



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第22卷 第12期(总第227期) 2024年12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

湖南省科学技术协会

主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民 中路 139 号中南
大学湘雅二医院内

出版: 《中南药 学》编辑部

发行: 湖南省报 刊发行局

印刷: 长沙建 华印务有限公司

订阅: 全国各地 邮局

定价: 每期 30.00 元, 全年 360.00 元

邮编: 410011

电话: (0731) 82258487/84895602

传真: (0731) 82258487

邮发代号: 42-290

投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

email: znyxzz2003@vip.163.com

广告经营许可 证: 4300004000764

中国标准连续 出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2024 年版权 归《中南药 学》

编辑部所有

研究论文

- (3127) Peptaibol 类多肽 Trichorzin F 对结直肠癌细胞 SW480 增殖、侵袭、凋亡和周期的影响 王晨蔚, 林霄, 高程海, 等
- (3133) 芦荟大黄素对 Cu^{2+} 存在下 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集及细胞毒性的影响 赵希彤, 陈杨, 杜保健, 等
- (3139) 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的二十五味大汤丸化学成分分析 严志宏, 许金娣, 索朗次仁, 等
- (3149) 槲皮素 -3'-O- 乙基衍生物的设计、合成与抗结肠癌活性研究 刘翠婷, 程卉
- (3156) 针对 *K-Ras* (*G12C*) 突变肿瘤的还原响应型纳米胶束的制备及评价 卢贵茹, 刘阳, 刘晶阳, 等
- (3162) 关苍术不同极性部位化学成分研究及其抗肿瘤活性研究 孙杰, 王静, 孙朝, 等
- (3169) 基于化学成分和代谢组学分析的传统去皮净制对何首乌肝毒性影响探讨 陈潘, 罗寒燕, 张伟豪, 等
- (3181) 基于电子鼻技术和 GC-MS 对不同产地乌药的鉴别和挥发油成分分析 王子燕, 王博诗, 王一帆, 等
- (3187) 基于分子对接和表面等离子共振分析五酯胶囊与 CYP3A4 的作用机制 叶倩倩, 蒋跃平, 葛成昱, 等
- (3193) 葛根中异黄酮类化学成分鉴定及其网络药理学研究 吴文娟, 吕伯龙
- (3200) 基于网络药理学和分子对接探讨苦杏仁苷治疗胃癌的作用机制及实验验证 彭琳, 廖彬, 龙慧玲
- (3206) 紫丁香叶化学成分研究 冯小涛, 孙延平, 黎冠兰, 等
- (3215) 木犀草素药-药共晶的制备、性质及生物利用度研究 李静萍, 陈新科, 蒋才武, 等
- (3221) 基于仿生技术和反向传播神经网络的黄芪产地判别模型构建研究 陈万金, 李虹, 张沛沛, 等

《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

- (3229) 基于分子对接与分子动力学模拟的 NorA 抑制剂虚拟筛选
..... 石欢, 王宇红, 孟盼, 等
- (3235) 两种 10- 羟基喜树碱碳酸酯的合成及其抗结肠癌活性研究
..... 王维, 陈家美, 贺欢欢, 等
- (3240) 参紫灵胶囊对二氧化硅诱导的大鼠肺纤维化的改善作用及其
作用机制研究 邹敏, 王风华, 胡雄飞, 等
- (3245) 鳖甲软脉汤改善慢性脑缺血小鼠学习和记忆障碍的作用研究
..... 郭羽晨, 邓珊珊, 高原, 等
- (3253) UPLC-MS/MS 测定人血浆中阿莫西林浓度及其在生物等效性
研究中的应用 唐维英, 朱恒怡, 李莎, 等
- (3259) 天蒲清脑颗粒制剂工艺及质量标准研究
..... 冯李乐, 罗晓曼, 栾飞, 等

血液肿瘤精准治疗专题

- (3264) 急性髓系白血病异基因造血干细胞移植后复发的治疗进展
..... 戴纬, 金梦迪, 郭智
- (3272) 中性粒细胞 / 淋巴细胞比值与免疫检查点抑制剂治疗淋巴瘤患者
预后的相关性分析 侯莉娜, 郭智, 任骅, 等
- (3280) 布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂治疗老年 / 体弱原发性中枢神经系统
淋巴瘤患者的临床疗效和安全性分析
..... 徐佳欢, 张倩, 冯佳, 等

综述

- (3286) 沉默信息调节因子 3 介导的线粒体功能在心肌损伤中的作用
及中药干预研究进展 梁雨娟, 成翠翠, 李星, 等
- (3295) 天然法尼醇 X 受体激动剂对腹泻型肠易激综合征的治疗潜力
..... 孙聪颖, 钟鑫勤, 赵玉翠, 等
- (3304) 植物类天然产物改善对乙酰氨基酚致肝损伤作用机制的研究
进展 王有根, 杨志慧, 杨秀鸿, 等
- (3311) 天然产物抗心肌缺血 / 再灌注损伤分子机制的研究进展
..... 唐灿, 罗秀菊, 彭军
- (3318) 药食同源中药防治中枢神经系统疾病的研究进展
..... 王晨莉, 窦金金, 侯惠玲, 等
- (3328) 单萜类化合物抗抑郁作用及其机制的研究进展
..... 胡红军, 张岩, 蒋翔锐
- (3336) 骨改良药物在肺癌骨转移中的研究进展
..... 王凯, 王娜, 姜金, 等

青年编委 (按姓氏笔画排列)

丁 骁 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。

药物分析与检验

- (3340) 十一味草果丸气相色谱指纹图谱及多成分含量测定研究
..... 王佩, 苏玫匀, 殷燕, 等
- (3345) 基于 UPLC-MS/MS 技术的更年宁水蜜丸中藏柴胡掺伪方法的研究
..... 蒋芦荻, 杨琰, 刘亚楠, 等
- (3351) 一测多评法同时测定柴胡牡蛎颗粒中 6 种成分的含量
..... 秦柳柳, 林佳明, 林利城, 等
- (3356) HPLC 法测定藏药细果角茴香中原阿片碱含量及其与海拔等影响因素的相关性分析
..... 吴雪花, 松长青, 金秉巾, 等
- (3361) 清肺抑火片质量标准提升研究
..... 范秀春, 徐维二, 罗廷顺, 等
- (3368) 阿那日五味散 HPLC 指纹图谱和多指标含量测定的研究
..... 张玉婷, 何春龙, 莎日娜, 等
- (3373) 高效液相色谱法检查醋酸阿托西班注射液中的 6 个杂质
..... 孙秋艳, 胡佳慧, 袁海成, 等
- (3378) 软袋产品包装密封性阳性样品的制作方法研究
..... 蒋芙蓉, 汤平, 邹松, 等

医院药学

- (3382) 阿美替尼对比奥希替尼二线治疗 EGFR T790M 阳性的晚期非小细胞肺癌的成本-效用分析
..... 任挺, 王琳宁, 常峰, 等
- (3388) 带量采购对某院口服降糖药原研药和仿制药使用的影响及思考
..... 张慧明, 戴立波

药事管理

- (3394) 2023 年 STOPP/START 标准解读
..... 刘子祺, 张帆, 李成敏, 等
- (3403) 基于 Kano-QFD 模型的 PIVAS 药学服务需求分析与服务模式构建
..... 凌亚, 朱玲, 豆兴茹, 等
- (3409) 国外药品监管信息电子提交体系分析
..... 孙哲丰
- (3413) 基于低代码开发平台构建药品盘点程序的实践与效果分析
..... 田京辉, 张慧丽, 陈静静, 等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*290*zh*P*30.0*44*2024-12

本期责任编辑: 邬志娟, 彭金飞, 李科, 陆窈窈

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 12 December 20 2024

Consultant

ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief

LI Huan-de

Chief of Editorial Office

ZHANG Bi-kui

Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

Directed by

Food and Drug Administration of
Hunan Province

Edited by

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

Tel

(0731) 82258487/84895602

Fax

(0731) 82258487

Website of Authors

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

Email

znyxzz2003@vip.163.com

Advertisement Publishing Certification

4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

- (3127) Effect of Peptaibol peptide Trichorzin F on the proliferation, invasion, apoptosis and cycle of colorectal cancer cell SW480
..... WANG Chen-wei, LIN Xiao, GAO Cheng-hai, et al
- (3133) Effect of aloe emodin on the aggregation and cytotoxicity of $A\beta_{42}$ in the presence of Cu^{2+}
..... ZHAO Xi-tong, CHEN Yang, DU Bao-jian, et al
- (3139) Chemical composition analysis of Twenty-five Flavor Soup pills based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS
..... YAN Zhi-hong, XU Jin-di, Suo-lang-ci-ren, et al
- (3149) Design, synthesis, and anti-colon cancer activity of quercetin-3'-O-ethyl derivatives LIU Cui-ting, CHENG Hui
- (3156) Preparation and evaluation of reduction-responsive nanomicelles for *K-Ras (G12C)* mutant tumors
..... LU Gui-ru, LIU Yang, LIU Jing-yang, et al
- (3162) Chemical compositions of different polar parts of *Atractylodes japonica* and its antitumor activity
..... SUN Jie, WANG Jing, SUN Zhao, et al
- (3169) Effect of traditional peeling on the hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum* Thunb. based on chemical composition analysis and metabolomics
..... CHEN Pan, LUO Han-yan, ZHANG Wei-hao, et al
- (3181) Identification of volatile oil composition of Wuyao from different origins based on electronic nose technology and GC-MS
..... WANG Zi-yan, WANG Bo-shi, WANG Yi-fan, et al
- (3187) Mechanism of interaction between Wuzhi capsules and CYP3A4 based on molecular docking and surface plasmon resonance
..... YE Qian-qian, JIANG Yue-ping, GE Cheng-yu, et al
- (3193) Identification of isoflavone chemical constituents in *Puerariae lobatae* radix and related network pharmacology
..... WU Wen-juan, LYU Bo-long
- (3200) Mechanism of amygdalin for gastric cancer based on network pharmacology and molecular docking
..... PENG Lin, LIAO Bin, LONG Hui-ling
- (3206) Chemical constituents of *Syringa oblata* leaves
..... FENG Xiao-tao, SUN Yan-ping, LI Guan-lan, et al

Postal code

42-290

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

¥ 30.00 an issue

¥ 360.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2024 by the
Central South Pharmacy**

All articles published represent the
opinions of the authors, do not reflect
the official policy of the Editorial
Board, unless this is clearly specified.

- (3215) Preparation, properties and bioavailability of drug-drug cocrystal of luteolin
..... *LI Jing-ping, CHEN Xin-ke, JIANG Cai-wu, et al*
- (3221) Identification of origin place for Astragali Radix based on biomimetics
..... *CHEN Wan-jin, LI Hong, ZHANG Pei-pei, et al*
- (3229) Virtual screening of NorA inhibitors based on molecular docking and
molecular dynamics simulation
..... *SHI Huan, WANG Yu-hong, MENG Pan, et al*
- (3235) Synthesis and anti-colon cancer activity of 10-hydroxycamptothecin car-
bonates *WANG Wei, CHEN Jia-mei, HE Huan-huan, et al*
- (3240) Effect and mechanism of Shenziling capsules on silica-induced pulmonary
fibrosis in rats *ZOU Min, WANG Feng-hua, HU Xiong-fei, et al*
- (3245) Effect of Biejia Ruanmai decoction on learning and memory impairment
in mice with chronic cerebral hypoperfusion
..... *GUO Yu-chen, DENG Shan-shan, GAO Yuan, et al*
- (3253) Determination of amoxicillin concentration in human plasma by UPLC-MS/
MS and its application in bioequivalence study
..... *TANG Wei-ying, ZHU Heng-yi, LI Sha, et al*
- (3259) Preparation and quality standard of Tianpu Qingnao granules
..... *FENG Li-le, LUO Xiao-man, LUAN Fei, et al*
- (3265) Progress in the treatment of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic
hematopoietic stem cell transplantation
..... *DAI Wei, JIN Meng-di, GUO Zhi*
- (3272) Correlation between neutrophil-to-lymphocyte ratio and prognosis of patients
with lymphoma treated with immune checkpoint inhibitors
..... *HOU Li-na, GUO Zhi, REN Hua, et al*
- (3280) Efficacy and safety of Bruton's tyrosine kinase inhibitors for the elderly
or infirm patients with primary central nervous system lymphoma
..... *XU Jia-huan, ZHANG Qian, FENG Jia, et al*
- (3286) Research progress on the role of mitochondrial function mediated by silent
information regulator 3 in myocardial injury and traditional Chinese med-
icine intervention ... *LIANG Yu-juan, CHENG Cui-cui, LI Xing, et al*
- (3295) Therapeutic potential of natural Farnesoid X receptor agonists for irrita-
ble bowel syndrome with diarrhea
..... *SUN Cong-ying, ZHONG Xin-qin, ZHAO Yu-cui, et al*
- (3304) Research progress in the mechanism of plant-derived natural products in
ameliorating acetaminophen-induced liver injury
..... *WANG You-gen, YANG Zhi-hui, YANG Xiu-hong, et al*
- (3311) Research progress in the molecular mechanism of natural products against
myocardial ischemia/reperfusion injury
..... *TANG Can, LUO Xiu-ju, PENG Jun*
- (3318) Research progress in the prevention and treatment of central nervous system
diseases by medicinal and edible homologous herbs
..... *WANG Chen-li, DOU Jin-jin, HOU Hui-ling, et al*

- (3328) Research progress in the antidepressant effects and mechanisms of monoterpenoids..... *HU Hong-jun, ZHANG Yan, JIANG Xiang-ru*
- (3336) Role of bone-modifying agents in the treatment of bone metastasis in lung cancer *WANG Kai, WANG Na, JIANG Jin, et al*
- (3340) GC fingerprints and content determination of multi-components of in Shiyiwei Caoguo pills *WANG Pei, SU Mei-yun, YIN Yan, et al*
- (3346) Adulteration of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in Gengnianning water-honeyed pill by UPLC-MS/MS
..... *JIANG Lu-di, YANG Yan, LIU Ya-nan, et al*
- (3351) Simultaneous determination of 6 components in Chaihu Muli granules by QAMS *QIN Liu-liu, LIN Jia-ming, LIN Li-cheng, et al*
- (3356) HPLC determination of the content of protopine in Xizang medicine *Hypecoum leptocarpum* and its influence factors at different altitudes
..... *WU Xue-hua, SONG Chang-qing, JIN Bing-jin, et al*
- (3361) Improvement of the quality standard of Qingfei Yihuo tablets
..... *FAN Xiu-chun, XU Wei-er, LUO Ting-shun, et al*
- (3368) HPLC fingerprint and multi-index content determination of Anari Wuwei power *ZHANG Yu-ting, HE Chun-long, SHA Ri-na, et al*
- (3373) Detection of 6 impurities in atosiban acetate injection by HPLC
..... *SUN Qiu-yan, HU Jia-hui, YUAN Hai-cheng, et al*
- (3378) Positive samples of package sealing integrity for soft bag products
..... *JIANG Fu-rong, TANG Ping, ZOU Song, et al*
- (3382) Cost-effectiveness of aumolertinib versus osimertinib as second-line regimen for EGFR T790M-positive patients with advanced non-small cell lung cancer
..... *REN Ting, WANG Lin-ning, CHANG Feng, et al*
- (3388) Impact of volume-based procurement on the use of original and generic oral hypoglycemic drugs in a hospital
..... *ZHANG Hui-ming, DAI Li-bo*
- (3394) Interpretation of the 2023 STOPP/START criteria
..... *LIU Zi-qi, ZHANG Fan, LI Cheng-min, et al*
- (3403) Demand analysis and service model construction of PIVAS pharmacy service based on Kano-QFD model
..... *LING Ya, ZHU Ling, DOU Xing-ru, et al*
- (3409) Analysis on the electronic submission system for drug administration information in foreign countries *SUN Zhe-feng*
- (3413) Practice and effect of establishing drug inventory program based on low-code development platform
..... *TIAN Jing-hui, ZHANG Hui-li, CHEN Jing-jing, et al*

研究论文

Peptaibol 类多肽 Trichorzin F 对结直肠癌细胞 SW480 增殖、侵袭、凋亡和周期的影响

王晨蔚^{1,2}, 林霄^{1,2}, 高程海^{1,2}, 易湘茜^{1,2*}, 唐振洲^{1,2*} (1. 广西中医药大学海洋药物研究院/药学院, 南宁 530200; 2. 广西海洋药物重点实验室, 南宁 530200)

摘要: **目的** 研究 Peptaibol 类多肽 Trichorzin F 对结直肠癌细胞 SW480 的抑制作用以及相关机制。**方法** 在体外培养 SW480 细胞, 使用 MTT 法检测 Trichorzin F 对 SW480 细胞的活力影响; 使用 Transwell 小室实验检测 Trichorzin F 对 SW480 细胞侵袭能力的影响; 采用 PI 染色和流式细胞术检测 Trichorzin F 作用下的 SW480 细胞周期分布和凋亡情况; 通过实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测细胞周期调控基因 *CCND1*、*CDK4* mRNA 的表达情况; 通过 Western blot 实验检测 Trichorzin F 对 SW480 细胞周期、凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 和 Cyclin D1 表达的影响, 并分析其对 Erk1/2 通路的影响。**结果** 与空白组相比, Trichorzin F 能够抑制 SW480 细胞活力和侵袭能力; PI 单染和流式细胞术结果表明 Trichorzin F 可呈时间和剂量依赖性地诱导 SW480 细胞发生凋亡, 并将细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期; RT-qPCR 结果显示 Trichorzin F 可下调 *CCND1*、*CDK4* mRNA 的表达情况; Western blot 结果显示 Trichorzin F 可上调 Bax 蛋白的表达, 下调 Cyclin D1、Bcl-2 蛋白的表达以及 Erk1/2 磷酸化水平。**结论** Trichorzin F 可抑制 SW480 细胞的活力和侵袭能力, 诱导细胞凋亡, 并阻滞细胞周期进程, 其作用机制可能与调控 Erk1/2 信号通路有关。

关键词: Trichorzin F; SW480 细胞; 结直肠癌; 凋亡; 细胞周期

中图分类号: R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)12-3127-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.001

Effect of Peptaibol peptide Trichorzin F on the proliferation, invasion, apoptosis and cycle of colorectal cancer cell SW480

WANG Chen-wei^{1,2}, LIN Xiao^{1,2}, GAO Cheng-hai^{1,2}, YI Xiang-xi^{1,2*}, TANG Zhen-zhou^{1,2*} (1. Institute of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Drugs, Nanning 530200)

Abstract: Objective To determine the inhibition effect of Peptaibol peptide Trichorzin F on colorectal cancer cell SW480 and related mechanism. **Methods** SW480 cells were cultured in vitro, and MTT assay was used to determine the effect of Trichorzin F on the cell viability. Transwell cell assay was used to detect the effect of SW480 cell invasion ability. Flow cytometry and PI staining were used to investigate the effect of Trichorzin F on the cell cycle distribution and apoptosis. RT-qPCR assay was performed to detect the expression of *CCND1*, and *CDK4* mRNA related to cell cycle regulation. Western blot was used to detect the protein expressions of Bax, Bcl-2 and Cyclin D1, and analyze their effect on Erk1/2 pathway. **Results** Compared with the blank control group, Trichorzin F inhibited SW480 cell viability and invasion ability. PI staining and flow cytometry showed that Trichorzin F induced the apoptosis of SW480 cells in a time and dose dependent manner, and blocked the cell cycle in the G₀/G₁ phase. RT-qPCR displayed that Trichorzin F down-regulated the expression

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82160669, No.53000108)。

作者简介: 王晨蔚, 女, 硕士研究生, 主要从事海洋天然产物药理活性方面的研究, email: 1253170733@qq.com ***通信作者:** 唐振洲, 男, 副研究员, 主要从事海洋天然产物药理活性方面的研究, email: tangzz@gxcmu.edu.cn; 易湘茜, 女, 教授, 主要从事中药民族药药效物质基础及健康产品开发, email: 42672960@qq.com

of *CCND1* and *CDK4* mRNA. Western blot showed that Trichorzin F up-regulated the expression of Bax protein, down-regulated the expression of CyclinD1, Bcl-2 protein and the phosphorylation level of Erk1/2. **Conclusion** Trichorzin F can inhibit the viability and invasion ability of SW480 cells, induce the cell apoptosis, and block the cell cycle process, the mechanism may be related to the regulation of Erk1/2 signaling pathway.

Key words: Trichorzin F; SW480 cell; colorectal cancer; cell apoptosis; cell cycle

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种常见的恶性肿瘤, 据 2022 年数据统计, 结直肠癌在我国癌症死亡率中位居第二^[1]。因结直肠癌早期发病隐匿, 多数患者无法有效治疗甚至出现转移, 而转移性结直肠癌患者中, 仅有 20% 的患者能存活超过 5 年^[2]。因此, 亟需寻找有效治疗结直肠癌的药物。

Peptaibol 类多肽是由木霉属真菌分离的一类富含 α -氨基丁酸的特殊抗菌肽^[3]。研究表明, Peptaibol 类多肽具有抗肿瘤、抗菌、抗疟原虫等多种药理活性^[4-6]。Trichorzin F 是从木霉属真菌 *Trichoderma* sp. GXIMD 01001 次级代谢产物中分离得到的一种 Peptaibol 类十八肽, 前期研究发现 Trichorzin F 对多种肿瘤细胞均具有抗增殖作用, 其中对结直肠癌 SW480 抑制活性更为显著^[7], 但相关的作用机制还不清晰, 本研究将基于体外细胞实验对 Trichorzin F 抗结直肠癌细胞 SW480 作用机制进行进一步深入的研究。

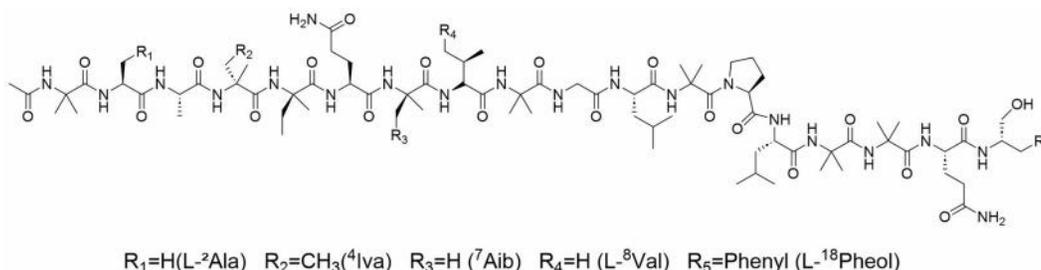


图 1 Trichorzin F 的化学结构

Fig 1 Chemical structure of Trichorzin F

1.3 仪器

VICTOR Nivo 多功能酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司); LSRFortessa 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司); Amersham Imager 680 超灵敏发光成像仪 (美国 GE 公司); 高通量实时荧光定量 PCR 系统 (瑞士 Roche 公司); DMi8 荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

用 L15 完全培养液 (含 10% 胎牛血清 + 1% 青霉素 - 链霉素混合液) 复苏 SW480 细胞, 置于 37℃、5%CO₂ 条件下的恒温培养箱中培养, 每 2 日换液 1 次, 待细胞贴壁生长到皿底的 70% ~ 80%, 用胰酶消化传代。

1 材料

1.1 细胞

人结直肠癌细胞株 SW480 细胞 (中科院上海细胞库)。

1.2 试剂

Trichorzin F (HPLC 纯度 ≥ 98%, 广西中医药大学海洋药物研究院实验室提取分离, 结构见图 1); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 噻唑蓝 (MTT)、青霉素 - 链霉素混合液、L15 培养基、结晶紫 (北京索莱宝科技有限公司); 碘化丙啶 (PI) 染料 (美国 MedChemExpress 公司); 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒 (北京四正柏生物科技有限公司); 逆转录试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); Bax、Bcl-2、Cyclin D1、p21 抗体 (美国 Proteintech Group 公司); Erk1/2、p-Erk1/2、GAPDH 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 超灵敏化学发光检测试剂盒 (上海雅酶生物医药科技有限公司)。

2.2 MTT 检测细胞活力^[8]

取对数生长期的 SW480 细胞, 按细胞浓度 2.5×10^5 个 \cdot mL⁻¹, 接种于 96 孔板中, 在 37℃、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h 后, 弃去旧培养液, 加入 0 (空白组)、0.3125、0.625、1.25、2.5、5 μ mol \cdot L⁻¹ 浓度的 Trichorzin F, 继续在恒温培养箱中培养。在培养 24、48、72 h 时, 每孔加入 10 μ L 的 5 mg \cdot mL⁻¹ 的 MTT 试剂, 避光孵育 4 h, 加入二甲基亚砷 (DMSO) 溶剂, 用酶标仪在 490 nm 波长处检测细胞吸光度 (OD 值)。

2.3 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力

将基质胶用无血清培养基按 1 : 7 稀释, 将稀释好的基质胶按 80 μ L/孔包被 Transwell 小室的上

室，在细胞培养箱中静置 2~4 h。吸弃上室多余的液体，取对数生长期的 SW480 细胞，将细胞悬液浓度调整为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ，加入 0 (空白组)、1.25、2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Trichorzin F，各取 200 μL 细胞悬液加入上室中，在下室加入 500 μL 完全培养基 (含 10% 胎牛血清)。培养 48 h 后，用棉签擦净小室上室，加入多聚甲醛固定 20~30 min，PBS 洗涤 2 次，用结晶紫染料染色 15 min。实验重复 3 次。在显微镜下观察拍照，用 Image J 软件进行穿过小室的细胞数量计数。

2.4 PI 染色

取对数期生长的 SW480 细胞，按细胞浓度 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ，接种于 24 孔板中，待细胞贴壁后，各孔都加入 0 (空白组)、2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Trichorzin F，分别在 0、6、12、24 h 时，PBS 洗涤 2 次，在不同的孔内加入 200 μL PI 染料，避光染色 15 min 后，置于倒置荧光显微镜下，选用大于 536 nm 的激发光，进行观察拍照。

2.5 流式细胞术检测细胞周期和凋亡^[9]

取对数生长期的 SW480 细胞，按细胞浓度 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ，接种于 6 孔板中，待细胞贴壁后，加入 0 (空白组)、1.25、2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 Trichorzin F，恒温培养 24 h 后，PBS 洗涤 2 次，用不含 EDTA 的胰酶消化，消化的细胞使用 PBS 洗涤 2 次，使用 PI 和 FITC 染料进行双染，采用 BD 流式细胞仪进行细胞凋亡的测定。收集细胞后，加入预冷的 75% 乙醇，在 4℃ 固定 24 h，使用 PI 染料进行单染，采用 BD 流式细胞仪进行细胞周期的测定。实验结果采用 ModFit LT 5.0 进行数据分析。

2.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测 mRNA 的表达

取对数生长期的 SW480 细胞，按细胞浓度 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ，接种于 6 孔板中，待细胞贴壁后，加入 0 (空白组)、1.25、2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Trichorzin F。恒温培养 24 h 后，用 TRIZOL 法提取 RNA，按照逆转录试剂盒方法，将 RNA 反转录成 cDNA，引物序列见表 1，以 GAPDH 为内参测定 CCND1、CDK4 mRNA 表达水平，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

表 1 GAPDH、CCND1、CDK4 的引物序列

Tab 1 Primers sequence of GAPDH, CCND1 and CDK4

基因	引物序列
GAPDH	Forward: 5'-CCCTGCAAATGAGCCCA-3'
	Reverse: 5'-GATGCCCCATGTTCTGTCAT-3'
CCND1	Forward: 5'-GATGCCAACCTCCTCAACGA-3'
	Reverse: 5'-ACTTCTGTTCTCGCAGACC-3'
CDK4	Forward: 5'-GTGTATGGGGCCGTAGGAAC-3'
	Reverse: 5'-CCATAGGCACCGACACCAAT-3'

2.7 Western blot 检测相关蛋白的表达^[10]

取对数生长期的 SW480 细胞，按细胞浓度 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ，接种于 6 孔板中，待细胞贴壁后，加入不同浓度的 Trichorzin F。恒温培养 24 h 后，用 PBS 洗一次，在冰上加入细胞裂解液，提取细胞蛋白，用 BCA 法进行蛋白定量，用 SDS-PAGE 进行蛋白分离，再转印至 PVDF 膜上，5% 的脱脂牛奶封闭后，在 4℃ 条件下一抗孵育过夜，用 TBST 洗脱抗体后，在室温下二抗孵育 2 h，在发光成像仪下显影，使用 Image J 进行数据处理。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对各组实验数据进行统计学分析。数据用均数 \pm 标准差表示，组间用单因素方差分析 (ANOVA) 方法， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Trichorzin F 对 SW480 细胞活力的影响

Trichorzin F 分别作用 SW480 细胞 24、48、72 h 后，随着药物浓度的增加，细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。同一浓度下，随着 Trichorzin F 作用时间增加，细胞活力降低，表明 Trichorzin F 显著抑制 SW480 细胞的活性，且呈剂量和时间依赖性 (见图 2)。

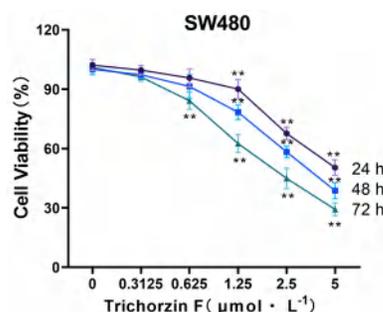


图 2 Trichorzin F 对 SW480 细胞活力的影响

Fig 2 Effect of Trichorzin F on SW480 cell viability

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ 。

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

3.2 Trichorzin F 对 SW480 细胞侵袭能力的影响

与空白组相比，经过 Trichorzin F 给药处理后，穿过基底膜的侵袭细胞数均显著减少 ($P < 0.01$)，且呈浓度依赖性，说明 Trichorzin F 能随着浓度的增加而显著抑制 SW480 细胞的侵袭能力 (见图 3)。

3.3 Trichorzin F 诱导 SW480 细胞凋亡

PI 染料可穿透凋亡细胞的细胞膜，与细胞核结合并发出红色荧光，如图 4 所示，在倒置显微镜下观察 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Trichorzin F 刺激 SW480 细胞不同时间 (6、12、24 h) 的细胞染色情况，结果发现，与对照组相比，随着 Trichorzin F 作用于 SW480 细胞的时间增加，代表细胞凋亡

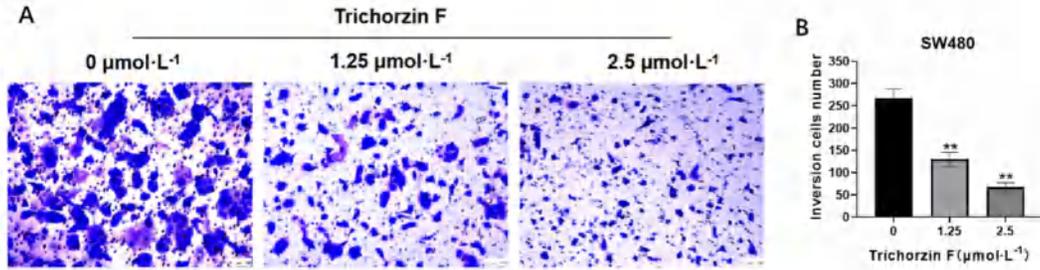


图3 Trichorzin F 对 SW480 细胞侵袭能力的影响 (×10)
 Fig 3 Effect of Trichorzin F on invasion ability of SW480 cells (×10)
 注: 与空白组比较, ***P* < 0.01.
 Note: Compared with the blank group, ***P* < 0.01.

的红色荧光光斑有增加趋势, 初步表明 Trichorzin F 可呈时间依赖性地诱导 SW480 细胞凋亡。

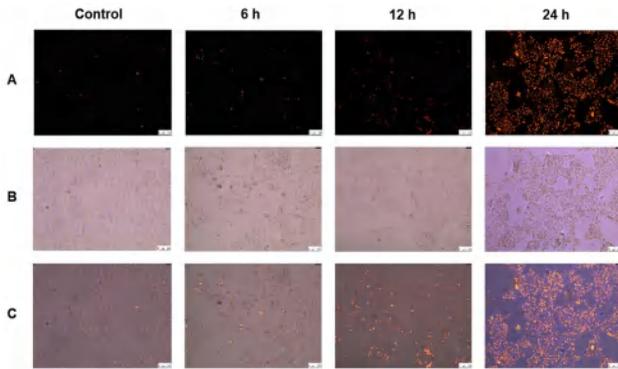


图4 不同时间下的 PI 荧光图 (A)、白光图 (B)、PI 荧光和白光合并图 (C)(×10)
 Fig 4 PI fluorescence image (A), white light image (B), and PI fluorescence spot and white light combined image (C) at different times (×10)

流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测结果显示, Trichorzin F 刺激 SW480 细胞 24 h 后, 1.25 和 2.5 μmol·L⁻¹ 的 Trichorzin F 引起细胞膜内磷脂酰丝氨酸蛋白外翻染色阳性的早期凋亡细胞占比分别为 (1.56±0.62)%、(12.67±1.65)%, 而细胞核碘化丙啶染色阴性的晚期凋亡细胞占比分别为 (7.84±1.35)%、(42.53±3.68)% (见图 5), 说明 Trichorzin F 可呈剂量依赖性地诱导 SW480 细胞凋亡, 并主要发生晚期凋亡。

为进一步验证 Trichorzin F 对 SW480 细胞凋亡的诱导作用, 本实验通过 Western blot 分析凋亡的关键蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达情况, 结果显示, Trichorzin F 刺激 SW480 细胞 24 h 后, 随着 Trichorzin F 浓度的增加, Bax 蛋白的表达升高, Bcl-2 蛋白的表达降低, 说明 Trichorzin F 诱导 SW480 凋亡可能与调控 Bax、Bcl-2 蛋白的表达水平有关 (见图 6)。

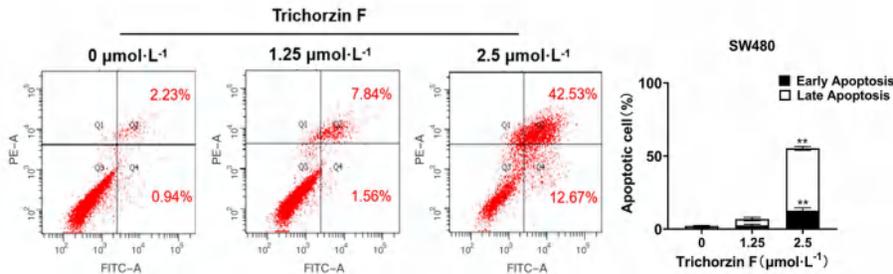


图5 Trichorzin F 对 SW480 细胞凋亡的影响
 Fig 5 Effect of Trichorzin F on apoptosis of SW480 cells
 注: 与空白组比较, ***P* < 0.01.
 Note: Compared with the blank group, ***P* < 0.01.

3.4 Trichorzin F 阻滞 SW480 细胞周期

Trichorzin F 刺激 SW480 细胞 24 h 后, 流式细胞术检测结果发现, 随着 Trichorzin F 浓度的增加, 2.5 μmol·L⁻¹ 时 G₀/G₁ 期的细胞数量显著增加 (*P* < 0.01), S 期和 G₂/M 期的细胞数量有所降低, 表明 Trichorzin F 作用 SW480 细胞后, 可将细胞阻滞在 G₀/G₁ 期 (见图 7)。

如图 8 所示, 随着 Trichorzin F 浓度的增加, 2.5 μmol·L⁻¹ 时 SW480 细胞中 *CCND1*、*CDK4* mRNA

的表达下调 (*P* < 0.01), 提示 Trichorzin F 阻滞细胞周期进程可能通过下调 *CCND1*、*CDK4* mRNA 的表达有关。

Western blot 实验结果也表明, Trichorzin F 可显著抑制 SW480 细胞中周期蛋白 Cyclin D1 的表达水平 (*P* < 0.01)。本实验结果表明 Trichorzin F 可能通过影响周期调控相关基因和蛋白 Cyclin D1 的表达, 进而阻滞 SW480 细胞的周期进程 (见图 9)。

3.5 Trichorzin F 抑制 Erk1/2 信号通路

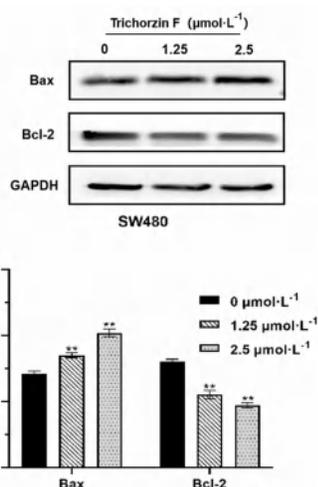


图 6 Trichorzin F 对 SW480 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白的表达的影响
Fig 6 Effect of Trichorzin F on the expression of Bax and Bcl-2 proteins in SW480 cells

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ 。

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

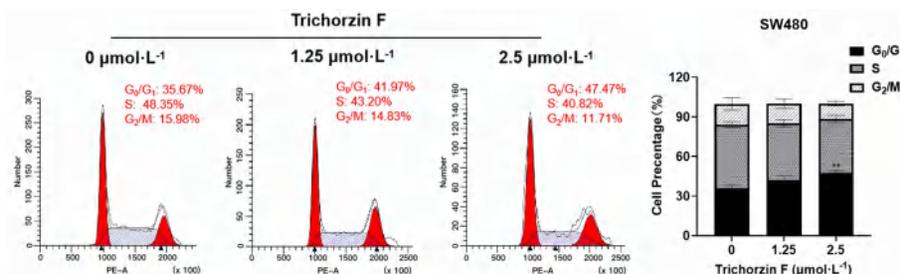


图 7 Trichorzin F 对 SW480 细胞周期的影响
Fig 7 Effect of Trichorzin F on the cell cycle of SW480

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ 。

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

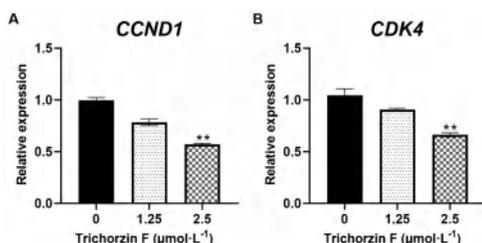


图 8 Trichorzin F 对 SW480 细胞 *CCND1* (A)、*CDK4* (B) mRNA 表达的影响
Fig 8 Effect of Trichorzin F on the expression of *CCND1* (A) and *CDK4* (B) mRNA in SW480 cells

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ 。

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

细胞凋亡是导致肿瘤细胞死亡的重要途径之一，也是许多抗肿瘤药物抑癌的主要作用机制。PI 染色和流式细胞术结果表明，Trichorzin F 呈时间和剂量依赖性地诱导细胞凋亡。Bax 和 Bcl-2 是 Bcl-2 蛋白家族中的经典凋亡蛋白，分别发挥促凋亡和抗凋亡作用，属于相互拮抗的关系^[12]。Western blot 分析发现，Trichorzin F 可下调抗凋亡

Erk1/2 是 MAPK 信号通路中的重要成员之一，Erk1/2 相关信号通路可参与细胞凋亡、侵袭和癌变等多种细胞生命活动^[11]。因此采用 Western blot 检测 Erk1/2 信号通路相关蛋白的表达，结果如图 10 所示，在 1.25 和 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Trichorzin F 刺激 SW480 细胞后，Erk1/2 磷酸化水平明显下调 ($P < 0.01$)，Erk1/2 总蛋白的表达变化并不明显，提示 Trichorzin F 可能通过下调 Erk1/2 信号通路，并诱导其凋亡。

4 讨论

本研究初步揭示了 Peptaibol 类多肽 Trichorzin F 抑制结直肠癌 SW480 细胞的作用及其机制，发现 Trichorzin F 可抑制 SW480 细胞的活力和侵袭能力，呈时间和剂量依赖性地诱导 SW480 细胞发生凋亡，并将细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。推测 Trichorzin F 抑制 SW480 细胞作用可能与下调 Erk1/2 信号通路有关。

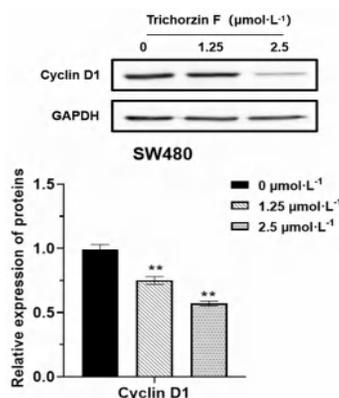


图 9 Trichorzin F 对 SW480 细胞 CyclinD1 蛋白的表达的影响
Fig 9 Effect of Trichorzin F on the expression of CyclinD1 proteins in SW480 cells

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ 。

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

蛋白 Bcl-2 的表达，而上调促凋亡蛋白 Bax 的表达，提示 Trichorzin F 可能通过调控 Bax 和 Bcl-2 两种凋亡蛋白的表达促进 SW480 细胞的凋亡。

细胞周期是一个连续的进程，其中运行的每

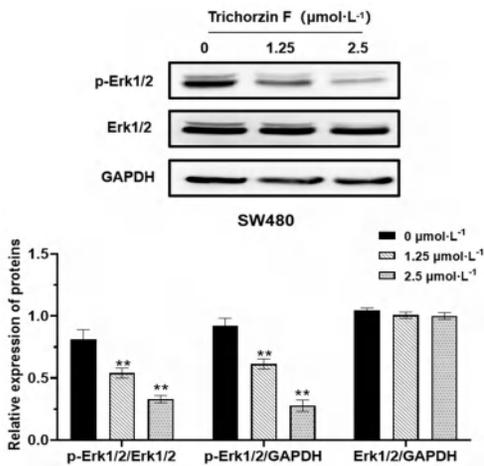


图 10 Trichorzin F 对 SW480 细胞 Erk1/2 信号通路的影响
Fig 10 Effect of Trichorzin F on Erk1/2 signaling pathway in SW480 cells

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ 。

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

一步都受到 Cyclin/CDK/CKI 轴的严格调控，故这些细胞周期相关调控因子是许多抗肿瘤药物研究的热门作用靶点。CDK4 为细胞周期的正调控因子，在 G₁ 期激活，引发底物磷酸化，进而催化后续进程^[13]。实验结果表明 Trichorzin F 可下调 CDK4 的表达，推测 Trichorzin F 阻滞 SW480 细胞于 G₀/G₁ 期与 CDK4 密切相关。Cyclin D1 主要参与调控细胞 G₁ 期过渡到 S 期的周期进程，高表达的 Cyclin D1 可促进细胞周期 G₁ 期向 S 期的快速过渡，并在多种肿瘤中均发现 Cyclin D1 过表达而导致细胞增殖失控^[14]。RT-qPCR 和 Western blot 实验结果均表明 Trichorzin F 可下调 Cyclin D1 的表达，提示 Trichorzin F 可能通过调控 Cyclin D1 的表达阻滞细胞周期进程，进而发挥抗增殖、促凋亡作用。

Erk1/2 通路是真核生物细胞内重要的信号传递途径之一，细胞外部信号通过跨膜受体进入细胞，经由 RAF-MEK-Erk 途径进行信号输送，其中 Erk1/2 是 MEK 专一靶点，激活后的 Erk 从细胞质转移至细胞膜，对蛋白激酶、信号传递因子、细胞骨架蛋白以及核内转录调控蛋白等多个底物进行磷酸化，进而调控细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和侵袭等多种细胞进程^[15-17]。本研究发现 Trichorzin F 可抑制 Erk1/2 的磷酸化程度，基于此，可推测 Trichorzin F 抑制结直肠癌 SW480 细胞的作用机制可能与调控 Erk1/2 信号通路有关。

综上，Trichorzin F 具有抗结直肠癌 SW480 细胞作用，推测可能与调控 Erk1/2 信号通路有关。

参考文献

- [1] 郑荣寿, 陈茹, 韩冰峰, 等. 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46 (3): 221-231.
- [2] Biller LH, Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review [J]. JAMA, 2021, 325 (7): 669-685.
- [3] Degenkolb T, Kirschbaum J, Brückner H. New sequences, constituents, and producers of peptaibiotics: an updated review [J]. Chem Biodivers, 2007, 4 (6): 1052-1067.
- [4] Du L, Risinger AL, Mitchell CA, et al. Unique amalgamation of primary and secondary structural elements transform peptaibols into potent bioactive cell-penetrating peptides [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114 (43): E8957-E8966.
- [5] Lee JW, Collins JE, Wendt KL, et al. Leveraging Trichorzin F biosynthetic promiscuity for next-generation antiplasmodial therapeutics [J]. J Nat Prod, 2021, 84 (2): 503-517.
- [6] Dalla Torre C, Sannio F, Battistella M, et al. Trichorzin F analogs show potent antibacterial activity against multidrug resistant opportunistic pathogens [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (9): 7997.
- [7] Lin X, Tang ZZ, Gan YM, et al. 18-Residue peptaibols produced by the sponge-derived *Trichoderma* sp. GXIMD 01001 [J]. J Nat Prod, 2023, 86 (4): 994-1002.
- [8] 罗梦花, 陈佩文, 陈志红, 等. 半边旗二萜化合物 5F 对人结直肠癌细胞增殖, 凋亡和自噬的影响 [J]. 中南药学, 2023, 21 (2): 407-413.
- [9] 李博, 雷琨, 刘家邑, 等. 金星散水提液诱导 ECA-109 细胞凋亡和氧化应激的作用及机制研究 [J]. 中南药学, 2024, 22 (1): 100106.
- [10] 易佩佩, 赵英琦, 丁吉雪, 等. 染料木黄酮对乳腺癌细胞增殖, 凋亡, 迁移和侵袭的影响 [J]. 中南药学, 2021, 19 (3): 460-465.
- [11] 严宁, 杨春霞, 马娟, 等. β -谷甾醇对大鼠心肌缺血再灌注损伤和 ERK1/2 信号通路的影响 [J]. 心血管病学进展, 2020, 41 (3): 321-325.
- [12] Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours [J]. Nature, 2005, 435 (7042): 677-681.
- [13] Bury M, Le Calvé B, Ferbeyre G, et al. New insights into CDK regulators: novel opportunities for cancer therapy [J]. Trends Cell Biol, 2021, 31 (5): 331-344.
- [14] Koseoglu RD, Sezer E, Eyibilen A, et al. Expressions of p53, cyclinD1 and histopathological features in basal cell carcinomas [J]. J Cutan Pathol, 2009, 36 (9): 958-965.
- [15] Roskoski RJ. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation [J]. Pharmacol Res, 2012, 66 (2): 105-143.
- [16] Wen XM, Jiao LD, Tan H. MAPK/ERK pathway as a central regulator in vertebrate organ regeneration [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (3): 1464.
- [17] Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21 (10): 607-632.

(收稿日期: 2024-05-06; 修回日期: 2024-06-14)

芦荟大黄素对 Cu^{2+} 存在下 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集及细胞毒性的影响

赵希彤, 陈杨, 杜保健, 范文倩, 王楚茵, 尹佳宁, 方芳*, 关君* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 研究芦荟大黄素 (AE) 在体外对 Cu^{2+} 存在下 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集及细胞毒性的抑制作用。**方法** 实验设置 $\text{A}\beta_{42}$ 组、($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+}$) 组、($\text{A}\beta_{42} + \text{AE}$) 组、($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+} + \text{AE}$) 组, 应用硫黄素 T 荧光实验、浊度法、透射电镜及 CCK8 细胞毒性实验分别探究各组 $\text{A}\beta_{42}$ 的纤维化聚集过程、总聚集程度、聚集体形貌及细胞毒性。**结果** 与空白组相比, Cu^{2+} 可增强 $\text{A}\beta_{42}$ 的总聚集程度, 诱导 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集形成低 β -折叠结构的无规则聚集体, 显著降低人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的活力。AE 不仅能抑制 $\text{A}\beta_{42}$ 自发聚集, 而且能抑制 Cu^{2+} 诱导的 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集。与 ($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+}$) 组相比, AE 能降低 $\text{A}\beta_{42}$ 的总聚集程度, 诱导 $\text{A}\beta_{42}$ 形成低 β -折叠结构的近圆形或短粗棒状聚集体, 并提高细胞活力。**结论** AE 可抑制 Cu^{2+} 存在下 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集及细胞毒性。**关键词:** 阿尔茨海默病; $\text{A}\beta_{42}$; 芦荟大黄素; 铜; 细胞毒性

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3133-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.002

Effect of aloe emodin on the aggregation and cytotoxicity of $\text{A}\beta_{42}$ in the presence of Cu^{2+}

ZHAO Xi-tong, CHEN Yang, DU Bao-jian, FAN Wen-qian, WANG Chu-yin, YIN Jia-ning, FANG Fang*, GUAN Jun* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the inhibitory effect of aloe emodin (AE) on the aggregation and cytotoxicity of $\text{A}\beta_{42}$ in the presence of Cu^{2+} in vitro. **Methods** An $\text{A}\beta_{42}$ group, a ($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+}$) group, a ($\text{A}\beta_{42} + \text{AE}$) group, and a ($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+} + \text{AE}$) group were set up in the experiment. The fibrotic aggregation process, total aggregation degree, aggregates morphology and cytotoxicity of $\text{A}\beta_{42}$ in each group were studied by thioflavin T fluorescence test, turbidity test, transmission electron microscopy test, and CCK8 cytotoxicity test. **Results** Compared with the blank group, Cu^{2+} enhanced the total degree of $\text{A}\beta_{42}$ aggregation, induced the $\text{A}\beta_{42}$ aggregation to form irregular aggregates with low β -sheet structure, and greatly reduced the viability of human neuroblastoma cells SH-SY5Y. AE inhibited not only auto aggregation of $\text{A}\beta_{42}$, but also Cu^{2+} -induced aggregation of $\text{A}\beta_{42}$. Compared with the ($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+}$) group, AE reduced the total aggregation degree of $\text{A}\beta_{42}$, induced $\text{A}\beta_{42}$ to form near-round or short rod-like aggregates with low β -sheet structure, and increased the cell viability. **Conclusion** AE can inhibit $\text{A}\beta_{42}$ aggregation and cytotoxicity in the presence of Cu^{2+} .

Key words: Alzheimer's disease; $\text{A}\beta_{42}$; aloe emodin; copper; cytotoxicity

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿、进行性发展的神经退行性疾病, 临床主要表现为学习记忆能力下降、情感语言障

碍、自理能力丧失等。截至 2020 年, 我国 60 岁及以上人群中的 AD 患者约为 983 万人^[1], 预计到 2050 年, 患病人数将攀升至 3003 万^[2], 这将

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 82074001); 国家中医药管理局“十四五”高水平中医药重点学科 (No. zyyzdxk-2023265)。
作者简介: 赵希彤, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药物质基础研究, email: 20210935072@bucm.edu.cn *通信作者: 关君, 女, 教授, 主要从事矿物药及金属有机药物的药效物质及作用机制研究, email: timeguan@bucm.edu.cn; 方芳, 女, 副教授, 主要从事中药神经药理研究, email: fangfl166@126.com

给经济和社会发展带来沉重负担。

AD 的发病机制复杂,存在多种假说。其中, β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $A\beta$)级联假说一直被认为是 AD 发病机制的一种主流假说。该假说认为异常聚集的 $A\beta$ 可作为始发因子,触发 Tau 蛋白磷酸化、氧化应激、炎症反应等一系列级联反应,最终导致 AD^[3-6]。 $A\beta$ 是由淀粉样前体蛋白经 β -分泌酶、 γ -分泌酶剪切形成的含有 39 ~ 43 个氨基酸的多肽,其中以 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 最为常见^[7]。虽然大脑中 $A\beta_{40}$ 的含量远高于 $A\beta_{42}$,但是 $A\beta_{42}$ 的聚集能力及细胞毒性更强,所以本研究以 $A\beta_{42}$ 为研究对象。 $A\beta_{42}$ 的聚集过程复杂, $A\beta_{42}$ 的自发聚集过程包括成核期、延伸期、稳定期三个阶段,最终形成富含 β -折叠结构的纤维状聚集体^[8]。而且 $A\beta_{42}$ 的聚集过程易受 Cu^{2+} 等金属离子的影响,在 Cu^{2+} 存在下, $A\beta_{42}$ 的聚集途径将被改变,主要通过非纤维聚集途径形成无定形聚集体^[9]。

Cu^{2+} 与 $A\beta_{42}$ 亲和能力较强,解离常数 K_d 值为 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,结合位点主要为 $A\beta_{42}$ 上的 6、13、14 位组氨酸^[10]。Alghamdi 等^[11]利用时间分辨荧光技术证实, Cu^{2+} 可与 $A\beta$ 形成 Cu- $A\beta$ 复合物,该复合物又能加速 $A\beta$ 的聚集。 Cu^{2+} 和 $A\beta$ 结合后被还原成 Cu^+ ,进而通过 Fenton 反应和 Haber-Weiss 反应产生大量高毒性的自由基,引起脂质、蛋白质过氧化和 DNA、RNA 损伤,进而影响神经元的功能^[12]。因此,应用 Cu^{2+} 螯合剂阻断 Cu^{2+} 与 $A\beta_{42}$ 的相互作用,抑制 Cu^{2+} 诱导的 $A\beta_{42}$ 聚集和细胞毒性是治疗 AD 的一条重要策略。

芦荟大黄素(aloe emodin, AE)具有 C-1、C-8 位羟基和 C-9 位羰基,完整的大 π 键共轭体系,强配位氧原子与合适的空间构型,是天然优良的 Cu^{2+} 螯合剂。潘晓丽^[13]合成了 Cu^{2+} -AE 螯合物并进行表征,实验结果显示,2 个 AE 分子失去 C-8 位酚羟基的质子并通过 C-9 位氧原子与 1 个 Cu^{2+} 螯合即可获得 Cu^{2+} -AE 螯合物,且 Cu^{2+} -AE 螯合物的抗氧化、抑菌活性均高于 AE。此外,AE 能有效抑制 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 聚集,减弱 $A\beta$ 诱导的细胞毒性^[14]。Tao 等^[15]的研究显示,AE 通过抑制乙酰胆碱酯酶活性、调节氧化应激等途径发挥抗 AD 的神经保护作用。基于 AE 具有抑制 $A\beta_{42}$ 自发聚集及螯合 Cu^{2+} 的能力,推测 AE 一方面可直接抑制 $A\beta_{42}$ 聚集;另一方面可通过阻断 Cu^{2+} 与 $A\beta_{42}$ 相互作用,抑制 Cu^{2+} 诱导的 $A\beta_{42}$ 聚集和毒性。因此,本研究应用硫黄素 T(thioflavin T, ThT) 荧光实验、浊度法、透射电镜及 CCK8 细胞毒性实验考察 AE 对 Cu^{2+} 存在下 $A\beta_{42}$ 聚集和细胞毒性的影响,旨在为 AE 应用于

AD 治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

N-EVAP 116 氮吹仪(美国 Organomation 公司);FS-50B 恒温培养摇床[菲斯福仪器(河北)有限公司];KQ-100DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Epoch 酶标仪(美国 BioTek 公司);SpectraMax i3x 多功能微孔读板机(美国 Molecular Devices 公司);JEM-1200Ex 透射电镜(日本 JEOL 公司);BJ-2CD 超净工作台(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);311 二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);Eclipse Ts100 倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);SC-2542 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

芦荟大黄素(批号:A17GS145379, HPLC $\geq 95\%$)、Tris-HCl(99%,批号:T19O11K127940)、六氟异丙醇(HFIP,99.5%,批号:J07IS216861)、二甲基亚砜(DMSO,99%,批号:A16IS223190)(上海源叶生物科技有限公司);无水氯化铜(II)($CuCl_2$,上海麦克林生化科技股份有限公司,99.99% metals basis,批号:C14071629); $A\beta_{42}$ (南京肽业生物科技有限公司, HPLC $\geq 95\%$,批号:NJP32802-230511);氢氧化钠(NaOH,批号:RH264779)、ThT(批号:RH231951,上海易恩化学技术有限公司);DMEM/F-12(1:1)(1 \times , MA0214-Sep-05I)、0.25% Trypsin-EDTA Phenol Red(改良型 meilunbio,批号:MA0233)、胎牛血清(FBS,批号:A0823D)、青霉素/链霉素溶液(100 \times 无菌,批号:MA0110-Nov-28I2)、细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK8)(增强型,MA0218-Jun-15I)、PBS(1 \times ,大连美仑生物技术有限公司);乙酸双氧钼(北京中镜科仪技术有限公司)。人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购自北京协和医学院基础医学院。

2 方法

2.1 样品溶液制备

2.1.1 $A\beta_{42}$ 母液 将 $A\beta_{42}$ 冻干粉充分溶解于预冷的 HFIP 中,配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。氮吹仪吹干,形成肉眼可见的无色肽膜, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏。使用前将 $A\beta_{42}$ 肽膜充分复溶于 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液,用 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)稀释至 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 芦荟大黄素母液 将 AE 溶于 0.2% DMSO 配制成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.1.3 $CuCl_2$ 母液 取无水氯化铜(II)适量,使用去离子水配制成 $0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.2 分组

$A\beta_{42}$ 组:用 Tris-HCl 缓冲液将 $A\beta_{42}$ 母液稀释至 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ($A\beta_{42} + Cu^{2+}$) 组: $A\beta_{42}$ 与 $CuCl_2$ 共同

孵育 ($A\beta_{42}$ 终浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CuCl_2 终浓度分别为 3.125 、 6.25 、 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); ($A\beta_{42} + \text{AE}$) 组: $A\beta_{42}$ 与 AE 共同孵育 ($A\beta_{42}$ 终浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, AE 终浓度分别为 6.25 、 25 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); ($A\beta_{42} + \text{Cu}^{2+} + \text{AE}$) 组: 先将 CuCl_2 溶液与 $A\beta_{42}$ 溶液混匀, 立即向混合体系中加入不同量的 AE 溶液 ($A\beta_{42}$ 终浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CuCl_2 终浓度为 $3.125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, AE 终浓度分别为 6.25 、 25 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。将各组置于 37°C 、 $150 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温培养摇床中避光孵育 120 h, 分别在不同时间点取样进行检测。

2.3 ThT 荧光实验

分别吸取各组孵育 0、1、2、4、6、12、24、48、72、96、120 h 的样品 $50 \mu\text{L}$ 至黑色透底 96 孔板中, 加入 ThT 溶液 $150 \mu\text{L}$ (ThT 终浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 室温避光反应 30 min, 使用多功能微孔读板机测定荧光强度。设定激发波长为 450nm , 发射波长为 485nm , 带宽分别为 9 、 15nm , 检测前振板 10 s。实验数据需扣除不含 $A\beta_{42}$ 的空白背景, 将 $A\beta_{42}$ 单独孵育的最大荧光强度设为 100% 进行归一化处理。

2.4 浊度法

分别吸取各组孵育 0、6、24、48、72、96、120 h 的样品 $200 \mu\text{L}$, 加入 96 孔板中。使用酶标仪测定其在 400nm 处的吸光度, 实验结果均扣除相应的空白背景。

2.5 透射电子显微镜实验

分别吸取各组孵育 24、120 h 的样品 $30 \mu\text{L}$ 滴加到碳支持膜上, 干燥后滴加 $30 \mu\text{L}$ 2% 乙酸双氧铀溶液进行负染, 干燥 3 h 后用透射电镜观察形貌。

2.6 CCK8 细胞毒性实验

SH-SY5Y 细胞用含有 10%FBS、1% 青霉素 / 链霉素溶液的 DMEM/F-12 培养基, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育。每隔 2 d 传代 1 次, 其间换液 1 次。收集对数期细胞, 将细胞以 2×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 孵育 24 h。待细胞贴壁后, 实验组用各组预先孵育 120 h 的样品处理细胞 ($A\beta_{42}$ 终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续孵育 24 h。将孔内培养基吸除后, 向每孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 10% 的 CCK8 溶液, 避光孵育 4 h。使用酶标仪测量 450nm 处的吸光度 A , 以仅含有细胞的样品作为对照组, 实验数据均扣除不含细胞的空白背景, 每组设置 5 次平行实验, 计算细胞生存率。细胞生存率 (%) = $A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.7 数据统计学处理

实验数据通过 SPSS Statistics 20 软件进行统计学分析, 应用 GraphPad Prism 10 软件作图。计量资料的结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表

示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差不齐的计量资料采用非参数秩和检验进行分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 AE 对 Cu^{2+} 存在下 $A\beta_{42}$ 纤维化聚集过程的影响

ThT 可与富含 β - 折叠结构的淀粉样纤维结合, 在 450nm 激发光的作用下, 于 485nm 处产生荧光信号。蛋白的 β - 折叠结构含量越多, ThT 荧光强度就越强, 因此 ThT 荧光实验可用于评估 $A\beta_{42}$ 的纤维化聚集过程^[16]。如图 1 所示, 单独孵育 $A\beta_{42}$, 0 ~ 6 h 为延伸期, $A\beta_{42}$ 单体快速聚集为富含 β - 折叠结构的聚集体, 成核期几乎不明显; 6 h 之后荧光强度缓慢增长, 从 24 h 开始荧光强度基本保持不变, 达到稳定期。将 Cu^{2+} 与 $A\beta_{42}$ 共同孵育, 与单独孵育 $A\beta_{42}$ 相比, 延伸期的斜率以及稳定期的荧光强度随 Cu^{2+} 浓度增加而逐渐降低; 当 Cu^{2+} 浓度增加到 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 孵育 12 h 后荧光强度开始降低, 孵育 72 h 后几乎检测不到荧光。表明在实验浓度范围内, Cu^{2+} 浓度依赖性地抑制 $A\beta_{42}$ 的纤维化聚集。

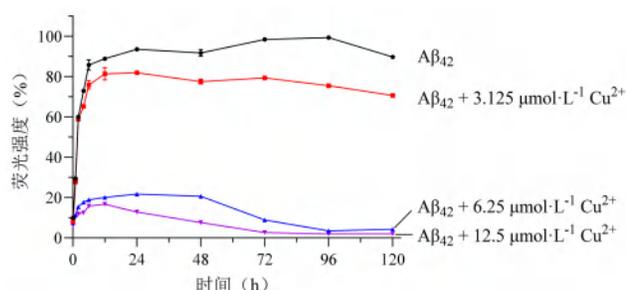


图 1 Cu^{2+} 对 $A\beta_{42}$ 纤维化聚集过程的影响

Fig 1 Effect of Cu^{2+} on the fibrotic aggregation process of $A\beta_{42}$

将 AE 与 $A\beta_{42}$ 共同孵育, 与 $A\beta_{42}$ 单独孵育相比, 延伸期的斜率以及稳定期的荧光强度随 AE 浓度的增加而逐渐降低。当 AE 浓度增加到 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 孵育 120 h 可使 $A\beta_{42}$ 的荧光强度降低至 44.79% (见图 2)。表明 AE 可抑制 $A\beta_{42}$ 的纤维化聚集。

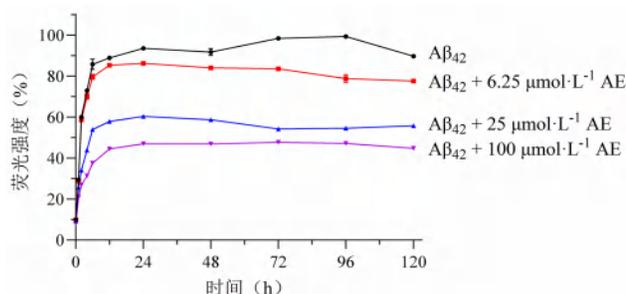


图 2 芦荟大黄素对 $A\beta_{42}$ 纤维化聚集过程的影响

Fig 2 Effect of aloe emodin on the fibrotic aggregation process of $A\beta_{42}$

将 AE 与 Cu^{2+} 、 $A\beta_{42}$ 共同孵育, 随着 AE 浓度增加, 延伸期的斜率以及稳定期的荧光强度逐渐降

低,表明 Cu^{2+} 存在下, AE 也能抑制 $\text{A}\beta_{42}$ 的纤维化聚集。当 AE 浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 孵育 120 h 可使 $\text{A}\beta_{42}$ 的荧光强度降低至 37.05% (见图 3)。

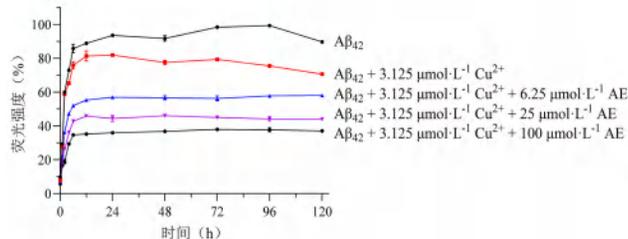


图 3 芦荟大黄素对 Cu^{2+} 存在下 $\text{A}\beta_{42}$ 纤维化聚集过程的影响
Fig 3 Effect of aloe emodin on the fibrotic aggregation process of $\text{A}\beta_{42}$ in the presence of Cu^{2+}

3.2 AE 对 Cu^{2+} 存在下 $\text{A}\beta_{42}$ 总聚集程度的影响

浊度法的基本原理是溶液中颗粒物的量与 400 nm 处的吸光度成正比, 因此通过浊度法可检测 $\text{A}\beta_{42}$ 各种结构聚集体的总聚集程度。如图 4 所示, 单独孵育 $\text{A}\beta_{42}$, 120 h 内样品的浊度缓慢增加, 120 h 时溶液的吸光度增长为原来的 2.28 倍。将 Cu^{2+} 与 $\text{A}\beta_{42}$ 共同孵育, 样品的浊度明显高于同时间单独孵育 $\text{A}\beta_{42}$ 的浊度, 说明 Cu^{2+} 对 $\text{A}\beta_{42}$ 总聚集程度有促进作用。而“3.1”项下 ThT 荧光实验的结果显示, Cu^{2+} 能浓度依赖性地抑制 $\text{A}\beta_{42}$ 的纤维化聚集。结合 ThT 荧光实验和浊度实验的结果, 推测 Cu^{2+} 促进 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集所形成的聚集体并非富含 β - 折叠结构的纤维。

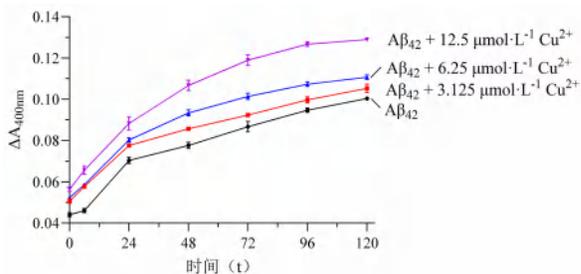


图 4 Cu^{2+} 对 $\text{A}\beta_{42}$ 总聚集浊度的影响
Fig 4 Effect of Cu^{2+} on the turbidity of $\text{A}\beta_{42}$ total aggregation

如图 5 所示, 将 AE 与 $\text{A}\beta_{42}$ 共同孵育, 与单独孵育 $\text{A}\beta_{42}$ 相比, 溶液的浊度明显降低。当 AE 的浓度为 $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 孵育 120 h 可使 $\text{A}\beta_{42}$ 的浊度降低 13.29%, 表明 AE 可抑制 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集。将 AE 与 $\text{A}\beta_{42}$ 、 Cu^{2+} 共同孵育, 样品的浊度进一步降低。与 ($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+}$) 组 (CuCl_2 终浓度为 $3.125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AE 孵育 120 h 可使样品的浊度降低 25.24%, 表明 AE 能抑制 Cu^{2+} 诱导的 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集。由于 AE 的溶解度较差, 本实验体系下高浓度的 AE 会析出, 影响浊度实验结果, 因此本实验未探究 25、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AE 对 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集的影响。

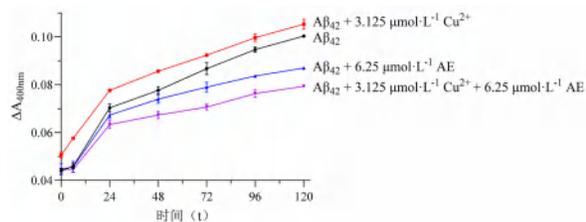


图 5 芦荟大黄素对 $\text{A}\beta_{42}$ 总聚集浊度的影响
Fig 5 Effect of aloe emodin on the turbidity of $\text{A}\beta_{42}$ total aggregation

3.3 AE 对 Cu^{2+} 存在下 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集体形貌的影响

为进一步研究 $\text{A}\beta_{42}$ 的聚集过程, 采用透射电镜观察各组聚集体的形貌。如图 6A、6B 所示, 单独孵育 $\text{A}\beta_{42}$, 24 h 时形成 $100 \sim 350 \text{ nm}$ 的短纤维, 120 h 时形成 400 nm 以上的长纤维。如图 6C 所示, 与 $\text{A}\beta_{42}$ 单独孵育相比, 加入 Cu^{2+} 和 $\text{A}\beta_{42}$ 共孵育 24 h, 形成的纤维长度较短, 同时形成直径 30 nm 左右的无规则聚集体。如图 6D 所示, 加入 Cu^{2+} 和 $\text{A}\beta_{42}$ 共孵育 120 h, 视野内几乎没有纤维, 仅形成结构较为致密的、直径 100 nm 左右的无规则聚集体。结合 ThT 荧光实验和浊度法的结果, 证明 Cu^{2+} 能促进 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集形成低 β - 折叠结构的无规则聚集体。如图 6E、6F 所示, 将 AE 和 $\text{A}\beta_{42}$ 共孵育, 形成 $100 \sim 200 \text{ nm}$ 的粗纤维和一些无规则结构聚集体; 孵育 120 h 还可见 100 nm 左右的无定形块状聚集体。结合 ThT 荧光实验和浊度法的结果, 证明 AE 能抑制 $\text{A}\beta_{42}$ 的纤维化聚集, 改变 $\text{A}\beta_{42}$ 的聚集途径形成低 β - 折叠结构的聚集体。如图 6G、6H 所示, 将 AE 与 $\text{A}\beta_{42}$ 、 Cu^{2+} 共孵育 24 h, 视野内聚集体较少, 仅有一些直径 $10 \sim 20 \text{ nm}$ 的近圆形聚集体; 孵育 120 h, 出现 $20 \sim 50 \text{ nm}$ 的短粗棒状聚集体。结合 ThT 荧光实验和浊度法的结果, 证明 AE 可抑制 Cu^{2+} 诱导的 $\text{A}\beta_{42}$ 聚集。

3.4 AE 对 Cu^{2+} 存在下 $\text{A}\beta_{42}$ 细胞毒性的影响

首先考察各组除 $\text{A}\beta_{42}$ 以外的组分对 SH-SY5Y 细胞活力的影响。如图 7 所示, 与空白组比较, 在实验浓度范围内的 Cu^{2+} 、AE 以及 Cu^{2+} -AE 复合物对 SH-SY5Y 的细胞活力基本没有影响。

如图 8 所示, 单独孵育 $\text{A}\beta_{42}$ 120 h 形成的长纤维具有一定的毒性, 可使细胞活力降低至 74.38%。与空白组比较, 0.625 、 1.25 、 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 与 $\text{A}\beta_{42}$ 共同孵育形成无规则聚集体可显著降低细胞活力 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 表明 Cu^{2+} 可增强 $\text{A}\beta_{42}$ 的细胞毒性。加入 AE 与 $\text{A}\beta_{42}$ 共同孵育, AE 以浓度依赖性的方式提高细胞活力。当 AE 的浓度增加到 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 可使细胞活力恢复至 85.82%, 表明 AE 可降低 $\text{A}\beta_{42}$ 的细胞毒性。与 ($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+}$) 组 (Cu^{2+} 浓度为 $0.625 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, ($\text{A}\beta_{42} + \text{Cu}^{2+} + \text{AE}$) 组 (Cu^{2+} 浓度为 0.625

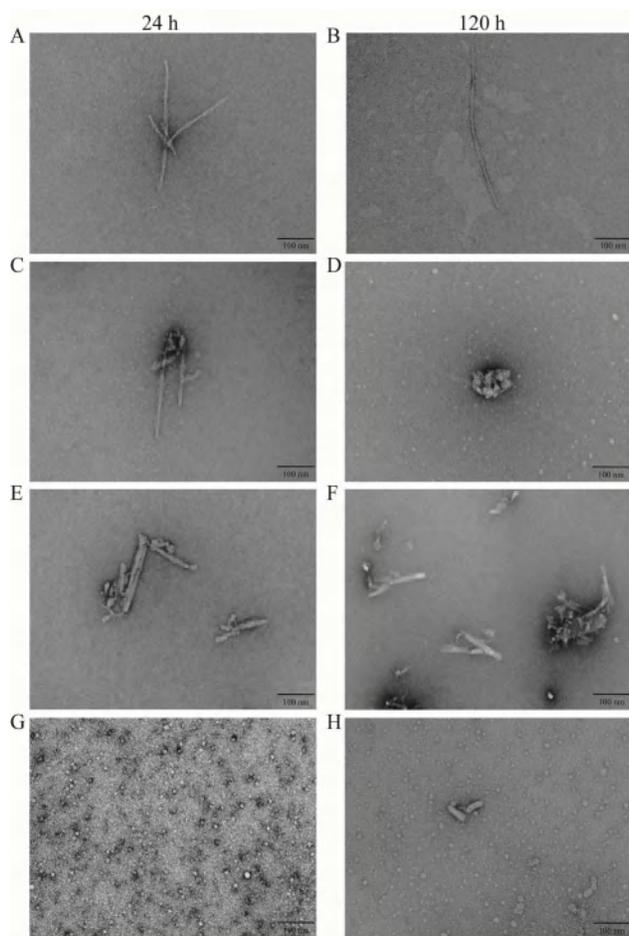


图 6 各组 $A\beta_{42}$ 孵育 24、120 h 形成的聚集体形貌 ($\times 30\ 000$)
 Fig 6 Aggregate morphology of $A\beta_{42}$ cultured for 24 and 120 h in each group ($\times 30\ 000$)

A、B. $A\beta_{42}$ 组 ($A\beta_{42}$ group); C、D. $A\beta_{42} + 3.125\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Cu}^{2+}$ 组 [$A\beta_{42} + 3.125\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Cu}^{2+}$ group]; E、F. $A\beta_{42} + 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AE}$ 组 [$A\beta_{42} + 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AE}$ group]; G、H. $A\beta_{42} + 3.125\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Cu}^{2+} + 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AE}$ 组 [$A\beta_{42} + 3.125\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Cu}^{2+} + 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AE}$ group]

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, AE 浓度分别为 1.25、5、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的细胞活力明显升高, 表明 AE 可减轻 Cu^{2+} 诱导 $A\beta_{42}$ 的细胞毒性。

4 讨论

本研究中将 $A\beta_{42}$ 置于 pH 7.4、37 °C 的条件下孵育 120 h, ThT 荧光强度、浊度逐渐增加, 形成富含 β - 折叠结构的长纤维聚集, 验证了 $A\beta_{42}$ 作为一种疏水多肽会自发聚集; 成核期不明显, 可能是因为 $A\beta_{42}$ 成核较为迅速, ThT 荧光实验难以检测到。将 Cu^{2+} 和 $A\beta_{42}$ 在 pH 7.4、37 °C 的条件下共孵育 120 h, 形成低 β - 折叠结构的细胞毒性较强的无规则聚集, 这与已报道的实验结果一致 [9, 16-17]。 Cu^{2+} 增强 $A\beta_{42}$ 毒性的机制, 主要与催化活性氧生成、改变 $A\beta$ 构象、导致细胞内外铜稳态失调有关 [18]。

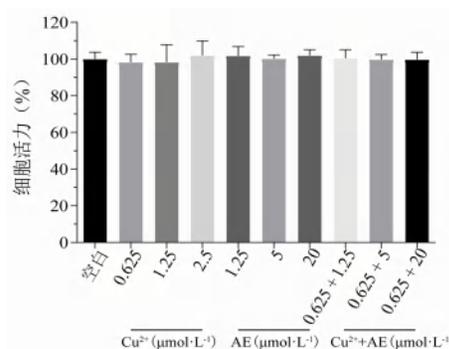


图 7 Cu^{2+} 、AE 及 Cu^{2+} -AE 复合物对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n = 5$)

Fig 7 Effect of Cu^{2+} , AE and Cu^{2+} -AE complex on the viability of SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s, n = 5$)

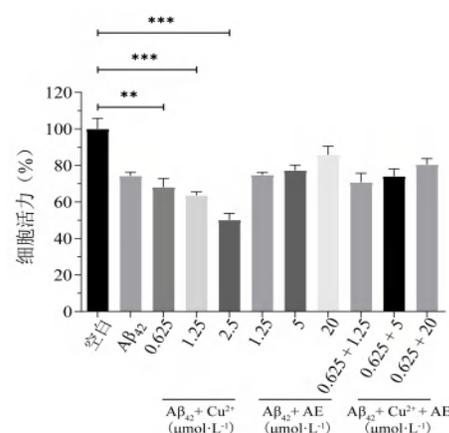


图 8 $A\beta_{42}$ 预孵育 120 h 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n = 5$)

Fig 8 Effect of $A\beta_{42}$ cultured for 120 h on the viability of SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s, n = 5$)

注: 与空白组相比, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

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

葱醌可以插入 β - 折叠结构中破坏链间氢键的稳定性, 干扰 $A\beta$ 纤维颤动, 抑制 $A\beta$ 聚集 [19-20]。AE 作为大黄葱醌单体之一, 是一种优良的蛋白聚集抑制剂 [21-22]。本研究结果显示, AE 可直接与 $A\beta_{42}$ 作用, 降低样品的 ThT 荧光强度和浊度, 改变 $A\beta_{42}$ 的聚集途径形成细胞毒性较低的无定形聚集, 有效抑制 $A\beta_{42}$ 聚集。此外, 在 Cu^{2+} 存在下, AE 降低了 $A\beta_{42}$ 的 ThT 荧光强度和浊度, 使其形成直径较小、细胞毒性较低的聚集。因此, AE 可作为一种效果优良的双功能抑制剂, 一方面抑制 $A\beta_{42}$ 的自发性聚集, 一方面通过整合 Cu^{2+} 抑制 Cu^{2+} 诱导的 $A\beta_{42}$ 聚集。AE 在体内是否能抑制 Cu^{2+} 存在下 $A\beta_{42}$ 的聚集及细胞毒性尚有待进一步研究。AE 能穿透血脑屏障到达大脑发挥作用 [23-24]。未来可通过饲喂含铜饲料或饮水、脑注射 Cu^{2+} 或 Cu^{2+} - $A\beta_{42}$ 等方法造模 AD 动物 [25-30], 考察 AE 在体内的抗 $A\beta_{42}$ 聚集和神经保护作用。

参考文献

- [1] Jia LF, Du YF, Chu L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study [J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5 (12): e661-e671.
- [2] 王英全, 梁景宏, 贾瑞霞, 等. 2020—2050 年中国阿尔茨海默病患病情况预测研究 [J]. *阿尔茨海默病及相关病*, 2019, 2 (1): 289-298.
- [3] Pagano K, Tomaselli S, Molinari H, et al. Natural compounds as inhibitors of $A\beta$ peptide aggregation: chemical requirements and molecular mechanisms [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 619667.
- [4] Han SH, Chang YJ, Jung ES, et al. Effective screen for amyloid β aggregation inhibitor using amyloid β -conjugated gold nanoparticles [J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 6: 1-12.
- [5] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297 (5580): 353-356.
- [6] Viayna E, Sabate R, Muñoz-Torrero D. Dual inhibitors of β -amyloid aggregation and acetylcholinesterase as multi-target anti-Alzheimer drug candidates [J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13 (15): 1820-1842.
- [7] 刘伟, 孙彦. β -淀粉样蛋白的聚集及其调控 [J]. *化工学报*, 2022, 73 (6): 2381-2396.
- [8] Kirkitadze MD, Condrón MM, Teplow DB. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis [J]. *J Mol Biol*, 2001, 312 (5): 1103-1119.
- [9] 杜明娇. 铜离子对 β 淀粉样蛋白聚集的影响及其调控研究 [D]. 青岛: 中国石油大学 (华东), 2021.
- [10] Kepp KP. Alzheimer's disease: how metal ions define β -amyloid function [J]. *Coord Chem Rev*, 2017, 351: 127-159.
- [11] Alghamdi A, Wellbrock T, Birch DJS, et al. Cu^{2+} effects on beta-amyloid oligomerisation monitored by the fluorescence of intrinsic tyrosine [J]. *Chem Phys Chem*, 2019, 20 (23): 3181-3185.
- [12] Hureau C, Fallier P. A β -mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease [J]. *Biochimie*, 2009, 91 (10): 1212-1217.
- [13] 潘晓丽. 大黄中蒽醌类化合物金属配合物的合成、表征及生物活性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [14] Ho SL, Poon CY, Lin C, et al. Inhibition of β -amyloid aggregation by albiflorin, aloemodin and neohesperidin and their neuroprotective effect on primary hippocampal cells against β -amyloid induced toxicity [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2015, 12 (5): 424-433.
- [15] Tao L, Xie JM, Wang YT, et al. Protective effects of aloemodin on scopolamine-induced memory impairment in mice and H_2O_2 -induced cytotoxicity in PC12 cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24 (23): 5385-5389.
- [16] Dai XL, Sun YX, Gao ZL, et al. Copper enhances amyloid-beta peptide neurotoxicity and non beta-aggregation: a series of experiments conducted upon copper-bound and copper-free amyloid-beta peptide [J]. *J Mol Neurosci*, 2010, 41 (1): 66-73.
- [17] 郭明, 陈平, 都秀波, 等. 硒蛋白 R 抑制铜离子介导的 $A\beta_{42}$ 聚集和细胞毒性 [J]. *生态毒理学报*, 2016, 11 (2): 399-404.
- [18] Okafor M, Gonzalez P, Ronot P, et al. Development of Cu (II)-specific peptide shuttles capable of preventing Cu-amyloid beta toxicity and importing bioavailable Cu into cells [J]. *Chem Sci*, 2022, 13 (40): 11829-11840.
- [19] Convertino M, Pellarin R, Catto M, et al. 9, 10-anthraquinone hinders beta-aggregation: how does a small molecule interfere with A β -peptide amyloid fibrillation? [J]. *Protein Sci*, 2009, 18 (4): 792-800.
- [20] Campora M, Canale C, Gatta E, et al. Multitarget biological profiling of new naphthoquinone and anthraquinone-based derivatives for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12 (3): 447-461.
- [21] Furkan M, Alam MT, Rizvi A, et al. Aloe emodin, an anthraquinone from Aloe vera acts as an anti aggregatory agent to the thermally aggregated hemoglobin [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2017, 179: 188-193.
- [22] 姚妮, 王楚茵, 赵希彤, 等. 芦荟大黄素对 Al^{3+} 存在下 $A\beta_{42}$ 聚集和细胞增殖抑制作用的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (18): 99-107.
- [23] Xian MH, Cai JL, Zheng KN, et al. Aloe-emodin prevents nerve injury and neuroinflammation caused by ischemic stroke via the PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B pathway [J]. *Food Funct*, 2021, 12 (17): 8056-8067.
- [24] 李淑芳, 冯素香. 芦荟大黄素在小鼠体内的药代动力学及组织分布特征研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34 (6): 34-38.
- [25] Zhao J, Shi QH, Tian HD, et al. TDMQ20, a specific copper chelator, reduces memory impairments in Alzheimer's disease mouse models [J]. *CS Chem Neurosci*, 2021, 12 (1): 140-149.
- [26] Tan X, Zhou YH, Gong PD, et al. A multifunctional bis(-)-nor-meptazinol-oxalamide hybrid with metal-chelating property ameliorates Cu (II)-induced spatial learning and memory deficits via preventing neuroinflammation and oxidative-nitrosative stress in mice [J]. *J Trace Elem Med Bio*, 2019, 52: 199-208.
- [27] Pan YM, Xu JQ, Chen C, et al. Royal jelly reduces cholesterol levels, ameliorates $A\beta$ pathology and enhances neuronal metabolic activities in a rabbit model of Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 50.
- [28] 吴丹. HDAC6 抑制剂 W5 改善 $A\beta/Cu^{2+}$ 诱导的阿尔茨海默病大鼠的学习记忆损伤及相关机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2024.
- [29] Behzadfar L, Abdollahi M, Sabzevari O, et al. Potentiating role of copper on spatial memory deficit induced by beta amyloid and evaluation of mitochondrial function markers in the hippocampus of rats [J]. *Metallomics*, 2017, 9 (7): 969-980.
- [30] 李淑玲. PIMPC 对 $A\beta/Cu^{2+}$ 诱导的阿尔茨海默病大鼠模型的多靶点作用研究 [D]. 济南: 山东大学, 2021.

(收稿日期: 2024-01-05; 修回日期: 2024-03-06)

基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的二十五味大汤丸 化学成分分析

严志宏¹, 许金娣¹, 索朗次仁², 张臣¹, 张宁方¹, 罗珍^{2*}, 杨雅雯¹ (1. 江西中医药大学, 南昌 330004;
2. 西藏藏医药大学, 拉萨 850000)

摘要: **目的** 采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法对二十五味大汤丸的化学成分进行分析鉴定。**方法** 利用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱技术 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 进行检测, 正、负离子模式采集数据, 采用 TraceFinder 4.1 软件筛查目标化合物, 分析化合物特征碎片离子, 结合相关文献对数据进行系统分析和各成分的中药来源进行归属。**结果** 在正、负离子模式下共鉴定出 102 个化合物, 包括黄酮类 30 个, 有机酸类 22 个, 萜类及三萜类 11 个, 苯丙素类 17 个, 鞣质类 10 个, 其他类 12 个。**结论** 应用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术可快速有效、全面地表征二十五味大汤丸中的主要化学成分, 为深入揭示其药效物质及作用机制提供依据。

关键词: 二十五味大汤丸; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; 化学成分; 裂解规律

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)12-3139-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.003

Chemical composition analysis of Twenty-five Flavor Soup pills based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS

YAN Zhi-hong¹, XU Jin-di¹, Suo-lang-ci-ren², ZHANG Chen¹, ZHANG Ning-fang¹, LUO Zhen^{2*},
YANG Ya-wen¹ (1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. University of
Xizang Medicine, Lasa 850000)

Abstract: Objective To identify the chemical components of Twenty-five Flavor Soup pills by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS method. **Methods** The detection was carried out using ultra performance liquid chromatography-linear ion trap-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS), and the data were collected in the positive and negative ion modes, and the target compounds were screened using TraceFinder 4.1 software to analyse the compound characteristic fragment ions, combined with the relevant literature for systematic analysis of the data and the attribution of the traditional Chinese medicine sources of each component. **Results** Totally 102 compounds were identified in the positive and negative ion modes, including 30 flavonoids, 22 organic acids, 11 terpenes and triterpenes, 17 phenylpropanoids, 10 tannins, and 12 other compounds. **Conclusion** The application of UPLC-LTQ-Orbitrap-MS technology can rapidly, effectively and comprehensively characterise the main chemical components in Twenty-five Flavor Soup pills, and provide the basis for the in-depth revelation of its pharmacological substances and mechanism of action.

Key words: Twenty-five Flavor Soup pill; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; chemical component; cracking regularity

二十五味大汤丸, 是藏族地区常用的藏药成方, 藏药名汤钦尼埃日布, 收录于 1995 年版的《中华人民共和国卫生部药品标准藏药》^[1], 属于

藏药处方中的平息方, 该方由红花、诃子、毛诃子、余甘子、藏木香、木香、波棱瓜子、渣驯膏、石榴子、榜嘎、角茴香、紫菀花、乌奴龙胆、豆蔻、

基金项目: 2021 年中药学 (藏药) 博士点培育科研支撑计划项目 (No. BSDPY-21-08); 2024 年度博士点中医学 (藏医) 学科建设及中药 (藏药) 学科培育项目藏药炮制学 (No. BSDJS-XKJS-24-04)。

作者简介: 严志宏, 男, 副教授, 主要从事中药分析和药物分析研究, email: yanzhihong03@126.com *通信作者: 罗珍, 女, 讲师, 主要从事中药学研究, email: 1046815559@qq.com

木瓜、猪血粉、甘青青兰、骨碎补、芫荽、獐牙菜、兔耳草、秦艽花、绿绒蒿、水柏枝、巴夏嘎二十五味药组成^[2]，方中主药为红花、诃子、毛诃子，余甘子调和诸药。具有开胃、愈溃疡、止痛、治疗月经过多等功能^[3]，现代临床常用于急慢性胃炎、浅表性胃炎、胃溃疡、胃酸、胃痛胃胀等胃肠功能紊乱疾病。现有二十五味大汤丸的研究多停留在临床应用和质量标准层面，而关于其活性物质基础的研究尚未有相关研究。为此，确定二十五味大汤丸的主要化学成分对其进一步的药效物质阐明和作用机制研究非常重要。

UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 全称为超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱法，具备离子阱质谱多级碎裂和静电场轨道阱高分辨功能，是一种超高效率和灵敏度的液质联用技术，是鉴定中药成分的有效手段之一^[4]。基于此，本实验首次利用该技术对二十五味大汤丸中的化学成分进行快速分析鉴定，为深入开展其功效物质基础的研究奠定了基础。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪、LTQ Orbitrap 型质谱仪、Xcalibur 2.1 化学工作站、TraceFinder 4.1 软件(美国 Thermo Fisher 公司)、Milli-Q Synthesis 型超纯水纯化系统(美国密理博公司)、TGL-16B 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)、SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)、BSA224S 型万分之一电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 试剂

去甲基维菊叶龙胆酮(批号: 23040309)、香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(批号: 21030907)、大波斯菊苷(批号: 21053112)、没食子酸(批号: 23101303)、柯里拉京(批号: 23062603)、绿原酸(批号: 22121606)(成都普菲德技术有限公司); α -亚麻酸(批号: J131B220095, 上海源叶生物科技有限公司), 所有对照品纯度均 > 98%; 二十五味大汤丸(批号: Z54020063, 0.5 g/丸, 西藏甘露藏药股份有限公司); 质谱级甲醇、甲酸、乙腈(德国 Merck KGaA 公司); 超纯水为自制。

2 方法

2.1 二十五味大汤丸化学成分数据库的建立

通过中药系统药理学数据库与分析平台、中国中医药数据库检索系统, 结合相关文献报道, 收集二十五味药材的化合物信息(名称、分子式、相对分子量), 构建二十五味大汤丸化学成分数据库。

2.2 二十五味大汤丸的制备

应用多功能粉碎机将二十五味大汤丸复方进

行粉碎, 过 60 目筛, 精确称取 0.2 g 粉末于 10 mL 离心管中, 加 5 mL 50% 的甲醇溶液, 振荡混匀, 超声 40 min, 于 13 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取出, 取上清液, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 测样分析。

2.3 对照品溶液的制备

称取对照品去甲基维菊叶龙胆酮、香叶木素-7-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷适量, 粉末置于量瓶中, 加 50% 甲醇使其充分溶解, 再稀释至刻度线, 摇动混匀, 作为混合对照品 1; 称取对照品大波斯菊苷、没食子酸、柯里拉京、绿原酸适量, 粉末置于量瓶中, 加 50% 甲醇使其充分溶解, 再稀释至刻度线, 摇动混匀, 作为混合对照品 2; 量取对照品 α -亚麻酸适量, 溶液置于量瓶中, 加 50% 甲醇使其充分溶解, 再稀释至刻度线, 摇动混匀, 作为对照品 3。

2.4 色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(正离子模式: 0~1 min, 5%B; 1~7 min, 5%~20%B; 7~12 min, 20%~24%B; 12~15 min, 24%~30%B; 15~18 min, 30%~35%B; 18~28 min, 35%~60%B; 28~34 min, 60%~75%B; 34~37 min, 75%~100%B; 37~39 min, 100%B; 39~39.1 min, 100%~5%B; 39.1~42 min, 5%B。负离子模式: 0~1 min, 5%B; 1~6 min, 5%~17%B; 6~10 min, 17%~23%B; 10~20 min, 23%~36%B; 20~27 min, 36%~48%B; 27~35 min, 48%~76%B; 35~38 min, 76%~100%B; 38~42 min, 100%B; 42~42.2 min, 100%~5%B; 42.2~45 min, 5%B), 流速 0.3 mL \cdot min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样体积 3 μ L。

2.5 质谱条件

数据采集模式为正、负离子模式, 应用电喷雾离子源(ESI); 正、负离子模式采集条件相同, 均为离子源温度 350 $^{\circ}$ C, 毛细管温度 320 $^{\circ}$ C, 毛细管电压 35 V, 管透镜电压 110 V, 喷雾电压 4 kV, 鞘气流速 35 L \cdot h⁻¹, 辅助气流速 10 L \cdot h⁻¹; 进行样品全扫描, 分辨率 30 000, 扫描范围 *m/z* 50~1250; 二级质谱采用 DDA 动态数据依赖性扫描, 选取丰度值排名为前六强的峰进行 CID 碰撞诱导解离碎片扫描, 采用离子阱打拿极检测。

2.6 数据采集与预处理

应用 Xcalibur 2.1 化学工作站采集数据, 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术结合 TraceFinder 4.1 软件筛查目标化合物。查阅二十五味藏药的化学成分相关文献, 收集二十五味藏药的化合物信息

(化合物名称、分子式、相对分子量), 汇总成表格, 保存为 CSV 格式, 建立数据库。将正、负离子模式下采集的数据导入 TraceFinder 4.1 软件进行自动筛查匹配, 实际分子量与理论分子量的偏差值 (δ) 设置为 5 ppm ($1 \text{ ppm} = 1 \times 10^{-6}$), 质谱精确性设置为 5。最后, 进行化合物鉴定, 结合相关文献对化合物的精确质量数和质谱裂解碎片及特征碎片离子进行结构推断, 确定最终筛选结果。

3 结果

采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 对二十五味大汤丸主要化学成分进行定性分析, 总离子流图见图 1。筛查目标化合物运用 TraceFinder 4.1 软件, 对两个模式下 $[M + H]^+$ 、 $[M - H]^-$ 检测出来的化合物偏差进行筛选, 初步筛选出 $\delta < 5 \text{ ppm}$ 的化合物, 获取相关化合物的特征碎片离子图谱, 再结合文献和对照品对化合物进行系统分析, 最后共鉴定出 102 个化合物, 包括黄酮类 30 个, 有机酸类 22 个, 萜类及三萜类 11 个, 苯丙素类 17 个, 鞣质类 10 个, 其他类 12 个。

3.1 黄酮及其苷类

黄酮类化合物是一种分子结构包含 2-苯基色原酮基本母核, 由酚羟基苯环和中央碳原子构成的 C6-C3-C6 结构的化合物。本实验从二十五味大汤丸提取液中鉴定出了 30 种黄酮及其苷类化合物。黄酮类化合物的母核 C 环容易发生逆狄尔斯-阿尔德 (RAD) 裂解, 从而生成一系列碎片离子。峰 90 的保留时间为 17.57 min, 准分子离子峰 m/z 259.0240 $[M-H]^-$, 接连丢失 CO 产生碎片离子 231.0919 $[M-H-CO]^-$ 、203.0218 $[M-H-2CO]^-$; 丢失 CO_2 产生碎片离子 215.1081 $[M-H-CO_2]^-$ 、继而丢失一分子 CO 产生碎片离子 186.9501 $[M-H-CO_2-CO]^-$; 丢失一分子 CHO 产生碎片离子 230.1215 $[M-H-CHO]^-$; 该化合物还发生 RAD 裂解产生碎片离子 151.0763 $[M-H-$

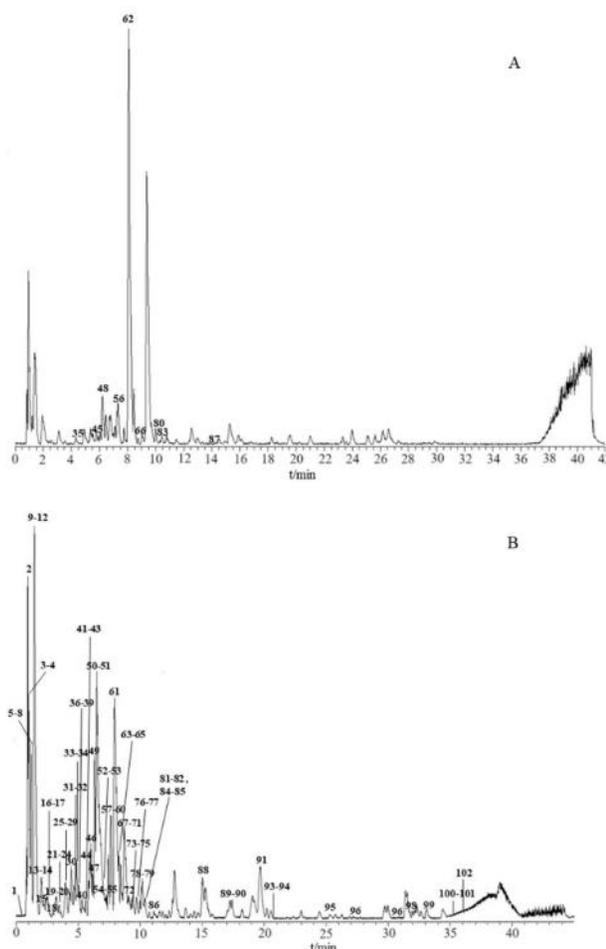


图 1 二十五味大汤丸 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 总离子流图
Fig 1 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS total ion current diagram of Twenty-five Flavor Soup pills
A. 正离子模式 (positive ion mode); B. 负离子模式 (negative ion mode)

$C_6H_4O_2]^-$ 、107.1646 $[M-H-C_7H_4O_4]^-$, 通过相关文献^[50]和对照品比对, 可以确定峰 90 是去甲基雏菊叶龙胆酮, 该化合物属于黄酮化合物中的吡喃酮类化合物, 分子式为 $C_{13}H_8O_6$, 裂解规律如图 2 所示。

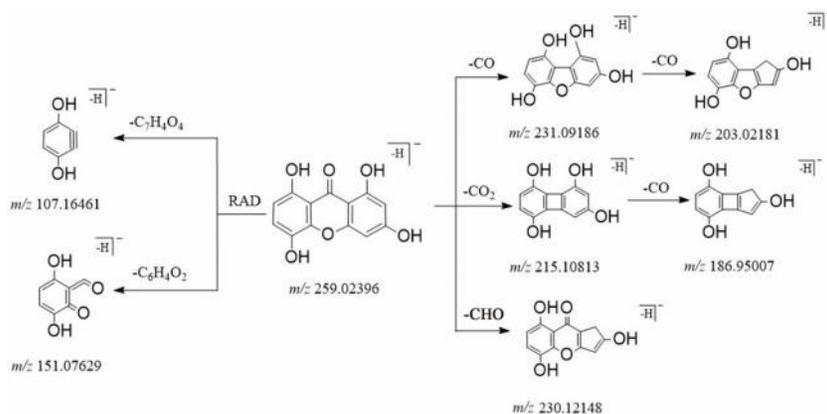


图 2 去甲基雏菊叶龙胆酮的裂解规律途径
Fig 2 Fragmentation pathway of desmethybellidifolin

3.2 有机酸及其苷类

二十五味大汤丸中有机酸化合物有 22 种, 包

括酚酸类、没食子酸类、单宁类及其苷类等, 在负离子模式中, 有机酸主要产生 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-$

表 1 二十五味大汤丸主要成分鉴定结果

Tab 1 Identification of the main components of the Twenty-five Flavor Soup pills

峰号	化合物	化学式	离子模式	<i>m/z</i> 理论值	<i>m/z</i> 实测值	$\delta/ \times 10^{-6}$	<i>t_R</i> /min	二级碎片离子	来源	类别	文献
1	果糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	179.0561	179.0560	-0.5305	0.21	161.0799	c	其他	[5]
2	粘酸	C ₆ H ₁₀ O ₈	[M-H] ⁻	209.0303	209.0300	-1.5392	0.95	191.0181、147.0342、133.0257	d	有机酸	[6]
3	顺式-乌头酸	C ₆ H ₆ O ₆	[M-H] ⁻	173.0092	173.0090	-0.9093	0.98	128.9920、111.0665、93.2088、85.2155	k	有机酸	[7]
4	D-半乳糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	179.0561	179.0560	-0.5305	0.99	160.9956、142.9745	q	其他	[5]
5	咪喃甲酸	C ₅ H ₄ O ₃	[M-H] ⁻	111.0088	111.0087	-0.2407	1.13	93.0611、83.1059、67.0762	k	有机酸	[8]
6	苹果酸	C ₄ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	133.0143	133.0141	-0.7902	1.21	114.9936、87.0658、71.0803	k	有机酸	[9]
7	脱氢二没食子酸	C ₁₄ H ₁₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	337.0201	337.0195	-1.7469	1.25	318.9743、292.9992、249.0293、274.9672、	x	鞣质	[10]
8	琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	117.0193	117.0193	-0.3013	1.27	117.0354、73.0844	q、k	有机酸	[11]
9	没食子酸*	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.0143	169.0139	-1.9761	1.37	151.1424、124.9863、107.0419、97.1939	b、n、s、d、x、i、k、c	有机酸	[12]
10	奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.0561	191.0556	-2.4938	1.38	172.9842、146.9815、111.0346、85.2087、59.2937	c、k	苯丙素	[12]
11	粘酸-1,4-内酯-3-O-C ₁₃ H ₁₂ O ₁₁ 没食子酸酯		[M-H] ⁻	343.0307	343.0299	-2.4307	1.42	190.9939	d	有机酸	[13]
12	诃子次酸	C ₁₄ H ₁₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	355.0307	355.0301	-1.7469	1.64	337.0415、319.0254、311.0639、293.0715	c、b、d	鞣质	[6]
13	5-羟甲基糠醛	C ₆ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	125.0244	125.0243	-0.9018	1.90	107.0600、81.1243	t、u、c	其他	[5]
14	L-苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M-H] ⁻	164.0717	164.0716	-0.9236	2.02	147.0235、120.0612、103.1494	l	其他	[5]
15	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	167.0350	167.0348	-1.2286	2.28	151.9815、149.0189、123.0136、	k、p、x、c	有机酸	[5]
16	3,4-二羟基-苯乙醇-8-O-β-D-吡喃阿洛糖苷	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	[M-H] ⁻	315.1085	315.1077	-2.5799	2.74	152.9983、135.0284	n	其他	[14]
17	2,3-二羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.0193	153.0192	-0.6792	2.78	109.0532	p	有机酸	[15]
18	3-乙酰氨基-4-羟基-苯甲酸	C ₉ H ₉ NO ₄	[M-H] ⁻	194.0459	194.0455	-1.8709	3.00	176.1104、150.0239	n	有机酸	[14]
19	L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M-H] ⁻	203.0826	203.0821	-2.2746	3.14	186.1011、159.0534、142.0186、130.0841、116.0485	l、g、d	其他	[16]
20	绿原酸*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.0878	353.0870	-2.1917	3.23	335.1183、191.0555、179.0301、173.0523、135.0111	m、s、u、k	苯丙素	[17]
21	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.0350	179.0348	-0.9758	3.50	135.0149	p、n、s、x、k、w	苯丙素	[18]
22	香豆酸-4-葡萄糖苷	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	[M-H] ⁻	325.0929	325.0923	-1.7667	3.60	281.0705、162.9998	n	有机酸	[19]
23	原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.0244	137.0244	-0.1547	3.72	109.0838、93.0658	p、r	有机酸	[5]
24	马钱苷酸	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	375.1297	375.1287	-2.6868	3.74	357.1127、213.0341、195.0250、169.0088、151.0232	r	萜类	[20]
25	对香豆酸	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	163.0401	163.0400	-0.7513	3.80	119.0292	n、w、k、q、x	苯丙素	[21]
26	桃叶珊瑚苷	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	345.1191	345.1181	-3.0062	3.94	299.1074、183.0174	y、q	萜类	[5]
27	对羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.0244	137.0244	-0.1547	4.01	93.0346	p、n、u、k、c	有机酸	[5]
28	8-epiloganic acid	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	375.1297	375.1287	-2.6868	4.04	357.1127、213.0537、195.0593、169.0640、151.0542	q	萜类	[22]
29	邻苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻	109.0295	109.0294	-0.7434	4.11	91.3263	h、p	有机酸	[21]
30	3-乙酰氧基苯甲酸	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.0350	179.0348	-0.9758	4.60	161.0550、135.0069、164.0116	p	有机酸	[11]
31	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.0506	193.0503	-1.7458	4.67	178.011、149.0290、134.0382	d	苯丙素	[20]
32	二氢红花菜豆酸-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	443.1923	443.1914	-1.9489	4.78	425.2358、399.1305、281.1380、237.1146、219.1695	a	萜类	[23]
33	没食子酸甲酯	C ₈ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	183.0299	183.0297	-1.2110	4.83	168.0105、139.0562、124.0058	b、d、c	有机酸	[9]
34	柯里拉京*	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	633.0733	633.0717	-2.5648	4.85	463.0073、300.9724	b、d、c	鞣质	[12]
35	羟基红花黄色素 A	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	613.1763	613.1743	-3.3508	5.13	595.0859、451.0826、433.1161、415.0680、355.0779	a	黄酮	[24]
36	3-O-阿魏酰奎尼酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	367.1035	367.1023	-3.1737	5.15	193.0291、173.0840、134.0537	u	苯丙素	[25]
37	原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.0193	153.0192	-0.6792	5.16	109.0052	b、n、s、y、d、k、w、p、r	有机酸	[15]
38	东莨菪素	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	191.0350	191.0352	1.1622	5.18	176.0480、172.9716	v、u	苯丙素	[20]

续表 1

峰号	化合物	化学式	离子模式	<i>m/z</i> 理论值	<i>m/z</i> 实测值	$\delta/ \times 10^{-6}$	<i>t_R</i> /min	二级碎片离子	来源	类别	文献
39	景天庚酮糖	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.0561	191.0556	-2.4938	5.19	172.9716、155.0022、119.1208	k	其他	[26]
40	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.0878	353.0870	-2.1917	5.34	191.0752、179.0189、173.0044、135.0089	u、t	苯丙素	[17]
41	短叶苏木酚酸	C ₁₃ H ₈ O ₈	[M-H] ⁻	291.0146	291.0139	-2.6975	5.55	247.0257、203.0235	c	有机酸	[25]
42	间羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.0244	137.0244	-0.1547	5.56	93.0327	p、h	有机酸	[15]
43	反式咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.0350	179.0348	-0.9758	5.67	135.0181、121.0093	n	苯丙素	[18]
44	咖啡酸甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.0506	193.0503	-1.7458	5.91	178.0104、149.0341、134.0135	s、y、x	苯丙素	[20]
45	异荛草素 -7-O- 葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	611.1607	611.1593	-2.2224	5.95	593.1359、575.1371、449.1213、431.1511、413.1107、383.1003、353.1053、329.1135	r	黄酮	[27]
46	诃子宁	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₉	[M-H] ⁻	651.0839	651.0828	-1.7453	6.07	633.0682、337.0317、318.9946、275.0014	c	鞣质	[17]
47	1, 2, 6- 三-O- 没食子酰基-β-D- 葡萄糖	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635.0890	635.0879	-1.7311	6.23	483.0829、465.1004、331.1043、313.0683、301.0391	b	鞣质	[9]
48	异荛草素 -4'-O- 葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	611.1607	611.1593	-2.2224	6.26	593.1305、449.1326、431.1075、413.1086、383.1309、353.1155、329.1123	r	黄酮	[27]
49	芒果苷	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	421.0776	421.0763	-3.1005	6.40	330.9958、301.0013、258.9971	p	黄酮	[9]
50	二氢山柰酚己糖苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.1089	449.1069	-4.5132	6.67	359.1047、329.0856、269.0650、259.0654	i	黄酮	[28]
51	3, 5- 二羟基-4- 甲氧基- 苯甲酸甲酯	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	197.0456	197.0451	-2.1036	6.95	182.0143	x	有机酸	[29]
52	1, 3, 6- 三没食子酰基- 葡萄糖	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635.0890	635.0879	-1.7311	7.07	483.0883、465.0721、331.0643、313.0740、301.0737	b	鞣质	[9]
53	绿原酸甲酯	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	367.1035	367.1023	-3.1737	7.09	191.0231	m、k	苯丙素	[11]
54	没食子酸乙酯	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	197.0456	197.0451	-2.1036	7.22	182.0330、169.0223	b、q、x、c	有机酸	[9]
55	6- 羟基山柰酚 -3-O-β- 芸香糖苷 -6-O-β-D- 葡萄糖苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	[M-H] ⁻	771.1989	771.1978	-1.4459	7.28	609.2208、301.1164	a	黄酮	[30]
56	6- 羟基芹菜素 -3, 6- 二-O-β-D- 葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	611.1607	611.1593	-2.2224	7.56	593.1741、449.0782、287.0480	a	黄酮	[30]
57	槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.0933	447.0920	-2.7712	7.62	300.9826、300.0295	b、x	黄酮	[5]
58	诃黎勒酸	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₇	[M-H] ⁻	953.0902	953.0902	-0.0221	7.71	633.1858、463.1583、301.1911	b、c	鞣质	[12]
59	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	197.0456	197.0451	-2.1036	7.72	182.0122、153.1183	p、e、c	有机酸	[31]
60	orientin 7-caffeate	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	[M-H] ⁻	609.1250	609.1246	-0.5684	7.74	447.0975、285.0872	r	黄酮	[32]
61	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.0882	463.0871	-2.3815	7.83	301.0087、300.1598	k	黄酮	[9]
62	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	611.1607	611.1593	-2.2224	8.14	465.0890、303.0509	k、c、b、p、e、d、o、u、x、a	黄酮	[20]
63	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.0882	463.0871	-2.3815	8.32	301.0097、271.1293、151.0573	x、w、t、p、q、u、d	黄酮	[9]
64	山柰酚 -3-O-β-D- 吡喃葡萄糖苷 -7-O-α-L- 阿拉伯呋喃糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	579.1355	579.1332	-3.9719	8.33	447.0769、265.0324	n	黄酮	[33]
65	槲皮素 -3-O- 葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	477.0675	477.0656	-3.8080	8.35	301.0621	x	黄酮	[21]
66	特马里素	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	[M+H] ⁺	787.0989	787.0963	-3.2226	8.68	769.1478、617.0638、447.0212、429.0152	c	鞣质	[24]
67	紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.0933	447.0920	-2.7712	8.69	429.1338、357.0910、327.1031、285.0635	p、n、q	黄酮	[9]
68	木犀草素 -7-O-β-D- 葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	461.0726	461.0714	-2.6024	8.76	327.0295、285.0194	n	黄酮	[34]
69	胡黄连苷 II	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	511.1457	511.1449	-1.5299	8.82	349.0693、235.0414、207.0393、166.9825	y	萜类	[35]
70	毛蕊花糖苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.1981	623.1962	-3.0680	8.87	461.2240、443.2310、315.1280、251.1644、179.0313	q	苯丙素	[5]

续表 1

峰号	化合物	化学式	离子模式	<i>m/z</i> 理论值	<i>m/z</i> 实测值	$\delta/ \times 10^{-6}$	<i>t_R</i> /min	二级碎片离子	来源	类别	文献
71	诃子林鞣酸	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₇	[M-H] ⁻	955.1058	955.1051	-0.7512	8.90	937.3085、803.2325、785.2575、767.2589、651.2458、633.2950、337.9863	b、d、c	鞣质	[12]
72	neocarthamin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.1089	449.1069	-4.5132	8.92	329.0576、287.0529、269.1447	a	黄酮	[36]
73	肉桂酸甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	[M-H] ⁻	161.0608	161.0606	-1.1927	9.23	117.1129	j	苯丙素	[37]
74	对羟基苯乙酮	C ₈ H ₈ O ₂	[M-H] ⁻	135.0452	135.0451	-0.3334	9.44	120.2020、117.1854、91.0149	q	其他	[38]
75	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.0878	353.0870	-2.1917	9.50	191.0555、179.0301、173.0523、135.0117	t、u	苯丙素	[17]
76	山柰酚-3- <i>O</i> - β -D-葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	461.0726	461.0714	-2.6024	9.64	415.2107、285.0389	x	黄酮	[39]
77	黄樟素	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	[M-H] ⁻	161.0608	161.0606	-1.1927	9.84	133.0111、115.1063	j	其他	[40]
78	异荛苁苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.0933	447.0920	-2.7712	10.04	429.1020、411.0630、357.0625、339.0848、327.0526、285.0440	r	黄酮	[41]
79	丁香脂素	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	[M-H] ⁻	417.1555	417.1546	-2.1286	10.05	402.1280、387.1687、181.0239、165.9682、150.9721	p、d、x、c	苯丙素	[42]
80	香叶木素-7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷*	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+H] ⁺	463.1235	463.1220	-3.2632	10.20	301.0535、153.0858	q	黄酮	[43]
81	大波斯菊苷*	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.0984	431.0963	-4.6996	10.22	341.0970、311.0531、269.0882、150.9725	m、r、q	黄酮	[44]
82	3'- <i>O</i> -甲基鞣花酸-4- <i>O</i> -鼠李糖苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	461.0726	461.0714	-2.6024	10.29	446.1282、315.0968	x	鞣质	[39]
83	柯伊利素-7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+H] ⁺	463.1235	463.1220	-3.2632	10.42	301.0508、153.0331	q	黄酮	[45]
84	圣草酚-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.1089	449.1069	-4.5132	10.48	329.0400、287.0452	n	黄酮	[37]
85	乌奴龙胆苷 D	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	511.1457	511.1449	-1.5299	10.58	467.1744、349.1190、152.9979	v	萜类	[46]
86	阿福豆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.0984	431.0963	-4.6996	11.02	285.0502、255.0298、227.0431	u	黄酮	[21]
87	6-hydroxykaempferol-di- <i>O</i> -glucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	[M+H] ⁺	627.1556	627.1537	-3.0192	14.14	609.2440、465.1401、385.0712、303.1434	a	黄酮	[47]
88	norathyriol	C ₁₃ H ₈ O ₆	[M-H] ⁻	259.0248	259.0240	-3.2958	15.05	231.1286、230.0893、215.0356、187.0647	p	黄酮	[48]
89	herpetetrone	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₃	[M-H] ⁻	729.2553	729.2535	-2.3585	17.35	711.2167、699.2231、681.2358、669.2626	g	苯丙素	[49]
90	去甲基雏菊叶龙胆酮*	C ₁₃ H ₈ O ₆	[M-H] ⁻	259.0248	259.0240	-3.2958	17.57	231.0919、230.1215、215.1081、203.0218、186.9501、151.0763、107.1646	p	黄酮	[50]
91	姜油酮	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	[M-H] ⁻	193.0870	193.0866	-2.1292	19.76	178.0696、175.0066	j	苯丙素	[51]
92	乔松素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.0663	255.0656	-2.8551	21.49	213.0126、150.9644	j	黄酮	[43]
93	1, 3, 8-三羟基-7-甲氧基咕吨酮	C ₁₄ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	273.0405	273.0398	-2.4358	21.71	258.0696	p	黄酮	[52]
94	1, 3, 8-三羟基-5-甲氧基咕吨酮	C ₁₄ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	273.0405	273.0398	-2.4358	22.75	258.0254	p	黄酮	[52]
95	阿江榄仁酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	[M-H] ⁻	487.3429	487.3416	-2.7019	25.36	469.3708、443.3362、425.3876、407.3242、391.3419	b、c	三萜	[53]
96	2 α , 3 α / β , 19 α -三羟基乌索-12-烯-28-酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	[M-H] ⁻	487.3429	487.3416	-2.7019	27.23	469.2720、443.3520、425.3338、406.9889、	k、c	三萜	[53]
97	异木香酸	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	[M-H] ⁻	233.1547	233.1542	-2.1217	30.80	189.1195	f	萜类	[24]
98	α -亚麻酸*	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻	277.2173	277.2166	-2.5855	31.95	233.2142	m、g、i、d、c、其他		[21]
99	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	279.2330	279.2323	-2.4378	33.36	235.2501	u b、m、g、d、w、其他		[44]
100	油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	281.2486	281.2478	-2.9432	35.21	265.1255	i g、m、g、d、o、其他		[42]
101	熊果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M-H] ⁻	455.3531	455.3521	-2.1713	35.23	437.3641、411.2937、395.8283、369.3552	q、i k、c、w、p、d、三萜 q、x、r、h		[41]

续表 1

峰号	化合物	化学式	离子模式	m/z 理论值	m/z 实测值	$\delta/ \times 10^{-6}$	t_R/ min	二级碎片离子	来源	类别	文献
102	齐墩果酸	$C_{30}H_{48}O_3$	[M-H] ⁻	455.3531	455.3521	-2.1713	35.98	437.2584、411.4828、407.3611、395.1744	c、k	三萜	[41]

注 (Note): a. 红花 (Carthamus tinctorius); b. 诃子 (Medicine terminalia); c. 毛诃子 (Terminaliae belliricae fructus); d. 余甘子 (Phyllanthi fructus); e. 藏木香 (Inulae racemosa); f. 木香 (Aucklandia lappa); g. 波棱瓜子 (Semenherpetospermi); h. 渣驯膏 (Faeces ochtonae erythrotis); i. 石榴子 (Semen punicae granati); j. 豆蔻 (Whitefruit amomim fruit); k. 木瓜 (Chaenomeles speciosa); l. 猪血粉 (Swine blood meal); m. 甘青青兰 (Dracocephalum tanguticum); n. 骨碎补 (Drynaria fortune); o. 芫荽 (Fructus coriandri sativa); p. 獐牙菜 (Herba swertiae mussoitii); q. 兔耳草 (Lagotis breviflora); r. 秦艽花 (Gentiana staminea); s. 榜嘎 (Bang ga); t. 角茴香 (Hypecoum leptum); u. 紫堇花 (Aster flaccidus); v. 乌奴龙胆 (Gentiane urnula); w. 绿绒蒿 (Herba meconopsis); x. 水柏枝 (Ramulus myricariae); y. 巴夏嘎 (Adhatoda vasica); * 为对照品比对的化合物 (*mean confirmed with standards)。

H-CO]⁻、[M-H-CO₂]⁻等中性碎片离子峰。峰 6 的保留时间为 1.21 min, 准分子离子峰 m/z 133.0141 [M-H]⁻, 同时丢失 H₂O 产生碎片离子 114.9936 [M-H-H₂O]⁻, 再接着丢失一分子 CO₂ 产生碎片离

子 71.0803 [M-H-H₂O-CO₂]⁻, 丢失一分子 HCOOH 产生碎片离子 87.0658 [M-H-HCOOH]⁻, 通过相关文献 [9] 比对, 可以确定峰 6 是苹果酸, 分子式为 C₄H₆O₅, 裂解规律如图 3 所示。

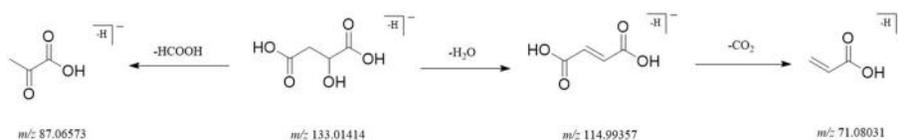


图 3 苹果酸的裂解规律途径

Fig 3 Fragmentation pathway of malic acid

3.3 苯丙素类

苯丙素类化合物是一类天然有机化合物, 其基本母核包含一个或多个 C6-C3 单元。这类化合物包括简单苯丙素、香豆素、木脂素等结构类型。本研究从二十五味大汤丸提取液中鉴定出了 16 种苯丙素类化合物, 其结构通常含有多个氧原子、甲氧基、羟基等与芳香环相连接, 因此在质谱中可能观察到一系列丢失羟基、羰基、水、甲基或甲氧基的碎片离子峰。峰 20 的保留时间为 3.23 min, 准分子

离子峰 m/z 353.0870 [M-H]⁻, 丢失 H₂O 产生碎片离子 335.1183 [M-H-H₂O]⁻、丢失 C₆H₇O₃ 产生碎片离子 191.0555 [M-H-C₆H₇O₃]⁻、再丢失 H₂O 产生碎片离子 173.0523 [M-H-C₆H₇O₃-H₂O]⁻、丢失 C₇H₁₂O₅ 产生碎片离子 179.0301 [M-H-C₇H₁₂O₅]⁻、再丢失 CO₂ 产生碎片离子 135.0111 [M-H-C₇H₁₂O₅-CO₂]⁻, 通过对照品和相关文献 [17] 比对, 可以确定峰 20 是绿原酸, 分子式为 C₁₆H₁₈O₉, 裂解规律如图 4 所示。

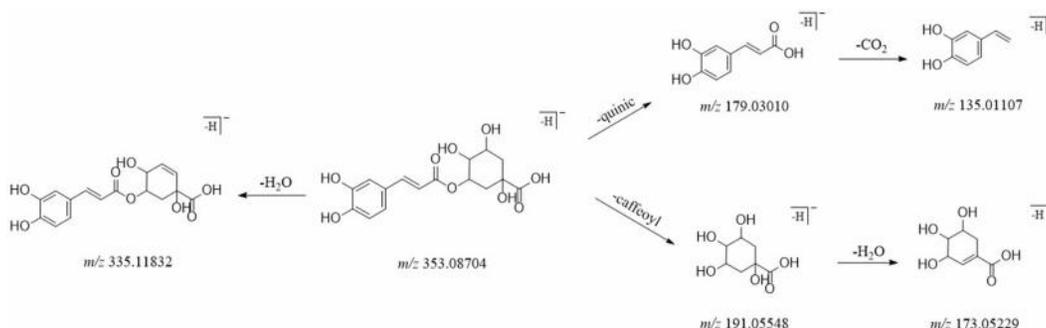


图 4 绿原酸的裂解规律途径

Fig 4 Fragmentation pathway of chlorogenic acid

3.4 萜类及三萜类

萜类是一类母核具有一个或多个异戊二烯结构首尾相连的聚合物及其衍生物的天然有机化合物, 本研究从二十五味大汤丸提取液中鉴定出了 12 种萜类及三萜类化合物。峰 95 的保留时间为 25.36 min, 准分子离子峰 m/z 487.3416 [M-H]⁻, 丢失 H₂O、CO₂

分别产生碎片离子 469.3708 [M-H-H₂O]⁻、443.3362 [M-H-CO₂]⁻、同时丢失 CO₂ 和 H₂O 产生碎片离子 425.3876 [M-H-CO₂-H₂O]⁻、同时丢失 CO₂ 和两分子 H₂O 产生碎片离子 407.3242 [M-H-CO₂-2H₂O]⁻, 通过相关文献 [53] 比对, 可以确定峰 95 是阿江榄仁酸, 分子式为 C₃₀H₄₈O₅, 裂解规律如图 5 所示。

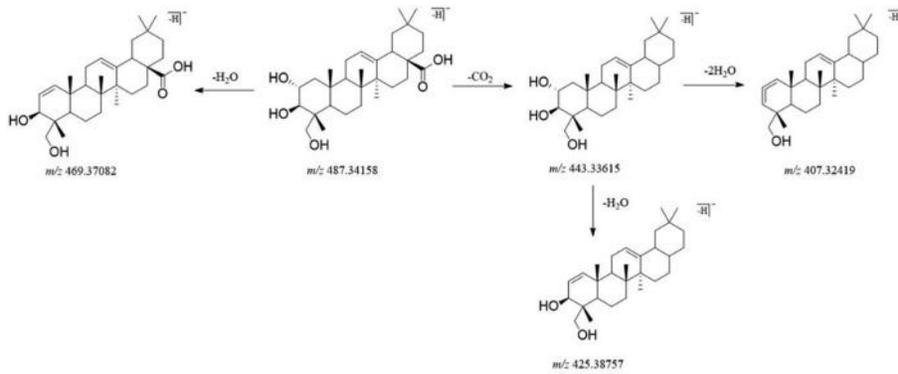


图 5 阿江榄仁酸的裂解规律途径

Fig 5 Fragmentation pathway of arjunolic acid

3.5 鞣质类化合物

鞣质类化合物也称为单宁类化合物，是植物多酚化合物，由没食子酸或其聚合物的葡萄糖、其他多元醇酯、黄烷醇及其衍生物组成。从二十五味大汤丸提取液中鉴定出了 10 种鞣质类化合物，鞣质类化合物结构中含有六羟基二苯甲酰基结构 (HHDP)，分子质量为 302，负离子模式下会丢失一个氢，产生

m/z 301 的特征碎片。峰 34 保留时间为 4.85 min，准分子离子峰 m/z 633.0717 $[M-H]^-$ ，丢失一个没食子酸产生碎片离子 463.0073 $[M-H-gallic]^-$ 、丢失一分子没食子葡萄糖单元产生特征碎片离子 HHDP 300.9724 $[M-H-galloyglucose]^-$ ，通过对照品和相关文献^[12] 比对，可以确定峰 34 是柯里拉京，分子式为 $C_{27}H_{22}O_{18}$ ，裂解规律如图 6 所示。

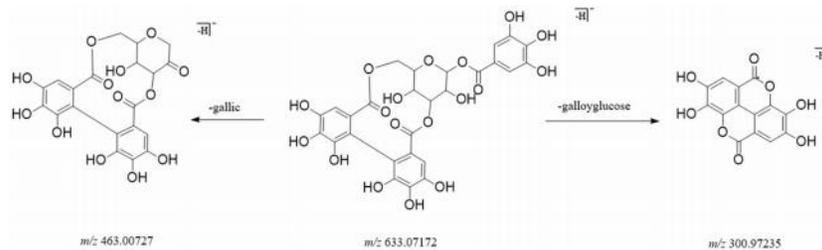


图 6 柯里拉京的裂解规律途径

Fig 6 Fragmentation pathway of corilagin

3.6 其他类

在负离子模式下，从二十五味大汤丸中鉴定出 9 种其他类化合物。峰 14 保留时间为 2.02 min，准分子离子峰 m/z 164.0716 $[M-H]^-$ ，丢失一分子氨基产生碎片离子 147.0235 $[M-H-NH_3]^-$ 、丢失一分子羰基

产生碎片离子 120.0612 $[M-H-CO_2]^-$ 、继而丢失一分子氨基产生碎片离子 103.1494 $[M-H-NH_3-CO_2]^-$ ，通过相关文献^[5] 比对，可以确定峰 14 是 L-苯丙氨酸，分子式为 $C_9H_{11}NO_2$ ，裂解规律如图 7 所示。

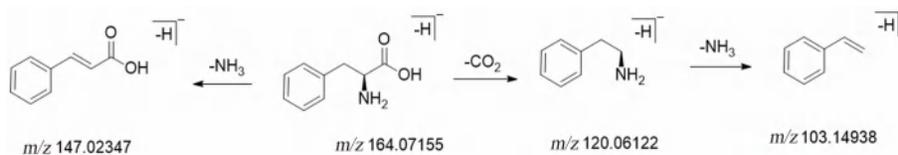


图 7 L-苯丙氨酸的裂解规律途径

Fig 7 Fragmentation pathway of L-phenylalanine pathway

4 讨论

复方的中药物质基础研究一直以来都是中药现代研究的热点和难点，这些药物的有效成分是由多种复杂成分组合而成的，这些成分共同发挥作用。UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 同时具备离子阱质谱的多级碎裂和 Orbitrap 的高分辨功能，具有高灵敏度、高分辨率和精确分子测定等优点，能通过一次进样高通量完成对复杂化学成分的鉴定，

是分析鉴定中药复杂体系中化学成分最前沿的技术之一。实验通过使用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 现代分析技术快速分析了藏成方二十五味大汤丸的主要化学成分，共鉴定出了 102 个化合物，涵盖黄酮类、有机酸类、苯丙素类、萜类及三萜类、鞣质类等多种类型的化合物。总结的各类化合物的裂解规律可为二十五味大汤丸后续成分研究以及同类化合物的鉴定提供一定的参考依据。

现代药理研究表明,黄酮类成分大波斯菊苷、紫云英苷具有抗肿瘤活性,大波斯菊苷还具有促进乳腺癌细胞自噬的能力,能抑制乳腺癌的发展^[54]。有机酸类化合物没食子酸具有抗氧化作用,能够减轻氧化应激并抑制炎症反应^[55]。五环三萜类化合物熊果酸具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等多种药理活性且毒性小^[56],单萜中的环烯醚萜苷类马钱苷酸具有保肝、抗炎镇痛、抑菌、抗氧化等活性^[57]。苯丙素类化合物咖啡酸具有降低血糖、消炎抗菌、抗氧化、抗凋亡等多种药理活性,对急性肺损伤具有保护作用^[58]。鉴定出的化合物涵盖了二十五味组方药材的活性成分,归属成分较多的藏药主要是诃子、毛诃子、余甘子、獐牙菜、木瓜等,组方中这些成分所占比重比例也比较多。

二十五味大汤的组方中的二十五味药,红花和诃子为君药,而藏木香、骨碎补、木瓜、余甘子等为辅药。方中各味药配伍,其性味以辛、温、苦、寒为主,能够温中和胃、收敛止血、祛瘀止痛、清热解毒。君药红花性温,能够疏通经络、活血化瘀、缓解疼痛,对因出血后的机体虚弱情况具有改善作用;毛诃子味甘涩、性平,能够收敛养血、调和诸药。藏木香性温,具有健脾和胃的作用,与木瓜、木香、甘青青兰、獐牙菜、紫菀花等几味药合用可有效保护肺、脾、胃等重要脏器功能;余甘子、猪血粉、石榴子、巴夏嘎味酸涩、性温,有止血功效,对胃溃疡出血症状能够有效控制;獐牙菜、榜嘎、绿绒蒿、波棱瓜子、兔耳草、角茴香几味藏药性凉寒,具有清热、解毒的功效,能够降低机体的炎症反应,改善症状;渣驯膏作为一味矿物药,清除胃中邪热,对胃溃疡具有重要治疗作用^[59]。二十五味大汤中的各种藏药的合理配伍,有效改善胃溃疡出血症状,治疗胃溃疡,并抑制病情发展,实现对机体的整体性调节。因此,对藏药成分的深入分析有助于了解其药理作用及临床应用。UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术能够系统、准确地对二十五味大汤丸的化学成分进行表征,为进一步开展该方的药代动力学和药效物质基础研究提供了数据支持,为临床应用提供了理论基础。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典委员会. 卫生部药品标准藏药[S]. 第一册. 1996: 144.
 [2] 叶本贵, 吴娅, 阿萍, 等. 二十五味大汤丸中药材的鉴别及羟基红花黄色素 A 的测定[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(2): 152-154.
 [3] 青海省藏药检验所. 中国藏药[M]. 第一卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 1-24.
 [4] 周婷. 液质联用在中药复方研究中的应用[J]. 山东化工,

2016, 45(11): 63-64.
 [5] 雷星, 王小平, 张艳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的建昌帮砂仁陈皮制熟地黄适宜炮制时间分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(4): 134-143.
 [6] 李君, 顾艳丽, 张谦, 等. 基于 HPLC-Q-Exactive MS 的蒙药那如-3 醇提物成分分析[J]. 中药材, 2022, 45(10): 2403-2410.
 [7] 熊佩, 李凯琳, 龚开妍, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术的血藤果化学成分分析[J]. 中国药业, 2021, 30(18): 55-60.
 [8] 李泮霖, 黄昕, 云莎, 等. 基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术的银杏叶提取物注射液化学物质基础研究[J]. 中南药学, 2017, 15(5): 573-579.
 [9] 武俊颖, 张武岗, 郎一帆, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的芒果核化学成分分析[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(6): 949-965.
 [10] Chumbalov T, Bukbulatova T, Il' yasova M. Polyphenols of *Myricaria alopecuroides*: III. Hydrolyzable tanning substances[J]. Chem Nat Compd, 1976, 12(1): 127-128.
 [11] 盛节英, 周洪雷, 周倩, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析宣木瓜饮片化学成分[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4773-4779.
 [12] 策力木格, 许良, 松林, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术结合序贯代谢法研究诃子汤炮制草乌机理[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(8): 2995-3013.
 [13] 张秋楠, 常子豪, 叶婷, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 整合网络药理学研究藏药大三果化学成分及作用机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(6): 1850-1866.
 [14] 周群, 曾弦, 黄丹, 等. 骨碎补化学成分和生物活性研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(8): 2727-2741.
 [15] 陈金梅, 廖锦红, 高金薇, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究胆木药材水提物的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 49-56.
 [16] 陈美庆, 朱卫丰, 管咏梅, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析葛根配方颗粒的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(19): 176-186.
 [17] 董世奇, 赵鹿, 张东旭, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的扎冲十三味丸化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1546-1557.
 [18] 李晓娜, 董馨, 李娜, 等. 四味土木香散化学成分 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 高分辨质谱快速分析鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 121-131.
 [19] 王新雷, 王乃利, 黄文秀, 等. 骨碎补中的苯丙素类成分及其对 UMR 106 细胞增殖作用的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(1): 24-29.
 [20] 刘茜, 付娟, 胡军华, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术咳喘宁颗粒化学成分分析及多指标定量测定[J]. 药物评价研究, 2023, 46(5): 1012-1023.
 [21] 肖岩, 马博稷, 李冰涛, 等. 青钱柳醇提物中化学成分的 UHPLC-Q-TOF/MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(16): 196-204.
 [22] Wen C, Wang DS, Li X, et al. Targeted isolation and identification of bioactive compounds lowering cholesterol in the crude extracts of crabapples using UPLC-DAD-MS-SPE/NMR based on pharmacology-guided PLS-DA[J]. J Pharm Biomed,

- 2018, 150: 144-151.
- [23] Joung U, Lee J, Nam JW, et al. Identification of a new isomer of dihydrophaseic acid 3'-O- β -D-glucopyranoside from *Nelumbo nucifera* [J]. B Korean Chem Soc, 2011, 32: 4083-4085.
- [24] 梁艳. 基于 LC-MS 和代谢组学的二十五味珍珠丸的体内成分定性定量和抗线粒体凋亡治疗脑缺血机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2023.
- [25] 罗玉婷, 曾宇骄, 彭家艳, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术的藏药吉尼德协化学成分分析研究 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31 (17): 1727-1735.
- [26] 朱高峰, 陈瑞, 王建塔, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速鉴定截叶铁扫帚中化学成分 [J]. 药物化学, 2021, 9 (2): 35-43.
- [27] Olennikov DN. Separation, characterization and mammal pancreatic lipase inhibitory potential of cucumber flower flavonoids [J]. Separations, 2023, 10 (4): 255.
- [28] 李国萍. 色谱-质谱联用技术在石榴籽等样品分析中的应用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [29] 李帅, 陈若芸, 于德泉. 三春水柏枝化学成分的研究 I [J]. 中国中药杂志, 2007, 22 (5): 403-406.
- [30] 范莉, 赵海誉, 濮润, 等. 红花的黄酮类化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46 (5): 333-337.
- [31] 门磊, 侯梦阳, 胡文忠. 基于 LC-LTQ-Orbitrap/MS 的复方木鸡颗粒成分分析 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (6): 1048-1057.
- [32] 李雨蔚, 李荣娇, 袁绿益, 等. 西藏秦艽花的化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46 (14): 2052-2056.
- [33] Wang XL, Wang NL, Zhang Y, et al. Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SM. on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell line [J]. Chem Pharm Bull, 2008, 56 (1): 46-51.
- [34] 王梦, 田伟, 甄亚钦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的彝族药姜味草化学成分分析 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57 (20): 1717-1725.
- [35] 牟德华, 胡高爽, 李存满. UPLC/Q-TOF MS/MS 负离子模式下环氧烷型环烯醚萜苷的结构表征 [J]. 质谱学报, 2019, 40 (2): 197-207.
- [36] Hong B, Wang Z, Xu TJ, et al. Matrix solid-phase dispersion extraction followed by high performance liquid chromatography-diode array detection and ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometer method for the determination of the main compounds from *Carthamus tinctorius* L. (Hong-hua) [J]. J Pharm Biomed, 2015, 107: 464-472.
- [37] 苟晓玲, 丁银, 罗玉婷, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱的藏药圆柏子化学成分分析研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2023, 46 (3): 22-30.
- [38] 于红红, 高晓燕. 基于 UPLC-Q-TOF/MS^E 快速分析茵陈中化学成分 [J]. 中南药学, 2019, 17 (5): 656-661.
- [39] 武鑫玥, 丁银, 赵程成, 等. UPLC-Q-TOF/MS 法鉴定不同基原水柏枝的化学成分 [J]. 中成药, 2023, 45 (11): 3656-3662.
- [40] 周洁, 汤维维, 陈君. 基于 UPLC-QTOF-MS/MS 法的茅苍术与北苍术化学成分分析 [J]. 药学与临床研究, 2020, 28 (5): 321-328.
- [41] 熊波, 桑吉东知, 倪梁红, 等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术分析藏药粗壮秦艽的化学成分 [J]. 西北药学杂志, 2023, 38 (4): 1-8.
- [42] 罗林, 张晏源, 王程, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 联合网络药理学探讨驱虫斑鸠菊注射液诱导黑色素积累的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (6): 1606-1619.
- [43] 续艳丽, 李晨曦, 杨飞霞, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析经典名方芍药甘草汤的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37 (6): 938-948.
- [44] 龙红萍, 易健, 蔺晓源, 等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术的复方钩藤降压片化学成分分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34 (3): 396-403.
- [45] 张晨辉, 李敏, 谢雄雄, 等. 短管兔耳草化学成分的研究 (II) [J]. 中成药, 2020, 42 (1): 107-111.
- [46] 付林, 古锐, 张彩虹, 等. 藏药大花龙胆正丁醇部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49 (5): 1002-1006.
- [47] 王松松, 马艳, 张毅, 等. UHPLC-MS/MS 快速鉴别红花中的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (7): 1347-1354.
- [48] Guo X, Chen MC, Hu P, et al. Absorption, metabolism, and pharmacokinetics profiles of norathyriol, an aglycone of mangiferin, in rats by HPLC-MS/MS [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66 (46): 12227-12235.
- [49] Kaouadji M, Favre-Bonvin J, Sarrazin F, et al. Herpetrone, another tetrameric lignoid from *Herpetospermum caudigerum* seeds [J]. J Nat Prod, 1987, 50: 1089-1094.
- [50] 段吉平, 段琼, 王铁战, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的当药化学成分分析 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (7): 1182-1189.
- [51] 陶巧凤. 生姜化学成分和水飞蓟宾衍生物的分析与活性评价 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [52] 董惠敏, 许如玲, 陈晓青, 等. 印度獐牙菜中 (口山) 酮类成分的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37 (5): 744-749.
- [53] Dixin Z, Jinfeng W, Bo Z, et al. Analysis of chemical constituents in Wuzi-Yanzong-Wan by UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS [J]. Molecules, 2015, 20 (12): 21373-21404.
- [54] 汪丹, 潘燕. 大波斯菊苷通过诱导乳腺腺细胞自噬抑制乳腺癌的发展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35 (10): 750.
- [55] 郑时旭, 陈丽, 丁雅容, 等. 没食子酸激活 Nrf-2 信号通路降低高糖诱导 NIH-3T3 细胞氧化应激与炎症反应 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40 (2): 78-84.
- [56] Li W, Zhang HX, Nie MX, et al. A novel synthetic ursolic acid derivative inhibits growth and induces apoptosis in breast cancer cell lines [J]. Oncol Lett, 2018, 15 (2): 2323-2329.
- [57] Abirami A, Sinsinwar S, Rajalakshmi P, et al. Antioxidant and cytoprotective properties of loganic acid isolated from seeds of *Strychnos potatorum* L. against heavy metal induced toxicity in PBMC model [J]. Drug Chem Toxicol, 2022, 45 (1): 239-249.
- [58] 孙雅丽. 咖啡酸对脂多糖诱导急性肺损伤的保护作用及机制研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2022.
- [59] 邱建智. 藏药学基础理论与方剂配伍规律的探析 [J]. 西部中医药, 2013, 26 (1): 64-67.

(收稿日期: 2024-04-17; 修回日期: 2024-06-19)

槲皮素 -3'-O- 乙基衍生物的设计、合成与抗结肠癌活性研究

刘翠婷^{1,3}, 程卉^{2*} (1.安徽中医药大学 药学院, 合肥 230012; 2.安徽中医药大学 科研技术中心, 合肥 230012; 3.长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133)

摘要: **目的** 设计和合成槲皮素 -3'-OH 位衍生物, 初步筛选抗结肠癌活性更强的槲皮素衍生物。**方法** 以槲皮素为先导化合物, 在槲皮素 -3'-OH 位连接不同长度的烷烃链, 再通过酰胺键或磺酰胺键连接不同类型的片段基团, 设计合成一系列槲皮素衍生物并对上述化合物进行抗肿瘤活性测试。**结果** 设计合成了 11 个槲皮素衍生物 QCT-001 ~ QCT-011, 大部分化合物都具有较好的抗肿瘤活性, 其中 QCT-009 的抑制肿瘤活性最佳, IC_{50} 为 11.25 ~ 23.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论** 通过对槲皮素 -3'-OH 位进行片段生长、增大分子结构的修饰策略提高槲皮素抗肿瘤活性具备一定可行性, 为后续研究该类化合物的合成研究提供了实验基础。

关键词: 槲皮素; 衍生物; 抗肿瘤; 分子对接

中图分类号: R285, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3149-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.004

Design, synthesis, and anti-colon cancer activity of quercetin-3'-O-ethyl derivatives

LIU Cui-ting^{1,3}, CHENG Hui^{2*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Research and Technology Center, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 3. Drug Research Institute of Yangtze Delta, Nantong Jiangsu 226133)

Abstract: Objective To design and synthesize derivatives of quercetin-3'-OH with the aim of preliminary screening for quercetin derivatives displaying stronger anti-colon cancer activity. **Methods** Quercetin was utilized as the lead compound to connect various lengths of alkyl chains at 3'-OH position. Different types of fragment groups were linked via amide or sulfonamide bonds. A series of quercetin derivatives were designed, synthesized, and subjected to anti-tumor activity testing. **Results** Totally 11 quercetin derivatives QCT-001 ~ QCT-011 were successfully designed and synthesized, with most of the compounds exhibiting good anti-tumor activity. Among them, QCT-009 demonstrated the highest inhibitory activity with an IC_{50} ranging from 11.25 to 23.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** The strategy of fragment growth and structural modification at 3'-OH position of quercetin shows promise in enhancing its anti-tumor activity. This study provides an experimental foundation for further research on the synthesis of such compounds.

Key words: quercetin; derivative; anti-tumor; molecular docking

结肠癌作为消化系统中常见的恶性肿瘤, 是全球四大常见恶性肿瘤之一, 也是第五大癌症死因^[1]。研究发现, 当 Wnt/ β -catenin 信号通路被异常激活时, 细胞内的 β -catenin 蛋白无法被破坏蛋白复合物水解, 进而发生核易位, 激活下游 *c-myc*、*Axin2*、*Cyclin D1* 等癌症相关的靶基因, 在结肠癌的形成、侵袭和复发中充当着关键角色^[2-3]。大量

研究表明, 抑制 β -catenin 对下游靶基因的激活, 可以有效抑制肿瘤生长。Wnt 通路上游靶标易导致严重的毒副作用, 因此近十几年人们逐渐把目光集中在 Wnt 信号通路的下游阶段。其中 *BCL9* (B-cell lymphoma 9) 作为 Wnt 信号通路的诱导基因之一, 在 Wnt 信号通路组成异常活跃的结肠癌细胞核内高表达^[4]。后续科研人员通过进一步基因耗竭实验

作者简介: 刘翠婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药活性成分结构修饰与改造研究, email: ctliu1210@163.com *通信作者: 程卉, 女, 副研究员, 主要从事中药及活性成分抗肿瘤作用研究, email: chenghuiyuzx@ahtcm.edu.cn

和小鼠实验证实, *BCL9* 的缺失能降低肿瘤中 Wnt 信号传导, 减少结肠癌细胞中 Wnt 靶基因的表达, 但对正常细胞没有明显影响^[5-6]。由此可知靶向 β -catenin/*BCL9* 是 Wnt 信号通路上一个具有开发潜力的抗结肠癌的靶点, 目前已报道了该领域多个相关的小分子抑制剂, 例如 PNPB-29^[7]、ZW4864^[8]、C41^[9] 等。除此之外, 鼠尾草酸^[10]、槲皮素^[11]、姜黄素^[12] 等天然产物也陆续被发现能阻断 β -catenin/*BCL9* 蛋白-蛋白相互作用。通过结构修饰, 这些化合物成为具有抗结肠癌作用的潜在先导化合物。本研究选择槲皮素作为先导化合物进行研究。

槲皮素 (quercetin, QCT) 作为一种多羟基黄酮类化合物, 是多种中药的重要有效成分, 具有极高的药用价值, 在抗肿瘤药物领域被广泛研究。目前主要作为一种膳食补充剂在美国上市。根据既往研究报道, QCT 抗肿瘤的分子机制复杂, 能通过多种途径抑制肿瘤的生长, 例如影响线粒体完整性和扰乱活性氧 (ROS) 稳态, 抑制 β -catenin 核易位, 阻断 Wnt 信号通路的传导等^[13-14]。近期研究发现, QCT 及其衍生物能靶向阻断 β -catenin/*BCL9* 蛋白-蛋白相互作用, 经荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 检测 IC_{50} 为 $10.08 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 具有较好的抗肿瘤活性, 这一研究不仅为 β -catenin/*BCL9* 小分子抑制剂领域增加了新的结构骨架, 同时也为 QCT 的抗肿瘤作用机制提供了新的研究思路^[11]。

在 β -catenin/*BCL9* 抑制剂的研究中, Shen 等^[11] 以 QCT 作为先导化合物, 通过在不同羟基位点延长分子片段并连接不同的亲水基团, 发现 3'-OH 位可能是 QCT 合适的取代位置 (见图 1A), 能显著提高 QCT 衍生物的抗肿瘤活性。通过对 β -catenin/*BCL9* (PDB ID: 2GL7) 结合位点的进一步分析, 可得知 β -catenin N 端的结合口袋由残基 D145、A149、A152、L156、L159、L160、V167、A171、M174、L178、K181 组成, 具有较大的空腔结构并且以疏水相互作用为主, 是一个适合药物设计的停靠位点 (见图 1B)^[15-16]。目前大多数 β -catenin/*BCL9* 抑制剂的主要研发思路是通过设计修饰, 使配体与蛋白之间产生稳定的氢键相互作用以及增强其对蛋白疏水空腔的填充作用以达到较好的结合活性^[17]。将 QCT 与 β -catenin 蛋白进行分子对接, 推测 QCT 分子骨架较小, 无法充分占据 β -catenin 的疏水空腔 (见图 1C), 因此选用片段生长, 连接亲水基团等修饰策略更好地适配蛋白的疏水口袋, 提高配体与靶蛋白的结合能力。考虑到 β -catenin N 端的结合位点是以疏水相互作用为主导, 因此本研究将继续探索在槲皮素的 3'-OH 位进行修饰的可能性, 沿用片段拼接的

方式, 延长烷烃链的长度连接不同的疏水基团片段填充上方疏水口袋, 增强其与 β -catenin 蛋白的疏水相互作用。除此之外, 参考其他的 β -catenin/*BCL9* 抑制剂结构, 多选用酰胺键和磺酰胺键连接片段基团, 因此在后续设计上选择引入酰胺键和磺酰胺键作为烷烃链与疏水片段的连接器。为了评估该分子设计的可行性, 本研究使用 QCT 作为起始化合物, 合成了 11 个槲皮素衍生物, 并进行抗结肠癌活性测试。最后通过分子对接模拟, 预测其与 β -catenin 的结合方式以及相互作用。

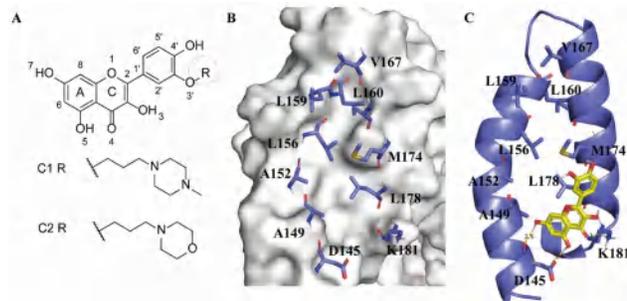


图 1 QCT 与 β -catenin 结合位点的作用

Fig 1 Role of QCT with the β -catenin binding site

A. QCT 及其衍生物结构 (structures of QCT and its derivatives); B. β -catenin/*BCL9* 结合位点关键残基 (key residues of β -catenin/*BCL9* binding site); C. QCT 与 β -catenin 的对接结果 (docking results of QCT with β -catenin)

1 材料

DF-101S 集热式加热磁力搅拌器 (上海仪昕科学仪器有限公司); Bruker NMR 400 MHz 型核磁共振仪 [DMSO- d_6 为溶剂, 四甲基硅烷 (TMS) 为内标, 德国 Bruker 公司]; UPLC-MS 质谱仪 (Waters 中国有限公司); 旋转蒸发器 (EYELA 东京理化器械株式会社); 硅胶 (200 ~ 300 目, 青岛海洋, 为快速柱层析固定相); 制备液相色谱仪 (江苏汉邦科技有限公司), 多功能酶标仪 (珀金埃尔默仪器)。槲皮素 (含量: 98%, 上海麦克林生化科技有限公司), 其余试剂都为市售溶剂, 且均为分析纯或化学纯产品。人结肠癌 HCT-116 细胞、SW-480 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司), 小鼠结肠癌 CT-26 细胞 (南京科佰生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 目标化合物合成路线

将 QCT 和溴化苄 (BnBr) 反应进行选择保护得到 S1, S1 经 Williamson 醚化反应与不同长度的烷烃链连接得到 S2 ~ S3。随后在三氟乙酸 (TFA) 的作用下脱去 S2 ~ S3 上的 Boc 后得到 S4 ~ S5, S4 ~ S5 与羧酸类化合物进行酰胺缩合反应得到 S6 ~ S12, 或者 S5 与磺酰氯类化合物在碱性条件下发生亲核取代生成 S13 ~ S15。其中 S12 ~ S14 与不同的硼酯类化

合物通过 Suzuki 偶联反应得到 **S16** ~ **S19**。最后 **S6** ~ **S11**、**S15** ~ **S19** 通过氢化反应脱去苄基得到终产物 **QCT-001** ~ **QCT-011** (见图 2)。

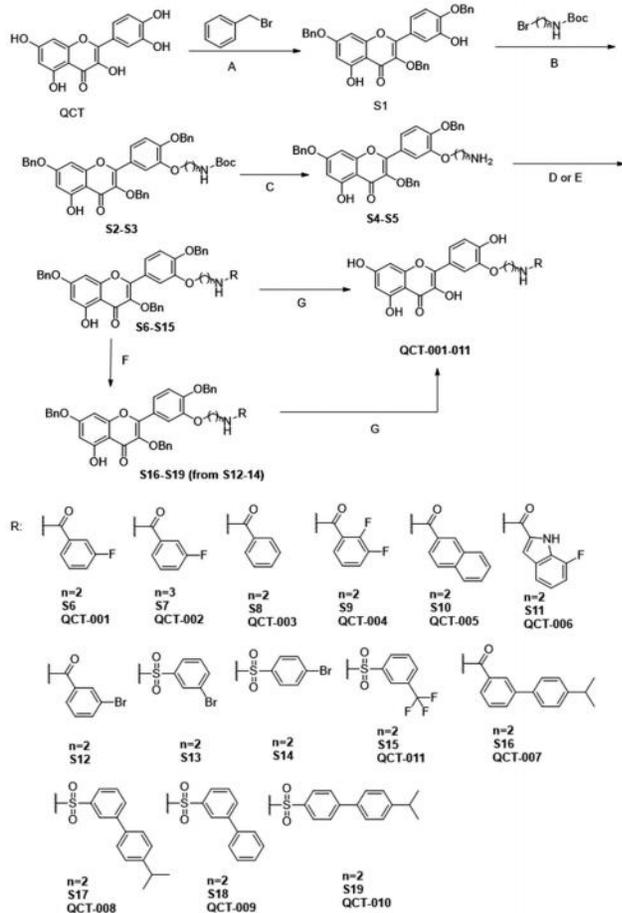


图 2 槲皮素衍生物 **QCT-001** ~ **QCT-011** 合成路线

Fig 2 Synthesis route of quercetin derivatives **QCT-001** ~ **QCT-011**

A. 碳酸钾, *N,N*-二甲基甲酰胺, 室温, 12 h (K_2CO_3 , DMF, rt, 12 h); B. 碳酸钾, *N,N*-二甲基甲酰胺, 60 °C, 12 h (K_2CO_3 , DMF, 60 °C, 12 h); C. 三氟乙酸, 二氯甲烷, 室温, 1 h (TFA, DCM, rt, 1 h); D. *N,N*-二异丙基乙胺, 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯, *N,N*-二甲基甲酰胺, 室温, 5 h (DIPEA, HATU, DMF, rt, 5 h); E. *N,N*-二异丙基乙胺, 二氯甲烷, 0 °C 升至室温, 6 h (DIPEA, DCM, 0 °C to rt, 6 h); F. 碳酸钾, 1, 1'-双二苯基膦二茂铁二氯化钯, 1, 4-二氧六环-乙醇-水 (5 : 2 : 1), 85 °C, 12 h [K_2CO_3 , Pd (dppf) Cl_2 , 1, 4-dioxane-EtOH-H₂O (5 : 2 : 1)], 85 °C, 12 h; G. 10% 氢氧化钯炭, 乙醇-四氢呋喃 (1 : 1), 50 °C, 12 h [10% Pd (OH)₂/C, EtOH/THF (1 : 1), 50 °C, 12 h].

槲皮素系列衍生物使用 QCT 作为原料, 通过苄基保护、醚化、TFA 脱保护、酰胺缩合或亲核取代、Suzuki 偶联反应得到一系列中间体, 最后氢化脱去苄基得到了 11 个槲皮素 3'-OH 位取代衍生物。氢化反应中选择了 10% Pd (OH)₂/C 作为催化剂。在实验条件探索的过程中, 发现 10% Pd/C 的脱氢效率较低, 反应产物较杂, 而 Pd (OH)₂/C 对于苄基的脱除效果更为纯净。同时

通过条件优化, 在 50 °C 的温度下反应效率更高, 12 h 后反应基本完成。除此之外在反应体系中添加 3 滴浓盐酸有助于提供质子, 将苄基羟基转化为羟基, 同时还能帮助催化反应的进行, 更有利于保护基的脱去。

2.2 目标化合物 **QCT-001** ~ **QCT-011** 的合成

2.2.1 化合物 **S1** 的合成

将 **QCT** (2.00 g, 6.62 mmol)、 K_2CO_3 (1.83 g, 13.25 mmol) 溶于 40 mL DMF 中, 缓慢滴加 BnBr (3.51 g, 20.52 mmol), 常温反应 12 h, 反应完成后经 TLC 板检测, 向反应液中加入 100 mL 水, 用 30 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相得到粗产品。粗产品经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚-二氯甲烷 = 2 : 1, *V/V*), 最终得到黄色固体 **S1** (1.99 g, 产率为 52.5%)。MS (ESI) *m/z*: 573.6[M + H]⁺。

2.2.2 化合物 **S2** ~ **S3** 的合成 (以 **S2** 为例)

将 **S1** (1.00 g, 1.75 mmol)、 K_2CO_3 (0.48 g, 3.51 mmol)、*N*-Boc-溴乙胺 (0.47 g, 2.10 mmol) 溶于 20 mL DMF 中, 60 °C 反应 12 h, 反应完成后经 TLC 板检测, 向反应液中加入 50 mL 水, 用 15 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相得到粗产品。粗产品经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚-二氯甲烷 = 3 : 1, *V/V*), 最终得到黄色固体 **S2** (1.05 g, 产率为 84.0%)。MS (ESI) *m/z*: 716.7[M + H]⁺。**S3** 参照此法合成。

2.2.3 化合物 **S4** ~ **S5** 的合成 (以 **S4** 为例)

将 **S2** (1.00 g, 1.39 mmol) 溶于 12 mL DCM/TFA (3 : 1) 中, 室温反应 1 h, 反应完成后经 TLC 板检测, 减压蒸除溶剂, 将得到的残留物用饱和 Na_2CO_3 溶液调 pH 至 8 ~ 9, 用 15 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相并得到微黄色油状物 **S4** (0.82 g, 产率为 95.0%)。MS (ESI) *m/z*: 616.5[M + H]⁺。**S5** 参照此法合成。

2.2.4 化合物 **S6** ~ **S12** 的合成 (以 **S6** 为例)

将 **S4** (0.30 g, 0.49 mmol), 间氟苯甲酸 (0.08 g, 0.54 mmol), HATU (0.20 g, 0.54 mmol), DIPEA (0.07 g, 0.54 mmol) 溶于 5 mL DMF 中, 室温反应 5 h, 反应完成后经 TLC 板检测, 向反应液中加入 20 mL 水, 用 15 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相得到粗产品。粗产品经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚-二氯甲烷 = 1 : 1, *V/V*), 最终得到黄色固体 **S6** (0.21 g, 产率为 58.3%)。MS (ESI) *m/z*: 738.5[M + H]⁺。**S7** ~ **S12** 参照此法合成。

2.2.5 化合物 **S13** ~ **S15** 的合成 (以 **S13** 为例)

将 **S4** (0.60 g, 0.97 mmol), DIPEA (0.40 g, 1.08 mmol) 溶于 15 mL 无水二氯甲烷中, N_2 保护, 3-溴苯磺酰氯 (0.28 g, 1.08 mmol) 溶于 5

mL 无水二氯甲烷中, 在 0 °C 的冰水浴中缓慢滴入反应体系中, 滴加完毕后升至室温, 反应 6 h, 反应完成后经 TLC 板检测, 加入 20 mL 水, 用 15 mL 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相得到粗产品。粗产品经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚-二氯甲烷 = 5 : 1, *V/V*), 最终得到黄色固体 **S13** (0.64 g, 产率为 78.0%)。MS (ESI) *m/z*: 834.4[M + H]⁺。 **S14** ~ **S15** 参照此法合成。

2.2.6 化合物 **S16** ~ **S19** 的合成 (以 **S18** 为例)

将 **S13** (0.30 g, 0.49 mmol), 苯硼酸频哪醇酯 (0.22 g, 1.10 mmol) 为原料, K₂CO₃ (0.08 g, 0.58 mmol), Pd (dppf) Cl₂ (0.02 g, 0.03 mmol) 溶于 16 mL 1, 4-dioxane/EtOH/H₂O (5 : 2 : 1) 中, N₂ 置换, 85 °C 反应 12 h, 反应完成后经 TLC 板检测, 终止反应后过滤, 减压浓缩滤液。粗产品经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 = 5 : 1, *V/V*), 最终得到黄色固体 **S18** (0.17 g, 产率为 51.6%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.67 (s, 1H), 8.13 ~ 8.03 (m, 2H), 7.91 (dt, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.85 (dt, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 8.2, 3.2 Hz, 4H), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.53 ~ 7.34 (m, 15H), 7.30 ~ 7.26 (m, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.22 (d, *J* = 4.5 Hz, 4H), 5.05 (s, 2H), 3.96 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.17 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H); MS (ESI) *m/z*: 832.7[M + H]⁺。 **S16** ~ **S17**, **S19** 参照此法合成。

2.2.7 化合物 **QCT-001** ~ **QCT-011** 的合成 (以 **QCT-001** 为例)

将 **S6** (0.21 g, 0.28 mmol), 10% Pd (OH)₂/C (0.06 g, 30% wt) 溶于 8 mL EtOH/THF (1 : 1) 中, 加入 3 滴浓盐酸, 0.4 MPa 50 °C 催化加氢反应 12 h, 经 HPLC 检测反应完成后, 减压过滤, 浓缩滤液得到黄色油状物。将得到的黄色油状物溶解于 10 mL 去离子水-乙腈 (MeCN) (1 : 6) 中, 用 C₁₈ 柱 (MeCN/H₂O, 0.01% TFA) 进行反相液相色谱纯化。将得到的水溶液冻干, 得到 3-氟-*N*-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)苯甲酰胺 (**QCT-001**), 黄色固体 (0.023 g, 产率 17.7%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.45 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.78 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.72 (dt, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 2H), 7.65 (dt, *J* = 10.1, 2.2 Hz, 1H), 7.53 (td, *J* = 8.1, 5.8 Hz, 1H), 7.38 (td, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 7.01 ~ 6.91 (m, 1H), 6.50 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.20 (d, *J* =

2.1 Hz, 1H), 4.18 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.71 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H); MS (ESI) *m/z*: 468.3[M + H]⁺。 **QCT-002** ~ **QCT-011** 参照此法合成。

3-氟-*N*-(3-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}丙基)苯甲酰胺 (**QCT-002**), 黄色固体 (0.031 g, 产率为 19.4%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.46 (s, 1H), 10.78 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 9.69 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.78 ~ 7.61 (m, 4H), 7.51 (td, *J* = 8.0, 5.8 Hz, 1H), 7.41 ~ 7.33 (m, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 19.6, 2.1 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.12 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.53 ~ 3.46 (m, 2H), 2.10 ~ 1.98 (m, 2H); MS (ESI) *m/z*: 482.3[M + H]⁺。

N-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)苯甲酰胺 (**QCT-003**), 黄色固体 (0.013 g, 产率为 14.4%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.45 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.69 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.86 (td, *J* = 4.8 Hz, 2.6 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.72 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.54 ~ 7.50 (m, 1H), 7.47 (dd, *J* = 8.2, 6.5 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.20 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 4.17 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.71 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H); MS (ESI) *m/z*: 450.5[M + H]⁺。

2, 3-二氟-*N*-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)苯甲酰胺 (**QCT-004**), 黄色固体 (0.021 g, 产率为 14.2%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.44 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 9.47 (d, *J* = 23.4 Hz, 2H), 8.70 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.79 ~ 7.67 (m, 2H), 7.57 (dtd, *J* = 9.9, 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.43 (ddt, *J* = 7.6, 5.9, 1.6 Hz, 1H), 7.29 (tdd, *J* = 8.1, 4.9, 1.5 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.16 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.71 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H); MS (ESI) *m/z*: 486.3[M + H]⁺。

N-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)萘-2-甲酰胺 (**QCT-005**), 黄色固体 (0.011 g, 产率为 13.1%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.45 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.86 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 1.6 Hz,

1H), 8.05 ~ 7.87 (m, 4H), 7.81 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.76 ~ 7.68 (m, 1H), 7.68 ~ 7.54 (m, 2H), 6.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.22 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.77 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H)。MS (ESI) m/z : 500.6[M + H]⁺。

7-氟-N-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)-1H-吡啶-2-甲酰胺 (QCT-006), 黄色固体 (0.018 g, 产率为 21.1%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.45 (s, 1H), 12.05 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 10.76 (s, 1H), 9.67 ~ 9.61 (m, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.74 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H), 7.48 ~ 7.40 (m, 1H), 7.20 (dd, $J = 3.2, 2.1$ Hz, 1H), 7.06 ~ 6.93 (m, 3H), 6.49 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.19 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.74 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H)。MS (ESI) m/z : 507.4[M + H]⁺。

N-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)-3-[4-(丙-2-基)苯基]苯甲酰胺 (QCT-007), 黄色固体 (0.013 g, 产率为 21.1%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.45 (s, 1H), 10.75 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 8.79 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.10 (q, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.85 ~ 7.77 (m, 3H), 7.74 ~ 7.69 (m, 1H), 7.67 ~ 7.61 (m, 2H), 7.54 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.36 (td, $J = 6.2, 5.5, 2.2$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.20 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.74 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.94 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.24 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); MS (ESI) m/z : 568.4[M + H]⁺。

N-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)-3-[4-(丙-2-基)苯基]苯甲酰胺 (QCT-008), 黄色固体 (0.026 g, 产率为 22.2%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.45 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.02 (dd, $J = 3.7, 1.8$ Hz, 2H), 7.81 (ddt, $J = 11.3, 7.9, 1.3$ Hz, 2H), 7.71 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H), 7.64 ~ 7.58 (m, 2H), 7.56 ~ 7.51 (m, 2H), 7.30 ~ 7.26 (m, 2H), 6.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.98 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.29 ~ 3.24 (m, 2H), 2.90 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); MS (ESI) m/z : 604.5[M + H]⁺。

N-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基

色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)-3-苯基苯磺酰胺 (QCT-009), 黄色固体 (0.023 g, 产率为 19.2%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.45 (s, 1H), 10.76 (s, 1H), 9.40 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 8.08 ~ 8.03 (m, 1H), 8.02 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 7.86 (ddt, $J = 19.4, 8.0, 1.3$ Hz, 2H), 7.70 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H), 7.68 ~ 7.58 (m, 4H), 7.50 ~ 7.42 (m, 2H), 7.42 ~ 7.35 (m, 1H), 6.93 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.00 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.27 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H); MS (ESI) m/z : 562.5[M + H]⁺。

N-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)-4-[4-(丙-2-基)苯基]苯磺酰胺 (QCT-010), 黄色固体 (0.021 g, 产率为 14.0%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.44 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 10.77 (s, 1H), 9.41 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 8.00 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.89 ~ 7.85 (m, 2H), 7.76 ~ 7.72 (m, 2H), 7.55 ~ 7.48 (m, 3H), 7.28 ~ 7.24 (m, 2H), 6.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 3.88 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.28 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.90 ~ 2.83 (m, 1H), 1.18 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); MS (ESI) m/z : 604.3[M + H]⁺。

N-(2-{[2-羟基-5-(3, 5, 7-三羟基-4-氧亚基色烯-2-基)苯基]氧基}乙基)-3-(三氟甲基)苯磺酰胺 (QCT-011), 黄色固体 (0.028 g, 产率为 21.9%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.44 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 10.79 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 9.42 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 8.23 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.93 (dd, $J = 8.4, 6.1$ Hz, 2H), 7.76 ~ 7.66 (m, 1H), 7.63 ~ 7.55 (m, 1H), 6.95 (dd, $J = 8.6, 5.0$ Hz, 1H), 6.45 (dd, $J = 13.8, 2.0$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.03 ~ 3.93 (m, 2H), 3.28 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H); MS (ESI) m/z : 554.5[M + H]⁺。

2.3 体外抗肿瘤活性测试

本研究采用 CCK-8 实验检测 QCT、QCT-001 ~ QCT-011 在 HCT-116、SW-480、CT-26 细胞中的体外抗肿瘤活性。取对数生长期的上述结肠癌细胞分别铺于 96 孔板中, HCT-116、SW-480、CT-26 细胞密度为 2000 个/孔, 在 37℃、5%CO₂ 条件下恒温培养 24 h。随后去除原培养基更换为药物浓度为 0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (QCT、QCT-001 ~ QCT-011) 的含药培养基, 每组设 3 个平行孔,

继续孵育 72 h; 孵育结束后每孔加入 10 μL CCK-8 增强型溶液, 再次孵育 3 h, 孵育完成后在酶标仪上测定 450 nm 处的吸光度, 根据吸光度计算槲皮素及其衍生物在各浓度下的细胞存活率并计算 IC_{50} 值, 具体结果如表 1 所示。

表 1 槲皮素及其衍生物对三种结肠癌细胞的抑制活性
Tab 1 Antiproliferative activity of quercetin and its derivatives against three colon cancer cells

化合物	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	HCT-116	SW-480	CT-26
QCT	40.58	37.52	21.00
QCT-001	35.94	28.52	46.77
QCT-002	24.83	24.23	21.00
QCT-003	48.81	35.51	28.74
QCT-004	22.26	33.26	45.99
QCT-005	17.64	22.03	28.14
QCT-006	20.39	22.93	23.11
QCT-007	24.36	72.28	41.88
QCT-008	14.64	> 80	> 80
QCT-009	11.25	23.25	17.41
QCT-010	14.71	18.88	21.43
QCT-011	> 80	> 80	> 80

对合成的 11 个化合物进行初步抗结肠癌活性测试, 结果显示相对于 QCT, 大部分槲皮素衍生物抗肿瘤活性均有一定提升。初步的构效关系表明: 当 QCT-001 中的乙胺键被 QCT-002 丙胺键替换后, 抑制活性有一定的提升; 然而当 QCT-001 的苯环上的 3-F 取代基被去除后对活性提高没有明显帮助; 反观 2, 3-二氟苯基、萘环、4-氟吡啶的引入对抑制活性改善得更为明显, 表明亲脂性的基团有助于抑制活性的提高, 并且芳香环的尺寸越大, 可能对抑制活性提高更显著。除了延长碳链和增大环尺寸外, 还通过引入联苯基团进一步增大芳香基团的尺寸, QCT-007 采用联苯策略增大分子的片段, 在苯环上连接 4-异丙基-苯基进一步延伸片段后, 发现抑制活性没有明显变化, 甚至在 SW-480 跟 CT-26 细胞中表现出抑制活性降低的情况。然而当 QCT-007 的酰胺键转换成磺酰胺键后, 活性有了明显改善, 在 HCT-116 细胞中抑制活性提高了接近 1 倍。综合对比多个联苯衍生物, QCT-009 的抑制效果最佳, 在三种不同结肠癌细胞中都表现出较好的抑制活性, IC_{50} 为 11.25 ~ 23.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 具有潜在的抗结肠癌先导化合物的特征。

2.4 分子对接

选用 QCT 和 QCT-009 与 β -catenin 进行分子对接模拟, 探究其结合模式与相互作用。 β -catenin (PDB ID: 2GL7) 从 RCSB 蛋白质数据库 (PDB) 获得 (<https://www.rcsb.org/>); 采用 Schrödinger

Maestro 11.5 对 β -catenin 蛋白进行预处理, 仅保留 A 链后优化蛋白结构; 使用 LigPrep 工具和 OPLS3 力场进行配体制备; 选择 β -catenin 与 BCL9 相互作用的主要残基 A149、A152、L156、L159、L160、V167、A171、M174 和 L178 作为对接的主要活性位点^[18]; 随后选择分子对接模块进行目标产物与 β -catenin 分子对接, 其余参数使用默认设置, 配体-蛋白质的结合最终评估是通过打分完成。随后将对接结果加载到 Hermite (<https://hermite.dp.tech/>) 计算结合能, 并且导入 PyMol 进行可视化分析。

从分子对接结果 (见图 3) 可知 QCT 结合在活性口袋的下方区域, A 环两个羟基与 D145 形成氢键作用, 羰基与 K181 产生氢键作用, 结合能为 $-43.66 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 初步推断这可能是 QCT 与 β -catenin 蛋白结合并能阻断 β -catenin/BCL9 相互作用的原因。QCT-009 与 β -catenin 对接结果如图 3B 所示, 可观察到 QCT-009 的母核结构与 β -catenin 结合模式和槲皮素相似, 通过叠合分析发现母核结合位置近乎重叠在一起, 形成了几乎一致的相互作用。而相同骨架以外的部分, 3'-OH 位连接二苯基能与上方 L156、L159、L160、V167 和 A171 残基组成的疏水口袋形状相匹配并产生疏水相互作用。这些范德华作用驱动 QCT-009 更倾向进入蛋白的疏水空腔, 形成更稳定的结合模式, 结合能为 $-111.35 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这可能是 QCT-009 抗肿瘤活性得到提高的原因之一。

3 讨论与总结

在 3'-OH 位对 QCT 进行修饰, 通过引入酰胺键或磺酰胺键连接不同类型的疏水基团, 增大分子结构, 共合成了 11 个化合物, 其结构均经过 MS 谱和 ^1H NMR 谱确证。利用三种结肠癌细胞对上述衍生物进行初步筛选, 结果显示槲皮素衍生物的抗结肠癌活性均有不同程度提高。从初筛结果可得知, 抗肿瘤活性与疏水基团的选择有较大关联, 乙胺基所连接的片段基团的环尺寸越大越有助于抑制活性的提高; 并且结果显示同样的联苯类基团片段, 磺酰胺键进行连接的分子活性提高的更为显著。综合比较下 QCT-009 的抑制活性较为理想, IC_{50} 为 11.25 ~ 23.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随后结合分子对接预测 QCT-009 与 β -catenin 的结合模式以及相互作用, 推测相比于 QCT, 可能 QCT-009 上的二苯基增强对 L156、L159、L160、V167 和 A171 残基组成的疏水空腔的疏水相互作用。这表明疏水基团的引入可能有助于增强配体与上方蛋白空腔形成疏水相互作用, 或许这也是 QCT-009 表现出更佳抑制活性的重要原因之一。

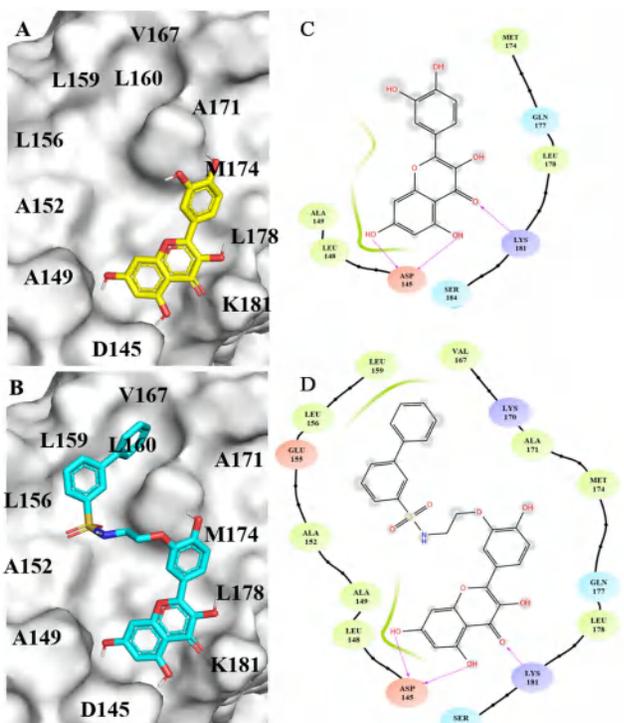


图 3 QCT (A) 及 QCT-009 (B) 与 β -catenin 相互作用的三维结构和二维结构

Fig 3 Three-dimensional and two-dimensional structures of QCT (A) and QCT-009 (B) interacting with β -catenin

为了进一步阐明构效关系，后期将选用更多不同类型的大分子片段或联苯类化合物进行修饰取代，获得更多的槲皮素-3'-O-乙基衍生物，深入探讨该类化合物与抗肿瘤活性方面的关联。与此同时后续研究中将进行更多药效学评价，深入探讨槲皮素衍生物对 β -catenin/BCL9 的靶向抑制作用，寻找抗肿瘤活性更高的槲皮素-3'-O-乙基衍生物。

参考文献

[1] Xia CF, Dong XS, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135 (5): 584-590.
 [2] Zhang XQ, Hao JJ. Development of anticancer agents targeting the Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5 (8): 2344-2360.
 [3] Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1): 165.
 [4] De La Roche M, Worm J, Bienz M. The function of BCL9 in Wnt/beta-catenin signaling and colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 199.
 [5] Moor AE, Anderle P, Cantù C, et al. BCL9/9L- β -catenin signaling is associated with poor outcome in colorectal cancer [J]. *EBioMedicine*, 2015, 2 (12): 1932-1943.

[6] Gay DM, Ridgway RA, Mueller M, et al. Loss of BCL9/9L suppresses Wnt driven tumorigenesis in models that recapitulate human cancer [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 723.
 [7] Bowman AL, Nikolovska-Coleska Z, Zhong HZ, et al. Small molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction discovered by ensemble-based receptor models [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129 (42): 12809-12814.
 [8] Wang Z, Zhang M, Quereda V, et al. Discovery of an orally bioavailable small-molecule inhibitor for the beta-catenin/B-cell lymphoma 9 protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2021, 64 (16): 12109-12131.
 [9] Zhang H, Liu CL, Chen QS, et al. Discovery of novel 3-phenylpiperidine derivatives targeting the beta-catenin/B-cell lymphoma 9 interaction as a single agent and in combination with the anti-PD-1 antibody for the treatment of colorectal cancer [J]. *J Med Chem*, 2023, 66 (2): 1349-1379.
 [10] De La Roche M, Rutherford TJ, Gupta D, et al. An intrinsically labile alpha-helix abutting the BCL9-binding site of beta-catenin is required for its inhibition by carnosic acid [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 608.
 [11] Shen LA, Peng XY, Bao Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of quercetin derivatives as novel beta-catenin/B-cell lymphoma 9 protein-protein interaction inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 247: 115075.
 [12] 鲁猛, 王刚, 贾洪艳, 等. 姜黄素通过 β -Catenin/BCL9 信号通路介导的细胞自噬调节肝癌细胞的恶性生物学行为 [J]. *中医药导报*, 2023, 29 (9): 12-17.
 [13] Ward AB, Mir H, Kapur N, et al. Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways [J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16 (1): 108.
 [14] Mojsin M, Vicentic JM, Schwirtlich M, et al. Quercetin reduces pluripotency, migration and adhesion of human teratocarcinoma cell line NT2/D1 by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Food Funct*, 2014, 5 (10): 2564-2573.
 [15] Sampietro J, Dahlberg CL, Cho US, et al. Crystal structure of a beta-catenin/BCL9/Tcf4 complex [J]. *Mol Cell*, 2006, 24 (2): 293-300.
 [16] Hoggard LR, Zhang YQ, Zhang M, et al. Rational design of selective small-molecule inhibitors for beta-catenin/B-cell lymphoma 9 protein-protein interactions [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137 (38): 12249-12260.
 [17] Zhang M, Wang Z, Zhang YQ, et al. Structure-based optimization of small-molecule inhibitors for the beta-catenin/B-cell lymphoma 9 protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2018, 61 (7): 2989-3007.
 [18] Wang Z, Zhang M, Luo W, et al. Discovery of 2-(3-(3-carbamoylpiperidin-1-yl) phenoxy) acetic acid derivatives as novel small-molecule inhibitors of the beta-catenin/B-cell lymphoma 9 protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2021, 64 (9): 5886-5904.

(收稿日期: 2024-04-29; 修回日期: 2024-06-14)

针对 *K-Ras* (*G12C*) 突变肿瘤的还原响应型纳米胶束的制备及评价

卢贵茹¹, 刘阳^{1*}, 刘晶阳¹, 冯友成¹, 马孟城², 张壮壮³, 付志远⁴ (1. 信阳职业技术学院附属医院药学部, 河南 信阳 464000; 2. 信阳市中心医院药学部, 河南 信阳 464000; 3. 宁波宝亭生物科技有限公司, 浙江 宁波 315000; 4. 生物治疗全国重点实验室, 成都 610000)

摘要: **目的** 以不同分子量的巯基化聚乙二醇和 *K-Ras* (*G12C*) 抑制剂 6 合成一系列还原敏感型高分子前药 (PERI), 制备并筛选出最优纳米胶束 (PERIs 胶束), 考察其理化性质和体外抗肿瘤作用。 **方法** 通过二硫键将巯基化聚乙二醇与小分子抑制剂结合, 得到还原敏感型 PERIs 高分子前药, 通过其自组装制备 PERIs 胶束。透射电镜观察其形态; 粒度仪测定其粒径和表面电位; 芘荧光探针法测定其临界胶束浓度; 间接法测定其载药量及包封率; 透析法测定其在不同还原条件下的体外释药行为; 采用 CCK-8 法评价其细胞增殖毒性。 **结果** 核磁共振氢谱表明 PERIs 成功合成; PERIs 胶束 (Mw: 2000) 的平均粒径为 (95.76 ± 1.8) nm, 多分散系数为 (0.189 ± 0.0084), Zeta 电位为 - (7.07 ± 0.14) mV, 临界胶束浓度为 0.875 μg · mL⁻¹, 载药量为 (11.5 ± 0.16) %, 包封率为 (71.6 ± 0.83) %; 体外释放度实验表明 PERIs 胶束具有还原敏感性; 细胞毒性实验表明 PERIs 胶束对肿瘤细胞有较强的增殖抑制作用。 **结论** 制备的 PERIs 胶束 (Mw: 2000) 粒径均一, 分散性及稳定性良好, 具有控释能力, 并对肿瘤细胞有较强的增殖抑制作用。

关键词: 巯基化聚乙二醇; *K-Ras* (*G12C*) 抑制剂 6; 还原敏感; 前药纳米胶束

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3156-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.005

Preparation and evaluation of reduction-responsive nanomicelles for *K-Ras* (*G12C*) mutant tumors

LU Gui-ru¹, LIU Yang^{1*}, LIU Jing-yang¹, FENG You-cheng¹, MA Meng-cheng², ZHANG Zhuang-zhuang³, FU Zhi-yuan⁴ (1. Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Xinyang Vocational and Technical College, Xinyang Henan 464000; 2. Department of Pharmacy, Xinyang Central Hospital, Xinyang Henan 464000; 3. Ningbo Baoting Biotechnology Co., Ltd., Ningbo Zhejiang 315000; 4. State Key Laboratory of Biotherapy, Chengdu 610000)

Abstract: Objective To synthesize a series of reduction-sensitive macromolecular prodrugs from thiolated polyethylene glycol of different molecular weights and *K-Ras* (*G12C*) inhibitor 6 to prepare nanomicelles, and to screened the optimal nanomicelle (PERIs micelles) to evaluate its physicochemical property and anti-tumor effect in vitro. **Methods** Through disulfide bonds, the thiolated polyethylene glycol was combined with *K-Ras* (*G12C*) inhibitor 6 to form reduction sensitive PERIs prodrug nanocarriers, and PERIs micelles were prepared by its self-assembly property. The morphology was observed by transmission electron microscopy. The particle size and Zeta potential were measured by particle size analyzer. The critical micelle concentration was determined by pyrene-based fluorescence probe. Drug loading and encapsulation rate were measured indirectly. Drug release of the micelles was evaluated by dialysis, and cytotoxicity was evaluated by CCK-8. **Results** A series of reduction-sensitive macromolecular prodrugs (PERI) were verified by ¹H-NMR. Based on the size, surface potential and drug loading, PERIs micelles (Mw: 2000) was screened for subsequent experiments. The mean particle size

基金项目: 信阳市软科学研究计划项目 (No.20230068)。

作者简介: 卢贵茹, 女, 主管药师, 主要从事药物制剂研究, email: 991409843@qq.com * 通信作者: 刘阳, 男, 副主任药师, 主要从事临床药学及药剂学研究, email: ly10250516@163.com

was (95.76 ± 1.8) nm with a polydispersity index of (0.189 ± 0.0084) , Zeta potential was $- (7.07 \pm 0.14)$ mV, critical micelle concentration was $0.875 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the drug loading was $(11.5 \pm 0.16)\%$ and the encapsulation rate was $(71.6 \pm 0.83)\%$. The drug release experiments in vitro showed that PERIs were sensitive to reduction. Cytotoxicity analysis showed that PERIs effectively inhibited the proliferation of tumor cells. **Conclusion** The prepared PERIs micelles (Mw: 2000) exhibits uniform particle size, good dispersion and stability, sustained drug release, and strong proliferation inhibition of tumor cells.

Key words: thiolated polyethylene glycol; K-Ras (G12C) inhibitor 6; reduction-sensitive; predrug nanomicelle

大鼠肉瘤基因 (rat sarcoma gene, *Ras*) 家族中 *K-Ras* 突变最为常见^[1]。*Ras* 蛋白是 *Ras* 基因表达的产物, 通过调节鸟嘌呤三核苷酸磷酸 (GTP) 与鸟嘌呤二核苷酸磷酸 (GDP) 的相互转化来调节细胞增殖分化^[2]。*Ras* 基因突变后, *Ras* 蛋白构型发生改变, 失去了调节能力, 造成细胞不可控地增殖^[3]。Ostrem 等^[4]发现了一种针对 *K-Ras* (*G12C*) 突变体的 *K-Ras* (*G12C*) 抑制剂 6 [*K-Ras* (*G12C*) inhibitor 6, RI], 其可以使 *Ras* 蛋白倾向于与 GDP 结合而处于失活状态, 因此可大幅度降低含有 *K-Ras* (*G12C*) 突变的肿瘤细胞活性, 并且加速其凋亡^[5-6]。但 RI 不溶于水, 在临床治疗过程中需要助溶剂增加其溶解度, 而助溶剂会给机体带来严重不良反应, 临床应用受限^[7-8]。

纳米制剂能够改善传统化疗药物的生物利用度并将其通过被动/主动靶向递送至肿瘤部位, 其中刺激响应型前药纳米制剂可避免使用大量助溶剂以及递送过程中发生药物渗漏所造成的严重不良反应, 具有肿瘤微环境响应释药特性并具有较高的载药能力, 备受研究者关注^[9-11]。由于肿瘤细胞活跃地增殖生长, 肿瘤细胞内谷胱甘肽 (GSH) 浓度比正常组织高 100 ~ 1000 倍^[12]。二硫键是人体内重要的还原敏感型共价键, 其在正常生理条件下非常稳定, 但在高 GSH 浓度下易被还原成巯基而断裂^[13]。因此, 本实验选择有良好的水溶性、生物相容性和生物膜可渗透性的聚乙二醇 (PEG) 作为载体^[14], 将 RI 通过二硫键偶联到巯基化聚乙二醇的末端, 构建具有还原敏感的功能化纳米胶束 (PERIs), 并对其理化性质和体外抗肿瘤作用进行评价。

1 材料

1.1 试药

巯基化聚乙二醇、二硫二吡啶 (纯度: 98%)、二氯甲烷 (分析纯)、磷酸盐缓冲液 (PBS) 粉末 (上海阿拉丁科技), RI (纯度 > 98%)、CCK-8 试剂 (大连美仑生物技术有限公司), 透析袋 (索莱宝生物科技有限公司), 细胞培养皿 (Corning Incorporated), 0.25% 胰酶 (含 EDTA)、青霉素/链霉素双抗溶液 (Hyclon), 96 孔细胞培养板

(Corning Incorporated), 二甲基亚砜 (DMSO) (纯度 > 99.8%, Sigma-Aldrich), RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS) (Gibco), 人非小细胞肺癌细胞 H358、小鼠成纤维细胞 L929 (ATCC)。

1.2 仪器

万分之一分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo), 恒温摇床 (上海一恒科学仪器), 核磁共振波谱仪 (美国 Bruker), 马尔文激光粒度仪 (英国 Malvern Nano-ZS), 紫外分光光度计 (上海翱艺仪器), 酶标仪 (美国 Thermo Scientific), 透射电子显微镜 (日本 Hitachi)。

2 方法与结果

2.1 高分子前药 (PERI) 的合成与表征

反应 1: 称取巯基化聚乙二醇 (Mw: 1000, 1 g, 1 mmol) 加入 50 mL 反应瓶中, 用 5 mL DMSO 溶解并加入 200 μL 乙酸。称取二硫二吡啶 (1.1 g, 5 mmol) 溶于 5 mL DMSO 中, 在室温搅拌下缓慢加入反应瓶中, 滴加完毕后继续搅拌反应 5 h。反应完成后先后在 DMSO 和二氯甲烷中透析, 然后旋蒸干燥得到二硫吡啶化聚乙二醇 (PR)。

反应 2: 称取 PR (Mw: 1000, 0.5 g, 0.5 mmol) 加入 50 mL 反应瓶中, 用 5 mL DMSO 溶解并加入 200 μL 乙酸。称取 RI (0.4 g, 1 mmol) 溶于 5 mL DMSO 中, 在室温搅拌下缓慢加入反应瓶中, 滴加完毕后继续搅拌反应 10 h。反应完成后先后在 DMSO 和二氯甲烷中透析, 然后旋蒸干燥得到 PERI, 记为 PERI (Mw: 1000)。反应路线见图 1, PERI (Mw: 2000), PERI (Mw: 4000), PERI (Mw: 5000) 均采用上述步骤合成得到。

PERI (Mw: 2000) ¹H-NMR 鉴定产物结果见图 2, 化学位移 7 ~ 8 中 3 个特征峰是 RI 苯环上 3 个氢的特征峰, 8.03 是 RI 仲胺氢的特征峰, 合成原料及各步骤合成结果的核磁对比图表明目标产物 PERI 成功合成。

2.2 标准曲线的建立

由于聚乙二醇和小分子抑制剂均无光学特性, 而上述反应 1 和反应 2 有相同且单一的副产物 2-吡啶硫酮, 与反应产物以及原料的摩尔比均

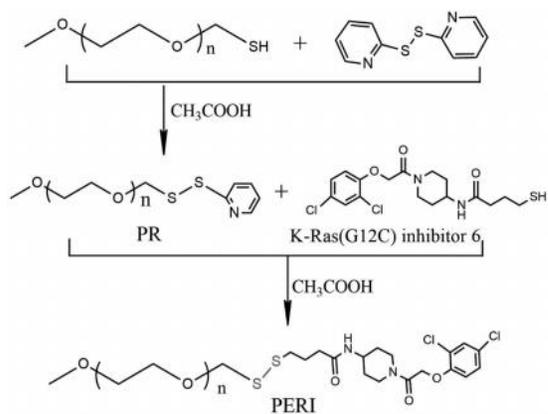


图 1 高分子前药 PERI 的合成路线

Fig 1 Synthesis route of polymeric prodrug PERI

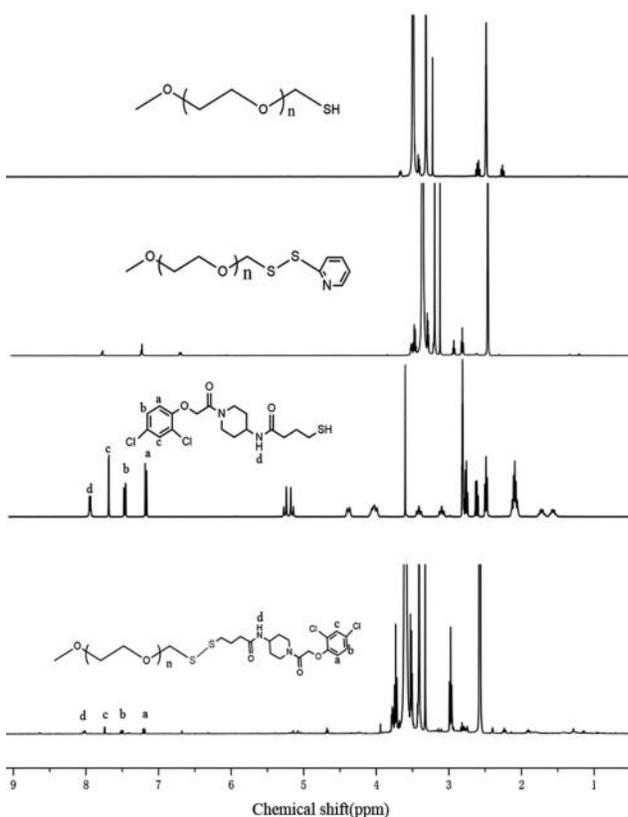


图 2 PERI (Mw: 2000) 的核磁共振氢谱

Fig 2 ¹H-NMR spectra of PERI (Mw: 2000)

表 1 不同分子量 PERIs 胶束的物理性质对比结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 1 Physical properties of PERIs micelles with different molecular weights ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

材料	EE/%	DL/%	粒径 /nm	多分散系数	Zeta 电位 /mV
PERIs (Mw: 1000)	10.5 ± 0.28	75.3 ± 0.56	104.3 ± 3.4	0.096 ± 0.0045	- 5.63 ± 0.55
PERIs (Mw: 2000)	11.5 ± 0.16	71.6 ± 0.83	95.76 ± 1.8	0.189 ± 0.0084	- 7.07 ± 0.14
PERIs (Mw: 4000)	8.6 ± 0.13	57.1 ± 0.68	120.2 ± 4.2	0.105 ± 0.007	- 9.19 ± 0.89
PERIs (Mw: 5000)	9.2 ± 0.35	62.4 ± 0.85	114.6 ± 5.3	0.167 ± 0.012	- 8.10 ± 0.57

大小合适、Zeta 电位稳定且载药量和包封率较高的 PERIs 胶束 (Mw: 2000) 用于后续的研究。PERIs 胶束 (Mw: 2000) 的平均粒径为 (95.76 ± 1.8) nm, 多分散系数为 (0.189 ± 0.0084), 表明其粒径均一, 分散性良好。进一步测定 PERIs 胶束 (Mw: 2000)

为 1 : 1, 且在约 375 nm 波长处有吸收^[15-16], 因此利用反应副产物的特性分别在 370、375、380 nm 处考察标准曲线的吻合程度。首先将抑制剂 RI 溶解在 DMSO 中, 配制成质量浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的溶液作为母液, 将母液稀释成一系列含有抑制剂 RI 的 DMSO 溶液 (2、5、8、10、15、20、25、30、35、40、50 μg · mL⁻¹), 然后分别加入二硫二吡啶按照反应 1 的步骤充分反应。反应结束后将反应液加入 DMSO 定容至 1 mL, 然后对吸光度进行检测, 以抑制剂 RI 的浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。根据 R² 值, 375 nm 波长处得到的标准曲线拟合度最好, 线性方程为 $y = 0.0056x - 0.0003$ 。

2.3 载药量 (DL) 及包封率 (EE) 测定

吸取 500 μL 的终反应液, 使用 DMSO 定容至 1 mL, 测定其吸光度, 根据浓度与吸光度之间的函数关系式计算出副产物 2-吡啶硫酮的量。副产物 2-吡啶硫酮和 RI 的摩尔比为 1 : 1, 通过以下公式计算高分子前药中 RI 的 DL 和 EE, 结果见表 1。材料 PERI (Mw: 2000) 和 PERI (Mw: 1000) 的 DL 和 EE 均大于材料 PERI (Mw: 4000)、PERI (Mw: 5000), 因此可初步定为候选材料。DL (%) = 高分子前药中 RI 的含量 / 高分子前药的质量 × 100%; EE (%) = 高分子前药中 RI 的含量 / 投入 RI 的质量 × 100%。

2.4 粒径、电位及稳定性测定

超声法制备 1 mg · mL⁻¹ 的胶束溶液, 通过动态光散射测试法对胶束的粒度进行表征。检测条件: 温度为 25 °C, 散射角 173°, 每个样品测定 3 次。将制备的 1 mg · mL⁻¹ 的胶束溶液转入 37 °C 恒温箱中, 在预设的时间点 (1、2、3、4、5、6、7 d) 取出并测定其粒径和电位, 每个样品测定 3 次。结果如表 1 所示, 4 种材料的多分散系数显示粒径较均匀, 只有 PERI (Mw: 2000) 的粒径小于 100 nm。稳定性测定结果如图 3 所示, 4 种材料均显示出较好的稳定性。综上, 本实验选择粒径

在含有 10%FBS 的 (RPMI-1640) 培养基中的粒径和 Zeta 电位稳定性 (见图 4), 其在培养基中仍具有较好的稳定性。

2.5 PERIs 胶束 (Mw: 2000) 的形态测定

制备 1 mg · mL⁻¹ 的胶束溶液, 稀释后滴到

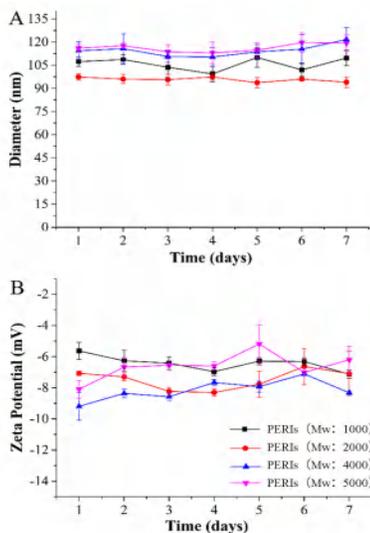


图 3 4 种胶束在 7 d 内的粒径 (A) 和 Zeta 电位 (B) 稳定性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 3 Particle size (A) and Zeta potential (B) stability of 4 micelles within 7 days ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

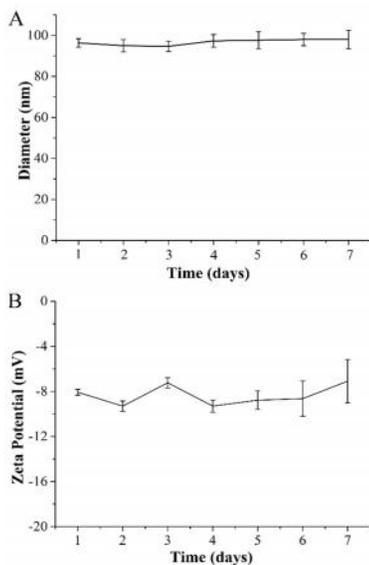


图 4 PERIs 胶束 (Mw: 2000) 在 RPMI-1640 培养基中的粒径 (A) 和 Zeta 电位 (B) 稳定性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 4 Particle size (A) and Zeta potential (B) stabilization of PERIs micelles (Mw: 2000) within RPMI-1640 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

铜网上, 磷钨酸负染后利用透射电镜 (TEM) 观察纳米胶束的形貌。结果见图 5, PERIs 胶束形态良好, 分布均匀, 呈现出规则的球形状, 且未见相互粘连。

2.6 临界胶束浓度 (CMC) 的测定

通过芘探针荧光光谱法测定载药胶束的 CMC。将冻干的胶束用少量 DMSO 溶解后, 剧烈搅拌下加入适量芘水, 避光敞口搅拌过夜制备得到一定浓度的胶束溶液。将该胶束母液用芘水稀释得到一系列浓度梯度的胶束溶液, 然后用荧光光度计检测样品的荧光光度值。固定激发波长为

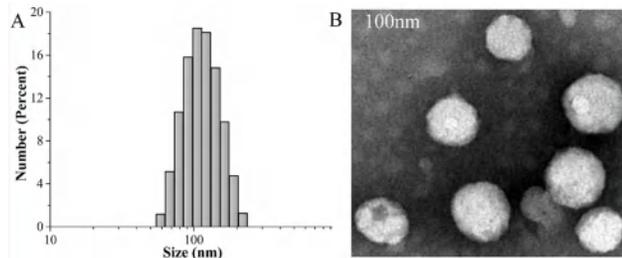


图 5 PERIs 胶束 (Mw: 2000) 的粒径分布 (A) 和 TEM (B) 图
Fig 5 Size distribution (A) and TEM (B) image of PERIs micelles (Mw: 2000)

334 nm, 记录 373 nm 和 384 nm 处的荧光强度分别记为 I_1 和 I_3 。以 373 nm 和 384 nm 处荧光强度的比值 I_1/I_3 对 PERIs 胶束对数浓度作图, 通过斜率的突变点确定 PERIs 胶束的 CMC 值。结果如图 6 所示, PERIs 胶束的 CMC 为 $0.875 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

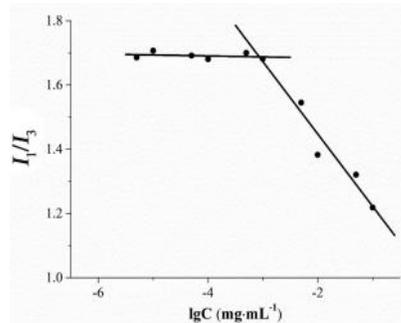


图 6 芘探针在不同波长处荧光强度的比值

Fig 6 Ratio of fluorescence intensity of pyrene at different emission wavelengths

2.7 体外释药行为测定

模拟还原环境 [含 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇 (DTT) 的 PBS, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4] 和非还原环境 (不含 DTT 的 PBS, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4), 进行体外药物释放实验。分别取 1 mL 药物质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的纳米胶束置于透析袋中, 将其置于含有 20 mL 相应缓冲液的离心管中, 每组设定 3 个平行样。将所有离心管放入 37°C 恒温摇床中, 转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 避光振荡。在预先设定的时间点从各组中取出 5 mL 缓冲液, 并分别加入等量的相应新鲜缓冲溶液。最后将取出的所有样品通过高效液相色谱法测定其浓度^[17], 再计算纳米胶束的累计释放量。结果如图 7 所示, PERIs 胶束在非还原性条件下释药速率较慢, 10 h 后其释药量趋于稳定, 仅释放约 10% 的药物; 在还原性环境中的释药速率大为增加, 10 h 时释放约 65% 的药物, 随着时间的延长, 累计释放量可达约 82%。这是由于该高分子前药的二硫键在 DTT 存在下发生断裂, 造成胶束结构破坏, 致使小分子抑制剂快速释放出来。

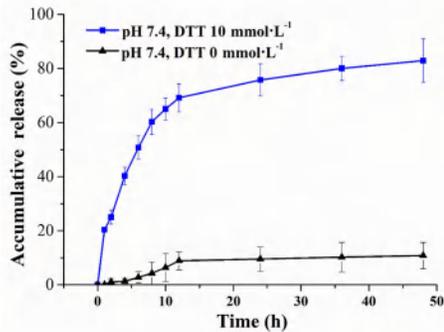


图 7 不同还原条件下小分子抑制剂的累计释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 7 In vitro release curve of small molecule inhibitors under different reduction conditions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8 中间体 PR 的生物相容性实验

将对数生长期的 H358 细胞和 L929 细胞分别按照每孔 5000 个和 2000 个细胞的密度接种在 96 孔板中，置于 37 °C、5%CO₂ 的孵育箱中孵育，24 h 贴壁后吸去原有培养基，加入含有 PR 的新鲜培养基，孵育 48 h，孵育之后每孔加入 100 μL 含 CCK-8 的培养基，继续培养 2 h，用酶标仪检测 470 nm 波长下的吸光度 (OD) 值，并计算细胞存活率，细胞存活率 (%) = (OD_{样品} - OD_{空白对照}) / (OD_{阴性对照} - OD_{空白对照}) × 100%。每组设置 5 个平行样。结果如图 8 所示，中间体 PR 对 H358 和 L929 细胞并未显示出系统毒性，即使在高浓度 500 μg · mL⁻¹ 时，仍表现出一定程度的促增殖作用，表明其具有良好的生物相容性。

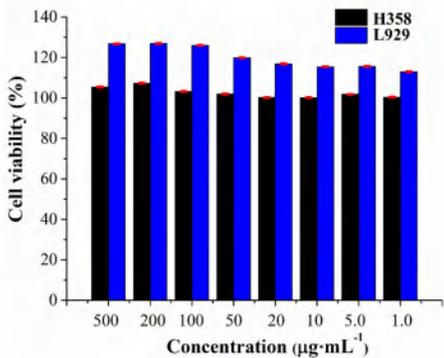


图 8 中间体 PR 与 H358 和 L929 细胞孵育 48 h 后的生物相容性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig 8 Biocompatibility of PR with H358 and L929 cells after incubation for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.9 纳米胶束的体外抗增殖实验

将对数期生长的 H358 细胞按照每孔 5000 个细胞的密度接种在 96 孔板中，置于 37 °C、5%CO₂ 的孵育箱中孵育，24 h 贴壁后吸去原有培养基。加入含有载药胶束溶液的新鲜培养基，孵育 48 h，孵育之后操作方式及计算方式同生物相容性实验。结果如图 9 所示，PERIs 胶束的毒性随着抑制剂 RI 浓度的增加而增强，说明其在肿瘤细胞

内能释放出 RI 抑制肿瘤细胞增殖且呈现出浓度依赖性。

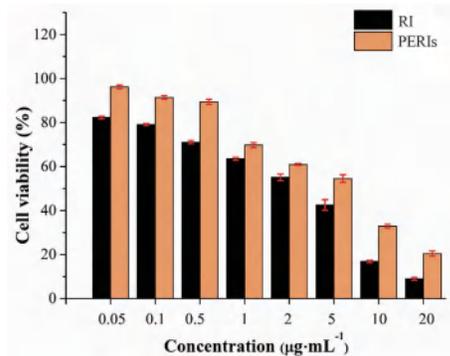


图 9 RI 和 PERIs 与 H358 细胞孵育 48 h 后的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig 9 Cell viabilities of H358 after incubation with RI and PERIs for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

近年来，一些新的药物递送系统，包括脂质体^[18]、纳米粒^[19]、胶束^[20]等，被用于不同药物的体内递送。随着研究的深入，为了使载体更加的智能化，针对刺激响应性载体的研究更是百花齐放，如 pH^[21]、酶^[22]、光^[23]、温度^[24]等，然而真正应用到临床的却寥寥无几，因此本实验回归临床转化的初心，选择安全性良好、研究较为成熟的 PEG 作为药物载体，期望能为从开发到临床转化提供实验基础。研究显示粒径在 60 ~ 100 nm 的胶束更有利于通过高渗透长滞留效应增强药物在肿瘤的聚集^[25]，胶束表面负电荷可以防止胶束间的聚集，避免蛋白吸附，增加体内稳定性，延长体内循环时间^[26]，因此在 PERIs 胶束 (Mw: 1000) 和 PERIs 胶束 (Mw: 2000) 的载药量及包封率相近的情况下，选择粒径小于 100 nm 的 PERIs 胶束 (Mw: 2000) 用于后续研究。通常，CMC 越低，在相同浓度下，形成的胶束浓度越高，难溶性药物的载药量越多。而且较低的 CMC 使胶束溶液具有更好的稀释稳定性。PERIs 胶束 (Mw: 2000) 具有较低的 CMC，表明其具有优良的载药性能和稳定性^[27]。

PERIs 胶束 (Mw: 2000) 表征结果显示，其粒径大小合适且均一，有利于增加肿瘤部位药物浓度，提高抗肿瘤效果；表面带负电荷，有助于延长体内的循环时间；药物释放实验显示其在高还原性肿瘤细胞内能够实现有效的药物释放；L929 细胞实验显示中间体 PR 具有良好的生物相容性，可以作为一种安全无毒的载体负载药物；抗增殖体外研究表明其可高效递送小分子抑制剂，显著抑制 K-Ras (G12C) 突变的 H358 细胞的增殖。PERIs 胶束 [IC₅₀ 为 (5.79 ± 0.087) μg · mL⁻¹] 的细胞毒性小于 RI [IC₅₀ 为 (4.72 ± 0.058) μg · mL⁻¹]，可能由于

纳米胶束经过胞吞途径入胞，入胞后需进一步裂解二硫键释放出游离药物，而游离药物则可通过被动扩散入胞，入胞后直接发挥作用。正因为如此，游离药物因其对机体无选择性攻击而造成的严重不良反应大大限制了其临床应用。

该纳米药物递送体系 PERIs 兼具被动靶向和还原响应控释性能，为小分子抑制剂的靶向输送提供了新的策略，然而本实验在载药量方面仍需提高，体内抗肿瘤效果仍需验证，下一步将从体内抗肿瘤效果评价、联合化疗及分子机制方面进行更加深入全面的研究。

参考文献

- [1] Ferguson R, Aughton K, Evans A, et al. Mutant K-Ras in pancreatic cancer: an insight on the role of wild-type N-Ras and K-Ras dependent cell cycle regulation [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45 (3): 2505-2520.
- [2] Yin G, Huang J, Peter AJ, et al. Targeting small GTPases: emerging grasps on previously untamable targets, pioneered by K-Ras [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8: 212.
- [3] Zinatizadeh MR, Momeni SA, Zarandi PK, et al. The role and function of Ras-association domain family in cancer: a review [J]. *Genes Dis*, 2019, 6 (4): 378-384.
- [4] Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions [J]. *Nature*, 2013, 503: 548-551.
- [5] Rathod LS, Dabhade PS, Mokale SN. Recent progress in targeting K-Ras mutant cancers with covalent G12C-specific inhibitors [J]. *Drug Discovery Today*, 2023, 28 (5): 103557.
- [6] Wu X, Song WP, Cheng C, et al. Small molecular inhibitors for K-Ras mutant cancers [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1223433.
- [7] Wu HM, Xu S, Lin KW, et al. Acidity-activatable dynamic halloysite nanotubes as a drug delivery system for efficient antitumor therapy [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2023, 81: 104208.
- [8] Zhuang H, Rui Z, Xu SY, et al. Construction of nano-drug delivery and antitumor system of stimuli-responsive polypeptides [J]. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2023, 226: 113310.
- [9] Sumera K, Noor A, Firdos AK, et al. Nanocarriers based novel and effective drug delivery system [J]. *Int J Pharmaceut*, 2023, 632: 122570.
- [10] Giri PM, Banerjee A, Layek B. A recent review on cancer nanomedicine [J]. *Cancers*, 2023, 15 (8): 2256.
- [11] Bargakshatriya R, Pramanik SK. Stimuli-responsive prodrug chemistries for cancer therapy [J]. *Chembiochem*, 2023, 24 (18): e202300155.
- [12] Lee CG, Kwon TH. Controlling morphologies of redox-responsive polymeric nanocarriers for a smart drug delivery system [J]. *Chem Eur J*, 2023, 29 (34): e202300594.
- [13] Fu S, Rempson CM, Puche V, et al. Construction of disulfide containing redox-responsive polymeric nanomedicine [J]. *Methods*, 2022, 199: 67-79.
- [14] Fujiura K, Naito M, Tanaka Y, et al. Development of stealth nanoparticles coated with poly (2-methoxyethyl vinyl ether) as an alternative to poly (ethylene glycol) [J]. *J Appl Polym Sci*, 2024, 141 (11): e55044.
- [15] Ghosh S, Subhadeep B, Sankaran T. Simultaneous and reversible functionalization of copolymers for biological applications [J]. *Macromolecules*, 2006, 39: 5595-5597.
- [16] Wang LH, Wu DC, Xu HX, et al. High DNA-binding affinity and gene-transfection efficacy of bioreducible cationic nanomicelles with a fluorinated core [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55: 755.
- [17] Ganjiwale SV, Dewani AP, Chandewar AV, et al. A comprehensive overview of HPLC method development and validation [J]. *Int J of Pharm Sci*, 2024, 2 (1): 802-811.
- [18] Wang CH, Dong ZY, Zhang Q, et al. Stimulus-responsive nano liposome for enhancing the anti-tumour effect of a novel peptide Dermaseptin-PP [J]. *IET Nanobiotechnology*, 2023, 17 (4): 352-359.
- [19] Chen Y, Liu SY, Liao Y, et al. Albumin-modified gold nanoparticles as novel radiosensitizers for enhancing lung cancer radiotherapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 1949-1964.
- [20] Bose A, Burman DR, Sikdar B, et al. Nanomicelles: types, properties and applications in drug delivery [J]. *IET Nanobiotechnology*, 2021, 15 (1): 19-27.
- [21] Zhang J, Wei LW, Ma XC, et al. pH-sensitive tumor-tropism hybrid membrane-coated nanoparticles for reprogramming the tumor microenvironment and boosting the antitumor immunity [J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 166: 470-484.
- [22] Feng XY, Li LL, Zhao YL, et al. Enzyme and microRNA dual-regulated photodynamic molecular beacons for cell-selective amplification of antitumor efficacy [J]. *Nano Letters*, 2023, 23 (16): 7743-7749.
- [23] Zhao J, Yang YG, Xu X, et al. Super light-sensitive photosensitizer nanoparticles for improved photodynamic therapy against solid tumors [J]. *Angewandte Chemie*, 2022, 134 (43): e202210920.
- [24] Liu YL, Ma WQ, Zhou P, et al. In situ administration of temperature-sensitive hydrogel composite loading paclitaxel microspheres and cisplatin for the treatment of melanoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114380.
- [25] Fan WF, Xiang JJ, Wei QY, et al. Role of micelle size in cell transcytosis-based tumor extravasation, infiltration, and treatment efficacy [J]. *Nano Lett*, 2023, 23 (9): 3904-3912.
- [26] Marques C, Hajipour MJ, Mares C, et al. Identification of the proteins determining the blood circulation time of nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2023, 17 (13): 12458-12470.
- [27] Su H, Wang FH, Ran W, et al. The role of critical micellization concentration in efficacy and toxicity of supramolecular polymers [J]. *PNAS*, 2020, 117 (9): 4518-4526.

(收稿日期: 2024-04-10; 修回日期: 2024-06-17)

关苍术不同极性部位化学成分研究及其抗肿瘤活性研究

孙杰¹, 王静¹, 孙朝¹, 王萍², 方振兴³, 于海龙⁴, 王道深¹, 周媛媛^{1*} (1. 黑龙江中医药大学教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036; 3. 黑龙江省科学院自然与生态研究所, 哈尔滨 150040; 4. 哈尔滨市产品质量综合检验检测中心, 哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 研究菊科苍术属植物关苍术 (*Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam) 的化学成分。**方法** 使用关苍术干燥根茎, 将其 75% 乙醇提取物中的二氯甲烷部位与正丁醇部位进行分离纯化, 使用正相硅胶色谱、反相 ODS 和 HPLC 等方法, 并使用各种波谱技术对所得化合物进行结构鉴定。使用人胃癌细胞 MGC-803 和人宫颈癌细胞 HeLa 对 14 个化合物进行抗肿瘤活性测定。**结果** 从中共得到 14 种化合物, 通过 NMR 和 HR-ESI-MS 方法鉴定分别为: 五味子甲素 (1)、(7*S*, 8*R*)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-9'-*O*- β -D-glucopyranoside (2)、(7*S*, 8*R*)-dehydrodiconiferyl alcohol 9'- β -glucopyranoside (3)、artemordolignan glycoside A (4)、开环异落叶松脂素-9-*O*- β -D-葡萄糖苷 (5)、2-甲氧基-4-(2-丙烯基)苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (6)、1, 2-di-*O*- β -D-glucopyranosyl-4-allylbenzene (7)、白术内酯 I (8)、白术内酯 II (9)、表白术内酯 I (10)、白术内酯 III (11)、atractylenother (12)、双白术内酯 (13)、双表白术内酯 (14)。从二氯甲烷组分中分离得到化合物 1, 8 ~ 14, 正丁醇组分中分离得到化合物 2 ~ 7。MTT 实验结果显示, 化合物 1, 8 ~ 14 对 HeLa 细胞具有一定的抗肿瘤活性, 化合物 8 ~ 11, 13 对 MGC-803 具有一定的抗肿瘤活性。**结论** 本次实验共得到 14 个化合物, 其中化合物 1 ~ 7 均为首次从该药用部位中分离获得, 部分化合物具有一定的抗肿瘤活性。

关键词: 关苍术; 化学成分; 提取分离; 结构鉴定; 抗肿瘤活性

中图分类号: R283, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)12-3162-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.006

Chemical compositions of different polar parts of *Atractylodes japonica* and its antitumor activity

SUN Jie¹, WANG Jing¹, SUN Zhao¹, WANG Ping², FANG Zhen-xing³, YU Hai-long⁴, WANG Dao-shen¹, ZHOU Yuan-yuan^{1*} (1. Key Laboratory of Basic and Applied Research in Northern Medicine, Commission Education, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036; 3. Institute of Nature and Ecology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150040; 4. Harbin Examining and Inspection Center for Products Quality, Harbin 150030)

Abstract: Objective To determine the chemical components of *Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam. **Methods** Dried rhizome of *Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam was used. The dichloromethane part separated and purified from the *n*-butanol part of its 75% ethanol extract. The structure of the resulting compounds was identified by normal-phase silica gel chromatography, reversed-phase ODS, HPLC, and other spectroscopic techniques. The antitumor activity was determined for 14 compounds using human gastric cancer cells MGC-803 and human cervical cancer cells HeLa. **Results** Totally 14 compounds were obtained from *Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam and identified as deoxyschizandrin (1), (7*S*, 8*R*)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-9'-*O*- β -D-glucopyranoside (2), (7*S*, 8*R*)-dehydrodiconiferyl alcohol 9'- β -glucopyranoside (3), artemordolignan

基金项目: 黑龙江省“头雁”团队支持项目 (No. 黑龙江省头雁行动领导小组文件〔2019〕5号); 2018 年校基金新药基金 (No.2018xy02); 2023 年黑龙江省大学生创新创业训练计划项目 (No.S202310228067)。

作者简介: 孙杰, 男, 硕士研究生, 主要从事中药及复方药效物质基础研究, email: 2021014150@qq.com * **通信作者:** 周媛媛, 女, 博士, 教授, 主要从事中药及复方药效物质基础研究, email: zhouyuanyuan1998@163.com

glycoside A (4), secoisolariciresinol-9-*O*- β -D-glucopyranoside (5), 2-methoxy-4-(2-propenyl) phenyl- β -D-glucopyranoside (6), 1, 2-di-*O*- β -D-glucopyranosyl-4-allylbenzene (7), atractylenolide I (8), atractylenolide II (9), isoatractylenolide I (10), atractylenolide III (11), atractylenolide (12), biatractylenolide (13), and biepiatractylenolide (14). Compounds 1, 8 ~ 14 were isolated from the dichloromethane fraction while compounds 2 ~ 7 were isolated from the *n*-butanol fraction. The MTT experiments showed that compounds 1, 8 ~ 14 had certain anti-tumor activity against HeLa cells, and compounds 8 ~ 11, 13 had certain anti-tumor activity against MGC-803. **Conclusion** Totally 14 compounds have been obtained. Compounds 1 ~ 7 have been isolated from this medicinal part for the first time, several compounds showed certain anti-tumour activity.

Key words: *Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam; chemical constituent; extraction and separation; structural identification; anti-tumor activity

关苍术 (*Atractylodes japonica* Koidz. ex Kitam) 为菊科苍术属的一种草本植物, 广泛分布于我国黑、吉、辽三省, 以其根茎入药。关苍术作为苍术属五大主属之一, 根据现有文献, 具有抗胃溃疡^[1]、抗菌消炎^[2]、对心脑血管系统保护^[3]及抗肿瘤^[4]、抗糖尿病、降血糖^[5]等作用。此外, 关苍术的化学成分如白术内酯 I 主要具有抗炎和肝障碍诱发症的抑制作用^[6]。本实验对关苍术干燥根茎的二氯甲烷和正丁醇不同萃取部位进行系统的分离纯化, 并使用波谱技术对其进行结构鉴定。本次实验共得到 14 种化合物 (结构式见图 1), 其中化合物 1 ~ 7 均为首次从该植物中得到, 并对 14 种化合物进行抗肿瘤活性测定, 以期扩大关苍术的应用。

1 材料

EYELA 旋转蒸发仪 N-1101 (东京理化器械株式会社); Bruker-600 型超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Q-TOF (ESI) 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); 柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目) 和薄层色谱硅胶板 (GF₂₅₄ 青岛海洋化工厂); LC-20AR 型半制备型高效液相色谱 (日本岛津公司); 多功能全波长酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司); 96 孔细胞培养板 (北京甄选科技有限责任公司, 批号: 11312); 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司, 批号: 150i); Agilent Eclipse XDB-C18 半制备型色谱柱 (9.4 mm×250 mm, 5 μ m, 美国安捷伦公司); 用于半制备液相的试剂为色谱纯; D-葡萄糖对照品 (HPLC \geq 99.5%, 上海士锋生物科技有限公司); 其余均为分析纯。D-葡萄糖对照品 (HPLC \geq 99.5%, 上海士锋生物科技有限公司)。

人胃癌细胞 MGC-803、人宫颈癌细胞 HeLa、二甲基亚砜 (DMSO)、顺铂 (上海碧云天生物技术有限公司); 噻唑蓝 (MTT); DMEM 培养液 (浙江吉诺赛百尔生物科技有限公司, 批号: GNM-31053); 胎牛血清、青霉素-链霉素 (美国

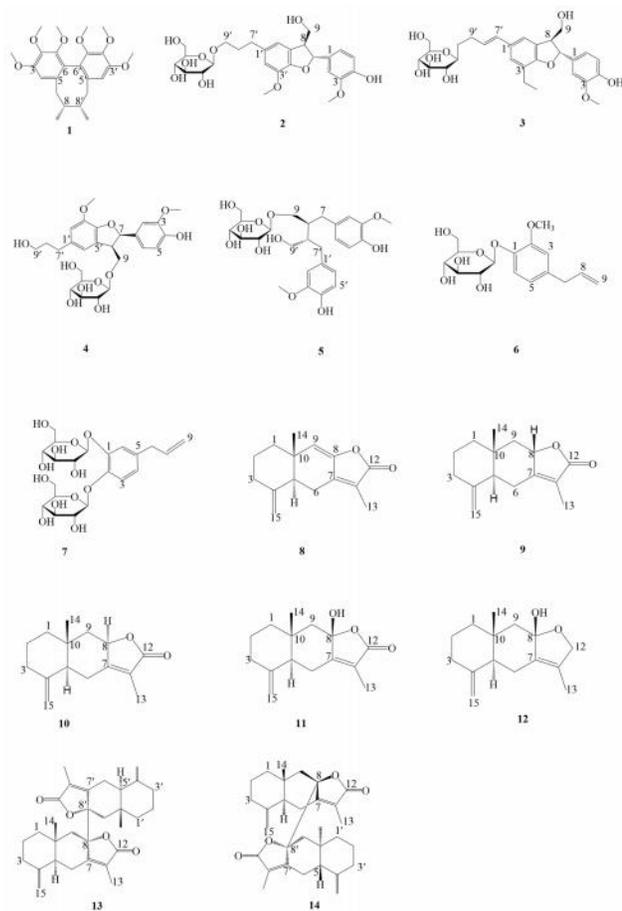


图 1 化合物 1 ~ 14 结构

Fig 1 Structures of compounds 1 ~ 14

Thermo 公司)。

实验所使用关苍术药材采摘自吉林省延边州长白山区域。经黑龙江中医药大学药学院杨炳友教授鉴定为菊科植物关苍术 (*Atractylodes Japonica*) 的干燥根茎, 本次实验的标本植物 (编号为 20200928) 保存于黑龙江中医药大学中药化学教研室。

2 提取与分离

将已阴干的关苍术药材根茎适度粉碎 (10.0

kg), 用 75% 乙醇溶液连续回流提取 5 次, 每次 4 h, 减压可得粗提物 (693.4 g)。使用热水将所得粗提物分散, 依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和水饱和的正丁醇减压萃取, 得石油醚萃取部位 (113.6 g), 二氯甲烷萃取部位 (59.3 g), 乙酸乙酯萃取部位 (208.2 g)、正丁醇萃取部位 (251.5 g)。本实验主要对关苍术的二氯甲烷和正丁醇萃取部位进行系统的分离纯化。

二氯甲烷萃取部位用硅胶色谱以二氯甲烷-甲醇 (1:0 → 0:1, *V/V*) 为流动相梯度洗脱。经 TLC 检测合并得到 8 个组分 (Fr.A1 ~ 8)。Fr.A4 经硅胶柱色谱法以二氯甲烷-甲醇 (1:0 → 0:1, *V/V*) 为流动相洗脱, 得 5 个组分 (Fr.A4.1 ~ 4.5)。Fr.A4.2 用硅胶柱洗脱得化合物 **8** (19.8 mg), **9** (11.8 mg), **10** (8.3 mg), **11** (18.6 mg)。Fr.A5 经硅胶柱色谱法以二氯甲烷-甲醇 (50:1 → 0:1, *V/V*) 洗脱, 得 8 个组分 (Fr.A5.1 ~ 5.8)。Fr.A5.4 经硅胶柱洗脱得化合物 **12** (6.3 mg), **13** (15.2 mg), **14** (7.4 mg)。Fr.A7 组分经硅胶柱分离洗脱得化合物 **1** (5.7 mg)。

正丁醇萃取部位用硅胶色谱柱以二氯甲烷-甲醇 (1:0 → 0:1, *V/V*) 为流动相梯度洗脱, TLC 检测合并得到 10 个组分 (Fr.B1 ~ 10)。Fr.B2 组分用 ODS 柱色谱以甲醇-水 (1:9 → 1:0, *V/V*) 为流动相洗脱得 6 个组分 (Fr.B2.1 ~ 2.6)。Fr.B2.6 用半制备型 HPLC (甲醇-水 = 42:58, 3 mL·min⁻¹) 纯化, 得到化合物 **4** (2.7 mg, *t_R* = 15.3 min), **5** (4.3 mg, *t_R* = 17.3 min)。Fr.B2.7 用半制备型 HPLC (甲醇-水 = 45:55, 3 mL·min⁻¹) 纯化, 得到化合物 **2** (14.6 mg, *t_R* = 20.1 min), **3** (4.3 mg, *t_R* = 24.2 min)。Fr.B7 组分用 ODS 柱色谱以甲醇-水 (1:9 → 1:0, *V/V*) 为流动相洗脱得 7 个组分 (Fr.B7.1 ~ 7.6)。Fr.B7.3 用半制备型 HPLC (甲醇-水 = 38:62, 3 mL·min⁻¹) 纯化, 得到化合物 **7** (4.9 mg, *t_R* = 15.1 min); Fr.B7.5 用半制备型 HPLC (甲醇-水 = 56:44, 3 mL·min⁻¹) 纯化, 得到化合物 **6** (5.3 mg, *t_R* = 19.5 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 434.2539 [M + NH₄]⁺ (计算值 434.2537), [α] = -52.3° (*c* 1.0, CHCl₃)。其分子式为 C₂₄H₃₂O₆。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 6.58 (1H, s, H-4'), 6.52 (1H, s, H-4), 3.93 (3H, s, 2-OCH₃), 3.87 (6H, s, 1, 2'-OCH₃), 3.82 (3H, s, 1'-OCH₃), 3.62 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.55 (3H, s, 3-OCH₃), 2.54 (1H, dd, *J* = 13.6, 7.5 Hz, H-7a), 2.53 (1H, dd, *J* = 13.6, 1.6 Hz, H-7b), 2.28 (1H, dd, *J* = 13.4, 9.6 Hz, H-7'a), 2.03

(1H, d, *J* = 13.4 Hz, H-7'b), 1.95 (1H, m, H-8), 1.82 (1H, m, H-8'), 1.00 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, 9-CH₃), 0.75 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, 9'-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 152.8 (C-3'), 152.3 (C-1), 151.9 (C-3), 151.5 (C-1'), 140.3 (C-2'), 140.1 (C-2), 139.1 (C-5), 134.3 (C-5'), 123.3 (C-6), 122.4 (C-6'), 110.5 (C-4'), 107.2 (C-4), 61.3 (1-OCH₃, 2-OCH₃, 1'-OCH₃, 2'-OCH₃), 56.3 (3-OCH₃, 3'-OCH₃), 41.2 (C-8', 8), 35.5 (C-7'), 34.3 (C-7), 21.9 (9-CH₃), 12.8 (9'-CH₃)。与文献报道^[7]基本一致, 故鉴定其为五味子甲素。

化合物 **2**: 淡黄色粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 523.2246 [M + H]⁺ (计算值 523.2248), [α] = +62.3° (*c* 1.0, MeOH)。其分子式为 C₂₆H₃₄O₁₁。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 6.95 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 6.85 (1H, dd, *J* = 1.5, 8, 2 Hz, H-6), 6.76 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.74 (2H, s, H-2', 6'), 5.48 (1H, d, *J* = 6.3 Hz, H-7), 4.25 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1''), 3.86 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃), 3.79 (1H, m, H-9a), 3.65 (2H, m, H-9'), 3.60 (1H, m, H-6'a), 3.53 (1H, m, H-8), 3.50 (1H, dd, *J* = 13.1, 6.8 Hz, H-9b), 3.41 (1H, m, H-6'b), 3.31 (1H, m, H-4''), 3.29 (1H, m, H-5''), 3.28 (1H, m, H-3''), 3.24 (1H, m, H-2''), 2.70 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-7'); 1.93 (2H, m, H-8'); ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 147.8 (C-3), 146.2 (C-4'), 145.8 (C-4), 143.8 (C-3'), 135.2 (C-1'), 133.2 (C-1), 128.6 (C-5'), 118.0 (C-6), 116.5 (C-6'), 114.9 (C-5), 112.7 (C-2'), 108.9 (C-2), 103.2 (C-1''), 87.4 (C-7), 76.6 (C-3'', 5''), 73.5 (C-2''), 70.4 (C-4''), 68.3 (C-9'), 63.3 (C-9), 61.5 (C-6''), 55.5 (3'-OCH₃), 54.8 (3-OCH₃), 54.1 (C-8), 31.8 (C-8'), 31.3 (C-7')。将化合物进行酸水解, 经 GC 分析发现其保留时间与葡萄糖对照品保留时间一致 (*t_R* = 16.3 min), 因此确定其中含糖, 且糖为葡萄糖。其中糖的端基碳信号为 δ: 103.2, 且 δ: 4.25 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'') 为糖的端基质子信号, 说明为 β 构型, 与文献报道^[8]基本一致, 故鉴定化合物其为 (7*S*, 8*R*)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-9'-*O*-β-D-glucopyranoside。

化合物 **3**: 淡黄色无定形粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 543.2363 [M + Na]⁺ (计算值 543.2365), [α] = -22.1° (*c* 0.5, MeOH)。分子式为 C₂₆H₃₂O₁₁。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 7.00 (1H, brs, H-6'), 6.99 (1H, s, H-2'), 6.95 (1H, s, H-2), 6.87 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.78 (1H, d,

$J = 8.0$ Hz, H-5), 6.63 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7'), 6.23 (1H, dt, $J = 15.6, 6.1$ Hz, H-8'), 5.52 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-7), 4.52 (2H, dd, $J = 5.8, 12.5$ Hz, H-9'), 4.42 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1''), 4.30 (1H, dd, $J = 12.4, 6.8$ Hz, H-6''a), 3.87 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.85 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-9a), 3.84 (3H, s, 3-OCH₃), 3.79 (1H, m, H-9b), 3.70 (1H, dd, $J = 11.9, 5.5$ Hz, H-6''b), 3.51 (1H, m, H-8), 3.40 (1H, m, H-3''), 3.34 (1H, m, H-5''), 3.33 (1H, m, H-4''), 3.29 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, H-2''); ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 149.3 (C-4'), 148.7 (C-3), 147.6 (C-4), 145.4 (C-3'), 134.5 (C-1), 133.9 (C-7'), 132.3 (C-1'), 130.2 (C-5'), 124.2 (C-8'), 119.4 (C-6), 116.5 (C-6'), 116.1 (C-5), 112.0 (C-2'), 110.6 (C-2), 103.1 (C-1''), 89.0 (C-7), 78.1 (C-3''), 78.0 (C-5''), 74.7 (C-2''), 71.3 (C-4''), 70.6 (C-9'), 64.6 (C-9), 62.6 (C-6''), 56.7 (C-8), 56.0 (3'-OCH₃), 54.6 (3-OCH₃)。将化合物进行酸水解, 经 GC 分析发现其保留时间与葡萄糖对照品保留时间一致 ($t_R = 16.3$ min), 因此确定其中含糖, 且糖为葡萄糖。其中糖的端基碳信号为 δ : 103.1, 且 δ : 4.42 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'') 为糖的端基质子信号, 说明为 β 构型, 与文献报道^[9]基本一致, 故鉴定其为 (7*S*, 8*R*)-dehydropiconiferyl alcohol 9' β -glucopyranoside。

化合物 4: 白色不定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 521.2035 [M-H]⁻ (计算值 521.2033), $[\alpha] = -12.1^\circ$ (c 0.5, MeOH)。分子式为 C₂₆H₃₄O₁₁。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 6.97 (1H, brs, H-2), 6.87 (1H, brd, $J = 8.3$ Hz, H-6), 6.76 (1H, brs, H-6'), 6.75 (1H, brs, H-2'), 6.73 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 5.61 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-7), 4.36 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 4.19 (1H, m, H-9a), 3.89 (1H, m, H-6''a), 3.87 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.80 (3H, s, 3-OCH₃), 3.77 (1H, m, H-9b), 3.68 (1H, m, H-8), 3.63 (1H, m, H-6''b), 3.58 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-9'), 3.36 (1H, m, H-5''), 3.29 (1H, m, H-4''), 3.26 (1H, m, H-3''), 3.22 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-2''), 2.61 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-7'), 1.83 (2H, m, H-8'); ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 147.9 (C-3), 146.4 (C-4), 146.2 (C-4'), 143.7 (C-3'), 135.2 (C-1'), 133.2 (C-1), 128.1 (C-5'), 118.2 (C-6), 116.6 (C-6'), 114.5 (C-5), 112.9 (C-2'), 109.2 (C-2), 103.4 (C-1''), 87.7 (C-7), 76.8 (C-5''), 76.5 (C-3''),

73.5 (C-2''), 71.2 (C-9''), 70.4 (C-4''), 61.2 (C-6''), 60.9 (C-9'), 55.3 (3'-OCH₃), 55.2 (3-OCH₃), 51.8 (C-8), 34.5 (C-8'), 31.2 (C-7')。将化合物进行酸水解, 经 GC 分析发现其保留时间与葡萄糖对照品保留时间一致 ($t_R = 16.3$ min), 因此确定其中含糖, 且糖为葡萄糖。其中糖的端基碳信号为 δ : 103.4, 且 δ : 4.36 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'') 为糖的端基质子信号, 说明为 β 构型, 与文献报道^[10]基本一致, 故鉴定其为 artemordolignan glycoside A。

化合物 5: 白色不定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 525.2305 [M + H]⁺ (计算值 525.2303), $[\alpha] = -27.1^\circ$ (c 1.0, MeOH)。分子式为 C₂₆H₃₆O₁₁。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 6.65 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-5'), 6.65 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 6.63 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-5), 6.62 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.60 (1H, m, H-6), 6.59 (1H, m, H-6'), 4.17 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.89 (1H, m, H-6''a), 3.82 (1H, m, H-9'a), 3.74 (6H, s, 3, 3'-OCH₃), 3.69 (1H, m, H-6''b), 3.65 (1H, m, H-9a), 3.59 (2H, m, H-9b, 9'b), 3.36 (1H, m, H-4''), 3.34 (1H, m, H-5''), 3.31 (1H, m, H-3''), 3.24 (1H, m, H-2''), 2.71 (2H, m, H-7'), 2.66 (2H, m, H-7), 2.05 (1H, m, H-8'), 2.01 (1H, m, H-8); ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 148.7 (C-3, 3'), 145.6 (C-4, 4'), 134.2 (C-1), 133.8 (C-1'), 123.0 (C-6), 122.9 (C-6'), 115.9 (C-5), 115.6 (C-5'), 113.7 (C-2'), 113.3 (C-2), 104.5 (C-1''), 78.3 (C-3''), 78.1 (C-5''), 75.2 (C-2''), 71.9 (C-4''), 70.7 (C-9'), 62.8 (C-9), 62.6 (C-6''), 56.5 (3-OCH₃), 56.1 (3'-OCH₃), 44.3 (C-8), 41.5 (C-8'), 35.8 (C-7'), 35.4 (C-7)。将化合物进行酸水解, 经 GC 分析发现其保留时间与葡萄糖对照品保留时间一致 ($t_R = 16.3$ min), 因此确定其中含糖, 且糖为葡萄糖。其中糖的端基碳信号为 δ : 104.5, 且 δ : 4.17 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'') 为糖的端基质子信号, 说明为 β 构型, 与文献报道^[11]基本一致, 鉴定为开环异落叶松脂素-9-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 6: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 327.1326 [M + H]⁺ (计算值 327.1324), $[\alpha] = -54.1^\circ$ (c 0.2, MeOH)。分子式为 C₁₆H₂₂O₇。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.03 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.78 (1H, brs, H-3), 6.67 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 5.88 (1H, m, H-8), 4.97 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-9a), 4.95

(1H, brs, H-9b), 4.92 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.79 (3H, s, 2-OCH₃), 3.78 (1H, m, H-6'a), 3.75 (1H, m, H-6'b), 3.44 (1H, m, H-2'), 3.40 (1H, m, H-5'), 3.36 (1H, m, H-3'), 3.30 (2H, m, H-7'), 3.29 (1H, m, H-4'); ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 150.8 (C-2), 146.4 (C-1), 139.1 (C-8), 136.2 (C-4), 122.1 (C-5), 117.9 (C-6), 115.4 (C-9), 114.3 (C-3), 103.0 (C-1'), 78.2 (C-3'), 77.7 (C-5'), 74.5 (C-2'), 71.0 (C-4'), 62.2 (C-6'), 56.7 (2-OCH₃), 40.7 (C-7)。将化合物进行酸水解, 经 GC 分析发现其保留时间与葡萄糖对照品保留时间一致 ($t_R = 16.3$ min), 因此确定其中含糖, 且糖为葡萄糖。其中糖的端基碳信号为 δ : 103.0, 且 δ : 4.92 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1') 为糖的端基质子信号, 说明为 β 构型, 与文献报道^[12]数据基本一致, 故鉴定化合物为 2-甲氧基-4-(2-丙烯基)苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 7: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 475.2089 [M + H]⁺ (计算值 475.2087), $[\alpha] = -46.7^\circ$ (c 0.5, MeOH)。分子式为 C₂₁H₃₀O₁₂。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.11 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3), 7.09 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.81 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-4), 5.89 (1H, m, H-8), 5.00 (2H, m, H-9), 4.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1''), 4.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 3.81 (2H, m, H-6'), 3.79 (2H, m, H-6''), 3.63 (2H, m, H-2', 2''), 3.46 (2H, m, H-3', 3''), 3.42 (1H, m, H-4''), 3.39 (1H, m, H-4'), 3.34 (1H, m, H-5'), 3.33 (1H, m, H-5''), 3.29 (2H, m, H-7); ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 148.7 (C-1), 147.0 (C-2), 138.3 (C-5), 137.1 (C-8), 124.8 (C-4), 120.8 (C-3), 120.7 (C-6), 116.1 (C-9), 103.8 (C-1'), 103.6 (C-1''), 77.9 (C-5', 5''), 77.7 (C-3', 3''), 74.7 (C-2', 2''), 71.3 (C-4''), 71.2 (C-4'), 62.5 (C-6'), 62.3 (C-6''), 40.4 (C-7)。将化合物进行酸水解, 经 GC 分析发现其保留时间与葡萄糖对照品保留时间一致 ($t_R = 16.3$ min), 因此确定其中含糖, 且糖为葡萄糖。其中两个糖的端基碳信号为 δ : 103.8、103.6, 且 δ : 4.82 (1H, d, $J = 8.0$, H-1''), 4.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1') 为糖的端基质子信号, 说明为 β 构型, 与文献报道^[13]基本一致, 鉴定为 1, 2-di-*O*- β -D-glucopranosyl-4-allylbenzene。

化合物 8: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 231.1326 [M + H]⁺ (计算值 231.1324), $[\alpha] = +19.1^\circ$ (c 1.0, MeOH)。分子式为 C₁₅H₁₈O₂。

¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 5.68 (1H, s, H-9), 4.91 (1H, brd, $J = 1.1$ Hz, H-15a), 4.72 (1H, brd, $J = 1.1$ Hz, H-15b), 2.77 (1H, dd, $J = 17.0, 3.9$ Hz, H-6a), 2.61 (1H, m, H-6b), 2.41 (1H, m, H-3a), 2.34 (1H, m, H-5), 2.10 (1H, m, H-3b), 1.87 (3H, dd, $J = 1.7, 6.4$ Hz, 13-CH₃), 1.72 (2H, m, H-2), 1.65 (2H, m, H-1), 0.95 (3H, s, 14-CH₃); ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 172.4 (C-12), 149.8 (C-4), 149.0 (C-7), 148.9 (C-8), 120.5 (C-11), 120.1 (C-9), 107.7 (C-15), 48.2 (C-5), 39.4 (C-1), 38.4 (C-10), 36.7 (C-3), 23.4 (C-6), 22.9 (C-2), 18.8 (14-CH₃), 8.6 (13-CH₃)。与文献报道^[14]基本一致, 故鉴定化合物为白术内酯 I。

化合物 9: 白色针晶, mp 100 ~ 103 °C。HR-ESI-MS m/z : 233.1453 [M + H]⁺ (计算值 233.1454), $[\alpha] = +22.1^\circ$ (c 1.0, MeOH)。分子式为 C₁₅H₂₀O₂。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 4.89 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-15a), 4.88 (1H, dd, $J = 11.6, 6.4$ Hz, H-8), 4.62 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-15b), 2.74 (1H, dd, $J = 13.6, 3.6$ Hz, H-6a), 2.37 (1H, dt, $J = 13.6, 2.4$ Hz, H-3a), 2.29 (1H, m, H-9a), 2.27 (1H, m, H-6b), 1.97 (1H, dt, $J = 12.6, 5.6$ Hz, H-3b), 1.87 (1H, dt, $J = 12.6, 1.4$ Hz, H-5), 1.80 (3H, s, 13-CH₃), 1.65 (1H, m, H-1a), 1.58 (2H, m, H-2), 1.35 (1H, dt, $J = 13.6, 4.8$ Hz, H-1b), 1.13 (1H, t, $J = 11.6$ Hz, H-9b), 0.92 (3H, s, 14-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 174.8 (C-12), 162.4 (C-7), 148.6 (C-4), 120.3 (C-11), 107.1 (C-15), 78.2 (C-8), 50.1 (C-5), 47.7 (C-9), 40.8 (C-1), 36.8 (C-10), 36.5 (C-3), 25.6 (C-6), 22.3 (C-2), 16.4 (14-CH₃), 8.4 (13-CH₃)。与文献报道^[14]基本一致, 故鉴定化合物为白术内酯 II。

化合物 10: 白色针晶, mp 123 ~ 126 °C。HR-ESI-MS m/z : 233.1455 [M + H]⁺ (计算值 233.1453), $[\alpha] = -17.3^\circ$ (c 1.0, MeOH)。分子式为 C₁₅H₂₀O₂。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 5.03 (1H, t, $J = 10.2$ Hz, H-8), 4.91 (1H, s, H-15a), 4.68 (1H, s, H-15b), 2.67 (1H, dd, $J = 18.6, 12.5$ Hz, H-6a), 2.62 (1H, m, H-6b), 2.42 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-3a), 2.41 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-5), 2.22 (1H, dd, $J = 13.8, 10.2$ Hz, H-9a), 1.84 (3H, s, 13-CH₃), 1.69 (1H, m, H-3b), 1.61 (1H, m, H-1a), 1.59 (2H, m, H-2), 1.54 (1H, m, H-1b), 1.35 (1H, dd, $J = 13.8, 8.8$ Hz, H-9b), 0.67 (3H,

s, 14-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 175.3 (C-12), 162.3 (C-7), 147.9 (C-4), 121.4 (C-11), 108.3 (C-15), 77.6 (C-8), 44.3 (C-9), 42.8 (C-5), 42.7 (C-1), 36.6 (C-3), 35.4 (C-10), 24.5 (C-6), 23.3 (C-2), 21.3 (14-CH₃), 8.4 (13-CH₃)。上述数据与文献报道^[15]基本一致, 故鉴定化合物为表白术内酯 I。

化合物 11: 白色针晶, mp 166 ~ 170 °C。HR-ESI-MS *m/z*: 249.1429 [M + H]⁺ (计算值 249.1426), [α] = +23.4° (c 2.0, MeOH), 分子式为 C₁₅H₂₀O₃。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 4.87 (1H, brs, H-15a), 4.62 (1H, brs, H-15b), 2.64 (1H, dd, *J* = 13.4, 3.1 Hz, H-6a), 2.45 (1H, t, *J* = 12.9 Hz, H-3a), 2.37 (1H, d, *J* = 13.4 Hz, H-6b), 2.32 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, H-9a), 1.97 (1H, td, *J* = 12.3, 7.0 Hz, H-3b), 1.86 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, H-5), 1.83 (3H, s, 13-CH₃), 1.66 (2H, m, H-2), 1.58 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-1a), 1.54 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, H-9b), 1.24 (1H, td, *J* = 5.3, 12.8 Hz, H-1b), 1.03 (3H, s, 14-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 172.0 (C-12), 160.6 (C-7), 148.7 (C-4), 122.1 (C-11), 106.8 (C-15), 103.3 (C-8), 51.8 (C-9), 51.2 (C-5), 41.2 (C-1), 36.8 (C-10), 36.2 (C-3), 24.7 (C-6), 22.2 (C-2), 16.7 (14-CH₃), 8.3 (13-CH₃)。数据与文献报道^[14]基本一致, 故鉴定化合物为白术内酯 III。

化合物 12: 白色固体。HR-ESI-MS *m/z*: 235.1696 [M + H]⁺ (计算值 235.1695), [α] = +13.3° (c 0.1, MeOH), 分子式为 C₁₅H₂₂O₂。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 4.83 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-15a), 4.73 (1H, dd, *J* = 16.0, 1.3 Hz, H-12a), 4.54 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-15b), 4.08 (1H, dd, *J* = 16.0, 2.8 Hz, H-12b), 2.54 (1H, dd, *J* = 13.6, 3.0 Hz, H-6a), 2.41 (1H, dt, *J* = 13.2, 2.0 Hz, H-3a), 2.11 (1H, dd, *J* = 13.6, 1.2 Hz, H-6b), 1.98 (1H, td, *J* = 13.2, 6.2 Hz, H-5), 1.83 (1H, dd, *J* = 12.9, 1.2 Hz, H-5), 1.79 (1H, d, *J* = 13.6 Hz, H-9a), 1.69 (3H, s, 13-CH₃), 1.65 (1H, m, H-2a), 1.62 (1H, m, H-2b), 1.51 (1H, dt, *J* = 13.2, 3.2 Hz, H-1a), 1.31 (1H, d, *J* = 13.6 Hz, H-9b), 1.23 (1H, td, *J* = 13.2, 4.8 Hz, H-1b), 1.05 (3H, s, 14-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 149.8 (C-4), 130.3 (C-7), 124.7 (C-11), 106.1 (C-15), 97.5 (C-8), 73.0 (C-12), 50.1 (C-5), 46.7 (C-9), 41.3 (C-1), 36.6 (C-3), 36.5 (C-

10), 24.0 (C-6), 22.6 (C-2), 16.9 (14-CH₃), 13.8 (13-CH₃)。与文献报道^[15]基本一致, 故鉴定化合物为 atractylenether。

化合物 13: 白色颗粒状晶体, mp 207 ~ 213 °C。HR-ESI-MS *m/z*: 463.2782 [M + H]⁺ (计算值 463.2783), [α] = +24.7° (c 0.2, MeOH), 分子式为 C₃₀H₃₈O₄。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 4.86 (2H, s, H-15a, 15'a), 4.65 (2H, s, H-15b, 15'b), 2.87 (2H, d, *J* = 14.4 Hz, H-9a, 9'a), 2.75 (2H, d, *J* = 13.2 Hz, H-6a, 6'a), 2.68 (2H, dd, *J* = 13.2, 3.4 Hz, H-6b, 6'b), 2.35 (2H, d, *J* = 13.0 Hz, H-3a, 3'a), 1.93 (2H, m, H-6b, 6'b), 1.78 (6H, s, 13-CH₃, 13'-CH₃), 1.72 (2H, m, H-5, 5'), 1.68 (4H, m, H-2, 2'), 1.64 (2H, m, H-1a, 1'a), 1.41 (2H, d, *J* = 14.4 Hz, H-9b, 9'b), 1.25 (2H, m, H-1b, 1'b), 1.13 (6H, s, 14-CH₃, 14'-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 172.3 (C-12, 12'), 164.8 (C-7, 7'), 148.2 (C-4, 4'), 124.8 (C-11, 11'), 107.6 (C-15, 15'), 89.6 (C-8, 8'), 53.0 (C-5, 5'), 49.7 (C-9, 9'), 42.2 (C-1, 1'), 37.1 (C-10, 10'), 36.1 (C-3, 3'), 28.0 (C-6, 6'), 22.3 (C-2, 2'), 17.3 (14-CH₃, 14'-CH₃), 8.5 (13-CH₃, 13'-CH₃)。与文献报道^[15]基本一致, 鉴定化合物为双白术内酯。

化合物 14: 无色针晶, mp 205 ~ 208 °C。HR-ESI-MS *m/z*: 463.2780 [M + H]⁺ (计算值 463.2782), [α] = -0.4° (c 0.3, MeOH), 分子式为 C₃₀H₃₈O₄。¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 4.86 (2H, s, H-15a, 15'a), 4.61 (2H, s, H-15b, 15'b), 2.83 (2H, t, *J* = 10.0 Hz, H-5, 5'), 2.66 (2H, dd, *J* = 17.4, 10.2 Hz, H-6a, 6'a), 2.35 (2H, d, *J* = 13.2 Hz, H-3a, 3'a), 2.34 (2H, d, *J* = 15.0 Hz, H-9a, 9'a), 2.17 (2H, ddd, *J* = 17.4, 7.8, 2.0 Hz, H-6b, 6'b), 2.07 (2H, m, H-3b, 3'b), 2.01 (2H, d, *J* = 15.0 Hz, H-9b, 9'b), 1.78 (6H, s, 13-CH₃, 13'-CH₃), 1.67 (2H, m, H-2a, 2'a), 1.56 (2H, m, H-1a, 1'a), 1.49 (2H, m, H-2b, 2'b), 1.44 (2H, m, H-1b, 1'b), 0.50 (6H, s, 14-CH₃, 14'-CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 172.8 (C-12, 12'), 163.5 (C-7, 7'), 148.3 (C-4, 4'), 125.4 (C-11, 11'), 107.4 (C-15, 15'), 89.4 (C-8, 8'), 47.0 (C-9, 9'), 42.6 (C-5, 5'), 42.1 (C-1, 1'), 37.0 (C-10, 10'), 36.8 (C-3, 3'), 24.8 (C-6, 6'), 22.7 (C-2, 2'), 19.0 (14-CH₃, 14'-CH₃), 8.5 (13-CH₃, 13'-CH₃)。与文献报道^[16]基本一致, 故鉴定化合物为双表白术内酯。

4 细胞毒活性研究

使用 MTT 法对本次实验得到的 14 种化合物进行人胃癌细胞 MGC-803 和人宫颈癌细胞 HeLa 的活性筛选。将对数生长期的细胞按 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 在培养箱 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养。当细胞贴壁后, 将 96 孔板设空白组 (空白培养基) 和给药组, 每组设置 3 个复孔, 给药培养 24 h 后, 每孔加入 MTT 试剂 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $20 \mu\text{L}$, 放入培养箱中培养 4 h 后加入 $120 \mu\text{L}$ 的 DMSO, 振荡, 用酶标仪在 570 nm 波长处测定 OD 值, 计算细胞抑制率, 得到 IC_{50} 值。由表 1 结果可知, 化合物 1、8 ~ 14 对 HeLa 细胞具有一定的抗肿瘤活性, 化合物 8 ~ 11、13 对 MGC-803 具有一定的抗肿瘤活性。其中化合物白术内酯 III 对 HeLa 和 MGC-803 的细胞毒作用最强, 其 IC_{50} 值为 (20.19 ± 1.30) 、 $(59.98 \pm 2.62) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 14 个化合物单体及顺铂对 HeLa 和 MGC-803 细胞的 IC_{50} 比较 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Tab 1 IC_{50} of 14 compounds alone and cisplatin on HeLa and MGC-803 cells ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

化合物	HeLa	MGC-803
化合物 1	85.72 ± 2.07	> 100
化合物 2	> 100	> 100
化合物 3	> 100	> 100
化合物 4	> 100	> 100
化合物 5	> 100	> 100
化合物 6	> 100	> 100
化合物 7	> 100	> 100
化合物 8	33.42 ± 1.11	70.61 ± 2.05
化合物 9	22.13 ± 1.03	75.28 ± 1.81
化合物 10	27.51 ± 1.66	77.36 ± 1.76
化合物 11	20.19 ± 1.30	59.98 ± 2.62
化合物 12	48.88 ± 2.25	> 100
化合物 13	78.52 ± 1.99	87.63 ± 3.16
化合物 14	82.64 ± 2.67	> 100
顺铂	20.73 ± 2.12	18.32 ± 2.03

5 讨论

本实验共分离出 14 种化合物, 主要为倍半萜和木脂素类成分。据现代研究表明, 关苍术的倍半萜类成分主要具有抗炎抗菌和肝障碍诱发症的抑制作用; 菊科中, 木脂素类成分主要具有抗肿瘤、抗炎等药理活性。本次实验中化合物 1 ~ 7 为首次从关苍术的二氯甲烷和正丁醇的萃取部位分离得到, 新天然产物的发现有利于进一步对该资源的深入开发。药理细胞毒活性实验表明白术内酯 III 对 HeLa 和 MGC-803 细胞具有良好的抑制作用。随着苍术资源的不断减少, 关苍术具有某

些与苍术相似的药用功效, 正在被逐步开发为苍术的替代品使用。本实验进一步研究了关苍术的化学成分, 为关苍术的药理作用研究和进一步开发利用提供有价值的药效物质基础, 为了充分发挥其药用价值, 应继续推进对关苍术化学成分和药理作用的相关研究。

参考文献

- [1] 赵千里, 王美娟, 赵敏, 等. 关苍术的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49 (16): 3797-3803.
- [2] 刘思佳, 姚杰, 宋雪, 等. 苍术属药用植物的化学成分、药理作用、临床应用概况 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (1): 151-154.
- [3] 李海兰, 冯卫军, 朴光春, 等. 朝药关苍术的化学成分及药理作用研究 [J]. 中国药房, 2018, 29 (11): 1515-1519.
- [4] 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.
- [5] 李英姬, 朴惠善. 关苍术的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2002, 21 (1): 12-14.
- [6] 马玲, 张海毅, 杨世海, 等. 关苍术的研究现状 [J]. 人参研究, 2012, 24 (3): 51-54.
- [7] 姜侃, 郭晔红. 华中五味子根部木脂素类化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2022, 53 (21): 6666-6673.
- [8] Kuang HX, Xia YG, Yang BY, et al. Lignan constituents from *Chloranthus japonicus* Sieb [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32 (3): 329-334.
- [9] Jiang ZH, Tanaka T, Sakamoto M, et al. Studies on a medicinal parasitic plant: lignans from the stems of *Cynomorium songaricum* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2001, 49 (8): 1036-1038.
- [10] Wang YH. Structure elucidation of a new lignan glycoside from *Artemisia ordosica* [J]. Chem Nat Compd, 2019, 55 (6): 1007-1009.
- [11] 高艳艳, 郭凤霞, 郭少波, 等. 宽筋藤氯仿和正丁醇部位化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34 (8): 1325-1331.
- [12] 彭中灿, 赫军, 潘雪格, 等. 山茱萸化学成分的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2021, 52 (15): 4480-4486.
- [13] Ly TN, Yamauchi R, Shimoyamada M, et al. Isolation and structural elucidation of some glycosides from the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance) [J]. J Agr Food Chem, 2002, 50 (17): 4919-4924.
- [14] 李滢, 杨秀伟. 生白术化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20 (4): 382-386.
- [15] 周媛媛, 高蕙蕊, 吴熙培, 等. 关苍术石油醚部位化学成分研究 [J]. 中医药学报, 2020, 48 (12): 26-29.
- [16] 李滢, 杨秀伟. 麸炒白术化学成分的研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20 (9): 1074-1079.

(收稿日期: 2024-03-05; 修回日期: 2024-05-02)

基于化学成分和代谢组学分析的传统去皮净制 对何首乌肝毒性影响探讨

陈潘¹, 罗寒燕², 张伟豪², 李新星¹, 陈锦津², 朱利霞³, 许军^{2*}, 赵中振^{1*}, 魏胜利^{1*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 香港浸会大学中医药学院, 香港 999077; 3. 中山大学附属第八医院药学部, 广东 深圳 518033)

摘要: **目的** 比较去皮对何首乌水提取物化学成分及潜在肝毒性的影响。**方法** 用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析去皮何首乌水提取物、粗皮水提取物的化学成分并鉴定, 结合多元统计分析对比何首乌不同组织部位水提取物肝毒性成分含量差异。选取雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为正常组, 未去皮何首乌水提取物给药组, 去皮何首乌水提取物给药组, 粗皮水提取物给药组, 各给药组大鼠灌胃剂量 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按照未去皮何首乌药材量计算), 正常组灌胃等体积去离子水, 每日一次, 连续灌胃 35 d, 搜集血清、肝脏。通过血清生化指标分析、肝病理学观察比较各组肝损伤情况。通过代谢组学分析, 比较各给药组大鼠肝损伤生物标志物水平的变化。**结果** 共鉴定出何首乌中 190 种化学成分, 去皮显著减少何首乌水提取物中肝毒性成分 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 (THSG) 和潜在肝毒性成分 THSG 二聚体 (Di-THSG) 及蒽醌类成分, 并明显减轻何首乌对大鼠的肝脏病理损伤。代谢组学分析结果提示, 相对不去皮给药, 去皮给药显著回调大鼠体内源性肝损伤生物标志物二十二碳六烯酸、吡啶酸、甘羟胆酸、酪氨酸和还原型谷胱甘肽水平, 与正常组差异无统计学意义。**结论** 本研究明确了去皮可减少何首乌水提取物中二苯乙烯苷类和蒽醌类肝毒性成分, 其可能通过减弱何首乌对内源性肝损伤生物标志物的扰动降低药物的肝病理损伤作用, 为何首乌的加工方法标准化提供了科学依据。

关键词: 代谢组学; 肝毒性; 何首乌; 加工; 去皮

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3169-12

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.007

Effect of traditional peeling on the hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum* Thunb. based on chemical composition analysis and metabolomics

CHEN Pan¹, LUO Han-yan², ZHANG Wei-hao², LI Xin-xing¹, CHAN Kam-chun², ZHU Li-xia³, XU Jun^{2*}, ZHAO Zhong-zhen^{1*}, WEI Sheng-li^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Hong Kong 999077; 3. Department of Pharmaceutical, The Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen Guangdong 518033)

Abstract: Objective To compare the effect of peeling on the chemical compositions and potential hepatotoxicity of the water extract of *Polygonum multiflorum* Thunb. (*Heshouwu*). **Methods** The chemical constituents of water extract of peeled *Heshouwu*, and water extract of peels were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS, before the identification. Multivariate statistical analysis was used to compare the levels of hepatotoxic constituents in different parts of *Heshouwu*. Totally 40 male SD rats were selected and randomly divided into a normal group, a water extract of unpeeled *Heshouwu* group and a water extract of peeled *Heshouwu* group. The rats in each treatment group were orally given a dose of $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (calculated according to the amount of unpeeled *Heshouwu* materials), while the

基金项目: Hong Kong General Research Fund 香港优配研究金 (No. 12103919); 广东省中医药局 (No. 20221097)。

作者简介: 陈潘, 女, 硕士研究生, 主要从事中药材产地加工研究, email: 13540284719@163.com *通信作者: 许军, 男, 助理教授, 主要从事中药炮制化学和药理学研究, email: davidxujun@hkbu.edu.hk; 赵中振, 男, 教授, 主要从事中药鉴定研究, email: zhongzhenzhao2@gmail.com; 魏胜利, 男, 教授, 主要从事中药资源产业经济学研究, email: wsl7491@126.com

rats in the normal group were orally given an equivalent volume of deionized water once daily for 35 consecutive days, before the serum and liver samples were collected. Serum biochemical analysis and liver pathology were used to compare the liver injury in each group, while metabolomics was used to compare the level of liver injury biomarkers of rats in each administration group. **Results** Totally 190 chemical constituents were identified in *Heshouwu*. Peeling significantly reduced the levels of hepatotoxic constituent 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside and potentially hepatotoxic constituent dimer of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, as well as anthraquinones in the water extract of *Heshouwu*. Peeling also obviously alleviated the liver pathological damage of *Heshouwu* to rats. Metabolomic analysis showed that peeled *Heshouwu* greatly reversed the levels of endogenous liver injury biomarkers such as docosahehexanoic acid, pipercolinic acid, glycohyocholic acid, tyrosine and reduced glutathione in rats compared with unpeeled *Heshouwu*. **Conclusion** Peeling can reduce the hepatotoxic constituents of stilbene glycosides and anthraquinones in the water extract of *Heshouwu* and may reduce the hepatic pathological damage effect of *Heshouwu* by attenuating the perturbation of endogenous liver injury biomarkers. This study provides a scientific basis for the standardisation *Heshouwu* processing.

Key words: metabolomics; hepatotoxicity; *Polygonum multiflorum* Thunb.; processing; peeling

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 临床上常用于分解毒素、滋肠通便。然而, 国内外不断出现临床上服用何首乌后出现肝损伤的不良后果^[1-4], 其原因尚未完全明确。产地加工和炮制是中药增效减毒的重要手段, 吴玫萱等^[5]指出金铁锁的根去皮后, 水煎液毒性大大降低。明代《本草纲目》记载了何首乌的加工方式: “用何首乌赤白各一斤, 竹刀刮去粗皮, 切片……”, 但在《中国药典》(2020年版) 中何首乌未被要求除粗皮^[6]。古今的加工方法差异, 可能与何首乌的临床肝毒性有重要关系。二苯乙烯类和蒽醌类为何首乌的主要肝毒性成分^[7], 且二苯乙烯苷、游离/结合大黄素和游离/结合大黄素甲醚的含量在皮中的含量均不低^[8], 但目前尚不清楚去皮对何首乌整体化学成分及何首乌体内肝毒性的影响, 本研究将通过化学分析、动物实验及代谢组学分析探讨去皮对何首乌肝毒性的影响及潜在机制, 为优化何首乌加工方法提供更加丰富的理论基础。

1 材料

1.1 仪器与试药

Agilent 6540 型 QTOF/MS、Agilent 1290 UPLC 超高效液相色谱系统、PL602E 型电子分析天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司), OSB-2200 型旋蒸仪器 (东京理化器械株式会社), TGL-16 型冷冻高速离心机 (湘仪离心机仪器有限公司), N-EVAP 型氮吹仪 (美国 Organomation 有限公司), 水质叶绿素提取研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司) 自动

生化分析仪 [型号: 7060, 日立 (中国) 有限公司], DM3000 LED 生物显微镜 (德国莱卡有限公司)。

生何首乌药材 (批号: YT7041004127613, 济世堂有限公司) 购自中国四川省, 经北京中医药大学赵中振教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 凭证标本 HSWE20220815 存放于中国香港浸会大学中医学院香港中药鉴定中心。谷草转氨酶 (AST) 测定试剂盒 (货号: E-BC-K236-M)、谷丙转氨酶 (ALT) 测定试剂盒 (货号: E-BC-K235-M) (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), HE 染色 (北京索莱宝科技有限公司), 乙腈为色谱级, 甲醇、甲酸为分析级, 水为去离子水, 其他试剂为分析纯。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 (200±20) g [香港中文大学实验动物中心 (中国香港), 生产许可证号为: 2023-21-A], 饲养于香港浸会大学大鼠动物房。所有动物实验均经香港浸会大学环境健康与安全委员会批准 (伦理审查号: 03/2023/HMF-7-B), 程序均符合香港浸会大学动物护理伦理委员会及香港特别行政区卫生署的指导方针。

2 方法与结果

2.1 何首乌各植物部位水提物全面化学表征

2.1.1 何首乌及各部位水提物制备 将生首乌均分为两部分, 一部分标记为未去皮何首乌 (HSW), 另一部分将 0.5 mm 厚的粗皮与肉质分离, 分别标记为去皮何首乌 (Flesh) 和粗皮 (Peel)。以上三种样品切成小块 (约 2 mm×0.5 mm), 分别加去离子水提

取两次，第一次加 8 倍量水 (g/mL，按未去皮何首乌药材量计算) 煮沸 2 h，180 目尼龙网过滤，取上清液，药渣用 4 倍量水煮沸 2 h，过滤，合并上清液，减压浓缩干燥，去离子水溶解为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (按未去皮何首乌药材量计算) 溶液，依次得何首乌水提物 (HSWE)、去皮何首乌水提物 (FleshE)、粗皮何首乌水提物 (PeelE)。取 HSWE、FleshE、PeelE 各 5 mL，分别加入 25 mL 甲醇，涡旋混匀， 4°C 下静置 48 h，离心 ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 4°C ，10 min)，上清液减压浓缩至 1/10， $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤，上清液用于液质分析。

2.1.2 色谱质谱条件 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ， $1.7 \mu\text{m}$)；流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和 0.1% 甲酸乙腈 (B) 溶液，洗脱条件：0 ~ 2 min，2%B；2 ~ 4.5 min，2% ~ 8%B；4.5 ~ 6.5 min，8%B；6.5 ~ 12.5 min，8% ~ 22%B；12.5 ~ 14.5 min，22%B；14.5 ~ 22 min，22% ~ 45%B；22 ~ 22.5 min，45% ~ 70%B；22.5 ~ 23.5 min，70%B；23.5 ~ 23.6 min，70% ~ 100%B；23.6 ~ 26.6 min，100%B；26.6 ~ 26.7 min，100% ~ 2%B；26.7 ~ 30 min，2%B。样品室温度 4°C ；流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；柱温 40°C ；进样量 $3 \mu\text{L}$ 。

质谱条件：采用 QTOF/MS 质谱仪；正 (ESI⁺)、负 (ESI⁻) 离子源；干燥气体 (N_2) 温度 300°C ，流量 $7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ；鞘气流量 $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ；气体加热丝 350°C ；雾化器压力 45 psi；毛细管电压 3500 V；全扫描质量范围 m/z 100 ~ 1700，分辨率 30 000。

2.1.3 In-house 数据库建立及成分鉴定 总结文献报道的何首乌化学成分建立数据库，导入 Agilent Mass Hunter PCDL Manager 软件 (版本 B.04.00, Agilent Technologies, Inc. 2011) 匹配化合物，将对应的二级碎片信息与文献^[9-12]和 Pubchem 网站信息比对，鉴定化合物，最大质量测量误差 10.0 ppm ($1 \text{ ppm} = 1 \times 10^{-6}$)。

FleshE 和 PeelE 中共鉴定出 190 种化合物 (见表 1 及图 1)，主要包括二苯乙烯类 19 种、蒽醌类 19 种、黄酮类 69 种、多酚类 34 种，还包括脂肪酸类、糖类、氨基酸类、生物碱类、羧酸类、萜类和其他类。FleshE 中鉴定出 171 种化学成分，其中二苯乙烯类 17 种，蒽醌类 18 种。PeelE 中鉴定出 148 种化学成分，其中二苯乙烯类 13 种，蒽醌类 16 种。PeelE 中二苯乙烯类和蒽醌类成分种数与 FleshE 中接近，提示去皮可能对 HSWE 中二苯乙烯类和蒽醌类成分含量有较大影响。

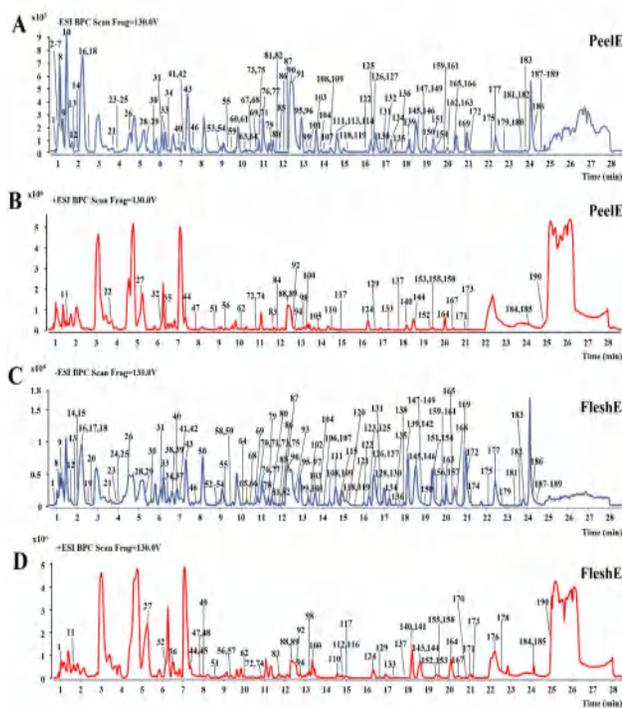


图 1 去皮何首乌水提物和粗皮水提物负 (A 和 C)、正 (B 和 D) 离子 BPC 图

Fig 1 Typical representative BPC of water extract of peeled *Heshouwu* and water extract of peel in negative (A and C) and positive (B and D) ion modes

2.2 HSWE 与 FleshE 化学成分差异

将 HSWE 和 FleshE 的液质数据导入 Metabo-Analyst 6.0 平台进行归一化、主成分分析 (PCA) 和火山图分析 ($P < 0.05$ ， $\text{FC} > 1$)。HSWE 组和 FleshE 组在 PCA 得分图 (见图 2A) 上明显分离，表明两组化学特征差异明显，火山图分析筛选出 80 种差异成分 (见表 1 及图 2B)，主要包含二苯乙烯苷类、蒽醌类、黄酮类和多酚类，其中二苯乙烯苷类有 11 种，成分 65、70、76、90、120、132、141 在 HSWE 中相对含量更高，对应的 $\log_2(\text{FC})$ 值为 0.85、0.81、0.15、2.98、0.47、0.54、1.40，其中成分 76 [2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 (THSG)] 为肝毒性成分^[13-14]，成分 120 [THSG 二聚体 (Di-THSG)] 为潜在肝毒性成分，成分 53、55、108、113 在 FleshE 中相对含量更高，对应的 $\log_2(\text{FC})$ 值为 -0.42、-0.56、-0.51、-0.21，在差异显著性相似情况下，HSWE 中的 7 种成分对应的 FC 值更大，提示去皮整体上降低了 HSWE 中二苯乙烯苷类成分的含量。蒽醌类差异成分有 14 种，其相对含量均在 HSWE 中更高。以上结果表明，去皮显著减少 HSWE 中二苯乙烯苷类和蒽醌类这两种具有潜在肝毒性成分的含量。

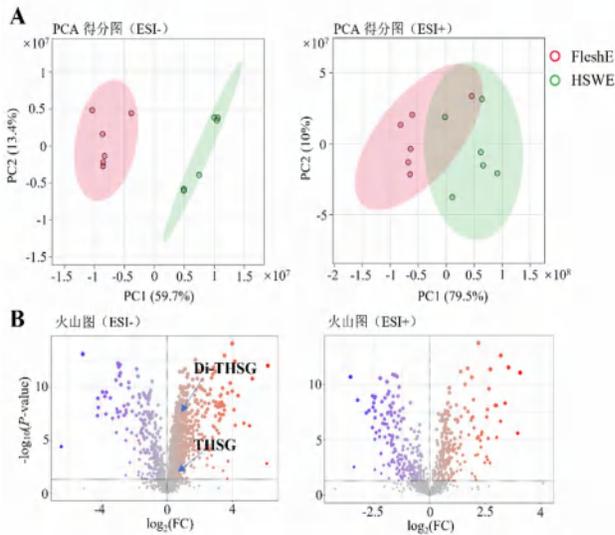


图 2 正负离子模式下未去皮何首乌水提取物和去皮何首乌水提取物化学成分的 PCA 得分图 (A) 及差异成分火山图 (B)

Fig 2 PCA plots (A) and volcano plots (B) of chemical compositions of water extract of unpeeled *Heshouwu* and water extract of peeled *Heshouwu* in negative and positive ion modes

2.3 各提取物对大鼠的肝毒性研究

2.3.1 分组与给药 雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为正常组 (CON 组)、HSWE 给药组,

FleshE 给药组和 PeelE 给药组。实验在 SPF 环境中进行。大鼠适应性喂养 1 周, 标准实验室饮食并自由饮水, 动物房温度 (22±1) °C, 湿度 40% ~ 55%。给药组大鼠灌胃剂量为 20 g · kg⁻¹ (按照对应的未去皮何首乌生药量计算), CON 组大鼠灌胃等体积去离子水, 每日上午给药一次, 连续灌胃 35 d。

2.3.2 标本采集 最后一次给药结束后, CON 组、HSWE 给药组、FleshE 给药组和 Peel 给药组分别剩余 10 只、7 只、10 只、9 只大鼠存活。大鼠禁食不禁水 12 h, 麻醉, 腹主动脉取血, 分离血清, - 80 °C 保存。摘取肝脏, 一半用 4% 多聚甲醛固定, 一半 - 80 °C 保存。

2.3.3 血清生化指标分析 按试剂盒说明书操作, 并在全自动生化分析仪上定量。用 GraphPad 单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较组间差异。给药后, 大鼠血清 AST 和 ALT 水平 (见图 3A) 未显著上升。

2.3.4 组织病理学观察 固定后的肝组织进行 HE 染色。观察到 CON 组和 FleshE 给药组肝细胞核大而圆, 细胞核居中, 肝细胞整齐排列, HSWE 给药组肝细胞出现肿胀和轻微坏死, 有明显局灶性炎症细胞浸润 (见图 3B), 提示 HSWE 给药导致肝细胞损伤, 而 FleshE 无明显肝毒性。

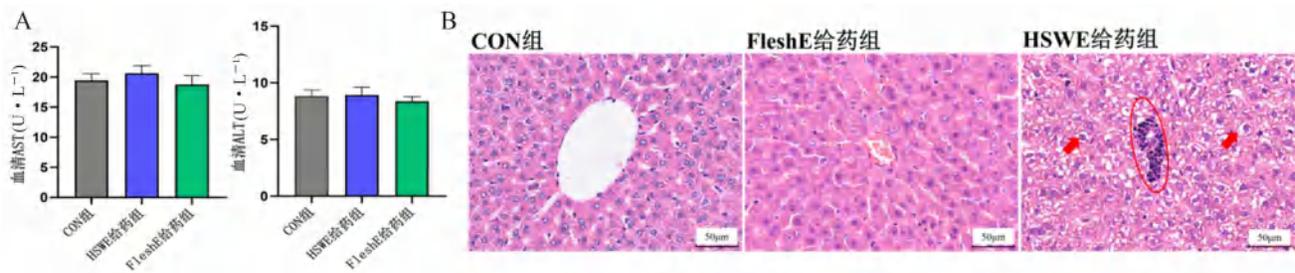


图 3 大鼠血清 AST 和 ALT 水平 (A) 及不同组别 HE 染色结果 (B)

Fig 3 AST and ALT levels in rat serum (A) and HE staining of different group (B)

2.4 血清、肝脏代谢组学

2.4.1 样品前处理 ① 血清样品: 取 150 μL 血清加入 600 μL 乙腈 - 甲醇 (4 : 1, V/V), 涡旋 60 s, 离心 (4 °C, 15 000 g, 10 min), 取上清液, 40 °C 下氮气吹干, 加入 150 μL 60% 甲醇, 涡旋 60 s 溶解。② 肝脏样品: 取肝脏 50 mg 加入离心管, 加入 500 μL 80% 甲醇 (预冷) 和 3 mm、4 mm 钢珠各一颗, 研磨两次, 每次 30 s, 离心 (19 000 g, 4 °C, 20 min), 经 0.22 μm 滤膜过滤, 取上清液。

2.4.2 色谱质谱条件 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 柱。血清样品洗脱条件: 0 ~ 6 min, 2% ~ 75%B; 6 ~ 9 min, 75% ~ 100%B; 9 ~ 12 min, 100%B; 12 ~ 12.1 min, 100% ~ 2%B; 12.1 ~ 15 min, 2%B。肝脏样品洗脱条件: 0 ~ 5.5 min, 1% ~ 22%B; 5.5 ~ 8.2 min, 22%B; 8.2 ~ 8.21 min, 22% ~ 75%B; 8.21 ~ 10

min, 75% ~ 100%B; 10 ~ 12 min, 100%B; 12 ~ 12.01 min, 100% ~ 1%B; 12.01 ~ 15 min, 1%B。其余色谱质谱条件同“2.1.2”项下。

2.4.3 数据提取与分析 Mass Hunter 软件 (版本 B.06.00, Agilent) 提取样品数据。质谱原始数据经 AnalysisBaseFileConverter 软件转换成 Abf 格式, 导入 MS-Dial 5.1.230429, 用其自建二级质谱数据库注释代谢物。质谱原始数据经 ProteoWizard 软件转成 mzML 格式, 导入 MetaboAnalyst 6.0, 进行数据归一化、有监督模式的偏最小二乘法分析 (PLS-DA)、火山图分析, 将筛选的差异代谢物与 MS-Dial 注释结果进行比对鉴定, 鉴定出的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 6.0 进行通路分析。用 GraphPad Prism 10.1.2 软件 One-way ANOVA 分析各组肝损伤生物标志物水平差异, 结果表示为平均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$), $P < 0.05$ 认为差异

表 1 通过 UPLC-QTOF-MS/MS 鉴定出的 FleshE 样品和 PeelE 样品中的主要化学成分

Table 1 Identification of major components in FleshE samples and PeelE samples by UPLC-QTOF-MS/MS

No.	t_R /min	中文名	分子式	离子模式	m/z	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片 质荷比 (m/z)	Flesh E	Peel E	趋势	结构 类型
1	0.937	葡萄糖酸	$C_6H_{12}O_7$	[M-H] ⁻	195.0494	- 8.52	75.0070, 99.0089	+	+		糖类
2	1.012	赤藓糖	$C_4H_8O_4$	[M+HCOO] ⁻	165.0408	2.14	55.0188, 56.9659, 59.0137, 73.0278	-	+		糖类
3	1.012	阿洛糖	$C_6H_{12}O_6$	[M+HCOO] ⁻	225.0612	0.43	59.0137, 71.0129, 89.0240	-	+		糖类
4	1.012	阿拉伯糖	$C_5H_{10}O_5$	[M+HCOO] ⁻	195.0511	0.20	59.0136	-	+		糖类
5	1.012	乳果糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	[M+HCOO] ⁻	387.1132	- 2.96	161.0398, 101.0221	-	+		糖类
6	1.029	L-精氨酸	$C_6H_{14}N_4O_2$	[M+H] ⁺	175.1186	- 2.15	70.0649, 71.0488, 116.0674, 158.0833, 130.0895	+	-		氨基酸类
7	1.070	丁二酸异构体	$C_4H_6O_5$	[M-H] ⁻	133.0140	- 1.99	72.9926, 59.0133	-	+		羧酸类
8	1.129	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	[M-H] ⁻	191.0205	3.86	87.0084, 85.0290, 111.0080, 191.0153,	+	+		羧酸类
9	1.259	丁二酸异构体	$C_4H_6O_5$	[M-H] ⁻	133.0141	- 0.87	72.9932, 59.0151	+	+		羧酸类
10	1.466	柠檬酸异构体	$C_6H_8O_7$	[M-H] ⁻	191.0209	5.73	87.0088, 85.0294, 111.0085, 191.0184	-	+		羧酸类
11	1.673	L-酪氨酸异构体	$C_9H_{11}NO_3$	[M+H] ⁺	182.0801	- 6.00	123.0413, 136.0721, 91.0529, 119.0479	+	+		氨基酸类
12	1.698	丁二酸	$C_4H_6O_4$	[M-H] ⁻	117.0196	3.01	72.9927, 59.0132	+	+		羧酸类
13	1.844	亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	[M-H] ⁻	130.0874	0.07	71.0138	+	+		氨基酸类
14	2.012	没食子酸-O-葡萄糖苷	$C_{13}H_{16}O_{10}$	[M-H] ⁻	331.0676	2.89	169.0145, 125.0253, 124.0113, 81.0341	+	+		多酚类
15	2.049	丁二酸异构体	$C_4H_6O_5$	[M-H] ⁻	133.0144	1.01	72.9936, 59.0155	+	-		羧酸类
16	2.224	1, 3, 5-苯三醇异构体	$C_6H_6O_3$	[M-H] ⁻	125.0246	1.91	97.0298, 125.0242, 67.0186	+	+	↑****	多酚类
17	2.224	柠檬酸异构体	$C_6H_8O_7$	[M-H] ⁻	191.0202	2.35	87.0103, 85.0272, 111.0100	+	-		羧酸类
18	2.248	没食子酸	$C_7H_6O_5$	[M-H] ⁻	169.0153	5.81	123.0070, 169.0138, 81.0347, 97.0293	+	+		多酚类
19	2.575	1, 3, 5-苯三醇	$C_6H_6O_3$	[M-H] ⁻	125.0244	0.85	97.0314, 125.0238, 67.0209	+	+		多酚类
20	2.751	乳果糖异构体	$C_{12}H_{22}O_{11}$	[M-H] ⁻	341.1094	1.06	101.0243, 161.0472	+	-		糖类
21	3.683	2-羧间苯二酚异构体	$C_7H_6O_4$	[M-H] ⁻	153.0196	1.50	91.0180, 67.0190, 65.0390, 153.0185, 109.0304	+	+		多酚类
22	3.757	茉莉酸甲酯	$C_{13}H_{20}O_3$	[M+Na] ⁺	247.1293	- 5.79	77.0373, 165.0527	-	+		萜类
23	3.917	羧香草酸	$C_9H_8O_6$	[M-H] ⁻	211.0255	3.16	123.0448	+	+		多酚类
24	4.034	4-羟基苯甲醛	$C_7H_6O_2$	[M+HCOO] ⁻	167.0352	1.22	93.0338, 108.0199	+	+	↓***	多酚类
25	4.034	多巴乙酸	$C_8H_8O_4$	[M-H] ⁻	167.0351	0.78	123.0449, 122.0370	+	+	↓***	多酚类
26	4.498	2-羧间苯二酚	$C_7H_6O_4$	[M-H] ⁻	153.0195	1.13	91.0175, 65.0395, 153.0180, 109.0296	+	+		多酚类
27	5.270	5-羟基麦芽酚	$C_6H_6O_4$	[M+H] ⁺	143.0337	- 1.31	68.0258	+	+		吡喃酮类
28	5.337	它乔糖苷	$C_{13}H_{18}O_8$	[M+HCOO] ⁻	347.0994	3.55	139.0397, 140.0081	+	+	↑*	多酚类
29	5.386	2-(β-D-吡喃葡萄糖基氧基)-3,5-二羟基苯甲醛	$C_{13}H_{16}O_9$	[M-H] ⁻	315.0729	2.50	153.0181	+	+		多酚类
30	5.659	L-酪氨酸	$C_9H_{11}NO_3$	[M-H] ⁻	180.0668	0.98	163.0242, 121.0624, 134.0603	+	+	↑****	氨基酸类
31	6.094	3-羟基苯甲酸异构体	$C_7H_6O_3$	[M-H] ⁻	137.0248	2.36	65.0032, 93.0333	+	+		多酚类
32	6.177	2-乙烯基-1H-咪唑-3-羧酸	$C_{11}H_9NO_2$	[M+H] ⁺	188.0709	1.48	144.0810, 118.0645, 116.0684	+	+		生物碱类
33	6.298	3-羟基苯甲酸异构体	$C_7H_6O_3$	[M-H] ⁻	137.0246	1.32	93.0349, 65.0387, 75.0209	+	+		多酚类
34	6.386	表儿茶素-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	$C_{21}H_{24}O_{11}$	[M-H] ⁻	451.1246	- 1.12	289.0717, 271.0634	+	+		黄酮类
35	6.419	儿茶素异构体	$C_{15}H_{14}O_6$	[M+H] ⁺	291.0862	- 0.45	111.0433, 124.0532	-	+		黄酮类
36	6.440	烯丙基愈创木酚	$C_{10}H_{12}O_2$	[M+H] ⁺	165.0903	- 6.63	77.0345	+	-		多酚类
37	6.445	杜仲苷异构体	$C_{15}H_{22}O_9$	[M-H] ⁻	345.1195	6.32	89.0246, 59.0145,	+	-	↓*	萜类
38	6.632	原花青素 B8/B5/B6	$C_{30}H_{26}O_{12}$	[M-H] ⁻	577.1363	1.51	289.0720, 125.0243, 245.0820, 407.0769	+	-		黄酮类
39	6.691	表没食子儿茶素	$C_{15}H_{14}O_7$	[M-H] ⁻	305.0668	0.38	125.0257, 137.0225, 109.0307, 139.0368, 125.0206	+	-	↑****	黄酮类
40	6.900	原花青素 B8/B5/B6 异构体	$C_{30}H_{26}O_{12}$	[M-H] ⁻	577.1355	0.25	289.0717, 125.0249, 245.0417	+	+		黄酮类
41	7.037	2-乙烯基-1H-咪唑-3-羧酸异构体	$C_{11}H_9NO_2$	[M-H] ⁻	186.0566	2.58	116.0505, 142.0663	+	+	↓*	生物碱类

续表 1

No.	t_R /min	中文名	分子式	离子模式	m/z	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片 质荷比 (m/z)	Flesh E	Peel E	趋势	结构 类型
42	7.037	刺桐碱	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	[M-H] ⁻	245.1301	1.75	142.0659, 186.0574	+	+	↓*	生物碱类
43	7.329	儿茶素异构体	$C_{15}H_{14}O_6$	[M+HCOO] ⁻	335.0778	4.64	109.0293, 123.0452, 122.0358	+	+	↑*	黄酮类
44	7.355	3-羟基苯甲酸异构体	$C_7H_6O_3$	[M+H] ⁺	139.0390	-0.21	67.0190	+	+		多酚类
45	7.376	脱落酸	$C_{15}H_{20}O_4$	[M+H] ⁺	265.1425	-4.97	187.0692	+	-		羧酸类
46	7.762	原花青素 B8/B5/B6 异构体	$C_{30}H_{26}O_{12}$	[M-H] ⁻	577.1354	-0.22	407.0748, 289.0716, 125.0247, 245.0430	+	+		黄酮类
47	7.844	THSG 二聚体异构体	$C_{40}H_{42}O_{18}$	[M+H] ⁺	811.2444	-1.50	649.1943, 487.1424	+	+		二苯乙烯类
48	7.844	杜仲苷	$C_{15}H_{22}O_9$	[M+Na] ⁺	369.1176	5.53	189.0563, 207.0675	+	-	↓**	萜类
49	8.049	THSG 二聚体异构体	$C_{40}H_{42}O_{18}$	[M+H] ⁺	811.2441	-0.77	649.1865, 487.1363	+	-		二苯乙烯类
50	8.163	4-羟基苯甲酸异构体	$C_7H_6O_2$	[M-H] ⁻	121.0298	2.18	92.0268, 121.0295	+	+	↓**	多酚类
51	8.663	原花青素 B8/B5/B6 异构体	$C_{30}H_{26}O_{12}$	[M+H] ⁺	579.1496	-0.98	291.082, 127.0386, 247.0568, 409.0906	+	+		黄酮类
52	8.747	聚黄烷醇 A 异构体	$C_{35}H_{34}O_{15}$	[M-H] ⁻	693.1820	-1.70	405.1195	+	-	↑**	黄酮类
53	8.834	何首乌糖苷 A/B	$C_{40}H_{44}O_{18}$	[M+HCOO] ⁻	857.2502	-1.16	649.1913, 243.0666, 405.1175, 487.1406	+	+	↓****	二苯乙烯类
54	8.888	原花青素 B8/B5/B6 异构体	$C_{30}H_{26}O_{12}$	[M-H] ⁻	577.1348	-1.56	289.0703, 125.0233, 245.0753, 407.0773	+	+		黄酮类
55	9.218	Polygonumosides C	$C_{40}H_{44}O_{19}$	[M-H] ⁻	827.2418	1.13	485.1175, 421.1161, 405.1211, 349.1066, 331.0974, 315.0725, 259.0612, 241.0555, 153.0192	+	+	↓*	二苯乙烯类
56	9.336	羟基酸模素-己糖	$C_{19}H_{22}O_9$	[M+H] ⁺	395.1338	0.59	233.0803, 189.0621, 109.0251	+	+	↓*	萜类
57	9.336	2', 3', 4'-三甲氧基苯乙酮	$C_{11}H_{14}O_4$	[M+Na] ⁺	233.0800	7.11	191.0694, 160.0497	+	-		多酚类
58	9.397	甘草素-己糖-木糖/芳酸	$C_{26}H_{30}O_{13}$	[M-H] ⁻	549.1605	-1.82	387.1065, 297.0743, 281.0418, 269.0732, 255.0693, 241.0492, 176.0159, 161.0106	+	-		黄酮类
59	9.497	Polygonumosides C 异构体	$C_{40}H_{44}O_{19}$	[M-H] ⁻	827.2392	-2.07	485.1327, 421.1094, 405.1216, 349.0855, 331.1013, 315.0727, 259.0551, 153.0186	+	+		二苯乙烯类
60	9.788	儿茶酚	$C_{15}H_{14}O_6$	[M-H] ⁻	289.0731	4.31	109.0289, 123.0455, 122.0364	+	+		黄酮类
61	9.904	2, 4-二羟基-6-[(1E)-2-(4-羟基苯基)乙炔基]苯基-2-O-β-D-呋喃果糖基-β-D-吡喃葡萄糖苷	$C_{26}H_{32}O_{14}$	[M+HCOO] ⁻	613.1778	0.34	405.1193	+	+		多酚类
62	10.067	白果内酯	$C_{15}H_{18}O_8$	[M+Na] ⁺	349.0916	6.82	165.0672, 239.0667	+	+		萜类
63	10.067	儿茶素异构体	$C_{15}H_{14}O_6$	[M-H] ⁻	289.0724	2.23	109.0292, 123.0450	-	+		黄酮类
64	10.106	3, 4'-二羟基二苯乙烯-3-β-D-吡喃葡萄糖苷	$C_{20}H_{22}O_8$	[M+HCOO] ⁻	435.1301	2.02	227.0335, 185.0319	+	+		二苯乙烯类
65	10.318	四羟基二苯乙烯-O-丙二酰基-己糖异构体	$C_{23}H_{24}O_{12}$	[M-H] ⁻	491.1196	-0.75	285.0786, 329.0606, 313.0645	+	-	↑****	二苯乙烯类
66	10.318	桑皮苷 F	$C_{26}H_{30}O_{14}$	[M-H] ⁻	565.1565	-2.34	403.1464, 241.3479	+	-		黄酮类
67	10.423	原花青素 B8/B5/B6 异构体	$C_{30}H_{26}O_{12}$	[M-H] ⁻	577.1351	-0.25	289.0734, 125.0218, 245.0462, 407.0747	-	+		黄酮类
68	10.497	羧香草酸异构体	$C_9H_8O_6$	[M-H] ⁻	211.0253	2.32	123.0451	+	+	↑*	多酚类
69	10.660	2-香豆酸	$C_9H_8O_3$	[M-H] ⁻	163.0402	0.74	119.0503, 93.0309	+	+	↑*	多酚类
70	10.748	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-(2"-O-乙酰基)-β-D-葡萄糖苷异构体	$C_{22}H_{24}O_{10}$	[M+HCOO] ⁻	493.1366	3.15	243.0460	+	-	↑****	二苯乙烯类
71	10.748	乙酰基表儿茶素-葡萄糖苷乙酰基表儿茶素-葡萄糖苷	$C_{23}H_{26}O_{12}$	[M-H] ⁻	493.1366	2.79	269.0869, 330.0735, 401.1244, 243.0640, 255.0658, 227.0738, 161.0206,	+	+	↑***	黄酮类
72	10.769	肉桂基-没食子酰基-己糖异构体	$C_{22}H_{22}O_{11}$	[M+H] ⁺	463.1233	-0.03	301.0667	+	+		多酚类
73	10.806	2, 4-二羟基-6-[(1E)-2-(4-羟基苯基)乙炔基]苯基-2-O-β-D-呋喃果糖基-β-D-吡喃葡萄糖苷异构体	$C_{26}H_{32}O_{14}$	[M-H] ⁻	567.1729	2.34	405.1194	+	+		多酚类

续表 1

No.	t_R /min	中文名	分子式	离子模式	m/z	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片 质荷比 (m/z)	Flesh E	Peel E	趋势	结构 类型
74	10.827	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷异构体	$C_{20}H_{22}O_9$	[M+H] ⁺	407.1332	-1.49	245.0774, 227.0693, 199.0727	+	+		二苯乙烯类
75	10.835	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	[M-H]	301.0361	2.49	255.0252, 227.1386, 211.0386, 107.0120	+	+	↓*	黄酮类
76	11.069	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	$C_{20}H_{22}O_9$	[M-H]	405.1202	2.07	243.0663, 225.0568, 197.0471	+	+	↑*	二苯乙烯类
77	11.099	水杨酸甲酯	$C_8H_8O_3$	[M-H]	151.0403	1.44	95.0525, 151.0400, 67.0195,	+	+	↑***	多酚类
78	11.186	原花青素 B8/B5/B6 异构体	$C_{30}H_{26}O_{12}$	[M-H]	577.1351	-1.39	289.0697, 125.0240, 407.0754	+	-		黄酮类
79	11.433	6-甲氧基-2-乙酰基-3-甲基胡桃酮-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	$C_{20}H_{22}O_{10}$	[M-H]	421.1147	1.25	259.0628	+	+		萜类
80	11.578	橙皮素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	$C_{22}H_{24}O_{11}$	[M-H]	463.1257	1.94	301.0692, 151.0367	+	+		黄酮类
81	11.669	2, 5-二甲基-7-羟基色酮	$C_{11}H_{10}O_3$	[M-H]	189.0560	1.57	148.0696, 121.0604, 161.0646	+	+		黄酮类
82	11.669	5-羧甲基-7-羟基-2-甲基色酮	$C_{12}H_{10}O_5$	[M-H]	233.0462	2.60	189.0550, 161.0254	+	+	↑****	黄酮类
83	11.684	5, 7-二甲氧基苯酚	$C_{10}H_{10}O_4$	[M+H] ⁺	195.0650	7.33	189.0543	+	+		苯并呋喃类
84	11.859	羟基酸模素-己糖异构体	$C_{19}H_{22}O_9$	[M+H] ⁺	395.1344	1.85	233.0805, 109.0285	-	+		萜类
85	11.860	(+)-南烛木树脂酚-3- <i>O</i> - β -吡喃葡萄糖苷	$C_{28}H_{38}O_{13}$	[M+HCOO] ⁻	627.2294	0.28	419.1698	+	+	↑****	多酚类
86	12.035	芹菜苷	$C_{26}H_{28}O_{14}$	[M-H]	563.1406	-0.20	269.0093, 270.0449, 89.0239	+	+		黄酮类
87	12.223	儿茶素-3- <i>O</i> -没食子酸酯	$C_{22}H_{18}O_{10}$	[M-H]	441.0850	5.09	289.0715, 259.0582, 243.0658, 169.0150, 137.0239	+	+		黄酮类
88	12.320	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷异构体	$C_{20}H_{22}O_9$	[M+H] ⁺	407.1327	-2.94	245.0789, 227.0673, 199.0731	+	+		二苯乙烯类
89	12.381	葱林异构体	$C_{14}H_{10}O_3$	[M+H] ⁺	227.0696	-2.67	152.0621	+	+		葱醌类
90	12.385	何首乌糖苷 A/B 异构体	$C_{40}H_{44}O_{18}$	[M-H]	811.2477	2.35	243.0670, 405.1205	+	+	↑****	二苯乙烯类
91	12.502	槲皮素异构体	$C_{15}H_{10}O_7$	[M-H]	301.0363	3.26	227.0307, 107.0105	-	+		黄酮类
92	12.612	儿茶素-3- <i>O</i> -没食子酸酯异构体	$C_{22}H_{18}O_{10}$	[M+H] ⁺	443.0944	-7.12	291.0849, 139.0379	+	+		黄酮类
93	12.691	甘草苷异构体	$C_{21}H_{22}O_9$	[M-H]	417.1196	1.19	255.0638, 213.0510	+	-		黄酮类
94	12.725	肉桂酰-没食子酰-己糖	$C_{22}H_{22}O_{11}$	[M+H] ⁺	463.1259	4.57	301.0707	+	+	↑****	多酚类
95	12.887	β -D-吡喃葡萄糖苷, 2, 4-二羟基-6-[(1 <i>E</i>)-2-(4-羟基苯基)乙烯基]苯基	$C_{27}H_{26}O_{13}$	[M-H]	557.1322	3.40	395.0752	+	+		多酚类
96	12.887	何首乌糖苷 A/B 异构体	$C_{40}H_{44}O_{18}$	[M-H]	811.2445	-1.82	405.1189, 243.0680	+	+		二苯乙烯类
97	12.932	大黄素-8- <i>O</i> -D-己糖硫酸盐异构体	$C_{21}H_{20}O_{13}S$	[M-H]	511.0558	0.36	431.1014	+	-	↑*	黄酮类
98	13.184	4', 7-二羟基黄酮酮 4'- β -D-吡喃葡萄糖苷	$C_{21}H_{22}O_9$	[M+H] ⁺	419.1356	3.83	257.0806, 173.0531, 215.0576	+	+	↑*	黄酮类
99	13.270	四羟基菲- <i>O</i> -己糖	$C_{20}H_{20}O_9$	[M+HCOO] ⁻	449.1098	1.58	213.0447	+	+	↓*	菲类
100	13.330	2, 5-二甲基-7-羟基色酮 A 异构体	$C_{11}H_{10}O_3$	[M+H] ⁺	191.0699	-1.79	162.0643, 151.0345, 123.0444	+	+	↑*	黄酮类
101	13.358	聚黄烷醇 A	$C_{35}H_{34}O_{15}$	[M-H]	693.1821	-1.07	405.1241	+	+	↑***	黄酮类
102	13.446	3-羟基苯甲酸	$C_7H_6O_3$	[M-H]	137.0243	-0.30	93.0312, 75.0254, 65.0371	+	-		多酚类
103	13.615	β -D-吡喃葡萄糖苷, 2, 4-二羟基-6-[(1 <i>E</i>)-2-(4-羟基苯基)乙烯基]苯基异构体	$C_{27}H_{26}O_{13}$	[M-H]	557.1319	2.75	395.0771	+	+		多酚类
104	13.811	二氢槲皮素	$C_{15}H_{12}O_7$	[M-H]	303.0512	0.24	125.1259, 285.0157, 303.0481	+	+	↑*	黄酮类
105	13.864	反式-N-咖啡酰酪胺	$C_{17}H_{17}NO_4$	[M+H] ⁺	300.1231	-0.70	163.0379, 145.0378, 135.0435, 117.0322, 89.0380	-	+	↑*	生物碱类
106	14.015	牡丹皮苷 E	$C_{24}H_{30}O_{13}$	[M-H]	525.1615	-1.03	167.0314, 363.6899	+	-	↑***	萜类
107	14.086	壬二酸	$C_9H_{16}O_4$	[M-H]	187.0979	1.25	125.0963, 187.0949, 97.0652, 123.0764	+	+	↑***	羧酸类
108	14.337	四羟基二苯乙烯- <i>O</i> -丙二酰基-己糖	$C_{23}H_{24}O_{12}$	[M-H]	491.1196	-0.13	313.0328, 329.0635, 285.0383, 169.0133	+	+	↓**	二苯乙烯类
109	14.394	1, 3-双(2, 4-二甲氧基苯基)-1, 3-丙二酮	$C_{19}H_{20}O_6$	[M+HCOO] ⁻	389.1242	-0.39	136.4310	+	+		多酚类
110	14.545	2, 5-二甲基-7-羟基色酮 A 异构体	$C_{11}H_{10}O_3$	[M+H] ⁺	191.0708	2.22	163.0705, 151.0393, 123.0787, 122.0342	+	+	↑**	黄酮类

续表 1

No.	t_R /min	中文名	分子式	离子模式	m/z	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片 质荷比 (m/z)	Flesh E	Peel E	趋势	结构 类型
111	14.645	β -D-吡喃葡萄糖苷, 2, 4-二羟基-6-[(1E)-2-(4-羟基苯基)乙烯基]苯基异构体	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	557.1318	2.56	395.0815	+	+		多酚类
112	14.749	羟基酸模素-己糖苷异构体	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	395.1325	- 2.16	233.0812, 189.0574, 109.0234	+	-	↑*	萘类
113	14.789	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙炔-2-O-(2"-O-乙酰基)- β -D-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	447.1292	- 3.45	243.0666, 225.0521	-	+	↓*	二苯乙炔类
114	14.789	黄芪苷异构体	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+HCOO] ⁻	493.1002	3.39	285.0413, 284.0301	-	+		黄酮类
115	14.862	β -D-吡喃葡萄糖苷, 4, 6-二羟基-3-(羟甲基)-2-[(1E)-2-(4-羟基苯基)乙烯基]苯基	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	435.1303	0.81	273.0758	+	-		多酚类
116	14.895	根皮素	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	275.0904	- 3.27	107.0479, 108.0646	+	-		多酚类
117	15.003	3, 5, 7-三羟基黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.0603	0.86	271.0602, 153.0723, 105.0381, 141.0688, 197.0574	+	+	↑****	黄酮类
118	15.124	1, 5-二羟基蒽醌	C ₁₄ H ₈ O ₄	[M+HCOO] ⁻	285.0410	2.09	182.0335, 197.0608	+	+	↑**	蒽醌类
119	15.124	2-羟基大黄素异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.0410	1.75	241.0506	+	+	↑****	蒽醌类
120	15.254	THSG 二聚体	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	809.2292	- 1.00	647.1755, 485.1195	+	-	↑****	二苯乙炔类
121	15.656	水杨酸甲酯异构体	C ₈ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	151.0402	0.52	123.0222	+	-	↑****	多酚类
122	16.004	二氢榭皮素异构体	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	303.0516	1.72	151.0398, 257.0436, 125.0248, 123.0445	+	+	↑*	黄酮类
123	16.188	芹菜素 6, 8-二吡喃葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.1503	- 2.33	593.1441	+	-		黄酮类
124	16.296	N-反式阿魏酰酰胺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	[M+H] ⁺	314.1398	2.89	177.0544, 145.0278, 146.0628, 117.0332, 121.0640, 194.0800, 65.0396, 77.0386	+	+		生物碱类
125	16.349	黄芪苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.0934	0.26	285.0393, 284.0247	+	+	↑***	黄酮类
126	16.493	1, 3, 8-三羟基-6-甲基-9, 10-蒽二酮, 单 β -D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.0991	1.43	269.0455	+	+		蒽醌类
127	16.493	大黄素-8-O-D-己糖硫酸盐	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃ S	[M-H] ⁻	511.0571	3.31	431.0995, 269.0456, 241.0476, 225.0549	+	+	↑***	黄酮类
128	16.652	肉桂基-没食子酰基-己糖异构体	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	461.1090	- 0.52	299.0599	+	-	↓**	多酚类
129	16.675	ω -羟基大黄素-8-甲酰异构体	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	301.0705	- 0.32	199.0740, 185.0591, 171.0763	+	+	↑****	蒽醌类
130	16.751	欧前胡素	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M+HCOO] ⁻	315.0879	1.29	128.9288	+	+	↑**	苯并吡喃类
131	16.863	反式-N-阿魏酰基-3-O-甲基多巴胺	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅	[M-H] ⁻	342.1352	1.11	327.1104	+	+	↑***	生物碱类
132	17.039	二-2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙炔-2-O- β -D-葡萄糖苷异构体	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	809.2293	- 1.15	647.1748, 485.1226	-	+	↑***	二苯乙炔类
133	17.277	4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	[M+H] ⁺	339.1068	- 2.64	177.0540	+	+		苯并吡喃类
134	17.348	榭皮素异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.0358	2.02	151.0033, 121.0289, 107.0133, 245.0446	+	+	↑****	黄酮类
135	17.529	黄芪苷异构体	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.0942	2.12	285.0383, 284.0359	+	+		黄酮类
136	17.718	2-乙酰大黄素	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	311.0566	0.66	269.0458, 283.0685	+	+	↑****	黄酮类
137	17.827	异鼠李醇	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	317.0647	- 0.53	299.0532	+	+	↑****	苯并吡喃类
138	17.971	二-2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙炔-2-O- β -D-葡萄糖苷异构体	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	809.2298	- 0.67	647.1771, 482.1251	+	-		二苯乙炔类
139	18.155	决明柯酮	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	245.0826	2.70	230.0590	+	+		萘类
140	18.168	银杏内酯 A	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	[M+H] ⁺	409.1499	1.14	295.0888, 307.0973, 303.1251, 255.0946	+	+	↑****	萜类
141	18.198	3, 4'-5-三羟基二苯乙炔-3- β -D-吡喃葡萄糖苷异构体	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	391.1396	1.73	229.0806	+	-	↑****	二苯乙炔类
142	18.382	乙酰大黄素-O-己糖苷异构体	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	473.1090	0.28	311.0572, 283.0512, 241.0453	+	-		黄酮类
143	18.432	儿茶素异构体	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M+Na] ⁺	313.0695	4.13	165.0688, 139.0386	+	-	↑****	黄酮类
144	18.578	3, 5, 7-三羟基黄酮异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.0610	2.74	271.0591, 153.0173, 105.0337, 141.0687, 197.0594	+	+		黄酮类
145	18.610	1, 5-二羟基蒽醌异构体	C ₁₄ H ₈ O ₄	[M+HCOO] ⁻	285.0409	1.95	138.1440, 197.0605	+	+	↑****	蒽醌类
146	18.610	2-羟基大黄素异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.0410	1.72	241.0509	+	+	↑**	蒽醌类

续表 1

No.	t_R /min	中文名	分子式	离子模式	m/z	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片 质荷比 (m/z)	Flesh E	Peel E	趋势	结构 类型
147	18.815	6-羧基大黄素	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	[M-H]	313.0360	2.10	269.0463, 241.0511, 225.0551	+	+		黄酮类
148	18.889	葱林	C ₁₄ H ₁₀ O ₃	[M+HCOO]	271.0615	1.84	150.0204	+	-		葱醌类
149	18.918	黄芪苷异构体	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H]	447.0933	0.05	285.0426, 284.0348	+	+		黄酮类
150	19.001	ω -羟基大黄素-8-甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H]	299.0564	0.79	169.0304, 240.0384, 212.0573, 183.0789	+	+	↑**	葱醌类
151	19.359	乙酰大黄素-O-己糖苷异构体	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	[M-H]	473.1095	-2.70	311.0616, 283.0952, 241.0424, 225.0546	+	+		黄酮类
152	19.359	3, 5, 7-三羟基黄酮异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.0608	2.14	271.0599, 105.0437, 141.0695, 197.0586	+	+		黄酮类
153	19.447	苜蓿素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺	331.0815	0.06	331.0811, 315.0501, 301.0345	+	+	↑*	黄酮类
154	19.489	决明柯酮-8-O-(6'-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₀	[M-H]	449.1456	0.51	245.0824, 230.0577	+	+	↓*	萜类
155	19.506	乙酰基-表儿茶素-葡萄糖苷异构体	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₂	[M+H] ⁺	495.1531	2.71	271.0963, 257.0748, 229.0859	+	+	↓*	黄酮类
156	19.572	4-苯基香豆素 7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷异构体	C ₂₁ H ₂₀ O ₈	[M+HCOO]	445.1142	0.42	283.0618	+	-	↑***	黄酮类
157	19.572	大黄素甲醚 1-O- β -D-葡萄糖苷异构体	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M-H]	445.1142	0.06	283.0618, 254.0029	+	-	↑**	黄酮类
158	19.593	汉黄芩素异构体	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.0767	2.48	285.0753, 270.0502	+	+		黄酮类
159	19.834	乙酰大黄素-O-己糖苷	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	[M-H]	473.1089	-0.54	311.0521, 283.0543, 241.0505, 225.0578	+	+	↑***	黄酮类
160	19.850	1, 5-二羟基葱醌异构体	C ₁₄ H ₈ O ₄	[M+HCOO]	285.0413	3.14	183.0481, 211.0389, 239.0336	+	-		葱醌类
161	19.850	2-羟基大黄素异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H]	285.0413	2.63	241.0513, 257.0439, 267.0204	+	+		葱醌类
162	20.013	4-苯基香豆素 7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₈	[M+HCOO]	445.1144	1.05	283.0616	-	+		黄酮类
163	20.013	大黄素甲醚 1-O- β -D-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+HCOO]	491.1199	0.69	283.0615, 254.0580	+	+	↑****	黄酮类
164	20.107	汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.0769	3.62	285.0757, 270.0504, 252.0406	+	+	↓*	黄酮类
165	20.374	2-羟基大黄素异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H]	285.0415	3.55	241.0513, 257.0430, 267.0232	+	+		葱醌类
166	20.390	1, 5-二羟基葱醌异构体	C ₁₄ H ₈ O ₄	[M+HCOO]	285.0408	1.40	197.0642, 211.0420	-	+		葱醌类
167	20.487	3, 5, 7-三羟基黄酮异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.0606	1.52	271.0603, 105.0434, 141.0698, 197.0579	+	+		黄酮类
168	20.687	二大黄素-8-O-D-葡萄糖苷	C ₄₂ H ₄₂ O ₁₈	[M-H]	833.2289	-1.54	671.1718, 269.0575	+	-	↑****	黄酮类
169	20.884	乙酰大黄素-O-己糖苷异构体	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	[M-H]	473.1094	0.60	311.0555, 283.0626, 241.0413	+	+		黄酮类
170	20.888	3, 5, 7-三羟基黄酮异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.0595	-2.09	271.0643, 141.0709, 197.0603	+	-		黄酮类
171	21.064	汉黄芩素异构体	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.0753	-2.19	270.0584, 252.0350	+	+	↓*	黄酮类
172	21.126	决明柯酮-8-O-(6'-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷异构体	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₀	[M-H]	449.1462	1.57	245.0822, 230.0591	+	+	↑*	萜类
173	21.152	决明柯酮异构体	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	[M+H] ⁺	247.0956	-3.39	247.0956, 232.0819	+	+	↓***	萜类
174	21.353	汉黄芩素异构体	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H]	283.0616	1.23	283.0612, 285.0563,	+	-		黄酮类
175	22.203	1, 5-二羟基葱醌异构体	C ₁₄ H ₈ O ₄	[M+HCOO]	285.0410	2.49	183.0451, 181.9337, 197.0662, 211.0385, 239.0302	+	+		葱醌类
176	22.224	汉黄芩素异构体	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.0751	-2.01	285.0711, 270.0500	+	-		黄酮类
177	22.418	3, 5, 7-三羟基黄酮异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H]	269.0465	3.13	269.0459, 196.0537, 171.0435	+	+	↑****	黄酮类
178	22.529	ω -羟基大黄素-8-甲醚异构体	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	301.0708	0.00	199.0727, 171.0811, 214.0450	+	-		葱醌类
179	22.767	ω -羟基大黄素-8-甲醚异构体	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H]	299.0567	1.30	240.0427, 212.0488, 197.0210, 183.0426	+	+	↑****	葱醌类
180	22.858	乙酰大黄素-O-己糖苷异构体	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	[M-H]	473.1088	-0.60	311.0596, 241.0519, 225.0519	-	+		黄酮类
181	23.592	苍术内酯Ⅲ	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	[M-H]	247.1340	0.17	247.0646, 203.1403, 89.0232	+	+		萜类
182	23.613	6-羧基大黄素异构体	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	[M-H]	313.0354	0.99	269.0461, 241.0528, 225.0596	+	+	↑*	黄酮类
183	23.830	6-羧基大黄素异构体	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M-H]	311.0567	1.81	269.0445	+	+	↑*	黄酮类
184	24.150	3, 5, 7-三羟基黄酮异构体	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+Na] ⁺	293.0422	3.28	271.0611, 105.0332, 141.0707, 197.0598	+	+		黄酮类
185	24.150	α -亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	279.2313	-1.83	67.0058, 81.0700, 95.0861, 109.1010	+	+	↓*	脂肪酸类
186	24.322	2-羟基大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H]	285.0410	2.80	285.0409, 257.0444	+	+		葱醌类

续表 1

No.	t_R /min	中文名	分子式	离子模式	m/z	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片 质荷比 (m/z)	Flesh Peel E E	趋势	结构 类型
187	24.572	1, 5-二羟基蒽醌异构体	$C_{14}H_8O_4$	[M+HCOO] ⁻	285.0411	2.54	211.0371, 197.0600	+	+	蒽醌类
188	24.572	2-羟基大黄素异构体	$C_{15}H_{10}O_6$	[M-H] ⁻	285.0411	2.13	285.0414, 257.0453	+	+	蒽醌类
189	24.572	肉豆蔻酸异丙酯	$C_{17}H_{34}O_2$	[M+HCOO] ⁻	315.2545	1.52	58.0067	+	+	脂肪酸类
190	24.877	α -亚麻酸异构体	$C_{18}H_{30}O_2$	[M+H] ⁺	279.2319	0.43	67.0547, 81.0692, 95.0847, 109.1000	+	+	脂肪酸类

注：与 FleshE 组相比， $\downarrow\uparrow$ HSWE 组中差异显著的化学成分的水平变化趋势；* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ；**** $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with FleshE group, $\downarrow\uparrow$ trends in the level of chemical compositions that differ significantly in HSWE; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

具有统计学意义。

2.4.4 代谢组学结果 各组的血清代谢物群和肝脏代谢物群均能在 PLS-DA 得分图上被明显区分 (见图 4A ~ 4B)，且 HSWE 给药组比 FleshE 给药组距离 CON 组更远，提示 HSWE 给药对血清、肝脏代谢物水平影响比 FleshE 给药更大。对血清、肝脏代谢物进行火山图分析 ($P < 0.05$, $FC > 1$) (见图 4C ~ 4D)，血清和肝脏中分别筛选出 15 个和 14 个给药组与 CON 组的差异代谢物 (见表 2)。将各给药组差异代谢物分别导入 Metaboanalyst 6.0 分析通路。血清中，HSWE 给药干扰了 10 条代谢通路，而 FleshE 给药只干扰了 5 条 (见图 5A)；肝脏中，HSWE 给药干扰了 22 条代谢通路，而 FleshE 给药组只干扰 11 条，且谷胱甘肽代谢通

路异常仅出现在 HSWE 给药组 (见图 5C)。提示 HSWE 给药比 FleshE 给药扰乱的代谢通路更多。与 CON 组相比，血清中肝损伤生物标志物二十二碳六烯酸 (DHA) [15]、哌啶酸 [16]、甘羟胆酸 [17] 和肝脏中肝损伤生物标志物酪氨酸 [18]、还原型谷胱甘肽 [19] 及肝损伤相关代谢物维生素 C [20] 在 HSWE 给药组中显著变化趋势与大鼠肝损伤时趋势一致，而在 FleshE 给药组中显著回调至与 CON 组无显著差异 (见图 5B 和 5D)，提示 FleshE 给药相比于 HSWE 给药可显著减轻大鼠肝损伤生物标志物的扰动，并使其与正常组无显著差异。以上结果显示，未去皮何首乌给药使大鼠出现显著的肝脏代谢紊乱，而去皮后给药导致的紊乱显著减轻，提示去皮显著降低何首乌的潜在肝毒性。

表 2 HSWE 给药组和 FleshE 给药组大鼠血清、肝脏差异代谢物

Tab 2 Different metabolites in the serum and liver of rats in the HSWE and FleshE groups

血清差异代谢物				肝脏差异代谢物			
编号	中文名	HSWE 给药组	FleshE 给药组	编号	中文名	HSWE 给药组	FleshE 给药组
1	L-赖氨酸		\uparrow	1	鸟氨酸	\downarrow	
2	哌啶酸	\uparrow		2	赖氨酸	\downarrow	\downarrow
3	5-氧代-D-脯氨酸	\downarrow		3	天冬氨酸	\downarrow	\downarrow
4	L-酪氨酸	\downarrow		4	Sn-甘油 3-磷酸酯	\downarrow	
5	3-羟基丁酸酯	\downarrow		5	维生素 C	\downarrow	
6	组氨酸		\uparrow	6	蛋氨酸	\downarrow	
7	D-葡萄糖醛酸内酯	\downarrow		7	还原型谷胱甘肽	\downarrow	
8	甘氨酸	\uparrow	\uparrow	8	尿酸盐	\uparrow	
9	甘羟胆酸	\uparrow		9	酪氨酸	\downarrow	
10	鹅去氧胆酸		\downarrow	10	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP ⁺)	\downarrow	\downarrow
11	γ -亚麻酸	\downarrow		11	苯丙氨酸	\downarrow	
12	二十二碳六烯酸	\downarrow		12	色氨酸	\downarrow	
13	花生四烯酸	\downarrow		13	甘氨酸	\uparrow	
14	羟孕酮	\downarrow		14	花生四烯酸	\downarrow	\downarrow
15	油酸	\downarrow					

注：与对照组比较， $\downarrow\uparrow$ 表示差异显著的代谢物水平变化趋势。

Note: Compared with the control group, $\downarrow\uparrow$ trends in the level of metabolites that differ significantly.

3 讨论

Xu 等 [21] 指出 THSG 会加重小鼠肝脏中谷胱甘肽的消耗，肝脏中还原谷胱甘肽不足会降低肝脏的解毒作用，从而导致肝损伤 [19]，这可能导致了本研究中 HSWE 给药组大鼠肝损伤程度大于 FleshE 给药组。现行药典何首乌项下只要求了 THSG 含

量下限 [6]，因此进一步控制何首乌中 THSG 的含量上限对降低药材肝毒性可能有重要作用。Di-THSG 是 THSG 的二聚体，本文猜测其在体内代谢后与 THSG 具有类似的肝毒性作用。本研究中，HSWE 给药组大鼠出现肝病理损伤而未见 AST、ALT 水平相对于 CON 组显著升高，与 Yan 等 [22] 研究结果

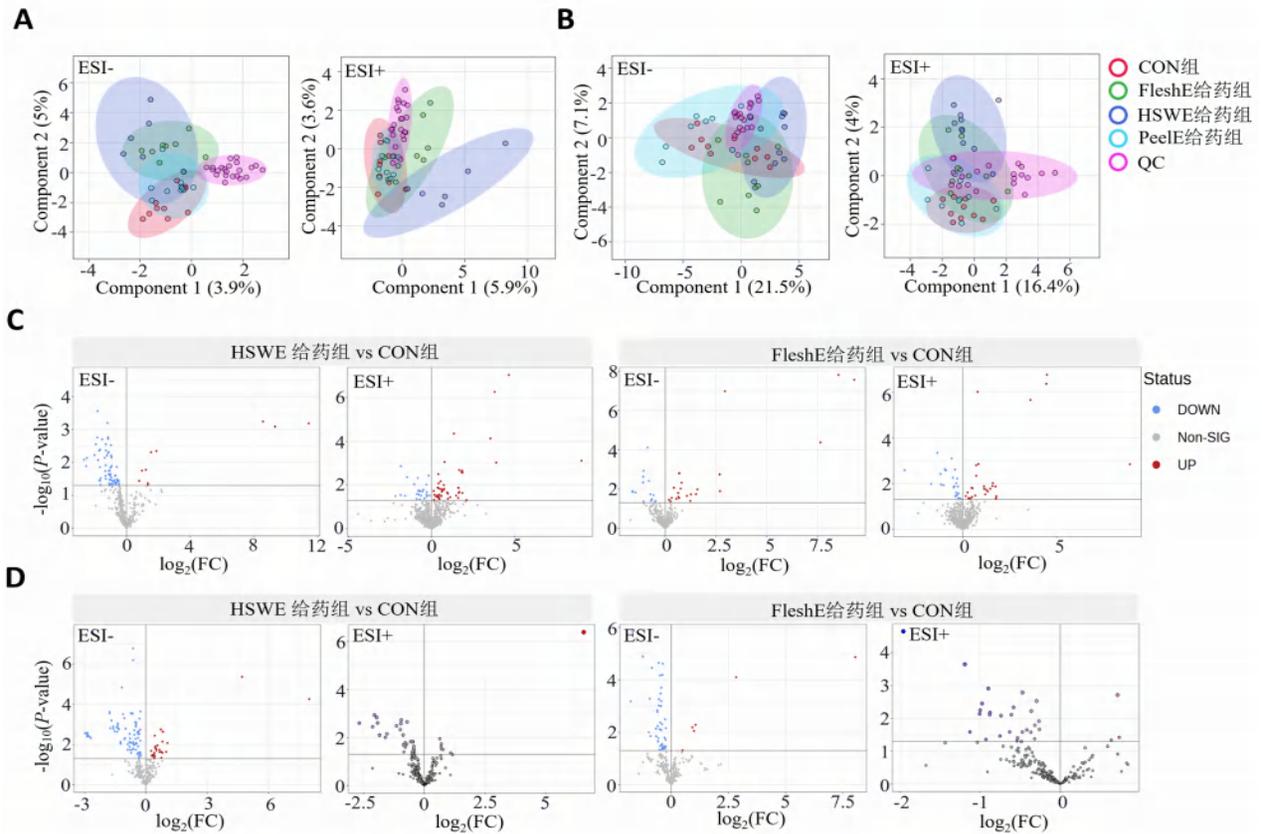


图 4 各组大鼠血清 (A)、肝脏 (B) 代谢物 PLS-DA 得分图及血清 (C)、肝脏 (D) 差异代谢物火山图
 Fig 4 PLS-DA plots of the serum (A) and the liver (B) metabolites and volcano plot of differential metabolites in the serum (C) and the liver (D) of rats in dosing group

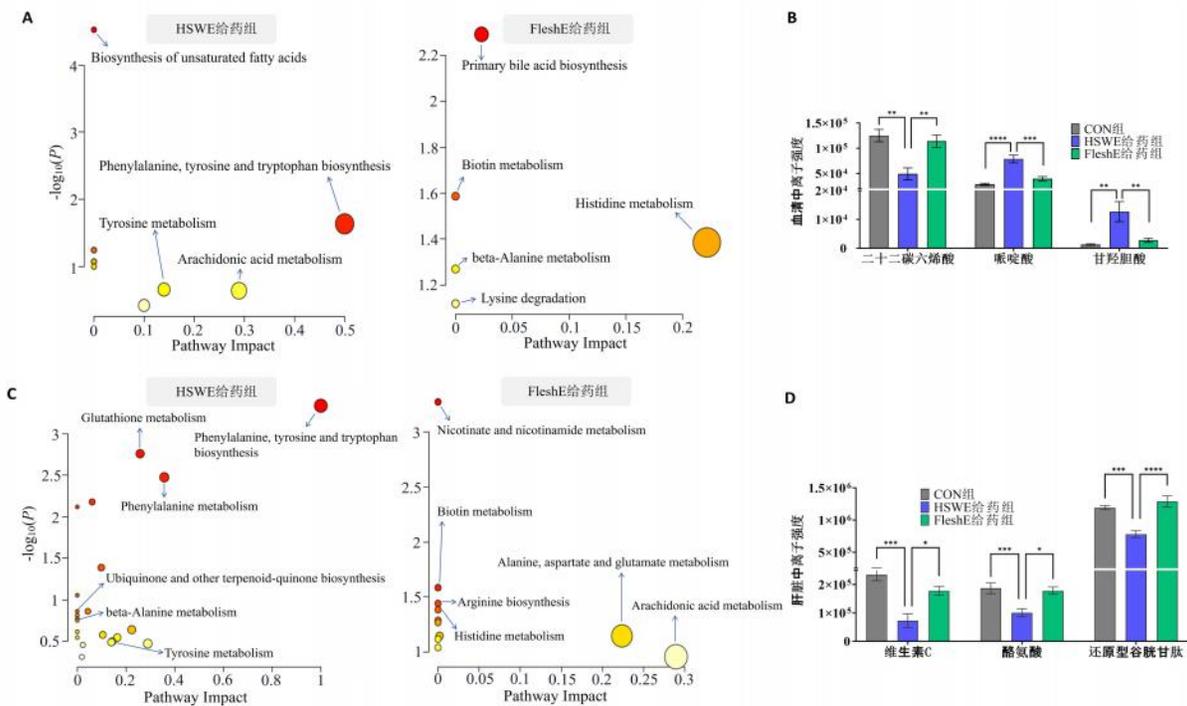


图 5 给药组大鼠血清 (A)、肝脏 (C) 异常代谢通路及血清 (B)、肝脏 (D) 肝损伤生物标志物水平 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)
 Fig 5 Disturbed serum (A) and liver (C) metabolic pathways in rats of dosing groups, and liver injury biomarker levels in rat serum (B) and liver (D) (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)

一致。血清生化结果未显示出肝损伤可能与给药时间不足有关,在后期的研究中,可增加给药时间,或在不改变给药时间的情况下进行脂多糖(LPS)诱导^[23],以更清晰地呈现药物的特异质肝损伤作用。本研究为何首乌加工方法标准化提供了科学依据,以确保何首乌用药安全性,也为其他需要加工且已被报道具有类似不良反应的中药的加工方法提供了研究模型。

参考文献

- [1] Furukawa M, Kasajima S, Nakamura Y, et al. Toxic hepatitis induced by Show-Wu-Pian, a Chinese herbal preparation [J]. Intern Med, 2010, 49 (15): 1537-1540.
- [2] Jung KA, Min HJ, Yoo SS, et al. Drug-induced liver injury: twenty five cases of acute hepatitis following ingestion of *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. Gut Liver, 2011, 5 (4): 493.
- [3] Lei X, Chen J, Ren JT, et al. Liver damage associated with *Polygonum multiflorum* Thunb.: a systematic review of case reports and case series [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015 (1): 459749.
- [4] Liu Y, Wang Q, Yang JB. *Polygonum multiflorum* Thunb.: a review on chemical analysis, processing mechanism, quality evaluation, and hepatotoxicity [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 364.
- [5] 吴玫萱, 郭建友, 王谦, 等. 金铁锁去皮根、带皮根、根皮水煎液对小鼠急性毒性的实验研究 [J]. 中国药物警戒, 2016, 13 (2): 70-77.
- [6] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 183.
- [7] 汪明金, 陈雯清, 袁伟博, 等. 何首乌化学成分、药理作用及肝毒性的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2024, 58 (3): 86-91.
- [8] 刘振丽, 宋志前, 李淑莉. 何首乌净选加工、切制和干燥方法对化学成分的影响 [J]. 中草药, 2004, 35 (4): 404-406.
- [9] Liang L, Xu J, Zhou WW, et al. Integrating targeted and untargeted metabolomics to investigate the processing chemistry of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 400060.
- [10] Lin LF, Lin HM, Zhang M, et al. A novel method to analyze hepatotoxic components in *Polygonum multiflorum* using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Hazard Mater, 2015, 299: 249-259.
- [11] Qiu XH, Zhang J, Huang ZH, et al. Profiling of phenolic constituents in *Polygonum multiflorum* Thunb. by combination of ultra-high-pressure liquid chromatography with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2013, 1292: 121-131.
- [12] Wang LL, Sang MM, Liu EW, et al. Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from *Polygonum multiflorum* by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 45-61.
- [13] Ma J, Zheng L, Deng T, et al. Stilbene glucoside inhibits the glucuronidation of emodin in rats through the down-regulation of UDP-glucuronosyltransferases 1A8: application to a drug-drug interaction study in Radix *Polygoni Multiflori* [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147 (2): 335-340.
- [14] Yang XW, Zhang YH, Liu Y, et al. Emodin induces liver injury by inhibiting the key enzymes of FADH/NADPH transport in rat liver [J]. Toxicol Res, 2018, 7 (5): 888-896.
- [15] Puri P, Wiest MM, Cheung O, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Hepatology, 2009, 50 (6): 1827-1838.
- [16] Kawasaki H, Hori T, Nakajima M, et al. Plasma levels of piperolic acid in patients with chronic liver disease [J]. Hepatology, 1988, 8 (2): 286-289.
- [17] Fu XW, Xiao Y, Golden J, et al. Serum bile acids profiling by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and its application on pediatric liver and intestinal diseases [J]. Clin Chem Lab Med, 2020, 58 (5): 787-797.
- [18] Liu P, Wu J, Yu XY, et al. Metabolomics and network analyses reveal phenylalanine and tyrosine as signatures of anthracycline-induced hepatotoxicity [J]. Pharmaceuticals, 2023, 16 (6): 797.
- [19] Salama SA, Arab HH, Hassan H, et al. Cadmium-induced hepatocellular injury: modulatory effects of γ -glutamyl cysteine on the biomarkers of inflammation, DNA damage, and apoptotic cell death [J]. J Trace Elem Med Biol, 2019, 52: 74-82.
- [20] Chtourou Y, Garoui EM, Boudawara T, et al. Therapeutic efficacy of silymarin from milk thistle in reducing manganese-induced hepatic damage and apoptosis in rats [J]. Hum Exp Toxicol, 2012, 32 (1): 70-81.
- [21] Xu SF, Liu J, Shi JS, et al. 2, 3, 4', 5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside exacerbates acetaminophen-induced hepatotoxicity by inducing hepatic expression of CYP2E1, CYP3A4 and CYP1A2 [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 16511.
- [22] Yan Y, Shi N, Han XY, et al. UPLC/MS/MS-based metabolomics study of the hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats induced by *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. ACS Omega, 2020, 5 (18): 10489-10500.
- [23] 谢丽华. 何首乌醇提液对 LPS 诱导致大鼠肝损伤机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2016.

(收稿日期: 2024-06-19; 修回日期: 2024-09-11)

基于电子鼻技术和 GC-MS 对不同产地乌药的鉴别和挥发油成分分析

王子燕, 王博诗, 王一帆, 管家齐*, 张睿* (浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 利用电子鼻技术和气相色谱质谱联用 (GC-MS) 法对不同产地乌药进行鉴别以及成分分析。方法 采用电子鼻检测来自 10 个产地的乌药块根气味信息, 采用主成分分析 (PCA)、线性判别分析 (LDA) 和负荷加载分析 (LA) 构建分类乌药鉴别模型实现快速区分, 同时结合 GC-MS 对其挥发油成分进行定性和定量分析验证。结果 PCA 分析表明第一主成分的贡献率为 97.57%, 总贡献率为 99.08%。LDA 分析表明第一主成分的贡献率为 55.47%, 总贡献率为 92.61%。GC-MS 从 10 个产地乌药中共检测出 145 种成分, 13 种共有成分, 49 种特有成分。结论 不同产地的乌药由于挥发性成分种类及相对含量有差异, 并且电子鼻技术可以对不同产地乌药进行有效区分。可为后续此类药物药效动力学研究和质量控制研究提供科学规范的物质基础。

关键词: 乌药; 挥发油; 质量控制; 产地鉴别

中图分类号: R282, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3181-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.008

Identification of volatile oil composition of Wuyao from different origins based on electronic nose technology and GC-MS

WANG Zi-yan, WANG Bo-shi, WANG Yi-fan, GUAN Jia-qi*, ZHANG Rui* (Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053)

Abstract: Objective To identify the volatile compositions of Wuyao from different origins based on electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Methods** Electronic nose was used to detect the odor of Wuyao from 10 origins. Principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA), and loading analysis (LA) were used to establish a classification model. GC-MS was used to verify the volatile components both qualitatively and quantitatively. **Results** The findings from the PCA reveal that primary component 1 accounts for a substantial proportion of 97.57%, and the total contribution rate reached 99.08%. LDA showed that the contribution rate of primary component 1 was 55.47%, while the total contribution rate reached 92.61%. Totally 145 components, 13 common components and 49 specific components of samples were detected by GC-MS from Wuyao from 10 origins. **Conclusion** There is a clear difference in volatile constituents and relative content in Wuyao from different origins. Electronic nose can effectively distinguish Wuyao samples from different origins. It can provide standardized material basis for subsequent pharmacokinetics and quality control of similar herbs.

Key words: Wuyao; volatile oil; quality control; origin identification

乌药 *Radix Linderae* 药用来源为樟科山胡椒 块根, 具有止痛行气、温肾散寒等功效, 临床用
属乌药 *Lindera aggregate* (Sims) Kosterm. 的干燥 于治疗腹脘胀痛, 头痛胸胁, 痛经及产后腹痛,

基金项目: 浙江中医药大学校级科研项目人才专项 (No.2023RCZXZK23)。

作者简介: 王子燕, 女, 主要从事中药化学成分功效物质基础研究, email: ziyaw000@gmail.com *通信作者: 张睿, 男, 讲师, 主要从事中医优势病种用药规律研究, email: zhangrui@zcmu.edu.cn; 管家齐, 男, 副教授, 主要从事中药药性理论研究, email: guanjq99@163.com

寒疝，尿频症等^[1]。陈藏器曰：“乌药生岭南、邕州、容州及江南。今台州、雷州、衡州皆有之，以天台者为胜”^[2]。历代本草关于乌药的产地记载不一，自宋代起以浙江天台所产者为最佳，现代浙江天台仍为道地产区，但均未有深入的产地质量控制研究。同时，现代药理研究表明，作为乌药主要有效成分之一的挥发油，具有镇痛消炎、灭菌止痒、抗肿瘤等活性^[3]。因不同产地乌药的挥发油含量及成分不同，表现出的药理作用可能有所差异，本实验首次将嗅觉仿生技术运用于产地乌药鉴别，采集不同样品气味信息构建气味数据分析模型区分不同产地乌药，同时通过气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对不同产地乌药挥发油所含成分进行定性分析，以验证电子鼻鉴别不同产地乌药方法的可靠性，也可为后续乌药中药材生产质量研究提供理论基础。

1 材料

1.1 药材

乌药药材收集于全国 10 个产地，共 10 批。样品性状鉴别：各批样品均呈纺锤状，7~15 cm，大小不等，表面均为黄褐色，干燥，略弯曲，有纵皱纹，质坚硬；切面为淡黄棕色或黄棕色，有放射状射线；气香，味微苦。粉末显微鉴别：各批样品均淀粉粒多，单粒呈球状，椭圆状，脐点多叉状、人字状；木纤维淡黄色，成束；韧皮纤维长梭形，单个散在，壁极厚；均含油细胞少量，内有棕色分泌物。最终均经浙江中医药大学药学院管家齐副教授鉴定为正品，具体信息见表 1。

表 1 样品来源信息

Tab 1 Sample source information

组别	产地	采集时间
1	浙江天台	2023 年 2 月
2	浙江建德	2023 年 1 月
3	湖北咸宁	2023 年 3 月
4	江西德兴	2023 年 3 月
5	江西宜春	2023 年 4 月
6	江西上饶	2023 年 2 月
7	江西景德镇	2023 年 1 月
8	广西贺州	2023 年 3 月
9	湖南邵阳	2023 年 4 月
10	云南大理	2023 年 5 月

1.2 仪器

PEN3 电子鼻(德国 AIRSENSE 公司)，内置 10 个 MOS 传感器组成的传感器阵列(其功能见表 2)；AL104 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司，精度为 0.0001 g)；CX-200 型高速多功能粉碎

机(浙江永康市太阳机电有限公司)；7890A/5975C 型 GC-MS、HP-5MS 型色谱柱(美国 Agilent 科技有限公司)；TBSD-2874 型挥发油提取器(天长市天博盛达分析仪器有限公司)；LWFS32701 型超纯水机(安维迪生命科学有限公司)。

表 2 PEN3 系统各传感器名称及特点

Tab 2 Names and features of PEN3 system sensors

编号	传感器名称	性能	选择气体	检测范围 / (L · L ⁻¹)
S1	W1C	对芳香成分灵敏	甲苯	1 × 10 ⁻⁵
S2	W5S	灵敏度大，对氮氧化物很灵敏	NO ₂	1 × 10 ⁻⁶
S3	W3C	对氨水、芳香成分灵敏	苯	1 × 10 ⁻⁵
S4	W6S	对氢气灵敏	H ₂	1 × 10 ⁻⁴
S5	W5C	对烷烃、芳香成分灵敏	丙烷	1 × 10 ⁻⁶
S6	W1S	对甲烷灵敏	CH ₄	1 × 10 ⁻⁴
S7	W1W	对硫化物灵敏	H ₂ S	1 × 10 ⁻⁶
S8	W2S	对乙醇灵敏	CO	1 × 10 ⁻⁴
S9	W2W	对芳香成分、有机硫化物灵敏	H ₂ S	1 × 10 ⁻⁶
S10	W3S	对烷烃灵敏	CH ₃	1 × 10 ⁻⁵

1.3 试药

正己烷(上海麦克林生化科技有限公司，批号：C15600364)。

2 方法

2.1 电子鼻检测

2.1.1 样品准备 取乌药药材粉碎，过五号筛，称取乌药样品细粉每份 0.3 g，置于 300 mL 玻璃烧杯中密封。为确保测试数据的精度，每批产地样品重复取 6 份，共计 60 份样品。

2.1.2 样品检测 预设置每份样品传感器进气冲洗时间 100 s，采样时间 100 s。每个产地批次样品测试后可得 6 个数据文件，由此建立 6 × 10 个数据矩阵(采样时间内 10 个传感器的响应值)。10 批乌药样品采集完毕共获得 600 (10 × 60 = 600) 个数据文件。

2.1.3 数据分析 利用 PEN3 的 Winmuster 分析软件对已采集的样品数据进行分析，主要分析方法为通过响应曲线图、主成分分析(PCA)、线性判别分析(LDA)、负荷加载分析(LA)模型。

2.2 GC-MS 检测

2.2.1 供试品溶液制备 取单个产地乌药样品，经粉碎处理过二号筛，称取 100 g 粗粉。按比例 1 : 12 加入超纯水，振摇，静置 3 h，应用挥发油提取装置提取乌药中的挥发油，冷凝回流 3 h，使用正己烷分离提取物中的油相，定容至 20 mL，置于 4 °C 备用。

2.2.2 样品检测 GC-MS 条件: 使用 HP-5MS 色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 初温设定 60 °C, 终温升高至 250 °C, 维持时间 ≥ 8 min, 升温速率为 6 °C·min⁻¹, 保持此温度时间 30 min; 选定载气为氦气, 分流比为 30:1。设定离子源温度 200 °C, 电离压 70 eV, 扫描质量范围 *m/z* 35 ~ 400, 扫描间隔 0.5 s^[4]。用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 6.0-QualDAMethod.m 软件处理数据, 并经匹配 NIST 质谱库, 同时与人工图谱解析结合分析未知化合物, 采用面积归一化法定量分析, 计算检测样品中各成分占比。

3 结果

3.1 电子鼻成分检测结果

3.1.1 LA 分析 应用电子鼻对不同产地乌药进行 LA 分析, 结果总贡献率为 99.29%, 由图 1 可得, 首先筛选出对第一主成分香气物质较为灵敏的传感器是 S7 号、S9 号传感器, 对第二主成分灵敏度最高的是 S2 号传感器。由表 2 可知 S2 号传感器对响应氮氧化合物, S7 号传感器对响应硫化物, 而 S9 号传感器则对芳香成分、有机硫化物最为灵敏。具体结果见图 1。

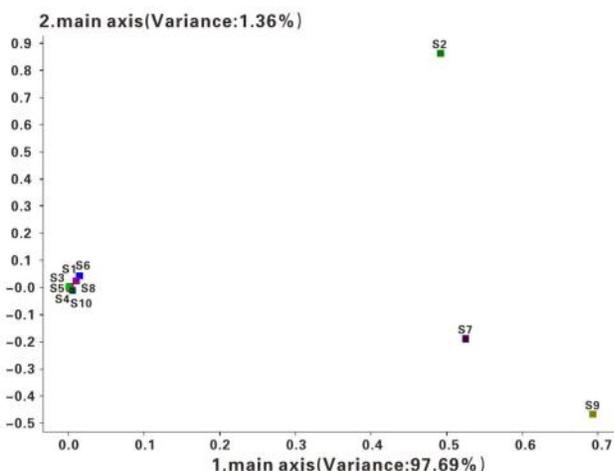


图 1 基于电子鼻不同产地乌药的 LA 分析
Fig 1 LA of different origins of Wuyao based on electronic nose

3.1.2 PCA 分析 应用电子鼻对不同产地乌药的 PCA 分析显示第一主成分的贡献率为 97.57%, 第二主成分的贡献率为 1.51%, 总贡献率为 99.08%, 说明这两个主成分包含了样品的大部分信息, 可以反映整体挥发性物质的规律, 且样品差异性主要体现在第一主成分上。从图 2 中可以看出, 10 个产地乌药的挥发性成分形成 10 个不同区域, 特别是不同省份区块之间边界明显, 有明显的距离区分, 说明不同产地乌药各自有独特的香气成分。具体结果见图 2。

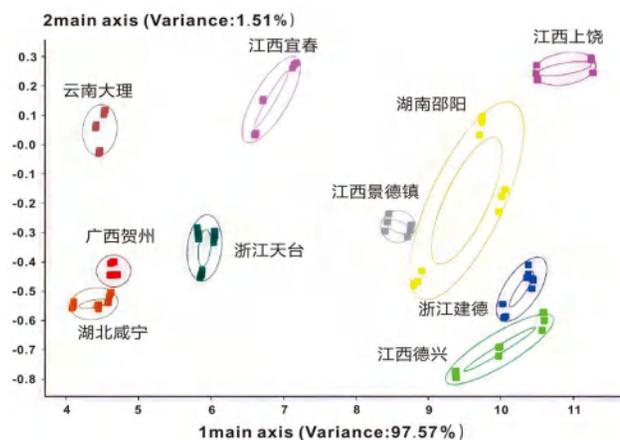


图 2 基于电子鼻不同产地乌药的 PCA 分析
Fig 2 Principal component analysis of different origins of Wuyao based on electronic nose

3.1.3 LDA 分析 应用电子鼻对不同产地乌药的 LDA 分析显示第一主成分的贡献率为 55.47%, 第二主成分的贡献率为 37.14%, 总贡献率为 92.61%。从图 3 中可以看出, 不同产地乌药彼此区分明显且样本点之间无交叉, 说明不同产地乌药有独特的风味成分。因此, LDA 方法同样可以从挥发性物质角度较好地区分不同产地乌药样品, 这与图 2 电子鼻对不同产地乌药的 PCA 分析结果一致。具体结果见图 3。

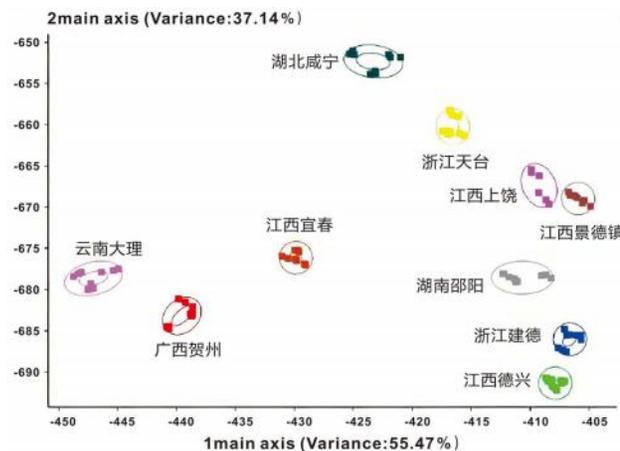


图 3 基于电子鼻不同产地乌药的 LDA 分析
Fig 3 Linear discriminant analysis of different origins of Wuyao based on electronic nose

3.2 GC/MS 成分检测结果

GC-MS 从 10 个产地乌药中共检测出 145 种成分, 其中浙江天台、浙江建德、湖北咸宁、江西德兴、江西宜春、江西上饶、江西景德镇、广西贺州、湖南邵阳、云南大理 10 个产地的乌药挥发油样品分别检出不同数量成分, 见表 3。其中不同产地乌药挥发油组成成分种类差异大, 化合物含量也有明显区别。所认定的挥发油共有化学成分相对百分含量对比见表 4, 产地特有成分含量见表 5。

表 3 不同产地乌药所检出化合物数量

Tab 3 Number of compounds detected in different origins of Wuyao

组别	产地	化合物数量
1	浙江天台	47
2	浙江建德	58
3	湖北咸宁	55
4	江西德兴	55
5	江西宜春	68
6	江西上饶	65
7	江西景德镇	78
8	广西贺州	49
9	湖南邵阳	47
10	云南大理	35

4 分析与讨论

乌药作为传统中药，在中国已经有几千年的应用历史^[5-6]，其所含成分复杂多样，市场现有在售药材种类繁多，良莠不齐，仍缺乏完善的质量控制^[7]。因此本研究采用电子鼻技术快速区别不同产地乌药，并用水蒸气蒸馏法提取药材中挥发油成分^[1]，对乌药挥发油样品成分进行 GC-MS 分析验证以提高精度^[8]。

电子鼻 PCA、LDA 和 LA 分析结果表明，其可对不同产地乌药进行有效快速区分。PCA 通过矩阵线性变换从降维的角度表达不同样品间的差异，用较少变量来解释较多的原始信息，降低计

表 4 不同产地挥发油样品中共有化合物名称及相对百分含量 (%)

Tab 4 Names and relative percentages of shared compounds in volatile oil samples from different origins (%)

组别	4 (15), 5, 10 (14) - 大根香叶三烯 -1- 醇	香樟烯	杜松醇	γ - 摩勒烯	大根香叶烯 B	β - 桉叶醇	吉马酮	4a- 甲基 -1- 亚甲基 -1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a- 八氢菲	8- 甲基 -2- 苯基 - 壬 -4, 7- 二烯 -2- 醇	莜术呋喃烯	β - 榄香烯	异香橙烯环氧化物	人参环氧炔醇
1	1.54	25.40	0.74	0.46	0.22	1.46	1.16	29.02	24.43	3.55	0.46	0.44	0.30
2	0.78	27.72	0.70	0.70	0.54	1.79	1.32	20.16	22.29	4.74	0.98	0.25	0.70
3	0.66	16.78	3.96	0.42	0.14	1.55	1.03	49.44	8.06	3.17	0.61	0.06	0.10
4	2.20	24.32	0.68	0.66	0.37	1.80	1.53	17.24	29.52	3.56	0.79	1.13	0.39
5	1.67	25.89	0.74	0.71	0.43	2.42	1.23	20.12	24.04	3.49	1.00	0.25	0.41
6	2.21	24.73	0.69	0.51	0.41	0.85	1.57	20.90	27.95	4.05	0.68	0.97	0.42
7	1.55	22.46	0.82	0.80	0.58	1.48	1.64	18.08	25.90	5.13	1.43	0.52	0.46
8	2.43	19.51	3.10	0.60	0.30	1.38	1.08	25.38	25.53	3.25	0.66	0.63	1.00
9	2.08	21.78	0.69	0.38	0.42	0.63	1.08	21.96	24.48	4.78	1.28	0.85	0.43
10	1.12	22.57	0.88	0.25	0.21	1.80	1.40	19.16	28.03	3.57	0.48	1.10	0.83

算量，解决问题的复杂性，可得样品的最佳描述特征^[9]。而 LDA 分析法能使同一类别内部的分布及相互距离增大，通过从所有数据中采集信息，以增加不同类目之间区分精度^[10]。LA 分析能够反映原始指标变量与主成分的相关系数，也能反映各个变量与因子间的相关程度^[11]。所得结果不同产地乌药样本点之间无交叉，说明彼此区分度良好。证明应用电子鼻收集不同样品气味信息可以高效区别不同产地乌药。同时分析得 S7 号、S9 号传感器对第一主成分（芳香类、硫化物）贡献率较大。

GC-MS 结果显示样品挥发油中共检测出 145 种成分，从化学成分组成的种类分析，10 个产地乌药挥发油结果显示其中共有成分 13 种，其中 4 (15), 5, 10 (14) - 大根香叶三烯 -1- 醇、杜松醇、 γ - 摩勒烯、大根香叶烯 B、 β - 桉叶醇、吉马酮、莜术呋喃烯、 β - 榄香烯、异香橙烯环氧化物、人参环氧炔醇 10 种相对含量存在一定差异，但相对含量差值均小于 5.13%。而共有成分 4a- 甲基 -1- 亚

甲基 -1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a- 八氢菲、8- 甲基 -2- 苯基 - 壬 -4, 7- 二烯 -2- 醇、香樟烯含量在不同产地乌药挥发油中有明显差异，其中广西贺州产地挥发油化学成分中 4a- 甲基 -1- 亚甲基 -1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a- 八氢菲相对含量最高 (49.44%)，江西上饶产地挥发油中该成分相对含量最低 (17.24%)；江西上饶产地挥发油成分中 8- 甲基 -2- 苯基 - 壬 -4, 7- 二烯 -2- 醇相对含量最高 (29.52%)，广西贺州产地挥发油中该成分相对含量最低 (8.06%)；湖南邵阳产地挥发油化学成分中香樟烯相对含量最高 (27.72%)，广西贺州产地挥发油化学成分中该成分相对含量最低 (16.78%)。说明不同产地乌药中挥发性成分的种类繁多，不同产地含特有成分，部分共有成分含量差异明显，产地对于乌药挥发油成分具有较大影响。恰好印证电子鼻的区分结果。而 GC-MS 分析共有成分占比最高的为萜类和倍半萜成分，属芳香化合物，则印证电子鼻分析 S9 号传感器结果。但 GC-MS 未检出硫化物，S7 号传感器结果未完全对应，由结果可

表 5 不同产地乌药挥发油特有成分及相对百分含量 (%)

Tab 5 Compounds and relative percentages of distinctive compounds in volatile oil samples from different origins (%)

产地	化合物名称	相对含量	产地	化合物名称	相对含量
浙江天台	螺旋 [4.4] 壬 -1, 6- 二烯	0.10	广西贺州	异乌药内酯	0.06
	环氧柏木烷	0.56		双环 [4.1.0] 庚 -2- 醇, 1 β - (3- 甲基 -1, 3- 丁二烯)	0.05
	8H- 苯并 [1, 2-b: 3, 4-b'] 二吡喃 -2- 酮, 8, 8- 二甲基	0.65		玟烯	0.04
	双环 [4.1.0] 庚烷, 7- 双环 [4.1.0] 庚 -7- 亚甲基	0.03	(-) - 蓝桉醇	0.56	
	蓝桉醇	0.14	(+) - 异愈创木醇	0.74	
	宝丹酮	0.44	3 β -17 β - 二羟基酯 -4- 烯	0.09	
江西景德镇	三环 [3.2.2.0] 壬烷 -2- 羧酸	0.04	呋喃桉 -1, 3- 二烯	0.34	
	锡瓦斯密菊蒿内酯	0.17	(+) - 绿花白千层醇	0.09	
	2- 环丙基亚金刚烷	0.03	石竹烯醇	0.20	
	桉烯	0.11	古巴烯	0.06	
	(-) - β - 古巴烯	0.43	异橄榄烯	0.06	
	双环 [4.4.0] 癸 -2- 烯 -4- 醇, 2- 甲基 -9- (丙基 -1- 烯 -3- 醇 -2- 基)	0.27	萜澄茄油烯醇	0.05	
反 - 长叶松香芹醇	0.07	愈创木醇	0.66		
甲基 -2- 苯基 - 壬 -4, 7- 二烯基 -2- 醇	0.75	云南大理 (-) - α - 菖蒲二烯	0.22		
邻伞花烃	0.03	江西上饶 6, 9- 愈创木二烯	0.07		
浙江建德	(9 α , 10 β) - (+ / -) - 三环 8.6.0.02.9 十六烷 -1 (16), 2- 二烯	0.13	2- 蒎烯	0.06	
	A- 菖蒲醇	0.17	愈创木酯 -1 (10), 11- 二烯	0.14	
	2, 5- 二甲基 -4- 乙烯基 -6-2, 5- 二烯醛	0.20	湖南邵阳 (5R, 6R) -3.6- 二甲基 -5- (丙基 -1- 烯 -2- 基) -6- 乙烯 -6, 7- 二氢苯呋喃 -4 (5H) - 酮	0.01	
	愈创木酯 -3, 9- 二烯	0.19	A- 菖蒲醇	0.18	
	乙酸异龙脑酯	1.17	湖北咸宁 4, 6, 6- 三甲基 -2- (3- 甲基丁基 -1, 3- 二烯基) -3- 氧三环 [5.1.0.0 (2, 4)] 辛烷	0.18	
	(-) - (Z) - 澳白檀醇	0.09	萘, 1, 6- 二甲基 -4- (1- 甲基乙基)	0.11	
竹节参炔	0.05	十氢二甲基甲乙烯基萘酚	0.14		
江西宜春	(-) - 马兜铃烯	0.14	江西德兴 双环 [4.2.0] 辛烯 -1- 烯, 7- (1E) -1- 丙烯 -1- 基	0.05	
	(4R, 5E, 9S, 11aS) -4, 9- 二羟基 -6- 甲基 -3, 10- 二 (亚甲基) -3A, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 11A- 八氢环癸并 [b] 呋喃 -2 (3H) - 酮	0.11	环己烯, 3- 甲基 -6- (1- 甲基环己烯)	0.03	
	雄甾 -1, 4, 6- 三烯 -3, 17- 二酮	0.19			

推测 GC-MS 与电子鼻分析对物质识别分类方式有一定差异和局限性。作为乌药的活性成分之一的倍半萜类, 已有文献研究发现该类成分具有抗肿瘤、抗炎、抗高血脂、抗肝纤维化等活性^[12-13]。

实验发现 4a- 甲基 -1- 亚甲基 -1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a- 八氢菲、8- 甲基 -2- 苯基 - 壬 -4, 7- 二烯 -2- 醇、香樟烯等共有成分在不同产地乌药挥发油中含量占比最高, 差异大。同时现代研究表明, 从乌药中提取的挥发油具有较强的抗肿瘤、抗菌和调节胃肠运动等作用^[14]。结合单体成分研究, 杜松醇能够抑制促炎细胞因子的活性, 从而发挥抗炎作用^[15], 其他共有成分 β - 榄香烯具有抗肿瘤活性^[16-17], 吉马酮具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒活性^[18-21], 已有文献研究表明香樟烯具有镇痛抗炎作用^[22]。几种活性成分之间或者是活性成分与挥发油的其他成分之间的协同作用, 也是

挥发油发挥作用的可能机制之一^[23]。根据乌药的临床效用与这些化合物的生物活性、药理作用有一定的相关性的结果, 推测这些不同产地的共有成分可能作为乌药挥发油质控的潜在成分, 具有深入研究价值。

其中天台乌药含有 5 种特有成分, 从挥发油成分分析为天台乌药的道地性研究提供一定的理论依据。中药材挥发油成分组成复杂, 无论是提取纯化中采用提取方法、提取时间, 还是后续贮存方式以及分析鉴定方法的不同都会间接导致检测结果的差异。根据部分地区乌药挥发油含有的特有成分, 推测不同产地乌药中挥发油含量和种类不同, 可能是受到海拔、土壤、光照、气候、人为干预、采集季节等因素影响, 进而影响挥发油的生物合成^[11, 24-25]。为区分不同产地的乌药, 还需扩大样本量进行实验, 分析其中的特有成分,

由此可为乌药品种和产地鉴别提供新思路^[26]。

综上,本实验初步探索了基于电子鼻技术对不同产地乌药的气味进行快速区别,该方法高效、方便简单、鉴别准确率高。基于 GC-MS 技术从挥发性成分分析的结果,探讨了乌药不同产地药材的差异,可为乌药挥发油成分的物质基础研究提供参考。当然,为实现乌药药材的全面质量控制,还需要结合中药药理学、毒理学展开研究。这将对规范乌药药材生产质量,完善质量控制标准,实现乌药生产产业化具有深远意义。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 79.
- [2] 苏颖,赵宏岩.《本草图经》研究[M].北京:人民卫生出版社,2011: 458.
- [3] 邢梦雨,田崇梅,夏道宗.乌药化学成分及药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2017,29(12): 2147-2151.
- [4] 邓桂明,向彪,肖小芹,等.基于 GC-MS 和 UPLC-ESI-MS/MS 法研究乌药化学成分[J].中药材,2016,39(10): 2229-2236.
- [5] Ye JW, Li DZ. Development of 20 chloroplast microsatellite primers in Wuyao (*Lindera aggregata*, Lauraceae) [J]. Appl Plant Sci, 2019, 7(8): e01213.
- [6] 罗益远,蔡红蝶,沙秀秀,等.天台乌药不同部位挥发性成分的 GC-MS 分析[J].中药材,2019,42(6): 1319-1322.
- [7] 牟娟,张胜玉.不同产地乌药的质量研究[J].云南中医中药杂志,2013,34(9): 62-63.
- [8] 周华英,骆德汉,何家峰,等.枳壳及其混淆品无损鉴别结合 GC-MS 挥发油成分分析研究[J].时珍国医国药,2018,29(9): 2180-2184.
- [9] 李俣珠,杨康卓,刘志鹏,等.基于电子鼻和 HS-SPME-GC-MS 比较不同空间层次浓香型原酒挥发性风味成分[J].中国酿造,2024,43(1): 34-40.
- [10] 邓梦青,袁扬,赵恬,等.电子鼻和电子舌技术在五倍子蜂蜜风味识别中的应用[J].现代食品科技,2023,39(9): 270-278.
- [11] 曹森,赵成飞,马凤伟,等.基于电子鼻和 GC-MS 评价不同采收期天麻的芳香品质[J].北方园艺,2019,(19): 87-94.
- [12] 杨文翠,于金倩,刘双,等.乌药化学成分及药理作用研究进展[J].中成药,2023,45(7): 2300-2307.
- [13] Ji D, Zhao Q, Qin YW, et al. Germacrone improves liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway [J]. Cell Biol Int, 2021, 45(9): 1866-1875.
- [14] 晏润纬,彭小梅.乌药挥发油的化学成分及药理作用[J].时珍国医国药,2014,25(11): 2747-2749.
- [15] El-Banna A A, Shawky E, Celik I, et al. Deciphering the putative bioactive metabolites and the underlying mechanism of *Juniperus horizontalis* Moench (Creeping juniper) in the treatment of inflammation using network pharmacology and molecular docking [J]. J Pharm Pharmacol, 2024, 76(5): 514-533.
- [16] Xu C, Jiang ZB, Shao L, et al. β -elemene enhances erlotinib sensitivity through induction of ferroptosis by upregulating lncRNA H19 in EGFR-mutant non-small cell lung cancer [J]. Pharmacol Res, 2023, 191: 106739.
- [17] 朱琳芳,王秋岩,吴慧丽,等.榄香烯抗肿瘤活性机理及其衍生物活性研究进展[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2018,17(2): 170-176.
- [18] Sun XF, Zhong X, Ma WF, et al. Germacrone induces caspase-3/GSDME activation and enhances ROS production, causing HepG2 pyroptosis [J]. Exp Ther Med, 2022, 24(1): 456-466.
- [19] Lou GH, Huang Y, Wang Y, et al. Germacrone, a novel and safe anticancer agent from genus *Curcuma*: a review of its mechanism [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2023, 23(13): 1490-1498.
- [20] 李泽宇,郝二伟,杜正彩,等.吉马酮的药理作用及其作用机制的研究进展[J].现代药物与临床,2022,37(3): 644-652.
- [21] Panyajai P, Viriyaadhamma N, Tima S, et al. anticancer activity of *Curcuma aeroginosa* essential oil and its nano-formulations: cytotoxicity, apoptosis and cell migration effects [J]. BMC Complement Med Ther, 2024, 24(1): 16-28.
- [22] Germano A, Occhipinti A, Barbero F, et al. A pilot study on bioactive constituents and analgesic effects of MyrLiq®, a commiphoramyrtha extract with a high furanodiene content [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 3804356.
- [23] 晏润纬,花金红.乌药根挥发油的体外抗肿瘤活性及其有效成分分析[J].武汉大学学报(理学版),2014,60(4): 345-348.
- [24] 邱佳,刘付松,梁光平,等.贵州省野生火棘果营养成分与气候因子相关性分析[J].生物资源,2023,45(6): 592-599.
- [25] 武晨.温度及 CO₂ 浓度对两株不同地域小球藻生长及其关键酶的影响[D].南京:南京农业大学,2023.
- [26] 马丽娟.马尾松树轮宽度对气候因子响应的地域差异分析[D].南京:南京师范大学,2020.

(收稿日期:2024-04-17;修回日期:2024-06-25)

基于分子对接和表面等离子共振分析五酯胶囊与 CYP3A4 的作用机制

叶倩倩^{1, 2}, 蒋跃平^{1, 2}, 葛成昱¹, 王柠柠^{1, 2}, 刘韶^{1, 2*} (1.中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 2.国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院), 长沙 410008)

摘要: **目的** 探讨五酯胶囊通过 CYP3A4 影响其他药物代谢的作用机制。**方法** 首先采用分子对接技术虚拟筛选五酯胶囊中 6 种主要活性成分(即五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙及五味子酯甲)和阳性对照药物伊曲康唑与 CYP3A4 的作用机制, 应用 Molecular Operating Environment 软件的 Dock 功能进行分子对接, 得出对接评分 (S)。之后利用表面等离子共振 (SPR) 评估各活性成分及阳性对照与 CYP3A4 的亲合力。**结果** 分子对接结果显示五酯胶囊的 6 种主要成分与 CYP3A4 在空间结构上互补性高, 其中五味子酯甲的 S 值最低, 为 -8.4517 。SPR 显示五味子酯甲与 CYP3A4 的亲合力最强, K_d 值为 $3.21 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其次为五味子甲素, 五味子醇甲与五味子丙素与 CYP3A4 的亲合力相对较弱。亲合力拟合曲线显示五酯胶囊的 6 种主要活性成分与 CYP3A4 亲合力均较好。**结论** 五味子酯甲与 CYP3A4 的结合力最强, 相较于伊曲康唑, 其他成分与 CYP3A4 同样存在较强的结合能力, 这可能是五酯胶囊通过 CYP3A4 影响其他药物代谢的主要原因。

关键词: 五酯胶囊; 分子对接; 表面等离子共振; 相互作用

中图分类号: R285, R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3187-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.009

Mechanism of interaction between Wuzhi capsules and CYP3A4 based on molecular docking and surface plasmon resonance

YE Qian-qian^{1, 2}, JIANG Yue-ping^{1, 2}, GE Cheng-yu¹, WANG Ning-ning^{1, 2}, LIU Shao^{1, 2*} (1. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008; 2. National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital, Changsha 410008)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Wuzhi capsules affecting the metabolism of other drugs through CYP3A4. **Methods** Molecular docking was used to screen the mechanism of six main active components of Wuzhi capsules: schisandrin A, schisandrin B, schisandrin C, schisandrol A, schisandrol B, and schisantherin A, along with the positive control drug itraconazole with CYP3A4. The docking function of Molecular Operating Environment software was used to obtain the docking scores (S). Subsequently, surface plasmon resonance (SPR) was used to assess the affinity of each active component and the positive control with CYP3A4. **Results** The molecular docking showed that the six main components of Wuzhi capsules were highly complementary to CYP3A4 in terms of space structure, among which schisantherin A had the lowest S -value of -8.4517 . SPR showed that schisantherin A had the strongest binding affinity to CYP3A4, with a K_d of $3.21 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, followed by schisandrin A. The affinity of schisandrin C, and schisandrol A propin to CYP3A4 was relatively weak. In the affinity fitting curves, the six main components of pentosan capsules had better affinity with CYP3A4. **Conclusion** Schisantherin A shows the strongest binding to CYP3A4. As compared with the itraconazole, other components also show strong binding ability to CYP3A4, which may be the main

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No. 2022JJ80047); 国家老年疾病临床医学研究中心资助项目 (No.2021LNJJ20)。

作者简介: 叶倩倩, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: 313349415@qq.com *通信作者: 刘韶, 男, 主任药师, 博士生导师, 主要从事药事管理、天然药化研究和开发, email: iushao999@csu.edu.cn

reason how Wuzhi capsules affect the metabolism of other drugs through CYP3A4.

Key words: Wuzhi capsule; molecular docking; surface plasmon resonance; drug interaction

五酯胶囊是木兰科植物华中五味子的果实经醇提制成的具有保肝作用的中药制剂。华中五味子又称“南五味子”，主产于我国西南及长江流域以南各省。五酯胶囊适用于慢性、迁延性肝炎谷丙转氨酶升高者，临床上广泛用于治疗各种类型肝损伤^[1]。高剂量环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)和单剂量五酯胶囊联合给药显示大鼠体内CTX的代谢物一氯乙醛显著降低，对CTX诱导的肾脏和大脑氧化应激具有保护作用^[2]。另有机机制显示通过激活核因子E2相关因子2(Nuclear factor erythroid 2 related factor 2, NRF2)介导的防御反应，五酯胶囊对顺铂诱导的肾毒性具有保护作用^[3]。近期的研究显示五酯胶囊的各主要成分具有多种药理作用，五味子甲素通过促进法尼醇X受体信号通路降低肠道炎症改善小鼠急性溃疡性结肠炎^[4]，五味子乙素通过Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路减轻急性胰腺炎大鼠肺损伤，修复肺功能^[5]。近年的研究显示五酯胶囊具有更广阔的医药应用前景^[6]。

细胞色素CYP450 3A(cytochrome P450 3A, CYP3A)是人体最重要的药物代谢酶，占CYP450总含量30%以上，参与多种治疗药物的代谢^[7]。其中CYP3A4广泛分布于肝脏和肠道，在包括芬太尼、咪达唑仑、免疫抑制剂等大约50%在售药品的代谢中发挥了重要作用^[8-9]。研究显示五酯胶囊可影响CYP3A活性，通过影响其他药物的代谢进而导致药物-药物相互作用(drug-drug interaction, DDI)^[10]。根据不同的用药情况，DDI可能引起不良反应，也可能对治疗用药有益。既往研究证实五酯胶囊及五酯片通过抑制CYP3A从而升高他克莫司及环孢素的血药浓度，五味子制剂和他克莫司联用时对于CYP3A5快代谢型患者可升高他克莫司浓度1倍^[11]。本课题组前期研究同样发现五酯胶囊可显著增加肾移植患者他克莫司的血药浓度且减少日剂量，显示出较好的安全性、经济性^[12]。另有研究显示，五酯胶囊与CTX联用较CTX单用时的AUC及C_{max}均有所增加，提示两者联用时应密切监测CTX的不良反应用^[13]。除此之外，一些抗肿瘤药与抗血小板聚集药等均显示与五味子制剂具有相互作用^[14-15]。

目前，五酯胶囊主要成分与CYP3A4相互作用的研究较少且不够系统，五酯胶囊对于其他药物代谢的机制研究仍不充分，本研究拟用分子对

接(molecular docking)和表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)研究五酯胶囊主要成分与CYP3A4相互作用强度，以期在五酯胶囊在临床安全合理应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试药

雷帕霉素(上海源叶生物科技有限公司, 批号: B20714, 规格: 20 mg, HPLC \geq 99%), 药品五味子甲素(批号: W005118111023, 规格: 20 mg, HPLC > 98%)、五味子乙素(批号: W005118111013, 规格: 20 mg, HPLC > 98%)(北京中科质检生物技术有限公司), 五味子丙素(上海源叶生物科技有限公司, 批号: J05GB150952, 规格: 20 mg, HPLC > 98%), 五味子醇甲(批号: 92KNRHR, 规格: 20 mg, HPLC \geq 95%)、五味子醇乙(批号: 9SEK5R6Q, 规格: 20 mg, HPLC \geq 95%)、五味子酯甲(批号: 9GPKR6MU)(萨恩化学技术有限公司), 伊曲康唑(MedChemExpress, 批号: 15455, 规格: 100 mg, 纯度: 99.81%)。

1.2 五酯胶囊主要成分与CYP3A4的分子对接研究

1.2.1 数据库与软件 分子对接采用Molecular Operating Environment软件(MOE, version 2016)中的Dock模块, 所有受体分子均来源于RCSB PDB数据库(<http://www.resb.org/>), Dock模块参数采用Placement: Triangle Matcher, Refinement: Induced fit, London dG: 30, GBVI/WSA dG: 5, 其他参数除非特别指明, 均为默认值。

1.2.2 CYP3A4蛋白结构准备 从RCSB PDB数据库(<http://www.resb.org/>)中下载具有活性结合位点标识的CYP3A4晶型结构, PDB蛋白编码为CYP3A4-5AIR(种属: 人), 分辨率为2.45 Å。蛋白晶体前处理及结合口袋的定义: 删除水分子、金属离子、原配体分子及其非相关的蛋白质构象, 经QuickPrep工具进行优化处理, 定义蛋白为受体, 通过MOE中的SiteView功能快速寻找结合口袋, 最后保存备用。

1.2.3 配体分子的准备及数据库构建 从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜集得到6种五酯胶囊主要成分以及阳性对照化合物结构, 将其导入MOE软件建立数据库, 通过加氢以及Wash功能对配体分子进行结构优化, 保存后作为分子对接的配体分子数据库。五酯胶囊6种主要成分和阳性对照物(伊曲康唑)的化学结构, 见图1。

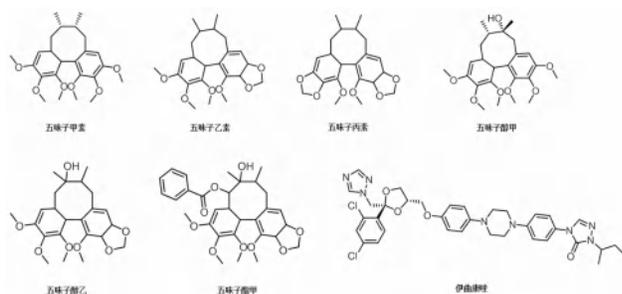


图 1 五酯胶囊 6 种活性成分及伊曲康唑的化学结构

Fig 1 Structures of 6 main active ingredients in Wuzhi capsules and itraconazole

1.2.4 分子对接方法 将上述组建的小分子配体和受体导入 MOE, 调用 Dock 模块, 修改对接参数 Placement: Triangle Matcher, Refinement: Induced fit, London dG: 30, GBVI /WSA dG: 1, 其余均为默认值; 同样的参数调节, 将阳性对照小分子化合物、五酯胶囊主要成分与受体进行对接。 S 得分越低, 表明配体与蛋白结合力越强。

1.2.5 对接方法可行性验证 含有原配体的蛋白晶体复合结构, 若将原配体抽离, 之后按原参数对接回其结合口袋, 计算对接构象与原配体结构的均方根偏差值 (root mean square deviation, RMSD), 一般认为 $RMSD \leq 2$ 时^[16], 提示该套参数可较好地重现此配体与受体的结合模式, 该对接方法可行。

1.3 五酯胶囊主要成分 SPR 研究

1.3.1 测试芯片打印 将 7 种化合物样品、1 种蛋白样品从 -80°C 冰箱取出后室温回温。使用二甲基亚砜 (DMSO) 将 7 种化合物稀释至打印浓度作为固定相打印工作液。之后通过 Biodot AD1520 芯片阵列打印机将打印工作液打印在 3D 光交联芯片上, 每种样品打印 4 个重复点, 四角打印 4 组阳性对照点 (雷帕霉素)。将打印后的芯片进行真空干燥, 之后放置于光交联仪器内进行光交联反应; 然后依次使用 N,N -二甲基甲酰胺 (DMF)、乙醇、水摇洗 15 min, 氮气吹干, 装配 Flowcell Cover 备用。

1.3.2 亲和力检测 向 1 种蛋白样品储备液加入 PBST 缓冲液 (pH 7.4, 0.1% Tween 20) 稀释为 5 个浓度梯度 (10、40、160、640、2560 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。所有样品依次流通, 进行测试。PBST 缓冲液在整个实验中作为流动载体^[17]。互作测试环节, 分析物以 $0.5 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ 流经在芯片表面; 表面重生环节, 用 Glycine-HCl 溶液 (pH 2.0) 作为重生液, 流速为 $2 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ 。实验按浓度由低到高依次加载不同浓度梯度的化合物样品, 流速为 $0.5 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$, 结合反应温度为 4°C , 结合时间为 600 s, 解离时间为 360 s。随后, 用 Glycine-HCl 溶液 (pH 2.0) 作

为重生液, 进行重生。最后收集实验数据, 评价筛选出 7 种化合物与蛋白受体的结合能力。

亲和曲线拟合用 Origin 软件进行评估及拟合。绘制单体化合物与靶蛋白的结合曲线, 即 SPR 光谱图, 并且计算获得动力学参数 K_a 、解离速率常数 K_d 和解离平衡常数 KD 。

2 结果

2.1 分子对接结果分析

分析五酯胶囊 6 种活性成分及伊曲康唑与 CYP3A4 的相互作用模式, 得出相互作用的残基见表 1。伊曲康唑作为阳性对照物, 五酯胶囊 6 种活性成分的对接评分 (S) 值均小于伊曲康唑 (-6.5746), 表明各成分与 CYP3A4 的空间结构上互补性高, 其中五味子酯甲的 S 值最低, 为 -8.4517 , 其次为五味子醇甲、五味子甲素, 详见图 2。

2.2 SPR 结果分析

采用 SPR 生物传感器检测 7 种化合物与 CYP3A4 之间的结合力, 结果显示五味子丙素和五味子醇甲的解离常数 K_d 值以及动力学参数 K_a 值较小, 各亲和力参数见表 2。五味子酯甲与 CYP3A4 的亲和力最强, KD 为 $3.21 \times 10^{-8} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其次为五味子甲素, 五味子醇甲与五味子丙素与 CYP3A4 的亲和力相对较弱。在亲和力拟合曲线中, 6 种五酯胶囊的主要成分与 CYP3A4 亲和力均较好, 如图 3 所示。

3 讨论

中药是中华民族的瑰宝, 中草药制剂也成为更多患者的选择, 中药与西药的联合使用在临床中更加常见, 中药和西药间的相互作用也可能随之增加^[18]。五酯胶囊可显著增加移植患者中他克莫司的血药浓度, 在移植领域应用较广^[19]。然而, 目前对五酯胶囊与细胞色素 P450 酶的研究主要倾向于 CYP3A5^[20-21]。CYP3A4 主要在肝脏和小肠中大量表达, 对很多药物的代谢有着重要作用, 参与了黄酮类、香豆素类、生物碱类等天然产物以及咪达唑仑和利托那韦等多种药物的代谢过程^[22]。因此, 明确五酯胶囊对 CYP3A4 的抑制作用, 对预测五酯胶囊临床应用中可能产生的药物相互作用具有重要意义。

唑类抗真菌药是 CYP450 的典型抑制剂, 在 DDI 中发挥着重要作用, 其中酮康唑、氟康唑及伊曲康唑是研究 DDI 常用的参比药物^[23]。既往五味子提取物与 CYP3A 相互作用研究中, 酮康唑作为一种经典的 CYP3A4 竞争性可逆性抑制剂, 是体外孵育实验常用的经典对照品^[24]。相较于酮康唑, 伊曲康唑在临床中应用更为广泛, 对 CYP3A4 具有较强的抑制作用。一项体外研究显示伊曲康唑对吡咯替尼有较强的抑制作用, IC_{50} 值为 $0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[25]。故本研究采用伊曲康唑

表 1 五酯胶囊 6 种活性成分和伊曲康唑与 CYP3A4 相互作用情况

Tab 1 Relations between CYP3A4 and 6 main active ingredients of Wuzhi capsules and itraconazole

化合物	S	RMSD	相互作用			
			H-donor	H-acceptor	pi-cation	pi-H
五味子甲素	-7.7859	2.0363	His267, Asp201	Arg212, Arg260		
五味子乙素	-6.9061	1.1139	Cys442			Lys424
五味子丙素	-7.0333	1.2836		Arg130, Lys67	Arg212	
五味子醇甲	-7.9123	1.7367	Met256, Gly190	Arg260, Lys453, Arg212		Phe57
五味子醇乙	-7.0373	1.5419	Asp357, Asp174, Phe189, Cys442			
五味子酯甲	-8.4517	0.8036	Pro434, Gln200, Asp174	Arg212	Ala370	
伊曲康唑	-6.5746	1.8066	Ser495	Lys251, Asn280, Lys67, Lys115, Arg243, Lys466	Lys413, Arg496	Leu211, Gly31, Arg161, Glu165

注：对接评分 (S) 是选取 5 种构象中的最小值，RMSD 是选取最小 S 对应的 RMSD。

Note: Docking score (S) is the minimum value selected from the 5 conformations, and RMSD is the RMSD corresponding to the minimum S.

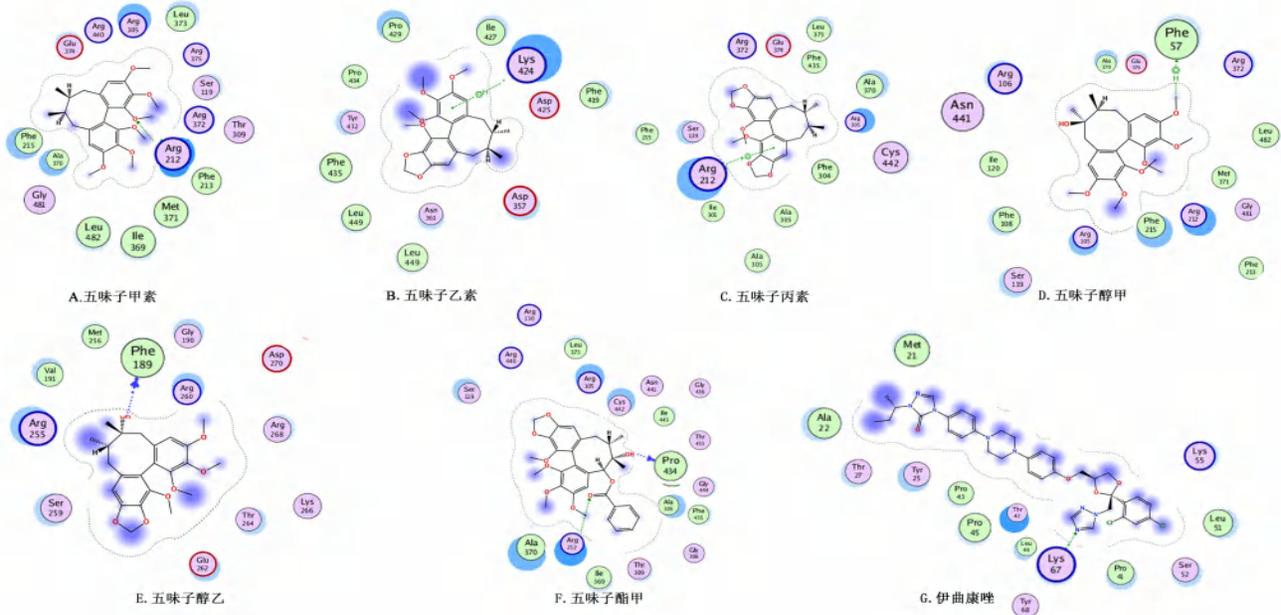


图 2 五酯胶囊 6 种活性成分和伊曲康唑与 CPY3A4 的对接构象图

Fig 2 Relations between CYP3A4 and 6 main active components of Wuzhi capsules and itraconazole

表 2 五酯胶囊 6 种活性成分及伊曲康唑与 CYP3A4 的动力学及亲和力参数

Tab 2 Binding affinity between CYP3A4 and 6 main active components of Wuzhi capsules and itraconazole

化合物	$K_d / (\cdot \text{Ms}^{-1})$	$K_d / (\cdot \text{s}^{-1})$	$KD / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
五味子甲素	1.42×10^5	6.35×10^{-3}	4.47×10^{-8}
五味子乙素	3.26×10^4	7.83×10^{-3}	2.40×10^{-7}
五味子丙素	1.87×10^3	1.23×10^{-2}	6.57×10^{-6}
五味子醇甲	1.81×10^4	1.02×10^{-2}	5.64×10^{-7}
五味子醇乙	2.29×10^5	1.88×10^{-2}	8.21×10^{-8}
五味子酯甲	3.43×10^5	1.10×10^{-2}	3.21×10^{-8}
伊曲康唑	2.86×10^5	1.80×10^{-2}	6.29×10^{-8}
DMSO	2.53	3.78×10^{-1}	1.49×10^{-1}

作为阳性对照。

分子对接是预测配体与受体活性位点相互作用的一种计算机仿真建模技术，通过利用计算机技术，模拟酶和底物结合过程，进而预测配体与靶点在分子水平上的相互作用或确定结构 - 活性关

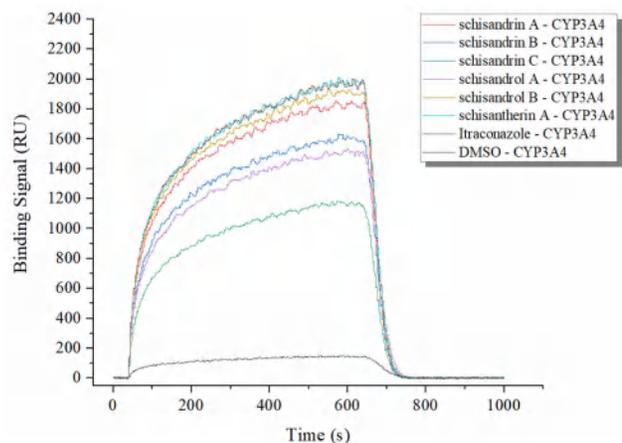


图 3 五酯胶囊 6 种活性成分及伊曲康唑与 CYP3A4 的拟合曲线

Fig 3 Fitting curves of interactions between CYP3A4 and 6 main active components of Wuzhi capsules and itraconazole

系^[26]。自 20 世纪 70 年代应用以来，分子对接已被证明是分析化合物与其分子靶点相互作用的重要工具，并逐渐运用到药物靶点捕捉、多药药理学、

相互作用分析以及不良反应预测等众多领域^[27]。本研究采用 MOE 软件对五酯胶囊中的 6 种主要活性成分、阳性对照物伊曲康唑与 CYP3A4 进行模拟对接,结果显示 6 种活性成分的 *S* 值主要在 -7 左右,且低于伊曲康唑的 *S* 值,提示这 6 种成分与 CYP3A4 的空间结构互补性较高。而五味子酯甲的 *S* 值达到 -8 左右,相较于其他成分具有较强的相互作用关系。然而,一项动物实验显示他克莫司与五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙联用时, *AUC* 较单独使用他克莫司组相比,分别增加了 152.0%、109.6%、46.4%、41.4%、598.4% ($P < 0.0005$),五味子醇乙显示出最强的抑制作用^[28-29]。另有研究显示五味子制剂对 CYP3A 的强效抑制作用可能是亚甲基二氧苯基结构与 P450 酶形成的代谢物-中间体复合物所致,即具有一个亚甲基二氧苯基结构的木脂素如 Gom A、Gom B、Gom C 和 Sch B,对 CYP3A 活性的抑制作用最强, IC_{50} 值低至 $0.19 \sim 0.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,远低于其他 P450 同工酶^[24, 30-31]。对于这些五味子木脂素成分,一些研究获得了更大的 IC_{50} 值,其差异可能源于孵育条件(包括 CYP3A 探针底物和/或酶来源)的不同^[32]。

SPR 是一种基于光学原理探索生物分子间相互作用的生物传感分析技术,因其检测灵敏度高、消耗样品少及实时化等优点,现已广泛应用于药动学分析、高通量筛选及小分子检测等多个领域^[33-34]。目前,利用 SPR 分析底物或抑制剂对于 CYP450 相互作用的研究较少且不够系统。Ershov 课题组针对此课题开展了相关研究,前期研究利用 SPR 筛选与 CYP51A1 有相互作用的唑类,发现酮康唑与其亲和力最高,同时探索了奥美拉唑与 CYP2C19 的亲和力^[35-36]。Pearson 等^[37]利用 SPR 分析伊曲康唑和酮康唑与 CYP3A4 的结合模式,结果观察到多项结合动力学,显示 SPR 在阐明药物与蛋白相互作用方面具有明显的实用性。本研究首次使用 SPR 分析五酯胶囊中木脂素成分与 CYP3A4 的相互作用机制,结果显示五味子酯甲与 CYP3A4 的亲和力最强(其 K_d 值最小),这与分子对接的结果一致(*S* 值最小)。

本研究证实五味子酯甲与 CYP3A4 结合力最强,而其他成分的亲和力强弱呈现结果并不一致。目前,分子对接已广泛应用于中药研究领域,据报道基于该方法识别的活性成分靶点假阳性率高达 50%^[38-39]。故在实际科研探索中,多种方法联合应用不仅可以发挥各方法的优势、同时还能提高结果的可信度。然而,鉴于体外实验存在不一致性,仍需借助分子生物学、动物实验及临床

研究进行进一步验证。

本研究首次使用分子对接及 SPR 联合技术探索了五酯胶囊 6 种成分与 CYP3A4 的相互作用,发现五味子酯甲对 CYP3A4 的亲和力最强,对于研究中药与药物代谢酶间的相互作用提供了新的研究思路与方法。

参考文献

- [1] 王晓艳,李伟霞,张辉,等.五酯胶囊(片/滴丸)防治药物性肝损伤有效性与安全性的 Meta 分析[J].实用中医内科杂志,2020,34(12):9-13.
- [2] Chen L, Xiong XJ, Hou XY, et al. Wuzhi capsule regulates chloroacetaldehyde pharmacokinetics behaviour and alleviates high-dose cyclophosphamide-induced nephrotoxicity and neurotoxicity in rats [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 125 (2): 142-151.
- [3] Zeng XZ, Li X, Xu CS, et al. Schisandra sphenanthera extract (Wuzhi Tablet) protects against chronic-binge and acute alcohol-induced liver injury by regulating the NRF2-ARE pathway in mice [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7 (5): 583-592.
- [4] 蒋嘉瑞,董跨,金玉春,等.五味子甲素调控 FXR 信号通路改善 DSS 诱导的小鼠急性溃疡性结肠炎[J].药理学报,2024,59(5):1261-1270.
- [5] 黄夏冰,王馨苑,李娟,等.五味子乙素通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对急性胰腺炎大鼠肺部损伤的影响[J].中国免疫学杂志,2024,40(2):266-272.
- [6] Li ZJ, He X, Liu F, et al. A review of polysaccharides from Schisandra chinensis and Schisandra sphenanthera: properties, functions and applications [J]. Carbohydr Polym, 2018, 184: 178-190.
- [7] 林洁,葛卫红.中药活性成分对细胞色素 P450 的影响[J].安徽医药,2007,11(1):8-10.
- [8] Saravanakumar A, Sadighi A, Ryu R, et al. Physicochemical properties, biotransformation, and transport pathways of established and newly approved medications: a systematic review of the top 200 most prescribed drugs vs. the FDA-approved drugs between 2005 and 2016 [J]. Clin Pharmacokinet, 2019, 58 (10): 1281-1294.
- [9] Pratt VM, Cavallari LH, Fulmer ML, et al. CYP3A4 and CYP3A5 Genotyping Recommendations: a Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, College of American Pathologists, Dutch Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Pharmacists Association, European Society for pharmacogenomics and personalized therapy, and pharmacogenomics knowledgebase [J]. J Mol Diagn, 2023, 25 (9): 619-629.
- [10] 叶倩倩,尹桃,伍列林,等.中草药、食物及膳食补充剂对肾移植患者用药及肾功能的影响[J].中南药学,2019,17(11):1890-1894.
- [11] 刘晓曼,陈杰.肾移植患者免疫抑制剂长期管理医药专家共识[J].今日药学,2022,32(11):801-816.
- [12] 叶倩倩,李思曼,蒋跃平,等.五酯胶囊联合他克莫司在

- 肾移植患者中的疗效及安全性研究[J]. 中南药学, 2024, 22 (1): 253-258.
- [13] Chen L, Ji N, Zhang M, et al. The influence of Wuzhi capsule on the pharmacokinetics of cyclophosphamide [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2022, 17 (2): 195-203.
- [14] 冯格, 翟健秀, 陈万生, 等. 南北五味子及其制剂与其他药物相互作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37 (21): 2206-2209.
- [15] 张露丹, 左旭锐, 刘凡琪, 等. 应用定量药理学模型开展中西药相互作用的研究进展[J]. 中草药, 2024, 55 (6): 1799-1805.
- [16] Gohlke H, Hendlich M, Klebe G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions [J]. *J Mol Biol*, 2000, 295 (2): 337-356.
- [17] Xian HB, Feng WN, Zhang JR. Schizandrin A enhances the efficacy of gefitinib by suppressing IKKbeta/NF-kappaB signaling in non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 855: 10-19.
- [18] Chen KC, Lu R, Iqbal U, et al. Interactions between traditional Chinese medicine and western drugs in Taiwan: a population-based study [J]. *Comput Methods Programs Biomed*, 2015, 122 (3): 462-470.
- [19] Huang SQ, Song W, Jiang SM, et al. Pharmacokinetic interactions between tacrolimus and Wuzhi capsule in liver transplant recipients: genetic polymorphisms affect the drug interaction [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 391: 110906.
- [20] Chen P, Dai R, She YJ, et al. Prediction of tacrolimus and Wuzhi tablet pharmacokinetic interaction magnitude in renal transplant recipients [J]. *Clin Transplant*, 2022, 36 (12): e14807.
- [21] Qu JL, Bian RR, Liu BG, et al. The pharmacokinetic study of tacrolimus and Wuzhi capsule in Chinese liver transplant patients [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 956166.
- [22] 张凤, 张甜甜, 涂东珠, 等. 中草药抑制 CYP3A4 的效应物质研究进展[J]. 遵义医科大学学报, 2021, 44 (5): 559-574.
- [23] Bellmann R, Smuszkiewicz P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients [J]. *Infection*, 2017, 45 (6): 737-779.
- [24] Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, et al. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in Schisandra fruit extract [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32 (12): 1351-1358.
- [25] Wang L, Wu F, Xu J, et al. Differential effects of ketoconazole, fluconazole, and itraconazole on the pharmacokinetics of pyrotinib in vitro and in vivo [J]. *Front Pharmacol*, 2022, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.962731>.
- [26] Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (18): 4331.
- [27] Ferreira LG, Dos Santos-RN, Oliva G, et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies [J]. *Molecules*, 2015, 20 (7): 13384-13421.
- [28] Wei H, Tao X, Di P, et al. Effects of traditional Chinese medicine Wuzhi capsule on pharmacokinetics of tacrolimus in rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41 (7): 1398-1403.
- [29] Qin XL, Chen X, Wang Y, et al. In vivo to in vitro effects of six bioactive lignans of Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) on the CYP3A/P-glycoprotein-mediated absorption and metabolism of tacrolimus [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42 (1): 193-199.
- [30] Lai L, Hao HP, Wang Q, et al. Effects of short-term and long-term pretreatment of Schisandra lignans on regulating hepatic and intestinal CYP3A in rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37 (12): 2399-2407.
- [31] Seo HJ, Ji SB, Kim SE, et al. Inhibitory effects of schisandra lignans on cytochrome P450s and uridine 5'-diphospho-glucuronosyl transferases in human liver microsomes [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (3): 371.
- [32] Zhang F, Zhai JX, Weng N, et al. A comprehensive review of the main lignan components of Schisandra chinensis (North Wu Wei Zi) and Schisandra sphenanthera (South Wu Wei Zi) and the lignan-induced drug-drug interactions based on the inhibition of cytochrome P450 and P-glycoprotein activities [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 816036.
- [33] Olaru A, Bala C, Jaffrezic-Renault N, et al. Surface plasmon resonance (SPR) biosensors in pharmaceutical analysis [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2015, 45 (2): 97-105.
- [34] 胡馨儿, 戚敏钰, 张颖, 等. 表面等离子共振传感器在生物分子检测中的应用进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2024, 41 (8): 957-965, 994.
- [35] Gnedenko OV, Kaluzhskii LA, Mol' Nar AA, et al. SPR-biosensor assay for analysis of small compounds interaction with human cytochrome P450 51A1 (CYP51A1) [J]. *Biomed Khim*, 2013, 59 (4): 388-398.
- [36] Ershov PV, Yablokov EO, Florinskaya AV, et al. SPR-based study of affinity of cytochrome P450s / redox partners interactions modulated by steroidal substrates [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 187: 124-129.
- [37] Pearson JT, Hill JJ, Swank J, et al. Surface plasmon resonance analysis of antifungal azoles binding to CYP3A4 with kinetic resolution of multiple binding orientations [J]. *Biochemistry*, 2006, 45 (20): 6341-6353.
- [38] Wei XX, Wu X, Cheng ZY, et al. Botanical drugs: a new strategy for structure-based target prediction [J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23 (1): bbab425.
- [39] 吴雪芬, 卫晓红, 武玉卓, 等. 中药活性成分靶点确定及作用机制研究方法进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (17): 4565-4573.

(收稿日期: 2024-04-07; 修回日期: 2024-05-23)

葛根中异黄酮类化学成分鉴定及其网络药理学研究

吴文娟, 吕伯龙* (国检测控股集团(安徽)拓维检测服务有限公司, 安徽 宣城 242000)

摘要: 目的 研究葛根中的异黄酮类化学成分, 结合网络药理学探究其治疗糖尿病的作用机制。方法 利用大孔树脂、 C_{18} 柱色谱和制备高效液相色谱等技术, 从葛根 80% 乙醇提取物中分离纯化得到单体成分, 通过 NMR 等波谱分析进行结构鉴定。利用 PubChem 和 GeneCards 等数据库预测所鉴定成分的糖尿病治疗靶点及通路, 对核心基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并使用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点-通路-疾病”网络图。结果 共分离得到 15 个异黄酮类化合物, 分别鉴定为 3'-甲氧基大豆苷元(1)、葛根素-4'- O - β -D-葡萄糖苷(2)、6''- O -丙二酰基大豆苷(3)、葛根素-6''- O -木糖苷(4)、黄豆黄苷(5)、3'-甲氧基大豆苷(6)、葛根素(7)、3'-甲氧基葛根素(8)、大豆苷元(9)、葛根素芹菜糖苷(10)、美佛辛-4'- O -葡萄糖苷(11)、3'-羟基葛根素芹菜糖苷(12)、大豆素-7, 4'-二葡萄糖苷(13)、芒柄花苷(14)和二氢大豆苷(15)。利用 15 个化合物筛选出葛根治疗糖尿病的 111 个潜在靶点, 确定化合物 3 和化合物 15 分别作用于 CASP3 和 PRKCA 两个关键靶点。结论 化合物 15 为首次从葛属中分离得到的异黄酮类化合物, 网络药理学研究结果为葛根治疗糖尿病的研究提供思路。

关键词: 葛根; 异黄酮; 化学成分; 结构鉴定; 网络药理学

中图分类号: R283, R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3193-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.010

Identification of isoflavone chemical constituents in *Puerariae lobatae* radix and related network pharmacology

WU Wen-juan, LYU Bo-long* (CTC. (Anhui) Topway Testing Services Co., Ltd., Xuancheng Anhui 242000)

Abstract: Objective To determine isoflavone chemical constituents in *Puerariae lobatae* radix and their mechanisms of action in treating diabetes mellitus with network pharmacology. **Methods** Isoflavone compounds were isolated and purified from an 80% ethanol extract of *Pueraria lobata* with macroporous resin, C_{18} column chromatography, and preparative high-performance liquid chromatography. The structures were identified primarily through NMR and other spectral analyses. The potential targets and pathways for treating diabetes were predicted with databases such as PubChem and GeneCards. The core genes were subjected to Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. A “constituent-target-pathway-disease” network was established with Cytoscape software. **Results** Totally 15 isoflavone compounds were isolated and identified: 3'-methoxydaidzein (1), puerarin-4'- O - β -D-glucopyranoside (2), 6''- O -malonyldaidzin (3), puerarin 6''- O -xyloside (4), glycitin (5), 3'-methoxydaidzin (6), puerarin (7), 3'-methoxypuerarin (8), daidzein (9), mirificin (10), mirificin-4'- O -glucoside (11), 3'-hydroxymirificin (12), daidzein-7, 4'-diglucoside (13), ononin (14), and dihydrodaidzin (15). Out of the 15 compounds, 111 potential targets in *Pueraria lobata* for diabetes were screened, with compound 3 and compound 15 acting on the key targets CASP3 and PRKCA, respectively. **Conclusion** Compound 15 is a newly isolated isoflavone from the genus *Pueraria*. The network pharmacology research provides insights into the use of *Pueraria lobata* for diabetes mellitus.

Key words: *Pueraria lobata* root; isoflavone; chemical constituent; structural identification; network pharmacology

作者简介: 吴文娟, 女, 工程师, 主要从事天然药物及中药材质量检测研究, email: 3286304759@qq.com *通信作者: 吕伯龙, 男, 工程师, 主要从事天然药物及中药材质量检测研究, email: lvbl@ahtwjc.com

葛 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 隶属于豆科葛属, 是一种广泛分布于温带和亚热带地区的多年生攀缘植物^[1]。葛的地下部分葛根, 是一味常用的中药, 不仅在传统中医中占有重要地位, 具有解表退热、生津止渴、升阳止泻等功效^[2]。因其丰富的药用和食用价值, 葛根受到人们的广泛关注, 被誉为“亚洲人参”^[3]。早在 1988 年, 葛根被我国卫生部列入“药食同源”物品名录^[4]。葛根的药用历史可追溯至数千年前。《神农本草经》中记载葛根“主消渴, 身大热, 呕吐, 诸痹, 起阴气, 解诸毒, 主下利”^[5]。《本草纲目》中则记载葛根能“止渴, 排毒, 利大小便, 解酒, 去烦热”^[6]。葛根同时也是多种中成药的重要原料, 如葛根素注射液、葛根芩连片等^[2]。

近年来, 随着对葛根的深入研究, 多种活性成分被陆续发现。据文献报道, 葛根中已鉴定出的化学成分超过 100 种, 包括异黄酮类、三萜类

化合物、香豆素和生物碱等, 这些成分被证实具有降血糖、抗高血压、抗动脉粥样硬化、抗心肌缺血等广泛的药理作用^[7-9]。特别是葛根素等异黄酮类成分, 已被广泛研究并用于治疗心脑血管疾病^[10]。此外, 葛根的“药食同源”特性, 使其在食品工业中也有广泛应用, 如葛根粉、葛根茶等, 为人们的日常饮食提供了新的选择。

网络药理学是一种系统生物学方法, 通过分析药物成分、靶点和疾病之间的网络关系, 揭示药物的多成分、多靶点、多途径作用机制^[11]。本研究旨在进一步探索葛根中的化学成分, 特别是异黄酮类化合物。通过对葛根 80% 乙醇提取物的系统提取、分离和结构鉴定, 得到一系列异黄酮类化合物 (见图 1)。同时, 结合网络药理学的方法, 探讨这些化合物在治疗糖尿病中的潜在应用。通过对葛根中异黄酮类化合物的深入研究, 为其药用价值的深入开发和应用提供科学依据。

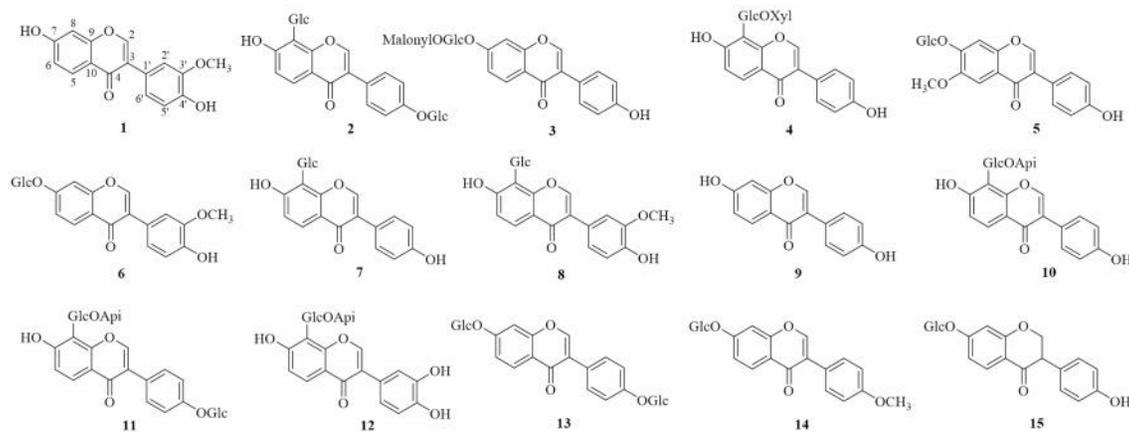


图 1 化合物 1 ~ 15 的结构式

Fig 1 Structures of compounds 1 ~ 15

1 材料

Bruker AVANCE III HD 400 型核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司); Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱仪 (美国赛默飞公司); LC-16P 制备液相色谱仪 [岛津仪器 (苏州) 有限公司], 配备 PDA 检测器、C₁₈ 色谱柱 (10 mm×250 mm, 5 μm); MCI (日本富士化学公司); AB-8 型大孔树脂 (日本三菱化学株式会社); HSGF₂₅₄ 薄层层析硅胶板 (青岛海洋化工有限公司); RP-18 高效薄层色谱预制板 (美国默克公司)。色谱纯乙腈、甲醇 (美国赛默飞世尔科技公司); 其他分析级试剂均为天津市大茂化学试剂厂生产; 氘代试剂均由上海麦克林生化科技有限公司生产; 核磁样品管 (美国 Wilmad 公司)。

样品于 2021 年 7 月购自安徽亳州中药材批发市场, 由吕伯龙工程师鉴定为葛 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 干燥的根, 样品标本编号 No.20210701。

2 方法

2.1 提取与分离

取干燥后的葛根根茎 3 kg, 进行粉碎处理, 用 80% 乙醇溶液浸渍 3 次, 每次 7 日。提取液经旋转蒸发器在 40 °C 下减压浓缩, 得到 520 g 总浸膏。将总浸膏溶解于甲醇中, 并经 AB-8 型大孔树脂柱色谱洗脱。采用甲醇-水梯度洗脱 (20 : 80 至 100 : 0, V/V), 通过薄层色谱 (TLC) 检视并合并相同流份的洗脱液, 最终获得 4 个主要组分 Fr.A ~ Fr.D。

Fr.A 经过 MCI 柱进行进一步的分离, 使用甲醇-水 (30 : 70 至 100 : 0, V/V) 作为洗脱剂, 得到 5 个亚流份 Fr. A1 ~ Fr. A5。亚流份 Fr. A1-1 通过制备液相色谱仪 (Prep-HPLC), 以甲醇-水 (40 : 60, V/V) 等度洗脱, 纯化得到化合物 1 (7.6 mg); 亚流份 Fr. A1-2 以甲醇-水 (60 : 40, V/V) 等度洗脱, 纯化得到化合物 2 (6.2 mg) 和化合物 3

(5.7 mg); 亚流份 Fr. A1-4 以甲醇-水 (65 : 35, *V/V*) 等度洗脱, 纯化得到化合物 **4** (9.1 mg) 和化合物 **5** (7.5 mg); 亚流份 Fr. A1-5 以甲醇-水 (60 : 40, *V/V*) 等度洗脱, 纯化得到化合物 **6** (8.4 mg)。亚流份 Fr. A2 首先以甲醇-水 (40 : 60, *V/V*) 进行 Prep-HPLC 洗脱, 随后使用乙腈-水 (40 : 60, *V/V*) 进行 Prep-HPLC 洗脱, 成功分离出化合物 **7** (9.1 mg) 和化合物 **8** (10.4 mg)。亚流份 Fr. A3 则通过 Prep-HPLC 以甲醇-水 (40 : 60, *V/V*) 洗脱, 得到 Fr. A3-1 ~ Fr. A3-4。Fr. A3-1 经乙腈-水 (45 : 55, *V/V*) 洗脱, 得到化合物 **9** (9.4 mg)。Fr. A3-2 在经过乙腈-水 (40 : 60, *V/V*) Prep-HPLC 洗脱后, 再以甲醇-水 (35 : 65, *V/V*) 进行第二次 Prep-HPLC 洗脱, 得到化合物 **10** (8.8 mg)。Fr. A3-3 和 Fr. A3-4 通过两次 Prep-HPLC 洗脱, 使用乙腈-水 (50 : 50, *V/V*) 作为流动相进行洗脱, 分别得到化合物 **11** (9.3 mg) 和化合物 **12** (8.9 mg)。Fr. B 通过 MCI 柱分离, 使用甲醇-水 (40 : 60 至 100 : 0, *V/V*) 作为洗脱剂, TLC 分析后合并得到 5 个亚流份 Fr. B1 ~ Fr. B5。Fr. B1 经两次 Prep-HPLC 洗脱以乙腈-水 (30 : 70, *V/V*) 洗脱, 得到化合物 **13** (9.7 mg) 和化合物 **14** (15.2 mg)。Fr. B2 经 Prep-HPLC 以乙腈-水 (40 : 60, *V/V*) 洗脱, 再以甲醇-水 (70 : 30, *V/V*) 进行第二次 Prep-HPLC 洗脱, 得到化合物 **15** (4.7 mg)。

2.2 网络药理学分析方法

所有鉴定的化合物均转换为 PubChem 数据库 [PubChem (nih.gov)] 中的 SMILES 结构格式。利用 Swiss Target Prediction 数据库 (Swiss Target Prediction) 获得这些化合物的潜在作用靶点。利用 GeneCards 数据库 (www.genecards.org) 获取与糖尿病相关的靶基因。利用微生信可视化平台 (bioinformatics.com.cn) 将葛根的潜在基因与糖尿病的靶基因取交集并可视化。此外, 利用 Metascape 对葛根靶点进行基因本体 (GO) 富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 获得靶点治疗糖尿病可能的通路, 同时利用微生信可视化平台 (Bioinformatics.com.cn) 分析富集结果, 通过核心通路寻找最核心靶点。最终利用 Cytoscape 3.9.1 绘制中药-化合物-靶点-疾病网络图。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1** 为淡黄色粉末 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 283.0607 [$M - H$]⁻ (计算值: 283.0612, 偏差: -1.7568, 分子式: C₁₆H₁₂O₅); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.77 (1H, s, 7-OH), 9.00 (1H, s, C4'-OH), 8.28 (1H, s, H-2), 7.96 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 7.05 (1H, d, *J* = 2.0 Hz,

H-2'), 7.00 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, H-6), 6.92 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.85 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 3.79 (3H, s, 3'-OCH₃), ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 174.6 (C-4), 162.6 (C-7), 157.4 (C-9), 153.1 (C-2), 147.6 (C-3'), 146.1 (C-4'), 127.4 (C-5), 124.8 (C-3), 123.4 (C-1'), 119.8 (C-6'), 116.7 (C-10), 115.2 (C-5'), 116.5 (C-6), 115.2 (C-2'), 102.2 (C-8), 55.7 (3'-OCH₃)。NMR 数据与文献^[12]中报道的 3'-甲氧基大豆昔元基本一致, 因此鉴定化合物 **1** 为 3'-甲氧基大豆昔元 (3'-methoxydaidzein)。

化合物 **2** 为棕褐色粉末 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 577.1555 [$M - H$]⁻ (计算值: 577.1552, 偏差: 0.4759, 分子式: C₂₇H₃₀O₁₄); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 8.41 (1H, s, H-2), 7.95 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 6.99 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-6), 7.08 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 7.51 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 4.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, glc-1), 4.91 (1H, glc-1'), 3.18 ~ 3.72 (6H, m, glc-2 ~ 6), 3.18 ~ 3.72 (6H, m, glc-2' ~ 6'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 153.6 (C-2), 123.2 (C-3), 175.3 (C-4), 126.0 (C-5), 115.0 (C-6), 161.8 (C-7), 113.2 (C-8), 156.7 (C-9), 117.2 (C-10), 125.5 (C-1'), 130.4 (C-2', 6'), 116.4 (C-3', 5'), 156.1 (C-4'), 73.4 (glc-1), 70.8 (glc-2), 77.1 (glc-3), 70.2 (glc-4), 82.3 (glc-5), 61.9 (glc-6), 100.9 (glc-1'), 73.7 (glc-2'), 76.5 (glc-3'), 70.1 (glc-4'), 76.6 (glc-5'), 61.2 (glc-6')。NMR 数据与文献^[13]中报道的葛根素-4'-*O*-葡萄糖苷基本一致, 因此鉴定化合物 **2** 为葛根素-4'-*O*-β-D-葡萄糖苷 (puerarin-4'-*O*-β-D-glucopyranoside)。

化合物 **3** 为白色粉末 (甲醇), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.58 (1H, s, 4'-OH), 8.35 (1H, s, H-2), 8.07 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 7.12 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 7.15 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-8), 7.40 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 5.14 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1"), 3.20 ~ 4.44 (6H, m, H-2" ~ 6"), 3.47 (1H, br s, H-2"")。 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 153.4 (C-2), 122.3 (C-3), 174.8 (C-4), 127.1 (C-5), 115.0 (C-6), 161.1 (C-7), 103.6 (C-8), 157.0 (C-9), 118.6 (C-10), 122.3 (C-1'), 130.1 (C-2', 6'), 115.3 (C-3', 5'), 157.0 (C-4'), 99.8 (C-1'), 73.8 (C-2'), 76.2 (C-3'), 69.7 (C-4'), 73.0 (C-5'), 64.1 (C-6'), 168.0 (C-1"'), 41.4 (C-2"'), 166.9 (C-3"')。NMR 数据与文献^[14]中报道的 6"-*O*-丙二酰基大豆昔基本一

致, 因此鉴定化合物 **3** 为 6"-*O*-丙二酰基大豆昔 (6"-*O*-malonyldaidzin)。

化合物 **4** 为白色粉末 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 547.1453 $[M - H]^-$ (计算值: 547.1457, 偏差: -0.8231 , 分子式: $C_{26}H_{28}O_{13}$); 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.52 (1H, s, 7-OH), 4.91 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, glc-H-1), 8.33 (1H, s, H-2), 7.93 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-5), 6.98 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-6), 7.40 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2'), 6.81 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-3'), 5.04 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, glc-1), 3.25 ~ 3.67 (5H, m, glc-H); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 153.1 (C-2), 123.0 (C-3), 175.4 (C-4), 126.7 (C-5), 115.4 (C-6), 161.5 (C-7), 113.0 (C-8), 117.3 (C-9), 156.7 (C-10), 123.3 (C-1'), 130.5 (C-2'), 157.2 (C-4'), 73.2 (glc-C-1), 71.3 (glc-C-2), 79.0 (glc-C-3), 69.7 (glc-C-4), 80.6 (glc-C-5), 69.9 (glc-C-6), 104.4 (xyl-C-1), 71.1 (xyl-C-2), 77.0 (xyl-C-3), 69.8 (xyl-C-4), 66.1 (xyl-C-5)。这些 NMR 数据与文献^[15]报道基本一致, 确定化合物 **4** 为葛根素-6"-*O*-木糖苷 (puerarin 6"-*O*-xyloside)。

化合物 **5** 为白色粉末 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 445.1136 $[M - H]^-$ (计算值: 445.1140, 偏差: -1.0427 , 分子式: $C_{22}H_{32}O_1$); 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.55 (1H, s, 7-OH), 8.38 (1H, s, H-2), 7.49 (1H, s, H-5), 7.33 (1H, s, H-8), 7.42 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-3', 5'), 3.88 (3H, s, OCH₃-6), 5.17 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, Glc-1), 3.17 ~ 3.73 (6H, m, Glc-2 ~ 6)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 153.49 (C-2), 123.6 (C-3), 174.86 (C-4), 105.22 (C-5), 147.93 (C-6), 153.49 (C-7), 103.90 (C-8), 151.69 (C-9), 118.29 (C-10), 123.07 (C-1'), 130.55 (C-2', 6'), 115.46 (C-3', 5'), 157.65 (C-4'), 56.31 (OCH₃-6), 100.10 (glc-1), 73.49 (glc-2), 77.22 (glc-3), 70.06 (glc-4), 77.68 (glc-5), 61.11 (glc-6)。NMR 数据与文献^[16]中报道基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为黄豆黄苷 (glycitin)。

化合物 **6** 呈白色粉末状 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 445.1137 $[M - H]^-$ (计算值: 445.1140, 偏差: -0.7685 , 分子式: $C_{22}H_{22}O_{10}$); 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.08 (1H, s, 4'-OH), 8.40 (1H, s, H-2), 8.02 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.10 (1H, dd, $J = 8.0, 2.2$ Hz, H-6), 7.20 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 7.14 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.97 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6'), 5.15 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, glc-H-1"), 3.27 ~ 3.35 (1H, m,

glc-H-2"), 3.13 (1H, m, glc-H-4"), 3.28 (1H, m, glc-H-5"), 3.35 (1H, m, glc-H-6"), 3.70 (1H, m, glc-H-6"), 3.76 (3H, s, 3'-OCH₃)。NMR 数据与文献^[14]中的 3'-甲氧基大豆昔报道基本一致, 因此鉴定化合物 **6** 为 3'-甲氧基大豆昔 (3'-methoxydaidzin)。

化合物 **7** 呈白色粉末状 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 451.1026 $[M - H]^-$ (计算值: 415.1035, 偏差: -1.9869 , 分子式: $C_{21}H_{20}O_9$); 1H -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.13 (1H, s, H-2), 7.99 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.31 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 6.79 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3', 5'), 5.04 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, glc-H-1"), 以及 3.43 ~ 4.08 (6H, m, glc-H-2" ~ 6")。这些 NMR 数据与文献^[17]中的葛根素报道基本一致, 因此鉴定化合物 **7** 为葛根素 (puerarin)。

化合物 **8** 呈白色粉末状 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 445.1133 $[M - H]^-$ (计算值: 445.1140, 偏差: -1.7283 , 分子式: $C_{22}H_{22}O_{10}$); 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.34 (1H, s, H-2), 7.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.14 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.02 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, H-6'), 4.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, Glc-H-1"), 3.22 ~ 4.03 (6H, m, Glc-H-2" ~ 6"), 3.78 (3H, s, 3'-OCH₃)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 154.7 (C-2), 125.5 (C-3), 178.2 (C-4), 128.1 (C-5), 116.2 (C-6), 163.0 (C-7), 113.1 (C-8), 154.7 (C-9), 118.5 (C-10), 124.7 (C-1'), 114.0 (C-2'), 148.8 (C-3'), 147.8 (C-4'), 116.2 (C-5'), 122.8 (C-6'), 56.5 (3'-OCH₃), 75.6 (C-1"), 73.0 (C-2"), 80.0 (C-3"), 71.7 (C-4"), 82.7 (C-5"), 62.8 (C-6")。NMR 数据与文献^[15]中的 3'-甲氧基葛根素报道基本一致, 因此鉴定化合物 **8** 为 3'-甲氧基葛根素 (3'-methoxypuerarin)。

化合物 **9** 为无色针状晶体 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 253.0502 $[M - H]^-$ (计算值: 253.0506, 偏差: -1.7622 , 分子式: $C_{15}H_{10}O_4$); 1H -NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 10.81 (1H, s, 7-OH), 9.56 (1H, s, 4'-OH), 8.26 (1H, s, H-2), 7.97 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.36 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6), 6.85 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.80 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', 5')。 ^{13}C -NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 152.9 (C-2), 122.6 (C-3), 174.8 (C-4), 127.4 (C-5), 115.0 (C-6), 162.6 (C-7), 102.17 (C-8), 157.5 (C-9), 116.7 (C-10), 123.6 (C-1'), 130.15 (C-2', 6'), 115.2 (C-

3', 5'), 157.2 (C-4')。NMR 数据与文献^[17]中报道的大豆昔元基本一致, 因此鉴定化合物 **9** 为大豆昔元 (daidzein)。

化合物 **10** 为白色粉末状 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 547.1447 [M - H]⁻ (计算值: 547.1457, 偏差: -1.9386, 分子式: C₂₆H₂₈O₁₃); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.34 (1H, s, H-2), 7.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.99 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.40 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 9.54 (1H, s, 4'-OH), 4.78 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-1''), 4.01 (1H, dd, $J = 9.8, 8.5$ Hz, H-2''), 3.40 (1H, dd, $J = 8.5, 8.0$ Hz, H-3''), 3.27 (1H, dd, $J = 8.2, 8.4$ Hz, H-4''), 3.25 (1H, dd, $J = 8.4, 7.6$ Hz, H-5''), 3.93 (1H, dd, $J = 11.2, 7.6$ Hz, H-6''), 4.77 (1H, br d, $J = 11.2$ Hz, Hb-6''), 5.09 (1H, br s, H-1'''), 4.44 (1H, br s, H-2'''), 3.84 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, Ha-4'''), 3.57 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, Hb-4'''), 3.26 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, Ha-5'''), 3.30 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, Hb-5''')。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 153.1 (C-2), 123.6 (C-3), 175.4 (C-4), 126.8 (C-5), 115.5 (C-6), 161.5 (C-7), 113.0 (C-8), 157.6 (C-9), 117.4 (C-10), 123.0 (C-1'), 130.5 (C-2', 6'), 115.5 (C-3', 5'), 156.7 (C-4'), 73.7 (C-1''), 71.2 (C-2''), 79.1 (C-3''), 71.0 (C-4''), 80.5 (C-5''), 68.8 (C-6''), 109.6 (C-1'''), 76.2 (C-2'''), 79.2 (C-3'''), 73.9 (C-4'''), 63.6 (C-5''')。NMR 数据与文献^[15]中报道的葛根素芹菜糖苷基本一致, 因此确定化合物 **10** 为葛根素芹菜糖苷 (mirificin)。

化合物 **11** 为白色粉末状 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 709.1979 [M - H]⁻ (计算值: 709.1985, 偏差: -0.9325, 分子式: C₃₂H₃₈O₁₈); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.14 (1H, s, H-2), 7.96 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.08 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 7.39 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.90 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 5.02 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, glc-1), 4.86 (1H, m, api-1), 3.79 ~ 3.80 (1H, m), 3.79 ~ 3.80 (1H, m), 3.55 ~ 3.65 (2H, m), 3.38 ~ 3.43 (2H, m), 3.21 ~ 3.26 (6H, m)。NMR 数据与文献^[15]中报道的美佛辛-4'-*O*-葡萄糖苷基本一致, 因此确定该化合物 **11** 为美佛辛-4'-*O*-葡萄糖苷 (mirificin-4'-*O*-glucoside)。

化合物 **12** 为白色粉末状 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 563.139 53 [M - H]⁻ (计算值: 563.140 63, 偏差: -1.957 32, 分子式: C₂₆H₂₈O₁₄); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.28 (1H, s, H-2), 7.94

(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 7.00 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6), 7.04 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.82 (1H, dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, H-6'), 4.81 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-1''), 4.78 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-1'''), 3.93 ~ 5.07 (glc, api-OH), 3.18 ~ 4.01 (m, glc, api-H)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 153.0 (C-2), 123.5 (C-3), 175.4 (C-4), 126.7 (C-5), 115.8 (C-6), 161.6 (C-7), 113.0 (C-8), 156.6 (C-9), 117.5 (C-10), 122.9 (C-1'), 114.9 (C-2'), 145.2 (C-3'), 145.7 (C-4'), 117.1 (C-5'), 120.2 (C-6'), 75.0 (C-1''), 71.0 (C-2''), 78.1 (C-3''), 73.7 (C-4''), 80.5 (C-5''), 68.8 (C-6''), 109.5 (C-1'''), 75.2 (C-2'''), 78.2 (C-3'''), 72.8 (C-4'''), 63.4 (C-5''')。NMR 数据与文献^[18]中报道的 3'-羟基葛根素芹菜糖苷基本一致, 因此鉴定化合物 **12** 为 3'-羟基葛根素芹菜糖苷 (3'-hydroxymirificin)。

化合物 **13** 为白色粉末状 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 577.1554 [M - H]⁻ (计算值: 577.1563, 偏差: -1.5302, 分子式: C₂₇H₃₀O₁₄); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.46 (1H, s, H-2), 8.06 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 7.53 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', 6'), 7.17 (1H, $J = 1.8$ Hz, H-8), 7.15 (1H, dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, H-6), 7.10 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 5.09 (1H, d, $J = 8.1, 7-O$ -glc H-1''), 4.91 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, 4'-*O*-glc-H-1'), 3.20 ~ 3.75 (glc-H)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 154.3 (C-2), 123.8 (C-3), 175.1 (C-4), 127.5 (C-5), 116.5 (C-6), 161.9 (C-7), 103.9 (C-8), 157.5 (C-9), 118.9 (C-10), 122.3 (C-1'), 130.5 (C-2'), 116.1 (C-3'), 156.7 (C-4'), 100.8 (C-1''), 73.0 (C-2''), 77.7 (C-3''), 73.3 (C-4''), 77.0 (C-5''), 70.1 (C-6''), 100.5 (C-1'''), 73.0 (C-2'''), 77.5 (C-3'''), 70.2 (C-4'''), 77.1 (C-5'''), 61.1 (C-6''')。NMR 数据与文献^[19]中报道的大豆素-7, 4'-二葡萄糖苷基本一致, 因此鉴定化合物 **13** 为大豆素-7, 4'-二葡萄糖苷 (daidzin-7, 4'-diglucoside)。

化合物 **14** 为棕褐色粉末 (甲醇), ESI-HRMS: m/z 429.1187 [M - H]⁻ (计算值: 429.1180, 偏差: 1.7134, 分子式: C₂₂H₂₂O₉); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.45 (1H, s, H-2), 8.06 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.54 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.25 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 7.17 (1H, dd, $J = 8.8, 1.8$ Hz, H-6), 7.00 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 5.10 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.80 (3H, s, 4'-OCH₃), 以及 3.19 ~ 3.80 (6H, m, glc-H) 为糖部分的质子信号。NMR 数据与文献^[20]

中报道的芒柄花苷基本一致，因此鉴定化合物 **14** 为芒柄花苷 (ononin)。

化合物 **15** 为淡黄色无定形粉末 (甲醇)，ESI-*HRMS*: m/z 417.1183 $[M - H]^-$ (计算值: 417.1191, 偏差: -1.9642, 分子式: $C_{21}H_{22}O_9$); 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) 的数据显示了苷元部分和葡萄糖苷部分的质子信号, 包括: δ 4.60 (1H, dd, $J = 4.5, 12.0$ Hz, H-2a), 5.02 (1H, dd, $J = 7.4, 12.0$ Hz, H-2b), 3.90 (1H, t, $J = 4.5$ Hz, H-3), 7.84 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.75 (1H, dd, $J = 2.3, 8.4$ Hz, H-6), 6.70 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 7.10 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.79 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 以及葡萄糖苷部分的信号: δ 4.61 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1"), 3.50 (1H, dd, $J = 7.6, 9.0$ Hz, H-2"), 3.68 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-3"), 3.47 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-4"), 3.34 (1H, m, H-5"), 3.71 (1H, dd, $J = 12.2, 3.5$ Hz, H-6"a), 3.89 (1H, dd, $J = 12.2, 5.3$ Hz, H-6"b)。NMR 数据与文献^[21]中报道的二氢大豆苷基本一致, 因此鉴定化合物 **15** 为二氢大豆苷 (dihydrodaidzin)。

3.2 网络药理学分析结果

3.2.1 葛根中化学成分的靶点预测以及疾病靶点的检索 根据葛根中分离鉴定的 15 个化合物, 在 PubChem 中获取其 Canonical SMILES, 于 Swiss Target Prediction 中预测潜在靶点, 筛选出概率大于 0 的靶点, 去除重复项后得 125 个潜在药物靶点。在 GeneCards 数据库以 "Diabetes Mellitus" 为关键词在 GeneCards 中共得到糖尿病相关靶点 15 924 个。

3.2.2 潜在治疗靶点的筛选及富集分析 利用 Excel 软件筛选出药物靶点与疾病靶点的交叉靶点, 将交叉的靶点作为葛根治疗糖尿病的潜在治疗靶点, 共交集获得 111 个交叉靶点。利用 Metascape 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络 (PPI), 并对潜在靶点进行 GO 富集和 KEGG 富集分析。对 111 个潜在治疗靶基因进行 GO 富集 (如图 2 所示), 主要包括分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 以及细胞组分 (CC)。在 BP 富集分析中, 目标基因主要富集在细胞对氮化合物的反应 (cellular response to nitrogen compound)、细胞对有机环状化合物的反应 (cellular response to organic cyclic compound) 和对外源性刺激的反应 (response to xenobiotic stimulus) 中; 在 CC 富集分析中, 目标基因主要富集在细胞的顶端部分 (apical part of cell)、细胞体 (cell body) 和细胞质的核周区 (perinuclear region of cytoplasm) 中; 在 MF 富集分析中, 目

标基因主要富集在碳酸酐酶活性 (carbonate dehydratase activity)、一氧化氮合酶调节活性 (nitric-oxide synthase regulator activity) 和氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity) 中。KEGG 富集分析显示 (如图 3 所示), 上述潜在治疗靶基因主要富集在脂质与动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway) 以及血清素能突触 (serotonergic synapse) 中, 且有研究证明这些通路可能与糖尿病的发生发展有关。根据 KEGG 富集结果的拓扑逻辑属性分析, 脂质与动脉粥样硬化、MAPK 信号通路以及血清素能突触的富集程度较高, 其中脂质与动脉粥样硬化信号通路的富集程度最高。将这 3 个通路的靶基因进行了可视化, 最终得出了两个共同的核心基因 *CASP3* 和 *PRKCA*。

3.3.3 中药-成分-靶点-通路-疾病网络构建

利用 Cotoscape 3.9.1 将葛根中 15 个化合物与 111 个交叉靶点以及富集得到的核心通路进行可视化, 构建中药-化合物-靶点-疾病网络图, 见图 4。结合以上信息, 葛根中的化合物 **3** 和 **15**, 分别通过作用于 *CASP3* 和 *PRKCA* 这两个关键靶点, 进而影响了脂质与动脉粥样硬化、MAPK 信号通路以及血清素能突触这 3 个重要的生物途径, 这些作用机制最终可能有助于治疗糖尿病。

4 讨论

本研究深入研究了葛根中的异黄酮类化学成分, 成功分离并鉴定了 15 个异黄酮类化合物。化合物 **15** (二氢大豆苷, dihydrodaidzin) 首次从葛属植物中被分离鉴定, 这一发现丰富了葛根的化学成分信息, 为其药用价值提供了新的物质基础。利用 PubChem 和 GeneCards 等数据库, 我们预测了这些化合物可能在治疗糖尿病方面的作用靶点及通路。通过筛选, 共鉴定出 111 个潜在靶点, 涵盖多个与糖尿病相关的生物学过程和信号通路。特别是化合物 **3** 和化合物 **15** 被确认作用于 *CASP3* 和 *PRKCA* 这两个关键靶点, 为进一步揭示葛根治疗糖尿病分子机制提供了重要线索。异黄酮类化合物在葛根中表现出显著的生物活性, 已成为药物研发的热点, 包括抗糖尿病、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等多种生物活性。这些活性可能与其化学多样性相关, 包括不同的异黄酮骨架及甲氧基化、甲基化和糖基化等化学修饰形式。尤其是本研究新发现的二氢大豆苷, 其药理作用尚未被充分研究, 值得进一步探索。作为传统中药, 葛根的药用价值已被广泛认可。本研究

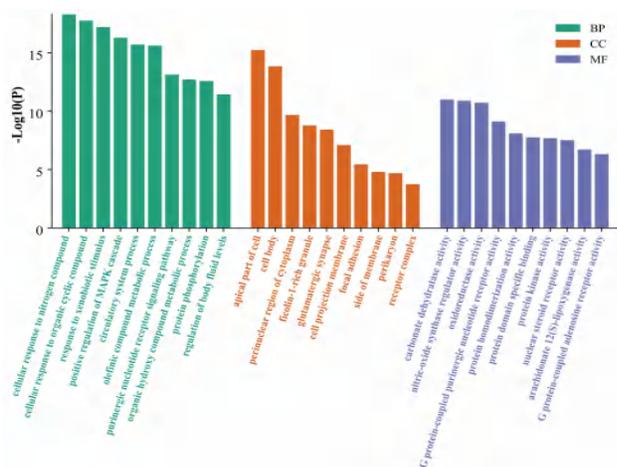


图 2 潜在治疗靶基因 GO 富集分析图
Fig 2 GO enrichment analysis map of potential therapeutic target genes

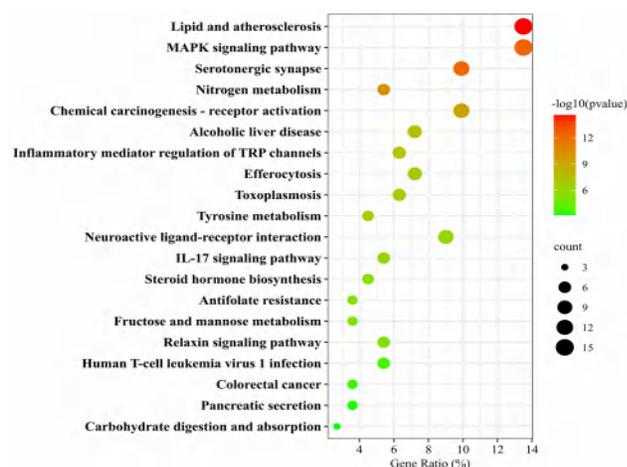


图 3 KEGG 富集气泡分析图
Fig 3 KEGG enrichment bubble analysis diagram

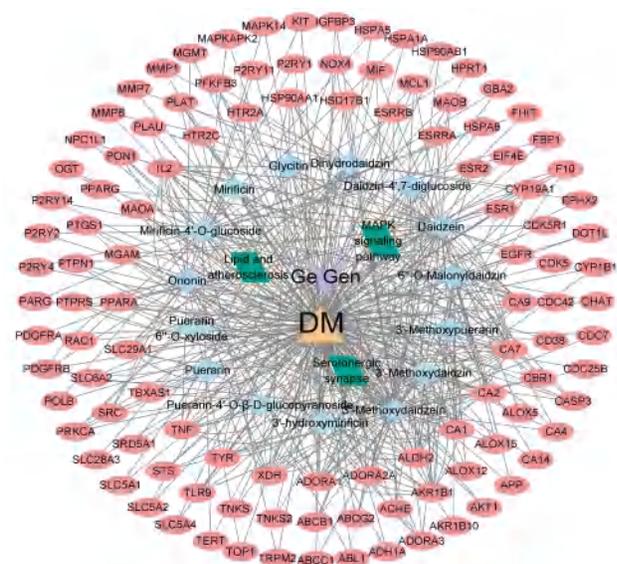


图 4 化合物-靶点-通路-疾病网络图
Fig 4 Compound-target-pathway-disease network diagram
注 (Note): 粉色为靶点; 蓝色为化合物成分; 绿色为核心通路; 紫色为中药; 橙黄色为疾病 (Pink represents targets; blue represents compound components; green represents core pathways; purple represents traditional Chinese medicine; orange represents diseases)。

不仅为葛根的化学成分研究提供了新的数据支持, 也为其深入开发和应用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 41 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 224.
- [2] 于钦辉, 杜以晴, 孙启慧, 等. 基于功效和物质基础的野葛、粉葛解热和抗病毒作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (9): 89-94.
- [3] 李晓玲, 吕寻, 胡劲鸿, 等. 野葛扦插生根的影响因素研究 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学版), 2020, 40 (4): 169-174.
- [4] 李红宁, 孙爱群, 林长松, 等. 六盘水葛资源及其药用价值研究 [J]. 种子, 2013, 32 (12): 51-54.
- [5] 曾慧婷, 陈超, 褚怀亮, 等. 粉葛资源产业化过程废弃物中的黄酮类化学成分分析 [J]. 中国药房, 2020, 31 (4): 451-456.
- [6] 张长贵, 王兴华, 谢伍容. 葛资源开发与利用研究 [J]. 粮食与油脂, 2009, 22 (9): 41-44.
- [7] 史晨旭, 杜佳蓉, 吴威, 等. 葛根化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (12): 2177-2195.
- [8] 朱卫丰, 李佳莉, 孟晓伟, 等. 葛属植物的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (6): 1311-1331.
- [9] Zhang Z, Lam TN, Zuo Z. Radix puerariae: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. J Clin Pharmacol, 2013, 53 (8): 787-811.
- [10] 贾亚倩, 王慧, 赵振营, 等. 葛根素对心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39 (4): 1067-1071.
- [11] 陈健, 陈启龙. 网络药理学在中医药研究中的现状及思考 [J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35 (5): 1-6, 13.
- [12] 吴云秋, 闫炳雄, 阮丽君, 等. 广金钱草中黄酮及黄酮苷类化学成分研究 [J]. 中草药, 2023, 54 (15): 4780-4788.
- [13] 范森崑, 刘荣华, 邵峰, 等. 葛根化学成分研究 [J]. 中药材, 2022, 45 (8): 1877-1885.
- [14] Hirakura K, Morita M, Nakajima K, et al. Phenolic glucosides from the root of *Pueraria lobata* [J]. Phytochemistry, 1997, 46: 921-928.
- [15] 季鹏, 张蕾, 李民. 葛根化学成分研究 [J]. 中国药师, 2020, 23 (6): 1184-1188.
- [16] 张杰, 常义生, 曾铨, 等. 葛花化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (23): 65-67.
- [17] 迟霏菲, 张国刚, 李萍, 等. 安徽产葛根的化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2007, 17 (1): 47-49.
- [18] 王付荣, 葛喜珍, 杨秀伟. 通脉方化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (20): 61-69.
- [19] 冯文娟, 欧阳发, 苏亚伦, 等. 蒙古沙冬青的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (8): 1040-1042.
- [20] 蒋晓文, 白俊鹏, 田星, 等. 牛蒡根中黄酮苷类化学成分及其抗氧化活性构效关系的研究 [J]. 中草药, 2016, 47 (5): 726-731.
- [21] Hosny M, Rosazza JPN. New isoflavone and triterpene glycosides from soybeans [J]. J Nat Prod, 2002, 65: 805-813.

(收稿日期: 2024-04-30; 修回日期: 2024-06-11)

基于网络药理学和分子对接探讨苦杏仁苷治疗胃癌的作用机制及实验验证

彭琳¹, 廖彬¹, 龙慧玲^{2*} (1. 湖南省药品审核查验中心, 长沙 410001; 2. 湖南省药品审评与不良反应监测中心, 长沙 410001)

摘要: **目的** 基于网络药理学的方法, 结合分子对接和体外实验, 揭示苦杏仁苷治疗胃癌的生物活性、关键靶点和潜在的药理作用机制。**方法** 基于公共数据库筛选出苦杏仁苷以及胃癌的靶点基因, 进行靶点标准化; 运用 Cytoscape 软件构建胃癌-苦杏仁苷-靶点网络; 将获得的关键靶标上传到 STRING 数据库, 用于蛋白质相互作用网络分析; 通过拓扑分析确定苦杏仁苷治疗胃癌的核心靶标, 并进行功能注释分析和路径富集分析; 结合分子对接技术验证苦杏仁苷与核心靶标之间结合活性的强弱; 最后通过体外实验进行验证。**结果** CCK-8 结果显示, 与对照组比较, 苦杏仁苷 4、8 mg · mL⁻¹ 干预 48 h 后, HGC-27 细胞增殖作用受到显著抑制; 流式细胞术结果表明, 苦杏仁苷能够浓度依赖性促进胃癌细胞的凋亡; 与对照组比较, 苦杏仁苷 4、8 mg · mL⁻¹ 干预 48 h 后, Bax 蛋白表达水平明显增加, Bcl2 蛋白表达水平明显下降。共筛选出苦杏仁苷治疗胃癌的交集靶点 34 个, 核心靶点分别是 SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5, 分子对接结果显示苦杏仁苷与这 5 个核心靶点有极好的结合能力; 与对照组比较, 苦杏仁苷 4、8 mg · mL⁻¹ 干预 48 h 后, SSTR3 蛋白表达水平明显增加。**结论** 苦杏仁苷可以通过发挥类似生长抑素的作用于生长抑素受体 SSTR3, 增加胃癌细胞凋亡, 并影响其生长增殖的生物学过程来发挥对胃癌的治疗作用。

关键词: 苦杏仁苷; 胃癌; 网络药理学; 分子对接; 体外实验

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3200-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.011

Mechanism of amygdalin for gastric cancer based on network pharmacology and molecular docking

PENG Lin¹, LIAO Bin¹, LONG Hui-ling^{2*} (1. Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410001; 2. Hunan Center for Drug Evaluation and Adverse Reaction Monitoring, Changsha 410001)

Abstract: Objective To determine the biological activity, key targets, and potential pharmacological mechanism of amygdalin for gastric cancer based on network pharmacology, molecular docking and in vitro experiments. **Methods** The relevant targets of amygdalin and gastric cancer were identified and standardized based on data from public databases. The gastric cancer-amygdalin-target network was established with Cytoscape software. Key targets were uploaded to the STRING database for protein-protein interaction (PPI) analysis. Topological analysis identified the core targets of amygdalin therapy in gastric cancer, followed by Gene Ontology and pathway enrichment analyses of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment. Molecular docking was used to evaluate the binding affinities between amygdalin and the core targets. In vitro experiments validated these findings, and assessed the therapeutic potential of amygdalin against gastric cancer. **Results** The CCK-8 results indicated that the proliferation of HGC-27 cells was much inhibited after 48 h of intervention with 4 mg · mL⁻¹ and 8 mg · mL⁻¹ of amygdalin, as compared with the control group. Totally 34 intersecting target genes of amygdalin for gastric cancer were identified, with the core targets being SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, and SSTR5. Molecular docking analysis showed good binding activity between amygdalin and

作者简介: 彭琳, 女, 副主任药师, 主要从事药品、医疗器械检验检测及标准研究, email: 156658863@qq.com *通信作者: 龙慧玲, 女, 高级工程师, 主要从事药品、医疗器械、化妆品技术审评与不良反应监测研究, email: 25352830@qq.com

the 5 core targets. Compared with the control group, the expression levels of Bax and SSTR3 proteins greatly increased, while the expression level of Bcl2 protein decreased after 48 h of intervention with 4 mg · mL⁻¹ and 8 mg · mL⁻¹ of amygdalin. **Conclusion** Amygdalin has a therapeutic effect on gastric cancer by acting as a growth inhibitor on the SSTR3 receptor, increasing the apoptosis of gastric cancer cells, and affecting their growth and proliferation processes.

Key words: amygdalin; gastric cancer; network pharmacology; molecular docking; in vitro experiment

根据 2020 年全球癌症统计数据, 胃癌的死亡率排名第四, 发病率极高; 早期胃癌患者无症状, 通常诊断时已为晚期, 对人们的生命和健康构成严重的威胁^[1]。尽管手术方法、放疗、化疗和新辅助治疗的进步显著提高了胃癌患者的生存率, 但预后不良和治疗选择有限, 晚期胃癌患者的预后仍然令人失望, 因此, 需要寻找新的治疗方法^[2-3]。

中药具有靶点多、不良反应少等特点, 在改善胃癌患者生活质量方面具有巨大优势。天然产物是治疗疾病和开发合成药物的丰富来源^[4], 苦杏仁苷主要存在于苦杏仁中, 是一种天然芳香氰化物, 广泛分布于植物中, 尤其存在于蔷薇科植物种子中, 如杏、桃、樱桃、李子等^[5]。苦杏仁苷除了具有抗纤维化、抗炎、抗动脉粥样硬化、改善消化系统和生殖系统、镇痛、免疫调节以及降低血糖的药理活性等作用外, 还具有抗肿瘤的特性。研究表明, 苦杏仁苷的抗肿瘤活性是通过诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞生长和减少肿瘤细胞转移来实现的^[6]。但其在胃癌治疗方面尚未见相关研究。本课题组前期研究表明, 苦杏仁苷能够以浓度依赖性的方式抑制胃癌细胞的增殖。

网络药理学结合了系统生物学和生物信息学来阐述药物的复杂机制, 为疾病的药物发现提供了新的途径, 为阐明药物的作用机制提供了新的方法^[7-8]。本研究旨在通过网络药理学和分子对接并结合体外实验, 分析苦杏仁苷防治胃癌的作用机制, 为其治疗胃癌的进一步研究提供科学依据, 现报道如下。

1 材料

1.1 细胞株

人胃癌细胞株 HGC-27 细胞, 购自中科院上海细胞库。

1.2 试剂

苦杏仁苷 (Sigma 公司); RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗 (Gibco 公司); 流式检测凋亡试剂盒 (BD, USA); 一抗 Bax、Bcl2、SSTR3、GAPDH、山羊抗兔和山羊抗鼠二抗 (三鹰生物技术有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂

盒 (博士德); 0.25% 胰蛋白酶溶液 (北京索莱宝公司); CCK-8 试剂溶液 (美仑生物); RT-PCR 试剂盒 (Promega 公司)。

1.3 仪器

电子分析天平 ($d = 0.0001 \text{ g}$, SHIMADZU); CO₂ 细胞培养箱 (Panasonic 公司); 电泳仪、电泳槽、转膜槽 (美国 Bio-Rad 公司); 生化培养箱 (宁波扬辉仪器有限公司); 多功能酶标仪 DTX880 (美国 Thermo 公司); Mastercycle PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法与结果

2.1 苦杏仁苷对胃癌细胞增殖的影响

将 HGC-27 细胞置于 5%CO₂、37 °C 培养箱中培养, 待细胞密度达到 80% 左右, 将其消化, 离心收集后重悬, 然后以 1×10^4 个每孔接种于 96 孔板中, 置于 37 °C、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养过夜。已有体外研究结果显示, 苦杏仁苷发挥抗肿瘤作用的质量浓度范围为 $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[9], 苦杏仁苷质量浓度为 $4、8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时肝癌 HuH-7 细胞存活率显著低于对照组^[10]。故本实验设置 3 组: 苦杏仁苷药物组高、低剂量组 (给药质量浓度分别为 $8、4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 及对照组 (不给予药物)。在各组培养 48 h 时, 使用含有 10% CCK-8 的空白培养基孵育细胞 1 h, 在酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度, 计算细胞存活率。实验结果显示, 苦杏仁苷作用于 HGC-27 细胞 48 h 后, 显著抑制胃癌细胞增殖, 见图 1。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡

将 HGC-27 细胞按 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 稳定培养 24 h; 加入 $0、4、8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苦杏仁苷干预 48 h, 收集细胞置于离心管中, 用 PBS 洗涤细胞, 离心后弃上清液; 加入 200 μL $1 \times$ Binding Buffer, 重悬细胞, 避光, 加入 Annexin-FITC, 冰上孵育 10 min; 加入 PI, 冰上孵育 10 min, 使用 Flow Jo 软件进行统计学分析。结果显示, 苦杏仁苷以浓度依赖性的方式诱导 HGC-27 细胞凋亡 (见图 2A 及 2B)。

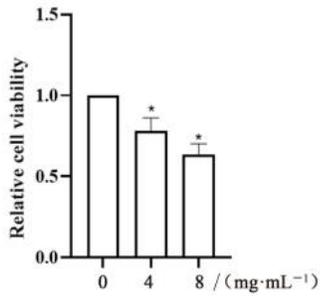


图 1 苦杏仁苷对 HGC-27 细胞增殖的影响
Fig 1 Effect of amygdalin on the proliferation of HGC-27

注: 与对照组 (0 mg·mL⁻¹) 相比, *P < 0.05。

Note: Compared with the control group (0 mg·mL⁻¹), *P < 0.05.

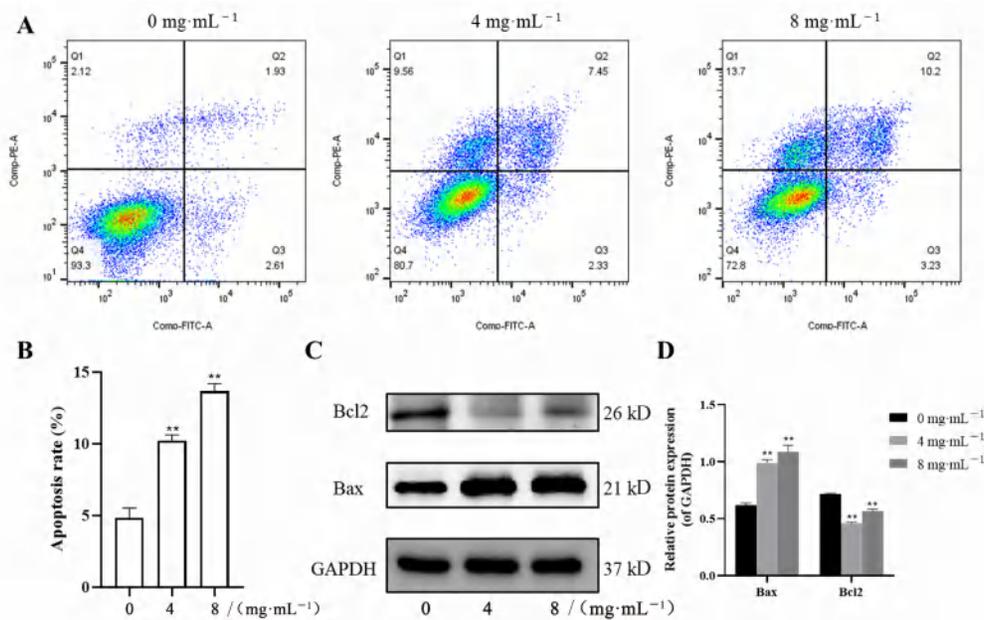


图 2 苦杏仁苷对 HGC-27 细胞凋亡的影响
Fig 2 Effect of amygdalin on the apoptosis of HGC-27 cells

注: 与对照组 (0 mg·mL⁻¹) 比较, **P < 0.01。

Note: Compared with the control group (0 mg·mL⁻¹), **P < 0.01.

分析 将与胃癌治疗相关的 34 个苦杏仁苷靶点映射到 DAVID 数据库进行生物功能富集分析, 从整体角度出发, 系统研究苦杏仁苷在对胃癌治疗方面可能涉及的生物功能及相关分子机制。GO 分析结果显示, 苦杏仁苷在胃癌治疗方面可能参与细胞增殖的负调控、生长抑素信号通路等生物学过程。靶基因主要富集在质膜和细胞质中, 以及具有调节生长抑素受体活性、碳酸盐脱水酶活性等分子功能, 见图 3。KEGG 分析结果显示, 苦杏仁苷主要参与了代谢以及胃酸分泌等相关信号通路, 见图 4。富集结果表明, 苦杏仁苷可能通过参与生长抑素信号通路在胃癌发病过程中发挥关键作用。

2.3.3 苦杏仁苷 - 胃癌潜在作用靶点的 PPI 将 34 个潜在作用靶点导入 STRING 数据库以构建

2.3 网络药理学分析

2.3.1 苦杏仁苷 - 胃癌疾病靶点 通过 TCMSP 以“amygdalin”为关键词搜索得到 7 个靶点。同时, 使用 SwissTargetPrediction 数据库, 在首页选择“homo sapiens”输入从 PubChem 获得 SMILES 号, 得到苦杏仁苷 100 个潜在靶点, 选取前 32 个 probability 大于 0 的靶点用于后续分析; 去重, 最终共获得 39 个潜在靶点。通过 GeneCards 在线数据库得到“胃癌”相关疾病靶点 11 842 个。使用 Venny 2.1.0 在线平台, 得到交集靶点 34 个, 作为苦杏仁苷治疗胃癌的潜在作用靶点。

2.3.2 苦杏仁苷 - 胃癌靶点 GO 功能与 KEGG 富集

PPI 网络, 剔除 4 个与其他靶点不存在相互作用的潜在作用靶点, 得到最终的 PPI 网络。将其导入到 Cytoscape 3.2.1 软件中, 得到共涉及 30 个节点, 55 条边的可视化的蛋白质相互作用体系网络。在网络中, 节点大小、颜色与靶点蛋白的 Degree 值成正比, 节点间连线表示靶点蛋白间存在潜在的相互作用关系。使用 CytoNCA 进行打分, 结果表明 SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5 在该网络体系中的重要程度较高, 见图 5。

2.3.4 分子对接验证核心活性成分与关键靶点的结合作用 利用 AutoDock 1.5.6 工具和 Vina 对“2.3.3”项下所得到的核心子网络中的蛋白与苦杏仁苷分别进行对接, 并根据对接结合自由能进行评分, 结果见表 1。一般认为结合能小于 - 17.78

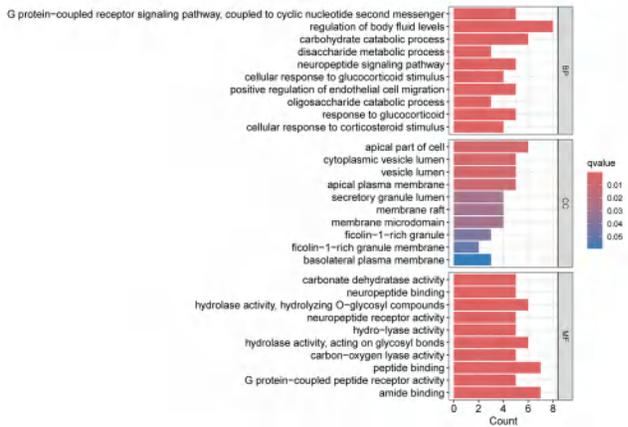


图 3 苦杏仁苷 - 胃癌基因的 GO 富集分析的条形图
Fig 3 Barplot map of GO enrichment analysis of amygdalin-gastric cancer gene

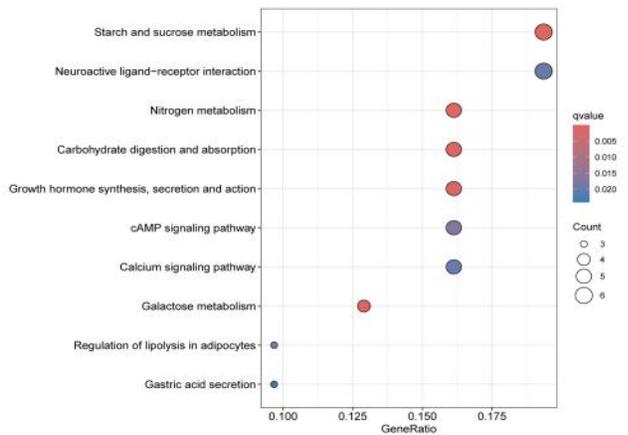


图 4 苦杏仁苷 - 胃癌基因的 KEGG 富集分析气泡图
Fig 4 Bubble map for KEGG enrichment analysis of amygdalin-gastric cancer gene

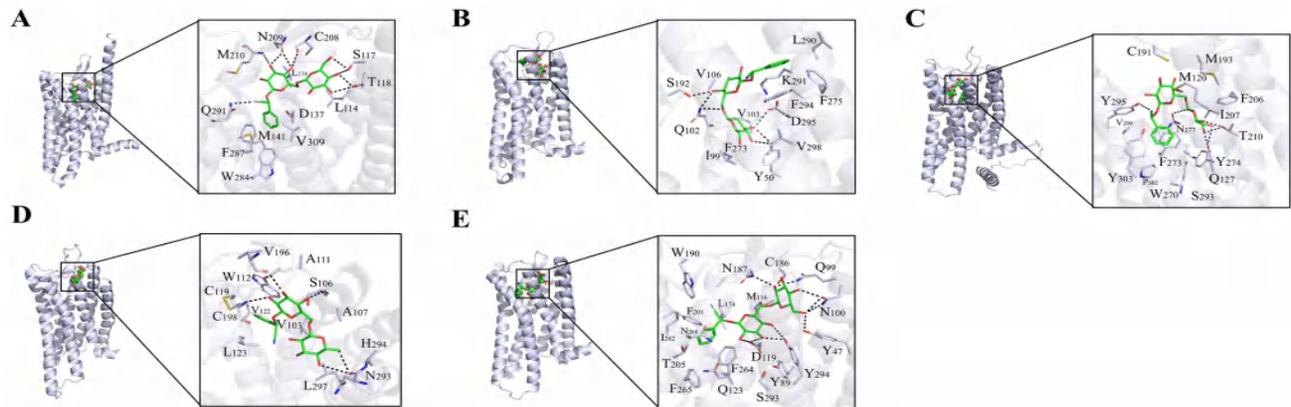


图 6 苦杏仁苷与核心靶点的对接
Fig 6 Docking of amygdalin with core targets
A ~ E. 依次为 SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4 和 SSTR5 与苦杏仁苷的对接 (A ~ E. SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 and SSTR5 docking with amygdalin)

逆转录得到 cDNA，然后检测其中 *SSTR1*、*SSTR2*、*SSTR3*、*SSTR4* 和 *SSTR5* 的 mRNA 水平，引物序列见表 2。与对照组相比，4、8 mg · mL⁻¹ 苦杏仁苷干预胃癌 HGC-27 细胞后，核心基因均显示上调趋势，结果如图 7A 所示。其中，*SSTR3* 上调

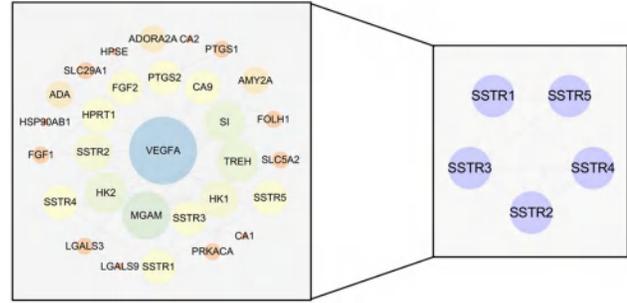


图 5 苦杏仁苷 - 胃癌靶点蛋白互作网络图
Fig 5 Interaction network of amygdalin-gastric target proteins

$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 提示配体与受体有一定的结合活性，小于 $-20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 有较好的结合活性，小于 $-29.29 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 有强烈的结合活性^[11]；可以看出，这 5 个核心靶点均能够与苦杏仁苷之间形成极好的结合。最后使用 PyMOL 4.6.0 对结果进行可视化，结果见图 6。

表 1 各蛋白体系与苦杏仁苷分子对接能
Tab 1 Molecular docking energy scale of each protein system and amygdalin

核心靶点	分子对接能量 / ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
SSTR1	-30.79
SSTR2	-30.42
SSTR3	-33.22
SSTR4	-32.13
SSTR5	-33.77

2.4 RT-PCR 实验

苦杏仁苷处理 HGC-27 细胞 48 h 后用 Trizol 法提取各组总 RNA，用 Real-Time PCR 试剂盒进行

最为明显。

2.5 Western blot 法检测细胞 Bax、Bcl2、SSTR3 蛋白表达

取对数生长期胃癌 HGC-27 细胞，接种于 6 孔培养板中，置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养

表 2 RT-PCR 检测的引物序列
Tab 2 Primer sequence detected by RT-PCR

基因	引物
SSTR1	Forward: 5'-TAACAGACCGCACATGCACT-3'
	Reverse: 5'-CGGCTCTGGACTGGTAAATG-3'
SSTR2	Forward: 5'-CCTCCAGGTCCATTAAGGT-3'
	Reverse: 5'-CATGTGTGGCTTCCATTGAG-3'
SSTR3	Forward: 5'-TAGGGCTACTTCCCAAGGT-3'
	Reverse: 5'-AGACCTGGCAGCAATAGCAT-3'
SSTR4	Forward: 5'-CGCTATCCAGTGCATCTACG-3'
	Reverse: 5'-GGTAGCCGTCTTCATCTTGG-3'
SSTR5	Forward: 5'-CCCTTCTTACCGTCAACAT-3'
	Reverse: 5'-GTTGGCGTAGGAGAGGATGA-3'

箱中过夜;使用 4、8 mg·mL⁻¹ 苦杏仁苷处理细胞, 收集各组细胞, 充分裂解后进行蛋白质定量, 计算蛋白上样体积 (上样量 20 μg); 加入适量上样缓冲液至剩余蛋白中, 使其终浓度为 1× 即可。将混合后的样本 95 °C 水煮 10 min, 于 -20 °C 环境下保存; 取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 结束后湿转至 PVDF 膜, 室温封闭, 4 °C 一抗孵育过夜, 次日洗膜, 后显影; 使用 Image J 软件进行灰度分析。发现用苦杏仁苷处理后, Bax 的表达显著增加, 而 Bcl2 的表达显著降低 (见图 2C、D)。图 7B、C 显示, 苦杏仁苷可显著上调 SSTR3 在 HGC-27 细胞中的蛋白表达水平。

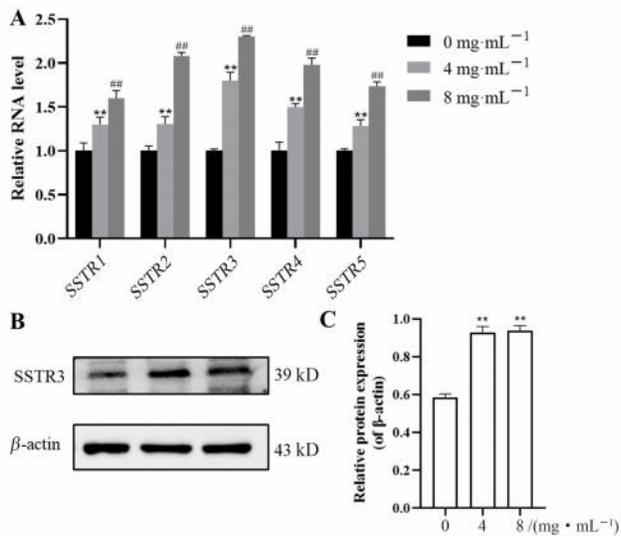


图 7 苦杏仁苷对 HGC-27 细胞中 SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4、SSTR5 基因 (A) 及 SSTR3 蛋白 (B) 变化的影响

Fig 7 Effect of amygdalin on SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5 genes (A) and SSTR3 protein (B) in HGC-27 cells

注: 与对照组 (0 mg·mL⁻¹) 比较, **P < 0.01。
Note: Compared the with control group (0 mg·mL⁻¹), **P < 0.01.

3 讨论

近年来, 胃癌发病率和死亡率逐渐增加, 这与饮食、生活方式、遗传等因素有关。由于远处转移和复发, 大多数患者预后不良^[4, 12]。中药已

有两千多年的历史, 临床应用广泛^[13]; 近年来, 传统中医药在胃癌治疗领域的发展速度显著加快, 众多研究报道了中药单体成分在对抗胃癌方面的疗效, 如黄芪甲苷、丹皮酚等^[14-15]。苦杏仁苷具有良好的抗肿瘤作用, 然而, 其在胃癌治疗领域的作用及作用机制尚未见详细文献报道。

HGC-27 细胞株是胃癌相关研究中常用的细胞株, 故本研究选择其进行体外实验验证^[16-17]。结果发现, 苦杏仁苷具有良好的抗肿瘤活性, 能够浓度依赖性地抑制胃癌细胞的增殖; 流式细胞术实验结果表明, 苦杏仁苷呈剂量依赖性的方式诱导胃癌细胞凋亡, 并且上调 Bax、下调 Bcl2 蛋白的表达。随后, 使用网络药理学对苦杏仁苷治疗胃癌的作用机制进行初步探究。结果显示, SSTR1、SSTR2、SSTR3、SSTR4 和 SSTR5 可能是苦杏仁苷治疗胃癌的核心靶点; 富集分析结果表明苦杏仁苷可能通过调节生长抑素受体活性以及参与细胞增殖的负调控的生物学过程发挥对胃癌的治疗作用。大量研究表明, 生长抑素类似物可以抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡^[18]。生长抑素通过与特定的表面膜受体 SSTRs 结合来发挥作用, SSTR1 ~ SSTR5 是 SSTR 的五种亚型。Zhao 等^[19] 发现生长抑素受体 1 (SSTR1) 是一种由胃癌细胞中 EB 病毒感染驱动的新型甲基化基因, 可作为潜在的肿瘤抑制因子; 有学者通过实验发现 SSTR3 可能通过结合生长抑素在胃癌和胃癌细胞的生长中发挥作用, 如果 SSTR3 消失, 生长抑素将失去其作用靶点, 然后失去其细胞抑制或凋亡的作用^[20]; SSTR2 表达已在多种内分泌型肿瘤中鉴定出来, 研究证实, 体内生长抑素对胃黏膜细胞增殖的抑制作用下降可能是胃癌发生的原因之一^[21]。分子对接结果显示, 苦杏仁苷与 SSTR3 具有较高的结合活性。

在正常的胃黏膜中, SSTR3 蛋白分布于黏膜下层的细胞膜和细胞质或间质组织中, 胃癌患者中 SSTR3 蛋白的表达明显低于正常黏膜患者^[20]。本研究中 RT-PCR 实验结果显示, 苦杏仁苷能够显著升高人胃癌 HGC-27 细胞中 SSTRs 的 mRNA 水平, SSTR3 较为明显; 同时, 用苦杏仁苷进行干预后, HGC-27 细胞中 SSTR3 蛋白表达显著增加。提示苦杏仁苷可能通过作用于 SSTR3 发挥类似于生长抑素类似物的作用诱导抑制胃癌细胞增殖并且诱导其凋亡来发挥对胃癌的治疗作用。

本研究利用网络药理学和分子对接并结合体外实验阐明了苦杏仁苷治疗胃癌的可能的作用机制, 苦杏仁苷有潜力成为治疗胃癌的有效药物, 后续需要进行体内实验来进一步证实其疗效及作用机制。

综上所述, 苦杏仁苷可能通过作用于 SSTR3 抑制胃癌细胞增殖并诱导其凋亡发挥治疗作用, 本研究结果为进一步阐明其作用机制和后续实验研究提供了一定的参考。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396 (10251): 635-648.
- [3] 杨靖芸, 谢家诚, 马晓聪, 等. 胃癌相关信号通路的中药调控研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (16): 217-228.
- [4] Gao J, Yang SF, Xie GQ, et al. Integrating network pharmacology and experimental verification to explore the pharmacological mechanisms of aloin against gastric cancer [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 1947-1961.
- [5] Song ZQ, Xu XH. Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin [J]. *J Cancer Res Therap*, 2014, 10 (5): 3-7.
- [6] He XY, Wu LJ, Wang WX, et al. Amygdalin-A pharmacological and toxicological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112717.
- [7] Zhang MY, Ding YJ, Hu S, et al. Transcriptomics and systems network-based molecular mechanism of herbal formula Huosu-Yangwei inhibited gastric cancer in vivo [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 316: 116674.
- [8] Li X, Liu ZQ, Liao J, et al. Network pharmacology approaches for research of traditional Chinese medicines [J]. *Chin J Nat Med*, 2023, 21 (5): 323-332.
- [9] Shi JM, Chen QQ, Xu M, et al. Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: a review [J]. *Cancer Med*, 2019, 8 (6): 3004-3011.
- [10] 王青瑛, 王郁金, 邢文文, 等. 苦杏仁苷介导人肝癌细胞 HuH-7 凋亡的实验研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21 (17): 3227-3231, 3216.
- [11] Xiang C, Liao YL, Chen ZY, et al. Network pharmacology and molecular docking to elucidate the potential mechanism of Ligusticum Chuanxiong against osteoarthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 854215.
- [12] Li L, Lu YZ, Liu YL, et al. Network pharmacology analysis of Huangqi Jianzhong Tang targets in gastric cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 882147.
- [13] Huang YX, Lin JT, Yi WM, et al. Research on the potential mechanism of Gentiopicroside against gastric cancer based on network pharmacology [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2020, 14: 5109-5118.
- [14] 陈凤琴, 樊涛, 宁月, 等. 基于网络药理学及体外实验探讨黄芪甲苷治疗胃癌的机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34 (9): 1236-1244.
- [15] Li M, Cai O, Yu YJ, et al. Paeonol inhibits the malignancy of Apatinib-resistant gastric cancer cells via LINC00665/miR-665/MAPK1 axis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153903.
- [16] Liu MY, Li HM, Zhang HJ, et al. RBMS1 promotes gastric cancer metastasis through autocrine IL-6/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (3): 287.
- [17] Xu MM, Ren L, Fan JH, et al. Berberine inhibits gastric cancer development and progression by regulating the JAK2/STAT3 pathway and downregulating IL-6 [J]. *Life Sci*, 2022, 290: 120266.
- [18] Borin JF, Tang LH, Kidd M, et al. Somatostatin receptor regulation of gastric enterochromaffin-like cell transformation to gastric carcinoid [J]. *Surgery*, 1996, 120 (6): 1026-1032.
- [19] Zhao J, Liang Q, Cheung KF, et al. Somatostatin receptor 1, a novel EBV-associated CpG hypermethylated gene, contributes to the pathogenesis of EBV-associated gastric cancer [J]. *Brit J Cancer*, 2013, 108 (12): 2557-2564.
- [20] Hu CY, Yi CQ, Hao ZM, et al. The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3 (8): 726-730.
- [21] Kim HJ, Park JL, Yoon BH, et al. Aberrant methylation of somatostatin receptor 2 gene iyis initiated in aged gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori* and consequential gene silencing is associated with establishment of inflammatory microenvironment in vitro study [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14 (24): 6183.

(收稿日期: 2023-12-11; 修回日期: 2024-06-24)

紫丁香叶化学成分研究

冯小涛, 孙延平, 黎冠兰, 王知斌, 杨炳友, 匡海学* (黑龙江中医药大学, 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 研究紫丁香叶的化学成分。**方法** 运用硅胶、ODS 等柱色谱方法及制备型高效液相色谱等技术对紫丁香叶进行系统的提取分离, 采用 NMR、MS 等技术综合解析鉴定化学成分的结构。**结果** 从紫丁香叶中共分离得到 19 个化合物, 分别鉴定为 syringalactone B (1)、(8E)-ligstroside (2)、(8E)-女贞子苷 (3)、hydroxyframoside (4)、fraxiformoside (5)、oleoacteoside (6)、丁香苦苷 (7)、tetracentronside B (8)、(+)-松脂酚-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (9)、4, 4'-dimethoxy-3'-hydroxy-7, 9': 7', 9'-diepoxylignan-3-O-β-D-glucopyranoside (10)、lariciresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside (11)、olivil-4'-O-β-D-glucopyranoside (12)、isolariciresinol-4-O-β-D-glucopyranoside (13)、紫丁香苷 (14)、松柏苷 (15)、(4ξ)-α-terpineol 8-O-[α-L-arabinopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside] (16)、(Z)-3-hexenyl β-D-glucopyranoside (17)、苯甲醇-β-巢菜糖苷 (18)、冬绿苷 (19)。**结论** 化合物 5、10、15、16 ~ 19 为首次从丁香属植物中分离得到, 化合物 4、6、12 为首次从紫丁香叶中分离得到。

关键词: 紫丁香叶; 化学成分; 分离鉴定

中图分类号: R284.1, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3206-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.012

Chemical constituents of *Syringa oblata* leaves

FENG Xiao-tao, SUN Yan-ping, LI Guan-lan, WANG Zhi-bin, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue* (Heilongjiang University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Basic and Applied Research in North Medicine, Commission Education, Heilongjiang Key Laboratory of Drug Efficacy Material of Traditional Chinese Medicine and Natural Product, Harbin 150040)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of *Syringa oblata* (*S.oblata*) leaves. **Methods** The chemical components of *S.oblata* leaves were separated and purified by column chromatography with silica gel, ODS, and preparative HPLC. The structures of the chemical components were determined comprehensively with nuclear magnetic resonance and mass spectrum. **Results** Totally 19 compounds were isolated from *S.oblata* leaves and identified as syringalactone B (1), (8E)-ligstroside (2), (8E)-ligustroside (3), hydroxyframoside (4), fraxiformoside (5), oleoacteoside (6), syringopicroside (7), tetracentronside B (8), (+) pinoresinol-4-O-β-D-glucopyranoside (9), 4, 4'-dimethoxy-3'-hydroxy-7, 9': 7', 9'-diepoxylignan-3-O-β-D-glucopyranoside (10), lariciresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside (11), olivil-4'-O-β-D-glucopyranoside (12), isolariciresinol-4-O-β-D-glucopyranoside (13), syringin (14), coniferin (15), (4ξ)-α-terpineol 8-O-[α-L-arabinopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside] (16), (Z)-3-hexenyl β-D-glucopyranoside (17), benzyl alcohol-β-vicianoside (18), and gaultherin (19). **Conclusion** Compounds 5, 10, 15 and 16 ~ 19 have been first isolated from *Syringa*, and compounds 4, 6, 12 have been isolated for the first time from *S.oblata* leaves.

Key words: *Syringa oblata* leave; chemical constituent; isolation and identification

基金项目: 中药传承与创新“百千万”人才工程——岐黄工程首席科学家项目(国中医药人教函[2021]7号); 2022年全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号); 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目(国中医药人教函[2022]76号)。
作者简介: 冯小涛, 男, 硕士研究生, 主要从事中药及复方药效物质基础研究, email: xiaotaof@163.com *通信作者: 匡海学, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药及复方药效物质基础研究、中药性味理论研究, email: hxkuang@hljucm.edu.cn

紫丁香 (*Syringa oblata* L.) 为木犀科丁香属的小乔木或灌木。2019 年版《吉林省中药材标准》记载紫丁香叶味苦性寒, 归肝、肺、大肠经, 具清热燥湿、解毒、止咳、止痢等功效。紫丁香在我国具有悠久的历史, 具有抗炎^[1]、抗菌^[2]、保护肝脏^[3]、抗氧化^[4]、调控血糖^[5]等作用。研究显示, 紫丁香叶中主要含有环烯醚萜类、木脂素类、苯丙素类、苯乙醇类化合物, 为丰富紫丁香叶的化学成分^[6]。本研究对紫丁香叶乙醇提取物的正丁醇部位进行化学成分研究, 分离鉴定出 19 个化合物, 其中包括 8 个单萜苷类、8 个苯丙素类、3 个其他类化合物, 分别为 syringalactone B (1)、(8*E*)-ligstroside (2)、(8*E*)-女贞子苷 (3)、hydroxyframoside (4)、fraxiformoside (5)、丁香

苦苷 (7)、tetracentronside B (8)、(+)-松脂酚-4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (9)、4, 4'-dimethoxy-3'-hydroxy-7, 9': 7', 9-diepoxy lignan-3-*O*- β -D-glucopyranoside (10)、lariciresinol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside (11)、olivil-4'-*O*- β -D-glucopyranoside (12)、isolariciresinol-4-*O*- β -D-glucopyranoside (13)、紫丁香苷 (14)、松柏苷 (15)、(4 ξ)- α -terpineol 8-*O*-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] (16)、(*Z*)-3-hexenyl β -D-glucopyranoside (17)、苯甲醇- β -巢菜糖苷 (18)、冬绿苷 (19)。化合物 5、10、15、16~19 为首次从丁香属分离得到, 化合物 4、6、12 为首次从紫丁香中分离得到。化合物结构见图 1, 现报道如下。

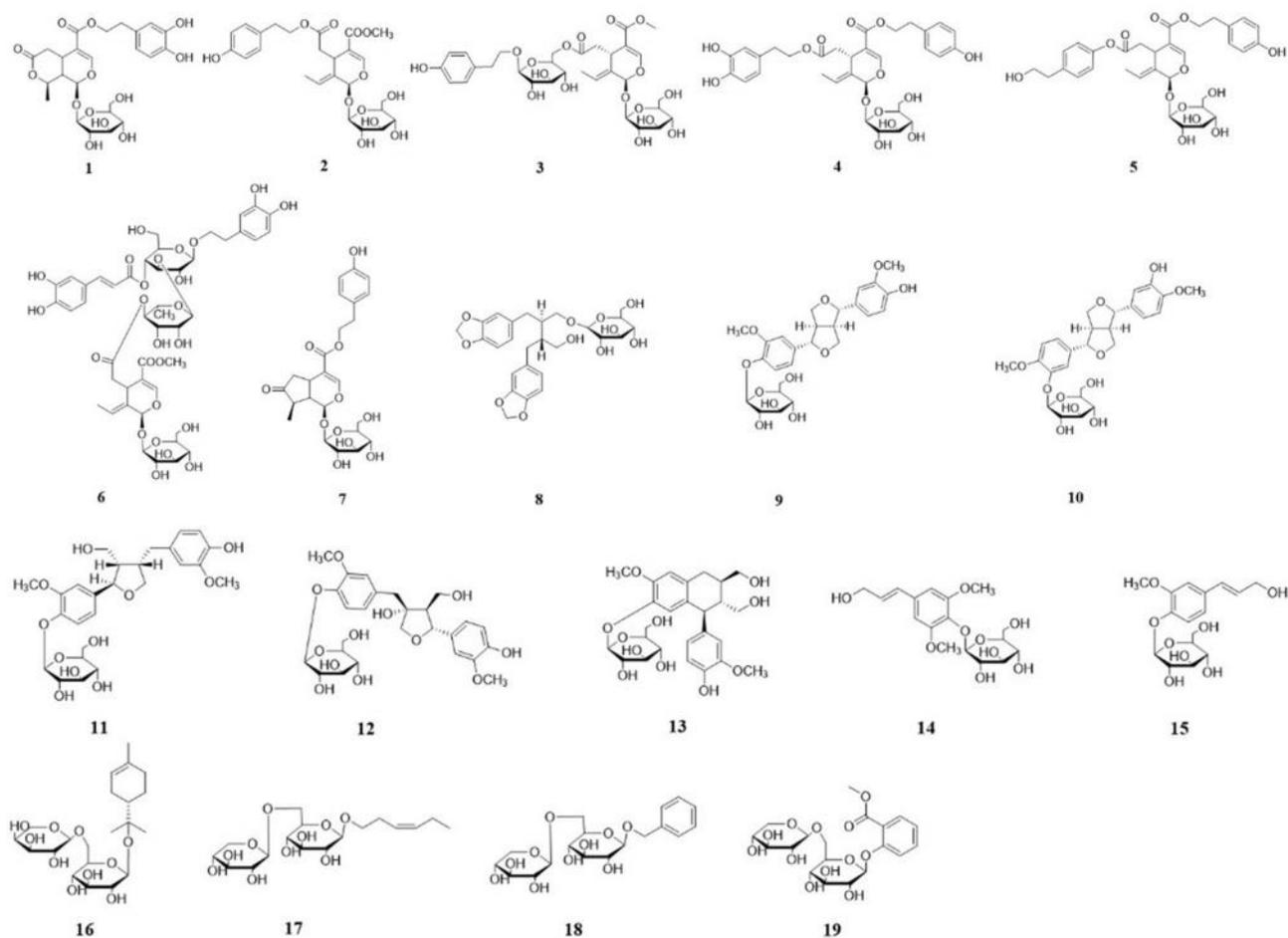


图 1 化合物 1~19 的结构式

Fig 1 Structures of compounds 1~19

1 材料

Bruker-600 超导核磁共振光谱仪瑞士 (Bruker 公司); 2695-2996 型分析 HPLC、Q-TOF (ESI) 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); LC-20AR 型制备 HPLC (日本岛津公司); EYELA N-1300 型旋

转蒸发仪、EYELA NVC-2200 型旋转蒸发仪 (日本东京理化株式会社); 硅胶柱色谱 (80~100 目, 200~300 目, 青岛海洋化工厂); 分析型色谱柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm, 美国 Waters 公司); ODS (日本 YMC 公司); 薄层层析硅胶 (青岛海洋化工

厂); 半制备高效液相色谱所用试剂为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

紫丁香叶于 2023 年 6 月采自黑龙江中医药大学, 经黑龙江中医药大学药学院药用植物教研室樊锐锋副教授鉴定为木犀科丁香属植物紫丁香 *Syringa oblata* L. 的叶。

2 提取分离

紫丁香叶 40.0 kg, 干燥后 75% 乙醇冷浸 3 次, 每次 2 h, 回收溶剂得 7.5 kg 总提取物。将总提取物用水 (8 L) 混悬, 依次用石油醚 (8 L)、乙酸乙酯 (8 L)、水饱和正丁醇 (8 L) 萃取, 减压回收溶剂, 得石油醚萃取物 100.8 g, 二氯甲烷萃取物 690.3 g, 正丁醇萃取物 450.1 g。将 250.0 g 正丁醇层进行硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷: 甲醇 (1 : 0 ~ 0 : 1) 梯度洗脱, 合并得到 5 个组分 Fr.S1 ~ Fr.S5。

Fr.S1 采用 ODS 开口柱分离, 经甲醇-水 (20 : 80 ~ 100 : 0) 洗脱得到 2 个流份 Fr.S1.1 和 Fr.S1.2。Fr.S1.1 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 55 : 45) 分离纯化得到化合物 **2** (6.1 mg, $t_R = 26$ min)、**7** (9.4 mg, $t_R = 17$ min) 和 **8** (4.9 mg, $t_R = 25$ min); Fr.S1.2 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 42 : 58) 分离纯化得到化合物 **9** (3.0 mg, $t_R = 20$ min)、**10** (23.1 mg, $t_R = 22.5$ min)。

Fr.S2 采用 ODS 开口柱分离, 经甲醇-水 (10 : 90 ~ 100 : 0) 洗脱得到 3 个流份 Fr.S2.1 ~ Fr.S2.3。Fr.S2.1 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 30 : 70) 分离纯化得到化合物 **1** (57.2 mg, $t_R = 29$ min)、**11** (6.9 mg, $t_R = 26$ min) 和 **13** (3.1 mg, $t_R = 19$ min); Fr.S2.2 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 58 : 42) 分离纯化得到化合物 **4** (13.0 mg, $t_R = 31$ min)、**5** (7.9 mg, $t_R = 20$ min); Fr.S2.3 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 24 : 76) 分离纯化得到化合物 **14** (3.3 mg, $t_R = 29$ min)、**15** (5.2 mg, $t_R = 45$ min)。

Fr.S3 采用 ODS 开口柱分离, 经甲醇-水 (10 : 90 ~ 100 : 0) 洗脱得到 3 个流份 Fr.S3.1 ~ Fr.S3.3。Fr.S3.1 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 31 : 69) 分离纯化得到化合物 **12** (4.9 mg, $t_R = 14$ min); Fr.S3.2 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 48 : 42) 分离纯化得到化合物 **16** (5.9 mg, $t_R = 42.5$ min); Fr.S3.3 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 40 : 60) 分离纯化得到化合物 **19** (15.7 mg, $t_R = 16$ min)。

Fr.S4 采用 ODS 开口柱分离, 经甲醇-水

(10 : 90 ~ 100 : 0) 洗脱得到 2 个流份 Fr.S4.1 和 Fr.S4.2。Fr.S4.1 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 55 : 45) 分离纯化得到化合物 **3** (8.9 mg, $t_R = 30$ min); Fr.S4.2 通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 33 : 67) 分离纯化得到化合物 **17** (10.4 mg, $t_R = 52$ min)、**18** (14.6 mg, $t_R = 22$ min)。

Fr.S5 采用 ODS 开口柱分离, 经甲醇-水 (10 : 90 ~ 100 : 0) 洗脱后通过制备型 HPLC (甲醇-水 = 45 : 55) 分离纯化得到化合物 **6** (8.7 mg, $t_R = 21$ min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS m/z : 527.1759[M + H]⁺ (计算值 527.1686), $[\alpha] = -42.0^\circ$ (c 2.86, MeOH), 分子式为 C₂₄H₃₀O₁₃。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.46 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1), 7.51 (1H, s, H-3), 3.01 (1H, m, H-5), 2.81 (1H, m, H-6 α), 2.44 (1H, m, $J = 11.5, 16.6$ Hz, H-6 β), 4.47 (1H, m, H-8), 2.10 (1H, m, H-9), 1.48 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 6.65 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.54 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 4.26 (2H, m, H-7'), 2.79 (2H, m, H-8'), 4.70 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1''), 3.38 (1H, m, H-2''), 3.20 (1H, m, H-3''), 3.24 (1H, m, H-4''), 3.33 (1H, m, H-5''), 3.90 (1H, dd, $J = 1.9, 11.9$ Hz, H-6' α), 3.62 (1H, dd, $J = 6.8, 11.9$ Hz, H-6' β); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 96.3 (C-1), 154.4 (C-3), 109.6 (C-4), 28.1 (C-5), 34.6 (C-6), 174.8 (C-7), 75.8 (C-8), 21.7 (C-9), 167.9 (C-10), 131.0 (C-11), 116.5 (C-1'), 154.4 (C-2'), 146.2 (C-3'), 144.9 (C-4'), 117.1 (C-5'), 121.3 (C-6'), 66.5 (C-7'), 35.5 (C-8'), 100.6 (C-1''), 74.7 (C-2''), 78.5 (C-3''), 71.6 (C-4''), 77.9 (C-5''), 62.9 (C-6'')。其核磁数据与文献^[7]报道一致, 故鉴定化合物 **1** 为 syringalactone B。

化合物 **2**: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS m/z : 525.1967[M + H]⁺ (计算值 525.1894), $[\alpha] = -182.6^\circ$ (c 0.30, MeOH), 分子式为 C₂₅H₃₂O₁₂。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.92 (1H, brs, H-1), 7.51 (1H, s, H-3), 3.97 (1H, dd, $J = 4.4, 9.2$ Hz, H-5), 2.70 (1H, dd, $J = 4.4, 14.2$ Hz, H-6 α), 2.42 (1H, dd, $J = 9.2, 14.2$ Hz, H-6 β), 6.08 (1H, q, $J = 7.1$ Hz, H-8),

1.64 (3H, dd, $J = 1.2, 7.1$ Hz, H-10), 7.05 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'), 6.72 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'), 6.72 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.05 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6'), 2.82 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-7'), 4.20 (1H, dt, $J = 7.0, 10.7$ Hz, H-8' α), 4.10 (1H, dt, $J = 7.0, 10.7$ Hz, H-8' β), 4.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.41 (1H, m, H-2'''), 3.32 (1H, m, H-3'''), 3.33 (1H, m, H-4'''), 3.35 (1H, m, H-5'''), 3.88 (1H, dd, $J = 1.2, 12.0$ Hz, H-6'' α), 3.66 (1H, dd, $J = 5.6, 12.0$ Hz, H-6'' β), 3.71 (3H, s, 11-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 95.2 (C-1), 155.2 (C-3), 109.4 (C-4), 31.8 (C-5), 41.3 (C-6), 173.3 (C-7), 124.9 (C-8), 130.5 (C-9), 13.6 (C-10), 168.7 (C-11), 130.1 (C-1'), 131.0 (C-2'), 116.3 (C-3'), 157.0 (C-4'), 116.3 (C-5'), 131.0 (C-6'), 35.2 (C-7'), 66.9 (C-8'), 100.9 (C-1''), 74.8 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.6 (C-4''), 78.5 (C-5''), 62.8 (C-6''), 52.0 (11-OCH₃)。核磁数据与文献^[8]报道一致, 故鉴定化合物 **2** 为 (8*E*)-ligstroside。

化合物 **3**: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS m/z : 687.2495 [M + H]⁺ (计算值 687.2422), $[\alpha] = -137.0^\circ$ (c 0.44, MeOH), 分子式为 C₃₁H₄₂O₁₇。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.90 (1H, brs, H-1), 7.50 (1H, s, H-3), 3.94 (1H, dd, $J = 4.8, 8.4$ Hz, H-5), 2.73 (1H, dd, $J = 4.8, 14.3$ Hz, H-6 α), 2.48 (1H, dd, $J = 8.8, 14.3$ Hz, H-6 β), 6.08 (1H, m, H-8), 1.71 (3H, dd, $J = 1.5, 7.1$ Hz, H-10), 7.04 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'), 6.68 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'), 6.68 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.04 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6'), 2.82 (2H, m, H-7'), 3.87 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz, H-8' α), 3.70 (1H, m, H-8' β), 4.29 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 4.33 (1H, dd, $J = 2.2, 11.9$ Hz, H-6'' α), 4.20 (1H, dd, $J = 5.8, 11.9$ Hz, H-6'' β), 4.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'''), 3.94 (1H, m, H-6''' α), 3.65 (1H, m, H-6''' β), 3.67 (3H, s, 11-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 95.2 (C-1), 155.2 (C-3), 109.4 (C-4), 31.8 (C-5), 41.3 (C-6), 173.1 (C-7), 125.0 (C-8), 130.5 (C-9), 13.7 (C-10), 168.7 (C-11), 130.7 (C-1'), 131.0 (C-2'), 116.2 (C-3'), 156.8 (C-4'), 116.2 (C-5'), 131.0 (C-6'), 36.4 (C-7'), 72.2

(C-8'), 104.4 (C-1''), 74.8 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.6 (C-4''), 75.2 (C-5''), 65.0 (C-6''), 100.9 (C-1'''), 75.0 (C-2'''), 78.4 (C-3'''), 71.5 (C-4'''), 78.0 (C-5'''), 62.7 (C-6'''), 52.0 (11-OCH₃)。核磁数据与文献^[9]报道一致, 故鉴定化合物 **3** 为 (8*E*)-女贞子苷。

化合物 **4**: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS m/z : 647.2334 [M + H]⁺ (计算值 647.2262), $[\alpha] = -107.0^\circ$ (c 0.65, MeOH), 分子式为 C₃₂H₃₈O₁₄。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.89 (1H, brs, H-1), 7.45 (1H, s, H-3), 3.90 (1H, m, H-5), 2.37 (1H, dd, $J = 4.4, 14.2$ Hz, H-6 α), 2.64 (1H, dd, $J = 9.4, 14.2$ Hz, H-6 β), 6.07 (1H, m, H-8), 1.71 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-10), 4.79 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.66 (1H, m, H-2'), 3.40 (1H, m, H-3'), 3.38 (1H, m, H-4'), 3.38 (1H, m, H-5'), 3.90 (1H, m, H-6' α), 3.66 (1H, m, H-6' β), 4.27 (2H, m, H-1''), 2.86 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-2''), 7.05 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4''), 6.69 (1H, overlap, H-5''), 6.69 (1H, overlap, H-7''), 7.05 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8''), 4.09 (1H, dt, $J = 7.1, 10.7$ Hz, H-1''' α), 4.20 (1H, m, H-1''' β), 2.75 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2'''), 6.69 (1H, overlap, H-4'''), 6.69 (1H, overlap, H-7'''), 6.54 (1H, dd, $J = 1.9, 8.0$ Hz, H-8'''); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 95.2 (C-1), 155.2 (C-3), 109.6 (C-4), 31.8 (C-5), 41.2 (C-6), 173.2 (C-7), 124.9 (C-8), 131.0 (C-9), 13.6 (C-10), 168.2 (C-11), 100.9 (C-1'), 74.8 (C-2'), 78.4 (C-3'), 71.5 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.8 (C-6'), 66.4 (C-1''), 35.4 (C-2''), 130.4 (C-3''), 130.8 (C-4''), 116.3 (C-5''), 157.1 (C-6''), 116.3 (C-7''), 131.0 (C-8''), 66.9 (C-1'''), 35.4 (C-2'''), 130.3 (C-3'''), 117.1 (C-4'''), 146.3 (C-5'''), 144.9 (C-6'''), 116.5 (C-7'''), 121.4 (C-8''')。核磁数据与文献^[10]报道一致, 故鉴定化合物 **4** 为 hydroxyframoside。

化合物 **5**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 631.2385 [M + H]⁺ (计算值 631.2312), $[\alpha] = -109.3^\circ$ (c 0.39, MeOH), 分子式为 C₃₂H₃₈O₁₃。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.00 (1H, brs, H-1), 7.50 (1H, s, H-3), 4.06 (1H, dd, $J = 4.4, 9.4$ Hz, H-5), 2.87 (1H, overlap, H-6 α), 2.66 (1H, m, H-6 β), 6.16 (1H, q, $J = 5.9$ Hz,

H-8), 1.74 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-10), 7.06 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'), 6.70 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'), 6.70 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.06 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 2.81 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-7'), 4.28 (2H, m, H-8'), 6.99 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2''), 7.24 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3''), 7.24 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5''), 6.99 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6''), 2.81 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-7''), 3.74 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-8''), 4.81 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'''); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 95.3 (C-1), 155.3 (C-3), 109.4 (C-4), 31.7 (C-5), 41.0 (C-6), 171.7 (C-7), 125.1 (C-8), 130.9 (C-9), 13.8 (C-10), 168.2 (C-11), 130.3 (C-1'), 131.0 (C-2'), 116.3 (C-3'), 157.1 (C-4'), 116.3 (C-5'), 131.0 (C-6'), 35.3 (C-7'), 66.5 (C-8'), 150.5 (C-1''), 122.6 (C-2''), 130.9 (C-3''), 138.2 (C-4''), 130.9 (C-5''), 122.6 (C-6''), 39.6 (C-7''), 64.1 (C-8''), 101.0 (C-1'''), 74.8 (C-2'''), 78.0 (C-3'''), 71.4 (C-4'''), 78.4 (C-5'''), 62.7 (C-6''').核磁数据与文献^[11]报道一致,故鉴定化合物 5 为 fraxiformoside。

化合物 6: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 1011.3340 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (计算值 1011.3267), $[\alpha] = -147.2^\circ$ (c 0.43, MeOH), 分子式为 $\text{C}_{46}\text{H}_{58}\text{O}_{25}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.61 (1H, brs, H-1), 7.45 (1H, brs, H-3), 3.85 (1H, m, H-5), 1.95 (1H, dd, $J = 8.3, 16.3$ Hz, H-6 α), 2.11 (1H, dd, $J = 3.4, 16.3$ Hz, H-6 β), 5.99 (1H, brq, $J = 6.8$ Hz, H-8), 1.67 (3H, brd, $J = 7.0$ Hz, H-10), 6.7 (1H, overlap, H-2'), 6.71 (1H, overlap, H-5'), 6.56 (1H, brd, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 2.81 (2H, m, H-7'), 3.73 (1H, overlap, H-8' α), 4.04 (1H, m, H-8' β), 7.04 (1H, overlap, H-2''), 6.71 (1H, overlap, H-5''), 6.97 (1H, brd, $J = 8.2$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7''), 6.26 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8''), 4.38 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'''), 3.45 (1H, overlap, H-2'''), 3.90 (1H, t, $J = 9.1$ Hz, H-3'''), 4.98 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-4'''), 3.55 (1H, m, H-5'''), 3.55 (1H, m, H-6'' α), 3.64 (1H, m, H-6'' β), 5.47 (1H, brs, H-1'''), 3.85 (1H, m, H-2'''), 3.64 (1H, m, H-3'''), 4.81 (1H, overlap, H-4'''), 3.73 (1H, overlap, H-5'''), 1.07 (3H, d, $J = 6.1$ Hz,

H-6'''), 4.84 (1H, overlap, H-1'''), 3.32 (1H, m, H-2'''), 3.46 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-3'''), 3.32 (1H, m, H-4'''), 3.40 (1H, m, H-5'''), 3.73 (1H, overlap, H-6'' α), 3.97 (1H, brd, $J = 11.7$ Hz, H-6'' β), 3.70 (3H, s, 11-OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 95.5 (C-1), 155.1 (C-3), 109.2 (C-4), 30.7 (C-5), 40.9 (C-6), 172.9 (C-7), 124.6 (C-8), 130.9 (C-9), 13.7 (C-10), 168.7 (C-11), 131.4 (C-1'), 116.3 (C-2'), 146.1 (C-3'), 144.7 (C-4'), 117.1 (C-5'), 121.3 (C-6'), 36.6 (C-7'), 72.3 (C-8'), 127.5 (C-1''), 115.4 (C-2''), 147.0 (C-3''), 150.0 (C-4''), 116.8 (C-5''), 123.1 (C-6''), 148.2 (C-7''), 114.2 (C-8''), 168.1 (C-9''), 104.2 (C-1'''), 76.7 (C-2'''), 77.6 (C-3'''), 70.2 (C-4'''), 75.8 (C-5'''), 62.2 (C-6'''), 101.0 (C-1'''), 74.8 (C-2'''), 78.0 (C-3'''), 71.4 (C-4'''), 78.2 (C-5'''), 62.7 (C-6'''), 51.9 (11-OCH₃)。核磁数据与文献^[12]报道一致,故鉴定化合物 6 为 oleoacteoside。

化合物 7: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 495.1861 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (计算值 495.1788), $[\alpha] = -114.0^\circ$ (c 0.47, MeOH), 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.61 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-1), 7.44 (1H, s, H-3), 3.20 (1H, m, H-5), 2.31 (1H, m, H-6 α), 2.10 (1H, m, H-6 β), 2.56 (1H, m, H-8), 2.44 (1H, m, H-9), 1.14 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-10), 7.04 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'), 6.71 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'), 6.71 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.04 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 2.84 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-7'), 4.25 (2H, m, H-8'), 4.67 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1''), 3.24 (1H, m, H-2''), 3.38 (1H, m, H-3''), 3.28 (1H, m, H-4''), 3.33 (1H, m, H-5''), 3.90 (1H, dd, $J = 1.9, 11.9$ Hz, H-6'' α), 3.65 (1H, dd, $J = 6.2, 11.9$ Hz, H-6'' β); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 95.4 (C-1), 153.2 (C-3), 111.2 (C-4), 28.2 (C-5), 43.5 (C-6), 218.1 (C-7), 44.6 (C-8), 46.5 (C-9), 13.7 (C-10), 168.4 (C-11), 130.1 (C-1'), 130.9 (C-2'), 116.3 (C-3'), 157.1 (C-4'), 116.3 (C-5'), 130.9 (C-6'), 35.3 (C-7'), 66.3 (C-8'), 100.2 (C-1''), 74.7 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.6 (C-4''), 78.4 (C-5''), 62.7 (C-6'')。核磁数据与文献^[8]报道一致,故鉴定化合物 7 为丁香苦苷。

化合物 **8**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 521.2017 $[M + H]^+$ (计算值 521.1945), $[\alpha] = -10.5^\circ$ (c 0.24, MeOH), 分子式为 $C_{26}H_{32}O_{11}$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.60 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-2), 6.66 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 6.58 (1H, m, H-6), 2.61 (2H, m, H-7), 2.05 (1H, m, H-8), 3.86 (1H, m, H-9 α), 3.51 (1H, m, H-9 β), 5.87 (2H, s, H-10), 6.60 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H-2'), 6.66 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5'), 6.58 (1H, m, H-6'), 2.61 (2H, m, H-7'), 1.97 (1H, m, H-8'), 3.60 (1H, m, H-9' α), 3.54 (1H, m, H-9' β), 5.87 (2H, s, H-10'), 4.18 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.19 (1H, m, H-2''), 3.35 (1H, m, H-3''), 3.22 (1H, m, H-4''), 3.25 (1H, m, H-5''), 3.88 (1H, m, H-6'' α), 3.66 (1H, m, H-6'' β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 136.2 (C-1), 108.8 (C-2), 149.0 (C-3), 147.1 (C-4), 110.4 (C-5), 123.2 (C-6), 35.6 (C-7), 44.3 (C-8), 70.3 (C-9), 102.0 (C-10), 136.3 (C-1'), 108.8 (C-2'), 149.0 (C-3'), 147.1 (C-4'), 110.4 (C-5'), 123.2 (C-6'), 35.6 (C-7'), 41.8 (C-8'), 62.8 (C-9'), 102.0 (C-10'), 104.6 (C-1''), 71.7 (C-2''), 78.1 (C-3''), 75.2 (C-4''), 78.0 (C-5''), 62.6 (C-6'')。核磁数据与文献^[13]报道一致, 故鉴定化合物 **8** 为 tetracentronside B。

化合物 **9**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 521.2017 $[M + H]^+$ (计算值 521.1945), $[\alpha] = -62.0^\circ$ (c 0.15, MeOH), 分子为 $C_{26}H_{32}O_{11}$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.02 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.14 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.91 (1H, dd, $J = 1.8, 8.3$ Hz, H-6), 4.75 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-7), 3.13 (1H, m, H-8), 4.24 (1H, m, H-9 α), 3.84 (1H, m, H-9 β), 6.94 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.80 (1H, dd, $J = 1.8, 8.3$ Hz, H-6'), 4.70 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-7'), 3.13 (1H, m, H-8'), 4.24 (1H, m, H-9' α), 3.84 (1H, m, H-9' β), 4.87 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.45 (1H, m, H-2''), 3.47 (1H, m, H-3''), 3.38 (1H, m, H-4''), 3.39 (1H, m, H-5''), 3.84 (1H, m, H-6'' α), 3.68 (1H, m, H-6'' β), 3.86 (3H, s, 3-COCH₃), 3.85 (3H, s, 3'-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 137.5 (C-1), 111.7 (C-2), 151.0 (C-3), 147.5 (C-4), 118.1 (C-5), 119.8 (C-6), 87.1 (C-7), 55.6 (C-

8), 72.8 (C-9), 133.8 (C-1'), 111.0 (C-2'), 149.2 (C-3'), 147.4 (C-4'), 116.1 (C-5'), 120.1 (C-6'), 87.5 (C-7'), 55.4 (C-8'), 72.7 (C-9'), 102.9 (C-1''), 74.9 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.4 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.5 (C-6''), 56.8 (3-OCH₃), 56.4 (3'-OCH₃)。核磁数据与文献^[14]报道一致, 故鉴定化合物 **9** 为 (+) 松脂酚-4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **10**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 521.2017 $[M + H]^+$ (计算值 521.1945), $[\alpha] = -53.2^\circ$ (c 1.15, MeOH), 分子式为 $C_{26}H_{32}O_{11}$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.01 (1H, brs, H-2), 7.13 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.90 (1H, brd, $J = 8.3$ Hz, H-6), 4.74 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-7), 3.10 (1H, overlap, H-8), 4.22 (2H, m, H-9), 6.92 (1H, brs, H-2'), 6.76 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.79 (1H, brd, $J = 8.3$ Hz, H-6'), 4.69 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-7'), 3.11 (1H, overlap, H-8'), 3.86 (2H, overlap, H-9'), 4.87 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.34 ~ 3.45 (4H, m, H-3''), 3.68 (1H, m, H-6'' α), 3.49 (1H, m, H-6'' β), 3.85 (3H, s, 4-OCH₃), 3.84 (3H, s, 4'-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 137.5 (C-1), 111.6 (C-2), 147.5 (C-3), 151.0 (C-4), 118.0 (C-5), 119.8 (C-6), 87.1 (C-7), 55.5 (C-8), 72.7 (C-9), 133.8 (C-1'), 111.0 (C-2'), 147.3 (C-3'), 149.1 (C-4'), 116.1 (C-5'), 120.1 (C-6'), 87.5 (C-7'), 55.3 (C-8'), 72.7 (C-9'), 102.8 (C-1''), 74.9 (C-2''), 77.8 (C-3''), 71.3 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.5 (C-6''), 56.8 (4-OCH₃), 56.4 (4'-OCH₃)。核磁数据与文献^[15]报道一致, 故鉴定化合物 **10** 为 4, 4'-dimethoxy-3'-hydroxy-7, 9': 7', 9'-diepoxylignan-3-*O*- β -D-glucopyranoside。

化合物 **11**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 523.2174 $[M + H]^+$ (计算值 523.2101), $[\alpha] = -17.6^\circ$ (c 0.34, MeOH), 分子式为 $C_{26}H_{34}O_{11}$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.79 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 6.71 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.64 (1H, d, $J = 1.9, 8.0$ Hz, H-6), 2.91 (1H, dd, $J = 5.0, 13.6$ Hz, H-7 α), 2.51 (1H, dd, $J = 11.1, 13.6$ Hz, H-7 β), 2.72 (1H, m, H-8), 4.00 (1H, dd, $J = 6.6, 8.3$ Hz, H-9 α), 3.70 (1H, m, H-9 β), 6.98 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 7.14 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.88 (1H, dd, $J = 1.9, 8.4$ Hz, H-6'),

4.83 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-7'), 2.35 (1H, m, H-8'), 3.74 (1H, dd, $J = 6.4, 8.4$ Hz, H-9 α), 3.64 (1H, m, H-9 β), 4.88 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.49 (1H, m, H-2''), 3.49 (1H, m, H-3''), 3.40 (1H, m, H-4''), 3.46 (1H, m, H-5''), 3.88 (1H, m, H-6'' α), 3.68 (1H, m, H-6'' β), 3.83 (3H, s, 3-OCH₃), 3.86 (3H, s, 3'-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 133.5 (C-1), 113.4 (C-2), 149.0 (C-3), 145.8 (C-4), 116.2 (C-5), 122.1 (C-6), 33.6 (C-7), 43.8 (C-8), 73.7 (C-9), 139.5 (C-1'), 111.3 (C-2'), 150.8 (C-3'), 147.3 (C-4'), 117.9 (C-5'), 119.6 (C-6'), 83.8 (C-7'), 54.1 (C-8'), 60.5 (C-9), 102.9 (C-1''), 75.0 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.4 (C-4''), 77.8 (C-5''), 62.5 (C-6''), 56.4 (3-OCH₃), 56.7 (3'-OCH₃)。核磁数据与文献^[16]报道一致, 故鉴定化合物 **11** 为 *lariciresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside*。

化合物 **12**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 539.2123 [M + H]⁺ (计算值 539.2050), $[\alpha] = -0.90^\circ$ (c 0.24, MeOH), 分子式为 C₂₆H₃₄O₁₂。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.14 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 6.73 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.84 (1H, dd, $J = 1.9, 8.2$ Hz, H-6), 4.72 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-7), 2.30 (1H, q, $J = 6.3$ Hz, H-8), 3.39 (2H, m, H-9), 7.00 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 7.08 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.87 (1H, dd, $J = 1.9, 8.2$ Hz, H-6'), 3.02 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-7 α), 2.96 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-7 β), 3.85 (1H, m, H-9 α), 3.74 (1H, m, H-9 β), 4.86 (1H, m, H-1''), 3.80 (1H, m, H-2''), 3.69 (1H, m, H-3''), 3.60 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-4''), 3.83 (1H, m, H-5''), 3.48 (2H, m, H-6''), 3.84 (3H, s, 3-OCH₃), 3.86 (3H, s, 3'-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 133.5 (C-1), 111.6 (C-2), 146.7 (C-3), 150.4 (C-4), 115.7 (C-5), 120.8 (C-6), 85.8 (C-7), 62.0 (C-8), 60.8 (C-9), 134.1 (C-1'), 116.2 (C-2'), 147.2 (C-3'), 149.1 (C-4'), 117.8 (C-5'), 124.0 (C-6'), 40.7 (C-7'), 82.5 (C-8'), 77.9 (C-9'), 103.0 (C-1''), 75.0 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.4 (C-4''), 78.0 (C-5''), 62.6 (C-6''), 56.7 (3-OCH₃), 56.4 (3'-OCH₃)。核磁数据与文献^[17]报道一致, 故鉴定化合物 **12** 为 *olivil-4'-O- β -D-glucopyranoside*。

化合物 **13**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 523.2174 [M + H]⁺ (计算值 523.2101), $[\alpha] = -30.3^\circ$ (c 0.15, MeOH), 分子式为 C₂₆H₃₄O₁₁。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.75 (1H, s, H-2), 6.50 (1H, s, H-5), 2.81 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7), 1.78 (1H, m, H-8), 3.69 (1H, m, H-9 α), 3.65 (1H, m, H-9 β), 6.68 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, H-2'), 6.74 (1H, brs, H-5'), 6.61 (1H, dd, $J = 1.9, 8.1$ Hz, H-6'), 3.84 (1H, m, H-7'), 2.04 (1H, m, H-8'), 3.68 (1H, m, H-9 α), 3.40 (1H, m, H-9 β), 4.38 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1''), 3.3 ~ 3.7 (6H, m, H-2''), 3.82 (3H, s, 3-OCH₃), 3.78 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 132.3 (C-1), 113.2 (C-2), 149.1 (C-3), 146.3 (C-4), 119.0 (C-5), 134.8 (C-6), 33.4 (C-7), 47.5 (C-8), 65.8 (C-9), 138.1 (C-1'), 113.9 (C-2'), 148.6 (C-3'), 146.2 (C-4'), 116.2 (C-5'), 123.3 (C-6'), 48.2 (C-7'), 39.9 (C-8'), 62.3 (C-9'), 103.4 (C-1''), 74.7 (C-2''), 77.9 (C-3''), 70.8 (C-4''), 78.0 (C-5''), 62.0 (C-6''), 56.4 (3-OCH₃), 56.8 (3'-OCH₃)。核磁数据与文献^[18]报道一致, 故鉴定化合物 **13** 为 *isolariciresinol-4-O- β -D-glucopyranoside*。

化合物 **14**: 白色针状结晶。HR-ESI-MS m/z : 373.1493 [M + H]⁺ (计算值 373.1420), $[\alpha] = -17.4^\circ$ (c 0.16, MeOH) 分子式为 C₁₇H₂₄O₉。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.74 (1H, s, H-3), 6.74 (1H, s, H-5), 6.54 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 6.32 (1H, dt, $J = 5.6, 15.8$ Hz, H-8), 4.21 (2H, dd, $J = 1.9, 5.6$ Hz, H-9), 4.86 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 3.20 (1H, m, H-2'), 3.47 (1H, m, H-3'), 3.41 (1H, m, H-4'), 3.40 (1H, m, H-5'), 3.77 (1H, dd, $J = 2.3, 12.0$ Hz, H-6' α), 3.66 (1H, dd, $J = 5.2, 12.0$ Hz, H-6' β), 3.85 (3H, s, 2-OCH₃), 3.85 (3H, s, 6-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 135.9 (C-1), 154.4 (C-2), 105.5 (C-3), 135.3 (C-4), 105.5 (C-5), 154.4 (C-6), 130.1 (C-7), 131.3 (C-8), 63.6 (C-9), 105.3 (C-1'), 75.7 (C-2'), 78.4 (C-3'), 71.3 (C-4'), 77.8 (C-5'), 62.6 (C-6'), 57.0 (2-OCH₃), 57.0 (6-OCH₃)。核磁数据与文献^[19]报道一致, 故鉴定化合物 **14** 为紫丁香苷。

化合物 **15**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z :

343.1387 $[M + H]^+$ (计算值 343.1315), $[\alpha] = -57.8^\circ$ (c 0.26, MeOH), 分子式为 $C_{16}H_{22}O_8$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.06 (1H, brs, H-2), 7.10 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.93 (1H, brd, $J = 8.3$ Hz, H-6), 6.54 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), 6.26 (1H, dt, $J = 5.6, 15.8$ Hz, H-8), 4.20 (2H, d, $J = 5.6$ Hz, H-9), 4.88 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1'), 3.46 (1H, m, H-2'), 3.39 (1H, m, H-3'), 3.46 (1H, m, H-4'), 3.39 (1H, m, H-5'), 3.85 (1H, overlap, H-6 α), 3.68 (1H, dd, $J = 5.3, 13.3$ Hz, H-6 β), 3.87 (3H, s, 3-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 133.7 (C-1), 111.4 (C-2), 150.9 (C-3), 147.7 (C-4), 118.0 (C-5), 120.8 (C-6), 131.3 (C-7), 128.9 (C-8), 63.7 (C-9), 102.8 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.4 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.5 (C-6'), 56.7 (3-OCH₃)。核磁数据与文献^[20]报道一致, 故鉴定 **15** 化合物为松柏昔。

化合物 **16**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 449.2381 $[M + H]^+$ (计算值 449.2308), $[\alpha] = -33.0^\circ$ (c 0.29, MeOH), 分子式为 $C_{21}H_{36}O_{10}$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.35 (1H, m, H-2), 2.04 (1H, m, H-3 α), 1.91 (1H, m, H-3 β), 1.78 (1H, m, H-4), 2.04 (1H, m, H-5 α), 1.68 (1H, m, H-5 β), 2.04 (1H, m, H-6 α), 1.29 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-6 β), 1.62 (3H, s, H-7), 1.17 (3H, s, H-9), 1.22 (3H, s, H-10), 4.44 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.12 (1H, dd, $J = 7.7, 9.1$ Hz, H-2'), 3.25 (1H, m, H-3'), 3.34 (1H, m, H-4'), 3.34 (1H, m, H-5'), 3.93 (1H, m, H-6 α), 3.75 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-6 β), 4.95 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-1''), 3.55 (1H, m, H-2''), 3.34 (1H, m, H-3''), 3.93 (1H, m, H-4''), 3.85 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-5'' α), 3.55 (1H, m, H-5'' β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 135.0 (C-1), 121.9 (C-2), 28.2 (C-3), 45.1 (C-4), 25.1 (C-5), 32.1 (C-6), 23.6 (C-7), 81.1 (C-8), 23.0 (C-9), 25.2 (C-10), 104.6 (C-1'), 71.7 (C-2'), 8.1 (C-3'), 75.2 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.6 (C-6'), 110.9 (C-1''), 75.4 (C-2''), 76.4 (C-3''), 71.9 (C-4''), 65.9 (C-5'')。核磁数据与文献^[21]报道一致, 故鉴定化合物 **16** 为 (4 ξ)- α -terpineol 8- O -[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranoside)。

化合物 **17**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z :

395.1912 $[M + H]^+$ (计算值 395.1839), $[\alpha] = -36.4^\circ$ (c 0.52, MeOH), 分子式为 $C_{17}H_{30}O_{10}$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.85 (2H, m, H-1), 2.38 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, H-2), 5.45 (1H, dt, $J = 7.1, 10.8$ Hz, H-3), 5.38 (1H, dt, $J = 7.1, 10.8$ Hz, H-4), 2.08 (2H, m, H-5), 0.97 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 4.27 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.49 (1H, m, H-2'), 3.35 (1H, m, H-3'), 3.19 (1H, m, H-4'), 3.43 (1H, m, H-5'), 3.19 (2H, m, H-6'), 4.32 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 3.55 (1H, m, H-2''), 3.35 (1H, m, H-3''), 3.29 (1H, overlap, H-4''), 4.09 (1H, dd, $J = 2.1, 11.6$ Hz, H-5'' α), 3.74 (1H, dd, $J = 5.6, 11.6$ Hz, H-5'' β); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 70.6 (C-1), 28.8 (C-2), 125.9 (C-3), 134.5 (C-4), 21.6 (C-5), 14.7 (C-6), 104.4 (C-1'), 74.8 (C-2'), 77.9 (C-3'), 71.2 (C-4'), 77.7 (C-5'), 69.7 (C-6'), 105.5 (C-1''), 75.0 (C-2''), 76.9 (C-3''), 71.4 (C-4''), 66.9 (C-5'')。核磁数据与文献^[22]报道一致, 故鉴定化合物 **17** 为 (*Z*)-3-hexenyl β -D-glucopyranoside。

化合物 **18**: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z : 403.1599 $[M + H]^+$ (计算值 403.1526), $[\alpha] = -66.7^\circ$ (c 0.73, MeOH), 分子式为 $C_{18}H_{26}O_{10}$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ : 7.56 (1H, m, H-2), 7.38 (1H, m, H-3), 7.29 (1H, m, H-4), 7.38 (1H, m, H-5), 7.56 (1H, m, H-6), 5.22 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, H-6 α), 4.83 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, H-6 β), 4.91 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.35 (1H, dd, $J = 2.5, 11.4$ Hz, H-6'), 5.04 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 4.87 (1H, dd, $J = 1.9, 11.4$ Hz, H-5'' α), 4.37 (1H, dd, $J = 1.2, 11.4$ Hz, H-5'' β); ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) δ : 139.0 (C-1), 128.7 (C-2), 128.6 (C-3), 127.8 (C-4), 128.6 (C-5), 128.7 (C-6), 71.8 (C-7), 103.9 (C-1'), 75.2 (C-2'), 78.6 (C-3'), 71.2 (C-4'), 77.4 (C-5'), 70.1 (C-6'), 106.2 (C-1''), 75.1 (C-2''), 78.4 (C-3''), 71.0 (C-4''), 67.3 (C-5'')。核磁数据与文献^[23]报道一致, 故鉴定化合物 **18** 为苯甲醇- β -巢菜糖苷。

化合物 **19**: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS m/z : 447.1497 $[M + H]^+$ (计算值 447.1424), $[\alpha] = -85.3^\circ$ (c 0.78, MeOH), 分子式为 $C_{19}H_{26}O_{12}$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.44 (1H, d,

$J = 8.4$ Hz, H-3), 7.56 (1H, m, H-4), 7.12 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-5), 7.75 (1H, dd, $J = 1.4, 7.6$ Hz, H-6), 4.86 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.32 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.88 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 122.3 (C-1), 158.6 (C-2), 119.2 (C-3), 135.4 (C-4), 123.7 (C-5), 132.1 (C-6), 168.6 (C-7), 103.9 (C-1'), 77.7 (C-2'), 77.6 (C-3'), 77.4 (C-4'), 75.0 (C-5'), 75.0 (C-6'), 105.5 (C-1''), 71.3 (C-2''), 71.2 (C-3''), 69.9 (C-4''), 66.9 (C-5''), 52.8 (7-OCH₃)。核磁数据与文献^[24]报道一致,故鉴定化合物 19 为冬绿苷。

4 讨论

本研究从紫丁香叶中共分离鉴定出 19 个化合物,包括 8 个单萜苷类、8 个苯丙素类、3 个其他类化合物。化合物 5、10、15、16~19 为首次从丁香属分离得到,化合物 4、6、12 为首次从紫丁香中分离得到。紫丁香叶中的化学成分具有抗病毒^[25]、神经保护^[26]、镇痛、镇静^[27]等其他药理作用,本文分离鉴别得到的化合物可能为其发挥药效的物质基础。本研究不仅丰富了紫丁香叶化学成分,也可为后续的药理学以及药效物质基础研究提供参考。

参考文献

- [1] Zhu WB, Su FZ, Sun YP, et al. Antipharyngitis Effects of *Syringa oblata* L. ethanolic extract in acute pharyngitis rat model and anti-inflammatory effect of iridoids in LPS-induced RAW 264.7 cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 5111752.
- [2] 张喜武, 杨斯棋, 李永吉, 等. 基于丁香苦苷抗菌药效研究的丁香叶质量标志物指认 [J]. 中医学报, 2020, 48 (11): 23-27.
- [3] 胡闪闪. 紫丁香苷对 D-GalN/LPS 诱导的小鼠肝损伤的保护作用研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2023.
- [4] Li ZQ, Zhang HN, Li WT, et al. Potential antioxidative components from *Syringa oblata* Lindl stems revealed by affinity ultrafiltration with multiple drug targets [J]. Bioorg Chem, 2023, 138: 106604.
- [5] 李美谦, 康凯, 杨立群. 丁香苦苷对 2 型糖尿病小鼠降糖效果的实验研究 [J]. 现代预防医学, 2015, 42 (3): 492-494.
- [6] 马瑾煜, 刘珊瑚, 焦顺刚, 等. 丁香属植物的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (8): 1833-1843.
- [7] 祝文博, 孙延平, 王知斌, 等. 紫丁香叶化学成分研究 [J]. 中成药, 2022, 44 (12): 3872-3878.
- [8] 张树军, 时志春, 王丹, 等. 紫丁香树叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49 (16): 3747-3757.
- [9] 张泉修, 刘艳丽, 李笑然, 等. 广西毛冬青的化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (9): 1730-1734.
- [10] Iossifova T, Vogler B, Kostova I. Secoiridoid glucosides from *Fraxinus ornus* bark [J]. Phytochemistry, 1998, 49 (5): 1329-1332.
- [11] He ZD, Ueda S, Inoue K, et al. Secoiridoid glucosides from *Fraxinus malacophylla* [J]. Phytochemistry, 1993, 35 (1): 177-181.
- [12] 陈祥泰. 广西毛冬青根部化学成分研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2018.
- [13] 梁玮. 羊耳蒜化学成分及生物活性研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [14] 刘艳, 刘培, 黄金, 等. 北柴胡地上部分苯丙素及其抗肿瘤增殖活性 [J]. 中成药, 2022, 44 (7): 2176-2186.
- [15] 李宁谭, 周俊. 大叶仙茅中一个新的木脂素苷 (英文) [J]. 云南植物研究, 2003, 25 (6): 711-716.
- [16] 侯萍, 任晨阳, 黄艳, 等. 红叶野桐叶中的木脂素类化合物 [J]. 广西植物, 2024, 44 (6): 1151-1158.
- [17] Tomassini L, Ventrone A, Frezza C, et al. Lignans and secoiridoid glycosides from the stem barks of *Jasminum tortuosum* [J]. Nat Prod Res, 2018, 32 (15): 1853-1857.
- [18] 胡瑞航, 殷鑫, 周永强, 等. 百两金根的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57 (8): 605-612.
- [19] 张美素, 聂雨杉, 汪洋, 等. 水冬瓜中苯丙素类化学成分研究 [J]. 中药材, 2024, 47 (4): 887-891.
- [20] 刘艳, 尧俊涵, 梅瑀, 等. 红景天化学成分研究 [J]. 中草药, 2024, 55 (9): 2875-2886.
- [21] Kikuchi T, Zhang J, Huang Y, et al. Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Momordica charantia* [J]. Chem Biodivers, 2012, 9 (7): 1221-1230.
- [22] 杨郁, 徐锐, 李长伟, 等. 榿木水溶性化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57 (11): 886-889.
- [23] 崔微, 郑琇梅, 李虹霞, 等. 鲜地黄的化学成分研究 [J]. 中药材, 2022, 45 (10): 2369-2375.
- [24] 何婷, 赵怡程, 李鹏跃, 等. 滇白珠抗炎镇痛活性部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (17): 3469-3474.
- [25] Zhang YC, Xu JY, Liu CM, et al. Screening of neuraminidase inhibitors from the leaves of *Syringa velutina* Kom. via compound fractionation and in vitro activity evaluation [J]. Anal Methods-UK, 2017, 9 (3): 500-510.
- [26] Park KJ, Suh WS, Subedi L, et al. Secoiridoid glucosides from the twigs of *Syringa oblata* var. *dilatata* and their neuroprotective and cytotoxic activities [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2017, 65 (4): 359-364.
- [27] Xu JX, Tai B, Jiao SG, et al. The ethanol extract of *Syringa oblata* Heartwood, a mongolian folk medicine containing major lignans, exerts analgesic and sedative effects on mice [J]. Chem Biodivers, 2023, 20 (1): e202200984.

(收稿日期: 2024-05-06; 修回日期: 2024-06-20)

木犀草素药 - 药共晶的制备、性质及生物利用度研究

李静萍, 陈新科, 蒋才武*, 邓刚 (广西中医药大学, 广西壮瑶药重点实验室, 南宁 530200)

摘要: **目的** 合成木犀草素-5-氟尿嘧啶 (LU-5-FU) 和木犀草素-烟酸 (LU-NA) 共晶, 增加木犀草素的水溶性及其生物利用度。**方法** 通过湿法研磨法和溶剂法设计合成两个药物-药物共晶, 采用粉末 X 射线衍射、红外光谱、差热分析和磁共振谱等技术对其进行表征, 利用高效液相色谱法研究其在 pH 1.2 盐酸溶液中的体外溶出度, 并在大鼠体内进行药动学研究, 计算主要药动学参数。**结果** LU-5-FU 共晶和 LU-NA 共晶出现了特征光谱; 在 pH 1.2 盐酸溶液中最大溶出度分别提高 2320% 和 300%; 药动学实验中, LU-5-FU 共晶和 LU-NA 共晶的最大血药浓度 (C_{max})、曲线下面积 ($AUC_{0\sim t}$) 与木犀草素原料药相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 共晶的 C_{max} 与 $AUC_{0\sim t}$ 对比原料药有显著提高, 其相对生物利用度分别为 850% 和 560%。**结论** 合成了两个化学计量比为 1:1 的目标共晶, 它们能够显著提高木犀草素的体外溶出度和体内生物利用度。

关键词: 木犀草素; 5-氟尿嘧啶; 烟酸; 药物共晶; 溶出度; 生物利用度

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3215-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.013

Preparation, properties and bioavailability of drug-drug cocrystal of luteolin

LI Jing-ping, CHEN Xin-ke, JIANG Cai-wu*, DENG Gang (Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Medicine, Nanning 530200)

Abstract: Objective To synthesize luteolin-5-fluorouracil (LU-5-FU cocrystal) and luteolin-nicotinic acid (LU-NA cocrystal) cocrystals and improve their water solubility and bioavailability. **Methods** Two drug-drug cocrystals were designed and synthesized by wet grinding and solvent method. They were characterized by powder X-ray diffraction, infrared spectroscopy, differential thermal analysis and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Their in vitro dissolution in pH 1.2 hydrochloric acid solution was determined by high performance liquid chromatography. The main pharmacokinetic parameters of rats were calculated. **Results** The characteristic spectra of LU-5-FU cocrystal and LU-NA cocrystal appeared. The maximum dissolution rate in the pH 1.2 hydrochloric acid solution increased by 2320% and 300%, respectively. In the pharmacokinetic experiments, there was a significant difference ($P < 0.05$) in the maximum blood drug concentration (C_{max}) and area under the curve ($AUC_{0\sim t}$) of LU-5-FU cocrystal and LU-NA cocrystal as compared with the raw material of luteolin. The C_{max} and $AUC_{0\sim t}$ were greatly improved as compared with the raw material of luteolin, with relative bioavailability at 850% and 560%, respectively. **Conclusion** Two target cocrystals with a stoichiometric ratio of 1:1 are synthesized, whose in vitro dissolution and in vivo bioavailability of luteolin have been improved.

Key words: luteolin; 5-fluorouracil; nicotinic acid; drug cocrystal; dissolution; bioavailability

药物共晶, 是指活性药物成分 (API) 和共晶形成物在氢键或其他非共价键的作用下结合而成的具有特定化学计量比的晶体, 可增加 API 的

形态, 改善药物的诸多性质, 如溶解度、稳定性、机械性质、生物利用度等^[1], 是近年来解决创新药成药性问题和开发改良型新药的新技术。形成

基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (No.2023GXNSFAA026292); 广西壮瑶药重点实验室开放课题 (No. 桂科基字 [2014]32 号)。

作者简介: 李静萍, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药制剂研究与开发, email: 2427993028@qq.com * **通信作者:** 蒋才武, 男, 教授, 主要从事中药制剂研究与开发, email: jiangcw@gxctmu.edu.cn

共晶主要依靠氢键的作用, 需要分子结构中有形成氢键的官能团, 根据法规, 共晶形成物一般是公认安全的物质, 包括药用辅料、营养保健品等, 也可以是药物分子, 即形成药物-药物共晶。

木犀草素 (LU) 是一类天然黄酮类化合物, 具有多种药理作用^[2-8], 但其溶解度小, 限制了应用, 因此考虑制成共晶改善其水溶性^[9-10]。根据氢键形成规则和药理作用, 本文选择 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 和烟酸 (NA) 作为共晶配体。在药理上, 木犀草素具有抗肿瘤和改善心血管功能的作用, 5-氟尿嘧啶是临床抗代谢类抗肿瘤药物, 烟酸可用于治疗高脂血症和高血压, 因此, 联合使用可产生协同增效作用。在结构上, 木犀草素分子中含有芳香环结构和多个 -OH, 可作为氢键的供体, 烟酸和 5-氟尿嘧啶的 O、N 原子均可作为氢键的受体, 其药物共晶也是研究的热点^[10-17]。因此, 本文制备了木犀草素-5-氟尿嘧啶 (LU-5FU) 和木犀草素-烟酸 (FU-NA) 两个新型具有协同增效作用的药物-药物共晶。

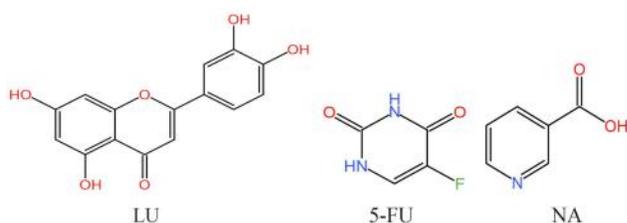


图 1 木犀草素 (LU)、5-氟尿嘧啶 (5-FU) 和烟酸 (NA) 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of luteolin (LU), 5-fluorouracil (5-FU) and nicotinic acid (NA)

1 材料

1.1 仪器

Mini Flex 600 粉末衍射仪、STA449F5 同步热分析仪 (日本理学株式会社); PerkinElmer 傅里叶红外光谱仪 (Llantisant, UK); Ascend 600M 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); SOP 型电子天平 (赛多利斯公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌机 (上海力辰邦西仪器科技有限公司)。

1.2 试药

木犀草素对照品 (纯度: 99.6%, 中国食品药品检定研究院, 批号: A2GF-WXQZ), 木犀草素供试品 (纯度: 98%, 批号: C12617611)、5-氟尿嘧啶 (纯度: 98%, 批号: C13454414) (上海麦克林生化科技股份有限公司); 烟酸 (纯度: 98%, 阿拉丁试剂有限公司); 甲醇、无水乙醇、乙腈 (AR, 广东光华科技股份有限公司); 甲酸

(色谱纯, 赛默飞世尔科技公司); 甲酸 (AR, 国药集团)。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠 [雌雄各半, 体重 (200±5) g, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004]。

2 方法与结果

2.1 木犀草素含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Acclaim C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水 (65:35), 检测波长为 349 nm, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。

2.1.2 线性关系考察 精密称取木犀草素对照品 4 mg 于 20 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 得到 0.2 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。用甲醇逐步稀释成质量浓度为 0.05、0.4、1、4、16 μg·mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 进样测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果为 $Y = 38.55X - 0.7284$, $R^2 = 1.000$ 。

2.1.3 精密度考察 取高、中、低质量浓度 (16.0、4.0、0.4 μg·mL⁻¹) 的木犀草素对照品溶液, 按照“2.1.1”项下条件分别连续进样 6 次, 结果木犀草素峰面积的 RSD 值分别为 0.70%、1.1%、4.1%。

2.1.4 稳定性考察 精密称取木犀草素供试品 2 mg 于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 得到 4 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液。分别于 0、1、5、18、22、67 h 进样测定木犀草素的峰面积变化情况, 结果显示其峰面积的 RSD 为 1.2%。

2.1.5 重复性考察 按照“2.1.4”项下方法制备 4 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 平行配制 6 份。按照“2.1.1”项下色谱条件分别进样测定, 结果显示木犀草素峰面积的 RSD 为 1.1%。

2.1.6 加样回收试验 取“2.1.5”项下的溶液适量, 加入木犀草素对照品, 配制 100% 浓度加样回收率溶液 ($n = 6$), 进样分析, 结果显示回收率为 98.3%, RSD 值小于 10%。

2.2 共晶的制备

2.2.1 LU-5-FU 共晶的制备 分别精密称取木犀草素供试品 286 mg (1 mmol) 和 5-氟尿嘧啶 130 mg (1 mmol) 置于玛瑙研钵中, 滴入 3~5 滴甲醇-乙腈 (1:1, V/V), 研磨至溶剂挥干。将上述研磨产物粉置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 30 mL 甲醇-乙腈 (1:1, V/V) 溶液, 在 50 °C 下回流搅拌 6 h 至沉淀完全溶解, 在室温下静置挥发, 即得 LU-5-FU 共晶。

2.2.2 LU-NA 共晶的制备 分别精密称取木犀草素供试品 286 mg (1 mmol) 与烟酸 126 mg (1 mmol) 放进研钵中, 混匀, 滴加 1 mL 50% 乙醇, 充分研磨至溶剂挥干, 放入圆底烧瓶中, 加入 60 mL 50% 乙醇, 室温搅拌 12 h, 于室温下静置挥发, 即得 LU-NA 共晶。

2.3 共晶的表征

2.3.1 X-射线粉末衍射 (PXRD) 使用 Mini Flex 600 X-射线粉末衍射仪对样品进行检测。设置 2θ 扫描范围为 $3^\circ \sim 40^\circ$, 扫描速度为 $10^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, 步长为 0.02° , 粉末衍射数据采用 Origin 软件处理。结果见图 2, LU-5-FU 共晶在 9.76° 、 9.97° 、 11.98° 、 19.03° 、 20.62° 、 22.14° 、 23.58° 处出现新的特征峰, LU-NA 共晶在 7.27° 、 13.45° 、 15.23° 、 22.50° 处出现新的特征峰, 说明新相形成。

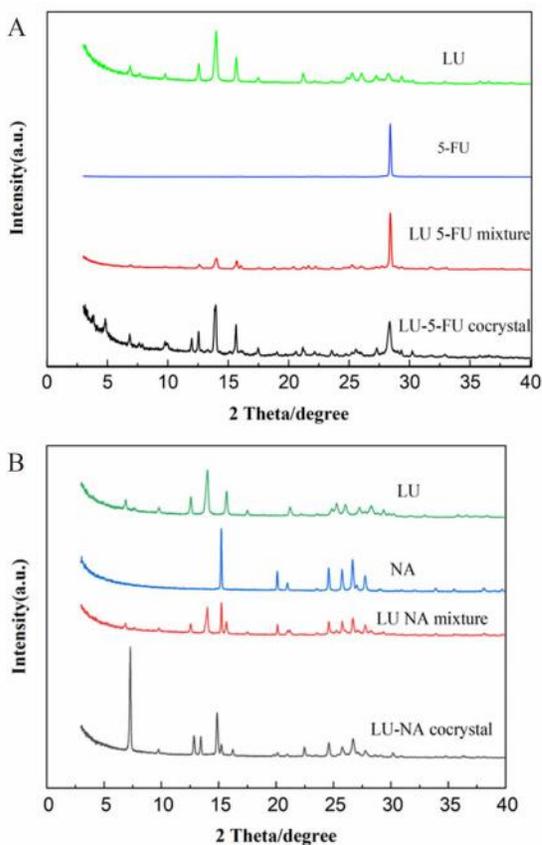


图 2 LU-5-FU (A) 和 LU-NA (B) 的粉末衍射图
Fig 2 Powder X-ray diffraction patterns of LU-5-FU (A) and LU-NA (B)

2.3.2 傅里叶变换红外光谱法 (FT-IR) 分别测试原料药、共晶的红外光谱, 在 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 进行扫描, 结果见图 3。木犀草素 $\nu_{\text{O-H}}$ 峰位于 3392 cm^{-1} , LU-5-FU 共晶 $\nu_{\text{O-H}}$ 峰位于 3580 cm^{-1} ; 木犀草素 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰位于 1664 cm^{-1} , 5-氟尿嘧啶 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰位于 1672 cm^{-1} , LU-5-FU 共晶 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰位于 1651 cm^{-1} 。木犀草素 $\nu_{\text{O-H}}$ 峰位于

3393 cm^{-1} , 烟酸 $\nu_{\text{O-H}}$ 峰位于 3076 cm^{-1} , LU-NA 共晶 $\nu_{\text{O-H}}$ 峰位于 3411 cm^{-1} ; 木犀草素 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰位于 1667 cm^{-1} , 烟酸 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰位于 1707 cm^{-1} , LU-NA 共晶 $\nu_{\text{C=O}}$ 峰位于 1654 cm^{-1} 。说明共晶中木犀草素羟基与 5-氟尿嘧啶、烟酸中羰基形成氢键, 引起木犀草素羟基峰发生蓝移、烟酸羰基峰发生红移。

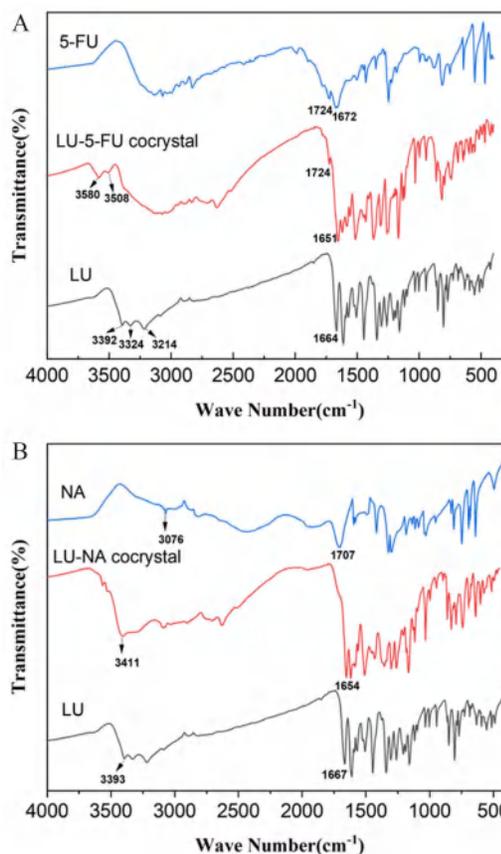


图 3 LU-5-FU (A) 和 LU-NA (B) 的红外光谱图
Fig 3 Infrared patterns of LU-5-FU (A) and LU-NA (B)

2.3.3 差示扫描量热法 (DSC) 由 Rigaku DSC 差示扫描量热仪对样品进行 DSC 测定。精密称重待测样品约 3 mg, 装入铝坩埚中, 以空坩埚作参比, 扫描速度: $5^\circ \text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 以氮气作为保护气体及吹扫气, N1 流速: $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, N2 流速: $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 测试温度为室温至 400°C 。数据采用 Origin 软件处理。测试曲线如图 4 所示, 共晶的熔化峰在两个共形成物的熔点之间或比两者的更小, 说明共晶新相形成。

2.3.4 核磁共振法 ($^1\text{H NMR}$) 称取 3 mg 共晶样品于核磁管中, 加入 0.6 mL 二甲基亚砜- d_6 ($\text{DMSO-}d_6$), 完全溶解后, 利用 600 M 核磁共振波谱仪进行核磁氢谱测试。结果显示, LU-5-FU 共晶的 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz , $\text{DMSO-}d_6$): δ 12.97 (1H, s, 5-OH), 10.84 (1H, s, 7-OH), 9.93

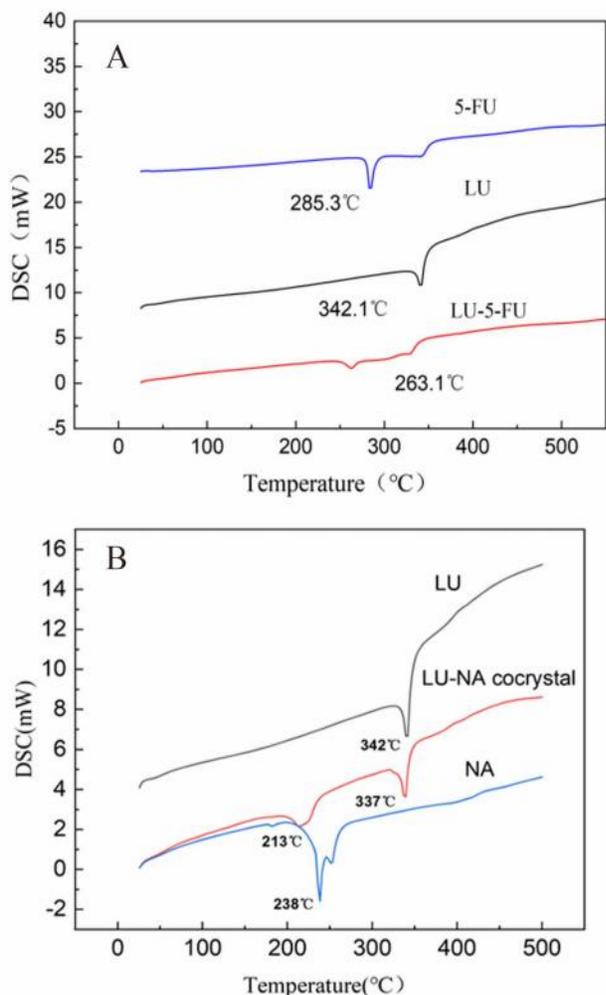


图 4 LU-5-FU (A) 和 LU-NA (B) 的差示扫描量热图
Fig 4 DSC patterns of LU-5-FU (A) and LU-NA (B)

(1H, s, 4'-OH), 9.42 (1H, s, 3'-OH), 7.76 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, 2'-H), 7.41 (1H, dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, 6'-H), 6.88 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 5'-H), 6.67 (1H, s, 3-H), 6.44 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, 8-H), 6.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 6-H) 归属为木犀草素特征峰^[18]; 7.39 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, 1'-H) 归属为 5-氟尿嘧啶特征峰。分别选取木犀草素和 5-氟尿嘧啶的特征峰进行积分, 木犀草素的特征峰化学位移 12.97 积分为 0.97, 5-氟尿嘧啶的特征峰 1'-H 化学位移 7.39 积分为 1.00, 以上结果表明 LU-5-FU 共晶是由木犀草素和 5-氟尿嘧啶组成, 摩尔比为 1 : 1。LU-NA 共晶的 ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.99 (1H, s, 5-OH), 7.42 (1H, dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, 6-H), 6.89 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 5-OH), 6.68 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 归属为木犀草素特征峰^[19]; 9.08 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 8.79

(1H, dd, $J = 4.8, 1.7$ Hz, H-6), 8.27 (1H, m, $J = 7.9, 1.9$ Hz, H-4), 7.55 (1H, dd, $J = 7.9, 4.8$ Hz, H-5), 归属为烟酸特征峰^[20]。分别选取木犀草素和烟酸的特征峰进行积分, 木犀草素特征峰 5-OH 的化学位移 12.99 积分为 1, 烟酸的特征峰 H-6 化学位移 8.79 积分为 1.01, 以上结果表明 LU-NA 共晶由木犀草素和烟酸组成, 其摩尔比为 1 : 1。

2.4 共晶的体外溶出度研究

在圆底烧瓶中加入 50 mL 的盐酸缓冲溶液 (pH 约 1.2), 在 37 °C 下预热 30 min, 精密称取 1 mg 的木犀草素供试品、LU-5-FU 共晶、LU-NA 共晶置于圆底烧瓶中, 37 °C 下以 15 r · min⁻¹ 搅拌, 分别在 5、15、30、60 min 及 2、4 h 取 1 mL 溶液, 过滤, 补充相同体积的原溶液, 重复做 3 次。过滤液在 40 °C 下氮气吹去溶剂, 加 200 μ L 甲醇复溶, 按“2.1.1”项下方法进行含量测定。结果见图 5, 由溶出曲线可以看出, 共晶在不同时间点的溶出度都高于原料, LU-5-FU 共晶在前 2 h 平均溶出度是原料的 13.1 倍, 最高达 24.2 倍。LU-NA 共晶在前 2 h 平均溶出度是木犀草素原料的 2.9 倍, 最高达 4 倍。说明共晶具有改善溶解度, 提高溶出速率的作用。

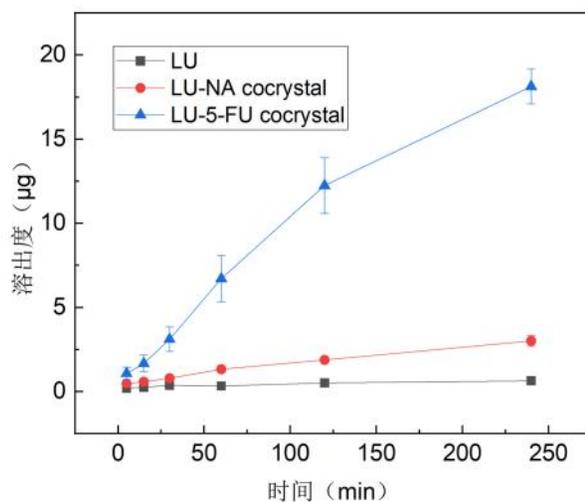


图 5 木犀草素及其共晶溶出曲线图
Fig 5 Dissolution curve of luteolin and its cocrystal

2.5 药动学研究

2.5.1 动物实验步骤

取木犀草素供试品、LU-5-FU 共晶、LU-NA 共晶适量, 用 0.5% CMC-Na 溶液配制成 10 mg · mL⁻¹ 的混悬液作为灌胃溶液。取 SD 大鼠 18 只, 雌雄各半, 随机分为 3 组, 每组 6 只。于实验室环境中适应 5 d, 自由喝水。给药前禁食 12 h (但不限饮水), 按 100 mg · kg⁻¹

剂量灌胃。各组大鼠于实验开始 5、15、30、45 min, 1、1.5、2、3、6、9、12 h 眼内眦静脉丛取血约 0.4 mL 置肝素抗凝管, 5000 r · min⁻¹ 离心 10 min ($r = 6$ cm)。精密吸取肝素抗凝血浆 100 μL, 转移至另一空白离心管中, 放入 -20 °C 的冰箱保存, 等待分析。分析前解冻, 向装有血浆 100 μL 的离心管中加入 0.1% 甲酸-乙腈 400 μL, 漩涡 5 min, 离心 (13 000 r · min⁻¹, $r = 6$ cm) 10 min。取上清液 300 μL 置于进样瓶内衬管, 氮气吹去有机溶剂, 100 μL 甲醇复溶沉淀物。按“2.1.1”项下方法, 进样 50 μL, 由 Origin 绘制血药浓度-时间曲线, SPSS 统计分析数据。

2.5.2 对照品溶液的配制 精密称取木犀草素对照品 2 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 得到 0.2 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液。用甲醇逐步稀释成质量浓度为 0.03、0.1、0.25、0.5、1 μg · mL⁻¹ 的系列对照品溶液。

2.5.3 专属性及线性曲线考察 取装有 100 μL 大鼠空白血浆的离心管, 分别精密量取 100 μL 的质量浓度为 0.03、0.1、0.25、0.5、1 μg · mL⁻¹ 的系列对照品溶液置于离心管内, 并加入 0.1% 甲酸-乙腈 300 μL, 漩涡 5 min, 离心 (13 000 r · min⁻¹, $r = 6$ cm) 10 min。取上清液 300 μL 于进样瓶内衬管, 氮气吹去有机溶剂, 100 μL 甲醇复溶沉淀物。进样 50 μL, 记录 HPLC 色谱峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标制作标准曲线, 回归方程为 $Y = 21.741X + 0.0645$, $R^2 = 0.9991$ 。

2.5.4 方法学考察 取低、中、高质量浓度 (0.1、0.5、1 μg · mL⁻¹) 的血浆对照品溶液, 日内精密度结果显示, 低、中、高浓度木犀草素血浆溶液的 RSD 值分别为 3.8%、2.4%、1.2% ($n = 3$), 日间精密度 RSD 结果分别为 8.5%、7.9%、7.3% ($n = 3$)。按“2.5.2”项下方法配制质量浓度为 0.1、0.5、1 μg · mL⁻¹ 的木犀草素供试品溶液, 按“2.5.3”项下方法配制相应的血浆样品溶液, 用 HPLC 分析, 代入线性回归方程计算含量, 以测定质量浓度与配制质量浓度的比值作回收率。结果回收率在 94.6% ~ 106.0%。取 0.5 μg · mL⁻¹ 的血浆供试品溶液, 连续 3 d 进样分析, 结果显示其 RSD 为 8.0%, 可以认为其稳定。

2.5.5 药动学实验结果 绘制血药浓度-时间曲线见图 6, 木犀草素进入血液的量非常少, 几乎不吸收, 而共晶各个时间点的血药浓度均高于原料药, 说明共晶入血速度快, 生物利用度高, 且在较长时间内维持较高浓度, 说明共晶中的木

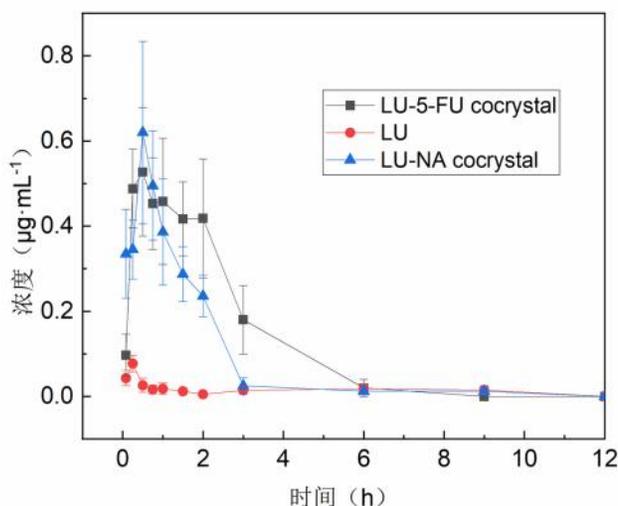


图 6 木犀草素及其共晶药物浓度-时间曲线图

Fig 6 Profiles of plasma concentration-time of luteolin and its cocrystal

表 1 木犀草素及其共晶的药动学参数表 ($n = 6$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of luteolin and its cocrystal ($n = 6$)

化合物	t_{max}/h	$C_{max}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$AUC_{0 \sim t}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	F
LU	0.19 ± 0.03	0.87 ± 0.02	0.17 ± 0.1094	1
LU-5-FU 共晶	1.12 ± 0.30 ^{###}	0.74 ± 0.15 ^{###}	1.47 ± 0.5121 ^{###}	8.50
LU-NA 共晶	0.43 ± 0.09	0.78 ± 0.13 ^{###}	0.97 ± 0.3307 [#]	5.60

注 (Note): vs LU group, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$ 。

犀草素在体内作用时间长。主要药动学参数见表 1, 共晶的 C_{max} 、 $AUC_{0 \sim t}$ 与木犀草素原料药相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 共晶的 C_{max} 与 $AUC_{0 \sim t}$ 对比原料药木犀草素有显著提高, LU-NA 共晶与木犀草素的 t_{max} 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 LU-5-FU 共晶的 t_{max} 显著延后 ($P < 0.01$)。结果表明, 共晶可明显提高药物吸收入血的速度和程度, 进一步提高木犀草素的进入体循环的量, 其相对生物利用度分别是原料的 8.5 倍和 5.6 倍。

3 讨论

木犀草素在水中溶解度低, 在冷水中几乎不溶, 热水中略微溶解。实验表明, 制成共晶可明显改善其溶出度和生物利用度, 其中, LU-5-FU 共晶在短时间内能达到较高血药浓度, 并显示出较慢的体内消除速度, 这使得药物在体内停留时间延长, 增强临床疗效, 且两者具有不同的抗肿瘤作用靶点, 联合应用可能产生协同增效的效果。此外, 共晶可以减少药物的用量, 发挥药效的同时减少毒性。

本文成功合成了 LU-5-FU 和 LU-NA 两种药物-药物共晶, 通过 X 射线衍射、DSC、红外光谱和核磁共振进行了结构表征。结果表明, 合成

了摩尔比为 1 : 1 的目标药物 - 药物共晶, 与原料药木犀草素相比, 共晶在 pH 1.2 的盐酸溶液中溶解度显著增加, 其中, LU-5-FU 共晶的溶解度改善更为显著。体内实验也表明共晶能增加木犀草素口服用药的生物利用度, 同时也为临床抗肿瘤药物 5- 氟尿嘧啶与中药联用新剂型开发提供研究基础, 具有重大的理论和实际意义。

参考文献

- [1] 尹苗苗, 尚海花, 侯越, 等. 共晶改善黄酮类化合物成药性能的研究进展[J]. 中南药学, 2024, 22 (3): 715-723.
- [2] Rocchetti MT, Bellanti F, Zadorozhna M, et al. Multi-faceted role of luteolin in cancer metastasis: EMT, angiogenesis, ECM degradation and apoptosis [J]. Int J Boil Macromol, 2023, 242: 125059.
- [3] Cetinkaya M, Baran Y. Therapeutic potential of luteolin on cancer [J]. Vaccines, 2023, 11 (3): 554.
- [4] Geng YF, Yang C, Zhang Y, et al. An innovative role for luteolin as a natural quorum sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Life Sci, 2021, 274: 119325-119325.
- [5] Attiq A, Jali JY, Husain K, et al. Luteolin and apigenin derived glycosides from *Alphonsea elliptica* abrogate LPS-induced inflammatory responses in human plasma [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114120-114120.
- [6] 姚玲, 程靖, 邱璐琦, 等. 基于网络药理学及实验验证探究益肾活血方治疗肾纤维化的作用机制 [J]. 中南药学, 2023, 21 (7): 1786-1793.
- [7] 李兰林, 孙晓博, 向大雄. 天然药物中有效成分抗类风湿性关节炎研究进展 [J]. 中南药学, 2011, 9 (2): 130-134.
- [8] 刘小芬, 蔡洪鲲, 罗孟君, 等. RP-HPLC 法同时测定裸花紫珠分散片中 5 种有效成分的含量 [J]. 中南药学, 2016, 14 (5): 532-535.
- [9] Tan X, Yang Y, Xu JG, et al. Luteolin exerts neuroprotection via modulation of the p62/keap1/Nrf2 pathway in Intracerebral hemorrhage [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1551.
- [10] Yin HM, Xie JY, Jiang JY, et al. Strategy to tune the performance of two drug components: drug-drug cocrystals of lobaplatin with flavonoids [J]. Cryst Growth Des, 2022, 22 (4): 2602-2610.
- [11] Lv WT, Liu XX, Dai X. L, et al. A 5-fluorouracil-kaempferol drug-drug cocrystal: a ternary phase diagram, characterization and property evaluation [J]. Cryst Eng Comm, 2020, 22 (46): 8127-8135.
- [12] Hao H, Zhang Y, Hu XX, et al. Cocrystallization of 5-fluorouracil with gallic acid: a novel 5-fluorouracil cocrystal displaying synergistic anti-tumor activity both in oral and intraperitoneal injection administration [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2023, 187: 12-23.
- [13] Yu YM, Bu FZ, Yu Y, et al. 5-fluorouracil-caffeic acid cocrystal delivery agent with long-term and synergistic high-performance antitumor effects [J]. Nanomedicine, 2022, 17 (30): 2215-2229.
- [14] Yu YM, Bu FZ, Meng SS, et al. The first marine dual-drug cocrystal of cytarabine with 5-fluorouracil having synergistic antitumor effects shows superior biopharmaceutical peculiarities by oral administration [J]. Int J Pharmaceut, 2022, 629: 122386.
- [15] Hao H, Jia XM, Ren TT, et al. Novel insight into the mechanism underlying synergistic cytotoxicity from two components in 5-fluorouracil-phenylalanine co-crystal based on cell metabolomics [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2022, 180: 181-189.
- [16] Yu YM, Niu YY, Wang LY, et al. Supramolecular self-assembly of amantadine hydrochloride with ferulic acid via dual optimization strategy establishes a precedent of synergistic antiviral drug-phenolic acid nutraceutical [J]. cocrystal Analyst, 2021, 146 (8): 2506-2519.
- [17] Li M, Yang Z, Zhang Y, et al. Synthesis, crystal structure, and solubility study of a supramolecular assembly cocrystal formed by levofloxacin and nicotinic acid [J]. J Mol Struct, 2022, 1249: 31549.
- [18] Prabha EAJY, Sangeetha R, Langeswaran K, et al. Experimental, and theoretical investigations on the structure and vibrational spectral analysis of oxalate complex of nicotinamide and computational scrutiny against prostate cancer [J]. J Biomol Struct Dyn, 2021, 40 (13): 5903-5916.
- [19] 张体灯, 潘瑞娥, 毕志明, 等. 金花忍冬地上部分的黄酮类成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41 (10): 741-743.
- [20] 马迪, 冯娜, 韩伟, 等. 灰树花子实体的化学成分研究 [J]. 食用菌学报, 2015, 22 (3): 80-84.

(收稿日期: 2024-04-05; 修回日期: 2024-08-02)

基于仿生技术和反向传播神经网络的黄芪产地 判别模型构建研究

陈万金¹, 李虹¹, 张沛沛², 邵炜娴¹, 王越¹, 范昕煜¹, 赵婷^{1, 3}, 刘凤波^{1, 3}, 魏胜利^{1, 3*}, 于芳^{1*}, 张媛^{1, 3*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 中国药科大学药学院, 南京 211198; 3. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 102488)

摘要: **目的** 基于仿生技术和反向传播神经网络 (BPNN) 构建黄芪的产地鉴别模型。**方法** 采用色度计、电子鼻和电子舌共测得 21 项指标, 通过 RFI 进行特征筛选后得到 14 项指标, 并将黄芪产地鉴定问题建模为多分类问题。通过对随机森林 (RF)、支持向量机 (SVM) 和 BPNN 这三种机器学习模型比较, 我们建立了一个基于 BPNN 的黄芪产地分类决策系统。**结果** BPNN 仅用了 11 个特征变量就能够较好地预测黄芪产地。多分类模型构建后, 引入 SHAP 值对构建的产地鉴别模型进行解释。**结论** SHAP 特征重要性的排序揭示了变量在实际构建出的模型的重要程度。可解释预测模型在增加产地预测模型的透明度的同时, 又能保持原模型的判别正确率。该研究为产地鉴别模型的构建提供了一定的启示, 也为客观产地鉴别提供了参考。

关键词: 黄芪; 产地鉴别; 仿生技术; 反向传播神经网络; SHAP; 可解释机器学习

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3221-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.014

Identification of origin place for Astragali Radix based on biomimetics

CHEN Wan-jin¹, LI Hong¹, ZHANG Pei-pei², SHAO Wei-xian¹, WANG Yue¹, FAN Xin-yu¹, ZHAO Ting^{1, 3}, LIU Feng-bo^{1, 3}, WEI Sheng-li^{1, 3*}, YU Fang^{1*}, ZHANG Yuan^{1, 3*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 3. Engineering Research Center of Good Agricultural Practice for Chinese Crude Drugs, Ministry of Education, Beijing 102488)

Abstract: Objective To construct the origin identification model of the roots of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* based on biomimetics and back propagation neural network (BPNN). **Methods** Totally 21 indicators were measured by colorimeter, electronic nose (E-nose), and electronic tongue (E-tongue). Totally 14 indicators were obtained by random forest importance (RFI) after feature screening, and AR origin identification was modeled as a multi-classification problem. By comparing the three machine learning models (RF, SVM, and BPNN), a decision system was built for classification based on BPNN. **Results** BPNN well predicted the geographical origins of AR with only 11 feature variables. After constructing the multi-classification model, SHapley Additive exPlanation (SHAP) values were introduced to interpret the constructed origin identification model. **Conclusion** The importance ranking of the SHAP features shows how important the variables are in the actual model. Interpretable prediction models increase the transparency of the origin prediction model while maintaining the discrimination correctness of the original model. This study provides some reference for the construction of origin identification models.

Key words: Astragali Radix; geographical traceability; biomimetics; back propagation neural network; SHapley Additive exPlanation; interpretable machine learning

基金项目: 国家重点研发计划项目-中医药现代化专项 (No.2022YFC3501505)。

作者简介: 陈万金, 女, 硕士, 主要从事中药药效物质基础及质量标注研究, email: 743393327@qq.com *通信作者: 张媛, 女, 教授, 主要从事中药药效物质基础及质量标注研究, email: zhangyuan@bucm.edu.cn; 于芳, 女, 博士, 主要从事数据科学与大数据计算研究, email: 201601005@bucm.edu; 魏胜利, 男, 教授, 主要从事精准药材定向培育研究, email: wsl7491@126.com

黄芪为中医传统大宗中药材之一,系豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1],具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、保肝^[4]、增强免疫功能^[5]、防治阿尔茨海默病^[6-7]等药理作用。黄芪的市场用量巨大,陕西、山西、甘肃、宁夏等多地的黄芪药材成为了市场主流商品。但受不同产地的土壤、气候、栽培方式等因素的影响,黄芪质量参差不齐,黄芪产地溯源方法的研究对其质量控制具有重要意义。

传统中药产地鉴别主要通过眼观、鼻闻、口尝等多维度性状鉴别方法实现,该方法简便高效,但需要丰富的专业经验,鉴定结果的准确率易受到主观因素的影响。如何能够客观传承专家鉴定经验,同时保证鉴定结果的准确性和稳定性是解决中药产地鉴别的关键问题。随着仿生技术的发展,中药性状特征客观化得以实现,通过色度仪、电子鼻、电子舌等仿生仪器对中药的形色气味特征进行分析^[8],实现了中药性状特征的客观化和数据化。近年来仿生技术在中药领域应用逐渐广泛:在中药材的产地鉴别方面,如基于性状电子检测技术对薏苡仁的产地进行了鉴别^[9],并基于电子鼻、电子舌对肉豆蔻的产地进行鉴别^[10];在中药的真伪鉴别方面,使用电子鼻区分了金银花和山银花^[11];在中药基原鉴别方面,基于电子感官系统区分了大黄的不同基原^[12];在中药炮制方面,基于电子鼻识别了炮制前后药材的变化,如白芍^[13]和草果仁^[14]。

但想要建立准确的产地识别方法,挖掘特征数据并拟合出产地鉴别的数学模型是核心。近年来,有学者采用多源光谱融合技术结合随机森林(RF)、卷积神经网络^[15]等人工智能机器学习技术对黄芪药材的产地进行识别^[16]。由此可知,人工智能是值得尝试的中药产地判别模型建立的技术。识别模型的构建常采用的机器学习方法有反向传播神经网络(BPNN)、支持向量机(support vector machines, SVM)、RF等。BPNN是一种按误差逆传播算法训练的多层前馈网络BP,它是通过反向传播来不断调整网络的权值和阈值,使网络的误差平方和最小^[17]。SVM是一种二分类模型,它的基本模型是定义在特征空间上的间隔最大的线性分类器^[18-19]。RF是通过集成学习的Bagging思想将多棵树集成的一种算法,它的基本单元就是决策树^[20]。但是,人工智能技术建立的识别模型缺乏可解释性,使中药产地鉴别成为难以解释的黑箱。

SHAP算法是一种模型事后解释的算法,可以对复杂的机器学习模型的识别结果进行解释。

SHAP值可以通过量化每个变量对于模型识别结果所做的贡献,不仅可以反映各个变量对于产地识别结果的影响程度,而且可以准确指明影响程度的正负,使得模型具有了可解释性^[21-24]。

本研究拟采用色度计、电子鼻和电子舌将黄芪的颜色、气味和味道等感官特征进行客观化、数据化。并将数据化的性状特征应用于建立产地判别模型中,应用BPNN、SVM和RF尝试构建了黄芪的产地识别模型;建模后结合SHAP值揭示不同特征在分类模型中的重要程度,从而阐明产地与中药特征识别的内在机制。

1 材料

1.1 药材

118份新鲜黄芪样品来源于陕西省、山西省、甘肃省和宁夏回族自治区4个产地,所有样品均于2021年9月至10月采集,详细信息见表1。选择符合《中国药典》2020年版中规定的直径>1cm的黄芪段作为实验用样品,切段、烘干、打粉,于室温(25℃)保存备用。其中甘肃和宁夏的黄芪为当地广泛采用的育苗移栽方式,种植两年或三年采收;山西和陕西黄芪为当地广泛采用的仿野生种子直播方式,种植五年采收。经北京中医药大学张媛教授对收集的样品进行鉴定,确定所收样品均为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的根,凭证标本存放于北京中医药大学中药资源样品库。

表1 黄芪样品信息表

产地	采收时间	采收年限	样品量
陕西	2021年9月	五年	47
山西	2021年10月	五年	30
甘肃	2021年10月	两年或三年	23
宁夏	2021年9月	两年或三年	18

1.2 仪器

AL204型电子分析天平($d = 0.0001$ g,梅特勒-托利多仪器有限公司);CM-5型分光测色仪(日本柯尼卡美能达公司);全新气流式超微粉碎机(欣镇精密企业有限公司);HH-S8恒温水浴锅(北京科伟有限公司); α -Fox3000气味指纹分析仪、 α -Astree电子舌系统(法国Alpha Mos公司)。

2 方法与结果

2.1 不同产地黄芪的颜色比较

实验采用CM-5型分光测色仪对不同产地的黄芪粉末颜色差异进行测定。采用CIE色度空间系统进行颜色量化,色度空间由L*、a*、b*表示,分别对应于亮度(范围:0~100)、红-绿轴(范围:-120~120)和黄-蓝轴(范围:-120~120)^[25-26]。

不同产地的黄芪因所含的黄酮类成分含量不同, 导致其粉末颜色也具有一定的差异。由于测定中黄芪样品粉末的 a^* 值数值过小, 导致误差值过大, 因此在本文中只测定不同产地黄芪粉末的 L^* 值与 b^* 值来表示粉末颜色, 并进行后续分析。

取混合均匀的黄芪粉末适量, 置于石英比色皿中, 使粉末铺满比色皿底部, 测定光源 D 65, 测定试场 10° , 视角测量口径 $\phi 3\text{ mm}$, 截止波长 $360 \sim 740\text{ nm}$, 测量模式为排除镜面反射 (SCE), 对仪器进行黑白板校正后, 进行样品的测量。每份样品平行测定 3 次, 取平均值。

使用色度计测定不同产地黄芪的颜色。测定结果采用单因素方差分析, 见图 1。从图 1 可以看出, 不同产地的黄芪粉末的 L^* 和 b^* 值略有不同。在 L^* 值中, 陕西样本与山西、宁夏样本差异有统计学意义; 在 b^* 值中, 宁夏样本与陕西、甘肃样本差异有统计学意义。通过数据分析发现, 陕西黄芪的 L^* 值与山西、宁夏两地样品相比较低, 说明陕西黄芪的明度较低; 宁夏产地黄芪的 b^* 值更高, 说明与其他 3 个产地的黄芪样品相比, 宁夏黄芪的黄色值更高。

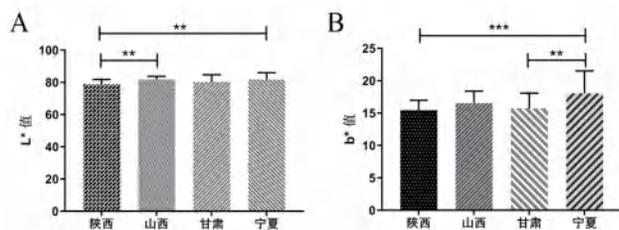


图 1 黄芪样品 L^* 值 (A) 和 b^* 值 (B) (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)
Fig 1 L^* values (A) and b^* values (B) for Astragali Radix samples (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

2.2 基于传感器优化的不同产地黄芪气味比较
本研究中所采用的电子鼻包括了 12 根不同的

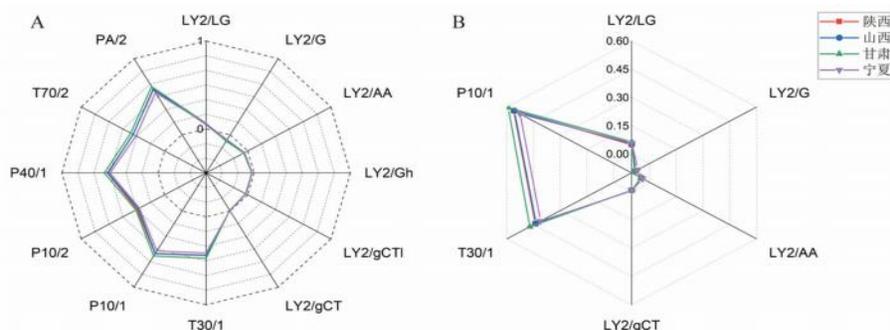


图 2 电子鼻传感器雷达图结果 (A) 和传感器阵列优化后的雷达图结果 (B)
Fig 2 E-nose sensor radar map results (A) and radargram results after sensor array optimization (B)

2.2.1 Kruskal-Wallis H 检验 对电子鼻 12 根传感器的最大响应值进行正态性检验, 12 根传感器的最大响应值均不符合正态分布, 因此采用多个独立样本的 Kruskal-Wallis H 检验, 结果见表

传感器, 可以检测不同种类的气体, 详见表 2^[27]。

表 2 电子鼻传感器型号
Tab 2 Main application of 12 sensors in E-nose

传感器型号	检测范围
LY2/LG	氧化气体
LY2/G	氨气 / 有机胺类、一氧化氮
LY2/AA	乙醇
LY2/GH	氨气 / 有机胺类
LY2/gCT1	硫化氢
LY2/gCT	丙烷 / 丁烷
T30/1	有机溶剂
P10/1	烃类、甲烷
P10/2	甲烷
P40/1	氟
T70/2	芳香族化合物
PA/2	乙醇、氨气 / 有机胺类

将 0.7 g 黄芪样品 (过四号筛) 置于 10 mL 的顶空瓶中, 在 55°C 中孵化 300 s, 后将样品气体注射进传感器中分析, 每次注射 $1500\ \mu\text{L}$, 分析时间持续 120 s 以获得关于挥发性化合物的信息。每秒收集一个信号进行分析。

电子鼻传感器的响应信号表示为 G/G_0 (电阻率, Ω), 其中 G 和 G_0 分别表示传感器暴露于挥发性气体和清洁空气时的电导率。每个样品平行测定 3 次, 选取 12 根传感器的最大响应值作为数据分析及建模的原始数据。每个样品获得 12 个特征用于化学计量分析。

对 118 份不同产地的黄芪样品粉末进行电子鼻检测, 电子鼻雷达图结果见图 2A。由图 2 可知, 4 个产地的黄芪样品在某些传感器上的响应值差异很小。为删除冗余数据, 本研究拟基于 Kruskal-Wallis H 检验、累计相关系数分析、聚类分析结合典则判别指标筛选法、逐步判别分析法, 筛选电子鼻的最优传感器^[28-29]。

3. 根据结果的渐进显著性 P 值判断, P 值越小, 表明传感器在 4 个产地间的区分度越好。如表 3 所示, 按 P 值由大到小排序, PA/2 的 P 值最小, LY2/LG 的 P 值最大。

表 3 12 根传感器的单因素方差分析结果

Tab 3 ANOVA test table of maximum response values of 12 sensors

传感器	P 值	传感器	P 值
LY2/LG	0.003 763	LY2/gCT	0.001 982
LY2/G	0.000 144	T30/1	0.000 439
LY2/AA	0.000 178	P10/1	0.000 037
LY2/Gh	0.000 560	P10/2	0.000 951
LY2/gCTI	0.000 704	P40/1	0.000 996
PA/2	0.000 017	T70/2	0.000 090

2.2.2 相关性分析 相关系数是反映两个特征之间相关性的统计指标，而一个特征与其他类别的所有特征之间的总体相关性很难推断。因此定义变量 (R_r) 来反映各传感器之间的总体相关性，其方程如下：

$$R_r = \sum_{m=1, m \neq i}^P \left(\sum_{j=1}^N |R_{mj}| \right)$$

式中， P 是指类别的数量， N 是指每个类别的特征的数量， R_{mj} 是指第 r 个特征与第 m 个类别的第 j 个特征之间的相关系数，并且 R_r 是指第 r 个特征与来自其他类别的特征的总体相关系数。

传感器相关性分析的结果见表 4，相比较来说，具有较高 R_r 的传感器具有更多的冗余信息。12 根传感器中 LY2/LG 的 R_r 最小，T70/2 的 R_r 最大。

表 4 12 根传感器的 R_r 值

Tab 4 R_r values of 12 sensors features

传感器	R_r 值	传感器	R_r 值
LY2/LG	4.55764	LY2/gCT	8.41941
LY2/G	8.68081	T30/1	9.44941
LY2/AA	8.66068	P10/1	9.47516
LY2/Gh	8.22126	P10/2	9.24196
LY2/gCTI	8.23133	P40/1	9.25697
PA/2	9.50966	T70/2	9.59727

2.2.3 逐步判别分析法 采用 Wilks' Lambda 方法进行逐步判别分析，以 F 值作为判别统计量，一个变量能否进入模型主要取决于协方差分析中检验的显著性水平和设置的进入、离开模型的 F 值，逐步判别分析的结果见表 5。表中统计量 F 是该变量的均方与误差均方的比值。该值越大， P 值越小，该值最大的先进入判别函数。当 P 值小于 0.05 或 0.01 时，拒绝零假设。显著性检验结果 $P = 0.00$ ，可以得出结论 LY2/gCT 和 LY2/AA 对判别的贡献有统计学意义。

2.2.4 聚类分析结合典型指标筛选法 聚类分析是一种无监督的学习算法，用于将不同特征的对象分类到不同的集合中。在均值和变异系数分析的基础上，采用平方欧氏距离进行聚类分析。对电子鼻 12 根传感器进行聚类分析，结果如图 3 所示，特征可以被分为不同的集合。从变量聚类全过程的树形图可以看出，12 根传感器可分为 3 组，A 组：LY2/Gh、LY2/gCTI、LY2/gCT、LY2/

表 5 逐步判别分析结果

Tab 5 Stepwise discriminant analysis

步骤	输入变量	Wilks' Lambda							
		统计量	Df ₁	Df ₂	Df ₃	统计量	Df ₁	Df ₂	P
1	LY2/gCT	0.783	1	3	114	10.506	3	114	0.00
2	LY2/AA	0.555	2	3	114	12.885	6	226	0.00

注：最大步骤数为 24；要输入的最小偏 F 为 3.84，要删除的最大偏 F 为 2.71。

Note: The maximum number of steps is 24; the minimum offset to enter is 3.8, and the maximum offset to remove is 2.71.

AA、LY2/LG、LY2/G；B 组：P10/1、P40/1、PA/2；C 组：P10/2、T70/2、T30/1。

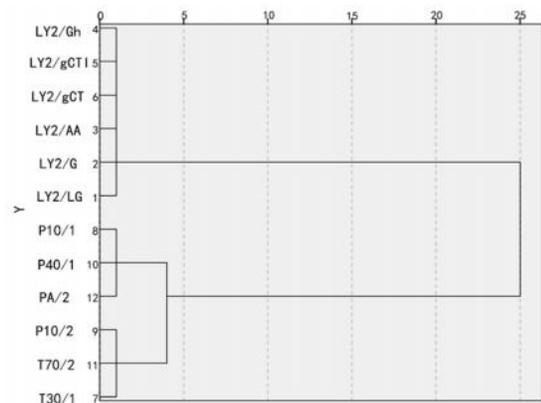


图 3 电子鼻 12 根传感器聚类分析结果

Fig 3 Cluster analysis of 12 sensors of the E-nose

聚类分析后，为了减少特征矩阵的冗余，需从每一类中选择一个相关指数最高的特征，因此通过 R_r 值对每组特征进行选择。最终确定优化后的电子鼻传感器阵列组成为 LY2/gCT、LY2/LG、LY2/AA、LY2/G、P10/1、T30/1。

优化后的传感器阵列结果见图 2B 和表 6。对传感器结果进行单因素方差分析，结果不同产地的黄芪在气味上的差异具有统计学意义。在传感器 LY2/LG、LY2/G、P10/1 和 T30/1 上，甘肃黄芪的气味最浓；而宁夏黄芪则在传感器 LY2/gCT 和 LY2/AA 的气味最浓，与其他产地黄芪相比，差异具有统计学意义。

2.3 基于传感器优化的不同产地黄芪味道比较

本研究所采用的电子舌传感器阵列包含了 7 个不同的传感器：AHS (酸)、CTS (咸)、NMS (鲜)、ANS (甜)、SCS (苦)、PKS (通用)、CPS (通用)^[30]。

取过 65 目筛的样品 1.0 g，置于圆底烧瓶中，与 200 mL 去离子水混合，100 °C 水浴回流 2 h。冷却至室温后，离心 (5000 r · min⁻¹, 10 min)，取上清液即得。样品检测时间为 120 s，并且每 1 s 记录响应信号。每份样品平行测定 9 次，并将每份样品后 3 次 100 ~ 120 s 处的数据用于后续的化学计量学分析。为避免样品间交叉污染及确保稳

表 6 电子鼻传感器阵列优化后结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 6 E-nose sensors results after sensor array optimization ($\bar{x} \pm s$)

传感器	陕西 ($n = 47$)	山西 ($n = 30$)	甘肃 ($n = 23$)	宁夏 ($n = 18$)
LY2/gCT	-0.007 ± 0.001^b	-0.007 ± 0.001^b	-0.008 ± 0.002^b	-0.005 ± 0.002^a
LY2/LG	0.050 ± 0.015^b	0.054 ± 0.013^b	0.065 ± 0.017^a	0.059 ± 0.017^{ab}
LY2/AA	-0.046 ± 0.007^a	-0.045 ± 0.006^a	-0.048 ± 0.007^a	-0.039 ± 0.007^b
LY2/G	-0.080 ± 0.013^a	-0.078 ± 0.012^a	-0.083 ± 0.013^a	-0.065 ± 0.012^b
P10/1	0.561 ± 0.059^{ab}	0.558 ± 0.047^{ab}	0.592 ± 0.051^a	0.525 ± 0.025^b
T30/1	0.440 ± 0.057^{ab}	0.436 ± 0.044^{ab}	0.471 ± 0.051^a	0.411 ± 0.026^b

注 (Note): 同行不同小写字母表示不同组数据间, $P < 0.05$ (Different lowercase letters in the same industry between different sets of data indicate significant differences, $P < 0.05$)。

定的电势, 两样品间设置一杯去离子水清洗传感器, 清洗时间为 30 s。

对 118 份不同产地黄芪样品的水提液进行电子舌检测, 电子舌的结果见图 4A。为剔除传感器中的冗余数据, 依据“2.2.1 ~ 2.2.4”项下步骤对电子舌的传感器阵列进行优化, 优化后结果见图 4B 和表 7。最终确定优化后的电子鼻传感器阵列组成为 PKS (通用)、CTS (咸味)、NMS (鲜

味)、CPS (通用)、ANS (甜味)、SCS (苦味)。对传感器结果进行单因素方差分析, 结果见表 7。由表 7 可知, 不同产地的黄芪在味道上差异具有统计学意义; 在甜味上, 陕西黄芪的浓度高于山西和宁夏的黄芪; 在咸味和苦味上, 陕西黄芪的浓度均大于其他三个产地的黄芪; 在鲜味上甘肃黄芪是最浓的。山西黄芪的咸味、甜味和苦味在 4 个产地黄芪中浓度均是最低的。

表 7 电子舌传感器阵列优化后结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 7 E-tongue sensors after sensor array optimization ($\bar{x} \pm s$)

传感器	陕西 ($n = 47$)	山西 ($n = 30$)	甘肃 ($n = 23$)	宁夏 ($n = 18$)
PKS	2692.79 ± 203.57^a	2650.95 ± 224.20^a	2449.41 ± 150.74^b	2379.76 ± 103.39^b
CTS	631.58 ± 68.31^a	539.01 ± 23.11^b	626.89 ± 33.77^a	603.39 ± 19.55^a
NMS	2439.82 ± 662.80^b	2734.30 ± 613.51^{ab}	2840.60 ± 657.30^a	1330.04 ± 90.87^c
CPS	720.84 ± 57.22^a	645.48 ± 34.62^b	721.12 ± 36.03^a	692.85 ± 16.92^a
ANS	776.34 ± 59.18^a	692.33 ± 26.83^b	790.89 ± 38.77^a	765.55 ± 22.29^a
SCS	790.96 ± 46.43^a	738.83 ± 30.54^b	785.64 ± 34.53^a	752.78 ± 21.54^b

注 (Note): 同行不同小写字母表示不同组数据间, $P < 0.05$ (Different lowercase letters in the same industry between different sets of data indicate significant differences, $P < 0.05$)。

2.4 基于 RFI 的特征排序

将通过传感器优化后的变量提交到一个过滤器的功能选择方法, RFI (Random Forest Importance) [31]。该方法通过 RF 分类器对筛选后得到的 14 个特征的重要性进行排序。我们根据每个变量的重要性选择变量, 并应用于之后的模型预测。利用 RFI 对各个变量的重要性进行排序, 结果见图 5。由图可知, 对模型预测贡献度最大的变量为 PKS, 其次为 NMS, 分别为 0.148 和 0.127。对模型预测贡献度最小的变量为 LY2/LG, 为 0.0309, 其次为 LY2/gCT 和 LY2/G, 均为 0.0310。

2.5 模型方法及变量个数筛选

基于 RFI 的结果, 分别采用 SVM、RF 和 BPNN 执行如下 14 个分类模型。第一个分类模型仅使用一个变量 (PKS), 第二个分类模型使用前两个变量 (PKS 和 NMS), 以此类推, 直到第 14 个分类模型, 则使用经由传感器优化得到的 14 个变量。表 8 分别表示了 SVM、RF 和 BPNN 的 14 个分类模型判别结果, 给出了输入的变量及每

个分类模型的准确度值。最终采用 BPNN 进行产地鉴别模型的构建, 并纳入排名前 11 个变量进行构建。

2.6 模型的构建

基于“2.5”项下选择的机器学习方法及变量个数, 进行产地判别模型构建。采用颜色中的 L* 值, b* 值; 3 个气味传感器 LY2/AA、T30/1、P10/1; 6 个味道传感器 PKS (通用)、NMS (鲜)、CTS (咸)、ANS (甜)、CPS (通用)、SCS (苦), 共 11 个变量进行产地鉴别。随机抽取总样品量的 80% 作为模型的训练集, 其余 20% 为模型的测试集。BPNN 的参数设置为: 隐藏层设置为两层, 神经元数量分别为 5 和 6; 最大迭代次数设置为 2000; 选择神经网络激活函数为 tanh; 采用五折交叉验证进行分析。BPNN 的流程图见图 6。最终得到黄芪的产地鉴别模型正确率为 84%。

2.7 模型结果解释

为进一步深入理解建模过程, 探究究竟哪些特征影响了模型的预测结果, 需要分析给定模型的特征重要性的信息。为此, 使用 SHAP 中的

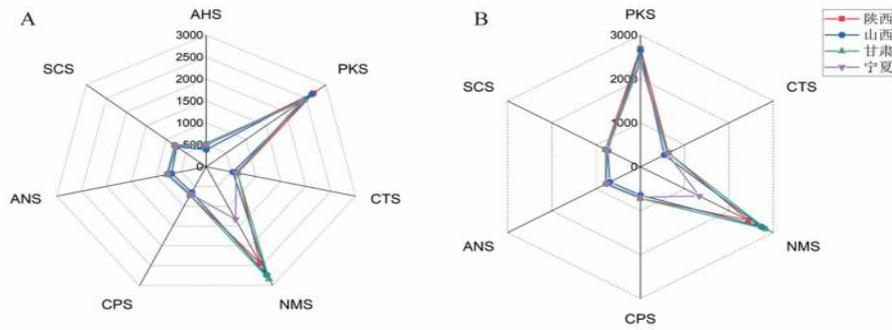


图 4 电子舌传感器雷达图结果 (A) 和传感器阵列优化后的雷达图结果 (B)
Fig 4 E-tongue sensors radar map (A) and radargram after sensor array optimization (B)

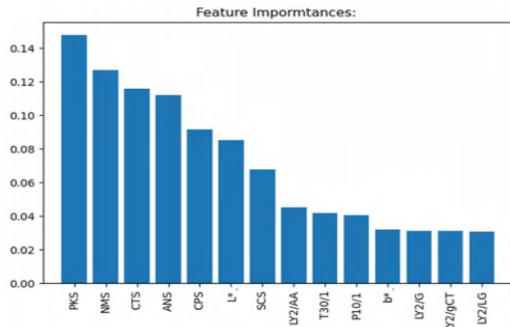


图 5 基于 RFI 的 14 个变量重要性排序
Fig 5 Importance ranking of 14 variables according to RFI

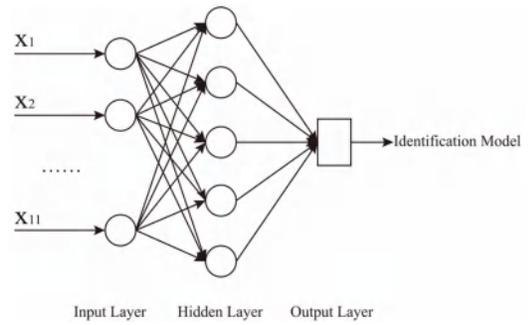


图 6 BPNN 模型构建流程图
Fig 6 Flowchart of BPNN model construction

表 8 SVM、RF 和 BPNN 的模型预测结果

Tab 8 Classification with SVM, RF, and BPNN associated to feature selection

模型	变量	SVM/%	RF/%	BPNN/%
#01	PKS	31	59	51
#02	PKS, NMS	49	64	79
#03	PKS, NMS, CTS	74	73	82
#04	PKS, NMS, CTS, ANS	74	72	85
#05	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS	76	78	81
#06	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*	78	77	83
#07	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*, SCS	77	75	81
#08	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*, SCS, LY2/AA	75	76	83
#09	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*, SCS, LY2/AA, T30/1	75	75	81
#10	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*, SCS, LY2/AA, T30/1, P10/1	76	76	83
#11	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*, SCS, LY2/AA, T30/1, P10/1, b*	76	75	84
#12	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*, SCS, LY2/AA, T30/1, P10/1, b* LY2/G	76	75	75
#13	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*, SCS, LY2/AA, T30/1, P10/1, b* LY2/G, LY2/gCT	78	74	77
#14	PKS, NMS, CTS, ANS, CPS, L*, SCS, LY2/AA, T30/1, P10/1, b* LY2/G, LY2/gCT, LY2/LG	79	75	79

Kernel SHAP 方法做进一步分析, Kernel SHAP 方法可对任意模型进行解释。图 7 显示了用于黄芪产地判别解释性分析的 SHAP 特征重要性的排序, 揭示了变量在实际构建的模型中的重要程度, 以确定哪些变量对特定的类分配贡献最大。在该黄芪产地鉴别模型中, 排名前 5 位的变量均为味道方面的变量, 各个产地黄芪的味道主要在甜味、咸味和苦味这三方面存在差异。可知味道是造成各个产地黄芪存在差异的主要因素。后几名指标为气味变量, 说明气味信息在黄芪产地鉴别中不是决定性因素。

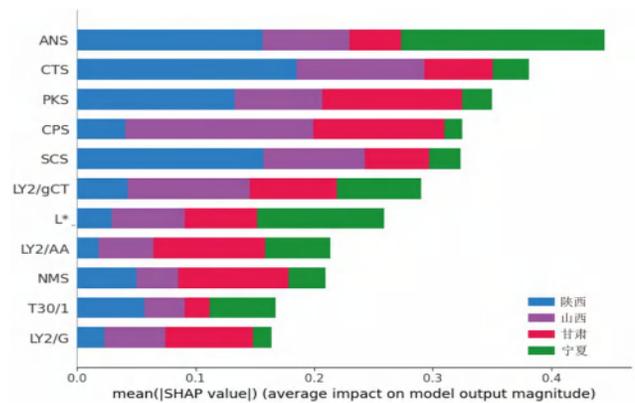


图 7 预测模型变量重要性排名
Fig 7 Importance ranking of predictive model variables

为了进一步明确各个变量对于模型中分类的正/负关系,采用 SHAP 概要图对单个产地的 SHAP 值分析,揭示特征取值是如何影响模型分类到该类别的概率。SHAP 概要图是将特征重要性与特征效应结合在一起。样本颜色由蓝到红代表特征的值由低到高。如图 8A 所示,以分类为陕西产地的样品为例,CPS 和 CTS 具有高特征值且对应其具有正向 SHAP 值,这说明该特征数值越大,

模型将样品分类为陕西产地的可能性越大;而从图 8B 中可知,CTS 对模型将样品分类为山西产地的影响最大,CTS 具有高特征值,但对应其具有负向 SHAP 值,这说明该特征数值越小,模型将样品分类为山西产地的可能性越大;综合来看,这与黄芪的电子舌测定结果相一致,说明 Kernel SHAP 对模型的解释与实际情况一致,证明了产地鉴别模型的实用性。

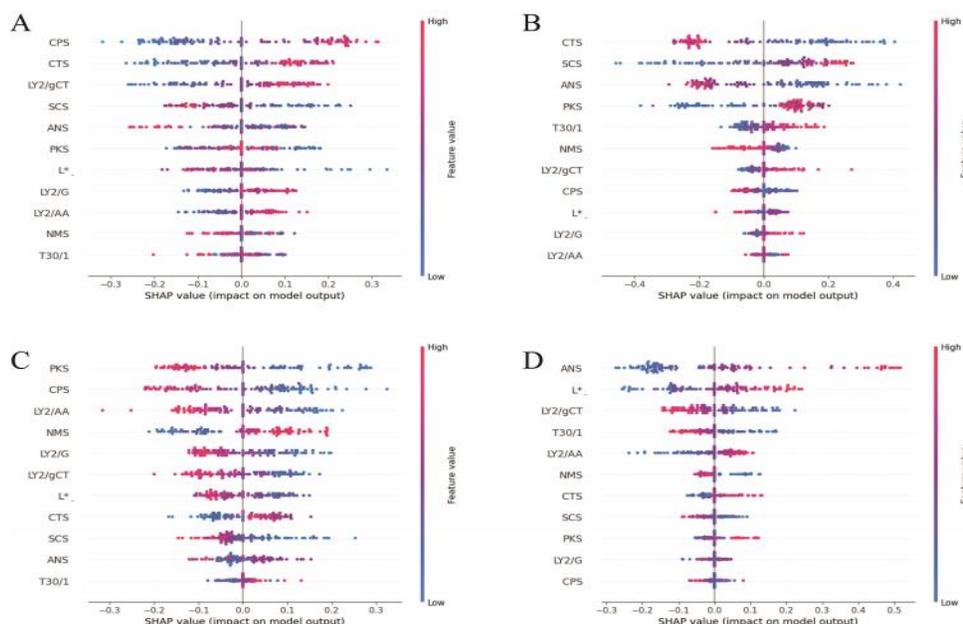


图 8 陕西省 (A)、山西省 (B)、甘肃省 (C) 和宁夏回族自治区 (D) 黄芪 11 个特征变量 SHAP 摘要图
 Fig 8 SHAP summary plots of the 11 characteristic variables of Shannxi (A), Shanxi (B), Gansu (C) and Ningxia (D)

3 结论与讨论

利用机器学习模型构建产地判别模型是近年来的热点问题^[32],然而不同的机器学习模型对产地判别的能力及模型可解释性问题均有待于深入研究。基于此,本文以 4 个产地的黄芪药材为例,采用三种仿生技术手段对黄芪的感官特征进行测定与分析,并通过进行特征筛选和机器学习模型的训练,构建了一个黄芪产地判别模型。最后使用 SHAP 值进行了建模后的分析与解释,得到如下主要结论:

① 本研究结合 BPNN 方法与仿生技术共同分析,使得黄芪的产地鉴别正确率达 84%。相较于 RF、SVM 这两种机器学习模型,BPNN 在黄芪产地鉴定方面具有较高准确率。

② 在黄芪产地鉴别模型中,变量重要性排名前 5 名均为黄芪味道特征的变量,说明味道在黄芪产地鉴别问题所涉及的感官指标中是重要因素。后几名指标为 LY2/G、T30/1、NMS 和 LY2/AA,为气味变量,说明气味和颜色在黄芪产地鉴别问题中并不是决定性因素。在建立模型时,

应更关注味道指标。

通过对陕西黄芪的 SHAP 值分析,可知陕西产地黄芪味道变量的 SHAP 值多为正值,且与电子舌结果比较发现,陕西黄芪的甜味、苦味和咸味相较于其他产地黄芪的味道更浓,这与陕西黄芪的味道感官特征具有一致性。因此在不同的鉴别场景中,味道越浓,鉴定为陕西黄芪的可能性越大。

传统中药的产地鉴别往往依赖专家经验,且鉴定结果易受主观因素影响。本文通过采集感官指标构建机器学习模型,并对模型进行解释。一方面,颜色、气味和味道是中药鉴别的重要部分,通过仿生技术手段可以客观化表征中药的形色气味,对样品进行整体分析,解决了传统鉴别需依赖专家经验的问题,对中药的感官进行了系统的评价;另一方面,基于建立的感官评价可以为未来客观化鉴别中药的产地提供一定的依据,在中药的鉴别上有较好的应用前景。

本文收集了 4 个产地的蒙古黄芪样品,产地鉴别正确率较高;而《中国药典》2020 年版一部

中规定了黄芪的基原为蒙古黄芪和膜荚黄芪,本研究对黄芪药材的鉴别应用范围仍有不足,后续可通过进一步收集样品进行实验对膜荚黄芪的产地进行鉴别。

参考文献

- [1] 李俊霖, 郭淑红, 张强, 等. 蒙古黄芪叶绿体全基因组特征解析及亲缘性分析[J]. 中草药, 2024, 55 (7): 2366-2374.
- [2] Auyeung KKW, Cho CH, Ko JKS. A novel anticancer effect of Astragalus saponins: transcriptional activation of NSAID-activated gene [J]. Int J Cancer, 2009, 125 (5): 1082-1091.
- [3] Yu DH, Bao YM, Wei CL, et al. Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from *Astragalus mongholicus* Bunge. [J]. Biomed Environ Sci, 2005, 18 (5): 297-301.
- [4] Yan F, Zhang QY, Jiao L, et al. Synergistic hepatoprotective effect of Schisandrae lignans with Astragalus polysaccharides on chronic liver injury in rats [J]. Phytomedicine, 2009, 16 (9): 805-813.
- [5] Fu J, Wang ZH, Huang LF, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi) [J]. Phytother Res, 2014, 28 (9): 1275-1283.
- [6] 彭涛, 张慧, 杨一帆, 等. 黄芪治疗血管性痴呆药理机制研究进展[J]. 中国医药, 2024, 19 (2): 297-302.
- [7] 王哲, 马定财, 王毛毛, 等. 黄芪及其活性成分防治阿尔茨海默病机制研究进展[J]. 中草药, 2024, 55 (6): 2094-2100.
- [8] Hua PM, Fei SY, Jing LX, et al. Identification of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl in different harvest periods using intelligent sensory technologies, HPLC characteristic fingerprint coupled with chemometrics [J]. Phytochem Anal, 2022, 33 (3): 490-501.
- [9] 张云飞, 张玖捌, 陈鹏, 等. 基于性状电子检测技术结合机器学习的不同产地薏苡仁的快速鉴别[J]. 中草药, 2024, 55 (12): 4185-4193.
- [10] 胡锦阳, 朱小玲, 孙国园, 等. 基于电子鼻和电子舌技术分析不同产地肉豆蔻气味特征研究[J]. 环球中医药, 2024, 17 (6): 1055-1064.
- [11] 王俊亮, 查圣华, 廉翠翠, 等. 基于 Heracles Neo 超快速气相电子鼻快速鉴别金银花与山银花的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15 (13): 142-149.
- [12] 杨硕, 徐中利, 赵新芝, 等. 基于电子感官系统和 GC-IMS 技术的大黄饮片基原辨识研究[J]. 中国药房, 2024, 35 (9): 1076-1081.
- [13] 彭嘉玉, 黄玉珍, 温佳文, 等. 基于 HS-GC-MS 和电子感官技术分析白芍不同炮制品的颜色、气味变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (20): 141-150.
- [14] 任东, 姜晓娅, 雷京奇, 等. 基于电子鼻结合顶空-气相色谱-质谱法研究草果仁 3 种不同炮制品的差异[J]. 中草药, 2024, 55 (15): 5070-5082.
- [15] Xiao QL, Bai XL, Gao P, et al. Application of convolutional neural network-based feature extraction and data fusion for geographical origin identification of Radix Astragali by visible/short-wave near-infrared and near infrared hyperspectral imaging [J]. Sensors, 2020, 20 (17): 1-14.
- [16] 冯超玲, 何力, 梁家伟, 等. 基于机器算法的药材种类与产地鉴定[J]. 广西职业技术学院学报, 2022, 15 (2): 54-62.
- [17] Makarichian A, Amiri CR, Ahmadi E, et al. Assessment the influence of different drying methods and pre-storage periods on garlic (*Allium Sativum* L.) aroma using electronic nose [J]. Food Bioprod Process, 2021, 127: 198-211.
- [18] Girish C, Feart S. A survey on feature selection methods [J]. Comput Electr Eng, 2014, 40 (1): 16-28.
- [19] Mu FL, Gu Y, Zhang J, et al. Milk source identification and milk quality estimation using an electronic nose and machine learning techniques [J]. Sensors, 2020, 20 (15): 1-14.
- [20] Breiman L. Random forests [J]. Mach Learn, 2001, 45: 5-32.
- [21] Jimenez LJ, Grisoni F, Schneider G. Drug discovery with explainable artificial intelligence [J]. Nat Mach Intell, 2020, 2 (10): 573-584.
- [22] Rodriguez PR, Bajorath JR. Interpretation of compound activity predictions from complex machine learning models using local approximations and shapley values [J]. J Med Chem, 2019, 63 (16): 8761-8777.
- [23] 罗妍, 王枫, 叶文玲. 基于 XGBoost 和 SHAP 的急性肾损伤可解释预测模型[J]. 电子与信息学报, 2022, 44 (1): 27-38.
- [24] 张喜科, 赵文华, 付先军, 等. 基于 XGBoost 和 SHAP 的中药寒热药性识别及寒热特征标记可视化研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24 (12): 4984-4993.
- [25] Pan MH, Su YF, Liu XJ, et al. Identification of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl in different harvest periods using intelligent sensory technologies, HPLC characteristic fingerprint coupled with chemometrics [J]. Phytochem Anal, 2022, 33 (3): 490-501.
- [26] Li JH, Shao YY, Yao YB, et al. A novel quality evaluation method for magnolia bark using electronic nose and colorimeter data with multiple statistical algorithms [J]. J Tradit Chin Med Sci, 2020, 7 (2): 221-227.
- [27] Lin H, Yan YH, Zhao T, et al. Rapid discrimination of Apiaceae plants by electronic nose coupled with multivariate statistical analyses [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 84: 1-4.
- [28] Xu KM, Wang J, Wei ZB, et al. An optimization of the MOS electronic nose sensor array for the detection of Chinese pecan quality [J]. J Food Eng, 2017, 203: 25-31.
- [29] 邹慧琴, 刘勇, 陶欧, 等. 电子鼻 MOS 传感器阵列优化及其在中药材快速鉴别中的应用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (2): 161-166.
- [30] 李虹, 黄晓欣, 刘勇, 等. 基于电子舌技术的生炒酸枣仁滋味比较[J]. 中国现代中药, 2022, 24 (1): 122-127.
- [31] Da CNL, Valentin LA, Castro IA, et al. Predictive modeling for wine authenticity using a machine learning approach [J]. AIIA, 2021, 5: 157-162.
- [32] 汤玉荣. 机器学习方法鉴别中药材种类和产地的比较研究[J]. 甘肃科技, 2024, 40 (1): 84-87, 105.

(收稿日期: 2024-07-17; 修回日期: 2024-09-24)

基于分子对接与分子动力学模拟的 NorA 抑制剂虚拟筛选

石欢^{1,2}, 王宇红¹, 孟盼^{1*}, 曹东升^{1,2*} (1. 湖南中医药大学科技创新中心, 长沙 410208; 2. 中南大学湘雅医学院, 长沙 410013)

摘要: **目的** 基于计算机的方法筛选天然产物数据库中潜在的新型 NorA 抑制剂。**方法** 利用分子对接、ADMET 性质预测、分子动力学模拟、结合自由能计算等方法进行虚拟筛选。**结果** 筛选得到 4 个化合物, 它们通过与 NorA 蛋白发生特异性非共价相互作用而结合, 分子动力学模拟也表明这些复合物体系在模拟时间内保持稳定。**结论** 这 4 个化合物具有潜在的 NorA 抑制活性, 本研究为发现新的 NorA 抑制剂提供了新思路, 并为进一步实验验证和药物开发提供了潜在候选化合物。

关键词: 外排泵抑制剂; 虚拟筛选; 分子对接; 分子动力学模拟

中图分类号: R914, O642 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3229-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.015

Virtual screening of NorA inhibitors based on molecular docking and molecular dynamics simulation

SHI Huan^{1,2}, WANG Yu-hong¹, MENG Pan^{1*}, CAO Dong-sheng^{1,2*} (1. *Science and Technology Innovation Center of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208*; 2. *Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013*)

Abstract: Objective To screen potential novel NorA inhibitors from natural product databases by computer-based methods. **Methods** Virtual screening was conducted with molecular docking, ADMET property prediction, molecular dynamics simulation, and binding free energy calculation. **Results** Four compounds were identified, which interacted with NorA proteins through specific non-covalent interactions. Molecular dynamics simulations showed that these complex systems remained stable throughout the simulation. **Conclusion** The obtained 4 compounds show promising NorA inhibition potential. This research introduces a novel concept to uncover new NorA inhibitors and identifies potential compounds for future experimental testing and drug development.

Key words: efflux pump inhibitor; virtual screening; molecular docking; molecular dynamics simulation

当前, 细菌的多药耐药性已经成为全球公共卫生领域面临的严重问题之一。多药耐药性指的是细菌对多种抗菌药物产生耐药性, 导致常规抗菌药物无法有效治疗感染性疾病, 从而病死率不断上升^[1]。主动外排机制是细菌产生多药耐药性的重要机制之一^[2], 通过外排泵的作用, 细菌能够识别和主动排出抗菌药物分子, 使得细菌细胞内的抗菌药物浓度降低, 从而削弱抗菌药物的杀菌效果^[3-4]。细菌对抗菌药物产生耐药性, 进一步增加了感染治疗的难度。由于新的抗菌药物的研

发异常困难, 近二十年来全球都没有新的抗菌药物获批上市, 因此, 抗菌药物佐剂成为备受瞩目的替代治疗选择。抗菌药物佐剂能够恢复或增强抗菌药物的活性^[5-7], 最大限度地减少甚至直接阻断耐药性的产生。因此, 开发外排泵抑制剂被认为是对抗细菌多药耐药性的有效途径^[8-10]。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*, MRSA) 是一种特殊的金黄色葡萄球菌亚型, 因其对多种抗菌药物, 包括甲氧西林耐药, 而被称为“超级细菌”。这

作者简介: 石欢, 女, 硕士, 主要从事计算机辅助药物设计研究, email: kakaka0509@163.com *通信作者: 曹东升, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事人工智能药物设计研究, email: oriental-cds@163.com; 孟盼, 女, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药神经药理研究, email: mengpan0822@163.com

种细菌的出现,大大增加了感染治疗的难度。细菌外排泵作为一种耐药机制,是导致细菌产生多药耐药性的主要原因之一。在 MRSA 中,外排泵的作用尤其显著,是 MRSA 产生耐药性的关键因素。因此,探索并发现新的外排泵抑制剂,对于有效防控 MRSA 感染具有极其重要的意义。

NorA 多药外排泵蛋白 (NorA multidrug efflux pump protein) 是革兰氏阳性菌 (如金黄色葡萄球菌) 中的反向膜转运蛋白,与多药耐药性密切相关^[11-12]。它能识别和结合多种抗菌药物,如青霉素和氟喹诺酮类药物^[13],并通过三磷酸腺苷 (ATP) 将其泵出细胞,导致抗菌药物失效。因此, NorA 成为研发外排泵抑制剂的潜在目标。抑制 NorA 可增强抗菌药物效果,降低耐药性,为感染治疗提供新途径^[14-15]。目前还没有临床批准上市的外排泵抑制剂,大多在研的化合物存在毒性和较强的副作用,而天然产物通常具有毒性低,生物活性多样,在生物体内表现出较好的相容性,并且有较好的生物可获取性等优点,因此,从天然产物中寻找低毒性的潜在 NorA 抑制剂具有较大的可行性。

计算机辅助药物设计通过模拟分子结构、相互作用和性质,预测生物活性和药代动力学特征,从而加速新药发现,提高研发效率,节省资源^[16-17]。本研究运用分子对接、分子动力学模拟及自由能计算等方法,从天然产物库中筛选出有潜力的 NorA 抑制剂,为抗 MRSA 药物研发提供新型先导化合物^[15]。

1 方法

本研究采用基于结构的虚拟筛选方法。首先,针对细菌外排泵蛋白 NorA 的三维结构,利用分子对接方法,将天然产物化合物数据库中的 6342 个分子对接到靶标的结合口袋,根据小分子与靶标口袋的几何形状和化学性质匹配程度,通过打分函数进行评估筛选。其次,计算 MMGBSA,并预测化合物的吸收、分布、代谢、排泄及毒性 (ADMET) 性质参数,以评估化合物的类药性。最后,对候选化合物与蛋白复合物进行分子动力学模拟,计算 MMPBSA,以全面评估化合物和靶蛋白的结合亲和力及稳定性。最终筛选得到的化合物可作为潜在的外排泵抑制剂进一步研究。

1.1 分子对接

从 RCSB 蛋白质数据库中下载 NorA 的晶体结构 (PDBID: 7LO7)^[14],使用 Schrodinger 2022-1 的 Protein Preparation Wizard^[18] 模块对蛋白进行去水加氢,并修正和补充不合理或缺失的氨基酸残基,最后进行能量最小化。根据已知的活性位点 (见图 1) 确定结合口袋并生成对接盒

子,其中包括关键残基 Gln51、Asn137、Phe140、Glu222、Asp307、Arg310、Ser337、Asn340^[1]。

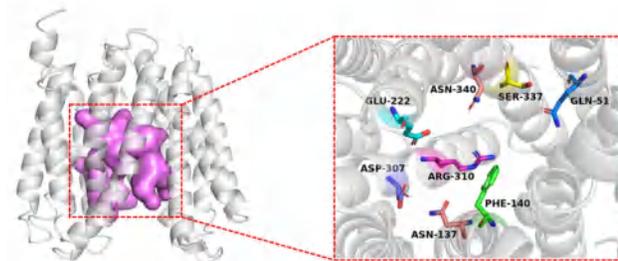


图 1 NorA 活性口袋及关键位点

Fig 1 Activity pocket and key sites of NorA

下载天然产物小分子数据库 (来自 selleck 网站: www.selleck.cn), 使用 Schrodinger 2022-1 的 LigPrep 模块进行质子化以及能量最小化处理,在 OPLS3e 力场下对小分子能量进行优化,同时在 pH 为 7.0 ± 2.0 的环境下对小分子带电状态进行分析,设置每个小分子最多产生 32 个立体异构,将化合物的 2D 结构转化为 3D 形式。

使用 Schrodinger 2022-1 的 Ligand Docking 模块进行分子对接,分别采用标准精度 (SP) 和超高精度 (XP) 模式对接,根据对接得分进行初步筛选^[19-22]。

1.2 ADMET 性质预测

使用 SwissADME (www.swissadme.ch) 平台对候选化合物进行 ADMET 性质预测^[23],通过 Lipinski 规则、PAINS 规则过滤候选化合物,确定小分子的生物相容性、生物利用度、人类肠道吸收等重要参数。使用 Schrodinger 2022-1 的 QikProp 模块计算皮肤渗透性、脑血分配系数、与人血白蛋白结合常数、水溶性等参数,进一步评估和验证药物相似性。

1.3 分子动力学模拟

对候选化合物与蛋白复合物进行分子动力学模拟,评估蛋白配体的动态相互作用^[16],整个模拟过程使用 Gromacs 2022.3 软件进行^[24]。准备过程:

① 系统构建: 使用 CHARMM-GUI 构建初始模型^[25],并应用 CHARMM36 力场参数化。将模型置于边长距离蛋白 10 \AA 的周期性边界盒中,并基于 TIP3P 水模型,添加适量水分子和盐离子以模拟生理环境。② 能量最小化: 通过最速下降法进行能量最小化,直至系统最大力小于 $1000 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}$,以消除高能位形。③ 预平衡: 先后在 NVT (50 ps, 310 K, V-rescale 温度耦合) 和 NPT (100 ps, 1 bar, Berendsen 压力耦合) 集合下进行预平衡,以达到热力学平衡。④ 生产模拟: 在 NPT 集合下进行 100 ns 的无约束生产模拟。模拟结束后对轨迹进行矫正,计算均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD)、

均方根涨落 (root mean square fluctuation, RMSF), 测量回旋半径 (radius of gyration, Rg) 和分子间氢键的建立 (hydrogen bonds, H-bond), 观察这几个指标随时间的变化, 并从 90 ~ 100 ns 轨迹中提取 200 帧轨迹文件, 通过 gmx_MMPBSA^[26] 进行结合自由能计算, 评估结合强度及能量贡献^[27]。

2 结果

2.1 虚拟筛选结果分析

基于 NorA 的三维结构从中药及天然产物数据库中 进行多轮虚拟筛选 (见图 2)。首先, 通过分子对接初步筛选, 选用 SP 模式对接, 并选取打分小于 -6 的化合物进行下一轮 XP 模式对接; 对 XP 对接打分小于 -7 的化合物进行 MMGBSA 计算, 筛除 MMGBSA 值大于 -30 kJ·mol⁻¹ 的化合物 (见表 1)。接着, 预测 ADMET 性质进行再次筛选 (见表 2), 对于成药性较好的化合物, 我们根据结合模式选择合理的构象进行分子动力学模拟并计算结合自由能, 以进一步评估小分子与蛋白结合的稳定性, 最终得到 4 个候选化合物。

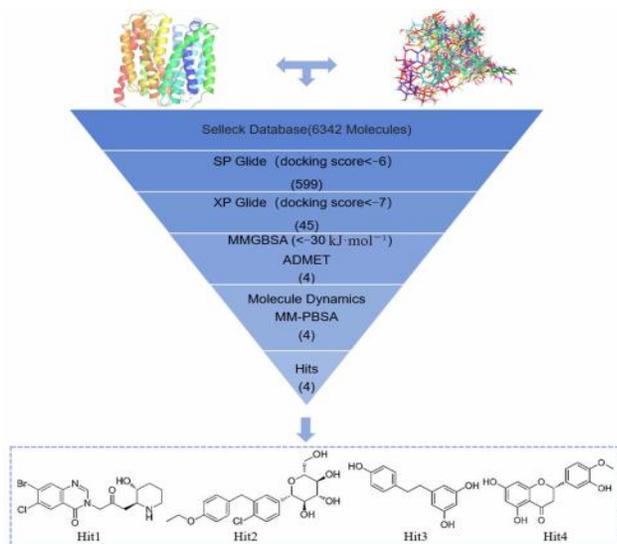


图 2 虚拟筛选流程

Fig 2 Virtual screening process

表 1 候选化合物对接得分和 MMGBSA 结合自由能
Tab 1 Docking score and MMGBSA binding free energy of candidate compounds

化合物	分子量	对接得分	MMGBSA 结合自由能 / (kJ·mol ⁻¹)	相互作用残基
Hit1	414.69	-7.12	-39.60	Asn137, Glu222, Arg310, Asn340
Hit2	408.88	-7.41	-51.82	Asn137, Phe306, Asp307, Arg310, Asn340
Hit3	230.26	-7.64	-31.96	Asn137, Asp307, Arg310, Glu22
Hit4	302.28	-7.13	-32.46	Gln51, Glu222, Arg310

2.2 分子动力学模拟结果分析

通过以上的几轮筛选, 最后得到 4 个潜在化合物, 为了进一步评估候选化合物与蛋白结合的稳定性和分子间相互作用, 本研究对 4 个化合物进行分子动力学模拟。我们使用各种标准模拟参数严格分析了所有化合物的最终轨迹, 这些参数包括计算配体和主链原子的 RMSD、Rg, 确定不同氨基酸残基的 RMSF, 并检查 H-bond。

RMSD 值是某时刻的结构相对于初始构象的偏差, 可以反映模拟过程中体系稳定情况, 由图可知 4 个化合物体系的 RMSD 值都在 10 ns 后基本达到稳定并维持到最后 (见图 3A), 变化趋势相似, 均无较大波动, 表明体系在模拟过程中达到了平衡。RMSD 值越小说明体系越稳定, 结合越紧密, 如图所示 Hit4 体系的 RMSD 值最低, 说明该化合物在同等条件下与靶蛋白的结合最稳定 (见图 3A)。

Rg 是用于描述聚合物或生物大分子的空间展开程度或紧密程度的指标。MD 模拟过程中 4 个化合物都表现出明显的致密性模式, 均保持稳定, 表明具有很强的致密构象, 维持了蛋白质结构的稳定性 (见图 3B)。

表 2 ADMET 性质参数

Tab 2 Parameters of ADMET properties

化合物	QPlogS	QPlogHERG	QPlogBB	QPlogKhsa	胃肠道吸收 (GIA)	生物利用度 /%
Hit1	-3.17	-5.72	-0.35	-0.25	优	55
Hit2	-4.44	-5.66	-1.63	-0.19	优	55
Hit3	-2.91	-5.11	-1.29	-0.11	优	55
Hit4	-4.51	-5.64	-1.89	0.10	优	55

注: QPlogS (水溶性). 参考范围为 -6.5 ~ 0.5; QPlogHERG (钙通道阻塞的 LogP 值). 推荐范围 < -5, 值越小越好; QPlogBB (脑血分配系数). 推荐范围 -3.0 ~ 1.2; QPlogKhsa (与人血清蛋白的结合常数). 推荐范围 -0.5 ~ 1.5; 生物利用度. 推荐范围 0.5 ~ 1, 越高越好。

Note: QPlogS (water solubility) reference range is -6.5 to 0.5; QPlogHERG (LogP value of calcium channel blockage) recommended range: < -5, the smaller, the better; QPlogBB (cerebral blood partition coefficient) recommended range: -3.0 to 1.2; QPlogKhsa (binding constant with human serum albumin) recommended range: -0.5 to 1.5; bioavailability: recommended range 0.5 ~ 1, the higher, the better.

RMSF 值为原子位置变化对于时间的平均, 给出了结构各个区域柔性的表征, 表示分子中各原子

运动的自由程度, 用来评价模拟过程中氨基酸的稳定性。如图所示 4 个体系变化趋势基本相同 (见

图 3C), 残基 RMSF 值基本在 1 nm 以内, 没有大幅波动; 结合口袋中关键残基 Gln51、Asn137、Phe140、Glu222、Asp307、Arg310、Thr336、Asn340 的 RMSF 值均处于一个相对较低的水平, 说明化合物与结合口袋形成了稳定的相互作用。

最后分析了模拟过程中的氢键变化, 氢键是分子间关键的弱相互作用, 对稳定分子结构、调

控相互作用及影响功能至关重要。如图所示 Hit2 形成的氢键数量较多, 表明其分子间相互作用强, 结构可能更稳定(见图 3D)。其他化合物也都产生了氢键, 表明蛋白和配体之间均存在相互作用, 氢键的形成有助于维持分子的稳定结构, 证明了结合模式有较好的稳定性。

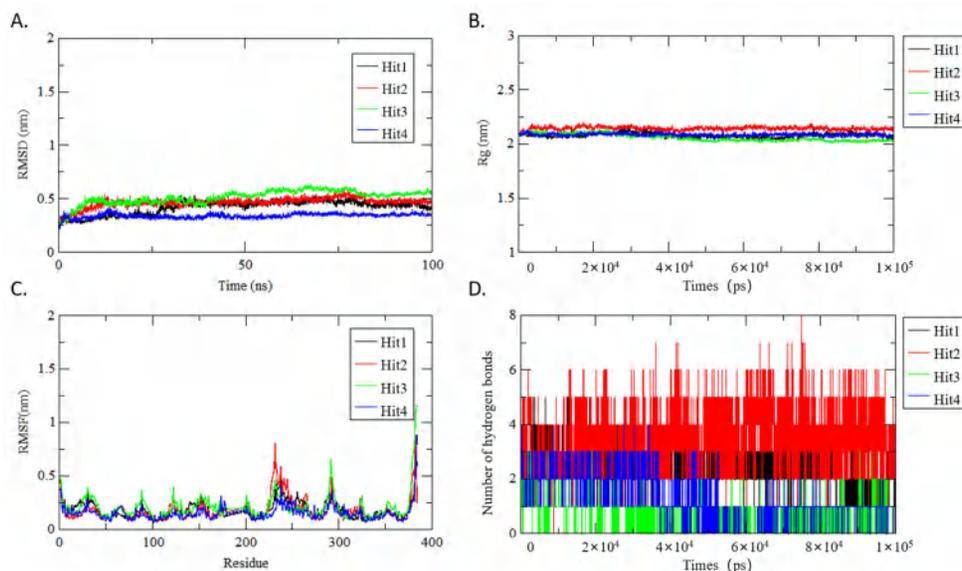


图 3 分子动力学模拟结果

Fig 3 Molecular dynamics simulation

根据分子动力学模拟结果, 4 个化合物体系均有较好的稳定性以及较高的结合亲和力, 可进一步计算结合自由能进行评估。

2.3 MMPBSA 计算结果分析

结合自由能用于评估不同小分子与靶蛋白结合的稳定性及结合亲和力。本研究分别选取 4 个化合物的一段稳定的动力学轨迹进行 MMPBSA 计算。结合能分项包括范德华作用能 (VDWAALS)、静电能 (EEL)、溶剂化极化能 (EPB)、非极性溶剂化能 (ENPOLAR)、气相自由能 (GGAS) 和溶

剂化自由能 (GSOLV)(见表 3)。根据表 3 的结果, 范德华作用能、静电能、溶剂化极化能和气相自由能都有助于蛋白配体的结合。其中, 静电能和气相自由能的作用尤为显著。总结合自由能是评估蛋白配体结合稳定性和亲和力的重要指标, 所有候选化合物总的结合自由能都为负值, 表明这些复合物在热力学上是稳定的, 且结合过程可以自发进行。其中氢溴酸常山酮和达格列净的自由能值低于 $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 说明它们与靶蛋白的结合最稳定, 具有较高的亲和力, 是潜在的优质候选药物。

表 3 4 个化合物的结合自由能 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Tab 3 Free energy of binding of 4 compounds ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

化合物	范德华作用能	静电能	溶剂化极化能	非极性溶剂化能	气相自由能	溶剂化自由能	总结合自由能
Hit1	-35.30	-146.34	154.22	-3.16	-181.64	151.06	-30.58
Hit2	-35.74	-49.25	59.61	-4.75	-84.98	54.86	-30.12
Hit3	-27.83	-25.32	33.33	-3.38	-53.15	29.94	-23.20
Hit4	-23.84	-33.43	35.27	-3.28	-57.27	31.99	-25.28

2.4 候选化合物与靶蛋白相互作用分析

通过多轮虚拟筛选, 最终得到 4 个化合物, 分别为氢溴酸常山酮、达格列净、二氢白藜芦醇、橙皮素。我们选取蛋白配体的最佳构象分析了相互作用力。如图所示, 氢溴酸常山酮与 NorA (见图 4A) 蛋白的关键残基 Asn137、Glu222、

Arg310、Asn340 之间存在氢键相互作用, 形成稳定的复合物。达格列净与 NorA (见图 4B) 蛋白的关键残基 Asn137、Asp307、Arg310、Asn340 存在氢键相互作用, 与残基 Phe306 也形成了氢键, 此外与关键残基 Phe140 之间存在 π - π 堆积作用, 使结合亲和力增加, 降低了结合能, 与活性

残基紧密结合，形成稳定的复合物。二氢白藜芦醇与 NorA (见图 4C) 蛋白的关键残基 Asn137、Asp307、Arg310、Glu222 之间形成氢键，二氢白藜芦醇同样与 Phe140 之间形成 π - π 堆积作用，使其与蛋白的亲合力增加，形成了稳定的复合物。橙皮素与 NorA (见图 4D) 蛋白的关键残基 Gln51、Glu222、Arg310 之间形成氢键，并且与残基 Phe16 和 Phe140 之间存在疏水相互作用，使蛋白质空间结构稳定。

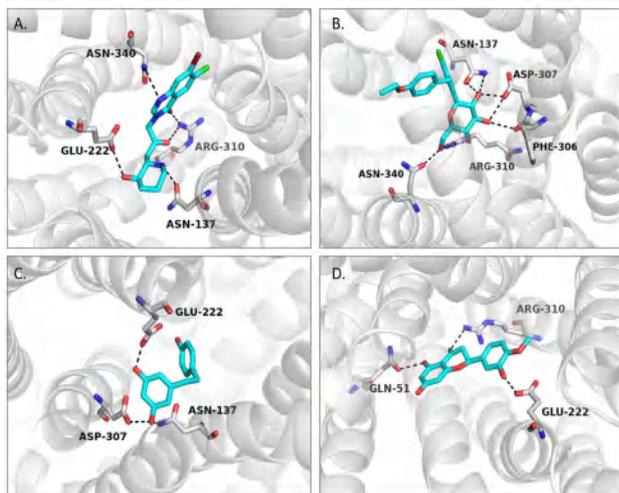


图 4 候选化合物与 NorA 相互作用

Fig 4 Interacting of Hit compounds and NorA

注 (Note): A. NorA- 氢溴酸常山酮 (NorA-halofuginone); B. NorA- 达格列净 (NorA-dapagliflozin); C. NorA- 二氢白藜芦醇 (NorA-dihydroresveratrol); D. NorA- 橙皮素 (NorA-hesperetin)。

上述结果表明，候选化合物均与 NorA 蛋白之间存在多种相互作用力，结合紧密，形成了稳定的复合物。为进一步验证虚拟筛选方法的准确性和可靠性，本课题组以利血平作为阳性药参照，研究表明利血平对 NorA 蛋白具有抑制作用，分析利血平与 NorA 蛋白的结合模式及结合口袋位置。如图 5 所示，利血平与 NorA 的氨基酸残基 Glu222 和 Asn340 之间产生了氢键，与 Phe140 和 Arg310 之间产生 π - π 堆积作用，形成稳定的复合物。4 个候选化合物与 NorA 的结合模式与利血平相似，且结合口袋位置相同，表明候选化合物可能具有与利血平相似的作用。

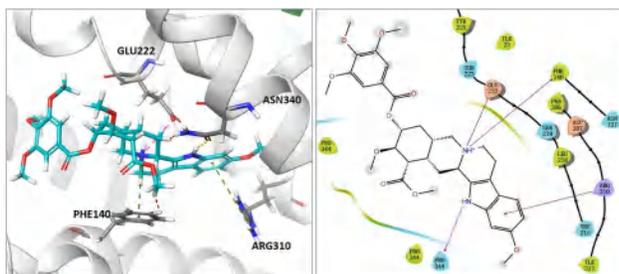


图 5 利血平与 NorA 相互作用

Fig 5 Interacting of reserpine and NorA

2.5 候选化合物结构分析

经过多轮虚拟筛选得到了 4 个候选化合物，对 NorA 有抑制活性，其结构如图 1 所示。氢溴常山酮属于喹诺酮类化合物，达格列净属于 C-葡萄糖苷类化合物，二氢白藜芦醇属于二苯乙烯类化合物，是白藜芦醇的还原形式，橙皮素属于黄酮类化合物。尽管这些化合物属于不同类别，但都具有氢键供体或受体基团，如羟基或酮基等极性官能团，这些基团能够形成氢键，增加了化合物与靶标蛋白的结合稳定性。4 个候选化合物都具有芳香环结构，有助于增强化合物与 NorA 蛋白的相互作用，特别是与疏水性残基的堆积作用。此外，这些化合物都具有一定的结构灵活性，与 NorA 蛋白的多个不同残基形成了相互作用，能够适应蛋白质表面的不同结合口袋。这些共性特征可以为后续 NorA 抑制剂的开发研究提供参考。

3 讨论

细菌的多药耐药性已成为一个日益严峻的问题，极大地限制了新抗菌药物的开发。因此，研发抗菌药物佐剂成为解决这一问题的关键途径之一。外排泵是细菌耐药性的重要机制，大多数已发现的外排泵抑制剂因毒性大、成药性差或活性低而难以应用于临床。因此，开发新型外排泵抑制剂对于克服细菌耐药性至关重要。传统的药物研发流程耗时长且效率低下，而计算机虚拟筛选方法则可以大幅缩短研发周期，提高成功率。本研究利用计算机方法从天然产物库中筛选出具有潜力的新型 NorA 抑制剂，旨在解决细菌的多药耐药问题。

NorA 蛋白是革兰氏阳性细菌多药耐药性的关键调控因子，抑制 NorA 蛋白功能对于克服多药耐药性具有重要意义。本文基于 NorA 蛋白的三维结构，从中药及天然产物数据库中进行虚拟筛选，并采用分子对接和分子动力学模拟等方法进行深入研究。经过多轮筛选，最终获得了 4 个对 NorA 具有抑制活性的候选化合物。分子对接结果显示这些化合物与 NorA 形成了稳定的复合物，并具有较强的结合亲和力。同时，ADMET 性质预测和分子动力学模拟结果也表明这些化合物具有良好的成药性和结构稳定性。未来，我们将对这些化合物的活性进行测试，并进行毒性和安全性评估，以确保它们在临床应用中的可行性和安全性。

综上所述，本研究通过虚拟筛选方法成功筛选出 4 个有潜力的 NorA 蛋白抑制剂候选化合物，为解决多药耐药性问题提供了新的希望。然而，这些结果仍需要在实验中得到验证，并进行更深入的研究，以实现其在临床上的应用。这一研究为抗菌药物研发和多药耐药性的克服提供了新的方向和启示。

致谢: 感谢许磊教授提供了 Schrodinger 软件版权。

参考文献

- [1] Brawley DN, Sauer DB, Li J, et al. Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus* [J]. Nat Chem Biol, 2022, 18 (7): 706-712.
- [2] Bhaskar BV, Babu TM, Reddy NV, et al. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus* [J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 3237-3252.
- [3] Huemer M, Mairpady SS, Brugger SD, et al. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives [J]. EMBO Rep, 2020, 21 (12): e51034.
- [4] Mohanty H, Pachpute S, Yadav RP. Mechanism of drug resistance in bacteria: efflux pump modulation for designing of new antibiotic enhancers [J]. Folia Microbiol (Praha), 2021, 66 (5): 727-739.
- [5] Lamut A, Peterlin Mašič L, Kikelj D, et al. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria [J]. Med Res Rev, 2019, 39 (6): 2460-2504.
- [6] Yu XH, Hao ZH, Liu PL, et al. Increased expression of efflux pump *norA* drives the rapid evolutionary trajectory from tolerance to resistance against ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2022, 66 (12): e0059422.
- [7] Liu Y, Tong ZW, Shi JR, et al. Drug repurposing for next-generation combination therapies against multidrug-resistant bacteria [J]. Theranostics, 2021, 11 (10): 4910-4928.
- [8] Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Annu Rev Biochem, 2015, 84: 577-601.
- [9] Zhang L, Ma ST. Efflux pump inhibitors: a strategy to combat P-glycoprotein and the NorA multidrug resistance pump [J]. Chem Med Chem, 2010, 5 (6): 811-822.
- [10] Tommasi R, Iyer R, Miller AA. Antibacterial drug discovery: some assembly required [J]. ACS Infect Dis, 2018, 4 (5): 686-695.
- [11] Wright GD. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance [J]. Trends Microbiol, 2016, 24 (11): 862-871.
- [12] Shailaja S, Harshitha N, Fasim A, et al. Identification of a potential inhibitor for New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) from FDA approved chemical library-a drug repurposing approach to combat carbapenem resistance [J]. J Biomol Struct Dyn, 2023, 41 (16): 7700-7711.
- [13] Forli S, Huey R, Pique ME, et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite [J]. Nat Protoc, 2016, 11 (5): 905-919.
- [14] Ma DL, Chan DS, Leung CH. Drug repositioning by structure-based virtual screening [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42 (5): 2130-2141.
- [15] Kumar G, Kiran TA. Tackling multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by natural products and their analogues acting as NorA efflux pump inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2023, 80: 117187.
- [16] Jha RK, Singh E, Khan RJ, et al. Droperidol as a potential inhibitor of acyl-homoserine lactone synthase from *A. baumannii*: insights from virtual screening, MD simulations and MM/PBSA calculations [J]. Mol Divers, 2023, 27 (5): 1979-1999.
- [17] Palazzotti D, Felicetti T, Sabatini S, et al. Fighting antimicrobial resistance: insights on how the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump recognizes 2-phenylquinoline inhibitors by supervised molecular dynamics (SuMD) and molecular docking simulations [J]. J Chem Inf Model, 2023, 63 (15): 4875-4887.
- [18] Sastry GM, Adzhigirey M, Day T, et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments [J]. J Comput Aided Mol Des, 2013, 27 (3): 221-234.
- [19] Yang Y, Yao K, Repasky MP, et al. Efficient exploration of chemical space with docking and deep learning [J]. J Chem Theory Comput, 2021, 17 (11): 7106-7119.
- [20] Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, et al. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes [J]. J Med Chem, 2006, 49 (21): 6177-6196.
- [21] Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening [J]. J Med Chem, 2004, 47 (7): 1750-1759.
- [22] Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. method and assessment of docking accuracy [J]. J Med Chem, 2004, 47 (7): 1739-1749.
- [23] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42717.
- [24] Paul Bauer, Berk Hess, Erik Lindahl. GROMACS 2022.3 manual (2022.3) [S]. Zenodo, 2022, 7037337.
- [25] Jo S, Cheng X, Lee J, et al. CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation [J]. J Comput Chem, 2017, 38 (15): 1114-1124.
- [26] Valdés-Tresanco MS, Valdés-Tresanco ME, Valiente PA, et al. gmx_MMPBSA: a new tool to perform end-state free energy calculations with GROMACS [J]. J Chem Theory Comput, 2021, 17 (10): 6281-6291.
- [27] van der Schot G, Bonvin AM. Performance of the WeNMR CS-Rosetta3 web server in CASD-NMR [J]. J Biomol NMR, 2015, 62 (4): 497-502.

(收稿日期: 2024-04-10; 修回日期: 2024-06-27)

两种 10-羟基喜树碱碳酸酯的合成及其抗结肠癌活性研究

王维¹, 陈家美², 贺欢欢¹, 刘静¹, 杨俊², 梁光平^{2*} (1. 遵义医科大学附属医院临床医学公共实验中心, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义医药高等专科学校药理学系, 贵州 遵义 563006)

摘要: **目的** 寻找高效低毒的 10-羟基喜树碱新型衍生物。**方法** 以 4-氨基丁醇为起始原料, 羟基端通过酯化反应与 *N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸保护, *N*端进一步与对硝基苯基氯甲酸酯反应后, 再分别与 10-羟基喜树碱、7-乙基-10-羟基喜树碱反应得到两种碳酸酯类衍生物, 其结构经 HR-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 表征确认。以伊立替康为阳性对照, 采用 CCK8 法测试它们对人结肠癌细胞 (HCT-116、Caco2)、人结肠癌耐药细胞 (HCT-15/Taxol、HCT-8/V、HCT-116/5-FU)、人正常结肠上皮细胞 (NCM-460) 的抑制活性。HPLC 初步分析衍生物在不同 pH 下的稳定性。**结果** 两种碳酸酯类衍生物对五种结肠癌细胞具有显著的抑制作用, 且来源于 7-乙基-10-羟基喜树碱的衍生物对 HCT-15/Taxol、HCT-8/V、HCT-116/5-FU 等结肠癌耐药细胞的抑制活性优于非耐药结肠癌细胞 HCT-116、Caco2, *IC*₅₀ 分别为 2.56、2.70、1.42 μmol · L⁻¹。其对 HCT-8/V、HCT-116/5-FU 的选择指数 (*SI*) 也优于阳性对照伊立替康。在 pH 1.0 下, 该衍生物 3 h 内可稳定在 70% 左右, 4 h 后急剧下降到 10% 以下; 在 pH 7.4 下, 12 h 内可稳定在 80% ~ 90%。**结论** 来源于 7-乙基-10-羟基喜树碱的碳酸酯衍生物可作为抗结肠癌药物做进一步研究。

关键词: 10-羟基喜树碱; 衍生物; 结肠癌

中图分类号: R96, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3235-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.016

Synthesis and anti-colon cancer activity of 10-hydroxycamptothecin carbonates

WANG Wei¹, CHEN Jia-mei², HE Huan-huan¹, LIU Jing¹, YANG Jun², LIANG Guang-ping^{2*} (1. *Public Laboratory Center for Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563000*; 2. *Department of Pharmacy, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi Guizhou 563006*)

Abstract: Objective To find novel 10-hydroxycamptothecin derivatives with high efficiency and low toxicity. **Methods** The 4-aminobutanol was used as the starting material, the hydroxyl group was protected by Z-Gly-Pro-OH through esterification reaction, and the *N*-terminal was further reacted with *p*-nitrophenylchloroformate, and then reacted with 10-hydroxycamptothecin or 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin to obtain two carbonic acid derivatives, whose structures were confirmed by HR-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. CCK8 assay was used to test the inhibition of irinotecan on human colon cancer cells (HCT-116 and Caco2), human colon cancer drug resistant cells (HCT-15/Taxol, HCT-8/V, and HCT-116/5-FU) and human normal colon epithelial cells (NCM-460) with irinotecan as positive control. The stability at different pH values was analyzed by HPLC. **Results** Both carbonic acid derivatives had significant inhibition on 5 colon cancer cells. The derivative derived from 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin showed better inhibition on HCT-15/Taxol, HCT-8/V and HCT-116/5-FU cells (with *IC*₅₀ values being 2.56, 2.70 and 1.42 μmol · L⁻¹, respectively) than that on HCT-116 and Caco2 cells. The selection index of HCT-8/V and HCT-116/5-FU was better than that of irinotecan. At pH 1.0, the original drug stabilized at about 70% for 3 h, and then drop sharply to less than 10% after 4 h. At pH 7.4, the original drug stabilized at about 80% ~ 90% within 12 h. **Conclusion** Carbonic acid derivatives from 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin can be further studied as anti-colon cancer drugs.

Key words: 10-hydroxycamptothecin; derivative; colon cancer

基金项目: 遵义市科技合作计划项目 (遵市科合 HZ 字 [2022] 146 号)。

作者简介: 王维, 女, 助理实验师, 主要从事小分子抗肿瘤活性研究, email: 1136912458@qq.com *通信作者: 梁光平, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事杂环小分子靶向抗肿瘤抑制剂的研究, email: guangping_liang@aliyun.com

结直肠癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 位居女性第二、男性第三^[1]。目前, 虽然结直肠癌的治疗方法以手术切除为主, 但随着新型靶向药物的应用, 靶向治疗已逐步成为结直肠癌个体化治疗和综合治疗的一线方案, 如西妥昔单抗、瑞戈非尼、伊立替康、拉罗替尼等均已获批用于结直肠癌的治疗^[2-3]。在这些小分子药物中, 经天然产物 10-羟基喜树碱结构衍生的伊立替康是研究最好的拓扑异构酶 I 抑制剂之一, 它是一种水溶性喜树碱类前体药物, 在体内羧酸酯酶的裂解下转化为 7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN38) 而发挥作用^[4], 常与其他药物 (如奥沙利铂) 配合作为结直肠癌的一线或二线治疗方案使用。但是, 伊立替康存在恶心、呕吐、疲乏、发热、迟发性腹泻、脱发等多种不良反应以及稳定性低的缺陷。其中, 迟发性腹泻的发生率较高, 严重者甚至会危及生命, 这也限制了伊立替康在临床中的应用^[4]。

根据伊立替康的体内代谢可知, 羧酸酯酶主要裂解 C₁₀-OH 连接的酰胺结构。而碳酸酯作为常见的一种结构, 已用于人参皂苷元^[5]、姜黄素^[6]等天然产物的结构修饰中, 得到的衍生物具有良好的抗肿瘤活性, 并且碳酸酯结构用于前体药物研究也有报道^[7]。鉴于喜树碱 C₁₀-OH 连接酰胺结构得到的伊立替康存在多种不良反应, 碳酸酯在抗肿瘤化合物结构修饰中已有应用。因此, 本研究以 10-羟基喜树碱 (6a)、SN38 (6b) 为原料, 通过如图 1 所示路线制备了两种碳酸酯类衍生物 (7a、7b), 并通过活性筛选评价它们在结直肠癌治疗中的应用潜力, 为 10-羟基喜树碱碳酸酯类衍生物在抗结直肠癌方面的应用研究提供参考。

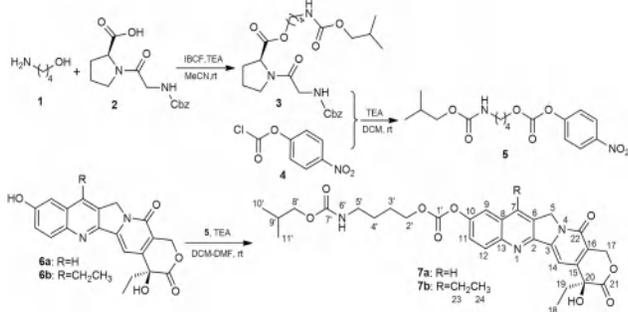


图 1 10-羟基喜树碱碳酸酯衍生物的合成路线

Fig 1 Synthetic route of 10-hydroxycamptothecin carbonate derivatives

1 材料

1.1 仪器

AVANCE NEO 600MHz 型 NMR 仪 (DMSO-*d*₆ 为氘代溶剂, 德国 Bruker 公司); 8045 型三重四极杆 LC-MS 仪 (日本岛津公司); U3000-Q Exactive Focus 型 HR-MS 仪 (美国 Thermo Fisher 公司); MCO-15AC 型二氧化碳培养箱 (日本 SANYO 公司); Flexstation

3 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); SGW X-4 型显微熔点仪 (上海仪电物理光学仪器有限公司); RV3 型旋转蒸发仪 (德国 IKA 公司)。

1.2 试剂

10-羟基喜树碱、SN38、*N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸、对硝基氯甲酸苯酯、氯甲酸异丁酯 (IBCF) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 伊立替康 (MedChemExpress 公司); 乙腈、二氯甲烷 (DCM)、甲醇、三乙胺 (TEA)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 均为市售分析纯, 未经进一步处理直接使用。

1.3 细胞

人结肠癌细胞 (HCT-116、Caco2)、人正常结肠上皮细胞 (NCM-460) (上海富衡生物科技有限公司)。人结肠癌耐药细胞 (HCT-15/Taxol)、人结肠癌长春新碱耐药株 (HCT-8/V) (北京北纳创联生物技术研究院)。人结肠癌耐药细胞 (HCT-116/5-FU) (武汉华研生物科技有限公司)。DMEM 培养基、胎牛血清、PRMI1640 培养基、胰蛋白酶 (索莱宝公司)。

2 方法

2.1 化学合成

2.1.1 中间体 3 的合成 取 *N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸 2 (600 mg, 1.96 mmol) 溶于 30 mL 乙腈, 加入三乙胺 (1.1 mL, 7.83 mmol) 后冰浴 10 min, 搅拌下缓慢滴加氯甲酸异丁酯 (1.0 mL, 7.83 mmol)。继续冰浴反应 30 min, 缓慢滴加 4-氨基-1-丁醇 (1, 2.7 mL, 29.38 mmol) 的乙腈溶液 6 mL, 滴毕后自然升温至室温反应, TLC 检测 6 h 反应完全, 45 °C 减压除去乙腈, 残留物加水 (150 mL) 稀释, 二氯甲烷 (100 mL×3) 萃取, 45 °C 减压回收溶剂得黄色油状物中间体 3, 未经纯化直接用于下一步反应。

2.1.2 中间体 5 的合成 将上一步制得的中间体 3 (930 mg, 2.46 mmol) 溶解在 40 mL 二氯甲烷中, 室温下加入对硝基氯甲酸苯酯 4 (992 mg, 4.93 mmol) 搅拌溶解后, 缓慢滴加三乙胺 (688 μL, 4.93 mmol), 室温搅拌反应, TLC 检测 22 h 反应完全, 反应液加 200 mL 水稀释, 乙酸乙酯 (150 mL×3) 萃取, 45 °C 减压回收溶剂, 残留物经快速柱层析 (二氯甲烷-甲醇=30:1) 纯化得黄色油状物 5, 45 °C 干燥后未经纯化直接用于下一步反应。

2.1.3 目标产物 7a、7b 的合成 参照文献^[8]方法, 取 6a (185.6 mg, 0.51 mmol) 溶于二氯甲烷:*N,N*-二甲基甲酰胺 (1:1) 20 mL 混合溶液中, 依次加入三乙胺 (177 μL, 1.27 mmol)、中间体 5 (330 mg, 0.61 mmol), 室温搅拌, TLC 检测

36 h 反应完全, 反应液加 150 mL 水稀释, 乙酸乙酯 (100 mL×3) 萃取, 减压回收溶剂, 残留物经快速柱层析 (二氯甲烷-甲醇=70:1) 纯化得浅黄色粉末 **7a**, 收率 67.4%。m.p. 205.4~206.0 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.66 (s, 1H, 7-ArH), 8.20 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, 12-ArH), 8.02 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 9-ArH), 7.77 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H, 11-ArH), 7.34 (s, 1H, 14-ArH), 7.17 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, 6'-NH), 6.55 (s, 1H, 20-OH), 5.43 (s, 2H, 17-CH₂), 5.28 (s, 2H, 5-CH₂), 4.27 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, 2'-CH₂), 3.77~3.71 (m, 2H, 8'-CH₂), 3.04 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, 5'-CH₂), 1.93~1.85 (m, 2H, 19-CH₂), 1.85~1.79 (m, 1H, 9'-CH), 1.74~1.67 (m, 2H, 3'-CH₂), 1.53 (dt, *J* = 14.4, 7.0 Hz, 2H, 4'-CH₂), 0.89 (t, *J* = 5.1 Hz, 3H, 18-CH₃), 0.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, 10', 11'-CH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 172.9 (22-C=O), 157.2 (21-C=O), 156.9 (10-C), 153.4 (-C=O), 153.2 (-C=O), 150.5 (15-C), 149.6 (6-C), 146.4 (8-C), 145.7 (13-C), 131.8 (12-C), 131.1 (3-C), 131.0 (2-C), 128.7 (7-C), 125.9, 119.7, 119.3, 97.2 (14-C), 72.8 (C-20), 70.1 (-OCH₂), 69.1 (-OCH₂), 65.7 (17-C), 50.7 (5-C), 40.5 (5'-C), 30.7 (19-C), 28.1 (9'-C), 26.2 (-CH₂), 25.9 (-CH₂), 19.4 (2×C, 10', 11'-CH₃), 8.3 (18-CH₃)。HR-MS, *m/z* calcd. for C₃₀H₃₄O₉N₃ ([M + H]⁺): 580.2289, found: 580.2267^[9]。

取 **6b** (200.2 mg, 0.51 mmol)、三乙胺 (177 μL, 1.27 mmol)、中间体 **5** (330 mg, 0.61 mmol), 采用与化合物 **7a** 相同方法制得淡黄色粉末 **7b**, 收率 62.3%。m.p. 223.0~223.5 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.15 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, 12-ArH), 8.08 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, 9-ArH), 7.72 (dd, *J* = 9.1, 2.4 Hz, 1H, 11-ArH), 7.30 (s, 1H, 14-ArH), 7.17 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, 6'-NH), 6.54 (s, 1H, 20-OH), 5.43 (s, 2H, 17-CH₂), 5.24 (s, 2H, 5-CH₂), 4.27 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, 2'-CH₂), 3.73 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, 8'-CH₂), 3.14 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, 23-CH₂), 3.04 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, 5'-CH₂), 1.93~1.79 (m, 3H, 19-CH₂, 9'-CH), 1.74~1.67 (m, 2H, 3'-CH₂), 1.53 (dt, *J* = 14.3, 7.0 Hz, 2H, 4'-CH₂), 1.28 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, 24-CH₃), 0.89 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H, 18-CH₃), 0.87 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, 10', 11'-CH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆)

δ: 172.5 (22-C=O), 156.8 (21-C=O), 156.5 (10-C), 153.0 (-C=O), 152.1 (-C=O), 150.0 (15-C), 149.3 (6-C), 146.5 (8-C), 145.8 (13-C), 145.5, 131.4, 128.5, 127.0, 125.0, 119.1, 114.9, 96.8 (14-C), 72.4 (C-20), 69.7 (-OCH₂), 68.6 (-OCH₂), 65.3 (17-C), 49.5 (5-C), 40.1 (5'-C), 30.4 (19-C), 27.7 (9'-C), 25.8 (-CH₂), 25.5, 22.3, 19.0 (2×C, 10', 11'-CH₃), 13.9 (-CH₃), 7.8 (18-CH₃)。HR-MS, *m/z* calcd. for C₃₂H₃₈O₉N₃ ([M + H]⁺): 608.2603, found: 608.2581^[9]。

2.2 细胞活性测试

以伊立替康为阳性对照, 设置浓度为 0.01、0.1、1、10、100 μmol·L⁻¹, 根据文献^[9]的 CCK-8 法测试化合物 **7a**、**7b** 作用 48 h 对 HCT-116、Caco2、HCT-15/Taxol、HCT-8/V、HCT-116/5-FU、NCM-460 细胞的抑制活性, 采用 GraphPad Prism9 计算其半数抑制浓度 (IC₅₀), 同时以化合物对 NCM-460 细胞的 IC₅₀ 和各种结肠癌细胞的 IC₅₀ 比值计算选择指数 (SI 值)。

2.3 分子对接分析

从 PDB 数据库下载喜树碱耐药的拓扑异构酶 I 突变蛋白 (PDB: 1RRJ) 晶体结构, 按文献^[10]方法采用 Autodock 进行处理, 分析合成化合物与喜树碱耐药的拓扑异构酶 I 的相互作用。

2.4 pH 稳定性分析

化合物储备液的配制、色谱条件、HPLC 分析同文献^[9]。pH 1.0、pH 4.0 缓冲液按文献^[11]方法配制。

3 结果与讨论

3.1 目标化合物的合成及表征

在最初的合成过程中, 课题组拟以 4-氨基-1-丁醇 (**1**) 作为连接臂, 将特异性作用于成纤维细胞激活蛋白 α (FAPα) 的底物 *N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸 (**2**) 与 10-羟基喜树碱拼接, 以获取 10-羟基喜树碱衍生物 (**9a**、**9b**, 见图 2), 开展作用于成纤维细胞激活蛋白 α 的相关研究。但在实际合成中, 经质谱和核磁表征确定所得终产物为化合物 **7a**、**7b**, 并未获得预期的化合物 **9a**、**9b**。通过对合成路径的分析, 发现 4-氨基-1-丁醇在氯甲酸异丁酯和三乙胺的作用下可同时与 NH₂、OH 形成中间态, 当 *N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸加入后, 4-氨基-1-丁醇 OH 端的中间态优先和 *N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸的羧基反应生成中间体 **3**, 而非通过反应得到中间体 **8**。随后, 中间体 **3** 与对硝基氯甲酸苯酯继续在三乙胺作用下反应时, *N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸部分起到类似“保护载体”的作用, 被对硝基氯甲酸苯酯置换去除, 最终生成了中间体 **5**。中间

体 **5** 再分别与 10-羟基喜树碱、SN38 反应得到了具有碳酸酯结构的衍生物 **7a**、**7b**。

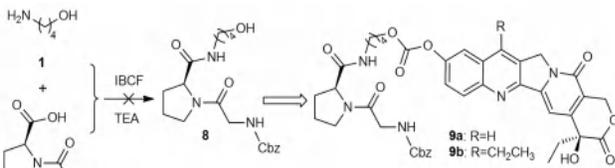


图 2 10-羟基喜树碱与 *N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸拼接合成原定路线

Fig 2 Original synthesis route of 10-hydroxycamptothecin and Z-Gly-Pro-OH

由于实际合成目标产物并非为预想中的结构，我们通过 ¹H-NMR 分析了第一步反应所得油状物 **3**。对比原料 **2** 的 ¹H-NMR，在中间体 **3** 的 ¹H-NMR 中新增了酰胺、CH₂、CH₃ 等片段信息（见图 3）。在 MS 中，也检测到 *m/z* 478 的碎片信息，为中间体 **3** 的分子离子峰。因此，初步确定得到的中间体为化合物 **3**，而非化合物 **8**。

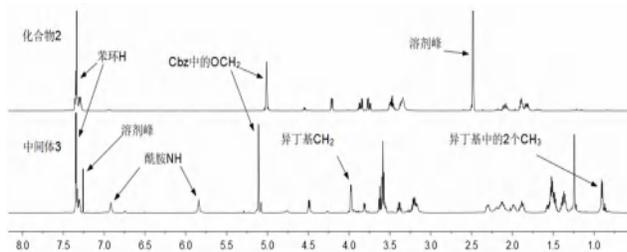


图 3 原料 **2** 和中间体 **3** 的 ¹H-NMR 对比

Fig 3 ¹H-NMR comparison of raw material **2** and intermediate **3**

同时，借助 HR-MS 分析得知化合物 **7a** 中含有 30 个 C、33 个 H。在化合物 **7a** 的 ¹H-NMR 中， δ_{H} 0.89、0.88 附近有 9 个 H 质子信号，分别为 10-羟基喜树碱结构中的 18-CH₃ 以及 10' 和 11' 位的 2 个甲基信号。 δ_{H} 7.17 的三重峰为酰胺 NH 的 H 质子信

号， δ_{H} 4.27、3.04、1.74-1.67、1.53 为来源于 4-氨基-1-丁醇的 4 个 CH₂ 质子信号， δ_{H} 1.85 ~ 1.79 的 1 个 H 为来源于氯甲酸异丁酯中异丁基 CH 质子信号， δ_{H} 3.71 的 2 个 H 为来源于氯甲酸异丁酯中异丁基 CH₂ 质子信号。而在 ¹³C-NMR 中， δ_{C} 19.4 也有 2 个来源于相同化学环境的甲基 C 信号，且 δ_{C} 153.4、153.2 比 10-羟基喜树碱多了 2 个羰基 C 信号。其他 C、H 信号与文献^[12]报道的 10-羟基喜树碱的 ¹H-NMR、¹³C-NMR 信号基本一致。因此，我们确认化合物 **7a**、**7b** 为如图 1 中所示的结构。

3.2 抗肿瘤活性

根据表 1 的细胞活性结果可知，化合物 **7a**、**7b** 对人正常结肠细胞 NCM-460 的抑制作用比阳性对照伊立替康弱，说明化合物 **7a**、**7b** 对正常细胞的毒性可能更低。在对五种结直肠癌细胞抑制作用方面，虽然化合物 **7a**、**7b** 的抑制强度虽比阳性对照弱，但也具有较好的 IC₅₀。同时，化合物 **7b** 对三种结肠癌耐药细胞（HCT-15/Taxol、HCT-8/V、HCT-116/5-FU）的抑制活性优于两种非耐药结肠癌细胞（HCT-116、Caco2），对 HCT-15/Taxol、HCT-8/V、HCT-116/5-FU 的 IC₅₀ 值分别为 2.56、2.37、1.42 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，初步显示化合物 **7b** 可能在结直肠癌耐药研究中具有更大的潜力。

同时，计算化合物 **7a**、**7b** 对五种结直肠癌细胞的选择指数 SI 值（见表 1）。结果显示，除化合物 **7a** 对 HCT-116/5-FU 细胞的 SI 值小于 1.00 外，其余 SI 值均大于 1.00，尤以化合物 **7b** 对结肠癌耐药细胞 HCT-8/V、HCT-116/5-FU 的作用最突出，分别达到了伊立替康的 2.8 倍、1.5 倍。提示化合物 **7b** 在对 5-氟尿嘧啶、长春新碱等药物治疗后的结肠癌耐药情况可能比伊立替康更有潜力，值得进一步研究。

表 1 化合物 **7a**、**7b** 对 6 种细胞的抑制作用及其选择指数

Tab 1 Inhibitory effect of compounds **7a** and **7b** on 6 cells and their selection index

化合物	HCT-116		Caco2		HCT-15/Taxol		HCT-8/V		HCT-116/5-FU		NCM-460	
	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SI	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SI	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SI	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SI	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SI	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SI
7a	7.01	1.77	5.22	2.38	11.76	1.05	9.23	1.34	12.56	0.99	12.40	1.00
7b	7.71	1.95	5.33	2.82	2.56	5.87	2.37	6.33	1.42	10.56	15.02	1.00
伊立替康	0.35	6.25	0.70	3.16	0.33	6.68	0.98	2.24	0.31	7.07	2.20	1.00

化合物 **7b** 对三种结肠癌耐药细胞（HCT-15/Taxol、HCT-8/V、HCT-116/5-FU）的抑制活性优于两种非耐药结肠癌细胞（HCT-116、Caco2），且具有较高的 SI，故我们采用分子对接分析了化合物 **7b** 与喜树碱耐药的拓扑异构酶 I 突变蛋白（PDB: 1RRJ）的结合作用。结果显示，化合物 **7b** 与该蛋白的结合自

由能为 $-36.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，并且与蛋白残基 Asn491、Thr501、Arg364 形成 3 个氢键，键长分别为 2.98Å、2.84Å、2.91Å。同时，化合物 **7b** 与 Val502、Lys493、Thr498、Gly363、Phe361、Glu418、Lys374、Lys425、Asp533、Lys532、Gly490、Gly503、Arg488 等 13 个蛋白残基还产生了疏水作用（见图 4）。

而阳性对照伊立替康与该蛋白无论是氢键数量还是疏水作用均弱于化合物 **7b**。仅在 Asn352 形成 1 个键长为 2.93Å 的氢键 (见图 4)。在疏水作用方面, 伊立替康与 Pro431、Lys436、Pro357、Tyr426、Glu418、Lys374、Ile377、Glu356、Asn419、Lys425、Arg375 等 11 个蛋白残基形成疏水作用, 也少于化合物 **7b** 的 13 个。

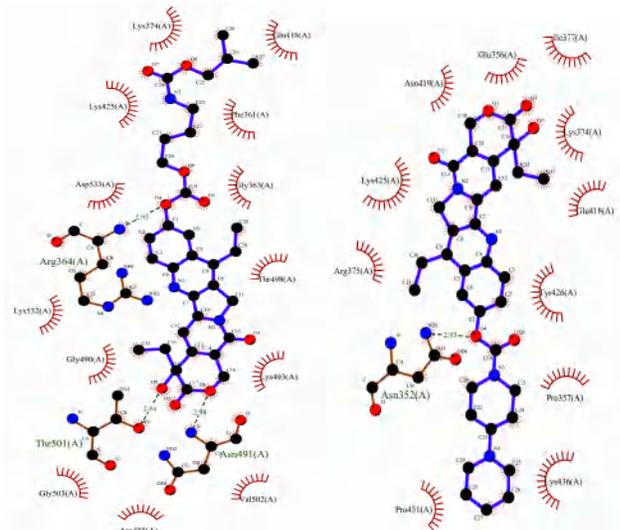


图 4 化合物 **7b** (左)、伊立替康 (右) 与喜树碱耐药的拓扑异构酶 I 突变蛋白的分子对接

Fig 4 Molecular docking of compounds **7b** (left) and irinotecan (right) with camptothecin-resistant topoisomerase I mutant protein

此外, 由于喜树碱类药物的稳定性也是影响其使用的重要因素, 本研究还初步分析了化合物 **7b** 在 pH 1.0、pH 7.4 下的稳定性。结果显示, 化合物 **7b** 在 pH 1.0 中的稳定性差, 3 h 内原药结构形式仅稳定在 70% 左右, 到 4 h 急剧下降到 10% 以下^[9]。而在 pH 7.4 中, 化合物 **7b** 在 12 h 内原药结构形式可稳定在 80% ~ 90% (见图 5)。但由于喜树碱内酯环在不同 pH 下具有不同的解离形式^[13], 暂不确定化合物 **7b** 降解后的具体情况。

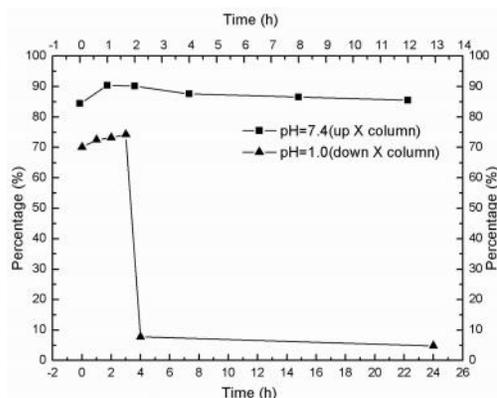


图 5 化合物 **7b** 在不同 pH 下的稳定性

Fig 5 Stability of compound **7b** at different pH

4 结论

以 *N*-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸充当“保护基”作用, 通过三步反应制得了两种 10-羟基喜树碱碳酸酯衍生物, 反应条件温和且易操作。来源于 7-乙基-10-羟基喜树碱的碳酸酯衍生物对耐药结直肠癌细胞的抑制作用、SI 优于非耐药结直肠癌细胞, 且该衍生物在弱碱性条件下具有较好的稳定性, 具有进一步研究的潜力。

参考文献

- [1] 梁光平, 胡恩明, 唐文茜, 等. 猕猴桃根抗结肠癌活性提取物的筛选及其成分分析 [J]. 生物资源, 2023, 45 (3): 250-258.
- [2] Paty PB, Garcia-Aguilar J. Colorectal cancer [J]. J Surg Oncol, 2022, 126 (5): 881-887.
- [3] 顾艳宏, 姜争, 李健, 等. 结直肠癌靶向治疗中国专家共识 [J]. 中华普通外科学文献 (电子版), 2023, 17 (1): 1-8.
- [4] 宋成慧, 杨扬, 拓扑异构酶抑制剂伊立替康的研究进展 [J]. 广东化工, 2023, 50 (8): 88-90.
- [5] Guo JH, Xu Z, Liu YF, et al. Synthesis of novel 25-hydroxyprotopanaxadiol derivatives by methylation and methoxycarbonylation using dimethyl carbonate as a environment-friendly reagent and their anti-tumor evaluation [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26 (19): 4763-4768.
- [6] Lee DY, Lin HY, Ramasamy M, et al. Synthesis and characterization of the ethylene-carbonate-linked L-valine derivatives of 4, 4-dimethylcurcumin with potential anti-cancer activities [J]. Molecules, 2021, 26 (22): 7050.
- [7] Li YW, Ye C, Cai CC, et al. Design and synthesis of polymer prodrugs for improving water-solubility, pharmacokinetic behavior and antitumor efficacy of TXA9 [J]. Pharm Res, 2020, 37 (3): 66.
- [8] 吴玲, 龚琳慧, 宿冬远, 等. 新型 7-乙基-10-羟基喜树碱衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性 [J]. 合成化学, 2019, 27 (4): 237-243.
- [9] 梁光平, 王维, 杨俊. 一种 10-羟基喜树碱碳酸酯类化合物及其制备方法与应用: 202410307128.6 [P]. 2024-03-18.
- [10] 梁光平, 王维, 朱绪秀, 等. 新型齐多夫定与 4-苯胺啉啉骨架拼接产物的合成及体外抗肿瘤活性 [J]. 有机化学, 2022, 42 (9): 2793-2805.
- [11] 蔡慧杰. 口服吉西他滨前药的合成及研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [12] 李国强, 李韵仪, 谭卓杰. 10-羟基喜树碱的波谱学结构解析 [J]. 广东化工, 2018, 45 (12): 75-76.
- [13] Thakur R, Sivakumar B, Savva M. Thermodynamic studies and loading of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin into mesoporous silica particles MCM-41 in strongly acidic solutions [J]. J Phys Chem B, 2010, 114 (17): 5903-5911.

(收稿日期: 2024-04-07; 修回日期: 2024-05-30)

参紫灵胶囊对二氧化硅诱导的大鼠肺纤维化的改善作用及其作用机制研究

邹敏, 王风华, 胡雄飞, 余晓巍, 张婷, 田秋艳, 王若伊, 卢涛, 邓晓彬*, 田审* (湖南省职业病防治院, 长沙 410007)

摘要: **目的** 观察参紫灵灌胃对二氧化硅诱导的大鼠肺纤维化改善作用, 并探讨其作用机制。 **方法** 将雄性 SD 大鼠 120 只随机分为 5 组, 分别为对照组、模型组、参紫灵胶囊低剂量组、参紫灵胶囊中剂量组、参紫灵胶囊高剂量组, 每组 24 只。除对照组外, 其余各组采用一次性非暴露式二氧化硅气管滴注法制作硅肺模型。造模成功后第 2 日, 对照组和模型组均给予 10 mL/(kg·d) 生理盐水灌胃, 参紫灵胶囊高、中、低剂量组分别给予 0.60、0.30、0.15 mg/(g·d) 参紫灵胶囊灌胃, 连续 28 d。分别检测大鼠体重增重、肺脏脏器系数、肝脏脏器系数和脾脏脏器系数。HE 染色观察肺组织病理变化; ELISA 试剂盒检测各组大鼠血清中干扰素 (IFN)- γ 、白细胞介素 (IL)-17、IL-4 和 CD25 水平。 **结果** 与模型组相比, 对照组及参紫灵胶囊低剂量组、中剂量组和高剂量组的大鼠在体重增重、肺脏脏器系数、肝脏脏器系数和脾脏脏器系数方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组大鼠的肺泡腔内充满分泌物及渗出物, 并且炎性浸润显著增加。经参紫灵胶囊治疗后, 大鼠肺组织的炎性损伤显著减轻, 血清中的 IFN- γ 、IL-17 和 CD25 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 IL-4 水平显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 **结论** 参紫灵胶囊能改善肺组织炎症损伤, 其作用机制可能与抑制 IFN- γ 、IL-17 和 CD25 因子释放, 增加 IL-4 因子表达水平有关。

关键词: 参紫灵; 肺纤维化; 炎症损伤

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3240-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.017

Effect and mechanism of Shenziling capsules on silica-induced pulmonary fibrosis in rats

ZOU Min, WANG Feng-hua, HU Xiong-fei, YU Xiao-wei, ZHANG Ting, TIAN Qiu-yan, WANG Ruo-yi, LU Tao, DENG Xiao-bin*, TIAN Shen* (Hunan Provincial Institute for Occupational Disease Prevention, Changsha 410007)

Abstract: Objective To observe the improvement effect of Shenziling capsules on silica-induced pulmonary fibrosis in rats and to explore its mechanism. **Methods** Totally 120 male SD rats were randomly divided into 5 groups: a control group, a model group, a low-dose Shenziling capsule group, a medium-dose Shenziling capsule group, and a high-dose Shenziling capsule group, with 24 rats in each group. Except for the normal group, the other groups used a single non-exposure silica tracheal instillation method to create a silicosis model. On the second day after successful modeling, the control group and model group were given 10 mL/(kg·d) normal saline by oral administration, and the high-, medium-, and low- dose Shenziling capsule groups were given 0.60, 0.30, and 0.15 g/(g·d) Shenziling capsules by oral administration for 28 consecutive days. The body weight gain, lung organ coefficient, liver organ coefficient, and spleen organ coefficient of the rats were measured. HE staining was used to observe pathological changes in lung tissue. ELISA kits were used to detect

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No.2021JJ30413); 湖南省职业病防治院院级课题 (No.Y2022-008)。

作者简介: 邹敏, 女, 主管药师, 硕士研究生, 主要从事临床药学与临床药理学研究, email: 18874039605@163.com *通信作者: 邓晓彬, 男, 主任药师, 主要从事临床药学与临床药理学研究, email: xdyyyjk@163.com; 田审, 男, 主管药师, 主要从事临床药学与临床药理学研究, email: 393920478@qq.com

the levels of IFN- γ , IL-17, IL-4, and CD25 in the serum of each group of rats. **Results** Compared with the model group, there was no significant difference in body weight gain, lung organ coefficient, liver organ coefficient, and spleen organ coefficient among the control group, low-dose Shenziling capsule group, medium-dose Shenziling capsule group, and high-dose Shenziling capsule group ($P > 0.05$). The alveolar cavity of rats in the model group was filled with secretions and exudates, and inflammatory infiltration increased significantly. After the treatment with Shenziling capsules, the inflammatory damage of lung tissue was significantly reduced, and the levels of IFN- γ , IL-17, and CD25 in the serum were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the level of IL-4 increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Shenziling capsules can improve inflammatory damage in the lung tissue, and its mechanism may be related to inhibiting the release of IFN- γ , IL-17, and CD25 factors and increasing the expression level of IL-4.

Key words: Shenziling capsule; pulmonary fibrosis; inflammatory damage

肺纤维化是一种慢性、进行性的肺组织纤维化病变, 表现为肺泡结构破坏和肺功能下降^[1]。该病症导致纤维结缔组织在肺组织内过度增生, 造成组织硬化和弹性丧失, 从而影响气体交换^[2]。全球范围内, 肺纤维化的发病率逐年上升, 在欧美国家为每 10 万人中有 5 ~ 20 例, 且以中老年男性为主^[3]。中医学认为其主要病因包括热毒、痰瘀阻滞肺络, 归属于“肺痹”“肺萎”等范畴^[4]。西医学则指出, 肺纤维化涉及细胞损伤与修复失调, 尤其是肺泡上皮细胞和内皮细胞的反复损伤^[5]。慢性炎症导致纤维母细胞活化, 过度生成胶原蛋白和细胞外基质, 吸烟、空气污染和职业暴露(如石棉、煤矿粉尘等)也是重要诱因。特发性肺纤维化预后不佳, 平均生存期为 3 ~ 5 年^[6]。当前治疗方法包括抗纤维化药物(如吡非尼酮和尼达尼布), 这些药物能够延缓疾病进展^[7-8]。此外, 免疫抑制剂如糖皮质激素和硫唑嘌呤也被使用, 但效果有限且副作用较大^[9-10]。抗纤维化药物虽然能在一定程度上延缓病情进展, 但总体效果有限, 无法根治疾病。多数患者在治疗后病情仍逐渐恶化, 可能需要依赖氧疗或考虑肺移植。治疗效果受限于肺纤维化发病机制复杂且尚未完全阐明。

参紫灵的处方是我院职业病科在传统方剂的基础上, 根据临床疗效不断修改和整理而得出的独特配方, 包含西洋参 40 g、冬虫夏草 80 g、紫河车 80 g、灵芝 60 g、枸杞子 40 g、何首乌 40 g、甘草 20 g, 采用二君二臣二佐一使的组方原则。各药合用, 具有补益肺肾、养血安神、止咳平喘的功效。经过多年的临床系统观察, 确认该处方在治疗肺纤维化方面具有独特且确切的疗效^[11]。肺部疾病通常伴随着炎症的产生, 干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-17 和 CD25 等促炎

因子通过增强细胞介导的免疫反应, 可能在肺纤维化的早期阶段通过加剧炎症反应导致组织损伤和纤维化^[12-14]; 而 IL-4、IL-10 等抗炎因子通过抑制 Th1 型免疫反应, 可能在某些情况下对纤维化过程起到保护作用^[15]。肺纤维化的发生和发展涉及复杂的免疫调节机制, 促炎因子和抗炎因子在其中扮演着关键角色。了解这些因子的具体作用, 有助于开发新的治疗策略, 调节免疫反应, 延缓纤维化进程。基于此, 本实验拟采用二氧化硅诱导的大鼠肺纤维化模型, 初步研究参紫灵灌胃对肺纤维化的抗炎作用, 并探讨其机制, 为中药的临床应用及二次开发提供参考。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠 120 只 [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 体重 180 ~ 220 g, 许可证号: SCXK(湘) 2019-0004]。实验动物饲养于湖南省职业病防治院 SPF 级动物房, 动物房内 12/12 h 明暗交替, 温度 (22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45% ~ 60%。本研究由湖南省职业病防治院伦理委员会批准, 批准备案编号: S2021JJMSXM3214。

1.2 药物

参紫灵胶囊是湖南省职业病防治院职业病科制备的医院制剂, 配方成分包括西洋参、冬虫夏草、紫河车、灵芝、枸杞子、何首乌和甘草, 按照比例称量后清洗、干燥、粉碎, 均匀混合后制粒并填充胶囊, 每粒规格为 0.36 g。成人每日总剂量为 2.88 g (48 mg \cdot kg⁻¹), 大鼠等效剂量为 302.4 mg \cdot kg⁻¹, 实验分为低、中、高剂量组, 分别为 0.15、0.30、0.60 mg/(g \cdot d)。二氧化硅(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 91053-39-3)。

苏木素-伊红染色液 [HE, 云科生物技术(泰

州)有限公司]; IFN- γ 、大鼠 IL-17、大鼠 IL-4、大鼠 CD25 ELISA 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

1.3 仪器

徕卡 2235 病理切片机(德国徕卡仪器有限公司); Axio Scope. A1 生物显微镜(德国蔡司); 高速冷冻离心机(HeraeusMultifuge X1R, 赛默飞世尔科技公司); TECAN sunrise 酶标仪(瑞士帝肯)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

将雄性 SD 大鼠 120 只随机分为 5 组, 分别为对照组、模型组、参紫灵胶囊高剂量组、参紫灵胶囊中剂量组、参紫灵胶囊低剂量组, 每组 24 只, 分笼饲养。正常饲养 7 d 后, 除对照组外, 模型组和参紫灵胶囊高、中、低剂量组采用一次性非暴露式二氧化硅气管滴注法制作硅肺模型。大鼠麻醉后, 模型组及参紫灵胶囊不同剂量组气管内滴注 1 mL 二氧化硅混悬液, 对照组气管内滴注 1 mL 生理盐水。造模后第 19 日每组随机抽取 2 只大鼠解剖观察大鼠肺组织纤维化程度, 病理切片证实大鼠肺组织纤维化形成即造模成功。造模成功后第 2 日, 将参紫灵胶囊的内容物从胶囊中取出, 并与生理盐水混合, 制成均匀的悬浊液, 对照组和模型组均给予 10 mL/(kg·d) 生理盐水灌胃。参紫灵胶囊高、中、低剂量组分别给予相应剂量参紫灵胶囊灌胃, 连续 28 d。

2.2 取材

末次给药后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉, 开胸腹, 腹主动脉采血后分离血清, 于 -20℃ 冰箱保存。取肺组织, 水洗, 滤纸吸干, 称定重量, 左侧肺叶固定于 4% 多聚甲醛, 右侧肺叶于冻存管 -80℃ 冰箱备用。

2.3 各组大鼠一般情况观察

5 组大鼠每周称重记录, 观察并记录动物的饮食活动、毛色、死亡等情况。每组于造模 28 d 后取 5 只大鼠处死, 处死后称量全肺、肝、脾湿重并记录。计算公式如下: 脏器系数(%) = 脏器湿重(mg)/体重(g) × 100%。

2.4 HE 染色

每组大鼠的左肺组织被制成石蜡切片, 并进行脱蜡和水化处理, 使用苏木精染色, 随后用盐酸水溶液分化, 再用氨水水溶液返蓝, 接着进行伊红染色、脱水和封片。观察肺组织中的炎性细胞浸润情况, 肺泡腔内是否有渗出物, 以及是否存在充血和水肿的改变。

2.5 ELISA 试剂盒测定大鼠血清中 IFN- γ 、IL-17、IL-4 和 CD25 水平

将冷冻保存的血清样本依次在 -20℃ 和 4℃ 条件下解冻, 将试剂盒平衡至室温后, 按照 ELISA 试剂盒说明书的步骤进行加样、孵育和洗板, 最后检测血清中 IFN- γ 、IL-17、IL-4 和 CD25 的含量变化。

2.6 统计分析

采用 GraphPad Prism 10.0.2 和 SPSS 25.0 软件进行数据图表制作及统计分析。计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。对于满足正态分布和方差齐性的情况, 采用单因素方差分析, 并使用 LSD 法进行两两比较; 对于不满足正态分布的情况, 应用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体重情况比较

与对照组相比, 药物干预 2 周和 3 周时, 模型组的大鼠体重均有所增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组相比, 药物干预后 2 周和 3 周时, 参紫灵胶囊高剂量组的大鼠体重增重有所增加, 而参紫灵胶囊低剂量组及中剂量组的大鼠体重增重有所减少, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 药物干预 2 周和 3 周各组大鼠体重增加情况比较

Tab 1 Weight gain in rats in each group at 2 weeks and 3 weeks after drug intervention

组别	增重/g	
	干预后 2 周	干预后 3 周
对照组	18.7 ± 7.8	44.3 ± 11.4
模型组	26.3 ± 5.8	48.9 ± 5.3
参紫灵胶囊低剂量组	25.0 ± 8.0	50.0 ± 12.6
参紫灵胶囊中剂量组	22.4 ± 11.0	40.9 ± 18.5
参紫灵胶囊高剂量组	26.4 ± 12.4	56.1 ± 10.5

3.2 各组大鼠脏器系数比较

与对照组相比, 模型组的肺脏、肝脏、脾脏脏器系数有所增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组相比, 参紫灵胶囊低、中、高剂量组的各脏器系数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 2。

3.3 各组大鼠肺组织病理形态比较

在对照组大鼠中, 肺泡结构清晰, 无充血、水肿及结节现象; 而模型组大鼠则表现为肺泡间隔增宽, 肺泡腔内充满分泌物和渗出物, 并伴有大量炎性浸润, 炎症相对面积显著增加。与模型组相比, 参紫灵胶囊低、中、高剂量组大鼠的肺泡结构较为完整, 肺泡腔内仅有少量渗出物和炎性浸润, 其炎症和纤维化相对面积显著减少。详见图 1。

表 2 药物干预后各组大鼠脏器系数比较

Tab 2 Organ coefficients in rats after the drug intervention

组别	肺脏脏器系数 /%	肝脏脏器系数 /%	脾脏脏器系数 /%
对照组	0.473 ± 0.010	2.563 ± 0.098	0.206 ± 0.019
模型组	0.565 ± 0.156	2.577 ± 0.204	0.215 ± 0.050
参紫灵胶囊低剂量组	0.635 ± 0.099	2.572 ± 0.245	0.195 ± 0.013
参紫灵胶囊中剂量组	0.605 ± 0.173	2.562 ± 0.202	0.198 ± 0.030
参紫灵胶囊高剂量组	0.539 ± 0.096	2.756 ± 0.408	0.209 ± 0.022

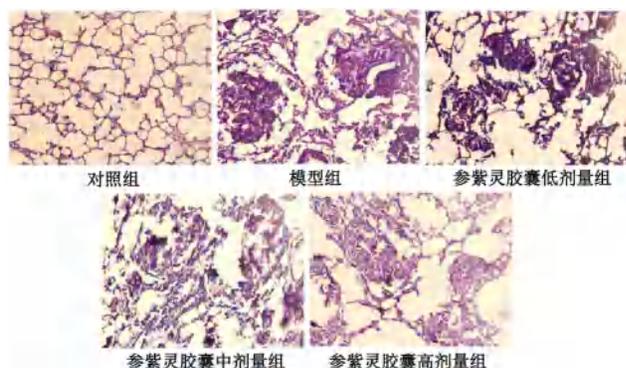


图 1 参紫灵胶囊对肺纤维化大鼠肺组织病理形态的影响

Fig 1 Effect of Shenzilong capsule on the pathological morphology of lung tissue in rats with pulmonary fibrosis

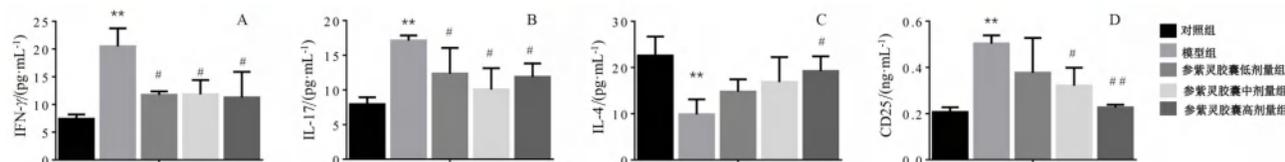


图 2 参紫灵胶囊对肺纤维化大鼠血清中 INF-γ、IL-17、IL-4 及 CD25 水平影响

Fig 2 Effect of Shenzilong capsule on the levels of INF-γ, IL-17, IL-4, and CD25 in the serum of rats with pulmonary fibrosis

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

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

平，并降低 CD25 水平，这表明该胶囊在调节炎症因子方面具有潜在作用，并提示这些因子在肺纤维化病理过程中扮演关键角色。尽管药物干预后大鼠的肺脏、肝脏和脾脏脏器系数有所变化，但差异未有统计学意义，可能与样本量限制有关。然而，病理结果表明，参紫灵胶囊能显著改善肺组织的病理变化，减轻炎症和纤维化损伤，保护肺泡结构。这些发现支持了参紫灵胶囊在肺纤维化治疗中的潜在应用价值。

参紫灵胶囊治疗组大鼠血清中的 IFN-γ 显著降低，提示 IFN-γ 可能在肺纤维化进程中起促进作用。已有研究显示，IFN-γ 作为促炎性细胞因子，通过激活免疫细胞促进纤维化的发生和发展^[16]。本研究结果进一步支持这一观点，并表明参紫灵胶囊通过下调 IFN-γ 水平，可能有效减轻肺纤维化。

其次，IL-17 在模型组大鼠血清中显著升高，而

3.4 各组大鼠血清中 IFN-γ、IL-17、IL-4、CD25 水平比较

与对照组比较，模型组大鼠血清中 IFN-γ、IL-17 显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，参紫灵低、中、高剂量组大鼠血清中 IFN-γ、IL-17 明显降低 ($P < 0.05$)。这些结果表明 IFN-γ、IL-17 上调促进了大鼠肺纤维化的进程。与对照组比较，模型组大鼠血清中 IL-4 显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，参紫灵高剂量组大鼠血清中 IL-4 明显增加 ($P < 0.05$)。这些结果表明 IL-4 水平上调抑制了大鼠肺纤维化的进程。与对照组比较，模型组大鼠血清中 CD25 显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，参紫灵中、高剂量组大鼠血清中 CD25 明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。这些结果表明 CD25 水平上调促进了大鼠肺纤维化的进程 (见图 2)。

4 讨论与结论

本研究系统评估了参紫灵胶囊对肺纤维化大鼠的治疗效果，并探讨了其潜在机制。结果显示，参紫灵胶囊在各剂量下均能显著降低模型组大鼠血清中的 IFN-γ 和 IL-17 水平，同时提高 IL-4 水

参紫灵胶囊治疗后显著降低，这也与肺纤维化的病理机制密切相关。文献报道 IL-17 在多种纤维化疾病中均表现出显著的升高，并通过促进炎症反应和纤维化组织重塑，加剧疾病进程^[17]。本研究结果表明，参紫灵胶囊可能通过抑制 IL-17 的表达，减少炎症浸润和组织损伤，从而发挥其抗纤维化作用。

此外，IL-4 作为一种抗炎性细胞因子，在模型组大鼠血清中显著下降，而在高剂量参紫灵胶囊组中则显著上调。这一发现与 IL-4 在抗纤维化中的保护作用相吻合。IL-4 可以通过促进 M2 型巨噬细胞的极化和抗炎因子的释放，减缓纤维化的进展^[18]。因此，参紫灵胶囊通过上调 IL-4 水平，可能在肺纤维化的治疗中发挥了重要的保护作用。

最后，CD25 作为 T 细胞活化的标志物，在纤维化病理过程中也表现出重要作用。本研究发现模型组大鼠血清中 CD25 水平显著升高，而参紫灵胶囊中、高剂量组则显著降低，进一步支持了参紫

灵胶囊在调节免疫反应中的作用。已有研究表明, CD25 的高表达与 T 细胞的过度活化和组织损伤密切相关^[19], 本研究结果表明参紫灵胶囊可能通过抑制 CD25 的表达, 从而减轻免疫介导的肺损伤。

综上所述, 本研究系统地揭示了参紫灵胶囊在调节多种炎性因子中的作用, 并进一步阐明了其在肺纤维化治疗中的潜在机制。这些发现不仅丰富了我们对参紫灵胶囊作用机制的理解, 也为其在纤维化疾病中的临床应用提供了新的理论依据。尽管本研究揭示了参紫灵胶囊在调节多种炎性因子中的作用, 并阐明了其在肺纤维化治疗中的潜在作用机制, 但仍存在一些不足之处。例如, 本研究缺乏长期疗效观察, 尚未全面探讨参紫灵胶囊对肺纤维化的长期影响; 虽然初步探讨了参紫灵胶囊的作用机制, 但具体的分子机制和信号通路仍需进一步研究。未来研究应着重于长期疗效的评估和更深入的机制研究, 以进一步验证和完善本文发现。

参考文献

- [1] Koudstaal T, Funke-Chambour M, Kreuter M, et al. Pulmonary fibrosis: from pathogenesis to clinical decision-making [J]. *Trends Mol Med*, 2023, 29 (12): 1076-1087.
- [2] Rajan SK, Cottin V, Dhar R, et al. Progressive pulmonary fibrosis: an expert group consensus statement [J]. *Eur Respir J*, 2023, 61 (3): 2103187-2103206.
- [3] Maher T M, Bendstrup E, Dron L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2021, 22 (1): 197-205.
- [4] 李金飞, 肖世伟, 朱亚楠, 等. 基于“玄府-气液-肺络”理论探讨特发性肺纤维化的证治 [J]. *中医药信息*, 2024, 41 (8): 1-5.
- [5] Hage R, Gautschi F, Steinack C, et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) clinical features and management [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16 (6): 167-177.
- [6] Li YP, He YW, Chen SB, et al. S100A12 as biomarker of disease severity and prognosis in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13 (3): 810338-810345.
- [7] Finnerty JP, Ponnuswamy A, Dutta P, et al. Efficacy of antifibrotic drugs, nintedanib and pirfenidone, in treatment of progressive pulmonary fibrosis in both idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and non-IPF: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21 (1): 411-418.
- [8] Ding DY, Gao R, Xue QF, et al. Genomic fingerprint associated with familial idiopathic pulmonary fibrosis: a review [J]. *Int J Med Sci*, 2023, 20 (3): 329-345.
- [9] Naccache JM, Jouneau S, Didier M, et al. Cyclophosphamide added to glucocorticoids in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis (EXAFIP): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2022, 10 (1): 26-34.
- [10] Asl MS, Motakef Z, Behgam N, et al. Comparison of longevity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis using pirfenidone versus triple therapy with prednisolone, azathioprine, and acetylcysteine [J]. *Tanaffos*, 2023, 22 (1): 129-135.
- [11] 李颖, 肖雄斌, 邓晓彬, 等. 参紫灵胶囊对尘肺病免疫功能影响的临床研究 [J]. *中医药导报*, 2013, 19 (12): 22-24.
- [12] Mahmoudi Z, Kalantar H, Mansouri E, et al. Dimethyl fumarate attenuates paraquat-induced pulmonary oxidative stress, inflammation and fibrosis in mice [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2023, 190 (3): 105336-105343.
- [13] Senoo S, Higo H, Taniguchi A, et al. Pulmonary fibrosis and type-17 immunity [J]. *Respir Investig*, 2023, 61 (5): 553-562.
- [14] Zhang JH, Deng JH, Yao XL, et al. CD4⁺CD25⁺Tregs as dependent factor in the course of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Cell Res*, 2020, 386 (1): 111700-111708.
- [15] Rao LZ, Wang Y, Zhang L, et al. IL-24 deficiency protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by repressing IL-4-induced M2 program in macrophages [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28 (4): 1270-1283.
- [16] Zhu XL, Yuan S, Zheng XF, et al. Pre-exposure to aerosolized polyvalent bacterial lysates protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Inflammation*, 2022, 45 (4): 1692-1699.
- [17] Zhang Q, Luo T, Yuan DZ, et al. Qilongtian ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via inhibiting IL-17 signal pathway [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 6002-6009.
- [18] Mattoo H, Bangari DS, Cummings S, et al. Molecular features and stages of pulmonary fibrosis driven by type 2 inflammation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2023, 69 (4): 404-421.
- [19] Liu W, Zhang JH, Gao L, et al. Correlation between the dynamic changes of $\gamma\delta$ T cells, Th17 cells, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood and pharmacological interventions against bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression in mice [J]. *Exp Cell Res*, 2024, 439 (1): 114098-114105.

(收稿日期: 2024-06-22; 修回日期: 2024-09-26)

鳖甲软脉汤改善慢性脑缺血小鼠学习和记忆障碍的作用研究

郭羽晨¹, 邓珊珊², 高原², 章超凡², 李铁军^{1*} (1. 上海市浦东新区浦南医院, 上海 200125; 2. 上海大学医学院, 上海 200444)

摘要: **目的** 研究鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠学习和记忆障碍的改善作用并初步探究其作用机制。**方法** 采用双侧颈总动脉狭窄法制备小鼠慢性脑缺血模型, 通过 Morris 水迷宫和新物体识别实验评估小鼠的学习记忆能力, 采用 LFB 染色、尼氏染色、NeuN 染色、TUNEL 染色检测小鼠脑组织的髓鞘损伤及神经元凋亡情况; 采用免疫荧光染色检测小鼠脑组织中 NF- κ B p65 的表达情况; 采用免疫印迹法检测小鼠脑组织中 NF- κ B p65、IKK- β 的表达情况。**结果** Morris 水迷宫实验结果显示, 与模型组相比, 鳖甲软脉汤高剂量组小鼠学习和记忆功能得到改善 ($P < 0.05$)。新物体识别实验中, 给药 6 周后, 鳖甲软脉汤低剂量组和高剂量组新物体识别指数显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 给药 12 周后, 鳖甲软脉汤高剂量组新物体识别指数显著增加 ($P < 0.05$)。病理结果显示, 鳖甲软脉汤治疗组小鼠脑组织中神经元髓鞘损伤减轻, 神经元凋亡情况减少。免疫荧光染色显示, 鳖甲软脉汤低剂量组小鼠脑组织小胶质细胞 NF- κ B p65 表达减少 ($P < 0.05$); 高剂量组小鼠脑组织小胶质细胞 CD11b、NF- κ B p65 表达减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫印迹结果显示, 鳖甲软脉汤高剂量组小鼠脑组织 NF- κ B p65、IKK- β 的表达水平明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 鳖甲软脉汤能改善慢性脑缺血小鼠认知功能障碍, 其治疗作用可能是通过 NF- κ B 途径减少慢性脑缺血小鼠的脑组织髓鞘及神经元损伤。

关键词: 鳖甲软脉汤; 慢性脑缺血; 学习和记忆障碍; 凋亡; 髓鞘损伤; NF- κ B

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3245-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.018

Effect of Biejia Ruanmai decoction on learning and memory impairment in mice with chronic cerebral hypoperfusion

GUO Yu-chen¹, DENG Shan-shan², GAO Yuan², ZHANG Yue-fan², LI Tie-jun^{1*} (1. *Shanghai Punan Hospital of Pudong New District, Shanghai* 200125; 2. *School of Medicine, Shanghai University, Shanghai* 200444)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect of Biejia Ruanmai decoction on learning and memory impairment in mice with chronic cerebral hypoperfusion (CCH) and its potential mechanism of action. **Methods** CCH mice models were established with the bilateral common carotid artery stenosis method. We evaluated the learning and memory abilities of the mice through the Morris water maze and novel object recognition tests. We detected the myelin damage and neuronal apoptosis in the mouse brain tissues through LFB, Nissl, NeuN, and TUNEL staining. The expression of NF- κ B p65 in the mouse brain tissues was detected by immunofluorescence staining. The expression levels of NF- κ B p65 and IKK- β in the mouse brain tissues were detected by Western blot. **Results** The Morris water maze test obviously improved the learning and memory in the high-dose Biejia Ruanmai group as compared with the model group ($P < 0.05$). After 6 weeks of treatment, both the low- and high-dose Biejia Ruanmai groups significantly increased the novel object recognition index ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with sustained

基金项目: 上海市浦东新区卫生系统学科建设项目 - 新兴、交叉学科 (No.PWXx2020-03); 上海市浦东新区卫生系统学科建设项目 - 重点专科 (No.PWZzk 2022-08)。

作者简介: 郭羽晨, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: guoyuchen0623@163.com *通信作者: 李铁军, 男, 主任药师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心脑血管药理学研究, email: ltj204@163.com

improvement in the high-dose group after 12 weeks ($P < 0.05$). Histopathological examination indicated reduced myelin damage and neuronal apoptosis in the brain tissues of Biejia Ruanmai-treated mice. Immunofluorescence staining showed reduced NF- κ B p65 expression in the microglia of the low-dose group ($P < 0.05$), and reduced CD11b and NF- κ B p65 expression in the high-dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Western blot confirmed that the high-dose BJRM group significantly downregulated NF- κ B p65 and IKK- β expression in the brain tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Biejia Ruanmai decoction may mitigate brain myelin and neuronal damage in CCH mice through the NF- κ B pathway, thereby ameliorating cognitive dysfunction.

Key words: Biejia Ruanmai decoction; chronic cerebral hypoperfusion; learning and memory impairment; apoptosis; myelin sheath injury; NF- κ B

慢性脑缺血 (chronic cerebral hypoperfusion, CCH), 又称慢性脑低灌注, 是一种由于多种原因引起的脑血管结构性病变和/或血液浓度及血流动力异常性低灌注, 导致大脑整体水平或前、后循环供血区域性血供减少的一种病理状态。临床上患者主要表现包括头痛、头胀等症状, 可能伴有高血压、眼底动脉硬化改变或脑灌注动脉的血管杂音^[1]。长期慢性的全脑或局部脑缺血低灌注易导致皮层和海马缺血缺氧, 诱发迟发性神经元损伤, 最终发展为严重的认知功能障碍综合征, 严重影响了患者的日常生活。目前, 治疗慢性脑缺血多侧重于抗血小板聚集、抗凝、改善循环及脑代谢等药物。虽然这些治疗方法效果肯定, 但常伴有不确定的不良反应。因此, 寻找有效的治疗策略对于改善患者预后具有重要意义。

中医临床将慢性脑缺血归类于“眩晕”“不寐”“痴呆”“郁病”等范畴, 其治疗宗旨在于活血化瘀、益气通络。上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院奚九一教授根据中医理论和长期临床实践总结拟订中药复方鳖甲软脉汤, 由鳖甲、垂盆草、石菖蒲、白芍、黄芪、续断、甘草、川芎组成, 具有软坚解痉、清热解毒、益气活血的功效, 在临床上用于治疗经络不畅导致的结缔组织增生及外周小血管循环不畅等症状, 具有非常好的临床疗效^[2]。基于此, 本研究旨在探究鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠的学习和记忆障碍的改善作用, 并初步揭示其潜在的作用机制。

本实验采用双侧颈总动脉狭窄 (bilateral common carotid artery stenosis, BCAS) 法在 C57 小鼠上制备慢性脑缺血模型。术后 1 个月开始连续灌胃给药 12 周, 假手术组和模型组连续灌胃等量生理盐水, 其余给药组灌胃给予相应药物。利用 Morris 水迷宫和新物体识别实验评估小鼠的学习

记忆能力, 并通过组织染色和免疫印迹实验等方法, 检测小鼠脑组织的病理变化和蛋白的表达情况, 阐明鳖甲软脉汤改善慢性脑缺血小鼠的学习和记忆障碍的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 25 ~ 30 g 健康雄性 C57BL/6 小鼠 [动物生产合格证号: SCXK (苏) 2021-0013], 均饲养于 SPF 级动物房, 实验中自由获取水和食物。环境温度 (22 ± 3) °C, 相对湿度 (60 ± 10) %, 12 h 明/暗交替。受试小鼠经适应性饲养 1 周后再进行实验。整个实验过程严格遵照上海大学实验动物伦理委员会要求, 伦理编号为 No. ECSHU 2023-009。

1.2 试剂

银杏叶提取物 (上海阿拉丁生物化学技术公司, 批号: G195711)。鳖甲软脉汤由鳖甲、垂盆草、石菖蒲、白芍、黄芪、续断、甘草、川芎八味药材组成, 药方配比为 10 : 6 : 6 : 9 : 9 : 6 : 3 : 9, 所用药材均由上海中医药大学药学院张宏教授提供和鉴定。NeuN 抗体 (批号: ab177487)、NF- κ B p65 抗体 (批号: ab207297) (美国 Abcam 公司); IKK- β 抗体 (美国 CST 公司, 批号: 8943); CD11b 抗体 (批号: GB15058)、TUNEL 染液 (批号: G1507) (武汉赛维尔生物科技有限公司); 尼氏 (Nissl) 染液 (批号: G3245)、LFB 染液 (批号: G1202) (北京索莱宝技术有限公司); ECL 发光液 (美国 Biosharp 公司, 批号: BL520A)。

1.3 仪器

Morris 水迷宫 (上海奥尔科特生物科技有限公司); 组织脱水机、包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); 倒置生物显微镜 (日本尼康); 病理切片仪 (上海徠卡仪器有限公司); 免疫组化笔 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 化学发光成像系

统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 提取方法

用 8 倍体积量的 75% 乙醇回流提取中药材 2 次, 每次提取时间为 1.5 h。提取液经四层纱布过滤后, 在旋转蒸发器中浓缩, 然后在冷冻干燥机料盘中—50℃ 预冻 5 h, 真空干燥^[2]。最后将温度固定在一 40℃, 保持 72 h, 制成冻干粉, 保存在—80℃ 冰箱中待用。

2.2 分组与模型制备

采用 BCAS 方法制作慢性脑缺血小鼠模型^[3-4]。术前禁食 12 h, 禁水 4 h。小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后, 剃除颈部毛发, 仰卧位固定, 用手术剪沿颈部矢状正中中线剪开 1 cm 纵向切口, 逐层钝性分离颈部组织, 以显露并分离颈总动脉和迷走神经, 将两条 4-0 缝合线绕过颈总动脉, 取微弹簧(线圈内径 0.18 mm, 无锡萨密你弹簧有限公司)缠绕在双侧颈总动脉上, 将小鼠颈部组织归位, 缝合颈部切口。

共造模 45 只慢性脑缺血模型小鼠, 10 只假手术组(Sham 组)小鼠未进行微弹簧套扎。实验小鼠术后正常饲养 1 个月, 其间慢性脑缺血模型小鼠死亡 3 只, 并剔除 2 只状态不佳的小鼠。余下 30 只模型小鼠随机分组: 银杏叶提取物组(GBE 组, 30 mg·kg⁻¹), 鳖甲软脉汤低剂量治疗组(BJRMT-L 组, 3.78 g·kg⁻¹), 鳖甲软脉汤高剂量治疗组(BJRMT-H 组, 14.9 g·kg⁻¹), 每组 10 只。分组后开始给药处理, GBE 组小鼠灌胃给予银杏叶提取物, BJRMT 组小鼠灌胃给予相应剂量鳖甲软脉汤, Sham 组、模型(CCH)组小鼠灌胃给予等量生理盐水, 所有小鼠连续给药 12 周。

2.3 Morris 水迷宫测试

在第 6 周和第 12 周的给药后, 对存活的小鼠进行 Morris 水迷宫实验, 评估它们的学习和记忆能力。整个实验包括定位航行阶段和空间探索阶段。在定位航行阶段中, 每日将小鼠面向池壁放入圆形水池的不同象限游泳, 记录小鼠入水后成功找到平台所需的时间即为逃避潜伏期。小鼠找到平台后或者始终找不到平台, 则将其引导至平台休息 10 s 再进行下一次实验, 每只小鼠每日训练 3 次, 每进行一次训练休息 1 min, 连续训练 5 d。每日实验结束后用毛巾将小鼠擦干后, 放在白炽灯下烤 5 min 再放回笼内。在第 6 日空间探索阶段, 将小鼠面向池壁释放到起始平台对面的象限, 小鼠自由探索空间, 通过 Morris 水迷宫自动监视处理系统记

录穿过平台的小鼠次数和停留在目标象限的时间百分比, 停留在目标象限的时间百分比(%) = 停留在目标象限的时间 / 潜伏期时间 × 100%。

2.4 新物体识别实验

啮齿类动物很容易被新物体吸引并表现出较为强烈的探索偏好, 因此新物体识别实验常被用于评估小鼠的记忆能力。

在第 6 周和第 12 周给药后, 对存活的小鼠进行新物体识别实验以检测其学习记忆能力, 分为适应、熟悉和测试 3 个阶段。适应阶段: 实验前 3 日将小鼠放入箱子(长宽高均为 50 cm)熟悉 10 min 后再取出, 让小鼠适应箱子环境。熟悉阶段: 实验第 4 日在箱内两端对称处放置两个完全相同的木方块(旧物体, 3 cm×3 cm×1 cm), 两木块距箱壁及箱中心处距离均为 1 cm, 将小鼠放入箱内与两方木块等距的位置, 等待小鼠自由探索 10 min。测试阶段: 将其中一个木方块换成木三角块(新物体, 3 cm×2 cm×1 cm), 分别记录小鼠在 10 min 内对木三角块和木方块的探索时间, 计算新物体识别指数。

新物体识别指数(%) = 探索木三角块时间 / (探索木三角块时间 + 探索木方块时间) × 100%。

2.5 LFB 染色

小鼠完成行为学实验后, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉, 取出脑组织在 4% 多聚甲醛中浸泡固定 24 h, 经过蒸馏水清洗 2 h, 依次在 70% ~ 100% 的乙醇、二甲苯和石蜡中脱水、透明和浸蜡, 随后进行常规石蜡包埋、切片和干燥。切片在二甲苯中脱蜡 15 min, 通过乙醇梯度水化, 用蒸馏水清洗, 将切片浸入 LFB 染液中染色, 并用 95% 乙醇处理过量染液。染色后的切片用蒸馏水清洗, 并用碳酸锂溶液处理 20 s 后开始分化, 直至背景呈浅蓝色。最后, 切片通过乙醇逆梯度脱水, 二甲苯透明处理后封片, 在显微镜下观察胼胝体髓鞘的情况。

2.6 尼氏染色

尼氏染色的制片、脱蜡和水化过程与 LFB 染色相同。在完成水化步骤后, 将切片置于尼氏染色液中染色 10 min, 使用磷酸盐缓冲液(PBS)洗去未结合的染料, 通过 70% ~ 100% 的乙醇进行逆梯度脱水, 在二甲苯中透明化处理后, 封片并在显微镜下观察细胞尼氏小体的形态。

2.7 NeuN 染色

NeuN 染液可以与神经元核的抗原特异性结合, 因此通过 NeuN 染色可以分析脑组织神经元的情况。NeuN 染色的制片、脱蜡和水化过程与 LFB 染色相同。在完成水化步骤后, 将切片置于柠檬酸溶

液中,通过微波处理以暴露抗原。随后,使用 PBS 洗涤切片,在 3% 过氧化氢溶液中室温孵育 20 min, PBS 洗涤,滴加封闭液覆盖组织,室温孵育 30 min,滴加 NeuN 抗体 4 °C 过夜孵育。然后,用 PBS 洗涤切片,滴加二抗,室温下孵育 1 h,用 PBS 洗涤后,滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温孵育 1 h,用二氨基联苯胺进行显色,直至切片上出现棕黄色颗粒,经过苏木素复染、纯水洗涤、分化液分化、氨水返蓝和纯水冲洗,封片后,在显微镜下观察神经元细胞的分布情况。

2.8 TUNEL 染色

凋亡细胞的细胞核 DNA 断裂会暴露出 3'-OH 末端, TUNEL 染色可检测 3'-OH 末端的存在,从而评估细胞凋亡情况。TUNEL 染色的制片、脱蜡和水化过程与 LFB 染色相同。在完成水化步骤后,用 PBS 洗涤切片 5 min,在柠檬酸溶液中处理 15 min 以促进抗原的暴露。随后,使用 PBS 洗涤切片,在室温下使用 3% 过氧化氢溶液孵育 20 min,加入 TUNEL 反应混合液,37 °C 孵育 1 h,用 PBS 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶反应液,在 37 °C 下孵育 30 min,用二氨基联苯胺进行显色,直至观察到棕黄色颗粒。显色完成后,切片经过苏木素复染、纯水洗涤、分化液分化、纯水洗涤、氨水返蓝和纯水冲洗,在二甲苯中透明化并封片,在显微镜下观察凋亡细胞的分布情况。

2.9 组织免疫荧光

完成行为学测试后,受试小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉,取脑组织,进行常规的脱水、硬化、透明、包埋和浸蜡处理。切片后,进行脱蜡和乙醇梯度水化处理,使用双蒸水和 PBS 进行洗涤。切片随后被置于柠檬酸缓冲液中,微波修复抗原,用 PBS 洗涤 3 次以去除未结合的抗体,滴加封闭液,室温封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,用 PBS 洗涤后加入相应的二抗。封片后利用显微镜观察并拍摄图像。

2.10 蛋白免疫印迹检测

完成行为学测试后,受试小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉,取脑组织,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,经研磨后使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。样品蛋白变性后, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转至 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭 2 h,一抗 4 °C 孵育过夜,洗涤后室温孵育二抗,采用 ECL 发光液进行化学发光。

2.11 数据统计分析

研究采用 GraphPad Prism 8.2.4 软件对所得

数据进行统计学分析。样本数据为计量资料,使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠学习和记忆能力的影响

分别在小鼠给药的第 6 周 ($n = 8$) 和第 12 周 ($n = 6$),采用 Morris 水迷宫实验评估每组小鼠的学习和记忆能力。结果如图 1A ~ 1D 所示, CCH 组小鼠相较于 Sham 组小鼠在目标象限的活动时间和跨越平台次数显著减少 ($P < 0.05$)。给药 6 周后,鳖甲软脉汤高剂量组小鼠平台穿越次数显著增加 ($P < 0.05$); 给药 12 周后,鳖甲软脉汤高剂量组小鼠目标象限的活动时间百分比和平台穿越次数显著增加 ($P < 0.05$)。

在给药的 6 周 ($n = 8$) 和第 12 周 ($n = 6$),分别对小鼠进行新物体识别实验测试。如图 1E 所示,给药 6 周后, CCH 组小鼠与 Sham 组小鼠相比新物体识别指数显著降低 ($P < 0.01$),经过鳖甲软脉汤治疗后,新物体识别指数显著增加 ($P < 0.01$)。如图 1F 所示,给药 12 周后, CCH 组小鼠与 Sham 组小鼠相比新物体识别指数显著降低 ($P < 0.05$); 与 CCH 组相比,鳖甲软脉汤高剂量组新物体识别指数显著增加 ($P < 0.05$)。以上结果提示,鳖甲软脉汤可以改善慢性脑缺血小鼠的学习和记忆能力。

3.2 鳖甲软脉汤减轻慢性脑缺血小鼠的病理损伤

采用 NeuN 染色、TUNEL 染色和尼氏染色检测小鼠脑组织的病理损伤情况,结果见图 2 及图 3。Sham 组海马 NeuN 阳性细胞较多,细胞多层且紧密排列, CCH 组小鼠海马 NeuN 阳性细胞明显减少 ($P < 0.01$),结构松散。经过银杏叶提取物和鳖甲软脉汤高剂量治疗后 NeuN 阳性细胞增加 ($P < 0.05$),提示海马神经元损伤的情况得到了改善。Sham 组皮层细胞的 TUNEL 阳性细胞数较少, CCH 组小鼠相较于 Sham 组小鼠皮层 TUNEL 阳性细胞显著增多 ($P < 0.01$),表明皮层有大量神经元凋亡,经过银杏叶提取物和鳖甲软脉汤治疗后 TUNEL 阳性细胞减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),神经元损伤的情况得到了改善。

Sham 组小鼠的海马神经元尼氏阳性细胞数量较多,尼氏小体着色深,细胞核完整,而 CCH 组小鼠海马神经元尼氏阳性细胞数明显减少 ($P < 0.01$),结构松散且细胞核固缩,尼氏小体色浅,鳖甲软脉

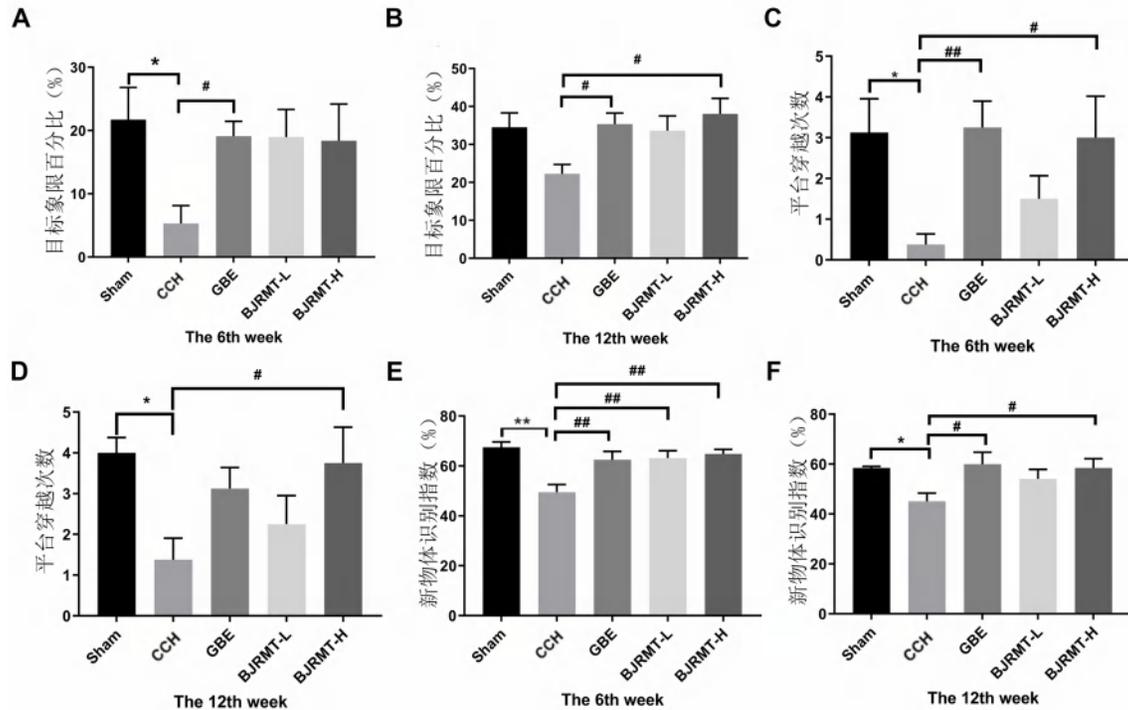


图 1 鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠学习和记忆能力的影响

Fig 1 Effect of Biejia Ruanmai decoction on learning and memory ability of mice with CCH

注：与 Sham 组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 CCH 组相比，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

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

汤高剂量组小鼠相较于 CCH 组小鼠海马神经元尼氏阳性细胞数明显增加 ($P < 0.05$)。LFB 染色常用于检测髓鞘结构形态及轴突纤维密度。本实验采用 LFB 染色检测小鼠脑组织胼胝体神经元髓鞘病理损伤情况，以评估鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠脑白质胼胝体病理损伤的治疗作用。实验结果显示，Sham 组小鼠胼胝体髓鞘结构致密，着色较深；CCH 组小鼠胼胝体髓鞘着色较浅，结构松散，部分髓鞘空泡化。经鳖甲软脉汤和银杏叶提取物治疗后，髓鞘病理损伤减轻，染色加深，髓鞘空泡化现象减少，以上结果表明鳖甲软脉汤能减轻慢性脑缺血小鼠脑组织的髓鞘损伤 (见图 3)。

3.3 鳖甲软脉汤抑制慢性脑缺血小鼠脑组织中 NF- κ B 途径

CD11b 是小胶质细胞的标志物，在小胶质细胞激活过程中表达增加。免疫荧光实验结果如图 4A 显示，Sham 组小鼠脑组织皮层区域 CD11b 阳性细胞较少，说明基本无小胶质细胞聚集。与 CCH 组相比，鳖甲软脉汤低剂量组小鼠脑组织小胶质细胞 NF- κ B p65 表达减少 ($P < 0.05$)；高剂量组小鼠脑组织小胶质细胞 CD11b、NF- κ B p65 表达减少 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)。

进一步采用免疫印迹方法对小鼠脑组织中 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达进行检测。如图

5 所示，CCH 组相较于 Sham 组，NF- κ B p65 和 IKK- β 蛋白表达水平上调 ($P < 0.01$)，而经过银杏叶提取物、鳖甲软脉汤高剂量的处理后，NF- κ B p65 和 IKK- β 蛋白表达水平下调 ($P < 0.05$ ， $P < 0.01$)。上述结果表明鳖甲软脉汤能抑制慢性脑缺血小鼠脑组织中 NF- κ B 信号通路。

4 讨论与结论

慢性脑缺血指大脑长期血流量不足，其典型临床表现包括头昏、乏力、记忆力减退以及认知功能障碍等症状^[5]。研究表明，慢性脑缺血的病理生理机制涉及皮质和海马区神经元丢失、脑白质病变 (WML)、免疫炎症损伤、血管内皮功能障碍、氧化应激损伤和细胞凋亡等^[6-7]。在慢性脑缺血发生时，大脑处于持续缺氧状态，脑内的免疫细胞如小胶质细胞和星形胶质细胞会快速反应并激活 MAPK 和 NF- κ B 等免疫相关信号通路，产生大量炎症介质，导致血管内皮细胞功能障碍和脑血流微循环受阻。这些炎症介质还会促进免疫炎症恶性循环和内皮细胞功能障碍，进一步加重 WML 和认知功能障碍^[8-9]。这一点在慢性脑缺血动物模型中也有表现，例如 Morris 水迷宫实验显示，慢性脑缺血大鼠的逃避潜伏期和游泳路径均明显延长^[10-11]。此外，慢性脑缺血还会导致基底前脑胆碱能神经系统损伤，从而在整体水平出现学习记忆障碍^[12]。

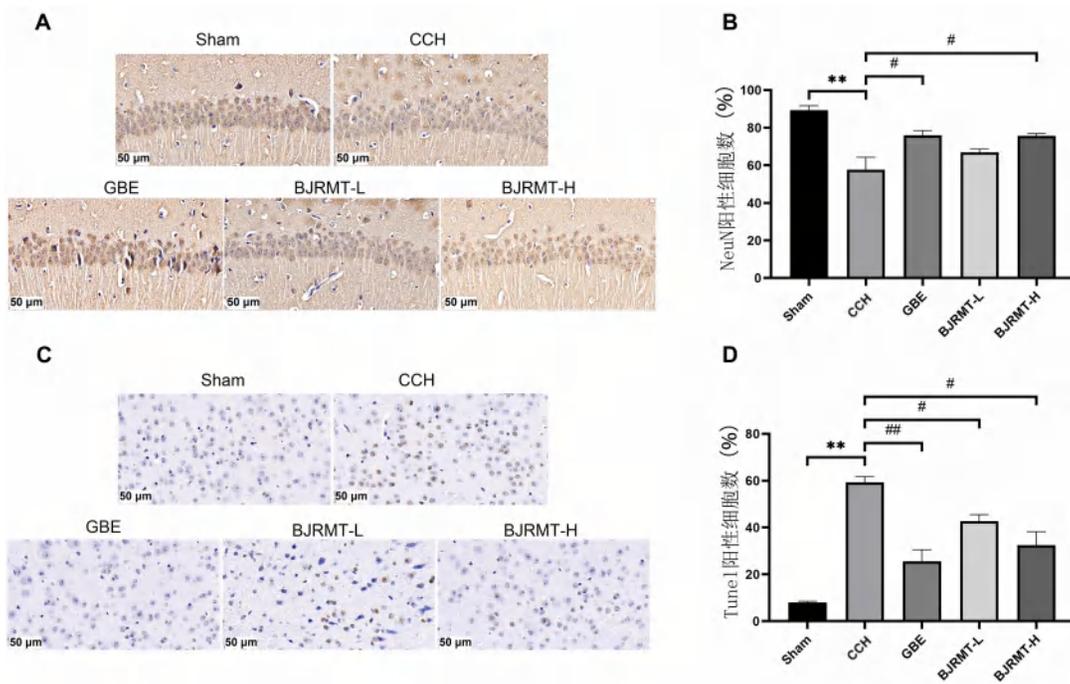


图 2 NeuN 染色和 TUNEL 染色检测小鼠脑组织的病理损伤情况

Fig 2 Pathological damage in the mouse brain tissues detected by NeuN staining and TUNEL staining

A. NeuN 染色图 (NeuN staining) ; B. NeuN 阳性细胞统计图 (NeuN-positive cell statistic) ; C. TUNEL 染色图 (TUNEL staining graph) ; D. TUNEL 阳性细胞统计 (TUNEL-positive cell statistic)。

注：与 Sham 组相比，** $P < 0.01$ ；与 CCH 组相比，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

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

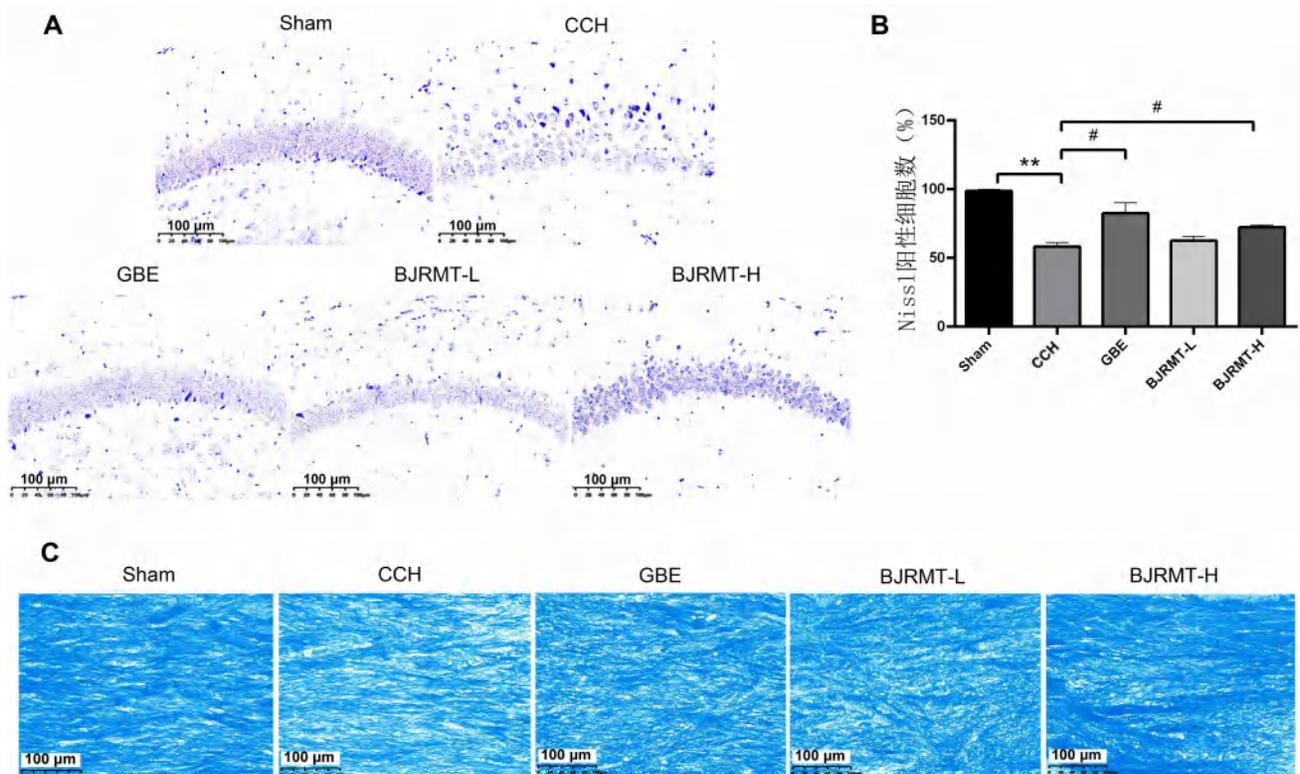


图 3 尼氏染色和 LFB 染色检测小鼠脑组织的病理损伤情况

Fig 3 Pathological damage in mouse brain tissue detected by Nissl staining and LFB staining

A. 尼氏染色图 (Nissl staining graph) ; B. 尼氏阳性细胞统计图 (Nissl-positive cell statistic) ; C. LFB 染色图 (LFB staining graph)。

注：与 Sham 组相比，** $P < 0.01$ ；与 CCH 组相比，# $P < 0.05$ 。

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

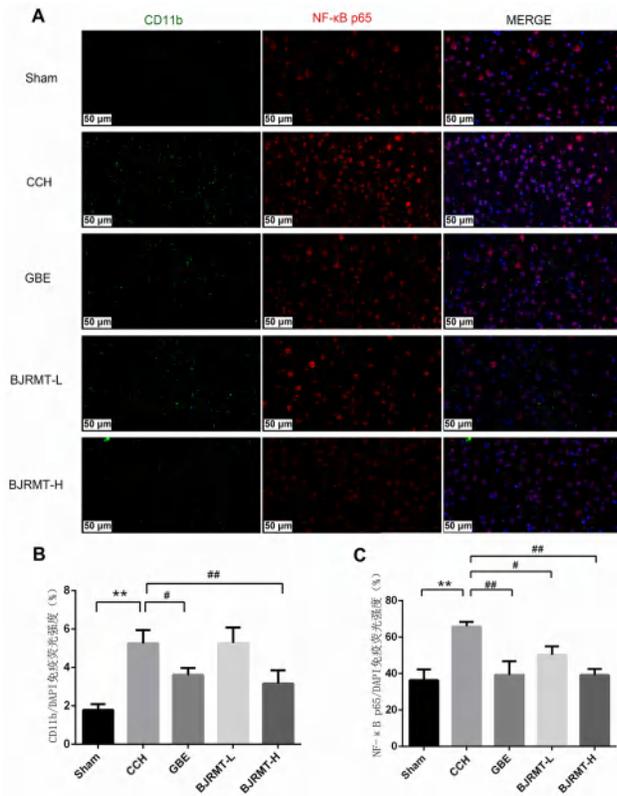


图4 鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠脑组织中 NF-κB 表达的影响
 Fig 4 Effect of Biejia Ruanmai detection on NF-κB expression in the brain tissues of mice with chronic cerebral hypoperfusion
 注：与 Sham 组相比，** $P < 0.01$ ；与 CCH 组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the Sham group, ** $P < 0.01$ ； compared with the CCH group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

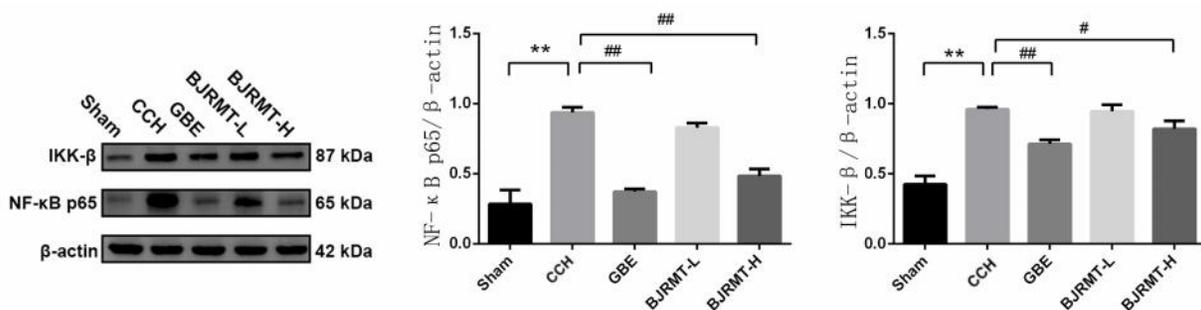


图5 鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠脑组织中 NF-κB 蛋白表达的影响
 Fig 5 Effect of Biejia Ruanmai detection on NF-κB protein expression in the brain tissue of mice with chronic cerebral hypoperfusion
 注：与 Sham 组相比，** $P < 0.01$ ；与 CCH 组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the Sham group, ** $P < 0.01$ ； compared with the CCH group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

激活极化在慢性脑缺血的发生发展过程中也有着多重的作用。因此，本研究探讨了鳖甲软脉汤对 NF-κB 信号通路的影响。免疫荧光和免疫印迹实验结果表明，鳖甲软脉汤治疗能显著降低慢性脑缺血小鼠脑组织中 NF-κB p65 和 IKK-β 的表达水平。所以，鳖甲软脉汤有可能通过抑制 NF-κB 信号通路发挥神经保护作用，这为鳖甲软脉汤治疗慢性脑缺血提供了一种可能的分子机制。

鳖甲软脉汤经过多年的临床应用，已被证实对小血管疾病有良好的治疗效果^[2]。给药第 6 周和第 12 周均进行了水迷宫实验和新物体识别实验，实验结果显示，经过鳖甲软脉汤治疗的慢性脑缺血小鼠有更好学习记忆能力，后续的病理学实验进一步验证了鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠的治疗作用。LFB 染色实验结果显示慢性脑缺血小鼠胼胝体髓鞘结构松散甚至有部分髓鞘出现部分空泡化的现象，表明长时间的脑低灌注导致了慢性脑缺血小鼠胼胝体髓鞘的损伤。经鳖甲软脉汤治疗后，髓鞘病理损伤减轻，髓鞘空泡化现象减少。尼氏染色、NeuN 染色和 TUNEL 染色的病理染色结果显示，慢性脑缺血小鼠皮层和海马神经元都出现了大量神经元凋亡的情况，而经过鳖甲软脉汤的治疗后，慢性脑缺血小鼠的神经元损伤的情况得到了改善。以上结果都验证了鳖甲软脉汤对慢性脑缺血导致的髓鞘损伤和神经元凋亡有改善作用。

小胶质细胞作为中枢神经系统的常驻免疫细胞，在大脑受到损伤时会迅速动员激活，是大脑神经炎症发生的标志。在采用 BCAS 手术建立的小鼠模型研究中发现，小鼠持续的脑低灌注导致脑内炎症反应活跃，小胶质细胞激活加重脑白质损伤，进一步加重认知功能损伤。NF-κB 信号通路作为经典的核心炎症通路，已经被证实可以介导小胶质细胞激活极化的作用，同时小胶质细胞

值得注意的是，鳖甲软脉汤多成分的协同作用可能是其发挥疗效的关键^[13-15]。鳖甲软脉汤中的药材如鳖甲、垂盆草、石菖蒲等均具有清热解毒、益气活血等功效，鳖甲软脉汤中的许多化合物或成分已被发现与慢性脑缺血的治疗有关。例如，已知的天然类黄酮类化合物槲皮素可清除自由基，介导小胶质细胞向抗炎表型的转变，并减少海马区促炎症因子的产生，减轻脑白质损伤^[16]。木犀草素可通过

调节 PI3K/Akt 信号通路减轻慢性脑缺血诱导的大鼠认知功能障碍^[17]。这些成分可能通过不同的途径共同发挥神经保护和抗炎作用。然而, 鳖甲软脉汤的具体成分如何相互作用以及各自的贡献仍需进一步的研究。

综上所述, 本研究表明鳖甲软脉汤对慢性脑缺血小鼠学习和记忆障碍具有显著改善作用, 并初步揭示了其通过 NF- κ B 信号通路发挥神经保护作用的潜在机制。这些发现为治疗慢性脑缺血相关认知功能障碍方面的应用提供了科学依据, 并为未来的临床研究和药物开发提供了参考。

参考文献

- [1] 李建章, 张杰文, 刘恒方. 慢性脑缺血临床诊治专家共识 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2022, 25 (6): 661-667.
- [2] Liu QP, Chen YY, Yu YY, et al. Bie-Jia-Ruan-Mai-Tang, a Chinese medicine formula, inhibits retinal neovascularization in diabetic mice through inducing the apoptosis of retinal vascular endothelial cells [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 959298.
- [3] Shibata M, Ohtani R, Ihara M, et al. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Stroke, 2004, 35 (11): 2598-2603.
- [4] Shibata M, Yamasaki N, Miyakawa T, et al. Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Stroke, 2007, 38 (10): 2826-2832.
- [5] 穆浩月, 鞠奕, 赵性泉. 慢性脑缺血病理生理机制与临床表现的研究进展 [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2021, 13 (4): 21-25.
- [6] Miyanohara J, Kakae M, Nagayasu K, et al. TRPM2 channel aggravates CNS inflammation and cognitive impairment via activation of microglia in chronic cerebral hypoperfusion [J]. J Neurosci, 2018, 38 (14): 3520-3533.
- [7] Huang YH, Zhang WW, Lin L, et al. Is endothelial dysfunction of cerebral small vessel responsible for white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rats? [J]. J Neurol Sci, 2010, 299 (1-2): 72-80.
- [8] Chojdak-Lukasiewicz J, Dziadkowiak E, Zimny A, et al. Cerebral small vessel disease: a review [J]. Adv Clin Exp Med, 2021, 30 (3): 349-356.
- [9] Kim MS, Bang J, Jeon WK. The involvement of canonical Wnt signaling in memory impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in mice [J]. Transl Stroke Res, 2020, 11 (4): 734-746.
- [10] 赵玲, 刘丽, 李雅莉, 等. 慢性脑低灌注状态对大鼠学习记忆功能及脑组织自由基代谢的影响 [J]. 中国行为医学科学, 2005, 14 (11): 7-9.
- [11] Sun ZY, Gao CH, Gao DD, et al. Reduction in pericyte coverage leads to blood-brain barrier dysfunction via endothelial transcytosis following chronic cerebral hypoperfusion [J]. Fluids Barriers CNS, 2021, 18 (1): 21.
- [12] 李永生, 陈皓, 王玉宾, 等. 慢性低灌注对大鼠基底前脑胆碱能系统及认知功能的影响 [J]. 实用医药杂志, 2006, 23 (4): 443-446.
- [13] 王岩玲, 任明, 张翔宇, 等. 慢性脑缺血证候分布和辨证用药规律的文献研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28 (3): 394-397.
- [14] Gao NX, Liu HQ, Li SQ, et al. Volatile oil from *Acorus gramineus* Ameliorates the injury neurons in the hippocampus of amyloid Beta 1-42 injected mice [J]. Anat Rec (Hoboken), 2019, 302 (12): 2261-2270.
- [15] Du WQ, Liang X, Wang SZ, et al. The underlying mechanism of *Paeonia lactiflora* Pall. in Parkinson's disease based on a network pharmacology approach [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 581984.
- [16] Tan ZH, Yang G, Qiu J, et al. Quercetin alleviates demyelination through regulating microglial phenotype transformation to mitigate neuropsychiatric symptoms in mice with vascular dementia [J]. Mol Neurobiol, 2022, 59 (5): 3140-3158.
- [17] He HT, Chen X. Luteolin attenuates cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion through the modulation of the PI3K/Akt pathway in rats [J]. J Vet Res, 2021, 65 (3): 341-349.

(收稿日期: 2024-04-02; 修回日期: 2024-07-20)

UPLC-MS/MS 测定人血浆中阿莫西林浓度及其在生物等效性研究中的应用

唐维英¹, 朱恒怡¹, 李莎¹, 杨姗姗², 吴强^{1*} (1.四川省药品检验研究院 国家药品监督管理局药物制剂体内外相关性技术研究重点实验室, 成都 611731; 2.四川尚锐分析检测有限公司, 成都 610093)

摘要: **目的** 建立一套样品和沉淀剂用量更少, 操作更简便的超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定人血浆中阿莫西林浓度, 并应用于国产制剂阿莫西林胶囊与其参比制剂的生物等效性研究。**方法** 采用 Waters Acquity UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 以 0.05% 甲酸水溶液(A)-含 0.1% 甲酸的 75% 甲醇水溶(B)为流动相, 流速 0.35 mL·min⁻¹ 进行梯度洗脱, 进样量 1 μL, 柱温 35 °C, 以 ESI 离子源、正离子 MRM 模式测定阿莫西林(*m/z* 366.1 → 114.0), 阿莫西林-d4(*m/z* 370.2 → 114.0)作为内标。血浆样品依次加入内标、甲醇沉淀蛋白后, 取上清液稀释后进样检测。**结果** 阿莫西林在 20 ~ 8000 ng·mL⁻¹ 与测定值线性关系良好, 定量下限为 20 ng·mL⁻¹, 质控样品批内、批间精密度 CV ≤ 3.9%, 准确度相对偏差在标示值-1.9% ~ 3.9%, 提取回收率、专属性、基质效应、稳定性等各项指标均符合《中国药典》四部通则中生物样品定量分析方法验证指导原则。本方法被成功应用于健康受试者口服 250 mg 阿莫西林胶囊的生物等效性研究, 在餐后给药状态下, 受试制剂和参比制剂 C_{max} 分别为 (4922.16±967.16) 和 (5172.19±905.07) ng·mL⁻¹, AUC_{0~12h} 分别为 (14 165.22±1686.79) 和 (13 869.53±1939.31) h·ng·mL⁻¹; 在空腹给药状态下, 受试制剂和参比制剂 C_{max} 分别为 (6087.36±1766.53) 和 (5697.95±1768.73) ng·mL⁻¹, AUC_{0~12h} 分别为 (15 081.27±2342.12) 和 (14 564.04±2364.83) h·ng·mL⁻¹, 受试制剂与参比制剂 C_{max}、AUC_{0~12h} 几何均值比的 90% 置信区间均落在 80.00% ~ 125.00%。**结论** 该方法灵敏度高、前处理过程简便, 适用于血浆样品中阿莫西林的高通量分析; 受试制剂阿莫西林胶囊与参比制剂具有生物等效性。

关键词: 阿莫西林; 抗菌药; 血浆浓度; 生物等效性; 超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3253-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.019

Determination of amoxicillin concentration in human plasma by UPLC-MS/MS and its application in bioequivalence study

TANG Wei-ying¹, ZHU Heng-yi¹, LI Sha¹, YANG Shan-shan², WU Qiang^{1*} (1. Sichuan Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Technical Research on Drug Products in Vitro and in Vivo Correlation, Chengdu 611731; 2. Sichuan Shangrui Analysis and Testing Co.Ltd, Chengdu 610093)

Abstract: Objective To establish a UPLC-MS/MS method with less sample and precipitant and easy operation to determine amoxicillin concentration in human plasma, and to use it in the bioequivalence study of amoxicillin capsules and their reference preparations. **Methods** A Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) column was used with the mobile phase consisting of 0.05% formic acid water (A) and 75% methanol solution (containing 0.1% formic acid) (B) in gradient elution. The flow rate was 0.35 mL·min⁻¹ with the injection volume of 1 μL and the column temperature was 35 °C. Amoxicillin (*m/z* 366.1 → 114.0) was detected by ESI ion source and positive ion MRM scanning mode, with amoxicillin-d4 (*m/z* 370.2 → 114.0) as the internal standard. After adding the internal standard, the plasma protein was precipitated by methanol, the supernatants were diluted and measured.

作者简介:唐维英,女,主管药师,主要从事体内药物分析和药代动力学研究, email:weiyang.tang@scidc.org.cn *通信作者:吴强,男,工程师,主要从事体内药物分析和药代动力学研究, email: qiang.wu@scidc.org.cn

Results The linearity ranged 20 ~ 8000 ng · mL⁻¹ and the lower limit of quantification was 20 ng · mL⁻¹. The intra-day and inter-day precision *CV* of quality-control samples was ≤ 3.9%, and the accuracy ranged - 1.9% ~ 3.9% in terms of relative error. The recovery rate, specificity, matrix effect and stability all met the guiding principles for verification of quantitative analysis of biological samples in the General Rules of *Chinese Pharmacopoeia* (four edition). The method was successfully applied to a bioequivalence study of amoxicillin orally disintegrating capsules containing 250 mg in healthy volunteers. In the fed test, the *C*_{max} of the test or reference formulation of amoxicillin capsules was (4922.16 ± 967.16) and (5172.19 ± 905.07) ng · mL⁻¹; *AUC*_{0~12h} was (14 165.22 ± 1686.79) and (13 869.53 ± 1939.31) h · ng · mL⁻¹. In the fasting test, the *C*_{max} of the test or reference formulation of amoxicillin capsules was (6087.36 ± 1766.53) and (5697.95 ± 1768.73) ng · mL⁻¹; *AUC*_{0~12h} was (15 081.27 ± 2342.12) and (14 564.04 ± 2364.83) h · ng · mL⁻¹. The 90% confidence intervals of the geometric mean ratios of *C*_{max} and *AUC*_{0~12h} between the test and the reference formulation completely fell at 80.00% ~ 125.00%. **Conclusion** The method is highly sensitive, simple and rapid, and is suitable for high throughput analysis of amoxicillin in the plasma sample. The test amoxicillin orally disintegrating capsules are bioequivalent to the reference capsules.

Key words: amoxicillin; antimicrobial; plasma concentration; bioequivalence; UPLC-MS/MS

阿莫西林作为第二代广谱半合成青霉素, 具有抗菌谱广、对酸稳定、口服吸收快、杀菌速度优于青霉素、头孢菌素等特点, 是一种高效、安全、患者耐受性好以及服用方便的抗感染药物^[1]。

随着新药 I 期临床试验中药物的一致性评价工作的不断开展, 人血浆中阿莫西林的检测方法从早期的液相色谱方法^[2-3]转变为液-质联用的方法, 前处理方法目前主要有蛋白沉淀法^[4-9]、蛋白沉淀-液液萃取法^[10], 但蛋白沉淀方法都存在血浆用量以及沉淀剂用量较大等问题^[3-9], 导致样品处理只能采用传统大容器, 不适用快速和大批量样品检测; 而蛋白沉淀-液液萃取方法前处理更加耗时且烦琐。本研究采用 UPLC-MS/MS 技术建立了一套样品和沉淀剂用量更少, 操作更简便的新方法用于血浆中阿莫西林浓度的快速测定, 并将该方法应用于阿莫西林胶囊受试制剂及参比制剂在中国健康受试者体内的药动学特征以及生物等效性研究, 为临床合理用药以及药物评价提供参考。

1 仪器与试剂

LC-30AD 超高效液相色谱仪 (日本岛津公司); TQ5500 质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); 色谱柱为 Waters Acquity BEH C18 (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm); X3R 低温离心机、ULTS1368 超低温冰箱 (美国 Thermo 公司); XPR6UD5 百万分之一电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

阿莫西林 (批号: 130409-201913, 含量: 87.0%, 中国食品药品检定研究院), 阿莫西

林-d4 (批号: 2938-083A3, HPLC 纯度: 98.7%, 同位素纯度: 98.2%, 含水量: 15.4%, TLC 公司), 受试制剂阿莫西林胶囊 (批号: 200702, 好医生药业集团有限公司, 规格: 250 mg/粒); 参比制剂 Sawacillin (批号: 2002A03, LTL ファーマ株式会社, 规格: 250 mg/粒); 甲醇和甲酸分别为 HPLC 级和质谱级 (美国 Fisher 公司), 实验中纯水均由德国默克 Milli-Q 超纯水仪制得。山东省聊城市人民医院提供本实验用的空白血浆; 溶血空白血浆由破红的全血加入空白血浆 [- 70 °C 冷冻 2 h 后于室温解冻振摇破红的全血-空白血浆 (1 : 49, *V/V*)] 制备, 高脂空白基质由 20% 脂肪乳加入空白血浆 [20% 脂肪乳-空白血浆 (1 : 9, *V/V*)] 制备。

2 方法

2.1 血药浓度测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 采用 Waters Acquity UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 以 0.05% 甲酸水溶液 (A) 和含 0.1% 甲酸的 75% 甲醇水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0.0 ~ 0.8 min, 95%A; 0.8 ~ 2.0 min, 95% ~ 20%A; 2.0 ~ 3.0 min, 20%A; 3.0 ~ 3.1 min, 20% ~ 95%A; 3.1 ~ 4.0 min, 95%A), 流速 0.35 mL · min⁻¹, 含 0.1% 甲酸的 75% 甲醇水溶液为洗针液 (进行针管外清洗, 吸入样品前后清洗, 置换清洗液体积为 550 μL, 针管浸入清洗口时间为 5 s, 仅使用清洗泵清洗针管, 清洗时间为 4 s), 柱温 35 °C, 自动进样器温度 8 °C, 进样量 1 μL。

2.1.2 质谱条件 采用正离子多反应监测 (MRM) 模式测定待测物阿莫西林 (m/z 366.1 \rightarrow 114.0)、内标阿莫西林-d4 (m/z 370.2 \rightarrow 114.0), 阿莫西林和内标子离子的去簇电压 (DP) 均为 45 V, 入口电压 (EP) 均为 10 V, 碰撞室出口电压 (CXP) 均为 8 V, 碰撞电压 (CE) 分别为 26 V、27 V, 分析物滞留时间 (Dwell time): 200 ms。离子源为 ESI 源, 电压 (IS) 5500 V, 温度 (TEM) 500 °C, 气帘气 (CUR) 35 psi, 辅助气 1 (GS1) 和辅助气 2 (GS2) 分别为 50 psi 和 55 psi。

2.2 试验设计和样品采集

该研究是在健康成年受试者中进行的单中心、单剂量、空腹及餐后、随机、开放、两周期、双交叉试验, 临床研究单位为成都中医药大学附属医院, 伦理批件号为 2020ZL-010。共纳入体检筛选合格的餐后和空腹各 24 例受试者, 受试者按照筛选先后顺序随机分为两组, 在空腹状态下 (在给药前空腹至少 10 h) 或进食高脂高热餐后 (给药前 30 min 时开始进食高脂高热餐, 并在 30 min 内将高脂高热餐全吃完) 按照随机分组表给药, 每周期分别单次给予受试制剂或参比制剂 250 mg (250 mg/粒 \times 1 粒), 用温水 240 mL 送服, 给药后 2 h 内需要保持坐位或半卧位, 除了必要的活动, 4 h 之后不可进行剧烈的活动, 清洗期为 5 d。

空腹试验在给药 0 h (给药前 60 min 内) 和给药后 0.333 (20 min)、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、8、10、12 h; 餐后试验在给药 0 h (于餐后至给药前) 和给药后 0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、3、3.25、3.5、4、4.5、5、6、8、10、12 h 分别于肘前或以下静脉采血 4 mL, 置于已标记好的含有肝素抗凝剂的采血管中。血样采集完毕后尽快放入低温离心机 (4 °C) 中, 1700 g 离心 10 min, 离心后立即取约 1 mL 血浆移至检测样品管, 剩余的血浆移至备份样品管, 一份用于血样分析, 一份备份。采集过程中, 全血样品及离心后的血浆样品需在黄光、冰浴条件下暂存, 直至放入 -70 °C 超低温冰箱。从血样采集到血浆样品放入冰箱的过程不能超过 2 h。

2.3 血浆样品前处理

取血浆样品 50 μ L 置于 2.2 mL 96 深孔聚丙烯板中, 加入 20 μ L 内标工作液 (300 ng \cdot mL⁻¹), 涡旋混匀后, 加入 230 μ L 甲醇振摇提取 5 min,

然后将样品板于 4 °C、2120 g 离心 10 min, 添加 160 μ L 5% 甲醇水溶液置于 96 深孔聚丙烯板中, 并转移上述离心后的上清液 100 μ L 至相应孔位, 混匀后, 封膜进样。

2.4 数据处理

所有原始数据由 Analyst v1.6.3 采集处理后的样品得到, 通过 Analyst v1.6.3 与 Watson LIMS 7.5 SP1 系统的传输接口, 将数据传输至 Watson LIMS 系统计算得到数据结果。使用 Phoenix WinNonlin 软件 (ver 8.0) 计算临床样品中阿莫西林的药动学参数, 经对数转换后, 采用非房室模型进行方差分析、双单侧 t 检验和 90% 置信区间分析, 评价两种制剂的生物等效性。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 选择性 分别用 6 个来源空白血浆、1 个来源溶血空白血浆、1 个来源高脂空白血浆配制空白血浆样品 (不添加待测物和内标) 和定量下限 (LLOQ) 血浆样品 (添加内标), 每个来源各 3 个重复, 按“2.3”项下方法处理后进样分析。结果空白血浆对阿莫西林和内标阿莫西林-d4 检测无干扰, 见图 1。配制定量上限 (ULOQ) 血浆样品 (不添加内标, 6 个重复) 和空白血浆样品 (只添加内标, 6 个重复), 按照“2.3”项下方法处理后进样分析。结果显示, 在工作液考察稳定时间范围内, 阿莫西林和阿莫西林-d4 内标检测相互无干扰。

3.1.2 定量下限、标准曲线和定量范围 用 50% 甲醇水溶液配制阿莫西林储备液 (1.00 mg \cdot mL⁻¹), 以及系列阿莫西林标准曲线工作液 (160、130、80、40、16、4、1、0.4 μ g \cdot mL⁻¹), 临用前用空白血浆按 1:19 比例稀释工作液, 制得标准曲线血浆样品进行测定。结果阿莫西林的定量下限为 20 ng \cdot mL⁻¹, 线性范围为 20 ~ 8000 ng \cdot mL⁻¹, 用加权线性回归方法计算回归方程 (权重系数为 $1/\chi^2$) 为: $Y = 8.61 \times 10^{-4}X + 2.89 \times 10^{-4}$, $r = 0.9998$ 。

3.1.3 精密度、准确度的考察 取阿莫西林储备液, 用 50% 甲醇水溶液稀释系列阿莫西林质控工作液 (120、70、8、1.2、0.4 μ g \cdot mL⁻¹), 临用前用空白血浆按 1:19 比例稀释工作液, 制得质控血浆样品, 每个浓度重复 6 次, 按“2.3”项下方法在不同天处理 3 个分析批, 进样分析, 结果显示准确度 (以相对偏差 RE 表示) 和精密度 (以变异系数 CV 表示) 良好, 见表 1。

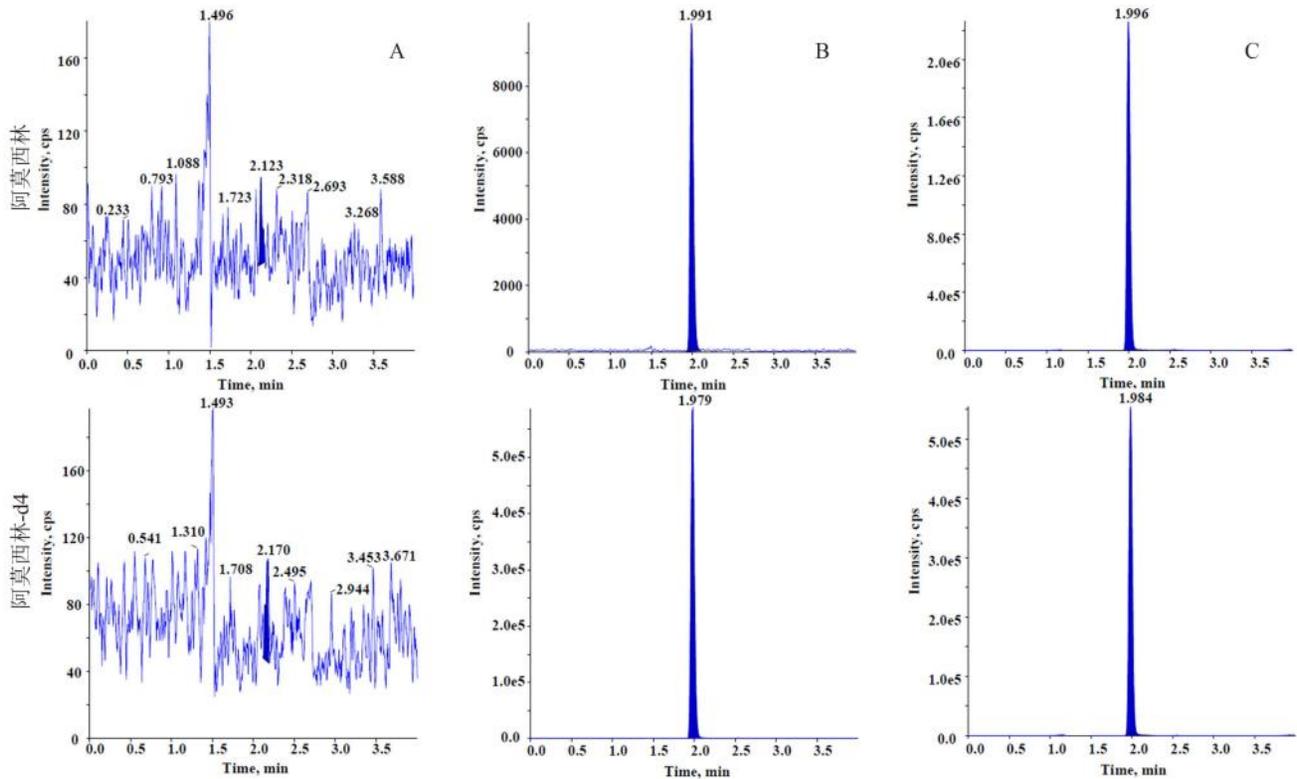


图 1 阿莫西林和阿莫西林-d4 的 UPLC-MS/MS 图

Fig 1 UPLC-MS/MS chromatograms of amoxicillin and amoxicillin-d4

A. 空白血浆样品 (blank plasma sample); B. 定量下限血浆样品 (LLOQ plasma sample); C. 受试者口服给药 1.25 h 后的血浆样品 (plasma sample at 1.25 h after oral administration)

表 1 精密度准确度结果
Tab 1 Precision and accuracy

质量浓度 / (ng · mL ⁻¹)	精密度 (CV) /%		准确度 (RE) /%	
	批内 (最大值)	批间	批内 (范围)	批间
20	3.9	3.3	-0.1 ~ 3.9	1.5
60	2.3	1.7	-1.9 ~ 0.2	-0.85
400	1.6	1.2	-1.3 ~ -1.7	-1.5
3500	1.2	1.3	0.3 ~ 2.0	1.0
6000	2.3	1.7	-1.5 ~ 0.1	-0.84

3.1.4 基质效应 分别取 6 个来源的空白血浆, 不添加内标, 按“2.3”项下方法进行蛋白沉淀提取得 6 个不同来源空白血浆上清液, 用上述 6 个来源上清液配制基质效应测试样品 [阿莫西林和内标阿莫西林-d4 浓度与 3 个浓度水平 (60、

3500、6000 ng · mL⁻¹) 的质控血浆样品进样浓度一致], 每个浓度重复 3 次, 以超纯水代替空白血浆, 配制阿莫西林和内标阿莫西林-d4 浓度与基质效应测试样品浓度一致的作为基质效应参比样品, 每个浓度重复 3 次, 进样分析。内标归一化基质效应因子为每个来源基质效应测试样品与基质效应参比样品中待测物峰面积的比值除以内标的峰面积的比值, 结果见表 2。

用 1 个来源的溶血和高脂空白血浆配制 60、3500、6000 ng · mL⁻¹ 质量浓度下的质控血浆样品, 每个浓度重复 3 次, 考察准确度和精密度。溶血和高脂质控血浆样品的平均测定值与其理论值的偏差 ≤ ±15.0%, 结果见表 2。

表 2 基质效应结果
Tab 2 Matrix effect

质量浓度 / (ng · mL ⁻¹)	空白基质						溶血基质 /%		高脂基质 /%			
	内标归一化基质效应因子						均值	RSD/%	准确度	RSD	准确度	RSD
60	0.961	0.973	0.958	1.006	0.994	0.993	0.981	1.97	-7.7 ~ 1.7	4.8	-2.2 ~ 1.1	1.8
3500	1.076	1.082	1.062	1.072	1.057	1.076	1.071	0.91	-1.6 ~ 2.4	2.0	1.7 ~ 5.0	1.7
6000	0.982	0.969	0.969	0.983	0.992	0.987	0.980	0.97	-0.4 ~ 2.5	1.5	1.3 ~ 4.4	1.6

3.1.5 提取回收率 取 1 个来源空白血浆配制 3 个浓度水平 (60、3500、6000 ng · mL⁻¹) 的质控血浆

样品, 每个样品取 50 μL (每个浓度重复 6 次), 按“2.3”项下方法处理作为提取回收率测试样品; 取

同一起来源的空白血浆，不添加内标，按“2.3”项下方法进行蛋白沉淀提取空白血浆上清液，配制与提取回收率测试样品中阿莫西林和内标阿莫西林-d4 浓度一致的样品作为提取回收率参比样品（每个浓度重复 6 次）。计算提取回收率测试与参比样品中待测物和内标的峰面积比值，结果 3 个质控浓度（60、3500、6000 ng · mL⁻¹）的平均回收率分别为 107.4%、100.6%、104.4%，RSD 分别为 3.2%、1.7%、0.90%；内标回收率为 104.8%，RSD 为 2.3%。

3.1.6 稳定性的考察 分别考察了血浆样品在室温白光，黄光冰浴，-20℃、-70℃条件下放置以及反复冻融 4 次的稳定性；样品处理后在进样器（8℃）的稳定性；前处理过程中，分别在加入内标后、加入沉淀剂后、振荡提取后在室温白光下放置 30 min，离心后在 4℃放置 30 min，于前处理结束后在室温白光下放置 1 h 稳定性。配制低、高浓度的稳定性质控

样品，在相应条件下放置考察各项样品稳定性，取样品 50 μL（各验证条件下各浓度均重复 6 次），按“2.3”项下方法处理，进样检测，使用新鲜制备的标准曲线定量，其结果均符合测定浓度与理论浓度的偏差 ≤ ±15% 的要求，结果见表 3；另考察了全血样品在黄光冰浴放置 3 h，全血样品放置后待测物和内标峰面积比值的均值与 0 h 峰面积比值的均值的偏差 ≤ -10.5%，表明全血样品在上述条件下稳定。

同时考察了储备液和工作液稳定性，结果表明阿莫西林储备液室温白光放置 13 h，阿莫西林-d4 储备液室温白光放置 6 h，阿莫西林和阿莫西林-d4 的储备液 -20℃放置 15 d，阿莫西林以及阿莫西林-d4 的工作液室温白光放置 13 h 和 -20℃放置 15 d，溶液与 0 h 溶液的响应的偏差均 ≤ -7.0%，RSD 均 ≤ 1.9%，表明各溶液在上述条件下稳定。

表 3 稳定性试验准确度相对偏差结果 (n = 6, %)
Tab 3 Relative deviation of stability test (n = 6, %)

理论浓度 / (ng · mL ⁻¹)	短期放置		反复冻融	进样器放置	长期放置		前处理过程 中稳定性
	室温白光 8 h	黄光冰浴 23 h	-70℃ 4 次	8℃ 43 h	-20℃ 8 d	-70℃ 46 d	
60	-9.5	-6.0	-1.0	0.9	-13.2	-1.5	2.6
6000	-9.1	-5.6	-0.2	1.2	-13.7	-1.8	2.6

3.1.7 其他 使用不同批次的色谱柱，进行方法耐用性考察，待测物和内标的色谱峰形、保留时间无明显变化，质控样品准确度、精密度符合要求；对稀释可靠性（稀释质控浓度 12 000 ng · mL⁻¹），稀释因子（3）、分析批容量（运行样品 164 个）、进样残留项目进行考察。所有方法验证结果均符合《中国药典》四部通则中生物样品定量分析方法验证指导原则^[11]及数据核查要求。

3.2 药动力学及生物等效性评价结果

健康受试者在空腹和餐后条件下分别口服 250 mg 阿莫西林胶囊受试制剂与参比制剂，采集血浆样品，前处理后进行 UPLC-MS/MS 分析。按“2.4”项下方法进行数据处理，餐后和空腹组受试者阿莫西林的参比制剂和受试制剂平均血药浓度-时间曲线见图 2，具体药代动力学参数见表 4。

本次空腹试验和餐后试验均有 24 例受试者纳入生物等效性数据集。餐后试验中，受试制剂与参比制剂的 C_{max}、AUC_{0~12h} 和 AUC_{0~∞} 几何均值比分别为 95.17%、102.13%、102.12%，90% 置信区间分别为 89.69%~100.97%、99.75%~104.57%、99.79%~104.51%；空腹试验中，受试制剂与参比制剂的 C_{max}、AUC_{0~12h} 和 AUC_{0~∞} 几何均值比分别为 106.83%、103.55%、103.62%，90% 置信区间

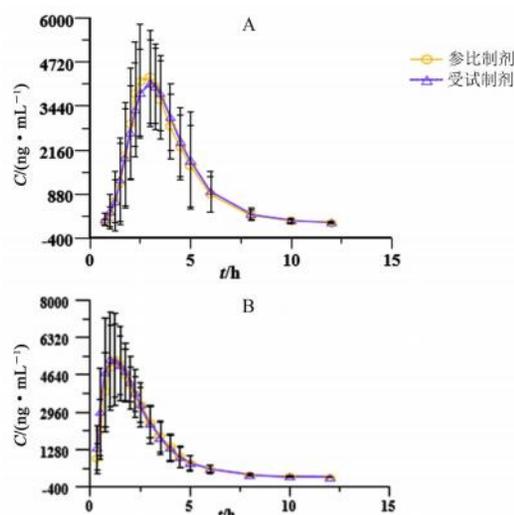


图 2 阿莫西林的平均血药浓度-时间曲线 (n = 24)

Fig 2 Mean concentration-time curves of amoxicillin (n = 24)
A. 餐后条件 (fed condition); B. 空腹条件 (fasting condition)

分别为 99.36%~114.87%、100.59%~106.60%、100.67%~106.64%，详见表 5。两种制剂 AUC_{0~12h}、AUC_{0~∞} 和 C_{max} 几何均值比的 90% 置信区间均落在 80.00%~125.00%，主要药动力学参数 AUC_{0~12h}、AUC_{0~∞} 和 C_{max} 均符合生物等效的判定标准，表明两种制剂生物等效。

4 讨论

表 4 餐后、空腹试验中阿莫西林受试与参比制剂的药代动力学参数 (n = 24)

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of amoxicillin of test capsule and reference capsule under fed and fasting condition (n = 24)						
试验	制剂	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim 12h}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim \infty}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	t_{max}/h	$t_{1/2}/h$
餐后	受试制剂	4922.12±967.16	14 165.22±1686.79	14 249.17±1712.18	3.00 (1.75, 5.00)	1.33±0.19
	参比制剂	5172.19±905.07	13 869.53±1939.31	13 952.82±1942.58	3.00 (2.00, 5.00)	1.34±0.14
空腹	受试制剂	6087.36±1766.53	15 081.27±2342.12	15 160.14±2354.49	1.25 (0.75, 3.00)	1.52±0.23
	参比制剂	5697.95±1768.73	14 564.04±2364.83	14 631.15±2374.93	1.25 (0.75, 3.50)	1.45±0.17

试验	制剂	$CL/(mL \cdot h^{-1})$	V_z/mL	MRT/h	λ_z/h^{-1}	$AUC_{\%}$, Extrapolation/%
餐后	受试制剂	17 544.88±1958.76	33 579.16±5685.28	3.82±0.60	0.52±0.06	1.85±1.14
	参比制剂	17 917.52±2579.96	34 711.49±6531.19	3.77±0.60	0.52±0.05	2.03±0.56
空腹	受试制剂	16 490.61±2416.61	36 081.20±6257.13	2.36±0.47	0.46±0.07	2.70±1.04
	参比制剂	17 086.84±2601.74	35 623.74±8284.37	2.46±0.41	0.48±0.05	2.33±0.73

表 5 餐后、空腹试验中阿莫西林受试与参比制剂的生物利用度参数

Tab 5 Bioavailability parameters of amoxicillin test capsule and reference capsule under fed and fasting condition					
试验	药动学参数	几何均值比 (R/T) /%	受试者体内变异系数 /%	90% 置信区间 /%	试验把握度
餐后	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	95.17	11.99	89.69 ~ 100.97	1.00
	$AUC_{0 \sim 12h}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	102.13	4.76	99.75 ~ 104.57	1.00
	$AUC_{0 \sim \infty}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	102.12	4.66	99.79 ~ 104.51	1.00
空腹	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	106.83	14.71	99.36 ~ 114.87	0.97
	$AUC_{0 \sim 12h}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	103.55	5.86	100.59 ~ 106.60	1.00
	$AUC_{0 \sim \infty}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	103.62	5.81	100.67 ~ 106.64	1.00

阿莫西林结构中含有β-内酰胺环，β-内酰胺环热稳定性较差^[12]，因此试验过程中考察了室温白光和黄光冰浴条件下血浆样品的稳定性，结果表明在黄光冰浴条件下更稳定，但室温白光放置 8 h 稳定，满足样品测定所需的时间，因此整个样品测定在室温白光下进行，更加便于操作。同时考察了柱温 25、30、35℃ 时同一浓度阿莫西林的响应，结果响应无明显差别，故选择 35℃ 为柱温的设置温度，降低系统压力的同时对仪器友好。

本研究建立了一套样品、沉淀剂用量更少、操作更简便的测定人体血浆中阿莫西林浓度的 UPLC-MS/MS 方法。样品采用在 96 深孔聚丙烯板中直接蛋白沉淀的处理方法，血浆用量仅需 50 μL，更利于临床试验过程中样品的采集；沉淀蛋白的甲醇仅用 230 μL，操作便捷，可极大节约成本、减少环境污染。本方法具有前处理简便，灵敏度高、选择性好、基质效应小的优点，适用于血浆样品中阿莫西林的高通量测定分析，满足阿莫西林体内药动学试验的检测需要。在本研究中，该方法成功应用于人体生物等效性试验，研究表明中国健康受试者服用受试制剂阿莫西林胶囊与参比制剂 Sawacillin 具有生物等效性。

参考文献

[1] 黄婕, 高源, 徐洪, 等. 国产阿莫西林口服制剂质量评价 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41 (1): 50-54.
 [2] 刘孟斯, 尹运涵, 李薇, 等. 反相高效液相色谱法检测

阿莫西林-克拉维酸钾 (8 : 1) 干混悬剂血药浓度及生物等效性研究 [J]. 中南药学, 2009, 7 (10): 745-749.
 [3] 叶淑华, 赵菲. HPLC 测定人血浆中阿莫西林含量 [J]. 中国现代应用药学, 2008, 25 (3): 239-240.
 [4] 帅海涛, 帅放文, 王向峰, 等. 液相色谱-质谱联用法测定人血浆中的阿莫西林 [J]. 化学分析计量, 2018, 27 (1): 51-54.
 [5] 陈冠华, 江羽, 雷后亮. HPLC-MS/MS 法测定人血浆中阿莫西林的质量浓度 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34 (3): 327-331.
 [6] 高瞰, 邢俊家. LC/MS/MS 法测定人血浆中阿莫西林克拉维酸浓度及其药物代谢动力学及人体生物等效性研究 [J]. 山西医药杂志, 2011, 40 (8): 831-833.
 [7] 雷雨燕, 卢俊丽, 颜羽, 等. 阿莫西林颗粒在中国健康人体内的生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (18): 2684-2688.
 [8] 张元元, 王晨, 张斗胜, 等. LC-MS/MS 法测定犬血浆中阿莫西林的浓度及其药动学研究 [J]. 中国药房, 2018, 29 (23): 3193-3197.
 [9] Reyns T, De Baere S, Croubels S, et al. Determination of clavulanic acid in calf plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2006, 41 (11): 1414-1420.
 [10] 徐一丹, 郭凡溪, 刘利锋, 等. UPLC-MS/MS 法测定犬血浆中阿莫西林和克拉维酸片剂的生物等效性研究 [J]. 南京农业大学学报, 2023, 46 (6): 1116-1124.
 [11] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 466 <通则 9012 > .
 [12] 纪顺利, 宋帆帆, 郑阳, 等. LC-MS/MS 同时测定人血浆中阿莫西林和克拉维酸及其生物等效性研究 [J]. 中国药科大学学报, 2019, 50 (6): 699-706.
 (收稿日期: 2024-04-05; 修回日期: 2024-05-06)

天蒲清脑颗粒制剂工艺及质量标准研究

冯李乐¹, 罗晓曼¹, 栾飞¹, 邹俊波¹, 史亚军¹, 张小飞¹, 郭东艳¹, 翟秉涛¹, 卫培峰¹, 缪峰², 王景媛^{1*} (1. 陕西中医药大学, 西安 712046; 2. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 目的 筛选天蒲清脑颗粒的最佳制备工艺, 并对其质量标准进行研究。方法 以干浸膏得率和提取物中葛根素的含量作为考核指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验法确定天蒲清脑颗粒的水提取工艺, 进一步确定浓缩工艺、干燥工艺、成型工艺。采用薄层色谱法对川芎、钩藤、羌活进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法对葛根中葛根素含量进行测定。结果 最佳水提取工艺为提取两次, 第一次 10 倍量水煎煮 120 min, 第二次 8 倍量水煎煮 90 min; 采用减压浓缩、微波干燥获得干膏粉, 干膏粉与糊精比例在 1:2 湿法制粒时所得颗粒最佳; 薄层鉴别斑点清晰, 阴性样品无干扰。结论 天蒲清脑颗粒制备工艺稳定可行, 并且该制剂质量标准专属性强, 重复性好, 可用于其质量控制。

关键词: 天蒲清脑颗粒; 正交试验; 制备工艺; 质量标准; 含量测定; 薄层鉴别

中图分类号: R283, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3259-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.020

Preparation and quality standard of Tianpu Qingnao granules

FENG Li-le¹, LUO Xiao-man¹, LUAN Fei¹, ZOU Jun-bo¹, SHI Ya-jun¹, ZHANG Xiao-fei¹, GUO Dong-yan¹, ZHAI Bing-tao¹, WEI Pei-feng¹, MIAO Feng², WANG Jing-yuan^{1*} (1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046; 2. The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the optimal preparation of Tianpu Qingnao granules and related quality standard. **Methods** The dry extract yield and content of puerarin in the extract were used as the indexes. The aqueous extraction of Tianpu Qingnao granules was determined by $L_9(3^4)$ orthogonal test. The concentration, drying and shaping were further determined. The thin layer chromatography was used to qualitatively identify *Chuanxiong Rhizoma*, *Uncariae ramulus cum uncis*, and *Notopterygii rhizoma et radix*, and the content of puerarin in *Puerariae Lobatae radix* was determined by high performance liquid chromatography. **Results** The optimal water extraction was twice. The initial extraction used 10 times of water and 120 min decoction. In the subsequent extraction, 8 times of water, and 90 min decoction. The dry paste powder was obtained through vacuum concentration and microwave drying techniques. The particle size was optimal when the ratio of dry paste powder to dextrin was 1:2, followed by additional wet granulation. The thin layer identification spots were clear, without interference of the negative sample. **Conclusion** The preparation of Tianpu Qingnao granules is both stable and feasible. Additionally, the quality standards exhibit strong specificity and good repeatability, facilitating effective quality control.

Key words: Tianpu Qingnao granule; orthogonal experiment; preparation; quality standard; content determination; thin layer identification

基金项目: 陕西中医药大学学科创新团队项目 (No.2019-YL11)。

作者简介: 冯李乐, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药新制剂与新剂型研究, email: 2017096572@qq.com *通信作者: 王景媛, 女, 硕士, 主要从事中药新制剂与新剂型研究, email: wangjingyuan@sntcm.edu.cn

头晕、目眩、头痛是一种十分常见的疾病,往往是由影响内耳或参与平衡的脑部疾病引起的^[1]。症状可能包括虚脱、平衡失调、眩晕、难以描述的头重脚轻或游泳感,或多种症状合并出现^[2]。此外,严重者还并伴有呼吸困难、肢体偏瘫、意识障碍等伴随症状^[3]。中医则认为头晕、目眩、头痛等症基本病机是风火痰瘀等病邪侵扰清窍或闭阻脑脉,或正虚脑失所养^[4]。天蒲清脑颗粒是陕西中医药大学第二附属医院在中医药理论指导下所研发的院内制剂,主要由天麻、川芎、葛根、盐泽泻、钩藤、茯苓、白芷、石菖蒲、羌活、菊花、姜半夏等十一味药材组成,可有效治疗头晕、目眩、头痛等症状。本试验旨在探寻天蒲清脑颗粒的最佳制备工艺路线及其质量标准,以期为天蒲清脑颗粒的进一步研发利用以及工业化大生产提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030 高效液相色谱仪(日本岛津公司), XMTD-400 型电热恒温水浴锅、DZTW 电子调温电热套(上海科恒实业发展有限公司), DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱、DZF-6020 真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), M1-L213B 微波炉(中国美的集团), AL204 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司), PL-S40 超声波清洗仪(东莞康士洁超声波科技有限公司), 416 高速离心机(上海基因有限公司), N-1200B 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 试药

天麻、川芎、葛根等中药材(陕西兴盛德药业有限责任公司), 经陕西中医药大学颜永刚教授鉴定; 川芎对照药材(批号: 120918-201813)、钩藤对照药材(批号: 121190-201204)、紫花前胡昔(纯度: 99.6%, 批号: 11182-201604)、葛根素(纯度: 95.4%, 批号: 110752-201514)(中国食品药品检定研究院)。水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 甲醇为色谱纯(美国费希尔公司); 其余试剂均为分析纯(天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 水提取工艺考察

2.1.1 色谱条件 采用 Agilent 5 TC-C18 (2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇-水(75:25, V/V); 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 250 nm; 进样量 10 μL; 柱温 30 ℃; 时间 30 min^[5]。方法学考察结果均符合药典要求。回归方程为: $Y = 3.788 \times 10^6 X + 1.053 \times 10^5$ ($R^2 = 0.9993$), 葛根素在 0.604 ~ 6.04 μg 与峰面积的线性关系良好。

2.1.2 溶液的制备 ① 对照品溶液: 取葛根素适量, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇制成 0.302 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。② 供试品溶液: 精密量取样品提取液 70 mL, 置具塞锥形瓶中, 再加无水乙醇 30 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 用 30% 乙醇补足减失的重量, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。③ 空白溶液: 另取 30% 乙醇溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.3 吸水率考察 按照处方比例称取处方量饮片 71 g, 加一定量的水, 浸渍至药材透芯(浸渍约 4 h), 对其进行过滤, 称取吸水后的饮片重量, 计算得饮片的吸水率为 140.81%, 初次提取应加 1.5 倍量水, 以补充药材的吸水量。

2.1.4 葛根素转移率的测定 取适量不同水提工艺下的样品, 依据“2.1.2”项下方法制备, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 计算葛根素的含量。

2.1.5 干膏率的测定 取浓缩药液适量, 加入恒重且编号的干燥蒸发皿中, 置水浴锅上恒温 100 ℃ 浓缩, 得棕褐色稠膏, 然后放置烘箱中, 105 ℃ 浓缩液完全烘干, 称取蒸发皿及干膏总重, 计算干膏率^[6]。

2.1.6 正交试验的设计 试验对加水量、提取时间、提取次数进行考察, 设计三因素三水平试验^[7], 具体因素水平见表 1。以干膏率和葛根素含量作为正交试验的评价指标, 采用综合评分(综合评分 = 干膏率/干膏率的最大值 × 30 + 葛根素含量/葛根素含量最高值 × 70)的方法进行评价^[8], 结果可见表 2、3。由表可知, 加水量对试验有较大影响, 其余两者次之。方差分析结果发现提取次数具有显著影响。结合实际生产和经济成本等方面考虑, 确定工艺条件为 A₃B₂C₃, 即采用水煎煮提取 2 次, 先加 10 倍水量, 并煎煮 120 min; 再加 8 倍水量, 并煎煮 90 min。

2.1.7 验证试验 取处方量 2 倍药材进行提取, 重复提取过程 3 次, 测定干膏率以及葛根素含量, 结果见表 4。结果表明该水提工艺制备出的成品干膏率及葛根素含量上下波动并不显著, 说明此工艺稳定可靠, 重复性较好。

2.2 浓缩工艺考察

考察常压浓缩与减压浓缩两种不同浓缩方式对工艺影响^[9]。按处方准确称取各饮片, 共计 71 g, 滤液平行分为两份。常压浓缩(温度 100 ℃), 减压浓缩(浓缩参数为 70 ℃, 真空度 0.05 ~ 0.06 MPa), 平行一次试验。浓缩至相对密度为 1.20 ~ 1.25

表 1 正交试验因素水平

Tab 1 Orthogonal test factor level

水平	因素		
	A 加水量 / 倍	B 提取时间 / min	C 提取次数 / 次
1	6	60	1
2	8	90	2
3	10	120	3

表 2 正交试验结果

Tab 2 Orthogonal experiment

编号	因素			干膏率 / %	葛根素含量 / (mg · g ⁻¹)	评分
	A	B	C			
1	1	1	1	15.75	25.72	51.98
2	1	2	2	23.20	51.13	94.68
3	1	3	3	27.93	50.05	98.25
4	2	1	2	25.56	46.02	90.20
5	2	2	3	28.01	49.93	98.16
6	2	3	1	21.11	37.36	73.61
7	3	1	3	27.50	49.34	96.81
8	3	2	1	21.83	41.65	80.25
9	3	3	2	28.20	48.28	96.10
K ₁	244.91	238.99	205.84			
K ₂	261.97	273.09	280.98			
K ₃	273.16	267.96	293.22			
极差	28.25	34.1	87.38			

表 3 正交试验方差分析结果 (以空白项为误差)

Tab 3 Variance analysis for orthogonal experiments (with blank term as error)

方差来源	离差平方和 SS	自由度	方差 MS	F 值	临界值	显著性
加水量	134.925	2	67.463	1.39	9	
提取时间	225.376	2	112.688	2.32	99	
提取次数	1492.345	2	746.173	15.38		P < 0.05
空白	97.012	2	48.506			

表 4 验证结果

Tab 4 Verification

编号	干膏率 / %	葛根素含量 / (mg · g ⁻¹)
1	26.53	45.88
2	26.96	46.14
3	26.45	44.77
平均值	26.65	45.59

(60 °C), 测定干膏率及葛根素含量, 结果见表 5。浓缩方式对干膏率和葛根素含量的影响较小, 但常压浓缩工艺更为耗时, 结合实际生产角度, 选用减压浓缩方式用于后续的干燥工艺。

表 5 浓缩工艺考察结果

Tab 5 Concentration process

浓缩方式	干膏率 / %	葛根素含量 / (mg · g ⁻¹)
常压浓缩	25.20	44.04
减压浓缩	26.00	45.94

2.3 干燥工艺考察

上述水煎提取浓缩得浸膏, 分别置微波干燥、热风干燥及真空干燥中, 考察 3 种不同方式对葛根素含量的影响^[10], 结果见表 6。微波干燥对葛根素含量影响较小, 且耗时较少, 故最终采用微波干燥作为干燥方式。进一步对微波干燥温度进行考察, 发现温度低于 50 °C 时干燥时间较长, 效率低, 温度高于 60 °C 时浸膏易发生焦糊。综上, 微波干燥的温度定于 55 °C, 以保证干燥完全, 不易焦糊。

表 6 干燥工艺考察结果

Tab 6 Drying process investigation results

干燥方式	葛根素含量 / (mg · g ⁻¹)
微波干燥	44.98
热风干燥	31.48
真空干燥	42.07

2.4 成型工艺考察

本研究中干浸膏粉为水提物制备的粉末, 且多糖类物质含量较大, 药膏干粉吸湿性强, 不可使用含水量高的润湿剂, 因此后续选用乙醇作为润湿剂。进一步考察颗粒剂制备时的辅料种类与用量^[11]。分别以淀粉、糊精、蔗糖作为填充剂制备颗粒, 发现淀粉所制得颗粒较为松散, 而蔗糖在制粒过程中极易黏结成块状固体, 因此确定糊精作为填充剂, 结果见表 7。

表 7 成型工艺考察结果

Tab 7 Molding process

填充剂	成型率 / %	得率 / %	性状
淀粉	78.96	67.54	棕褐色颗粒, 粉末较多
糊精	98.03	93.60	棕褐色颗粒, 粉末较少
蔗糖	21.75	4.10	黏结为褐色块状固体, 无法制粒

进一步考察辅料用量对颗粒成型的影响, 结果表明, 干膏粉与糊精比例在 1 : 2 时制得颗粒效果较好, 软材软硬适中, 成型率好, 适宜制成颗粒剂。

2.5 含量测定

2.5.1 溶液的制备 ① 对照品溶液: 按照“2.1.2”项下方法制备对照品溶液。② 供试品溶液: 取制备好的颗粒 1 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30% 乙醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 30% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。③ 空白溶液: 另取 30% 乙醇溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.5.2 线性试验 以对照品峰面积 (Y) 对葛根素

含量 (X) 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y = 3.981 \times 10^9 X - 1.015 \times 10^4$ ($R^2 = 1.000$), 结果表明葛根素在 $0.302 \sim 3.02 \mu\text{g}$ 内与峰面积成良好的线性关系。

2.5.3 专属性的考察 取供试品、对照品溶液、空白溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件分别进样, 结果见图 1, 结果表明空白溶液无干扰。

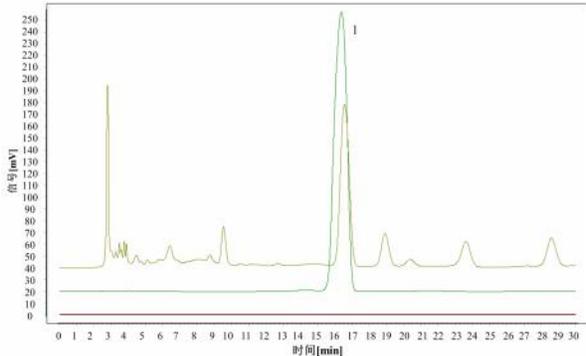


图 1 空白溶剂 (S1)、葛根素对照品 (S2)、天蒲清脑颗粒供试品 (S3) 的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC of blank solvent (S1), puerarin control (S2) and Tianpu Qingnao granules sample (S3)

1. 葛根素 (puerarin)

2.5.4 精密度、重复性、稳定性、加样回收试验

吸取对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 重复进样 6 次, 计算峰面积 $RSD < 1.0\%$, 表明精密度较好。取天蒲清脑颗粒同一批样品, 分为同等质量的 6 份, 按“2.5.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算峰面积 $RSD < 1.0\%$, 表明方法重复性较好。取天蒲清脑颗粒样品, 按“2.5.1”项下方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定, 计算峰面积 $RSD < 2.0\%$, 表明样品中葛根素在室温条件下稳定。取天蒲清脑颗粒约 0.5 g , 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 每份精密加入与样品含量约 1:1 的对照品葛根素溶液 (质量浓度为 $0.302 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10.110 mL , 精密加入 30% 乙醇 39.890 mL , 按“2.5.1”项下方法制备样品溶液, 平行操作 6 份, 进样测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 100.19% , RSD 为 0.37% , 表明方法准确良好。

2.5.5 样品测定 取天蒲清脑颗粒的中试产品 3 批, 按含量测定方法对葛根素进行测定, 3 批产品葛根素平均含量为 $6.28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。综合考虑其他因素的影响, 暂定本制剂含葛根以葛根素 ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$) 计, 不得少于 $5.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (测得量的 80%)。

2.6 薄层鉴别

2.6.1 川芎 取天蒲清脑颗粒 3 g , 研细, 加二氯甲烷 20 mL , 加热回流 30 min , 滤过, 滤液蒸

干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取川芎对照药材 0.5 g , 加二氯甲烷 20 mL , 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版四部通则 0502) 试验, 吸取上述两种溶液各 $5 \sim 10 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯 (9:5) 为展开剂, 饱和 15 min 后, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点^[12], 见图 2。

2.6.2 钩藤 取天蒲清脑颗粒 5 g , 研细, 加水 50 mL , 溶解, 调节 pH 至 $11 \sim 12$, 加三氯甲烷 50 mL , 超声 30 min , 取三氯甲烷层挥干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取钩藤对照药材 0.5 g , 加 1 mL 浓氨水浸泡 30 min , 再加三氯甲烷 50 mL , 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版四部通则 0502) 试验, 吸取上述两种溶液 $5 \sim 10 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以改良碘化铋钾溶液。在日光下检视, 供试品色谱在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点^[13], 见图 3。

2.6.3 羌活 取天蒲清脑颗粒 5 g , 研细, 加甲醇 30 mL , 超声处理 30 min , 取上清液, 作为供试品溶液。取紫花前胡苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 中含 0.5 mg 的溶液作为对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版四部通则 0502) 试验, 吸取上述 3 种溶液各 $5 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇 (8:2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点^[14], 见图 4。

3 讨论

本研究通过正交试验筛选出天蒲清脑颗粒的最佳水提取工艺, 考察了其浓缩、干燥和成型工艺, 保证了该制剂工艺水平的经济、可靠和稳定。本研究在前期生产工艺指标性成分筛选基础上, 建立了以葛根素含量测定为主的质量标准, 选择了图谱清晰、分离度好、专属性强、重复性好的川芎、钩藤和羌活对天蒲清脑颗粒进行定性鉴别, 为天蒲清脑颗粒质量标准的建立提供一定依据。

此外, 在干燥工艺考察阶段发现鼓风干燥可显著降低葛根素含量, 这主要是由于葛根素是葛根中的主要黄酮成分, 随着鼓风干燥温度上升, 加快了葛根素的氧化程度, 最终导致样品中葛根

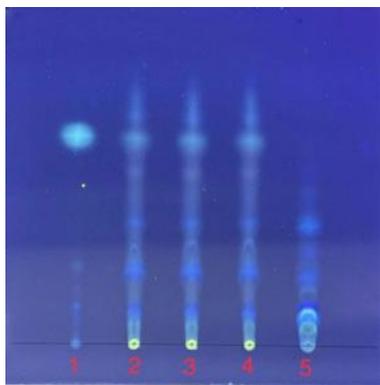


图 2 川芎药材在紫外光灯下检视色谱图

Fig 2 Chromatogram of *Chuanxiong rhizoma* herb under ultraviolet light

注 (Note): 1. 川芎对照药材 (*Chuanxiong rhizoma* control herb); 2. 供试品 1 (test sample 1); 3. 供试品 2 (test sample 2); 4. 供试品 3 (test sample 3); 5. 缺川芎阴性对照 (negative sample without *Chuanxiong rhizoma*)。

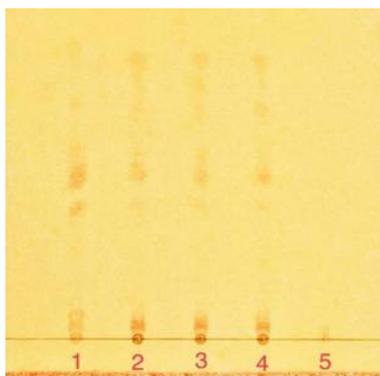


图 3 钩藤药材在日光灯下检视色谱图

Fig 3 *Uncariae ramulus cum uncis* herbs examined under fluorescent light

注 (Note): 1. 钩藤对照药材 (*Uncariae ramulus cum uncis* control herb); 2. 供试品 1 (sample 1); 3. 供试品 2 (sample 2); 4. 供试品 3 (sample 3); 5. 缺钩藤阴性样品 (negative sample without *Uncariae ramulus cum uncis*)。

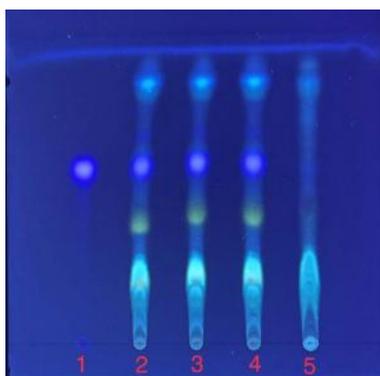


图 4 羌活药材在紫外光灯下检视色谱图

Fig 4 *Notopterygii rhizoma et radix* herbs examined under ultraviolet light

注 (Note): 1. 紫花前胡苷对照品 (previoside control); 2. 供试品 1 (sample 1); 3. 供试品 2 (sample 2); 4. 供试品 3 (sample 3); 5. 缺羌活阴性对照 (negative sample without *Notopterygii rhizoma et radix*)。

素含量降低。因此选择快速高效的微波干燥,以降低有效成分的流失^[15]。

综上所述,本研究所建立的部分药材鉴定方法以及含量测定方法其专属性、灵敏度、重现性都符合标准,因此可以用于后续天蒲清脑颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] Hall CD, Herdman SJ, Whitney SL, et al. Treatment of vestibular disorders (Inner ear balance problems): how does your physical therapist treat dizziness related to inner ear balance problems? [J]. *J Neurol Phys Ther*, 2022, 46 (2): 178-179.
- [2] 傅珍玥, 高希亚, 吕佳誉, 等. 半夏白术天麻汤合泽泻汤治疗眩晕临床疗效的 Meta 分析与试验序贯分析 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22 (6): 1121-1127.
- [3] 彭雨蒙, 王均琪, 白颖璐, 等. 缺血性脑卒中相关头痛发病机制及中药治疗研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48 (16): 4261-4274.
- [4] 刘红喜, 路梦颖, 梁晓, 等. 基于历代本草文献探讨头痛辨治思路 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (22): 155-162.
- [5] 李文莉, 朱凯, 赵莹, 等. 加味葛根颗粒制备工艺研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2023, 32 (21): 55-60.
- [6] 田明鑫, 倪昌荣, 周洪亮, 等. 昆葵保肾颗粒提取工艺优化 [J]. *中成药*, 2023, 45 (12): 4066-4070.
- [7] 于亚田, 王智群, 冯建安, 等. 正交试验优选杞黄明目颗粒提取工艺的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31 (6): 1358-1360.
- [8] 袁敏. 正交试验设计优选利湿通淋颗粒的醇提工艺研究 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (7): 1330-1333.
- [9] 郭志烨, 杨明, 韩丽, 等. 肤立乐颗粒水提部分制备工艺研究 [J]. *中药与临床*, 2015, 6 (3): 26-30.
- [10] 万琴, 高欢, 齐娅汝, 等. 中药浸膏干燥技术及干燥机制的研究进展与发展趋势 [J]. *中草药*, 2023, 54 (23): 7884-7894.
- [11] 赫光中, 果秋婷. Box-Behnken 效应面法优化胃爽颗粒剂成型工艺 [J]. *中南药学*, 2013, 11 (7): 498-501.
- [12] 曹瑞, 曹林林, 郭东艳, 等. 天麻眩晕宁片的薄层色谱鉴别研究 [J]. *云南中医学院学报*, 2016, 39 (4): 26-29, 34.
- [13] 杨爱霞, 鲁力, 柳佚雯, 等. 祛白颗粒质量标准的完善 [J]. *中国药师*, 2022, 25 (11): 2043-2047, 2057.
- [14] 罗群, 杨忠明, 唐定洪, 等. 消麻散质量标准研究 [J]. *中国药业*, 2022, 31 (24): 58-62.
- [15] 常飞, 段旭昌, 王倩倩, 等. 不同干燥方法对葛根黄酮含量的影响研究 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35 (9): 78-81, 86.

(收稿日期: 2024-07-05; 修回日期: 2024-09-12)

血液肿瘤精准治疗专题

【编者按】

中枢神经系统淋巴瘤是一种较为罕见的结外非霍奇金淋巴瘤，病理类型 90% 以上为弥漫大 B 细胞淋巴瘤非生发中心型，恶性程度高、预后较差，一线治疗以大剂量甲氨蝶呤联合化疗为主。继以大剂量化疗后的自体造血干细胞移植，对于高龄、并发症多、肾功能不全的患者往往受到限制，新的靶向治疗布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 抑制剂对弥漫大 B 细胞淋巴瘤具有很高的 BTK 抑制作用，在复发和难治性中枢神经系统淋巴瘤患者中显示出良好的脑脊液分布，单中心回顾性研究发现其取得了良好的临床疗效。分析中性粒细胞与淋巴细胞比值对接受免疫检查点抑制剂治疗淋巴瘤患者预后的影响，单中心结果显示其比值动态变化能更好地预测疗效，且在临床中更容易获取该比值分析结果，其可作为一个简单可行的预后评价指标。急性髓系白血病是成人最常见的急性白血病，异基因造血干细胞移植是急性髓系白血病治疗的重要选择，为疾病最终治愈提供可能，与常规化疗相比有更好的长期生存，移植后复发是移植后死亡的首要原因，暂无统一治疗标准，主流的治疗措施包括第二次异基因造血干细胞移植、供者淋巴细胞输注、常规化疗、去甲基化药物的应用、靶向药物治疗、嵌合抗原 T 细胞疗法等，为复发后精准治疗带来曙光，更多的治疗手段将会基于分子生物学进行分层，从而达到个体化治疗。

【主持人简介】



郭智，男，教授，硕士研究生导师，华中科技大学协和深圳医院血液内科主任，主任医师，广东省杰出青年医学人才，致力于淋巴瘤、白血病、骨髓瘤等血液肿瘤规范化治疗，擅长细胞免疫治疗、造血干细胞移植等工作。担任中国抗癌协会血液肿瘤整合康复专委会副主任委员；中国抗癌协会肿瘤与微生态专委会副主任委员；中国抗癌协会肿瘤血液病专委会常委；中国抗癌协会感染性肿瘤专委会常委；中华中医药学会免疫学分会常委；中华中医药学会血液病分会委员；中国中西医结合学会干细胞与再生医学专委会委员；广东省预防医学会血液肿瘤专委会主任委员；湖北省免疫学会肿瘤与微生态专委会副主任委员；广东省医师协会血液科医师分会常委等学术任职。负责及参与省部级及以上课题 10 项，以第一/通信作者发表 SCI 论文 20 余篇、中文核心期刊论文 120 余篇，主编《临床移植实践及血液肿瘤诊断与治疗》《肿瘤与微生态》《血液肿瘤与微生态》等专著 8 部，参编《国家基本药物指南》等专著 10 余部，目前已牵头制定并发布 15 部行业诊疗规范指南和共识。

急性髓系白血病异基因造血干细胞移植后复发的治疗进展

戴纬¹，金梦迪¹，郭智^{1, 2*} (1. 华中科技大学协和深圳医院血液内科，广东 深圳 518052；2. 国家卫生健康委核技术医学转化实验室（绵阳市中心医院），广东 深圳 518052)

摘要：急性髓系白血病异基因造血干细胞移植后复发是移植后死亡的首要原因。移植后复发的治疗暂无统一标准，主流的治疗措施包括二次异基因造血干细胞移植、供者淋巴细胞输注、常规化疗、去甲基化药物的应用、靶向药物治疗、嵌合抗原 T 细胞疗法 (CAR-T) 等。本文就急性髓系白血病异基因造血干细胞移植后复发的治疗最新进展做一综述。

关键词：急性髓系白血病；异基因造血干细胞移植；复发；治疗进展

中图分类号：R733.71

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2024)12-3264-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.021

基金项目：国家卫生健康委核技术医学转化重点实验室开放课题资助 (No.2023HYX033)；深圳市南山区卫生健康系统科技重大项目 (No.NSZZ2023018)。

作者简介：戴纬，男，硕士，主要从事白血病诊断及造血干细胞移植工作，email: 13289937568@163.com *通信作者：郭智，男，教授，主任医师，硕士研究生导师，主要从事血液肿瘤诊断及造血干细胞移植工作，email: guozhi77@126.com

Progress in the treatment of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

DAI Wei¹, JIN Meng-di¹, GUO Zhi^{1,2*} (1. Department of Hematology, Union Shenzhen Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Shenzhen Guangzhou 518052; 2. Key Laboratory of Nuclear Technology Medical Transformation (Mianyang Central Hospital), National Health Commission, Shenzhen Guangzhou 518052)

Abstract: Relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia is a major mortality risk. Currently, there is a lack of consensus regarding the optimal treatment for post-transplant relapse, with common strategies including second allogeneic transplantation, donor lymphocyte infusion, conventional chemotherapy, demethylating agents, targeted therapies, and chimeric antigen receptor T cell therapy. This article comprehensively reviewed the progress in the management of recurrence after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Key words: acute myeloid leukemia; allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; relapse; therapeutic progress

急性髓系白血病 (AML) 是成人最常见的急性白血病, 年发病率为 (3 ~ 4) / 10 万, 全球年均死亡人数约 80 000^[1]。异基因造血移植是急性髓系白血病治疗的重要选择, 为疾病最终治愈提供可能。与常规化疗相比, 异基因造血移植患者有更好的长期生存。然而, 40% ~ 50% 的 AML 患者会面临复发, 移植后复发的患者 2 年总生存期 (OS) 低于 20%^[2]。随着预处理方案、移植物抗宿主病 (GVHD) 预防和支持治疗的改进, 移植相关死亡风险不断降低, 复发成为移植后死亡的首要原因。AML 患者诊断时的高危遗传学特征, 移植前疾病未到达完全血液学缓解, 移植时使用降低强度的预处理方案, 移植后 T 细胞功能缺失等均是移植后复发的高危因素。分子生物学技术的发展, 特别是二代测序 (NGS) 技术, 为 AML 患者提供了基于基因层面的危险分层, 为白血病复发后的精准治疗奠定了基础。同样, 除了多参数流式细胞术 (MFC)、聚合酶链式反应 (PCR) 技术, NGS 技术能够更好地追踪微小残留 (MRD) 的状态^[3], 及早地发现移植后复发的证据。因此, 移植后复发患者的治疗可依据 MRD 的检测情况进行抢先治疗, 以避免血液学全面复发, 或者在疾病全面复发时进行。目前, AML 移植后复发的治疗暂无统一标准, 主流的治疗措施包括二次异基因造血干细胞移植、供者淋巴细胞输注 (DLI)、常规化疗、去甲基化药物的应用、靶向药物治疗、嵌合抗原 T 细胞疗法 (CAR-T) 等^[4]。本文就 AML 异基因造血干细胞移植后复发的治疗最新进展做一综述。

1 细胞免疫治疗

1.1 DLI

DLI 作为细胞治疗最早应用于慢性髓性白血病 (CML) 异基因移植后复发的患者, 可使 70% ~ 80% 的血液或细胞遗传学 CML 复发患者完全缓解, 其通过增强移植物抗白血病效应 (GVL) 诱导持久的缓解。然而, 只有不到 40% 的急性白血病患者对 DLI 有反应, 根据使用 DLI 的时机分为预防性治疗 DLI、抢先治疗性 DLI、治疗性 DLI。

Naparstek 等^[5]在 1995 首先开展了 DLI 的预防性使用, 研究纳入 146 例全相合异基因造血干细胞移植患者 (其中 81 例为 AML 患者), 使用 Campath 1 单克隆抗体进行 T 细胞清除, 为了诱导移植物抗白血病效应作用, 移植后输注了供者外周血淋巴细胞, 结果显示复发率显著降低。De Lima 等^[6]对移植后不同时间段 DLI 进行了研究, 共纳入 12 例患者 (其中 4 例 AML), 在移植后的 30、60 和 90 d 应用 DLI, 结果显示有高达 75% 的反应率, 但 GVHD 发生率升高。移植后第 30 日, 1×10^7 个 $CD3^+$ 细胞 $\cdot kg^{-1}$ 的 DLI 将导致一半患者发生 GVHD。Schmid 等^[7]对 75 例接受异基因造血干细胞患者使用 DLI 作为预防措施 (其中 50 例患者患有 AML), 对于完全缓解且未发生 GVHD 的患者, 在移植后 120 d 或停止使用免疫抑制药物后 30 d 给予 DLI, DLI 的剂量逐渐增加 5 ~ 10 倍, 在没有 GVHD 发生的情况下, 在 4 ~ 6 周的间隔内共给药 3 次, 结果显示 12 例患者符合预防性 DLI 的条件, 其中 11 例持续完全缓解 (CR), 从移植时起 3 年无白血病生存率达 92%。Dominietto 等^[8]研究了预防性使用 DLI 对移植后 MRD 阳性患者复发的保护作用, 选取了 80 例异基因移植患者

(其中 36 例为 AML), 结果显示未接受 DLI 治疗的 MRD 阳性患者复发率最高 (63%), 接受 DLI 治疗的 MRD 阳性患者复发率最低 (6%)。

关于 AML 移植后血液学复发患者的治疗性 DLI, 欧洲血液和骨髓移植协会急性白血病工作组 (EBMT-ALWP) 进行了一项回顾性研究^[9], 共纳入 399 名异基因移植后复发的 AML 患者, 其中 171 名患者接受了 DLI 治疗, 结果显示接受 DLI 治疗的患者的 2 年 OS 为 (21±3)%, 而未接受 DLI 治疗的患者的 2 年 OS 为 (9±2)%。在多因素分析后, DLI 治疗仍然是获得更好 OS 的独立预测因素 ($P = 0.04$), 而且较低的肿瘤负荷 (低于 35% 的骨髓原始细胞) ($P = 0.006$)、疾病完全缓解 ($P < 0.0001$) 和良好的细胞遗传 ($P = 0.004$) 患者使用 DLI 回输能获得更好的 OS。EBMT-ALWP 进行的另一项研究^[10], 纳入 263 名经降低强度预处理 (RIC) 异基因移植后复发的 AML 患者, 结果显示与未接受细胞治疗的患者相比, 38 例再次诱导化疗后完全缓解的患者接受巩固性 DLI 和/或 (allo-HSCT) 与 OS 改善相关 [(55±11)% vs (20±10)%]。然而, 在对一线化疗无反应并接受 DLI 治疗的患者中, 并没有显示出生存获益。因此, 在使用治疗性 DLI 前, 更加倾向于采取再次诱导化疗的策略, 使移植后复发患者尽可能降低肿瘤负荷, 甚至达到再次缓解。Takami 等^[11]对 AML 患者治疗性 DLI 后 OS 获益的主要因素进行了研究, 结果显示在 143 例首次血液学复发的成人 AML 患者中, 76% 的患者接受单次 DLI 输注, 其余患者接受 2 次或 2 次以上 DLI 输注, 治疗后 1 年、2 年和 5 年的总生存率分别为 (32±4)%、(17±3)% 和 (7±3)%。只有 8% 的患者在 DLI 前到达完全缓解, 其 2 年生存率高达 100%。DLI 后 OS 最强的预测因素是 DLI 治疗时的完全缓解状态。另一个预测更好 OS 的因素是移植和复发之间的时间间隔 ≥ 5 个月。在亚组分析中比较这两个预测因素时, 移植后 ≥ 5 个月复发的患者的 2 年 OS 仅为 12%。这表明, 治疗性 DLI 获益人群主要为再次完全缓解患者。

1.2 二次异基因造血干细胞移植

相对于治疗性 DLI, 二次异基因造血干细胞移植需要再次行预处理, 且受限于第一次移植复发, 往往需选择新的预处理方案及供者^[12]。目前尚无大型随机对照研究来探索二次移植与其他细胞治疗的疗效差异, 现有研究大多是回顾性研究, 因此证据等级有限。EBMT-ALWP 的一项回顾性研究比较了异基因造血干细胞移植后复发的 AML 患者二次使用移植与治疗性 DLI 的疗效, 研究共

纳入 418 例 AML 患者, 其中 137 例接受了二次移植, 281 例接受了 DLI 治疗, 结果二次移植组和 DLI 组报告的 5 年 OS 分别为 19% 和 15% ($P = 0.86$), 两组之间的 OS 差异无统计学意义^[13]。

日本一项基于 1265 例完全缓解时行异基因造血干细胞移植后复发的 AML 患者的研究^[14], 发现复发的中位时间为 6.1 个月; 在移植后的前 3~6 个月, 复发率最高为 29%, 此后随着时间的推移, 复发率下降, 3 年后复发率小于 1%。分别对 152 例 (12%) 和 481 例 (38%) 患者进行了治疗性 DLI 和二次移植治疗, 再次 CR 患者接受二次移植时的 2 年 OS 为 38% (95%CI, 29%~46%), 非 CR 患者接受二次移植的 2 年 OS 为 25% (95%CI, 18%~32%), 以 CR 组二次移植为对照, 非 CR 组二次移植的校正 HR (95%CI) 为 1.36 (1.02~1.81) ($P = 0.034$)。因此二次移植在 CR 进行时, 可以看到明显的生存获益。这项研究证明了二次移植的有效性, 并强调了移植前缓解状态的重要性。二次移植后的生存获益, 根据研究人群、供体类型和预处理方案的不同, 多项研究报告了不同的 OS 结果。

一项大型回顾性研究纳入了 179 例患者, 其中 132 例为 AML, 二次移植后的 2 年 OS 率为 25%, 在多因素分析中, 复发与移植之间的时间间隔超过 6 个月是 OS 的有利因素。Christopoulos 等^[15]研究了 58 例异基因造血干细胞移植后复发的 AML 患者, 接受二次移植后 1 个月时 50 例患者到达 CR, 3 年复发率为 56%, 治疗相关死亡率为 31%, OS 为 18%, 无事件生存期 (EFS) 为 13%。OS 随着患者年龄的减小、第一次移植后无复发间隔时间的延长以及存在慢性移植物抗宿主病而改善。3 年生存率低至 18%, 复发率高达 56%。CIBMTR 公布了 125 例接受二次异基因造血干细胞移植的 AML 患者的 3 年生存率为 27%。而 EBMT 报告了二次造血干细胞移植的 AML 患者的 5 年 OS 为 17%^[16]。

1.3 CAR-T 细胞治疗

CAR-T 细胞是一种修饰后的 T 细胞, 通过表面表达的嵌合抗原受体 (CAR) 来改变 T 细胞的抗原特异性, 并增强其抗肿瘤活性。CAR-T 细胞治疗在治疗淋巴瘤方面取得了显著的成果, 并已经获得了美国食品药品监督管理局 (FDA) 的批准。鉴于 CD19 CAR-T 细胞治疗急性 B 淋巴细胞白血病取得令人鼓舞的疗效, 近年来, CD33、CD123、CLL-1、CD70、TIM-3、FRβ、CD93、FLT-3 等肿瘤抗原已成为治疗 AML 的潜在靶点^[17-18]。

CD33 是一种骨髓特异性唾液酸结合受体, 几乎在 90% 髓系原始细胞上表达, 在临床试验中已被验证为有效靶点^[19]。Kenderian 等^[20]使用靶

向 CD33 CAR-T 细胞体外试验表明具有显著的抗白血病效应。

CD123 是白细胞介素 -3 (IL-3) 受体的 α 亚基。CD123 在多种免疫细胞上表达, 包括单核细胞、B 细胞、巨核细胞、浆细胞样树突状细胞和造血干/祖细胞。

大多数髓系原始细胞中存在 C 型凝集素样分子 1 (CLL-1) 的表达, 但仅限于造血谱系中, 未定型的干细胞 ($CD34^+ CD38^-$ 或 $CD34^+ D33^-$) 上大多不表达。一项 CLL-1 CAR-T 细胞治疗复发难治 AML 临床试验显示, 10 例受试者在回输 CAR-T 细胞后, 7 例达到完全缓解伴或不伴血液学恢复 (CR/CRi) [21]。

CD70 属于 TNF- α 家族, 在白血病干细胞上表达, 而在正常造血细胞上几乎没有表达, 最近作为 AML 的细胞表面靶抗原得到了重视。Reither 等 [22] 证明应用去甲基化药物 (HMA) 治疗的 AML 患者白血病干细胞 (LSCs) CD70 表达上调。因此, Sauer 等 [23] 进一步研究显示靶向 CD70 特异性 CAR-T 细胞呈现出很好的抗白血病效应, 且不会损害正常干细胞。其他大量 AML 相关的 CAR-T 靶点都在临床前实验阶段, 但距离 CAR-T 细胞治疗真正应用于 AML 患者的目标越来越远 [24]。

2 药物治疗

2.1 异柠檬酸脱氢酶抑制剂 (IDH)

10% ~ 30% 的 AML 患者具有编码异柠檬酸脱氢酶 1 (IDH1) 或异柠檬酸脱氢酶 2 (IDH2) 的基因突变, 但这两种突变通常不会同时出现。IDH1 基因位于 2 号染色体上, 而 IDH2 基因位于 15 号染色体上。它们的编码产物存在于细胞的不同区域, IDH1 编码的酶主要在于细胞质和线粒体间质中, 而 IDH2 编码的酶绝大部分在线粒体中。这些酶催化异柠檬酸盐转化为酮戊二酸盐。IDH1/IDH2 突变导致酶活性改变, 使异柠檬酸盐转化为 2-羟戊二酸, 从而引起能量代谢异常, 使造血干细胞的细胞分化受损, 进一步诱导白血病的发生 [25]。IDH 抑制剂选择性靶向作用于白血病细胞, 研究显示针对复发难治急性髓系白血病 IDH1 抑制剂艾伏尼布 (ivosidenib) 和 IDH2 抑制剂恩西地平 (enasidenib) 的完全缓解率约为 30%, 为此 FDA 批准了这两种药物用于复发难治 AML [26]。DiNardo 等 [27] 的一项研究调查了选择性 IDH1 抑制剂艾伏尼布在 R/R IDH1 突变 AML 患者中的作用, 结果显示中位 OS 为 8.8 个月, 其中一半的患者在 18 个月随访时达到 CR。选择性 IDH2 抑制剂恩西地平也在 R/R IDH2 突变 AML 患者中进行了研究。一项复发难治 AML 患者使用恩西地平的 I / II 期

临床研究中, 20% 的患者达到 CR, 客观缓解率为 40.3%, 其中较低的肿瘤负荷能获得更好的反应 [28]。目前有关 IDH 抑制剂用于治疗造血干细胞移植后复发的临床试验还在早期阶段。一项正在进行的 I 期临床试验旨在评估恩西地平治疗异基因造血干细胞移植后 IDH2 突变型 AML 的疗效 [29], 另一项研究是在评估恩西地平在 AML 维持治疗中的疗效 [30]。艾伏尼布治疗异基因造血干细胞移植后 IDH1 突变型 AML 的疗效评估也正在临床试验阶段 (NCT03564821)。相关临床试验结果暂未公布。

2.2 去甲基化药物 (HMAs)

HMAs 在 AML 患者的诱导治疗阶段显示出很好的疗效, 特别是对于可能无法耐受更强化疗的老年患者。最常用的 HMAs 包括阿扎胞苷 (AZA) 和地西他滨 (DAC)。阿扎胞苷除了通过 DNA 低甲基化发挥抗白血病活性外, 阿扎胞苷还可以通过增加肿瘤相关抗原 DR-1 的表达, 增强移植后的 GVL, 从而促进疾病控制 [31]。HMAs 还具有免疫调节活性, 可增强调节性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞的活性, 这两种细胞在维持 GVL 和调节 GVHD 中发挥重要作用 [32]。

一项回顾性研究纳入 9 例异基因造血干细胞移植后复发的患者使用低剂量阿扎胞苷, 5 名患者达到 CR [33]。De Lima 等 [34] 进行的一项 I 期剂量限制性研究, 纳入 37 例异基因移植的 AML 患者以及 8 例骨髓增生异常综合征患者, 使用了不同剂量的阿扎胞苷维持治疗, 结果显示低剂量阿扎胞苷 $32 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ 连续使用 5 d 是最佳剂量, 1 年 OS 为 77%, 复发率为 53%; 除了评估其疗效外, 该研究还显示阿扎胞苷还能在移植后的前 3 个月内增加免疫调节性 T 调节细胞的数量, 这揭示了移植后使用阿扎胞苷作为增强 GVL 而不增加 GVHD 风险的机制。另一项 RICAZA 试验研究同样显示在异基因造血干细胞移植后使用阿扎胞苷降低了复发的风险 [35]。Platzbecker 等 [36] 通过供体 CD34⁺ 血细胞嵌合分析, 研究了骨髓增生异常综合征 (MDS) 或 AML 患者在接受异基因造血干细胞移植后进行 MRD 监测后, 将阿扎胞苷作为 MRD 转阳时的抢先治疗取得很好疗效。在这项试验之后, Platzbecker 团队还进行了一项前瞻性研究, 该研究纳入 172 例 AML 患者和 26 例 MDS 患者, 在常规化疗或异基因造血干细胞移植后获得完全缓解 [37]; 但其中 60 例 (30%) 在随访 24 个月时 MRD 转阳, 有 53 例开始行阿扎胞苷治疗, 6 个月后, 无复发生存率为 58%; 随访 1 年, 无复发生存率为 46%。这提示了阿扎胞苷在预防和 / 或 MRD 转阳时抢先治疗时可延缓复发。此外, El-

Cheikh 等^[38]的一项观察性研究表明,在移植后维持使用低剂量阿扎胞苷,可以降低高危 AML 患者的复发风险,并诱导持续缓解。Oran 等^[39]进行的一项 II 期随机临床试验评估了阿扎胞苷在移植后维持治疗的疗效,共纳入了 187 例异基因造血干细胞移植后的 AML 患者。阿扎胞苷的使用周期为 4 疗程,虽然相对于对照组无复发生存和总生存差异没有统计学意义,但提示了移植后进行前瞻性试验是安全的。另一项多中心随机试验纳入 204 例接受异基因造血干细胞移植并达到 MRD 阴性的高危 AML 患者,应用小剂量地西他滨联合重组人粒细胞集落刺激因子维持治疗,维持治疗组 2 年复发率为 15%,而未接受维持治疗的患者为 38% ($P < 0.01$)^[40]。另一项口服阿扎胞苷 CC-486 的临床试验结果显示在移植患者中耐受性良好,一年复发率为 21%^[41]。

此外, HMAs 联合 DLI 回输相关研究也显示出一定效果。比利时血液学会一项 II 期前瞻性研究,纳入 49 名 AML 或 MDS 移植后复发患者,接受第 1 周期硫唑嘌呤 (AZA) $100 \text{ mg} \cdot \text{m}^2 \times 5$ 日,第 2~6 周期,阿扎胞苷剂量降至 $35 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$,如未出现 GVHD,则在第 2、4、6 周期的第 1 或 2 日行 DLI 回输,DLI 呈现剂量递增方案:同胞供者 5×10^7 、 1×10^8 和 $5 \times 10^8 \text{ CD}3^+ \cdot \text{kg}^{-1}$,无关供者 5×10^6 、 1×10^7 和 $5 \times 10^7 \text{ CD}3^+ \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[42]。结果显示 11 例 (22.4%) 患者对 AZA 有反应,包括 10 例 CR/CRi 和 1 例 PR,第 180 日的 ORR 为 29%,中位 OS 为 6 个月。与阿扎胞苷相比,地西他滨相关前瞻性研究比较有限,德国一项 DAC 联合 DLI 回输治疗移植后复发的多中心研究,回顾性分析了来自德国 6 个移植中心 36 例移植后复发的患者资料,其中 AML 29 例, MDS 7 例^[43]。全部患者接受了中位 2 个周期的 DAC 治疗,其中 22 例患者 (61%) 还接受了中位 2 次 DLI 回输,结果显示总缓解率为 25%,包括 6 例 CR (17%) 和 3 例 PR (8%),2 年 OS 为 11% ($\pm 6\%$)。

2.3 维奈克拉

BCL-2 的选择性抑制剂维奈克拉 (venetoclax) 与 HMAs 或低剂量阿糖胞苷联合治疗新诊断的 AML 患者中已显示出有效的效果,尤其在不适合强烈化疗的患者中有良好的耐受性^[44]。Dinardo 等^[45]研究表明,维奈克拉联合地西他滨或阿扎胞苷治疗老年 AML 耐受性良好且有效,67% 的患者实现了 CR。在另一项研究中,对于不适合强化疗的 AML 患者,维奈克拉联合低剂量阿糖胞苷可将 CR 率从 8% 提高到 26%^[46]。基于这些试验的结果,FDA 批准维奈克拉联合阿扎胞苷或低剂量阿糖胞苷用于强

烈化疗不耐受或由于年龄较大、伴有严重并发症等不适合强烈诱导的患者。正是鉴于维奈克拉靶向白血病细胞的作用以及良好的耐受性,Kent 等^[47]研究了其在复发风险高的 AML 患者移植后维持治疗中作用,结果显示维奈克拉作为单一药物作为移植后维持治疗耐受性良好,无复发生存率为 87%。然而,仍存在 4.8% 的患者因骨髓抑制而减低用药剂量。移植后复发应用维奈克拉作为挽救性治疗的临床数据十分有限。Zucenka 等^[48]的一项回顾性研究比较了 20 例接受维奈克拉、低剂量阿糖胞苷和放线菌素 D 治疗的患者与 29 例接受 FLAG-IDA 强烈化疗方案治疗移植后复发的 AML 患者的预后,结果维奈克拉组总有效率为 75%,而 FLAG-IDA 组总有效率为 66%,但差异无统计学意义 ($P = 0.542$);然而,维奈克拉组的治疗相关死亡率为 0%,而化疗组为 34%,因此维奈克拉联合治疗具有很好的抗白血病效果,而不增加治疗相关死亡。

2.4 FLT-3 抑制剂

大约 30% 的新诊断 AML 成人中存在编码 FMS 样酪氨酸激酶 3 (FLT-3) 的基因突变^[47]。这些患者中近 75% 为内部串联重复突变 (ITD),其主要位于受体的近膜结构域,其余 25% 的患者在受体的酪氨酸激酶结构域 (TKD) 中存在点突变^[49-50]。而 FLT3-ITD 突变会带来不良预后,TKD 突变的预后影响不确定。第一代 FLT-3 抑制剂米哌妥林 (midostaurin)、索拉非尼 (sorafenib) 为非选择性抑制剂,而不是特异性的 FLT-3 抑制剂,这种可能抑制其他激酶的特性解释了作为单一药物给药时的脱靶效应以及存在较多不良反应,但在 FLT-3 野生型 AML 患者中的显示出的疗效也促使相关研究的进行。一项大型 III 期随机对照试验,研究对象为 18~60 岁伴有 FLT-3 突变的 AML 患者,结果显示,与安慰剂+标准诱导和巩固化疗治疗组相比,米哌妥林+标准诱导和巩固化疗联合治疗组 OS 提高 23% ($P = 0.0074$);米哌妥林治疗组中位 OS 为 74.7 个月,安慰剂组中位 OS 为 25.6 个月,且差异有统计学意义^[51]。米哌妥林是第一个显示出总体生存获益的 FLT-3 抑制剂,这导致米哌妥林被批准用于 FLT-3 突变 AML 患者的一线治疗。当与传统化疗联合使用可使死亡风险降低 22%,特别是在首次完全缓解后接受异基因造血干细胞移植的患者具有更显著的生存获益。而一项关于索拉非尼的随机 II 期临床试验,对其在异基因后的维持治疗进行了测试 (EUDRACT 2010-018539-16),最新临床试验结果表明索拉非尼在移植后维持治疗的总体生存率和无复发生存率方面获益^[52]。尽管 FDA 未批准该适应证,但在考虑对伴有 FLT-3 突变患者进行维持治疗的选择有参考意义。第二代

FLT-3 抑制剂, 例如吉瑞替尼 (gilteritinib) 和奎扎替尼 (quizartinib), 可以更特异性地选择抑制 FLT-3, 并且即使作为单一药物使用也更有效。奎扎替尼针对具有 *FLT3-ITD* 突变的复发难治 AML 患者的随机 III 期临床试验^[53] 共终纳入 539 例 FLT3-ITD 阳性 AML 患者 (男性 294 例, 女性 245 例), 并随机分配到奎扎替尼组 (268 例) 或安慰剂组 (271 例), 中位随访时间为 39.2 个月, 奎扎替尼组的中位总生存期为 31.9 个月, 安慰剂组为 15.1 个月 ($HR = 0.78$, $95\%CI 0.62 \sim 0.98$, $P = 0.032$), 而且奎扎替尼组显示出更高的完全缓解率 (48% vs 27%)。

2.5 来那度胺 (Lena)

来那度胺属于一类免疫调节药物 (IMiD) 已在多发性骨髓瘤、伴 del (5q) 的较低危组骨髓增生异常综合征取得很好的疗效。尽管来那度胺在血液系统恶性肿瘤中的临床反应上佳, 但复发和耐药仍然是基于 IMiD 治疗中的难题。随着来那度胺抗肿瘤治疗的分子机制不断被发现, 其在恶性血液肿瘤中的应用不断被拓宽。He 等^[54] 研究发现, 在 MDS 和 AML 中, 来那度胺介导的 Ikaros 家族锌指蛋白 1 (IKZF 1) 降解导致 G 蛋白偶联受体 68 (GPR 68) 相关的促凋亡途径活化, 并抑制钙调神经磷酸酶 1 (RCAN 1) 等促存活信号通路调节因子, 因此移植后预防 GVHD 的关键药物环孢菌素 A 可以增强来那度胺在伴有或不伴有 del (5q) 的 MDS/AML 中的抗白血病活性。

Azalena 临床研究 (NCT02472691) 纳入 50 例移植后复发患者, 其中 AML 23 例 (46%)、MDS 24 例 (48%)、CMML 3 例 (6%), 复发中位时间 233 d。患者接受 8 个周期的 Azalena ($75 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$, 第 1~7 日), 来那度胺 (2.5 mg 或 5 mg, 第 1~21 日) 和最多 3 次 DLI 回输, 结果显示总有效率为 56%, 25 例患者 (50%) 达到 CR, 持续缓解率为 80%, 中位 OS 为 21 个月, 1 年 OS 率为 65%。Craddock 等^[55] 研究纳入 29 名因 AML 或 MDS 异基因造血干细胞移植后复发的患者, 复发中位时间 10 个月, 中位随访时间为 23 个月。患者接受了连续 Azalena ($75 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$, 持续 7 d) 治疗, 随后在第 10~30 日接受剂量递增的来那度胺治疗。结果显示移植后来那度胺联合 Azalena 的最大耐受剂量为 $25 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。其中 25 mg 组 15 例患者中 3 例患者发生 2~4 级 GVHD, 无 GVHD 相关死亡, 7 例患者 (47%) 在治疗后获得了主要临床应答 (3 例 CR, 3 例 CRi, 1 例 PR)。

3 展望

尽管过去几十年来在 AML 治疗、降低非复发死亡率方面已取得了很多进展, 但移植后复发仍是一项巨大挑战。一旦诊断明确移植后血液学

复发, 首先应立即停用免疫抑制剂并尽早开始治疗。移植后防治复发处理措施包括减/停免疫抑制、靶向药物、放化疗、免疫治疗和细胞治疗。髓外复发的治疗病变受累的范围选择局部治疗、全身化疗或联合治疗, 局部治疗包括手术切除、鞘内注射和局部放疗, 全身治疗包括化疗、供者淋巴细胞输注和二次移植等。疗效肯定的是 DLI, 特别是那些早期复发的患者, 通常难以耐受强烈化疗, 而且即使是采用细胞疗法, 也只有少数患者能够生存获益。新的研究进展肠道菌群在免疫稳态中的重要作用, 影响异基因造血干细胞移植免疫重建, 并可能成为监测指标以调整移植后的免疫相关策略, 由于肠道菌群存在免疫调控作用并在 GVHD 发生中发挥潜在作用, 且也与疾病预后有关, 有可能成为重要的治疗随访指标之一, 肠道菌群失衡可导致移植后出现疾病复发, 说明维持肠道微生态稳态可能在抗肿瘤药物治疗过程中发挥关键作用, 通过干扰全身代谢、免疫系统和炎症来影响抗肿瘤药物的治疗效果^[56-57]。新技术的进步揭示了造血干细胞移植后复发的机制多样性, 还有二代测序的发展对于复发机制的理解可能为复发后精准治疗的指导带来曙光, 更多的治疗手段将会基于分子生物学进行分层, 从而达到个体化治疗。

参考文献

- [1] DiNardo CD, Erba HP, Freeman SD, et al. Acute myeloid leukaemia [J]. *Lancet*, 2023, 401 (10393): 2073-2086.
- [2] Moukalled NM, Kharfan-Dabaja MA. What is the role of a second allogeneic hematopoietic cell transplant in relapsed acute myeloid leukemia? [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2020, 55 (2): 325-331.
- [3] Sequencing identifies relapse-prone AML patients [J]. *Cancer Discov*, 2023, 13 (5): OF2.
- [4] Harada K, Mizuno S, Yano S, et al. Donor lymphocyte infusion after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2022, 101 (3): 643-653.
- [5] Naparstek E, Or R, Nagler A, et al. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia using Campath-1 antibodies and post-transplant administration of donor's peripheral blood lymphocytes for prevention of relapse [J]. *Br J Haematol*, 1995, 89 (3): 506-515.
- [6] De Lima M, Bonamino M, Vasconcelos Z, et al. Prophylactic donor lymphocyte infusions after moderately ablative chemotherapy and stem cell transplantation for hematological malignancies: high remission rate among poor prognosis patients at the expense of graft-versus-host disease [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27 (1): 73-78.
- [7] Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, et al. Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for

- allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (24): 5675-5687.
- [8] Dominiotto A, Pozzi S, Miglino M, et al. Donor lymphocyte infusions for the treatment of minimal residual disease in acute leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109 (11): 5063-5064.
- [9] Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT acute leukemia working party [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25 (31): 4938-4945.
- [10] Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2012, 119 (6): 1599-1606.
- [11] Takami A, Yano S, Yokoyama H, et al. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis by the adult acute myeloid leukemia working group of the japan society for hematopoietic cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Tr*, 2014, 20 (11): 1785-1790.
- [12] Bornhäuser M, Schliemann C, Schetelig J, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation vs standard consolidation chemotherapy in patients with intermediate-risk acute myeloid leukemia: a randomized clinical trial [J]. *JAMA Oncol*, 2023, 9 (4): 519-526.
- [13] Kharfan-Dabaja MA, Labopin M, Polge E, et al. Association of second allogeneic hematopoietic cell transplant vs donor lymphocyte infusion with overall survival in patients with acute myeloid leukemia relapse [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4 (9): 1245-1253.
- [14] Yanada M, Konuma T, Yamasaki S, et al. Relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation: clinical features and outcomes [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2021, 56 (5): 1126-1133.
- [15] Christopoulos P, Schmoor C, Waterhouse M, et al. Reduced-intensity conditioning with fludarabine and thiopeta for second allogeneic transplantation of relapsed patients with AML [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2013, 48 (7): 901-907.
- [16] Ruutu T, de Wreede LC, van Biezen A, et al. Second allogeneic transplantation for relapse of malignant disease: retrospective analysis of outcome and predictive factors by the EBMT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2015, 50 (12): 1542-1550.
- [17] Shaw BE, Mufti GJ, Mackinnon S, et al. Outcome of second allogeneic transplants using reduced-intensity conditioning following relapse of haematological malignancy after an initial allogeneic transplant [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2008, 42 (12): 783-789.
- [18] Boucher JC, Shrestha B, Vishwasrao P, et al. Bispecific CD33/CD123 targeted chimeric antigen receptor T cells for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2023, 31: 100751.
- [19] Abaza Y, Fathi AT. Monoclonal antibodies in acute myeloid leukemia-are we there yet? [J]. *Cancer J*, 2022, 28 (1): 37-42.
- [20] Kenderian SS, Ruella M, Shestova O, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2015, 29 (8): 1637-1647.
- [21] Jin X, Zhang M, Sun R, et al. First-in-human phase I study of CLL-1 CAR-T cells in adults with relapsed/refractory acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15 (1): 88.
- [22] Riether C, Pabst T, Höpner S, et al. Targeting CD70 with cusatuzumab eliminates acute myeloid leukemia stem cells in patients treated with hypomethylating agents [J]. *Nat Med*, 2020, 26 (9): 1459-1467.
- [23] Sauer T, Parikh K, Sharma S, et al. CD70-specific CAR T cells have potent activity against acute myeloid leukemia without HSC toxicity [J]. *Blood*, 2021, 138 (4): 318-330.
- [24] Badar T, Manna A, Gadd ME, et al. Prospect of CAR T-cell therapy in acute myeloid leukemia [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2022, 31 (2): 211-220.
- [25] Lee S, Urman A, Desai P. Emerging drug profile: krebs cycle and cancer: IDH mutations and therapeutic implications [J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60 (11): 2635-2645.
- [26] Tangella AV, Gajre A, Kantheti VV. Isocitrate dehydrogenase 1 mutation and ivosidenib in patients with acute myeloid leukemia: a comprehensive review [J]. *Cureus*, 2023, 15 (9): e44802.
- [27] DiNardo CD, Stein EM, De Botton S, et al. Durable remissions with ivosidenib in IDH1-mutated relapsed or refractory AML [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (25): 2386-2398.
- [28] Stein EM. Enasidenib, a targeted inhibitor of mutant IDH2 proteins for treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia [J]. *Future Oncol*, 2018, 14 (1): 23-40.
- [29] Fathi AT, Kim HT, Soiffer RJ, et al. Enasidenib as maintenance following allogeneic hematopoietic cell transplantation for IDH2-mutated myeloid malignancies [J]. *Blood Adv*, 2022, 6 (22): 5857-5865.
- [30] Shallis RM, Podoltsev NA. Maintenance therapy for acute myeloid leukemia: sustaining the pursuit for sustained remission [J]. *Curr Opin Hematol*, 2021, 28 (2): 110-121.
- [31] Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsrna including endogenous retroviruses [J]. *Cell*, 2015, 162 (5): 974-986.
- [32] Schroeder T, Fröbel J, Cadeddu RP, et al. Salvage therapy with azacitidine increases regulatory T cells in peripheral blood of patients with AML or MDS and early relapse after allogeneic blood stem cell transplantation [J]. *Leukemia*, 2013, 27 (9): 1910-1913.
- [33] Jabbour E, Giralt S, Kantarjian H, et al. Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia [J]. *Cancer*, 2009, 115 (9): 1899-1905.
- [34] De Lima M, Giralt S, Thall PF, et al. Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: a dose and schedule finding study [J]. *Cancer*, 2010, 116 (23): 5420-5431.

- [35] Craddock C, Jilani N, Siddique S, et al. Tolerability and clinical activity of post-transplantation azacitidine in patients allografted for acute myeloid leukemia treated on the RICAZA trial [J]. *Biology of Blood & Marrow Transplantation Journal of the American Society for Blood & Marrow Transplantation*, 2016, 22 (2): 385-390.
- [36] Platzbecker U, Wermke M, Radke J, et al. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial [J]. *Leukemia*, 2012, 26 (3): 381-389.
- [37] Platzbecker U, Middeke JM, Sockel K, et al. Measurable residual disease-guided treatment with azacitidine to prevent haematological relapse in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia (RELAZA2): an open-label, multicentre, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19 (12): 1668-1679.
- [38] El-Cheikh J, Massoud R, Fares E, et al. Low-dose 5-azacytidine as preventive therapy for relapse of AML and MDS following allogeneic HCT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2017, 52 (6): 918-921.
- [39] Oran B, De Lima M, Garcia-Manero G, et al. A phase 3 randomized study of 5-azacitidine maintenance vs observation after transplant in high-risk AML and MDS patients [J]. *Blood Adv*, 2020, 4 (21): 5580-5588.
- [40] Gao L, Zhang YQ, Wang SB, et al. Effect of rhG-CSF combined with decitabine prophylaxis on relapse of patients with high-risk MRD-negative AML after HSCT: an open-label, multicenter, randomized controlled trial [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38 (36): 4249-4259.
- [41] De Lima M, Oran B, Champlin RE, et al. CC-486 maintenance after stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24 (10): 2017-2024.
- [42] Poiré X, Graux C, Ory A, et al. Sequential administration of low dose 5-azacytidine (AZA) and donor lymphocyte infusion (DLI) for patients with acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS) in relapse after allogeneic stem cell transplantation (SCT): a prospective study from the Belgian Hematology Society (BHS) [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2022, 57 (1): 116-118.
- [43] Schroeder T, Rautenberg C, Krüger W, et al. Treatment of relapsed AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation with decitabine and DLI-a retrospective multicenter analysis on behalf of the German Cooperative Transplant Study Group [J]. *Ann Hematol*, 2018, 97 (2): 335-342.
- [44] Dinardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, et al. Azacitidine and venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (7): 617-629.
- [45] Dinardo CD, Pratz K, Pullarkat V, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2019, 133 (1): 7-17.
- [46] Tiong IS, Dillon R, Ivey A, et al. Venetoclax induces rapid elimination of NPM1 mutant measurable residual disease in combination with low-intensity chemotherapy in acute myeloid leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2021, 192 (6): 1026-1030.
- [47] Kent A, Schwartz M, McMahon C, et al. Venetoclax is safe and tolerable as post-transplant maintenance therapy for AML patients at high risk for relapse [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2023, 58 (8): 849-854.
- [48] Zucenka A, Vaitekėnaite V, Maneikis K, et al. Venetoclax-based salvage therapy followed by Venetoclax and DLI maintenance vs. FLAG-Ida for relapsed or refractory acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2021, 56 (11): 2804-2812.
- [49] Garciaz S, Hospital MA. FMS-Like tyrosine kinase 3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: an update on the emerging evidence and safety profile [J]. *Onco Targets Ther*, 2023, 16: 31-45.
- [50] Haage TR, Schraven B, Mougiakakos D, et al. How ITD insertion sites orchestrate the biology and disease of FLT3-ITD-mutated acute myeloid leukemia [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15 (11): 2991.
- [51] Stone R M, Dohner H, Ehninger G, et al. CALGB 10603 (RATIFY): a randomized phase III study of induction (daunorubicin/cytarabine) and consolidation (high-dose cytarabine) chemotherapy combined with midostaurin or placebo in treatment-naive patients with FLT3 mutated AML [J]. *Ernhrungs Umschau*, 2011, 61 (11): M599-M604.
- [52] Kreidieh F, Abou Dalle I, Moukalled N, et al. Relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: an overview of prevention and treatment [J]. *Int J Hematol*, 2022, 116 (3): 330-340.
- [53] Griffin JD, Yang HB, Song Y, et al. Treatment patterns and healthcare resource utilization in patients with FLT3-mutated and wild-type acute myeloid leukemia: a medical chart study [J]. *Eur J Haematol*, 2019, 102 (4): 341-350.
- [54] He XF, Dou AX, Feng SR, et al. Cyclosporine enhances the sensitivity to lenalidomide in MDS/AML in vitro [J]. *Exp Hematol*, 2020, 86: 21-27. e2.
- [55] Craddock C, Slade D, De Santo C, et al. Combination lenalidomide and azacitidine: a novel salvage therapy in patients who relapse after allogeneic stem-cell transplantation for acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2019; 37 (7): 580-588.
- [56] Wang Q, Lei YM, Wang J, et al. Expert consensus on the relevance of intestinal microecology and hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Clin Transplant*, 2024, 38 (1): e15186.
- [57] 中国抗癌协会肿瘤与微生态专业委员会. 肠道微生态与造血干细胞移植相关性中国专家共识 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2021, 48 (3): 129-135.

(收稿日期: 2024-02-29; 修回日期: 2024-05-29)

中性粒细胞 / 淋巴细胞比值与免疫检查点抑制剂治疗淋巴瘤患者预后的相关性分析

侯莉娜^{1, 2}, 郭智^{1, 3}, 任骅^{1, 2}, 王强^{1*} (1. 武汉科技大学医学院, 武汉 430065; 2. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院, 广东 深圳 518116; 3. 华中科技大学协和深圳医院血液内科, 广东 深圳 518052)

摘要: **目的** 探讨中性粒细胞与淋巴细胞比值 (NLR) 对接受免疫检查点抑制剂 (ICIs) 治疗淋巴瘤患者预后的影响。**方法** 回顾性分析本中心 2018 年 1 月至 2022 年 6 月期间接受 ICIs 治疗的 100 例淋巴瘤患者的病例资料, 收集患者每一次治疗前中性粒细胞数、淋巴细胞数, 计算 NLR 值, 通过受试者工作特征曲线 (ROC) 得到 NLR 的最佳截断值 (Cut-off 值), 以此值将患者分为两组, 生存分析用 Kaplan-Meier 曲线和 Log-rank 检验, 危险因素用 Cox 比例风险回归模型, 分析 NLR 和各种临床特征与免疫抑制剂治疗疗效、无进展生存期 (PFS) 和总生存期 (OS) 之间的关系。**结果** 两组患者在疗效方面有差异 ($P = 0.041$)。低 NLR 组第 1、2、3 年累计无进展生存率分别为 70.4%、69.1%、64.8%, 明显高于高 NLR 组的 52.6%、15.8%、15.8% ($P = 0.001$); 低 NLR 组第 1、2、3 年累计生存率分别为 85.2%、81.5%、81.5%, 高于高 NLR 组的 78.9%、57.9%、57.9% ($P = 0.043$)。单因素分析显示年龄、首次使用免疫治疗年龄、治疗方式、治疗前 NLR 为 PFS 预后不良的危险因素 ($P < 0.05$); Cox 多因素分析发现治疗前 NLR 和治疗方式是 PFS ($P = 0.005$, $P = 0.004$) 的独立预后预测因素。**结论** 对于接受 ICIs 治疗的淋巴瘤患者, 治疗前较低的 NLR 可以获得较长的 PFS, 低 NLR 的患者更能从免疫抑制剂治疗中获益, 因此 NLR 是一个简单可行的预后评价指标。

关键词: 淋巴瘤; 免疫检查点抑制剂; 中性粒细胞与淋巴细胞比值; 预后

中图分类号: R733

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3272-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.022

Correlation between neutrophil-to-lymphocyte ratio and prognosis of patients with lymphoma treated with immune checkpoint inhibitors

HOU Li-na^{1, 2}, GUO Zhi^{1, 3}, REN Hua^{1, 2}, WANG Qiang^{1*} (1. College of Medical, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065; 2. National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital & Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Shenzhen Guangdong 518116; 3. Department of Hematology, Huazhong University of Science and Technology Union Shenzhen Hospital, Shenzhen Guangdong 518052)

Abstract: Objective To determine the impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) on the prognosis of patients with lymphoma treated with immune checkpoint inhibitors (ICIs). **Methods** We retrospectively analyzed 100 patients with lymphoma treated with ICIs from January 2018 to June 2022. The neutrophil and lymphocyte counts before each ICI treatment were collected, and the NLR was measured. The best cut-off value for NLR was obtained with a receiver operating curve. The patients were divided into two groups based on this cut-off value. Kaplan-Meier method and Log-rank test were used for survival analysis. Univariate and multivariate Cox regression models evaluated the relationship between NLR and various clinical features, as well as the efficacy of immunotherapy and progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). **Results** Significant differences in the curative effect were observed between the low and high NLR groups ($P = 0.041$). The PFS in the low NLR group was much better than that in the high NLR group (1-year PFS: 70.4% vs 52.6%; 2-year PFS: 69.1% vs 15.8%; 3-year

作者简介: 侯莉娜, 女, 副主任医师, 主要从事肿瘤综合治疗方面的研究, email: 413398046@qq.com *通信作者: 王强, 男, 教授, 主要从事肿瘤免疫和微生态方面研究, email: wangqiang@wust.edu.cn

PFS: 69.1% vs 15.8%; $P = 0.001$). Similarly, the OS in the low NLR group was much better than that in the high NLR group (1-year OS: 85.2% vs 78.9%; 2-year OS: 81.5% vs 57.9%; 3-year OS: 81.5% vs 57.9%; $P = 0.043$). Univariate analysis showed that age, age at first immunotherapy, treatment modality, and pretreatment NLR served as prognostic risk factors ($P < 0.05$). Cox multifactorial analysis found pretreatment NLR and treatment modality to be independent prognostic predictors of PFS ($P = 0.005$, $P = 0.004$). **Conclusion** Patients with low NLR receiving ICIs treatment have longer PFS and are more likely to benefit from immunosuppressive therapy. Therefore, NLR is a simple and feasible prognostic indicator for patients with lymphoma treated with ICIs.

Key words: lymphoma; immune checkpoint inhibitor; neutrophil to lymphocyte ratio; prognosis

淋巴瘤是临床上常见的一种肿瘤, 根据病理组织学特点分为霍奇金淋巴瘤 (Hodgkin's lymphoma, HL) 和非霍奇金淋巴瘤 (Non-Hodgkin's lymphoma, NHL) [1-3]。随着淋巴瘤治疗研究的深入, 淋巴瘤的治疗由原先的传统化疗逐渐转化为综合治疗模式 [4-6]。免疫治疗尤其是免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 是目前淋巴瘤治疗的一个新方向。程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1) 与肿瘤细胞上的程序性死亡蛋白配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 结合, 通过负反馈抑制 T 细胞免疫功能, 使肿瘤细胞发生免疫逃逸, 而 PD-1 检查点抑制剂能够激活 T 细胞免疫功能, 进而杀灭肿瘤细胞 [6-10]。

PD-1/PD-L1 逃避免疫应答的主要机制是肿瘤细胞与肿瘤微环境的相互作用、肿瘤细胞的 PD-L1 高表达 [11-12]。研究显示 PD-L1 在淋巴瘤中过表达的主要机制有染色体 9p24.1 的遗传改变 [13]、JAK/STAT 通路的激活 [14]。因此抗 PD-1/PD-L1 抑制剂可阻断 PD-1/PD-L1 信号通路, 增强肿瘤 T 细胞免疫功能的激活作用, 进而加强抗肿瘤作用 [15]。9p24.1 异常会增加 PD-1 配体的蛋白表达, 上调 Janus 激酶 (JAK) 2 表达, 激活 Janus 激酶-信号传导与转录激活因子 (JAK/STAT) 信号通路, 从而进一步增强 PD-1 配体的表达 [13]。研究发现霍奇金淋巴瘤经典型 (classical Hodgkin lymphoma, cHL)、原发睾丸弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 和原发中枢神经系统弥漫大 B 细胞淋巴瘤、原发纵隔大 B 细胞淋巴瘤 (primary mediastinal large B-cell lymphoma, PMBCL) 患者中均存在 9p24.1 染色体异常 [16-18]; 非生发中心型 DLBCL 约 30% 有 MYD88 突变, 从而激活 JAK/STAT 通路 [19], 导致 PD-L1 上调; JAK/STAT3 是 PD-L1 过表达的上游信号通路, 通过抑制和调控这些通路信号传导可发挥抗肿瘤作用 [20]。多个研究表明应用 ICIs 可以提高淋巴瘤治疗的总缓解率 (ORR) 和完全缓解率 (CR), 延长总生存期 (OS) 和无进展生存期 (PFS) [21-23]。

随着 ICIs 在肿瘤治疗中的广泛应用, 能预测接

受 ICIs 治疗生存获益的生物标志物也越来越受到关注。已被证明与 ICIs 疗效相关的生物标志物有肿瘤组织 PD-L1 的表达水平 [24-25]、肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMB) [26]、错配修复缺陷/微卫星高度不稳定 (deficient mismatch repair/microsatellite instability-high, DMMR/MSI-H) [27]、肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) [28-29]。但这些指标检测常需要精密的检测平台, 在临床中未广泛开展应用。炎症反应已被证实是在肿瘤发生、发展中起重要作用。有研究报道血常规中的中性粒细胞与淋巴细胞比值 (neutrophil to lymphocyte ratio, NLR) 与肺癌、肝癌等实体瘤接受 ICIs 治疗的预后有一定的相关性, 较高的 NLR 生存获益比低 NLR 的差 [30-37]。最近一项关于 NSCLC 患者接受 PD-1 治疗的研究结果显示, NLR 低表达组 ($NLR < 5.6$) 中位 PFS 为 8.51 个月, 而 NLR 高表达组 ($NLR \geq 5.6$) 中位 PFS 为 0.70 个月; NLR 低表达组中位 OS 为 20.30 个月, 而 NLR 高表达组中位 OS 为 1.21 个月 [38]。但 NLR 对淋巴瘤预后作用价值的研究相对较少。本研究旨在回顾性分析治疗前 NLR 对接受 PD-1 检查点抑制剂治疗淋巴瘤患者预后的影响。

1 资料与方法

1.1 入选标准

2018 年 1 月至 2022 年 6 月期间在中国医学科学院肿瘤医院深圳医院确诊为淋巴瘤, 并采用 PD-1 检查点抑制剂治疗的淋巴瘤患者的病例资料。本研究通过中国医学科学院肿瘤医院深圳医院伦理委员会审核批准 (JS2024-16-1)。病例纳入标准: ① 临床或病理确诊为淋巴瘤; ② 经影像学证实有可评价的客观病灶; ③ 给予 PD-1 检查点抑制剂为非一线治疗或之前治疗失败后使用至少一个周期; ④ 患者年龄 < 80 岁。排除标准: ① 严重的器官功能不全; ② 合并第二肿瘤; ③ 凝血功能障碍性疾病; ④ 合并活动性感染; ⑤ 既往治疗期间出现不可逆重度骨髓抑制; ⑥ 外院转入且已在外院进行 PD-1 检查点抑制剂治疗, 无法明确初次治疗前血常规结果。本研究对符合标准的 100 例患者进行分析。

1.2 临床资料

所有患者均接受 PD-1 检查点抑制剂, 直至疾病进展或因药品不良反应停止治疗, 具体剂量根据患者情况调整。PD-1 检查点抑制剂作为单药或联合化疗、靶向治疗使用。治疗前所有患者都要进行常规血液检测 (包括血常规、血液生化和血清肿瘤标志物水平) 以及 CT、MRI、超声等影像学检查, 以全面评估病情并获得基线信息。定期复查患者血液学指标, 包括血常规、血液生化等, 采用影像学检查评价患者的疗效, 详细记录治疗过程中出现的不良反应。

1.3 疗效评价

根据 2014 年 Lugano 修订版淋巴瘤疗效评价标准, 评价疗效可分为完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、疾病稳定 (SD) 和疾病进展 (PD)。PFS 和 OS 评价预后生存。PFS 为从患者接受 PD-1 治疗到疾病复发或进展的时间间隔, OS 为从患者接受 PD-1 治疗到任何原因引起的死亡或末次随访的时间间隔。客观缓解率 (ORR) % = (CR + PR) / 总人数 × 100%, 疾病控制率 (DCR) % = (CR + PR + SD) / 总人数 × 100%。随访截至 2023 年 6 月 30 日。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件和 R Statistical Software (version 4.2.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) 进行统计分析。对于服从正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 并采用 *t* 检验进行组间比较; 对于不服从正态分布的计量资料, 采用中位数 (四分位数) 描述, 并采用秩和检验进行组间比较; 计数资料采用例数 (百分比) 描述, 并采用卡方检验进行组间比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。生存曲线采用 Kaplan-Meier 法进行分析, 生存率比较用 Log-rank 检验。多因素分析采用 Cox 回归分析, P < 0.05 为差异有统计学意义, 剔除标准 $\alpha = 0.10$ 。

2 结果

2.1 患者基本情况

100 例淋巴瘤患者中, 男性 59 例 (59.0%), 女性 41 例 (41.0%); 平均年龄为 46.8 岁; NHL 78 例 (78.0%), 其中 DLBCL 51 例 (51%)、滤泡性淋巴瘤 (follicular lymphoma, FL) 9 例 (9%)、外周 T 细胞淋巴瘤 (peripheral T-cell lymphoma, PTCL) 13 例 (13%) 和其他类型淋巴瘤 5 例 (5%); HL 22 例 (22.0%), 都是 cHL。死亡 22 例 (22.0%), 其中男性死亡 13 例, 女性死亡 9 例; NHL 死亡 20 例, HL 死亡 2 例。6 例在接受治疗 3 个月时死亡。治疗方式为 PD-1 检查点抑制剂单药治疗和 PD-1 检查点抑制剂联合其他治疗方式 (包括化疗和靶向治疗)。PD-1 检查点抑制剂单药治疗 31 例, 联合治疗 69 例, 其中 54 例患者接受 PD-1 检查点抑制剂

联合化疗, 3 例患者接受 PD-1 检查点抑制剂联合化疗和靶向治疗, 12 例患者受 PD-1 检查点抑制剂联合靶向治疗。100 例淋巴瘤患者使用均为 PD-1 检查点抑制剂, 分别是纳武单抗治疗 3 例 (3.0%), 替雷利珠单抗治疗 13 例 (13.0%), 特瑞普利单抗 47 例 (47.0%), 信迪利单抗 37 例 (37.0%)。100 例患者中应用 PD-1 检查点抑制剂最短 1 个周期, 最长 17 个周期, 中位周期为 5 个。

2.2 ROC 曲线

利用受试者工作特征曲线 (receiver operating curve, ROC) 获取 NLR 的最佳截断值 (Cut-off 值), 用治疗前 NLR 作为预测因子, 对患者随访期内是否发生疾病进展进行预测。通过 ROC 曲线获得患者 PD-1 治疗前 NLR 的 Cut-off 值为 5.20, 敏感性和特异性分别为 43.2% 和 98.2%。ROC 曲线下的面积 (AUC) 为 0.727 (见图 1)。根据 NLR 最佳截断值 5.20 将所有患者分为高 NLR 组 (NLR > 5.20) 和低 NLR 组 (NLR ≤ 5.20)。

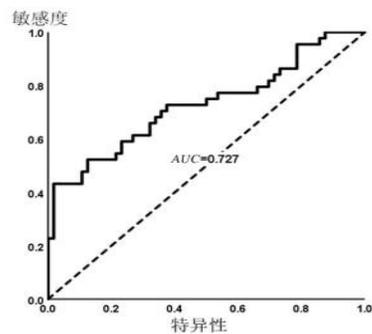


图 1 治疗前 NLR 的 ROC 曲线和曲线下面积

Fig 1 ROC and area under the curve of NLR before the treatment

2.3 NLR 与临床特征之间关系

低 NLR 组患者 81 例, DLBCL 44 例 (54.3%) 最多, cHL 15 例; 高 NLR 组患者 19 例, cHL 7 例 (36.8%)、DLBCL 7 例 (36.8%); 在性别、年龄、分期、体质量指数 (BMI)、既往首次治疗方式、肿瘤类型、IPI 评分、治疗方式、免疫治疗药物、免疫治疗周期数、免疫治疗时间方面差异均无统计学意义 (P > 0.05) (见表 1)。

2.4 疗效分析

100 例患者中, CR 34 例、PR 25 例、SD 27 例、PD 14 例; ORR 为 59.0%、DCR 为 86.0%。两组患者的疗效差异有统计学意义 (P = 0.041) (见表 2)。亚组分析 51 例 DLBCL 的低 NLR 组与高 NLR 组疗效, 结果差异有统计学意义 (P = 0.034) (见表 3)。22 例 cHL 患者低 NLR 组与高 NLR 组疗效差异无统计学意义 (P = 1.000) (见表 4)。

2.5 生存分析

低 NLR 组第 1、2、3 年累计无进展生存率分

表 1 淋巴瘤患者低 NLR 组与高 NLR 组的临床特征

Tab 1 Clinical features of both low NLR group and high NLR group of patients with lymphoma

变量	总数 (n = 100)	NLR ≤ 5.20 (n = 81)	NLR > 5.20 (n = 19)	P	χ ² /z
性别 /n (%)				0.354	0.861
男	59 (59.0)	46 (56.8)	13 (68.4)		
女	41 (41.0)	35 (43.2)	6 (31.6)		
年龄分类 /n (%)				0.965	0.002
≤ 60 岁	68 (68.0)	55 (67.9)	13 (68.4)		
> 60 岁	32 (32.0)		6 (31.6)		
BMI 分类 /n (%)				0.078	5.106
≤ 8.4 kg · m ⁻²	12 (12.0)		5 (26.3)		
18.5 ~ 23.9 kg · m ⁻²	48 (48.0)		9 (47.4)		
≥ 24 kg · m ⁻²	40 (40.0)		5 (26.3)		
第一次使用免疫治疗年龄 / 岁	49.9 ± 16.1		47.1 ± 19.6	0.056	3.747
分期 /n (%)				1.000	0.022
I、II	25 (25.0)		5 (26.3)		
III、IV	75 (75.0)		14 (73.7)		
既往首次治疗方式 /n (%)				0.722	0.127
化疗	87 (87.0)		17 (89.5)		
手术	13 (13.0)		2 (10.5)		
肿瘤类型 /n (%)				0.128	Fisher
HL					
cHL	22 (22.0)		7 (36.8)		
NHL					
DLBCL	51 (51.0)	44 (54.3)	7 (36.8)		
FL	9 (9.0)	9 (11.1)	0 (0.0)		
PTCL	13 (13.0)	9 (11.1)	4 (21.1)		
其他	5 (5.0)	4 (4.9)	1 (5.3)		
IPI 评分				0.281	Fisher
0 ~ 1	19 (19.0)	16 (19.8)	3 (15.8)		
2 ~ 3	64 (64.0)	49 (60.5)	15 (78.9)		
4 ~ 5	17 (17.0)	16 (19.8)	1 (5.3)		
治疗方式 /n (%)				0.173	1.859
单药治疗	31 (31.0)	28 (34.6)	3 (15.8)		
联合治疗	69 (69.0)	53 (65.4)	16 (84.2)		
免疫治疗药物 /n (%)				0.228	Fisher
纳武单抗	3 (3.0)	0 (3.7)	0 (0.0)		
特瑞普利单抗	47 (47.0)	40 (49.4)	7 (36.8)		
替雷利珠单抗	13 (13.0)	12 (14.8)	1 (5.3)		
信迪利单抗	37 (37.0)	26 (32.1)	11 (57.9)		
免疫治疗周期数	5 (3.25, 8)	5 (3.5, 8)	5 (3, 8)	0.995	0.993
免疫治疗时间 / 月	7 (4, 11)	7 (4, 11)	6 (3, 9)	0.422	0.802

表 2 淋巴瘤患者低 NLR 组与高 NLR 组的疗效差异 [n(%)]

Tab 2 Difference in efficacy between low NLR group and high NLR group of patients with lymphoma [n(%)]

变量	总人数 (n = 100)	低 NLR 组 (n = 81)	高 NLR 组 (n = 19)	P	z/χ ²
CR	34 (34.0)	32 (39.5)	2 (10.5)	0.041	7.827
PR	25 (25.0)	17 (21.0)	8 (42.1)		
SD	27 (27.0)	22 (27.2)	5 (26.3)		
PD	14 (14.0)	10 (12.3)	4 (21.1)		
ORR	59 (59.0)	49 (60.5)	10 (52.6)	0.607	0.999
DCR	86 (86.0)	71 (87.7)	15 (78.9)	0.460	Fisher

表 3 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者低 NLR 组与高 NLR 组的疗效 [n(%)]

Tab 3 Difference in efficacy between low NLR group and high NLR group of patients with diffuse large B-cell lymphoma [n(%)]

变量	总人数 (n = 51)	低 NLR 组 (n = 44)	高 NLR 组 (n = 7)	P	z/χ ²
CR	18 (35.3)	18 (40.9)	0 (0.0)	0.034	Fisher
PR	11 (21.6)	7 (15.9)	4 (57.1)		
SD	14 (27.5)	12 (27.3)	2 (28.6)		
PD	8 (15.7)	7 (15.9)	1 (14.3)		
ORR	29 (56.9)	25 (56.8)	4 (57.1)	1.000	Fisher
DCR	43 (84.3)	37 (84.1)	6 (85.7)	1.000	Fisher

别为 70.4%、69.1%、64.8%，明显高于高 NLR 组 (52.6%、15.8%、15.8%) ($P = 0.001$ ，见图 2A)。低 NLR 组第 1、2、3 年累计生存率分别为 85.2%、81.5%、81.5%，明显高于高 NLR 组 (78.9%、57.9%、

57.9%) ($P = 0.043$ ，见图 2B)。亚组分析 51 例 DLBCL 低 NLR 组第 1、2、3 年累计无进展生存率分别为 63.6%、63.6%、63.6%，明显高于高 NLR 组的 57.1%、14.3%、0.0% ($P = 0.026$ ，见图 3A)；低

表 4 霍奇金淋巴瘤经典型患者低 NLR 组与高 NLR 组的疗效差异 [n(%)]

Tab 4 Difference in efficacy between low NLR group and high NLR group in patients with classical Hodgkin lymphoma[n(%)]

变量	总人数 (n = 22)	低 NLR 组 (n = 15)	高 NLR 组 (n = 7)	P	z/χ^2
CR	5 (22.7)	3 (20.0)	2 (28.6)	1.000	Fisher
PR	11 (50.0)	7 (46.7)	4 (57.1)		
SD	5 (22.7)	4 (26.7)	1 (14.3)		
PD	1 (4.5)	1 (6.7)	0 (0.0)		
ORR	16 (72.7)	10 (66.7)	6 (85.7)	1.000	Fisher
DCR	16 (72.7)	10 (66.7)	6 (85.7)	1.000	Fisher

NLR 组第 1、2、3 年累计生存率与高 NLR 组差异无统计学意义 ($P = 0.918$, 见图 3B)。22 例 cHL 亚组分析低 NLR 组第 1、2、3 年累计无进展生存率分别为 86.7%、80.0%、80.0%，明显高于高 NLR 组的 71.4%、42.9%、28.6% ($P = 0.013$, 见图 4A)。低 NLR 组第 1、2、3 年累计生存率与高 NLR 组差异均无统计学意义 ($P = 0.599$, 见图 4B)。

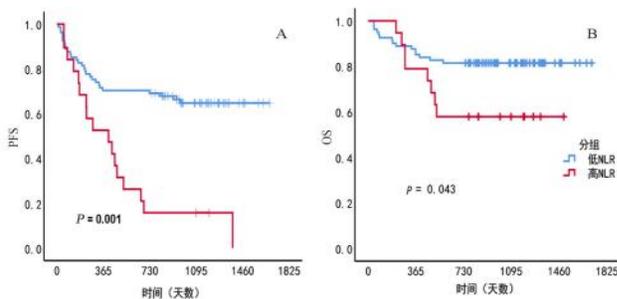


图 2 不同 NLR 组患者的 PFS 和 OS

Fig 2 PFS and OS in patients with different NLR groups

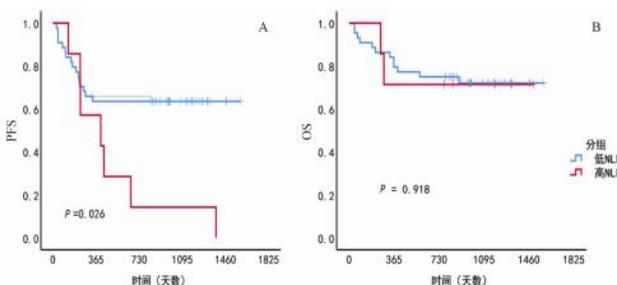


图 3 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的不同 NLR 组 PFS 和 OS 情况分析
Fig 3 PFS and OS in patients with diffuse large B-cell lymphoma with different NLR values

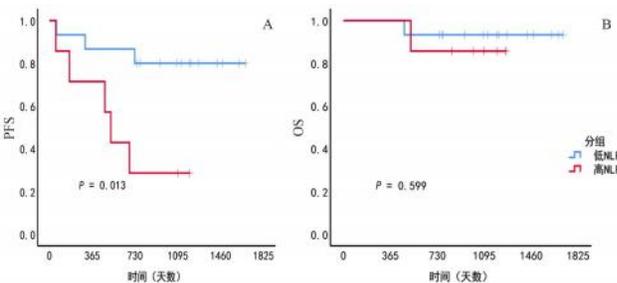


图 4 cHL 患者不同 NLR 组的 PFS 和 OS 情况分析

Fig 4 PFS and OS in patients with classical Hodgkin lymphoma different NLR values

2.6 单因素及多因素的预后分析

单因素分析显示, 年龄、首次使用免疫治疗年龄、治疗方式、治疗前 NLR 是 PFS 预后不良的危险因素 ($P < 0.05$) (见表 5)。将年龄、首次使用免疫治疗年龄、治疗方式、治疗前 NLR 引入 Cox 回归模型, 结果发现治疗前 NLR [$HR (95\%CI)$: 2.494 (1.312, 4.740), $P = 0.005$]、治疗方式 [$HR (95\%CI)$: 4.073 (1.571, 10.558), $P = 0.004$] 对 PFS 有显著影响 (见表 6)。

2.7 NLR 动态变化分析

2.7.1 NLR 动态变化对预后的预测分析 根据完成 4 周期 PD-1 治疗后的疗效分为进展组和非进展组, 观察患者 NLR 的变化, 进展组 NLR 变化中位数为 -0.96 (-2.98, 0.47), 未进展组 NLR 变化中位数 -0.04 (-1.52, 0.44), 两组 NLR 变化差异无统计学意义 ($z = 0.770$, $P = 0.441$) (见表 7)。

2.7.2 NLR 动态变化与 PFS 和 OS 的关系 对所有完成 4 个周期 PD-1 治疗的 52 例患者进行治疗前 NLR0 和治疗 4 周期后的 NLR4 的 PFS 和 OS 分析。低 NLR0-低 NLR4 患者第 1、2、3 年累计无进展生存率分别为 83.3%、80.8%、74.8%，明显高于高 NLR0-低 NLR4 患者的 50.0%、50.0%、50.0% 和高 NLR0-高 NLR4 患者的 50.0%、25.0%、0% ($P < 0.001$, 见图 5A)。低 NLR0-低 NLR4 患者第 1、2、3 年累计生存率分别为 95.2%、92.9%、92.9%，明显优于高 NLR0-低 NLR4 患者的 83.3%、66.7%、66.7% 和高 NLR0-高 NLR4 患者的 75.0%、50.0%、50.0% ($P = 0.012$, 见图 5B)。

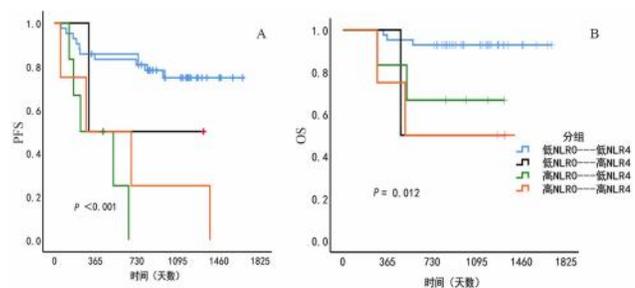


图 5 NLR 动态变化 PFS 和 OS 情况分析

Fig 5 PFS and OS in NLR dynamic change patients

3 讨论

ICIs 已被用于治疗包括淋巴瘤在内的各种恶性肿瘤^[13]。PD-1 与其配体 PD-L1 结合后, 向 T 细胞受体 (TCR) 通路转导抑制性信号, 从而抑制 TCR 介导的淋巴增生和活化, 进而下调免疫应答^[13]。阻断 PD-1/PD-L1 通路可使 T 细胞从肿瘤细胞的抑制作用中释放出来, 并恢复 T 细胞介导的抗肿瘤免疫应答^[13, 15]。近几年 PD-1 检查点抑制剂在淋巴

表 5 淋巴瘤患者预后危险因素的单因素分析

Tab 5 Univariate analysis of prognostic risk factors in patients with lymphoma

变量	PFS			变量	PFS		
	进展率 /%	P	χ^2		进展率 /%	P	χ^2
性别		0.879	0.023	肿瘤类型		0.477	0.507
男	42.4			NHL	44.9		
女	43.9			HL	36.4		
年龄		0.023	5.148	IPI 评分		0.337	2.178
≤ 60 岁	35.3			0 ~ 1	36.8		
> 60 岁	59.4			2 ~ 3	40.6		
BMI 分类		0.385	1.911	4 ~ 5	58.8		
≤ 18.4 kg · m ⁻²	33.3			治疗方式		< 0.001	13.235
18.5 ~ 23.9 kg · m ⁻²	50.0			单药治疗	16.1		
≥ 24 kg · m ⁻²	37.5			联合治疗	55.1		
首次使用免疫治疗年龄分类		0.012	6.349	免疫治疗药物		0.202	4.614
< 60 岁	33.8			纳武单抗	33.3		
≥ 60 岁	60.0			特瑞普利单抗	53.2		
分期		0.907	0.014	替雷利珠单抗	23.1		
I、II	44.0			信迪利单抗	37.8		
III、IV	42.7			治疗前 NLR		< 0.001	16.253
既往首次治疗方式		0.397	0.717	≤ 5.2	33.3		
化疗	41.4			> 5.2	84.2		
手术	53.8						

表 6 影响淋巴瘤患者 PFS 的多因素分析

Tab 6 Multivariate analysis of risk factors for PFS of patients with lymphoma

变量	B	SE	W	P	HR	95.0% Exp (B) 的 CI	
						下限	上限
治疗前 NLR (≤ 5.2 vs > 5.2)	0.914	0.328	7.776	0.005	2.494	1.312	4.740
治疗方式 (单药 vs 联合)	1.404	0.486	8.352	0.004	4.073	1.571	10.558
首次使用免疫治疗年龄	0.602	0.750	0.683	0.409	1.859	0.427	8.092
年龄 (≤ 60 岁 vs > 60 岁)	0.225	0.754	0.114	0.736	1.290	0.294	5.654

表 7 NLR 动态变化对预后的预测分析

Tab 7 Prognostic analysis of NLR dynamic changes

分组	中位数 (P25, P75)	中位数差值 (95%CI)	Wilcoxon 两样本秩和验	
			z	P
进展组	- 0.96 (- 2.98, 0.47)	0.479 (- 0.474 ~ 1.812)	0.770	0.441
未进展组	- 0.04 (- 1.52, 0.44)			

瘤治疗中的应用已观察到了一定的临床效果, 但如何选择有效预后指标进而快速精准筛选淋巴瘤免疫治疗最佳获益人群越来越受到关注。PD-L1 的表达、TMB、dMMR/MSI-H、TILsCD8⁺是目前 PD-1 检查点抑制剂常用的预测指标^[24-29], 但因检测平台未标准化、检测成本高等多种因素限制并没有广泛应用于临床。为了探索更加简便的预测指标, 很多学者开始关注炎症指标, 其中 NLR 已被多个研究证实与实体瘤预后有相关性, 高 NLR 患者的 PFS 和 OS 都明显低于低 NLR 患者^[35-38], 也就是 NLR 升高的患者更容易发生进展、预后较差。有研究报道 NLR 测量的外周中性粒细胞计数与肿瘤微环境的中性粒细胞数量直接相关^[39-40], 即当外周中性粒细胞增高时肿瘤微环境中的中性粒细胞也增高, 进而促进肿瘤细胞发生增殖和转移^[41-42]。淋巴细胞是重要的免疫细胞, 能够抑制肿瘤细胞增殖和转

移^[43]。因此无论是中性粒细胞增高还是淋巴细胞减少都会导致肿瘤进展, 这也就解释了 NLR 升高的肿瘤患者预后不良。

本研究中低 NLR 组第 1、2、3 年累计无进展生存率及累计生存率明显高于高 NLR 组, 但 ORR、DCR 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可能与该亚组样本量小有关。同时亚组分析显示, 51 例 DLBCL 亚组和 22 例 cHL 亚组的低 NLR 组与高 NLR 组的 PFS 有显著统计学意义 ($P = 0.026$, $P = 0.013$), 而亚组分组的 OS 差异均无统计学意义 ($P = 0.918$, $P = 0.599$)。

本研究单因素分析发现年龄、首次使用免疫药物年龄、治疗方式、治疗前 NLR 是 PFS 的影响因素, 而 IPI 评分、分期和 PD-1 检查点抑制剂治疗淋巴瘤预后未发现显著相关性, 这与传统淋巴瘤预后结果不一致, 可能与本研究样本量少有关。纳入

多因素分析发现治疗前 NLR 和治疗方式是 PFS 的独立预后预测因素 ($P = 0.005$, $P = 0.004$)。一项纳入 51 例 NSCLC 患者接受 PD-1 检查点抑制剂研究发现低 NLR 患者可以获得较长的 PFS 和 OS, 低 NLR 组中位 PFS 为 8.51 个月, 而高 NLR 组中位 PFS 为 0.70 个月; 低 NLR 组中位 OS 为 20.30 个月, 高 NLR 组中位 OS 为 1.21 个月^[38]。

同时本研究也关注了 BMI 对预后的影响, 发现 BMI 对预后没有显著相关性, 但由于本研究样本量少, 还需进一步扩大样本进行验证。

关于 NLR 动态变化与预后的关系研究比较少, 有研究报道 NLR 动态变化对胃癌辅助化疗疗效有很好预测价值 ($HR 5.309$, $95\%CI 2.585 - 10.901$; $P < 0.001$), NLR 的治疗相关变化比治疗前 NLR 更有预测价值, NLR 动态变化可能反映了治疗引起的免疫应答的动态反应^[44]。本研究也关注了治疗过程中 NLR 动态变化与预后的相关性, 研究发现治疗前低 NLR 和治疗后低 NLR (低 NLR0-低 NLR4) 水平的淋巴瘤患者疗效最好, PFS 更长, 而治疗前高 NLR 和治疗后低 NLR (高 NLR0-低 NLR4) 的患者疗效也明显优于治疗前高 NLR 和治疗后高 NLR (高 NLR0-高 NLR4) 的患者。因此治疗前后 NLR 的变化与 PD-1 检查点抑制剂治疗的 PFS 相关, 即治疗前后 NLR 值均低于截断值的淋巴瘤患者更有可能从 PD-1 检查点抑制剂治疗中获益, 而治疗过程中 NLR 升高可能提示预后不良。

总之, 治疗前 NLR 可能是 PD-1 检查点抑制剂治疗淋巴瘤患者的较好预后指标, 治疗期间 NLR 动态变化可能更好地预测经 PD-1 检查点抑制剂治疗的淋巴瘤患者的疗效。在 PD-1 检查点抑制剂治疗期间, NLR 值在临床中更容易测量获取, 且费用较低。本研究存在一定的局限性, 首先本研究为单中心、小样本回顾性研究, 可能存在选择性偏倚, 但本研究明确了 NLR 在淋巴瘤免疫治疗中的预测作用, 也提示了治疗期间 NLR 动态变化在淋巴瘤免疫治疗中可能有更好的预测价值。

综上所述, 对于接受免疫抑制剂治疗的淋巴瘤患者, 治疗前较低 NLR 可以获得较长的 PFS, 治疗前后 NLR 的变化与免疫抑制剂治疗的 PFS 相关。且 NLR 仅需检查血常规即可获得, 治疗前 NLR 动态变化作为淋巴瘤免疫抑制剂治疗的一个简单可行的预后指标, 具有进一步研究和探索价值。

参考文献

[1] Luminari S, Cesaretti M, Rashid I, et al. Incidence, clinical characteristics and survival of malignant lymphomas: a population-based study from a cancer registry in northern Italy [J]. Hematol Oncol, 2007, 25 (4): 189-197.

[2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.

[3] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134 (7): 783-791.

[4] 贤晓敏, 蓝晓凤, 刘玄勇, 等. R-CHOP 方案序贯自体造血干细胞移植在中高危弥漫大 B 淋巴瘤的应用: 单中心回顾性分析 [J]. 中南药学, 2022, 20 (7): 1503-1509.

[5] 中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会, 中国医师协会肿瘤医师分会, 中国医疗保健国际交流促进会肿瘤内科分会. 中国淋巴瘤治疗指南 (2021 年版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43 (7): 707-735.

[6] 国家癌症中心, 国家肿瘤质控中心淋巴瘤质控专家委员会. 中国淋巴瘤规范诊疗质量控制指标 (2022 版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2022, 44 (7): 628-633.

[7] Wei LY, Xie J, Wang YQ, et al. The efficacy of PD-1 inhibitors in the maintenance treatment of diffuse large B-cell lymphoma: a single-center retrospective analysis [J]. J Cancer Res Ther, 2022, 18 (2): 525-531.

[8] Mitteldorf C, Berisha A, Pfaltz MC, et al. Tumor microenvironment and checkpoint molecules in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma-new therapeutic targets [J]. Am J Surg Pathol, 2017, 41 (7): 998-1004.

[9] 刘玄勇, 郭智, 谢晶, 等. PD-1 检查点抑制剂在弥漫大 B 细胞淋巴瘤维持治疗中的作用: 单中心回顾性病例对照研究 [J]. 中国癌症防治杂志, 2021, 13 (4): 359-364.

[10] Gou Q, Dong C, Xu H, et al. PD-L1 degradation pathway and immunotherapy for cancer [J]. Cell Death Dis, 2020, 11 (11): 955.

[11] Kate S, Goodman A, Walavalkar V, et al. Hypermutators after immunotherapy: analysis of genomic alterations associated with accelerated growth rate [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23 (15): 4242-4250.

[12] Peng W, Chen JQ, Liu CW, et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy [J]. Cancer Discov, 2016, 6 (2): 202-216.

[13] Xie W, Medeiros LJ, Li S, et al. PD-1/PD-L1 pathway and its blockade in patients with classic Hodgkin lymphoma and nonHodgkin large-cell lymphomas [J]. Curr Hematol Malig Rep, 2020, 15 (4): 372-381.

[14] Vincent-Fabert C, Roland L, Zimmer-Strobl U, et al. Pre-clinical blocking of PD-L1 molecule, which expression is down regulated by NF- κ B, JAK1/JAK2 and BTK inhibitors, induces regression of activated B-cell lymphoma [J]. Cell Commun Signal, 2019, 17 (1): 89.

[15] House IG, Savas P, Lai J, et al. Macrophage-derived CXCL9 and CXCL10 are required for antitumor immune responses following immune checkpoint blockade [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26 (2): 487-504.

[16] Roemer MGM, Advani RH, Ligon AH, et al. PD-L1 and PD-L2 genetic alterations define classical Hodgkin lymphoma and predict outcome [J]. J Clin Oncol, 2016, 34 (23):

- 2690-2697.
- [17] Nayak L, Iwamoto FM, LaCasce A, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma [J]. *Blood*, 2017, 129 (23): 3071-3073.
- [18] Gravelle P, Burrone B, Péricart S, et al. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (27): 44960-44975
- [19] Sethi TK, Kovach AE, Grover NS, et al. Clinicopathologic correlates of MYD88L265P mutation and programmed cell death (PD-1) pathway in primary central nervous system lymphoma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60 (12): 2880-2889.
- [20] Wang L, Li LR, Young KH. New agents and regimens for diffuse large B cell lymphoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1): 175.
- [21] Moskowitz AJ, Shah G, Schöder H, et al. Phase II trial of pembrolizumab plus gemcitabine, vinorelbine, and liposomal doxorubicin as second-line therapy for relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39 (28): 3109-3117.
- [22] Voltin CA, Mettler J, van Heek L, et al. Early response to first-line anti-PD-1 treatment in Hodgkin lymphoma: a PET-based analysis from the prospective randomized phase II NIVAHL trial [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27 (2): 402-407.
- [23] Armand P, Rodig S, Melnichenko V, et al. Pembrolizumab in relapsed or refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37 (34): 3291-3299.
- [24] Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14 (4): 847-856.
- [25] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366 (26): 2443-2454.
- [26] Yarchoan M, Johnson BA, Lutz ER, et al. Targeting neoantigens to augment antitumor immunity [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17 (4): 209-222.
- [27] Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372 (26): 2509-2520.
- [28] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance [J]. *Nature*, 2014, 515 (7528): 568-571.
- [29] Daud AI, Leo K, Pauli ML, et al. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126 (9): 3447-3452.
- [30] Jiang T, Bai YC, Zhou F, et al. Clinical value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with non-small-cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors [J]. *Lung Cancer*, 2019, 130: 76-83.
- [31] Russo A, Russano M, Franchina T, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), and outcomes with nivolumab in pretreated non-small cell lung cancer (NSCLC): a large retrospective multicenter study [J]. *Adv Ther*, 2020, 37 (3): 1145-1155.
- [32] Zaragoza J, Kervarrec T, Touzé A, et al. A high neutrophil-to-lymphocyte ratio as a potential marker of mortality in patients with Merkel cell carcinoma: a retrospective study [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2016, 75 (4): 712-721.
- [33] Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small cell lung cancer patients treated with atezolizumab [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (9): 1441-1448.
- [34] Afzal MZ, Sarwar T, Shirai K. Prognostic significance of hematological indices in malignant melanoma treated with immune checkpoint inhibitors [J]. *J Immunother*, 2019, 42 (7): 251-264.
- [35] Diem S, Schmid S, Krapf M, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) as prognostic markers in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with nivolumab [J]. *Lung Cancer*, 2017, 111: 176-181.
- [36] Akce M, Liu Y, Zakka K, et al. Impact of Sarcopenia, BMI, and inflammatory biomarkers on survival in advanced hepatocellular carcinoma treated with anti-PD-1 antibody [J]. *Am J Clin Oncol*, 2021, 44 (2): 74-81.
- [37] Bagley S, Kothari S, Aggarwal C, et al. P3.02c-069 Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) predicts outcomes with nivolumab in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *J Thorac Oncol*, 2017 (12): S1318.
- [38] Sánchez-Gastaldo A, Muñoz-Fuentes MA, Molina-Pinelo S, et al. Correlation of peripheral blood biomarkers with clinical outcomes in NSCLC patients with high PD-L1 expression treated with pembrolizumab [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2021, 10 (6): 2509-2522.
- [39] Moses K, Brandau S. Human neutrophils: their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells [J]. *Semin Immunol*, 2016, 28 (2): 187-196.
- [40] Dumitru CA, Lang S, Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment mechanisms and consequences for tumor progression [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23 (3): 141-148.
- [41] Bambace NM, Holmes CE. The platelet contribution to cancer progression [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 9 (2): 237-249.
- [42] De Larco JE, Wuertz BR, Furcht LT. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8 [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (15): 4895-4900.
- [43] Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity [J]. *Nature*, 2001, 410 (6832): 1107-1111.
- [44] Mori M, Shuto K, Kosugi C, et al. An increase in the neutrophil to-lymphocyte ratio during adjuvant chemotherapy indicates a poor prognosis in patients with stage II or III gastric cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18 (1): 1261.

(收稿日期: 2024-02-29; 修回日期: 2024-09-10)

布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂治疗老年 / 体弱原发性中枢神经系统淋巴瘤患者的临床疗效和安全性分析

徐佳欢¹, 张倩², 冯佳², 孙丽华², 钟凤鸾², 张文丽², 许蕾², 徐海婵², 温娟娟², 覃宝珍², 蒋官忙², 李晋萌², 陈思亮², 吴泽华², 戴婧², 张红宇^{1, 2*} (1. 安徽医科大学北大深圳医院临床学院/安徽医科大学第五临床医学院, 合肥 230032; 2. 北京大学深圳医院血液内科, 广东 深圳 518000)

摘要: **目的** 探讨布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 抑制剂治疗老年 / 体弱原发性中枢神经系统淋巴瘤患者的临床疗效和安全性, 并随访生存情况。**方法** 回顾性收集 2018 年 3 月至 2023 年 3 月北京大学深圳医院收治的老年 / 体弱原发性中枢神经系统淋巴瘤患者 15 例, 收集患者的临床资料。所有患者接受基于 BTK 抑制剂的诱导或维持治疗, 观察其无进展生存期 (PFS)、总生存期 (OS) 和不良反应。**结果** 15 例患者中位维持治疗时间为 13 (IQR 7 ~ 16) 个月, 6 个月、12 个月的 PFS 率分别为 85.6%、66.7%, 中位 PFS 为 13 个月。中位 OS 在随访期内未达到。有 5 例原发性中枢神经系统淋巴瘤患者行 BTK 抑制剂联合治疗, 有 10 例原发性中枢神经系统淋巴瘤患者接受了 BTK 抑制剂单药治疗, 两组患者 PFS、OS 差异均无统计学意义。在本研究中, 观察到的不良反应有白细胞减少、血红蛋白减少、肺部感染、复杂性尿路感染等。**结论** BTK 抑制剂单药或联合治疗在老年 / 体弱原发性中枢神经系统淋巴瘤患者中具有良好的临床疗效, 且不良反应可耐受, 值得临床进一步推广应用。

关键词: 布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂; 原发性中枢神经系统淋巴瘤; 临床疗效; 安全性

中图分类号: R96, R739.4 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3280-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.023

Efficacy and safety of Bruton's tyrosine kinase inhibitors for the elderly or infirm patients with primary central nervous system lymphoma

XU Jia-huan¹, ZHANG Qian², FENG Jia², SUN Li-hua², ZHONG Feng-luan², ZHANG Wen-li², XU Lei², XU Hai-chan², WEN Juan-juan², QIN Bao-zhen², JIANG Guan-yi², LI Jin-meng², CHEN Si-liang², WU Ze-hua², DAI Jing², ZHANG Hong-yu^{1, 2*} (1. College of Clinical, Peking University Shenzhen Hospital/Fifth Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032; 2. Department of Hematology, Shenzhen Hospital of Peking University, Shenzhen Guangdong 518000)

Abstract: Objective To evaluate the clinical efficacy and safety of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors for elderly or infirm patients with primary central nervous system lymphoma (PCNSL), and to assess the post-treatment survival outcomes. **Methods** Data of 15 elderly and infirm PCNSL patients treated at Shenzhen Hospital of Peking University between March 2018 and March 2023 were retrospectively analyzed. The treatment regimen included induction or maintenance therapy with BTK inhibitors. The key endpoints included progression-free survival (PFS), overall survival (OS), and adverse events. **Results** The median duration of maintenance therapy was 13 months (interquartile range, 7 to 16 months). The PFS rates at 6 and 12 months were 85.6% and 66.7%, respectively, with a median PFS of 13 months. We failed to reach the median OS within the follow-up period. Among the cohort, five patients received combination therapy with BTK inhibitors, and the other ten patients received therapy with single BTK inhibitor, without obvious difference in the PFS and OS between

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (编号: 2021A151012185); 深圳市科创委基础研究专项 (编号: JCYJ20210324105802007)。

作者简介: 徐佳欢, 女, 在读硕士研究生, 主要从事原发中枢神经系统淋巴瘤相关临床研究, email: 2585900172@qq.com *通信作者: 张红宇, 男, 主任医师, 主要从事恶性血液病的基础及临床研究, email: zyiqu@163.com

the two groups. The observed adverse events included leukopenia, anemia, pulmonary infections, and complex urinary tract infections. **Conclusion** BTK inhibitor monotherapy and combination therapy demonstrate good clinical efficacy and manageable safety profiles in the elderly and infirm patients with PCNSL, which facilitates further clinical application of BTK inhibitors in the elderly.

Key words: Bruton's tyrosine kinase inhibitor; primary central nervous system lymphoma; clinical efficacy; safety

原发性中枢神经系统淋巴瘤 (PCNSL) 是一种较为罕见的结外非霍奇金淋巴瘤。随着年龄增长, 其发病率增长越快, 70 ~ 79 岁患者的发病率为 4.32/10 万^[1-2]。其病理类型 90% 为弥漫大 B 细胞淋巴瘤, 且以非生发中心型为主, 恶性程度高, 预后较差。治疗上, 目前认为一线治疗以大剂量甲氨蝶呤为基础的联合化疗为主, 继以大剂量化疗后的自体干细胞移植 (HDC/ASCT) 或全脑放疗 (WBRT) 作为巩固治疗^[3]。然而这些治疗往往更适用于基础疾病少、相对较年轻的患者。对于高龄、并发症多、器官功能不全的患者, 上述治疗往往受到限制。新的靶向治疗, 布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 抑制剂可降低 NF- κ B 信号通路的活性, 并在一系列 B 细胞肿瘤中发挥治疗作用^[4-5]。分子和基因表达谱研究表明, 大多数 PCNSL 是活化 B 细胞型的弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (ABC-DLBCL), 通常携带 *MYD88L265P* 和 *CD79B* 的突变^[3]。目前国外已有多项研究显示 BTK 抑制剂对 ABC-DLBCL 的患者, 特别是同时有 *MYD88L265P* 和 *CD79B* 突变的患者, 具有很强的抑制作用^[6-9], 然而国内相关报道较少。本研究旨在评价 BTK 抑制剂在老年/体弱的 PCNSL 患者中的临床疗效及安全性, 以期为进一步积累资料。

1 资料与方法

1.1 病例资料

回顾性分析 2018 年 3 月至 2023 年 3 月我院收治的 15 例经病理证实为 PCNSL 的老年/体弱患者的临床资料。纳入标准: ① 经组织病理学确诊为淋巴瘤且无其他系统累及; ② 年龄 ≥ 60 岁; ③ 年龄 < 60 岁且合并心、肾、脑、代谢等共患疾病, aCCI ≥ 3 分的患者。排除标准: ① 未使用 BTK 抑制剂治疗的 PCNSL 患者; ② 年龄 < 60 岁, aCCI < 3 分的患者; ③ 使用 BTK 抑制剂但确诊为继发性中枢神经系统淋巴瘤患者; ④ 临床资料不完整的患者。本研究已通过医院伦理委员会审批同意, 批件号: 北大深医伦审 (研) [2024] 第 (037) 号。所有患者均接受了含 BTK 抑制剂的诱导或维持治疗, 其中 14 例患者使用二代测序的方

法行淋巴瘤基因突变检测。观察患者使用 BTK 抑制剂后的无进展生存期 (PFS, 为从使用 BTK 抑制剂治疗至疾病进展或死亡或末次随访时间)、总生存期 (OS, 为从使用 BTK 抑制剂治疗到死亡或末次随访时间) 及安全性。

1.2 治疗

所有患者在经过诱导治疗后转入维持治疗。BTK 抑制剂包括伊布替尼、泽布替尼和奥布替尼, 化疗相关药物包括甲氨蝶呤、阿糖胞苷、替莫唑胺, 单抗类为利妥昔单抗, 免疫相关药物为来那度胺。伊布替尼的初始剂量均为 $420 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 泽布替尼的初始剂量均为 $320 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 奥布替尼的初始剂量均为 $150 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.3 评价方法

根据国际 PCNSL 协作组 (IPCG) 治疗反应评价共识标准进行疗效评价^[10], 分为完全缓解 (CR)、CR/未确认 (CRu)、部分缓解 (PR)、稳定 (SD)、进展 (PD)。维持治疗的有效性通过增强磁共振成像 (MRI) 进行评估。客观缓解率 (ORR, %) = $[(\text{CR} + \text{PR}) / \text{总人数}] \times 100\%$ 。以 ORR 作为评价近期疗效的主要指标。采用电话或门诊病历系统随访, 随访截至 2024 年 1 月。根据临床表现、体格检查、实验室检查和不良事件评估治疗方案的安全性。根据常见毒性分级标准 5.0 版 (CTCAE 5.0) 对不良事件进行分级^[11]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 使用 Graphpad Prism 10.0 软件作图。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数和四分位间距 (IQR) 表示, 计数资料以百分率 (%) 或构成比表示, 结果采用描述性方法进行分析。采用 Kaplan-Meier 法计算生存曲线, 采用 Log-rank 检验比较疗效差异, 采用 $\alpha = 0.05$ 作为显著水平参数, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料分析

所有纳入患者的基线资料见表 1, 年龄 < 60 岁的 6 例, 年龄 ≥ 60 岁的 9 例, 平均年龄 (61.1 ± 10) 岁; 男性 8 例, 女性 7 例; 15 例患者中有 14 例患

者病理类型为弥漫大 B 细胞淋巴瘤，其中 GCB 型 5 例，non-GCB 型 9 例；1 例为相对罕见的原发眼内淋巴瘤，其病理类型为侵袭性 B 细胞淋巴瘤伴浆样分化。ECOG 评分 < 2 分者 5 例，ECOG 评分 ≥ 2 分者 10 例；IELSG 评分 < 2 分者 4 例，IELSG 评分 ≥ 2 分者 11 例；15 例患者中 14 例行淋巴瘤基因突变检测，其中检测到 *MYD88L265P* 突变 10 例，*CD79B* 突变 8 例，*MYD88L265P* 和 *CD79B* 共突变者 7 例，未检测到上述基因突变者 2 例。

表 1 所有纳入患者的基线特征
Tab 1 Baseline characteristics of all patients

患者特征	n/%
年龄 / 岁	
< 60	6 (40.0)
≥ 60	9 (60.0)
性别	
男	8 (53.3)
女	7 (46.7)
病理类型	
GCB	5 (35.7)
non-GCB	9 (64.3)
ECOG 评分 / 分	
< 2	5 (33.3)
≥ 2	10 (66.7)
IELSG 评分 / 分	
< 2	4 (26.7)
≥ 2	11 (73.3)
基因突变	
<i>MYD88L265P</i>	10 (71.4)
<i>CD79B</i>	8 (57.1)
<i>CD79B</i> 和 <i>MYD88L265P</i>	7 (50.0)
无	2 (14.3)

2.2 疗效分析

15 例患者的诱导及维持治疗信息见表 2，15 例患者使用 BTK 抑制剂治疗后的疗效及后续随访信息见图 1。15 例患者中位随访时间为 16 (IQR 13 ~ 27) 个月，中位维持治疗时间为 13 (IQR 7 ~ 16) 个月，6 个月、12 个月的 PFS 率分别为 85.6%、66.7%，中位 PFS 为 13 个月。中位 OS 在随访期内未达到。治疗 3 ~ 6 个月均可评价，其中 CR/CRu 者 7 例 (46.7%)，PR 者 2 例 (13.3%)，SD 者 1 例 (6.7%)，PD 者 5 例 (33.3%)，患者总 ORR 为 60%。所有患者使用 BTK 抑制剂治疗的生存曲线见图 2。

15 例使用 BTK 抑制剂的患者中，可分为 BTK 抑制剂联合治疗组、BTK 抑制剂单药组，两组患者的 PFS 及 OS 生存曲线对比见图 3，在诱导治疗后有 5 例 PCNSL 患者使用 BTK 抑制剂联合免疫治疗，在治疗 7 (IQR 4 ~ 22.5) 个月后，中位

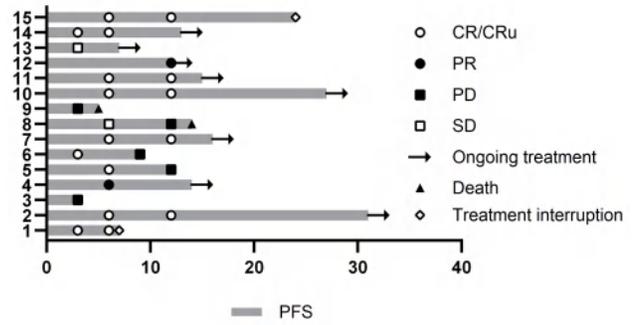


图 1 15 例患者使用 BTK 抑制剂治疗后缓解持续时间及疗效评价的泳道图

Fig 1 Swimmer plot of the duration of remission and efficacy assessment in 15 patients treated with BTK inhibitor

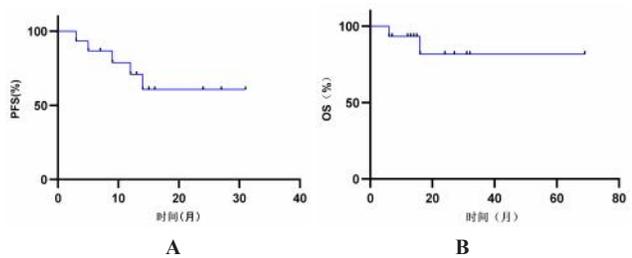


图 2 15 例使用 BTK 抑制剂治疗 PCNSL 患者的 PFS (A) 及 OS (B) 生存曲线

Fig 2 PFS (A) and OS (B) survival curves of 15 patients with PCNSL treated with BTK inhibitors

PFS 为 7 个月。有 10 例 PCNSL 患者接受了 BTK 抑制剂单药治疗，在治疗 13.5 (IQR 11.3 ~ 18) 个月后，中位 PFS 为 13.5 个月，两组患者 PFS、OS 差异均无统计学意义。

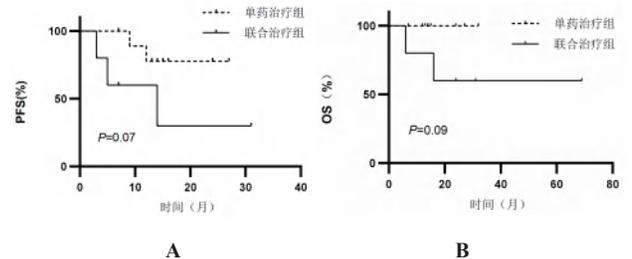


图 3 BTK 抑制剂单药组及联合治疗组患者的 PFS (A) 及 OS (B) 生存曲线

Fig 3 PFS (A) and OS (B) survival curves for patients treated with combination therapy of BTK inhibitors or single BTK inhibitor

15 例使用 BTK 抑制剂的患者中，可分为 *MYD88L265P*、*CD79B* 单一突变组及 *MYD88L265P*、*CD79B* 双突变组，两组患者的 PFS 及 OS 生存曲线对比见图 4。在本组患者中有 4 例患者检测出 *MYD88L265P*、*CD79B* 单一突变，有 7 例患者检测出 *MYD88L265P*、*CD79B* 双突变。两组患者 PFS、OS 差异均无统计学意义。

2.3 不良反应

表 2 患者诱导及巩固治疗相关信息

Tab 2 Information of induction and consolidation therapy for all patients

病例	诱导 / 复发后再诱导治疗方案	疗效评价	维持治疗	PFS/月	疗效评价
1	R-MA 方案 5 程 + MTR 方案 4 程	CRu	L + O	7	CRu
2	R-MA 方案 5 程	CR	L + O	31	CR
3	R-M 方案 2 程	PD	L + I	3	PD
4	MTR 方案 6 程	PR	O	14	PR
5	MTR 方案 4 程	CRu	O	12	PD
6	MTR 方案 6 程	PR	O	9	PD
7	R-MOT 方案 5 程	PR	O	16	CR
8	R-M 方案 5 程序贯 R2 方案	PD	ZR2	14	PD
9	IR2 方案 6 程	PD	—	5	PD
10	R-MAT 方案 6 程	CRu	O	27	CRu
11	MTR 方案 2 程 + R-MOT 方案 4 程	CR	O	15	CR
12	MTR 方案 6 程	PR	Z	12	PR
13	ZR + HDMTX 方案 + MTX 眼内注射 4 程	SD	Z	7	SD
14	MTR 方案 7 程	CRu	O	13	CRu
15	R-MA 方案 6 程	CRu	O	24	CRu

注 (Note): R-MA 方案. 利妥昔单抗 + 大剂量甲氨蝶呤 + 阿糖胞苷; MTR 方案. 大剂量甲氨蝶呤 + 替莫唑胺 + 利妥昔单抗; R-M 方案. 利妥昔单抗 + 大剂量甲氨蝶呤; R-MOT 方案. 利妥昔单抗 + 大剂量甲氨蝶呤 + 替莫唑胺 + 奥布替尼; R2 方案. 利妥昔单抗 + 来那度胺; IR2 方案. 伊布替尼 + 利妥昔单抗 + 来那度胺; R-MAT 方案. 利妥昔单抗 + 大剂量甲氨蝶呤 + 阿糖胞苷 + 替莫唑胺; L + O. 来那度胺 + 奥布替尼; L + I. 伊布替尼 + 来那度胺; O. 奥布替尼; Z. 泽布替尼; ZR2. 泽布替尼 + 利妥昔单抗 + 来那度胺; ZR + HDMTX. 泽布替尼 + 利妥昔单抗 + 大剂量甲氨蝶呤 (R-MA regimen. rituximab + high-dose methotrexate + cytarabine; MTR regimen. high-dose methotrexate + temozzolomide + rituximab; R-M regimen. rituximab + high-dose methotrexate; R-MOT regimen. rituximab + high-dose methotrexate + temozzolomide + orelabrutinib; R2 regimen. rituximab + lenalidomide; IR2 regimen. ibrutinib + rituximab + lenalidomide; R-MAT regimen. rituximab + high-dose methotrexate + cytarabine + temozzolomide; L + O. lenalidomide + orelabrutinib; O. orelabrutinib; Z. zanubrutinib; ZR2. zanubrutinib + rituximab + lenalidomide; ZR + HDMTX. zanubrutinib + rituximab + high-dose methotrexate).

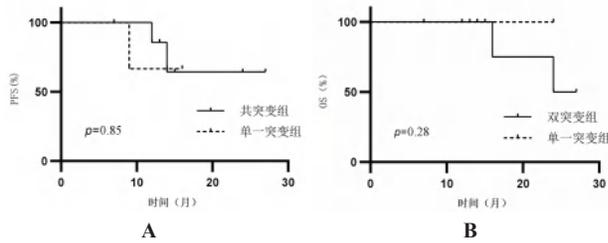


图 4 MYD88L265P、CD79B 单一突变组与 MYD88L265P、CD79B 双突变组的 PFS (A) 及 OS (B) 生存曲线

Fig 4 PFS (A) and OS (B) survival curves for MYD88L265P and CD79B single mutation group versus MYD88L265P and CD79B double mutation group

在本研究中, 较常见的不良反应有白细胞减少、血红蛋白减少、血小板减少、肺部感染、泌尿系感染等。所有用药患者均参加随访, 皆可耐受相关不良反应, 经对症治疗后可恢复, 暂无患者因出现严重不良反应而减量或停药, 截至随访时间, 共 2 名患者因疾病进展而死亡, 无治疗相关性死亡案例。所有患者的不良反应见表 3。

3 讨论

3.1 一般资料分析

PCNSL 是一种相对罕见的颅内肿瘤, 好发于中老年人, 大多数在 60 岁左右发病, 男性发病率高于女性。病理类型多为弥漫大 B 细胞淋巴瘤, 占

表 3 不良反应分析 [n(%)]

Tab 3 Adverse reactions [n(%)]

不良反应	1 ~ 2 级	3 ~ 4 级
血液学不良反应		
血红蛋白减少	3 (20.0)	0 (0.0)
白细胞减少	19 (6.7)	1 (6.7)
血小板减少	2 (13.3)	(0.0)
非血液学不良反应		
肺部感染	1 (6.7)	1 (6.7)
泌尿系感染	1 (6.7)	1 (6.7)
低蛋白血症	3 (20.0)	(0.0)

70% ~ 90%, 且以 non-GCB 亚型多见^[2-3, 12]。本研究 15 例患者中, 患者平均年龄 61 岁, 男女比例为 1.14 : 1, 14 例患者原发部位为脑, 病理类型均为弥漫大 B 细胞淋巴瘤, 其中 non-GCB 亚型占 64.3%, GCB 亚型占 35.7%。研究表明, 在 PCNSL 中, BCR 和 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 通路发生频繁突变。BTK 连接 BCR 和 TLR 通路, 激活下游的 NF- κ B 通路, 导致细胞周期失调, 从而发生不受控制的细胞增殖。该通路主要受 MYD88L265P 和 CD79B 的频繁复发突变的影响^[13-16]。高通量基因测序提示在 67% ~ 72% 的 PCNSL 患者中检出 MYD88L265P 的突变, 61% 的患者检出 CD79B 的突变^[17-18]。我中心针对 14 名 PCNSL 患者行淋巴瘤基因突变检测, 结果表明, 71.4% 的患者存在

MYD88L265P 突变, 54.1% 的患者存在 CD79B 突变, 50% 的患者存在 MYD88L265P 和 CD79B 的共突变, 这与既往文献报道基本相符^[15, 17-18]。这提示 BCR 和 TLR 通路的频繁突变可能是 PCNSL 发生的重要驱动因素。

3.2 临床疗效分析

BTK 抑制剂可靶向抑制 BCR 及 TLR 通路, 阻断下游 NF- κ B 通路的活化, 从而抑制 B 细胞淋巴瘤的生长并促进其凋亡^[4], 因此 BTK 抑制剂可能是治疗 PCNSL 患者, 特别是携带 MYD88L265P 和 / 或 CD79B 突变患者的有希望的药物。一项前瞻性、多中心的 II 期临床试验招募了 52 名复发 / 难治的 PCNSL 患者, 所有患者均接受了伊布替尼的治疗, 结果显示 44 例患者可评价为缓解, 在接受伊布替尼单药治疗 2 个月, 中位随访时间为 25.7 个月, mPFS 和 mOS 分别为 4.8 个月和 19.2 个月^[19]。同样在常规治疗剂量下, 相较于伊布替尼, 新一代 BTK 抑制剂泽布替尼及奥布替尼在复发 / 难治的 PCNSL 患者中显示出更加良好的脑脊液分布。Wu 等^[20] 在一项针对 23 例中枢神经系统淋巴瘤 (CNSL) 的回顾性研究中发现, 在新诊断的 CNSL 患者中使用奥布替尼, 患者的 ORR 可达 100%, 6 个月 PFS 率和 OS 率均为 100%; 在 15 例复发 / 难治的 CNSL 患者中 ORR 为 60%, 6 个月 PFS 率和 OS 率分别为 67.7% 和 70%。Zhang 等^[21] 在一项回顾性病例系列研究中发现, 第二代 BTK 抑制剂泽布替尼对于 PCNSL 及复发 / 难治系统性弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 均有良好的效果, 总有效率达 84.5%。马珊珊等^[22] 回顾性评价了 11 例 PCNSL 患者使用奥布替尼治疗的临床疗效, 结果显示在中位维持治疗 5 (IQR 2.3 ~ 8.5) 个月, 患者的 6 个月、12 个月 PFS 率分别为 63.6%、50.9%。我中心 15 例使用 BTK 抑制剂的 PCNSL 患者大部分使用新一代 BTK 抑制剂, 患者中位维持治疗时间为 13 (IQR 7 ~ 16) 个月, 6 个月、12 个月的 PFS 率分别为 85.6%、66.7%, 患者 ORR 为 60%。各研究间出现差异的原因可能与各中心纳入的样本数量、患者使用 BTK 抑制剂维持治疗的时间及患者启用 BTK 抑制剂时的疾病状态等差异有关, 且我中心 15 例患者均为 PCNSL, 尚未纳入继发中枢神经系统淋巴瘤, 而既往研究表明, 与继发中枢神经系统淋巴瘤相比, PCNSL 对于 BTK 抑制剂的治疗反应性更高^[23-24]。

联合治疗可通过单抗靶向杀伤肿瘤细胞、靶向治疗阻断增殖途径、免疫治疗调节肿瘤微环境等多方面消除肿瘤细胞。一项回顾性病例分析

报道了来那度胺联合奥布替尼对复发 / 难治 PCNSL 的近期疗效评价, 结果表明该联合方案显示出了良好的抗肿瘤活性, ORR 为 86.7%, DCR 为 93.3%, 并且在复发 / 难治的 PCNSL 患者中具有可接受的毒性^[25]。在我中心 15 例 PCNSL 患者中, 有 5 例患者接受了基于 BTK 抑制剂的联合治疗, 包括利妥昔单抗、来那度胺。为了探讨 BTK 抑制剂单药和联合治疗对于患者的 PFS、OS 是否有差异, 本研究将 15 例患者分为 BTK 抑制剂单药组及联合治疗组, 分别对两组患者的 PFS、OS 进行比较, 结果提示两组间差异均无统计学意义。本研究为单中心、非随机的回顾性临床研究, 受两组患者的基线特征、样本量及个体对于药物的反应性等的影 响, 该结果目前还存在诸多局限性。BTK 抑制剂单药组及联合治疗组对于 PCNSL 的 ORR、DCR 是否存在差异, 联合治疗相较于单药治疗是否可以进一步延长患者的 PFS、OS, 以及联合用药的安全性等问题, 未来还需要更多前瞻性的队列研究进一步探索。既往少量文献报道 MYD88L265P 突变常与较好的预后相关^[26], 但也有文献报道 MYD88L265P 突变与较差的预后相关^[27-28], 本研究对本中心检测到 MYD88L265P、CD79B 单一突变或共突变患者的 PFS、OS 进行比较, 结果提示两组间差异无统计学意义。由于样本量较少, 组间病例数不均, 该研究结果尚存在一定的局限性。

3.3 不良反应

本研究中 3 ~ 4 级不良反应共观察到 3 例, 包括泌尿系感染、肺部感染和白细胞减少。患者经过积极的临床治疗, 症状可好转。尚未观察到一代 BTK 抑制剂常存在的脱靶效应, 如房颤、腹泻、出血等不良反应。本研究中大部分患者使用的我国首创的新型 BTK 抑制剂奥布替尼, 该药较其他 BTK 抑制剂, 有更小的空间夹角、更少的铰链区 H 键结合位点, 因此具有更好的激酶选择性, 极少出现脱靶效应^[29]。目前的临床研究中也显示其发生不良反应的概率更低。

综上所述, BTK 抑制剂对于 PCNSL 的治疗反应好, 用药不良反应少, 可耐受, 值得临床进一步推广应用。未来期待更多针对中国 PCNSL 患者的真实世界研究, 通过设计良好的前瞻性随机对照试验, 检查靶向治疗的疗效, 对本研究结果进一步确认。此外 BTK 抑制剂的耐药性仍是目前亟待解决的问题, 期待更多基础实验及临床试验对 BTK 抑制剂的耐药机制进行深入探索, 为老年 / 体弱的 PCNSL 患者提供更多的治疗选择。

参考文献

- [1] Batchelor TT. Primary central nervous system lymphoma: a curable disease [J]. *Hematol Oncol*, 2019, 37 (S1): 15-18.
- [2] Ferreri A, Calimeri T, Cwynarski K, et al. Primary central nervous system lymphoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9 (1): 29.
- [3] Schaff LR, Grommes C. Primary central nervous system lymphoma [J]. *Blood*, 2022, 140 (9): 971-979.
- [4] Wen TY, Wang JS, Shi YH, et al. Inhibitors targeting Bruton's tyrosine kinase in cancers: drug development advances [J]. *Leukemia*, 2021, 35 (2): 312-332.
- [5] Nakhoda S, Vistarop A, Wang YL. Resistance to Bruton tyrosine kinase inhibition in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2023, 200 (2): 137-149.
- [6] Lewis KL, Chin CK, Manos K, et al. Ibrutinib for central nervous system lymphoma: the Australasian Lymphoma Alliance/MD Anderson Cancer Center experience [J]. *Br J Haematol*, 2021, 192 (6): 1049-1053.
- [7] Lionakis MS, Dunleavy K, Roschewski M, et al. Inhibition of B cell receptor signaling by ibrutinib in primary CNS lymphoma [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31 (6): 833-843.
- [8] Grommes C, Pastore A, Palaskas N, et al. Ibrutinib unmasks critical role of Bruton tyrosine kinase in primary CNS lymphoma [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7 (9): 1018-1029.
- [9] Narita Y, Nagane M, Mishima K, et al. Phase I/II study of tirabrutinib, a second-generation Bruton's tyrosine kinase inhibitor, in relapsed/refractory primary central nervous system lymphoma [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23 (1): 122-133.
- [10] Abrey LE, Batchelor TT, Ferreri AJ, et al. Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (22): 5034-5043.
- [11] Freites-Martinez A, Santana N, Arias-Santiago S, et al. Using the common terminology criteria for adverse events (CTCAE-Version 5.0) to evaluate the severity of adverse events of anticancer therapies [J]. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*, 2021, 112 (1): 90-92.
- [12] 李丽, 谢建兰, 张燕林, 等. 原发性中枢神经系统淋巴瘤 167 例临床特征及病理类型构成分析 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34 (11): 1189-1193.
- [13] Zhang Y, Zhou DB. Primary central nervous system lymphoma: status and advances in diagnosis, molecular pathogenesis, and treatment [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133 (12): 1462-1469.
- [14] Ou A, Sumrall A, Phuphanich S, et al. Primary CNS lymphoma commonly expresses immune response biomarkers [J]. *Neurooncol Adv*, 2020, doi: 10.1093/NOAJNL/VDAA018.
- [15] Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, et al. Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2016, 42 (3): 279-290.
- [16] Zhu Q, Wang JC, Zhang WF, et al. Whole-genome/exome sequencing uncovers mutations and copy number variations in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 878618.
- [17] Braggio E, Van Wier S, Ojha J, et al. Genome-wide analysis uncovers novel recurrent alterations in primary central nervous system lymphomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (17): 3986-3994.
- [18] Nayyar N, White MD, Gill CM, et al. MYD88 L265P mutation and CDKN2A loss are early mutational events in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Blood Adv*, 2019, 3 (3): 375-383.
- [19] Soussain C, Choquet S, Blonski M, et al. Ibrutinib monotherapy for relapse or refractory primary CNS lymphoma and primary vitreoretinal lymphoma: final analysis of the phase II 'proof-of-concept' iLOC study by the Lymphoma study association (LYSA) and the French oculo-cerebral lymphoma (LOC) network [J]. *Eur J Cancer*, 2019, 117: 121-130.
- [20] Wu JJ, Wang WH, Dong M, et al. Orelabrutinib-Bruton tyrosine kinase inhibitor-based regimens in the treatment of central nervous system lymphoma: a retrospective study [J]. *Invest New Drugs*, 2022, 40 (3): 650-659.
- [21] Zhang Y, Li YN, Zhuang Z, et al. Preliminary evaluation of zanubrutinib-containing regimens in DLBCL and the cerebrospinal fluid distribution of zanubrutinib: a 13-case series [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 760405.
- [22] 马珊珊, 张旭东, 汪文华, 等. 奥布替尼维持治疗对老年或体弱中枢神经系统淋巴瘤患者的疗效和安全性分析 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31 (7): 1315-1320.
- [23] 汪文华, 马珊珊, 张旭东, 等. BTK 抑制剂在中枢神经系统淋巴瘤中的治疗作用及安全性分析 [J]. *中国肿瘤临床*, 2023, 50 (5): 237-243.
- [24] Grommes C, Wolfe J, Gavrilovic I, et al. Phase II of single-agent ibrutinib in recurrent/refractory primary (PCNSL) and secondary CNS lymphoma (SCNSL) [J]. *Blood*, 2018, 132 (Supplement 1): 2965.
- [25] Yang CW, Cui Y, Ren XH, et al. Orelabrutinib combined with lenalidomide and immunochemotherapy for relapsed/refractory primary central nervous system lymphoma: a retrospective analysis of case series [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 901797.
- [26] Curran OE, Poon MTC, Gilroy L, et al. MYD88 L265P mutation in primary central nervous system lymphoma is associated with better survival: a single-center experience [J]. *Neurooncol Adv*, 2021, doi: 10.1093/NOAJNL/VDAB090.
- [27] Takano S, Hattori K, Ishikawa E, et al. MyD88 mutation in elderly predicts poor prognosis in primary central nervous system lymphoma: multi-institutional analysis [J]. *World Neurosurg*, 2018, 112: e69-e73.
- [28] Zhou YY, Liu W, Xu ZJ, et al. Analysis of genomic alteration in primary central nervous system lymphoma and the expression of some related genes [J]. *Neoplasia*, 2018, 20 (10): 1059-1069.
- [29] Dhillon S. Orelabrutinib: first approval [J]. *Drugs*, 2021, 81 (4): 503-507.

(收稿日期: 2024-02-29; 修回日期: 2024-06-29)

综述

沉默信息调节因子 3 介导的线粒体功能在心肌损伤中的作用及中药干预研究进展

梁雨娟¹, 成翠翠¹, 李星², 吕明^{1*}, 朱彦^{1*} (1.天津中医药大学, 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617; 2. 贵州百灵企业集团制药股份有限公司, 贵阳 550000)

摘要: 沉默信息调节因子 3 (SIRT3) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 依赖性脱乙酰化酶, 其定位于线粒体中, 被激活后能够通过脱乙酰化下游线粒体蛋白, 调节线粒体氧化还原平衡、能量代谢、线粒体自噬、线粒体动力学等生物学过程。心肌细胞中富含大量的线粒体, SIRT3 在线粒体功能障碍引起的心肌损伤的预防和治疗中具有重要作用。越来越多的研究报道, 中药及其活性成分能够激活 SIRT3 及其下游通路。本文将总结归纳 SIRT3 介导的线粒体功能在心肌梗死、心力衰竭、心肌肥大、糖尿病及高血压等诱导的心肌损伤中的作用, 并综述相关中药及活性成分干预的研究进展, 以期为靶向 SIRT3 在中医药临床治疗心血管疾病应用提供参考。

关键词: 沉默信息调节因子 3; 线粒体; 心肌损伤; 中药

中图分类号: R714, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3286-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.024

Research progress on the role of mitochondrial function mediated by silent information regulator 3 in myocardial injury and traditional Chinese medicine intervention

LIANG Yu-juan¹, CHENG Cui-cui¹, LI Xing², LYU Ming^{1*}, ZHU Yan^{1*} (1. *National Key Laboratory for the Creation of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617*; 2. *Guizhou Bailing Group Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550000*)

Abstract: Silent information regulator 3 (SIRT3) is a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) dependent deacetylase located in the mitochondria. After the activation, its downstream mitochondrial proteins can be deacetylated to regulate mitochondrial redox balance, energy metabolism, mitochondrial autophagy, mitochondrial dynamics, and other mitochondrial biological processes. The mitochondria have lots of myocardial cells. SIRT3 has great potential in the prevention and treatment of myocardial injury caused by mitochondrial dysfunction. More and more research reported that traditional Chinese medicine (TCM) and related active ingredients can activate the expression of SIRT3 and downstream pathway. This article summarized the role of SIRT3-mediated mitochondrial function in myocardial infarction, heart failure, myocardial hypertrophy and myocardial injury induced by diabetes and hypertension, as well as the research progress in TCM and related active ingredients that regulate SIRT3 expression, to provide reference for the clinical application of TCM targeting SIRT3 for cardiovascular diseases.

Key words: silent information regulator 3; mitochondrial; myocardial injury; traditional Chinese medicine

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82104431, No.81873037); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2023] 一般 100); 京津冀基础研究合作专项 (No.23JCZXJC00380); 天津市教委科研计划项目 (No.2022KJ148); 组分中药国家重点实验室青苗基金 (No.CBCM2023205)。

作者简介: 梁雨娟, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: lyj953766656@163.com *通信作者: 吕明, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药药理学研究, email: minglyu@tjutc.edu.cn; 朱彦, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药理学与毒理学研究, email: yanzhu.harvard@icloud.com

心血管疾病 (CVD) 仍然是全球最常见的死亡原因, 根据全球心血管风险联盟数据显示, 在 2010 年至 2020 年的十年中, 全球心血管疾病死亡率显著增加, 其中全因死亡率归因比例女性占 22%, 男性占 19.1%^[1]。尽管, 近年来缺血性心脏病治疗的改善和生存率的提高, 能够延长心力衰竭患者的生命, 心力衰竭的患病率仍然在不断增加^[2]。此外, 由糖尿病、高血压以及其他因素导致的心血管危险事件也应受到关注^[3]。SIRT3 在富含线粒体的组织中广泛表达, 具有强脱乙酰活性, 能够通过脱乙酰化线粒体蛋白, 调节线粒体内的氧化还原、能量代谢, 以及线粒体动力学平衡等线粒体生物学过程^[4]。心肌细胞中富含线粒体, 可为心脏的收缩舒张提供能量^[5]。因此, 心肌损伤导致心功能障碍时, 线粒体也会随之出现功能紊乱, 调节受损心肌的线粒体功能障碍是治疗心血管疾病的重要机制。中药治疗具有多成分、多靶点、多途径的特点, 可以实现整体的平衡和全面的改善。目前, 中药已越来越多地应用于心血管疾病的预防和治疗。值得注意的是, 多种中药及其成分可以通过调节线粒体功能和相关信号通路来保护心肌细胞, 治疗心血管疾病^[6]。本文以 SIRT3 为核心, 对其通过调节线粒体功能在心肌梗死、心肌肥大、心力衰竭、糖尿病心肌病、高血压及其他因素诱发的心肌损伤中的作用及机制进行梳理。通过以“SIRT3”“Cardiac”或“Heart”“Chinese medicine”或“Natural product”为关键词检索近十年有关中药或天然产物调控 SIRT3 治疗心肌损伤的研究, 讨论其潜在的临床治疗意义, 以期为目标 SIRT3 干预心血管疾病在中医临床的应用提供参考。

1 SIRT3 的结构和功能

SIRT3 是 NAD 依赖性蛋白质脱乙酰酶家族 Sirtuins 中的一员。SIRT3 因其具有高度保守的酶核心区域, 以 NAD 依赖性方式发挥脱乙酰功能。其核心区域包含一个 Rossmann 折叠组成的大结构域和一个由螺旋束与锌结合基序组成的小结构域, 其中大结构域是 NAD 特异性结合位点。SIRT3 的底物结合位点位于两个结构域之间。SIRT3 具有较强的脱乙酰功能, 乙酰化修饰参与线粒体功能调节的各个方面, 包括三羧酸循环 (TCA)、脂质代谢、抗氧化和线粒体稳态^[7]。因此乙酰化修饰对线粒体的命运至关重要。研究报道, 线粒体中 SIRT3 可以直接与线粒体中至少 84 种蛋白相互作用, 参与线粒体生物学的多个方面, 如维持线粒体代谢稳定性, 包括 TCA、脂肪酸氧化、氧化磷酸化; 线粒体动力学稳定, 包括线粒体自噬、线

粒体融合和分裂、线粒体生物合成等维持线粒体稳态以保护线粒体免受损伤。SIRT3 在线粒体功能调节中发挥着至关重要的作用^[4-5]。线粒体是提供细胞代谢所需能量的主要细胞器, SIRT3 也能在调节三磷酸腺苷 (ATP) 的产生中发挥作用, 调节线粒体能量代谢和氧化还原平衡^[8]。

2 SIRT3 调控线粒体功能在心肌损伤中的作用机制

心脏是一个强大的肌肉泵, 线粒体在心肌细胞中含量丰富, 线粒体氧化磷酸化产生 ATP 为心脏的收缩和舒张供能^[9], 占 90% 以上的能量供应。线粒体功能障碍直接影响心肌细胞的收缩和舒张功能, 导致一系列心血管疾病^[10], 包括心肌梗死、心力衰竭、心肌肥大等。SIRT3 主要参与维持线粒体稳态、线粒体能量代谢, 在心肌损伤中起着不可替代的作用。本文将对 SIRT3 在心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭、心肌肥大、糖尿病心肌病和其他因素诱发的心肌损伤中的作用机制进行总结, 以阐明 SIRT3 在心肌损伤中的重要作用, 机制简图如图 1 所示。

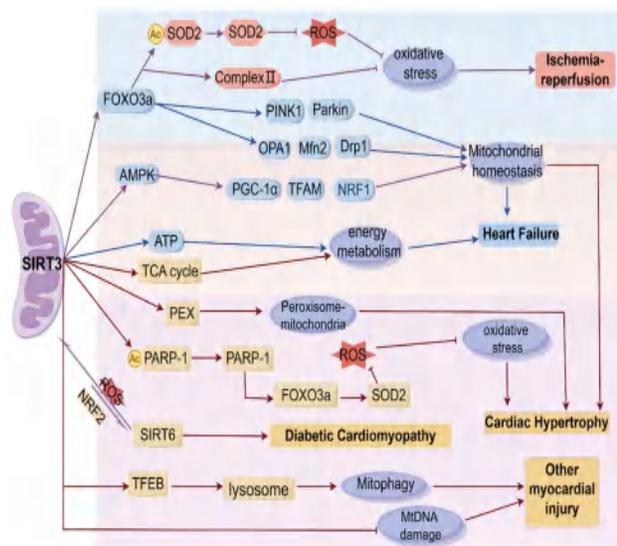


图 1 SIRT3 调控线粒体功能在心肌损伤中的作用机制简图 (基于 Figdraw^[4-5] 绘制)

Fig 1 Mechanism of SIRT3 regulating mitochondrial function in myocardial injury (Adapted from Figdraw^[4-5])

2.1 心肌缺血再灌注 (I/R) 损伤

心肌缺血可能是由于动脉粥样硬化斑块破裂和血栓形成引起的, 也可能是心肌供氧失衡导致的^[11], 及时有效地再灌注治疗恢复血流是临床上应对急性心肌缺血的治疗方法。然而, 尽管及时再灌注能够恢复心肌供血, 但突然的血氧输送会导致活性氧 (ROS) 的积累, 造成细胞损伤。线粒体被认为是 ROS 的主要来源, I/R 应激期间 ROS 生成异常, 导致氧化还原稳态紊乱触发一系列信号通路, 诱导线粒体功能障碍, 导致心脏不

可逆损伤, 而 SIRT3 可以通过调节底物代谢和炎症维持氧化还原稳态, 从而发挥心肌保护作用^[12]。

研究显示, *sirt3* 的缺失会加重心肌缺血诱导的心功能障碍和细胞死亡, 而过表达 *sirt3* 可以减轻心肌缺血导致的心功能障碍, 维持心脏功能^[13-14]。在 *sirt3* 缺失的小鼠心脏中, 线粒体膜通透性增加, 线粒体肿胀严重, 同时电子传递链 (ETC) 复合物 II 活性降低, 线粒体质量增加, 线粒体中 ROS 的产生增加, 超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 活性降低, 导致线粒体蛋白的氧化损伤增加^[15], 而 SIRT3 的上调可降低 SOD2 的乙酰化, 减少氧化应激和细胞凋亡, 从而改善心肌 I/R 损伤^[16-17]。同时, SOD2 的去乙酰化显著抑制 I/R 诱导的自噬, 并保留了自噬通量^[18]。而 SOD2 过度乙酰化导致 SOD2 活性的降低则会引起线粒体裂变和融合失衡^[19]。另外, 上调 SIRT3 蛋白的表达, 激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK), 降低过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α (PGC-1 α) 的乙酰化能够抑制线粒体氧化应激和细胞凋亡, 从而对 I/R 心脏发挥心肌保护作用^[20]。SIRT3 定位于线粒体中, 在调节线粒体功能中发挥关键作用, 除抗氧化应激外, 缺氧复氧 (H/R) 损伤引发 H9c2 心肌细胞中线粒体自噬过度增强, 而 SIRT3/叉头框蛋白 O3a (FOXO3a) 信号通路的激活, 能够抑制线粒体自噬的过度增强, 改善线粒体功能障碍, 保护心肌细胞^[21]。也有研究报道, SIRT3 可被外泌体如 miR-503 激活, 通过 PGC-1 β /核呼吸因子 1 (NRF-1) 和 SIRT3/丙酮酸脱氢酶 (PDH)/ATP 合酶信号通路触发线粒体功能障碍和心肌细胞死亡^[22]。综上, 在 I/R 中, SIRT3 主要通过调节线粒体蛋白的乙酰化程度, 降低氧化应激水平和线粒体自噬来改善线粒体功能, 进而改善心肌缺血损伤。

2.2 心力衰竭

心力衰竭是一种复杂的临床综合征, 是由多种病因导致的心脏损伤代偿失败的终末结果。心脏主要依赖线粒体中的氧化代谢来提供能量, 长期以来, 无法有效产生和传递能量一直被认为是连接线粒体功能障碍和心力衰竭的主要机制^[23]。在慢性心力衰竭和病理性心肌肥大患者血浆中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氢 (NADPH) 含量降低, 而外源性的 NADPH 可以增加 SIRT3 的表达, 从而改善能量代谢, 改善线粒体功能, 促进 ATP 的产生, 进而在病理性心肌肥大和心力衰竭中显示出积极的正性肌力作用, 该研究体现出 SIRT3 蛋白在病理性心肌肥大和心力衰竭中的重要作用^[24]。Zhang 等^[25]发现在主动脉弓缩窄 (TAC)

诱导的心力衰竭心肌中 SIRT3 的表达降低, 导致心肌能量代谢关键酶 PDH 复合物和 ATP 合酶乙酰化增加, 酶活性降低, 进而引起线粒体代谢功能障碍。

在心力衰竭心脏中, 线粒体稳态的破坏也是心肌受损的主要原因之一。心肌梗死后心力衰竭小鼠的线粒体自噬水平下降, 并出现了不平衡的线粒体融合-裂变动力学。增加 SIRT3 在线粒体中的积累, 能够激活 FOXO3a 的细胞核转导, 激活线粒体自噬, 促进 PTEN 诱导性激酶蛋白 1 (PINK1)/帕金森病蛋白 (Parkin) 的表达, 并通过调节线粒体融合和分裂蛋白促进线粒体动力学平衡, 改善缺血诱发的心力衰竭^[26]。抑制 SIRT3 的表达与线粒体融合和裂变有着直接的相互作用, 促进 SIRT3 的表达, 能够促进 TAC 诱导的心力衰竭心脏中线粒体融合视神经萎缩蛋白 1 (OPA1) 表达升高, 促进线粒体融合机制, 缓解压力超负荷引起的心力衰竭^[27]。SIRT3 在射血分数保留型心力衰竭 (HFpEF) 中也发挥着重要作用, 其特征是左心室肥厚和舒张功能障碍而左心室射血分数保持不变。研究报道, HFpEF 心肌中线粒体功能存在障碍, 特异性敲除 *sirt3* 的小鼠表现出明显的舒张功能障碍, 表明心肌细胞 SIRT3 在 HFpEF 发病机制中具有保护作用^[28]。此外, SIRT3 的上调, 能够促进 PGC-1 α 的信号传导, 进而上调线粒体转录因子 A (TFAM) 和 NRF1 的表达, 促进线粒体生物合成, 改善异丙肾上腺素诱导的心力衰竭^[29]。因此, 无论是在心肌梗死诱导的心力衰竭、TAC 诱导的压力负荷型心力衰竭还是 HFpEF 中, SIRT3 调控的线粒体代谢功能和线粒体动力学都发挥着重要作用。

2.3 心肌肥大

心肌肥大是心脏对负荷增加的反应, 若未得到适当干预, 最终可能发展为严重的收缩功能障碍和失代偿性心力衰竭。持续的心脏超负荷必然导致高能量消耗, 破坏了线粒体能量供应和心脏能量需求的平衡。越来越多的研究表明, 线粒体功能障碍与病理性心肌肥大相关。线粒体能量代谢和线粒体蛋白质组成的显著变化等都可能加速心肌肥大的发生和进展^[30]。

研究表明, SIRT3 通过调控过氧化物酶体生物发生因子 5 的表达来缓解肥厚型心肌细胞的过氧化物酶体异常, 调节过氧化物酶体-线粒体的相互作用, 从而改善线粒体功能, 维持线粒体稳态, 抑制心肌肥大^[31]。SIRT3 是 miR-214 的直接靶标, miR-214 的过表达能够降低 SIRT3 的表达, 在血管紧张素 II (Ang II) 诱导的小鼠心肌肥大

中 *sirt3* 的缺乏加剧了小鼠心肌肥大, 而敲低 miR-214 能够通过激活 SIRT3-FOXO3a 信号传导, 上调线粒体融合蛋白 2 (Mfn2), 平衡线粒体稳态, 改善线粒体功能, 改善心肌肥大^[32]。在 TAC 诱导的心肌肥大小鼠心肌组织中, SIRT3 能够通过促进 OPA1、PGC-1 α 的表达, 抑制线粒体动力相关蛋白 1 (Drp1) 的表达, 改善线粒体稳态^[33]。有研究表明, *sirt3* 过表达能够改善肥大心肌细胞的线粒体能量代谢功能障碍^[34]。SIRT3 可以与聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 (PARP-1) 相互作用, 过表达 *sirt3* 能够降低 PARP-1 的乙酰化水平和活性^[35], 增加 FOXO3a 和 SOD2 的表达, 降低过度的线粒体 ROS 的产生^[36], 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞的氧化应激^[37], 缓解心肌肥大。SIRT3 被报道在阿霉素 (Dox) 诱导的心肌肥大中也发挥着关键作用, 研究结果表明 SIRT3 可抑制线粒体功能和心肌细胞死亡关键因子 Bcl-2/腺病毒 E1B 19kD 蛋白相互作用蛋白 3 的表达, 使心脏免受 Dox 诱导的心肌肥大和线粒体功能障碍的影响^[38]。

2.4 糖尿病心肌病 (DCM)

DCM 是由糖尿病引起的心功能受损, 可发展为心力衰竭, 代谢紊乱是其基本病理特征^[39]。研究表明, 靶向 PARP1-NAD-SIRT3 轴为干预 DCM 的机制策略。在 DCM 小鼠心脏组织中, 过表达 ADP-核糖基水解酶 1 (Macrod1) 显著抑制 PARP1 的表达, 减少 NAD 消耗, 从而激活 SIRT3 的表达, 发挥抗氧化应激的作用^[40]。Jin 等^[41]研究了成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 在 DCM 改善作用中的机制。结果表明, FGF21 可以通过诱导 AMPK/FOXO3/SIRT3 信号轴改善线粒体功能和氧化应激。SIRT3 与 SIRT6 的相互作用, 能够保护心脏免受肥胖诱导的 DCM 的影响。SIRT3 通过减少氧化应激来维持 SIRT6 水平, 而 SIRT6 通过上调核因子红系 2 相关因子 2 (Nrf2) 依赖性 *Sirt3* 基因转录来维持 SIRT3 蛋白水平。SIRT6 和 SIRT3 可以维持彼此的活性并保护心脏免受 DCM 的侵害^[42]。DACH1 的内含子长链非编码 RNA (LncDACH1) 已被证明与心力衰竭和心脏再生密切相关。Zhang 等^[43]发现 LncDACH1 能够直接与 SIRT3 结合通过泛素化促进 SIRT3 的降解, 促进小鼠心脏中线粒体氧化损伤和细胞凋亡, 心肌纤维化和心肌肥大, 加重 DCM。线粒体自噬降解受损的线粒体并维持健康的线粒体, 对于糖尿病应激下心肌细胞的存活至关重要。哺乳动物 Ste20 样激酶 1 是 Hippo 信号通路的关键组成部分, 通过抑制 SIRT3-Parkin 线粒体自噬信号在 DCM 的进展中起关键作用^[44]。*sirt3* 的缺失

会导致 FOXO3a-Parkin 信号传导介导的线粒体自噬下调, 从而加剧糖尿病引起的心功能障碍^[45]。此外, *sirt3* 的敲除还可能激活 NOD 样受体蛋白 3 炎症小体, 促进坏死性凋亡, 并最终加剧了链脲佐菌素诱导的 DCM^[46]。

2.5 其他心肌损伤

Dox 是一种对白血病、淋巴瘤和其他肿瘤有效的蒽环类药物, 但会对心脏产生毒性并引起一系列心肌病, 如心肌肥大、扩张型心肌病等。研究发现 SIRT3 的激活与 Dox 诱导的心肌病 (DICM) 改善有关。SIRT3 激活修复线粒体 DNA 损伤, 保护心脏免受 Dox 诱导的心肌肥大^[47]。DICM 心脏中 SIRT3 下调, 其下游转录因子 EB (TFEB) 也下调, 溶酶体功能减弱, 导致线粒体自噬通量下降, 破坏线粒体功能。激活 SIRT3/TFEB 信号通路, 可恢复自噬通量, 保护心脏免受 Dox 损伤^[48]。同时 SIRT3 的下调也增加了心肌细胞中参与氧化应激的线粒体蛋白质乙酰化, 促进氧化应激的发生, 增加线粒体 ROS 产生, 导致线粒体功能障碍。而 *sirt3* 过表达能够调节细胞氧化应激, 保护心脏功能^[49-50]。据报道, miRNA 参与 Dox 诱导的 DICM 进展, miR-34a-5p 已被确定为 DICM 的早期诊断标志; SIRT3 是 miR-34a-5p 的直接靶点, miR-34a-5p 能够通过调节 SIRT3 改善线粒体自噬和线粒体融合分裂来缓解心肌细胞焦亡, 进而改善 Dox 诱导的扩张型心肌病^[51]。

高血压是心肌梗死和心力衰竭的主要危险因素, 线粒体功能障碍可导致高血压, SIRT3 在调节与高血压相关的代谢和抗氧化功能方面至关重要。高血压患者 SIRT3 的缺乏会促进内皮功能障碍、血管肥大和血管炎症^[52], 影响血管生成而加速高血压导致的心脏重构^[53]。研究表明, *sirt3* 过表达可以恢复淋巴管生成, 减轻心脏损伤。Zhang 等^[54]发现 SIRT3 可能通过影响血管内皮生长因子受体 3 和 ERK 通路, 促进淋巴管生成, 改善 Ang II 诱导的高血压心脏损伤。

脓毒性休克引起的急性心损伤是危重症患者常见的心血管并发症。SIRT3 在脓毒症引起的心肌损伤中也发挥着关键作用。已有研究报道, 脓毒症可诱导 SIRT3 表达降低, 而 *sirt3* 的缺失导致线粒体 TCA 中的关键酶过度乙酰化, 导致心脏能量代谢障碍^[55]。过表达 *sirt3* 能够激活 AMPK 介导的线粒体生物发生信号通路, 维持线粒体氧化还原稳态, 维持线粒体呼吸, 抑制细胞凋亡, 减少脓毒症诱导的心肌损伤^[56]。

综上, SIRT3 在心肌损伤中扮演着重要角色, 在各种因素诱导的心肌损伤中, SIRT3 通过调节

不同的信号通路,维持线粒体功能,改善心肌损伤导致的心功能障碍。因此,靶向 SIRT3 调控线粒体功能可能成为干预心肌损伤导致的心脏疾病的一个重要的治疗策略。

3 中药干预 SIRT3 调节线粒体功能发挥心肌保护作用

中药对于心肌梗死、心力衰竭等心血管疾病治疗效果显著,可有效控制心血管危险因素且具有良好的安全性。在病理机制上,中药因其多成

分-多靶点的优势,可通过多组分配伍发挥疗效。由于心血管疾病复杂的致病机制和西医疗效的减弱,现代医学联合中医治疗心血管疾病的模式已在中国被确立为主要方法,甚至部分以中医为主^[57]。从中药的角度,基于 SIRT3 对心肌损伤的改善作用,一些中药单体化合物已被报道可以作为 SIRT3 的激活剂,用于心肌病的治疗,而中药复方或中药制剂也能够通过调控 SIRT3 的表达来改善线粒体功能改善受损心肌。汇总情况见表 1。

表 1 中药调控 SIRT3 介导的线粒体功能在心肌损伤中的作用
Tab 1 Role of TCM in modulating SIRT3-mediated mitochondrial function in myocardial injury

中药	靶点 / 信号通路	功能	疾病	参考文献
总丹酚酸注射液	SIRT1/SIRT3	氧化应激	I/R	[59]
淫羊藿次苷	Nrf2/SIRT3	线粒体动力学	I/R	[61]
白藜芦醇	SIRT3/TFAM	线粒体质量控制	I/R、DCM	[63, 81]
枸杞多糖	SIRT3	氧化应激	I/R	[64]
土贝母苷甲	SIRT3	氧化应激	I/R	[65]
苓桂术甘汤	SIRT3、Mfn2、PGC-1 α 、PPAR- γ 、p-Drp-1	线粒体动力学和氧化应激	HF	[66]
附子联合生姜	PPAR- α 、PGC-1 α 、SIRT3	能量代谢	HF	[70]
大豆苷元	SIRT3/FOXO3a	能量代谢	HF	[68]
大黄素	SIRT3/PGC-1 α	氧化应激	心肌肥大	[74]
大蒜	SIRT3/MnSOD	线粒体生物合成	DCM	[77]
和厚朴酚	SIRT3/MnSOD/MFN1/OPA1、DRP1	氧化应激 / 能量代谢	DCM	[75-76, 78]
淫羊藿苷	Apelin/SIRT3/PGC-1 α 、Mfn2 和 Cyt-b	线粒体动力学	DCM	[79]
红景天苷	SIRT3/AMPK/PGC-1 α /TFAM	线粒体生物合成	DCM	[80-81]

3.1 靶向 SIRT3 中药在防治 I/R 损伤中的作用

总丹酚酸注射液 (TSI) 是丹参活性成分的制剂。丹酚酸属于丹参中水溶性成分的一种,主要作用于血管和心肌,具有保护心肌、抗氧化等功效^[58]。在 I/R 心脏中,TSI 减轻了 I/R 诱导的心肌损伤,这与氧化应激的抑制有关。TSI 可以上调 SIRT1/SIRT3,增加呼吸链复合酶 I (Complex I)、复合酶 II 的亚基 NADH 氧化还原酶辅酶 10 和琥珀酸脱氢酶的表达,揭示了 TSI 能够作为一种抗氧化剂用于 ETC,缓解 I/R 引起的心肌损伤^[59]。药理学研究表明,淫羊藿具有抗氧化、抗炎等药理作用,临床上被广泛用于治疗心血管疾病。在心肌梗死、心力衰竭、动脉粥样硬化等心血管疾病中具有广泛的应用前景^[60]。淫羊藿次苷 II (ICS II) 是淫羊藿中的活性成分之一,研究报道,ICS II 可以通过激活 Nrf2/SIRT3 信号通路促进线粒体融合,抑制线粒体裂变和氧化应激来平衡线粒体动力学,减轻心肌梗死造成的心肌损伤^[61]。白藜芦醇是一种多酚,具有广泛的药理作用,如抗氧化、抗炎,具有心脏和神经保护作用,还能够抗糖尿病、抗肿瘤等。SIRT3 是白藜芦醇的上游信号分子之一^[62]。研究报道显示,白藜芦醇增加 H/R 损伤的心肌细胞中 SIRT3 的表达,改善线粒体融合-裂变平衡、线粒体自噬通量和线

粒体生物合成,在线粒体质量控制中有着重要作用^[63]。此外,枸杞多糖可减轻 H/R 造成的心肌细胞损伤,并上调 SIRT3 的表达,同时给予 SIRT3 抑制剂能够阻断枸杞多糖对 H9c2 心肌细胞的保护作用^[64]。心脏 I/R 导致 SIRT3 表达和活性显著降低,给予土贝母苷甲后能够上调 SIRT3 的表达和活性,减弱氧化应激,改善心肌 I/R 损伤^[65]。

3.2 靶向 SIRT3 中药在防治心力衰竭中的作用

苓桂术甘汤已用于缺血性心血管疾病的临床治疗,能够显著改善心功能,防止心肌梗死后的心室重塑。苓桂术甘汤处理心肌梗死大鼠和氧糖剥夺 (OGD) 损伤的 H9c2 心肌细胞后,能够逆转缺血缺氧诱导的 SIRT3、Mfn2、PGC-1 α 、过氧化物酶体增殖物激活受体 - γ (PPAR- γ) 表达,降低 p-Drp-1 表达,改善线粒体动力学紊乱和氧化应激。而给予 SIRT3 抑制剂后,阻断了苓桂术甘汤的保护作用,表明苓桂术甘汤对心肌损伤的保护作用是通过激活 SIRT3,保护线粒体功能,改善心肌梗死后的心室重塑发挥的^[66]。附子与生姜的联用是治疗心血管疾病的经典配伍,两者联用能够增强心肌收缩力、降低心肌耗氧量、扩张血管等,从而发挥抗心力衰竭的作用。Wen 等^[67]证明了附子联合生姜能够通过上调 PPAR- α 、PGC-1 α 和 SIRT3 的蛋白和基因表达,促进线粒体能量代

谢, 显著改善 Dox 诱导的心力衰竭导致的左心室功能障碍。四氢姜黄素 (THC) 是姜黄素的主要活性代谢产物, 近年来其调节氧化应激和线粒体功能的能力引起广泛关注^[68]。研究报道, THC 可抑制心肌梗死 (MI) 小鼠中 Nrf2 的核积累的减少和 SIRT3 信号传导, 减少 ROS 的产生, 保护线粒体功能, 从而减轻 MI 后心肌的氧化应激, 从而改善心力衰竭^[69]。大豆苷元 (DAI) 是一种存在于多种植物中的异黄酮, 广泛用于治疗更年期综合征、前列腺癌、乳腺癌、心脏病、心血管疾病和骨质疏松症, 具有抗氧化和抗炎特性。研究发现, DAI 对心力衰竭也有改善作用, 能够显著改善 Dox 诱导的心功能下降, 降低左室射血分数、心脏炎症、氧化应激、细胞凋亡和纤维化。机制上, DAI 通过调控 SIRT3 影响心脏能量代谢, 并在体内外实验中通过改善糖、脂、酮体代谢以及恢复线粒体功能障碍来满足心脏对 ATP 的需求。此外, DAI 可通过 SIRT3/FOXO3a 通路发挥抗氧化作用, 减轻心力衰竭^[70]。

心肌纤维化是多种心血管疾病转化为心力衰竭的重要病理过程。黄芪生脉饮可以抑制异丙肾上腺素诱导的心功能障碍, 并能上调 SIRT3 的表达, 抑制转化生长因子- β 1/Smad 信号通路, 改善心肌纤维化, 阻断心力衰竭的发展^[71]。

3.3 靶向 SIRT3 中药在防治心肌肥大中的作用

槲皮素是一种天然黄酮醇, 在体内外都可以防治心肌肥大。槲皮素能够显著抑制 Ang II 诱导的心肌细胞中 PARP-1 上调, 减弱线粒体膜电位去极化, 恢复膜电位, 逆转 SIRT3 的表达; 敲低 *sirt3* 后, 槲皮素的保护作用减弱, 表明槲皮素通过调节 SIRT3/PARP-1 信号通路在线粒体功能中发挥保护作用^[72]。通脉养心通过上调 SIRT3 表达来发挥抗心肌肥大作用。从通脉养心中鉴定出的甘草异黄酮 A 可通过上调 SIRT3 的表达, 降低 SOD2 蛋白的乙酰化改善去氧肾上腺素诱导的心肌肥大。这些结果表明, 甘草异黄酮 A 是一种潜在的 SIRT3 激活剂, 对心肌肥大具有治疗作用^[73]。已有研究报道, 中药大黄用于心力衰竭、心肌肥大等慢性心脏病的防治, 其活性成分之一大黄素对 TAC 或异丙肾上腺素诱导的心肌肥大小鼠和去氧肾上腺素损伤的心肌细胞有保护作用, 可通过激活 SIRT3, 进而调控上下游信号通路, 保护线粒体功能, 改善心肌肥大^[74]。和厚朴酚来源于木兰科, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等特性。研究表明, 和厚朴酚是 SIRT3 的激活剂, 通过激活 SIRT3, 促进 SOD2 的去乙酰化, 上调 Mfn1/OPA1 表达水平, 下调 DRP1 表达, 促进线粒体融合和

裂变平衡, 减轻线粒体损伤^[75], 同时也减少线粒体中蛋白的乙酰化, 阻断心肌肥大的发展, 并能抑制成纤维细胞分化, 发挥抗纤维化作用^[76]。

3.4 靶向 SIRT3 中药在防治 DCM 中的作用

大蒜可以激活 DCM 心脏中 SIRT3 的表达, 促进线粒体生物发生, 促进 SOD2 的去乙酰化, 降低 ROS 的水平, 改善线粒体功能障碍^[75]。和厚朴酚具有心肌保护作用, 不仅能够抑制心肌肥大和心肌纤维化, 还能够通过增加 ATP 的合成, 改善线粒体能量代谢, 改善 DCM^[78]。淫羊藿苷被证明在 DCM 的治疗中发挥作用, 显著激活 DCM 小鼠或高糖诱导的心肌细胞中被抑制的脂肪细胞因子艾帕素 (Apelin) 和 SIRT3, 上调 PGC-1 α 、Mfn2 和线粒体 DNA 细胞色素 b (Cyt-b) 线粒体相关蛋白的表达水平, 恢复线粒体膜电位, 维持线粒体稳态, 并抑制细胞凋亡减少心肌纤维化, 延缓 DCM 的发展^[79]。红景天苷和白藜芦醇可减轻高脂饮食联合链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠的心功能障碍, 直接或间接激活 SIRT3 并通过激活 AMPK/PGC-1 α /TFAM 信号通路, 降低 TFAM 的乙酰化, 促进线粒体生物发生, 改善线粒体功能, 进而改善 DCM^[80-81]。

4 总结与展望

本文对 SIRT3 调节线粒体功能在心肌损伤中的作用机制进行总结, 并梳理了已知中药复方及单体活性成分通过调节或靶向 SIRT3 在心肌损伤中的有益作用。线粒体为心脏提供收缩舒张的能量和动力, 线粒体功能障碍是参与心血管疾病发展的重要机制。SIRT3 作为一个具有强脱乙酰作用的酶存在于线粒体中, 可通过脱乙酰化线粒体蛋白, 调节 ATP 的产生, 抑制 ROS 的生成, 改善线粒体氧化应激和能量代谢; 同时也参与 TCA 和 ETC 线粒体复合物的合成, 调节线粒体呼吸。此外, SIRT3 可以调节线粒体动力学, 维持线粒体稳态。当线粒体受损时, SIRT3 激活线粒体自噬清除受损线粒体, 促进受损线粒体的分裂和健康线粒体的融合, 维持线粒体数量和质量, 同时线粒体受损严重还可以促进线粒体的生物合成, 因此靶向 SIRT3 有望成为治疗心肌损伤引起的心脏疾病的又一策略。

中医药在治疗心血管疾病方面具有较大的潜力, 本文归纳了调节或靶向 SIRT3 改善心肌损伤的中药复方和单体化合物, 旨在强调具有中药激活 SIRT3 调控线粒体功能改善心肌损伤对于心血管疾病的重要作用及广泛前景。目前靶向 SIRT3 抗心肌损伤的临床试验较少, 尽管运用动物与细胞的实验尽可能地接近临床, 但在指导临床用药

方面依然面临着巨大的挑战。此外, 线粒体在治疗各种心肌损伤相关的心血管疾病中扮演着重要的角色, SIRT3 参与了线粒体生物学各个方面。在未来的研究中, 开发 SIRT3 激活剂及创新中药抗心肌损伤治疗心血管疾病具有广阔的研究价值和社会效益。

参考文献

- [1] Global Cardiovascular Risk Consortium, Magnussen C, Ojeda FM, et al. Global effect of modifiable risk factors on cardiovascular disease and mortality [J]. *N Engl J Med*, 2023, 389 (14): 1273-1285.
- [2] Savarese G, Becher PM, Lund LH, et al. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 118 (17): 3272-3287.
- [3] Andersson C, Naylor M, Tsao CW, et al. Framingham heart study: JACC focus seminar, 1/8 [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77 (21): 2680-2692.
- [4] Zhang J, Xiang HG, Liu J, et al. Mitochondrial Sirtuin 3: new emerging biological function and therapeutic target [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (18): 8315-8342.
- [5] Cao MF, Zhao QR, Sun X, et al. Sirtuin 3: emerging therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 180: 63-74.
- [6] Gao J, Hou TS. Cardiovascular disease treatment using traditional Chinese medicine: mitochondria as the Achilles' heel [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114999.
- [7] Tang XQ, Chen XF, Chen HZ, et al. Mitochondrial Sirtuins in cardiometabolic diseases [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131 (16): 2063-2078.
- [8] Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, et al. Sirtuin 1 and Sirtuin 3: physiological modulators of metabolism [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92 (3): 1479-1514.
- [9] Atici AE, Crother TR, Noval RM. Mitochondrial quality control in health and cardiovascular diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1290046.
- [10] Wang J, Zhou H. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10 (10): 1866-1879.
- [11] Hung J, Roos A, Kadesjö E, et al. Performance of the GRACE 2.0 score in patients with type 1 and type 2 myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (26): 2552-2561.
- [12] Zhang JW, Ren D, Fedorova J, et al. SIRT1/SIRT3 modulates redox homeostasis during ischemia/reperfusion in the aging heart [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9 (9): 858.
- [13] Porter GA, Urciuoli WR, Brookes PS, et al. SIRT3 deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury: implication for aged hearts [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306 (12): H1602-1609.
- [14] He XC, Zeng H, Chen JX. Ablation of SIRT3 causes coronary microvascular dysfunction and impairs cardiac recovery post myocardial ischemia [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 215: 349-357.
- [15] Parodi-Rullán RM, Chapa-Dubocq X, Rullán PJ, et al. High sensitivity of SIRT3 deficient hearts to ischemia-reperfusion is associated with mitochondrial abnormalities [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 275.
- [16] Zhai ME, Li BY, Duan W, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis [J]. *J Pineal Res*, 2017, 63 (2): e12419.
- [17] Darwesh AM, Bassiouni W, Adebesein AM, et al. A synthetic epoxydocosapentaenoic acid analogue ameliorates cardiac ischemia/reperfusion injury: the involvement of the Sirtuin 3-NLRP3 pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (15): 5261.
- [18] Ma LL, Kong FJ, Dong Z, et al. Hypertrophic preconditioning attenuates myocardial ischaemia-reperfusion injury by modulating SIRT3-SOD2-mROS-dependent autophagy [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54 (7): e13051.
- [19] Bai Y, Yang YL, Gao YF, et al. Melatonin postconditioning ameliorates anoxia/reoxygenation injury by regulating mitophagy and mitochondrial dynamics in a SIRT3-dependent manner [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 904: 174157.
- [20] Eid RA, Bin-Meferij MM, El-Kott AF, et al. Exendin-4 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by upregulation of SIRT1 and SIRT3 and activation of AMPK [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021, 14 (4): 619-635.
- [21] Wu JJ, Yang YL, Gao YF, et al. Melatonin attenuates anoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive mitophagy through the MT2/SIRT3/FoxO3a signaling pathway in H9c2 cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 2047-2060.
- [22] Sun P, Wang C, Mang G, et al. Extracellular vesicle-packaged mitochondrial disturbing miRNA exacerbates cardiac injury during acute myocardial infarction [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12 (4): e779.
- [23] Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128 (9): 3716-3726.
- [24] Qian K, Tang J, Ling YJ, et al. Exogenous NADPH exerts a positive inotropic effect and enhances energy metabolism via SIRT3 in pathological cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *EBioMedicine*, 2023, 98: 104863.
- [25] Zhang XK, Ji RP, Liao XH, et al. MicroRNA-195 regulates metabolism in failing myocardium via alterations in Sirtuin 3 expression and mitochondrial protein acetylation [J]. *Circulation*, 2018, 137 (19): 2052-2067.
- [26] Hu JG, Liu T, Fu F, et al. Omentin1 ameliorates myocardial ischemia-induced heart failure via SIRT3/FOXO3a-dependent mitochondrial dynamical homeostasis and mitophagy [J]. *J Transl Med*, 2022, 20 (1): 447.
- [27] Suo MY, Qi Y, Liu LX, et al. SS31 Alleviates pressure overload-induced heart failure caused by Sirt3-mediated mitochondrial fusion [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 858594.
- [28] Tong D, Schiattarella GG, Jiang N, et al. NAD (+) repletion reverses heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Circ Res*, 2021, 128 (11): 1629-1641.
- [29] Zhu ZY, Li HH, Chen WL, et al. Perindopril improves cardiac function by enhancing the expression of SIRT3 and

- PGC-1 α in a rat model of isoproterenol-induced cardiomyopathy [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 00094.
- [30] Yang D, Liu HQ, Liu FY, et al. Mitochondria in pathological cardiac hypertrophy research and therapy [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 822969.
- [31] Wang MH, Ding YQ, Hu YH, et al. SIRT3 improved peroxisomes-mitochondria interplay and prevented cardiac hypertrophy via preserving PEX5 expression [J]. *Redox Biol*, 2023, 62: 102652.
- [32] Ding YQ, Zhang YH, Lu J, et al. MicroRNA-214 contributes to Ang II -induced cardiac hypertrophy by targeting SIRT3 to provoke mitochondrial malfunction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (9): 1422-1436.
- [33] Meng GL, Liu JQ, Liu SM, et al. Hydrogen sulfide pretreatment improves mitochondrial function in myocardial hypertrophy via a SIRT3-dependent manner [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175 (8): 1126-1145.
- [34] You J, Yue Z, Chen S, et al. Receptor-interacting protein 140 represses Sirtuin 3 to facilitate hypertrophy, mitochondrial dysfunction and energy metabolic dysfunction in cardiomyocytes [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017, 220 (1): 58-71.
- [35] Feng XJ, Wang YN, Chen WX, et al. SIRT3 inhibits cardiac hypertrophy by regulating PARP-1 activity [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (5): 4178-4192.
- [36] Tronchere H, Cinato M, Timotin A, et al. Inhibition of PIKfyve prevents myocardial apoptosis and hypertrophy through activation of SIRT3 in obese mice [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9 (6): 770-785.
- [37] Guo LR, Yin AK, Zhang Q, et al. Angiotensin- (1-7) attenuates angiotensin II -induced cardiac hypertrophy via a Sirt3-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312 (5): H980-H991.
- [38] Du Q, Zhu B, Zhai Q, et al. Sirt3 attenuates doxorubicin-induced cardiac hypertrophy and mitochondrial dysfunction via suppression of Bnip3 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9 (7): 3360-3373.
- [39] Dillmann WH. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2019, 124 (8): 1160-1162.
- [40] Liu YT, Qiu HL, Xia HX, et al. Macrodl suppresses diabetic cardiomyopathy via regulating PARP1-NAD (+) -SIRT3 pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024.
- [41] Jin LG, Geng LL, Ying L, et al. FGF21-Sirtuin 3 Axis confers the protective effects of exercise against diabetic cardiomyopathy by governing mitochondrial integrity [J]. *Circulation*, 2022, 146 (20): 1537-1557.
- [42] Kanwal A, Pillai VB, Samant S, et al. The nuclear and mitochondrial sirtuins, Sirt6 and Sirt3, regulate each other's activity and protect the heart from developing obesity-mediated diabetic cardiomyopathy [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (10): 10872-10888.
- [43] Zhang Q, Li DY, Dong X, et al. LncDACH1 promotes mitochondrial oxidative stress of cardiomyocytes by interacting with Sirtuin3 and aggravates diabetic cardiomyopathy [J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65 (6): 1198-1212.
- [44] Wang SJ, Zhao ZJ, Fan YH, et al. Mst1 inhibits Sirt3 expression and contributes to diabetic cardiomyopathy through inhibiting Parkin-dependent mitophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865 (7): 1905-1914.
- [45] Yu WJ, Gao BL, Li N, et al. Sirt3 deficiency exacerbates diabetic cardiac dysfunction: role of Foxo3A-Parkin-mediated mitophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863 (8): 1973-1983.
- [46] Song S, Ding Y, Dai GL, et al. Sirtuin 3 deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy via necroptosis enhancement and NLRP3 activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (2): 230-241.
- [47] Pillai VB, Bindu S, Sharp W, et al. Sirt3 protects mitochondrial DNA damage and blocks the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310 (8): H962-H972.
- [48] Ma YY, Ma JP, Lu LH, et al. Melatonin restores autophagic flux by activating the Sirt3/TFEB signaling pathway to attenuate doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12 (9): 1716.
- [49] Tomczyk MM, Cheung KG, Xiang B, et al. Mitochondrial Sirtuin-3 (SIRT3) prevents doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy by modulating protein acetylation and oxidative stress [J]. *Circ Heart Fail*, 2022, 15 (5): e008547.
- [50] Cheung KG, Cole LK, Xiang B, et al. Sirtuin-3 (SIRT3) protein attenuates doxorubicin-induced oxidative stress and improves mitochondrial respiration in H9c2 cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290 (17): 10981-10993.
- [51] Zhong ZQ, Gao YF, Zhou JD, et al. Inhibiting mir-34a-5p regulates doxorubicin-induced autophagy disorder and alleviates myocardial pyroptosis by targeting Sirt3-AMPK pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115654.
- [52] Dikalova AE, Pandey A, Xiao L, et al. Mitochondrial deacetylase Sirt3 reduces vascular dysfunction and hypertension while Sirt3 depletion in essential hypertension is linked to vascular inflammation and oxidative stress [J]. *Circ Res*, 2020, 126 (4): 439-452.
- [53] Wei T, Huang GJ, Gao J, et al. Sirtuin 3 deficiency accelerates hypertensive cardiac remodeling by impairing angiogenesis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6 (8): e006114.
- [54] Zhang C, Li N, Suo MY, et al. Sirtuin 3 deficiency aggravates angiotensin II -induced hypertensive cardiac injury by the impairment of lymphangiogenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (16): 7760-7771.
- [55] Xu YC, Zhang SJ, Rong JB, et al. Sirt3 is a novel target to treat sepsis induced myocardial dysfunction by acetylated modulation of critical enzymes within cardiac tricarboxylic acid cycle [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104887.
- [56] Xin T, Lu CZ. Sirt3 activates AMPK-related mitochondrial biogenesis and ameliorates sepsis-induced myocardial injury [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (16): 16224-16237.
- [57] Hao PP, Jiang F, Cheng J, et al. Traditional Chinese medicine for cardiovascular disease: evidence and potential mechanisms [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69 (24): 2952-2966.
- [58] 丁凡, 王拥军, 张岩. 丹参活性成分的药理作用和临床应用研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (2): 659-662.

- [59] Huang DD, Wei XH, Mu HN, et al. Total salvianolic acid injection prevents ischemia/reperfusion-induced myocardial injury via antioxidant mechanism involving mitochondrial respiratory chain through the upregulation of Sirtuin1 and Sirtuin3 [J]. *Shock*, 2019, 51 (6): 745-756.
- [60] 方东菲, 张建永. 淫羊藿及其活性成分对心血管疾病的改善作用机制研究进展 [J]. *中国药房*, 2020, 31 (9): 1139-1143.
- [61] Li YL, Feng LY, Xie DY, et al. Icariside II mitigates myocardial infarction by balancing mitochondrial dynamics and reducing oxidative stress through the activation of Nrf2/SIRT3 signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 956: 175987.
- [62] Ungurianu A, Zanfrescu A, Margină D. Sirtuins, resveratrol and the intertwining cellular pathways connecting them [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 88: 101936.
- [63] Zheng MS, Bai YL, Sun XY, et al. Resveratrol reestablishes mitochondrial quality control in myocardial ischemia/reperfusion injury through Sirt1/Sirt3-Mfn2-Parkin-PGC-1 α pathway [J]. *Molecules*, 2022, 27 (17): 5545.
- [64] Wu HL, Liu YJ, Hao Y, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury via activation of SIRT3/CypD signaling [J]. *Ann Transl Med*, 2023, 11 (2): 72.
- [65] Lv DY, Luo MH, Cheng Z, et al. Tubeimoside I ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5577019.
- [66] Xiang M, Zhao X, Lu YD, et al. Modified Linggui Zhugan Decoction protects against ventricular remodeling through ameliorating mitochondrial damage in post-myocardial infarction rats [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 1038523.
- [67] Wen JX, Zou WJ, Wang RL, et al. Cardioprotective effects of Aconiti Lateralis Radix Praeparata combined with Zingiberis Rhizoma on doxorubicin-induced chronic heart failure in rats and potential mechanisms [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111880.
- [68] Chen XY, Xie QF, Zhu Y, et al. Cardio-protective effect of tetrahydrocurcumin, the primary hydrogenated metabolite of curcumin in vivo and in vitro: Induction of apoptosis and autophagy via PI3K/AKT/mTOR pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 911: 174495.
- [69] Zhang B, Yang JC, Li XY, et al. Tetrahydrocurcumin ameliorates postinfarction cardiac dysfunction and remodeling by inhibiting oxidative stress and preserving mitochondrial function via SIRT3 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155127.
- [70] Li HX, Zhang MX, Wang YY, et al. Daidzein alleviates doxorubicin-induced heart failure via the SIRT3/FOXO3a signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2022, 13 (18): 9576-9588.
- [71] Pan JH, Cao ZH, Fang CQ, et al. Huangqi Shengmai Yin ameliorates myocardial fibrosis by activating Sirtuin3 and inhibiting TGF- β /Smad pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 722530.
- [72] Chen WJ, Cheng Y, Li W, et al. Quercetin attenuates cardiac hypertrophy by inhibiting mitochondrial dysfunction through SIRT3/PARP-1 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 739615.
- [73] Guo R, Liu NN, Liu H, et al. High content screening identifies licoisoflavone A as a bioactive compound of Tongmai yangxin Pills to restrain cardiomyocyte hypertrophy via activating Sirt3 [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153171.
- [74] Gao J, Zhang KL, Wang Y, et al. A machine learning-driven study indicates emodin improves cardiac hypertrophy by modulation of mitochondrial SIRT3 signaling [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104739.
- [75] Pillai VB, Kanwal A, Fang YH, et al. Honokiol, an activator of Sirtuin-3 (SIRT3) preserves mitochondria and protects the heart from doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (21): 34082-34098.
- [76] Pillai VB, Samant S, Sundaresan NR, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6656.
- [77] Sultana MR, Bagul PK, Katare PB, et al. Garlic activates SIRT-3 to prevent cardiac oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diabetes [J]. *Life Sci*, 2016, 164: 42-51.
- [78] Kerr M, Miller JJ, Thapa D, et al. Rescue of myocardial energetic dysfunction in diabetes through the correction of mitochondrial hyperacetylation by honokiol [J]. *JCI Insight*, 2020, 5 (17): e140326.
- [79] Ni TJ, Lin N, Huang XX, et al. Icarin ameliorates diabetic cardiomyopathy through Apelin/Sirt3 signalling to improve mitochondrial dysfunction [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 256.
- [80] Li Y, Wei X, Liu SL, et al. Salidroside protects cardiac function in mice with diabetic cardiomyopathy via activation of mitochondrial biogenesis and SIRT3 [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (8): 4579-4591.
- [81] Bagul PK, Katare PB, Bugga P, et al. SIRT-3 modulation by resveratrol improves mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic heart through deacetylation of TFAM [J]. *Cells*, 2018, 7 (12): 235.

(收稿日期: 2024-04-17; 修回日期: 2024-05-27)

天然法尼醇 X 受体激动剂对腹泻型肠易激综合征的治疗潜力

孙聪颖, 钟鑫勤, 赵玉翠, 袁思宇, 祝世晓, 王小莹* (天津中医药大学 中药学院, 天津 301617)

摘要: 受饮食习惯、社会和心理压力等因素的影响, 腹泻型肠易激综合征在国内的患病率越来越高, 其中不少患者伴随胆汁酸代谢异常。法尼醇 X 受体 (FXR) 是参与胆汁酸代谢的关键受体, 可以调控胆汁酸合成。本文总结了对腹泻型肠易激综合征具有潜在治疗作用的天然 FXR 激动剂, 其药理作用主要包括改善临床症状, 调节胆汁酸代谢, 改善肠屏障损伤以及调节肠道菌群。天然 FXR 激动剂有望成为治疗伴胆汁酸代谢异常腹泻型肠易激综合征的潜力药物。

关键词: 腹泻型肠易激综合征; FXR 激动剂; 胆汁酸代谢; 肠屏障损伤; 肠道菌群

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3295-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.025

Therapeutic potential of natural Farnesoid X receptor agonists for irritable bowel syndrome with diarrhea

SUN Cong-ying, ZHONG Xin-qin, ZHAO Yu-cui, YUAN Si-yu, ZHU Shi-xiao, WANG Xiao-ying* (College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Affected by dietary habits, social and psychological pressure and other factors, the irritable bowel syndrome with diarrhea in China is getting more prevalent. Many patients are accompanied by abnormal bile acid metabolism. Farnesoid X receptor (FXR) is a key receptor involved in the bile acid metabolism and can regulate bile acid synthesis. This article summarized the potential therapeutic effect of natural FXR agonists on irritable bowel syndrome with diarrhea, which mainly included improving clinical symptoms, regulating bile acid metabolism, improving intestinal barrier damage, and regulating intestinal flora. Natural FXR agonists are expected to be potential drugs for irritable bowel syndrome with diarrhea with abnormal bile acid metabolism.

Key words: irritable bowel syndrome with diarrhea; Farnesoid X receptor agonist; bile acid metabolism; intestinal barrier injury; intestinal flora

腹泻型肠易激综合征 (irritable bowel syndrome with diarrhea, IBS-D) 是一种以腹泻和持续性腹痛为主要症状的功能性肠病, 对人们的生活质量造成了严重的影响^[1]。据统计, 超过 25% 的 IBS-D 患者伴有胆汁酸代谢异常^[2], 表现为粪便总胆汁酸量增加、初级胆汁酸比例升高, 并与结肠传输速率、粪便 Bristol 评分、排便次数以及内脏超敏反应相关^[3-4]。法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 作为胆汁酸受体参与机体内多种生理功能, 是核受体超家族的成员之一^[5]。FXR 的一个重要生理功能是参与胆汁酸的负反馈调节, 调控胆汁

酸合成, 因此 FXR 激动剂被用于治疗胆汁酸代谢异常相关疾病。近年来研究发现, 天然 FXR 激动剂不仅可以治疗胆汁酸代谢异常, 对 IBS-D 也有潜在的治疗作用。因此, 本文归纳了对伴胆汁酸代谢异常 IBS-D 有潜在治疗作用的天然 FXR 激动剂, 旨在为临床开发利用新的治疗药物提供参考。

1 胆汁酸合成与代谢

胆汁酸以胆固醇为原料在肝脏中合成, 其合成途径分为经典途径和替代途径。如图 1 所示, 经典途径由 CYP7A1 启动, 经 CYP8B1 和 CYP27A1 作用后产生胆酸 (cholic acid, CA) 和鹅脱氧胆

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82192914)。

作者简介: 孙聪颖, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 1299370526@qq.com * 通信作者: 王小莹, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药理学研究, email: wxy@tjutcm.edu.cn

酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA)。替代途径由 CYP27A1 启动, 经 CYP7B1 作用后产生 CDCA^[6]。其中 CYP8B1 促进胆酸形成可以决定胆酸与 CDCA 的比例。在肝细胞中, 大多数游离胆汁酸经酶作用后与甘氨酸或牛磺酸结合形成结合型胆汁酸, 通过胆盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP) 从肝脏分泌到胆管中^[7]。而硫酸化或葡糖醛酸化的胆汁酸经甘氨酸或牛磺酸结合后, 通过多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) 2 从肝脏分泌到胆管中^[8]。

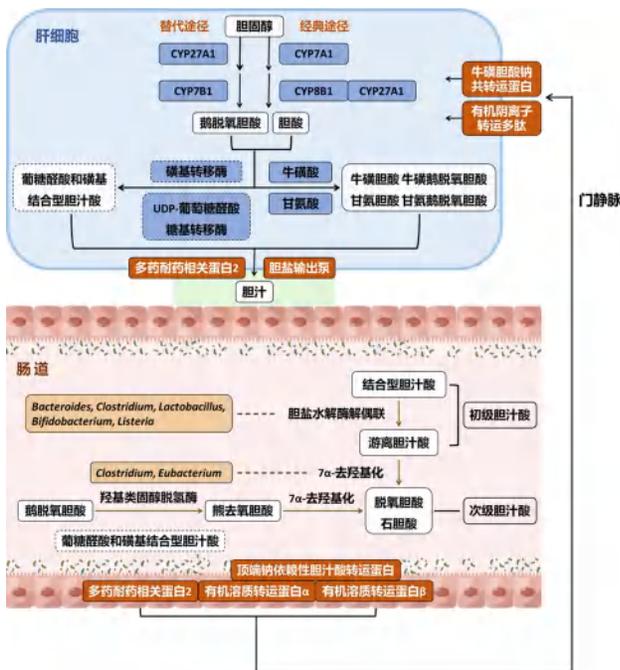


图 1 胆汁酸的合成与代谢

Fig 1 Synthesis and metabolism of bile acids

胆囊收缩将胆汁释放到肠腔后, 大部分胆汁酸在回肠末端经顶端钠依赖性胆汁酸转运蛋白 (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) 重吸收^[9], 与回肠胆汁酸结合蛋白 (ileal bile acid-binding protein, IBABP) 结合后通过肠上皮细胞转运到基底外侧膜, 在有机溶质转运蛋白 (organic solute transporter, OST) α -Ost β 复合体的作用下向门静脉转运^[10], 回到肝脏完成肝-肠循环。

到达结肠的胆汁酸经胆盐水解酶 (bile salt hydrolases, BSH) 和 7α -脱羟基酶去结合后形成次级胆汁酸脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA) 和石胆酸 (lithocholic acid, LCA)^[7], CDCA 还可被羟基类固醇脱氢酶 (hydroxysteroid dehydrogenase, HSDH) 转化为熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA)^[11]。在结肠中, *Bacteroides*、*Clostridium*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 和 *Listeria* 等多种微

生物表达 BSH, 参与胆汁酸解偶联^[12]。厚壁菌门成员 *Clostridium* 和 *Eubacterium* 则具有 7α -脱羟基酶作用^[13]。结肠中的游离胆汁酸经被动扩散重吸收到肝脏或随粪便排出, 其中 DCA 和 LCA 占粪便总胆汁酸的 80%~90%^[14], 葡糖醛酸化或硫酸化的胆汁酸通过 MRP2 随尿液排出^[15]。

2 FXR 与 IBS-D

FXR 参与 IBS-D 的机制如图 2 所示。FXR 与配体结合后, 以单体或与 9-顺式维甲酸受体 (9-cis-retinoic acid receptor, RXR) 形成异二聚体的形式与多种 DNA 元件结合, 调控下游基因的转录^[16]。当机体内胆汁酸池增大时, 胆汁酸激活 FXR 诱导小异二聚体伴侣 (small heterodimer partner, SHP) 1 表达, 进而抑制 *CYP7A1* 基因表达^[17]。肠道 FXR 可以直接诱导成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 19 产生, FGF19 通过门静脉循环进入肝脏激活 FGFR4, 经 cJun N-JNK 途径抑制 *CYP7A1* 基因表达, 减少胆汁酸合成^[18]。研究发现, 与健康对照组相比, IBS-D 患者血清中 FGF19 的含量较低^[19], 说明由 FXR 介导的 FGF19-FGFR4-JNK 负反馈调节通路在 IBS-D 患者中可能受到了抑制, 从而导致胆汁酸代谢异常, 促进了 IBS-D 的发展。肠道中过量的胆汁酸可以诱导内脏超敏反应发生。Li 等^[20]发现肠道胆汁酸激活 FXR 后, 通过 MKK3/6-p38-丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)-核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 途径, 诱导肠黏膜肥大细胞分泌神经生长因子 (nerve growth factor, NGF), NGF 与高亲和力受体酪氨酸激酶 (tyrosine kinase, Trk) A 结合, 进一步诱导伤害性背根神经节上的瞬时受体电位香草酸 (transient receptor potential vanilloid, TRPV) 1 表达, 导致内脏超敏反应发生。因此, 减少肠道中的胆汁酸含量对于缓解内脏超敏反应具有重要意义。

3 天然 FXR 激动剂对 IBS-D 的潜在药理作用

胆汁酸是内源性天然 FXR 激动剂, 其中作用最强的是 CDCA, 其次是 DCA 和 LCA^[21]。外源性天然 FXR 激动剂主要来自植物、微生物等。本文总结了外源性天然产物中的 FXR 激动剂, 主要包括黄酮类、萜类及甾体、生物碱类、酚类衍生物等化合物, 其对伴胆汁酸代谢异常 IBS-D 的作用机制包括调节胆汁酸代谢、保护肠道屏障、调节肠道菌群以及改善临床症状等, 如表 1 所示。

3.1 缓解 IBS-D 临床症状

3.1.1 生物碱类 FXR 激动剂 小檗碱 (berberine) 又名黄连素, 是生物碱类 FXR 激动剂^[22]。小檗碱

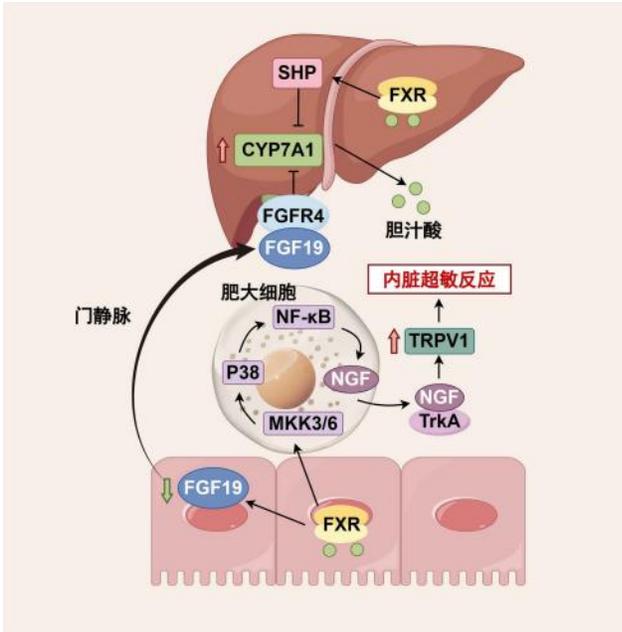


图 2 FXR 参与 IBS-D 的机制

Fig 2 Mechanism of FXR involved in IBS-D

可以激活肠道 FXR 受体信号通路，上调肠道 FXR 及其靶基因表达，但在 FXR 基因敲除小鼠中小檗碱的治疗作用消失，证明小檗碱可能靶向激活 FXR 受体产生效应^[23]。每日给予 IBS-D 患者小檗碱 400 mg，与安慰剂组相比，治疗 8 周后患者的腹泻、腹痛减轻，急便次数显著减少，焦虑和抑郁情况显著改善，生活质量大大提高且未出现不良反应^[24]。小檗碱可以通过 μ 、 δ -阿片受体作用逆转 IBS-D 小鼠肠道运动过度、分泌过多和伤害性感受，并增加了小鼠肠道和大鼠胎脑皮层神经元中的 μ 、 δ -阿片受体表达^[25]。离体实验显示，小檗碱可抑制神经递质引起的结肠纵行平滑肌收缩，包括乙酰胆碱激动剂（卡巴胆碱）、NOS 抑制剂（L-NAME）和 P2Y₁ 受体拮抗剂（MRS2500）^[26]。这些研究表明，小檗碱可以抑制肠道过度收缩、减少肠道分泌、缓解内脏超敏反应，有效改善 IBS-D 的临床症状。

表 1 天然 FXR 激动剂对 IBS-D 的主要作用及机制

Tab 1 Main effect and mechanism of natural FXR agonists on IBS-D

分类	天然 FXR 激动剂	主要作用及机制
黄酮类	黄腐醇	具有抗焦虑和抑郁作用；改变菌群分布，丙酸盐水平 ↑
	橙皮苷	CYP7A1、CYP27A1 ↓
	licraside	SHP ↑，胆汁酸水平 ↓
	EGCG	血清促炎因子 ↓；炎症相关菌丰度 ↓，益生菌丰度、短链脂肪酸含量 ↑
萜类及甾体	alisol B 23-acetate	SHP ↑，CYP7A1、CYP8B1 ↓；结肠促炎因子 ↓，NF- κ B/MAPK/TLR/MyD88 和 TLR4-NOX1/ROS 通路 ↓，肠 TJ 蛋白 ↑；致病菌 <i>Klebsiella</i> 和 <i>Citrobacter</i> 丰度 ↓，益生菌丰度、菌群多样性 ↑
	咖啡醇	CYP7A1、CYP27A1 和 CYP7B1 基因表达 ↓
	二氢青蒿素	CYP7A1 基因表达、CA 和 CDCA ↓；CD4 ⁺ T 细胞、Th 细胞、促炎因子 ↓，Treg 细胞、肠 TJ 蛋白 ↑；致病菌丰度 ↓，益生菌丰度、菌群多样性 ↑
	齐墩果酸	SHP 基因表达 ↑，CYP7A1 基因表达、胆汁酸水平 ↓；TGR5 基因表达、TLR4 表达 ↓，肠 TJ 蛋白 ↑
	胡黄连苷 II	CYP7A1、CYP8B1 ↓；依赖 TLR4 的 PI3K/AKT/NF- κ B 通路 ↓；益生菌丰度 ↑，致病菌 <i>Helicobacter</i> 、 <i>Escherichia Shigella</i> 丰度 ↓
	人参皂苷 Rg ₁	促炎因子、TLR4/MyD88 通路、Th 细胞 ↓，抑炎因子、Treg 细胞 ↑；益生菌丰度 ↑，致病菌 <i>Odoribacter</i> 和 <i>Turicibacter</i> 丰度 ↓，血清吲哚 -3- 甲醛、吲哚 -3- 乳酸、3- 吲哚丙酸和烟酰胺水平 ↑
	薯蓣皂苷	TLR4/MyD88/NF- κ B 通路、促炎因子 ↓，抑炎因子、回肠杯状细胞、肠 TJ 蛋白 ↑；菌群多样性、Lachnospiraceae、Ruminococcaceae 丰度 ↑， <i>Escherichia coli</i> 丰度 ↓
	京尼平苷酸	NF- κ B 通路、促炎因子 ↓，肠 TJ 蛋白 ↑；菌群丰富度和多样性、Bacteroidetes 丰度 ↑
	熊果酸	肠 TJ 蛋白 ↑，回肠炎性细胞浸润、NF- κ B 通路 ↓
	环黄芪醇	SphK/MIP-1 α /miR-143 通路 ↓
生物碱类	小檗碱	改善腹泻、腹痛、排便急迫、焦虑和抑郁等症状；粪便 UDCA、DCA 比例 ↑，肠道 FXR、TGR5 表达 ↑；肝脏 CYP7A1 ↓ 和 TGR5 表达 ↓；结肠黏蛋白、A20 基因表达 ↑，TNF- α /NF- κ B/MLCK 通路 ↓；益生菌丰度 ↑，致病菌 <i>Alloprevotella</i> 和 <i>Eisenbergiella</i> 丰度 ↓，乙酸、丁酸、戊酸水平 ↑
酚类衍生物	五味子甲素	具有抗抑郁作用；肠上皮细胞活力、肠 TJ 蛋白 ↑，NF- κ B、MAPK、ROS、促炎因子、CD4 ⁺ T 细胞 ↓
	葡萄内酯	CYP7A1、CYP8B1 ↓；促炎因子、MPO 活性、TLR4/NF- κ B 信号通路 ↓，肠 TJ 蛋白、短链脂肪酸水平 ↑
	nelumal A	肠道 FXR、SHP、FGF15 基因表达，肝脏 FGFR4 基因表达 ↑，CYP7A1 基因表达 ↓；结肠 TNF- α ↓，过氧化氢酶、GPX、SOD、肠 TJ 蛋白 ↑
	yangonin	SULT2A1 基因表达 ↑，CYP7A1、CYP8B1 基因表达 ↓

3.1.2 黄酮类 FXR 激动剂 黄腐醇 (xanthohumol) 为黄酮类 FXR 激动剂, 在啤酒花中含量丰富, 可以剂量依赖性地诱导 BSEP 启动子驱动的荧光素酶活性^[27]。研究显示, 黄腐醇可显著改善大鼠早期应激诱导的抑郁和焦虑样行为, 降低血浆皮质酮水平, 升高脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 水平, 从而发挥抗抑郁作用^[28]。

3.1.3 酚类衍生物 FXR 激动剂 五味子甲素 (deoxy-schizandrin) 来源于中药五味子, 是木质素类 FXR 激动剂, 双荧光素酶报告基因和环磷酸腺苷 (cAMP) 测定将其鉴定为 FXR 激动剂, 可激活 FXR 信号通路^[29]。五味子甲素可以减轻慢性不可预知应激诱导的小鼠抑郁样行为, 影响 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) /NF- κ B/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体途径, 通过谷氨酸受体 (glutamate receptor, GluR) /突触后致密区 95 (postsynaptic density-95, PSD95) 级联反应改善树突棘密度, 达到抗抑郁作用^[30]。

3.2 调节胆汁酸的合成与代谢

3.2.1 黄酮类 FXR 激动剂 橙皮苷 (hesperidin) 主要来源于柑橘属果皮, 分子对接模型预测橙皮苷可与 FXR 结合, 体外和体内实验证明橙皮苷可以增加 FXR 的表达和活性, 从而抑制胆汁酸合成相关酶 CYP7A1 和 CYP27A1 的表达, 进而抑制肝脏胆汁酸合成^[31]。Licraside 来源于中药甘草, 分子对接方法和双荧光素酶报告基因测定法证明 licraside 通过激活 FXR 上调下游蛋白 SHP 表达, 进而抑制胆汁酸合成, 降低胆汁酸水平^[32]。

3.2.2 萜类及甾体 FXR 激动剂 Alisol B 23-acetate 来源于中药泽泻, 可以激活肝脏 FXR, 诱导 SHP 表达, 抑制肝脏 CYP7A1 和 CYP8B1 活性, 从而减少胆汁酸合成, 调节胆汁酸分布^[33-34]。咖啡醇 (cafestol) 主要来源于咖啡豆, 作为 FXR 激动剂配体可以增加肠道中 FXR 靶基因的表达^[35], 下调小鼠肝脏中 CYP7A1、CYP27A1 和 CYP7B1 基因的表达, 从经典途径和替代途径来抑制胆汁酸的合成^[36]。二氢青蒿素 (dihydroartemisinin) 主要来源于植物黄花蒿, 可以激活 FXR 抑制肝脏 CYP7A1 基因表达, 降低 CA 和 CDCA 水平^[37]。然而, FXR 拮抗剂及 FXR 基因沉默可以消除或减弱二氢青蒿素的效应, 说明二氢青蒿素可以特异性激活 FXR 发挥作用^[38]。齐墩果酸 (oleanolic acid) 主要来源于油橄榄树, 与 FXR 的配体结合域 (ligand binding domain,

LBD) 结合, 阻断其与共激活因子 SRC-3 相互作用的能力, 并适当增强 FXR 靶基因 SHP 的表达^[39], 进而抑制 CYP7A1 基因表达, 降低胆汁酸水平^[40]。胡黄连苷 II (picroside II) 来源于植物胡黄连, 可以激活 FXR 通路, 降低 CYP7A1 和 CYP8B1 表达, 减少胆汁酸合成; FXR 基因沉默消除了胡黄连苷 II 对胆汁酸代谢的调节作用, 且双荧光素酶报告基因测定结果表明 FXR 被胡黄连苷 II 激活^[41]。

3.2.3 生物碱类 FXR 激动剂 研究发现, 小檗碱可以上调结肠炎小鼠中产生 BSH 的 *Lactobacillus* 和 *Roseburia* 的丰度, 增加粪便中次级胆汁酸 UDCA 和 DCA 的比例, 抑制肝脏 CYP7A1 和武田 G 蛋白偶联受体 5 (takeda G protein-coupled receptor 5, TGR5) 蛋白表达, 上调肠道 FXR 和 TGR5 蛋白水平, 负反馈抑制胆汁酸合成, 但在肠道菌群耗竭的结肠炎小鼠中无法发挥此作用, 说明小檗碱对胆汁酸代谢的调节作用依赖于肠道菌群^[42]。

3.2.4 酚类衍生物 FXR 激动剂 葡萄内酯 (auraptenone) 是一种来自柑橘属的香豆素类化合物, 可以通过激活 FXR 抑制肝脏中 CYP7A1 和 CYP8B1 的表达来减少胆汁酸合成^[43], FXR 拮抗剂和 FXR 基因沉默可以消除葡萄内酯对肝脏的效应^[44]。Nelumal A 来源于植物莲叶囊吾, 双荧光素酶报告基因检测结果显示 nelumal A 可与 FXR 的 LBD 结合, 且表现出较强的活性^[45]。Nelumal A 可以上调结肠炎小鼠肠道中 FXR、SHP 和 FGF15 基因表达, 上调肝脏中 FGFR4 基因表达, 下调 CYP7A1 基因表达, 从而抑制胆汁酸合成^[46]。Yangonin 来源于卡瓦胡椒, 可以通过激活 FXR 诱导磺基转移酶家族 (sulfotransferase family 2A1, SULT2A1) 基因表达, 抑制 CYP7A1 和 CYP8B1 基因表达, 从而改善胆汁酸稳态^[47]。体外证据表明, 当 FXR 被沉默后, yangonin 诱导的转运体和酶的变化被消除^[48]。

3.3 改善肠屏障损伤

3.3.1 黄酮类 FXR 激动剂 表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 主要来源于植物茶树, EGCG 可以特异性激活 FXR 诱导靶基因表达, 并对其他 FXR 激动剂具有拮抗作用^[49]。EGCG 可以减弱 *Clostridioides difficile* 对小鼠肠组织结构完整性和屏障功能的损害, 降低血清炎症因子白细胞介素 (interleukin, IL) 6 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) α 水平, 从而减轻结肠炎症^[50]。

3.3.2 萜类及甾体 FXR 激动剂 动物实验显示, alisol B 23-acetate 抑制结肠炎小鼠结肠组织中炎症因

子 IL-6、TNF- α 和干扰素 (interferon, IFN) γ 表达, 抑制炎症信号通路 NF- κ B/MAPK/TLR/髓分化因子 (myeloid differentiation factor, MyD) 88, 上调肠道紧密连接 (tight junction, TJ) 蛋白表达, 降低肠道通透性, 维持肠屏障完整^[51]; 体外实验显示, alisol B 23-acetate 可以抑制脂多糖 (LPS) 诱导的 Caco-2 细胞产生 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β , 并抑制 TLR4-NOX1/活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 信号通路, 上调 TJ 蛋白表达, 改善肠屏障功能障碍^[52]。人参皂苷 (ginsenoside) Rg₁ 来源于中药人参, 具有激活 FXR 调节其靶基因表达的效力^[53]。人参皂苷 Rg₁ 可以降低结肠中 IL-6、IL-33、TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A 和 IFN- γ 水平, 增加 IL-10 和 IL-4 水平, 抑制 TLR4/MyD88 通路改善肠道炎症, 还可上调结肠炎小鼠脾脏中调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 水平, 下调辅助性 T 细胞 (T helper cell, Th) 17 水平以维持肠道内稳态^[54-55]。二氢青蒿素通过促进血红素加氧酶-1 产生, 诱导活化的 CD4⁺ T 细胞凋亡, 恢复 Th/Treg 平衡发挥抗结肠炎作用^[56]。二氢青蒿素还可减少肠道炎症细胞浸润, 降低 TNF- α 和 IL-1 β 表达, 上调 TJ 蛋白表达, 有效改善结肠炎小鼠肠功能障碍^[57]。薯蓣皂苷 (dioscin) 富含于中药山药中, 通过氢键、疏水作用和静电作用直接靶向 FXR, 可以激活 FXR 对抗氧化应激^[58]。薯蓣皂苷可抑制肠黏膜炎大鼠的 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路, 减少促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达, 促进免疫调节介质 IL-10 产生, 同时上调回肠杯状细胞数量及 TJ 蛋白表达, 保护肠黏膜屏障^[59]。京尼平苷酸 (geniposidic acid) 主要来源于中药杜仲, 分子对接和双荧光素酶报告基因测定发现京尼平苷酸可以激活 FXR 及其信号通路^[60]。京尼平苷酸可以抑制结肠中 NF- κ B 通路的激活, 降低炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 表达, 增强 TJ 蛋白表达以维持结肠屏障完整性^[61]。研究显示, *TGR5* 基因表达上调促进肠道细胞凋亡, 补充适量齐墩果酸可以抑制 *TGR5* 基因的表达, 减轻细胞凋亡, 从而改善肠道健康状况^[62]。此外, 齐墩果酸还可维持肠道 TJ 蛋白的表达和定位, 保护肠道 TJ 屏障的完整性, 并抑制 TLR4 表达使 NF- κ B 失活, 下调 NF- κ B 相关蛋白, 抑制 MAPK 通路中关键蛋白的磷酸化, 有效减轻肠道炎症的发展^[63]。研究发现, 胡黄连苷 II 具有抗炎和抗氧化活性, 通过抑制依赖 TLR4 的磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) /NF- κ B 通路, 改善肠屏障损伤^[64]。熊果酸 (ursolic acid) 在山茱

萸中含量较高, 可通过调节 FXR 间接调控有机阴离子转运多肽 (organic anion transporting polypeptides, OATP) 1B3 的表达, 沉默 FXR 后熊果酸的作用消除^[65]。熊果酸可以显著上调肠道 TJ 蛋白表达, 减少回肠固有层炎症细胞浸润, 降低肠组织中丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、P67phox 和 NOX2 表达, 改善肠道氧化应激^[66]; 并可下调 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) α 磷酸化, 减轻结肠炎症反应^[67]。体外研究显示, 熊果酸可以抑制 TNF- α 诱导 COLO 205 细胞产生 IL-8, 活化 NF- κ B 及磷酸化 I κ B α , 还可抑制 LPS 诱导腹腔巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-6 和 IL-12, 抑制 NF- κ B 信号通路^[67]。环黄芪醇 (cycloastragenol) 来源于中药黄芪, 基因表达、蛋白分析和分子对接实验均验证了环黄芪醇对 FXR 信号通路的激活^[68]。环黄芪醇通过抑制鞘氨醇激酶 (sphingosine kinase, SphK) / 巨噬细胞炎症蛋白 (macrophage inflammatory protein, MIP) -1 α / 微小 RNA-143 (microRNA-143, miR-143) 通路, 减轻肠道炎症和凋亡, 改善结肠炎^[69]。

3.3.3 生物碱类 FXR 激动剂 研究显示, 小檗碱能明显改善结肠炎小鼠结肠组织中黏蛋白减少, 抑制肠道炎症反应, 修复肠屏障损伤^[42]。小檗碱还可上调 IBS-D 小鼠中 *A20* 基因的表达, 抑制 TNF- α /NF- κ B/肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 通路的异常激活, 保护肠上皮紧密连接, 修复 IBS-D 对肠上皮屏障的损伤^[70]。

3.3.4 酚类衍生物 FXR 激动剂 研究显示, 葡萄内酯可以抑制小鼠结肠组织中 NF- κ B、TNF- α 、信号传导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、核因子红细胞系 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、IL-6 和 IL-1 β 表达, 缓解结肠炎症^[71], 还可抑制髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性和 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活, 上调结肠 TJ 蛋白表达和短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs) 水平, 改善肠屏障损伤^[72]。五味子甲素可以增加肠上皮细胞活力, 恢复肠 TJ 蛋白表达, 阻断 NF- κ B 向核内转运, 抑制 I κ B α 降解和 NF- κ B 活化, 并可抑制 MAPK 活化和 ROS 增加, 从而减少细胞凋亡^[73-74]。五味子甲素还可降低结肠中炎症细胞因子的水平, 抑制 CD4⁺ T 细胞浸润, 有效抑制细胞凋亡, 缓解结肠炎小鼠的肠道损伤^[75]。Nelumal A 可以降低结肠黏膜中 TNF- α 水平, 上调过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX)、超氧化物歧

化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和 TJ 蛋白表达, 保护肠屏障功能^[46]。

3.4 调节肠道菌群

3.4.1 黄酮类 FXR 激动剂 EGCG 可以减少肠道炎症相关的肠球菌科 (Enterococcaceae) 和肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 丰度, 增加产生短链脂肪酸的乳杆菌科 (Lactobacillaceae) 和毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 丰度, 并提高盲肠中短链脂肪酸水平, 调节肠道免疫功能^[50]。EGCG 还可富集 *Akkermansia*, 增加短链脂肪酸的产生, 促进肠道抗炎、抗氧化状态^[76]。黄腐醇可以调节抑郁大鼠肠道 Lachnospiraceae、*Asteroplasma* 和 *Coprococcus* 的丰度, 回调细菌代谢产物丙酸盐的水平^[28]。

3.4.2 萜类及甾体 FXR 激动剂 Alisol B 23-acetate 可以增加结肠炎小鼠肠道菌群多样性, 减少致病菌 *Klebsiella* 和 *Citrobacter* 丰度, 增加益生菌 *Bacteroides*、*Lactobacillus* 和 *Alloprevotella* 丰度^[51]。二氢青蒿素可以增加结肠炎小鼠肠菌多样性, 上调拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 丰度, 下调厚壁菌门 (Firmicutes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 丰度, 恢复结肠炎小鼠的菌群组成^[57]。薯蓣皂苷调节肠黏膜炎大鼠的菌群结构, 恢复其多样性及 Firmicutes 和 Proteobacteria 的比例, 降低 *Escherichia coli* 丰度, 促进 Lachnospiraceae 和瘤胃球菌科 (Ruminococcaceae) 生长, 减少黏膜损伤^[59]。结肠炎小鼠给予京尼平苷酸治疗后改变了菌群的丰富度和多样性, 显著增加 Bacteroidetes 丰度^[61]。人参皂苷 Rg₁ 可以调节结肠炎小鼠菌群结构, 增加益生菌 *norank_f_Muribaculaceae*、*Akkermansia* 和 *Lactobacillus* 丰度, 减少致病菌 *Odoribacter* 和 *Turicibacter* 丰度, 并调节微生物色氨酸代谢, 升高血清中吲哚-3-甲醛、吲哚-3-乳酸、3-吲哚丙酸和烟酰胺水平, 缓解结肠炎症^[77]。胡黄连苷 II 通过升高 *Lactobacillus* 和 *Prevotella* 的相对丰度, 降低 *Helicobacter* 和 *Escherichia_Shigella* 的相对丰度, 改善肠屏障损伤^[64]。

3.4.3 生物碱类 FXR 激动剂 小檗碱增加结肠炎小鼠中益生菌 *Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Butyrivibrio*、*Roseburia* 和 *Tyzzelerella* 的相对丰度, 降低致病菌 *Alloprevotella* 和 *Eisenbergiella* 的相对丰度, 并逆转了乙酸、丁酸和戊酸的下调^[42]。

3.4.4 酚类衍生物 FXR 激动剂 葡萄内酯通过增加 Lactobacillaceae、*Allobaculum* 和 *Oscillospira* 等有益菌的数量, 降低有害菌的数量, 提高了结

肠炎小鼠肠道菌群的多样性^[72]。

上述研究表明, 天然 FXR 激动剂可以改善肠道微生物群的组成, 上调其丰富度和多样性, 通过调节菌群丰度及代谢产物发挥治疗作用。

4 讨论

临床证据显示, IBS-D 中有部分患者存在胆汁酸腹泻 (bile acid diarrhoea, BAD), 胆汁酸增强黏膜通透性, 诱导水和电解质分泌, 并可刺激推进性高振幅结肠收缩来加速结肠转运^[78]。奥贝胆酸和 tropifexor 等 FXR 激动剂已被用于治疗 BAD。奥贝胆酸可以减少胆汁酸合成, 显著改善 BAD 患者的腹痛和腹泻症状, 减少排便频率和腹泻次数^[79]。Tropifexor 显著增加 BAD 患者血清中 FGF19 水平, 降低 C4 水平, 显著延长结肠排空的时间^[80]。这些证据表明 FXR 激动剂可以作为治疗伴胆汁酸代谢异常 IBS-D 的潜力药物。

当胆汁酸的肠肝循环出现障碍时, 回肠胆汁酸重吸收减少、FGF19 合成不足, 导致结肠中胆汁酸浓度过高, 进而激活肠嗜铬细胞上的 TGR5 刺激 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 分泌^[78]。5-HT 激活内源性初级传入神经元上的 5-HT₄ 受体, 释放降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP), 胆汁酸也可以直接激活肠神经元上的 TGR5, 诱导 CGRP 释放^[81]。CGRP 可以调节运动神经元上神经递质的释放, 影响肠道蠕动^[82]。此外, 5-HT 激活肠道传入神经元上的 5-HT₃ 受体可以诱导超敏反应^[83]。因此, 结肠中过度存在的胆汁酸可能是加重 IBS-D 患者腹泻、腹痛等症状的重要因素。

天然 FXR 激动剂通过特异性激活 FXR, 负反馈抑制胆汁酸合成, 可以有效降低胆汁酸水平, 减轻胆汁酸诱发的不良反应; 部分天然 FXR 激动剂可以直接靶向肠道, 减轻肠道炎症和氧化应激, 改善肠屏障损伤, 抑或通过调节肠道菌群间接发挥作用。总的来说, 天然 FXR 激动剂是治疗伴胆汁酸代谢异常 IBS-D 的潜力药物, 进一步发掘其药理机制和药用价值, 有助于为 IBS-D 等相关疾病的治疗提供有效方案。

参考文献

- [1] Buono JL, Carson RT, Flores NM. Health-related quality of life, work productivity, and indirect costs among patients with irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Health Qual Life Outcomes, 2017, 15 (1): 35.
- [2] Slattery SA, Niaz O, Aziz Q, et al. Systematic review with meta-analysis: the prevalence of bile acid malabsorption in

- the irritable bowel syndrome with diarrhoea [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015, 42 (1): 3-11.
- [3] Ní Dhonnabháin R, Xiao Q, O' Malley D. Aberrant gut-to-brain signaling in irritable bowel syndrome-the role of bile acids [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 745190.
- [4] Shin A, Camilleri M, Vijayvargiya P, et al. Bowel functions, fecal unconjugated primary and secondary bile acids, and colonic transit in patients with irritable bowel syndrome [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013, 11 (10): 1270-1275. e1271.
- [5] Forman BM, Goode E, Chen J, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites [J]. *Cell*, 1995, 81 (5): 687-693.
- [6] Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, et al. Bile acids as regulatory molecules [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50 (8): 1509-1520.
- [7] Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, et al. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7 (8): 678-693.
- [8] Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83 (2): 633-671.
- [9] Dawson PA, Lan T, Rao A. Bile acid transporters [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50 (12): 2340-2357.
- [10] Dawson PA. Role of the intestinal bile acid transporters in bile acid and drug disposition [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, (201): 169-203.
- [11] Zheng MM, Wang RF, Li CX, et al. Two-step enzymatic synthesis of ursodeoxycholic acid with a new 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus torques* [J]. *Process Biochem*, 2015, 50 (4): 598-604.
- [12] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47 (2): 241-259.
- [13] Gérard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota [J]. *Pathogens*, 2013, 3 (1): 14-24.
- [14] Connors J, Dunn KA, Allott J, et al. The relationship between fecal bile acids and microbiome community structure in pediatric Crohn's disease [J]. *ISME J*, 2020, 14 (3): 702-713.
- [15] Palmer RH. Bile acid sulfates. II. Formation, metabolism, and excretion of lithocholic acid sulfates in the rat [J]. *J Lipid Res*, 1971, 12 (6): 680-687.
- [16] Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, et al. Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (14): 10638-10647.
- [17] Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis [J]. *Mol Cell*, 2000, 6 (3): 517-526.
- [18] Holt JA, Luo G, Billin AN, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis [J]. *Genes Dev*, 2003, 17 (13): 1581-1591.
- [19] Vijayvargiya P, Camilleri M, Carlson P, et al. Performance characteristics of serum C4 and FGF19 measurements to exclude the diagnosis of bile acid diarrhoea in IBS-diarrhoea and functional diarrhoea [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46 (6): 581-588.
- [20] Li WT, Luo QQ, Wang B, et al. Bile acids induce visceral hypersensitivity via mucosal mast cell-to-nociceptor signaling that involves the farnesoid X receptor/nerve growth factor/transient receptor potential vanilloid 1 axis [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (2): 2435-2450.
- [21] Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids [J]. *Science*, 1999, 284 (5418): 1362-1365.
- [22] Sun R, Yang N, Kong B, et al. Orally Administered berberine modulates hepatic lipid metabolism by altering microbial bile acid metabolism and the intestinal FXR signaling pathway [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91 (2): 110-122.
- [23] Shu XB, Li M, Cao Y, et al. Berberine alleviates non-alcoholic steatohepatitis through modulating gut microbiota mediated intestinal FXR activation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 750826.
- [24] Chen CQ, Tao CH, Liu ZC, et al. A randomized clinical trial of berberine hydrochloride in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Phytother Res*, 2015, 29 (11): 1822-1827.
- [25] Chen CQ, Lu ML, Pan QH, et al. Berberine improves intestinal motility and visceral pain in the mouse models mimicking diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) symptoms in an opioid-receptor dependent manner [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12): e0145556.
- [26] Lu YL, Huang JJ, Zhang Y, et al. Therapeutic effects of berberine hydrochloride on stress-induced diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats by inhibiting neurotransmission in colonic smooth muscle [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 596686.
- [27] Nozawa H. Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A (y) mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336 (3): 754-761.
- [28] Donoso F, Egerton S, Bastiaanssen TFS, et al. Polyphenols selectively reverse early-life stress-induced behavioural, neurochemical and microbiota changes in the rat [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 116: 104673.
- [29] Gu M, Feng YR, Chen YJ, et al. Deoxyschizandrin ameliorates obesity and non-alcoholic fatty liver disease: involvement of dual Farnesyl X receptor/G protein-coupled bile acid receptor 1 activation and leptin sensitization [J]. *Phytother Res*, 2023, 37 (7): 2771-2786.
- [30] Ma XF, Zhu ZH, Guo S, et al. The effect of deoxyschizandrin on chronic unpredictable mild stress-induced depression [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, 68 (1): 52-59.
- [31] Zhang GQ, Sun XH, Wen YJ, et al. Hesperidin alleviates cholestasis via activation of the farnesoid X receptor in vitro and in vivo [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 885: 173498.

- [32] Xi LL, Shi A, Shen TT, et al. Licraside as novel potent FXR agonist for relieving cholestasis: structure-based drug discovery and biological evaluation studies [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1197856.
- [33] Fu Y, Feng H, Ding X, et al. Alisol B 23-acetate adjusts bile acid metabolism via hepatic FXR-BSEP signaling activation to alleviate atherosclerosis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154120.
- [34] Meng Q, Chen XL, Wang CY, et al. Alisol B 23-acetate protects against ANIT-induced hepatotoxicity and cholestasis, due to FXR-mediated regulation of transporters and enzymes involved in bile acid homeostasis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 283 (3): 178-186.
- [35] Ricketts ML, Boekschoten MV, Kreeft AJ, et al. The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane X receptors [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21 (7): 1603-1616.
- [36] Post SM, de Roos B, Vermeulen M, et al. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (6): 1551-1556.
- [37] Guo YL, Peng Q, Hao LY, et al. Dihydroartemisinin promoted FXR expression independent of YAP1 in hepatocellular carcinoma [J]. *FASEB J*, 2022, 36 (6): e22361.
- [38] Xu WX, Lu CF, Zhang F, et al. Dihydroartemisinin counteracts fibrotic portal hypertension via farnesoid X receptor-dependent inhibition of hepatic stellate cell contraction [J]. *FEBS J*, 2017, 284 (1): 114-133.
- [39] Liu WM, Wong CW. Oleanolic acid is a selective farnesoid X receptor modulator [J]. *Phytother Res*, 2010, 24 (3): 369-373.
- [40] Liu JM, Liu JW, Meng C, et al. Oleanolic acid alleviates ANIT-induced cholestatic liver injury by activating FXR and Nrf2 pathways to ameliorate disordered bile acids homeostasis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154173.
- [41] Li TT, Xu LJ, Zheng RY, et al. Picroside II protects against cholestatic liver injury possibly through activation of farnesoid X receptor [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153153.
- [42] Sun XJ, Zhang Y, Cheng G, et al. Berberine improves DSS-induced colitis in mice by modulating the fecal-bacteria-related bile acid metabolism [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115430.
- [43] Wang JQ, Fu T, Dong RC, et al. Hepatoprotection of auraptene from the peels of citrus fruits against 17 α -ethinyl-estradiol-induced cholestasis in mice by activating farnesoid X receptor [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (7): 3839-3850.
- [44] Gao XG, Fu T, Wang CY, et al. Computational discovery and experimental verification of farnesoid X receptor agonist auraptene to protect against cholestatic liver injury [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 146: 127-138.
- [45] Epifano F, Genovese S, James Squires E, et al. Nelumal A, the active principle from *Ligularia nelumbifolia*, is a novel farnesoid X receptor agonist [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22 (9): 3130-3135.
- [46] Miyazaki T, Shirakami Y, Mizutani T, et al. Novel FXR agonist nelumal A suppresses colitis and inflammation-related colorectal carcinogenesis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 492.
- [47] Kong L, Dong RC, Huang K, et al. Yangonin modulates lipid homeostasis, ameliorates cholestasis and cellular senescence in alcoholic liver disease via activating nuclear receptor FXR [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153629.
- [48] Kong YL, Gao XG, Wang CY, et al. Protective effects of yangonin from an edible botanical Kava against lithocholic acid-induced cholestasis and hepatotoxicity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 824: 64-71.
- [49] Li GD, Lin WW, Araya JJ, et al. A tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, is a unique modulator of the farnesoid X receptor [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 258 (2): 268-274.
- [50] Wu ZJ, Shen J, Xu QM, et al. Epigallocatechin-3-gallate improves intestinal gut microbiota homeostasis and ameliorates *Clostridioides difficile* infection [J]. *Nutrients*, 2022, 14 (18): 3756.
- [51] Zhu HC, Jia XK, Fan Y, et al. Alisol B 23-acetate ameliorates azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced male murine colitis-associated colorectal cancer via modulating the composition of gut microbiota and improving intestinal barrier [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 640225.
- [52] Xia F, Li YX, Deng LJ, et al. Alisol B 23-acetate ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier dysfunction by inhibiting TLR4-NOX1/ROS signaling pathway in Caco-2 cells [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 911196.
- [53] Xiao Q, Zhang SJ, Ren HN, et al. Ginsenoside Rg₁ alleviates ANIT-induced intrahepatic cholestasis in rats via activating farnesoid X receptor and regulating transporters and metabolic enzymes [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 324: 109062.
- [54] Zhang R, Zhang QQ, Chen YN, et al. Combined treatment with Rg₁ and adipose-derived stem cells alleviates DSS-induced colitis in a mouse model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13 (1): 272.
- [55] He XY, Gao ZY, Liang W, et al. Ameliorative effect of ginsenoside Rg₁ on dextran sulfate sodium-induced colitis: involvement of intestinal barrier remodeling in mice [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10 (24): 1328.
- [56] Yan SC, Wang YJ, Li YJ, et al. Dihydroartemisinin regulates the Th/Treg balance by inducing activated CD4⁺ T cell apoptosis via heme oxygenase-1 induction in mouse models of inflammatory bowel disease [J]. *Molecules*, 2019, 24 (13): 2475.
- [57] Lei ZL, Yang YH, Liu SM, et al. Dihydroartemisinin ameliorates dextran sulfate sodium induced inflammatory bowel diseases in mice [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 100: 103915.
- [58] Zhang YM, Xu YW, Qi Y, et al. Protective effects of dioscin against doxorubicin-induced nephrotoxicity via adjusting FXR-mediated oxidative stress and inflammation [J]. *Toxicology*, 2017, 378: 53-64.
- [59] Jin SZ, Guan TX, Wang S, et al. Dioscin alleviates cisplatin-induced mucositis in rats by modulating gut microbiota, enhancing intestinal barrier function and attenuating TLR4/NF- κ B signaling cascade [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (8):

- 4431.
- [60] Liu MJ, Jin FJ, Zhang S, et al. Activation of farnesoid X receptor signaling by geniposidic acid promotes osteogenesis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154258.
- [61] Jiang P, Zhang Y, Li XJ, et al. Geniposidic acid attenuates DSS-induced colitis through inhibiting inflammation and regulating gut microbiota [J]. *Phytother Res*, 2023, 37 (8): 3453-3466.
- [62] Zhai ZY, Liu YC, Niu KM, et al. Oleanolic acid alleviate intestinal inflammation by inhibiting Takeda G-coupled protein receptor (TGR) 5 mediated cell apoptosis [J]. *Food Funct*, 2024, 15 (4): 1963-1976.
- [63] Dong N, Xue CY, Zhang L, et al. Oleanolic acid enhances tight junctions and ameliorates inflammation in Salmonella typhimurium-induced diarrhea in mice via the TLR4/NF- κ B and MAPK pathway [J]. *Food Funct*, 2020, 11 (1): 1122-1132.
- [64] Piao XH, Liu BH, Sui XD, et al. Picroside II improves severe acute pancreatitis-induced intestinal barrier injury by inactivating oxidative and inflammatory TLR4-dependent PI3K/AKT/NF- κ B signaling and improving gut microbiota [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3589497.
- [65] 丁薇. 熊果酸经 FXR 调控 OATP1B3 的表达及其机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [66] Zhang W, Gan DK, Jian J, et al. Protective effect of ursolic acid on the intestinal mucosal barrier in a rat model of liver fibrosis [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 956.
- [67] Chun J, Lee C, Hwang SW, et al. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates experimental colitis in mice [J]. *Life Sci*, 2014, 110 (1): 23-34.
- [68] Gu M, Zhang SY, Zhao YY, et al. Cycloastragenol improves hepatic steatosis by activating farnesoid X receptor signalling [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 121: 22-32.
- [69] Bagalagel A, Diri R, Noor A, et al. The therapeutic effects of cycloastragenol in ulcerative colitis by modulating SphK/MIP-1 α /miR-143 signalling [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2022, 131 (5): 406-419.
- [70] Hou QK, Zhu SL, Zhang CR, et al. Berberine improves intestinal epithelial tight junctions by upregulating A20 expression in IBS-D mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109206.
- [71] Tanaka T, de Azevedo MB, Durán N, et al. Colorectal cancer chemoprevention by 2 beta-cyclodextrin inclusion compounds of auraptene and 4'-geranyloxyferulic acid [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126 (4): 830-840.
- [72] Chen T, Jin NZ, Zhang Q, et al. Auraptene mitigates colitis induced by dextran sulfate sodium in mice by regulating specific intestinal flora and repairing the intestinal barrier [J]. *Inflammation*, 2024, doi: 10.1007/s10753-023-01965-5.
- [73] Deng YY, Zhang Z, Hong YZ, et al. Schisandrin A alleviates mycophenolic acid-induced intestinal toxicity by regulating cell apoptosis and oxidative damage [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2022, 32 (8): 580-587.
- [74] Gu BH, Minh NV, Lee SH, et al. Deoxyschisandrin inhibits H₂O₂-induced apoptotic cell death in intestinal epithelial cells through nuclear factor-kappaB [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26 (3): 401-406.
- [75] Zhang WF, Yang Y, Su X, et al. Deoxyschisandrin suppresses dss-induced ulcerative colitis in mice [J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2016, 22 (6): 448-455.
- [76] Wu ZH, Huang SM, Li TT, et al. Gut microbiota from green tea polyphenol-dosed mice improves intestinal epithelial homeostasis and ameliorates experimental colitis [J]. *Microbiome*, 2021, 9 (1): 184.
- [77] Cheng H, Liu J, Zhang DD, et al. Ginsenoside Rg₁ alleviates acute ulcerative colitis by modulating gut microbiota and microbial tryptophan metabolism [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 817600.
- [78] Camilleri M. Bile acid diarrhea: prevalence, pathogenesis, and therapy [J]. *Gut Liver*, 2015, 9 (3): 332-339.
- [79] Walters JR, Johnston IM, Nolan JD, et al. The response of patients with bile acid diarrhoea to the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2015, 41 (1): 54-64.
- [80] Camilleri M, Nord SL, Burton D, et al. Randomised clinical trial: significant biochemical and colonic transit effects of the farnesoid X receptor agonist tropifexor in patients with primary bile acid diarrhoea [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2020, 52 (5): 808-820.
- [81] Alemi F, Poole DP, Chiu J, et al. The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144 (1): 145-154.
- [82] Grider JR. Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307 (2): 460-467.
- [83] Humphrey PP, Bountra C, Clayton N, et al. Review article: the therapeutic potential of 5-HT₃ receptor antagonists in the treatment of irritable bowel syndrome [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999 (Suppl 2): 31-38.

(收稿日期: 2024-04-25; 修回日期: 2024-07-16)

植物类天然产物改善对乙酰氨基酚致肝损伤作用机制的研究进展

王有根¹, 杨志慧², 杨秀鸿³, 易吉平³, 曾明^{1*} (1. 中南大学湘雅公共卫生学院卫生毒理学系, 长沙 410013; 2. 西安交通大学第一附属医院癌症中心, 西安 710061; 3. 湖南省职业病防治院, 长沙 410021)

摘要: 对乙酰氨基酚 (APAP) 是应用最广泛的解热镇痛药之一, 过量服用可导致急性肝损伤, 甚至急性肝衰竭。近年来, 植物类天然产物因具有多靶点、多途径、低毒性等优点, 被广泛用于防治药物性肝损伤的研究。因此, 本文对 APAP 诱导肝损伤的发生情况和相关机制, 以及植物类天然产物改善 APAP 致肝损伤的作用机制研究进行综述, 以期防治 APAP 致肝损伤提供参考。

关键词: 植物类天然产物; 对乙酰氨基酚; 肝损伤

中图分类号: R965, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3304-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.026

Research progress in the mechanism of plant-derived natural products in ameliorating acetaminophen-induced liver injury

WANG You-gen¹, YANG Zhi-hui², YANG Xiu-hong³, YI Ji-ping³, ZENG Ming^{1*} (1. Department of Health Toxicology, Xiangya School of Public Health, Central South University, Changsha 410013; 2. Center of Cancer, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; 3. Hunan Prevention and Treatment Institute for Occupational Disease, Changsha 410021)

Abstract: Acetaminophen (APAP) is a widely used antipyretic and analgesic drug, but its overdose may lead to acute liver injury or even acute liver failure. Recently, plant-derived natural products have attracted much attention in preventing and treating drug-induced liver injury for their potential multi-target effects, multiple pathways, and low toxicity. This paper reviewed the incidence and mechanisms of APAP-induced liver injury, and the progress in the protective effects of plant-derived natural products against APAP-induced liver damage, to provide a reference for prevention and treatment of APAP-induced liver injury.

Key words: plant-derived natural compound; acetaminophen; liver injury

药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 是指由药物或其代谢产物引起的肝脏毒性作用, 进而影响肝脏代谢、解毒、免疫调节、消化等重要功能。除处方药外, 包括生物制剂、中药、保健品、膳食补充剂及其代谢产物在内的各种药物都可能导致 DILI^[1-2]。其中, 对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是一种解热镇痛药, 在治疗剂量下具有良好的治疗效果, 是数百种非处方和处方药的主要成分。但其过量服用可能会导致急性肝损伤 (acetaminophen-induced liver injury, AILI)^[3]。

天然产物主要包括植物、动物和矿物, 其原料药是现代医学理论指导下使用的天然药用物质、天然提取物及复合物等。植物类天然产物主要包括多糖类、黄酮类、萜类、多酚类和生物碱类等化合物^[4], 具有来源广、生物利用度高、不良反应少、多靶点、多途径的优点^[5]。已有研究表明, 植物类天然产物具备抗肝损伤的生理活性, 如 Kong 等^[6]发现青蒿琥酯能够通过调节肝星状细胞铁蛋白吞噬介导的铁死亡来减轻四氯化碳诱导的肝纤维化。因此, 本文针对 AILI 的发生

基金项目: 湖南省自然资源科技计划项目 (No.20230136ST); 湖南省卫生健康委科研计划课题 (No. D202312046214); 中南大学研究生自主探索创新项目 (No.2024ZZTS0895)。

作者简介: 王有根, 男, 硕士研究生, 主要从事药物毒理学研究, email: 15717381014@163.com * **通信作者:** 曾明, 女, 教授, 主要从事环境毒理学和药物毒理学研究, email: zengming@csu.edu.cn

情况和致病机制, 以及植物类天然产物改善 AILI 的相关作用机制进行综述, 以期研发防治 AILI 安全有效的药物提供新思路。

1 APAP 致肝损伤的发生情况及机制

治疗剂量下的 APAP 通常是安全的, 当 APAP 过量时则会导致肝损伤甚至急性肝衰竭。在美国, 每年约有 30 000 名患者因 APAP 肝毒性而入院治疗, 过量服用容易发生肝衰竭并导致肝移植的转诊^[7]。虽然大多数 APAP 过量患者表现为症状较轻的不良反应, 如肝炎, 无症状的谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 升高, 但 APAP 肝毒性导致的急性肝衰竭约占急性肝衰竭诊断的 48%^[8]。在我国, APAP 导致的急性肝衰竭仅占所有 DILI 的 5% 左右, 并不是导致 DILI 的主要诱因^[9]。但随着 APAP 和阿片类药物联合镇痛药的出现, 以及居民对解热镇痛药物的不规范使用, 使更多的患者面临 APAP 肝毒性的风险。由此可见, APAP 肝毒性是一个重要的公共卫生问题。

正常情况下, APAP 经过血液循环后会在肝脏中分别与葡糖醛酸基转移酶和巯基转移酶结合生成无毒化合物, 然后随尿液排出体外, 此过程通常可代谢 85%~90% 的 APAP^[8]; 剩下 5%~9% 的 APAP 在细胞色素 P450 酶 (CYP450) 系统中进行代谢, 其中以 CYP2E1 酶作用最为显著, 生成高活性毒性产物 *N*-乙酰-对苯二酚亚胺 (*N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine, NAPQI)^[10]。服用治疗剂量的 APAP 时, NAPQI 会迅速与谷胱甘肽 (GSH) 结合而被解毒为无害的代谢物, 然后随尿液排出。

然而, 当机体接触过量的 APAP 时, 葡糖醛酸化或硫酸化途径会饱和, 使大量的 NAPQI 与 GSH 结合, 造成 GSH 耗竭, 从而导致 NAPQI 蓄积^[11]。过量的 NAPQI 无法代谢排出, 会进一步与肝细胞中蛋白尤其是线粒体蛋白共价结合形成蛋白加合物, 其中一种重要的谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 被 NAPQI 加合后, 其酶活性降低 60%, 从而诱导线粒体发生氧化应激, 产生大量的超氧化物^[12-13]。这些超氧阴离子一部分经由超氧化物歧化酶 (SOD) 转化为过氧化氢, 另一部分与一氧化氮 (NO) 反应生成过氧亚硝酸盐——一种被认为是 APAP 引发肝脏损伤的重要强氧化剂^[14]。此外, 大量活性氧 (ROS) 和蓄积的 NAPQI 会通过多种途径激活线粒体外 c-Jun-N 末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK), 使其与凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1) 解离后发生磷酸化易位至新的线粒体中, 从而放大线粒体氧化应激, 形成恶性循环, 导致线粒体通透性转变 (mitochondrial permeability transition,

MPT) 孔的开放, 使膜电位崩溃和三磷酸腺苷 (ATP) 合成停止^[15]。线粒体膜电位的崩溃会导致外膜破裂, 蛋白质从膜间大量释放, 如核酸内切酶 G 以及凋亡诱导因子 (AIF), 两者可易位至细胞核中, 诱导核 DNA 断裂, 引起肝细胞坏死^[16]。坏死的肝细胞会刺激大量损伤相关分子模式因子 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 分泌, 进一步激活肝脏库普弗细胞 (Kupffer cells, KCs), 活化的 KCs 会产生大量促炎因子和趋化因子, 募集众多单核细胞/巨噬细胞、中性粒细胞在损伤处, 进而诱导过度的无菌性炎症, 导致损伤无法及时再生修复^[17]。最终造成以肝小叶中心坏死为主要特征的严重损伤^[18]。

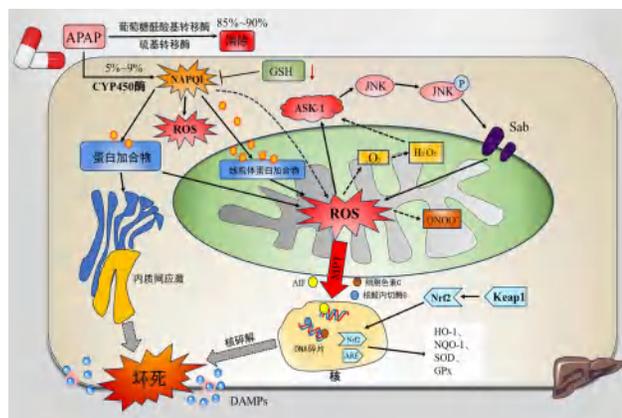


图 1 APAP 引起肝脏损伤相关作用机制

Fig 1 Mechanisms of liver injury induced by acetaminophen

2 植物类天然产物对 APAP 致肝损伤的保护作用及机制

植物类天然产物具有巨大的治疗潜力, 目前许多临床药物以植物源性天然产物或其衍生物为主要治疗成分, 其中具有代表性的就是吗啡、咖啡因以及秋水仙素等^[19-20]。近期的众多研究提示植物类天然产物可以通过多种方式在 AILI 模型中发挥保护作用^[21]。尽管某些治疗方式可能需要进一步验证, 但它们为治疗 APAP 致肝损伤的药物开发提供了重要的参考, 其中具有代表性的主要为以下几种作用机制。

2.1 激活 Nrf2, 增强抗氧化系统

核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是肝脏抗氧化反应基因的主要调节因子。正常情况下, Nrf2 在肝脏中通过与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 结合而被抑制, 从而保持低活性状态。然而, 当生理条件发生变化时, ROS 可氧化 Keap1 中的巯基, 导致 Nrf2 释放并易位到细胞核, 从而上调抗氧化防御酶的表达, 包括 GPx、SOD 和血红素氧合酶 -1 (heme

oxygenase-1, HO-1) 等。因此, Nrf2 是限制氧化应激的重要内源性手段^[22]。有研究发现, 在一次性大剂量注射 APAP 后, 与野生型 (WT) 小鼠相比, Nrf2 敲除小鼠的血浆 ALT 活性显著升高, 死亡率也显著增加; 并且在小鼠肝组织中也发现 APAP 蛋白加合物增多, GSH 合成酶有所减少^[23]。

在植物类天然产物中, 许多化合物被发现能够通过不同机制激活 Nrf2 信号通路, 从而增强肝脏的抗氧化防御机制, 减轻 APAP 诱导的肝损伤。其中蒲公英水溶性多糖通过降低抑制性蛋白 Keap1 的表达进而诱导 Nrf2 活化, 导致下游抗氧化蛋白包括 NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 (NQO1) 和 HO-1 的表达增加, 抗氧化酶 GSH、GPx、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 表达水平呈剂量依赖性增加, 进而预防 APAP 引起的肝氧化损伤^[24]。槲皮苷是一种广泛存在于植物中的黄酮类单体化合物, 具有抗氧化^[25]、抗炎^[26] 和增强免疫^[27] 活性。在 APAP 肝损伤小鼠模型中, 槲皮苷通过激活 Nrf2/ARE 途径及其下游抗氧化因子, 恢复抗氧化酶 SOD、GPx 活性, 减轻炎症^[28]。在我国由黄芩苷制成的片剂和胶囊已在临床上用于急慢性肝炎的治疗中^[29]。研究发现, 黄芩苷能够通过降低磷酸化蛋白磷酸酶 2A-A 亚基 (PP2A-A) 和丝裂原活化蛋白激酶 -1 (MAPK phosphatase-1, MKP-1) 的表达从而诱导细胞外信号调节激酶 1 和 2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, ERK1/2) 及蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的持续磷酸化, 最终导致 Nrf2 增加及随后的核积累, 更多地与核内抗氧化应答元件 (ARE) 结合, 增强肝脏细胞对氧化应激和毒性物质的抵抗能力^[30]。人参皂苷也同样通过促进 Nrf2 核转位, 调节 GSH 的合成、结合和分泌, 剂量依赖性地拮抗 APAP 小鼠急性药物性肝损伤^[31]。灵芝总三萜则在 APAP 诱导的 Wistar 大鼠急性肝损伤模型中通过上调肝组织 Nrf2 下游靶基因 *HO-1* 的表达, 从而增加 GSH 和 SOD 的活性, 提高机体内的抗氧化能力, 减轻 AILI^[32]。柯里拉京是一种从叶下珠和老鹳草中提取出来的天然多酚化合物。在实验中, 柯里拉京可以通过增强 AMPK/GSK3 β 途径刺激诱导 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的激活, 增强小鼠肝脏的抗氧化能力, 最终降低 APAP 诱发的小鼠死亡率和肝毒性^[33]。山柰酚则通过阻止 Nrf2 与 Keap1 结合来上调小鼠肝脏和 L02 肝细胞中的 GPx4 以抑制 APAP 诱导的铁死亡进而减轻 APAP 诱导的肝损伤, 分子对接结果也表明山柰酚与 Keap1 存在潜在的相互作用^[34]。综上所述, 植物类天然产物可以通过解离 Keap1-Nrf2 复合物、促

进 Nrf2 的核转位以及激活下游抗氧化基因表达 (如 NQO1、HO-1 等), 显著增强肝脏的抗氧化防御机制从而减轻 APAP 诱导的肝损伤, 揭示了植物天然产物在肝脏保护中的潜力。

2.2 抑制 CYP450 酶的代谢, 减少 NAPQI 的产生

CYP450 通常被认为可以代谢大多数外来化学物质^[35], 而其中与 APAP 代谢相关的主要亚型分别是 CYP2E1、CYP1A2 和 CYP3A4, 其中最关键的代谢酶是 CYP2E1^[36]。超剂量的 APAP 在进入人体后大部分由葡糖醛酸基转移酶和硫酸基转移酶代谢成无毒物质经尿液和血液排出体外, 但仍存在部分 APAP 会在 CYP450 酶系统下代谢为高毒性物质 NAPQI。因此, 有学者认为抑制 CYP450 酶系统的功能减少 NAPQI 的产生或许对治疗有所帮助。研究显示, 4-甲基吡唑 (4-methylpyrazole) 在体内外实验中通过抑制 CYP2E1 的表达, 造成 NAPQI 与细胞蛋白螯合物的减少从而改善 APAP 过量肝脏损伤^[37]。

而在植物类天然产物中, 桑黄多糖通过其配体与 CYP2E1 结合, 从而抑制 APAP 代谢成高毒产物 NAPQI, 降低小鼠体内 APAP 过量时的氧化应激和炎症状态^[38]。水飞蓟素是治疗肝脏疾病常见的药物, 在临床上被广泛使用^[39]。Yang 等^[40] 的实验发现, 水飞蓟素能够降低大鼠体内 CYP2E1 的酶活性, 减少 CYP2E1 介导的药物代谢进而减轻肝损伤。紫杉醇作为一种结构复杂且独特的四环二萜类天然产物, 其通过降低 AILI 小鼠肝组织中 CYP2E1 以及 CYP3A4 的蛋白表达, 使小鼠肝脏病理损伤减轻^[41]。甘草次酸在 100 mg·kg⁻¹ 剂量下预处理小鼠, 通过抑制 CYP2E1 的表达, 进而提高 GSH 水平, 并使肝脏中一系列炎症因子如高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 的含量明显减少, 降低 AILI 小鼠肝组织中肝细胞的坏死凋亡以及炎症细胞的浸润水平^[42]。迷迭香酸是一种天然酚, 具有抗氧化的作用。Hasanein 等^[43] 通过使用迷迭香酸预处理雄性 Wistar 大鼠一周后进行 APAP 腹腔注射, 发现迷迭香酸能够显著抑制 CYP2E1 活性, 改善肝脏中 GSH 的含量, 保护肝脏免受 APAP 诱发的损伤。非瑟酮是一种膳食性的多酚类黄酮, 可通过抑制 CYP2E1 发挥保肝作用^[44]。和厚朴酚是一种从厚朴树皮提取的生物活性成分, 能够抑制另一种 CYP450 酶亚型 CYP1A2 的活性, 减少 APAP 蛋白加合物的生成从而改善 APAP 引起的肝损伤^[45]。综上所述, 植物类天然产物通过抑制 CYP450 酶的代谢从而减少有毒代谢产物 NAPQI 的产生, 也是保护肝脏病变的可行方式之一。

2.3 减轻线粒体功能障碍

线粒体是细胞内有氧呼吸及能量代谢的主要场所,也是影响细胞生存/死亡及信号传导的重要细胞器^[46]。APAP 过量后,线粒体内锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)水平减少、线粒体氧化应激和过氧化氢通过多种途径激活 MAPK 激酶 JNK,导致其磷酸化并易位到新的线粒体内,加剧线粒体氧化应激并进一步造成线粒体膜 MPT 孔的失控,这些过程都在 APAP 诱导的肝损伤中发挥着关键作用^[47]。因此,靶向调节线粒体损伤对于防护 APAP 肝毒性也具有重要的应用价值。

岩藻依聚糖为从褐海藻中提取的硫酸化多糖。Wang 等^[48]发现岩藻依聚糖通过减弱氧化应激诱导的 JNK 易位以及线粒体 MPT 孔的开放,最终改善 APAP 肝毒性。水飞蓟素在 100 mg/(kg·d) 剂量下预处理小鼠 3 d 后,同样显著降低了 JNK 的表达和磷酸化,减轻了 APAP 过量小鼠肝脏中炎症因子表达以及小鼠肝脏病理损伤^[49]。醉茄素 A 是一种从醉茄植物中提取的甾体内酯,通常被认为具有抗氧化活性^[50]。Jadeja 等^[50]则发现醉茄素 A 通过减轻因 JNK 和 Bax 活化导致的线粒体功能的障碍从而改善 APAP 过量引起的肝损伤。小檗碱预处理通过抑制线粒体外 JNK 磷酸化,从而阻止 APAP 诱导线粒体 MPT 孔的开放以及随后的核 DNA 断裂,显著降低促炎细胞因子、HMGB1、p-p65 和 cleaved caspase-1 的表达,并抑制巨噬细胞和中性粒细胞的浸润^[51]。悬铃木苷是一种潜在的新型四分子植物药物抗生素,可有效对抗耐药传染病。而在 APAP 过量肝损伤小鼠模型中,悬铃木苷处理抑制了线粒体膜外 JNK 的活化以及与线粒体膜上转导和转录激活因子结合蛋白(signal transducer and activator of transcription-binding protein, Sab)的结合,从而减少对线粒体的损伤,减轻因 APAP 诱导的肝损伤^[52]。由此可见,利用植物类天然产物靶向调节减轻线粒体功能障碍对治疗 APAP 诱导的肝损伤具有较大应用潜力。

2.4 增强自噬功能

自噬是蛋白质和细胞器降解的细胞过程^[53]。在 APAP 过量导致的肝脏损伤中,一旦 GSH 耗尽,NAPQI 与许多细胞蛋白(尤其是线粒体蛋白)形成蛋白加合物,这些 APAP 蛋白加合物就会导致线粒体损伤和肝细胞坏死。而作为维持细胞稳态的重要机制,自噬可以去除 APAP 蛋白加合物和受损的线粒体,从而防止 APAP 诱导的肝细胞坏死^[54]。有研究发现二甲双胍可通过增强线粒体自噬的能力,从而减轻因 APAP 过多造成的线粒体氧化应激和线粒体功能障碍^[55]。在 APAP 处理的原代肝细胞中,使用 p62 蛋白也能促进 APAP 蛋白加合物的自噬清除,进而减少 APAP 诱导的肝毒性^[56]。因此,增强

自噬是对抗 APAP 肝毒性的一个有前景的方式。

紫锥菊多糖通过促进 Parkin 蛋白诱导线粒体发生依赖性自噬,从而改善由 APAP 诱导的小鼠肝损伤;并且在体外实验中,紫锥菊多糖处理后的 L02 肝细胞在透射电子显微镜下可以观看到细胞内自噬泡数量明显增长,导致 L02 肝细胞坏死数减少^[57]。阿魏酸是一种广泛存在于自然界的酚类化合物,在诸如坚果、西红柿和当归等植物中均有发现^[58]。Wu 等^[59]的研究证实,阿魏酸可以通过增加自噬通量从而减轻 APAP 诱导的肝损伤,并且通过网络药理学分析和体外 HepG2 细胞实验发现,阿魏酸主要依靠 AMPK 磷酸化来增强自噬。除此之外,桑黄多糖在 80 mg·kg⁻¹ 剂量下可以显著上调 AILI 小鼠肝脏中自噬相关蛋白 7 (AuTophagy 7, ATG7)、ATG12、ATG5 和 ATG3 水平从而减轻 APAP 肝毒性^[60]。而 ATG 基因对于自噬的调节至关重要,ATG7 调节自噬体的大小,ATG12 则促进自噬体的形成^[17]。异柚皮素是从传统中药柑橘皮中分离出来的主要生物活性成分之一。在 APAP 处理的小鼠和肝细胞中,异柚皮素通过增强 PPP3/钙调神经磷酸酶活性,导致转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 去磷酸化和核转位,进而激活自噬溶酶体途径,从而使一系列与自噬、溶酶体水解酶、溶酶体膜和溶酶体酸化相关基因的蛋白和 mRNA 表达升高,最终改善 APAP 诱导的氧化应激和肝损伤^[61]。荷叶碱是从荷花中分离出来的一种阿朴啡生物碱^[62],可通过疏水接触和氢键从而与一系列自噬蛋白(如 LC3-II、Beclin 1 等)结合并使其表达水平呈剂量依赖性增加,进而诱导自噬改善 APAP 诱导的 AILI^[63]。上述研究表明,通过增强自噬的方式减轻 APAP 引起的肝损伤,也是许多植物类天然产物对肝脏保护的一种方式。

2.5 减轻细胞内质网应激

维持细胞蛋白质稳态是细胞健康的关键。为了维持这种稳态,内质网会采用多种机制来控制蛋白质合成、折叠、细胞内运输以及调节蛋白质降解^[64]。而进入内质网中新合成的多肽链和离开内质网的折叠蛋白质之间的不平衡会导致未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网中积累,进而引起内质网应激^[65]。多项研究表明,内质网应激是 APAP 引起肝损伤反应级联的事件之一^[66-67]。Paridaens 等^[68]的研究发现内质网应激抑制剂牛磺熊去氧胆酸与 N-乙酰半胱氨酸联合应用对 APAP 所致肝损伤的治疗效果优于常规治疗。提示通过植物类天然产物来调控内质网应激信号可能也是降低 APAP 肝毒性的重要策略。

红景天苷是一种苯丙素类糖苷化合物,是红

景天根的主要成分。Xu 等^[69]的研究发现,以 100 mg·kg⁻¹ 的剂量腹腔内注射红景天苷可以通过激活 AMPK/SIRT1 信号通路从而抑制内质网应激,减轻 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤。同样,在金合欢素预处理的小鼠中,内质网应激相关 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP)、激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 和磷酸化内质网激酶 (p-PERK) 表达明显降低,从而有效降低了 APAP 处理小鼠血清 ALT、AST 和碱性磷酸酶 (ALP) 水平^[70]。冬凌草甲素作为一种二萜类化合物,具有抗炎^[71]、抗肿瘤^[72]、抗氧化^[73] 特性,在前期研究发现冬凌草甲素可预防四氯化碳以及脂多糖 (LPS) 引起的急性肝损伤^[74]。而 Yu 等^[75] 的研究发现,冬凌草甲素以 ATF4/PGC-1 α 依赖的方式抑制由线粒体功能障碍和内质网应激引起的氧化应激,从而有效预防 APAP 诱导的急性肝损伤。在另外一项实验中,木犀草素降低了 ATF4 和 CHOP 水平,表明木犀草素对 APAP 肝损伤的保护作用也可能是由于其抗内质网应激的能力^[76]。显然,通过利用植物类天然产物调节内质网应激,为开发更有效的 APAP 肝损伤治疗策略提供了有益的启示。

3 结语

综上,植物类天然产物可以从增强抗氧化、减少 APAP 代谢毒物产生、减轻线粒体功能障碍、激活自噬以及调节内质网应激等方面发挥抗肝损伤保护作用。并且随着计算机药理学的兴起,以及纳米颗粒与药物提取物分子对接技术的发展,天然产物药物的开发将更加深入。

在目前植物类天然产物对 APAP 致肝损伤的保护研究中,研究模式仍存在很多不足,多数研究仍侧重于检测血清及肝脏生化指标、肝脏病理组织变化来判断对肝损伤改善的效果,缺乏对天然产物在体内代谢转运的具体评估。对于天然产物抗肝损伤的分子作用机制方面的研究也不够深入。此外,动物模型之间造模剂量差异较大、造模时间点和给药方法不统一、动物模型研究中需天然产物单体成分进行研究等,导致大部分研究成果以实验结果为主,缺少临床应用。以在上述研究中发现的造模时间点问题为例,APAP 致肝损伤造模是在水飞蓟素预处理长达 21 d 之后进行的^[40],而这显然与患者因 APAP 致肝损伤之后再入院治疗的情况不符。并且在动物模型方面,只有小鼠和小鼠肝细胞因 APAP 引起的肝损伤病理生理学才与人类相接近^[77]。但已发表的研究中,却有使用大鼠模型的。因此,合理筛选动物模型、制订良好的实验设计,深入研究植物类天然产物对 APAP 诱导的肝损伤的保护

作用及机制仍将是今后的研究重点。

参考文献

- [1] Chalasani N, Fontana R, Watkins PB, et al. Drug induced liver injury network (DILIN) prospective study: initial results: 375 [J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101: S169.
- [2] Devarbhavi H. An update on drug-induced liver injury [J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2012, 2 (3): 247-259.
- [3] Daifallah A, Jabr R, Al-Tawil F, et al. An assessment of parents' knowledge and awareness regarding paracetamol use in children: a cross-sectional study from Palestine [J]. *BMC Public Health*, 2021, 21 (1): 380.
- [4] 彭清, 孙柳, 苗雪圆, 等. 天然产物化合物作为肿瘤免疫调节剂的研究进展 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2021, 27 (1): 136-140.
- [5] 杨杰, 丁雅雪, 宗艺璇, 等. 天然产物通过 GSH 在防治肝病中的作用及机制研究 [J]. *药学研究*, 2020, 39 (4): 225-228.
- [6] Kong ZY, Liu R, Cheng YR. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway [J]. *Bio Pharm*, 2019, 109: 2043-2053.
- [7] Blieden M, Paramore LC, Shah D, et al. A perspective on the epidemiology of acetaminophen exposure and toxicity in the United States [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2014, 7 (3): 341-348.
- [8] Bunchorntavakul C, Reddy KR. Acetaminophen-related hepatotoxicity [J]. *Clin Liver Dis*, 2013, 17 (4): 587-607.
- [9] 沈毅, 黄昕, 王誉雅, 等. 我国药物性肝损伤流行病学研究现状 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34 (6): 1152-1155.
- [10] Jaeschke H, McGill MR. Cytochrome P450-derived versus mitochondrial oxidant stress in acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 235 (3): 216-217.
- [11] Ohashi N, Kohno T. Analgesic effect of acetaminophen: a review of known and novel mechanisms of action [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 580289.
- [12] Tirmenstein MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265 (6): 3059-3065.
- [13] Du K, Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: sources, pathophysiological role and therapeutic potential [J]. *Redox Biol*, 2016, 10: 148-156.
- [14] 张玉. 基于转录组学探究 GDF15 与 IER2 在对乙酰氨基酚致小鼠肝损伤中的作用及机制 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2023.
- [15] Win S, Than TA, Min RW, et al. c-Jun N-terminal kinase mediates mouse liver injury through a novel Sab (SH3BP5)-dependent pathway leading to inactivation of intramitochondrial Src [J]. *Hepatology*, 2016, 63 (6): 1987-2003.
- [16] Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Drug Metab Rev*, 2012, 44 (1): 88-106.
- [17] Tan QH, Liu YJ, Deng XY, et al. Autophagy: a promising

- process for the treatment of acetaminophen-induced liver injury [J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94 (9): 2925-2938.
- [18] Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 144 (3): 279-288.
- [19] Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33 (8): 1582-1614.
- [20] David B, Wolfender JL, Dias DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2015, 14: 299-315.
- [21] Che CT, Zhang H. Plant natural products for human health [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (4): 830.
- [22] McGill MR, Hinson JA. The development and hepatotoxicity of acetaminophen: reviewing over a century of progress [J]. *Drug Metab Rev*, 2020, 52 (4): 472-500.
- [23] Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, et al. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes [J]. *Toxicol Sci*, 2001, 59 (1): 169-177.
- [24] Cai L, Wan D, Yi F, et al. Purification, preliminary characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from Dandelion root [J]. *Molecules*, 2017, 22 (9): 1409.
- [25] Ham YM, Yoon WJ, Park SY, et al. Quercitrin protects against oxidative stress-induced injury in lung fibroblast cells via up-regulation of Bcl-xL [J]. *J Funct Foods*, 2012, 4 (1): 253-262.
- [26] Choi SJ, Tai BH, Cuong NM, et al. Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratoxylum formosum*) [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2012, 21 (2): 587-595.
- [27] Cruz EA, Da-Silva SA, Muzitano MF, et al. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8 (12): 1616-1621.
- [28] Truong VL, Ko SY, Jun M, et al. Quercitrin from *Toona sinensis* (Juss.) M. Roem. attenuates acetaminophen-induced acute liver toxicity in HepG2 cells and mice through induction of antioxidant machinery and inhibition of inflammation [J]. *Nutrients*, 2016, 8 (7): 431.
- [29] 刘仁伟, 刘冰. 黄芩苷胶囊联合胸腺法新治疗慢性乙型肝炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33 (12): 3312-3316.
- [30] Shi L, Hao ZX, Zhang SB, et al. Baicalein and baicalin alleviate acetaminophen-induced liver injury by activating Nrf2 antioxidative pathway: the involvement of ERK1/2 and PKC [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 150: 9-23.
- [31] Ning CQ, Gao XG, Wang CY, et al. Ginsenoside Rg₁ protects against acetaminophen-induced liver injury via activating Nrf2 signaling pathway in vivo and in vitro [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2018, 98: 58-68.
- [32] 敖艳霞, 冯彩玲, 吴岩斌, 等. 灵芝总三萜对对乙酰氨基酚肝损伤的保护作用 [J]. *海峡药学*, 2022, 34 (4): 8-12.
- [33] Lv HM, Hong LH, Tian Y, et al. Corilagin alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via enhancing the AMPK/GSK3 β -Nrf2 signaling pathway [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17 (1): 2.
- [34] Li HY, Weng QQ, Gong S, et al. Kaempferol prevents acetaminophen-induced liver injury by suppressing hepatocyte ferroptosis via Nrf2 pathway activation [J]. *Food Funct*, 2023, 14 (4): 1884-1896.
- [35] Gonzalez FJ, Kimura S. Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 409 (1): 153-158.
- [36] Sinclair J, Jeffery E, Wrighton S, et al. Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: role of CYP2E and CYP3A [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55 (10): 1557-1565.
- [37] Pourbagher-Shahri AM, Schimmel J, Shirazi FM, et al. Use of fomepizole (4-methylpyrazole) for acetaminophen poisoning: a scoping review [J]. *Toxicol Lett*, 2022, 355: 47-61.
- [38] Chen C, Liu X, Qi SS, et al. Hepatoprotective effect of *Phellinus linteus* mycelia polysaccharide (PL-N1) against acetaminophen-induced liver injury in mouse [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 1276-1284.
- [39] Abenavoli L, Capasso R, Milic N, et al. Milk thistle in liver diseases: past, present, future [J]. *Phytother Res*, 2010, 24 (10): 1423-1432.
- [40] Yang WP, Liang ZX, Wen CM, et al. Silymarin protects against acute liver injury induced by acetaminophen by down-regulating the expression and activity of the CYP2E1 enzyme [J]. *Molecules*, 2022, 27 (24): 8855.
- [41] Hu C, Ye JW, Zhao LC, et al. 5, 7, 3', 4'-flavan-ol (taxifolin) protects against acetaminophen-induced liver injury by regulating the glutathione pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 236: 116939.
- [42] Yang GL, Zhang L, Ma L, et al. Glycyrrhetic acid prevents acetaminophen-induced acute liver injury via the inhibition of CYP2E1 expression and HMGB1-TLR4 signal activation in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 186-193.
- [43] Hasanein P, Sharifi M. Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Wistar rats [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55 (1): 1809-1816.
- [44] Ugan RA, Cadirci E, Un H, et al. Fisetin attenuates paracetamol-induced hepatotoxicity by regulating CYP2E1 enzyme [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2023, 95 (2): e20201408.
- [45] Miao XL, Jin CT, Liu J, et al. Honokiol attenuates acetaminophen-induced acute liver injury by inhibiting hepatic CYP1A2 activity and improving liver mitochondrial dysfunction [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15 (2): 231-239.
- [46] 伍敏, 金虹, 李可欣, 等. 对乙酰氨基酚致肝损伤的线粒体机制研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37 (5): 393-400.
- [47] Cai XP, Cai HQ, Wang J, et al. Molecular pathogenesis of acetaminophen-induced liver injury and its treatment options [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2022, 23 (4): 265-285.
- [48] Wang YQ, Wei JG, Tu MJ, et al. Fucoidan alleviates acet-

- aminophen-induced hepatotoxicity via oxidative stress inhibition and Nrf2 translocation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (12): 4050.
- [49] Papackova Z, Heczkova M, Dankova H, et al. Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (1): e0191353.
- [50] Jadeja RN, Urrunaga NH, Dash S, et al. Withaferin-A reduces acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 97 (1): 122-132.
- [51] Zhao Z, Wei QY, Hua WW, et al. Hepatoprotective effects of berberine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1319-1326.
- [52] Samuvel DJ, Nguyen NT, Jaeschke H, et al. Platanosides, a potential botanical drug combination, decrease liver injury caused by acetaminophen overdose in mice [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85 (7): 1779-1788.
- [53] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147 (4): 728-741.
- [54] Ni HM, Bockus A, Boggess N, et al. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *Hepatology*, 2012, 55 (1): 222-232.
- [55] Du K, Ramachandran A, Weemhoff JL, et al. Editor's highlight: metformin protects against acetaminophen hepatotoxicity by attenuation of mitochondrial oxidant stress and dysfunction [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 154 (2): 214-226.
- [56] Ni HM, McGill MR, Chao X, et al. Removal of acetaminophen protein adducts by autophagy protects against acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *J Hepatol*, 2016, 65 (2): 354-362.
- [57] Yu TD, He YN, Chen HT, et al. Polysaccharide from *Echinacea purpurea* plant ameliorates oxidative stress-induced liver injury by promoting Parkin-dependent autophagy [J]. *Phyto-medicine*, 2022, 104: 154311.
- [58] 朱舜明, 张荣怀, 张学军, 等. 阿魏酸通过磷酸肌醇 3 激酶 / 丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶途径保护大鼠免受心肌缺血 / 再灌注损伤 [J]. *安徽医药*, 2022, 26 (11): 2203-2208, 2333.
- [59] Wu JZ, Zhou F, Fan GF, et al. Ferulic acid ameliorates acetaminophen-induced acute liver injury by promoting AMPK-mediated protective autophagy [J]. *IUBMB Life*, 2022, 74 (9): 880-895.
- [60] Zhao LL, Zheng LW, Li Z, et al. *Phellinus linteus* polysaccharides mediates acetaminophen-induced hepatotoxicity via activating AMPK/Nrf2 signaling pathways [J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14 (17): 6993-7002.
- [61] Fang ZY, Xu YY, Liu GW, et al. Narirutin activates TFEB (transcription factor EB) to protect against acetaminophen-induced liver injury by targeting PPP3/calcineurin [J]. *Autophagy*, 2023, 19 (8): 2240-2256.
- [62] Tong YL, Li ZW, Wu YK, et al. Lotus leaf extract inhibits ER (—) breast cancer cell migration and metastasis [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2021, 18 (1): 20.
- [63] Zhou ZX, Qi J, Wu YJ, et al. Nuciferine effectively protects mice against acetaminophen-induced liver injury [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12 (4): 949.
- [64] Sala AJ, Bott LC, Morimoto RI. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216 (5): 1231-1241.
- [65] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (7): 519-529.
- [66] Tak J, Kim YS, Kim TH, et al. α (12) overexpression in hepatocytes by ER stress exacerbates acute liver injury via ROCK1-mediated miR-15a and ALOX12 dysregulation [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (4): 1570-1588.
- [67] Li LJ, Wang HT, Zhang J, et al. SPHK1 deficiency protects mice from acetaminophen-induced ER stress and mitochondrial permeability transition [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27 (6): 1924-1937.
- [68] Paridaens A, Raevens S, Colle I, et al. Combination of tauroursodeoxycholic acid and *N*-acetylcysteine exceeds standard treatment for acetaminophen intoxication [J]. *Liver Int*, 2017, 37 (5): 748-756.
- [69] Xu J, Zhao LY, Zhang XT, et al. Salidroside ameliorates acetaminophen-induced acute liver injury through the inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated ferroptosis by activating the AMPK/SIRT1 pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 262: 115331.
- [70] Miao JE, Yao SJ, Sun H, et al. Protective effect of water-soluble acacetin prodrug on APAP-induced acute liver injury is associated with upregulation of PPAR γ and alleviation of ER stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (14): 11320.
- [71] He HB, Jiang H, Chen Y, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 2550.
- [72] Liu X, Xu JM, Zhou J, et al. Oridonin and its derivatives for cancer treatment and overcoming therapeutic resistance [J]. *Genes Dis*, 2021, 8 (4): 448-462.
- [73] Li L, Cheng SQ, Guo W, et al. Oridonin prevents oxidative stress-induced endothelial injury via promoting Nrf-2 pathway in ischaemic stroke [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (20): 9753-9766.
- [74] Liu D, Qin HL, Yang BX, et al. Oridonin ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through inhibition of the NLRP3 inflammasome [J]. *Drug Dev Res*, 2020, 81 (4): 526-533.
- [75] Yu DS, Li JY, Wang Y, et al. Oridonin ameliorates acetaminophen-induced acute liver injury through ATF4/PGC-1 α pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2023, 84 (2): 211-225.
- [76] Tai MH, Zhang JY, Song SD, et al. Protective effects of luteolin against acetaminophen-induced acute liver failure in mouse [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 27 (1): 164-170.
- [77] Jaeschke H, Adelusi OB, Akakpo JY, et al. Recommendations for the use of the acetaminophen hepatotoxicity model for mechanistic studies and how to avoid common pitfalls [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (12): 3740-3755.

(收稿日期: 2024-07-17; 修回日期: 2024-09-10)

天然产物抗心肌缺血 / 再灌注损伤分子机制的研究进展

唐灿¹, 罗秀菊², 彭军^{1*} (1. 中南大学湘雅药学院药理学系, 长沙 410078; 2. 中南大学湘雅三医院检验系, 长沙 410013)

摘要: 心肌缺血 / 再灌注损伤 (myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI) 机制主要涉及氧化应激、炎症反应、钙超载、细胞凋亡、自噬和能量代谢障碍等。天然产物因具有低毒性、多靶点等优势, 已被广泛应用于心脑血管疾病的防治, 为了深入研究它们对 MIRI 的治疗机制, 本文综合评述了天然产物在抗 MIRI 相关信号通路方面的研究进展, 并利用网络药理学分析技术预测天然产物治疗 MIRI 的机制。由于天然产物机制复杂, 完全阐明其抗 MIRI 分子机制仍任重道远。

关键词: 天然产物; MIRI; 氧化应激; 炎症反应; 钙超载; 细胞凋亡; 自噬; 能量代谢障碍

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)12-3311-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.027

Research progress in the molecular mechanism of natural products against myocardial ischemia/reperfusion injury

TANG Can¹, LUO Xiu-ju², PENG Jun^{1*} (1. Department of Pharmacology, Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078; 2. Department of Laboratory Medicine, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013)

Abstract: The mechanism of myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI) primarily involves oxidative stress, inflammatory response, calcium overload, cell apoptosis, autophagy, and energy metabolism disorders. Natural products have been widely used in the prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases due to their of low toxicity and multiple targets. To further determine their therapeutic mechanisms for MIRI, this paper comprehensively reviewed the progress in the study of natural products related to the signaling pathways of MIRI. It also discussed the mechanism of natural products against MIRI with network pharmacological analysis. Due to the complex of natural medicines, there is still a long way to go to fully elucidate their molecular mechanisms of alleviating MIRI.

Key words: natural product; MIRI; oxidative stress; inflammatory response; calcium overload; cell apoptosis; autophagy; energy metabolism disorder

心肌梗死是一种非常严重的缺血性心脏病, 临床治疗策略为尽快恢复缺血心肌的血液供应, 以减少心肌细胞损伤和死亡。然而, 除缺血外, 再灌注本身对缺血心肌造成损伤^[1]。中医药在心肌缺血的防治中占据重要的地位, 随着分子生物学技术和网络药理学等研究方法的广泛应用, 目前对天然产物抗心肌缺血 / 再灌注损伤 (myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)

分子机制的认识不断提高。本文就天然产物防治 MIRI 的相关信号通路进行综述并用网络药理学技术进行预测, 以期更多的天然产物治疗缺血性心脏病提供理论依据。

1 天然产物拮抗氧化应激的信号通路

心肌缺血 / 再灌注时, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成与清除失衡, 导致 ROS 过量堆积而引起氧化应激, 造成心肌损伤^[2]。天然产物

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 82173815; No. 81872873)。

作者简介: 唐灿, 女, 硕士, 主要从事心血管药理学方面的研究, email: tangcan@csu.edu.cn * **通信作者:** 彭军, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事心血管药理学方面的研究, email: junpeng@csu.edu.cn

可通过调节一条或多条信号通路发挥抗氧化应激作用,进而减轻 MIRI。天然产物抗氧化损伤的经典途径涉及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (AKT)^[3],核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) / 血红素加氧酶 -1 (HO-1)^[4]等。

1.1 PI3K/AKT 信号通路

白藜芦醇预处理 MIRI 大鼠后,一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 及一氧化氮 (nitric oxide, NO) 表达增加,PI3K-AKT 特异性阻断剂可以逆转这一变化^[5]。人参皂苷 Rg₁ 可以通过调控 PI3K/AKT/内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 信号通路改善异丙肾上腺素诱导的急性心肌缺血^[6]。缺血/再灌注大鼠在经甘木通总黄酮干预后,心肌梗死面积显著降低,AKT 和 eNOS 磷酸化水平明显升高,说明其抗氧化应激、减轻 MIRI 作用可能与激活 PI3K/AKT/eNOS 信号通路有关^[7]。体外实验结果表明黄芪甲苷 IV 可通过 PI3K/AKT/HO-1 信号通路发挥抗 MIRI 的作用^[8]。另有研究表明淫羊藿黄素通过抑制磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 的表达,激活 PI3K/AKT 信号通路来减少丙二醛和 ROS 的生成,减轻 MIRI^[9]。

1.2 Nrf2/HO-1 通路

有学者用降香新黄酮处理 H9c2 细胞缺氧/复氧模型^[10],发现它能够通过激活 Nrf2/HO-1 通路增强 HO-1 表达,提升细胞活力,抑制氧化应激来发挥对心肌细胞的保护作用^[11]。MIRI 大鼠经风轮菜总黄酮干预后,抗氧化能力显著增强,心肌缺血损伤得到缓解,而这可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关^[12]。常山酮也能够激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻心肌缺血/再灌注所致心肌细胞氧化损伤,改善心律失常^[13]。

2 天然产物抑制炎症损伤的分子机制

心肌缺血/再灌注后诱发的炎症反应是造成心肌损伤的重要机制之一。心肌梗死后心肌细胞释放大量细胞因子,激活免疫通路,引起剧烈的炎症反应,造成免疫通路失调,炎症抑制功能受损,进一步恶化心功能,最终诱发心力衰竭^[14]。炎症反应涉及多条信号通路,如 Toll 样受体 4 (TLR4) / 核因子 κ B (NF- κ B), NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) / 半胱氨酸蛋白酶 -1 (Caspase-1) / 白细胞介素 -1 β (IL-1 β) 通路。目前已发现多种天然产物能通过阻断炎症相关信号通路减轻心肌缺血/再灌注炎症损伤,从而改善心肌梗死症状和预后。

2.1 TLR4/NF- κ B 通路

有研究发现丹酚酸 B 能剂量依赖性地抑制内毒素诱导的 H9c2 细胞中 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活和 NLRP3 炎症体的表达,进而抑制炎症级联反应,减轻 MIRI^[15-16]。葛根素是从中药葛根中分离得到的一种异黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化等活性,它可以通过降低 TLR4、髓样分化因子 88 (MyD88) 以及 IL-1 β 、白细胞介素 18 (IL-18) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平,同时抑制 NF- κ B 蛋白磷酸化,减轻 MIRI^[17]。丹参酮 II A 在心肌梗死所致心力衰竭大鼠模型中能显著改善心功能,下调 TLR4、IL-1 β 和 NF- κ B p65 在心肌组织中的水平,减轻心肌损伤^[18]。

2.2 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路

有学者发现在急性心肌梗死模型中,安石榴苷可与 NLRP3、Caspase-1 结合,通过抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路减轻缺血/再灌注炎症损伤,改善心脏功能^[19-20]。肉桂酸可以显著改善 MIRI 后心脏舒张功能,降低缺血/再灌注后心肌组织 NLRP3、Caspase-1、IL-18 和 IL-1 β 的水平,减轻炎症反应^[21]。有学者发现用冬凌草甲素干预 MIRI 小鼠可降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子水平,并进一步证实冬凌草甲素通过靶向抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路减轻心肌缺血/再灌注炎症损伤^[22]。

3 天然产物抑制钙超载的分子机制

钙稳态在维持心肌细胞的兴奋-收缩耦联中发挥重要作用,而心肌缺血/再灌注时会引起心肌细胞钙超载,线粒体钙离子过载和 ROS 增加可导致线粒体通透性过渡孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 打开,从而进一步损害细胞能量学,加重 MIRI。因此,钙通道阻滞剂常用于治疗心肌梗死^[23]。近年来,随着对天然产物的研究不断深入,发现某些天然产物也可通过减轻钙超载来改善 MIRI。天然产物抑制钙超载的相关通路包括 WNT/Ca²⁺ 通路、L-型钙通道 (LTCC) 等。

3.1 WNT/Ca²⁺ 通路

有研究发现,抑制 WNT5A/Ca²⁺ 通路可减轻 MIRI。实验证明,人参皂苷 Rd 能增强低氧/复氧处理后的心肌细胞线粒体膜电位,降低 WNT5A 和磷酸化钙蛋白激酶 II (p-CaMK II) / 钙蛋白激酶 II (CaMK II) 的蛋白水平,进而抑制 WNT5A/Ca²⁺ 通路,减轻钙超载,缓解 MIRI^[24]。白藜芦醇能够抑制 WNT5A 基因及蛋白表达水平,抑制缺血/再灌注后心肌细胞钙离子超载^[25]。

3.2 L-型钙通道

LTCC 是心肌细胞膜上的主要钙离子通道。

心肌细胞兴奋时会使 LTCC 开放, Ca^{2+} 流向细胞内并触发肌浆网“以钙释钙”机制迅速升高细胞内 Ca^{2+} 水平, 满足心肌细胞兴奋收缩耦联所需的 Ca^{2+} [26]。因此, 抑制该通道可以有效减轻心肌缺血/再灌注时的钙超载, 进而减轻线粒体损伤, 改善心肌梗死患者的症状和预后。

羟基红花黄色素 A 是红花的水溶性成分, 临床上主要用于治疗稳定型心绞痛。利用膜片钳全细胞记录技术, 发现羟基红花黄色素 A 对于心肌细胞的 LTCC 具有一定的阻断作用, 进而抑制细胞凋亡和钙超载来保护心肌细胞, 改善 MIRI [27]。金盏花苷 E 具有浓度依赖性地阻滞大鼠心室肌细胞 LTCC 的作用, 可以通过调控离子稳态来缓解继发性 MIRI [28]。研究证明槲皮素对于心肌缺血的治疗作用也与抑制 Ca^{2+} 内流和细胞收缩力有关 [29]。

4 天然产物抑制细胞凋亡的经典信号通路

细胞凋亡是 MIRI 的重要病理机制, 因而抑制细胞凋亡是改善 MIRI 预后的有效途径 [30]。细胞凋亡经典途径包括死亡受体途径和线粒体途径, 两条途径均涉及激活 Caspases 家族。天然产物抗 MIRI 涉及细胞凋亡相关的经典信号通路主要包括丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK), Janus 激酶 (JAK) / 信号传导与转录活化因子 (STAT)。

4.1 MAPK 通路

MAPK 家族包括细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)、c-Jun N 末端激酶 (JNK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38-MAPK)、细胞外信号调节激酶 5 (ERK5) 这 4 个分支。从尼泊尔黄堇中分离的生物碱类成分可以通过 p38-MAPK 信号通路抑制细胞凋亡, 改善心功能 [31]。从中药积雪草中提取纯化的积雪草酸能够抑制 p38-MAPK 和 JNK-MAPK 的磷酸化, 减少心肌细胞凋亡, 从而发挥心脏保护作用 [32]。山楂有机酸能够通过上调 p-ERK、p-AKT 的蛋白表达, 下调 p-p38 和 p-JNK 的蛋白表达改善过氧化氢诱导的心肌细胞损伤, 表明山楂有机酸对于心肌细胞的保护作用与 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路有关 [33]。

4.2 JAK/STAT 通路

黄芩苷可以通过影响 JAK/STAT 信号通路, 减少促凋亡因子 Caspase-3 和增加抗凋亡因子 Bcl2 的表达, 进而减少心肌细胞凋亡, 发挥心脏保护作用 [34]。黄连中的活性成分小檗碱可上调 p-JAK2、p-STAT3 的表达, 抑制细胞凋亡, 对缺氧/复氧的 H9c2 细胞具有良好的保护作用 [35]。丹参素可以通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路抑制心肌细胞凋亡,

减轻冠心病心肌损伤 [36]。川芎嗪 [37]、圣草次苷 [38]、人参皂苷等天然产物均能调控 JAK2/STAT3 信号通路, 促进缺血/再灌注后心功能恢复。

5 天然产物调节细胞自噬的经典通路

细胞自噬在 MIRI 中是一把双刃剑。心肌缺血早期, 细胞自噬通过降解细胞成分提供能量, 对缺血心肌具有保护作用, 而再灌注后期因自噬被持续激活导致细胞大量死亡, 加重心肌损伤, 因此, 应用天然产物在心肌缺血早期适度促进自噬可有效减轻 MIRI [39]。自噬经典途径涉及腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) / 哺乳类雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路, 缺氧诱导因子 -1 α (HIF-1 α) / BCL2 相互作用蛋白 3 (BNIP3) 信号通路等。

5.1 AMPK/mTOR 信号通路

虫草素是虫草的主要活性成分, 有研究发现缺血/再灌注小鼠在给予虫草素干预后, 心肌梗死体积显著减小, 并进一步证明虫草素是通过 AMPK/mTOR 信号通路增强自噬, 发挥心脏保护作用, 促进 MIRI 后的心脏功能恢复 [40]。从中药西红花中提取的藏红花素通过 AMPK/mTOR 通路调节心肌缺血和再灌注期间的自噬激活, 减少了细胞凋亡和坏死, 具有心肌保护作用 [41]。天然化合物五味子乙素对于 MIRI 的保护作用也涉及 AMPK/mTOR 信号通路 [42]。

5.2 HIF-1 α /BNIP3 信号通路

黄酮类物质乔松素通过上调 HIF-1 α /BNIP3 信号通路而促进自噬, 减轻炎症与氧化应激, 抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡 [43]。有研究报道柚皮苷也可通过激活 HIF-1 α /BNIP3 信号通路来调节自噬, 减轻 MIRI [44]。此外, 小檗碱 [45]、三七总皂苷 [46] 等也均能通过调节 HIF-1 α /BNIP3 通路促进自噬, 保护心肌细胞。

6 天然产物改善能量代谢的信号通路

线粒体是机体的能量中心, 其功能障碍会引起能量代谢紊乱 [47], 从而破坏心肌细胞中糖代谢和脂质代谢之间的平衡。天然产物通过改善线粒体功能而改善心肌缺血/再灌注时的能量供应, 减轻心肌损伤, 涉及 AMPK、Ras 同源家族成员 A (RhoA) / Rho 相关激酶 (ROCK) 等信号通路。

6.1 AMPK 信号通路

AMPK 被称为是真核细胞的“代谢感受器”或“燃料开关”, 在心肌能量代谢中占据关键地位。AMPK 通路通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α) 活化沉默信息调节因子 -1 (SIRT1) 减轻线粒体氧化损伤, 从而改善心肌缺血/再灌注时的能量代谢 [48]。香青兰总黄酮

可通过提高 AMPK、SIRT1、PGC-1 α mRNA 水平, 升高 AMPK 蛋白的磷酸化水平和 SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平, 抵抗线粒体氧化损伤, 改善能量代谢, 减轻心肌梗死严重程度^[49]; 从中药灯盏花中提取的灯盏花素具有抗血栓、抗炎等心肌保护作用, 进一步研究发现灯盏花素可通过调节 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路来改善心肌缺血大鼠的能量供应进而减轻 MIRI^[50]。

6.2 RhoA/ROCK 信号通路

RhoA 属于小 G 蛋白 Rho 亚家族, 在调控心肌细胞凋亡中发挥着重要作用, 它与下游分子 ROCK 共同作用, 可以改善缺血心肌能量代谢, 减轻 MIRI^[51]。三七皂苷 R1 可以发挥类似 ROCK 抑制剂

Y-27632 的作用, 通过抑制 RhoA/ROCK 信号通路促进能量物质的合成, 减轻线粒体损伤, 从而防止 MIRI 引起的能量代谢障碍^[52]。

天然产物抗 MIRI 的机制众多, 如穿心莲内酯可以通过调节 NF- κ B、PI3K/AKT、MAPK 等多种信号通路调节炎症反应, 减轻 MIRI 大鼠心肌损伤; 也可通过激活 Nrf-2 来抑制氧化应激; 还可通过胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF-1R)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR- α) 等机制来调节细胞凋亡, 减轻 MIRI^[53]。因此, 很难将具体药物的作用机制进行完整阐述, 这是本综述的不足之处。

天然产物及活性成分改善 MIRI 的作用机制见表 1。

表 1 天然产物对心肌缺血/再灌注损伤的作用机制

Tab 1 Mechanisms for the role of natural products in myocardial ischemia-reperfusion injury

药理机制	天然产物	作用机制	信号通路	参考文献	
调节氧化应激	白藜芦醇	p-AKT 表达水平显著上调, 抑制氧化应激	PI3K/AKT	[5]	
	人参皂苷 Rg ₁	显著上调 PI3K 蛋白表达及 AKT 蛋白磷酸化水平	PI3K/AKT/eNOS	[6]	
	甘木通总黄酮	增强 AKT 和 eNOS 磷酸化水平	PI3K/AKT/eNOS	[7]	
	黄芪甲苷 IV	增加 AKT 磷酸化, 促进 HO-1 的表达	PI3K/AKT/HO-1	[8]	
	淫羊藿黄素	增加 AKT 的磷酸化, 抑制 PTEN 的表达	PTEN/PI3K/AKT	[9]	
	降香新黄酮	升高胞浆中 Nrf2、HO-1 及胞核中 Nrf2 蛋白表达	Nrf2/HO-1	[10]	
	风轮菜总黄酮	增强 SOD、CAT 酶活性, 诱导 Nrf2 核易位和 HO-1 蛋白表达	AKT/Nrf2/HO-1	[12]	
	常山酮	上调心肌组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平	Nrf2/HO-1	[13]	
	抑制炎症反应	丹酚酸 B	下调 TLR4、NF- κ B、NLRP3 的表达	TLR4/NF- κ B	[16]
		葛根素	下调 TLR4、MyD88、TNF- α 的蛋白表达, 减少 NF- κ B 磷酸化	TLR4/NF- κ B	[17]
丹参酮 II A		下调 TLR4、NF- κ B p65、IL-1 β 的表达水平	TLR4/NF- κ B p65	[18]	
安石榴苷		降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 的表达	NLRP3/Caspase-1/IL-1 β	[20]	
肉桂酸		下调 NLRP3、IL-1 β 、IL-18、Caspase-1 的表达水平	NLRP3/Caspase-1/IL-1 β	[21]	
冬凌草甲素		降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 水平, 抑制 NLRP3 炎症小体途径	NLRP3	[22]	
减轻钙超载	人参皂苷 Rd	降低 WNT5A、p-CaMK II /CaMK II 表达以及钙超载	WNT5A/Ca ²⁺	[24]	
	白藜芦醇	显著降低 WNT5A 基因表达及 WNT5A 蛋白水平	WNT5A/Ca ²⁺	[25]	
	羟基红花黄色素 A	降低线粒体膜电位, 抑制细胞凋亡和钙超载	LTCC	[27]	
	金盏花苷 E	抑制 L 型钙电流增加, 调节钙稳态	LTCC	[28]	
	槲皮素	以浓度依赖性抑制 LTCC, 抑制钙离子内流	LTCC	[29]	
抑制细胞凋亡	尼泊尔黄堇生物碱	抑制 p38 MAPK 的蛋白表达	p38 MAPK	[31]	
	积雪草酸	抑制 p38 MAPK 和 JNK-MAPK 的磷酸化	MAPK	[32]	
	山楂有机酸	上调 p-AKT 和 p-ERK 的蛋白表达, 下调 p-JNK 和 p-p38 的蛋白表达	MAPK	[33]	
	黄芩苷	抑制 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平	JAK/STAT	[34]	
	小檗碱	上调 p-JAK2、p-STAT3 的表达	JAK/STAT	[35]	
	丹参素	p-JAK2/JAK2、p-STAT1/STAT1、p-STAT3/STAT3 降低	JAK/STAT	[36]	
	川芎嗪	增加 JAK2、STAT3、Bcl2 蛋白表达	JAK/STAT	[37]	
	圣草次苷	显著降低 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 水平	JAK/STAT	[38]	
	调节细胞自噬	虫草素	调节 AMPK 通路, 缺氧期间诱导自噬	AMPK/mTOR	[40]
		藏红花素	调节 AMPK 通路, 缺氧期间诱导自噬	AMPK/mTOR	[41]
五味子乙素		促进 AMPK 的激活, 下调 mTOR 的磷酸化	AMPK/mTOR	[42]	
乔松素		诱导自噬介导的 HIF-1 α /BNIP3 蛋通路	HIF-1 α /BNIP3	[43]	
柚皮苷		增强血管生成因子 HIF-1 α 生成, 调节自噬	HIF-1 α /BNIP3	[44]	
小檗碱		诱导自噬介导的 HIF-1 α /BNIP3 通路	HIF-1 α /BNIP3	[45]	
三七总皂苷		升高 HIF-1 α 和 BNIP3 表达	HIF-1 α /BNIP3	[46]	
抗线粒体功能障碍	香青兰总黄酮	显著提高 AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α mRNA 水平	AMPK	[49]	
	灯盏花素	升高 SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白水平	AMPK/SIRT1/PGC-1 α	[50]	
	三七皂苷 R1	抑制 RhoA 和 ROCK-1 的表达	RhoA/ROCK	[52]	

7 基于网络药理学分析天然产物治疗 MIRI 的机制

进一步利用网络药理学预测表 1 中所包含的天然产物治疗 MIRI 的作用机制。首先，在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 查询天然产物的 SMILES；将 SMILES 导入 Swiss Target-Prediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>) 中获取靶点；再通过中药系统药理学数据库和分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) 获取天然产物靶点和来源中药，取并集后去除重复靶点；以“myocardial ischemia reperfusion injury”为关键词在 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中进行检索，收集 MIRI 的靶点；再使

用 Venn 图对上述得到的天然产物靶点和疾病靶点取交集 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>)，获得天然产物治疗 MIRI 的可能靶点；将天然产物抗 MIRI 的靶点导入 DAVID 数据库，进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析，最终取排名前 10 的信号通路构建疾病-来源中药-天然产物-作用靶点-信号通路网络图 (见图 1)。该图包含 456 个节点和 2000 条边，20 个信号通路节点，35 个成分节点，100 个中药节点，1 个疾病节点，300 个靶点节点。在这些天然产物中，拥有较高度值的槲皮素、白藜芦醇可能在抗 MIRI 中发挥更加重要的作用。靶点富集程度较高的信号通路有癌症通路、脂质和动脉粥样硬化通路等。

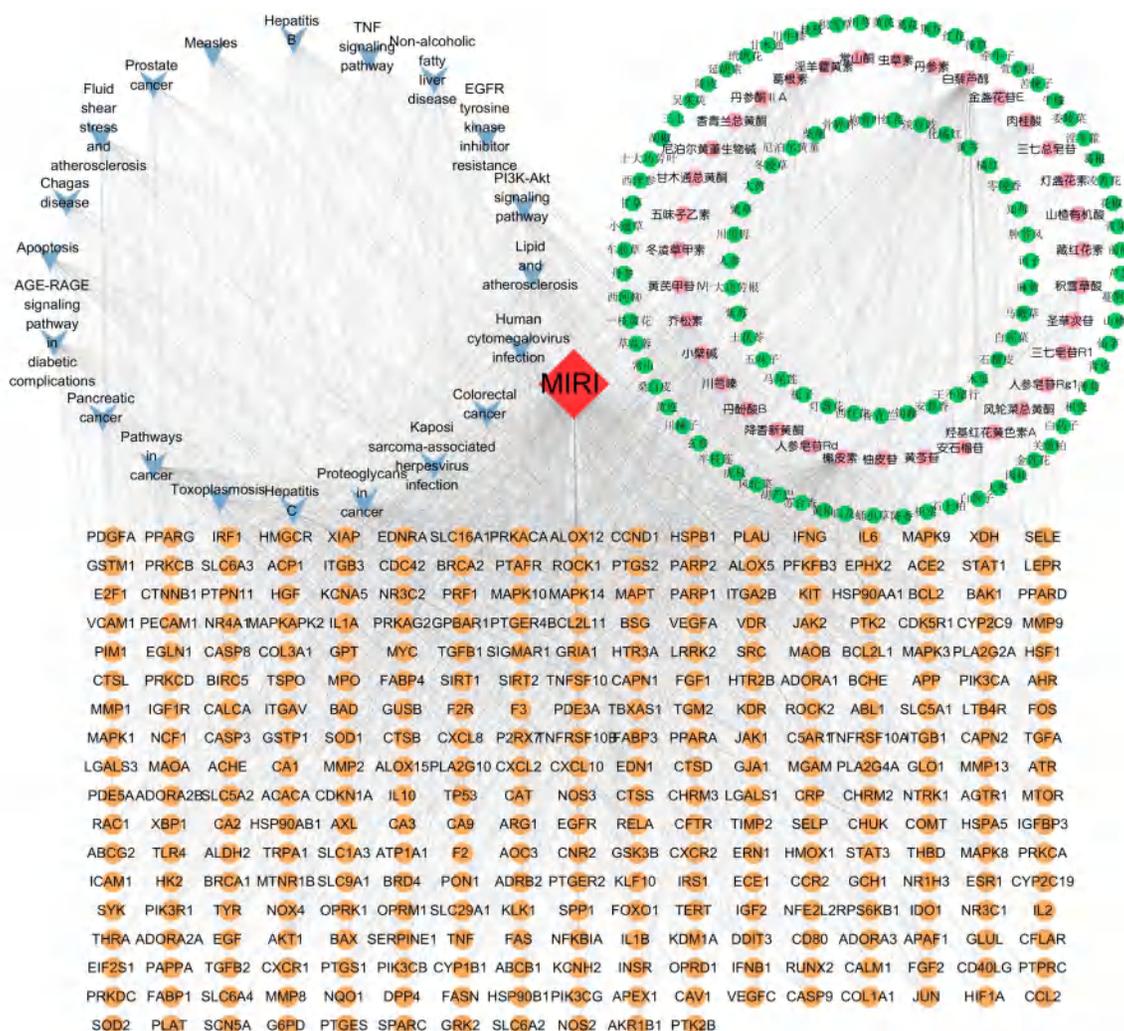


图 1 “天然产物-天然产物来源-作用靶点-通路-疾病”网络

Fig 1 “Natural products-sources of natural products-target-pathway-disease” network

注：绿色八边形表示天然产物来源，粉色六边形节点表示天然产物，红色菱形节点表示疾病，橙色圆形节点表示交集靶点，蓝色节点表示通路，线代表天然产物、天然产物来源、交集靶点、疾病和信号通路之间的关系。

Note: Green octagons represent natural product sources, pink hexagonal nodes represent natural products, red rhombic nodes represent diseases, orange circular nodes represent intersecting targets, blue nodes represent pathways, and the lines show the connections between natural products, sources of natural products, intersecting targets, disease and signaling pathways.

8 小结与展望

总之,天然产物可通过拮抗氧化应激、减少炎症反应、阻止钙超载、抑制细胞凋亡、调节自噬和能量代谢等多种机制减轻 MIRI,上述机制之间也存在相互作用。当细胞中 ROS 含量过高造成氧化应激时还会激活炎症反应,进一步加重氧化损伤;ROS 水平增加还会损伤线粒体,导致钙超载进而诱发细胞凋亡;抑制钙超载可以有效减轻 MIRI 中的氧化损伤;阻止线粒体 mPTP 通道的开放所致能量代谢障碍同样可以减少氧化应激,进而减轻 MIRI。目前,天然产物在心脑血管疾病的防治方面已得到广泛应用,但天然产物特别是中药复方作用机制尚不明确,导致很多患者对中药的疗效将信将疑。本文从信号通路出发阐述天然产物抗 MIRI 机制,有助于加深对天然产物抗 MIRI 的理解。相信随着网络药理学在探讨天然产物机制方面的应用,其多靶点的机制将逐步阐明,其作用途径更加明晰,也更有利于优化中药配伍,实现精准治疗和适度治疗。

参考文献

- [1] Wang JJ, Liu Y, Liu Y, et al. Recent advances in nanomedicines for imaging and therapy of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *J Control Release*, 2023, 353: 563-590.
- [2] Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866 (7): 165768.
- [3] Deng RM, Zhou J. The role of PI3K/AKT signaling pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110714.
- [4] Zhang XY, Yu YH, Lei HY, et al. The Nrf-2/HO-1 signaling axis: a ray of hope in cardiovascular diseases [J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, 2020: 5695723.
- [5] 何东伟, 刘新伟, 庞勇, 等. 白藜芦醇对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的抑制作用与 PI3K-Akt 信号通路的关系 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37 (15): 2323-2326.
- [6] 冷雪, 臧安缘, 李其芳. 人参皂苷 R_{g1} 通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路调控异丙肾上腺素致急性心肌缺血大鼠心肌的抗氧化作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (11): 145-150.
- [7] 聂阳, 丁立, 黄海潮, 等. PI3K/Akt-eNOS 信号通路在甘木通总黄酮后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (23): 4692-4697.
- [8] Yang P, Zhou YP, Xia Q, et al. Astragaloside IV regulates the PI3K/AKT/HO-1 signaling pathway and inhibits H9c2 cardiomyocyte injury induced by hypoxia-reoxygenation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42 (5): 721-727.
- [9] Zhang W, Xing BC, Yang LL, et al. Icaritin attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury via anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects in rats [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43 (6): 1083-1097.
- [10] 张妮, 陈兰英, 骆瑶, 等. 降香新黄酮 latifolin 通过 Nrf2/HO-1 通路抗 H9c2 细胞缺氧复氧损伤作用研究 [J]. *中药材*, 2019, 42 (7): 1629-1634.
- [11] Zhang Q, Liu J, Duan HXY, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- [12] Zhang HJ, Chen RC, Sun GB, et al. Protective effects of total flavonoids from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Ktze on myocardial injury in vivo and in vitro via regulation of AKT/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2018, 40: 88-97.
- [13] 王彦新, 陈立涛, 刘振华, 等. 常山酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路改善大鼠心肌缺血/再灌注心律失常作用 [J]. *解剖科学进展*, 2024, 30 (2): 193-196.
- [14] Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33 (6): 357-366.
- [15] Qiu Z, He YH, Ming H, et al. Lipopolysaccharide (LPS) aggravates high glucose- and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9C2 cardiomyocytes [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 8151836.
- [16] Hu Y, Li QJ, Pan YZ, et al. Sal b alleviates myocardial ischemic injury by inhibiting TLR4 and the priming phase of NLRP3 inflammasome [J]. *Molecules*, 2019, 24 (23): 4416.
- [17] 王丹姝, 燕柳艳, 孙姝婵, 等. 葛根素通过 TLR4/Myd88/NF- κ B 抑制 NLRP3 炎症小体抗大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *药理学报*, 2021, 56 (5): 1343-1351.
- [18] Chai RN, Ye ZL, Xue WJ, et al. Tanshinone II A inhibits cardiomyocyte pyroptosis through TLR4/NF- κ B p65 pathway after acute myocardial infarction [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1252942.
- [19] 萧闵, 向晶晶, 王威, 等. 金香丹抑制 NLRP3/IL-1 β /Caspase-1 信号通路缓解大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (20): 87-94.
- [20] Peng JF, Zhao XN, Zhang M, et al. Punicalagin attenuates ventricular remodeling after acute myocardial infarction via regulating the NLRP3/caspase-1 pathway [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61 (1): 963-972.
- [21] Luan F, Rao ZL, Peng LX, et al. Cinnamic acid preserves against myocardial ischemia/reperfusion injury via suppression of NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154047.
- [22] Lu CH, Chen CB, Chen A, et al. Oridonin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via downregulating oxidative stress and NLRP3 inflammasome pathway in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 7395187.
- [23] Wang RY, Wang M, He SB, et al. Targeting calcium homeostasis in myocardial ischemia/reperfusion injury: an overview of regulatory mechanisms and therapeutic reagents [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 872.
- [24] Cui ZK, Gu LF, Liu T, et al. Ginsenoside Rd attenuates myocardial ischemia injury through improving mitochondrial biogenesis via WNT5A/Ca²⁺ pathways [J]. *Eur J Pharmacol*,

- 2023, 957: 176044.
- [25] 吴翔. 白藜芦醇后处理对缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞钙超载的保护效应及作用机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [26] Sanchez Alonso JL, Loucks A, Schobesberger S, et al. Nanoscale regulation of L-type calcium channels differentiates between ischemic and dilated cardiomyopathies [J]. EBioMedicine, 2020, 57: 102845.
- [27] Ye JX, Wang RY, Wang M, et al. Hydroxysafflor yellow a ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing calcium overload and apoptosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6643615.
- [28] Wang RY, Wang M, Zhou JH, et al. Calenduloside E suppresses calcium overload by promoting the interaction between L-type calcium channels and Bcl2-associated athanogene 3 to alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. J Adv Res, 2021, 34: 173-186.
- [29] Liang YR, Zhang YY, Liu MM, et al. Protective effect of quercetin against myocardial ischemia as a Ca²⁺ channel inhibitor: involvement of inhibiting contractility and Ca²⁺ influx via L-type Ca²⁺ channels [J]. Arch Pharm Res, 2020, 43 (8): 808-820.
- [30] Xiang Q, Yi X, Zhu XH, et al. Regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Trends Endocrinol Metab, 2024, 35 (3): 219-234.
- [31] Ge FX, Gao XL, Zhou XC, et al. The alkaloids of *Corydalis hendersonii* Hemsl. contribute to the cardioprotective effect against ischemic injury in mice by attenuating cardiomyocyte apoptosis via p38 MAPK signaling pathway [J]. Chin Med, 2023, 18 (1): 29.
- [32] Yi CL, Song MJ, Sun LF, et al. Asiatic acid alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the ROS-mediated mitochondria-dependent apoptosis pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 3267450.
- [33] 权赫秀, 龚铭, 罗涛, 等. 山楂有机酸通过 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路保护心肌缺血再灌注损伤的缺血后适应作用 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40 (7): 42-48.
- [34] Xu M, Li XY, Song LC. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway [J]. Pharm Biol, 2020, 58 (1): 655-663.
- [35] Zhao GL, Yu LM, Gao WL, et al. Berberine protects rat heart from ischemia/reperfusion injury via activating JAK2/STAT3 signaling and attenuating endoplasmic reticulum stress [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37 (3): 354-367.
- [36] 李晨, 薛贤, 韩羽, 等. 丹参素通过 JAK/STAT 信号通路对冠心病大鼠的心肌保护作用及对血栓弹力图的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20 (17): 3141-3146.
- [37] 陈乘波, 陈天宝, 许友榜. 川芎嗪通过 JAK2/STAT3 信号通路调节线粒体自噬减轻心肌缺血再灌注损伤的机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37 (7): 819-823.
- [38] 李丽丽, 杨桂枝, 田志斌, 等. 圣草次苷对大鼠缺血再灌注心肌损伤的保护作用 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (9): 1505-1512.
- [39] Popov SV, Mukhomedzyanov AV, Voronkov NS, et al. Regulation of autophagy of the heart in ischemia and reperfusion [J]. Apoptosis, 2023, 28 (1-2): 55-80.
- [40] Xu H, Cheng J, He F. Cordycepin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by enhancing autophagy via AMPK-mTOR pathway [J]. J Physiol Biochem, 2022, 78 (2): 401-413.
- [41] Zeng C, Li H, Fan ZW, et al. Crocin-elicited autophagy rescues myocardial ischemia/reperfusion injury via paradoxical mechanisms [J]. Am J Chin Med, 2016, 44 (3): 515-530.
- [42] 卢长青, 贾合磊, 雷震, 等. 五味子乙素通过诱导线粒体自噬减轻心肌缺血再灌注损伤 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54 (3): 418-422, 428.
- [43] 刘冰, 方存明, 马小林. 乔松素通过调节 HIF-1 α /BNIP3 信号通路介导细胞自噬减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤 [J]. 河北医学, 2022, 28 (11): 1761-1768.
- [44] Viswanatha GL, Shylaja H, Keni R, et al. A systematic review and meta-analysis on the cardio-protective activity of naringin based on pre-clinical evidences [J]. Phytother Res, 2022, 36 (3): 1064-1092.
- [45] Zhu N, Li J, Li YL, et al. Berberine protects against simulated ischemia/reperfusion injury-induced H9C2 cardiomyocytes apoptosis in vitro and myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis in vivo by regulating the mitophagy-mediated HIF-1 α /BNIP3 pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 367.
- [46] Liu XW, Lu MK, Zhong HT, et al. Panax notoginseng saponins attenuate myocardial ischemia-reperfusion injury through the HIF-1 α /BNIP3 pathway of autophagy [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, 73 (2): 92-99.
- [47] 李慧敏, 祝德秋, 武丹. 线粒体通信与心血管疾病 [J]. 中南药学, 2023, 21 (11): 2828-2833.
- [48] Zhang W, Chen RC, Xu KY, et al. Protective effect of Xinmai' an tablets via mediation of the AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Phytomedicine, 2023, 120: 155034.
- [49] 赵云丽, 袁勇, 马晓莉, 等. 基于 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路研究香青兰总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制 [J]. 中国药房, 2021, 32 (3): 278-283.
- [50] 毛治尉, 张涛, 武永新, 等. 基于 AMPK/SIRT1/PGC1 α 信号通路探究灯盏花素联合有氧运动对冠心病大鼠心功能障碍的改善作用及机制研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2023, 38 (9): 1185-1191.
- [51] Zhang Q, Wang L, Wang SQ, et al. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 78.
- [52] Yan L, Pan CS, Liu YY, et al. The composite of 3, 4-dihydroxyl-phenyl lactic acid and notoginsenoside R1 attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury through regulating mitochondrial respiratory chain [J]. Front Physiol, 2021, 12: 538962.
- [53] Wong SK, Chin KY, Ima Nirwana S. A review on the molecular basis underlying the protective effects of *Andrographis paniculata* and andrographolide against myocardial injury [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 4615-4632.

(收稿日期: 2024-04-12; 修回日期: 2024-07-01)

药食同源中药防治中枢神经系统疾病的研究进展

王晨莉¹, 窦金金², 侯惠玲³, 赵程程¹, 高金瑞¹, 张喜武^{1*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第四医院, 哈尔滨 150077; 3. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 中枢神经系统疾病严重影响大脑和脊髓功能, 威胁患者生命健康。随着人类寿命的延长和人口老龄化的加剧, 中枢神经系统疾病的患病率逐年攀升, 医学界乃至全社会高度关注此类疾病的防治。药食同源中药以其预防性强、安全性高、适用范围广、综合调理效果显著和患者接受度良好等特点, 成为防治中枢神经系统疾病的优选, 具有广泛的应用前景和重要医学价值。因此, 本文查阅国内外文献, 系统综述了用于防治中枢神经系统疾病的药食同源中药及其作用机制的研究进展, 以期作为药品或功能性食品的开发提供参考。

关键词: 药食同源中药; 中枢神经系统疾病; 缺血性脑卒中; 阿尔茨海默病; 帕金森病; 抑郁症; 癫痫

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3318-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.028

Research progress in the prevention and treatment of central nervous system diseases by medicinal and edible homologous herbs

WANG Chen-li¹, DOU Jin-jin², HOU Hui-ling³, ZHAO Cheng-cheng¹, GAO Jin-rui¹, ZHANG Xi-wu^{1*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Fourth Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150077; 3. Qiqihar Medical College, Qiqihar Heilongjiang 161006)

Abstract: Central nervous system (CNS) illnesses have a major impact on the brain and spinal cord function, putting patients' lives and health at risk. As human life expectancy increases and the population ages, the prevalence of CNS diseases rises year after year. The medical community, and even society as a whole, is deeply worried about the prevention and treatment of these diseases. Medicinal and edible homologous herbs have become the preferred choice for CNS diseases due to their strong prevention, high safety, broad application, comprehensive conditioning effect, and fair patient acceptance. They also have wide application prospect and good medical value. This paper reviewed the domestic and foreign literatures and the research progress in medicinal and edible homologous herb for the prevention and treatment of CNS diseases, as well as related mechanism.

Key words: medicinal and edible homologous herb; central nervous system disease; ischemic stroke; Alzheimer's disease; Parkinson's disease; depression; epilepsy

中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 为调控人类思维、情感、运动等高级功能的核心系统, 由脑和脊髓构成, 以神经元与胶质细胞为基本单元, 参与能量代谢、营养支持、血脑屏障 (BBB) 维护等关键过程^[1]。CNS 疾病的发病机制异常复杂, 往往涉及神经元的退化、神经递质

的失衡、神经通路的异常等多个环节, 加之血脑屏障的存在, 使得药物研发面临重重挑战。当前, 临床上用于治疗 CNS 疾病的药物虽不乏其数, 但主要集中于受体调节剂和神经递质调节剂。此类药物局限于特定受体或神经递质, 对疾病进程改善有限, 并伴随嗜睡、呕吐、头晕等不良反应,

基金项目: 黑龙江省博士后特别资助 (博士后青年英才计划) (No.LBH-TZ1620); 黑龙江省“揭榜挂帅”重点项目 (No.2023ZXJ02C02); 黑龙江省卫生健康委科技计划 (No.20222121021039); 黑龙江中医药大学大学生科技创新项目 (一般项目) (No.KY2022-12)。

作者简介: 王晨莉, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药保健食品开发研究, email: wcl_526@163.com *通信作者: 张喜武, 男, 博士, 主要从事纳米靶向给药研究, email: 149772105@qq.com

导致患者长期治疗体验与效果均不理想^[2]。因此,探索安全、有效的 CNS 疾病预防和治疗策略,已成为该领域研究的热点与迫切需求。

《黄帝内经·素问》中“空腹食之为食物,患者食之为药物”的论述,深刻揭示了利用食材的药物特性以调和人体至均衡状态的传统智慧^[3]。药食同源中药,作为这一智慧的现代诠释,既保障能量供给,又蕴含防病之效,实现了食物安全与药物疗效的完美融合。卫健委公布的 110 味药食同源中药,是中医药大健康产业发展的重要基石,其功能开发更是聚焦于功能性食品与药品的革新研发。特别是在应对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 等慢性 CNS 疾病时,这些中药展现出了卓越的长期调理潜力。鉴于此,本文通过梳理国内外相关文献,系统总结了药食同源中药对 CNS 疾病防治的作用及机制,旨在为 CNS 疾病患者提供高效安全的治疗途径,并促进中医药在现代医疗中的创新融合与发展。

1 药食同源中药在 CNS 疾病防治中的作用

CNS 疾病主要包括脑血管疾病、神经退行性疾病、癫痫功能性疾病等几大类。这些疾病虽各具病理特征,如缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 的脑血流障碍、AD 的认知衰退、PD 的运动障碍、抑郁的情绪异常以及癫痫的神经元异常放电,但均涉及 CNS 的结构与功能异常。药食同源中药以其多成分、多靶点优势,通过调节神经递质、抗氧化应激、抑制炎症等多途径干预,有效保护神经元,促进神经功能的恢复与重建。

1.1 IS

1.1.1 中医对 IS 的病因病机认识及药食同源中药防治策略 IS 作为中医“中风”范畴,常表现为猝然昏仆、口舌歪斜、神识昏蒙等症状。国医大师张志远教授认为中风急性期的病机关键在玄府闭塞、气血不通,恢复期多属气虚血瘀之证,后遗症期则以元气亏虚为主^[4]。赵赫等^[5]强调中焦脾虚为 IS 发病之先,脾虚进而引发肝风内动、肾阳不足等病机。刘雪梅^[6]则认为 IS 急性期元气始亏,多见阴火亢盛实证;恢复期及后遗症期则以肾气衰虚等虚证为主。综上,IS 多为肝肾阴虚、脾虚气弱之本虚,加之风火痰瘀等邪实,形成虚实夹杂之证。

基于上述病因病机,中医多利用具有益气活血、平肝熄风、清热解毒等功效的药食同源中药,达到辅助防治中风的效果。如西红花疏通血脉,能够保障 IS 患者大脑的血供和氧供^[7];姜黄祛瘀通滞,兼具抗炎、抗凋亡、保护血脑屏障等作用,协同抵御 IS^[8]。白芷祛风解毒,可促进脑血栓溶解,减轻氧化应激损伤,以改善神经缺损症状^[9]。

黄芪与人参等补益类中药可通过补充气血、促进气血运行,改善脑血供不足的状态。栀子清热泻火、凉血解毒,能够有效抑制炎症反应,强化血管内皮保护、促进神经营养,发挥脑保护作用^[10]。

1.1.2 药食同源中药防治 IS 的作用机制 IS 为由暂时或永久性的大脑动脉供血不足引起的脑组织坏死,是 CNS 常见且严重的脑血管病之一,具有较高的致死率和致残率。研究表明,IS 主要涉及神经元自损伤、氧化应激反应、神经炎症和程序性细胞死亡等病理机制^[11]。

维护血脑屏障结构和功能的完整性是改善 IS 的重要途径。Oh 等^[12]通过建立短暂性大脑中动脉闭塞 (tMCAO) 大鼠模型,发现当归能上调酪氨酸蛋白激酶受体 -2 (Tie-2)、闭锁小带蛋白 -1 (ZO-1) 和咬合蛋白 (Occludin) 的表达,降低缺血诱导的血脑屏障通透性并抑制神经元死亡。此外,肉苁蓉总苷也已被证实能够上调结构蛋白的表达,维持血脑屏障紧密连接的结构和功能,从而有效减轻脑组织因缺血诱发的炎症和氧化应激损伤^[13]。

脑缺血触发胶质细胞异常活化,释放过量炎症介质,进而介导神经元受损。Liu 等^[14]研究表明,葛根素显著降低了脑缺血/再灌注 (I/R) 大鼠脑组织中白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的水平,减少缺血性脑梗死体积,其机制可能与 Janus 激酶的激酶 2 (JAK2)/转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路的激活与核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路的抑制有关。另外,6-姜烯酚可通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号传导,下调环氧合酶 (COX-2) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 等炎症相关酶的表达,改善大脑中动脉闭塞 (MCAO) 小鼠缺陷性行为^[15]。

抗氧化应激是药食同源中药发挥脑保护作用的核心策略。蒲公英甾醇可增强醌氧化还原酶 1 (NQO-1) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)-3 的表达,显著降低海马神经元中活性氧 (ROS) 和丙二醛 (MDA) 含量,有效减轻脑组织氧化应激损伤^[16]。牡荆素通过激活 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路,增强超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 等抗氧化酶的活性,降低氧化应激标志物水平,进而减轻缺血缺氧性脑损伤^[17]。另外,体内实验结果表明,丁香酚缓解心肌 I/R 损伤与抗氧化防御系统的恢复有关^[18]。

当脑组织缺血缺氧后,神经元过度凋亡,进而加剧脑部损伤。银杏内酯 B 可上调抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤 -2 (Bcl-2) 水平,下调促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 和半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase)-3 的表达,从而抑制神经元细胞凋亡^[19]。黄豆苷元通过激活 Akt/mTOR/BDNF 通路,上调 Bcl-2 相关死亡启动因子 (BAD) 磷酸化

水平,降低 Caspase-3 的表达,显著改善神经功能缺损并降低梗死体积^[20]。人参皂苷 Rg₁ 则通过下调 cAMP 激活的交换蛋白分子 (Epac1)、Ras 相关蛋白 1 (Rap1)、Caspase-3 等蛋白的表达,抑制脑神经凋亡,发挥神经保护作用^[21]。

血管新生作为恢复缺血区血液供应的重要途径,是药食同源中药干预 IS 的关键环节。研究发现,黄芪甲苷能够上调血管内皮生长因子

(VEGF) 水平,提高缺血区脑组织微血管的密度^[22]。另外,当归多糖可上调 VEGF 和血小板内皮细胞黏附分子 (CD31) 水平,促进缺血区血管的修复和新血管的再生,进而减少脑梗死体积^[23]。

综上,药食同源中药可维护血脑屏障的完整性、调控氧化应激和炎症反应、抑制细胞凋亡、促进血管新生,干预 IS 病理生理性变化,延缓其发生与发展,详见表 1。

表 1 药食同源中药防治 IS 的作用及机制

Tab 1 Mechanism of prevention and treatment of IS by medicinal and edible homologous herb

中药	活性成分	药效机制	分子机制	参考文献
当归	根部水提物	保护血脑屏障	Tie-2、ZO-1 和 Occludin 表达 ↑	[12]
肉苁蓉	肉苁蓉总苷		claudin-5、Occludin 和 ZO-1 水平 ↑	[13]
葛根	葛根素	抑制炎症反应	激活 JAK2/STAT3 信号通路,抑制 NF-κB 信号通路,IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平 ↓	[14]
生姜	6-姜烯酚		抑制 MAPK 信号传导,COX-2 和 iNOS 表达 ↓,IL-1β 和 TNF-α 水平 ↓	[15]
蒲公英	蒲公英甾醇	抗氧化应激	NQO-1 和 GPx-3 表达 ↑,ROS 和 MDA 水平 ↓	[16]
山楂	牡荆素		激活 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路,SOD 和 GSH 水平 ↑,ROS 和 MDA 水平 ↓	[17]
丁香	丁香酚		SOD 水平 ↑,MDA 水平 ↓	[18]
白果	银杏内酯 B	抑制神经元凋亡	Bcl-2 水平 ↑,Bax 和 Caspase-3 水平 ↓	[19]
葛根	黄豆苷元		激活 Akt/mTOR/BDNF 通路,p-BAD 水平 ↑,Caspase-3 表达 ↓	[20]
人参	人参皂苷 Rg ₁		Epac1、Rap1 和 Caspase-3 表达 ↓	[21]
黄芪	黄芪甲苷	促进血管新生	VEGF 水平 ↑	[22]
当归	当归多糖		VEGF 和 CD31 表达 ↑	[23]

注:“↑”表示上调或者激活;“↓”表示下调或抑制。

Note:“↑”Indicates upregulation or activation;“↓”indicates downregulation or inhibition.

1.2 AD

1.2.1 中医对 AD 的病因病机认识及药食同源中药防治策略

AD 在中医范畴内归属“痴呆”,临床以记忆衰退、精神淡漠、反应迟钝为主要特征。黄巧艺等^[24]强调脾肾虚损为 AD 发病的关键,因虚致瘀、最终瘀毒损伤脑络。鲍远程教授^[25]认为 AD 病机以肾精亏虚为本,瘀痰阻窍为要,虚实夹杂,累及心肝脾肾。国医大师卢芳教授^[26]指出 AD 的病位为心窍和脑窍,主张痰邪与瘀血阻窍为核心病机。故而,AD 属本虚标实之候,其核心在于脾肾等脏腑功能不足,而由此引发的痰瘀毒等病理产物则是病情加重的关键因素。

药食同源中药在 AD 的防治中具有独特的优势,多通过滋补肾精、补脾益气、疏肝解郁、活血通络等途径发挥作用。如黄精与当归配伍,具有补肾填精、活血通络之功效,不仅强化机体抗氧化能力,还可减轻脑内炎症反应,改善 AD 患者生活自理能力^[27]。黄芪滋养脾胃,能通过抗炎和神经保护机制,促进认知功能恢复^[28]。人参有大补元气、补脾益肺之功,内含皂苷与多糖等多种成分,可有效保护神经突触、改善胆碱能系统,缓解 AD 症状^[29]。天麻疏肝解郁、增智益脑,能显著修复海马区突触可塑性损伤,展现神经保护潜力^[30]。姜黄多用于气滞血瘀之证,其主要成分姜黄素可改善神经元损伤,修复记忆与认知功能^[31]。

1.2.2 药食同源中药防治 AD 的作用机制

AD 作为典型的年龄相关性神经退行性疾病,其核心病理特征包括老年斑 (SP)、神经原纤维缠结以及神经元的丢失,这些变化主要涉及 β-淀粉样蛋白 (Aβ) 的异常聚集、Tau 蛋白过度磷酸化、线粒体功能障碍等病理机制^[32]。

药食同源中药通过调控 Aβ 生成与降解的关键酶,可有效减少 Aβ 的生成与积累。例如,石斛生物碱可增强去整合素 - 金属蛋白酶 (ADAM) 17 的蛋白表达并降低 ADAM10 的蛋白表达^[33];四氢姜黄素可抑制 β-分泌酶 (BACE) 及 γ-分泌酶 (PS1) 的活性,两者均能促进 Aβ 的清除,从而减轻海马及大脑皮层中的毒性累积^[34]。此外,花椒提取物 N-[2-(3,4-二甲氧基苯基)乙基]-3-苯基丙烯酰胺 (gx-50) 可穿透血脑屏障,直接分解 Aβ 低聚物,减少其在脑内的沉积,改善认知能力^[35]。

抑制 Tau 蛋白的过度磷酸化是药食同源中药防治 AD 的重要策略。山茱萸多糖通过减少糖原合成酶激酶 3β (GSK-3β) 水平,党参多糖通过上调蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 的活性,发挥抑制 Tau 蛋白的过度磷酸化,减少 Tau 缠结的形成,保护受损神经元的作用^[36-37]。

在抗氧化应激方面,蒲公英总黄酮可显著上调 SOD 活性,下调 MDA、ROS 等氧化应激标志物的水平,有效清除自由基,以减轻氧化应激对神经元

的损害^[38]。此外，黄芪多糖可通过激活 Nrf2 抗氧化通路，增加 SOD 和 GSH-Px 的含量，抑制脂质过氧化，从而减少自由基对机体的损伤^[39]。

针对神经炎症这一关键环节，紫苏醇提物可清除 A β 沉积物，阻止小胶质细胞和星形胶质细胞的增多，通过发挥抗炎作用来改善记忆障碍^[40]。京尼平苷可抑制细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 和 I κ B/NF- κ B 炎症通路，减少 AD 模型小鼠体内 TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子的产生，发挥抗神经炎症作用^[41]。

药食同源中药能够改善胆碱能系统的功能，促进神经细胞的修复和再生。茯苓多糖和羟基- α -山椒素等成分可通过增强乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 表达，抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性，促进乙酰胆碱 (ACh) 合成，以恢复胆碱能神经传递，对抗认知障碍^[42-43]。

在抑制细胞凋亡方面，当归多糖通过调节凋亡相关蛋白，上调 Bcl-2 水平，并抑制 Bax 与 Caspase-3 表达，减少神经细胞的凋亡，维护神经元正常的结

构与功能^[44]。此外，紫苏多糖通过增强聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 (PARP) 等 DNA 修复酶的表达，下调细胞色素 C (Cyt C)、Caspase-3 和 Caspase-8 等蛋白水平，减轻神经元损伤并发挥神经保护作用^[45]。

药食同源中药在调节线粒体功能、促进线粒体自噬方面也表现出显著作用。例如，人参皂苷 Rg₁ 可增强 PTEN 诱导激酶 1 (PINK1)、帕金 (Parkin) 蛋白的表达，增加微管相关蛋白轻链 3 (LC3) II / I 比例并降低 p62 蛋白水平，进而促进线粒体自噬，维护线粒体稳态，对抗 AD 中的能量代谢障碍^[46]。党参多糖可通过下调 CD38 表达，增加默信息调节 2 同系物 1 (SIRT1)、SIRT3 和过氧化物酶体增殖活化受体 γ 共激活因子 -1 α (PGC-1 α) 等关键因子活性，改善线粒体功能障碍并减弱神经毒性^[47]。

综上所述，药食同源中药防治 AD 机制多元，涵盖减少 A β 沉积、抑制 Tau 磷酸化、抗氧化、抗炎、调节胆碱能及改善线粒体功能障碍等多个途径，协同保护神经元，防御 AD 病理损害，详见表 2。

表 2 药食同源中药防治 AD 的作用及机制

Tab 2 Mechanism of prevention and treatment of AD by medicinal and edible homologous herb

中药	活性成分	药效机制	分子机制	参考文献
铁皮石斛	石斛生物碱	减少 A β 的生成和积累	ADAM17 表达 \uparrow , APP、ADAM10 和 BACE1 表达 \downarrow , A β ₁₋₄₂ 水平 \downarrow	[33]
姜黄	四氢姜黄素		PS1 和 BACE 水平 \downarrow , A β 生成 \downarrow	[34]
花椒	gx-50		A β 聚集 \downarrow	[35]
山茱萸	山茱萸多糖	抑制 Tau 过度磷酸化	GSK-3 β 水平 \downarrow , Tau 蛋白磷酸化水平 \downarrow	[36]
党参	党参多糖		PP2A 活性 \uparrow , Tau 蛋白磷酸化水平 \downarrow	[37]
蒲公英	蒲公英总黄酮	抑制氧化应激	SOD 活性 \uparrow , ROS 和 MDA 含量 \downarrow	[38]
黄芪	黄芪多糖		激活 Nrf2 通路, SOD 和 GSH-Px 水平 \uparrow , MDA 含量 \downarrow	[39]
紫苏	紫苏醇提物	抑制神经炎症	小胶质细胞、星形胶质细胞水平 \downarrow	[40]
栀子	京尼平苷		抑制 ERK 和 I κ B/NF- κ B 通路的激活, TNF- α 和 IL-1 β 水平 \downarrow	[41]
茯苓	茯苓多糖	降低胆碱能损伤	ACh 和 ChAT 水平 \uparrow , AChE 水平 \downarrow	[42]
花椒	羟基- α -山椒素		AChE 活性 \downarrow , ACh 含量 \uparrow	[43]
当归	当归多糖	抑制细胞凋亡	Caspase-3 和 Bax 水平 \downarrow , Bcl-2 水平 \uparrow	[44]
紫苏	紫苏多糖		PARP 表达 \uparrow , Bax、Cyt C、Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 水平 \downarrow , Bcl-2 水平 \uparrow	[45]
人参	人参皂苷 Rg ₁	改善线粒体功能障碍	PINK1 和 Parkin 表达 \uparrow , LC3 II / I \uparrow , p62 水平 \downarrow	[46]
党参	党参多糖		CD38 表达 \downarrow , SIRT1、SIRT3、PGC-1 α 和 ATP 水平 \uparrow	[47]

1.3 PD

1.3.1 中医对 PD 的病因病机认识及药食同源中药防治策略 PD 属中医“颤证”范畴，以静止性震颤、运动迟缓和肌肉僵直为主要临床症状。黄煌教授认为 PD 病因的核心为“风胜则动”，病涉肝筋，关联肺脾肾心^[48]。马云枝教授主张肝肾虚损为 PD 发病之始，中期以气虚血瘀为要，晚期为五脏元气皆虚^[49]。而老中医符为民认为 PD 病源脑府，核心为肝肾脾亏、气血双虚等虚证，并表现痰浊、瘀血、火热、腑实等邪实症状^[50]。总之，PD 为本虚标实之证，其病因核心在于肝肾亏虚，并与风、痰、瘀、毒等病理因素相互交织，导致脑窍失养，五脏稳态失衡。

针对 PD 的治疗策略中，药食同源的理念被

广泛应用，旨在通过温补肾阳、平肝熄风、祛痰化湿与活血化瘀等方法，综合调理患者体质。如杜仲叶补肝肾、强筋骨，可对抗多巴胺神经元的退行性丢失，从而缓解 PD 症状^[51]。天麻为颤证治疗要药，其主要活性成分天麻素在抗凋亡和抗炎方面展现出显著疗效，能够有效对抗 PD^[52]。甘草祛痰止咳，其黄酮类成分在抗炎、调节免疫方面表现优异，可减轻 PD 僵直、震颤等症状^[53]。针对血瘀痹阻的病机，西红花可减轻氧化应激和炎症对多巴胺能神经元的损伤，有效保护神经元并促进脑络畅通^[54]。

1.3.2 药食同源中药防治 PD 的作用机制 PD 在人群中的发病率逐年上升，是仅次于 AD 的第二大神经退行性疾病。PD 的核心病理特征在于中

脑黑质多巴胺能神经元的进行性丧失，是神经炎症、氧化应激、细胞凋亡以及线粒体功能障碍等多重机制共同作用的结果^[55]。

PD 患者黑质区神经炎症显著，表现为胶质细胞的激活与炎症因子的过度释放。研究发现甘草黄酮 A 通过抑制 ERK1/2、NF- κ B 炎症通路的激活，抑制小胶质细胞的过度活化及 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎介质的释放，从而保护多巴胺神经元免受炎症侵袭^[56]。此外，松果菊苷通过增强 STAT3 在 Ser727 位点磷酸化水平、抑制 STAT3 在 tyr705 位点上的磷酸化，实现神经营养和抗炎双重作用^[57]。

抑制氧化应激在防御 PD 的作用机制中扮演着重要角色。黄芪甲苷可通过增强 SOD 活性，减少 ROS 的生成，进而有效缓解 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 诱导的神经细胞损伤，展现出抗氧化应激效应^[58]。另外，西红花苷可缓解 PD 果蝇的运动缺陷，其相关机制与增强过氧化氢酶 (CAT)、GSH 等抗氧化酶的活性有关^[59]。

细胞凋亡是 PD 神经元丧失的直接原因，Caspase 家族及 Bcl-2 家族蛋白在此过程中扮演着关键角色。研究表明，白藜芦醇可降低 Bax/Bcl-2 比值，下调 Caspase-3 水平，抑制 6-羟多巴胺 (6-OHDA) 的毒性作用^[60]。松果菊苷则通过抑制激活转录因子 3 (ATF3)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 和 α -突触核蛋白 (SCNA) 等凋亡基因的表达，降低 Caspase-3 活

性并部分上调 BDNF 的表达，进而提高多巴胺能神经元的存活率^[61]。另外，石斛碱通过上调中脑星形胶质细胞源性神经营养因子 (MANF) 表达，有效缓解内质网应激，从而抑制多巴胺能神经元凋亡^[62]。

自噬作为细胞内的降解系统，其功能紊乱与 PD 的神经元丢失密切相关。研究表明，迷迭香酸可抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，激活细胞自噬，并促进 Bcl-2 表达以抑制细胞凋亡^[63]。山柰酚能增强自噬特异性基因 (*Beclin-1*) 和 LC3 等自噬相关蛋白的表达，有效维持黑质多巴胺能神经元内的自噬平衡^[64]。

线粒体功能障碍作为 PD 病理链条的下游，可导致三磷酸腺苷 (ATP) 生成减少、ROS 释放过度，进而加速神经元死亡。乌梅总黄酮通过促进线粒体自噬，增加 ATP 酶活性，并上调 Bcl-2 相互作用蛋白 3 (BNIP3) 等蛋白的表达，有效改善线粒体功能损伤^[65]。此外，人参总蛋白可通过调节线粒体未折叠蛋白反应，促进 PINK1 缺陷型黑腹果蝇线粒体功能的维持，抑制 ROS 的生成，恢复 ATP 水平，并显著增加大脑中的多巴胺 (DA) 含量，防止多巴胺能神经元变性^[66]。

综上所述，抑制神经炎症、抗氧化应激、抑制细胞凋亡、调节自噬以及改善线粒体功能障碍是药食同源中药有效保护多巴胺神经元、延缓 PD 病理进程的重要途径，详见表 3。

表 3 药食同源中药防治 PD 的作用及机制

Tab 3 Mechanism of prevention and treatment of PD by medicinal and edible homologous herb

中药	活性成分	药效机制	分子机制	参考文献
甘草	甘草黄酮 A	抑制神经炎症	抑制 ERK1/2 和 NF- κ B 信号通路，小胶质细胞水平 \downarrow ，IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平 \downarrow	[56]
肉苁蓉	松果菊苷		p-STAT3 (Ser727) \uparrow ，p-STAT3 (tyr705) \downarrow ，IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平 \downarrow	[57]
黄芪	黄芪甲苷	抗氧化应激	激活 JAK2-STAT3 信号通路，SOD 活性 \uparrow ，ROS 水平 \downarrow	[58]
西红花	西红花苷		SOD 活性 \uparrow ，GSH 和 CAT 水平 \uparrow	[59]
决明子	白藜芦醇	抑制细胞凋亡	激活 PI3K/Akt 信号通路，Bax/Bcl-2 \downarrow ，Caspase-3 水平 \downarrow	[60]
肉苁蓉	松果菊苷		ATF3、CHOP 和 SCNA 表达 \downarrow ，Caspase-3 水平 \downarrow	[61]
铁皮石斛	石斛碱		MANF 表达 \uparrow ，CHOP 表达 \downarrow ，TH 水平 \uparrow ，Caspase-3 水平 \downarrow ，Bcl-2/Bax \uparrow	[62]
紫苏	迷迭香酸	调节自噬	抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路，Bcl-2 水平 \uparrow ，Beclin-1 和 LC3 II / I 表达 \uparrow	[63]
山柰	山柰酚		抑制 mTOR 信号通路， <i>Beclin-1</i> 、LC3 表达 \uparrow	[64]
乌梅	乌梅总黄酮	改善线粒体功能障碍	LC3- II、Beclin-1 和 BNIP3 表达 \uparrow ，ATP 活性 \uparrow	[65]
人参	人参总蛋白		DA 含量 \uparrow ，ATP 水平 \uparrow ，ROS 水平 \downarrow	[66]

1.4 抑郁症

1.4.1 中医对抑郁症的病因病机认识及药食同源中药防治策略 抑郁症多属中医学“郁证”的范畴，其核心症状围绕心情低落、情绪不宁及生理功能紊乱展开。国家名老中医马云枝^[67]认为抑郁症初期以肝气郁滞为主，兼有痰、瘀和火等实证；后期涉及心脾肾等脏腑气血阴阳失调等虚证。马烈光教授^[68]则指出主要病机在于肝郁脾虚，气机郁滞与脾气不足两者皆不可忽视。总而言之，抑郁症多因肝脾功能失调、心神失常，以致气、

血、痰、火、湿等病理产物积聚，最终扰乱神机。

依据上述病机，中医在防治抑郁症时，多采用具有疏肝解郁、健脾益气、活血化瘀、除烦安神等功效的药食同源中药。如佛手行气解郁，具有调节神经递质水平、增强神经营养的作用^[69]。黄精补脾气、升清阳，可通过调节神经递质来保护神经元，改善抑郁样行为^[70]。当归，以其补血活血之功，不仅滋养肝血，还通过影响神经可塑性、调节细胞因子及抗氧化应激等途径，发挥抗抑郁作用^[71]。栀子清心除热，在调控神经递质、

抑制神经元损伤、降低炎症水平等多个层面展现出抗抑郁潜力^[72]。

1.4.2 药食同源中药防治抑郁症的作用机制 抑郁症是一种常见的精神障碍病，与多种 CNS 疾病展现出较高的共病风险。目前公认的抑郁症病理机制包括单胺假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 功能失调、神经炎症、免疫系统异常等^[73]。

单胺类神经递质包括 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE)、DA 等，其代谢异常会导致神经传递减少和认知能力受损，从而引发抑郁症。刘亚敏等^[74] 研究显示夏枯草水提物可改善抑郁小鼠在强迫游泳实验和悬尾实验中的行为，其作用机制可能与增加海马中 5-HT、NE、DA 及脑源性神经营养因子 (BDNF) 含量有关。此外，黄精多糖调节突触可塑性，改善抑郁样行为，与 5-HT 的增加有关^[75]。

HPA 轴功能亢进，边缘系统受到过度刺激会产生抑郁样行为。橙皮苷可降低肾上腺皮质激素皮质酮 (CORT) 水平，增加糖皮质激素受体 (GR) 表达，负反馈调节 HPA 轴，起到抗抑郁作用^[76]。胡椒碱则通过降低促皮质激素释放因子 (CRF) 和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 水平，从上游抑制 HPA 轴功能亢进，显著改善抑郁导致的行为障碍^[77]。

神经炎症也是导致抑郁症的重要诱因之一。

Zhao 等^[78] 研究发现栀子苷可抑制神经元凋亡，并降低 IL-1 β 和 TNF- α 水平，减轻神经炎症，发挥抗抑郁样作用。另外，姜黄素通过抑制 NF- κ B 炎症通路和 NLRP3 炎性小体的活化，下调 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 炎症介质水平，改善了慢性不可预知轻度应激 (CUMS) 大鼠的抑郁样行为^[79]。

氧化应激水平的升高是抑郁症发病机制中的另一关键因素。研究表明，人参皂苷 Rh₂ 和葛根素可通过增强 SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶的活性，降低 ROS 和 MDA、NO 等氧化产物水平，有效抑制神经细胞氧化应激损伤，进而改善抑郁症状^[80-81]。

神经可塑性障碍是抑郁症发作的重要病理特征。Qian 等^[82] 通过建立卒中后抑郁小鼠模型，发现莫诺苷可激活 BDNF/酪氨酸激酶受体 B (TrkB) 信号通路，促进神经细胞的生成与突触重塑，保护受损神经元，从而缓解抑郁症状。此外，灵芝多糖能通过激活 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体 (AMPA) 受体，增强突触可塑性，改善慢性社会挫败应激 (CSDS) 模型小鼠的抑郁行为^[83]。

综上，调控单胺类神经递质、恢复 HPA 轴平衡、抗炎、抗氧化和改善神经可塑性是药食同源中药减缓抑郁症发生、发展的主要途径，详见表 4。

表 4 药食同源中药防治抑郁症的作用机制

Tab 4 Mechanism of prevention and treatment of depression by medicinal and edible homologous herb

中药	活性成分	药效机制	分子机制	参考文献
夏枯草	夏枯草水提物	调节单胺类神经递质	5-HT、NE、DA 水平 \uparrow	[74]
黄精	黄精多糖		CORT 水平 \downarrow ，5-HT 水平 \uparrow	[75]
陈皮	橙皮苷	调节 HPA 轴	CORT 水平 \downarrow ，CRF 表达 \downarrow ，GR 表达 \uparrow	[76]
胡椒	胡椒碱		CRF 和 ACTH 水平 \downarrow	[77]
栀子	栀子苷	调节炎症反应	IL-1 β 和 TNF- α 水平 \downarrow	[78]
姜黄	姜黄素		NF- κ B 活化 \downarrow ，NLRP3 表达 \downarrow ，IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 \downarrow	[79]
人参	人参皂苷 Rh ₂	抑制氧化应激	SOD 和 GSH-Px 水平 \uparrow ，MDA 和 NO 水平 \downarrow	[80]
葛根	葛根素		SOD 和 CAT 活性 \uparrow ，ROS 水平 \downarrow	[81]
吴茱萸	莫诺苷	改善神经可塑性	激活 BDNF/TrkB 信号通路，BDNF 水平 \uparrow	[82]
灵芝	灵芝多糖		AMPA 受体表达 \uparrow ，BDNF 水平 \uparrow	[83]

1.5 癫痫

1.5.1 中医对癫痫的病因病机认识及药食同源中药防治策略 癫痫，中医称之为“痫病”“羊癫风”等，是一种以突发意识丧失、肢体抽搐、口吐涎沫、颈项强直等为特征的反复发作性神志病。名老中医董少龙教授^[84] 认为癫痫病位在脑，发作期呈以痰风为主的标实之症；缓解期则以脏腑虚损为主。迟华基教授^[85] 则认为癫痫以脾虚肾亏为本虚，痰浊气逆为标实之关键。可知，癫痫多属本虚标实之证，病因病机涉及心肝脾肾失衡之虚证，风、火、痰、瘀等标证。

在中医防治癫痫的策略中，常采用具有平肝熄风、补肾益精、化痰祛瘀、宁心安神等功效的药食同源中药。如天麻为“治风之神药”，通过调节神经递质、抑制细胞凋亡与氧化应激，能有效缓解抽搐症状^[86]。山茱萸补肝益肾，可改善认知与运动功能，减少癫痫发作次数^[87]。姜黄多用于气滞血瘀之症，其活性成分姜黄素具有抗炎、抗氧化功效，能显著减轻脑部炎症与氧化应激，发挥抗癫痫作用^[88]。灵芝以其独特的养心安神功效，有效抑制神经元癫痫样放电，同时促进神经修复，保护脑组织并减轻癫痫发作程度^[89]。

1.5.2 药食同源中药防治癫痫的作用机制 癫痫是一种常见的慢性 CNS 疾病，其核心特征在于大脑细胞的异常放电现象，涉及神经递质紊乱、炎症、氧化应激反应以及神经元凋亡等多重发病机制^[90]。

神经递质的抑制性和兴奋性失衡是癫痫发作的主要机制。 γ -氨基丁酸 (GABA) 作为关键抑制性神经递质，其活性增强被视为治疗癫痫的潜在途径。在毛果芸香碱诱导的癫痫模型中，天麻素通过保护 GABA_A 受体 $\alpha 1$ 亚基，促进 GABA 传递，以减轻神经元兴奋性毒性^[91]。此外，酸枣仁醇提物能增强 AChE 和丁酰胆碱酯酶 (BchE) 活性，延长抽搐潜伏期，展现抗惊厥潜力，从而预防癫痫发作^[92]。

癫痫发作时会诱导促炎因子的生成与释放，加剧炎症反应。在戊四唑诱导的癫痫模型小鼠中，黄芪多糖可减少小胶质细胞与星形胶质细胞的活化，下调 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎因子水平，从而阻断神经炎症级联反应，显著减轻伴随的认知功能障碍^[93]。丁香酚可靶向 NF- κ B 及 NLRP3 炎症小体，降低 TNF- α 和 IL-1 β 的水平，抑制癫痫发作后的过度炎症反应^[94]。

氧化与抗氧化系统失衡会引发神经元损伤和凋亡，进一步加剧神经元的异常放电。枸杞多糖可通过升高 SOD 和 GSH-Px 活性，降低 MDA 水平，有效保护海马神经元，进而提升癫痫大鼠的学习和记忆能力^[95]。人参皂苷 Rb₁ 可增加脑组织中 GSH 水平，同时降低 MDA 水平，降低癫痫发作严重程度并改善认知功能缺陷^[96]。

在癫痫发作后，神经元凋亡是神经元丢失的重要形式。山茱萸多糖通过抑制 MAPK 通路，下调 Cyt C 和 Caspase-3 水平，抑制神经元凋亡^[97]。灵芝酸则通过下调钙感受受体 (CaSR) 表达，降低 Bax 和 Caspase-3 水平，并增加 Bcl-2 的含量，抑制神经元凋亡，展现出显著的抗癫痫活性与神经保护作用^[98]。胡椒碱能够改善大鼠癫痫持续状态和记忆障碍，与 Caspase-3 活性和 Bax/Bcl-2 比例的下调有关^[99]。

综上所述，药食同源中药在癫痫治疗中，通过调控神经递质平衡、抑制神经炎症、增强抗氧化能力以及抑制神经元凋亡等多个途径，有效降低癫痫发作频率，缓解认知功能减退等伴随症状，详见表 5。

表 5 药食同源中药防治癫痫的作用及机制

Tab 5 Mechanism of prevention and treatment of epilepsy by medicinal and edible homologous herb

中药	活性成分	药效机制	分子机制	参考文献
天麻	天麻素	调节神经递质及受体	GABA _A 受体 $\alpha 1$ 亚基水平 \uparrow , GABA 活性 \uparrow	[91]
酸枣仁	醇提物		AchE 和 BchE 活性 \uparrow	[92]
黄芪	黄芪多糖	抑制炎症反应	小胶质细胞、星形胶质细胞的活化 \downarrow , IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 \downarrow	[93]
丁香	丁香酚		抑制 NF- κ B 的激活, NLRP3 表达 \downarrow , TNF- α 和 IL-1 β 水平 \downarrow	[94]
枸杞	枸杞多糖	抗氧化应激	SOD、GSH-Px 活性 \uparrow , MDA 水平 \downarrow	[95]
人参	人参皂苷 Rb ₁		GSH 水平 \uparrow , MDA 水平 \downarrow	[96]
山茱萸	山茱萸多糖	抑制神经元凋亡	抑制 MAPK 信号通路, Cyt C 和 Caspase-3 水平 \downarrow	[97]
灵芝	灵芝酸		CaSR 表达 \downarrow , Bax 和 Caspase-3 水平 \downarrow , Bcl-2 含量 \uparrow	[98]
胡椒	胡椒碱		Caspase-3 活性 \downarrow , Bax/Bcl-2 \downarrow	[99]

2 结论与展望

CNS 结构的复杂性，调控机制的精密性以及涵盖病种的多样性导致其成为诸多慢性病、疑难病、罕见病产生的高地。药食同源中药具有多成分、多靶点、多通路的协同调控作用，与现代多靶点治疗复杂疾病的原理不谋而合。研究证实，药食同源中药在 CNS 疾病中展现广泛疗效，涵盖抑制神经元凋亡、抗氧化、抗炎、改善线粒体功能障碍、调节 HPA 轴与自噬水平等多种作用途径 (见图 1)，并通过调控 NF- κ B、Nrf2/HO-1、PI3K/Akt 及 MAPK 等关键信号通路，发挥预防和治疗作用。由此可见，药食同源中药的多靶点干预策略为 CNS 疾病防治提供了新视角，预示着其在功能食品或药物研发中的独特优势和广阔前景。

当前，药食同源中药在 CNS 疾病防治中的

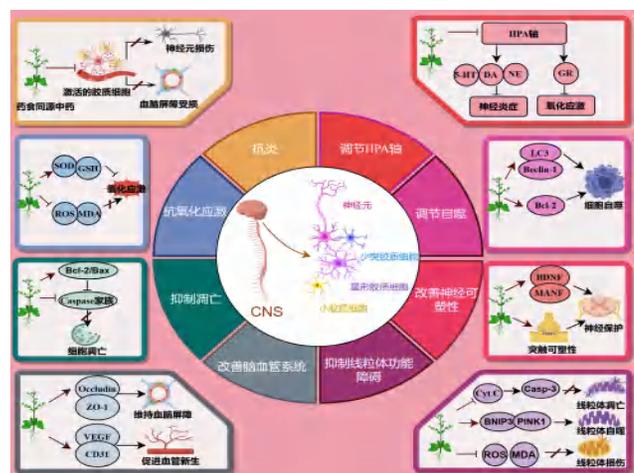


图 1 药食同源中药防治中枢神经系统疾病机制图 (来源于 www.figdraw.com)

Fig 1 MEHs in the prevention and treatment of CNS diseases [provided by FigDraw (www.figdraw.com)]

研究面临模型局限、临床验证不足及创新乏力等挑战。未来研究应着重：① 深化药效基础，融合肠道微生物组学、代谢组学和免疫学等多组学技术阐明作用机制；② 融合现代医学，实施严谨的临床试验，强化疗效验证与安全保障；③ 优化给药途径，利用纳米技术等新兴载体或改良鼻腔、脑脊液给药系统，增强药物靶向性。总体而言，药食同源中药在预防疾病领域显示出巨大潜力，未来应聚焦药效机制研究、个性化治疗及新药或功能性食品的研发，促进其在 CNS 疾病治疗中的实践应用，实现传统医学与现代科学的深度融合与创新。

参考文献

- [1] Joshi AU, Minhas PS, Liddelow SA, et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22 (10): 1635-1648.
- [2] Bothos E, Ntounou E, Kelaidoni K, et al. Clinical pharmacogenomics in action: design, assessment and implementation of a novel pharmacogenetic panel supporting drug selection for diseases of the central nervous system (CNS) [J]. *J Transl Med*, 2021, 19 (1): 151.
- [3] 嵇晶, 张云羽, 王令充, 等. 基于经典名方的药食同源大健康产品开发应用探讨 [J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39 (9): 961-966.
- [4] 李顺, 刘桂荣. 国医大师张志远治疗中风经验 [J]. *世界中医药*, 2024, 19 (4): 556-560.
- [5] 赵赫, 王成银. 从“一气周流”论治缺血性中风病 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30 (3): 533-536.
- [6] 刘雪梅. 基于“火与元气不两立”论治缺血性中风 [J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46 (9): 1291-1295.
- [7] 沙一飞, 臧妮, 钱卓磊. 西红花对脑梗死后遗症患者临床症状和血流动力学的影响 [J]. *上海医药*, 2024, 45 (1): 12-13, 18.
- [8] 杨圆圆, 倪金霞, 王迪, 等. 姜黄的活性成分防治缺血性脑卒中作用机制的研究进展 [J]. *环球中医药*, 2023, 16 (12): 2598-2604.
- [9] 刘江红, 王世祥, 黄开远, 等. 白芷和石菖蒲配伍对大鼠脑缺血损伤的保护作用 [J]. *西北药学杂志*, 2020, 35 (3): 368-372.
- [10] 王云, 李东影, 林凡凯, 等. 栀子治疗脑缺血的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (24): 226-234.
- [11] Zhou Z, Lu J, Liu WW, et al. Advances in stroke pharmacology [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 191: 23-42.
- [12] Oh TW, Park KH, Jung HW, et al. Neuroprotective effect of the hairy root extract of *Angelica gigas* NAKAI on transient focal cerebral ischemia in rats through the regulation of angiogenesis [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 101.
- [13] Wang FJ, Li RY, Tu PF, et al. Total glycosides of *cistanche deserticola* promote neurological function recovery by inducing neurovascular regeneration via Nrf-2/Keap-1 pathway in MCAO/R rats [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 236.
- [14] Liu XJ, Mei ZG, Qian JP, et al. Puerarin partly counteracts the inflammatory response after cerebral ischemia/reperfusion via activating the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8 (34): 3203-3215.
- [15] Na JY, Song K, Lee JW, et al. Pretreatment of 6-shogaol attenuates oxidative stress and inflammation in middle cerebral artery occlusion-induced mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 788: 241-247.
- [16] He Y, Jiang KF, Zhao X. Taraxasterol protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury through activation of Nrf2 signaling pathway [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48 (1): 252-258.
- [17] Guo L, Shi L. Vitexin improves cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating oxidative injury and ferroptosis via Keap1/Nrf2/HO-1 signaling [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48 (3): 980-995.
- [18] 韩运祺, 王娜, 石佳琦, 等. 丁香酚包合物对心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏的保护作用及机制研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24 (6): 2353-2360.
- [19] Wei H, Sun T, Tian YH, et al. Ginkgolide B modulates BDNF expression in acute ischemic stroke [J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2017, 60 (4): 391-396.
- [20] Zheng MZ, Zhou M, Chen MH, et al. Neuroprotective effect of daidzein extracted from *pueraria lobate* radix in a stroke model via the Akt/mTOR/BDNF channel [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 772485.
- [21] 王坤, 许佩佩, 周兰兰, 等. 人参皂苷 R_{g1} 调控 Epac1/Rap1 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经保护作用机制研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2023, 28 (7): 721-727.
- [22] Shi G, Chen JM, Zhang C, et al. Astragaloside IV promotes cerebral angiogenesis and neurological recovery after focal ischemic stroke in mice via activating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Heliyon*, 2023, 9 (12): e22800.
- [23] 李晶晶, 雷涛, 林俊, 等. 当归多糖通过促血管再生保护大鼠脑缺血再灌注损伤机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37 (9): 2272-2276, 2317.
- [24] 黄巧艺, 马丽娜, 吴素素, 等. 基于“虚损瘀毒”探讨阿尔茨海默病的病机与治疗 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44 (3): 461-466.
- [25] 董婷, 鲍远程, 匡春俊. 鲍远程教授治疗阿尔茨海默病临证经验 [J]. *中国民族民间医药*, 2021, 30 (12): 95-97.
- [26] 马锐, 兰闻禹, 王晓瑞, 等. 基于“窍”理论辨治阿尔茨海默病 [J]. *中医药学报*, 2023, 51 (10): 49-53.
- [27] 杨晶莹, 肖移生, 姜劫琳, 等. 黄精丸治疗轻中度阿尔茨海默病临床研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27 (11): 40-44.
- [28] 王哲, 马定财, 王毛毛, 等. 黄芪及其活性成分防治阿尔茨海默病机制研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55 (6): 2094-2100.
- [29] 王超楠, 赵大庆, 严铭铭, 等. 人参治疗阿尔茨海默病药理作用及机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 42 (3): 116-122.
- [30] 毕天, 李彦文, 段靖远, 等. 天麻抗老年期痴呆有效成分的研究进展 [J]. *中医药导报*, 2013, 19 (2): 103-106.
- [31] 陈娟丽, 魏传飞, 韩发彬. 姜黄素改善阿尔茨海默病认知和记忆功能的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41 (4): 887-891.

- [32] Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju VC, et al. Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer ' s disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2015, 12 (1): 32-46.
- [33] Huang J, Huang NQ, Zhang MH, et al. Dendrobium alkaloids decrease $A\beta$ by regulating α - and β -secretases in hippocampal neurons of SD rats [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7627.
- [34] 罗雅琪, 郭志清, 戴瑛, 等. 四氢姜黄素固体分散体对 D-半乳糖联合三氯化铝致小鼠学习记忆障碍的作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34 (6): 38-42.
- [35] Tang MP, Wang ZX, Zhou Y, et al. A novel drug candidate for Alzheimer ' s disease treatment: gx-50 derived from *Zanthoxylum bungeanum* [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 34 (1): 203-213.
- [36] 苏亚楠, 程开, 窦鹏挥, 等. 山茱萸多糖对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆及海马糖原合成酶激酶-3 β 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38 (11): 2700-2702.
- [37] Zhang Q, Xia YY, Luo HB, et al. Codonopsis pilosula polysaccharide attenuates Tau hyperphosphorylation and cognitive impairments in hTau infected mice [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 437.
- [38] 赵娣, 李爽, 徐婧. 蒲公英总黄酮改善 $A\beta$ 25-35 诱导的阿尔茨海默病大鼠记忆功能障碍的观察 [J]. *中国药物评价*, 2019, 36 (1): 41-45.
- [39] Qin X, Hua J, Lin SJ, et al. Astragalus polysaccharide alleviates cognitive impairment and β -amyloid accumulation in APP/PS1 mice via Nrf2 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 531 (3): 431-437.
- [40] Cho E, Lee J, Sin JS, et al. Effects of *Perilla frutescens* var. *acuta* in amyloid β toxicity and Alzheimer ' s disease-like pathology in 5XFAD mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 161: 112847.
- [41] Lv C, Wang L, Liu XL, et al. Multi-faced neuroprotective effects of geniposide depending on the RAGE-mediated signaling in an Alzheimer mouse model [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 89: 175-184.
- [42] Zhou XB, Zhang YX, Jiang YQ, et al. Poria cocos polysaccharide attenuates damage of nervus in Alzheimer ' s disease rat model induced by D-galactose and aluminum trichloride [J]. *Neuroreport*, 2021, 32 (8): 727-737.
- [43] Zhang MM, Xie MG, Wei DN, et al. Hydroxy- α -sanshool isolated from *Zanthoxylum bungeanum* attenuates learning and memory impairments in scopolamine-treated mice [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (11): 7315-7324.
- [44] Du Q, Zhu XY, Si JR. Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer ' s disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020, 245 (1): 1-10.
- [45] Byun EB, Cho EJ, Kim YE, et al. Neuroprotective effect of polysaccharide separated from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo against H_2O_2 -induced oxidative stress in HT22 hippocampus cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82 (8): 1344-1358.
- [46] 李和梅, 蒋怡萱, 黄盼玲, 等. 人参皂苷 Rg₁ 通过激活 PINK1/Parkin 增强线粒体自噬保护 $A\beta$ 损伤的 PC12 细胞 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (2): 484-491.
- [47] Hu YR, Xing SL, Chen C, et al. Codonopsis pilosula polysaccharides alleviate $A\beta$ ₁₋₄₀-induced PC12 cells energy dysmetabolism via CD38/NAD⁺ signaling pathway [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2021, 18 (3): 208-221.
- [48] 常美如, 张静艺, 骆守真, 等. 黄煌辨体质分阶段治疗帕金森病经验 [J]. *河南中医*, 2024, 44 (7): 1049-1054.
- [49] 孟明贤, 沈晓明, 卢瑾, 等. 马云枝从“虚-瘀-毒”分期辨治帕金森病经验 [J]. *山东中医杂志*, 2024, 43 (2): 181-184.
- [50] 关仁杰, 陈炯华, 王永生. 符为民从本虚邪实论治帕金森病临证经验探讨 [J]. *中医药临床杂志*, 2020, 32 (11): 2065-2068.
- [51] Zhang SS, Yu ZP, Xia JY, et al. Anti-Parkinson ' s disease activity of phenolic acids from *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extracts and their autophagy activation mechanism [J]. *Food Funct*, 2020, 11 (2): 1425-1440.
- [52] 朱文静, 吴春云. 天麻素用于治疗中枢神经系统疾病的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2021, 50 (15): 2670-2674.
- [53] 陈浩, 师亮, 王燕宏, 等. 甘草黄酮对 MPTP 帕金森病模型小鼠的神经保护作用及对小胶质细胞活化的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (20): 225-229.
- [54] 龚俊杰, 徐子金, 王平. 基于网络药理学和分子对接探讨西红花治疗帕金森病的作用机制 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2023, 47 (12): 1383-1394.
- [55] Ali N, Syeda A, Topgyal T, et al. Parkinson ' s disease: a current perspectives on Parkinson ' s disease and key bioactive natural compounds as future potential drug candidates [J]. *Curr Drug Targets*, 2022, 23 (1): 2-20.
- [56] Huang BX, Liu JX, Ju C, et al. Licochalcone a prevents the loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation in lipopolysaccharide (LPS) -induced Parkinson ' s disease models [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (10): 2043.
- [57] Yang XP, Yv QY, Ye FL, et al. Echinacoside protects dopaminergic neurons through regulating IL-6/JAK2/STAT3 pathway in Parkinson ' s disease model [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 848813.
- [58] 黄晓静, 黄淮, 徐正虎, 等. 黄芪甲苷改善 1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导的帕金森病 SK-N-SH 细胞损伤疗效初探 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2022, 22 (3): 155-162.
- [59] Rao SV, Muralidhara, Yeniseti SC, et al. Evidence of neuroprotective effects of saffron and crocin in a drosophila model of Parkinsonism [J]. *Neurotoxicology*, 2015, 52: 230-242.
- [60] Huang NQ, Zhang Y, Chen MJ, et al. Resveratrol delays 6-hydroxydopamine-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Exp Gerontol*, 2019, 124: 110653.
- [61] Zhao Q, Yang XY, Cai DF, et al. Echinacoside protects against MPP⁺-induced neuronal apoptosis via ROS/ATF3/CHOP pathway regulation [J]. *Neurosci Bull*, 2016, 32 (4): 349-362.
- [62] Li QM, Li X, Su SQ, et al. Dendrobine inhibits dopaminergic neuron apoptosis via MANF-mediated ER stress suppression in MPTP/MPP⁺-induced Parkinson ' s disease models [J]. *Phyto-medicine*, 2022, 102: 154193.
- [63] 吕润潇, 杜莉莉, 周风华, 等. 迷迭香酸抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进细胞自噬缓解帕金森的机制研究 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2019, 41 (12): 1189-1194.
- [64] 刘展, 蔡美云, 庄文欣, 等. 山茱萸通过 mTOR 通路诱导细胞自噬保护帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33 (4): 446-453.
- [65] 王春玲, 罗宁, 文晓东, 等. 乌梅总黄酮通过线粒体自噬对

- 帕金森病大鼠的保护作用[J]. 西部中医药, 2022, 35 (12): 72-76.
- [66] Liu MC, Yu ST, Wang JW, et al. Ginseng protein protects against mitochondrial dysfunction and neurodegeneration by inducing mitochondrial unfolded protein response in *Drosophila melanogaster* PINK1 model of Parkinson's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 247: 112213.
- [67] 史继鑫, 张君君. 马云枝诊治抑郁症经验[J]. 中医学报, 2024, 39 (2): 354-358.
- [68] 张弛, 张梦雪, 马烈光. 马烈光教授从肝脾辨病程论治抑郁症[J]. 成都中医药大学学报, 2021, 44 (2): 62-65.
- [69] 常军, 边育红, 徐欢, 等. 佛手治疗抑郁症的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2021, 32 (8): 1971-1973.
- [70] 黄世敬, 潘菊华, 王彦云. 黄精在抑郁症中的应用及其抗抑郁机理探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22 (12): 127-129.
- [71] 宫文霞, 周玉枝, 李肖, 等. 当归抗抑郁化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2016, 47 (21): 3905-3911.
- [72] 田磊, 栗俞程, 白明, 等. 梔子及其方剂配伍治疗抑郁症研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (14): 239-247.
- [73] Malhi GS, Mann JJ. Depression [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10161): 2299-2312.
- [74] 刘亚敏, 栗俞程, 李寒冰, 等. 夏枯草水提取物抗抑郁作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28 (4): 440-444.
- [75] Shen FM, Song ZJ, Xie P, et al. Polygonatum sibiricum polysaccharide prevents depression-like behaviors by reducing oxidative stress, inflammation, and cellular and synaptic damage [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114164.
- [76] 蔡莉, 李荣, 吴清清, 等. 橙皮苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及 HPA 轴的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (2): 229-233.
- [77] 胡园, 廖红波, 刘屏, 等. 胡椒碱调节大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴抗抑郁作用的实验研究[J]. 中西医结合学报, 2009, 7 (7): 667-670.
- [78] Zhao YH, Li HY, Fang F, et al. Geniposide improves repeated restraint stress-induced depression-like behavior in mice by ameliorating neuronal apoptosis via regulating GLP-1R/AKT signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 676: 19-26.
- [79] Zhang WY, Guo YJ, Han WX, et al. Curcumin relieves depressive-like behaviors via inhibition of the NLRP3 inflammasome and kynurenine pathway in rats suffering from chronic unpredictable mild stress [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 138-144.
- [80] 吴欢欢, 陆清溪, 陈晓群. 人参皂苷 Rh₂ 通过抑制氧化应激和神经炎症缓解小鼠应激诱导的抑郁样行为[J]. 徐州医科大学学报, 2023, 43 (3): 163-169.
- [81] 张聪, 胡楚璇, 李穗华, 等. 葛根素对慢性不可预知温和刺激大鼠抑郁行为的影响及其机制[J]. 药理学学报, 2018, 53 (2): 220-226.
- [82] Qian LH, Huang SR, Liu XL, et al. Morroniside improves the symptoms of post-stroke depression in mice through the BDNF signaling pathway mediated by MiR-409-3p [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155224.
- [83] Li HR, Xiao YH, Han L, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides ameliorated depression-like behaviors in the chronic social defeat stress depression model via modulation of dectin-1 and the innate immune system [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 171: 16-24.
- [84] 陈风华, 胡勇, 董少龙. 董少龙治疗癫痫经验[J]. 中国民间疗法, 2022, 30 (24): 64-66.
- [85] 鲁明源, 杜颖初. 迟华基论治癫痫的理论特色和经验[J]. 山东中医杂志, 2017, 36 (11): 922-925.
- [86] 吴纪添, 张永全, 胡芷颖, 等. 天麻对癫痫的影响及潜在机制[J]. 中国医学创新, 2023, 20 (2): 184-188.
- [87] 冶秀兰, 李明, 王兆建, 等. 山茱萸多糖对难治性癫痫幼鼠行为学及海马组织中多药耐药基因 1b 及主穹隆蛋白表达的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47 (3): 644-651.
- [88] 刘德英, 雷芳, 谢苗莹, 等. 姜黄素治疗癫痫疾病的作用机制研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2024, 33 (5): 714-719.
- [89] 农雪娟, 覃丽娜, 赵爽. 灵芝有效成分抗癫痫作用的生物学机制进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18 (18): 36-39.
- [90] Zhang LQ. Research on the pathogenesis and treatment of epilepsy [J]. *J Med Inf*, 2021, 34 (16): 44-46.
- [91] Yang CS, Chiu SC, Liu PY, et al. Gastrodin alleviates seizure severity and neuronal excitotoxicities in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy via enhancing GABA ergic transmission [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 269: 113751.
- [92] Pahuja M, Mehla J, Reeta KH, et al. Hydroalcoholic extract of *Zizyphus jujuba* ameliorates seizures, oxidative stress, and cognitive impairment in experimental models of epilepsy in rats [J]. *Epilepsy Behav*, 2011, 21 (4): 356-363.
- [93] Lu YL, Lin ML, Ou SJ, et al. Astragalus polysaccharides ameliorate epileptogenesis, cognitive impairment, and neuroinflammation in a pentylenetetrazole-induced kindling mouse model [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1336122.
- [94] Zhu J, Park S, Kim CH, et al. Eugenol alleviates neuronal damage via inhibiting inflammatory process against pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248 (8): 722-731.
- [95] 陈博, 宋小娜, 宋彦, 等. 枸杞多糖对癫痫大鼠学习记忆能力的影响及抗氧化应激作用[J]. 中国中医药科技, 2020, 27 (2): 204-207.
- [96] Shi YB, Miao W, Teng JF, et al. Ginsenoside Rb₁ protects the brain from damage induced by epileptic seizure via Nrf2/ARE signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45 (1): 212-225.
- [97] Sun XM, Kong LT, Zhou L. Protective effect of Fructus corni polysaccharide on hippocampal tissues and its relevant mechanism in epileptic rats induced by lithium chloride-pilocarpine [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16 (1): 445-451.
- [98] Pang W, Lu SQ, Zheng R, et al. Investigation into antiepileptic effect of ganoderic acid A and its mechanism in seizure rats induced by pentylenetetrazole [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 5940372.
- [99] Mao K, Lei D, Zhang H, et al. Anticonvulsant effect of piperine ameliorates memory impairment, inflammation and oxidative stress in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13 (2): 695-700.

(收稿日期: 2024-07-15; 修回日期: 2024-08-20)

单萜类化合物抗抑郁作用及其机制的研究进展

胡红军^{1,4}, 张岩², 蒋翔锐^{3*} (1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 中科环渤海(烟台)药物高等研究院/烟台新药创制山东省实验室, 山东 烟台 264117; 4. 南通长三角药物高等研究院, 江苏南通 226133)

摘要: 单萜类化合物是一类含有两个异戊二烯结构的重要天然产物, 具有广泛的药理活性, 包括抗炎、抗氧化、免疫调节、神经保护等。越来越多的研究证实, 单萜类化合物在抗抑郁疾病方面具有潜在的效果。一些单萜类化合物能通过调节神经递质水平, 改善下丘脑-垂体-肾上腺轴功能, 影响神经营养因子水平, 抑制炎症和氧化应激等机制缓解抑郁症状。本文归纳了具有抗抑郁作用的单萜类天然产物, 并对其抗抑郁作用机制进行了汇总, 以为抑郁症的治疗与药物研发提供参考。

关键词: 单萜类化合物; 环烯醚萜类; 天然产物; 抗抑郁; 作用机制

中图分类号: R285, R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3328-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.029

Research progress in the antidepressant effects and mechanisms of monoterpenoids

HU Hong-jun^{1,4}, ZHANG Yan², JIANG Xiang-rui^{3*} (1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203; 3. Shandong Laboratory of Yantai Drug Innovation and Preparation, Bohai Rim Advanced Research Institute for Drug Innovation, Yantai Shandong 264117; 4. Nantong Haimen Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133)

Abstract: Monoterpenoids are important natural product containing two isoprene structures with many pharmacological activities, including anti-inflammation, antioxidation, immune regulation, and neuroprotection, etc. Some monoterpenoids can relieve depressive symptoms by regulating the levels of neurotransmitters, improving the function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, affecting the levels of neurotrophic factors, and inhibiting the inflammation and oxidative stress, etc. This article summarized natural monoterpenoids with antidepressant effect and summarized their antidepressant mechanism, to provide reference for the treatment and drug development of depression.

Key words: monoterpenoid; iridoid; natural product; antidepressant; mechanism of action

抑郁症是一种常见的精神障碍疾病, 主要表现为情绪低落、快感缺乏、易怒、注意力不集中以及食欲和睡眠异常等症状^[1]。世界卫生组织(WHO)于2022年3月发布的数据显示, 全世界有超过3.5亿人正遭受抑郁症困扰, 预计影响的人数还在快速增长中^[2]。抑郁症的病因较复杂, 机体的神经递质水平异常、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能异常、激素失调、神经营养中断、肠道微生物组紊

乱、线粒体能量代谢障碍等因素都有可能导致抑郁症^[3]。虽然临床上抗抑郁药物较多, 但是治疗效果并不理想, 存在疗效延迟、较易复发等问题, 而且这些药物普遍存在一定的不良反应, 例如恶心、头晕、头痛、胃肠道不适、体重增加、性功能障碍和睡眠障碍等^[4-5]。因此从种类丰富、来源广泛的天然产物中寻找更有效更安全的抗抑郁化合物具有重要意义。

作者简介: 胡红军, 男, 硕士, 主要从事中枢神经系统疾病药物的合成研究, email: hjhu.hm@simm.ac.cn *通信作者: 蒋翔锐, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事抗病毒药物、中枢神经系统疾病药物发现以及药物绿色合成方法研究, email: jiangxiangrui@simm.ac.cn

单萜类化合物是一类以两分子异戊二烯为基本骨架的化合物,广泛存在于植物中,也是许多中药的药理活性物质,具有抗炎、抗氧化、免疫调节、神经保护等作用^[6]。本文综述了天然存在的环烯醚萜类化合物及其他单萜类化合物的抗抑郁作用及机制,以期对抑郁症治疗和药物研发提供参考。

1 环烯醚萜类化合物

环烯醚萜类化合物是一组具有环戊烷环和半

缩醛结构的特殊单萜类化合物,主要存在于玄参科、茜草科、唇形科、龙胆科、马鞭草科、木犀科等双子叶植物中。据不完全统计,已从植物中分离并鉴定结构的环烯醚萜类化合物超过 800 种,其中大多数为苷类成分^[7]。研究发现具有抗抑郁作用的环烯醚萜类化合物主要包括梓醇、栀子苷、山栀苷甲酯、马钱子苷、莫诺苷、桃叶珊瑚苷、龙胆苦苷和橄榄苦苷等(结构见图 1)。

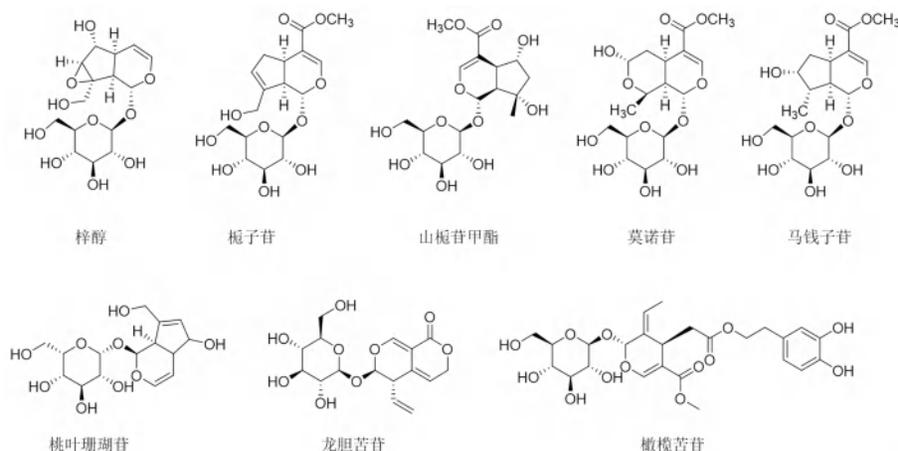


图 1 部分具有抗抑郁作用的环烯醚萜类化合物

Fig 1 Some iridoid compounds with antidepressant effect

1.1 梓醇的抗抑郁作用

梓醇属于 7, 8- 环氧型环烯醚萜类化合物,是地黄的主要活性成分之一^[8]。梓醇的抗抑郁作用可能与中枢神经系统中的 5- 羟色胺 (5-HT) 能神经元密切相关。梓醇治疗显著改善了利血平 (囊泡再摄取抑制剂) 导致的小鼠直肠温度下降、运动障碍和眼睑下垂等症状; 并且增加了小鼠大脑中 5-HT 和 5- 羟基吲哚乙酸 (5-HIAA) 的水平, 但对去甲肾上腺素 (NE) 和多巴胺 (DA) 的水平没有影响^[9]。梓醇可能通过上调磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (Akt) / 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) / 血红素加氧酶 -1 (HO-1) 通路起到抗抑郁作用。PI3K/Akt 信号通路在预防应激诱发性抑郁症的发生中起重要作用, 还可以促进 Nrf2/HO-1 通路抗氧化反应元件的结合, 从而保护身体免受氧化应激损伤^[10]。在慢性温和不可预见刺激 (CUMS) 小鼠模型中, 梓醇可以上调 PI3K、Akt、Nrf2 和 HO-1 的水平, 发挥神经保护和抗氧化作用, 改善小鼠的动力缺乏、兴趣低、快感缺乏和行为绝望等抑郁样行为^[11]。梓醇还可通过影响脑源性神经营养因子 (BDNF) 和环氧合酶 -2 (COX-2) 水平而发挥抗抑郁作用。在 CUMS 大鼠模型中, 梓醇通过上调 BDNF、原肌球蛋白受体激酶 B (TrkB) 的水平, 下调 COX-2 的水平, 修复神经元可塑性的损伤, 改善大鼠的神经炎症和抑郁样行为^[12]。此外, 梓醇还

可能通过氧化应激调控 NLRP3 炎症小体而发挥抗抑郁作用。在 CUMS 模型小鼠中, 梓醇能够通过减少活性氧 (ROS) 的产生来抑制 NLRP3 的激活, 显著降低裂解的半胱氨酸蛋白酶 -1 (Caspase-1)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素 1β (IL- 1β) 和肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 的水平, 并抑制小胶质细胞活化, 改善小鼠的抑郁症状^[13]。

1.2 栀子苷的抗抑郁作用

栀子苷属于 7, 8- 环戊烯型环烯醚萜类化合物, 是栀子、地黄、杜仲和牛膝等中药的有效成分^[14], 主要来源于栀子, 在药用栀子果实中占 3.3% ~ 8.6%^[15]。栀子苷是一种胰高血糖素样肽 -1 受体 (GLP-1R) 激动剂, 可通过激活 GLP-1R/AKT 信号通路来发挥抗抑郁作用。GLP-1R 在海马体、新皮层、下丘脑、脊髓和小脑中广泛表达, 能减少脑部的神经炎症, 增加存活细胞的腺苷酸环化酶 (AC)、蛋白激酶 C (PKC) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等 G 蛋白信号传导^[16]。栀子苷可以促进反复抑制应激 (RRS) 模型小鼠海马的 GLP-1R/AKT 信号通路相关蛋白的表达来抑制小鼠海马的神经元凋亡, 降低 IL- 1β 和 TNF- α 水平, 改善小鼠的抑郁症状, 并且这些作用可被 GLP-1R 拮抗剂阻断^[17]。栀子苷可能通过影响脑内酸性鞘磷脂酶 (ASM) / 神经酰胺 (Cer) 系统而发挥抗抑郁作用。ASM/Cer 系统被认为是抗抑郁的

潜在靶点,条件性敲除 ASM 可以降低大脑中 Cer 的水平,促进 Akt/GSK3 β 信号传导来保护神经元^[18-19]。槲子苷可以抑制 CUMS 模型小鼠脑内 ASM 的活性,降低 Cer 水平,升高 PI3K、Akt 和糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β) 的磷酸化水平,抑制细胞凋亡相关蛋白的表达,进而缓解神经元凋亡,改善小鼠的抑郁样行为^[20]。槲子苷能够抑制酪氨酸激酶 (BTK) 的信号传导而发挥抗抑郁作用。在脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠中,槲子苷可以减弱 BTK、Janus 激酶 2 (JAK2) 的信号传导和转录激活因子 1 (STAT1) 的磷酸化,并且能够抑制 BDNF/TrkB 信号传导,抑制小胶质细胞的活化,降低 TNF- α 和 IL-6 的水平,改善小鼠的神经炎症和抑郁样行为^[21]。槲子苷还增加 CUMS 模型小鼠对蔗糖的偏好,减少小鼠在悬尾实验 (TST) 和强迫游泳实验 (FST) 的不动时间,其机制可能是抑制了 BTK/TLR4/NF- κ B 信号通路,从而降低了 TNF- α 和 IL-6 的水平以及抑制超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性^[22]。槲子苷还可以通过影响 HPA 轴来发挥抗抑郁作用。在 CUMS 模型大鼠中,槲子苷可以抑制下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) mRNA 的表达水平,上调下丘脑糖皮质激素受体 (GR) mRNA 水平,从而调节 HPA 轴的水平,改善大鼠的抑郁样行为^[23]。

1.3 山柃苷甲酯的抗抑郁作用

山柃苷甲酯属于环戊烷型环烯醚萜类化合物,是独一味的主要活性成分,也是 2020 年版《中国药典》独一味药材指标成分之一^[24]。山柃苷甲酯可以增加 CUMS 模型小鼠对蔗糖的偏好,以及减少小鼠在 FST 和 TST 的不动时间。其抗抑郁机制可能是山柃苷甲酯能够抑制海马体中 miRNA-155 的表达,促进细胞因子信号抑制因子 1 (SOCS1) 的信号传导,减少 IL-6 和 TNF- α 的产生^[25]。

1.4 莫诺苷的抗抑郁作用

莫诺苷是一种非典型的环烯醚萜类化合物,其结构与常见环烯醚萜类化合物的不同之处是五元碳环的 C-7 和 C-8 处双键断裂,并被六元环醚片段取代,是山茱萸和接骨木药材中的主要活性成分之一^[26-27]。莫诺苷可以改善 CUMS 模型大鼠抑郁样行为,包括增加大鼠对蔗糖的偏好以及在旷场实验 (OFT) 中活动水平。此外,莫诺苷还改善了大鼠大脑前额叶脑区神经元的组织病理学改变,能够抑制 NF- κ B 信号通路,降低神经炎症反应,使神经元细胞数量增加,排列整齐^[28]。

1.5 马钱子苷的抗抑郁作用

马钱子苷属于环戊烷型环烯醚萜类化合物,也是山茱萸的主要活性成分之一,在山茱萸中含量可达 0.50% ~ 0.91%^[29]。马钱子苷的抗抑郁作用可能

是由中枢神经系统的 5-HT 能神经元介导的。马钱子苷能减少抑郁小鼠在 TST 的不动时间,并显著提高中枢神经系统的 5-HT 水平,但不影响 NE 的水平。此外,马钱子苷对 5-HIAA 的水平没有显著影响,但可能会抑制 5-HT 代谢为 5-HIAA^[30]。马钱子苷可以改善 HPA 轴功能障碍而发挥抗抑郁作用。在 CUMS 小鼠模型中,马钱子苷可以增加小鼠对蔗糖的偏好,减少小鼠在 FST 和 TST 中的不动时间,并且能够显著降低小鼠血清中促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和皮质酮 (CORT) 的水平,增加前额叶皮层中单胺类神经递质的水平和促进 BDNF 的表达^[31]。马钱子苷还能改善抑郁症相关的神经炎症。根据网络药理学分析,连环蛋白 β 1 (CTNN β 1) 可能是马钱子苷-炎症-抑郁交叉靶点交叉网络中的主要节点。在 LPS 诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症模型中,马钱子苷能够显著升高 BV-2 细胞中 CTNN β 1 的 mRNA 水平,抑制细胞的炎症反应^[32]。此外,在抑郁症合并糖尿病的大鼠模型中,马钱子苷显著降低 IL-6 和 TNF- α 的水平,减少大鼠在 FST 的不动时间^[33]。

1.6 桃叶珊瑚苷的抗抑郁作用

桃叶珊瑚苷属于 7, 8-环戊烯型环烯醚萜类化合物,是玄参、杜仲和车前草等中草药的有效成分之一^[34-35]。桃叶珊瑚苷可能通过激活 GR 来抑制 NF- κ B/NLRP3 信号通路,发挥抗抑郁作用。桃叶珊瑚苷能够抑制 CUMS 模型小鼠血清中 CORT、ACTH 和 CRH 的释放,通过促进下丘脑和海马中 GR 的磷酸化来抑制 NF- κ B/NLRP3 信号通路传导,降低 L-1 β 和 IL-18 的水平,促进神经元的轴突再生,增加神经元数量,改善小鼠抑郁样行为^[36]。

1.7 龙胆苦苷的抗抑郁作用

龙胆苦苷属于裂环环烯醚萜类化合物,是多种龙胆科植物的主要活性成分之一^[37]。龙胆苦苷可以通过抑制犬尿氨酸 (KYN) 途径来改善抑郁症状。KYN 途径是色氨酸代谢的主要途径,在吲哚胺 2, 3-双加氧酶的催化下,形成代谢产物犬尿喹啉酸和喹啉酸^[38]。犬尿喹啉酸和喹啉酸可以通过多种机制作用于 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (NMDA),与抑郁症密切相关^[39]。在 LPS 诱导的小鼠模型中,龙胆苦苷能够降低小鼠脑中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平,降低 KYN/色氨酸比值,抑制小鼠的色氨酸过度降解,改善抑郁样行为^[40]。龙胆苦苷还可以降低 CORT 模型大鼠的花生四烯酸等代谢物水平,调节 5-HT 水平,促进 BDNF 的表达,抑制 Caspase-3 的表达,减轻海马体的细胞凋亡和氧化应激;而体外研究表明,花生四烯酸逆转了龙胆苦苷对 CORT 诱导的神经母细胞瘤细胞氧化应激的治疗作用^[41]。

1.8 橄榄苦苷的抗抑郁作用

橄榄苦苷属于苯酚类裂环环烯醚萜苷化合物,广泛存在于木樨科的木樨榄属、丁香属、女贞属和茉莉属植物中,也是橄榄树果实和叶片中主要的酚类化合物^[42]。橄榄苦苷可通过抑制 RhoA/ROCK 信号通路而发挥抗抑郁作用。在 LPS 诱导的小鼠模型中,橄榄苦苷能够通过抑制 RhoA 和 ROCK 的表达来上调 NT-3 和 NT-4 的水平,调节神经元细胞的生

长和分化,改善小鼠抑郁样行为^[43]。橄榄苦苷还可以改善 CORT 模型小鼠抑郁样行为,减少小鼠在 TST 和 FST 的不动时间,减少小鼠在旷场中央区域的运动,并调节 HPA 轴的水平,逆转 CORT 模型小鼠脑部的 GSH 水平降低和硫代巴比妥酸反应物(TBARS)水平升高,减轻脑部氧化应激^[44]。

综上所述,常见的环烯醚萜类化合物在抑郁症中的作用机制见表 1。

表 1 环烯醚萜类化合物抗抑郁症作用机制

Tab 1 Mechanism of antidepressant of iridoid compounds

化合物	动物/细胞模型	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	作用机制	文献
梓醇	FST, TST 导致的急性应激模型小鼠	5、10、20	增加 5-HT 和 5-HIAA 水平	[9]
	CUMS 小鼠	10	上调 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1 水平	[11]
	CUMS 大鼠	5、10、20	上调 BDNF、TrkB 水平, 下调 COX-2 水平	[12]
	CUMS 小鼠	20	抑制 NLRP3 的激活, 降低裂解的 Caspase-1、iNOS、IL-1 β 和 TNF- α 的水平	[13]
栀子苷	RRS 小鼠	100	抑制 GLP-1R/AKT 信号通路, 降低 IL-1 β 、TNF- α 水平	[17]
	CUMS 小鼠	30、60、90	抑制脑内 ASM 的活性, 减少 Cer 水平, 促进 PI3K、Akt 和 GSK-3 β 的磷酸化	[20]
	LPS 诱导小鼠	10、40	抑制 BDNF/TrkB 信号传导, 下调 TNF- α 、IL-6 水平	[21]
	CUMS 小鼠	10、40	抑制 BTK/TLR4/NF- κ B 信号通路, 抑制 SOD、GSH-PX 的活性, 下调 TNF- α 、IL-6 水平	[22]
	CUMS 大鼠	25、50、100	抑制 CRH 的 mRNA 的表达, 上调 GR 的 mRNA 水平, 调节 HPA 轴水平	[23]
山栀苷甲酯	CUMS 小鼠	25、50	抑制海马体中 miRNA-155 的表达, 促进 SOCS1 信号传导, 下调 IL-6、TNF- α 水平	[25]
莫诺苷	CUMS 大鼠	200	抑制 NF- κ B 信号通路	[28]
马钱子苷	TST 导致的急性应激模型小鼠	3、12.5、50	提高 5-HT 水平	[30]
	CUMS 小鼠	12.5、50	下调 ACTH 和 CORT 的水平, 上调单胺类神经递质的水平, 促进 BDNF 表达	[31]
LPS 诱导 BV-2 小胶质细胞		10、20、40	上调 CTNBN1 的 mRNA 水平	[32]
	STZ 诱导大鼠	40	下调 IL-6 和 TNF- α 水平	[33]
	STZ 诱导大鼠	40	下调 IL-6 和 TNF- α 水平	[33]
桃叶珊瑚苷	CUMS 小鼠	10、20	调节 HPA 轴激素水平, 抑制 NF- κ B/NLRP3 通路, 下调 IL-1 β 、IL-18 水平	[36]
龙胆苦苷	LPS 诱导小鼠	50	降低 IL-1 β 和 TNF- α 的水平, 降低 KYN/色氨酸比值	[40]
	CORT 诱导大鼠	100	降低花生四烯酸等代谢物水平, 促进 BDNF 的表达,	[41]
橄榄苦苷	LPS 诱导小鼠	10	抑制 RhoA/ROCK 信号通路, 促进 NT-3 和 NT-4 的表达	[43]
	CORT 诱导小鼠	8、16、32	调节 HPA 轴的水平, 上调脑部 GSH 水平、下调 TBARS 水平	[44]

2 其他单萜类化合物

除了环烯醚萜类化合物, 其他的单萜类化合物结构通常更简单, 分子量更小, 具有明显的挥发性, 少数单萜类化合物上连有其他官能团, 结构更丰富, 常不具备挥发性^[45]。虽然一些富含单萜类化合物的精油如薰衣草精油、柠檬精油、川芎精油和细辛精油等常用于缓解抑郁和平静情绪^[46], 但是这类单萜类化合物作为单一成分被用于抑郁症的研究比较少, 主要包括芍药苷、大麻二酚、香叶醇、麝香草酚、L-薄荷酮和紫苏醇等(结构见图 2)。

2.1 芍药苷的抗抑郁作用

芍药苷是具有萜烷骨架的单萜双环糖苷类化合

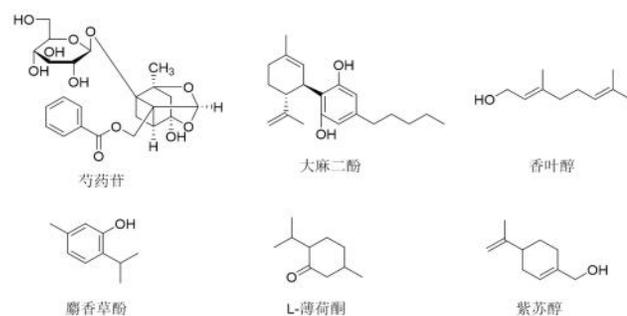


图 2 部分具有抗抑郁作用的其他单萜类化合物

Fig 2 Other monoterpenoids with antidepressant effects

物, 其骨架上连接了 β -D-吡喃葡萄糖基、苯甲酰基和半缩醛结构, 主要来源于毛茛科植物芍药根、牡

丹根、紫牡丹根^[47]。芍药苷可以上调神经元释放 5-HT 的水平,改善 CUMS 模型小鼠的抑郁样行为,显著缩短小鼠在 FST 和 TST 中的不动时间。经利血平处理的小鼠可出现上睑下垂、体温过低和僵直症状,这些症状能被芍药苷拮抗。此外,芍药苷还显著增加了海马体中 5-HT 和 5-HIAA 的水平^[48]。芍药苷可以促进细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 信号通路来发挥抗抑郁作用。ERK1/2 是一种重要的 MAPK,在抑郁症中起重要作用。当小鼠经历慢性束缚应激 (CRS) 时,参与 ERK1/2 信号通路的关键蛋白 (包括 ERK1/2、CREB 和 BDNF) 的表达显著降低^[49]。芍药苷可以促进 CRS 模型小鼠 ERK1/2 蛋白的表达,改善小鼠海马神经元的不良形态,增加海马神经元的数量,改善小鼠抑郁样行为^[50]。芍药苷可以通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路传导来减轻小鼠的抑郁症状。在 LPS 诱导的小鼠模型中,芍药苷可以通过抑制 TLR4、NF- κ B、NLRP3 的磷酸化来降低海马中的促炎细胞因子水平和抑制小胶质细胞活化,并上调神经元的成纤维细胞生长因子 (FGF-2) 的水平和树突棘的密度,发挥抗抑郁作用^[51]。

2.2 大麻二酚的抗抑郁作用

大麻二酚是一种柠檬烯衍生物的单萜类化合物,其骨架上连接了间苯二酚和戊碳链结构,是大麻中的非精神活性成分^[52]。大麻二酚在 FST/习得性无助 (LH) 模型小鼠和 Flinders 敏感品系 (FSL) /Flinders 抗性品系 (FSL) 模型大鼠中均发挥着快速的抗抑郁药样作用。大麻二酚抗抑郁样作用呈剂量依赖性,给药后 30 min 即可显著减少抑郁模型的小鼠和大鼠在 FST 的不动时间。大麻二酚快速抗抑郁样作用可能涉及 BDNF/TrkB 和雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号传导。大麻二酚能在短时间内提高海马和前额叶皮层中的 BDNF 水平,并且促进突触后致密区蛋白 95 (PSD95) 和突触素 (SYP) 表达,增加前额叶皮层中突触蛋白和树突棘的密度,改善抑郁样行为^[53]。大麻二酚的抗抑郁作用可能与中枢神经系统的 5-HT 能神经元密切相关。大麻二酚与 5-HT 抗抑郁药 (氟西汀) 具有协同作用,并且使用对氯苯氧乙酸 (PCPA) 和 *N*-(2-氯乙基)-*N*-乙基-2-溴苄胺盐酸盐 (DSP-4) 预处理小鼠,结果只有 PCPA 抑制了大麻二酚在 FST 中对小鼠行为所产生的影响^[54]。在抑郁症嗅球切除 (OBX) 小鼠模型中,大麻二酚也能通过调节 5-HT_{1A} 受体增强 5-HT 和谷氨酸 (Glu) 的传递来发挥抗抑郁作用^[55]。大麻二酚还可以通过抑制 NF- κ B 信号通路降低 LPS 诱导的模型小鼠中 IL-6 水平,并且能够激活 KYN 通路,增加海马体和皮层中 KYN/前体色氨酸 (TRP) 和

KYN/5-HT 比率,改善小鼠抑郁症状^[56]。

2.3 香叶醇的抗抑郁作用

香叶醇是一种无环单萜类化合物,主要存在于玫瑰、生姜、掌楸、柠檬、橙子、薰衣草等植物中^[57]。香叶醇可以增加 CUMS 小鼠对蔗糖的偏好,缩短小鼠在 TST 和 FST 的不动时间,其作用机制可能是通过抑制小鼠前额叶皮层的 NF- κ B 通路,调节 NLRP3 炎症小体激活,从而改善小鼠的神经炎症和抑郁样行为^[58]。此外,香叶醇还可以改善创伤后应激障碍 (PTSD) 模型小鼠的抑郁状况,减少小鼠在 FST 和 TST 的不动时间。香叶醇能够缓解 PTSD 小鼠的 HPA 轴失调,降低 TNF- α 和 IL-6 的水平,改善小鼠脑部氧化症状^[59]。

2.4 麝香草酚的抗抑郁作用

麝香草酚是一种天然存在的伞花烃单萜类化合物,是百里香精油、牛至油和罗勒精油等精油的主要成分之一^[60]。麝香草酚可以改善 CORT 模型小鼠的抑郁样行为,包括减少小鼠在 TST 和 FST 的不动时间,其抗抑郁机制可能与上调 BDNF 的水平有关^[61]。此外,在 CUMS 模型小鼠中,麝香草酚还可以调节 HPA 轴水平,并且抑制 NLRP3 炎症小体的表达,降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平^[62]。

2.5 L-薄荷酮的抗抑郁作用

L-薄荷酮是单环单萜类化合物,广泛存在于薄荷、五味子、黄芩、广藿香等植物中^[63]。L-薄荷酮可以增加 CUMS 模型大鼠对蔗糖的偏好,增加大鼠在 OFT 中的运动活力和探索行为,缩短在 TST 和 FST 的不动时间,并恢复前额叶皮层 5-HT 和 NE 的水平。L-薄荷酮还可以显著抑制 CUMS 模型大鼠中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达,下调 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平^[64]。

2.6 紫苏醇的抗抑郁作用

紫苏醇是单环单萜类化合物,存在于柑橘、薄荷、留兰香、薰衣草、鼠尾草、芹菜、樱桃等植物中^[65]。紫苏醇可通过抑制硫氧还蛋白相互作用蛋白 (TXNIP) /硫氧还蛋白 (TRX) /NLRP3 信号通路传导来发挥抗抑郁作用。在 CUMS 模型大鼠中,紫苏醇可以下调 TXNIP 和 TRX 的水平,抑制海马体中 NF- κ B 和 NLRP3 炎症小体的表达,从而抑制 IL-1 β 的产生和分泌,改善大鼠的抑郁样行为^[66]。紫苏醇还能显著缩短 LPS 诱导的小鼠模型在 TST 和 FST 中的不动时间,可以有效上调前额叶皮层中 5-HT 和 NE 的水平,并下调 TNF- α 和 IL-6 的水平^[67]。

综上,其他的单萜类化合物在抑郁症中的作用机制汇总见表 2。

3 小结与展望

从天然植物中寻找安全、高效的抗抑郁化合

表 2 其他的单萜类化合物抗抑郁作用机制

Tab 2 Mechanism of antidepressant of other monoterpenoids

化合物	动物 / 细胞模型	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	作用机制	文献
芍药苷	CUMS	10、20、40	上调海马中 5-HT、5-HIAA 水平	[48]
	CRS	10、30、60、120	促进 ERK1/2、CREB、BDNF 表达	[50]
	LPS 诱导小鼠	20、40、80	抑制 TLR4/NF-κB/NLRP3 信号通路传导, 降低海马中的促炎细胞因子水平并上调神经元中 FGF-2 的水平	[51]
大麻二酚	FST 小鼠、LH 小鼠、FSL 大鼠、FSL 大鼠	7、10、30	促进 BDNF/TrkB 和 mTOR 信号传导, 上调 BDNF 水平, 促进突触后 PSD95 和 SYP 表达	[53]
	OBX 小鼠	50	调节 5-HT1A 受体, 增强 5-HT 和 Glu 的神经传递	[55]
	LPS 诱导小鼠	30	降低 IL-6 水平, 提高 KYN/ 前体 TRP 和 KYN/5-HT 比率	[56]
	PTSD 小鼠	50、100	调节 PTSD 小鼠的 HPA 轴水平, 降低 TNF-α、IL-6 水平	[59]
麝香草酚	CORT 小鼠	50	上调 BDNF 水平	[61]
	CUMS 小鼠	15、30	调节 HPA 轴水平, 抑制 NLRP3 炎症小体, 降低 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平	[62]
L-薄荷酮	CUMS 大鼠	15、30	上调 5-HT、NE 水平, 抑制 NLRP3、Caspase-1 的表达, 下调 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平	[64]
紫苏醇	CUMS 大鼠	20、40	抑制 TXNIP/TRX/NLRP3 信号通路传导, 抑制海马体中 NF-κB、NLRP3 炎症小体的表达, 降低 IL-1β 水平	[66]
	LPS 诱导小鼠	60、120	上调 5-HT、NE 水平, 下调 TNF-α、IL-6 水平	[67]

物, 是开发抗抑郁药物的重要途径。单萜类化合物是地黄、栀子、马钱子、龙胆、独一味、芍药等药用植物中重要的活性成分, 具有丰富的结构和生物活性。其中多种天然环烯醚萜类化合物和其他单萜类化合物在抑郁症的体内外实验中表现出明显的治疗作用, 能够通过抑制神经炎症和氧化应激、调节神经营养因子、调节神经递质水平、改善 HPA 轴功能、增加突触可塑性等作用机制来改善抑郁症状, 是一类具有多靶点协同作用特征天然化合物 (见图 3)。

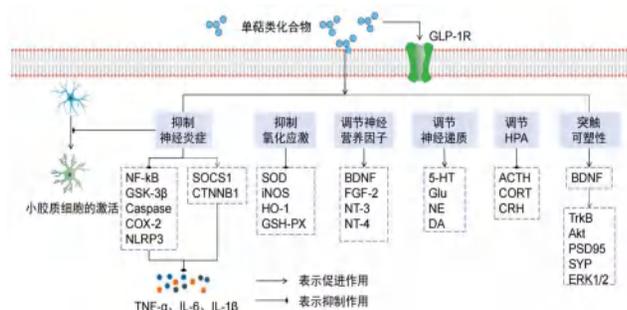


图 3 单萜类化合物的抗抑郁作用机制

Fig 3 Antidepressant mechanisms of monoterpenoids

虽然含有单萜类化合物成分的经方和精油已经用于治疗抑郁症, 但是单一的单萜类化合物在抑郁症的临床应用研究报道较少。药用植物中存在结构多样的单萜类化合物, 但大多数单萜类化合物的抗抑郁作用没有被发掘出来。因此, 需要更多单萜类化合物开展体内外临床前研究甚至临床研究, 以深入研究其抗抑郁作用及可能的机

制。环烯醚萜类多是以糖苷的形式稳定存在, 而且其他单萜类化合物大多是低沸点的油类化合物。在后期的研究也可对这类化合物进行结构修饰, 提高化合物的稳定性, 增加化合物的生物利用度, 增强抗抑郁作用。

参考文献

- [1] Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression [J]. Nature, 2008, 455 (7215): 894-902.
- [2] COVID-19 Mental Disorders Collaborators. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic [J]. Lancet, 2021, 398 (10312): 1700-1712.
- [3] Peng GJ, Tian JS, Gao XX, et al. Research on the pathological mechanism and drug treatment mechanism of depression [J]. Curr Neuropharmacol, 2015, 13 (4): 514-523.
- [4] Wang JH, Wu XH, Lai WY, et al. Prevalence of depression and depressive symptoms among outpatients: a systematic review and meta-analysis [J]. BMJ Open, 2017, 7 (8): e017173.
- [5] Sabella D. Antidepressant medications [J]. Am J Nurs, 2018, 118 (9): 52-59.
- [6] Wojtunik-Kulesza KA, Kasprzak K, Oniszczyk T, et al. Natural monoterpenes: much more than only a scent [J]. Chem Biodivers, 2019, 16 (12): e1900434.
- [7] 郭建华, 田成旺, 刘晓, 等. 中药环烯醚萜类化合物研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34 (4): 293-297.
- [8] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52 (6): 1772-1784.
- [9] Wang JM, Cui Y, Feng WS, et al. Involvement of the central monoaminergic system in the antidepressant-like effect of catalpol in mice [J]. Biosci Trends, 2014, 8 (5): 248-252.
- [10] Matsuda S, Ikeda Y, Murakami M, et al. Roles of PI3K/

- AKT/GSK3 pathway involved in psychiatric illnesses [J]. *Diseases*, 2019, 7 (1): 22.
- [11] Wang JM, Chen RX, Liu C, et al. Antidepressant mechanism of catalpol: involvement of the PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway in rat hippocampus [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 909: 174396.
- [12] Wang JM, Yang LH, Zhang YY, et al. BDNF and COX-2 participate in anti-depressive mechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress [J]. *Physiol Behav*, 2015, 151: 360-368.
- [13] Wang YL, Wu HR, Zhang SS, et al. Catalpol ameliorates depressive-like behaviors in CUMS mice via oxidative stress-mediated NLRP3 inflammasome and neuroinflammation [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11 (1): 353.
- [14] Shan MQ, Yu S, Yan H, et al. A review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide a natural product [J]. *Molecules*, 2017, 22 (10): 1689.
- [15] Lee EJ, Hong JK, Whang WK. Simultaneous determination of bioactive marker compounds from *Gardeniae fructus* by high performance liquid chromatography [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37 (8): 992-1000.
- [16] Zhao X, Wang MH, Wen ZT, et al. GLP-1 receptor agonists: beyond their pancreatic effects [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 721135.
- [17] Zhao YH, Li HY, Fang F, et al. Geniposide improves repeated restraint stress-induced depression-like behavior in mice by ameliorating neuronal apoptosis via regulating GLP-1R/AKT signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 676: 19-26.
- [18] Gulbins E, Palmada M, Reichel M, et al. Acid sphingomyelinase/ceramide system mediates effects of antidepressant drugs [J]. *Nat Med*, 2013, 19: 934-938.
- [19] Jazvinščak JM, Hof PR, Šimić G. Ceramides in Alzheimer's disease: key mediators of neuronal apoptosis induced by oxidative stress and A β accumulation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 346783.
- [20] Wang MH, Yang L, Chen ZL, et al. Geniposide ameliorates chronic unpredictable mild stress induced depression-like behavior through inhibition of ceramide-PP2A signaling via the PI3K/Akt/GSK3 β axis [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2021, 238 (10): 2789-2800.
- [21] Zheng ML, Li K, Chen T, et al. Geniposide protects depression through BTK/JAK2/STAT1 signaling pathway in lipopolysaccharide-induced depressive mice [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 170: 65-73.
- [22] Chen T, Liu SN, Zheng ML, et al. The effect of geniposide on chronic unpredictable mild stress-induced depressive mice through BTK/TLR4/NF- κ B and BDNF/TrkB signaling pathways [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (2): 932-945.
- [23] Cai L, Li R, Tang WJ, et al. Antidepressant-like effect of geniposide on chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats by regulating the hypothalamus-pituitary-adrenal axis [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25 (8): 1332-1341.
- [24] 管珂, 过立农, 马双成, 等. 藏药独一味中 30 种化学成分的 UPLC-ESI-TOFMS 分析鉴定 [J]. *中国药事*, 2018, 32 (6): 757-763.
- [25] Sun ZW, Zhan HG, Wang C, et al. Shanzhiside methyl ester protects against depression by inhibiting inflammation via the miRNA-155-5p/SOCS1 axis [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2022, 239 (7): 2201-2213.
- [26] Wang LL, Chen H, Jiang YH, et al. Simultaneous determination of 11 high-polarity components from *fructus corni*: a quantitative LC-MS/MS method for improved quality control [J]. *J Chromatogr Sci*, 2018, 56 (1): 56-64.
- [27] Han H, Li ZQ, Qu N, et al. Synthesis and promotion of the osteoblast proliferation effect of morroniside derivatives [J]. *Molecules*, 2018, 23 (6): 1412.
- [28] 未小明. 莫诺苷对抑郁模型大鼠抑郁样行为及神经炎症的影响 [J]. *中医临床研究*, 2020, 12 (34): 19-21.
- [29] Zhang F, Yan Y, Zhang J, et al. Phytochemistry, synthesis, analytical methods, pharmacological activity, and pharmacokinetics of loganin: a comprehensive review [J]. *Phytother Res*, 2022, 36 (6): 2272-2299.
- [30] Pan CH, Xia CY, Yan Y, et al. Loganin ameliorates depression-like behaviors of mice via modulation of serotonergic system [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2021, 238 (11): 3063-3070.
- [31] Guo YX, Xia CY, Yan Y, et al. Loganin improves chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and neurochemical dysfunction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116288.
- [32] Xia CY, Xu JK, Li L, et al. Identifying the mechanism underlying antidepressant-like effects of loganin by network pharmacology in combination with experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 114526.
- [33] Rajabi M, Mohaddes G, Farajdokht F, et al. Impact of loganin on pro-inflammatory cytokines and depression-and anxiety-like behaviors in male diabetic rats [J]. *Physiol Int*, 2018, 105 (3): 199-209.
- [34] Zhu MQ, Sun RC. *Eucommia ulmoides* oliver: a potential feedstock for bioactive products [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66 (22): 5433-5438.
- [35] 黄健军, 谢冬养, 梁爽, 等. 车前草中桃叶珊瑚苷的提取、分离纯化工艺研究 [J]. *中药材*, 2021, 44 (4): 928-932.
- [36] Liu P, Song SY, Yang P, et al. Aucubin improves chronic unpredictable mild stress-induced depressive behavior in mice via the GR/NF- κ B/NLRP3 axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110677.
- [37] Wu SP, Ning YY, Zhao YY, et al. Research progress of natural product gentiopicroside-a secoiridoid compound [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2017, 17 (1): 62-77.
- [38] Badawy AA. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2017, 10: 1178646917691938.
- [39] Correia AS, Vale N. Tryptophan metabolism in depression: a narrative review with a focus on serotonin and kynurenine pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (15): 8493.
- [40] Deng YT, Zhao MG, Xu TJ, et al. Gentiopicroside abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in

- mice through tryptophan-degrading pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33 (5): 1413-1420.
- [41] Yao T, Cui Q, Liu ZC, et al. Metabolomic evidence for the therapeutic effect of gentiopicroside in a corticosterone-induced model of depression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109549.
- [42] Khalil AA, Rahman MM, Rauf A, et al. Oleuropein: chemistry, extraction techniques and nutraceutical perspectives-an update [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023, 5: 1-22.
- [43] Xu AN, Nie F. Brain-derived neurotrophic factor enhances the therapeutic effect of oleuropein in the lipopolysaccharide-induced models of depression [J]. *Folia Neuropathol*, 2021, 59 (3): 249-262.
- [44] Badr AM, Attia HA, Al-Rasheed N. Oleuropein reverses repeated corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: evidence of modulating effect on biogenic amines [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 3336.
- [45] Wojtunik-Kulesza KA, Kasprzak K, Oniszczyk T, et al. Natural monoterpenes: much more than only a scent [J]. *Chem Biodivers*, 2019, 16 (12): e1900434.
- [46] Zhang YL, Long Y, Yu S, et al. Natural volatile oils derived from herbal medicines: a promising therapy way for treating depressive disorder [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105376.
- [47] Zhang XX, Zuo JQ, Wang YT, et al. Paeoniflorin in paeoniaceae: distribution, influencing factors, and biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 980854.
- [48] Qiu FM, Zhong XM, Mao Q, et al. The antidepressant-like effects of paeoniflorin in mouse models [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5 (4): 1113-1116.
- [49] Albert-Gascó H, Ros-Bernal F, Castillo-Gómez E, et al. MAP/ERK signaling in developing cognitive and emotional function and its effect on pathological and neurodegenerative processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (12): 4471.
- [50] Tang ML, Chen M, Li Q. Paeoniflorin ameliorates chronic stress-induced depression-like behavior in mice model by affecting ERK1/2 pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (2): 11329-11341.
- [51] Cheng J, Chen M, Wan HQ, et al. Paeoniflorin exerts antidepressant-like effects through enhancing neuronal FGF-2 by microglial inactivation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 274: 114046.
- [52] Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, et al. Phytocannabinoids: a unified critical inventory [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33 (12): 1357-1392.
- [53] Sales AJ, Fogaça MV, Sartim AG, et al. Cannabidiol induces rapid and sustained antidepressant-like effects through increased BDNF signaling and synaptogenesis in the prefrontal cortex [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56 (2): 1070-1081.
- [54] Sales AJ, Crestani CC, Guimarães FS, et al. Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 86: 255-261.
- [55] Linge R, Jiménez-Sánchez L, Campa L, et al. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 103: 16-26.
- [56] Florensa-Zanuy E, Garro-Martínez E, Adell A, et al. Cannabidiol antidepressant-like effect in the lipopolysaccharide model in mice: modulation of inflammatory pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 185: 114433.
- [57] Lapczynski A, Bhatia SP, Foxenberg RJ, et al. Fragrance material review on geraniol [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46 (11): S160-170.
- [58] Deng XY, Xue JS, Li HY, et al. Geraniol produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable mild stress mice model [J]. *Physiol Behav*, 2015, 152: 264-271.
- [59] Ben-Azu B, Adebayo OG, Moke EG, et al. Geraniol attenuates behavioral and neurochemical impairments by inhibitions of HPA-axis and oxido-inflammatory perturbations in mice exposed to post-traumatic stress disorder [J]. *J Psychiatr Res*, 2023, 168: 165-175.
- [60] Salehi B, Mishra AP, Shukla I, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: health and potential uses [J]. *Phytother Res*, 2018, 32 (9): 1688-1706.
- [61] Capibaribe VCC, Vasconcelos Mallmann AS, Lopes IS, et al. Thymol reverses depression-like behaviour and upregulates hippocampal BDNF levels in chronic corticosterone-induced depression model in female mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71 (12): 1774-1783.
- [62] Deng XY, Li HY, Chen JJ, et al. Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 291: 12-19.
- [63] Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS, et al. Fragrance material review on d, l-menthol [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46 (11): 224-227.
- [64] Xue JS, Li HY, Deng XY, et al. L-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 134: 42-48.
- [65] 黄杰秋, 朱秋劲, 茅林春, 等. 紫苏醇的研究进展 [J]. *贵州农业科学*, 2016, 44 (9): 109-113.
- [66] Song YC, Sun RX, Ji ZY, et al. Perilla aldehyde attenuates CUMS-induced depressive-like behaviors via regulating TXNIP/TRX/NLRP3 pathway in rats [J]. *Life Sci*, 2018, 206: 117-124.
- [67] Ji WW, Wang SY, Ma ZQ, et al. Effects of perillaldehyde on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 116: 1-8.

(收稿日期: 2024-02-28; 修回日期: 2024-04-28)

骨改良药物在肺癌骨转移中的研究进展

王凯¹, 王娜², 姜金¹, 敏思聪¹, 叶凯山^{1*} (1. 兰州大学第二医院骨科, 兰州 730000; 2. 兰州大学第二医院肿瘤内科, 兰州 730000)

摘要: 目前各指南推荐恶性肿瘤骨转移的内科治疗药物主要为骨改良药物, 分为地舒单抗和双膦酸盐类, 同时这两类药物也获批适应证为治疗高钙血症、骨质疏松。双膦酸盐类药物临床使用时间长, 应用广泛, 种类较多, 目前分为三代, 每代都有不同的代表药物, 如一代的依替膦酸二钠、膦酸二钠等, 二代的帕米膦酸二钠, 三代的唑来膦酸等。肺癌是全球发病率较高的肿瘤, 患者就诊时大多已为晚期, 其中出现骨转移的患者约占一半, 给患者的生活质量带来了巨大的负担, 因此一旦明确诊断肺癌骨转移, 应尽早使用骨改良药物治疗。本文就骨改良药物在肺癌骨转移中的应用做一综述。

关键词: 骨改良药物; 肺癌; 骨转移

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3336-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.030

Role of bone-modifying agents in the treatment of bone metastasis in lung cancer

WANG Kai¹, WANG Na², JIANG Jin¹, MIN Si-cong¹, YE Kai-shan^{1*} (1. Department of Orthopedics, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000; 2. Department of Oncology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract: Currently, the medical treatment drugs recommended by various guidelines for bone metastasis of malignant tumors are mainly bone-modifying agent, which are divided into desuzumab and bisphosphonate drugs, and these two kinds of drugs are also approved to be used in the treatment of hypercalcemia and osteoporosis. Bisphosphonate drugs have been used in clinic for a long time, with wide application and many varieties. At present, they are divided into three generations, and each generation has different representative drugs, such as the first generation of etidronate chlorophosphonate, the second generation of pamidronate disodium, the third generation of zoledronic acid and so on. Lung cancer is a tumor with a high incidence globally. Most patients are in the advanced stage when they see a doctor, and about half of them show bone metastasis, a huge burden to patients quality of life. Therefore, once the bone metastasis of lung cancer is clearly diagnosed, bone-modifying agent should be used as soon as possible. This article reviewed the application of bone-improving drugs for bone metastasis in lung cancer.

Key words: bone-modifying agent; lung cancer; bone metastasis

肺癌作为人类常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内发病率及死亡率均较高。而在我国, 肺癌的发病率和病死率均位于恶性肿瘤的首位^[1], 并且, 发病率还在逐年增高。肺癌临床表现没有特异性, 因此初期不易发现, 大部分患者就诊时已处于晚期, 且出现多部位转移, 其中骨是常见的转移部位之

一^[2]。现在肺癌已经进入了精准的靶向治疗时代, 特别是对于携带表皮生长因子受体 (EGFR) 或间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 基因突变的患者, 靶向药物带来了新的希望。对于驱动基因突变阴性的患者, 使用化疗联合贝伐珠单抗为主的抗血管生成治疗、免疫检查点抑制剂程序性死亡受体 1 (PD1) /

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (No.23JRRA1620, No.22JR5RA957, No.22JR5RA984)。

作者简介: 王凯, 男, 副主任医师, 主要从事骨肿瘤及骨科常见疾病的诊治, email: 56966186@qq.com *通信作者: 叶凯山, 男, 主任医师, 博士, 主要从事骨科的外科治疗, email: 455166039@qq.com

程序性死亡受体 - 配体 1 (PDL1) 的单用或联合治疗的应用, 使得晚期肺癌患者的 5 年生存率较前显著提高^[3], 但患者生存期不断延长的同时, 发生骨转移及骨相关事件 (skeletal related events, SREs) 的风险也明显提高^[4-5]。

肺癌骨转移的治疗目标以延长生存时间、缓解症状、提高生活质量、预防或延缓病理性骨折及解除神经压迫症状为主, 因此一般采用综合治疗手段, 包括放射治疗、外科手术治疗、局部治疗 (射频消融和冷冻消融)、骨改良药物治疗 (双膦酸盐和地舒单抗)、对症治疗 (止痛及营养支持) 等。

骨改良药物主要分为双膦酸盐类药物和地舒单抗 (denosumab, D-mab), 两者在预防骨相关事件发生方面, 均可使患者获益^[6]。

1 骨改良药物的概述

1.1 双膦酸盐类药物

双膦酸盐主要作用于破骨细胞, 选择性地抑制破骨细胞活性, 导致破骨细胞凋亡, 阻止破骨细胞分化成熟, 进而抑制骨吸收, 避免肿瘤细胞扩散、浸润和黏附于骨质^[7-10]。

目前进入临床应用的双膦酸盐类药物分为三代: 第一代代表药物, 如依替膦酸二钠、氯膦酸二钠等, 与第二代、第三代相比, 第一代双膦酸盐类药物在结构上的区别是不含氮原子, 可作为焦膦酸盐的类似物, 能够抑制骨细胞活性。研究表明, 与安慰剂相比, 氯膦酸盐能明显降低骨相关事件的发生率^[11]。第一代双膦酸盐类药物的具体用法: 氯膦酸盐片 $1600 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$; 或氯膦酸盐针剂 $300 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 输注时间大于 2 h, 连用 5 d, 后改为口服。但因疗效不如第二代、第三代, 已逐渐被淘汰。

第二代代表药物, 如帕米膦酸二钠、阿仑膦酸钠, 作用机制为与骨小梁表面结合, 阻止破骨细胞溶解, 使破骨细胞不能向骨表面移动, 同时还可以阻断破骨细胞前体向破骨细胞转化。具体用法: 帕米膦酸二钠 90 mg, 输注时间大于 4 h, 每 3 ~ 4 周重复; 阿仑膦酸钠片: 口服, 每日早餐前至少 30 min 空腹用 200 mL 温开水送服, 一次 10 mg, 一日 1 次。

第三代代表药物, 如唑来膦酸、伊班膦酸钠、因卡膦酸二钠和利塞膦酸钠片。作用机制依然是进入到破骨细胞中, 使破骨细胞的功能下降, 有效减少 SREs 的发生风险, 缓解骨痛。以唑来膦酸为例, 其作用机制为: ① 循环系统优先被转运到骨代谢活跃的部位, 沉积到骨表面, 阻滞矿物质骨和软骨的再吸收; ② 直接抑制破骨细胞的活化和增生来抑制骨吸收, 减少骨基质生长因子的

释放; ③ 通过抑制甲醛戊酸途径、阻滞细胞周期来诱导破骨细胞和单核细胞前体细胞的凋亡, 提高抑制骨吸收的效果^[12]。具体用法: 唑来膦酸 4 mg, 输注时间大于 15 min, 每 3 ~ 4 周重复; 伊班膦酸钠 6 mg, 静脉输注时间大于 15 min, 每 3 ~ 4 周重复; 因卡膦酸二钠 10 mg, 对于 65 周岁以上老年患者剂量进行减量, 调整为 5 mg, 静脉输注时间 2 ~ 4 h, 每 3 ~ 4 周重复; 利塞膦酸钠片: 口服用药, 需至少餐前 30 min 直立位服用, 200 mL 左右清水送服, 服药后 30 min 内不宜卧床。用量为一日一次, 一次 5 mg。

1.2 地舒单抗

地舒单抗是高效的骨吸收抑制剂, 是人免疫球蛋白 G2 (IgG2) 单克隆抗体, 可抑制核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL), 其作用机制是通过特异性结合 RANKL, 抑制破骨细胞的形成、增殖及存活。RANKL 是一种由肿瘤细胞和成骨细胞分泌的蛋白, 是破骨细胞激活的关键因子, 它可与破骨细胞表面的 RANKL 受体结合, 促进破骨细胞的分化、增殖和成熟, 从而发挥破骨细胞对骨骼的损伤作用^[13]。地舒单抗在 2020 年经国家药品监督管理局 (NMPA) 批准用于恶性肿瘤骨转移及多发性骨髓瘤, 加入骨改良药物的分类中, 给患者提供了更多的选择。针对不同的适应证, 地舒单抗用法不同, 用于骨巨细胞瘤或肿瘤所致高钙血症推荐剂量为 120 mg, 每 4 周一次, 治疗第 1 个月的第 8 日和第 15 日分别额外给予 120 mg; 用于体瘤骨转移推荐剂量为 120 mg, 每 4 周一次。地舒单抗使用过程中需补充钙剂及维生素 D。

在骨转移治疗方面的药物主要为双膦酸盐及地舒单抗, 在骨质疏松治疗方面的药物除骨改良药物外, 还包括罗莫佐单抗、特立帕肽等, 但目前尚未在骨转移中获批适应证。

2 骨改良药物在肺癌骨转移中的应用进展

晚期肺癌的转移部位中, 骨转移是其常见的转移途径之一。针对肺癌骨转移的治疗, 除了放疗、靶向治疗、免疫治疗等治疗方式外, 骨改良药物的应用, 已有越来越多的科学证据支持。第一代双膦酸盐类药物, 由于疗效及服用方式等特点, 逐渐被第二代及第三代双膦酸盐类药物所替代。一项针对肺癌骨转移的临床研究对比唑来膦酸与安慰剂, 结果显示, 唑来膦酸可有效降低骨不良事件的发生率^[14]。

在第二代与第三代之间的比较中, 帕米膦酸二钠与唑来膦酸头对头的治疗肺癌骨转移的研究结果显示, 在疼痛控制、临床疗效和安全性等方面, 唑来膦酸与帕米膦酸二钠均可有效改善晚期肺癌骨转移患者的症状, 安全性好, 但唑来膦酸

输注时间短, 用药剂量小, 临床使用更方便^[15]。

其次, 第三代双膦酸盐之间的比较, 唑来膦酸与伊班膦酸钠在治疗肺癌骨转移方面的对比结果提示, 在疗效、癌痛评分、生活质量评分、相关生化指标及不良反应发生情况方面, 伊班膦酸钠效果显著, 可降低癌痛评分, 提高患者生活质量, 降低肾毒性发生率^[16]。

双膦酸盐与地舒单抗之间的对比, 两者都可以改善肺癌骨转移患者的 SREs 的风险。一项关于肺癌骨转移的临床试验, 亚组分析地舒单抗和唑来膦酸之间的对比^[17], 提示地舒单抗的总生存期长于唑来膦酸, 且肾毒性发生率低。

肺癌骨转移的防治策略旨在实现多方面目标: 第一是改善症状, 缓解疼痛; 第二是预防或延迟骨相关事件的发生; 第三是延长患者生存期并显著提高生活质量。

3 骨改良药物在肺癌骨转移治疗中出现的不良反应

3.1 药物性颌骨坏死

药物性颌骨坏死是骨改良药物相对严重的并发症, 其发生部位主要为下颌骨, 发生率相对较低, 临床表现主要是牙齿持续或间断疼痛, 针刺样, 有时伴有牙龈软组织破溃、流脓、口臭等, 如病情进一步加重, 可导致颌骨疼痛加重, 有可能出现内外瘘, 创面无法修复^[18]。因是骨改良药物引起的颌骨坏死, 也就意味着大部分都是恶性肿瘤骨转移引起的, 所以出现药物性颌骨坏死时, 主要是对症治疗, 包括内科的止痛、抗感染及姑息局部手术治疗。目前关注比较多的是双膦酸盐治疗相关的颌骨坏死。虽然骨改良药物引起的颌骨坏死导致的后果比较严重, 对患者的生活质量影响很大, 但是其发生率低, 且可通过预防降低发生风险。《骨改良药物安全性管理专家共识》2021 版推荐其预防及治疗措施主要为: ① 应用骨改良药物前, 全面评估口腔健康, 尽量在用药前完成相关诊疗; ② 如在使用骨改良药物时需要进行口腔疾病治疗, 建议暂停骨改良药物的使用, 尽量选择微创手术; ③ 如在骨改良药物治疗结束后必须拔牙的患者, 也应该尽量选择微创, 同时密切观察术后情况, 因即使停用骨改良药物, 仍有发生颌骨坏死的风险^[19]。

3.2 低钙血症

低钙血症是骨改良药物使用过程中出现的不良反应, 其机制主要为: 骨改良药物抑制破骨细胞的分化和成熟, 抑制骨吸收进而降低血钙。因此在使用此类药物时注意监测离子水平, 常规补充钙剂。地舒单抗相较双膦酸盐发生低钙血症的概率更高, 一项地舒单抗与唑来膦酸治疗恶性肿瘤骨转移

的 meta 分析表明, 地舒单抗的低钙血症概率高于唑来膦酸, 但大部分无缺钙的临床表现, 且易通过补充钙剂和维生素 D 纠正^[20]。《骨改良药物安全性管理专家共识》2021 版推荐其预防及治疗措施主要为: 使用骨改良药物治疗的患者 (除了出现高钙血症的患者) 每日至少补充钙 (500 mg) 和维生素 D (400 IU), 并规律监测血清钙或钙离子水平^[19]。

3.3 流感样症状

使用骨改良药物后 1~3 d 内可出现发热等类似流感样症状, 属于双膦酸盐的急性期反应, 且在伊班膦酸盐和唑来膦酸盐中发生率更高^[21]。国外一项前瞻性研究结果表明, 输注唑来膦酸组的患者流感样症状的发生率可达 47.7%, 第一次输注时出现发热的比例更高, 可达 55.6%^[22]。我国的一项多中心研究也有同样的发现, 第一次输注唑来膦酸一周内出现发热的患者比例有 28.65%, 除了发热, 伴有疼痛的患者比例高达 54.36%^[23]。虽然流感样症状发生率高, 但临床发热一般程度较轻, 经过对症处理后大部分患者可缓解。《骨改良药物安全性管理专家共识》2021 版推荐其预防及治疗措施主要为: 对于体温不超过 38.5℃ 的低热患者, 建议物理降温; 对于体温超过 38.5℃ 的患者, 物理降温的同时可给予解热镇痛药, 必要时给予静脉补液; 对于出现持续高热的患者, 可根据具体情况加用激素类药物^[19]。

3.4 肾不良反应

国内外的各项研究中关于唑来膦酸的肾功能损伤已有报道, 唑来膦酸经肾脏代谢, 有导致肾功能损伤的可能性^[24]。临床应用过程中发现使用双膦酸盐类药物出现肾功能损伤的发生率比较低, 并且用药前做好尿常规、肾功能等指标的评估, 可有效减少肾功能损伤的发生率。不过, 不良反应虽然发生率低, 但是后果较为严重, 临床应用时仍不能轻视, 并且必要时联系肾病科进行多学科讨论。《骨改良药物安全性管理专家共识》2021 版推荐其预防及治疗措施主要为: 对于轻中度肾功能不全者, 应根据肌酐清除率调整唑来膦酸剂量, 若使用帕米膦酸则无需降低用药剂量, 但需延长输液时间, 至少长于 4 h; 对于严重肾功能不全者, 不建议使用其他双膦酸盐类, 若应用伊班膦酸钠, 需调整剂量, 用药剂量调整为 2 mg, 适当延长输注时间, 建议不低于 1 h, 每 3~4 周一次。地舒单抗因不经肾脏代谢, 肾脏不良反应发生率低, 相对使用安全, 若临床上出现肾功能损伤, 建议先排除其他病因, 可不调整地舒单抗的应用剂量^[19]。

4 结语

肺癌骨转移发生率高,目前内科治疗的药物主要为双膦酸盐类药物及地舒单抗,美国临床肿瘤学会年会(American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, ASCO)已经将这两种药物归为骨改良药物,也推荐应用于恶性肿瘤骨转移治疗中。至于在临床上如何应用,应根据患者的个体情况选用,如伊班膦酸钠、地舒单抗肾毒性稍低于其他骨改良药物,地舒单抗的低钙血症发生率稍高于双膦酸盐类药物,但用法方便,且预防骨相关事件疗效优于唑来膦酸等。唑来膦酸与地舒单抗药理机制不同,不存在交叉耐药,在临床应用时给患者提供了更多的选择。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] 中华医学会肿瘤学分会,中华医学会杂志社.中华医学会肿瘤学分会肺癌临床诊疗指南(2021版)[J].*中华医学杂志*, 2021, 101 (23): 1725-1757.
- [3] Delea T, Langer C, McKiernan J, et al. The cost of treatment of skeletal-related events in patients with bone metastases from lung cancer [J]. *Oncology*, 2004, 67 (5-6): 390-396.
- [4] Chinese Anti-Cancer Association. Expert consensus statement on clinical diagnosis and treatment of malignant tumor bone metastasis and bone related diseases [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2010.
- [5] Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26 (21): 3543-3551.
- [6] 北京医学奖励基金会肺癌青年专家委员会,中国胸外科肺癌联盟.肺癌骨转移诊疗专家共识(2019版)[J].*中国肺癌杂志*, 2019, 22 (4): 187-207.
- [7] 胡晓华,王美玲,姜斌.帕米膦酸二钠联合骨架型芬太尼透皮贴剂治疗肿瘤骨转移疼痛的临床观察[J].*临床肿瘤学杂志*, 2011, 16 (13): 265-267.
- [8] Sugie-Oya A, Takakura A, Takao-Kawabata R, et al. Comparison of treatment effects of teriparatide and the bisphosphonate risedronate in an aged, osteopenic, ovariectomized rat model under various clinical conditions [J]. *J Bone Miner Metab*, 2016, 34 (3): 303-314.
- [9] 张健.双膦酸盐类药物性颌骨坏死的治疗现状和研究进展[J].*山东医药*, 2012, 52 (32): 101-103.
- [10] Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years [J]. *Bone*, 2011, 49 (1): 2-19.
- [11] Gulley J, Dahut WL. Clodronate in the prevention and 5 treatment of skeletal metastasis [J]. *Expert Rev Anticancer*, 2005, 5 (2): 221-230.
- [12] 谈仪炯,席宇飞,范国荣,等.唑来膦酸注射液不良反应信号的挖掘与评价[J].*中南药学*, 2022, 20 (2): 441-447.
- [13] Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, et al. Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48 (16): 3082-3092.
- [14] Hirsh V, Major PP, Lipton A, et al. Zoledronic acid and survival in patients with metastatic bone disease from lung cancer and elevated markers of osteoclast activity [J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3 (3): 228-236.
- [15] 张冬庆,郭红云,刘新民,等.唑来膦酸注射液与帕米膦酸二钠治疗晚期肺癌骨转移患者的对比分析[J].*癌症进展*, 2020, 18 (19): 2019-2021.
- [16] 李为之,张群贵,丁金泉,等.伊班膦酸钠与唑来膦酸治疗肺癌骨转移患者的临床效果研究[J].*中国医学创新*, 2020, 17 (32): 54-58.
- [17] Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S, et al. Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7 (12): 1823-1829.
- [18] 徐骏疾,周建,王松灵.放射性及双膦酸盐相关性颌骨坏死的发病机制及治疗进展[J].*中华口腔医学杂志*, 2021, 56 (5): 404-409.
- [19] 中国医师协会肿瘤医师分会乳腺癌学组,中国抗癌协会国际医疗交流分会.骨改良药物安全性管理专家共识[J].*中华肿瘤杂志*, 2021, 43 (6): 622-628.
- [20] 陈皖京,王蓓,高秀飞,等.地诺单抗与唑来膦酸治疗恶性肿瘤伴骨转移安全性和有效性的Meta分析[J].*浙江医学*, 2017, 39 (18): 1536-1547.
- [21] 谢炜星,马辉,晋大祥,等.首次使用唑来膦酸的急性期反应预测及对肝功能影响的分析[J].*中国骨质疏松杂志*, 2015, 21 (7): 870-874.
- [22] Popp A, Senn R, Curkovic I, et al. Factors associated with acute-phase response of bisphosphonate-naïve or pretreated women with osteoporosis receiving an intravenous first dose of zoledronate or ibandronate [J]. *Osteoporos Int*, 2017, 28: 1995-2002.
- [23] Ding Y, Zeng JC, Yin F, et al. Multicenter study on observation of acute-phase responses after infusion of zoledronic acid 5 mg in Chinese women with postmenopausal osteoporosis [J]. *Orthop Surg*, 2017, 9: 284-289.
- [24] Singireesu SS, Mondal SK, Yerramsetty S, et al. Zoledronic acid induces micronuclei formation, mitochondrial-mediated apoptosis and cytostasis in kidney cells [J]. *Life Sci*, 2018, 203: 305-314.

(收稿日期: 2024-04-08; 修回日期: 2024-06-12)

药物分析与检验

十一味草果丸气相色谱指纹图谱及多成分含量测定研究

王佩^{1, 3, 4}, 苏玫匀^{1, 3, 4}, 殷燕^{1, 3, 4}, 吴明慧^{1, 3, 4}, 朱业锦^{2*}, 谢和兵^{1, 3, 4, 5*} (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.南京中医药大学医学院·整合医学院, 南京 210023; 3.南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 4.江苏神猴医药研究有限公司, 江苏 南通 226133; 5.西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 857000)

摘要: **目的** 建立十一味草果丸气相色谱法 (GC) 指纹图谱, 并测定其中桉油精、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯、去氢木香内酯的含量。**方法** 采用 SH-WAX (0.25 mm×0.25 μm×30 m) 毛细管柱; 进样口温度为 220 ℃; 检测器温度为 240 ℃; 程序升温; 分流比为 10:1。**结果** 建立了 10 批十一味草果丸指纹图谱, 相似度均大于 0.99, 共标定了 20 个共有峰, 对其中 5 个成分 (桉油精、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯、去氢木香内酯) 进行含量测定, 各成分质量浓度分别在 0.80 ~ 7.98 μg·mL⁻¹, 34.93 ~ 349.30 μg·mL⁻¹, 19.66 ~ 196.57 μg·mL⁻¹, 23.44 ~ 234.39 μg·mL⁻¹, 14.21 ~ 142.14 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系 ($r \geq 0.9998$); 高、中、低浓度的平均加样回收率 ($n = 3$) 分别在 90.68% ~ 92.66%、95.44% ~ 96.42%、99.59% ~ 102.38%、98.34% ~ 103.04%、98.94% ~ 101.66%。**结论** 建立的指纹图谱及多成分含量测定方法专属性强、精密度高、稳定可靠, 可较为全面地对十一味草果丸进行质量控制, 为其质量评价和标准建立提供科学依据。

关键词: 十一味草果丸; 气相色谱法; 指纹图谱; 多成分含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3340-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.031

GC fingerprints and content determination of multi-components of in Shiyiwei Caoguo pills

WANG Pei^{1, 3, 4}, SU Mei-yun^{1, 3, 4}, YIN Yan^{1, 3, 4}, WU Ming-hui^{1, 3, 4}, ZHU Ye-jing^{2*}, XIE He-bing^{1, 3, 4, 5*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023; 3. Yangtze Delta Advanced Drug Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 4. Jiangsu Shenhou Pharmaceutical Research Co, Ltd, Nantong Jiangsu 226133; 5. Xizang Shenhou Pharmaceutical Co., Ltd, Xigaze Xizang 857000)

Abstract: Objective To establish the gas chromatographic (GC) fingerprints of Shiyiwei Caoguo pills and to determine the content of eucalyptus oleoresin, eugenol, geomannan lactone, isogeomannan lactone and dehydrogeomannan lactone. **Methods** SH-WAX (0.25 mm×0.25 μm×30 m) capillary column was used. The temperature of the injection port was 220 ℃; the temperature of the detector was 240 ℃; the column temperature was programmed to increase; and the partition ratio was 10:1. **Results** The fingerprints of 10 batches of Shiyiwei Caoguo pills were established, with similarities all greater than 0.99. Totally 20 common peaks were calibrated, and the content of 5 components (eucalyptus oleoresin, eugenol, geomannanolide lactone, isogeomannanolide lactone, and dehydrogeomannanolide

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82304595); 西藏自治区科技厅区域科技协同创新专项 (No.QYXTZX-RKZ2022-07)。

作者简介: 王佩, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药剂学研究, email: 1498119071@qq.com ***通信作者:** 朱业锦, 男, 博士, 讲师, 主要从事呼吸与消化系统疾病治疗药物的机制研究, email: yejin_zhu@njucm.edu.cn; 谢和兵, 男, 高级工程师, 硕士研究生导师, 主要从事高原医学、传统藏药的产业化开发研究, email: 76445044@qq.com

lactone) were determined. The linearity concentrations ranged $0.80 \sim 7.98 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $34.93 \sim 349.30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $19.66 \sim 196.57 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $23.44 \sim 234.39 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $14.21 \sim 142.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively ($r \geq 0.9998$). The average recoveries of low, middle, high concentration ($n = 3$) were within $90.68\% \sim 92.66\%$, $95.44\% \sim 96.42\%$, $99.59\% \sim 102.38\%$, $98.34\% \sim 103.04\%$, and $98.94\% \sim 101.66\%$. **Conclusion** The established fingerprints and multi-component content determination methods are exclusive, stable and reliable, which can be used to control the quality of Shiyiwei Caoguo pills comprehensively, and provide a scientific basis for the quality control and standards establishment.

Key words: Shiyiwei Caoguo pill; gas chromatography; fingerprinting; multi-component content determination

十一味草果丸，藏药名“阿如久巴日布”，处方源于《四部医典》，并收录于中华人民共和国卫生部 1995 年出版的《药品标准·藏药：第一册》^[1]，本品是由草果、藏茜草、紫草茸、荜茇、诃子、波棱瓜子、麻黄、木香、豆蔻、丁香、藏木香十一味药材粉碎为细粉，直接入药制备的水泛丸，具有健脾的功效，用于寒热脾症引起的腹胀、肠鸣、脾区疼痛等症状，目前临床主要用于急慢性胃肠炎的治疗^[2]，本课题组研究发现本方在预防和治疗放射性肠损伤方面具有显著的药效，临床应用价值巨大。

十一味草果丸是西藏神猴药业有限责任公司生产的全国独家产品，现行标准为国家药品监督管理局标准（试行）WS-631（Z-176）—2002，该标准中只规定了性状、薄层鉴别（丁香、木香、紫草茸、藏茜草）、重量差异、水分和微生物限度^[3]，没有指标成分的定量检测，无法满足对产品质量全面控制的要求，影响产品的质量稳定性。有文献报道十一味草果丸中麻黄碱、没食子酸等极性较大的水溶性成分的含量测定方法^[2]，但对极性较小的挥发性成分研究还未有报道。本方中的挥发性成分主要为草果、丁香、木香、藏木香、豆蔻等药材的有效成分，具有显著的药理作用。其中草果、豆蔻中的挥发性成分桉油精具有调节胃肠道功能、抑菌等多种药理作用，对消化系统具有显著的保护作用，且安全性良好^[4-7]。丁香中挥发油成分丁香酚具有抗炎、抗氧化、改善消化系统功能等药理作用^[8-11]。木香、藏木香、豆蔻三种药材具有健胃消食的传统药理功效，有利于胃肠保护^[12]。藏木香和木香中的去氢木香内酯具有抗菌、抗肿瘤、抗炎等生物活性，还具有扩张支气管、改善胃功能、缓解血管平滑肌痉挛等作用^[13-15]。藏木香中土木香内酯和异土木香内酯具有抗炎、抗菌等作用^[16-18]。因此，为更好地控制十一味草果丸质量，确保临床疗效的稳定，本研究采用 GC 法建立了十一味草果丸的指纹图

谱，同时测定桉油精、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯、去氢木香内酯 5 种成分的含量，旨在为十一味草果丸质量标准的建立提供依据。

1 仪器与试药

GC-2014C 气相色谱仪（配 FID 检测器，岛津公司）；XSR205DU/AC 十万分之一天平（梅特勒托利多公司）；ZJSB-5200 超声清洗仪（300W、50 kHz，常州中捷试验仪器制造有限公司）。

桉油精对照品（批号：DSTDA002502，纯度：98.83%）（乐美天医药科技有限公司）；土木香内酯对照品（批号：111524-201811，纯度：99.4%）、丁香酚对照品（批号：110725-201917，纯度：99.1%）、异土木香内酯对照品（批号：111524-201806，纯度：97.4%）、去氢木香内酯对照品（批号：111525-201912，纯度：99.5%）（中国食品药品检定研究院）；氯仿（分析纯）、甲醇（色谱纯）（国药集团化学试剂有限公司）；十一味草果丸（批号：20220501、20220901、20221201、20230101、20230201、20230401、20230502、20230602、20230801、20230901，每丸重 0.5 g，西藏神猴医药有限责任公司，编号 S1 ~ S10）。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别精密称定桉油精、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯、去氢木香内酯对照品 23.88、24.44、19.68、20.37、20.37 mg，分别置于 20 mL 量瓶中，加甲醇溶解定容，制成质量浓度分别为 1180.03、1211.00、978.10、992.02、1013.41 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。再分别精密移取各储备液适量，置同一量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配成各成分质量浓度分别为桉油精 7.98 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丁香酚 349.30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、土木香内酯 196.57 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异土木香内酯 234.39 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、去氢木香内酯 142.14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取十一味草果丸适量，用捣

药罐捣碎成粗粉,精密称取 1 g,置 150 mL 锥形瓶中,按重量体积比 1:20 加入氯仿,称重,超声(功率 300 W,频率 50 kHz) 30 min,放冷,用氯仿补足减失的量,摇匀,静置,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.1.3 空白溶液 取不加十一味草果丸药材的粗粉,其余操作同“2.1.2”项下,制得空白溶液。

2.2 色谱条件

SH-WAX 毛细管柱 (0.25 mm \times 0.25 μm \times 30 m); 进样口温度为 220 $^{\circ}\text{C}$; FID 检测器温度为 240 $^{\circ}\text{C}$; 程序升温(初始温度 30 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 100 $^{\circ}\text{C}$,保留 1 min,以 25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 200 $^{\circ}\text{C}$,保留 1 min,以 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 220 $^{\circ}\text{C}$,保留 1 min,以 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$,保留 2 min); 分流进样,分流比 10:1,进样量 1 μL ; 载气为 99.9% 的氮气,流速 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,空气流速 400 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,氢气流速 40 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,尾吹气流速 30 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.3 指纹图谱

2.3.1 精密度 取十一味草果丸供试品溶液(编号 S1),按“2.2”项下色谱条件进样,连续进样 6 次,以 16 号(土木香内酯)为参照峰,结果 20 个共有峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 0.49%,相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性 取十一味草果丸供试品溶液(编号 S1) 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液样品,以 16 号(土木香内酯)为参照峰,结果 20 个共有峰的相对峰面积的 *RSD* 均小于 1.7%,表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性 取十一味草果丸供试品溶液(编号 S1),分别在 0、4、8、16、24 h 进样测定,以 16 号(土木香内酯)为参照峰,结果 20 个共有峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 0.35%,相对峰面积的 *RSD* 均小于 1.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 指纹图谱的建立 取 10 批十一味草果丸,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液(S1~S10),按“2.2”项下色谱条件测定,记录色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012)对 10 批样品进行分析,采用多点校正后进行色谱峰匹配(时间窗为 0.1 min),用平均数法生成 10 批十一味草果丸的 GC 指纹图谱和对照指纹图谱 R,共标定了 20 个共有峰,见图 1。通过与混合对照品溶液色谱图(S0)进行比对,指认了 5 个共有峰,即 1 号峰(桉油精)、10 号峰(丁香酚)、16 号峰(土木香内酯)、18 号峰(异土木香内酯)、20 号峰(去氢木香内酯),见图 2。

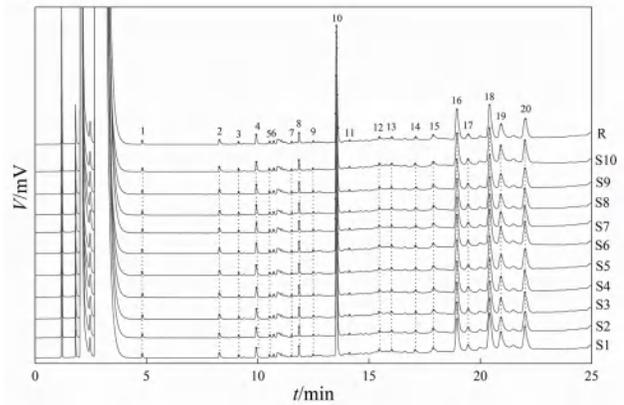


图 1 10 批十一味草果丸的 GC 指纹图谱(S1~S10)和对照指纹图谱(R)

Fig 1 GC fingerprints and reference fingerprint (R) of 10 batches Shiyiwei Caoguo pills (S1~S10)

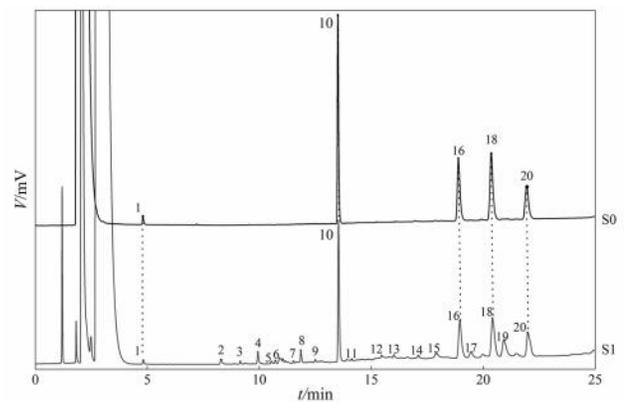


图 2 十一味草果丸共有峰的指认图

Fig 2 Identification of common peaks in Shiyiwei Caoguo pills

1. 桉油精 (eucalyptus oleoresin); 10. 丁香酚 (eugenol); 16. 土木香内酯 (geomannan lactone); 18. 异土木香内酯 (isogeomannan lactone); 20. 去氢木香内酯 (dehydrogeomannan lactone)

2.3.5 指纹图谱相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度系统(2012.130723 版本)》软件计算 10 批十一味草果丸指纹图谱与对照指纹图谱 R 的相似度。结果显示,10 批十一味草果丸指纹图谱的相似度均在 0.99 以上,说明不同批次的十一味草果丸间相似度较高,整体质量较为稳定,见表 1。

2.4 含量测定

2.4.1 系统适用性及专属性试验 取“2.1”项下各溶液,按“2.2”项下色谱条件分别测定,色谱图见图 3。结果显示供试品、对照品溶液色谱图中各成分的色谱峰保留时间一致,各成分峰完全分离,理论塔板数均在 10 000 以上。

2.4.2 线性关系、检测限和定量限 取“2.1.1”项下混合对照品溶液,用甲醇稀释成系列质量浓度,分别测定。以溶液质量浓度为横坐标(*X*),峰面积为纵坐标(*Y*)作回归曲线;以信噪比 3:1、10:1 时的浓度分别作为检测限和定量限,结果见表 2。

表 1 10 批十一味草果丸相似度评价结果

Tab 1 Similarity of 10 batches of Shiyiwei Caoguo pills

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.999	0.998	0.994	0.995	0.998	0.998	0.999	0.998	0.995	0.999
S2	0.999	1.000	0.998	0.995	0.996	0.999	0.998	0.999	0.995	0.996	0.998
S3	0.998	0.998	1.000	0.996	0.995	0.999	0.996	0.998	0.995	0.999	0.999
S4	0.995	0.995	0.996	1.000	0.999	0.995	0.993	0.995	0.998	0.998	0.997
S5	0.995	0.996	0.995	0.999	1.000	0.996	0.994	0.997	0.998	0.999	0.997
S6	0.998	0.999	0.999	0.995	0.996	1.000	0.998	0.999	0.999	0.995	0.999
S7	0.998	0.998	0.996	0.993	0.994	0.997	1.000	0.998	0.999	0.999	0.998
S8	0.999	0.999	0.998	0.995	0.997	0.999	0.997	1.000	0.998	0.998	0.999
S9	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.999	1.000	0.995	0.993
S10	0.999	0.998	0.994	0.995	0.998	0.998	0.999	0.998	0.996	1.000	0.999
R	0.999	0.998	0.999	0.997	0.998	0.999	0.998	0.999	0.998	0.995	1.000

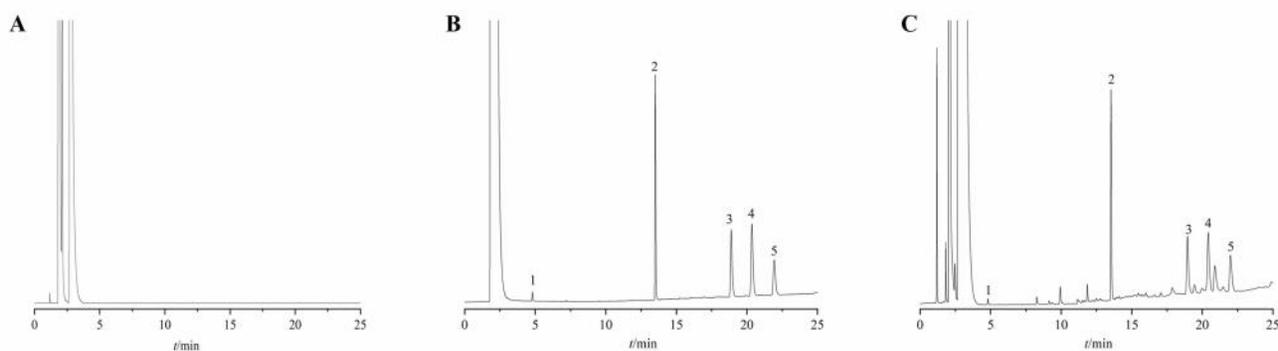


图 3 空白溶液 (A)、混合对照品溶液 (B) 及供试品溶液 (C) 的 GC 图

Fig 3 GC chromatogram of blank solution (A), mixed references solution (B) and sample solution (C)

1. 桉油精 (eucalyptus oleoresin); 2. 丁香酚 (eugenol); 3. 土木香内酯 (geomannan lactone); 4. 异土木香内酯 (isogeomannan lactone); 5. 去氢木香内酯 (dehydrogeomannan lactone)

表 2 线性范围、检测限和定量限结果

Tab 2 Linearity, limit of detection and limit of quantification

成分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	检测限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
桉油精	$Y = 1.521 \times 10^3 X + 1.93$	0.80 ~ 7.98	0.9999	0.13	0.435
丁香酚	$Y = 1.135 \times 10^3 X + 1.300 \times 10^3$	34.93 ~ 349.30	0.9998	0.46	1.520
土木香内酯	$Y = 1.359 \times 10^3 X + 1.023 \times 10^3$	19.66 ~ 196.57	0.9998	0.83	2.769
异土木香内酯	$Y = 1.394 \times 10^3 X + 438.85$	23.44 ~ 234.39	0.9998	0.18	0.586
去氢木香内酯	$Y = 1.318 \times 10^3 X + 458.56$	14.21 ~ 142.14	0.9998	0.11	0.355

2.4.3 精密度试验 取“2.1.1”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，结果桉油精、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯、去氢木香内酯峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 1.8%、2.0%、1.2%、1.2%、1.2%，表明仪器精密度良好。另取“2.1.2”项下供试品溶液，于 1 d 内重复进样 6 次，连续进样 3 d，计算日内精密度 ($n = 6$) 和日间精密度 ($n = 3$)，结果显示日内精密度 RSD 分别为 1.3%、0.95%、1.0%、1.7%、0.97%，日间精密度 RSD 分别为 1.9%、1.9%、1.5%、1.5%、1.5%，表示日内、日间精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样检

测，结果桉油精、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯、去氢木香内酯峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 1.6%、1.9%、1.9%、1.8%、1.9%，表明溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 取十一味草果丸 (批号：20230201) 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，分别测定，结果桉油精、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯和去氢木香内酯的平均含量依次为 0.03、1.47、0.70、0.80、0.56 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ， RSD ($n = 6$) 依次为 1.2%、1.9%、1.5%、1.8% 和 1.7%，表明本方法重复性良好。

2.4.6 加样回收试验 取各成分含量已知的十一味

草果丸(批号:20230201)9份,每份1g,精密称定,分成高、中、低浓度加样组,分别精密加入相当药材中指标成分量的150%、100%、50%的桉油精、丁香酚、土木香内酯、去氢土木香内酯和异土木香内酯对照品储备液适量,每个浓度加样组平行制备3份,按“2.1.2”项下方法制备溶液,分别测定,计算得桉油精、丁香酚、土木香内酯、去氢土木香内酯和异土木香内酯5种成分高、中、低浓度平均加样回收率分别为90.68%~92.66%、95.44%~96.42%、99.59%~102.38%、98.34%~103.04%、98.94%~101.66%,RSD值均小于2.0%,符合方法学要求。

2.4.7 样品含量测定 取10批十一味草果丸,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别测定,外标法计算各成分含量,结果见表3。

表3 10批十一味草果丸的含量样品测定结果(mg·g⁻¹)

Tab 3 Content determination of 10 batches of Shiyiwei Caoguo pills

(mg·g⁻¹)

批号	桉油精	丁香酚	土木香内酯	异土木香内酯	去氢土木香内酯
S1	0.03	1.63	0.77	0.89	0.62
S2	0.03	1.44	0.70	0.81	0.56
S3	0.03	1.71	0.83	0.95	0.66
S4	0.03	1.66	0.74	0.83	0.59
S5	0.03	1.56	0.69	0.76	0.52
S6	0.02	1.78	0.85	0.94	0.61
S7	0.04	1.39	0.69	0.76	0.52
S8	0.04	1.48	0.69	0.76	0.52
S9	0.03	1.63	0.85	0.94	0.61
S10	0.02	1.70	0.80	0.92	0.64

3 讨论

3.1 样品前处理研究

十一味草果丸是传统的生药丸剂,质地较硬,需要破碎后再用于制备供试品溶液,本研究比较了捣碎、研磨、粉碎机粉碎方式以及不同粉末粒径对5种指标成分含量的影响。结果发现采用研磨、粉碎机粉碎的方式制备的供试品溶液中桉油精、丁香酚的含量显著低于捣碎方式,其原因为研磨、粉碎机粉碎过程中的局部摩擦高温导致易挥发性指标成分的逸失,且捣碎的粒径对供试品溶液中的指标成分含量影响显著。因此,本研究采用将样品捣碎为粗粉制备供试品溶液的方法。

3.2 供试品溶液的制备研究

本研究通过单因素试验比较了提取方式、溶剂、时间以及液料比对供试品溶液中指标成分的影响^[19-21]。结果表明,水蒸气蒸馏提取的挥发油分层导致难以收集,而且挥发油中成分更为复杂,对指标

成分的色谱峰干扰严重;与石油醚、氯仿、正己烷、乙酸乙酯、甲醇、乙醇相比,氯仿提取的供试品溶液中5种成分均能检出,且含量较高;超声时间在10~30min内与提取液中指标成分的含量成正相关,但超声时间超过30min,提取液中指标成分含量反而下降,可能是长时间超声提取使得溶液温度上升,导致挥发性成分的逸失;提取溶剂与样品的体积质量比在(5~20):1内与提取液中指标成分的含量成正相关,当提取溶剂与样品的体积质量比超过20:1时,提取液中5种指标成分的含量变化不显著。因此,本研究的供试品溶液制备方法是采用氯仿为提取溶剂,液料比20:1,超声提取30min。

3.3 色谱条件的研究

本研究尝试采用100、150、200℃柱温分析5种挥发性指标成分^[22-24],但均未能实现分离,其原因与指标成分的沸点差异较大有关^[17, 25],因此采取程序升温的方式。在色谱柱的选择中,本研究发现使用非极性(SH-5)色谱柱,异土木香内酯与去氢土木香内酯不能与其他成分分开,而使用强极性(SH-WAX)毛细管色谱柱可以使主要色谱峰均有效分离,色谱行为较为理想。

4 小结

本研究建立了十一味草果丸的GC指纹图谱并同时测定其中5种指标成分桉油精、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯和去氢土木香内酯的含量,结果表明本方法的线性范围广,系统适用性、重复性、精密度良好,稳定可行,可为十一味草果丸的质量控制以及质量标准完善提供依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 藏药第一册.
- [2] 何启香,常立德,王迪科,等. 高效液相色谱法测定十一味草果丸中5种成分的含量[J]. 中南药学, 2018, 16(10): 1437-1440.
- [3] 中国药典2020年版. 四部[S]. 2020: 10.
- [4] 雷智冬,黄锁义,草果提取方法、生物活性与临床应用研究新进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 245-249.
- [5] 杨志清,徐绍忠,张薇,等. 云南草果茎叶挥发油含量及主要化学成分分析[J]. 中药材, 2019, 42(2): 339-343.
- [6] 谢鹏,秦华珍,谭喜梅,等. 草豆蔻化学成分和药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(3): 60-63.
- [7] 金新宇,王晓霞,柳航,等. 草果化学成分的研究[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2539-2542.
- [8] Aboubakr HA, Nauertz A, Luong NT, et al. In vitro antiviral activity of clove and ginger aqueous extracts against Feline Calicivirus, a surrogate for human norovirus[J]. J Food Prot, 2016, 79(6): 1001-1012.
- [9] Li FJ, Yang ZJ. Tumor suppressive roles of eugenol in human

- lung cancer cells [J]. Thorac Cancer, 2018, 9 (1): 25-29.
- [10] Han X, Parker TL. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts [J]. Pharm Biol, 2017, 55 (1): 1619-1622.
- [11] 王萍, 汪镇朝, 刘英孟, 等. 丁香挥发油的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44 (3): 871-878.
- [12] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 17-175.
- [13] 毛景欣, 王国伟, 易漫, 等. 川木香化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48 (22): 4797-4803.
- [14] Paço A, Brás T, Santos JO, et al. Anti-inflammatory and immunoregulatory action of sesquiterpene lactones [J]. Molecules, 2022, 27 (3): 1142.
- [15] Xie F, Zhang H, Zheng C, et al. Costunolide improved dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis in mice through NF- κ B, STAT1/3, and Akt signaling pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 84: 1065-1067.
- [16] 张新新, 杨洋, 刘胜家, 等. 藏木香中土木香内酯和异土木香内酯的制备 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45 (2): 116-119.
- [17] 唐逢雨, 仇坤, 周利梅, 等. 土木香内酯生物黏附微球的制备及其对溃疡性结肠炎模型大鼠的药效评价 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58 (19): 1759-1768.
- [18] Chen HL, Lin SC, Li S, et al. Alantolactone alleviates collagen-induced arthritis and inhibits Th17 cell differentiation through modulation of STAT3 signalling [J]. Pharm Biol, 2021, 59 (1): 134-145.
- [19] Yang YC, Wei MC, Hong SJ. Ultrasound-assisted extraction and quantitation of oils from *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) with supercritical carbon dioxide [J]. J Chromatogr A, 2014, 1323: 18-27.
- [20] 刘巨钊, 鲜梦雪, 孔伟华, 等. 草果精油提取工艺优化与成分分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35 (5): 766-780.
- [21] 戈雅倩, 谢和兵, 尼玛次仁, 等. HPLC 法同时测定藏药三味檀香汤散中主要指标成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (5): 748-753.
- [22] 左遨勋, 刘积光, 高玉梅, 等. 丁香不同部位挥发油的 GC-MS 成分分析和抗氧化活性比较 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43 (8): 146-151.
- [23] 陈飞龙, 谭晓梅, 汤庆发, 等. 几种“木香”挥发油成分的 GC-MS 比较研究 [J]. 中药材, 2011, 34 (3): 395-399.
- [24] 燕霞, 张慧, 罗轶. GC-MS/MS 测定宽胸气雾剂中 12 种指标成分 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (20): 2127-2131.
- [25] 施璐, 史颖颖, 曹晓琴, 等. GC-MS 鉴定不同产地丁香花蕾油的生物活性成分及其抗氧化性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2023, 34 (11): 190-196.

(收稿日期: 2024-04-10; 修回日期: 2024-06-17)

基于 UPLC-MS/MS 技术的更年宁水蜜丸中藏柴胡掺伪方法的研究

蒋芦荻, 杨琰, 刘亚楠, 李海燕, 王海波*, 王晓燕 (河南省药品医疗器械检验院, 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室, 郑州 450018)

摘要: 目的 建立更年宁中藏柴胡掺伪检查方法, 考察生产企业是否存在使用藏柴胡替代柴胡投料的情况。方法 采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术, 选择 Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μ m), 流动相为乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 1 μ L; 采用电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式, 进行多反应监测 (MRM), 选择 m/z 943.5 \rightarrow 635.4、 m/z 943.5 \rightarrow 797.5 和 m/z 943.5 \rightarrow 781.5 为尼泊尔柴胡皂苷 K 的检测离子对。结果 尼泊尔柴胡皂苷 K 质量浓度在 93.3 ~ 3734 ng·mL⁻¹ 内与峰面积呈现良好的线性关系 ($r = 0.9998$); 精密度、重复性、稳定性 (24 h) 试验的 RSD 均小于 2.0%; 3 个浓度平均加样回收率为 96.4% ~ 99.6% (RSD 均 < 3.0)。更年宁中藏柴胡掺伪比例在 3% ~ 100% 内与尼泊尔柴胡皂苷 K 质量浓度的线性关系良好 ($r = 0.9947$)。以掺伪藏柴胡不得过 10% 为限度, 对 44 批更年宁样品进行筛查, 结果 5 批更年宁掺伪藏柴胡 22% ~ 36%, 超出拟订限度。结论 该方法准确、可靠, 可用于更年宁中藏柴胡掺伪检查及市场监管。

关键词: 更年宁; 柴胡; 藏柴胡; 掺伪; 尼泊尔柴胡皂苷 K; 超高效液相色谱-质谱联用法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3345-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.032

基金项目: 2022 年国家药品抽检 (中央补助地方经费项目) (No.41); 河南省市场监督管理局科技计划项目 (No.2023sj61); 中国药品监管科学行动计划第二批重点项目 (No.NMPAJGKX-2023-029)。

作者简介: 蒋芦荻, 女, 主管中药师, 主要从事中药质量控制研究, email: jiangludi_52@163.com * **通信作者:** 王海波, 男, 主任药师, 主要从事中药质量控制研究, email: gnn2022gc@163.com

Adulteration of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in Gengnianning water-honeyed pill by UPLC-MS/MS

JIANG Lu-di, YANG Yan, LIU Ya-nan, LI Hai-yan, WANG Hai-bo*, WANG Xiao-yan (Henan Institute for Drug and Medical Device Inspection, State Drug Administration Key Laboratory of Quality Control of Chinese Herbal Medicine and Decoction Pieces, Zhengzhou 450018)

Abstract: Objective To establish the detection method for the adulteration of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in Gengnianning water-honeyed pill, and to find out whether *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* was used to replace *Bupleuri Radix* in the manufacturing enterprises. **Methods** UPLC-MS/MS was performed on Waters BEH C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), with acetonitrile and 0.1% formic acid as the mobile phase in gradient elution at 0.3 mL·min⁻¹. The column temperature was 35 °C and the injection volume was 1 μL. A triple quadrupole mass spectrometer was used for the detection in negative ion mode with an electrospray ion source. *m/z* 943.5 → 635.4, *m/z* 943.5 → 797.5 and *m/z* 943.5 → 781.5 were selected as the ion pairs and multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for the determination of nepesaikosaponin K. **Results** Nepesaikosaponin K showed a good linearity at 93.3 ~ 3734 ng·mL⁻¹ (*r* = 0.9998). The *RSDs* of precision, repeatability and stability (24 h) were all lower than 2.0%. The average recoveries at three spiked levels were 96.4% ~ 99.6% (*RSD* < 3.0%). The adulteration ratio of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in Gengnianning water-honeyed pill showed a good linearity to the content of nepesaikosaponin K within 3% ~ 100% (*r* = 0.9947). Totally 44 batches of Gengnianning water-honeyed pill were screened with the limit that the doping of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* should not exceeding 10%. The doping of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in 5 batches of Gengnianning water-honeyed pill was 22% ~ 36%, which exceeded the proposed limit. **Conclusion** The method is accurate and reliable, can be used to detect the adulteration of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in Gengnianning water-honeyed pill.

Key words: Gengnianning water-honeyed pill; *Bupleuri Radix*; *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*; adulteration; nepesaikosaponin K; UPLC-MS/MS

更年宁, 收载于《卫生部药品标准(中药成方制剂)》第六册, 由柴胡、黄芩、人参等 22 味药组成, 剂型包括水蜜丸和大蜜丸, 具有疏肝解郁、益气养血、健脾安神的功效^[1]。处方中首味药柴胡, 来源于伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. (*B. chinense* DC.) 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzoniferifolium* Willd. 的干燥根^[2]。柴胡近源品种较多, 近年来柴胡需求量大增, 市场上常有柴胡混伪品作药用情况^[3-5]。其中, 藏柴胡为常见伪品, 藏柴胡为伞形科植物窄竹叶柴胡 *Bupleurum marginatum* Wall. ex DC. var. *stenophyllum* (Wolff) Shan et Y. Li (*B. marginatum* Wall. ex DC. var. *stenophyllum*) 的干燥根^[6-7]。因其资源量大、价格低、性状与柴胡相近、柴胡皂苷含量高, 市场上存在藏柴胡掺入柴胡使用情况^[8-9]。研究表明, 藏柴胡具有抑制流感病毒活性、解热、抗炎等作用^[10]; 但动物实验表明, 服用藏柴胡的小鼠出现明显的中毒症状, 而相同生药量柴胡并未呈现毒性^[11]。藏柴胡掺伪柴胡使用, 使得临床用药安全性和有效性受到很大威胁。

含柴胡的中成药有 500 余种,《中国药典》等标

准中采用柴胡对照药材进行定性鉴别, 或以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 对照品进行定量分析。目前, 含柴胡中成药标准仅能控制柴胡不投料或少投料情况, 因藏柴胡中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的含量较柴胡高, 现行标准无法检查柴胡投料真伪, 不法企业利用此漏洞以藏柴胡掺伪或替代柴胡投料。更年宁现行质量标准缺乏柴胡的质量控制项目^[1], 为有效控制更年宁的质量, 提高临床用药的安全性和有效性, 本研究以藏柴胡的特征性成分尼泊尔柴胡皂苷 K 为基础^[12-15], 采用 UPLC-MS/MS 技术检查更年宁中藏柴胡掺伪的情况, 为柴胡在中药制剂中掺伪投料的监管提供技术支持。

1 仪器与试药

Thermo Fisher TSQ Altis 三重四极杆液相色谱-质谱联用仪(赛默飞世尔公司); XPE205 电子天平(十万分之一, Mettler Toledo 公司); KQ-300DA 型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司; 超声功率: 300 W; 频率: 40 kHz)。

尼泊尔柴胡皂苷 K 对照品(批号: 112073-202201, 含量以 94.2% 计)、柴胡对照药材(批号:

120992-201509)(中国食品药品检定研究院),藏柴胡对照药材(批号:WXHY-ZCH-001,天津万象恒远科技有限公司)。甲醇、氨水(分析纯),乙腈、甲酸(质谱级),水为 Milli-Q 系统制备。

收集到柴胡样品 12 批、藏柴胡样品 12 批,经河南省药品医疗器械检验院刘亚楠副主任中药师鉴定分别为伞形科植物柴胡 *B. chinense* DC. 的干燥根、伞形科植物窄竹叶柴胡 *B. marginatum* Wall. ex DC. var. *stenophyllum* 的干燥根; 更年宁水蜜丸 44 批次(5 个企业)均为 2022 年国家药品抽检样品。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

采用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 以乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱(0~3 min, 25%~30%A; 3~30 min, 30%~50%A; 30~31 min, 50%~90%A; 31~34 min, 90%A; 34~35 min, 90%~25%A; 35~40 min, 25%A); 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 35℃; 进样量 1 μL。

采用电喷雾离子源(ESI), 负离子扫描, 多反应监测(MRM)模式, 离子喷雾电压 2.5 kV, 鞘气 50 Arb, 辅助气 10 Arb, 蒸发温度 350℃, 离子传输管温度 325℃。选择 *m/z* 943.5→635.4(定量离子对)、*m/z* 943.5→797.5(定性离子对)和 *m/z* 943.5→781.5(定性离子对)为尼泊尔柴胡皂苷 K 的检测离子对, 碰撞能量均为 45 eV。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品储备溶液 取尼泊尔柴胡皂苷 K 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 100 μg 的对照品储备溶液。

2.2.2 供试品溶液 取更年宁水蜜丸适量, 研碎, 取约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 5% 浓氨试液的甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 藏柴胡药材溶液 取藏柴胡药材约 0.1 g, 按“2.2.2”项下方法制备, 精密吸取续滤液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用含 5% 浓氨试液的甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 柴胡药材溶液 取柴胡药材约 0.1 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得。

2.2.5 柴胡阴性样品溶液 按更年宁水蜜丸处方比例及工艺自制柴胡阴性样品 1 批, 按“2.2.2”项下方法制备柴胡阴性样品溶液。

2.3 方法学研究

2.3.1 专属性考察 取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、柴胡阴性样品溶液, 依照“2.1”项下条件检

测, 结果显示, 柴胡阴性样品中特征离子对均未检出, 阴性样品无干扰。尼泊尔柴胡皂苷 K 的保留时间为 4.40 min, 其 MRM 提取离子流图见图 1。

2.3.2 基质效应考察 更年宁水蜜丸处方药味众多, 柴胡投料量占比较低(约占处方量 2.9%), 故需对制剂基质效应进行考察。基质效应对照品溶液: 精密量取 3734 ng·mL⁻¹ 的尼泊尔柴胡皂苷 K 对照品溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。基质效应标准加入溶液: 精密量取 3734 ng·mL⁻¹ 的尼泊尔柴胡皂苷 K 对照品溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用柴胡阴性样品溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。取上述 2 种溶液, 分别进样测定, 以基质效应标准加入溶液峰面积与基质效应对照品溶液峰面积的比值计算基质效应。

结果, 基质效应标准加入溶液 *m/z* 943.5→635.4 的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷 K 色谱峰的峰面积为 248 907, 基质效应对照品溶液相应色谱峰面积为 259 008, 计算得出基质效应为 96.1%, 表明样品基质对尼泊尔柴胡皂苷 K 的测定基本无干扰。

2.3.3 线性关系考察及定量限测定 精密量取“2.2.1”项下对照品储备液适量, 以甲醇配制系列浓度(*n* = 5)对照品溶液, 按“2.1”项下条件进样测定, 以尼泊尔柴胡皂苷 K 进样质量浓度(*X*, ng·mL⁻¹)为横坐标, 峰面积值(*Y*)为纵坐标对 *X* 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 674.88X + 7051.2$ ($r = 0.9998$), 线性范围为 93.3~3734 ng·mL⁻¹。

将对照品溶液稀释至不同浓度, 进样测定, 以信噪比 3:1 时的对照品质量浓度为检测限, 10:1 时的对照品质量浓度为定量限。结果更年宁水蜜丸中尼泊尔柴胡皂苷 K 的检测限为 3.7 ng·mL⁻¹, 定量限为 7.5 ng·mL⁻¹。

2.3.4 精密度试验 取尼泊尔柴胡皂苷 K 质量浓度为 186.7 ng·mL⁻¹ 的对照品溶液, 连续进样 6 次, 以 *m/z* 943.5→635.4 的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷 K 色谱峰的峰面积进行计算, 结果 *RSD* (*n* = 6) 为 1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 分别精密称取同一更年宁水蜜丸样品(B企业, 批号: 210401) 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件进样测定, 测得尼泊尔柴胡皂苷 K 的平均含量为 14.9 μg·g⁻¹, *RSD* 为 0.80%, 表明该方法的重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取“2.3.5”项下同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项下条件进样, 测定峰面积, 结果尼泊尔柴胡皂苷 K 峰面积的 *RSD* 为 1.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 回收试验 精密称取已知尼泊尔柴胡皂苷 K 含量的更年宁水蜜丸样品(B企业, 批号: 210401) 粉末 1.0 g 共 9 份, 置具塞锥形瓶中, 以

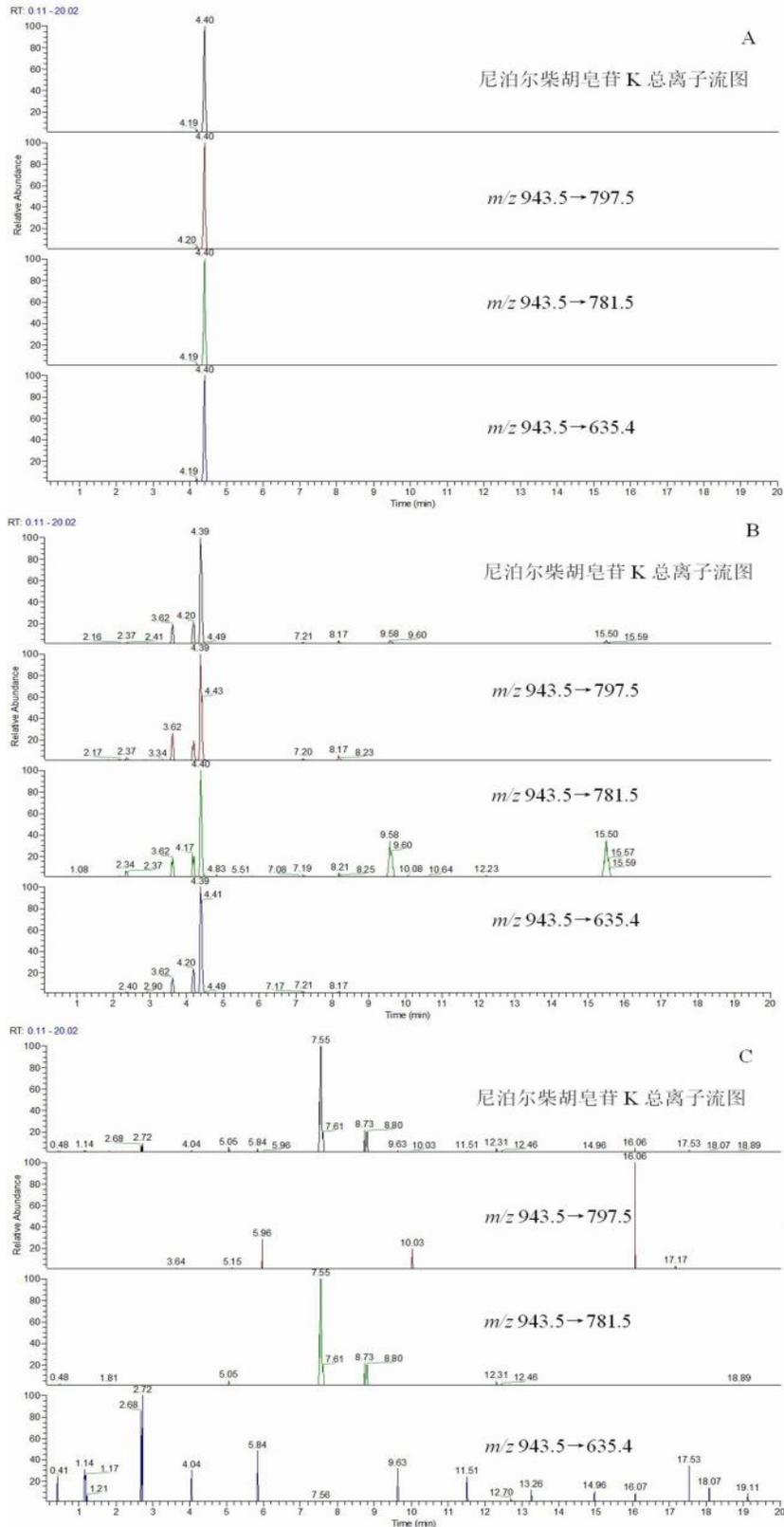


图 1 对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和柴胡阴性样品溶液 (C) 的 MRM 提取离子流图

Fig 1 Extraction MRM chromatogram of reference solution (A), sample solution (B) and negative sample solution (C)

3 份为一组, 分别按相对于本品约 50%、100%、200% 的 3 个含量比例精密加入尼泊尔柴胡皂苷 K 对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法操作, 即得。进样测定, 计算加样回收率。结果尼泊尔柴胡皂苷

K 在 3 个浓度水平的加样回收率 ($n = 3$) 分别为 96.4%、99.6%、97.9%, RSD 分别为 2.9%、0.80%、1.9%, 表明该方法回收率良好。

2.4 藏柴胡掺伪检查的限度拟订研究

2.4.1 药材中尼泊尔柴胡皂苷 K 的测定 取不同批次的藏柴胡及柴胡药材各 0.1 g, 精密称定, 分别按“2.2.3”和“2.2.4”项下方法制备藏柴胡及柴胡药材溶液。按“2.1”项下条件进样分析, 计算尼泊尔柴胡皂苷 K 的含量。结果表明, 柴胡及藏柴胡中均含有尼泊尔柴胡皂苷 K, 藏柴胡中尼泊尔柴胡皂苷 K 的含量是柴胡的 40 倍左右, 见表 1。

表 1 柴胡药材和藏柴胡药材中尼泊尔柴胡皂苷 K 的含量

Tab 1 Content of nepesaikosaponin K in *B.chinense* DC and *B.marginatum* var. *stenophyllum*

柴胡编号	含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	藏柴胡编号	含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	16.2	1	1028.7
2	22.7	2	740.9
3	45.7	3	750.9
4	15.1	4	902.4
5	12.6	5	1011.5
6	33.4	6	1206.9
7	20.9	7	849.4
8	19.4	8	841.4
9	17.2	9	1088.9
10	24.7	10	880.0
11	19.7	11	889.5
12	12.8	12	566.4
对照药材	20.1	对照药材	524.4
平均值	21.6	平均值	867.8

2.4.2 掺伪比例与尼泊尔柴胡皂苷 K 质量浓度的线性关系考察 取柴胡对照药材, 分别以含藏柴胡 3%、5%、10%、25%、50%、100% 的比例制备不同掺伪比例的柴胡原料, 按更年宁水蜜丸处方比例及工艺制备模拟掺伪样品, 按“2.2.2”项下方法制备溶液, 进样分析。不同掺伪比例样品中尼泊尔柴胡皂苷 K 的质量浓度分别为 145.8、240.6、338.7、721.7、1538.5、3406.2 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以尼泊尔柴胡皂苷 K 的质量浓度 (Y) 为纵坐标, 掺伪比例 (X) 为横坐标, 进行线性回归, 计算得回归方程为 $Y = 33.332X - 6.9116$ ($r = 0.9947$)。结果表明, 藏柴胡掺伪比例在 3% ~ 100% 与尼泊尔柴胡皂苷 K 质量浓度呈良好的线性关系, 该方法可对更年宁水蜜丸中藏柴胡掺伪量进行定量检测。

2.4.3 掺伪判定浓度的拟订 参照 2020 年版《中国药典》四部“0212 药材和饮片检定通则”所述杂质通常不得过 3%, 考虑柴胡存在交叉种植、种质多样及性状易混淆的情况, 而柴胡药材中均含有微量尼泊尔柴胡皂苷 K, 同时结合更年宁水蜜丸制法与柴胡处方量, 为防止限度拟订过低造成假阳性结果, 本研究拟订更年宁水蜜丸中藏柴胡的掺伪限度为 10%。

以 12 批藏柴胡药材、1 批藏柴胡对照药材分别按含藏柴胡 10% 的比例掺入柴胡对照药材, 按更年宁水蜜丸处方比例及工艺制备 13 批藏柴胡掺伪比例为 10% 的参比掺伪样品, 按“2.2.2”项下方法

制备其溶液, 进样分析, 根据“2.3.3”项下回归方程计算尼泊尔柴胡皂苷 K 的浓度, 结果见表 2。参比掺伪样品溶液中尼泊尔柴胡皂苷 K 的平均质量浓度为 271.6 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 拟订更年宁水蜜丸供试品溶液中尼泊尔柴胡皂苷 K 的质量浓度不得超过 272 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并以此浓度作为检查更年宁水蜜丸中是否存在藏柴胡掺伪的判定质量浓度。更年宁水蜜丸为全粉入药制剂, 折算成更年宁水蜜丸中尼泊尔柴胡皂苷 K 的含量限度为不得过 3.4 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 2 13 批藏柴胡制备掺伪 10% 藏柴胡的参比溶液检测结果

Tab 2 Detection of 13 batches of *B.marginatum* var. *stenophyllum* added with 10% reference solutions

自制掺伪 编号	尼泊尔柴胡皂苷 K/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	自制掺伪 编号	尼泊尔柴胡皂苷 K/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	216.9	8	287.3
2	258.5	9	335.1
3	329.8	10	313.2
4	261.3	11	289.0
5	320.6	12	228.9
6	257.6	13	185.1
7	247.8		

2.5 样品测定及结果分析

取 44 批更年宁水蜜丸样品各 2 份, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项下条件进样测定, 以随行标准曲线计算含量, 结果见表 3。5 批样品 (B 企业, 批号分别为 210201、210202、210401、210601、210602) 尼泊尔柴胡皂苷 K 含量超出拟订限度, 提示藏柴胡掺伪投料。将上述样品尼泊尔柴胡皂苷 K 质量浓度分别代入“2.4.2”项下掺伪比例与尼泊尔柴胡皂苷 K 质量浓度的线性方程, 5 批样品藏柴胡掺伪比例在 22% ~ 36%。B 企业样品中, 上述问题样品生产日期集中在 2021 年 2 月至 6 月, 2021 年下半年至 2022 年年初样品未发现藏柴胡掺伪投料情况。提示 B 企业应加强原料质量控制, 严格把好入库关。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察

考察不同溶剂 (甲醇、含 5% 浓氨试液的甲醇溶液、乙腈), 提取方式 (回流、超声), 提取时间 (回流 0.5、1 h, 超声 15、30、45 min) 的提取效果。结果含 5% 浓氨试液的甲醇溶液提取效果优于甲醇或乙腈溶液, 采用超声提取 30 min 结果最优。

3.2 色谱 - 质谱条件优化

3.2.1 流动相条件考察 对流动相组成 (甲醇 - 水、甲醇 - 0.1% 甲酸水、乙腈 - 水、乙腈 - 0.1% 甲酸水) 进行优化, 结果以乙腈 - 0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱, 峰形对称、出峰时间稳定、分离度最佳。

3.2.2 色谱柱的选择 考察了 3 种色谱柱 Waters

表 3 更年期宁水蜜丸中尼泊尔柴胡皂苷 K 含量测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
 Tab 3 Contents of nepesaikosaponin K in Gengnianning water-honeyed pill ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

企业	批号	尼泊尔柴胡皂苷 K	企业	批号	尼泊尔柴胡皂苷 K
A	21030536	1.6	C	210601	2.4
A	21033791	1.4	C	210801	2.5
B	210201	9.4	C	210802	2.5
B	210202	9.8	C	210804	2.6
B	210401	14.9	C	210805	2.4
B	210601	11.9	C	210806	2.5
B	210602	11.1	C	210808	2.3
B	211001	1.1	C	211001	2.5
B	211201	1.2	C	211003	2.5
B	220201	1.7	C	211006	2.4
C	200405	2.1	C	211008	2.1
C	200610	1.2	C	211009	2.3
C	200807	1.2	C	211205	2.5
C	201013	2.1	C	220104	2.5
C	201203	2.5	C	220105	2.1
C	201209	2.2	D	200702	1.2
C	201210	2.0	D	201201	1.3
C	201215	2.3	D	201203	1.2
C	210202	2.0	D	200703	1.2
C	210413	1.7	D	201202	1.3
C	210414	1.5	E	191001	1.2
C	210415	1.7	E	191002	1.5

BEH C_{18} (1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm)、YMC-Triart C_{18} (1.9 μm , 2.1 mm \times 100 mm)、YMC-Triart C_{18} (3 μm , 2.1 mm \times 150 mm) 对分离的影响。结果显示, 粒径 3 μm 的色谱柱分离度不佳; 粒径 1.7 μm 和 1.9 μm 的色谱柱各项方法学均满足要求, 粒径 1.7 μm 的色谱柱呈现的峰分离度和峰形更好。故本方法采用 1.7 μm 色谱柱进行检测。

3.2.3 检测离子对的选择 电喷雾负离子模式下可检出尼泊尔柴胡皂苷 K 的分子离子峰, 选取丰度最高的分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 943.5 为母离子, 选择 m/z 943.5 \rightarrow 635.4、 m/z 943.5 \rightarrow 797.5 和 m/z 943.5 \rightarrow 781.5 为尼泊尔柴胡皂苷 K 的检测离子对, 其中 m/z 943.5 \rightarrow 635.4 的色谱峰响应值最大、分离度好、信噪比高, 故选择该离子对作为定量离子对。

3.3 基质效应考察

基质效应是指在对分析物的浓度或质量测定过程中, 来自样品中其他化合物的一种或几种综合的影响。可通过比较空白样品加标与采用纯溶剂配制的同样浓度的对照品溶液的测定值确认基质效应的有无及强弱^[16]。若基质效应在 85% ~ 115% 内, 可以认为基质效应不明显^[17]。本研究基质效应为

96.1%, 无需采用基体匹配校准法、标准加入法等方法消除基质效应。

4 结论

本研究首次建立了 UPLC-MS/MS 法检查更年期宁水蜜丸中藏柴胡掺伪的方法, 该方法可靠性强, 快速便捷, 可为评价更年期宁水蜜丸等含柴胡中药制剂中柴胡投料掺伪情况提供技术支持。

参考文献

[1] 卫生部药品标准中药成方制剂第 6 册 [S]. 1993: 70.
 [2] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 293.
 [3] 张军, 戴衍朋, 王世丽, 等. 北柴胡及常见伪品藏柴胡、锥叶柴胡鉴别研究 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42 (4): 23-25, 266-268.
 [4] 陈馥, 黄俊忠, 李华, 等. UPLC-MS/MS 检测全粉投料中成药制剂中柴胡掺杂藏柴胡成分方法的研究 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (7): 1245-1254.
 [5] 丁锤, 徐莹, 马孝熙, 等. 柴胡属 5 种易混药材的鉴别研究 [J]. 中药材, 2016, 39 (9): 1975-1981.
 [6] 李玉婷, 马玉芝, 朋冬琴, 等. 藏柴胡研究概况 [J]. 中国现代中药, 2023, 25 (10): 2229-2233.
 [7] 马黎娟, 冯玛莉, 全立国, 等. 藏柴胡药材化学成分及其药理作用研究综述 [J]. 中国医药科学, 2023, 13 (10): 54-57, 88.
 [8] 刘潇潇, 陈馥, 林锦锋, 等. 含柴胡中成药的质量控制方法探讨 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54 (17): 1452-1456.
 [9] 赵丹彤, 高一军, 毕天琛, 等. 柴胡属饮片藏柴胡掺伪检测方法研究 [J]. 药学研究, 2022, 41 (10): 653-658, 663.
 [10] 王惠, 冯玛莉, 张越, 等. 藏柴胡与北柴胡急性毒性、解热、抗炎作用的对比研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22 (5): 1517-1523.
 [11] 王惠. 藏柴胡与北柴胡的鉴别与药理活性对比研究 [D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2020.
 [12] 陈馥, 黄俊忠, 徐万帮, 等. 基于 UPLC-MS/MS 技术检查银柴颗粒中柴胡掺伪的鉴别研究 [J]. 中国药事, 2023, 37 (4): 426-433.
 [13] 殷世宁, 卢京光, 宿曼筠, 等. 感冒清热颗粒中藏柴胡检查方法的研究 [J]. 中国药事, 2023, 37 (4): 461-468.
 [14] 赵丹彤, 高一军, 毕天琛, 等. 感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪检测方法的建立及掺伪限度拟定 [J]. 中国药房, 2022, 33 (20): 2454-2459.
 [15] 赵一擎, 王艳伟, 杨元, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定乳核内消液中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 b₂ 和柴胡皂苷 k 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (10): 1702-1708.
 [16] 许玮仪, 郭藤, 黄金莉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定 3 种含麦冬中药注射剂中多效唑残留量 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (11): 1884-1890.
 [17] 中国食品药品检定研究院. 中药中有害物质残留量检测分析质量控制指导原则 (试行) [S]. 北京: 中检业务 [2015]43 号. (收稿日期: 2024-04-12; 修回日期: 2024-06-12)

一测多评法同时测定柴胡牡蛎颗粒中 6 种成分的含量

秦柳柳^{1, 2, 3}, 林佳明⁵, 林利城⁵, 黄雨颖⁶, 杜正彩^{2, 3, 4}, 梁钰莹^{1, 2, 3}, 覃豪丽^{1, 2, 3}, 邓家刚^{2, 3, 4*}, 侯小涛^{1, 2, 3*} (1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2. 广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530200; 3. 广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心, 南宁 530200; 4. 广西中医药大学广西中医药科学实验中心, 南宁 530200; 5. 钦州市中医医院, 广西 钦州 535000; 6. 广西食品药品审评查验中心, 南宁 530200)

摘要: **目的** 建立柴胡牡蛎颗粒中 6 种成分的一测多评 (QAMS) 定量分析方法。**方法** 采用 Waters C18 反相色谱柱; 流动相为乙腈-0.5% 磷酸溶液, 梯度洗脱; 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长为 274 nm 。以黄芩苷为内参物, 建立 HPLC 一测多评法测定黄芩苷、野黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量。**结果** 6 种成分在各自的浓度范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999$)。以黄芩苷为内参物, 野黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的相对校正因子分别为 1.80、1.14、0.91、0.69、0.62。7 批柴胡牡蛎颗粒中以上 6 种成分的含量分别为 $7.80 \sim 8.61$ 、 $0.32 \sim 0.36$ 、 $0.94 \sim 1.09$ 、 $1.77 \sim 1.83$ 、 $0.17 \sim 0.18$ 、 $0.12 \sim 0.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。**结论** 建立的 QAMS 法简便、经济、适用性好, 可为柴胡牡蛎颗粒的质量控制研究提供基础。

关键词: 柴胡牡蛎颗粒; 一测多评法; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3351-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.033

Simultaneous determination of 6 components in Chaihu Muli granules by QAMS

QIN Liu-liu^{1, 2, 3}, LIN Jia-ming⁵, LIN Li-cheng⁵, HUANG Yu-ying⁶, DU Zheng-cai^{2, 3, 4}, LIANG Yu-ying^{1, 2, 3}, QIN Hao-li^{1, 2, 3}, DENG Jia-gang^{2, 3, 4*}, HOU Xiao-tao^{1, 2, 3*} (1. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Nanning 530200; 3. Guangxi Collaborative Innovation Center of Study on Functional Ingredients of Agricultural Residues, Nanning 530200; 4. Guangxi Scientific Experimental Center of Traditional Chinese Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 5. Qinzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qinzhou Guangxi 535000; 6. Guangxi Food and Drug Evaluation and Inspection Center, Nanning 530200)

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) to determine 6 components in Chaihu Muli granules. **Methods** Waters C18 reverse chromatographic column was used. The mobile phase was acetonitrile-0.5% phosphoric acid solution with gradient elution; the flow rate was $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; the column temperature was $25 \text{ }^\circ\text{C}$; and the detection wavelength was 274 nm . Baicalin was used as the internal standard, a QAMS method was established to simultaneously determine the content of baicalin, scutellarin, oroxylin A-7-O- β -D-glucuronide, wogonoside, baicalein and wogonin. **Results** The 6 components showed good linearity in their respective concentration ranges ($r \geq 0.999$). With baicalin as the internal standard, the relative

基金项目: 2020 年广西中药药效研究重点实验室 (No.20-065-38); 2020 年农作物废弃物功能成分研究协同创新中心项目 (No. CICAR2020); 广西中医药大学“桂派中医药传承创新团队”资助项目 (No.2022A005); 医疗机构制剂委托研发及提供备案材料 (No. H2021021); 广西研究生联合培养基地 (No. 桂学位[2021]6 号) 资助。

作者简介: 秦柳柳, 女, 在读硕士研究生, 主要从事海洋中药学的研究与应用, email: 319396994@qq.com ***通信作者:** 侯小涛, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药活性成分与质量控制研究, email: xthou@126.com; 邓家刚, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药基础理论与药效筛选研究, email: dengjg53@126.com

correction factors of scutellarin, oroxylin A-7-*O*- β -D-glucuronide, wogonoside, baicalein and wogonin were 1.80, 1.14, 0.91, 0.69 and 0.62, respectively. The 6 components in 7 batches of Chaihu Muli granules were 7.80 ~ 8.61, 0.32 ~ 0.36, 0.94 ~ 1.09, 1.77 ~ 1.83, 0.17 ~ 0.18, and 0.12 ~ 0.13 mg · g⁻¹. **Conclusion** The QAMS method is simple, economical and feasible, which provides a basis for the quality control of Chaihu Muli granules.

Key words: Chaihu Muli granule; QAMS; content determination

随着社会经济的发展、人们生活习惯的改变、生活节奏的加快及竞争压力的增大, 郁病发病率逐年增加。柴胡牡蛎颗粒方由汉代张仲景《伤寒论》中“柴胡加龙骨牡蛎汤”加减而成, 由柴胡、黄芩、法半夏、生牡蛎、党参、茯苓、首乌藤、远志、炙甘草等中药组成, 具有解郁化痰、宁心安神的功效, 主要用于治疗痰热内扰型郁病。

中药或中成药成分复杂, 单一成分往往不能确切体现中药或中成药的质量, 因此对中药及中成药中多种成分进行同步质量控制^[1]很有必要。一测多评法(QAMS)在2005年由王智民教授提出后^[2], 逐渐被行业内认可, 并在方法的适应范围、方法学验证等方面进行了完善^[1]。该法可在明确代表性成分与其他成分之间相对校正因子的前提下, 完成对中药及其复方制剂所含多成分的质量控制。本研究采用高效液相色谱法(HPLC), 以黄芩苷为内参物, 建立野黄芩苷等5个化学成分测定的QAMS方法, 旨在为该制剂的质量控制提供思路。

1 材料

1.1 仪器

Alliance e2695 型高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司); Agilent1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); LC-2030 PLUS 型高效液相色谱仪(岛津仪器有限公司); KD2200DB 型超声波清洗机(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

黄芩苷(纯度: 98.5%, 批号: 110715-202122, 中国食品药品检定研究院); 汉黄芩苷(纯度: 98%, 批号: B20488, 上海源叶生物科技有限公司); 野黄芩苷(纯度: 98%, 批号: MUST-23041711)、千层纸素 A-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷(纯度: 98%, 批号: MUST-23102111)、黄芩素(纯度: 98%, 批号: MUST-23030618)、汉黄芩素(纯度: 98%, 批号: MUST-23032214)(曼斯特生物科技有限公司); 柴胡牡蛎颗粒(批号: S220903 ~ S220909, 规格: 15 g/袋)及阴性颗粒

(批号: 230303)(广西大海阳光药业有限公司); 乙醇(分析纯, 成都市科隆化学品有限公司); 乙腈(色谱纯, Fisher Chemical 试剂公司); 磷酸(色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂); 超纯水自制。

2 方法

2.1 HPLC 色谱条件

色谱柱为 Waters C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈(A)-0.5%磷酸水溶液(B)(梯度洗脱: 0 ~ 29 min, 5% ~ 22%A, 29 ~ 50 min, 22%A, 50 ~ 65 min, 22% ~ 27%A, 65 ~ 87 min, 27% ~ 33%A, 87 ~ 88 min, 33% ~ 39%A, 88 ~ 97 min, 39% ~ 42%A, 97 ~ 107 min, 42% ~ 44%A, 107 ~ 108 min, 44% ~ 62%A, 108 ~ 113 min, 62%A); 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 274 nm; 流速 0.8 mL · min⁻¹; 进样量 10 μ L。混合对照品、柴胡牡蛎颗粒溶液及阴性样品溶液的色谱图见图 1。

2.2 供试品溶液及阴性样品溶液的制备

将该制剂研成粉末, 精密称定 0.1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密移取 15 mL 50%乙醇溶液加入, 称重, 超声 30 min^[3], 取出, 放冷, 称重, 补足重量, 摇匀, 取续滤液过 0.45 μ m 的微孔滤膜, 作为柴胡牡蛎颗粒含量测定的供试品溶液。同法制备阴性样品溶液。

2.3 对照品储备液的制备

精密称取各对照品适量加甲醇稀释定容, 制成野黄芩苷、黄芩苷、千层纸素 A-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素质量浓度分别为 23.9、148.8、19.3、26.7、12.9、11.9 μ g · mL⁻¹ 的混合对照品储备液, 备用。

2.4 定量方法的建立

2.4.1 线性关系考察 精密吸取 0.5、1、3、5、7 mL 混合对照品储备液, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容成不同浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 以质量浓度(μ g · mL⁻¹)与峰面积作线性回归^[4], 结果见表 1。

2.4.2 精密度、重复性、稳定性的考察 取柴胡

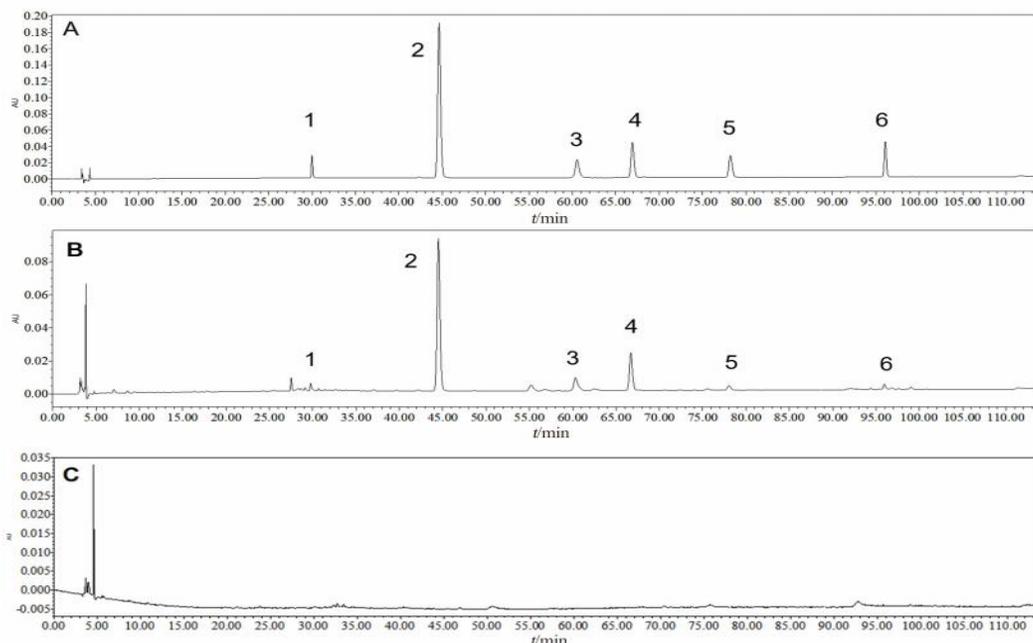


图 1 混合对照品 (A)、柴胡牡蛎颗粒溶液 (B) 及缺黄芩阴性颗粒溶液 (C) 的色谱图

Fig 1 Chromatogram chart of mixed reference substance (A), Chaihu Muli granules (B) and negative granules without Scutellaria (C)

1. 野黄芩苷 (scutellarin); 2. 黄芩苷 (baicalin); 3. 千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (oroxylin A-7-O-β-D-glucuronide); 4. 汉黄芩素 (wogonoside); 5. 黄芩素 (baicalein); 6. 汉黄芩素 (wogonin)

表 1 柴胡牡蛎颗粒中各成分线性关系

Tab 1 Linearity of various constituents in Chaihu Muli granules

成分	线性方程	线性范围 / (μg · mL ⁻¹)	r
野黄芩苷	$y = 2.306 \times 10^4 x - 1.748 \times 10^4$	1.19 ~ 16.73	0.9990
黄芩苷	$y = 4.153 \times 10^4 x - 1.002 \times 10^5$	7.44 ~ 104.16	0.9998
千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	$y = 3.695 \times 10^4 x - 1.216 \times 10^4$	0.96 ~ 13.51	0.9996
汉黄芩苷	$y = 4.596 \times 10^4 x - 1.512 \times 10^4$	1.33 ~ 18.69	1.0000
黄芩素	$y = 6.165 \times 10^4 x - 1.551 \times 10^4$	0.64 ~ 9.03	0.9998
汉黄芩素	$y = 6.736 \times 10^4 x - 7.185 \times 10^3$	0.59 ~ 8.33	0.9999

牡蛎颗粒 1 份, 按“2.2”项下方法制备, 进样测定 6 次, 计算得野黄芩苷、黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.1%、0.36%、1.8%、0.50%、1.4%、1.4%, 表明仪器精密度良好。取 S220903 批次柴胡牡蛎颗粒 6 份, 按“2.2”项下方法制备, 进样测定, 计算得上述 6 种成分的含量分别为 454.5、8077.5、1047.0、1783.5、202.5、138.0 μg · g⁻¹, RSD 分别为 1.5%、1.4%、1.3%、1.6%、1.7%、1.8% (n = 6), 表明方法的重复性良好。取 S220903 批次柴胡牡蛎颗粒, 按“2.2”项下方法制备, 进样测定, 计算得上述 6 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.6%、1.6%、1.7%、1.6%、0.71%、0.52%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.3 加样回收试验 精密称定已知含量的柴胡牡蛎颗粒约 0.05 g, 平行 6 份^[3], 分别加入大约等

于已知含量的对照品溶液, 按“2.2”项下方法制备, 进样测定, 计算得野黄芩苷、黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的加样回收率分别在 95.95% ~ 102.93%、95.58% ~ 105.28%、95.31% ~ 107.12%、92.77% ~ 101.55%、96.96% ~ 103.20%、91.22% ~ 102.07%, RSD 在 2.5% ~ 4.4%, 表明方法准确度良好。

2.5 相对校正因子 (f_{s/i}) 的建立

采用斜率法计算, 分别以黄芩苷标准曲线斜率 / 待测成分标准曲线斜率^[5] 计算各成分 f_{s/i}, 结果野黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素校正因子 f_{s/a}、f_{s/b}、f_{s/c}、f_{s/d}、f_{s/e} 分别为 1.801、1.124、0.904、0.674、0.617。

2.6 f_{s/i} 的耐用性评价

2.6.1 耐用性考察 考察了不同色谱柱 (Waters、

Phenomenex、Welch，规格均为 250 mm×4.6 mm，5 μm)、不同流速 (0.6、0.8、1.0 mL·min⁻¹)、不同柱温 (20、25、30 °C) 和不同仪器 (Waters2695、Agilent1260、岛津 2030) 对 $f_{s/i}$ 的影响，结果见表 2，表明在不同因素下各成分间的 f 无显著性差异。

表 2 不同因素对 $f_{s/i}$ 的影响

Tab 2 Relative correction factor of different factors

因素		$f_{s/a}$	$f_{s/b}$	$f_{s/c}$	$f_{s/d}$	$f_{s/e}$
色谱柱	Waters	1.784	1.145	0.912	0.694	0.630
	Phenomenex	1.765	1.134	0.901	0.685	0.625
	Welch	1.762	1.152	0.911	0.695	0.636
	平均值	1.77	1.14	0.91	0.69	0.63
	RSD/%	0.67	0.79	0.67	0.80	0.87
流速 / (mL·min ⁻¹)	0.6	1.812	1.133	0.907	0.683	0.620
	0.8	1.808	1.179	0.899	0.687	0.620
	1.0	1.816	1.169	0.910	0.688	0.622
	平均值	1.81	1.16	0.91	0.69	0.62
	RSD/%	0.22	2.1	0.63	0.39	0.19
柱温 / °C	20	1.785	1.143	0.910	0.695	0.630
	25	1.784	1.141	0.914	0.695	0.630
	30	1.788	1.166	0.914	0.697	0.631
	平均值	1.79	1.15	0.91	0.70	0.63
	RSD/%	0.12	1.2	0.25	0.17	0.092
仪器	Waters2695	1.784	1.145	0.912	0.694	0.630
	Agilent1260	1.823	1.123	0.899	0.672	0.611
	岛津 2030	1.858	1.104	0.886	0.665	0.607
	平均值	1.82	1.12	0.90	0.68	0.62
	RSD/%	2.0	1.8	1.4	2.2	2.0

2.6.2 $f_{s/i}$ 的确定 综合上述试验结果，取各影响因素考察结果的平均值确定为最终的 $f_{s/i}$ ，即： $f_{s/a} = 1.80$ 、 $f_{s/b} = 1.14$ 、 $f_{s/c} = 0.91$ 、 $f_{s/d} = 0.69$ 、 $f_{s/e} = 0.62$ ，RSD 分别为 1.2%、1.5%、0.55%、1.2%、0.92%。

2.6.3 色谱峰定位 考察不同仪器、色谱柱下各成分的相对保留时间 (待测成分与内参物保留时间之比)，结果见表 3，各成分保留时间 RSD 均小于 3.0%，表明不同仪器、色谱柱下各成分的相对保留时间无显著差异。

2.7 不同批次柴胡牡蛎颗粒 6 种成分含量测定

取各批次样品，分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定各批次样品的含量，结果见表 4。

3 讨论与结论

3.1 柴胡牡蛎颗粒中成分与郁病的相关研究

研究发现，柴胡牡蛎颗粒中的黄芩在发病率最高的神志病——郁病的治疗中占据了不容忽视的地位，其中野黄芩苷、黄芩苷成分被证实具有抗抑郁作用，黄芩素和黄芩苷被认为是黄芩中发挥解热作用的主要成分。野黄芩苷通过激活 GSK-3β/catenin 信号通路，调控海马神经从而改善抑郁样行为^[6]。黄芩苷可通过上调 PI3K/AKT/GSK3 β/catenin 信号通路促进抑郁模型小鼠齿状回神经发生发挥抗抑郁作用^[7]。有研究表明黄芩素和黄芩苷是黄芩解热作用的重要物质基础^[8]，黄芩苷和黄芩素能够通过干扰花生四烯酸

表 3 不同仪器、色谱柱对相对保留时间的影响

Tab 3 Effect of different instruments and columns on relative retention time

仪器	色谱柱	相对保留时间				
		野黄芩苷	千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
Waters2695	Waters	0.67	1.35	1.49	1.75	2.14
	Phenomenex	0.70	1.32	1.50	1.75	2.25
	Welch	0.71	1.31	1.50	1.75	2.25
Agilent1260	Waters	0.67	1.35	1.49	1.74	2.14
	Phenomenex	0.70	1.32	1.50	1.74	2.24
	Welch	0.70	1.32	1.50	1.75	2.25
岛津 2030	Waters	0.67	1.36	1.50	1.74	2.14
	Phenomenex	0.70	1.32	1.50	1.75	2.25
	Welch	0.71	1.31	1.50	1.75	2.25
平均值		0.69	1.33	1.50	1.75	2.21
RSD/%		2.5	1.4	0.29	0.29	2.5

的代谢通路、抑制细胞因子的活性等产生解热抗炎作用^[9-13]。有研究表明汉黄芩苷具有显著的体内外抗炎活性及明确的抗炎分子作用机制^[14]。

3.2 内参物的选择

依据 QAMS 方法要求^[15]，宜选择中药材中

药理活性明确且廉价易得的成分作为内参物，通过内参物与其他活性组分之间 $f_{s/i}$ 的换算实现对其他组分的同时测定。内参物的选择一般采用含量较高并且化学性质较为稳定的物质，本方法下黄芩苷含量较高且稳定，故选其为内参物。

表 4 不同批次柴胡牡蛎颗粒 6 种成分含量测定结果 (mg · g⁻¹)

Tab 4 Determination of 6 constituents in different batches of Chaihu Muli granules (mg · g⁻¹)

批号	黄芩苷	野黄芩苷	千层纸素 A-7-O-β-D-葡 萄糖醛酸苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
S220903	7.95	0.35	0.94	1.77	0.17	0.13
S220904	7.80	0.35	1.05	1.77	0.17	0.13
S220905	7.85	0.36	1.08	1.83	0.18	0.13
S220906	7.95	0.35	1.07	1.80	0.17	0.13
S220907	8.61	0.32	1.07	1.82	0.18	0.12
S220908	7.96	0.33	1.09	1.82	0.17	0.13
S220909	7.95	0.35	0.94	1.77	0.17	0.13

3.3 f_{s_i} 的耐用性考察及确认

不同测定条件可能导致色谱峰的响应值等发生变化从而影响 f_{s_i} ^[16], 本试验考察了野黄芩苷等 5 个成分的 f_{s_i} , 结果表明在不同色谱柱, 流速、柱温、仪器下各成分的 f_{s_i} 的 RSD 均小于 3.0%, 表明以上因素对 f_{s_i} 无显著影响, 取各因素下的 f_{s_i} 的平均值作为确定值合理。

3.4 小结

综上, 本研究首次建立了以黄芩苷为内参物, 同时测定柴胡牡蛎颗粒中野黄芩苷、黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素^[10-11]6 种成分的 QAMS 方法, 该方法简便、耐用性好、准确度高、成本较低; 同时, 有机溶剂用量减少, 也降低了环境污染, 可用于柴胡牡蛎颗粒的整体质量评价。

参考文献

[1] 杨菲, 冯伟红, 王智民, 等. 一测多评法测定银黄制剂中 4 种黄酮类成分含量 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47 (12): 984-989.
 [2] Wang ZM, Gao HM, Fu XT, et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine [J]. China J Chin Mater

Med, 2006, 31 (23): 1925-1928.
 [3] 苏建春, 柯华香, 赵俊霞, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和判别分析鉴别黄芩产地研究 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11 (4): 24-27.
 [4] 李健, 张爱均, 刘雯, 等. 紫锥菊地上部分 4 种酚酸类成分的 HPLC 法测定研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44 (9): 1935-1937.
 [5] 杨婷, 邓芳, 刘涛, 等. 一测多评法同时测定肺气肿片中 14 种成分的含量 [J]. 中南药学, 2023, 21 (12): 3298-3304.
 [6] 黎顺成, 徐雪怡, 刘向来, 等. 野黄芩苷对卒中后抑郁模型大鼠糖原合成酶激酶 3β/β- 连环蛋白信号通路的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37 (19): 2596-2600.
 [7] 赵凡. 黄芩在治疗抑郁症方剂中的配伍应用及其抗抑郁机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
 [8] 孟庆刚, 王微, 李强, 等. 黄芩解热作用的谱效关系研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34 (6): 379-383.
 [9] 李倩楠, 葛晓群. 黄芩苷的解热作用及对细胞因子的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (8): 1068-1072.
 [10] 靳国强, 赵蕾, 韩宗昌, 等. 顽痹清丸联合常规西药治疗湿热痹阻证强直性脊柱炎 28 例临床观察 [J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8 (7): 8-12.
 [11] Tsai CC, Lin MT, Wang JJ, et al. The antipyretic effects of baicalin in lipopolysaccharide-evoked fever in rabbits [J]. Neuropharmacology, 2006, 51 (4): 709-717.
 [12] 付璟, 石继和. 黄芩素体外抑菌与体内抗炎作用研究 [J]. 中国药房, 2014, 25 (23): 2136-2138.
 [13] Woo KJ, Lim JH, Suh SI, et al. Differential inhibitory effects of baicalein and baicalin on LPS-induced cyclooxygenase-2 expression through inhibition of C/EBPβ DNA-binding activity [J]. Immunobiology, 2006, 211 (5): 359-368.
 [14] 申云富, 范小青. 汉黄芩苷的药理活性研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30 (4): 98-101.
 [15] Bao YR, Feng YD, Zeng WZ, et al. Application of fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of Blumea balsamifera [J]. J Ginseng Res, 2021, 33 (3): 21-27.
 [16] 毕福钧, 陆巧茵, 林彤. 一测多评法测定莲芝消炎胶囊中 4 种二萜内酯 [J]. 中国药品标准, 2024, 25 (1): 48-54.

(收稿日期: 2024-04-23; 修回日期: 2024-06-17)

HPLC 法测定藏药细果角茴香中原阿片碱含量及其与海拔等影响因素的相关性分析

吴雪花¹, 松长青¹, 金秉中¹, 张轶惟¹, 牟妍红¹, 丁玉^{2, 3, 4}, 梁永欣^{2, 3, 4}, 林鹏程^{2, 3, 4*} (1.青海省人民医院药学部, 西宁 810007; 2.青海民族大学药学院, 西宁 810007; 3.青海省青藏高原植物化学重点实验室, 西宁 810007; 4.国家民委青藏高原藏药资源保护与开发利用重点实验室, 西宁 810007)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法测定 31 批不同产地、不同海拔藏药材细果角茴香中原阿片碱含量。**方法** 色谱柱 ZORBAX SB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液体系 (32 : 68, V/V), 进样量 20 μL, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 289 nm。**结果** 31 批不同产地细果角茴香中原阿片碱含量存在较大差异, 处于中高海拔地区的药材中原阿片碱含量偏高, 处于高海拔地区的药材中原阿片碱含量偏低。**结论** 该方法科学、简便、准确, 可用于原阿片碱含量测定。不同海拔细果角茴香中原阿片碱含量的差异, 对该药材种植、开发和利用具有一定的参照价值。

关键词: 细果角茴香; 高效液相色谱; 原阿片碱; 含量测定; 海拔

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)12-3356-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.034

HPLC determination of the content of protopine in *Hypecoum leptocarpum* and its influence factors at different altitudes

WU Xue-hua¹, SONG Chang-qing¹, JIN Bing-jin¹, ZHANG Yi-wei¹, MOU Yan-hong¹, DING Yu^{2, 3, 4}, LIANG Yong-xin^{2, 3, 4}, LIN Peng-cheng^{2, 3, 4*} (1. Department of Pharmacy, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007; 2. College of Pharmacy, Qinghai Nationalities University, Xining 810007; 3. Qinghai Provincial Key Laboratory for Chemistry of Plant Resources of Qinghai-Xizang Plateau, Xining 810007; 4. State Ethnic Affairs Commission Key Laboratory for Protection Development and Utilization of Qinghai-Xizang Plateau Xizang Medicine Resources, Xining 810007)

Abstract: Objective To establish an HPLC method to determine the content of protopine in 31 batches of Xizang medicine *Hypecoum leptocarpum* from different origins and altitudes. **Methods** A ZORBAX SB-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of methanol-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution (32 : 68, V/V). The injection volume was 20 μL, the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 289 nm. **Results** There was a significant difference in the protopine content in *Hypecoum leptocarpum* from different origins, with higher protopine content in middle to high altitudes, but low levels in high altitudes. **Conclusion** The method can be used for the determination of protopine content. The difference in protopine content at different altitudes provides reference for the cultivation, development, and utilization of the medicinal herb.

Key words: *Hypecoum leptocarpum*; HPLC; protopine; content determination; altitude

基金项目: 青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”-培养拔尖人才项目(青人才字[2020]18号); 青海省创新平台建设项目(No.2022-ZJ-Y14); 青海省药材资源保护与高值化利用创新团队(No.2021XJPI02)。

作者简介: 吴雪花, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学及抗缺氧中藏药物研究, email: wxh_8284@163.com ***通信作者:** 林鹏程, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中藏药物质量控制及抗缺氧中藏药物研究, email: qhlpc@126.com

藏药细果角茴香 (*Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms.), 藏药名“Bar-bata (音译)”, 为罂粟科角茴香属的干燥全草。生长于海拔 2000 ~ 4300 m 的山坡、草甸、砂砾地上, 在四川、青海、云南、西藏均有分布。全草入药, 性寒, 味苦, 具有止痛、清热解毒和祛湿功效, 可治疗瘟疫病、血热病、中毒热症、急性咽喉炎、肺炎、胆囊炎、关节疼痛等^[1-2], 根据《青海经济植物志》记载, 细果角茴香细果角茴香是藏医治疗流感、肝胆等疾病的常见药物之一^[3]。《藏药志》记载: 细果角茴香是“七味草药方”“二十二味胆汤”“十二味翼首草散”等 35 个方剂的主要原料^[4]。现代药理学研究表明角茴香有抑菌、镇痛、抗炎、保肝、抗病毒等作用, 含有生物碱类、酚类、强心苷、内酯类、香豆素等多种成分。其中生物碱类成分活性显著, 具有重要的药用价值, 如原阿片碱具有镇痛、抗心律失常、抗血小板凝集作用, 血根碱和白屈菜红碱、苯菲啶季铵碱表现出广谱抗肿瘤、抑菌、抗炎等活性^[5]。

目前, 细果角茴香在藏药制剂中使用广泛, 但现有的研究主要集中在对其成分和临床药理作用的研究, 缺乏对其质量检测和标准的研究, 本研究采用高效液相色谱法对 31 批细果角茴香中原阿片碱成分的含量进行测定, 方法操作简便、有效, 可为今后进一步研究细果角茴香质量提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 配自动进样器和二极管阵列检测器 (美国 Agilent 公司); XS105DU 梅特勒-托利多专业型 XS 分析天平 (精度: 0.01 mg, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); SB25-12DT 新芝超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Milli-Q2355 超纯水机 (美国密理博有限公司)。

1.2 试药

乙腈 (HPLC 级, 山东禹王实业有限公司化工分公司); 乙酸铵 (分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 冰乙酸 (分析纯, 天津市百世化工有限公司); 甲醇 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司); 原阿片碱对照 (纯度 $\geq 98\%$, Solarbio 公司, 批号: SP8610)。药材产地信息见表 1, 样品经青海民族大学药学院林鹏程教授鉴定为罂粟科角茴香属细果角茴香 *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms. 的干燥全草, S1 ~ S29 号样品于 2019 年及 2020 年 7、8 月 (花期) 采自青海省湟中、门源等 29 个不同地区, S30、S31 号样品于 2023 年 7、8 月 (花期) 采自青海省祁连、玛多 2 个不同地区, 粉碎备用。

表 1 药材产地信息

Tab 1 Information of habitat of medicinal materials

编号	地名	海拔 /m	经度 /°	纬度 /°
S1	青海玉树	3488	96.42	32.53
S2	青海同德	3108	100.58	35.52
S3	青海湟中	2618	101.56	36.80
S4	青海同仁	2495	102.02	35.51
S5	青海泽库	3655	101.47	35.03
S6	青海乐都	1989	102.40	36.48
S7	青海贵南	3091	100.75	35.59
S8	青海玛沁	3723	100.24	34.48
S9	青海门源	2867	101.62	37.38
S10	青海互助	2900	102.14	36.84
S11	青海西宁	2246	101.73	36.65
S12	青海大通	2665	101.57	37.11
S13	青海民和	1817	102.83	36.32
S14	青海湟源	2490	101.40	36.67
S15	青海久治	3416	101.29	33.26
S16	青海祁连	2730	100.25	38.18
S17	青海海晏	3110	100.90	36.96
S18	青海共和	2862	100.62	36.28
S19	青海称多	4336	97.36	34.40
S20	青海玛多	4002	98.19	34.50
S21	青海平安	2673	101.92	36.34
S22	青海尖扎	2063	102.03	35.94
S23	青海河南	3270	101.56	35.15
S24	青海班玛	3446	100.39	33.16
S25	青海兴海	3460	98.21	34.49
S26	青海杂多	3970	96.36	32.54
S27	青海达日	3639	99.39	33.45
S28	甘肃玛曲	3309	101.50	33.49
S29	甘肃碌曲	3328	101.51	35.14
S30	青海祁连	2730	100.25	38.18
S31	青海班玛	3446	100.39	33.16

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪, Agilent Zorbax SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 甲醇 -0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液 (每 1 L 溶液中加入 0.5 mL 冰乙酸) 体系 (32 : 68, V/V); 检测波长: 289 nm; 流速: 0.8 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。在此条件下样品和对照品都得到了很好的基线分离 (见图 1)。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取原阿片碱对照品适量于 5 mL 量瓶中, 用甲醇 -1% 盐酸 (50 : 50) 溶液溶解并稀释至刻度, 超声溶解, 得到质量浓度分别为 0.065、0.13、0.26、0.52、0.78、1.04 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取细果角茴香药材粉末 0.75 g, 置于 150 mL 锥形瓶中, 加入甲醇 -1% 盐酸 (50 : 50) 溶液 25 mL, 称重, 超声提取 30 min 后补足失重, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 留续滤液备用。

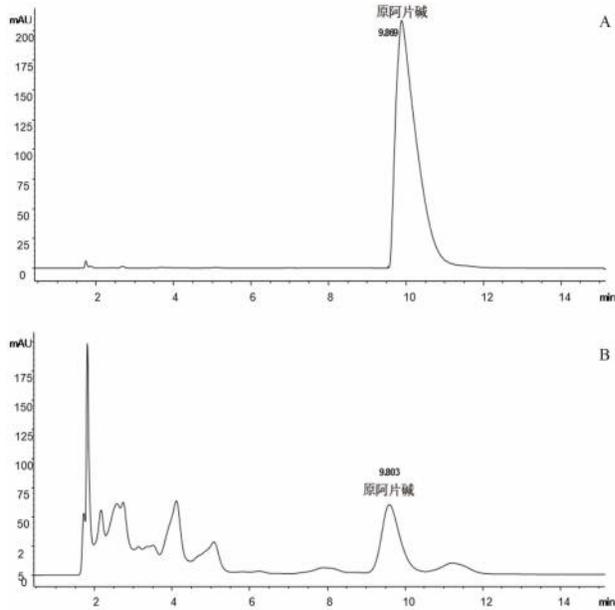


图1 原阿片碱对照品(A)和药材样品(B) HPLC图
Fig 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.4 线性关系的考察

分别精密吸取原阿片碱对照品溶液(质量浓度分别为 0.065、0.13、0.26、0.52、0.78、1.04 mg·mL⁻¹) 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以进样量(μg)为横坐标, 以峰面积积分为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $y = 69.212x + 321.92$ ($r = 0.9992$), 结果表明, 原阿片碱进样量在 1.3 ~ 20.8 μg 内线性关系良好。

2.5 精密度试验

取 S3 样品供试品溶液连续进样 6 次, 记录色谱峰的面积, 结果原阿片碱峰面积的 RSD 为 1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取 S3 样品供试品溶液分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行测定, 记录色谱峰的面积, 结果原阿片碱峰面积的 RSD 为 0.85%, 表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取 S3 样品 6 份, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别测定其含量, 结果原阿片碱峰面积的 RSD 为 1.3%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收试验

分别精密称取样品 S1 (原阿片碱含量为 6.08 mg·g⁻¹) 9 份, 每份约 0.4 g, 置于锥形瓶中, 分别按原阿片碱含量的 50%、100%、150% 精密加入原阿片碱对照品溶液低、中、高浓度样品各 3 份, 按照“2.3”项下方法制备, 进样测定, 计算回收率和 RSD 值, 结果低、中、高浓度样品中原阿片碱的回收率均在 97.47% ~ 102.44%, RSD 值均小于 2.0%。

2.9 样品含量测定

取不同产地的细果角茴香粉末, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录原阿片碱的峰面积, 采用外标法计算其含量, 结果见表 2。发现所有属地的药材均含有原阿片碱, 平均含量为 (6.557 ± 1.777) mg·g⁻¹。但差异较为明显, 班玛县的药材 (S24、S31) 原阿片碱含量仅为 3.62、3.52 mg·g⁻¹, 而互助县的药材 (S10) 中原阿片碱含量高达 11.03 mg·g⁻¹。

表 2 31 个不同产地细果角茴香中原阿片碱含量
Tab 2 Protopine content of *Hypecoum leptocarpum* from 31 different habitats

编号	峰面积	样品质量 /g	原阿片碱含量 / (mg·g ⁻¹)
S1	3433.5	0.7565	6.08
S2	4349.0	0.7588	7.66
S3	3884.1	0.7503	6.92
S4	3536.8	0.7538	6.28
S5	3406.6	0.7537	6.05
S6	5212.9	0.7523	9.24
S7	4739.2	0.7569	8.36
S8	4065.6	0.7586	7.17
S9	2863.4	0.7538	5.10
S10	6287.3	0.7598	11.03
S11	3508.2	0.7503	6.26
S12	4615.9	0.7520	8.20
S13	5270.0	0.7518	9.35
S14	4998.5	0.7537	8.85
S15	2802.5	0.7538	4.99
S16	3518.4	0.7515	6.27
S17	3936.5	0.7513	7.01
S18	3807.0	0.7550	6.75
S19	2340.2	0.7513	4.19
S20	2708.0	0.7549	4.82
S21	3220.8	0.7583	5.69
S22	4594.6	0.7573	8.10
S23	3268.7	0.7510	5.83
S24	2015.2	0.7510	3.62
S25	3898.3	0.7507	6.95
S26	2027.5	0.7534	3.63
S27	3115.3	0.7540	5.54
S28	2901.3	0.7509	5.19
S29	2804.1	0.7496	5.02
S30	3518.4	0.7515	6.34
S31	2015.2	0.7510	3.52

2.10 海拔、纬度与生物碱含量线性关系

对 31 个产地细果角茴香按照所属产地的海拔、纬度、经度分别和原阿片碱的含量进行相关分析。按照正态分布检验的结果, 原阿片碱、海拔、纬度数据 $P > 0.05$ 符合正态分布, 可行 Pearson 相关分析。经度数据 $P < 0.05$, 数据不符合正态分布, 不符合 Pearson 相关分析要求, 行 Spearman 相关分析。

结果显示, 原阿片碱含量与海拔的 Pearson 相关

系数为 $r = -0.641$, $P < 0.001$, 两者呈现显著相关 (见表 3)。绘制散点图, 两者呈现线性负相关 (见图 2A)。原阿片碱含量与纬度的 Pearson 相关系数为 $r = 0.572$, $P = 0.001$, 两者呈现显著相关 (见表 4)。绘制散点图, 两者呈现线性正相关 (见图 2B)。原阿片碱含量与经度的 Spearman 相关系数为 0.468, 相关系数绝对值大小为 $0 \sim 1$, $0.468 > 0$, 两个变量成正相关, $P < 0.05$, 相关系数具有统计学意义 (见表 5)。绘制散点图, 两者成正相关 (见图 2C)。

表 3 海拔与原阿片碱含量相关性

因素	相关性	海拔	原阿片碱含量
海拔	Pearson 相关性	1	-0.641
	显著性 (双尾)		< 0.001
	个案数	31	31
原阿片碱含量	Pearson 相关性	-0.641	1
	显著性 (双尾)	0.000	
	个案数	31	31

表 4 纬度与原阿片碱含量相关性

因素	相关性	纬度	原阿片碱含量
纬度	Pearson 相关性	1.000	0.572
	显著性 (双尾)		0.001
	个案数	31	31
原阿片碱含量	Pearson 相关性	0.572	1
	显著性 (双尾)	0.001	
	个案数	31	31

表 5 经度与原阿片碱含量相关性

因素	相关性	经度	原阿片碱含量
经度	斯皮尔曼 Rho 相关系数	1.000	0.468
	显著性 (双尾)		0.010
	个案数	31	31
原阿片碱含量	斯皮尔曼 Rho 相关系数	0.468	1.000
	显著性 (双尾)	0.010	
	个案数	31	31

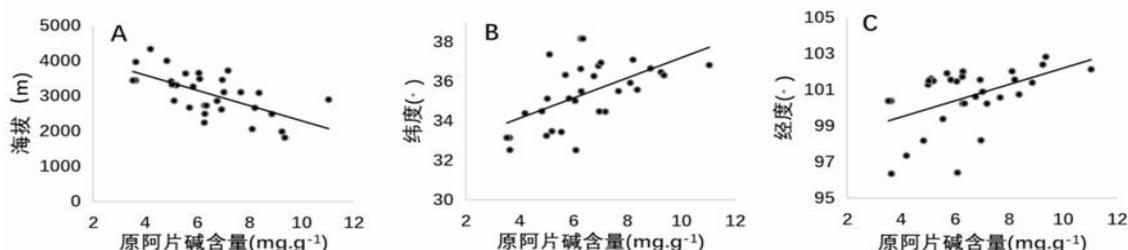


图 2 海拔 (A)、纬度 (B)、经度 (C) 与原阿片碱含量散点图

Fig 2 Scatter plot of altitude (A), latitude (B), longitude (C) and protopine content

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察和色谱条件优化

考察不同提取溶剂 [水、乙醇、甲醇、甲醇 -1% 盐酸 (50 : 50)], 不同流动相 [甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 -0.1% 乙酸溶液、乙腈 - (乙酸 - 三乙胺) 溶液, 乙腈 -0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液], 不同提取方法 (回流、超声), 不同流速 (0.8、1.0、1.2 mL · min⁻¹) 等对样品制备的影响, 从混合对照品和样品中被测成分的分离情况、基线的稳定性及分析时间、含量、成本、时间等方面综合分析, 结果样品提取以甲醇 -1% 盐酸 (50 : 50) 为提取溶剂、流速为 0.8 mL · min⁻¹ 处理效率最高, 确定其为本研究的提取方法。

考察了多种流动相系统: 甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 -0.1% 乙酸溶液、乙腈 - (乙酸 - 三乙胺) 溶液、乙腈 -0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液, 结果表明, 乙腈 -0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液体系基线平稳、分离效果较好。探究了甲醇 -0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液和乙腈 -0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液对色谱峰分离效

果的影响, 发现原阿片碱在这两种流动相下分离效果均较好, 考虑到甲醇廉价易得, 毒性相对较小, 故选择甲醇 -0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液流动相。此外还考察了流速 0.8、1.0、1.2 mL · min⁻¹ 对分离效果的影响, 发现当流速为 0.8 mL · min⁻¹ 时分离效果较好, 峰形最为对称。

3.2 原阿片碱含量测定结果分析

原阿片碱是异喹啉类生物碱, 现代药理学证明, 原阿片碱除具有镇痛的作用外, 具有抑制血小板凝聚、松弛平滑肌、抗心律失常、抗胆碱酯酶等活性^[4], 还具有抗肿瘤^[5]、保护肾脏^[6]、抗肝损伤等药理作用。由于原阿片碱具有较强的药用活性和广泛的药用价值, 得到学界的广泛认可, 不仅在延胡索^[7]、小黄花堇^[8] 等中草药原药材活性成分方面得到研究, 而且在中成药成分分析^[9-11] 中被广泛重视。

细果角茴香的主要活性成分是生物碱类^[12], 化学成分研究显示该药材干全草中生物碱含量约为 0.38%, 其中原阿片碱占到生物碱含量的

85%^[5]。文怀秀等^[13]曾用反相高效液相色谱法测定了两个产地的细果角茴香中原阿片碱的含量,分别为 2.37% 和 0.1%,产地差异明显。为进一步探索在同一花期下不同产地原阿片碱含量的差异化,以及研究这种差异与药材属地特征间的关系,本研究最初测定了 29 个地区细果角茴香中原阿片碱含量。为了验证之前的数据,笔者于 2023 年 7、8 月份(花期)再次采集并测定其中 2 个地区(祁连、班玛)细果角茴香中原阿片碱含量,结果与之前数据相近。根据研究结果,原阿片碱的含量和产地海拔成负相关,这一结论与不同海拔产地的麻花苳^[14]、灰兜巴^[15]的成分研究和桔梗^[16]的质量研究结论一致,海拔高度确实对药材的质量和成分具有一定的影响。在以往的研究中也发现,细果角茴香的生长和繁殖受到高原海拔的制约,其微量元素含量以海拔 3200 m 为界限分为两类^[17]。考虑同一药材的成分、微量元素的差异可能与高原高寒、光照、紫外线辐射等原因相关。此外,研究结果还显示细果角茴香中原阿片碱含量与经度、纬度成正相关。目前尚未查到有关经纬度和药材成分相关的报道,但同一药材不同产地的成分也有较大差异。熊康宁等^[18]分析喀斯特地区不同等级石漠化金银花有效成分,发现药材有效成分与土壤养分相关。高慧如等^[19]研究发现温度对甘草黄酮类成分具有显著影响。经度与纬度的变化影响着温度、降水、富氧、辐射等因素的变化也与药用植物的生长密切相关。虽然研究中经纬度与细果角茴香中原阿片碱含量具有统计学关联,但相对于本研究中药材采集产地海拔高度 1817 ~ 4336 m,经纬度受限于采集药材地域的影响,经度范围仅为 96.42° ~ 102.83°,纬度范围仅为 32.53° ~ 38.18°,要探索经纬度与细果角茴香中原阿片碱含量关系,还需进一步扩大调查研究的范围。

细果角茴香的原阿片碱含量与药材属地的海拔和经纬度具有一定相关性,相对于高海拔和低经纬度,中高海拔和高经纬度的药材中原阿片碱含量更高,研究结果提示这一区域可能是细果角茴香的优良产区,可以为该药的人工种植提供依据。同时,不同属地的原阿片碱差异也可为药物的成分筛选和质量控制提供理论参考。

参考文献

- [1] 江苏医学院. 中药大辞典上册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1986: 436.
- [2] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京: 民族出版社, 1997: 99.
- [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, 1999: 185.
- [4] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [5] 张瑞飞, 查色, 尹旭, 等. 藏药角茴香及同属植物的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(7): 1217-1224.
- [6] 吴新玉, 李靖, 张金娟, 等. 原阿片碱对人肝星状细胞 HSC-LX2 增殖的抑制作用及机制研究[J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3210-3215.
- [7] 叶汉林, 乔淦, 王琳琳, 等. 原阿片碱通过线粒体凋亡途径抑制肝细胞癌生长[J]. 药学学报, 2021, 56(8): 2223-2229.
- [8] 刘振辉, 周宁, 刘振, 等. 基于血清代谢组学探究土元胡中原阿片碱对脂多糖诱导急性肾损伤小鼠的保护作用[J]. 药学学报, 2022, 57(4): 1106-1114.
- [9] 程井, 孙爱玲, 孙凤娟, 等. UPLC-MS/MS 法测定不同产地延胡索中原阿片碱、盐酸巴马汀、脱氢紫堇碱、延胡索乙素和延胡索甲素[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(6): 1239-1243.
- [10] 杜清, 陈志, 吴江, 等. 一测多评法同时测定斑花黄堇药材中 4 种生物碱成分[J]. 中草药, 2021, 52(19): 6038-6044.
- [11] 王欢, 毕福钧, 林彤, 等. 延胡索 HPLC 指纹图谱研究及 9 种生物碱含量测定[J]. 中药材, 2017, 40(3): 624-629.
- [12] 张晓峰, 张宏, 李小云, 等. 高速逆流色谱-UPLC-QTOF-MS/MS 法分离制备延胡索中脱氢紫堇碱和海罂粟碱[J]. 中草药, 2016, 47(24): 4351-4356.
- [13] 文怀秀, 邵赞, 陶燕铎, 等. RP-HPLC 法测定藏药细果角茴香中原阿片碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 137-139.
- [14] 王怡, 聂颖杰, 王志波, 等. 青海不同地区麻花苳地上部位有效成分的含量测定[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2019, 42(1): 49-54.
- [15] 李丽霞, 付婷婷, 王强, 等. 不同海拔灰兜巴药材中挥发油成分的研究[J]. 华西药学杂志, 2017, 32(4): 424-426.
- [16] 黄娇. 指纹图谱和主成分分析法评价不同海拔高度的桔梗药材质量[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 309-313.
- [17] 赵旭升, 林鹏程, 梁永欣. 青海不同地区藏药细果角茴香中微量元素的聚类分析[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 2021, 44(4): 349-353.
- [18] 熊康宁, 赖佳丽, 张俞, 等. 喀斯特地区不同等级石漠化金银花有效成分及其与土壤养分的关系研究[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3142-3146.
- [19] 高慧如, 王佳慧, 关瑜. 高温对甘草黄酮类成分的影响[J]. 中药材, 2019, 42(3): 524-529.

(收稿日期: 2024-04-15; 修回日期: 2024-06-20)

清肺抑火片质量标准提升研究

范秀春, 徐维二, 罗廷顺, 董坤, 缪明锦* (大理白族自治州药品检验所, 云南 大理 671000)

摘要: **目的** 基于评价抽验工作, 提升清肺抑火片质量标准, 综合评价不同厂家的清肺抑火片质量。**方法** 建立大黄、栀子、黄芩、黄柏、苦参的 TLC 鉴别方法, 采用 HPLC 法建立了 35 批清肺抑火片的特征图谱, 同时采用 PCA-X 及 OPLS-DA 的分析方法对共有峰峰面积进行统计分析, 筛选出清肺抑火片的关键质控成分并测定关键质控成分黄芩苷的含量。**结果** 建立的 TLC 鉴别方法快速、简便、准确易操作。清肺抑火片高效液相特征图谱共标定 16 个共有峰, 并指出 12 个已知成分。基于统计分析方法, 初步发现不同厂家及不同批次间样品存在差异, 并发现可能导致清肺抑火片质量微小差异的关键质控成分。HPLC 法测得黄芩苷的含量为 1.82 ~ 12.64 mg/片。**结论** 各厂家清肺抑火片质量存在差异, 现行质量标准不够全面合理, 不能完全评价清肺抑火片质量, 建议提升质量标准, 确保产品的质量和疗效的一致性。

关键词: 清肺抑火片; 薄层鉴别; 特征图谱; 含量测定; 质量评价

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3361-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.035

Improvement of the quality standard of Qingfei Yihuo tablets

FAN Xiu-chun, XU Wei-er, LUO Ting-shun, DONG Kun, MIAO Ming-jin* (*Drug Control Institute of Dali Bai Autonomous Prefecture, Dali Yunnan 671000*)

Abstract: Objective To comprehensively evaluate the quality of Qingfei Yihuo tablets from different manufacturers by improving their quality standard based on the sampling and testing. **Methods** TLC identification method was established to detect rhubarb, gardenia, scutellaria, phellodendri and sophora, and the feature chromatograph of 35 batches of Qingfei Yihuo tablets was established by HPLC. Meanwhile, the area of common peaks was analyzed by PCA-X and OPLS-DA. The quality control components of Qingfei Yihuo tablets were screened and the content of baicalin was determined. **Results** The TLC identification method for rhubarb, gardenia, scutellaria, phellodendron and sophora was rapid, simple, accurate and easy to operate. The HPLC of Qingfei Yihuo tablets identified 16 common peaks and 12 known components. Based on the statistical analysis method, the differences between different manufacturers and samples batches were preliminarily found. The key quality control components which for the slight difference in the quality of Qingfei Yihuo tablets were found. The content of baicalin by HPLC ranged 1.82 ~ 12.64 mg/tablet. **Conclusion** There are differences in the quality of Qingfei Yihuo tablets by different manufacturers. The existing quality standards need improvement to ensure the consistency of product quality and curative effect.

Key words: Qingfei Yihuo tablet; thin layer identification; feature map; content determination; quality evaluation

2021 年云南省药品评价抽检专项工作引入“检验+评价”模式, 开展省级药品评价抽检专项工作。2022 年, 我所承担了清肺抑火片的评价抽检任务, 本研究将从清肺抑火片 TLC 薄层鉴

别、HPLC 特征图谱及黄芩苷含量测定等方面开展探索性研究, 评价清肺抑火片的质量。

清肺抑火片是由黄芩、栀子、天花粉、桔梗、知母、大黄、前胡、黄柏、苦参九味中药通过现

基金项目: 2022 年云南省药品评价抽检计划项目 (云药监办 2022-07)。

作者简介: 范秀春, 女, 主管中药师, 主要从事中药、中成药检验及质量分析, email: 584522922@qq.com *通信作者: 缪明锦, 男, 副主任药师, 主要从事中药、中成药检验及质量分析, email: 365171533@qq.com

代工艺制备而成的复方中成药, 具有清肺止咳、降火生津的功效, 用于治疗肺热咳痰、痰涎雍盛、咽喉肿痛、口鼻生疮、牙齿疼痛、牙根出血、大便干燥、小便赤黄^[1]。目前, 全国共有 20 个批准文号, 涉及 19 个生产企业。通过查阅文献发现, 对清肺抑火片的研究主要包括含量测定^[2-6]及药理作用^[7-10]研究。本研究从探索性研究角度出发, 比较不同批次间清肺抑火片的质量差异^[11-13], 综合评价清肺抑火片质量, 为清肺抑火片的质量评价和标准提升提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

OLYMPUS DP74 型显微镜 [奥林巴斯 (中国) 有限公司], ZB-ID 型智能崩解仪 (北京铭成基业科技有限公司), 1260 II 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司), AX-200 型电子天平 [奥豪斯仪器 (上海) 有限公司], XSE205DU 型电子分析天平 (美国梅特勒), KMHI-360W9151-6 型固特双频超声波清洗机 (广东固特超声股份有限公司), HH-S26S 型数显恒温水浴锅 (郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 试药

对照品栀子苷 (批号: 110749-201919, 含量: 97.1%)、芒果苷 (批号: 111607-201704, 含量: 98.1%)、黄芩苷 (批号: 110715-201821, 含量: 95.4%)、盐酸小檗碱 (批号: 110713-202015, 含量: 85.9%)、汉黄芩苷 (批号: 112002-201702, 含量: 98.5%)、黄芩素 (批号: 112015-201801, 含量: 97.8%)、芦荟大黄素 (批号: 111940-201804, 含量: 97.5%)、大黄酸 (批号: 110757-201607, 含量: 99.3%)、汉黄芩素 (批号: 111514-200403)、大黄素 (批号: 110756-201913, 含量: 96.0%)、大黄酚 (批号: 110796-201922, 含量: 99.4%)、大黄素甲醚 (批号: 110758-201817, 含量: 99.2%) 及对照药材大黄 (批号: 120902-201912)、栀子 (批号: 120986-202111)、黄芩 (批号: 120955-201810)、黄柏 (批号: 121510-201807)、苦参 (批号: 121019-201708) (中国食品药品检定研究院)。液相用乙腈、甲醇为色谱纯, 其余溶剂为分析纯, 水为超纯水。6 个企业、35 批次清肺抑火片样品均为 2022 年云南省药品评价抽检项目抽检样品, 生产企业名称以 A、B、C、D、E、F 表示, 知母、栀子、黄芩、黄柏等 9 味药材均购自大理金贝药材城, 均由本实验室鉴定, 本实验室依据处方自制各缺味样品。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别研究

清肺抑火片现行法定标准为《卫生部药品标

准》中药成方制剂第二册 WS₃-B-0418-90, 此标准的检验项目仅有性状和检查。仅 E 厂家生产的薄膜衣片执行标准 YBZ05022020 中增加了大黄和桔梗的显微鉴别和大黄对照药材、盐酸小檗碱对照品、苦参碱对照品的薄层鉴别以及黄芩苷含量测定, 因此, 现行检验标准不能全面评价清肺抑火片的质量。本研究根据清肺抑火片的组方形成, 对黄芩 (处方中用量最大的君药), 栀子、黄柏 (臣药), 大黄 (处方中用量第二大, 且市场上常有土大黄冒充大黄的情况) 以及苦参进行薄层色谱鉴别研究, 研究投料真实性的同时建立薄层色谱鉴别的方法, 多方面评价清肺抑火的质量^[14-16]。

2.1.1 黄芩 取样品粉末 1 g, 加甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 取黄芩对照药材和黄芩阴性样品, 同法制成对照药材溶液和阴性样品溶液; 取黄芩苷对照品加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版通则 0502) 试验, 取上述溶液各 4 ~ 6 μ L, 分别点于同一以含 4% 乙酸钠的羧甲基纤维素钠溶液为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水 (5:3:1:1) 为展开剂, 预饱和 30 min 后展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 三氯化铁乙醇溶液, 详见图 1A。

2.1.2 大黄 取样品粉末 2 g, 加甲醇 25 mL, 超声处理 30 min, 静置分层, 取上清液, 水浴蒸至近干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 转移至分液漏斗中, 用乙醚分两次提取, 每次 10 mL, 合并乙醚液, 挥干, 残渣加甲醇 3 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 水液层蒸干, 备用。另取大黄对照药材和大黄阴性样品, 同法制成对照药材溶液和阴性样品溶液; 再取大黄酸对照品加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版通则 0502) 试验, 取上述溶液各 4 ~ 6 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (30 ~ 60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸 (15:5:1) 的上层溶液为展开剂, 预饱和 15 min 后展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视, 详见图 1B。

2.1.3 栀子 取大黄项下备用水液层残渣, 加甲醇 5 mL 使溶解作为供试品溶液。另取栀子对照药材和栀子阴性样品, 同法制成对照药材溶液和阴性样品溶液; 再取栀子苷对照品加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版通则 0502) 试验, 取上述溶液各 4 ~ 6 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水 (11:4:1:2) 为展开剂, 预饱和 15 min 后展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸试液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 详见图 1C。

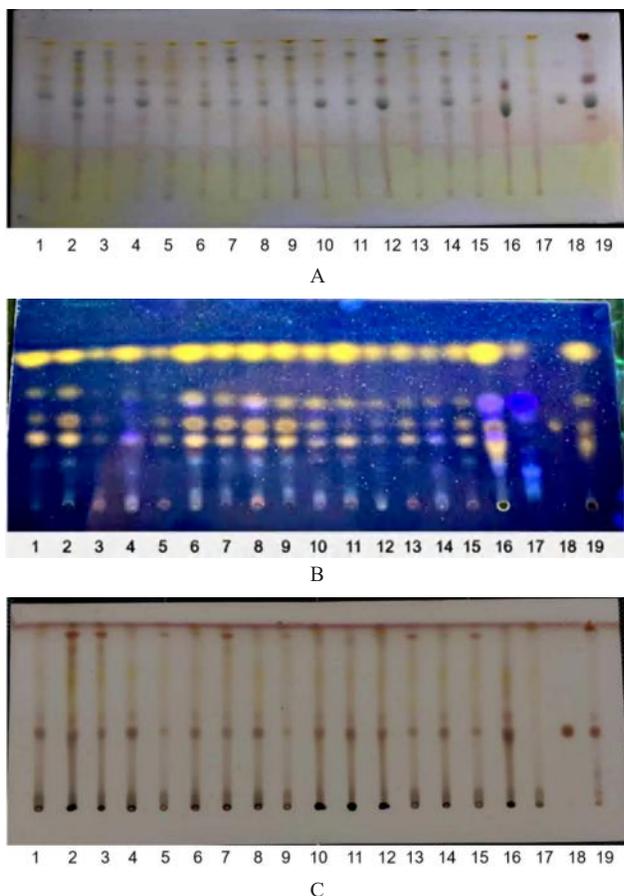


图 1 黄芩 (A)、大黄 (B)、栀子 (C) 薄层鉴别色谱图

Fig 1 TLC of scutellaria (A), rhubarb (B), and gardenia (C)

1. A 厂家样品 (sample from manufacturer A); 2、3、5、13、15. B 厂家样品 (sample from manufacturer B); 4、14. E 厂家样品 (sample from manufacturer E); 6、8. F 厂家样品 (sample from manufacturer F); 7、9. D 厂家样品 (sample from manufacturer D); 10、11、12. C 厂家样品 (sample from manufacturer C); 16. 自制样品 (home-made sample); 17. 阴性样品 (negative sample without scutellaria); 18. 黄芩苷对照品 (baicalin); 19. 对照药材 (control medicine)

2.1.4 黄柏 取样品粉末 1 g, 加氨水 5 mL 湿润, 加二氯甲烷 30 mL, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。另取黄柏对照药材和黄柏阴性样品, 同法制成对照药材溶液和阴性样品溶液; 再取盐酸小檗碱对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版通则 0502) 试验, 取上述溶液各 2~4 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇-冰乙酸-水 (7:1:2) 为展开剂, 预饱和 15 min 后展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视, 详见图 2。

2.1.5 苦参 取苦参对照药材和苦参阴性样品, 同黄柏项下供试品溶液制备方法制成对照药材溶液和阴性样品溶液; 取苦参碱对照品加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版通则 0502) 试验, 取黄柏

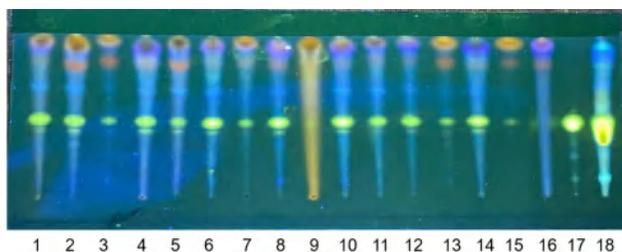


图 2 黄柏薄层鉴别色谱图

Fig 2 TLC of phellodendron

1. A 厂家样品 (sample from manufacturer A); 2、3、5、13、15. B 厂家样品 (sample from manufacturer B); 4、14. E 厂家样品 (sample from manufacturer E); 6、8. F 厂家样品 (sample from manufacturer F); 7、9. D 厂家样品 (sample from manufacturer D); 10、11、12. C 厂家样品 (sample from manufacturer C); 16. 缺黄柏阴性样品 (negative sample without phellodendron); 17. 盐酸小檗碱对照品 (berberine hydrochloride reference); 18. 黄柏对照药材 (phellodendron control medicine)

项下供试品溶液及上述溶液各 4~6 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-丙酮-乙酸乙酯-浓氨试液 (2:3:4:0.2) 为展开剂, 预饱和 10 min 后展开, 取出, 晾干, 喷以稀碘化铯钾试液, 详见图 3。

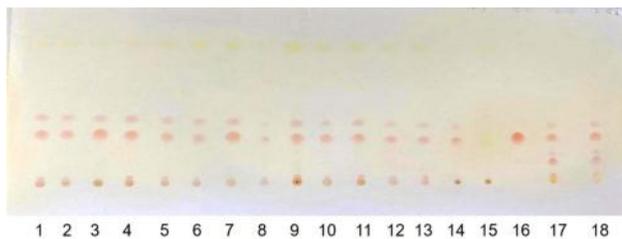


图 3 苦参薄层鉴别色谱图

Fig 3 TLC of radix sophorae

1. A 厂家样品 (sample from manufacturer A); 2、3、5、13. B 厂家样品 (sample from manufacturer B); 4、14. E 厂家样品 (sample from manufacturer E); 6、8. F 厂家样品 (sample from manufacturer F); 7、9. D 厂家样品 (sample from manufacturer D); 10、11、12. C 厂家样品 (sample from manufacturer C); 15. 缺苦参阴性样品 (negative sample without sophora); 16. 苦参碱对照品 (matrine reference); 17、18. 苦参对照药材 (sophora control medicine)

2.1.6 TLC 薄层鉴别结果 供试品色谱图均检出与对照药材和对照品相应的斑点, 阴性样品无干扰, 合格率 100%。该鉴别方法可控制处方中黄芩、栀子、黄柏、大黄、苦参投料的真实性, 且方法操作简便、重现性好、适用性强, 可用于控制清肺抑火片的质量。

2.2 清肺抑火片特征图谱的建立^[17]

2.2.1 对照品溶液的制备^[18] 精密称取除芒果苷外的 11 种对照品各适量, 分别用甲醇配制成储备液, 精密称取芒果苷适量, 用 70% 乙醇溶剂配制成储备液, 加甲醇制成大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、芒果苷、黄

芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷、栀子苷、盐酸小檗碱质量浓度分别为 60.7200、45.4755、51.4871、51.8320、38.1713、42.2222、79.3158、79.4000、938.1636、243.0980、248.1876、223.1682 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备^[15] 取清肺抑火片 20 片,精密称定,研细,取约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇溶液 25 mL,称定重量,超声处理 30 min,放冷、称定重量,用 70%乙醇溶液补重,摇匀,过滤,即得。

2.2.3 色谱条件 采用菲罗门 TitankC18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~19 min, 12%A, 19~20 min, 12%~18%A, 黄芩苷 20~35 min, 18%~19%A, 35~36 min, 19%~22%A, 36~68 min, 22%A, 68~69 min, 22%~30%A, 69~86 min, 30%~37%A, 86~90 min, 37%~44%A, 90~105 min, 44%~48%A, 105~106 min, 48%~52%A, 106~120 min, 52%~64%A, 120~131 min, 64%~90%A, 131~132 min, 90%~12%A)。柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 254 nm;进样量 10 μL 。

2.2.4 方法学验证

① 精密度考察:按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液(S25号)1份,按“2.2.3”项下色谱条件连续进样6次,16个共有峰的相对峰面积RSD在0.11%~1.6%,相对保留时间RSD在0.011%~0.19%,表明液相色谱仪精密度良好。

② 稳定性考察:按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液(S25号)1份,按照“2.2.3”项下色谱条件,分别于第0、2、4、6、8、10、12、24 h进样,16个共有峰的相对峰面积RSD在0.10%~1.5%,相对保留时间RSD在0.020%~0.36%,结果表明清肺抑火片供试品溶液在24 h内稳定。

③ 重复性考察:按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液(S25号)6份,按照“2.2.3”项下色谱条件进样,16个共有峰的相对峰面积RSD在0.20%~1.9%,相对保留时间RSD在0.020%~0.33%,表明方法重复性良好。

2.2.5 清肺抑火片 HPLC 特征图谱的建立

① 特征图谱共有峰的指认及相似度的计算:将35批样品按“2.2.2”项下方法制备,并测定。将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版),以S1号样品色谱峰为参照峰,生成叠加图谱,通过Mark峰匹配,生成对照图谱,见图4,共标定出16个共有峰,以处方中君药黄芩的指标性成分黄芩苷峰(5号峰)为参照峰(S峰),通过已知对照品对色谱峰(见图5)进行

指认,指认出12个已知成分,与专属性试验中阴性样品比对,指认栀子苷来源于栀子药材;芒果苷来源于知母药材;黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素来源于黄芩药材;盐酸小檗碱来源于黄柏药材;芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚来源于大黄药材;7号峰和13号峰均来自黄芩药材,3号峰和4号峰未指认出来,可能是其中几味药材的共有成分。将样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723版)并计算相似度,结果显示各批次清肺抑火片质量存在差异,相似度计算结果见表1,非共有峰峰面积占比为36.43%~56.81%,结果表明各批次清肺抑火片使用的原料药材质量及生产工艺存在差异,导致各批次质量差异较大,该方法无法对制剂的均一性、稳定性进行准确评价及控制,故建立清肺抑火片的特征图谱方法,整体评价清肺抑火片质量。

② 样品测定及结果:取样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定。结果35批次样品色谱图均呈现16个色谱峰,并与对照色谱峰中的16个特征峰保留时间一致,计算各特征峰与黄芩苷参照峰(S峰)的相对保留时间均在规定值内。因此,可规定各峰相对保留时间为:0.29(峰1:栀子苷)、0.36(峰2:芒果苷)、0.56(峰3)、0.96(峰4)、1.00[峰5(S):黄芩苷]、1.18(峰6:盐酸小檗碱)、1.24(峰7)、1.38(峰8:汉黄芩苷)、1.54(峰9:黄芩素)、1.68(峰10:芦荟大黄素)、1.75(峰11:大黄酸)、1.78(峰12:汉黄芩素)、1.83(峰13)、2.04(峰14:大黄素)、2.23(峰15:大黄酚)、2.31(峰16:大黄素甲醚),其相对保留时间应在规定值的 $\pm 10\%$ 之内。

2.3 化学模式识别

2.3.1 主成分分析 将特征图谱中共有峰的峰面积导入SIMCA14.1软件,对35批样品进行主成分分析。累计方差贡献率为82.4%,得分图详见图6A。由图可知:C、F两个厂家部分批次出现离群现象,A、B、D、E4个厂家呈现聚拢趋势。图6B(载荷图)表示每个变量对样本离群现象的贡献,图中大黄酚、黄芩苷和3号峰绝对值较大,表明以上成分可能是导致药物的质量内在差异的主要因素,因此,在该品种的质量及生产工艺控制中应重点关注大黄及黄芩的原料药材质量及提取工艺。

2.3.2 正交偏最小二乘法-判别分析 为进一步分析不同厂家清肺抑火片的成分差异,采用OPLS-DA模型进行分析,计算变量VIP值,以VIP>1为标准,筛选出了5个对清肺抑火片贡献较大的化学成分:5号峰(黄芩苷)、9号峰(黄芩素)、15号峰(大黄酚)、6号峰(盐酸小檗碱)、

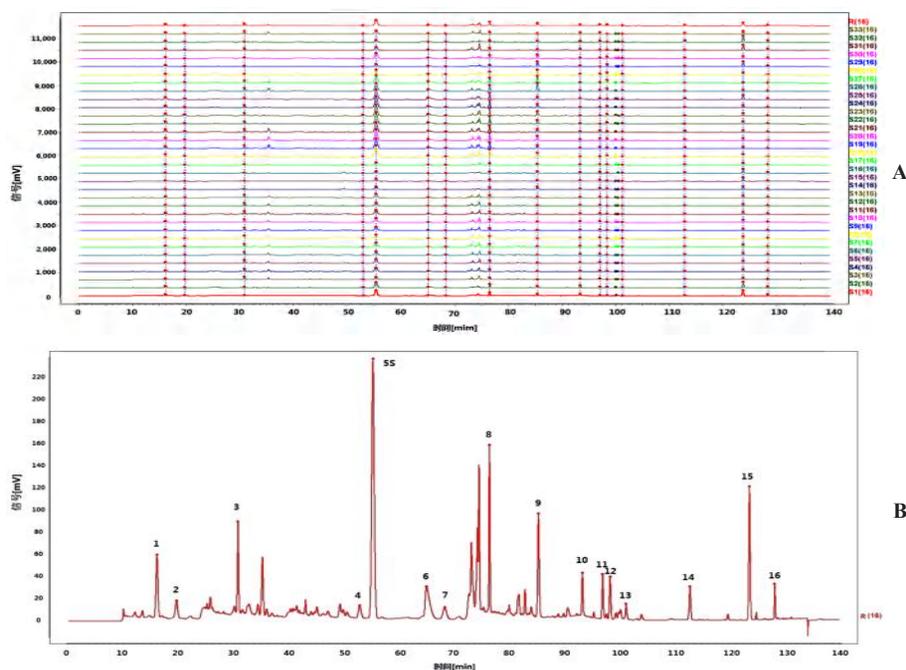


图 4 不同生产企业间清肺抑火片指纹图谱匹配叠加图 (A) 及特征图 (B)

Fig 4 Fingerprint matching overlay (A) and characteristic (B) chromatogram of Qingfei Yihuo tablets from different manufacturers

1. 栀子苷 (geniposide); 2. 芒果苷 (mangiferin); 5 (S). 黄芩苷 (baicalin); 6. 盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride); 8. 汉黄芩苷 (oroxindin); 9. 黄芩素 (baicalin); 10. 芦荟大黄素 (aloe-emodin); 11. 大黄酸 (rhein); 12. 汉黄芩素 (wogonin); 14. 大黄素 (rheum emodin); 15. 大黄酚 (chrysophanol); 16. 大黄素甲醚 (physcion)

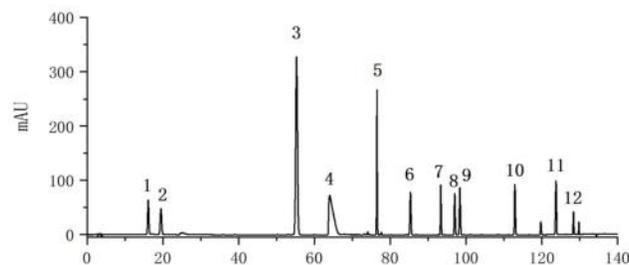


图 5 混合对照品图谱

Fig 5 Spectrum of mixed reference

1. 栀子苷 (geniposide); 2. 芒果苷 (mangiferin); 3. 黄芩苷 (baicalin); 4. 盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride); 5. 汉黄芩苷 (oroxindin); 6. 黄芩素 (baicalin); 7. 芦荟大黄素 (aloe-emodin); 8. 大黄酸 (rhein); 9. 汉黄芩素 (wogonin); 10. 大黄素 (rheum emodin); 11. 大黄酚 (chrysophanol); 12. 大黄素甲醚 (physcion)

3 号峰 (未知成分), 详见图 6C, 结果与主成分分析结果一致, 说明这 5 种成分直接决定了清肺抑火片的质量。

2.4 HPLC 法测定黄芩苷的含量

2.4.1 供试品制备及色谱条件 按“2.2.1”及“2.2.2”项下方法制备供试品及对照品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件, 以黄芩苷的最大紫外吸收波长 280 nm 为检测波长测定。色谱图见图 7。

2.4.2 方法学考察

① 线性范围考察: 精密吸取特征图谱“2.2.1”项下对照品储备液 0.2、0.5、1、2、5、10 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇定容至刻度。按“2.4.1”

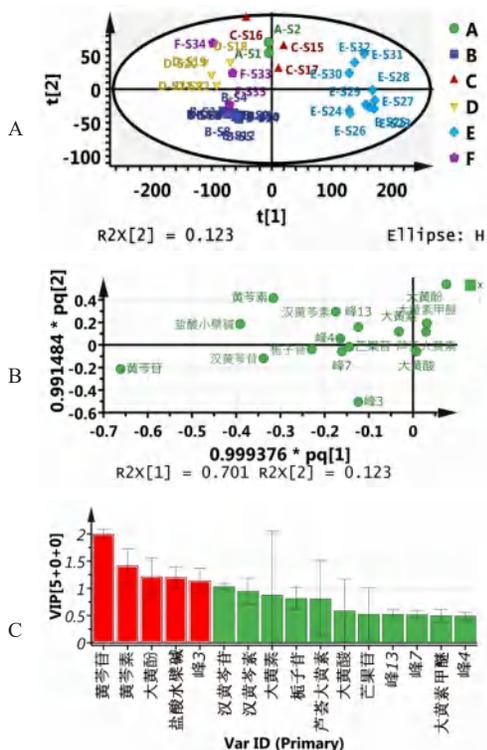


图 6 不同厂家样品 PCA 得分图 (A)、主成分模型载荷图 (B) 及主要成分的 VIP 图 (C)

Fig 6 PCA scores (A), principal component model loading diagram (B) and VIP diagram (C) of samples by different producers

项下色谱条件测定, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 对照品浓度 (X, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 进行线性回

表 1 指纹图谱相似度

Tab 1 Similarity of fingerprint			
编号	厂家	批号	相似度
S1	A	DAA2003	0.996
S2	A	DAA2004	0.989
S3	B	210729	0.973
S4	B	210953	0.997
S5	B	220106	0.995
S6	B	211165	0.993
S7	B	220107	0.997
S8	B	220322	0.998
S9	B	220326	0.998
S10	B	220324	0.998
S11	B	210950	0.978
S12	B	220329	0.998
S13	B	211054	0.992
S14	B	211275	0.997
S15	C	220101	0.980
S16	C	220301	0.972
S17	C	220314	0.935
S18	D	210107	0.923
S19	D	220305	0.976
S20	D	20220178	0.992
S21	D	20211284	0.987
S22	D	20211227	0.991
S23	E	20211284	0.986
S24	E	20220179	0.993
S25	E	20220260	0.993
S26	E	20220177	0.993
S27	E	20211023	0.981
S28	E	20210556	0.957
S29	E	20201172	0.970
S30	E	210312	0.990
S31	E	210710	0.899
S32	E	210404	0.989
S33	F	211203	0.947
S34	F	220304	0.892
S35	F	210501	0.938

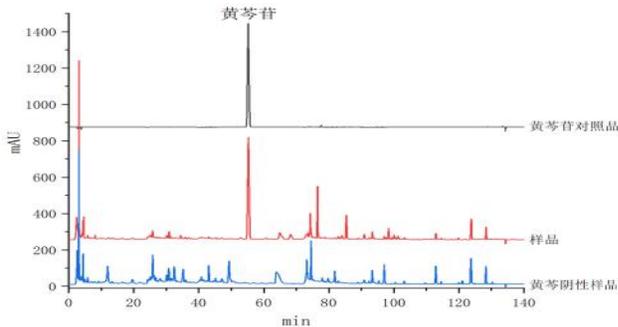


图 7 黄芩苷的色谱图
Fig 7 Chromatogram of baicalin

归, 得黄芩苷的回归方程, $Y = 35.65X + 1.77$, $r = 0.9999$, 黄芩苷在 $18.7633 \sim 938.163 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

② 检测限和定量限: 将“2.2.1”项下的对照品溶液逐级稀释并进行测定, 按 3 倍信噪比计算待测成分的检测限为 2.5 ng, 按 10 倍信噪比计算各待测成分的定量限为 8.34 ng。

③ 精密度试验: 精密吸取“2.2.1”项下对照品储备液 10 μL , 连续进样 6 次, 记录黄芩苷峰面积, 计算峰面积 RSD 为 0.010%。结果表明仪器精密度良好。

④ 稳定性试验: 将 S25 号样品按照“2.2.2”项下样品处理方法制备成供试品溶液, 分别于第 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定, 记录黄芩苷峰面积, 计算峰面积 RSD 为 0.19%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

⑤ 重复性试验: 将 S25 号样品按照“2.2.2”项下样品处理方法制备 6 份供试品溶液, 分别精密吸取供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录黄芩苷峰面积并计算平均含量为 11.5 mg/片, 计

算 RSD 为 0.36%, 结果表明重复性良好。

⑥ 加样回收试验: 精密称取供试品 6 份, 每份约 0.25 g, 置于具塞三角瓶中, 精密加入对照品储备液 (黄芩苷 $2656.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.2 mL, 挥干溶剂。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.4.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积并计算黄芩苷含量, 结果其回收率为 97.86%, RSD 为 1.7%。

2.4.3 样品含量测定 取 35 批样品, 按照“2.4.1”项下方法进行测定并计算含量, 结果见表 2。

2.4.4 黄芩苷含量限度规定 结合黄芩中提取黄芩苷的转移率^[19-22], 以 35 批次样品中黄芩苷平均含量的 50% 拟订限度, 最终含量限度规定: 不得少于 3.2 mg/片, 35 批清肺抑火片中合格 30 批, 合格率为 85.7%。A、B、C 和 E 厂家生产的清肺抑火片中黄芩苷含量均符合限度规定。D 厂家生产的 5 批样品中, 4 批样品不符合规定; F 厂家生产的 3 批样品中, 1 批样品不符合规定; 黄芩苷含量不符合规定的 2 个厂家的检验标准均未规定黄芩苷的含量。

表 2 35 批清肺抑火片中黄芩苷的含量 (mg/片)

Tab 2 Content of baicalin in 35 batches of Qingfei Yihuo tablets (mg/片)					
厂家	批号	黄芩苷含量	厂家	批号	黄芩苷含量
A	DAA2003	6.96	D	220101	3.95
A	DAA2004	7.32	D	220301	2.97
B	210729	3.48	D	220314	2.16
B	210953	4.86	D	210107	1.82
B	220106	5.51	D	220305	3.06
B	211165	4.56	E	20220178	12.32
B	220107	5.53	E	20211284	11.23
B	220322	5.37	E	20211227	11.88
B	220326	5.07	E	20211284	10.92
B	220324	5.47	E	20220179	12.38
B	210950	3.61	E	20220260	11.54
B	220329	5.35	E	20220177	12.64
B	211054	4.25	E	20211023	11.01
B	211275	5.49	E	20210556	9.02
C	210312	6.53	E	20201172	8.85
C	210710	3.31	F	211203	4.41
C	210404	7.13	F	220304	2.74
			F	210501	3.97

3 讨论

从调研结果可知, 不同生产企业检验标准存在差异, 其中 A、C、D、F 四个生产企业执行现行法定标准《卫生部药品标准》中药成方制剂第二册 WS₃-B-0418-90, 仅 B、E 两个生产企业执行注册标准, B 厂家生产的薄膜衣片执行标准 YBZ16492009 增加了大黄显微鉴别, 大黄、黄芩、黄柏和苦参薄层鉴别及黄芩苷含量测定; E 厂家生产的薄膜衣片执行标准 YBZ05022020 增加了

大黄和桔梗显微鉴别, 大黄、黄柏和苦参薄层鉴别及黄芩苷含量测定, 但黄芩苷的含量测定限值存在差异, 各生产企业执行不同的质量标准, 导致各企业间的药品质量参差不齐, 很难达到药效的一致性; 各生产企业的原辅料、处方与生产工艺、包装材料存在的问题, 原料的产地来源和质量控制不严, 各生产企业的原料产地来源混乱, 对原料的质量控制不严; 工艺参数差异较大, 各生产企业执行标准的生产工艺流程基本一致, 但提取溶剂的量、提取次数及清膏的相对密度等工艺参数差异较大; 使用的辅料及其用量有差异, 各生产企业使用的辅料和用量不一致, 导致不同生产企业的产品质量存在一定差异。从试验结果可知: 相似度计算结果为 0.892 ~ 0.996、非共有峰峰面积占比为 36.43% ~ 56.81%, 黄芩苷含量测定结果为 1.82 ~ 12.64 mg/片, 试验结果差异较大, 表明不同生产企业生产的产品质量差异较大, 也直接反应了各批次样品使用的原料药材质量、辅料品种、生产工艺、执行标准等存在差异。

4 结论

本研究建立大黄、栀子、黄芩、黄柏、苦参的 TLC 鉴别方法, 增加对照药材的同时还增加了指标性成分的鉴别, 可全面评价中药原料的投料情况, 采用特征图谱鉴别方法, 多成分、全方位控制清肺抑火片质量, 并测定黄芩苷的含量, 全面保证中药制剂质量稳定。建议各生产厂家建立由原料选材、生产过程、质量控制、药效评价及品牌建设等组成的全流程控制的中成药优质评价标准^[22-23], 严格把控清肺抑火片生产全过程, 对饮片、投料、提取、干燥浓缩、制粒等各个环节进行规范, 重点关注可能产生质量差异的环节, 提升质量标准, 加大监管力度, 不断提高清肺抑火片的整体质量。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂 (第二册) [S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1990: 248.
- [2] 王琳, 郭冬琴, 周浓, 等. 清肺抑火片指纹图谱的建立及其在质量控制中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (9): 114-117.
- [3] 唐德智. 高效液相色谱波长切换法测定清肺抑火片中栀子苷、芒果苷和黄芩苷的含量 [J]. 中南药学, 2016, 14 (11): 1253-1256.
- [4] 叶隽, 陈斌, 余岳林, 等. 高效液相色谱法同时测定清肺抑火片中 8 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37 (6): 968-974.
- [5] 王慧竹, 王肃樊, 邓博文, 等. HPLC 法同时测定清肺抑火丸中 9 种成分的含量 [J]. 中药材, 2018, 41 (3): 652-656.
- [6] 王洋洋, 佟若菲, 孙燕燕. HPLC 法同时测定清肺抑火片中盐酸小檗碱、大黄素和大黄酚的含量 [J]. 天津药学, 2021, 33 (3): 11-13.
- [7] 胡茜, 严钰锋, 林君, 等. 清肺抑火胶囊镇咳、祛痰及平喘的药效学研究 [J]. 中国当代医药, 2020, 27 (10): 17-20.
- [8] 陈麒, 蒋骏, 顾新丰, 等. 清肺抑火胶囊治疗风热犯肺型急性支气管炎的临床观察 [J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33 (2): 14-18.
- [9] 汤葳, 周俊, 高习文, 等. 联合清肺抑火胶囊治疗支气管扩张症急性加重的多中心随机对照研究 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2019, 18 (4): 352-356.
- [10] 刘培杰, 施小山, 杨默. 清肺抑火胶囊联合布地奈德治疗急性支气管炎的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35 (6): 1102-1105.
- [11] 张海朋, 金建文, 武婧. 基于指纹图谱的复方伤痛胶囊质量分析及质控成分确认 [J]. 药物评价研究, 2023, 46 (3): 592-598.
- [12] 刘现磊, 李琨, 张辉, 等. 市售丹参配方颗粒的 UPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (1): 2000-2009.
- [13] 刘慧, 肖金超, 张庆捷, 等. 金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (14): 4185-4192.
- [14] 国家食品药品监督管理总局. 《国家药品监督管理局标准》YBZ16492009 [S]. 2019.
- [15] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 1669.
- [16] 国家食品药品监督管理总局. 《国家食品药品监督管理局标准》YBZ07562008 [S]. 2018.
- [17] 甄汉深, 范秀春, 丘琴, 等. 中药指纹图谱研究的一些问题探讨 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (8): 1960-1961.
- [18] 段营辉, 朱樵苏, 黄澜, 等. 高效液相色谱法同时测定清肺抑火丸中 13 种成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 22 (12): 1399-1404.
- [19] 李蒙恩, 马彦江, 陈天朝, 等. 黄芩不同炮制品饮片与汤剂物性参数及化学成分含量的相关性分析 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (4): 869-872.
- [20] 陈天朝, 李瑞颖, 于兰兰, 等. 5 种中药饮片在细粉、水丸之间吸水率和吸水膨胀度的传递性 [J]. 中医研究, 2018, 31 (5): 66-70.
- [21] 陈天朝, 于兰兰, 刘瑞霞, 等. 不同物料参数及配比对模型丸剂体外溶出的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35 (11): 2899-2902.
- [22] 张纯, 陈叶青, 金佩芬, 等. 清肺抑火片质量评价 [J]. 中成药, 2023, 45 (11): 3540-3547.
- [23] 刘艳, 郭丛, 章军, 等. 基于全流程控制的中成药优质评价标准改进研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (6): 1700-1704.

(收稿日期: 2024-03-21; 修回日期: 2024-06-26)

阿那日五味散 HPLC 指纹图谱和多指标含量测定的研究

张玉婷¹, 何春龙¹, 莎日娜^{2*}, 王焕芸¹, 刘爽², 霍婷² (1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学第二附属医院, 呼和浩特 010110)

摘要: **目的** 建立蒙药阿那日五味散指纹图谱和多指标含量测定方法。**方法** 采用 Sepax HP-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.1% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱; 流速为 1 mL·min⁻¹; 检测波长为 275 nm; 柱温为 30 ℃; 进样量为 10 μL; 建立 15 批阿那日五味散的指纹图谱, 并采用一测多评法测定其中 5 种成分的含量。**结果** 阿那日五味散 HPLC 指纹图谱确定 12 个共有峰, 指认出原儿茶酸、没食子酸、安石榴苷、肉桂醛、鞣花酸、胡椒碱、槲皮素 7 个成分, 通过一测多评法计算得到 5 个成分的含量值与外标法比较, 15 批阿那日五味散含量测定结果一致。经方法学验证, 各成分在各自线性范围内与峰面积线性关系良好 ($r \geq 0.9990$), 加样回收率为 95.0% ~ 105.0%。**结论** 所建立的指纹图谱和多指标含量测定方法准确、高效, 特征性强, 可为蒙药阿那日五味散的质量控制提供参考。

关键词: 阿那日五味散; 指纹图谱; 一测多评法; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3368-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.036

HPLC fingerprint and multi-index content determination of Anari Wuwei power

ZHANG Yu-ting¹, HE Chun-long¹, SHA Ri-na^{2*}, WANG Huan-yun¹, LIU Shuang², HUO Ting² (1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110; 2. The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110)

Abstract: Objective To establish the fingerprint and multi-index content determination method for Mongolian medicine Anari Wuwei power, and provide a basis for its quality control. **Methods** Sepax HP-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) chromatographic column was used with methanol 0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase in gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 275 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. The fingerprint spectra of 15 batches of Anari Wuwei power were established. Quantitative analysis of multi-components by single-marker was used to measure the content of 5 components. **Results** The HPLC fingerprint of Anari Wuwei powder identified 12 common peaks, and 7 components, namely protocatechuic acid, gallic acid, pomegranate glycoside, cinnamaldehyde, ellagic acid, piperine, and quercetin. The content of 5 components was measured with quantitative analysis of multi-components by single-marker and was compared with that of the external standard method. The 15 batches of Anari Wuwei powder were consistent. Through methodological verification, the linear relationship was good ($r \geq 0.9990$), and the recovery ranged from 95.0% to 105.0%. **Conclusion** The fingerprint and multi-index content determination method are accurate, efficient, and highly characteristics, which can provide reference for the quality control of Anari Wuwei power.

Key words: Anari Wuwei power; fingerprint; quantitative analysis of multi-components by single-marker; high performance liquid chromatography

基金项目: 内蒙古医科大学面上项目 (No. YKD2022MS072); 内蒙古医科大学 2022 年学科建设项目 (No. YKD2022XK011)。

作者简介: 张玉婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析方面的研究, email: 2550243768@qq.com *通信作者: 莎日娜, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 主要从事中蒙药质量控制及药效物质基础研究, email: 1062673315@qq.com

阿那日五味散是蒙古族经典方剂，由肉桂、石榴、葶苈、豆蔻、干姜组成，具有温胃、消食的作用，用于胃脘寒湿，食欲不振，消化不良，肾寒腰痛。查阅相关文献发现阿那日四味散、阿那日五味散、阿那日八味散和阿那日十四味散已有部分含量测定^[1-7]，其中有关阿那日五味散的报道仅有安石榴苷的含量测定与胡椒碱的定性定量而无整体质量控制^[8-9]。因蒙药成分较为复杂，单一成分不能准确地判断蒙药的质量，为完善其质量控制标准，本研究采用高效液相色谱法，建立蒙药阿那日五味散的指纹图谱，并采用一测多评法（quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS）测定 5 个主要成分（没食子酸、安石榴苷、鞣花酸、肉桂醛、胡椒碱）的含量，为蒙药制剂阿那日五味散的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

安捷伦 1260 型高效液相色谱仪（安捷伦科技有限公司）；Waters E 2695 高效液相色谱仪（郑州今时迈科技有限公司）；AB135-S 十万分之一电子天平（德国 Sartorius 公司）；艾泽拉多功能粉碎机（河南润枫机械设备有限公司）；KQ-500DE 超声仪（昆山市超声仪器厂）。

1.2 试药

市售阿那日五味散（每袋装 15 g，批号：220309、220818，内蒙古库伦蒙药有限公司；批号：20220911、20221125、20230223、20230516、20230618，内蒙古国际蒙医医药）；对照品原儿茶酸（批号：#G2131283）、没食子酸（批号：B2218027）、安石榴苷（批号：JO3HB186918）、鞣花酸（批号：K-003-150730）、肉桂醛（批号：531V021）、胡椒碱（批号：#K2211769）、槲皮素（批号：Z30S11S126545）（均供含量测定用，上海源叶生物科技有限公司）；甲醇（色谱纯购于阿拉丁试剂有限公司），超纯水（实验室自制），甲酸（市售分析纯）；收集不同产地的肉桂、石榴、葶苈、豆蔻、干姜，分别经内蒙古医科大学药学院渠弼教授鉴定为肉桂（*Cinnamomum cassia* Presl）、石榴（*Punica granatum* L.）、葶苈（*Fructus Piperis* L.）、豆蔻（*Alpinia katsumadai* Hayat）、干姜（*Zingiber officinale* Rosc.），具体信息见表 1。按照蒙药阿那日五味散处方和制法，随机选取上述蒙药材制备阿那日五味散（每袋装 15 g，批号分别为 20230212、20230216、20230219、20230221、20230224、20230226、20230228、20230229，编号见表 2）。

表 1 药材信息

Tab 1 Information of medicinal herb

药材	产地
肉桂	广西 (3 批)、广东 (2 批)、云南 (3 批)、湖南 (2 批)
石榴	云南 (3 批)、陕西 (2 批)、山东 (3 批)、河南 (2 批)
葶苈	云南 (3 批)、广西 (2 批)、广东 (2 批)、福建 (3 批)
豆蔻	广西 (3 批)、广东 (3 批)、云南 (2 批)、海南 (2 批)
干姜	山东 (3 批)、四川 (3 批)、贵州 (2 批)、湖北 (2 批)

表 2 阿那日五味散样品编号

Tab 2 Sample number of Anari Wuwei power

批号	编号	批号	编号
220309	S1	20230212	S8
220818	S2	20230216	S9
20220911	S3	20230219	S10
20221125	S4	20230221	S11
20230223	S5	20230224	S12
20230516	S6	20230226	S13
20230618	S7	20230228	S14
		20230229	S15

2 方法与结果

2.1 色谱条件

安捷伦 1260 型高效液相色谱仪；色谱柱为 Sepax HP-C₁₈ 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.1% 磷酸（A）- 甲醇（B）水溶液，梯度洗脱（0 ~ 10 min，3% ~ 11%B，10 ~ 16 min，11% ~ 17%B，16 ~ 35 min，17% ~ 35%B，35 ~ 42 min，35% ~ 50%B，42 ~ 45 min，50% ~ 60%B，45 ~ 60 min，60% ~ 75%B）；流速 1 mL·min⁻¹，检测波长 275 nm，柱温 30 °C，进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定没食子酸、安石榴苷、鞣花酸、肉桂醛、胡椒碱对照品适量，加 70% 甲醇溶解制成含 0.06 mg·mL⁻¹ 没食子酸、1.77 mg·mL⁻¹ 安石榴苷、2.23 mg·mL⁻¹ 肉桂醛、1.60 mg·mL⁻¹ 鞣花酸、0.55 mg·mL⁻¹ 胡椒碱的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取阿那日五味散粉末（过 6 号筛）约 1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入 10 mL 70% 甲醇，称定重量，超声提取 30 min，用 70% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液即得。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验 取混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱峰面积并计算，结果各对照品色谱峰的峰面积、相对保留时间 RSD 均小于 2.7%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取阿那日五味散（S1）约 1.0 g，精密称定，共 6 份，按“2.3”项下方法分别制

备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别测定，记录色谱峰面积并计算得到各共有峰的峰面积、相对保留时间 *RSD* 均小于 0.78%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取阿那日五味散 (S1) 约 1.0 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，并于 0、2、4、8、16、24 h 按“2.1”项下色谱条件测定，记录峰面积，计算得到各共有峰峰面积、保留时间均小于 0.68%，证明样品在 24 h 内稳定。

2.4.4 指纹图谱的建立及相似度评价 分别取 15 批阿那日五味散，单味药材按照处方量称量，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件分别进样，记录色谱图，导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2012.1 版本)，经多点校正后自动匹配，标定 12 个共有峰。其中 5 号峰分离度良好，相对保留时间、峰面积稳定，因此以其为参照峰。采用对照品确认 7 个共有峰，分别为没食子酸 (3 号峰)、原儿茶酸 (4 号峰)、安石榴苷 (5 号峰)、鞣花酸 (6 号峰)、胡椒碱 (7 号峰)、肉桂醛 (8 号峰)、槲皮素 (9 号峰)。经单味药材比对其中 6 个峰来自葎苳，5 个峰来自干姜，4 个峰来自肉桂，7 个峰来自石榴皮，2 个峰来自豆蔻，1 号峰来自干姜、豆蔻、肉桂、葎苳与石榴，2 号峰来自干姜、葎苳、石榴与豆蔻，3、5、6 号峰来自石榴，4 号峰来自肉桂与石榴，7 号峰来自葎苳，8 号峰来自肉桂，9 号峰来自石榴和肉桂，10、11、12 号峰均来自葎苳与干姜。阿那日五味散的叠加图见图 1，共有模式图谱见图 2，阿那日五味散和单味药材指纹图谱对比图见图 3。15 批样品相似度 0.868 ~ 1.000，见表 2，单味药材与阿那日五味散相似度 0.192 ~ 1.000，见表 3。

2.5 QAMS 含量测定

2.5.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下混合对照品储备液 1 mL，用 70% 甲醇稀释成不同的浓度，分别注入液相色谱仪，色谱条件同“2.1”项下，记录色谱图。以峰面积 (*y*) 对不同质量浓度 (*x*) ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 绘制标准曲线，得回归方程，结果见表 4。表明没食子酸、安石榴苷、鞣花酸、肉桂醛、胡椒碱质量浓度分别在 0.02 ~ 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.62 ~ 1.29 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.56 ~ 1.44 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.86 ~ 2.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.21 ~ 1.55 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系，相关系数均 ≥ 0.9990 。

2.5.2 精密度试验 取混合对照品溶液，按“2.1”

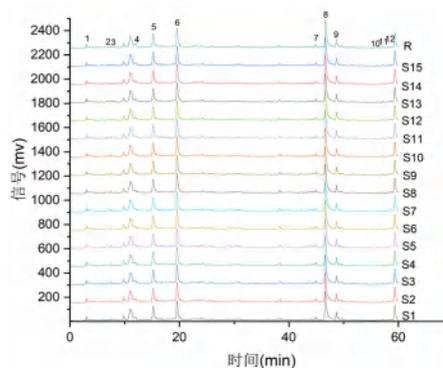


图 1 15 批阿那日五味散 HPLC 叠加图谱

Fig 1 Superimposed HPLC map of 15 batches of Anari Wuwei power

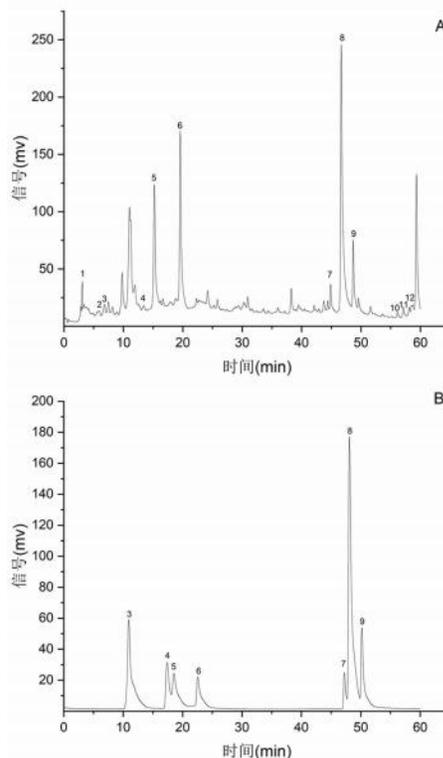


图 2 阿那日五味散对照图谱 (A) 及混合对照品的色谱图 (B)

Fig 2 Chromatogram of Anari Wuwei power control map (A) and mixed controls (B)

3. 没食子酸 (gallic acid); 4. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 5. 安石榴苷 (pomegranate glycoside); 6. 鞣花酸 (ellagic acid); 7. 胡椒碱 (piperine); 8. 肉桂醛 (cinnamaldehyde); 9. 槲皮素 (quercetin)

项下色谱条件连续进样测定 6 次，计算得到没食子酸、安石榴苷、鞣花酸、肉桂醛、胡椒碱峰面积的 *RSD* 分别为 0.35%、0.87%、0.19%、2.7%、0.30%，均小于 2.7%，表明仪器精密度高。

2.5.3 重复性试验 取阿那日五味散 (S1) 粉末 1.0 g，精密称定，共 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件分别测定，记录峰面积，计算得到没食子酸、安石榴苷、鞣花酸、肉桂醛、胡椒碱平均含量分别为 0.22、4.84、7.62、3.95、1.69 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，*RSD* 分别 为

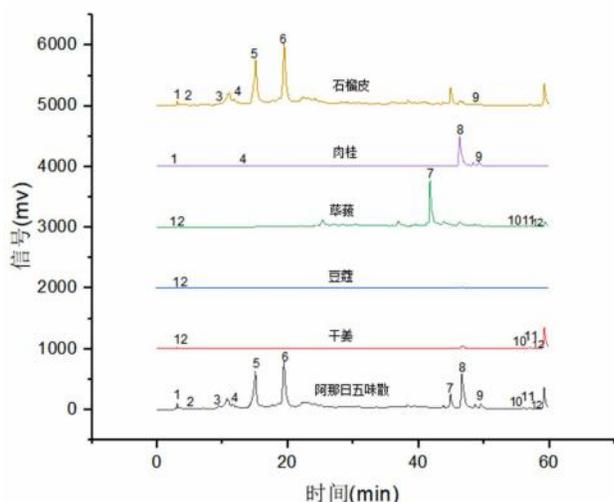


图 3 阿那日五味散和单味药材色谱图
Fig 3 Chromatogram of Anari Wuwei power and single medicinal herb

表 2 15 批阿那日五味散指纹图谱相似度结果

Tab 2 Fingerprint similarity of 15 batches of Anari Wuwei power

编号	相似度	编号	相似度
S1	1.000	S9	0.868
S2	0.999	S10	0.885
S3	0.991	S11	0.895
S4	0.912	S12	0.894
S5	0.908	S13	0.904
S6	0.946	S14	0.962
S7	0.957	S15	0.968
S8	0.963		

表 3 单味药材与阿那日五味散指纹图谱相似度评议结果

Tab 3 Fingerprint similarity of single medicinal herb and Anari Wuwei power

药材	相似度
阿那日五味散	1.000
荜茇	0.285
干姜	0.263
肉桂	0.192
石榴	0.882
豆蔻	0.452

表 4 线性关系考察结果

Tab 4 Linear relationship

成分	回归方程	R^2	线性范围 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
没食子酸	$y = 3.021 \times 10^4 x - 64.622$	1.000	0.02 ~ 0.05
安石榴苷	$y = 7.652 \times 10^3 x - 1121.7$	1.000	0.62 ~ 1.29
鞣花酸	$y = 1.028 \times 10^4 x - 1.249 \times 10^3$	0.9997	0.56 ~ 1.44
肉桂醛	$y = 8.202 \times 10^4 x - 3.734 \times 10^3$	0.9999	0.86 ~ 2.00
胡椒碱	$y = 34.709 \times 10^4 x + 2.090 \times 10^4$	0.9990	0.21 ~ 1.55

0.46%、0.60%、0.31%、0.78%、0.47%，表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取阿那日五味散 (S1) 粉末

1.0 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，并于 0、2、4、6、16、24 h 按“2.1”项下色谱条件测定，记录峰面积，计算得到没食子酸、安石榴苷、鞣花酸、肉桂醛、胡椒碱峰面积的 *RSD* 分别为 0.18%、0.10%、0.13%、0.45%、0.11%，表明样品在 24 h 内稳定。

2.5.5 加样回收试验 取阿那日五味散粉末 0.5 g，精密称定，共 6 份，分别置于锥形瓶中，分别取对照品溶液适量置于锥形瓶中，挥干溶剂，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件进样，对没食子酸、安石榴苷、鞣花酸、肉桂醛、胡椒碱 5 个成分计算回收率，回收率在 95.0% ~ 105.0%，*RSD* 值均 ≤ 2.1%，表明该方法准确度良好。

2.5.6 相对校正因子 (*f*) 的确认与计算 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 3、4、5、6、7、8 μL 注入高效液相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件进行测定，因胡椒碱在各批次阿那日五味散中稳定存在，且含量较高，故选择胡椒碱为内参物，按照公式 ($f_{k/s}$): $f_{k/s} = (C_s \times A_k) / (C_k \times A_s)$ 计算^[10-11]，式中 C_s 为内参物质量浓度， C_k 为待测成分质量浓度， A_s 为内参物色谱峰峰面积， A_k 为对照成分色谱峰峰面积。没食子酸、安石榴苷、鞣花酸、肉桂醛、胡椒碱的校正因子平均值分别为 0.3763、0.1373、0.1689、0.1739、1.000，*RSD* 均小于 2%。

2.5.7 *f* 的耐用性试验

① 不同仪器、色谱柱：考察不同仪器 (Waters E 2695、Agilent 1260)、不同色谱柱 [Sepax HP-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Agilent 5 TC-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、依利特 C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)] 对 *f* 的影响，各成分 *f* 值的 *RSD* 分别为 0.72%、2.4%、1.7%、4.9%，均小于 5%，耐用性良好。

② 不同柱温：取样品适量，分别考察不同柱温 25、28、30、32、35 $^{\circ}\text{C}$ 对 *f* 的影响，结果各成分 *f* 值的 *RSD* 分别为 3.5%、3.5%、2.6%、1.9%，均小于 4%，耐用性良好。

2.5.8 两种方法测定含量的比较 分别采用外标法 (EMS) 和 QAMS 计算含量，并将两种方法计算的结果进行比较，取 10 批样品各适量，分别采用外标法与 QAMS 法计算各成分含量，结果如表 5 所示，各成分的相对平均偏差 (RAD) 均小 4%，表明本方法可用于阿那日五味散主要化学成分的质量评价研究。

3 讨论

本研究采用 HPLC 法建立了 15 批阿那日五

表 5 外标法与一测多评法测定结果的比较 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)Tab 5 Results of external standard method and quantitative analysis of multi-components by single-marker method ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

编号	胡椒碱	没食子酸			安石榴苷			鞣花酸			肉桂醛		
		EMS	QAMS	RAD/%	EMS	QAMS	RAD/%	EMS	QAMS	RAD/%	EMS	QAMS	RAD/%
S1	0.2258	0.2258	0.2326	3.01	18.608	19.1662	3.00	0.6087	0.633	4.00	8.9562	9.0458	1.00
S2	0.2303	0.2303	0.2372	3.00	17.0609	17.5727	3.00	0.5951	0.6189	4.00	8.1495	8.231	1.00
S3	0.2495	0.2495	0.257	3.01	17.6141	18.1425	3.00	0.6262	0.6513	4.00	8.7183	8.8055	1.00
S4	0.2491	0.2491	0.2566	3.01	18.3007	18.8498	3.00	0.6481	0.674	4.00	8.8304	8.9187	1.00
S5	0.2446	0.2446	0.2519	2.98	16.5339	17.0299	3.00	0.6212	0.6461	4.00	8.3702	8.4539	1.00
S6	0.2644	0.2644	0.2724	3.03	3.4392	3.5424	3.00	5.2312	5.4404	4.00	2.8723	2.901	1.00
S7	0.2635	0.2635	0.2714	3.00	3.4403	3.5436	3.00	5.1826	5.3899	4.00	2.8726	2.9013	1.00
S8	0.2633	0.2633	0.2712	3.00	3.4407	3.5439	3.00	5.3418	5.5554	4.00	2.8803	2.9091	1.00
S9	0.2625	0.2625	0.2704	3.01	3.4322	3.5351	3.00	5.1764	5.3835	4.00	2.887	2.9158	1.00
S10	0.2632	0.2632	0.2711	3.00	3.4174	3.52	3.00	5.3626	5.5771	4.00	2.9112	2.9403	1.00

味散指纹图谱, 确认了 12 个共有峰, 指出原儿茶酸、没食子酸、安石榴苷、肉桂醛、肉桂醛、胡椒碱、槲皮素 7 个成分。结合单味药材比对结果, 1、2、4、9、10、11、12 号色谱峰为多味药材共有, 最终选取 3、5、6、7、8 号色谱峰为特征指标成分, 作为 QAMS 含量测定的指标成分。其中没食子酸 (3 号峰)、安石榴苷 (5 号峰) 和鞣花酸 (6 号峰) 为石榴的主要有效成分; 胡椒碱 (7 号峰) 为葎苳的主要有效成分; 肉桂醛 (8 号峰) 为肉桂的主要有效成分。

采用 QAMS 测定 5 种特征成分的含量, 并与外标法所测含量值相比较, 两种方法所测定的 10 批阿那日五味散含量结果一致, 同时进行了方法学考察, 结果表明所建立的指纹图谱和多指标含量测定方法准确、高效、特征性强。QAMS 不仅极大地减少了对照品的使用数量, 节约了成本, 而且增加了检测的便利性。

4 结论

本试验建立的 HPLC 指纹图谱和 QAMS, 可为提高蒙药阿那日五味散的质量标准提供依据, 也可为药效物质基础的研究奠定基础。

参考文献

[1] 闫烁, 薄彧坤, 李景琦, 等. HPLC 同时测定蒙药阿那

日 -4 中 3 种成分的含量 [J]. 食品与药品, 2019, 21 (1): 16-19.

- [2] 苏都那布其, 郝俊生, 王秀兰, 等. 高效液相色谱法同时测定蒙药阿那日 -4 散中 3 种成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38 (12): 1266-1268.
- [3] 海霞, 玉山, 张志强. 蒙药阿那日 -4 治疗胃溃疡的实验研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25 (6): 30, 80.
- [4] 宋晓玲, 闫焱, 郑斯聪, 等. 蒙药阿那日四味散 HPLC 指纹图谱的建立及主要指标成分测定 [J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25 (7): 45-47.
- [5] 古丽巴哈尔·艾力. 阿那日五味散定性定量控制方法与阿那日五味片前处理工艺研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2022.
- [6] 玉华. HPLC 法测定蒙药阿那日十四味散中胡椒碱的含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19 (4): 55-56.
- [7] 张丽. 高效液相色谱法测定蒙药阿那日八味散中胡椒碱的含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23 (12): 59-61.
- [8] 那仁花. 蒙药阿那日 -5 散的研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (44): 96-97.
- [9] 巴根那, 吴香杰, 包桂花, 等. HPLC 法测定蒙药阿那日五味散中胡椒碱的含量 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35 (1): 111-112.
- [10] 吴文静, 徐焯, 尚秧, 等. 基于指纹图谱结合一测多评定量分析的蓝莓花青素提取物质量控制方法研究 [J]. 当代化工, 2024, 53 (2): 282-287, 293.
- [11] 郭绪生, 邱学伟, 李丽, 等. 一测多评法同时测定天麻头风灵胶囊中 10 种成分的含量 [J]. 中成药, 2024, 46 (2): 359-364.

(收稿日期: 2024-04-25; 修回日期: 2024-06-25)

高效液相色谱法检查醋酸阿托西班注射液中的 6 个杂质

孙秋艳^{1,2}, 胡佳慧⁴, 袁海成³, 赵旻¹, 王森¹, 赵春杰^{1*} (1.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2.广州博济生物医药科技园有限公司, 广州 511300; 3.扬子江药业集团广州海瑞药业有限公司, 广州 510663; 4.广州合和医药有限公司, 广州 510663)

摘要: **目的** 检查醋酸阿托西班注射液中潜在的二聚体杂质 (Z35) 等 6 个杂质。**方法** 采用飞诺美 Phenomenex Gemini C₁₈ 110A (4.6 mm×250 mm, 3 μm) 色谱柱, 流动相 A 为乙腈-甲醇-溶液 I (取纯水 2000 mL, 用三氟乙酸调 pH 至 3.2)(15:10:75), 流动相 B 为乙腈-甲醇 (60:40), 进行梯度洗脱, 柱温 60 °C, 流速 1.2 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm。**结果** 在该色谱条件下, 6 个杂质分离度符合要求, 且空白溶液不干扰各杂质的检出; 滤膜对杂质均无明显吸附作用; 阿托西班及各杂质在 50%~150% 的限度浓度范围内与峰面积线性关系良好; 各杂质的定量限和检测限均小于限度浓度水平, 符合检测要求; 重复性 6 份样品的各单杂和总杂含量变化绝对值均小于限度值的 20%, 符合精密度要求; 加样回收率结果均在 80%~120% 内, 方法准确度良好; 供试品溶液及对照溶液在室温条件下放置 24 h, 各杂质检出无明显变化。**结论** 该方法简便、可行, 可用于醋酸阿托西班注射液中有关系物质检查。

关键词: 醋酸阿托西班注射液; HPLC 法; 聚体杂质

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3373-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.037

Detection of 6 impurities in atosiban acetate injection by HPLC

SUN Qiu-yan^{1,2}, HU Jia-hui⁴, YUAN Hai-cheng³, ZHAO Min¹, WANG Miao¹, ZHAO Chun-jie^{1*} (1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 2. Guangzhou Boji Biomedicine Technopark Co., Ltd., Guangzhou 511300; 3. Yangzijiang Pharmaceutical Group Guangzhou Hairui Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510663; 4. Guangzhou Hehe Pharma Ltd., Guangzhou 510663)

Abstract: Objective To examine 6 impurities including potential dimer impurity (Z35) in atosiban acetate injection. **Methods** Phenomenex Gemini C₁₈ 110A (4.6 mm×250 mm, 3 μm) chromatographic column was used. Mobile phase A was acetonitrile-methanol-solution I (2000 mL of pure water was used, and the pH was adjusted to 3.2 with trifluoroacetic acid) (15:10:75), while mobile phase B was acetonitrile-methanol (60:40). Gradient elution was performed, the column temperature was 60 °C, the flow rate was 1.2 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 220 nm. **Results** Under the chromatographic conditions, the separation degree of the 6 impurities met the requirements, and the blank solution did not interfere with the detection of each impurity. The filter membrane had no obvious adsorption effect on the impurities. Atosiban and each impurity had a good linear relationship at 50%~150%. Both the quantification limit and detection limit of each impurity were lower than the limit concentration level, which met the detection requirements. The absolute value of each single impurity and total impurity content change of the 6 samples were less than 20% of the limit value, which also met the precision requirements. The sample recovery ranged at 80%~120%, and the accuracy of the method was good. The test solution and the control solution were placed at room temperature for 24 h, without significant change in the content of each impurity. **Conclusion** The method is simple and feasible, and can be used for the detection of related substances in atosiban acetate injection by HPLC.

Key words: atosiban acetate injection; HPLC method; dimer impurity

作者简介: 孙秋艳, 女, 硕士研究生, 主要从事药品生产的质量管理, email: audrey_sunqiuayan@163.com *通信作者: 赵春杰, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事体内药物分析及中西新药开发研究, email: zcjlj@sina.com

醋酸阿托西班注射液为催产素拮抗药,阿托西班通过与缩宫素受体特异性结合,对人催产素产生竞争性抑制作用,从而抑制宫缩,有较好的临床效果。由于其为唯一具有子宫特异性的宫缩抑制剂,对心血管方面的影响少,不良反应发生率低于其他宫缩抑制剂,已被英国皇家妇产科学院推荐作为抗早产的一线药物。因此,醋酸阿托西班注射液是治疗先兆早产安全且有效的药物,值得在临床推广应用^[1]。

依据国家药品监督管理局药品审评中心发布的《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评

价技术要求》^[2]及《化学药物杂质研究技术指导原则》^[3],对药物的工艺杂质及潜在降解杂质进行深入透彻的剖析及研究,以确保产品的安全性。

目前,国内对醋酸阿托西班注射液有关物质检测方法的研究比较少^[4-5],且未对该方法进行全面的的方法学验证。考虑到醋酸阿托西班注射液中可能存在制剂过程中产生的降解杂质以及来源于原料药的工艺杂质,因此,本文在进口药品注册标准(标准号:JX20110002)^[6]的基础上,结合已上市品种注册标准(YBH02152019)^[7],对醋酸阿托西班注射液以下几个杂质进行研究,具体的杂质谱分析见图1。

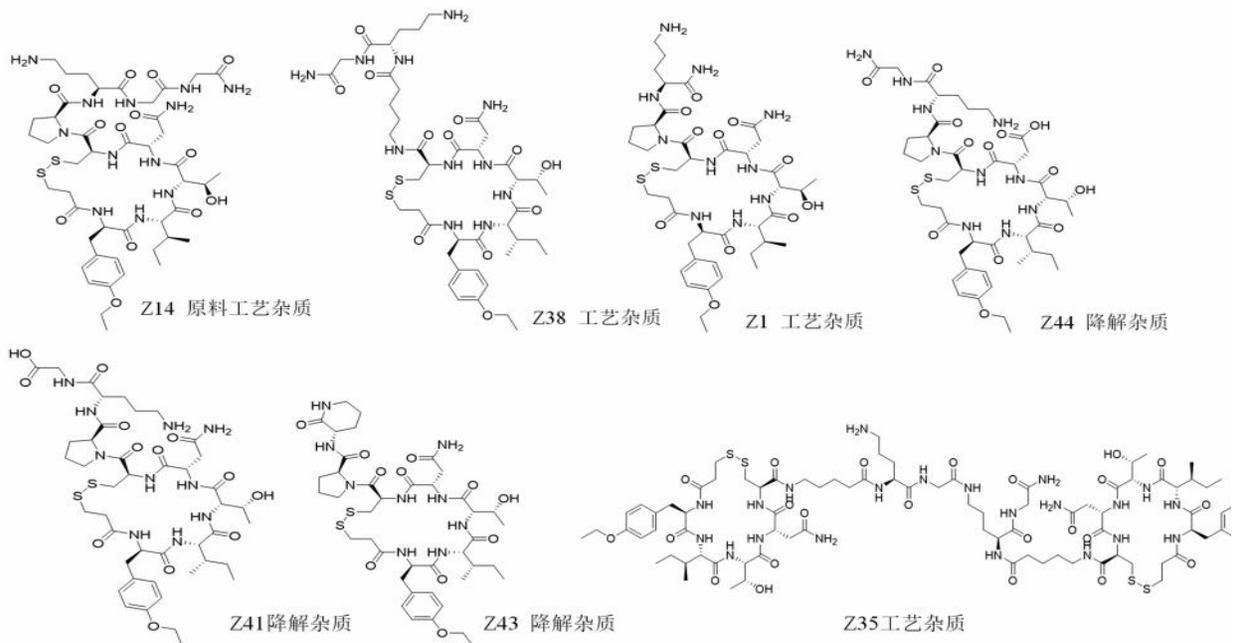


图1 醋酸阿托西班注射液杂质谱分析
Fig 1 Impurity in atosiban acetate injection

1 仪器与试药

1.1 仪器

安捷伦 1260 高效液相色谱仪(安捷伦); S220 酸度计、XSE205 十万分之一电子天平(美国梅特勒-托利多公司)。

1.2 试药

乙腈、甲醇(色谱纯,默克公司),三氟乙酸、冰乙酸(分析纯,国药化学试剂有限公司);醋酸阿托西班注射液(批号:73191201、73191202、73200901,扬子江药业集团广州海瑞药业有限公司);醋酸阿托西班对照品(批号:RS1912010,肽含量:91.93%)、杂质 Z35(批号:200501,肽含量:82.68%)(上海苏豪逸明有限公司);杂质 Z14(批号:19110007,纯度:95.57%)、杂质 Z1(批号:020170809,肽含量:84.74%)、杂质 Z44(批号:D2014092601,纯度:72.97%)、杂质 Z41(批号:D20140317,纯度:89.29%)、杂质 Z43(批号:D2014101603,纯度:

89.8%)(哈尔滨吉象隆生物技术有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈ 110A(4.6 mm×250 mm, 3 μm);流动相 A 为乙腈-甲醇-溶液 I(取纯水 2000 mL,用三氟乙酸调 pH 至 3.2)(15:10:75),流动相 B 为乙腈-甲醇(60:40),按表 1 进行梯度洗脱;柱温为 60℃,流速为 1.2 mL·min⁻¹,检测波长为 220 nm,进样量为 25 μL。

表 1 梯度洗脱程序
Tab 1 Gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
15	100	0
25	82	18
30	62	38
35	62	38
36	100	0
46	100	0

2.2 溶液配制

2.2.1 空白溶液（稀释液） 即溶液 I。

2.2.2 系统适用性溶液 分别取醋酸阿托西班对照品和阿托西班各杂质适量，用稀释液溶解稀释制成每 1 mL 中分别含阿托西班约 0.6 mg，含 Z14、Z41 各约 1.2 μg，含 Z1 约 1.8 μg，含 Z44 约 2.4 μg，含 Z35 约 1.8 μg，含 Z43 约 3.0 μg 的混合溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密移取醋酸阿托西班注射液 2 mL，置 25 mL 量瓶中，用稀释液稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 对照溶液 精密移取供试品溶液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用稀释液稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。

2.2.5 灵敏度溶液 精密移取对照溶液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用稀释液稀释至刻度，摇匀，作为灵敏度溶液。

2.2.6 乙酸定位溶液 取乙酸约 60 mg，置 100 mL 量瓶中，用稀释液稀释至刻度，摇匀，作为醋酸定位溶液。

2.2.7 空白辅料溶液 精密称取甘露醇约 0.1 g，置烧杯中，加水适量使溶解，用盐酸调节 pH 至 4.5，转移至 25 mL 量瓶中，加水至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为空白辅料溶液。

2.2.8 各杂质定位溶液 分别精密称定 Z35、Z14、Z1、Z44、Z41 及 Z43 杂质约 0.003 g，置于相应的 50 mL 量瓶中，用适量稀释液溶解并稀释至刻度，再分别量取 3、2、3、4、2、5 mL 溶液置 100 mL 量瓶中，稀释至刻度，摇匀，作为各杂质定位溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性 取“2.2”项下方法配制的空白溶液、空白辅料溶液、系统适用性溶液各 25 μL，分别进样测定，记录色谱图。结果见图 2~4，空白溶液不干扰各杂质和主成分检测。Z14 与阿托西班的分离度为 3.47，Z1 与阿托西班分离度为 2.90，表明方法专属性良好。

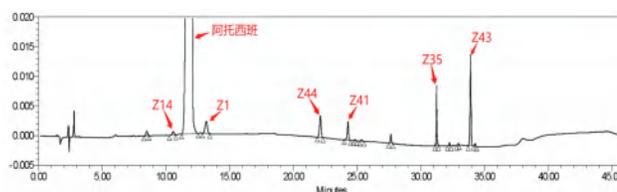


图 2 系统适用性溶液 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of system suitability solution

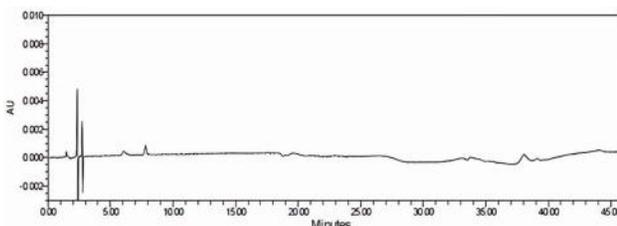


图 3 空白溶液 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC chromatogram of blank solution

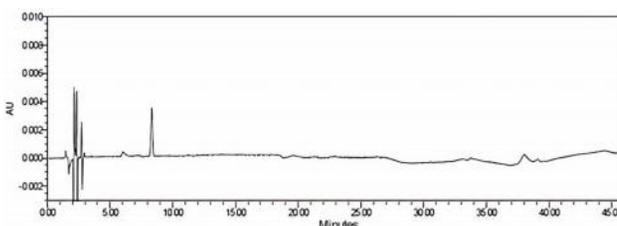


图 4 空白辅料溶液 HPLC 图谱

Fig 4 HPLC chromatogram of blank excipient solution

2.3.2 滤膜吸附试验 采用直径为 25 mm 的聚四氟乙烯滤膜过滤，供试品溶液分别过滤 0、2、4、6 mL 后，相对控制样品主峰面积的回收率分别为 99.7%、99.9%、100.0%、100.0%；其中 Z1、Z44、Z43 均无变化，Z14 + Z38 的最大变化绝对值为 0.01% ($\leq 0.04\%$)，Z41 的最大变化绝对值为 0.01% ($\leq 0.04\%$)，Z35 的最大变化绝对值为 0.03% ($\leq 0.06\%$)，其他最大未知单杂的最大变化绝对值为 0.02% ($\leq 0.02\%$)，其他杂质总量（除 Z14 + Z38、Z1 外）的 RSD 为 4.2%。因此，采用聚四氟乙烯滤膜进行过滤，对供试品溶液无影响。各杂质检测结果见表 2。

表 2 滤膜吸附试验杂质结果 (%)

Tab 2 Filter membrane adsorption test for impurity (%)

有关物质	控制样品	过滤 0 mL	过滤 2 mL	过滤 4 mL	过滤 6 mL	最大变化绝对值	RSD/%
Z14 + Z38	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.01	/
Z1	ND	ND	ND	ND	ND	0	/
Z44	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0	/
Z41	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.01	/
Z35	0.04	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	/
Z43	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0	/
其他最大单杂	0.04	0.06	0.06	0.06	0.06	0.02	/
总量	0.32	0.29	0.32	0.32	0.32	/	4.2

注 (Note): “ND” 表示 “未检出” (“ND” means “not detected”).

2.3.3 检测限与定量限 取醋酸阿托西班、Z35 及其他杂质的对照品储备液，用稀释液逐级稀释后进样，记录信噪比 S/N 约为 3 : 1 的量即为检测限， S/N 约为 10 : 1 的量即为定量限。结果见表 3。

表 3 检测限及定量限结果
Tab 3 LOQ and LOD

有关物质	检测限 /ng	相当于供试品溶液的浓度 /%	定量限 /ng	相当于供试品溶液的浓度 /%
Z43	0.28	0.002	0.70	0.005
Z44	0.33	0.002	0.56	0.004
Z41	0.28	0.002	0.70	0.005
Z14	0.55	0.004	1.59	0.01
Z1	0.55	0.004	1.58	0.01
Z38	0.32	0.002	1.06	0.007
阿托西班	1.23	0.008	2.58	0.017
Z35	1.23	0.008	2.28	0.015

2.3.4 标准曲线制备 精密称取醋酸阿托西班、Z35 及各杂质对照品适量，加稀释液溶解，分别配制成相当于限度浓度的 20%、50%、100%、150%、200%、500%，并以定量限溶液浓度和峰面积作为试验最低点，以进样浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线，并计算回归方程。结果见表 4。

表 4 标准曲线结果
Tab 4 Standard curve

有关物质	回归方程	相关系数 r	校正因子
Z14	$y = 1.488 \times 10^4 x - 90.219$	1.0000	1.30
Z1	$y = 2.220 \times 10^4 x - 107.6$	1.0000	0.87
Z44	$y = 2.172 \times 10^4 x - 146.8$	1.0000	0.89
Z41	$y = 2.072 \times 10^4 x + 41.843$	1.0000	0.93
Z43	$y = 2.210 \times 10^4 x - 408.2$	0.9999	0.88
Z38	$y = 1.605 \times 10^4 x - 3.614$	1.0000	1.21
阿托西班	$y = 1.937 \times 10^4 x + 873.6$	0.9999	/
Z35	$y = 1.818 \times 10^4 x - 810.6$	0.9998	1.07

2.3.5 杂质的校正因子 根据线性回归方程，按照以下公式计算各杂质的校正因子：校正因子 = 醋酸阿托西班主成分标准曲线斜率 / 各杂质标准曲线斜率。各杂质的校正因子见表 4。

2.3.6 精密度 照“2.2”项下方法配制空白溶液、系统适用性溶液、供试品溶液（平行配制 6 份）、灵敏度溶液、对照溶液、醋酸定位溶液，精密量取上述溶液各 25 μL ，注入色谱仪，记录色谱图。6 份供试品溶液校正后 Z14 + Z38 含量之和为 0.05% ~ 0.06%，含量变化绝对值为 0.01% ($\leq 0.04\%$)；Z1、Z44 均未检出；Z41 含量为 0.03% ~ 0.04%，含量变化绝对值为 0.01% ($\leq 0.04\%$)；Z35 含量为 0.01% ~ 0.02%，含量变化绝对值为 0.01% ($\leq 0.06\%$)；Z43 含量均为 0.11%；其他最大单杂为含量 0.02% ~ 0.03%，含

量变化绝对值为 0.01% ($\leq 0.02\%$)；除 Z14、Z38、Z1 外其他杂质总量为 0.20% ~ 0.23%，含量变化绝对值为 0.03% ($\leq 0.30\%$)，结果均符合规定，表明本法精密度良好。

2.3.7 准确度 分别选择醋酸阿托西班注射液各杂质的 50%、100%、150% 的浓度水平作为回收试验溶液。结果三个浓度下，Z14 的平均回收率分别为 96.6%、96.2%、95.4%， RSD 分别为 1.3%、0.91%、0.18%；Z44 的平均回收率分别为 100.6%、101.5%、102.7%， RSD 分别为 0.55%、1.4%、2.1%；Z41 的平均回收率分别为 100.2%、101.2%、103.0%， RSD 分别为 0.71%、1.8%、1.7%；Z1 的平均回收率分别为 101.1%、102.1%、102.6%， RSD 分别为 2.4%、1.2%、0.48%；Z43 的平均回收率分别为 93.9%、93.1%、97.9%， RSD 分别为 0.59%、0.86%、1.5%；Z35 的平均回收率分别为 103.7%、109.4%、108.7%， RSD 分别为 9.4%、0.19%、1.4%。表明方法准确度良好。

2.3.8 溶液稳定性 照“2.2”项下方法配制供试品溶液、对照溶液，分别精密量取常温条件下存放 0、2、4、8、12、16、20、24 h 的对照溶液和供试品溶液各 25 μL 进样检测，记录色谱图。在室温条件下，对照溶液及供试品溶液在 24 h 内各时间点主峰峰面积与 0 h 主峰峰面积的百分比在 99.9% ~ 100.9%，各时间点供试品溶液检出 Z14 + Z38、Z41、最大未知单杂、除 Z14、Z38、Z1 外的其他杂质总量最大变化绝对值分别为 0.01%、0.01%、0.01%、0.02%，Z44、Z1 均未检出，Z35 均为 0.01%，Z43 均为 0.11%。结果表明，供试品溶液和对照溶液均在室温下存放 24 h 内稳定。

2.3.9 样品中有关物质的测定 采用“2.1”项下检测方法，对 3 批醋酸阿托西班注射液产品进行测定，结果各批样品的单杂和总杂均在限度范围之内，见表 5。

3 讨论

3.1 方法来源

醋酸阿托西班注射液进口药品注册标准（标准号：JX20110002）^[6] 中有关物质的检测方法为 HPLC 法，色谱条件为常见的反相梯度洗脱法，色谱柱、试剂均为常见易得，该标准中采用加校正因子的主成分自身对照法，并记载了各杂质的校正因子，因此方法简单可行，为行业内常见的方法。故本文采用了进口药品注册标准中有关物质检测方法，并根据《中国药典》通则中分析方法验证指导原则的要求，对醋酸阿托西班注射液的关键工艺杂质（Z14、Z38、Z1、Z35）和关键降解杂质（Z44、Z41、Z43）进行方法学验证，以确认该方法在现有试验条件下检测醋酸阿托西

表 5 多批样品检测结果 (%)

Tab 5 Multiple batches of samples (%)

批号	Z14 + Z38	Z1	Z44	Z41	Z35	Z43	其他最大单杂	杂质总量 (除 Z14+Z38、Z1 外)
73191201	0.06	未检出	未检出	0.03	0.01	0.12	0.02	0.23
73191202	0.05	未检出	未检出	0.03	0.01	0.11	0.03	0.21
73200901	0.02	未检出	未检出	0.02	0.01	0.09	0.02	0.17

班注射液有关物质的适用性, 并确定各杂质的校正因子。

3.2 Z14 与 Z38

在专属性及系统适用性试验的研究中发现, Z14 和 Z38 出峰时间基本一致, 故本项研究结果与进口药品注册标准中将两个杂质一并订入标准按照一个杂质峰进行控制的要求保持一致。因此, 本文中后续其他验证项目只选取 Z14 作为 Z14 和 Z38 的代表杂质进行研究。

3.3 Z14

由本研究结果可知, Z14 与阿托西班的分离度为 3.47, 符合进口药品注册标准中分离度的要

求 (应不小于 1.2), 同时符合《中国药典》通则中分离度的要求 (应不小于 1.5), 说明在现有试验条件下, 该检测方法的系统适用性良好。

3.4 二聚体杂质 Z35

醋酸阿托西班为多肽类药物, 由于醋酸阿托西班在光照条件下二硫键活化为硫自由基, 然后发生分子间聚合反应生成二聚体, 因此二聚体为该产品的杂质。本文选取潜在的二聚体杂质 MPr-D-Tyr (OET)-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly-NH₂, 环肽 (Z35) 进行了研究, 该杂质含两对二硫键, MPr 与 Cys 和 Cys 与 Mpr。其杂质产生途径如图 5 所示。

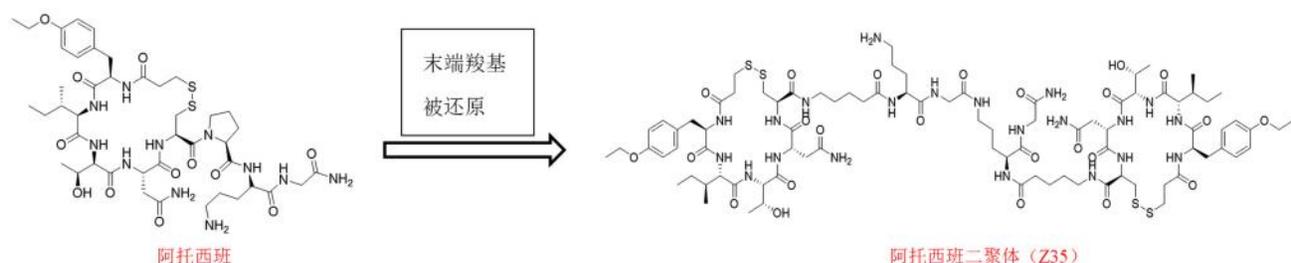


图 5 阿托西班二聚体杂质 (Z35) 的产生途径

Fig 5 Production pathway of atosiban dimer impurity (Z35)

在一项关于液质联用技术用于醋酸阿托西班注射液中杂质结构鉴定^[8]的研究中, 采用高效液相色谱、超高效液相色谱-四极杆串联静电场轨道阱高分辨质谱技术可有效鉴定出阿托西班二聚体杂质, 可为本文的二聚体杂质 Z35 进行结构鉴定提供参考依据。

由于阿托西班 Z35 为工艺杂质, 且未收录在进口药品注册标准中; 本次方法学验证结果显示, 本法能准确检测 Z35, 因此, 本次研究结果可作为提升醋酸阿托西班注射液质量标准的依据。

4 结论

本文参照进口药品注册标准 (标准号: JX20110002) 中记载的有关物质检测方法, 对醋酸阿托西班注射液的 6 个杂质进行检查, 并对该方法进行方法学验证, 结果准确、可靠, 适用于检查醋酸阿托西班注射液中的有关物质。

本次研究使醋酸阿托西班注射液的质量研究更加充分, 可为企业在进行产品研发过程中进行杂质研究提供思路, 这对缩短产品的注册审评时间有很重要的意义。

参考文献

- [1] 陈丽华. 醋酸阿托西班治疗先兆早产的观察与护理[J]. 北方药学, 2020, 17 (10): 86-87.
- [2] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 关于发布《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》等 3 个文件的通告 (2020 年第 2 号) [EB/OL]. (2020-05-14) [2024-01-05]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/d9c6f118b773f54e8feba3519bf78a11>.
- [3] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 化学药物杂质研究技术指导原则[S]. 2005.
- [4] 姚志勇, 支钦, 李新宇. HPLC 法测定醋酸阿托西班有关物质的研究[J]. 中国处方药, 2014, 12 (5): 8-11.
- [5] 李玉勤. 醋酸阿托西班注射液研发和质量研究[D]. 南京: 南京大学, 2017.
- [6] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 原研产品的进口药品注册标准 (JX20110002) [S]. 2011.
- [7] 扬子江药业集团广州海瑞药业有限公司. 已上市品种醋酸阿托西班注射液国家药品注册质量标准 (YBH02152019) [S]. 2019.
- [8] 尹红锐, 张颖, 于继伟, 等. 液质联用技术用于醋酸阿托西班注射液中杂质结构鉴定[J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (1): 20-28.

(收稿日期: 2024-01-05; 修回日期: 2024-04-03)

软袋产品包装密封性阳性样品的制作方法研究

蒋芙蓉¹, 汤平¹, 邹松¹, 王显雷¹, 陈超^{2*} (1. 湖南科伦制药有限公司, 湖南 岳阳 414100; 2. 湖南省药品审评与不良反应监测中心, 长沙 410013)

摘要: **目的** 开发一种用于软袋包装密封性阳性样品制作的方法。**方法** 通过采用在软袋外壁连接电阻, 模拟样品渗漏, 通过高压电检漏的方法检测, 并与传统的毛细管法比较检测结果。**结果** 模拟电阻法能够将 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的泄漏 100% 剔除, 使用毛细管制作阳性样品, 只能做到 $30 \mu\text{m}$ 的孔径模拟, 模拟电阻法替代阳性样品则可以实现更高的检出灵敏度。**结论** 模拟电阻法的灵敏度更高, 而且阳性样品可以重复使用, 更加节约成本。

关键词: 包装密封完整性; 高压放电检漏法; 阳性样品

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3378-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.038

Positive samples of package sealing integrity for soft bag products

JIANG Fu-rong¹, TANG Ping¹, ZOU Song¹, WANG Xian-lei¹, CHEN Chao^{2*} (1. Hunan Kelun Pharmaceutical Co., Ltd., Yueyang Hunan 414100; 2. Hunan Center for Drug Evaluation and Adverse Drug Reaction Monitoring, Changsha 410013)

Abstract: Objective To develop a method to make positive samples of package sealing integrity for soft bag products. **Methods** We simulated the sample leakage by connecting the resistance on the outer wall of soft bags to determine the leakage with high-voltage leak detection, and compared the results with those of traditional capillary method. **Results** The simulated resistance method could exclude the leakage bigger than $10 \mu\text{m}$ completely, while the traditional capillary method could only simulate at $30 \mu\text{m}$ pore size. The simulated electrical resistance method achieved higher detection sensitivity by replacing the positive samples. **Conclusion** The simulated electrical resistance method is sensitive, and the positive samples are recycled, which is more cost-effective.

Key words: package sealing integrity; leak detection by high voltage discharge; positive sample

注射剂的无菌性直接关系到患者的生命安全, 注射剂在其整个生命周期内必须符合无菌的要求并能通过无菌检查^[1-2], 药品包装密封完整性的保证是药品生命周期无菌安全的关键因素之一^[3-7], 随着管理和技术的不断发展, 中国接轨国际, 逐步地在完善该领域相关要求, 美国、欧盟、日本、澳大利亚、巴西、加拿大等国家和地区均颁布法律法规, 要求注射剂包装具有密封完整性^[8], 中国从 2020 年开始相继出台了相关技术要求、指南文件, 2022 年 7 月国家药典委员会发布了“关于征求《中国药典》药品包装系统密封性研究指导原则意见的通知”^[9], 药品包装系统密封性研究指导原则将纳入《中国药典》2025 年版,

相关的研究和控制要求将进一步提高。

《美国药典》总论章节《1207》包装完整性评价-无菌产品 (GENERAL CHAPTERS GENERAL INFORMATION < 1207 > PACKAGE INTEGRITY EVALUATION—STERILE PRODUCTS) 建议, 采用高压放电法检测密封完整性时需评估其在整个生命周期里对药品质量的影响^[10], 中国《化学药品注射液剂包装系统密封性研究技术指南 (试行)》文件中^[11], 对高压放电检漏法的设备验证、精度确认、日常测试等内容要求都较高, 都必须设置阳性对照。目前硬质包装的阳性样品的制作方法较为成熟, 而且具备较为贴切实际需求的高精度模拟泄漏孔径, 例如玻璃瓶使用激光打孔就可以得到精度较高的泄

作者简介: 蒋芙蓉, 女, 副主任药师, 主要从事药品质量控制与药物分析, email: jfr519@qq.com *通信作者: 陈超, 男, 主管药师, 主要从事药事管理与药物制剂研究, email: 392450017@qq.com

漏孔，而对软包装阳性样品而言，袋体本身设计模拟泄漏孔的方法不成熟，常规方法的优缺点见表 1。

表 1 阳性样品的制作方法优缺点

Tab 1 Advantages and disadvantages of positive sample preparation methods

序号	阳性样品	用途	优点	缺点
1	毛细管预埋	设备验证、精度确认、日常测试	孔径精度高具备代表性	一次性使用、耗材成本高、不便于保存
2	微滴管预埋	设备验证、精度确认、日常测试	孔径精度高具备代表性	一次性使用、耗材成本高、不便于保存
3	针直接穿刺	日常测试	制备速度快	一次性使用、药液较容易泄漏造成环境和设备的污染

目前用以进行确认的阳性样品为一次性使用，毛细管、微滴管的成本较高，而且容易堵塞、不易保存，药液的泄漏可能会造成环境的污染。因此开发一种可以重复使用、便于长期保存的阳性样品来持续优化生产控制、降低过程耗用显得尤为迫切。

1 材料

0.9% 氯化钠注射液、5% 葡萄糖注射液（湖南科伦制药有限公司）；电阻丝（维芯微电子科技有限公司）。

2 试验设计与样品制作

2.1 设计要求

基于目前常规阳性样品在实际使用中存在的弊端，替代阳性样品应满足以下几项基本要求：可重复使用、便于长期保存、无内容物泄漏等，

并且要与常规阳性样品具备等效的导电能力。

① 可重复使用：模拟的泄漏通道不会被堵塞，且能耐受测试过程反复的高压电击，模拟泄漏孔径不会随之发生改变，替代品的内容物不会随着使用增加而变化。② 便于长期保存：模拟的泄漏通道不会被堵塞，样品的性质（导电性能）不会随着存放时间的延长发生改变。③ 无内容物泄漏：替代阳性样品的内容物的物理形态较为稳定，不易流动或者碎裂、粉碎。④ 导电能力：具备与目标产品在密封不良状态下相当的导电性能，即电导率。⑤ 尺寸重量：替代样品尺寸应与产品基本相当，保证产品在设备运行状态与常规样品状态一致。

根据性能要求分析，考虑高压放电检漏的基本原理，拟订了三个方案，并对方案进行了可行性分析，具体见表 2。

表 2 方案可行性分析

Tab 2 Scheme feasibility analysis

方案	方案内容	方案可行性分析
1	① 在目标袋型中填充具备与目标产品（密封不良状态）下同等级导电能力的凝胶或者其他固态、半固态的导电物质；② 袋一侧的膜上，镶嵌金属丝，模拟泄漏通道，可选择金属材料铜，金属丝使用绝缘胶固定在膜材上，一侧漏出袋腔外，用以接触检测电极，袋腔内侧插入内容物质；③ 保持样品形态与常规阳性样品基本一致	① 样品结构相对较为简单；② 调配同等导电性能凝胶或者其他固态物质填充可操作性不强；③ 难以模拟 5、10、15、20 μm 孔径下的导电性能
2	① 在目标袋型中内置与目标产品（密封不良状态）电阻阻值基本相当的电阻元件；② 电阻元件一侧固定在袋腔内膜内壁上，另一侧通过金属丝穿过膜材，固定在膜材上，伸出袋腔外，用以接触检测电极；③ 填充具备导电能力的凝胶或者其他固态、半固态的导电物质，保持样品形态与常规阳性样品基本一致	① 调配同等导电性能凝胶或者其他固态物质可操作性不强，且会与电阻形成并联通路，大大降低阻值效果，影响实际效果；② 难点在于模拟 5、10、15、20 μm 孔径下的电阻计算；③ 整体与替代阳性样品使用要求符合度更高
3	① 在目标袋型中内置与目标产品（密封不良状态）电阻阻值基本相当的电阻元件；② 电阻元件一侧固定在袋腔内膜内壁上，另一侧通过金属丝穿过膜材，固定在膜材上，伸出袋腔外，用以接触检测电极；③ 填充不导电的凝胶或者其他固态、半固态的导电物质，保持样品形态与常规阳性样品基本一致	① 难点在于模拟 5、10、15、20 μm 孔径下的电阻计算；② 整体与替代阳性样品使用要求符合度更高

对比三个方案，方案 1 和方案 2 均需调配同等导电性能凝胶或者其他固态物质填充，可操作性不强，且方案 1 难以模拟不同孔径下的导电性；方案 2 会与电阻形成并联通路，大大降低阻值效果，影响实际效果；方案 3 避免了上述缺陷，且通过选用不同电阻可以模拟不同泄漏孔径，可操作性更强。综合分析，选择方案 3 为实施方案。

2.2 电阻率的理论计算

测得 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液两个品种电导率分别 11.40、14.22 μs·cm⁻¹。以 5% 葡萄糖注射液作为计算基础，核算阳性样品所需要的电阻元件的阻值大小。

不良品在电路中电阻包括三个部分：泄漏孔径处形成的电阻、溶液电阻、袋壁产生容抗形成的电阻，见图 1。

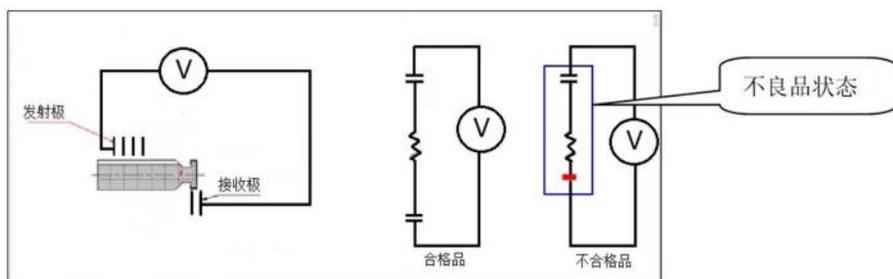


图 1 高压检漏原理图
Fig 1 Schematic diagram of high-pressure leak detection

以 5% 葡萄糖注射液电导率为 $14.22 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，泄漏孔径为 5、10、15、20 μm 计，常规阳性样品使用的毛细管长度 5 mm 作为计算依据，5、10、15、20 μm 孔径的电阻分别为 179 077.295、44 769.324、21 293.376、11 192.331 Ω 。

将软袋产品看作长方体，作为等效形状计算溶液电阻值，产品袋液腔厚度 0.02 m、宽 0.09 m、长 0.11 m，计算溶液电阻为 0.007 81 Ω 。溶液电阻较小，可以忽略不计。另一侧袋壁以完整状态接入，即为其实际电阻状态，暂不用考虑具体阻值。因此，电阻值可以只考虑泄漏孔径处形成的电阻即可。

2.3 样品制作

样品制作流程：① 制作焊盖空袋→② 电阻丝预埋（袋壁开口，一般不超过 10 mm，电阻元件一侧用胶带充分固定在内壁，另一侧伸出膜，使用专用胶固定电阻元件及开口，外侧固定接触金属片）→③ 绝缘胶填充（从胶塞处使用注射器向腔内填充绝缘胶，使得腔室厚度达到 20 mm 即可）。模拟图见图 2。

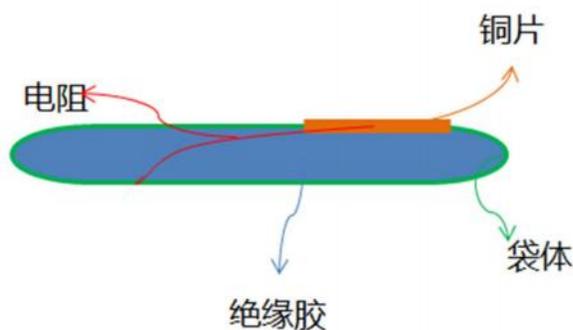


图 2 样品制作图示
Fig 2 Diagram of sample making

具体操作为：

- ① 根据被检测袋型，制作空袋，焊接组合盖。
- ② 根据溶液计算出的模拟电阻，选用同等阻值的电阻元件。
- ③ 在空袋一侧开不超过 10 mm 的开口，保

证另一侧袋壁的完整，将电阻元件放入袋腔内，采用强力胶带的方式固定在另一侧袋壁内侧，电阻元件另一侧伸出开口，在外侧与金属导电片（多采用铜片）相连，使用专用的密封胶固定电阻元件穿过膜材的电阻丝以及将 10 mm 的开口封闭，将已连接电阻元件的铜片固定在开口袋壁外侧，确保铜片覆盖的范围可接触不同检测部位的电极。从胶塞处使用注射器向腔内填充绝缘胶，使得腔室厚度达到 20 mm 即可。

④ 模拟点位的选择，熔封区域与非熔封区域交界处为泄漏高风险点，选取弱焊焊接、周边强封以及口管焊接的边界作为模拟点位设计区域，考虑检测区域可及性的代表性，选取四个点位（S1 ~ S4）作为模拟泄漏点位，具体见图 3。

⑤ 取既定阻值大小的电阻元件，按样品的制作流程制作替代阳性样品，每种阻值大小，每个点位制作 1 袋（共 4 袋）替代阳性样品；取 12 袋密封完整性良好的样品，作阴性对照；每袋阳性样品上机重复 12 次，每袋阴性对照只能上机 1 次；根据设备参数设定检查电压为 18 kV，泄漏电压为 2.6 V。

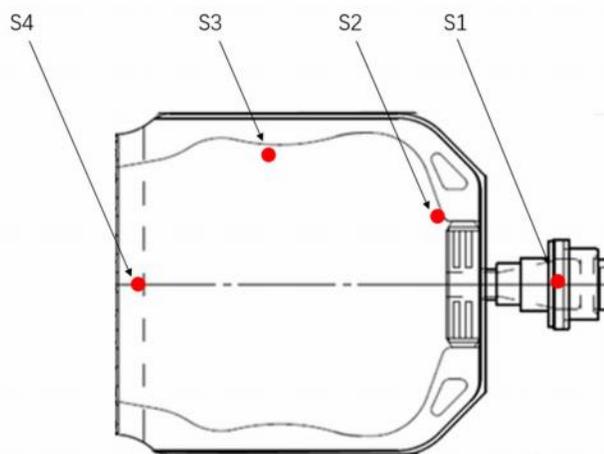


图 3 模拟泄漏点位图
Fig 3 Bitmap of simulated leak points

3 结果与讨论

记录上机测试的结果, 阴性对照全都未剔除, 阳性样品 5、10、15、20 μm 的剔除率分别为 45%、100%、100%、100%。结果表明, 采用该方法 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的泄漏能够 100% 剔除。使用毛细管制作阳性样品, 只能做到 30 μm 的孔径模拟, 替代阳性样品则可以模拟更小孔径电阻。

药品与包装导电性差异越大, 施加的电压越大, 药品与漏孔的距离越近, 方法的灵敏度就越高。本试验采用的替代阳性样品 5 μm 模拟孔径的样品无法 100% 被检出, $\geq 10 \mu\text{m}$ 模拟孔径的替代阳性样品能够有效被检出并被剔除, 依据检出效果, 选择 10 μm 模拟孔径的替代阳性样品, 可以实现与设备灵敏度基本类似效果。

注射剂的不同形态和组成对质量提取法检测结果的影响不同。Yoon 等^[12] 研究发现, 注射剂为固体粉末(甘露醇粉)时, 不会堵塞漏孔; 注射剂为液态时, 黏度对检测结果影响较小。当注射剂为液态的蛋白质类药物且浓度较低时, 漏孔不会堵塞; 当药物浓度增大时, 漏孔会被堵塞, 原因是大分子蛋白质类药物在漏孔附近聚集阻塞漏孔, 产生假阴性结果。替代阳性样品避免了当前阳性使用过程中容易堵塞不易保存, 药液的泄漏可能会造成环境的污染等问题, 也可减少毛细管、微滴管的耗用, 既节约了成本, 又保护了环境, 表明该方法能够完全替代传统的阳性样品制作方法。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 生物制品稳定性研究技术指导原则(试行)[Z]. 2015-04-15.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. 化学药物(原料药和制剂)稳定性研究技术指导原则[Z]. 2015-02-05.
- [3] 王静, 黄思嘉, 王妮, 等. 微生物挑战法测定注射剂药品包装容器密封完整性[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(7): 1213-1220.
- [4] 郭涤亮, 董武军, 马骏威, 等. 《美国药典》〈1207〉无菌药品包装系统密封性评估的介绍与解读[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(10): 880-885.
- [5] 陆维怡, 蔡荣. 国内外药品包装系统密封完整性研究与保障药品质量安全的思考[J]. 中国药事, 2021, 35(7): 828-834.
- [6] 杨蕙如, 王松, 赵海云, 等. 注射用阿莫西林钠克拉维酸钾包材密封完整性的研究和考察[J]. 药学研究, 2022, 41(10): 650-652, 677.
- [7] 陈江, 王俊苏, 关天横, 等. 注射剂包装密封完整性检测技术研究进展[J]. 中国药业, 2021, 30(2): 5-11.
- [8] Warnenw N, Mahlerhc HC. Challenges in Protein Product Development [M]. Basel: Springer International Publishing AG, 2018: 257-290.
- [9] 国家药典委员会. 关于征求《中国药典》药品包装系统密封性研究指导原则意见的通知[EB/OL]. [2022-7-11] (2024-5-6). <https://www.chp.org.cn/#/newsDetail?id=17162>.
- [10] GENERAL CHAPTERS GENERAL INFORMATION 〈1207〉 PACKAGE INTEGRITY EVALUATION—STERILE PRODUCTS [Z]. 2024.
- [11] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《化学药品注射剂包装系统密封性研究技术指南(试行)》和《化学药品注射剂生产所用的塑料组件系统相容性研究技术指南(试行)》的通告[EB/OL]. [2020-10-21] (2024-5-6). <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfo-Common/8a4f9f16844fbed617f8e8ed59485c1d>.
- [12] Yoon SY, Sagi H, Goldhammer C, et al. Mass extraction container closure integrity physical testing method development for parenteral container closure systems [J]. PDA J Pharm Sci and Tech, 2012, 66(5): 403-419

(收稿日期: 2024-04-03; 修回日期: 2024-07-17)

阿美替尼对比奥希替尼二线治疗 EGFR T790M 阳性的晚期非小细胞肺癌的成本 - 效用分析

任挺, 王琳宁, 常峰, 路云* (中国药科大学国际医药商学院, 南京 211198)

摘要: **目的** 从中国卫生体系的角度, 对于阿美替尼二线治疗 EGFR T790M 阳性的晚期非小细胞肺癌患者的经济性开展药物经济学评价, 为临床用药选择提供参考。**方法** 采用三状态分区生存模型, 采用成本效用分析, 生存数据来源于 APOLLO 和 AURA3 临床试验, 成本和效用等参数信息来自公开发表的文献, 对 EGFR T790M 阳性的晚期非小细胞肺癌患者使用阿美替尼和奥希替尼进行药物经济学评价, 并对结果进行敏感性分析。**结果** 在基础分析中, 阿美替尼相比奥希替尼可改善生存获益并增加成本, ICER 为 218 926.80 元/QALY。单因素敏感性分析表明, 阿美替尼和奥希替尼的成本对 ICER 的影响较大。概率敏感性分析显示, 阿美替尼方案随着 WTP 阈值的升高, 具有经济性的概率增加。**结论** 从中国卫生体系角度来看, 以 3 倍我国人均 GDP 为 WTP, 阿美替尼对比奥希替尼二线治疗 EGFR T790M 阳性的晚期 NSCLC 具有经济性, 并随着 WTP 阈值的提高, 经济性优势增加。

关键词: 非小细胞肺癌; 阿美替尼; 奥希替尼; 成本效用

中图分类号: R956, R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)12-3382-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.039

Cost-effectiveness of aumolertinib versus osimertinib as second-line regimen for EGFR T790M-positive patients with advanced non-small cell lung cancer

REN Ting, WANG Lin-ning, CHANG Feng, LU Yun* (*School of International Pharmaceutical Business, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*)

Abstract: Objective To evaluate the pharmacoeconomics of aumolertinib as a second-line regimen for EGFR T790M-positive patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) from the perspective of Chinese healthcare system, and to provide reference for clinical medication selection. **Methods** A three-state partitioned survival model was used in the cost-effectiveness analysis. Survival data were sourced from the APOLLO and AURA3 clinical trials, while parameter for cost and effectiveness were derived from published literatures. A pharmacoeconomic evaluation was performed for EGFR T790M-positive patients with advanced NSCLC treated with aumolertinib and osimertinib, respectively. The sensitivity of the results was analyzed. **Results** In the base-case analysis, aumolertinib improved survival benefits but increased the costs as compared with osimertinib, with an incremental cost-effectiveness ratio (ICER) of 218 926.80 Yuan per quality-adjusted life year (QALY). Univariate sensitivity analysis indicated that the costs of both aumolertinib and osimertinib greatly influenced the ICER. Probabilistic sensitivity analysis showed that the probability of aumolertinib being cost-effective increased as the willingness-to-pay (WTP) threshold rose. **Conclusion** From the perspective of the Chinese healthcare system, with a WTP threshold set at three times the per capita GDP of China, aumolertinib is economically viable as compared with osimertinib as second-line regimen for EGFR T790M-positive patients with advanced NSCLC. The economic advantage of aumolertinib over osimertinib increases with the WTP threshold.

Key words: non-small cell lung cancer; aumolertinib; osimertinib; cost-effectiveness

基金项目: 国家医疗保障局——药品国内外价格的对比分析 (No.7422200094-001)。

作者简介: 任挺, 男, 硕士, 主要从事药物经济学和医药卫生政策方面的研究, email: rtcpu@foxmail.com * 通信作者: 路云, 女, 教授, 主要从事药物经济学和医药卫生政策方面的研究, email: luyuncpu@163.com

肺癌已成为世界范围内致死率最高的肿瘤之一，中国肺癌的发病率和病死率居各种恶性肿瘤之首^[1]。肺癌中约 85% 为非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）^[2]，表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）突变在 NSCLC 基因突变患者中是较为常见的基因突变，在东亚人群中发生率为 30% ~ 40%^[3]。NSCLC 临床实践指南^[4]推荐使用 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitor, TKI）（如吉非替尼、厄洛替尼和阿法替尼等）一线治疗 EGFR 突变阳性 NSCLC。而在一线 EGFR-TKIs 治疗后疾病发生进展后，约 60% 来自 T790M 突变而导致耐药^[5]。《中国临床肿瘤学会（CSCO）非小细胞肺癌诊疗指南 2023》^[6]指南优先推荐第三代 EGFR-TKIs 作为 EGFR T790M 阳性的晚期 NSCLC 的二线治疗药物。阿美替尼是首个国产第三代 EGFR-TKIs，有效地延长了晚期 NSCLC 患者的寿命。一项 II 期针对中国人群的临床研究 APOLLO（NCT02981108）显示，阿美替尼的中位无进展生存期（progression-free survival, PFS）为 12.3 个月，中位生存期（overall survival, OS）为 22.9 个月（未成熟）^[7]。然而，目前缺少阿美替尼在中国二线治疗 EGFR T790M 阳性的晚期 NSCLC 患者的药物经济学评价研究，与其他治疗方案的经济性差异未知。最新研究显示，第三代 EGFR-TKIs 中奥希替尼在二线治疗中相比于常规化疗更有成本效益^[8]，且更符合临床应用。因此，本研究选取奥希替尼为参照药物，对阿美替尼进行成本效用分析，以期为国内二线治疗 EGFR T790M 阳性的晚期 NSCLC 患者的临床决策提供支撑参考，节省治疗支出成本，实现患者健康和利益最大化。

1 材料与方法

1.1 目标人群

本研究纳入的目标人群为既往经 EGFR-TKIs 治疗时或治疗后出现疾病进展（progressed disease, PD），并且经检测确认存在 EGFR T790M 阳性的局部晚期或转移性 NSCLC 患者。

1.2 治疗方案

本研究分为阿美替尼和奥希替尼两种治疗方案，给药周期与临床试验设定一致，为 21 d。阿美替尼组每日 110 mg，奥希替尼组每日 80 mg，两组均使用直至出现 PD 或不能耐受的毒性。两个给药方案在 PD 后停止使用当前治疗方案转入后线治疗，根据《中国临床肿瘤学会（CSCO）非小细胞肺癌诊疗指南 2023》^[6]指南和已发表的奥希替尼二线治疗的药物经济学研究^[8]，研

究假定疾病进展后的患者使用培美曲塞加顺铂（pemetrexed plus cisplatin, PC）化疗，持续 4 个周期。

1.3 模型结构

本研究基于中国卫生体系的角度，使用 Excel（2019）软件构建分区生存模型（见图 1）。模型包括 3 个健康状态：PFS、PD、死亡（Death）。模型假定所有患者进入时均处于 PFS 状态，模型运行到终止时患者处于死亡状态，根据阿美替尼和奥希替尼的给药周期，将模型循环周期设为 3 周，研究时限模拟为终身，即当 PFS 和 PD 状态中活着的总人数小于 1% 时，模型终止。

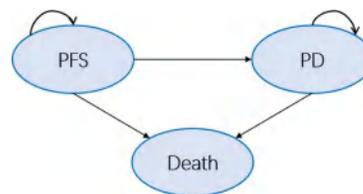


图 1 分区生存模型结构

Fig 1 Structure of partitioned survival model

1.4 生存分析

研究对阿美替尼和奥希替尼的基线人群在性别、是否吸烟、是否中枢性转移等基线特征进行两样本独立 Z 检验（适用于 $n > 30$ ），两组人群的基线特征具有一致性（ $P > 0.05$ ）。进而可以对两个非头对头临床试验的生存数据进行朴素的间接比较，检验结果见表 1。

表 1 阿美替尼组和奥希替尼组基线特征 Z 检验结果

Tab 1 Z-test for baseline characteristics between the aumolertinib group and the osimertinib group

基线特征	阿美替尼 (n = 244)	奥希替尼 (n = 279)	Z	P
女性比例 /%	58.20	61.65	- 0.804	0.421
有吸烟史比例 /%	27.05	32.26	- 1.299	0.194
存在中枢性转移比例 /%	36.07	33.33	0.655	0.512
外显子 19 突变比例 /%	63.53	68.46	- 1.190	0.234
外显子 21 突变比例 /%	34.84	29.75	1.243	0.214

阿美替尼和奥希替尼的 PFS 曲线和 OS 曲线分别来自 APOLLO^[7] 和 AURA3^[9-10] 研究。研究首先使用 Get data（2.26）软件提取生存曲线上的各时间点的生存率，在 R（4.2）软件中依据 Guyot 等^[11] 推导出的算法重构患者个体病例数据（individual patient data, IPD），然后使用 Stata 软件（17.0）进行生存分析，采用 6 种标准参数生存模型对得到的生存曲线（OS 和 PFS 曲线）进行长期拟合外推，包括 Exponential、Gompertz、Weibull、Log-logistic、Log-normal 和 Generalized Gamma 模型，依据赤池

信息准则 (Akaike information criterion, AIC) 和贝叶斯信息准则 (Bayesian information criterion, BIC) 并结合视觉检验选取最优拟合分布^[12]。本研究最终选择 Log-normal 和 Log-logistic 模型分别对阿美

替尼组的 PFS 曲线和 OS 曲线进行拟合外推, 使用 Log-logistic 模型对奥希替尼组的 PFS 曲线和 OS 曲线进行拟合外推。两组最优拟合曲线及其 AIC、BIC 值分别见表 2、3, 生存曲线拟合结果见图 2、3。

表 2 K-M 曲线拟合分布的 AIC、BIC 值
Tab 2 AIC and BIC values for the Kaplan-Meier curve fitting distribution

拟合优度	K-M 曲线	参数模型					
		Exponential	Weibull	Gompertz	Log-normal	Log-logistic	Generalized Gamma
AIC	阿美替尼 PFS 曲线	608.3255	589.8895	594.9722	589.7178	593.3484	589.8174
	阿美替尼 OS 曲线	437.5813	414.9327	417.9836	418.9695	415.7663	416.8874
	奥希替尼 PFS 曲线	597.825	577.3511	589.1287	572.6542	572.7896	573.948
	奥希替尼 OS 曲线	693.9388	667.084	678.6058	684.97	664.739	667.6267
BIC	阿美替尼 PFS 曲线	611.8226	596.8838	601.9665	596.7121	600.3428	600.3089
	阿美替尼 OS 曲线	441.0784	421.9271	424.9779	425.9638	422.7607	427.3789
	奥希替尼 PFS 曲线	601.4563	584.6135	596.3911	579.9166	580.0521	584.8417
	奥希替尼 OS 曲线	697.57	674.3464	685.8682	692.2324	672.0014	678.5203

表 3 生存曲线的最优拟合模型和分布参数
Tab 3 Optimal fitting model and distribution parameters in the survival curves

生存曲线	拟合模型	分布参数值
阿美替尼组 PFS	Log-normal	$\mu = 2.4145, \sigma = 0.9900$
阿美替尼组 OS	Log-logistic	$\lambda = 3.3476, \gamma = 0.5535$
奥希替尼组 PFS	Log-logistic	$\lambda = 2.2716, \gamma = 0.5619$
奥希替尼组 OS	Log-logistic	$\lambda = 3.2884, \gamma = 0.5389$

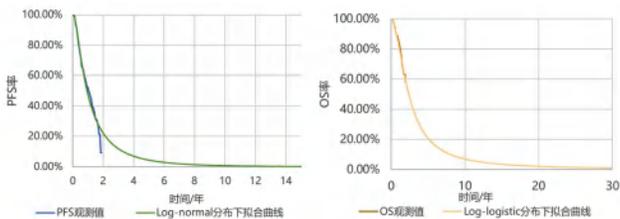


图 2 阿美替尼组 PFS 和 OS 原始生存曲线及最优拟合曲线
Fig 2 PFS and OS raw survival curves and best-fit curves of the aumolertinib group

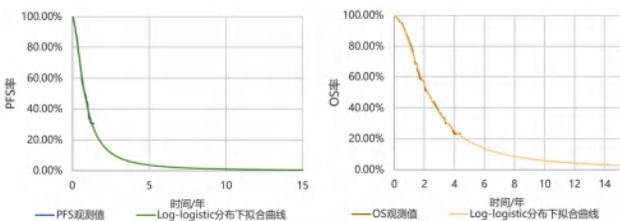


图 3 奥希替尼组 PFS 和 OS 原始生存曲线及最优拟合曲线
Fig 3 PFS and OS raw survival curves and best-fit curves for the osimertinib group

1.5 成本和效用参数

本研究选取中国卫生体系为研究角度, 考虑了直接医疗成本, 包括阿美替尼和奥希替尼的药品成本、PD 后化疗治疗成本、常规随访成本、严重不良反应的治疗成本和临床姑息治疗成本。阿美替尼和奥希替尼采用米内网 (<https://www.menet.com>。

cn/) 最新的国家医保谈判准入价格, 培美曲塞 ($500 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$) 和顺铂 ($75 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$) 双药化疗的价格采用最新的集采中选价格, 依据人体平均表面积^[13] 计算用量, 并在成本的计算中考虑了药品浪费^[14]。常规随访包括两周期一次的门诊、血常规、血生化、尿常规、心电图、胸腹部 CT 扫描、血清肌酸激酶测定和脑部 MRI^[15-17], 成本来源于医疗保障局公布的医疗服务价格项目; 严重不良反应的选取依据阿美替尼和奥希替尼临床试验中记录的 ≥ 3 级且发生率 $\geq 1\%$ 的需要治疗的不良反应^[18-19]。严重不良反应和临终姑息治疗成本来自现有文献^[20-21]。使用质量调整生命年 (quality-adjusted life year, QALY) 作为健康产出的指标。效用值参数来源于 Nafees 等^[22] (2017) 的一项研究, PFS 和 OS 状态的效用值分别是 0.804、0.321。本研究同时考虑了严重不良反应导致的效用值降低, 数据来源于文献^[22-23]。根据《中国药物经济学评价指南 2020》的建议, 研究采用 5% 的贴现率对成本和健康产出进行贴现, 同时对成本和健康产出应用了半周期校正^[24]。输入模型的成本、不良反应发生率和效用参数及分布情况详见表 4。

1.6 基础分析和敏感性分析

研究通过比较阿美替尼与奥希替尼的增量成本效果比 (incremental cost-effectiveness ratio, ICER) 与意愿支付值 (willingness-to-pay, WTP) 以判断用药方案的经济性, 采用 2023 年中国 1~3 倍人均 GDP 作为 WTP ($89\,358 \sim 268\,074 \text{ 元/QALY}$)^[25], 分析不同 WTP 阈值下阿美替尼的经济性。

采用敏感性分析方法对模型参数进行不确定性

表 4 模型基本参数情况

Tab 4 Basic parameters of the model

参数描述	基础值	上下限	分布	来源
成本 / 元				
奥希替尼单价 (80 mg)	165.54	140.71 ~ 190.37	Gamma	a
阿美替尼单价 (55 mg)	100.80	85.68 ~ 115.92	Gamma	a
培美曲塞单价 (500 mg)	2735.83	2462.25 ~ 3009.41	Gamma	a
顺铂单价 (50 mg)	76	68.4 ~ 83.6	Gamma	a
疲劳 / 衰弱治疗成本	943.38	801.87 ~ 1084.88	Gamma	[20]
腹泻治疗成本	42.56	36.17 ~ 48.94	Gamma	[20]
中性粒细胞减少治疗成本	3780.61	3213.51 ~ 4347.70	Gamma	[20]
贫血治疗成本	4355.14	3701.87 ~ 5008.42	Gamma	[20]
常规随访成本	652.81	587.53 ~ 718.09	Gamma	b
临终姑息治疗成本	15 279.80	5936.05 ~ 40809.19	Gamma	[21]
不良反应发生率 /%				
阿美替尼致贫血	1.64		Beta	[7]
奥希替尼致腹泻	1.08		Beta	[9]
奥希替尼致疲劳 / 衰弱	1.08		Beta	[9]
奥希替尼致中性粒细胞减少	1.43		Beta	[9]
奥希替尼致贫血	0.72		Beta	[9]
效用值				
PFS 状态效用值	0.804	0.683 ~ 0.925	Beta	[22]
PD 状态效用值	0.321	0.273 ~ 0.369	Beta	[22]
腹泻负效用	- 0.070	- 0.060 ~ - 0.081	Beta	[22]
疲劳负效用	- 0.070	- 0.060 ~ - 0.081	Beta	[22]
虚弱负效用	- 0.070	- 0.060 ~ - 0.081	Beta	[22]
中性粒细胞减少症负效用	- 0.200	- 0.170 ~ - 0.230	Beta	[22]
贫血负效用	- 0.090	- 0.077 ~ - 0.104	Beta	[23]
其他				
贴现率 /%	0.05	0.045 ~ 0.08	Uniform	[24]
人体平均表面积 /m ²	1.67	1.34 ~ 2.004	Normal	[13]

注 (Note): a. 米内网数据库 (Menet database); b. 医疗保障局医疗服务价格项目 (medical service price items of the Medical Security Administration)。

分析, 包括单因素敏感性分析和概率性敏感性分析。单因素敏感性分析中参数变动范围以原始研究的参数估计值的 95% 置信区间, 若无来源, 则设置参数上下浮动 10% 作为取值区间。通过龙卷风图呈现各参数对研究结果的影响程度。概率性敏感性分析采用蒙特卡罗模拟对成本参数和效用参数进行 1000 次重复抽样。其中, 成本参数采用 Gamma 分布, 效用值采用 Beta 分布^[26]。通过成本效用散点图和成本效用可接受曲线呈现多次模拟下模型结果的分布情况。

2 结果

2.1 基础分析结果

分区生存模型的基础分析结果 (见表 5) 显示, 阿美替尼组质量调整生命年比奥希替尼组高 0.13 QALYs, 阿美替尼组的总成本比奥希替尼组高 28 399.82 元, ICER 为 218 926.80 元 /QALY, 当 WTP 在 1 倍人均 GDP (89 358 元 /QALY) 时, 阿美替

尼二线治疗方案相比奥希替尼二线治疗方案不具有经济性, 当 WTP 在 3 倍人均 GDP (268 074 元 /QALY) 时, 阿美替尼治疗方案更具有经济性。

表 5 成本效用基础分析结果

Tab 5 Basic results for cost-utility analysis

治疗方案	总成本 / 元	增量成本 / 元	效用 / QALYs	增量效用 / QALYs	ICER / (元 / QALY)
阿美替尼	136 285.17	28 399.82	1.69	0.13	218 926.80
奥希替尼	107 885.35	-	1.56	-	-

2.2 敏感性分析结果

单因素敏感性分析结果的龙卷风图表明, 阿美替尼单价、奥希替尼单价、PFS 状态的生命质量、年贴现率和临终姑息治疗的成本是对结果产生影响的主要因素, 其他参数对于结果的影响较小 (见图 4)。概率敏感性分析结果表明, 阿美替尼相比奥希替尼可以产生更多的健康收益和成本, 其具有经济

性的概率随着 WTP 的增加而增加，当 WTP 超过 360 000 元/QALY 时，阿美替尼方案相比奥希替尼方案具有经济性的概率达到 100% (见图 5 及图 6)。

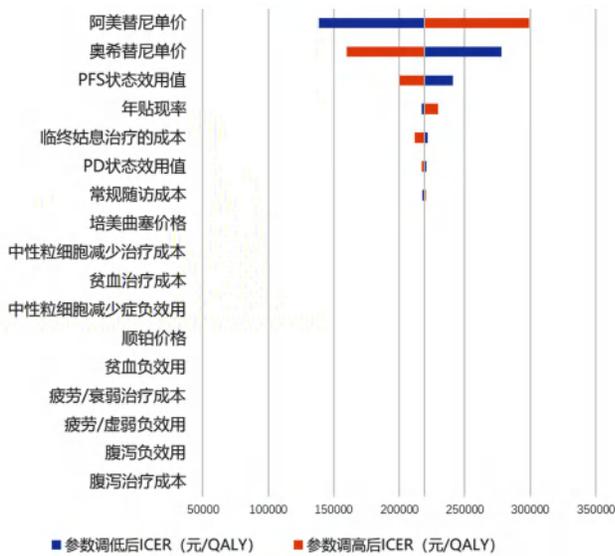


图 4 单因素敏感性分析的龙卷风图

Fig 4 Tornado diagram of one-way sensitivity analysis

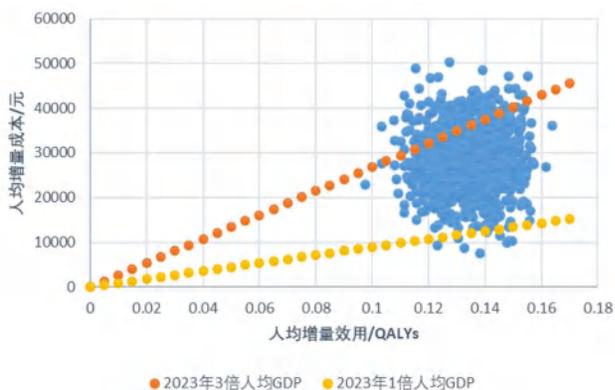


图 5 阿美替尼对于奥希替尼在意向治疗人群中的成本效用散点图

Fig 5 Cost-effectiveness scatter plot of aumolertinib versus osimertinib in population with treatment intention

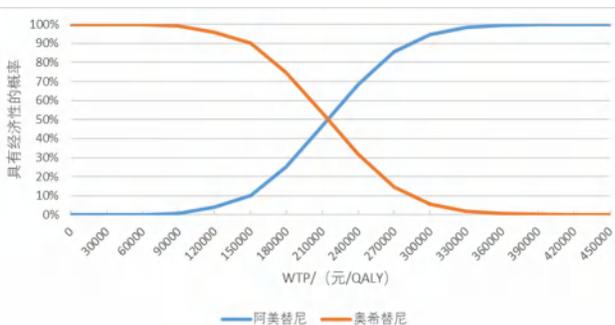


图 6 阿美替尼和奥希替尼在意向治疗人群中的成本效用可接受性曲线

Fig 6 Cost-effectiveness acceptability curves for the aumolertinib and osimertinib in population with treatment intention

3 讨论

目前，国内多款三代 EGFR-TKIs (阿美替尼、奥希替尼和伏美替尼) 被指南纳入推荐用于二线

治疗 EGFR T790M 阳性的晚期 NSCLC 患者，且最新研究表明阿美替尼和奥希替尼均可有效提高患者的生存时间^[27-28]，但是目前缺少三代 EGFR-TKIs 之间的经济性比较研究，临床医师及患者缺少基于药物经济学视角的证据来判断更经济的用药选择。因此，同代药物之间的经济性评估尤为重要。2020 年 12 月阿美替尼二线治疗 EGFR T790M 阳性的晚期 NSCLC 适应证经医保谈判首度进入医保目录，2022 年医保谈判进一步续约，用药可及性得到进一步提升，本研究通过探究了阿美替尼对比奥希替尼二线治疗 EGFR T790M 阳性的晚期 NSCLC 的经济性，填补了现有靶向药物治疗的经济性对比研究空白。基础分析和敏感性分析结果均显示，尽管阿美替尼相比于奥希替尼的治疗成本更高，但是健康获益 (QALYs) 更多，ICER 在 1~3 倍 2023 年我国人均 GDP 的 WTP 之间，并随着 WTP 阈值的提高，阿美替尼方案的经济性优势增加。阿美替尼和奥希替尼的价格变化对研究结果影响较大，目前多地区的惠民保将阿美替尼和奥希替尼纳入其特药目录，并在原有医保报销的基础上对特药进行二次报销，大幅减轻了有特药需求的参保人负担，如果通过惠民保的二次报销，将 ICER 值降至可接受的范围之内，将进一步提高阿美替尼的经济性。

然而，本研究也具有局限性：

① 分区生存模型是基于临床试验公布的生存曲线进行模拟外推研究，需要尽可能完整的生存数据，而目前公开发表的 APOLLO 研究中阿美替尼的中位生存时间未达到，生存曲线不成熟，对阿美替尼的 OS 曲线的拟合外推造成了影响，非头对头临床试验的生存数据比较的偏倚对经济性评价证据质量有一定的影响，需要更多的临床研究支持。

② 当使用靶向药物疾病进展后，指南^[6]推荐使用含铂双药化疗，不同患者根据个体特征情况选择不同的后续治疗方案，由于无法获取真实的后续治疗方案，本研究结合既往药物经济学研究，选择培美曲塞联合顺铂双药化疗作为最终治疗方案，并对其进行单因素敏感性分析检验，发现化疗的药品成本波动对最终的 ICER 值的变动不会影响其经济性结果判断，因此本研究结论仍具有可信性。

参考文献

[1] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解

- 读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
- [2] Wakelee H, Kelly K, Edelman MJ. 50 Years of progress in the systemic therapy of non-small cell lung cancer [J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014. DOI: 10.14694/Ed-Book_AM.2014.34.177.
- [3] 邵岚, 张沂平. 奥希替尼治疗晚期非小细胞肺癌的疗效及影响因素[J]. 中国新药与临床杂志, 2020, 39(3): 155-161.
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 原发性肺癌诊疗指南(2022年版)[J]. 中国合理用药探索, 2022, 19(9): 1-28.
- [5] Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(6): 1616-1622.
- [6] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)非小细胞肺癌诊疗指南 2023 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2023: 84-86.
- [7] Lu S, Wang Q, Zhang GJ, et al. Efficacy of aumolertinib (HS-10296) in patients with advanced EGFR T790M + NSCLC: updated post-national medical products administration approval results from the APOLLO registrational trial [J]. J Thorac Oncol, 2022, 17(3): 411-422.
- [8] Shi Y, Pei R, Liu S. Osimertinib versus platinum-pemetrexed in patients with previously treated EGFR T790M advanced non-small cell lung cancer: an updated AURA3 trial-based cost-effectiveness analysis [J]. Front Oncol, 2022, 12: 833773.
- [9] Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer [J]. N Engl J Med, 2017, 376(7): 629-640.
- [10] Papadimitrakopoulou VA, Mok TS, Han JY, et al. Osimertinib versus platinum-pemetrexed for patients with EGFR T790M advanced NSCLC and progression on a prior EGFR-tyrosine kinase inhibitor: AURA3 overall survival analysis [J]. Ann Oncol, 2020, 31(11): 1536-1544.
- [11] Guyot P, Ades AE, Ouwens MJ, et al. Enhanced secondary analysis of survival data: reconstructing the data from published Kaplan-Meier survival curves [J]. BMC Med Res Methodol, 2012, 12: 9.
- [12] Nicholas L. Nice DSU technical support document 14: survival analysis for economic evaluations alongside clinical trials: extrapolation with patient-level data [EB/OL]. (2023-3) [2024-2-25]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK395885/pdf/Bookshelf_NBK395885.pdf.
- [13] Wu YL, Tong RZ, Zhang Y, et al. Conventional real-time PCR-based detection of T790M using tumor tissue or blood in patients with EGFR TKI-resistant NSCLC [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 3307-3312.
- [14] 张森, 贾才凤, 徐浩, 等. 优替德隆联合卡培他滨二线治疗转移性乳腺癌的药物经济学评价[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2732-2737.
- [15] 郑冬妮, 周后凤, 郑寒蕊. 纳武利尤单抗治疗含铂方案化疗失败且PD-L1%的非小细胞肺癌的经济学评价[J]. 中南药学, 2021, 19(1): 153-157.
- [16] 孙蕾, 周大创, 陈平钰, 等. 恩沙替尼一线治疗间变性淋巴瘤激酶阳性晚期非小细胞肺癌的药物经济学评价[J]. 中国药房, 2022, 33(12): 1479-1484.
- [17] Wu B, Ye M, Chen HF, et al. Costs of trastuzumab in combination with chemotherapy for HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer: an economic evaluation in the Chinese context [J]. Clin Ther, 2012, 34(2): 468-479.
- [18] Li WQ, Qian L, Li W, et al. Cost-effectiveness analysis of different sequences of osimertinib administration for epidermal growth factor receptor-mutated non-small-cell lung cancer [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(4): 343.
- [19] Wu B, Gu XH, Zhang Q. Cost-effectiveness of osimertinib for EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer after progression following first-line EGFR TKI therapy [J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(2): 184-193.
- [20] Guan HJ, Liu G, Xie F, et al. Cost-effectiveness of osimertinib as a second-line treatment in patients with egfr-mutated advanced non-small cell lung cancer in China [J]. Clin Ther, 2019, 41(11): 2308-2320.
- [21] Lu S, Zhang J, Ye M, et al. Economic analysis of ALK testing and crizotinib therapy for advanced non-small-cell lung cancer [J]. Pharmacogenomics, 2016, 17(9): 985-994.
- [22] Nafees B, Lloyd AJ, Dewilde S, et al. Health state utilities in non-small cell lung cancer: an international study [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2017, 13(5): e195-e203.
- [23] Beusterien KM, Davies J, Leach M, et al. Population preference values for treatment outcomes in chronic lymphocytic leukaemia: a cross-sectional utility study [J]. Health Qual Life Outcomes, 2010, 8: 50.
- [24] 刘国恩. 中国药物经济学评价指南(2020) [M]. 北京: 中国市场出版社, 2020: 27-46.
- [25] 国家统计局. 国家数据 [EB/OL]. (2024-02-25). <https://data.stats.gov.cn/>.
- [26] 姚嘉奇, 管欣, 张瑶, 等. 药物经济学概率敏感性分析中关联参数的处理与实践探讨 [J]. 中国药物评价, 2019, 36(2): 150-155.
- [27] 黄珺霞. 阿美替尼治疗晚期肺癌患者的临床疗效观察 [D]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- [28] 浦柳美, 黄国兰, 潘天宇, 等. 甲磺酸奥希替尼治疗晚期非小细胞肺癌的效果及预后相关因素分析 [J]. 中南医学科学杂志, 2023, 51(3): 376-379.

(收稿日期: 2024-04-21; 修回日期: 2024-05-09)

带量采购对某院口服降糖药原研药和仿制药使用的影响及思考

张慧明, 戴立波* (内蒙古自治区人民医院药学处, 呼和浩特 010017)

摘要: **目的** 研究带量采购政策对某院口服降糖药原研药和仿制药使用情况的影响, 并探讨由此带来的启示和思考。**方法** 利用 Excel 软件对某院口服降糖药的单价、用药频度 (DDDs)、限定日费用 (DDC)、仿制药替代率及实际节省费用等数据进行分析。**结果** 带量采购政策实施后, 原研药和仿制药价格都产生了联动下降, 其中中选品种阿卡波糖片原研药价格降幅达到 91.39%; 原研药用药频度下降了 8.23%, 使用金额下降了 85.81%; 仿制药用药频度增加了 825.14%, 而使用金额却下降了 5.02%; 仿制药替代率由 2.07% 上升至 82.61%。总实际节省费用高达 443.67 万元。**结论** 带量采购政策实施后, 不仅降低了药品费用, 一定程度上减轻了患者的经济负担, 还极大地促进了口服降糖药仿制药替代原研药的进展。

关键词: 带量采购; 口服降糖药; 原研药; 仿制药

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3388-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.040

Impact of volume-based procurement on the use of original and generic oral hypoglycemic drugs in a hospital

ZHANG Hui-ming, DAI Li-bo* (Department of Pharmaceutical Section, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017)

Abstract: Objective To determine the influence of volume-based procurement on the use of original and generic oral hypoglycemic drugs in a hospital, and reflect on the influence. **Methods** Excel software was used to summarize the drug price, defined daily dose (DDDs), defined daily cost (DDC), substitution rate and cost saving of oral hypoglycemic drugs in a hospital. **Results** After the implementation of volume-based procurement, the prices of both original and generic drugs fell. Among them, the unit price of original acarbose decreased 91.39%. The DDDs of original drugs decreased by 8.23%, and the total cost decreased by 85.81%. The DDDs of generic drugs increased by 825.14%, while the total cost decreased by 5.02%. The substitution rate of generic drugs increased from 2.07% to 82.61%, the total cost savings reaching 4.44 million. **Conclusion** The implementation of volume-based procurement not only reduces the cost of drugs and alleviates the economic burden of patients, but also greatly promotes the replacement of original drugs with generic oral hypoglycemic drugs.

Key words: volume-based procurement; oral hypoglycemic drug; original drug; generic drug

新发布的《2021 IDF 全球糖尿病地图 (第 10 版)》显示, 十年间我国糖尿病患者数由 9000 万增至 1.4 亿, 增幅高达 56%^[1], 其中 2 型糖尿病在糖尿病总人数中占比超过 90%, 而该类患者维持稳定血糖水平的主要手段为口服降糖药^[2]。糖尿病不仅发病率高, 而且作为一种慢性病, 患者

需终身规范服用药物, 这些问题给糖尿病患者个人和社会经济都带来了巨大的负担。

为进一步调整药品价格机制, 从根本上解决药品费用高及用药负担重等问题, 2018 年 11 月, 《4 + 7 城市药品集中采购文件》首次发布 (后简称“集采”)^[3], 并于 11 个城市进行试点, 文件规定带

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目 (No.2021MS08164); 公立医院科研联合基金科技项目 (No.2023GLLH0071)。

作者简介: 张慧明, 女, 药师, 主要从事医院药学研究, email: 18852850576@163.com * 通信作者: 戴立波, 女, 副主任药师, 主要从事体内药物分析与药物代谢动力学研究, email: daili-bo0926@163.com

量采购品种若为仿制药, 则需通过药品质量一致性评价标准, 以带量为核心, 实现仿制药高质量发展以及集采政策降价提质的预期。2019 年 9 月, 国家医保局等部门制定的《联盟地区药品集中采购文件》明确开展跨区域联盟药品集中带量采购, 内蒙古自治区正式成为试点扩大区域之一^[4]。内蒙古自治区人民医院为一所综合型三级甲等医院, 糖尿病患者就诊人数多, 口服降糖药消耗量大, 集采后许多口服降糖药仿制药中选并在我院供应, 弥补了之前基本仅有原研药供应的不足, 提供了更多的用药选择。本研究通过信息采集系统, 以口服降糖药为研究对象, 分析讨论集采政策实施后仿制药对非集采原研药的替代情况, 为后续口服降糖药的使用以及政策的优化提供借鉴。

1 资料与方法

1.1 资料来源

因第 1 批带量采购中选药品中不含有口服降糖药, 所以通过我院信息系统 (HIS) 提取第 2 批至第 5 批带量采购涉及的口服降糖药名称、单价、厂家、规格、使用数量及使用金额等数据, 且均收集各批次执行前后一年的数据进行分析。各批次带量采购落地时间: 第 2 批 (2020 年 4 月 28 日); 第 3 批 (2020 年 11 月 17 日); 第 4 批 (2021 年 6 月 1 日); 第 5 批 (2021 年 10 月 28 日)。共收集 7 个品种, 17 个品规, 包括 1 种 α -糖苷酶抑制剂 (阿卡波糖片)、1 种磺脲类胰岛素促泌剂 (格列美脲片)、2 种胰岛素增敏剂 (盐酸二甲双胍缓释片、盐酸二甲双胍片)、1 种钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂 (卡格列净片)、1 种非磺脲类胰岛素促泌剂 (瑞格列奈片)、1 种二肽基肽酶抑制剂 (沙格列汀片)。因新型冠状病毒感染疫情的影响, 医院门诊和住院患者均减少, 可能在一定程度上影响了口服降糖药的正常使用数量。

1.2 统计分析方法

利用药物限定日剂量 (DDD) 法计算得到每个药物的用药频度 (DDDs) 以及限定日费用 (DDC), DDD 值根据世界卫生组织官方网站, 《新编药理学》第 17 版^[5] 以及药品说明书确定。DDDs = 某药品的消耗总剂量 / 该药 DDD 值, 反映了药物的使用频率, 该值越小说明选择该药的可能性越低; DDC = 某药品的使用总金额 / 该药 DDDs 值, 其被作为评价药物经济性的指标, 该值越大表示患者的经济负担越重, 该药的经济性越差。仿制药替代率 (%) = 仿制药消耗总量 / 该药消耗总量 $\times 100\%$, 是用来反映仿制药替代情况的

重要指标。实际节省费用 = (带量采购前 DDC - 带量采购后 DDC) \times 带量采购后 DDDs^[6]。

药品的可负担性是通过世界卫生组织 / 国际健康行动机构 (WHO/HAI) 标准调查法来评价的^[7], 其含义是指根据标准诊疗指南推荐的日剂量, 在一定疗程内治疗某一疾病所花费的药品总费用与政府部门非技术类工作人员的最低日薪标准的比值^[8-9]。据内蒙古自治区人力资源和社会保障厅发布《内蒙古自治区人民政府办公厅关于调整自治区最低工资标准及非全日制工作小时最低工资标准的通知》(内政办发[2021]69号), 最低工资标准为 1850 元/月, 即 $61.67 \text{元} \cdot \text{d}^{-1}$ 。WHO 标准治疗指南推荐慢性病用药天数为 30 d。因此, 本研究中可负担系数 = 30 d 花费的药品总费用 / 呼和浩特市最低日薪。当一个治疗期内药品费用低于一倍最低日薪, 即可负担系数小于 1 时, 提示该药品可负担性良好。

2 结果

2.1 集采前后口服降糖药单价变化情况

以第 2 批至第 5 批集采政策在我院的落实时间为界限, 将该院口服降糖药的单价变化情况进行比较。带量采购中标品种中, 阿卡波糖片 (50 mg \times 30 片/盒, 拜耳医药) 单价降幅最高, 达 91.39%, 1 mg 格列美脲片的单价仅为 0.05 元, 盐酸二甲双胍缓释片及盐酸二甲双胍片价格仅为 0.075 元/片和 0.03 元/片, 药物经济性极佳。其他未中标药品的价格也呈现不同程度的下降 (见表 1)。

2.2 集采前后口服降糖药原研药和仿制药 DDDs 及使用金额的变化

集采后原研药和仿制药使用量及使用金额的变化分别见表 2 及表 3。表 2 反映出在带量采购政策执行后, 除阿卡波糖片 (50 mg \times 30 片/盒, 拜耳医药) 因作为原研药纳入集采范围之外, 其余原研药的 DDDs 值大幅下降, 平均降幅高达 95.40%, 大部分仿制药的 DDDs 值显著升高。表 3 提示集采后原研药使用金额均呈不同程度下降, 平均降幅为 92.79%。因卡格列净片仿制药成功替代原研药, 所以其 DDDs 和使用金额都直线上升。结合表 2 及表 3, 集采后仿制药 DDDs 上升 825.14%, 使用金额反而下降 5.02%, 阿卡波糖片原研药用药频度上升 189.31%, 金额却下降 74.56%。仿制药替代率也由之前的 2.07% 上升至 82.61%。

2.3 集采前后口服降糖药 DDDs 和使用金额在同种药品中的占比情况

集采前因我院大部分口服降糖药只有原研药

表 1 口服降糖药在带量采购执行前后的价格变化

Tab 1 Price changes in the oral hypoglycemic drugs before and after the implementation of volume-based procurement

药品名称	品规	生产厂家	集采前价格/(元/片)	集采后价格/(元/片)	单价降幅/%
阿卡波糖片	50 mg×30 片/盒	拜耳医药*	2.09	0.18	91.39
	50 mg×30 片/盒	杭州中美华东制药	1.43	0.64	55.24
格列美脲片	2 mg×15 片/盒	赛诺菲	4.51	3.29	27.05
	1 mg×30 片/盒	山东新华制药*	—	0.05	—
	2 mg×30 片/盒	山东新华制药*	—	0.09	—
盐酸二甲双胍缓释片	0.5 g×30 片/盒	北京万辉双鹤药业*	—	0.075	—
	0.5 g×30 片/盒	默克	1.51	1.05	30.46
盐酸二甲双胍片	0.25 g×100 片/盒	北京京丰制药*	—	0.03	—
	500 mg×20 片/盒	中美上海施贵宝	1.16	0.96	17.24
卡格列净片	0.1 g×30 片/盒	正大天晴药业*	—	1.77	—
	100 mg×10 片/盒	杨森制药	9.60	4.08	57.50
	100 mg×14 片/盒	江苏豪森药业	3.78	停用	—
瑞格列奈片	1 mg×30 片/盒	北京福元医药*	—	0.24	—
	1 mg×60 片/盒	江苏豪森药业	1.00	0.82	18.00
	2 mg×30 片/盒	诺和诺德	2.38	2.21	7.14
沙格列汀片	5 mg×7 片/盒	百时美施贵宝	8.65	8.63	0.23
	5 mg×30 片/盒	齐鲁制药*	—	1.66	—

注：*为国家带量采购品种，—代表无法计算。

Note: *Refers to the variety selected in the “4 + 7” volume-based procurement, — refers to cannot be calculate.

表 2 原研药和仿制药在带量采购执行前后的 DDDs 变化情况

Tab 2 DDDs of the original drugs and generic drugs before and after the implementation of volume-based procurement

药品名称	原研药			仿制药			仿制药替代率/%	
	执行前 DDDs	执行后 DDDs	变化幅度/%	执行前 DDDs	执行后 DDDs	变化幅度/%	执行前	执行后
阿卡波糖片	86 529	250 338	189.31	18 596	196	— 98.95	17.69	0.08
格列美脲片	48 155	2628	— 94.54	0	59 521	—	0	95.77
盐酸二甲双胍缓释片	41 213	38	— 99.91	0	27 708	—	0	99.86
盐酸二甲双胍片	78 795	943	— 98.8	0	151 568	—	0	99.38
卡格列净片	4745	0	— 100.00	70	36 841	52 530.07	1.45	100.00
瑞格列奈片	17 735	2122	— 88.03	13 355	16 054	20.21	42.96	88.32
沙格列汀片	2047	182	— 91.11	0	4350	—	0	95.98
合计	279 219	256 251	— 8.23	32 021	296 238	825.14	2.07	82.61

表 3 原研药和仿制药在带量采购执行前后使用金额变化情况

Tab 3 Changes in total cost of original drugs and generic drugs before and after the implementation of volume-based procurement

药品名称	原研药			仿制药		
	执行前/元	执行后/元	变化幅度/%	执行前/元	执行后/元	变化幅度/%
阿卡波糖片	1 083 344	275 587	— 74.56	159 811	752	— 99.53
格列美脲片	217 148	8633	— 96.02	0	5486	—
盐酸二甲双胍缓释片	248 434	158	— 99.94	0	8312	—
盐酸二甲双胍片	364 503	3612	— 99.01	0	35 649	—
卡格列净片	91 104	0	— 100.00	529	130 232	24 509.22
瑞格列奈片	84 336	9372	— 88.89	53 420	15 369	— 71.23
沙格列汀片	17 711	1571	— 91.13	0	7223	—
合计	2 106 580	298 933	— 85.81	213 760	203 023	— 5.02

可供选择，所以格列美脲片、盐酸二甲双胍缓释片、盐酸二甲双胍片和沙格列汀片原研药的 DDDs 和使用金额占比均为 100%。集采后我院

口服降糖药中选品种 DDDs 占同种药品的比率在 88.32% ~ 100.00%，其中格列美脲片（2 mg×30 片/盒，山东新华制药）DDDs 占同种药品比率为

90.78%，而使用金额仅占同种药品的 36.50%，但格列美脲片原研药虽然 DDDs 占同种药品百分比仅为 4.23%，使用金额占比却在 50% 以上；卡格列净片（0.1 g×30 片/盒，正大天晴药业）完全替代其他非中选药物，所以其 DDDs 和使用金额占同种药品比率均为 100%（见表 4）。

表 4 中标品种和非中标品种在带量采购执行前后的 DDDs 和使用金额比较

Tab 4 DDDs and total cost of the selected and non-selected drugs before and after the implementation of the volume-based procurement

药品名称	品规	生产厂家	执行前		执行后	
			DDD _s 占同种药品百分比 /%	使用金额占同种药品总金额百分比 /%	DDD _s 占同种药品百分比 /%	使用金额占同种药品总金额百分比 /%
阿卡波糖片	50 mg×30 片 / 盒	拜耳医药*	82.31	87.14	99.92	99.73
	50 mg×30 片 / 盒	杭州中美华东制药	17.69	12.86	0.08	0.27
格列美脲片	2 mg×15 片 / 盒	赛诺菲	100.00	100.00	4.23	61.15
	1 mg×30 片 / 盒	山东新华制药*	—	—	4.99	2.35
	2 mg×30 片 / 盒	山东新华制药*	—	—	90.78	36.50
盐酸二甲双胍缓释片	0.5 g×30 片 / 盒	北京万辉双鹤药业*	—	—	99.86	98.13
	0.5 g×30 片 / 盒	默克	100.00	100.00	0.14	1.87
盐酸二甲双胍片	0.25 g×100 片 / 盒	北京京丰制药*	—	—	99.38	90.80
	500 mg×20 片 / 盒	中美上海施贵宝	100.00	100.00	0.62	9.20
卡格列净片	0.1 g×30 片 / 盒	正大天晴药业*	—	—	100.00	100.00
	100 mg×10 片 / 盒	杨森制药	98.55	99.42	—	—
	100 mg×14 片 / 盒	江苏豪森药业	1.45	0.58	—	—
瑞格列奈片	1 mg×30 片 / 盒	北京福元医药*	—	—	88.32	62.12
	1 mg×60 片 / 盒	江苏豪森药业	42.96	38.78	—	—
	2 mg×30 片 / 盒	诺和诺德	57.04	61.22	11.68	37.88
沙格列汀片	5 mg×7 片 / 盒	百时美施贵宝	100.00	100.00	4.02	17.86
	5 mg×30 片 / 盒	齐鲁制药*	—	—	95.98	82.14

注：*为国家带量采购品种，—代表无法计算。

Note: *Refers to the variety selected in the “4 + 7” volume-based procurement, — refers to cannot be calculate.

2.4 集采前后口服降糖药实际节省费用情况和可负担性评价

集采后我院口服降糖药的 DDC 值均呈不同程度降低，实际节省费用共计 443.67 万元。如表 5 所示，阿卡波糖片 DDC 值相较集采前下降了 10.73 元·d⁻¹，实际节省费用 268.82 万元；作为控制血糖的一线用药和联合用药中的基本用药，二甲双胍片的限定日费用也下降了 94.38%，节省费用 66.65 万元；DDC 值最高的卡格列净片由 19.03 元·d⁻¹

降至 3.53 元·d⁻¹，节省费用 57.10 万元。

可负担性评价方面，集采政策执行前均不可负担，执行后几种口服降糖药的可负担性大幅提高，其中格列美脲片、盐酸二甲双胍片和盐酸二甲双胍缓释片月治疗费用分别是最低日工资的 0.11 倍、0.13 倍和 0.15 倍，可负担性良好，沙格列汀片可负担系数为 0.94，基本可负担，卡格列净片可负担系数虽然大幅下降，降幅高达 81.43%，但依然不可负担。

表 5 口服降糖药在带量采购执行前后的实际节省费用和可负担性情况

Tab 5 Actual cost savings and afford ability of oral hypoglycemic drugs before and after the implementation of volume-based procurement

药品名称	DDC/元		疗程费用/元		可负担系数		实际节省费用/万元
	执行前	执行后	执行前	执行后	执行前	执行后	
阿卡波糖片	11.83	1.10	354.90	33.00	5.75	0.54	268.82
格列美脲片	4.51	0.23	135.30	6.90	2.19	0.11	26.60
盐酸二甲双胍缓释片	6.03	0.31	180.90	9.30	2.93	0.15	15.87
盐酸二甲双胍片	4.63	0.26	138.90	7.80	2.25	0.13	66.65
卡格列净片	19.03	3.53	570.90	105.90	9.26	1.72	57.10
瑞格列奈片	4.43	1.36	132.90	40.80	2.16	0.66	5.58
沙格列汀片	8.65	1.94	259.50	58.20	4.21	0.94	3.04
合计							443.67

3 讨论

3.1 口服降糖药集中带量采购的必要性

糖尿病是一种常见的慢性代谢性疾病, 其对健康的危害程度仅次于心脑血管疾病和癌症, 是世界第三大慢性病^[10], 而由糖尿病导致的足病、肾病、视网膜病变等多种并发症又会进一步降低患者期望寿命和生命质量^[11]。尤其我院位于内蒙古中西部地区, 该地畜牧业发达, 居民饮食结构主要以肉蛋奶为主, 长期的高热量饮食导致该地糖尿病的发病率逐年上升^[12]。糖尿病发病还具有隐匿性的特点, 因此可能还存在极大数量的糖尿病患者人群未被诊断^[13-14]。庞大的患病人群以及严重的并发症都给社会经济带来了沉重的负担, 因此, 为了调整药品价格机制, 控制药品费用比例, 降低患者经济负担, 口服降糖药集中带量采购政策的执行十分必要。

3.2 带量采购政策对我院口服降糖药使用的影响

3.2.1 价格和仿制药替代率

我院“4+7”带量采购政策落地后, 价格降低的不仅有中标药品, 许多非中标药品(包括原研药)的价格也发生了联动下降。例如卡格列净片(0.1 g×30片/盒, 正大天晴药业)通过一致性评价后进入集采, 其原研药(杨森制药)价格也相应降低, 降幅高达57.50%, 其他未进入集采的同通用名仿制药, 例如阿卡波糖片(50 mg×30片/盒, 杭州中美华东制药), 单片药物价格降低了55.24%。由此可见, 带量采购“以量换价”“招采合一”这一政策的实施^[15], 对于调控药品价格来说切实可行。因为药品是医保基金的重要支出, 药品价格降低的同时也节约了大量医保基金, 2022年我院仅口服降糖药就为医保基金节省近164万元。集采后仿制药替代率相较之前增长了40倍之多, 分析原因可能是: ①集采前我院格列美脲片、盐酸二甲双胍片、盐酸二甲双胍缓释片和沙格列汀片均只有原研药可供使用, 所以集采前的仿制药总替代率仅为2.07%; ②集采中标药品基本均为仿制药, 且我院积极响应国家带量采购政策, 向临床科室下达任务量, 控制原研药的使用; ③医患对通过一致性评价的仿制药疗效及集采政策充分认可。这也提示带量采购政策在我院的实施不仅为患者提供了更多的用药选择, 也有效提高了仿制药的使用率。

3.2.2 用药结构

用药结构方面带量采购政策执行前后变化不大, 阿卡波糖片和盐酸二甲双胍片的DDDs值始终位于前两位, 说明该政策的执行对我

院临床医师的用药选择未产生明显影响。阿卡波糖片的用药频度位居榜首可能有三方面的原因。第一, 阿卡波糖片是通过减少碳水化合物在小肠的吸收而达到降血糖的目的, 因此对于一直以来偏重碳水饮食的中国人来说更适合使用阿卡波糖来降血糖; 第二, 因为阿卡波糖片是唯一作为原研药中选集采的药品, 很多医患对原研药疗效更为肯定; 第三, 因中选阿卡波糖片在集采前就已在院应用, 医师因对药物的了解程度以及用药习惯也更倾向于使用该药。盐酸二甲双胍片在各国指南中均推荐为一线降糖药, 因此盐酸二甲双胍片DDDs值始终位居前列也证明我院口服降糖药的使用符合指南推荐, 但盐酸二甲双胍片的DDD值偏高, 应注意避免出现不良反应的风险。

3.2.3 用药负担

集采后我院各类口服降糖药DDC值均降低, 平均降幅超过80%, 可负担性也由之前的均不可负担变成基本可负担, 这一结果提示集采政策的实施切实减轻了我院糖尿病患者的经济负担, 在一定程度上解决了“看病贵”“药价高”的问题。虽然研究结果显示集采后口服降糖药的可负担性大幅提高, 但依然存在一些局限性: ①糖尿病患者需要长期规律用药, 实际用药时间远远大于30d, 因此, 患者的可负担系数可能远远高于用最低日薪来计算的水平; ②本文使用的最低日薪是以呼和浩特市四类地区最低工资标准计算得到, 可能会忽略部分收入低于最低日工资标准的农民, 因此可能会低估患者用药的经济负担; ③因患者参加的医疗保险类型多样且各地市政策有所不同, 本研究仅讨论了自费患者的可负担性, 未考虑医保支付情况。

3.3 带量采购政策实施带来的思考

带量采购政策实施以来, 确实实现了“以量换价”的预期, 但在执行过程中发现依然存在一些问题, 例如还有许多患者反映药价昂贵, 难以承受。以本研究为例, 虽然集采后患者的经济负担明显减轻, 但卡格列净片依然不可负担, 这提示我们不仅要考虑提高居民经济收入, 也要考虑目前的集采药品是否依然有降价空间, 应该适当增加中标企业的竞争, 只有市场竞争越激烈, 降价的效果才会越明显, 才能最高限度地减轻患者用药经济负担^[16-17]。还有许多研究表明目前有医患依然对仿制药信心不足, 存在仿制药不如原研药的固有观念^[18]。针对这一问题, 一方面, 应该提高仿制药的合格标准, 不仅要注意对生物等效性进行评价, 更要注意临床等效性的评价, 使医

患切实体会到仿制药疗效并不劣于原研药；另一方面，要加大对通过一致性评价仿制药的宣传力度，临床医师和药师应利用自己的专业知识向患者进行宣传教育，提高大众对仿制药的认知。相信在集采政策的日益优化以及推动下，中选药品因其“价低质优”的特点会逐渐成为医患的用药首选，同时在该政策的冲击下，传统药物对药企来说基本无利可图，大力发展创新药并快速推向市场几乎是药企持续发展的唯一选择。

综上所述，带量采购政策的执行不仅对药品价格进行了有效调控，有效减少了医保基金支出，而且为原研药和仿制药提供了同台竞争的机会，加速推动仿制药替代原研药，但带量采购政策的持续推进还需要进一步完善。第一，药品是否中选不能单以价格为主，而是应该综合考虑药品质量以及企业生产供应能力等指标；第二，动态调整集采药品遴选机制，对于临床不常用品种和生产力不足的中选企业及时淘汰；第三，建立和落实“结余留用，合理超支分担”机制，对于医保结余资金应返还给医院，使其通过正规渠道奖励给医务工作者，从而充分调动医疗机构和医务人员对于集采政策的积极性；第四，药学部、临床科室、信息科等部门联合作业，及时对往年患者的用药数据进行统计分析，上报合理的使用量，避免出现供应不足的情况^[19]。通过多方面的调整与协作，相信带量采购政策的实施可逐步实现仿制药的替代，将大批药品价格的“水分”挤出，节约大量医保基金，从而更多地投入到创新药研发之中，提高医保基金的使用效率，推动我国进一步从医药大国迈向医药强国^[20]。

参考文献

[1] 吕若琦. 最新版全球糖尿病地图里的中国景象[J]. 江苏卫生保健, 2020, 22(2): 56.
 [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4): 315-409.
 [3] 侯琳琳. 药品集中带量采购体系构建[J]. 合作经济与科技, 2022, 38(1): 143-145.
 [4] 王皎皎, 王昊, 杨宏昕. 4 + 7 带量采购对内蒙古自治

区人民医院口服抗肿瘤药原研药和仿制药使用情况影响[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(8): 1872-1878.
 [5] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学(第 17 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 656-664.
 [6] 屈茹楠, 高岸, 范国荣, 等. 国家带量采购政策对上海某院原研和仿制降压药使用状况的影响[J]. 中国药业, 2022, 31(15): 10-15.
 [7] 徐倩, 徐斌. 上海市口服抗帕金森病药品可负担性评价[J]. 中国药业, 2021, 30(23): 1-4.
 [8] 万茜, 王晶, 顾申勇. 国家药品集中采购对 3 种抗肿瘤药物临床使用的影响[J]. 中国药业, 2022, 31(16): 15-18.
 [9] 邹雅敏, 董卫华, 毛静, 等. 国家药品集中采购前后陕西省原研与仿制降压药可负担性的横断面调查[J]. 医药导报, 2023, 42(10): 1473-1478.
 [10] 侯清涛, 李芸, 李舍予, 等. 全球糖尿病疾病负担现状[J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(1): 92-96.
 [11] Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, et al. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence[J]. Diabetologia, 2019, 62(1): 3-16.
 [12] 祝丽姣, 李增艳. 内蒙古部分地区 2 型糖尿病肾病发病的危险因素探讨[J]. 中国实用医药, 2023, 18(10): 36-40.
 [13] 国家老年医学中心, 中医学会老年医学分会, 中国老年保健协会糖尿病专业委员会. 中国老年糖尿病诊疗指南(2021 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(1): 14-46.
 [14] 王庆霞. 2 型糖尿病的临床治疗进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2021, 36(9): 64-66.
 [15] 梁刚, 赵福兰, 周彦池, 等. 药品集中带量采购政策的执行问题及对策建议[J]. 中国药物经济学, 2022, 17(3): 5-8.
 [16] 奉子岚. 我国药品集中带量采购政策控费效果研究[D]. 南京: 南京大学, 2021.
 [17] 陈刚, 袁玉丽. 带量采购政策对我院核苷类抗乙型肝炎病毒药物使用情况的影响[J]. 中南药学, 2024, 22(3): 799-804.
 [18] 赵丽俊, 张卫东, 王海荣, 等. 精神科护士睡眠质量与职业倦怠相关性的研究[J]. 护理管理杂志, 2011, 11(11): 764-765.
 [19] 张秋玉, 王芸, 胡元霞, 等. 我国药品及医用耗材集中带量采购政策的实施现状及建议[J]. 中国药房, 2022, 33(2): 136-141.
 [20] 周程祎. 阻碍创新, 还是推动创新[N]. 解放日报, 2022-08-09(01).

(收稿日期: 2024-04-19; 修回日期: 2024-05-25)

2023 年 STOPP/START 标准解读

刘子祺, 张帆, 李成敏, 田英超, 杜艳红, 付晓菲, 雷宁* (火箭军特色医学中心, 北京 100088)

摘要: **目的** 对 2023 年第三版老年人潜在不适当处方筛查工具 (STOPP) / 处方遗漏筛查工具 (START) 标准进行详细解读, 从而优化药物治疗并最大限度地减少老年人 (特别是患有多种疾病和使用多种药物的老年人) 的药物不良反应 / 事件。**方法** 通过与 2014 年第二版 STOPP/START 标准进行比对, 对比对结果进行逐条分析, 对差异进行总结。**结果** 第三版 STOPP/START 标准共 190 个条目, 其中 STOPP 标准新增 54 个条目, 删除 4 个条目, 修订 31 个条目。START 标准新增指示性药物、凝血系统、肾脏系统 3 个部分 / 系统, 新增 24 个条目, 删除 3 个条目, 修订 20 个条目。**结论** 2023 年第三版 STOPP/START 标准提升了准确性和实用性, 更有利于帮助临床医师和药师在常规药物审查期间发现和预防更多的不良药物 - 药物和药物 - 疾病相互作用, 但要在临床诊疗中发挥更大的作用, 还需先进的技术支持及多个部门通力合作。

关键词: STOPP/START 标准; 潜在不适当用药; 老年人; 合理用药

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3394-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.041

Interpretation of the 2023 STOPP/START criteria

LIU Zi-qi, ZHANG Fan, LI Cheng-min, TIAN Ying-chao, DU Yan-hong, FU Xiao-fei, LEI Ning* (Characteristic Medical Center of the Rocket Force, People's Liberation Army, Beijing 100088)

Abstract: Objective To optimize medication use and minimize adverse drug events during medication review in the elderly, particularly for those with various diseases and taking several medicines through a detailed interpretation of screening tool of older persons' prescriptions/screening tool to alert to right treatment (STOPP/START) criteria (version 3) in 2023. **Methods** We compared STOPP/START criteria of 2014 (version 2) with version 3 of 2023 and summarized the differences. **Results** STOPP/START version 3 consisted of 190 criteria, 54 of which were newly added, 4 of which criteria were removed, and 31 revised. Meanwhile, 3 parts /systems (indicated drugs, coagulation system, and the renal system) and 24 items were added, 3 were removed, and 20 revised in the START new version. **Conclusion** The 2023 STOPP/START criteria are more accurate and useful, facilitating clinicians and pharmacists in detecting and preventing adverse events and their consequences during routine review. Further technical support and cooperation between departments are needed.

Key words: STOPP/START criteria; potentially inappropriate medication usage; the elderly; rational drug use

老年人不适当处方筛查工具 (screening tool of older persons' prescriptions, STOPP) / 老年人处方遗漏筛查工具 (screening tool to alert to right treatment, START) 标准是 2008 年由爱尔兰 Cork 大学

组织老年医学、临床药理学、临床药学、老年精神病学及社区医疗等专业的专家制定的老年人潜在不适当用药 (potential inappropriate medication, PIM) 评估标准, 该标准基于生理系统进行划分,

基金项目: 部委级保健专项科研课题 (No. 20BJZ14)。

作者简介: 刘子祺, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事药理学和信息药理学研究, email: 705368757@qq.com *通信作者: 雷宁, 女, 博士, 主管药师, 主要从事医院药学研究, email: epln78@163.com

用于提示临床实践中潜在的不适当用药和处方遗漏相关问题。第一个版本的 STOPP/START 包括 65 个 STOPP 和 22 个 START 标准^[1]。2015 年发布的第二版 STOPP/START 标准扩展到 80 个 STOPP 标准和 34 个 START 标准^[2]。第二版标准已被英国国家临床卓越研究所 (NICE)^[3]、英国皇家全科医师学院和英国老年病学学会^[4] 批准用于老年人的常规药物审查。2021 年,《英国国家处方集》推荐在老年人的常规药物审查中使用 STOPP/START 标准,作为识别和减少这一高危人群不适当处方的一种手段^[5],《荷兰老年人综合用药多学科指南》也实施了 STOPP/START 标准^[6]。STOPP/START 标准已在不同临床环境下的几类人群中得到验证,并在多个国家的不同环境中评估了其有效性^[7]。

2022 年 O' Mahony 等^[5] 对 STOPP/START 标准进行修订更新并于 2023 年 5 月在线发布。新标准的形成过程为:① 对标准结构达成共识;② 修订第二版标准;③ 对 2014 年 4 月至 2022 年 3 月新文献进行全面审查以支持现有和拟议的新标准;④ 对第三版标准草案进行德尔菲验证,通过 4 轮德尔菲验证最终达成共识。因第二版和第三版标准间隔时间较长,新的循证证据支持第二版标准条目的修订并形成许多新的标准条目,故第三版标准做了较大修改。本文将围绕主要变化内容,详细解读 2023 年第三版 STOPP/START 标准,以期为医师和临床药师提供参考。

1 第三版 STOPP/START 标准主要更新内容

1.1 数量变更情况

第三版 STOPP/START 标准共 190 个条目,其中 STOPP 标准涉及 13 个部分/系统共 133 个条目,与第二版 STOPP 标准相比,新增 54 个条目,删除 4 个条目,修订 31 个条目,44 个条目基本保持不变,另有原标准中 2 个条目拆分为 5 个条目。START 标准涉及 12 个部分/系统共 57 个条目,将第二版标准中枢神经系统和眼系统删除了 1 个眼部疾病相关条目,系统名称调整为中枢神经系统。新增指示性药物、凝血系统、肾脏系统 3 个部分/系统,其中凝血系统共 2 个条目,为原第二版中的心血管系统 2 个条目重新划分而来。共计新增 24 个条目,删除 3 个条目,修订 20 个条目,11 个条目基本保持不变,另有原标准中 2 个条目拆分为 4 个条目。

1.2 新增内容

第三版 STOPP/START 标准的每一项标准基本格式与第二版相同,STOPP 标准为:XX 疾病应用 XX 药物(不建议用药的原因);START 标准为:XX 疾病患者应用 XX 药物。

STOPP 标准新增内容涉及 10 个部分/系统。避免使用中新增药品类别包括延长 QTc 间期的药物、他汀类、P-糖蛋白抑制剂、益智药、钠-葡萄糖共转运蛋白 2 (SGLT-2) 抑制剂、抗利尿激素类似物、抗癫痫药物、加巴喷丁类药物、抗菌药物;新增品种包括雄激素、美金刚、黄体酮、左甲状腺素、利多卡因贴剂、呋喃妥英、双膦酸盐(非口服给药途径)、甲氨蝶呤、醋酸甲地孕酮、左甲状腺素、对乙酰氨基酚。新增疾病或状态包括 QTc 明显延长、主动脉瓣狭窄、静脉血栓栓塞史、大出血病史、躁动、癫痫、胃窦血管扩张、食欲减退、无症状性菌尿、亚临床甲状腺功能减退、反复跌倒患者降低血压、反复跌倒患者尿失禁、骨关节炎疼痛、非神经性疼痛、体质量指数 (BMI) < 18 kg · m⁻²、慢性肝病等。

START 标准新增内容涉及 9 个部分/系统。建议新增药品类别包括矿化皮质激素受体拮抗剂、SGLT-2 抑制剂、静脉注射铁剂、磷结合剂、促红细胞生成素类似物、血管紧张素受体阻滞剂 (ARBs)、渗透性通便剂、益生菌、5-磷酸二酯酶抑制剂、水痘-带状疱疹疫苗、SARS-CoV2 疫苗;新增品种包括沙库巴曲缬沙坦、5% 利多卡因贴剂;新增治疗包括抗吸收治疗、幽门螺杆菌 (HP) 根除治疗。新增疾病或状态包括原发性震颤伴功能损害及由此导致的残疾、严重慢性肾脏疾病伴低钙血症和继发性甲状旁腺功能亢进、严重慢性肾脏疾病伴非血液病引起的贫血或血红蛋白浓度达到 10.0 ~ 12.0 g · dL⁻¹ 的缺铁性贫血、慢性肾病伴蛋白尿、消化性溃疡病史、反流性食管炎病史、良性便秘、HP 相关活动性消化性溃疡、复发性尿路感染、持续性勃起功能障碍、局部神经性疼痛;进行非甾体抗炎药 (NSAIDs) 治疗、停用至少两剂地诺单抗、停止特立帕肽/阿巴帕肽骨质疏松治疗、正在进行抗菌药物治疗等。完整列表及其余新增内容,详见表 1、2。

1.3 变更内容

STOPP 标准变更内容主要分为以下 7 类:① 增减了药品的种/类并通过举例明确药物品种,如 4 (13) 抗胆碱能或抗毒蕈碱药物由第二版仅描述药品种类变更为描述种类并举例 4 种药品;② 修改或更详细地描述不建议用药原因,如 2 (2) 由第二版“可能加重心力衰竭”变更为“因降低射血分数可能加重心力衰竭,例如射血分数减少的心力衰竭 (HFREF)”;③ 增减了疾病范围及限定,如 2 (7) 由第二版“高血压”变更为“无心力衰竭的高血压”;④ 明确了疾病临床指标,如 2 (12) 明确高钾血症为血清 K⁺ > 5.5 mmol · L⁻¹;

表 1 2023 年第三版 STOPP 标准及更新内容
Tab 1 2023 STOPP criteria and updates (version 3)

以下处方可能不适合 65 岁及以上患者使用	更新内容
<p>1 药物的适应证</p>	
<p>(1) 使用药物不基于循证的临床指征；(2) 当疗程有明确规定时，超疗程使用药物；(3) 同类药物重复使用（与必要时使用不同），例如同时使用两种 NSAIDs、选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂（SSRIs）、袢利尿药、血管紧张素转化酶抑制剂（ACEIs）、抗凝剂、抗精神病药物、阿片类镇痛剂（应先将单类药物治疗疗效进行优化，再考虑加用其他药物）</p>	<p>(3) 增加“与必要时使用不同”，增加抗精神病药物、阿片类镇痛剂两类药物</p>
<p>2 心血管系统</p>	
<p>(1) 地高辛用于心室收缩功能正常的心力衰竭患者（目前无明确证据显示获益）；(2) 维拉帕米或地尔硫草用于纽约心功能分级（NYHA）Ⅲ级或Ⅳ级的心力衰竭患者（因降低射血分数可能加重心力衰竭，例如 HFREF）；(3) β受体阻滞剂与维拉帕米或地尔硫草联用（存在心脏传导阻滞的风险）；(4) 心室限速药物，例如 β受体阻滞剂、维拉帕米、地尔硫草、地高辛用于心动过缓（$< 50 \text{次} \cdot \text{min}^{-1}$）、II型房室传导阻滞或完全性房室传导阻滞（存在完全性房室传导阻滞和心搏停止的风险）；(5) β受体阻滞剂单药治疗非复杂性高血压，例如无心绞痛、主动脉瘤或其他需要 β受体阻滞剂治疗的疾病（没有确切的疗效证据）；(6) 胺碘酮作为室上性心动过速的一线治疗药物（较 β受体阻滞剂、地高辛、维拉帕米或地尔硫草主要不良反应的风险更高）；(7) 袢利尿剂作为无心力衰竭的高血压一线用药（有更安全、有效的药物可供选择）；(8) 袢利尿剂用于无心力衰竭、肝衰竭、肾病综合征或肾衰竭的临床、生化或影像学证据的依赖性踝部水肿（腿部抬高和/或使用弹力袜通常更合适）；(9) 噻嗪类利尿剂用于显著低血钾（血清 $\text{K}^+ < 3.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$）、低血钠（血清 $\text{Na}^+ < 130 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$）、高血钙（校正血清钙 $> 2.65 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$）或有痛风病史的患者（可加重低血钾、低血钠、高血钙和痛风）；(10) 袢利尿剂用于高血压伴尿失禁的患者（可能加重尿失禁）；(11) 中枢降压药，如甲基多巴、可乐定、莫索尼定、利美尼定、胍法辛（老年人对中枢性降压药的耐受性普遍较年轻人差）；(12) ACEIs 或者 ARBs 用于高钾血症的患者（血清 $\text{K}^+ > 5.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$）；(13) 醛固酮拮抗剂（如螺内酯、依普利酮）与保钾药物（如 ACEIs、ARBs、阿米洛利、氨苯蝶啶）联用时未监测血钾（存在高血钾风险，如血清 $\text{K}^+ > 6.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$，需定期检测血钾，至少 1 次/6 个月）；(14) 5-磷酸二酯酶抑制剂（如西地那非、他达拉非、伐地那非）用于以低血压（收缩压 $< 90 \text{mmHg}$）（$1 \text{mmHg} = 0.133 \text{kPa}$）为特征的严重心力衰竭患者，或与硝酸盐类制剂联用治疗心绞痛（存在心血管衰竭的风险）；(15) 存在延长 QTc 间期不良反应（$\text{QTc} = \text{QT}/\text{RR}$）的药物，包括喹诺酮类、大环内酯类、昂丹司琼、西酞普兰（剂量 $\geq 20 \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$）、艾司西酞普兰（剂量 $\geq 10 \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$）、三环类抗抑郁药（TCAs）、锂、氟哌啶醇、地高辛、1A 类抗心律失常药、III 类抗心律失常药、替扎尼定、吩噻嗪、阿司咪唑、米拉贝隆用于 QTc 明显延长（男性 $\geq 450 \text{ms}$，女性 $\geq 470 \text{ms}$）的患者（存在危及生命的室性心律失常风险）；(16) 他汀类药物用于年龄 ≥ 85 岁、身体虚弱、预期寿命可能小于 3 年患者的心血管疾病的初级预防（缺乏有效性证据）；(17) 非外用 NSAIDs 长期用于已知有冠状动脉、大脑或周围血管疾病史的患者（增加血栓形成风险）；(18) 抗精神病药物长期用于已知有冠状动脉、大脑或周围血管疾病史的患者（增加血栓形成风险）；(19) NSAIDs 或全身性糖皮质激素用于需要袢利尿剂治疗的心力衰竭（存在加重心力衰竭的风险）；(20) 降压药用于严重症状性主动脉瓣狭窄患者（存在严重低血压、晕厥的风险）；(21) 地高辛作为房颤患者长期（> 3 个月）室率控制的一线治疗（长期使用地高辛增加死亡率；优先选择性 β受体阻滞剂）</p>	<p>(2) 药物引起的不良反应说明更详细，由“可能加重心力衰竭”变更为“因降低射血分数可能加重心力衰竭，例如 HFREF”；(4) 增加药物：维拉帕米、地尔硫草、地高辛；(5) 新增内容；(7) 增加疾病限定，由“高血压”变更为“无心力衰竭的高血压”；(11) 删除“除非其他降压药无效或不耐受”；(12) 明确范围“血清 $\text{K}^+ > 5.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$”；(14) 修改不良反应内容，由“存在严重威胁生命的低血压或休克的风险”改为“存在心血管衰竭的风险”；(15)~(21) 新增内容</p>
<p>3 凝血系统</p>	
<p>(1) 长期使用 $> 100 \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 的阿司匹林（增加出血风险，无增加疗效的证据）；(2) 抗血小板药物，维生素 K 拮抗剂，直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂伴显著出血风险的患者，如存在控制不佳的重度高血压、出血倾向或近期较重的自发性出血的患者（存在较高出血风险）；(3) 阿司匹林联合氯吡格雷作为长期继发性卒中的预防（> 4 周），以下情况除外：患者在过去 12 个月内植入了冠状动脉支架；并发急性冠状动脉综合征；有高度症状性颈动脉狭窄（尚无证据显示优于氯吡格雷单药治疗）；(4) 抗血小板药物联合维生素 K 拮抗剂、直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂用于慢性房颤患者，除非同时植入冠状动脉支架或血管造影证实冠状动脉高度狭窄（$> 50\%$）（比起单用抗血小板药物没有额外获益）；(5) 抗血小板药物联合维生素 K 拮抗剂、直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂用于有稳定的冠状动脉、脑血管或外周动脉疾病的患者（两药联合不增加获益）；(6) 在任何情形下使用噻氯匹定（氯吡格雷和普拉格雷疗效与之相似，但证据更强、不良反应更小）；(7) 抗血小板药物替代维生素 K 拮抗剂、直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂预防慢性房颤患者卒中（无疗效证据）；(8) 首诊且无持续促发危险因素（如血栓形成倾向）的深静脉血栓形成患者使用维生素 K 拮抗剂、直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂 > 6 个月（无增加获益的证据）；</p>	<p>(1) 调整阿司匹林用药剂量，由 $> 160 \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 调整为 $> 100 \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$；(2) 扩大药物范围，由阿司匹林、双嘧达莫扩展为抗血小板药物；(3) 明确联合用药持续时间 > 4 周；(4) 扩大药物范围，由阿司匹林扩展为抗血小板药物；增加使用条件“除非同时植入冠状动脉支架或血管造影证实冠状动脉高度狭窄（$> 50\%$）”；(7) 及 (11)~(14) 新增内容</p>

续表 1

以下处方可能不适合 65 岁及以上患者使用	更新内容
<p>(9) 首诊且无持续促发危险因素(如血栓形成倾向)的肺栓塞患者使用维生素 K 拮抗剂、直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂 > 12 个月(无增加获益的证据);(10) NSAIDs 和维生素 K 拮抗剂、直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂联合应用(存在胃肠道大出血的风险);(11) 维生素 K 拮抗剂作为房颤的一线抗凝剂,除非同时存在同期原位金属心脏瓣膜(concurrent metallic heart valve in-situ)、中度至重度二尖瓣狭窄或估算肾小球滤过率(eGFR) < 15 mL/(min · 1.73 m²)(直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂与维生素 K 拮抗剂同样有效且安全);(12) SSRIs 联合使用维生素 K 拮抗剂、直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂用于既往有大出血史的患者(SSRIs 的抗血小板作用增加出血风险);(13) 直接凝血酶抑制剂(如达比加群)联合地尔硫草或维拉帕米(增加出血风险);(14) 阿哌沙班、达比加群、依多沙班、利伐沙班联合 P-糖蛋白抑制剂,如胺碘酮、阿奇霉素、卡维地洛、环孢菌素、决奈达隆、伊曲康唑、酮康唑(非局部治疗)、大环内酯类药物、奎宁、雷诺嗪、他莫昔芬、替格瑞洛、维拉帕米(增加出血风险);(15) 全身性雌激素或雄激素用于有静脉血栓栓塞史的患者(增加静脉血栓栓塞复发风险);(16) 阿司匹林用于心血管疾病的一级预防(无获益证据)</p>	<p>(16) 新增内容</p>
<p>4 中枢神经系统</p>	
<p>(1) TCAs 用于痴呆、闭角型青光眼、心脏传导异常、前列腺疾病、慢性便秘、近期跌倒、有尿潴留或体位性低血压病史的患者(可加重这些疾病状态);(2) 将 TCAs 作为重度抗抑郁一线治疗药物[TCAs 较 SSRIs 或 5-羟色胺去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRIs)不良反应更多];(3) 严重高血压(即收缩压 > 180 mmHg 和/或舒张压 > 105 mmHg)患者使用 SNRI(如文拉法辛、度洛西汀)(可能加重高血压);(4) 有中度抗毒蕈碱或抗胆碱能作用的抗精神病药物(乙酰丙嗪、氯丙嗪、氯氮平、氟哌辛醇、三氟噻吨、左旋丙嗪、奥氮平、哌泊噻嗪、普马嗪、甲硫哒嗪)用于有前列腺病史或尿潴留等下尿路病史的患者(存在尿潴留的高风险);(5) 抗精神病药物用于治疗痴呆的精神行为症状,未进行药物治疗评估或不进行药物审查保持剂量不变持续服药 > 3 个月(增加锥体外系副作用和认知功能慢性恶化的风险,增加主要心血管疾病发病和死亡风险);(6) SSRIs 用于目前或近期有低钠血症(血清 Na⁺ < 130 mmol · L⁻¹)的患者(存在加重或诱发低钠血症的风险);(7) SSRIs 用于当前或最近大量出血的患者(SSRIs 的抗血小板作用有导致出血加重或复发的风险);(8) 苯二氮草类应用 > 4 周(更长疗程无指征;有造成长时间镇静、意识障碍、损害平衡能力、跌倒、发生交通事故的风险,所有苯二氮草类用药 > 4 周时停药应逐渐减量,因突然停药可能出现戒断综合征);(9) 苯二氮草类药物用于躁动行为或痴呆症状(无疗效证据);(10) 苯二氮草类药物治疗失眠 ≥ 2 周(增加药物依赖性,摔倒、骨折和发生交通事故的风险);(11) Z-药物(唑吡坦、唑吡酮、扎来普隆)治疗失眠 ≥ 2 周(增加跌倒和骨折的风险);(12) 抗精神病药物(喹硫平和氯氮平除外)用于帕金森病和路易体病的患者(有发生严重锥体外系症状的风险);(13) 抗胆碱能或抗毒蕈碱药物(比哌立登、邻甲苯海明、普环啶、苯海索)用于治疗抗精神病药物引起的锥体外系反应(存在抗胆碱能毒性风险);(14) 抗胆碱能或抗毒蕈碱药物[强效抗胆碱能/抗毒蕈碱作用的药物包括 TCAs(如阿米替林、多塞平、丙咪嗪、去甲替林)、抗精神病药(如氯丙嗪、氯氮平、硫硝嗪)、第一代抗组胺药(如苯海拉明、氯苯那敏)、膀胱解痉药(如托特罗定、奥昔布宁)、东莨菪碱、普环啶、苯托品、替托尼定]用于谵妄或痴呆的患者(存在加重认知障碍风险);(15) 抗精神病药物用于痴呆型精神行为症状 > 12 周,除非症状严重或非药物治疗无效(增加中风、心肌梗死的风险);(16) 将抗精神病药物作为安眠药,除非失眠是由精神病或痴呆引起(存在意识障碍、低血压、锥体外系症状和跌倒风险);(17) 胆碱酯酶抑制剂用于有持续心动过缓史(< 60 次 · min⁻¹)、心脏传导阻滞或反复出现不明原因晕厥的患者,或合用减慢心率的药物如 β 受体阻滞剂、地高辛、地尔硫草、维拉帕米(存在心脏传导阻滞、晕厥和受伤的风险);(18) 胆碱酯酶抑制剂与诱发持续性心动过缓(< 60 次 · min⁻¹)的药物联合使用,如 β 受体阻滞剂、地高辛、地尔硫草、维拉帕米(存在心脏传导阻滞、晕厥和受伤的风险);(19) 美金刚用于既往或现阶段存在癫痫发作的患者(增加癫痫发作的风险);(20) 益智药(银杏叶、吡拉西坦、普拉西坦、苯基吡拉西坦、茴拉西坦、磷脂酰丝氨酸、莫达非尼、L-茶氨酸、ω-3 脂肪酸、人参、红景天、肌酸)用于痴呆的患者(无有效性证据);(21) 吩噻嗪类作为精神病或痴呆的非认知症状的一线药物,因有更安全和有效的替代药物(吩噻嗪类有镇静作用、在老年人中有显著的抗胆碱毒性;以下情况除外:奋乃静用于呕吐、恶心、眩晕,氯丙嗪用于缓解持续的呃逆和左米丙嗪作为姑息治疗的镇吐药);(22) 左旋多巴和多巴胺受体激动剂用于良性特发性震颤(无有效性证据);(23) 左旋多巴或多巴胺激动剂用于治疗抗精神病药物或其他类药物引起的帕金森病的锥体外系副作用(避免不适当的“处方瀑布”);(24) 第一代抗组胺药作为过敏或瘙痒的一线治疗药物(更安全、低毒的药物已广泛应用);(25) 第一代抗组胺药治疗失眠(副作用风险高,Z-药物更安全,更适合短期使用)</p>	<p>(1) 增加疾病类型:慢性便秘、近期跌倒、体位性低血压病史;(2) 增加疾病限定,由“抗抑郁”变更为“重度抗抑郁”;(3) 新增内容;(4) 增加药品:乙酰丙嗪、左旋丙嗪、奥氮平、甲硫哒嗪;删除药品:珠氯噻醇;(5) 新增内容;(7) ~ (11) 新增内容;(13) 明确具体药物:比哌立登、邻甲苯海明、普环啶、苯海索;(14) 明确具体药物:强效抗胆碱能/抗毒蕈碱作用的药物种类;(15) 明确用药持续时间,增加心肌梗死风险;(18) ~ (20) 新增内容;(21) 增加疾病限定“精神病或痴呆的非认知症状”;(23) 新增内容;(24) 增加疾病限定“作为过敏或瘙痒的一线治疗药物”;(25) 新增内容</p>

续表 1

以下处方可能不适合 65 岁及以上患者使用	更新内容
5 肾脏系统, 以下常用处方药可能不适用于患有急性或慢性肾脏疾病且肾功能受损低于特定 eGFR 水平的老年人	
(1) eGFR < 30 mL / (min · 1.73 m ²) 时, 长期使用 > 125 μg · d ⁻¹ 地高辛 (未进行血药浓度监测可能存在中毒风险); (2) eGFR < 30 mL / (min · 1.73 m ²) 时直接使用凝血酶抑制剂 (如达比加群)(存在出血风险); (3) eGFR < 15 mL / (min · 1.73 m ²) 时使用 Xa 因子抑制剂 (如利伐沙班、阿哌沙班、依多沙班) (存在出血风险); (4) eGFR < 50 mL / (min · 1.73 m ²) 时使用 NSAIDs (存在肾功能恶化风险); (5) eGFR < 10 mL / (min · 1.73 m ²) 时使用秋水仙碱 (存在秋水仙碱毒性风险); (6) eGFR < 30 mL / (min · 1.73 m ²) 时使用二甲双胍 (存在乳酸酸中毒风险); (7) eGFR < 30 mL / (min · 1.73 m ²) 时使用盐皮质激素受体拮抗剂 (如螺内酯、依普利酮)(存在高钾血症风险); (8) eGFR < 45 mL / (min · 1.73 m ²) 时使用呋喃妥英 (增加呋喃妥英毒性风险); (9) eGFR < 30 mL / (min · 1.73 m ²) 时使用双膦酸盐 (增加急性肾衰竭风险); (10) eGFR < 30 mL / (min · 1.73 m ²) 时使用甲氨蝶呤 (增加甲氨蝶呤毒性风险)	(3) 增加药品: 依多沙班; (7) ~ (10) 新增内容
6 胃肠道系统	
(1) 奋乃静或甲氧氯普胺用于帕金森患者 (可加重帕金森症状); (2) 无并发症的消化性溃疡患者使用全剂量质子泵抑制剂 (PPI) > 8 周 (应减低剂量或及早停药或 H ₂ 拮抗剂维持治疗); (3) 在有替代药物的情况下, 将易引起便秘的药物 (如抗毒蕈碱药物、口服铁剂、阿片类、维拉帕米、含铝抗酸剂) 用于慢性便秘的患者 (加重便秘); (4) 口服铁元素大于 200 mg · d ⁻¹ (如富马酸亚铁 > 600 mg · d ⁻¹ 、硫酸亚铁 > 600 mg · d ⁻¹ 、葡萄糖酸亚铁 > 1800 mg · d ⁻¹ , 无证据表明更大剂量可以增加铁的吸收); (5) 有消化性溃疡或糜烂性食管炎病史的患者使用糖皮质激素 (有复发风险, 除非联合 PPI); (6) 有胃窦血管扩张 (西瓜胃) 病史的患者使用抗血小板或抗凝药物 (有胃肠道大出血风险); (7) 吞咽困难患者使用抗精神病药物 (增加吸入性肺炎风险); (8) 给予醋酸甲地孕酮以增加食欲 (增加血栓形成和死亡的风险, 但疗效尚未证实)	(2) 删除疾病限定“糜烂性食管炎”, 增加消化性溃疡的序贯治疗方法“H ₂ 拮抗剂维持治疗”; (5) ~ (8) 新增内容
7 呼吸系统	
(1) 茶碱作为慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的单一治疗药物 (有更安全、有效的可选药物; 治疗窗窄容易导致不良反应); (2) 采用全身性糖皮质激素而非吸入糖皮质激素作为中、重度 COPD 患者维持治疗 (吸入糖皮质激素有效时, 应避免全身性糖皮质激素所致的不良反应); (3) 长效毒蕈碱类拮抗剂 (如噻托溴铵、阿地溴铵、umeclidinium、格隆溴铵) 用于有闭角型青光眼 (可能加重青光眼) 或膀胱出口梗阻史的患者 (可能造成尿潴留); (4) 苯二氮草类药物用于急、慢性呼吸衰竭 [氧分压 (pO ₂) < 8.0 kPa 和 / 或二氧化碳分压 (pCO ₂) > 6.5 kPa] 的患者 (加重呼吸衰竭的风险)	(3) 增加药品: 阿地溴铵、umeclidinium、格隆溴铵, 删除药品: 异丙托溴铵
8 肌肉骨骼系统	
(1) 选用 NSAIDs 而非选择性环氧酶 -2 (COX-2) 抑制剂用于有消化性溃疡史或消化道出血患者, 除非联用 PPI 或 H ₂ 受体阻断剂 (存在消化性溃疡复发风险); (2) NSAIDs 用于重度高血压即收缩压持续 > 170 mmHg 和 / 或舒张压持续 > 100 mmHg 的患者 (可加重高血压); (3) 未试用对乙酰氨基酚的情况下长期用 NSAIDs (> 3 个月) 缓解骨关节炎的疼痛 (简单的镇痛药更可取, 而且通常疗效相当, 更安全); (4) 长期单用糖皮质激素 (> 3 个月) 治疗类风湿关节炎 (存在全身性糖皮质激素的不良反应风险); (5) 糖皮质激素 (单纯骨关节炎患者周期性关节内注射除外) 用于骨关节炎 (存在全身性糖皮质激素的不良反应风险); (6) 不存在黄嘌呤氧化酶抑制剂 (如别嘌醇、非布司他) 使用禁忌证时, 长期 (> 3 个月) 将 NSAIDs 或秋水仙碱治疗慢性痛风 (黄嘌呤氧化酶抑制剂是预防痛风发作的首选药物); (7) NSAIDs 联合糖皮质激素治疗任何类型的关节炎 / 风湿病 (增加消化性溃疡疾病的风险); (8) 口服双膦酸盐用于近期或现阶段存在上消化道疾病 (如吞咽困难、食管炎、胃炎、十二指肠炎、胃及十二指肠溃疡或上消化道出血) 的患者 (有食管炎、食管溃疡、食管狭窄复发 / 加重的风险); (9) 长期服用阿片类药物治疗骨关节炎 (缺乏疗效证据, 增加严重副作用风险)	(2) 增加重度高血压的解释“收缩压持续 > 170 mmHg 和 / 或舒张压持续 > 100 mmHg”; 缩小疾病范围, 删除“严重心力衰竭”; (3) 增加对乙酰氨基酚用药原因“更安全”; (6) 明确药物使用持续时间 > 3 个月; (7) 删除上一版建议“未预防性使用 PPI”, 增加疾病类型“治疗任何类型的关节炎 / 风湿病”; (9) 新增内容
9 泌尿生殖系统	
(1) 抗毒蕈碱药物 (奥昔布宁、托特罗定、曲司氯铵) 用于痴呆或慢性认知障碍 (增加混乱和骚动的风险); (2) 抗毒蕈碱药物 (奥昔布宁、托特罗定、曲司氯铵) 用于闭角型青光眼 (存在青光眼急性加重的危险); (3) 抗毒蕈碱药物 (奥昔布宁、托特罗定、曲司氯铵) 用于良性前列腺增生的下尿路症状和排空后残余尿量高 (大于 200 mL) (不确定在老年男性尿潴留的疗效, 增加尿潴留风险); (4) 抗毒蕈碱药物 (奥昔布宁、托特罗定、曲司氯铵) 用于便秘患者 (存在加剧便秘的风险); (5) α ₁ 受体拮抗剂除西洛多辛外 (如阿夫唑嗪、多沙唑嗪、吡哌胺、坦索罗辛、特拉唑嗪) 用于体位性低血压或晕厥史 (可致反复晕厥); (6) 米拉贝隆用于不稳定或严重的高血压 (加重高血压的风险); (7) 度洛西汀用于尿急或急迫性尿失禁 (度洛西汀适用于压力性尿失禁, 但不适用于尿急或急迫性尿失禁); (8) 抗菌药物用于无症状性菌尿 (无治疗指征)	(1)(2)(3) 明确具体药物: 奥昔布宁、托特罗定、曲司氯铵。由上一版一条调整为三条, 每一种疾病分别列一条; (3) 增加症状“排空后残余尿量高”; (4) 新增内容; (5) 明确具体药物: 阿夫唑嗪、多沙唑嗪、吡哌胺、坦索罗辛、特拉唑嗪。扩大疾病类型: 由上一版“排尿性晕厥”调整为“晕厥史”; (6) ~ (8) 新增内容

续表 1

以下处方可能不适合 65 岁及以上患者使用	更新内容
10 内分泌系统	
(1) 长效磺脲类(格列本脲、氯磺丙脲、格列美脲)用于 2 型糖尿病(可致持续性低血糖);(2) 噻唑烷二酮(吡格列酮、罗格列酮)用于心力衰竭患者(可能加重心力衰竭);(3) 非选择性β受体阻滞剂用于频繁出现低血糖的糖尿病患者(掩盖低血糖症状);(4) SGLT-2 抑制剂(如卡格列净、达格列净、恩格列净、艾瑞格列净)用于症状性低血压(加重低血压风险);(5) 有乳腺癌病史患者使用雌激素(增加复发风险);(6) 有静脉血栓栓塞史患者使用雌激素(增加复发风险);(7) 有冠状动脉狭窄、脑或外周动脉疾病史患者进行绝经期激素治疗(雌激素加黄体酮)(增加急性动脉血栓形成风险);(8) 子宫完整的患者在不补充孕激素的情况下口服雌激素(存在子宫内膜癌的风险);(9) 左甲状腺素用于亚临床甲状腺功能减退,即游离 T4 正常,促甲状腺激素(TSH)升高但< 10 mU·L ⁻¹ (无证据获益,有医源性甲状腺毒症风险);(10) 抗利尿激素类似物(如去氨加压素、抗利尿激素)用于治疗尿失禁或尿频(症状性低钠血症风险)	(1) 缩小药物种类:由上一版“β受体阻滞剂”调整为“非选择性β受体阻滞剂”;(4) 新增内容;(5)(6) 由上一版一条调整为二条,每一种疾病分别列一条;(9)~(10) 新增内容
11 老年人使用可能增加跌倒风险的药物	
(1) 苯二氮草类药物用于反复跌倒患者(可能导致感觉减退,平衡能力受损);(2) 抗精神病药物用于反复跌倒患者(可能导致帕金森病);(3) 血管舒张剂用于反复跌倒并持续性体位性低血压(反复出现收缩压下降≥ 20 mmHg)的患者(可致晕厥、跌倒);(4) Z- 药物如佐匹克隆、唑吡坦、扎来普隆用于反复跌倒的患者(可致持续的日间镇静、共济失调);(5) 抗癫痫药物用于反复跌倒患者(可能损害感觉,对小脑功能产生不利影响);(6) 第一代抗组胺药用于反复跌倒的患者(可能损害感觉);(7) 阿片类药物用于反复跌倒患者(可能损害感觉);(8) 抗抑郁药用于反复跌倒患者(可能损害感觉);(9) α受体阻滞剂用于反复跌倒患者降血压(可能引起直立性低血压);(10) α受体阻滞剂除西洛多辛外用于反复跌倒患者的尿失禁(可能引起直立性低血压);(11) 使用中枢性降压药(可能损害感觉并引起体位性低血压);(12) 抗毒蕈碱药物用于膀胱过度活动或急性尿失禁(可能损害感觉)	(1) 增加疾病限定:用于反复跌倒患者;(2) 增加疾病限定:用于反复跌倒患者;(3) 删除上一版举例品种:α1受体阻滞剂、钙通道阻断剂、长效硝酸酯类、ACEIs、ARBs;增加疾病限定:用于反复跌倒患者;(4) 增加疾病限定:用于反复跌倒患者;(5)~(12) 新增内容
12 镇痛药物	
(1) 口服或经皮使用强效阿片类(吗啡、羟考酮、芬太尼、丁丙诺啡、二醋吗啡、美沙酮、曲马多、哌替啶、喷他佐辛)作为轻度疼痛的一线药物(WHO 镇痛阶梯治疗未推荐,对乙酰氨基酚或 NSAIDs 不作为一线治疗);(2) 规律使用阿片类药物(与必要时使用不同)时未联用缓泻药(严重便秘的风险);(3) 仅使用长效阿片类药物治疗爆发痛而未联用短效阿片类药物(存在持续性重度疼痛的风险);(4) 局部用利多卡因贴剂治疗慢性骨关节炎疼痛(缺乏疗效证据);(5) 加巴喷丁类药物(如加巴喷丁、普瑞巴林)治疗非神经性疼痛(缺乏疗效证据);(6) 对营养状况不佳,即 BMI < 18 kg·m ⁻² 或慢性肝病的患者,对乙酰氨基酚剂量≥ 3 g·24 h ⁻¹ (存在肝毒性风险)	(1) 增加不适用药理由:“对乙酰氨基酚或 NSAIDs 不作为一线治疗”;(2) 增加限定条件:“与必要时使用不同”;(4)~(6) 新增内容
13 抗毒蕈碱/抗胆碱药物	
(1) 联用两种以上抗毒蕈碱/抗胆碱能药物(如膀胱解痉剂、肠道解痉剂、TCAs、第一代抗组胺药、抗精神病药)会增加抗毒蕈碱/抗胆碱药物的毒性	(1) 增加药物品种:抗精神病药

表 2 2023 年第三版 START 标准及更新内容
Tab 2 2023 START criteria and updates (version 3)

除非老年患者处于临终状态,需要姑息治疗,否则在排除用药禁忌证情况下考虑应用这些药物	更新内容
1 指示性药物	
(1) 如果一种药物在特定的临床情况下有明确的适应证并被认为是合适的,并且没有明确的禁忌证,那么该药物应该按照处方指南的剂量和持续时间开始使用	(1) 新增内容
2 心血管系统	
(1) 收缩压> 140 mmHg 和/或舒张压> 90 mmHg 的患者接受抗高血压治疗;如果是中度或重度身体虚弱的患者,收缩压> 150 mmHg 和/或舒张压> 90 mmHg 的患者接受抗高血压治疗;(2) 有冠状动脉、脑血管或周围血管疾病病史的患者可接受他汀类药物,除非患者处于生命末期或已确定中度或重度虚弱状态;(3) 冠状动脉疾病患者使用 ACEIs;(4) 冠状动脉疾病患者使用β受体阻滞剂;(5) 心力衰竭伴射血分数降低的患者使用 ACEIs;(6) 稳定心力衰竭伴射血分数降低患者使用心脏选择性β受体阻滞剂(比索洛尔、奈必洛尔、美托洛尔或卡维地洛);(7) 心力衰竭无严重肾功能损害[即 eGFR > 30 mL/(min·1.73 m ²)]的患者使用盐皮质激素受体拮抗剂(螺内酯、依普利酮);(8) 伴有或不伴有射血分数降低的症状性心力衰竭,无论是否存在糖尿病患者使用 SGLT-2 抑制剂(卡格列净、达格列净、恩格列净、艾瑞格列净);(9) 对于已经进行了足剂量的 ACEIs 或 ARBs 治疗后仍出现持续性 HFREF 的患者建议用沙库巴曲缬沙坦替代 ACEIs 或 ARBs;(10) 心率不受控制的慢性心房颤动患者使用β受体阻滞剂;(11) 伴射血分数降低和缺铁的症状性心力衰竭患者进行静脉注射铁剂治疗	(1) 更改降压起始指标,由“收缩压持续> 160 mmHg”更改为“收缩压> 140 mmHg”;更改疾病限定,由“糖尿病患者”变更为“中度或重度身体虚弱的患者”;(2) 更改疾病限定,由“年龄> 85 岁”更改为“中度或重度虚弱状态”;(3)(5) 由一项调整为两项,每一种疾病分别列一项。并更改疾病限定,由上一版“收缩性心力衰竭”变更为“心力衰竭伴射血分数降低”;(4) 更改疾病限定,删除上一版“缺血性心脏病”更改为“冠状动脉疾病”;(6) 更改疾病限定,增加“射血分数降低”限定;(7)~(11) 新增内容

续表 2

除非老年患者处于临终状态, 需要姑息治疗, 否则在排除用药禁忌证情况下考虑应用这些药物	更新内容
3 凝血系统	新增, 将心血管系统中两项变更至凝血系统
(1) 慢性或阵发性房颤患者使用维生素 K 拮抗剂或直接凝血酶抑制剂或 Xa 因子抑制剂; (2) 有冠状动脉、脑血管或外周血管疾病病史的患者接受抗血小板治疗 (阿司匹林、氯吡格雷、普拉格雷或替格瑞洛)	(1) 更改疾病限定, 增加“阵发性房颤”限定
4 中枢神经系统	更改系统, 由“中枢神经系统和眼”变更为“中枢神经系统”, 删除青光眼患者处方遗漏的提醒内容
(1) 伴有功能障碍和残疾的特发性帕金森病患者使用左旋多巴或多巴胺受体激动剂; (2) 重度抑郁症患者使用非 TCAs; (3) 轻-中度阿尔茨海默病患者使用乙酰胆碱酯酶抑制剂 (例如多奈哌齐、卡巴拉汀或加兰他敏); (4) 路易体痴呆或帕金森病患者进行卡巴拉汀治疗; (5) 影响到独立功能和生活质量的持续严重焦虑患者使用 SSRIs, 如果 SSRIs 禁忌, 使用 SNRIs 或普瑞巴林; (6) 排除铁缺乏和严重肾衰竭 (即 eGFR < 30 mL / (min·m ⁻²) 的不宁腿综合征患者使用多巴胺激动剂 (罗匹尼罗、普拉克索或罗替戈汀); (7) 原发性震颤伴功能损害及由此导致的残疾的患者使用普萘洛尔	(2) 更改疾病限定, 删除“持续性”限定; (3) ~ (4) 由一项调整为两项, 增加“帕金森痴呆”疾病限定, 并将“路易体痴呆或帕金森痴呆患者”处方遗漏提醒由“乙酰胆碱酯酶抑制剂”一类药品变更为“卡巴拉汀”单个药品; (5) 更改疾病限定, 增加“生活质量”限定; (6) 明确严重肾衰竭检测结果: 即 eGFR < 30 mL / (min·m ⁻²); (7) 新增内容
5 肾脏系统	新增肾脏系统
(1) 严重慢性肾脏疾病 [即 eGFR < 30 mL / (min·1.73 m ²)] 伴低钙血症 (校正后的血清钙 < 2.10 mmol·L ⁻¹) 和继发性甲状旁腺功能亢进患者使用 1 α -羟基骨化醇或骨化三醇; (2) 重度慢性肾脏疾病 [即 eGFR < 30 mL / (min·1.73 m ²)] 在坚持肾病饮食情况下血清磷酸盐浓度持续 > 1.76 mmol·L ⁻¹ (5.5 mg·dL ⁻¹) 的患者使用磷结合剂; (3) 严重慢性肾脏疾病 [即 eGFR < 30 mL / (min·1.73 m ²)] 伴非血液病引起的贫血或血红蛋白浓度达到 10.0 至 12.0 g·dL ⁻¹ 的缺铁性贫血患者使用促红细胞生成素类似物; (4) 慢性肾病伴蛋白尿 (尿白蛋白排泄 > 300 mg/24 h) 的患者使用 ARBs 或 ACEIs	(1) ~ (4) 新增内容
6 消化系统	
(1) 严重的胃食管反流病或需要扩张手术治疗的消化道狭窄患者使用 PPI; (2) 既往有消化性溃疡或反流性食管炎病史的患者在起始服用低剂量阿司匹林同时使用 PPI; (3) 进行短期 (< 2 周) 或长期 (> 2 周) NSAIDs 治疗的患者使用 PPI; (4) 憩室病且有便秘病史的患者使用纤维补充剂 (例如麸皮、卵叶车前草、甲基纤维素及苜蓿); (5) 慢性持续性特发性或继发性良性便秘患者使用渗透性通便剂 (如乳果糖、聚乙二醇、山梨醇); (6) 未出现免疫功能低下或严重虚弱的患者在进行抗生素治疗同时使用益生菌, 用以预防难辨梭状芽孢杆菌相关腹泻; (7) HP 相关活动性消化性溃疡患者进行 HP 根除治疗	(2) ~ (3)、(5) ~ (7) 新增内容
7 呼吸系统	
(1) 有症状的 GOLD 分级为一级或二级的 COPD 和慢性哮喘使用长效的抗胆碱能药物 (如噻托溴铵、阿地溴铵、乌美溴铵、格隆溴铵) 或长效 β_2 受体激动剂 (如班布特罗、福莫特罗、茚达特罗、奥达特罗、沙美特罗); (2) 中-重度哮喘或 COPD 患者规律使用吸入的糖皮质激素类药物 (如倍氯米松、布地奈德、环索奈德、氟替卡松、莫米松), 其中第 1 s 用力呼气容积 < 50% 预计值并且反复急性加重的患者需要口服糖皮质激素治疗; (3) 慢性低氧血症 (即 pO ₂ < 8.0 kPa/60 mmHg 或动脉血氧饱和度 < 0.89%) 患者使用家庭持续氧疗	(1) 新增内容; (2) 增加吸入用糖皮质激素举例
8 肌肉骨骼系统	
(1) 慢性、活动性、致残性风湿病患者使用缓解病情的抗风湿药物; (2) 长期接受全身性糖皮质激素治疗的患者使用双膦酸盐、维生素 D 和钙剂用以预防类固醇性骨质疏松症; (3) 骨质疏松症和 / 或脆性骨折和 / 或一个或多个部位骨密度 T-值 < -2.5 的患者补充维生素 D; (4) 没有药理学或临床禁忌 (如预期寿命低于一年) 和 / 或既往有脆性骨折的骨质疏松症 (一个或多个部位骨密度 T-值 < -2.5) 患者接受骨抗吸收或合成代谢治疗 (如双膦酸盐、特立帕肽、地诺单抗); (5) 居家不出或有跌倒史或骨质减少 (一个或多个部位骨密度 T-值 > -2.5 但 < -1.0) 并确认为 25-羟基骨化醇缺乏 (< 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, < 50 nmol·L ⁻¹) 的老年人补充维生素 D; (6) 在停用至少两剂地诺单抗后进行抗吸收治疗 (地诺单抗停药后反弹增加骨转换标志物, 骨密度损失和后椎体骨折的风险); (7) 停止特立帕肽 / 阿帕帕肽骨质疏松治疗后进行抗吸收治疗; (8) 具有痛风复发史的患者使用黄嘌呤氧化酶抑制剂 (例如别嘌醇、非布司他); (9) 服用甲氨蝶呤的患者补充叶酸	(1) 缩小疾病限定范围, 增加“慢性”限定; (2) 增加用药目的说明: 以预防类固醇性骨质疏松症; (3) ~ (4) 扩大疾病限定范围, 由“多部位”变更为“一个或多个部位”, 对临床禁忌情况进行举例: 预期寿命低于一年; (5) 更改疾病限定范围, 由上一版“多部位骨密度 T-值 < -2.5”变更为“一个或多个部位骨密度 T-值 < -2.5”; 增加“确认为 25-羟基骨化醇缺乏 (< 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, < 50 nmol·L ⁻¹)”限定; (6) ~ (7) 新增内容
9 泌尿生殖系统	

续表 2

药物	更新内容
除非老年患者处于临终状态, 需要姑息治疗, 否则在排除用药禁忌证情况下考虑应用这些	
(1) 不需要前列腺切除术的良性前列腺增生存在下尿路症状的患者使用选择性 $\alpha 1$ 受体阻滞剂 (如坦索罗辛、西洛多辛); (2) 不需要前列腺切除术的良性前列腺增生存在下尿路症状的患者使用选择性 5α -还原酶抑制剂 (如非那雄胺、度他雄胺); (3) 症状性萎缩性阴道炎患者局部使用阴道雌激素或阴道雌激素栓剂; (4) 复发性尿路感染的女性患者局部使用阴道雌激素或阴道雌激素栓剂; (5) 持续性勃起功能障碍患者使用 5-磷酸二酯酶抑制剂 (如阿伐地尔、西地那非、他达拉非、伐地那非)	(1) 缩小疾病限定范围, 增加“存在下尿路症状”限定; 缩小药物种类: 由“ $\alpha 1$ 受体阻断剂”调整为“选择性 $\alpha 1$ 受体阻滞剂”; 增加举例药品: 坦索罗辛、西洛多辛; (2) 缩小药物种类: 由“ 5α 还原酶抑制剂”调整为“选择性 5α 还原酶抑制剂”, 并举例药品; (4)~(5) 新增内容
10 内分泌系统	
(1) 具有肾脏疾病证据的糖尿病患者, 即蛋白尿或微量蛋白尿 ($> 30 \text{ mg}/24 \text{ h}$), 除非有严重慢性肾脏病的证据 [$\text{eGFR} < 30 \text{ mL}/(\text{min} \cdot \text{m}^2)$], 使用 ACEIs 或 ARBs (如果 ACEIs 不耐受)	(1) 缩小疾病限定范围, 增加“除非有严重慢性肾脏病的证据 ($\text{eGFR} < 30 \text{ mL}/(\text{min} \cdot \text{m}^2)$)”限定
11 止痛药	
(1) 对乙酰氨基酚、NSAIDs 或弱阿片类药物不适用或无效的中-重度疼痛患者使用强效阿片类药物; (2) 定期服用 (与必要时使用不同) 阿片类药物的患者使用缓泻剂; (3) 5% 利多卡因贴剂用于局部神经性疼痛, 如疱疹后神经痛	(1) 增加“与必要时使用不同”; (3) 新增内容
12 疫苗	
(1) 每年接受季节性流感疫苗的注射; (2) 根据国家指南至少接种一次肺炎球菌疫苗; (3) 根据国家指南接种水痘-带状疱疹疫苗; (4) 按照国家指南接种 SARS-CoV2 疫苗	(3)~(4) 新增内容

⑤ 调整用药剂量, 如 3 (1) 阿司匹林由第二版 $> 160 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 调整为 $> 100 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$; ⑥ 明确用药持续时间, 如 3 (3) 明确长期继发性卒中预防时间为 > 4 周; ⑦ 根据疾病不同拆分条目, 如第二版“抗毒蕈碱药物用于痴呆或慢性认知功能损害或闭角型青光眼, 或慢性前列腺疾病”拆分为 9 (1)“抗毒蕈碱药物用于痴呆或慢性认知障碍”、9 (2)“抗毒蕈碱药物用于闭角青光眼”、9 (3)“抗毒蕈碱药物用于良性前列腺增生的下尿路症状和排尿后残留量高”三项。

START 标准变更内容分类与 STOPP 标准类似, 同样包括了 STOPP 标准①③④⑦四类变更且主要集中在增减疾病范围及限定, 另有一类为增加用药目的说明, 如 8 (2) 增加双膦酸盐、维生素 D 和钙剂使用目的为预防类固醇性骨质疏松症。完整列表及其余变更内容详见表 1、2。

1.4 删除内容

删除内容为已经过时或冗余项目。第三版 STOPP/START 标准正文描述为第二版 STOPP 标准删除了 2 个条目, 即条目 3 (2) 和 8 (7); START 标准删除了 1 个条目, 即条目 2 (1)。如 3 (2)“对于有消化性溃疡病史的患者使用阿司匹林时未给予 PPI”这项标准因在第三版 START 新增标准 6 (2) 中进行体现, 所以在 STOPP 标准中删除。

2 讨论

2.1 第三版标准更具有实用性

2014 年第二版 STOPP/START 标准发表后, 有文献指出很多条目未标注具体的用药名称^[8], 对使用者的要求更高, 且更容易产生歧义。第三

版 STOPP 标准中修订的 7 个条目 [4 (4)、4 (13)、4 (14)、9 (1)、9 (2)、9 (3)、9 (5)] 和新增的 8 个条目 [2 (15)、3 (14)、4 (11)、4 (20)、9 (4)、10 (4)、10 (10)、12 (5)] 均列举了具体药品品种; 对疾病对应检查指标或用药持续时间也进行了明确定义: 如高钾血症血钾范围 [2 (12)]、持续性心动过缓心率范围 [4 (18)]、重度高血压血压范围 [8 (2)]、亚临床甲状腺功能减退 TSH 范围 [10 (9)]、营养状况不佳 BMI 范围 [12 (6)]; 长期用药或持续服药时间 [3 (3)、4 (5)、4 (10)、4 (15)、8 (6) 等]。总之, 第三版 STOPP/START 标准对比第二版标准药品更明确, 指标更具体。对于临床医师和药师来说, 更加具体实用。

2.2 第三版标准更科学合理

第三版 STOPP/START 标准拟议时间距离第二版标准发布已有 7 年之久, 在此期间有关老年人 PIM 和潜在性处方遗漏 (PPO) 的文献大量增加, 因此新标准对第二版标准内容进行了大量的修订和更新, 疾病范围也根据新的循证证据进行了限定。使新标准更加科学合理。例如沙库巴曲缬沙坦是在 2015 年先后在美国和欧盟获得上市批准, 2017 年中国国家食品药品监督管理总局批准上市。欧美和中国的心力衰竭指南关于慢性 HFREF 治疗中, 均推荐沙库巴曲缬沙坦替代 ACEIs 或 ARBs, 以进一步降低心力衰竭的发病率及死亡率^[9-11]。在第三版 START 标准中, 新增了相关标准条目, 即 2 (9) 对于已经进行了足剂量的 ACEIs 或 ARBs 治疗后仍出现持续性 HFREF 的患者建议用沙库巴曲缬沙坦替代 ACEIs 或 ARBs。

2.3 新标准带来的挑战

第三版 STOPP/START 标准较第二版标准条目增加了 66.67%。诸多的审查规则对其在临床医师日常药物审查中的应用提出了挑战。通过手工筛查可能耗费大量的人力和时间成本。而开发和使用计算机软件将 STOPP/START 转换为算法,在医师处方开具同时直接给出 STOPP/START 标准化建议辅助决策,提高标准应用的便利性,这就需要医师、药师和信息工程师的沟通协作。目前已有计算机辅助 STOPP/START 标准应用于临床的研究^[12-14], Verdoorn 等^[14]将第二版 STOPP/START 标准集成到临床决策支持系统中,但由于计算机编辑的审查规则分辨率较低,导致过多假阳性结果出现,使计算机辅助审查接受率低。因此亟须更加精准的计算机语言辅助,使新版 STOPP/START 标准更好地服务临床。

2.4 删除条目未对应部分解释

对比第二、第三版标准,笔者实际发现 STOPP 标准删除了 4 个条目,START 标准删除了 3 个条目。除了上文“1.4”项下删除内容提到的 3 个条目外,另有第二版 STOPP 标准 2 个条目 [3 (11)、10 (6)] 和 START 标准 2 个条目 [1 (2)、3 (4)],笔者理解在新版本中也进行了删除。

综上所述,2023 年第三版 STOPP/START 标准新增、修订了多个标准条目,表述更加准确实用,更有利于帮助临床医师在常规药物审查期间发现和预防更多的不良药物-药物和药物-疾病相互作用。但要在临床诊疗中发挥更大的作用,还需先进的技术支持及多个部门通力合作。

参考文献

- [1] Gallagher P, Ryan C, Byrne S, et al. STOPP (Screening Tool of Older Person's Prescriptions) and START (Screening Tool to Alert doctors to Right Treatment) . Consensus validation [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2008, 46 (2): 72-83.
- [2] O' Mahony D, O' Sullivan D, Byrne S, et al. STOPP/START criteria for potentially inappropriate prescribing in older people: version 2 [J]. *Age Ageing*, 2015, 44 (2): 213-218.
- [3] NICE guideline [NG5]. Medicines Optimisation: The Safe and Effective Use of Medicines to Enable the Best Possible Outcomes [DB/OL]. [2024-3-25]. <https://www.nice.org.uk/guidance/ng5>.
- [4] Turner G, Clegg A, British Geriatrics Society, et al. Best practice guidelines for the management of frailty: a British Geriatrics Society, Age UK and Royal College of General Practitioners report [J]. *Age Ageing*, 2014, 43 (6): 744-747.
- [5] O' Mahony D, Cherubini A, Guiteras AR, et al. STOPP/START criteria for potentially inappropriate prescribing in older people: version 3 [J]. *Eur Geriatr Med*, 2023, 14 (4): 625-632.
- [6] Dutch Society for Geriatric Medicine. Multidisciplinary Guideline for polypharmacy in older people [DB/OL]. [2024-03-25]. https://richtlijndatabase.nl/richtlijn/polyfarmacie_bij_ouderen/polyfarmacie_bij_ouderen_2e_lijn.html.
- [7] Thomas RE, Thomas BC. A systematic review of studies of the STOPP/START 2015 and American Geriatric Society Beers 2015 criteria in patients ≥ 65 years [J]. *Curr Aging Sci*, 2019, 12 (2): 121-154.
- [8] 李渊源, 蔡伟伟, 辛海莉, 等. 老年人潜在不适当用药文献计量分析 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (9): 1556-1561.
- [9] 国家心血管病中心, 国家心血管病专家委员会心力衰竭专业委员会, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 等. 国家心力衰竭指南 2023 (精简版) [J]. *中华心血管病杂志*, 2023, 38 (12): 1207-1237.
- [10] Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37 (27): 2129-2200.
- [11] Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70 (6): 776-803.
- [12] O' Mahony D, Gudmundsson A, Soiza RL, et al. Prevention of adverse drug reactions in hospitalized older patients with multi-morbidity and polypharmacy: the SENATOR* randomized controlled clinical trial [J]. *Age Ageing*, 2020, 49 (4): 605-614.
- [13] Sallevelt BTGM, Huibers CJA, Heij JMJO, et al. Frequency and acceptance of clinical decision support system-generated STOPP/START signals for hospitalised older patients with polypharmacy and multimorbidity [J]. *Drugs Aging*, 2022, 39 (1): 59-73.
- [14] Verdoorn S, Kwint HF, Hoogland P, et al. Drug-related problems identified during medication review before and after the introduction of a clinical decision support system [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2018, 43 (2): 224-231.

(收稿日期: 2024-04-21; 修回日期: 2024-06-28)

基于 Kano-QFD 模型的 PIVAS 药学服务需求分析与服务模式构建

凌亚, 朱玲, 豆兴茹, 潘振峰, 曹谨谨, 孙怡, 陈蓉* (苏州大学附属第一医院药学部, 江苏 苏州 215006)

摘要: **目的** 准确有效地识别静脉用药调配中心 (PIVAS) 药学服务的临床需求, 根据需求设计 PIVAS 药学服务模式, 提升药学服务质量。 **方法** 对我院临床护理人员进行 PIVAS 需求问卷调查, 通过 Kano 模型对临床需求进行属性分析, 同时基于质量功能展开 (QFD) 理论以临床需求属性为导向进行方案设计, 搭建质量屋模型。 **结果** 收集 16 个临床需求, 通过权重排序确定提高工作效率和提升临床沟通满意度为两大攻坚点, 制订我院 PIVAS 药学服务的方策为: ① 优化智能审方系统; ② 优化工作流程; ③ 完善绩效考核制度; ④ 建立 PIVAS 药师与临床沟通新模式。 **结论** 通过 Kano 模型与 QFD 模型的结合, 更加准确地将临床需求转化为 PIVAS 药学实践, 实现以临床需求为驱动的 PIVAS 药学服务模式。

关键词: 静脉用药调配中心; Kano-QFD 模型; 药学服务

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3403-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.042

Demand analysis and service model construction of PIVAS pharmacy service based on Kano-QFD model

LING Ya, ZHU Ling, DOU Xing-ru, PAN Zhen-feng, CAO Jin-jin, SUN Yi, CHEN Rong* (Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou Jiangsu 215006)

Abstract: Objective To accurately and effectively identify the clinical demands of pharmacy intravenous admixture services (PIVAS) pharmacy service, design PIVAS pharmacy service model according to the demands, and improve the quality of pharmacy service. **Methods** PIVAS demand questionnaire was prepared for clinical nursing staff in our hospital, and attribute analysis of clinical demand was conducted out through the Kano model. Meanwhile, programme was designed based on the QFD theory with the attributes of clinical demand as the guide, and the quality house model was constructed. **Results** Totally 16 clinical demands were collected, improving efficiency and satisfactory communication satisfaction were the two main aspects in weighted ranking, and the PIVAS pharmacy service policy was as follows: ① optimization of the intelligent prescription system; ② workflow simplification; ③ optimizing performance appraisal system; ④ establishment of a PIVAS pharmacist-clinical communication system. **Conclusion** By the combination of Kano model and QFD model, we accurately translate clinical demands into PIVAS pharmacy practice to facilitate PIVAS pharmacy service driven by clinical demands.

Key words: PIVAS; Kano-QFD model; pharmacy service

静脉用药调配中心 (PIVAS) 是医疗机构为患者提供静脉用药集中调配专业技术服务的部门, 通过静脉用药处方医嘱审核干预、加药混合

调配、参与静脉用药使用评估等为临床提供优质、可直接静脉输注的成品输液^[1]。随着国家医药卫生体制改革的不断推进, 医疗服务质量越来越受

基金项目: 苏州市卫健委卫生青年骨干人才“全国导师制”项目 (No.Qngg2021002); 苏州大学横向项目 (No.H230343)。

作者简介: 凌亚, 男, 主管药师, 主要从事医院药学方面的工作, email: njmuly@163.com *通信作者: 陈蓉, 女, 主任药师, 主要从事医院药学方面的工作, email: rongchen_76@aliyun.com

到人们的重视，因此如何科学合理地评价医疗服务质量显得尤为重要。在临床日常工作中，医嘱提交、病区成品输液核对签收以及给予患者用药都是由病区临床护士完成，因此临床护士满意度是评估 PIVAS 服务质量的一个重要指标^[2]。2021 年发布的《静脉用药调配中心建设与管理指南（试行）》第三十条规定，PIVAS 药师应当与临床科室保持紧密联系，了解各临床科室静脉用药特点、总结临床典型案例，调研、掌握临床静脉用药状况，收集临床科室有关成品输液质量等反馈信息^[1]。国家卫生健康委《关于进一步加强用药安全管理提升合理用药水平的通知》指出当前推进药学服务应从“以保障药品供应为中心”转变为“在保障药品供应的基础上，以重点加强药学专业技术服务，参与临床用药为中心”^[3]。因此，深入临床，了解临床需求，并基于临床需求及时优化 PIVAS 药学服务模式显得尤为重要。

Kano 模型由东京理工大学 Noriaki Kano 教授发明，是一种根据产品质量要素与顾客满意度之间不同类型的非线性关系对用户进行分类和优先排序的工具，被广泛应用于提升产品服务质量的^[4]。有研究显示将 Kano 模型应用于医疗服务需求评价中，可为医疗服务质量改进提供依据^[5-6]。功能质量展开（quality function deployment, QFD）主要通过“质量屋”模型，以文字图片结合形式表现用户需求与产品要素之间的联系，用于分析产品的设计目标^[7]。Kano 模型分析可以对用户需求进行分类，但不具有将用户需求转化为产品设计要素功能，通常在满意度评价前作为一种辅助研究模型^[8]。将 Kano 模型与 QFD 模型进行结合即 Kano-QFD 模型，可有效完善模型功能并且提高模型可靠性，应用 Kano-QFD 模型不但能够准确分析用户需求，确定正确服务方向，还能够引导产品设计符合用户需求，保证用户满意度^[9]。本研究旨在应用 Kano 模型与 QFD 模型集成方法，准确有效地识别 PIVAS 药学服务的临床需求，根据需求设计 PIVAS 药学服务模式，提升药学服务质量。

1 资料与方法

1.1 Kano 模型构建

1.1.1 Kano 模型问卷设计 通过访谈法对我院两名内外科护理部主任和两名 PIVAS 负责人就药学服务需求进行访谈，获取原始数据。问卷设计在借鉴国内外成熟的满意度调研问卷指标基础上，结合三甲医院 PIVAS 药学服务的特征，根据

Kano 模型中的“二维度”概念，将服务内容中的条目设置成正反两个问题，问卷设计给临床护士提供的选项均为：非常满意、应该如此、无所谓、尚能忍受、不满意 5 个选项。根据每个项目的配对问题，受访者有 5×5 种回答结果，根据既往研究的属性采集方式，研究者根据每个组合可以给出一个合适的属性定义^[6]。其中 A 代表魅力属性，指满足此类需求会明显增加用户满意度，不满足也不会引起用户大量不满；M 代表必备属性，指在满足此类需求时并不会明显增加用户满意度，但在不满足时则会显著降低用户满意度；O 代表期望属性，满足此类需求时能够提升用户满意度，不满足时则会降低用户满意度；I 代表无差异属性，用户对此需求不感兴趣，无论满足与否都不影响用户满意度；R 代表反向属性，指用户对此类需求有着相反的期望，满足反而会降低用户满意度；Q 代表可疑属性，指提供此类需求或不提供此类需求都满意或不满意。具体见表 1。

表 1 Kano 模型分类^[6]
Tab 1 Classification of Kano model^[6]

提供此项服务	不提供此项服务				
	非常满意	应该如此	无所谓	尚能忍受	不满意
非常满意	Q	R	R	R	R
应该如此	A	I	I	I	R
无所谓	A	I	I	I	R
尚能忍受	A	I	I	I	R
不满意	O	M	M	M	Q

1.1.2 Kano 模型问卷信效度分析 信度方面，采用普遍使用的 Cronbach's α 信度系数法。一般而言， $\alpha > 0.7$ ，表示信度相当高； $0.35 < \alpha < 0.7$ ，表示信度尚可；若 $\alpha < 0.35$ ，则表示信度较低。效度分析通过计算 KMO 值和 Bartlett 球形检验显著性进行评价。

1.1.3 Kano 模型问卷调研 本研究调查地点选取我院临床输液在 PIVAS 进行调配的科室，调查对象为临床护士。由研究者对临床护士进行一对一问卷调查，根据问卷调查结果识别临床需求的属性分类。调查时间为 2023 年 5 月 10 日—7 月 10 日。

1.1.4 临床需求属性分类 依据最大百分比进行分类，根据调研结果将临床需求分为魅力属性、必备属性和期望属性。

1.2 QFD 模型构建

1.2.1 临床关键需求确定 选择省内具有代表性的两家医院 PIVAS 做对比，通过对其负责人的访谈和交流，设定了本研究需要达成的目标水平。

通过需求重要度、水平上升率、魅力值的确定（魅力属性赋值 1.5，期望属性赋值 1.2，必备属性赋值 1.0）计算出质量需求的绝对权重（绝对权重 = 重要度 × 水平提高率 × 魅力值）与相对权重（将绝对权重求和，各项目所占百分比即需求相对权重）。

1.2.2 设定目标值和攻坚点 将相对权重进行排序，结合实际，选择相对权重较高的质量需求。

1.2.3 质量设计与方策拟订 构建质量需求 - 质量特性质量屋（HQQ），左墙为各项质量需求，天花板为质量需求相对应的质量特性，研究者对质量需求和质量特性的相关性打分，分值为 1、3、5 分别对应相关性弱、一般、强。 $W_j = \sum R_i \cdot R_{ij}$ （ W_j 为第 j 个服务要素的重要度， R_j 为第 i 项临床需求与第 j 项服务要素的相关程度系数）。运用独立配点法计算出质量特性重要性，根据质量特性重要性排序。

1.2.4 质量传递与方策实现 根据质量特性重要性设计 PIVAS 药学服务新模式。具体流程见图 1。

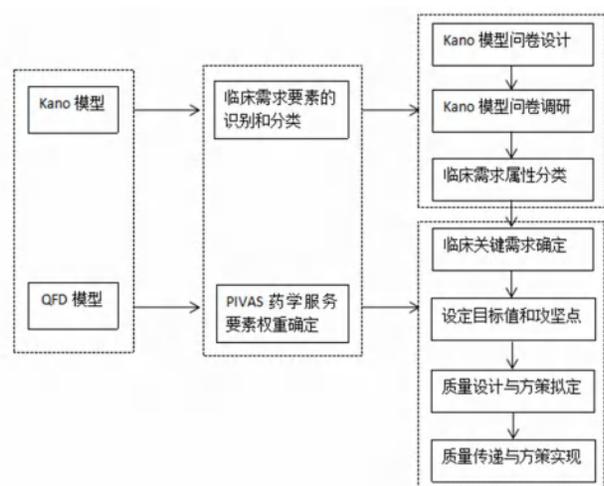


图 1 基于 Kano-QFD 模型的 PIVAS 药学服务模式构建流程
Fig 1 Construction of PIVAS pharmacy service model based on Kano-QFD model

2 结果

2.1 临床需求获取

研究者根据专家筛选条目后共获得的临床需求 16 项，经过层次化分析分为安全、服务和效率 3 项，具体见表 2。

2.2 调查问卷基本情况

此次调查问卷共发放 170 份，回收 170 份，有效问卷 167 份，有效率为 98.24%。本研究共调查临床护理人员 167 人，男性 8 人，女性 159 人；年龄在 21 ~ 45 岁，平均年龄为 (28.43 ± 3.70) 岁；内科护理人员 82 人，外科护理人员 85 人；学历以

表 2 药学服务需求

一级需求	二级需求	三级需求
高质量 PIVAS 药学服务	安全	前置审方
		药师审方
		减少调配差错
		避免输液漏液
	服务	避免输液颜色异常、浑浊等问题
		合理专业用药咨询
		PIVAS 药师到临床沟通
		PIVAS 药师帮助处理输液不良反应
		成品输液问题解决
		药师服务态度
	效率	固定系统接收医嘱时间
		药品各批次顺序合理性及衔接
		成品输液及时送达病区
		及时退药
		药品缺货、更换厂家等及时通知病区
		及时接听病区电话

本科为主，占 90.4%；专科占 7.2%；硕士占 2.4%。

2.3 Kano 问卷质量分析

对 Kano 问卷的数据资料进行分析，其中 Cronbach' α 值为 0.898，大于 0.8，表明问卷信度较好；效度检验 KMO = 0.851，Bartlett 球形检验 P 值 < 0.001，表明问卷整体效度较好。

2.4 各种需求的属性分类

16 项服务需求的属性分类结果见表 3。其中魅力属性和必备属性分别为 4 项，期望属性为 8 项。

表 3 按 Kano 模型分类的临床需求

Kano 模型属性	临床需求
魅力属性	前置审方
	合理专业用药咨询
	PIVAS 药师到临床沟通
	药师帮助处理输液质量引起的不良反应
必备属性	减少调配差错
	避免输液漏液
	避免输液颜色异常、浑浊等问题
	固定系统接收医嘱时间
期望属性	药师审方
	成品输液问题解决
	良好的药师服务态度
	药品各批次顺序合理性及衔接
	成品输液及时送达病区
	及时退药
	药品缺货、更换厂家等及时通知病区
	及时接听病区电话

2.5 质量需求层次化分析及评价结果

本研究通过重要度、魅力值、水平提高率的

确定，计算出需求的相对重要度，根据质量需求相对重要度排序，相对重要度排名前六的分别为前置审方、成品输液及时送达病区、合理专业用

药咨询、PIVAS 药师到临床沟通、药师审方和成品输液问题解决。根据以上设定攻坚点位：①提高工作效率；②提升临床沟通满意度。具体见表 4。

表 4 临床需求相对权重
Tab 4 Relative weighting of clinical demands

第一层	第二层	重要度	魅力值	本医院水平	A 医院	B 医院	目标水平	水平提高率	绝对重要度	相对重要度
安全	前置审方	4.50	1.50	3.00	4.00	4.00	5.00	1.67	11.25	0.101
	药师审方	4.80	1.20	4.00	4.00	3.00	5.00	1.25	7.20	0.065
	减少调配差错	5.00	1.00	4.00	4.00	3.00	5.00	1.25	6.25	0.056
	避免输液漏液	5.00	1.00	4.00	3.00	3.00	5.00	1.25	6.25	0.056
	避免输液颜色异常、浑浊等问题	5.00	1.00	4.00	4.00	4.00	5.00	1.25	6.25	0.056
服务	合理专业用药咨询	4.90	1.50	4.00	4.00	3.00	5.00	1.25	9.20	0.083
	PIVAS 药师到临床沟通	3.00	1.50	2.00	2.00	3.00	4.00	2.00	9.00	0.081
	药师帮助处理输液质量引起的不良反应	3.00	1.50	3.00	2.00	2.00	4.00	1.33	6.00	0.054
	成品输液问题解决	4.80	1.20	4.00	4.00	4.00	5.00	1.25	7.20	0.065
	药师服务态度	4.60	1.20	4.00	4.00	3.00	5.00	1.25	6.90	0.062
效率	固定系统接收医嘱时间	4.00	1.00	4.00	4.00	4.00	5.00	1.25	5.00	0.045
	药品各批次顺序合理性及衔接	4.70	1.20	4.00	4.00	4.00	5.00	1.25	7.05	0.063
	成品输液及时送达病区	4.80	1.20	3.00	3.00	3.00	5.00	1.67	9.60	0.086
	及时退药	4.50	1.20	4.00	3.00	3.00	5.00	1.25	6.75	0.061
	药品缺货、更换厂家等及时通知病区	4.50	1.20	4.00	4.00	3.00	5.00	1.25	6.75	0.061
	及时接听病区电话	4.60	1.20	4.00	3.00	3.00	5.00	1.25	6.90	0.062

2.6 质量屋构建

采用专家咨询与小组内部讨论方式，将临床相关需求转化为具体可执行的质量特性。利用质量屋技术，将质量特性从质量需求中抽离出来。通过临床需求匹配得出相应的服务要素，并建立临床需求和服务要素之间的二维矩阵，即质量屋的房间。根据专家和参考文献意见，对临床需求和质量改进要素打分，最终根据公式计算出每项质量改进要素的重要度。具体见表 5。

2.7 质量传递与方策实现

通过对攻坚点质量特性值排序，排名前三的质量特性分别为定期进行专业技能培训并考核，提升药师工作积极性、增加药师与临床沟通。小组讨论建立本院 PIVAS 药学服务系统，更好地实现临床各方面的需求，并确定我院 PIVAS 药学服务模式的方策为：① 优化智能审方平台系统；② 优化工作流程；③ 完善绩效考核制度；④ 建立 PIVAS 药师与临床沟通新模式，具体见表 6。

3 讨论

目前，越来越多的研究模型用于改善医疗服务质量，其中应用较多的是服务质量模型 (SERVQUAL)^[10]、PDCA 循环管理^[11-12]，以及加权逼近理想解排序 (TOPSIS) 法^[13]等。Kano-QFD

模型可在准确分析用户具体需求的基础上，确定重点服务方向，设计出符合用户需求的服务模式，越来越多地应用于医疗行业中从而改善医疗服务质量。张幸国等^[14]利用 Kano-QFD 模型以相关药学服务需求为中心，改进当前药学服务中存在的问题，设计出更具有市场竞争力的药学服务模式。刘岳金等^[15]基于 QFD 模型结合 PDCA 循环管理工具，优化药学服务降低感染风险，推动药学服务的现代化、科学化和精细化管理。孙志勇等^[16]通过 Kano-QFD 模型创新型品管圈，从患者需求出发，改进当前药学服务中存在的问题，构建了满足慢病患者需求的全流程药学服务模式。

本研究通过 Kano 模型迅速有效地识别临床需求，计算各临床需求的权重并进行排序，找到影响临床满意度的关键因素，利用 QFD 理论对 PIVAS 药学服务设计要求的重要度进行量化，最终得出 PIVAS 药学服务的重点设计方向，将各功能设计转化为日常 PIVAS 工作模块，建立以临床需求为导向的 PIVAS 管理及工作模式。

① 优化智能审方平台系统：PIVAS 药师团队与信息药师根据最新药品说明书、临床指南、UpToDate 临床顾问等权威数据及我院静脉用药情况，通过定期对审核规则的科学定义，建立静脉

表 5 临床需求重要性与质量特性相关矩阵

Tab 5 Clinical demands importance and quality characteristics correlation matrix

需求	质量特性											
	前置审方覆盖率	药师审方	摆药、加药、核对差错率	输液漏液率	输液量合格率	增加药师与临床沟通	优化工作流程、明确岗位职责	调配效率考核	定期进行专业技能培训和考核	提升药师工作积极性	信息登记记录奖惩制度	软件系统定期维护
前置审方	5	3										5
药师审方	5	5				5	1		5	5	3	
减少调配差错	3	3	5				1	3	1		3	
避免输液漏液				5							3	
避免输液颜色异常、浑浊等问题					5	1			5		3	
合理专业用药咨询		3				3			5	3	5	
PIVAS 药师到临床沟通		3				5	3		5	3	3	
药师帮助处理输液质量引起的不良反应						5			5	3	1	
成品输液问题解决						5	3		5	3	1	
药师服务态度							3			5		
固定系统接收医嘱时间												5
药品各批次顺序合理性及衔接	5	5				3	5		5			
成品输液及时送达病区	1						5	5	3	3		
及时退药	1					3	5		1	5		
药品缺货、更换厂家等及时通知病区						3	3			5	5	3
及时接听病区电话							3			5	5	
质量特性值	113.1	178.31	31.25	31.25	31.25	242.46	240.7	28.8	301.24	295.46	232.24	178.9

表 6 PIVAS 药学服务模式的构建方策

Tab 6 Strategies for constructing a PIVAS pharmacy service model

创新方策	选定方案
优化智能审方平台系统	完善前置审方流程规范 建立肠外营养医嘱自动化审核模块 基于循证药学创建 PIVAS 药品审方专家库
优化工作流程	完善智能摆药、贴签、加药系统 全流程使用条码标签扫描 建立责任药师制 护士站与 PIVAS 系统对接，帮助护士随时查看成品输液信息
完善绩效考核制度	智能差错管理系统并建立奖惩制度 药物咨询与临床服务考核 临床投诉与满意度评分
建立 PIVAS 药师与临床沟通新模式	定期进行 PIVAS 药师培训、提升专业素养 实施病区合理用药个人负责制 收集临床意见，增强主动服务意识

用药审方数据库，并通过审核规则的智能优化，从而建立系统优先、药师辅助的审核体系。肠外营养审核根据药物选择合理性、药物配比合理性、药物相容性与稳定性等多个层面展开，通过功能模块设计要点，建立信息化肠外营养处方审核逻辑和审核数据库，构建肠外营养处方决策系统。对于药师审方需要根据系统中提示情况审核患者特殊用法用量。自动批次管理系统根据给药频次、输液顺序、医嘱用法、临床用药习惯、输液稳定性等实现系统自动划分批次，药师在已排批次基础上根据当日输液量和临床特殊需求手动调整用药批次，确保患者及时用药和衔接。

② 优化工作流程：第一，采用信息化技术

用于 PIVAS 的建设，比如药品条码技术、自动化溶媒贴签技术、六工位机器人加药技术、成品输液小车轨道运输技术等，通过对信息化技术的不断优化可显著降低差错问题；第二，通过建立责任药师制对每个班次人员的责任分工以及对成品输液全程的监控和记录，能够有效防范药品不良事件，每日派出一名专职药师负责临床沟通，包括接听电话、退药、药品缺货、更换厂家等及时通知病区、药物咨询以及临床沟通交流等，提升药学服务质量；第三，通过护士站工作系统与 PIVAS 系统相连接，临床护士可随时查看患者成品输液信息，方便临床工作安排。

③ 完善绩效考核制度：通过建立责任药师制，

根据工作量、工作质量(含差错情况)、劳动纪律、药学服务满意度、科内贡献、个人综合评价等方面的内容,采用打分制模式,全流程采用电子化信息采集,全面评估药师绩效。对于静配中心质控、培训、科研等贡献采取赋分加分模式,全流程采用电子化信息采集方式,在公平公正的基础上,提高员工积极性和改善工作纪律。刘玲等^[17]通过对我国 PIVAS 绩效考核的文献分析,建议构建适宜的绩效考核体系,可提高工作效率与工作质量,降低差错率,确保其保质保量地完成日常工作。

④ 建立 PIVAS 药师与临床沟通新模式:首先,PIVAS 每月组织相关药学专业知识培训并组织考核,考核成绩与绩效相关联。其次,实施病区合理用药负责制,每名药师负责相应病区,通过审方系统导出不合理医嘱,按月撰写不合理医嘱点评报告,统计不合理医嘱率;针对存疑的用药问题,积极查阅文献,寻求高级别循证证据并及时与临床沟通答疑,将临床用药服务落实到深处。此外,PIVAS 药师根据不同科室的用药情况以及常见的咨询问题具体分析,比如不同成品输液储存时间、是否需要避光、常见不良反应等进入临床宣教,以达到按科室解决问题。

本研究调研人群可能因为性别、年龄、科室、学历等对 PIVAS 存在不同的临床需求,调研问卷结果存在偏倚,从而对药学服务重点产生偏差,因此对于今后的研究中应进行大样本数据调研从而更加准确地满足临床需求。其次,本研究调查对象仅为临床护理人员,对于临床医师的需求未进行调研,因此后续应该对临床医师进行访谈调研,更加全面地了解临床需求,建立更完整的药学服务方案。

本研究通过 Kano-QFD 模型识别临床需求并通过方策改进开展 PIVAS 药学服务实践,是将创新型质量管理工具与药学服务模式转变的实践相融合的初步尝试,以临床对于 PIVAS 的需求为导向,结合 PIVAS 部门内部工作流程和内容,契合药师胜任力与药学服务转型需求,从优化智能审方系统、优化工作流程、完善绩效考核制度和建立 PIVAS 药师与临床沟通新模式等方面探索满足临床需求的 PIVAS 药学服务模式,以期给 PIVAS 药师同行提供理论上的借鉴。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委. 静脉用药调配中心建设与管理指南(试行). 国卫办医函[2021]598 [EB/OL]. (2021-12-10) [2024-04-24]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/202112/6f-c8ac699c1f4fefb9e80a80d4f4fa55.shtml>.
- [2] 倪倍倍, 冷萍, 刘晓英, 等. 我院临床护士对 PIVAS 服务满意度的调查分析[J]. 中国药房, 2017, 28(33): 4629-4632.
- [3] 国家卫生健康委, 国家中医药管理局. 国卫医函[2022]122 号: 关于进一步加强用药安全管理提升合理用药水平的通知 [EB/OL]. (2022-07-27) [2024-04-24]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-07/30/content_5703604.htm.
- [4] 薛景梅, 邢可欣. 基于 Kano-QFD 模型的校园快递服务质量提升研究[J]. 河北科技大学学报(社会科学版), 2019, 19(2): 31-38.
- [5] 张卓一, 黄小民, 周晶晶, 等. Kano 模型在急诊服务质量改进中的应用[J]. 医院管理论坛, 2013, 30(8): 23-27.
- [6] 李腾辉, 石应康, 文进. 基于 Kano 模型的三甲医院门诊服务调查分析[J]. 中国医院管理, 2015, 35(3): 36-38.
- [7] 刘雪蕊, 于东玖. 下肢单肢伤残的康复装备设计研究[J]. 设计, 2021, 34(3): 103-105.
- [8] 薛景梅, 邢可欣. 基于 Kano-QFD 模型的校园快递服务质量提升研究[J]. 河北科技大学学报(社会科学版), 2019, 19(2): 31-38.
- [9] 李卓, 刘星辰. 基于 KANO-QFD 模型的家划船机设计研究[J]. 艺术与设计(理论), 2023, 2(11): 117-120.
- [10] 李旭, 赖思宏, 陈静纯, 等. 基于 SERVQUAL 模型的基层医疗卫生服务质量评价研究[J]. 中国卫生事业管理, 2024, 41(3): 274-279.
- [11] 陈刚, 袁玉丽, 黄秋明. 采用 PDCA 循环管理规范重点监控药品合理使用的实践[J]. 中南药学, 2022, 20(7): 1698-1703.
- [12] 吴戈, 刘芳群, 欧艳, 等. 品管圈在自动化建设中提高门诊药房处方调配速率及优化调配路径的应用与效果分析[J]. 中南药学, 2018, 16(7): 1030-1033.
- [13] 宋佳伟, 李春贤, 施朕善, 等. 基于加权 TOPSIS 法评价与药学干预对癌痛治疗效果的分析[J]. 中南药学, 2019, 17(2): 281-285.
- [14] 张幸国, 赵昕, 叶云, 等. 基于 Kano-QFD 集成方法的区域药学服务需求分析与服务模式构建[J]. 医院管理论坛, 2021, 38(2): 55-59.
- [15] 刘岳金, 叶岩荣, 王彩云, 等. 基于 QFD 优化医院药学服务模式降低感染风险[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(2): 263-268.
- [16] 孙志勇, 史香芬, 张瑞, 等. 基于质量功能展开创新型品管圈的门诊药学服务实践[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(14): 1483-1487.
- [17] 刘玲, 胡建新, 陶松. 我国静脉用药集中调配中心绩效考核现状的文献分析[J]. 中国药房, 2023, 34(3): 280-284.

(收稿日期: 2024-04-24; 修回日期: 2024-06-13)

国外药品监管信息电子提交体系分析

孙哲丰 (国家药品监督管理局信息中心, 北京 100076)

摘要: 美国、欧盟、日本等国家或组织持续推进安全、可靠、高效的药品监管信息电子提交体系的建设和应用, 其中美国的 eCopy、eSubmitter、ESG 等药品监管信息电子提交工具建设相对较早、使用较久且相对成熟。为此, 本文在概要分析美国、欧盟、日本药品监管信息电子提交体系的基础上, 重点就美国药品监管信息电子提交体系进行分析。再结合我国现状和要求, 对比国外建设情况, 总结得出不断强化体系化设计、持续完善标准规范、进一步确保网络和数据安全等关键点, 以期助力国内药品监管信息电子提交等有关信息化系统的建设。

关键词: 药品监管; 电子提交; 数据安全

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3409-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.043

Analysis on the electronic submission system for drug administration information in foreign countries

SUN Zhe-feng (Center for Information, NMPA, Beijing 100076)

Abstract: Countries or organizations such as the United States, the European Union and Japan continue to promote the construction and application of safe, reliable, and efficient electronic submission systems for drug administration information. The electronic submission systems for drug administration information in the United States, such as eCopy, eSubmitter, and ESG, were established early, and have been used for a long time. This paper briefly introduced the electronic submission systems for drug administration information in the United States, the European Union, and Japan, and focused on analyzing the one in the United States. After comparing the situation abroad, we summarized key points such as continuously strengthening systematic design, improving standard specifications, and further ensuring network and data security, to assist in the establishment of electronic submission of drug administration system in China.

Key words: drug administration; electronic submission; data security

信息提交方式经历了从纸质到电子化、从无序到有清晰层次结构的发展历程。以药品注册申报资料的提交为例, 国际上, 提交方式经历了纸质提交、PDF 刻盘提交、非电子通用技术文件 (Electronic Common Technical Document, eCTD) 电子提交、eCTD 电子提交的迭代发展过程。美国、欧盟、日本共同发起的国际人用药品注册技术协调会 (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 于 2008 年 7 月发布了《ICH eCTD 技术规范 (V3.2.2)》, 建议以通过互联网进行安全的数据交换作为传递手段。目前, 美国强制要求新药临床试验申请、新药上市申请、仿制药上市申请、生物制品上市许可申请、药物主控文件申请等以 eCTD 格式电子提交^[1], 欧盟强制要求所有药品上市注册申请均以 eCTD 格式电子提交^[2], 日本大多数新药上市

申请均以 eCTD 格式电子提交^[1]。

药品监管信息提交方式的改变带来了工作方式的改变, 包括试验记录电子化、提交方式电子化、审评审批电子化等。这种改变也带来了便利: 一方面, 就信息本身而言, 技术上可实现信息的即时采集、审阅、传输及归档, 管理上可建立或参考已有的元数据等标准规范, 有利于信息的全生命周期、标准化、一体化、高效率管理; 另一方面, 就企业和监管发展而言, 无纸化流转、信息的关联利用等, 有利于绿色可持续发展、提高监管效能、企业降本增效。

1 美国、欧盟、日本药品监管信息电子提交体系的对比分析

研究发现, 美国食品药品监督管理局 (FDA)、欧洲药品管理局 (EMA)、日本药品和医疗器械管理局 (PMDA) 等均致力于推进建立安全、可靠、高效的药品监管信息电子提交体系。

作者简介: 孙哲丰, 女, 工程师, 主要从事信息化研究, email: sunzf@nmpaic.org.cn

相同的是, FDA、EMA 和 PMDA 的药品监管信息电子提交体系均包括了系统版和网页版的电子提交网关 (Electronic Submission Gateway, ESG)。系统版, 即安装客户端、建立网关到网关的连接后, 申请者可实现和监管机构间的系统到系统、遵循行业传输协议的自动化传输和提交。网页版, 即基于浏览器的 HTTPS 等安全连接, 申请者可以实现文件的上传、下载。

不同的是, FDA、EMA 和 PMDA 的 ESG 使用范围、技术侧重点存在差异, FDA、EMA 等存在除 ESG 之外的其他电子提交方式。关于使用范围, FDA 早在 2006 年开始使用 ESG^[3], 要求所有不超过 10 GB 的 eCTD 都通过 ESG 提交, 而大于 10 GB 的 eCTD 及其他文件既可以通过 ESG 又可以通过 USB 驱动器等其他方式提交。EMA 于 2012 年上线了 ESG^[4], 强制要求所有 eCTD 格式的集中程序通过 ESG 递交。PMDA 亦搭建了 ESG^[5], 支持临床数据 eCTD、临床数据交换标准协会 (Clinical Data Interchange Standards Consortium, CDISC) 电子化提交。关于技术侧重点, EMA 的 ESG 突出安全、高效的数据传输, 实现对传输过程的查询和监控, 强调认证管理架构的灵活性, 即可使用自有认证系统, 也可采用主流的公钥基础设施认证体系, 强化互联互通, 即兼容行业传输协议、报文格式。PMDA 的 ESG 聚焦于安全、高效、可扩展等方面, 设计了身份验证、加密、回执等可靠消息传递机制, 预留了可供将来使用的多种类型电子数据空间, 支持后端系统集成和格式校验集成, 支持格式数据解析, 并可直接写入数据库。关于其他提交方式, 除 ESG 外, FDA 还提供了 eCopy、eSubmitter 等工具及疫苗不良事件报告系统 (Vaccine Adverse Event Reporting System) 等, EMA 还提供了欧洲通用提交平台 (Common European Submission Platform)。

2 美国药品监管信息电子提交体系的重点分析

鉴于 FDA 的 ESG 开发相对较早, 电子提交体系相对完备, 本文对其进行重点分析。

FDA 各中心需求不同, 向 FDA 提交资料的方式主要包括 CD/DVD、其他媒介、在线门户网站及 ESG 等^[6], 为此, FDA 开发了 eCopy、eSubmitter、ESG 等工具, 建立了药品监管信息电子提交体系。

2.1 eCopy

eCopy 是一种电子版的提交资料, 即将纸质文件转换为电子文件, 再存储于 CD、DVD 或 U 盘等介质中^[7]。申请者可将上述介质、附手写签名或数字签名的纸质版公司附信, 一并提交至 FDA 有关中心。

2.1.1 关于文件的格式 eCopy 的结构和所含文件类型, 包括单一 PDF 格式、多文件格式、多媒体资料格式、数据统计资料格式等。

2.1.2 关于文件的规范性 eCopy 文件必须符合《用

于医疗器械提交的 eCopy 程序》等指南有关要求, 尤其要关注电子文档的命名, 若出现文件命名规则、命名格式等不满足指南要求, 则会导致审核暂停, 直到提交了满足要求的 eCopy 才会进入下一个阶段。为此, FDA 开发了 eCopy Validation 小工具以验证 PDF 格式的 eCopy 是否符合技术要求, 并且开发了 eSubmitter^[6] 以协助生成符合技术标准的 eCopy 文件。

2.1.3 关于文件的提交反馈 如果 eCopy 审核通过, 则会将 eCopy 内容和公司附信加载到相应中心的资料提交库中, 否则将书面通知申请者。书面通知将描述 eCopy 失败的原因以及提交替换 eCopy 的邮寄要求等, 而在替换的 eCopy 中, 需提供完整的内容, 而不只是更正的内容。

2.1.4 优势和局限性 eCopy 适用于医疗器械上市前通知提交、紧急使用授权和预提交等。这种方式减轻了过去除电子文档外还需要提交纸质文档的负担, 意味着 FDA 进入无纸化审核的时代。同时, 这种方式的局限性在于: ① 只是将纸质文档转变为电子文档, 文档本身的内容未做任何改变; ② 电子文档是不加密的状态。实验室报告可以是加密的状态, 但操作有限, 只能读取、不能编辑。目前, FDA 生物制品评价与研究中心等机构鼓励以 ESG 的形式提交符合技术标准的 eCopy 和公司附信, 而非邮寄。

2.2 eSubmitter

eSubmitter 是一款由 FDA 发布的包含电子提交模板的供申请者自愿使用的独立、免费软件, 可帮助申请者完成电子申请材料的规范填写^[6]。

2.2.1 关于报告类型 为满足不同申请类型的需求, eSubmitter 提供了 eCopy、MedWatch 表单、报告等多种选项^[8]。同时, eSubmitter 还可以添加各类型中的 PDF 文件, PDF 文件内不包含附件, 没有密码保护, 且应小于 50 MB。

2.2.2 关于使用 eSubmitter 使用的辅助性材料包括《FDA eSubmitter 电子提交用户手册》《eSubmitter 快速指南》《FDA 电子提交计划的可用性——从有执照的血液机构提交》等。通过 eSubmitter, 申请者可对文件进行增、删、改、查、调整顺序等编辑操作, 以及检查文件是否符合规范。具体应用场景包括: ① 用 eSubmitter 制作 eCopy 后, 可以直接拷入 CD 等介质寄往 FDA; ② 在进行 ESG 账户创建的时候, 可以使用 eSubmitter 来制作 ESG 的测试文件; ③ 用 eSubmitter 制作的仿制药工厂电子自我鉴定被 validator 有关网站验证后, 可通过 ESG 上传至 FDA 药品评价与研究中心、FDA 生物制品评价与研究中心; ④ 可用于生物制品上市许可申请、年度报告和修订等内容的提交。

2.2.3 eSubmitter 的优势 ① eSubmitter 充分考虑信息的标准化、完整性及准确性等; ② eSubmitter 允许

离线使用。FDA 不会通过网络获取软件里面的信息,从而保证用户的信息安全;③ eSubmitter 在软件设计中兼顾 FDA 法规中的数据元素,并能生成符合 HL7 标准的 XML 信息,便于通过 ESG 成功传送报告^[9]。

2.3 ESG

ESG 是一个文档电子化、结构电子化、递交电子化、审阅电子化的一体化安全网关体系。通过该网关,企业可以相对安全地提交上市前和上市后的监管信息供审查,提交的信息也会自动路由到相应的 FDA 中心或办公室。具体涉及接收、确认、选择途径/路由和通知等步骤,上述步骤共同构成了电子提交的整个流程。“接收”是指将从申请者的系统转移到 ESG 的一个临时存储区。“确认”是指对发送者的确认,即提交物已从发送者的系统发送并由网关接收。“选择途径/路由”指的是将提交物交付给中心级存储区,并启动加载程序,将提交物放入中心接收系统中。“通知”指将提交物发送给负责本中心接收系统的人员。FDA 的 ESG 自 2006 年开始使用,符合超文本传输安全协议消息标准,并使用数字证书进行安全通信。

2.3.1 关于提交途径 ESG 的提交途径具体包括 WebTrader 和 AS2 两种方法^[10]。WebTrader 是为小批量报告的电子提交而设计的门户网站。用户可通过用户名和密码登录网站界面查看、数字签名、提交。为规范并方便 WebTrader 的使用, FDA 编制了《FDA ESG WebTrader 指南》。AS2 是为大批量报告的提交而设计的对接方式。该方式需要开发或购买软件、一定的服务器,该类软件能生成符合 HL7 信息交换标准的 XML 文件等,与 FDA 的系统直接对接,可以实现系统对系统、网关到网关的连接、自动提交、自动发送文件包,可接受 FDA 发回来的收据和确认信息。

2.3.2 关于账户的设置 设置 ESG 的 WebTrader 或 AS2 账户包括准备工作、注册测试账户、设置机器、发送测试文件、生产账户审批。为此, ESG 开发了测试账户登录入口、生产账户登录入口,并在入口处提供了使用指南、未来发展趋势等帮助服务。FDA 建议申请者在获得 AS2 大批量报告账户测试和审批前先获得 WebTrader 小批量报告账户测试,获得 WebTrader 小批量报告账户能够使报告者的 AS2 系统出现技术问题时使用 eSubmitter 和 WebTrader 作为备用。

2.3.3 ESG 优势 ① 提高时间效率,使即时送达成为可能;② 用于提交和归档等用途而生成的纸质资料数量减少;③ 运输费用被取消或减少;④ 可即时反馈电子资料是否已及时接收到,即确认情况,并对确认情况进行精细化管理,即按中心、时间等维度进行分类统计、分析等;⑤ 可借助云平台和 COTS 软件进行可扩展、高性能的升级改造。

3 思考

我国已经在药物警戒系统中启用了 ESG 技术^[11]。我国于 2017 年提出逐步实现各类注册申请的电子提交和审评审批,2021 年 12 月起实施 eCTD 申报,2023 年 1 月起以电子形式提交药品注册申报资料^[12],虽然目前的药品 eCTD 申报资料需通过物理电子媒介提交,但也正在积极开展 eCTD 申报资料 ESG 的技术研究^[13]。我国还按需开发了基于 B/S 架构的各类业务信息提交系统,例如药品业务应用系统等。此外,《“十四五”国家药品安全及促进高质量发展规划》完善国家药品不良反应监测系统专栏指出,要建立在线报告、网关传输等多种报告途径。《国家药监局关于实施药品电子通用技术文档申报的公告》(2021 年第 119 号)指出,后续随 eCTD 全面实施,将加快推进 ESG 建设,实现申报资料的网上提交。由此可见,与美国、欧盟、日本类似,我国也致力于推进建立安全、可靠、高效的药品监管信息电子提交体系。

为进一步推动我国药品监管信息电子提交体系的发展,更好地与国际接轨,结合我国现状和要求,对比分析 FDA、EMA、PMDA 的药品监管信息电子提交情况,可以从不断强化体系化设计、持续完善标准规范、进一步确保网络和数据安全等角度发力。

3.1 不断强化体系化设计

信息化系统的设计,强调系统思维^[14]。《数字中国建设整体布局规划》指出,要强化系统观念和底线思维,加强整体布局^[15]。

一方面, FDA 药品监管信息电子提交体系等突出了信息提交、查询、反馈、错误分析、纠错、版本控制、电子归档等的在线一体化设计,保障了系统运行的整体性、系统性、协同性;另一方面, ESG 对多、大文件更友好且便捷高效,所以在提交大文件时一般优选 ESG 方式提交。但在文件相对较少、系统或端口对接等出现故障而无法使用 ESG 方式提交时,可选择网页版文件提交方式。

基于此,可从如下角度探索,不断强化体系化设计。借鉴 FDA 等的经验,围绕信息采集、整理、分析、利用等的全生命管理开展系统设计,统筹考虑业务常规、基础性功能和错误提醒、纠错、版本控制、电子归档、反馈等便于异常管理、闭环管理类功能的设计,充分兼顾算力、存储等的当前需求和未来预期。考虑到电子提交体系的工具各有千秋、适用情况存在差异,在体系设计时须充分考虑各种场景下的各种需求,适时保留或开发符合当前需求或未来发展的工具,包括但不限于满足个性化需求或具有普适性的应用系统、ESG、各类校验验证和病毒检查类的工具等。

3.2 持续完善标准规范

ICH 已经发布了 eCTD 技术规范、eCTD 文件格式规范等一系列的药品监管信息电子提交有关的标准规范。FDA、EMA、PMDA 等相对较早地按照 ICH 等标准规范制定了本国或组织的标准规范,开展 ESG 等的建设。我国近些年也按照 ICH 等有关标准规范,制定了 eCTD 的技术规范、验证标准、实施指南等标准规范或技术要求,推进了 eCTD 的 ESG 提交技术研究。如《药物临床试验期间安全性数据快速报告标准和程序》等。

鉴于我国 ESG 等的建设相对较晚,为保证更好地与国际接轨,有必要继续全面学习 ICH 等的标准规范,持续跟进最新的标准规范建设动态。在掌握国际上的标准规范建设现状和发展方向的同时,立足国情,建立我国相关的标准规范,并在 ICH 等国际平台上积极宣传我国的建设经验,从而取长补短、持续遵守并不断完善我国的监管信息电子提交体系标准规范,如《药物临床试验期间安全性数据快速报告标准和程序》等。

3.3 进一步确保网络和数据安全

《数字中国建设整体布局规划》指出,要切实维护网络安全,完善网络安全法律法规和政策体系,要增强数据安全保障能力,建立数据分类分级保护基础制度,健全网络数据监测预警和应急处置工作体系。FDA、EMA、PMDA 等从规章制度、技术路径、保障机制等角度入手,努力保障网络和数据安全。我国在 eCTD 等的建设中,从资料传输的安全性、资料的真实性、资料的完整性、资料的机密性、网络安全风险、系统安全风险等角度入手,努力保障信息安全,并且建立了网络及系统安全、资料安全、管理安全等信息安全保障措施。由此可见,在数字产业化、产业数字化、数据价值化、数字化治理的大环境下,在药品监管信息电子提交系统建设中,网络和数据安全的保障值得关注且已形成广泛共识^[16]。

基于此,为进一步确保网络和数据安全,可以从体制、机制、法制、技术支撑等多角度协同发力。体制,可以是系统支撑服务部门,提供帮助服务、建立安全制度、统筹协调安全保障的诸多事务等。机制,可以是系统访问的权限管理机制、数据下载利用审批管理机制等。法制,可以是数据安全相关的标准规范、指南文件等。技术支撑,可以是大数据模型、加密技术、身份认证技术、访问控制技术、入侵检测与防御技术、安全审计与日志分析技术、数据备份与恢复技术、网络安全技术、数据安全传输技术、隐私计算等。通过上述工作的协同推进,构建出安全的体系架构,筑牢网络安全屏障,保障信息的安全性和完整性等。

4 小结

本文比较研究发现,美国、欧盟、日本等均致

力于推进安全、可靠、高效的药品监管信息电子提交体系,并重点分析了 eCopy、eSubmitter、ESG 等美国药品监管信息电子提交体系。最后,提出不断强化体系化设计、持续完善标准规范、进一步确保网络和数据安全等工作建议,以期助力国内药品监管信息电子提交有关信息化系统的建设及不断优化。

参考文献

- [1] 杜嘉晰,王峻霞,杨瑶瑶,等. ICH eCTD 研究及对我国实施的建议[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(19): 2166-2171.
- [2] 朱晓琳,李斌,杨东升,等. 我国 eCTD 实施策略研究——基于 ICH 国家经验借鉴[J]. 中国药学(英文版), 2016, 25(7): 552-558.
- [3] FDA. About ESG [EB/OL]. (2018-03-21) [2024-05-17]. <https://www.fda.gov/industry/electronic-submissions-gateway/about-esg>.
- [4] EMA. eSubmission Gateway and eSubmission Web Client [EB/OL]. (2024-03-20) [2024-05-17]. <https://esubmission.ema.europa.eu/esubmission.html>.
- [5] PMDA. New Drug Applications Using the Gateway System [EB/OL]. (2022-04-01) [2024-05-17]. <https://www.pmda.go.jp/files/000247156.pdf>.
- [6] FDA. FDA eSubmitter [EB/OL]. (2023-10-16) [2024-5-17]. <https://www.fda.gov/industry/fda-esubmitter>.
- [7] FDA. eCopy Program for Medical Device Submissions [EB/OL]. (2020-04-27) [2024-05-17]. <https://www.fda.gov/media/83522/download?attachment>.
- [8] FDA. Links to Center-Specific Submission Preparation Guidelines [EB/OL]. (2018-07-31) [2024-05-17]. <https://www.fda.gov/industry/policiesguidance/links-center-specific-submission-preparation-guidelines>.
- [9] FDA. Code of Federal Regulations [EB/OL]. (2024-05-13) [2024-05-17]. <https://www.ecfr.gov/>.
- [10] FDA. Electronic Submissions Gateway [EB/OL]. (2024-03-22) [2024-05-17]. <https://www.fda.gov/industry/electronic-submissions-gateway>.
- [11] 国家药品监督管理局药品评价中心、国家药品监督管理局药品审评中心. 关于药品审评中心变更临床试验期间药物警戒系统网关电子传输方式提交的通知 [EB/OL]. (2023-11-01) [2024-5-17]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/40ef95178d5941b2f7b82389b29d54cd>.
- [12] 陈华,邢花. 我国正式实施 eCTD 后药品生产企业的注册申报应对策略[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(12): 1177-1184.
- [13] 范乙. 实施 eCTD 面临的机遇、挑战和对策[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(16): 1997-2003.
- [14] 陈雄,王志超. 系统思维在信息化顶层设计中的应用[J]. 系统科学学报, 2020, 28(1): 93-97.
- [15] 中共中央国务院. 中共中央 国务院印发《数字中国建设整体布局规划》[EB/OL]. (2023-02-27) [2024-5-17]. http://www.xinhuanet.com/2023-02/27/c_1129401407.htm.
- [16] 单志广. 新型智慧城市与智慧社会建设[J]. 中国建设信息化, 2018(3): 12-15.

(收稿日期: 2024-04-01; 修回日期: 2024-06-12)

基于低代码开发平台构建药品盘点程序的实践与效果分析

田京辉, 张慧丽, 陈静静, 徐贞贞, 曹凯*, 赵亮 (许昌市中心医院药学部, 河南 许昌 461000)

摘要: **目的** 基于低代码开发平台构建药品盘点程序, 利用信息化手段提升药品盘点工作效率。**方法** 利用低代码开发平台“简道云”, 通过需求分析、建立表单、仪表盘、数据关联、配置角色和权限、移动端适配等步骤构建药品盘点程序。经过测试与优化后, 以药品盘点时间和盘点误差率对系统应用后的效果进行评价分析。**结果** 基于低代码开发平台构建的药品盘点程序能够实现扫码录入、无纸化盘点、实时汇总等功能。程序应用后, 药品初盘时间由 (60.88 ± 6.51) min 缩短至 (42.75 ± 3.10) min ($t = 6.37, P < 0.05$), 盘点误差率由 7.16% 下降至 3.80% ($\chi^2 = 7.444, P < 0.05$)。**结论** 基于低代码开发平台构建的药品盘点程序能够简化药品盘点流程、缩短盘点时间、提高盘点准确率, 有效提升了药品盘点工作效率。

关键词: 低代码开发平台; 药品盘点程序; 药学信息化; 药品盘点

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)12-3413-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.12.044

Practice and effect of establishing drug inventory program based on low-code development platform

TIAN Jing-hui, ZHANG Hui-li, CHEN Jing-jing, XU Zhen-zhen, CAO Kai*, ZHAO Liang
(Department of Pharmacy, Xuchang Central Hospital, Xuchang Henan 461000)

Abstract: Objective To construct drug inventory program based on low-code development platform, to improve the efficiency of drug inventory via information technology. **Methods** Low-code was used to develop simple path cloud system, the drug inventory program was established through demand analysis, data forms, dashboards, data association, configuring permissions and roles, and mobile terminal fitting. After the testing and optimization, the effect of the system was evaluated according to drug inventory time and inventory error rates. **Results** The drug inventory program based on the low-code system enabled code scanning entry, paperless inventory, real-time summary and so on. After the application of the system, the initial drug inventory time was shortened from (60.88 ± 6.51) min to (42.75 ± 3.10) min ($t = 6.37, P < 0.05$), and the inventory error rates decreased from 7.16% to 3.80% ($\chi^2 = 7.444, P < 0.05$). **Conclusion** The drug inventory program based on the low-code development system helps simplify the drug inventory process, shorten the inventory time, and improve the accuracy and efficiency of drug inventory.

Key words: low-code development platform; drug inventory program; pharmaceutical informatization; drug inventory

药品盘点是医院药房管理的重要工作之一^[1], 既是药品质量管理的重点, 也是医院经济运营管理的重点^[2]。药品盘点涉及环节多、任务繁杂。部分研究显示目前大多数医疗机构仍采用手工盘点的工作模式^[3]。手工盘点需要对大量的盘点数据进行登

记、汇总, 存在收集数据费时、数据汇总难、无法实时分析的问题, 并且数据转抄转录过程中易发生错误, 最终进行盈亏计算时难以追溯错误发生的原因, 影响了盘点管理质量^[2, 4-5]。目前, 国内有部分大型医院引入了药品供应链配送 (supply-

基金项目: 许昌市重点研发与推广专项 (No.20220213037)。

作者简介: 田京辉, 男, 副主任药师, 主要从事智慧化药房及信息化技术应用, email: tianjinghui65@163.com *通信作者: 曹凯, 男, 副主任药师, 主要从事医院药事管理, email: caokai46@126.com

processing-distribution, SPD) 系统, 大幅提升了包括药品盘点工作在内的院内药品供应链管理效率。然而, 受信息化建设程度和资金投入的限制, 大多数医疗机构尚没有条件使用药品 SPD 系统。在此条件下, 如何利用信息化工具精简药品盘点工作流程、提升工作效率成为亟待解决的问题。

低代码开发平台 (low-code development platform, LCDP) 是近年来软件开发领域的一个重要趋势, 它允许开发者通过图形界面和配置而非传统的手写代码来创建应用程序。国内目前常用的 LCDP 有简道云、氚云、明道云等。其中, 简道云拥有表单、仪表盘、知识库等核心功能, 无需编写代码即可搭建出符合自身需求的业务管理应用^[6-8], 同时支持手机移动端操作^[9], 可多人随时随地处理工作^[10-11]。本文利用“简道云”构建药品盘点程序, 旨在以信息化手段辅助药师开展药品盘点工作, 提高药品盘点工作的效率, 希望为业内同行提供参考。

1 药品盘点平台的构建

1.1 需求分析

结合门诊药房盘点业务需求, 确定药品盘点平台需要实现的功能, 即药品信息管理、盘点任务创建、盘点结果录入、盘点数据统计与分析等。

1.2 平台构架设计

根据需求分析的结果, 设计平台结构, 主要包括以下几个部分。

1.2.1 药品信息表单 创建药品信息表单, 设置字段包括药品编号、名称、规格、单位、厂家、药品本位码、平台库存数量等, 并对字段属性逐一设置。其中, 应将药品编号字段设置为主键, 即“校验”选择“必填”和“不允许重复值”。表单内具体药品信息可从医院信息系统 (hospital information system, HIS) 中导出药品基础信息的 Excel 文件格式, 并将其导入药品信息表单即可。药品信息表单可为其他表单提供药品基础信息。

1.2.2 药品盘点表单 根据药品盘点内容和流程创建药品盘点表单, 设置包括字段药品编号、名称、规格、单位、厂家、药品本位码、盘点库存数量、盘点人、盘点时间等, 并对字段属性逐一设置。其中, 同样应将药品编号字段设置为主键。同时, 药品本位码字段可设置扫码输入, 从而实现通过扫描药品包装上的本位码, 实现药品自动识别的功能。

之后, 通过药品编号字段对药品信息表单和药品盘点表单设置数据联动 (见图 1)。通过数据关联设置, 药品盘点表单可调用药品信息表单中的药品基础信息, 达到减少录入工作量的目的。



图 1 药品盘点表单数据联动的设置

Fig 1 Setting of data linkage of drug inventory form

1.2.3 药品盘点数据统计表单 通过“聚合表”功能创建药品盘点数据统计表单。在“数据来源”中选择“药品信息表单”和“药品盘点表单”进行关联。设置“盈亏数量”字段, 并将“行表头”关联并编辑为“盈亏数量=盘点库存数量-平台库存数量”。

1.3 设计数据视图

简道云提供了“仪表盘”功能, 可使用丰富的图表和组件, 如统计表、柱状图、趋势图等, 对表单收集的数据进行处理, 并以可视化的方式展示分析结果, 帮助管理员快速了解数据的整体情况和变化趋势。药品信息表单和药品盘点表单等构建完成后, 均可以根据工作需要创建仪表盘 (见图 2)。



图 2 仪表盘的功能配置

Fig 2 Functional configuration of the dashboard

1.4 配置角色和权限

根据实际业务需求, 可以为药师分配不同用户角色, 并配置相应操作权限, 如数据查看、数据录入、数据审核等, 保证数据的安全性。

1.5 移动端适配

“简道云”支持响应式设计, 可以适配不同尺寸的屏幕, 包括手机和平板电脑, 方便用户在手机等移动设备上数据进行录入和查看。药师可通

过移动设备登录微信“简道云”小程序实现盘点数据的录入和管理(见图3)。



图3 移动端盘点表
Fig 3 Mobile inventory table

2 效果评价

2.1 数据来源

数据来源于某院门诊药房在应用药品盘点程序之前(2023年1—3月)和之后(2023年7—9月)各月的药品盘点数据。

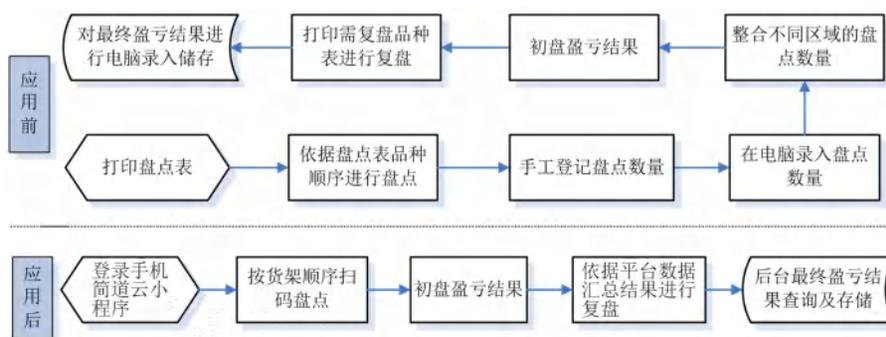


图4 盘点程序应用前后流程图对比
Fig 4 Flow charts before and after the application of the inventory procedures

3.2 药品盘点程序构建成效分析

3.2.1 盘点时间 某院门诊药房共有药品品规750余种,根据任务分工划分为8个盘点区域,并由8位工作人员分别进行盘点。对程序应用前(2023年1—3月)和应用后(2023年7—9月)的初盘平均时间进行配对t检验,时间由(60.88±6.51)min缩短至(42.75±3.10)min($t=6.37, P<0.05$)(见表1)。

应用盘点程序对医院药房药品进行盘点操作步骤简单,利用云计算进行自动化数据处理,不但有效降低初盘和复盘时间,而且节省了对各区域盘点数据的汇总与统计时间,因此可以大幅缩短盘点周期,显著提高时效性(见图5)。

3.2.2 有效降低初盘误差率 由于盘点过程中会出现盘点错误、录入错误和汇总错误等,故每次盘点后,会结合盘点数据进行核对。使用药品

2.2 应用效果评价指标的统计方法

以药品盘点时间和盘点误差率为评价指标对程序应用前后的效果进行对比。其中,盘点误差率=(初盘账务相符品规数-复核账务相符品规数)÷复核账务相符品规数×100%,盘点时间=初盘时间+数据汇总时间+复盘时间。采用SPSS进行分析。初盘时间用配对t检验进行分析,盘点误差率用卡方检验进行数据分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 药品盘点基本情况

某院门诊药房药品分布区域主要包括智能调配机、自动化发药机药房、应急货架、智能货架和二级库。由于同一品规的药品可能分布不同的区域,传统手工盘点模式下,盘点人员需携带纸质库存明细,逐一记录药品盘点数量,最后录入电脑计算后交药房负责人汇总。使用程序后,盘点人员全程只需登录微信“简道云”小程序,通过扫码方式逐一录入药品盘点数量,最后由系统进行计算和汇总。具体流程对比见图4。

盘点程序后,盘点误差率从7.16%下降至3.80%($\chi^2=7.444, P<0.05$)(见表2)。

表1 盘点程序应用前后初盘时间对比

Tab 1 Initial time before and after the application of the inventory procedures

盘点区域	平均初盘时间/min	
	应用前(2023年1—3月)	应用后(2023年7—9月)
二级仓库整件区	68	38
二级仓库0~2货架	55	42
二级仓库3~5货架	58	40
应急货架A~E货架	60	45
应急货架F~J货架	65	43
电子货架R~V货架	62	41
电子货架W~Z货架+冰箱	69	46
智能调配机+自动发药系统	50	47

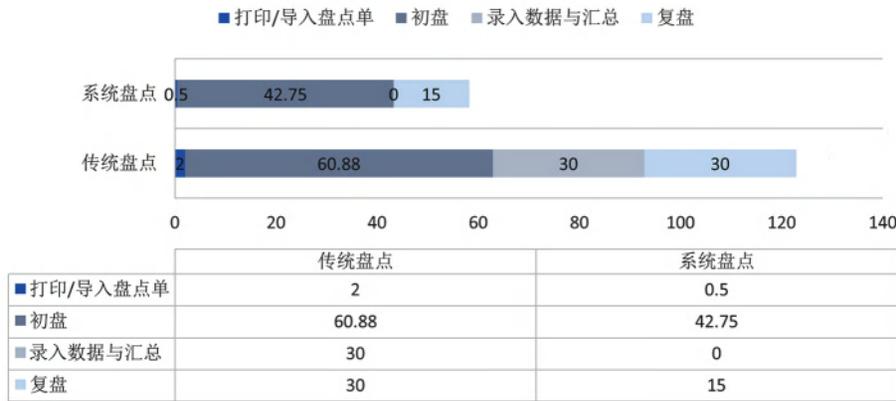


图 5 药品盘点总时间对比 (min)

Fig 5 Comparison of total time of drug inventory (min)

表 2 盘点程序应用前后初盘误差率比较
Tab 2 Initial error rate before and after the application of the inventory procedures

时间	盘点账务相符		初盘误差率/%
	品规数/种	品规数/种	
程序应用前	2023 年 1 月	629	7.16
	2023 年 2 月	617	
	2023 年 3 月	620	
程序应用后	2023 年 7 月	669	3.80
	2023 年 8 月	658	
	2023 年 9 月	650	

4 结果与讨论

随着医改的不断推进，集中带量采购、国家基本药物、协议期内国家医保谈判药品等政策的落实，许多地区取消了医疗机构药品数量限制，医疗机构结合自身功能定位和服务能力，合理确定配备使用药品品种和数量。这对药品盘点管理提出了更高要求。近年来，信息化技术的不断发展为利用信息手段辅助开展药品盘点管理提供了可能。本研究结合医院药房盘点管理实际情况，利用 LCDP 构建了药品盘点程序，实现了移动端扫码盘点、数据自动汇总等功能，简化了盘点工作流程、降低了盘点时间、减少了盘点过程中的数据差错率，大幅度提升了药品盘点工作效率。

与上线 SPD 相比，使用 LCDP 构建药品盘点程序，极大地节省了程序研发上线和运维费用，实现了以低成本进行药品盘点信息化管理的目的。对于目前信息化建设相对滞后和投入不足的医疗机构来说，作为信息化建设完善前的过渡方式更加具有高效性和经济性。同时，利用药品盘点程序实现了“无纸化”盘点，符合医疗机构节能减排、降低运营成本的绿色办公理念。

此外，LCDP 降低了软件开发门槛，没有 IT 基础的药学专业技术人员也可根据工作需求自主

搭建管理程序。与直接上线的管理程序相比，具有更多的灵活性与可拓展性，更加适应药房管理不断改革创新的需要，如目前我院门诊药房同时也利用 LCDP 自主开发药品入库管理程序，转变了传统入库验收的手工工作模式，实现了药品入库信息化的管理。

参考文献

- [1] 唐哲, 韦韡, 西娜. 我院加强药品盘点监管的探讨[J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1378-1380.
- [2] 刘学辉, 史香芬, 吴彩霞, 等. 品管圈在提高药品盘点账物相符率中的应用[J]. 上海医药, 2020, 41(5): 61-64.
- [3] 王作荣, 陈萍, 符萍媛, 等. 贵州省 130 家公立医疗机构药品盘点现状调查[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(11): 1275-1280.
- [4] 周雪莹, 于忠辉, 赵辰阳, 等. 应用 PDA 盘点提高门诊药房管理水平[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(102): 160-161.
- [5] 邱学玲. 我院门诊西药房药品盘点情况分析 with 改进[J]. 中国医疗管理科学, 2020, 10(1): 57-60.
- [6] 孙慧. 基于低代码系统的项目仓库系统设计与实现[J]. 电脑知识与技术, 2022, 18(11): 110-117.
- [7] 杨红斌, 周文丽. Android 移动设备在医院药品盘点管理中的应用[J]. 医药导报, 2019, 38(7): 972-974.
- [8] 邓利强, 张继东, 曹靖城, 等. Paas 能力服务管理系统的开发运维一体化实践[J]. 计算机与网络, 2020, 46(11): 41-42.
- [9] 孔海涛. 基于“简道云”+企业微信平台搭建院级信息化管理平台的探索与实践——以常州信息职业技术学院电子工程学院为例[J]. 电脑知识与技术, 2021, 17(35): 28-60.
- [10] 李钢, 周红, 张西峰. 基于“简道云”平台的检验检测信息化系统及其应用[A]. 中国水利学术大会论文集[C]. 北京, 2022.
- [11] 曾锦丽. 基于“钉钉+简道云”架构的小学生综合素质评价系统构建研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2021.

(收稿日期: 2024-08-01; 修回日期: 2024-09-25)