



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第23卷 第3期(总第230期) 2025年3月20日出版

目 次

顾问

周宏灏

主编

李焕德

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省科学技术协会

主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民中路 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) 84895602/82258487

传真: (0731) 82258487

邮发代号: 42-290

投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

email: znyxzz2003@vip.163.com

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2025 年版权归《中南药 学》

编辑部所有

研究论文

- (581) 甘草 - 大戟配伍对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响 张奉献, 乔姗姗, 王莎, 等
- (587) 基于核心功效成分柚皮苷的化学稳定性探讨丹苓补骨胶囊的配伍合理性 周琦人, 杨晓雯, 豆志亚, 等
- (598) 基于网络药理学研究紫苏醛对宫颈癌的药效作用 曙丽盼·木拉提, 徐叶杰, 张苗苗, 等
- (603) 巨噬细胞极化在去氢骆驼蓬碱诱导的细粒棘球蚴损伤中的作用研究 潘美驰, 巩月红, 林玉霞, 等
- (610) 青翘清热解毒的谱效关系研究 王宁, 邓庆庆, 白佳欣, 等
- (616) 硫酸多黏菌素 E 提高脂质纳米粒的 siRNA 递送效应用于抗肿瘤研究 孙雪如, 钱磊, 吴佳杨
- (622) 阿霉素介孔纳米粒的制备工艺优化及质量评价研究 杨倩, 窦欣, 冯玉琦, 等
- (628) 基于网络药理学技术探究雪莲注射液抗类风湿关节炎的作用及机制研究 顾春宇, 王亦巍, 康建英, 等
- (638) 雷公藤红素促进癌旁脂肪细胞分泌脂联素抗肾透明细胞癌上皮间充质转化作用 何鹏, 张婵娟, 石雅宁, 等
- (644) 羟丙基- β -环糊精包合宽叶缬草挥发油的工艺研究 郭玉虎, 王平, 刘军锋, 等
- (650) 基于网络药理学和实验验证探究棉酚抗宫颈癌的作用机制 热依沙·艾赛提, 李金艳, 马悦, 等
- (657) 豚鼠 IV 型过敏反应中血清 IL-2、IFN- γ 、IgE 及 IgM 的时效变化研究 鲍颖霞, 邹国发, 刘永俊, 等
- (662) 龙眼核标准汤剂抗氧化谱效关系研究 蒋佳丽, 王艺洁, 谢谭芳, 等
- (668) 藏药痛风丸 HPLC 特征图谱及 7 种成分含量测定研究 贾苗苗, 吴明慧, 谢和兵, 等
- (674) Zeylenone 通过影响 FA 通路蛋白 FANCD2 逆转肺癌顺铂耐药的研究 杨淑贤, 刘树森, 曹丽, 等
- (680) 基于多指标分析的止痒方提取液纯化工艺研究 齐梦飞, 林涛, 尚上, 等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编 (排名不分先后)

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 (排名不分先后)

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
何鹤飞 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 章超凡
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

(685) 基于体外溶出度评价的祖师麻肠溶片包衣材料优选及质量研究
..... 卢凤华, 朱荣玥, 彭胡麟玥, 等

药食两用资源开发及质量控制专题

- (690) 桑葚化学成分、药理活性及产品开发研究进展
..... 闫子轩, 陈海洋, 胡云飞, 等
- (700) 鹿药炮制方法、化学成分与药理作用研究进展
..... 王力, 李存浩, 胡云飞, 等
- (709) 当归药效物质基础及质量控制技术研究进展
..... 张建雨, 高鑫, 余河水, 等
- (717) 中药材中重金属的监测与控制研究进展
..... 张怡婧, 张书乐, 陈海洋, 等

药物分析与检验

- (725) 茵芹果饮片标准汤剂质量标准研究
..... 王贺伟, 刘亭阳, 任盈盈, 等
- (730) 高效液相色谱-高分辨质谱法测定盐酸替罗非班中偶氮类遗传毒性杂质
..... 张申奥, 左呈露, 胡林
- (735) HPLC法测定氟比洛芬中有关物质的含量
..... 张硕, 孙婷, 赵云丽
- (740) 高效液相色谱法测定盐酸伊伐布雷定缓释片中有关物质的含量
..... 王肖, 崔祥祯, 解元元, 等
- (745) 缓解体力疲劳类中成药及保健食品中非法添加化学药物高通量筛查模式的建立
..... 赵琪, 张珊珊, 冯哲玺, 等
- (756) 基于UPLC多指标成分和化学计量学研究不同产地炙甘草
..... 张春平, 宋霞, 卜晨琛, 等

综述

- (762) 解吸电喷雾电离质谱成像技术在药物研究中的应用
..... 徐磊, 陈竝瑞, 杜犀, 等
- (769) I型干扰素在肺炎发生发展中的作用机制研究进展
..... 岳瑞琪, 张小峰, 杨静, 等
- (776) 靶向肠黏膜屏障的糖类化合物研究进展
..... 陈钱悦, 张宇飞, 孙一立, 等
- (782) 流感病毒神经氨酸酶抑制剂的研究进展
..... 田诚, 陈梦涵, 辛义周
- (790) 药食同源类中药防治痛风的研究进展
..... 宋靖雯, 窦金金, 尹丽颖, 等
- (798) CYP2C9基因多态性对氯沙坦和厄贝沙坦药效学影响的研究进展
..... 曲志浩, 王玉, 李文娟, 等

青年编委 (排名不分先后)

丁 晓 于世慧 王 刚 王 洪
 王春江 方伟进 孔维军 兰丽丽
 朱志红 刘 宏 刘心如 刘丽华
 刘宏飞 刘剑敏 刘梦扬 孙 逸
 孙万阳 孙丙军 孙晓慧 苏 丹
 杜恩明 李 丹 李 娟 李语玲
 李新刚 肖朝江 吴成军 邱玉玲
 何 艳 邹振兴 张 弘 张 凭
 张妙红 张纯刚 张程亮 陈 倩
 陈 璐 陈国宁 陈富超 呼庆勋
 罗 聪 金 锐 周志旭 赵 亮
 赵 娣 胡 楠 姜 雷 秦 超
 贾玉平 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
 陆窈窕

本刊声明:

本刊已入编中国知网、万方等数据库,其收录论文作者著作权使用费与本刊稿酬一并支付。凡不同意编入数据库的稿件,请在来稿时声明。

除非特别声明,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

医院药学

- (803) 替罗非班治疗急性缺血性脑卒中的快速卫生技术评估
 李燕飞,何鸽飞,胡林,等
- (812) 新疆某三甲医院成人肾移植患者霉酚酸暴露量的影响因素分析
 阿丽耶·拜尔迪,马丽娟,吴洁茹,等
- (819) 口服中成药联合常规西药治疗高血压头痛的网状 Meta 分析
 刘可欣,彭涛,李凯,等
- (826) 免疫检查点抑制剂相关噬血细胞综合征文献分析
 孙志猛,唐晓霞,蔡佩淳,等

临床药师在临床

- (833) 临床药师参与 1 例颅内动脉瘤支架辅助栓塞术后合并肺栓塞患者的抗栓治疗实践 靳露,于英英,李琴,等
- (837) 大剂量替加环素治疗嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染的临床实践与文献分析 贺茹茜,解沛涛,田雪梅,等

中药与临床

- (840) 椿乳凝胶治疗中医湿热瘀阻证型阴道炎的临床疗效研究
 姚亮元,袁红波,荣苑君,等

药品不良反应

- (845) 信迪利单抗在晚期非小细胞肺癌患者中致心肌炎、肌炎、重症肌无力 1 例 舒蕾,何智辉
- (849) 多种油脂脂肪乳注射液(C_{6~24})致脂肪超载综合征 1 例
 张为好,彭怀文,王晓涛,等
- (853) 基于 FAERS 对儿童使用多西环素和米诺环素的不良反应信号挖掘和分析 罗佳妮,汪春燕,谭胜蓝
- (858) 脑苷肌肽致吉兰-巴雷综合征 1 例并文献复习
 贾晓丽,王姬,张荣福,等
- (863) 卡瑞利珠单抗致糖尿病酮症酸中毒 1 例并文献复习
 谢杏梅

药学教育

- (866) 药学教育教学法的文献计量学研究可视化分析
 陶旭锋,席艳,吕林林,等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*m*A4*190*zh*P*30.0*700*46*2025-3

本期责任编辑:李科,陆窈窕,彭金飞,邬志娟

英文编辑:周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 23, Number 3 March 20 2025

Consultant

ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief

LI Huan-de

Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

Directed by

Hunan Association for Science and
Technology

Edited by

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

Tel

(0731) 84895602/82258487

Fax

(0731) 82258487

Website of Authors

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

Email

znyxzz2003@vip.163.com

Postal code

42-290

Publish

Editorial Department of Central
South Pharmacy

Subscribe

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

CONTENTS IN BRIEF

- (581) **Effect of Glycyrrhizae Radix and Euphorbiae Pekinensis Radix combination on activity of CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 from rat liver microsomes**
..... ZHANG Feng-xian, QIAO Shan-shan, WANG Sha, et al
- (587) **Compatibility rationality of Danling Bugu capsules based on the chemical stability of naringin as a core active ingredient**
..... ZHOU Qi-ren, YANG Xiao-wen, DOU Zhi-ya, et al
- (598) **Pharmacological effect of perillaldehyde against cervical cancer based on network pharmacology**
..... Shulipan • Mulati, XU Ye-jie, ZHANG Miao-miao, et al
- (603) **Role of macrophage polarization in harmine-induced injury of Echinococcus granulosus**
..... PAN Mei-chi, GONG Yue-hong, LIN Yu-xia, et al
- (610) **Spectrum-effect relationship of heat-clearance and detoxification effect of Green Forsythia**
..... WANG Ning, DENG Qing-qing, BAI Jia-xin, et al
- (616) **Polymyxin E sulfate enhances the siRNA delivery efficiency of lipid nanoparticles in anti-tumor research**
..... SUN Xue-ru, QIAN Lei, WU Jia-yang
- (622) **Optimization of preparation technology and quality evaluation of doxorubicin-loaded mesoporous nanoparticles**
..... YANG Qian, DOU Xin, FENG Yu-qi, et al
- (628) **Mechanism of Xuelian injection for rheumatoid arthritis based on network pharmacology**
..... GU Chun-yu, WANG Yi-wei, KANG Jian-ying, et al
- (638) **Celastrol promotes the secretion of adiponectin by adjacent adipocytes and inhibits the EMT of renal clear cell carcinoma**
..... HE Peng, ZHANG Chan-juan, SHI Ya-ning, et al
- (644) **Process of hydroxypropyl- β -cyclodextrin encapsulation of *Valeriana officinalis* L. var *latifolia* Miq volatile oil**
..... GUO Yu-hu, WANG Ping, LIU Jun-feng, et al
- (650) **Mechanism of gossypol against cervical cancer based on network pharmacology and experimental verification**
..... Rayisa Asat, LI Jin-yan, MA Yue, et al

Price

¥ 30.00 an issue

¥ 360.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2025 by the
Central South Pharmacy**

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

- (657) **Temporal changes in serum IL-2, IFN- γ , IgE and IgM in type IV allergic reactions in Guinea pigs**
..... BAO Ying-xia, ZOU Guo-fa, LIU Yong-jun, et al
- (662) **Antioxidant spectrum and effect of longan seed standard decoction**
..... JIANG Jia-li, WANG Yi-jie, XIE Tan-fang, et al
- (668) **HPLC characteristic chromatogram and content determination of 7 components in Tongfeng pills**
..... JIA Miao-miao, WU Ming-hui, XIE He-bing, et al
- (674) **Zeylenone reverses cisplatin resistance in lung cancer by affecting FANCD2 protein in FA pathway**
..... YANG Shu-xian, LIU Shu-sen, CAO Li, et al
- (680) **Purification of antipruritic decoction extract based on multi-index analysis**
..... QI Meng-fei, LIN Tao, SHANG Shang, et al
- (685) **Optimization of coating materials and quality of Zushima enteric-coated tablets based on evaluation of in vitro dissolution**
..... LU Feng-hua, ZHU Rong-yue, PENG Hu-lin-yue, et al
- (691) **Research progress in the phytochemical compositions, pharmacological activities, and product development of *Mori Fructus***
..... YAN Zi-xuan, CHEN Hai-yang, HU Yun-fei, et al
- (700) **Research progress on processing, chemical compositions, pharmacological effect and prospects of deer medicine**
..... WANG Li, LI Cun-hao, HU Yun-fei, et al
- (709) **Research progress in the material basis and quality control of *Angelica sinensis***
..... ZHANG Jian-yu, GAO Xin, YU He-shui, et al
- (717) **Monitoring and control of heavy metals in traditional Chinese medicinal materials** ZHANG Yi-jing, ZHANG Shu-le, CHEN Hai-yang, et al
- (725) **Quality standard of Pimpinellae anisi fructus piece decoction**
..... WANG He-wei, LIU Ting-yang, REN Ying-ying, et al
- (730) **Determination of azo genotoxic impurities in tirofiban hydrochloride by high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry**
..... ZHANG Shen-ao, ZUO Cheng-hu, HU Lin
- (735) **Determination of related substances in flurbiprofen by HPLC**
..... ZHANG Shuo, SUN Ting, ZHAO Yun-li
- (740) **HPLC determination of related substances in ivabradine hydrochloride sustained-release tablets**
..... WANG Xiao, CUI Xiang-zhen, XIE Yuan-yuan, et al
- (745) **Establishment of a high-throughput screening model for illegal addition of chemical drugs in anti-fatigue Chinese patent medicine and health foods**
..... ZHAO Qi, ZHANG Shan-shan, FENG Zhe-xi, et al
- (756) **Multi-indicator composition and chemometrics of honey-fried licorice from different origins**
..... ZHANG Chun-ping, SONG Xia, BU Chen-chen, et al

- (762) **Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging in pharmaceutical research** *XU Lei, CHEN Hong-rui, DU Xi, et al*
- (769) **Mechanism of type I interferons in the onset and progression of pneumonia** *YUE Rui-qi, ZHANG Xiao-feng, YANG Jing, et al*
- (776) **Research progress in carbohydrate compounds targeting the intestinal barrier** *CHEN Qian-yue, ZHANG Yu-fei, SUN Yi-li, et al*
- (782) **Research progress in influenza virus neuraminidase inhibitors** *TIAN Cheng, CHEN Meng-han, XIN Yi-zhou*
- (790) **Prevention and treatment of gout by food homologous traditional Chinese medicine** *SONG Jing-wen, DOU Jin-jin, YIN Li-ying, et al*
- (798) **Research progress in the effect of CYP2C9 gene polymorphism on the efficacy of losartan and irbesartan** *QU Zhi-hao, WANG Yu, LI Wen-juan, et al*
- (803) **Rapid health assessment of tirofiban for acute ischemic stroke** *LI Yan-fei, HE Ge-fei, HU Lin, et al*
- (812) **Factors affecting mycophenolic acid exposure in adult renal transplant patients in a tertiary hospital in Xinjiang** *Aliya • Bardi, MA Li-juan, WU Jie-ru, et al*
- (819) **Network meta-analysis of oral Chinese patent medicine combined with conventional Western medicine for hypertensive headache** *LIU Ke-xin, PENG Tao, LI Kai, et al*
- (833) **Clinical pharmacist involvement in antithrombotic therapy for a patient with recurrent pulmonary embolism after stent-assisted embolization of an intracranial aneurysm** *JIN Lu, YU Ying-ying, LI Qin, et al*
- (840) **Clinical efficacy of Chunru gel in the treatment of vaginitis with traditional Chinese medicine dampness-heat and blood stasis syndrome** *YAO Liang-yuan, YUAN Hong-bo, RONG Yuan-jun, et al*
- (853) **Data mining of adverse reaction signals in children using doxycycline and minocycline based on FAERS** *LUO Jia-ni, WANG Chun-yan, TAN Sheng-lan*
- (866) **Bibliometric and visual analysis of teaching methods for pharmaceutical education** *TAO Xu-feng, XI Yan, LYU Lin-lin, et al*

研究论文

甘草 - 大戟配伍对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响

张奉献¹, 乔姗姗¹, 王莎¹, 徐风^{2*}, 王如峰^{1*} (1.北京中医药大学生命科学院, 北京 102488; 2.北京大学药学院, 北京 100080)

摘要: **目的** 研究甘草、大戟药对配伍前后对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响。**方法** 采用 Cocktail 探针药物法测定甘草 - 大戟配伍对探针药物非那西丁、氯唑沙宗和氨苯砜代谢的影响, 评价其对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响。**结果** 甘草与大戟配伍后, 与空白对照组相比, 甘草 - 大戟 1 : 1 组: 非那西丁的半衰期 ($t_{1/2}$) 与表观分布容积 (V_d) 显著增大, 曲线下面积 (AUC) 显著减小、氯唑沙宗清除率 (CL) 与 V_d 显著减小, AUC 显著增大、氨苯砜的 AUC 显著减小; 甘草 - 大戟 2 : 1 组: 非那西丁的 $t_{1/2}$ 与 AUC 显著减小、氯唑沙宗的 CL 与 V_d 显著减小, AUC 显著增大、氨苯砜的 V_d 显著减小; 甘草 - 大戟 3 : 1 组: 非那西丁的 $t_{1/2}$ 与 V_d 显著减小, CL 显著增大、氯唑沙宗的 $t_{1/2}$ 与 AUC 显著增大, CL 与 V_d 显著减小、氨苯砜的 CL 与 V_d 显著减小, AUC 显著增大。**结论** 甘草 - 大戟 1 : 1 配伍对 CYP1A2 和 CYP2E1 有抑制作用, 而对 CYP3A4 有促进作用; 甘草 - 大戟 2 : 1 和 3 : 1 配伍对 CYP1A2 有显著促进作用, 对 CYP2E1 和 CYP3A4 有抑制作用, 这可能是其配伍禁忌的内在机制之一。

关键词: 十八反; 甘草; 大戟; CYP1A2; CYP2E1; CYP3A4

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0581-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.001

Effect of Glycyrrhizae Radix and Euphorbiae Pekinensis Radix compatibility on activities of CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 from rat liver microsomes

ZHANG Feng-xian¹, QIAO Shan-shan¹, WANG Sha¹, XU Feng^{2*}, WANG Ru-feng^{1*} (1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100080)

Abstract: Objective To determine the effect of Glycyrrhizae Radix (GR) and Euphorbiae Pekinensis Radix (EPR) on activities of CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 from rat liver microsomes before and after the compatibination use. **Methods** The effect of GR and EPR combination on the metabolism of the probe drugs phenacetin, chlorzoxazone and dapsone was determined by Cocktail probe drug method. Their effects on the activity of CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 subtypes of liver drug enzymes in rats were evaluated. **Results** The half-life ($t_{1/2}$), apparent volume of distribution (V_d), area under the curve (AUC) and clearance rate (CL) of the probes in the combination groups of GR and EPR were compared with those in the blank control group. In the GR-EPR (1 : 1) group, the $t_{1/2}$ and V_d of phenacetin increased while the AUC decreased obviously; the CL and V_d of chlorzoxazone decreased while the AUC increased obviously; and the AUC of dapsone decreased. In the GR-EPR (2 : 1) group, the $t_{1/2}$ and AUC of

基金项目: 国家科技重大专项 (No. 2019ZX09201004-002)。

作者简介: 张奉献, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药效物质研究, email: zfx15649056238@163.com *通信作者: 徐风, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药代谢研究, email: xufeng76@bjmu.edu.cn; 王如峰, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药化学研究, email: wangrufeng@tsinghua.org.cn

phenacetin decreased substantially; the CL and V_d of chlorzoxazone decreased while the AUC increased substantially; the V_d of dapsone decreased obviously. In the GR-EPR (3 : 1) group, the $t_{1/2}$ and V_d of phenacetin decreased while the CL increased greatly; the $t_{1/2}$ and AUC of chlorzoxazone increased while the CL and V_d decreased greatly; the CL and V_d of dapsone decreased while the AUC increased greatly.

Conclusion GR : EPR (1 : 1) combination inhibits the activity of CYP1A2 and CYP2E1 but promotes CYP3A4, while GR : EPR (2 : 1) and (3 : 1) significantly promote the activity of CYP1A2 and inhibit CYP2E1 and CYP3A4. This may be a possible mechanism of combination incompatibility.

Key words: eighteen incompatible medicament; Glycyrrhizae Radix; Euphorbiae Pekinensis Radix; CYP1A2; CYP2E1; CYP3A4

中药“十八反”是对临床用药经验总结的结果,也是构成中医药配伍禁忌理论重要的组成部分^[1],其明确指出某些药对不可同时配伍使用,甘草与大戟就是其中不宜配伍使用的药对之一^[2]。中药“十八反”受到历代医家的重视,也是现代中医药理论研究的热点,但是,关于这些药对组合能否用于临床以及相反的机制现在还没有定论^[3]。甘草-大戟作为“十八反”的一组药对,已有研究对其相反机制进行了探索^[4-6],提出了根据药物的体内代谢过程来研究和分析反药组合,从而揭示其配伍禁忌的内在机制^[7]。

细胞色素 P450 (CYP450) 是关键的药物代谢酶,作为 I 期代谢酶系统参与大部分药物的代谢过程,与许多药物之间的相互作用密切相关^[8],两者之间的相互作用表现为药物对 CYP450 酶的诱导或抑制^[9],而被诱导或抑制的 CYP450 酶又可影响药物化学成分的代谢,进一步影响药物的毒性或药效^[10]。有研究表明甘草-大戟配伍后对肝脏、肾脏和心脏产生的不良反应要强于两者单独使用^[11],本实验选择肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 进行研究。CYP1A2 在 CYP450 总量中所占比例为 13% ~ 15%^[12-13],主要参与肝脏中的氧化、还原、水解等 I 相代谢反应^[14]。CYP2E1 约占肝脏代谢酶总量的 7%,可调控体内的一些药物、前毒物和前致癌物的代谢^[15-16]。除药物代谢外,CYP2E1 还与糖尿病等疾病有关^[17]。CYP3A4 在 CYP450 总量中所占比例为 30% ~ 40%^[18-19],参与许多前毒物的代谢及活化过程^[20]。作为 CYP3A 亚家族的重要亚型,CYP3A4 被确定参与一半以上治疗药物的代谢^[21-22]。Breimer 等^[23]于 20 世纪 90 年代初首次提出 Cocktail 探针法,即利用多个探针药物对多种 CYP450 同工酶活性进行同时评价的方法^[23]。有文献报道非那西丁主要被 CYP1A2 代谢,氯唑沙宗主要被 CYP2E1 代谢,氨苯砜主要被

CYP3A4 代谢^[24],因此,本研究以非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砜为探针药物,以探针药物的药动学参数为基础研究甘草-大戟配伍前后对 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 活性的影响,从而为“十八反”中的配伍禁忌提供实验基础和用药依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体重 160 ~ 180 g [斯贝福(北京)实验动物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2011-0004]。

1.2 试药

甘草和大戟均购自河北省安国药材市场,由北京中医药大学生命科学院王如峰教授鉴定两者分别为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根及根茎,大戟科大戟属植物大戟 *Euphorbia pekinensis* Rupr. 的干燥根。安替比林(批号:20150120,宜昌人福药业有限公司);非那西丁(批号:20130815,纯度:99.8%)、氯唑沙宗(批号:100191-200606,纯度:99.5%)(中国食品药品检定研究院);氨苯砜(批号:20150222,纯度:98.5%,武汉江民华泰医药化工有限公司)。

1.3 仪器

Waters 液相色谱仪(美国 Waters 公司), Heraeus 台式离心机(德国 Biofuge Stratos), 氮气吹干仪(北京市优晟联合科技有限公司), 漩涡混匀仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), AE240 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler 公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 水煎液制备 ① 甘草水煎液:称取甘草 200 g,加入 2 L 纯化水浸泡 30 min,然后煎煮 1 h;倒出煎煮液后再次加入 1.6 L 纯化水继续煎煮 1 h。合并两次得到的煎煮液,减压浓缩至最终含生药

量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。大戟水煎液制备方法同甘草水煎液。

② 甘草-大戟混合煎液：先称取大戟 3 份，各 200 g；然后甘草-大戟按 1:1、2:1、3:1 的比例称取甘草，再分别与大戟混合，煎煮及浓缩方法同甘草水煎液，保存于 4°C 冰箱，备用。临用前根据动物给药剂量配制所需浓度。

2.1.2 大鼠尾静脉注射溶液 精密称取非那西丁 50 mg、氨苯砒 50 mg、氯唑沙宗 75 mg，分别置于研钵中，加入适量吐温-80 研磨，转移至 25 mL 量瓶中，生理盐水溶解。药物质量浓度分别为 2、2、3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.3 探针溶液制备 精密称取 25 mg 非那西丁、氯唑沙宗和氨苯砒，分别置于 25 mL 量瓶中，甲醇溶解，制得质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的探针溶液。

2.1.4 内标溶液制备 精密称取 25 mg 安替比林置于 25 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度。精密移取该溶液 1 mL 置于 50 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

2.2 HPLC 方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Ultimate XB-C18 (250 mm×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱，流动相为乙腈 (A) -20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液 (B)，梯度洗脱 (0~3 min, 30%A; 3~13 min, 30%~70%A; 13~15 min, 70%~30%A)，检测波长为 265 nm，流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，柱温为 40°C ，进样体积为 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2.2 动物分组与给药 参考 2020 年版《中国药典》^[25] 规定的人用口服剂量制订给药剂量，以人和大鼠体表面积比例进行换算。灌胃体积 2.0 mL (每日两次)，连续灌胃 30 d，给药前禁食 12 h。动物分组及给药方案见表 1，每组 5 只大鼠。于末次给药后 30 min，尾静脉注射探针药物溶液，给药量为 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表 1 动物分组及给药方案

Tab 1 Grouping of animals and dosing regimens

组别	给药剂量
空白对照组	等体积水
甘草组	$0.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
大戟组	$0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
甘草-大戟 1:1 组	$0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草 + $0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大戟
甘草-大戟 2:1 组	$0.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草 + $0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大戟
甘草-大戟 3:1 组	$0.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草 + $0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大戟

2.2.3 血浆样品采集与处理 分别于给药后 10、20、30、60、120、240、480、720、1440 min 经大鼠眼底静脉丛取血约 0.2 mL 于肝素钠抗凝管

中，冰水浴 30 min，于 4°C ， $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取血浆 $60.0 \mu\text{L}$ 于 1.5 mL EP 管中，加内标溶液安替比林 (质量浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $10.0 \mu\text{L}$ ，混匀；再加入 1.0 mL 异丙醇-氯仿 (1:9) 混合溶液，混匀； $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min；取上清液， 37°C 水浴中氮气吹干；残渣精密加入初始流动相 $60.0 \mu\text{L}$ ，混匀，经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.4 专属性 以空白血浆为基质，制备空白血浆+探针药物+内标样品和注射探针药物 120 min 后的血浆+内标样品，进样分析。结果如图 1 所示，血浆中的杂质不干扰样品测定，且非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砒及内标安替比林相互无干扰，分离度好，表明该方法特异性良好。

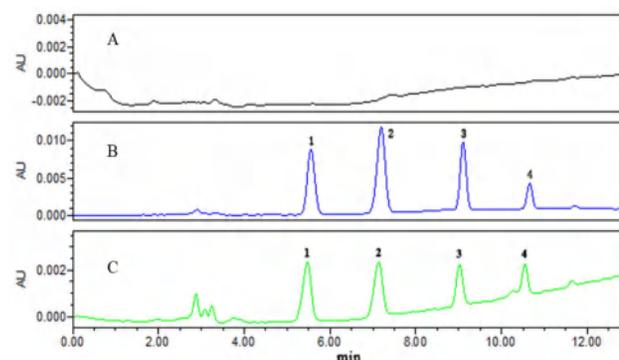


图 1 血浆中各待测成分的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of each component in the plasma

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆+探针药物+内标 (blank plasma + probe drug + internal standard); C. 注射探针药物 120 min 后的血浆+内标 (plasma after 120 min of injection of probe drug + internal standard); 1. 安替比林 (antipyrine); 2. 氯唑沙宗 (chlorzoxazone); 3. 非那西丁 (phenacetin); 4. 氨苯砒 (dapsone)

2.2.5 线性关系与定量限 制备不同浓度的探针药物非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砒的混合甲醇溶液 $100 \mu\text{L}$ ，氮气吹干；加入空白血浆 $100 \mu\text{L}$ ，得到质量浓度为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列血浆样品；以对照品质量浓度 (X) 和对照品与内标峰面积比 (Y) 作线性回归，见表 2。结果表明非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砒在 $0.1 \sim 50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好，3 种探针药物的最低定量限 (LOQ) 分别为 0.33、0.40、0.15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.6 精密度和准确度 分别制备非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砒的低、中、高质量浓度 (0.4、2、20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的质控样品，在该浓度水平下，考察 3 种探针药物的精密度和准确度和绝对回收率，结果见表 3。非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砒日内精密度 RSD 为 1.9%~9.4%，日间精密度 RSD 为 3.9%~7.8%，准确度为 98.10%~103.79%，绝对

表 2 3 种探针药物的回归方程、相关系数、线性范围和 LOQ

Tab 2 Regression equation, correlation coefficient, linearity and LOQ of 3 probe drugs

成分	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (mg · L ⁻¹)	LOQ / (mg · L ⁻¹)
非那西丁	$Y = 8.686 \times 10^3 X + 1.436 \times 10^3$	0.9998	0.1 ~ 50.0	0.33
氯唑沙宗	$Y = 1.000 \times 10^4 X + 3.847 \times 10^3$	0.9995	0.1 ~ 50.0	0.40
氨苯砜	$Y = 3.100 \times 10^4 X - 3.706 \times 10^3$	0.9998	0.1 ~ 50.0	0.15

回收率在 61.20% ~ 79.14%，RSD 为 2.1% ~ 5.9%，表明建立的方法良好，符合生物样品的测定要求。

2.2.7 稳定性和重复性 不同浓度的质控样品平行 5 份，于常温保存 12 h、4 °C 保存 24 h 考察样品短期稳定性；于 -20 °C 保存 10 d 后考察长期稳定性；于 4 °C 保存 24 h、室温融化、4 °C 保

存 24 h，如此冻融循环 2 次，考察冻融循环稳定性。结果见表 3，非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砜重复性 RSD 为 2.5% ~ 5.6%，稳定性 RSD 均小于 15%，说明该样品符合 2020 年版《中国药典》四部中对生物样品的定量要求。

表 3 3 种探针药物的方法学考察结果 (n = 5)

Tab 3 Methodological investigation of 3 probe drugs (n = 5)

成分	质量浓度 / (mg · L ⁻¹)	重复性 /% RSD	准确度 /%	精密度 RSD		稳定性 RSD			绝对回收率	
				日内 /%	日间 /%	短期 /%	长期 /%	冻融循环 /%	回收率 /%	RSD /%
非那西丁	0.4	3.2	102.14	3.9	7.4	9.4	8.1	9.3	67.91	3.3
	2	4.7	98.93	1.9	6.1	1.7	6.7	8.7	74.52	4.8
	20	4.7	103.79	3.9	4.8	2.9	6.3	9.0	73.50	2.2
氯唑沙宗	0.4	3.5	101.95	3.7	6.0	3.3	7.1	8.3	69.98	5.9
	2	5.6	98.53	4.3	4.9	4.3	6.8	7.5	75.35	4.6
	20	3.3	102.69	3.3	3.9	0.73	4.9	9.1	79.14	3.4
氨苯砜	0.4	3.5	98.10	4.7	7.8	3.9	7.7	9.8	61.20	5.4
	2	5.0	99.51	9.4	5.5	1.9	6.4	8.5	69.72	4.3
	20	2.5	99.95	3.7	5.3	0.91	6.8	8.1	77.28	2.1

2.3 体内药动学研究

2.3.1 血浆中探针药物的测定 取大鼠血浆 100 μL，按“2.2.3”项下方法处理，进样分析。各实验组大鼠尾静脉注射探针药物，在不同时间点取血测定探针药物在大鼠体内的浓度。使用 DAS 2.0 软件根据非房室模型拟合计算药动学参数。

2.3.2 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行单因素方差分析，各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.3.3 甘草与大戟配伍前后对大鼠血浆中探针药物的药动学影响 甘草 - 大戟配伍前后探针药物的药

动学参数结果见表 4 ~ 6。甘草、大戟单独给药的药动学参数表明：与空白对照组相比，甘草可以加快非那西丁的代谢，减缓氯唑沙宗和氨苯砜的代谢；大戟对非那西丁和氯唑沙宗的代谢影响较小。而与甘草组相比，大戟可以加快氨苯砜的代谢。当甘草 - 大戟配伍后，与空白对照组、甘草组和大戟组相比，甘草 - 大戟 1 : 1 配伍后，可以减缓非那西丁和氯唑沙宗的代谢，而加快氨苯砜的代谢；甘草 - 大戟 2 : 1 和 3 : 1 配伍后，可以加快非那西丁的代谢，而减缓氯唑沙宗和氨苯砜的代谢。

表 4 非那西丁主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 4 Main pharmacokinetic parameters of phenacetin ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$t_{1/2}/h$	$CL / (L \cdot kg \cdot h^{-1})$	$V_d / (L \cdot kg^{-1})$	$AUC / (mg \cdot h \cdot L^{-1})$
空白对照组	1.61 ± 0.11	0.93 ± 0.04	1.94 ± 0.22	15.00 ± 2.67
甘草	0.98 ± 0.04 ^{**}	1.27 ± 0.12 [*]	1.81 ± 0.12	7.85 ± 0.13 [*]
大戟	1.68 ± 0.11 [#]	0.88 ± 0.05 [#]	2.12 ± 0.12	11.42 ± 0.35 [#]
甘草 - 大戟 1 : 1	2.04 ± 0.15 ^{**#}	0.86 ± 0.05 [#]	2.30 ± 0.09 ^{**}	11.63 ± 0.70 ^{**}
甘草 - 大戟 2 : 1	1.28 ± 0.17 ^{**#}	1.17 ± 0.07 [^]	2.06 ± 0.20	8.96 ± 0.17 ^{**}
甘草 - 大戟 3 : 1	0.87 ± 0.13 ^{**}	1.22 ± 0.10 ^{**#}	1.02 ± 0.13 ^{**#}	12.22 ± 0.18 [#]

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ；与甘草组比较，# $P < 0.05$ ；与大戟组比较，^ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, * $P < 0.05$; compared with the Glycyrrhizae Radix group, # $P < 0.05$; compared with the Euphorbiae Pekinensis Radix group, ^ $P < 0.05$.

表 5 氯唑沙宗主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Tab 5 Main pharmacokinetic parameters of chlorzoxazone ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$t_{1/2}/h$	$CL/(L \cdot kg \cdot h^{-1})$	$V_d/(L \cdot kg^{-1})$	$AUC/(mg \cdot h \cdot L^{-1})$
空白对照组	3.07±0.44	0.65±0.05	2.87±0.29	22.09±1.04
甘草	2.73±0.22	0.47±0.02 ^{*a}	1.77±0.20 ^{*a}	30.95±1.28 [*]
大戟	2.53±0.21	0.72±0.02 [#]	2.64±0.20 [#]	20.06±0.31 [#]
甘草-大戟 1:1	2.66±0.37	0.37±0.03 ^{*#a}	1.77±0.19 ^{*a}	37.52±1.31 ^{*#a}
甘草-大戟 2:1	2.76±0.42	0.36±0.03 ^{*#a}	1.28±0.16 ^{*#a}	41.63±1.03 ^{*#a}
甘草-大戟 3:1	4.83±0.32 ^{*#a}	0.37±0.02 ^{*#a}	2.57±0.17 ^{*#}	38.25±3.41 ^{*#a}

注：与空白对照组比较，^{*} $P < 0.05$ ；与甘草组比较，[#] $P < 0.05$ ；与大戟组比较，[^] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ^{*} $P < 0.05$; compared with the Glycyrrhizae Radix group, [#] $P < 0.05$; compared with the Euphorbiae Pekinensis Radix group, [^] $P < 0.05$.

表 6 氨苯砜主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Tab 6 Main pharmacokinetic parameters of dapsone ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$t_{1/2}/h$	$CL/(L \cdot kg \cdot h^{-1})$	$V_d/(L \cdot kg^{-1})$	$AUC/(mg \cdot h \cdot L^{-1})$
空白对照组	4.13±0.12	0.42±0.02	2.90±0.15	31.04±0.68
甘草	6.38±0.68 ^{*a}	0.32±0.08 ^{*a}	1.90±0.39 ^{*a}	41.37±0.39 ^{*a}
大戟	4.89±0.31 [#]	0.46±0.14 [#]	3.25±0.15 [#]	21.07±0.34 [#]
甘草-大戟 1:1	4.13±0.80 [#]	0.47±0.12 [#]	2.83±0.55 [#]	21.09±0.23 [#]
甘草-大戟 2:1	4.79±0.65 [#]	0.36±0.05	1.64±0.20 [*]	25.75±3.81 [#]
甘草-大戟 3:1	5.36±0.15	0.24±0.02 ^{*#a}	1.95±0.10 ^{*#a}	42.02±2.91 ^{*#a}

注：与空白对照组比较，^{*} $P < 0.05$ ；与甘草组比较，[#] $P < 0.05$ ；与大戟组比较，[^] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ^{*} $P < 0.05$; compared with the Glycyrrhizae Radix group, [#] $P < 0.05$; compared with the Euphorbiae Pekinensis Radix group, [^] $P < 0.05$.

3 总结与讨论

本研究采用动物实验探讨了甘草与大戟以不同比例配伍对主要肝药酶的影响，以非那西丁、氯唑沙宗和氨苯砜作为探针药物，建立了同时快速测定三者血浆中含量的高效液相色谱法。CYP450 酶参与大部分药物代谢，其诱导或抑制可引起药物的毒性或疗效的增强或减弱^[26-28]。非那西丁、氯唑沙宗和氨苯砜分别主要被 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 代谢，本实验通过对上述 3 种探针药物药动学的研究，评价甘草-大戟配伍对 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 酶活性的影响。本研究的实验动物采用药物代谢研究常用的大鼠。关于实验动物数的选择，我们遵循药动学实验中常用的动物数，即每组 3~6 只^[29-30]；同时参照“3R”原则中的“reduction”，即减少实验中的动物数量的原则，且本实验的结果显示药动学参数的 SD 值较小，数据离散程度较小。因此，本实验选择每组 5 只大鼠进行药动学研究。

根据实验数据得到的药动学参数判断，甘草可以加快非那西丁的代谢，对 CYP1A2 具有诱导作用，这与文献报道一致^[31]；而减缓氯唑沙宗、氨苯砜的代谢，表明甘草对 CYP2E1 和 CYP3A4 存在抑制作用。大戟可以加快氨苯砜的代谢而对非那西丁、氯唑沙宗无影响，表明大戟对 CYP3A4 有诱导作用。有研究表明，酶活性的诱导可能会促进大戟中某些物质的代谢或将大戟存在的前毒性物质转化

为有毒物质，从而对机体产生毒性^[32]。CYP2E1 和 CYP3A4 在 CYP450 酶系中负责毒物或前毒物的代谢和活化，甘草能够抑制 CYP2E1 和 CYP3A4 的活性，配伍后甘草对 CYP2E1 的活性抑制有所增强；与甘草相反，大戟对 CYP3A4 有促进作用，但是与甘草合用后促进作用消失。本课题组已有研究证明：甘草-大戟药对由于甘草的双向调控使得两者的配伍禁忌是有条件的，是相对的。甘草-大戟 1:1、2:1、3:1 配伍随着甘草比例的增加毒性减小，即甘草-大戟 1:1 配伍增加大戟的毒性，证明了两者的不相容性；而甘草-大戟 2:1 和 3:1 配伍，大戟的毒性随着甘草的剂量增加而减弱，这支持了甘草的解毒作用，从而成为两者相容性的基础^[33]。配伍中甘草可对 CYP1A2 产生促进作用，对 CYP3A4 产生抑制作用；大戟单煎液与药对合煎液甘草-大戟 3:1 相比，CYP3A4 由促进作用变为抑制作用。

单独给药时甘草诱导 CYP1A2 而抑制 CYP2E1 和 CYP3A4 的活性；大戟诱导 CYP3A4 的活性。甘草-大戟 1:1 配伍对 CYP1A2 和 CYP2E1 有抑制作用，而对 CYP3A4 有促进作用；2:1 和 3:1 配伍对 CYP1A2 有显著促进作用，对 CYP2E1 和 CYP3A4 有抑制作用。甘草与大戟配伍前后对 CYP 亚型的双向调节作用，可能存在基于药物代谢酶机制的相反作用，从而使甘草-大戟“绝对的配伍禁忌”成为“相对的配伍禁忌”和“有条件的应用”，这可能是

甘草-大戟配伍禁忌的内在机制之一,有待于进行更深层次的实验研究加以阐明。

参考文献

- [1] 田颐, 李慕云, 曹灿, 等. 基于毒效关系的“十八反”研究现状与思考[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(4): 1426-1430.
- [2] 高建联, 苗明三. “十八反”药理毒理研究现状、存在问题及研究思路[J]. 中医学报, 2010, 25(3): 483-486.
- [3] 柳海艳, 修琳琳, 陈绍红, 等. 基于经典名方探讨“十八反”反药组合应用的宜忌条件[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(6): 752-757.
- [4] 丁鹏敏, 乔姗姗, 刘斯琪, 等. 甘草-大戟配伍对大戟峻下逐水作用的影响[J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2163-2167.
- [5] 张会平, 蔡丽侠, 于文帅, 等. UPLC法研究甘草京大戟反药对配伍后京大戟对甘草中有效成分含量的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(3): 216-223.
- [6] Liu SQ, Qiao SS, Wang S, et al. Intestinal bacteria are involved in Radix Glycyrrhizae and Radix Euphorbiae Pekinensis incompatibility[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 113839.
- [7] 郭建明, 段金彪, 郝海平, 等. 基于药物体内代谢过程的中药配伍禁忌研究思路与方法[J]. 中草药, 2011, 42(12): 2373-2378.
- [8] 霍旺, 李晗, 李林, 等. 诃子、甘草与制草乌配伍调控 CYP450 系统减轻肝毒性研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1618-1624.
- [9] Guengerich FP, Waterman MR, Egli M. Recent structural insights into cytochrome P450 function[J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 37(8): 625-640.
- [10] Li AF, Ma NN, Zhao ZJ, et al. Glycyrrhetic acid might increase the nephrotoxicity of bakuchiol by inhibiting cytochrome P450 isoenzymes[J]. Peer J, 2016, 4: e2723.
- [11] 鞠雷, 李汝春, 李舫. 中药“十八反”的研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2016, 37(6): 69-71.
- [12] Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2006, 2(6): 875-894.
- [13] Guo JC, Zhu XH, Badawy S, et al. Metabolism and mechanism of human cytochrome P450 enzyme 1A2[J]. Curr Drug Metab, 2021, 22(1): 40-49.
- [14] Gunes A, Dahl ML. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms[J]. Pharmacogenomics, 2008, 9(5): 625-637.
- [15] 谭孝琼, 杨光谦, 张林, 等. 细胞色素 P450 2E1 介导外源性化合物毒性损伤研究进展[J]. 中国职业医学, 2016, 43(2): 234-236.
- [16] Krajcinovic M, Sinnott H, Richer C, et al. Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Int J Cancer, 2002, 97(2): 230-236.
- [17] Ishteyaque S, Yadav KS, Verma S, et al. CYP2E1 triggered GRP78/ATF6/CHOP signaling axis inhibit apoptosis and promotes progression of hepatocellular carcinoma[J]. Arch Biochem Biophys, 2023, 745: 109701.
- [18] Zhou SF. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4[J]. Curr Drug Metab, 2008, 9(4): 310-322.
- [19] Wang MZ, Wu JQ, Dennison JB, et al. A gel-free MS-based quantitative proteomic approach accurately measures cytochrome P450 protein concentrations in human liver microsomes[J]. Proteomics, 2008, 8(20): 4186-4196.
- [20] 许菊青, 蒋峰. CYP3A4、CYP3A5 多态性与肿瘤的关系[J]. 实用老年医学, 2017, 31(1): 79-82.
- [21] Wang FL, Zhang X, Wang YY, et al. Activation/inactivation of anticancer drugs by CYP3A4: influencing factors for personalized cancer therapy[J]. Drug Metab Dispos, 2023, 51(5): 543-559.
- [22] Martiny VY, Miteva MA. Advances in molecular modeling of human cytochrome P450 polymorphism[J]. J Mol Biol, 2013, 425(21): 3978-3992.
- [23] Breimer DD, Schellens JHM. A “Cocktail” strategy to assess in vivo oxidative drug metabolism in humans[J]. Trends Pharmacol Sci, 1990, 11(6): 223-225.
- [24] 王小平, 白吉庆, 胡锦涛, 等. 丹参-红花药对配伍前后对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响[J]. 药物评价研究, 2017, 40(3): 300-306.
- [25] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 88-89.
- [26] 骆文香, 张银娣. 药物代谢中的肝细胞色素 P₄₅₀[J]. 药学进展, 1999, 23(1): 30-36.
- [27] 陈宇征, 吕文良. 中药导致药物性肝损伤的机制研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(11): 1476-1478.
- [28] 贺佳, 霍敏, 陈绍红, 等. 甘遂半夏汤中甘遂甘草反药组合加减应用对腹水大鼠 CYP450 酶的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(23): 10-18.
- [29] 王玲梅, 杨凡, 梁博涵, 等. X射线辐射对埃克替尼大鼠体内药动学的影响[J]. 中国新药杂志, 2024, 33(12): 1262-1269.
- [30] 王美晴, 白虎成, 张枢, 等. 新型 KRAS^{G12C} 抑制剂 VT198 的药效学及药动学研究[J]. 中国新药杂志, 2024, 33(14): 1466-1471.
- [31] 景欣悦, 彭蕴茹, 王新敏, 等. 甘遂与甘草合用对大鼠肝药酶 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP2E1 的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11): 1625-1626.
- [32] 武洁, 沈红, 钟荣玲, 等. 探针药物法评价大鼠体内甘草配伍大戟、甘遂和芫花对细胞色素 CYP1A2 活性的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(20): 1721-1725.
- [33] Chen M, Geng D, Yang X, et al. In vitro nephrotoxicity induced by herb-herb interaction between Radix Glycyrrhizae and Radix Euphorbiae Pekinensis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 6894751.

(收稿日期: 2024-07-02; 修回日期: 2024-08-21)

基于核心功效成分柚皮苷的化学稳定性探讨 丹苓补骨胶囊的配伍合理性

周琦人, 杨晓雯, 豆志亚, 戴俊东* (北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 基于中药复方中柚皮苷与单体柚皮苷热稳定性的差异, 从核心功效成分的化学稳定性角度探讨中药复方配伍合理性。**方法** 采用网络药理学及分子对接技术预测柚皮苷治疗原发性骨质疏松症的核心靶点、关键信号通路及生物过程等生物信息, 验证柚皮苷作为丹苓补骨胶囊核心功效成分和质量指标性成分的合理性; 利用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对丹苓补骨胶囊中的抗氧化活性成分进行定性分析, 并基于密度泛函理论 (DFT) 及 DPPH、ABTS、ORAC 3 种体外抗氧化活性测定方法, 预测分析各成分的抗氧化活性强弱及抗氧化作用机制, 进而从核心功效成分化学稳定性的角度分析探讨复方配伍的合理性。**结果** 网络药理学与分子对接结果表明, 柚皮苷治疗原发性骨质疏松症的潜在作用靶点为 34 个, 其中有 6 个核心靶点, 分别为 ALB、TNF、ESR1、CASP3、SERPINE1、ACE, 柚皮苷治疗原发性骨质疏松症涉及细胞周期、凋亡、信号传导等多种生物过程以及 p53、IL-17、PI3K-Akt 等多条信号通路; 柚皮苷与核心靶点基因所编码的蛋白结合效果良好, 结合能均小于 $-5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; 通过 UPLC-Q-TOF/MS 技术确定了丹苓补骨胶囊中柚皮苷、淫羊藿苷、丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 4 种天然酚类抗氧化活性成分的存在; DFT 计算和体外抗氧化活性实验结果表明, 4 种酚类化合物的抗氧化活性强弱顺序为: 丹酚酸 B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 淫羊藿苷和柚皮苷; 稳定性验证实验结果表明, 丹苓补骨胶囊中丹酚酸 B 等抗氧化活性成分对柚皮苷具有显著的保护作用, 可显著提高复方中柚皮苷的热稳定性。**结论** 丹苓补骨胶囊中丹参等含有抗氧化活性成分的药味与君药骨碎补配伍时, 丹酚酸 B 等抗氧化活性强于柚皮苷的成分在处方中可充当抗氧化剂, 从而显著增强柚皮苷在生产和制剂贮藏过程中的化学稳定性, 保证其在丹苓补骨胶囊中含量的稳定, 有利于改善丹苓补骨胶囊的质量和临床疗效。进而从中药复方核心功效成分的化学稳定性角度证实了丹苓补骨胶囊中君药骨碎补与其他药味配伍的科学性和合理性。

关键词: 柚皮苷; 化学稳定性; 配伍; 网络药理学; 分子对接; 密度泛函理论; 抗氧化活性
中图分类号: R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0587-11
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.002

Compatibility rationality of Danling Bugu capsules based on the chemical stability of naringin as a core active ingredient

ZHOU Qi-ren, YANG Xiao-wen, DOU Zhi-ya, DAI Jun-dong* (*School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488*)

Abstract: Objective To determine the compatibility of rationality in traditional Chinese medicine compound formulas from the chemical stability of naringin, a core active ingredient, based on the differences in thermal stability between compound formula and a single compound. **Methods** Network pharmacology and molecular docking were used to predict the core targets, key signaling pathways, biological processes, and other information of naringin in the treatment of primary osteoporosis (POP), to validate the rationality of naringin as the core active ingredient and quality indicator of Danling Bugu capsules. UPLC-Q-TOF/MS technology was utilized to qualitatively

基金项目: 国家中医药管理局高水平建设学科 - 中药药剂学 (No.ZYYZDXK-2023272)。

作者简介: 周琦人, 男, 硕士, 主要从事中药制剂研究, email: zhouqr970@163.com ***通信作者:** 戴俊东, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事分子药剂学与新型给药系统研究, email: daijd@163.com

analyze antioxidant active components in Danling Bugu capsules. Based on density functional theory (DFT) and three in vitro antioxidation assays (DPPH, ABTS, and ORAC), the antioxidation and mechanism of each component were analyzed to determine the compatibility rationality of Danling Bugu capsules from the chemical stability of naringin. **Results** The network pharmacology and molecular docking indicated 34 potential targets of naringin in the treatment of POP, with 6 core targets being ALB, TNF, ESR1, CASP3, SERPINE1, and ACE. The treatment of POP with naringin involved multiple biological processes such as the cell cycle, apoptosis, and signal transduction, as well as several signaling pathways such as p53, IL-17, and PI3K-Akt. Naringin exhibited strong binding affinity with proteins encoded by core target genes, with binding energies all less than $-5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. With UPLC-Q-TOF/MS technology, four natural phenolic antioxidant active components were identified in Danling Bugu capsules: naringin, icariin, salvianolic acid B, and calycosin-7-*O*-glucoside. DFT calculations and in vitro antioxidation experiments demonstrated the order of antioxidation of the four phenolic compounds follows the order: salvianolic acid B > calycosin-7-*O*-glucoside > icariin and naringin. The stability verification experiments indicated that the antioxidation components, such as salvianolic acid B in Danling Bugu capsules, exhibited obvious significant protective effect on naringin, markedly enhancing its thermal stability within the compound. **Conclusion** When Danshen is combined with the monarch herb *Drynariae Rhizoma*, components like salvianolic acid B exhibit stronger antioxidant activity than naringin, and serve as antioxidants in the formulation. This greatly enhances the chemical stability of naringin during the production and storage of Danling Bugu capsules. The compatibility of the monarch herb *Drynariae Rhizoma* with other herbal medicines in traditional Chinese medicine formulations is rational.

Key words: naringin; chemical stability; compatibility; network pharmacology; molecular docking; density functional theory; antioxidant activity

中药复方是中药临床应用的主要形式，充分体现了中医辨证论治的特色与灵魂。“药有个性之专长，方有合群之妙用”，中药复方配伍绝不是简单的药物堆砌和叠加，而是在中医药理论的指导下，基于“君臣佐使”“七情和合”等配伍理论以合适的剂量遣药组方，进而达到增效减毒的目的^[1]。无论是传承千百年的经典古方还是临床常用的经验方均来源于长期临床实践，通过现代研究阐明复方配伍的科学性和合理性，对于中药复方的疗效验证、药理机制探讨、安全性评估、标准化生产、创新与发展、文化传承与保护以及国际化推广具有重要意义。目前，中药复方配伍研究主要从药物的性味归经、药效毒性、化学成分的体内外相互作用等角度进行探讨，尚未见基于核心功效成分的化学稳定性角度对中药复方配伍合理性的探索研究。

丹苓补骨胶囊是山西天生制药公司在临床经验方的基础上改良研发的一款中成药，由熟地黄、骨碎补、补骨脂、淫羊藿、黄芪等十二味中药组成，具有补肾壮骨、益气健脾、活血止痛之效，可用于原发性骨质疏松症的辅助治疗。骨碎补为该方的君药，据《本草新编》记载：“骨碎补，入骨，用

之以补接伤碎最神”；《本草筌蒙》有云：“补骨节伤碎，疗风血积疼”，可见，骨碎补具有疗伤止痛，补肾壮骨之效。柚皮苷是丹苓补骨胶囊和君药骨碎补的核心功效成分及指标性成分。现代药理研究表明柚皮苷具有抗骨质疏松症、抗氧化、抗炎等生物活性^[2]。此外，它作为一种植物雌激素，还被证实可以模仿雌激素作用，以防止与雌激素相关的骨质流失^[3]。

本研究首先基于网络药理学和分子对接技术验证柚皮苷对原发性骨质疏松症的药理作用及其作用机制，说明选择柚皮苷作为丹苓补骨胶囊核心功效成分和指标成分的合理性。课题组前期实验结果表明丹苓补骨胶囊中柚皮苷的稳定性显著优于单体成分，分析可能与复方中其他抗氧化活性成分对其的保护作用有关。故采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对丹苓补骨胶囊中的抗氧化活性成分进行定性分析；再结合密度泛函理论 (DFT) 计算和体外抗氧化活性实验对比研究相关成分的抗氧化活性强弱；最后通过热稳定性实验考察配伍前后柚皮苷的稳定性变化情况。基于上述研究从核心功效成分的化学稳定性角度分析探讨丹苓补骨胶囊中君药骨碎补与其他药味配伍的科学性和合理性。

1 材料

1.1 数据库与软件

TCMSP 数据库 (<https://www.tcmsp-e.com/#/database>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch>)、Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org>)、DisGenet 数据库 (<https://www.disgenet.org>)、DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com>)、VENNY 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>)、STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org>)、DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>)、微生信在线平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn>)、PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>)、Cytoscape 3.7.2、AutoDocktools 1.5.7、PyMOL、MassLynxV 4.1、HMDB 数据库 (<https://hmdb.ca>)、MassBank 数据库 (<https://massbank.jp>)、MoNA 数据库 (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、Gaussian 16、GaussView 6.0。

1.2 试药与仪器

乙腈(质谱级)、甲醇(色谱级)、甲酸(色谱级)[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、水溶性维生素 E (Trolox)、荧光素钠、过硫酸钾(批号分别为 D2673AABE、H1433AB29、F9733AB29、P96438544, 上海吉至生化科技有限公司); 2, 2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)(批号为 KN300957, 北京欣恒研科技有限公司); 2, 2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(AAPH)(货号为 GC19496, 美国 Glpbio 公司); 淫羊藿苷(纯度 $\geq 95\%$)、柚皮苷(纯度 $\geq 99\%$)(批号分别为 C14751702、C16098810, 上海麦克林生化科技有限公司); 丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(纯度均 $\geq 98\%$, 批号分别为 PS012397、PS010246, 成都普思生物科技有限公司)。熟地黄、骨碎补、补骨脂、淫羊藿、炙黄芪、茯苓、黄瓜子、丹参、自然铜(煅)、乳香(制)、没药(制)、丹苓补骨胶囊(山西天生制药有限责任公司), 药材经山西天生制药有限责任公司高级工程师孟中华鉴定: 黄瓜子为《重庆市中药材质量标准(2022 年版)》收录品种, 其余均为《中国药典》收录品种。

Waters-ACQUITY™ I-Class SYNAPT G2-Si MS UPLC-Q-TOF/MS 仪(美国 Waters 公司); SpectraMax i3x 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); 十万分之一分析天平 BT 125D(德国赛多利斯科学仪器有限公司); 数控超声波清洗器 KQ-500DE 型(昆

山市超声仪器有限公司); 96 孔板(透明)(武汉赛维尔生物科技有限公司); 96 孔板(黑色)(北京白鲨易科技有限公司); Thermo UltiMate 3000 超高效液相色谱仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

2 方法

2.1 网络药理学分析柚皮苷治疗原发性骨质疏松症的作用机制

2.1.1 成分作用靶点及疾病靶点的获取

利用 TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库获取柚皮苷的作用靶点及相关信息, 同时在 GeneCards、OMIM、DisGenet 及 DrugBank 数据库中检索“primary osteoporosis”, 以获得疾病靶点。去除重复, 整合后利用 Uniprot 数据库将靶点转换为对应的人源基因名。

2.1.2 蛋白互作(PPI)网络的构建及核心靶点筛选

取柚皮苷作用靶点与原发性骨质疏松症疾病靶点的交集靶点, 即为柚皮苷治疗原发性骨质疏松症的潜在作用靶点, 并上传至 STRING 数据库中, 隐藏孤立蛋白, 构建 PPI 网络; 利用 Cytoscape 3.7.2 的内置插件 Centiscape 2.2 计算 PPI 网络的阈值, 筛选核心靶点。

2.1.3 GO 功能与 KEGG 信号通路分析

通过 DAVID 数据库对潜在作用靶点进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析。

2.1.4 构建“柚皮苷-潜在靶点-原发性骨质疏松症-通路”网络

通过检索相关文献, 筛选疾病相关通路, 利用 Cytoscape 3.7.2 构建“柚皮苷-潜在靶点-原发性骨质疏松症-通路”网络。

2.1.5 分子对接

在 PDB 数据库中下载核心靶点的蛋白结构 PDB 文件, 以柚皮苷为配体, 各核心靶点蛋白为受体, 利用 AutoDocktools 1.5.7 进行分子对接, 计算结合能。最后, 借助 PyMOL 对分子对接结果进行可视化处理。

2.2 丹苓补骨胶囊中抗氧化活性成分的定性分析

2.2.1 供试品溶液的制备

精密称定 0.6 g 丹苓补骨胶囊内容物, 加入 50 mL 甲醇超声(500 W, 40 kHz)处理 15 min, 放冷后, 甲醇补足减失的重量。取上清液 750 μL 以等量甲醇稀释, 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.2.2 色谱条件

Waters Acquity UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸水, B 为 0.1% 甲酸乙腈, 梯度洗脱(0~3 min, 2%~8%B; 3~6 min, 8%~20%B; 6~17 min, 20%~98%B; 17~20 min, 98%B; 20~20.10 min, 98%~2%B; 20.10~21 min, 2%B); 流速为 0.3 mL \cdot min $^{-1}$, 进样器温度为 10 $^{\circ}\text{C}$, 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 2 μL 。

2.2.3 质谱条件 采用电喷雾 (ESI) 离子源, 离子源温度为 120 °C; 采用 MSE 正、负离子扫描模式, 扫描质量范围为 m/z 50 ~ 1500, 扫描时间为 0.2 s; 毛细管电压为 2.0 kV, 高能通道碰撞电压为 10 ~ 75 V, 锥孔电压为 40 V, 锥孔气流速为 50 L · h⁻¹, 脱溶剂气温度为 450 °C, 脱溶剂气流速为 800 L · h⁻¹; 使用 MassLynxV 4.1 软件进行数据采集与分析。

2.2.4 定性分析 通过查阅文献、《中国药典》等途径, 筛选丹苓补骨胶囊中含量高、抗氧化活性强、含有酚羟基的指标成分, 选择其中具有代表性的成分进行研究。通过 UPLC-Q-TOF/MS 得到丹苓补骨胶囊质谱图, 使用 MassLynxV 4.1 软件将质谱图中的准分子离子峰、二级碎片等信息与 HMDB、MassBank、MoNA、PubChem 数据库及相关文献进行比对分析, 确定抗氧化活性成分。

2.3 抗氧化活性成分的 DFT 研究^[4]

基于 DFT 方法, 计算所用软件为 Gaussian 16 和 GaussView 6.0。选用 B3LYP/6-31G (d, p) 基组, 考虑溶剂效应和弱相互作用, 溶剂模型为 IEFPCM, 溶剂为水, 色散校正为 GD3BJ, 对抗氧化活性成分的结构 (包括中性分子、阳离子自由基、脱氢自由基) 进行结构优化和频率分析, 以获得最稳定构型及热力学参数。以各成分结构的最稳定构型, 在 M062X/def2TZVP 的水平下考虑溶剂效应和弱相互作用, 溶剂模型为 SMD, 溶剂为水, 色散校正为 GD3, 计算各结构的高精度单点能。最后计算各成分参数: 键解离焓 (BDE) 值、电离势 (IP) 值、最高占据分子轨道 (HOMO)、最低占据分子轨道 (LUMO) 及能级差, 比较各参数大小, 预测各成分的抗氧化活性强弱。

2.4 体外抗氧化活性测定

2.4.1 DPPH 自由基清除能力测定 在 96 孔透明板中分别加入 100 μL 质量浓度梯度为 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40 μg · mL⁻¹ 的 Trolox 对照品溶液、丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷供试品溶液及质量浓度梯度为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 μg · mL⁻¹ 的柚皮苷、淫羊藿苷供试品溶液, 再加入 100 μL 0.24 mmol · L⁻¹ 的 DPPH 工作液, 混合均匀, 室温下避光静置 30 min, 反应完全后测定 517 nm 处吸光度。以 Trolox 为阳性对照, 溶剂为空白对照, 实验结果用 DPPH 自由基清除率表示。

2.4.2 ABTS⁺ 自由基清除能力测定 在透明 96 孔板中分别加入 50 μL 质量浓度梯度为 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40 μg · mL⁻¹

的 Trolox 及丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷、柚皮苷供试品溶液, 再加入 200 μL ABTS⁺ 工作液, 混合均匀, 室温下避光静置 30 min, 反应完全后测定 734 nm 处吸光度。以 Trolox 为阳性对照, 溶剂为空白对照, 实验结果用 ABTS⁺ 自由基清除率表示。

2.4.3 氧自由基吸收能力 (ORAC) 测定 在黑色 96 孔板中先分别加入 100 μL 质量浓度梯度为 0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6、4.0 μg · mL⁻¹ 的 Trolox 对照品、淫羊藿苷、柚皮苷供试品溶液及质量浓度梯度为 0.08、0.12、0.16、0.20、0.24、0.28、0.32、0.36、0.40 μg · mL⁻¹ 的丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷供试品溶液, 再加入 50 μL 0.2 μmol · L⁻¹ 的荧光素钠溶液, 混合均匀后室温下避光静置 15 min; 再向各孔快速加入 50 μL 80 mmol · L⁻¹ 的 AAPH 溶液, 立即用酶标仪在室温下测定各孔荧光强度 (激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm), 每隔 1 min 检测一次, 直至荧光强度衰减呈基线后为止。同时设定两种对照, 即未添加自由基组 (- AAPH) 和未添加抗氧化剂组 (+ AAPH)。抗氧化剂的氧自由基清除能力 ORAC 值可通过 Trolox 当量表示。

2.5 稳定性验证

2.5.1 柚皮苷水溶液的制备 精密称定柚皮苷对照品 3 mg 于 50 mL 量瓶中, 纯化水超声溶解, 定容, 制成 60 μg · mL⁻¹ 的柚皮苷水溶液。

2.5.2 柚皮苷和抗氧化活性成分混合溶液的制备 根据 DFT 计算和体外抗氧化活性实验的结果, 确定最强的抗氧化活性成分。取该抗氧化活性成分和柚皮苷对照品各 3 mg, 按“2.5.1”项下方法制备, 即得。

2.5.3 丹苓补骨胶囊水煎液的制备 取熟地黄 12 g, 骨碎补、补骨脂、淫羊藿、炙黄芪、茯苓、黄瓜子、丹参、自然铜 (煅) 各 10 g, 乳香 (制)、没药 (制) 各 4 g, 加自来水冷凝回流煎煮两次, 第一次加自来水 20 倍量, 煎煮 2 h, 第二次加自来水 15 倍量, 煎煮 1.5 h, 煎煮完成后用 200 目筛网过滤药液, 合并煎液, 即得。

取上述各溶液约 2 mL 熔封于安瓿瓶中, 分别于 100 °C 和 60 °C 条件下放置 4、8、12、24 h, 取出冷却至室温后, 参照《中国药典》2020 年版第一部骨碎补含量测定方法, 测定加热前后柚皮苷含量变化, 对比分析, 评价柚皮苷的热稳定性。

2.6 数据处理与统计分析

数据采用 GraphPad Prism 9.5 进行统计分析, 数据均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据图中用误差棒表示标准差。两组间差异采用独立样本

t 检验, 多组间采用单因素方差 (ANOVA) 分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学分析柚皮苷治疗原发性骨质疏松症的作用机制

3.1.1 成分作用靶点及疾病靶点的获取 通过各数据库共得到柚皮苷作用靶点 105 个, 原发性骨

质疏松症的疾病靶点 1778 个。取交集后共获得 34 个柚皮苷治疗原发性骨质疏松症的潜在作用靶点。

3.1.2 PPI 网络的构建及核心靶点筛选 潜在作用靶点的 PPI 网络见图 1。筛选后得到 6 个核心靶点, 分别为 ALB、TNF、ESR1、CASP3、SERPINE1、ACE, 详细信息见表 1, 筛选过程见图 2。

表 1 柚皮苷治疗原发性骨质疏松症的核心靶点

Tab 1 Core targets of naringin in the treatment of primary osteoporosis

序号	Uniprot ID	靶点名	名称	度值	介数中心性	接近度中心性
1	P02768	ALB	白蛋白	27	211.93	0.026
2	P01375	TNF	肿瘤坏死因子	26	133.76	0.025
3	P03372	ESR1	雌激素受体	24	132.50	0.024
4	P42574	CASP3	半胱氨酸蛋白酶 3	23	118.22	0.023
5	P05121	SERPINE1	纤溶酶原激活物抑制剂 1	15	32.67	0.020
6	P12821	ACE	血管紧张素转换酶	11	112.01	0.018

3.1.3 GO 功能与 KEGG 信号通路分析 GO 功能富集分析共得到 210 条结果, 包括生物过程 (BP) 151 条, 细胞组分 (CC) 16 条, 分子功能 (MF) 43 条。KEGG 信号通路富集分析共得到 53 条结果, 主要涉及的通路有 p53 信号通路和 IL-17 信号通路等。

3.1.4 构建“柚皮苷 - 交集靶点 - 原发性骨质疏松症 - 通路”网络 综合文献发现, 在 53 条信号通路富集结果中, 有 17 条通路与原发性骨质疏松症密切相关, 详见表 2。“柚皮苷 - 交集靶点 - 原发性骨质疏松症 - 通路”网络如图 3 所示。

表 2 原发性骨质疏松症相关通路

Tab 2 Pathways related to primary osteoporosis

序号	ID	信号通路	基因数	<i>P</i> 值	富集倍数
1	hsa04115	p53 信号通路	5	0.000 118	18.7140
2	hsa04657	IL-17 信号通路	5	0.000 297	14.7323
3	hsa04151	PI3K-Akt 信号通路	5	0.034 908	3.8575
4	hsa04933	糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路	4	0.004 954	11.0787
5	hsa04064	NF- κ B 信号通路	4	0.005 527	10.6526
6	hsa04210	细胞凋亡	4	0.011 547	8.1461
7	hsa04010	MAPK 信号通路	4	0.086 405	3.6806
8	hsa04664	Fc ϵ RI 信号通路	3	0.023 309	12.2192
9	hsa04917	催乳素信号通路	3	0.024 605	11.8700
10	hsa04012	ErbB 信号通路	3	0.035 220	9.7753
11	hsa04668	TNF 信号通路	3	0.059 729	7.2886
12	hsa04071	甲状腺激素信号通路	3	0.066 329	6.8669
13	hsa04919	鞘脂信号通路	3	0.066 329	6.8669
14	hsa04926	松弛素信号通路	3	0.074 157	6.4411
15	hsa04068	FoxO 信号通路	3	0.076 160	6.3427
16	hsa04380	破骨细胞分化	3	0.080 217	6.1548
17	hsa04915	雌激素信号通路	3	0.082 271	6.0649

3.1.5 分子对接 分子对接结果显示, 柚皮苷与 CASP3 (1NMQ)、TNF (7KP9)、ESR1 (1X7R)、SERPINE1 (7AQF)、ALB (7VR0)、ACE (6H5W) 各核心靶点蛋白的结合能分别为 -29.41、-27.24、-26.15、-22.72、-22.88、-29.92 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 可视化分析见图 4, 柚皮苷嵌入蛋白质口袋, 与周围的氨基酸残基形成稳定氢键, 可见 6 个核心靶点蛋白与柚皮苷结合性均较好。

3.2 丹苓补骨胶囊中抗氧化活性成分的定性分析 对丹苓补骨胶囊各中药组分进行文献调研^[5-19], 选取了骨碎补、丹参、淫羊藿、黄芪中含有的抗氧化活性较强的成分, 分别为柚皮苷、丹酚酸 B、淫羊藿苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷。正、负离子模式下丹苓补骨胶囊的 TIC 图如图 5 所示, 通过对质谱数据进行分析, 确定了丹苓补骨胶囊中上述 4 种成分的存在, 详细鉴定信息见表 3。

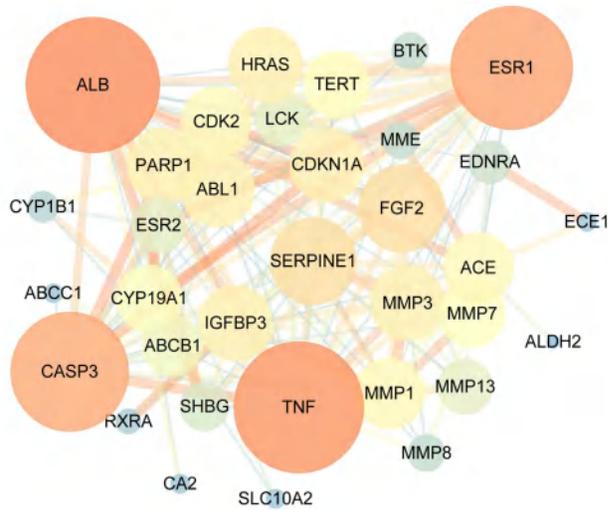


图 1 潜在作用靶点的 PPI 网络图
Fig 1 PPI network of potential targets

3.3 抗氧化活性成分的 DFT 研究

3.3.1 酚羟基 BDE 在抗氧化活性研究中 通常以 O-H 键的 BDE 来表征酚羟基氢的离域能力, BDE 越小, 化学键越容易断裂, 以氢原子转移机制 (HAT) 为基础的自由基清除反应越容易发生, 化合物的抗氧化活性越强^[20]。本研究结果显示: 丹酚酸 B 由 3 分子的丹参素与 1 分子的咖啡酸缩合而成, 其中咖啡酸部分的对位酚羟基、与咖啡酸的羧基连接的丹参素上的间位酚羟基的 BDE 值分别为 343.9959、364.9106 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷酚羟基的 BDE 值分别为 355.1910、375.1685 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 柚皮苷中 A 环 C5-OH、B 环 C4'-OH 的 BDE 值分别为 410.7913、381.6981 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由此推断, 4 种酚类化合物的抗氧化活性顺序为: 丹酚酸

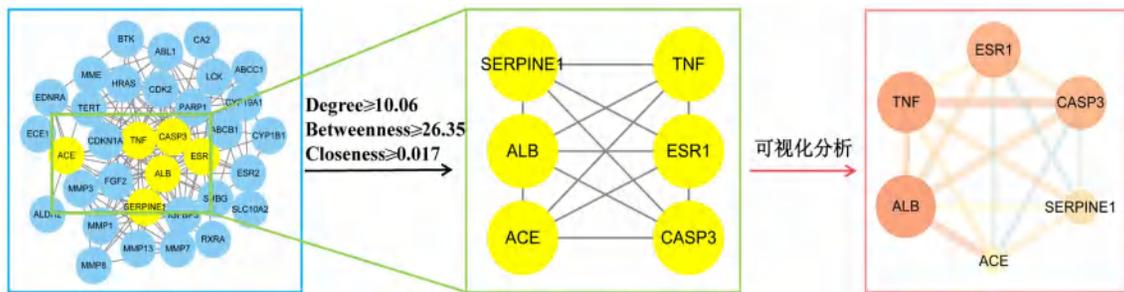


图 2 核心靶点筛选过程
Fig 2 Screening process of core targets

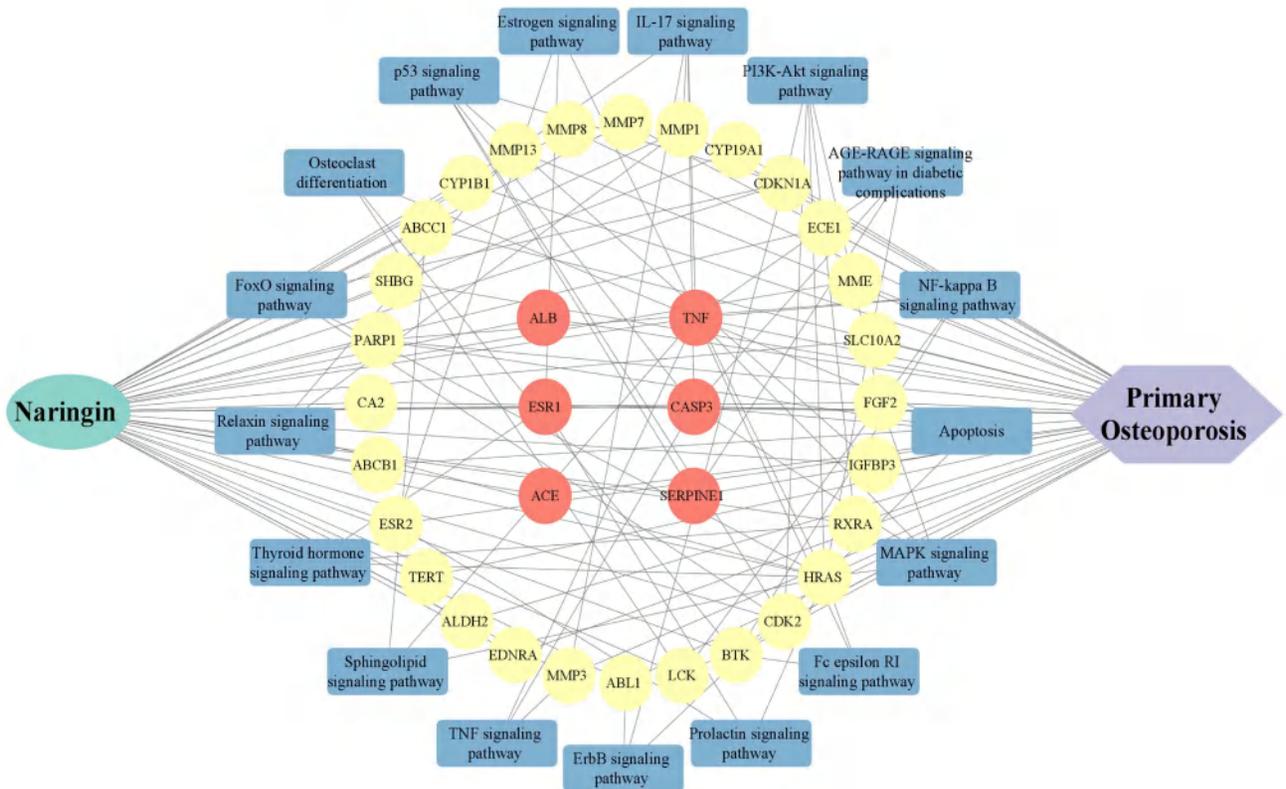


图 3 “柚皮苷 - 交集靶点 - 原发性骨质疏松症 - 通路” 网络图
Fig 3 Network diagram of “naringin-intersection targets-primary osteoporosis-pathways”

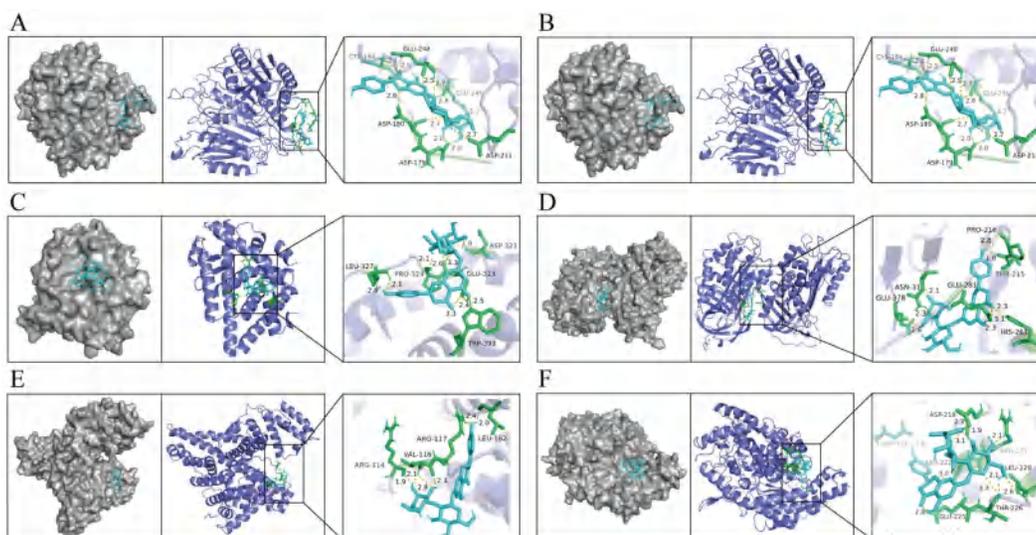


图 4 核心靶点蛋白与柚皮苷分子的对接图
 Fig 4 Molecular docking of core target proteins with naringin
 A. CASP3; B. TNF; C. ESR1; D. SERPINE1; E. ALB; F. ACE

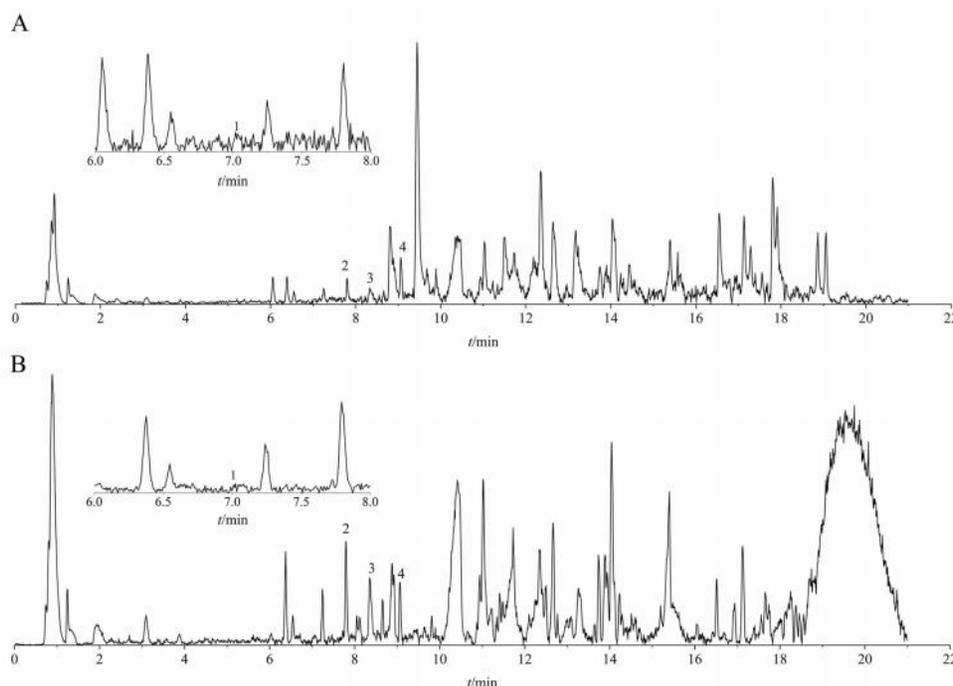


图 5 正 (A)、负 (B) 离子模式下丹苓补骨胶囊的 TIC 图
 Fig 5 TIC chromatogram of Danling Bugu capsules in positive (A) and negative (B) ion modes
 1. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-O-glucoside); 2. 柚皮苷 (naringin); 3. 丹酚酸 B (salvianolic acid B); 4. 淫羊藿苷 (icariin)

B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 淫羊藿苷 > 柚皮苷。
3.3.2 IP 在抗氧化研究中, IP 是与单电子转移机制 (SET) 相关的重要参数, 能够反映分子的给电子能力, 常被用于表征分子的抗氧化活性。IP 值越低, 电子越容易转移, 说明抗氧化剂是优良的电子供体, 抗氧化活性越强^[21]。本研究计算了丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷、柚皮苷的 IP 值, 结果分别为 545.3797、550.7121、582.4676、600.7463 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。由此推断 4 种酚

类成分的抗氧化活性强弱顺序为: 丹酚酸 B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 淫羊藿苷 > 柚皮苷, 此结果与 BDE 结果一致。

3.3.3 前线分子轨道及轨道能级 前线分子轨道理论认为, HOMO 的能量越高, 处于该轨道的电子越不稳定, 越容易失去电子; 能量越低的 LUMO 则越容易接受电子。最低占据轨道能级 (E_{LUMO}) 与最高占据轨道能级 (E_{HOMO}) 之差 ΔE 表示化学反应发生时分子形成活化态, 电子从

表 3 丹苓补骨胶囊中抗氧化活性成分鉴定信息

Tab 3 Identification information of antioxidant active components in Danling Bugu capsules

No.	t_R/min	分子式	质荷比 (m/z)		加合离子	误差 / $\times 10^{-6}$	MS ² 质谱碎片	化合物名
			理论值	实测值				
1	7.02	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.1286	447.1260	[M + H] ⁺	- 5.76	285.0791, 270.0475, 213.0542, 137.0213	毛蕊异黄酮葡萄糖苷
			491.1196	491.1185	[M + HCOO] ⁻	- 2.04	283.0580, 268.0436, 211.0416, 135.0403	
2	7.80	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.1865	581.1819	[M + H] ⁺	- 7.88	419.1292, 383.1169, 273.0760, 153.0174	柚皮苷
			579.1719	579.1731	[M-H] ⁻	2.02	459.1145, 271.0626, 151.0025, 119.0526	
3	8.39	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	736.1872	736.1846	[M + NH ₄] ⁺	- 3.55	521.1075, 323.0528, 295.0563, 181.0499	丹酚酸 B
			717.1461	717.1441	[M-H] ⁻	- 2.80	519.0930, 339.0516, 321.0405, 295.0655	
4	9.06	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	677.2440	677.2438	[M + H] ⁺	- 0.29	531.1909, 369.1313, 313.0723, 135.0458	淫羊藿苷
			721.2349	721.2321	[M + HCOO] ⁻	- 3.91	529.1626, 513.1788, 367.1155, 351.0920	

HOMO 轨道跃迁到 LUMO 轨道所需要的能量, 即 ΔE 越小, 所需的能量越小, 反应的活性越高, 分子越活泼, 抗氧化活性越强^[22]。因此, 可以通过 HOMO 能级和 ΔE 反映分子的给电子能力和反应活性, 进而表征化合物的抗氧化活性, 结果见表 4。

结果显示, 4 种酚类成分的 E_{HOMO} 大小顺序为: 丹酚酸 B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 淫羊藿苷 > 柚皮苷; ΔE 的大小顺序为: 丹酚酸 B < 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 < 淫羊藿苷 < 柚皮苷。由此推测其抗氧化活性强弱顺序为: 丹酚酸 B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 淫羊藿苷 > 柚皮苷, 这与前文 BDE 值和 IP 值结果均一致。

表 4 4 种酚类化合物的前线分子轨道能及能级差 (eV)

Tab 4 Frontier molecular orbital energies and energy gaps of 4 phenolic compounds (eV)

化合物	E_{HOMO}	E_{LUMO}	ΔE
丹酚酸 B	- 5.5614	- 1.9099	3.6516
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	- 5.5911	- 1.5319	4.0592
淫羊藿苷	- 5.8733	- 1.6956	4.1777
柚皮苷	- 6.0608	- 1.6016	4.4592

3.4 体外抗氧化活性测定

3.4.1 DPPH 自由基清除能力 结果表明, 4 种酚类化合物对 DPPH 自由基均具有一定的清除活性, 且与浓度成正相关, 见图 6。Trolox、丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷及柚皮苷的 IC_{50} 分别为: 18.42、14.47、40.75、2187.95、1322.25 $\mu g \cdot mL^{-1}$, 因此, 4 种酚类化合物的抗氧化活性强弱顺序为: 丹酚酸 B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 柚皮苷 > 淫羊藿苷。

3.4.2 ABTS⁺ 自由基清除能力 结果显示, 4 种酚类化合物对 ABTS⁺ 自由基均具有一定的清除活性, 且呈浓度依赖性, 见图 7。Trolox、丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷及柚皮苷的 IC_{50} 分别为: 18.98、16.04、29.47、36.74、80.82

$\mu g \cdot mL^{-1}$, 由此推断, 4 种酚类化合物的抗氧化活性强弱顺序为: 丹酚酸 B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 淫羊藿苷 > 柚皮苷。

3.4.3 ORAC 测定 由图 8 可知, 4 种酚类化合物对氧自由基引起的荧光衰减均具有保护作用, 且随着浓度的增加保护作用越强。丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷及柚皮苷的 ORAC 值分别为 22.050、9.261、3.991、7.827 $\mu mol Trolox \cdot mg^{-1}$, 由此推断, 其氧自由基吸收能力强弱顺序为: 丹酚酸 B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 柚皮苷 > 淫羊藿苷。

3.5 稳定性验证

根据 DFT 分析及体外抗氧化活性实验可以确定, 丹酚酸 B 的抗氧化活性最强。因此, 本研究以柚皮苷水溶液为对照组, 考察柚皮苷水溶液、柚皮苷与丹酚酸 B 混合水溶液及丹苓补骨胶囊煎液的热稳定性, 以验证强抗氧化剂对柚皮苷的保护作用。结果见图 9, 在 60 °C 条件下, 3 种溶液中柚皮苷的降解程度均较小, 说明柚皮苷在该条件下热稳定性较好。在 100 °C 时, 柚皮苷水溶液出现明显的降解现象, 24 h 后含量仅为最初的 60% 左右; 在柚皮苷水溶液中加入丹酚酸 B 后, 柚皮苷在各加热时间点的相对含量均高于柚皮苷组, 柚皮苷的降解现象得到明显的缓解, 说明丹酚酸 B 对柚皮苷具有保护作用; 而丹苓补骨胶囊煎液中柚皮苷的降解程度最低, 即使在 100 °C 24 h 时仍有 80% 左右, 说明在丹苓补骨胶囊中除丹酚酸 B 外还有其他抗氧化活性成分对柚皮苷具有保护作用。对结果进行的统计学分析显示, 相同加热时间下, 100 °C 柚皮苷组、100 °C 柚皮苷 + 丹酚酸 B 组与 100 °C 丹苓补骨胶囊煎液组两两比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.0001$)。由此可证明, 丹酚酸 B 及丹苓补骨胶囊中的其他抗氧化活性成分对柚皮苷的化学稳定性具有显著的保护作用, 能够提高其热稳定性。

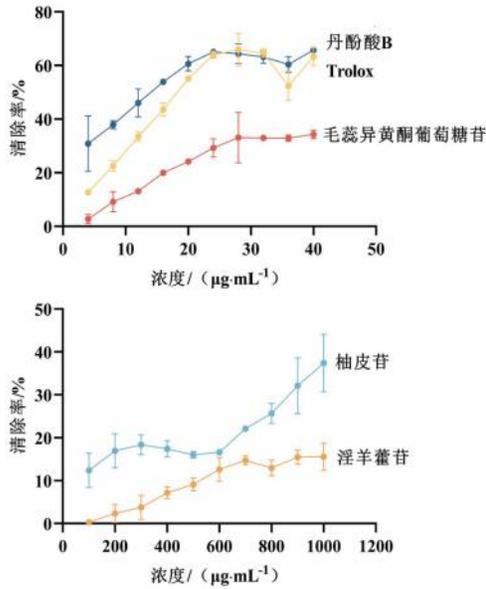


图 6 4 种酚类化合物和 Trolox 的浓度 -DPPH 清除率曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 6 Concentration-DPPH scavenging rate curves of 4 phenolic compounds and Trolox ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

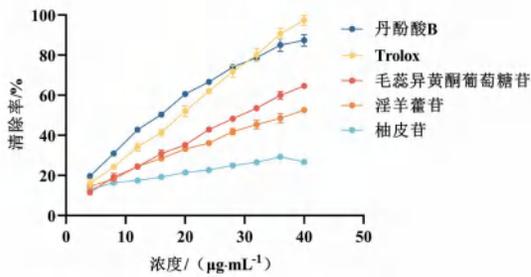


图 7 4 种酚类化合物和 Trolox 的浓度 -ABTS⁺清除率曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 7 Concentration-ABTS⁺ scavenging rate curves of 4 phenolic compounds and Trolox ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

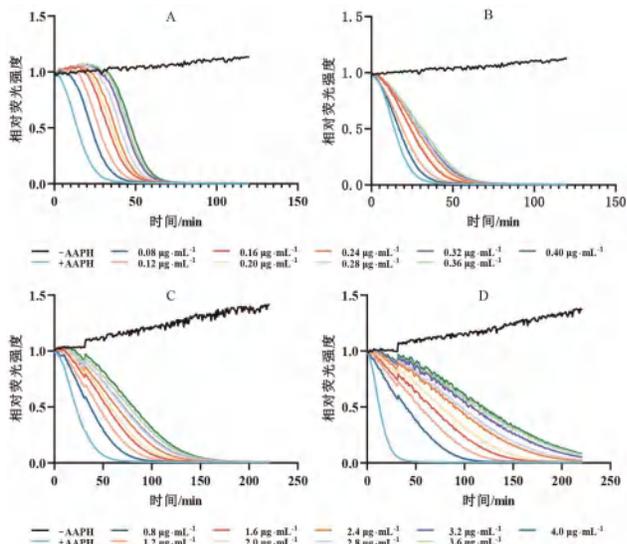


图 8 丹酚酸 B (A)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (B)、淫羊藿苷 (C)、柚皮苷 (D) 的荧光衰减曲线

Fig 8 Fluorescence decay curves of salviaolic acid B (A), calycosin-7-O-glucoside (B), icariin (C), and naringin (D)

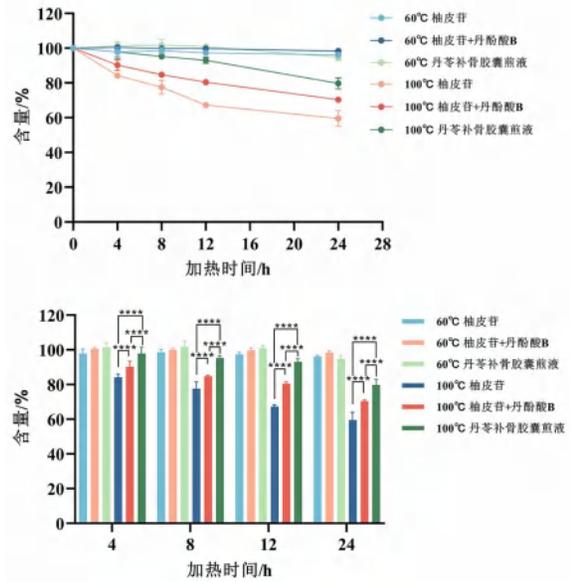


图 9 柚皮苷水溶液、柚皮苷与丹酚酸 B 混合水溶液及丹苓补骨胶囊水煎液的热稳定性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, **** $P < 0.0001$)

Fig 9 Thermal stability of naringin aqueous solution, naringin mixed with salviaolic acid B aqueous solution, and Danling Bugu capsules decoction ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, **** $P < 0.0001$)

4 讨论

4.1 核心功效成分柚皮苷的网络药理学分析

柚皮苷作为一种在自然界分布较为广泛的天然黄酮苷, 已有相关研究表明其针对原发性骨质疏松症具有骨骼保护、促进骨折愈合、减少雌激素缺乏引起的骨质流失等生物活性^[3, 23]。本研究通过网络药理学和分子对接技术对柚皮苷治疗原发性骨质疏松症的作用机制进行研究。结果表明, 筛选出的 6 个核心靶点 (TNF、CASP3、ESR1、SERPINE1、ALB、ACE) 与柚皮苷治疗原发性骨质疏松症密切相关。CASP3 是调控骨细胞凋亡因子中的执行因子^[24]; TNF 是一种强效骨吸收刺激因子^[25]; ESR1 是一种骨代谢激素调节剂, 与原发性骨质疏松症密切相关; SERPINE1 可编码产生 PAI-1 定向诱导骨髓间充质干细胞 (hBMSCs) 向成骨细胞分化^[26-27]。ALB 能够有效促进骨骼生长发育、愈合和维持力学性能^[28]; ACE 是骨组织局部肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的重要组成部分^[29]。GO 功能富集分析显示, 柚皮苷治疗原发性骨质疏松症主要涉及细胞周期、凋亡、免疫、炎症等多种生物过程; 涵盖了细胞核、细胞质、外泌体、细胞膜等几乎全阶段的细胞组分; 影响了金属离子结合、蛋白质结合、转录因子活性、激素受体活性等分子功能。KEGG 信号通路富集分析表明, 柚皮苷可通过多条信号通路, 如雌激素信号通路、p53、IL-17、PI3K-Akt 等信号通路, 实现对原发性骨质疏松症的治疗作用。其中雌激

素信号通路是绝经后骨质疏松症发病机制中的重要通路, 雌激素的缺少导致雌激素信号通路受阻, 破骨细胞增殖, 骨吸收增加, 同时还可促进 *IL-17*、*TNF- α* 等基因的表达, 协同 *IL-17* 信号通路、*TNF* 信号通路等其他通路共同诱导破骨细胞的增殖和成骨细胞的凋亡^[30]。此外, 分子对接结果显示, 柚皮苷与核心靶点之间结合效果良好, 具有较强的对接活性和稳定性。由此可见, 柚皮苷可通过调控 *TNF*、*CASP3*、*ESR1*、*SERPINE1* 等核心靶点, 影响雌激素信号通路、*p53*、*IL-17*、*PI3K-Akt* 等信号通路, 干预细胞凋亡、氧化应激反应及炎症反应等过程, 进而调控骨髓间充质干细胞、成骨细胞、破骨细胞等细胞的增殖分化和凋亡, 实现对原发性骨质疏松症的治疗作用。基于上述分析, 说明君药骨碎补中的柚皮苷是丹苓补骨胶囊治疗原发性骨质疏松症的核心药效成分之一, 也验证了柚皮苷作为丹苓补骨胶囊质量指标成分的合理性。

4.2 丹苓补骨胶囊中抗氧化活性成分对柚皮苷的保护作用

课题组前期实验结果表明丹苓补骨胶囊中柚皮苷的热稳定性显著优于柚皮苷单体, 分析其原因可能与复方中其他抗氧化活性成分对其的保护作用有关。为验证此猜想, 本研究利用 *UPLC-Q-TOF/MS* 确定了丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷、柚皮苷 4 种代表性酚类化合物在丹苓补骨胶囊中的存在。

DFT 计算结果显示, 4 种酚类化合物以 *BDE*、*IP* 和前线分子轨道能级及能级差表征的抗氧化活性强弱顺序均一致, 即丹酚酸 B > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 淫羊藿苷 > 柚皮苷。

为验证理论计算的可靠性, 选用 *DPPH*、*ABTS*、*ORAC* 3 种体外抗氧化活性测定方法分别测定了丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、淫羊藿苷、柚皮苷的抗氧化活性。无论是理论计算还是体外实验结果均显示, 在 4 种酚类化合物中丹酚酸 B 的抗氧化活性最强, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷其次, 且均强于淫羊藿苷和柚皮苷, 而淫羊藿苷和柚皮苷的抗氧化活性在不同的体外抗氧化活性测定方法中则表现为不同的强弱顺序。推测其原因可能与抗氧化剂的溶解性、反应体系所用的溶剂以及抗氧化机制有关。在 4 种酚类化合物中只有淫羊藿苷的水溶性较差, 在实际测定实验中需溶解于高浓度的甲醇溶液, 而理论计算均以水为溶剂, 这使得理论计算得到的淫羊藿苷抗氧化活性强弱可能与实验测定结果不一致。其次, 3

种体外抗氧化活性测定方法中所使用的自由基的溶解性各不相同, 反应体系的溶剂也各不相同, 如 *DPPH* 水溶性较差, 通常以甲醇或乙醇为溶剂, 适用于脂溶性成分的测定; *ABTS* 在水和有机溶剂中均可溶解, 适用于亲水和亲脂性物质的测定, 本研究中 *ABTS* 实验以水为溶剂; 使用 *FL* 的 *ORAC* 实验是以水为反应体系的溶剂, 适用于亲水性物质的测定^[31-32]。因此, 亲水性物质和亲脂性物质对不同的自由基的亲合力不同, 而在不同的反应体系中可能表现出不一样的自由基清除能力。此外, 各种抗氧化活性测定方法之间的抗氧化机制也各有差异, 主要是 *HAT* 或 *SET*, 抑或两者同时发生, 如 *DPPH* 和 *ABTS* 反应机制主要是 *SET* 机制占主导, 也存在 *HAT* 机制^[31, 33]; *ORAC* 的反应机制是 *HAT* 机制, 该机制更接近生理环境中抗氧化剂所扮演的角色, 所以被认为是众多测定方法中最好的一种^[34]。至于何种抗氧化机制占主导地位通常由抗氧化剂的结构、溶解性、反应体系的溶剂等因素决定^[35]。因此, 即是同一化合物在不同的抗氧化活性测定方法下, 也可能表现出不同的抗氧化活性。

为验证丹苓补骨胶囊中的抗氧化活性成分是否对柚皮苷起到了保护作用, 本研究以柚皮苷水溶液为对照组, 对比研究柚皮苷与丹酚酸 B 混合水溶液、丹苓补骨胶囊水煎液及柚皮苷水溶液的热稳定性。结果显示, 丹苓补骨胶囊水煎液中的柚皮苷最为稳定, 柚皮苷与丹酚酸 B 混合水溶液次之。上述结果证明, 丹苓补骨胶囊中丹参等含有抗氧化活性成分的药味与君药骨碎补配伍时, 可显著增强核心功效成分和质量指标成分柚皮苷的热稳定性, 究其原因丹参等药味中丹酚酸 B 等抗氧化活性强于柚皮苷的成分在处方中可充当抗氧化剂, 从而显著增强柚皮苷在生产的煎煮、浓缩、干燥等热处理过程和制剂贮藏过程中的化学稳定性, 保证其在丹苓补骨胶囊中含量稳定, 有利于改善丹苓补骨胶囊的质量和临床疗效。进而从中药复方核心功效成分的化学稳定性角度证实了丹苓补骨胶囊中君药骨碎补与其他药味配伍的科学性与合理性。

参考文献

- [1] 李海英, 贺鹏, 贺玉婷, 等. 中药复方配伍研究的关键问题及超分子化学解决对策 [J]. 中草药, 2019, 50 (12): 2757-2762.
- [2] Stabrauskiene J, Kopustinskiene DM, Lazauskas R, et al. Naringin and naringenin: their mechanisms of action and the potential anticancer activities [J]. Biomedicines,

- 2022, 10 (7): 1686.
- [3] Zhao Q, Feng JJ, Liu FB, et al. Rhizoma Drynariae-derived nanovesicles reverse osteoporosis by potentiating osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via targeting ER α signaling [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14 (5): 2210-2227.
- [4] 陈金祥. 酚酸抗氧化活性的构效关系及抗氧化机制的研究 [D]. 太原: 中北大学, 2020.
- [5] 屈媛, 王婷, 付慧婕, 等. 丹参有效成分及药理作用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26 (9): 172-176.
- [6] 张敏敏, 程素盼, 赵志国, 等. UPLC-DPPH-PAD-ESI-TOF/MS 在线联用技术快速筛选丹参中的抗氧化成分 [J]. *中草药*, 2020, 51 (11): 2908-2913.
- [7] 谌顺清, 梁伟, 张雪妹, 等. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (11): 2737-2745.
- [8] 杨新荣, 窦霞, 李国峰, 等. 柚皮苷药理作用及机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53 (10): 3226-3240.
- [9] 周晓洁, 姚辛敏, 周妍妍. 淫羊藿的药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2022, 50 (11): 112-115.
- [10] 史阔豪, 张光财, 武康雄, 等. 4 种淫羊藿黄酮苷类主要成分体外药理活性比较 [J]. *陕西科技大学学报*, 2021, 39 (2): 56-61.
- [11] 金荣耀, 茹娅娟. 黄芪的药理活性及其治疗胃溃疡的作用机制研究进展 [J]. *中药材*, 2024, 47 (9): 2401-2406.
- [12] 何嘉郡, 秦晨, 贺廉清, 等. 黄芪黄酮类成分及其药理作用研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26 (1): 112-119.
- [13] 孙宇, 陈雪, 唐守祥, 等. 黄芪中主要成分含量测定及其抗氧化活性研究 [J]. *化学试剂*, 2023, 45 (12): 90-97.
- [14] 赵婧含, 李雪, 吴文轩, 等. 熟地黄的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2023, 51 (6): 110-114.
- [15] 沈华旦, 方江济, 郭鹏程, 等. 基于 HPLC-UV-DPPH 法的地黄和熟地黄药材抗氧化活性成分比较研究 [J]. *中草药*, 2018, 49 (3): 582-588.
- [16] 鲁亚奇, 张晓, 王金金, 等. 补骨脂化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (3): 180-189.
- [17] 路平, 史汶龙, 杨思雨, 等. 茯苓化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中成药*, 2024, 46 (4): 1246-1254.
- [18] 刘迪, 张冰洋, 姚铁, 等. 乳香化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51 (22): 5900-5914.
- [19] 韩璐, 孙甲友, 周丽, 等. 没药化学成分和药理作用研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2015, 11 (3): 38-42.
- [20] 胡栋宝, 李德良, 李明, 等. 河北香菊中 5 种黄酮类化合物抗氧化活性的 DFT 研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (4): 719-724.
- [21] 张良聪. 特境微生物天然产物体外抗氧化活性及构效关系分析 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [22] 胡栋宝, 赵剑雄. 中药满山红中 4 个黄酮类化合物结构及其抗氧化活性的理论研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41 (14): 2675-2679.
- [23] 陈家敏, 朱洁英, 庞祖才, 等. 骨碎补总黄酮及其成分柚皮苷促进牵张成骨新骨愈合作用比较 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42 (5): 94-97, 281-282.
- [24] Li ZC, Liang SL, Ke LQ, et al. Cell life-or-death events in osteoporosis: all roads lead to mitochondrial dynamics [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 208: 107383.
- [25] 陈鹏, 李杨, 胡伟文, 等. 绝经后骨质疏松症 TNF- α 通过激活 NF- κ B 促进 RANKL 诱导的破骨细胞形成 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38 (2): 960-965.
- [26] Takafuji Y, Tatsumi K, Ishida M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency suppresses osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells in mice [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (6): 9687-9697.
- [27] 金赫秀, 王飘, 王学玖, 等. PAI-1 对人骨髓间充质干细胞骨向分化的影响 [J]. *北京口腔医学*, 2020, 28 (1): 12-15.
- [28] 张晓, 钱志远, 顾柏林, 等. 骨密度与血清白蛋白、钙、镁、磷及血红蛋白的相关性研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21 (3): 292-297.
- [29] Garbieri TF, Martin V, Santos CF, et al. The embryonic chick femur organotypic model as a tool to analyze the angiotensin II axis on bone tissue [J]. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 2021, 14 (5): 469.
- [30] Chou CW, Chiang TI, Chang IC, et al. Expression levels of estrogen receptor alpha mRNA in peripheral blood cells are an independent biomarker for postmenopausal osteoporosis [J]. *BBA Clin*, 2016, 5: 124-129.
- [31] 贾雪丽, 祖姆热提·艾孜则, 毕永贤, 等. 两种体外评价抗氧化活性方法影响因素分析: DPPH 和 ABTS [J]. *日用化学工业 (中英文)*, 2024, 54 (7): 866-872.
- [32] 王会. 表征抗氧化剂活性的 ORAC 法 [J]. *河南化工*, 2019, 36 (9): 12-16.
- [33] Avdovic EH, Milanovic Z, Simijonovic D, et al. An effective, green synthesis procedure for obtaining coumarin-hydroxybenzohydrazide derivatives and assessment of their antioxidant activity and redox status [J]. *Antioxidants*, 2023, 12 (12): 2070.
- [34] 王晓宇, 杜国荣, 李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展 [J]. *食品与生物技术学报*, 2012, 31 (3): 247-252.
- [35] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53 (10): 4290-4302.

(收稿日期: 2024-10-05; 修回日期: 2024-12-05)

基于网络药理学研究紫苏醛对宫颈癌的药效作用

曙丽盼·木拉提, 徐叶杰, 张苗苗, 马嘉宁, 乃吾开尔·奥斯曼, 张伟怡* (新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 基于网络药理学研究紫苏醛 (PAE) 对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用及其对凋亡蛋白的影响。**方法** 利用网络药理学及分子对接探究 PAE 潜在的靶点蛋白; 采用 CCK-8 法和流式细胞仪来评估 PAE 对 HeLa 细胞增殖的抑制效果, 并通过 JC-1 荧光探针、Hoechst 33342 荧光染色法和蛋白免疫印迹 (Western blot) 等测定 HeLa 细胞的凋亡情况。**结果** 网络药理学分析和分子对接结果表明, 潜在的作用靶点有丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、雄激素受体 (AR)、孕激素受体 (PGR) 等; PAE 能够抑制细胞生长, 阻滞细胞周期在 G₀/G₁ 期降低线粒体膜电位并诱导细胞凋亡。**结论** PAE 可能是通过抑制线粒体途径诱导 HeLa 细胞凋亡。**关键词:** 紫苏醛; 宫颈癌; HeLa 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0598-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.003

Pharmacological effect of perillaldehyde against cervical cancer based on network pharmacology

Shulipan · Mulati, XU Ye-jie, ZHANG Miao-miao, MA Jia-ning, Naiwukaier · Aosiman, ZHANG Wei-yi* (School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Abstract: Objective To determine the inhibitory effect of perillaldehyde (PAE) in human cervical cancer HeLa cells, and on apoptotic proteins. **Methods** The potential target proteins were determined by network pharmacology and molecular docking. The inhibitory effect of PAE on the proliferation was determined by CCK-8 assay. The effect of PAE on the cycle distribution was detected by flow cytometry. The apoptosis of HeLa cells was determined by JC-1 fluorescent probe, Hoechst 33342 fluorescent staining method, and Western blot. **Results** Network pharmacology and molecular docking showed that the potential targets included MAPK3 (mitogen-activated protein kinase 3), AR (androgen receptor), PGR (progesterone receptor). PAE inhibited the cell proliferation, blocked the cell cycle at the G₀/G₁ phase, decreased the mitochondrial membrane potential and induced apoptosis in HeLa cells.

Conclusion PAE may induce the apoptosis in HeLa cells by inhibiting the mitochondrial pathway.

Key words: perillaldehyde; cervical cancer; HeLa cell; apoptosis

宫颈癌是全球范围内女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率处在世界第四位^[1]。2022 年我国新发的宫颈癌病例是 11.1 万例, 居女性癌症发病的第五位, 严重危害了广大女性的健康^[2-3]。近年来, 得益于宫颈癌早期检测和人乳头瘤病毒 (HPV) 疫苗接种的推广, 宫颈癌的发病率和死亡率逐年下降, 但在欠发达国家和农村地区, 宫

颈癌的预防和治疗仍然是一项重大挑战^[4]。

紫苏醛 (perillaldehyde, PAE) 是存在于天然紫苏油、莲叶桐和香柠檬油的一种具有香气的光学活性萜类化合物^[5-6]。PAE 具有独特的药用效果, 如抗炎、抗氧化、抗真菌、抗衰老和降血脂等功能^[7]。近年来, PAE 在一些癌症的治疗领域中也表现出较好的治疗效果, 具有广谱、高效、低毒的抗肿瘤作

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (No.2021D01C294); 国家自然科学基金项目 (No.82204438); 新疆维吾尔自治区天然药物有效成分与释放技术重点实验室基金 (No. XJDX1713)。

作者简介: 曙丽盼·木拉提, 女, 硕士, 主要从事天然小分子化合物药物研发, email: 2077471383@qq.com * **通信作者:** 张伟怡, 女, 副教授, 主要从事天然小分子化合物药物研发, email: zwy13132150812@163.com

用^[5]。但是目前有关 PAE 对宫颈癌的抗肿瘤作用及机制并未阐明,因此本文拟对其进行初步探究。

1 材料

1.1 试剂

HeLa 细胞 (Pricella); PAE (纯度: 98%, 上海源叶生物科技有限公司); Actin、Bax、Bak、Mcl-1、Bcl-2 以及 Survivin 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司); SDS-PAGE 凝胶、Hoechst 33342、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)、细胞周期检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 细胞培养级二甲基亚砜 (DMSO)、高糖培养基 DMEM 以及胎牛血清 (FBS) (美国 Hyclone 公司)。

1.2 仪器

细胞培养箱 (QP160, 博科控股集团有限公司), 多功能酶标仪 (瑞士帝肯公司), 荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 化学成像仪 (上海天能生命科学有限公司), 蛋白电泳设备 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 网络药理学分析 将 PAE 的简化分子线性输入系统 (SMILES) 号导入 Swiss Target Prediction (<https://www.swisstargetprediction.ch>) 数据库, 预测 PAE 的靶点信息。利用 DrugBank、GeneCards、TTD、pharm GKB 数据库筛选出宫颈癌的相关靶点, 并利用 Venny 图取其交集, 并将交集靶点信息导入到 Cytoscape 3.9.0 中进行可视化。此外, 将交集靶点信息导入到 DAVID 平台中获得京都基因与基因组百科全书系统 (KEGG) 富集数据和基因本体富集分析 (GO) 数据, 最后用微生信平台可视化展示。

2.1.2 分子对接 利用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库获得 PAE 的 2D 分子结构, 丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、雄激素受体 (AR)、孕激素受体 (PGR)、CYP19A1 三维结构以 PDB 格式从蛋白质结构数据库 (RCSB) 网站 (<http://www.rcsb.org>) 下载, 通过 Auto Dock Tools 软件进行分子对接验证, 并使用 PyMOL 软件作可视化分析。

2.1.3 药物配制 将 20 mg PAE 粉末溶解于 DMSO 溶液中, 配成 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液, 分装保存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.1.4 细胞培养和细胞活力测定 HeLa 细胞在 DMEM 培养基中达到对数生长期后进行传代培养。HeLa 细胞以 4.0×10^3 个/孔铺于 96 孔板内培养过夜, 实验组分别加入 400、200、100、50、 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PAE, 空白组加入磷酸盐缓冲液 (PBS), 对照组加入等倍稀释的溶剂 DMSO (溶

剂对照)。使用 CCK-8 试剂盒测定 PAE 对 HeLa 细胞生长的抑制作用。

2.1.5 细胞克隆形成实验 将 HeLa 细胞铺到含有 PAE (0 、 5 、 10 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 6 孔板中 (每孔 800 个细胞), 培养 12 d。随后, 将细胞在 4% 组织细胞固定液中固定 15 min, 再用吉姆萨染色液染色 20 min, 之后拍摄克隆形成图片。

2.1.6 细胞周期的流式细胞仪检测 收集 HeLa 细胞样品于流式管中, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后, PBS 洗涤 2 次, 弃上清液。75% 冷乙醇固定过夜, 固定细胞离心 5 min 后, 用 PBS 洗涤 2 次。按照周期试剂盒说明书加入核糖核酸酶 A (RNase A) 和碘化丙啶 (PI) 染色液, 上机进行流式检测, 最后采用 Modfit 软件分析实验结果。

2.1.7 Hoechst 33342 荧光染色法鉴定凋亡细胞 HeLa 细胞以 5.0×10^4 个/孔铺于 6 孔板中培养过夜后加入 PAE (25 、 50 、 100 、 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养 24 h, 本研究采用的步骤与本课题组前期研究^[8]相似, 用 4% 组织细胞固定液固定 HeLa 细胞后, PBS 洗去固定液, 加入 Hoechst 33342 染色液, 使用荧光显微镜观测。

2.1.8 细胞中线粒体膜电位的检测 HeLa 细胞以 3.0×10^4 个/孔铺于共聚焦小皿中培养过夜后, 加入 PAE (200 、 100 、 50 、 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 培养 24 h, 阳性对照组加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 解偶联剂 (CCCP)。具体步骤与本课题组前期研究^[8]相似, 于共聚焦显微镜下观察。

2.1.9 Western blot 检测 为检测宫颈癌 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 (Bcl-2、Bak、Mcl-1、Bax、Survivin) 的表达情况, 具体步骤包括样品准备、蛋白质定量、电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、再次洗膜、化学曝光^[8]。最后, 使用 Image J 软件进行灰度统计分析。

2.1.10 数据统计分析 所有数据均进行统计学处理, 通过 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用单因素方差分析对多次比较数据进行统计, 使用 t 检验对单次比较数据进行统计。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.2 结果

2.2.1 PAE 治疗宫颈癌潜在作用靶点 将从 Swiss Target Prediction 数据库中筛选出的 PAE 作用靶点与从 DrugBank、GeneCards、TTD、pharm GKB 数据库中筛选出的宫颈癌相关靶点, 用 Venny 图交集得到 PAE 抗宫颈癌的 35 个靶点, 其中有 MAPK3、AR、PGR 等靶点处于网络图的中心位置 (见图 1)。

2.2.2 GO 及 KEGG 通路富集分析 通过注释、可视化和综合发现数据库 (DAVID) 进行 GO 富集分析, 在生物过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞

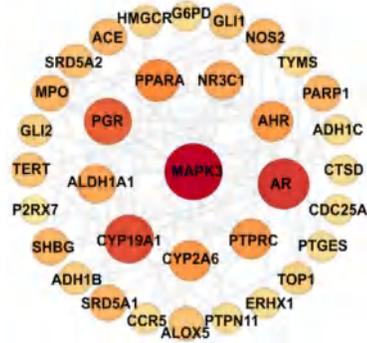


图 1 PAE 与宫颈癌交集靶点蛋白质互作网络图
Fig 1 Protein-protein interaction network of the intersection targets of PAE and cervical cancer

组分 (CC) 中, 主要包括对外来刺激的反应、对类固醇激素刺激的反应、MAPK 信号通路的调节。结果表明, 交集靶点基因编码的蛋白在细胞凋亡和蛋白结合等分子生物过程中具有丰富的功能 (见图 2)。通过 DAVID 平台进行 KEGG 分析中, 得到化学致癌 - 受体活化通路、视黄醇的新陈代谢通路等, 这表明 PAE 可能通过作用于多种信号通路发挥抗宫颈癌的作用 (见图 3)。

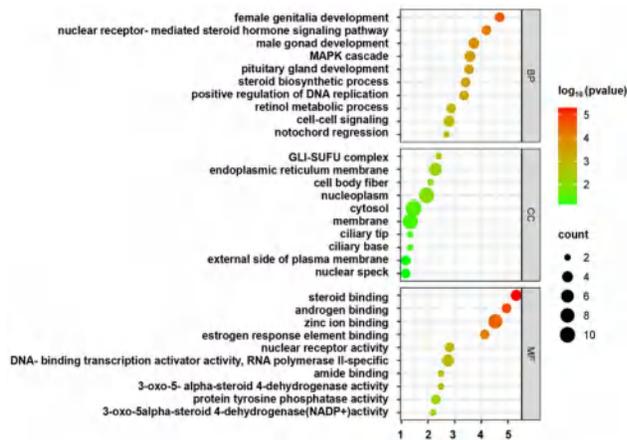


图 2 PAE 与宫颈癌的 GO 富集分析图
Fig 2 GO analysis of PAE and cervical cancer

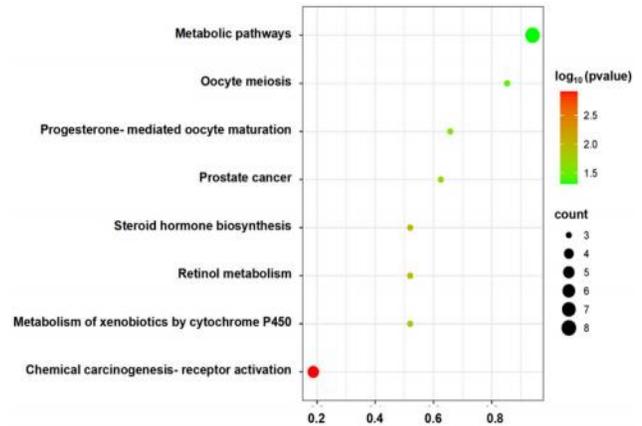


图 3 PAE 与宫颈癌的 KEGG 富集分析图
Fig 3 KEGG analysis of PAE and cervical cancer

2.2.3 分子对接验证 PAE 抗宫颈癌的潜在靶点 进一步对排名靠前的靶点进行分子对接, 以考察 PAE 与潜在靶蛋白的结合情况。结果如图 4 所示, PAE 与 MAPK3、AR、PGR、CYP19A1 的结合能分别是 -22.84 、 -20.92 、 -23.85 、 -23.01 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。对接结果显示 PAE 和作用靶点蛋白之间均具有良好的结合效果。

2.2.4 PAE 抑制 HeLa 细胞的增殖和侵袭 PAE 呈时间、浓度依赖性地抑制 HeLa 细胞的生长, 且给药后 24、48 和 72 h 的 IC_{50} 分别为 282.9、97.5 和 $62.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明 PAE 能够抑制 HeLa 细胞的增殖, 结果如图 5 所示。

2.2.5 PAE 抑制 HeLa 细胞克隆形成 为了探究 PAE 对 HeLa 细胞克隆形成能力的影响, 给予不同浓度的 PAE 作用于 HeLa 细胞, 与 Ctrl 组相比, 随着 PAE 给药浓度的升高, PAE 能够显著减少 HeLa 细胞克隆形成数 (见图 6)。

2.2.6 PAE 阻滞 HeLa 细胞周期并诱导凋亡 将 PAE (0 、 25 、 50 、 100 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 依次加入到 HeLa 细胞培养基中, 培养 24 h 后, 利用流

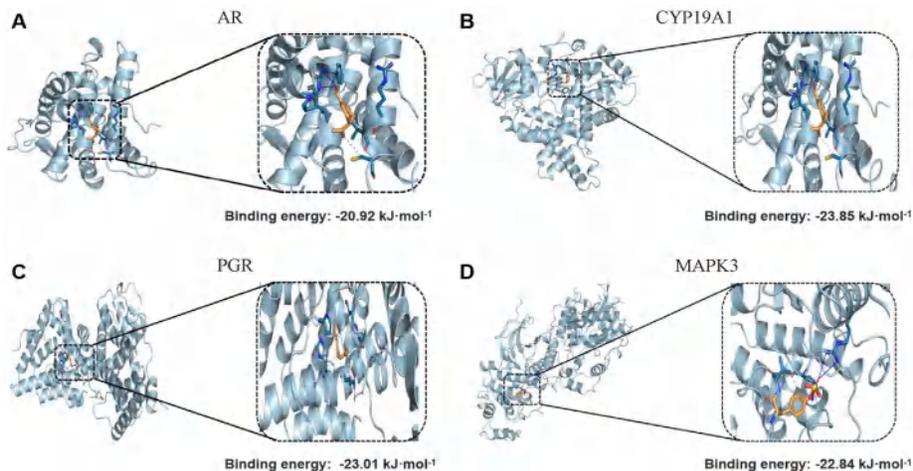


图 4 PAE 和核心蛋白的 3D 对接姿态和 2D 相互作用关系图
Fig 4 3D docking pose and 2D interaction diagram of PAE and core protein

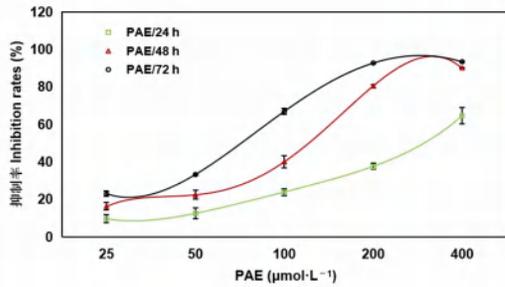


图 5 PAE 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用 ($n = 3$)
Fig 5 Inhibitory effect of PAE on the proliferation of HeLa cells ($n = 3$)

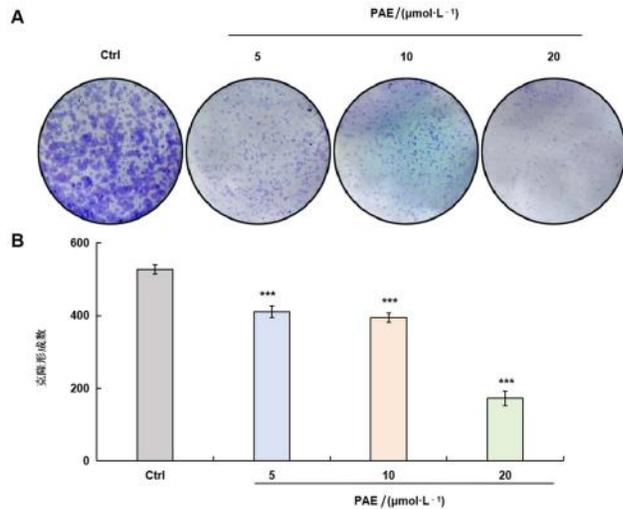


图 6 PAE 对 HeLa 细胞克隆形成能力的影响
Fig 6 Effect of PAE on the forming ability of HeLa cells
注: 与“Ctrl”组相比, $***P < 0.001$ 。
Note: Compared with the “Ctrl” group, $***P < 0.001$ 。

式细胞仪检测 HeLa 细胞相关的周期分布。结果见图 7, 与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, 随着 PAE 浓度的不断增加, 处于 G_0/G_1 期的细胞比例从 63.48% 增加到 93.40%, 且呈现浓度依赖性, 表明 PAE 可将 HeLa 细胞阻滞在 G_0/G_1 期。

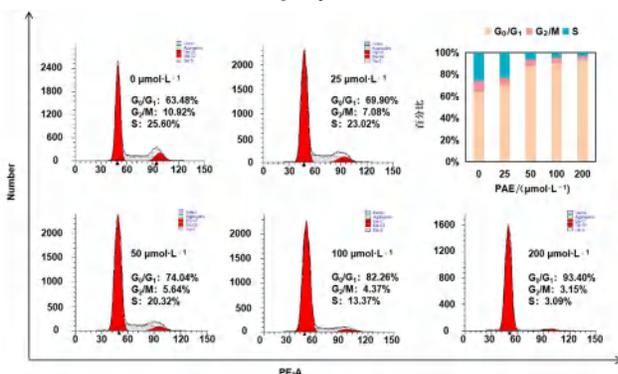


图 7 PAE 对 HeLa 细胞增殖的影响
Fig 7 Effect of PAE on apoptosis of HeLa cells

Hoechst 33342 染色结果显示, PAE 处理后, 细胞核荧光更为明亮, 呈圆状且具有浓度依赖性, 提示 PAE 诱导 HeLa 细胞凋亡 (见图 8)。JC-1 染色结果也证实, 与阳性对照组相比, 随着 PAE 浓

度的升高, 给药组绿色荧光显著增强, 说明 PAE 破坏了线粒体跨膜电位, 诱导 HeLa 细胞凋亡 (见图 9)。

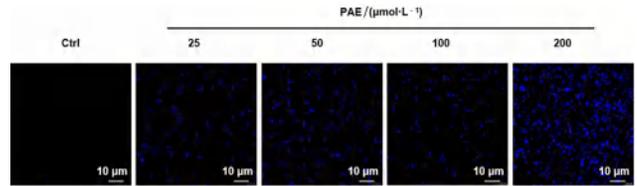


图 8 各组 HeLa 细胞核染色质的变化 (标尺: $10 \mu\text{m}$)
Fig 8 Changes in nuclear chromatin of HeLa cells in various groups (scale: $10 \mu\text{m}$)

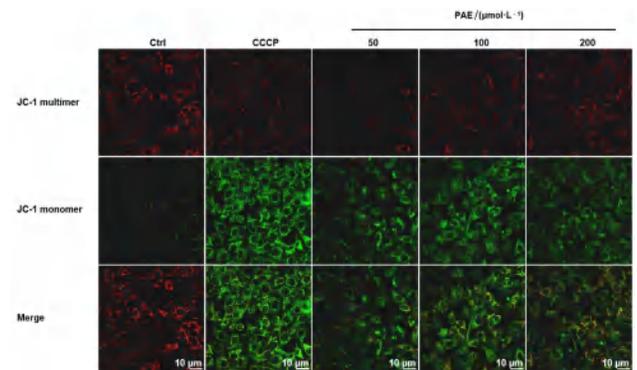


图 9 各组 HeLa 细胞线粒体跨膜电位变化 (标尺: $10 \mu\text{m}$)
Fig 9 Changes in mitochondrial transmembrane potential of HeLa cells in each group (scale: $10 \mu\text{m}$)

Western blot 检测结果显示, 随着 PAE 浓度升高, HeLa 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2、Survivin 的表达减少, 促凋亡蛋白 Bax 的表达增多 (见图 10)。以上结果均进一步证明了 PAE 可以诱导 HeLa 细胞发生凋亡。

3 讨论与结论

近年来癌症治疗虽取得了进步, 但宫颈癌的发病率仍然居于高位^[9]。传统的治疗手段包括放 / 化疗、手术等, 但这些传统方法存在许多缺点, 这凸显了识别 / 开发新的治疗策略的重要性。PAE 作为天然的小分子化合物, 应用于保健、化妆品、香水和制药等行业。近年来, 针对 PAE 抗肿瘤作用的报道也逐渐增多, 其潜在抗肿瘤活性具有很大的研究和开发价值^[10]。

笔者前期利用网络药理学探索 PAE 对宫颈癌的作用机制, 共获得 35 个潜在靶基因, 其中 MAPK3、AR、PGR、CYP19A1 可能是 PAE 治疗宫颈癌过程中的重要靶点。结合 GO 和 KEGG 富集分析发现 PAE 可能通过调节 MAPK 信号通路在抗宫颈癌中发挥重要作用。分子对接结果也证实了 PAE 与 MAPK3、AR、PGR、CYP19A1 具有较强的结合效果。随后通过 CCK-8 与克隆形成实验, 验证了 PAE 能够显著抑制 HeLa 细胞增殖。此外, PAE 还可以阻滞 HeLa 细胞周期在 G_0/G_1 期, 抑制 HeLa 细胞 DNA 合成。

线粒体调控细胞凋亡是抗肿瘤治疗的有效方

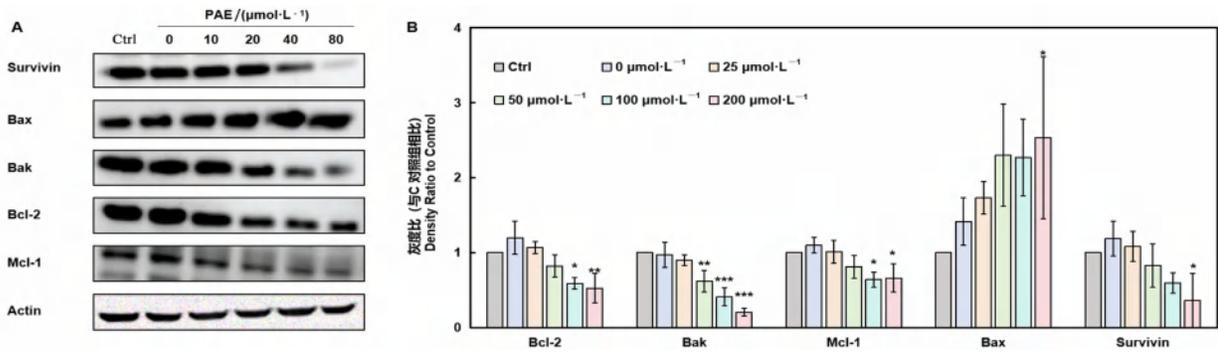


图 10 各组 HeLa 细胞凋亡蛋白的表达 (n = 3)

Fig 10 Expression of apoptotic proteins in HeLa cells of each group (n = 3)

注: 与“Ctrl”组相比, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

Note: Compared with the “Ctrl” group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

式之一, 而维持线粒体膜电位是细胞耐力的基础。线粒体膜电位的降低导致线粒体外膜通透性增加, 两侧电荷分布不均, 细胞色素 C 释放到胞质溶胶中, 并激活细胞凋亡^[11-12]。Bcl-2 位于线粒体外膜上, 通过保持线粒体膜完整性来控制细胞凋亡, 调节线粒体通透性并抑制细胞色素 C 释放^[13]。此外, 促凋亡的 Bax 在氧化应激的情况下增加, 并促进细胞色素 C 从胞质溶胶中释放到线粒体^[14]。本研究中的 JC-1 染色结果显示 PAE 降低了线粒体膜电位, 并抑制了抗凋亡蛋白 Bcl-2、增加了促凋亡蛋白 Bax 的表达, 从而提高了 Bax/Bcl-2 的比值以及细胞质中细胞色素 C 的浓度。Hoechst 33342 染色以及 Western blot 分析也进一步证明了 PAE 可以诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡。

综上所述, PAE 对 HeLa 细胞具有较强的抑制作用, 并通过降低线粒体完整性诱导细胞凋亡以及增加 Bax/Bcl-2 比值, MAPK3、AR、PGR、CYP19A1 可能是潜在靶点。以上结果表明, PAE 可能是一种很有前途的宫颈癌辅助治疗剂, 具有靶向肿瘤细胞的潜力。然而, PAE 抗肿瘤靶点仍需进一步鉴定并测试其在人类其他宫颈癌细胞和体内实验中的生物活性。

参考文献

[1] Wentzensen N, Clarke MA. Cervical cancer screening—past, present, and future [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2021, 30 (3): 432-434.
 [2] 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.
 [3] 任璐, 曹芹雪, 杨少琴. 灵芝乙醇提取物对宫颈癌细胞生

物学行为和 JAK1/STAT3 信号通路的影响 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2022, 48 (6): 1474-1480.

[4] Williams AL, Walton CB, Pinell B, et al. Ischemic heart injury leads to HIF1-dependent differential splicing of CaMK2γ [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 13116.
 [5] 邹宾宾, 陈茜文, 王贵武. 固体超强酸催化异构桃金娘烯醛合成紫苏醛 [J]. *化工进展*, 2013, 32 (4): 905-908.
 [6] 朱双全. 紫苏化学成分及药理学研究进展概要 [J]. *生物化工*, 2018, 4 (2): 148-149, 152.
 [7] Chen L, Qu S, Yang KL, et al. Perillaldehyde: a promising antifungal agent to treat oropharyngeal candidiasis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114201.
 [8] 紫若·塔里哈提, 曙丽盼·木拉提, 张伟怡, 等. 桂皮醛诱导人宫颈癌 Siha 细胞凋亡并下调 HPV E6/E7 蛋白表达 [J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34 (9): 1565-1572, 1617.
 [9] Voelker RA. Cervical cancer screening [J]. *JAMA*, 2023, 330 (20): 2030.
 [10] Catanzaro E, Turrini E, Kerre T, et al. Perillaldehyde is a new ferroptosis inducer with a relevant clinical potential for acute myeloid leukemia therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113662.
 [11] Brazhe NA, Nikelshparg EI, Baizhumanov AA, et al. SERS uncovers the link between conformation of cytochrome C heme and mitochondrial membrane potential [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 196: 133-144.
 [12] Aly HAA, Eid BG. Cisplatin induced testicular damage through mitochondria mediated apoptosis, inflammation and oxidative stress in rats: impact of resveratrol [J]. *Endocr J*, 2020, 67 (9): 969-980.
 [13] 丁晓青. 诃子成分五没食子酰葡萄糖及其联合 5-FU 对 HepG2 细胞的抑制和机理研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018.
 [14] Quarato G, Mari L, Barrows NJ, et al. Mitophagy restricts BAX/BAK-independent, Parkin-mediated apoptosis [J]. *Sci Adv*, 2023, 9 (21): eadg8156.

(收稿日期: 2024-09-07; 修回日期: 2024-12-12)

巨噬细胞极化在去氢骆驼蓬碱诱导的细粒棘球蚴损伤中的作用研究

潘美驰¹, 巩月红^{2, 3}, 林玉霞¹, 赵一聪¹, 罗春林¹, 王建华^{2, 3*} (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011; 3. 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 探究 M1 和 M2 型巨噬细胞在去氢骆驼蓬碱诱导的细粒棘球蚴损伤中的作用。**方法** 以不同浓度脂多糖 (LPS)、白细胞介素 -25 (IL-25) 刺激 RAW264.7 巨噬细胞, 流式细胞术检测细胞表型并选择适宜的干预浓度。伊红拒染法检测不同浓度去氢骆驼蓬碱干预不同时间后细粒棘球蚴存活率, 筛选细粒棘球蚴与不同表型巨噬细胞最适宜共培养比例。去氢骆驼蓬碱干预 72 h 后的细粒棘球蚴与不同表型的巨噬细胞以最佳比例共培养, 伊红拒染法检测细粒棘球蚴存活率。活性氧试剂盒检测不同表型巨噬细胞对去氢骆驼蓬碱干预的细粒棘球蚴的活性氧含量。彗星实验检测不同表型巨噬细胞对去氢骆驼蓬碱干预的细粒棘球蚴的 DNA 损伤程度。**结果** 选用 $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS、 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-25 作为极化 M1、M2 型巨噬细胞的刺激浓度; 去氢骆驼蓬碱干预细粒棘球蚴后可明显抑制细粒棘球蚴活性, 干预 120 h 后细粒棘球蚴 IC_{50} 为 $40.88 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 巨噬细胞与细粒棘球蚴最佳共培养比例为 500 : 1; 去氢骆驼蓬碱干预细粒棘球蚴原头节 72 h 后和巨噬细胞共培养显示: 与未共培养组相比, M1 型巨噬细胞共培养的原头节存活率降低 ($P < 0.01$)、活性氧含量显著升高 ($P < 0.0001$)、DNA 损伤程度显著加重 ($P < 0.0001$); M2 型巨噬细胞共培养的原头节存活率升高 ($P < 0.01$, $P < 0.0001$)、活性氧含量显著降低 ($P < 0.05$)、DNA 损伤程度显著减轻 ($P < 0.01$)。**结论** M1 型巨噬细胞在体外对去氢骆驼蓬碱干预的细粒棘球蚴原头节具有损伤作用, M2 型巨噬细胞对去氢骆驼蓬碱干预的细粒棘球蚴原头节有一定的损伤修复作用。

关键词: 去氢骆驼蓬碱; 细粒棘球蚴; 巨噬细胞极化; DNA 损伤修复; 死亡率

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0603-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.004

Role of macrophage polarization in harmine-induced injury of *Echinococcus granulosus*

PAN Mei-chi¹, GONG Yue-hong^{2, 3}, LIN Yu-xia¹, ZHAO Yi-cong¹, LUO Chun-lin¹, WANG Jian-hua^{2, 3*} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 3. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Urumqi 830011)

Abstract: Objective To determine the role of M1 and M2 macrophages in harmine-induced injury of *Echinococcus granulosus*. **Methods** The phenotype of RAW264.7 macrophages stimulated by different concentrations of lipopolysaccharide (LPS) and interleukin-25 (IL-25) was detected by flow cytometry, and appropriate intervention concentration was selected. The survival rate of *Echinococcus granulosus* was detected by eosin exclusion method after different concentrations of harmine were intervened for

基金项目: 新疆维吾尔自治区科学技术厅自然科学基金重点项目 (No.2021D01D15); 新疆维吾尔自治区天山英才青年骨干项目 (No. TSYC202301B095); 省部共建国家重点实验室开放课 (No.SKL-HIDCA-2023-1)。

作者简介: 潘美驰, 女, 在读硕士研究生, 主要从事新疆地产抗包虫病新药研究, email: panmeichi006@163.com *通信作者: 王建华, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事新疆地产抗寄生虫新药研发, email: jhw716@163.com

different time, and the most suitable co-culture ratio of *Echinococcus granulosus* and macrophages with different phenotypes was screened. *Echinococcus granulosus* was co-cultured with macrophages with different phenotypes at the best ratio after 72 h intervention with harmine, and the survival rate of *Echinococcus granulosus* was detected by eosin exclusion. The reactive oxygen species content of *Echinococcus granulosus* intervened by different phenotypes of macrophages was detected by reactive oxygen species kit. Comet assay was used to detect the DNA damage of macrophages with different phenotypes to *Echinococcus granulosus* intervened by harmine. **Results** LPS at $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and IL-25 at $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ were selected as the stimulating concentrations to polarize M1 and M2 macrophages. The activity of *Echinococcus granulosus* was obviously inhibited by harmine intervention, with its IC_{50} at $40.88 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ after 5 d of intervention. The optimal co-culture ratio of macrophages and *Echinococcus granulosus* was 500 : 1. Co-culture of *Echinococcus granulosus* protoscolex with harmine for 72 h showed that compared with the non-co-culture group, the survival rate of M1-type macrophages co-cultured protoscolex decreased ($P < 0.01$), the content of reactive oxygen species increased significantly ($P < 0.0001$) and the degree of DNA damage increased significantly ($P < 0.0001$). The survival rate of primordial segment co-cultured with M2 macrophages increased ($P < 0.01$, $P < 0.0001$), the content of active oxygen decreased significantly ($P < 0.05$), and the degree of DNA damage decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** M1-type macrophages can damage the protoscolex of *Echinococcus granulosus* intervened by harmine in vitro, and M2-type macrophages can repair the protoscolex of *Echinococcus granulosus* intervened by harmine to some extent.

Key words: harmine; *Echinococcus granulosus*; macrophage polarization; repair of DNA damage; mortality rate

包虫病 (hydatid disease) 又称棘球蚴病 (echinococcosis), 是由棘球蚴幼虫寄生于肝脏和肺脏等组织器官导致危及生命的人畜共患寄生虫病, 于世界各地广泛流行。据估计, 全球棘球蚴病每年可导致 19 300 人死亡, 造成的疾病负担约 871 000 伤残调整生命年, 经济损失高达 30 亿美元^[1]。我国是世界上包虫病流行最严重的国家之一, 主要在西部农牧区居民群体中发生, 截至 2022 年我国流行地区平均患病率可达 5.835 例/万^[2]。目前, 临床上以手术治疗为主导, 药物治疗作为辅助。药物治疗对肝内多发包虫、合并多脏器包虫、术后预防复发、小体积的包虫病灶、各种原因无法手术等的包虫病患者提供了有效的治疗方法^[3]。而目前治疗包虫病的药物选择较少、效果不佳、生物利用度低且不良反应明显^[4]。因此, 亟待开发精准高效、低毒的治疗药物及探索药物联合应用的新方式。

去氢骆驼蓬碱 (harmine, HM) 属于 β - 咪唑类生物碱, 具有抗肿瘤、抗包虫等活性^[5]。本课题组多年研究证实, HM 是一种极具开发潜力的杀灭包虫的药物^[6-7]。本课题组研究还发现细粒棘球蚴 (*Echinococcus granulosus*, Eg) DNA 可能是 HM 主要攻击部位, HM 可导致同源重组修复通路相关基因表达上调, 进一步研究发现 HM 可激活

ATM-P53-Topo2a 通路致细粒棘球蚴 DNA 双链断裂损伤, 明确了 HM 可导致基因组不稳定、诱发 DNA 损伤。然而, 随着疾病的发生发展, 部分 Eg 会启动 DNA 修复功能而成功存活并使包虫病复发。HM 致 Eg DNA 损伤后, 机体是如何启动修复过程的尚未可知。因此, 亟须明确 HM 治疗机制, 阐明 HM 与宿主之间的作用关系。

宿主通过摄入棘球蚴虫卵而感染疾病^[8], 棘球蚴进入宿主体内后, 会在感染的不同阶段引起不同的免疫应答^[9]。巨噬细胞作为先天免疫的重要组成部分, 在 Eg 感染中的作用越发受到关注。已有研究表明, 不同表型的巨噬细胞在棘球蚴病的发病机制中有重要作用^[10], 在棘球蚴感染早期巨噬细胞被诱导为 M1 型巨噬细胞, 抑制寄生虫增殖; 随着寄生虫进入慢性感染期, M2 型巨噬细胞被激活, 有利于寄生虫增殖^[11]。本课题组在前期研究中发现, 在 HM 干预治疗中巨噬细胞会产生表型变化, 但不知是否与 HM 作用 Eg 后的损伤修复有关。因此, 本研究选取不同表型巨噬细胞以及经 HM 干预的 Eg 作为研究对象, 通过评估 Eg 的死亡率、DNA 损伤等关键指标, 探讨 M1 型和 M2 型巨噬细胞在 HM 诱导的 Eg 损伤中的作用, 以期为深入理解及治疗棘球蚴病提供新的视角和策略。

1 材料

1.1 细胞及细粒棘球蚴

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 未处理的细胞为 M0 型巨噬细胞、脂多糖 (LPS) (北京索莱宝生物科技有限公司) 刺激的细胞为 M1 型巨噬细胞、白细胞介素 -25 (IL-25, 武汉云克隆科技股份有限公司) 刺激的细胞为 M2 型巨噬细胞; 绵羊感染细粒棘球蚴的肝脏 (乌鲁木齐市华凌畜牧屠宰基地)。

1.2 试剂与仪器

HM (新疆华世丹药业股份有限公司); RAW 264.7 专用培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、CD206 流式抗体 (美国 Biolegend); 活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (北京兰杰柯科技有限公司); 低熔点琼脂糖、Tris (北京索莱宝生物科技有限公司); PI 染料 (上海联迈生物科技有限公司); 伊红染色液 (无锡傲锐东源生物科技有限公司)。3111 型 37℃ 细胞培养箱、AMF500 型荧光倒置显微镜 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 Eg 原头节的提取与体外培养

从患有包虫病的羊肝包囊中收集 Eg 原头节, 将收集到的原头节用生理盐水清洗 5 次, 用含 2% 双抗的 1% 胃蛋白酶消化 30 min, 再用含 2% 双抗的生理盐水清洗 5 次, 用 0.1% 的伊红染色检测, 保证 Eg 原头节活力 $\geq 97\%$, Eg 原头节转移至 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清, 1% 双抗) 中, 在 37℃、5%CO₂ 条件下培养。

2.2 RAW264.7 细胞的培养与传代

采用 RAW264.7 专用培养基培养 RAW264.7 细胞, 培养条件为 37℃、5%CO₂, 培养至细胞密度为 80% ~ 90% 时传代。传代至第三代且具有良好生长状态的细胞用于后续实验。

2.3 流式细胞术鉴定巨噬细胞表型

将对数生长期的 RAW264.7 细胞分为空白对照组 (M0)、阳性对照组 (单染管, 用于调节电压)、LPS (100、200、400 ng · mL⁻¹) 处理组、IL-25 (25、50、75 ng · mL⁻¹) 处理组。各组以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中。在培养箱培养 4 h, 待细胞完全贴壁后。LPS 处理组、IL-25 处理组分别加入相应 LPS、IL-25 刺激, 其余组加入等量 PBS。

培养 24 h 后, 将细胞进行收集、洗涤, 加入 100 μ L 破膜液, 4℃ 孵育 25 min, 用 1× 破膜洗涤液洗涤 2 次, 离心 (1000 g、5 min) 弃上清液。用 200 μ L 破膜洗涤液重悬, 加入 1 μ L 抗体室温孵育 15 min, 用破膜洗涤液洗涤 2 次, 离心 (1000 g、5 min) 弃上清液, 用 400 μ L 破膜洗涤液重

悬、200 目筛网过滤, 采用流式细胞仪检测各组 iNOS、CD206 表达情况, 并计算表达量。

2.4 伊红拒染法检测不同浓度 HM 干预不同时间后 Eg 存活率

取活力 $\geq 97\%$ 的 Eg, 以每孔 300 头 Eg 培养在 48 孔培养板中, 将其分为空白对照组、HM (10、25、50、75、100 μ g · mL⁻¹) 干预组。每组加入相应量的 HM, 放入培养箱中培养 24、72、120 h 后取出 Eg, 用 0.1% 伊红染色 10 min、制片, 于倒置显微镜下观察其形态及活力、记录 Eg 存活数、死亡数并计算其存活率。Eg 存活率 (%) = [(Eg 总数 - Eg 死亡数) / Eg 总数] × 100%。

2.5 伊红拒染法筛选 Eg 与不同表型巨噬细胞最佳共培养比例的存活率

取活力 $\geq 97\%$ 的 Eg, 将 300 头 Eg 与 M0 型、M1 型、M2 型巨噬细胞以 1 : 5、1 : 25、1 : 50、1 : 250、1 : 500 比例共培养。于 24、72、120 h 后取 Eg, 用 0.1% 伊红染色 10 min、制片, 于倒置显微镜下观察其形态及活力, 记录 Eg 存活数、死亡数并计算其存活率。

2.6 伊红拒染法检测 HM 干预 Eg 后与不同表型巨噬细胞共培养的存活率

取活力 $\geq 97\%$ 的 Eg, 将每孔 300 头 Eg 培养在 48 孔培养板中, 分为: 空白对照组、Eg + M0 对照组、Eg + M1 对照组、Eg + M2 对照组; HM-Eg 组 (50 μ g · mL⁻¹ HM 干预 72 h, 弃去含药培养基, PBS 洗涤 3 次)、HM-Eg + M0 组、HM-Eg + M1 组、HM-Eg + M2 组。将 Eg 用 50 μ g · mL⁻¹ HM 干预后与巨噬细胞以最佳比例共培养。共培养 24、72、120 h 后, 取 Eg 用 0.1% 伊红染色、制片, 于倒置显微镜下观察其形态及活力, 计数并计算 Eg 存活率。

2.7 试剂盒检测 Eg 的 ROS 表达水平

分组及给药方式同“2.6”项下, 共培养 72 h 后, 将 Eg 用 PBS 清洗 3 次。按照活性氧检测试剂盒操作说明用 1 : 1000 无血清培养基稀释 H₂DCFDA, 加入稀释好的 H₂DCFDA 染料。室温避光孵育 1 h 后, 用 PBS 清洗 3 次。将 Eg 用载玻片制片, 于荧光显微镜下观察并采集图片。

2.8 彗星实验检测 Eg 的 DNA 损伤程度

分组及给药方式同“2.6”项下, 共培养 72 h 后, Eg 用 PBS 清洗 3 次。将 0.6% 正常熔点琼脂糖加热融化后取 80 μ L 铺于载玻片, 4℃ 固化 10 min。用 0.75% 的低熔点琼脂糖凝胶将 Eg 重悬后铺于底层胶上, 4℃ 固化 10 min。采用同样的方法加入 70 μ L 的 0.75% 的低熔点琼脂糖凝胶, 4℃ 固化 10 min。将载玻片放入新鲜配制的细胞裂解

液 [100 mmol · L⁻¹ Na₂EDTA, 2.5 mol · L⁻¹ NaCl, 10 mmol · L⁻¹ Tris, 4 mol · L⁻¹ NaOH 调 pH 至 10, 使用前加入 1% TritonX-100 和 10% 二甲基亚砜 (DMSO) 混匀] 中裂解, 4 h 后取出载玻片用 PBS 清洗两次, 浸入碱性缓冲液中解旋 25 min 后进行电泳, 电泳条件为 25 V, 30 min。电泳完成后用 Tris-HCl (pH 7.5) 洗涤 3 次, PI 染色液避光染色 10 min, 用纯水洗涤 3 次, 于荧光显微镜下观察并采集图片。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 软件进行统计学分析, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。使用 Graphpad Prism 9.0 对数据进行可视化。

3 结果

3.1 不同浓度 LPS、IL-25 刺激巨噬细胞后 iNOS、CD206 表达量

流式细胞术结果显示 (见图 1), 100、200、400 ng · mL⁻¹ 的 LPS 刺激后, 其 iNOS⁺ 的细胞比例分别为 (50.96 ± 0.81) %、(68.37 ± 0.85) %、(78.02 ± 1.21) %, 与对照组 (36.82 ± 1.53) % 相比差异均有统计学意义 ($P < 0.0001$)。鉴于 LPS 刺激后巨噬细胞极化效应的显著性, 后续实验确定了 400 ng · mL⁻¹ 为诱导巨噬细胞向 M1 型极化的最适宜浓度。

25、50、75 ng · mL⁻¹ 的 IL-25 刺激后, 其 CD206⁺ 的细胞比例分别为 (45.74 ± 0.53) %、(52.7 ± 0.6) %、(56.59 ± 1.96) %, 与对照组 (15.71 ± 0.42) % 相比差异均有统计学意义 ($P < 0.0001$); 在质量浓度为 50 ng · mL⁻¹ 与 75 ng · mL⁻¹ 的 IL-25 实验组之间, 差异并无统计学意义 ($P > 0.05$)。鉴于成本效益的考量, 选择 50 ng · mL⁻¹ 作为 IL-25 诱导巨噬细胞向 M2 表型极化的适宜浓度。

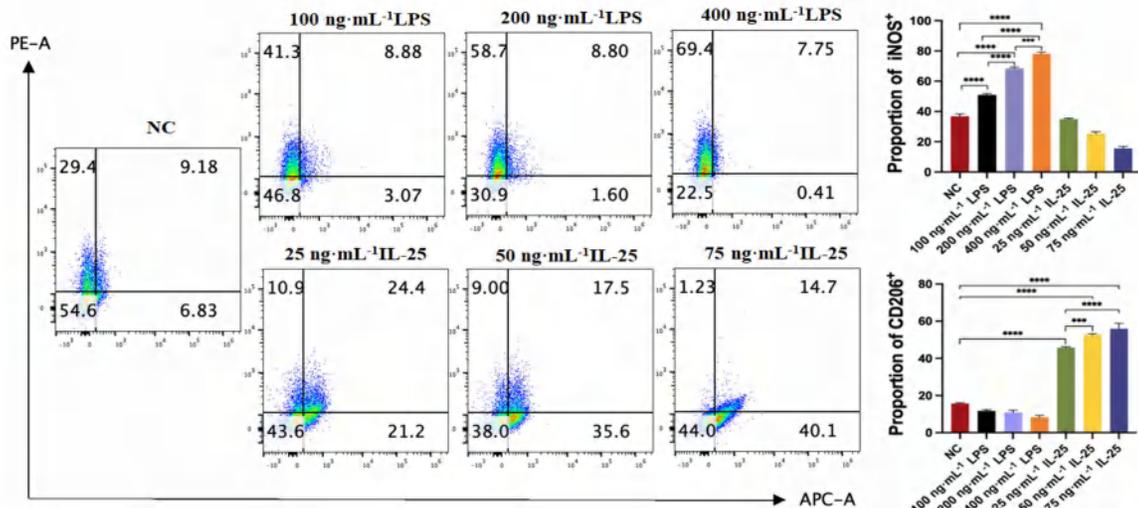


图 1 不同浓度 LPS、IL-25 刺激巨噬细胞后的 iNOS、CD206 表达量变化 (** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)

Fig 1 Expression of iNOS and CD206 in macrophages stimulated by LPS and IL-25 at different concentrations (** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)

3.2 不同浓度 HM 干预不同时间后 Eg 存活率

用不同浓度 HM 干预 Eg, 在不同时间下 Eg 存活率见图 2。空白组在 24、72、120 h 时差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与同期空白组相比, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ HM 干预 24 h 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余组差异均有统计学意义 ($P < 0.0001$)。HM 干预 Eg 120 h 后, Eg 的 IC_{50} 为 40.88 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 因此后续实验选用 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ HM 干预 Eg。

3.3 Eg 与不同表型巨噬细胞共培养比例筛选

将巨噬细胞与 Eg 以不同比例共培养 24、72、120 h 后, Eg 存活率见图 3A ~ 3C, 巨噬细胞与 Eg 500 : 1 存活率见图 3D。根据 Eg 存活率情况和镜下观察, 巨噬细胞与 Eg 以 500 : 1 比例共培养时 Eg 生长状态均较佳。在 500 : 1 比例下共培

养 24、72、120 h: M1 型巨噬细胞共培养组 Eg 存活率低于 M0 型巨噬细胞共培养组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 和 M2 型巨噬细胞共培养组 ($P < 0.0001$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。共培养 24 h, M0 型巨噬细胞共培养的 Eg 存活率低于 M2 型巨噬细胞共培养组 ($P < 0.05$), 共培养 72、120 h, 两者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.4 不同表型巨噬细胞对 HM 干预的 Eg 存活率影响

将不同表型巨噬细胞与 HM 干预的 Eg 以最适宜比例共培养 24、72、120 h 后, Eg 存活率见图 4。HM-Eg + M0 组的 Eg 存活率与 HM-Eg 组相比整体无统计学意义; HM-Eg 组存活率显著高于 HM-Eg+M1 组 ($P < 0.01$)、显著低于 HM-

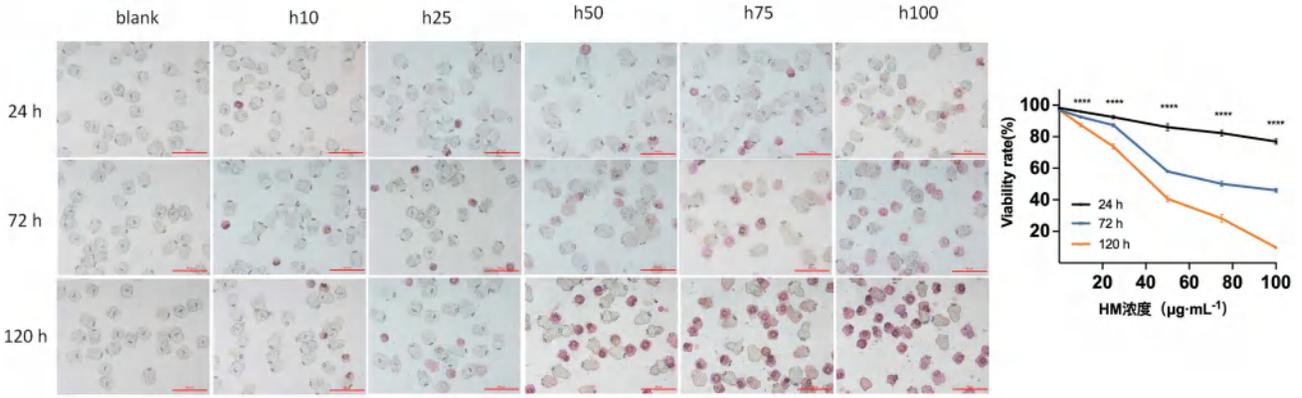


图 2 不同浓度 HM 干预不同时间后 Eg 存活率

Fig 2 Survival rate of Eg after different concentrations of HM intervention for different time

注：与同期空白组比较，**** $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the control group in the same period, **** $P < 0.0001$.

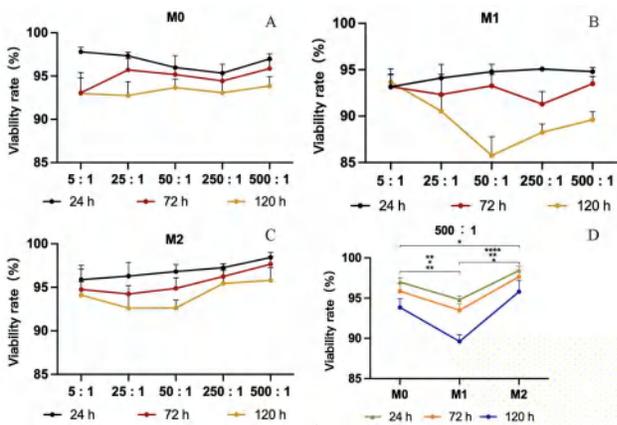


图 3 Eg 与不同比例巨噬细胞共培养 24、72、120 h 时 Eg 存活率

Fig 3 Survival rate of Eg co-cultured with macrophages of different proportions for 24, 72 and 120 h

注：在 24 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ ；在 72 h, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ ；在 120 h, ●● $P < 0.01$ 。

Note: at 24 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ ；at 72 h, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ ；at 120 h, ●● $P < 0.01$ 。

Eg+M2 组 ($P < 0.01$, $P < 0.0001$)。

HM-Eg + M0 组的 Eg 存活率显著高于 HM-Eg + M1 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)、显著低于 HM-Eg + M2 组 ($P < 0.01$, $P < 0.0001$)。

3.5 不同表型巨噬细胞对 HM 干预的 Eg 引起的 ROS 影响

Eg 的 ROS 水平检测结果 (见图 5) 显示：Eg + M0 对照组、Eg + M1 对照组、Eg + M2 对照组、HM-Eg + M2 组相较空白对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。HM-Eg 组、HM-Eg + M0 组、HM-Eg + M1 组相较空白组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.0001$)。

HM-Eg 组的 ROS 含量低于 HM-Eg + M1 组 ($P < 0.0001$)、高于 HM-Eg + M0 组和 HM-

Eg + M2 组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。HM-Eg + M0 共培养组与 HM-Eg + M2 共培养组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明 M1 型巨噬细胞可增加 HM 干预 Eg 产生的 ROS 含量，M2 型巨噬细胞可降低 HM 干预 Eg 产生的 ROS 含量。

3.6 不同表型巨噬细胞对 HM 干预的 Eg 引起的 DNA 损伤影响

Eg 各组 DNA 损伤彗星图如图 6 所示：Eg + M0 对照组、Eg + M1 对照组、Eg + M2 对照组和空白对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。HM-Eg、HM-Eg + M0 组、HM-Eg + M1 组、HM-Eg + M2 组与空白对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.0001$)。

HM-Eg 组的 DNA 损伤程度低于 HM-Eg + M1 组 ($P < 0.0001$)、高于 HM-Eg + M2 组 ($P < 0.01$)、高于 HM-Eg+M0 组 ($P < 0.05$)。表明 M1 型巨噬细胞可加重 HM 干预 Eg 引起的 DNA 损伤程度，M2 型巨噬细胞可减轻 HM 干预 Eg 引起的 DNA 损伤程度。

4 讨论

巨噬细胞作为机体抵御外界病原微生物感染的第一道防线，在宿主 - 寄生虫相互作用中发挥重要的调控作用^[12]。巨噬细胞可塑性很强，在不同的微环境下可极化为不同功能表型的巨噬细胞。M1 型巨噬细胞 (经典激活的巨噬细胞) 作为促炎细胞，在宿主防御感染中起核心作用^[13]。M2 型巨噬细胞的主要功能是诱导 Th2 型免疫应答，分泌白细胞介素 -10 (IL-10)、转化生长因子 β (TGF β) 等多种抗炎性细胞因子，下调宿主免疫应答，在寄生虫感染、组织修复与重建以及肿瘤的形成过程中发挥作用^[12]。本课题组前期研究明确了 HM 可导

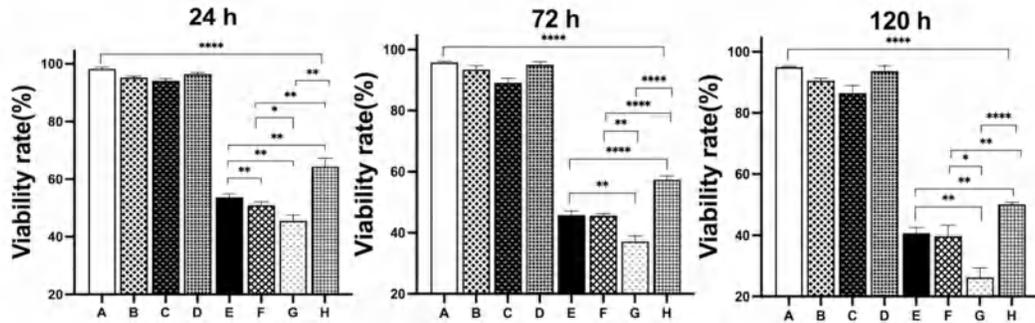


图 4 HM 干预 72 h 后的 Eg 与不同表型巨噬细胞共培养 24、72、120 h 的 Eg 存活率 ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$)

Fig 4 Survival rate of Eg co-cultured with macrophages of different phenotypes for 24 h, 72 h and 120 h after HM intervention for 72 h ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$)

A. 空白对照组 (blank control group); B. M0 + Eg 对照组 (M0 + Eg group); C. M1 + Eg 对照组 (M1 + Eg group); D. M2 + Eg 对照组 (M2 + Eg group); E. HM-Eg 组 (HM-Eg group); F. HM-Eg + M0 组 (HM-Eg + M0 group); G. HM-Eg + M1 组 (HM-Eg + M1 group); H. HM-Eg + M2 组 (HM-Eg + M2 group)

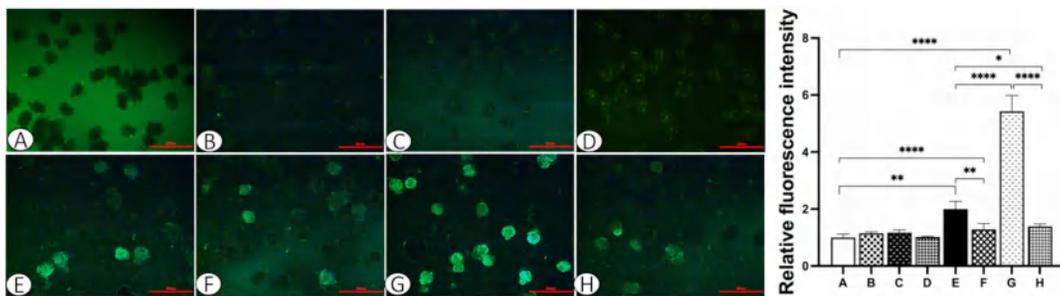


图 5 HM 干预的 Eg 与不同表型巨噬细胞共培养 72 h 活性氧含量 ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$)

Fig 5 Reactive oxygen species content of HM-intervened Eg co-cultured with macrophages of different phenotypes for 72 h ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$)

A. 空白对照组 (blank control group); B. M0 + Eg 对照组 (M0 + Eg group); C. M1 + Eg 对照组 (M1 + Eg group); D. M2 + Eg 对照组 (M2 + Eg group); E. HM-Eg 组 (HM-Eg group); F. HM-Eg + M0 组 (HM-Eg + M0 group); G. HM-Eg + M1 组 (HM-Eg + M1 group); H. HM-Eg + M2 组 (HM-Eg + M2 group)

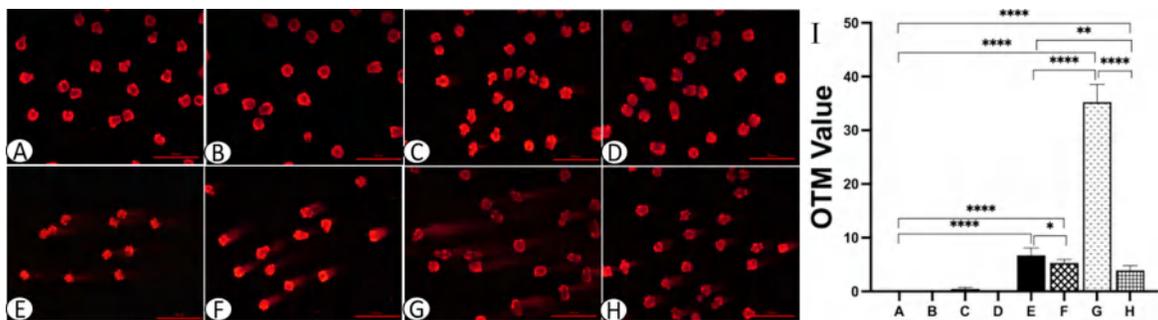


图 6 不同表型巨噬细胞与 HM 干预的 Eg 共培养 72 h DNA 损伤情况 ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$)

Fig 6 DNA damage of HM-intervened Eg co-cultured with macrophages of different phenotypes for 72 h ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$)

A. 空白对照组 (blank control group); B. M0 + Eg 对照组 (M0 + Eg group); C. M1 + Eg 对照组 (M1 + Eg group); D. M2 + Eg 对照组 (M2 + Eg group); E. HM-Eg 组 (HM-Eg group); F. HM-Eg + M0 组 (HM-Eg + M0 group); G. HM-Eg + M1 组 (HM-Eg + M1 group); H. HM-Eg + M2 组 (HM-Eg + M2 group)

致 Eg 基因组不稳定、诱发 DNA 损伤。但随着疾病的发生发展, 部分 Eg 会启动 DNA 修复功能而成功存活并使包虫病复发。棘球蚴感染中晚期巨噬细胞逐渐转变为 M2 型巨噬细胞, 诱导宿主形成免疫耐受, 促进虫体的慢性感染和长期寄生^[11, 14]。因此, 本课题进行了巨噬细胞极化以及巨噬细胞与 HM 干预的 Eg 共培养后 Eg 变化的探讨。

本研究首先以 LPS、IL-25 干预巨噬细胞使其极化为 M1 型、M2 型, 通过流式细胞术鉴定, 400 ng · mL⁻¹ 的 LPS、50 ng · mL⁻¹ 的 IL-25 可以很好地极化巨噬细胞 ($P < 0.0001$)。然后, 采用不同浓度 HM 体外干预 Eg, 各浓度的 HM 干预 120 h 后对 Eg 均有显著的抑制作用 ($P < 0.0001$), 且 HM 干预 120 h 后 Eg 的 IC₅₀ 为 40.88 μg · mL⁻¹。之后

研究在体外采用 HM 干预 Eg, 探讨了不同表型巨噬细胞对 HM 干预 Eg 的损伤影响, 结果表明 M2 型巨噬细胞有利于 HM 干预的 Eg 的持续存活, 与 Wang 等^[10]结果相一致。Eg 在宿主体内为逃避免疫细胞的清除, 会分泌抗体等物质调节宿主的免疫反应, 像抗原 B 等抑制炎症因子, 促使巨噬细胞从 M1 型向 M2 型分化^[15]。M1 型巨噬细胞可释放 ROS、炎症介质, 清除病原体^[16-17]。M2 型巨噬细胞在促进细胞增殖、组织修复等方面起着主导作用^[18], 减少炎症信号促进上皮再生、参与 DNA 的损伤修复等^[18-20]。本研究结果表明, 与未共培养组相比, M1 型巨噬细胞可增加 HM 引起的 Eg 的 ROS 生成量, 加重 Eg 的 DNA 损伤程度; M2 型巨噬细胞可显著减少 HM 引起的 Eg 的 ROS 生成量, 降低 Eg 的 DNA 损伤程度, 故推测 M2 型巨噬细胞可能在宿主体内棘球蚴修复形成过程中发挥作用。

综上所述, M1 型巨噬细胞可能会加重 HM 所致的 Eg 损伤; M2 型巨噬细胞有助于修复 HM 对 Eg 造成的损伤。然而, M2 型巨噬细胞促进修复的具体机制尚不明确, 需要进一步深入研究。同时, 这种促进修复的作用是否与 HM、寄生虫、巨噬细胞三者共同培养时产生的影响一致, 亦需通过更多实验来验证。但 HM 治疗机体过程中可通过抑制 M2 型巨噬细胞以增加 HM 的药效。

参考文献

- [1] Fu MH, Wang X, Han S, et al. Advances in research on echinococcoses epidemiology in China [J]. *Acta Trop*, 2021, 219: 105921.
- [2] 黄嫣, 薛垂召, 王旭, 等. 2022 年全国棘球蚴病防治工作进展 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2024, 42 (1): 8-16.
- [3] 孟凯, 周鸿乾, 安秀青, 等. 儿童肝囊型包虫病诊治进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2022, 30 (9): 387-392.
- [4] 秦敏, 王立英. 阿苯达唑联合药物治疗棘球蚴病的研究进展 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2022, 40 (5): 647-655.
- [5] Zhang L, Li DC, Yu SL. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 1259: 1275.
- [6] 巩月红, 高惠静, 卢帅, 等. 去氢骆驼蓬碱体外诱导细粒棘球蚴原头节凋亡过程中 caspase-3 及抗氧化酶活性检测分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13 (11): 1207-1210.
- [7] 李红玲, 赵军, 马运芳, 等. 去氢骆驼蓬碱抗细粒棘球蚴原头节作用研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9 (11): 995-999.
- [8] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: advances in the 21st century [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32 (2): e00075-18.
- [9] Vatankhah A, Halász J, Piurkó V, et al. Characterization of the inflammatory cell infiltrate and expression of costimulatory molecules in chronic echinococcus granulosus infection of the human liver [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 530.
- [10] Wang H, Yu Q, Wang MK, et al. Hepatic macrophages play critical roles in the establishment and growth of hydatid cysts in the liver during *Echinococcus granulosus sensu stricto* infection [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2023, 17 (11): e0011746.
- [11] Wang H, Zhang CS, Fang BB, et al. Dual role of hepatic macrophages in the establishment of the echinococcus multilocularis metacystode in mice [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 600635.
- [12] 侯娇, 温浩, 王明坤, 等. 多房棘球蚴感染小鼠脾脏巨噬细胞亚群及其极化表型的变化 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2021, 39 (6): 771-778.
- [13] 张星星. 棘球蚴感染通过极化巨噬细胞调控免疫性血小板减少症 (ITP) 的机制研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2024.
- [14] Jiang XF, Zhang XF, Jiang N, et al. The single-cell landscape of cystic echinococcosis in different stages provided insights into endothelial and immune cell heterogeneity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1067338.
- [15] Silva-Álvarez V, Folle AM, Ramos AL, et al. *Echinococcus granulosus* Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation [J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9: 69.
- [16] Xiao H, Guo Y, Li B, et al. M2-like tumor-associated macrophage-targeted codelivery of STAT6 inhibitor and *IKK β* siRNA induces M2-to-M1 repolarization for cancer immunotherapy with low immune side effects [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6 (7): 1208-1222.
- [17] Gunassekaran GR, Poongkavithai Vadevoo SM, Baek MC, et al. M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages [J]. *Biomaterials*, 2021, 278: 121137.
- [18] Yan WH, Li TH, Yin TY, et al. M2 macrophage-derived exosomes promote the c-KIT phenotype of vascular smooth muscle cells during vascular tissue repair after intravascular stent implantation [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (23): 10712-10728.
- [19] Liang XS, Zhang H, Wang ZY, et al. JMJD8 is an M2 macrophage biomarker, and it associates with DNA damage repair to facilitate stemness maintenance, chemoresistance, and immunosuppression in pan-cancer [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 875786.
- [20] Deng FH, Yan J, Lu JX, et al. M2 macrophage-derived exosomal miR-590-3p attenuates DSS-induced mucosal damage and promotes epithelial repair via the LATS1/YAP/ β -Catenin signaling axis [J]. *J Crohns Colitis*, 2021, 15 (4): 665-677.
- [21] Silva-Álvarez V, Folle AM, Ramos AL, et al. *Echinococcus granulosus* Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation [J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9: 69.

(收稿日期: 2024-09-27; 修回日期: 2024-10-27)

青翘清热解毒的谱效关系研究

王宁¹, 邓庆庆¹, 白佳欣², 薛志鹏¹, 孟祎¹, 赵伊君¹, 白吉庆¹, 王小平^{1*} (1. 陕西中医药大学药学院, 西安 712046; 2. 黑龙江中医药大学第二临床医学院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 研究青翘指纹图谱与清热解毒之间的谱效关系。**方法** 采用 HPLC 法建立青翘的指纹图谱; 再用综合指数法计算青翘清热解毒的总效应值; 最后用灰色关联分析法将青翘指纹图谱中各共有峰与其清热解毒总效应值进行关联分析。**结果** 青翘指纹图谱有 26 个共有峰, 12 批青翘相似度均在 0.9 以上; 青翘低、中、高剂量组的抗炎总效应值分别为 3.39、4.25、5.18; 解热总效应值分别为 1.51、0.99、0.83; 17 (连翘酯苷 A)、1、26 (连翘脂素)、22 (连翘苷) 号共有峰与解热药效关系的关联度大于 0.8; 1、22 (连翘苷)、15 (芦丁) 号共有峰, 与抗炎药效的关联度大于 0.8。**结论** 1、15 (芦丁)、17 (连翘酯苷 A)、22 (连翘苷)、26 (连翘脂素) 号共有峰与青翘清热解毒的疗效密切相关, 可能为青翘清热解毒的物质基础。

关键词: 青翘; 指纹图谱; 抗炎; 解热; 谱效关系; 多指标综合指数法; 灰色关联分析

中图分类号: R283, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0610-06
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.005

Spectrum-effect relationship of heat-clearance and detoxification effect of Green Forsythia

WANG Ning¹, DENG Qing-qing¹, BAI Jia-xin², XUE Zhi-peng¹, MENG Yi¹, ZHAO Yi-jun¹, BAI Ji-qing¹, WANG Xiao-ping^{1*} (1. *School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046*; 2. *Second Clinical Medical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040*)

Abstract: Objective To determine the spectrum-effect relationship between the chemical fingerprint of Green Forsythia decoction and its heat-clearance and detoxification effect. **Methods** The chemical fingerprint of Green Forsythia was established by high-performance liquid chromatography (HPLC). The total effect values of Green Forsythia's heat-clearance and detoxification effect were calculated with a comprehensive index method. Subsequently, grey correlation analysis was performed to evaluate the relationship between the common peaks in the fingerprint and total effect values. **Results** Totally 26 common peaks were identified in the fingerprint of Green Forsythia, with a similarity exceeding 0.9 across 12 batches. The total anti-inflammatory effect values for low, medium, and high doses of Green Forsythia were 3.39, 4.25, and 5.18, respectively. The corresponding total pyretolysis effect values were 1.51, 0.99, and 0.83. Peaks 17 (forsythiaside A), 1, 26 (forsythiaside), and 22 (forsythidin) showed correlation coefficients greater than 0.8 with antipyretic effect. Similarly, peaks 1, 22 (phillyrin), and 15 (rutin) showed correlation coefficients exceeding 0.8 with anti-inflammation effect. **Conclusion** Peaks 1, 15 (rutin), 17 (forsythiaside A), 22 (forsythidin), and 26 (forsythiaside) are strongly associated with the heat-clearance and detoxification effect of Green Forsythia, likely serving as the material basis for Green Forsythia's pharmacological efficacy.

Key words: Green Forsythia; fingerprint profile; anti-inflammation; fever relief; spectrum-effect relationship; multi-index comprehensive index method; grey correlation analysis

基金项目: 陕西省科技厅社发攻关项目 (No.2023-YBSF-553)。

作者简介: 王宁, 女, 硕士, 主要从事中草药药效物质基础研究, email: xwang1124@163.com * **通信作者:** 王小平, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中草药药效物质基础研究, email: wangxiaoping323@126.com

木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的果实在初熟且尚带绿色时采收, 除去杂质后蒸熟、晒干, 即为“青翘”。青翘具有清热解毒、消肿散结、疏散风热的功效^[1]。现代药理研究表明, 连翘还具有解热、抗炎、抑菌、保肝等多种药理活性^[2-5]。

中药药效的发挥是多成分、多靶点、多途径协同作用的结果^[6]。灰色关联度分析法广泛应用于中药谱效关系的研究^[7-10]。本研究采用灰色关联度法将青翘指纹图谱共有峰与其清热解毒的总效应值进行关联分析, 以期研究青翘清热解毒物质基础提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 KM 小鼠, 体重 18 ~ 20 g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (川) 2020-0030。实验动物伦理审查批号为 SUCMDL20220228001。小鼠在温度为 24 ~ 27 °C, 湿度为 40% ~ 60% 的环境下饲养, 光照适度, 提供充足的食物和水。

1.2 药材

青翘在杨永佳药材购销部 (陕西省铜川市) 购买, 由陕西中医药大学白吉庆教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的初熟干燥果实 (批号: 20190628 ~ 20190707, 编号 S1 ~ S12)。经检测, 该药材符合 2020 年版《中国药典》的规定。

1.3 试药

连翘酯苷 A (纯度: 97.1%, 批号: 11180-201703)、连翘苷 (纯度: 96.9%, 批号: 110821-201911)、芦丁 (纯度: 96.8%, 批号: 10080-201507) (中国食品药品检定研究院); 连翘脂素 (纯度: 98%, 批号: DSTDL014401, 成都乐美天医药科技有限公司); 槲皮素 (纯度: 98%, 批号: C09S8Y43412, 上海源叶生物科技有限公司); 双黄连颗粒 (批号: 230109, 哈尔滨儿童制药厂有限公司, 规格: 5 g/袋, 相当于净饮片 15 g); 高活性干酵母 (安琪酵母股份有限公司, 规格: 9 g/袋); 角叉菜胶 (上海源叶生物科技有限公司); 白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 乙腈 (色谱纯, 美国默克公司); 水 (超纯水, Millipore 纯水机自制); 其他试剂均为分析纯 (天津天力化学试剂有限公司)。

1.4 仪器

Dionex Ultimate3000 高效液相色谱仪 (上海赛默飞仪器有限公司); Balance XSE105DU/A 电子分析天平 (精度为万分之一, 梅特勒托利多科技有限公司); D-10 电子温度计 (临海医疗仪表厂); Direct-Q3UV 纯化水机 (美国 Millipore 公司);

TG16-WS 型高速台式离心机 (湘仪离心机仪器有限公司); FlexA-200 酶联免疫分析仪 (杭州奥盛仪器有限公司); Research Plus 系列移液枪 (德国 Eppendorf 股份有限公司); N-1300 型旋转蒸发器 (上海爱郎仪器有限公司); SHB-III 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); LG-01 高速中药粉碎机 (温岭市林大机械有限公司)。

2 方法与结果

2.1 青翘 HPLC 指纹图谱的研究^[11]

2.1.1 供试品溶液的制备 取青翘粗粉 (批号 20190628 ~ 20190707) 各 3 g, 加 10 倍量纯水, 煎煮 3 次, 0.5 h/次, 滤液合并减压浓缩至 0.6 g (生药材) \cdot mL⁻¹ 的溶液, 用于药效学试验。精密吸取上述溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 用于指纹图谱的建立。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取连翘酯苷 A、连翘苷、芦丁、槲皮素、连翘脂素对照品适量, 用甲醇溶解, 配制成质量浓度分别为 0.144、0.108、0.166、0.132、0.121 mg \cdot mL⁻¹ 的对照品储备液。精密吸取上述对照品溶液各 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 色谱条件 Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, B 为乙腈, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 98% ~ 96%A; 10 ~ 15 min, 96%A; 15 ~ 35 min, 96% ~ 94%A; 35 ~ 65 min, 94% ~ 88%A; 65 ~ 100 min, 88% ~ 84%A; 100 ~ 120 min, 84% ~ 82%A; 120 ~ 130 min, 82% ~ 81%A; 130 ~ 155 min, 81% ~ 78%A; 155 ~ 170 min, 78% ~ 70%A; 170 ~ 180 min, 70% ~ 60%A); 流速: 0 ~ 10 min, 0.8 mL \cdot min⁻¹; 15 ~ 180 min, 1.0 mL \cdot min⁻¹; 进样量 3 μ L, 柱温 30 °C, 检测波长 235 nm。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 6 次, 记录色谱图, 以 22 号峰连翘苷为参照峰 (S), 结果各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 值均 < 3%, 表明仪器精密度良好。

2.2.2 重复性试验 取同一青翘粗粉 6 份, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 进样, 记录色谱图, 结果各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 值均 < 3%, 表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、24 h 进样, 记录色谱图, 结果各共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 值均 < 3%, 表明样品在 24 h 内基本稳定。

2.3 指纹图谱的建立和共有峰的指认

取 12 批青翘图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版”软件, 以 S3 图谱作为参照

指纹图谱, 选择中位数法, 时间窗宽度为 0.1 s, 进行全谱峰匹配, 确定了 26 个共有峰, 并生成青翘的 HPLC 指纹图谱的叠加图和对照图谱, 结果见图 1 及图 2A。12 批青翘相似度均在 0.9 以上, 符合谱效相关研究对样品的要求, 结果见表 1。采用混合对照品和 LC-MS 对指纹图谱中的共有峰进行指认, 其中 7 号峰为 forsythide, 9 号峰为 forsythenside A, 13 号峰为异连翘酯苷 A, 15 号峰为芦丁, 17 号峰为连翘酯苷 A; 21 号峰为槲皮素; 22 号峰为连翘苷 (参照峰); 26 号峰为连翘脂素, 见图 2B。

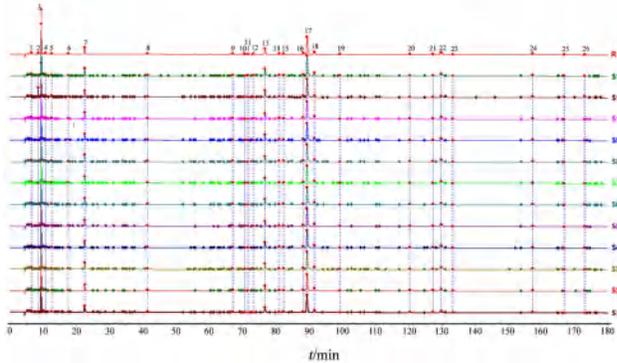


图 1 青翘 HPLC 图谱叠加图

Fig 1 HPLC chromatogram overlay map of Green Forsythia

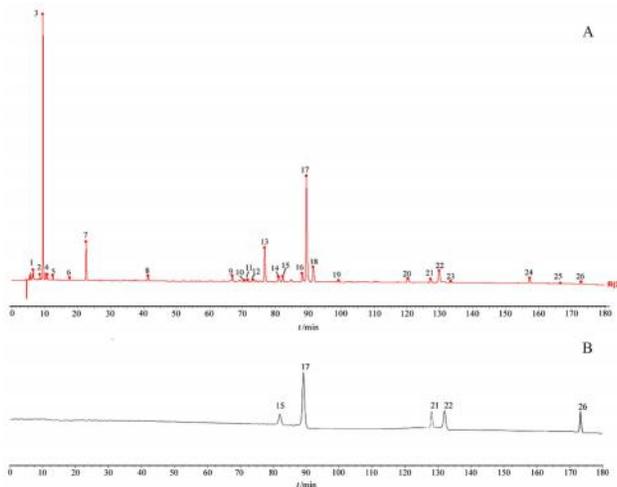


图 2 青翘对照指纹图谱 (A) 和混合对照品 HPLC 色谱图 (B)

Fig 2 Green Forsythia control fingerprint (A) and mixed reference substance HPLC chromatogram (B)

7. forsythide; 9. forsythenside A; 13. 异连翘酯苷 A (isoforsythiaside A); 15. 芦丁 (rutin); 17. 连翘酯苷 A (forsythiaside A); 21. 槲皮素 (quercetin); 22. 连翘苷 (phillyrin); 26. 连翘脂素 (phillygenin)

表 1 12 批青翘指纹图谱相似度分析结果

Tab 1 Fingerprint similarity of 12 batches of Green Forsythia

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.998	S7	0.991
S2	1.000	S8	0.986
S3	0.986	S9	0.998
S4	0.986	S10	0.999
S5	0.993	S11	0.988
S6	0.991	S12	0.998

2.4 抗炎活性研究^[12-14]

小鼠适应性喂养 7 d 后, 将 60 只小鼠随机分为空白组 (纯水)、模型组 (纯水)、阳性组 (双黄连颗粒, 给药剂量 $6.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 青翘水煎液低、中、高剂量组 (按照生药计分别为 1.5 、 3 、 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 用纯水配制成质量浓度为 0.15 、 0.3 、 $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液)。各组小鼠灌胃体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日 1 次, 连续 7 d。于末次给药后 1 h, 空白组小鼠右耳正反面均匀涂抹纯水各 $10 \mu\text{L}$, 右后肢皮下注射生理盐水 $50 \mu\text{L}$, 其余组小鼠右耳正反面涂抹二甲苯各 $10 \mu\text{L}$, 右后肢皮下注射 1% 的角叉菜胶 $50 \mu\text{L}$, 建立小鼠炎症模型, 1 h 后眼眶取血, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取血清按照试剂盒检测 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 炎症因子; 脱臼处死, 双耳用打孔器 (6 mm) 取同一位置耳片, 称重, 计算耳肿胀度; 在距离小鼠的左、右后肢踝关节 2 mm 处剪下, 称重, 计算足肿胀度。采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间的数据比较采用 One-way Analysis of Variance (ANOVA) 的 Tukey 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果如图 3 所示, 与空白组相比, 模型组小鼠耳肿胀度、足肿胀度、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量均显著升高 ($P < 0.01$), 表明造模成功; 与模型组相比, 阳性组与青翘各给药组的耳肿胀度、足肿胀度、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结果表明, 在一定剂量下, 青翘水煎液对急性炎症具有明显的抑制作用。

2.5 解热活性研究^[15-17]

将小鼠适应性喂养 7 d, 用直肠测温计经凡士林润滑后插入小鼠直肠 1 cm 深处, 测量小鼠肛温, 待温度稳定后读数, 早中晚各 1 次, 剔除体温异常的小鼠, 温差 $\leq 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 的作为实验对象, 用体温的均值作为基础温度, 取 60 只体温正常小鼠随机分为空白组 (纯水)、模型组 (纯水)、阳性组 (双黄连颗粒, 给药剂量 $6.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 青翘低、中、高剂量组 (按照生药计分别为 1.5 、 3 、 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 灌胃体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。除空白组外, 每只小鼠皮下注射 20% 干酵母混悬液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 各组于注射后 6 h 时测一次体温, 体温上升 $0.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上, 视为造模成功, 空白组给予等体积的水。其余各组灌胃相应药物, 每间隔 1 h 测体温 1 次, 连续测量 3 次。最后一次测温后, 眼眶取血, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-1 β 。

结果显示, 与空白组相比, 模型组小鼠体温显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给药 2 h 后, 各给药组小鼠体温显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。与空白组相比, 模型组小鼠血清中内源性致热原因子含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组

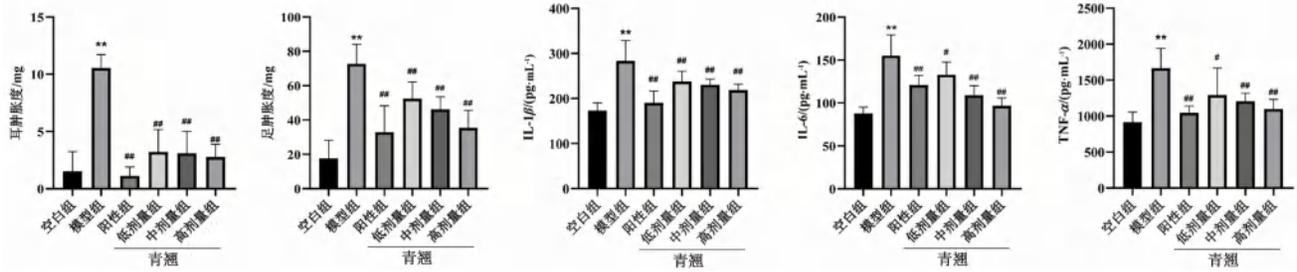


图 3 急性炎症模型小鼠的耳、足肿胀度及相关炎症因子含量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig 3 Swelling degree of ear and foot and the content of related inflammatory factors in acute inflammation model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

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

相比，各给药组小鼠内源性致热因子含量显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (见图 4)，说明青翘水煎液具有良好的解热效果。

表 2 各组小鼠体温变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Changes in body temperature of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	基础体温 / $^{\circ}\text{C}$	造模 6 h	给药后不同时间点体温值 / $^{\circ}\text{C}$		
			1 h	2 h	3 h
空白组	36.90 ± 0.21	36.93 ± 0.40	37.01 ± 0.15	36.80 ± 0.28	36.5 ± 0.33
模型组	36.88 ± 0.33	37.86 ± 0.28**	37.90 ± 0.43**	37.86 ± 0.35**	37.88 ± 0.53**
阳性组	36.02 ± 0.61	37.30 ± 0.22**	37.23 ± 0.45	36.75 ± 0.66 [#]	36.65 ± 0.49 ^{###}
青翘低剂量组	37.14 ± 0.53	38.17 ± 0.46**	37.79 ± 0.60 ^{###}	37.03 ± 0.38 ^{###}	37.15 ± 0.34 ^{###}
青翘中剂量组	36.72 ± 0.44	37.78 ± 0.39**	37.48 ± 0.58 [#]	36.73 ± 0.27 ^{###}	36.36 ± 0.33 ^{###}
青翘高剂量组	36.62 ± 0.61	37.92 ± 0.60**	37.60 ± 0.49 [#]	36.84 ± 0.50 ^{###}	36.46 ± 0.17 ^{###}

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

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

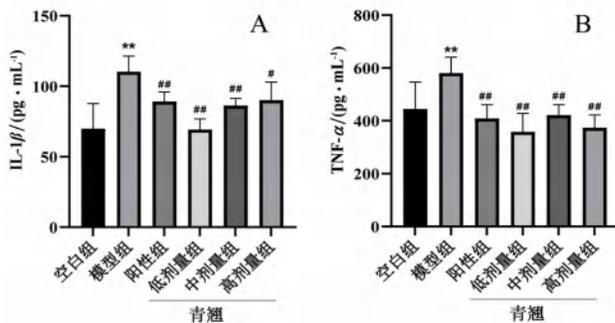


图 4 解热模型小鼠内源性致热因子的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig 4 Contents of endogenous pyrogenic factors in antipyretic model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

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

2.6 基于多指标综合指数法整合青翘抗炎、解热的总效应值

根据多指标综合指数法^[18-19]，各指标进行标化处理。当模型组指标值 (V) 大于给药组时， $V_{\text{标}} = (V_{\text{模型}} - V_{\text{给药}}) / V_{\text{模型}}$ ，模型组指标值小于给药组时， $V_{\text{标}} = (V_{\text{给药}} - V_{\text{模型}}) / V_{\text{模型}}$ 。将抗炎药效各指标和解热药效各指标的标化数据导入到 SIMCA-P 14.0 软件，选择正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 模

型进行分析，得到变量投影重要性 (VIP) 值，结合文献报道中各指标的出现频次，确定各指标的权重系数，各指标标化值乘以权重系数的加和值，即为总效应值。

2.6.1 青翘抗炎效应指标的权重及总效应值
VIP 值结合文献，最终确定 IL-1 β 、IL-6 指标的权重系数为 3，耳肿胀度、足肿胀度指标权重系数为 2，TNF- α 权重系数为 1，各指标的标化值和总效应值见表 3，高剂量组抗炎的总效应值最大。

表 3 基于多指标综合指数法的青翘抗炎整合总效应值

Tab 3 Total anti-inflammatory effect integration values of Green Forsythia based on multi-indicator composite index approach

分组	标化值 (a)		标化值 (b)		标化值 (c)	总效应值 (3a + 2b + c)
	足肿胀度	IL-1 β	IL-6	耳肿胀度	TNF- α	
空白组	0.76	0.39	0.43	0.86	0.45	6.91
阳性组	0.10	0.33	0.22	0.89	0.37	4.10
青翘低剂量组	0.28	0.16	0.15	0.70	0.22	3.39
青翘中剂量组	0.36	0.19	0.30	0.71	0.28	4.25
青翘高剂量组	0.51	0.23	0.38	0.74	0.34	5.18

2.6.2 青翘解热效应指标的权重及总效应值
VIP 值结合文献，最终确定 IL-1 β 指标的权重系数为 3，体温指标权重系数为 2，TNF- α 权重系数

为 1, 各指标的标化值和总效应值见表 4, 表明青翘的低剂量组解热的总效应值最大。

表 4 基于多指标综合指数法的青翘解热的总效应值
Tab 4 Total effect values for the integration of Green Forsythia's antipyretic effects based on the multi-indicator composite index approach

分组	标化值 (a)	标化值 (b)	标化值 (c)	总效应值 (3a + 2b + c)
	IL-1 β	体温	TNF- α	
空白组	0.37	0.03	0.38	1.55
阳性组	0.19	0.03	0.30	0.93
青翘低剂量组	0.37	0.02	0.36	1.51
青翘中剂量组	0.22	0.03	0.27	0.99
青翘高剂量组	0.18	0.03	0.23	0.83

2.7 谱效关系研究

运用 SPSSAU 中的灰色关联分析法^[20-23], 对青翘指纹图谱中各共有峰与抗炎总效应值和解热总效应值进行相关性分析。计算青翘水煎液低、中、高剂量组的 HPLC 图谱与青翘清热解毒药效指标之间的关联度 (见表 5 ~ 6)。当关联度大于 0.6 时, 表明色谱峰代表的化学成分与药理指标有关联性, 当关联度大于 0.8 时, 表明色谱峰代表的化学成分与药理指标密切相关。表 5 显示, 17 (连翘酯苷 A)、1、26 (连翘脂素)、22 (连翘苷) 号峰关联度均 > 0.8, 与抗炎药效关联密切, 推测为青翘抗炎的主要药效成分; 由表 6 可知, 1、22 (连翘苷)、15 (芦丁) 号峰关联度均 > 0.8, 与解热药效关联密切, 推测为青翘解热的主要药效成分; 因此, 共有峰 1、15 (芦丁)、17 (连翘酯苷 A)、22 (连翘苷)、26 (连翘脂素) 是青翘发挥清热解毒作用的潜在药效成分。

3 讨论

本研究建立青翘水煎液指纹图谱, 采用灰色关联度分析法, 探究青翘化学成分与药效学之间的关系。中药药效通常具有多成分、多环节、多靶点共同作用的特性^[22]。谱效关系研究在不确定药效金指标的情况下, 采用适宜的数据处理方法, 获取药效的总效应值, 以总效应值进行谱-效相关分析可解决以单一指标筛选结果存在局限性的问题。

谱效关系研究为中药药效物质基础的研究提供新方法、新思路。本研究通过总效应值与青翘水煎液图谱进行谱-效关联性分析, 最终确定青翘清热解毒作用有效成分群与文献研究结果一致^[24-26]; 韦永浩^[27]和薛柯等^[28]通过体外抗炎谱效关系研究, 筛选出与抗炎密切相关的化学成分同样包括芦丁、连翘酯苷 A、连翘苷和连翘脂素。

表 5 共有峰与抗炎药效指标和总效应值的关联度
Tab 5 Correlation between common peaks and anti-inflammatory efficacy indexes and total effect values

峰号	足肿胀	耳肿胀	TNF- α	IL-6	IL-1 β	总效应值的关联度	排名
1	0.626	0.660	0.795	0.666	0.705	0.865	2
2	0.743	0.755	0.687	0.677	0.688	0.751	10
3	0.614	0.622	0.551	0.584	0.550	0.658	18
4	0.747	0.662	0.693	0.680	0.695	0.779	7
5	0.592	0.598	0.624	0.614	0.623	0.623	24
6	0.617	0.626	0.654	0.644	0.654	0.666	15
7	0.636	0.647	0.678	0.668	0.679	0.698	12
8	0.601	0.608	0.635	0.624	0.634	0.639	22
9	0.642	0.655	0.686	0.675	0.687	0.772	9
10	0.694	0.603	0.628	0.613	0.628	0.642	21
11	0.608	0.615	0.645	0.639	0.644	0.644	20
12	0.618	0.627	0.656	0.648	0.656	0.664	16
13	0.609	0.618	0.645	0.633	0.646	0.660	17
14	0.692	0.697	0.624	0.616	0.623	0.619	25
15	0.641	0.657	0.686	0.667	0.689	0.780	6
16	0.653	0.667	0.701	0.694	0.702	0.778	8
17	0.661	0.691	0.706	0.636	0.718	0.878	1
18	0.573	0.577	0.601	0.593	0.600	0.591	26
19	0.640	0.651	0.683	0.675	0.684	0.743	11
20	0.616	0.627	0.654	0.640	0.655	0.677	13
21	0.657	0.673	0.605	0.691	0.607	0.790	5
22	0.728	0.745	0.756	0.794	0.761	0.808	4
23	0.615	0.625	0.653	0.639	0.653	0.673	14
24	0.598	0.605	0.631	0.621	0.630	0.633	23
25	0.612	0.621	0.594	0.593	0.649	0.657	19
26	0.732	0.749	0.760	0.798	0.766	0.815	3

这一定程度上也证明了谱-效相关法筛选青翘抗炎解热有效成分群的可靠性。姬昌彬^[29]的研究显示, 连翘酯苷 A 可能通过抑制 NF- κ B/p38 MAPK 信号通路, 从而改善大鼠软骨细胞炎症。铜川等地为陕西连翘主产区^[30], 本研究采用的样品为陕西的主产区铜川产的青翘, 结果可为铜川青翘有效性评价提供试验依据。

对于本研究中未指认的共有峰的化学结构类型及药理活性还有待进一步研究确认。本研究选用的动物模型无法全面涵盖连翘清热解毒、疏散风热等功效的内涵, 后续需要对青翘的药理效应进行更加全面系统的研究; 关于青翘水煎液中化学成分的鉴定有待进一步研究; 此外, 产地对中药材的品质也有影响, 后续可对陕西不同产地, 甚至全国不同产地的青翘进行全面深入的研究, 以期对青翘的质量控制和评价奠定基础。

表 6 共有峰与解热药效指标和总效应值的关联度

Tab 6 Correlation between common peaks and heat-clearance efficacy index and total effect values

峰号	体温	TNF- α	IL-1 β	总效应值的关联度	排名
1	0.840	0.772	0.833	0.864	1
2	0.774	0.761	0.719	0.773	7
3	0.768	0.708	0.716	0.762	13
4	0.709	0.739	0.754	0.770	9
5	0.638	0.587	0.590	0.632	24
6	0.772	0.713	0.722	0.764	10
7	0.799	0.732	0.745	0.775	6
8	0.650	0.597	0.602	0.642	19
9	0.704	0.734	0.747	0.763	12
10	0.643	0.599	0.606	0.625	25
11	0.612	0.565	0.565	0.610	26
12	0.662	0.610	0.619	0.648	17
13	0.760	0.696	0.702	0.764	11
14	0.637	0.582	0.585	0.637	23
15	0.790	0.764	0.785	0.804	3
16	0.625	0.645	0.662	0.644	18
17	0.810	0.759	0.780	0.776	5
18	0.671	0.619	0.629	0.654	15
19	0.675	0.643	0.690	0.638	22
20	0.673	0.621	0.633	0.654	16
21	0.742	0.763	0.804	0.771	8
22	0.816	0.752	0.769	0.859	2
23	0.666	0.608	0.615	0.659	14
24	0.646	0.593	0.598	0.639	21
25	0.679	0.642	0.688	0.641	20
26	0.708	0.741	0.856	0.794	4

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 177-178.
 [2] Zhang Y, Miao H, Yan HY, et al. Hepatoprotective effect of forsythiae fructus water extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 218: 27-34.
 [3] Wang ZY, Xia Q, Liu X, et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of *Forsythia suspensa* (thunb.) Vahl: a review [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 210: 318-339.
 [4] 赵佩媛, 韩立柱, 汪芸兰, 等. 连翘的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (4): 19-27.
 [5] 郭健敏, 富力, 秦丽莉, 等. 连翘苷体内外抗病毒及解热作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38 (8): 1170-1175.
 [6] 张铁军. 基于中药质量标志物的中药产业高质量发展技术策略 [J]. 中国现代中药, 2024, 26 (2): 234-239.
 [7] 黄广伟, 陈淮臣, 刘渝, 等. 基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的芩苏胶囊抑菌谱效关系研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45 (6): 1060-1069.
 [8] 陈瑞鑫, 康点点, 詹琥珀, 等. 基于谱效关系和成分敲除探讨独一味总黄酮抗炎风湿关节炎的关键成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35 (11): 1833-1841.
 [9] 邢耀莹, 王姿杨, 王露, 等. 牛蒡子-甘草药对指纹图谱的建立及其抗炎活性谱效关系研究 [J]. 中草药, 2024, 55 (4): 1237-1247.
 [10] 周玲利, 刘刚, 刘育辰, 等. 中药谱效关系在中药中应用进展 [J]. 中南药学, 2024, 22 (9): 2398-2404.

[11] 丁晓彦, 刘晓金, 赵瀚年. 基于谱-效相关的连翘体外抑菌物质基础研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (4): 1868-1873.
 [12] Nawaz I, Tahir A, Iqbal SM, et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and anti-pyretic activities of cenchrus ciliaris l [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 309: 116332.
 [13] Yuan A, Gong LH, Luo L, et al. Revealing anti-inflammation mechanism of water-extract and oil of forsythiae fructus on carrageenan-induced edema rats by serum metabolomics [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 929-937.
 [14] 袁岸, 罗林, 龚小红, 等. 连翘提取物对角叉菜胶和鸡蛋清所致大鼠足肿胀的影响研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43 (10): 2200-2203.
 [15] Roy R, Roy J, Liya IJ, et al. Antipyretic and antinociceptive effects of methanolic extract of c. Iria l. Tuber [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318 (Pt A): 116860.
 [16] 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.
 [17] 赵晶晶, 武文星, 朱昭颖, 等. 牻牛儿苗对 LPS 诱导发热大鼠模型的解热活性评价及机制研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38 (10): 936-944.
 [18] 肖日传, 罗光明, 朱继孝, 等. 基于偏最小二乘法和多指标综合指数法的栀子根不同提取部位保肝作用评价 [J]. 中草药, 2017, 48 (23): 4921-4927.
 [19] 陶慧娟, 乐世俊, 唐于平, 等. 基于主成分分析和多指标综合指数法研究丹参-三七药对活血化瘀作用量效关系 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28 (17): 2141-2147.
 [20] 张雪丽, 杨长福, 李玮, 等. 半夏水溶性成分抗氧化活性谱效关系研究 [J]. 中南药学, 2023, 21 (5): 1183-1189.
 [21] 赵斯尘, 王晓东, 吴灏, 等. 猴耳环消炎片指纹谱效学分析 [J]. 中南药学, 2022, 20 (7): 1540-1544.
 [22] 方可儿, 张海瑞, 竹炳, 等. 基于谱效关系的续断盐制前后对肾虚大鼠的物质基础研究 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (12): 3220-3228.
 [23] 史精干, 李燊星, 王恒, 等. 决明子分散片对大鼠急性肝损伤的保护作用及其谱效关系研究 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58 (14): 1295-1304.
 [24] Liu CL, Su HC, Wan HY, et al. Forsythoside a exerts anti-pyretic effect on yeast-induced pyrexia mice via inhibiting transient receptor potential vanilloid 1 function [J]. Int J Biol Sci, 2017, 13 (1): 65-75.
 [25] Liu WJ, Li JJ, Xu SH, et al. Phillyrin and its metabolites exert antipyretic effects by targeting the NAD⁺ binding domain of GAPDH, MDH2 and IDH2 [J]. Phytomedicine, 2024, 134: 155955.
 [26] 付金凤. 连翘指标成分的抗炎活性研究 [D]. 长春: 长春师范大学, 2023.
 [27] 韦永浩. 青翘抗炎谱效关系及质量评价研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
 [28] 薛柯, 苏亚菲, 韩紫岩, 等. 基于谱-效关联分析筛选青翘和老翘抗炎活性差异的质量标志物 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58 (11): 966-976.
 [29] 姬昌彬. 基于 NF- κ B/p38 MAPK 通路探究连翘酯苷 A 对大鼠软骨细胞炎症的影响 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2023.
 [30] 康梦娇, 张伟, 赵林华, 等. 重构本草——连翘 [J]. 吉林中医药, 2023, 43 (3): 331-334.

(收稿日期: 2024-09-23; 修回日期: 2024-10-23)

硫酸多黏菌素 E 提高脂质纳米粒的 siRNA 递送效应 用于抗肿瘤研究

孙雪如¹, 钱磊², 吴佳杨³ (1. 乌兰察布医学高等专科学校, 内蒙古 乌兰察布 012000; 2. 乌兰察布医学高等专科学校附属医院, 内蒙古 乌兰察布 012000; 3. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014040)

摘要: **目的** 构建一种新的一体化脂质纳米粒 (lipid nanoparticles, LNPs) 递送系统, 通过增强 siRNA 溶酶体逃逸, 实现高效安全的 siRNA 递送效应, 增加血管内皮生长因子 (VEGF) - siRNA 的抗肿瘤效应。**方法** 采用阳离子脂质 DOTAP 包封硫酸多黏菌素 E (colistin, COL) 和 siRNA 得到 LNPs/COL/siRNA 脂质纳米粒, 纳米粒度电位仪分析其粒径和 Zeta 电位; 多功能酶标仪和高效液相色谱分别测定 siRNA 和 COL 的包封率 (EE); 流式细胞仪检测细胞摄入和凋亡; CCK-8 法评价其安全性和细胞增殖抑制作用; 共聚焦显微镜考察其对 siRNA 溶酶体逃逸效应, 聚合酶链式反应 (PCR) 和酶联免疫吸附 (ELISA) 考察其对基因和蛋白层面表达的影响。**结果** 构建的 LNPs/COL/siRNA 脂质纳米粒粒径为 101.8 nm, Zeta 电位为 7.88 mV, PDI = 0.21, siRNA 包封率约 75%, 在 150 nmol·L⁻¹ 以下, 细胞存活率为 82% 以上; 与 Free-siRNA 组比较, 细胞摄取约提高 3 倍; 与 LNPs/siRNA 组比较, 明显可以观察到具有很强的溶酶体逃逸效率, 并且使 VEGF-mRNA 基因沉默效应提高 1.3 倍, VEGF 蛋白表达降低; 体外抗肿瘤活性结果表明, 其抑制增殖作用大大增强, 并且可以加大对 HepG2 细胞的凋亡。**结论** 构建一体化 LNPs 纳米递送系统可以提升 LNPs 的溶酶体逃逸, 增强 siRNA 递送效应, 抑制肿瘤发展。

关键词: 脂质纳米粒; siRNA 递送; 溶酶体逃逸; 抗肿瘤

中图分类号: R943, R73 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0616-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.006

Polymyxin E sulfate enhances the siRNA delivery efficiency of lipid nanoparticles in anti-tumor research

SUN Xue-ru¹, QIAN Lei², WU Jia-yang³ (1. Wulanchabu Medical College, Wulanchabu Inner Mongolia 012000; 2. Affiliated Hospital of Wulanchabu Medical College, Wulanchabu Inner Mongolia 012000; 3. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou Inner Mongolia 014040)

Abstract: Objective To construct a novel integrated lipid nanoparticles (LNPs) delivery system to improve siRNA lysosomal escape, and achieve efficient and safe siRNA delivery thus enhancing the anti-tumor effect of VEGF-siRNA. **Methods** Cationic lipid DOTAP was used to encapsulate colistin E (colistin, COL) and siRNA to obtain LNPs/COL/siRNA LNPs. In addition, the particle size and Zeta potential were measured by nanoparticle size analyzer, while the encapsulation efficiency (EE) of siRNA and COL was assessed with microplate reader and high-performance liquid chromatography. The cellular uptake and apoptosis were evaluated by flow cytometry. Besides, the safety and cell proliferation inhibition were determined by CCK-8 assay. Confocal microscopy was used to detect to lysosomal escape effect of siRNA. Moreover, gene and protein expressions were elucidated by PCR and ELISA. **Results** The size, Zeta potential and PDI of LNPs/COL/siRNA was 101.8 nm, 7.88 mV, and 0.21, respectively. The siRNA encapsulation efficiency was approximately 75% and the cell viability was over 82% at concentrations below 150 nmol·L⁻¹. Compared with the Free-siRNA group, the

基金项目: 内蒙古自治区教育科学研究基金 (No.NZJGH2023113)。

作者简介: 孙雪如, 女, 讲师, 主要从事核酸药物递送研究, email: 1149164689@qq.com

LNPs/COL/siRNA group showed about 3 times higher cellular uptake. Furthermore, Compared with the LNPs/siRNA group, LNPs/COL/siRNA group showed a substantially higher lysosomal escape; and the silencing effect of VEGF-mRNA increased by 1.3 times and VEGF protein expression reduced. The in vitro anti-tumor activity showed that LNPs/COL/siRNA greatly inhibited the proliferation and increased the apoptosis of HepG2 cells. **Conclusion** The constructed integrated LNPs delivery system can enhance the lysosomal escape, improve siRNA delivery efficiency, and inhibit tumor development.

Key words: lipid nanoparticle; siRNA delivery; lysosomal escape; anti-tumor

siRNA 是一种短小的 RNA 分子, 可以通过干扰靶基因的表达来特异性调控基因功能。然而 siRNA 半衰期短、细胞摄取差、容易被溶酶体降解等问题严重制约了其临床应用^[1]。

脂质纳米粒 (lipid nanoparticles, LNPs) 具有一定的溶酶体逃逸能力, 可以使 siRNA 释放到细胞质中。在 2018 年 8 月, FDA 批准了第一个 siRNA 药物, 称为 ONPATRO (Patisiran)^[2], 其主要是由 4-(N, N-二甲基氨基)丁酸 (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-庚三十碳-6, 9, 28, 31-四烯-19-基脂 (Dlin-MC3-DMA) 主脂材和辅助脂材组装而成的 LNPs, 摄取入胞后在溶酶体中通过六角形结构诱导膜融合, 使被包裹的 siRNA 释放到细胞质中^[3]。也有报道阳离子主脂材 (2, 3-二油氧基丙基) 三甲基氯化铵 (DOTAP) 和辅助脂材构成的 LNPs 被摄入细胞内吞入溶酶体后, 由于渗透压失衡引起质子海绵效应导致 siRNA 发生逃逸^[4]。但是有研究者报道, LNPs 溶酶体逃逸效率仍然很低, 只有 1% ~ 2%^[5]。因此进一步提高 LNPs 的 siRNA 的溶酶体逃逸效率非常重要。

硫酸多黏菌素 E (colistin, COL) 是一种来自于多黏菌的抗菌化合物, 临床上用来对抗细菌感染, 其表面含有带正电荷的氨基, 能与革兰氏阴性菌细胞膜的磷脂中带负电荷的磷酸根相互作用导致细胞膜的破坏和渗漏进而使内容物外泄, 最终导致细菌死亡^[6-7]。本研究拟探索硫酸多黏菌素 E 是否可以导致溶酶体膜破坏, 产生渗漏, 同时结合 LNPs 本身的溶酶体膜破坏作用, 有效促进 siRNA 在细胞质释放。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是肿瘤组织内表达较高的促血管生长因子, 可以使肿瘤的新生血管形成以及侵袭转移^[8-9]。VEGF-siRNA 可以诱导同源性 mRNA 的降解, 抑制肿瘤发展^[10]。基于此, 本研究设计了一套安全有效的 siRNA 递送系统, 通过 LNPs 包裹硫酸多黏菌素 E 和 VEGF-siRNA, 首次报道利用

硫酸多黏菌素 E 增加 LNPs 对 VEGF-siRNA 溶酶体逃逸, 提高 VEGF-siRNA 递送效应, 从而延缓肿瘤进展。

1 材料

1.1 试药及细胞

硫酸多黏菌素 E (纯度: 99.8%, 北京奇松生物科技有限公司); 乙醇、甲醇、无核酶水 (北京百灵威科技有限公司); DOTAP、二硬酯酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、胆固醇 (Chol)、二肉豆蔻酰甘油-聚乙二醇 2000 (DMG-PEG2000)(上海艾伟拓医药科技有限公司); Negative control siRNA (正义链序列: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反义链序列: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'), VEGF-siRNA 序列为: (正义链序列 5'-GCGCAAGAAAUCCCGGUAUTT-3', 反义链序列 5'-AUACCGGGAUUUCUUGCGCTT-3'), FAM-siRNA, Cy5-siRNA (苏州吉玛制药技术有限公司); DMEM 培养基、OPTI-DMEM 培养基 (北京中科迈晨科技有限公司); 1 mL 一次性无菌注射器 (上海碧迪医疗器械有限公司); 透析袋 (Mw: 20 kD)(北京索莱宝科技有限公司); 人肝癌细胞株 (HepG2)、人乳腺癌细胞 (MCF7)(中国科学院肿瘤医院细胞库)。

1.2 仪器

共聚焦显微镜 (德国 Confocal laser scanning microscopy, Leica, TCSSP5); D-400898 推吸注射泵 (美国 Harvard Apparatus 公司); 多功能酶标仪 (赛默飞世尔科技公司); 20 mm 共聚焦培养皿 (美国 MatTek, MA 公司); 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); 25 cm² 细胞培养瓶、96 孔板、12 孔板、6 孔板 (美国 Corning 公司); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法与结果

2.1 LNPs/COL/siRNA 脂质纳米粒制备与表征

按照脂材摩尔比 DOTAP : Chol : DSPC : DMG-PEG2000 = 50 : 38.5 : 10 : 1.5 溶解在乙醇溶液制备成有机相。siRNA 用硫酸多黏菌素 E 浓度为 12

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无核酶水溶液稀释到 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 制备成水相。利用微流控装置将有机相 - 水相按照 1 : 3 的流速 (总流速 = $8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 进行混合, 收集混合液, 置于透析袋, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 过夜透析, 即得到 LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米粒。

取 $80 \mu\text{L}$ LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米粒, 置于粒径仪测试杯中, 采用马尔文粒径测定脂质纳米粒的平均粒径和 Zeta 电位。另取 LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米粒用去离子水稀释 2 倍, 吸取 $5 \mu\text{L}$ 滴于铜网上, 磷钨酸钠负染, 自然挥干, 并于 TEM 电镜下进行拍照留存。

如图 1A ~ 1D 所示 LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米粒水合粒径值为 101.8 nm , 电位为 7.88 mV , $\text{PDI} = 0.21$, 通过 TEM 电镜测得 LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米粒粒径约为 90 nm (如图 1E), 比通过粒径仪测得粒径稍小, 原因可能是纳米粒干燥所致。结果表明 LNPsi/COL/siRNA 具有较小的粒径、正电位和 PDI。

2.2 LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米粒 COL 包封率

准确配制 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸多黏菌素 E 的样品溶液, 稀释为不同浓度, 取 $10 \mu\text{L}$ 进样 [色谱条件为: X Bridge RP-C18 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$), 流动相为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸 - 乙腈 (77 : 23), 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 紫外检测波长: 205 nm , 进样量: $10 \mu\text{L}$, 柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$], 以浓度为横坐标, 硫酸多黏菌素 E1 的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。取透析后的 LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米粒, 加 0.1% Triton X-100 破膜, $10 \mu\text{L}$ 进样, 通过标准曲线, 计算硫酸多黏菌素 E 脂质体中包裹硫酸多黏菌素 E 的量为 $W_{\text{包}}$, 硫酸多黏菌素 E 投入量为 $W_{\text{总}}$, 包封率 (%) = $(W_{\text{包}}/W_{\text{总}}) \times 100\%$ 。结果如图 1F ~ 1G 所示, LNPsi/COL/siRNA 透析后, 硫酸多黏菌素 E 包封率达 2.55%。说明 LNPsi 可以对硫酸多黏菌素 E 有效包封。

2.3 LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米 siRNA 包封率

脂质纳米粒总 siRNA 量的测定: 取 96 孔板, 加入 $20 \mu\text{L}$ 制剂, 加入 0.1% Triton X-100 $10 \mu\text{L}$ 破膜, 再加入 1% 肝素钠 $10 \mu\text{L}$, 加 TE 缓冲液到 $100 \mu\text{L}$ 。游离 siRNA 量的测定: 取 $20 \mu\text{L}$ 制剂, 加 TE 缓冲液到 $100 \mu\text{L}$ 。各孔加入用 TE 缓冲液稀释的 $1 \times \text{RiboGreen}$ $100 \mu\text{L}$ 。避光静置 5 min, 在 $480 \sim 520 \text{ nm}$ 波长处测定每孔吸收度 OD 值, 计算 siRNA 包封率。siRNA 包封率 (%) = $(\text{总 siRNA} - \text{游离 siRNA}) / \text{总 siRNA} \times 100\%$ 。结果如图 1H 所示, LNPsi/siRNA 包封硫酸多黏菌素 E

后包封率约为 75%。

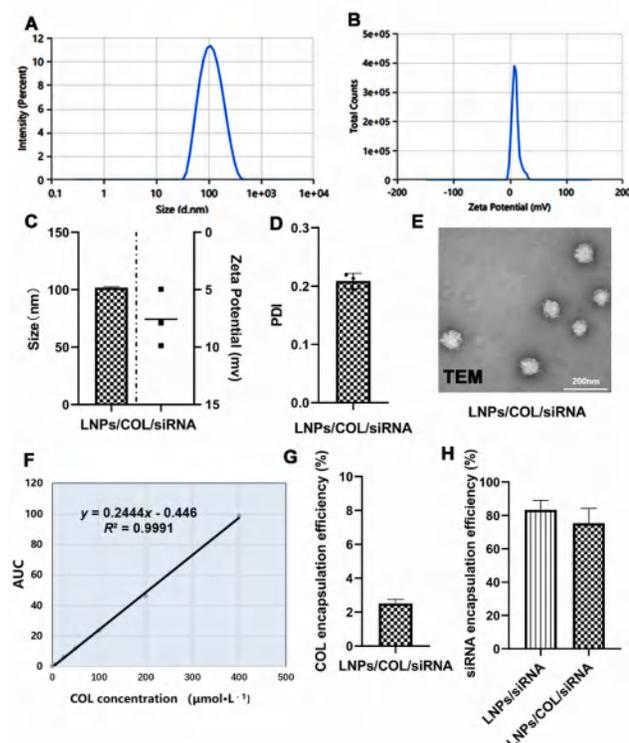


图 1 纳米粒的粒径电位和 PDI (A ~ E) 以及 COL 标准曲线 (F)、包封率 (G)、siRNA 包封率 (H) ($n = 3$)

Fig 1 Size, potential, PDI (A ~ E), and COL standard curve (F), encapsulation efficiency (G), siRNA encapsulation efficiency (H) of nanoparticles ($n = 3$)

2.4 LNPsi/COL/siRNA 纳米粒体外安全性

将 HepG2 细胞和 MCF-7 细胞以 6000 个 / 孔 $200 \mu\text{L}$ 铺于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 加入 OPTI-DMEM 稀释的不同浓度 LNPsi/COL/siRNA-NC 和 LNPsi/siRNA-NC 脂质纳米粒 $100 \mu\text{L}$ / 孔, 对照组加入等体积的培养基, 空白组加入 PBS, 培养 6 h 后, 更换 DMEM 完全培养基孵育 24 h 后吸弃各孔液体, 加入 10% CCK-8 培养基, 继续孵育 1 h。置于酶标仪中, 在 450 nm 波长处测定吸光度 (OD) 值, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = $(\text{给药孔 OD} - \text{空白对照孔 OD}) / (\text{对照孔 OD} - \text{空白对照孔 OD}) \times 100\%$ 。实验结果如图 2A ~ 2B, 纳米粒随着给药浓度从 $25 \sim 150 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加, 毒性稍有增加。但是 LNPsi/siRNA 和 LNPsi/COL/siRNA 的细胞存活率均在 82% 以上, 这表明制剂在 $150 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下浓度有很好细胞安全性。

2.5 LNPsi/COL/siRNA 脂质纳米粒细胞摄取

HepG2 细胞以 2×10^5 个 / 孔铺于 12 孔板中, 培养 24 h 后加入 OPTI-DMEM 稀释的不同浓度 Free FAM-siRNA, LNPsi/FAM-siRNA 和 LNPsi/COL/FAM-siRNA 脂质纳米粒 1 mL / 孔, 对照组加入等体积的培

培养基, 培养 6 h 后吸弃各孔液体加入 200 μL 胰酶消化, 待消化完全, 加培养基终止消化, 吸至 1.5 mL 离心管, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 弃上清液, 重复 2 次, 并使用 300 μL PBS 重悬细胞, 双激光流式细胞仪测量细胞中 FAM 荧光强度, 结果见图 2C, 与游离的 FAM-siRNA 相比, LNP/FAM-siRNA 和 LNP/COL/FAM-siRNA 脂质纳米粒组平均荧光强度提高 3 倍, 说明纳米粒可以有效摄取进入细胞。

2.6 LNP/COL/siRNA 脂质纳米粒 siRNA 溶酶体逃逸

HepG2 和 MCF-7 细胞铺于直径 20 mm 的玻底小皿中, 孵育 24 h 待细胞贴壁后, 加入 OPTI-DMEM 稀释的 LNP/Cy5-siRNA 和 LNP/COL/Cy5-siRNA 脂质纳米粒 1 mL/孔, 继续孵育 6 h。在培养结束前加入 200 mL, 300 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyso Tracker Red 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342 染色 30 min。之后使用 PBS 洗 3 次, 使用甘油-PBS (V/V = 9:1) 封片, 共聚焦进行观察拍摄。结果如图 2D ~ 2E 所示, 在 HepG2 细胞和 MCF-7 细胞中, 给药 6 h 时, 与 LNP/siRNA 脂质纳米粒比较, LNP/COL/siRNA 脂质纳米粒与溶酶体共定位系数降低。同时通过图 2F ~ 2G 可以看到, 在 HepG2 细胞和 MCF-7 细胞中, LNP/COL/siRNA 组细胞中黄色荧光点减少, 出现了明显游离的红色荧光点, 表明 Cy5-siRNA 逃离溶酶体, 而 LNP/siRNA 脂质纳米粒给药组仍可观测到较多的黄色共定位。结果表明, 在这两种肿瘤细胞中, 相比于 LNP/siRNA 脂质纳米粒, LNP/COL/siRNA 脂质纳米粒溶酶体逃逸能力更强, 这可归因于硫酸多黏菌素 E 对溶酶体膜的破坏。

2.7 LNP/COL/siRNA-VEGF 脂质纳米粒的 VEGF mRNA 沉默效应

VEGF 在肿瘤中高度过表达, 与肿瘤细胞的快速增殖、血管新生、侵袭转移等密切相关, 本研究选用靶向 VEGF 的 siRNA 敲低 VEGF 表达来进行研究^[11]。将 HepG2 细胞铺于 12 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁生长, 去除培养基, 加入 OPTI-DMEM 培养基稀释的包含 25 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ siRNA 的 Free/siRNA-VEGF、LNP/COL/siRNA-VEGF、LNP/siRNA-VEGF、LNP/COL/siRNA-NC 和 Lipo/siRNA-VEGF 脂质纳米粒培养, 对照组 (Control) 只加入培养基。培养 6 h, 更换为 DMEM 完全培养基, 孵育 24 h 后, 弃去含抑制剂培养基, 使用 RT-PCR 对 VEGF mRNA 的表达进行测定。结果如图 3A 所示, Lipo/siRNA-VEGF 和 LNP/siRNA-VEGF 相比, LNP/COL/siRNA-VEGF 可以大幅度降低 VEGF mRNA 的表达, 使基因沉默效应

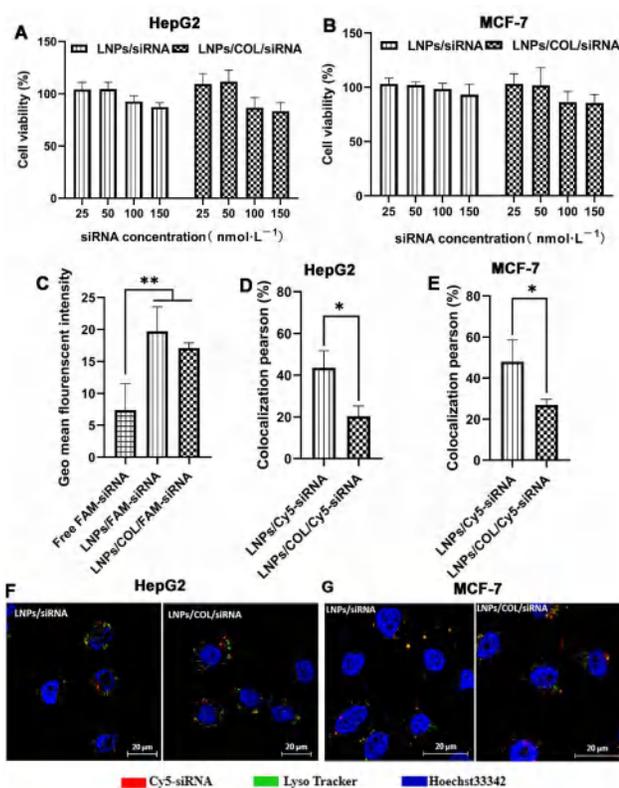


图 2 纳米粒的细胞毒性 (A ~ B)、摄取 (C) 和溶酶体逃逸 (D ~ G) 效应考察 ($n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig 2 Toxicity (A ~ B), uptake (C) and lysosomal escape (D ~ G) of nanoparticles ($n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

提高 1.3 倍。这可能是硫酸多黏菌素 E 的包载促进 siRNA 溶酶体逃逸所导致。

2.8 VEGF 蛋白表达效应

将 HepG2 细胞铺于 6 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁生长, 去除培养基, 加入 OPTI-DMEM 培养基稀释的浓度为 25 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LNP/COL/siRNA-VEGF、LNP/siRNA-VEGF 和 LNP/COL/siRNA-NC 脂质纳米粒, 对照组 (Control) 只加入培养基。转染 6 h 后, 更换为 DMEM 完全培养基培养 24 h, 弃去含抑制剂培养基, 根据 VEGF ELISA 试剂盒测定 VEGF 蛋白。如图 3B 所示, 在蛋白水平方面, 与 Control 组相比, LNP/siRNA-VEGF 和 LNP/COL/siRNA-VEGF 均可以使 VEGF 蛋白表达下降。与 LNP/siRNA-VEGF 相比, LNP/COL/siRNA-VEGF 可以大幅度降低 VEGF 蛋白表达。

2.9 HepG2 细胞增殖效应

VEGF 在肿瘤中高度过表达, 会导致肿瘤细胞的快速增殖, 如果抑制肿瘤细胞增殖会减慢肿瘤发展^[12]。将 HepG2 细胞以 6000 个/孔 200 μL 铺于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 加入 OPTI-DMEM 稀释的不同浓度 LNP/COL/siRNA-VEGF、LNP/siRNA-VEGF 和 LNP/COL/siRNA-NC 脂质纳米粒

100 μL/孔，对照组加入等体积的培养基，空白组加入 PBS，培养 6 h 后，更换 DMEM 完全培养基孵育 48 h 后吸弃各孔液体，加入 10% CCK-8 培养基，继续孵育 1 h。置于酶标仪中，采用 450 nm 波长，测定 OD 值，计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (给药孔 OD - 空白对照孔 OD 值) / 空白对照孔 OD 值 × 100%。如图 3C，与 LNP/siRNA-VEGF (抑制率 64%) 相比，LNP/COL/siRNA-VEGF (抑制率 36%) 可以大幅度抑制 HepG2 细胞增殖，说明硫酸多黏菌素 E 可以提升 VEGF-siRNA 对肿瘤细胞的增殖抑制效应。

2.10 HepG2 细胞凋亡

将 HepG2 细胞铺于 12 孔板中，培养 24 h，待

细胞贴壁生长，去除培养基，加入 OPTI-DMEM 稀释的 LNP/COL/siRNA-VEGF、LNP/siRNA-VEGF 和 LNP/COL/siRNA-NC 脂质纳米粒 6 h 后，更换为 DMEM 完全培养基，孵育 48 h 后根据试剂盒进行凋亡测定操作，最后进行双激光流式细胞仪 (FACS) 检测，Annexin V-FITC 和 PI 荧光。结果如图 3D ~ 3E 所示，Control 组的细胞凋亡率约 2.7% (早调+晚调)，在脂质纳米粒处理组中，细胞凋亡率明显增加，且 LNP/siRNA-VEGF (19.51%) < LNP/COL/siRNA-VEGF (35.17%)，与 LNP/siRNA-VEGF 组 HepG2 细胞凋亡比较，LNP/COL/siRNA-VEGF 组明显增加。证明 LNP/COL/siRNA-VEGF 脂质纳米粒有更好的促肿瘤细胞凋亡作用。

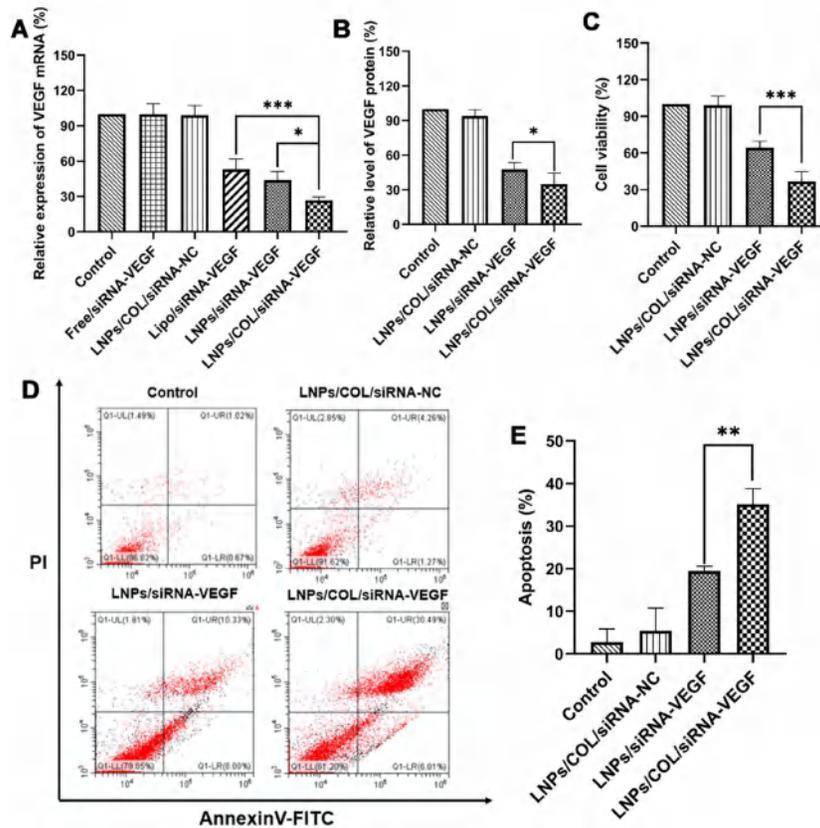


图 3 纳米粒对细胞的 VEGF mRNA (A)、蛋白 (B)、增殖 (C) 与凋亡 (D ~ E) 的影响 (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

Fig 3 Effect of VEGF mRNA (A), protein (B), cell proliferation (C) and apoptosis of nanoparticles (D ~ E) (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

2.11 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 8.0.2 进行计算。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间比较采取单因素方差分析 (One-way ANOVA)，两组之间比较采取 t 检验，P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 讨论

siRNA 可以通过 RNA 干扰现象特异性沉默基因表达，被认为在肿瘤、遗传性、心血管等疾

病中具有潜在的治疗前景 [13-14]，但是基于 LNPs 的递送系统由于溶酶体逃逸能力不足，导致不能达到预期治疗效果 [15]。本研究提出以 LNPs 包载 siRNA 和硫酸多黏菌素 E，构建一体化纳米递送系统，极大地增强了 siRNA 递送效应，并且具有很好的体外安全性。

siRNA 在细胞内逃脱溶酶体的降解，从而能够进入细胞质发挥其功能。为了实现 siRNA 的溶酶体

逃逸^[16], 有文献报道去甲替林、卡维地洛、沙美特罗和氯雷他定可以诱导内体/溶酶体磷脂沉积症(PLD)、溶酶体肿胀。通过游离给药方式可以使葡聚糖纳米凝胶 siRNA 基因沉默提高 1.5 倍^[17]。本文通过 LNPs 包载 siRNA 和硫酸多黏菌素 E, 利用硫酸多黏菌素 E 的破膜作用, 观察到 siRNA 溶酶体逃逸效率大大增加, 使 siRNA 基因沉默效应提高 1.3 倍。

肿瘤细胞中常常存在异常活化或过表达的基因, 这些基因对肿瘤的发生和发展起着重要作用^[18]。通过设计特异性的 siRNA 靶向这些基因, 可以抑制其表达, 从而抑制肿瘤细胞的增殖和生存能力^[19-20]。本研究中, 利用 siRNA-VEGF 抑制 VEGF 的表达, 从而达到抑制肿瘤生长和转移的目的。通过基因和蛋白水平分析, 发现 LNPs/COL/siRNA-VEGF 脂质纳米粒可以有效增强 VEGF mRNA 基因沉默作用, 降低 VEGF 蛋白表达, 并且大大抑制了 HepG2 细胞增殖, 同时与 LNPs/siRNA 相比, 使细胞凋亡增加, 极大地抑制了肿瘤发展。

综上, 本研究成功构建了新的 siRNA 递送系统, 并且验证了其高效 siRNA 递送效应, 且具有很好的肿瘤杀伤能力, 为临床上 siRNA 在肿瘤治疗领域提供了理论基础。

参考文献

- [1] 王小旭, 杜昊洋, 姜美如, 等. 阳离子化白及多糖作为非病毒基因载体的初步研究 [J]. 中南药学, 2023, 21 (3): 612-617.
- [2] Akinc A, Maier MA, Manoharan ANM, et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs [J]. Nat Nanotechnol, 2019, 14 (12): 1084-1087.
- [3] Raguram A, Banskota S, Liu DR. Therapeutic in vivo delivery of gene editing agents [J]. Cell, 2022, 185 (15): 2806-2827.
- [4] Yonezawa S, Koide H, Asai T. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 154-155: 64-78.
- [5] Chatterjee S, Kon E, Sharma P, et al. Endosomal escape: a bottleneck for LNP-mediated therapeutics [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121 (11): 1006-1012.
- [6] Materon IC, Palzkill T. Structural biology of MCR-1-mediated resistance to polymyxin antibiotics [J]. Curr Opin Struct Biol, 2023, 82 (10): 2647-2654.
- [7] Elasyed MAE, Zhong LL, Shen C, et al. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000—2019) [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9 (1): 868-885.
- [8] Simons M, Gogdon E, Claesson-welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17 (10): 611-625.
- [9] 魏佳, 丁晶晶. 抗血管生成药物联合免疫检查点抑制剂治疗晚期非小细胞肺癌的协同作用机制及临床研究的新进展 [J]. 中南药学, 2023, 21 (11): 2990-2995.
- [10] Song YD, Tang C, Yin CH. Combination antitumor immunotherapy with VEGF and PIGF siRNA via systemic delivery of multi-functionalized nanoparticles to tumor-associated macrophages and breast cancer cells [J]. Biomaterials, 2018, 185: 117-32.
- [11] 谢欣, 艾俊涛, 李代洪, 等. 血管内皮生长因子受体靶向性小分子抑制剂治疗非小细胞肺癌研究进展 [J]. 中南药学, 2012, 10 (12): 902-905.
- [12] Zhao Z, LI YK, Shukla R, et al. Development of a biocompatible copolymer nanocomplex to deliver VEGF siRNA for triple negative breast cancer [J]. Theranostics, 2019, 9 (15): 4508-4524.
- [13] Kara G, Calin GA, Ozpolat B. RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 182: 114113.
- [14] Hu B, Zhong LP, Weng YH, et al. Therapeutic siRNA: state of the art [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5 (1): 101-107.
- [15] Xu B, Zhu YJ, Wang CH, et al. Improved cell transfection of siRNA by pH-responsive nanomicelles self-assembled with mPEG-b-PHis-b-PEI copolymers [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10 (26): 21847-21860.
- [16] Yan Y, Wang CH, Cui SH, et al. Enhanced cancer therapeutic efficiency of NO combined with siRNA by caspase-3 responsive polymers [J]. J Control Release, 2021, 339: 506-520.
- [17] Joris F, Debacker L, Vandevyver T, et al. Repurposing cationic amphiphilic drugs as adjuvants to induce lysosomal siRNA escape in nanogel transfected cells [J]. J Control Release, 2018, 269: 266-276.
- [18] Tang Y, Jia CH, Wang Y, et al. Lactate consumption via cascaded enzymes combined VEGF siRNA for synergistic anti-proliferation and anti-angiogenesis therapy of tumors [J]. Adv Healthc Mater, 2021, 10 (19): 2100799.
- [19] Ku SH, Kim K, Choi K, et al. Tumor-targeting multi-functional nanoparticles for siRNA delivery: recent advances in cancer therapy [J]. Adv Healthc Mater, 2014, 3 (8): 1182-1193.
- [20] Anthiya S, Ozturk SC, Yanik H, et al. Targeted siRNA lipid nanoparticles for the treatment of KRAS-mutant tumors [J]. J Control Release, 2023, 357: 67-83.

(收稿日期: 2024-07-05; 修回日期: 2024-09-06)

阿霉素介孔纳米粒的制备工艺优化及质量评价研究

杨倩¹, 窦欣¹, 冯玉琦¹, 刘丹¹, 乔赛^{2*} (1. 陕西能源职业技术学院, 陕西 咸阳 712000; 2. 空军军医大学, 西安 710000)

摘要: 目的 优化负载阿霉素 (DOX) 的唑来膦酸钙包覆介孔聚多巴胺 (MPDA-capzol-DOX) 纳米粒的制备工艺, 并对其进行质量评价。方法 采用“一锅法”制备 MPDA-capzol-DOX 纳米粒, 基于单因素试验结果, 通过响应面法优化制备工艺, 通过测定纳米粒的粒径、Zeta 电位、包封率、体外释药行为、pH 响应性进行质量评价。结果 MPDA-capzol-DOX 纳米粒的最优处方为: 介孔聚多巴胺浓度为 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 氯化钙的投入量为 55 mg, 唑来膦酸的投入量为 35 mg。制备工艺优化为: 包覆唑来膦酸钙的搅拌时间为 3.5 h。优化后测得纳米粒的粒径为 $(213 \pm 1.2) \text{ nm}$, PDI 为 (0.204 ± 0.014) , Zeta 电位为 $(-19.15 \pm 0.32) \text{ mV}$, 包封率为 $(95.24 \pm 1.25) \%$, 载药量为 $(6.24 \pm 0.05) \%$ 。透射电镜观察其外观呈规则圆球形态, 分散均匀。体外释药结果表明纳米粒具有缓释释放性能和 pH 响应性。结论 工艺优化后所制备的 MPDA-capzol-DOX 纳米粒理化性质良好, 为 DOX 载药介孔纳米粒的制备研究提供理论基础。**关键词:** 阿霉素; 唑来膦酸钙; 介孔聚多巴胺纳米粒; 制备工艺; 质量评价

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0622-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.007

Optimization of preparation technology and quality evaluation of doxorubicin-loaded mesoporous nanoparticles

YANG Qian¹, DOU Xin¹, FENG Yu-qi¹, LIU Dan¹, QIAO Sai^{2*} (1. Shaanxi Energy Institute, Xianyang Shaanxi 712000; 2. Air Force Medical University, Xi'an 710000)

Abstract: Objective To prepare the mesoporous polydopamine nanoparticles coated with calcium zoledronic acid loaded with doxorubicin (MPDA-capzol-DOX NPs), to optimize the preparation and evaluate their quality. **Methods** MPDA-capzol-DOX NPs were prepared by “one-pot method”. Based on the single-factor experiments, the preparation was optimized with the response surface method. The quality of the nanoparticles was evaluated by measuring the particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency, in vitro drug release behavior, and pH responsiveness. **Results** The optimal formulation of MPDA-capzol-DOX NPs was as follows: the concentration of mesopore polydopamine was $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the mass input of calcium chloride was 55 mg, and the mass input of zoledronic acid was 35 mg. The preparation was optimized by adjusting: the stirring time of zoledronate-coated calcium is 3.5 h. After the optimization, the particle size of the nanoparticles was $(213 \pm 1.2) \text{ nm}$, the PDI was (0.204 ± 0.014) , the Zeta potential was $(-19.15 \pm 0.32) \text{ mV}$, the encapsulation rate was $(95.24 \pm 1.25) \%$, and the drug loading was $(6.24 \pm 0.05) \%$. Transmission electron microscope showed regular spherical appearance and uniform dispersion. The in vitro drug release showed that the nanoparticles had slow release and pH (5.0) response. **Conclusion** The optimized MPDA-capzol-DOX NPs possess good physicochemical properties, providing a theoretical basis for the preparation of doxorubicin drug-loading mesoporous nanoparticles.

Key words: doxorubicin; calcium zoledronate; mesoporous polydopamine nanoparticle; preparation technology; quality evaluation

基金项目: 陕西省教育厅科学研究项目 (No.23JK0377); 陕西能源职业技术学院校级自然科技项目 (No.2022KY16KJPQN)。

作者简介: 杨倩, 女, 讲师, 主要从事纳米药物递送系统的研究, email: Qianyang033@163.com *通信作者: 乔赛, 女, 讲师, 主要从事纳米药物递送系统的研究, email: qssai@126.com

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是一类广谱抗肿瘤药物, 广泛应用于肺癌、乳腺癌、卵巢癌等疾病的治疗^[1-2]。然而, 其严重的毒副作用如心脏毒性、肾毒性、呕吐等限制了临床应用。因此, 降低 DOX 的毒副作用是临床亟待解决的关键问题。目前, 纳米给药系统的应用受到广泛关注^[3-4], 与传统药物相比, 可显著提高化合物生物利用度、靶向性以及减轻药物毒性作用, 从而改善药物的生物特性^[5]。常见的纳米载体包括脂质体、聚合物胶束、树状大分子等。

相较于脂质体、胶束等药物载体, 多孔纳米材料因其负载率高、结构可调控、表面改性位点丰富等优势被广泛应用^[6-7]。其中介孔聚多巴胺 (MPDA) 具有多孔结构、生物相容性优良、制备工艺简单、成本低等特点, 且制备的纳米载体具有缓释性能^[8-9], 是一种理想的药物载体。研究表明, 孔隙结构的 MPDA 具有高效的载药能力, DOX 与 MPDA 可通过 π - π 堆积介导的物理吸附作用负载于介孔材料孔隙内。此外, MPDA 具有较强的黏附性, 易于合成和修饰^[10-11], MPDA 纳米粒粒径小且比表面积高, 可显著提高化合物的溶出度及生物利用度^[12]。

唑来膦酸 (zoledronic acid, Zol) 是一种水溶性较强的双膦酸盐类药物, 在临床中应用于骨病的治疗^[13-14]。Zol 可通过直接影响破骨细胞的形成过程, 减轻由于癌症诱导的骨侵蚀, 并降低骨转移的相关风险^[15]。此外, Zol 结构中的咪唑侧链上具有 2 个氮原子, 与骨质中的羟基磷灰石有很高的亲和力, 可以快速、选择性地吸附于骨组织中^[16-17], 具有良好的骨组织靶向性。Zol 还可以抑制骨髓腔内肿瘤的侵袭、增殖以及肿瘤细胞对骨基质的黏附^[18]。前期研究中我们发现 Zol 与钙离子结合形成的唑来膦酸钙具有酸敏特性, 可在肿瘤的微酸性环境中促进药物的释放, 传统的化疗药物 (例如多西他赛、羟喜树碱等) 由于骨组织的血流量低、药物渗透性差^[19-22], 需要高剂量和高频次给药才能达到有效治疗浓度, 但常引起严重的不良反应。利用 Zol 与化疗药物结合, 既能够抑制肿瘤细胞和破骨细胞, 又能够通过微环境响应性调节药物的释放, 显著减少不良反应。

因此, 本研究通过制备介孔 MPDA 纳米粒来递送 DOX, 利用氯化钙 (CaCl_2)、Zol 及磷酸氢二铵结合形成唑来膦酸钙, 包覆于 MPDA 表面, 使其具备缓释以及 pH 响应性能。通过响应面法优化制备工艺, 并对其进行质量评价, 为开发新型包载 DOX 介孔纳米粒的制备研究提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

UM-4T 磁力搅拌器 (德国 Wiggins 公司); KQ5200DB 数控超声波清洗器 (昆明市超声仪器有限公司); 纳米粒度分析仪 (济南微纳公司); LGJ-10C 真空冷冻干燥机 (北京四环起航); UV-650 型紫外可见分光光度计 (上海美普达仪器有限公司); 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 透析袋 (美国 Viskase 公司); 透射电镜 (日本 JEOLJEM-F200); 扫描电镜 (德国 ZEISS Sigma 300); pH 计 (雷磁 PHS-2F)。

1.2 试剂

DOX (上海麦克林生化科技有限公司); Pluronic (R) F-127 试剂 (Sigma-Aldrich); Zol、盐酸多巴胺、1, 3, 5-三甲苯 (TMB) (安耐吉化学有限公司); CaCl_2 、磷酸氢二铵 (天津大茂有限公司); 乙醇溶液、盐酸溶液 (分析纯, 富宇试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 DOX 含量的测定

2.1.1 DOX 紫外检测波长的选择 取适量 DOX 溶于乙醇溶液, 用紫外分光光度计在 200 ~ 600 nm 内扫描, 确定 DOX 检测波长为 497 nm。

2.1.2 线性关系和方法学考察 分别配制不同浓度 DOX 乙醇溶液在 497 nm 波长下吸光度值, 得标准曲线 $A = 0.0149C + 0.00132$, $r = 0.9999$, 线性范围为 1 ~ 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。低、中、高浓度 (5、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 DOX 乙醇溶液日内精密度的 RSD 分别为 1.4%、0.58%、1.2% ($n = 3$), 日间精密度的 RSD 分别为 1.5%、0.35%、1.7% ($n = 3$), 平均回收率分别为 102.6%、101.7%、100.3%, RSD 分别为 1.4%、0.60%、1.3% ($n = 3$), 结果表明本方法的仪器精密度和回收率良好。

2.2 MPDA-capzol-DOX 纳米粒的制备

MPDA 的制备基于文献报道的“一锅法”^[23]: 称取泊洛沙姆 (F127, 500 mg) 与盐酸多巴胺 (150 mg) 于圆底烧瓶中, 加入乙醇水溶液 (1:1, V/V), 加入 TMB 适量, 超声 10 min 后, 置于磁力搅拌器中搅拌 15 min, 加入氨水调节 pH 至 8.5, 反应一定时间后, 离心 3 次 (15 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$), 冻干得 MPDA。称取 MPDA 粉末 (40 mg) 溶于纯化水 (10 mL) 中, 在圆底烧瓶中搅拌溶解, 随后加入 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DOX 溶液, 反应 12 h, 离心去除上清液, 将沉淀重悬于蒸馏水中, 加入 CaCl_2 (40 mg)、磷酸氢二铵 (10 mg)、Zol (30 mg), 搅拌 2 h, 得到载 DOX 的 MPDA-capzol 纳米粒 (MPDA-capzol-DOX NPs) 溶液。

2.3 包封率和载药量的测定

通过超滤离心法测定^[24]。取定量的 MPDA-capzol-DOX NPs 溶液, 置于截留分子量为 100 kD 的

超滤离心管中，离心 30 min (4 °C, 12 000 r·min⁻¹)，取分离下来的游离药物溶液，用乙醇水溶液 (1 : 1, V/V) 稀释 2 倍，按“2.1”项下方法，采用紫外分光光度法测定药物的含量，测得游离 DOX 的含量。同时取 MPDA-capzsol-DOX NPs 溶液，加入等体积盐酸，采用紫外分光光度计进行分析，测得 DOX 总含量，计算包封率 (EE%) 和载药量 (DL%)。

$$EE\% = (W_2 - W_1/W_2) \times 100\%$$

$$DL\% = (W_3/W_4) \times 100\%$$

其中， W_1 为测得游离 DOX 的含量， W_2 为纳米粒溶液中 DOX 的总含量， W_3 为纳米粒中包封 DOX 的总含量， W_4 为 MPDA-capzsol 的总质量。

2.4 单因素考察 MPDA-capzsol-DOX NPs 处方及制备工艺

根据前期预试验结果，制备方法同“2.2”项下，

固定其他条件不变，通过单因素试验分别考察 Zol 投入量 (10、20、30、40、50、60 mg)、CaCl₂ 投入量 (35、40、45、50、55、60 mg)、MPDA 浓度 (0.35、0.5、0.65、0.8、0.95、1.1 mg·mL⁻¹)、搅拌时间 (1、3、5、7、9、11 h) 对 MPDA-capzsol-DOX NPs 包封率的影响。

由图 1A 可知，当 Zol 投入量为 30 mg 时，MPDA-capzsol 的包封率最大，为 61.33%。图 1B 结果表明，CaCl₂ 投入量比对包封率影响较大，当 CaCl₂ 投入量为 50 mg 时，包封率为 91.33%，随着 CaCl₂ 增加，包封率呈减小的趋势。由图 1C 可知，当 MPDA 浓度为 0.65 mg·mL⁻¹ 时，包封率最大，为 81.42%。由图 1D 可知，随着搅拌时间的延长，纳米粒的包封率呈现先增大后减小，且当搅拌时间为 3 h 时，包封率最大，为 82.58%。

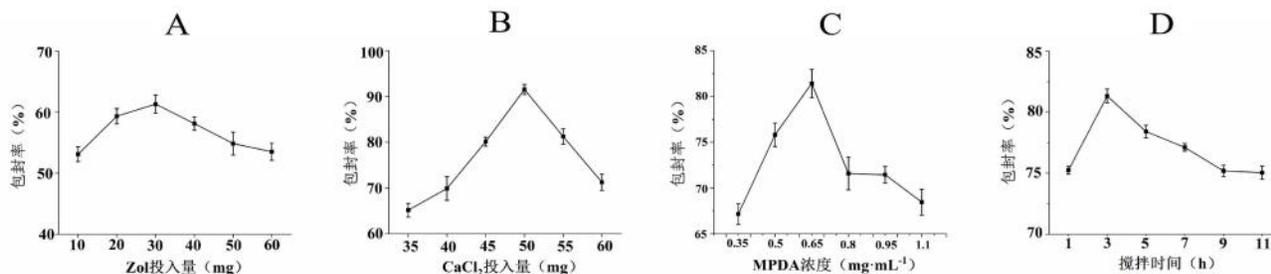


图 1 不同因素对 MPDA-capzsol-DOX NPs 包封率的影响

Fig 1 Effect of different factors on the encapsulation rate of MPDA-capzsol-DOX NPs

2.5 Box-Benhnken 响应面法优化最佳处方

2.5.1 试验设计方案及结果 在“2.4”项下单因素试验的基础上，选取对 MPDA-capzsol NPs 包封率影响显著的 4 个因素，即 Zol 投入量 (A)、CaCl₂ 投入量 (B)、MPDA 浓度 (C)、搅拌时间 (D) 为自变量，以包封率作为指标设计三水平四因素的响应面试验进行优化 (见表 1)。根据试验设计方案测定不同条件下 MPDA-capzsol NPs 的包封率，结果见表 2，其中试验号 25、26、27 用于衡量误差分析^[25]。结果最优处方为：Zol 投入量为 30 mg，CaCl₂ 投入量 50 mg，MPDA 浓度为 0.65 mg·mL⁻¹，搅拌时间为 3 h。

表 1 响应面设计水平和因素

Tab 1 Level and factor for response surface design

水平	因素			
	A.Zol 投入量 /mg	B. CaCl ₂ 投入量 /mg	C.MPDA 浓度 / (mg·mL ⁻¹)	D. 搅拌 时间 /h
- 1	20	50	0.5	1
0	30	55	0.65	3
1	40	60	0.8	5

2.5.2 模型拟合及方差分析 利用 Design Expert 13 软件，以试验变量为自变量，以包封率为响应值进行多元回归拟合，得到二次多项回归方程： $Y = 96.53 - 0.95A + 0.44B + 0.75C + 1.16D - 0.14AB - 1.15AC - 0.19AD + 0.82BC - 0.28BD + 0.67CD -$

$1.74A^2 - 1.07B^2 - 2.38C^2 - 1.76D^2$ 。方差分析结果见表 3，模型 P 值小于 0.0001，且失拟项 P 值大于 0.05，说明该模型方程拟合度好，可用于对制备工艺进行分析和预测；由各因素对包封率的影响可知， A 、 C 、 D 对包封率影响极显著 ($P < 0.01$)， B 对包封率影响显著 ($P < 0.05$)，且二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对包封率的影响均为显著，说明这 4 个因素对包封率具有非线性的影响 (见图 2)。得出制备工艺对包封率的影响程度为搅拌时间 > MPDA 浓度 > Zol 投入量 > CaCl₂ 投入量。

2.5.3 响应面优化与工艺验证 为了进一步研究不同因素之间的交互作用及最优工艺处方参数，由 Design Expert 13 软件对试验进行优化，得到最优工艺处方参数：MPDA 浓度为 0.66 mg·mL⁻¹、Zol 投入量为 35.52 mg、CaCl₂ 投入量为 55.83 mg、搅拌时间为 3.60 h，包封率为 95.66%。为了确定该模型的准确性，采用优化后的参数进行验证试验，为方便操作，条件参数设为 MPDA 浓度为 0.70 mg·mL⁻¹、Zol 投入量为 35 mg、CaCl₂ 投入量为 55 mg、搅拌时间为 3.5 h，按“2.3”项下方法进行检测，该条件下重复试验 3 次，通过计算得到 $EE\%$ 为 (95.24 ± 1.25)%，与预测值相近， $DL\%$ 为 (6.24 ± 0.05)%，说明该模型优化得到的工艺参数可靠，可用于制备处方优化。

表 2 BBD 响应面试验设计与结果

No.	A	B	C	D	EE/%
1	-1	-1	0	0	93.78
2	1	-1	0	0	92.25
3	-1	1	0	0	95.31
4	1	1	0	0	93.22
5	0	0	-1	-1	91.35
6	0	0	1	-1	90.89
7	0	0	-1	1	92.38
8	0	0	1	1	94.6
9	-1	0	0	-1	93.22
10	1	0	0	-1	91.15
11	-1	0	0	1	95.75
12	1	0	0	1	92.89
13	0	-1	-1	0	92.47
14	0	1	-1	0	91.84
15	0	-1	1	0	93.14
16	0	1	1	0	95.78
17	-1	0	-1	0	91.16
18	1	0	-1	0	92
19	-1	0	1	0	94.79
20	1	0	1	0	91.05
21	0	-1	0	-1	91.84
22	0	1	0	-1	92.77
23	0	-1	0	1	94.86
24	0	1	0	1	94.69
25	0	0	0	0	96.32
26	0	0	0	0	96.11
27	0	0	0	0	97.15

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	85.68	14	6.12	22.14	< 0.0001
A	10.39	1	10.39	39.52	0.0001
B	2.31	1	2.31	8.38	0.0135
C	6.83	1	6.83	24.69	0.0003
D	16.22	1	16.22	58.66	< 0.0001
AB	0.07	1	0.28	0.28	0.6041
AC	5.24	1	5.24	18.97	0.0009
AD	0.16	1	0.16	0.56	0.4670
BC	2.67	1	2.67	9.67	0.0090
BD	0.30	1	0.30	1.09	0.3169
CD	1.80	1	1.80	6.50	0.0255
A ²	16.17	1	16.17	58.49	< 0.0001
B ²	6.09	1	6.09	22.04	0.0005
C ²	30.24	1	30.24	109.39	< 0.0001
D ²	16.59	1	16.59	60.01	< 0.0001
残差	3.32	12	0.28		
失拟项	2.71	10	0.27	0.89	0.6345
纯误差	0.60	2	0.3024		
总和	89.00	26			

2.6 纳米粒的质量评价

2.6.1 激光粒度检测分析 取 MPDA-capzol-DOX NPs 溶液适量, 用纳米粒度分析仪测得粒径结果如图 3, 粒径为 (213 ± 1.2) nm, PDI 为 (0.204 ± 0.014) 。测得其 Zeta 电位为 (-19.15 ± 0.32) mV。表明制备

的纳米粒粒径均匀, 且分散性较好。

2.6.2 纳米粒形态分析 精密移取 MPDA-capzol-DOX NPs 溶液 10 μ L, 将其滴在干净的铜网上, 静置一段时间后用滤纸吸去多余的液体, 加 2% 的磷钨酸复染, 静置干燥后在透射电镜 (TEM) 下观察外观形态并拍照, 如图 4A, 结果显示 MPDA-capzol-DOX NPs 呈球形, 分散均一。扫描电镜 (SEM) 观察被测物的形貌, 结果如图 4B 所示, 纳米粒形态为大小均一的球形粒子。

2.6.3 稳定性试验 将 MPDA-capzol-DOX NPs 冻干粉末分散于 pH 为 7.4 的 PBS 溶液中, 采用纳米粒度仪测定纳米粒的粒径、PDI、Zeta 电位变化 ($n = 3$)。结果表明, 纳米粒溶液在室温条件下 7 d 内粒径、电位均没有发生显著性变化, 说明制备工艺优化后所得的 MPDA-capzol-DOX NPs 稳定性良好 (见图 5)。

2.6.4 纳米粒的 pH 响应性 为了模拟肿瘤微环境, 将 MPDA-capzol-DOX NPs 冻干粉末分散于 pH 为 5.0 的 PBS 溶液中, 分别在 4、10 h 采用纳米粒度测定仪测定粒径的变化。结果表明, 随着时间的延长, 粒径逐渐变大, 4 h 粒径由 231 nm 增加至 387 nm, 10 h 粒径为 548 nm, 但粒径累积量减少 (见图 6A、6B)。同时, 在 4、10 h 吸取液体滴于铜网上, 采用 TEM 观察酸性条件下 (pH 5.0) 纳米粒的形态, 如图 6C、6D 所示, 4 h 时纳米粒呈球形但粒径逐渐增大, 10 h 时部分纳米粒在酸性条件下逐渐解体, 此结果表明 MPDA-capzol-DOX NPs 具有酸敏特性。

2.6.5 体外释药试验 分别将 MPDA-capzol-DOX NPs 分散在 2 mL 不同 pH 的 PBS 溶液中, 置于透析袋中 (10 kDa), 37 $^{\circ}$ C 的恒温振荡器中恒速 (100 $r \cdot \text{min}^{-1}$) 搅拌。于 0、0.5、1、3、5、8、12、24、36、48 h 各取 1.0 mL 溶液离心取上清液, 再加等量的 PBS 溶液。用紫外可见分光光度计测定上清液在 497 nm 处的吸光度, 计算纳米粒中 DOX 的含量。如图 7 所示, 游离 DOX 在 pH 7.4 的 PBS 溶液中, 5 h 累计释放率为 (81.42 ± 2.50) %, 而 MPDA-capzol-DOX NPs 在 pH 7.4 的 PBS 溶液中 DOX 释放缓慢, 48 h 累计释药量为 (45.24 ± 1.23) %, 表明制备的纳米粒具有缓释作用。此外, 在 pH 5.0 条件下 MPDA-capzol-DOX NPs 在 48 h 内 DOX 累计释药量为 (72.11 ± 2.04) %, 显著高于在 pH 7.4 条件下的累计释药量, 说明 MPDA-capzol-DOX NPs 具有 pH 响应特性。

3 讨论

本研究将 Zol 修饰于负载 DOX 的 MPDA 表面, 通过响应面法, 以包封率为指标对 MPDA-capzol-DOX 纳米粒的制备工艺进行优化, 制备所得的 MPDA-capzol-DOX NPs 粒径为 (213 ± 1.2) nm, PDI

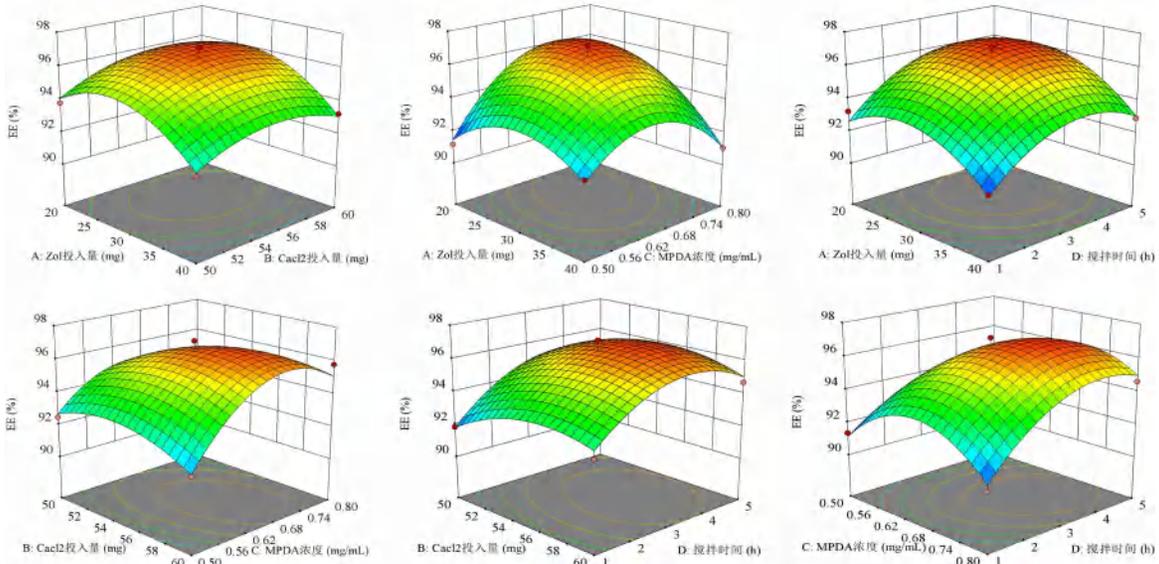


图 2 各因素交互作用的影响面

Fig 2 Response surface of interactions between each factor

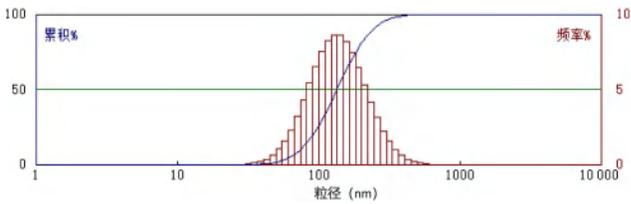


图 3 MPDA-capzol-DOX NPs 粒径图

Fig 3 Size distribution of MPDA-capzol-DOX NPs

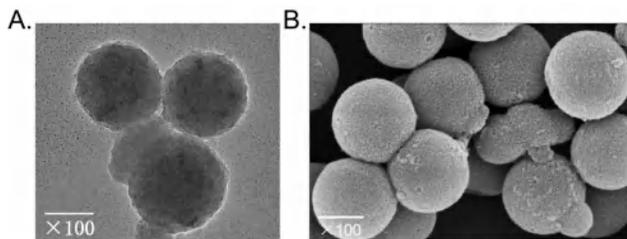


图 4 MPDA-capzol-DOX NPs 的 TEM 图 (A) 和 SEM 图 (B)

Fig 4 TEM (A) and SEM (B) of MPDA-capzol-DOX NPs

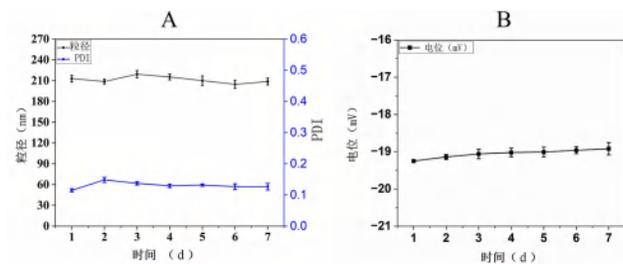


图 5 MPDA-capzol-DOX NPs 的稳定性

Fig 5 Stability of MPDA-capzol-DOX NPs

为 (0.204 ± 0.014) , 电位为 (-19.15 ± 0.32) mV, $EE\%$ 为 $(95.24 \pm 1.25)\%$, $DL\%$ 为 $(6.24 \pm 0.05)\%$ 。TEM 和 SEM 显示其形貌呈球形, 分散均一, 符合纳米递送系统要求^[26]。稳定性试验表明, MPDA-capzol-DOX NPs 在常温条件下储存 7 d 后粒径、电位没有发生显著变化, 且电位呈现负值, 说明纳米粒所带的负电荷能够使其在放置过程中不易发生

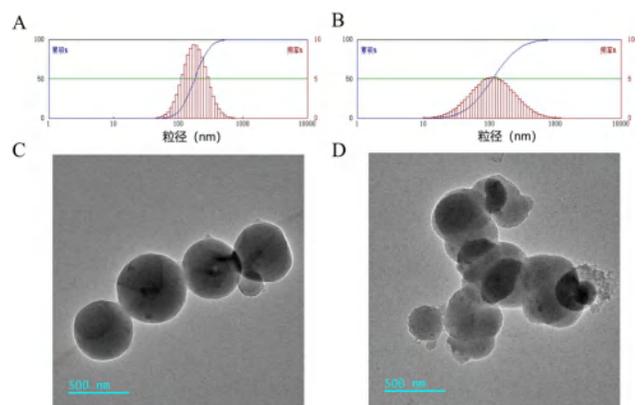


图 6 MPDA-capzol-DOX NPs 的 pH 响应特性

Fig 6 pH responsiveness of MPDA-capzol-DOX NPs

A、B. 在 pH 5.0 条件下 4、10 h 后的粒径分布图 (particle size distributions at pH 5.0 for 4 h and 10 h); C、D. 在 pH 5.0 条件下 4、10 h 后的 TEM 图 (TEM at pH 5.0 for 4 h and 10 h)

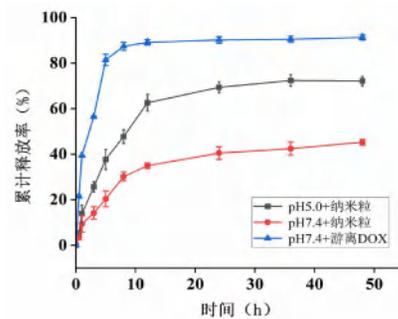


图 7 游离 DOX 及 MPDA-capzol-DOX NPs 的体外释放度

Fig 7 In vitro release degree of DOX and MPDA-capzol-DOX NPs

聚集^[27]。体外释放试验结果表明, MPDA-capzol-DOX NPs 具有缓释特性和 pH 响应特性, 与游离 DOX 相比, MPDA-capzol-DOX NPs 48 h 内累计释药量为 $(72.11 \pm 2.04)\%$, 而游离 DOX 5 h 累计释放率为 $(81.42 \pm 2.50)\%$, 表明 MPDA-capzol-DOX

纳米粒具有缓释作用。此外,在酸性环境 MPDA-capzol-DOX NPs 的释药量显著高于生理环境;TEM 结果也显示,MPDA-capzol-DOX 纳米粒在酸性环境下随时间推移粒径变大,说明部分解体,表明 MPDA-capzol-DOX NPs 在肿瘤微酸环境中能够有效释放 DOX,提高 DOX 在肿瘤组织中的蓄积。

综上所述,本研究制备所得的 MPDA-capzol-DOX NPs 分布均匀、分散性良好,具有较高的载药量和包封率,稳定性良好且具有 pH 响应特性,为新型包载 DOX 介孔纳米粒的制备研究提供理论依据和数据支撑。

参考文献

- [1] Rony AS, Urip HR, Aminah D, et al. The role of flavonoids as a cardioprotective strategy against doxorubicin induced cardiotoxicity [J]. *Molecules*, 2022, 27 (4): 1320.
- [2] Chen R, Niu MW, Hu X, et al. Targeting mitochondrial dynamics proteins for the treatment of doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 3 (10): 1241225.
- [3] Zhao HB, Jing Y, Zhang RH, et al. Doxorubicin pro-drug-based nanomedicines for the treatment of cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 258: 115612.
- [4] Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin; an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems [J]. *J Pharm Pharmacology*, 2013, 65 (2): 157-170.
- [5] Zhu LS, Mei L. The synthesis of nano doxorubicin and its anticancer effect [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21: 2466-2477.
- [6] Khalil M, Kadja GTM, Ilmi M. Advanced nano materials for catalysis: current progress in fine chemical synthesis, hydro-carbon processing, and renewable energy [J]. *J Ind Eng Chem*, 2021, 93: 78-100.
- [7] Fang XL, Zhao XJ, Fang WJ, et al. Self templating synthesis of hollow mesoporous silica and their applications in catalysis and drug delivery [J]. *Nanoscale*, 2013, 5 (6): 2205-2218.
- [8] Xu C, Lei C, Wang Y, et al. Dendritic meso porous nanoparticles: structure, synthesis and properties [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61 (12): 2021-2035.
- [9] Teng ZG, Han YD, Li J, et al. Preparation of hollow meso porous silica spheres by a sol-gel/emulsion approach [J]. *Micropor Mesopor Mat*, 2010, 127 (1-2): 67-72.
- [10] 王旭阳, 汪颖军, 所艳华. 介孔材料的制备及其催化应用的研究进展 [J]. *化学与粘合*, 2020, 42 (5): 383-387.
- [11] Yuan SD, Hu KP, Luo Y, et al. Preparation and characterization of a new porous material with high specific surface area [J]. *J Wuhan Univ Technol*, 2013, 35 (3): 15-19.
- [12] Du JZ, Chen YM, Zhang YH, et al. Organic/inorganic hybrid vesicles based on a reactive block copolymer [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125 (48): 14710-14711.
- [13] Liu YL, Ai KL, Lu LH. Poly dopamine and its derivative materials: synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields [J]. *Chem Rev*, 2014, 114 (9): 5057-5115.
- [14] Chen F, Xing YX, Wang ZQ, et al. Nano scale poly dopamine (PDA) meets π - π interactions: an interface-directed coassembly approach for meso porous nano particles [J]. *Langmuir*, 2016, 32 (46): 12119-12128.
- [15] Zheng XY, Li HW, Zhai ZJ, et al. Zoledronic acid: pleiotropic anti-tumor mechanism and therapeutic outlook for osteosarcoma [J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19 (5): 409-421.
- [16] Antoine F, Jeanny B, Ching A. Zoledronic acid for the treatment of prostate cancer [J]. *Expert Opin Pharmacol*, 2019, 20 (6): 657-666.
- [17] Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy [J]. *Osteoporosis Int*, 2008, 19 (6): 733-759.
- [18] 黄晓林, 廖健, 洪伟, 等. 破骨细胞形成过程中唑来膦酸的作用途径及机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23 (17): 2716-2721.
- [19] Kohno N, Aogi K, Minami H, et al. Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: a randomized, placebo-controlled trial [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (15): 3314-3321.
- [20] Wang JL, Li BC, Li ZJ, et al. Electro polymerization of dopamine for surface modification of complex-shaped cardiovascular stents [J]. *Biomaterials*, 2014, 35 (27): 7679-7689.
- [21] Saad F, Brown J, Van PC, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases [J]. *Ann oncol*, 2012, 23 (5): 1341-1347.
- [22] Huang YG, Xiao ZG, Guan ZL, et al. Bone-seeking nano platform co-delivering cisplatin and zoledronate for synergistic therapy of breast cancer bone metastasis and bone resorption [J]. *Acta Pharm*, 2020, 10 (12): 2384-2403.
- [23] Zhu YF, Ling JH, Xu XY, et al. Redox and pH dual sensitive carboxymethyl chitosan functionalized poly dopamine nanoparticles loaded with doxorubicin for tumor chemo-photothermal therapy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023 (240): 124488.
- [24] 毛艳婷, 马姝丽, 白朝辉, 等. 木犀草素纳米结构脂质载体及其冻干粉制备和体外释药研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40 (23): 2423-2429.
- [25] 贾文, 丁文华, 汪凯康, 等. 白杨素脂质体的制备工艺优化及抗神经炎症活性研究 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (4): 864-870.
- [26] Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, et al. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (26): 10058-10063.
- [27] Tong B, Andrea G, Julius G, et al. Electrostatic co-assembly of nanoparticles with oppositely charged small molecules into static and dynamic superstructures [J]. *Nat Chem*, 2021, 13 (10): 940-949.

(收稿日期: 2024-07-07; 修回日期: 2024-08-09)

基于网络药理学技术探究雪莲注射液抗 类风湿关节炎的作用及机制研究

顾春宇, 王亦巍, 康建英, 颜丽珊, 邱新宇, 罗赣, 张翼* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 探究雪莲注射液 (XLI) 治疗类风湿关节炎 (RA) 的作用及其机制。**方法** 采用网络药理学预测 XLI 治疗 RA 的活性成分、作用靶点和信号通路, 选择活性成分与靶点基因通过分子对接技术进行验证。建立脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 炎症细胞模型, 给予不同浓度的 XLI 进行治疗。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测炎症因子 *TNFA*、*IL-1B* 和 *MCP-1* 基因的表达。采用蛋白免疫印迹法检测核心靶点 COX2、eNOS、p-AKT 和 AKT 的表达水平。建立弗氏完全佐剂 (CFA) 诱导的 RA 大鼠模型, 给予不同浓度的 XLI 进行治疗并收集血清, 采用非靶向代谢组学技术检测血清代谢物的水平。**结果** 网络药理学筛选出 XLI 治疗 RA 的 17 个潜在活性成分和 165 个潜在作用靶点, 蛋白互作网络核心靶点为炎症因子, GO 和 KEGG 富集分析涉及 MAPK、NF- κ B、FoxO 等多条信号通路。体外实验显示 XLI 能明显降低巨噬细胞 *TNFA*、*IL-1B* 和 *MCP-1* 基因的表达, 并降低 COX2、eNOS 和 p-AKT 蛋白表达水平。血清非靶向代谢组学显示 XLI 主要改变了花生四烯酸氧基蛋白代谢通路、鞘脂在内质网和高尔基体中的代谢、白三烯 C4 合成不足、罗非昔布和水杨酸钠药物的作用途径, 并明显下调血清 5, 6-环氧二十碳三烯酸 (5, 6-EET)、12S-羟基十七碳三烯酸 (12S-HHT)、血栓素 B2 (TXB2)、12-oxo-5Z, 8Z, 10E, 14Z-二十碳四烯酸 (12-KETE)、二氢鞘氨醇、3-脱氢鞘氨醇、8-异前列腺素 A1 (8-iso-PGA1) 的水平。**结论** XLI 治疗 RA 的作用机制可能与其抑制巨噬细胞 *TNFA*、*IL-1B* 和 *MCP-1* 基因的表达, 抑制 COX2、eNOS 和 p-AKT 蛋白的表达及花生四烯酸代谢通路有关。

关键词: 雪莲注射液; 类风湿关节炎; 网络药理学; RAW264.7 细胞; 血清代谢组学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0628-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.008

Mechanism of Xuelian injection for rheumatoid arthritis based on network pharmacology

GU Chun-yu, WANG Yi-wei, KANG Jian-ying, YAN Li-shan, QIU Xin-yu, LUO Gan, ZHANG Yi* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Xuelian injection (XLI) in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The active ingredients, targets and signal pathways of XLI for RA were predicted with network pharmacology, and the active ingredients and target genes were verified by molecular docking. RAW264.7 cells were induced by lipopolysaccharide (LPS), and then treated with different concentrations of XLI. Real-time quantitative fluorescent PCR (qRT-PCR) was used to detect the gene expression of inflammatory cytokines, including *TNFA*, *IL-1B*, and *MCP-1*. The expression levels of the core targets COX2, eNOS, p-AKT and AKT were detected by Western blot. The arthritis model of rat induced by Fraulein complete adjuvant (CFA) was established and then treated with different concentrations of XLI. The metabolites change in the serum were detected by non-targeted metabolomics. **Results** Totally 17 potential active ingredients and 165 potential targets of XLI for RA were screened by network pharmacology. The core targets

基金项目: 2017 年度基本科研业务费项目 (青年教师) (No.2017-JYB-JS-057)。

作者简介: 顾春宇, 女, 硕士研究生, 主要从事中药防治代谢性疾病的药理研究, email: guchunyu2001@163.com * 通信作者: 张翼, 男, 副教授, 主要从事中药防治代谢性及呼吸系统疾病的药理研究, email: yizhang714@163.com

of protein-protein interaction network were inflammation mediators. GO and KEGG enrichment analysis involved many signaling pathways, such as MAPK, NF- κ B, and FoxO. The expression of *TNFA*, *IL-1B*, and *MCP-1*, and the expression levels of COX2, eNOS and p-AKT proteins in LPS-induced RAW264.7 cells were decreased after the XLI treatment. Non-targeted metabolomics in the serum showed that XLI mainly changed the metabolic pathways of arachidonic acid oxy protein, sphingolipid metabolism in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, leukotriene C4 synthesis insufficiency, and metabolic pathways of rofecoxib, sodium salicylate action pathways in RA rats. XLI significantly reduced the serum levels of 5, 6-EET, 12S-HHT, thromboxane B2 (TXB2), 12-oxo-5Z, 8Z, 10E, 14Z-eicosatetraenoic acid (12-KETE), dihydrosphingosine, 3-dehydrosphingosine, and 8-isoprostaglandin A1 (8-iso-PGA1). **Conclusion** The underlying mechanism of XLI for RA may be related to the suppression of XLI on *TNFA*, *IL-1B*, and *MCP-1* expression and expression of COX2, eNOS and p-AKT proteins, plus the inhibition of arachidonic acid metabolic pathways.

Key words: Xuelian injection; rheumatoid arthritis; network pharmacology; RAW264.7 cell; serum metabolomics

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节疼痛、肿胀及滑膜炎等症状为主的自身免疫性疾病^[1]。RA 在亚洲的患病率约为 0.1% ~ 0.32%^[2], 且在我国的发病率呈逐年增长趋势^[3]。RA 发病机制复杂且致残率高, 如治疗不及时会导致严重的关节损伤, 并影响肺、心脏等多个器官^[4], 易并发高血压、冠心病、糖尿病等疾病^[5]。目前用于治疗关节炎的化学药物主要为非甾体抗炎药、皮质类固醇和改善病情抗风湿药 (DMARDs), 尽管这些药物能有效缓解关节炎患者的关节肿胀, 但是长期使用会引发一系列不良反应, 包括恶心、腹痛、肝肾损伤等^[5]。因此, 研究开发安全有效的关节炎治疗药物具有重要的社会意义。

天山雪莲为菊科植物天山雪莲 [*Saussurea involucreata* (Kar. et Kir.) Sch.-Bip.] 的干燥地上部分, 具有温肾助阳、祛风胜湿、通经活血的功效^[6]。雪莲注射液 (Xuelian injection, XLI) 是由天山雪莲经提取精制而成的注射液, 临床主要用于缓解急、慢性 RA、骨性关节炎所导致的关节肿胀和疼痛等症状。研究表明, XLI 对 RA 的早、中、晚期均有疗效, 并对 RA 患者的关节囊纤维化、关节囊肥厚以及慢性滑膜炎也有一定的缓解作用^[7]。此外, XLI 能通过抑制 RA 大鼠血清及滑膜中白细胞介素 (IL)-2、IL-6 及 IL-21 水平、调节 Th1/Th2 细胞比例失衡及 Th17 细胞分化导致的免疫紊乱, 从而发挥治疗 RA 的作用^[8]。但目前 XLI 治疗 RA 的药理研究较少, 抗关节炎的相关机制仍不明确, 严重制约了其临床应用。因此, 本研究首先通过网络药理学技术筛选出 XLI 治疗 RA 的活性成分与作用靶点, 进一步通过分子对接技术进行验证, 并通过细胞实验和动物实验进一步验证 XLI 的药效及其相

关机制。

1 材料

1.1 实验细胞

RAW264.7 细胞株, 由北京中医药大学中药现代研究中心朱枝祥老师惠赠。

1.2 实验动物

SPF 级 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠 60 只 [北京斯贝福生物技术有限公司, 许可证号: SCXK[京] 2019-0010]。所有动物实验操作均符合北京中医药大学动物保护与福利委员会的伦理标准。

1.3 试剂

XLI (批号: 180703, 国药集团新疆制药有限公司); 脂多糖 (LPS)、弗氏完全佐剂 (CFA, 批号: SLBZ9885) (Sigma 公司); 地塞米松注射液 (批号: 2103192211, 辰欣药业股份有限公司); 胎牛血清 (FBS, 货号: C04001)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 货号: 02-024-1ACS)、0.25% 胰蛋白酶 (货号: C3532)、DMEM 高糖培养基 (货号: C3103) 和青霉素-链霉素双抗试剂 (货号: C3420) (Biological Industries 公司); 放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液 (批号: 1090110931)、制胶溶液 (批号: 3291091521、SL30183602 和 S488051611)、溴酚蓝上样缓冲液 (批号: 2526062131)、含吐温-20 的 Tris 缓冲盐溶液 (TBST, 批号: 99039100731)、脱脂奶粉 (批号: 7861040732) (北京兰博利德商贸有限公司); 内皮型一氧化氮合酶 (eNOS, 货号: 27120-1-AP)、丝氨酸/苏氨酸激酶 (AKT, 货号: 10176-2-AP) (美国 Proteintech 公司); 磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 (p-AKT, 货号: 4060)、环氧合酶-2 (COX-2, 货号: 12282)、 β -肌动蛋白 (β -actin, 货号: 4970)、抗兔 IgG HRP 抗体

(货号: 7074)(美国 Cell Signaling 公司); FastPure Cell/Tissue Total Isolation Kit-Box2 试剂盒 (货号: RC101-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

1.4 仪器

ME204 万分之一电子天平 (瑞士梅特勒托利多公司); BJ-2CD 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); Nikon Eclipse E100 正置光学显微镜 (日本尼康公司); Western blot 系统 (包括 Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽、手灌胶系统、PowerPac HC 高电流电泳仪电源, Bio-Rad); Tanon 5200 Multi 全自动化学发光/荧光图像分析系统 (上海天能公司); Eppendorf Mastercycler pro PCR 仪、Centrifuge 5810 R 台式低温冷冻离心机、Eppendorf Thermo MixerC 恒温混匀仪 (德国艾本德公司); Heracell 150I CO₂ 恒温培养箱、ABI Step One Plus 荧光定量 PCR 仪、Thermo NanoDrop one/oneC 微量紫外分光光度计、Q Exactive™ 组合型四极杆-Orbitrap 质谱仪 (美国赛默飞世尔公司); BioTek Epoch 全波长酶标仪 (美国伯腾公司); N-EVAP-34 氮吹仪 (美国 Organomation 公司)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学

2.1.1 XLI 潜在活性成分及其作用靶点筛选 XLI 是由天山雪莲直接提取精制所得, 因此利用中药系统药理学分析平台 (TCMSP) (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 检索天山雪莲的化学成分, 并根据药物的 ADME 参数, 以分子量 (MW) ≤ 500、脂水分配系数 AlogP ≤ 5, 类药性 (DL) ≥ 0.18 为筛选条件, 共筛选得到 20 个 XLI 的潜在活性成分。将筛选出来的活性成分利用 TCMSP 中的药物相关靶点预测功能分别进行靶点预测, 共获得 206 个作用靶点。在 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中限定物种为 “Homo sapiens” 并将其靶点名称转换为 gene symbol。

2.1.2 RA 潜在作用靶点的预测及筛选 以 “rheumatoid arthritis” 为关键词检索 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、Malacards (<https://www.malacards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、Disgenet (<https://www.disgenet.org/>) 和 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 6 个数据库, 取并集后, 共获得 6814 个 RA 的相关靶点。

2.1.3 “药物活性成分-疾病潜在靶点” 网络图的构建 将 “2.1.1” 与 “2.1.2” 项中获取的靶点取交集, 共得到 165 个交集靶点。将获取的 165 个交集靶点回溯 XLI 的成分群, 筛选可得到 17 个 XLI 抗 RA 的主要潜在活性成分, 命名为 XLI1 ~ XLI17 (见表 1)。

将 XLI 中 17 个主要潜在活性成分及 165 个

交集靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件构建得到 XLI 抗 RA 的药物活性成分-潜在靶点网络 (见图 1)。

表 1 XLI 抗 RA 作用的主要潜在活性成分

Tab 1 Potential active ingredients of anti-RA activity in XLI			
编号	Mol ID	潜在活性成分	DL
XLI1	MOL000006	木犀草素	0.25
XLI2	MOL000007	芹苷元-7-葡萄糖苷	0.74
XLI3	MOL000008	芹菜素	0.21
XLI4	MOL000009	木犀草苷	0.78
XLI5	MOL000098	槲皮素	0.28
XLI6	MOL000347	紫丁香苷	0.32
XLI7	MOL000396	(+)-丁香树脂酚	0.72
XLI8	MOL000422	山柰酚	0.24
XLI9	MOL000701	槲皮苷	0.74
XLI10	MOL001735	高车前素	0.27
XLI11	MOL001939	异欧前胡素	0.22
XLI12	MOL003612	蛇床明素	0.52
XLI13	MOL005305	泽兰黄酮	0.31
XLI14	MOL009295	酒渣碱	0.39
XLI15	MOL009296	(2S)-1-[[(3R, 3aS, 6aR, 9aR, 9bS)-2-酮基-6, 9-二亚甲基-3a, 4, 5, 6a, 7, 8, 9a, 9b-八氢化-3H-萹 [5, 4-d] 咪喃-3-基] 甲基] 脯氨酸	0.47
XLI16	MOL009297	棕矢车菊素	0.34
XLI17	MOL009299	东莨菪苷	0.39

2.1.4 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络的构建及核心靶点的筛选 将交集靶点导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 物种选择 “Homo sapiens”, 最低要求互动得分设置为 0.99。将网络数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件得到由 172 个节点构成的 PPI 网络 (见图 2)。原始 PPI 经 MCODE 筛选后得到核心 PPI, 共选取到 12 个核心靶点, 分别为 TNF、IL-6、CCL2、IFNG、IL-1B、IL-1A、CXCL10、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、CACL8。MCODE 筛选参数均为默认, 即度值截止值为 2, 节点得分截止值为 0.2, K 核心值为 2, 最大深度为 100。

2.1.5 基因本体 (GO) 功能分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集 将 165 个交集靶点输入 Metascape 平台 (<http://metascape.org>), 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 设置物种为 “Homo sapiens”, Min Overlap 为 3, P Value Cutoff 为 0.01, Min Enrichment 为 1.5。GO 富集分析共获得 2117 个条目, 其中生物过程 (BP) 获得 1849 个条目、细胞组分 (CC) 获得 88 个条目、分子功能 (MF) 获得 180 个条目。BP 主要有对无机物的反应、对激素的反应、细胞对脂质的反应、细胞程序性死亡的正调控、凋亡信号通路的调控等, CC 主要涉及膜筏、转录调控复合体、蛋白

激酶复合物、膜侧、Bcl-2 家族蛋白复合物等, MF 主要涉及 DNA 结合型转录因子结合、蛋白激酶结合、细胞因子受体结合、蛋白质同源二聚化活性、泛素样蛋白连接酶结合等。KEGG 富集分析共获得 199 条通路, 主要涉及 MAPK、NF- κ B、FoxO、Thyroid hormone 等信号通路。

2.1.6 分子对接 对“药物活性成分-潜在靶点”网络图中与 RA 相关的度值排名前三的活性成分槲皮素 (quercetin)、芹菜素 (apigenin)、木犀草素 (luteolin) 分别与 Degree 值排名前十且与炎症相关的靶点基因 *PTGS2*、*NOS3*、*AKT1* 进行分子对接。

在中药系统药理学分析平台 (TCMSP) (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 下载成分的结构式作为配体, 在 RCSB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶点结构, 然后导出至 AutoDockTools1.5.6 软件中进行初始化操作, 包括除去水分子和配体、加氢、能量初始化等, 对接点位覆盖整个蛋白分子。当结合能小于 0 时, 认为配体与受体结合的构象稳定, 能量越低其结合的可能性越大。结合能 $\leq -20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时, 化合物与靶点具有良好的亲和力。对最低构象结果使用 PyMol 软件进行可视化处理, 获得最终验证结果。分子对接结果见图 3, 对接结合能结果见表 2。

表 2 3 种活性成分与 *PTGS2*/*NOS3*/*AKT1* 对接结合能结果 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Tab 2 Docking binding energy of 3 active ingredients and *PTGS2*/*NOS3*/*AKT1* ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

活性成分	对接结合能		
	<i>PTGS2</i>	<i>NOS3</i>	<i>AKT1</i>
槲皮素	-37.6560	-38.4928	-43.5136
芹菜素	-38.9112	-39.3296	-40.5848
木犀草素	-39.7480	-38.0744	-41.8400

2.2 体外实验验证

2.2.1 细胞培养与药液配制 RAW264.7 细胞培养于高糖 DMEM 完全培养基中, 完全培养基中含 10%FBS 和 1% 青霉素-链霉素双抗试剂, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。

称取 XLI 冻干粉用 DMEM 培养液溶解并稀释, 根据前期实验结果^[9], 选用 200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为 XLI 实验浓度。

2.2.2 qRT-PCR 法检测炎症因子 mRNA 的表达水平 在 RA 发展中, 巨噬细胞会释放出大量的细胞因子和趋化因子参与 RA 炎症反应^[10]。因此, 选用 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞验证网络药理学结果。

将 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 3.5×10^5 个, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养过夜。将细胞用质量浓度为 200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 XLI 预处理 1 h。除对照组外, 其余各组加入 LPS (终质量浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激 6 h, 按照说明书从

细胞中提取 mRNA。引物序列见表 3, 引物合成委托上海生工生物工程股份有限公司完成。将样品、引物、SYBR TM Green 按照比例加入 96 孔板中, 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 使用 qRT-PCR 仪器检测 *TNFA*、*IL-1B* 和 *MCP-1* 的 mRNA 表达水平。如图 4 所示, 与对照组相比, LPS 组 *TNFA*、*IL-1B* 和 *MCP-1* 的表达均显著增加 ($P < 0.01$), 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ XLI 可以剂量依赖性抑制上述基因表达的增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2.3 Western blot 法检测核心靶点蛋白表达量 实验分为正常组、模型组、XLI (200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组。取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 接种于 60 mm 培养皿, 每皿 5×10^5 个。细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养过夜, 给药组用不同浓度的 XLI (200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 预处理 1 h。除对照组外, 其余各组加入 LPS (终质量浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激 0.5 h 或 24 h。PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 50 μL RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。用 Bradford 法测定样品蛋白浓度并定量, 加入溴酚蓝上样缓冲液, 98 $^{\circ}\text{C}$ 加热 8 min 使蛋白变性, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。样品经上样、电泳及转膜后, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入相应一抗 (COX2、eNOS、p-AKT、AKT), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 1 \times TBST 液洗膜 3 次后, 加入相应二抗孵育 1 h。孵育结束后用 1 \times TBST 液洗膜 3 次。条带于 ECL 化学发光显色液孵育后进行曝光显影并拍照。使用 Image J 软件对蛋白条带图像进行灰度分析, 蛋白条带灰度与其相应的内参蛋白灰度的比值即为待测蛋白的相对表达水平。

如图 5 所示, 在 LPS 的刺激下, RAW264.7 细胞核心靶点蛋白 eNOS、COX2 和 p-AKT 的表达显著增加 ($P < 0.01$), 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ XLI 组可以明显抑制 LPS 刺激后核心靶点蛋白 eNOS、COX2、p-AKT ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 XLI 对 CFA 诱导的 RA 大鼠血清非靶向代谢组学

2.3.1 分组、造模及给药 所有大鼠均在北京中医药大学中药学院中药药理系动物房饲养, 动物房温度为 23 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 50% ~ 55%, 所有大鼠自由进食进水。适应性饲养一周后, 从 60 只大鼠中随机选取 10 只作为对照组, 其余 50 只进行造模。除对照组外, 其余大鼠每只右足足跖部注射 0.1 mL CFA, 7 d 后相同位置注射同剂量的 CFA 进行加强。注射 2 h 后观察大鼠并测量右足足周长, 根据足周长大小将大鼠分为 5 组: 模型组、XLI 低剂量组 (0.45 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、XLI 中剂量

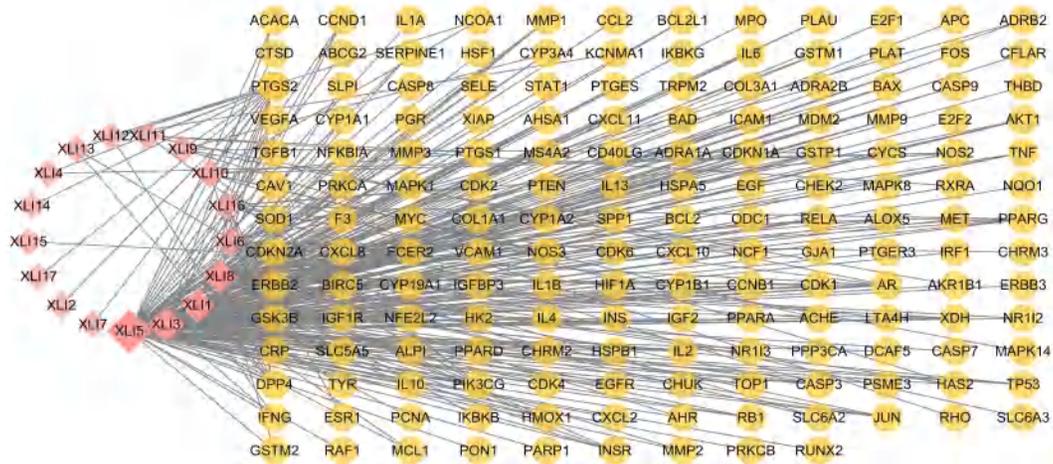


图 1 XLI 抗 RA 作用的活性成分-潜在靶点网络图

Fig 1 Anti-RA active ingredients-potential target network map in XLI

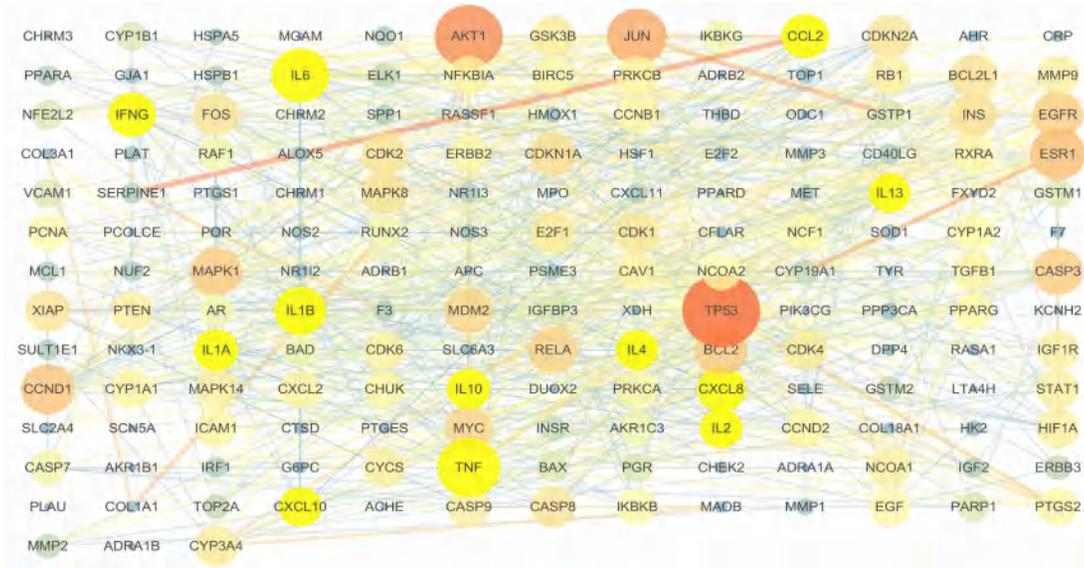


图 2 XLI 抗 RA 作用的原始 PPI 网络图

Fig 2 Original PPI network map of anti-RA activity in XLI

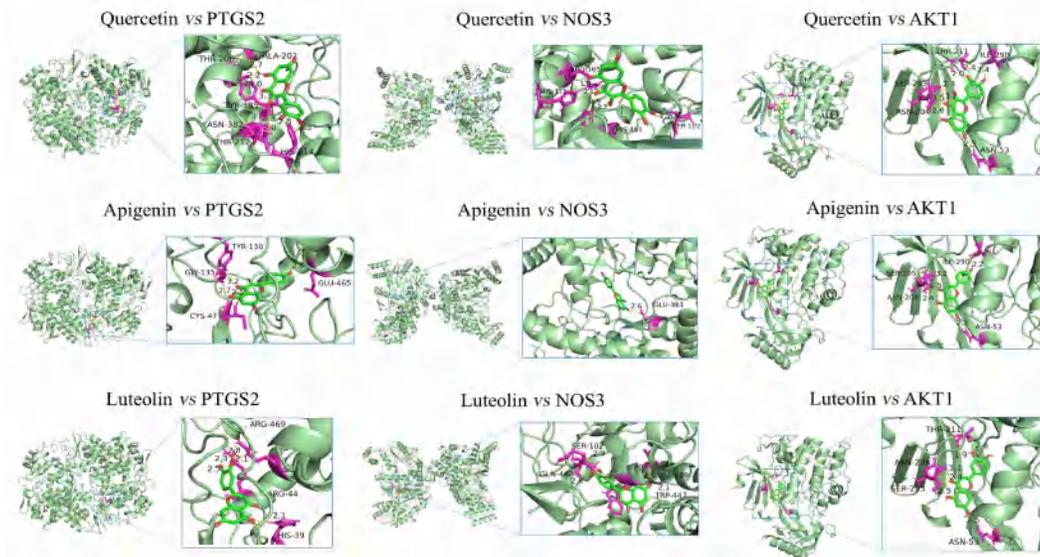


图 3 3 种活性成分与 PTGS2/NOS3/AKT1 的分子对接图

Fig 3 Molecular docking of 3 active ingredients and PTGS2/NOS3/AKT1A

表 3 引物序列表

Tab 3 Primer sequence list

基因	正向 (5'-3')	反向 (5'-3')
<i>TNFA</i>	ATGAGAAGTCCCAAATGGC	CTCCACTGGTGGTTTGCTA
<i>IL-1B</i>	GAAGAAGAGCCCATCCTCTG	TCATCTCGGAGCCTGTAGTG
<i>MCP-1</i>	AATGCTAACGCCACCGAGAG	CCTTGTCTGCTCCTCATAGTCC
<i>GAPDH</i>	GGCCTCCGTGTTCTACC	TGCCTGCTTCACCACCTTC

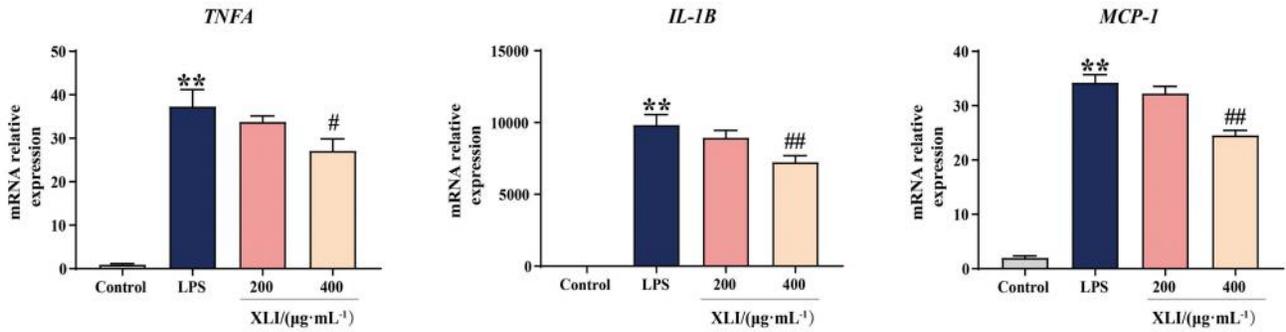


图 4 XLI 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

Fig 4 Effect of XLI on mRNA expression of inflammatory factors in LPS-stimulated RAW264.7 cells

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

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

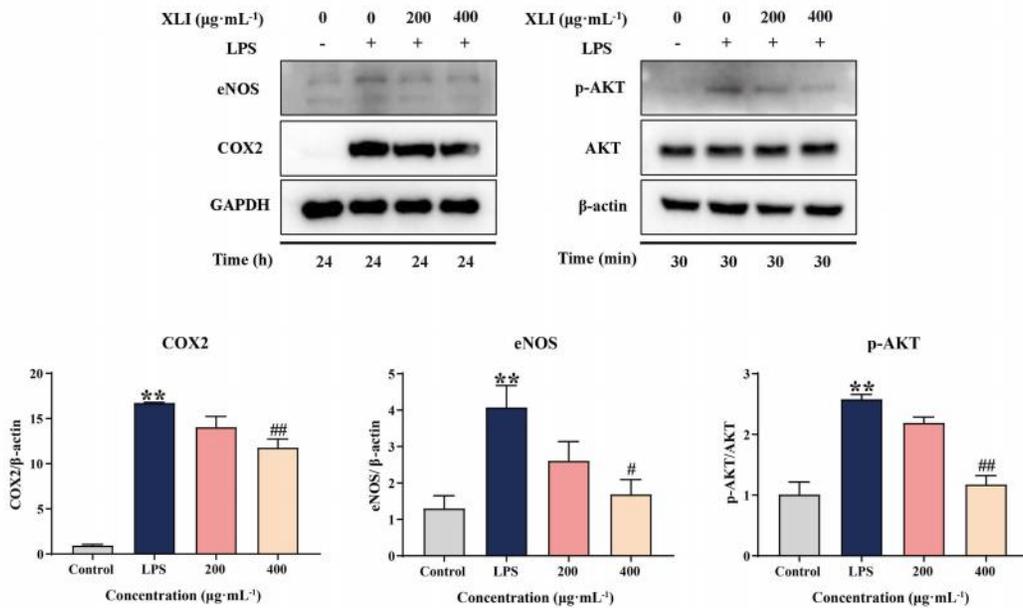


图 5 XLI 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞核心靶点蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of XLI on core target protein expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells

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

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

组 ($0.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、XLI 高剂量组 ($1.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、地塞米松组 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)，每组 10 只。XLI 低、中、高剂量分别为临床的 1、2、4 倍。各组大鼠腹腔注射给予相应剂量的药物，对照组和模型组腹腔注射 $0.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 PBS，每日给药一次。连续给药 14 d，第 21 日取血、取材^[9]。

2.3.2 血清样本采集与制备 取对照组、模型组与 XLI 高剂量组大鼠血清 200 μL ，加入 800 μL 甲醇，涡旋 10 s，在 -20°C 条件下放置 2 h 沉淀蛋白。将

样品于 4°C 、 $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min，吸取上清液并置于 1.5 mL 离心管中。使用氮吹仪将液体吹干，加入 250 μL 甲醇复溶残留物，在冰水浴中超声 10 min。再将样品于 4°C 、 $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min，吸取 150 μL 上清液转移至样品瓶中。每个样本吸取 10 μL 进行混合，作为质量控制样本 (QC)。样品分析时，每进样 5 针样品后进 1 针质量控制样品，以检验系统的稳定性。使用 Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass 质谱仪对样品进行测定。

① 色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相为水 (含 0.1% 甲酸, A) 和乙腈 (含 0.1% 甲酸, B), 梯度洗脱 (0~2 min, 2%~30%B; 2~6 min, 30%~70%B; 6~10 min, 70%~98%B; 10~13 min, 98%B; 13~13.1 min, 98%~2%B; 13.1~16 min, 2%B), 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温为 35℃。

② 质谱条件: HESI 离子源, 正负离子检测模式, 电喷雾电压 3800 V (负离子 -3000 V), 毛细管温度 320℃, 鞘气流速 40 Arb, 辅助气流速 10 Arb, 最大喷雾电流 100 μA, 探头加热器温度 350℃, S-Lens RF 水平为 55。

2.3.3 数据处理 使用 Progenesis QI 2.1 (Waters, 美国) 对原始数据进行分析, 得到每个样品的保留时间、*m/z* 和峰强度的三维数据矩阵, 然后将数据矩阵引入 Ezinfo 3.0 软件 (Umetrics, 瑞典) 进行 OPLS-DA 分析。通过将 Progenesis QI 提取的每个峰的精确质量和 MSn 片段信息与 HMDB (<http://www.hmdb.ca>) 和 LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>) 数据库中的信息进行比较, 进行代谢物的鉴定。将鉴定后的代谢物数据导入 MetaboAnalyst 网站 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 进行数据分析, 代谢通路使用 Enrichment Analysis 方法分析。

2.3.4 结果 RA 患者糖、胆碱、氨基酸和脂质代谢紊乱会导致炎症性代谢产物累积, 这些异常的代谢产物会进一步加重炎症反应^[11]。课题组前期研究表明, XLI 能够改善 CFA 诱导的大鼠踝关节炎症状, 降低大鼠血清中炎症介质肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 和调节正常 T 细胞表达和分泌因子 (Rantes) 的水平^[9]。因此, 我们采用血清非靶向代谢组学技术, 进一步探究 XLI 对 CFA 诱导的 RA 大鼠血清代谢物的影响。OPLS-DA 结果显示, 在正离子和负离子检测模式下, 对照组和模型组之间分类趋势明显, 同时模型组和 XLI 组之间也呈现出明显的分类趋势 (见图 6)。

差异代谢物热图显示, 与对照组大鼠相比, 模型组大鼠脂肪酰基、神经鞘脂、异戊二烯脂、甘油磷脂、甘油糖脂、有机酸和衍生物、有机氧化合物、类固醇和类固醇衍生物类代谢物显著改变。此外, 与模型组相比, XLI 的治疗显著影响了这些代谢产物 (见图 7)。

图 8A 和 8B 结果表明, RA 大鼠血清多条代谢通路发生了改变, 其中排名前五的为花生四烯酸 (AA, ARA) 氧基蛋白代谢、通过环氧合酶 (COX) 的类花生酸代谢、前列腺素 (PG) 和血栓素 (TX) 合成、

花生四烯酸环氧合酶/环氧化物水解酶与白三烯 C4 合成不足。与对照组相比, 上述代谢通路相关的血清代谢物 (5, 6-EET、PGJ2 和 12S-HHT) 的水平明显上调 ($P < 0.05$ 或 0.01), 血清花生四烯酸水平明显下调 ($P < 0.01$)。与模型组相比, XLI 主要改变了花生四烯酸氧基蛋白、鞘脂在内质网和高尔基体中的代谢、白三烯 C4 合成不足及罗非昔布、水杨酸钠等药物的作用途径。如图 8C 和 8D 所示, XLI 明显下调了血清 5, 6-EET、12S-HHT、血栓素 B2 (TXB2)、12-KETE、二氢鞘氨醇、3-脱氢鞘氨醇、8-异前列腺素 A1 (8-iso-PGA1) 的水平。如图 8E 和 8F 所示, 对照组和模型组大鼠血清炎症因子 TNF-α 和 Rantes 与 12S-HHT 和 PGJ2 成正相关 ($P < 0.01$), TNF-α 与 5, 6-EET 成正相关 ($P < 0.01$), MCP-1 与花生四烯酸成负相关 ($P < 0.01$)。模型组和 XLI 组大鼠血清炎症因子 TNF-α、Rantes 和 MCP-1 与 5, 6-EET、二氢鞘氨醇和 3-脱氢鞘氨醇均成正相关 ($P < 0.01$), TNF-α 和 Rantes 与 12-KETE、12S-HHT、TXB2 成正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3.5 统计学分析方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 GraphPad Prism 8.0.2 软件对其进行处理, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 多组比较采用 Dunnett 多重比较检验统计学差异, 两两比较采用双尾非配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 讨论

XLI 中 Degree 值最高的 3 个活性成分为槲皮素、芹菜素和木犀草素。研究显示, 槲皮素能通过抑制 CIA 大鼠 TLR4/NF-κB 通路, 从而缓解关节滑膜炎。槲皮素能调控关节成纤维样滑膜细胞 (RA-FLSs) 的侵袭和凋亡^[12], 并能抑制中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 产生^[13]。芹菜素能缓解 CIA 小鼠模型的关节肿胀, 其机制可能与调节 Th1/Th2 平衡有关^[14]。木犀草素对 RA 的保护作用是通过抑制 NLRP3 过表达, 进一步降低 Caspase-1、RANKL、VEGF 和 HIF-1α 蛋白表达有关^[15]。以上 3 个活性成分可能是 XLI 抗 RA 的物质基础。

此外, XLI 治疗 RA 的重要预测靶点包括 TNF、IL-6 和 MCP-1 等 12 个炎症因子。体外实验结果表明, XLI 可以明显抑制 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 *TNFA*、*IL-1B* 和 *MCP-1* 基因表达的增加, 证明 XLI 是通过抑制这些炎症因子的产生发挥抗 RA 作用。PTGS2、NOS3、AKT1 分别与槲皮素、芹菜素和木犀草素的分子对接结合能均在 $-43.5136 \sim -37.656 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。COX2 可在炎症部位催化前列腺素的合成并诱发关节炎反应^[16-17]。eNOS 在 RA 的临床病理进程中发挥着重要作用^[18], 其中 eNOS 基因多态性是影响 RA

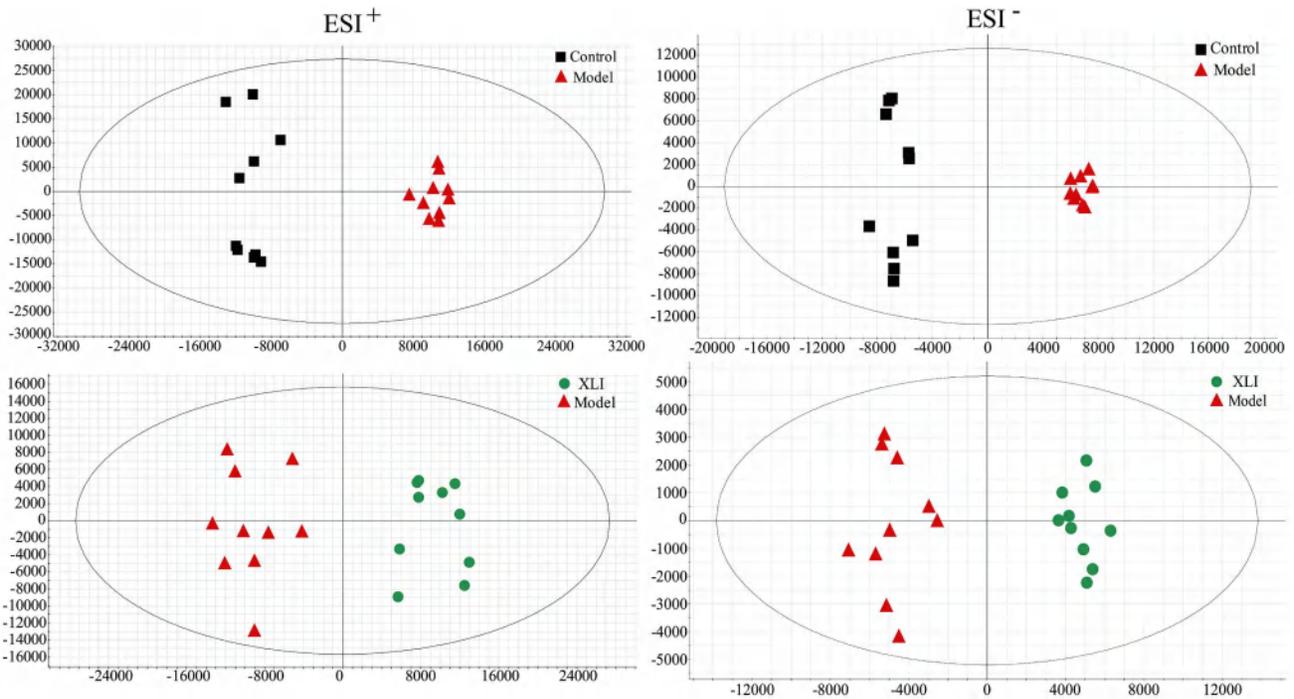


图 6 OPLS-DA 图 (n = 10)

Fig 6 OPLS-DA diagram (n = 10)

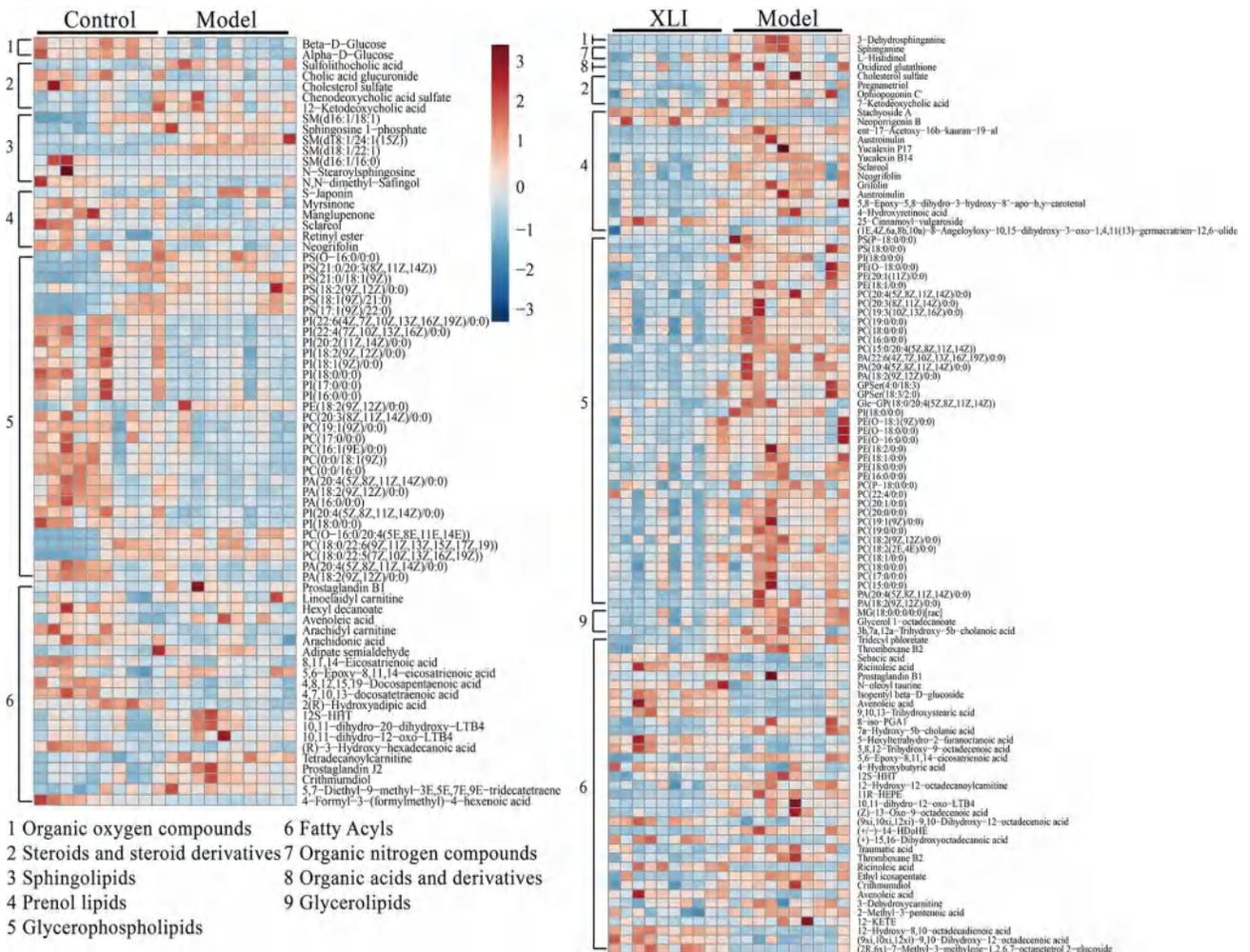


图 7 对照、模型、XLI 组差异代谢物热图及分类 (n = 10)

Fig 7 Heat map and classification of differential metabolites among control, model and XLI groups (n = 10)

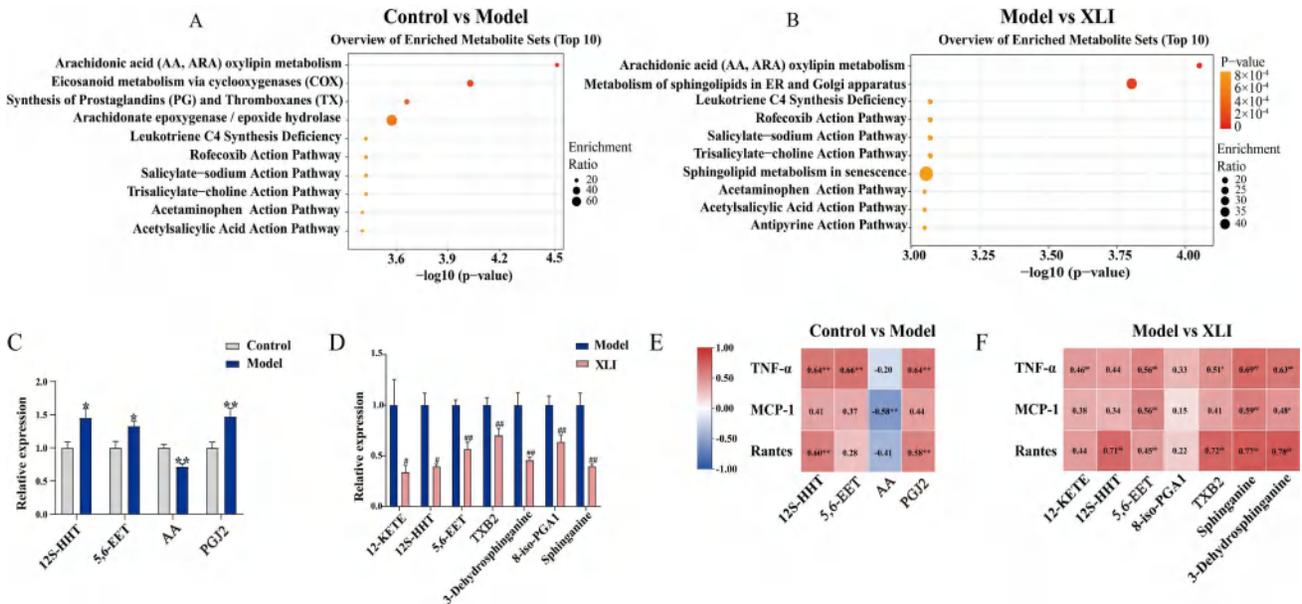


图 8 对照、模型、XLI 组富集代谢通路以及相关代谢通路代谢物

Fig 8 Enrichment of metabolic pathways and related metabolic pathway metabolites among control, model and XLI groups

A. 对照组与模型组大鼠排名前十大差异代谢通路 (top ten ranked differential metabolic pathways between control and model rats); B. XLI 组与模型组大鼠排名前十大差异代谢通路 (top ten ranked differential metabolic pathways between XLI and model rats); C. 对照组与模型组大鼠差异代谢物 (differential metabolites between control and model rats); D. XLI 组与模型组大鼠差异代谢物 (differential metabolites between XLI and model rats); E. 对照组与模型组大鼠差异代谢物与炎症因子相关性分析 (differential metabolites and inflammatory factors correlation analysis between control and model rats); F. XLI 组与模型组大鼠差异代谢物与炎症因子相关性分析 (differential metabolites and inflammatory factors correlation analysis between XLI and model rats)

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

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

易感性的因素之一^[19], 并与 RA 的发病机制^[20]和临床表现^[21]存在一定的内在联系。RA 患者滑膜组织 p-AKT 的表达增加且与 RA 疾病活动相关指标成正相关^[22]。PI3K/AKT 信号通路是中药治疗 RA 的主要分子机制^[23]。结果显示, XLI 可以明显抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 eNOS、COX2、p-AKT 的表达, 提示 XLI 可能通过抑制上述核心靶点, 从而发挥抗 RA 作用。

本研究选用 CFA 诱导的 RA 大鼠模型探究 XLI 对其血清代谢物的影响。结果表明, RA 大鼠血清花生四烯酸氧基蛋白相关代谢通路包括环氧合酶 (COX) 代谢路径、脂氧合酶 (LOX) 代谢路径与细胞色素 P450 (CYP450) 代谢路径发生改变。在组织细胞受到机械性创伤、细胞因子或其他炎症刺激后, 花生四烯酸在细胞质磷脂酶 A2 (PLA2) 的催化下从磷脂膜释放, 经 COX 代谢路径形成 PGs 和 TXs^[24]。花生四烯酸也可以通过 LOX 代谢路径形成白三烯 (LTs)、脂氧素 (LXs) 和羟基二十碳四烯酸 (X-HETE)^[25], 或通过 CYP450 代谢路径形成二十碳三烯酸 (EETs) 和 X-HETE^[26], 非酶氧化途径生成 iso-PGs 和 X-HETE^[27]。研究表明, 趋化因子 MCP-1 和 Rantes 均能诱导单核细胞 (如巨噬

细胞) 中花生四烯酸的快速释放, 进而诱导细胞炎症, 释放大量炎症介质^[28]。XLI 能下调血清花生四烯酸氧基蛋白代谢通路及相关代谢物的含量, 如 5, 6-EET、12S-HHT、TXB2、12-KETE, 且与血清炎症因子水平密切相关, 说明其抗 RA 作用与其抑制花生四烯酸代谢通路及其代谢产物有关。

综上所述, 本研究基于网络药理学技术筛选 XLI 治疗 RA 的活性成分、关键靶点及核心通路, 利用分子对接技术进行初步验证, 并通过体内外实验进一步进行验证。结果显示 XLI 治疗 RA 的作用机制与其抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 MCP-1 炎症因子基因及 COX2、eNOS 和 p-AKT 蛋白的表达, 以及抑制花生四烯酸代谢通路有关。

参考文献

[1] 刘晨旭, 郜娜. 蛋白质组学在类风湿关节炎中发病机制及诊疗研究中的最新研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34 (7): 49-54.
 [2] Finckh A, Gilbert B, Hodkinson B, et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18 (10): 591-602.
 [3] 益西拉姆, 林雪妮, 赵国青, 等. 类风湿关节炎流行病学研究概况 [J]. 西藏医药, 2023, 44 (5): 153-155.

- [4] Smith MH, Berman JR. What is rheumatoid arthritis? [J]. *JAMA*, 2022, 327 (12): 1194.
- [5] Huang J, Fu XK, Chen XX, et al. Promising therapeutic targets for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 686155.
- [6] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 55.
- [7] 顾云, 谢金萍, 杨云. 雪莲注射液穴位注射治疗类风湿关节炎 60 例 [J]. *山西中医*, 2009, 25 (3): 30.
- [8] 李潭, 王怡杨, 丛珊, 等. 雪莲注射液对胶原诱导性关节炎大鼠 Th1/Th2 平衡及 Th17 细胞的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34 (12): 5661-5664.
- [9] Yan LS, Cheng BC, Wang YW, et al. Xuelian injection ameliorates complete Freund's adjuvant-induced acute arthritis in rats via inhibiting TLR4 signaling [J]. *Heliyon*, 2023, 9 (11): e21635.
- [10] 赵磊, 万磊, 刘健, 等. 巨噬细胞炎症极化在类风湿关节炎中的作用 [J]. *医学研究杂志*, 2023, 52 (2): 11-14.
- [11] Xu LX, Chang C, Jiang P, et al. Metabolomics in rheumatoid arthritis: advances and review [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 961708.
- [12] 梁舒, 左淑飞, 崔玉荣, 等. 槲皮素通过调控 miR-431-5p/ 鼠双微基因 4 信号通路抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞侵袭和促进凋亡 [J]. *实用临床医药杂志*, 2023, 27 (12): 50-56.
- [13] Yuan K, Zhu QQ, Lu QY, et al. Quercetin alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting neutrophil inflammatory activities [J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 84: 108454.
- [14] 张洁, 刘巍, 朱新辉, 等. 针刺配合芹菜素治疗对胶原诱导性关节炎小鼠 Th1/Th2 细胞亚群的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35 (5): 1353-1355.
- [15] 刘杨, 吕冰清, 吴玉梅, 等. 木犀草素抑制类风湿关节炎大鼠 NLRP3 炎性小体活化增强关节骨保护作用研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (1): 513-516.
- [16] Siegle I, Klein T, Backman JT, et al. Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41 (1): 122-129.
- [17] 徐红梅, 魏伟. 前列腺素 E₂ 与类风湿关节炎及其药物研究 [J]. *中国药理学通报*, 2005, 21 (3): 262-266.
- [18] 刘雅璐, 杨树龙. 类风湿关节炎与一氧化氮及其合成酶的相关研究进展 [J]. *南昌大学学报 (医学版)*, 2020, 60 (6): 66-70.
- [19] Vazgiourakis V, Sidiropoulos P, Bertias G, et al. Association of the nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism with increased risk for both lupus glomerulonephritis and rheumatoid arthritis in a single genetically homogeneous population [J]. *Lupus*, 2007, 16 (11): 867-874.
- [20] An JD, Li XY, Yu JB, et al. Association between the eNOS gene polymorphisms and rheumatoid arthritis risk in a northern Chinese population [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125 (8): 1496-1499.
- [21] Brenol CV, Chies JAB, Brenol JCT, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations [J]. *Clin Rheumatol*, 2009, 28 (2): 201-205.
- [22] 徐子涵, 常文静, 周凯伦, 等. 类风湿关节炎患者滑膜组织中 p-AKT、Bcl-2、MMP-9 的表达水平及临床意义 [J]. *武警医学*, 2023, 34 (6): 484-489.
- [23] 陆婷, 唐芳, 马武开, 等. 中医药介导 PI3K/AKT 信号通路在类风湿关节炎中的机制探讨 [J]. *风湿病与关节炎*, 2023, 12 (10): 43-46, 55.
- [24] P JJ, Manju SL, Ethiraj KR, et al. Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: a structure-based approach [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 121: 356-381.
- [25] Saraf P, Tripathi PN, Tripathi MK, et al. Novel 5, 6-diphenyl-1, 2, 4-triazine-3-thiol derivatives as dual COX-2/5-LOX inhibitors devoid of cardiotoxicity [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 129: 106147.
- [26] Froogh G, Garcia V, Schwartzman ML. The CYP20-HETE/GPR75 axis in hypertension [J]. *Adv Pharmacol*, 2022, 94: 1-25.
- [27] Honda Y, Kosugi K, Fuchikami C, et al. The selective PGI₂ receptor agonist selexipag ameliorates Sugen 5416/hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (10): e0240692.
- [28] Locati M, Zhou D, Luini W, et al. Rapid induction of arachidonic acid release by monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. Role of Ca²⁺ influx, synergism with platelet-activating factor and significance for chemotaxis [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (7): 4746-4753.

(收稿日期: 2024-07-15; 修回日期: 2024-08-14)

雷公藤红素促进癌旁脂肪细胞分泌脂联素 抗肾透明细胞癌上皮间充质转化作用

何鹏¹, 张婵娟^{1, 2}, 石雅宁^{1, 3}, 朱能⁴, 陈聪¹, 彭柳¹, 覃丽^{1, 5*} (1. 湖南中医药大学药学院 干细胞中药调控与应用实验室, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学药学院 药剂学教研室, 长沙 410208; 3. 湖南中医药大学 科技创新中心, 长沙 410208; 4. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 5. 湖南中医药大学 血管生物学与转化医学湖南省重点实验室, 长沙 410208)

摘要: **目的** 探讨雷公藤红素 (CeT) 诱导癌旁脂肪细胞分泌脂联素 (APN) 抑制人肾透明细胞癌细胞株 786-O 增殖迁移的作用机制。**方法** 通过 CCK 8 法检测 CeT 对 786-O 和 3T3-L1 细胞的毒性, 诱导 3T3-L1 分化并采用油红 O 染色检测 3T3-L1 细胞分化情况, 通过 ELISA 检测不同浓度 CeT 对于 3T3-L1 细胞分化后的成熟脂肪细胞分泌脂联素情况。建立 786-O 和 3T3-L1 细胞共培养体系, 采用划痕实验、EDU 检测共培养体系对 786-O 细胞增殖、迁移能力的影响, 并采用 Western blot 法检测上皮间充质转化 (EMT) 相关蛋白 (E-cad、N-cad、Snail、Vim)、Adiponectin 等相关蛋白的表达。**结果** 50、100、200 nmol·L⁻¹ 的 CeT 可刺激成熟脂肪细胞分泌脂联素, 抑制肾癌细胞增殖和迁移; 共培养后 786-O 细胞中 EMT 相关蛋白 N-cad、Snail、Vim 的表达水平显著下调, E-cad 表达水平上升。**结论** CeT 通过诱导脂肪细胞分泌脂联素抑制肾透明细胞癌 EMT 进程。

关键词: 雷公藤红素; 肾透明细胞癌; 脂联素; 共培养

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0638-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.009

Celastrol promotes the secretion of adiponectin by adjacent adipocytes and inhibits the EMT of renal clear cell carcinoma

HE Peng¹, ZHANG Chan-juan^{1, 2}, SHI Ya-ning^{1, 3}, ZHU Neng⁴, CHEN Cong¹, PENG Liu¹, QIN Li^{1, 5*} (1. Laboratory of Stem Cell Regulation and Application of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 3. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 4. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007; 5. Hunan Key Laboratory of Vascular Biology and Translational Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

Abstract: Objective To determine the mechanism by which celastrol induces the secretion of adiponectin by adjacent adipocytes to inhibit the invasion and metastasis of cell line 786-O in human renal clear cell carcinoma. **Methods** The toxicity of celasterol on 786-O and 3T3-L1 cells was detected with CCK 8 assay. ELISA was used to test the secretion of adiponectin by mature adipocytes differentiated from 3T3-L1 cells at different concentrations of celastrol. Oil red O staining was used to measure the differentiation of 3T3-L1 cells. The co-culture system for 786-O and 3T3-L1 cells was successfully established. Wound healing and EDU assays were used to examine the effect of the co-culture system on the migration and proliferation of 786-O cells. Western blot was used to detect the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins such as

基金项目: 湖南省自然科学基金科药联合基金 (No.2022JJ80088); 国家自然科学基金项目 (No.82274159); 湖南省卫生健康委员会重点指导课题 (No.202213055529); 湖南省自然科学基金青年项目 (No.2023JJ40485); 湖南省教育厅优秀青年项目 (No.22B0355)。

作者简介: 何鹏, 男, 硕士研究生, 主要从事肿瘤药理学研究, email: hepeng805@163.com ***通信作者:** 覃丽, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤、心血管疾病的发病机制及其中医药防治研究, email: Lqin@hnuem.edu.cn

E-cadherin, N-cadherin, Snail, Vimentin, Adiponectin and so on. **Results** Celastrol stimulated mature adipocytes to secrete adiponectin at 50, 100, and 200 nmol · L⁻¹, inhibited the proliferation and migration of renal cancer cells. The expressions of N-cadherin, Snail, and Vimentin in 786-O cells were substantially down-regulated after the co-culture, while the expression level of E-cadherin was increased. **Conclusion** Celastrol can inhibit the EMT progression of renal clear cell carcinoma by inducing adiponectin secretion of adipocytes.

Key words: celastrol; renal clear cancer cell carcinoma; adiponectin; co-culture

肾癌 (renal cell carcinoma, RCC) 又称肾细胞癌, 是肾脏最常见的实质肿瘤。RCC 是成人肾脏最常见的恶性肿瘤, 其中肾透明细胞癌 (renal clear cell carcinoma, ccRCC) 是最常见的组织学亚型, 占肾癌的 70% ~ 80%。转移性肾癌患者对放疗不敏感, 预后极差, 5 年生存率仅为 8%^[1-3]。因此, 探讨 ccRCC 发生转移的分子机制, 寻找有效的药物进行防治, 对于提高 ccRCC 患者的生存率具有极其重要的意义。研究表明癌周脂肪组织是介导肿瘤发展转移的重要危险因素^[4], 癌周脂肪组织可通过其旁分泌功能参与构建肿瘤微环境, 进而促进肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤血管生成, 加速侵袭转移进程, 这主要通过调节脂肪因子分泌, 如下调脂联素 (APN) 表达, 而 APN 水平与肾癌、肝癌和乳腺癌等多种肿瘤发展成负相关^[5-7]。

在原发性上皮性肿瘤 (如肾癌等) 的侵袭与转移过程中上皮间充质转化 (EMT) 发挥着关键的作用。细胞发生 EMT 过程, 主要表现为上皮细胞失去上皮表型, 并转化为具备迁移侵袭及抗凋亡能力的间质表型, 进而导致肿瘤的侵袭转移及不良预后。EMT 的发生可导致上皮细胞标志物如 E-钙黏蛋白 (E-cad) 表达下调, 间质细胞标志物如 N-钙黏蛋白 (N-cad)、波形蛋白 (Vim)、锌指蛋白 (Snail) 等表达上调。雷公藤红素 (celastrol, CeT) 是从雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook.f) 根皮中分离出的五环三萜类化合物, 又名南蛇藤素, 分子式为 C₂₉H₃₈O₄, 也是药用雷公藤的主要活性成分, 具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降脂^[8-10] 及免疫抑制等生物活性。此外, 课题组前期研究发现 CeT 诱导脂自噬^[11], 可阻断 EMT 进程, 并抑制肾癌转移, 抑制肿瘤干性特征, 延缓肾癌进展^[12]。本研究旨在探讨 CeT 通过影响癌旁脂肪细胞与 ccRCC 的相互作用, 调节脂肪因子 APN 分泌以发挥抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 试药

雷公藤红素、地塞米松、胰岛素、罗格列酮、顺铂 (DDT) (美国 Sigma 公司, 批号分别为:

C0869-10MG、D4902-25MG、I9278-5ML、R2408-10MG); RPMI 1640 培养基、DMEM 高糖培养基和胰蛋白酶 (Gibco 公司, 批号分别为: C11875500BT、C11995500BT、25200056); 标准胎牛血清 (FBS, 南京森贝伽生物科技有限公司, 批号: BC-SE-FBS01C); 油红 O 染色试剂盒、二甲基亚砷 (DMSO) (北京索莱宝科技有限公司); APN 鼠源性 ELISA 试剂盒、E-cad 抗体、N-cad 抗体、Snail 抗体、Vim 抗体、APN 抗体、二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 仪器

细胞培养箱、多功能酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS 公司); 移液器、高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司); 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); Mini-protean 3 小型垂直电泳转印系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞

肾癌 786-O 细胞、小鼠成纤维细胞 3T3-L1 (中国科学院上海细胞库)。786-O、3T3-L1 细胞分别培养于含 10%FBS、1% 青霉素 / 链霉素的 RPMI 1640 和 DMEM 培养基中, 在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育。

2 方法

2.1 细胞毒性实验

将 CeT 以 DMSO 溶解后, 以 DMEM 培养基稀释, 且最终使用的溶液中 DMSO 含量低于 0.1%。取对数生长期的 786-O、3T3-L1 细胞消化后制成细胞悬液, 在 96 孔板中以 1.0 × 10⁴ 个 / 孔接种细胞, 每孔 100 μL, 培养 24 h, 吸弃每孔中旧培养液, 7 个实验组分别加入配制好的含 50、100、200、400、800、1600 nmol · L⁻¹ CeT 的 DMEM 完全培养液, 每孔 100 μL, 设置 6 个复孔, 于培养箱中培养 24 h 或 48 h 后吸弃每孔中培养液, 加入 CCK 8 与 DMEM 以 1 : 10 比例配制溶液, 每孔 100 μL, 置于培养箱中孵育 1 h 后采用酶联免疫检测仪在波长为 450 nm 处检测其吸光度 (A) 值, 以每组的平均 A 值, 计算每组细胞的存活率。计算公式: 存活率 (%) = (A_{实验组} / A_{对照组}) × 100%。

2.2 共培养体系构建

2.2.1 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化 3T3-L1 细胞置于 DMEM 培养基 (含 10% FBS) 中培养, 隔日更换新鲜培养基。待 3T3-L1 细胞生长密度达到 80% ~ 90% 后, 将细胞传代到 6 孔板中, 待细胞接触抑制 2 d, 于第 3 日更换新的分化培养液 I (含 0.5 mmol·L⁻¹ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、5.0 μmol·L⁻¹ 地塞米松、1.0 μmol·L⁻¹ 罗格列酮、1.0 μg·L⁻¹ 胰岛素和 10% FBS), 在分化液 I 中分化 2 d, 再更换为分化培养液 II (含 1 μg·L⁻¹ 胰岛素和 10% FBS), 继续在分化培养液 II 中分化 6 d, 隔日换新鲜 DMEM 培养基。

2.2.2 油红 O 检测 3T3-L1 分化情况 将细胞培养于 6 孔板内, 细胞经处理后磷酸盐缓冲液 (PBS) 润洗, 4% 多聚甲醛溶液固定, 油红 O 染色液染色 20 min, 苏木素复染。倒置显微镜观察, 细胞内脂质呈红色, 细胞核呈蓝色, 随机选取 5 个区域拍摄。

2.2.3 共培养体系的构建 将诱导分化成熟的脂肪细胞, 与生长至 80% 的 786-O 细胞采用 Transwell 6 孔板进行共培养, 上室为 786-O 细胞, 下室为成熟脂肪细胞。给予不同浓度 50、100、200 nmol·L⁻¹ CeT 加入下室脂肪细胞, 观察 786-O 细胞的改变。

2.2.4 ELISA 法筛选共培养药物剂量 在上述细胞共培养体系下室中, 给予 25、50、100、200、400 nmol·L⁻¹ CeT 干预下室脂肪细胞后, 收集下室细胞上清液, 采用 ELISA 试剂盒检测脂肪细胞上清液中 APN 含量。

2.3 细胞迁移实验检测共培养对 786-O 细胞迁移的影响

在细胞共培养体系下室加入 50、100、200 nmol·L⁻¹ CeT, 以 2 μmol·L⁻¹ DDT 为阳性药物, 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。用 1000 μL 枪头画直线, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入无 FBS 培养基, 37℃、5%CO₂ 中培养 0、24、48 h 后随机选取 5 个区域用显微镜观察并拍照。

2.4 EDU 实验检测共培养体系对 786-O 细胞增殖的影响

在细胞共培养体系下室加入 50、100、200 nmol·L⁻¹ CeT, 以 2 μmol·L⁻¹ DDT 为阳性药物, 置于 37℃、5%CO₂ 中培养, 使用 EDU 试剂盒检测细胞增殖情况。随机选取 5 个区域观察并拍照, ImagePro Plus 6.0 (Media Cybernetics) 图像分析软件分析实验结果。

2.5 Western blot 法检测 APN 及 EMT 相关蛋白的表达

CeT 处理共培养体系下室给药, 以 2 μmol·L⁻¹ DDT 为阳性药物, 给药 24 h 后, 在上室和下室中分别加入裂解液; 置冰上充分裂解 30 min 后收集细胞, 以 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液, 即为总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 取各组样本蛋白 40 μg 上样; 采用 ImagePro Plus 6.0 (Media Cybernetics) 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 对目的蛋白进行半定量分析。

2.6 统计学处理方法

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行数据分析并作图; 计量资料以均数 ± 标准差表示; 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间比较采用配对 *t* 检验; 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CeT 抑制 3T3-L1 及 786-O 细胞活力

结果如图 1 所示, CeT 对 3T3-L1 细胞 24、48 h 所得 IC₅₀ 值分别为 211.7、163.3 nmol·L⁻¹, CeT 对 786-O 细胞 24、48 h 所得 IC₅₀ 值分别为 469.4、267.7 nmol·L⁻¹, 故采取 50、100、200 nmol·L⁻¹ CeT 开展后续实验。

3.2 共培养体系中成熟细胞细胞模型建立

结果如图 2 所示, 当诱导 3 d 时出现明显空泡 (见图 2A); 当诱导 6 d 时, 出现较小的金黄色、扁平状脂滴 (见图 2B); 当诱导至 9 d 时, 可见明显脂滴 (见图 2C)。油红 O 染色显示诱导 9 d 后出现明显红色脂滴 (见图 2D), 提示 3T3-L1 细胞诱导分化成功。

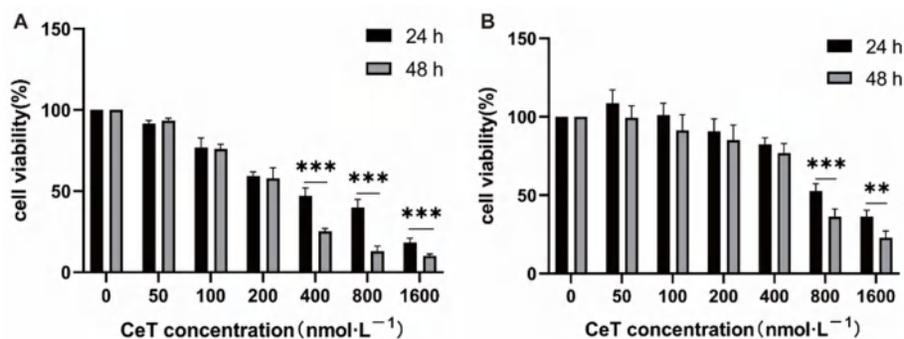


图 1 CeT 对 3T3-L1 (A) 及 786-O (B) 细胞活力影响

Fig 1 Effect of CeT on 3T3-L1 (A) and 786-O (B) cell viability

注 (Note): 与 24 h 组比较, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 (Compared with the 24 h group, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001)。

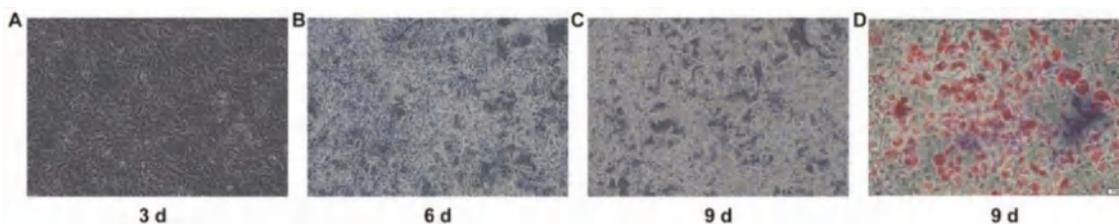


图 2 3T3-L1 细胞诱导分化过程 (A ~ C) 及油红 O 染色 (D) (×100)

Fig 2 3T3-L1 cell differentiation process (A ~ C) and oil red O staining (D) (×100)

3.3 CeT 刺激共培养体系中脂肪细胞的 APN 分泌
 结果如图 3 所示, 与空白组比较, 除 25 nmol · L⁻¹ CeT 给药组, 其余各组细胞上清液中 APN 含量显著增高, 并呈剂量依赖性 ($P < 0.001$)。

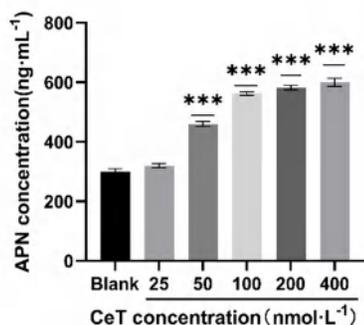


图 3 CeT 对共培养体系中 APN 分泌影响

Fig 3 Effect of CeT on adiponectin secretion in co-culture system

注 (Note): 与空白组比较, *** $P < 0.001$ (Compared with the blank group, *** $P < 0.001$)。

3.4 添加 CeT 共培养后可抑制 786-O 细胞增殖能力
 在细胞共培养体系的下室给予 50、100、200 nmol · L⁻¹ CeT 处理后, 与对照组相比, EDU 荧光强度明显降低, 表明 786-O 细胞增殖能力显著下调; 与共培养组相比, CeT 刺激共培养体系后, 发挥更强的抑制增殖作用 (见图 4)。

3.5 添加 CeT 共培养后可降低 786-O 细胞迁移能力
 在细胞共培养体系的下室给予 50、100、200 nmol · L⁻¹ 的 CeT 处理显著降低了 786-O 细胞的迁移能力, 并且抑制作用随 CeT 浓度的增加而增强 (见图 5)。

3.6 添加 CeT 共培养后 786-O 中 EMT 相关蛋白表达变化

经过 CeT 处理共培养体系后, 上室 786-O 细胞间质细胞标志物如 N-cad、Vim、Snail 明显降低, 上调上皮细胞标志物 E-cad 表达, 而阳性对

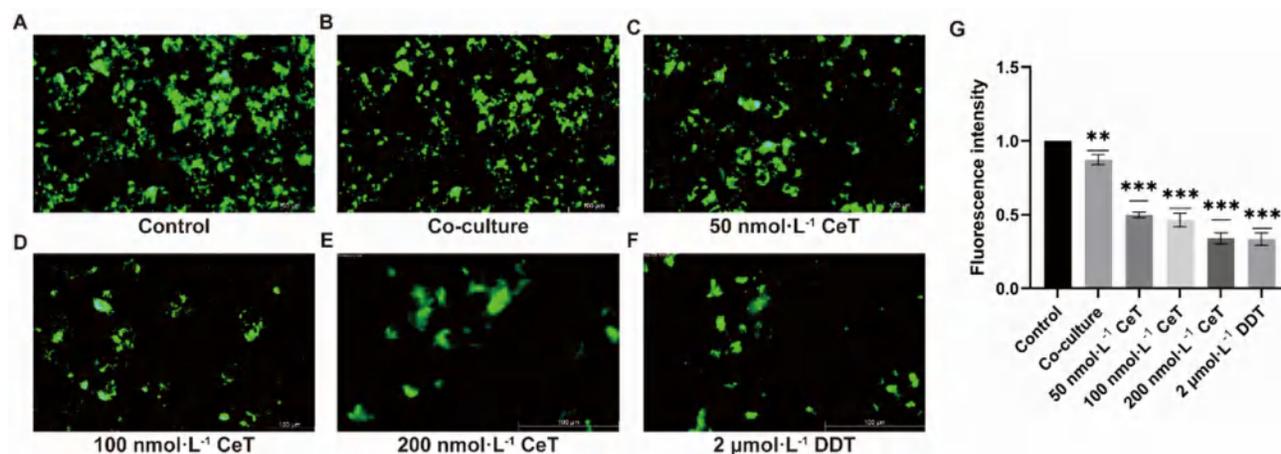


图 4 CeT 对共培养体系中 786-O 增殖能力影响 (×100)

Fig 4 Effect of CeT on the proliferation ability of 786-O in co-culture system (×100)

注 (Note): 与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

照药顺铂对 E-cad 的蛋白表达无显著影响; 此外, CeT 可显著上调下室中 3T3-L1 细胞中 APN 蛋白表达 (见图 6)。

4 讨论

激活 EMT 是导致 ccRCC 发展转移的关键过程, 上皮细胞标志物和间充质细胞标志物的表达变化导致细胞与相邻上皮细胞之间的黏附减少。脂肪组织主要由脂肪细胞组成, 同时也包含了前

脂肪细胞、内皮细胞、巨噬细胞、多能干细胞等。现有研究表明, 脂肪组织除了发挥能量储库功能之外, 还可通过分泌多种因子如瘦素、APN、趋化因子等 [13-15], 这些脂肪因子可通过自分泌、旁分泌和内分泌途径作用于肿瘤细胞, 调控胰岛素敏感性、炎症应答、能量平衡、血管生成和细胞增殖等 [16-18]。在肿瘤组织中, 癌旁脂肪细胞分泌的促炎细胞因子能够激活肿瘤微环境中的免疫细

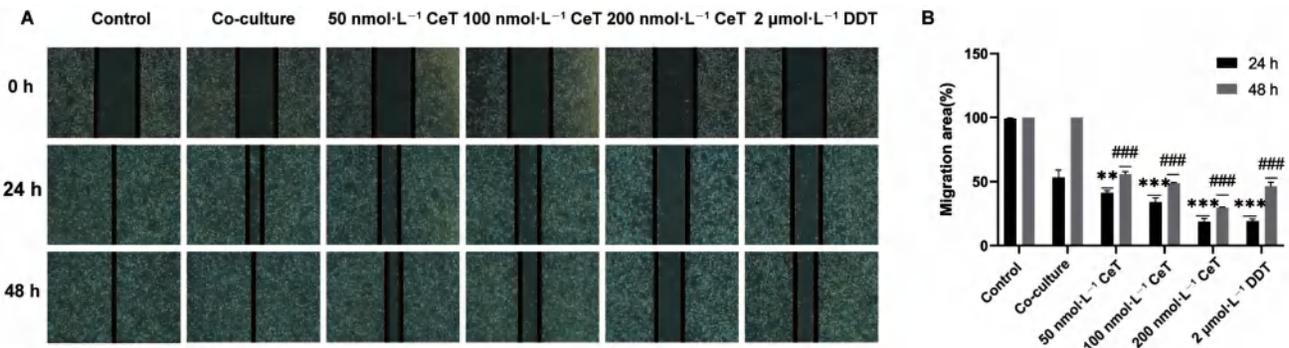


图 5 CeT 对共培养体系中 786-O 细胞迁移能力影响 (×100)

Fig 5 Effect of CeT on the migration ability of 786-O cells in co-culture system (×100)

注 (Note): 与 24 h 的共培养组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 48 h 的共培养组相比, ### $P < 0.001$ (Compared with the 24 h co-culture group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with the 48 h co-culture group, ### $P < 0.001$).

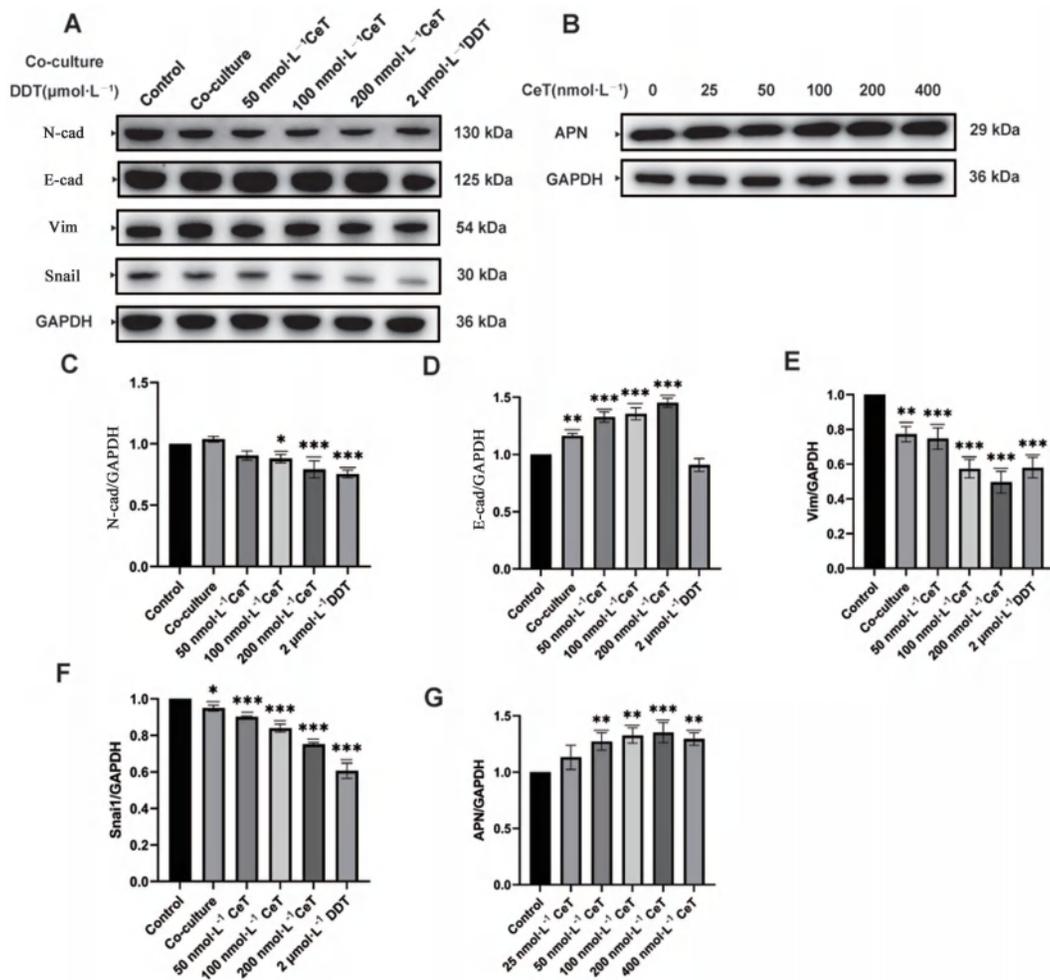


图 6 CeT 对细胞共培养体系中 786-O 细胞 EMT 蛋白及 3T3-L1 细胞 APN 表达的影响

Fig 6 Effects of CeT on the expression of EMT proteins in 786-O cells and APN in 3T3-L1 cells in cell co-culture system

注 (Note): 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

胞, 导致慢性炎症反应, 并通过分泌基质金属蛋白酶 (MMPs) 和其他酶类, 降解细胞外基质, 促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[19-21]。

本研究成功构建了一种细胞共培养体系 (即分化后的 3T3-L1 细胞和肾癌 786-O 细胞), 旨在模拟肾癌及其癌旁脂肪的关系。CeT 可呈浓度依

性增加细胞共培养体系中脂肪细胞分泌 APN 的水平, 并显著性抑制细胞共培养体系中肾癌细胞的增殖、迁移能力。课题组前期已经证实了 Cet 具有显著的抗肾癌作用, 其机制与 Cet 诱导肾癌细胞脂自噬, 抑制肿瘤干性特征有关。本研究进一步提示, CeT 除了直接发挥抗肿瘤作用, 还能通

过促进癌旁脂肪细胞分泌脂肪因子 APN, 进而改变肿瘤微环境发挥抗肿瘤作用。有研究表明, 抑制 NF- κ B (核因子 κ B) 通路, 可以提高 APN 的水平, 而 CeT 可以显著抑制 NF- κ B 通路, 提示 CeT 可能通过此途径增加 APN 分泌。此外, APN 可通过直接与细胞表面特异性 AdipoR1 受体结合诱导 AMPK 磷酸化, 进而介导 AMPK 通路激活^[22]。基于此, 后续将深入研究 CeT 促进 APN 分泌的机制及 APN 影响肿瘤微环境抗肿瘤机制, 并在动物水平上进一步验证, 寻找防治肾癌转移的新靶点, 阐明 CeT 作用于癌周脂肪组织抑制肾癌侵袭转移的新机制, 为以肾癌为代表的肿瘤药物防治提供新思路。

参考文献

- [1] Wettersten HI. Reprogramming of metabolism in kidney cancer [J]. *Semin Nephrol*, 2020, 40 (1): 2-13.
- [2] Yang Y, Lane AN, Ricketts CJ, et al. Metabolic reprogramming for producing energy and reducing power in fumarate hydratase null cells from hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e72179.
- [3] Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 715-736.
- [4] Simiczyjew A, Wadzynska J, Pietraszek-Gremplewicz K, et al. melanoma cells induce dedifferentiation and metabolic changes in adipocytes present in the tumor niche [J]. *Cell Mol Bio Lett*, 2023, 28 (1): 58.
- [5] Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2019, 79 (18): 4557-4566.
- [6] Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20 (9): 516-531.
- [7] Martinez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21 (10): 669-680.
- [8] Shi YN, Zhu N, Liu C, et al. Wnt5a and its signaling pathway in angiogenesis [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 471: 263-269.
- [9] Kannaiyan R, Manu KA, Chen L, et al. Celastrol inhibits tumor cell proliferation and promotes apoptosis through the activation of c-Jun N-terminal kinase and suppression of PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2011, 16 (10): 1028-1041.
- [10] Zhang CJ, Zhu N, Liu Z, et al. Wnt5a/Ror2 pathway contributes to the regulation of cholesterol homeostasis and inflammatory response in atherosclerosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865 (2): 158547.
- [11] Zhang CJ, Zhu N, Long J, et al. Celastrol induces lipophagy via the LXRA/ABCA1 pathway in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (9): 1472-1485.
- [12] Raccosta L, Fontana R, Corna G, et al. Cholesterol metabolites and tumor microenvironment: the road towards clinical translation [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65 (1): 111-117.
- [13] Fontana R, Mestre-Farrera A, Yang J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression [J]. *Annu Rev Pathol*, 2024, 19: 133-156.
- [14] Celià-Terrassa T, Kang Y. How important is EMT for cancer metastasis? [J]. *PLoS Biol*, 2024, 22 (2): e3002487.
- [15] Paul MC, Schneeweis C, Falcomatà C, et al. Non-canonical functions of SNAIL drive context-specific cancer progression [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 1201.
- [16] Currie E, Schulze A, Zechner R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer [J]. *Cell Metab*, 2013, 18 (2): 153-161.
- [17] Huang YH, Hong WQ, Wei XW. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15 (1): 129.
- [18] Tauriello DVF, Sancho E, Batlle E. Overcoming TGF β -mediated immune evasion in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22 (1): 25-44.
- [19] Broadfield LA, Pane AA, Talebi A, et al. Lipid metabolism in cancer: new perspectives and emerging mechanisms [J]. *Dev Cell*, 2021, 56 (10): 1363-1393.
- [20] Bian XL, Liu R, Meng Y, et al. Lipid metabolism and cancer [J]. *J Exp Med*, 2021, 218 (1): e20201606.
- [21] Sharma A, Blériot C, Currenti J, et al. Oncofetal reprogramming in tumour development and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22 (10): 593-602.
- [22] Jian M, Kwan JS, Binting M, et al. Adiponectin suppresses amyloid- β oligomer (A β O)-induced inflammatory response of microglia via AdipoR1-AMPK-NF- κ B signaling pathway [J]. *J Neuroinflamm*, 2019, 16 (1): 110.

(收稿日期: 2024-07-24; 修回日期: 2024-09-05)

羟丙基- β -环糊精包合宽叶缬草挥发油的工艺研究

郭玉虎¹, 王平², 刘军锋^{1,3}, 王旭^{2*}, 咎俊峰^{1*} (1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学老年脑健康中医药防护技术与新产品研发教育部工程研究中心, 武汉 430065; 3. 湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065)

摘要: **目的** 优化宽叶缬草挥发油环糊精包合工艺, 提高宽叶缬草挥发油水溶性。**方法** 采用相溶解度法探究不同环糊精对宽叶缬草挥发油的增溶作用, 优选最佳包合材料; 以包合材料与挥发油比例、包合时间、包合温度为影响因素, 包合率、收率、含油率为综合评价指标, 正交试验法优化宽叶缬草挥发油羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD) 包合工艺; 傅里叶红外光谱 (FTIR)、差示扫描量热法 (DSC)、X 射线衍射法 (XRD) 对包合物结构进行表征; 顶空-气相色谱质谱联用法 (HS-GC-MS) 检测包合物中挥发性成分。**结果** 最佳包合材料为 HP- β -CD, 最佳工艺为 HP- β -CD 与挥发油比例 14:1、包合时间 90 min、包合温度 50℃, 包合物中主要成分为乙酸龙脑酯。**结论** 宽叶缬草挥发油 HP- β -CD 包合工艺稳定、热稳定性强、增溶效果良好, 能对活性成分乙酸龙脑酯进行选择性的包合。

关键词: 宽叶缬草; 挥发油; 环糊精; 乙酸龙脑酯; 顶空-气相色谱质谱联用法

中图分类号: R94, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0644-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.010

Process of hydroxypropyl- β -cyclodextrin encapsulation of *Valeriana officinalis* L. var *latifolia* Miq volatile oil

GUO Yu-hu¹, WANG Ping², LIU Jun-feng^{1,3}, WANG Xu^{2*}, ZAN Jun-feng^{1*} (1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; 2. Engineering Research Center of Ministry of Education on Research and Development of Traditional Chinese Medicine Protection Technology and New Products for Elderly Brain Health, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; 3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources and Compounds, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065)

Abstract: Objective To optimise the cyclodextrin encapsulation of *Valeriana officinalis* L. var *latifolia* Miq volatile oil and to improve the water solubility of *Valeriana officinalis* L. var *latifolia* Miq volatile oil. **Methods** The phase solubility method was used to determine the effect of different cyclodextrins on the volatile oil of *Valeriana officinalis* L. var *latifolia* Miq, and to select the optimal encapsulation material. The ratio of encapsulation material to volatile oil, encapsulation time, and temperature were served as the influencing factors, and the encapsulation rate, the yield, and the oil content were taken as the evaluation indexes. The encapsulation of *Valeriana officinalis* volatile oil hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) inclusion was optimized by the orthogonal experimental method. Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, X-ray diffraction were used to characterize the inclusion structure. The volatile constituents in the inclusion mixture were detected by headspace-gas chromatography-mass spectroscopy. **Results** The best encapsulation material was HP- β -CD, and the optimal ratio of HP- β -CD to volatile oil was 14:1, encapsulation for 90 min, at 50℃, and the main encapsulation component was bornyl acetate. **Conclusion** The HP- β -CD encapsulation of *Valeriana officinalis* L. var *latifolia* Miq volatile oil is stable and thermally stable, with good solubilization, and can selectively encapsulate the active ingredient bornyl acetate.

基金项目: 湖北省自然科学基金-中医药创新发展联合基金资助项目 (No.2024AFD285)。

作者简介: 郭玉虎, 男, 硕士研究生, 主要从事中药物质基础与作用机制研究, email: 2604883952@qq.com *通信作者: 咎俊峰, 女, 副教授, 主要从事中药及其复方物质基础研究, email: 914120885@qq.com; 王旭, 男, 讲师, 主要从事中药资源品质评价与开发利用研究, email: wang158xu@163.com

Key words: *Valeriana officinalis* L. var *latifolia* Miq; volatile oil; cyclodextrin; bornyl acetate; headspace-gas chromatography-mass spectroscopy

宽叶缬草 (*Valeriana officinalis* L. var *latifolia* Miq) 是缬草属 *Valeriana* 植物, 是一种多年生开花植物, 其根状茎和根为入药部位。缬草约有 250 种, 广泛分布于欧亚大陆、北美和南美中部, 在我国主要分布于东北、西南和西北地区^[1]。缬草具有镇静安神、解痉止痛的功效, 临床上常用来缓解心神不宁、心悸、失眠、焦虑, 还可以用于慢性消化不良、闭经、帕金森等^[2]。同等剂量下, 在增加小鼠睡眠率和延长小鼠睡眠时间上, 缬草挥发油比缬草水提物效果更明显^[3]。缬草挥发油主要来源于缬草的根和根茎, 根茎挥发油含量为 0.5% ~ 2.0%。缬草挥发油稳定性差, 高温环境下易变质, 且具有独特气味, 影响患者服药顺应性, 常采用环糊精对缬草挥发油进行包合, 增强稳定性、降低气味、增加溶解度^[4-6]。

α -环糊精 (α -CD)、 β -环糊精 (β -CD)、 γ -环糊精 (γ -CD) 是由 6、7、8 个由 α - (1, 4) 键连接的吡喃葡萄糖单元组成的环状低聚糖。由于环糊精内部疏水, 外部亲水, 因此能包合疏水性药物。HP- β -CD 是具有不同取代度的无定形物, 可防止结晶, 相较于 β -CD 具有更高的水溶性。HP- β -CD 由于溶解性好、热稳定性高、毒性小, 被广泛应用于药物和食品中。此外, 它还可作为分子胶囊, 可有效避免光解、氧化和热破坏, 有利于保持药物稳定性, 在提高许多活性物质的保质期方面发挥重要作用^[7]。

接排稿本文采用相溶解度法研究不同环糊精对缬草挥发油的包合行为, 单因素试验和正交试验优化包合工艺, 顶空-气相色谱质谱联用法 (HS-GC-MS) 技术鉴定包合成分, 探究包合前后挥发性成分差异, 为缬草挥发油新剂型的开发提供参考改为本文采用相溶解度法考察不同环糊精对挥发油的增溶效果及包合形式; 以含油率、收率和包合率的综合评分为评价指标, 通过单因素试验和正交试验优选 HP- β -CD 最佳包合工艺; 采用 FTIR、DSC、XRD 对 HP- β -CD 包合物进行评价; HS-GC-MS 法分析缬草挥发油 HP- β -CD 包合前后成分差异, 为缬草挥发油新剂型的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

HP5890 II-HP5971 GC-MS 气相色谱-质谱联用仪 (美国赛默飞世尔科技公司); AB135-S 十万分之一分析天平 (瑞士梅特勒托利多仪器公司); FDU-1110 冷冻干燥机 (EYEL4 东京理化); F-101Z 恒温加热磁力搅拌器 (上海秋佐科学仪器有限公

司); JP-020S 超声波清洗机 (深圳市洁盟清洗设备有限公司); GeneSpeed 1580R 高速冷冻离心机 (基因有限公司); NP80 超微量紫外分光光度计 (因普恩国际贸易有限公司); Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); TA 250 差示扫描量热仪 (美国 TA 仪器有限公司); ultimaIV X 射线衍射仪 (日本理学株式会社)。

1.2 试药

宽叶缬草挥发油 (实验室自制); α -CD (上海思域化工科技有限公司, 含量: 98%, 批号: JD8020605); β -CD (上海阿达玛斯贝塔化学试剂有限公司, 含量: 99%, 批号: P1453631); γ -CD (含量: 98%, 批号: L1725009)、HP- β -CD (含量: 97%, 批号: I2222843) (上海阿拉丁科技有限公司); 水 (实验室自制, 超纯水); 无水乙醇 (批号: 20230324)、石油醚 (60 ~ 90 °C, 批号: 20221213) (国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 缬草挥发油的标准曲线^[8]

配制缬草挥发油醇溶液, 以无水乙醇为空白对照, 在 200 ~ 900 nm 内进行全波长扫描, 结果缬草挥发油在 263 nm 处有最大吸收, 确定 263 nm 为检测波长。

配制系列不同浓度缬草挥发油醇溶液, 263 nm 处测定其吸光度。以吸光度 (Y) 对挥发油的质量浓度 (X) 进行回归, 得方程 $Y = 0.0133X + 0.0039$, $R^2 = 0.9995$, 表明缬草挥发油在 10.4 ~ 62.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与吸光度具有良好的线性关系。

2.2 相溶解度法^[9-11]

精密称取适量 α -CD、 β -CD、 γ -CD、HP- β -CD, 配制系列浓度的水溶液。分别取适量上述溶液, 加入过量缬草挥发油, 于 25 °C 下以 120 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡 72 h。静置, 待溶液稳定平衡后, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液用无水乙醇稀释后于 263 nm 处测量吸光度。以缬草挥发油浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对环糊精浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 绘制相溶解度曲线 (见图 1)。

由图 1 可知, α -CD 和 HP- β -CD 的相溶解度曲线为线性, 挥发油浓度随环糊精浓度增加而增加, 而 β -CD 和 γ -CD 的相溶解度曲线为非线性, 挥发油浓度随环糊精浓度增加呈现先升后降的趋势。 α -CD 的回归方程为 $Y = 0.0067X + 0.0989$, R^2 为 0.9459, 平衡常数 K 为 0.065 $\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1}$; HP- β -CD 的回归方程为 $Y = 0.1069X + 0.1319$, R^2 为 0.9875, 平衡常数 K 为 1.162

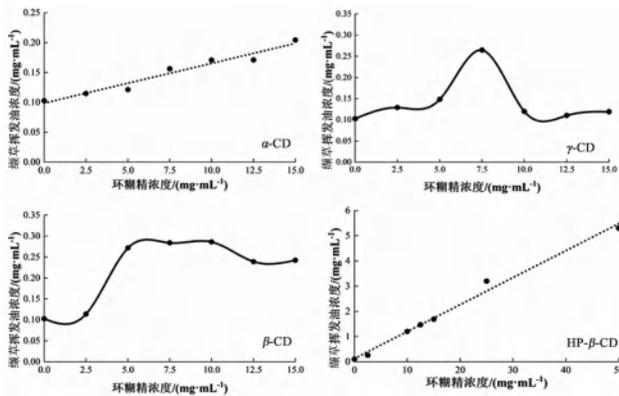


图 1 不同环糊精相溶解曲线

Fig 1 Dissolution curves of different cyclodextrin phases

$\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。HP-β-CD 的 K 值高于 α-CD, 表明其对药物的包合更为稳定, 环糊精质量浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, HP-β-CD 的增溶倍数为 16.40 倍, 远高于其他环糊精 (见表 1)。根据相溶解度结果, 选择 HP-β-CD 作为包合材料, 对缬草挥发油进行后续包合。

表 1 不同环糊精对缬草挥发油的增溶倍数

Tab 1 Solubilization multiplicity of different cyclodextrins on valerian volatile oils

环糊精质量浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	α-CD	β-CD	γ-CD	HP-β-CD
0.0	1.00	1.00	1.00	1.00
2.5	1.12	1.11	1.25	2.51
5.0	1.18	2.64	1.44	2.42
7.5	1.52	2.76	2.57	2.39
10.0	1.66	2.78	1.16	11.71
12.5	1.66	2.32	1.07	14.27
15.0	1.99	2.35	1.16	16.40

2.3 缬草挥发油包合物的制备

采用水溶液搅拌法, 称取 1 g HP-β-CD 于锥形瓶, 置于恒温磁力搅拌器中, 加入适量蒸馏水使其溶解, 搅拌过程中逐滴加入 200 μL 50% 缬草挥发油醇溶液, 于 50°C 下包合 90 min。包合完成后冷却至室温, 用少量石油醚分两次萃取, 取下层液体冷冻干燥, 即得白色的缬草挥发油 HP-β-CD 包合物 (简称包合物) 粉末。

2.4 评价指标测定 [12-13]

2.4.1 测定方法 称取包合物约 15 mg, 加 1 mL 无水乙醇溶液溶解, 超声、离心后取上清液, 稀释后于 263 nm 处测定吸光度, 代入标准曲线计算挥发油含量。并计算含油量、含油率、收率和包合率。

含油量 = 包合物中挥发油的质量浓度 × 稀释后体积 × 包合物总质量 × 稀释倍数 / 称取量;
含油率 (%) = 含油量 / 包合物总质量 × 100%;
收率 (%) = 包合物总质量 / (环糊精加入量 + 挥发油加入量) × 100%;
包合率 (%) = 含油量 / 挥发油加入量 × 100%。

2.4.2 信息熵赋权法 [14] 在综合评价时, 权数的确定直接影响最终结果的准确性和科学性。常用的权数确定方法为主观赋权法, 主观赋权法需要根据评价指标性质和评价目的进行配合使用确定各指标权数, 具有一定局限性。信息熵赋权法是利用不同指标的熵值来判断其离散程度, 信息熵越小, 指标的离散程度越大, 该指标对综合评价的影响越大。

设定 1 个评价指标系统由 m 个评价对象、 n 个评价指标组成, 则原始指标的数据矩阵为 $X = (X_{ij})_{m \times n}$ 。具体步骤如下:

- (1) 将原始数据矩阵归一化, $X'_{ij} = (X_{ij} - X_{min}) / (X_{max} - X_{min})$ 、 $X''_{ij} = (X_{max} - X_{ij}) / (X_{max} - X_{min})$ 。
- (2) 计算各指标概率 P_{ij} , $P_{ij} = X'_{ij} / \sum_{j=1}^n X'_{ij}$ 。
- (3) 计算各指标熵 H_i , $H_i = -k \sum_{j=1}^n P_{ij} \ln P_{ij}$ 。
- (4) 计算各指标权重 W_i , $W_i = (1 - H_i) / \sum_{j=1}^n (1 - H_j)$ 。

以含油率、收率、包合率为评价指标, 按上述方法计算权重, 结果见表 2。综合评分 = 含油率 × 47.74% + 收率 × 8.23% + 包合率 × 44.03%。

表 2 包合工艺不同评价指标信息熵计算法权重结果

Tab 2 Weight of information entropy calculation method for different evaluation indexes in the encapsulation

评价指标	平均值 /%	标准差	CV 系数 /%	权重 /%
含油率	5.162	0.428	8.30	47.74
收率	90.363	1.293	1.43	8.23
包合率	64.728	4.955	7.65	44.03

2.5 单因素试验

根据前期文献研究选择 HP-β-CD 与挥发油的比例 (料物比)、包合时间、包合温度作为影响因素 [15-18], 以含油率、收率和包合率的综合评分为指标进行单因素试验, 见图 2。由试验结果可知当料物比在 6 : 1 ~ 14 : 1 (g/mL) 时, HP-β-CD 与挥发油的比例为 12 : 1 其包合效果最好; 当包合时间在 60 ~ 180 min 时, 90 min 为最佳包合时间; 当包合温度在 40 ~ 60 $^\circ\text{C}$ 时, 55 $^\circ\text{C}$ 为最佳包合温度。

2.6 正交试验

在单因素试验的基础上采用正交试验法对包合工艺进行进一步优化, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 因素水平见表 3。按“2.3”项下方法进行试验, 以含油率、收率和包合率的综合评分为指标, 试验结果见表 4。

表 3 正交试验因素水平

Tab 3 Factor and level of orthogonal test

因素	水平		
	1	2	3
A. 包合料物比 / (g/mL)	10 : 1	12 : 1	14 : 1
B. 包合时间 /min	60	90	120
C. 包合温度 / $^\circ\text{C}$	50	55	60

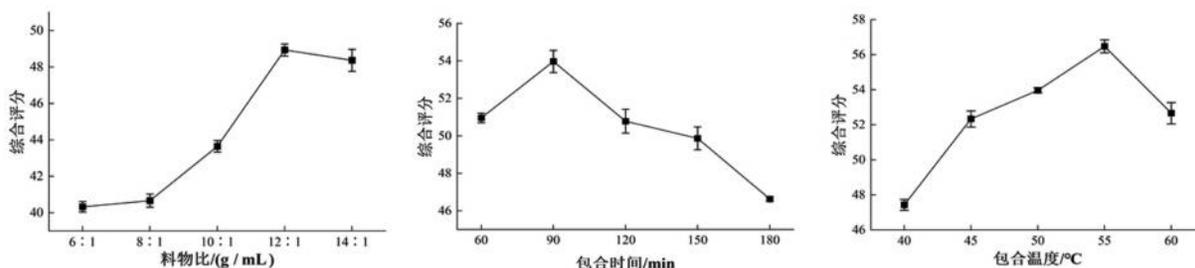


图 2 各因素对包合效果的影响

Fig 2 Effect of each factor on the effect of encapsulation

表 4 正交试验结果
Tab 4 Orthogonal test

No.	A	B	C	D	含油率 /%	收率 /%	包合率 /%	综合评分
1	1	1	1	1	5.62	89.60	59.56	36.28
2	1	2	2	2	5.70	88.88	59.98	36.44
3	1	3	3	3	5.56	89.59	58.86	35.94
4	2	1	2	3	5.15	89.01	64.18	38.04
5	2	2	3	1	5.24	90.63	66.43	39.21
6	2	3	1	2	5.10	91.15	65.09	38.60
7	3	1	3	2	4.34	91.17	63.93	37.72
8	3	2	1	3	4.93	91.20	72.60	41.82
9	3	3	2	1	4.83	92.05	71.92	41.55
K_1	108.67	112.04	116.70	117.04				
K_2	115.85	117.48	116.03	112.76				
K_3	121.10	116.09	112.87	115.80				
R	12.43	5.43	3.83	3.04				

正交试验结果表明，影响宽叶缬草挥发油包合的因素顺序为 $A > B > C$ ，最佳工艺为 $A_3B_2C_1$ ，即 HP- β -CD 与挥发油的比例为 14 : 1，包合时间 90 min，包合温度 50 °C。根据优选出的最佳工艺条件进行 3 次验证试验，结果见表 5，结果表明优化后的缬草挥发油 HP- β -CD 包合工艺稳定、可行。

表 5 缬草挥发油最佳包合条件验证试验结果
Tab 5 Valerian volatile oil optimal encapsulation conditions validation test

平行实验数	含油率 /%	收率 /%	包合率 /%	综合评分
1	5.06	91.39	72.59	41.95
2	4.99	91.66	71.72	41.56
3	4.91	90.97	72.24	41.64
平均值 /%	4.99	91.34	72.18	41.72
RSD /%	1.50	0.38	0.60	0.50

2.7 包合物质量评价

2.7.1 傅里叶红外光谱 (FTIR) 鉴别 分别取 HP- β -CD、包合物、挥发油与 HP- β -CD 物理混合物 (以下简称物理混合物)、挥发油适量，采用溴化钾压片法，分辨率 4 cm^{-1} ，扫描范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ ，进行红外光谱测试。HP- β -CD 与包合物红外光谱图相似，物理混合物则是 HP- β -CD 与挥发油的叠加。物理混合物与挥发油在 1735 cm^{-1} 处出现酯类的 $C = O$ 伸缩振动峰， 1680 cm^{-1} 处出现 α, β -不饱

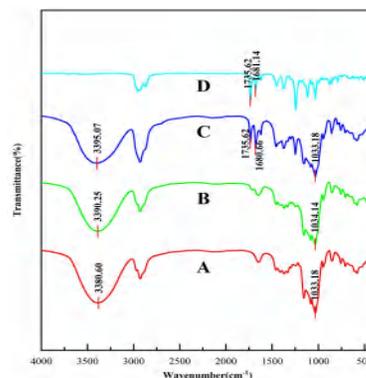


图 3 缬草挥发油包合物 FTIR 光谱

Fig 3 FTIR spectra of valerian volatile oil encapsulation

A. HP- β -CD; B. 包合物 (inclusion complex); C. 物理混合物 (physical mixtures); D. 挥发油 (volatile oil)

和酮的 $C = O$ 伸缩振动峰，包合后这两处伸缩振动峰消失，表明挥发油中的成分进入 HP- β -CD 空腔形成包合物 (见图 3)。

2.7.2 差示扫描量热 (DSC) 分析 分别取适量 HP- β -CD、包合物、物理混合物于铝制坩埚中，采用差示扫描量热仪进行分析。参数设置为：氮气流速 $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，升温速度 $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ，升温范围 $30 \sim 200 \text{ }^\circ\text{C}$ 。DSC 结果显示，物理混合物在 $151.97 \text{ }^\circ\text{C}$ 出现一个明显的放热峰，而包合物则与 HP- β -CD 相似，在 $136.57 \text{ }^\circ\text{C}$ 出现放热峰，这表明挥发油进入了 HP- β -CD 空腔，同时挥发油的热稳定性在包合后也得到了显著提高 (见图 4)。

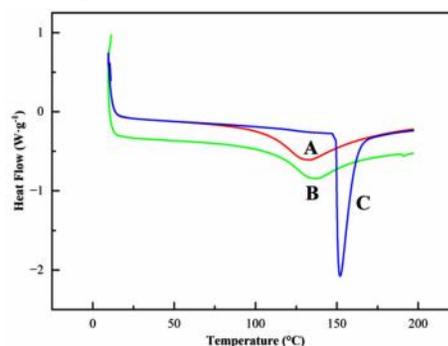


图 4 缬草挥发油包合物差示扫描量热图

Fig 4 DSC diagram of valerian volatile oil encapsulation

A. HP- β -CD; B. 包合物 (inclusion complex); C. 物理混合物 (physical mixtures)

2.7.3 X射线衍射 (XRD) 分析 分别取适量 HP- β -CD、包合物、物理混合物和挥发油, 进行 XRD 分析。工作电压为 40 kV, 电流 30 mA, 采用 Cu 靶, 扫描速度为 $5 (^{\circ}) \cdot \text{min}^{-1}$, 扫描范围 $5^{\circ} \sim 90^{\circ}$ 。XRD 结果显示, HP- β -CD、包合物、物理混合物和挥发油均为无定型结构。HP- β -CD 和物理混合物在 18.58° 和 18.47° 处出现宽峰, 而包合物则在 19.07° 处出现宽峰, 且 12.22° 和 11.81° 处未出现与 HP- β -CD 和物理混合物相似的峰, 表明挥发油进入 HP- β -CD 空腔, 以无定型形态呈现 (见图 5)。

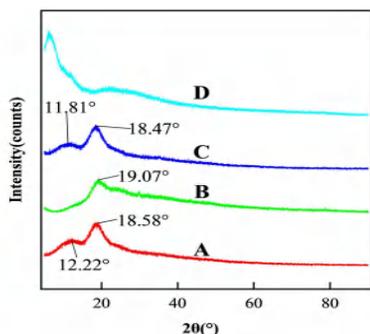


图 5 缬草挥发油包合物 X 射线衍射图

Fig 5 X-ray diffractogram of valerian volatile oil encapsulation

A. HP- β -CD; B. 包合物 (inclusion complex); C. 物理混合物 (physical mixtures); D. 挥发油 (volatile oil)

2.8 包合前后挥发性成分鉴定

2.8.1 HS-GC-MS 条件^[19]

① 顶空进样条件: 分别称取缬草挥发油 10 μL 和 100 mg 包合物置于 20 mL 顶空瓶中, 密封后放于样品盘中, 样品瓶加热温度 120°C , 传输线温度 250°C , 样品瓶平衡时间 10 min。

② GC-MS 条件: 色谱柱为 TR-5MS 毛细管气相色谱柱; 载气为纯氦气, 载气流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样口温度设定值 260°C ; 采用顶空进样, 分流比 20:1, 分流流速 $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分流时间 2 min; 梯度升温程序为 60°C 保持 7 min; 以 $9^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 150°C , 保持 2 min; 以 $2^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 170°C , 保持 1 min; 以 $25^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 270°C , 保持 1 min; 电离方式为 EI; 电离电压 70 eV; 离子源温度 200°C ; 采集方式为全扫描模式; 扫描质量范围设定为 m/z 40 ~ 550; 扫描次数 $5 \text{ 次} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

③ 成分分析: 采用峰面积归一化法计算相对百分含量, 通过 NIST 2011 标准谱库检索并结合相关参考文献^[20-23]等, 确定成分。

2.8.2 宽叶缬草挥发油成分鉴定 采用“2.8.1”项下方法对缬草挥发油进行挥发性成分分析。在缬草挥发油中, 共鉴定出 51 种化合物, 其中含量较高的 10 种成分分别为乙酸龙脑酯 15.67%、蒎烯 9.40%、乙酸桃金娘烯酯 6.85%、长叶松香芹酮 6.72%、D-柠檬烯 6.60%、2-异丙基-5-甲基茴香醚

4.72%、(+)- α -蒎烯 4.63%、左旋- β -蒎烯 4.14%、1, 8-环戊并癸二炔 3.81% 和反式石竹烯 3.68%。

2.8.3 包合物成分鉴定 采用最佳工艺制备包合物, 按照“2.8.1”项下方法进行成分分析。包合物中, 仅有少数成分被有效包合, 即蒎烯、乙酸龙脑酯、乙酸桃金娘烯酯、脱氢香橙烯和长叶松香芹酮。主要药效成分乙酸龙脑酯的相对百分含量从挥发油中的 15.67% 提高到 81.81%, 表明该工艺能对乙酸龙脑酯进行选择性的包合。

2.8.4 乙酸龙脑酯与 HP- β -CD 分子模拟 将 HP- β -CD 和乙酸龙脑酯分别作为受体和配体进行分子对接 (见图 6), 通过 Discovery Studio 呈现包合物的最佳结合模式, 结果见图 6。结果表明, 乙酸龙脑酯能够完整进入 HP- β -CD 空腔内, 乙酸酯基位于 HP- β -CD 大口端。此外, 乙酸龙脑酯与 HP- β -CD 分子间形成 6 个氢键: 乙酸龙脑酯乙酸酯基上的双键 O 与 HP- β -CD 中的 H 形成 4 个氢键, 单键 O 形成 2 个氢键, 氢键均属于非典型氢键, 是 C-H \cdots O 型, 氢键距离分别为 2.40、2.42、2.61、2.82、2.69、2.74 \AA , 结合能为 $-22.19 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

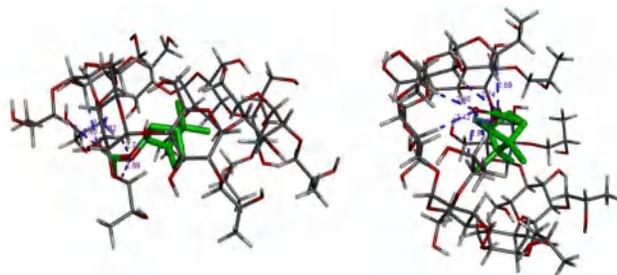


图 6 乙酸龙脑酯与 HP- β -CD 对接的相互作用图

Fig 6 Interaction of bornyl acetate docking with HP- β -CD

3 讨论

本文采用相溶解度法考察 α -CD、 β -CD、 γ -CD 和 HP- β -CD 对缬草挥发油溶液的增溶能力, 结果显示 HP- β -CD 增溶效果更好, 平衡常数 K 值更大。根据 Higuchi 和 Connors 的分类^[24], α -CD 和 HP- β -CD 的相溶解度曲线为 A_L 型, 即溶解度随环糊精浓度的增加呈线性增长, 说明此溶液中环糊精与缬草挥发油形成了 1:1 包合物。 β -CD 和 γ -CD 的相溶解度曲线为 B_S 型, 即溶解度随环糊精浓度的增加呈先升后降的趋势, 说明缬草挥发油与环糊精包合形成难溶性物质而沉淀, 使溶解度下降。 β -CD 包合缬草挥发油后取沉淀而不取滤液, 与 β -CD 相溶解度曲线结果吻合。缬草挥发油难溶于水, 用 HP- β -CD 包合后可有效减少上述问题。采用单因素试验和正交试验对料物比、包合时间、包合温度进行考察, 3 个因素中, 料物比对包合效果影响最大。

FTIR 结果表明, 缬草挥发油在 1735 cm^{-1} 处出现伸缩振动峰, 根据 GC-MS 结果推测该峰是

由乙酸龙脑酯的 C = O 产生, 1680 cm^{-1} 处出现伸缩振动峰, 推测由长叶松香芹酮产生, 包合后 1735 cm^{-1} 和 1680 cm^{-1} 峰消失, 表明成分被 HP- β -CD 包合, 与 GC-MS 结果相符。DSC 结果表明, 包合能大幅提高缬草挥发油的热稳定性, 使其不易挥发和发生化学反应。XRD 结果表明, 缬草挥发油被包合后以无定型形态存在于 HP- β -CD 空腔。

本文制备的包合物中挥发性成分与缬草挥发油中成分有较大差异, 乙酸龙脑酯的含量发生显著变化, 一方面是由于乙酸龙脑酯含量较高, 能更好地与 HP- β -CD 进行结合, 另一方面是因为 HP- β -CD 上的羟丙基破坏了 β -CD 分子内氢键, 使其空腔结构发生了变化。Yuan 等^[25]发现桉树精油中的醇和醛等分子更容易被 HP- β -CD 包合, 可能是这些成分的空间大小适合 HP- β -CD 空腔, 或者它们轻微极性使其更容易溶解于水, 使 HP- β -CD 对其有更高的选择性。Manaprasersak 等^[26]对姜科植物 *Zingiber cassumunar* Roxb. 的挥发油进行包合时发现 HP- β -CD 对 (*E*)-1-(3, 4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) 具有较高的选择性, 是因为羟丙基取代基链长较长, 羟基之间的氢键减少, 使 HP- β -CD 的空腔边缘比 β -CD 的空腔边缘大, 因此较大的 DMPBD 分子可以进入 HP- β -CD 的空腔。本研究发现乙酸龙脑酯能与 HP- β -CD 形成 6 个分子间氢键, 使 HP- β -CD 对乙酸龙脑酯的分子识别能力更强, 同时乙酸龙脑酯微溶于水, 使其与 HP- β -CD 分子结合的概率更大。乙酸龙脑酯是一种双环萜烷型单萜化合物, 是许多针叶树油和中药的主要挥发性成分, HP- β -CD 选择性包合可排除挥发油中大部分成分对其干扰, 更好地考察乙酸龙脑酯的药理活性。

综上, 采用 HP- β -CD 以料物比 14:1、包合温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、包合时间 90 min 对宽叶缬草挥发油进行包合, 能得到乙酸龙脑酯的选择性包合物, 该工艺制得的包合物可以更好地发挥乙酸龙脑酯的药效作用, 同时也为挥发油中成分的分纯化提供一定思路。

参考文献

- [1] 殷勇冠, 朱全红, 王彩云. 缬草的研究进展 [J]. 医药导报, 2006, 25 (3): 230-231.
- [2] 魏桂民, 李德文, 王少铭, 等. 缬草研究进展 [J]. 农技服务, 2016, 33 (12): 18-19.
- [3] 冷家归, 董燕梅. 一种畅销的天然药用植物——缬草 [J]. 生命世界, 2021, 48 (9): 54-55.
- [4] 司奇, 吴丹, 曹青日, 等. 缬草挥发油 β - 环糊精包合物的制备与评价 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (14): 2309-2313.
- [5] 杨红武, 毛衍平, 邱应海, 等. 缬草油 β - 环糊精包结物的工艺及稳定性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 1998, 18 (12): 544-546.
- [6] 陈洪燕, 万明, 廖蔚珍, 等. β - 环糊精包合缬草挥发油的工艺研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25 (4): 336-337.
- [7] Hu J, Du PT, Liu SS, et al. Comparative study on the effect of two drying methods on the guest encapsulation behavior of osmanthus flavor-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex [J]. Flavour Frag J, 2021, 36 (1): 84-98.
- [8] 李曦, 杨雅静, 刘路路, 等. 羟丙基 β - 环糊精对降香挥发油溶解度及稳定性的影响 [J]. 华西药学杂志, 2017, 32 (2): 146-149.
- [9] 杨玉婷, 刘云华, 黄志芳, 等. β - 环糊精、羟丙基 β - 环糊精对川芎挥发油的包合行为差异性研究 [J]. 中药与临床, 2021, 12 (2): 14-17.
- [10] 王娜, 张抗怀, 毛文彬, 等. 相溶解度法研究不同环糊精对淫羊藿苷的增溶作用 [J]. 中国药师, 2020, 23 (2): 260-263.
- [11] 陆兰芳, 杨鹏, 王展, 等. 相溶解度法研究环糊精对山奈酚的增溶作用 [J]. 中国调味品, 2019, 44 (6): 65-69.
- [12] 毛见智, 刘晓会. 罗勒挥发油包合物制备及抑菌活性研究 [J]. 上海工程技术大学学报, 2021, 35 (2): 118-122.
- [13] 韦小翠, 杨书婷, 张焱, 等. 都梁方中挥发油 β - 环糊精包合物的制备 [J]. 中成药, 2019, 41 (4): 721-726.
- [14] 刘欣钰, 刘效栓, 李季文, 等. 养阴生肌肠溶胶囊成型工艺优化 [J]. 中成药, 2023, 45 (9): 3033-3037.
- [15] 陈海清, 李后如, 谢俊俊. 肉桂挥发油 β - 环糊精包合工艺优选及特征鉴别 [J]. 药品评价, 2022, 19 (8): 453-456.
- [16] 袁彩英, 刘本涛, 黄嘉咏, 等. 响应曲面法优化小叶红藤挥发油包合物的制备工艺及评价 [J]. 西部中医药, 2022, 35 (9): 55-61.
- [17] 李锦莲, 单静影, 曲之佳, 等. 正交试验法优选蜘蛛香挥发油 β - 环糊精包合工艺 [J]. 数理医药学杂志, 2006, 19 (2): 199-200.
- [18] 肖胜利, 王家龙, 张秋燕, 等. 肉桂挥发油包合工艺研究及其包合物的特征鉴别 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42 (7): 1297-1300.
- [19] 赵旭, 李旭博, 高丽娟. GC-MS 结合化学计量学方法用于缬草挥发性成分的定性研究 [J]. 中医药学报, 2015, 43 (3): 17-19.
- [20] Huang BK, Qin LP, Chu QC, et al. Comparison of head-space SPME with hydrodistillation and SFE for analysis of the volatile components of the roots of *Valeriana officinalis* var. *latifolia* [J]. Chromatographia, 2009, 69 (5-6): 489-496.
- [21] 蔡昊城, 刘志华, 熊文, 等. 缬草根提取物中挥发性香气成分分析 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49 (4): 186-190.
- [22] 黄龙, 宋旭艳, 孙海辉, 等. 缬草油化学成分 GC/MS 分析研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24 (2): 11-14.
- [23] 肖雪, 罗娟敏, 马晋芳, 等. GC-MS 联用技术分析缬草精油挥发性成分 [J]. 中药材, 2017, 40 (6): 1348-1350.
- [24] Valle D, Martin EM. Cyclodextrins and their uses: a review [J]. Process Biochem, 2004, 39 (9): 1033-1046.
- [25] Yuan C, Thomas DS, Hook JM, et al. Molecular encapsulation of eucalyptus staigeriana essential oil by forming inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. Food Bioproc Tech, 2019, 12 (8): 1264-1272.
- [26] Manaprasersak A, Karpkird T. Selectivity encapsulation of *Zingiber cassumunar* Roxb. oil by beta-cyclodextrin derivatives [J]. Mater Today Proc, 2020, 23 (4): 659-665.

(收稿日期: 2024-07-05; 修回日期: 2024-09-08)

基于网络药理学和实验验证探究棉酚抗宫颈癌的作用机制

热依沙·艾赛提, 李金艳, 马悦, 马英兰, 蒋磊, 李敏* (新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 采用网络药理学、分子对接技术及体外实验验证棉酚对人宫颈癌细胞 (Hela) 的治疗效果, 探究中药棉酚抗宫颈癌的潜在作用机制。**方法** 首先借助数据库和在线平台筛选棉酚潜在作用靶点和宫颈癌相关靶点; 利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件对棉酚和宫颈癌的共同靶点进行蛋白-蛋白相互作用网络构建和拓扑学分析; 运用 DAVID 数据库对靶点进行 GO 注释和 KEGG 通路富集分析; 对棉酚和 PI3K-AKT 信号通路、Wnt/ β -catenin 信号通路等通路相关靶点进行分子对接。通过 CCK-8 法检测不同浓度棉酚对 Hela 的抑制率并计算 IC_{50} 值; 通过 IC_{50} 值确定分组, 利用 Western blot 进行机制验证。**结果** 网络药理学结果共筛选出棉酚潜在作用靶点 359 个, 药物-疾病共同靶点 128 个, 蛋白-蛋白相互作用网络筛选出 24 个关键靶点, 富集分析得到 666 个 GO 功能富集条目和 150 个 KEGG 通路富集条目; 分子对接结果显示棉酚与 AKT1、CTNNB1、EGFR、CASP3 等有较好的结合能力; 体外实验结果表明, 棉酚可下调 AKT1、CTNNB1 的蛋白表达量 ($P < 0.05$)。**结论** 利用网络药理学、分子对接和实验验证, 初步阐明棉酚可能通过调控 PI3K-AKT 信号通路、Wnt/ β -catenin 信号通路促进宫颈癌细胞的凋亡, 达到抗宫颈癌的作用, 为其药效物质基础和作用机制研究提供了理论基础。**关键词:** 棉酚; 宫颈癌; 网络药理学; 分子对接; PI3K-AKT 信号通路; Wnt/ β -catenin 信号通路
中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0650-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.011

Mechanism of gossypol against cervical cancer based on network pharmacology and experimental verification

Rayisa Asat, LI Jin-yan, MA Yue, MA Ying-lan, JIANG Lei, LI Min* (College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Abstract: Objective To determine the potential mechanism of gossypol against cervical cancer based on network pharmacology and molecular docking, and to verify the therapeutic effect of gossypol on human cervical cancer cells (Hela) by in vitro cell experiments. **Methods** Firstly, the potential targets of gossypol and cervical cancer related targets were screened in databases and online platforms. The common target of gossypol and cervical cancer were determined by STRING database. The protein interaction network was established and topological analysis conducted by Cytoscape. DAVID database was used to perform GO annotation and KEGG pathway enrichment of the targets. Molecular docking of gossypol and PI3K-AKT signaling pathway, Wnt/ β -catenin signaling pathway and other pathway-related targets were performed. The inhibition rate of gossypol at different concentrations on Hela cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and the IC_{50} value was calculated. IC_{50} value was used to determine the grouping, and Western blot was used to verify the mechanism. **Results** Totally 359 potential targets of gossypol were identified by network pharmacology, and 128 common targets of drug-disease; 24 key targets were identified by protein-protein network interaction, and 666 enrichment items of GO function and 150 enrichment items of KEGG pathway were obtained via enrichment. Molecular docking showed that gossypol had good binding ability with AKT1, CTNNB1, EGFR, and CASP3, etc. In vitro experiment

基金项目: 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室项目 (No.SKL-HIDCA-2023-YX3)。

作者简介: 热依沙·艾赛提, 女, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究, email: Larisa1218@163.com *通信作者: 李敏, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然活性化合物的开发与利用研究, email: limin1120@xjmu.edu.cn

showed that gossypol down-regulated the protein expression levels of AKT1 and CTNNB1 ($P < 0.05$).

Conclusion Network pharmacology, molecular docking and experimental verification help elucidate that gossypol may effectively promote the apoptosis of cervical cancer cells and achieve the anti-cervical cancer effect by regulating the PI3K-AKT signaling pathway and Wnt/ β -catenin signaling pathway, which provides a theoretical basis for the study of drug effect material basis and mechanism.

Key words: gossypol; cervical cancer; network pharmacology; molecular docking; PI3K-AKT signaling pathway; Wnt/ β -catenin signaling pathway

宫颈癌 (cervical cancer) 是一种严重影响女性身体健康的恶性肿瘤, 其发病率近几年来呈上升趋势^[1]。据报道, 每年约有 51 万宫颈癌新发病例, 中国每年新增病例高达 10 万例, 且其死亡率持续上升^[2]。临床研究发现, 宫颈癌患者发病年龄日趋年轻化, 其中 35 岁以下的癌前病变人数占总数的近 50%^[3], 近几年来发病率仍然在持续升高。宫颈癌的常规治疗措施为手术治疗及放化疗, 但存在毒副作用大、易复发及易产生耐药等难题^[4]。目前宫颈癌疾病的确切机制尚不清楚, 因此探究宫颈癌可能的发病机制对于宫颈癌的临床治疗具有重要意义。

中药棉籽是锦葵科棉属植物草棉、树棉及陆地棉的种子, 在新疆广泛分布, 具有补肝肾、强腰膝、暖胃止痛、止血、催乳等功效^[5]。棉酚 (gossypol) 是一种黄色多元酚类化合物, 是棉籽的主要活性成分^[6]。棉酚具有包括抗病毒、抗氧化、抗菌、抗疟疾和抗肿瘤在内的多种生物活性^[5]。课题组前期研究发现, 棉酚对宫颈癌 Hela 细胞具有一定的抑制作用。本研究借助生物分子网络系统整合的大量数据及生物信息, 利用网络药理学方法, 预测棉酚抗宫颈癌的潜在作用机制, 通过分子对接技术和体外细胞实验进一步探究棉酚基于 PI3K-AKT 信号通路、Wnt/ β -catenin 信号通路等通路抗宫颈癌的作用机制, 为棉酚后续的实验研究和临床应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞株

人宫颈癌 Hela 细胞由新疆医科大学协同实验中心提供。

1.2 试剂

棉酚 (成都仪睿生物科技有限公司, 批号: YRM082-221201); 细胞增殖与活性检测 (CCK-8) 试剂盒 (北京希诺因子科技有限公司, 批号: 2250L23-10-01); DMEM 高糖完全培养基 [含 10% 胎牛血清 (FBS)] (武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号: PM150210B); 0.25% 胰蛋白酶、三色预染蛋白 Marker (赛默飞世尔科技有限公司); 磷酸盐 (PBS) 缓冲液 (杭州思拓凡生物科技有限公司, 批号: AH29827278); 高效 RIPA 细胞裂解

液、PMSF 蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 磷酸酶抑制剂 Cocktail (上海奥默生物技术有限公司, 批号: M7528); 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: CR2312070); 7.5% SDS-PAGE 一步法凝胶快速制备试剂盒 (北京博泰斯生物技术有限公司, 批号: WB2101); ECL 化学发光液 (超敏型) (和元李记上海生物技术有限公司, 批号: LFI23098); β -actin 抗体、山羊抗兔 (江苏亲科生物研究中心有限公司, 批号: AF7018、S0001); AKT1 抗体、 β -catenin 抗体 (赛信通上海生物试剂有限公司, 批号: 2938、8480)。

1.3 仪器

QP-60 II 型 CO₂ 细胞培养箱 (山东博科生物产业有限公司); FC 型全自动酶标仪 (美国 ThermoFisher 科技公司); L-RSK 型摇床 (北京兰杰柯科技有限公司); TD-4M 型离心机 (山东博科生物产业有限公司); FX-M 型涡旋仪 (北京索莱宝科技有限公司); PowerPac 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); FUSION FX6 型化学发光凝胶成像系统 (VILBER BIO IMAGING 公司)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学中棉酚和宫颈癌的潜在作用靶点

2.1.1 棉酚活性成分靶点获取及靶点网络图的构建

利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取棉酚的 Canonical SMILES 字符串和 sdf* 格式文件, 利用 Swiss Target Prediction (<http://www.SwissTargetprediction.ch/>)、PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/check.html/>) 数据库预测棉酚的潜在作用靶点, 并通过 Cytoscape 3.9.0 软件, 构建“药物-靶点”网络图。筛选结果合并去重后, 共获得 359 个棉酚潜在作用靶点。将棉酚及其潜在作用靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件中, 构建“棉酚-作用靶点”网络图, 见图 1。其中, 绿色矩形节点代表棉酚, 黄色矩形节点代表棉酚潜在作用靶点, 每条边代表棉酚与作用靶点之间的相互作用关系。对靶点网络图进行网络拓扑学分析, 共涉及 128 个节点, 2126 条边。

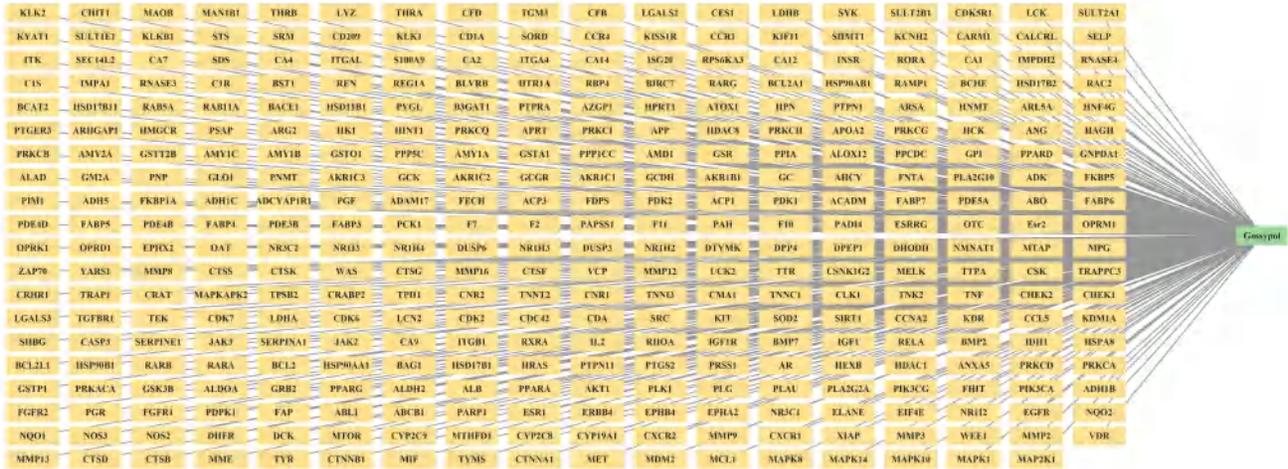


图 1 棉酚 - 作用靶点网络

Fig 1 Gossypol-target network

2.1.2 宫颈癌相关靶点及药物 - 疾病共同靶点的获取 利用疾病数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、CTD (<http://ctdbase.org/>) 和 Drugbank (<https://go.drugbank./>) 数据库,以“cervical cancer”为检索词条,对宫颈癌的靶点进行检索收集,获取宫颈癌相关作用靶点。将“2.1.1”项下获得的棉酚靶点与宫颈癌疾病靶点导入 Venny 2.1 在线工具绘制 Venn 图,获得棉酚 - 宫颈癌交集靶点。汇总 5 个数据库靶点结果,去除重复基因,得到宫颈癌相关靶点 1821 个。将宫颈癌与棉酚的靶点输入 Venny 2.1.0 软件绘制韦恩图,取其交集后获得棉酚 - 宫颈癌交集靶点 128 个。

2.1.3 蛋白 - 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建及可视化 将棉酚 - 宫颈癌交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 进行分析,设置置信度 ≥ 0.40 ,隐藏网络中断开的节点,结果保存为 *tsv 格式文件,并将其导入 Cytoscape 3.9.0 软件中,利用“Network Analyzer”功能对结果进行网络拓扑学分析,构建 PPI 图,见图 2。利用 Cytoscape 3.9.0 软件中的插件 CytoNCA 对棉酚进行关键靶点的筛选。通过 STRING 数据库对棉酚 - 宫颈癌交集靶点进行 PPI 分析,隐藏网络中断开的节点,共涉及 128 个节点和 2126 条边。PPI 网络图见图 3,其中度值 (degree) 越大,节点颜色越深。拓扑学分析结果显示,度中心性 (DC)、中介中心性 (BC) 和紧密中心性 (CC) 的平均值分别是 27、34.141、0.548,大于等于三者均值的靶点共有 56 个,在这 56 个靶点参数的基础上再次取中位数,DC、BC、CC 分别为 49.5、110.055、0.613,大于等于三者均值的靶点共有 24 个,见图 4。

2.1.4 GO 生物功能和 KEGG 通路富集分析 基于 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对交集靶点进行基因本体 (GO) 功能注释和京都基因

与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。利用 Omicshare (<https://www.omicshare.com/tools/>) 在线作图工具和微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线平台对 GO 和 KEGG 通路富集结果进行可视化分析。利用 DAVID 6.8 数据库对棉酚和宫颈癌的交集靶点进行生物富集分析,得到具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的 GO 功能富集条目为 666 条,其中生物过程 (BP) 为 500 条,细胞组分 (CC) 为 60 条,分子功能 (MF) 为 106 条。对 GO 富集条目按照 P 进行排序, P 越小表示富集程度越高,分别选取 BP、CC 和 MF 中排名前 10 的条目绘制条形图,见图 5。KEGG 通路富集结果显示,128 个交集靶点共涉及 150 条通路,利用 P 值排序绘制排名前 20 的 KEGG 通路气泡图,见图 5。其中 X 轴代表基因所占的比例, Y 轴代表通路名称,气泡面积则代表通路富集基因数,气泡颜色代表 P 的大小,气泡颜色越蓝表示信号通路的显著性就越高。富集结果显示棉酚抗宫颈癌治疗中起到主要作用的通路为 MAPK 信号通路、PI3K-AKT 信号通路以及 HIF-1 信号通路等,这些通路与棉酚抗宫颈癌的生物过程存在密切的关系。

2.1.5 “药物 - 靶点 - 疾病 - 通路”网络构建 将棉酚、宫颈癌和前 20 条 KEGG 通路及其涉及的靶点数据进行整合,导入至 Cytoscape 3.9.0 软件相关靶点 - 药物 - 疾病网络图,见图 6。其中圆形为交集靶点节点,菱形为前 20 条 KEGG 通路节点,八边形为宫颈癌节点,箭头为棉酚节点。度值越大,节点越大,表明节点在网络中更重要,揭示了棉酚抗宫颈癌的多靶点、多途径的作用特点。

2.2 “药物 - 靶点”分子对接验证

利用 PubChem 数据库和 Open Babel 软件获取棉酚的 *mol2 格式文件,从 RCSB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 中下载核心靶点的 3D 结构,并运用 PyMol 软件对蛋白质进行去水、加氢等操作

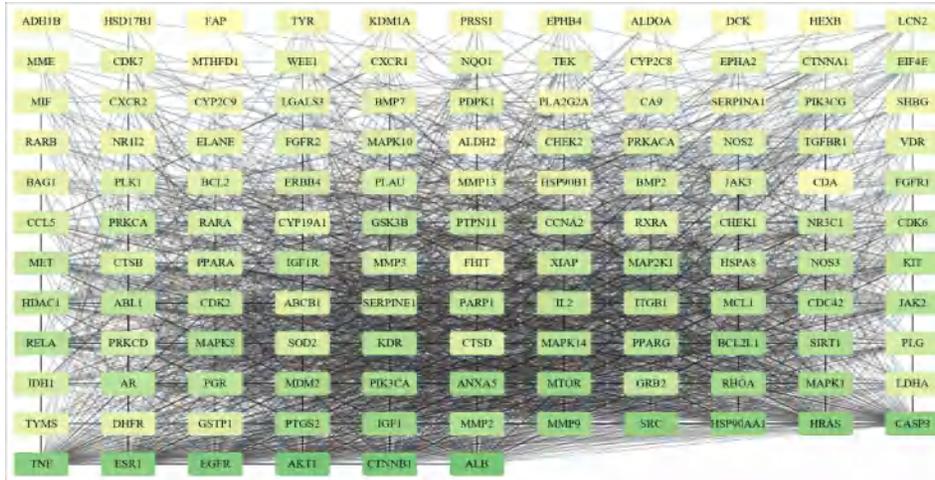


图 2 棉酚 - 宫颈癌 128 个交集靶点
Fig 2 128 intersection targets of gossypol-cervical cancer

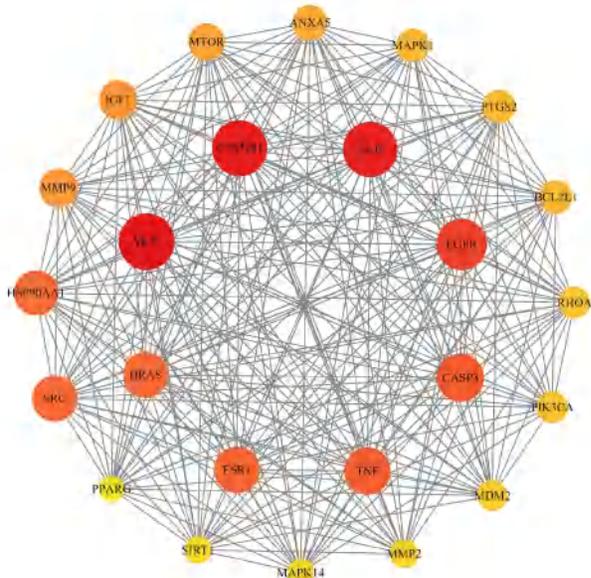


图 3 棉酚 - 宫颈癌 24 个核心靶点的 PPI 网络图
Fig 3 PPI network of 24 core targets of gossypol-cervical cancer

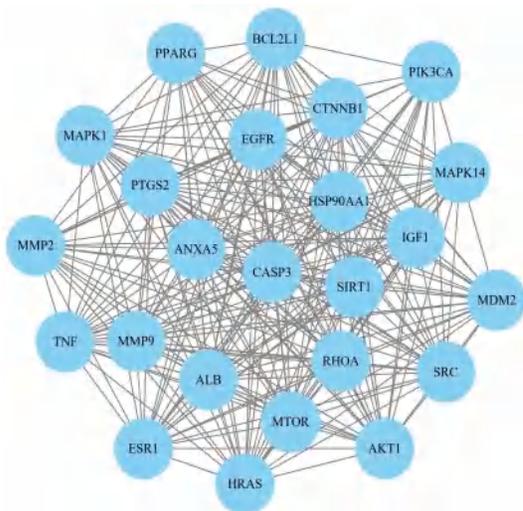


图 4 利用 BC、CC、DC 筛选棉酚 - 宫颈癌交集靶点的 24 个核心靶点
Fig 4 Twenty-four core targets of gossypol-cervical cancer intersection targets screened by BC, CC, and DC

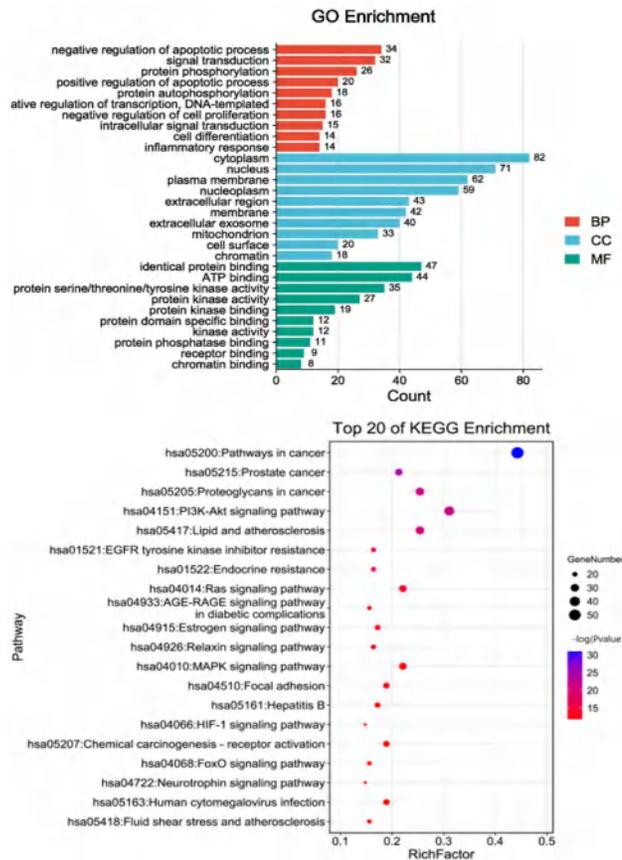


图 5 棉酚与宫颈癌的 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析
Fig 5 GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis for gossypol and cervical cancer

作，将其结果保存为 *.pdb 格式，再经过 AutoDock Tools 1.5.6 软件和 AutoDock Vina 1.1.2 软件对两者进行分子对接，通过两者结合能来评价其结合活性。分别选取各蛋白中与棉酚结合能最小的对接模式，利用 PyMol 软件进行作图分析。通过文献查阅并结合网络药理学 KEGG 通路分析结果，对 PI3K-AKT、MAPK 等信号通路上的蛋白 AKT1、CTNNB1、ALB、EGFR、CASP3、TNF、ESR1、

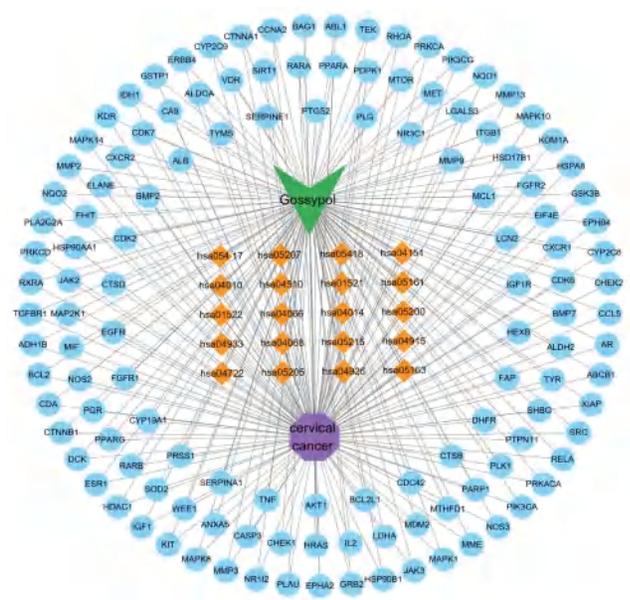


图 6 棉酚与宫颈癌的“药物-靶点-疾病-通路”网络图
Fig 6 “Drug-target-disease-pathway” network diagram for gossypol and cervical cancer

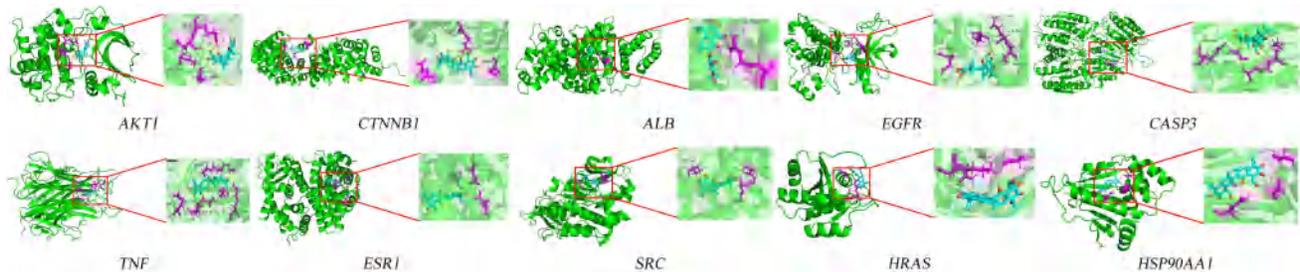


图 7 棉酚与靶蛋白分子对接可视化
Fig 7 Visualization of gossypol docking with target protein molecules

在 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中对人宫颈癌 Hela 细胞培养。设空白对照组 (DMEM 培养液)、干预组 (棉酚不同浓度给药)。

2.3.2 CCK-8 法检测细胞抑制率 取对数生长期的 Hela 细胞, 以每孔 1×10⁵ 个细胞密度接种于 96 孔板, 按照实验分组方法干预, 培养 48 h 后, 弃去上清液, 按照 CCK-8 法加入含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基, 37℃ 孵育 30 min 后, 使用酶标仪在 450 nm 下测定吸光度, 计算细胞抑制率。结果见图 8, 与空白组比较, 棉酚干预组对 Hela 细胞抑制率具有浓度依赖性, 随着棉酚浓度的升高, Hela 细胞抑制率显著上升 ($P < 0.0001$), IC_{50} 值为 14.35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测相关蛋白表达情况 按照实验分组方法对细胞进行干预, 用 RIPA 裂解液提取细胞蛋白样本, 并按照 BCA 试剂盒方法进行含量测定, 经过制备 SDS-PAGE 凝胶、上样、电泳、电转、5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 一抗 (AKT1、 β -catenin) 4℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h 后, 用 ECL 发光试剂盒显色, 将凝胶成像系统曝光的蛋白条带结果用 Image J 进行灰度

SRC、HRAS、HSP90AA1 与棉酚进行分子对接, 见表 1。分子对接结合能均 $< -20.92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明棉酚与以上蛋白有一定的结合能力, 利用 PyMol 软件对其结果进行可视化作图, 见图 7。

表 1 棉酚与靶蛋白分子对接结合能

Tab 1 Binding energy of gossypol and target protein molecules

蛋白	PDB ID	结合能 / ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
AKT1	3CQW	-41.84
CTNNB1	1JDH	-38.49
ALB	1E7E	-47.28
EGFR	2ITX	-40.58
CASP3	3DEJ	-38.49
TNF	1A8M	-36.82
ESR1	2G5O	-51.46
SRC	2H8H	-49.37
HRAS	121P	-43.10
HSP90AA1	1BYQ	-41.84

2.3 棉酚抗宫颈癌体外实验验证

2.3.1 细胞培养及实验分组 使用 DMEM 高糖完全培养基 (含 10%FBS 和 1% 青链霉素双抗),

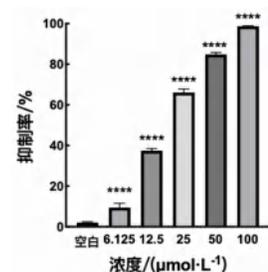


图 8 棉酚对 Hela 细胞抑制率
Fig 8 Inhibitory rate of gossypol on Hela cells
注: 与空白组比较, **** $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the blank group, **** $P < 0.0001$.

值分析, 以 β -actin 为内参。软件自动读取的指标灰度值与内参灰度值的比值, 即样本的相对含量, 表示蛋白质的相对表达水平。Western blot 结果见图 9, 与空白组比较, 中浓度组 (14.35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、高浓度组 (28.71 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的棉酚可以使 AKT1、 β -catenin 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。

2.4 统计学分析

采用 Prism 9 软件进行统计学数据分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐采用

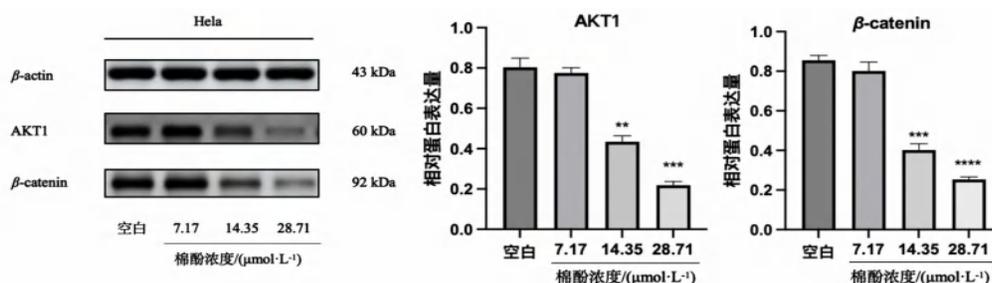


图9 棉酚对 HeLa 细胞中 AKT1、 β -catenin 蛋白表达的影响

Fig 9 Effect of gossypol on AKT1 and β -catenin protein expression in HeLa cells

注: 与空白组比较, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the blank group, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$.

最小显著性差异法 (LSD); 若方差不齐则使用 Tamhane's 事后检验法分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

宫颈癌是由高危型人乳头状瘤病毒 (hrHPV) 持续感染引起, 是全球范围内第二大常见的妇科恶性肿瘤, 也是导致全球女性癌症死亡的第四大原因, 严重威胁着女性的健康^[7]。临床研究发现, 宫颈癌患者的发病年龄日趋年轻化, 近年来宫颈癌的发病率和死亡率一直在持续上升^[8]。虽然通过 hrHPV 和巴氏涂片检测进行的定期监测显著降低了全球宫颈癌发病率, 然而宫颈癌在不同人群中的发生和转化存在较大的不一致性^[9]。尽管人乳头状瘤病毒疫苗 (HPV 疫苗) 的接种取得了较好的效果, 然而这种预防措施因其价格昂贵, 并没有完全普及并实施。因此, 对于宫颈癌疾病的相关机制研究及临床防治显得极为重要。棉酚是棉籽的主要活性成分, 是一种多酚双萜类化合物^[8]。棉酚是临床上常用的妇科出血性疾病的治疗药物, 近年来研究发现棉酚还具有良好的抗肿瘤活性^[10]。但是, 目前棉酚及其衍生物抗宫颈癌作用的相关报道较少, 且多见于体外活性验证阶段, 其抗肿瘤分子机制及靶点尚不明确。

本研究通过 GO 富集分析, 预测棉酚在抗宫颈癌防治过程中与细胞凋亡、信号转导、细胞增殖、免疫反应、炎症反应等过程有关, 可涉及细胞的细胞质、细胞核、线粒体等多个区域, 其分子功能主要集中于蛋白质结合、激酶活性、受体结合等。炎症有助于生物体抵抗病原体, 但持续的炎症可能会带来不良反应。反复的组织修复和组织损伤很容易导致 DNA 损伤^[11]。肿瘤的特征是致癌或肿瘤抑制基因的表观遗传变化或突变, 以及正常细胞的转化, 持续炎症很容易促进这两个特征^[12]。肿瘤微环境 (TME) 由于其异质性, 免疫系统的细胞被招募, 各种促肿瘤和抗肿瘤炎症细胞相互竞争^[13]。这些细胞能够释放促炎细胞

因子、趋化因子和生长因子, DNA 损伤途径可以通过随着时间的推移积累这些分子来激活。

通过 KEGG 富集分析预测棉酚抗宫颈癌可能作用的通路, 结合相关文献的报道, 发现 PI3K-AKT 信号通路和 Wnt/ β -catenin 信号通路在棉酚抗宫颈癌机制中发挥着至关重要的作用。PI3K/AKT 通路在调控各种细胞功能方面, 肿瘤调控中起关键作用^[14]。PI3K/AKT 信号通路在机体细胞中普遍存在, 是传导细胞内外信号的重要途径, 其在结肠癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤疾病中异常激活, 目前已成为临床上肿瘤领域的研究重点之一。其中, AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 对细胞增殖、分化及存活等多种生物学过程起重要的调节作用, 能够参与调节肿瘤、炎症、糖尿病等多种疾病的发生^[15]。有关研究表明, p-AKT1 表达的变化能影响非甾体抗炎剂 (NS398), 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制作用, 这表明 AKT1 与宫颈癌的发展有重要关系^[16]。相关研究表明, Wnt/ β -catenin 信号通路对肿瘤细胞的凋亡呈负性调控作用^[17]。CTNNB1 也叫 β -catenin 基因, 是调控 Wnt/ β -catenin 通路开启的关键影响因子, 在肿瘤细胞 Wnt/ β -catenin 信号传导通路被激活, 发挥抑制 GSK-3 β 活性的作用。当 β -catenin 呈高表达时, 通路启动, 从而影响 Wnt1、GSK-3 β 等相关特异基因的表达; 反之, 通路将自动关闭^[18]。 β -catenin 在卵巢癌中的表达与卵巢癌组织分化程度、淋巴结转移相关^[19]。相关研究显示, 宫颈良性病变组织、宫颈癌组织 β -catenin mRNA 表达依次上升, 与妇科肿瘤分期、腹主动脉旁淋巴结转移、盆腔淋巴结转移、分化程度相关, 说明 β -catenin 影响宫颈癌病理特征^[20]。

分子对接结果显示, PPI 筛选出的 24 个核心靶点中度值排名前 10 的靶点与棉酚小分子进行分子对接, 其结合能均 $< -20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明棉酚与 AKT1、CTNNB1、ALB、EGFR、CASP3、TNF、ESR1、SRC、HRAS 和 HSP90AA1 结合活

性良好, 结合位点均有稳定的氢键, 构象稳定, 且结合能越小表明对接越稳定, 在棉酚抗宫颈癌作用中更为重要。本文选用结合能较好的 AKT1 和 CTNNB1 进行体外细胞实验验证。

综上所述, 本研究基于网络药理学方法, 对棉酚抗宫颈癌的作用靶点及通路进行研究, 并进一步利用分子对接技术和体外实验对 PI3K/AKT 信号通路、Wnt/ β -catenin 信号通路进行初步验证。体外研究表明棉酚明显降低了 AKT1 和 CTNNB1 蛋白的表达, 可通过调控 PI3K/AKT 信号通路和 Wnt/ β -catenin 信号通路, 能够有效抑制宫颈癌细胞的增殖, 从而达到抗宫颈癌的作用。此研究为后续棉酚抗宫颈癌机制的深入研究提供了理论依据, 并为后续实验设计提供了新的思路和方向。

参考文献

- [1] 朱晓芹, 刘志强, 王博龙. 基于生物分子网络和分子对接研究槲皮素抗宫颈癌的机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32 (1): 23-31, 69.
- [2] Huang JJ, Deng YY, Daniel B, et al. Global distribution, risk factors, and recent trends for cervical cancer: a worldwide country-level analysis [J]. Gynecol Oncol, 2021, 164 (1): 85-92.
- [3] Miller JW, Hanson V, Johnson GD, et al. From cancer screening to treatment: service delivery and referral in the national breast and cervical cancer early detection program [J]. Cancer, 2014, 120 Suppl 16 (0 16): 2549-2456.
- [4] Liu XS, Xing Y, Li MY, et al. Licochalcone A inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cell by targeting programmed cell death-ligand 1 via the NF- κ B and Ras/Raf/MEK pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 113989.
- [5] 付帅, 吴勇. 棉酚及其衍生物抗肿瘤机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17 (4): 524-526.
- [6] Chen CW, Hu S, Tsui KH, et al. Anti-inflammatory effects of gossypol on human lymphocytic jurkat cells via regulation of MAPK signaling and cell cycle [J]. Inflammation, 2018, 41: 2265-2274.
- [7] Dina J, Elmehrath AO, Khalil RM, et al. Protein networks linking Warburg and reverse Warburg effects to cancer cell metabolism [J]. Biofactors, 2021, 47 (5): 713-728.
- [8] 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.
- [9] Olusola P, Banerjee HN, Philley JV, et al. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities [J]. Cells, 2019, 8 (6): 622.
- [10] Lu MD, Li LY, Li PH, et al. Gossypol induces cell death by activating apoptosis and autophagy in HT-29 cells [J]. Mol Med Rep, 2017, 16 (2): 2128-2132.
- [11] Yamanishi Y, Boyle DL, Rosengren S, et al. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (15): 10025-10030.
- [12] Kumari A, Souvick R, Chinmoy G, et al. Prolonged inflammatory microenvironment is crucial for pro-neoplastic growth and genome instability: a detailed review [J]. Inflamm Res, 2017, 66 (2): 119-128.
- [13] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144 (5): 646-674.
- [14] 张献, 冯欣. PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂在宫颈癌治疗中的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33 (5): 1278-1284.
- [15] 王昊, 汪潮潮, 胡元亮, 等. IL-1 β 通过激活 PI3K/AKT1/STAT3 轴诱导 IL-6 分泌和胶质母细胞瘤增殖 [J]. 现代免疫学, 2023, 43 (2): 105-112.
- [16] 刘小叶, 周建斌, 李婷, 等. Akt1 在环氧合酶-2 抑制剂抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖中的作用 [J]. 中南医学科学杂志, 2014, 42 (4): 359-362.
- [17] Ma QM, Yu JL, Zhang X, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway—a versatile player in apoptosis and autophagy [J]. Biochimie, 2023, 211: 57-67.
- [18] 刘海艳, 王艳铭, 王雨艳, 等. CTNNB1 基因在卵巢癌组织中的表达及其相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36 (11): 2675-2677.
- [19] 张静, 张红, 陈正莲, 等. 卵巢癌患者 CTNNB1、miR-34 表达与临床病理特征及预后的关系 [J]. 中国妇幼保健, 2019, 34 (18): 4325-4328.
- [20] 李志强, 王琳冬, 闫雪花. 宫颈癌组织 CTNNB1 和 TP53 表达特点及其临床意义研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19 (10): 1081-1085.

(收稿日期: 2024-07-15; 修回日期: 2024-09-20)

豚鼠Ⅳ型过敏反应中血清 IL-2、IFN- γ 、IgE 及 IgM 的时效变化研究

鲍颖霞¹, 邹国发², 刘永俊², 郭秋平², 秦飞^{1*} (1.广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂/广东省化学药原料与制剂关键技术研究重点实验室, 广州 510515; 2.广州医药研究总院有限公司 药物非临床评价研究中心, 广州 510240)

摘要: **目的** 研究豚鼠Ⅳ型过敏反应过程中细胞因子和免疫球蛋白的变化规律, 为临床合理用药提供参考依据。**方法** 采用二硝基氯苯建立Ⅳ型过敏反应模型(豚鼠最大化过敏性试验), 激发后 1、5、24、48、72 h 不同时间点评价豚鼠背部皮肤红斑、水肿及其致敏率, 并测定豚鼠血清中白细胞介素-2 (IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)、免疫球蛋白 E (IgE) 和免疫球蛋白 M (IgM) 的含量。**结果** 激发后不同时间点, 实验组动物背部皮肤均可见红斑、水肿, 评分在 5~24 h 达峰值; 致敏率在 1~48 h 达 100%。激发后实验组与对照组相比, IL-2、IgE、IgM 含量在各时间点升高, 但达峰时间并不一致; 而 IFN- γ 含量逐渐降低或显著降低。**结论** Ⅳ型过敏反应过程涉及多种免疫途径的相互作用, IL-2、IgE、IgM 与 IFN- γ 的含量随时间变化而呈现不同的规律。

关键词: Ⅳ型过敏反应; 豚鼠最大化过敏性试验; 豚鼠; 细胞因子; 免疫球蛋白

中图分类号: R758.24 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0657-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.012

Temporal changes in serum IL-2, IFN- γ , IgE and IgM in type IV allergic reactions in Guinea pigs

BAO Ying-xia¹, ZOU Guo-fa², LIU Yong-jun², GUO Qiu-ping², QIN Fei^{1*} (1. *Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holding Co., Ltd., Baiyunshan Pharmaceutical General Factory/Guangdong Key Laboratory of Critical Technology for Chemical Pharmaceutical Raw Materials and Formulations, Guangzhou 510515*; 2. *Drug Non-clinical Evaluation Center of Guangzhou Institute of Pharmaceutical Industry, Guangzhou General Pharmaceutical, Guangzhou 510240*)

Abstract: Objective To determine the changing patterns of cytokines and immunoglobulins during the process of type IV allergic reactions in guinea pigs, to provide a reference for the rational use of drugs. **Methods** A type IV allergic reaction model (Guinea pig maximization test) was established by dinitrochlorobenzene. Time-effect relation of the erythema, edema and sensitization rate, interleukin-2 (IL-2), stimulation- γ (IFN- γ), immunoglobulin E (IgE) and immunoglobulin M (IgM) was tested respectively at 1, 5, 24, 48 and 72 h. **Results** After the activation at various time points, redness and edema on the backs of the trial group were observed, with scores peaking between 5 to 24 h; the allergy rate reached 100% between 1 to 48 h. Compared with the control group, the levels of IL-2, IgE, and IgM increased or significantly increased at various time points, but did not peak at the same time; while the levels of IFN- γ gradually decreased or significantly decreased in the experiment group. **Conclusion** The process of type IV allergic reaction involves the interaction of multiple immune pathways, and the contents of IL-2, IgE, IgM, and IFN- γ vary with time.

Key words: type IV allergic reaction; Guinea pig maximization test; Guinea pig; cytokine; immunoglobulin

基金项目: 广东省科技厅公益研究与能力建设 (No. 2019A101002014)。

作者简介: 鲍颖霞, 女, 高级工程师, 主要从事药理毒理学研究, email: baoyx@byszc.com *通信作者: 秦飞, 男, 高级工程师, 主要从事临床药理学研究, email: qinf@byszc.com

过敏反应根据所产生的抗体类型、临床症状、组织损伤机制、补体是否参加等分为 4 型, 即 I 型 (IgE 抗体介导型)、II 型 (细胞毒型)、III 型 (免疫复合物型)、IV 型 (迟发型)。I、II、III 型均由抗体介导, 是速发型过敏反应, 通常发生在 24 h 内^[1]。IV 型过敏反应又称迟发型变态反应, 主要由 T 淋巴细胞介导, 通常在给药后 24 ~ 48 h 内发生^[2]。IV 型过敏反应是一种重要的公共卫生问题, 以组织细胞损伤和炎症为主要特征, 皮肤是最常受影响的器官^[3]。T 淋巴细胞合成和分泌的细胞因子在 IV 型过敏反应的发生发展中起重要作用, 但有关细胞因子在此过程中随时间变化规律的研究较少。

IV 型过敏反应的研究方法包括豚鼠最大化试验 (Guinea pig maximization test, GPMT) 和豚鼠封闭斑贴试验 (Buehler test, BT) 等^[4]。本研究采用豚鼠最大化试验建立 IV 型过敏反应, 激发后 1、5、24、48 和 72 h 对豚鼠背部红斑、水肿进行评分, 并测定豚鼠血清中白细胞介素-2 (IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)、免疫球蛋白 E (IgE) 和免疫球蛋白 M (IgM) 的含量, 动态观察其含量变化, 旨在探讨上述细胞因子和免疫球蛋白在 IV 型过敏反应发生发展中的作用及其变化规律, 为临床合理用药提供参考依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Hartley 豚鼠, 雌雄各半, 体重 240 ~ 320 g [广东维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK (粤) 2022-0063, 动物合格证号: No.44829700001260]。动物实验经广州医药研究总院有限公司药物非临床评价研究中心动物管理与使用伦理委员会批准, 批件号: IA-SE2022003-03A。

1.2 仪器

SW-CJ-2FD 净化工作台 (苏州净化设备有限公司), BSG-6EX 生物安全柜 (珠海市造鑫企业有限公司); SIGMA3-18K 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司), BP3100S 电子天平 (赛多利斯), Synergy Lx 酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

1.3 试药

1-氯-2, 4-二硝基苯 (批号: P-DCJRHAA, 深圳大力水手生物科技有限公司), 丙酮 (批号: 2021110105, 广州化学试剂厂), 医用凡士林 (批号: 2021825, 天津市致远化学试剂有限公司), 橄榄油 (批号: L-22112052, Aceites Abril S.L.R.S.I.16.02939/OR), 完全氟氏佐剂 (批号: SLCF9648, Sigma 公司), 戊巴比妥钠 (批号: 170108, 德国默克公司);

IL-2 (批号: 202208)、IFN- γ (批号: 202208)、IgM (批号: 202208)、IgE (批号: 202208) (北京东歌博业生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 1-氯-2, 4-二硝基苯溶液的配制

2.1.1 首次致敏用 称取 0.005 g 1-氯-2, 4-二硝基苯, 加入 0.5 mL 丙酮充分溶解, 再加入橄榄油至 5.0 mL, 配制得 0.1% 1-氯-2, 4-二硝基苯橄榄油溶液。

2.1.2 再次致敏用 称取凡士林 7 g, 将已称量好的 0.035 g 1-氯-2, 4-二硝基苯加入 0.5 mL 丙酮中充分溶解, 再倒入凡士林中, 搅拌均匀, 制得 0.5% 1-氯-2, 4-二硝基苯凡士林软膏。

2.1.3 激发用 称取凡士林 7 g, 将已称量好的 0.007 g 1-氯-2, 4-二硝基苯加入 0.5 mL 丙酮中充分溶解, 再倒入凡士林中, 搅拌均匀, 制得 0.1% 1-氯-2, 4-二硝基苯凡士林软膏。

2.2 动物分组和模型制备

2.2.1 动物分组 选用 24 只检疫合格的 Hartley 豚鼠, 按体重和性别均衡随机分为对照组 (0.9% 氯化钠注射液) 和实验组 (1-氯-2, 4-二硝基苯溶液), 每组 12 只。

2.2.2 模型制备 参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 (2014)》^[5]。

首次致敏: 致敏前一日对两组每只豚鼠背部进行脱毛处理, 采用皮内注射给药, 每只豚鼠背部脱毛, 从头部向尾部选择 3 排 6 个点, 分别为 A、B 点为一排, C、D 点为一排, E、F 点为一排, 每排两点间距 1.5 cm, 各排间距 2 cm。对照组 A、B 点注射 0.1 mL 完全弗氏佐剂原液, C、D 点注射 0.1 mL 0.9% 氯化钠注射液, E、F 点注射 0.1 mL 完全弗氏佐剂原液与 0.9% 氯化钠注射液的等量混合溶液。实验组 A、B 点注射 0.1 mL 完全氟氏佐剂原液, C、D 点注射 0.1 mL 0.1% 1-氯-2, 4-二硝基苯橄榄油溶液, E、F 点注射 0.1 mL 完全弗氏佐剂原液与 0.1% 1-氯-2, 4-二硝基苯橄榄油溶液的等量混合溶液。

再次致敏: 首次致敏后的第 6 日注射部位再次涂皮给药致敏, 即对照组和实验组动物的注射部位皮肤分别与 0.9% 氯化钠注射液或 0.5% 1-氯-2, 4-二硝基苯凡士林软膏接触 24 h, 对照组为 0.5 mL/只, 实验组动物为 0.5 g/只。

激发: 首次致敏后的第 20 日涂皮给药激发, 即对照组和实验组动物的未处理过的皮肤分别与 0.9% 氯化钠注射液或 0.1% 1-氯-2, 4-二硝基苯

凡士林软膏接触 24 h, 对照组为 0.5 mL/只, 实验组动物为 0.5 g/只。激发后按表 1 的评分标准进行评分, 再按表 2 判断其致敏强度, 计算致敏率^[6], 致敏率 (%) = [(红斑例数 + 水肿例数) / 受试动物总数] × 100%^[7]。

表 1 皮肤过敏反应评分标准

皮肤反应强度	分值	皮肤反应强度	分值
红斑		水肿	
无红斑	0	无水肿	0
轻微可见红斑	1	轻度水肿	1
中度红斑	2	中度水肿	2
严重红斑	3	严重水肿	3
水肿性红斑	4		

注: 平均分 = (红斑形成总分 + 水肿形成总分) / 合计动物数。

Note: Average score = (total score of erythema formation + total score of edema formation) / total number of animals.

表 2 皮肤过敏性评价标准

致敏率 /%	分级	过敏反应强度
0 ~ 8	I	弱致敏
9 ~ 28	II	轻度致敏
29 ~ 64	III	中度致敏
65 ~ 80	IV	强致敏
81 ~ 100	V	极强致敏

表 3 豚鼠背部皮肤评分变化 (n = 12)

Tab 3 Changes of skin score in the dorsal skin of Guinea pig (n = 12)

组别	激发时间				
	1 h	5 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
实验组	2.58 ± 0.67**	2.75 ± 0.62**	2.75 ± 0.45**	2.17 ± 0.94**	1.25 ± 0.75**

注: 与对照组比较, **P < 0.01。

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

表 4 豚鼠背部皮肤过敏性变化 (n = 12)

Tab 4 Allergic changes in the dorsal skin of Guinea pig (n = 12)

组别	过敏指标	激发时间				
		1 h	5 h	24 h	48 h	72 h
对照组	过敏反应例数	0	0	0	0	0
	致敏率 /%	0	0	0	0	0
	分级	I	I	I	I	I
实验组	过敏反应例数	12	12	12	12	11
	致敏率 /%	100	100	100	100	92
	分级	V	V	V	V	V

IL-2 含量逐渐升高, 且在 5 h 含量达到最高, 在 1 ~ 72 h 时间点与对照组比较差异有统计学意义 (P < 0.05); 随着时间变化实验组血清 IFN- γ 含量逐渐降低, 且在 5 h 含量达到最低, 在 1 ~ 48 h 时间点与对照组比较差异有统计学意义

2.3 豚鼠血清中相关因子测定

激发后 1、5、24、48、72 h 对各组豚鼠进行采血。各时间点的各例动物采血至少 0.8 mL, 不抗凝, 室温静置 30 min 后, 以 2000 g 相对离心力在 20 °C 离心 10 min, 血清悬液分批保存于约 -20 °C 冰箱中。各组随机选取 6 例动物血清采用 ELISA 法测定 IL-2、IFN- γ 、IgE、IgM 的含量。

2.4 统计方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 实验数据以均数 ± 标准差表示。IL-2、IFN- γ 、IgE、IgM 含量采用两组独立样本 t 检验进行分析, 豚鼠背部皮肤评分变化采用秩和检验 (Mann-Whitney U 检验), P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 激发后豚鼠皮肤评分情况

豚鼠激发后 72 h 内, 对照组动物背部皮肤均未见红斑、水肿。随着时间变化, 实验组动物背部皮肤评分逐渐升高, 在 5 ~ 24 h 评分达到最高, 随后逐渐降低; 致敏率在 1 ~ 48 h 为 100%, 在 72 h 降至 92%。具体结果见表 3 ~ 4。

3.2 激发后豚鼠血清中 IL-2、IFN- γ 、IgE、IgM 的含量变化

豚鼠激发后, 随着时间变化实验组血清

(P < 0.05); 随着时间变化实验组血清 IgE 含量逐渐升高, 且在 24 h 含量达到最高, 在 1 ~ 48 h 时间点与对照组比较差异有统计学意义; 随着时间变化实验组血清 IgM 含量逐渐升高, 且在 72 h 含量达到最高, 在 5 ~ 72 h 时间点与对照组比较差异有统计学意义, 详见表 5。

4 讨论

在 IV 型过敏反应中, T 淋巴细胞通过释放细胞因子触发炎症反应, 进而导致组织损伤^[8]。T 淋巴细胞主要分为细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)、辅助性 T 淋巴细胞 (Th) 和调节性 T 淋巴细胞 (Treg) 等亚群^[9], 其中 Th 细胞主要表面标志为 CD4, CTL 细胞主要表面标志为 CD8^[10]。CD4⁺T 细胞主要分化为 Th1 和 Th2 两种亚型^[11-12]。正常机体内

表 5 豚鼠血清中 IL-2、IFN- γ 、IgE、IgM 的含量变化 ($n = 6, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
 Tab 5 Content of IL-2, IFN- γ , IgE, and IgM in the serum of Guinea pigs ($n = 6, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

指标	组别	激发时间				
		1 h	5 h	24 h	48 h	72 h
IL-2	对照组	36.24 \pm 5.78	36.90 \pm 5.58	36.05 \pm 2.65	35.63 \pm 2.21	35.39 \pm 2.57
	实验组	44.53 \pm 3.93 [*]	46.26 \pm 4.53 [*]	45.22 \pm 6.41 ^{**}	40.68 \pm 4.98 [*]	40.04 \pm 2.93 [*]
IFN- γ	对照组	7.37 \pm 0.91	7.14 \pm 1.30	7.43 \pm 1.00	6.73 \pm 0.67	6.60 \pm 0.85
	实验组	5.83 \pm 0.65 [*]	5.43 \pm 0.93 [*]	5.64 \pm 0.99 [*]	5.50 \pm 0.95 [*]	5.46 \pm 1.55
IgE	对照组	39.05 \pm 4.36	39.00 \pm 5.49	39.60 \pm 2.48	32.95 \pm 5.05	28.65 \pm 5.66
	实验组	46.72 \pm 4.76 [*]	47.42 \pm 4.47 [*]	51.52 \pm 4.14 ^{**}	40.97 \pm 4.49 [*]	33.70 \pm 4.20
IgM	对照组	170.72 \pm 12.08	169.86 \pm 50.98	209.95 \pm 22.72	231.27 \pm 38.14	241.86 \pm 30.68
	实验组	221.29 \pm 45.18 [*]	267.30 \pm 43.82 [*]	253.35 \pm 36.91 [*]	301.63 \pm 54.21 [*]	317.91 \pm 64.69 [*]

注：与对照组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

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

Th1/Th2 比例保持动态平衡，两者既互相拮抗又互相调节^[13-14]。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2 等细胞因子，通过激活 CD8⁺ T 细胞和巨噬细胞介导细胞免疫；而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子，刺激肥大细胞、嗜酸性粒细胞和 B 细胞，介导体液免疫^[15-16]。

IV 型过敏反应已被证实是一种 Th1 驱动的免疫反应^[17]。Th1 细胞分泌的 IFN- γ 可显著提高抗原呈递的效率，从而在 IV 型过敏反应的诱发过程中发挥关键的放大作用^[18]。IFN- γ 还能增强 NK 细胞的细胞溶解活性^[19]；抑制 Th2 细胞的增殖，调节 Th1/Th2 平衡，保持免疫系统的稳态^[20-21]。IL-2 也在 IV 型过敏反应中发挥重要作用，通过促进 Th1 细胞的增殖和分化来增强细胞免疫反应^[22]，促进 B 细胞的分化使 IgM、IgG 和 IgA 的分泌量增加^[23]。IL-2 还可促进 IL-2 受体的表达，而可溶性 IL-2 受体的表达水平与 IV 型过敏反应的严重程度具有明显的相关性。IgE 是 I 型过敏反应中产生的主要抗体，而在 IV 型过敏反应进程中，Th2 相关细胞因子介导 B 细胞活化使 IgE 水平显著增加^[24]。IgM 是 II 型和 III 型过敏反应中产生的主要抗体^[25]，也是 B 细胞响应感染或免疫刺激后最早产生的抗体^[26]。

豚鼠最大化试验是《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》推荐用于评估 IV 型过敏反应的有效方法，通过皮内注射诱导和斑贴激发的方式，在规定时间内观察豚鼠激发部位皮肤反应，以评价试验样品使豚鼠产生皮肤致敏反应的潜能。本研究采用 1-氯-2,4-二硝基氯苯建立 IV 型过敏反应，通过检测豚鼠激发后 1~72 h 的血清，发现实验组 IL-2、IgE、IgM 的含量较对照组显著升高，达峰时间分别为 5、24、72 h；IFN- γ 的含量较对照组显著降低，与研究报道一

致^[27-30]，谷值时间为 5 h；而豚鼠在激发 5 h 时皮肤过敏反应评分达峰值，持续至 24 h 后逐渐降低。该研究结果提示 IL-2 和 IFN- γ 位于 IV 型过敏反应的起始环节，其动态变化能够及时反映过敏反应的严重程度；而 IgE 和 IgM 则参与了 IV 型过敏反应发展的后期进程，反映了过敏反应的免疫调节和持续性。IgE 可以诱导肥大细胞释放炎症介质，从而加强炎症反应^[31]。IgM 可能在 IV 型过敏反应中通过与补体系统的相互作用或促进吞噬细胞的吞噬作用来参与炎症反应。

综上所述，化学物质触发的 IV 型过敏反应可能不仅仅是由单一类型的免疫反应引起的，而是多种免疫途径共同作用的结果。这些化学物质可能同时激活 Th1 和 Th2 细胞，导致促炎和抗炎细胞因子的复杂网络失衡，甚至进一步激活 Treg 细胞和其他免疫细胞，影响 B 细胞的功能和抗体的产生。因此，探讨 IV 型过敏反应进程中复杂的免疫相互作用对于开发有效的治疗方法和预防策略具有重要意义。

参考文献

- [1] Marwa K, Kondamudi NP. Type IV hypersensitivity reaction [M]. Treasure Island: StatPearls Publishing LLC, 2024.
- [2] Li Y, Deshpande P, Hertzman RJ, et al. Genomic risk factors driving immune-mediated delayed drug hypersensitivity reactions [J]. Front Genet, 2021 (12): 641905.
- [3] Schunkert EM, Shah PN, Divito SJ. Skin resident memory T cells may play critical role in delayed-type drug hypersensitivity reactions [J]. Front Genet, 2021 (12): 654190.
- [4] 陈美灵, 王庆利, 光红梅, 等. 药物制剂安全性评价及常见问题分析 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (1): 139-143.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 药物刺激性、过敏性

- 和溶血性研究技术指导原则[S]. 2014.
- [6] 王薇, 何志伟, 杨柳, 等. 哮喘凝胶贴膏皮肤安全性考察[J]. 中国药师, 2020, 23(3): 569-572.
- [7] 李力, 王薇, 杨柳, 等. 黑膏药鼻炎贴不同摊涂工艺的皮肤安全性比较研究[J]. 中国药师, 2018, 21(3): 411-414.
- [8] Chu MT, Chang WC, Pao SC, et al. Delayed drug hypersensitivity reactions: molecular recognition, genetic susceptibility, and immune mediators[J]. Biomedicines, 2023, 11(1): 177-196.
- [9] Linette GP, Carreno BM. Tumor-infiltrating lymphocytes in the checkpoint inhibitor era[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2019, 14(4): 286-291.
- [10] 李媛, 楚兰, 张艺凡. 重症肌无力免疫学机制研究进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2015, 22(3): 209-214.
- [11] 严丹丽, 朱玲玲, 周清华. 肿瘤浸润淋巴细胞在小细胞肺癌中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(15): 800-803.
- [12] 靳贝贝, 龚平. CD4⁺T 淋巴细胞亚群与脓毒症免疫应答的研究进展[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(9): 1174-1178.
- [13] Song J, Liu D, Yin WZ. lnc-THRIL and miR-125b relate to disease risk, severity, and imbalance of Th1 cells/Th2 cells in allergic rhinitis[J]. Allergol Immunopathol, 2022, 50(3): 15-23.
- [14] 赵亚, 李苹, 吴亚运, 等. 不同分子量醋柴胡多糖对迟发型超敏反应小鼠的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(7): 902-907.
- [15] Tong J, Hu XJ, Cai WQ, et al. Puerarin alleviates delayed-type hypersensitivity via cytokine inhibition by modulating Th1/Th2 balance[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5): 4255-4262.
- [16] 姜婷婷, 翟亮, 李京旻, 等. 温肺益气方治疗肺气虚寒型变应性鼻炎的临床疗效及对 Th1/Th2 和 Th17/Treg 平衡影响随机双盲对照研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(9): 1063-1068.
- [17] Li GY, Kolan SS, Guo S, et al. Activated, pro-inflammatory Th1, Th17, and memory CD4⁺T cells and B cells are involved in delayed-type hypersensitivity arthritis (DHTA) inflammation and paw swelling in mice[J]. Front Immunol, 2021, 12: 689057.
- [18] Guo XN, Du WX, Li JL, et al. A comparative study on the mechanism of delayed-type hypersensitivity mediated by the recombinant mycobacterium tuberculosis fusion protein ESAT6-CFP10 and purified protein derivative[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(23): 16612.
- [19] Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy[J]. Nat Rev Immunol, 2018(8): 648-659.
- [20] Ng CT, Fong LY, Abdullah MNH. Interferon-gamma (IFN- γ): reviewing its mechanisms and signaling pathways on the regulation of endothelial barrier function[J]. Cytokine, 2023(166): 156208.
- [21] Ou JY, Liu FL, Chen CL, et al. Immunomodulatory effects of ulva-derived polysaccharides, oligosaccharides, and residues in a murine model of delayed-type hypersensitivity[J]. Biosci Microb Food H, 2024, 43(2): 128-134.
- [22] Pol JG, Caudana P, Paillet J, et al. Cytokines focus effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression[J]. J Exp Med, 2019, 217(1): e20191247.
- [23] 郑厚胜, 郑斯文, 王英平, 等. 人参皂苷 Rg₃ 对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3202-3206.
- [24] 刘祥琪, 张贵民, 姚景春, 等. 荆防颗粒治疗 2, 4-二硝基氯苯诱导小鼠迟发性过敏反应药效评价研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(10): 15-19, 221.
- [25] Abbas M, Moussa M, Akel H. Type I hypersensitivity reaction[M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC, 2023.
- [26] 孙凤娇. 鱼腥草注射液致大鼠和猕猴过敏性反应的比较研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2014.
- [27] 何红梅, 程雁, 马如龙, 等. 去氢茯苓酸对湿疹大鼠的治疗作用及对免疫反应的影响[J]. 现代免疫学, 2024, 44(2): 104-111.
- [28] 刘芳榕, 徐翠萍, 刘朝圣, 等. 止痒润肤乳对特异性皮炎小鼠模型皮损组织 IL-4、IFN- γ 蛋白质与基因表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(1): 22-29.
- [29] 何秋婷, 庞彩霞, 陈春木, 等. 黄连散改善特异性皮炎模型小鼠皮肤屏障及抗炎作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(9): 19-27.
- [30] 秦宗碧, 徐爱琴, 蔡翔, 等. 黄连素调节 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路对慢性湿疹大鼠皮肤损伤的影响[J]. 天津医药, 2023, 51(8): 834-840.
- [31] Xing X, Huang CQ, Wang FQ, et al. Qingxue Jiedu formulation ameliorated DNFB-induced atopic dermatitis by inhibiting STAT3/MAPK/NF-kappa B signaling pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113773.

(收稿日期: 2024-07-23; 修回日期: 2024-11-05)

龙眼核标准汤剂抗氧化谱效关系研究

蒋佳丽^{1, 2, 3}, 王艺洁^{1, 2, 3}, 谢谭芳^{1, 3*}, 王志萍^{1, 2, 3*} (1.广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2.农作物废弃物功能成分研究协同创新中心, 南宁 530200; 3.广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530200)

摘要: **目的** 建立龙眼核标准汤剂高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱方法, 探讨龙眼核标准汤剂抗氧化作用及其与化学成分之间的谱效关系。**方法** 采用 HPLC 法建立 17 批不同产地龙眼核标准汤剂指纹图谱, 运用相似度分析、聚类分析、主成分分析评价其质量, 以铁离子还原能力 (FRAP) 法测定其总抗氧化能力并通过灰色关联度分析、双变量相关性分析探究发挥抗氧化活性的关键物质。**结果** 17 批龙眼核标准汤剂相似度均 > 0.9, 共标定 15 个共有峰, 指出 5 个化合物, 聚类分析将其聚为两类, 主成分分析共提取 3 个主成分。17 批龙眼核标准汤剂均表现出一定的抗氧化能力, 总抗氧化能力范围为 0.69 ~ 1.54 mmol · g⁻¹; 灰色关联度分析结果表明除 F1 外, 其余共有峰对抗氧化活性均具有一定贡献 (关联度值 > 0.6); 双变量相关性分析结果表明, F2、F3、F5 ~ F12、F14 与抗氧化活性成显著正相关。**结论** 建立的龙眼核标准汤剂 HPLC 指纹图谱方法稳定、可靠, 17 批龙眼核标准汤剂抗氧化活性良好, 其发挥抗氧化活性是多组分协同作用的结果。

关键词: 龙眼核标准汤剂; 指纹图谱; 抗氧化活性; 谱效关系

中图分类号: R285, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0662-06
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.013

Antioxidant spectrum and effect of longan seed standard decoction

JIANG Jia-li^{1, 2, 3}, WANG Yi-jie^{1, 2, 3}, XIE Tan-fang^{1, 3*}, WANG Zhi-ping^{1, 2, 3*} (1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Collaborative Innovation Research Center for Functional Ingredients from Agricultural Residues (Guangxi University of Chinese Medicine), Nanning 530200; 3. Key Laboratory of Generic Technology Research and Development of Traditional Chinese Medicine Preparations in Colleges and Universities in Guangxi, Nanning 530200)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of longan seed standard decoction, and determine the antioxidant effect of longan seed standard decoction and its spectrum effect relationship in chemical components. **Methods** The fingerprints of 17 batches of longan seed standard decoction from different origins were established by HPLC. Similarity analysis, cluster analysis, and principal component analysis were used to evaluate its quality, the ferric ion reducing antioxidant power method was used to determine its total antioxidant capacity. The key substances with antioxidant activity were measured by grey correlation analysis and bivariate correlation analysis. **Results** The similarity of 17 batches of longan seed standard decoction was over 0.9. Totally 15 common peaks were calibrated, 5 compounds identified, and clustered into two classes. Three principal components were extracted. The 17 batches of longan seed standard decoction all showed certain antioxidant capacity, with the total antioxidant capacity ranging 0.69 ~ 1.54 mmol · g⁻¹. The grey correlation analysis showed that except for F1, the other common peaks all contributed to the antioxidant activity (correlation value > 0.6), and the bivariate correlation analysis showed that F2, F3, F5 ~ F12 and F14 were positively correlated with the antioxidant activity. **Conclusion** The HPLC fingerprint of longan seed standard decoction is stable and reliable. All the 17 batches of longan seed standard decoction have good antioxidant activity,

基金项目: 农作物废弃物功能成分研究协同创新中心课题 (No. CICAR 2023-P2)。

作者简介: 蒋佳丽, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药剂学研究, email: 1603880791@qq.com ***通信作者:** 谢谭芳, 女, 副教授, 主要从事药物新剂型、新制剂的研究与开发工作, email: xietanf111@163.com; 王志萍, 女, 教授, 主要从事中药、民族药新制剂与新剂型的研发, email: 318007460@qq.com

its antioxidant with multi-component synergistic effect.

Key words: longan seed standard decoction; fingerprint; antioxidant activity; spectrum effect relationship

龙眼为无患子科 *Sapindaceae* 植物龙眼树的果实, 主要分布于我国西南部至东南部, 以福建最盛, 广东次之, 云南及广西南部亦有栽培^[1]。龙眼的假种皮龙眼肉补益心脾, 养血安神, 主要用于气血不足、心悸怔忡、健忘失眠、血虚萎黄^[2], 而种子龙眼核则被当成农作物废弃物而丢弃^[3]。《本草再新》中记载其可治瘰疬;《岭南采药录》中记录其外敷可用于治疗疮癣。现代研究表明, 龙眼核富含黄酮^[4]、多酚^[5]、多糖^[6]以及淀粉、蛋白质和氨基酸等成分^[7], 具有抗氧化^[4-5]、抗炎^[8]、降糖^[9]等药理活性。龙眼核多酚能够减轻急性肺损伤小鼠的氧化应激反应, 起到保护肺组织的作用^[10]; 龙眼核对 Fe^{3+} 也表现出一定的还原能力^[11]。

中药指纹图谱技术是一种基于中药化学成分系统研究、全面反映药物化学信息的技术^[12], 通过描绘出特定化学成分的峰值分布情况来宏观表征中药化学信息^[13], 但这些化学信息与中药药效之间的联系如何无从体现, 而中药谱效关系学可有效解决这一问题, 它以中药指纹图谱为研究基础, 通过一定的分析方法将中药化学信息与中药药效信息结合, 进而筛选出与药效关系密切的化学成分^[14-15]。课题组前期对龙眼核药材的指纹图谱和相关化学成分进行了研究^[16], 现将其制成标准汤剂并建立标准汤剂的指纹图谱, 以铁离子还原能力 (FRAP) 法测定龙眼核标准汤剂的总抗氧化能力 (T-AOC), 研究其指纹图谱中各共有峰与抗氧化活性之间的关系, 以期为龙眼核标准汤剂的质量评价和抗氧化药效物质基础研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030 Plus 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); InfiniteM200pro 型多功能酶标仪 (瑞士 TECAN); XSR205DU/A 型十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); SQP 型万分之一分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-800DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HWS-28 型电热恒温水浴锅 (上海齐欣科学仪器有限公司); UPH-IV-20TN 型优普系列超纯水机 (四川优谱超纯科技有限公司)。

1.2 药材

没食子酸 (批号: MUST-22112411)、没食子酸乙酯 (批号: MUST-22102805)、鞣花酸 (批号: MUST-23033114)、柯里拉京 (批号: MUST-

23060211) (成都曼斯特生物科技有限公司), 咖啡酸 (批号: 110885-201703, 中国食品药品检定研究院), 以上对照品纯度均 $\geq 99\%$ 。乙腈、甲醇 (色谱纯, 美国 Fairfield 公司)。磷酸 (色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), T-AOC 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.3 样品信息

本研究共收集 17 批龙眼核样品, 经广西中医药大学田慧教授鉴定为无患子科 *Sapindaceae* 植物龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 的干燥成熟种子, 详见表 1。

表 1 样品信息

Tab 1 Sample information

批次	产地	批号	批次	产地	批号
S1	福建莆田	20230528	S10	广西南宁	20230904
S2	福建莆田	20230815	S11	广西武鸣	20230604
S3	福建莆田	20231123	S12	广西贵港	20230806
S4	福建漳州	20230530	S13	广西武宣	20230901
S5	福建漳州	20231119	S14	广西玉林	20230602
S6	广东高州	20230603	S15	广西玉林	20230902
S7	广东高州	20230726	S16	广西博白	20230527
S8	广东高州	20230902	S17	广西博白	20230903
S9	广东茂名	20231118			

2 方法与结果

2.1 龙眼核标准汤剂冻干粉制备

取龙眼核药材 100 g, 破碎种仁及种皮, 以 14 倍体积纯水浸泡 30 min, 武火煮沸转文火煎煮 30 min, 200 目滤布趁热过滤; 二煎加 12 倍体积纯水煎煮 20 min, 三煎同二煎方法煎煮 20 min, 滤过, 合并滤液, 浓缩至 500 mL, 浓缩液低温 (-80°C) 预冻 12 h, 真空冷冻干燥机中冻干, 得龙眼核标准汤剂冻干粉。依法制备 17 批不同产地龙眼核标准汤剂冻干粉。

2.2 龙眼核标准汤剂冻干粉 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 岛津 ShimNex CS C18 ($5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$) 色谱柱, 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5%A; 10 ~ 20 min, 5% ~ 12%A; 20 ~ 35 min, 12% ~ 13%A; 35 ~ 40 min, 13% ~ 14%A; 40 ~ 50 min, 14% ~ 14.3%A; 50 ~ 55 min, 14.3% ~ 15%A; 55 ~ 65 min, 15% ~ 17%A; 65 ~ 75 min, 17% ~ 25%A; 75 ~ 90 min, 25% ~ 40%A; 90 ~ 95 min, 40% ~ 5%A), 流速 $1.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 $10\ \mu\text{L}$, 柱温 30°C , 检测波长 $318\ \text{nm}$ 。

2.2.2 溶液的制备 ① 精密称取 0.2 g 龙眼核标准汤剂冻干粉，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密量取纯水 25 mL 于锥形瓶中，称定重量，超声 15 min，放冷，再次称定重量，用纯水补至初始重量，混匀过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，得供试品溶液。② 取没食子酸、咖啡酸、柯里拉京、没食子酸乙酯、鞣花酸对照品适量，精密称定，加甲醇溶解得质量浓度分别 195.3、531.2、205.7、181.1、189.6 μg · mL⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.2.3 精密度试验 按“2.2.2”项下方法制备龙眼核标准汤剂冻干粉 (S17) 供试品溶液，连续进样 6 次，以 8 号峰 (F8) 为参照峰 (S)，计算得各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 均 < 2.5%，表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 按“2.2.2”项下方法制备 6 份龙眼核标准汤剂冻干粉 (S17) 供试品溶液，进样测定，以 F8 为参照峰 (S)，计算得各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 均 < 2.8%，表明该方法重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备龙眼核标准汤剂冻干粉 (S17) 供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，以 F8 为参照峰 (S)，计算得各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 均 < 2.9%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 HPLC 指纹图谱的建立 将 17 批龙眼核标准汤剂冻干粉注入高效液相色谱仪采集色谱图。将色谱图以 CDF 格式文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》，采用平均数法，设置 S17 为参照图谱，经多点校正、Mark 峰匹配，生成 17 批龙眼核标准汤剂冻干粉叠加指纹图谱和对照指纹图谱，共标定 15 个共有峰，结果见图 1 及图 2。通过与混合对照品比对，共指认出 5 个成分，分别为 2 号峰 (F2) 没食子酸、6 号峰 (F6) 咖啡酸、F8 为柯里拉京、10 号峰 (F10) 没食子酸乙酯、15 号峰 (F15) 鞣花酸 (见图 3)。17 批龙眼核标准汤剂冻干粉相似度范围为 0.938 ~ 0.999 (见表 2)。

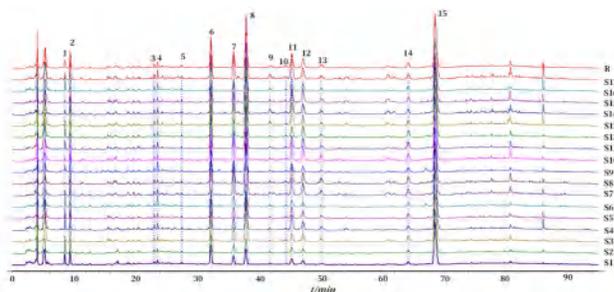


图 1 17 批龙眼核标准汤剂冻干粉叠加指纹图谱及对照指纹图谱
Fig 1 Overlay fingerprint and control fingerprint of 17 batches of longan seed standard decoction freeze-dried powder
2. 没食子酸 (gallic acid); 6. 咖啡酸 (caffeic acid); 8. 柯里拉京 (corilagin); 10. 没食子酸乙酯 (ethyl gallate); 15. 鞣花酸 (ellagic acid)

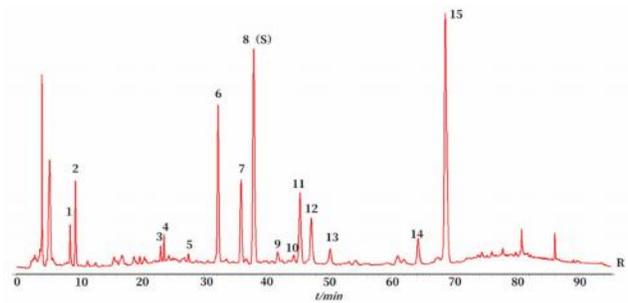


图 2 龙眼核标准汤剂冻干粉 HPLC 对照指纹图谱
Fig 2 HPLC control fingerprint of longan seed standard decoction freeze-dried powder

2. 没食子酸 (gallic acid); 6. 咖啡酸 (caffeic acid); 8. 柯里拉京 (corilagin); 10. 没食子酸乙酯 (ethyl gallate); 15. 鞣花酸 (ellagic acid)

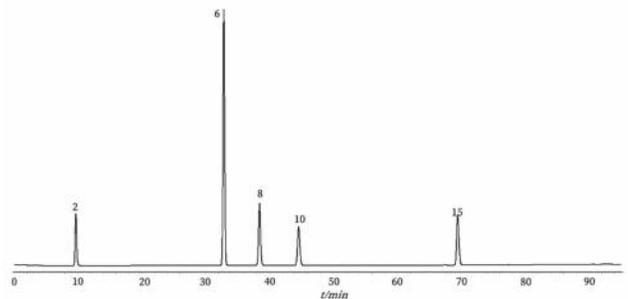


图 3 混合对照品 HPLC 色谱图
Fig 3 HPLC chromatogram of mixed control
2. 没食子酸 (gallic acid); 6. 咖啡酸 (caffeic acid); 8. 柯里拉京 (corilagin); 10. 没食子酸乙酯 (ethyl gallate); 15. 鞣花酸 (ellagic acid)

表 2 17 批龙眼核标准汤剂冻干粉相似度结果
Tab 2 Similarity of 17 batches of longan seed standard decoction freeze-dried powder

批次	相似度	批次	相似度
S1	0.948	S10	0.975
S2	0.938	S11	0.999
S3	0.996	S12	0.997
S4	0.989	S13	0.992
S5	0.994	S14	0.988
S6	0.972	S15	0.977
S7	0.982	S16	0.990
S8	0.974	S17	0.997
S9	0.977		

2.2.7 聚类分析 将共有峰进行标准化处理并导入 IBM SPSS statistics 27.0.1 软件，运用组间联接法，以平方欧氏距离为测距进行聚类分析，结果见图 4。由图 4 可知，当欧氏距离为 20 时，17 批龙眼核标准汤剂批冻干粉可聚为两类，其中 S1 ~ S6、S9、S11 ~ S12、S16 聚为一类，S7 ~ S8、S10、S13 ~ S15、S17 聚为一类。

2.2.8 主成分分析 以共有峰峰面积为变量，将其导入 IBM SPSS statistics 27.0.1 软件进行分析，结果显示 KMO 值为 0.567 (> 0.5)，Bartlett 球形度检验具有显著性 (P < 0.01)，表明模型符合主成分分析要求，可用于进一步分析。以特征值 > 1 为提取原

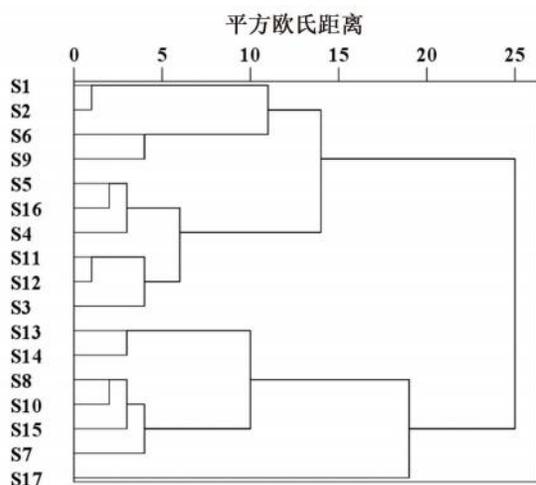


图 4 17 批龙眼核标准汤剂冻干粉聚类分析树状图

Fig 4 Cluster analysis treemap of 17 batches of longan seed standard decoction freeze-dried powder

则，共提取得到 3 个主成分（见表 3），累计方差贡献率为 87.098%，表明这 3 个主成分可以体现龙眼核标准汤剂 87.098% 的信息。采用最大方差法进行旋转因子分析，旋转后的因子载荷矩阵见表 4，由表 4 可知，F1、F3、F5 ~ F8（柯里拉京）、F10（没食子酸乙酯）~ F14 在主成分 1 上有较高载荷量（载荷值绝对值 > 0.6）；F2（没食子酸）、F3、F15（鞣花酸）在主成分 2 上有较高载荷量，F4 在主成分 3 上有较高载荷量，可分别反映主成分 1、2、3 中的大部分信息。

表 3 主成分特征值及方差贡献率

Tab 3 Eigen values and variance contribution rates of principal components

主成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	9.302	62.016	62.016
2	2.626	17.507	79.523
3	1.136	7.575	87.098

表 4 旋转后因子载荷矩阵

Tab 4 Factor loading matrix after the rotation

峰号	载荷系数			峰号	载荷系数		
	主成分 1	主成分 2	主成分 3		主成分 1	主成分 2	主成分 3
F1	-0.905	0.194	-0.012	F9	0.500	0.492	0.548
F2	0.064	0.792	0.557	F10	0.728	0.290	0.462
F3	0.603	0.753	0.036	F11	0.697	0.599	0.238
F4	-0.228	0.026	0.847	F12	0.908	0.287	-0.067
F5	0.798	0.409	0.160	F13	0.932	0.084	-0.079
F6	0.892	0.255	-0.188	F14	0.814	0.042	-0.195
F7	0.870	0.277	0.259	F15	0.018	0.977	-0.035
F8	0.872	0.447	0.079				

将共有峰峰面积导入 IBM SPSS statistics 27.0.1 软件中进行标准化处理，以下用 $X_1 \sim X_{15}$ 表示 15 个共有峰标准化峰面积。以载荷系数除以对应特征值的算术平方根计算各主成分得分系数。根据各主成分得分系数计算各主成分得分及综合得分（见表 5）。主成分 1 得分公式 = $-0.297X_1 + 0.021X_2 + 0.198X_3 - 0.075X_4 + 0.262X_5 + 0.292X_6 + 0.285X_7 + 0.286X_8 + 0.164X_9 + 0.239X_{10} + 0.229X_{11} + 0.298X_{12} + 0.305X_{13} + 0.267X_{14} + 0.006X_{15}$ ；主成分 2 得分公式 = $0.120X_1 + 0.488X_2 + 0.465X_3 + 0.016X_4 + 0.252X_5 + 0.157X_6 + 0.171X_7 + 0.276X_8 + 0.304X_9 + 0.179X_{10} + 0.370X_{11} + 0.177X_{12} + 0.052X_{13} + 0.026X_{14} + 0.603X_{15}$ ；主成分 3 得分公式 = $-0.012X_1 + 0.523X_2 + 0.034X_3 + 0.795X_4 + 0.150X_5 - 0.176X_6 + 0.243X_7 + 0.074X_8 + 0.514X_9 + 0.433X_{10} + 0.224X_{11} - 0.062X_{12} - 0.074X_{13} - 0.183X_{14} - 0.033X_{15}$ ；综合得分公式 = $(62.016\% \text{ 主成分 1 得分} + 17.507\% \text{ 主成分 2 得分} + 7.575\% \text{ 主成分 3 得分}) / 87.098\%$ 。以综合得分为排序依据，各批次主成分分析排序为 $S17 > S8 > S7 > S14 > S10 > S13 > S15 > S11 > S12 >$

$S4 > S3 > S5 > S16 > S9 > S6 > S1 > S2$ 。

表 5 主成分得分及综合得分

Tab 5 Principal component scores and composite scores

批次	主成分 1	主成分 2	主成分 3	综合得分	排序
S1	-3.885	-4.228	-2.503	-3.834	16
S2	-4.144	-4.250	-2.806	-4.049	17
S3	-0.842	-1.906	-2.082	-1.164	11
S4	-1.029	1.414	-0.425	-0.486	10
S5	-1.529	-0.877	-1.764	-1.418	12
S6	-3.783	-3.662	1.426	-3.305	15
S7	2.833	1.392	1.066	2.389	3
S8	3.340	0.608	-0.928	2.419	2
S9	-2.961	-2.394	0.826	-2.518	14
S10	3.097	0.598	-0.398	2.291	5
S11	0.323	0.047	-0.542	0.192	8
S12	0.248	0.218	-0.942	0.139	9
S13	1.874	3.200	2.396	2.186	6
S14	2.200	2.605	2.484	2.306	4
S15	2.608	1.202	-0.553	2.051	7
S16	-1.807	-0.635	-0.418	-1.450	13
S17	3.456	6.669	5.162	4.250	1

2.3 T-AOC 测定 (FRAP 法)

按 T-AOC 测定试剂盒说明书配制 FRAP 工作液和浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 标准品

溶液，取适量标准品溶液稀释至 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mmol · L⁻¹。精密移取不同浓度标准品溶液 5 μL 和 FRAP 工作液 180 μL 于 96 孔板中，混匀、37 °C 孵育 5 min，酶标仪 593 nm 处测定各孔 OD 值，以蒸馏水代替标准品溶液测定溶剂吸光度。以浓度为横坐标、扣除溶剂吸光度的 OD 值为纵坐标绘制标准曲线，得 $Y = 0.2631X - 0.0005$ ， $R^2 = 0.9992$ ，表明 FeSO₄·7H₂O 标准品溶液在 0.15 ~ 1.5 mmol · L⁻¹ 内与吸光度呈良好线性关系。

取各批次质量浓度为 0.5 mg · mL⁻¹ 的样品水溶液 5 μL 与 FRAP 工作液 180 μL 于 96 孔板中，混匀、37 °C 孵育 5 min，酶标仪 593 nm 处测定各孔 OD 值。平行测定 3 次，取 OD 值均值代入标准曲线方程计算 X 值。依据公式 $R = X/C$ 计算各批次样品的 T-AOC（即对 Fe³⁺ 的还原能力），结果见表 6。式中 X 为样品 OD 值对应的标准品浓度（mmol · L⁻¹），C 为样品质量浓度（mg · mL⁻¹），R 为样品对 Fe³⁺ 还原能力，以 mmol · g⁻¹ 来表示。由表 6 可知，不同批次的样品对 Fe³⁺ 还原能力不同，范围为 0.69 ~ 1.54 mmol · g⁻¹。

表 6 FRAP 抗氧化结果
Tab 6 FRAP antioxidant

批次	Fe ³⁺ 还原能力 / (mmol · g ⁻¹)	批次	Fe ³⁺ 还原能力 / (mmol · g ⁻¹)
S1	0.69	S10	0.92
S2	0.85	S11	1.09
S3	0.97	S12	1.25
S4	1.01	S13	1.21
S5	1.03	S14	1.19
S6	1.02	S15	1.16
S7	0.93	S16	0.76
S8	1.41	S17	1.54
S9	1.00		

2.4 灰色关联度分析

以样品对 Fe³⁺ 还原能力为参考序列，共有峰峰面积为比较序列。因母序列与子序列单位和量级不同，采用均值化法对其进行无量纲化处理后代入公式 $\xi_{0i}(k) = (\Delta \min[|X_0(k) - X_i(k)|] + \rho \Delta \max[|X_0(k) - X_i(k)|]) / (|X_0(k) - X_i(k)| + \rho \Delta \max[|X_0(k) - X_i(k)|])$ ，其中，无量纲化后的母序列数据记 $X_0(k)$ ，子序列数据记为 $X_i(k)$ ，两者绝对差值记为 $|X_0(k) - X_i(k)|$ ，分辨系数 (ρ) 作为控制 $\Delta \max$ 对总体关联度影响的参数，取值范围一般为 0 ~ 1，通常取 0.5 计算关联系数^[17-20]。关联度由关联系数取平均值得出，关联度越大表明该共有峰对抗氧化活性贡献程度越大，以公式 $r_{0i} = 1/n \sum_{k=1}^n \xi_{0i}(k)$ 计算关联度，将关联度大小进行排序，结果见表 7。除 F1 外，其余共有峰与抗氧化药效指标关联度值均 > 0.6，其中 F2（没食子酸）、F3、

F15（鞣花酸）、F10（没食子酸乙酯）、F6（咖啡酸）关联度 > 0.8，对抗氧化活性贡献度较大。

表 7 关联度和关联序结果
Tab 7 Correlation degree and association sequence

关联序	峰号	Fe ³⁺ 还原能力关联度	关联序	峰号	Fe ³⁺ 还原能力关联度
1	F2	0.863	9	F4	0.754
2	F3	0.840	10	F8	0.751
3	F15	0.837	11	F14	0.750
4	F10	0.831	12	F11	0.683
5	F6	0.802	13	F13	0.681
6	F5	0.783	14	F9	0.629
7	F7	0.776	15	F1	0.556
8	F12	0.759			

2.5 双变量相关性分析

以标准化后的 Fe³⁺ 还原能力值为因变量 (Y)，共有峰峰面积为自变量 (X)，将数据导入 IBM SPSS statistics 27.0.1 软件进行相关性分析，计算共有峰峰面积与 Fe³⁺ 还原能力值的 Pearson 相关系数，结果见表 8，F2、F3、F5 ~ F12、F14 与 Fe³⁺ 还原能力值成显著正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，按相关系数大小排序为：F10（没食子酸乙酯）> F3 > F11 > F8（柯里拉京）> F5 > F2（没食子酸）> F12 > F7 > F6（咖啡酸）= F14 > F9。

表 8 Pearson 相关系数

Tab 8 Pearson correlation coefficients			
峰号	相关系数	峰号	相关系数
F1	-0.402	F9	0.538*
F2	0.606*	F10	0.724**
F3	0.685**	F11	0.674**
F4	0.189	F12	0.603*
F5	0.642**	F13	0.427
F6	0.539*	F14	0.539*
F7	0.542*	F15	0.474
F8	0.671**		

注 (Note): * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 提取条件与色谱条件

实验前期考察了提取溶剂（甲醇、乙醇和纯水）、提取方式（超声和回流）、提取时间（15、30、45 min）、提取溶剂用量（10、25、50 mL），对提取效果的影响，最终发现在按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液时各色谱峰响应值较高，主要成分基本得到分离。对冻干粉指纹图谱进行全波长扫描，同时考察检测波长（278、318、325 nm）对色谱峰测定的影响，发现在 318 nm 时色谱峰信息丰富、响应值高。还考察了不同流动相体系（甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸），发现在以乙腈-0.1% 磷酸为流动相体系进行梯度洗脱时，基线平稳、各色谱峰峰形较好。实验还对流速分别为 0.8、1.0、1.2 mL · min⁻¹ 和柱温分别为 25、

30、35℃进行考察,结果在流速为 1.0 mL·min⁻¹、柱温为 30℃时各色谱峰保留时间适中、峰形较好。

3.2 指纹图谱结果分析

本研究收集福建、广东、广西等产地的 17 批龙眼核药材,制备成标准汤剂并建立指纹图谱。选择保留时间居中、响应值相对较高的 F8 (柯里拉京) 为参照峰 (S),方法学考察结果表明建立的指纹图谱方法良好,可用于龙眼核标准汤剂质量评价。叠加指纹图谱显示各批次龙眼核标准汤剂化学成分基本一致,各批次龙眼核标准汤剂指纹图谱相似度均 > 0.9,并标定了 15 个共有峰,进一步表明各批次龙眼核标准汤剂质量相对均一。聚类分析将 17 批龙眼核标准汤剂聚为两类,其中 S6、S7、S8 批次产地均为广东高州,但因采集时间不同 S6 被聚为第一类, S7、S8 则为第二类, S16、S17 批次亦如此,表明不仅产地对化学成分有影响,采收时间也有影响。主成分分析共提取到 3 个主成分,其中 S17、S8、S7 综合得分排名前三,排名后三的批次为 S6、S1、S2。

3.3 抗氧化及谱效关系结果分析

本研究采用 FRAP 法测定龙眼核标准汤剂的 T-AOC,其对 Fe³⁺的还原能力越强说明抗氧化效果越好^[21]。结果表明各批次龙眼核标准汤剂对 Fe³⁺均表现出一定的还原能力,但对 Fe³⁺还原能力具有一定差异,Fe³⁺还原能力排名前三的批次为 S17 (广西博白)、S8 (广东高州)、S12 (广西贵港),排名后三的批次为 S2 (福建莆田)、S16 (广西博白)、S1 (福建莆田),与主成分分析结果较为一致。由此可见,福建莆田产地的龙眼核标准汤剂对 Fe³⁺还原能力相对较弱;可能受采集时间影响,同为广西博白产地的龙眼核标准汤剂表现出的 Fe³⁺还原能力差异较大。灰色关联度分析结果和双变量相关性分析结果反映出龙眼核标准汤剂并不是单一的化学成分发挥抗氧化活性,而是多成分(没食子酸、鞣花酸等)协同起效,研究所筛出的抗氧化活性成分在其他药材的抗氧化作用研究中有报道^[22-23],本研究结果为龙眼核标准汤剂体外抗氧化活性物质基础研究提供了科学参考。但因目前对龙眼核的化学成分研究基础较为薄弱,筛出的抗氧化活性成分未能全部指认,后续可通过借助液质联用等技术更深入研究其化学成分,进一步确定其发挥抗氧化活性的物质基础。

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 [M]. 北

京: 科学出版社, 1985: 28.

- [2] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 100.
- [3] 邱松山, 李颖, 姜翠翠, 等. 龙眼加工废弃物的综合利用探讨 [J]. 甘肃农业科技, 2016 (5): 59-64.
- [4] 陈心雨, 李琳, 刘宏飞, 等. 桂圆果核黄酮提取工艺及抗氧化活性研究 [J]. 食品与发酵科技, 2023, 59 (4): 44-50.
- [5] 刘春丽, 颜小捷, 杨子明, 等. 龙眼果皮及果核中植物多酚含量的测定及抗氧化能力研究 [J]. 食品科技, 2014, 39 (11): 203-206, 211.
- [6] 刘萍, 程轩轩, 张旭红, 等. 响应面法优化龙眼核多糖的酶法提取工艺研究 [J]. 今日药学, 2016, 26 (5): 331-334.
- [7] 王莲. 龙眼在食品加工中的应用研究进展 [J]. 现代食品, 2023, 29 (6): 23-25.
- [8] 刘运磊, 景蓉, 李宝莉, 等. 龙眼核组方镇痛抗炎作用的机理性研究 [J]. 陕西中医, 2015, 36 (11): 1566-1567.
- [9] 王俊, 任美萍, 陈斯玮, 等. 龙眼核原花青素提取物对 II 型糖尿病小鼠血糖血脂的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34 (7): 594-599.
- [10] 范凤颖, 骆珊, 赵莉. 龙眼核多酚对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织的保护作用及机制 [J]. 西南国防医药, 2021, 31 (6): 497-500.
- [11] 孙蕊峰, 孙培冬. 龙眼核多酚的提取分离及抗氧化性能研究 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45 (9): 197-201.
- [12] 赵斯尘, 王晓东, 吴灏, 等. 猴耳环消炎片指纹谱效学分析 [J]. 中南药学, 2022, 20 (7): 1540-1544.
- [13] 巨珊珊, 李耀磊, 林志健, 等. 中药质量控制模式的现状分析与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (18): 269-274.
- [14] 张强, 杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (3): 680-683.
- [15] 周玲利, 刘刚, 刘育辰, 等. 中药谱效关系在中药中应用进展 [J]. 中南药学, 2024, 22 (9): 2398-2404.
- [16] 王艺洁, 蒋佳丽, 陈彦洁, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多组分含量测定结合化学模式识别研究的龙眼核质量评价 [J]. 中南药学, 2024, 22 (4): 1059-1064.
- [17] 钱隼驰, 仇蕾. 灰色关联分析中分辨系数取值的定量研究 [J]. 统计与决策, 2019, 35 (10): 10-14.
- [18] 黄潇, 刘婧, 吴建华, 等. 基于灰色关联法分析栀子提取物抗炎作用谱效关系 [J]. 中成药, 2020, 42 (1): 233-237.
- [19] 曹凡, 陈琳, 宋忠兴, 等. 金茵利胆胶囊的高效液相色谱指纹图谱及其抗氧化作用的灰色关联分析 [J]. 中南药学, 2022, 20 (3): 574-579.
- [20] 黄广伟, 陈淮臣, 刘渝, 等. 基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的芩苏胶囊抑菌谱效关系研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45 (6): 1060-1069.
- [21] 李艳, 张楠, 张凌云, 等. 荔枝核与龙眼核水提取物的体外抗氧化活性的比较与评估 [J]. 湖南中医杂志, 2012, 28 (6): 110-112, 115.
- [22] 尹可欢, 罗晓敏, 丁翼, 等. 余甘子及其活性成分肝保护作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53 (1): 295-307.
- [23] 李安林, 郭瑛, 赵文惠, 等. 不同采收期疏花蔷薇果成分积累及抗氧化活性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2024, 35 (3): 78-87.

(收稿日期: 2024-09-13; 修回日期: 2024-11-07)

藏药痛风丸 HPLC 特征图谱及 7 种成分含量测定研究

贾苗苗^{1, 2, 3}, 吴明慧^{1, 2, 3}, 谢和兵^{1, 2, 3, 4*}, 袁志兵^{1, 2, 3}, 尼玛次仁⁴ (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 江苏神猴医药研究有限公司, 江苏 南通 226133; 4. 西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 857000)

摘要: **目的** 建立痛风丸 HPLC 特征图谱, 并同时测定指标成分没食子酸、秦皮甲素、紫丁香苷、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸的含量。**方法** 采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.1% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱; 流速为 1 mL·min⁻¹; 检测波长为 270 nm; 柱温为 30 °C。**结果** 痛风丸特征图谱中标识出 30 个共有峰, 特征图谱相似度 > 0.99; 7 种成分在对应线性范围内与峰面积线性良好 ($r \geq 0.9997$); 精密度、重复性、稳定性试验的 RSD ($n = 6$) 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 94.87% ~ 100.33%, RSD 为 0.68% ~ 1.9% ($n = 3$)。**结论** 本研究建立的特征图谱和指标成分含量测定方法简便、准确、稳定, 可为提升痛风丸的质量标准提供参考。

关键词: 藏药; 痛风丸; 特征图谱; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0668-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.014

HPLC characteristic chromatogram and content determination of 7 components in Tongfeng pills

JIA Miao-miao^{1, 2, 3}, WU Ming-hui^{1, 2, 3}, XIE He-bing^{1, 2, 3, 4*}, YUAN Zhi-bing^{1, 2, 3}, Ni-ma-ci-ren⁴ (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 3. Jiangsu Shenhou Pharmaceutical Research Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226133; 4. Xizang Shenhou Pharmaceutical Co., Ltd., Xigaze Xizang 857000)

Abstract: Objective To establish the HPLC characteristic chromatogram of Tongfeng pills and determine the content of gallic acid, aesculin, syringin, corilagin, chebulate biphenyl acid, ellagic acid and chebulate acid. **Methods** An Ultimate XB-C₁₈ chromatographic column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, with 0.1% phosphoric acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 270 nm, and the column temperature was 30 °C. **Results** Thirty common peaks were identified in the characteristic chromatogram of 10 batches of Tongfeng pills, with the similarities more than 0.99. The linear ranges of the 7 index components matched well with the peak areas ($r \geq 0.9997$). The relative standard deviations of the stability, repeatability, and precision tests were all less than 2.0%. The average recovery ranged 94.87% ~ 100.33%, while the relative standard deviations ranged 0.68% ~ 1.9%. **Conclusion** The characteristic chromatogram and the determination method for the index components are simple, accurate, and stable, which provide reference for improving the quality standard of Tongfeng pills.

Key words: Xizang medicine; Tongfeng pill; characteristic chromatogram; HPLC; content determination

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81470247); 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: 贾苗苗, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药剂学研究, email: 2495925831@qq.com *通信作者: 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

藏药痛风丸是西藏神猴药业有限责任公司开发的西藏自治区医疗机构制剂产品(藏药制备字 Z20210486000),具有祛风除痹、消炎止痛、舒筋通络、干黄水功效,藏医临床用于“叱乃”^[1](痛风)病引起的四肢关节红、肿、热、痛及活动受限等症状。痛风丸处方源自藏医经典古籍《秘诀宝源》,其处方由寒水石(热制)、诃子(去核)、渣驯膏、菥蓂子、宽筋藤、秦皮、碱花(制)、藏茜草、甘草 9 味药材组成。本课题组开展的痛风丸人用经验研究中共梳理分析了西藏神猴藏医院自 2021 年 8 月至 2023 年 12 月共计 951 例使用痛风丸临床病例,结果发现本品短期服用改善痛风发作的关节红、肿、热、痛临床症状以及长期服用降低痛风发作频率的疗效显著,有效率超过 90%,临床应用前景较大。

痛风丸现行的西藏自治区医疗机构制剂产品质量标准中仅有性状以及《中国药典》2020 年版第四部通则丸剂项下的各项规定^[2],未有成分的定性定量检测项,质量控制水平无法确保产品质量稳定。因此,本课题组为了藏药经典名方医疗制剂痛风丸的新药注册,依据《基于人用经验的中药复方制剂新药药学研究技术指导原则(试行)》^[3](简称《指导原则》),采用 HPLC 法建立痛风丸的特征图谱,并同时测定其没食子酸、秦皮甲素、紫丁香苷、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸的含量,为提升痛风丸制剂的质量标准提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1100 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);UV-1900i 紫外分光光度计(日本岛津公司);XSR205DU-AC 十万分之一天平(梅特勒托利多科技有限公司);PTY-B5000 百分之一天平(上海微峰生物技术有限公司);FB-5510DTH 型超声波清洗仪(上海生析超声仪器有限公司);Synergy-UV 纯水仪(默克密理博公司)。

1.2 试药

没食子酸(批号: DST240122-008, 纯度: 100.0%)、紫丁香苷(批号: DST200914-012, 纯度: 98.54%)、秦皮甲素(批号: DST240424-049, 纯度: 99.46%)、柯里拉京(批号: DST210311-012, 纯度: 100.0%)、诃子酸(批号: DST230801-065, 纯度: 98.31%)、诃子联苯酸(批号: DST240228-064, 纯度: 98.45%)(成都乐美天医药科技有限公司);鞣花酸(批号: 111959-201903, 纯度: 88.80%,

中国食品药品检定研究院)。乙腈(色谱纯,湖北弗顿生化科技有限公司);磷酸(优级纯)、甲醇(色谱纯)(国药集团化学试剂有限公司);超纯水由纯水仪制备。

秦皮(批号: 20240629)、诃子(批号: 20240622)、宽筋藤(批号: 20240627)、渣驯膏(批号: 20240621)、菥蓂子(批号: 20240626)、甘草(批号: 20240625)、藏茜草(批号: 20240628)、碱花(批号: 20240624)、寒水石(批号: 20240623)均由西藏神猴药业有限责任公司提供,经江苏神猴医药研究有限公司 CNAS 认证的中药检测实验室谢和兵副主任医师鉴定为正品;痛风丸(规格: 0.95 ~ 1.2 g/丸,批号: 20220901、20220902、20221001、20221002、20230501、20230601、20231001、20231101、20240501、20240701, 编号 S1 ~ S10, 西藏神猴医药有限责任公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 8%A; 10 ~ 15 min, 8% ~ 10%A; 15 ~ 50 min, 10%A; 50 ~ 55 min, 10% ~ 15%A; 55 ~ 75 min, 15% ~ 16%A; 75 ~ 90 min, 16% ~ 25%A), 进样量 10 μL, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温 30 °C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称定没食子酸 10.07 mg、柯里拉京 10.02 mg、秦皮甲素 10.15 mg、紫丁香苷 10.04 mg、诃子联苯酸 10.28 mg 于 10 mL 量瓶中,加入甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液(7 : 3, V/V, 后文简称溶剂)溶解并定容至刻度,摇匀,制得质量浓度分别为 1.01、1.00、1.01、0.99、1.01 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液;精密称定诃子酸 20.16 mg 置于 20 mL 量瓶中,加入溶剂溶解并定容,摇匀,制得质量浓度为 0.99 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液;精密称定鞣花酸对照品 10.07 mg 置于 50 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并定容,摇匀,制得质量浓度为 0.18 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液。

精密移取上述各对照品储备液适量,置于同一 50 mL 量瓶中,加入溶剂定容,摇匀,制得没食子酸、柯里拉京、秦皮甲素、紫丁香苷、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸质量浓度分别为 80.56、10.02、20.19、15.83、121.45、50.06、198.20 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取痛风丸,研磨成细粉,

称取粉末 2 g, 精密称定, 置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加溶剂 200 mL, 称重量, 超声 (250 W, 50 kHz) 60 min, 放冷, 再称重量, 用溶剂补足减少的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.3 空白对照溶液 不加痛风丸细粉, 其余操作同“2.2.2”项下, 制得空白对照溶液。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 依照痛风丸处方比例称取各味药材, 分别制备缺宽筋藤、秦皮、诃子的阴性样品, 药材混合粉碎成细粉, 按“2.2.2”项下方法制得各种阴性样品溶液。

2.3 特征图谱

2.3.1 精密度试验 取痛风丸细粉 (S8), 制备供试品溶液, 连续测定 6 次, 以 7 号峰 (没食子酸) 为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.11%, 相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取痛风丸细粉 (S8), 制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定, 以 7 号峰 (没食子酸) 为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.16%, 相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取痛风丸细粉 (S8), 平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定, 以 7 号峰 (没食子酸) 为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.14%, 相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 对照特征图谱的生成 取 10 批痛风丸 (S1 ~ S10), 制备供试品溶液, 进样测定并将色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2012 版), 以 S7 色谱图为参照, 采用中位数法, 时间窗宽度设为 0.1 min, 进行多点校正和色谱峰匹配, 生成 10 批痛风丸的高效液相色谱法 (HPLC) 叠加特征图谱及对照特征图谱 R, 共标识出 30 个共有峰, 见图 1。

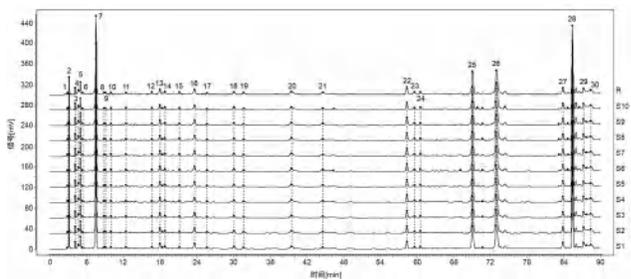


图 1 10 批痛风丸样品的 HPLC 叠加特征图谱
Fig 1 HPLC characteristic chromatogram of 10 batches of Tongfeng pills

2.3.5 色谱峰的指认 通过对照特征图谱 R 与混

合对照品溶液色谱图 (S0) 进行对比, 指认了 7 个共有峰, 即 7 号峰 (没食子酸)、14 号峰 (秦皮甲素)、16 号峰 (紫丁香苷)、21 号峰 (柯里拉京)、25 号峰 (诃子联苯酸)、26 号峰 (鞣花酸)、28 号峰 (诃子酸), 见图 2。以 7 号峰 (没食子酸) 为参照峰, 计算 10 批样品中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 分别为 0% ~ 0.18%、0% ~ 31.1%, 表明不同批次的痛风丸样品的化学组成成分相似, 但部分成分的含量有一定差异。

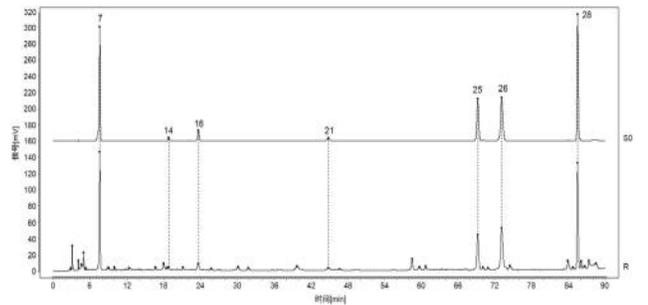


图 2 痛风丸共有峰的指认
Fig 2 Identification of common peaks of Tongfeng pills

7. 没食子酸 (gallic acid); 14. 秦皮甲素 (aesculin); 16. 紫丁香苷 (syringin); 21. 柯里拉京 (corilagin); 25. 诃子联苯酸 (chebulate biphenyl acid); 26. 鞣花酸 (ellagic acid); 28. 诃子酸 (chebulate acid)

2.3.6 特征图谱相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度系统 (2012 版)》软件分析计算 10 批痛风丸特征图谱与对照特征图谱 R 的相似度。结果显示, 10 批痛风丸特征图谱的相似度均大于 0.99, 说明不同批次的痛风丸整体质量较为稳定, 见表 2。

2.4 含量测定

2.4.1 系统适用性及专属性试验 取“2.2”项下各溶液, 分别进样测定, 记录色谱图见图 3。结果显示, 供试品和对照品溶液的指标成分色谱峰保持时间一致, 空白对照和阴性样品无干扰, 各个对照色谱峰的分离度、拖尾因子、理论塔板数均符合《中国药典》2020 年版规定。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用溶剂定容, 摇匀, 分别测定, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 3。

2.4.3 定量限、检测限考察 取“2.2.1”项下混合对照品溶液逐级稀释, 以信噪比为 3 : 1 和 10 : 1 时的质量浓度作为检测限和定量限。结果表明, 没食子酸、秦皮甲素、紫丁香苷、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸的定量限分别为 2.63、0.66、0.52、0.33、4.03、1.67、6.59 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限分别为 0.79、0.20、0.16、0.10、1.21、0.50、1.98 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 2 10 批痛风丸相似度评价

Tab 2 Evaluation of the similarity of 10 batches of Tongfeng pills

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.997	0.999	0.994	0.991	0.995	0.990	0.992	0.990	0.992	0.996
S2	0.997	1.000	0.996	0.993	0.991	0.995	0.990	0.992	0.991	0.992	0.996
S3	0.999	0.996	1.000	0.996	0.994	0.997	0.993	0.994	0.993	0.995	0.997
S4	0.994	0.993	0.996	1.000	0.994	0.993	0.992	0.995	0.993	0.995	0.997
S5	0.991	0.991	0.994	0.994	1.000	0.995	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999
S6	0.995	0.995	0.997	0.993	0.995	1.000	0.997	0.995	0.994	0.996	0.998
S7	0.990	0.990	0.993	0.992	0.998	0.997	1.000	0.997	0.997	0.998	0.998
S8	0.992	0.992	0.994	0.995	0.999	0.995	0.997	1.000	0.999	0.999	0.999
S9	0.990	0.991	0.993	0.993	0.999	0.994	0.997	0.999	1.000	0.999	0.998
S10	0.992	0.992	0.995	0.995	0.999	0.996	0.998	0.999	0.999	1.000	0.999
R	0.996	0.996	0.997	0.997	0.999	0.998	0.998	0.999	0.998	0.999	1.000

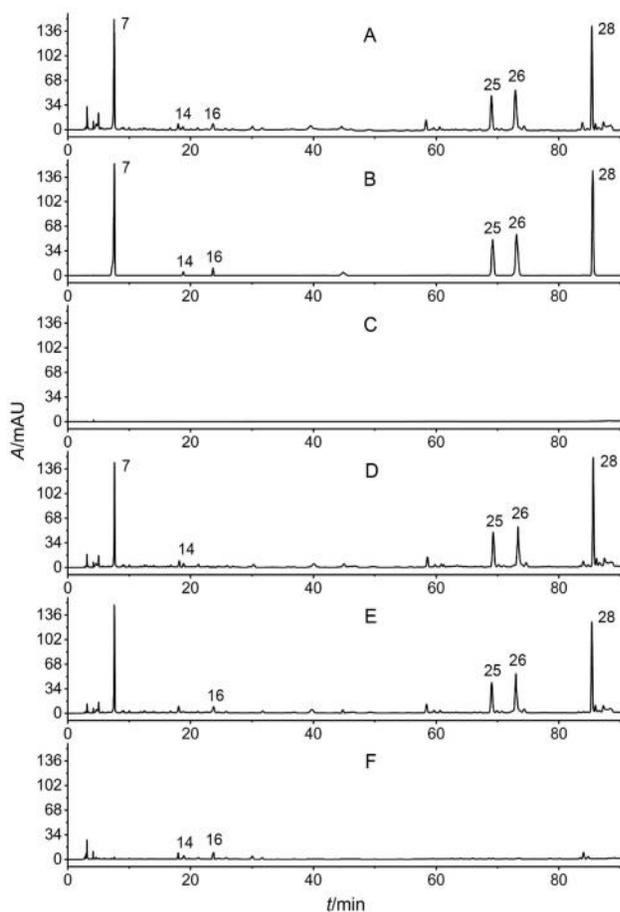


图 3 供试品 (A)、混合对照品 (B)、空白对照 (C) 及缺宽筋藤 (D)、缺秦皮 (E)、缺诃子阴性样品 (F) HPLC 图

Fig 3 HPLC chromatogram of sample (A), mixed reference substance (B), blank solution (C), and negative sample without *Tinospora sinensis* (D), negative sample without *Cortex fraxini* (E) and negative sample without *Chebulae fructus* (F)

7. 没食子酸 (gallic acid); 14. 秦皮甲素 (aesculin); 16. 紫丁香苷 (syringin); 21. 柯里拉京 (corilagin); 25. 诃子联苯酸 (chebulate biphenyl acid); 26. 鞣花酸 (ellagic acid); 28. 诃子酸 (chebulate acid)

2.4.4 精密度试验 取同一份供试溶液, 连续进样 6 次。测得没食子酸、秦皮甲素、紫丁香苷、

表 3 7 个指标成分线性关系考察结果

Tab 3 Linearity of 7 index components

成分	线性方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r
没食子酸	$Y = 32.77X + 4.254$	8.06 ~ 80.56	0.9998
秦皮甲素	$Y = 4.129X + 0.9951$	2.02 ~ 20.19	0.9999
紫丁香苷	$Y = 22.99X + 1.686$	1.58 ~ 15.83	0.9999
柯里拉京	$Y = 19.21X - 0.1644$	1.00 ~ 10.02	0.9999
诃子联苯酸	$Y = 14.99X + 5.661$	12.15 ~ 121.45	0.9997
鞣花酸	$Y = 48.03X - 8.923$	5.01 ~ 50.06	0.9997
诃子酸	$Y = 16.87X - 3.867$	19.82 ~ 198.2	0.9997

柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸的峰面积 RSD 分别为 0.50%、0.78%、1.3%、1.1%、1.7%、0.43%、1.7%，表明仪器精密度良好。

2.4.5 重复性试验 取痛风丸 (S8), 平行制备 6 份供试品溶液, 采用“2.1”项下色谱条件测定, 测得没食子酸、秦皮甲素、紫丁香苷、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸的平均含量分别为 4.72、1.11、0.80、0.48、6.90、2.33、10.66 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 1.1%、1.2%、1.1%、1.3%、1.2%、2.0%、2.0%，表明该方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验 取痛风丸 (S8), 新制 1 份供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样分析, 测得没食子酸、秦皮甲素、紫丁香苷、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸峰面积的 RSD 分别为 0.83%、1.8%、1.7%、1.1%、2.0%、1.1%、2.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.7 加样回收试验 取痛风丸 (S8) 9 份, 每份 1 g, 精密称定, 分成低、中、高浓度加样组, 分别精密加入没食子酸对照品 2、4、5 mg, 秦皮甲素对照品储备液 0.6、1.2、1.5 mL, 紫丁香苷对照品储备液 0.4、0.8、1 mL, 柯里拉京对照品储备液 0.25、0.5、0.7 mL, 诃子联苯酸对照品 3、6、8

mg, 鞣花酸对照品 1.5、3、5 mg, 诃子酸对照品 5、10、15 mg, 每个浓度平行制备 3 份, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别测定并计算回收率。没食子酸、秦皮甲素、紫丁香苷、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸的低、中、高浓度

平均加样回收率均在 94.87% ~ 100.33%, *RSD* 分别为 0.68% ~ 1.9%, 表明该方法回收率良好。

2.4.8 样品含量测定 取痛风丸 (S1 ~ S10), 按照“2.2.2”项下方法制得供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 用外标法计算含量, 结果见表 4。

表 4 痛风丸样品中 7 种指标成分含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 4 Content of 7 index components in the Tongfeng pills ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

样品编号	没食子酸	秦皮甲素	紫丁香苷	柯里拉京	诃子联苯酸	鞣花酸	诃子酸
S1	4.81	1.00	0.78	0.48	5.72	2.65	10.00
S2	4.78	0.99	0.81	0.48	5.84	2.80	10.26
S3	4.88	1.01	0.83	0.51	5.73	2.54	10.07
S4	4.59	1.00	0.81	0.50	5.86	2.64	10.10
S5	4.36	0.92	0.74	0.45	5.51	2.46	9.69
S6	4.30	0.91	0.75	0.48	5.86	2.44	9.36
S7	4.39	0.91	0.80	0.50	6.12	2.45	10.12
S8	4.57	0.92	0.82	0.50	6.19	2.63	10.13
S9	4.55	0.90	0.76	0.49	5.96	2.51	9.76
S10	4.39	0.92	0.78	0.48	5.97	2.98	9.75
均值	4.56	0.95	0.79	0.49	5.88	2.61	9.92
<i>RSD</i> /%	4.5	4.7	3.8	3.5	3.4	6.6	2.8

3 讨论

3.1 基于人用经验的中药复方制剂的质量标准研究

依据《指导原则》, 人用经验所用药物的质量应当满足临床需求, 保证质量基本可控。处方中宽筋藤具有活血化瘀、舒筋活络、祛风止痛、清热润肺、干黄水的功效^[4-6], 为方中君药; 宽筋藤中丁香苷、紫丁香苷等苯丙素类成分是其质量标志物^[7], 具有降糖降脂、抗炎止痛、增强免疫力的作用^[8-10]。方中秦皮具有清热燥湿、收涩止痢、止带、明目、干黄水之功效^[11], 为方中臣药; 秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷等香豆素类成分具有抗炎、抗氧化、止痛的功效^[12-14], 其中秦皮甲素的含量最高^[15]。方中诃子又被称为“藏药之王”, 具有清热解毒、收敛养血、涩肠止泻、调和三因、调和诸药等功效^[11, 16-18], 是藏医药中使用最频繁的一味药^[19]; 现代研究表明诃子含有的诃子酸、没食子酸、诃子联苯酸、鞣花酸、柯里拉京等多酚类、鞣质类成分具有抗氧化、抗炎、免疫调节、降尿酸等多重生物学功能^[20-27]。因此本研究结合《指导原则》和临床定位, 选择没食子酸、柯里拉京、秦皮甲素、紫丁香苷、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸作为痛风丸质量标准中的主要指标成分。

3.2 供试品溶液的制备

本研究的各指标成分的溶解性差异较大, 其中苯丙素、香豆素类成分和鞣花酸^[28]水溶性较差,

在醇中溶解度显著提高, 而酚酸类成分水溶性较好^[29], 在醇中溶解度较差。因此, 本研究通过单因素试验考察了提取方式、提取溶剂、提取时间对供试品溶液中指标成分色谱峰形及含量的影响。结果发现采用同一种提取溶剂, 超声和回流两种提取方式制备的供试品溶液中各指标成分含量未有明显差异; 不同浓度甲醇溶液作为提取溶剂制备的供试品溶液中指标成分色谱峰的分度、拖尾因子、理论塔板数均优于不同浓度乙醇溶液制备的供试品溶液, 且当采用 70% 的甲醇溶液作为提取溶剂时, 制备的供试品溶液中 7 种指标成分的含量均为最高; 超声提取时间超过 60 min 后供试品溶液中 7 种指标成分含量变化均不明显。因此, 本研究优选 70% 甲醇, 超声提取 60 min 制备供试品溶液。

3.3 检测波长的选择

对照品溶液的紫外全波长扫描显示各指标成分在 220 ~ 300 nm 处均具有较高的吸收, 但在不同的检测波长下各成分的相对色谱峰面积有较大变化, 综合发现各成分在 270 nm 波长均有较高的吸收峰面积, 因此选择检测波长 270 nm。

3.4 样品含量测定结果分析

10 批痛风丸中 7 个指标成分含量的 *RSD* 为 2.8% ~ 6.6%, 可能与原料药材产地、厂家、批次及制备工艺等因素有关。这提示企业实际生产时应优选并固定原料药材的产地与厂家, 以保证药品的质量控制。其中, 鞣花酸含量的 *RSD* 最大, 可能

除了与产地、厂家等因素有关,也与鞣花酸的理化性质有关,光照对鞣花酸的稳定性有较大影响,紫外照射能够导致鞣花酸自身的氧化聚合^[30],提示含有鞣花酸有效成分的诃子药材在加工、炮制的过程应尽量避免阳光的长时间照射。

3.5 小结

本研究采用高效液相色谱法建立痛风丸的特征图谱,并同时测定其指标成分没食子酸、秦皮甲素、紫丁香苷、柯里拉京、诃子联苯酸、鞣花酸、诃子酸的含量,经方法学验证,该方法准确性、稳定性较高,操作简便,可为痛风丸的质量标准提供依据。

参考文献

- [1] 索朗欧珠,次旦朗杰.吡乃(痛风)病的藏医特色诊疗方案[J].中国民族医药杂志,2011,17(7):23,44.
- [2] 中国药典2020年版.四部[S].2020:10.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心网站.基于人用经验的中药复方制剂新药药学研究技术指导原则(试行)[J].中国医药导刊,2023,25(10):997,1013.
- [4] 广东省药品监督管理局.广东省中药材标准:第一册[M].广州:广东科技出版社,2004:183-184.
- [5] 广西壮族自治区药品监督管理局.广西壮族自治区壮药材质量标准:第一卷[M].南宁:广西科学技术出版社,2008:167.
- [6] 湖南省食品药品监督管理局.湖南省中药材标准[M].长沙:湖南科技出版社,2009:160.
- [7] 刘晓芳,史俊豪,古宝浚,等.宽筋藤化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物的预测分析[J].中华中医药学刊,2023,41(7):156-165.
- [8] 龚娟,杨华,唐雪勇,等.基于网络药理学研究宽筋藤治疗特异性皮炎的作用机制[J].中药与临床,2022,13(1):32-35,43.
- [9] 王菲,袁冲,杨艳芳,等.紫丁香苷的植物资源、体内代谢途径及药理作用研究进展[J].中国药师,2021,24(11):2073-2076.
- [10] 杨光忠,李庆庆,徐晓诗,等.藏药宽筋藤化学成分的研究[J].中南民族大学学报(自然科学版),2019,38(4):547-550.
- [11] 中国药典2020年版.一部[S].2020:194-282.
- [12] 叶称连,陈进聪,吴龙火,等.香豆素抗炎活性的研究进展[J].现代医药卫生,2022,38(23):4063-4065,4069.
- [13] 储正达,蔡彬.秦皮甲素和秦皮乙素的药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2024,35(2):291-298.
- [14] 程果,徐国兵.香豆素类化合物的药理作用研究进展[J].中成药,2013,35(6):1288-1291.
- [15] 汪国松,杨亚滨,李璠,等.秦皮的研究进展[J].国外医药(植物药分册),2007,22(3):108-111.
- [16] 罗杰,梁奇,白玛卓嘎,等.藏药诃子的配伍减毒机制与临床研究进展[J].时珍国医国药,2024,35(5):1215-1218.
- [17] 董婉绒,崔雨,刘恬恬,等.诃子化学成分及药理活性研究进展[J].中成药,2024,46(4):1237-1245.
- [18] 久欣,李君,张慧文,等.不同产地诃子中11种成分的含量测定及其化学计量学综合评价[J].中国药房,2022,33(3):299-307.
- [19] 苏日古嘎其其格,美丽,松林.浅述蒙药诃子的应用与药理作用研究[J].中国民族医药杂志,2024,30(6):50-54.
- [20] 赵鹿,廖翠萍,杨秀娟,等.诃子的研究进展及质量标志物的预测[J].中草药,2020,51(10):2732-2744.
- [21] 刘双,董红敬,陈盼盼,等.天然多酚类成分缓解高尿酸血症及其机制研究进展[J].山东科学,2024,37(2):12-19.
- [22] Xu Y, Tang GY, Zhang C, et al. Gallic acid and diabetes mellitus: its association with oxidative stress [J]. Molecules, 2021, 26(23): 7115.
- [23] Oi Y, Hou IC, Fujita H, et al. Antiobesity effects of Chinese black tea (Pu-erh Tea) extract and gallic acid [J]. Phytother Res, 2012, 26(4): 475-481.
- [24] 张子微,段子渊,程卯生.多酚类化合物对脂代谢的影响[J].中国食品工业,2024(14):87-89.
- [25] 罗甜裕,周小艺,秦敏燕,等.柯里拉京抑制LPS和ATP激活的NLRP3炎症小体和巨噬细胞焦亡[J].免疫学杂志,2023,39(4):296-304.
- [26] 陈玫伶,勾玲,卢海嘯.鞣花酸药理作用研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2023,25(1):196-202.
- [27] 贝玉祥,郭英,范逸平,等.诃子多酚清除活性氧自由基及体外抗氧化作用研究[J].云南民族大学学报(自然科学版),2009,18(1):51-54.
- [28] 屈艳君,王文慧,曹家南,等.鞣花酸的制备及应用研究进展[J].中国食物与营养,2022,28(6):39-45.
- [29] Pellati F, Bruni R, Righi D, et al. Metabolite profiling of polyphenols in a Terminalia chebula Retzius ayurvedic decoction and evaluation of its chemopreventive activity [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(2): 277-285.
- [30] 王佳鸾,赵俸艺,张春红,等.鞣花酸提取、纯化及其生物活性研究进展[J].食品工业科技,2022,43(13):416-424.

(收稿日期:2024-09-20;修回日期:2024-11-05)

Zeylenone 通过影响 FA 通路蛋白 FANCD2 逆转肺癌顺铂耐药的研究

杨淑贤¹, 刘树森², 曹丽^{3*}, 李草^{1*} (1. 首都医科大学附属北京天坛医院药学部, 北京 100070; 2. 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076; 3. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: **目的** 探究多氧环己烯酮 Zeylenone (Zey) 逆转肺癌顺铂耐药作用及相关分子机制。**方法** 使用肺癌 A549 亲本细胞 (A549P) 和肺癌 A549 顺铂耐药细胞 (A549cisR), 首先用 CCK8 法检测顺铂或 Zey 对这两种细胞增殖的影响, 然后在顺铂中加入 Zey 共同作用于 A549cisR 细胞, 利用中位效应法评估联用效果及计算逆转倍数。采用分子对接技术探究 Zey 与范科尼贫血 (FA) 通路相关蛋白的相互作用, 最后通过分子动力学模拟和 Western blot 实验验证 Zey 对 FA 通路关键蛋白 FANCD2 的影响。**结果** Zey 对 A549P 和 A549cisR 细胞增殖均有良好的抑制作用, IC_{50} 值相近。Zey 显著增加 A549cisR 细胞对顺铂的敏感性, 并可通过抑制 FA 通路的活性逆转肺癌细胞对顺铂的耐药。**结论** Zey 可通过影响 FA 通路 FANCD2 蛋白逆转肺癌顺铂耐药, 该结果可为后续开发 Zey 为新型耐药逆转剂提供数据支撑。

关键词: Zeylenone; 肺癌; 顺铂耐药; 范科尼贫血; FANCD2

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0674-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.015

Zeylenone reverses cisplatin resistance in lung cancer by affecting FANCD2 protein in FA pathway

YANG Shu-xian¹, LIU Shu-sen², CAO Li^{3*}, LI Cao^{1*} (1. Department of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070; 2. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193)

Abstract: Objective To determine the effect of Zeylenone (Zey) on reversing cisplatin resistance in lung cancer and related molecular mechanism. **Methods** Lung cancer A549 parent cells (A549P) and lung cancer A549 cisplatin resistant cells (A549cisR) were used. Firstly, CCK8 method was used to detect the effect of cisplatin or Zey on the proliferation of these two cells, and then Zey was added to cisplatin to jointly act on A549cisR cells. The median effect method was used to evaluate the combined effect and calculate the reversal times. Then, the interaction between Zey and the related protein of Fanconi anemia (FA) pathway was determined by molecular docking. Finally, the influence of Zey on the key protein FANCD2 of FA pathway was verified by molecular dynamics simulation and Western blot. **Results** Zey not only had a good inhibitory effect on A549P, but also a good inhibitory effect on A549cisR, with similar IC_{50} value. Zey greatly increased the sensitivity of A549cisR to cisplatin and reversed the resistance of lung cancer cells to cisplatin by inhibiting the activity of the FA pathway. **Conclusion** Zey can reverse cisplatin resistance in lung cancer by affecting FANCD2 protein in FA pathway. Providing data support for the development of Zey as a novel drug resistance reversal agent.

Key words: Zeylenone; lung cancer; cisplatin resistance; Fanconi anemia; FANCD2

基金项目: 北京市医院管理局临床医学发展专项扬帆计划基金资助项目 (No.ZYLYX201827)。

作者简介: 杨淑贤, 女, 博士, 药师, 主要从事中药/天然产物抗肿瘤药理药效与分子机制研究, email: yangshuxianlove@163.com

***通信作者:** 曹丽, 女, 教授, 主要从事天然药物抗肿瘤药理学方面的研究, email: lcao@implad.ac.cn; 李草, 男, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: livenlife@163.com

肺癌已成为全球发病率及病死率最高的恶性肿瘤,全球每年肺癌新发病例超过 200 万,死亡病例超过 170 万,5 年生存率低于 20%,在中国每年有超过 73 万人死于肺癌^[1-2]。顺铂虽被广泛应用于肺癌的治疗中,但是,因耐药严重限制了其疗效。因此,研发新型顺铂耐药逆转剂是肺癌治疗的重要内容。研究显示,参与 DNA 交联修复和双链断裂修复的范科尼贫血(Fanconi anemia, FA)通路是肿瘤细胞对顺铂敏感性的重要决定因素,是逆转耐药研究中的明星靶点^[3]。多氧环己烯酮 Zeylenone (Zey) 是从山椒子中提取分离得到的天然产物,有良好的抗肿瘤活性。前期研究显示,Zey 可通过调控 HSP90/AKT/GSK3 β 和 FA 通路增强顺铂的抗骨肉瘤作用^[4],也可显著抑制肺癌 A549 移植瘤的体内生长^[5]。基于此,本文拟通过体外实验确认 Zey 是否可基于 FA 通路逆转肺癌顺铂耐药,并探究相关的分子机制,以期为临床提供具有潜在研究价值的新型顺铂耐药逆转剂。

1 材料

1.1 细胞

人肺癌 A549 亲本细胞(A549P)和人肺癌 A549 顺铂耐药细胞(A549cisR)均购自中国医学科学院基础医学研究所资源中心。A549P 和 A549cisR 细胞分别使用 McCoy's 5A 和 DMEM 完全培养基培养。

1.2 试药

Zey (CAS: 193410-84-3),由北京协和医学院药用植物研究所许旭东教授提供,HPLC 检测纯度 > 97.5%,化学结构见图 1。注射用顺铂(批号:OLO644B03,规格:20 mg/支,齐鲁制药有限公司),CCK8 试剂(碧云天生物技术有限公司),FANCI 抗体(Abcam 公司),FANCD2 抗体(Santa Cruz Biotechnology),胎牛血清(美国 Hyclone 公司)。

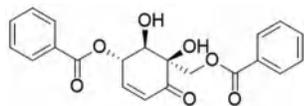


图 1 Zey 的化学结构

Fig 1 Chemical structure of Zey

1.3 仪器

MCO-18AC 型 CO₂ 细胞培养箱(日本 Panasonic 公司),1X71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),EPS-300 型电泳仪及转膜仪(上海天能公司),TGL-16M 型离心机(湖南湘仪科技公司),Multiskan FC 型酶标仪(Thermo 公司),电子天平 AL104 型(梅特勒托利多仪器有限公司),ChemiDoc XRS 型凝胶

成像系统(美国 Bio-Rad 公司),ZD-9556 型水平摇床(太仓市科技器材厂)。

2 方法和结果

2.1 CCK8 法检测 A549cisR 细胞的耐药倍数

首先,采用 CCK8 法鉴定购买的耐药细胞是否满足实验需求。取对数生长期的 A549P 和 A549cisR 细胞,制备成 0.6×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,每孔 100 μL 铺于 96 孔板内,放于培养箱过夜。使用细胞培养液配制不同浓度的顺铂药液,并设置对照组(加 100 μL 培养基),药物作用 24 h。结束后每孔加 10 μL CCK8 反应 2 h 后测光密度值(OD)值,计算细胞增殖抑制率,顺铂或 Zey 的 IC₅₀ 值。计算 A549cisR 细胞对顺铂的耐药倍数,计算公式如下:

$$\text{耐药倍数} = \text{IC}_{50 \text{ A549cisR}} / \text{IC}_{50 \text{ A549P}} \quad (1)$$

耐药倍数 < 5 为低度耐药,耐药倍数在 5 ~ 15 为中度耐药,耐药倍数 > 15 为高度耐药,耐药倍数 > 5 即符合实验要求。

实验结果如图 2 显示,随着顺铂浓度的增加,顺铂对 A549P 和 A549cisR 细胞的生长抑制作用越来越显著,有剂量依赖性。顺铂作用于 A549P 和 A549cisR 细胞 24 h 的 IC₅₀ 值分别为 $(19.62 \pm 0.56) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(296.42 \pm 5.4) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,耐药倍数为 15.10,因此,A549cisR 细胞具有中度耐药性,符合实验需求。

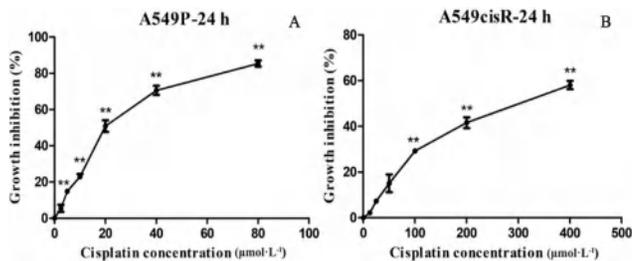


图 2 顺铂对 A549P (A) 和 A549cisR (B) 细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of cisplatin on the proliferation of A549P cells (A) and A549cisR cells (B)

注:与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

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

2.2 CCK8 法检测 Zey 对 A549P 和 A549cisR 细胞增殖的影响

使用细胞培养液配制不同浓度的 Zey 药液,采用“2.1”项下 CCK8 法考察 Zey 对 A549P 和 A549cisR 细胞增殖的影响。结果增殖曲线图如图 3 所示,Zey 对两种细胞的生长抑制作用随 Zey 浓度的增加而越来越显著,有剂量依赖性。Zey 作用于 A549P 和 A549cisR 细胞 24 h 的 IC₅₀ 值分别为 $(21.35 \pm 0.15) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(36.41 \pm 1.64) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明 Zey 不仅对 A549P 细胞有很好的抑制作用,对耐药 A549cisR 细胞同样有很好的抑制作用。

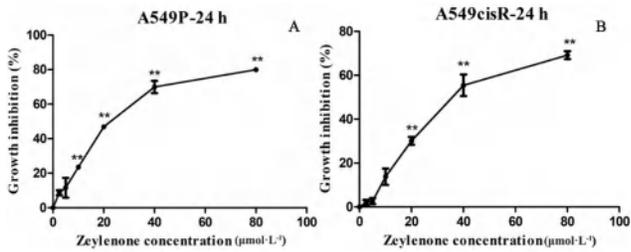


图 3 Zey 对 A549P (A) 和 A549cisR (B) 细胞增殖的影响
Fig 3 Effect of Zey on the proliferation of A549P cells (A) and A549cisR cells (B)

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

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

2.3 CCK8 法检测 Zey 联合顺铂对 A549cisR 细胞增殖的影响

取对数生长期 A549cisR 细胞, 以每孔 6000 个细胞铺于 96 孔板内, 过夜贴壁后, 设置对照组、单用顺铂组、单用 Zey 组、Zey 联合顺铂组, 药物作用 24 h 后, 每孔加 10 μL CCK8 反应 2 h, 随后检测 OD 值并计算 IC_{50} 值。另外, 用 IC_{50} 值计算逆转倍数, 计算公式如下:

逆转倍数 = 使用逆转剂前 IC_{50} 值 / 使用逆转剂后 IC_{50} 值 (2)

进一步使用国际标准的中位效应法 (Chou-Talalay) 评估 Zey 与顺铂联用后的效应, 该法以联合指数 (CI) 为主要判断指标。将至少 3 次独立重复的实验结果合并后计算平均值, 将平均值输入 CompuSyn 1.0 软件中进行效应分析。其中, CI 值反映两个药物之间的相互作用。CI 值的计算公式如下:

$$CI = (D)1 / (Dx)1 + (D)2 / (Dx)2 \quad (3)$$

(Dx)1 和 (Dx)2 表示两个药物达到特定抑制率独自所需要的浓度, (D)1 和 (D)2 是两药联合使用时, 达到与单药使用时相同抑制率独自所需要的浓度。CI < 0.9、0.9 < CI < 1.1、CI > 1.1 分别表示协同效应、加和效应和拮抗效应。

结果如图 4A 所示, 当在顺铂中加入 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Zey 后, 顺铂的增殖抑制率大幅增加。CI 结果如图 4B 所示, 在 A549cisR 细胞中, 各浓度下的 CI 均小于 1, 表现出明显的协同增敏作用。再从 IC_{50} 值进一步分析, 单用顺铂组的 IC_{50} 值为 $(296.42 \pm 5.40) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 联用组的 IC_{50} 值为 $(61.28 \pm 3.19) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 差异显著 ($P = 0.00071$)。计算逆转倍数, 发现 Zey 对 A549cisR 细胞的逆转倍数为 4.84。以上结果说明, 顺铂中加入了 Zey 后, IC_{50} 值下降, A549cisR 细胞对顺铂的敏感性增加, Zey 在肺癌 A549 细胞中可逆转顺铂的耐药性。

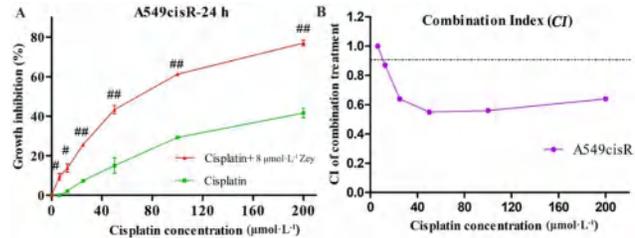


图 4 Zey 对 A549cisR 细胞对顺铂的敏感性的影响
Fig 4 Effect of Zey on the sensitivity of A549cisR cells to cisplatin
注: 与顺铂组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the cisplatin group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

2.4 分子对接预测 Zey 与 FA 通路相关蛋白的结合模式

将 FA 通路重要蛋白 (FANCA、FANCM、FANCI、FANCD2、FANCL 和 FANCT) 与 Zey 进行分子对接, 初步探索 Zey 与 FA 通路的作用。从 RCSB PDB 下载 FA 通路重要蛋白, 选择分辨率较高 ($\text{\AA} < 2.50$) 的晶体结构进行对接。从 PubChem 获取 Zey 的三维结构。将化学成分的结构进行优化处理, 并使用 Open Babel 2.4.1 将其从自然格式转换为 pdbqt 格式。然后, 使用 Autodock Vina 1.2.0 进行对接, 最后, 使用 PyMol 2.5.4 进行可视化。本研究主要通过结合能评价和化合物与靶点的结合活性, 结合能低于 $-19 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表明分子与靶点之间有结合活性^[6]。实验结果如表 1 及图 5 所示, Zey 与 FA 通路蛋白的结合能均在 $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 以下, 说明 Zey 与 FA 通路相关蛋白均有良好结合力, 再结合空腔体积参数发现, Zey 与 FANCD2 蛋白的相互作用最强。因此, 推测 Zey 可能作用于 FANCD2 蛋白从而减弱 DNA 损伤修复, 导致顺铂耐药的逆转。

表 1 Zey 与 FA 通路蛋白的结合能

蛋白	结合能 / ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	空腔体积
FANCA	-35	5207
FANCM	-30	614
FANCI	-31	2687
FANCD2	-33	50898
FANCL	-39	561
FANCT	-32	3918

2.5 分子动力学分析 Zey 与 FANCD2 蛋白的相互作用

分子对接是研究小分子-蛋白质之间的相互作用, 而分子动力学模拟更适合于研究小分子-蛋白质之间相互作用的动态特征, 因此使用分子动力学模拟进一步探究。首先将要模拟的蛋白体系嵌入到溶剂盒子内, 设置其边界距蛋白边界不

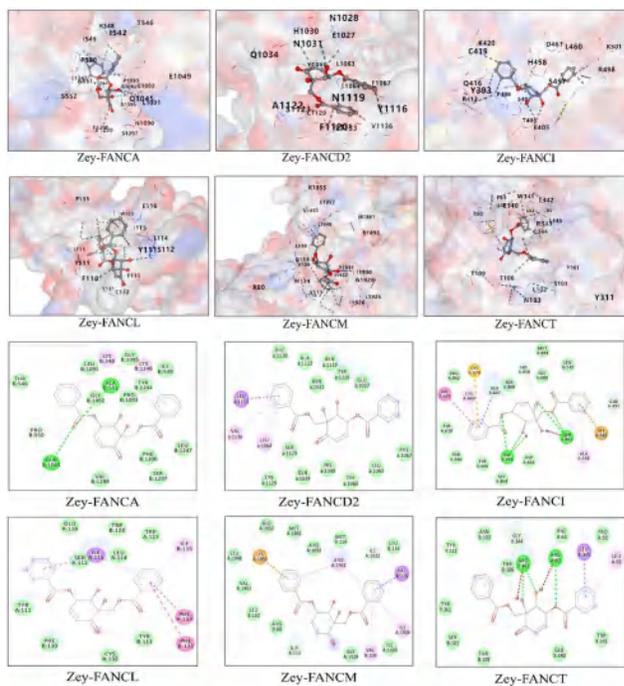


图 5 分子对接模式图

Fig 5 Molecular docking mode diagram

小于 10 Å，在其中添加合适数目的 Na⁺ 或 Cl⁻ 保持体系的电中性，将构建好的体系在 amber99sb 力场下进行能量最小化，防止动力学模拟过程崩溃。随后进行 NVT 及 NPT 预平衡，平衡后设置体系在 NPT 系统下进行模拟，设置温度为 300 K，设置步长为 2 fs，进行分子动力学模拟。结果显示，Zey 与 FANCD2 蛋白的 ARG1336、GLY1387、GLN1332 氨基酸形成氢键进行结合，与 VAL1368、LEU1389、THR1335、HIS1339、LEU1386、PHE1384、VAL1371 形成疏水相互作用（见图 6）。因此，推测 FANCD2 蛋白极有可能是 Zey 影响 FA 通路活性的关键蛋白。

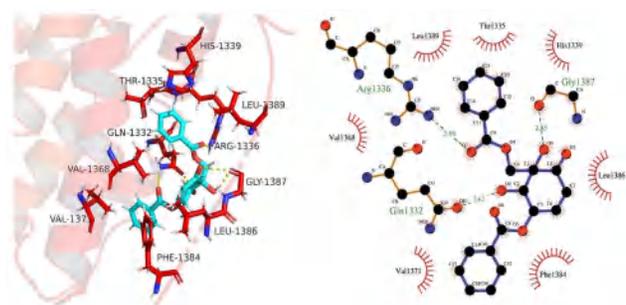


图 6 分子动力学模拟

Fig 6 Molecular dynamics simulations

2.6 Western blot 检测 Zey 对 FA 通路蛋白表达的影响

将对数生长期的 A549P 和 A549cisR 分别接种于 T75 瓶内，待细胞长到 80% 满时，常规消化，收集到 10 mL 离心管内，1000 r · min⁻¹ 离心 4 min，去除上清后，每管加入 300 μL 裂解液（含 1% 蛋白酶、磷酸酶抑制剂），在冰上裂解 30 min，10 000 r · min⁻¹ 离心 15 min，去除果冻状沉淀，上清液即为不同细胞内的蛋白样品。随后，只用 A549cisR，设置对照组及 Zey 组（8 μmol · L⁻¹），作用 12 h 后，Western blot 检测 Zey 对 FANCD2、FANCI 蛋白表达的影响。

实验结果如图 7 所示，相比 A549P 细胞，A549cisR 细胞中 FANCD2 的单泛素化水平增加，且 FANCI 蛋白的表达水平提升，表明 FA 通路被激活，证实 FA 通路参与了顺铂的耐药机制，FANCD2 单泛素化程度和顺铂对肺癌细胞的敏感性相关，提示 FANCD2 有望成为逆转肺癌顺铂耐药的新靶点。另外，Zey 可抑制 FANCI 蛋白的表达，并且可显著抑制 FANCD2 的单泛素化，从而抑制 FA 通路（见图 8）。因此，Zey 可通过影响 FA 通路的 FANCD2 蛋白逆转肺癌细胞对顺铂的耐药。

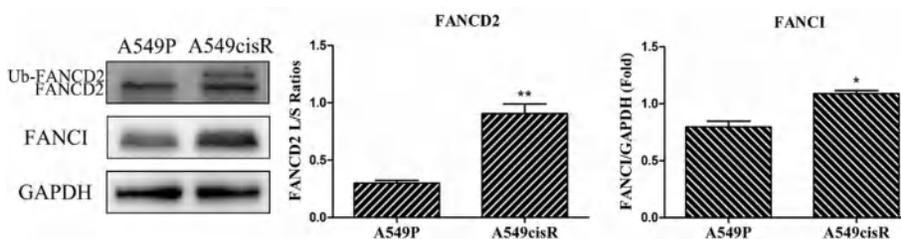


图 7 A549P 及 A549cisR 细胞中 FA 通路蛋白的表达

Fig 7 Expression of FA pathway protein in A549P and A549cisR cells

注：与 A549P 细胞组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01。

Note: Compared with the A549P cell group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

2.7 统计分析

实验结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，使用 SPSS V21 (SPSS, Chicago, IL) 软件进行统计分析，如果数据服从正态分布，则采用单因素

方差分析 (One-Way ANOVA)，然后使用 Tukey 检验进行组间两两比较；如果数据不符合正态分布，则使用 Kruskal-Wallis 检验。当 *P* < 0.05 时认为差异存在统计学意义。

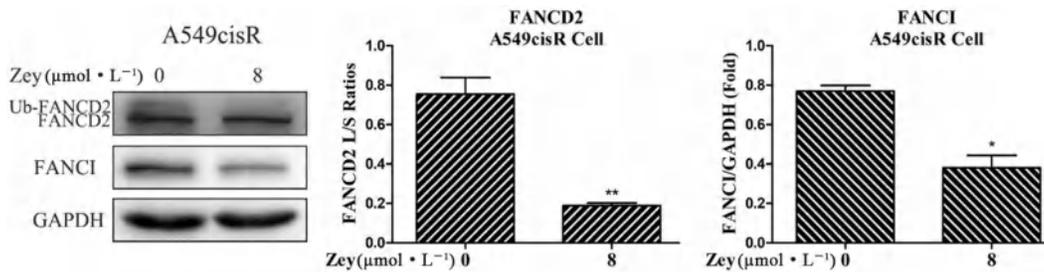


图 8 Zey 对 A549cisR 细胞中 FANCD2 和 FANCI 蛋白的影响

Fig 8 Effect of Zey on FANCD2 and FANCI proteins in A549cisR cells

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

3 讨论

化疗耐药是肿瘤治疗中的重大问题, 占治疗失败的 90%^[7], 因此提高化疗敏感性并寻求有效的耐药逆转剂是改善肿瘤患者治疗的关键一步。顺铂作为肺癌的标准治疗药物, 经过长时间的治疗后, 顺铂的获得性耐药常导致肿瘤复发, 其耐药问题亟待解决^[8-10]。多项研究表明, DNA 修复和耐受系统在顺铂耐药性中至关重要^[11-13]。顺铂可引起链内交联和链间交联 (interstrand crosslinks, ICLs), 虽然链内交联很容易通过核苷酸切除修复通路修复, 但 ICLs 是一种高度细胞毒性的病变, 主要通过 FA 通路修复^[14]。多项研究显示, FA 通路与顺铂的耐药性显著相关, FA 通路的基因改变和沉默可增加肿瘤细胞对顺铂的敏感性, FA 通路被激活则导致化疗耐药的产生^[15]。因此, 调控 FA 通路的策略已被用于提高化疗敏感性和逆转耐药。

本研究使用 A549P 细胞和 A549cisR 细胞进行探究, 我们发现单用 Zey 时对 A549cisR 细胞有很好的抑制作用, 在此基础上, 将 Zey 与顺铂联合作用于 A549cisR 细胞时, Zey 显著增加了顺铂敏感性并逆转顺铂耐药。进一步探究分子机制发现 Zey 与 FA 通路的关键蛋白均可很好结合, 特别是 FANCD2 蛋白。查阅文献发现, FANCD2 与 FANCI 常以复合体的形式在 FA 通路中发挥作用, 如果 FANCD2/FANCI 复合体不发生单泛素化, 将不会有后续的 DNA 修复过程, 因此, FANCD2 的单泛素化 (FANCD2-S 转变为 FANCD2-L) 常被认为是 FA 通路激活的最核心环节^[16-18]。因此, 笔者猜测 Zey 可能是作用于 FANCD2 蛋白对 FA 通路产生影响。

基于以上结果和文献, 分子动力学模拟证实 Zey 与 FANCD2 有高结合力, 相比亲本细胞 A549P, 耐药细胞 A549cisR 中 FANCD2 的单泛素化水平增加, 且 FANCI 蛋白的表达水平提升, 表明 FA 通路被激活, 证实细胞持续暴露于顺铂可导

致 FA 通路的激活, FA 通路确实参与了顺铂的耐药机制, 这与文献报道的结果一致^[19-20]。当 Zey 作用于 A549cisR 中 24 h 后, 发现 Zey 可以抑制 FANCI 蛋白的表达及 FANCD2 的单泛素化, 从而抑制 FA 通路。以上结果表明 FA 通路参与顺铂耐药, 并且 Zey 可通过调控 FANCD2 蛋白的泛素化进而抑制 FA 通路, 并进一步逆转顺铂耐药。

如今, 靶向 FA 通路诱导 DNA 损伤修复障碍是一种潜在的肿瘤治疗策略, 可增加顺铂敏感性, 因此, 基于 FA 通路开发的小分子抑制剂可在临床上作为耐药逆转剂用于癌症治疗^[21-22], 且这些抑制剂多靶向 FANCD2 蛋白。近年来, 已有很多研究小组开发了 FA 通路小分子抑制剂, 例如硼替佐米、苯丁酸酯、姜黄素、氯喹和雷公藤红素等。硼替佐米通过抑制 FANCD2 单泛素化使卵巢癌细胞对 DNA 交联剂美法仑敏感; 雷公藤红素引起蛋白酶体依赖的 FANCD2 降解, 对胶质瘤发挥化学增敏作用^[23-24]。结合本研究结果, Zey 可发挥与 FANCD2 抑制剂类似的作用, 对顺铂增敏。但是, Zey 靶向 FANCD2 蛋白仍需通过基因敲除、细胞热转移分析及药物亲和靶标稳定性等实验进一步验证, 此外, 还需阐明 Zey 靶向 FANCD2 蛋白的特异性, 可通过体外 ATR 激酶检测、UBE2T 和 FANCL 自泛素化检测、FA 核心复合物的形成评估等实验来明确其靶标特异性^[25]。

迄今为止, 国内外尚未见 Zey 通过抑制 FA 通路逆转肺癌细胞对顺铂耐药的报道。本研究结果可为开发 Zey 为顺铂耐药逆转剂提供有价值的实验依据, 此外, 靶向 FA 通路是逆转顺铂耐药的一个可行策略, 有望为顺铂耐药的患者带来一些临床益处。

参考文献

- [1] Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, et al. Lung cancer [J].

- Lancet, 2021, 398 (10299): 535-554.
- [2] Luo YH, Chiu CH, Scott Kuo CH, et al. Lung cancer in republic of China [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16 (4): 519-527.
- [3] Peake JD, Noguchi E. Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair [J]. *Hum Genet*, 2022, 141 (12): 1811-1836.
- [4] Yang SX, Xiao HY, Sun YF, et al. Zeilynone synergizes with cisplatin in osteosarcoma by enhancing DNA damage, apoptosis, and necrosis via the Hsp90/AKT/GSK3 β and Fanconi anaemia pathway [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (10): 5899-5918.
- [5] Hu X, Han R, Quan LH, et al. Stabilization and sustained release of zeilynone, a soft cytotoxic drug, within polymeric micelles for local antitumor drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2013, 450 (1-2): 331-337.
- [6] 杨淑贤, 孙阿宁, 朱斌, 等. 基于网络药理学联合 GEO 数据库及分子对接探究脑安胶囊治疗缺血性脑卒中的作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40 (3): 435-439.
- [7] Liu WJ, Du Y, Wen R, et al. Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 206: 107438.
- [8] Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 106: 27-36.
- [9] Hu HL, Li B, Wang JK, et al. New advances into cisplatin resistance in head and neck squamous carcinoma: mechanisms and therapeutic aspects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114778.
- [10] Xue DF, Pan ST, Huang G, et al. ROS enhances the cytotoxicity of cisplatin by inducing apoptosis and autophagy in tongue squamous cell carcinoma cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 122: 105732.
- [11] Kiss RC, Xia F, Acklin S. Targeting DNA damage response and repair to enhance therapeutic index in cisplatin-based cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (15): 8199.
- [12] Curtin NJ. Targeting the DNA damage response for cancer therapy [J]. *Biochem Soc Trans*, 2023, 51 (1): 207-221.
- [13] Minten EV, Yu DS. DNA repair: translation to the clinic [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2019, 31 (5): 303-310.
- [14] Liu WJ, Palovcak A, Li F, et al. Fanconi anemia pathway as a prospective target for cancer intervention [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 39.
- [15] Li YQ, Zhang YN, Yang Q, et al. Silencing of FANCI promotes DNA damage and sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2022, 22 (7): 591-602.
- [16] Lemonidis K, Arkinson C, Rennie ML, et al. Mechanism, specificity, and function of FANCD2-FANCI ubiquitination and deubiquitination [J]. *FEBS J*, 2022, 289 (16): 4811-4829.
- [17] Lemonidis K, Rennie ML, Arkinson C, et al. Structural and biochemical basis of interdependent FANCI-FANCD2 ubiquitination [J]. *EMBO J*, 2023, 42 (3): e111898.
- [18] Tan W, van Twest S, Leis A, et al. Monoubiquitination by the human Fanconi anemia core complex clamps FANCI: FANCD2 on DNA in filamentous arrays [J]. *eLife*, 2020, 9: e54128.
- [19] Zhang YC, Li JY, Zhou YM, et al. And-1 Coordinates with the FANCM complex to regulate Fanconi anemia signaling and cisplatin resistance [J]. *Cancer Res*, 2022, 82 (18): 3249-3262.
- [20] Ghosal K, Agatemor C, Han RI, et al. Fanconi anemia DNA repair pathway as a new mechanism to exploit cancer drug resistance [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20 (9): 779-787.
- [21] Du CZ, Li SW, Singh SX, et al. Epigenetic regulation of Fanconi anemia genes implicates PRMT5 blockage as a strategy for tumor chemosensitization [J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19 (12): 2046-2056.
- [22] Taylor SJ, Arends MJ, Langdon SP. Inhibitors of the Fanconi anaemia pathway as potential antitumour agents for ovarian cancer [J]. *Explor Target Antitumor Ther*, 2020, 1 (1): 26-52.
- [23] Lin HH, Zeng WH, Yang HK, et al. Fanconi anemia complementation group D2 promotes sensitivity of endometrial cancer cells to chemotherapeutic agents by inhibiting the ferroptosis pathway [J]. *BMC Womens Health*, 2024, 24 (1): 41.
- [24] Chen YF, Pang YC, Wang HC, et al. Identification of arnicolide C as a novel chemosensitizer to suppress mTOR/E2F1/FANCD2 axis in non-small cell lung cancer [J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181 (8): 1221-1237.
- [25] Hater N, Iwaniuk KM, Leifeld C, et al. Identification of new RAD51D-regulating microRNAs that also emerge as potent inhibitors of the Fanconi anemia/homologous recombination pathways [J]. *Hum Mol Genet*, 2022, 31 (24): 4241-4254.

(收稿日期: 2024-05-02; 修回日期: 2024-07-08)

基于多指标分析的止痒方提取液纯化工艺研究

齐梦飞, 林涛, 尚上, 向亚津晶, 杨帆, 沈家燕, 童瑛, 张颜, 刘葭, 吴清* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 筛选止痒方最优纯化方法。**方法** 以有效成分保留率以及药液理化性质(出膏率、电导率、透光率)为指标, 分别考察高速离心法、热处理冷藏法和澄清剂吸附法对止痒方的纯化效果, 以筛选最优纯化方法。**结果** 澄清剂吸附法为止痒方的最优纯化方法, 最佳条件为: 搅拌速度为 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 絮凝温度为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 澄清剂配制浓度为 2%, 药液浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 澄清剂添加量为 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。有效成分落新妇苷保留率为 94.08%, 透光率为 69.12%, 出膏率为 27.21%, 电导率为 $7.53 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。**结论** 采用天然澄清剂吸附法对止痒方纯化效果最好, 且该法操作简单, 工艺稳定, 可为制剂进一步开发提供参考。

关键词: 止痒方; 纯化工艺; 天然澄清剂; 保留率; 透光率

中图分类号: R284.1, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0680-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.016

Purification of antipruritic decoction extract based on multi-index analysis

QI Meng-fei, LIN Tao, SHANG Shang, XIANG Ya-jin-jing, YANG Fan, SHEN Jia-yan, TONG Ying, ZHANG Yan, LIU Jia, WU Qing* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To optimize the purification of antipruritic decoction. **Methods** The purification effect of high speed centrifugal method, heat treatment before the refrigeration method and clarifier adsorption method on the antipruritic decoction was determined according to the effective ingredient retention rate and physicochemical properties of the liquid (extract rate, conductivity and light transmittance). The optimal purification method was selected. **Results** Clarifier adsorption method was the best for antipruritic decoction. The optional condition was as follows: the stirring speed was $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, the flocculation temperature was $50 \text{ }^\circ\text{C}$, the preparation concentration of clarifier was 2%, the concentration of liquid was $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the addition amount of clarifier was $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The retention rate of astilbe was 94.08%, the light transmittance was 69.12%, the extract rate was 27.21%, and the conductivity was $7.53 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$. **Conclusion** The clarifier adsorption method has the best purification, which is simple operable and stable, providing reference for further development of the preparation.

Key words: antipruritic decoction; purification process; natural clarifier; retention rate; light transmittance

止痒方是临床上用于治疗各种瘙痒的有效经验方, 方中以土茯苓为君药, 能够解毒、除湿、通利关节。搭配徐长卿、防风等药材, 共奏祛风止痒、清热利湿的功效。临床常以水煎煮后外用涂抹的方式应用, 该方式存在易发霉变质、不易储存、不利于携带、不便随时使用等缺点。基于溶液型喷雾剂

具有性质稳定、均匀度好、起效迅速、方便使用、便于携带和保存等优势^[1], 将止痒方研制成溶液型喷雾剂, 可提高患者顺应性。但提取液中含有的蛋白质、淀粉、色素、鞣质等杂质, 会影响止痒方喷雾剂的质量和稳定性。为了提高药物的纯度和澄明度, 增强药物的治疗效果, 减少不良反应, 保证止

作者简介: 齐梦飞, 男, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: qimengfeifddzyyr@163.com *通信作者: 吴清, 女, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: qwu@vip.sina.com

痒方喷雾剂的有效性和安全性,并且满足喷雾剂药液具有一定的均匀性和稳定性的要求,本文对该方纯化方法进行研究。

目前中药纯化工艺考察多以单一指标或者主观指标为主,但中药复方成分复杂,单一指标无法全面反映中药提取液的质量^[2],会对试验结果产生片面影响,具有一定的局限性;而主观指标往往容易导致结果不够准确,存在个体差异,重现性较差。因此,本试验采用化学和物理多指标相结合的方法对止痒方提取液纯化工艺进行评定,使得结果更加全面系统。其中,出膏率是评价药材质量的重要指标,同时中药提取液纯化前后出膏率差异也可作为评价纯化除杂效果的重要指标^[3];落新妇苷为 2020 年版《中国药典》^[4]土茯苓含量测定的质量控制成分^[5],因此将其保留率作为纯化指标之一;电导率与中药提取液中带电胶体粒子密切相关^[6],能有效表征溶液体系的稳定性^[7],同时电导率能在一定程度上反映中药水提液中无机盐与蛋白质等带电大分子以及其他荷电有机物的含量^[8-9];透光率常用来表征液体的澄明度,在食品工业和医药行业中具有广泛应用^[10-11]。以上四个指标客观准确,能够使止痒方提取液的外观澄明度、稳定性,以及疗效得到保证,满足后续喷雾剂的制备要求,并且对于其他制剂工艺研究具有一定的指导意义。

1 材料

1.1 试药

土茯苓(产地:安徽,批号:230601);徐长卿(产地:河北,批号:230401);防风(产地:内蒙古,批号:230301)等,所有药材均购自洪雅县瓦屋山药业有限公司,经北京中医药大学中药学院杨瑶珺教授鉴定;落新妇苷(上海源叶生物科技有限公司,纯度:98%,批号:D26GB172582);甲醇[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,HPLC级,批号:225397];冰乙酸(天津市致远化学试剂有限公司,批号:2021032040);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);壳聚糖(上海源叶生物科技有限公司,批号:A30S11K126403);羧甲基壳聚糖(北京索莱宝科技有限公司,批号:2230807001);天然澄清剂(河南百味食品配料有限公司);101果汁澄清剂(陕西森弗天然制品有限公司,批号:23072801);ZTC-II型天然澄清剂(武汉正天成生物科技有限公司,批号:20231219);海藻酸钠(北京凯国科技有限公司,批号:AB083877)。

1.2 仪器

低速离心机[艾卡仪器设备(广州)有限公司];LC-20A型高效液相色谱仪、SPD-M20A型光电二极

管阵列紫外可见光检测器(日本岛津公司);RE-501型旋转蒸发器、SHB-III循环水式真空泵(北京神泰伟业仪器设备有限公司);BZF50型真空干燥箱(上海BOXUN公司);BT125D电子分析天平(北京赛多利斯公司);电热套(北京科伟永兴仪器有限公司);SB-5200DTD超声波清洗机(宁波新芝生物科技有限公司);JY20002电子天平、756PC型紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);雷磁DDS-11A型电导率仪(上海仪电科学仪器股份有限公司);BY-G20型医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司);数显恒温磁力搅拌水浴锅(湖南前沿科技有限公司);ZNCL-S-5D多点智能磁力搅拌器(河南爱博特科技发展有限公司);HH-6数显恒温水浴锅(常州普天仪器制造有限公司)。

2 方法与结果

2.1 止痒方提取浓缩液的制备

将含挥发性成分的中药徐长卿、防风等加入 15 倍量水浸泡 60 min,水蒸气蒸馏法收集 10 倍量蒸馏液,药渣同土茯苓等余下饮片进行水提,加入 10 倍量水,回流提取 90 min,提取 2 次,合并提取液,减压浓缩至生药量 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,即得。

2.2 指标测定

2.2.1 出膏率 取干燥至恒重的蒸发皿,分别取纯化后的药液 5 mL,用水浴锅蒸干水分后,置于 105 °C 烘箱中继续干燥至恒重,静置冷却至室温后立即精密称重,折算出膏率。

2.2.2 落新妇苷保留率的测定 取纯化前后的药液,按照“2.3”项下落新妇苷含量测定方法检测落新妇苷含量,并计算保留率(%)。

保留率(%) = 纯化后提取液中落新妇苷含量 / 原提取浓缩液中落新妇苷含量 $\times 100\%$ 。

2.2.3 电导率的测定 分别取纯化后的药液,测定样品 25 °C 的电导率。

2.2.4 透光率的测定 参照文献方法^[12],采用紫外分光光度法,选定 760 nm 作为检测波长,以去离子水作为空白对照,测定各纯化后药液样品的透光率,反映药液的澄明度。

2.3 落新妇苷含量测定方法

2.3.1 HPLC 色谱条件 色谱柱为 INERTSILODS-3C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);以甲醇为流动相 A,以 0.1% 冰乙酸溶液为流动相 B,按表 1 条件进行梯度洗脱;检测波长 291 nm;流速 1 mL \cdot min⁻¹;柱温 30 °C;进样量 10 μL 。理论板数按落新妇苷峰计算应不低于 5000。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密吸取不同方法纯化后的提取液样品 1 mL 转移至 5 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀,用微孔滤膜过滤,取续滤液即得。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution of mobile phase

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 5	10 ~ 22	90 ~ 78
5 ~ 35	22 ~ 34	78 ~ 66
35 ~ 50	34 ~ 37	66 ~ 63

2.3.3 对照品溶液的制备 取落新妇苷对照品适量，精密称定，加甲醇溶解，定容，得到 $339 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的落新妇苷对照品溶液。

2.3.4 阴性样品溶液的制备 称取不含土茯苓的其余饮片，按照“2.3.2”项下方法制备阴性样品溶液。

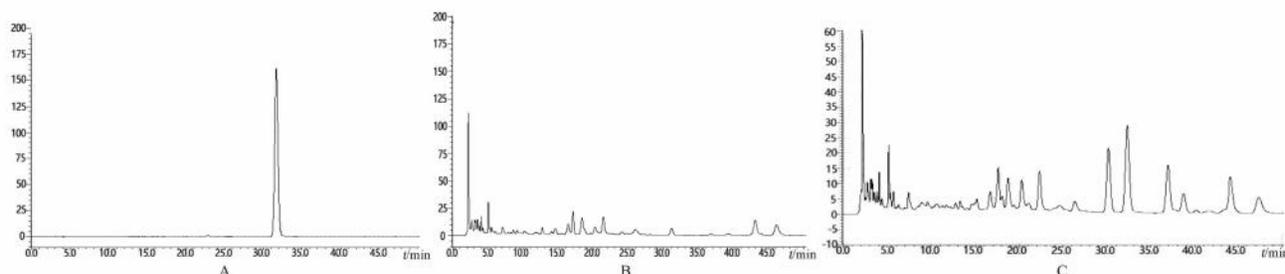


图 1 落新妇苷专属性 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of astilbe specificity

A. 对照品溶液 (control solution); B. 阴性样品溶液 (negative sample solution); C. 供试品溶液 (sample solution)

2.4 纯化方法筛选

中药复方提取液的常见的纯化方法有水提醇沉法、醇提水沉法、大孔树脂吸附法、膜分离法、澄清剂吸附法、离心分离法等，依据中药复方提取液和有效成分的性质选择适当的方法可以实现不同的纯化目的。结合本课题组前期止痒方的提取方法，拟采用高速离心法、热处理冷藏法和澄清剂吸附法来对止痒方提取液进行纯化。

2.4.1 高速离心法及热处理冷藏法 ① 高速离心法：取止痒方浓缩液 80 mL， $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心 40 min；② 热处理冷藏法：取止痒方浓缩液煮沸 5 min，冷却后置 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏 24 h，再按 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min。分别取上清液，备用。

2.4.2 澄清剂吸附法^[13] 取止痒方浓缩液 6 份，每份 80 mL，置于洁净的烧杯中，将烧杯置于磁力搅拌器上，转速 $400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，以常用添加量按照 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的添加量分别考察 1% 壳聚糖、1% 羧甲基壳聚糖、1% 天然澄清剂、1% 海藻酸钠对药液澄清效果的影响，按照 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的添加量考察 5% 101 果汁澄清剂，按照 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的添加量考察 ZTC-II 型天然澄清剂，分别磁力搅拌 15 min，将纯化样品置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏 24 h 后于 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min，取上清液，备用。

2.5 不同方法纯化效果

不同纯化方法的纯化效果如表 2 所示，结果表明，不同纯化方法对落新妇苷的保留率、出膏率影

响并不是很大，而对溶液的电导率和透光率影响较大，透光率反映的是溶液的澄清情况，这对制剂外观和稳定性有着重要意义，因此综合考虑，选择对落新妇苷具有较高保留率且纯化药液具有较高透光率的天然澄清剂的澄清剂吸附法作为纯化方法。

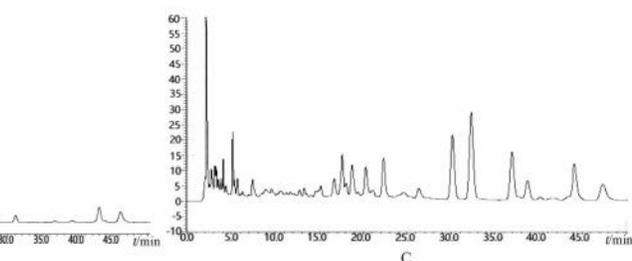


表 2 不同纯化方法对药液澄清效果的影响 ($n = 2$)

Tab 2 Influence of different purification methods on clarifying effect of liquid medicine ($n = 2$)

纯化方法	落新妇苷保留率 / %	透光率 / %	出膏率 / %	电导率 / ($\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$)
原液	100.00	—	29.26	9.23
高速离心法	83.20	53.85	23.50	8.81
热处理冷藏法	75.21	58.93	24.31	8.80
澄清剂吸附法				
1% 壳聚糖	81.22	66.16	23.60	8.78
1% 羧甲基壳聚糖	77.32	72.06	23.60	9.15
5% 101 果汁澄清剂	85.80	58.66	24.43	10.42
1% 天然澄清剂	85.67	77.10	23.98	8.56
1% ZTC-II 型天然澄清剂	86.29	59.50	23.84	7.97
1% 海藻酸钠	81.58	52.70	23.87	8.60

2.6 澄清剂吸附法纯化工艺优化

采用澄清剂吸附法，以落新妇苷保留率、出膏率、透光率、电导率为指标，用单因素试验考察搅拌速度、絮凝温度、澄清剂浓度、澄清剂添加量和药液浓度等因素对药液澄清效果的影响，确定最优工艺参数。

2.6.1 搅拌速度考察 取止痒方浓缩液，每份 40 mL，置于洁净的烧杯中，将烧杯置于磁力搅拌器上，分别设置转速 200、400、600、800、1000 $r \cdot \min^{-1}$ ，按 $2 g \cdot L^{-1}$ 分别缓慢加入提前配制好的 1% 天然澄清剂，磁力搅拌 15 min，将纯化样品于 4 °C 静置 48 h 后于 4000 $r \cdot \min^{-1}$ 下离心 30 min，取上清液检测各项指标。结果如表 3 所示，表明转速对透光率的影响较大，当转速为 600 $r \cdot \min^{-1}$ 时透光率最大，因此选择转速为 600 $r \cdot \min^{-1}$ 。

表 3 搅拌速度对药液澄清效果的影响

Tab 3 Influence of stirring speed on clarifying effect of liquid medicine

转速 / ($r \cdot \min^{-1}$)	落新妇苷 保留率 /%	透光率 /%	出膏率 /%	电导率 / ($mS \cdot cm^{-1}$)
200	73.43	50.6	28.05	7.81
400	70.62	71.3	27.82	7.74
600	69.35	72.8	27.00	7.64
800	68.95	67.9	27.28	7.70
1000	68.39	66.2	27.62	7.74

2.6.2 絮凝温度考察 取止痒方浓缩液，每份 40 mL，分别考察室温 (25 °C) 以及 40、50、60、70、80 °C 时的絮凝除杂效果。固定转速为 600 $r \cdot \min^{-1}$ ，按照 $2 g \cdot L^{-1}$ 分别缓慢加入提前配制好的 1% 天然澄清剂，磁力搅拌 15 min 后，在不同温度下保温 1 h，将保温后的样品于 4 °C 静置 48 h 后于 4000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 30 min，取上清液检测各项指标。结果如表 4 所示，表明温度对落新妇苷保留率和透光率影响较大，综合试验结果选择 50 °C 作为纯化工艺的絮凝温度。

表 4 絮凝温度对药液澄清效果的影响

Tab 4 Influence of flocculation temperature on clarifying effect of liquid medicine

温度 /°C	落新妇苷 保留率 /%	透光率 /%	出膏率 /%	电导率 / ($mS \cdot cm^{-1}$)
25	83.62	71.2	27.38	7.78
40	81.32	73.2	27.90	7.78
50	91.01	73.0	28.55	7.80
60	90.96	64.3	28.37	7.72
70	92.07	65.8	28.97	7.75
80	87.68	67.8	29.05	7.86

2.6.3 澄清剂浓度考察 取止痒方浓缩液，每份 40 mL，分别考察浓度为 0.5%、1%、2%、3%、4%、5% 的天然澄清剂的除杂效果。固定转速为 600 $r \cdot \min^{-1}$ ，澄清剂添加量为 $2 g \cdot L^{-1}$ ，磁力搅拌 15 min 后，在 50 °C 下保温 1 h，将保温后的样品于 4 °C 静置 48 h 后于 4000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 30 min，取上清液检测各项指标。结果如表 5 所示，随着澄

清剂浓度的增加，纯化药液的透光率增加，但落新妇苷的保留率也随之下落，综合试验结果确定澄清剂配制浓度为 2%。

表 5 澄清剂配制浓度对药液澄清效果的影响

Tab 5 Influence of concentration of clarifying agent on clarifying effect of liquid medicine

澄清剂 浓度 /%	落新妇苷 保留率 /%	透光率 /%	出膏率 /%	电导率 / ($mS \cdot cm^{-1}$)
0.5	98.57	59.8	28.19	7.36
1	95.37	66.9	27.86	8.28
2	95.47	69.5	28.99	8.26
3	80.73	71.7	28.02	8.61
4	90.89	75.4	27.82	8.70
5	91.26	74.3	28.10	8.74

2.6.4 药液浓度考察 取相当于 20 g 生药量的止痒方浓缩液，分别考察生药浓度为 0.5、0.75、1.0 $g \cdot mL^{-1}$ 时天然澄清剂的除杂效果。固定转速为 600 $r \cdot \min^{-1}$ ，每份加入配制浓度为 2% 天然澄清剂 4 mL，磁力搅拌 15 min 后，在 50 °C 下保温 1 h，将保温后的样品于 4 °C 静置 48 h 后于 4000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 30 min，取上清液检测各项指标。结果如表 6 所示，当药液浓度逐渐增大时，落新妇苷的保留率和透光率逐渐下降，最终选择药液浓度为 0.5 $g \cdot mL^{-1}$ 。

表 6 药液浓度对药液澄清效果的影响

Tab 6 Influence of liquid concentration on clarifying effect of liquid medicine

药液浓度 / ($g \cdot mL^{-1}$)	落新妇苷 保留率 /%	透光率 /%	出膏率 /%	电导率 / ($mS \cdot cm^{-1}$)
0.5	90.23	68.2	25.41	8.22
0.75	83.04	65.1	24.70	8.11
1.0	82.69	63.5	24.22	7.99

2.6.5 澄清剂添加量考察 取止痒方浓缩液若干份，每份 40 mL，分别考察不同澄清剂添加量的除杂效果。固定转速为 600 $r \cdot \min^{-1}$ ，2% 天然澄清剂，加入不同量的澄清剂，磁力搅拌 15 min 后，在 50 °C 下保温 1 h，将保温后的样品于 4 °C 静置 48 h 后于 4000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 30 min，取上清液检测各项指标。结果如表 7 所示，当澄清剂的添加量在 $3 g \cdot L^{-1}$ 时，纯化药液具有较高的落新妇苷保留率，因此选择澄清剂的添加量为 $3 g \cdot L^{-1}$ 。

2.7 验证试验

综上，最佳纯化工艺为：取止痒方浓缩液 (生药量 $0.5 g \cdot mL^{-1}$) 3 批，每份 40 mL，固定转速为 600 $r \cdot \min^{-1}$ ，澄清剂浓度为 2%，澄清剂添加量为 $3 g \cdot L^{-1}$ ，磁力搅拌 15 min 后，在 50 °C 下保温 1 h，将保温后的样品于 4 °C 静置 48 h 后

表 7 澄清剂添加量对药液澄清效果的影响

Tab 7 Influence of the amount of clarifying agent on clarifying effect of liquid medicine

澄清剂添加量 / (g · L ⁻¹)	落新妇苷 保留率 /%	透光 率 /%	出膏 率 /%	电导率 / (mS · cm ⁻¹)
1	92.39	71.1	26.32	7.82
2	89.03	71.8	26.53	7.88
3	94.09	69.1	27.09	7.69
4	87.28	73.7	27.24	7.71
5	92.70	74.0	27.86	7.81
6	94.82	74.6	27.54	7.76

于 4000 r · min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液检测各项指标。结果见表 8, 3 批止痒方浓缩液经过最优纯化工艺得到的样品各项指标 RSD 均小于 2%, 表明该纯化工艺稳定可行。且 2020 年版《中国药典》^[4] 要求溶液型喷雾剂药液表观性状需澄清, 经过该纯化工艺得到的药液符合要求。

表 8 最佳纯化工艺的验证试验结果

Tab 8 Verification of the best purification process

批次	落新妇苷 保留率 /%	透光率 /%	出膏 率 /%	电导率 / (mS · cm ⁻¹)	性状
第 1 批	94.03	68.34	27.72	7.65	澄清
第 2 批	94.45	69.23	27.23	7.39	澄清
第 3 批	93.76	69.78	26.67	7.56	澄清
平均值	94.08	69.12	27.21	7.53	/
RSD/%	0.37	1.1	1.9	1.8	/

3 讨论

本文比较了高速离心法、热处理冷藏法和澄清剂吸附法对止痒方提取液的纯化效果。虽然乙醇沉淀法是中药制剂中最为常用简单的纯化除杂方法, 但是其使用大量有机溶剂, 易污染环境, 不够绿色环保, 且处理成本高昂, 同时有机溶剂残留容易造成皮肤刺激性, 影响后续喷雾剂的疗效, 为了契合止痒方在临床上的传统水煎应用形式, 尽可能不采用乙醇等有机溶剂, 因此没有对乙醇沉淀法进行研究。

纯化后的药液澄清, 符合 2020 年版《中国药典》^[4] 对于溶液型喷雾剂药液的要求。且初步稳定性结果表明, 止痒方提取液进行纯化后, 在高温 (40 °C)、低温 (4 °C) 和持续光照条件下放置 10 d 以内, 药液表观性状均良好, 溶液澄清透明, 有效成分保留量较高, 表明该纯化工艺效果显著, 纯化后的药液符合要求。

试验中参照文献方法^[12] 选用 760 nm 作为透光

率的测定波长, 并对测定方法进行了方法学考察, 结果仪器的精密度、重复性以及样品在 60 min 内的稳定性均良好, 表明该测定方法稳定可行。

此外, 本试验也存在一些不足之处, 该纯化工艺的最佳试验条件是基于实验室小试规模的基础探索, 后续有必要将该工艺参数进行大生产验证, 并根据后续生产中的实际情况对工艺参数的范围进行改进和进一步验证, 确保基础研究与实际生产的高效结合。综上所述, 本研究选择了澄清剂吸附法作为止痒方的纯化方法, 并对纯化工艺进行了优化, 优化后的纯化工艺操作简单, 工艺稳定, 成本较低, 对皮肤无刺激性, 可以为止痒方制剂进一步开发提供参考。

参考文献

- [1] 张鹰楠, 许子艺, 卢光照, 等. 喷雾剂临床应用及质量控制研究进展 [J]. 药学实践与服务, 2024, 42 (1): 1-5.
- [2] 杨园, 罗舒, 宋怡, 等. 中药提取及澄清工艺优化指标选择的研究进展 [J]. 四川农业科技, 2024, 5 (4): 78-82.
- [3] 周小波. 参芎益气活血方水提液不同纯化工艺的比较 [J]. 贵州中医药大学学报, 2023, 45 (5): 51-56.
- [4] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 19.
- [5] 彭嘉文, 谢晶晶, 马玉明, 等. 土茯苓的质量控制现状及质量标志物预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 6 (6): 1-17.
- [6] 曹云台, 郭立玮, 施栋磊, 等. 陶瓷膜应用于中药精制的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41 (2): 314-317.
- [7] 权利娜, 崔春利, 刘红波, 等. 不同纯化方法对补阳还五汤水提液物质组成的影响 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34 (5): 586-589.
- [8] 金唐慧, 张刘红, 朱华旭, 等. 反渗透浓缩对四逆汤物料体系理化参数的影响及其相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (8): 1421-1425.
- [9] Guo A, Xiong YL. Electrical conductivity: a simple and sensitive method to determine emulsifying capacity of proteins [J]. J Food Sci, 2021, 86 (11): 4914-4921.
- [10] 张海悦, 闫小娟, 石翔. 芹菜降压口服液的研制 [J]. 食品工业科技, 2011, 32 (3): 274-276.
- [11] 崔长伟, 马彤彤, 杨正芳, 等. 黑虎香葡萄果醋澄清配方研制与澄清工艺优化 [J]. 食品工业, 2023, 44 (3): 34-37.
- [12] 黄星源, 黄星才, 谢永巧, 等. 101 果汁澄清剂, 壳聚糖及复合澄清剂对无核黄皮果醋澄清效果的比较研究 [J]. 酿酒, 2023, 50 (5): 130-133.
- [13] 王枫, 李柯帆, 丁雯, 等. 中药口服液澄清剂及澄清工艺的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2022, 37 (5): 182-185.

(收稿日期: 2024-05-06; 修回日期: 2024-08-06)

基于体外溶出度评价的祖师麻肠溶片包衣材料优选及质量研究

卢风华^{1,2}, 朱荣玥¹, 彭胡麟玥¹, 孙旭², 张旭², 张仲毅², 董晓旭¹, 曲昌海¹, 尹兴斌¹, 倪健^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 秦皇岛市山海关药业有限责任公司, 河北 秦皇岛 066200)

摘要: 目的 优选祖师麻肠溶片包衣工艺, 制备出符合肠溶片剂要求的祖师麻肠溶片, 并对祖师麻肠溶片进行质量评价。方法 以体外溶出度、崩解时限为指标, 确定祖师麻肠溶片的最佳包衣材料及最优包衣工艺; 采用薄层色谱法对祖师麻肠溶片中的祖师麻甲素进行鉴别; 通过重量差异、微生物限度、溶出度检测进行检查项的测定; 采用高效液相色谱法测定祖师麻肠溶片中祖师麻甲素的含量。结果 筛选出了祖师麻肠溶片的最优制备工艺, 所得制剂符合要求; 薄层色谱斑点清晰, 分离度良好; 祖师麻肠溶片重量差异、微生物限度、溶出度均符合要求; 样品中祖师麻甲素的平均含量为 3.06 mg/片。结论 本研究成功制备了符合规定的祖师麻肠溶片; 检测方法操作方便、结果准确, 可用于祖师麻肠溶片的质量评价。

关键词: 祖师麻肠溶片; 祖师麻甲素; 溶出度; 工艺优选; 质量研究

中图分类号: R283, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0685-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.017

Optimization of coating materials and quality of Zushima enteric-coated tablets based on evaluation of in vitro dissolution

LU Feng-hua^{1,2}, ZHU Rong-yue¹, PENG Hu-lin-yue¹, SUN Xu², ZHANG Xu², ZHANG Zhong-yi², DONG Xiao-xu¹, QU Chang-hai¹, YIN Xing-bin¹, NI Jian^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Qinhuangdao Shanhaiguan Pharmaceutical Co., Ltd., Qinhuangdao Hebei 066200)

Abstract: Objective To optimize the coating process of Zushima enteric-coated tablets, prepare the Zushima enteric-coated tablets, and evaluate their quality. **Methods** The most suitable coating material and the best coating process of Zushima enteric-coated tablets were determined by in vitro dissolution and disintegration time. Thin-layer chromatography was used to identify daphnetin in Zushima enteric-coated tablets. The weight difference, microbial limit and dissolution rate were examined respectively. High performance liquid chromatography was used to determine the content of daphnetin in Zushima enteric-coated tablets. **Results** The optimum preparation of Zushima enteric-coated tablets was selected, and the preparation met the requirements. The spots of thin-layer chromatography were clear and well-separated was good. The weight difference, microbial limit and dissolution rate of Zushima enteric-coated tablets all met the requirements. The average content of daphnetin in the sample was 3.06 mg/tablet. **Conclusion** Zushima enteric-coated tablets have been prepared successfully. The sample detection method is easy to operate and accurate, which can be used for the quality evaluation of Zushima enteric-coated tablets.

Key words: Zushima enteric-coated tablet; daphnetin; dissolution rate; process optimization; quality study

祖师麻片是由祖师麻饮片经加工制成的片剂, 具有祛风除湿、活血止痛的功效^[1], 是治疗风湿痹症、关节炎及类风湿关节炎的常用中成药, 最早收载于 2010 年版《中国药典》^[2]。多年的临

基金项目: 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (No.2021-QNRC2-A03); 国家中医药管理局高水平建设学科-中药药剂学 (No. zyyzdxk2023272)。

作者简介: 卢风华, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: lfh19851227@163.com *通信作者: 倪健, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: njtcm@263.net

床应用证明了其对类风湿关节炎^[3]、未分化脊柱关节病^[4]、肾小球肾炎^[5]等疾病具有很好的治疗作用。近年来,祖师麻片与美洛昔康^[6]、尼美舒利^[7]等联合使用治疗膝骨关节炎,或与中药熏蒸结合治疗强直性脊柱炎^[8],均取得了较好的疗效。然而在临床上,患者在服用祖师麻片的过程中会出现胃部不适或疼痛、食欲减少等胃部不良反应^[9]。因此,《中国药典》祖师麻片项下、祖师麻片说明书及相关报道中均指出有胃病者可饭后服用^[10],并配合健胃药使用^[11]。祖师麻片对胃部的不良反应严重影响了胃病患者的服用,限制了其临床应用范围。

本研究对祖师麻片进行肠溶包衣,以体外溶出度、崩解时限为指标,优选祖师麻肠溶片的最佳包衣材料及最优包衣工艺,并进行中试试验,以确定工艺稳定可行。同时对祖师麻肠溶片质量进行初步评价,以期进一步扩大祖师麻肠溶片的应用范围。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); RCZ-8M 型溶出试验仪、RZQ-8C 型溶出仪自动取样器(天津天大天发公司); ZBS-6G 型智能崩解试验仪(天津大学无线电厂); BGB-150B 型高效糖衣、薄膜包衣机(温州市制药设备厂)。

1.2 试药

祖师麻甲素对照品(纯度>98%,批号: MUST-13071104,成都曼思特生物科技有限公司); 碳酸钙(上海诺成药业股份有限公司); 淀粉、糊精(辽宁东源药业有限公司); 乙醇(梅河口市阜康酒精有限责任公司); 甲醇[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 冰乙酸(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂); 纯净水(娃哈哈集团有限公司); 尤特奇 L30D-55、尤特奇 L100、尤特奇 S100、尤特奇 FS30D、尤特奇 E 100、尤特奇 E PO(赢创工业集团上海尤特奇公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.5% 冰乙酸(25:75), 检测波长为 327 nm, 进样量为 10 μL, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温为室温^[11]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 取祖师麻甲素对照品适量,精密称定,加 85% 甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液制备 取本品连同包衣研细,取约 0.3 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加 85% 甲醇适量,超声提取 30 min,放至室温,定容,摇匀,即得。

2.3 祖师麻肠溶片制备

取祖师麻,加水煎煮 3 次,第一次 2 h,第二次 1 h,第三次 1 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩得清膏,加乙醇静置使沉淀,取上清液,回收乙醇并浓缩至适量,加入碳酸钙 10 g 及淀粉、糊精适量,混匀,制成颗粒,干燥,压制成 1000 片。分别采用 6 种肠溶包衣液(尤特奇 L30D-55、尤特奇 L100、尤特奇 S100、尤特奇 FS30D、尤特奇 E 100、尤特奇 E PO;固含量 6%)包薄膜衣,包衣锅转速 3~8 r·min⁻¹,包衣增重 10%,即得 6 种祖师麻肠溶片样品 A~F。

2.4 片重及含量测定

分别取祖师麻肠溶片样品 A~F 各 20 片,带包衣称重($n=3$),按“2.2.2”项下方法制备,进样测定,结果见表 1。6 种不同祖师麻肠溶片之间的片重差异 $RSD=1.9%$,单种祖师麻肠溶片每片中祖师麻甲素含量 RSD 均小于 3%,质量稳定。

表 1 不同配方祖师麻肠溶片含量测定结果

Tab 1 Determination of Zushima enteric-coated tablets with different formulations

样品	平均片重/g	祖师麻甲素平均测定浓度/(μg·mL ⁻¹)	祖师麻甲素的含量/(μg/片)	含量 RSD/%
A	0.31	41.37	4136.60	1.1
B	0.30	42.68	4268.00	2.8
C	0.32	41.85	4184.60	0.38
D	0.31	42.24	4224.00	0.98
E	0.31	42.04	4203.60	0.93
F	0.31	41.53	4153.30	1.1

2.5 崩解时限检查

参照《中国药典》2020 年版四部通则 0921 崩解时限检查法^[12],对 6 种祖师麻肠溶片崩解时限进行检查,研究中记录药片全部崩解完全的时间,结果见表 2。结果显示,6 种祖师麻肠溶片崩解时限均符合药典规定。其中,样品 A(以尤特奇 L30D-55 为包衣材料)在磷酸盐缓冲液中崩解最快,能够在 20 min 内全部崩解完全。

2.6 溶出度测定及包衣材料选择

参考《中国药典》2020 年版四部通则 0931 溶出度与释放度测定法第一法篮法^[12],对祖师麻肠溶片进行溶出度试验,结果见图 1。结果显示,在 6 种样品中,只有样品 A 在磷酸盐缓冲液中的累计溶出率超过 70%,为(72.49±1.79)%,符合药典对肠溶制剂在缓冲液中释放量的要求。且经肠溶衣

表 2 6 种包衣材料的祖师麻肠溶片样品崩解时限检查结果

Tab 2 Disintegration time of Zushima enteric-coated tablets with six coating materials

样品	盐酸溶液 (9 → 1000) 2 h	磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 1 h
A	无裂缝、软化、崩解现象	20 min 内所有药片全部崩解完全
B	无裂缝、软化、崩解现象	40 min 内所有药片全部崩解完全
C	无裂缝、软化、崩解现象	50 min 内所有药片全部崩解完全
D	包衣着色层迅速分解, 无裂缝、软化、崩解现象	40 min 内所有药片全部崩解完全
E	无裂缝、软化、崩解现象	40 min 内所有药片全部崩解完全
F	无裂缝、软化、崩解现象	40 min 内所有药片全部崩解完全

包覆后, 样品在酸中释放量为 0%, 符合规定。因此, 结合“2.5”项下结果, 样品 A 的包衣材料奇特 L30D-55 是祖师麻肠溶片合适的包衣材料。

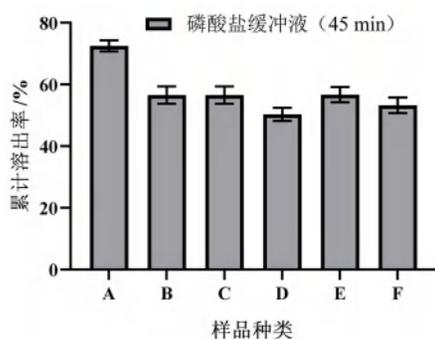


图 1 6 种包衣材料的祖师麻肠溶片累计溶出率柱状图 (n = 6)

Fig 1 Histogram of cumulative dissolution rate of Zushima enteric-coated tablets with six coating materials (n = 6)

2.7 肠溶包衣增重比例考察

肠溶制剂的增重比例会影响其溶出度, 因此对已优选包衣材料 (奇特 L30D-55) 的祖师麻肠

溶片 A 的 4 种不同增重比例的制剂进行了考察优选。分别按照 10%、11%、12%、13% 的包衣材料增重比例制备祖师麻肠溶片 A₁、A₂、A₃、A₄, 按“2.6”项下方法测定祖师麻甲素的溶出度, 计算累计溶出度和溶出率, 结果见图 2。参照药典规定^[12], 本溶出实验中 4 种样品的酸中释放量均为 0%, 符合药典对于肠溶制剂的要求, 但由于祖师麻肠溶片样品 A₁ 在缓冲液中累计溶出率最大且超过 70% [(79.74 ± 2.85)%]。因此, 样品 A₁ 是祖师麻肠溶片合适的包衣材料增重比例, 即增重 10%。

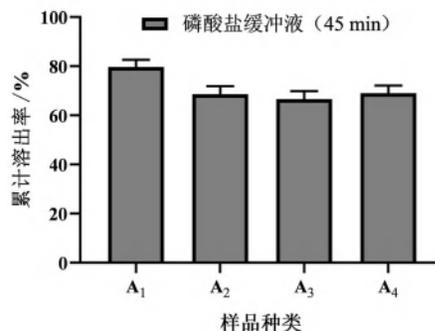


图 2 不同包衣增重的祖师麻肠溶片累计溶出率柱状图 (n = 6)

Fig 2 Histogram of cumulative dissolution rate of Zushima enteric-coated tablets with four different weight gain ratios (n = 6)

2.8 祖师麻肠溶片的中试试验

按照上述已确定的祖师麻肠溶片制法, 制备 3 批中试样品 (批号: 0701、0702、0703), 每次投药 190 kg, 确定工艺的可行性, 结果见表 3。由结果可知, 祖师麻肠溶片的制剂工艺基本稳定, 可用于生产。

表 3 3 批祖师麻肠溶片中试生产数据

Tab 3 Pilot production data of 3 batches of Zushima enteric-coated tablet

样品	提取药材量 / kg	提取物浸膏重量 / kg	辅料重量 / kg	颗粒总重 / kg	理论成品数 / 片	实际成品数 / 片	成品率 / %
0701	190.0	33.5	21.2	52.1	172 800	159 408	92.3
0702	190.0	32.0	22.7	51.8	172 800	162 108	93.8
0703	190.0	33.0	21.7	51.9	172 800	160 488	92.9

2.9 祖师麻肠溶片的质量评价

2.9.1 性状 本品为肠溶衣片, 除去包衣后显棕色, 味微苦。

2.9.2 规格 肠溶片剂, 每片重 0.3 g。

2.9.3 鉴别 取本品 2 片, 照祖师麻片项下鉴别项试验^[11], 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。结果如图 3 所示, 经 1% 三氯化铁乙醇溶液显色后, 供试品色谱与对照品色谱、对照药材色谱相应位置上均显示相同颜色的斑点。

2.9.4 检查

① 重量差异: 按照药典规定, 片重应在标示片重 ± 5% 的范围内^[13], 3 批中试供试品的平均片重分别为 (0.31 ± 0.0025) g、(0.31 ± 0.0032) g、(0.30

± 0.0029) g, 均符合要求。

② 微生物限度检查: 按照微生物限度检查法 (《中国药典》2020 年版三部 1107 非无菌药品微生物限度标准^[13]) 检查, 3 批中试供试品中需氧菌未超过 1 × 10³ cfu · g⁻¹、霉菌和酵母菌总数未超过 1 × 10² cfu · g⁻¹, 且未检测出大肠埃希菌。

③ 溶出度考察: 照溶出度与释放度测定法篮法 (2020 年版四部通则 0931 溶出度与释放度测定法第一法)^[12] 对祖师麻肠溶片进行溶出度考察。结果显示, 3 批中试供试品在酸中的释放量均为 0%, 而在磷酸盐缓冲液中的释放量分别为 97%、93%、97%, 符合要求。

2.10 含量测定

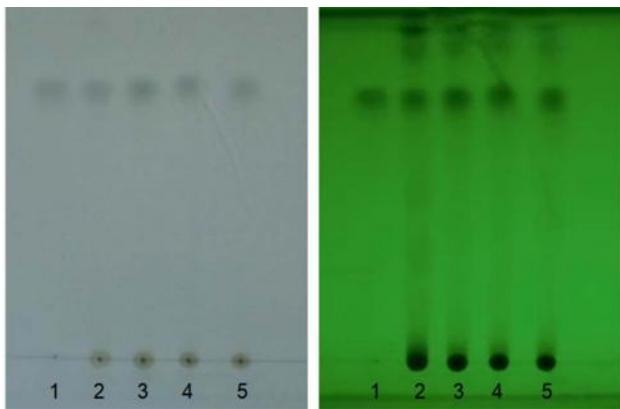


图3 祖师麻肠溶片薄层色谱图

Fig 3 TLC of Zushima enteric-coated tablets

1. 祖师麻甲素对照品 (daphnetin standard substance); 2. 祖师麻对照药材 (Zushima reference crude drug); 3~5. 祖师麻肠溶片 0701~0703 (Zushima enteric-coated tablet 0701~0703)

2.10.1 溶液配制

① 对照品溶液的制备: 制备方法同“2.2”项下对照品溶液制备。

② 供试品溶液的制备: 取本品 20 片, 研细, 取约 0.6 g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加 85% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 称定重量, 用 85% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

③ 阴性样品溶液的制备: 取不含药材的空白片 20 片, 其余操作同“②”项下供试品溶液的制备。

2.10.2 方法学考察

① 专属性考察: 如图 4 所示, 对照品溶液与供试品溶液中祖师麻甲素出峰时间一致, 且阴性样品溶液色谱图无干扰, 证明该方法专属性良好。

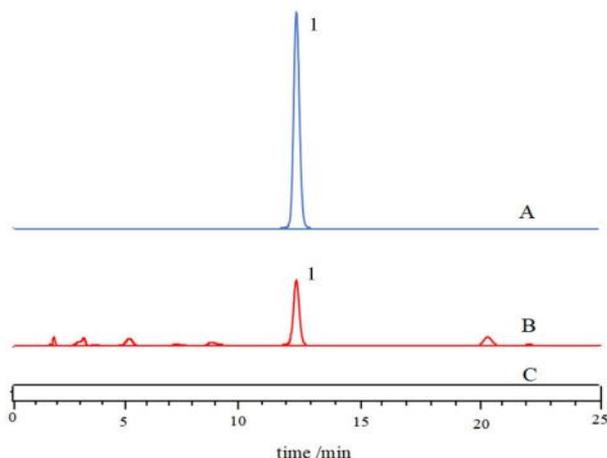


图4 祖师麻肠溶片高效液相色谱图

Fig 4 High performance liquid chromatogram of Zushima enteric-coated tablets daphnetin

A. 祖师麻甲素对照品 (daphnetin standard substance); B. 肠溶片供试品 0701 (enteric-coated tablet test sample 0701); C. 阴性样品 (negative sample)

1. 祖师麻甲素 (daphnetin)

② 线性范围考察: 取不同浓度的祖师麻甲素对照品溶液, 注入液相色谱仪, 测量色谱峰面积积分值, 结果显示, 祖师麻甲素色谱峰面积积分值 (y) 与进样浓度 (x) 之间的回归方程为: $y = 3.97 \times 10^7 x + 5.36 \times 10^4$, $r = 0.9999$ 。结果表明祖师麻甲素在 $0.01 \sim 0.64 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

③ 精密度、重复性、稳定性及加样回收率的考察: 连续进样 6 次, 祖师麻甲素峰面积 $RSD = 1.1\%$; 同一条件下测定 6 份样品中祖师麻甲素含量的 $RSD = 1.6\%$; 供试品溶液 24 h 内祖师麻甲素含量的 $RSD = 1.2\%$; 祖师麻甲素的平均加样回收率为 99.20% , $RSD = 1.4\%$ 。方法学考察符合要求。

④ 样品的含量测定: 分别测定 3 批中试样品的含量, 祖师麻甲素平均含量为 3.06 mg/片 , $RSD = 1.1\%$, 表明制备工艺稳定可行, 成品质量可控。拟订祖师麻肠溶片含量测定标准为: 本品每片含祖师麻以祖师麻甲素 ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$) 计, 不得少于 2.00 mg 。

2.11 加速稳定性及长期稳定性结果

根据新药 (中药) 稳定性试验要求, 对采用市售包装的祖师麻肠溶片 (批号: 0701、0702、0703) 进行稳定性考察。规定时间内 (加速稳定性考察 0、1、3、6 个月, 长期稳定性考察 0、3、6、9、12、18 个月), 3 批祖师麻肠溶片的性状、定性鉴别、重量差异、微生物限度、溶出度、祖师麻甲素含量、在酸及磷酸盐缓冲液中的释放量均符合质量要求。

3 总结与讨论

本文以溶出度为指标, 通过对肠溶包衣工艺的优选, 成功制备出了符合要求的祖师麻肠溶片。最终确定包衣工艺是以尤特奇 L30D-55 作为包衣材料 (固含量 6%), 按增重 10% 对祖师麻素片进行包薄膜衣, 包衣锅转速 $3 \sim 8 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 即得。制备所得的祖师麻肠溶片在人工胃液中不溶出释放药物, 而在人工肠道缓冲液中的溶出度大于 70%, 符合药典规定。同时, 包衣增重 10% 对服药剂量影响不大。

祖师麻甲素作为祖师麻中的主要药效成分, 具有消炎、镇痛、抗凝、抗血栓等作用^[14]。因此我们选择以祖师麻甲素作为评价指标, 分别建立了 TLC 鉴别、HPLC 含量测定方法, 检测方法符合要求, 可用于后续质量控制。同时对肠溶片进行溶出度的检查, 以保证制剂可在肠道中定位释放, 切实减少药物对胃部的刺激。祖师麻肠溶片

的制备使得药物口服后在肠道得以释放，避免了对患者胃部的刺激性，能够减少胃部不良反应的发生，提高患者依从性。

参考文献

- [1] 周颖. 祖师麻定性定量方法的研究[J]. 中南药学, 2012, 10(10): 745-748.
- [2] 中国药典 2010 年版. 一部[S]. 2010: 97.
- [3] 程振伦, 李雪辉, 杨阳. 祖师麻片治疗类风湿关节炎的疗效分析[J]. 中医临床研究, 2011, 3(23): 64-65.
- [4] 郑宝林, 余俊文, 张小娟, 等. 祖师麻片治疗未分化脊柱关节病 50 例临床观察[J]. 新中医, 2010, 42(8): 48-49, 183.
- [5] 杨剑辉, 张纪芸, 王艳侠. 祖师麻片治疗肾小球肾炎效果观察[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(1): 20-21.
- [6] 赵杨, 王平, 周鑫, 等. 祖师麻片联合美洛昔康治疗膝骨关节炎急性期的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(7): 1444-1449.
- [7] 陈志清, 刘智, 田永刚, 等. 祖师麻片联合尼美舒利治疗骨关节炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(5): 1454-1457.
- [8] 刘自刚, 郭子平, 张耀光. 祖师麻片联合中药熏蒸对强直性脊柱炎临床疗效观察[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(3): 579-581.
- [9] 林志翔, 郑良成, 戴益琛, 等. 祖师麻片联合西药治疗类风湿性关节炎的临床观察[J]. 海南医学, 2008, 19(5): 25-27.
- [10] 夏文青. 祖师麻片治疗风湿关节病临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 1998, 5(10): 57-50.
- [11] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 1424.
- [12] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 59, 129, 132.
- [13] 中国药典 2020 年版. 三部[S]. 2020: 439, 534, 683.
- [14] 敖利, 宋健. 骨痹消巴布剂中祖师麻甲素高效液相色谱法含量测定[J]. 中国医药指南, 2023, 21(6): 62-64.

(收稿日期: 2024-07-25; 修回日期: 2024-09-25)

关于《中南药学》期刊相关变更的公告

根据国家相关政策要求和期刊发展需要,《中南药学》期刊的主管单位和出版单位自 2024 年 10 月起发生变更,具体如下:

主管单位: 由湖南省药品监督管理局变更为湖南省科学技术协会

出版单位: 由中南药学杂志社变更为《中南药学》编辑部

主办单位: 湖南省药学会

从 2025 年 1 月起,原中南药学杂志社单位已经注销,其银行账号和公章同时作废。《中南药学》编辑部现作为湖南省药学会的内设机构,负责期刊的编辑、出版和发行工作,现启用主办单位湖南省药学会的银行账号,具体信息如下:

户名: 湖南省药学会

账号: 52460188000095587

开户行: 中国光大银行股份有限公司长沙人民路支行

请各位作者、读者及相关单位知悉并更新相关信息。如有任何疑问,请联系《中南药学》编辑部。

药食两用资源开发及质量控制专题

【编者按】

中药在预防和治疗现代疾病中的潜力日益凸显,在这一背景下,中药的药食同源特性愈发受到重视,一大批药食两用资源的研究开发也在不断深入。桑葚则因其丰富的化学成分和显著的药理作用,成功转化为多种大健康产品,提升了经济价值;鹿药因其丰富的生物活性成分和独特的炮制工艺而受到关注,显示出多重保健功效;当归作为大宗主流中药材,其药理活性、质量标准及安全性管理已有系统研究,但其养生保健功能仍有待深入挖掘;在药食两用资源的品质保障上,重金属污染是个备受关注的问题,加强中药材的重金属监测与控制显得尤为重要。本专题报道了对这些药材的物质基础、药理活性、产品开发及质量控制方面的研究进展,以期药食两用资源的合理应用和深度开发提供参考。

【主持人简介】



李文龙,男,天津中医药大学中药制药工程学院研究员,博士研究生导师/博士后合作导师。长期从事中药质量控制和中药制药工艺研究,以第一作者和通信作者身份发表论文 140 余篇,其中 SCI 收录 80 余篇,申报专利 10 余项。主持国家重点研发计划课题、中国博士后科学基金及特别资助项目、天津市自然科学基金重点项目、国家中医药管理局中药标准化项目、浙江省自然科学基金等课题 30 余项;获山东省科技进步奖、湖北省科技进步奖、陆婉珍近红外光谱奖青年奖、中国仪器仪表学会科技进步奖各 1 次。参与编写《电感耦合等离子体质谱应用实例》《新编中国药材学》等专著、教材 12 部。目前担任中药制药工程分会常务委员中国颗粒学

会青年理事、药物制剂与粒子设计专委会委员;担任《中南药学》《中国实验方剂学杂志》等 10 余种期刊编委、青年编委等国内外 40 余种期刊审稿专家。

桑葚化学成分、药理活性及产品开发研究进展

闫子轩¹, 陈海洋¹, 胡云飞³, 陈伟⁴, 周桂芳⁴, 张智勇¹, 李文龙^{1, 2*} (1. 天津中医药大学 中药制药工程学院, 天津 301617; 2. 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617; 3. 亳州学院, 安徽 亳州 236800; 4. 上海真仁堂药业有限公司, 上海 200000)

摘要: 桑葚 (*Mori Fructus*) 作为药食同源的中药材, 富含黄酮类、酚酸类、生物碱类及多糖等多种活性化学成分。这些成分赋予了桑葚多种显著的药理作用, 包括抗糖尿病、保肝、抗氧化、抗衰老、免疫调节和抗炎等功能。在商业应用领域, 桑葚已成功开发为多种产品形态, 如桑葚酒、桑葚醋、桑葚果酱等, 极大提升了其经济价值, 并推动了其保健功能的普及。本文系统地回顾了桑葚的化学成分构成、丰富的药理作用及其在产品开发领域的成就, 旨在为桑葚的深入研究与广泛利用提供参考。

关键词: 桑葚; 化学成分; 药理作用; 产品开发

中图分类号: R284, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0690-10
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.018

基金项目: 上海市 2022 年度“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项项目 (No.22S21904600); 安徽省首批科技特派团项目 (No.2023tpt014)。

作者简介: 闫子轩, 男, 硕士研究生, 主要从事经典名方质量控制与制备工艺研究, email: 876383634@qq.com *通信作者: 李文龙, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药质量控制技术研究, email: wshlwl@tjutc.edu.cn

Research progress in the phytochemical compositions, pharmacological activities, and product development of *Mori Fructus*

YAN Zi-xuan¹, CHEN Hai-yang¹, HU Yun-fei³, CHEN Wei⁴, ZHOU Gui-fang⁴, ZHANG Zhi-yong¹, LI Wen-long^{1,2*} (1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. National Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Development, Tianjin 301617; 3. Bozhou College, Bozhou Anhui 236800; 4. Shanghai Zhenrentang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200000)

Abstract: *Mori Fructus*, a traditional Chinese medicine with dual medicinal and dietary applications, contains many bioactive compounds, including flavonoids, phenolic acids, alkaloids, and polysaccharides. These constituents endow mulberry with various pharmacological properties, such as anti-diabetic, hepatoprotective, antioxidant, anti-aging, immunomodulatory, and anti-inflammatory effects. In addition to its medicinal value, *Mori Fructus* has gained significant commercial traction, being developed into various products such as mulberry wine, vinegar, and jam, thereby increasing its economic potential and broadening its use in health and wellness. This paper comprehensively reviewed summarizes the chemical compositions, diverse pharmacological activities, and advancements in product development related to *Mori Fructus*, offering insights and guidance for further research and broader utilization of this valuable medicinal resource.

Key words: *Mori Fructus*; chemical composition; pharmacological activity; product development

桑葚是桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的干燥果穗^[1], 俗称桑果、桑枣、桑泡儿、乌葚等, 大多数呈紫黑色。一般在每年 4~6 月果实变红时采收。桑葚可供鲜食、晒干或经过轻微蒸制后晒干使用。由于桑树广泛分布于亚洲、欧洲和南美洲等地区, 中国桑葚资源十分丰富。目前, 黑桑、白桑和红桑是最受欢迎的三大类型。桑葚的药用与保健功效历史悠久, 在许多古代典籍中都有记载, 《新修本草》中记载“桑葚, 味甘, 寒, 无毒, 单食, 主消渴”, 这是古代医学家对桑葚药用价值的最早认识^[2], 由于桑葚显著的药用价值, 在民间素有“中华果皇”“三月桑葚赛人参”的说法。在 2022 年, 桑葚被国家卫生健康委员会批准为药食同源食物^[3], 由于桑葚含水量超过 80%, 果皮薄且易腐烂变质, 采摘期较短, 这为其储存和运输带来了困难, 导致资源的大量浪费^[4]。随着现代科学技术的发展, 人们对桑葚的认识逐渐加深, 应用市场不断扩展, 产业链得以延长, 使桑葚资源得到了更充分的利用。如今, 桑葚已被广泛开发为多种产品形态, 包括果汁、酒、茶、果酱、果冻等, 这些产品对人体健康有诸多益处。本文将系统综述桑葚的化学成分、药理作用及其产品开发的最新研究进展, 为后续桑葚在相关大健康产品和药物开发提供理论基础。

1 桑葚的化学成分

桑葚是桑树中药用价值较高的部分之一, 富含多种人体必需的营养成分。成熟的桑葚不仅含有优质的脂肪和碳水化合物, 其矿物质和维生素含量也很丰富。此外, 桑葚中丰富的活性物质, 如黄酮类、酚酸类和多糖类等, 已引起了广泛关注。本文将对不同桑葚品种中的主要活性物质进行系统性综述, 以期为后续的研究和应用提供参考。

1.1 桑葚中的糖类成分

桑葚中糖类成分主要以葡萄糖、果糖和蔗糖的形式存在, 其中葡萄糖的含量为蔗糖的 8 倍, 果糖的含量为蔗糖的 5 倍^[5], 此外, 桑葚中还含有其他糖类, 如阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、木糖和甘露糖等。桑葚还含有一种名为菊糖的特殊多糖, 这种多糖不仅能够调节血糖、促进肠道健康, 在维持体重方面也展现了显著效果^[6]。桑葚中糖类成分并非一成不变, 根据桑葚的品种、生长环境以及成熟度的不同, 其所含有的糖类化合物含量亦存在较大的差异。陈春等^[7]研究发现, 新疆地区的日温差、日照时长和海拔等环境因素显著影响了桑葚中多糖等次级代谢产物的积累, 这些因素的变化促使桑葚多糖含量在不同环境条件下出现差异。代君君等^[8]发现桑葚多糖会随着桑葚的成熟而逐渐增多, 前期多糖增加速度较慢, 后期则急速增加。

1.2 桑葚中的氨基酸类成分

氨基酸是桑葚中的重要营养成分之一，游离氨基酸不仅可以直接被人体所吸收，还表现出酸、苦、甜、涩及鲜等不同的味道，赋予了桑葚丰富的味觉层次^[9]。桑葚中含有 19 种游离氨基酸，其中 7 种为人体必需氨基酸，12 种为非必需氨基酸。研究表明，桑葚中总氨基酸的比例超过了鱼和牛奶等其他优质蛋白食品^[10]。此外，桑葚的不同品种中氨基酸含量差异显著，例如，黑桑葚中的赖氨酸、组氨酸和脯氨酸含量高于白桑葚，而亮氨酸和赖氨酸的含量则低于白桑葚^[11]。桑葚中的氨基酸不仅有助于调节人体的酸碱平衡，还能促进胰岛素生成、增强免疫力，甚至用于治疗肝硬化和脂肪肝等疾病。例如，赖氨酸在促进儿童生长发育和增强免疫功能方面具有重要作用^[12]；谷氨酸则在改善脑功能和促进神经传导方面发挥关键作用^[13]。综上所述，桑葚富含的氨基酸在促进人体健康和预防疾病中发挥着关键作用，未来的研究应进一步探讨桑葚中氨基酸的具体机制和应用潜力，以更好地利用这一宝贵的天然资源。

1.3 桑葚中的花青素类化合物

研究表明，成熟的桑葚富含天然色素——花青素。花青素是黄酮类化合物的一个重要亚类，具有水溶性且对人体健康有益。作为桑葚成分研究的热点之一，花青素正受到越来越多的关注。花青素与其他酚类化合物的主要区别在于其结构中含有氧正离子^[14]，并且大多数与糖结合以苷的形式存在，即为花色苷，有助于花朵或者果实呈现鲜艳的颜色。花青素-3-芸香苷和花青素-3-葡萄糖苷是从桑葚中分离出的主要的花青素类成分^[15]。研究发现，桑葚中花青素的含量受桑葚的品种、成熟度、生长气候、土壤等因素的影响，而其稳定性则易受温度、pH、添加剂、氧化等因素的干扰。不同成熟度的桑葚所含有花青素含量存在较大差异，桑葚在未成熟到成熟的整个过程中，花青素的含量急剧增加^[16]。即使是同一物种中不同颜色的桑葚，花青素含量也可能有所不同，且白色品种不含有任何花青素^[17]。闫祝炜等^[18]研究表明，黑紫色桑葚鲜果中的总多酚含量较为丰富，进一步证明了桑葚中的花青素含量随果实发育和颜色变化而逐渐增加。桑葚中的花青素不仅赋予了果实鲜艳的颜色，还具有多种生物活性和药理作用。未来的研究应进一步探讨花青素的具体机制和应用潜力。花青素类化学成分信息见表 1，化学结构见图 1。

表 1 桑葚中的花青素类化合物

Tab 1 Anthocyanin compounds in <i>Mori Fructus</i>		
No.	化合物名称	参考文献
1	cyanidin-3- <i>O</i> -hexoside	[19]
2	pelargonidin 3- <i>O</i> -hexoside	[19]
3	delphinidin acetyl-hexoside	[19]
4	cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside	[20]
5	cyanidin 3- <i>O</i> -rutinoside	[20]
6	pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside	[21]
7	pelargonidin 3- <i>O</i> -rutinoside	[21]
8	cyanidin 3- <i>O</i> - (6"-malonyl-glucoside)	[20]
9	矢车菊素 (cyanidin chloride)	[22]
10	矢车菊素 -7- <i>O</i> - β -D- 葡萄糖苷	[23]
11	矢车菊素 -3- <i>O</i> - β -D- 半乳糖苷	[23]
12	cyanidin 3- <i>O</i> - (6"- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl- β -D-galactopyranoside)	[23]
13	天竺葵素 -3- <i>O</i> - 氯化葡萄糖苷	[24]

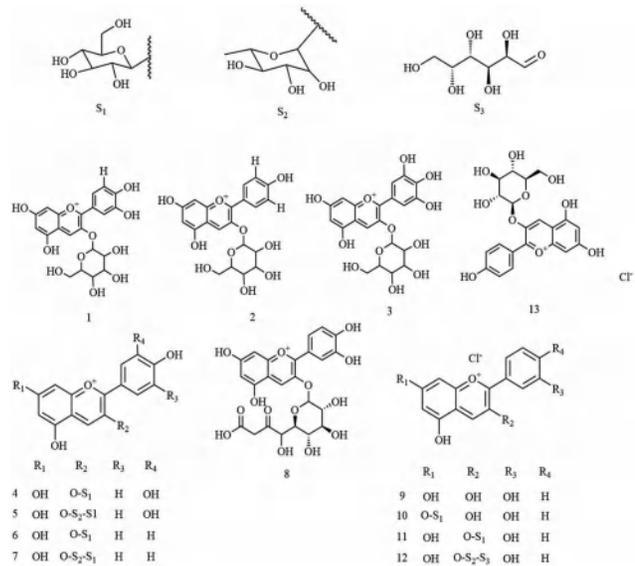


图 1 桑葚中花青素类化合物的结构

Fig 1 Structure of anthocyanin compounds in *Mori Fructus*

1.4 桑葚中的白藜芦醇

白藜芦醇，又称为芪三酚，是一种天然存在的多酚类植物抗毒素，主要存在于浆果的果皮中。桑葚果皮中的白藜芦醇含量相对丰富。其含量约为葡萄中的 5 倍^[25]。作为一种含有芪类结构的天然多酚类有机化合物，白藜芦醇在植物体内以游离态和糖苷结合态两种形式存在，其中糖苷结合态结构更稳定，且生物活性更广泛。白藜芦醇含量随着季节、地理和环境因素的变化而变化。朱祥瑞等^[26]研究发现，采摘后 1~4 h 内，桑葚中的白藜芦醇含量略有上升；但在 5 h 后，随着放置时间的延长，其含量逐渐下降。这种现象可能是由于桑葚在刚采摘时受到机械刺激，导致白藜芦醇含量短暂上升，随后因果皮中的分解酶作用，将其转化为代谢产

物，导致含量下降。白藜芦醇能够抑制肿瘤细胞生长，引起了广泛关注^[27]。此外，桑葚中的白藜芦醇还能够在一定程度上抑制炎症因子的表达，发挥抗炎作用。然而，由于提取工艺的限制，当前从桑葚中提取的白藜芦醇浓度较低，亟须进一步优化提取工艺以提高提取效率。

1.5 桑葚中的黄酮类成分

桑葚提取物富含黄酮类成分，主要成分包括芦丁、槲皮素、异槲皮素、异槲皮素苷等黄酮类化合物^[14]。不同品种、生长环境、成熟度、储存运输条件以及加工方式等因素都会显著影响桑葚的内在成分^[16]。对比不同生长阶段的桑葚黄酮含量变化发现，桑葚中的黄酮类物质随着生育期的推进逐渐增加，且在果实完全成熟后其含量达到较高水平，这表明黄酮类成分在桑葚成熟过程中积累显著，为桑葚成熟期的营养价值提供了支持^[28]。不同基因型的桑葚在相同的成熟期也存在显著差异，例如，安葚果实的黄酮含量显著高于桂花果实^[29]。王振江等^[30]研究发现桑葚中的黄酮在幼果期含量较高，随着果实的成熟而逐渐下降，后期含量又进一步升高，表明桑葚黄酮类化合物在幼果期和果实成熟期各有一个含量较高的峰值。桑葚中黄酮类化学成分信息见表 2，化学成分结构见图 2。

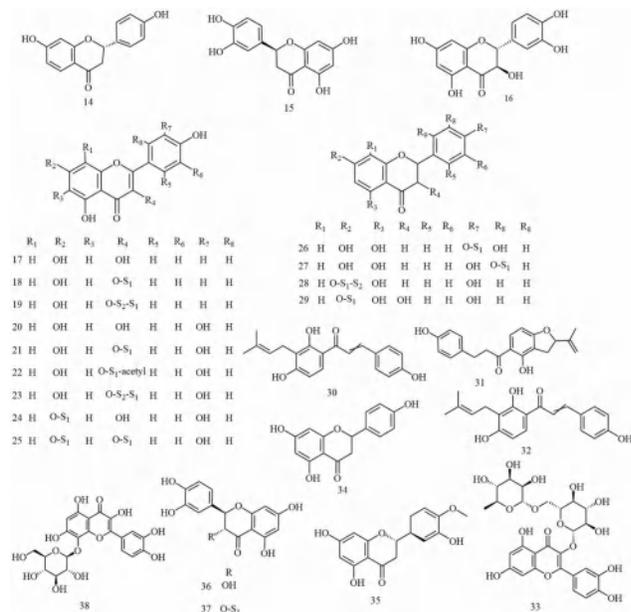


图 2 桑葚中黄酮类化合物的结构

Fig 2 Structure of flavonoid compounds in Mori Fructus

1.6 桑葚中的其他类成分

桑葚中人体所需的矿物质元素含量也非常的丰富，如硒 (Se)、钾 (K)、钠 (Na)、铁 (Fe)、铜 (Cu)、钙 (Ca)、锌 (Zn)、镁 (Mg) 等元素，吴祖芳等^[35]研究发现，在桑葚中 Se 的含量

表 2 桑葚中的黄酮类化合物

Tab 2 Flavonoids in Mori Fructus

No.	化合物名称	参考文献
14	(2S)-7, 4'-dihydroxyflavanone	[31]
15	eriodictyol	[31]
16	(2R, 3R)-dihydroquercetin	[31]
17	kaempferol	[31]
18	kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside	[32]
19	kaempferol 3-O-β-D-rutinoside	[32]
20	quercetin	[31-32]
21	quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside	[32]
22	quercetin 3-O-(6"-O-acetyl)-8-D-glucopyranoside	[32]
23	quercetin 3-O-β-D-rutinoside	[32]
24	quercetin 7-O-β-D-glucopyranoside	[32]
25	quercetin 3, 7-di-O-β-D-glucopyranoside	[32]
26	5, 7, 3'-trihydroxy-flavanone-4'-O-β-D-glucopyranoside	[32]
27	5, 7, 4'-trihydroxy-flavanone-3'-O-β-D-glucopyranoside	[32]
28	naringenin	[31]
29	dihydrokaempferol 7-O-β-D-glucopyranoside	[32]
30	isobavachalcone	[31-32]
31	(2E)-1-[2, 3-dihydro-4-hydroxy-2-(1-methylethenyl)-5-benzofuranyl]-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanone	[32]
32	isoquercitrin	[33]
33	芦丁	[33]
34	naringenin	[34]
35	hesperetin	[34]
36	taxifolin	[34]
37	taxifolin-7-O-β-D-glucopyranoside	[34]
38	gossypin	[34]

是苹果的 8 倍，是猕猴桃的 10 倍，而黑桑葚中 K 的含量远远高于其他水果的含量。水果是人们获取维生素的重要来源之一，桑葚中含有维生素 C、维生素 A 和维生素 B 等，其中维生素 C 含量为李子的 4 倍，水蜜桃的 2 倍。桑葚中的生物碱主要以吡咯生物碱和多羟基生物碱为主^[36]，且 1-脱氧野尻霉素 (1-deoxynojirimycin, DNJ) 在桑叶、桑枝和桑葚中都有存在^[37-38]。此外，桑葚脂肪酸主要是不饱和脂肪酸，其次为单不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸^[39]，其中亚油酸、油酸、棕榈酸以及硬脂酸的含量约占总脂肪酸的 70%。在不同的桑葚品种中，黑桑葚的棕榈酸和油酸较高，而白桑葚的亚油酸较高^[40]。桑葚还含有丰富的有机酸，其中苹果酸在所有桑葚物种中均有分布。桑葚中的挥发性成分也较为丰富，这些成分是其香气的主要来源。桑葚中生物碱化学成分的信息见表 3，化学结构见图 3。

表 3 桑葚中生物碱类化合物

Tab 3 Alkaloid compounds in *Mori Fructus*

No.	化合物名称	参考文献
39	4-[formyl-5-(hydroxymethyl) -1H-pyrrol-1-yl] butanoate	[37]
40	4-[formyl 5-(methoxymethyl) -1H-pyrrol-1-yl] butanoic acid	[37]
41	methyl 2-[2-formyl-5-(methoxymethyl) -1H-pyrrole-1-yl] propanoate	[37]
42	morrole B	[37]
43	morrole C	[37]
44	morrole D	[37]
45	methyl 2-[2-formyl-5-(methoxymethyl) -1H-pyrrol-1-yl]-3-(4-hydroxyphenyl) propanoate	[37]
46	2-(5-hydroxymethyl-2-formylpyrrol-1-yl) propionic acid lactone	[37]
47	2-(5-hydroxymethyl-2-formylpyrrol-1-yl) isovaleric acid lactone	[37]
48	2-(5-hydroxymethyl-2-formylpyrrol-1-yl) isocaproic acid lactone	[37]
49	2-[2-formyl-5-hydroxymethyl-1-pyrrolyl]-3-methylpentanoic acid lactone	[37]
50	2-(5'-hydroxymethyl-2'-formylpyrrol-1'-yl) -3-phenyl-propionic acid lactone	[37]
51	2-(5'-hydroxymethyl-2'-formylpyrrol-1'-yl) -3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid lactone	[37]
52	2-(5-hydroxymethyl-2', 5'-dioxo-2', 3', 4', 5'-tetrahydrobipyrrole) carbaldehyde	[37]
53	morrole E	[37]
54	morrole F	[37]
55	5-hydroxymethyl-1H-pyrrole-2-carboxaldehyde	[37]
56	2-formyl-1H-pyrrole-1-butanoic acid	[37]
57	2-formyl-5-hydroxymethyl-1H-pyrrole-1-butanoic acid	[37]
58	2-formyl-5-methoxymethyl-1H-pyrrole-1-butanoic acid	[37]
59	morrole A	[37]
60	2-(2-formyl-5-(hydroxymethyl) -1H-pyrrol-1-yl) propanoic acid	[38]
61	methyl-2-[2-formyl-5-(methoxymethyl) -1H-pyrrole-1-yl]propanoate	[38]
62	morrole G	[38]
63	1-脱氧野尻霉素	[38]
64	N-甲基-1-脱氧野尻霉素	[38]
65	2-O- α -D-galactopyranosyl-1-deoxynojirimycin	[38]
66	6-O- β -D-glucopyranosyl-1-deoxynojirimycin	[38]
67	1, 4-dideoxy-1, 4-imino-D-arabinitol	[38]
68	1, 4-dideoxy-1, 4-imino-(2-O- β -D-glucopyranosyl) -D-arabinito	[38]

2 桑葚的药理作用

桑葚作为中药材，具有悠久的医学应用历史，其活性物质种类繁多、组成复杂，既包括多种单体化合物，也包括以聚合物形式存在的活性

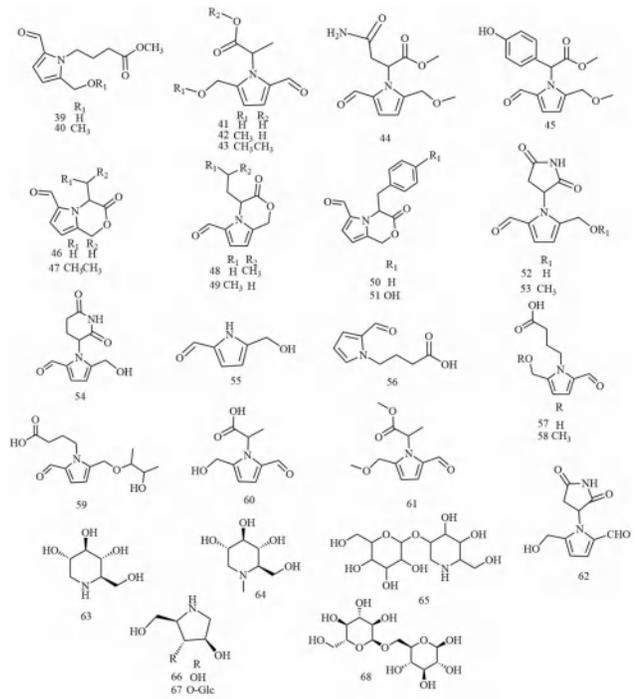


图 3 桑葚中生物碱类化合物结构

Fig 3 Structure of alkaloid compounds in *Mori Fructus*

物质。桑葚中的化学成分展现出显著的协同作用和多样化的生物活性，能够进入人体的不同器官，并在各自的靶点发挥重要作用。本文将结合现代药理学研究思路，深入探讨桑葚在抗糖尿病、抗氧化、抗肿瘤等方面的药理作用机制，为其在医药开发中的应用提供科学依据。

2.1 抗氧化作用

近几年研究表明，桑葚具有显著的抗氧化作用，且其抗氧化活性与桑葚的品种和生长环境密切相关。在不同的品种和环境条件下，桑葚的抗氧化性能存在一定的差异。研究发现，桑葚中花青素和总酚含量越高，抗氧化能力越强^[41-42]。在不同颜色的桑葚中，紫色桑葚的花青素含量高于红色桑葚，因此其抗氧化性和自由基清除活性更为显著^[43]。此外，桑葚的成熟度也会影响其抗氧化效果，研究表明，完全成熟的桑葚具有更高的抗氧化活性，这可能与成熟桑葚中花青素、白藜芦醇等抗氧化物质的含量较高有关^[44]。

桑葚中的多种化合物，如花青素、白藜芦醇、黄酮类化合物和多糖等，展现出卓越的抗氧化活性。其中，白藜芦醇能够有效降低活性氧 (ROS) 水平并抑制脂质过氧化，从而减少 DNA 损伤。研究表明，桑葚中的黄酮类化合物对羟基自由基的清除率为 93.13%，对 DPPH 自由基的清除率为 90.07%，且总黄酮的抗氧化能力随着其浓度的增加而增强^[45]。此外，桑葚中的多糖同样对 DPPH、

羟基自由基和超氧自由基具有显著的清除作用,且其清除能力与多糖浓度成正相关^[46]。Zhang 等^[47]通过 D-半乳糖诱导衰老小鼠模型研究桑葚提取物的抗氧化作用,结果表明桑葚提取物能够有效改善小鼠的皮肤情况、减少氧化应激作用并降低了衰老小鼠体内晚期糖基化终产物(AGE)的水平,这些结果均表明桑葚提取物在缓解衰老小鼠模型中的皮肤衰老和相关氧化损伤方面具有潜力。桑葚中的蛋白组分通过羧基/羰基与过氧自由基结合,阻止自由基链反应,从而表现出抗氧化活性。其中,桑葚蛋白 4 由于含有大量低分子量组分和较高水平的半乳糖醛酸,因而展现出优异的 DPPH 自由基清除能力^[48]。桑葚的抗衰老作用与其抗氧化活性密切相关,其延缓衰老的效果主要通过抗氧化机制实现。研究发现,桑葚果汁能够降低衰老小鼠体内的丙二醛含量,表现出显著的抗氧化和延缓衰老作用^[49]。同时,桑葚提取物能够增加小鼠体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,进一步发挥强大的抗氧化作用^[50]。综上所述,桑葚中的多种化合物通过协同作用,有效清除自由基并抑制过氧化反应,从而起到延缓机体衰老的作用。这为进一步开发桑葚在抗氧化和延缓衰老方面的应用提供了坚实的科学依据。

2.2 抗肿瘤、抗诱变作用

肿瘤的主要特征是异常细胞的生长,这些细胞能够侵入身体的其他区域并引发病变。近年来,全球肿瘤的发病率和病死率逐年上升。尽管恶性肿瘤的治疗取得了显著进展,但患者的 5 年生存率仍然较低^[51]。传统的肿瘤治疗方法,如化疗、手术和激素疗法等,虽然能够杀灭肿瘤细胞,但常伴随严重的不良反应,且容易导致药物耐药性的产生^[52]。近年来,研究表明,桑葚中的多种活性成分具有显著的抗肿瘤活性,可能成为一种新型抗肿瘤药物来源。这些活性物质通过多种机制抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、诱导凋亡等,从而抑制肿瘤生长。Zheng 等^[53]发现桑葚能够通过增强小鼠免疫功能间接抑制结肠癌的形成。桑葚中花青素类物质具有抗肿瘤活性,它能够通过调节相关信号、抑制胃癌、膀胱癌等肿瘤细胞的 DNA 合成和有丝分裂,诱导肿瘤细胞凋亡和自噬^[54]。此外,花青素与化疗药物紫杉醇的协同作用能够进一步增强抗肿瘤效果^[55]。桑葚多糖能抑制肿瘤细胞迁移,通过增加相关基因的表达来激活树突状细胞和 T 细胞,增强机体抗肿瘤免疫力,并通

过诱导凋亡等途径预防化学诱导的肝癌发生^[56]。桑葚提取物中的烯醇类物质也表现出显著的抗肿瘤作用,能够抑制 70%~80% 的肿瘤细胞生长,并使肿瘤细胞停滞在细胞周期的 S 期^[57]。

2.3 降血糖作用

糖尿病是一种常见的慢性代谢性疾病,根据发病机制的不同,主要分为 1 型糖尿病和 2 型糖尿病两大类。典型的临床表现包括多饮、多尿、多食以及体重减轻,俗称为“三多一少”。降血糖的作用机制包括促进肝糖原合成、抑制肝糖原分解、促进胰岛素分泌、增强胰岛素敏感性和抑制 α -糖苷酶活性等^[58]。尽管多数药物在降低血糖水平方面已经取得显著疗效,但仍然存在耐药性、低血糖风险、体重增加以及增加肝肾负担等局限性^[59]。因此,急需开发出无副作用或者副作用少的降糖药物。

研究发现,桑葚多糖能够增加胰岛素分泌并促进胰岛 β 细胞增殖,从而降低血糖水平;动物实验进一步证实,桑葚多糖能够显著降低高血糖小鼠的血糖水平,但对正常小鼠的血糖无显著影响^[60]。也有研究显示,糖尿病大鼠服用桑葚多糖 2 周后,空腹血糖明显下降^[61]。此外,桑葚中的酚类物质也具有降血糖作用,并能够在一定程度上改善糖脂代谢紊乱^[62]。研究表明,桑葚中的花色苷可以通过提高肝细胞对葡萄糖的摄取和促进糖原合成来改善糖代谢,从而对糖尿病具有治疗作用^[63]。花青素类化合物主要通过调控 PI3K/AKT 信号通路及降低肝脏氧化应激水平来改善胰岛素抵抗^[64]。DNJ 是桑葚中的一种碱性物质,可与小肠中的 α -糖苷酶(如麦芽糖酶、乳糖酶等)结合,抑制二糖的水解,由于二糖在体内没有分解,无法进入血液循环中,减轻了胰腺细胞的负担,从而控制餐后血糖升高^[65]。此外,桑葚的水提取物和甲醇提取物也通过抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和葡萄糖-6-磷酸酶等途径发挥降血糖活性^[66]。除了上述直接降血糖作用外,桑葚还通过抗氧化、调节脂质代谢和肠道菌群等途径对糖尿病进行整体调节。研究发现,桑葚提取物能够通过调节 AMPK/ACC/mTOR 通路来缓解 2 型糖尿病小鼠的氧化损伤,并改善其功能障碍^[67]。此外,桑葚可以降低 2 型糖尿病小鼠的游离脂肪酸水平、提高抗氧化酶活性和谷胱甘肽水平,并改善肠道菌群紊乱,从而达到预防和治疗糖尿病的效果^[68]。

2.4 提高免疫力

桑葚多糖是桑葚中具有重要免疫调节功能的活性成分之一。杨小兰等^[69]通过动物实验,采用桑

葚鲜果或桑葚原汁喂养小鼠,发现其能够有效拮抗免疫抑制剂对免疫功能的抑制作用,显著提高小鼠的脾脏指数、巨噬细胞吞噬率、吞噬指数以及血清溶血素含量,证实了桑葚具有增强人体免疫力的作用。桑葚提取汁还能够促进淋巴细胞的转化与 T 淋巴细胞的成熟,延缓白细胞因衰老而减退的趋势,有效增强人体免疫功能^[70]。骆新等^[71]通过建立环磷酸腺苷诱导的小鼠免疫低下模型发现,高剂量桑葚多糖能够增强小鼠的脾脏和胸腺指数,促进淋巴细胞的转化及抗体生成细胞的功能,发挥免疫保护作用,进一步证明了桑葚多糖在免疫调节方面的显著活性。此外,桑葚蛋白也具有一定的免疫调节特性,可以影响巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞等多种免疫细胞^[72]。研究还发现,桑葚中存在一种特殊的二萜蛋白(JS-MP-1),在一定剂量下能够显著促进 B 细胞和 T 细胞的增殖并与生物碱结合,对巨噬细胞产生免疫调节作用^[73]。

2.5 抗炎作用

炎症反应是机体应对微生物入侵或组织损伤的保护性反应,旨在清除病原体并修复受损组织。然而,过度或持续的炎症反应可能导致多种慢性疾病,如类风湿关节炎、心血管疾病和肿瘤等。因此,寻找安全有效的抗炎药物对于预防和治疗这些疾病至关重要^[74]。天然药物由于毒副作用小、靶向性好等优势,在抗炎领域备受关注。桑葚作为一种传统食用果实,其多糖、黄酮、生物碱等活性成分被证实能够通过多种途径发挥抗炎作用。

Bhatia 等^[75]对桑葚在炎症治疗中的作用进行了研究,结果显示,桑葚水提物对烧伤大鼠有显著的治疗效果,其疗效可能与桑葚的抗氧化潜力和黄酮类成分的作用有关。桑葚中的白藜芦醇可显著降低小鼠体内环氧合酶-2(COX-2)的表达,从而发挥抗炎效果^[76]。桑葚提取物能够保护脂多糖刺激的 RAW264.7 巨噬细胞,并剂量依赖性地抑制 ROS 和一氧化氮(NO)的生成,减轻炎症反应^[77]。肠道微生物群在维持肠道屏障完整性方面起到关键作用,而肠道屏障的健康则是调节免疫功能的重要因素。研究表明,桑葚多糖能够调节肠道菌群,改善肠道菌群紊乱,从而发挥整体的抗炎效果^[78]。综上所述,桑葚及其活性成分通过调节氧化应激、炎症信号通路、肠道菌群和机体免疫功能等多种途径发挥抗炎作用,为开发天然抗炎药物提供了潜在资源。

3 桑葚功能性产品开发

桑葚作为一种传统的食用果实,具有极高的

营养价值和保健功能。然而,由于桑葚含水量高且极易变质,为其储存和运输带来了诸多困难,造成了资源的巨大浪费。随着人们对健康生活方式的追求以及科学技术的进步,如何充分开发和利用桑葚资源,减少浪费并满足市场的多元化需求,已成为相关领域的研究热点。为了应对这一挑战,桑葚被制成了多种保健食品,如保健酸奶、桑葚醋、桑葚果酱、糖蜜和果冻等。此外,桑葚还常常被加入到其他产品中,以增强它们的风味和营养价值。

在产品开发方面,桑葚酒作为一种低酒精果酒,因其高水分含量、丰富的色素和独特香气,逐渐受到关注。桑葚酒的酿造通常采用桑葚或桑葚汁作为原料,通过不同菌种的发酵,将糖转化为酒精,形成具有醇香风味的果酒。研究表明,使用混合发酵菌种能够增加桑葚果酒中酯类物质的种类和含量,从而提升其香气与口感品质^[79]。为了进一步丰富桑葚果酒的风味和营养价值,研究人员尝试将桑葚与柑橘汁、桑叶、玫瑰、樱桃等其他水果或原料进行复合发酵,开发出多种具有特色风味的复合果酒,如桑葚柑橘复合酒^[80]和桑葚玫瑰复合酒^[81],不仅拓展了产品种类,还为消费者提供了更多选择。

桑葚醋作为另一种重要的桑葚衍生产品,是以桑葚或其加工副产物为原料,经过酒精和乙酸双重发酵而制成的保健酸性饮品。桑葚醋不仅兼具桑葚和果醋的营养功能,还具有酸甜可口的独特风味,深受消费者喜爱。有研究优化了桑葚果醋的酒精发酵和乙酸发酵两个关键阶段,确定了最佳发酵条件,为高质量桑葚醋的生产提供了参考^[82]。此外,采用固态发酵方式酿造的桑葚果醋在风味上更加丰富突出,为开发高品质桑葚果醋提供了新思路^[83]。

在食品安全和新鲜度方面,传统的包装和保鲜方式已无法完全满足消费者对高品质食品的需求。因此,开发智能化、绿色环保的食品包装和保鲜新技术备受关注。Zheng 等^[84]将桑葚花青素与胶原蛋白、壳聚糖复合,研制出智能响应 pH 膜,该膜不仅具有良好的机械强度和抗氧化性能,还能在包装内食品发生腐败变质时通过颜色变化指示新鲜度。此外,桑葚花青素与葛根淀粉/壳聚糖复合制成的可食 pH 指示膜^[85],不仅能够延缓肉制品的变质,还能通过颜色变化快速辨别食品的新鲜度,展现出优异的应用前景。

除了上述应用,桑葚还在医药保健和功能性食品等领域展现出广泛的应用潜力。通过提取和浓缩等工艺,桑葚可以制成不同剂型,如采用低聚异麦

芽糖代替蔗糖成功制备出质量稳定、口感良好的低糖型桑葚煎膏剂,该产品具有改善肾脏和肝脏功能、增强视力和听力等保健功效^[86]。此外,桑葚与黑藜复合制成的口服液,不仅颜色均匀、酸甜可口,还具有独特的风味和较高的抗氧化活性,为桑葚的多元化产品开发提供了新的思路^[87]。桑葚及其活性成分不仅可制成药食同源制剂和功能性食品,还可在医疗保健、天然染料等领域展现出巨大的应用潜力。

4 总结与展望

桑葚作为一种具有悠久历史的中药材,其丰富的生物活性成分和多样的药理功能一直是现代科学研究的热点。桑葚的生物活性成分通过多靶点、多途径的作用机制,展现出广泛的保健功能。现代研究通过对桑葚化学成分的深入分析和药理作用的系统研究,进一步明确了其在体内的作用机制,为其临床应用提供了科学依据。然而,现有研究多集中于单体成分的提取和动物实验,缺乏系统分离和整体观念指导的研究,这在一定程度上限制了桑葚的全面开发和应用。虽然目前有很多桑葚相关的产品进入市场,但是未来的产品开发应注重创新,通过现代科技手段,开发出更多形式的新型产品,以满足市场多样化的需求。同时,还应探索桑葚在新型药物中的应用,如通过结构修饰提高活性,或与其他药物联合用药,发挥协同增效作用。

综上所述,随着现代科技的进步,桑葚的化学成分、药理作用及其在临床应用和产品开发中的研究将愈发清晰和精细,其在医药和保健领域的应用前景也将愈加广阔。这不仅是对中医药宝贵遗产的传承与创新,更是对“古为今用”科学精神的体现,为桑葚的现代化研究和应用开辟了新的道路。

参考文献

- [1] 张志强, 杨清香, 孙来华. 桑葚的开发及利用现状[J]. 中国食品添加剂, 2009 (4): 65-68.
- [2] 苏敬. 新修本草[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1981: 335.
- [3] 雷勇, 尹俊涛, 刘艳怀, 等. 接骨木莓桑葚复合饮料的研制[J]. 食品工业, 2023, 44 (8): 27-30.
- [4] 包海蓉, 李柏林, 阎冬妮, 等. 桑葚的开发利用与市场营销[J]. 食品科学, 2004, 25 (S1): 208-211.
- [5] Gündoğdu M, Tunçtürk M, Berk S, et al. Antioxidant capacity and bioactive contents of mulberry species from Eastern Anatolia region of Turkey [J]. Indian J Pharm Educ Res, 2018, 52 (4s): s96-s101.
- [6] Jiang W, Li CL, Cheng JS, et al. Analysis of quality changes in mulberry fruit at three developmental stages using targeted metabolomics based on LC-MS [J]. Trop Plant Biol, 2023, 16 (4): 287-306.
- [7] 陈春. 桑葚多糖的结构鉴定、活性评价及其体外消化降解[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [8] 代君君, 范涛, 章玉萍, 等. 桑葚成熟过程中多糖的动态变化[J]. 食品安全导刊, 2016, (15): 137-138.
- [9] 陈晨, 马雯芳. 桑葚化学成分与药理作用研究进展[J]. 心理月刊, 2020, 15 (8): 232-233.
- [10] Hussain SZ, Naseer B, Qadri T, et al. Mulberry (*M. rubra*) — morphology, taxonomy, composition and health benefits [M]. Cham: Springer International Publishing, 2021: 305-315.
- [11] Jiang Y, Nie WJ. Chemical properties in fruits of mulberry species from the Xinjiang province of China [J]. Food Chem, 2015, 174: 460-466.
- [12] 王小生. 必需氨基酸对人体健康的影响[J]. 中国食物与营养, 2005 (7): 48-49.
- [13] Palomo-Buitrago ME, Sabater-Masdeu M, Moreno-Navarrete JM, et al. Glutamate interactions with obesity, insulin resistance, cognition and gut microbiota composition [J]. Acta Diabetol, 2019, 56: 569-579.
- [14] 彭赛男. 桑葚中主要化学成分的研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [15] Suh HJ, Noh DO, Kang CS, et al. Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract [J]. Food Nahrung, 2003, 47 (2): 132-135.
- [16] Lee Y, Hwang KT. Changes in physicochemical properties of mulberry fruits (*Morus alba* L.) during ripening [J]. Sci Hortic, 2017, 217: 189-196.
- [17] Sánchez-Salcedo EM, Sendra E, Carbonell-Barrachina Á A, et al. Fatty acids composition of Spanish black (*Morus nigra* L.) and white (*Morus alba* L.) mulberries [J]. Food Chem, 2016, 190: 566-571.
- [18] 闫祝炜, 鹿毅, 杨涛. 分光光度法测定 3 种颜色桑葚中的总多酚[J]. 光谱实验室, 2011, 28 (1): 325-328.
- [19] Chan EWC, LYE Phui-Yan, Wong SK. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba* [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14 (1): 17-30.
- [20] Jin Q, Yang JF, Ma LY, et al. Identification of polyphenols in mulberry (genus *Morus*) cultivars by liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometer [J]. J Food Compos Anal, 2017, 63: 55-64.
- [21] Qin CG, Li Y, Niu WN, et al. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit [J]. Czech J Food Sci, 2010, 28 (2): 117-126.
- [22] 孙乐, 张小东, 郭迎迎. 桑葚的化学成分和药理作用研究进展[J]. 人参研究, 2016, 28 (2): 49-54.
- [23] Du QZ, Zheng J, Xu Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity [J]. J Food Compos Anal, 2008, 21 (5): 390-395.
- [24] Khalifa I, Zhu W, Li K, et al. Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds: compositions, metabolism, health benefits, and stability—a structural review [J]. J Funct Foods, 2018, 40: 28-43.

- [25] 朱祥瑞, 费建明, 杨逸文, 等. 桑椹和桑枝中白藜芦醇的提取及含量测定[J]. 蚕业科学, 2007, 33 (1): 110-112.
- [26] 朱祥瑞, 杨逸文, 占鹏飞, 等. 桑椹采摘后白藜芦醇含量的变化[J]. 蚕桑通报, 2013, 44 (1): 32-34.
- [27] 张万生, 赵荣, 田丰雨, 等. 白藜芦醇对人前列腺癌细胞株 PC-3 增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 山东医药, 2018, 58 (7): 36-38.
- [28] Hu L, Wang C, Guo X, et al. Flavonoid levels and antioxidant capacity of mulberry leaves: effects of growth period and drying methods [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 684974.
- [29] 孙志超, 郭新森, 李蒙, 等. 2 个桑树品种果实不同发育时期营养物质的变化[J]. 果树学报, 2024, 41 (4): 703-711.
- [30] 王振江, 罗国庆, 唐翠明, 等. 桑椹成熟过程中酚类物质、总黄酮及花色苷含量的动态变化[J]. 热带作物学报, 2011, 32 (9): 1658-1660.
- [31] Xu X, Huang YY, Xu JW, et al. Anti-neuroinflammatory and antioxidant phenols from mulberry fruit (*Morus alba* L.) [J]. J Funct Foods, 2020, 68: 103914.
- [32] Wang YH, Xiang LM, Wang CH, et al. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract [J]. PLoS One, 2013, 8 (7): e71144.
- [33] Fatima M, Dar MA, Dhanavade MJ, et al. Biosynthesis and pharmacological activities of the bioactive compounds of white mulberry (*Morus alba*): current paradigms and future challenges [J]. Biology, 2024, 13 (7): 506.
- [34] Kim KS, Kim R, Son SR, et al. Oddioside A, a new phenolic glycoside isolated from the fruits of *Morus alba* (Mulberry), protects TNF- α -induced human dermal fibroblast damage [J]. Antioxidants, 2022, 11 (10): 1894.
- [35] 吴祖芳, 翁佩芳. 桑椹的营养组分与功能特性分析[J]. 中国食品学报, 2005, 5 (3): 109-114.
- [36] 崔琛, 张宸瑞, 李莎, 等. 桑葚活性物质及其加工利用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44 (3): 208-213.
- [37] Kim SB, Chang BY, Hwang BY, et al. Pyrrole alkaloids from the fruits of *Morus alba* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24 (24): 5656-5659.
- [38] Asano N, Yamashita T, Yasuda K, et al. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.) [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49 (9): 4208-4213.
- [39] Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez J M, et al. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health [J]. Nutrition, 2012, 28 (1): 9-19.
- [40] Skrovankova S, Ercisli S, Ozkan G, et al. Diversity of phytochemical and antioxidant characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruits from Turkey [J]. Antioxidants, 2022, 11 (7): 1339.
- [41] 余柳仪, 陈森芬, 刘京宏, 等. 桑不同部位及不同成熟度桑葚挥发性成分分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46 (1): 63-69.
- [42] Gungor N, Sengul M. Antioxidant activity, total phenolic content and selected physicochemical properties of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits [J]. Int J Food Prop, 2008, 11 (1): 44-52.
- [43] Li YT, Bao T, Chen W. Comparison of the protective effect of black and white mulberry against ethyl carbamate-induced cytotoxicity and oxidative damage [J]. Food Chem, 2018, 243: 65-73.
- [44] Arias A, Feijoo G, Moreira M T. Exploring the potential of antioxidants from fruits and vegetables and strategies for their recovery [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2022, 77: 102974.
- [45] 赵梓伊, 霍岩, 张一鸣, 等. 桑葚总黄酮体外抗氧化及其抑菌活性分析[J]. 饲料研究, 2020, 43 (10): 69-73.
- [46] 王锐, 何媚, 袁晓春, 等. 桑椹多糖体外清除自由基活性研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (2): 775-776.
- [47] Zhang LJ, Chen QR, Chen Z, et al. Anti-skin aging effects of mulberry fruit extracts: in vitro and in vivo evaluations of the anti-glycation and antioxidant activities [J]. J Funct Foods, 2024, 112: 105984.
- [48] Wang PP, Huang Q, Chen C, et al. The chemical structure and biological activities of a novel polysaccharide obtained from *Fructus Mori* and its zinc derivative [J]. J Funct Foods, 2019, 54: 64-73.
- [49] 游庭活. 桑椹多酚类化合物抗氧化及延缓衰老作用研究[D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [50] Wang YH, Xiang LM, Wang CH, et al. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract [J]. PLoS One, 2013, 8 (7): e71144.
- [51] Zhang YT, Rumgay H, Li MM, et al. Nasopharyngeal cancer incidence and mortality in 185 countries in 2020 and the projected burden in 2040: population-based global epidemiological profiling [J]. JMIR Public Health Surveill, 2023, 9 (1): e49968.
- [52] Ledzewicz U, Schättler HM. Drug resistance in cancer chemotherapy as an optimal control problem [J]. Discrete Cont Dyn-B, 2006, 6 (1): 129.
- [53] Zheng QJ, Wu ZQ, Huang L, et al. Mulberry fruit prevents LPS-induced NF- κ B/pERK/MAPK signals in macrophages and suppresses acute colitis and colorectal tumorigenesis in mice [J]. Sci Rep, 2015, 5 (1): 17348.
- [54] 聂超, 曾庆琪, 张学飞, 等. 桑葚花青素对 S180 移植瘤抑制效应及对细胞增殖凋亡影响的初步研究[J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28 (6): 44-48.
- [55] Chen NC, Chyau CC, Lee YJ, et al. Promotion of mitotic catastrophe via activation of PTEN by paclitaxel with supplement of mulberry water extract in bladder cancer cells [J]. Sci Rep, 2016, 6 (1): 20417.
- [56] Li SS, Li Y, Sun HJ, et al. Mulberry fruit polysaccharides alleviate diethylnitrosamine/phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in vivo: the roles of cell apoptosis and inflammation [J]. Bioengineered, 2021, 12 (2):

- 11599-11611.
- [57] Alam AHMK, Hossain ASMS, Khan MA, et al. The antioxidative fraction of white mulberry induces apoptosis through regulation of p53 and NF κ B in EAC cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (12): e0167536.
- [58] Kaur P, Kumar M, Parkash J, et al. Oral hypoglycemic drugs: an overview [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2019, 9 (3-s): 770-777.
- [59] Jang SY, Jang J, Yang DH, et al. Impact of insulin therapy on the mortality of acute heart failure patients with diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2021, 20 (1): 180.
- [60] 胡海梅. 桑椹多糖提取工艺优化、组分分析及降血糖活性鉴定 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- [61] Guo C, Li R, Zheng N, et al. Anti-diabetic effect of ramulus mori polysaccharides, isolated from *Morus alba* L., on STZ-diabetic mice through blocking inflammatory response and attenuating oxidative stress [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16 (1): 93-99.
- [62] 王瑞坡, 王珂, 李姣, 等. 桑椹乙酸乙酯萃取物对链脲佐菌素致高血糖大鼠的降血糖作用 [J]. *中成药*, 2011, 33 (10): 1668-1672.
- [63] 阎芙洁. 桑葚花色苷对糖代谢的调控作用及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [64] Zhao X, Fu ZF, Yao MH, et al. Mulberry (*Morus alba* L.) leaf polysaccharide ameliorates insulin resistance-and adipose deposition-associated gut microbiota and lipid metabolites in high-fat diet-induced obese mice [J]. *Food Sci Nutr*, 2022, 10 (2): 617-630.
- [65] 谢小花, 陈静, 安晓婷, 等. 桑葚的化学成分和功效作用研究进展 [J]. *吉林工程技术师范学院学报*, 2017, 33 (9): 85-87.
- [66] Choi KH, Lee HA, Park MH, et al. Mulberry (*Morus alba* L.) fruit extract containing anthocyanins improves glycemic control and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic C57BL/Ksj-db/db mice [J]. *J Med Food*, 2016, 19 (8): 737-745.
- [67] Yan FJ, Zheng XD. Anthocyanin-rich mulberry fruit improves insulin resistance and protects hepatocytes against oxidative stress during hyperglycemia by regulating AMPK/ACC/mTOR pathway [J]. *J Funct Foods*, 2017, 30: 270-281.
- [68] Long XS, Liao ST, Li EN, et al. The hypoglycemic effect of freeze-dried fermented mulberry mixed with soybean on type 2 diabetes mellitus [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9 (7): 3641-3654.
- [69] 杨小兰. 桑椹对小鼠免疫功能和果蝇衰老过程的影响 [J]. *山西食品工业*, 2001 (3): 2-3, 16.
- [70] 吴婧婧, 梁贵秋, 陆春霞, 等. 桑椹果醋的功能性研究以及发展现状 [J]. *广西蚕业*, 2012, 49 (1): 67-71.
- [71] 骆新, 王忠, 朱虎虎, 等. 桑葚多糖对环磷酸腺苷诱导小鼠免疫功能低下的调节作用 [J]. *新疆医科大学学报*, 2018, 41 (1): 75-78.
- [72] Lee D, Lee SR, Kang KS, et al. Bioactive phytochemicals from mulberry: potential anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (15): 8120.
- [73] Lee JS, Synytsya A, Kim HB, et al. Purification, characterization and immunomodulating activity of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit *Oddi* (*Morus alba* L.) [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17 (3): 858-866.
- [74] Chen LL, Deng HD, Cui HM, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs [J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (6): 7204.
- [75] Bhatia N, Singh A, Sharma R, et al. Evaluation of burn wound healing potential of aqueous extract of *Morus alba* based cream in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 3 (6): 378-383.
- [76] Sirago G, Toniolo L, Crea E, et al. A short-term treatment with resveratrol improves the inflammatory conditions of middle-aged mice skeletal muscles [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2022, 73 (5): 630-637.
- [77] Yu JS, Lim SH, Lee SR, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *Molecules*, 2021, 26 (4): 920.
- [78] Lu N, Zhang L, Tian YQ, et al. Biosynthetic pathways and related genes regulation of bioactive ingredients in mulberry leaves [J]. *Plant Signal Behav*, 2023, 18 (1): 2287881.
- [79] 刘宜睿, 魏雯丽, 苏瑶, 等. 混菌发酵桑葚果酒工艺优化及其特性分析 [J]. *食品研究与开发*, 2023, 44 (13): 113-119.
- [80] 孔燕, 秦凡平, 覃俊, 等. 不同酵母对桑葚酒品质的影响及菌株筛选 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46 (22): 64-70.
- [81] 谭霄, 曾林, 赵婷婷, 等. 产 γ -氨基丁酸酿酒酵母 JM037 酿造桑葚酒风味物质分析 [J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43 (12): 191-198.
- [82] 王俊伟, 李国德, 柳叶飞, 等. 一种发酵型桑葚枸杞酒及其制备方法: CN107177442A [P]. 2017-09-19.
- [83] 王婷, 刘丽媛, 周慧, 等. 复合型桑葚酒的制作工艺 [J]. *中国食品*, 2021 (18): 84-85.
- [84] Zheng TT, Tang PP, Li GY. Development of a pH-sensitive film based on collagen/chitosan/ZnO nanoparticles and mulberry extract for pork freshness monitoring [J]. *Food Chem*, 2023, 402: 134428.
- [85] 黄迎迎, 李志红, 余森艳, 等. 低醇玫瑰-桑葚果酒的发酵工艺优化及抗氧化研究 [J]. *四川蚕业*, 2024, 52 (1): 32-38.
- [86] 管冠宇. 桑葚果醋发酵工艺优化及其果渣色素提取 [D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2019.
- [87] 王艳丽, 邓杰, 卫春会, 等. 配制型桑椹醋生产工艺研究 [J]. *四川理工学院学报 (自然科学版)*, 2015, 28 (4): 1-4.

(收稿日期: 2024-10-08; 修回日期: 2024-11-19)

鹿药炮制方法、化学成分与药理作用研究进展

王力¹, 李存浩¹, 胡云飞³, 陈伟⁴, 周桂芳⁴, 张智勇¹, 李文龙^{1, 2*} (1. 天津中医药大学 中药制药工程学院, 天津 301617; 2. 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617; 3. 亳州学院, 安徽 亳州 236800; 4. 上海真仁堂药业有限公司, 上海 200000)

摘要: 近年来, 鹿药作为一种传统养生保健品, 受到广泛关注, 主要产品包括鹿茸、鹿角胶、鹿角霜、鹿皮胶、鹿角盘、鹿鞭、鹿骨等。传统中医药理论认为, 鹿药的炮制工艺在其发挥疗效方面起着至关重要的作用。通过科学的炮制方法, 可增强药物功效, 降低毒性, 优化药材的储存条件并改善其使用效果。现代研究表明, 鹿药中含有丰富的活性成分, 如多糖、蛋白质、氨基酸、核苷类、维生素及微量元素等, 这些成分具有抗氧化、抗炎、抗疲劳、调节免疫功能、增强机体抗病能力、延缓衰老以及治疗骨质疏松等多重功效。本文从传统中医药理论的视角, 综述了鹿药的炮制工艺、化学成分及药理作用的现代研究进展, 并探讨了鹿药产业的未来发展前景, 以期传统鹿药材的开发利用提供参考。

关键词: 鹿药; 炮制加工; 化学成分; 药理作用; 鹿产业

中图分类号: R284, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0700-09
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.019

Research progress on processing, chemical compositions, pharmacological effect and prospects of deer medicine

WANG Li¹, LI Cun-hao¹, HU Yun-fei³, CHEN Wei⁴, ZHOU Gui-fang⁴, ZHANG Zhi-yong¹, LI Wen-long^{1, 2*} (1. *School of Pharmaceutical Engineering, Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301617*; 2. *National Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Development, Tianjin 301617*; 3. *Bozhou College, Bozhou Anhui 236800*; 4. *Shanghai Zhenrentang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200000*)

Abstract: In recent years, deer medicine has gained widespread attention as a traditional health supplement, with key products including deer antler velvet, deer antler gum, deer antler cream, deer skin glue, deer antler plate, deer whip, and deer bone. According to traditional Chinese medicine theory, the processing techniques of deer medicine play a crucial role in enhancing its therapeutic efficacy. Through scientific processing, the efficacy of the medicine can be increased, toxicity reduced, storage and overall effectiveness improved. Modern research has shown that deer medicine has rich active ingredients, including polysaccharides, proteins, amino acids, nucleosides, vitamins, and various trace elements. These components exhibit antioxidation, anti-inflammation, anti-fatigue, immune-regulating effects, enhancing the body's disease resistance, delaying aging, and treating osteoporosis. From traditional Chinese medicine, this paper reviews the latest research progress on the processing methods, chemical composition, and pharmacological effects of deer medicine, while also exploring the future development prospects of the deer medicine industry. The aim is to provide valuable insights for the development and utilization of traditional deer medicine.

Key words: deer medicine; processing; chemical composition; pharmacological effect; deer industry

随着现代物质生活水平的不断提高, 人们对健康的追求愈发强烈, 养生保健成为人们生活中

基金项目: 上海市 2022 年度“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项项目 (No. 22S21904600); 安徽省首批科技特派团项目 (No. 2023tpt014)。

作者简介: 王力, 男, 硕士研究生, 主要从事经典名方质量控制与制备工艺研究, email: 2451084205@qq.com *通信作者: 李文龙, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药质量控制技术研究, email: wshlwl@tjutcm.edu.cn

不可忽视的重要组成部分。传统中医药理论中, 草药疗法和中医养生方法历经数千年实践, 逐渐成为现代养生的重要选择之一。其中, 鹿药作为一种传统的养生保健品, 引起了广泛的关注。鹿茸、鹿角、鹿角胶、鹿角霜、鹿皮胶、鹿角盘、鹿鞭、鹿骨、鹿筋、鹿尾、鹿胎、鹿血、鹿肉和其他鹿产品以其丰富的药用价值和独特的保健功效被广泛应用。在中医药领域, 鹿药的炮制工艺被视为其发挥疗效的关键环节。通过清洗、切片、蒸煮、焙干等炮制方法, 不仅可以提升药效, 还能够有效降低其毒性并延长药材的保质期。现代研究也对鹿药的化学成分和药理作用进行了深入探讨, 揭示了其抗氧化、抗炎、抗疲劳、调节免疫功能、抗衰老、治疗骨质疏松等多重功效。此外, 随着生态环境保护意识的提高, 野生鹿已被列为法定保护动物, 因此市面上供食用和药用的鹿产品主要来自人工养殖。这不仅保护了野生鹿资源, 也为传统鹿药材的开发提供了稳定的来源。本文将传统中医药理论为基础, 结合现代研究成果, 系统综述鹿药的炮制工艺、化学成分及药理作用。同时, 对鹿产业的现状及未来发展前景进行探讨, 以期对鹿药的开发和应用提供参考。

1 鹿类药材介绍

鹿类药用历史悠久, 早在《神农本草经》中就已有的药性归经记载, 是享誉国内外的药食两用的特种经济动物。中国是世界上养鹿最早的国家, 同时也是养鹿大国之一。目前国内驯养鹿的种类有梅花鹿、马鹿、麋鹿、水鹿和坡鹿等, 数量已达数百万头^[1]。人工养殖以梅花鹿和马鹿为主要药用鹿种。梅花鹿 (*Cervus nippon Temminck*) 又称花鹿, 雄鹿有角, 雌鹿无角, 主产于吉林、辽宁等地, 列属东北特种经济动物, 是与人参、貂皮齐名的“东北三宝”之一^[2]。马鹿 (*Cervus elaphus Linnaeus*) 和梅花鹿相似, 主要分布于东北、华北、西南及华东等地区。鹿产品具有显著的滋补强壮作用。早在《本草纲目》便记载鹿产品入药达 17 种, 称“鹿之一身皆益于人, 或蒸, 或脯, 或煮, 同酒食良之, 大抵鹿为仙兽, 纯阳多寿之物, 能食良草, 又通督脉, 故其肉角有益无损”“鹿茸生精补髓、养血益阳、强筋健骨, 治一切虚损、耳聋、目暗、眩晕、虚痢^[3]”。鹿角始载于《神农本草经》, 附于鹿茸项下, 列为上品。鹿角胶亦载于《神农本草经》, 称之为白胶, 为鹿角经水煎煮、浓缩制成的固体胶。《中国药典》2020 年版收录了鹿角霜, 为鹿角去胶质的角块^[4]。《本草品汇精要》记载鹿肾“主补肾气”, 《名医别录》称鹿肉“补五脏, 调血脉”。不同部位的鹿肉亦有各自的药效, 如鹿头肉的主要作用

为补益精气, 用于治疗虚劳、消渴、夜梦等症; 鹿蹄肉具有治脚膝骨疼痛的作用^[5]。鹿筋始载于《唐本草》, 鹿骨的药用首见于《名医别录》。《本草纲目》中记载鹿皮“补气, 涩精, 敛疮”, 《四川中药志》进一步阐明其疗效。鹿胎自古就是一味名贵的滋补品, 是“妇科三宝”之一, 广泛用于“鹿胎膏”“女宝”等中成药的原料^[6]。《中国药典》1977 年版收录了鹿茸、鹿角、鹿角胶、鹿角霜 4 味中药, 自此各版药典均有沿用。除上述药材外, 鹿血、鹿角盘 (鹿脱盘)、鹿尾、鹿皮胶、鹿鞭等鹿产品亦具有滋补强壮的作用。

2 鹿药的炮制工艺、化学成分及药理作用研究

2.1 鹿药的炮制加工方法

中药炮制是在传统中医药理论的指导下, 根据中药药效成分、功用不同及用药需求, 对药材进行加工处理, 达到增效减毒、改变药性、便于切制、纯净药材和矫臭矫味等目的。

鹿茸为鹿科动物梅花鹿或马鹿的雄鹿未骨化、密生茸毛的幼角, 具有极高的药用价值, 作为珍贵的传统滋补药已有悠久的历史。古代炮制鹿茸的经验丰富, 主要方法包括熏制和水焯, 以解决夏秋季节采收后易腐败变质的问题。《新修本草》记载鹿茸“夏收, 阴干, 百不收一”, 为应对这一问题, 古人常用烟熏和火烤, 李时珍《本草纲目》中记载了以火烤法熏干鹿茸的操作。《医钞类编》则载“炮制鹿茸”用滚水多次焯制, 使其血液凝固、质地坚实。自南北朝至明清, 炮制方法不断丰富, 如羊脂制、黄精汁制、酥炙、酒浸、醋炙、盐酒制及膏制等多种工艺逐渐形成规范^[7]。现代炮制方法在传统基础上有所改进, 《中国药典》2020 年版规定: 鹿茸需先燎去茸毛, 刮净后灌入热白酒润透, 再横切成薄片、压平、干燥^[4]。此外, 岭南地区还采用“米酒润湿, 蒸软后纵切, 拼接成圆柱状, 再切片干燥”的工艺。现代还有文帮、彭氏等炮制法^[8]。

鹿角, 习称“马鹿角”“梅花鹿角”或“鹿角脱盘”, 来源于马鹿或梅花鹿的已骨化角或翌年春季脱落的角基。通常在春季拾取, 除去泥沙并风干, 再经温水浸泡、锯段、镑片或锉成粗末后备用。由于鹿角质地坚硬, 加工耗时且有效成分难以煎出。吴新春等^[9]尝试高压蒸制法炮制鹿角, 与药典法相比, 高压蒸制法的水溶性浸出物煎出率更高, 且质地松脆易碎, 无需先煎, 克服了药典法中浸泡过程成分流失及易发臭的缺点。

鹿角胶的应用历史悠久, 《本草纲目》引述弘景说: “今人少复煮作, 惟合角弓用之”, 制作方法为先将鹿角浸泡米汁七日使其软化, 再煮制; 或锉细鹿角, 入干牛皮一片一起煮制。此外, 《雷

公炮制论》也记载了其炮制法，强调用醋煮鹿角以软化成胶，最后研制成膏状^[10]。现代胶类药材多采用制成胶珠的形式。程一帆等^[11]研究了微波技术在胶类炮制中的应用，发现微波法能够均匀加热胶珠，避免传统方法中表面过热或内部温度不均的问题，提升了炮制效率和产品质量。

鹿角霜为鹿角去胶质的角块，其制作方法在古代有所不同。宋代陈衍《宝庆本草折衷》记载了两种制作方法：一种是煮取鹿角胶后剩余的物质即为鹿角霜，另一种是将鹿角粉碎后称为鹿角霜。《太平圣惠方》则提供了另一方法，即将鹿角捣碎后以桑柴和炭火烧制九遍，成霜^[12]。元代医家对鹿角霜的炮制进行了创新探索，诸如朱佐的《类编朱氏集验医方》、许国祯的《御药院方》及危亦

林的《世医得效方》等详细总结了鹿角的切制与净制、煮胶时间、增添热水频率、成霜火候、辅料添加以及胶霜同用等鹿角霜煮制方式。明代在元代基础上优化了炮制工艺，进一步细化了热水的增添、防止焦糊和控制成霜火候等技术。如韩《韩氏医通》所述，“以瓦缶入水，桑柴火煮，每一斤入黄蜡半斤，以壶掩住，水少旋添”，强调了角软如粉、角软可切、角质酥松等火候。清代医家则对传统炮制方法进行了反思，回归唐宋时期的胶霜同制法，并重新定义了鹿角霜的概念^[13]。如章穆《调疾饮食辩》记载：“或细剉，炒黄色，碾为粉，名鹿角霜”，将鹿角粉称为鹿角霜。

其他鹿副产品炮制工艺总结见表 1。

表 1 鹿副产品药用部位与炮制(加工)工艺
Tab 1 Medicinal parts and processing of deer byproducts

名称	药用部位	炮制(加工)工艺	文献
鹿角盘	鹿茸被割以后自然生长出来的盘状物质，通常又叫鹿脱盘、鹿花盘、鹿角帽	① 水煎煮法或弱碱盐冷浸法直接提取蛋白类成分；② 取鹿角盘洗净切薄片，置锅中煎煮制取胶液，文火浓缩后冷却凝固，切小块阴干即为鹿角胶，剩余灰白色骨渣为鹿角霜	[14]
鹿皮胶	以鹿皮为主料熬制而成	① 新鲜鹿皮洗净浸泡过夜，剪成小方块，于功率为 800 W 蒸锅中加水常压蒸制 8 h；② 制备工艺依次为：鹿皮浸泡、刮皮、切片、洗涤、焯皮、洗涤、化皮、合并胶液、过滤、胶液浓缩、加辅料、出胶	[15]
鹿皮	马鹿皮或梅花鹿皮	① 主要加工成鹿皮胶，熬制过程中以少量明矾为辅料，经数十道工序加工而成	[16]
鹿胎	雌鹿腹中的带胎衣、胎水的胎	① 鹿胎粉，将鹿胎洗净绞碎，于通风处阴干，粉碎，过筛；② 酒炖鹿胎，将洗净的鹿胎用黄酒炖煮 30 min，出锅晾干后碾成粉末，净鹿胎与黄酒的比例为 4 : 1	[17]
鹿骨	马鹿或梅花鹿的骨骼	① 取出骨头，去除残余筋肉，用温水浸润洗净，随后在阳光下晒干；② 采用超高压提取技术，将新鲜鹿骨冻干粉碎后加压提取	[18]
鹿筋	马鹿或梅花鹿的四肢干燥筋	① 滑石粉炒，将鹿筋切成薄片，预热烫板后撒入滑石粉，翻炒至灵活状态，再加入鹿筋片炒至酥泡，取出分离并晾凉；② 砂烫鹿筋，用砂子炒制鹿筋，用武火炒至深黄色，质地酥脆，气微香即得	[19]
鹿血	马鹿或梅花鹿的鹿茸血或腔血	① 鹿血晶：纯的新鲜鹿血经炮制加工冷冻干燥后制得的结晶片。② 鹿血酒：在新鲜鹿血中加入适量白酒，配制成 15% 的鹿血酒。③ 鹿血粉：冷冻干燥法：将预处理后的鹿血低温浓缩，按比例加入抗凝剂和保鲜剂，充分混合均匀后冷冻干燥，粉碎过筛并灭菌即得。乙醇凝固法：将预处理后的鹿血与食用乙醇按一定比例混合，充分搅拌均匀，静置后离心分离出乙醇，采用热力干燥或真空干燥，加入填充剂和辅料混匀，粉碎过筛并灭菌即得	[20]
鹿鞭	雄性马鹿或梅花鹿干燥后带睾丸的生殖器官，又称为鹿茎筋、鹿肾、鹿冲	① 鹿鞭：秋冬季节采收雄鹿的阴茎及睾丸，清除多余脂肪及残肉，固定在木板上自然风干，或直接用沸水浇烫后于 80 °C 烘箱烘干。② 鹿鞭片：取鹿鞭去除筋膜及多余物质，洗净后温水浸泡。取出中火靠软，迅速切成薄片，干燥。③ 鹿鞭粉：取适量滑石粉置于锅中炒至灵活状态，加入洗净的鹿鞭片，翻炒至鹿鞭片鼓起并呈深黄色，迅速取出，筛去滑石粉，冷却至室温后碾磨成粉	[21]
鹿尾	由尾椎、腔、肌肉纤维、脂肪组织、尾腺、结缔组织被膜和皮肤组成	① 去毛、封口、风干和整形	[22]
鹿肉	马鹿或梅花鹿的肉	① 冷却肉，将鹿肉用 2% 乙酸溶液喷涂后，用紫外灯照射抑制细菌微生物的生长；② 将鹿肉加工成腌制鹿肉、鹿肉酱、鹿肉香肠等鹿产品	[23]

2.2 鹿药的主要化学成分

鹿茸作为一种通过肾经起作用的阳气补品，在传统中医药上有壮肾阳，益精血，强筋骨，调冲任，托疮毒的功效^[4]，这些功效与其丰富的化学成分密切相关。研究表明，鹿茸含有氨基酸、

多肽、蛋白质等重要活性成分，目前已经鉴定出 19 种氨基酸；此外还存在矿物质、多糖和脂质等成分^[24]。Tseng 等^[25]在不同部位的水溶性和乙醇提取物中检测到氨基酸、睾酮、胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)、睾酮与雌二醇的含量在不同部

位间存在显著差异,其中顶端的含量明显高于基部,而钙含量则从顶端向基部逐渐增加;此外,蛋白质、糖胺聚糖、胆固醇、雌二醇、铜和铁的含量均从顶端至基部逐渐降低;除脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸和精氨酸在不同部位间无显著差异外,大多数氨基酸在顶端的含量显著高于基部。鹿茸不同部位划分见图 1。Gong 等^[26]采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术研究不同加工方法的鹿茸,发现水煮鹿茸中的糠氨酸含量显著高于冻干鹿茸,而物理离心去血后的鹿茸糠氨酸含量则低于未去血的鹿茸;该研究还检测到蛋白质、还原糖、赖氨酸、甘氨酸等成分,且各成分在顶端蜡片中的含量均明显高于基部骨片。Kim 等^[27]对韩国、新西兰和俄罗斯鹿茸的抗氧化活性成分进行比较研究,发现韩国产鹿茸中多肽、氨基酸、核苷酸等抗氧化活性物质含量高于俄罗斯和新西兰鹿茸;氨基酸分析结果显示,在 3 种鹿茸中共检测到 20 种氨基酸,其中脯氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸和蛋氨酸的含量受产地影响较大。

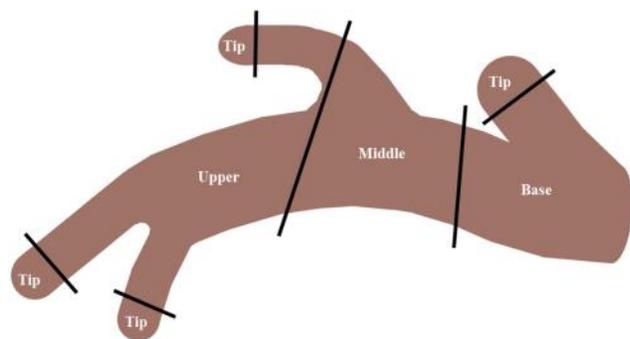


图 1 鹿茸顶端、上部、中部和基部划分示意图

Fig 1 Diagram of the division of the tip, upper, middle and base of deer antler velvet

鹿茸骨化后则为鹿角,其有效成分与鹿茸相似,也富含氨基酸、多肽和蛋白质,但含量略有差异。此外,鹿角中还含有糖胺聚糖(GAGs)、神经节苷脂和糖醛酸等生物活性化合物。GAGs 主要包括皮肤蛋白、角蛋白和硫酸软骨素,其中硫酸软骨素是主要成分。神经节苷脂由鞘糖脂和唾液酸组成。Zhang 等^[28]在鹿角提取物中检测出 16 种氨基酸,包括 8 种人体必需氨基酸,总含量为 $231 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,其中赖氨酸含量最高($190 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$);其余氨基酸为酸性和中性氨基酸,总含量为 $242.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,其中甘氨酸含量最高($75.60 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。Lu 等^[29]采用固相萃取(SPE)和气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)联用技术对鹿角中的甾体激素进行了研究,检测出雄激素、雌激素、皮质激素和孕激素等 4 类 18 种甾体激素,包括 17α -炔雌酮、 17α -雌二醇、 19 -去

甲睾酮、雌三醇等。

鹿角胶是传统的动物药,在中国已有 2000 多年的用药历史。沈童等^[30]研究发现,鹿角胶的化学成分主要为蛋白质、氨基酸,铜、锌、铅等微量元素和钠、钾、钙、镁等元素及其氧化物。Shi 等^[31]通过比较醋制和水制鹿角胶的化学成分,发现醋制鹿角胶的氨基酸含量略高,且丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸含量也显著高于水制鹿角胶。这表明醋制鹿角胶可能具有更好的药理作用。

鹿角胶熬制后剩余的灰白色骨渣为鹿角霜,现代药理学研究发现鹿角霜主要含有碳酸钙、磷酸钙等矿物质及少量氨基酸。与鹿角和鹿茸相比,鹿角霜的成分相似,但含量有所不同。Liu 等^[32]采用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)和二维傅里叶变换红外光谱(2D-IR)对鹿茸、鹿角和鹿角霜的成分进行分析,FT-IR 结果表明,鹿茸和鹿角含有较高水平的蛋白质,酰胺带在 $1800 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 内有强吸收峰,而鹿角霜的红外光谱未观察到酰胺带,且波段形状和强度存在明显差异;2D-IR 分析结果显示,3 种样品在 $1700 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ 内差异显著,鹿茸中出现 1749 cm^{-1} 的脂肪酸峰值,而鹿角和鹿角霜未见此峰值。

鹿胎是传统的名贵滋补品,有研究表明足月妊娠的健康鹿胎中含有丰富的营养物质和生物活性物质,其中主要营养物质包括鹿胎蛋白、多肽、氨基酸、核酸、磷酸、脂肪酸、糖脂、维生素、微量元素以及无机盐等^[33]。鹿产品主要化学成分见表 2。

2.3 鹿药的现代药理作用

近年来,许多研究揭示了鹿药在免疫系统、血液系统等方面的药理功能,并报道了其抗肿瘤、抗疲劳、抗炎、抗氧化等作用。

2.3.1 抗肿瘤作用 鹿茸和鹿角等鹿类药物在抗肿瘤方面显示出显著的药理效应。鹿茸提取物在多种细胞实验中展现出抗肿瘤作用,尤其是在联合使用激酶抑制剂[如间质表皮转化因子(MET)、Akt 等]时效果更为显著。Nazarbek 等^[69]的研究发现,鹿茸提取物可以增强磷酸酶抑制剂、Akt 抑制剂、MET 抑制剂以及奥拉帕利对 PC3 的抑制作用,尤其是 MET 抑制剂与鹿茸提取物联合使用时,肿瘤细胞活力下降最明显。此外,在乳腺癌相关研究中鹿角霜通过下调 TGF- β 通路,抑制肿瘤细胞增殖,鹿角盘提取物则可调控 MCF-7 细胞中凋亡调控因子 p-38 和转录因子 cJun 的高表达,从而抑制 Bcl-2 表达和 ER- α 36 介导的雌激素信号^[70]。

2.3.2 抗疲劳作用 鹿茸和鹿角在抗疲劳方面同样具有显著效果。Luo 等^[71]研究表明,服用鹿茸多肽的小鼠表现出显著延长的抗缺氧生存时间和负重游泳时间,同时血清乳酸水平显著降低,展

表 2 鹿产品主要化学成分

Tab 2 Main chemical components of deer products

成分	鹿药	化合物
氨基酸	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[31] 、鹿角胶 ^[35] 、鹿角盘 ^[36] 、鹿皮胶 ^[37] 、鹿胎 ^[38] 、鹿血 ^[39] 、鹿肉 ^[39]	鹿茸到鹿肉均含有赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、缬氨酸
	鹿皮 ^[40] 、鹿茸霜 ^[41]	甘氨酸、谷氨酸、脯氨酸、丙氨酸、羟脯氨酸、赖氨酸、亮氨酸、缬氨酸、精氨酸、天冬氨酸、 γ -氨基丁酸、谷氨酸
蛋白质 / 多肽	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[42]	血红蛋白 β -3 亚型、血红蛋白 β -c 亚型、抗菌肽、肽聚糖识别蛋白、前血清白蛋白、腐胺、精脞、精胺、血红蛋白 α 亚型、成人 β -珠蛋白、碳酸酐酶、过氧化物还原酶-2、载脂蛋白 A- II、谷胱甘肽转移酶 1、 α -1b 糖蛋白、血清转铁蛋白、过氧化物酶-6、纤溶酶
	鹿角盘 ^[43] 、鹿皮 ^[44]	胰蛋白酶、抗菌蛋白、鹿角盘总蛋白、胶原蛋白、鹿角盘多肽、胶原蛋白
	鹿血 ^[45] 、鹿尾 ^[46]	血红蛋白、球蛋白、白蛋白、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽氧化酶、鹿尾蛋白
	鹿茸 ^[47] 、鹿角盘 ^[48] 、鹿血 ^[49] 、鹿皮胶 ^[50] 、鹿鞭 ^[51]	粗脂肪、游离脂肪酸、磷脂、胆固醇、油酸、亚油酸、亚麻油酸、磷脂、游离脂肪酸、棕榈酸、棕榈烯酸、棕榈二烯酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸、棕榈油酸、油酸、硬脂酸
	鹿茸 ^[52] 、鹿角 ^[29]	磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、鞘磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、豆蔻酸、亚麻酸、棕榈酸、棕榈油酸
	鹿角盘 ^[53] 、鹿胎 ^[17] 、鹿筋 ^[54] 、鹿鞭 ^[55]	睾酮、雌二醇、雌酮、雌三醇、孕酮、 17α -炔雌酮、 17α -雌二醇、19-去甲睾酮、雌三醇、睾酮、雄酮、 17β -雌二醇、雌酮、孕酮、 17α -羟孕酮、丙酸睾酮、皮质酮
多糖	鹿茸 ^[26, 34] 、鹿角 ^[56-57]	雌二醇、孕酮、睾酮、孕酮、雄酮硫酸盐、睾酮、雌二醇
	鹿皮胶 ^[58]	17-羟基孕烯醇酮、雌三醇、17-羟孕酮、21-羟孕酮、雌二醇、睾酮、11-去氧皮质醇、醛固酮、雄烯二酮、孕酮、21-去氧皮质醇、褪黑素、前列腺素 A、前列腺素 E
无机元素	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	甘露糖、葡萄糖胺、核糖、葡萄糖酸、半乳糖酸、氨基半乳糖、葡萄糖、半乳糖、3, 4-对-O-邻甲基- β -葡糖醇、1, 2, 3, 5-四-O-乙酰基-D核糖醇、甘露糖、核糖、糖醛酸、氨基半乳糖、葡萄糖
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	糖醛酸、鹿皮胶多糖
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	钙、磷、钠、钾、镁、铁、锌、锰、铝、锶、钡、铜
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	钙、磷、镁、钾、钠、铁、锶、锌、锰、铝
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	铜、锌、铅、镍、铁、锰、锡、钡、钛
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	铁、钴、镉、铜、锰、钼、镍、锌、磷、钙、钠、钾
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	钙、磷、锌、铁、锶、铝、钡、镁、钠、硅
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	钾、钠、钙、镁、铁、硼、镉、钴、铬、铜、锂、锰、钼、镍、铅等
核苷类	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	钙、钠、镁、钾、铁、铝、银、钡、铍、钴、锰、钒、铬、锌、硒等
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	钠、钾、磷、钙、铁、镁、锂、铝、锌、钡、铬、铜、钛、锰、铅、钒、镉等
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	次黄嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤、肌酸酐、尿苷、盐酸
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	黄嘌呤
维生素	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	鸟嘌呤、腺嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	次黄嘌呤、2'-脱氧鸟苷
	鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	尿苷、鸟苷、肌苷、胞苷、尿嘧啶、次黄嘌呤
鹿茸 ^[34] 、鹿角 ^[59] 、鹿角胶 ^[60] 、鹿血 ^[61] 、鹿角盘 ^[62] 、鹿鞭 ^[63] 、鹿骨 ^[64] 、鹿筋 ^[65]	鹿茸 ^[24] 、鹿胎 ^[67] 、鹿血 ^[68]	维生素 A、维生素 B ₁ 、维生素 B ₂ 、维生素 D、维生素 E、维生素 K、维生素 A、维生素 B ₁ 、维生素 B ₂ 、维生素 A、维生素 B ₁ 、维生素 B ₂ 、维生素 B ₆ 、维生素 K

现出鹿茸多肽对抗缺氧和抗疲劳的提升作用。炮制后的鹿角提取物也被证明能够提升运动耐力和减少运动引发的肌肉损伤。此外，鹿角盘、鹿血、鹿皮胶、鹿尾和鹿鞭亦被证明具有抗疲劳作用。

2.3.3 抗炎镇痛作用 鹿茸提取物在神经萎缩性

疾病、骨折愈合、关节炎和肌肉萎缩的治疗中表现出有益的作用^[72]。Chang 等^[73]研究发现，鹿角提取物可以通过下调一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 以及 IL-10 的产生，显著减轻脂多糖诱导的肺部

炎症。罗尚文等^[74]的实验表明,复方鹿角霜浸膏能够通过调节促炎和抗炎因子的平衡,显著减轻佐剂性关节炎大鼠的炎症反应。鹿角胶在非特异性炎症模型中表现出显著的抗炎镇痛作用,并能通过促进软骨细胞增殖和上调丝裂原活化蛋白激酶(MKK)表达,减缓骨关节炎的发展^[75]。鹿骨提取物肌昔通过促进肥大细胞脱颗粒,抑制巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞产生炎症因子,从而实现对机体进行免疫调节的效果^[76]。此外,鹿尾提取物能显著增加雄性大鼠血清中IL-2含量,鹿胎也显示出对小鼠和大鼠模型的显著抗炎镇痛效果^[33, 46]。

2.3.4 抗氧化作用 Je等^[77]对新西兰鹿茸提取物的研究表明,其对过氧化氢、DPPH和羟基自由基有显著的清除作用。此外,炮制鹿角提取物可抑制乳酸脱氢酶(LDH)活化和SOD活性降低。鹿皮提取物可改善白细胞(WBC)、红细胞(RBC)及血小板(PLT)等参数,并显著提高SOD和过氧化氢酶的活性^[78]。鹿胎能促进皮肤细胞和神经细胞的生长,增加人体肝脏蛋白活性^[33]。

2.3.5 抗菌和抗病毒作用 Qi等^[79]从梅花鹿角中分离出一种18 kDa的蛋白,研究发现该蛋白对革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌、中间葡萄球菌、木糖葡萄球菌)和革兰氏阴性菌(铜绿假单胞菌、大肠埃希菌)的生长有抑制作用,证明了鹿角提取物有抗菌作用。

2.3.6 其他作用 鹿茸多肽可影响巨噬细胞的吞噬能力,调节免疫功能,对糖代谢、骨代谢等具有调节作用,并展示出抗应激等效果^[80]。研究显示,鹿角提取物可抑制刀豆蛋白A诱导的脾细胞增殖,进而抑制T细胞活性,并调节小鼠腹膜巨噬细胞的免疫反应^[81]。鹿角胶被用于骨质疏松、

骨关节炎和贫血等疾病的治疗,能够促进伤口愈合、提高骨细胞增殖^[75]。鹿角霜则在增强造血干细胞增殖、分化、成熟以及临床上用于乳腺癌等疾病的治疗中显示了潜在的药理价值^[48]。据有关文献报道,鹿角胶对骨质疏松、骨关节炎、贫血、男科疾病、乳腺增生等多种疾病具有治疗和预防作用,还能促进伤口愈合^[82]。鹿血可以明显增强小鼠腹腔M细胞的吞噬作用,增强T淋巴细胞和B淋巴细胞的活性,明显提高小鼠脾细胞溶血空斑数目,增强NK细胞活性及促进小鼠脾细胞产生IL-2的能力^[83]。鹿皮胶提取物可抑制骨髓细胞凋亡,增加CD34⁺细胞表达,并且升高外周血RBC、WBC、血红蛋白水平。鹿筋提取物通过提高谷胱甘肽S-转移酶Pi1(Gstp1)、细胞因子受体样因子1(Crlf1)、Thbs1、SOD3和醌NADH脱氢酶1(Nqo1)等正向调控MC3T3E1细胞增殖的基因表达水平,促进成骨细胞的增殖和细胞外基质的合成^[84]。鹿鞭可通过调节PI3K-Akt通路促进肝糖原的合成积累以增强肾阴虚、肾阳虚小鼠的体力^[85]。

2.4 鹿产品研究现状

随着现代科技的发展和人们思维模式的转变,鹿产品的应用已不局限于传统的鹿原产物。许多鹿药被用作主要原料,结合其他具有保健作用的药食同源中药材或辅料,制成各类制剂、保健品、化妆品等。目前鹿类药物主要有片剂、丸剂、胶囊剂;保健食品有200多种,主要用于缓解疲劳、增强免疫力、抗衰老等;化妆品涵盖精华、霜、保湿水、洁面乳和乳液五大剂型,鹿茸产品占据主要市场份额。近年来研究人员开发的部分鹿产品见表3。

表 3 鹿产品保健功能及主要成分

Tab 3 Health functions and main components of deer products

鹿产品	主要成分	保健功能	文献
鹿血肽巧克力丸	鹿血、黑芝麻、山药、芡实、茯苓、桑葚、莲子、代可可脂巧克力、腰果、核桃仁、杏仁、巴旦木、蜂蜜	滋补肝肾、疏肝解郁	[49]
山楂红枣鹿皮胶果冻	鹿皮胶、山楂、红枣、蜂蜜	补益作用	[86]
鹿骨霜补钙软糖	鹿骨霜、无盐黄油、无糖棉花糖、红皮花生、全脂调制奶粉	补钙强体、健脾养胃	[87]
鹿骨淫羊藿片	鹿骨、淫羊藿、骨碎补、氨糖、硫酸软骨素、碳酸钙	增加骨密度、改善骨质疏松	[88]
红参鹿血片	鹿血、红参	补益作用	[89]
鹿血压片糖果	鹿血粉、蔗糖、蜂蜜	抗疲劳、提高免疫力、延缓衰老、改善记忆力	[90]

3 讨论

3.1 品种优化、药效研究、替代品探索与高端产品开发

鹿作为经济动物,品种众多,但《中国药典》2020年版仅将梅花鹿和马鹿列为药用品种。

然而,部分养殖者为追求经济效益,进行品种杂交和不规范饲养,导致品种混乱,进而影响鹿药的药效和保健功能。为推动鹿产业的健康发展,亟须运用现代科学技术与规范化养殖管理,确保品种纯净性与药效稳定性,从而提升鹿药质量以

满足市场需求。在研究层面,采用网络药理学方法构建鹿药药效物质基础与靶标蛋白之间的相互作用,通过分子生物学和生物化学技术深入解析活性成分的结构与作用机制,同时结合临床经验验证药效,构建现代研究与传统经验的桥梁,以推动鹿药产业的科技化与规范化发展。另一方面,随着野生鹿资源的日益枯竭和相关保护法规的实施,寻找鹿药替代品已成为紧迫课题。科研机构需加大研发力度,探索具有相似药效的新鹿品种,并通过科学验证确保其安全性和有效性,从而助力中医药的可持续发展。此外,由于鹿药活性成分普遍存在难溶性和不稳定性,开发高端鹿产品成为提升产业附加值的关键。借助现代药剂学技术,如纳米化和微乳化技术,可显著提高活性成分的溶解度和生物利用度,结合靶向输送与控释技术优化药效并减少不良反应。同时,必须建立严格的质量标准与检测方法,通过临床试验验证产品的安全性和有效性。开发高端鹿产品需持续创新,以满足市场和消费者需求,推动鹿产业向高端化和可持续方向发展。

3.2 建立整体控制及快速分析技术

鹿产品具有成分多样和复杂性特点,其活性成分含量较低,需进行高灵敏度的分析。建立全面质量控制体系,涵盖原药材、生产工艺和成品的全过程检测,以确保产品质量稳定。中药快速分析技术结合数学模型和现代分析技术,能够快速、准确地进行成分分析,具有高效率 and 准确性。通过光谱数据、色谱数据等建立数学模型,进行定性和定量分析,从而在不破坏样品的情况下对鹿产品进行快速鉴定和分析。利用这一技术,可以有效提升鹿产业的质量控制水平,推动鹿产业健康快速发展。

4 展望

鹿药以其独特的药用价值和传统的药食同源理念,在中医药领域有着悠久的历史,近年来鹿药研究在中医药领域备受关注,其在保健和治疗方面的潜力逐渐被揭示。现代科学验证了鹿药的药用功效,尤其是鹿茸、鹿血等产品被证实具有补益、调理、抗衰老和免疫调节等多种作用。随着人们健康意识的提高和老龄化趋势的加剧,对保健品的需求日益增加,鹿药市场具有巨大的潜力。国际市场对中药材的需求也在增加,鹿药作为中国传统药材之一,具有较大的出口潜力,通过国际合作拓展市场或将成为鹿产业发展的重要途径。然而,鹿药研究和产业发展仍面临一些挑

战。一方面,鹿资源的有限性和野生鹿资源的保护成为制约产业发展的主要因素,亟需建立鹿资源的可持续利用和保护机制;另一方面,鹿药产品的质量和安全问题亟待解决,加强监管和质量控制是产业发展的关键。此外,鹿药研究仍需要进一步深入,特别是在活性成分的解析、药效机制的阐明和临床应用的验证等方面需要加强研究。

参考文献

- [1] 何贵祥, 赵全民, 赵岩, 等. 鹿源生物活性肽的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(9): 2916-2923.
- [2] 孙印石, 王燕华, 王玉方, 等. UPLC法测定不同加工方式梅花鹿鹿茸中的核苷类成分[J]. 中草药, 2018, 49(4): 840-846.
- [3] 张辛宁, 许亮, 才丽平, 等. 鹿源中药材的 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(16): 144-146.
- [4] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 335-336.
- [5] 林伟欣, 鞠贵春, 张爱武. 鹿肉的营养特性与生产概况[J]. 经济动物学报, 2014, 18(4): 228-232, 237.
- [6] 蒋琦, 王凤. 鹿胎保健作用研究进展[J]. 当代化工研究, 2017, 24(11): 126-127.
- [7] 王亚苹, 张凯月, 张辉, 等. 鹿茸炮制方法 / 化学成分以及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药, 2019, 39(4): 484-486.
- [8] 朱阳春, 张南方, 张义生. 介绍几种鹿茸传统炮制方法[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12): 2907-2912.
- [9] 吴新春, 刘国利, 王恩银. 高压蒸制法炮制鹿角的研究[J]. 滨州医学院学报, 1994, 11(4): 370-371.
- [10] 于大猛. 鹿角胶传统炮制工艺探讨[J]. 陕西中医, 2020, 41(6): 827-830.
- [11] 程一帆, 苟虹, 谭淇文, 等. 微波技术用于胶类药材炮制研究[J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1373-1375.
- [12] 王怀隐. 太平圣惠方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 404-406.
- [13] 于大猛. 论鹿角霜炮制方法的变迁[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(1): 182-188.
- [14] 何贵祥. 梅花鹿角盘蛋白组对 LPS/D-GalN 诱导小鼠急性肝损伤保护作用及机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
- [15] 张行, 韩冬, 李星辰, 等. 鹿皮胶制备工艺及增免活性研究[J]. 吉林农业大学学报, 2023, 35(7): 1-11.
- [16] 都帅. 鹿皮胶熬制工艺优化及免疫调节机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
- [17] 张凯月. 鹿胎肽对骨髓造血机能与免疫功能的影响[D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [18] 李星辰, 王莲萍, 赵天宇, 等. 不同生茸期梅花鹿鹿骨对小鼠成骨细胞增殖影响及活性成分的超高压提取工艺研究[J]. 吉林农业大学学报, 2023, 8(3): 1-10.
- [19] 孙绍猛, 谢明. 制鹿筋全国 13 个地区中药饮片质量标准比较研究[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(5): 174-177.
- [20] 邓万娟, 梁潇, 刘娇, 等. 鹿血晶对肾阳虚小鼠性激素水平的影响[J]. 贵州中医药大学学报, 2023, 45(5): 46-50.

- [21] 康樱樱, 周婷婷, 王春驰, 等. 梅花鹿鞭提取物抗疲劳作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(5): 694-698.
- [22] 魏启琢, 吴克. 梅花鹿和马鹿鹿尾及其加工方法[J]. 特产科学实验, 1987, 5(1): 43-44.
- [23] 袁琴琴, 刘文营. 鹿肉及其产品加工现状与趋势[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(11): 219-224.
- [24] Orassay A, Sadvokassova D, Berdigaliyev A, et al. Deer antler extract: pharmacology, rehabilitation and sports medicine applications[J]. *Pharmacol Res Mod Chin Med*, 2024, 32(9): 1003-1008.
- [25] Tseng SH, Sung CH, Chen LG, et al. Comparison of chemical compositions and osteoprotective effects of different sections of velvet antler[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 15(21): 352-360.
- [26] Gong RZ, Wang YH, Gao K, et al. Quantification of furorosine (N-epsilon-(2-furoylmethyl)-L-lysine) in different parts of velvet antler with various processing methods and factors affecting its formation[J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1255-1261.
- [27] Kim YA, Kim SW, Lee MH, et al. Comparisons of chemical composition, flavor and bioactive substances between Korean and imported velvet antler extracts[J]. *Food Sci Anim Resour*, 2021, 41(3): 386-401.
- [28] Zhang BX, Jin CA, Zhao YP. The chemical composition and utilization of antler plate[J]. *Spec Econ Anim Plant*, 2005, 12(1): 7-12.
- [29] Lu CM, Wang MT, Mu J, et al. Simultaneous determination of eighteen steroid hormones in antler velvet by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Chem*, 2013, 41(18): 1796-1806.
- [30] 沈童, 刘芬芬, 周亚博, 等. 龟鹿二仙胶源流考辨与研究进展[J]. 世界中医药, 2022, 17(17): 2517-2523.
- [31] Shi MQ, Li TS, Zhao Y, et al. Comparative studies on the chemical composition and pharmacological effects of vinegar-processed antler glue modified from Lei Gong Pao Zhi Lun and traditional water-processed antler glue[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 321(15): 1175-1183.
- [32] Liu Y, Zhang GJ, Sun SQ, et al. Study on similar traditional Chinese medicines Cornu Cervi Pantotrichum, Cornu Cervi and Cornu Cervi Degelatinatum by FT-IR and 2D-IR correlation spectroscopy[J]. *J Pharm and Biomed Anal*, 2010, 305(16): 631-635.
- [33] 张凯月, 杨小倩, 张辉, 等. 鹿胎药理作用研究[J]. 吉林中医药, 2019, 39(5): 634-637.
- [34] Wu FF, Li HQ, Jin LJ, et al. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(18): 621-626.
- [35] Kim DK, Lee SH, Lee ED, et al. Characterizing sections of Elk velvet antler by pH and mineral, fatty acid, and amino acid composition[J]. *J Food Nutr Res*, 2021, 9(12): 170-176.
- [36] Hu W, Qi L, Tian YH, et al. Studies on the purification of polypeptide from sika antler plate and activities of antitumor[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 16(15): 328-334.
- [37] 陈思, 邵玉钢, 臧埔, 等. 鹿角脱盘及其 5 种提取部位 21 种氨基酸含量对比分析[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1851-1857.
- [38] 刘朋, 邱芳萍. 梅花鹿胎衣中蛋白质的提取分离[J]. 现代食品科技, 2016, 22(4): 153-155.
- [39] 金春爱, 崔松焕, 宋超, 等. 不同加工方式下不同部位梅花鹿肉中氨基酸的含量分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 68-75.
- [40] 陆雨顺, 张磊, 姜辉, 等. 梅花鹿副产品中氨基酸及胶原蛋白含量的测定与分析[J]. 特产研究, 2020, 42(6): 43-47, 54.
- [41] 高梦雅, 洪艳丽, 崔媚婷, 等. 补肾化痰方治疗多囊卵巢综合征的作用机制: 基于网络药理学和分子对接方法[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(1): 1-12.
- [42] María LP, José ML, Tomás LC, et al. Quantitative proteomic analysis of deer antler from two regenerating and mineralizing sections[J]. *Biology*, 2021, 10(7): 679-687.
- [43] Dong Z, Liu QX, Sun HM, et al. Quantitative proteomic analysis of deer antler stem cells as a model of mammalian organ regeneration[J]. *J Proteomics*, 2019, 195(49): 98-113.
- [44] 王天成. 鹿皮提取物对皮肤成纤维细胞调控机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [45] 黄开华, 高新华, 陈伟, 等. 鹿血抗氧化活性肽分子量测定及其氨基酸组成分析[J]. 应用技术学报, 2017, 17(1): 37-40.
- [46] 郭鑫, 吴梦阳, 郭子奕, 等. 鹿尾蛋白与多肽制备工艺优化及其对 TM-3 细胞增殖活性研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 181-186.
- [47] 田玉华. 梅花鹿角脱盘蛋白多肽的分离纯化及活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [48] 关晴, 赵海平, 李春义. 鹿角盘化学成分/药理作用及应用现状的研究进展[J]. 特产研究, 2018, 40(4): 119-123.
- [49] 李欣瑜. 鹿血及鹿皮仿生加工工艺优化与产品开发[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
- [50] 张磊, 王燕华, 刘畅, 等. 驴皮胶及鹿皮胶的化学品质分析与评价[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 57-63.
- [51] 李峰, 李竹, 康廷国, 等. 两种鹿鞭药材中脂肪酸成分分析[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 952-953.
- [52] 严历. 东北梅花鹿鹿茸 cDNA 文库的构建及初步鉴定[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [53] 权石范, 张秀莲, 常忠娟. 梅花鹿三种茸片和鹿角盘性激素含量测定[J]. 特产研究, 2014, 36(1): 10-11.
- [54] 刘冬, 钱齐妮, 张红印, 等. 基于 COI 条形码的鹿类中药材 DNA 条形码分子鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(2): 274-278.
- [55] 章敬程. 超高效液相色谱-串联质谱法联合网络药理学探讨鹿鞭治疗肾虚大鼠生精功能障碍的研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [56] Zhang JQ, Wang LL, He Y, et al. Purification characterization and anti-aging activity of Sika deer antler polysaccharide[J]. *J Tradit Complement Med*, 2022, 15(9): 88-92.
- [57] Gong RZ, Wang YH, Qi YL, et al. Effects of different processing methods on water soluble polysaccharide contents and monosaccharide compositions in Cervi Cornu Pantotrichum[J].

- Se Pu, 2019, 37 (2): 194-200.
- [58] 刘志洋, 孙琪瑶, 宫世平, 等. 鹿皮胶多糖对酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42 (23): 334-340.
- [59] Chutima L, Potcharet R, Kritthapas S, et al. Chemical constituents, antioxidant activities, and element concentrations of rusa deer velvet antler extracts [J]. J Chem, 2020, 2020 (1): 1-8.
- [60] 郑珍萍, 吴伟欣, 李晔, 等. 龟鹿二仙胶对膝骨关节炎大鼠软骨细胞 IHH-GLI 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39 (4): 1747-1752.
- [61] 戈欣. 鹿血晶治疗化疗后血小板减少症的临床疗效及安全性观察[D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [62] Tajchman K, Bogdazewski M, Kowalczyk-vasilev E. Effects of supplementation with different levels of calcium and phosphorus on mineral content of first antler, bone, muscle, and liver of farmed fallow Deer (Dama dama) [J]. Can J Anim Sci, 2020, 100 (1): 17-26.
- [63] 王海璐. 鹿鞭的化学成分分析及药理活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [64] 李倩, 李峰, 王婉, 等. 鹿骨、鹿角、鹿髓中无机元素分析[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (9): 222-228.
- [65] 鄧慧, 兰梦, 李晶峰, 等. 响应面法优化鹿筋蛋白提取工艺及体外抗类风湿性关节炎活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41 (22): 178-184.
- [66] 王跃龙, 杨小倩, 兰梦, 等. 基于灰色关联度的鹿骨提取物免疫调节作用的谱效关系研究[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44 (7): 757-763.
- [67] 杨洗尘, 张殿文. 梅花鹿的胎鹿及新生雌鹿的化学成分测定[J]. 特产研究, 2016, (3): 52-54.
- [68] 张志颀, 孙佳明, 牛晓晖, 等. 鹿血化学成分及其药理作用研究[J]. 吉林中医药, 2013, 33 (1): 61-63.
- [69] Nazarbek GD, Mu CL, Ainur S, et al. Deer antler extract-nanoparticles exhibit co-nanozyme activity and targeting of prostate cancer cells [J]. J Funct Foods, 2024, 81 (53): 1060-1069.
- [70] 赵丽君. 基于网络药理学探讨鹿角霜对乳腺癌干细胞活性及 TGF- β 通路影响的研究[D]. 晋中: 山西中医药大学, 2021.
- [71] Luo XD, Pan FG, Zhang TH, et al. Effects of pilose antler polypeptide on ability of mice anti-anoxia and anti-fatigue [J]. Food Sci, 2008, 118 (65): 386-388.
- [72] Lee JS, Han BC, Kim WJ, et al. Juvenile toxicity study of deer antler extract in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319 (43): 1170-1184.
- [73] Chang JS, Lin HJ, Deng JS, et al. Preventive effects of velvet antler (Cervus elaphus) against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting MAPK/NF- κ B activation and inducing AMPK/Nrf2 pathways [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018 (1): 287-294.
- [74] 罗尚文, 王燕燕, 张学农, 等. 复方鹿角霜浸膏对佐剂性关节炎大鼠的抗炎作用[J]. 中成药, 2018, 40 (6): 1253-1258.
- [75] 陈泽华, 林家辉, 陈炳艺, 等. 龟甲胶/鹿角胶含药血清对豚鼠骨关节炎软骨细胞 MKK 表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23 (9): 5-7, 11.
- [76] An LP, Shi LQ, Ye YJ, et al. Protective effect of Sika deer bone polypeptide extract on dexamethasone-induced osteoporosis in rats [J]. Electron J Biotechnol, 2021, 13 (5): 52-58.
- [77] Je JY, Park PJ, Kim EK, et al. Composition of biologically active substances and antioxidant activity of New Zealand deer velvet antler extracts [J]. Korean J Food Sci Anim Resour, 2010, 30 (1): 20-27.
- [78] 汪涛, 兰梦, 张辉, 等. 鹿皮蛋白酶解工艺及其酶解产物免疫活性研究[J]. 食品科技, 2020, 45 (7): 166-173.
- [79] Qi L, Li L, Chen DY, et al. Isolation and purification of 18KD protein of Sika deer antler plate and its antibacterial activity [J]. Pak J Zool, 2019, 52 (1): 115-119.
- [80] Sui ZG, Zhang LH, Huo YS, et al. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 87 (32): 229-240.
- [81] Zhao L, Wang X, Zhang XL, et al. Purification and identification of antiinflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (Cervus elaphus Linnaeus) [J]. J Food Drug Anal, 2016, 24 (2): 376-384.
- [82] 李娜, 胡亚楠, 王晓雪, 等. 鹿角胶化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中药材, 2021, 44 (7): 1777-1783.
- [83] 杜小琴, 张小琴, 夏炎, 等. 蛋白酶对鹿血成分及抗运动疲劳作用的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2022, 57 (1): 22-29.
- [84] Sun L, Liu JZ, Pei HY, et al. Structural characterisation of deer sinew peptides as calcium carriers, their promotion of MC3T3-E1 cell proliferation and their effect on bone deposition in mice [J]. Food Funct, 2024, 15 (23): 2587-2603.
- [85] 王祥山, 朱映黎, 吕美豫, 等. 鹿鞭对肾阴虚及肾阳虚小鼠抗疲劳作用及 PI3K-Akt 通路机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (11): 30-32.
- [86] 胡雪, 李镕基, 赵峰, 等. 鹿皮胶汁体内抗氧化效果及果冻产品研发[J]. 粮食与油脂, 2022, 35 (6): 124-130.
- [87] 高韩倩. 鹿骨胶/鹿骨霜质量分析及产品开发研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [88] 王旭东. 鹿骨淫羊藿片增加骨密度作用保健食品研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2022.
- [89] 刘禹彤, 王金玮, 刘琳琳, 等. Box-Behnken 响应面法优化红参鹿血补益片的工艺[J]. 人参研究, 2021, 33 (4): 9-12.
- [90] 邢耀东, 楚永兴, 王健恒, 等. 一种鹿血压片糖果及其生产方法[J]. 食品安全导刊, 2017, 2 (1): 55-57.

(收稿日期: 2024-10-09; 修回日期: 2024-11-09)

当归药效物质基础及质量控制技术研究进展

张建雨^{1, 2, 5}, 高鑫^{1, 2}, 余河水^{1, 2}, 李正^{1, 2}, 宋纹³, 赵亮⁴, 章顺楠^{5*}, 李文龙^{1, 2*} (1. 天津中医药大学 中药制药工程学院, 天津 301617; 2. 现代中医药海河实验室, 天津 301617; 3. 天津宏仁堂药业有限公司, 天津 300380; 4. 甘肃九州天润中药产业有限公司, 甘肃 定西 748400; 5. 天士力医药集团股份有限公司 中药先进制造技术国家地方联合工程实验室, 天津 300410)

摘要: 当归是大宗主流中药材之一, 主产于甘肃岷县, 临床应用广泛。近年来当归相关的研究主要集中于体内外药理活性、谱效关系、方剂配伍、药效物质含量测定、全面质量表征及快速分析、安全性指标等方面。本文对近十年来当归相关的研究进展进行归纳、总结, 以期当归药材的资源开发和临床应用提供参考。

关键词: 当归; 物质基础; 质量控制; 谱效关系

中图分类号: R283, R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0709-08
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.020

Research progress in the material basis and quality control of *Angelica sinensis*

ZHANG Jian-yu^{1, 2, 5}, GAO Xin^{1, 2}, YU He-shui^{1, 2}, LI Zheng^{1, 2}, SONG Wen³, ZHAO Liang⁴, ZHANG Shun-nan^{5*}, LI Wen-long^{1, 2*} (1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. Haihe Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 3. Tianjin HongRenTang Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300380; 4. Gansu JoinNative Chinese Traditional Medicine Industry Co., Ltd., Dingxi Gansu 748400; 5. National & Local United Engineering Laboratory for TCM Advanced Manufacturing Technology Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410)

Abstract: *Angelica sinensis*, a main traditional Chinese medicinal herb, is primarily produced in Min County, Gansu Province. It has wide range of clinical applications. In recent years, research on *Angelica sinensis* has focused on such aspects as in vitro and in vivo pharmacological activities, spectrum-effect relationships, compatibility of herbal formulations, determination of active ingredient content, comprehensive quality characterization, rapid analysis, and safety indexes. This article summarized the research progress in *Angelica sinensis* over the past decades, to provide reference for resource development and clinical application of *Angelica sinensis*.

Key words: *Angelica sinensis*; material basis; quality control; spectrum effect relationship

当归是伞形科植物 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 有补血活血、润肠通便等功效, 常被用于治疗妇科疾病, 如月经失调等^[1-2], 为医家常用, 素有“十方九归”之称。其在方剂中的应用频度甚高, 如在清著《汤头歌诀》中就有 53 种, 在日本《普通汉方》中有 56 种^[3]。当归主产甘肃东南部, 以岷县(岷归)产量多, 质量好,

云南(云归)、四川等省亦有栽培。当归最早记载于《神农本草经》, 谓之“当归味温, 主呃逆上气”被列为中品, 距今已有上千年的药用历史^[4]。

现代药理学研究证实当归含有丰富的生物活性物质, 因而有多种药理作用, 其主要活性成分是挥发油、多糖和有机酸^[5]。这些活性成分可能会因采收、加工等因素而影响到临床疗效。中药药效物质

基金项目: 定西市科技计划项目 (No.DX2021AH04); 天津市科技计划项目 (No.22ZYJDS00100)。

作者简介: 张建雨, 男, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制技术研究, email: 939589592@qq.com *通信作者: 李文龙, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药质量控制技术研究, email: wshlwl@tjutcm.edu.cn; 章顺楠, 男, 研究员, 主要从事中药国际化与智能制造研究, email: zsn@tasly.com

基础具有多组分、多靶点的特点，导致中药质量标准的研究变得较为复杂，当前，当归质量控制的方法有色谱法、一测多评法、近红外光谱技术等，但部分技术仍处于发展的阶段，尚未推广使用，在当归整体质量控制中的研究还较为浅显，因此全面的质量控制对保证当归质量至关重要。

本文总结了近十年来当归在化学成分、药效物质基础、质量控制等方面的研究进展，以期为后续当归研究以及当归复方制剂的创新开发、质量控制与评价提供评价和参考。

1 当归中的化学成分

研究表明，当归中含有多种活性成分，包括挥发油、多糖、有机酸、苯酐类化合物和黄酮等^[6]，其中挥发油、多糖、有机酸是当归的主要活性成分^[7]，因此本文主要综述这三类化合物的研究进展。

1.1 挥发油类化合物

挥发油是当归的有效成分之一，主要由苯酐类、萜烯类、酚类和烷烃类组成^[8]。化学成分主要包括丁基苯酐、丁烯基苯酐、藁本内酯、洋川芎内酯等，其中藁本内酯占此类化合物含量的 60% 以上^[9]，见表 1。相关研究表明，当归挥发油是当归发挥药效的重要成分，其中苯酐类成分如藁本内酯和丁烯基苯酐等，是其发挥脑神经保护作用的重要活性成分。除此之外，藁本内酯还常被用作当归的质量标志物。当归的药理活性不仅局限于神经系统，还涉及其他方面的保健作用^[10]。Zhong 等^[11]采用 GC-MS 的代谢组学研究当归挥发油的抗炎作用，基于代谢图谱模型可明确地区分不同处理方式的当归挥发油的抗炎作用。因此，不同加工方法是影响当归挥发油功效的重要因素。Yang 等^[12]通过糖尿病小鼠实验发现，藁本内酯可上调 bcl-2 的表达，同时抑制 BAX 和切割的 Caspase3 的表达，在保护视网膜功能以及缓解视网膜细胞凋亡方面发挥重要作用，表明藁本内酯对预防和治疗糖尿病视网膜病变有一定的潜力。

1.2 有机酸类化合物

当归含有带有机酸苯环及其酯的活性化合物，如阿魏酸、阿魏酸松柏酯、香草酸、咖啡酸、绿原酸等，其主要的有机酸化学成分见表 2。相关研究表明，阿魏酸在当归尾部含量最高^[8]，是最有代表性的及最早从当归中被分离出来的有机酸^[16]。由于阿魏酸是潜在的标志物和活性化合物，因此通过高效液相色谱（HPLC）测定其含量，结果显示最低含量为 0.050%^[2]。阿魏酸被广泛用来评价产品质量，因其和当归的药用功能有关^[4]，可用作抗炎和自由基清除剂，同时，阿魏酸具有

神经保护、抗氧化和抗炎作用，这可能有利于阿魏酸的多靶点治疗疾病。由于衍生后的阿魏酸具有更强的药理活性和更低的毒性^[17]，因此近年来越来越多的研究专注于阿魏酸衍生物的研究。

表 1 当归挥发油的主要化学成分

Tab 1 Main chemical components in *Angelica sinensis* volatile oils

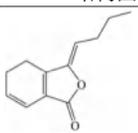
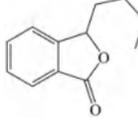
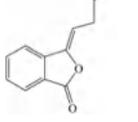
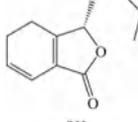
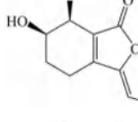
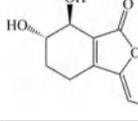
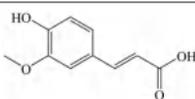
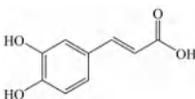
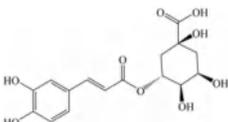
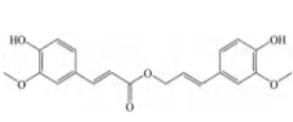
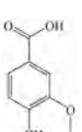
化合物	分子式	分子量	结构图
藁本内酯 ^[7-8, 13-15] (Z-ligustilide)	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	190.240	
丁基苯酐 ^[8, 13, 15] (butylphthalide)	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	190.238	
丁烯基苯酐 ^[8, 13, 15] (N-butylidene-phthalide)	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	188.223	
洋川芎内酯 A ^[8, 13, 15] (senkyunolide A)	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	192.254	
洋川芎内酯 H ^[8, 13, 15] (senkyunolide H)	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224.253	
洋川芎内酯 I ^[8, 13, 15] (senkyunolide I)	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224.253	

表 2 当归中有机酸类化学成分

Tab 2 Main chemical components in *Angelica sinensis* organic acids

化合物	分子式	分子量	结构图
阿魏酸 ^[7, 8, 13, 18] (ferulic acid)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.184	
咖啡酸 ^[8, 18] (caffeic acid)	C ₉ H ₈ O ₄	180.157	
绿原酸 ^[8, 14, 18] (chlorogenic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.309	
阿魏酸松柏酯 ^[8, 18] (coniferyl ferulate)	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	356.370	
香草酸 ^[8, 18] (vanillic acid)	C ₈ H ₈ O ₄	168.150	

1.3 多糖

多糖是当归主要的活性成分之一，广泛应用于中药中。当归多糖是水溶性多糖，主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等组成^[19]。当归多糖具有多种药理活性，主要用来治疗贫血、妇科疾病和肝病，近年来，利用多糖作为靶向药物载体的研究受到广泛关注。以当归多糖为载体的靶向药物可以靶向结肠、肺、脾、肝等^[20]。这些多糖还显示出肝脏保护性，降低氧化损伤，提高大脑中的抗氧化酶活性，且毒性水平较低。迄今为止，已经从当归中鉴定出了 36 种多糖^[5]。当归多糖的提取方法很多，主要采用热水提取法和超声微波辅助提取法^[21]。研究表明，当归多糖能够抑制再生障碍性贫血患者异常的 T 细胞免疫功能，防止线粒体凋亡，并恢复造血干细胞的功能^[22]。研究发现当归多糖可以与 Gal-3 结合并激活内在凋亡途径，以诱导白血病细胞凋亡^[23]，还可以通过抑制 TGF- β 信号通路降低胶质瘤细胞的致瘤性并促进其凋亡^[24]。Zhou 等^[25]研究发现，当归多糖可以通过调节 HT22 细胞中 Mir-10a 的表达并抑制 NF- κ B 和 JAK2/STAT3 通路，从而减少脂多糖 (LPS) 诱导的炎症损伤。

2 当归的药理作用

中药药效物质基础是指中药中能够表达药物临床疗效的活性成分总称。中药药效物质基础研究是中药现代研究的关键，是中药安全有效和质量控制的基石，对揭示中药复方配伍的内在规律、发展中药复方配伍理论、有效研发中药新产品与指导临床应用有重要意义^[26]。本文对当归在体内和体外的药理作用和谱效关系进行总结。

2.1 药理活性研究

中药的药效物质基础可以被中药的有效部位或有效成分清晰地表征，近年来有多项研究对当归的药效物质基础进行了探究。Li 等^[27]的研究表明，当归多糖具有良好的抗炎和保护肝脏的作用，抗炎机制可归因于直接或间接抑制促炎细胞因子、炎症介质和炎症相关酶的分泌，以及促进抗炎细胞因子白细胞介素 (IL)-10 的产生。Xiong 等^[28]研究表明，当归提取物通过抑制炎症因子，具有显著的抗子宫内膜异位作用。有研究表明，当归多糖明显抑制 U251 细胞的生长和增殖，并诱导其凋亡；此外，当归多糖有效地减少了几种细胞周期调节因子的表达，凋亡抑制蛋白同样被抑制，同时促凋亡蛋白的表达增加；当归多糖抑制转化生长因子，刺激 E-钙黏蛋白的表达，从而抑制细胞生长^[24]。Hua 等^[29]研究表明，当归能抑制炎症因子，在体内有良好的抗炎

活性：该研究利用 GC-MS 和 LC-Q/TOF-MS 对尿样中炎症的代谢组学和相关网络进行综合分析，结果表明，当归挥发油具有抗炎作用，可以通过调节代谢物的水平来抗内毒素诱导的炎症。Liu 等^[30]的研究揭示当归挥发油通过保护肠道屏障，抑制中性粒细胞和巨噬细胞的活化和浸润，有效地抑制溃疡性结肠炎的发病。综上，当归提取物以及多糖在体内均有良好的抗炎活性，能抑制炎症因子。

Yue 等^[31]的研究了当归提取物的体外增殖活性，证明了当归提取物对乳腺癌细胞系的增殖有一定的促进效果。当归多糖改善了 X 射线诱导的大鼠心肌纤维化，其潜在机制可能与诱导原代大鼠心肌成纤维细胞凋亡、抑制血清 TGF- β 1 的释放、降低 TnI 水平以及 OPN、c-jun、miRNA-21 和 COL1 α 的表达有关^[32]。宫文霞等^[33]在研究逍遥散抗抑郁有效成分的过程中发现，阿魏酸松柏酯能有效保护谷氨酸损伤的 PC12 细胞和 SH-SY5Y 细胞，当归可能为逍遥散抗抑郁作用的活性药味之一。Wang 等^[34]的研究表明，当归多糖作用于四氯化碳 (CCl₄) 诱导的慢性肝纤维化小鼠模型，与对照小鼠相比，当归多糖用药组小鼠具有更少的空泡化和变性肝细胞，纤维化面积减少了约 70%，此外，当归多糖处理的小鼠血清谷丙转氨酶 (ALT) 水平降低了约 50%。这些结果均表明了当归多糖有显著的抗纤维化作用。文印宪等^[35]研究表明，在体外实验中，当归多糖可以通过实时定量 PCR 和 Western blot 等检测方法验证 ASP-3c 对软骨细胞中 IL-1 β 、IL-6 及糖基转移酶基因表达的抑制作用，并促进软骨基质蛋白多糖合成恢复基质稳态，进而起到抗骨关节炎功效。有研究表明，在进行体外细胞实验时，发现当归多糖对细胞具有不同程度的抗氧化作用，尽管这些多糖均来自同一植物，但由于来自植物不同部位，多糖的结构和抗氧化活性存在差异^[36]。综上，当归多糖具有不同程度的抗氧化作用，以及改善大鼠心肌成纤维细胞凋亡等作用，为后续对当归进一步体内实验提供了基础。

2.2 谱效关系研究

中药谱效关系是通过研究中药的指纹图谱，将中药的化学成分与药效作用关联分析，进而阐明药效成分的一种研究方法。Fan 等^[37]通过建立高效液相色谱指纹图谱和 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2, 2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 (ABTS) 自由基清除能力以及铁离子抗氧化能力法 (FRAP) 的总抗氧化能力的光谱效应关系，确定了当归的生物活

性成分。Zhang 等^[38]建立了道地药材和非道地药材区域当归的 HPLC 指纹图谱和抗血小板聚集活性之间的谱效关系。通过光谱筛选发现 5 种化合物洋川芎内酯 I、尿苷、鸟嘌呤、阿魏酸和腺苷对抗血小板聚集活性有显著贡献,可作为当归 Q-markers 用于其质量控制。邢冬梅等^[39]的实验对当归挥发油体外抗氧化和共有峰化合物进行了灰色关联度分析,结果表明化合物 *E*-藁本内酯、(*E*)- β -罗勒烯、藁本内酯、别罗勒烯、 α -蒎烯、丁烯基苯酞对清除 DPPH、ABTS 自由基的贡献较大,进一步用偏最小二乘回归分析,结果显示藁本内酯、别罗勒烯、6-丁基-1,4-环庚二烯、丁烯基苯酞、 α -蒎烯的含量与 DPPH、ABTS 自由基清除率均成正相关。目前关于当归以及含当归的复方在治疗妇科疾病方面的谱效关系研究还较少,其不同药用部位的功效有所不同,尚不能系统地表征活性物质与疾病之间的关系。

2.3 药对和方剂配伍

林青等^[40]使用网络药理学、分子对接、细胞验证方法,验证了当归-牛膝药对可介导细胞周期信号通路而促使炎症软骨细胞的软骨增殖与修复,其防治骨关节炎的多靶点、多途径机制,为后续临床实验提供重要的指导意义。姜欢欢等^[41]使用 DPPH 法、ABTS 法和 FRAP 法,对黄芪-当归药的体外抗氧化能力进行了测试,结果显示,当归的比例越大,其抗氧化性也越强,而且随着药物浓度的提高,自由基的清除率也随之增加。王蕊娇等^[42]使用 Box-Behnken 设计优选当归-苦参药对的提取工艺,通过 HPLC 测定当归-苦参药对不同配比中的化学成分含量,发现药对的相互配伍对含量有一定的影响,利用主成分分析法将药对有效成分含量与血清生化指标进行整合,通过计算后的得分找出对心肌缺血小鼠的最佳配比。任存霞^[43]的研究表明了当归芍药散协同蒙药治疗慢性盆腔炎有着协同增效的作用,但此方面的研究较少,值得临床上深入研究。目前,当归药对的研究主要为网络药理学对药对协同增效的研究,通过 Box-Behnken 设计和主成分分析法对方法的优化,但最终应用于动物实验及临床的研究较少,后续应加强此方面的研究。

3 当归质量控制技术

当前中药质量控制常用方法为含量测定及指纹图谱,例如 HPLC、气相色谱-质谱技术(GC-MS)、毛细管电泳(CE)等技术,整体质量表征及快速分析技术,例如近红外光谱(NIRS)、电子鼻、电子舌等技术与化学计量学算法的结合,对药材的质量控制需具有较好的应用前景^[44]。相

关研究还包括安全性检测及生物效应评价技术。

3.1 指纹图谱

指纹图谱是对中药整体性的化学表征,具有信息量大、特征性强等特点。此外,该方法操作简单、快速、高效、灵敏度高。其基于整体性和模糊性特点的中药指纹图谱技术是符合中药特点的质量控制模式之一,结合化学计量学进而将中药复杂的多成分鉴别转化为对数据的解析,达到定性与定量研究的目的。

3.1.1 HPLC 指纹图谱 Shinjyo^[45]通过 HPLC 指纹分析等方法,发现阿魏酸是当归的主要成分,为后续控制当归药材质量提供了有益的信息。汪英俊等^[46]建立了当归 HPLC 指纹图谱,并结合化学计量学对当归质量进行评价,得出云南当归中阿魏酸含量较高,同时将云南当归和青海、甘肃当归分成两类,对后续当归的质量控制研究有一定的参考意义。杨燕等^[47]建立了不同产地当归的 HPLC 指纹图谱结合含量测定以及化学计量学研究方法,客观、全面地对不同产地当归质量特征进行探究,为当归的产地溯源及质量控制提供支撑。通过 HPLC 方法对当归进行化合物的定性和定量检测,通过建立指纹图谱可对当归的质量进行检测,两种方法结合,为当归的质量控制提供了参考依据。

3.1.2 UPLC 指纹图谱 王亚丹等^[48]通过建立的当归和欧当归药材的 UPLC 指纹图谱结合化学计量学方法可有效区分当归和欧当归并揭示其差异性成分。严维花等^[49]通过 UPLC 建立了当归不同炮制品的指纹图谱,并对 30 批当归炮制品中的 9 种酚酸及苯酞类成分进行了含量测定及化学计量学分析,结果发现不同炮制品之间含量变化差异明显,此方法可有效地对不同炮制品进行区分,并对其主要成分进行测定。通过建立当归的 UPLC 指纹图谱,可以发现不同批次之间含量变化差异明显,为后续全面科学评价当归提供了重要的依据。

3.1.3 红外光谱指纹图谱 顾志荣等^[50]采用近红外漫反射光谱(NIRDRS)指纹图谱结合 OPLS-DA 模型,可对 11 个当归产区的根际土壤按产地进行较为精确的分类,结果表明 8 个主产区根际土壤的 NIRDRS 指纹图谱、一阶导数光谱及二阶导数光谱均较为相似,但其中 3 个产区与其他产地差异明显;基于 OPLS-DA 模型能够将各产区根际土壤的 NIRDRS 指纹图谱进行明确区分。李小阳等^[51]采用傅里叶变换红外光谱仪对当归样品进行测定,选取 $1800 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1800 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1200 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ 3 个波段分别建立当归

药材的相关系数识别阈值,可以准确识别正常与异常的样品。使用多波段红外光谱指纹图谱相似度指标,可以对当归药材的质量进行客观量化的评价,为当归的全程质量控制提供一种高通量、低成本快速检测方法。

3.2 含量测定

3.2.1 HPLC 法 姚阳阳等^[52]采用 HPLC 法测定当归根中 7 种成分的含量,并运用聚类分析和主成分分析等方法,综合比较探讨了不同产地以及同产地不同处理对当归中 7 种成分含量和质量的影响,为进一步规范指导当归的生态种植应用和产地质量把控提供了参考。Jeong 等^[14]设计了一种快速优化的紫外检测色谱方法,用于 3 种样品的质量控制,采用 HPLC/DAD 方法对标志化合物进行定量分析和模式识别分析,为当归的综合质量控制提供了有效的手段。

3.2.2 UPLC 法 徐小琼等^[53]研究建立了 UPLC 同时测定甘肃省各产区当归中 8 个指标成分含量的方法,结合主成分分析对不同产区当归综合品质进行研究,结果显示定西市各产区当归总体质量优于其他市,绿原酸、洋川芎内酯 A、藁本内酯含量在不同产地样品中存在较大波动,对当归质量影响较大。史雪霞等^[54]建立 UPLC 法同时测定硫黄熏蒸前后当归中阿魏酸、藁本内酯、丁烯基苯酞、洋川芎内酯 A、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、欧当归内酯 A 等 7 种活性成分的含量,发现当归药材经硫黄熏蒸后,7 种活性成分的含量总体呈下降趋势,表明硫黄熏蒸对当归药材中活性成分含量的影响较大。

3.2.3 GC-MS 法 Chen 等^[55]的研究首次采用 GC-MS 法揭示了当归不同药用部位积累动态的差异,为不同药用部位的化学成分和药性的差异提供了理论依据。Zhong 等^[11]采用基于 GC/MS 的代谢组学方法研究当归挥发油 (VOASs) 的抗炎作用,基于代谢物的图谱模型可用于明确区分和分类 VOASs 的抗炎作用。炮制方法是影响药物疗效的重要因素,基于 GC/MS 的代谢组学方法可为当归炮制品的临床应用提供科学的理论依据。

综上所述,由于当归含量丰富,成分测定应以药效活性物质为导向,以体现药材质量。此外,测定方式应趋向于多成分同时分析,以实现更全面的药材质量控制。

3.3 光谱技术

NIRS 技术相比传统分析技术具有多重优点,如操作简便、分析速度快、能够同时对多个指标进行测定、成本较低等。此外,该技术不会破坏样品,也不需要样品进行复杂的预处理即可进

行测定,可实现远距离在线分析同时,NIRS 技术还具有样品无需特殊处理、分析过程可自动化等优点。这些优点使得 NIRS 技术在食品、药品、化工、农业等领域得到了广泛应用^[56]。雷晓晴等^[57]的研究应用 NIRS 技术结合偏最小二乘回归 (PLSR) 建立定量校正模型,实现了当归中 7 种成分的快速检测,为更好控制当归药材的质量奠定基础。闫孟琳等^[56]应用 NIRS 技术结合化学计量学,对 UPLC/Q-TOF 与 NF- κ B 双荧光素酶报告基因筛选出的 Q-maker 成分进行快速检测,为当归品质评价与监管提供创新方法。Zhang 等^[58]的研究表明,应用 NIRS 结合支持向量机 (SVM) 和 PLSR 算法可用于鉴别不同地理位置的当归,以进行质量保证、质量控制和监测。近红外光谱和 HPLC 相结合能够运行外标法对化合物进行定量模型的建立,为当归的含量快速测定提供了新的途径,NIRS 结合化学计量学对当归进行产地的分类,对当归的产地鉴别提供了新的思路。

3.4 电子传感技术

电子鼻是一种表征气味物质整体特征信息的检测仪器,相比于人工感官评定其结果较为客观,同时具备简便、高效、无损、稳定性好等优点。电子舌技术是一种能够智能识别味觉的电子系统,利用具有独特选择性和广域选择性的人工双层脂质膜,可以直接输出样品液的酸味、甜味、苦味等信息。该技术通过将多个感知单元(如离子选择性电极、液晶传感器、荧光传感器等)与一定的数学模型结合起来,能够对不同的食品样品进行分类和鉴别,具有高灵敏度、高选择性、高重现性等优点。因为它不需要破坏样品且操作简便,所以在食品质量控制、药品研发、环境监测等领域得到了广泛应用^[59]。通过电子鼻和 GC-MS 技术将当归的风味成分和气味复杂性联系起来,这项工作也向前迈进了一大步。它不仅提供了一个统计主成分分析模型,不依赖于任何预先确定的成分或感官特性,还可以全面了解当归材料的质量评价^[60]。结合电子鼻技术和液相色谱分析方法,能够综合利用电子鼻的快速、非破坏性检测和液相色谱的准确、可靠分析,从而更全面地评价当归的品质和成分。研究表明,该方法是一种有效的中药质量评价方法^[61]。传统中药材的评价主要采用定性判别方法,缺乏定量检测的技术和方法。因此,吴钰等^[62]采用电子舌智能感官评定技术来测定样品的口感,相比传统评价方法,电子舌技术具有更高的定量检测精度和准确性,能够更好地为中药材的质量评价和鉴别提供支持,研究结果显示,不同产地的当归中阿

魏酸含量明显不同, 并且阿魏酸含量与鲜味成显著正相关。即当归的鲜味越重, 阿魏酸的含量越高, 这一结果具有重要的实际应用价值。

3.5 安全性指标

3.5.1 农药残留 当归药材的农药残留超标问题已成为当前药材行业的热点问题之一。不规范使用农药会导致多种问题, 包括但不限于当归农药残留超标和环境污染。此外, 过度使用农药可能导致当归病虫害产生抗药性等问题。更为严重的是, 这些农药可能在人体内积累, 对身体健康造成危害^[63-64]。

为确保药材使用安全, 2020 年版《中国药典》规定了有害元素和重金属含量的检测方法, 但对农药残留的规定较为模糊, 后续应对农药残留有明确的规定。目前, 对于农药残留样品的前处理, 常用的方法有固相萃取法、固相微萃取法和经典分散固相萃取法。农药残留的检测属于痕量分析, 而 LC-MS/MS 技术则是目前最为重要、应用最为广泛的多农药残留检测技术。王晓琳等^[65]建立了一种禁限用农药残留的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测方法, 可用于检测岷县当归中 50 种禁限用农药的残留。吴福祥等^[66]利用 GC-MS/MS 建立同时测定当归中 35 种禁用农药残留量的分析方法, 该方法快捷、准确, 可用于当归中禁用农药残留的定性和定量分析。朱仁愿等^[67]测定当归中 30 种禁用农药的残留量, 以回收率为指标对 QuEChERS 法和固相萃取法进行考察评估, 结果表明两种方法均符合残留分析的要求, 可用于当归中 30 种禁用农药残留的定性和定量分析。由于不同样品的农药残留量存在较大差异, 因此需要制定适用于当归的多种农药残留限量标准, 以确保道地药材的品质。农药的过度使用引起各种安全问题, 上述研究以及药典的规定, 为当归的安全指标控制提供了有力的依据, 为后续当归中药材的生产、种植以及出口提供了更加有利的依据。

3.5.2 有害元素 2020 年版《中国药典》规定重金属及有害元素照铅、镉、砷、汞、铜测定法测定, 铅不得过 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 镉不得过 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 砷不得过 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 汞不得过 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 铜不得过 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。王涵等^[68]利用 ICP-MS 法测定了当归中 5 种重金属的含量检测结果显示, 对于 3 个批次的当归样品, 5 种重金属元素(Cu、As、Pb、Cd、Hg)的含量均未超过标准限量。赵波等^[69]使用超级微波-电感耦合等离子体质谱法测定岷县当归中的无机元素含量, 并建立了相应的无机元素指纹图谱, 这一研究进一步完善了岷县当归指纹图谱数据库, 为该地区的当归产地溯源技术提供了谱图支持。

4 结论与展望

目前, 对当归的化学成分、药理作用等方面的研究已有一定的进展。但对当归的研究还有很多不足, 如当归的药用物质基础尚不明确, 只能表明当归提取物有抗炎活性, 作用的机制尚未明确。另外, 当归的质量控制也是进行工业化原料发展的一大难题, 目前当归的 HPLC 方面的研究发展较为全面, 但整体质量表征和快速分析技术所进行的研究较为浅显。当归药材的农药残留超标问题已成为当前药材行业的热点问题之一, 为确保当归的安全性, 2020 年版《中国药典》规定了重金属和有害元素的含量。但目前对当归安全性指标的研究较为浅薄, 对生长激素、真菌毒素等方面研究更是薄弱。

根据文献调研分析, 当归今后的研究应集中于以下方面: ① 应加强对当归中大分子物质, 尤其是多糖的研究, 明确其发挥作用的机制; ② 深入研究临床上已经证实的药理作用及其机制; ③ 在当归的质量控制中, 应加强整体质量评价技术与快速分析技术的研究, 以满足当归作为中成药生产原料的质控要求; ④ 当归的安全性指标有待加强, 应对生长激素等进行规定, 除传统的农药残留和重金属元素的测定之外还应加强对生长激素、二氧化硫及真菌毒素的研究。

参考文献

- [1] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 111-114.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 139.
- [3] 陈慧珍. 当归的研究进展[J]. 海峡药学, 2008, 103(8): 83-85.
- [4] Wei WL, Zeng R, Gu CM, et al. *Angelica sinensis* in China—a review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 190: 116-141.
- [5] Hou CY, Yin MS, Lan P, et al. Recent progress in the research of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels polysaccharides: extraction, purification, structure and bioactivities[J]. Chem Biol Techn Agric, 2021, 8(1): 13.
- [6] 马艳春, 胡建辉, 段莹, 等. 当归补血汤研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(2): 10-13.
- [7] Fang L, Xiao XF, Liu CX, et al. Recent advance in studies on *Angelica sinensis* [J]. Chin Herb Med, 2012, 4(1): 12-25.
- [8] 李伟霞, 泥文娟, 王晓艳, 等. 当归化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 40-47, 274.
- [9] 杨海雁, 于喆源, 班小军. 当归挥发油及其主要成分的抗菌活性研究[J]. 生物化工, 2022, 8(2): 71-73.
- [10] 朱欢, 刘露丝, 熊亮, 等. 当归油化学成分及其神经保护作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9):

- 1477-1483.
- [11] Zhong LJ, Hua YL, Ji P, et al. Evaluation of the anti-inflammatory effects of volatile oils from processed products of *Angelica sinensis* radix by GC-MS-based metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 191: 195-205.
- [12] Yang B, Ma GB, Liu Y. Z-ligustilide ameliorates diabetic rat retinal dysfunction through anti-apoptosis and an antioxidation pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e925087.
- [13] 刘露丝, 彭成, 熊亮. 当归苯酞类化合物的研究进展 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2015, 17 (5): 958-962.
- [14] Jeong SY, Kim HM, Lee KH, et al. Quantitative analysis of marker compounds in *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, and *Angelica acutiloba* by HPLC/DAD [J]. *Chem Pharm Bull*, 2015, 63 (7): 504-511.
- [15] 冯慧敏, 李玥, 罗旭东, 等. 当归化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40 (4): 159-166.
- [16] 赵静, 夏晓培. 当归的化学成分及药理作用研究现状 [J]. *临床合理用药杂志*, 2020, 13 (6): 172-174.
- [17] 代阿丽. 阿魏酸及倍半萜衍生物的设计合成与生物活性研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2022.
- [18] 吕成龙, 李会会, 史永洁, 等. 中药当归现代研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (19): 5140-5157.
- [19] Zhang Y, Cheng Y, Wang N, et al. The action of JAK, SMAD and ERK signal pathways on hepcidin suppression by polysaccharides from *Angelica sinensis* in rats with iron deficiency anemia [J]. *Food Funct*, 2014, 5 (7): 1381-1388.
- [20] Zhang Y, Zhou T, Luo L, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and receptor mediated endocytosis of a natural *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2018, 46 (1): 254-263.
- [21] Chen F, Huang GL. Extraction and antioxidant activities of cushaw polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 1646-1649.
- [22] Nai JJ, Zhang C, Shao HL, et al. Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 2337-2353.
- [23] Liu WJ, Xiao KM, et al. Leukemia cells apoptosis by a newly discovered heterogeneous polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 241: 116279.
- [24] Zhang WF, Yang Y, Li X, et al. *Angelica* polysaccharides inhibit the growth and promote the apoptosis of U251 glioma cells in vitro and in vivo [J]. *Phytomedicine*, 2017, 33: 21-27.
- [25] Zhou YN, Guo XQ, Chen WM, et al. *Angelica* polysaccharide mitigates lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury by regulating microRNA-10a in neuronal cell line HT22 [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2019, 47 (1): 3194-3201.
- [26] 张王宁, 李爱平, 李科, 等. 中药药效物质基础研究方法进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53 (10): 761-764.
- [27] Li J, Hua YL, Ji P, et al. Effects of volatile oils of *Angelica sinensis* on an acute inflammation rat model [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54 (9): 1881-1890.
- [28] Xiong QX, Ruan XY, Deng AP, et al. Anti-endometriotic effect of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels extract in human endometriotic cells and rats [J]. *Trop J Pharm Res*, 2020, 19 (4): 817-821.
- [29] Hua YL, Ma Q, Zhang XS, et al. Urinary metabolomics analysis reveals the effect of volatile oil from *Angelica sinensis* on LPS-induced inflammation rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33 (2): e4402.
- [30] Liu C, He YX, Zhang JN, et al. *Angelica* oil restores the intestinal barrier function by suppressing S100A8/A9 signalling in mice with ulcerative colitis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154490.
- [31] Yue GL, Wong LS, Leung HW, et al. Is Danggui safe to be taken by breast cancer patients?—A skepticism finally answered by comprehensive preclinical evidence [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 706.
- [32] Ma CX, Fu ZY, et al. The effects of Radix *Angelica Sinensis* and Radix *Hedysari* ultrafiltration extract on X-irradiation-induced myocardial fibrosis in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108596.
- [33] 宫文霞, 周玉枝, 李肖, 等. 逍遥散中当归的抗抑郁活性成分的研究 [J]. *中草药*, 2015, 46 (19): 2856-2862.
- [34] Wang KP, Wang JF, Song MZ, et al. *Angelica sinensis* polysaccharide attenuates CCl₄-induced liver fibrosis via the IL-22/STAT3 pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 162: 273-283.
- [35] 文印宪, 秦俊, 谭扬, 等. 当归多糖组分 APS-3c 软骨保护作用研究的体外研究 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2019, 40 (1): 1-5.
- [36] Zou YF, Li CY, Fu YP, et al. The comparison of preliminary structure and intestinal anti-inflammatory and anti-oxidative activities of polysaccharides from different root parts of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *J. Ethnopharmacol*, 2022, 295: 115446.
- [37] Fan Q, Yang RJ, Yang FX, et al. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and antioxidant activity of *Angelica sinensis* [J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34 (2): e4707.
- [38] Zhang KX, Shen X, Yang L, et al. Exploring the Q-markers of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels of anti-platelet aggregation activity based on spectrum-effect relationships [J]. *Biom Chromatogr*, 2022, 36 (9): 5422.
- [39] 邢冬梅, 刘洁丽, 邓淑芳, 等. 当归挥发油抗氧化谱效关系研究 [J]. *化学世界*, 2020, 61 (4): 280-286.
- [40] 林青, 王南卜, 李小云, 等. 基于网络药理学探讨当归-牛膝防治骨关节炎的作用机制 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2022, 24 (9): 3532-3547.
- [41] 姜欢欢, 周亚明, 王礼丰, 等. 不同配比的黄芪-当归药对体外抗氧化性实验研究 [J]. *广州化工*, 2022, 50 (18): 40-43.
- [42] 王蕊娇, 张育龙, 董培良, 等. 基于 Box-Behnken 设计和主成分分析法研究当归-苦参药对的提取工艺及不同比例配伍对急性心肌缺血大鼠的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53 (12): 3632-3642.

- [43] 任存霞. 当归芍药散协同蒙药治疗慢性盆腔炎临证心得[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(10): 42-44.
- [44] Liu CX. Quality study needs innovation [J]. Chin Herb Med, 2021, 13(1): 1.
- [45] Shinjyo N, Fuchino H, Kawahara N, et al. Determination of (*E*)-ferulic acid content in the root of *Angelica acutiloba*: a simple chemical evaluation method for crude drug quality control [J]. J Nat Med, 2018, 72(3): 774-778.
- [46] 汪英俊, 严辉, 黄胜良, 等. 当归 HPLC 指纹图谱建立及化学计量学评价 [J]. 中成药, 2020, 42(2): 514-519.
- [47] 杨燕, 于春强, 郭子娴, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析的不同产地当归质量特征研究 [J]. 中草药, 2021, 52(15): 4666-4674.
- [48] 王亚丹, 陈明慧, 闫建功, 等. UPLC 指纹图谱结合化学计量学方法比较当归和欧当归药材的成分差异 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7214-7220.
- [49] 严维花, 曹虹虹, 郭爽, 等. 当归不同炮制品的 UPLC 指纹图谱与多成分含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2499-2510.
- [50] 顾志荣, 沈丹丹, 张瑛, 等. 当归产区根际土壤近红外漫反射光谱指纹图谱研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(4): 541-546, 602.
- [51] 李小阳, 宫源, 裴纹萱, 等. 基于红外光谱指纹图谱的当归快速鉴别 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(9): 1087-1091, 1096.
- [52] 姚阳阳, 穆希琼, 彭桐, 等. HPLC 法测定不同产地当归处理中 7 种成分的含量 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(8): 1987-1990.
- [53] 徐小琼, 陈博, 张小波, 等. 甘肃各主产区当归 UPLC 多成分含量测定及评析 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(6): 1014-1022.
- [54] 史雪霞, 李运. UPLC 法同时测定硫黄熏蒸前后当归中 7 种活性成分的含量 [J]. 中国药房, 2018, 29(17): 2389-2393.
- [55] Chen YY, Li Q, Qiu DY. The dynamic accumulation rules of chemical components in different medicinal parts of *Angelica sinensis* by GC-MS [J]. Molecules, 2022, 27(14): 4617.
- [56] 闫孟琳, 丛龙飞, 张子玥, 等. 基于质量标志物的当归抗炎功效近红外快速评价 [J]. 分析测试学报, 2020, 39(11): 1320-1326.
- [57] 雷晓晴, 王秀丽, 李耿, 等. 近红外光谱法快速测定当归中 7 种成分的含量 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3947-3954.
- [58] Zhang ZY, Wang YJ, Yan H, et al. Rapid geographical origin identification and quality assessment of *Angelicae Sinensis* radix by FT-NIR spectroscopy [J]. J Anal Methods Chem, 2021, 2021: 1-12.
- [59] Zhang JH, Cheng M, Xue YB, et al. Volatile flavour identification and odour complexity of radix *Angelicae sinensis* by electronic nose, integrated gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2023, 34(3): 329-346.
- [60] 孙亚丽, 卞建明, 谢秋涛, 等. 基于 GC-MS 与电子鼻技术结合化学计量学方法分析不同品种桂花浸膏的挥发性成分 [J]. 食品科学, 2023, 44(10): 257-264.
- [61] 刘阿静, 王娟, 王新潮, 等. 基于电子鼻技术对当归整体气味与其主要化学成分相关性的分析研究 [J]. 质量安全与检验检测, 2022, 32(2): 5-8, 51.
- [62] 吴钰, 饶智, 陈彦坤, 等. 基于仿生技术对不同产地当归阿魏酸含量与滋味的关联性研究 [J]. 中国食物与营养, 2022, 28(2): 37-43.
- [63] Cao P, Wang G, Wei XM, et al. How to improve CHMs quality: enlighten from CHMs ecological cultivation [J]. Chin Herb Med, 2021, 13(3): 301-312.
- [64] 陈静梅, 严辉, 周桂生, 等. 当归农药残留研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1445-1452.
- [65] 王晓琳, 张平, 刘志荣, 等. 岷县当归 50 种禁限用农药残留测定 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(11): 79-84.
- [66] 吴福祥, 李坚, 朱仁愿, 等. 气相色谱-串联质谱法同时测定当归中 35 种禁用农药残留量 [J]. 安徽农业科学, 2023, 51(5): 198-202, 205.
- [67] 朱仁愿, 陈婷, 闫君, 等. 不同前处理方式结合超高效液相色谱-串联质谱法测定当归中 30 种禁用农药残留量 [J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(10): 1170-1177.
- [68] 王涵, 董庆海, 吴福林, 等. ICP-MS 同时测定当归中 12 种人体必需微量元素及 5 种重金属元素的含量 [J]. 特产研究, 2019, 41(2): 69-73, 95.
- [69] 赵波, 闫君, 许晓辉, 等. 岷县当归无机元素分析及重金属安全研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(21): 7322-7328.

(收稿日期: 2024-06-10; 修回日期: 2024-09-20)

中药材中重金属的监测与控制研究进展

张怡婧¹, 张书乐¹, 陈海洋¹, 胡云飞³, 陈伟⁴, 周桂芳⁴, 张智勇¹, 所同川^{1, 2*}, 李文龙^{1, 2*} (1. 天津中医药大学 中药制药工程学院, 天津 301617; 2. 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617; 3. 亳州学院, 安徽 亳州 236800; 4. 上海真仁堂药业有限公司, 上海 200000)

摘要: 重金属是指相对密度较大且具潜在毒性的金属元素(如铅、汞、镉和砷), 广泛存在于自然环境和人类活动中。中药作为我国传统医学的重要组成部分, 近年来在国内外受到广泛关注, 其在疾病的预防、治疗和康复中的独特优势和关键作用得到了充分体现。中药中的重金属污染问题严重影响其安全性和有效性, 由重金属累积所致的人体健康风险给中药的推广、使用带来了一定的阻碍, 对患者健康构成了威胁。因此, 加强对中药材重金属的监测和控制是至关重要的。本文对中药材中重金属的来源、限量标准、检测方法进行综述, 以确保中药材和中药制品的安全性, 同时加强对中药生产环节的管理和规范, 减少重金属污染的发生。

关键词: 重金属; 中药; 限量标准; 检测技术

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0717-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.021

Monitoring and control of heavy metals in traditional Chinese medicinal materials

ZHANG Yi-jing¹, ZHANG Shu-le¹, CHEN Hai-yang¹, HU Yun-fei³, CHEN Wei⁴, ZHOU Gui-fang⁴, ZHANG Zhi-yong¹, SUO Tong-chuan^{1, 2*}, LI Wen-long^{1, 2*} (1. School of Pharmaceutical Engineering, Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. National Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Development, Tianjin 301617; 3. Bozhou College, Bozhou Anhui 236800; 4. Shanghai Zhenrentang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200000)

Abstract: Heavy metal refers to metal elements with relatively high density and potential toxicity, such as lead, mercury, cadmium, and arsenic. These metals are widely present in the natural environment and human activities. Traditional Chinese medicine (TCM), as an important component of China's healthcare system, has gained significant attention home and abroad in recent years, demonstrating its unique advantages and key roles in the prevention, treatment, and rehabilitation of diseases. However, heavy metal contamination in TCM seriously affects its safety and efficacy. The health risks to humans due to accumulation of heavy metals hinder TCM use, and threaten patient health. Therefore, monitor and control of heavy metals in TCM materials is crucial. This article reviewed the sources of heavy metals in TCM, the limits and standards, and detection methods to ensure the safety of TCM materials and products. We need to enhance the management and regulation of TCM production to reduce heavy metal contamination.

Key words: heavy metal; traditional Chinese medicine; limit standard; detection technique

中药作为我国传统医学的重要组成部分, 凭借 社会各方的认可^[1]。然而, 随着中药使用的普及, 其独特的药理作用为患者提供了重要贡献, 赢得了 重金属污染问题逐渐显现, 其对人体健康的潜在风

基金项目: 上海市 2022 年度“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项项目(No.22S21904600); 安徽省首批科技特派团项目(No.2023tpt014)。

作者简介: 张怡婧, 女, 硕士研究生, 主要从事中药质量评价与控制的研究, email: 1124167077@qq.com *通信作者: 所同川, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药制药过程分析技术研究, email: suotc@tjutcm.edu.cn; 李文龙, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药质量控制技术研究, email: wshlwl@tjutcm.edu.cn

险引发了广泛关注。重金属的累积可能导致神经系统损伤和肾功能障碍等问题,这不仅威胁了患者的安全,也阻碍了中药的推广。因此,解决中药中的重金属污染问题,确保其安全性和有效性,成为了中药行业可持续发展的重要任务^[2]。

重金属是具有金属性质的元素子集,主要包括一些过渡金属、类金属和锕系元素^[3]。在中药中,砷(As)、汞(Hg)、铅(Pb)、铜(Cu)和镉(Cd)等重金属尤其引人关注^[4]。重金属污染已成为全球环境问题,影响作物产量和土壤生物多样性,并导致金属在食物链中逐级积累^[5]。我国传统医药常使用含有重金属的矿物成分,并取得了显著的临床疗效。然而,目前对于这些含重金属药物的安全性,业界存在一定争议,且缺乏系统和科学的数据来评估其安全性。因此,许多国家依据重金属含量的相关限量标准,制定了关于含重金属中草药使用的相关要求。本文综述了含重金属中草药及其安全性控制的研究进展^[6]。

1 重金属元素的危害

重金属是一个广义的术语,是指密度大于 $5\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 的金属,包括金(Au)、银(Ag)、Cu和Pb等^[7]。由于生态、进化和环境因素,这些金属的毒性问题日益严重^[8]。一些重金属,如铁(Fe)、锌(Zn)、锰(Mn),在低浓度下对人类健康至关重要,但高浓度时则具有毒性。另外一些重金属,如As、Pb、Hg,没有生物学作用,在人体内一旦浓度达到一定水平,会引发毒性反应^[9]。例如,含重金属的废水,即便浓度较低,也可能在藻类和沉积物中富集,进而通过食物链放大污染^[10]。日本水俣病便是由含Hg废水引发的典型案例^[11]。此外,汽车尾气中的Pb通过大气扩散,显著提高了地表Pb浓度,严重危害人类的健康^[12]。

重金属对人体的健康影响极为严重。Hg能够迅速在肝脏中沉积,损伤大脑和视力;Cd的长期摄入则会损伤肝脏、肾脏及生殖功能;Pb一旦进入人体,难以排除,对脑细胞及胎儿的神经系统造成严重影响。此外,其他一些重金属如钴(Co)、钒(V)和锑(Sb)也可能引发多种健康问题,包括头痛、失眠、精神错乱及肿瘤等^[13]。因此,减少重金属的接触与排放,提高公众的认识,是保护人类健康的重要措施。

2 中药中重金属的来源

2.1 外界环境

中药中重金属的来源与其种植条件和生态环境密切相关,主要受到土壤、大气、水源、化肥和农药使用等因素的影响。同时,工业废气、废水和废渣等“三废”也会对中药造成直接或间接的

污染^[14]。土壤作为药材的生长介质,直接影响中药中无机元素的组成和含量,是影响药材质量的重要生态因子之一^[15]。药材生长高度依赖于土壤环境,但人类活动导致土壤污染、肥力下降和土地质量退化,进而使药材质量降低和有害物质超标^[16]。水源中的重金属则可能通过灌溉进入植物,空气中的重金属通过降雨或沉降污染土壤和作物。此外,农用化肥和农药中可能含有重金属成分,长期或过量使用会导致这些元素的积累^[17]。城市化和土地利用变化等生态环境变化更是加剧了重金属的分布和迁移^[18-19]。因此,监测和治理这些环境因素对确保中药的安全性至关重要。

2.2 炮制加工、储存运输

不同加工方式可能会影响中药中重金属的含量,进而影响其生物可给性与生物有效性。中药炮制是根据药材本身对中药材进行适宜的处理加工,炮制质量将直接影响中药的作用效果。不同炮制方法的中药材,其外观、药性、成分等都会发生显著变化,从而增强其药用价值,提升临床疗效^[20]。尽管关于炮制与药材中重金属含量的研究相对较少,但已有的研究发现炮制过程会引起药材中重金属含量的变化。曹帅等^[21]通过原子荧光法及电感耦合等离子体发射光谱法,测定了白芍中的Pb、As、Cu、Hg、Cd含量,结果显示未水煮的白芍中Pb、Cd、Cu含量均高于水煮去皮白芍中的含量,说明水煮能使Pb、Cd、Cu含量降低;与清炒白芍相比,麸炒白芍中Pb、Cd含量均明显增加,As、Hg、Cu含量相当,说明所用麦麸中可能引入重金属元素,该研究表明不同的炮制方法会导致白芍中重金属含量的差异。柳臻等^[22]采用电感耦合等离子体发射光谱法测定了何首乌、白芍、川乌和当归4种生药在不同炮制方法下Cr、Cu、Pb、Zn等重金属的含量,结果显示,何首乌经炮制为制首乌后,Cr、Cu、Pb、Zn的含量均有所提高;白芍经炮制为酒白芍后,Cr、Pb、Zn的含量上升,Cu含量有所下降;相较于生当归,当归炭中Cr、Cu、Zn的含量明显升高,Pb含量有一定程度下降;川乌炮制后Cu、Zn的含量有一定提高,Cr、Pb的含量无明显变化。可见,各药材的重金属含量在不同炮制方法下有不同程度的升降,表明中药材重金属含量受炮制影响。因此,在中药的炮制过程中,金属加工工具的使用和药用辅料的添加可能会导致重金属元素的引入,尤其是中药制剂中贵重药物制剂的加工,会引入大量的重金属元素。中药材在储存和运输过程中也可能受到多种因素的影响。为防止虫蛀和霉变,中药材或饮片在储存时

通常会使用含有重金属的防护剂；而在运输过程中，由于包装不规范和人为因素，重金属含量可能会进一步增加^[23]。

2.3 中药自身特性

2.3.1 植物药 植物通过根系吸收、叶面吸附和特定元素的分解，将重金属积累在可采收部位。药用植物在种植过程中施用的肥料和农药可能含有重金属，如 As、Hg，植物通过根部和茎叶吸收这些元素，可能导致重金属污染。

此外，植物的遗传特性，如其对重金属的吸收能力和富集特性，直接影响重金属的积累与含量。Naz 等^[24]通过研究重金属在植物根部和地上部分的富集，发现植物根部对镍 (Ni) 的积累量在 $75.7 \sim 156.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (干重) 之间，明显高于地上部分 ($0.95 \sim 1.19 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的含量，这一现象说明在根部接触土壤并吸收养分的过程中，植物能够高效地富集重金属。Wu 等^[25]的研究结果进一步支持了这种吸收模式，指出药材中根和根茎部位的重金属含量远高于其他部位，原因可能在于这些部位直接接触污染源、富集时间长，而花、叶、果实等地上部分则因离根系较远且生长周期短，重金属积累相对较低。提示在药材采收和使用中，可以有选择性地减少使用富集重金属的根和根茎部位，降低重金属超标风险。此外，这些研究还表明，不同药材部位的重金属含量不仅与环境污染有关，也与植物内部的富集机制密切相关，这为中药材重金属控制提供了更为细致的依据。

2.3.2 矿物药和动物药 矿物药在中药中的应用已有两千多年的历史，如朱砂、石膏、砒石等。其中大部分含有重金属元素，如朱砂是一种天然存在的矿物质，由 95% 以上的硫化汞 (HgS) 组成，长期与其他中药合用作为镇静催眠药^[26]。具有药用价值的矿物是在多种类型的火成岩、变质岩和沉积岩环境中，在多种多样的地质条件下形成的，它们也是在热液交代矿床和脉体中产生的^[27]。因此，不同类型的矿物药中重金属含量不同。研究中发现很多矿物药被误用，如三氧化二砷和砒霜、白矾和干矾、铅霜和水粉、天然朱砂和人工朱砂等，这些混淆现象时有发生^[28]。由于许多滥用的矿物药含有较高浓度的重金属，可能对人体健康构成潜在威胁。因此，准确鉴别矿物药的真伪，尤其是确保其安全性，显得尤为重要。

动物药是指源自动物的药物，涵盖动物的整体、器官或组织等。由于生物链的富集作用，重金属和有害元素大量进入动物或人体，其富集倍数可达到 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 倍^[29]。相比植物药，

这些元素在生物链中有更广泛的富集途径，残留问题日益严重，需引起重视^[30]。动物药在中药中仅占一小部分，但在临床中使用频繁。有研究检测了 31 种动物药中的 Hg 和 As 的残留，结果显示 87 个批次均含有 Hg^{2+} ，不同 As 形态 As (III)、As (V) 的检出率分别为 96.77%、100%^[31]。这些结果表明动物药中的重金属污染问题亟需引起关注。

2.3.3 中成药 有些中成药含有过量的金属，这可能是因为这些中成药使用了重金属作为化合物之一。含有 Hg 是由于使用了朱砂缘故^[32]，含 Pb 则可能与密陀僧的使用有关^[33]。雄黄作为一种常见的 As 化合物，广泛应用于治疗虫蛇咬伤、疟疾、咳嗽、痔疮，并且可作为解毒剂^[34]。Cu 化合物是一种以胆矾形式存在的绿色矿物，已被用于中成药治疗失眠^[35]，但 Cu 并非典型的重金属元素，在低剂量时是人体所需的必需元素，但在高剂量时也可能表现出重金属的毒性特征。中成药是中药中重金属污染水平最低的一类，其原因在于加工、提取和生产过程中去除了大部分重金属。目前尚未发现重金属元素在中成药口服液、颗粒剂、注射剂和胶囊剂中超标。部分与中成药合用的矿物药含有重金属，例如牛黄解毒片，但被认定为无污染^[36]。

综上，中药中的重金属污染主要来自种植环境、炮制加工过程及药材自身体质特性，不同中药形式的重金属含量有所差异，其中矿物药和动物药中重金属污染较高，中成药较低。因此，应加强中药材的种植环境监控和炮制加工管理，确保中药产品的安全性与质量。

3 国内外中药重金属的限量标准

3.1 国内限量标准

中药中的重金属和有害元素问题一直是国内外关注的中药安全性重点之一。《中国药典》自 2005 年版起增加了重金属及有害元素的检测要求，并对 6 种药材设定了限量标准。2010 年版又新增了山楂、枸杞子等植物药和阿胶等动物药的限量规定^[37]。2015 年版进一步扩大了重金属检测范围，涵盖部分动物药和海洋药材^[38]。2020 年版新增了桃仁、白芷、山茱萸等 10 种药材的限量规定^[39]，具体见表 1。因为重金属容易在体内累积且不易分解，动物药的重金属限量通常设定得比植物药和常规标准更高^[40]。部分矿物药的药效或成分较为单一，可能与其含有重金属有关^[41]。在检测方法上，2005 年版《中国药典》首次采用原子吸收光谱法和电感耦合等离子体质谱法对 Pb、Cr、As、Hg、Cu 进行测定，这两种方法也广泛应用于国际

无机金属元素检测。2015 年版《中国药典》四部通则采用高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法对 Hg 和 As 的形态及价态进行测定。根据 2020 年版《中国药典》的最新修订, 引入了 X 射线荧光光谱法作为一项新的检测技术。从《中国药典》标准的发展历程来看, 中药中重金属和有害元素的限量标准正逐步完善, 呈现出稳步发展的趋势。这一过程初步建立了一个广泛适用并与国际接轨的检测体系, 得益于分析技术的进步以及监管部门的高度重视。

表 1 2020 年版《中国药典》中药重金属限量标准
Tab 1 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia limits for heavy metals in traditional Chinese medicine

药材 / 饮片	状态	重金属限量 / (mg · kg ⁻¹)				
		Cu	As	Cd	Hg	Pb
白芷、葛根、当归、黄精、 人参、三七、桃仁、山 茱萸、酸枣仁	新增	20	2	1	0.2	5
冬虫夏草		20	/	1	0.2	5
山楂、丹参、甘草、白芍、 西洋参、金银花、枸杞 子、黄芪	调整	20	2	1	0.2	5
牡蛎、阿胶、珍珠、蛤壳	无变化	20	2	0.3	0.2	5
海螵蛸		20	10	5	0.2	5
昆布		20	/	4	0.1	5
海藻		20	/	4	0.1	5
水蛭		/	5	1	1	10
蜂胶		/	/	/	/	8

3.2 国外限量标准

随着中药在全球范围内的推广, 中药的质量控制问题受到广泛的关注。目前, 包括美国、英国和日本在内的多个国家和地区, 已经设立了中药材重金属含量的限量标准^[42], 详情见表 2。国际标准化组织 (ISO) 于 2015 年发布了首个中药重金属标准, 规定了药材中 Pb、Cd、As、Hg 的限量值。该标准并未设定各国的重金属限量上限, 而是为重金属检测方法和风险评估提供参考^[43]。这一标准的颁布有助于提升中药材质量, 推动中药行业规范化, 减少国际贸易中的重金属含量壁垒, 促进中药的全球化发展。

表 2 国外重金属限量标准
Tab 2 Foreign heavy metal limit standards

国家 / 组织	适用对象	重金属限量 / (mg · kg ⁻¹)			
		Pb	Cd	As	Hg
ISO	中药材	10	2	4	3
《美国药典》	药用植物	5	0.5	2	1
《欧洲药典》	草药	5	1	/	0.1
《英国药典》	草药	5	1	5	0.1
《日本药局方》	生药	20	/	5	/

4 重金属元素含量检测技术^[44]

4.1 原子吸收光谱法 (AAS)

AAS 是一种通过原子蒸气吸收特定光谱线进行定量分析的技术, 分为火焰法、石墨炉法、氢化物法和冷原子法。其优点包括高灵敏度和准确度, 适合微量金属检测, 缺点在于不能同时测定多种元素, 样品处理复杂, 并且只能分析元素总量, 无法检测形态。Gomez 等^[45]利用火焰原子吸收光谱和电热原子吸收光谱等方法检测贯叶连翘药物衍生物中的金属含量, 成功检测了钙 (Ca)、Cu、钾 (K) 等元素。Pohl 等^[46]通过氢化物和冷蒸气发生技术结合加热石英管原子吸收光谱法, 实现了对 As 和 Hg 的超灵敏测定, 为药材中重金属检测提供了高效、精准的方法。Nema 等^[47]选取芦荟、积雪草、金盏菊等 8 种不同植物, 使用 AAS 测定各植物中 Cu、Mn、Fe、镍 (Ni) 和重金属 As、Pb、Hg 的浓度, 建立校正曲线确保测量准确性, 为药材的安全应用提供了可靠依据。研究方法具有多样性, 为了确保中药材安全, 应根据具体的目标元素和药材特性选用不同的检测方法, 并应充分利用高灵敏度技术, 以更好地保障中药材的安全性和有效性。

4.2 原子荧光光谱法 (AFS)

AFS 是一种灵敏度高且成本低的技术, 自 20 世纪 60 年代以来广泛应用于重金属元素的检测。此方法适合多元素同时测定, 并可以开发多通道仪器。As 是一种危害最大的金属元素之一, 主要存在于地表水中, 并通过大米、鱼类和藻类等食品进入人体。在 As 形态中, 无机 As [如 As (III) 和 As (V)] 比有机 As [如一甲基砷酸 (MMA) 和二甲基砷酸 (DMA)] 毒性更强^[48]。张雯等^[49]使用液相色谱 - 氢化物发生 - AFS 测定中药材中 As 的 4 种形态, 以 0.15 mol · L⁻¹ 的硝酸溶液作为提取溶剂, 并在 90 °C 下进行热浸提。结果显示 7 种中药材样品中, As 主要以 As (III) 和 As (V) 形态存在。在某些藻类中, As 主要以砷糖和有机砷的形式 [如 As (B) 和 As (C)] 存在, 因此在这些藻类中, As 的存在对生态系统的影响可能较小^[50]。Zhang 等^[51]提出结合溴卤化和在线非极性固相萃取与氢化物发生 - AFS 的新方法, 成功实现了在 3 μg · kg⁻¹ 的检测限下测定藻类中的无机 As, 具有简便、快速和高灵敏度的特点。这一方法使其在藻类重金属检测中具有推广价值。与此类似, Yang 等^[52]也利用 AFS 结合氢化物发生技术为中药样品中 As (III) 和 As (V) 的测定提供了一种极为灵敏的方法学。王春燕等^[53]利用微波消解结合 AFS 测定川芎中重金属的含量, 结果显示 As 含量为 0.1011 mg · kg⁻¹,

Hg 含量为 $0.0129 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，均符合《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》的限量要求，表明该批次川芎合格。综上，AFS 在复杂样品中检测 As 及其他重金属时具有良好的灵敏度、准确性和耐基质特性。这些方法为中药材重金属检测提供了精确、快速的技术方案，有助于加强药材重金属含量的监控和质量保障。

4.3 电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-AES)

ICP-AES 通过加热元素以发出特征谱线，从而检测重金属^[54]。ICP-AES 具有广泛的线性范围、高灵敏度和较少的干扰等特点，能够同时检测多种金属元素。尽管其灵敏度略低于电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS)，但能有效避免质谱检测中的干扰，适用于多种重金属分析。其不足之处在于设备成本高，检测费用昂贵，且可能出现光谱干扰。Ni 等^[55]采用高效液相色谱 (HPLC) 和 ICP-AES 技术，获得了白术的分子指纹图谱和金属指纹图谱，为药材的质量评价提供了双重标准。金属指纹图谱不仅帮助区分不同产地的白术，还揭示了药材中的金属元素含量，为中药材的溯源和质量控制提供了重要工具。Lu 等^[56]采用 ICP-AES 分析了 37 个产地的甘草中 15 种元素的含量，结果显示硒 (Se) 和镉 (Cd) 两种元素均未检出，其余元素含量差异较大，表明土壤成分对药材金属含量有显著影响，为药材质量控制中的产地选择提供了数据支持。刘冬莲等^[57]采用微波消解技术与增敏-氢化物-ICP-AES 法，成功测定了黄芪中的痕量 Pb，检测限为 $0.23 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该方法能够快速、准确地测定植物样品中的 Pb，且具备低检测限、高灵敏度及

避免待测元素污染等优点。张胜帮等^[58]使用炭化酸溶法消解样品，并用 ICP-AES 测定了金银花中的 Ca、Pb、Mn 等元素。研究发现，金银花中除了富含 Ca 和镁 (Mg) 外，Fe 和 Mn 含量也较高，证明了其富含人体所需的微量元素，这些元素通常以水煎剂的形式被吸收。这些元素的检测对评估金银花的药理作用和营养价值具有重要参考意义。李铭芳等^[59]使用 ICP-AES 法测定了生脉散中的微量元素，并研究了不同人参品种煎煮液中元素的溶出情况，结果显示西洋参、麦冬和五味子的共煎液中微量元素溶出率较高，从而验证了生脉散配伍的科学性。该研究表明，通过金属元素分析可以评估中药复方的有效性和科学性。综上，这些研究利用 ICP-AES 技术对中药材中金属元素进行了多角度分析，从药材溯源、产地影响、质量监控到配伍科学性，都展示了微量元素在中药品质控制中的关键作用。

4.4 ICP-MS

ICP-MS 是一种质谱分析技术，利用等离子体作为离子源，主要用于痕量和超痕量多元素的检测，广泛应用于微量元素分析。ICP-MS 基本原理是高温等离子体使样品雾化并电离，生成的离子经由界面区传输至离子光学系统。离子光学系统聚焦并引导离子进入质谱分析器，根据离子的质荷比 (m/z) 对其进行分离，最终在检测器上完成测量^[60]，该方法具有高灵敏度和快速分析的优点，ICP-MS 相比于 ICP-AES 无光谱干扰，能测定大多数重金属元素 (除 Hg 外)，是痕量和超痕量分析的理想选择，但其缺点是设备昂贵且需专业操作。ICP-MS 在中药重金属检测中的应用情况见表 3。

表 3 基于 ICP-MS 的中药重金属检测研究

Tab 3 Research on the detection of heavy metals in traditional Chinese medicine based on ICP-MS

样品	重金属	检测结果	文献
冬虫夏草	As	总 As 含量为 $2.12 \sim 15.51 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，As (III) 和 As (V) 含量为 $2.31 \sim 18.71 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	[61]
柴胡	Al、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、As、Cd、钡 (Ba)、Pb、Hg	元素的浓度显示为 3 个水平：(a) Al 在 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 水平；(b) Pb、Cu、Ba、Mn、Cr、Ni 在 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 水平；(c) Co、As、Cd、Hg 在 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 水平	[62]
麻黄	Mn、Cu、Zn、钼 (Mo)	Mn 和 Cu 被视为麻黄中的特征元素	[63]
青礞石	Cr (VI)	回收率为 $95.8\% \sim 112.8\%$ ，检测限为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，定量限为 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	[64]
石斛	Zn、Mn、Cr	4 年生石斛 Zn ($0.049 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 和 Cr ($0.0018 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 含量最高；3 年生铁皮石斛内 Mn ($0.096 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 含量最高	[65]
当归	Zn、Cu、Mn、Cr、Al	Zn、Cu、Mn、Cr、Al 含量分别为 $(5.32 \pm 0.22) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $(81.74 \pm 0.08) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $(27 \pm 0.22) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $(51.02 \pm 0.11) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $(119.13 \pm 10.60) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	[66]

4.5 激光辅助诱导击穿光谱法 (LIBS)

LIBS 是一种高效的多元素分析技术，通过脉冲激光在样品表面激发等离子体，并分析其发射光谱，以确定元素的种类和含量^[67]。与传统重金属检测方法 (如 AAS、AFS) 相比，LIBS 具有

检测速度快、多元素同时检测、避免二次污染等独特优势，广泛应用于农业、工业、食品和医学等领域^[68]。然而，LIBS 的发展受到其检测灵敏度和检测限的限制。因此，为了提高 LIBS 的检测灵敏度和检测限，需要对 LIBS 信号进行增强，

以达到检测重金属元素的目的。尽管 LIBS 在灵敏度和检测限方面存在一些限制，但其快速、直接的分析特点使其在植物样品和中药材重金属元素分析中得到了广泛应用^[69]，见表 4。

表 4 基于 LIBS 的中药重金属检测研究

Tab 4 Research on the detection of heavy metal in traditional Chinese medicine based on LIBS

样品	重金属	检测结果	文献
浙贝母	Cd、Cu、Pb	3 种机器学习算法 GBM、PLSR 和 SVR 都能有效地选择变量，其中 GBM-UVE 用于 Cd，SVR-RF 用于 Pb，GBM-Cars 用于 Cu 效果最好	[70]
马尾藻	As、Cd、Cu、Hg、Pb、Zn	Cd、Cu、Pb、Zn 的 PLSR 模型的相对百分差异 (RPD) > 3，Hg 的 RPD 值在 2.5 ~ 3，As 的 RPD 值为 2.107	[71]
蒲公英、九味一枝蒿、沙枣、青葱小檗	Al、Cu、Mn	采用 SNV 预处理的 PLS-DA 分类模型对各种植物样本的分类效果最好，平均准确率达到 95%	[72]
浙贝母	Cd、Cu、Pb	Cd、Cu 和磷 (P)，SSA-BP 模型的相关系数平方 (Rp ²) 值分别为 0.972、0.991 和 0.956；预测均方根误差 (RMSEP) 值分别为 5.553、7.810、12.906 mg · kg ⁻¹ ；RPD 值分别为 6.04、10.34、4.94	[73]
桑叶	Cu、Cr	Cu 和 Cr 含量的最佳模型 RPD 值分别为 10.0494 和 8.3874，RMSEP 值分别为 110.4550、41.4561 mg · kg ⁻¹	[74]
三七	Zn	基于选择变量的 LS-SVM 模型预测效果最好，预测集相关系数 (Rp) 值为 0.9665，RMSEP 值为 0.001 mg · g ⁻¹	[75]

5 总结与展望

研究表明，许多中药材和中药制品中含有微量甚至超过安全限量的重金属，这主要是由于土壤、水源以及生长环境中的污染所导致。此外，中药加工过程中的不当操作也可能导致重金属污染。重金属污染可能会导致急性或慢性中毒，对人体造成损伤，尤其是长期使用含有重金属的中药制品。加强对中药中重金属的监测和控制，这包括建立更为严格的质量标准和监测体系，以确保中药材和中药制品的安全性，同时应加强对中药生产环节的管理和规范，减少重金属污染的发生。在今后的工作中，除了加强监管和管理外，技术创新也是解决中药重金属污染问题的重要途径。包括开发高效的重金属检测方法、探索新型的中药提取和加工工艺以及研究新型的重金属清除技术等，都有望在减少中药中重金属含量方面发挥积极作用。总之，中药中的重金属污染是一个严重的问题，需要政府、科研机构、生产企业以及消费者共同努力才能有效解决。通过加强监测和控制，确保中药的质量和安

参考文献

[1] Jiang YH, Kang J, Wang YR, et al. Rapid and sensitive analysis of trace leads in medicinal herbs using laser-induced breakdown spectroscopy-laser-induced fluorescence (LIBS-LIF) [J]. Appl Spectrosc, 2019, 73 (11): 1284-1291.
 [2] 邓智文, 方洪科, 刘阳. 中药重金属生物可给性与生物有效性研究进展 [J]. 华中农业大学学报, 2023, 42 (6):

175-184.
 [3] Babula P, Adam V, Opatrilova R, et al. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review [J]. Environ Chem Lett, 2008 (6): 189-213.
 [4] Gyamfi ET. Metals and metalloids in traditional medicines (Ayurvedic medicines, nutraceuticals and traditional Chinese medicines) [J]. Environ Sci Pollut Res, 2019, 26: 15767-15778.
 [5] Gratão PL, Polle A, Lea PJ, et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier [J]. Funct Plant Biol, 2005, 32 (6): 481-494.
 [6] Luo L, Wang B, Jiang JW, et al. Heavy metal contaminations in herbal medicines: determination, comprehensive risk assessments, and solutions [J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 595335.
 [7] Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, et al. Heavy metal toxicity and the environment [J]. Mol Clin Environ Toxicol, 2012, 3: 133-164.
 [8] Jaishankar M, Mathew BB, Shah MS, et al. Biosorption of few heavy metal ions using agricultural wastes [J]. Env Pollut Hum Health, 2014, 2 (1): 1-6.
 [9] Bharti R, Sharma R. Effect of heavy metals: an overview [J]. Mat Today Proc, 2022, 51: 880-885.
 [10] 李文华. 土壤重金属污染现状及防治 [J]. 农民致富之友, 2017 (24): 48.
 [11] 高健. 超支化聚酰胺介孔分子筛复合材料的设计制备及其在废水中的应用 [D]. 南京: 南京师范大学, 2017.
 [12] 邹志芬. PVC 膜金属离子选择性电极和纳米材料碳糊电极的研究及应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2011.
 [13] Suhani I, Sahab S, Srivastava V, et al. Impact of cadmium pollution on food safety and human health [J]. Curr Opin Toxicol, 2021, 27: 1-7.
 [14] Chen WY, Yang YC, Fu K, et al. Progress in ICP-MS

- analysis of minerals and heavy metals in traditional medicine [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 891273.
- [15] Yin YC, Wang YQ, Liu YG, et al. Cadmium accumulation and apoplasmic and symplasmic transport in *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich on cadmium-contaminated soil with the addition of EDTA or NTA [J]. *RSC Advances*, 2015, 5 (59): 47584-47591.
- [16] Adriano DC, Wenzel WW, Vangronsveld J, et al. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup [J]. *Geoderma*, 2004, 122 (2-4): 121-142.
- [17] Xiang MT, Li Y, Yang JY, et al. Heavy metal contamination risk assessment and correlation analysis of heavy metal contents in soil and crops [J]. *Environ Pollut*, 2021, 278: 116911.
- [18] Liu LW, Li W, Song WP, et al. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: principles and applicability [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 633: 206-219.
- [19] Dong B, Zhang RZ, Gan YD, et al. Multiple methods for the identification of heavy metal sources in cropland soils from a resource-based region [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 651: 3127-3138.
- [20] 陈华华. 延胡索绿色炮制条件的探究 [D]. 重庆: 重庆三峡学院, 2020, 35 (5): 366-367.
- [21] 曹帅, 权春梅, 张霄翔. 不同加工及炮制方法对亳白芍的重金属含量影响的研究 [J]. *辽宁科技学院学报*, 2014, 16 (2): 18-19, 47.
- [22] 柳臻, 苏欣, 周衡, 等. 几种重金属在药材炮制中的含量变化研究 [J]. *科技创新导报*, 2015, 12 (36): 252-254.
- [23] 鄢星, 魏惠珍, 朱益雷, 等. 中药重金属研究概述 [J]. *江西中医药大学学报*, 2017, 29 (5): 116-120.
- [24] Naz A, Chowdhury A, Chandra R, et al. Potential human health hazard due to bioavailable heavy metal exposure via consumption of plants with ethnobotanical usage at the largest chromite mine of India [J]. *Environ Geochem Health*, 2020, 42: 4213-4231.
- [25] Wu XB, Xue J. Heavy metals contamination status and analyses of traditional Chinese medicine [J]. *Asian J Chem*, 2013, 25 (1): 19-22.
- [26] Huang CF, Liu SH, Lin SY. Neurotoxicological effects of cinnabar (a Chinese mineral medicine, HgS) in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224 (2): 192-201.
- [27] 陆彦国. 综合构造研究浅析 [J]. *科技资讯*, 2013 (17): 211-212.
- [28] 陈龙. 矿物类中药系统鉴别方法的构建 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.
- [29] 李丽敏, 夏晶, 王欣美, 等. HPLC-ICP-MS 法研究 5 种含雄黄中成药的可溶性砷及其形态 [J]. *中成药*, 2012, 34 (11): 2118-2123.
- [30] 张慧莉. 我国中药材中重金属污染现状分析及对策研究 [J]. *山东化工*, 2018, 47 (1): 56-57.
- [31] 骆骄阳, 刘好, 谷善勇, 等. 31 种动物药中汞、砷元素形态残留分析与限量标准探讨 [J]. *药科学报*, 2018, 53 (11): 1879-1886.
- [32] Kang-Yum E, Oransky SH. Chinese patent medicine as a potential source of mercury poisoning [J]. *Vet Hum Toxicol*, 1992, 34 (3): 235-238.
- [33] Zhu YP. Chinese materia medica: chemistry, pharmacology and applications [M]. Boca Raton: CRC press, 2024.
- [34] 朱华, 杨雯琪, 黄飘玲, 等. 《中国药典》2020 年版收录的含雄黄的中药制剂质量标准探讨 [J]. *湖北农业科学*, 2021, 60 (19): 110-113.
- [35] Ye SK, Chu SS, Xu YM, et al. Regulatory control of Chinese proprietary medicines in Singapore [J]. *Health Pol*, 2005, 71 (2): 133-149.
- [36] 贺园园. 量子点荧光探针在中药重金属和亚硫酸盐检测中的应用 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2022.
- [37] 中国药典 2010 年版. 一部 [S]. 2010.
- [38] 中国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015.
- [39] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020.
- [40] 郭兰萍, 周利, 王升, 等. 《中医药-中药材重金属限量 中药材重金属限量》ISO 国际标准下中药材重金属污染现状与分析 [J]. *科技导报*, 2017, 35 (11): 91-98.
- [41] 韩旭, 骆骄阳, 刘秋桃, 等. 矿物药中重金属与有害元素的形态及价态研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (23): 4552-4559.
- [42] 王莹, 刘芫汐, 刘丽娜, 等. 中药中外源性有害残留物标准现状与监管建议 [J]. *中国现代中药*, 2023, 25 (5): 943-950.
- [43] ISO 18664 Traditional Chinese Medicine-determination of heavy metals in herbal medicines used in traditional Chinese medicine [S]. 2015: 7.
- [44] Amorello D, Barreca S, Gulli E, et al. Platinum and rhodium in wine samples by using voltammetric techniques [J]. *Microchem J*, 2017, 130: 229-235.
- [45] Gomez MR, Cerutti S, Olsina RA, et al. Metal content monitoring in *Hypericum perforatum* pharmaceutical derivatives by atomic absorption and emission spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 34 (3): 569-576.
- [46] Pohl P, Bielawska-Pohl A, Dzimitrowicz A, et al. Understanding element composition of medicinal plants used in herbalism-a case study by analytical atomic spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 159: 262-271.
- [47] Nema NK, Maity N, Sarkar BK, et al. Determination of trace and heavy metals in some commonly used medicinal herbs in Ayurveda [J]. *Toxicol Ind Health*, 2014, 30 (10): 964-968.
- [48] Agusa T, Kunito T, Fujihara J, et al. Contamination by arsenic and other trace elements in tube-well water and its risk assessment to humans in Hanoi, Vietnam [J]. *Environ Pollut*, 2006, 139 (1): 95-106.
- [49] 张雯, 徐丽, 刘德晔, 等. 液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱法测定中药样品中的 4 种砷形态 [J]. *食品与药品*, 2023, 25 (6): 514-519.
- [50] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific opinion on arsenic in food [J]. *Efsa Journal*, 2009, 7 (10): 1351.
- [51] Zhang WH, Qi YH, Qin DY, et al. Determination of

- inorganic arsenic in algae using bromine halogenation and on-line nonpolar solid phase extraction followed by hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. *Talanta*, 2017, 170: 152-157.
- [52] Yang LL, Gao LR, Zhang DQ. Speciation analysis of arsenic in traditional Chinese medicines by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Anal Sci*, 2003, 19 (6): 897-902.
- [53] 王春燕, 杨培, 张欣婷, 等. 微波消解-原子荧光光谱法测定川芎中的砷和汞 [J]. *化工设计通讯*, 2023, 49 (9): 187-190.
- [54] 王雪. 水环境中重金属检测方法研究进展 [J]. *冶金与材料*, 2018, 38 (6): 65-66.
- [55] Ni YN, Peng YY, Kokot S. Fingerprinting of complex mixtures with the use of high performance liquid chromatography, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and chemometrics [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 616 (1): 19-27.
- [56] Lu ZY, Hai CY, Yan SM, et al. Chemistry combining elemental profile, stable isotopic ratios, and chemometrics for fine classification of a chinese herb licoric from 37 producing area [J]. *J Anal Methods Chem*, 2022, 2022 (1): 8906305.
- [57] 刘冬莲, 客绍英, 叶荣, 等. 微波消解-CTAB 增敏-HG-ICP-AES 法测定中药黄芪中的痕量铅 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27 (11): 2337-2340.
- [58] 张胜帮, 李锦燕, 郭玉生. 金银花中多种金属元素的炭化酸溶法-ICP-AES 研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27 (6): 1222-1224.
- [59] 李铭芳, 柳英霞, 万益群. 电感耦合等离子体原子发射光谱测定生脉散中多种微量元素 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28 (2): 436-440.
- [60] Wilschefska SC, Baxter MR. Inductively coupled plasma mass spectrometry: introduction to analytical aspects [J]. *Clin Biochem Rev*, 2019, 40 (3): 115.
- [61] Zuo TT, Li YL, Jin HY, et al. HPLC-ICP-MS speciation analysis and risk assessment of arsenic in *Cordyceps sinensis* [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 1-10.
- [62] Li KL, Luo JY, Ding T, et al. Multielements determination and metal transfer investigation in herb medicine *Bupleuri Radix* by inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. *Food Sci Nutr*, 2018, 6 (8): 2005-2014.
- [63] Ma XF, Fan LL, Mao FY, et al. Discrimination of three *Ephedra* species and their geographical origins based on multi-element fingerprinting by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 10271.
- [64] Li P, Li LM, Xia J, et al. Determination of hexavalent chromium in traditional Chinese medicines by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J. Sep Sci*, 2015, 38 (23): 4043-4047.
- [65] Yuan YD, Yu MY, Zhang B, et al. Comparative nutritional characteristics of the three major Chinese *Dendrobium* species with different growth years [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (9): e0222666.
- [66] Li SJ, Wang H, Jin L, et al. Validation and analysis of the geographical origin of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels using multi-element and stable isotopes [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11928.
- [67] Fu XL, Zhao CJ, Ma SX, et al. Determining available potassium in soil by laser-induced breakdown spectroscopy combined with cation exchange membrane adsorption [J]. *J Anal At Spectrom*, 2020, 35 (11): 2697-2703.
- [68] Wang JM, Li XJ, Zheng PC, et al. Characterization of the Chinese traditional medicine *Artemisia annua* by laser-induced breakdown spectroscopy with 532 nm and 1064 nm excitation [J]. *Anal Lett*, 2020, 53 (6): 922-936.
- [69] Jiang YH, Kang J, Wang YR, et al. Rapid and sensitive analysis of trace leads in medicinal herbs using laser-induced breakdown spectroscopy-laser-induced fluorescence [J]. *Appl Spectrosc*, 2019, 73 (11): 1284-1291.
- [70] Kabir MH, Guindo ML, Chen R, et al. Heavy metal detection in *fritillaria thunbergii* using laser-induced breakdown spectroscopy coupled with variable selection algorithm and chemometrics [J]. *Foods*, 2023, 12 (6): 1125.
- [71] Su LJ, Shi W, Chen XJ, et al. Simultaneously and quantitatively analyze the heavy metals in *Sargassum fusiforme* by laser-induced breakdown spectroscopy [J]. *Food chem*, 2021, 338: 127797.
- [72] Nouman KM, Wang Q, Idrees BS, et al. Evaluation of medicinal plants using laser-induced breakdown spectroscopy combined with chemometric techniques [J]. *Lasers Med Sci*, 2023, 38 (1): 149.
- [73] Luo XM, Chen RQ, Kabir MH, et al. Fast detection of heavy metal content in *Fritillaria thunbergii* by laser-induced breakdown spectroscopy with PSO-BP and SSA-BP analysis [J]. *Molecules*, 2023, 28 (8): 3360.
- [74] Yang L, Meng LW, Gao HQ, et al. Building a stable and accurate model for heavy metal detection in mulberry leaves based on a proposed analysis framework and laser-induced breakdown spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2021, 338: 127886.
- [75] Shen TT, Li WJ, Zhang X, et al. High-sensitivity determination of nutrient elements in *panax notoginseng* by laser-induced breakdown spectroscopy and chemometric methods [J]. *Molecules*, 2019, 24 (8): 1525.

(收稿日期: 2024-09-10; 修回日期: 2024-11-02)

药物分析与检验

茵芋果饮片标准汤剂质量标准研究

王贺伟¹, 刘亭阳¹, 任盈盈¹, 田芳^{2*}, 穆丹丹², 李超杰², 宋菲², 尹强^{1,2}, 尹海龙^{1,2} (1.石河子大学, 新疆 石河子 832003; 2.新疆维吾尔药业有限责任公司, 乌鲁木齐 832026)

摘要: **目的** 制备茵芋果饮片标准汤剂, 并对其含量测定及指纹图谱分析, 为茵芋果配方颗粒质量标准的制定提供依据。**方法** 制备 15 批茵芋果饮片标准汤剂, 计算出膏率并通过检测异荭草苷的含量得到其转移率; 采用高效液相色谱法 (HPLC) 建立茵芋果饮片标准汤剂指纹图谱, 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 计算指纹图谱相似度并结合聚类分析对指纹图谱进行数据分析。**结果** 15 批茵芋果饮片标准汤剂中出膏率在 13.72%~22.26%, 平均出膏率为 19.24%, 异荭草苷转移率在 37.96%~62.47%, 平均转移率为 50.58%。经 HPLC 指纹图谱分析, 发现共有峰 7 个, 指出 5 个峰, 分别是绿原酸、异荭草苷、异牡荆素、木犀草素、芹菜素。15 批茵芋果饮片标准汤剂指纹图谱相似度均大于 0.95, 聚类分析将 15 批样品分成 4 类。**结论** 本研究建立了茵芋果饮片标准汤剂 HPLC 含量测定和指纹图谱分析方法, 可为茵芋果配方颗粒的质量标准提供依据。

关键词: 茵芋果饮片; 标准汤剂; 质量标准; 聚类分析

中图分类号: R284.1, R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0725-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.022

Quality standard of Pimpinellae anisi fructus piece decoction

WANG He-wei¹, LIU Ting-yang¹, REN Ying-ying¹, TIAN Fang^{2*}, MU Dan-dan², LI Chao-jie², SONG Fei², YIN Qiang^{1,2}, YIN Hai-long^{1,2} (1. Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832003; 2. Xinjiang Uyghur Pharmaceutical Co., Ltd., Urumqi 832026)

Abstract: Objective To prepare standard decoction of Pimpinellae anisi fructus pieces, measure their content and analyze fingerprint spectrum, to provide a basis for the quality standards of Pimpinellae anisi fructus formula granules. **Methods** Fifteen batches of Pimpinellae anisi fructus piece standard decoctions were prepared. The extraction rate was calculated, and the transfer rate of isoimperatorin was determined with its content. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to establish the fingerprint spectrum of the Pimpinellae anisi fructus piece standard decoction. The similarity of the fingerprint spectrum was calculated with the traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint spectrum similarity evaluation system, along with cluster analysis of the fingerprint spectrum. **Results** The extraction rates of the 15 batches of Pimpinellae anisi fructus standard decoctions ranged from 13.72% to 22.26%, with an average of 19.24%; the transfer rates of isoorientin ranged from 37.96% to 62.47%, with an average of 50.58%. HPLC fingerprint identified 7 common peaks, 5 of which were characterized, namely chlorogenic acid, isoimperatorin, isovitexin, luteolin, and apigenin. The similarity of the fingerprint spectra of the 15 batches of Pimpinellae anisi fructus piece standard decoctions was all greater than 0.95, and cluster analysis categorized the 15 samples into 4 classes. **Conclusion** The study has established an HPLC content measurement and fingerprint spectrum analysis method for Pimpinellae anisi fructus piece standard decoctions, providing a basis for the quality standard of Pimpinellae anisi fructus formula granules.

Key words: Pimpinellae anisi fructus piece; standard decoction; quality standard; cluster analysis

基金项目: 新疆地产药材配方颗粒研制及中试技术平台搭建 (No.2022LQ03020); 新疆维吾尔自治区“天山英才”-优秀工程师培养计划项目。
作者简介: 王贺伟, 男, 硕士研究生, 主要从事工业药学研究, email: 203978519@qq.com ***通信作者:** 田芳, 女, 副高级工程师, 主要从事中药配方颗粒工艺及质量标准研究, email: tian_fang@renfu.com.cn

在中药的悠久历史中，汤剂一直是临床上的主要应用形式，其独特的疗效和安全性得到了广泛的认可和应用。2016 年 8 月，国家药典委员会发布《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求（征求意见稿）》，预示着中药配方颗粒质量控制的新模式或将开启，新标准中应用了特征图谱质量控制技术，强化了中药配方颗粒的整体质量控制水平，尤其是标准制订过程中引入了“标准汤剂”的概念，不仅使中药配方颗粒制备工艺的合理性和质量控制有了衡量的依据，更是推动了中药质量控制模式的创新和发展^[1-2]。

茵芋果为伞形科植物茵芋 *Pimpinella anisum* L. 的干燥成熟果实，具消散寒气，促进机体自然随和，利尿通经，润肠止痛之功效^[3]。茵芋果药用价值得到了医学文献的肯定，如《保健药园》中记载其具有祛寒止痛，平咳止喘等功效；《注医典》描述其能够通阻止痛、除晕等^[4-5]。现代科学研究进一步揭示了茵芋果的化学成分，发现其富有黄酮、黄酮糖苷以及酚酸类等生物活性成分^[5-6]。在这些化合物中，异荭草苷作为茵芋果中的一种特殊黄酮糖苷类成分^[6]，具有保护神经^[7]、抗炎^[8-10]和抗病毒^[11]等功效，这些作用与茵芋果的传统功能主治密切相关。为了更好地评价茵芋果配方颗粒的质量，本研究选择产地地道产区新疆、甘肃的 15 批茵芋果药材经炮制后制成标准汤剂，参照技术要求^[12]，对茵芋果饮片标准汤剂的主要质量指标进行研究，以期为茵芋果配方颗粒标准的制定提供依据^[13]。

1 仪器与试剂

Water e2695 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；AL204 万分之一电子天平、MS205DU 十万分之一电子天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]；STX-1202ZH 百分之一电子天平 [奥豪斯仪器（常州）有限公司]；HWS-26 电热恒温水

浴锅（上海齐欣科学仪器有限公司）。

对照品绿原酸（批号：110753-202119，含量：96.3%）、异荭草苷（批号：111974-201401，含量：94.0%）、木犀草素（批号：111520-202107，含量：96.3%）、芹菜素（批号：111901-202205，含量：98.4%）、异牡荆素（批号：250215-202308，含量：98.0%）（中国食品药品检定研究院）。液相所用乙腈、甲醇、磷酸、冰乙酸均为色谱纯，其他试剂为分析纯。15 批茵芋果药材来源于不同产地（见表 1），经新疆维吾尔药业有限责任公司研发中心检定合格，符合茵芋果国家药品标准。按 2015 年版《新疆维吾尔自治区中药维吾尔药饮片炮制规范》“茵芋果”项下方法炮制，制成茵芋果饮片：筛去灰土，除去杂质。

2 方法与结果

2.1 标准汤剂的制备

根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》和《医疗机构中药煎室管理规范》，确定茵芋果饮片标准汤剂的制备工艺为：取茵芋果饮片 100 g，破碎，加入纯化水（饮片 - 纯化水 = 1 : 7, g/mL）浸泡 60 min，大火煎煮至沸腾后保持微沸煎煮 30 min，用 200 目标准筛趁热过滤；药渣加入纯化水 [饮片 - 纯化水 = 1 : 6, g/mL]，大火煮沸后保持微沸煎煮 20 min，合并两次滤液，于旋转蒸发仪上低温浓缩（≤ 60 °C，- 0.08 MPa）至 100 mL，冷冻干燥（- 20 °C 预冻 12 h，干燥 36 h），即得茵芋果饮片标准汤剂粉末。

2.2 出膏率测定

以冻干粉计，计算茵芋果饮片标准汤剂出膏率，见表 1。15 批茵芋果饮片标准汤剂出膏率为 13.72% ~ 22.26%，均值为 19.24%，标准偏差（SD）为 3.29%，根据《技术要求》^[12] 计算均值 ± 3SD（或均值的 70% ~ 130%）为出膏率允许范围，结果出膏率范围为 9.37% ~ 29.11% 或 13.47% ~ 25.01%。

表 1 15 批茵芋果产地信息和标准汤剂出膏率测定结果

Tab 1 Origin information and standard decoction extract rate of 15 batches of *Pimpinella anisum* fructus

编号	产地	出膏率 / %	编号	产地	出膏率 / %	编号	产地	出膏率 / %
HQ01	甘肃酒泉	15.66	HQ06	新疆喀什	21.96	HQ11	新疆和田	22.26
HQ02	甘肃酒泉	14.80	HQ07	新疆喀什	21.20	HQ12	新疆喀什	22.10
HQ03	甘肃酒泉	15.54	HQ08	新疆喀什	22.16	HQ13	新疆喀什	20.90
HQ04	甘肃酒泉	14.64	HQ09	新疆和田	21.47	HQ14	新疆喀什	21.72
HQ05	甘肃酒泉	13.72	HQ10	新疆和田	20.03	HQ15	新疆喀什	20.48

2.3 异荭草苷含量测定

2.3.1 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX-Eclipse-Plus-C18 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；以甲醇为流动相 A，以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B，

按表 2 条件梯度洗脱；检测波长 347 nm；流速 1.0 mL · min⁻¹；柱温 35 °C。在此条件下，对照品和供试品色谱图见图 1。

2.3.2 对照品溶液的制备 取异荭草苷适量，置于

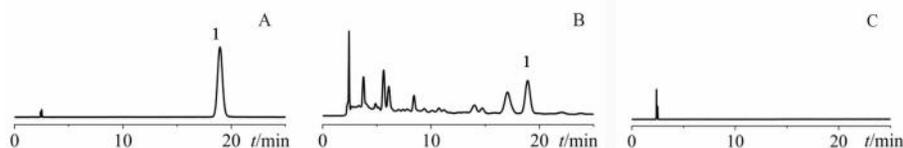


图 1 异荭草苷色谱峰

Fig 1 Chromatographic peak of isoorientin

A. 对照品 (reference standard); B. 茵芋果饮片标准汤剂 (Pimpinellae anisi fructus piece standard decoction); 1. 异荭草苷 (isoorientin)

50 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇制成 1 mL 含 128.216 μg 的溶液, 摇匀, 即得。

表 2 梯度洗脱程序
Tab 2 Gradient elution

时间 /min	甲醇 /%	0.1% 磷酸 /%
0 → 36	28	72
36 → 45	28 → 37	72 → 63
45 → 48	37 → 90	63 → 10
48 → 51	90	10
51 → 55	90 → 28	10 → 72
55 → 60	28	72

2.3.3 供试品溶液的制备 取茵芋果饮片标准汤剂冻干粉 (编号 HQ01) 适量, 研细, 精密称定 0.5 g, 置于 150 mL 锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 20 mL, 称重, 超声 15 min, 室温放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足失去的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 (128.216 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.25、0.5、1、2、4、10 mL, 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 有机滤膜过滤。分别吸取 10 μL , 按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 异荭草苷对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得回归方程: $Y = 0.4947X - 0.2881$ ($R^2 = 0.9999$), 结果表明, 异荭草苷对照品质量浓度在 3.2054 ~ 128.216 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 吸取“2.3.2”项下对照品溶液适量, 稀释至 25.6432 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 采用有机微孔滤膜过滤, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得异荭草苷峰面积的 RSD 值为 0.48% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 使用有机微孔滤膜过滤后, 按照“2.3.1”项下色谱条件分别于 0、4、9、14、24、31、38、48 h 进样测定。结果显示异荭草苷峰面积的 RSD 值为 0.60% ($n = 8$) ($RSD < 2\%$), 表明供试品溶液在 48 h 内具有良好的稳定性。

2.3.7 重复性试验 取同一批茵芋果饮片标准汤剂冻干粉 (编号 HQ01), 按照“2.3.3”项下方法制

备 6 份供试品溶液, 根据“2.3.1”项下色谱条件, 测得异荭草苷含量的 RSD 值为 0.97% ($n = 6$) ($RSD < 4\%$), 表明重复性良好。

2.3.8 加样回收试验 取 9 份已知异荭草苷含量的样品 (编号 HQ01), 置于 150 mL 锥形瓶中, 按照 50%、100%、150% 将对应的异荭草苷对照品溶液加入, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件, 测定峰面积, 并计算加样回收率。供试品溶液中异荭草苷的 50% 加样量的平均回收率为 103.24%, RSD 为 2.0%; 100% 加样量的平均回收率为 97.77%, RSD 为 0.23%; 150% 加样量的平均回收率为 94.46%, RSD 为 1.3%。

2.3.9 样品含量测定 按“2.3.3”项下方法, 制备 15 批茵芋果饮片标准汤剂供试品溶液, 以“2.3.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积, 计算茵芋果饮片标准汤剂异荭草苷的含量。15 批茵芋果饮片标准汤剂异荭草苷含量为 0.0931% ~ 0.1779%。异荭草苷转移率为 37.96% ~ 62.47%, 转移率的差异可能与药材的破碎程度有关^[14]。药材经破碎后, 其表面积的增加可能促进了有效成分的释放、更充分地与溶剂接触进而可能提升溶解和转移的效率。见表 3。转移率平均值为 50.85%, SD 为 7.02%, 根据《技术要求》^[12] 计算 $\bar{x} \pm 3SD$ (或均值的 70% ~ 130%) 为转移率允许范围, 结果转移率范围为 29.52% ~ 71.64% 或 35.41% ~ 65.75%。

2.4 指纹图谱建立

2.4.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱; 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.05% 冰乙酸, 梯度洗脱程序见表 4, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 10 μL ; 检测波长为 350 nm。

2.4.2 混合对照品溶液的制备 分别取绿原酸、异荭草苷、异牡荆素、木犀草素、芹菜素对照品适量, 精密称定, 加 70% 甲醇制成每 1 mL 各含 30 μg 的混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称定标准汤剂冻干粉 1 g, 置于 150 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 甲醇, 称定重量, 超声提取 45 min, 用甲醇补重,

表 3 15 批茵芋果饮片标准汤剂异荭草苷含量与转移率测定结果 (%)
Tab 3 Content of isoorientin content and transfer rate for 15 batches of Pimpinellae anisi fructus piece standard decoctions (%)

编号	异荭草苷含量 /%		转移率 /%
	饮片	标准汤剂	
HQ01	0.0292	0.0931	49.91
HQ02	0.0379	0.1188	46.34
HQ03	0.0377	0.1007	39.18
HQ04	0.0491	0.1315	37.96
HQ05	0.0488	0.1350	41.54
HQ06	0.0632	0.1624	56.42
HQ07	0.0673	0.1779	56.04
HQ08	0.0626	0.1765	62.47
HQ09	0.0710	0.1758	53.16
HQ10	0.0718	0.1637	45.69
HQ11	0.0698	0.1712	54.58
HQ12	0.0699	0.1664	52.59
HQ13	0.0625	0.1660	55.46
HQ14	0.0653	0.1585	52.76
HQ15	0.0600	0.1602	54.63
均值	0.0577	0.1505	50.58
SD	0.0138	0.0278	7.02
均值 ± 3SD	0.0163 ~ 0.0991	0.0670 ~ 0.2340	29.52 ~ 71.64
70% ~ 130% 均值	0.4039 ~ 0.7501	0.1054 ~ 0.1957	35.41 ~ 65.75

表 4 梯度洗脱程序
Tab 4 Gradient elution sequence

时间 /min	A/%	B/%
0 → 10	13	87
10 → 25	13 → 16	87 → 84
25 → 30	16 → 21	84 → 79
30 → 35	21	79
35 → 37	21 → 25	79 → 75
37 → 42	25 → 40	75 → 60
42 → 47	40 → 65	60 → 35
47 → 50	65 → 90	35 → 10
50 → 55	90 → 13	10 → 87
55 → 60	13	87

过滤，取续滤液，即得。

2.4.4 精密度试验 取同一批茵芋果饮片标准汤剂冻干粉 (编号 HQ01)，按“2.4.1”项下色谱条件重复测定 6 次，以异荭草苷色谱峰为参照峰 S，计算得各指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 为 0.03% ~ 0.11%，相对峰面积 RSD 为 0.36% ~ 1.3%，表明仪器精密度良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批茵芋果饮片标准汤剂冻干粉 (编号 HQ01)，约 1 g，精密称定，平行 6 份，按“2.4.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样测定，以异荭草苷色谱峰为参照峰 S，计算得各指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 为 0.01% ~ 0.16%，相对峰面积 RSD 为 0.48% ~ 1.5%，表明该方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验 取“2.4.5”项下供试品溶液，

按“2.4.1”项下色谱条件，分别于 0、4、9、19、28、40、48 h 进样测定，以异荭草苷色谱峰为参照峰 S，计算得各指纹峰与 S 峰的相对保留时间为 0.01% ~ 0.44%，相对峰面积为 0.30% ~ 1.9%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.7 指纹图谱建立与分析 按“2.4.3”项下方法制备 15 批茵芋果饮片标准汤剂供试品，按“2.4.1”项下色谱条件，分别进样，记录色谱图。利用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)，以 HQ01 指纹图谱为参照图谱，进行共有峰标识，共标定 7 个共有指纹峰，通过对照品指认出 5 个峰，1、3、5、6、7 号峰分别为绿原酸、异荭草苷、异牡荆苷、木犀草素、芹菜素。并进行多点保留时间校正和峰匹配，生成茵芋果饮片标准汤剂对照指纹图谱 (见图 2)。15 批茵芋果饮片标准汤剂的指纹图谱与对照图谱的相似度为 0.957 ~ 0.998 (见表 5)，表明 15 批样品均有较高的相似性。

表 5 15 批茵芋果饮片标准汤剂相似度评价

Tab 5 Similarity evaluation for 15 batches of Pimpinellae anisi fructus piece standard decoctions

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
HQ01	0.957	HQ06	0.997	HQ11	0.998
HQ02	0.961	HQ07	0.997	HQ12	0.998
HQ03	0.975	HQ08	0.997	HQ13	0.998
HQ04	0.971	HQ09	0.997	HQ14	0.995
HQ05	0.998	HQ10	0.997	HQ15	0.971

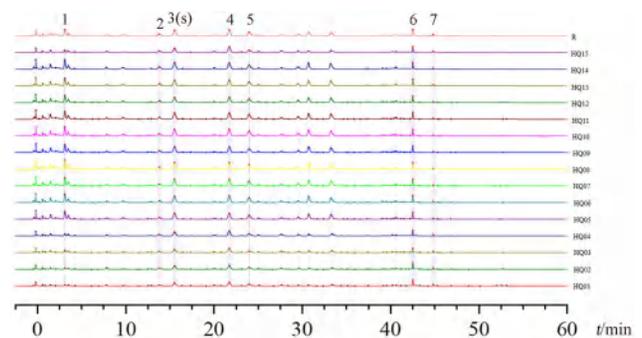


图 2 15 批茵芋果饮片标准汤剂指纹图谱

Fig 2 Fingerprint chromatogram for 15 batches of Pimpinellae anisi fructus piece standard decoctions

1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 3. 异荭草苷 (isoorientin); 5. 异牡荆素 (isovitexin); 6. 木犀草素 (luteolin); 7. 芹菜素 (apigenin)

2.4.8 聚类分析 将 15 批茵芋果饮片标准汤剂特征图谱中经标准化后的 7 个特征峰的峰面积导入 SPSS 26.0 软件进行聚类分析，见图 3。结果发现当刻度距离为 15 时，可分为两大类，标准汤剂 HQ6 ~ HQ15 聚为一类，标准汤剂 HQ1 ~ HQ5 聚为一类；当刻度距离为 7 时，可分为四大类，标准

汤剂 HQ1 ~ HQ3 聚为一类, 标准汤剂 HQ4、HQ5 聚为一类, 标准汤剂 HQ6、HQ10、HQ13、HQ14 聚为一类、标准汤剂 HQ7 ~ HQ9、HQ11、HQ12、HQ15 聚为一类, 说明相近地区的茵芋果饮片成分和品质较为一致^[15-16]。

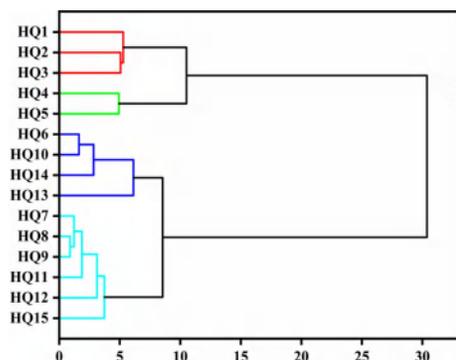


图 3 15 批茵芋果饮片标准汤剂指纹图谱聚类分析
Fig 3 Cluster analysis of fingerprint spectra for 15 batches of Pimpinellae anisi fructus piece standard decoctions

3 讨论

在 2023 年国家新修订的药材标准中, 尚未将高效液相色谱法应用于茵芋果的质量标准化。然而, 异荛草苷作为茵芋果中的关键药效成分, 其药理作用与茵芋果的传统功能主治紧密相关, 并且能够在汤剂中得到有效保留。鉴于此, 本文选择异荛草苷作为茵芋果饮片标准汤剂的质量控制指标。中药饮片标准汤剂不具有饮片的传统性状特征, 仅以单一指标成分进行定性定量分析难以评价质量优劣, 故需要建立指纹图谱或特征图谱进行汤剂的质量控制。本研究以冻干粉计算茵芋果饮片标准汤剂出膏率, 可为配方颗粒生产提供出膏率范围。通过测定茵芋果饮片标准汤剂中异荛草苷的含量, 计算转移率并确定其含量范围, 可为配方颗粒含量测定指标的选择和限度提供依据, 同时也为配方颗粒大生产工艺参数提供依据。

茵芋果饮片标准汤剂的指纹图谱共 7 个共有峰, 通过指认确定 5 种成分, 均为茵芋果的主要有效成分, 对 7 个共有峰进行聚类分析, 发现不同产地之间成分品质差异较大, 但相同产地来源成分品质差异较小, 本研究建立的指纹图谱为配方颗粒指纹图谱的建立提供依据和质量控制提供依据, 保证茵芋果配方颗粒的临床有效性。

参考文献

- [1] 张清波, 笔雪艳, 曲范娜. 中药配方颗粒质量控制概况与思考[J]. 中国食品药品监管, 2022 (3): 42-46.
- [2] 吴用彦, 李青蔚, 李红亮. 中药配方颗粒的研究现状及存在问题的思考[J]. 中南药学, 2019, 17 (1): 78-83.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 《中华人民共和国卫生部药品质量标准(维吾尔药分册)》[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1998.
- [4] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草维吾尔药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 291-293.
- [5] 刘永民. 维吾尔药志(上册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 491-422.
- [6] Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, et al. Antioxidant potential of two Apiaceae plant extracts: a comparative study focused on the phenolic composition[J]. Ind Crops Prod, 2016, 79: 188-194.
- [7] 赵一静, 李银桂, 赵忠正, 等. 异荛草苷调节小胶质细胞活化抑制内毒素血症小鼠神经炎症的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (10): 1452-1458.
- [8] 杨兰珠, 王勇, 杨靖亚. 异荛草苷对葡聚糖硫酸钠诱导溃疡性结肠炎小鼠的治疗作用及其机制[J]. 中国新药杂志, 2024, 33 (7): 688-695.
- [9] 杨靖亚杨兰珠李诗怡孙雨伟王勇. 异荛草苷通过 MAPK/FoxO 信号通路减轻 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应[J]. 安徽农业大学学报, 2024, 51 (1): 132-137.
- [10] Zhang L, Zhu X, Badamjav R, et al. Isoorientin protects lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via modulating Keap1/Nrf2-HO-1 and NLRP3 inflammasome pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 917: 174748.
- [11] 夏超, 朱秀珍, 申文伟, 等. 异荛草苷抗呼吸合胞病毒的活性研究[A]// 中国化学会第十届全国天然有机化学学术会议[C]. 广州: 2014.
- [12] 国家食品药品监督管理局. 中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求[EB/OL]. (2021-01-26) [2023-12-10]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtggtg/20210210145453181.html>.
- [13] 王龙, 高鑫, 闫信豪, 等. 中药配方颗粒研发生产中若干关键问题研究进展[J]. 中南药学, 2022, 20 (9): 2008-2014.
- [14] 林杰, 梁德勤, 罗云, 等. 白芍饮片厚度对其损耗及标准汤剂转移率和出膏率的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39 (1): 74-78.
- [15] 吴学文, 熊艳, 杜方麓. 聚类分析在中药材分类学中的应用[J]. 中南药学, 2003, 1 (4): 232-234.
- [16] 张萍, 罗敏, 胡克特, 等. 西南鬼灯檠 UPLC-ECD 指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[J]. 中南药学, 2021, 19 (1): 62-66.

(收稿日期: 2024-07-26; 修回日期: 2024-10-12)

高效液相色谱 - 高分辨质谱法测定盐酸替罗非班中偶氮类遗传毒性杂质

张申奥^{1, 2}, 左呈露³, 胡林^{2, 3*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230013; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 江苏慧聚药业股份有限公司, 江苏 南通 226123)

摘要: **目的** 采用高效液相色谱 - 高分辨质谱 (HPLC-HRMS) 法测定盐酸替罗非班中偶氮二甲酸二乙酯的含量。**方法** 在一定浓度的水合肼溶液中, 偶氮二甲酸二乙酯与水合肼反应合成 1, 2- 胍二羧酸二乙酯, 采用 Phenomenex Luna C18 (2) 100Å (2 mm×50 mm, 3 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) -0.1% 的甲酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 40℃, 进样体积 2 μL, 离子源为电喷雾离子源 (ESI), 采用正离子模式下单离子监测模式 (SIM) 监测。**结果** 衍生后的偶氮二甲酸二乙酯在 198.0396 ~ 1485.2970 ng·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.9980$); 定量限为 9.7058 ng·mL⁻¹, 检测限为 1.9412 ng·mL⁻¹; 低、中、高浓度的加样回收率均在 95.5% ~ 106.8%, $RSD \leq 3.6\%$ 。6 批盐酸替罗非班原料药中均未检出偶氮二甲酸二乙酯。**结论** 所建立的方法操作简单, 灵敏度高, 测试结果准确, 可用于盐酸替罗非班中偶氮二甲酸二乙酯总残留量的检测。

关键词: 盐酸替罗非班; 高效液相色谱 - 高分辨质谱法; Mitsunobu 反应; 偶氮二甲酸二乙酯; 柱前衍生; 遗传毒性杂质

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0730-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.023

Determination of azo genotoxic impurities in tirofiban hydrochloride by high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry

ZHANG Shen-ao^{1, 2}, ZUO Cheng-lu³, HU Lin^{2, 3*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230013; 2. Yangtze Delta Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 3. Wisdom Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226123)

Abstract: Objective To determine diethyl azodicarboxylate in tirofiban hydrochloride by high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS). **Methods** Diethyl 1, 2-hydrazinedicarboxylate was synthesized in a specific concentration of hydrazine hydrate solution, and diethyl azodicarboxylate reacted with hydrazine hydrate. The derivatization-HPLC-HRMS was equipped with a Phenomenex Luna C18 (2) 100Å column (2 mm×50 mm, 3 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile (A)-0.1% formic acid solution (B) with gradient elution at 0.8 mL·min⁻¹. The column temperature was 40℃, and injection volume was 2 μL. Electrospray ionization (ESI) was used to detect the positive ions by single ion monitor (SIM). **Results** The derived genotoxic impurity had a good linearity at 198.0396 ~ 1485.2970 ng·mL⁻¹ ($r = 0.9980$). The limit of quantitative was 9.7058 ng·mL⁻¹ and the limit of detection was 1.9412 ng·mL⁻¹. The recovery of low, medium and high concentrations ranged 95.5% ~ 106.8%, with $RSD \leq 3.6\%$. Diethyl azodicarboxylate was not detected in the 6 batches of tirofiban hydrochloride bulk drug samples. **Conclusion** The method is easily operable, with high sensitivity and accuracy. It can be

作者简介: 张申奥, 男, 硕士研究生, 主要从事药物分析方面的研究, email: zhangshenao032@163.com *通信作者: 胡林, 男, 高级工程师, 主要从事化药的研发及产业化方面的研究, email: l_hu@wisdompharma.com

used to detect of diethyl azodicarboxylate in tirofiban hydrochloride.

Key words: tirofiban hydrochloride; HPLC-HRMS; Mitsunobu reaction; diethyl azodicarboxylate; pre-column derivatization; genotoxic impurity

盐酸替罗非班是一种非肽类血小板表面糖蛋白 II b/III a (GP II b/III a) 受体拮抗剂, 化学名为 *N*-(正丁基磺酰基)-*O*-[4-(4-哌啶基)丁基]-*L*-酪氨酸盐酸盐水合物, 其化学结构式如图 1A 所示。作为一种人工合成的非肽酪氨酸衍生物, 盐酸替罗非班主要通过静脉注射给药^[1], 通过阻止血小板聚集过程的最后共同通路, 可逆性抑制纤维蛋白原与 GP II b/III a 受体结合, 从而阻断血小板聚集和血栓形成^[2], 临床上常与肝素、阿司匹林联用, 用于治疗急性冠脉综合征^[3-4]。相较于其他药物, 盐酸替罗非班选择性和特异性高, 半衰期较短, 无抗原性(不会引发免疫反应), 安全性较好^[5-6]。

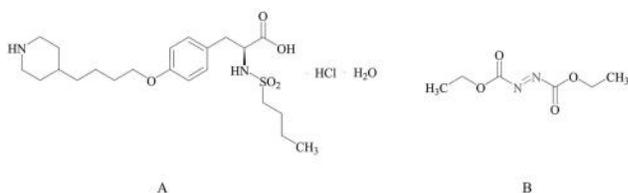


图 1 盐酸替罗非班 (A) 和偶氮二甲酸二乙酯 (B) 的结构式
Fig 1 Chemical structural formula of tirofiban hydrochloride (A), diethyl azodicarboxylate (B)

遗传毒性是指遗传物质中任何有害变化引起的毒性, 而不考虑诱发该变化的机制, 又称为基因毒性。遗传毒性杂质 (GTIs) 是指能引起遗传毒性的杂质, 包括致突变性杂质和其他类型的无致突变性杂质。GTIs 主要来源于原料药或制剂的生产过程, 如起始原料、反应物、催化剂、试剂、溶剂、中间体、副产物、降解产物等^[7]。本研究中所涉及的盐酸替罗非班原料药的合成路径见图 2。

该合成方法步骤 1 为 Mitsunobu 反应, 以偶氮二甲酸二乙酯 (DEAD) 为反应试剂, DEAD 是一种脂肪族偶氮化合物, 含有典型的遗传毒性警示结构^[8], 需要在原料药中严格控制 (见图 1B)。

截至目前, 对于 DEAD 尚无致畸性报道, 但通常具有此类警示结构的化合物经呼吸道、消化道或皮肤进入体内后, 可对人体造成中枢神经系统病变、中枢性呼吸抑制等不同程度的损害, 按照人用药品注册技术国际协调会议 (ICH) M7 分类原则, 应归属为 3 类遗传毒性杂质^[9]。根据 ICH M7 指南控制策略, 其毒理学关注阈值

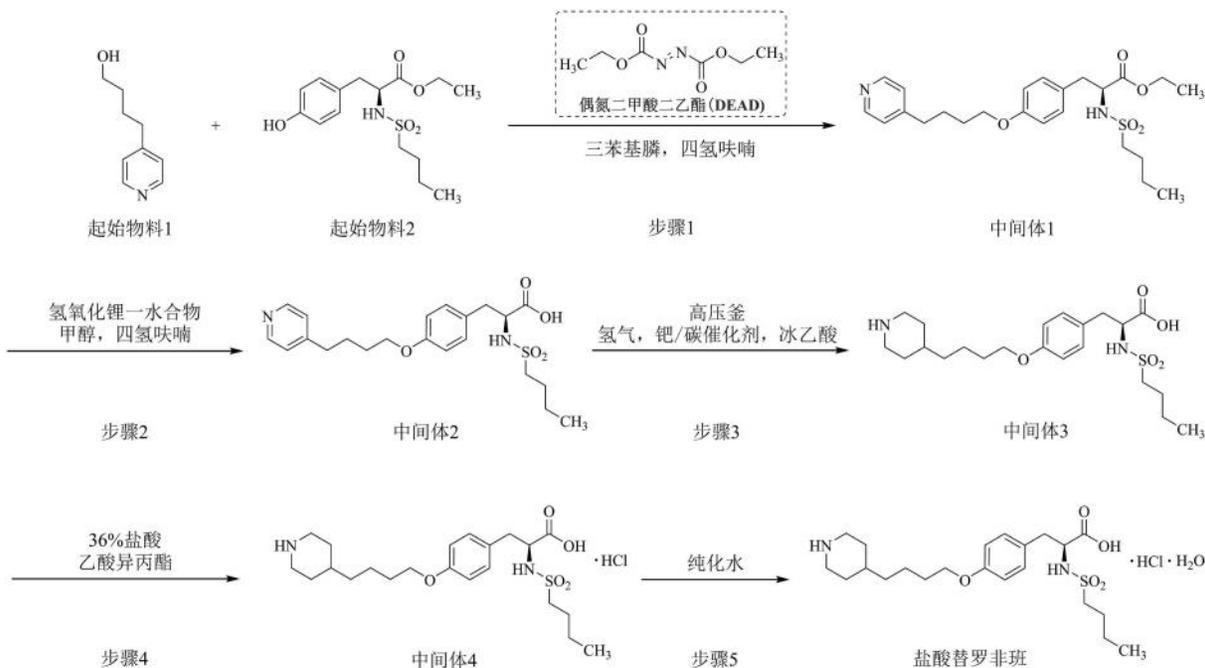


图 2 盐酸替罗非班的合成路径
Fig 2 Synthetic path of tirofiban hydrochloride

(TTC) 为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$, 在盐酸替罗非班日最大给药剂量为 20mg 的情况下, DEAD 的残留限度

不得超过 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

迄今为止, 尚未有对盐酸替罗非班中 DEAD

进行检测控制的文献报道, 由于 DEAD 的紫外吸收弱, 在产品中的控制限度要求高, 常规方法的检测灵敏度往往达不到要求; 并且 DEAD 的稳定性差, 对热、光、振动等敏感^[10], 在样品处理或检测过程中可能部分分解而导致错误的检测结果。因此, 将 DEAD 转化为稳定的 1, 2- 胍二羧酸二乙酯, 再采用 HPLC-HRMS 技术检测, 所建立的方法灵敏度高、专属性强, 可快速对盐酸替罗非班原料药中的 DEAD 遗传毒性杂质总残留量进行监控, 以保障患者的用药安全。

1 材料

1.1 仪器

SHIMADZU LC-20AT 型液相色谱仪 (日本 SHIMADZU 公司); AB Sciex Triple TOF 5600⁺ 飞行时间质谱 (配备 ESI 离子源, Analyst TF 1.7.1 数据采集软件, 美国 AB SCIEX 公司); Mettler XS-205DU 型电子天平 (十万分之一, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司); LIEBHERR LCexv 4010 型冰箱 (德国 LIEBHERR 公司)。

1.2 试剂

乙腈 (分析纯, 上海星可高纯溶剂有限公司); 乙腈 (质谱纯, Avantor J.T. Baker); 甲酸 (质谱纯, Thermo Fisher Scientific); 实验用水为默克 Milli-Q Advantage A10 超纯水系统制备。衍生用试剂水合胍 (批号: 20230517, 纯度: 86.5%, 国药集团化学试剂有限公司); DEAD 对照品 (批号: D2109136, 纯度: 97%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 1, 2- 胍二羧酸二乙酯对照品 (批号: STBK1570, 纯度: 96.5%, Merck Sigma-Aldrich); 盐酸替罗非班对照品 (批号: TRFB-LBJ-5106-029, 纯度: 100.0%, 江苏慧聚药业股份有限公司); 盐酸替罗非班原料药 (批次: PTRFB170301A, 纯度: 99.9%; 批次: PTRFB170302A, 纯度: 100.0%; 批次: PTRFB170303A, 纯度: 98.8%; 批次: PTRFB-A230501A, 纯度: 100.0%; 批次: PTRFB-A230502A, 纯度: 100.0%; 批次: PTRFB-A230601A, 纯度: 100.0%; 江苏慧聚药业股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 仪器工作条件

2.1.1 色谱条件 采用 Phenomenex Luna C18 (2) 100Å (2 mm×50 mm, 3 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) -0.1% 的甲酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0.0 ~ 9.0 min, 5% → 95%A; 9.0 ~ 9.1 min,

95% → 5%A; 9.1 ~ 12.0 min, 5%A), 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样体积为 2 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 在正离子模式下进行检测, 检测方式为单离子监测模式 (SIM)。离子源电压: 5.5 kV; ESI 温度: 500 °C; 干燥气流速: 50 mL·min⁻¹; 锥孔气流速: 20 mL·min⁻¹; 碰撞能量: 5.0 eV; 质谱扫描范围 *m/z*: 176.9 ~ 177.3, 质谱扫描时间为 0.0 ~ 2.8 min、4.0 ~ 12.0 min; 鞘气、辅助气均为氮气。

2.2 溶液的配制与处理

2.2.1 衍生剂 移取 1 mL 水合胍至 50 mL 量瓶中, 以纯化水溶解并定容至刻度, 摇匀, 冷藏备用。

2.2.2 DEAD 对照品储备液 取约 100 mg DEAD 对照品 (避光冷藏, 避免剧烈振动), 精密称定, 置 100 mL 棕色量瓶中, 以稀释剂 (80% 乙腈水溶液) 稀释并定容至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 1000 μg·mL⁻¹ 的 DEAD 对照品储备液。

2.2.3 DEAD 对照品溶液 移取质量浓度为 1000 μg·mL⁻¹ 的 DEAD 对照品储备液适量, 以稀释剂稀释, 制成质量浓度为 1000 ng·mL⁻¹ 的 DEAD 对照品溶液。

2.2.4 样品溶液 取约 20 mg 盐酸替罗非班, 精密称定, 置 20 mL 棕色量瓶中, 以稀释剂稀释并定容至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 1000 μg·mL⁻¹ 的样品溶液。

2.2.5 待测溶液的处理与测定 取样品溶液 / DEAD 对照品溶液 1 mL 和衍生剂 200 μL 置进样小瓶中, 每隔 5 min 振摇一次, 持续 30 min, 进行衍生处理, 按“2.1”项下 HPLC-HRMS 条件进样分析, 记录色谱图峰面积, 以外标法计算样品中 DEAD 的含量。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别取空白溶剂 (稀释剂)、样品溶液、DEAD 对照品溶液在建立的衍生化 HPLC-HRMS 方法下进样测定。如图 3 所示, 在所建立的方法下, 盐酸替罗非班中 DEAD 峰形良好, 出峰时间位于 1.49 min, 空白溶剂、样品溶液对 DEAD 的检测无干扰。

2.3.2 线性关系考察 精密量取 DEAD 对照品储备液适量, 以稀释剂逐级稀释制成 DEAD 质量浓度分别为 200、500、800、1000、1200、1500 ng·mL⁻¹ 的系列标准工作溶液。按“2.1”项下方法进样测定, 以峰面积 (*Y*) 为纵坐标, 以 DEAD 的质量浓度 (*X*, ng·mL⁻¹) 为横坐标, 计算线性回归方程。结果表明, DEAD 在 198.0396 ~ 1485.2970

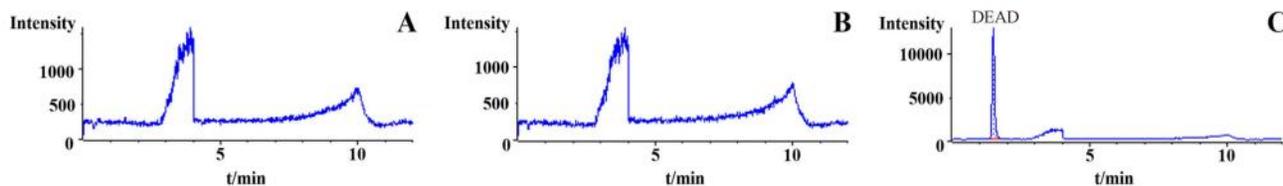


图3 空白溶剂(A)、样品溶液(B)、对照品溶液(C)的总离子流图

Fig 3 Total ion chromatogram of blank solvent (A), sample solution (B), and reference solution (C)

$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程为: $Y = 79.8164X + 2783.2935$, $r = 0.9980$ 。

2.3.3 检测限与定量限 取 DEAD 对照品溶液适量, 用稀释剂逐级稀释, 按“2.1”项下方法进样测定, 分别以信噪比 (S/N) 为 3:1、10:1 时的样品浓度作为检测限和定量限。结果显示该方法的检测限和定量限分别约为 $1.9412 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $9.7058 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表明该方法的灵敏度满足检测要求。

2.3.4 系统精密度试验 取 DEAD 对照品溶液, 按“2.1”项下方法进样测定, 连续进样 6 针, DEAD 经衍生后产物的峰面积和保留时间的 RSD 分别为 1.1% 和 0.50%, 表明仪器的精密度良好。

2.3.5 重复性试验 平行配制 6 份 20% 限度水平, 即 DEAD 质量浓度为 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的加标样品溶液, 考察方法的重复性, 结果显示, 6 份样品中 DEAD 含量的 RSD 为 1.9%, 表明方法的重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取室温保存 0、4、8、12 和 24 h 的样品溶液, 按“2.1”项下方法进样测定, 并配制 100% 限度水平, 即含有 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ DEAD 的加标样品溶液, 计算回收率的 RSD 。结果室温条件下样品溶液的加标回收率的 RSD 为 3.1%, 可见样品在室温条件下保存 24 h 稳定。

2.3.7 回收试验 取约 20 mg 的盐酸替罗非班原料药置 20 mL 棕色量瓶中, 移取 DEAD 对照品储备液适量, 以稀释剂稀释并定容至刻度, 制成低 (50% 限度浓度, $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中 (100% 限度浓度, $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高 (150% 限度浓度, $1500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 三种浓度的加标样品溶液, 各平行配制 3 份, 按“2.1”项下方法进样测定, 结果高、中、低浓度的加样回收率均在 95.5% ~ 106.8%, RSD 均 $\leq 3.6\%$, 表明该方法具有较好的回收率。

2.3.8 样品中 DEAD 的含量检测 取 6 批盐酸替罗非班原料药 (批次: PTRFB170301A、PTRFB170302A、PTRFB170303A、PTRFB-A230501A、PTRFB-A230502A、PTRFB-A230601A), 按“2.2.4”项下方法配制样品溶液并进行测定, 采用外标法计

算盐酸替罗非班中 DEAD 的总含量, 结果在 6 批盐酸替罗非班原料药中均未检出 DEAD。

3 讨论

3.1 衍生条件的选择与优化

有文献报道称, 在较为温和的条件下, 在乙醇、乙腈、氯仿等有机溶剂中, 胍和几种取代胍 (甲基胍、羟乙基胍和苯基胍) 以及胍苯的所有 N-H 键上的氢原子都能有效地传递给缺电子的二氮基^[11]。如图 4 所示, DEAD 可与一定浓度的水合胍水溶液发生还原反应, 最终生成 1, 2-胍二羧酸二乙酯; 故在“2.1”项 HPLC-HRMS 条件下, 可根据 DEAD 与水合胍衍生后产物 1, 2-胍二羧酸二乙酯的准分子离子 $[M + H]^+ = 177.08$ 来计算 DEAD 的总含量。

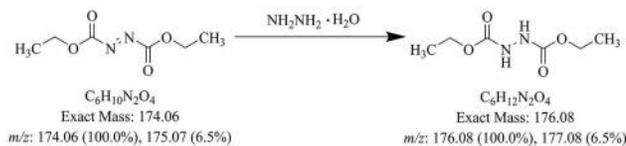


图4 衍生反应机制

Fig 4 Mechanism of derivation reaction

试验曾考察衍生反应时间对衍生率的影响: 移取 1 mL $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 1, 2-胍二羧酸二乙酯对照品溶液和 200 μL 的稀释剂置进样小瓶中, 同“2.2.3”项下 DEAD 对照品溶液经衍生处理后分别进样。结果表明, 衍生时间为 10、20、30、60、120 min 时, 衍生率分别为 54%、87%、93%、93%、93%, 故最终选择衍生反应时间为 30 min。

3.2 色谱及质谱条件的优化

DEAD 是盐酸替罗非班中潜在的遗传毒性杂质, 化学性质不稳定, 且紫外吸收弱, 很难利用常规的液相色谱对其进行痕量检测。本方法将 DEAD 衍生为稳定的 1, 2-胍二羧酸二乙酯进行检测, 很好地解决了这一问题。在日常分析中, 常利用离子色谱法、衍生化法对胍类化合物进行检测^[12-14], 而 GC/MS 法则被广泛应用于纺织行业和药学研究领域以测定偶氮类化合物^[15-18]。所以课题组首先采用了 GC/MS 法尝试对盐酸替罗非班中 DEAD 进行检测, 结果显示在 GC/MS 法

条件下, DEAD 表现为 1, 2- 胍二羧酸二乙酯的质谱响应 (见图 5), 说明 DEAD 在样品处理或检测过程中可能会部分转化为 1, 2- 胍二羧酸二乙酯。因此以 GC/MS 法检测 1, 2- 胍二羧酸二

乙酯的含量容易实现, 但检测 DEAD 的含量并不可靠。经综合评估, 最终决定选用衍生化-HPLC-HRMS 法检测 DEAD 在原料药中的总残留量, 并验证了方法的准确性。

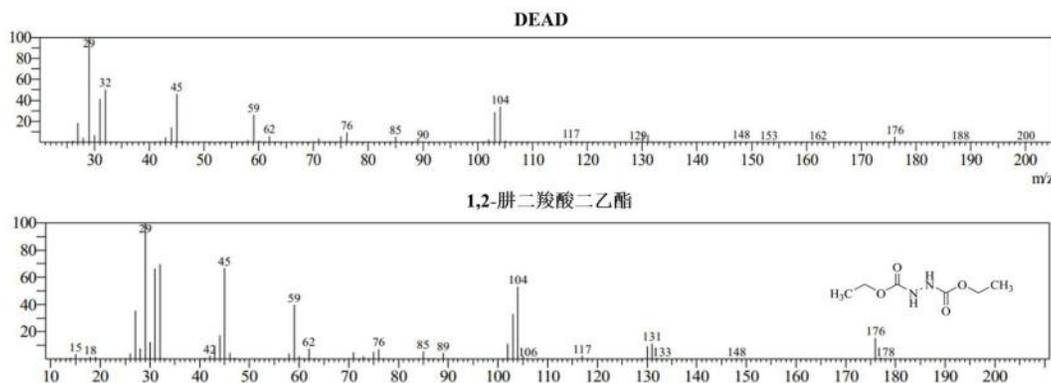


图 5 GC/MS 法检测 DEAD 的质谱图

Fig 5 Mass spectra of DEAD by GC/MS

此外, 试验中曾考察了不同进样体积 (1、2、5、20 μL) 对结果的影响。结果如图 6 所示, 随着进样

体积的增大, 峰形越来越差, 结合峰形、信噪比等多种因素, 最终确定进样体积为 2 μL 。

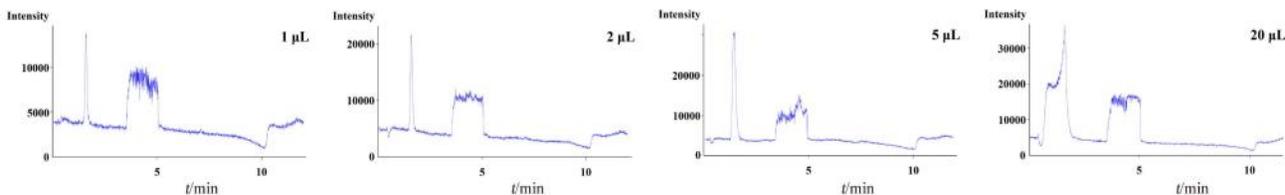


图 6 不同进样体积下 DEAD 的总离子流图

Fig 6 Total ion chromatogram of DEAD at different injection volumes

4 小结

DEAD 作为 Mitsunobu 反应中的必要试剂, 在药物合成工艺中广泛使用^[19], 作为一种 3 类遗传毒性杂质, 需要在原料药中严格控制其残留限度。但是, DEAD 在参与图 2 中步骤 1 反应后, 可能会转化为副产物 1, 2- 胍二羧酸二乙酯, 它与 DEAD 均属于 3 类遗传毒性杂质, 本方法虽然可以对其进行检测, 但仍有不足之处, 有待开发一种可以同时检测盐酸替罗非班中 DEAD 和 1, 2- 胍二羧酸二乙酯总含量的方法。

本文采用柱前衍生结合高分辨质谱, 建立了一种高效测定盐酸替罗非班中 DEAD 总残留量的外标法定量方法。通过方法优化和验证, 结果表明该方法可快速对 DEAD 总含量进行准确检测, 方法操作简便、灵敏度高、专属性强, 可为盐酸替罗非班的质量控制提供有力保障, 也可为其他药物中偶氮类遗传毒性杂质的检测提供重要参考。

参考文献

[1] 郑国民, 梁志刚, 张振. 替罗非班联合机械取栓治疗急

性缺血性卒中的研究进展 [J]. 中国卒中杂志, 2024, 19 (5): 573-578.
 [2] Wang J, Zou DN. Tirofiban-induced thrombocytopenia [J]. Ann Med, 2023, 55 (1): 2233425.
 [3] 中国卒中学会, 中国卒中学会神经介入分会, 中华预防医学会卒中预防与控制专业委员会介入学组. 替罗非班在动脉粥样硬化性脑血管疾病中的临床应用专家共识 [J]. 中国卒中杂志, 2019, 14 (10): 1034-1044.
 [4] Guo YZ, Zhao ZW, Li SM, et al. Clinical efficacy and safety of tirofiban combined with conventional dual antiplatelet therapy in ACS patients undergoing PCI [J]. Sci Rep, 2021, 11 (1): 17144.
 [5] 王秀春, 肖贺. 替罗非班在急性缺血性脑卒中的应用现状及研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2023, 39 (20): 3532-3536.
 [6] 张举昭, 曹骅, 张旭彤, 等. 替罗非班治疗缺血性脑卒中的研究进展 [J]. 吉林医学, 2024, 45 (4): 940-943.
 [7] 田冶, 陶晓莎, 冯媛媛, 等. 化学药品中的遗传毒性杂质的质量控制 [J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49 (1): 13-25.
 [8] 马磊, 马玉楠, 陈震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23 (18): 2106-2111.
 [9] ICH. M7 (R2): Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit

- Potential Carcinogenic Risk[EB/OL]. [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7_\(R2\)_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7_(R2)_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf). 2023-04-03/2024-08-15.
- [10] Yu Q, Liu SH, Guo ZR, et al. Thermal decomposition characteristics of diethyl azodicarboxylate dissolved in three ionic liquids as solvents [J]. *J Mol Liq*, 2020, 302: 112564.
- [11] Koppes WM, Moran JS, Oxley JC, et al. Azo bond hydrogenation with hydrazine, R-NHNH₂, and hydrazobenzene [J]. *Tetrahedron Lett*, 2008, 49 (20): 3234-3237.
- [12] 刘利霞, 侯春青, 曹同波, 等. 氟氟虫脞原药中水合肼的离子色谱分析 [J]. *农药*, 2023, 62 (12): 886-888, 900.
- [13] 刘爱赞, 袁永兵, 靳文仙, 等. 药物中胍类基因毒性杂质分析研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43 (2): 356-360.
- [14] 罗登台. 甲磺酸伊马替尼中甲基哌嗪和胍杂质的测定研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.
- [15] 郭常川, 文松松, 王维剑, 等. 气相色谱-质谱联用法测定奥美沙坦酯中的基因毒性杂质偶氮二异庚腈 [J]. *分析试验室*, 2024, 43 (12): 1679-1683.
- [16] 刘芬, 张维波, 沈佩佩, 等. GC-MS 法测定合成革中禁用偶氮染料的不确定度评定 [J]. *鞋类工艺与设计*, 2024, 4 (5): 9-11.
- [17] 杨光勇, 薛光, 郭金喜, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定中药材中 10 种偶氮染料 [J]. *质谱学报*, 2021, 42 (6): 1059-1067.
- [18] 牛明玉, 胡丽娜, 印嘉佳. GC-MS 测定富马酸卢帕他定中痕量杂质偶氮二异丁腈 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36 (4): 426-429.
- [19] Fletcher S. The Mitsunobu reaction in the 21st century [J]. *Org Chem Front*, 2015, 2 (6): 739-752.

(收稿日期: 2024-10-02; 修回日期: 2024-11-09)

HPLC 法测定氟比洛芬中有关物质的含量

张硕^{1,3}, 孙婷^{2*}, 赵云丽^{1*} (1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 3. 远大生命科学(辽宁)有限公司, 沈阳 110171)

摘要: 目的 建立氟比洛芬原料中有关物质的含量检测方法。方法 采用 phenomenex kinetex PFP F5 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水(磷酸调节 pH 2.0)(33:67, V/V) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35℃, 检测波长 254 nm。结果 在该色谱条件下, 氟比洛芬与相邻杂质及杂质之间分离良好, 分离度均大于 1.5。氟比洛芬及其有关物质 A、B、C、D、E、F、H、I、J、K 在各自线性范围内与峰面积线性良好, 各物质低、中、高浓度加样回收率在 98.5%~101.1%, RSD 为 0.40%~1.7%。测定 3 个批次氟比洛芬样品, 杂质 A 含量分别为 0.2%、0.2%、0.2%; 杂质 C 含量分别为 0.1%、0.1%、0.1%; 未知单杂分别为 0.03%、0.02%、0.03%; 除杂质 A 外, 其他杂质总和分别为 0.13%、0.12%、0.13%。结论 本方法专属性好、准确度高, 可有效检测氟比洛芬中的有关物质, 为其质量控制提供参考。

关键词: 氟比洛芬; 有关物质; HPLC 法

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0735-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.024

Determination of related substances in flurbiprofen by HPLC

ZHANG Shuo^{1,3}, SUN Ting^{2*}, ZHAO Yun-li^{1*} (1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 3. Yuanda Life Science (Liaoning) Co., Ltd., Shenyang 110171)

Abstract: Objective To establish a method to determine the related substances in flurbiprofen raw materials. **Methods** A phenomenex kinetex PFP F5 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used for

作者简介: 张硕, 女, 主管药师, 主要从事药品研发和质量研究, email: 172231187@qq.com *通信作者: 赵云丽, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药品质量控制与药代动力学、中药活性成分与药效物质基础研究, email: yunli76@163.com; 孙婷, 女, 主要从事药品质量控制及中药成分提取研究, email: 811189636@qq.com

gradient elution with acetonitrile and water (phosphoric acid regulating pH 2.0) (33 : 67, *V/V*) as the mobile phase A, and acetonitrile as the mobile phase B. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 254 nm. **Results** Under this chromatographic condition, the separation degree between flurbiprofen and impurities was greater than 1.5. The linearity of flurbiprofen and related substances A, B, C, D, E, F, H, I, J, and K was good within their linearity. The recoveries were at 98.5% ~ 101.1% with *RSD* of 0.40% ~ 1.7%. Three batches of flurbiprofen samples was determined. The contents of impurity A were 0.2%, 0.2% and 0.2%, respectively. The content of impurity C was 0.1%, 0.1%, 0.1%, respectively. The unknown miscellaneous is 0.03%, 0.02%, 0.03%. In addition to impurity A, the sum of other impurities was 0.13%, 0.12% and 0.13%, respectively. **Conclusion** The method has good specificity and high accuracy, which can effectively detect related substances in flurbiprofen and provide reference for its quality control.

Key words: flurbiprofen; related substance; HPLC

氟比洛芬化学名为 2-(2-氟-4-联苯基)-丙酸, 是英国布兹公司开发的一种非甾体抗炎药。临床用于治疗风湿性关节炎、骨关节炎及弯曲性脊椎炎等, 也可用于缓解软组织损伤和轻、中度疼痛。本品为同类型中作用较强且不良反应少的药物^[1-3]。

氟比洛芬以 4-溴-2-氟联苯和 2-溴丙酸乙酯为起始物料, 经过格氏反应^[4]、水解、酸化再重结晶, 精制获得, 工艺路线见图 1。目前, 各国药典主要采用高效液相色谱-不加校正因子的主成分自身对照法测定氟比洛芬的杂质 A ~ E, 但方法重现性不好, 且部分杂质分离度较差。根据合成路线和降解途径分析, 杂质 A、B、C、E 均为工艺杂质, 杂质 D 为降解杂质。此外尚可能存在未完全反应的起始物料(杂质 J)和中间体 1(杂质 K); 中间体 1 可能存在杂质 A, 且进一步水解生成杂质 F; 格氏试剂与氧气和水反应的产物分别为杂质 H 和杂质 I(见图 2)^[5-8]。结合 ICH

QbD“以终为始”的设计理念, 在研发初期, 应全面理解目标产品的质量概况, 如杂质(包括工艺杂质、遗传毒性杂质、元素杂质等), 在此基础上进行工艺开发优化和风险管理^[9-10]。因此, 本研究对色谱条件进行优化, 建立了 10 种杂质的检查方法。该方法不仅可用于工艺优化过程中的反应监测, 严格控制成品质量, 也可作为氟比洛芬的杂质研究提供参考^[11-12]。

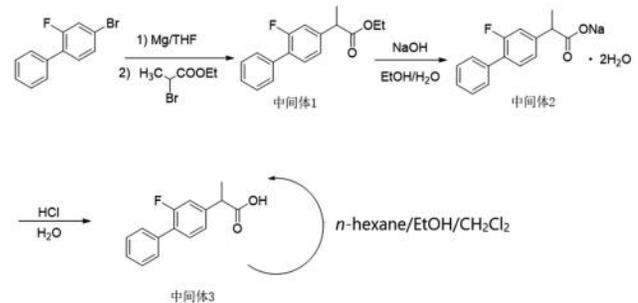


图 1 氟比洛芬原料制备工艺路线图

Fig 1 Preparation process of flurbiprofen raw material

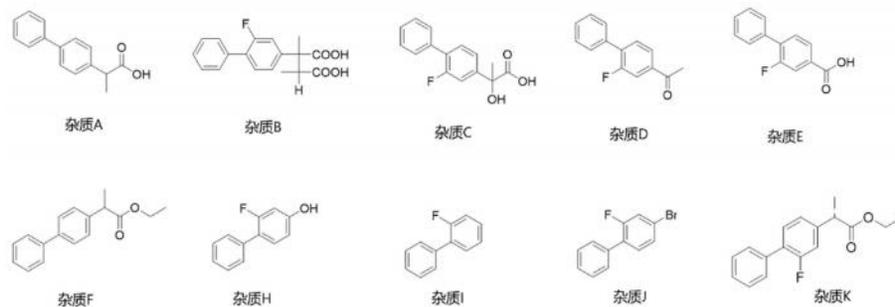


图 2 氟比洛芬中各杂质的化学结构式

Fig 2 Structure of impurities in flurbiprofen

1 仪器与试剂

LC-20A 型高效液相色谱仪(包括四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器, 日本岛津公司); 1260 型高效液相色谱仪(包括四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器, 美国安捷伦公

司); XS205DU 型电子天平(十万分之一)、S210 型 pH 计[梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司]。

杂质 A(批号: 1035-034A1, 纯度: 99.7%)、杂质 B(批号: 3684-028A4, 纯度: 99.6%)、杂质 C(批号: 2466-093A1, 纯度: 99.7%)、杂质 D(批

号: 3170-016A3, 纯度: 99.8%)、杂质 E (批号: 3053-044A2, 纯度: 99.8%)(加拿大 Toronto Research Chemicals 公司), 杂质 H (批号: U4O-6001009-03, 纯度: 99.9%, OST), 杂质 I (批号: F809514, 纯度: 98.0%, Macklin), 杂质 J (批号: 20211203, 纯度: 98.9%, 厦门丰禾源化工), 氟比洛芬对照品 (批号: 100725-202203, 纯度: 99.9%, 中国食品药品检定研究院), 乙腈 (美国 Fisher 公司)、氟比洛芬原料 (自制, 批号: 230408, 纯度: 99.6%)、杂质 F (批号: 20221225, 自制, 纯度: 98.1%)、杂质 K (批号: 20221016, 自制, 纯度: 98.7%), 磷酸、盐酸、氢氧化钠、30% 过氧化氢 (国药集团)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以 Phenomenex kinetex PFP F5 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以乙腈-水 (磷酸调节 pH 为 2.0)(33:67, V/V) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0~28 min, 100%A; 28~35 min, 100%~60%A; 35~50 min, 60%~40%A; 50~60 min, 40%~100%A; 60~65 min, 100%A), 检测波长为 254 nm, 柱温为 35 °C, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。

2.2 溶液制备

2.2.1 系统适用性溶液 取氟比洛芬对照品、杂质 A、B、C、D、E、F、H、I、J、K 对照品适量, 精密称定, 加乙腈-水 (45:55, V/V)(后文称为稀释液, 也作为空白溶剂) 溶解并稀释制成每 1 mL 中含氟比洛芬 1 mg 与杂质 A 5 μg、杂质 B~E 各 2 μg, 杂质 F 和杂质 K 各 1 μg, 杂质 H 10 μg, 杂质 I 2 μg, 杂质 J 10 μg 的溶液。

2.2.2 混合对照品储备液 分别取杂质 A、B、C、D、E、F、H、I、J、K 和氟比洛芬对照品适量, 精密称定, 加稀释液溶解并稀释成每 1 mL 含杂质 A 250 μg, 杂质 B 100 μg, 杂质 C 150 μg, 杂质 D 和杂质 E 各 100 μg, 杂质 F 50 μg, 杂质 H 500 μg, 杂质 I 100 μg, 杂质 J 500 μg, 杂质 K 和氟比洛芬各 50 μg 的混合溶液, 作为混合对照品储备液。

2.2.3 混合对照品溶液 精密量取氟比洛芬混合对照品储备液适量, 加稀释液稀释制成 1 mL 中含杂质 A 5 μg, 杂质 B~E 各 2 μg, 杂质 F、杂质 K、氟比洛芬各 1 μg, 杂质 H 10 μg、杂质 I 2 μg、杂质 J 10 μg 的溶液。

2.2.4 供试品溶液 取氟比洛芬原料药适量, 精密称定, 加稀释液溶解并稀释制成每 1 mL 中含氟比洛芬 1 mg 的溶液, 作为供试品溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取系统适用性溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 3。主峰与其相邻的杂质峰之间的分离度分别为 6.0 和 4.9; 杂质 H 和杂质 B 的分离度最小 (为 2.0), 其他各杂质均达到良好的分离。

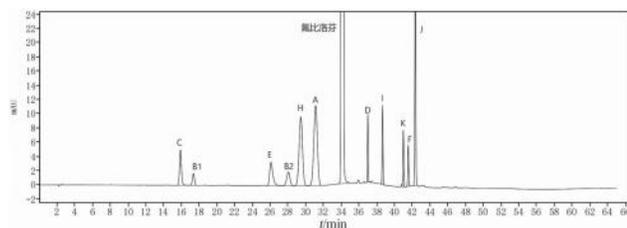


图 3 系统适用性溶液

Fig 3 System suitability solution

2.4 专属性试验

分别称取杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 对照品适量, 精密称定, 置 11 个不同的量瓶中, 加稀释液分别溶解并稀释至刻度, 其中杂质 A 的质量浓度为 5 μg·mL⁻¹, 杂质 B、C、D、E 分别为 2 μg·mL⁻¹, 杂质 F 为 1 μg·mL⁻¹, 杂质 H 为 10 μg·mL⁻¹, 杂质 I 为 2 μg·mL⁻¹, 杂质 J 为 10 μg·mL⁻¹, 杂质 K 为 1 μg·mL⁻¹, 氟比洛芬为 1 μg·mL⁻¹, 作为各杂质及主成分的定位溶液, 将以上 11 种溶液分别进样, 记录保留时间, 已确定各杂质的峰位。

称取氟比洛芬原料适量, 分别进行酸 (加 1.0 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 1.0 mL, 90 °C 水浴加热 6.5 h)、碱 (加 1.0 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1.0 mL, 90 °C 水浴加热 6.5 h)、氧化 (加 3% 过氧化氢溶液 1.0 mL, 90 °C 水浴加热 6.5 h)、高温 (90 °C 水浴加热 6.5 h)、光照 [照度为 (4500±500) lx 的光照箱中, 室温照射 10 d] 破坏^[13-15], 其中酸碱破坏后溶液须中和之后进样, 然后按照“2.2.4”项下方法配制强制降解待测溶液。

取空白溶剂、系统适用性溶液、未破坏供试品溶液以及上述 5 种强降解待测溶液注入液相色谱仪, 照“2.1”项下色谱条件进行测定。结果表明, 空白溶剂在主成分和各杂质峰处无干扰; 未破坏供试品溶液中已知杂质与主峰及相邻杂质峰的分离度大于 2.0; 氟比洛芬在酸、碱、高温和光照条件下较稳定, 图谱中未见新的降解产物峰; 经氧化破坏后的主要降解产物与主成分之间均有较好的分离度, 主成分峰进行 DAD 纯度分析, 纯度因子应均大于 990, 记录色谱图 (见图 4), 所有降解试验物料守恒, 平衡率在 95.9%~104.7%。

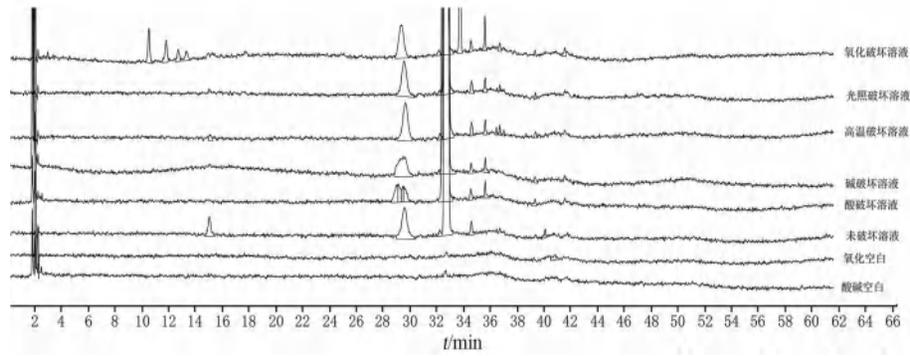


图 4 破坏试验色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms for destruction test

2.5 检测限 (LOD)、定量限 (LOQ) 及线性关系考察

精密量取“2.3”项下系统适用性溶液，用稀释液逐级稀释，使信噪比约为 10:1 (或者浓度满足检测灵敏度要求)，作为 LOQ 溶液，平行配制 6 份 LOQ 溶液，稀释至信噪比 (S/N) 约为 3 (或浓度满足检测灵敏度要求) 时的浓度为 LOD。6 份定量限溶液各杂质和氟比洛芬峰面积的 RSD

值均不大于 15.0%。

分别量取混合对照品储备液 0.4、0.6、1.0、1.5、2.0 mL 置 50 mL 量瓶中，用稀释液定容至刻度，摇匀，以定量限浓度点作为线性第一点。以各杂质浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，采用最小二乘法进行标准曲线方程的计算，得到各自回归方程和相关系数 (r)，结果见表 1。

表 1 LOQ、LOD 及线性范围结果

Tab 1 LOQ, LOD and linearity

物质	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性方程	r	LOQ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
杂质 A	0.10 ~ 10.12	$y = 53.798x - 1.5170$	0.9999	0.101	0.0303
杂质 B	0.040 ~ 3.99	$y = 30.566x + 0.0371$	0.9998	0.0399	0.0120
杂质 C	0.041 ~ 4.11	$y = 37.225x - 0.4668$	0.9999	0.0411	0.0123
杂质 D	0.04 ~ 4.04	$y = 28.740x + 1.0921$	0.9997	0.0404	0.0121
杂质 E	0.04 ~ 4.20	$y = 41.255x - 0.3704$	0.9999	0.0420	0.0126
杂质 F	0.022 ~ 2.21	$y = 41.128x + 0.7711$	0.9999	0.0221	0.006 64
杂质 H	0.10 ~ 10.06	$y = 50.708x + 3.5598$	0.9999	0.101	0.0302
杂质 I	0.042 ~ 4.16	$y = 30.909x + 1.8553$	0.9992	0.0416	0.0125
杂质 J	0.10 ~ 10.25	$y = 42.119x + 7.6508$	0.9996	0.103	0.0308
杂质 K	0.020 ~ 2.04	$y = 34.654x + 0.3476$	0.9999	0.0204	0.006 12
氟比洛芬	0.021 ~ 2.06	$y = 42.466x + 0.2098$	0.9997	0.0206	0.006 17

2.6 回收试验

精密称取氟比洛芬原料约 50 mg，置 50 mL 量瓶中，共 9 份。分别加入混合对照品储备液 0.8、1.0、1.2 mL，各 3 份，加稀释液定容后摇匀，配制成低、中、高 3 个浓度的回收试验溶液。另取氟比洛芬原料约 50 mg，置 50 mL 量瓶中，加稀释液溶解后定容摇匀，作为本底校正溶液。取各氟比洛芬杂质对照品适量，精密称定，加稀释液稀释制成 1 mL 中含杂质 A 5 μg ，杂质 B ~ E 各 2 μg ，杂质 F、杂质 K 各 1 μg ，杂质 H、杂质 J 各 10 μg ，杂质 I 2 μg 的溶液作为回收率对照品溶液。分别取回收率对照品溶液、本底校正溶液和回收试验溶液，按照“2.1”项下方法检测，按外

标法计算杂质 A ~ K 低、中、高浓度的平均回收率均在 98.0% ~ 102.0%， RSD 为 0.40% ~ 1.7%。

2.7 重复性试验

精密称取氟比洛芬原料约 50 mg，置 50 mL 量瓶中，精密量取“2.2”项下混合对照品储备液 1.0 mL，加稀释液定容至刻度，同法平行配制 6 份，作为重复性试验供试品溶液，重复性对照品溶液与回收率项下对照品溶液相同，分别进样测定，结果各杂质含量的 RSD 分别为 0.54%、1.9%、1.6%、1.3%、2.2%、1.0%、1.5%、2.0%、0.71% 和 0.89%，表明此方法的重复性良好。

2.8 耐用性试验

取系统适用性溶液和供试品加标溶液分别进

样,以系统适用性中各色谱峰的分离度和加标供试品中杂质含量的变化量为指标,分别考察柱温(30℃和40℃)、检测波长(249 nm和259 nm)、流速(0.9 mL·min⁻¹和1.1 mL·min⁻¹)、pH(1.8和2.2)等条件对测定结果的影响。结果表明,以上色谱条件发生变化时,相邻杂质之间的分离度均大于1.5,加标供试品中各杂质含量的变化量在±5.0%以内。

2.9 溶液稳定性试验

取“2.8”项下供试品加标溶液分别在室温下于0、2、4、6、8、12、24、36、48、72 h进样测定,结果各峰面积的RSD均小于1.5%,表明供试品溶液在72 h内稳定。

2.10 样品含量测定

取3批氟比洛芬自制样品(批号分别为230408、230512、230527)按照“2.2”项下方法制备供试品溶液进样测定,记录色谱图,以随行标准曲线,按照外标法以峰面积计算各已知杂质的含量,按照主成分自身对照法计算未知单杂的含量。结果3批样品中均未检出杂质B、D、E、F、H、I、J、K,检出的杂质含量结果见表2。

表 2 3 批样品有关物质检测结果 (%)

Tab 2 Related substances in 3 batches of samples (%)

批号	杂质 A	杂质 C	未知单杂	总杂(杂质 C + 未知单杂)
230408	0.2	0.1	0.03	0.13
230512	0.2	0.1	0.02	0.12
230527	0.2	0.1	0.03	0.13

3 讨论

3.1 色谱柱的选择及色谱条件的优化

本色谱条件参考了《中国药典》氟比洛芬质量标准中的流动相体系,色谱柱分别筛选了Ultimate F-C8 色谱柱,某品牌苯基硅烷键合硅胶色谱柱等。结合各杂质的化学结构的特殊性,最终优选出phenomenex kinetex PFP F5(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,可有效检出及分离氟比洛芬及其有关物质。

对于多种组分的分离,采用梯度洗脱优于等度洗脱。方法开发初期,最初以乙腈-水-冰乙酸系统按照固定比例配制流动相,后发现杂质A和杂质H保留时间受流动相pH影响,出峰顺序会变化或分离效果较差,反复调整后,将流动相pH固定后,可有效改善保留时间不固定的情况。

3.2 杂质限度的制订依据

参考《中国药典》中杂质限度的要求,结合多批次稳定小试的检测结果和生产工艺过程中杂

质的去除能力,将杂质的限度定为杂质A不得过0.5%,杂质B、C、D、E不得过0.2%,以氟比洛芬计,未知单杂不得过0.1%,除杂质A外,其他总杂不得过0.5%。

综上,本试验建立了HPLC法同时测定氟比洛芬原料中10种有关物质含量的方法,该分析方法经过验证,操作简便且稳定,可为氟比洛芬的质量研究提供参考^[15]。

参考文献

- [1] 赵立伟,王云鹏,李贺峰,等.氟比洛芬氧化脱羧的研究[J].山东化工,2021,50(6):33-34.
- [2] 杨红光,王庆河,王亚丽,等.氟比洛芬有关物质的合成[J].中国药物化学杂志,2013,23(6):473-475.
- [3] 戴杰,高云睿,梁中卫,等.HPLC法测定氟比洛芬酯注射液的含量和有关物质[J].山东化工,2021,50(20):103-104.
- [4] 赵立伟,王云鹏,李贺峰,等.氟比洛芬合成中的催化剂和配体效应[J].山东化工,2020,49(24):30-32.
- [5] 尹艳杰,张启明.HPLC法测定左旋氟比洛芬中的有关物质[J].中国药事,2007,21(9):718-719.
- [6] 周层,王少英,吴启婷,等.RP-HPLC法测定DHDK原料药中11种有关物质的含量[J].沈阳药科大学学报,2021,38(11):1159-1164.
- [7] 李颖,郑志波,彭朋,等.HPLC测定盐酸罂粟碱原料药中的有关物质[J].中国现代应用药学,2024,7(9):1-6.
- [8] 程冬,薛敏华,裘旭华,等.盐酸坦索罗辛有关物质测定方法及杂质控制限度研究[J].中国药理学杂志,2023,59(11):1047-1056.
- [9] 王春山.基于质量源于设计(QbD)理念的原料药工艺开发思路和方法[J].化工与医药工程,2021,42(6):30-33.
- [10] 王明娟,胡晓茹,戴忠,等.新型的药品质量管理理念“质量源于设计”[J].中国新药杂志,2014,23(8):948-954.
- [11] 刘晶晶,梁爱仙,庞赛,等.HPLC法测定阿利沙坦酯原料药的有关物质[J].中国药品标准,2020,21(4):350-354.
- [12] 晏海军,陈一波,张福利,等.HPLC测定盐酸氯胺酮原料药中的有关物质[J].中国现代应用药学,2022,39(5):633-637.
- [13] 尹秀娥,胡小燕,侯德粉,等.利伐沙班有关物质的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2019,50(12):1487-1491.
- [14] 马晓黎,李直,李波,等.门冬氨酸鸟氨酸注射液中的有关物质检查[J].中国医药工业杂志,2018,49(10):118-123.
- [15] 张玉珊,刘谢英,姚新成,等.高效液相色谱法同时测定茵栀黄颗粒中14个化学成分[J].药物分析杂志,2019,39(7):1229-1238.

(收稿日期:2024-07-23;修回日期:2024-09-19)

高效液相色谱法测定盐酸伊伐布雷定缓释片中有关物质的含量

王肖, 崔祥祯, 解元元, 杨永, 张贵民* (鲁南制药集团股份有限公司, 国家手性制药工程技术研究中心, 山东临沂 273400)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定盐酸伊伐布雷定缓释片中有关物质含量的方法。方法 采用 Ultimate XB C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液 (用氨水调节 pH 至 7.6), 流动相 B 为乙腈, 采用梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 220 nm, 进样体积 20 μL。结果 杂质 L、杂质 B、杂质 I、杂质 C、杂质 D、杂质 H、杂质 E、杂质 J 和伊伐布雷定的质量浓度分别在 0.18 ~ 3.59、0.12 ~ 2.41、0.18 ~ 3.64、0.13 ~ 2.52、0.11 ~ 2.30、0.30 ~ 6.07、0.12 ~ 2.33、0.28 ~ 5.64、0.30 ~ 6.07 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系 ($r > 0.9990$); 8 个杂质的回收率为 88.84% ~ 107.15%, 其 RSD 值均小于 10%; 8 个杂质和伊伐布雷定的定量限为 0.11 ~ 0.30 μg·mL⁻¹, 检测限为 0.028 ~ 0.075 μg·mL⁻¹。结论 本法专属性强、灵敏度高、准确度高、简便耐用, 可用于盐酸伊伐布雷定缓释片的生产控制及有关物质测定。

关键词: 盐酸伊伐布雷定缓释片; HPLC; 有关物质

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0740-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.025

HPLC determination of related substances in ivabradine hydrochloride sustained-release tablets

WANG Xiao, CUI Xiang-zhen, XIE Yuan-yuan, YANG Yong, ZHANG Gui-min* (*Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., National Engineering and Technology Research Center for Chirality Pharmaceuticals, Linyi Shandong 273400*)

Abstract: Objective To establish an HPLC method to determine the related substances in ivabradine hydrochloride sustained-release tablets. **Methods** Ultimate XB C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Mobile phase A was 0.02 mol·L⁻¹ ammonium dihydrogen phosphate solution (pH adjusted to 7.6 with ammonia), and mobile phase B was acetonitrile. Gradient elution was used, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 25 °C, the detection wavelength was 220 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results** Impurity L, B, I, C, D, H, E, J and ivabradine showed good linearity with the peak area ($r > 0.9990$) in the concentration ranges at 0.18 ~ 3.59, 0.12 ~ 2.41, 0.18 ~ 3.64, 0.13 ~ 2.52, 0.11 ~ 2.30, 0.30 ~ 6.07, 0.12 ~ 2.33, 0.28 ~ 5.64 and 0.30 ~ 6.07 μg·mL⁻¹. The average recoveries of the above 8 impurities ranged 88.84% ~ 107.15%, with RSD less than 10%. The quantitation limits of the 8 impurities and ivabradine ranged 0.11 ~ 0.30 μg·mL⁻¹, and the detection limits ranged 0.028 ~ 0.075 μg·mL⁻¹. **Conclusion** The method is exclusive, sensitive, accurate and durable. It can be used for the production control and related substances determination of ivabradine hydrochloride sustained-release tablets.

Key words: ivabradine hydrochloride sustained-release tablet; HPLC; related substance

盐酸伊伐布雷定 (ivabradine hydrochloride, IVB) 是离子通道抑制剂, 是第一个窦房结 If 电流选择特异性抑制剂^[1-3], 可剂量依赖性地降低患者静息和运动心率, 而不影响血压, 为高龄老年冠心

作者简介: 王肖, 女, 工程师, 主要从事新药质量研究, email: tcmwangxiao@163.com *通信作者: 张贵民, 男, 研究员, 主要从事新药研究与开发, email: lunanzhangguimin@163.com

病合并心功能不全者及钙离子通道阻滞剂、 β 受体阻断剂反应性不佳或禁忌者提供了新的选择。盐酸伊伐布雷定在临床上主要用于治疗慢性稳定型心绞痛,停药后无反跳现象,不会诱发其他不良心脏反应,可有效降低心血管疾病的发生率和死亡率^[4-10]。

将盐酸伊伐布雷定制成缓释剂型,不仅能减少患者的服药次数,增加病患尤其是老年患者的顺应性和依从性,同时也能使其在体内缓慢平稳地释放药物,避免出现峰谷现象,减轻毒副作用,临床优势明显^[11-14]。

药品在研发及生产过程中,有关物质是质量安全的关键指标,尚未见盐酸伊伐布雷定缓释片的有关物质研究报道,因此有必要对其进行研究以保证药品质量安全。本文旨在建立 HPLC 法测定盐酸伊伐布雷定缓释片的有关物质,并对建立的方法进行方法学验证,以期对盐酸伊伐布雷定缓释片的质量控制研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695 型、Acquity Arc 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); XPR2 型百万分之一、XS205 型十万分之一电子天平、Sevencompact 型 pH

计[梅特勒托利多科技(中国)有限公司]。

1.2 试药

杂质 L 对照品(纯度: 99.57%, 批号: I032120220517)、杂质 B 对照品(纯度: 89.08%, 批号: I032020220531)、杂质 C 对照品(纯度: 83.63%, 批号: I031920220518)、杂质 D 对照品(纯度: 84.82%, 批号: I031820220104)及杂质 J 对照品(纯度: 86.34%, 批号: I031320220326)(深圳市健兴医药科技有限公司); 杂质 I 对照品(纯度: 92.64%, 广州隽沐生物科技股份有限公司, 批号: DM21011580); 杂质 H 对照品(纯度: 95.49%, 批号: 200301)、杂质 F 对照品(纯度: 99.62%, 批号: 160101)、盐酸伊伐布雷定对照品(纯度: 99.8%, 批号: 615201002)、盐酸伊伐布雷定缓释片(规格: 15 mg, 批号: 220601、220701、220702)(山东新时代药业有限公司); 杂质 E 对照品(纯度: 93.08%, 山东博洛德生物科技有限公司, 批号: YFBLD-E-2207)。各对照品的结构式见图 1。乙腈为色谱纯(新蓝景); 盐酸、氢氧化钠、过氧化氢、磷酸二氢铵、氨水均为分析纯; 水为纯化水。

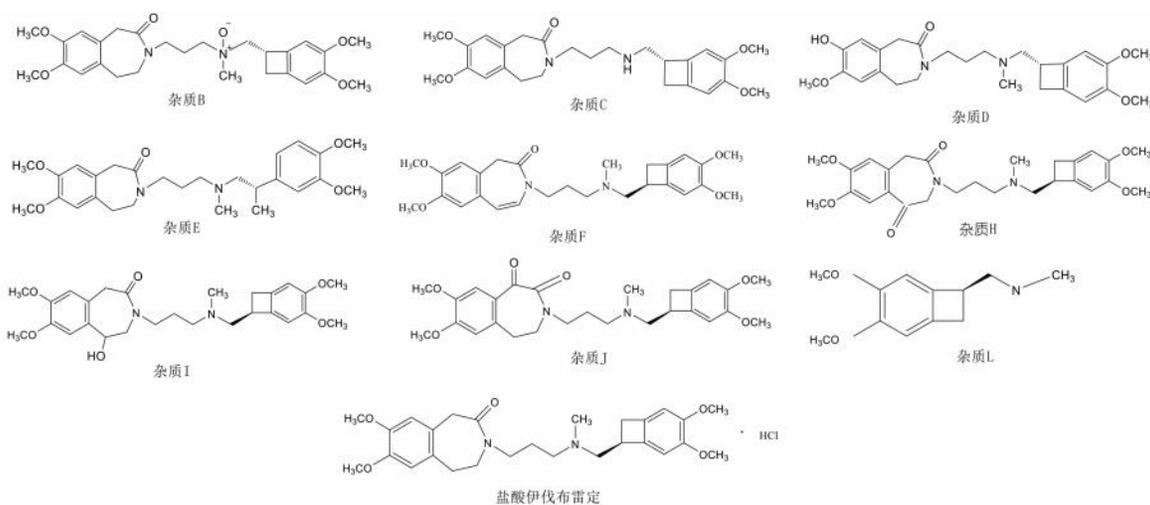


图 1 盐酸伊伐布雷定及其主要杂质化学结构

Fig 1 Chemical structures of ivabradine hydrochloride and its main impurities

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Ultimate XB C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相: A 为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液(用氨水调节 pH 至 7.6), B 为乙腈, 按表 1 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μ L。

2.2 专属性试验

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
10	70	30
30	60	40
40	60	40
50	70	30
55	70	30

2.2.1 空白干扰试验 分别精密称取对照品适量，加 30% 乙腈溶液溶解并稀释制成每 1 mL 中约含杂质 L、I 1.8 μg，杂质 B、C、D 及 E 1.2 μg，杂质 H、J 及伊伐布雷定 3.0 μg 的混合对照品溶液。取空白溶剂（30% 乙腈溶液）、空白辅料溶液（约相当于伊伐布雷定 20 mg，置 10 mL 量瓶中，加乙腈适量超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，取上清液滤过；精密量取续滤液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀）和混合对照品溶液进样测定，见图 2，空白溶剂及空白辅料均不干扰本品有关物质检测，主成分与各杂质及各杂质之间均可达到基线分离。

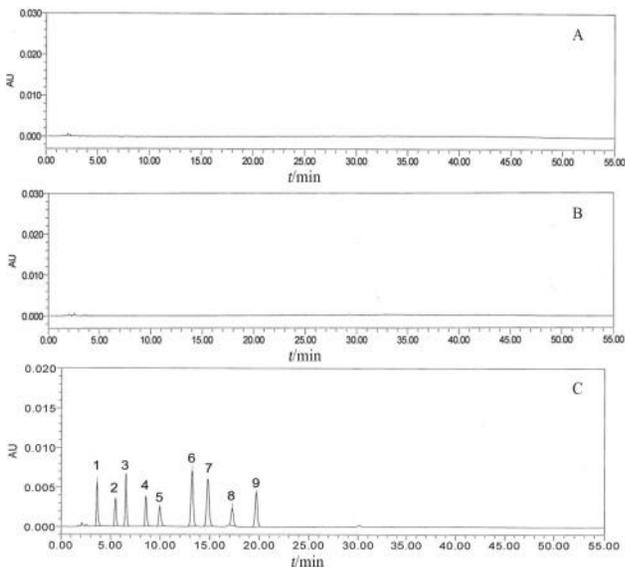


图 2 专属性试验 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity test

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 空白辅料 (blank excipient); C. 混合对照品溶液 (mixed reference solution); 1. 杂质 L (impurity L); 2. 杂质 B (impurity B); 3. 杂质 I (impurity I); 4. 杂质 C (impurity C); 5. 杂质 D (impurity D); 6. 杂质 H (impurity H); 7. 伊伐布雷定 (ivabradine); 8. 杂质 E (impurity E); 9. 杂质 J (impurity J)

2.2.2 强制降解试验 取本品 (批号: 220701) 细粉适量 (约相当于伊伐布雷定 40 mg)，置 20 mL 量瓶中，加乙腈适量超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，作为供试品母液。精密量取供试品母液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，作为未破坏样品。同法平行精密量取供试品母液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，按照以下试验条件进行强制降解试验：酸降解（加 3 mL 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液，90 °C 加热 1 h，冷却中和，用水定容）、碱降解（加 3 mL 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液，90 °C 加热 1 h，冷却中和，用水定容）、氧化降解（加 1 mL 3% 过氧化氢溶液，90 °C 加热 30 min，冷却，用水定容）、热降解（于 105 °C 放置 24 h，制备方法同未破坏样品）与光降解（于

5000 lx 光照 24 h，制备方法同未破坏样品）。

取上述破坏性试验样品，按“2.1”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图，按面积归一化结果统计各杂质降解量。与未破坏样品结果相比，本品对酸、碱及氧不稳定，酸、碱降解主要产生杂质 G（杂质 G 单独控制），氧化降解主要产生杂质 B，本品对热和光较稳定。主峰与各杂质峰分离度均符合要求，物料守恒^[15]（各条件降解后测得总峰面积与未降解溶液总峰面积的比值在 90% ~ 110%），结果见表 2，各降解杂质均可在该方法下准确检测。

表 2 强制降解试验物料守恒数据

Tab 2 Material conservation data of forced degradation test

条件	主峰纯度角度	主峰纯度阈值	主峰含量 / %	校正 / %
未破坏	2.622	10.007	99.952	—
酸降解	2.351	10.004	98.763	98.37
碱降解	2.546	10.004	99.301	98.53
氧化降解	2.103	10.005	99.060	98.84
固体热降解	1.632	10.004	99.945	98.63
固体光降解	2.159	10.004	99.961	98.25

2.2.3 系统适用性试验 取盐酸伊伐布雷定、杂质 F 及杂质 H 各适量，加 30% 乙腈溶液溶解并稀释制成每 1 mL 中约含伊伐布雷定 0.6 mg、杂质 F 6 μg、杂质 H 3 μg 的混合溶液，作为系统适用性试验溶液。按“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图，杂质 H、伊伐布雷定与杂质 F 依次出峰，伊伐布雷定与杂质 F 的分离度为 13.51，伊伐布雷定与杂质 H 峰的分度为 2.97，理论板数按伊伐布雷定峰计算为 15 277，均符合要求。

2.3 线性关系、定量限和检测限

分别精密称取各杂质对照品及盐酸伊伐布雷定对照品适量，加 30% 乙腈溶液溶解并逐步稀释制成每 1 mL 中约含杂质 L、I 18 μg，含杂质 B、C、D 和 E 12 μg，杂质 H、J 和伊伐布雷定 30 μg 的混合杂质对照品母液，作为线性储备液。

分别精密量取线性储备液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mL，各置 10 mL 量瓶中，用 30% 乙腈溶液稀释至刻度，摇匀，作为 10%、20%、40%、60%、80%、100%、200% 比例的溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，并记录色谱图。以峰面积 (A) 为纵坐标，质量浓度 (C, μg · mL⁻¹) 为横坐标进行线性回归。并对线性储备液逐级稀释，以信噪比约为 3 时计算检测限 (LOD)，以信噪比约为 10 时计算定量限 (LOQ)，结果见表 3。

2.4 进样精密度试验

取“2.3”项下 100% 比例的溶液，按“2.1”项下色谱条件连续测定 6 次，记录色谱图，计算保留时间与峰面积相对标准偏差 (RSD)，结果显

表 3 伊伐布雷定与各杂质线性关系、定量限、检测限结果

Tab 3 Linearity, LOQ and LOD of ivabradine and related substances

杂质	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相对校正因子 ^[6]	LOQ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
杂质 L	$A = 3.287 \times 10^4 C - 1.014 \times 10^3$	0.9999	0.18 ~ 3.59	1.14	0.18	0.045
杂质 B	$A = 3.349 \times 10^4 C - 3.233 \times 10^2$	1.000	0.12 ~ 2.41	1.12	0.12	0.030
杂质 I	$A = 3.983 \times 10^4 C - 6.002 \times 10^2$	0.9999	0.18 ~ 3.64	0.94	0.18	0.045
杂质 C	$A = 3.496 \times 10^4 C - 3.812 \times 10^2$	0.9999	0.13 ~ 2.52	1.07	0.13	0.033
杂质 D	$A = 3.396 \times 10^4 C - 1.255 \times 10^3$	0.9998	0.11 ~ 2.30	1.01	0.11	0.028
杂质 H	$A = 3.959 \times 10^4 C - 1.191 \times 10^3$	0.9999	0.30 ~ 6.07	0.94	0.30	0.075
伊伐布雷定	$A = 3.735 \times 10^4 C - 7.264 \times 10^2$	1.000	0.30 ~ 6.07	—	0.30	0.075
杂质 E	$A = 3.430 \times 10^4 C - 4.282 \times 10^2$	0.9999	0.12 ~ 2.33	1.09	0.12	0.030
杂质 J	$A = 3.506 \times 10^4 C - 9.982 \times 10^2$	0.9999	0.28 ~ 5.64	1.07	0.28	0.070

示杂质 L、B、I、C、D、H、E、J 和伊伐布雷定保留时间的 *RSD* 分别为 0.27%、0.36%、0.30%、0.35%、0.40%、0.30%、0.29%、0.31% 和 0.34%，峰面积的 *RSD* 分别为 0.45%、0.28%、0.24%、0.25%、0.29%、0.18%、0.38%、0.38% 和 0.14%。

2.5 加样回收试验

按照“2.3”项下方法配制混合杂质对照品母液。精密量取混合杂质对照品母液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用 30% 乙腈溶液稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液，平行配制两份。

取本品（批号：220701）20 片，研细，精密称取细粉适量（约相当于伊伐布雷定 100 mg），置 50 mL 量瓶中，加乙腈适量超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，作为校正溶液；精密量取续滤液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，精密加入混合杂质对照品母液 1 mL，用水稀释至刻度，摇匀，作为 100% 供试品溶液，同法制备 40%、200% 供试品溶液，每个浓度制备 3 份。按“2.1”项下色谱条件测定，按外标法以峰面积计算回收率，并计算 *RSD*，杂质 L、B、I、C、D、H、E 及 J 的低浓度平均回收率（ $n = 3$ ）为 88.84% ~ 102.59%，*RSD* 为 0.57% ~ 2.3%；中浓度平均回收率（ $n = 3$ ）为 99.51% ~ 106.38%，*RSD* 为 0.16% ~ 1.1%；高浓度平均回收率（ $n = 3$ ）为 98.94% ~ 107.15%，*RSD* 为 0.82% ~ 7.1%。

2.6 重复性试验

按照“2.5”项下方法配制对照品溶液及 100% 比例供试品溶液，共 6 份，分别进样检测，按照外标法计算供试品溶液中各杂质的含量。结果 6 次测定杂质 L、B、I、C、D、H、E 及 J 的含量分别为 0.31%、0.21%、0.31%、0.22%、0.21%、0.52%、0.19% 和 0.53%，*RSD* 分别为 1.8%、2.0%、1.3%、1.9%、2.5%、1.4%、2.7% 和 1.4%。

2.7 中间精密度试验

按照“2.5”项下方法配制对照品溶液及 100%

比例供试品溶液，由不同的人，采用不同的仪器于不同日期测定，每个仪器测定 6 份，按照外标法计算供试品溶液中各杂质的含量，计算 12 次测定结果的 *RSD*。12 次测定的杂质 L、B、I、C、D、H、E 及 J 的含量分别为 0.31%、0.21%、0.31%、0.22%、0.20%、0.52%、0.19% 和 0.53%，*RSD* 分别为 1.9%、2.3%、1.9%、2.2%、2.6%、1.8%、2.6% 和 1.6%。

2.8 稳定性试验

取“2.3”项下混合对照品 100% 比例溶液、“2.5”项下供试品溶液，于室温条件下放置，分别于 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 h 时取样，按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示，与 0 h 时样品比较，混合对照品溶液中杂质 B、I、C、D、H、E 及 J 峰面积的变化率均在 5% 以内，杂质 L 峰面积的变化率在 10% 以内；供试品溶液中，只检出了杂质 J 且其峰面积变化率在 2% 以内，说明混合对照品溶液和供试品溶液在室温条件下 30 h 内稳定。

2.9 耐用性试验

通过改变流速（ $\pm 0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ）、柱温（ $\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ）、流动相中盐溶液的 pH 值（ ± 0.2 ）及更换不同批号色谱柱考察本法的耐用性。通过微调色谱条件，本法对柱温、流速、波长、盐溶液的 pH 值及不同批号色谱柱耐用性均较好，与标准条件相比，主峰与杂质 F 峰的分度、杂质 H 与主峰的分度均符合要求，供试品溶液中杂质的检出数目及总杂含量无明显差异，说明本法耐用性较好。

2.10 样品中杂质含量的测定

取 3 批样品，采用加校正因子的自身对照法测定有关物质，结果见表 4。

3 讨论

根据本品原料的合成工艺，结合制剂的降解途径，参考本品原料有关物质 1 检查方法制订了有关物质检测的色谱条件及需要研究控制的已知

表 4 盐酸伊伐布雷定缓释片有关物质测定结果 (%)

Tab 4 Content of related substances in ivabradine hydrochloride sustained-release tablet (%)

批号	杂质 L	杂质 B	杂质 I	杂质 C	杂质 D	杂质 H	杂质 E	杂质 J	最大单杂	总杂
220601	ND	0.0110	ND	0.0097	ND	0.014	ND	0.049	ND	0.084
220701	ND	0.0071	ND	0.0091	ND	0.013	ND	0.051	ND	0.080
220702	ND	0.0078	ND	0.0071	ND	0.024	ND	0.077	0.023	0.140

注 (Note): ND 未检测到 (ND means no detection)。

杂质。对本品中的工艺杂质及降解产物进行了详细分析,其中杂质 C、杂质 D、杂质 E 属于原料工艺杂质,杂质 L 属于工艺杂质和降解杂质,杂质 B、杂质 H、杂质 I、杂质 J 属于制剂降解杂质,以上杂质均在有关物质方法中进行控制。参考原料项下系统适用性试验,将“主峰与杂质 F 分离度应大于 12”订入质量标准,杂质补充研究时发现杂质 H 与主峰较难分离,故将杂质 H 和杂质 F 订入系统适用性试验中,以保证杂质的有效检出。

氧化降解杂质 K 由于保留时间和主成分重叠,单独建立方法研究;原料和制剂酸降解产生的杂质 G 含卤代烷烃,属遗传毒性警示结构^[17],按照基因毒性杂质单独建立方法严格控制。

本品缓释材料中含有羟丙甲纤维素 K4M、K15M,由于其在含水溶剂中呈胶黏状,无法通过过滤或离心的方式处理样品,故调整供试品溶液的配制方法,先用乙腈超声溶解,使其易于过滤,再精密量取适量续滤液用水稀释制成。

参考本公司已获批的盐酸伊伐布雷定片中有有关物质的限度,根据盐酸伊伐布雷定缓释片工艺验证 3 批供试品影响因素试验、长期试验和加速试验的稳定性检测结果,拟订杂质 B~杂质 E 的限度为 0.20%,杂质 H 和杂质 J 的限度为 0.50%,杂质 L 和杂质 I 的限度为 0.30%,其他单个杂质的限度为 0.20%,总杂限度为 1.5%。

本研究建立了盐酸伊伐布雷定缓释片中有关物质的分析方法,方法学研究结果显示,本法专属性强、灵敏度高、重复性好、结果准确可靠,可为盐酸伊伐布雷定缓释片中有关物质的测定提供参考。

参考文献

[1] 阿孜古力·吐尔逊. 慢性稳定型心绞痛应用盐酸伊伐布雷定治疗的临床分析[J]. 当代医学, 2019, 25(19): 10-12.

[2] Vani P, Gopala K, Samba S. Formulation development and statistical optimization of ivabradine hydrochloride floating pulsatile pellets by fluidized bed coating technique [J]. Asian J Pharm Clin Res, 2016, 9(2): 159-166.

[3] 孟庆冬, 李振国, 王成. 血府逐瘀胶囊联合伊伐布雷定治疗稳定型心绞痛疗效及对患者 TXNIP、EMMPRIN 表达影响观察[J]. 中国药师, 2022, 25(8): 1394-1398.

[4] Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2016 ACC/AHA/HFSA focused update on new pharmacological therapy for heart failure: an update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of cardiomyopathy/American heart association task force on clinical practice guidelines and the heart failure society of America [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(13): 1476-1488.

[5] Manz M, Reuter M, Lauck G, et al. A single intravenous dose of ivabradine, a novel I(f) inhibitor, lowers heart rate but does not depress left ventricular function in patients with left ventricular dysfunction [J]. Cardiology, 2003, 100(3): 149-155.

[6] 张雁, 李东, 刘强, 等. 伊伐布雷定对冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛患者左心室功能的影响[J]. 中国药业, 2018, 27(19): 58-60.

[7] 汪海燕, 王喆, 李慧芳, 等. 益心舒片联合伊伐布雷定治疗慢性稳定型心绞痛的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(3): 648-651.

[8] 李艳艳, 张晓亮. 伊伐布雷定联合米力农治疗老年心力衰竭的效果研究[J]. 贵州医药, 2022, 46(6): 881-882.

[9] 秦利强, 袁亚琴, 杜超, 等. 养心定悸胶囊联合伊伐布雷定对中年冠心病患者心肌梗死术后不良事件、住院时间及生活质量的影响[J]. 河北医药, 2020, 42(23): 3615-3618.

[10] 曹杰, 李江. 伊伐布雷定治疗对慢性充血性心力衰竭病人血清亲环素 A 及肽素的作用[J]. 实用老年医学, 2019, 33(12): 1217-1220, 1225.

[11] 丁旭平, 刘锐锋. 盐酸羟考酮缓释片治疗晚期肿瘤中重度疼痛的临床分析[J]. 中国现代药物应用, 2021, 15(14): 171-173.

[12] Hooper C, Calvert J. The role for S-carboxymethylcysteine (carbocysteine) in the management of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2008, 3(4): 659-669.

[13] 彭顺清, 曹爱良, 吴霞, 等. 盐酸羟考酮缓释片与硫酸吗啡缓释片治疗重度癌痛的有效性及安全性比较[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(23): 94-96.

[14] 殷霞, 罗晶. 盐酸羟考酮缓释片治疗中晚期恶性肿瘤疼痛患者的效果[J]. 中国民康医学, 2023, 35(6): 36-39.

[15] 尹霞, 陈斌, 王燕清, 等. 反相高效液相色谱法测定阿立哌唑中的有关物质[J]. 中南药学, 2021, 19(6): 1189-1194.

[16] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 64.

[17] 马磊, 马玉楠, 陈震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构[J]. 新药研发论坛, 2014, 23(18): 2106-2111.

(收稿日期: 2024-07-24; 修回日期: 2024-09-02)

缓解体力疲劳类中成药及保健食品中非法添加化学药物高通量筛查模式的建立

赵琪, 张珊珊, 冯哲奎, 张超, 陈卫, 贾昌平* (苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215000)

摘要: **目的** 建立缓解体力疲劳类中成药及保健食品中非法添加化学药物的超高效液相色谱-高分辨质谱联用仪 (UPLC-ESI-Q-TOF/MS) 匹配数据库的高通量筛查检测方法。**方法** 通过收集保健食品中可能添加的所有缓解体力疲劳类化学药物及其衍生物, 建立数据库。根据其结构特征归类, 按照油水分配系数 ($\log P$ 值) 排序, 选取每一类代表性物质组成化合物集, 开发 UPLC-ESI-Q-TOF/MS 分析方法。样品的筛查通过质谱一、二级精确质量数比对进行, 定量则依据一级质谱响应。**结果** 各化学药物在 $1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好、精密度 RSD 小于 3%、回收率在 86.46% ~ 114.07%。10 批样品中, 育亨宾、达泊西汀、西地那非杂质 12 分别各有一批检出; 6 批检测出西地那非; 2 批检出促进剂 M、他达拉非; 3 批检出西地那非。**结论** 该方法快速、高效, 可以快速完成缓解体力疲劳类中成药及保健食品中八大类, 275 种化学药物的筛查、确证及定量。

关键词: 缓解体力疲劳保健食品; 中成药; 非法添加; 高通量筛查; 数据库

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0745-11

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.026

Establishment of a high-throughput screening model for illegal addition of chemical drugs in anti-fatigue Chinese patent medicine and health foods

ZHAO Qi, ZHANG Shan-shan, FENG Zhe-xi, ZHANG Chao, CHEN Wei, JIA Chang-ping* (Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou Jiangsu 215000)

Abstract: Objective To establish an ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF/MS) matching database with high-throughput screening of banned antibiotic components in anti-fatigue Chinese patient medicine and health food. **Methods** A compound database of antibiotics that might added in anti-fatigue Chinese patient medicine and health food was established. All component were classified according to their structural characteristics, and sorted according to the oil-water partition coefficient ($\log P$ value). The representative materials were collected to develop the UPLC-ESI-Q-TOF/MS analysis method. The screening of samples was conducted through the comparison of primary and secondary accurate mass numbers of mass spectrometry, while quantification was based on the primary mass spectrometry response. **Results** The method was validated. A good linear relationship was showed at $1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($RSD < 3\%$) and the recovery ranged 86.46% ~ 114.07%. Among the 10 batches of samples, yohimbine, dapoxetine, and sildenafil impurities were detected in 1 batch; sildenafil were detected in 6 batches; accelerators M and tadalafil were detected in 2 batches; sildenafil were detected in 3 batches. **Conclusion** The method is fast and efficient, and can quickly screen eight categories including 275 chemical drugs.

Key words: anti-fatigue health food; Chinese patent medicine; illegal addition; high-throughput screening; database

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目 (No.2024MK044)。

作者简介: 赵琪, 女, 高级工程师, 主要从事保健食品及中成药非法添加检验方面的研究, email: ladyamy@126.com * 通信作者: 贾昌平, 男, 主任药师, 主要从事保健食品非法添加检验及化妆品禁用物质检验方面的研究, email: jiakane@126.com

缓解体力疲劳类物质主要包括磷酸二酯酶-5 (PDE-5) 抑制剂^[1-3]、 α -肾上腺素受体阻滞剂^[4]、5-羟色胺再摄取抑制剂^[5]、多巴胺受体激动剂^[6]、天然前列腺类物质^[7]、蛋白同化制剂^[8]、育亨宾^[9-10]及其同分异构体、促进剂^[11]等。这些药物的添加可一定程度地提高性功能,给予消费者较为满意的疗效^[12-13]。但这些化学药物、衍生物及其同分异构体在食品、保健食品及中成药中添加时,通常含量较大且随意,甚至会有同时添加两三种的情况出现^[14-15];其次,多数化学药物,例如那非、拉非类同系物,并未进行相应的毒理学研究,安全性未知^[16-17]。消费者在不知情的情况下服用将会造成未知的健康风险^[18-20]。

原国家食品药品监督管理局对于食品、保健食品及中成药中缓解体力疲劳类非法添加标准主要有:国家食品药品监督管理局药品补充检验方法和检验项目批准件(编号:2009030)^[21]、食品中去甲基他达拉非和硫代西地那非的测定(BJS 201704)^[22]、食品中5种 α -受体阻断类药物的测定(BJS 201808)^[23]以及食品中那非类物质的测定(BJS 201805)^[24],检测方法为液相色谱法及液质联用^[25-27]。近年来,新型添加物以规避标准的方式不断出现^[28-29],需不断地制定补充检验方法。

针对以上情况,本实验室建立了缓解体力疲劳类非法添加化学药物筛查数据库,见表1。同一类别的药物,其结构母核相同或相近,在液相色谱中的保留行为接近,均可以在反相色谱柱完成分离。同一类别的物质在液相色谱保留时间主要取决于油水分配系数大小(以 $\log P$ 值衡量)。故本实验室拟建立一种新的筛查模式:通过选择耐纯水相的色谱柱,辅助宽范围的流动相洗脱程序,利用各成分的 $\log P$ 值差异,选择代表性化合物来建立色谱方法。同理,同一类别化合物的结构母核相似性决定了其各组分的质谱行为的相似性,故采用一套质谱条件参数即可实现所有缓解体力疲劳类化学药物的质谱响应。最终通过从各大类别组分中挑选代表性化学药物,建立色谱、质谱方法,结合数据库搜索与匹配,即可以完成对常见的几大类缓解体力疲劳类化学物质的同时筛查。该筛查模式的建立在不增加检验成本的基础上既能满足日常监督检验需求,对于新型添加物质具有很好的预判性,又为后续标准提升积累研究基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1290 超高效液相色谱仪串联 6538 ESI-Q-TOF/MS 质谱仪(美国安捷伦公司);XP56 型电子天平(瑞士 Mettler toledo 公司);KQ-300 DA 型数据超声波清洗器(昆山超声仪器公司);Thermo Heraeus

Multifuge X3 离心机(美国 Thermo 公司)。

1.2 试药

对照品:根据化合物的结构代表性及既往检出情况,根据表1中可能添加缓解体力疲劳类物质数据库中化学药物及化合物的 $\log P$ 值,按照类别,分别选取1~10种最大和最小或接近最大和最小的物质,组合成高通量筛查方法建立所用的17个代表性化学药物集(见表2)。水为 Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)制备;甲酸、甲醇和乙腈(质谱纯,美国 Merck 公司)。样品均来自实验室检品。

选取表1中除高通量筛查方法建立所需的化学药物之外的其他代表性化学药物,组合成验证方法化学药物集,共86种(见表3)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters CORTECS UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.6 μ m) 色谱柱;柱温:35 $^{\circ}$ C;流动相:A为甲醇-乙腈(1:1)(含0.1%甲酸)(V/V)、B为0.1%甲酸溶液;流速:0.3 mL \cdot min $^{-1}$;梯度洗脱(0~1 min, 95%B; 1~8 min, 5%B; 8~11 min, 5%B; 11~11.2 min, 95%B; 11.2~12.0 min, 95%B);进样体积:1 μ L。

2.2 质谱条件

电喷雾电离正/负离子模式(ESI $^{+/-}$);喷雾电压:2000 V(+)/3000 V(-);毛细管温度:350 $^{\circ}$ C;去溶剂气(N₂)流量:12.0 L \cdot min $^{-1}$;雾化器压力:40 psi;碎裂电压:125 V;采集模式:MS(Auto);扫描方式:一、二级;质谱扫描范围:50~1200;二级碰撞能量:10~40 V。方法学化学物质的分子式、采集模式、准分子离子精密质量、碰撞能量和碎片离子信息见表4。

2.3 对照品溶液的制备

2.3.1 方法建立化学药物混合溶液配制 分别精密称取方法建立化合物集中的组分对照品各约5 mg,加1%甲酸甲醇超声溶解并定容至10 mL,即得质量浓度分别为500 μ g \cdot mL $^{-1}$ 的混合对照品储备液;再移取0.5 mL,用甲醇稀释至25 mL,即得质量浓度分别为10 μ g \cdot mL $^{-1}$ 的方法建立化学药物混合溶液。

2.3.2 方法验证化学药物混合溶液配制 分别精密称取方法验证化合物集中的组分对照品各5 mg,加1%甲酸甲醇超声溶解并定容至5 mL,即得质量浓度分别为1000 μ g \cdot mL $^{-1}$ 的混合对照品储备液;再移取0.5 mL用甲醇稀释至10 mL,即得质量浓度分别为10 μ g \cdot mL $^{-1}$ 的方法验证化学药物混合溶液。

2.4 供试品溶液的制备

2.4.1 固体样品(片剂、颗粒剂、粉剂、丸剂、茶叶) 取适量样品,研磨研细后,精密称取细粉1 g,置50 mL量瓶中,加甲醇至10 mL,在

表 1 中成药及保健食品中可能添加的缓解体力疲劳类化学药物信息

Tab 1 Information of chemical drugs that may be added in anti-fatigue Chinese traditional patent medicine and health foods

序号	中文名称	CAS 号	logP	精确分子量
PDE-5 抑制剂				
1	甲基他达拉非	171488-11-2	2.48	403.4310
2	西地那非	139755-83-2	2.27	474.2049
3	他达拉非	171596-29-5	1.43	389.1375
4	脱硫伐地那非	139756-21-1	2.38	312.1586
5	庆地那非	147676-66-2	1.99	354.1692
6	那非乙酸	147676-78-6	2.21	356.1485
7	苯酰胺那非	1020251-53-9	3.38	389.1587
8	氨基他达拉非	385769-84-6	0.05	390.1328
9	他达拉非甲基氯化物	171489-59-1	2.95	426.0982
10	苯噻啶红地那非	147676-50-4	3.13	437.2427
11	那红地那非	949091-38-7	1.50	452.2536
12	卡巴地那非	944241-52-5	1.66	452.2536
13	伪伐地那非	224788-34-5	2.97	459.1940
14	那莫西地那非	371959-09-0	3.12	459.1940
15	N-去乙基伐地那非	448184-46-1	1.73	460.1893
16	N-去甲基西地那非	139755-82-1	1.88	460.1893
17	红地那非	831217-01-7	2.03	466.2692
18	羟基红地那非	147676-56-0	1.24	482.2642
19	阿伐那非	330784-47-9	3.52	483.1786
20	豪莫西地那非	642928-07-2	2.80	488.2206
21	伐地那非	224785-90-4	2.65	488.2206
22	硫代西地那非	479073-79-5	2.87	490.1821
23	硫代豪莫西地那非	479073-80-8	3.40	504.1978
24	羟基伐地那非	224785-98-2	1.85	504.2155
25	羟基豪莫西地那非	139755-85-4	2.00	504.2155
26	乌地那非	268203-93-6	4.24	516.2520
27	羟基硫代豪莫西地那非	479073-82-0	2.60	520.1926
28	那莫伐地那非	358390-39-3	2.06	356.1485
29	硝地那非	147676-99-1	2.28	357.1437
30	去甲基他达拉非	171596-36-4	0.38	375.1219
31	氯地那非	1058653-74-9	2.17	388.1302
32	羟基氯地那非	1391054-00-4	1.64	390.1459
33	N-丁基他达拉非	171596-31-9	3.02	431.1845
34	去甲基卡巴地那非	147676-79-7	1.13	438.2379
35	去碳西地那非	1393816-99-3	1.89	462.2049
36	二甲基红地那非	1290041-88-1	2.91	466.2692
37	二硫代去甲基卡巴地那非	1333233-46-7	2.26	470.1923
38	酮红地那非	1446144-70-2	2.02	480.2485
39	N-辛基去甲他达拉非	1173706-35-8	5.15	487.2471
40	双酮红地那非	1609405-33-5	0.16	494.2278
41	羟基硫代伐地那非	912576-30-8	2.45	520.1926
42	环戊那非	1173706-34-7	3.76	528.2519
43	丙氧苯基硫代羟基豪莫西地那非	479073-90-0	3.13	534.2083
44	苄西地那非	1446089-82-2	3.84	550.2362
45	桂地那非	1446089-83-3	3.73	554.3005
46	罗地那非碳酸酯	398507-55-6	4.87	1034.4103
47	丙氧苯基西地那非	877777-10-1	2.80	488.2206
48	脱哌嗪基硫代西地那非	1353018-10-6	1.84	408.0926
49	乙酰胺基他达拉非	1446144-71-3	0.00	432.1434
50	2-羟丙基去甲他达拉非	1353020-85-5	1.84	433.1638
51	乙酰伐地那非	1261351-28-3	1.88	466.2692
52	丙氧苯基羟基豪莫西地那非	139755-87-6	2.53	518.2311
53	丙氧苯基硫代艾地那非	856190-49-3	3.99	518.2134
54	N-去乙基红地那非	147676-55-9	1.93	438.2379
55	去甲基硫代西地那非	479073-86-4	2.48	476.1664

续表 1

序号	中文名称	CAS号	logP	精确分子量
56	N-叔丁氧羰基-N-去乙基红地那非	1246820-46-1	3.06	538.2903
57	N-乙基他达拉非	1609405-34-6	1.96	403.1532
58	O-去乙基西地那非	139755-91-2	0.95	446.1736
59	吡唑 N-去甲基西地那非	139755-95-6	2.42	460.1893
60	异丁基西地那非	1391053-95-4	2.62	488.2206
61	西地那非二聚体杂质	1346602-67-2	4.39	834.2941
62	伐地那非哌嗪酮	448184-58-5	0.16	474.1685
63	西地那非 N-氧化物	1094598-75-0	0.67	490.1998
64	伐地那非 N-氧化物	448184-48-3	1.06	504.2155
65	2-羟乙基去甲他达拉非	385769-94-8	0.97	419.1481
66	伐地那非乙酰基类似物	/	2.93	437.2430
67	伐地那非二聚体	1255919-03-9	4.10	834.2941
68	米罗那非	862189-95-5	4.11	531.2515
69	亚硝地那非	1387577-30-1	4.66	629.2203
70	硫唑那非	220060-39-9	2.53	448.2045
71	氨基西地那非	319491-68-4	1.25	405.1471
72	去乙基卡巴地那非	1027192-92-2	0.63	424.2223
73	双去碳西地那非	466684-88-8	1.40	448.1893
74	N-苯丙烯基他达拉非	2064212-00-4	/	504.5400
75	N-去乙基-N-甲基伐地那非	224785-87-9	2.12	474.2049
76	硫代艾地那非	856190-47-1	3.46	504.1977
77	双氯地那非	1446089-84-4	3.35	406.0963
78	哌唑那非	1335201-04-1	1.51	482.2642
79	丙氧苯基硫代西地那非	479073-87-5	3.99	504.1977
80	丙氧苯基硫代豪莫西地那非	479073-88-6	3.93	518.2134
81	二硫代去乙基卡巴地那非	1610830-81-3	1.87	456.1766
82	羟基硫代红地那非	1159977-47-5	1.84	498.2413
83	他达拉非二氯代杂质	1598416-08-0	3.66	460.0593
84	西地那非杂质 12	/		498.7000
85	去甲基哌嗪基西地那非磺酸	1357931-55-5	1.24	392.1154
86	丙氧苯基艾地那非	1391053-82-9	3.39	502.2362
87	西地那非杂质 14	2146091-79-2	2.86	484.2079
88	丙氧苯基异丁基艾地那非	1621873-33-3	3.74	516.2519
89	艾地那非	1416130-63-6	2.86	488.2206
90	硫代伐地那非	912576-24-0	3.25	504.1977
91	去甲基哌嗪基异西地那非磺酰氯	501120-42-9	2.76	410.0815
92	去(甲基哌嗪基)西地那非二聚体	1346603-48-2	3.33	686.2635
93	去甲哌嗪基去乙基西地那非磺酰氯	139756-27-7	-0.84	382.0503
94	吉沙那非	334826-98-1	1.87	519.2264
95	二甲基他达拉非	477970-21-1	1.83	403.1532
96	西地那非氯代磺酰化物	139756-22-2	2.76	410.0815
97	去亚甲基他达拉非	171489-03-5	0.23	377.1375
98	他达拉非杂质 29	929100-66-3	0.38	375.1219
99	N-去甲基-N-环戊基他达拉非	171596-32-0	2.92	443.1845
100	昔多芬杂质	845302-49-0	3.32	314.1740
101	2-乙氧基-5-[(4-甲基-1-哌嗪) 磺酰基] 苯甲醛	332374-42-2	2.53	312.1144
102	西地那非枸橼酸盐杂质 3	332374-45-5	3.21	476.2210
103	他达拉非杂质 I	1795790-92-9	1.48	405.1325
104	他达拉非氧代内酰胺	1346605-38-6	2.28	421.1274
105	他达拉非杂质 G	531500-48-8	3.70	403.1168
106	阿伐那非代谢物	330785-05-2	2.65	469.1630
107	伐地那非杂质	2245167-80-8	2.92	346.1197
	α -肾上腺素受体阻滞剂			
108	特拉唑嗪	63590-64-7	-0.96	387.1906
109	酚妥拉明	50-60-2	3.60	281.1528
110	哌唑嗪	19216-56-9	0.04	383.1594
111	妥拉唑林	86639-52-3	2.31	392.1372

续表 1

序号	中文名称	CAS号	logP	精确分子量
112	酚苄明	59-96-1	4.78	303.1390
113	特拉唑嗪杂质	1260939-66-9	3.19	377.1409
114	赛洛多辛	160970-54-7	2.52	495.2345
115	多沙唑嗪	74191-85-8	2.89	547.1737
116	阿夫唑嗪	81403-80-7	-1.00	389.2063
	5-羟色胺再摄取抑制剂			
117	西酞普兰	59729-33-8	2.51	324.1638
118	帕罗西汀	61869-08-7	3.89	329.1427
119	达泊西汀	119356-77-3	5.13	305.1780
120	舍曲林	79617-96-2	4.81	305.0738
121	N-甲基帕罗西汀	110429-36-2	3.91	343.1584
122	安索西汀	79130-64-6	5.08	399.1834
123	非莫西汀	59859-58-4	3.96	311.1885
124	伏硫西汀	508233-74-7	3.28	255.1623
125	托莫西汀	83015-26-3	2.64	271.1572
126	尼索西汀	57226-61-6	2.64	271.1572
127	沃替西汀	508233-74-7	4.26	298.1504
128	瑞波西汀	98769-81-4	2.82	313.1678
129	利托西汀	86811-09-8	3.39	241.1467
130	伊福西汀	66208-11-5	1.77	221.1416
131	度洛西汀	116539-58-3	3.73	297.1187
132	曲马多	27203-92-5	2.51	263.1885
	天然前列腺类物质			
133	前列地尔	745-65-3	2.24	354.2406
134	15-酮前列腺素 E1	22973-19-9	2.11	352.2250
135	19-羟基前列腺素 E1	55123-67-6	0.05	370.2355
136	11, 15-二脱氧前列腺素 E1	40098-50-8	5.64	322.2508
137	20-羟基前列腺素 E1	57930-99-1	0.24	370.2355
138	5, 6-二羟基前列腺素 E1	90817-53-1	-0.82	386.2304
139	11-脱氧前列腺素 E1	37786-00-8	3.79	338.2457
140	13, 14-二氢-15(R)-前列腺素 E1	201848-10-4	2.23	356.2563
141	13, 14-二氢-15-氧代前列腺素 E1	5094-14-4	2.71	368.2563
142	10, 10-二甲基-11-脱氧-6-酮基-前列腺素 E1	98677-35-1	3.16	380.2563
143	11-脱氧-16-苯氧基-17, 18, 19, 20-四去甲前列腺素 E1	80558-61-8	3.13	374.2093
144	前列腺素 E	363-24-6	1.88	352.2250
145	前列腺素 B1	13345-51-2	3.56	336.2301
146	前列腺素 I3	68794-57-0	1.63	350.2093
147	前列腺素 D2	41598-07-6	2.02	352.2250
148	前列腺素 A2	13345-50-1	3.25	334.2144
149	前列腺素 G1	52162-11-5	4.77	370.2355
150	6-酮前列腺素	58962-34-8	0.93	370.2355
	蛋白同化制剂			
151	炔诺酮	68-22-4	3.38	298.1933
152	丙卡特罗	72332-33-3	1.37	290.1631
153	司坦唑醇	10418-03-8	5.53	328.2515
154	16-羟基司坦唑醇	125590-76-3	4.35	344.2464
155	达那唑	17230-88-5	4.70	337.2042
156	21-氯-6-去氢达那唑	121565-24-0	5.14	369.1496
157	21-氯达那唑	121565-23-9	6.09	371.1652
158	甲睾酮	1039-17-4	3.64	300.2089
159	17-甲睾酮	58-18-4	4.02	302.2246
160	丙酸睾酮	57-85-2	4.90	344.2351
161	羟甲睾酮	145-12-0	3.78	318.2195
162	氟甲睾酮	76-43-7	2.17	336.2100
163	17β-溴乙酰氧基-19-去甲睾酮	55648-44-7	4.55	394.1143
164	5-二氢-19-去甲睾酮	1434-85-1	3.27	276.2089
165	美睾酮	1424-00-6	4.24	304.2402

续表 1

序号	中文名称	CAS号	logP	精确分子量
166	诺龙	434-22-0	3.00	274.1933
167	苯丙酸诺龙	637-27-4	2.09	150.0681
168	美雄醇	521-10-8	4.50	304.2402
169	勃拉睾酮	1605-89-6	4.51	316.2402
170	勃地酮 17- 硫酸酯	87331-43-9	3.77	366.1501
171	17- 乙酸勃地酮	2363-59-9	4.39	328.2039
172	6 β - 羟基 -17 α - 勃地酮	934536-49-9	1.93	302.1882
173	卡普睾酮	17021-26-0	4.51	316.2402
174	溴克仑特罗	37153-52-9	2.83	320.0291
175	羟甲基克仑特罗	38339-18-3	1.54	292.0745
176	5 α - 雄甾 -1- 烯 -3 β , 17 β - 二醇	5323-27-3	3.97	290.2246
177	宝丹酮	846-48-0	3.50	286.1933
178	克仑特罗	37148-27-9	2.61	276.0796
179	氯司替勃	1093-58-9	3.67	322.1700
180	醋酸氯司替勃	855-19-6	4.56	364.1805
181	普拉雄酮庚酸酯	23983-43-9	6.93	400.2978
182	去氢表雄酮	53-43-0	3.42	288.2089
183	屈他雄酮	58-19-5	4.24	304.2402
184	屈他雄酮丙酸酯	521-12-0	5.67	360.2664
185	甲基屈他雄酮	3381-88-2	4.78	318.2559
186	4- 氟 -19- 去甲睾酮	1881-31-8	2.92	292.1839
187	甲酰勃龙	2454-11-7	1.99	344.1988
188	夫拉扎勃	1239-29-8	4.96	330.2308
189	16 β - 羟基夫拉扎勃	36455-74-0	3.77	346.2257
190	美雄诺龙	521-11-9	4.29	304.2403
191	16 β - 羟基美雄诺龙	863760-64-9	3.11	320.2352
192	2- 羧基美雄诺龙甲酯	145553-00-0	3.82	362.2457
193	17- <i>O</i> - 三甲基硅烷基美雄诺龙	145760-86-7	6.63	376.2798
194	去氢美睾酮	1423-99-0	3.66	302.2246
195	美雄酮	72-63-9	4.04	300.2089
196	6 β - 羟基美雄酮	33526-41-9	7.19	460.2829
197	美替诺龙	153-00-4	4.03	302.2246
198	美替诺龙庚酸酯	303-42-4	7.58	414.3134
199	美替诺龙醋酸酯	434-05-9	4.93	344.2351
200	美雄醇二丙酸酯	3593-85-9	7.32	416.2927
201	19- 去甲美雄醇	95554-01-1	4.02	290.2246
202	17- <i>O</i> - 乙酰基 19- 去甲美雄醇	96059-83-5	4.92	332.2351
203	疏甲睾酮	2205-73-4	3.67	450.1898
204	19- 去甲睾酮乙酸酯	1425-10-1	3.89	316.2039
205	乙诺酮	52-78-8	4.07	302.2246
206	炔诺酮醋酸酯	51-98-9	4.06	340.2039
207	双甲乙炔睾酮	79-64-1	4.53	340.2402
208	17 α - 甲基异睾酮	65-4-3	3.98	302.2246
209	睾酮甲烷磺酸酯	23067-29-0	3.63	366.1865
210	19- <i>O</i> - 羧基甲氧基睾酮	67992-78-3	1.71	362.2093
211	睾酮 <i>p</i> - 甲苯磺酸酯	1255-57-8	5.49	442.2178
211	4- (羧基甲硫基) 睾酮	70838-03-8	3.95	378.1865
213	2- α - 甲基二氢睾酮吡喃 -2- 基醚	983-56-2	5.12	388.2978
214	苯丙酸诺龙	62-90-8	5.97	406.2508
215	米勃龙	659146	4.03	302.2246
216	20- 氟米勃酮	133083-42-8	4.07	319.2177
217	丙酸诺龙	7207-92-3	4.42	330.2195
218	雷那诺龙	565-99-1	1.32	334.2144
219	甲基诺龙	514-61-4	3.54	288.2089
220	癸酸诺龙	360-70-3	8.14	428.3290
221	十一酸诺龙	862-89-5	8.67	442.3447
222	6- 去氢诺龙	14531-84-1	2.50	272.1776

续表 1

序号	中文名称	CAS号	logP	精确分子量
223	环己基丙酸诺龙	912-57-2	7.01	412.2978
224	脱氢诺龙醋酸酯	2590-41-2	3.43	314.1882
225	雄诺龙	521-18-6	3.75	290.2246
226	诺勃酮	797-58-0	4.51	316.2402
227	诺司替勃	13583-21-6	3.19	308.1543
228	氧宝龙戊丙酯	1254-35-9	6.21	414.2770
229	氧甲氢龙	53-39-4	3.33	306.2195
230	甲基司腾勃龙	5197-58-0	4.03	302.2246
育亨宾类				
231	育亨宾	146-48-5	2.20	354.1943
232	育亨宾-17-酮	523-14-8	3.40	294.1732
233	育亨宾-17-醇	523-13-7	2.68	296.1889
234	(3 β)-17.1 羟基育亨宾-16 亨宾羧酸甲酯	84-37-7	2.20	354.1943
235	(3 β , 16 β , 17 α , 18 β , 20 α)-18-羟基-11, 17-二甲氧基育亨宾-16-羧酸甲酯	2901-66-8	1.61	414.2155
236	别育亨宾	483-26-1	4.72	280.1939
237	18-亚苄基育亨宾-17-醇	28529-01-3	4.45	384.2202
238	(15 β , 16E)-19, 20-二去氢-16-亚乙基-氧杂育亨宾-21-酮	102358-19-0	2.09	320.1525
239	11-羟基育亨宾碱	140405-13-6	1.47	370.1893
240	17 α -羟基育亨宾-16 α -甲醇 16, 17-环亚硫酸酯	439-64-5	1.96	372.1508
241	17 β -氯-16 α -甲基育亨宾	439-65-6	4.86	328.1706
242	(19 α)-16, 17-二去氢-10-甲氧基-19-甲基氧杂育亨宾-16-甲酰胺	72407-38-6	2.11	382.2005
243	17 α -羟基-育亨宾-16 α -羧酸乙酯	73840-32-1	2.73	368.2100
244	14-苯甲酰基氧育亨宾	90362-87-1	4.16	474.2155
245	10-羟基育亨宾碱	41928-02-3	1.03	370.1893
246	16 α -甲基育亨宾	549-76-8	5.22	294.2096
247	甲基(16 α , 19 α)-17-甲氧基-19-甲基-18-氧杂育亨宾-16-羧酸酯	63569-19-7	3.30	384.4766
248	10, 11-二甲氧基-19-甲基-16, 17-二去氢氧杂育亨宾-16-羧酸甲酯	3148-42-3	2.56	412.1998
促进剂				
249	促进剂 DPG	102-06-7	2.36	211.1109
250	促进剂 DOTG	97-39-2	3.77	239.1422
251	促进剂 BG	93-69-6	1.13	191.1171
252	促进剂 M	149-30-4	2.41	166.9863
253	促进剂 DM	120-78-5	7.04	331.9570
254	促进剂 NS	95-31-8	4.49	238.0598
255	促进剂 NOBS (MSA)	102-77-2	2.44	252.0391
256	促进剂 DZ	4979-32-2	7.34	346.1537
257	促进剂 OTOS	13752-51-7	-0.90	248.0653
258	促进剂 TMTM (TS)	97-74-5	0.87	208.0163
259	促进剂 T	137-26-8	1.75	239.9883
260	促进剂 TETD	97-77-8	3.88	296.0509
261	促进剂 TBTD	1634-02-2	8.13	408.1761
262	促进剂 TRA	120-54-7	5.50	383.9951
263	促进剂 TE	41365-24-6	6.47	392.0509
264	促进剂 TBzTD	10591-85-2	8.77	544.1135
265	促进剂 EZ (ZDEC)	136-94-7	3.62	359.9801
266	促进剂 BZ (ZDBC)	136-23-2	5.94	236.0526
267	促进剂 PX	14634-93-6	5.99	455.9801
268	促进剂 ZnBzDC	14726-36-4	8.34	608.0427
269	促进剂 TeEDC	20941-65-5	6.86	722.0081
270	促进剂 ZDBP	6990-43-8	8.08	546.0263
271	促进剂 Na-22	96-45-7	0.12	102.0252
272	促进剂 DETU	105-55-5	1.27	132.0721
273	促进剂 H	100-97-0	-1.27	140.1062
274	促进剂 ZIX	42590-53-4	2.48	166.9584
其他				
275	达克罗宁	586-60-7	4.67	289.2042

表 2 17 种对照品信息

Tab 2 Standard product information of 17 components

对照品	来源	批号	纯度/%	对照品	来源	批号	纯度/%
西地那非	中检院	510068-202101	100.0	氢溴酸西酞普兰	中检院	100110-201103	99.9
他达拉非	中检院	510170-202102	99.8	帕罗西汀	中检院	100357-202105	100.0
那非乙酰酸	TRC	1-WJS-22-3	99.2	前列地尔	TRC	S092035	100.0
N-辛基去甲他达拉非	TRC	1-HPA-15-4	99.7	炔诺酮	中检院	100053-200204	100.0
乙酰胺基他达拉非	TRC	7-APD-82-1	98.9	丙卡特罗	中检院	100275-201903	100.0
伐地那非哌嗪酮	TRC	1-EJB-20-2	99.1	育亨宾	中检院	520024-201401	99.9
去乙基卡巴地那非	TLC	2091-078A4	99.4	促进剂 DPG	BOSF	203-002-1	98.0
亚硝地那非	TRC	14-JQW-143-4	98.0	达克罗宁	中检院	100423-201102	99.8
特拉唑嗪	First Stangard	FS1605624	97.0				

表 3 86 种对照品信息

Tab 3 Standard product information of 86 components

对照品	来源	批号	纯度/%	对照品	来源	批号	纯度/%
脱硫伐地那非	TRC	1-ALB-8-1	95.0	氨基西地那非	TLC	2050-030A1	99.5
庆地那非	TRC	1-XDD-42-2	98.7	双去碳西地那非	TLC	2077-035A2	98.7
苯酰胺那非	TRC	4-ZCA-137-2	90.0	N-去乙基-N-甲基伐地那非	TLC	2114-020A2	99.7
苯噻啶红地那非	TRC	4-APK-41-1	99.9	双氯地那非	TRC	3-MUH-8-4	99.9
那莫西地那非	中检院	520040-202102	100.0	哌嗪那非	TRC	1-ZIW-178-1	95.0
N-去甲基西地那非	TRC	2-NOF-111-4	99.8	丙氧苯基硫代西地那非	TRC	3-KHI-18-2	98.0
羟基红地那非	TRC	1-TEK-52-2	98.9	丙氧苯基硫代豪莫西地那非	TLC	1528-079A2	98.8
阿伐那非	TRC	8-GHZ-5-1	97.7	氨基他达拉非	中检院	520042-202002	100.0
艾地那非	坛墨	1412103	98.5	他达拉非甲基氯化物	TRC	1-TGG-133-1	95.0
硫代西地那非	坛墨	22040056	99.0	卡巴地那非	TRC	2-CGF-95-3	99.6
硫代豪莫西地那非	TRC	1-PTY-87-2	99.2	豪莫西地那非	中检院	520046-202002	100.0
羟基硫代豪莫西地那非	TRC	FS1614352	99.4	羟基伐地那非	TRC	1-ARD-6-3	98.0
那莫伐地那非	TRC	3-LXS-59-2	97.8	去甲基他达拉非	安谱	2251644	99.0
硝地那非	TRC	7-GJF-119-1	98.6	N-丁基他达拉非	TRC	1-vas-21-2	98.0
氯地那非	TRC	3-PKB-26-3	98.6	2-羟丙基去甲他达拉非	TRC	1-HPA-25-1	98.0
羟基氯地那非	TRC	3-PKB-33-1	99.2	丙氧苯基羟基豪莫西地那非	TRC	4-LIJ-133-4	98.7
去甲基卡巴地那非	安谱	2250891	96.7	N-乙基他达拉非	TLC	1361-023a1	99.9
去碳西地那非	TRC	7-RFS-168-1	98.9	2-羟乙基去甲他达拉非	TRC	1-HPA-25-1	96.0
二甲基红地那非	TRC	19-PSB-16-2	95.8	硫唑嗪那非	安谱	2133-007A2	94.9
二硫代去甲基卡巴地那非	TRC	2-CGF-101-4	99.6	硫代艾地那非	中检院	520048-202002	100.0
酮红地那非	TLC	1361-0904	98.2	羟基硫代红地那非	TLC	2933-077A3	99.8
双酮红地那非	TRC	1384-004A4	98.8	他达拉非二氯代杂质	TLC	1626-093A10	99.4
环戊那非	TRC	1-CJM-6-1	96.0	西地那非杂质 12	TLC	2478-032	99.1
丙氧苯基硫代羟基豪莫西地那非	TRC	3-KHI-20-1	98.4	去甲基哌嗪基西地那非磺酸	TRC	1-JMS-103-5	98.0
丙氧苯基西地那非	TRC	1-URV-77-1	98.8	丙氧苯基艾地那非	TLC	1-PRB-41-2	98.0
丙氧苯基硫代艾地那非	TRC	3-KHI-19-3	98.6	西地那非杂质 14	曼哈格	2422-068A8	98.8
西地那非二聚体杂质	TRC	2-N07-109-2	98.7	丙氧苯基异丁基艾地那非	TLC	3103-042A3	99.5
羟基硫代伐地那非	TRC	1-JSC-92-2	99.2	那红地那非	中检院	520047-201802	100.0
苄西地那非	TRC	1446089-82-2	98.0	伪伐地那非	中检院	520041-202202	100.0
桂地那非	TLC	1316-061A1	99.5	N-去乙基伐地那非	TRC	1-JSC-41-3	97.0
脱哌嗪基硫代西地那非	TRC	1353018-10-6	99.1	红地那非	中检院	520047-201802	100.0
乙酰伐地那非	坛墨	21080176	98.6	伐地那非	中检院	510169-202001	100.0
N-去乙基红地那非	TRC	11-JTN-86-1	96.8	羟基豪莫西地那非	中检院	510032-201301	100.0
去甲基硫代西地那非	TRC	479073-86-4	98.0	乌地那非	TRC	268203-93-6	96.0
N-叔丁氧羰基-N-去乙基红地那非	TRC	1246820-46-1	98.8	丙氧苯基硫代艾地那非	TRC	3-KHI-19-3	98.0
O-去乙基西地那非	TRC	6-GUY-15-1	99.4	二硫代去乙基卡巴地那非	TLC	2-CGF-101-4	98.6
吡啶 N-去甲基西地那非	TRC	139755-5-6	98.0	酚妥拉明	中检院	100110-201103	100.0
异丁基西地那非	LGC GmbH	W1006639	99.8	哌嗪嗪	中检院	100164-201003	100.0
西地那非 N-氧化物	TRC	1-LUH-175-4	98.0	达泊西汀	曼哈格	F0034815	99.5
伐地那非 N-氧化物	TRC	448184-48-3	98.0	舍曲林	中检院	100702-202103	100.0
伐地那非乙酰基类似物	TRC	1-WJS-172-3	98.6	N-甲基帕罗西汀	中检院	101146-201001	100.0
伐地那非二聚体	TRC	6-JKL-141-2	98.0	17-甲睾酮	中检院	100172-200507	100.0
米罗那非	Dr.E	135624	99.1	促进剂 M	国药	20180327	100.0

表 4 方法建立化合物质谱参数
Tab 4 Parameters of compounds

编号	化合物	分子式	log <i>P</i> 值	采集模式	保留时间/min	母离子 <i>M</i> (<i>m/z</i>)	碰撞能量/V	子离子 <i>M</i> (<i>m/z</i>)
1	西地那非	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	2.27	ESI ⁺	5.793	475.2122	35	283、100
2	他达拉非	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	1.43	ESI ⁺	6.637	390.1448	15	268、135
3	那非乙酰胺	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄	2.21	ESI ⁺	6.961	357.1557	35	329、300
4	<i>N</i> -辛基去甲他达拉非	C ₂₉ H ₃₃ N ₃ O ₄	5.15	ESI ⁺	8.080	488.2544	35	366、169
5	乙酰氨基他达拉非	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O ₅	0.00	ESI ⁺	6.335	433.1506	25	262、135
6	伐地那非哌嗪酮	C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₅ S	0.16	ESI ⁺	5.793	475.1758	35	312、151
7	去乙酰卡巴地那非	C ₂₂ H ₂₈ N ₆ O ₃	0.63	ESI ⁺	5.309	425.2296	25	339、311
8	亚硝地那非	C ₂₇ H ₃₅ N ₉ O ₅ S ₂	4.66	ESI ⁺	6.335	630.2275	25	312、142
9	特拉唑嗪	C ₁₉ H ₂₅ N ₅ O ₄	-0.96	ESI ⁺	4.812	388.1979	35	290、247、71
10	氢溴酸西酞普兰	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	2.51	ESI ⁺	5.663	325.1711	35	234、109
11	帕罗西汀	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	3.89	ESI ⁺	5.931	330.1525	25	192、70
12	前列地尔	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	2.24	ESI ⁻	3.774	353.2333	15	317、235
13	炔诺酮	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	3.38	ESI ⁺	7.131	299.2006	35	109、83
14	丙卡特罗	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₃	1.37	ESI ⁺	3.877	291.1703	15	273、231
15	育亨宾	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	2.20	ESI ⁺	5.045	355.2016	35	212、144
16	促进剂 DPG	C ₁₃ H ₁₃ N ₃	2.36	ESI ⁺	4.680	212.1182	25	119、94、78
17	达克罗宁	C ₁₈ H ₂₇ NO ₂	4.76	ESI ⁺	5.968	290.2115	25	98

300 W、40 kHz 条件下，超声 20 min，冷至室温，用甲醇稀释至刻度，摇匀，于 10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液 100 μL 用甲醇稀释至 1 mL，即得。

2.4.2 液体样品口服液 若为稀溶液样品溶液与甲醇等比例混合；若为浓溶液样品溶液，可取样品溶液适量加入 3 ~ 5 倍的甲醇溶液，超声 20 min，摇匀，于 10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 后，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液 100 μL 用甲醇稀释至 1 mL，即得。不加样品，同法制备空白样品溶液。

2.5 定性筛查

供试品色谱图中，提取表 2 中的各化合物 [M + H]⁺ / [M - H]⁻ EIC 图，如果未发现色谱峰，则判断样品中没有添加表 2 中缓解体力疲劳类化学药物。如果发现色谱峰，则怀疑样品中可能添加缓解体力疲劳类化学药物，需获得该可疑物质的对照品，制备成质量浓度约为 10 μg · mL⁻¹ 的溶液，然后将空白溶液、对照品溶液、供试品溶液分别进样，采集化合物保留时间、质谱一、二级离子，完成确证。

2.6 检出物的含量测定

精密称量检出物质的对照品约 5 mg，配制成系列标准曲线溶液 (0 ~ 20 μg · mL⁻¹)。根据供试品中检出物的质谱一级响应调整其稀释倍数，使其位于标准曲线范围内，根据外标法计算含量。

2.7 方法学验证

2.7.1 分析方法的色谱保留 按“2.1”“2.2”项下条件分别进样方法建立混合对照溶液图谱，考察化合物的色谱保留，质谱一级响应，除前列地尔只有负离子响应外，其余 17 种化学药物均只有正离子响应，详见图 1。从图中可知，方法验证集中各成分均在方法建立化合物集色谱保留范围 (3.5 ~ 8.5

min) 间出峰，初步验证了色谱方法的通用性。

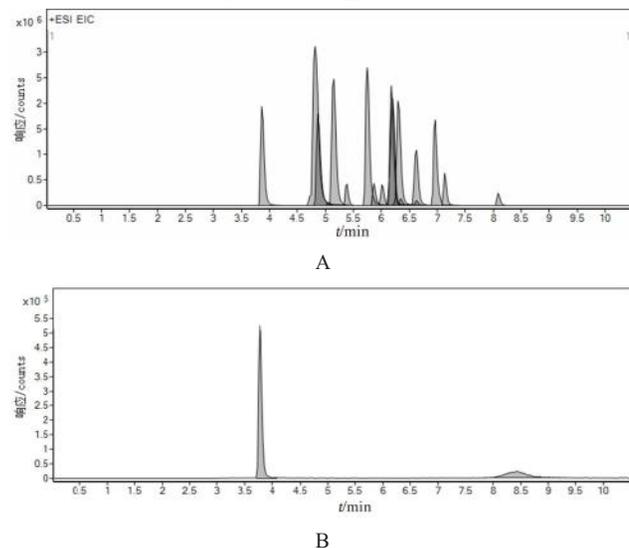


图 1 方法建立化合物集对照品总离子流叠加色谱图
Fig 1 Total ion flow spectra of methodological compounds
A. EIC⁺; B. EIC⁻

2.7.2 线性范围、检出限及回收率 对方法的专属性、线性范围和检测限进行考察。取“2.3.1”项下混合对照品储备液 (500 μg · mL⁻¹)，分别稀释成质量浓度为 0、0.5、1、2、5、10、20、50 μg · mL⁻¹ 的标准曲线工作溶液，以对照品进样量 (*x*, μg) 为横坐标，峰面积 (*y*) 为纵坐标，绘制标准曲线。计算方法建立化学药物的线性回归方程、线性范围、相关系数；以信噪比 (*S/N*) = 3 计算各化合物的检测限 (LOD) 和 (*S/N*) = 10 计算定量限 (LOQ)，各成分 LOD 在 1.42 ~ 20.41 ng · mL⁻¹，取阴性样品 1 次服用量的内容物 6 份分别加入一定量对照品，按样品处理方法同法处理测定回收率。结果见表 5。

2.7.3 精密度及重复性 取质量浓度均为 10

表 5 高通量筛查方法建立化学药物集线性关系及检测限、定量限、精密度、回收率

Tab 5 Linear equations, linearity, correlation coefficient, LOD and LOQ, recovery of logical chemical drugs by high-throughput screening method

化合物	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性方程	r	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	回收率	
						平均回收率 /%	RSD/%
那非乙酰胺	1 ~ 20	$y = 3.6 \times 10^5 x + 4.0 \times 10^5$	0.9995	3.04	10.12	92.04	0.10
他达拉非	1 ~ 20	$y = 2.5 \times 10^5 x + 4.1 \times 10^4$	0.9992	10.58	35.26	96.33	0.11
去甲基卡巴地那非	1 ~ 20	$y = 2.7 \times 10^5 x + 4.5 \times 10^5$	0.9999	20.41	68.02	91.97	0.10
乙酰胺基他达拉非	1 ~ 20	$y = 2.4 \times 10^5 x + 1.7 \times 10^5$	0.9996	9.97	33.23	91.58	0.20
伐地那非哌嗪酮	1 ~ 20	$y = 4.8 \times 10^5 x + 5.2 \times 10^5$	0.9991	4.11	13.71	91.02	0.31
西地那非	1 ~ 20	$y = 2.0 \times 10^5 x + 1.9 \times 10^5$	0.9993	4.12	13.74	87.21	0.13
N-辛基去甲他达拉非	1 ~ 20	$y = 1.8 \times 10^5 x + 3.3 \times 10^5$	0.9990	9.76	32.54	88.93	0.19
亚硝地那非	1 ~ 20	$y = 1.8 \times 10^5 x + 3.3 \times 10^5$	0.9990	4.45	14.85	82.46	0.10
促进剂 DPG	1 ~ 20	$y = 7.4 \times 10^5 x + 2.1 \times 10^5$	0.9995	1.42	4.72	109.86	0.070
达克罗宁	1 ~ 20	$y = 6.4 \times 10^5 x + 3.0 \times 10^5$	0.9994	2.45	8.16	102.62	0.20
丙卡特罗	1 ~ 20	$y = 3.9 \times 10^5 x + 6.2 \times 10^5$	0.9994	7.55	25.16	98.23	0.11
炔诺酮	1 ~ 20	$y = 1.2 \times 10^5 x + 9.0 \times 10^5$	0.9998	7.77	25.91	104.78	0.20
氢溴酸西酞普兰	1 ~ 20	$y = 6.0 \times 10^5 x + 7.3 \times 10^5$	0.9991	6.42	21.40	114.07	0.080
帕罗西汀	1 ~ 20	$y = 4.9 \times 10^5 x + 2.0 \times 10^5$	0.9992	6.39	21.30	98.20	0.15
育亨宾	1 ~ 20	$y = 7.3 \times 10^5 x + 1.0 \times 10^5$	0.9993	3.37	11.22	107.04	0.050
特拉唑嗪	1 ~ 20	$y = 5.9 \times 10^5 x + 1.0 \times 10^5$	0.9990	3.72	12.39	104.16	0.11
前列地尔	1 ~ 20	$y = 1.3 \times 10^5 x + 2.43 \times 10^5$	0.9994	8.64	28.80	99.50	0.20

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照溶液，按“2.1”“2.2”项下条件进样 6 针，提取表中的母离子的 EIC 图谱，计算保留时间和色谱峰面积的相对标准偏差 (RSD)。结果各化合物的保留时间 RSD < 1.0%，峰面积 RSD < 3.0%。

2.7.4 基质效应考察 取检测结果为阴性的固体制剂 (片剂、颗粒剂、粉剂、丸剂、茶叶) 和液体制剂 (口服液、膏) 样品，分别加入“2.3.1”项下 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的化学药物混合溶液，进样测定，考察基质效应，结果表明各剂型基质效应不明显。

2.8 验证方法化学药物的保留时间范围及 LOD

取“2.3.2”中的验证方法化学药物混合溶液集

按“2.1”项下条件进样 (同分异构体分开进样)，查看验证化学药物集混合溶液在所建立方法下的色谱保留以及质谱一级响应。结果发现各成分均在方法建立化学药物集色谱保留时间范围 (5.00 ~ 9.00 min) 内出峰，LOD 在 $5 \sim 25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，初步验证了色谱方法的通用性。

2.9 样品中非法添加化学药物含量测定

按“2.4”项下供试品处理方法提取 10 批样品，进样分析。结果显示：1 批检测出育亨宾和西地那非；2 批检测出西地那非和他达拉非；1 批检测出达泊西汀；2 批检出促进剂 M；1 批检出西地那非杂质 12；3 批检出西地那非。典型图谱见图 2。

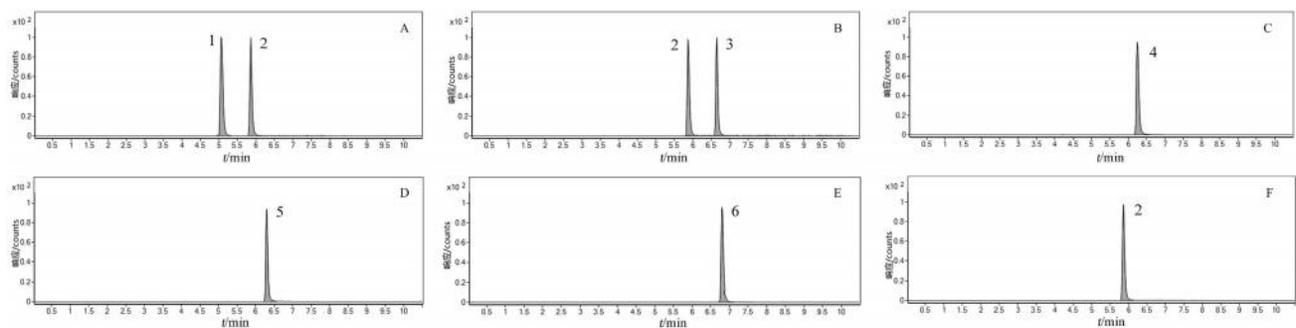


图 2 缓解体力疲劳保健食品阳性样品典型色谱图

Fig 2 Typical chromatograms of positive samples of anti-fatigue health food

1. 育亨宾 (yohimbine); 2. 西地那非 (sildenafil); 3. 他达拉非 (tadalafil); 4. 达泊西汀 (dapoxetine); 5. 促进剂 M (accelerator M); 6. 西地那非杂质 12 (sildenafil impurities 12)

3 讨论

本单位近 10 年来检测的 1000 批缓解体力疲劳类中成药及保健食品检验结果 80% 为阳性，检出西地那非、他达拉非、羟基豪莫西地那非、西地那非杂质 12、对乙酰氨基酚、达泊西汀、促进剂 M、促进剂 DPG。本文建立数据库时根据国家

标准、文献报道及本实验室在抗疲劳保健食品中发现的添加物，包括 PDE-5 抑制剂、 α -肾上腺素受体阻滞剂、蛋白同化制剂、天然前列腺类物质、育亨宾类、促进剂。其中，促进剂为工业用原料，为本实验室在多批样品中首次发现，可能是原料污染所致。

现行检验标准中多组分的 HPLC-DAD 检验方法, 为了追求各成分的色谱分离, 导致分析时间较长。从检验结果来看, 基本不存在检出多种药物分离不佳的情况。近年新发布的四极杆质谱法, 强调同时检测成分的数量, 不符合造假的真实情况及监管实际需求, 该方法既浪费对照品, 又耽误分析时间, 而且容易产生假阳性结果。

近年来, 食品及保健食品中非法添加化学物质以规避标准的形式不断出现, 标准的更新跟不上新型添加物的出现, 标准的出台即“作废”、“被动型”监管及“补丁式”标准方式急需转变。本试验系统性地提出了一种新的食品非法添加监督检验思路: 利用超高效液相色谱-高分辨质谱法, 结合数据库比对, 通过筛选少量代表性的对照品, 建立适用范围广泛的八大类、275 种抗疲劳类化合物的分离分析方法, 可实现在短时间内完成大量化合物的筛查。实践证明, 本实验方法可以替代抗疲劳中成药及保健食品中非法添加物检验的现行 4 项标准或补充检验方法, 并且对于新型未知物的判定也有很好的适用性^[30]。

参考文献

- [1] 刘素丽. 食品中非法添加物质情况及其检测方法研究进展[J]. 中国食品药品监管, 2022, 8: 90-95.
- [2] Trinchieri M, Trinchieri M, Perletti G, et al. Erectile and ejaculatory dysfunction associated with use of psychotropic drugs: a systematic review [J]. J Sex Med, 2021, 18 (8): 1354-1363.
- [3] Caretta N, Ponce MDR, Minicuci N, et al. Efficacy of penile low-intensity shockwave treatment for erectile dysfunction: correlation with the severity of cavernous artery disease [J]. Asian J Androl, 2021, 23 (5): 462-467.
- [4] Chen WK, Zhou T, Yu DD, et al. Effects of major depression and bipolar disorder on erectile dysfunction: a two-sample mendelian randomization study [J]. BMC Med Genomics, 2023, 16 (1): 66.
- [5] 毕海宁, 刘杰昊, 高江涛, 等. 疏肝益肾起痿汤联合他达拉非片治疗 5-羟色胺再摄取抑制剂类抗抑郁药物所致勃起功能障碍临床研究[J]. 新中医, 2023, 55 (12): 81-86.
- [6] 徐磊, 封宇飞. 5-羟色胺-多巴胺受体部分激动剂依匹哌啶的药理作用与临床评价[J]. 中国新药杂志, 2016, 25 (5): 481-511.
- [7] Sadovniova A. Glucocorticoid regulation of milk production, lactose synthesis, and alpha-lactalbumin gene expression [D]. Davis: UC Davis Electronic, 2022.
- [8] 刘川, 李佳佳, 吴雪莹, 等. 通过固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 30 种食源性兴奋剂[J]. 食品科学, 2024, 45 (4): 289-299.
- [9] 张苗, 朱晓玲, 江丰, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健食品中 18 种非法添加化合物[J]. 食品科技, 2020, 45 (8): 298-304.
- [10] 赵琪, 贾昌平, 钱叶飞, 等. UPLC-DAD 法快速检测保健食品中 13 种非法添加化学物质[J]. 中成药, 2019, 11 (41): 2792-2796.
- [11] 张斌, 潘建立, 储蓉, 等. 缓解体力疲劳类保健食品中 2 种新的化学添加物的鉴定及含量检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (2): 594-600.
- [12] 刘斌, 包懿, 郎乐, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查及定量分析保健食品中 29 种非法添加物[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10 (6): 1511-1518.
- [13] 谭丽容, 程敏, 林伟斌, 等. 串联固相萃取超高效液相色谱三重四级杆质谱法同时测定用于改善阳虚和缓解疲劳类的 20 种保健品非法添加物[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10 (21): 7418-7426.
- [14] 唐维英, 黄泽玮, 钱广生, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶、代用茶和饮料食品中 63 种非法添加化合物[J]. 色谱, 2018, 36 (12): 1245-1260.
- [15] 中国华, 董培智, 王子龙, 等. 中成药中非法添加二巯去甲基卡波地那非的检测[J]. 中成药, 2019, 41 (12): 3060-3063.
- [16] 黄越燕, 屠婕红, 徐宏祥, 等. UPLC-MS/MS 法快速测定中药和保健食品中非法添加 17 种抗炎镇痛类化学药的研究[J]. 中草药, 2016, 47 (2): 246-254.
- [17] 纪慧. 非甾体类抗炎药的临床应用及不良反应分析[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12 (24): 127-128.
- [18] 徐力, 陈婷. UPLC-MS/MS 法测定中药和保健食品中非法添加 13 种化学成分的含量[J]. 西北药学杂志, 2017, 32 (4): 461-464.
- [19] 倪赞, 张崇生. UPLC-MS/MS 测定补肾抗疲劳中成药及保健食品中非法添加的 9 种 PDE-5 抑制剂及其衍生物[J]. 中南药学, 2018, 16 (9): 1295-1299.
- [20] 王东风. 中成药及保健食品中非法添加化学药品检验中存在的问题及对策[J]. 药物研究, 2018, 26 (7): 110-111.
- [21] 2009030. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件[S]. 2009.
- [22] BJS 201704. 食品中去甲基他达拉非和硫代西地那非的测定[S]. 2017.
- [23] BJS 201808. 食品中 5 种 α -受体阻断类药物的测定[S]. 2018.
- [24] BJS 201805. 食品中那非类物质的测定[S]. 2018.
- [25] 徐硕, 金鹏飞, 徐文峰, 等. 补肾壮阳类药品中非法添加化学药物检测技术的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2017, 5 (32): 677-679.
- [26] 王伟姣, 龙凌云, 姜成君, 等. UPLC-MS/MS 法测定保健食品中添加剂的 114 个化学药[J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (12): 2157-2169.
- [27] 吕冠欣, 罗泉灼, 熊江云, 等. UPLC-MS/MS 测定代用茶中 98 种非法添加化学药物[J]. 食品与药品, 2024, 26 (1): 594-600.
- [28] 黄泽玮, 刘忠莹, 黄瑛, 等. Orbitrap-Elite 高分辨质谱用于减肥及壮阳类保健食品和中成药中 54 种非法添加物的快速筛查及确证[J]. 中国测试, 2019, 45 (1): 70-76.
- [29] Kee CL, Ge XW, Koh HL, et al. Isolation and characterization of propoxyphenyl linked sildenafil and thiosildenafil analogues in healthsupplements [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 70 (21): 265-272.
- [30] 贾昌平, 赵琪, 张珊珊, 等. 一种中成药及保健食品中促进 M 和促进剂 DPG 的检测方法: 110068629 B [P]. 2019-07-30.

(收稿日期: 2024-09-20; 修回日期: 2024-10-20)

基于 UPLC 多指标成分和化学计量学研究不同产地炙甘草

张春平^{1,2}, 宋霞², 卜晨琛², 乔亚玲², 韩晓萍^{2*} (1.青海大学药学院, 西宁 810016; 2.青海省药品检验检测院/青海省中藏药现代化研究重点实验室/国家药品监督管理局中藏药质量控制重点实验室, 西宁 810016)

摘要: **目的** 建立同时测定不同产地炙甘草中 7 种成分含量的 UPLC 方法, 结合化学计量学软件进行分析, 对比研究不同产地炙甘草的质量情况。**方法** 采用 UPLC 仪, Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 35℃, 检测波长 0~13 min, 237 nm; 13~22 min, 360 nm; 22~25 min, 254 nm; 25~33 min, 265 nm, 进样量 1 μL。**结果** 共分离出 18 个共有峰, 并对其中 7 种成分定量, 结果甘草苷为 0.06%~1.37%; 芹糖甘草苷为 0.04%~0.76%; 芹糖异甘草苷为 0.003%~0.45%; 异甘草苷为 0.001%~0.68%; 新异甘草苷为 0.004%~0.08%; 甘草酸为 1.40%~2.60%, 甘草香豆素为 0.002%~0.15%。产地为甘肃的炙甘草中甘草苷和甘草酸的含量分别为 0.68% 和 2.15%, 产地为内蒙古的分别为 0.65% 和 2.05%, 产地为新疆分别为 0.60% 和 2.02%; 产地为甘肃的炙甘草批间相似度值最高; 产地为内蒙古的炙甘草批间相似度值较为集中, 但有 3 批样品离散; 产地为新疆的炙甘草批间相似度值整体较为离散。**结论** 所建立的方法稳定、可靠, 有效地对比了不同产地的炙甘草质量。

关键词: 炙甘草; 指纹图谱; 超高效液相色谱法; 化学计量学

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0756-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.027

Multi-indicator composition and chemometrics of honey-fried licorice from different origins

ZHANG Chun-ping^{1,2}, SONG Xia², BU Chen-chen², QIAO Ya-ling², HAN Xiao-ping^{2*} (1. Department of Pharmacy, Qinghai University, Xining 810016; 2. Qinghai Pharmaceutical Inspection and Testing Institute/Qinghai Key Laboratory for Modernization of Chinese and Xizang Medicine/State Drug Administration Key Laboratory for Quality Control of Chinese and Xizang Medicines, Xining 810016)

Abstract: Objective To establish an ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of 7 components in honey-fried licorice from different origins, and analyze them with chemometrics software to compare their quality. **Methods** An ultra performance liquid chromatograph was used with a Waters BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), with acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase with gradient elution. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, the column temperature was 35℃. The detection wavelength was 0~13 min, 237 nm; 13~22 min, 360 nm; 22~25 min, 254 nm, and 25~33 min, 265 nm, and the injection volume was 1 μL. **Results** Totally 18 common peaks were separated and 7 components were quantified: 0.06%~1.37% for glycyrrhizin; 0.04%~0.76% for apigenin; 0.003%~0.45% for apigenin isoglycyrrhizin; 0.001%~0.68% for isoglycyrrhizin; 0.004%~0.08% for neoisoglycyrrhizin; 1.40%~2.60% for glycyrrhizic acid; and 0.002%~0.15% for glycyrrhizin coumarin. The content of glycyrrhizin and glycyrrhizic acid was 0.68% and 2.15% respectively in honey-fried licorice from Gansu, while that was 0.65% and 2.05% respectively from Inner Mongolia, and 0.60% and 2.02%

作者简介: 张春平, 女, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事中藏药分析与质量控制研究, email: 1605571237@qq.com *通信作者: 韩晓萍, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事中藏药分析与质量控制研究, email: 89323352@qq.com

respectively from Xinjiang. The highest inter-batch similarity was found in Gansu; the inter-batch similarity was more concentrated in Inner Mongolia, but that of three batches of samples was discrete; and the inter-batch similarity was more discrete in Xinjiang. **Conclusion** The method is stable, reliable and effective in comparing the quality of honey-fried licorice from different origins.

Key words: honey-fried licorice; fingerprint; ultra performance liquid chromatography; chemometrics

甘草为豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Batal.) 或光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* Linn.) 的干燥根及根茎, 具有清热解毒, 补气益脾胃, 润肺祛痰, 缓急止痛, 调和诸药的作用^[1-3]。炙甘草是其常用炮制品, 甘草经蜜炙后可增强其补脾和胃、益气复脉的功效, 临床上可用于脾胃虚弱, 倦怠乏力, 心动悸, 脉结代的治疗^[4-10]。

目前, 虽有炙甘草药材的指纹图谱研究^[11-12], 但均采用 HPLC 方法且样本量较少、未对不同产地的炙甘草进行比较。本文通过 UPLC 法建立了炙甘草的指纹图谱, 可以在 33 min 内实现 18 个共有峰的分离, 色谱峰峰形好、保留时间稳定, 同时可以测定其中 7 种成分含量, 以达到高效、环保的分析目的。

甘草的产区主要有甘肃、新疆和内蒙古^[13], 炙甘草为甘草的蜜炙品, 炮制过程中需加 25% 的炼蜜进行高温炒制, 为了考察不同产地的炙甘草饮片之间的差异, 以及甘肃、新疆、内蒙古 3 个产地的炙甘草整体质量差异, 本文对炙甘草进行化学成分分析测定的同时对不同产地的炙甘草进行对比研究, 结合 ChemPattern 化学计量学软件进行指纹谱图分析和聚类分析, 以直观比较不同产地炙甘草的质量情况。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); BSA224S-CW 电子天平 (Sartorius); Milli-QA 超纯水器 (美国密理博)。

1.2 试剂

蔗糖甘草苷对照品 (批号: 74639-14-8)、蔗糖异甘草苷对照品 (批号: 120926-46-7)、异甘草苷对照品 (批号: 5041-81-6)、新异甘草苷对照品 (批号: 7014-39-3)、甘草香豆素对照品 (批号: 94805-82-0) (上海源叶生物科技有限公司, 含量以 98.0% 计); 甘草苷对照品 (批号: 111610-202209, 含量以 95.2% 计)、甘草酸铵对照品 (批号: 110731-202122, 含量以 94.4% 计) (中国食品药品检定研究院); 乙腈为色

谱纯、甲酸为色谱纯、其余试剂为分析纯。

74 批炙甘草样品均来源于 2023 年国家药品抽检药材, 其中甘肃产 31 批, 新疆产 18 批, 内蒙古产 25 批。经青海省药品检验检测院中药室主任宋霞鉴定, 均为正品。选取其中 20 批样品为代表样品, 建立炙甘草指纹图谱。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 以乙腈 (A) -0.1% 甲酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~6 min, 5%~13%A; 6~13 min, 13%~19%A; 13~13.1 min, 19%~21%A; 13.1~18 min, 21%~25%A; 18~20 min, 25%~32%A; 20~23 min, 32%~49%A; 23~25 min, 49%~55%A; 25~27 min, 55%~67%A; 27~30 min, 67%~75%A; 30~33 min, 75%~80%A), 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 变换检测波长 (0~13 min, 237 nm; 13~22 min, 360 nm; 22~25 min, 254 nm; 25~33 min, 265 nm); 柱温: 35 °C; 进样量: 1 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取甘草苷、蔗糖甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草酸铵、甘草香豆素对照品适量, 分别置 50 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇溶解并稀释至刻度作为母液, 分别取母液适量至 25 mL 量瓶中并稀释至刻度, 配制上述 7 种成分质量浓度分别为 16.08、12.82、8.25、12.44、8.11、23.52、4.10 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品粉末 (过三号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 100 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 空白溶液 取相应试剂溶液即 70% 乙醇为空白溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取“2.2”项下空白溶液、对照品溶液、供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，记录色谱图。图谱显示空白溶液无干扰，方法专属性符合要求。空白溶液、对照品溶液及供试品溶液的色谱图见图 1。

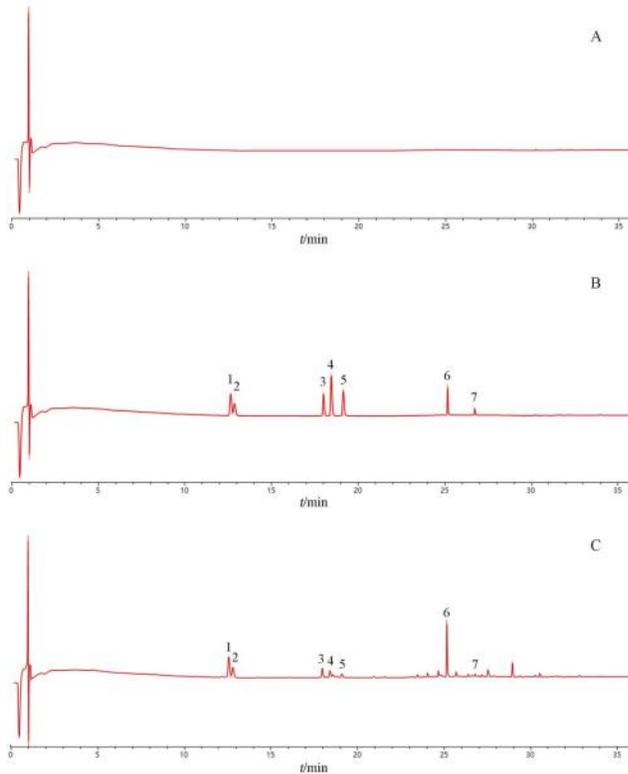


图 1 空白溶液 (A)、对照品溶液 (B) 及供试品溶液 (C) 色谱图
Fig 1 Chromatograms of blank solution (A)、control solution (B) and test solution (C)

1. 甘草苷 (glycyrrhizin); 2. 芹糖甘草苷 (apigenin); 3. 芹糖异甘草苷 (apigenin isoglycyrrhizin); 4. 异甘草苷 (isoglycyrrhizin); 5. 新异甘草苷 (neoisoglycyrrhizin); 6. 甘草酸 (glycyrrhizic acid); 7. 甘草香豆素 (glycyrrhizin coumarin)

2.3.2 线性关系考察 取稀释后的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行样品测定。结果甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草酸、甘草香豆素在相应线性范围内与峰面积呈良好的线性关系，结果见表 1。

2.3.3 精密度试验 精密吸取同一批 (11 号样品) 炙甘草供试品溶液 1 μL，连续进样测定 6 次，记录色谱图。以甘草苷峰为参照峰，计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间 $RSD < 1\%$ ，相对峰面积 $RSD < 2\%$ ($n = 6$)，表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批 (11 号样品) 炙甘草样品粉末 6 份，精密称定，按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液，精密吸取 1 μL，分别进样，记录色

表 1 回归方程、相关系数及线性范围

Tab 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range

成分	回归方程	R^2	线性范围 / (ng · mL ⁻¹)
甘草苷	$y = 5.91 \times 10^3 x + 4.63$	0.9992	3.2 ~ 32.2
芹糖甘草苷	$y = 4.78 \times 10^3 x - 0.22$	0.9990	2.6 ~ 25.6
芹糖异甘草苷	$y = 9.58 \times 10^3 x - 0.57$	0.9992	1.6 ~ 16.5
异甘草苷	$y = 1.31 \times 10^4 x - 1.006$	1.000	2.5 ~ 24.9
新异甘草苷	$y = 1.27 \times 10^4 x - 0.19$	0.9995	1.6 ~ 16.2
甘草酸	$y = 2.41 \times 10^3 x - 0.50$	0.9993	4.7 ~ 47.0
甘草香豆素	$y = 3.87 \times 10^3 x - 0.038$	0.9999	0.8 ~ 8.2

谱图。以甘草苷峰为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间 $RSD < 1\%$ ，相对峰面积的 $RSD < 2\%$ ，表明方法重复性好。甘草苷平均含量为 0.69% ($RSD = 1.4\%$)，芹糖甘草苷平均含量为 0.33% ($RSD = 1.7\%$)，芹糖异甘草苷平均含量为 0.02% ($RSD = 1.3\%$)，异甘草苷平均含量为 0.09% ($RSD = 1.8\%$)，新异甘草苷平均含量为 0.01% ($RSD = 0.60\%$)，甘草酸平均含量为 1.99% ($RSD = 1.0\%$)，甘草香豆素平均含量为 0.06% ($RSD = 1.4\%$) ($n = 6$)。

2.3.5 稳定性试验 精密吸取同一批 (11 号样品) 炙甘草供试品溶液 1 μL，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定，记录色谱图。以甘草苷峰为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间 $RSD < 1\%$ ($n = 7$)，相对峰面积的 $RSD < 2\%$ ($n = 7$)，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率 取炙甘草样品 (11 号样品) 0.1 g，共 6 份，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入“2.2.1”项下对照品母液适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，以“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图并计算加样回收率，结果 7 种成分的平均回收率为 100.09% ~ 101.20%， RSD 均 $< 2\%$ 。

2.4 样品含量测定

74 批炙甘草样品按“2.2.2”项下操作制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进行测定。结果 74 批炙甘草中均含有甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草酸、甘草香豆素 7 种化学成分，但不同批次之间各成分含量值差别较大：甘草苷为 0.06% ~ 1.37%，平均值为 0.60%；芹糖甘草苷为 0.04% ~ 0.76%，平均值为 0.35%；芹糖异甘草苷为 0.003% ~ 0.45%，平均值为 0.12%；异甘草苷含量为 0.001% ~ 0.68%，平均值为 0.08%；新异甘草苷为 0.004% ~ 0.08%，平均值为 0.05%；甘草酸为 1.40% ~ 2.60%，平均值

为 2.02%，甘草香豆素为 0.002% ~ 0.15%，平均值为 0.05%。化学成分含量测定聚类分析热图见图 2。

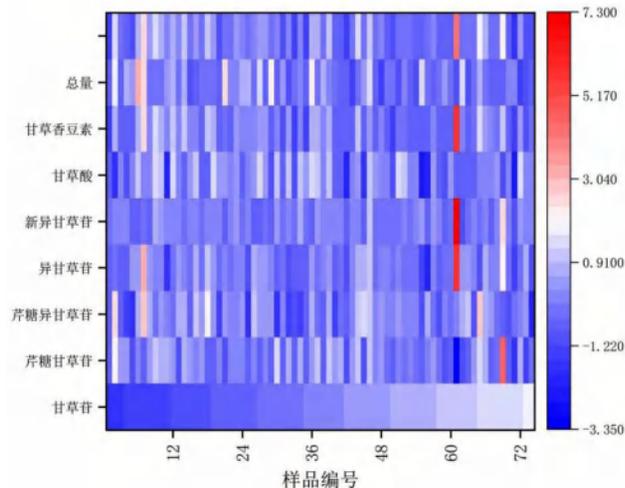


图 2 74 批炙甘草 7 种化学成分含量测定聚类分析热图
Fig 2 Heat map of cluster analysis of 74 batches of honey-fried licorice with determination of 7 components

2.5 不同产地 UPLC 图比较

将不同产地的炙甘草样品，按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录 UPLC 图（见图 3）。经过液相色谱图的比较，产地为甘肃、内蒙古、新疆的炙甘草 UPLC 图基本一致，3 个产地的炙甘草均具有 18 个主要色谱峰，主要化学成分一致，但不同产地炙甘草中的各主成分峰高略有不同，存在质量差异。

2.6 指纹图谱的建立

将“2.4”项下采集的图谱采用 ChemPattern 化学计量学软件进行数据分析处理，选取其中 20 批样品为代表样品，建立炙甘草指纹图谱方法并生成炙甘草共有模式的对照指纹图谱（见图 4、5），共有峰 18 个。经过与对照品比对，标定 2 号峰为甘草苷、3 号峰为芹糖甘草苷、4 号峰为芹糖异甘草苷、5 号峰为异甘草苷、7 号峰为新异甘草苷、13 号峰为甘草酸、15 号峰为甘草香豆素，这 7 个峰与 6 号峰、1 号峰、8 号峰、9 号峰、10 号峰、11 号峰、12 号峰、14 号峰、16 号峰、17 号峰、18 号峰均为共有峰。

2.7 指纹图谱数据评价

采用 ChemPattern 化学计量学软件以指纹图谱为参照，计算样品的相似度值（见图 6 及表 2）。74 批样品的相似度值为 0.58 ~ 0.99；产地为甘肃的炙甘草相似度值为 0.58 ~ 0.99，平均值为 0.85；产地为内蒙古的炙甘草相似度值为 0.59 ~ 0.99，平均均值为 0.81；产地为新疆的炙甘草相似度值

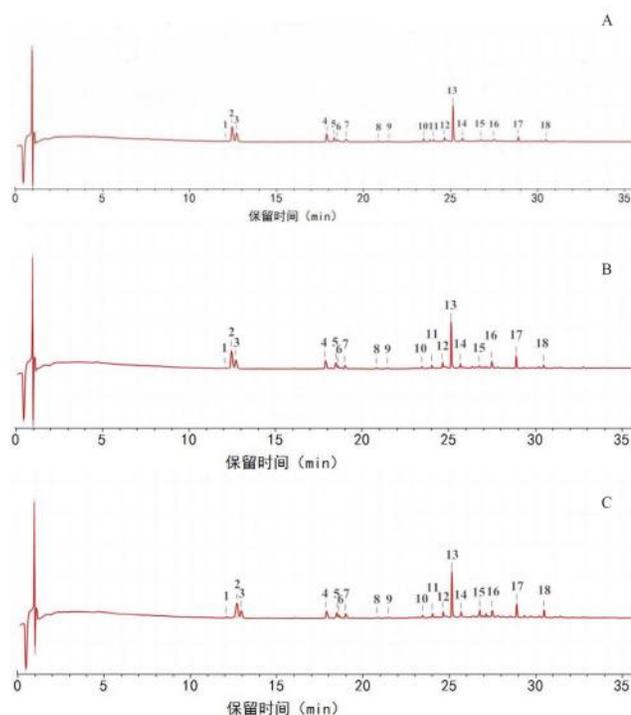


图 3 不同产地炙甘草 UPLC 图
Fig 3 UPLC graph of honey-fried licorice from different origins
A. 甘肃 (Gansu); B. 内蒙古 (Inner Mongolia); C. 新疆 (Xinjiang)

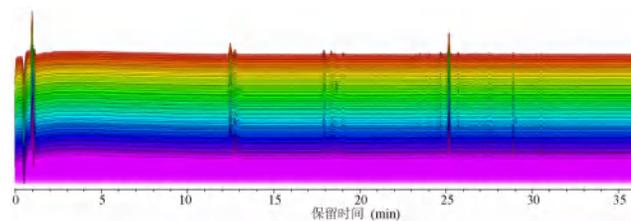


图 4 炙甘草指纹图谱
Fig 4 Honey-fried licorice fingerprint

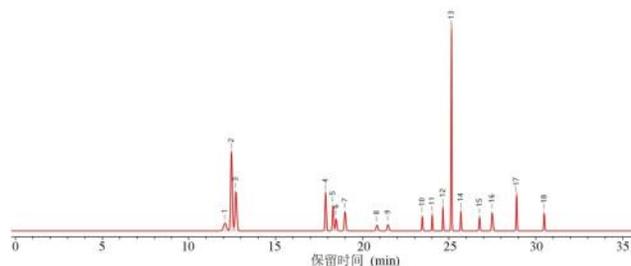


图 5 炙甘草 UPLC 对照指纹图谱
Fig 5 UPLC for fingerprint control of honey-fried licorice
2. 甘草苷 (glycyrrhizin); 3. 芹糖甘草苷 (apigenin); 4. 芹糖异甘草苷 (apigenin isoglycyrrhizin); 5. 异甘草苷 (isoglycyrrhizin); 7. 新异甘草苷 (neoisoglycyrrhizin); 13. 甘草酸 (glycyrrhizic acid); 15. 甘草香豆素 (glycyrrhizin coumarin)

为 0.58 ~ 0.99，平均均值为 0.76；由此可见，相同产地的炙甘草间均存在质量差异，不同产地之间相似度值的最低值与最高值的区间范围相差不大，但产地为甘肃的炙甘草相似度平均值最高，产地为新疆的炙甘草相似度平均值最低。

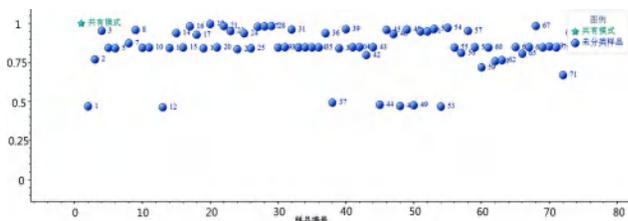


图 6 炙甘草相似度分析图

Fig 6 Similarity analysis of honey-fried licorice

2.8 化学计量学相似度分析

采用 ChemPattern 化学计量学软件对数据分析处理, 对采集数据按样品的标示产地进行分组并计算各批次炙甘草样品和对照指纹图谱的相似度, 相似度分析图 (见图 7)。结果显示, 产地标示为甘肃的炙甘草整体相似度较高, 产地标示为内蒙古的炙甘草整体相似度次之, 产地标示为新

表 2 74 批炙甘草相似度计算结果

Tab 2 Similarity of 74 batches of honey-fried licorice

序号	产地	相似度值	序号	产地	相似度值	序号	产地	相似度值
1	内蒙古赤峰	0.59	26	甘肃	0.98	51	内蒙古赤峰	0.99
2	甘肃	0.96	27	新疆	0.98	52	新疆	0.99
3	甘肃	0.99	28	甘肃	0.99	53	内蒙古阿拉善盟	0.59
4	甘肃	0.74	29	甘肃	0.74	54	甘肃	0.99
5	新疆	0.73	30	内蒙古	0.74	55	新疆	0.73
6	新疆	0.72	31	内蒙古	0.99	56	新疆	0.72
7	新疆	0.85	32	内蒙古	0.73	57	内蒙古	0.95
8	内蒙古	0.99	33	甘肃定西	0.74	58	内蒙古	0.74
9	新疆	0.73	34	内蒙古赤峰	0.74	59	甘肃	0.87
10	内蒙古	0.74	35	甘肃	0.74	60	内蒙古	0.74
11	新疆	0.64	36	新疆	0.91	61	新疆	0.74
12	新疆	0.58	37	新疆	0.59	62	内蒙古	0.92
13	新疆伊犁	0.73	38	甘肃	0.73	63	甘肃	0.76
14	甘肃	0.93	39	甘肃	0.99	64	甘肃	0.74
15	甘肃	0.74	40	内蒙古	0.74	65	新疆	0.93
16	甘肃	0.99	41	内蒙古	0.74	66	内蒙古	0.74
17	甘肃定西	0.95	42	甘肃	0.69	67	内蒙古	0.99
18	新疆	0.74	43	内蒙古赤峰	0.74	68	甘肃	0.74
19	甘肃定西	0.98	44	新疆	0.59	69	内蒙古	0.74
20	甘肃定西	0.74	45	甘肃定西	0.95	70	甘肃	0.74
21	内蒙古赤峰	0.99	46	甘肃	0.96	71	甘肃	0.85
22	内蒙古赤峰	0.99	47	甘肃	0.58	72	甘肃	0.94
23	内蒙古	0.74	48	甘肃	0.99	73	内蒙古	0.74
24	甘肃	0.92	49	内蒙古	0.69	74	新疆	0.73
25	甘肃	0.73	50	内蒙古	0.99	/	/	/

疆的炙甘草整体相似度最为分散; 该相似度分析图结果与“2.7”项下的相似度计算值结果一致。

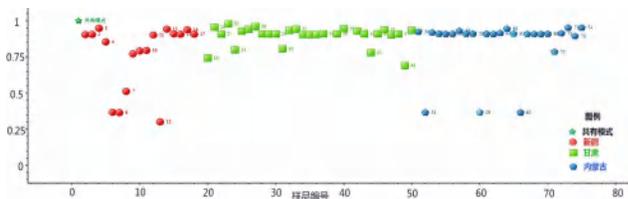


图 7 不同产地炙甘草相似度计算图

Fig 7 Calculation of similarity for honey-fried licorice from different origins

3 讨论

3.1 检测波长的选择

炙甘草的化学成分较为复杂, 通过二极管阵列检测器对样品进行全波长扫描共分离出 18 个色谱峰, 分析不同成分在不同的检测波长下呈现出的峰形、峰面积值及出峰的数量, 发现不同出峰时间在不同检测波长下可以将炙甘草的各种化学成分较好地表达出来, 因此选定 0 ~ 13 min 时 237 nm 为检测波长; 13 ~ 22 min 时 360 nm 为检测波长; 22 ~ 25 min 时 254 nm 为检测波长; 25 ~ 33 min 时 265 nm 为检测波长。

3.2 样品指纹图谱相似度分析

通过计算样品的相似度值发现, 74 批次样品的总体相似度分析值在 0.58 ~ 0.99, 其中有 7 批

较为离散,通过分析,离散值为产地标示为新疆和内蒙古的炙甘草样品,且结合性状分析发现,该 7 批样品的性状均较差,表现为饮片直径较小,表面颜色深浅不一同时含有杂质即地上茎部位。

3.3 不同产地样品分析

通过 UPLC 色谱分析对比,炙甘草中甘草酸含量最高且较为稳定,其次为甘草苷,其余化学成分均较低,新异甘草苷最低;通过对比不同产地的炙甘草后发现,产地为甘肃的炙甘草中甘草苷和甘草酸的含量整体最高,分别为 0.68% 和 2.15%, 15 ~ 18 号峰的峰面积值最低;产地为内蒙古的炙甘草中甘草苷和甘草酸的含量整体略低,分别为 0.65% 和 2.05%, 15 ~ 18 号峰的峰面积值略高;产地为新疆的炙甘草中甘草苷和甘草酸的含量整体最低,分别为 0.60% 和 2.02%, 15 ~ 18 号峰的峰面积值最高,不同产地炙甘草的甘草苷、甘草酸含量测定平均值及其余 16 个共有峰略有不同,但差别不大;通过对照指纹图谱相似度分析,产地为甘肃的炙甘草相似度最高且最为集中,相似度平均值最高;产地为内蒙古的炙甘草相似度值较为集中,但有 3 批样品离散;产地为新疆的炙甘草相似度值整体较为离散,相似度平均值最低。

4 结论

甘草主要分布于新疆、内蒙古、宁夏、甘肃、山西朔州,以野生为主。人工种植甘草主产于新疆、内蒙古、甘肃、宁夏部分地区;其中以甘肃产区产量最大、质量佳,占全国产量的 70% 以上;炙甘草是甘草的炮制品,在一定程度上甘草的质量可以反映炙甘草的质量。

本试验在同一色谱条件下,通过 UPLC 建立了炙甘草的指纹图谱并分离出 18 个共有峰,同时对其中甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、新异甘草苷、甘草酸、甘草香豆素 7 种化学成分进行了定量分析,结果甘草苷和甘草酸平均含量较高且可以较好地反映炙甘草的质量情况,其余成分含量均较低且批间差异较大,《中国药典》及各地

方标准将甘草苷、甘草酸列为含量测定指标较为合理;通过 UPLC 色谱图对比、化学成分对比后发现 3 个产地的炙甘草均具有 18 个共有峰,主成分相差不大;但通过指纹图谱对比后得出产地为甘肃的炙甘草整体质量最好,产地标示为内蒙古和新疆的炙甘草整体质量虽然不及甘肃的炙甘草,但所有检测指标均符合现行质量标准规定。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 88.
- [2] 段超慧. 甘草饮片质量分析与评价[J]. 中南药学, 2021, 19(9): 1925-1930.
- [3] 钟文峰, 张兰兰, 胡懿, 等. 甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 中南药学, 2022, 20(9): 2123-2128.
- [4] 王莎莎, 赵凌, 蔡广知. 炙甘草的质量评价[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(15): 129-131, 134.
- [5] 段伟萍, 李缘媛, 郑云枫, 等. 基于 LC-MS/MS 法分析生、炙甘草中水溶性成分[J]. 中成药, 2020, 42(5): 1237-1243.
- [6] 陈佳, 张权, 杨蕊, 等. 甘草药材及其炮制品炙甘草化学模式识别分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1963-1976.
- [7] 周倩, 戴衍朋, 郭威, 等. 基于顶空-气相色谱-离子迁移谱的生、炙甘草饮片挥发性有机物指纹图谱分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3857-3862.
- [8] 宋雪, 刘思佳, 樊建, 等. 基于炙甘草与炙甘草化学成分、药理作用差异的临床应用探讨[J]. 中国医药科学, 2022, 12(19): 114-117.
- [9] 张婧秋, 姜明瑞, 岳珠珠, 等. 基于蜜炙甘草性状特征与内在成分含量的相关性研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 16-19.
- [10] 魏照晴, 周静威, 陈振杰, 等. 浅谈甘草在肾性水肿中的应用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2022, 23(2): 186-188.
- [11] 周倩, 吕佳, 李贵海, 等. 蜜炙甘草饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1547-1550.
- [12] 崔淑芬, 张信青, Frank SCL, 等. HPLC 指纹图谱应用于炙甘草的炮制研究[J]. 中成药, 2007, 29(11): 1636-1639.
- [13] 苏苗, 张晶, 尤艳艳, 等. 不同产地甘草有效成分含量分析[J]. 中南药学, 2014, 12(10): 1022-1024.

(收稿日期: 2024-07-20; 修回日期: 2024-09-02)

综述

解吸电喷雾电离质谱成像技术在药物研究中的应用

徐磊¹, 陈宏瑞², 杜犀², 刘佳², 杨昊泽¹, 潘桂湘^{2*} (1. 天津中医药大学, 天津 301617; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300250)

摘要: 质谱成像 (MSI) 技术是一种无标记的分子成像方法, 因具有传统液质联用 (LC-MS)、气质联用 (GC-MS) 等分析技术所不具备的空间分辨能力, 逐步成为探究生物组织中药物及生物标志物精细空间分布的有力工具。解吸电喷雾电离质谱成像技术 (DESI-MSI) 是 MSI 的重要分支之一, 虽发展较二次离子质谱成像技术 (SIMS-MSI)、基质辅助激光解析电离质谱成像技术 (MALDI-MSI) 等晚, 但凭借其样品无需基质辅助处理、敞开式电离、操作简便等优点, 近年来发展迅猛, 应用日益广泛。本文就 DESI-MSI 的基本原理、操作流程做简要介绍, 并对其在药用植物生物合成途径、药物体内组织分布、精准医学生物标志物、药物安全性评价中的应用现状进行综述。

关键词: 解吸电喷雾电离质谱成像技术; 药物代谢; 质谱成像; 药用植物

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0762-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.028

Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging in pharmaceutical research

XU Lei¹, CHEN Hong-rui², DU Xi², LIU Jia², YANG Hao-ze¹, PAN Gui-xiang^{2*} (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617*; 2. *The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250*)

Abstract: Mass spectrometry imaging (MSI) is a label-free molecular imaging technique that has become an essential tool to determine the precise spatial distribution of drugs and biomarkers in biological tissues, thanks to its unique spatial resolution capabilities not found in traditional analytical methods such as liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI), a significant branch of MSI, is developed later than other techniques like secondary ion mass spectroscopy mass spectrometry imaging and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. However, due to its advantages, including matrix-free sample preparation, open-air ionization, and operational simplicity, DESI-MSI has seen rapid development and increasingly widespread use in recent years. This paper briefly introduced the basic principles and workflow of DESI-MSI and reviewed its current application in biosynthetic pathways of medicinal plants, drug tissue distribution, precision medicine biomarkers, and drug safety evaluation.

Key words: DESI-MSI; drug metabolism; mass spectrometry imaging; medicinal plant

现代药物开发和研究过程中, 对候选药物的吸收、分布、代谢、排泄和毒性 (ADMET) 的评估至关重要。各种分析技术在药物及其代谢物和相关生物标志物的检测中发挥着关键作用, 提供

基金项目: 天津市教委科研计划重点项目 (No. 2023ZD033)。

作者简介: 徐磊, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 3297793379@qq.com * 通信作者: 潘桂湘, 男, 研究员, 主要从事药物分析研究, email: guixiangp@163.com

了药物在体内的分布和递送等重要信息,有助于提升药物的有效性和安全性^[1]。目前,液质联用(LC-MS)、气质联用(GC-MS)平台仍是药物分析领域的主流技术,能够对药物的体内过程进行定性和定量分析^[2],但其样品前处理操作相对烦琐且需要组织均匀化处理,难以准确获取待测物在生物组织或药用植物的空间分布信息^[3-4]。

质谱成像(MSI)是一项新兴的分子成像技术,融合了质谱的高灵敏、高通量和直观成像的技术优势,近年来已成为药物研究的一种重要工具^[5-7]。该技术通过在真空或常压环境中对样品进行原位分析,可实现对药源性成分、内源性小分子、生物大分子、无机元素等的全面检测,并同时获取这些成分在空间上的原位分布信息。有别于放射性或荧光标记等成像技术,质谱成像无需对待测物进行标记,即可实现样品中多种成分高通量的原位信息获取^[8]。

解吸电喷雾电离质谱成像(DESI-MSI)是常压敞开式质谱成像技术的一种,无需复杂的样品前处理、无需在真空环境中离子化、无需进行额外的基质辅助,使得该技术对样品的破坏性较小,经质谱成像后样品还可进行后续的H&E染色等操作,成为小分子化合物开展质谱成像操作的首选。本文总结了DESI-MSI的原理、操作流程及其在药物研究中的应用,并展望了该技术未来的发展趋势。

1 DESI-MSI 技术简介

DESI-MSI由Cooks教授于2004年率先提出^[9]。样品无需依赖真空,在常压条件即可实现电离,且避免了辅助基质的使用,使MSI技术难度和分析成本大为降低,由此引领了敞开式MSI技术的快速发展。DESI离子源主要由喷针、3D可移动平台、离子传输管等部件组成(见图1)。目前普遍认为DESI-MSI的离子化原理是“液滴携带机制”。喷雾溶剂经蠕动泵输送至喷针,在氮气辅助下气化喷射至样品表面,通过喷雾形成的微小液膜对样品进行微萃取,使待测物带上电荷,实现目标分析物的解吸和电离^[10-11]。

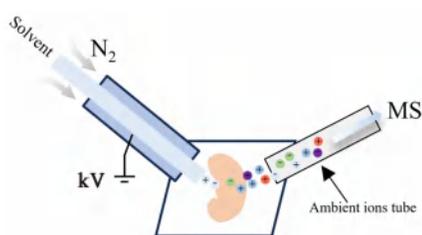


图1 DESI-MSI的离子化原理

Fig 1 Ionization principle of DESI-MSI

1.1 DESI-MSI 操作流程

1.1.1 样本前处理 取材后的新鲜生物样本宜用液氮快速冷冻,继而转移至 -80°C 低温保存。组织切片时,包埋剂建议使用3%左右的羧甲基纤维素(CMC)^[12],少用由聚乙二醇和聚乙烯醇组成的水溶性混合物(OCT),因为OCT在质谱检测过程中会产生一定程度的离子干扰。组织切片的厚度以 $10\sim 15\mu\text{m}$ 为佳,并保证切片的平整度(防止切片表面扭曲或折叠导致原位信息的丢失)。为了提高质谱成像检测灵敏度,降低基质效应的影响,还可对组织切片进行衍生化处理^[13],例如采用固体水凝胶覆盖组织切片表面,孵育反应一定时间后清洗,可显著降低组织中内源性物质对目标化合物的离子抑制;也可采用质谱标签探针某些功能性蛋白质(难电离的生物大分子)进行特异性抗体标记,通过间接检测被解吸的质谱标签离子,实现功能蛋白的原位质谱成像^[14]。

质地较坚硬的植物样本(如根、茎等),在包埋切片过程中,为避免样本发生碎裂,应适当增加切片厚度^[15];叶子等柔软的植物样本,因其表面疏水层容易导致待测物信号丢失或者响应降低,可采用压片法或基于PTFE膜的转印法进行制备^[16]。PTFE膜具有良好的吸收性,能使待测物尽量附着在膜表面进行原位分析,对DESI-MSI而言是一种不错的处理方法。

1.1.2 样本检测 在样本检测过程中,为获得较佳的成像效果,应对喷雾溶剂的组成、比例与流速、毛细管电压以及喷针的入射角和位置等参数进行优化^[17]。其中喷雾溶剂的流速和毛细管电压是两个较为关键的参数:流速过低会降低样品的解析效率,导致离子生成不足;流速过高则会导致样品离子信号被喷雾溶剂掩盖,降低待测物的信噪比。样品离子化效率(解吸和电离的程度),与喷雾溶剂的组成和比例密切相关。根据相似相溶原理,通常选取不同比例的甲醇、乙腈与水(或低浓度的酸水)进行优化。为降低喷雾溶剂引入的背景噪声,一般会在喷雾溶剂中加入内标或参比溶液,通过归一化处理消除这种影响^[18],例如Waters公司的DESI-XS成像系统建议用户在分析时向喷雾溶剂中加入一定浓度的亮氨酸脑啡肽^[19]。

毛细管电压的调节对不同类型化合物的质谱响应也具有显著影响,根据待测物的理化性质,调整和优化正负模式下的电压,可以提高待测物的分析灵敏度和信号稳定性。此外,喷针的入射

角度和位置也是影响成像效果的重要因素之一,一般以 75° 入射角度为基准进行微调,调节喷嘴与样品表面之间的距离,使喷雾液滴与样品表面充分接触,可进一步提高样品的离子化效率^[20]。

1.1.3 数据分析 质谱成像采集的数据包含大量信息,需要降噪、去卷积、归一化等处理以挖掘出有用的数据信息。市面上常用的数据处理软件

或工具包如表 1 所示。可以利用商业软件在特定厂商的 MSI 质谱仪上进行无缝的数据处理、分析,也可以先将 MSI 质谱数据转换为通用的数据格式,然后利用第三方软件或开源工具包,进行不同数据平台的交叉处理^[21-23],之后使用主成分分析(PCA)、聚类分析等识别和揭示不同样本间的相似性与差异性,为组学分析提供有力的支撑^[24]。

表 1 DESI-MSI 质谱成像数据处理常用软件包

Tab 1 Commonly used software package for DESI-MSI mass spectrometry imaging data processing

名称	数据格式	特点	网址
HDI (High Definition Imaging)	.raw	Waters 公司的商业软件,可对不同提取离子进行 RGB 通道叠加分析,并利用附带的 MSI Analyte Browser 等工具进行化合物的鉴定和聚类分析	https://www.waters.com/nextgen/cn/zh.html
MSiReader	All	开源软件,可兼容多种仪器数据格式,能直观展示出不同分子在样品中的分布情况,并且绘制聚类热图、轮廓图等	https://msireader.com/
Cardinal	imzML or .raw 等	开源软件,可提供多种数据可视化选项,支持图像的定量分析和统计分析;基于 R 语言环境运行,要求使用者具有一定的编程基础	https://cardinalmsi.org/
MassImager	All	科迈恩公司的商业软件,可对不同格式数据进行直接转换,实现多元变量统计及聚类分析	http://www.chemmind.com/cn/msi
SCiLS Lab	.raw or Bruker	Bruker 公司的商业软件,可直接读取 Waters 公司的 DESI-MSI 数据,并支持多个数据集同时处理,进行大规模样本分析	https://www.bruker.com/zh.html

1.2 DESI-MSI 技术进展

1.2.1 空间分辨率与灵敏度 DESI-MSI 的空间分辨率通常为 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 。为满足生命科学、医学领域对更小尺寸样品质谱成像的需求,科学家将探针和微小毛细管解吸电离技术相结合,研发了具有更高空间分辨率的 nano-DESI-MSI^[25],将空间分辨率提升至 $12 \mu\text{m}$ 。基于 nano-DESI-MSI 开发的集成微流控探针(iMFP),在保持高空间分辨率的情况下,经分析流程的优化可大幅缩短分析时间^[26]。气流辅助解吸电喷雾电离质谱成像(AFADESI-MSI)是 DESI-MSI 的另一重要进展。在质谱入口和采样端之间增加局部真空室,利用气体压力梯度,可聚焦并引导溅射自样品表面的离子,使离子能够更高效地进入质谱系统,突破了传统 DESI 技术对样品尺寸的限制,从而大幅提升检测灵敏度和成分覆盖范围。目前,AFADESI-MSI 技术已被成功应用于大鼠全身组织切片中药物、代谢物、内源性物质的检测,实现了待测物在不同器官、组织及全身的可视化呈现^[27],适用于药物代谢动力学、肿瘤诊断及疾病发病机制的研究^[28-30]。

1.2.2 定量 MSI 对不同组织或同一组织的不同区域进行 MSI 定量分析,可提供药代、药理、毒理学等方面的见解。然而基质效应、提取效率、组织异质性仍是目前定量 MSI 面临的主要挑战。

目前开发的 DESI-MSI 定量方法,主要有标准品斑点法和模拟组织法。前者是将系列浓度的标准品溶液直接滴加到载玻片上,将检测到的离子信号强度与待测物浓度建立标准曲线进行定量;后者是将其滴加在空白对照组的样品切片上。相对而言,第一种方法忽略了组织异质性对离子化过程的干扰和影响,而第二种方法能更好地模拟真实组织样品^[31-32]。Vismeh 等^[33]通过直接在对照组大鼠大脑组织上滴加添有内标的系列浓度标准品溶液,并基于标准品的浓度与经内标校正后的响应绘制标准曲线,计算给予 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯氮平后大鼠单个脑组织切片中氯氮平原形药物的含量为 $0.2 \sim 1.2 \text{ ng}$,这一结果的可靠性得到了 LC-MS/MS 方法的确证。

2 DESI-MSI 在药物研究中的应用

DESI-MSI 技术提供的空间分布信息,可为药用植物合理利用,药物体内药物代谢、药效评价,精准医学诊疗以及药物安全性评价提供独到的视角,有助于深入理解化合物在复杂生物系统中的运行途径和作用方式(见图 2)。

2.1 药用植物生物合成途径

DESI-MSI 能够直观展示植物初生或次生代谢产物(如黄酮类、生物碱、萜类等)在组织中的精确定位^[34],结合时间序列可进一步追踪这些成分在不同部位的动态变化,揭示药用植物的生

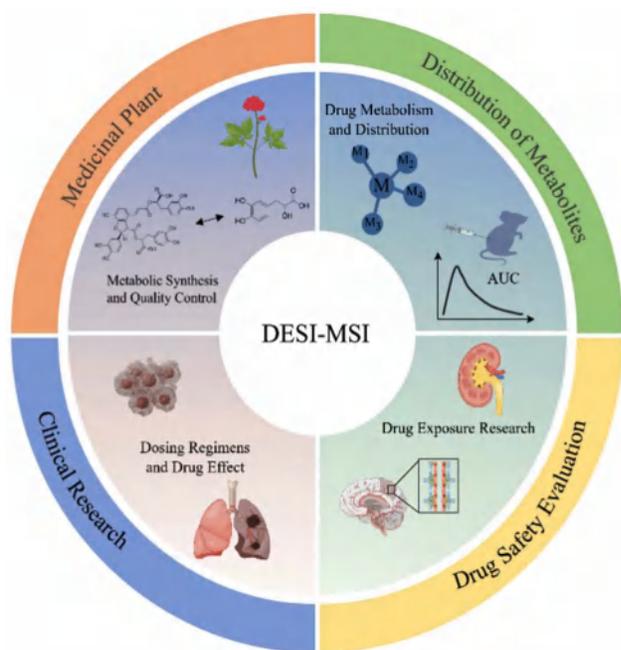


图 2 DESI-MSI 在药物研究中的应用 (本图由 Figdraw 绘制)

Fig 2 Application of DESI-MSI in drug research (This figure was drawn by Figdraw)

物合成途径及调控机制。Tong 等^[35]利用 DESI-MSI 分析丹参中多种酚酸类化合物的空间分布, 提出丹参素是丹参中多种酚酸合成的重要前体成分, 在丹参生物合成途径中扮演关键角色。陈文静等^[36]对芍药根进行 DESI-MSI 分析后发现, 具有保肝、活血作用的芍药苷主要分布在木质部, 而具有补血作用的芍药内酯苷则主要分布在皮质部, 这种活性成分的空间分布差异对于芍药根的质量评价具有重要参考意义。Mohana Kumara 等^[37]对四叶龙胆的根、叶片和果实中吲哚生物碱进行 DESI-MSI 分析, 结果显示生物碱在叶中分布较少, 主要富集在果实以及根的表皮和皮层。Lorenzen 等^[38]也利用 DESI-MSI 分析了四叶龙胆叶片中生物碱的分布特征, 发现利血平及其关键合成前体主要分布在叶脉区域, 而在叶面区域含量较低, 这种独特的分布差异为生物碱的合成与运输提供了参考。Srimany 等^[39]利用 DESI-MSI 发现青脆枝中的喜树碱在树皮中的含量高于茎和叶, 表明树皮部位可能是喜树碱合成的重要场所。Xi 等^[40]基于 DESI-MSI 表征了青钱柳叶片中黄酮、氨基酸等多种成分的空间分布以及生物合成途径, 提出绿原酸在黄酮类成分的合成中扮演了关键角色。

2.2 药物体内组织分布

药源性成分(原形药物及其代谢物)在体内不同组织脏器的暴露水平, 与药效的发挥息息相

关^[41-42]。Holm 等^[43]通过 DESI-MSI 分析了小鼠灌服环孢素后全身的组织分布特征, 发现给药后 4 h 药物原形主要富集在胰腺和肝脏, 24 h 原形药物消失但在肠道中可检测到环孢素的代谢产物。赵一帆^[44]运用 DESI-MSI 对小鼠灌服双氢青蒿素后 0.5、2、6 h 的全身组织切片进行原位分析, 发现多种代谢物主要在胃肠道分布并且随时间呈现出从无到有的分布特征。Mesa Sanchez 等^[45]利用 nano-DESI-MSI 技术, 对双氯芬酸在小鼠肾脏、肝脏中的代谢物进行原位分析, 发现代谢物双氯芬酸葡萄糖醛酸苷、羟基双氯芬酸在肾脏中分别富集于肾的内髓质和皮质, 而在肝脏中这两个代谢物则分布较为均匀。He 等^[46]采用 AFADESI-MSI 对大鼠腹腔注射抗失眠候选药物 N_6 - (4- 羟基苄基) - 腺苷 (NHBA) 的全身组织切片测定中发现, NHBA 会引起与神经系统疾病密切相关的神经递质 γ - 氨基丁酸和神经递质前体胆碱等多种代谢分子的显著变化, 提示它们与药物的作用机制具有潜在联系。钩藤中单萜吲哚生物碱是治疗中枢神经系统疾病的潜在活性成分, 有研究采用 DESI-MSI 分析了大鼠灌服钩藤生物碱后大脑中的药物分布情况, 经内标归一化处理后的半定量结果表明, 更容易透过血脑屏障的脂溶性吲哚类生物碱在多个脑部微区的含量最高, 尤其在松果体部位最为显著^[47]。Yamamoto 等^[48]使用 DESI-MSI 发现单次鼻腔吸入 1 μm 粒径的环索奈德后, 药物原形主要分布在气道上皮中, 而代谢物主要分布在肺组织中。上述研究展示了 DESI-MSI 技术在药物体内过程、靶部位发现、药物递送研究中的独特优势, 为药物代谢、药效和生物药剂学研究提供了技术支持。

2.3 精准医学 - 生物标志物

明确药物干预后内源性成分所发生的种类、浓度、组织分布等改变, 对寻找药物靶点、阐明疾病发生发展机制、发现生物标志物至关重要^[49]。Wang 等^[50]采用 DESI-MSI 与 MALDI-MSI 相结合的方式, 揭示了糖尿病肾病大鼠肾脏中发生的脂质代谢重编程, 两种技术的结合极大地提升了代谢物的检测覆盖率, 为糖尿病肾病的脂质分析提供了更全面的空间分布和代谢信息。Wang 等^[51]应用空间代谢组学的方法, 对暴露于马兜铃酸 I 的大鼠肾脏中多种内源性代谢物的空间分布和含量变化进行表征, 通过富集的差异代谢物生物通路分析, 发现精氨酸 - 肌酸、尿素循环等途径中精氨酸、尿素以及肌酐等代谢物的变化明显, 提

示这些代谢通路与马兜铃酸肾毒性具有潜在联系。Song 等^[52]对抑郁症小鼠脑部的 DESI-MSI 分析发现,包括大脑皮层的多个脑部微区中,与能量代谢和嘌呤代谢相关的代谢物组间变化明显。在一项区分乳腺癌的分型研究中,DESI-MSI 被用于识别不同乳腺癌亚型之间的差异代谢物,结果显示牛磺酸、尿酸等多种代谢物在不同亚型中具有显著差异,这种从空间分布上筛选的生物标志物对于区分疾病表型具有重要意义^[53]。

2.4 药物安全性评价

毒性药物在体内的组织分布特征是药物肝毒性、肾毒性研究中的重要方面^[54]。茜草素是一种具有肾毒性的天然产物,有研究基于 DESI-QTOF-MSI 技术发现茜草素在大鼠给药后 1、2、4 h 的时间点下,肾脏中的代谢产物卢西定特异性地分布在外髓质区域,并且呈时间依赖性降低,揭示了毒性成分在靶器官中的时空代谢特征^[55]。Jiang 等^[56]结合 AFADESI-MSI 与网络毒理学的代谢网络以及相关靶点,提出氧化应激、能量代谢以及脂质代谢紊乱与何首乌肝脏损伤密切相关。对乙酰氨基酚是一种过量使用会导致急性肝肾损伤的药物,Akakpo 等^[57]利用 DESI-MSI 在对乙酰氨基酚致急性肾损伤的研究中发现,造成肾毒性的氧化代谢产物主要在肾皮质部位蓄积,通过与免疫染色结果联合分析发现,肾皮质部位恰好与代谢酶 CYP2E1 表达较高的区域相吻合,这从空间分布上解释了对乙酰氨基酚造成肾损伤的毒性机制。通过与空间代谢组学、网络毒理学等手段结合,DESI-MSI 成为药物安全性评估的一种有力手段。

3 结语与展望

DESI-MSI 作为一种创新的分子成像技术,在药物递送、代谢及临床研究等领域展现出了独特的魅力,已经成为药物研究领域的重要工具^[58]。然而,DESI-MSI 在灵敏度和空间分辨率等方面,依然存在挑战:对于在样品中响应较低或者存在基质效应的成分,通过特异性的组织衍生生化前处理,有望提升其分析灵敏度;对于影响离子图像精度的空间分辨率,通过改进离子化方式与数据采集模式,有望在单位面积上获得更高的空间分辨率。在数据处理方面,机器学习和人工智能的引入,有助于进一步提升数据处理和待测物空间定位的精确性,实现对化学成分的自动

化识别,推动空间代谢组、转录组等多组学协同发展。此外,开放的数据处理平台能够促进研究人员之间的交流与学习,为跨学科合作提供新的契机。随着 DESI-MSI 与其他分析技术的融合以及数据处理技术的不断更新,相信质谱成像在未来的药物研究与开发中,有望发挥更为关键的作用,推动药物科学的进一步发展。

参考文献

- [1] Jia CY, Li JY, Hao GF, et al. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery [J]. *Drug Discovery Today*, 2020, 25 (1): 248-258.
- [2] Beccaria M, Cabooter D. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis [J]. *Analyst*, 2020, 145 (4): 1129-1157.
- [3] 李元元,王彩虹,生宁,等. 中药多成分药代动力学分析技术研究进展 [J]. *质谱学报*, 2023, 44 (1): 1-12.
- [4] Jiao WJ, Qin N, Wang K, et al. LC-MS/MS for determination of aesculetin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2022, 36 (1): 5233-5239.
- [5] Li FK, Wang M, Zhou J, et al. Nanocomposites of boronic acid-functionalized magnetic multi-walled carbon nanotubes with flexible branched polymers as a novel desorption/ionization matrix for the capture and direct detection of cis-diol-flavonoid compounds coupled with MALDI-TOF-MS [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 429: 128055.
- [6] Castellino S, Groseclose MR, Wagner D. MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development [J]. *Bioanalysis*, 2011, 3 (21): 2427-2441.
- [7] 孙雪倩,杨彬,李遇伯. 多基原中药质量评价研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55 (12): 4214-4224.
- [8] Zhao YS, Li C. Mass spectrometry imaging: applications in drug distribution studies [J]. *Curr Drug Metab*, 2015, 16 (9): 807-815.
- [9] Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization [J]. *Science*, 2004, 306 (5695): 471-473.
- [10] Bennett RV, Gamage CM, Fernández FM. Imaging of biological tissues by desorption electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Vis Exp*, 2013, 12 (77): 50575-50582.
- [11] Hu WY, Han YH, Sheng YQ, et al. Mass spectrometry imaging for direct visualization of components in plants tissues [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44 (18): 3462-3476.
- [12] 陈红,李信,陈菲,等. 两种冰冻切片包埋剂在解吸电喷雾电离质谱成像分析检测中的性能比较 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2022, 53 (2): 303-309.
- [13] Song XW, Luo ZG, Li X, et al. In situ hydrogel conditioning of tissue samples to enhance the drug's sensitivity

- in ambient mass spectrometry imaging [J]. *Anal Chem*, 2017, 89 (12): 6318-6323.
- [14] Song XW, Zang QC, Li C, et al. Immuno-desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging identifies functional macromolecules by using microdroplet-cleavable mass tags [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62 (9): e202216969.
- [15] 王慧敏. 基于高分辨液质联用和质谱成像技术人参、西洋参和三七蒸制前后多类别化学成分转化研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [16] Horn PJ, Chapman KD. Imaging plant metabolism in situ [J]. *J Exp Bot*, 2024, 75 (6): 1654-1670.
- [17] Maciel LÍL, Bernardo RA, Martins RO, et al. Desorption electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization as imaging approaches for biological samples analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415 (18): 4125-4145.
- [18] 袁俊鹏, 马艳, 郭庆梅. 质谱成像技术在药用植物研究中的应用 [J]. *植物生理学报*, 2023, 60 (1): 1-7.
- [19] Hsu CC, Dorrestein PC. Visualizing life with ambient mass spectrometry [J]. *Current Opin Biotechnol*, 2015, 31: 24-34.
- [20] 龚欢, 葛庆华. 敞开式离子化质谱及其在体内药物分析中的应用 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37 (1): 1-12.
- [21] Schramm T, Hester Z, Klinkert I, et al. imzML—— a common data format for the flexible exchange and processing of mass spectrometry imaging data [J]. *J Proteomics*, 2012, 75 (16): 5106-5110.
- [22] Bokhart MT, Nazari M, Garrard KP, et al. MSiReader v1.0: evolving open-source mass spectrometry imaging software for targeted and untargeted analyses [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2018, 29 (1): 8-16.
- [23] He JM, Huang LJ, Tian RT, et al. MassImager: a software for interactive and in-depth analysis of mass spectrometry imaging data [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1015 (26): 50-57.
- [24] Pirro V, Eberlin LS, Oliveri P, et al. Interactive hyperspectral approach for exploring and interpreting DESI-MS images of cancerous and normal tissue sections [J]. *Analyst*, 2012, 137 (10): 2374-2380.
- [25] Laskin J, Heath BS, Roach PJ, et al. Tissue imaging using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2012, 84 (1): 141-148.
- [26] Li XT, Hu H, Yin RC, et al. High-throughput nano-DESI mass spectrometry imaging of biological tissues using an integrated microfluidic probe [J]. *Anal Chem*, 2022, 94 (27): 9690-9696.
- [27] He JM, Sun CL, Li TG, et al. A sensitive and wide coverage ambient mass spectrometry imaging method for functional metabolites based molecular histology [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 5 (11): 1800250.
- [28] Huang LJ, Mao XX, Sun CL, et al. Molecular pathological diagnosis of thyroid tumors using spatially resolved metabolomics [J]. *Molecules*, 2022, 27 (4): 1390-1390.
- [29] Wang H, Fu WQ, Huo ML, et al. Spatial-resolved metabolomics reveals tissue-specific metabolic reprogramming in diabetic nephropathy by using mass spectrometry imaging [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (11): 3665-3677.
- [30] Sun CL, Li TG, Song XW, et al. Spatially resolved metabolomics to discover tumor-associated metabolic alterations [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (1): 52-57.
- [31] Unsihuay D, Mesa Sanchez D, Laskin J. Quantitative mass spectrometry imaging of biological systems [J]. *Annu Rev Phys Chem*, 2021, 72: 307-329.
- [32] Prideaux B, Lenaerts A, Dartois V. Imaging and spatially resolved quantification of drug distribution in tissues by mass spectrometry [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 44: 93-100.
- [33] Vismeh R, Waldon DJ, Teffera Y, et al. Localization and quantification of drugs in animal tissues by use of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging [J]. *Anal Chem*, 2012, 84 (12): 5439-5445.
- [34] Dong YH, Li B, Malitsky S, et al. Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: a review [J]. *Frontiers In Plant Science*, 2016, 7: 60.
- [35] Tong Q, Zhang C, Tu Y, et al. Biosynthesis-based spatial metabolome of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by combining metabolomics approaches with mass spectrometry-imaging [J]. *Talanta*, 2022, 238 (Pt 2): 123045.
- [36] 陈文静, 郑钰宁, 赵琳, 等. DESI-MSI 和 UPLC 分析芍药根不同组织药效成分的分布 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (16): 4333-4340.
- [37] Mohana Kumara P, Uma Shaanker R, Pradeep T. UPLC and ESI-MS analysis of metabolites of *Rauvolfia tetraphylla* L. and their spatial localization using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometric imaging [J]. *Phytochemistry*, 2019, 159: 20-29.
- [38] Lorensen MDBB, Bjarnholt N, St-Pierre B, et al. Spatial localization of monoterpene indole alkaloids in *Rauvolfia tetraphylla* by high resolution mass spectrometry imaging [J]. *Phytochemistry*, 2023, 209: 113620.
- [39] Srimanya A, Ifa DR, Naik HR, et al. Direct analysis of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) [J]. *Analyst*, 2011, 136 (15): 3066-3068.
- [40] Xi HT, Xu WX, He FX, et al. Spatial metabolome of biosynthesis and metabolism in *Cyclocarya paliurus* leaves [J]. *Food Chem*, 2024, 443: 138519.
- [41] Liang Y, Wang GJ, Xie L, et al. Recent development in liquid chromatography/mass spectrometry and emerging technologies for metabolite identification [J]. *Curr Drug Metab*, 2011, 12 (4): 329-344.
- [42] 王颂凯, 邹宇琛, 孙士鹏, 等. 质谱成像技术前沿进展及其在药物研究中的应用 [J]. *中国药科大学学报*, 2023,

- 54 (6): 653-661.
- [43] Holm NB, Deryabina M, Knudsen CB, et al. Tissue distribution and metabolic profiling of cyclosporine (CsA) in mouse and rat investigated by DESI and MALDI mass spectrometry imaging (MSI) of whole-body and single organ cryo-sections [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414 (24): 7167-7177.
- [44] 赵一帆. 双氢青蒿素在小鼠体内代谢产物及其分布研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- [45] Mesa Sanchez D, Brown HM, Yin R, et al. Mass spectrometry imaging of diclofenac and its metabolites in tissues using nanospray desorption electrospray ionization [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1233: 340490.
- [46] He JJ, Luo ZG, Huang L, et al. Ambient mass spectrometry imaging metabolomics method provides novel insights into the action mechanism of drug candidates [J]. *Anal Chem*, 2015, 87 (10): 5372-5379.
- [47] Gao L, Zhang ZJ, Wu WY, et al. Quantitative imaging of natural products in fine brain regions using desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI): uncaria alkaloids as a case study [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414 (17): 4999-5007.
- [48] Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, et al. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μm aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging [J]. *Int J Pharm*, 2021, 595: 120241.
- [49] Jove M, Spencer J, Clench M, et al. Precision pharmacology: mass spectrometry imaging and pharmacokinetic drug resistance [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 141: 153-162.
- [50] Wang ZH, Fu WQ, Huo ML, et al. Spatial-resolved metabolomics reveals tissue-specific metabolic reprogramming in diabetic nephropathy by using mass spectrometry imaging [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (11): 3665-3677.
- [51] Wang ZH, He BS, Liu YQ, et al. In situ metabolomics in nephrotoxicity of aristolochic acids based on air flow-assisted desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10 (6): 1083-1093.
- [52] Song YL, Xiao F, Aa JY, et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging techniques depict a reprogramming of energy and purine metabolism in the core brain regions of chronic social defeat stress mice [J]. *Metabolites*, 2024, 14 (5): 284.
- [53] Santoro AL, Drummond RD, Silva IT, et al. In situ DESI-MSI lipidomic profiles of breast cancer molecular subtypes and precursor lesions [J]. *Cancer Res*, 2020, 80 (6): 1246-1257.
- [54] Dannhorn A, Doria ML, McKenzie J, et al. Targeted desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging for drug distribution, toxicity, and tissue classification studies [J]. *Metabolites*, 2023, 13 (3): 377.
- [55] Ishii Y, Nakamura K, Mitsumoto T, et al. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 161: 112851.
- [56] Jiang HY, Gao HY, Li J, et al. Integrated spatially resolved metabolomics and network toxicology to investigate the hepatotoxicity mechanisms of component D of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115630.
- [57] Akakpo JY, Olivos H, Shrestha B, et al. Spatial analysis of renal acetaminophen metabolism and its modulation by 4-methylpyrazole with DESI mass spectrometry imaging [J]. *Toxicol Sci*, 2024, 198 (2): 328-346.
- [58] Zhao C, Dong JY, Deng LL, et al. Molecular network strategy in multi-omics and mass spectrometry imaging [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2022, 70: 102199.

(收稿日期: 2024-09-23; 修回日期: 2024-11-23)

I 型干扰素在肺炎发生发展中的作用机制研究进展

岳瑞琪¹, 张小峰², 杨静³, 尹建运⁴, 杨兰楠¹, 李盼英¹, 黄莉³, 倪倩^{2*} (1. 兰州大学第二临床医学院, 兰州 730000; 2. 兰州大学第二医院小儿呼吸科, 兰州 730000; 3. 兰州大学第二医院小儿肾病科, 兰州 730000; 4. 武汉市武昌医院儿科, 武汉 430064)

摘要:肺炎是肺部的感染性炎症, 通常由细菌、病毒或真菌感染引起, 能够损伤肺部气体交换, 成为多种肺部疾病的诱因。在肺部炎症的病理过程中, 干扰素反应是一个重要的驱动因素。I 型干扰素 (IFN- I) 主要由固有免疫细胞产生, 是人类抗病毒感染的关键细胞因子, 能够在防御呼吸道病毒传播方面发挥重要作用。随着对 IFN- I 研究的不断深入, 人们逐渐发现其在相同或不同病原体感染中具有多重作用, IFN- I 不仅在病毒感染后被诱导, 在细菌和真菌感染时也会被激活, 不同病原体激活 IFN- I 的信号通路可能引发相反或不稳定的免疫反应。本文将重点探讨 IFN- I 的激活机制及其信号传导途径, 分析其在驱动和维持肺部炎症中的作用, 以期对肺炎的临床治疗提供新的思路和治疗策略。

关键词: I 型干扰素; 肺部疾病; 感染; 炎症; 信号传导

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0769-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.029

Mechanism of type I interferons in the onset and progression of pneumonia

YUE Rui-qi¹, ZHANG Xiao-feng², YANG Jing³, YIN Jian-yun⁴, YANG Lan-nan¹, LI Pan-ying¹, HUANG Li³, NI Qian^{2*} (1. *The Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000*; 2. *Department of Pediatric Respiratory Medicine, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000*; 3. *Department of Pediatric Nephrology, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000*; 4. *Department of Pediatrics, Wuhan Wuchang Hospital, Wuhan 430064*)

Abstract: Pneumonia, an infectious inflammation of the lungs, is typically caused by bacterial, viral, or fungal pathogens. This condition disrupts pulmonary gas exchange and serves as a precursor to various pulmonary diseases. Within the pathological framework of lung inflammation, the interferon response emerges as a pivotal driver. Type I interferons (IFN- I), predominantly produced by the innate immune cells, are essential cytokines in human antiviral defense, playing a critical role in curbing respiratory viral spread. With research into IFN- I, their multifacet roles in responses to infections by identical or distinct pathogens have become increasingly apparent. IFN- I are not only induced after the viral infections but also activated in response to bacterial and fungal pathogens. Intriguingly, the IFN- I signaling pathways triggered by different pathogens may lead to divergent or even unstable immune responses. This review delved into the mechanism underlying IFN- I activation and its associated signaling pathways, and emphasized their role in initiating and sustaining pulmonary inflammation to provide new insights into therapeutic strategies for the clinical management of pneumonia.

Key words: type I interferon; lung disease; infection; inflammation; signal transduction

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (No. 2022-0405-JCC-2136); 兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划临床拔尖技术研究项目 (No. CY2022-BJ-08)。

作者简介: 岳瑞琪, 女, 硕士研究生, 主要从事小儿呼吸系统疾病的诊断与治疗研究, email: yueruiqi1002@163.com *通信作者: 倪倩, 女, 硕士研究生导师, 教授, 主要从事小儿呼吸系统疾病的诊断与治疗研究, email: natelieniqian@yeah.net

肺组织是通过肺泡上皮和周围毛细血管进行气体交换的主要器官,常受环境中病原微生物的侵袭,从而导致肺部感染及相关疾病的发生^[1]。为了抵御随空气吸入或血液携带的有害颗粒、毒素和过敏原,肺组织具备复杂的防御机制。其中,炎症反应的调节在抵御病原体入侵方面发挥着重要作用^[2]。

干扰素(IFN)是肺部炎症的重要调节因子,主要由固有免疫细胞产生,在参与先天免疫应答、病原体识别、免疫调节和肿瘤防御中发挥重要作用^[3]。IFN可分为三大类:I型、II型和III型IFN。其中,I型干扰素(IFN-I)包括IFN- β 、IFN- ω 、IFN- κ 、IFN- ϵ 、IFN- ζ 、IFN- δ 、IFN- τ 及14种IFN- α 亚型^[4-5]。IFN-I表达广泛,通过与干扰素受体(IFNAR1/IFNAR2)结合,激活信号传导通路,促进抗病毒基因的表达^[6-8]。IFN-I的主要生理功能包括诱导受感染细胞进入抗病毒状态、调节免疫反应及增强适应性免疫反应^[9-11]。宿主、病原体和环境因素的多样性使得IFN-I在不同情况下发挥多重作用^[12-13]。尽管其抗病毒和免疫调节作用被广泛认可,但在某些情况下,IFN-I也可能促进持续性病毒感染,并且在自身免疫性疾病中呈现出双刃剑效应^[14-16]。因此,深入探讨IFN-I的激活机制和信号传导路径及其在肺部炎症中的作用,能够为理解肺部疾病的发病机制和开发新型治疗策略提供重要理论基础。本文将系统分析IFN-I在肺部炎症中的作用机制及其生物学意义。

1 IFN-I 的作用机制

细胞通过模式识别受体(PRR)检测外来分子,并启动免疫应答。PRR识别病原体相关分子模式(PAMPs),进而诱导IFN-I及其他细胞因子的产生。感染细胞的PRR包括Toll样受体(TLR)、RIG-I样受体(RLR)、C型凝集素受体(CLR)和NOD样受体(NLR),这些受体位于细胞质和内体膜中识别病毒和细菌。TLR能够识别病毒核酸,刺激浆细胞样树突状细胞(pDC)通过TLR7和TLR9合成IFN。在细胞质中,RLR和DNA传感器(如cGAS)可以识别病毒中间RNA和DNA,触发IFN-I的产生、炎性小体的形成以及细胞凋亡等过程^[17-19]。RLR特异性识别病毒短分子双链RNA。CLR是跨膜先天受体,可在细菌、病毒和蠕虫的先天免疫中发挥作用。NLR是病原体入侵的胞质哨兵,在免疫和非免疫细胞中均有表达^[20]。综上所述,各种PRR在调控宿主先天免疫应答和抵御不同病原体感染中发挥着关键作用。

IFN-I通过其受体复合物IFNAR1和IFNAR2发出信号,主要依赖于JAK-STAT信号通路发挥作用。在这个过程中,IFN-I会募集JAK激酶中的TYK2和JAK1,JAK激酶的激活促进STAT1和STAT2的磷酸化和二聚化,形成IFN刺激基因3(ISGF3)复合体,该复合体进入细胞核与IFN激活反应元件(ISRE)结合,诱导多种IFN刺激基因(ISGs)的表达,增强细胞的抗病毒能力,并促进炎症介质的合成^[21-22](见图1)。除了JAK-STAT途径,IFN-I还激活MAPK和PI3K信号通路,这些通路在调节炎症反应和细胞存活中同样重要^[23-26]。在肺部炎症中,IFN-I作为先天免疫反应的重要介导,能有效驱动免疫应答。然而,IFN-I的过度上调可能导致促炎细胞因子的释放失控,进而引发免疫失衡和相关病理变化^[27-28]。因此,深入研究IFN-I的作用机制对理解肺部炎症的发生发展及其潜在治疗策略至关重要。

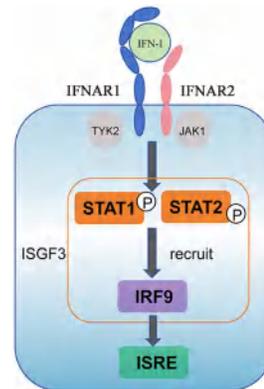


图1 IFN-I调节机制示意图

Fig 1 Schematic diagram of IFN-I regulation mechanism

2 IFN-I 在肺部感染中的作用

2.1 IFN-I 在肺部病毒感染中的作用

冠状病毒可对人体健康产生破坏性的影响。IFN-I对防御冠状病毒感染非常关键,体外和体内研究表明,IFN-I可广泛应用于中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)和严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)的治疗^[27-28]。当病毒感染宿主时,先天免疫会对冠状病毒感染即刻产生反应。NOD样受体热蛋白结构域蛋白3(NLRP3)通过组装炎性小体引发细胞焦亡,触发白细胞介素(IL)-1 β 和IL-18的表达,调节促炎反应^[29]。在急性感染中的早期阶段,IFN-I有助于限制病毒传播,启动抗病毒反应^[30]。然而,IFN-I的过表达会导致细胞凋亡和组织损伤,促进炎症反应,增加免疫细胞浸润,并诱发炎症性疾病,例如在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中,未控制的炎症会引起病毒发病机制;SARS-CoV-2 N蛋白已被证明通过与NLRP3直接结合来诱导NLRP3炎性小

体组装,从而导致过度炎症^[31]。SARS-CoV-2 N 蛋白也被证明会促进核因子(NF)- κ B 的过度激活,从而促进过度炎症^[32]。因此,IFN- I 在激活抗病毒反应的同时,可能存在潜在的破坏性免疫反应。然而,IFN- I 的含量与疾病严重程度之间的关系存在争议,并且可能具有误导性,在中东呼吸综合征(MERS)患者中观察到 IFN- α 水平升高,但在轻症患者中未观察到该现象^[33]。故不能单纯地依据 IFN- I 的含量来判断肺部炎症的严重程度。

呼吸道合胞病毒(RSV)是 2 岁以下儿童呼吸道感染最为常见的病因。RSV G 蛋白引起 IFN- I 上调可通过 TLR4 信号传导和 IFN- I 的细胞因子抑制物(SOCS)3 进行调节^[34], SOCS1 和 SOCS3 通过结合 IRF7 强烈抑制 TLR7 介导的 IFN- I 产生,从而促进病毒复制^[35]。然而,也有文献指出,RSV 是 IFN- I 不良的诱导剂^[36], IFN- I 的表达和激活增强可能会促进病毒复制。在没有 IFN- I 信号传导的情况下,RSV 感染的小鼠表现出体重减轻和气道阻塞显著减少,以及细胞因子和趋化因子分泌和气道炎症显著减少^[37]。因此,临床上使用 IFN- I 治疗 RSV 感染仍需谨慎。

流感病毒是人类呼吸道感染的主要病原体之一,目前已知 18 种血凝素(HA)亚型($H_1 \sim H_{18}$)和 11 种神经氨酸酶(NA)亚型($N_1 \sim N_{11}$)^[38],其中一些人畜共患亚型(H_5N_1 和 H_7N_9 等)具有高致病性。流感病毒感染后,病毒 RNA 可被各种 PRRs 感应,诱导上皮细胞、巨噬细胞、树突状细胞(DC)和 pDCs 分泌释放 IFN- I。非结构蛋白 1(NS1)是流感病毒编码最重要的拮抗剂蛋白,同时 NS1 也是一种多功能毒力因子,它能够抑制 IFN- I 宿主反应,而 NS1 的基因缺失可导致 IFN 产生增加、ISG 表达增加以及病毒生长减少^[39]。由此可见,IFN- I 在宿主对抗流感病毒中起关键作用。流感病毒也可通过多种策略逃避 IFN 系统进而造成肺部感染,在流感病毒感染时,IFN- I 被募集的促炎性单核细胞和 pDCs 高度诱导^[39],从而使 TNF 相关的凋亡诱导配体(TRAIL)上调^[40], TRAIL 通过与上皮细胞死亡受体结合引发细胞凋亡。IFN- I 具有驱动和放大促炎反应的作用,强烈的炎症反应可导致肺组织损伤,进而导致肺部病毒感染期间的死亡率增加^[41]。由此可见,IFN- I 反应和炎症的平衡性对消除流感病毒起着至关重要的作用。

2.2 IFN- I 在肺部细菌感染中的作用

IFN- I 在应对病毒感染和细菌感染中表现出两面性,其信号传导过程依赖于多种因素。在病毒感染时,IFN- I 的表达通常由转录因子 IRF3

和 IRF7 驱动^[42];而在细菌感染中,IRF5 在 IFN- I 诱导中起到主要作用^[43-44]。PRR 激活后,IRF 通过磷酸化依赖性机制被激活。具体来说,PRR 通过其效应域募集信号衔接分子,这些分子进一步激活 IRF 激酶如 TBK1、IRAK、IKK ϵ 和 IKK α 。在细胞质中,细菌 RNA 可被 RLR、RIG-I 和 MDA-5 识别;TLR 经配体同源二聚化后将信号衔接子分子 MyD88 桥接到 TLR2/7/8/9/13,导致 IRF 激酶 IRAK 和 IKK α 的激活;TLR4 募集接头蛋白 TRIF,它们一起激活 IRF 激酶 TBK1 和 IKK ϵ ;胞质传感器参与信号衔接分子 MAVS 的募集^[45];STING 是一种存在于内质网中的跨膜蛋白^[46],可募集包括 cGAS、DDX41 和 IFI16 在内的 DNA 传感器^[47];RIP2 募集包括 NOD1 和 NOD2 在内的 NLR^[48],激活后的 IRF 可与 NLR 相互作用,易位到细胞核并驱动 IFN- I 的表达。因此,IFN- I 信号的激活在病毒和细菌感染中通过不同的信号途径和转录因子发挥作用,这体现了其在免疫应答中的复杂性。

单核细胞增生李斯特菌(LM)是人畜共患的食源性致病菌,严重时可导致败血症和脑膜炎^[49]。在宿主细胞中,LM 通过溶血素 O 破坏吞噬体并转移至细胞质中,利用营养丰富的胞质进行快速复制。在细胞质中,LM 能被多个 PRR 检测到并诱导 IFN- I 表达^[50]。LM 的免疫应答涉及 TLR 依赖性和非 TLR 依赖性信号通路^[51],这些通路包括 STING、RIG-I、NOD2 及 TLR 信号传导^[52-53]。LM 来源的 DNA 和环状二核苷酸(CDNs)诱导 IFN- I 的产生,与此同时,RIG-I 的下游也会产生 IFN- I。LM 分泌的 RNA 通过 RIG-I 和 MDA5 诱导 IFN- β 的产生,此外,LM 分泌的 DNA 被 Pol III 转录成 RNA,通过 RIG-I 也可诱导产生 IFN- β ^[54]。NOD2 还可识别 LM 的细胞壁成分,并与 TLR 信号传导一起诱导产生 IFN- β 。当胞壁酰二肽(MDP)的 DNA 检测和 NOD2 检测同时发生时,IFN- I 免疫应答最为迅速^[55]。新的研究表明,STING 或 RIG-I 通过 Pol III 作为 LM 诱导 IFN- I 产生的核酸感应途径^[53]。LM 感染时,PAMP 的多种检测机制和随后的 IFN- I 诱导表明这些细胞因子具有重要作用,但其促进 LM 感染的机制尚不清楚。有数据表明,与野生型(WT)小鼠相比,IFNAR1^{-/-}小鼠对 LM 的全身感染更具抵抗力^[56]。且有报道表明,IFN- β 是 LM 感染期间增强细菌复制的主要 IFN- I 成员^[57]。IFN- I 过度表达可通过抑制抗菌免疫细胞的募集与活化,加速 LM 在宿主细胞间的传播,进而增加感染的严重性^[58-59]。过度激活反而可能促进病原的传播和感染的加重,表明在应对 LM 感染时需平衡 IFN- I 的

免疫反应。

结核分枝杆菌 (MTB) 是引起结核病的主要病原体, 能够侵袭人体多种器官。MTB 感染时, 细胞表面和细胞质的 PRR (如 TLR4、NOD2 和 STING) 能够识别分枝杆菌的产物, 激活 TBK1 激酶, 进一步导致 IRF3 或 IRF5 的磷酸化和二聚化, 从而促进 *IFN- β* 基因的转录。这一机制在 MTB 感染的发病过程中发挥重要作用, 且在临床研究和实验模型中得到了证实^[60-61]。细胞溶胶中分枝杆菌或线粒体 DNA 释放激活 cGAS, 从而合成 cGAMP, 宿主来源的 cGAMP 和/或分枝杆菌来源的 c-di-AMP 激活 STING 通路和下游 TBK1-IRF3 信号轴。肽聚糖片段可被胞质溶胶中的 NOD2 感应, 从而激活 TBK1-IRF5 信号通路, IRF3 主要促进 IFN- β 的产生, 增强抗病毒免疫反应, 而 IRF5 则在促进促炎细胞因子生成中发挥作用。在 MTB 感染初期, 高水平的 IFN- β 有助于免疫防御, 但当其过度或持续存在时, 会引起细胞因子风暴, 损害宿主肺部, 加重疾病进展。TLR4 检测细胞外 MTB 和/或其产物会触发某些菌株对 IFN- β 的 TRIF-TBK1-IRF3 依赖性诱导^[62]。IFN- β 促进 MTB 发病机制的一种方式是通过介导巨噬细胞死亡, 从而促进肺部感染和炎症的传播^[63], 在活动性肺结核的患者中, 检测到了血液中 ISGs 的过表达^[64]。在一些小鼠模型中, 将纯化的 IFN- α/β 直接滴注到感染的 B6D2/F1 小鼠肺部可导致肺部细菌负荷增加并降低其存活率^[65]。在 MTB 感染期间, 通过鼻内施用 TLR3 配体多聚 ICLC 延长诱导高水平的 IFN- β 加剧了 WT 小鼠的肺免疫病理学, 但在 IFNAR1^{-/-}小鼠中没有^[66]。总的来说, 过度或持续激活的 IFN- β 会加剧 MTB 肺部感染。

化脓性链球菌 (GAS) 是一种广泛存在的致病菌, 能够引起多种化脓性炎症。GAS 通过刺激小鼠骨髓来源的巨噬细胞 (BMDM) 激活先天免疫细胞中的 IFN- β , 主要为 IFN- β ^[67]。研究表明, IFNAR1^{-/-}小鼠对皮下 GAS 的感染更为敏感, 且其致死性与 IL-1 β 的全身性升高相关^[68]。由此可见, IFN- β 缺失会增加宿主对 GAS 的易感性。

继发性流感后感染肺炎链球菌可加重宿主的免疫损害。这是由于 IFN- β 能够抑制中性粒细胞趋化因子 CXCL1 和 CXCL2 以及巨噬细胞趋化因子 CCL2 和 IL-17 的产生。这种抑制作用使肺部白细胞浸润减少, 从而降低了宿主对细菌生长的控制能力^[69]。而在流感后感染金黄色葡萄球菌引发的肺炎中, 与 WT 小鼠相比, IFNAR1^{-/-}小鼠的免疫功能明显受损, 并表现出更高的死亡率^[68]。流感后感染铜绿假单胞菌或大肠埃希菌也会导致

肺部细菌负荷增加, 进而加重炎症反应和肺损伤^[70]。这些继发性细菌感染常导致宿主免疫抑制, 增加宿主的死亡率^[71]。这种易感性的增加可能与免疫反应的改变有关, 但其机制仍不完全清楚。初步研究表明, 这种免疫抑制可能与 IFN- β 介导的细胞因子的抑制有关^[72]。此外, 继发性细菌感染的易感性也受 IFN- β 表达的持续时间和程度影响。一旦病毒诱导的 IFN- β 水平降低, 则不易发生继发性细菌感染。这些现象说明 IFN- β 的持续表达和其介导的免疫抑制可能增加继发性细菌感染的易感性, 且其水平和持续时间对宿主免疫反应的影响至关重要。

2.3 其他病原体感染

沙眼衣原体是一类寄生于真核生物内的原核细胞型微生物。研究表明, 在感染沙眼衣原体之前用 IFN- β 处理人或小鼠细胞系可以降低病原体的感染性^[73-74], 这说明 IFN- β 在宿主体内可能具有抗菌作用。然而, 在使用 *Chlamydia muridarum* 生殖器感染模型中, 发现与 IFNAR1^{-/-}小鼠相比, WT 小鼠可更快速清除感染且细菌量较高^[75], 这显示了 IFN- β 可能在某些情况下促进宿主的感染。因此, IFN- β 在宿主中的作用并不统一, 需要视具体的感染模型而定。此外, 在相关小鼠模型的研究中, 如肺囊虫感染期间, IFNAR1^{-/-}小鼠体内检测到促炎反应减弱, 表现为炎症因子如肿瘤坏死因子 (TNF)- α 和 IL-6 水平下降, 且感染的清除速度明显延迟^[76]。这说明, IFN- β 在宿主免疫应答中的作用复杂, 既可能通过增强抗菌反应发挥保护作用, 也可能在特定情境下抑制免疫反应, 影响病原体的清除速度。

新型隐球菌是一种酵母型机会性真菌病原体, 主要通过呼吸道感染。该病原体能够在肺部引发炎症反应, 并且在入侵中枢神经系统时引发真菌性脑膜炎。在新型隐球菌感染早期阶段, 与 WT 小鼠相比, IFNAR1^{-/-}小鼠中的肺部活菌落数量显著减少, 这表明 IFN- β 可能在隐球菌感染的早期防御反应中起负向调节, 进而影响宿主对真菌的防御作用^[77]。

I 型 IFN 在不同病原体感染中对宿主的作用及机制, 汇总情况见表 1。

3 小结与展望

IFN- β 在炎症调节中发挥着至关重要的作用, 展现出强大的抗病毒能力。IFN- β 通过调节 JAK/STAT、TLRs、NF- κ B、PI3K/AKT 和 MAPK 等信号通路中的关键因子来调节炎症反应^[82]。值得注意的是, IFN- β 在某些情况下可能产生致病作用。过度或不恰当的 IFN- β 表达可能打破免疫系统的平衡,

表 1 IFN- I 在不同病原体感染中对宿主的作用及机制

Tab 1 Effect of IFN- I on hosts in different pathogen infections and related mechanism

病原体	革兰氏反应	对宿主作用	作用机制	
细菌	大肠埃希菌	阴性	保护	促进炎症消退 ^[78] ；增加细菌清除 ^[6]
	GAS	阳性	保护	抑制过度的促炎反应 ^[68]
	LM	阳性	损害	促进细胞凋亡 ^[50] ；抑制 II 型 IFN 和 IL-17 ^[79]
	金黄色葡萄球菌	阳性	损害	抑制先天细胞募集和促进炎症反应 ^[80]
	MTB	阳性	损害	介导巨噬细胞死亡 ^[63]
	继发感染肺炎链球菌	阳性	双重作用	白细胞浸润减少，促进细菌传播 ^[69]
病毒	铜绿假单胞菌	阴性	双重作用	过度激活中性粒细胞；改善巨噬细胞的吞噬作用 ^[7]
	冠状病毒	—	双重作用	早期有助于限制病毒传播，启动抗病毒反应 ^[30] ；促进炎症反应 ^[31]
	呼吸道合胞病毒	—	双重作用	促进病毒复制 ^[35] ；减弱气道炎症 ^[37]
其他	流感病毒	—	双重作用	抑制病毒生长 ^[39] ；驱动和放大促炎反应 ^[41]
	沙眼衣原体	阴性	双重作用	降低病原体的感染性 ^[81] ；促进炎症反应 ^[75]
	新型隐球菌	阴性	损害	侵犯中枢神经系统 ^[76]
	肺囊虫	—	保护	增强免疫反应，促进清除 ^[77]

进而引发一系列不良免疫反应。这些反应可能导致炎症发生及组织损伤，给机体带来严重危害。深入了解 IFN- I 在肺部疾病中的多样化作用，对于指导其在临床治疗中的合理应用具有重要的临床意义。

参考文献

[1] PRêLE CM, Hoyne GF. Immunopathobiology of chronic lung disease [J]. Clin Transl Immunol, 2020, 9 (8): e1170.

[2] Zhang HH, He F, Li P, et al. The role of innate immunity in pulmonary infections [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6646071.

[3] Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and distinct functions of type I and type III interferons [J]. Immunity, 2019, 50 (4): 907-923.

[4] Stanifer ML, Pervolaraki K, Boulant S. Differential regulation of type I and type III interferon signaling [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (6): 1445.

[5] Cao LH, Qian WW, Li WL, et al. Type III interferon exerts thymic stromal lymphopoietin in mediating adaptive antiviral immune response [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1250541.

[6] Novick D, Cohen B, Rubinstein M. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning [J]. Cell, 1994, 77 (3): 391-400.

[7] Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, et al. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor [J]. Science, 1992, 257 (5071): 809-813.

[8] Zoellner N, Coesfeld N, De Vos FH, et al. Synthetic mimetics assigned a major role to IFNAR2 in type I interferon signaling [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 947169.

[9] Wittling MC, Cahalan SR, Levenson EA, et al. Shared and unique features of human interferon-beta and interferon-alpha subtypes [J]. Front Immunol, 2020, 11: 605673.

[10] Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10 (11): a028423.

[11] Macmicking JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12 (5): 367-382.

[12] Barnes SA, Audsley KM, Newnes HV, et al. Type I interferon subtypes differentially activate the anti-leukaemic function of natural killer cells [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1050718.

[13] Cetin GK, Lamot L, Romano M, et al. The 2021 European Alliance of Associations for Rheumatology/American College of Rheumatology Points to Consider for Diagnosis and Management of Autoinflammatory type I Interferonopathies: CANDLE/PRAAS, SAVI, and AGS [J]. Arthritis Rheumatol, 2022, 74 (5): 735-751.

[14] Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FHT, et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (19): 7034-7039.

[15] Chua C, Mahamed D, Nkongolo S, et al. Liver-restricted type I IFN signature precedes liver damage in chronic hepatitis B patients stopping antiviral therapy [J]. J Immunol, 2024, 212 (6): 1002-1011.

[16] Fernandez-Ruiz R, Niewold TB. Type I interferons in autoimmunity [J]. J Invest Dermatol, 2022, 142 (3PtB): 793-803.

[17] Li DY, Wu MH. Pattern recognition receptors in health and diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6 (1): 291.

[18] Kano N, Ong GH, Ori D, et al. Pathophysiological role of nucleic acid-sensing pattern recognition receptors in inflammatory diseases [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 910654.

[19] Landelouci K, Sinha S, Pépin G. Type- I interferon signaling in *Fanconi Anemia* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 820273.

[20] Im JH, Duic I, Yoshimura SH, et al. Mechanisms of length-dependent recognition of viral double-stranded RNA by RIG-I [J]. Sci Rep, 2023, 13 (1): 6318.

[21] Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? [J]. J Exp Med, 2010, 207 (10): 2053-2063.

[22] Peignier A, Parker D. Impact of type I interferons on susceptibility to bacterial pathogens [J]. Trends Microbiol, 2021, 29 (9): 823-835.

[23] Plataniias LC. Mechanisms of type- I -and type- II -inter-

- feron-mediated signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 (5): 375-386.
- [24] Chakravarty S, Subramanian G, Popli S, et al. Interferon-stimulated gene TDRD7 interacts with AMPK and inhibits its activation to suppress viral replication and pathogenesis [J]. *mBio*, 2023, 14 (5): e0061123.
- [25] Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty [J]. *Immunity*, 2012, 36 (4): 503-514.
- [26] Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 513-545.
- [27] Stephens LM, Varga SM. Function and modulation of type I interferons during respiratory syncytial virus infection [J]. *Vaccines*, 2020, 8 (2): 177.
- [28] Ferrara JL, Abhyankar S, Gilliland DG. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1 [J]. *Transplant Proc*, 1993, 25 (1 Pt 2): 1216-1217.
- [29] Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19 (8): 477-489.
- [30] Domizio JD, Gulen MF, Saidoune F, et al. The cGAS-STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19 [J]. *Nature*, 2022, 603 (7899): 145-151.
- [31] Pan P, Shen MM, Yu ZY, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 4664.
- [32] Wu YX, Ma L, Cai SH, et al. RNA-induced liquid phase separation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein facilitates NF- κ B hyper-activation and inflammation [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 167.
- [33] Anjum FR, Anam S, Abbas G, et al. Type I IFNs: a blessing in disguise or partner in crime in MERS-CoV-, SARS-CoV-, and SARS-CoV-2-induced pathology and potential use of type I IFNs in synergism with IFN- γ as a novel antiviral approach against COVID-19 [J]. *Viral Immunol*, 2021, 34 (5): 321-329.
- [34] Moore EC, Barber J, Tripp RA. Respiratory syncytial virus (RSV) attachment and nonstructural proteins modify the type I interferon response associated with suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins and IFN-stimulated gene-15 (ISG15) [J]. *Virol J*, 2008, 5: 116.
- [35] Yu CF, Peng WM, Schlee M, et al. SOCS1 and SOCS3 target IRF7 degradation to suppress TLR7-mediated type I IFN production of human plasmacytoid dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2018, 200 (12): 4024-4035.
- [36] Hijano DR, Vu LD, Kauvar LM, et al. Role of type I interferon (IFN) in the respiratory syncytial virus (RSV) immune response and disease severity [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 566.
- [37] Ansar M, Qu Y, Ivanciuc T, et al. Lack of type I interferon signaling ameliorates respiratory syncytial virus-induced lung inflammation and restores antioxidant defenses [J]. *Antioxidants*, 2021, 11 (1): 67.
- [38] Tong SX, Zhu XY, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (10): e1003657.
- [39] Jewell NA, Vaghefi N, Mertz SE, et al. Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo [J]. *J Virol*, 2007, 81 (18): 9790-9800.
- [40] Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (1): 248-255.
- [41] Pillai PS, Molony RD, Martinod K, et al. Mx1 reveals innate pathways to antiviral resistance and lethal influenza disease [J]. *Science*, 2016, 352 (6284): 463-466.
- [42] Chen YZ, Lei XQ, Jiang ZZ, et al. Cellular nucleic acid-binding protein is essential for type I interferon-mediated immunity to RNA virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118 (26): e2100383118.
- [43] Bergström B, Aune MH, Awuh JA, et al. TLR8 senses *Staphylococcus aureus* RNA in human primary monocytes and macrophages and induces IFN- β production via a TAK1-IKK β -IRF5 signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2015, 195 (3): 1100-1111.
- [44] Burke TP, Engström P, Chavez RA, et al. Inflammasome-mediated antagonism of type I interferon enhances *Rickettsia pathogenesis* [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5 (5): 688-696.
- [45] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. *Immunity*, 2011, 34 (5): 637-650.
- [46] Smith JA. STING, the endoplasmic reticulum, and mitochondria: is three a crowd or a conversation? [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 611347.
- [47] Parvatiyar K, Zhang Z, Teles RM, et al. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13 (12): 1155-1161.
- [48] Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, et al. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (5): 1645-1662.
- [49] Rivas L, Paine S, Dupont PY, et al. Genome typing and epidemiology of human listeriosis in New Zealand, 1999 to 2018 [J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59 (11): e0084921.
- [50] Hansen K, Prabakaran T, Laustsen A, et al. *Listeria monocytogenes* induces IFN β expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway [J]. *EMBO J*, 2014, 33 (15): 1654-1666.
- [51] Witte CE, Archer KA, Rae CS, et al. Innate immune pathways triggered by *Listeria monocytogenes* and their role in the induction of cell-mediated immunity [J]. *Adv Immunol*, 2012, 113: 135-156.
- [52] Archer KA, Durack J, Portnoy DA. STING-dependent type I IFN production inhibits cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10 (1): e1003861.
- [53] Hagmann CA, Herzner AM, Abdullah Z, et al. RIG-I detects triphosphorylated RNA of *Listeria monocytogenes* during infection in non-immune cells [J]. *PLoS One*, 2013,

- 8 (4): e62872.
- [54] Abdullah Z, Schlee M, Roth S, et al. RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids [J]. EMBO J, 2012, 31 (21): 4153-4164.
- [55] Leber JH, Crimmins GT, Raghavan S, et al. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen [J]. PLoS Pathog, 2008, 4 (1): e6.
- [56] O'Connell RM, Saha SK, Vaidya SA, et al. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection [J]. J Exp Med, 2004, 200 (4): 437-445.
- [57] Shaabani N, Vartabedian VF, Nguyen N, et al. IFN- β , but not IFN- α , is responsible for the pro-bacterial effect of type I interferon [J]. Cell Physiol Biochem, 2021, 55 (3): 256-264.
- [58] Snyder DT, Hedges JF, Jutila MA. Getting "inside" type I IFNs: type I IFNs in intracellular bacterial infections [J]. J Immunol Res, 2017, 2017: 9361802.
- [59] McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, et al. Type I interferons in infectious disease [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15 (2): 87-103.
- [60] Zhou XY, Yang JH, Zhang ZL, et al. Different signaling pathways define different interferon-stimulated gene expression during mycobacteria infection in macrophages [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (3): 663.
- [61] Wang J, Hussain T, Zhang K, et al. Inhibition of type I interferon signaling abrogates early *Mycobacterium bovis* infection [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19 (1): 1031.
- [62] Moreira-Teixeira L, Mayer-Barber K, Sher A, et al. Type I interferons in tuberculosis: foe and occasionally friend [J]. J Exp Med, 2018, 215 (5): 1273-1285.
- [63] Zhang L, Jiang XJ, Pfau D, et al. Type I interferon signaling mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death [J]. J Exp Med, 2021, 218 (2): e20200887.
- [64] Berry MPR, Graham CM, McNab FW, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis [J]. Nature, 2010, 466 (7309): 973-977.
- [65] Manca C, Tsenova L, Bergtold A, et al. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type I immunity and is associated with induction of IFN- α / β [J]. PNAS, 2001, 98 (10): 5752-5757.
- [66] Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk [J]. Nature, 2014, 511 (7507): 99-103.
- [67] Mover E, Bolarin JS, Valfridsson C, et al. Interplay between human STING genotype and bacterial NADase activity regulates inter-individual disease variability [J]. Nat Commun, 2023, 14 (1): 4008.
- [68] Castiglia V, Piersigilli A, Ebner F, et al. Type I interferon signaling prevents IL-1 β -driven lethal systemic hyperinflammation during invasive bacterial infection of soft tissue [J]. Cell Host Microbe, 2016, 19 (3): 375-387.
- [69] Li WJ, Moltedo B, Moran TM. Type I interferon induction during influenza virus infection increases susceptibility to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection by negative regulation of $\gamma\delta$ T cells [J]. J Virol, 2012, 86 (22): 12304-12312.
- [70] Roe K. Are secondary bacterial pneumonia mortalities increased because of insufficient pro-resolving mediators? [J]. J Infect Chemother, 2024, 30 (10): 959-970.
- [71] Boxx GM, Cheng G. The roles of type I interferon in bacterial infection [J]. Cell Host Microbe, 2016, 19 (6): 760-769.
- [72] Lee B, Robinson KM, Mchugh KJ, et al. Influenza-induced type I interferon enhances susceptibility to gram-negative and gram-positive bacterial pneumonia in mice [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 309 (2): L158-L167.
- [73] Taylor BD, Criscitiello MF, Bazer FW, et al. Functional interferon-epsilon gene polymorphisms and sexually transmitted infections of the endometrium [J]. Am J Reprod Immunol, 2023, 90 (2): e13754.
- [74] He RZ, Torres CA, Wang YH, et al. Type-I interferon signaling protects against chlamydia trachomatis infection in the female lower genital tract [J]. Infect Immun, 2023, 91 (6): e0015323.
- [75] Nagarajan UM, Prantner D, Sikes JD, et al. Type I interferon signaling exacerbates *Chlamydia muridarum* genital infection in a murine model [J]. Infect Immun, 2008, 76 (10): 4642-4648.
- [76] Meissner NN, Swain S, Tighe M, et al. Role of type I IFNs in pulmonary complications of *Pneumocystis murina* infection [J]. J Immunol, 2005, 174 (9): 5462-5471.
- [77] Sato K, Yamamoto H, Nomura T, et al. Cryptococcus neoformans infection in mice lacking type I interferon signaling leads to increased fungal clearance and IL-4-dependent mucin production in the lungs [J]. PLoS One, 2015, 10 (9): e0138291.
- [78] Kotenko SV, Durbin JE. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location [J]. J Biol Chem, 2017, 292 (18): 7295-7303.
- [79] Morrow ZT, Sauer JD. Type I interferon signaling on antigen-presenting cells blunts cell-mediated immunity toward listeria monocytogenes [J]. Infect Immun, 2023, 91 (7): e0054022.
- [80] Goldmann O, Sauerwein T, Molinari G, et al. Cytosolic sensing of intracellular *Staphylococcus aureus* by mast cells elicits a type I IFN response that enhances cell-autonomous immunity [J]. J Immunol, 2022, 208 (7): 1675-1685.
- [81] De La Maza LM, Peterson EM, Goebel JM, et al. Interferon-induced inhibition of *Chlamydia trachomatis*: dissociation from antiviral and antiproliferative effects [J]. Infect Immun, 1985, 47 (3): 719-722.
- [82] Ji L, Li TL, Chen HM, et al. The crucial regulatory role of type I interferon in inflammatory diseases [J]. Cell Biosci, 2023, 13 (1): 230.

(收稿日期: 2024-11-09; 修回日期: 2024-12-05)

靶向肠黏膜屏障的糖类化合物研究进展

陈钱悦^{1, 2}, 张宇飞^{2, 3}, 孙一立^{2, 3*}, 蒋昊文^{1*} (1. 山东第一医科大学, 济南 250117; 2. 烟台新药创制山东省实验室, 中科环渤海(烟台)药物高等研究院, 山东 烟台 264117; 3. 安徽中医药大学, 合肥 230012)

摘要: 肠黏膜屏障作为人体的重要防御系统, 是避免细菌、毒素等与内环境接触的关键。肠黏膜屏障的破坏或紊乱会导致炎症性肠病、肠易激综合征和肠漏综合征等疾病的发生发展。糖类在为人提供能量的同时还在代谢调节和稳态维持方面起到重要作用。糖类药物是由具有生物活性的糖类化合物及其衍生物组成的一类重要药物, 具有毒副作用低的优点。本文旨在对改善肠黏膜屏障缺陷的糖类化合物进行综述, 以期为后续糖类化合物单独成药或联合用药提供理论基础及新的研究思路。

关键词: 肠黏膜屏障功能缺陷; 糖类化合物; 肠道疾病; 肠黏膜屏障

中图分类号: R322

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0776-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.030

Research progress in carbohydrate compounds targeting the intestinal barrier

CHEN Qian-yue^{1, 2}, ZHANG Yu-fei^{2, 3}, SUN Yi-li^{2, 3*}, JIANG Hao-wen^{1*} (1. Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117; 2. Shandong Laboratory of Yantai Drug Discovery, Bohai Rim Advanced Research Institute for Drug Discovery, Yantai Shandong 264117; 3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012)

Abstract: As an important defense system of the human body, the intestinal barrier is the key to avoid the contact of bacteria and toxins with the internal environment. Damage or dysregulation of the intestinal barrier may lead to the development of diseases such as inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, and leaky gut syndrome. Carbohydrates not only provide energy for the human body, but also play an important role in metabolic regulation and homeostasis maintenance. Carbohydrate-based drugs, consisting of biologically active carbohydrate compounds and their derivatives, are characterized by low toxicity and side effects. This paper reviewed carbohydrate compounds to improve the intestinal barrier deficiencies, and provide a theoretical foundation and new research directions for carbohydrate compounds as standalone drugs or combination therapy.

Key words: defective intestinal barrier function; carbohydrate compound; intestinal disease

肠黏膜屏障是人体与环境交互的重要界面, 其在吸收营养物质的同时遏制肠道内的促炎分子(如食物中的抗原、微生物和毒素)进入循环系统, 对于稳态的维持十分重要。肠黏膜屏障由机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障共同构成, 其中由肠上皮细胞组成的机械屏障起到最基础的分隔作用^[1-2]。肠上皮细胞将肠腔侧的肠

内容物和固有层中的免疫细胞隔开, 并且其分泌的黏液层和肠道中的共生菌群对这种分隔作用进行了增强, 有效避免了异常免疫反应的发生^[2-3]。肠黏膜屏障的破坏或紊乱则会导致炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)、肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)和肠漏综合征(leaky gut syndrome, LGS)等肠道疾病的发生发

基金项目: 山东省自然科学基金青年基金(No.ZR2024QC286)。

作者简介: 陈钱悦, 女, 在读硕士研究生, 主要从事炎症性肠病药理学方面的研究, email: chenqian Yue0516@163.com *通信作者: 蒋昊文, 男, 副研究员, 主要从事代谢性疾病药理学方面的研究, email: haowenjiang@simm.ac.cn; 孙一立, 女, 副研究员, 主要从事代谢性疾病药理学方面的研究, email: yilisun@simm.ac.cn

展, 在炎症性肠病患者的无症状近亲属中也发现了肠黏膜屏障的破坏^[4-5], 因此以肠黏膜屏障为靶标有望用于治疗 and 预防肠道相关疾病。

糖类不仅能为人体提供能量, 在代谢调节和稳态维持方面也起到重要作用。糖类药物是指分子中含糖分子骨架或源于糖类化合物及其衍生物且具有生物活性一类药物, 因具有对细胞和机体干扰较小, 毒副作用较低的优势而受到关注^[6]。在全球范围内有 170 多种含糖化合物获得临床批准和 54 种以上以糖类主要结构单元的药物被批准作为药物或者诊断剂^[6-7]。目前已被广泛应用的糖类药物有用于抗病毒的核苷类药物、用于心血管防治的肝素和用于治疗骨关节炎的硫酸软骨素等^[8]。当前糖类药物的开发主要集中于抗病毒、治疗糖尿病、抗肿瘤、抗菌和寄生虫这几个领域^[7], 针对肠黏膜屏障功能缺陷的糖类药物开发还处于前期阶段。本文综述了对肠黏膜屏障缺陷具有改善作用的糖类化合物的研究进展, 以期后续糖类化合物的单独成药或联合用药提供重要的理论基础及新的研究思路。

1 肠黏膜屏障

1.1 化学屏障

肠道化学屏障主要指的是黏液层。黏液层由杯状细胞分泌, 黏蛋白 2 (mucin-2, MUC-2) 是其骨架成分^[9-10]。黏液层由致密的内层和松散的外层组成, 内层基本无菌, 外层为共生的肠道菌群提供营养和附着位点^[10]。黏液屏障的分层结构是阻止细菌与肠上皮直接接触的关键^[11]。

1.2 机械屏障

肠道机械屏障主要由肠上皮细胞及其之间的紧密连接构成。肠上皮是一种单层结构, 由肠上皮细胞、帕内特细胞、杯状细胞、微褶皱细胞等组成, 其中肠上皮细胞在维持上皮屏障完整性中起到主要作用^[1]。相邻细胞上的跨膜蛋白通过密封蛋白 (claudins, CLDN)、闭合蛋白 (occludin, OCLU) 和连接黏附分子 (junctional adhesion molecule, JAM) 等将细胞连接^[12], 闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 作为连接蛋白同时与 OCLU 和纤维状肌动蛋白相互作用在跨膜蛋白和细胞骨架间建起桥梁^[13]。这种相互作用使整个肠上皮作为一个整体, 允许离子和亲水分子选择性通过, 限制细菌毒素和病原体的渗入。

1.3 免疫屏障

免疫屏障指的是肠黏膜中的免疫系统, 由非特异性的先天免疫和特异性的适应性免疫组成。与先天免疫相关的细胞有树突状细胞、巨噬细胞

和中性粒细胞等, 它们通过跨膜受体 Toll 受体和细胞质中的 NOD 样受体识别病原体, 对肠黏膜进行持续的监控, 从而快速响应病菌入侵^[14-15]。T 细胞和 B 细胞在适应性免疫中起主要作用, 其在抗原和抗原呈递细胞等的作用下激活, 分别负责细胞介导的免疫和抗体介导的免疫。

1.4 生物屏障

肠道菌群按一定的数量比例分布在肠道的不同部位, 为肠黏膜细胞提供营养物质及能量, 维持肠道微生态系统平衡, 构成生物屏障。全人类肠道微生物组由 1000 ~ 1150 种细菌组成, 个体至少有 160 种肠道微生物^[16]。最新的研究鉴定出 141 株核心细菌, 形成了两个功能群, 一群与疾病缓解相关, 另一群与疾病恶化相关^[17]。

2 肠黏膜屏障功能缺陷是肠道疾病发生发展的重要机制

肠黏膜屏障的破坏使得肠道内的细菌、毒素等有害物质更容易穿透肠壁, 引发肠道的持续性炎症反应, 这些炎症反应又会导致肠道黏膜的充血、水肿、糜烂、溃疡等病理变化, 继而引起了肠道疾病的发生, 如 IBD、LGS 和 IBS (见图 1)。

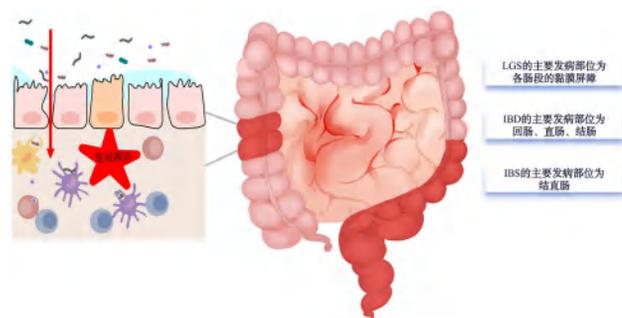


图 1 肠黏膜屏障功能缺陷与肠道疾病的发生发展的机制图

Fig 1 Mechanism diagram between the defective intestinal barrier function and the development of intestinal disease

2.1 IBD

肠黏膜屏障功能缺陷是多种肠道疾病发生与发展的重要机制, 其对 IBD 的影响尤为显著。IBD 是一种发作为于消化道的慢性炎症性疾病, 其主要临床表现为腹痛、腹泻、血便和体重下降^[18]。根据病变位置、病变区连续程度、溃疡外观等可以将炎症性肠病分为溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)^[19] 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)^[20] 两类。IBD 是由遗传、肠黏膜屏障、环境等因素相互作用导致的, 其中肠黏膜屏障的破坏带来的异常的免疫反应被认为起主要作用^[21]。

2.2 LGS 和 IBS

LGS 是一种严重的肠屏障功能障碍, 其主要

特征是肠道内出现溃疡。被限制在肠道内的物质穿过肠黏膜屏障，进入血液循环系统，从而引起腹痛、腹胀、腹泻等健康问题^[22]。IBS 由肠道通透性增加、肠道免疫反应异常以及肠道微生物群失衡等共同促进发生，患者表现为腹痛、腹部不适伴随排便习惯改变等功能性肠病症状^[23]。

3 对肠黏膜屏障有潜在治疗功能的糖类化合物

3.1 对机械屏障和化学屏障的损伤有潜在治疗功能的糖类化合物

目前已有 5 种单糖存在改善肠道机械屏障或化学屏障的相关报道。甘露糖 (*D*-mannose) 在葡聚糖硫酸钠 (DSS) 及 IL-10 缺陷 (*IL-10*^{-/-}) 小鼠模型中，通过增强溶酶体完整性和限制组织蛋白酶 B (cathepsin B) 释放来减轻肠黏膜屏障损伤，并能阻止肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 诱导的紧密连接破坏^[24]。阿洛酮糖 (*D*-psicose)，在自然界中含量低且难以被人体消化，但在 DSS 诱导的结肠炎模型中能促进 ZO-1 和 OCLU 的蛋白表达，显示出保护肠黏膜屏障的潜力^[25]。岩藻糖 (*L*-fucose) 在 *Muc2* 缺陷 (*Muc2*^{-/-}) 小鼠模型中，通过增加黏蛋白的表达，模拟了其在人类溃疡性结肠炎中的治疗效应^[26]。此外，半乳糖醛酸 (*D*-galacturonic acid) 在碘乙酰胺 (IA) 诱导的功能性消化不良模型中，不仅上调了肠道细胞黏附分子及紧密连接蛋白的表达，还改善了肠道纤维化^[27]。*N*-乙酰葡萄糖胺 (*N*-acetylglucosamine)，是人体中各种糖胺聚糖、

糖蛋白和糖脂类的主要组成成分，其可通过提高 OCLU 和 CLDN-1 蛋白的表达水平来改善 DSS 诱导的急性结肠炎中肠黏膜屏障的损伤^[28]。

部分多糖对肠道机械屏障或化学屏障损伤也展现出潜在治疗效果，它们通过促进紧密连接蛋白表达、保护杯状细胞、增加黏液层厚度及降低细胞渗透性等机制，来维护和恢复肠黏膜屏障的完整性。鼠李糖半乳糖醛酸 (rhamnogalacturonan) 源于植物细胞壁果胶，在 DSS 诱导的小鼠结肠炎模型中可减轻肠道黏膜屏障损伤的症状，保护杯状细胞，促进 MUC-1 表达，降低细胞渗透性，增加 CLDN-1 表达^[29]。羧甲基茯苓多糖 (carboxymethylpachyman, CMP) 是从茯苓提取并经修饰得到，主要活性成分为羧甲基葡聚糖^[30]。在肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的 Caco-2 模型中，CMP 能增加紧密连接蛋白表达，降低模型渗透率，可能与 NF- κ B/MLCK/p-MLC 信号通路有关^[31]。另一项研究中给小鼠喂食茯苓多糖亦能增加 MUC-2 表达和黏液层的厚度^[32]。黄芪多糖，从中药黄芪提取，在 DSS 诱导的小鼠结肠炎模型中能促进 CLDN-5、OCLU 和 ZO-1 表达，从而恢复肠黏膜屏障^[33]。以上多糖除了 CMP 主要活性成分是羧甲基葡聚糖外，关于多糖化合物是何成分、具体如何起效目前未见深入探讨的报道。

机械屏障与化学屏障共同构成了肠道菌群与宿主免疫细胞隔离的关键防御体系，对具有调节机械屏障和化学屏障功能的糖类化合物总结见表 1。

表 1 对机械屏障和化学屏障有潜在改善功能的糖类化合物
Tab 1 Carbohydrates exhibiting potential modulatory effects on mechanical and chemical barriers

分类	名称	组成	实验模型	与化学屏障相关机制 / 靶点	与机械屏障相关机制 / 靶点	参考文献
单糖	甘露糖	—	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型； <i>IL-10</i> ^{-/-} 小鼠结肠炎模型	—	溶酶体完整性↑；cathepsin B、MLCK↓	[24]
	阿洛酮糖	—	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型	MUC-2↑	ZO-1、OCLU↑	[25]
	岩藻糖	—	<i>Muc2</i> ^{-/-} 小鼠模型	MUC-2↑	—	[26]
	半乳糖醛酸	—	IA 诱导的大鼠功能性消化不良模型	—	OCLU、ZO-1↑	[27]
	<i>N</i> -乙酰葡萄糖胺	—	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型	—	OCLU、CLDN-1↑	[28]
多糖	鼠李糖半乳糖醛酸	半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖阿拉伯糖、葡萄糖	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型； <i>IL-1β</i> 诱导的 Caco-2 肠屏障功能损伤模型	MUC-1↑	渗透性↓；CLDN-1↑	[29]
	茯苓多糖	羧甲基、葡聚糖	TNF- α 诱导 Caco-2 肠屏障功能损伤模型	MUC-2↑	OCLU、ZO-3↑；MLCK↓	[30-32]
	黄芪多糖	阿拉伯糖、木糖、葡糖醛酸等	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型	—	CLDN-5、OCLU、ZO-1↑	[33]

3.2 对免疫屏障和生物屏障有潜在治疗功能的糖类化合物

对免疫屏障和生物屏障有潜在治疗功能的单糖。阿拉伯糖 (Ara) 是一种五碳糖，给 DSS 诱导

的结肠炎小鼠喂食 Ara 后发现，TNF- α 、白细胞介素 6 (IL-6)、干扰素- γ (IFN- γ)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧酶-2 (COX-2)、趋化因子-2 (CCL-2) 等促炎因子的表达水平降低；另一方面，

与 DSS 组相比, 喂食 Ara 的小鼠肠道中发现具有促炎作用的厚壁菌门 *Firmicutes* 减少, 具有抑炎作用的放线菌门 *Actinobacteria* 增多。在抗菌药物消除肠道菌群后, Ara 对结肠的恢复作用消失, 说明其可能是通过肠道菌群发挥作用的^[34]。

对生物屏障有潜在治疗功能的寡糖。江蓐寡糖提取自一种海岸生长的红藻, 其由半乳糖组成, 聚合度为 1 ~ 10 的江蓐寡糖占总量的 66%。给乙酸诱导的结肠炎小鼠模型中喂食江蓐寡糖, 小鼠肠道中双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、罗氏菌属 *Roseburia* 丰度上升且短链脂肪酸含量上升^[35]。母乳低聚糖 (HMO) 是寡糖的一种, 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL) 是其含量最高的成分。在一个双盲、随机、安慰剂对照的平行组临床试验中, IBS 患者被随机分配接受不同剂量 HMO, 持续 4 周, 干预后 IBS 患者双歧杆菌属 *Bifidobacterium* 丰度显著增加, 拟杆菌门 *Bacteroidetes* 丰度有所降低, 补充 HMO 能够改善 IBS 症状, 可能与调节肠道菌群有关^[36]。

对免疫屏障和生物屏障有潜在治疗功能的多糖

有黄芩多糖^[33]、竹荪多糖^[37]、灵芝多糖^[38]、五味子多糖^[39]和辣木叶多糖^[40]。这些多糖在 DSS 单独诱导或 DSS 与氧化偶氮甲烷 (AOM) 联合诱导的小鼠结肠炎模型中展现出免疫调节和肠道微生物调节作用。它们既可通过降低促炎细胞因子水平 (如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-18), 还可增加抑炎因子表达 [如 IL-10、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)] 来缓解肠道炎症。在生物屏障中, 这些多糖可使双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、乳杆菌属 *Lactobacillus*、罗氏菌属 *Roseburia* 等有益菌丰度显著上升; 使厚壁菌门 *Firmicutes*、拟杆菌门 *Bacteroidetes*、变形菌门 *Proteobacteria*、葡萄球菌属 *Staphylococcus* 等有害菌的丰度下降。它们通过调节肠道微生物群组成并维护肠道微生物群的平衡来缓解肠道炎症。

一些糖类化合物通过各种机制作用于肠道上皮细胞和免疫细胞, 调节其活性和反应, 具有改善免疫屏障和生物屏障的潜能, 这些糖类化合物汇总见表 2。这部分糖类化合物通过调节肠道菌群平衡和炎症因子分泌来抑制炎症的发生 (见图 2)。

表 2 对免疫屏障和生物屏障有潜在治疗功能的糖类化合物

Tab 2 Carbohydrates exhibiting potential therapeutic functions on immune and biological barriers

分类	名称	组成	实验模型	与免疫屏障 相关的机制 / 靶点	与生物屏障 相关的机制 / 靶点	参考 文献
单糖	阿拉伯糖	—	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型	IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、iNOS、COX-2、CCL-2、CCL-5 \downarrow	<i>Firmicutes</i> \downarrow ; <i>Actinobacteria</i> \uparrow	[34]
寡糖	江蓐寡糖	主要为半乳糖	乙酸诱导的小鼠结肠炎模型	—	<i>Bifidobacterium</i> 、 <i>Roseburia</i> \uparrow	[35]
	母乳低聚糖	葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、唾液酸等	IBS 患者平行、双盲、随机、安慰剂对照研究	—	<i>Bacteroidetes</i> \downarrow ; <i>Bifidobacterium</i> \uparrow	[36]
多糖	黄芩多糖	阿拉伯糖、木糖、葡萄糖醛酸、核糖等	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型	IL-6、IL-1 β 、TNF- α \downarrow	<i>Staphylococcus</i> 、 <i>Firmicutes</i> 、 <i>Proteobacteria</i> \downarrow ; <i>Lactobacillus</i> 、 <i>Roseburia</i> 、 <i>Bifidobacterium</i> \uparrow	[33]
	竹荪多糖	葡聚糖	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型	IL-10 \uparrow ; TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-18 \downarrow	—	[37]
	灵芝多糖	葡萄糖、甘露糖木糖等	AOM/DSS 诱导的炎症模型	IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS、COX-2 \downarrow	<i>Firmicutes</i> 、 <i>Bacteroidetes</i> \downarrow	[38]
	五味子多糖	葡萄糖、阿拉伯糖木糖等	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型	—	<i>Firmicutes</i> 、 <i>Bacteroidetes</i> 、 <i>Proteobacteria</i> \downarrow	[39]
	辣木叶多糖	岩藻糖、阿拉伯糖、鼠李糖等	DSS 诱导的急性结肠炎小鼠模型	TNF- α 、IL-1 β \downarrow ; IL-10、PPAR- γ \uparrow	—	[40]

4 总结和展望

本文系统地归纳分析了靶向肠黏膜屏障的糖类化合物研究进展。基于现有文献, 本文总结了 8 种对肠道机械屏障和化学屏障具有修复功能的糖类化合物, 这部分糖类化合物通过促进黏蛋白

和紧密连接蛋白表达的方式增强了肠道的屏障功能, 另外还总结了 8 种对肠道免疫屏障和生物屏障具有调节功能的糖类化合物, 本综述为进一步揭示糖类化合物提升肠黏膜屏障功能的机制和相关糖类药物的开发提供参考。

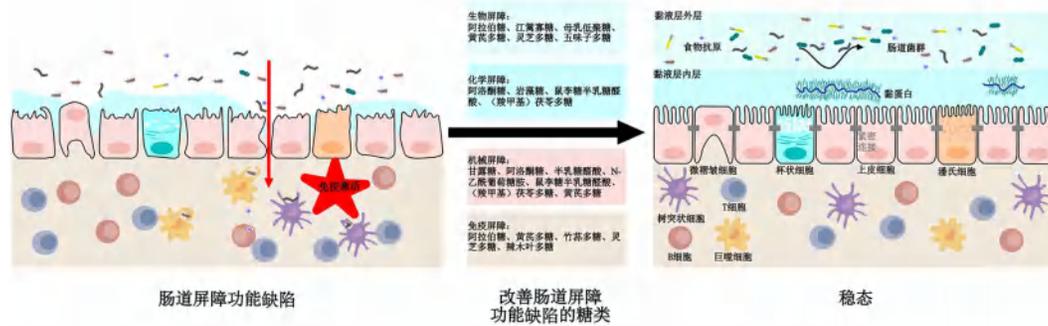


图 2 改善肠黏膜屏障功能缺陷的糖类

Fig 2 Carbohydrates for enhancing intestinal barrier function deficiencies

值得注意的是，部分糖类化合物在多个屏障功能维度上表现出治疗潜力，例如黄芪多糖^[33]。另在一项关于甘露糖的研究显示，抑制甘露糖转运体后，其改善屏障功能的效果消失，提示单糖或者小分子的寡糖可能是通过进入细胞内部而发挥功能的^[24]，而大分子多糖的作用机制在很大程度上仍未明确。大分子糖类除通过调节肠道菌群发挥作用外，推测其可能通过在肠腔或培养基内降解为小分子糖后被吸收，或通过细胞表面受体结合激活特定信号通路发挥作用。尽管已观察到一些糖类对肠黏膜屏障功能的积极影响，但当前对糖类化合物保护肠黏膜屏障功能方面的研究仍面临两大难点：一是对糖类化合物具体如何影响肠道细胞及其涉及的信号传导机制了解甚少；二是尚未明确多糖是通过其水解后的单糖或代谢产物在发挥功效，还是作为大分子整体直接参与治疗过程。因此，仍需更深入的研究来揭示这一机制。

随着未来研究的深入，部分糖类化合物可能会被发现有单独成药的潜力，成为治疗肠黏膜屏障功能障碍相关疾病的新型药物，其他糖类化合物则可能需要与免疫抑制剂等药物联合使用，通过协同作用来发挥最佳的肠黏膜屏障保护功能，以降低后者不良反应并增强疗效。

参考文献

[1] Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50 (8): 1-9.
 [2] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9 (11): 799-809.
 [3] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14 (3): 141-153.
 [4] Turpin W, Lee SH, Raygoza Garay JA, et al. Increased intestinal permeability is associated with later development

of Crohn's disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159 (6): 2092-2100.

[5] Torres J, Petralia F, Sato T, et al. Serum biomarkers identify patients who will develop inflammatory bowel diseases up to 5 years before diagnosis [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159 (1): 96-104.
 [6] Pan L, Cai C, Liu CJ, et al. Recent progress and advanced technology in carbohydrate-based drug development [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2021, 69: 191-198.
 [7] Cao X, Du XJ, Jiao H, et al. Carbohydrate-based drugs launched during 2000—2021 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12 (10): 3783-3821.
 [8] 薛浩宇, 金洪真, 赵炜. 糖药物在疾病治疗中的应用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2024, 40 (4): 504-512.
 [9] Yao DB, Dai WL, Dong M, et al. MUC2 and related bacterial factors: therapeutic targets for ulcerative colitis [J]. *EBioMedicine*, 2021, 74: 103751.
 [10] Song CY, Chai ZL, Chen S, et al. Intestinal mucus components and secretion mechanisms: what we do and do not know [J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55 (4): 681-691.
 [11] Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (39): 15064-15069.
 [12] Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4 (3): 225-236.
 [13] Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (45): 29745-29753.
 [14] Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (1): 91-99.
 [15] Chang JT. Pathophysiology of inflammatory bowel diseases [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (27): 2652-2664.
 [16] Qin JJ, Li RQ, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, 464 (7285): 59-65.
 [17] Wu GJ, Xu T, Zhao NS, et al. A core microbiome signature as an indicator of health [J]. *Cell*, 187 (23): 6550-6565.

- [18] 吴开春, 梁洁, 冉志华, 等. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2018 年·北京) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38 (9): 796-813.
- [19] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2023, 402 (10401): 571-584.
- [20] Roda G, Chien Ng S, Kotze PG, et al. Crohn's disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6 (1): 22.
- [21] Guan QD. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. J Immunol Res, 2019, 7247238: 16.
- [22] Frieling T, Gjini B, Melchior I, et al. Endoscopic laser endomicroscopy and "leaky gut" in patients with functional gastrointestinal symptoms and food intolerance [J]. Z Gastroenterol, 2023, 61 (11): 1465-1471.
- [23] Lacy BE, Pimentel M, Brenner DM, et al. ACG clinical guideline: management of irritable bowel syndrome [J]. Am J Gastroenterol, 2021, 116 (1): 17-44.
- [24] Dong LJ, Xie JW, Wang YY, et al. Mannose ameliorates experimental colitis by protecting intestinal barrier integrity [J]. Nat Commun, 2022, 13 (1): 4804.
- [25] Shi F, Gao YS, Han SM, et al. Allulose mitigates chronic enteritis by reducing mitochondria dysfunction via regulating cathepsin B production [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 129: 111645.
- [26] Feofanova NA, Bets VD, Borisova MA, et al. L-fucose reduces gut inflammation due to T-regulatory response in Muc2 null mice [J]. PLoS One, 2022, 17 (12): e0278714.
- [27] Wu YY, Zhong ZS, Ye ZH, et al. D-galacturonic acid ameliorates the intestinal mucosal permeability and inflammation of functional dyspepsia in rats [J]. Ann Palliat Med, 2021, 10 (1): 538-548.
- [28] Choi SI, Shin YC, Lee JS, et al. N-acetylglucosamine and its dimer ameliorate inflammation in murine colitis by strengthening the gut barrier function [J]. Food Funct, 2023, 14 (18): 8533-8544.
- [29] Maria-Ferreira D, Nascimento AM, Cipriani TR, et al. Rhamnogalacturonan, a chemically-defined polysaccharide, improves intestinal barrier function in DSS-induced colitis in mice and human Caco-2 cells [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 12261.
- [30] 徐攀, 张芳铭, 郑慧, 等. 羧甲基茯苓多糖的生物活性与食品应用 [J]. 食品与机械, 2024, 40 (6): 213-220.
- [31] Zhang JW, Lu Y, Wei JN, et al. Protective effect of carboxymethylpachymaran on TNF- α -induced damage in Caco-2 cell monolayers [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 93 (Pt A): 506-511.
- [32] Duan YT, Huang JJ, Sun MJ, et al. Poria cocos polysaccharide improves intestinal barrier function and maintains intestinal homeostasis in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 249: 125953.
- [33] Cui L, Guan XN, Ding WB, et al. Scutellaria baicalensis Georgi polysaccharide ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by improving intestinal barrier function and modulating gut microbiota [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 166: 1035-1045.
- [34] Li Y, Pan HO, Liu JX, et al. L-arabinose inhibits colitis by modulating gut microbiota in mice [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67 (48): 13299-13306.
- [35] Siringoringo B, Huipao N, Tipbunjong C, et al. Gracilaria fisheri oligosaccharides ameliorate inflammation and colonic epithelial barrier dysfunction in mice with acetic acid-induced colitis [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2021, 11: 440-449.
- [36] Iribarren C, Magnusson MK, Vignæs LK, et al. The effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota, metabolite profiles and host mucosal response in patients with irritable bowel syndrome [J]. Nutrients, 2021, 13 (11): 3836.
- [37] Wang YL, Ji XM, Yan ML, et al. Protective effect and mechanism of polysaccharide from Dictyophora indusiata on dextran sodium sulfate-induced colitis in C57BL/6 mice [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 140: 973-984.
- [38] Guo CL, Guo DD, Fang L, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon [J]. Carbohydr Polym, 2021, 267: 118231.
- [39] Bian ZH, Qin YW, Li L, et al. *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. protects against DSS-induced colitis in mice: involvement of TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway and gut microbiota [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 298: 115570.
- [40] Mohamed HH, Peng WL, Su HR, et al. Moringa oleifera leaf polysaccharide alleviates experimental colitis by inhibiting inflammation and maintaining intestinal barrier [J]. Front Nutr, 2022, 9: 1055791.

(收稿日期: 2024-11-05; 修回日期: 2024-12-25)

流感病毒神经氨酸酶抑制剂的研究进展

田诚¹, 陈梦涵^{2*}, 辛义周^{2, 3*} (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 济南 250011; 3. 山东中医药大学附属医院 中药饮片分子鉴定与生物评价实验室, 济南 250011)

摘要: 神经氨酸酶是流感病毒表面重要的糖蛋白, 在流感病毒生命周期的出芽释放阶段发挥着不可替代的作用, 是药物设计的理想靶点。目前已有神经氨酸酶抑制剂应用于流感的临床治疗, 但是由于用药选择的单一性及流感病毒潜在的变异性, 神经氨酸酶耐药毒株逐渐成为公众的担忧, 因此神经氨酸酶新型抑制剂的研发成为研究热点。本研究精选近 10 年代表性案例, 对神经氨酸酶抑制剂的发展状况进行综述, 以期研发具有更强活性及抗耐药性的神经氨酸酶抑制剂提供参考。

关键词: 神经氨酸酶抑制剂; 活性腔; 抗体募集; 蛋白质降解; 单克隆抗体

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0782-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.031

Research progress in influenza virus neuraminidase inhibitors

TIAN Cheng¹, CHEN Meng-han^{2*}, XIN Yi-zhou^{2, 3*} (1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355; 2. Level Three Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011; 3. Laboratory for Molecular Identification and Biological Evaluation of Chinese Herbal Pieces, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011)

Abstract: Neuraminidase is an important glycoprotein on the surface of influenza virus. It plays an irreplaceable role in the budding release stage of the influenza virus life cycle and is an ideal target for drug design. Currently, neuraminidase inhibitors have been used to treat influenza. However, due to the single drug selection and potential variability of virus, neuraminidase resistant strains have gradually become a public concern. Therefore, the development of new neuraminidase inhibitors has become a research hotspot. This study reviews representative cases in the past 10 years to provide a reference for the development of neuraminidase inhibitors with strong activity and anti-drug resistance.

Key words: neuraminidase inhibitor; active cavity; antibody recruitment; protein degradation; monoclonal antibody

流行性感 冒 (流 感) 是 由 流 感 病 毒 引 起 的 一 种 常 见 急 性 呼 吸 系 统 疾 病, 每 年 患 流 感 人 群 占 总 人 口 的 5% ~ 15%^[1-2]。流 感 病 毒 是 一 类 单 股 负 链 RNA 病 毒, 分 为 甲、乙、丙 及 丁 四 型, 其 中 甲 型 流 感 病 毒 是 临 床 最 常 见 的 类 型, 造 成 的 影 响 也 最 广。甲 型 流 感 病 毒 的 基 因 组 由 8 条 RNA 片 段 组 成, 分 别 为 聚 合 酶 碱 性 蛋 白 1、聚 合 酶 碱 性 蛋 白 2、

聚 合 酶 酸 性 蛋 白、血 凝 素 (hemagglutinin, HA)、核 蛋 白、神 经 氨 酸 酶 (neuraminidase, NA)、基 质 蛋 白 和 非 结 构 蛋 白 片 段。根 据 甲 型 流 感 病 毒 表 面 HA 和 NA 的 血 清 学 反 应, 可 将 其 分 为 不 同 的 亚 型, 目 前 已 从 禽 类 和 蝙 蝠 中 共 鉴 定 出 18 种 HA (H₁ ~ H₁₈) 和 11 种 NA (N₁ ~ N₁₁) 抗 原 亚 型^[3]。

基金项目: 山东省中医药科技重点项目 (No.Z-2023052); 山东省齐鲁卫生与健康领军人才项目 (No.2019); 山东省中医药科技计划项目 (No.2019-0078)。

作者简介: 田诚, 男, 硕士, 主要从事天然药物活性成分与质量控制研究, email: 976943395@qq.com *通信作者: 辛义周, 男, 主任药师, 主要从事天然药物活性成分与质量控制研究, email: xyz01010101@163.com; 陈梦涵, 女, 主管药师, 主要从事中药抗流感病毒研究, email: 15251752501@163.com

在甲型流感病毒出芽传播的过程中，NA 发挥了重要的作用。NA 通过切割新生病毒颗粒表面 HA 与宿主细胞表面唾液酸之间的糖苷键，使新生子代病毒释放到周围环境中，促进子代病毒的传播（见图 1）。NA 抑制剂通过抑制 NA 的活性，使子代病毒粒子不能有效地从宿主细胞表面释放，从而降低了病毒在体内进一步感染其他细胞的能力^[4]。NA 抑制剂奥司他韦是目前流感治疗的一线用药，但是由于用药选择单一，已经出现对该药耐药的流感病毒突变株，尤其是 H₁N₁-H259Y 和 H₃N₁-H274Y 突变株，严重限制了现有药物的临床疗效。因此，进一步提高 NA 抑制剂的抗病毒活性及克服其耐药性成为 NA 抑制剂研究的热点。

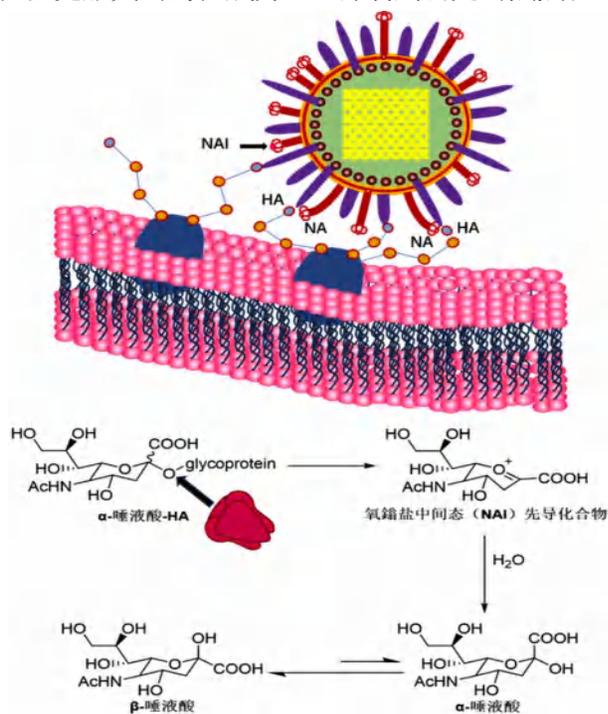


图 1 NA 的抗病毒作用机制图
Fig 1 Mechanism diagram of NA antiviral

目前 NA 抑制剂的研究主要分为经典小分子抑制剂的研究及新型 NA 抑制剂的研究。针对 NA 经典小分子抑制剂，可根据小分子与 NA 活性位点的相互作用方式分为竞争性抑制剂与非竞争性抑制剂，研发靶向 NA 150-腔、430-腔和 371-腔的抑制剂是小分子抑制剂研究的热点。除了经典的小分子抑制剂外，具有抗体募集功能的 NA 抑制剂、NA 降解剂及单克隆抗体等新型 NA 抑制剂，进一步为 NA 抑制剂的研究展示了广阔的前景。本文对近年 NA 抑制剂相关研究进行总结，期望对研发更强抑制活性及抗耐药活性的 NA 抑制剂提供参考。

1 靶向 NA 活性腔的经典小分子抑制剂

竞争性 NA 抑制剂 (competitive neuraminidase

inhibitors) 是一类重要的抗流感病毒药物，也是目前研究的重点。已上市的 NA 抑制剂包括奥司他韦 (oseltamivir)、扎那米韦 (zanamivir)、帕拉米韦 (peramivir) 和拉尼米韦 (laninamivir) 均为竞争性 NA 抑制剂。竞争性 NA 抑制剂主要靶向的活性位点有 150-腔、430-腔和 371-腔 (见图 2)。

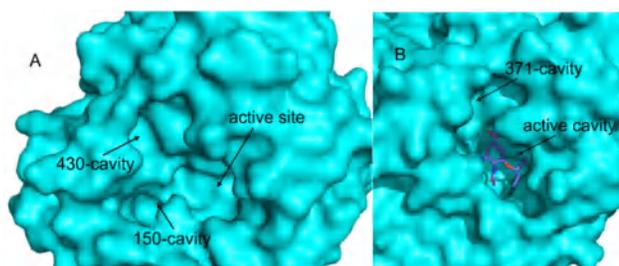


图 2 竞争性 NA 抑制剂主要靶向的活性位点
Fig 2 Main active sites targeted by competitive NA inhibitors
A. N₁ 亚型 (1918H₁N₁, PDB ID: 3BEQ) 的活性腔; B. N₁ 亚型 (H₁N₁, PDB ID: 2HU4) 的活性腔
A. active cavities of N₁ subtype (1918H₁N₁, PDB ID: 3BEQ); B. N₁ subtype (H₁N₁, PDB ID: 2HU4)

1.1 竞争性抑制剂

1.1.1 靶向 NA 150-腔的竞争性抑制剂 甲型流感病毒 NA 根据其一级结构可分为 Group 1 和 Group 2。Group 1 中 NA 的主要结构，特征是在活性位点上有一个额外的空腔，即 150-腔^[5]，其位置大约对应于 150 位氨基酸残基所在的环区域 (147 ~ 152 位氨基酸残基，见图 3)。现有的晶体结构研究表明，150-腔主要由疏水氨基酸组成，奥司他韦的 C5-NH₂ 即朝向 150-腔。这个空腔的结构特征为设计和开发新的 NA 抑制剂提供了可能的靶点。

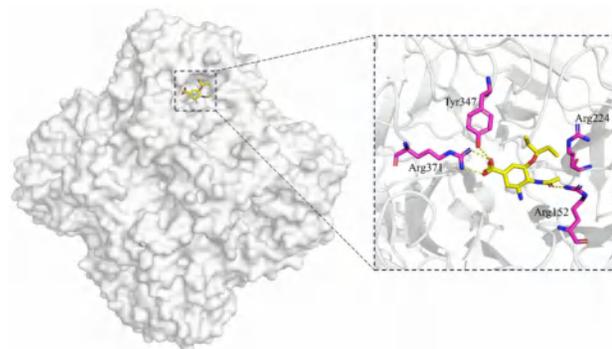


图 3 与奥司他韦结合的代表性基团 N₁ (H₃N₁, PDB ID: 2HU0) 在 150-腔内的蛋白-配体相互作用示意图
Fig 3 Protein-ligand interaction in the 150-cavity of the representative group N₁ (H₃N₁, PDB ID: 2HU0) bound to oseltamivir

① 抗耐药抑制剂：对 150-腔进行修饰是克服耐药性的有效策略之一。流感病毒耐药株 H274Y 突变体是较常见的耐药株，酪氨酸残基将 Glu276 的羧基推向 150-腔附近，带电荷的羧基破坏了容纳奥司他韦戊氧基的疏水口袋，从而引起奥司他韦构象的改变，降低对突变体 NA 的敏感性。在奥司

他韦 C5-NH₂ 上引入空间体积合适的疏水基团, 例如酰基及含苯基的疏水侧链, 从而与 150-腔内的氨基酸残基建立广泛的疏水相互作用是研究者常采用的提高 NA 抑制剂活性或克服耐药性的方法^[6]。

Xie 等^[7]以 150-腔为靶点, 设计合成了奥司他韦衍生物 **1** (结构式见图 4), 其对 H₃N₁-H274Y 突变的活性相对于奥司他韦羧酸酯有明显的提高。在与 H274Y 突变酶结合的情况下, 化合物 **1** 的 4-噻吩-2-基苯基更容易发生移动, 从而调节分子有效应对突变, 其对 H₃N₁-H274Y 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 160 nmol · L⁻¹。Jia 等^[8]设计并合成了一系列新型含硼 *N*-取代奥司他韦衍生物, 发现含 4-(3-硼酸苄

氧基) 苯基的化合物 **2** 对 H274Y 突变体的活性较奥司他韦羧酸酯有所提高, 这可能是由于化合物 **2** 与周围的氨基酸残基如 Arg152、Gln136 和 Val149 形成了附加氢键, 新的氢键弥补了化合物 **2** 中硼酸与 Gln136 和 Val149, 以及 C-4 乙酰胺与 Arg152 之间失去的相互作用。同时, 化合物 **2** 的苄基可能与 Thr439、Val116 和 Asp151 产生疏水相互作用, 也会使其对 H274Y 突变体有更高的活性。Jia 等^[9]又设计合成了含 3-氟-4-环戊烯基苯基片段的化合物 **3**, 其对突变型 NA (H₃N₁-H274Y 和 H₁N₁-H274Y) 的抑制活性分别是奥司他韦羧酸酯的 62.70 倍和 5.03 倍, 进一步增强了对耐药株的活性。

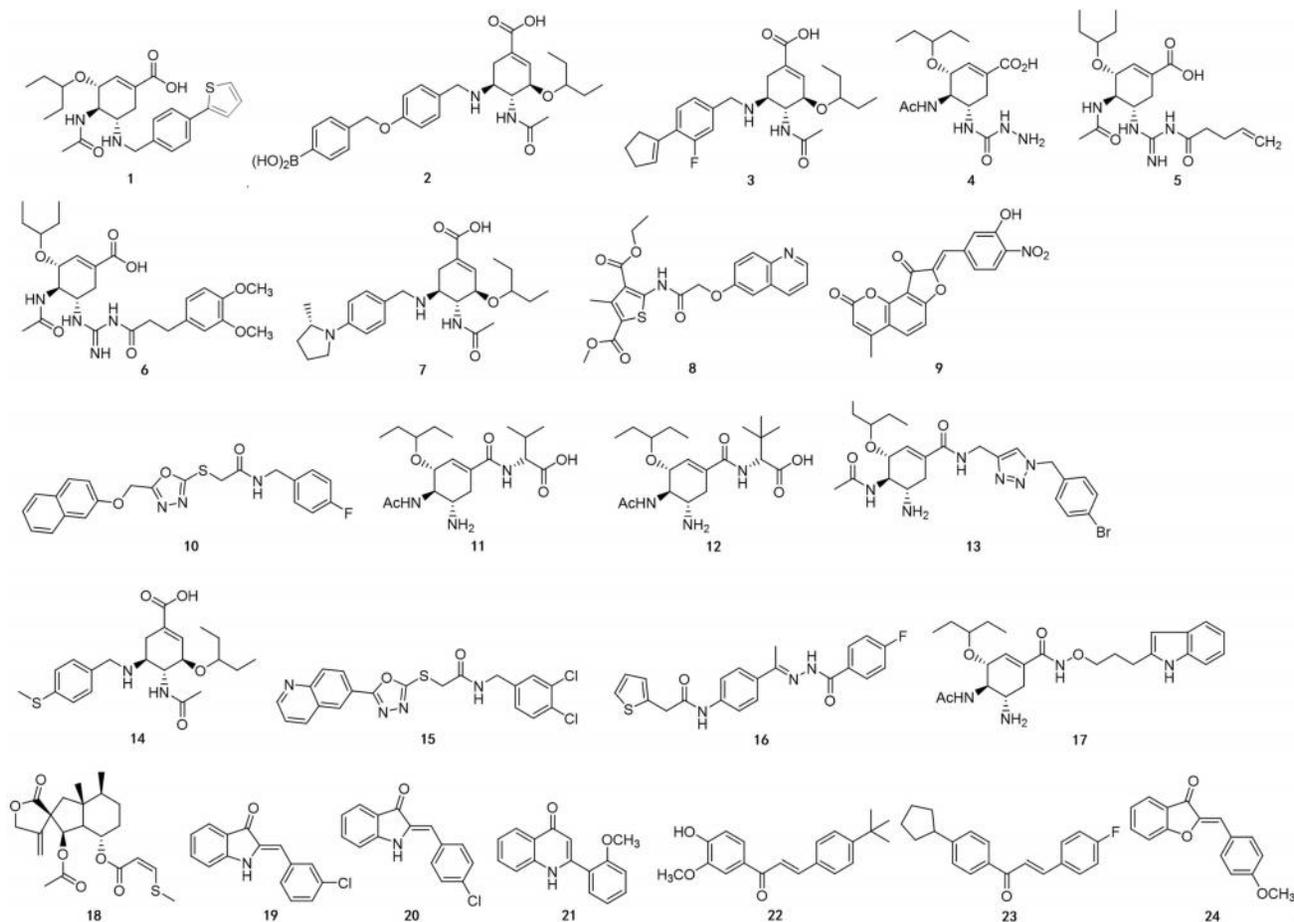


图 4 NA 抑制剂 **1** ~ **24** 的化学结构

Fig 4 Chemical structures of NA inhibitors **1** ~ **24**

奥司他韦的 C-5 位 -NH₂ 指向 NA 的 150-腔, 这个空腔影响了抑制剂对 N₁ 和 N₂ NA 的选择性。Zhao 等^[10]设计了一系列靶向 150-腔的含胍片段的奥司他韦衍生物, 其中化合物 **4** 对 H₃N₁ 和 H₁N₁ 的 IC₅₀ 分别为 26.8 nmol · L⁻¹、11.9 nmol · L⁻¹, 是奥司他韦羧酸盐的 8.77 倍和 4.12 倍。并且化合物 **4** 对流感突变株 H₃N₁-H274Y 及 H₁N₁-H274Y 也具有较好的抑制作用, 其 IC₅₀ 分别为 19.5 nmol · L⁻¹、133 nmol · L⁻¹, 分别为奥司他韦羧酸盐的 203 倍和 6.23 倍。

另一奥司他韦耐药株 H259Y 是由第 259 位的

组氨酸被酪氨酸取代引起的一种突变。Li 等^[11]合成了一系列酰基胍奥司他韦羧酸酯类似物, 其中化合物 **5** 和 **6** 对 H259Y 突变体具有较好的抑制活性, 化合物 **5** 和 **6** 对 H259Y 突变体的 IC₅₀ 分别为 30.5 nmol · L⁻¹ 和 14.5 nmol · L⁻¹, 比奥司他韦的活性分别提高了 5 倍和 11 倍。与奥司他韦相比, 化合物 **5** 和 **6** 酰基胍部分与 NA 的 150-腔和 430-腔附近的空腔新形成的氢键和疏水相互作用可能补偿了结合能的损失, 提高了其对 H259Y 突变体的活性。

② 非抗耐药抑制剂: Zhang 等^[12]设计并合成

了一系列具有不同 *N*-杂环取代基的新型奥司他韦衍生物, 这些衍生物被证明可以诱导第 2 组 NA 150-环的开放。其中, 含 4-(*R*-2-甲基吡咯烷-1-基) 苄基的化合物 **7** 对 H₃N₂ 病毒的抑制活性比羧酸奥司他韦增强了近 3 倍, 值得进一步研究。

Zhong 等^[13] 基于药效团虚拟筛选和分子动力学模拟, 发现了一种新的 NA 抑制剂 ZINC01121127。通过对 ZINC01121127 骨架进行优化, 合成了一系列新型含噻吩环的 NA 抑制剂。其中化合物 **8** 对 NA 的抑制活性最强 (IC_{50} 为 $0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 优于阳性对照药奥司他韦 (IC_{50} 为 $0.06 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 这些含噻吩环 NA 抑制剂的良好活性可能与噻吩环向 150-腔的延伸有关。同年, Zhong 等^[14] 又发现了一种二氢咪喃香豆素衍生物 ZINC05577497, 通过对其进行结构优化, 发现了一系列新的 NA 抑制剂, 其中化合物 **9** 对 NA 的抑制活性最强, IC_{50} 值为 $0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 优于奥司他韦 (IC_{50} 为 $0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 ZINC05577497 (IC_{50} 为 $0.11 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。Shang 等^[15] 以先导化合物 ZINC13401480 为基础, 设计并合成了 16 种以 1, 3, 4-噁二唑硫醚酰胺为核心骨架的新型多杂环 NA 抑制剂。其中化合物 **10** 对野生型 H₃N₁ 病毒 NA 的抑制活性最好, IC_{50} 值为 $0.14 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 优于奥司他韦 (IC_{50} 值 $0.31 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.1.2 靶向 430-腔的竞争性抑制剂 NA 氨基酸序列 430 位附近有一个空腔结构, 这个空腔由于其周围氨基酸形成的环具有较高的柔韧性, 从而形成了一个相对较大的空间, 称为 430-腔。近年来靶向 430-腔的 NA 抑制剂主要为奥司他韦衍生物, 即通过对奥司他韦 C-1 位羧基、C-3 位、C-4 位胍基、C-5 位及 C-6 位等进行修饰使其延伸到 430-腔中, 与空腔中的残基产生额外相互作用, 以增强化合物的亲和性、广谱性和抗药性, 其中 C-1 位是主要的修饰位点。此外, 通过虚拟筛选的方式快速寻找新型靶向 430-腔的化合物也是 NA 抑制剂研发的一项重要策略。

① 非抗耐药抑制剂: Ju 等^[16] 设计合成了一组 C-1 修饰的新型奥司他韦衍生物, 通过与 430-腔作用以提高对病毒的抑制活性, 其中化合物 **11** 对 H₃N₁ 和 H₃N₆ 菌株的 IC_{50} 值分别为 $0.088 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.097 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与羧酸奥司他韦的抑制效果相似。Wang 等^[17] 也设计合成了一系列可与 430-腔相互作用的羧基修饰奥司他韦类似物, 其中化合物 **12** [IC_{50} 为 $(1.30 \pm 0.23) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] 具有较强的抑制活性, 且化合物 **12** ($\log D = -0.12$) 在 pH 7.4 时比奥司他韦羧酸盐 ($\log D = -1.69$) 亲脂性更强, 有利于改善膜通透性和口服药物吸收度。

Ju 等^[18] 在奥司他韦 C-1 位引入 1, 2, 3-三氮唑单元作为连接体, 设计合成了一系列可同时占

据 NA 催化位点和 430-腔的新型 1, 2, 3-三唑类奥司他韦衍生物。与奥司他韦相比, 化合物 **13** (见图 5) 具有更强的广谱抗流感病毒活性, 对 H₃N₁、H₃N₂ 和 H₃N₆ 病毒株的 IC_{50} 分别为 $0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.049 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Jia 等^[19] 通过对奥司他韦的 C-1 和 C5-NH₂ 进行修饰, 设计合成了一系列新型奥司他韦衍生物, N₁ 选择性抑制剂化合物 **14** 对 N₁ (H₃N₁) 和 N₁ (H₃N₁-H274Y) 的活性分别是奥司他韦羧酸盐的 1.5 倍和 1.8 倍。

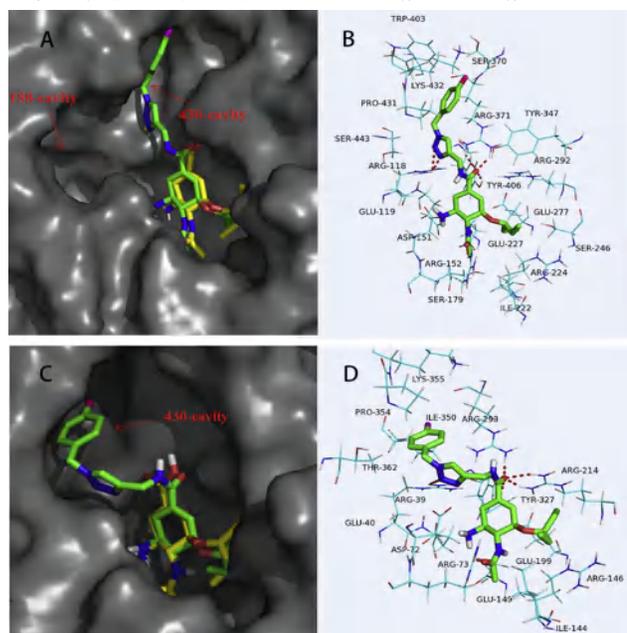


图 5 化合物 **13** 与 Group-1 NA (A, B, H₃N₁, PDB ID: 2HU0) 和 Group-2 NA (C, D, H₃N₆, PDB ID: 5HUM) 的相互作用

Fig 5 The interaction between compound **13** and Group-1 NA (A, B, H₃N₁, PDB ID: 2HU0) and Group-2 NA (C, D, H₃N₆, PDB ID: 5HUM)

② 抗耐药抑制剂: 由于流感病毒对占据酶活性位点的竞争性 NA 抑制剂的耐药性不断增强, 开发能够同时与 430-腔和 NA 表面其他催化位点相互作用的双功能化合物是提高 NA 抑制活性及增强化合物对耐药株 NA 抑制活性的一项重要策略。开发这种新型抑制剂不仅需要选择合适的连接子用于连接片段, 还需要确保其与 NA 催化中心独特的精氨酸三联体 Arg118-Arg292-Arg371 的有效相互作用^[20]。Shang 等^[15] 以先导化合物 ZINC13401480 为基础, 设计并合成的化合物 **15** 对 H₃N₁-H274Y 突变体表现出最好的活性, 其抑制活性约为奥司他韦羧酸的 60 倍, 这可能是因为化合物 **15** 可以通过其 1, 3, 4-噁二唑环和酰胺氧原子与活性位点的 3 个必需精氨酸残基 Arg118、Arg292 和 Arg371 形成氢键, 增强了相互作用。Fu 等^[21] 基于药效团的虚拟筛选和分子动力学模拟发现了一类先导化合物, 并根据药效团特征对其进行修饰得到了 14 个新化合物。其中, 化合物 **16** (IC_{50} 为 $0.44 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对突变型 NA

(H₅N₁-H274Y) 的抑制效果突出, 这可能与它可以同时占据 430-腔和活性位点, 并与关键的精氨酸残基 Arg118 和 Arg371 形成多个氢键有关。

1.1.3 靶向 371-腔的竞争性抑制剂 在 NA 活性位点附近还含有一个空腔, 此空腔是由 R371、P431、I427、K432 和 W403 残基围成的疏水性口袋, 命名为 371-腔。371-腔是奥司他韦等竞争性 NA 抑制剂的结合口袋之一, 这些抑制剂通过与该口袋内的特定氨基酸残基相互作用来获得额外的疏水性。目前针对 371-腔的 NA 抑制剂由于活性优势不够突出, 研究相对较少。

Chen 等^[22] 通过分子模拟发现, 磷酸单烷基酯在磷酸酯部分上含有负电荷, 可以与 NA 活性位点

的 3 个精氨酸残基 (R118、R292 和 R371) 产生足够的静电相互作用, 而烷基取代基位于 371-腔中, 可以获得额外的疏水相互作用, 从而增强与 NA 的亲和力, 使磷酸酯单酯类化合物通常对流感病毒表现出较强的 NA 抑制活性。

Hong 等^[23] 通过对奥司他韦进行修饰, 得到了一系列奥司他韦羧酸-异羟肟酸类衍生物。在此类衍生物中, 含有 *O*-(2-吡啶基)丙基取代基的化合物 **17** (见图 6) 表现出最好的 NA 抑制活性, 对 H₁N₁ (A/MSN/33) 的 IC₅₀ 为 6.4 nmol · L⁻¹, 远低于奥司他韦酸, 其活性较好的原因可能是由于 *O*-(2-吡啶基)丙基取代基可以位于 NA 的 371-腔中, 获得额外的疏水性增强了其 NA 抑制作用。

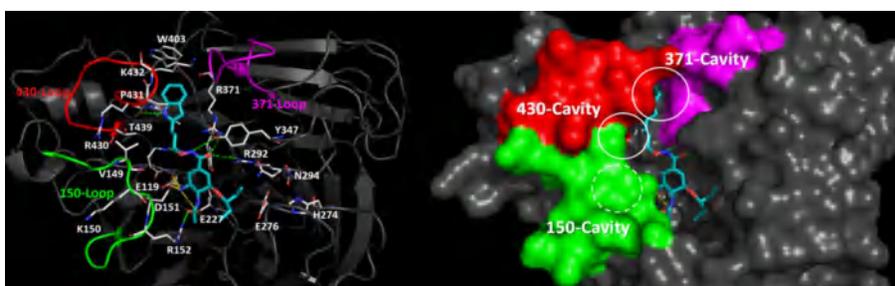


图 6 化合物 17 与 NA 的相互作用 (N₁ 亚型, PDB ID: 2HU4)

Fig 6 The interaction between compound 17 and NA (N₁ subtype, PDB ID: 2HU4)

1.2 非竞争性抑制剂

在 NA 抑制剂研究领域, 非竞争性抑制剂的研发不如竞争性抑制剂成熟。但非竞争性抑制剂可能具有不同的作用机制和降低耐药性的潜力, 因此对于开发新型抗病毒药物十分具有吸引力。非竞争性 NA 抑制剂可分为变构抑制剂和共价抑制剂, 变构抑制剂不直接结合在 NA 的活性位点上, 而是与酶的其他区域 (如变构位点或远端口袋) 发生相互作用, 导致酶的三维结构发生改变, 进而影响活性位点的构象 (见图 7), 使其失去与底物结合的能力。共价抑制剂可通过与酶活性位点上的特定氨基酸残基形成不可逆的共价键, 永久性地封闭活性位点, 阻止任何底物与酶的结合, 实现长期抑制作用。

Woo 等^[24] 通过柱色谱分离了日本毛连菜叶和茎中具有 NA 抑制作用的活性化合物, 发现蜂斗菜内酯 D (化合物 **18**) 不与活性位点对接, 为非竞争性抑制剂。化合物 **18** 可以与 NA 中的残基 K272 和 R467 形成强氢键, 与残基 F271 和 I332 形成 π -烷基相互作用, 具有进一步开发为 NA 抑制剂的潜力。

Malbari 等^[25] 设计合成了一系列非竞争性 NA 抑制剂骨架, 即橙酮、3-吡啶酮、4-喹诺酮和肉桂酸-哌嗪杂合物, 并对其体外抗 A/H₁N₁pdm09 流感病毒活性进行了研究。研究表明分子 (Z)-2-(3'-氯-苯亚甲基)-1, 2-二氢-吡啶-3-酮、(Z)-2-(4'-氯-苯亚甲基)-1, 2-二氢-吡啶-3-酮和 2-

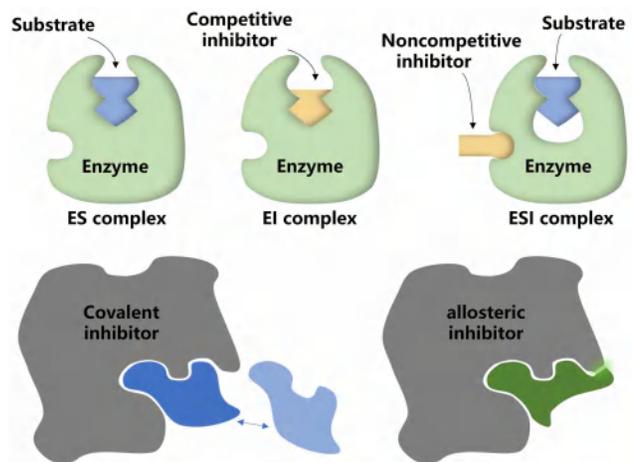


图 7 非竞争性抑制剂 (变构抑制剂与共价抑制剂) 与酶相互作用机制
Fig 7 Mechanism of interaction between non-competitive inhibitors (allosteric inhibitors and covalent inhibitors) and enzymes

(2'-甲氧基苯基)-1H-喹啉-4-酮 (化合物 **19**、**20**、**21**) 在亚微摩尔范围 (IC₅₀ 分别为 0.52、3.5、1.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 内表现出良好的 NA 抑制活性。

Hariyono 等^[26] 研究了 10 个查尔酮衍生物对 NA 抑制作用, 其中化合物 **22** 对 H₅N₁ NA 和 H₁N₁ NA 的 IC₅₀ 分别为 27.63 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 28.11 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 化合物 **23** 对 NA 的 IC₅₀ 分别为 87.54 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 73.17 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分子对接研究表明化合物 **22** 和 **23** 不与 NA 活性中心相互作用, 具有开发为非竞争性抑制剂的潜力。

Chintakrindi 等^[27]设计了一系列对位取代橙酮作为非竞争性 H₁N₁ NA 抑制剂，其中甲氧基取代的化合物显示出比硝基取代和氯取代化合物更高的 H₁N₁-NA 抑制活性，化合物 **24** 为活性最强的甲氧基取代橙酮，IC₅₀ 值为 (37.50 ± 1.12) μmol · L⁻¹。

2 具有抗体募集功能的 NA 抑制剂

具有抗体募集功能的 NA 抑制剂是一种新型

双功能 NA 抑制剂，它能促使致病因子（蛋白、病毒、细胞）与抗体之间形成三元复合物，导致免疫介导的致病因子的降解破坏。在结构上，该双功能分子一般由 3 个结构域组成（见图 8），分别是抗体结合端（ABT）、靶标结合端（TBT）和连接臂（Linker）。靶向致病因子的靶标结合端及修饰的 Linker 促使了抗体分子的募集。

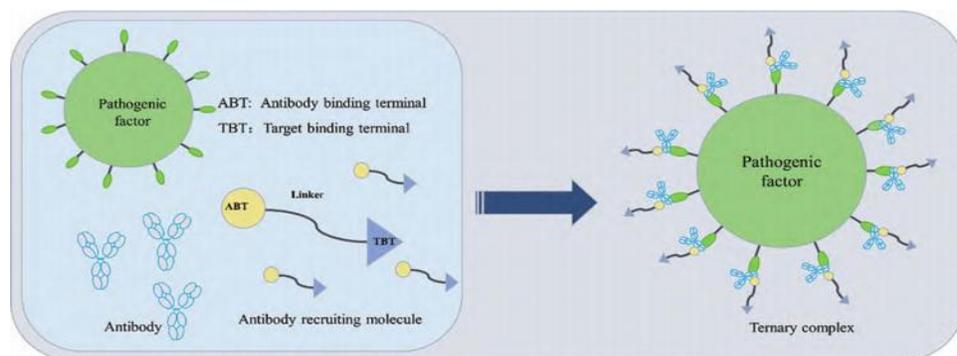


图 8 抗体募集功能的双功能分子作用机制^[6]

Fig 8 Mechanism of dual functional molecules with antibody recruitment function^[6]

Liu 等^[28]设计合成了一种双功能小分子化合物 **25**（见图 9），以 NA 抑制剂扎那米韦作为靶标结合端，高免疫性半抗原二硝基苯作为抗体结合端，特异性靶向游离病毒和被病毒感染细胞表面的 NA [H₁N₁: 解离常数 (K_d) = 0.8 nmol · L⁻¹, H₃N₂: K_d = 1.1 nmol · L⁻¹]，不仅能抑制子代病毒的释放，而且可通过免疫介导清除游离病毒和被病毒感染的细胞 [H₁N₁: 半数有效浓度 (EC₅₀) = 1.7 nmol · L⁻¹, H₃N₂: EC₅₀ = 7.6 nmol · L⁻¹]。对于轻度感染的小鼠经鼻内或腹腔注射单剂量的药物就可以清除甲型、乙型流感病毒，对于严重感染的小鼠在接种后 3 d 仍然有效。Liu 等^[29]继

续合成了另一种双功能分子化合物 **26**，将 NA 抑制剂扎那米韦，结合到一种纳米体上，该纳米体可以识别小鼠免疫球蛋白的 kappa 轻链。这种复合物被设计为通过与血液循环中更大的免疫球蛋白形成复合物来延长扎那米韦的半衰期。扎那米韦片段将加合物靶向病毒感染的细胞，而抗 kappa 成分同时递送特异性不确定的多克隆免疫球蛋白和所有同型。抗体依赖性细胞介导的细胞毒性和补体依赖性细胞毒性的激活促进了流感 NA 阳性细胞的消除。单剂量的结合物保护小鼠免受甲型或乙型流感病毒的危害，即使在感染致命剂量的病毒几天后给予也有效。

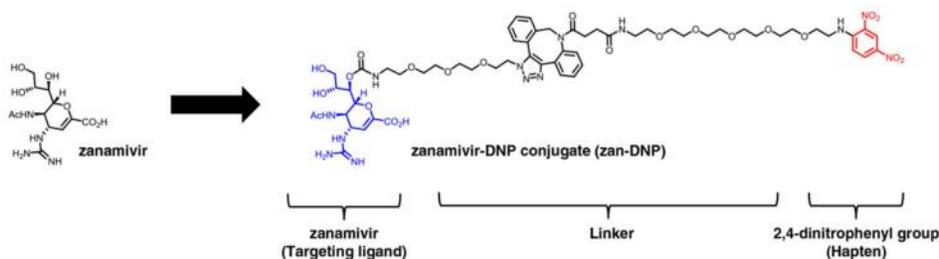


图 9 扎那米韦 -DNP 双功能分子结构^[28]

Fig 9 Chemical structure of zanamivir-DNP conjugate^[28]

3 NA 降解剂

除了抑制 NA 活性外，直接降解 NA 也是目前 NA 抑制剂研发的一个方向。蛋白质降解是药物利用细胞自身的泛素蛋白酶系统或溶酶体靶向降解目标蛋白质的技术，其中蛋白水解靶向嵌合体（proteolysis targeting chimeria, PROTAC）是目前最具有优势的蛋白质降解技术。PROTAC 通常以 E3 泛素蛋白酶系统来实现降解靶蛋白的目的，通

过 E3 泛素连接酶将泛素分子连接到目的蛋白上，从而实现目的蛋白的降解。PROTAC 分子是克服现有药物耐药性问题的有效解决策略，该类双功能分子通常一端连接结合靶蛋白的配体，一端连接 E3 连接酶的配体，中间通过合适的 Linker 相连。

Xu 等^[30]基于奥司他韦结构的设计了新型 PROTAC 分子 **27** 用于 NA 的降解（见图 10），**27** 可显著抑制 H₁N₁ 毒株 [EC₅₀ = 0.33 μmol · L⁻¹，细胞

半数中毒浓度 (CC_{50}) $> 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]。27 通过招募 E3 连接酶 VHL，以剂量依赖性的方式有效诱导流感 NA 降解，从而抑制 $\text{H}_1\text{N}_1\text{-H274Y}$ 突变株（流感病毒核蛋白和 mRNA 水平显著降低），同时也可以依赖泛素-蛋白酶途径，在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的剂量下显著诱导 NA 降解。这种新机制的 PROTAC 分子有望在流感的治疗中发挥重要作用。

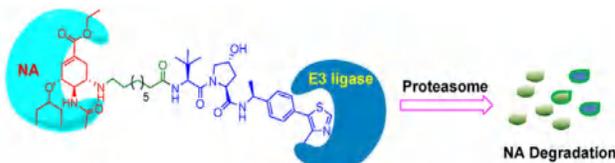


图 10 NA 降解示意图^[30]

Fig 10 Scheme of NA degradation^[30]

4 靶向 NA 的单克隆抗体

在 NA 头部的底部具有一个高度保守的区域，含有与抗体结合的靶点，并且不受耐药菌株中常见突变的影响，这个区域被称为“暗面”。NA 的暗面具有独特的未开发的抗原表位，针对 NA 暗面的单克隆抗体 (mAbs) 对 NA 的抑制作用类似于经典的 NA 抑制剂，并且其在抗奥司他韦耐药株上具有显著的优势。

Chen 等^[31]发现靶向 NA 的单克隆抗体能有效抑制包括奥司他韦耐药株在内的多种流感病毒 NA 活性，这些 NA 反应性 mAbs 即使在感染后 48 h 使用也能避免小鼠的体重减轻和死亡，表明它们可以作为 NA 抑制剂的潜在替代品。Yasuhara 等^[32]研究发现了人类单克隆抗体 DA03E17，DA03E17 对来自不同亚型 IAVs 和 IBVs 谱系的 NA 表现出广泛的反应性，该抗体靶向 NA 的高度保守表位，特别是 D151 和 T439 这两个关键氨基酸位置。尽管在体外实验中出现了逃逸突变病毒，但这些突变株的复制能力显著低于野生型病毒，并且与之前报道的具有交叉反应性的单克隆抗体 1G01 相比，DA03E17 具有更广的交叉反应性和更强的中和能力。

Hansen 等^[33]发现了两个具有广谱保护性的 NA 单克隆抗体 (即 2H08 和 3H03，见图 11)，能够通过抑制 NA 活性进而抑制多种流感病毒，包括季节性和大流行性 H1N1 病毒。这两个 mAbs 主要通过立体阻碍而非直接作用于活性位点来抑制 NA 活性，且在体外实验中显示出剂量依赖性的抗病毒效果，此外，这两个抗体还能通过 Fc 介导的效应功能如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 贡献于体内保护作用。Lederhofer 等^[34]研究了 5 种靶向 NA 暗面的单抗对 H_3N_2 、 $\text{H}_3\text{N}_2\text{v}$ 和 H_2N_2 病毒的抑制作用，发现所有靶向 NA 暗面的单抗均能抑制测试病毒的生长，还设计了含有 E119V/I222L 突变的重组 DW21 NA，而靶向 NA 暗面的单抗能抑制 E119V/I222L 突变的 DW21

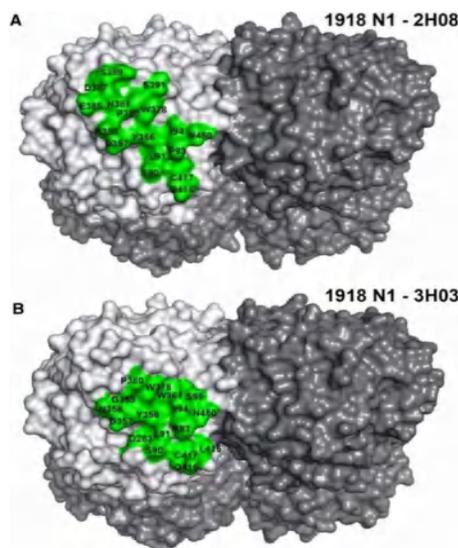


图 11 人源单克隆抗体 2H08 和 3H03 与 1918 N_1 NA 的抗原表位比较^[33]

Fig 11 Comparison of epitopes of human monoclonal antibodies 2H08 and 3H03 with 1918 N_1 NA^[33]

A. 2H08 的抗原表位定位于 1918 N_1 NA (绿色); B. 3H03 的抗原表位定位于 1918 N_1 NA (绿色)

A. The epitope of 2H08 was located at 1918 N_1 NA (green); B. The epitope of 3H03 was located at 1918 N_1 NA (green)

NA 活性，表明其具有抑制耐药病毒的应用潜力。

4 总结与展望

近年来，NA 耐药毒株的出现逐渐成为公众的担忧，研发更高效和抗耐药性的 NA 抑制剂成为该领域的研究热点。本文通过对近十年 NA 抑制剂研究的梳理总结，发现该领域的研究主要集中在两个方面：

一方面，NA 抑制剂的研究仍以小分子化学抑制剂为主，主要以奥司他韦为基础进行结构改造，通过靶向 NA 催化中心附近的 150-腔、430-腔和 371-腔以提高活性及抗耐药性。然而，靶向 150-腔的奥司他韦衍生物普遍具有明显的 NA 亚型选择性，广谱性较差。靶向 430-腔的奥司他韦衍生物往往 NA 抑制活性下降，而靶向 371-腔及非竞争性抑制剂研究较少，活性优势不突出。

另一方面，随着新技术的发展，陆续涌现出了新型的 NA 抑制剂，包括具有抗体募集功能的双功能 NA 抑制剂、NA 降解剂及 NA 单克隆抗体等，它们在抗耐药性方面具有显著的优势。然而，这些新型抑制剂往往面临药代动力学不佳等问题。这两大类 NA 抑制剂各具优势，都需要进一步发展完善以向临床应用推广。在流感病毒感染过程中，通过这两类 NA 抑制剂的联合交叉使用，或许能弥补各自的不足，为流感的防治提供新的选择。

参考文献

[1] Gaitonde DY, Moore FC, Morgan MK. Influenza: diagnosis and treatment [J]. Am Fam Physician, 2019, 100 (12): 751-758.

- [2] Dai J, Lyu F, Yu L, et al. Temporal and emotional variations in people's perceptions of mass epidemic infectious disease after the COVID-19 pandemic using influenza A as an example: topic modeling and sentiment analysis based on weibo data [J]. *J Med Internet Res*, 2023, 25: e49300.
- [3] 梁梦洁, 李永鑫, 张新. 甲型流感病毒分子诊断技术的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2024, 45 (13): 1640-1644, 1650.
- [4] 黎敏科, 杨博尧, 吴益喜, 等. 流感病毒抑制剂的研究进展 [J]. *药学进展*, 2024, 48 (5): 350-362.
- [5] Ju H, Hou LX, Zhao FB, et al. Iterative optimization and structure-activity relationship studies of oseltamivir amino derivatives as potent and selective neuraminidase inhibitors via targeting 150-cavity [J]. *J Med Chem*, 2022, 65 (17): 11550-11573.
- [6] 江圆敏, 张继伟, 贾瑞芳, 等. 靶向流感病毒表面糖蛋白的小分子抑制剂研究进展 [J]. *药学学报*, 2023, 58 (11): 3254-3269.
- [7] Xie YC, Xu DQ, Huang B, et al. Discovery of *N*-substituted oseltamivir derivatives as potent and selective inhibitors of H5N1 influenza neuraminidase [J]. *J Med Chem*, 2014, 57 (20): 8445-8458.
- [8] Jia RF, Zhang JW, Zhang J, et al. Discovery of novel boron-containing *N*-substituted oseltamivir derivatives as anti-influenza A virus agents for overcoming N1-H274Y oseltamivir-resistant [J]. *Molecules*, 2022, 27 (19): 6426.
- [9] Jia RF, Zhang JW, Shi FY, et al. Discovery of *N*-substituted oseltamivir derivatives as novel neuraminidase inhibitors with improved drug resistance profiles and favorable drug-like properties [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 252: 115275.
- [10] Zhao HQ, Jiang SY, Ye ZF, et al. Discovery of hydrazide-containing oseltamivir analogues as potent inhibitors of influenza A neuraminidase [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 221: 113567.
- [11] Li ZL, Meng YC, Xu ST, et al. Discovery of acylguanidine oseltamivir carboxylate derivatives as potent neuraminidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25 (10): 2772-2781.
- [12] Zhang JW, Liu CF, Jia RF, et al. A novel *N*-heterocycles substituted oseltamivir derivatives as potent inhibitors of influenza virus neuraminidase: discovery, synthesis and biological evaluation [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2023, 38 (1): 2277135.
- [13] Zhong ZJ, Hu XT, Cheng LP, et al. Discovery of novel thiophene derivatives as potent neuraminidase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 225: 113762.
- [14] Zhong ZJ, Cheng LP, Pang W, et al. Design, synthesis and biological evaluation of dihydrofurocoumarin derivatives as potent neuraminidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 37: 127839.
- [15] Shang LL, Zhong ZJ, Cheng LP. Discovery of novel polyheterocyclic neuraminidase inhibitors with 1, 3, 4-oxadiazole thioetheramide as core backbone [J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 269: 116305.
- [16] Ju H, Zhang J, Sun ZS, et al. Discovery of C-1 modified oseltamivir derivatives as potent influenza neuraminidase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 146: 220-231.
- [17] Wang BY, Wang KL, Meng PP, et al. Design, synthesis, and evaluation of carboxyl-modified oseltamivir derivatives with improved lipophilicity as neuraminidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28 (21): 3477-3482.
- [18] Ju H, Xiu SY, Ding X, et al. Discovery of novel 1, 2, 3-triazole oseltamivir derivatives as potent influenza neuraminidase inhibitors targeting the 430-cavity [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 187: 111940.
- [19] Jia RF, Zhang J, Ai W, et al. Design, synthesis and biological evaluation of "Multi-Site" -binding influenza virus neuraminidase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 178: 64-80.
- [20] Evteev S, Nilov D, Polenova A, et al. Bifunctional inhibitors of influenza virus neuraminidase: molecular design of a sulfonamide linker [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (23): 13112.
- [21] Fu SK, Cheng LP. Discovery and synthesis of novel benzoylhydrazone neuraminidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2024, 105: 129743.
- [22] Chen CL, Lin TC, Wang SY, et al. Tamiphosphor monoesters as effective anti-influenza agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 81: 106-118.
- [23] Hong BT, Chen CL, Fang JM, et al. Oseltamivir hydroxamate and acyl sulfonamide derivatives as influenza neuraminidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22 (23): 6647-6654.
- [24] Woo HS, Shin KC, Kim JY, et al. Bakkenolides and caffeoylquinic acids from the aerial portion of *Petasites japonicus* and their bacterial neuraminidase inhibition ability [J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (6): 888.
- [25] Malbari K, Saha P, Chawla-Sarkar M, et al. In quest of small-molecules as potent non-competitive inhibitors against influenza [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 114: 105139.
- [26] Hariyono P, Kotta JC, Adhipandito CF, et al. A study on catalytic and non-catalytic sites of H5N1 and H1N1 neuraminidase as the target for chalcone inhibitors [J]. *Appl Biol Chem*, 2021, 64 (1): 69.
- [27] Chintakrindi AS, Gohil DJ, Chowdhary AS, et al. Design, synthesis and biological evaluation of substituted flavones and auronones as potential anti-influenza agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28 (1): 115191.
- [28] Liu X, Zhang BN, Wang YC, et al. A universal dual mechanism immunotherapy for the treatment of influenza virus infections [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 5597.
- [29] Liu X, Balligand T, Carpenet C, et al. An armed anti-immunoglobulin light chain nanobody protects mice against influenza A and B infections [J]. *Sci Immunol*, 2023, 8 (84): eadg9459.
- [30] Xu ZC, Liu XJ, Ma XY, et al. Discovery of oseltamivir-based novel PROTACs as degraders targeting neuraminidase to combat H1N1 influenza virus [J]. *Cell Insight*, 2022, 1 (3): 100030.
- [31] Chen YQ, Wohlbold TJ, Zheng NY, et al. Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective neuraminidase-reactive antibodies [J]. *Cell*, 2018, 173 (2): 417-429.
- [32] Yasuhara A, Yamayoshi S, Kiso M, et al. A broadly protective human monoclonal antibody targeting the sialidase activity of influenza A and B virus neuraminidases [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 6602.
- [33] Hansen L, McMahon M, Turner HL, et al. Human anti-N1 monoclonal antibodies elicited by pandemic H1N1 virus infection broadly inhibit HxN1 viruses in vitro and in vivo [J]. *Immunity*, 2023, 56 (8): 1927-1938.
- [34] Lederhofer J, Tsybovsky Y, Nguyen L, et al. Protective human monoclonal antibodies target conserved sites of vulnerability on the underside of influenza virus neuraminidase [J]. *Immunity*, 2024, 57 (3): 574-586.

(收稿日期: 2024-10-08; 修回日期: 2024-11-02)

药食同源类中药防治痛风的研究进展

宋靖雯¹, 窦金金^{1, 2}, 尹丽颖¹, 黄毅然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 150040)

摘要: 痛风作为一种常见的代谢性疾病, 近年来由于生活方式的显著变化, 其在全球范围内的患病率急剧攀升, 已对人类健康构成严重威胁。尽管现有的西药治疗方案能有效缓解痛风症状, 但其伴随较多的不良反应, 会对身体造成不可忽视的损伤。相比之下, 中医药在痛风治疗方面展现出显著的优势, 不仅疗效确切, 而且用药相对安全, 尤其是药食同源类中药的应用更是为痛风患者提供了新的治疗选择。因此, 食疗替代疗法已成为当前研究的热点。本文基于中医学的病因病机理论与西医学的发病机制, 通过系统的文献调研, 深入分析和总结了清热解毒类、解表类、补虚类等药食同源类中药及由药食同源物质组成为主的中药复方在痛风治疗中的作用及其具体机制。着重明确了这类中药对痛风的作用效果及其效应成分, 并深入挖掘了其潜在的作用机制, 旨在为后期大力开发药食同源类中药用于痛风疾病的预防和治疗奠定坚实的理论基础, 并提供科学依据, 更为“健康中国”战略的早日实现提供了有益的思路借鉴。

关键词: 药食同源中药; 痛风; 高尿酸血症; 痛风性关节炎

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0790-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.032

Prevention and treatment of gout by food homologous traditional Chinese medicine

SONG Jing-wen¹, DOU Jin-jin^{1, 2}, YIN Li-ying¹, HUANG Yi-ran¹, ZHANG Xi-wu^{1*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Fourth Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: As a common metabolic disease, gout has become a public health problem that poses a serious threat to human health due to the dramatic changes in lifestyle in recent years. Although existing Western medicine treatment may effectively relieve the symptoms of gout, its accompanying side effects often cause much damage to the body. In contrast, traditional Chinese medicine has shown advantage in the treatment of gout, with obvious efficacy and safety. The application of food homologous traditional Chinese medicine provides a new treatment option for patients with gout. Therefore, dietary alternative therapy has become the focus of current research. Based on etiology and pathogenesis of traditional Chinese medicine and Western medicine, this paper summarized the role and specific mechanism of traditional Chinese medicine for gout via systematic literature review. It clarified the effect of Chinese medicine on gout and its effective components, and explored its potential mechanism of action, aiming to lay a theoretical foundation for the development of medicine and homologous food for gout.

Key words: medicinal and food homologous traditional Chinese medicine; gout; hyperuricemia; gouty arthritis

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目 (No.KZ2022-01); 黑龙江省“优秀青年教师基础研究支持计划”项目 (No.YQJH2023150); 黑龙江中医药大学科研项目 (No.2019JC01)。

作者简介: 宋靖雯, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新药开发研究, email: 2780846873@qq.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

痛风由尿酸钠 (MSU) 晶体在关节及非关节结构中沉积引发, 不仅会导致剧烈疼痛, 还常常伴随高血压病、高脂血症、动脉硬化、糖尿病、尿酸性肾病及肾结石等多种并发症, 对患者身心健康造成重大威胁^[1]。高尿酸血症 (HUA) 作为痛风的重要生化基础, 以痛风性关节炎 (GA) 作为其主要临床表现, 共同构成了这一复杂疾病的双重挑战。流行病学研究显示, 全球范围内痛风的患病率和发病率均显著上升, 且发病人群呈现年轻化趋势, 已成为人类健康领域不可忽视的公共卫生问题。然而, 令人担忧的是, 仅有一半的患者能够接受有效的降尿酸治疗, 导致患者生活质量严重下降^[2]。鉴于西药治疗虽能有效缓解症状, 但其显著的不良反应往往给患者身体带来损伤, 寻找更为安全有效的治疗方法显得尤为迫切。

在此背景下, 中医药尤其是药食同源类中药因其疗效确切、用药安全而备受瞩目。我国已正式公布了 114 种药食同源物质, 这些资源不仅历史悠久、种类丰富, 更因其独特的疗效、优良的风味及高度的安全性, 在防治痛风方面展现出巨大的潜力^[3]。随着全球健康意识的提升和大健康产业的蓬勃发展, 从中药尤其是药食同源类中药中挖掘具有防治痛风功能的成分, 并基于此开发新型食品, 已成为当前研究的热点与前沿。

本文旨在通过中医学的病因病机理论与西医学的发病机制, 深入探讨清热解毒类、解表类、补虚类等药食同源类中药在防治痛风中的作用及其具体机制, 能够为药食同源类中药在痛风预防和治疗中的应用提供坚实的理论基础和科学依据, 并结合国内外最新研究成果, 展现该领域的前沿动态, 明确解决当前痛风治疗中存在的问题, 为临床实践和科研探索提供新的思路与方向。

1 痛风的病因病机

1.1 中医学

痛风属于中医“痹症”范畴, 病名最早见于金元时期朱丹溪的《格致余论》^[4], 曰“彼痛风者, 大率因血受热, 已自沸腾, 其后涉于冷水, 或立湿地, 或扇风取凉, 或卧坐当风, 寒凉外搏, 热血当寒, 污浊凝涩, 所以作痛。夜则痛甚, 行于阴也。”《格致余论·痛风论》^[5]云:“肥人肢节痛, 是风湿与痰饮流注经络而痛。”古代医家将痛风的发生总结为“外感风寒湿邪, 痰浊湿热, 瘀阻经络”。清代徐大椿《医略六书·痛风》^[6]云“痛风”的临床表现是“轻则骨节疼痛, 走注四肢, 难以转侧, 肢节或红或肿, 甚则遍体瘰块,

或肿或瓠, 或痛如掣, 昼静夜剧。”现代医家在其基础上对痛风又有了新的认识。全国名老中医朱良春^[7]认为:“痛风, 受寒受湿是诱因之一, 但不是主因, 湿浊瘀滞内阻才是主要病机, 此湿浊之邪, 不受之于外, 而生之于内也……凡此悉皆浊瘀内阻使然, 实非风邪作祟。”此外, 王丹辉教授^[8]认为痛风患者多由先天禀赋不足, 脾肾亏虚, 加之饮食不节, 劳欲过度, 致使湿浊内生, 日久蕴而化热, 湿热毒邪伏藏日久, 痹阻经脉, 复受风湿热邪或风寒湿邪侵袭, 痹阻关节经络而为病。因此, 痛风的发生以内因为主, 外因为辅, 先天禀赋不足, 平素湿热潜伏体内, 加之正气不足, 腠理不密, 卫气失固, 湿热毒邪乘虚侵袭人体, 导致筋骨、关节、经络痹阻, 气血运行不畅, 不通则痛, 内外相引而发病。

1.2 西医学

现代医学普遍认为痛风是由于人体内尿酸 (UA) 水平紊乱而引起的晶体性关节炎, 而晶体沉积会导致受累关节的红肿热痛, 产生炎症反应。痛风的现代医学病机理论见图 1。

1.2.1 尿酸生成过多 尿酸是体内嘌呤分解代谢的终产物, 嘌呤和痛风之间的联系源于嘌呤分解导致尿酸盐的产生。腺苷脱氨酶 (ADA) 和鸟苷单磷酸还原酶 (GMPT1) 分别将腺苷-磷酸 (AMP) 和鸟苷-磷酸 (GMP) 转化为肌苷-磷酸 (IMP), AMP 和 GMP 也可以通过核苷酸酶代谢为腺苷和鸟苷。然后 IMP 与腺苷代谢为肌苷, 经嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 进一步代谢为次黄嘌呤, 之后次黄嘌呤经黄嘌呤氧化酶 (XOD) 代谢成黄嘌呤, 最终代谢为尿酸盐。同样, 鸟苷被 PNP 代谢为鸟嘌呤, 鸟嘌呤脱氨酶将其转化为黄嘌呤, 最终代谢为尿酸盐^[9-10]。

1.2.2 尿酸排泄减少 代谢产生的尿酸盐不溶于水, 需主动排泄。在血液中, 约三分之二的尿酸通过肾脏进行排泄。首先通过肾脏中的肾小球过滤, 会被近曲小管部位的尿酸盐转运蛋白 1 (URAT1) 和基底外侧葡萄糖转运蛋白 9 (GLUT9) 重新吸收至血液中, 然后又由远曲小管分泌而随尿排泄, 有机阴离子转运蛋白 (OAT) 通过特定的转运机制, 将尿酸从血液转运到肾小管腔中, 最终排出体外。这一过程中, 转运蛋白的活性、表达水平和调控机制都起重要作用; 而剩余约三分之一的尿酸经由肠道排泄。ATP 结合盒亚家族 G 成员 2 (ABCG2) 参与大量化学和结构多样化的化合物的细胞输出。研究表明, 它

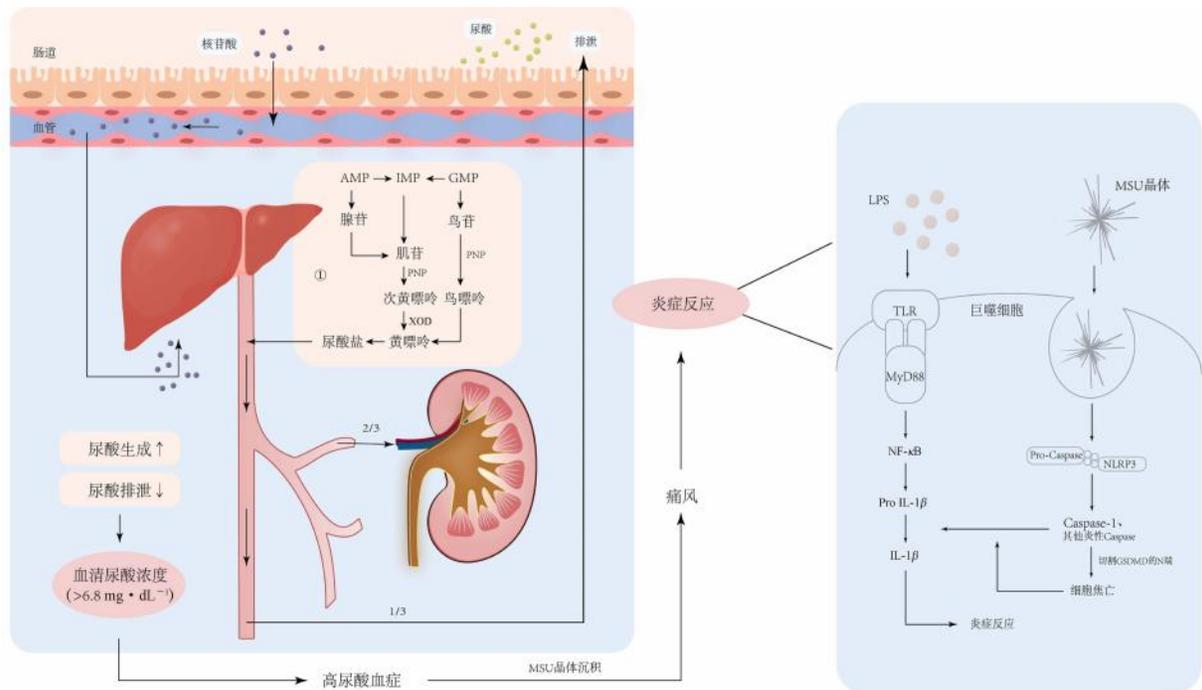


图 1 痛风的现代医学病理理论

Fig 1 Modern medical pathogenesis theory for gout

在肾脏和胃肠道尿酸盐排泄中起重要作用^[11-12]。

1.2.3 机体炎症反应 当体内尿酸盐水平失衡, 超过 $6.8 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 时, 单钠尿酸盐结晶会在关节及其他结缔组织中沉积引起炎性反应和组织破坏, 最终导致受累关节的红肿热痛, 即痛风性关节炎^[13]。

TLR/MyD88/NF- κ B 信号通路是机体炎症体系中的重要途径。TOLL 样受体 (TLR) 是一种跨膜蛋白, 能够识别脂多糖 (LPS), 引起机体炎症免疫应答, 而所有的 TLR 都能激活 MyD88 依赖性途径, 从而活化 NF- κ B, 导致炎症介质和细胞因子的释放, 进而引起炎症反应。

MSU 晶体对 NOD 样受体家族蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体的激活也是触发炎症反应的途径之一。NLRP3 炎性小体是由衔接蛋白凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和效应蛋白 pro-Caspase-1 的募集形成的, 能够调控半胱氨酸蛋白酶 (Caspase-1) 的活性并激活 Caspase-1, Caspase-1 被激活后, 会将无活性的促炎细胞因子切割为成熟体白细胞介素 (IL) - 1β (IL- 1β)、IL-18, 导致炎症的发生。除 Caspase-1 外, 其他炎性 Caspase 也能够切割 GSDMD 的 N 端结构, 发生细胞焦亡, 促进炎症介质和细胞因子的释放^[14-15]。

2 药食同源类中药防治痛风的作用及机制

本文通过整合近年来国内外关于此类中药的研究成果, 系统性地总结了 30 味常用药食同源中药、3 首由药食同源物质为主组成的中药复方

在防治痛风方面的有效成分及其具体作用机制。其中, 药食同源中药可根据其功效特性被归类为 12 大类别, 如图 2 所示。

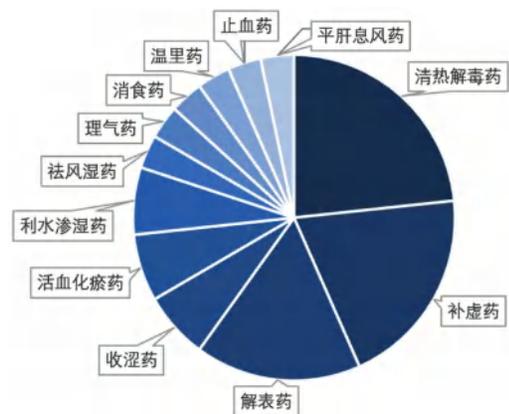


图 2 抗痛风药食同源中药分类

Fig 2 Classification of anti-gout medicine and food homologous traditional Chinese medicine

2.1 单味中药

2.1.1 清热解毒药 近年来, 清热类中药在痛风防治领域展现出了显著潜力。研究表明, 金银花、马齿苋、栀子、茯苓及菊花等中药材, 均能通过抑制体内 XOD 活性, 有效减少尿酸生成。特别是金银花^[16] 和马齿苋^[17], 两者分别在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 与 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下展示出了较好的调控尿酸水平的作用, 此外, 马齿苋还展现出抑制 TLR4/MyD88 通路的能力^[18], 对改善炎症与氧化应激反应大有裨益, 但其直接防治痛风的机制尚

待深入探索。

栀子中的β-谷固醇、槲皮素及山柰酚等成分，是抗痛风的关键分子^[19-20]。β-谷固醇以其抑制炎症因子释放的特性，显著减轻炎症反应，同时涉及NF-κB关键信号通路，全面调控机体免疫应答。

茯苓^[21]与菊花^[22]在促进尿酸排泄方面各显其能。茯苓多糖(1 g · kg⁻¹)能通过调控肾脏尿

酸转运蛋白OAT1与URAT1的表达，加速尿酸排出；而菊花则通过提升ABCG2转运蛋白活性，同时下调GLUT9与URAT1，降低血清尿酸水平，并对高尿酸伴发的肾脏疾病、高血脂及炎症起到改善作用。以上中药及其他清热解毒类中药的具体效应成分及作用机制详见表1。

表 1 清热药防治痛风疾病

Tab 1 Antipyretic medicine for preventing and treating gout

中药	效应成分	作用机制	文献
金银花	秦皮甲素、异绿原酸 B	抑制 XOD 活性	[16]
马齿苋	—	抑制 XOD 活性；抑制 TLR4/MyD88 通路	[17-18]
栀子	栀子苷、槲皮素、山柰酚、β-谷固醇	抑制 XOD 活性；参与 NF-κB 信号通路	[19-20]
茯苓	茯苓多糖	抑制 XOD 活性；下调 URAT1，上调 OAT1 蛋白表达	[21]
菊花	木犀草素、绿原酸	抑制 XOD 活性；上调肾脏 ABCG2、下调 GLUT9 和 URAT1 表达	[22]
决明子	—	抑制 XOD 活性	[23]
青果	胡椒碱、木犀草素	抑制 XOD 活性；下调 URAT1 表达	[24]

注：“—”暂无文献报道。

Note: “—” means without literature reported yet.

2.1.2 补虚药 山药、甘草、黄精与黄芪，这些传统意义上的滋补佳品，被研究证实为抗痛风的得力助手。Su等^[25]利用氧嗉酸钾诱导的HUA小鼠模型，揭示了山药的核心成分薯蓣皂苷在(3.8±0.51) μg · mL⁻¹剂量下可调控肾脏尿酸转运蛋白，下调mURAT1，上调mOAT1以促进尿酸排泄，同时保护肾脏免受损伤。

甘草黄酮醇作为甘草的有效成分，在高剂量20 μmol · L⁻¹时可抑制腺苷诱导的尿酸水平升高(但能否通过抑制XOD达到降尿酸效果尚未可知)，同时缓解高尿酸引起的肾小管上皮细胞氧化应激损伤，为甘草在痛风治疗中的应用提供了科学依据^[26]。黄精的有效成分薯蓣皂苷元、

黄芩苷元能够通过多维度调节与痛风密切相关的信号通路，有效减轻炎症反应^[27]，体外实验验证结果表明，薯蓣皂苷元低、高剂量组(10、20 μmol · L⁻¹)均能显著降低p38 MAPK及其上游ERK1/2磷酸化蛋白的表达，且呈剂量依赖性。黄芪的两大有效成分黄芪多糖与黄芪甲苷可发挥协同作用：黄芪多糖(IC₅₀ = 1.37 mg · mL⁻¹)能够可逆性结合XOD降低其活性，减少尿酸生成；黄芪甲苷则直接干预NF-κB炎症信号通路，抑制关键炎症因子的表达，显著改善GA症状^[28-29]。以上中药及其他补虚药的效应成分及作用机制详见表2。

表 2 补虚药防治痛风疾病

Tab 2 Deficiency medicine for preventing and treating gout

中药	效应成分	作用机制	文献
山药	薯蓣皂苷	下调 mURAT1 蛋白表达，上调 mOAT1 蛋白表达	[25]
甘草	甘草黄酮醇	降尿酸；缓解氧化应激损伤	[26]
黄精	薯蓣皂苷元、黄芩苷元	调节免疫反应和炎症反应等	[27]
黄芪	黄芪多糖、黄芪甲苷	抑制 XOD 活性；抑制 NF-κB 炎症信号通路	[28-29]
桑葚	桑葚黄酮	抑制 XOD 活性	[30]
杜仲叶	黄酮类、酚类	抑制 XOD 活性	[31]

2.1.3 解表药 在痛风的治疗领域，解表药正逐渐成为研究的热点。白芷的活性成分欧前胡素在动物实验中在20、40 mg · kg⁻¹剂量下展现出显著减轻MSU诱导的关节肿胀及炎症反应的能力，通过下调多种促炎细胞因子(如NLRP3、IL-

1β、TNF-α等)的表达，可有效改善关节环境，尽管其具体机制尚待深入解析^[32]。干姜中的阿魏酸与对香豆酸通过分子间相互作用影响XOD功能，同时0.5 mg · mL⁻¹阿魏酸的DPPH自由基清除率大于90%，也预示着其在降低尿酸水平方

面的可能性,为痛风治疗开辟了新路径^[33]。葛根成分葛根素在 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时能够平衡痛风小鼠体内的尿酸与一氧化氮水平。这一平衡调节不仅有助于减轻炎症反应,还促进了免疫系统的稳态恢复,通过调控巨噬细胞极化等过程,葛根素在机体内构建了一道坚实的抗炎防线^[34]。桑叶对 XOD 的抑制作用以及对肝、肾的保护效应,特别是其降低尿酸水平并减少促炎介质释放的能力,为痛风的综合管理提供了新策略^[35]。整理以上中药及其他解表药的效应成分及作用机制见表 3。

表 3 解表药防治痛风疾病

Tab 3 Antidote medicine for preventing and treating gout

中药	效应成分	作用机制	文献
白芷	欧前胡素	下调 mURAT1 蛋白表达,上调 mOAT1 蛋白表达	[32]
干姜	阿魏酸、对香豆酸	抑制 XOD 活性	[33]
葛根	葛根素	调节免疫反应和炎症反应等	[34]
桑叶	桑叶黄酮	抑制 XOD 活性;改善肾损伤	[35]
薄荷	黄酮类	抑制 XOD 活性	[36]

2.1.4 收涩药 肉豆蔻的醇提物在 $400 \sim 1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时通过抑制 XOD 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的活性,有效降低血清尿酸水平,显示出潜在的抗痛风潜力^[37]。而白果(银杏)不仅能抑制尿酸的生成和重吸收,还可以促进尿酸的排泄,从而全面调节尿酸水平^[38]。此外,白果还能有效干扰 NLRP3 等炎症系统,减轻痛风引起的炎症反应。

2.1.5 活血化瘀药 山楂的有效成分山楂叶总黄酮 ($6, 12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 能够可逆性竞争抑制 XOD 活性,有效降低血清尿酸水平,并对 HUA 导致的血管内皮细胞功能损伤具有防治作用^[39]。姜黄则能抑制 NF- κ B 信号通路激活,减少下游炎症因子表达,同时保护单核巨噬细胞免受 MSU 诱导的线粒体损伤^[40]。

2.1.6 祛风湿药 木瓜在 HUA 治疗中同样表现出色。它能抑制 XOD 活性以降低血清尿酸水平,并调节肾脏尿酸转运蛋白表达,增强肾脏尿酸排泄,减轻肾功能障碍^[41]。此外,木瓜还能提高抗氧化酶活性,抑制 HUA 引起的氧化应激反应。

2.1.7 利水渗湿药 菊苣的活性成分菊苣酸 ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能显著抑制高尿酸状态下 GLUT9 蛋白表达,促进肾脏尿酸排泄^[42-43]。同时,菊苣还能干预肠道菌群失衡,通过调节肠道菌群和下调肾脏中的炎症途径来降低炎症反应,促进尿酸排泄。另有枳椇子,能通过抑制 XOD 活性来降低血清尿酸^[44]。

2.1.8 理气药 紫苏提取物中的多种成分被鉴定为有效的黄嘌呤氧化酶抑制剂。研究表明,紫苏

叶提取物 ($IC_{50} = 5.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 不仅能降低体内血清尿酸水平,还能改善 HUA 导致的肾脏病理变化,提示其对肾脏具有一定的保护作用^[45]。

2.1.9 消食药 藏药余甘子在治疗 HUA 方面具有长期应用历史,并作为复方的重要组成部分被开发成多种中成药^[46-47]。余甘子提取物 ($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 通过抑制 XOD 活性来达到降尿酸的作用,其抗炎作用则与抑制局部组织和血清中炎症介质的释放有关。作为藏药经典方药三果汤的核心药物之一,余甘子在痛风及气血紊乱等疾病的治疗中发挥着重要作用。

2.1.10 其他类 其他中药材如温里药高良姜,止血药槐花,平肝息风药天麻的效应成分及作用机制见表 4^[37-50]。

2.2 中药复方

2.2.1 参苓白术散 参苓白术散源于《太平惠民和剂局方》,为健脾益气的代表方剂,由人参、茯苓、白术、山药、甘草、白扁豆、莲子、薏苡仁、砂仁、桔梗 10 味药组成,其中有 9 味属于药食同源类中药。汪永辉等^[51]使用 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的汤剂通过观察其对 HUA 小鼠模型的影响,得出参苓白术散降低血清尿酸含量是治疗 HUA 的关键环节,能够调节 HUA 小鼠肠组织 AMPKA 磷酸化,升高 ABCG2 表达。另外,参苓白术散水煎液也可能通过抑制 TLR4、NF- κ B 的磷酸化表达来显著降低大鼠血清中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平^[52]。

2.2.2 麻黄连翘赤小豆汤 麻黄连翘赤小豆汤出自《伤寒论·辨阳明病脉证并治》,主要用于治疗表证兼湿热内蕴的黄疸。随着医学研究的持续深入,该方剂的应用领域不断拓宽,展现出广泛的应用价值。临床研究表明,麻黄连翘赤小豆汤能够有效降低湿热蕴结型急性痛风患者的血清尿酸及炎症指标,减轻临床症状^[53-54]。然而,尽管其在临床疗效上表现卓越,但现有的研究大多仍聚焦于临床观察,对于其深层的作用机制,尚缺乏深入探索。

2.2.3 四妙勇安汤 经典名方四妙勇安汤由金银花、玄参、当归、甘草组成,收录于《古代经典名方(第一批)》中,具有清热解毒、活血止痛的功效。沈雨宇等^[55]运用网络药理学及构建 GA 大鼠的实验模型,探究其具体作用机制,结果表明,四妙勇安汤可降低 IL-17A、IL-17F、环氧合酶-2 (COX-2)、人生长调节致癌基因- β (CXCL-2)、IL-1 β 、TNF- α 炎症因子含量及大鼠踝关节组织 MEK1/2、Er K1/2 蛋白的表达,减轻炎症反应,从而对 GA 有一定治疗作用。

以上中药复方的来源、药味组成及作用机制见表 5。

表 4 其他类中药防治痛风疾病

Tab 4 Other types of traditional Chinese medicine for preventing and treating gout

中药	效应成分	作用机制	文献
肉豆蔻	—	抑制 XOD 和 TNF- α 活性	[37]
白果	黄酮类、萜类	抑制 XOD 活性; 下调 URAT1 蛋白表达; 干扰 NLRP3 等炎症系统	[38]
山楂	总黄酮	抑制 XOD 活性; 防治血管内皮细胞功能损伤	[39]
姜黄	姜黄素	抑制 NF- κ B 信号通路; 抑制 NLRP3 炎症反应活性	[40]
木瓜	黄酮类、酚类	抑制 XOD 活性; 下调肾脏 URAT1 蛋白、上调肾脏 OAT1 蛋白表达; 抑制氧化应激	[41]
菊苣	菊苣酸	抑制 GLUT9 蛋白表达, 下调血清 LPS 和 TLR4 /NF- κ B 炎症途径, 降低 LPS/TLR4 轴炎症反应	[42-43]
枳椇子	醇提取物	抑制 XOD 活性	[44]
紫苏	山柰酚-3-O-芸香苷、迷迭香酸、甲基迷迭香酸、芹菜素、4', 5, 7-三甲氧基黄酮	抑制 XOD 活性; 改善 HUA 导致的肾小管管腔扩张, 保护肾脏	[45]
余甘子	正丁醇、乙酸乙酯部位	抑制 XOD 活性; 抑制炎症介质的释放	[46-47]
高良姜	黄酮类、多糖类	抑制 XOD 活性; 下调肾脏 URAT1 和 GLUT9 表达; 保护肾脏	[48]
槐花	醇提取物	抑制 XOD 活性; 改善肾脏组织病理学变化	[49]
天麻	天麻素	抑制 XOD 活性; 调控 URAT1 和 OAT1 的 mRNA 的表达水平; 增加肾脏组织抗氧化活性和抗炎作用	[50]

注: “—” 暂无文献报道。

Note: “—” means without literature report yet.

表 5 中药复方防治痛风疾病

Tab 5 Traditional Chinese medicine formulas for preventing and treating gout

中药复方	来源	药味组成	作用机制	文献
参苓白术散	《太平惠民和剂局方》	人参、茯苓、白术、山药、甘草、白扁豆、莲子、薏苡仁、砂仁、桔梗	降低血清尿酸水平; 降低炎症因子水平	[51-52]
麻黄连翘赤小豆汤	《伤寒论·辨阳明病脉证并治》	连翘、甘草、生姜、大枣、杏仁、赤小豆、麻黄、生梓白皮	降低湿热蕴结型急性痛风患者的血清尿酸及炎症指标	[53-54]
四妙勇安汤	《古代经典名方(第一批)》	金银花、玄参、当归、甘草	降低炎症因子水平, 改善炎症反应	[55]

综上所述, 以上单味药及中药复方在痛风防治中展现出较好的药效和机制。通过多靶点、多通路协同作用, 不仅能降低血清尿酸水平, 还可减轻炎症反应、保护肾脏功能, 为痛风及 HUA 的防治提供了新的思路和选择。

3 总结与讨论

痛风作为一种常见的代谢性疾病, 其发病的核心机制在于机体内尿酸代谢的异常, 这种异常导致尿酸盐晶体在关节及其周边组织内积聚, 进而引发一系列炎症反应。针对这一病理过程, 当前防治痛风的主要策略聚焦于三个方面: 抑制尿酸的生成、促进尿酸的有效排泄, 以及减轻由尿酸盐沉积引发的炎症反应, 这三方面策略相辅相成, 共同构成了当前防治痛风的主要手段。在这一背景下, 药食同源类中药凭借其独特食用和药理作用双重属性, 在痛风治疗中展现出了显著的应用潜力。药食同源类中药主要通过以下几种方式发挥抗痛风作用。

首先, 它们能够抑制尿酸的生成。XOD 作

为尿酸合成的关键酶, 其活性受到多种成分的抑制, 进而减少尿酸的生成。在这类中药中, 黄酮类化合物占据了重要地位, 如槲子中的槲皮素和山柰酚、菊花中的木犀草素等, 均能有效抑制 XOD 活性。其次, 部分中药能够通过调控尿酸转运蛋白(如 URAT1、OAT1)的表达, 促进尿酸从肾脏和肠道的排泄。例如, 山药和白芷等中药能够下调尿酸重吸收蛋白的表达, 增加尿酸的排泄量。此外, 药食同源类中药还能减轻炎症反应。药食同源类中药通过干预 TLR/MyD88/NF- κ B 和 NLRP3/ASC/Caspase-1 等炎症信号通路, 抑制炎症因子(如 IL-6、IL-8、IL-1 β 等)的释放, 从而减轻关节的炎症反应。常见治疗痛风的中药分类及其治疗机制见图 3。

综上, 药食同源类中药及其复方可以作为痛风疾病防治的新视角。虽然我国药食同源类中药资源丰富、历史悠久, 但是部分单味药与复方的研究缺少体内外研究或临床试验验证, 未来可以通过探究现有中药具体效应成分和探索其他同样

具有清热解毒、抗炎镇痛功效的药食同源类中药, 扩大其在痛风疾病防治方向的研究与应用。另外, 随着新的共病与痛风之间的联系被确定, 痛风患者对不同共病之间相互关系的理解也得到了提高, 未来或可着眼于此, 解决共病问题以降低痛风发作频率, 改善痛风患者的生活质量。

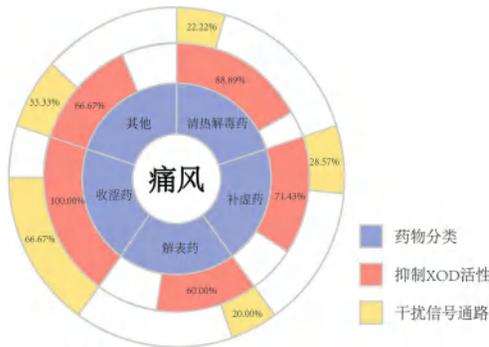


图3 常见中药治疗痛风病机图

Fig 3 Mechanism diagram of common traditional Chinese medicine in the treatment of gout

参考文献

- [1] Dalbeth N, Gosling AL, Gaffo A, et al. Gout [J]. Lancet, 2021, 397 (10287): 1843-1855.
- [2] Dehlin M, Jacobsson L, Roddy E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16 (7): 380-390.
- [3] 刘四军, 林秋红, 刘磊, 等. 药食两用物质在中医药辨证保健中的作用和特点 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (9): 5009-5012.
- [4] 吴彤, 贾春华. “痛风病”中医病因病机的隐喻分析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19 (9): 1494-1497.
- [5] 朱震亨. 格致余论 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2000.
- [6] 徐大椿. 医略六书 [M]. 宁波: 上洋赵翰香居, 1903.
- [7] 李君霞, 黄闰月, 陈秀敏, 等. 浅谈朱良春教授从“浊瘀”论治痛风的学术思想 [J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41 (4): 75-77, 86.
- [8] 吉兴旺, 王丹辉. 王丹辉教授对痛风性关节炎病因病机的认识 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2024, 22 (6): 58-60.
- [9] Zhang YL, Chen SM, Yuan M, et al. Gout and diet: a comprehensive review of mechanisms and management [J]. Nutrients, 2022, 14 (17): 3525.
- [10] Danve A, Sehra ST, Neogi T. Role of diet in hyperuricemia and gout [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2021, 35 (4): 101723.
- [11] Keenan RT. The biology of urate [J]. Semin Arthritis Rheum, 2020, 50 (3S): S2-S10.
- [12] Chen YY, Zhao ZA, Li YM, et al. Baicalein alleviates hyperuricemia by promoting uric acid excretion and inhibiting xanthine oxidase [J]. Phytomedicine, 2021, 80: 153374.
- [13] 章晓云, 曾浩, 李华南, 等. 痛风性关节炎的发病机制及中医药治疗研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (11): 256-267.
- [14] 单佳铃, 程虹毓, 文乐, 等. TLR/MyD 88/NF- κ B 信号通路参与不同疾病作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35 (4): 451-455.
- [15] So AK, Martinon F. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13 (11): 639-647.
- [16] 彭磊. 基于分子对接技术筛选金银花降尿酸物质基础 [J]. 中医药信息, 2020, 37 (4): 13-18.
- [17] 吕有为, 潘昱辰, 孙铭键, 等. 马齿苋降尿酸及肾脏保护作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43 (2): 354-359.
- [18] 包璇, 王丹, 刘莲, 等. 基于 Toll 样受体 4/ 髓样分化蛋白 88 通路研究马齿苋多糖对小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (4): 523-527.
- [19] 张妍, 李瑶, 赵亚妮, 等. 芒果苷、山柰酚和槲子苷对高尿酸血症小鼠的作用 [J]. 西北药学杂志, 2021, 36 (2): 215-219.
- [20] 刘佳, 李谄光, 陈杰. 槲子活性成分抗痛风的网络药理学作用机制探讨 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18 (5): 167-173.
- [21] 邓未娇, 闫洁熙, 王沛, 等. 茯苓多糖对高尿酸血症大鼠肾小管转运体 rURAT1、rOAT1 和 rOCT2 表达的影响 [J]. 西部中医药, 2019, 32 (6): 10-14.
- [22] 彭岸. 毫菊提取物改善大鼠高尿酸血症作用机制及其 XO1 活性谱效关系研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [23] 张瑛毓, 普布多吉, 卢聪, 等. 基于黄嘌呤氧化酶活性抑制和斑马鱼高尿酸血症模型的降尿酸功效食药材筛选 [J]. 食品工业科技, 2021, 42 (12): 334-339.
- [24] 张炳森, 赵泽安, 李咏梅, 等. 橄榄果汁冻干粉的降尿酸与抗痛风作用 [J]. 食品工业科技, 2021, 42 (24): 347-353.
- [25] Su JX, Wei YH, Liu ML, et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of Rhizoma Dioscoreae septemlobae extracts and its main component dioscin via regulation of mOAT1, mURAT1 and mOCT2 in hypertensive mice [J]. Arch Pharm Res, 2014, 37 (10): 1336-1344.
- [26] 曹文洁, 黄林生, 刘丽, 等. 甘草黄酮醇降尿酸及抑制氧化应激作用及其机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40 (4): 448-454.
- [27] 周艺璇, 陈如一, 李芬芬, 等. 基于网络药理学探讨黄精防治痛风的机制 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40 (2): 154-162.
- [28] 李晶, 姜丽丽, 李沐轩, 等. 黄芪多糖对黄嘌呤氧化酶活性的抑制作用 [J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40 (10): 16-20.
- [29] 杨大兴, 单延具, 张欣亮, 等. 黄芪甲苷对尿酸钠诱导的大鼠急性痛风性关节炎的防治作用及炎症反应机制研究 [J]. 河北医药, 2020, 42 (15): 2245-2249.

- [30] 王红权, 詹杰, 王小波, 等. 中药有效成分治疗高尿酸血症基础研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29 (3): 471-476.
- [31] 柴建新. 杜仲叶黄酮提取物的体外活性及其对大鼠高尿酸血症的防治作用 [D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- [32] 元明慧, 姜禹辰, 廉丽花, 等. 白芷提取物及其活性成分欧前胡素改善痛风性关节炎 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38 (9): 1416-1420.
- [33] 李佳惠, 焦文雅, 靳秋霞, 等. 干姜苯丙素类成分及其抗氧化、降尿酸活性分析 [J]. 食品科学, 2023, 44 (11): 26-31.
- [34] 张羽, 钟晓鸣, 杨静, 等. 葛根素对痛风性关节炎小鼠炎症相关细胞因子表达的影响 [J]. 免疫学杂志, 2020, 36 (10): 903-907, 913.
- [35] 王珂, 王瑞坡, 李姣, 等. 桑叶黄酮对腺嘌呤诱导大鼠高尿酸血症肾损伤的防治作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24 (2): 172-175, 202.
- [36] 刘璐. 中草药提取物体外黄嘌呤氧化酶抑制活性及其复合饮料研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- [37] 宗伟英, 肖功胜, 李世升, 等. 肉豆蔻提取物的抗痛风作用研究 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16 (12): 124-125.
- [38] 刘丹, 朱靖博, 王永华, 等. 基于网络药理学的银杏叶提取物治疗痛风潜在作用机制初探 [J]. 中草药, 2016, 47 (15): 2693-2700.
- [39] 张知贵, 杨华. 山楂叶总黄酮对高尿酸血症大鼠血尿酸及血管内皮细胞功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (12): 259-261.
- [40] 顾雯靓, 牛晓亚. 抑炎中药及其提取物治疗痛风急性发作研究进展 [J]. 中西医结合研究, 2021, 13 (1): 47-50.
- [41] Zhang R, Zhan SY, Li SY, et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of extracts from *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne in hyperuricemic mice [J]. Food Funct, 2018, 9 (11): 5778-5790.
- [42] 邹丽娜, 王雨, 姜卓希, 等. 基于肾脏尿酸转运的中药降尿酸活性成分筛选及评价——以菊苣酸为例 [J]. 世界中医药, 2021, 16 (1): 28-34.
- [43] Bian M, Wang J, Wang Y, et al. Chicory ameliorates hyperuricemia via modulating gut microbiota and alleviating LPS/TLR4 axis in quail [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110719.
- [44] 戴立珍. 中草药中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选及制剂研究 [D]. 武汉: 武汉工程大学, 2014.
- [45] 张蕾, 郝婧玮, 景云荣, 等. 紫苏叶对高尿酸血症模型小鼠的影响 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48 (12): 156-159.
- [46] 符晓晖. 抗痛风中药新药余甘子片的成药性研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [47] 岑志芳, 张继平, 李海燕, 等. 余甘子提取物对尿酸钠诱导大鼠急性痛风性关节炎的作用研究 [J]. 中国药房, 2011, 22 (47): 4425-4427.
- [48] 刘雪梅. 具有 XO1 活性的食源性植物多酚提取物的筛选、降尿酸活性评价及功效因子靶向鉴定 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [49] 韩玲玲, 樊海瑞, 林明珠, 等. 槐花醇提取物对 2 型糖尿病合并高尿酸血症小鼠疗效研究 [J]. 中药材, 2017, 40 (11): 2697-2700.
- [50] 褚亚慧. 天麻素对动物高尿酸血症和尿酸性肾病的改善作用和机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.
- [51] 汪永辉, 萧闵, 李瑛, 等. 参苓白术散调节 AMPK、ABCG2 改善高尿酸血症模型小鼠尿酸的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42 (12): 1982-1987.
- [52] 刘翠玲, 梁奇, 梁雁翔, 等. 参苓白术散对尿酸钠诱导急性痛风性关节炎模型大鼠的作用机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (6): 1311-1313.
- [53] 刘伊莎, 李耀辉, 李哲. 麻黄连翘赤小豆汤证病机及临床应用研究进展 [J]. 西部中医药, 2022, 35 (9): 146-150.
- [54] 孔令钊. 麻黄连翘赤小豆汤治疗湿热蕴结型急性痛风的疗效观察 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [55] 沈雨宇, 牛梦伟, 杨小英, 等. 四妙勇安汤通过 MEK1/2-Erk1/2 途径改善尿酸钠诱导大鼠痛风性关节炎的作用 [J]. 药物评价研究, 2024, 47 (7): 1572-1582.

(收稿日期: 2024-10-22; 修回日期: 2024-12-23)

CYP2C9 基因多态性对氯沙坦和厄贝沙坦药效学影响的研究进展

曲志浩¹, 王玉², 李文娟², 邓粉妮², 王皓天², 刘一帆¹ (1. 济南广音医疗科技有限公司, 济南 250000; 2. 西安时代基因健康科技有限公司, 西安 710065)

摘要: CYP2C9 是人体内重要的药物代谢酶, 其编码基因 CYP2C9 的多态性已被证实对多种药物的代谢活性具有显著影响, 其中包括广泛应用于高血压治疗的血管紧张素 II 受体阻滞剂 (ARBs)。东亚人群中常见的 CYP2C9*3 变异会影响 CYP2C9 酶的活性, 导致 CYP2C9*3 携带者使用氯沙坦或厄贝沙坦时药物代谢速率减慢, 血药浓度升高, 从而表现出药效的个体差异。本研究综述了近年来关于 CYP2C9 基因多态性对氯沙坦和厄贝沙坦药效学影响的研究进展, 旨在为临床实践中是否需进行 CYP2C9 基因检测提供依据, 以指导氯沙坦和厄贝沙坦的合理选择、剂量调整, 实现高血压治疗的精准化。

关键词: 高血压; 药物基因组学; 基因多态性; 血管紧张素 II 受体阻滞剂; CYP2C9*3

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0798-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.033

Research progress in the effect of CYP2C9 gene polymorphism on the efficacy of losartan and irbesartan

QU Zhi-hao¹, WANG Yu², LI Wen-juan², DENG Fen-ni², WANG Hao-tian², LIU Yi-fan¹ (1. Jinan Guangyin Medical Technology Co., Ltd., Jinan 250000; 2. Xi'an Genergy Health Technology Co., Ltd., Xi'an 710065)

Abstract: CYP2C9 is an important drug-metabolizing enzyme in the human body. Polymorphism in its encoding gene, CYP2C9, significantly influences drug metabolism, including that of Angiotensin II receptor blockers (ARBs). The common CYP2C9*3 variant in East Asian populations may affect CYP2C9 enzyme activity and cause slower drug metabolism in carriers of CYP2C9*3 when they receive losartan or irbesartan. This leads to higher blood drug levels and differences in drug efficacy for different individuals. This study reviews recent research progress in how CYP2C9 genetic polymorphism affected the pharmacodynamics of losartan and irbesartan. It aims to assist clinical practitioners to decide the necessity of CYP2C9 gene testing, and facilitate the selection and dosage adjustment of losartan and irbesartan for precise and individualized treatment.

Key words: hypertension; pharmacogenomics; gene polymorphism; Angiotensin II receptor blocker; CYP2C9*3

高血压是我国患病率较高、致残率较高及疾病负担较重的慢性非传染性疾病。据最新统计数据示, 我国 18 岁及以上人群高血压的患病率达到 27.5%, 患者数量多达 3 亿^[1], 这一数据揭示了高血压问题在我国公共卫生领域的严峻态势。同时, 我国高血压知晓率、治疗率和控制率

分别为 51.6%、45.8% 和 16.8%, 总体仍处于较低水平^[2], 这意味着大量高血压患者未能及时识别自身病情、接受规范治疗或有效控制血压。在已接受药物治疗的高血压人群中, 20%~50% 的患者未能实现理想的血压控制, 凸显了当前高血压管理中的问题^[3]。

基金项目: 湖南省重点领域研发计划 (No.2020SK2081)。

作者简介: 曲志浩, 男, 硕士, 主要从事药物基因组学研究, email: qu.zhi.hao@163.com

研究显示,个体差异是导致高血压患者接受治疗后降压疗效不同的主要因素。药物基因组学研究揭示,遗传多态性对药物效应的强弱具有显著影响,从而引起药物疗效在个体间的显著差异^[4]。药物代谢酶、转运体以及药物作用靶点(如受体)的遗传变异是导致患者对同一药物产生迥异反应的关键因素。以常用的血管紧张素Ⅱ受体阻滞剂(ARBs)氯沙坦为例,多项研究指出,CYP2C9是主导氯沙坦体内氧化代谢的主要细胞色素P450(CYP)同工酶,CYP2C9基因型的多样性导致了氯沙坦在不同个体中氧化与活化过程的差异,进而影响了药物的疗效^[5]。口服降压药物是原发性高血压患者维持血压稳定、降低心脑血管并发症风险的主要治疗手段,其选择与应用不应局限于现行诊疗指南与临床实践经验^[6]。因此,探寻并实施基于个体遗传特征的个性化降压治疗方案,对于优化血压管理、提升治疗效果至关重要^[7]。缬沙坦、替米沙坦和坎地沙坦在体内代谢程度较低,CYP2C9基因多态性对其疗效影响较小^[8-10]。奥美沙坦酯口服后迅速从胃肠道吸收,并在吸收过程中转化为奥美沙坦,即药理活性代谢物,随后无需进一步代谢即可排泄^[11],而阿利沙坦酯在胃肠道经酯酶水解,不需肝药酶代谢^[12]。因此,本文主要综述CYP2C9基因多态性对氯沙坦和厄贝沙坦疗效的影响,以期临床个体化治疗提供参考,助力实现更精准、更高效的血压管理,提升患者生活质量。

1 ARBs的降压机制

高血压的形成机制有两个重要环节,其一是水钠过度潴留使血浆容量增加,血压升高,属于容量负荷型高血压;其二是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAS)激活机制,循环及组织中RAS激活是血压升高及靶器官损伤的重要原因,为肾素激活性高血压。RAS通过一系列酶促反应将血管紧张素Ⅰ(AngⅠ)转化为血管紧张素Ⅱ(AngⅡ),AngⅡ与细胞表面的AngⅡ型受体1(AGTR1)结合,不仅能促进平滑肌细胞的收缩,还能增加醛固酮的释放,导致血压升高。

ARBs作为一线降压药,是目前临床上使用率增长最快的药物之一,具有强效、平稳、不良反应少、适应证广等特征。ARBs主要包括氯沙坦、缬沙坦、坎地沙坦、替米沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦及新药阿齐沙坦酯等。一方面,ARBs类药物能够直接抑制AngⅡ与AGTR1的结合,对RAS的阻滞更为完全,发挥降压疗效更直接;另一方面,ARBs类药物通过负反馈作用使AngⅡ生成增多,相对激活了AngⅡ2

型受体(AGTR2)。肾脏AGTR2的激活可以促进血钠排出,使舒血管物质一氧化氮(NO)、缓激肽等生成增加,发挥扩张血管和降低血压的作用^[13]。

2 CYP2C9基因多态性对ARBs药物的影响

2.1 CYP2C9基因多态性影响ARBs药物的机制

CYP2C9是CYP氧化酶“超家族”中的重要成员,在肝脏表达丰富,其含量约占肝脏CYP总量的20%,仅次于CYP3A4,居第2位^[14]。CYP2C9参与人体内多种药物的代谢,现临床使用的药物约16%通过CYP2C9代谢^[15]。CYP2C9基因位于人体常染色体10q24.2上,总长约为55 kb,有9个外显子,8个内含子,其编码的多肽含490个氨基酸,其编码蛋白质分子量约为55 kD^[16-17]。CYP2C9基因具有遗传多态性,可导致CYP2C9酶活性在不同个体间存在差异,使得药物疗效呈现个体差异,其中CYP2C9*3是研究最多的变异型^[18],在东亚人群中CYP2C9基因主要变异型也为CYP2C9*3^[19],变异频率为2%~3%,CYP2C9*3是在CYP2C9第7号外显子的第1075位置,碱基A突变为碱基C,导致在其编码的蛋白质一级结构的第359位置上,异亮氨酸(Ile)被亮氨酸(Leu)所取代^[20],引起CYP2C9酶活性降低,进而导致药物代谢个体差异^[21-22]。

Yin等^[23]研究显示,ARBs在体内主要由CYP2C9代谢,其中CYP2C9*3的突变使酶活性显著下降,导致药物疗效降低。Yasar等^[24]的研究也发现,CYP2C9*3突变对氯沙坦的代谢有显著影响,使其代谢率显著降低,降压效果减弱,然而CYP2C9*3突变可增加缬沙坦和厄贝沙坦的血药浓度,导致缬沙坦和厄贝沙坦降压效果增强,然而Liu等^[25]的研究未发现CYP2C9*3多态性与缬沙坦的降压作用有关。其他ARBs类药物代谢不受CYP2C9影响或影响较小,如坎地沙坦的代谢受CYP2C9影响较小,替米沙坦在肝脏内不经CYP2C9代谢^[26]。

2.2 CYP2C9基因多态性对氯沙坦药物疗效的影响

氯沙坦钾是全球第一个上市的ARBs。氯沙坦在肝脏中经CYP2C9酶介导代谢,在其7种代谢产物中,仅5-羟代谢产物(E3174)具有药理活性^[27],比母药氯沙坦活性强15~30倍。研究表明,CYP2C9*3突变可降低CYP2C9酶对氯沙坦的催化活性,减少活性代谢产物E3174的产生^[28],进而降低氯沙坦的降压疗效。

Yasar等^[5]研究表明,CYP2C9*1/*3和*3/*3基因型较*1/*1基因型志愿者氯沙坦代谢为E3174的速率显著降低。该团队还发现CYP2C9*1/*3组较CYP2C9*1/*1组患者E-3174的最大血药浓度

显著降低 ($P < 0.05$), $CYP2C9^*3/*3$ 组患者极低, 表明 $CYP2C9^*3$ 等位基因与氯沙坦活性代谢产物 E-3174 的形成减少有关^[24]。Babaolu 等^[29] 发现 $CYP2C9^*1/*3$ 基因型患者尿氯沙坦/E3174 比值 (中位数 2.35) 显著高于 $CYP2C9^*1/*1$ 基因型患者 (中位数 0.71) ($P < 0.05$)。Bae 等^[30] 发现 $CYP2C9^*1/*3$ 较 $CYP2C9^*1/*1$ 受试者口服氯沙坦清除率较低 [$(56.1 \pm 14.4) \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ vs $(82.7 \pm 20.0) \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, $P < 0.001$], C_{max} 较高 [$(459.0 \pm 208.7) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $(417.7 \pm 209.2) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$], E-3174 半衰期更长 [$(5.02 \pm 0.73) \text{ h}$ vs (4.43 ± 0.42)

h , $P < 0.01$]。Cabaleiro 等^[31] 研究表明 $CYP2C9$ 变异与氯沙坦药代动力学相关, $CYP2C9^*3$ 等位基因携带者的氯沙坦半衰期 (3.1 ± 0.4) h 高于野生型志愿者 (2.3 ± 0.1) h ($P < 0.05$)。Pedreros-Rosales 等^[32] 研究表明, $CYP2C9^*3$ 的存在与需要更高剂量的氯沙坦有关。Qayyum 等^[33] 研究发现, $CYP2C9^*1/*1$ 基因型和 *2 或 *3 变异型之间的疗效差异不具有统计学意义。Sinitina 等^[34] 研究表明, $CYP2C9^*3$ 等位基因携带者氯沙坦的降压效果显著降低 ($P < 0.001$, $OR = 8.13$)。

$CYP2C9$ 基因对氯沙坦的影响相关研究详见表 1。

表 1 $CYP2C9$ 基因对氯沙坦的影响
Tab 1 Impact of $CYP2C9$ gene on losartan

作者	年份	研究人群	例数	主要研究结果
Yasar 等 ^[5]	2001 年	瑞典志愿者	25	$CYP2C9^*1/*3$ 和 *3/*3 基因型志愿者较 *1/*1 基因型氯沙坦代谢为 E3174 的速率显著降低
Yasar 等 ^[24]	2002 年	瑞典志愿者	22	$CYP2C9^*1/*3$ 组较 *1/*1 组 E-3174 的最大血药浓度显著降低, *3/*3 基因型患者极低
Babaolu 等 ^[25]	2004 年	土耳其健康志愿者	85	$CYP2C9^*1/*3$ 基因型患者尿氯沙坦/E3174 比值 (中位数 2.35) 显著高于 $CYP2C9^*1/*1$ 基因型
Bae 等 ^[30]	2012 年	韩国志愿者	43	$CYP2C9^*1/*3$ 受试者较 *1/*1 受试者口服氯沙坦清除率较低, C_{max} 较高, E-3174 半衰期更长
Cabaleiro 等 ^[31]	2013 年	西班牙健康志愿者	36	$CYP2C9^*3$ 等位基因携带者的氯沙坦半衰期 (3.1 ± 0.4) h 高于野生型志愿者
Pedreros-Rosales 等 ^[32]	2019 年	智利高血压患者和健康志愿者	232	$CYP2C9^*3$ 的存在与需要更高剂量的氯沙坦有关
Qayyum 等 ^[33]	2022 年	巴基斯坦高血压患者	100	超过 63% 的 $CYP2C9^*1/*1$ 基因型患者对抗高血压治疗无反应, 超过 46% 的 $CYP2C9^*2$ 或 *3 变异型患者对治疗没有反应, 但两组之间差异没有统计学意义
Sinitina 等 ^[34]	2023 年	俄罗斯高血压患者	81	$CYP2C9^*3$ 等位基因携带者氯沙坦的降压效果显著降低

2.3 $CYP2C9$ 基因多态性对厄贝沙坦药物疗效的影响

厄贝沙坦属于 Ang II 受体拮抗剂, 通过对 AGTR1 产生不可逆的或非竞争性的抑制, 从而实现减轻 Ang II 的缩血管和促增生作用。厄贝沙坦属非前体药, 不需要肝脏酶的转换而本身具有药理活性, 其经肝脏 $CYP2C9$ 酶代谢清除^[30, 35], Cho 等^[36] 研究表明 $CYP2C9$ 基因多态性是厄贝沙坦药代动力学显著改变的主要原因。因此, $CYP2C9^*3$ 变异引起的 $CYP2C9$ 酶活性丧失, 使厄贝沙坦的药物代谢减慢, 血药浓度增加, 降压疗效增强。

Hallberg 等^[37] 一项纳入 102 例原发性高血压合并左心室肥厚患者的临床双盲对照 SILVHIA 研究的结果表明, $CYP2C9^*3$ 基因变异与厄贝沙坦的抗高血压疗效相关。Hong 等^[38] 研究结果表明 $CYP2C9^*3$ 携带者较 $CYP2C9^*1/*1$ 携带者血浆厄贝沙坦浓度较高。

Chen 等^[39] 研究表明 $CYP2C9^*1/*3$ 基因型原发性高血压受试者的血浆厄贝沙坦浓度显著高于 $CYP2C9^*1/*1$ 基因型受试者 ($\beta \pm SE = 81 \pm 36$), 且在 6 h 时舒张压反应更强 ($\beta \pm SE = 5.6 \pm 2.5 \text{ mmHg}$), $CYP2C9^*3$ 基因变异显著改变了中国高血压患者在厄贝沙坦治疗后 6 h 的血药浓度和急性舒张反应。Choi 等^[40] 研究表明 $CYP2C9$ 基因多态性对厄贝沙坦药代动力学有显著影响, $CYP2C9^*3$ 等位基因携带者体内厄贝沙坦的代谢速率下降。董辉等^[41] 研究表明与 $CYP2C9^*1/*1$ 组相比, $CYP2C9^*1/*3 + CYP2C9^*3/*3$ 组的收缩压降低值和舒张压降低值更大 [分别为 (34.9 ± 15.5) vs $(29.3 \pm 10.2) \text{ mmHg}$ 和 (22.8 ± 9.0) vs $(19.6 \pm 8.5) \text{ mmHg}$]。

$CYP2C9$ 基因对厄贝沙坦的影响相关研究详见表 2。

3 小结

现有的研究表明, 降压药物反应的个体差异

表 2 CYP2C9 基因对厄贝沙坦的影响
Tab 2 Impact of the CYP2C9 gene on irbesartan

作者	年份	研究人群	例数	主要研究结果
Hallberg 等 ^[37]	2002	瑞典原发性高血压合并左心室肥厚患者	102	CYP2C9*3 基因变异与厄贝沙坦的抗高血压疗效相关
Hong 等 ^[38]	2005	中国安徽高血压患者	1087	CYP2C9*3 携带者较 CYP2C9*1/*1 携带者血浆厄贝沙坦浓度较高
Chen 等 ^[39]	2006	中国高血压患者	196	CYP2C9*3 基因变异显著改变了中国高血压患者在厄贝沙坦治疗后 6 h 的血药浓度和急性舒张反应
Choi 等 ^[40]	2012	韩国健康志愿者	28	CYP2C9*3 携带者对厄贝沙坦代谢率下降
董辉等 ^[41]	2020	中国原发性高血压患者	598	与 *1/*1 组相比, *1/*3 + *3/*3 组的收缩压降低值和舒张压降低值更大

与遗传因素相关。降压药物基因变异的检测有助于高血压患者选择合适的降压药物, 提高药物疗效并降低不良心血管事件的风险。本文综述了近年来关于 CYP2C9 基因多态性对 ARBs 药效学影响的研究进展。CYP2C9 是人体内重要的药物代谢酶之一, 其基因多态性可导致不同个体之间药物代谢速率的差异, 从而影响 ARBs 的疗效。不同 CYP2C9 基因型的患者在使用 ARBs 时, 其药物代谢和药效存在显著差异, 这可能导致治疗反应的不一致和不良反应的增加。在临床工作中, 对于携带 CYP2C9*3 等位基因的患者, 对底物的代谢作用减弱可能导致血药浓度增加, 影响药物的疗效, 应特别注意。CYP2C9*3/*3 基因型的高血压患者对沙坦类药物的代谢影响较大, 建议换用其他适用的降压药物^[42]。从诊断定向治疗向基于药物基因多态性的个体化治疗转变的临床药物治疗模式, 可以弥补目前临床药物治疗有效率不足的情况, 为临床高血压患者个体化给药开辟新的途径, 从而使高血压患者能用上有效、安全的药物, 提高患者的依从性, 同时降低患者治疗费用。

参考文献

- Wang ZW, Chen Z, Zhang LF, et al. Status of hypertension in China: results from the China hypertension survey, 2012—2015 [J]. *Circulation*, 2018, 137 (22): 2344-2356.
- 马丽媛, 王增武, 樊静, 等.《中国心血管健康与疾病报告 2021》关于中国高血压流行和防治现状 [J]. *中国全科医学*, 2022, 25 (30): 3715-3720.
- 王申, 张舜华, 薛薇, 等. 沙坦类药物代谢酶 CYP2C9 的基因遗传多态性在高血压患者中的分布特征 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2021, 13 (6): 712-715.
- Rysz J, Franczyk B, Rysz-Górzynska M, et al. Pharmacogenomics of hypertension treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (13): 4709.
- Yasar Ü, Tybring G, Hidestrand M, et al. Role of CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29 (7): 1051-1056.
- Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH) [J]. *J Hypertens*, 2018, 39 (33): 3021-3104.
- Duarte JD, Cavallari LH. Pharmacogenetics to guide cardiovascular drug therapy [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18 (9): 649-665.
- Yuan LJ, Qian JC, Li XL, et al. Enzymatic activity on valsartan of 38 CYP2C9 variants from the Chinese population [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 353: 109799.
- Hirvensalo P, Tornio A, Launiainen T, et al. UGT1A3 and sex are major determinants of telmisartan pharmacokinetics—a comprehensive pharmacogenomic study [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 108 (4): 885-895.
- Jung EH, Cho CK, Kang P, et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of candesartan related to CYP2C9 genetic polymorphism in adult and pediatric patients [J]. *Arch Pharma Res*, 2021, 44 (12): 1109-1119.
- Soria-Chacartegui P, Zubiaur P, Ochoa D, et al. Impact of sex and genetic variation in relevant pharmacogenes on the pharmacokinetics and safety of valsartan, olmesartan and hydrochlorothiazide [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (20): 15265.
- Fan N, Gongmin Z, Wenming C, et al. Comparison of pharmacokinetics and bioavailability of fixed-dose combination tablet and monotherapy combination of allisartan isoproxil and indapamide sustained-release in healthy Chinese volunteers [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2024, 13 (2): 190-196.
- 孙晓方, 肖新华. ARB 降压机制及降压外的作用 [J]. *药品评价*, 2009, 6 (4): 129-132.
- 刘永敏, 夏玉凤. CYP450 底物, 抑制剂, 诱导剂及种属特异性的研究进展 [J]. *药物资讯*, 2023, 12 (2): 70-80.
- 石鲁月, 罗一夫, 张治然, 等. 基于基因多态性致药物代谢差异的临床个体化用药剂量调整 [J]. *精准医学杂志*, 2020, 35 (6): 548-558.
- Sangkuhl K, Claudio-Campos K, Cavallari LH, et al. Pharmvar genefocus: CYP2C9 [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110 (3): 662-676.

- [17] Zhou YT, Nevosadová L, Eliasson E, et al. Global distribution of functionally important CYP2C9 alleles and their inferred metabolic consequences [J]. *Hum Genomics*, 2023, 17 (1): 15.
- [18] 王瑞, 赵连友, 牛晓琳. 高血压药物基因组学的研究进展 [J]. *中华高血压杂志*, 2021, 29 (9): 815-819.
- [19] 何婷, 杨岚, 徐健. CYP2C9 基因多态性与华法林用药剂量的相关性研究进展 [J]. *大连医科大学学报*, 2022, 44 (6): 550-555.
- [20] 魏晓纯, 何震宇. 两个重要的高血压个体化用药相关基因多态位点及检测方法的研究进展 [J]. *生药医学*, 2024, 14 (2): 298-305.
- [21] 杨天伦, 陈美芳, 谢启应. 沙坦类药物代谢酶 CYP2C9 和受体 AT1 基因的遗传多态性在高血压患者中的分布特征 [J]. *中南药学*, 2007, 5 (1): 6-9.
- [22] 万淑君, 张梦莹, 陈其雷, 等. 高血压药物基因多态性分析对安徽皖南地区高血压患者个体化治疗的参考价值 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2024, 29 (1): 68-75.
- [23] Yin T, Maekawa K, Kamide K, et al. Genetic variations of CYP2C9 in 724 Japanese individuals and their impact on the antihypertensive effects of losartan [J]. *Hypertens Res*, 2008, 31 (8): 1549-1557.
- [24] Yasar Ü, Forslund-Bergengren C, Tybring G, et al. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 71: 89-98.
- [25] Liu Y, Kong X, Jiang Y, et al. Association of AGTR1 A1166C and CYP2C9*3 gene polymorphisms with the antihypertensive effect of valsartan [J]. *Int J Hypertens*, 2022, 2022: 7677252.
- [26] 孙忠实, 朱珠. AT 拮抗剂的新进展 [J]. *世界药品信息*, 2000, 1 (1): 58-62.
- [27] Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, et al. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1995, 58 (6): 641-649.
- [28] Xiao ZL, Yang M, Chen XB, et al. Personalized antihypertensive treatment guided by pharmacogenomics in China [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2022, 12 (5): 635-645.
- [29] Babaoglu MO, Yasar U, Sandberg M, et al. CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2004, 60: 337-342.
- [30] Bae JW, Choi CI, Lee HI, et al. Effects of CYP2C9*1/*3 and *1/*13 on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite E-3174 [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2012, 50 (9): 683-689.
- [31] Cabaleiro T, Román M, Ochoa D, et al. Evaluation of the relationship between sex, polymorphisms in CYP2C8 and CYP2C9, and pharmacokinetics of angiotensin receptor blockers [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41 (1): 224-229.
- [32] Pedreros-Rosales C. Association between cytochrome P4502C9 polymorphisms and losartan dosing in hypertensive patients [J]. *Rev Med Chil*, 2019, 147 (12): 1527-1534.
- [33] Qayyum A, Ashraf W, Javaid S, et al. Association between cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms and blood pressure in response to losartan [J]. *J Pers Med*, 2022, 2 (1): 19-26.
- [34] Sinitina II, Boyarko AV, Temirbulatov II, et al. CYP2C9 gene polymorphisms influence on antihypertensive effectiveness and hypouricemic effect of losartan among patients with arterial hypertension: an observational study [J]. *Drug Metab Pers Ther*, 2023, 38 (2): 163-168.
- [35] 张瑾, 陈绍行. 血管紧张素 II 受体拮抗剂的药理学与临床应用 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2004, 23 (2): 111-115.
- [36] Cho CK, Kang P, Jang CG, et al. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling to predict the pharmacokinetics of irbesartan in different CYP2C9 genotypes [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2023, 46 (11): 939-953.
- [37] Hallberg P, Karlsson J, Kurland L, et al. The CYP2C9 genotype predicts the blood pressure response to irbesartan: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA) trial [J]. *J Hypertens*, 2002, 20 (10): 2089-2093.
- [38] Hong XM, Zhang SC, Mao GY, et al. CYP2C9*3 allelic variant is associated with metabolism of irbesartan in Chinese population [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2005, 61: 627-634.
- [39] Chen G, Jiang S, Mao G, et al. CYP2C9 Ile359Leu polymorphism, plasma irbesartan concentration and acute blood pressure reductions in response to irbesartan treatment in Chinese hypertensive patients [J]. *Method Find Exp Clin Pharmacol*, 2006, 28 (1): 19-24.
- [40] Choi CI, Kim MJ, Chung EK, et al. CYP2C9*3 and*13 alleles significantly affect the pharmacokinetics of irbesartan in healthy Korean subjects [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2012, 68: 149-154.
- [41] 董辉, 王凤珍, 拾坤, 等. 细胞色素 P450 酶 2C9*3 和血管紧张素 II 1 型受体 (1166A > C) 基因多态性与原发性高血压的发生及厄贝沙坦降压疗效的关系 [J]. *中华高血压杂志*, 2020, 28 (6): 532-538.
- [42] Jarrar YB, Lee SJ. Molecular functionality of CYP2C9 polymorphisms and their influence on drug therapy [J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 2014, 29 (4): 211-220.

(收稿日期: 2024-07-11; 修回日期: 2024-11-04)

替罗非班治疗急性缺血性脑卒中的快速卫生技术评估

李燕飞¹, 何鹤飞¹, 胡林¹, 胡长平^{2*} (1. 中南大学湘雅医学院附属长沙医院, 长沙市第一医院药剂科, 长沙 410005; 2. 中南大学湘雅药学院药理学系, 长沙 410013)

摘要: **目的** 对替罗非班治疗急性缺血性脑卒中 (AIS) 的获益与风险进行评价, 为其临床应用与各层次决策提供证据参考。**方法** 系统检索 PubMed、中国知网等数据库及卫生技术评估相关网站, 由 2 名评价者根据纳入与排除标准独立筛选文献并提取数据。对纳入文献进行质量评价后, 运用快速卫生技术评估方法, 对替罗非班的有效性、安全性、经济性结果进行分类评价和描述性分析。**结果** 共纳入 24 篇 SR/Meta 分析, 1 篇药物经济学研究。在 AIS 及进展性卒中 (PIS) 患者中, 按不同的治疗方式 (常规治疗、静脉溶栓治疗、血管内治疗等) 分类分析。有效性方面: 在 AIS 及 PIS 患者中, 相比于对照组, 联合替罗非班治疗可降低患者 NIHSS 评分 ($P < 0.05$)、提高 3 个月预后良好率 ($P < 0.05$), 血管再通率、再闭塞率等在不同治疗方式中的结论不一致。安全性方面: 与对照组相比, 联合替罗非班治疗均不增加死亡率、颅内出血发生率、症状性颅内出血发生率 ($P > 0.05$); 在接受血管内治疗的 AIS 患者中, 联合替罗非班治疗甚至可降低死亡率 ($P < 0.05$), 但有研究显示致命性颅内出血发生风险增加 ($P < 0.05$), 可能与动脉内给药有关。经济性方面: 在中国, 与单用机械取栓相比, 联合替罗非班治疗 AIS 具有成本效果优势。可及性方面: 替罗非班氯化钠注射液有多个厂家的品种进入集中带量采购, 药价水平较低, 具有良好的可负担性和较好的可获得性。**结论** 替罗非班应用于 AIS 患者的有效性较好, 但在接受血管内治疗的 AIS 患者中, 使用替罗非班可能增加致命性颅内出血发生风险。相比于单用机械取栓, 联合替罗非班治疗 AIS 具有经济性。目前, 替罗非班在国内具有较好的可及性。

关键词: 替罗非班; 急性缺血性脑卒中; 进展性卒中; 快速卫生技术评估

中图分类号: R979.1, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0803-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.034

Rapid health assessment of tirofiban for acute ischemic stroke

LI Yan-fei¹, HE Ge-fei¹, HU Lin¹, HU Chang-ping^{2*} (1. Department of Pharmacy, The Affiliated Changsha Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University; The First Hospital of Changsha, Changsha 410005; 2. Department of Pharmacology, Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013)

Abstract: Objective To evaluate the benefit and risk of tirofiban for acute ischemic stroke (AIS), and to provide evidence for its clinical decision-making and application. **Methods** PubMed, CNKI and the other related databases, as well as health technology evaluation websites, were searched. Two reviewers independently conducted literature screening and data collection according to the inclusion and exclusion criteria. After the quality evaluation of included literatures, based on rapid health assessment, the collected data were evaluated and comprehensively analyzed from the safety, efficacy and economy of tirofiban. **Results** Totally 24 systematic reviews/meta-analysis and one pharmacoeconomic study were included.

基金项目: 中国医药教育协会 2023 年“临床用药卫生技术评估”专项课题资助项目 (No.2023WSJSPGZXKT-21); 湖南省卫生健康委科研计划课题资助项目 (No.D202313016976); 湖南省卫生健康委卫生科研课题资助项目 (No.W20243243)。

作者简介: 李燕飞, 女, 主管药师, 主要从事临床药学、循证药学方面的研究, email: 919454256@qq.com * **通信作者:** 胡长平, 男, 博士研究生导师, 主要从事心血管药理学方面的研究, email: huchangping@csu.edu.cn

In patients with AIS or progressive ischemic stroke (PIS), we analyzed different treatment methods, such as conventional treatment, intravenous thrombolysis or endovascular treatment. For efficacy outcomes, in patients with AIS or PIS treated with different methods, tirofiban significantly improved the NIHSS scores of patients or good functional outcome rate at 3 months ($P < 0.05$) as compared with those of the control group. In terms of vascular recanalization and reocclusion rate, the results of various studies showed inconsistency. For safety outcomes, compared with the control group, tirofiban did not increase the risk of mortality, the rate of intracranial hemorrhage or symptomatic intracranial hemorrhage ($P > 0.05$). Moreover, tirofiban significantly reduced the mortality in AIS patients receiving endovascular treatment ($P < 0.05$). However, some studies showed an increased risk of fatal intracranial hemorrhage in the tirofiban group, which might be related to the intra-arterial administration. As for economy, tirofiban combined with mechanical thrombectomy had better cost-effectiveness compared with mechanical thrombectomy alone. In terms of accessibility, multiple varieties of tirofiban sodium chloride injection by different manufacturers became available due to centralized procurement with volume. Tirofiban had an advantage in price, affordability and availability. **Conclusion** Tirofiban used in AIS patients is effective, but it may increase the risk of fatal intracranial hemorrhage in patients receiving endovascular treatment. Compared with mechanical thrombectomy alone, the combination of tirofiban in the treatment of AIS is cost-effective. owing to its fair accessibility in China.

Key words: tirofiban; acute ischemic stroke; progressive ischemic stroke; rapid health assessment

急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 是最常见的卒中类型, 具有高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率的特点, 疾病负担沉重^[1-3]。AIS 治疗方法中, 静脉溶栓治疗 (intravenous thrombolysis, IVT)、血管内治疗 (endovascular treatment, EVT) 因其较严格的时间窗而应用受限, 抗血小板治疗为主要治疗方法^[4]。最常用的口服抗血小板药如阿司匹林、氯吡格雷具有起效相对缓慢、作用机制未完全覆盖血小板聚集的信号通路、对胃肠道刺激性大等缺点, 甚至部分患者存在抵抗性, 导致疗效不佳^[5]。血小板糖蛋白 (glycoprotein, GP) II b/III a 受体是血小板聚集、血栓形成的最终共同通路^[6]。替罗非班通过阻止纤维蛋白原与血小板 GP II b/III a 受体结合, 可特异性且快速地抑制血小板聚集, 已被广泛用于急性冠脉综合征及经皮冠状动脉介入治疗^[7-8], 但在 AIS 治疗中的应用仍属于超说明书用药。近年来, 大量研究结果证实, 替罗非班可单药、与 IVT 或 EVT 联合用于 AIS 患者的治疗中^[9], 但在有效性和安全性方面的结果并不统一。而有关替罗非班应用于 AIS 患者的证据也在持续更新。因此需要基于当前证据, 全面评估替罗非班在 AIS 患者中的应用价值。

快速卫生技术评估 (health technology assessment, HTA) 通过简化 HTA 和系统评价 (systematic review, SR) 的方法和流程, 可根据当前最佳证据相对快速地进行药品评价, 有助于相关决策者在短时间内快速、有效地进行药物遴选^[10-11]。

本研究在中国医药教育协会的支持下, 进行替罗非班治疗 AIS 中的快速 HTA, 从有效性、安全性、经济性、可及性等方面进行初步评估, 旨在为替罗非班在 AIS 治疗中的临床合理使用和相关决策提供循证依据。

1 资料与方法

1.1 资料

纳入标准: 公开发表的替罗非班或联合 IVT/EVT 治疗 AIS 患者的中、英文文献, 包括 HTA 报告、SR/Meta 分析、经济学研究。排除标准: ① 不能获得全文的研究; ② 重复发表的研究; ③ 非中、英文文献; ④ 摘要、会议论文和编辑通信等; ⑤ 干预措施混杂, 将所有血小板 GP II b/III a 受体抑制药或抗血小板药物的研究进行合并; ⑥ 药物治疗适应证不符; ⑦ 非核心期刊文献。

1.2 方法

1.2.1 检索策略 系统检索中国知网、万方数据库、SinoMed、PubMed、Embase、The Cochrane Library 数据库, 以“替罗非班 (tirofiban)”和“卒中 (stroke)”作为检索词进行全文检索或主题检索, 并增加“系统评价 (systematic review)”“荟萃分析 (meta-analysis)”或药物经济学 (pharmacoeconomic evaluation, PE) 相关检索词 (成本、费用、经济、cost、economic) 等关键词加以限制。以“tirofiban”为关键词在英国约克大学评价与传播中心 (<http://www.crd.york.ac.uk/CRDWeb>)、加拿大药物卫生技术局 (www.cadth.ca)、卫生技术评估国际 (<https://www.htai.org>)、国家卫生技术

评估协会 (<http://www.istahc.org>) 在线检索 HTA 报告。检索时间为各数据库自建库至 2023 年 10 月 30 日。补充纳入药品说明书、药品价格等信息。

1.2.2 观察指标 主要有效性指标包括美国国立卫生研究院卒中量表 (National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS) 评分、3 个月改良 Rankin 量表 (Modified Rankin Scale, mRs) 评分、血管再通率、血管再闭塞率等; 主要安全性指标包括死亡率、颅内出血 (intracranial hemorrhage, ICH) 发生率、症状性颅内出血 (symptomatic intracranial hemorrhage, sICH) 发生率、致命性颅内出血 (fatal intracranial hemorrhage, fICH) 发生率等; 经济学指标包括治疗成本、增量成本、质量调整生命年 (quality-adjusted life-years, QALYs)、增量成本-效果比 (incremental cost effectiveness ratio, ICER) 等; 可及性指标包括药品价格水平、可负担性和可获得性。

1.2.3 文献筛选与数据提取 将检索到的文献排除重复文献后, 由 2 名研究者按照纳入、排除标准, 独立阅读文献题目与摘要进行初筛, 对初筛文献全文阅读进行复筛, 并进行交叉核对。采用预先设计的 Excel 表格提取数据, 由另一名研究者对数据进行复核。提取内容包括第一作者、发表时间、患者人群、纳入原始研究的个数及样本量、干预和对照措施、结局指标及其效应量、经济学模型、研究视角、研究时限等信息。以上步骤, 如遇分歧通过讨论或咨询第 3 位评价者解决。

1.2.4 质量评价 由 2 名研究者独立对纳入的研究进行质量评价。对于 SR/Meta 分析, 采用 AMSTAR 2 (a measurement tool to assess systematic reviews 2) 量表^[12] 从 16 个方面进行评价。对于经济学研究, 采用 CHEERS (Consolidated Health Economic Evaluation Reporting Standards) 量表进行质量评价^[13]。

1.2.5 分析方法 根据纳入文献的研究类型、治疗人群、治疗方式等维度, 对结局指标进行分组, 综合考量文献质量、研究年限、样本量等因素, 对有统计学检验结果的对比进行分类评价和描述性分析。

2 结果

2.1 文献检索结果

初检获得文献 508 篇, 按照纳入、排除标准进行逐层筛选后, 最终纳入 25 篇文献^[14-38], 其中 SR/Meta 分析 24 篇^[14-37]、药物经济学研究 1 篇^[38]。文献检索流程见图 1。

2.2 纳入研究的基本特征与质量评价

纳入 24 篇 SR/Meta 分析^[14-37], 发表时间集中在 2019—2023 年, 包括中文文献 7 篇^[15-17, 22, 27, 36-37], 英文文献 17 篇^[14, 18-21, 23-26, 28-35], 纳入的原始研究类型以观察性研究为主。纳入研究的基本特征和

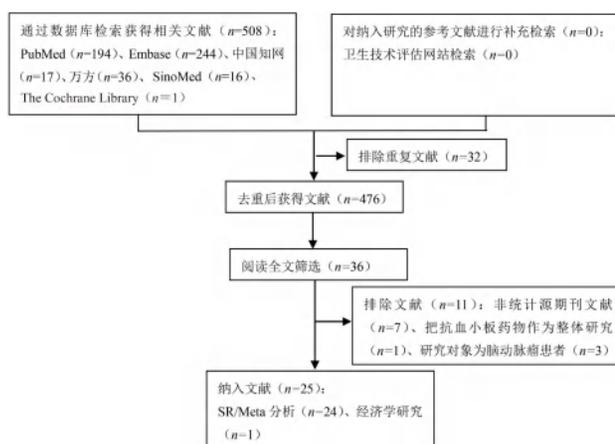


图 1 文献检索流程图

Fig 1 Literature screening progress

AMSTAR 2 质量评价结果见表 1, 可见纳入研究的文献方法学质量以低为主, 大部分研究在实施前未报告研究方法。

纳入的 1 篇经济学研究来自中国^[38], 研究对象为行机械取栓的 AIS 患者, 该项研究参考我国临床研究结果, 建立 Markov 模型, 模拟计算单用机械取栓或联合替罗非班治疗 AIS 的 QALYs 及治疗成本, 对机械取栓联合替罗非班用于 AIS 的成本-效果进行分析。该研究 CHEERS 评分 22 分, 质量高。

2.3 有效性评价

在 AIS 及进展性卒中 (progressive ischemic stroke, PIS) 患者中, 按不同的治疗方式 (常规治疗、静脉溶栓治疗、血管内治疗等) 分类分析。对纳入研究的有效性指标进行汇总整理 (见表 2)。

2.3.1 AIS 患者 基于 RCTs 的 SR 结果提示, 与对照组相比, 替罗非班可增加 mRs 为 0 分的人数, 降低 7 d 后 NIHSS 评分, 但 24 h NIHSS 评分的差异无统计学意义^[14]。在纳入 RCTs 和观察性研究之后, 1 项研究显示替罗非班可明显降低 2~7 d 后的 NIHSS 评分^[17]; 2 项研究提示替罗非班可提高患者的预后良好率 (3 个月时 mRs 评分 ≤ 2 分患者所占比率)^[16-17]; 但替罗非班不能改善血管再通率^[16-18], 也不能降低血管再闭塞的发生率^[16]。与阿司匹林注射剂相比, 替罗非班未降低远期死亡率或致残率^[21]。

2.3.2 接受 IVT 的 AIS 患者 在接受 IVT (未桥接 EVT) 的 AIS 患者中, 基于 RCTs 和观察性研究的 SR 结果提示, 与单纯 IVT 相比, 替罗非班联合 IVT 可提高患者的预后良好率^[22-24] 和预后极佳率 (3 个月时 mRs 评分 ≤ 1 分患者所占比率)^[24]。IVT 后早期联合替罗非班及 IVT 后 24 h 内发生神经功能恶化后联合替罗非班均可提高患者预后良好率^[22]。

表 1 纳入 SR/Meta 分析的基本特征

Tab 1 Basic characteristics of included systematic reviews/meta-analyses

文献	患者人群	纳入文献数量/性质	患者例数	干预组	对照组	主要有效性指标	主要安全性指标	AMSTAR 2 评价结果
Al-Salihi 2023 ^[14]	AIS 患者	7 篇 (RCTs)	2088	替罗非班	安慰剂/其他药物	a、c	h、i、j	低
刘惠莲 2023 ^[15]	AIS 患者	5 篇 (RCTs)	1095	替罗非班+其他治疗	其他治疗	b	h、i、l	极低
刘惠莲 2022 ^[16]	AIS 患者	16 篇 (RCTs 5 篇, 前瞻性队列研究 11 篇)	4700	替罗非班+其他治疗	其他治疗	b、f	h、i、k、l	极低
张利军 2020 ^[17]	AIS 患者	12 篇 (RCTs 2 篇, 队列研究 10 篇)	2137	替罗非班	安慰剂或其他药物	a、b、e	h、j、l	极低
Gong 2020 ^[18]	AIS 患者	17 篇 (RCTs 2 篇, 队列研究 15 篇)	2914	替罗非班	安慰剂/其他药物	b、c、e	h、j、k	低
Zhou 2020 ^[19]	AIS 患者	6 篇 (RCTs 3 篇, 回顾性研究 3 篇)	803	替罗非班 ±IVT (不包括 EVT)	安慰剂/其他药物 ±IVT (不包括 EVT)	/	h、i、j	极低
Zhu 2020 ^[20]	AIS 患者	13 篇 (RCTs 2 篇, 队列研究 11 篇)	/	替罗非班	安慰剂或其他药物	/	h、i、j	低
Ciccone 2014 ^[21]	AIS 患者	1 篇 (RCTs)	150	替罗非班	阿司匹林 (注射剂)	g	h、j、n	高
石叶军 2022 ^[22]	AIS 患者	9 篇 (RCTs 2 篇, 回顾性病例对照研究 7 篇)	1012	替罗非班+ IVT (不包括 EVT)	IVT	b	h、i、l、n	低
Shi 2023 ^[23]	AIS 患者	7 篇 (RCTs 1 篇, 队列研究 6 篇)	1036	替罗非班+ IVT 或桥接治疗	IVT 或桥接治疗	b	h、i、j	低
Liu 2022 ^[24]	AIS 患者	10 篇 (RCTs 1 篇, 队列研究 9 篇)	1568	替罗非班+ IVT 或桥接治疗	IVT 或桥接治疗	b、c、e	h、i、j	高
Li 2022 ^[25]	AIS 患者	7 篇 (RCTs 1 篇, 观察性研究 6 篇)	1176	替罗非班+ IVT 桥接 MT	IVT 桥接 MT	b、e、f	h、i、j	低
Liu 2023 ^[26]	AIS 患者	22 篇 (RCTs 1 篇, 队列研究 21 篇)	6062	替罗非班+ MT	MT	b、c、e、f	h、j	低
黄昌恒 2019 ^[27]	AIS 患者	6 篇 (RCTs + 单中心回顾性研究)	642	替罗非班+ MT	MT	b、e	i	极低
Liu 2022 ^[28]	AIS 患者	11 篇 (RCTs 1 篇, 队列研究 10 篇)	2832	替罗非班+ IVT 和 / 或 MT	IVT 和 / 或 MT	a、b	k	低
Liu 2023 ^[29]	AIS 患者	15 篇 (RCTs 1 篇, 队列研究 14 篇)	4608	替罗非班+ EVT	EVT	b、c、e	h、j	低
Zhang 2022 ^[30]	AIS 患者	12 篇 (RCTs 1 篇, 队列研究 11 篇)	3268	替罗非班+ EVT	EVT	b、e	h、i、j	低
Zhao 2021 ^[31]	AIS 患者	13 篇 (RCTs 1 篇, 观察性研究 12 篇)	2584	替罗非班+ EVT	EVT	b、e	h、j	低
Sun 2021 ^[32]	AIS 患者	11 篇 (RCTs 1 篇, 观察性研究 10 篇)	2387	替罗非班+ EVT	EVT	b、e	h、j	低
Tang 2021 ^[33]	AIS 患者	14 篇 (RCTs 1 篇, 观察性研究 13 篇)	3251	替罗非班+ EVT	EVT	b、e	h、i、j	低
Fu 2020 ^[34]	AIS 患者	11 篇 (队列研究)	2028	替罗非班+ EVT	EVT	b、e	h、j	低
Zhang 2020 ^[35]	AIS 患者	12 篇 (队列研究)	2533	替罗非班+ EVT	EVT	b、c、e、f	h、i、j、k、m	低
马嘉琦 2023 ^[36]	PIS 患者	15 篇 (RCTs 9 篇, 队列研究 6 篇)	1302	替罗非班+ 双抗	双抗	a、b	i、n	极低
秦祉祯 2022 ^[37]	PIS 患者	15 篇 (RCTs)	1415	替罗非班	安慰剂或其他药物	a、d	/	低

注 (Note): a. NIHSS 评分 (NIHSS score); b. 3 个月 mRs 评分 ≤ 2 分 (mRs ≤ 2 at 3 months); c. 3 个月 mRs 评分 ≤ 1 分 (mRs ≤ 1 at 3 months); d. 3 个月 ADL 评分 (ADL score at 3 months); e. 血管再通率 (recanalization rate); f. 血管再闭塞率 (reocclusion rate); g. 远期死亡率或致残率 (long-term death or dependency); h. 死亡率 (mortality); i. ICH 发生率 (rate of intracranial hemorrhage); j. sICH 发生率 (rate of symptomatic intracranial hemorrhage); k. fICH 发生率 (rate of fatal intracranial hemorrhage); l. ICH 转化率 (intracranial hemorrhagic transformation); m. 2 型实质血肿 (type 2 parenchymatous hematoma); n. 其他部位出血发生率 (incidence of bleeding in other systems); RCTs. 随机对照试验 (randomized controlled trials); MT. 机械取栓 (mechanical thrombectomy); ADL. 日常生活活动能力 (daily activities)。

表 2 替罗非班的有效性总结
Tab 2 Effectiveness of tirofiban

患者人群	干预组	对照组	有效性指标	效应量
AIS 患者	替罗非班	安慰剂 / 其他药物	a	用药后 24 h: NS ^[14] 用药后 7 d: MD = -0.90, 95%CI (-1.63, -0.17) ^[14] mRs 为 0 分患者比率: RR = 1.39, 95%CI (1.15, 1.69) ^[14]
			c	
	替罗非班+其他治疗	其他治疗	b	OR = 1.37, 95%CI (1.02, 1.85) ^[15]
			b	OR = 1.16, 95%CI (1.02, 1.32) ^[16]
	替罗非班	安慰剂 / 其他药物	e、f	NS ^[16]
			a	MD = -1.53, 95%CI (-2.98, -0.09) ^[17]
			b	RR = 1.17, 95%CI (1.05, 1.30) ^[17]
	替罗非班	安慰剂 / 其他药物	e	NS ^[17]
			b、c、e	NS ^[18]
	替罗非班	阿司匹林 (注射剂)	g	NS ^[21]
接受 IVT 的 AIS 患者	替罗非班+ IVT (不含 EVT)	IVT (不含 EVT)	b	RD = 0.223, 95%CI (0.150, 0.295) ^[22]
			b	仅 IVT: OR = 1.98, 95%CI (1.30, 3.02) ^[23] IVT 后桥接 EVT: NS ^[23]
	替罗非班+ IVT 或桥接治疗	IVT 或桥接治疗	b	仅 IVT: OR = 2.36, 95%CI (1.58, 3.52) ^[24] IVT 后桥接 EVT: NS ^[24]
			c	仅 IVT: OR = 2.68, 95%CI (1.58, 4.55) ^[24]
	替罗非班+ IVT 桥接 MT	IVT 桥接 MT	e	NS ^[24]
			b、e	NS ^[25]
			f	OR = 0.36, 95%CI (0.14, 0.91) ^[25]
	替罗非班+ MT	MT	b	OR = 1.24, 95%CI (1.11, 1.39) ^[26]
			c	NS ^[26]
	替罗非班+ MT	MT	e	OR = 1.38, 95%CI (1.17, 1.62) ^[26]
f			OR = 0.40, 95%CI (0.19, 0.82) ^[26]	
替罗非班+ IVT 和 / 或 MT	IVT 和 / 或 MT	b、e	NS ^[27]	
		a、b	NS ^[28]	
替罗非班+ EVT	EVT	b	前循环梗死: OR = 1.24, 95%CI (1.06, 1.45) ^[29] 后循环梗死: NS ^[29]	
		c	前、后循环梗死均为 NS ^[29]	
替罗非班+ EVT	EVT	e	前循环梗死: NS ^[29]	
		b	后循环梗死: OR = 1.94, 95%CI (1.43, 2.65) ^[29]	
替罗非班+ EVT	EVT	b	OR = 1.36, 95%CI (1.09, 1.70) ^[30]	
		e	OR = 1.50, 95%CI (1.08, 2.09) ^[30]	
替罗非班+ EVT	EVT	b	OR = 1.26, 95%CI (1.03, 1.54) ^[31]	
		e	NS ^[31]	
替罗非班+ EVT	EVT	b	RR = 1.13, 95%CI (1.02, 1.25) ^[32]	
		e	NS ^[32]	
替罗非班+ EVT	EVT	b	OR = 1.27, 95%CI (1.09, 1.48) ^[33]	
		e	OR = 1.66, 95%CI (1.16, 2.39) ^[33]	
替罗非班+ EVT	EVT	b	NS ^[34]	
		e	术前予替罗非班: OR = 2.30, 95%CI (1.15, 4.60) ^[34] NS ^[34]	
替罗非班+ EVT	EVT	b	术前予替罗非班: OR = 3.89, 95%CI (1.70, 8.93) ^[34]	
		c、e、f	OR = 1.29, 95%CI (1.05, 1.58) ^[35] NS ^[35]	
PIS 患者	替罗非班+双抗	双抗	a	MD = -2.47, 95%CI (-2.99, -1.94) ^[36]
			b	OR = 1.96, 95%CI (1.03, 3.71) ^[36]
	替罗非班	安慰剂或其他药物	a	卒中进展期: NS ^[37] 用药后 3 d: MD = -2.93, 95%CI (-3.98, -1.87) ^[37] 用药后 7 d: MD = -1.96, 95%CI (-2.44, -1.48) ^[37]
			d	MD = 6.87, 95%CI (5.02, 8.72) ^[37]

注 (Note): a. NIHSS 评分 (NIHSS score); b. 3 个月 mRs 评分 ≤ 2 分 (mRs ≤ 2 at 3 months); c. 3 个月 mRs 评分 ≤ 1 分 (mRs ≤ 1 at 3 months); d. 3 个月 ADL 评分 (ADL score at 3 months); e. 血管再通率 (recanalization rate); f. 血管再闭塞率 (reocclusion rate); g. 远期死亡率或致残率 (long-term death or dependency); OR. 比值比 (odds ratio); RD. 率差 (rate difference); RR. 相对危险度 (relative risk); NS. 差异无统计学意义 (no statistical difference); #: 该文献中纳入的研究有 11 项将预后良好定义为 3 个月时 mRs 评分 ≤ 2 分, 有 1 项研究定义为 mRs 评分 ≤ 3 分 (eleven of the studies included in this literature defined good prognosis as mRs score ≤ 2 at 3 months, and one study defined mRs score ≤ 3).

在接受 IVT 桥接 EVT (以下简称桥接治疗) 的 AIS 患者中, 基于 RCTs 和观察性研究的 SR 结果提示, 与单纯桥接治疗相比, 替罗非班联合桥接治疗不能提高患者的预后良好率^[23-25]和血管再通率^[24-25], 但可降低患者血管再闭塞率^[25]。

2.3.3 接受 EVT 的 AIS 患者 在接受血管内治疗 (包括桥接治疗) 的 AIS 患者中, 基于 RCTs 和观察性研究的 SR/Meta 分析结果显示, 与单纯 EVT 相比, 替罗非班联合 EVT 可提高患者的预后良好率^[26, 30-33, 35]和血管再通率^[26, 30, 33], 两组患者预后极佳率的差异无统计学意义^[29, 35]; 此外, 在接受机械取栓 (EVT 中的一种) 的患者中, 联合替罗非班还可降低血管再闭塞率^[25-26], 尤其在大动脉粥样硬化型 AIS 患者中。同时, 静脉给药途径相比动脉给药更能改善临床预后^[26]。

Liu 等^[29] 的研究将接受 EVT 的 AIS 患者分为前循环梗死和后循环梗死两组进行分析, 结果显示, 替罗非班可提高前循环梗死患者的预后良好率, 而后循环梗死患者中该指标在两组间的差异无统计学意义; 同时, 替罗非班可提高后循环梗死患者的血管再通率, 而前循环梗死患者中该指标在两组间的差异无统计学意义。

2.3.4 PIS 患者 在 PIS 患者中, 1 项研究^[36] 显示, 相比于单独双抗治疗, 替罗非班联合双抗治疗可改善患者 NIHSS 评分, 提高患者预后良好率; 1 项研究显示, 相比于对照组, 替罗非班不能改善患者在卒中进展期的 NIHSS 评分, 但可改善用药后 3 d 和 7 d 的 NIHSS 评分, 可提高用药后 3 个月的 ADL 评分^[37]。

2.4 安全性评价

2.4.1 AIS 患者 如表 3 所示, 基于 RCTs 的 SR 结果提示, 与对照组相比, 替罗非班不增加 sICH 和死亡风险, 但可增加 ICH 发生风险^[14]。然而, 在纳入 RCTs 和观察性研究之后, 3 项研究显示替罗非班不增加 ICH 发生风险^[16, 19-20]; 3 项研究显示替罗非班可明显降低死亡风险^[16-17, 20], 2 项研究显示两组死亡率的差异无统计学意义^[18-19]; sICH^[17-20]、ICH 转化^[16-17] 发生率在两组间的差异均无统计学意义; 1 项研究显示替罗非班可能增加 fICH 发生风险^[18], 但更新的 1 项研究显示该指标在两组间的差异无统计学意义^[16]。与阿司匹林注射剂相比, 替罗非班不增加 sICH、其他部位出血发生的风险^[21]。

2.4.2 接受 IVT 的 AIS 患者 在接受 IVT (无论是否桥接 EVT) 的 AIS 患者中, 基于 RCTs 和观察性研究的 SR 结果提示, 与单纯 IVT 相比, 替罗非班联合 IVT 不增加死亡率, 不增加 ICH、sICH^[19, 22-25]

发生风险。在接受 IVT 桥接 EVT 的 AIS 患者中, 替罗非班甚至可降低死亡率^[23-25]。

2.4.3 接受 EVT 的 AIS 患者 在接受 EVT (包括桥接治疗) 的 AIS 患者中, 基于 RCTs 和观察性研究的 SR/Meta 分析结果显示, 与单纯 EVT 相比, 替罗非班不增加死亡风险^[31-32, 35], 且可能可以降低死亡率^[26, 29-30, 33-34]; 两组间 ICH^[27, 30, 33, 35]、sICH^[26, 30-35] 差异无统计学意义, Liu 等^[29] 的研究的亚组分析结果显示在后循环梗死患者中, 替罗非班可降低 sICH 发生风险。值得注意的是, 有 3 项研究^[18, 28, 35] 提示在接受 EVT 的 AIS 患者中, 联合替罗非班可能增加 fICH 发生的风险。

2.4.4 PIS 患者 在 PIS 患者中, 1 项研究^[36] 结果显示, 相比于单独双抗治疗, 替罗非班联合双抗治疗不增加 ICH 的发生率, 但增加其他系统出血的发生率。

2.5 经济性评价

杨清理等^[38] 的成本效果研究采用 Markov 模型, 医疗成本、临床效果数据来源于已公开发表的文献, 研究中贴现率取值为 5%, 研究周期假设为 30 年, 结果显示, 机械取栓联合替罗非班与单用机械取栓的治疗总成本分别为 925 485.09 元、918 795.64 元, 可获得 QALYs 分别为 14.9 年、12.98 年; 机械取栓联合替罗非班治疗可提高患者的健康效果 ($\Delta E > 0$), 与此同时会增加治疗成本 ($\Delta C > 0$), 其增量成本效果比 (ICER) 为 3484.10 元/QALYs, 远低于 1 倍人均 GDP, 非常具有成本效果。无论是经济较为发达地区还是相对欠发达的地区, 机械取栓联合替罗非班均具有经济性。

2.6 可及性评价

替罗非班的可及性主要从药品价格水平、可获得性和可负担性这几个方面进行综合评价。截至目前, 替罗非班 (注射剂) 和替罗非班氯化钠 (注射剂) 已纳入乙类医保报销范围, 且有多个国产盐酸替罗非班氯化钠注射液为集中带量采购品种, 12.5 mg 规格的价格为每瓶 23.19 ~ 920 元, 原研盐酸替罗非班注射液 (50 mL: 12.5 mg) 价格为每瓶 1375.65 元, 相较于原研产品国产替罗非班注射液在我国应用具有一定的价格优势。对替罗非班注射液的注册生产企业所在地进行统计, 包括四川省 (4 家企业)、山东省 (3 家企业)、辽宁省 (3 家企业)、浙江省 (2 家企业)、湖北省 (2 家企业)、河北省 (2 家企业)、内蒙古 (1 家企业)、湖南省 (1 家企业)、天津市 (1 家企业)、贵州省 (1 家企业)、陕西省 (1 家企业)、广东省 (1 家企业)、北京市 (1 家企业) 等 13 个省、直辖市,

表 3 替罗非班的安全性
Tab 3 Safety of tirofiban

患者人群	干预组	对照组	安全性指标	效应量
AIS 患者	替罗非班	安慰剂 / 其他药物	a、c	NS ^[14]
			b	RR = 1.22, 95%CI (1.03, 1.44) ^[14]
	替罗非班+其他治疗	其他治疗	a	OR = 0.46, 95%CI (0.24, 0.88) ^[15]
			b、c	NS ^[15]
	替罗非班+其他治疗	其他治疗	a	OR = 0.71, 95%CI (0.60, 0.85) ^[16]
			b、d、e	NS ^[16]
	替罗非班	安慰剂 / 其他药物	a	RR = 0.79, 95%CI (0.65, 0.97) ^[17]
	替罗非班	安慰剂 / 其他药物	c、e	NS ^[17]
			d	OR = 2.84, 95%CI (1.38, 5.85) ^[18]
	替罗非班	安慰剂 / 其他药物	a、c	NS ^[18]
a、b、c			NS ^[19]	
替罗非班	安慰剂或其他药物	a	RR = 0.75, 95%CI (0.61, 0.93) ^[20]	
		b、c	NS ^[20]	
接受 IVT 的 AIS 患者	替罗非班	阿司匹林 (注射剂)	a、c、g	NS ^[21]
	替罗非班+ IVT (不含 EVT)	IVT (不含 EVT)	a、b、c	NS ^[19]
	替罗非班+ IVT (不含 EVT)	IVT (不含 EVT)	a、b、c、g	NS ^[22]
	替罗非班+ IVT (不含 EVT)	IVT (不含 EVT)	a、b、c	NS ^[23]
	替罗非班+ IVT (不含 EVT)	IVT (不含 EVT)	a、b、c	NS ^[24]
	替罗非班+ IVT 桥接 EVT	IVT 桥接 EVT	a	OR = 0.47, 95%CI (0.23, 0.98) ^[23]
	替罗非班+ IVT 桥接 EVT	IVT 桥接 EVT	b、c	NS ^[23]
			a	OR = 0.46, 95%CI (0.24, 0.89) ^[24]
	替罗非班+ IVT 桥接 MT	IVT 桥接 MT	b、c	NS ^[24]
			a	OR = 0.54, 95%CI (0.33, 0.87) ^[25]
接受 EVT 的 AIS 患者	替罗非班+ MT	MT	a	OR = 0.71, 95%CI (0.61, 0.82) ^[26]
			c	NS ^[26]
	替罗非班+ MT	MT	b	NS ^[27]
			d	RR = 3.59, 95%CI (1.62, 7.96) ^[28]
	替罗非班+ IVT 和 / 或 MT	IVT 和 / 或 MT	a	前循环梗死: OR = 0.80, 95%CI (0.65, 0.98) ^[29] 后循环梗死: OR = 0.63, 95%CI (0.50, 0.80) ^[29]
			c	前循环梗死: NS ^[29] 后循环梗死: OR = 0.60, 95%CI (0.37, 0.95) ^[29]
	替罗非班+ EVT	EVT	a	OR = 0.73, 95%CI (0.59, 0.89) ^[30]
			b、c	NS ^[30]
	替罗非班+ EVT	EVT	a、c	NS ^[31]
			a、c	NS ^[32]
替罗非班+ EVT	EVT	a	OR = 0.75, 95%CI (0.62, 0.91) ^[33]	
		b、c	NS ^[33]	
替罗非班+ EVT	EVT	a	OR = 0.68, 95%CI (0.52, 0.89) ^[34]	
		c	NS ^[34]	
替罗非班+ EVT	EVT	d	OR = 3.81, 95%CI (1.63, 8.90) ^[35]	
		a、b、c、f	NS ^[35]	
PIS 患者	替罗非班+双抗	双抗	b	NS ^[36]
			g	OR = 1.78, 95%CI (1.03, 3.09) ^[36]

注 (Note): a. 死亡率 (mortality); b. ICH 发生率 (rate of intracranial hemorrhage); c. sICH 发生率 (rate of symptomatic intracranial hemorrhage); d. fICH 发生率 (rate of fatal intracranial hemorrhage); e. ICH 转化率 (rate of intracranial hemorrhage); f. 2 型实质血肿 (type 2 parenchymatous hematoma); g. 其他部位出血发生率 (incidence of bleeding in other systems); NS. 表示差异无统计学意义 (no statistical difference)。

可获得性均良好。替罗非班注射液用于 AIS 患者, 指南推荐最长用药疗程为 72 h, 最大剂量为 14.7 ~ 66.15 mg (按说明书推荐体重 30 ~ 153 kg 计算), 如使用集采品种, 患者用药费用占全国居民人均可支配收入 (36 883.28 元, 2022 年) 比例

甚微, 因此替罗非班注射液有较好的可负担性。

3 讨论

本研究有效性方面评价结果提示, 在 AIS 或仅接受 IVT 的 AIS 患者中, 与对照组相比, 替罗非班可改善患者神经功能损伤和 / 或 3 个月预后;

在接受 EVT 的 AIS 患者中, 3 个月预后良好率、血管再通率、再闭塞率在不同研究中结论不一致。这可能与纳入文献的质量、替罗非班给药剂量、途径、疗程不同有关。此外, Liu 等^[29]的研究按梗死部位进行分析, 结果显示, 在接受 EVT 的患者中, 联用替罗非班仅可改善前循环梗死患者的 3 个月预后和提高后循环梗死患者的血管再通率, 这一结论也解释了同一结局指标在不同研究中结论不一致的原因。另外, 替罗非班单药治疗 AIS 的最新临床试验 (RESCUE BT2 试验) 结果表明, 对于急性非大-中动脉闭塞性致残性缺血性卒中患者, 静脉使用替罗非班可改善预后^[39]。综上所述, 目前证据显示替罗非班可能改善 AIS 患者神经功能缺损和预后。

安全性方面评价结果提示, 与对照组相比, 替罗非班均不增加死亡率、ICH 发生率、sICH 发生率、其他部位出血等的发生风险, 在接受 IVT 桥接 EVT 的 AIS 患者中, 替罗非班甚至可降低死亡率。但有 3 项研究^[18, 28, 35]提示在接受 EVT 的 AIS 患者中, 联合替罗非班可能增加 fICH 发生风险, 其中 Gong 等^[18]研究的亚组分析结果显示, 替罗非班组 fICH 发生率增加可能与动脉内给药有关。然而, 这一结论的可靠性有待商榷, 因为 3 项研究纳入的研究样本量较少, 且纳入了部分 2015 年发表的文献, 而在 2015 年关于 AIS 的血管内治疗适应证有所更新^[40]。

经济性方面评价结果显示, 相比于单用机械取栓, 联合替罗非班治疗 AIS 患者更具成本效果优势。但纳入研究中的健康效用值、临床事件转移概率来源于以西方人群为主体的研究^[38], 其研究结果在我国人群及经济环境下的适用性有待进一步研究。

本研究系统整合了替罗非班用于 AIS 的现有证据, 涵盖 AIS 和 PIS 人群, 按不同治疗方式分类分析, 弥补了既往证据的不足; 从有效性、安全性、经济性、可及性方面全面评价替罗非班在 AIS 患者中的应用价值, 为临床决策提供循证支持。本研究可能存在一定的局限性: 对纳入的研究仅做了定性描述, 且无法排除纳入研究的原始研究质量、数量、分组方法的缺陷对本研究的影响; 替罗非班的剂量和疗程在不同系统评价间可能存在一定异质性; 纳入的 SR/Meta 分析整体方法学质量低, 主要缺陷为研究实施前未报告研究方法, 说明在方法学方面应进一步规范, 但这些文献已是基于目前所有可获得的研究做出的分析, 仍有一定的参考价值。

综上, 替罗非班应用于 AIS 患者具有较好的

有效性和安全性, 但动脉内给药可能增加 fICH 发生风险。目前有关替罗非班的临床研究大部分为观察性研究, 未来可考虑开展更多大规模、多中心的随机对照研究, 进一步验证替罗非班治疗 AIS 的有效性和安全性。在中国, 相比于单用机械取栓, 联合替罗非班治疗 AIS 具有经济性。当前, 替罗非班注射液在国内具有较好的可及性。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组, 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经杂志, 2018, 51 (9): 666-682.
- [2] Wang WZ, Jiang B, Sun HX, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480687 adults [J]. Circulation, 2017, 135 (8): 759-771.
- [3] Wang PL, Wang YL, Zhao XQ, et al. In hospital medical complications associated with stroke recurrence after initial ischemic stroke: a prospective cohort study from the China National Stroke Registry [J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95 (37): e4929.
- [4] 刘丽萍, 周宏宇, 段婉莹, 等. 中国脑血管病临床管理指南 (第 2 版)(节选)——第 4 章缺血性脑血管病临床管理推荐意见 [J]. 中国卒中杂志, 2023, 18 (8): 910-933.
- [5] 王嘉晶, 况杰, 涂江龙, 等. 氯吡格雷联合阿司匹林精准用药与脑卒中患者短期预后的关系 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37 (13): 1737-1741.
- [6] Dornbos D, Katz JS, Youssef P, et al. Glycoprotein II b/III a inhibitors in prevention and rescue treatment of thromboembolic complications during endovascular embolization of intracranial aneurysms [J]. Neurosurgery, 2018, 82 (3): 268-277.
- [7] King S, Short M, Harmon C. Glycoprotein II b/III a inhibitors: the resurgence of tirofiban [J]. Vascular Pharmacol, 2016, 78: 10-16.
- [8] Wang K, Zuo GX, Zheng LY, et al. Effects of tirofiban on platelet activation and endothelial function in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71 (1): 135-142.
- [9] 中国卒中协会, 中国卒中协会神经介入分会, 中华预防医学会卒中预防与控制专业委员会介入学组. 替罗非班在动脉粥样硬化性脑血管疾病中的临床应用专家共识 [J]. 中国卒中杂志, 2019, 14 (10): 1034-1044.
- [10] 崔艳军, 马天, 刘一, 等. 卡瑞利珠单抗联合化疗一线治疗局部晚期/转移性非小细胞肺癌的快速卫生技术评估 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29 (7): 775-784.
- [11] 唐惠林, 门鹏, 翟所迪. 药物快速卫生技术评估方法及应用 [J]. 临床药物治疗杂志, 2016, 14 (2): 1-4.
- [12] Sheab J, Reeves BC, Wells G, et al. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both [J]. BMJ, 2017, 358: j4008.
- [13] Husereau D, Drummond M, Petrou S, et al. Consolidated

- health economic evaluation reporting standards (CHEERS) statement [J]. *J Med Econ*, 2013, 16 (6): 713-719.
- [14] Al-Salihi MM, Ayyad A, Al-Jebur MS, et al. Safety and efficacy of tirofiban in the management of stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2023, 232: 107867.
- [15] 刘惠莲, 王菊, 王源江, 等. 替罗非班治疗急性缺血性脑卒中安全性及有效性 Meta 分析 [J]. *中国药业*, 2023, 32 (4): 106-111.
- [16] 刘惠莲. 替罗非班对急性缺血性脑卒中的安全性及有效性 Meta 分析 [D]. 海口: 海南医学院, 2022.
- [17] 张利军, 惠鑫, 刘基, 等. 替罗非班治疗急性缺血性卒中安全性及有效性的 Meta 分析 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2020, 37 (7): 594-599.
- [18] Gong JH, Shang JJ, Yu H, et al. Tirofiban for acute ischemic stroke: systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2020, 76 (4): 475-481.
- [19] Zhou J, Gao Y, Ma QL. Safety and efficacy of tirofiban in acute ischemic stroke patients not receiving endovascular treatment: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (3): 1492-1503.
- [20] Zhu XL, Cao GM. Safety of glycoprotein II b-III a inhibitors used in stroke-related treatment: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2020, 26: 1076029620942594.
- [21] Ciccone A, Motto C, Abraha I, et al. Glycoprotein II b-III a inhibitors for acute ischaemic stroke [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014 (3): CD005208.
- [22] 石叶军, 荆玉雷, 李超生, 等. 阿替普酶静脉溶栓后联合替罗非班治疗急性缺血性脑卒中安全性及有效性的 Meta 分析 [J]. *临床神经病学杂志*, 2022, 35 (1): 24-29.
- [23] Shi H, Hou MM, Ren G, et al. Tirofiban for acute ischemic stroke patients receiving intravenous thrombolysis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2023, 52 (5): 587-596.
- [24] Liu QQ, Lu XF, Yang H, et al. Early tirofiban administration for patients with acute ischemic stroke treated with intravenous thrombolysis or bridging therapy: systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2022, 222: 107449.
- [25] Li W, Lin GH, Xiao ZX, et al. Safety and efficacy of tirofiban during intravenous thrombolysis bridging to mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke patients: a meta-analysis [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 851910.
- [26] Liu C, Yang X, Liu MS, et al. Meta-analysis of the efficacy and safety of tirofiban in patients with acute ischaemic stroke undergoing mechanical thrombectomy [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2023, 228: 107702.
- [27] 黄昌恒, 于耀宇, 姚自同. 急性缺血性脑卒中机械取栓术中应用替罗非班效果的 Meta 分析 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2019, 24 (9): 527-530.
- [28] Liu JT, Yang YH, Liu HB. Efficacy outcomes and safety measures of intravenous tirofiban or eptifibatid for patients with acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of prospective studies [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2022, 53 (4): 898-910.
- [29] Liu CX, Yang X, Liu MS, et al. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of adjunctive use of tirofiban in patients treated with endovascular therapy for acute ischemic stroke at different embolic sites [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102 (40): e35091.
- [30] Zhang AW, Wu NH, Liu XT, et al. Continuous intravenous tirofiban can improve the 90-day functional outcome and decrease 90-day mortality without increasing bleeding risk in acute ischemic stroke patients treated by endovascular therapy: a meta-analysis [J]. *J Clin Neurosci*, 2022, 99: 109-116.
- [31] Zhao HC, Feng YW, Rong XM, et al. Sequential tirofiban infusions combined with endovascular treatment may improve outcomes in acute ischemic stroke—a meta-analysis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13 (4): 5426-5441.
- [32] Sun YY, Guo ZN, Yan LX, et al. Safety and efficacy of tirofiban combined with endovascular therapy compared with endovascular therapy alone in acute ischemic stroke: a meta-analysis [J]. *Neuroradiology*, 2021, 63 (1): 17-25.
- [33] Tang LS, Tang XQ, Yang QW. The application of tirofiban in the endovascular treatment of acute ischemic stroke: a meta-analysis [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2021, 50 (2): 121-131.
- [34] Fu ZY, Xu CL, Liu X, et al. Safety and efficacy of tirofiban in acute ischemic stroke patients receiving endovascular treatment: a meta-analysis [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2020, 49 (4): 442-450.
- [35] Zhang PF, Guo YT, Shen J, et al. Efficacy and safety of tirofiban therapy in patients receiving endovascular treatment after large vessel ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Neurosci*, 2020, 80: 112-120.
- [36] 马嘉琦, 李映辰, 伍大华. 替罗非班联合双抗治疗进展性脑卒中有效性及安全性的 Meta 分析 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2023, 30 (5): 342-348, 367.
- [37] 秦祉祎, 朱明辉, 朱晓红, 等. 替罗非班治疗进展性脑卒中的 Meta 分析 [J]. *解放军药学学报*, 2022, 35 (3): 266-271.
- [38] 杨清理, 宋沧桑, 张阳, 等. 机械取栓联合替罗非班对比单用机械取栓治疗急性缺血性脑卒中的安全性、有效性、经济性 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (1): 197-203.
- [39] Zi WJ, Song JX, Kong WL, et al. Tirofiban for stroke without large or medium-sized vessel occlusion [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388 (22): 2025-2036.
- [40] Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372 (11): 1009-1018.

(收稿日期: 2024-07-13; 修回日期: 2024-09-02)

新疆某三甲医院成人肾移植患者霉酚酸暴露量的影响因素分析

阿丽耶·拜尔迪^{1,2}, 马丽娟², 吴洁茹⁴, 李牧云^{1,2}, 寇玉莲^{1,2}, 赵军^{3,5*} (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 新疆药物临床研究重点实验室, 乌鲁木齐 830011; 4. 新疆医科大学第四附属医院, 乌鲁木齐 830000; 5. 新疆及中亚特色医药资源教育部工程研究中心, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 探究成人肾移植患者霉酚酸 (MPA) 暴露量的影响因素, 为临床实施个体化用药提供参考。**方法** 选取新疆医科大学第一附属医院 2023 年 5 月至 2024 年 5 月行肾移植手术或肾移植术后常规随访的成人肾移植患者 166 例, 按霉酚酸的暴露量分为低暴露组 (MPA $AUC < 30 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 33 例)、目标暴露组 (MPA AUC 在 $30 \sim 60 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 85 例) 和高暴露组 (MPA $AUC > 60 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 例)。回顾性收集患者的霉酚酸血药浓度检测结果、基本临床资料、实验室检查结果、联合用药和合并疾病情况。通过单因素分析和多元 Logistic 回归方法分析霉酚酸暴露量的影响因素。**结果** 单因素分析结果显示, 患者的尿酸、白蛋白、血小板、白细胞、中性粒细胞、谷丙转氨酶、谷草转氨酶水平和血管紧张素 II 受体拮抗剂用药史是霉酚酸暴露量的影响因素 ($P < 0.05$)。多元 Logistic 回归分析结果显示, 患者谷草转氨酶、中性粒细胞水平和血管紧张素 II 受体拮抗剂用药史是霉酚酸暴露量的负向影响因素 ($P < 0.05$); 患者的谷草转氨酶、中性粒细胞、白蛋白、白细胞水平和血管紧张素 II 受体拮抗剂用药史是霉酚酸暴露量的正向影响因素 ($P < 0.05$)。**结论** 服用霉酚酸类药物的肾移植患者 MPA AUC 达标率较低, 影响因素较多, 临床医师或临床药师可利用治疗药物监测, 根据患者血管紧张素 II 受体拮抗剂用药史和谷草转氨酶、中性粒细胞、白蛋白、白细胞水平的变化结合临床疗效, 指导临床调整用药剂量。

关键词: 霉酚酸; 肾移植; 暴露量; 影响因素

中图分类号: R979.5, R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0812-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.035

Factors affecting mycophenolic acid exposure in adult renal transplant patients in a tertiary hospital in Xinjiang

Aliya · Bardi^{1,2}, MA Li-juan², WU Jie-ru⁴, LI Mu-yun^{1,2}, KOU Yu-lian^{1,2}, ZHAO Jun^{3,5*} (1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang Key Laboratory of Clinical Research of Drugs, Urumqi 830011; 4. The Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000; 5. Engineering Research Center of Xinjiang and Central Asian Medicine Resources, Ministry of Education, Urumqi 830011)

Abstract: Objective To determine the influencing factors for mycophenolic acid exposure in adult renal transplantation patients, and to provide reference for individualized medication. **Methods** Totally 166 adult patients who underwent renal transplantation or routine follow-up after renal transplantation from May 2023 to May 2024 in the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University were selected and divided into a low exposure group (MPA $AUC < 30 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 33 patients), a target exposure group (MPA AUC $30 \sim 60 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 85 patients), and a high-exposure group (> 60

基金项目: 新疆维吾尔自治区“天山英才”医药卫生高层次人才培养项目 (No.TSYC202301A051); 新疆医科大学第一附属医院“青年科研起航”专项基金项目 (No.2022YFY-QKQN-80)。

作者简介: 阿丽耶·拜尔迪, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: 17799214543@163.com * **通信作者:** 赵军, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药理学和药剂学研究, email: zhaojun700326@163.com

mg · h · L⁻¹, 48 patients) according to the degree of exposure to mycophenolic acid. The medical records, patients' mycophenolic acid blood concentration test results, basic clinical data, laboratory test results, co-medication, and co-morbidities were reviewed. Factors influencing mycophenolic acid exposure were analyzed by univariate analysis of variance and multivariate logistic regression. **Results** The patients' uric acid, albumin, platelets, leukocytes, neutrophils, glutamic-pyruvic transaminase, glutamic-oxaloacetic transaminase levels, and history of angiotensin II receptor antagonist medication were all influencing factors for mycophenolic acid exposure ($P < 0.05$). Multiple Logistic regression analysis showed that patients' glutamic-oxaloacetic transaminase, neutrophil level and history of angiotensin II receptor antagonist medication negatively influenced the mycophenolic acid exposure ($P < 0.05$); Patients' glutamic-oxaloacetic transaminase, neutrophil, albumin, leukocyte level and history of angiotensin II receptor antagonist medication positively influenced the mycophenolic acid exposure ($P < 0.05$). **Conclusion** Renal transplant patients taking mycophenolic acid drugs have a lower MPA AUC compliance rate and with many influencing factors. Clinicians or clinical pharmacists can monitor therapeutic drug to adjust drug dosage based on the patient's history of angiotensin II receptor antagonist medication and changes in the levels of glutamic-oxaloacetic transaminase, neutrophils, albumin, and leukocytes to improve medication efficacy.

Key words: mycophenolic acid; renal transplantation; exposure; influencing factor

慢性肾脏病在中国的患病率达 10.8%，患病人数约为 1.5 亿^[1]，其中超过 2% ~ 3% 的患者会发展成终末期肾病，严重影响患者的寿命和生活质量^[2]。肾移植是终末期肾脏病最有效的临床治疗手段，与透析治疗的患者相比，肾移植受者的生存率和生活质量较高，能够获得更好的临床结局^[3]。霉酚酸 (mycophenolic acid, MPA) 是主要的抗代谢免疫抑制剂之一^[4]，临床上与他克莫司 (TAC) 或环孢素 (CsA) 联用，以预防肾移植后的移植物排斥反应^[5-6]。MPA 通过抑制鸟嘌呤核苷酸从头合成途径的关键酶——次黄苷酸脱氢酶的活性，从而抑制 T、B 淋巴细胞增殖，发挥免疫抑制作用^[7-8]。临床应用的 MPA 类药物主要有吗替麦考酚酯 (MMF)、胶囊麦考酚钠 (EC-MPS) 肠溶片和吗替麦考酚酯分散片，体内活性形式均为 MPA^[9]。MPA 类药物个体间药物代谢动力学差异较大。研究发现，服用固定剂量 MMF 时，不同患者 MPA 暴露量可相差 10 倍^[10]。个体间药物代谢动力学的差异与药物代谢酶、转运体、药效酶基因多态性有关^[11]。 $0 \sim 12$ h 药物浓度 - 时间曲线下面积 ($AUC_{0 \sim 12h}$) 是评价 MPA 临床疗效的指标^[12]。对于肾移植受者，采用酶放大免疫分析法测定 MPA 的浓度时，推荐治疗窗： $AUC_{0 \sim 12h}$ 为 $30 \sim 60$ mg · h · L⁻¹^[13]。肾移植患者的 MPA 暴露量与排斥反应及相关不良反应有密切关系，可根据 MPA 的 AUC 进行 MPA 类药物的剂量调整^[14]。临床上常规测定 MPA 的 AUC 全点监测血样采样密集难以实施，且由于治疗药物检测存在滞后性，单一的治疗药物监测愈发不能满足患者对生命健康的需要，难以制订初始剂

量。因此通常采用有限采样策略 (limited sampling strategy, LSS)，即通过 3 ~ 4 个采样点和计算公式，估算 MPA 的 AUC 进行 MPA 个体化给药^[15]。

MPA 治疗窗窄，个体间差异较大^[16-17]。以往研究报告，患者人口统计学、生理和病理情况、合并用药和遗传多态性可能会导致 MPA 药代动力学参数的变化从而影响患者血药浓度^[18-20]。本研究以新疆各族人群为研究对象，在以往研究的基础上纳入更多的变量，全面分析 MPA 暴露量的影响因素，以期临床调整 MPA 的剂量提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

以 2023 年 5 月至 2024 年 5 月于新疆医科大学第一附属医院行肾移植手术或肾移植术后常规随访的患者为研究对象。本研究经本院医学伦理委员会批准 (批件号为: K202407-16)，由于是回顾性研究且获取的临床数据是匿名的，因此予以知情豁免。

纳入标准: ① 首次接受肾移植; ② 年龄 > 18 岁，男女不限; ③ 术后免疫抑制方案为 MPA + TAC/CsA + 类固醇皮质激素三联方案。

排除标准: ① 曾经接受过肾移植或联合移植; ② 肝功能异常; ③ 发生急性排斥反应或感染; ④ 临床资料严重缺失的患者。

1.2 免疫抑制方案

肾移植受者于移植术后 24 h 内开始口服 MPA 类药物，MMF 和 EC-MPS 的起始剂量分别为每次 $0.75 \sim 1.0$ g 和 $540 \sim 720$ mg，每 12 h 一次。

1.3 MPA 治疗药物浓度监测方法

MPA 血药浓度由精准用药实验室统一测定。患

者在肾移植术后相对固定时间口服 MPA 达到稳态血药浓度。与他克莫司联用的患者在服药后 1、2、4、8 h 采集外周血，EDTA 抗凝，分离血浆测定血药浓度，使用公式 $AUC = 8.36 + 0.76 \times C_{1h} + 1.34 \times C_{2h} + 1.66 \times C_{4h} + 7.49 \times C_{8h}$ 计算 MPA $AUC^{[21]}$ 。与 CsA 联用的患者在服药后 0.5、1、2、8 h 采集外周血，EDTA 抗凝，分离血浆测定血药浓度，使用公式 $AUC = 2.38 + 0.48 \times C_{0.5h} + 0.61 \times C_{1h} + 2.49 \times C_{2h} + 7.49 \times C_{8h}$ 计算 MPA $AUC^{[22]}$ 。测定方法为酶放大免疫分析法，仪器为 Viva-ProE 全自动生化分析仪（德国西门子），治疗窗：30 ~ 60 $mg \cdot h \cdot L^{-1}$ [23-24]。

1.4 数据收集

回顾性收集患者的基本临床资料 [性别、民族、年龄、体质量指数 (BMI) 和移植术后时间]，实验室检查结果 (肌酐、尿酸、尿素、肾小球滤过率、白蛋白、球蛋白、总蛋白、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、红细胞、中性粒细胞、白细胞、血小板、血红蛋白、红细胞压积、血小板压积和糖化血红蛋白)，合并疾病 (合并高血压、糖尿病、肝炎和冠心病)。MPA 用药情况 (MPA 剂型、剂量和血药浓度监测结果)，联合用药情况 [钙通道阻滞剂、更昔洛韦、 β 受体阻滞剂、胰岛素、他汀类、 α_1 受体阻滞剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB)、TAC 和 CsA]。

1.5 MPA 暴露量的影响因素分析

根据 MPA AUC 将 166 例患者分为低暴露组、目标暴露组和高暴露组，并分析患者基本临床资料、实验室检查结果、联合用药和合并疾病情况对三组 MPA 暴露量的影响。

1.6 统计分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，计数资料以率 (%) 表示，行 χ^2 检验。计量资料行正态性检验和方差齐性检验。正态资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用参数检验分析进行组间比较；非正态资料以中位数 [四分位数间距 (IQR)] 表示，采用非参数检验进行组间比较。通过单因素分析法对相关因素进行初步分析及筛选，为了确保纳入多元 Logistic 回归的变量与因变量有较强的关联性，选取 $P \leq 0.01$ 的变量进行多元 Logistic 回归分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾移植患者临床资料

本研究共纳入 166 例成人肾移植患者，其中男性患者 131 名，占总数的 78.9%；女性患者 35 名，占总数的 21.1%。患者的平均年龄为 (44.22 ± 10.94) 岁，临床资料见表 1。

2.2 肾移植患者 MPA 暴露量统计

根据 MPA AUC 值将 166 例患者分为低暴露

表 1 纳入患者的一般资料

资料	分类	数值
基本人口学特征		
性别 [n (%)]	男	131 (78.9)
	女	35 (21.1)
民族 [n (%)]	维吾尔族	85 (51.2)
	汉族	47 (28.3)
	哈萨克族	23 (13.9)
	其他	11 (6.6)
MPA 类药物剂型 [n (%)]	麦考酚钠肠溶片	86 (51.8)
	吗替麦考酚酯胶囊	48 (28.9)
	吗替麦考酚酯分散片	32 (19.3)
年龄 / 岁 ($\bar{x} \pm s$)		44.22 ± 10.94
BMI / ($kg \cdot m^{-2}$) [中位数 (IQR)]		23 (4.5)
移植术后时间 / d [中位数 (IQR)]		1461.5 (2654.5)
MPA 剂量 / mg [中位数 (IQR)]	麦考酚钠肠溶片	900 (540)
	吗替麦考酚酯胶囊	1000 (250)
	吗替麦考酚酯分散片	1500 (687.5)
MPA AUC / ($\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$) [中位数 (IQR)]		43.53 (32.49)

组 ($< 30 mg \cdot h \cdot L^{-1}$)，目标暴露组 ($30 \sim 60 mg \cdot h \cdot L^{-1}$) 和高暴露组 ($> 60 mg \cdot h \cdot L^{-1}$)，见表 2。服用 MPA 的肾移植患者 MPA AUC 在目标范围内的比例为 51.2%。

表 2 不同暴露组肾移植患者 MPA 暴露情况统计 (n = 166)

Tab 2 Statistics of MPA exposure in kidney transplant patients in different exposure groups (n = 166)

组别	n (%)	AUC / ($mg \cdot h \cdot L^{-1}$)	中位数 (范围)
低暴露组	33 (19.8)	24.27 ± 4.93	24.97 (13.15, 29.96)
目标暴露组	85 (51.2)	42.91 ± 8.87	41.72 (30.37, 59.68)
高暴露组	48 (28.9)	88.94 ± 27.43	79.03 (60.15, 176.65)

2.3 MPA 暴露量的影响因素

2.3.1 患者基本临床资料 患者性别、民族、年龄、MPA 剂型、BMI、移植后时间在不同暴露组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 3)。

2.3.2 实验室检查结果 患者的尿酸、白蛋白、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、中性粒细胞、白细胞、血小板水平在不同暴露组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 4)。

2.3.3 合并疾病 患者合并高血压、糖尿病、肝炎、冠心病在不同暴露组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 5)。

2.3.4 联合用药 联合使用 ARB 在不同暴露组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。联合使用百令胶囊、五酯胶囊、骨化三醇丸、钙通道阻滞剂等在不同暴露组之间无显著差异 ($P > 0.05$) (见表 6)。

2.4 MPA 暴露量影响因素的多元 Logistic 回归分析

为了确保纳入的变量与因变量有较强的关联性，选取单因素分析结果中 $P \leq 0.01$ 的变量进行多元 Logistic 回归分析，包括白蛋白、白细胞、中性粒细胞、谷草转氨酶水平和 ARB 用药史。多元

表 3 三组患者基本临床资料与 MPA 暴露量单因素分析结果比较

Tab 3 Univariate analysis of basic clinical data and MPA exposure in the three patient groups

基本信息	低暴露组 (n = 33)	目标暴露组 (n = 85)	高暴露组 (n = 48)	χ^2/H	P	
性别 (男/女)	24/9	71/14	36/12	2.289	0.318	
民族 [n (%)]	维吾尔族	18 (54.5)	43 (50.6)	24 (72.7)	2.839	0.829
	汉族	10 (30.3)	26 (30.6)	11 (22.9)		
	哈萨克族	4 (12.1)	10 (11.8)	9 (18.8)		
	其他	1 (3)	6 (7.1)	4 (8.4)		
MPA 剂型	麦考酚钠肠溶片	20 (60.6)	40 (47.1)	26 (30.6)	3.330	0.504
	吗替麦考酚酯分散片	7 (18.2)	18 (21.2)	7 (8.2)		
	吗替麦考酚酯胶囊	6 (18.2)	27 (31.8)	15 (17.6)		
年龄 / 岁 ($\bar{x} \pm s$)	42.33 ± 11.57	45.13 ± 11.052	43.92 ± 10.32	2.215	0.330	
BMI	23 (6.5)	23 (5)	22 (4)	5.423	0.066	
MPA 剂量	麦考酚钠肠溶片	1080 (495)	990 (360)	900 (360)	0.667	0.717
	吗替麦考酚酯分散片	1500 (625)	1500 (562.5)	1500 (750)		
	吗替麦考酚酯胶囊	1000 (250)	1000 (375)	1000 (260)		
移植术后时间	1124 (3421)	1631 (28.78)	634 (1956.25)	0.372	0.830	

表 4 三组患者实验室检查结果与 MPA 暴露量单因素分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Univariate analysis of laboratory test items and MPA exposure in the three patient groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	低暴露组 (n = 33)	目标暴露组 (n = 85)	高暴露组 (n = 48)	F/H	P
肌酐 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	154.32 ± 91.01	116.49 ± 35.35	140.07 ± 74.58	2.345	0.099
尿酸 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	402.5 ± 98.34	408.00 ± 95.75	410.69 ± 82.82	3.506	0.032
尿素 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	17.4 ± 2.69	8.19 ± 3.8	9.72 ± 5.09	1.291	0.278
肾小球滤过率 [mL / ($\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2$)]	78.77 ± 0.68	67.64 ± 21.69	59.23 ± 22.5	0.910	0.405
白蛋白 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	42.12 ± 1.15	39.72 ± 4.20	42.32 ± 4.05	9.402	< 0.001
总蛋白 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	66.42 ± 5.14	61.63 ± 6.15	64.58 ± 5.77	0.679	0.509
总胆红素 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	11.72 ± 4.54	14.59 ± 7.82	11.59 ± 4.78	0.454	0.636
直接胆红素 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	5.37 ± 1.64	4.38 ± 2.13	3.02 ± 1.49	0.782	0.459
间接胆红素 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	6.66 ± 3.16	10.20 ± 6.46	8.57 ± 4.20	0.000	1.000
谷草转氨酶 / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	52.45 ± 69.03	19.89 ± 6.54	20.02 ± 9.51	4.974	0.008
谷丙转氨酶 / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	18.25 ± 8.30	22.51 ± 11.02	21.71 ± 17.85	3.957	0.021
碱性磷酸酶 / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	117.32 ± 35.67	77.38 ± 24.35	97.73 ± 123.37	1.123	0.329
谷氨酸氨基转移酶 / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	28.15 ± 10.17	25.54 ± 13.06	46.15 ± 69.12	0.481	0.619
肌酸激酶 / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	106.5 ± 20.74	62.94 ± 36.18	63.11 ± 37.03	1.702	0.188
红细胞 / ($\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.69 ± 0.48	4.82 ± 0.84	4.34 ± 0.99	0.660	0.518
中性粒细胞 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	5.77 ± 1.31	4.24 ± 2.03	4.42 ± 2.03	8.107	< 0.001
白细胞 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	8.47 ± 1.09	7.05 ± 2.47	6.76 ± 2.76	7.670	0.010
血小板 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	269 ± 4.24	183.3 ± 48.76	204.61 ± 49.77	3.597	0.030
血红蛋白 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	137.4 ± 17.18	138.37 ± 21.1	127.55 ± 28.94	0.222	0.801
红细胞压积 / %	42.16 ± 4.87	43.39 ± 6.54	39.44 ± 8.72	0.390	0.678
血小板压积 / %	0.19 ± 0.04	0.19 ± 0.05	0.21 ± 0.05	2.897	0.058
糖化血红蛋白 / %	7.37 ± 1.10	5.78 ± 0.53	5.77 ± 0.92	2.930	0.058

表 5 三组患者合并疾病与 MPA 暴露量单因素分析结果比较 [n(%)]

Tab 5 Univariate analysis of co-morbidities and MPA exposure in the three patient groups [n(%)]

合并疾病	低暴露组 (n = 33)	目标暴露组 (n = 85)	高暴露组 (n = 48)	χ^2	P	
高血压	合并	26 (78.7)	79 (92.9)	43 (89.6)	4.938	0.085
	未合并	7 (21.2)	6 (7.05)	5 (10.4)		
糖尿病	合并	3 (9)	15 (17.6)	6 (12.5)	1.616	0.446
	未合并	30 (90.9)	70 (82.4)	42 (87.5)		
肝炎	合并	3 (9)	7 (8.2)	0 (0)	4.359	0.113
	未合并	30 (90.9)	78 (91.8)	48 (100)		
冠心病	合并	2 (6.06)	3 (3.5)	4 (8.3)	1.413	0.493
	未合并	31 (93.9)	82 (96.5)	44 (91.7)		

Logistic 回归分析结果显示, 以目标暴露组为参考时, 患者谷草转氨酶、中性粒细胞水平和 ARB 用药史是导致 MPA 低暴露量的因素 ($P < 0.05$); 患者的谷草转氨酶、中性粒细胞、白蛋白、白细胞水平和 ARB 用药史是导致 MPA 高暴露量的因素

($P < 0.05$)(见表 7)。

3 讨论

3.1 肾移植患者 MPA 暴露量影响因素研究的意义
中国血液净化病例信息登记系统的数据显示, 我国透析患者逐年增加^[25]。我国患者数量庞大, 器

表 6 三组患者联合用药与 MPA 暴露量单因素分析结果比较 [n(%)]

Tab 6 Univariate analysis of combined medication and MPA exposure in the three patient groups [n(%)]

药品种类		低暴露组 (n = 33)	目标暴露组 (n = 85)	高暴露组 (n = 48)	χ^2	P
百令胶囊	合用	9 (27)	26 (30.6)	15 (31.2)	0.165	0.921
	未合用	24 (72.7)	59 (69.4)	33 (68.7)		
五酯胶囊	合用	2 (6.06)	6 (7.05)	12 (0.25)	5.345	0.069
	未合用	31 (93.9)	79 (92.9)	36 (0.75)		
骨化三醇丸	合用	6 (18.1)	6 (7.05)	9 (18.75)	4.935	0.085
	未合用	27 (81.8)	79 (92.9)	39 (81.25)		
钙通道阻滞剂	合用	16 (48.5)	30 (35.2)	23 (47.9)	2.824	0.244
	未合用	17 (51.5)	55 (64.7)	25 (52.1)		
β 受体阻滞剂	合用	7 (21.2)	32 (37.6)	13 (27.1)	3.549	0.170
	未合用	26 (78.9)	53 (35.3)	35 (72.9)		
ARB	合用	5 (15.1)	25 (29.4)	3 (6.25)	10.910	0.004
	未合用	28 (84.5)	60 (70.6)	45 (93.8)		
α 1受体阻滞剂	合用	2 (6.0)	7 (82.3)	3 (6.25)	0.264	0.876
	未合用	31 (93.9)	78 (91.8)	45 (93.8)		
他汀类药物	合用	4 (12.1)	13 (15.3)	11 (22.9)	1.933	0.380
	未合用	29 (87.9)	72 (84.7)	37 (77.1)		
磺胺类抗菌药物	合用	5 (15.1)	12 (14.1)	12 (25)	2.673	0.263
	未合用	28 (84.8)	73 (85.9)	36 (75)		
更昔洛韦	合用	10 (30.3)	23 (27.6)	11 (22.9)	0.575	0.750
	未合用	23 (69.7)	62 (72.9)	37 (77.1)		
TAC	合用	25 (75.7)	76 (89.4)	43 (89.6)	4.327	0.115
	未合用	8 (24.2)	9 (10.59)	5 (10.4)		
CsA	合用	8 (24.2)	9 (10.59)	5 (10.4)	4.327	0.115
	未合用	25 (75.7)	76 (89.4)	43 (89.6)		
胰岛素	合用	4 (18.1)	8 (15.3)	4 (60.4)	0.332	0.847
	未合用	29 (81.8)	77 (84.7)	44 (39.6)		

表 7 MPA 暴露量影响因素的多元 Logistic 回归分析

Tab 7 Multiple Logistic regression analysis of factors influencing MPA exposure

组别		B	SE	P	OR	95%CI	
						下限	上限
低暴露组	白蛋白	- 0.013	0.008	0.080	0.987	0.972	1.002
	谷草转氨酶	0.016	0.002	< 0.001	1.016	1.012	1.020
	中性粒细胞	0.192	0.039	< 0.001	1.211	1.123	1.307
	白细胞	- 0.010	0.033	0.754	0.990	0.928	1.055
	联用 ARB	0.317	0.100	0.002	1.373	1.129	1.671
	未联用 ARB						
高暴露组	白蛋白	0.158	0.007	< 0.001	1.171	1.154	1.188
	谷草转氨酶	- 0.023	0.004	< 0.001	0.977	0.970	0.984
	中性粒细胞	0.249	0.037	< 0.001	1.283	1.193	1.380
	白细胞	- 0.263	0.031	< 0.001	0.769	0.724	0.817
	联用 ARB	- 0.605	0.077	< 0.001	0.546	0.470	0.635
	未联用 ARB						

注：以目标暴露组为参照组。

Note: Target-exposed group is used as the reference group.

官移植供给缺口巨大，肾移植患者的远期存活情况仍然不容乐观^[26-27]，移植后期受者的排斥反应和免疫抑制治疗仍是临床面临的重要问题。

MPA 是基础免疫抑制的重要组成部分，是肾移植受者的首选免疫抑制基础药物之一^[28]。尽管 MPA 在移植领域已有二十多年的应用历史，并得到了相关指南和专家共识的指引^[14, 29]，其应用也逐步趋向规范化，然而，治疗效果的达标率依然偏低。不容忽视的是，患者的人口统计学特征、生理与病理因素、合并用药情况、合并疾病以及治疗药物相

关的遗传多态性等因素，均对药物治疗效果产生了显著影响。在本研究中，选取了 166 例规律使用 MPA 联合 TAC 或 CsA 的成人肾移植患者作为研究对象。其中，MPA 暴露量达到目标水平的患者仅占 51.2%，而高暴露和低暴露的患者则占 48.8%。这一数据表明，即便患者按照规定的剂量规律用药，MPA 的暴露量也并未能达到理想的水平。

因此，有必要探讨 MPA 暴露量的影响因素，为临床个体化用药的实施提供参考。MPA 类药物药代动力学过程复杂、个体差异大和治疗窗较窄，暴

露量对于预防肾移植患者的不良反应至关重要^[30]。用药时可根据受者个体差异如体重或免疫风险确定起始剂量,结合临床表现或 MPA AUC 调整剂量以确保 MPA 达到目标暴露量。本研究在既往报道的基础上,进一步探讨了慢性并发症、用药史、民族、剂型和多种实验室指标对 MPA 暴露量的影响因素。结果显示,以目标暴露组为参考时,患者谷草转氨酶、中性粒细胞水平和 ARB 用药史是导致 MPA 低暴露量的因素;患者的谷草转氨酶、中性粒细胞、白蛋白、白细胞水平和 ARB 用药史是导致 MPA 高暴露量的因素。

3.2 MPA 暴露量影响因素及临床意义

结果显示,白蛋白浓度是导致 MPA 高暴露量的因素。在单因素分析中,白蛋白浓度在各暴露组之间存在显著差异,高暴露组患者的白蛋白浓度最高。提示服用 MPA 时需要密切监测患者白蛋白浓度。有研究表明,白蛋白浓度的变化会导致 MPA 暴露量发生临床相关的变化,即 MPA 暴露量随着白蛋白浓度的升高而升高^[31]。与参考文献结论一致^[32-35]。白蛋白可以通过与药物结合和影响 MPA 代谢物的生成和排泄的途径影响 MPA 的暴露量。因此,在临床实践中,应监测患者的白蛋白浓度,尤其关注高暴露量患者的白蛋白浓度,对于优化 MPA 药物治疗和减少不良反应具有重要意义。

多元 Logistic 回归分析结果显示谷草转氨酶是导致 MPA 高暴露量和低暴露量的关键因素。这一发现进一步强调了肝脏功能在 MPA 代谢过程中的核心作用。谷草转氨酶通常被用作评估肝脏炎症或损伤的生化指标,其活性的增加可能反映肝脏代谢能力的下降^[36]。在肾移植患者的治疗背景下,鉴于肝功能状态对 MPA 暴露量的显著影响,医师可能需要根据患者的肝功能情况,灵活调整 MPA 的用药剂量。这一措施旨在避免药物暴露量偏离理想范围,从而有效预防可能由药物浓度异常导致的不良反应。

此外,研究结果显示,中性粒细胞与白细胞是导致 MPA 高暴露量的因素。这一发现凸显了血液成分在 MPA 药代动力学中的潜在重要性。中性粒细胞与白细胞,作为免疫系统的核心组成部分,其水平的变化或可反映患者的免疫状况及炎症程度,进而可能间接调控 MPA 的代谢与清除速率。具体而言,当免疫系统活性升高时,可能会促进 MPA 的代谢过程;相反,在免疫抑制状态下,MPA 的代谢可能受到抑制^[37],从而导致 MPA 暴露量升高。因此,在肾移植患者的治疗过程中,应密切关注这些血液参数的变化,以便适时调整 MPA 的剂量,旨在确保药物疗效的同时,降低可能产生的毒副作用风险。

成人肾移植患者常面临高血压、糖尿病、冠心

病、肝炎等慢性并发症的困扰,因此需长期服用多种药物进行综合治疗。本研究发现合并多种慢性病并未对 MPA 的暴露量产生显著影响。然而,值得注意的是,联合使用 ARB 类药物与 MPA 低暴露量和高暴露量之间却存在着显著的关联性。ARB 类药物在肾移植患者高血压管理中扮演着重要角色,但这类药物可能通过多种机制对 MPA 的药代动力学产生影响。这一发现对医师在选择适合肾移植患者的抗高血压药物时提出了新要求,即必须充分考虑这些药物对 MPA 暴露量的潜在影响,以便制订更为科学合理的治疗方案。

3.3 研究局限性与未来方向

本研究仍存在一些局限性,具体体现在以下两个方面:①由于现实条件的限制,未能对患者进行药物代谢相关的基因多态性检测,这导致无法全面评估基因多态性对 MPA 暴露量的潜在影响。②除了已考察的因素外,MPA 的暴露量还受到饮食、环境等多种复杂因素的制约。本研究未能将这些因素纳入考察范围。因此,为了更深入地理解 MPA 的代谢过程及其影响因素,未来需要纳入更多相关因素,并扩大样本量进行进一步研究。

综上所述,对于定期使用 MPA 的成人肾移植患者而言,谷草转氨酶水平、中性粒细胞数量以及 ARB 的用药史是导致 MPA 低暴露量的重要因素;同时,患者的谷草转氨酶水平、中性粒细胞数量、白蛋白含量、白细胞数量以及 ARB 的用药史也是导致 MPA 高暴露量的关键因素。通过精确调控这些影响因素,能够更有效地管理肾移植患者的 MPA 治疗,从而增强治疗效果,降低不良反应的发生率,并最终改善患者的预后状况。这一发现为临床上 MPA 的合理应用提供了新颖的视角,为药物监测及个体化用药策略的制订提供了科学的参考,可提高肾移植患者治疗的安全性和有效性。

参考文献

- [1] Wang LM, Xu X, Zhang M, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: results from the sixth China chronic disease and risk factor surveillance [J]. *JAMA Intern Med*, 2023, 183 (4): 298-310.
- [2] 马晓杰,姚波暖,游咏,等.肾移植围手术期康复治疗研究进展[J].*器官移植*, 2023, 14 (3): 466-472.
- [3] Hakamaki M, Jarvisalo MJ, Lankinen R, et al. Evolution of quality of life in chronic kidney disease stage 4-5 patients transitioning to dialysis and transplantation [J]. *Nephron*, 2022, 146 (5): 439-448.
- [4] Yang CL, Sheng CC, Liao GY, et al. Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and transporters have no impact on mycophenolic acid pharmacokinetics in adult kidney transplant patients co-treated with tacrolimus: a population analysis [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2021, 46 (6): 1564-1575.

- [5] Hart A, Smith JM, Skeans MA, et al. OPTN/SRTR 2017 annual data report: kidney [J]. *Am J Transplant*, 2019, 19 (Suppl 2): 19-123.
- [6] 孙慕斌. 研究免疫抑制剂的基因多态性在指导肾移植患者个体化治疗中的价值 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [7] 柏智能. 肾移植患者霉酚酸酯群体药动学研究及其临床应用 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2016.
- [8] Li J, Liu YF, Huang JW, et al. Evaluation of mycophenolic acid exposure using a limited sampling strategy in renal transplant recipients [J]. *Am J Nephrol*, 2013, 37 (6): 534-540.
- [9] 郭苗, 王源园, 张宏文, 等. 肾移植患者霉酚酸暴露量的影响因素分析及其对血液系统不良反应的预测价值 [J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43 (21): 2419-2423.
- [10] Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2007, 46 (1): 13-58.
- [11] Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, et al. Personalized therapy for mycophenolate: consensus report by the international association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology [J]. *Ther Drug Monit*, 2021, 43 (2): 150-200.
- [12] Kuypers D R, Le Meur Y, Cantarovich M, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010, 5 (2): 341-358.
- [13] Saint-Marcoux F, Vandierdonck S, Premaud A, et al. Large scale analysis of routine dose adjustments of mycophenolate mofetil based on global exposure in renal transplant patients [J]. *Ther Drug Monit*, 2011, 33 (3): 285-294.
- [14] 陈刚, 陈志东, 蒋文涛, 等. 中国肝、肾移植受者霉酚酸类药物应用专家共识 (2023 版) [J]. *上海医药*, 2023, 44 (19): 3-19.
- [15] Chaabane A, Aouam K, Ben FN, et al. Limited sampling strategy of mycophenolic acid in adult kidney transplant recipients: influence of the post-transplant period and the pharmacokinetic profile [J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 53 (9): 925-933.
- [16] 钟建勋. 肾移植受者 UGT1A9、UGT1A8、UGT2B7、ABCC2、ABCG2 和 SLCO1B3 基因多态性与霉酚酸酯所致不良反应的相关性研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [17] 师天明. 中国肾移植受者米芙治疗药物监测 [D]. 上海: 上海交通大学外科学 (泌尿外科), 2016.
- [18] 郭苗, 王丽彬, 魏继福, 等. 不同霉酚酸的药代动力学差异及其暴露水平的影响因素研究 [A]// 2016 年江苏省药学会暨第十六届江苏省药师周论文集 [C]. 徐州: 2016.
- [19] Rexiti K, Jiang XH, Kong Y, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid and dose optimisation in adult Chinese kidney transplant recipients [J]. *Xenobiotica*, 2023, 53 (10-11): 603-612.
- [20] Shum B, Duffull SB, Taylor PJ, et al. Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2003, 56 (2): 188-197.
- [21] Zhang J, Sun Z, Zhu ZF, et al. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil and development of limited sampling strategy in early kidney transplant recipients [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 908.
- [22] Zhou PJ, Xu D, Yu ZC, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid and estimation of exposure using multiple linear regression equations in Chinese renal allograft recipients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2007, 46 (5): 389-401.
- [23] Wang PL, Xie HC, Zhang QW, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant patients: a comparison of the early and stable posttransplant stages [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 859351.
- [24] David-Neto E, Pereira LM, Kakehashi E, et al. The need of mycophenolic acid monitoring in long-term renal transplants [J]. *Clin Transplant*, 2005, 19 (1): 19-25.
- [25] 林涛. 我国活体肾移植的现状与思考 [J]. *中华器官移植杂志*, 2020, 41 (10): 577-578.
- [26] 赖彦华, 杨建荣. 我国器官捐献现状及展望 [J]. *中国临床新医学*, 2019, 12 (10): 1045-1048.
- [27] 方丽纳, 张博, 平丽英, 等. 霉酚酸酯的临床应用进展 [J]. *发酵科技通讯*, 2021, 50 (1): 14-19.
- [28] van Gelder T. How cyclosporine reduces mycophenolic acid exposure by 40% while other calcineurin inhibitors do not [J]. *Kidney Int*, 2021, 100 (6): 1185-1189.
- [29] 中国肾移植受者免疫抑制治疗指南 (2016 版) [J]. *器官移植*, 2016, 7 (5): 327-331.
- [30] Li PM, Shuker N, Hesselink DA, et al. Do Asian renal transplant patients need another mycophenolate mofetil dose compared with Caucasian or African American patients? [J]. *Transplant Int*, 2014, 27 (10): 994-1004.
- [31] de Winter BC, Mathot RA, Sombogaard F, et al. Nonlinear relationship between mycophenolate mofetil dose and mycophenolic acid exposure: implications for therapeutic drug monitoring [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011, 6 (3): 656-663.
- [32] Staatz CE, Tett SE. Pharmacology and toxicology of mycophenolate in organ transplant recipients: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88 (7): 1351-1389.
- [33] 许琼, 任斌, 王长希, 等. 肾移植术后早期霉酚酸群体药代动力学研究 [A]// 2008 第十一次全国临床药理学学术大会论文集 [C]. 中国药理学会临床药理专业委员会, 中国药理学学会, 2008.
- [34] van Hest RM, van Gelder T, Bouw R, et al. Time-dependent clearance of mycophenolic acid in renal transplant recipients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 63 (6): 741-752.
- [35] Sheng CC, Zhao Q, Niu WJ, et al. Effect of protein binding on exposure of unbound and total mycophenolic acid: a population pharmacokinetic analysis in chinese adult kidney transplant recipients [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 340.
- [36] 伍彩霞. 生化检验指标对病毒性肝炎的诊断价值分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2024, 18 (6): 71-74.
- [37] Rong Y, Patel V, Kiang TKL. Recent lessons learned from population pharmacokinetic studies of mycophenolic acid: physiological, genomic, and drug interactions leading to the prediction of drug effects [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2021, 17 (12): 1369-1406.

(收稿日期: 2024-11-05; 修回日期: 2024-12-08)

口服中成药联合常规西药治疗高血压头痛的网状 Meta 分析

刘可欣¹, 彭涛¹, 李凯¹, 刘韵琳¹, 冯银¹, 刘学¹, 赵晓平², 范小璇^{1, 2*} (1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要: **目的** 运用网状 Meta 分析方法探索不同中成药联合常规西药在治疗高血压头痛方面的疗效与安全性。**方法** 系统检索中国知网 (CNKI)、中国生物医学文献服务系统 (SinoMed)、维普 (VIP)、万方 (WanFang Data)、PubMed、EMbase、The Cochrane Library、Web of Science 等数据库, 收集自建库至 2024 年 9 月期间关于中成药治疗高血压头痛的随机对照试验 (RCT) 相关文献。采用 Stata 16 软件进行文献的质量评估及网状 Meta 分析。**结果** 纳入 22 项 RCTs, 总样本量 2022 例, 包括 4 种中成药 (养血清脑颗粒、丹珍头痛胶囊、川芎清脑颗粒、麝香保心丸)。网状 Meta 分析的结果显示, 与单纯常规西药治疗相比, 采用中成药联合常规西药疗法在治疗高血压头痛的疗效更佳, 安全性更高。在临床症状有效率方面, 累计概率排名曲线下面积 (SUCRA) 位列首位的干预措施是麝香保心丸联合常规西药; 在降低收缩压、舒张压方面, SUCRA 位列首位的干预措施均是丹珍头痛胶囊联合常规西药。**结论** 当前证据表明, 口服中成药治疗高血压病头痛在改善头痛症状和调节血压方面具有明显优势, 其中麝香保心丸、丹珍头痛胶囊等与常规西药联用可能是较有效的中西医结合方案。但因纳入文献的数量较少、质量不高, 因此有待未来能有更多高质量的研究对此进行验证和深入研究。

关键词: 中成药; 高血压头痛; 随机对照试验; 网状 Meta 分析

中图分类号: R259

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0819-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.036

Network meta-analysis of oral Chinese patent medicine combined with conventional Western medicine for hypertensive headache

LIU Ke-xin¹, PENG Tao¹, LI Kai¹, LIU Yun-lin¹, FENG Yin¹, LIU Xue¹, ZHAO Xiao-ping², FAN Xiao-xuan^{1, 2*} (1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712000)

Abstract: Objective To determine the clinical efficacy and safety of Chinese patent medicine combined with conventional Western medicine for hypertensive headache by network meta-analysis. **Methods** We searched CNKI, SinoMed, VIP, WanFang Data, PubMed, EMbase, The Cochrane Library, Web of Science and other databases, and collected literatures on randomized controlled trials (RCTs) of traditional Chinese patent medicine and simple preparations for hypertensive headache from the establishment of the database to September 2024. Review Manager 5.4 and Stata 16 software were used for literature quality evaluation and network meta-analysis. **Results** Twenty-two RCTs were included, involving 2022 patients, and four proprietary Chinese medicines (Yangxue Qingnao granules, Danzhen Toutong capsules, Chuanxiong Qingnao granules, and Shexiang Baoxin pills). The meta-analysis showed that compared with conventional western medicine alone, combination of Chinese patent medicine with Western medicine showed better efficacy and safety. The intervention measure with the highest cumulative area under the probability ranking curve (SUCRA) was combination of Shexiang Baoxin pills and conventional Western medicine. The top intervention measure of SUCRA in reducing systolic and diastolic blood pressure was

基金项目: 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (No. 国中医药人教函〔2023〕85 号); 中医药“双链融合”中青年科研创新团队 (No.2022-SLRH-LJ-015); 陕西省重点研发计划项目 (No.2019ZDLSF04-06-01); 陕西省首批省级院士专家工作站 (陕组通字〔2019〕49 号); 陕西省临床医学研究中心 (陕科社发〔2017〕176 号)。

作者简介: 刘可欣, 女, 硕士研究生, 主要从事高血压性脑血管病的中西医防治研究, email: liukexin_1998@163.com *通信作者: 范小璇, 男, 教授, 主任医师, 主要从事颅脑损伤、脑血管病及神经系统肿瘤的中西医结合临床研究, email: szfyfx@163.com

combination of Danzhen Toutong capsules and conventional Western medicine. **Conclusion** Oral Chinese patent medicine has advantages in improving headache symptoms and regulating blood pressure for patients with hypertensive headache. Combination of Shexiang Baoxin pills and Danzhen Toutong capsules with conventional Western medicine may be effective combination with Western medicine. Due to few literatures and low quality, more high-quality studies are expected to verify the results.

Key words: Chinese patent medicine; hypertensive headache; randomized controlled trial; network meta-analysis

高血压是最常见的慢性疾病之一，高血压头痛^[1]是高血压病常见的临床并发症，大约 80% 的高血压患者都会出现一定程度的头痛^[2-3]。相关研究表明，高血压是阵发性偏头痛向慢性头痛转化的关键因素之一，并且会提升头痛患者的脑血管及心血管事件风险的概率^[4]。随着现代社会生活模式的变迁和人口老龄化，高血压及其并发症已成为全球性的公共卫生挑战^[5]。中成药作为中医药现代化的产物，具有疗效确切、使用方便、便于长期服用等优点，已成为高血压头痛治疗的选择之一^[3]。研究显示，相较于单独使用西药，结合口服中成药的治疗方案在缓解临床症状方面具有显著优势^[6-7]。目前，关于中成药应用于临床改善高血压头痛的研究主要集中于养血清脑颗粒（YXQN）、丹珍头痛胶囊（DZTT）、川芎清脑颗粒（CXQN）、麝香保心丸（SXBX）等几种中成药。本研究遵循科学、严谨的原则，系统性检索和筛选文献，基于网状 Meta 分析评价养血清脑颗粒、丹珍头痛胶囊、川芎清脑颗粒、麝香保心丸治疗高血压头痛的疗效与安全性，以期为高血压头痛治疗决策提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 纳入标准

1.1.1 研究类型 随机对照试验（RCT）。

1.1.2 研究对象 临床诊断为高血压头痛的患者^[8-9]。

1.1.3 干预措施 对照组接受常规降压药物治疗，可联合使用安慰剂，治疗过程遵循相关用药指南；试验组在常规降压药物基础上加用口服中成药。

1.1.4 结局指标 主要指标：治疗有效（痊愈、显效、有效）和无效（无效、恶化）的患者人数。次要指标：收缩压、舒张压水平。安全性指标：药物引发的不良反应及事件。

1.2 排除标准

头痛非高血压疾病引起，或耳源性头痛等；学位论文、会议论文、综述、Meta 分析、动物实验研究、经验报道及学术论著等文献；纳入患者为儿童与妊娠女性等特殊人群的文献；未采用完

全随机对照设计试验，或组间基线数据存在显著不平衡的文献；结局指标与本研究设计不一致的文献；数据不完整、错误、重复或无法获得原始数据的文献；干预措施为非药物治疗、穴位贴敷、中药注射液、多种中成药共同应用，以及未采用中成药的文献；试验组样本量低于 30 例的文献，以及关于某种中成药文献数量小于 2 篇的文献。

1.3 检索策略

遵循 Cochrane 系统评价手册的指导原则，由两名专业研究者共同制订检索策略，检索中国知网（CNKI）、中国生物医学文献服务系统（SinoMed）、维普（VIP）、万方（WanFang Data）、PubMed、EMbase、The Cochrane Library 以及 Web of Science 等数据库建库起至 2024 年 9 月的相关文献。中文检索词包括：① 高血压头痛；② “中成药”“颗粒”“中药”“胶囊”“片”“散”“丸”“口服液”“丹”“合剂”“中药”“膏”“冲剂”“中医药”及相关同义词。英文检索词包括：① “Hypertensive headache”；② “Chinese patent medicine”“formula”“tablet”“powder”“pill”“granules”“capsules”“oral”“traditional Chinese medicine”“proprietary Chinese medicine”“Chinese patent medicine”“traditional Chinese medicine”“herbal medicine”及相关同义词。

1.4 文献筛选与信息提取

两名研究人员独立审阅文献的标题和摘要部分。根据预先设定的纳入与排除标准筛选出与研究主题紧密相关的文献，剔除不相关内容。通过阅读全文，确定纳入本研究范围的文献。采用 Excel 进行数据管理，提取文献发表详情（标题、第一作者姓名、期刊名称及发表年份），受试者基本特征（诊断标准、样本规模、性别分布、年龄范围、病程时长等），具体干预措施（药物名称、治疗周期等），各结局指标在治疗前后数值，以及潜在偏倚风险因素等。文献筛选与信息提取工作完成后，研究人员进行交叉核对验证，意见不一致时，则邀请第三方专家进行协助判断，以确保研究严谨性和可靠性。

1.5 质量评价

按照 Cochrane 偏倚风险评估工具^[10]对纳入

文献进行质量评估, 评估内容涵盖: ① 随机序列的生成方法; ② 分配隐藏的实施状况; ③ 对患者与试验人员实施盲法情况; ④ 对结局评估者实施盲法情况; ⑤ 结局数据完整性; ⑥ 报告选择性; ⑦ 其他潜在偏倚因素。均以“低风险”“高风险”“未知”进行评价。

1.6 统计分析

本研究执行网状 Meta 分析, 利用 Stata 16 软件进行统计分析。对于所有结局指标, 采用随机效应模型以确保分析稳健性。连续型变量用标准化均数差作为统计量; 二分类变量用比值比。采用 Stata 16 软件生成网状图, 展示各干预措施之间的比较关系。运用累计概率排名曲线下面积 (surface under the cumulative ranking curve, SUCRA) 对各项干预措施中的结局指标概率进行排序。最后绘制比较 - 校正漏斗图, 评估可能存在的发表偏倚。

2 结果

2.1 文献检索与筛选结果

初步检索获得文献 330 篇 (中文 262 篇, 英文 68 篇), 最终确定符合条件的 4 种中成药及相关的 22 项 RCTs^[11-32]。文献筛选流程图见图 1。

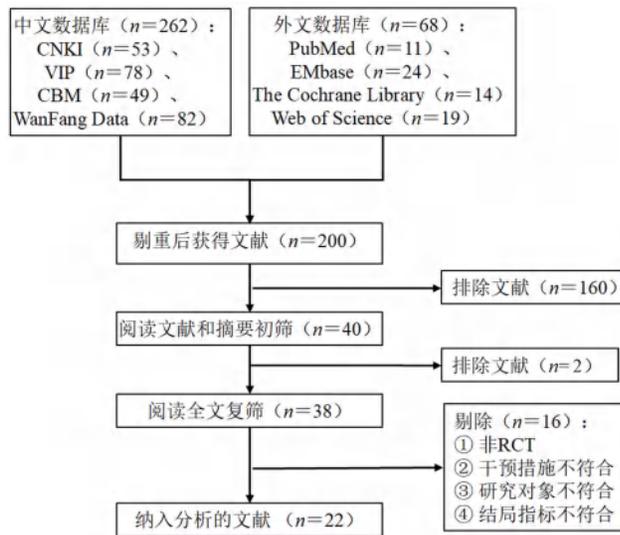


图 1 文献筛选流程

Fig 1 Literature screening process

2.2 文献基本特征

纳入 22 项 RCTs, 共 2022 例患者 (试验组 1018 例、对照组 1004 例)。共纳入 4 种中成药: 养血清脑颗粒、丹珍头痛胶囊、川芎清脑颗粒、麝香保心丸。所有纳入的文献, 试验组均采用口服中成药与常规西药联合方案, 对照组仅接受常规西药治疗。纳入文献基本特征见表 1。

2.3 偏倚风险评估

在随机序列生成方面, 13 篇文献^[11-19, 23-24, 29, 31]为

低风险; 1 篇文献^[22]为高风险; 8 篇文献^[20-21, 25-28, 30, 32]未提及任何关于分组方法, 风险等级为未知。

在盲法实施方面, 5 篇文献^[12, 14-16, 31]明确采用双盲法; 3 篇文献^[21, 27-28]使用单盲法, 被认为低风险; 剩余文献中并未提及盲法使用, 风险等级为未知。所有文献均未提及分配隐藏及对结局评估者实施盲法, 风险等级为未知。

在结局数据完整性方面, 2 项研究^[17, 19]存在病例脱落, 为高风险; 其他研究为低风险。

3 篇文献^[13-14, 26]存在选择性报告研究结果, 为高风险; 其他研究为低风险。具体评估结果见图 2。

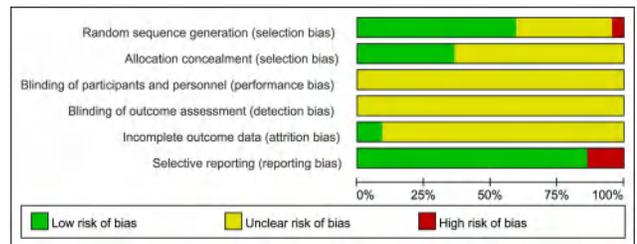


图 2 纳入 RCTs 的偏倚风险评价结果

Fig 2 Bias risk assessment for the included RCTs

2.4 临床症状有效率

2.4.1 证据网络 22 篇 RCTs 报告了临床症状有效率数据, 包括 5 种干预措施: 养血清脑颗粒联合常规西药、丹珍头痛胶囊联合常规西药、川芎清脑颗粒联合常规西药、麝香保心丸联合常规西药、单独使用常规西药。鉴于各干预措施之间并未构成闭合回路, 因此无需执行不一致性检验。证据网络结构见图 3A。

2.4.2 网状 Meta 分析 与单用常规西药治疗相比, 养血清脑颗粒联合常规西药、麝香保心丸联合常规西药可提高临床症状有效率 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.4.3 SUCRA 排序 SUCRA 排名为麝香保心丸联合常规西药 (SUCRA = 94.0%)、养血清脑颗粒联合常规西药 (SUCRA = 61.5%)、丹珍头痛胶囊联合常规西药 (SUCRA = 49.6%)、川芎清脑颗粒联合常规西药 (SUCRA = 44.8%)、单独使用常规西药 (SUCRA = 0.1%), 提示在提高临床症状有效率上, 麝香保心丸联合常规西药成为最优干预措施的可能性最大 (见图 4)。

2.5 收缩压

2.5.1 证据网络 10 篇 RCTs 报道了收缩压水平, 包括 4 种干预措施: 养血清脑颗粒联合常规西药、丹珍头痛胶囊联合常规西药、川芎清脑颗粒联合常规西药、单独使用常规西药。统计显示, 丹珍头痛胶囊联合常规西药对照单独使用常规西药的研究最多, 共计 3 篇 (见图 3B)。

表 1 纳入文献的基本特征

Tab 1 Basic features of the included studies

研究者	样本量 / 例		男 / 女 / 例		年龄 / 岁		疗程	试验组干预措施	结局指标
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组			
曹明芳 2024 ^[11]	42	42	21/21	22/20	57.99±3.06	58.69±3.05	2 年	YXQN + CWM	①②③④
李弘 2015 ^[12]	40	38	22/18	21/17	55.2±11.3	54.8±10.9	6 周	YXQN + CWM	①④
陈秀丽 2014 ^[13]	35	36	15/20	19/17	54.8±10.5	56.3±9.6	10 d	YXQN + CWM	①
艾长明 2012 ^[14]	52	50	25/27	25/25	54.9±10.8	56.6±9.7	6 周	YXQN + CWM	①
陈红梅 2007 ^[15]	50	50	23/27	25/25	54.9±10.8	56.6±9.7	6 周	YXQN + CWM	①④
袁志奇 2006 ^[16]	51	52	33/18	32/30	62.75±9.37	64.17±8.87	2 周	YXQN + CWM	①④
林婵 2004 ^[17]	50	50	20/30	19/31	52.8±9.2	50.3±10.6	15 d	YXQN + CWM	①
云嶷 2004 ^[18]	42	42	19/26	15/27	55.6±9.4	56.5±7.1	15 d	YXQN + CWM	①②③④
詹莹 2003 ^[19]	36	36	13/23	13/23	57.2±2.1	54.3±3.0	15 d	YXQN + CWM	①④
范织珍 2003 ^[20]	50	50	18/32	20/30	65	—	15 d	YXQN + CWM	①④
倪晓俊 2021 ^[32]	61	60	24/37	23/37	52.64±2.31	52.57±2.42	28 d	DZTT + CWM	①
陈涛 2019 ^[21]	44	44	27/17	24/20	56.54±5.37	55.34±5.48	1 月	DZTT + CWM	①②③
曲绍霞 2019 ^[22]	47	45	21/26	22/23	50.21±2.21	47.41±3.67	4 周	DZTT + CWM	①
贾晓伟 2019 ^[23]	58	58	30/28	28/30	51.7±3.5	51.5±3.7	4 周	DZTT + CWM	①②③
徐金美 2018 ^[24]	40	40	—	—	57.93±4.72	58.12±4.36	2 月	DZTT + CWM	①②③
呼庆华 2018 ^[25]	43	43	24/19	23/20	51.1±2.3	52.5±2.5	2 周	DZTT + CWM	①
赵忠良 2017 ^[26]	50	50	—	—	—	—	30 d	DZTT + CWM	①
吴颖 2015 ^[27]	38	30	—	—	45 ~ 60	—	2 周	DZTT + CWM	①
荣世舫 2016 ^[28]	60	60	37/23	39/21	46.11±12.36	46.41±12.41	30 d	CXQN + CWM	①②③
张鸿 2014 ^[29]	60	60	—	—	—	—	30 d	CXQN + CWM	①②③
徐振兴 2015 ^[30]	31	31	—	—	56.2±2.7	—	15 d	SXBX + CWM	①④
王元伟 2009 ^[31]	38	37	21/17	20/17	57.45±2.31	59.41±3.13	14 d	SXBX + CWM	①④

注 (Note): CWM. 常规西药 (conventional Western medicine); ① 临床症状有效率 (clinical symptom effectiveness); ② 收缩压 (systolic blood pressure); ③ 舒张压 (diastolic blood pressure); ④ 不良反应 (adverse reactions); —. 无数据 (no data)。

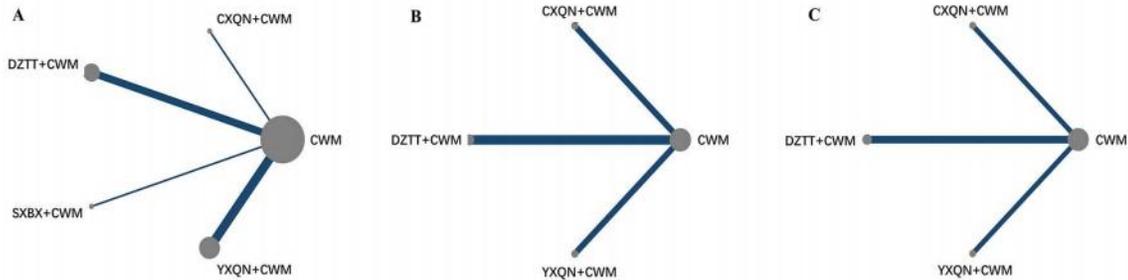


图 3 临床症状治疗有效率 (A)、收缩压 (B)、舒张压 (C) 证据网络图

Fig 3 Evidence network of clinical symptoms effectiveness (A), systolic blood pressure (B) and diastolic blood pressure (C)

表 2 临床症状有效率的网状 Meta 分析

Tab 2 Network meta-analysis of clinical symptom effectiveness

干预措施	OR[95%CI]				
	SXBX + CWM	YXQN + CWM	DZTT + CWM	CXQN + CWM	CWM
SXBX + CWM	1				
YXQN + CWM	1.21 (- 0.61, 3.03)	1			
DZTT + CWM	1.39 (- 0.43, 3.22)	0.19 (- 0.66, 1.03)	1		
CXQN + CWM	1.53 (- 0.50, 3.56)	0.32 (- 0.92, 1.56)	0.13 (- 1.11, 1.37)	1	
CWM	2.99 (1.27, 4.70)*	1.78 (1.17, 2.38)*	1.59 (0.99, 2.20)	1.46 (0.38, 2.54)	1

注 (Note): *P < 0.05。

2.5.2 网状 Meta 分析 与单独使用常规西药相比, 丹珍头痛胶囊联合常规西药收缩压下降水平更多 (P < 0.05), 见表 3。

2.5.3 SUCRA 排序 SUCRA 排名为丹珍头痛胶囊联合常规西药 (SUCRA = 88.1%)、养血清脑颗粒联合常规西药 (SUCRA = 60.8%)、单独使用常

规西药 (SUCRA = 26.3%)、川芎清脑颗粒丸联合常规西药 (SUCRA = 24.7%), 提示在降低收缩压上, 丹珍头痛胶囊联合常规西药成为最优干预措施的可能性最大 (见图 5)。

2.6 舒张压

2.6.1 证据网络 10 篇 RCTs 报道了收缩压水平,

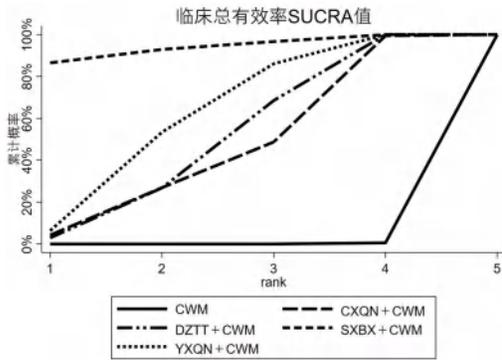


图 4 临床总有效率的 SUCRA 排序
Fig 4 SUCRA ranking of clinical effectiveness

包括 4 种干预措施：养血清脑颗粒联合常规西药、丹珍头痛胶囊联合常规西药、川芎清脑颗粒联合常规西药、常规西药。丹珍头痛胶囊联合常规西药对照常规西药的研究最多，共计 3 篇（见图 3C）。

2.6.2 网状 Meta 分析 与单用常规西药，丹珍头痛胶囊联合常规西药舒张压下降水平更多 ($P < 0.05$)，丹珍头痛胶囊联合常规西药优于川芎清脑颗粒联合常规西药 ($P < 0.05$)，见表 4。

2.6.3 SUCRA 排序 SUCRA 排名为丹珍头痛胶囊联合常规西药 (SUCRA = 96.2%)、养血清脑颗粒联合常规西药 (SUCRA = 65.1%)、川芎清

表 3 收缩压的网状 Meta 分析

Tab 3 Network meta-analysis of systolic blood pressure

干预措施	MD[95%CI]			
	YXQN + CWM	DZTT + CWM	CXQN + CWM	CWM
YXQN + CWM	0			
DZTT + CWM	- 4.59 (- 18.61, 9.43)	0		
CXQN + CWM	- 5.58 (- 20.73, 9.57)	- 10.17 (- 23.83, 3.49)	0	
CWM	- 4.57 (- 15.52, 6.37)	- 9.16 (- 17.93, - 0.40)*	- 1.01 (- 11.48, 9.47)	0

注 (Note) : * $P < 0.05$ 。

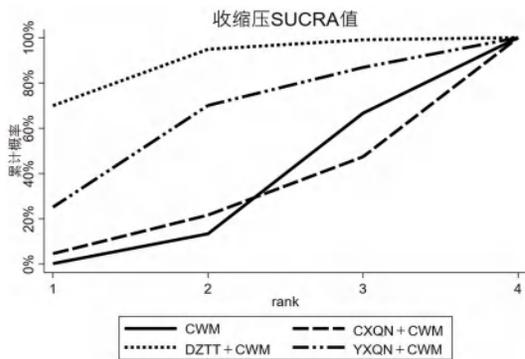


图 5 收缩压的 SUCRA 排序
Fig 5 SUCRA rank of systolic blood pressure

脑颗粒联合常规西药 (SUCRA = 22.6%)、单独使用常规西药 (SUCRA = 16.1%)，在降低舒张压上，丹珍头痛胶囊联合常规西药成为最优干预措施的可能性最大 (见图 6)。

2.7 安全性评价

在纳入的文献中，有 9 项研究报告了不良反应情况，涉及 2 种干预措施，试验组 380 例，对照组 378 例，丹珍头痛胶囊和川芎清脑颗粒未报告不良反应。考虑到不同研究对于不良反应的界定标准存在差异，因此仅对这些数据进行描述性统计分析。试验组报道了 2 例消化道症状^[15]、5

表 4 舒张压的网状 Meta 分析

Ta 4 Network meta-analysis of diastolic blood pressure

干预措施	MD[95%CI]			
	YXQN + CWM	DZTT + CWM	CXQN + CWM	CWM
YXQN + CWM	0			
DZTT + CWM	- 2.62 (- 6.77, 1.54)	0		
CXQN + CWM	- 2.76 (- 7.31, 1.79)	- 5.38 (- 9.15, - 1.61)*	0	
CWM	- 3.00 (- 6.45, 0.45)	- 5.62 (- 7.94, - 3.30)*	- 0.24 (- 3.21, 2.73)	0

注 (Note) : * $P < 0.05$ 。

例轻微消化道症状^[12, 18, 20]、1 例食欲下降^[11]、1 例腹泻^[11]、1 例轻度腹胀^[19]、2 例轻度腹痛^[30-31]、3 例口唇舌麻木感^[30]；对照组报道了 3 例食欲下降^[11]，3 例腹泻^[11]，2 例恶心呕吐^[11]，4 例轻度恶心^[30-31]，3 例阵发性头痛、头晕^[16]，4 例轻度疲乏、瞌睡^[30-31]。14 项研究的试验组未报告任何严重不良反应，提示口服中成药安全性较好。

2.8 发表偏倚

比较 - 校正漏斗图显示所纳入文献数据大致呈现对称分布，集中于倒漏斗图的中上部区域，并紧密围绕中线两侧展开，表明本研究受发表偏倚影响可能性较小。少数文献位于倒漏斗的底部，可能归因于样本量较少 (见图 7)。

3 讨论

中医治疗高血压头痛病常从平抑肝阳、滋养肝血、活血化瘀论治。临床实践中，广泛运用的

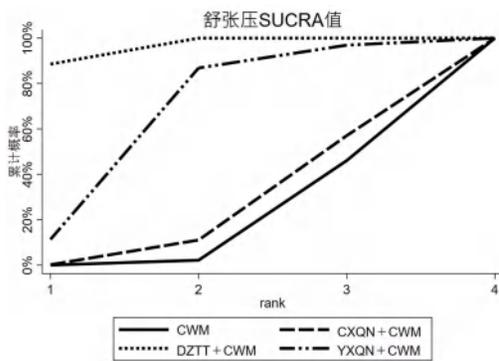


图 6 舒张压的 SUCRA 排序

Fig 6 SUCRA sequencing of diastolic blood pressure

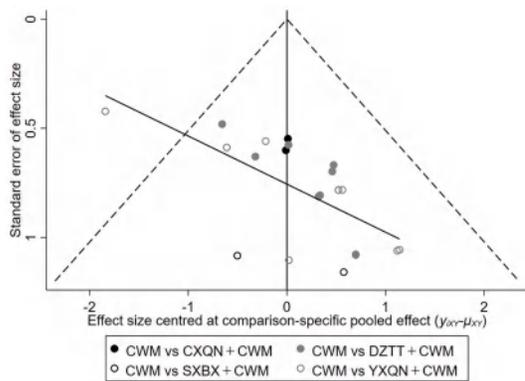


图 7 临床症状有效率的比较 - 校正漏斗图

Fig 7 Funnel plot of comparison-correction for of clinical symptom effectiveness

中成药便是基于这一理论化裁形成。目前临床上常用的有养血清脑颗粒、丹珍头痛胶囊颗粒、川芎清脑颗粒、麝香保心丸等。

麝香保心丸具有温通开窍、益气化痰等功能，且研究表明临床运用麝香保心丸治疗偏头痛疗效明显^[33]。研究表明麝香保心丸其可能具有促进微循环、抑制血小板聚集、增加血流量、扩张血管以及行气止痛等功效^[34]。此外苏合香脂、冰片以及麝香等药开窍、醒神作用强力迅猛，也适用于急性缓解头痛的治疗。丹珍头痛胶囊由八珍汤合丹参加减而成，其平肝熄风作用效佳^[23]，临床用于高血压治疗具有良好效果。相关研究也表明丹珍头痛胶囊对肝阳上亢型偏头痛有一定的治疗作用，具体机制涉及调节一氧化氮 (NO)、5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE)、一氧化氮合酶 (NOS) 等神经递质及血管活性物质的释放等^[35-37]。现代药理研究表明，养血清脑颗粒中川芎、当归、白芍等中药具有较强的镇痛、镇静以及改善血液循环的作用^[38]，具体机制可能涉及调控 TNF 信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路等，通过抗炎作用发挥治疗高血压的作用^[39]。川芎清脑颗粒中当归、白芷等能显著扩张血管和降低血压^[40]，研究显示川芎清脑颗粒可显

著降低白细胞介素 -6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)、白细胞介素 -1 β (IL-1 β)、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 等蛋白表达水平，调节血管活性物质水平，从而改善高血压头痛及其他类型的头痛^[41-44]。

网状 Meta 分析结果显示，与单独使用常规西药治疗相比，采用中成药联合常规西药治疗高血压头痛的疗效更佳，安全性更高。在症状有效率方面，SUCRA 位列首位的干预措施是麝香保心丸联合常规西药；在降低收缩压、舒张压方面，SUCRA 位列首位的干预措施是丹珍头痛胶囊联合常规西药。此外，在安全性评估中发现口服中成药 + 常规西药所导致的不良反应 / 事件总体上低于单独使用常规西药。

本研究也具有一定的局限性：① 多数文献质量不高，其中 8 篇 RCTs 未详细说明随机分配方式，并且所有入选文献均未提及分配隐藏情况及对结果评估者采用盲法的情况，这可能隐含小样本效应及发表偏倚的风险，进而可能削弱检验效力；② 研究涵盖的中成药种类相对有限，且部分中成药相关文献数量稀少，导致不同干预手段之间的对比均基于间接比较，影响了结果的精确度和可信度；③ 文献中治疗周期呈现出较大的一致性，范围从 15 d 至 2 年不等；④ 在结局指标方面，临床症状有效率容易受到患者主观感受的影响，并且缺乏针对长期预后效果的评估。

综上，本研究通过网状 Meta 分析为中成药治疗高血压头痛提供了循证医学证据。然而，鉴于所纳入文献的整体质量不高，加之部分中成药的相关文献数量较为有限，以及不同中成药之间直接对比的研究较为匮乏，故而本研究结果存在一定的局限性。本研究结论仅依据当前所纳入文献的数据分析得出，并不能全面且准确地反映各中成药在临床疗效上的优劣状况，因此在推荐药物时仍需保持审慎态度，谨慎参考。同时也建议未来的研究应采用多中心、大样本的 RCT，以提高证据的质量和可靠性。

参考文献

- [1] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 247.
- [2] Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, et al. Hypertension [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18014.
- [3] 季昭臣, 林姗姗, 胡海殷, 等. 口服中成药联合常规西药治疗高血压病临床疗效与安全性的网状 Meta 分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (7): 1955-1988.
- [4] Finocchi C, Sassos D. Headache and arterial hypertension [J]. Neurol Sci, 2017, 38 (Suppl 1): 67-72.
- [5] 刘靖, 卢新政, 陈鲁原, 等. 中国中青年高血压管理专家

- 共识[J]. 中华高血压杂志, 2020, 28(4): 316-324.
- [6] 段滨. 养血清脑颗粒治疗原发性高血压伴随症状的疗效观察[J]. 继续医学教育, 2020, 34(9): 165-166.
- [7] 雷林, 贾敏, 张允岭, 等. 养血清脑颗粒治疗偏头痛有效性及安全性的系统评价与 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5093-5102.
- [8] 周冀英, 贺维. 头痛的诊断思路与方法:《国际头痛分类第三版》的应用[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(7): 773-776.
- [9] 中国高血压基层管理指南(2014年修订版)[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2015, 7(7): 18-40.
- [10] Higgins JP, Altman DG, Gøtzsche PC, et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials[J]. BMJ, 2011, 343: d5928-d5936.
- [11] 曹明芳. 探索养血清脑颗粒治疗高血压头痛的临床价值[J]. 中国科技期刊数据库医药, 2024, 15(8): 56-59.
- [12] 李弘. 社区高血压头痛患者应用养血清脑颗粒治疗的效果观察[J]. 基层医学论坛, 2015, 19(17): 2322-2323.
- [13] 陈秀丽. 养血清脑颗粒治疗社区高血压头痛疗效观察[J]. 继续医学教育, 2014, 28(7): 57-58.
- [14] 艾长明. 养血清脑颗粒治疗高血压头痛 52 例疗效观察[J]. 中国医药指南, 2012, 10(10): 285-286.
- [15] 陈红梅. 养血清脑颗粒治疗高血压头痛 50 例疗效观察[J]. 中国基层医药, 2007, 14(11): 1882-1182.
- [16] 袁志奇. 养血清脑颗粒干预高血压头痛效果分析[J]. 中国现代医药杂志, 2006, 8(8): 95-96.
- [17] 林婵, 周晓晖. 养血清脑颗粒治疗高血压头痛 50 例[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(3): 28-28.
- [18] 云崑, 左岸休, 阮东英. 养血清脑颗粒治疗高血压头痛[J]. 医药论坛杂志, 2004, 25(16): 38-38.
- [19] 詹莹, 吴进平, 蒋昭君. 养血清脑颗粒治疗高血压头痛的临床观察[J]. 中国实用医学研究杂志, 2003, 2(5): 516-517.
- [20] 范织珍, 曾华良. 养血清脑颗粒治疗高血压头痛头昏的临床观察[J]. 中国临床医药研究杂志, 2003, 104: 17-18.
- [21] 陈涛, 薛春丽. 中西医结合治疗痰瘀互结型高血压头痛 44 例临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(17): 93-97.
- [22] 曲绍霞, 刘仕杰. 丹珍头痛胶囊治疗慢性高血压头痛疗效及对血管内皮功能的影响[J]. 中国实用医药, 2019, 14(13): 91-92.
- [23] 贾晓伟. 丹珍头痛胶囊治疗高血压头痛临床分析[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(3): 721-723.
- [24] 徐金美, 钱义明, 陈军, 等. 丹珍头痛胶囊治疗痰瘀互结型高血压头痛的疗效及对 SOD、NO 和 ADMA 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(5): 585-588.
- [25] 呼庆华. 丹珍头痛胶囊治疗高血压头痛的临床观察[J]. 北方药学, 2018, 15(11): 124-125.
- [26] 赵忠良. 丹珍头痛胶囊治疗高血压头痛的临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(9): 59-60.
- [27] 吴颖. 丹珍头痛胶囊治疗高血压头痛 68 例临床观察[J]. 中国基层医药, 2015, 22(15): 2350-2352.
- [28] 荣世舫. 川芎清脑颗粒治疗高血压头痛的临床观察[J]. 中国医药指南, 2016, 14(26): 210-211.
- [29] 张鸿. 川芎清脑颗粒治疗高血压头痛的临床疗效观察[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2014, 21(5): 377-378.
- [30] 徐振兴. 麝香保心丸治疗高血压头痛疗效分析[J]. 世界中医药, 2015, 9(2): 926-926.
- [31] 王元伟, 王光胜, 陈孝东, 等. 麝香保心丸治疗高血压头痛 38 例临床疗效观察[J]. 中国临床医生杂志, 2009, 37(10): 50-51.
- [32] 倪晓俊, 刘就娣, 钟璟仪, 等. 高血压头痛患者临床治疗中应用丹珍头痛胶囊治疗的临床价值[J]. 健康之友, 2021, 31(7): 60.
- [33] 陈伏建, 黄健飞, 方欣荣, 等. 麝香保心丸开窍化痰功能在治疗偏头痛中的增效作用观察[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(2): 166-168.
- [34] 赵晓明. 探析中药治疗高血压头痛的临床疗效研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(44): 154-155.
- [35] 陈涛, 李雄伟. 丹珍头痛胶囊对偏头痛大鼠药理作用的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(9): 1672-1674, 1683.
- [36] 马少玉, 宁艳梅, 杜丽东, 等. 丹珍头痛胶囊对肝阳上亢型偏头痛大鼠血清及三叉神经脊束尾核组织中 NOS、NO、ET、CGRP 表达的影响[J]. 甘肃科技纵横, 2022, 51(12): 73-77.
- [37] 王瑞琼, 宁艳梅, 吴国泰, 等. 丹珍头痛胶囊对慢性偏头痛大鼠的干预作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2022, 38(6): 771-775, 819.
- [38] 李倩倩, 杨园园, 曹锦江, 等. 养血清脑颗粒治疗高血压头痛的临床研究 Meta 分析[J]. 中风与神经疾病杂志, 2022, 39(11): 1004-1007.
- [39] 史嘉雯, 郝磊, 王玉, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨养血清脑颗粒治疗高血压的作用机制[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(8): 1206-1214.
- [40] 薛瑞文, 许红, 王斌. 黄竹清脑颗粒联合针刺治疗缺血性中风(痰热腑实证)的疗效及对患者血清 SOD、MDA、TNF- α 的影响[J]. 中国中医急症, 2019, 28(2): 322-325.
- [41] 侯静怡, 倪理琪, 田良良, 等. 基于网络药理学探讨川芎清脑颗粒改善偏头痛作用机制及验证研究[J]. 药学学报, 2022, 57(10): 3095-3105.
- [42] 吴平荣, 孙成铭, 都亚楠, 等. 川芎清脑颗粒治疗偏头痛患者的临床效果[J]. 中国民康医学, 2022, 34(1): 75-77, 84.
- [43] 张蕊, 赵梦杨. 养血清脑颗粒联合氟桂利嗪治疗紧张性头痛疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2020, 36(11): 1428-1428.
- [44] 张美娇, 崔利, 程政平, 等. 养血清脑颗粒对脑梗死后头痛、头晕的临床疗效观察[J]. 中国实用医药, 2020, 15(4): 5-8.

(收稿日期: 2024-10-21; 修回日期: 2024-11-01)

免疫检查点抑制剂相关噬血细胞综合征文献分析

孙志猛¹, 唐晓霞¹, 蔡佩淳², 段曼^{1*} (1. 武汉科技大学附属孝感市中心医院药学部, 湖北 孝感 432000; 2. 湖北省航天医院药学部, 湖北 孝感 432000)

摘要: **目的** 探索免疫检查点抑制剂相关噬血细胞综合征的发生规律、临床特点, 以为临床诊疗提供参考。**方法** 收集中英文数据库中有关免疫检查点抑制剂相关噬血细胞综合征的文献报道, 并进行描述性分析。**结果** 共纳入 28 篇文献, 涉及 31 例患者, 其中男性 20 例 (64.5%), 女性 11 例 (35.5%), 患者中位年龄为 64 岁 (2~80 岁), 中位发生时间为 29.5 d (5~270 d)。主要涉及癌种为肺癌 10 例 (32.2%) 和黑色素瘤 8 例 (25.8%)。主要涉及的免疫检查点抑制剂为帕博利珠单抗 15 例 (45.2%) 和纳武利尤单抗联合伊匹木单抗双免治疗 7 例 (22.6%)。发热 [31 例 (100%)]、高铁蛋白血症 [31 例 (100%)] 是最常见的症状, 并伴有贫血 [22 例 (71.1%)]、白细胞减少 [21 例 (67.7%)]、血小板减少 [27 例 (87.1%)]、肝脾肿大 [25 例 (80.6%)]、转氨酶升高 [20 例 (64.5%)]。其中 29 例 (93.5%) 患者行糖皮质激素治疗, 8 例进一步行托妥珠单抗、免疫球蛋白、英夫利昔单抗等免疫治疗。31 例患者中, 27 例好转, 3 例死亡, 1 例未报道转归情况。**结论** 临床需警惕免疫检查点抑制剂治疗期间噬血细胞综合征的发生, 特别是使用免疫检查点抑制剂治疗后出现不明原因发热、血常规下降、转氨酶升高、肝脾肿大, 应及时行铁蛋白检测, 防止误诊。明确噬血细胞综合征后尽早行激素治疗, 必要时及时调整生物免疫治疗支持。

关键词: 免疫检查点抑制剂; 噬血细胞综合征; 文献分析

中图分类号: R73; R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0826-07
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.037

噬血细胞综合征 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH) 是一种由遗传性或获得性免疫调节功能障碍引起的严重炎症反应综合征^[1], 主要临床特征为发热、血细胞减少、肝脾肿大、骨髓噬血症^[2], HLH 作为一种罕见的血液相关疾病, 通常由恶性肿瘤、风湿免疫性疾病、感染和药物等原因引起^[3-4], 致命且易误诊, 早期诊断和治疗至关重要。

随着免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 在临床使用越来越广泛, 目前偶有 ICIs 相关 HLH 病例被报道, 但 ICIs 诱导的 HLH 临床表现、实验室特征、治疗方案和患者预后均不清晰。目前还没有指南给出明确的诊疗方法, 需要进一步探索。本文通过收集国内外 ICIs 诱导的 HLH 的个案文献报道, 探索其临床特点和诊疗预后, 以为临床诊疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

检索中国知网、万方、维普、PubMed、Embase 和 ScienceDirect 等数据库。中文以“免疫检查点抑制

剂”“PD-1 抑制剂”“PD-L1 抑制剂”“CTLA-4”“噬血细胞综合征”, 英文以“HLH”“hemophagocytic”“lymphohistiocytosis”“hemophagocytic syndrome”“HPS”“ICIs”“immune checkpoint inhibitors”“immunotherapy”“PD-1 inhibitor”“PD-L1 inhibitor”“CTLA-4 inhibitor”等为检索词。检索时间: 截至 2024 年 2 月。

1.2 纳入和排除标准

纳入标准: ① 满足 HLH-2004 诊断标准^[5]; ② 与 ICIs 相关性为可能及以上; ③ 文献类型为病例报告; ④ 病例信息相对完整。**排除标准:** ① 不满足 HLH 诊断标准; ② 综述、临床试验、基础研究及重复报道; ③ 非中文和英文语种; ④ 与 ICIs 完全不相关。

1.3 方法

采用回顾性研究, 由两名研究者独立按照纳入与排除标准筛选文献, 若遇到分歧则由第三名研究者协助筛选。详细阅读文献病例, 并采用 Excel 表记录病例信息: 报道时间、性别、国家、合并用药、适应证、起病时间、临床症状、血细胞、铁蛋白、三酰甘油、纤维蛋白原、肝功能、

作者简介: 孙志猛, 男, 主管药师, 主要从事抗肿瘤临床药理学, email: 243079106@qq.com ***通信作者:** 段曼, 女, 硕士, 主要从事医院药理学临床药理学方面的研究, email: 279543257@qq.com

肝脾影像学、骨髓活检、治疗方案和转归、与 ICI 相关性等，并对获得的临床数据进行描述性统计分析。

2 结果

2.1 患者基本情况

根据纳排标准，最终纳入 28 篇案例报道^[6-33]，共涉及 31 例患者。患者来源于多个国家，其中美国 9 例^[1, 11-12, 18-20, 23, 26, 29] (29%)、日本 7 例^[6, 13-14, 17, 21, 31] (22.6%)、中国 7 例^[24-25, 27-28, 33] (22.6%) 等。男性 20 例 (64.5%)，女性 11 例 (35.5%)。患者中位年龄 64 岁 (2 ~ 80 岁)。原发恶性肿瘤为肺癌 10 例^[6, 13-14, 16-17, 19, 28, 31-32] (32.2%)、黑色素瘤 8 例^[8, 12, 15, 21-22, 26, 29-30] (25.8%) 等 12 个癌种。合并人类疱疹病毒 4 型 (EB) 感染 2 例^[21, 28]，金黄色葡萄球菌感染、类风湿关节炎等并发症各 1 例。从首次输注 ICI 到确诊 HLH 的中位时间为 29.5 d (5 ~ 270 d)，详见表 1。

2.2 ICI 使用情况

31 例患者共涉及 7 个品种 ICI，分别为帕博利珠单抗 15 例^[7, 9, 13-14, 17, 19-20, 23, 26-28, 31-32] (48.4%)，纳武利尤单抗联合伊匹木单抗双免治疗 7 例^[8, 10-12, 21-22, 29] (22.6%)、纳武利尤单抗 2 例^[18, 30]、阿替利珠单抗 2 例^[6, 16]、卡瑞利珠单抗 2 例^[25]、其余各 1 例。具体见表 1。

2.3 相关性

根据诺氏药物不良反应评估量表^[34]，评估纳入病例中 ICI 与 HLH 的相关性，其中 24 例^[6-14, 16, 18-20, 22-27, 29, 31, 33] (77.4%) 相关性为很可能，7 例^[15, 17, 21, 28, 30, 32] (22.6%) 为可能。具体见表 1。

2.4 临床表现

31 例患者均出现发热，部分患者还伴有皮疹 7 例^[15, 23, 25, 31] (22.6%)、腹泻 5 例^[12, 21, 25, 31] (16.1%)、恶心呕吐 3 例^[12, 24, 26] (9.7%)、肌肉关节痛、谵妄等症状。影像学检查提示脾大 16 例^[6-7, 11, 13-14, 20, 22-24, 27-30, 33] (51.6%)、肝脾肿大 8 例^[9, 12, 16-19, 21, 32]。具体见表 2。

2.5 实验室检查结果

31 例患者均出现高铁蛋白血症，同时皆伴有血常规三系下降情况，其中血小板减少 27 例^[6-14, 16-17, 19-26, 28-33] (87.1%)，占比最高；高三酰甘油血症 15 例^[9, 11-12, 15, 18-21, 24-29] (48.4%)；低纤维蛋白原性血症 15 例^[7-8, 10-12, 20, 22-25, 28, 30-31] (48.4%)；可溶性 CD25 水平升高 18 例 (58.1%)；转氨酶升高 20 例 (64.5%)；行穿刺活检患者中 19 例^[6-10, 13-14, 16-18, 20-22, 25, 28-31] (79.2%) 见嗜血现

象，具体见表 2。

2.6 治疗与转归

31 例患者均采取停用 ICI 措施。其中 29 例^[6-17, 19-31, 33] (93.5%) 患者接受糖皮质激素治疗，8 例^[7, 16-17, 20, 22-23, 28] (25.8%) 患者接受依托泊苷治疗，少部分患者同时接受免疫球蛋白、托珠单抗、英夫利昔单抗等免疫治疗。27 例^[6, 8-14, 17, 19-33] (87.1%) 患者好转，1 例患者未报告预后情况，3 例^[15-16, 18] (9.7%) 患者死亡。具体见表 1。

3 讨论

3.1 ICI 诱发 HLH 相关机制

目前，细胞毒性 CD8⁺ T 细胞和巨噬细胞的异常激活导致的炎性细胞因子释放，可能是核心致病机制^[35-36]，此外也有接受嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 治疗的患者发生 HLH，进一步证明了 T 细胞活性调节与 HLH 发生之间的关联性^[37]。而程序性死亡受体 -1 (PD-1) 通过阻断 PD-1/程序性死亡受体配体 -1 (PD-L1) 信号通路，导致免疫激活，增加细胞毒性 T 细胞活性，尤其是 CD8⁺ T 细胞的活性^[38]，可能是导致 HLH 发生的一个重要因素。同时 Gordon 等^[39] 研究发现，在小鼠和人类癌症模型中，PD-1 的表达与巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬效力成反比，随着 ICI 对 PD-1 / PDL-1 的阻断的增加，呈现出巨噬细胞激活，对肿瘤细胞吞噬作用增加等情况。因此 ICI 直接作用于巨噬细胞，调动其活化也可能为诱导 HLH 发生的因素。

3.2 相关性

本研究纳入的病例皆满足 HLH-2004 的诊断标准，时间上皆在 ICI 使用后发生，并有 29 例患者单独或联合使用糖皮质激素治疗后 HLH 症状、实验室指标得到缓解。且 ICI 相关 HLH 作为一种罕见的免疫相关不良反应，目前也有许多报道研究^[40-41]，而病例中联用的药物如紫杉醇、卡铂、帕唑替尼等目前暂无诱发 HLH 相关报道。但是除了使用 ICI 治疗，癌症患者还可能由其他导致 HLH 的相关原因，如感染、风湿免疫性疾病、癌症本身的进展以及潜在的遗传因素^[5]，而此研究中大部分患者不伴有其他潜在诱因，仅 7 例患者^[15, 17, 21, 28, 30, 32] 分别伴有 EB 病毒阳性、类风湿关节炎、干燥综合征、神经结核、新型冠状病毒感染 (新冠感染) 等诱因。根据诺氏药物不良反应评估量表，大部分纳入病例 (77.4%) 的 ICI 与 HLH 相关性为很可能，而少部分纳入病例 (22.6%) 的 ICI 与 HLH 的相关性仅为可能，应考虑传染性检查以及癌症重新评估。

3.3 ICI 相关 HLH 发生规律

表 1 ICI 相关 HLH 患者基本资料及治疗情况

编号	年份	国家	年 龄 / 性别	ICIs	HLH 发生 时间 /d	癌种	治疗方案	转归	ICI 停 用情况	诺氏相关 性评分
1 ^[6]	2021	日本	40 女	阿替利珠单抗+白蛋白紫杉醇+卡铂	29	肺腺癌	泼尼松龙 1 mg/(kg·d)	好转	永久停用	7 分, 很可能
2 ^[7]	2017	美国	76 男	帕博利珠单抗	270	膀胱癌	依托泊苷+地塞米松	/	N/A	7 分, 很可能
3 ^[8]	2018	德国	26 女	纳武利尤单抗+伊匹木单抗	60	黑色素瘤	泼尼松 2 mg/(kg·d)	好转	永久停用	7 分, 很可能
4 ^[9]	2019	英国	68 男	帕博利珠单抗+恩扎卢胺	N/A	前列腺癌	糖皮质激素+他克莫司	好转	永久停用	8 分, 很可能
5 ^[10]	2021	英国	54 男	纳武利尤单抗+伊匹木单抗+卡博替尼	6	肾细胞癌	甲泼尼龙 100 mg·d ⁻¹	好转	暂停	6 分, 很可能
6 ^[11]	2021	美国	68 男	纳武利尤单抗+伊匹木单抗	90	肾细胞癌	地塞米松注射液 36 mg·d ⁻¹	好转	N/A	7 分, 很可能
7 ^[12]	2021	美国	33 男	纳武利尤单抗+伊匹木单抗	14	黑色素瘤	甲泼尼龙	好转	永久停用	7 分, 很可能
8 ^[13]	2019	日本	78 男	帕博利珠单抗	24	肺鳞癌	糖皮质激素	好转	暂停	6 分, 很可能
9 ^[14]	2021	日本	75 男	帕博利珠单抗	46	肺腺癌	甲泼尼龙 1 g·d ⁻¹	好转	N/A	7 分, 很可能
9 ^[14]	2021	日本	60 女	帕博利珠单抗+培美曲塞	30	肺腺癌	甲泼尼龙 1 g·d ⁻¹	好转	N/A	7 分, 很可能
10 ^[15]	2017	法国	42 男	伊匹木单抗	5	黑色素瘤	糖皮质激素+万古霉素	死亡	永久停用	3 分, 可能
11 ^[16]	2022	西班牙	67 男	阿替利珠单抗	14	肺腺癌	地塞米松注射液 20 mg·d ⁻¹ + 依托泊苷注射液	死亡	永久停用	6 分, 很可能
12 ^[17]	2020	日本	74 男	帕博利珠单抗	27	肺腺癌	地塞米松+依托泊苷注射液	好转	永久停用	4 分, 可能
13 ^[18]	2020	美国	74 男	纳武利尤单抗	25	胶质母细胞瘤	万古霉素+头孢他啶+甲硝唑	死亡	永久停用	6 分, 很可能
14 ^[19]	2021	美国	71 男	帕博利珠单抗	21	肺腺癌	泼尼松 1 mg/(kg·d)	好转	永久停用	8 分, 很可能
15 ^[20]	2020	美国	61 男	帕博利珠单抗	196	头颈鳞状细胞癌	地塞米松 10 mg/(kg·d) + 依托泊苷注射液 150 mg·m ⁻²	好转	暂停	6 分, 很可能
16 ^[21]	2020	日本	69 女	纳武利尤单抗+伊匹木单抗	21	黑色素瘤	泼尼松龙 50 mg·d ⁻¹	好转	N/A	4 分, 可能
17 ^[22]	2022	波兰	57 女	纳武利尤单抗+伊匹木单抗	28	黑色素瘤	甲泼尼龙 1 g·d ⁻¹ + 依托泊苷 200 mg	好转	永久停用	8 分, 很可能
18 ^[23]	2022	美国	80 女	帕博利珠单抗	230	皮肤鳞状细胞癌	地塞米松 10 mg/(kg·d) + 托珠单抗 4 mg·kg ⁻¹ + 伊托泊苷 150 mg·m ⁻²	好转	暂停	6 分, 很可能
19 ^[24]	2023	中国	36 男	特瑞普利单抗+帕唑帕尼	N/A	右心房肉瘤	甲泼尼龙 0.5 g·d ⁻¹ + 英夫利昔单抗 0.3 g	好转	N/A	7 分, 很可能
20 ^[25]	2022	中国	10 女	卡瑞利珠单抗	14	急性髓系白血病	甲泼尼龙 10 mg/(kg·d) + 巴利昔单抗	好转	N/A	7 分, 很可能
20 ^[25]	2022	中国	2 女	卡瑞利珠单抗	N/A	急性髓系白血病	甲泼尼龙 10 mg/(kg·d) + 巴利昔单抗	好转	N/A	7 分, 很可能
21 ^[26]	2018	美国	58 男	帕博利珠单抗	31	黑色素瘤	口服泼尼松龙 1 mg/(kg·d)	好转	永久停药	8 分, 很可能
22 ^[27]	2024	中国	73 女	帕博利珠单抗+贝伐珠单抗	7	宫颈鳞癌	甲泼尼龙+免疫球蛋白	好转	永久停药	8 分, 很可能
23 ^[28]	2022	中国	50 女	帕博利珠单抗	18	胸腺癌	地塞米松+依托泊苷	好转	N/A	4 分, 可能
23 ^[28]	2022	中国	70 男	帕博利珠单抗+卡铂+紫杉醇注射液	12	肺鳞癌	地塞米松+依托泊苷	好转	N/A	4 分, 可能
24 ^[29]	2018	美国	35 女	纳武利尤单抗+伊匹木单抗	21	黑色素瘤	甲泼尼龙 1.5 mg/(kg·d)	好转	N/A	7 分, 很可能
25 ^[30]	2021	巴西	76 男	纳武利尤单抗+利福平+吡嗪酰胺+异烟肼	60	黑色素瘤	地塞米松+免疫球蛋白	好转	永久停药	4 分, 可能
26 ^[31]	2020	日本	78 男	帕博利珠单抗	46	肺腺癌	甲泼尼龙	好转	永久停药	8 分, 很可能
27 ^[32]	2021	西班牙	76 男	帕博利珠单抗	14	肺腺癌	免疫球蛋白	好转	N/A	4 分, 可能
28 ^[33]	2023	中国	49 男	替雷利珠单抗	35	肝细胞癌	甲泼尼龙 60 mg·d ⁻¹	好转	永久停药	7 分, 很可能

注: N/A. 未报道; 暂停: 后续随访有重启 ICI 的。

本研究发现 ICI 相关 HLH 在男性患者中占比较大, 这可能与男性患者的癌症发病率较高相关^[42]。不同国家来源 ICI 相关 HLH 报告率也存在差异, 美国、中国和日本 ICI 相关 HLH 报告

率较高, 这表明 ICI 相关 HLH 存在遗传易感性可能, 与之前观察到的特定遗传背景下不同患者对 HLH 触发的倾向类似^[43]。同时观察到在肺癌患者中 HLH 占比最高, 这可能与肺癌发病率以

表 2 ICI 相关 HLH 患者症状及实验室检查情况

编号	临床症状	转氨酶	血常规	铁蛋白 / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	CD25	纤维蛋白 原 / ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	三酰甘油 / ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	腹部 CT	其他引发 HLH 的因素	穿刺结果
1 ^[6]	发热	升高	血常规三系下降	14 101	未升高	1.85	2.54	脾大	阴性	噬血现象
2 ^[7]	发热、斑丘疹	N/A	血常规三系下降	100 000	升高	1.22	N/A	脾大	阴性	噬血现象
3 ^[8]	发热	升高	血常规三系下降	22 871	未升高	0.65	N/A	N/A	阴性	噬血现象
4 ^[9]	发热	升高	血常规三系下降	73 662	升高	1.51	3.17	肝脾肿大	阴性	嗜血现象
5 ^[10]	发热、斑丘疹、口腔 溃疡	升高	Hb: $79\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $57\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	2869	N/A	0.51	N/A	N/A	阴性	噬血现象
6 ^[11]	发热、心动过速	N/A	Hb: $77\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $46\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, ANC: $0.7\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	57 931	升高	1.48	3.82	脾大	阴性	无噬血现象
7 ^[12]	高热、腹泻、呕吐	升高	PLT 下降	3446	未升高	1.45	5.91	肝脾肿大	阴性	N/A
8 ^[13]	高热、黄疸	N/A	血常规三系下降, Hb: 82 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $25\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, WBC: $1.52\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	35 400	升高	5.93	N/A	脾大	阴性	噬血现象
9 ^[14]	发热	升高	血常规三系下降	11 273	N/A	N/A	N/A	脾大	阴性	噬血现象
9 ^[14]	发热	升高	血常规三系下降	64 726	N/A	N/A	N/A	脾大	阴性	噬血现象
10 ^[15]	高热、皮疹	N/A	ANC 下降	升高	N/A	N/A	升高	脾大	细菌感染	无噬血现象
11 ^[16]	发热、肌痛	N/A	Hb: $71\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $25\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, WBC: $2.58\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	7035	升高	5.07	1.72	肝脾肿大	阴性	噬血现象
12 ^[17]	发热	N/A	Hb: $71\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $13\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, WBC: $2.71\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	28 976	升高	4.94	0.99	肝脾肿大	类风湿关节 炎	噬血现象
13 ^[18]	发热、谵妄	升高	WBC, ANC 减少	33 738	升高	N/A	9.53	肝脾肿大	阴性	噬血现象
14 ^[19]	发热	N/A	三系下降	1303	未升高	N/A	3.25	肝脾肿大	阴性	无噬血现象
15 ^[20]	发热	升高	Hb: $95\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $32\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	57 934	升高	1.34	3.22	脾大	阴性	噬血现象
16 ^[21]	发热、腹泻	升高	三系下降, Hb 下降, PLT: $9.6\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, WBC 下降	19 460	N/A	1.6	3.09	肝脾肿大	EB 病毒抗原 阳性	噬血现象
17 ^[22]	发热, 伴呼吸困难	N/A	Hb: $81\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $79\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	7256	N/A	1.17	N/A	脾大	阴性	噬血现象
18 ^[23]	发热、皮疹	升高	Hb: $54\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $34\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, WBC: $0.9\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	64 579	升高	0.99	2.83	脾大	阴性	无噬血现象
19 ^[24]	发热、恶心、谵妄	升高	PLT: $35\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	81 769	N/A	0.65	6.13	脾大	阴性	N/A
20 ^[25]	发热、皮疹、腹泻	升高	Hb: $85\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $61\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, ANC: $1.58\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	20 920	升高	0.71	4.94	N/A	阴性	无噬血现象
20 ^[25]	发热、皮疹、腹泻	升高	Hb: $77\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $16\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, ANC: $0.03\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	10 450	升高	2.85	5.35	N/A	阴性	噬血现象
21 ^[26]	发热、恶心、关节疼	/	血常规三系下降	40 000	升高	N/A	3.49	N/A	阴性	N/A
22 ^[27]	发热、皮疹	升高	WBC: $0.8\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, ANC: $0.03\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	3877	升高	1.81	4.03	脾大	阴性	N/A
23 ^[28]	发热	升高	PLT: $59\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	2000	升高	0.37	3.17	脾大	干燥综合征	N/A
23 ^[28]	发热	升高	N/A	2000	升高	N/A	2.46	脾大	EB 病毒阳性	噬血现象
24 ^[29]	发热、乏力	升高	血常规三系下降	5474	升高	N/A	3.79	脾大	阴性	噬血现象
25 ^[30]	发热、弥漫性瘀点	/	Hb: $85\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLT: $68\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	20 406	N/A	1.38	N/A	脾大	神经结核	噬血现象
26 ^[31]	发热、腹泻、皮疹	升高	PLT: $44\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, WBC: $0.51\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	11 273	升高	0.643	N/A	N/A	阴性	噬血现象

续表 2

编号	临床症状	转氨酶	血常规	铁蛋白 / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	CD25	纤维蛋白 原 / ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	三酰甘油 / ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	腹部 CT	其他引发 HLH 的因素	穿刺结果
27 ^[32]	发热	/	血常规三系下降	3931	升高	5.84	2.16	肝脾肿大	COVID-19	N/A
28 ^[33]	发热	升高	PLT: $29\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, ANC: $1.05\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$	91 501	N/A	1.52	N/A	脾大	阴性	N/A

注: N/A. 未报道; ANC. 中性粒细胞计数; WBC. 白细胞计数; PLT. 血小板计数; Hb. 血红蛋白计数。

及 ICIs 在肺癌中使用率较高有关。而黑色素瘤患者也有着较高的占比, 同样在一项 ICIs 相关 HLH 不良反应数据库研究中发现黑色素瘤患者中 ICIs 相关 HLH 发生率较高^[44], 可能与伊匹木单抗联合纳武利尤单抗双免治疗黑色素瘤相关。有研究表明联合抗 CTLA-4 与抗 PD-1 较单一使用, 免疫相关不良反应发生率更高^[45], 而从双免治疗作用机制上看, 其可作用于不同 T 细胞群体, 也可作用于同一 T 细胞, 相较于单免更能促进 T 细胞的活化^[46], 这可能是黑色素瘤双免治疗患者 HLH 发生率较高的因素之一。除了伊匹木单抗联合纳武利尤单抗相关 HLH 发生率较高以外, 还观察到使用帕博利珠单抗相关 HLH 发生率最高, 而在一项回顾性研究中同样发现帕博利珠单抗相对其他 ICIs 有较高的 HLH 发生率^[47], 这可能与帕博利珠单抗使用率有关, 具体原因还需进一步探究。

3.4 ICIs 相关 HLH 临床特点

本研究首次使用 ICIs 到确诊 HLH 的中位时间为 29.5 d, 一篇荟萃分析报告的 HLH 发生更早, 中位时间为 26 d^[48], 这相对于其他 ICIs 相关血液毒性的中位时间较短, 例如自身免疫性溶血性贫血 50 d, 免疫性血小板减少症 41 d^[4]。同时观察到除了 HLH-2004 诊断标准中的指标外, 有些患者在早期还伴有 AST、ALT 升高 (63.3%) 等情况, 这可能由于活化的噬血细胞组织细胞浸润或细胞因子过量产生引起的肝损伤^[49], 且 HLH 患者肝脏的组织病理学常表现为非特异性改变, 包括肝窦扩张、肝细胞坏死、内皮炎和脂肪变性^[50], 这也进一步导致了肝大、D-D 二聚体升高、低纤维蛋白原血症等症状出现。所以转氨酶升高也可能是 HLH 发生的前兆, 而在临床上常被当成药物性肝损伤, 有可能错过救治时期。此外, 本研究还发现血常规三系中, 血小板下降发生率最高 (87%), 且中位数为 $35\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$, 所以此类患者出血风险值得进一步关注。

3.5 治疗方案

HLH-94 和 2004 方案是 HLH 公认的传统疗法, 包括大剂量地塞米松、依托泊苷或环孢菌素

等^[5]。而权威的免疫相关不良事件 (irAEs) 管理指南中, 尚无 ICIs 相关 HLH 分级管理、诊疗方式等指导意见, 通过查阅文献发现, 国际组织细胞协会的专家发表了一篇 HLH 相关的诊疗建议, 其中提到对于 ICIs 相关 HLH 一线治疗推荐使用糖皮质激素^[51]。

本研究中, 仅 14 例 HLH 患者 (46.6%) 单独使用糖皮质激素, 并取得好转; 难治性 HLH 患者在接受了托珠单抗、他克莫司、英夫利昔单抗等二线挽救治疗后也逐渐好转; 而 3 例死亡患者中, 1 例仅使用抗感染治疗, 其余 2 例使用激素控制不佳没有进一步采用二线挽救治疗。最近的回顾性研究表明, 61% 的病例单独使用类固醇可解决 ICI 诱导的 HLH^[52]。而对于更严重 HLH 糖皮质激素单药治疗可能是不够的, 细胞因子靶向和免疫治疗可能是一种很有前途的策略, 包括 CD52 单克隆抗体 (阿仑单抗)、JAK1/2 抑制剂 (芦可替尼) 和抗白细胞介素 -6 (IL-6) 抗体 (托珠单抗)^[53-55]。

所以尽快明确 HLH 诊断, 及时行激素和免疫救治非常关键。但目前 ICIs 相关 HLH 的治疗中激素的选用和剂量用法还没有一个统一标准, 值得后续进一步研究。

4 结论

ICIs 相关 HLH 是一种罕见, 且严重危及生命的免疫相关不良反应, 一篇荟萃分析提到 ICIs 相关 HLH 的死亡率为所有 ICIs 相关血液毒性中最高, 达到 23%^[48], 早期诊断救治非常关键, 但目前还没有 ICIs 相关 HLH 诊疗指南。这几年随着免疫治疗逐渐开展, ICIs 相关 HLH 的报道也逐渐增多, 对其也越发关注, 尤其是临床、实验室特征规律、治疗方法值得进一步探索。在使用 ICIs 治疗后, 如果出现早期不明原因发热、肝损伤、血常规下降等情况需考虑 HLH 的可能, 并及时完善诊断, 尽早给予治疗。

参考文献

[1] Hayden A, Park S, Giustini D, et al. Hemophagocytic syndromes (HPSs) including hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in adults: a systematic scoping review [J]. Blood Rev, 2016, 30 (6): 411-420.

- [2] Janka GE, Lehmborg K. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: pathogenesis and treatment [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013, 2013 (1): 605-611.
- [3] 庄俊玲, 赵静婷, 郭潇潇, 等. 免疫检查点抑制剂相关血液毒性处理的临床诊疗建议 [J]. *中国肺癌杂志*, 2019, 22 (10): 676-680.
- [4] Risma KA, Marsh RA. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: clinical presentations and diagnosis [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2019, 7 (3): 824-832.
- [5] 中国医师协会血液科医师分会, 中华医学会儿科学分会血液学组, 噬血细胞综合征中国专家联盟. 中国噬血细胞综合征诊断与治疗指南 (2022 年版) [J]. *中华医学杂志*, 2022, 102 (20): 1492-1499.
- [6] Endo Y, Inoue Y, Karayama M, et al. Marked, lasting disease regression and concomitantly induced autoimmune hemolytic anemia and hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with lung adenocarcinoma and autoantibodies receiving atezolizumab plus chemotherapy: a case report [J]. *JTO Clin Res Rep*, 2021, 3 (1): 100263.
- [7] Shah D, Shrestha R, Ramlal R, et al. Pembrolizumab associated hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28 (6): 1403.
- [8] Satzger I, Ivanyi P, Länger F, et al. Treatment-related hemophagocytic lymphohistiocytosis secondary to checkpoint inhibition with nivolumab plus ipilimumab [J]. *Eur J Cancer*, 2018, 93 (4): 150-153.
- [9] Lorenz G, Schul L, Bachmann Q, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis secondary to pembrolizumab treatment with insufficient response to high-dose steroids [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2019, 58 (6): 1106-1109.
- [10] Azari AE, Stratton R, Singh A. First case of hemophagocytic lymphohistiocytosis secondary to cabozantinib with checkpoint inhibitors [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60 (5): e167-e168.
- [11] Masood A, Wahab A, Clifford T, et al. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis due to nivolumab/ipilimumab in a renal cell cancer patient—a case report [J]. *Clin Case Rep*, 2021, 9 (12): e05184.
- [12] Ghous G, Shoukat HMH, Tarar ZI, et al. Encephalitis associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis secondary to immune checkpoint inhibitors: an unfamiliar spin-off [J]. *Cureus*, 2021, 13 (6): e16079.
- [13] Okawa S, Kayatani H, Fujiwara K, et al. Pembrolizumab-induced autoimmune hemolytic anemia and hemophagocytic lymphohistiocytosis in non-small cell lung cancer [J]. *Intern Med*, 2019, 58 (5): 699-702.
- [14] Kurozumi A, Takahashi H, Watanabe T, et al. Two cases of lung cancer with hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by immune checkpoint inhibitors [J]. *Thorac Cancer*, 2021, 12 (10): 1625-1628.
- [15] Malissen N, Lacotte J, Du-Thanh A, et al. Macrophage activation syndrome: a new complication of checkpoint inhibitors [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 77 (2): 88-89.
- [16] Rubio-Perez J, Rodríguez-Perez ÁR. Treatment-related hemophagocytic lymphohistiocytosis due to atezolizumab: a case report and review of the literature [J]. *J Med Case Rep*, 2022, 16 (1): 365.
- [17] Akagi Y, Awano N, Inomata M, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with rheumatoid arthritis on pembrolizumab for lung adenocarcinoma [J]. *Intern Med*, 2020, 59 (8): 1075-1080.
- [18] Thummalapalli R, Heumann T, Stein J, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis secondary to PD-1 and ido inhibition in a patient with refractory glioblastoma [J]. *Case Rep Oncol*, 2020, 13 (2): 508-514.
- [19] Doyle JJ, Hall JA, Reely K, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis due to pembrolizumab therapy for adenocarcinoma of the lung [J]. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2021, 34 (6): 729-730.
- [20] Kalmuk J, Puchalla J, Feng G, et al. Pembrolizumab-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis: an immunotherapeutic challenge [J]. *Cancers Head Neck*, 2020, 5: 3.
- [21] Mizuta H, Nakano E, Takahashi A, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis with advanced malignant melanoma accompanied by ipilimumab and nivolumab: a case report and literature review [J]. *Dermatol Ther*, 2020, 33 (3): e13321.
- [22] Pacholczak-Madej R, Grela-Wojewoda A, Lompart J, et al. Effective treatment of a melanoma patient with hemophagocytic lymphohistiocytosis after nivolumab and ipilimumab combined immunotherapy [J]. *Prague Med Rep*, 2022, 123 (1): 35-42.
- [23] Marar R, Prathivadhi-Bhayankaram S, Krishnan M. Immune checkpoint inhibitor-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with squamous cell carcinoma [J]. *J Hematol*, 2022, 11 (4): 142-147.
- [24] He L, Zhuang Y, Zhang DL, et al. PD-1 blockader-associated atypical hemophagocytic lymphohistiocytosis: a cautionary case report [J]. *Transfus Apher Sci*, 2023, 62 (2): 103603.
- [25] Du ZZ, Zhou M, Ling J, et al. PD-1 checkpoint blockade in patients for acute myeloid leukemia after HSCT relapse resulted in severe GVHD and Shh [J]. *Case Rep Hematol*, 2022, 2022: 1705905.
- [26] Sadaat M, Jang S. Hemophagocytic lymphohistiocytosis with immunotherapy: brief review and case report [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6 (1): 49.
- [27] Zhai CY, Jin XH, You LK, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis following pembrolizumab and bevacizumab combination therapy for cervical cancer: a case report and systematic review [J]. *BMC Geriatr*, 2024, 24 (1): 32.
- [28] Wei YQ, He W, Sun W, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients following treatment with pembrolizumab: two case reports and a literature review [J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11 (8): 2960-2966.
- [29] Hantel A, Gabster B, Cheng JX, et al. Severe hemophagocytic lymphohistiocytosis in a melanoma patient treated with ipilimumab + nivolumab [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6 (1): 73.
- [30] Costa CM, Gadotti LL, Seiwald MC, et al. Ganglionar

- tuberculosis infection evolving to hemophagocytic lymphohistiocytosis after anti-programmed cell death 1 treatment for high-risk melanoma: a case report [J]. *J Med Case Rep*, 2021, 15 (1): 350.
- [31] Takahashi H, Koiwa T, Fujita A, et al. A case of pembrolizumab-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis successfully treated with pulse glucocorticoid therapy [J]. *Respir Med Case Rep*, 2020, 30: 101097.
- [32] Ramos-Ruperto L, Busca-Arenzana C, Valdivieso J, et al. COVID-19 and pembrolizumab-induced secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report [J]. *SN Compr Clin Med*, 2021, 3 (6): 1412-1415.
- [33] 李安霞, 薛淑一, 赵冰清. 替雷利珠单抗致噬血细胞综合征 [J]. *药物不良反应杂志*, 2023, 25 (11): 700-702.
- [34] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1981, 30 (2): 239-245.
- [35] Griffin G, Shenoi S, Hughes GC. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: an update on pathogenesis, diagnosis, and therapy [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2020, 34 (4): 101515.
- [36] Kelkar MG, Bargir UA, Malik-Yadav R, et al. CD8⁺ T cells exhibit an exhausted phenotype in hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *J Clin Immunol*, 2021, 41 (8): 1794-1803.
- [37] Al-Samkari H, Snyder GD, Nikiforow S, et al. Haemophagocytic lymphohistiocytosis complicating pembrolizumab treatment for metastatic breast cancer in a patient with the PRF1 A91 V gene polymorphism [J]. *J Med Genet*, 2019, 56 (1): 39-42.
- [38] Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, et al. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alpha PD-L1 blockade [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 30, 105 (39): 15016-21.
- [39] Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity [J]. *Nature*, 2017, 545 (7655): 495-499.
- [40] Al-Samkari H, Snyder GD, Nikiforow S, et al. Haemophagocytic lymphohistiocytosis complicating pembrolizumab treatment for metastatic breast cancer in a patient with the PRF1 A91 V gene polymorphism [J]. *J Med Genet*, 2019, 56 (1): 39-42.
- [41] 金相红, 张炎, 庄俊玲. 免疫检查点抑制剂相关血液学毒性的诊治进展 [J]. *临床内科杂志*, 2023, 40 (2): 73-78.
- [42] Zhu YZ, Shao XY, Wang XY, et al. Sex disparities in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 466: 35-38.
- [43] Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, López-Guillermo A, et al. Adult haemophagocytic syndrome [J]. *Lancet*, 2014, 383 (9927): 1503-1516.
- [44] Nosedà R, Bertoli R, Müller L, et al. Haemophagocytic lymphohistiocytosis in patients treated with immune checkpoint inhibitors: analysis of WHO global database of individual case safety reports [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7 (1): 117.
- [45] Boutros C, Tarhini A, Routier E, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13 (8): 473-486.
- [46] Willsmore ZN, Coumbe BGT, Crescioli S, et al. Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: treatment of melanoma and immune mechanisms of action [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51 (3): 544-556.
- [47] Diaz L, Jauzelon B, Dillies AC, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with immunological checkpoint inhibitors: a pharmacovigilance study [J]. *J Clin Med*, 2023, 12 (5): 1985.
- [48] Davis EJ, Salem JE, Young A, et al. Hematologic complications of immune checkpoint inhibitors [J]. *Oncologist*, 2019, 24 (5): 584-588.
- [49] Lin SD, Li Y, Long J, et al. Acute liver failure caused by hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: a case report and review of the literature [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95 (47): e5431.
- [50] Khan SA, Amir M. Hemophagocytic lymphohistiocytosis masquerading as autoimmune hepatitis [J]. *Cureus*, 2023, 15 (3): e36543.
- [51] La Rosée P, Horne A, Hines M, et al. Recommendations for the management of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults [J]. *Blood*, 2019, 133 (23): 2465-2477.
- [52] Nosedà R, Bertoli R, Müller L, et al. Haemophagocytic lymphohistiocytosis in patients treated with immune checkpoint inhibitors: analysis of WHO global database of individual case safety reports [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7 (1): 117.
- [53] Dufranc E, Del Bello A, Belliere J, et al. TAIIDI (Toulouse Acquired Immune Deficiency and Infection) study group. IL6-R blocking with tocilizumab in critically ill patients with hemophagocytic syndrome [J]. *Crit Care*, 2020, 24 (1): 166.
- [54] Marsh RA, Allen CE, McClain KL, et al. Salvage therapy of refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis with alemtuzumab [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2013, 60 (1): 101-109.
- [55] Wang JS, Wang YN, Wu L, et al. Ruxolitinib for refractory/relapsed hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Haematologica*, 2020, 105 (5): e210-e212.

(收稿日期: 2024-07-01; 修回日期: 2024-09-02)

临床药师参与 1 例颅内动脉瘤支架辅助栓塞术后合并肺栓塞患者的抗栓治疗实践

靳露^{1, 2}, 于英英², 李琴¹, 刘珊珊^{2*}, 周琰^{1*} (1. 上海交通大学医学院附属第一人民医院临床药学科, 上海 201600; 2. 新疆维吾尔自治区喀什地区第二人民医院药学部, 新疆 喀什 844000)

摘要: 临床药师参与 1 例肺栓塞抗凝治疗 3 个月后进行颅内动脉瘤支架辅助栓塞术后抗栓治疗 6 周再次出现肺栓塞患者抗栓方案的制订, 通过查阅抗栓的循证证据资料, 分析患者以往肺栓塞原因和动脉静脉疾病合并时抗栓药物方案, 并应用到现治疗方案, 为抗栓药物治疗提出优化建议, 医师采纳临床药师建议, 患者肺栓塞治愈且未出现出血症状。治疗过程中临床药师以药学监护、用药教育、血药浓度监测为切入点, 为患者制订个体化用药方案, 确保用药的安全性和有效性。

关键词: 颅内动脉瘤; 支架辅助栓塞术; 肺栓塞; 抗栓治疗; 药学实践; 临床药师

中图分类号: R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)03-0833-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.038

Clinical pharmacist involvement in antithrombotic therapy for a patient with recurrent pulmonary embolism after stent-assisted embolization of an intracranial aneurysm

JIN Lu^{1, 2}, YU Ying-ying², LI Qin¹, LIU Shan-shan^{2*}, ZHOU Yan^{1*} (1. Department of Clinical Pharmacy, the First Affiliated People's Hospital of School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201600; 2. Department of Pharmacy, Kashi Prefecture Second People's Hospital, Kashgar Xinjiang 844000)

Abstract: Clinical pharmacists participated in the formulation of an antithrombotic regimen for a patient with recurrent pulmonary embolism who underwent 3 months of anticoagulant therapy for pulmonary embolism, 6 weeks of antiplatelet therapy post-intracranial aneurysm stent-assisted embolization, and subsequent management of recurrent pulmonary embolism. By reviewing evidence-based resources of antithrombotic therapy we analyzed the causes for the patient's previous pulmonary embolism in conjunction with concurrent arterial and venous disorders, and optimized antithrombotic strategy. The physicians adopted clinical pharmacists' recommendations, successfully resolved the patient's pulmonary embolism without bleeding. Throughout the treatment, clinical pharmacists provided pharmaceutical care, monitored therapeutic drugs, and ensured individualized medication plan for the safety and efficacy of the treatment.

Key words: intracranial aneurysm; stent-assisted embolization; pulmonary embolism; antithrombotic therapy; pharmaceutical practice; clinical pharmacist

基金项目: 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划-临床药师项目 (No. 沪卫人事〔2021〕99); 新疆维吾尔自治区药学会科研基金资助项目 (No. YXH202217); “天山英才”医药卫生高层次人才培养计划 (No. TSYC202301A074, No. TSYC202301B153)。

作者简介: 靳露, 女, 主管药师, 主要从事抗凝方向临床药学工作, email: 747421075@qq.com *通信作者: 周琰, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: nyxzy@163.com; 刘珊珊, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 85775264@qq.com

未破裂颅内动脉瘤是颅内动脉壁的局限性、病理性扩张,存在破裂风险^[1]。动脉瘤一旦破裂,致死率、致残率高。大部分的未破裂颅内动脉瘤通过介入治疗可以有效地阻挡进入颅内动脉瘤内的血流,达到预防动脉瘤出血的目的。支架辅助栓塞术是介入治疗的一种主要方式^[2],在支架植入术前和术后给予双重抗血小板治疗(dual antiplatelet therapy, DAPT)^[3]是降低支架辅助栓塞术后缺血性并发症的有力措施。肺栓塞是以各种栓子阻塞肺动脉或其分支为发病原因的一组疾病或疾病综合征的总称,其中肺血栓栓塞症(pulmonary thromboembolism, PTE)是肺栓塞最常见的类型。抗凝治疗是肺栓塞的基础治疗手段,可有效防止血栓再形成和复发^[3]。任何可以导致静脉血流瘀滞、血管内皮损伤和血液高凝状态的因素均能引起PTE,手术是PTE的危险因素之一^[3]。动脉瘤支架辅助栓塞术后需要DAPT治疗,PTE患者需要抗凝治疗,联合应用抗血小板和抗凝治疗可以有效减少缺血和血栓栓塞事件,但会大大增加出血风险。如何权衡出血与血栓风险,选择合理的抗栓治疗方案至关重要。本文对1例颅内动脉瘤支架辅助栓塞术后合并肺栓塞患者的抗栓方案进行讨论。

1 病历资料

患者,女,66岁,身高155 cm,体重65 kg,体质指数 $27.06 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ 。2023年12月13日因“突发晕厥1次”送入抢救室。CT肺动脉造影:双侧肺动脉分叉多发栓塞。入院诊断为肺栓塞。既往史:2023年6月28日因肺栓塞第一次入院收治呼吸科。入院后给予那屈肝素钙 0.4 mL bid ih ,出院给予利伐沙班 15 mg bid po (前3周 15 mg bid ,后 20 mg qd 至3个月,复查)。10月7日门诊随访肺部增强CTA:右上肺动脉分支血管内栓塞,呼吸科医师嘱继续服用利伐沙班 20 mg qd po 。

2023年10月24日因颅内动脉瘤第二次入院。

入院后给予阿司匹林 100 mg qd po 、替格瑞洛 90 mg bid po ,停用利伐沙班。10月25日行“经导管颅内动脉瘤支架辅助栓塞术”,术中使用替罗非班 5 mg ivgtt 。11月11日出院给予阿司匹林 100 mg qd po 、替格瑞洛 45 mg bid po 、利伐沙班 10 mg qd po 、贝前列素钠片 $20 \mu\text{g tid po}$ 。阿司匹林+替格瑞洛+利伐沙班服用6周至12月13日入院前,3种抗栓药物联用。

患者2020年因脑梗长期服用血栓通和甲钴胺胶囊(剂量不详),2021年诊断支气管哮喘,现未使用药物。

2 诊疗经过

入院体检:体温 36.5°C ,脉搏 $64 \text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$,呼吸 $26 \text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$,血压 $136/92 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)。双肺呼吸音粗,呼吸急促。实验室检查:血常规、生化和凝血常规示,白细胞 $4.9 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$,红细胞 $3.91 \times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$,血红蛋白 $125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,血小板 $140 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$,C-反应蛋白 $7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,谷草转氨酶 $66 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$,谷丙转氨酶 $20 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$,肌酐 $88.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,尿素 $7.27 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,D-二聚体 $9.91 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,凝血酶原时间(PT) $14.3 \text{ s}\uparrow$,部分凝血活酶时间(APTT) $65.70 \text{ s}\uparrow$,国际标准化比值(INR)1.2、纤维蛋白原浓度(FBG) $2.86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,纤维蛋白原降解产物(FDP) $24.64 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$,血浆抗凝血酶活性79.4%。CTA:双侧肺动脉分叉多发栓塞。入院诊断为肺栓塞。

12月13日入院,停用阿司匹林+替格瑞洛+利伐沙班,给予那屈肝素钙 0.6 mL bid ih 。当日局麻下行“肺动脉取栓术+肺动脉造影术+下腔静脉造影”,手术顺利,复查造影见右肺明显通畅,术后拔除口插管入ICU监护治疗。12月19日患者好转出院。出院带药:利伐沙班 15 mg qd po (至少3个月)、阿司匹林 100 mg qd po (至少1年)。患者3次住院抗栓治疗方案见表1。

表1 患者3次住院抗栓治疗方案

Tab 1 Antithrombotic regimen for three hospitalizations of patients

时间	诊断	手术	抗栓治疗
第一次住院 2023-6-28—7-3	肺栓塞	无	那屈肝素钙 0.4 mL bid ih
第一次出院 2023-7-4—10-23	—	—	利伐沙班前3周 15 mg bid ,后 20 mg qd
第二次住院 2023-10-24—11-10	颈内动脉交通段动脉瘤	经导管颅内动脉瘤支架辅助栓塞术	阿司匹林 100 mg qd po 、替格瑞洛 90 mg bid po ,术中使用时替罗非班 5 mg ivgtt
第二次出院 2023-11-11—12-12	—	—	阿司匹林 100 mg qd po 、替格瑞洛 45 mg bid po 、利伐沙班 10 mg qd po
第三次住院 2023-12-13—12-19	肺栓塞	肺动脉取栓术	那屈肝素钙 0.6 mL bid ih
第三次出院 2023-12-20—至今	—	—	阿司匹林 100 mg qd po 一年以上、利伐沙班 15 mg qd po 3个月以上

3 讨论

3.1 首次肺栓塞住院及出院抗凝药物分析

患者2023年6月28日因肺栓塞入院,当日给予那屈肝素钙 0.4 mL bid ih 至出院,共计使用

6 d。根据《肺血栓栓塞症诊治与预防指南》^[3],抗凝治疗是PTE的基础治疗手段。与普通肝素相比,低分子肝素(LMWH)和磺达肝癸钠发生大出血或者肝素诱导的血小板减少症的风险较低,所以

首选用于 PTE 患者的初始抗凝治疗, LMWH 必须根据体重给药, 该患者选用那屈肝素钙作为初始抗凝治疗合理, 但使用剂量偏低, 根据体重 (65 kg) 应给予患者 0.6 mL bid。指南指出 PTE 患者抗凝疗程至少 3 个月^[3], 出院患者选用口服抗凝药物更为方便, 与华法林相比, 利伐沙班或阿哌沙班的单药治疗或者达比加群与肝素桥接治疗更优, 不需要监测凝血常规^[4], 起效快, 且大出血风险相对达比加群酯更低^[5], 该患者出院停用那屈肝素钙, 换用利伐沙班口服, 前 3 周 15 mg bid, 后 20 mg qd, 合理。规律服药 3 个月后, 2023 年 10 月 7 日至呼吸科复诊, 肺部增强 CTA: 右上肺动脉分支血管内栓塞。考虑肺部仍存在血栓, 嘱其继续服用抗凝药利伐沙班 20 mg qd, 合理。

3.2 第二次颅内动脉瘤入院及出院抗栓药物分析

3.2.1 围手术期抗栓药物分析

用 Caprini 评分^[6]对患者 VTE 风险评估: 年龄、体质量指数 $> 25 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 、VTE 史、计划进行手术时间超过 45 min 的重大手术、卧床 $> 72 \text{ h}$, 共计 11 分。用 Paris 评分^[7]对患者出血风险进行评估: 年龄、出院后三联抗血小板治疗, 共计 4 分, 中危风险。该患者本次住院围手术期 10 月 25 日、11 月 2 日、11 月 6 日、11 月 10 日的 D-二聚体分别为 0.16、0.58、9.07、5.22 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

根据颅内未破裂动脉瘤相关指南^[1], 对于需要使用支架辅助栓塞治疗的颅内动脉瘤, 充分的抗血小板治疗是降低支架辅助栓塞出现缺血性并发症的有力措施。抗血小板聚集药物治疗方案: 术前持续口服阿司匹林和氯吡格雷 3 ~ 14 d, 采用血栓弹力图检测抗血小板聚集功能, 达到抑制标准后, 可实施支架辅助栓塞; 术后的治疗方案为阿司匹林联合氯吡格雷, 血小板检测结果提示对血小板聚集药物抵抗的患者, 建议改成其他抗血小板聚集药物代替治疗。盐酸替罗非班能在短时间内有效抗血小板聚集, 停药 4.0 h 后血小板功能恢复超过 50%。颅内动脉瘤支架辅助栓塞术中使用时替罗非班可有效预防支架内血栓形成, 并不增加动脉瘤术中出血的风险。

由于缺少颅内动脉瘤支架置入伴肺栓塞治疗的相关指南和研究, 临床一般借鉴经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 或者心血管动脉疾病合并房颤或者静脉血栓疾病的指南。根据 2020 年《冠心病合并心房颤动患者抗栓管理中国专家共识》^[8], 接受口服抗凝药物 (OAC) 的房颤患者发生急性冠脉综合征后立即口服阿司匹林负荷剂量, 然后给予维持剂量。如果该患者需要行 PCI, 考虑采用 P2Y12 受体拮抗剂进行预处理, P2Y12 受体拮抗剂应首选氯吡格雷, 但是对于血栓风险高、出血风险低的患者, 替格瑞洛是合

理的选择。

根据 2020 年 ACC 专家共识决策路径^[9], 既往 VTE、服用 DOAC 治疗的患者需要 PCI 和 APT 时, 在围手术期遵循 PCI 围手术期用药管理。

该患者在围手术期用药参考颅内动脉瘤围手术期用药, 选择替格瑞洛与阿司匹林联用, 停用利伐沙班, 术中使用替罗非班, 在术后第二日做血栓弹力图和二磷酸腺苷诱导血小板聚集率在正常范围内, 围手术期使用抗血小板药物合理。从患者 Caprini 评分 11 分, 以及住院手术后 D-二聚体显著增加, 不排除患者术后有静脉血栓形成, 应及时完善外周血管 B 超及 CT 肺动脉造影等相关检查, 为患者抗栓治疗提供循证学依据。

3.2.2 出院抗栓药物分析

患者颅内动脉瘤支架辅助栓塞植入术需要抗血小板双抗治疗至少 6 个月以降低支架辅助栓塞后缺血性并发症^[1], 而抗凝是肺栓塞患者的基础治疗手段。联合应用抗血小板与抗凝治疗可有效减少缺血及血栓栓塞事件, 但会增加出血风险。共识指出抗凝治疗的房颤患者 (高血栓风险和低出血风险患者) 行 PCI 时抗栓治疗策略是围手术期三联治疗: OAC + DAPT, 1 个月后双联治疗: OAC + 单一抗血小板治疗 (SAPT) 至 12 月, 12 月以后 OAC 治疗^[4]。PIONEER AF-PCI 研究针对 ACS 和 / 或 PCI 合并房颤患者, 采用利伐沙班 15 mg tid + P2Y12 受体拮抗剂及利伐沙班 2.5 mg tid + DAPT 两种方案^[10], 推荐采用利伐沙班 15 mg qd 的双联抗栓方案预防卒中^[7, 11]。

患者本次入院前于门诊行肺部 CTA 提示右上肺动脉分支血管内栓塞, 出院后仍需抗凝, 故考虑三联抗栓治疗。神经内科医师参考上述指南予以小剂量利伐沙班 10 mg qd 联合双联抗血小板治疗, 但是患者肺栓塞的复发说明该方案存在问题。

临床药师后期查阅相关指南, 颅内动脉瘤支架辅助栓塞术后合并肺栓塞患者抗栓治疗可参考 2020 年 ACC 专家共识决策路径^[9], 既往 VTE、服用 DOAC 治疗的患者需要 PCI 和 APT 时, 住院或出院抗栓药物治疗管理首选 VTE 治疗剂量 DOAC + P2Y12 受体拮抗剂, 如果血栓风险高, 出血风险小, 可短时间加阿司匹林 81 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$, P2Y12 受体拮抗剂首选氯吡格雷。出院后抗栓药物治疗 VTE 3 个月治疗结束转换成阿司匹林, P2Y12 受体拮抗剂使用 6 ~ 12 个月, 12 月以后继续使用 APT。

患者支架植入后一个月肺栓塞加重晕厥进入抢救室, 此时仍处于三联抗栓治疗期间发生肺栓塞, 可能与在肺部有血栓的情况下行颅内动脉瘤支架植入手术, 同时利伐沙班未达到抗凝治疗强度等综合因素有关。

3.3 再次肺栓塞住院及出院抗栓药物分析

患者于 2023 年 12 月 23 日因肺栓塞入院抢救,入院当日局麻行“肺动脉取栓术”,停用阿司匹林、替格瑞洛、利伐沙班,给予那屈肝素钙 0.6 mL bid 皮下注射。出院后给予利伐沙班 15 mg qd po (最少 3 个月)、阿司匹林 100 mg qd (至少 1 年)。

2020 年 ACC 专家共识决策路径建议^[9],抗血小板治疗新发或复发 VTE 时,选择单纯抗凝治疗,还是联合抗血小板治疗和抗凝治疗,以及治疗时间取决于抗血小板治疗的适应证。对于前 1~3 个月内进行颈动脉支架置入术的患者,建议大多数患者停用阿司匹林,继续 P2Y₁₂ 受体拮抗剂,并开始抗凝。如果颈动脉支架置入术后 DAPT 的标准持续时间已经结束(通常为 1~3 个月),所有抗血小板药物都可能停止,大多数患者可以单药抗凝治疗。该患者颅内动脉瘤解剖位置处在颅内与颈部交通段,可参考颈动脉支架植入术,患者在支架植入术 3 个月内,选择一个抗血小板药物,药师建议医师停用替格瑞洛,继续服用阿司匹林肠溶片 100 mg qd。鉴于患者在三联抗栓治疗下仍发生肺栓塞,临床药师建议抗凝药物利伐沙班至增加剂量 15 mg qd,医师采纳建议。

3.4 出院后医药联合门诊随访

2024 年 3 月 4 日患者至血管外科门诊复查,肺动脉 CTA 增强提示未见明显异常。2024 年 3 月 11 日患者至血管外科医药联合门诊复查,虽然利伐沙班无需常规监测凝血参数,但在出血、急性脑卒中、紧急手术前等特殊情况下,有必要监测患者体内利伐沙班血药浓度^[12],鉴于该患者肺栓塞复发史,药师建议医师采用高效液相色谱串联质谱监测患者利伐沙班的血药浓度,医师采纳建议,结果患者利伐沙班峰浓度为 $317.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,在说明书提及的 $22 \sim 535 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,并且在均值 $215 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上,医师嘱按原方案剂量继续治疗。2024 年 5 月 30 日患者再次于血管外科医药联合门诊复诊,D-二聚体、纤维蛋白原在正常范围内,肺动脉 CTA 增强提示未见明显异常,经医师、药师讨论,将利伐沙班减量至 10 mg qd,同时联用阿司匹林肠溶片 100 mg qd。

4 总结

血栓栓塞性疾病发病率逐渐升高,越来越多患者需要长期抗凝或抗血小板甚至联合抗栓治疗,联合应用抗血小板与抗凝治疗可有效减少缺血及血栓栓塞事件,但会大大增加出血风险。如何平衡抗栓治疗有效性与安全性,权衡血栓与出血风险、制订最佳抗栓方案,对于临床医师与药师,仍是一个严峻的挑战。该患者第三次入院后,血

管外科驻科抗凝专业临床药师全程参与住院诊疗,协助医师制订合理的抗栓方案,同时将药学服务延伸至出院后,在医药联合门诊参与抗栓方案评估与调整,发挥不可或缺的作用。抗凝专业临床药师结合最新临床药物治疗指南和共识,积极配合临床医师,灵活运用最新循证研究证据及治疗药物监测等辅助临床进行抗凝治疗决策,并在抗凝治疗过程中,密切随访、监护与宣教,可大大提高患者抗凝药物治疗依从性、有效性和安全性。

参考文献

- [1] 中国医师协会神经介入专业委员会,中国颅内动脉瘤计划研究组.中国颅内未破裂动脉瘤诊疗指南[J].中国脑血管病杂志,2021,18(9):634-664.
- [2] Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, et al. Guidelines for the pre-vention of stroke in patients with stroke and TIA: a guideline for healthcare professionals from the AHA/ASA [J]. Stroke, 2014, 45 (7): 2160-2236.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会肺栓塞与肺血管病学组,中国医师协会呼吸医师分会肺栓塞与肺血管病工作委员会,全国肺栓塞与肺血管病防治协作组.肺血栓栓塞症诊治与预防指南[J].中华医学杂志,2018,98(14):1060-1087.
- [4] Wang KL, Kao YT, Chang WT, et al. Management of VTE: part II . The consensus for PE and updates [J]. Acta Cardiol Sin, 2020, 36 (6): 562-582.
- [5] 李婷,封宇飞,倪倩,等.新型口服抗凝药物治疗急性静脉血栓栓塞症疗效和出血风险的网络 meta 分析[J].药物不良反应杂志,2018,20(4):249-258.
- [6] Cronin M, Dengler N, Krauss ES, et al. Completion of the updated caprini risk assessment model (2013 version) [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2019, 25: 1076029619838052.
- [7] 周溯喆,潘志刚.支架植入术后缺血事件和双联抗血小板治疗后出血事件风险评估的研究进展[J].中国全科医学,2019,22(36):4415-4419.
- [8] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会.冠心病合并心房颤动患者抗栓管理中国专家共识[J].中华心血管病杂志,2020,48(7):552-564.
- [9] ACC solution set oversight committee. 2020 ACC expert consensus decision pathway for anticoagulant and antiplatelet therapy in patients with AF or VTE undergoing PCI or with ASCVD [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 77 (5): 629-658.
- [10] Gibson CM, Mehran R, Bode C, et al. Prevention of bleeding in patients with AF undergoing PCI [J]. N Engl J Med, 2016, 375 (25): 2423-2434.
- [11] Angiolillo DJ, Goodman SG, Bhatt DL, et al. Antithrombotic therapy in patients with AF treated with OAC undergoing PCI: a NA perspective-2018 update [J]. Circulation, 2018, 138 (5): 527-536.
- [12] 余巧玲,翟葳葳,刘平,等.利伐沙班血药浓度监测的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2023,28(7):809-817.

(收稿日期:2024-07-03;修回日期:2024-09-12)

大剂量替加环素治疗嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染的 临床实践与文献分析

贺茹菁¹, 解沛涛¹, 田雪梅¹, 叶小健², 刘敏¹, 王丹¹, 卢立山^{1*} (1. 鄂尔多斯市中心医院药剂科, 内蒙古鄂尔多斯 017000; 2. 鄂尔多斯市中心医院神经外科, 内蒙古鄂尔多斯 017000)

摘要: 嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染发生率低, 目前无明确推荐的治疗方案。本文回顾 1 例临床药师参与的嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染案例, 探讨磺胺甲噁唑-甲氧苄啶联用大剂量替加环素治疗嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染的可行性。通过检索 PubMed、Embase、中国知网、万方等数据库, 收集国内外相关案例进行汇总分析, 以期为临床实践提供参考。

关键词: 嗜麦芽窄食单胞菌; 颅内感染; 甲氧苄啶-磺胺甲噁唑; 替加环素

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0837-03

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.039

嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*), 是一种机会性致病的革兰氏阴性杆菌, 对 β -内酰胺类、碳青霉烯类等抗菌药物天然耐药。在院内感染中, 以肺部感染最常见, 颅内感染相对罕见^[1]。尽管被认为是低毒力病原体, 但免疫功能低下或日常活动能力衰弱患者感染后具有较高死亡率^[2]。由于缺乏高质量临床试验数据, 国内外指南和专家共识对嗜麦芽窄食单胞菌所致颅内感染都无明确治疗方案。目前推荐的方案多基于用药经验、案例报道和体外药敏试验^[3-4]。本文首次报道 1 例口服磺胺甲噁唑-甲氧苄啶 (SMZ-TMP) 联用静脉输注大剂量替加环素治疗成功的嗜麦芽窄食单胞菌严重颅内感染, 并对国内外已报道的相关案例进行分析, 以期为临床提供参考。

1 临床实践

患者, 男, 32 岁, 既往高血压病史, 未规律服药。2023 年 9 月 1 日因高血压脑出血行脑室外引流术。术后合并吸入性肺炎, 痰培养肺炎克雷伯菌, 先后给予哌拉西林他唑巴坦 (4.5 g q8h ivgtt) 和美罗培南 (1 g q8h ivgtt) 治疗, 感染未能完全控制。9 月 15 日因拔除脑室引流管后患者出现脑积水, 行侧脑室穿刺引流术。术后再次脑出血, 保留脑室引流管。9 月 27 日痰培养为耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌, 仅 SMZ-TMP 敏感, 调整用药方案为复方磺胺甲噁唑片 (0.96 g tid po)。10 月 2 日患者肺部症状明显改善, 停用 SMZ-TMP。10 月 8 日由于脑室引流管不通畅, 置入腰大池引流管。10 月 9 日患者体温 38.6 °C, 肢体肌肉痉挛, 腰大池引流出脓性脑脊液伴絮状沉淀, 立即给予美罗培南 2 g。10 月 10 日患

者四肢痉挛, 腰大池持续引流浑浊液体, 脑脊液实验室检查: 白细胞计数 $8032 \times 10^6 \cdot L^{-1} \uparrow$, 多核为主, 葡萄糖 $0.05 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$, 氯 $116 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$, 总蛋白 $6.1 \text{ g} \cdot L^{-1} \uparrow$ 。考虑颅内感染严重, 给予利奈唑胺 (600 mg q12h ivgtt)、美罗培南 (2 g q8h ivgtt)、SMZ-TMP (0.96 g tid po) 联合治疗。10 月 12 日脑脊液培养初步鉴定结果为革兰氏阴性杆菌, 停用利奈唑胺。经验性抗菌治疗后患者脑脊液相关实验室指标好转, 但体温仍间断性升高。10 月 13 日脑脊液培养鉴定为嗜麦芽窄食单胞菌, 对 SMZ-TMP、米诺环素、左氧氟沙星、氯霉素敏感。调整方案为 SMZ-TMP (0.96 g tid po), 联用替加环素 (首剂 200 mg, 维持 100 mg q12h ivgtt)。进一步治疗后, 患者四肢肌张力较前降低, 脑脊液相关实验室指标较前改善 (白细胞计数 $185 \times 10^6 \cdot L^{-1}$, 葡萄糖 $1.99 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 氯 $111 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 总蛋白 $4.31 \text{ g} \cdot L^{-1}$), 体温降至 37.5 °C 左右。10 月 17 日引流出清澈脑脊液, 考虑到患者预后和治疗的费用问题, 家属决定回当地医院继续治疗。10 月 31 日电话随访, 当地医院沿用本院治疗方案, 目前患者病情稳定, 体温正常, 脑脊液培养无致病菌。在约 3 周的抗感染治疗中未见恶心、腹泻、皮疹等不良反应, 肝肾功能均正常。患者颅内感染后在本院的用药情况以及相关化验指标变化见图 1。

2 文献分析

2.1 文献检索方法

以“*Stenotrophomonas maltophilia*”“intracranial infection”“meningitis”为英文关键词, 检索 PubMed、Embase 数据库, 以“嗜麦芽窄食单胞菌”“颅内感

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (No.2020MS08177)。

作者简介: 贺茹菁, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: hrphrp2009@163.com *通信作者: 卢立山, 男, 副主任中药师, 主要从事临床药学研究和药事管理研究, email: lulisahn@163.com

染”“脑膜炎”为中文关键词检索中国知网、万方数据库，检索时限为建库至 2023 年 12 月，收集相关病例报道。

2.2 文献检索结果

通过文献检索发现迄今为止报道案例数较少 (17 例)，且均成功被治愈。其中，男性占比高 (82.4%)，儿童有 5 例 (29.4%)，多数在发病前接受过神经外科干预。常见治疗方案是以 SMZ-TMP 为基础联用另一种抗菌药物，治疗周期为 2~3 周。喹诺酮类药物是常用的联合治疗药物，对嗜麦芽窄食单胞菌具有杀菌作用，由于治疗过程中易发生快速耐药不被推荐用于单药治疗。值得一提的是，虽然报道有头孢他啶治愈的案例，但因嗜麦芽窄食单胞菌对β-内酰胺类固有耐药，美国感染病学会认为其疗效不确定，在指南中明确不推荐使用头孢他啶^[4]。具体案例见表 1。

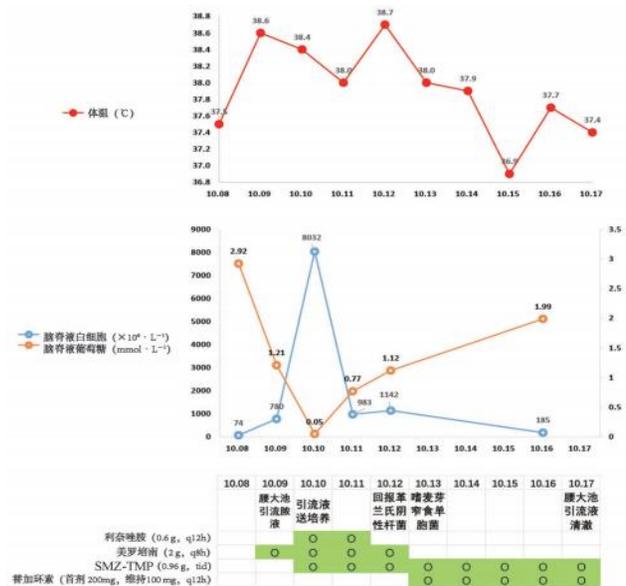


图 1 治疗过程及指标变化图
Fig 1 Diagram of the treatment process and index changes

表 1 嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染案例报道主要信息

作者	性别	年龄	神经外科干预	并发症	治疗方案和时间	结局
Platsouka 等 ^[5]	男	42 岁	脑室腹腔分流术	脑积水, 癫痫, 吸入性肺炎	甲硝唑+头孢他啶+ SMZ-TMP (23 d)	治愈
Caylan 等 ^[6]	男	52 岁	脑室腹腔分流术	蛛网膜下腔出血	SMZ-TMP (3 周)	治愈
Lo 等 ^[7]	女	早产儿	无	无	环丙沙星 (4 周)	治愈
Libanore 等 ^[8]	男	49 岁	无	无	头孢他啶+阿米卡星 (14 d)	治愈
黄秋妹等 ^[9]	男	20 d	无	双眼脓性分泌物	SMZ-TMP + 卡胺丁那霉素+环丙沙星 (8 d) → SMZ-TMP (7 d)	治愈
Reddy 等 ^[10]	男	48 岁	开颅手术	复发肿瘤	SMZ-TMP (12 d) → 莫西沙星 (21 d)	治愈
Yemisen 等 ^[11]	男	30 岁	开颅手术	硬膜下血肿	SMZ-TMP + 环丙沙星 (14 d)	治愈
Sood 等 ^[12]	男	6 个月	第三脑室造瘘术和导水管支架置入术	先天性导水管狭窄伴脑积水	阿米卡星 (14 d) + SMZ-TMP (7 d)	治愈
Correia 等 ^[13]	男	4 岁	脑室外引流管置入	先天性导水管狭窄伴脑积水	SMZ-TMP + 头孢他啶 (2 d) → SMZ-TMP + 头孢他啶+左氧氟沙星 (21 d)	治愈
Wang 等 ^[14]	男	73 岁	脑室外引流管置入	无	头孢他啶 (3 周)	治愈
Wang 等 ^[14]	男	61 岁	立体定向神经内镜检查	无	头孢他啶 (3 周)	治愈
Ibrahim 等 ^[15]	男	13 d	无	淋球菌性眼炎	SMZ-TMP + 环丙沙星 (21 d)	治愈
Khanum 等 ^[16]	女	60 岁	脑室外引流管置入	高血压	多黏菌素 E + SMZ-TMP (21 d)	治愈
Khanum 等 ^[16]	男	35 岁	开颅手术和脑室腹腔分流术	无	SMZ-TMP + 头孢他啶 (21 d)	治愈
王小刚等 ^[17]	男	17 岁	双侧侧脑室穿刺引流术	无	替加环素+头孢哌酮舒巴坦 (32 d)	治愈
Manuel 等 ^[18]	女	24 岁	脑室腹腔分流术	先天性脑积水	SMZ-TMP (14 d)	治愈
张艳利等 ^[19]	男	66 岁	脑室外引流管置入	脑膜瘤, 梗阻性脑积水	SMZ-TMP + 替加环素 (16 d)	治愈

3 讨论

患者两次神经外科手术干预和留置脑室引流管增加了术后感染的风险。在长期使用广谱抗菌药物的情况下，嗜麦芽窄食单胞菌成为主要致病菌并形成脓肿灶。腰大池管置入过程中使脓肿破裂，导致临床症状加重和一过性的白细胞增高。体外药敏试验显示其对 SMZ-TMP 敏感，经验性抗菌药物治疗初见疗效可能与此有关，但患者体温、肌张力等临床症状未得到明显改善。根据文献分析结果，嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染常用治疗方案为以 SMZ-TMP 为基础联用另一种抗菌药物。临床药师综合考虑了药敏结果、文献资料、患者自身情况、院内药品供应等信息，推荐选择

替加环素。根据中国 CHINET 监测网 2023 年上半年细菌耐药监测结果，嗜麦芽窄食单胞菌对替加环素敏感率为 91.5%。此外，研究显示在嗜麦芽窄食单胞菌感染的治疗中替加环素与 SMZ-TMP 效果相当^[20]，联合使用具有协同作用^[21]。然而，替加环素血脑屏障穿透能力弱，正常情况下难以在脑脊液中达到理想的药物浓度。针对这一问题，一些研究在静脉给药的同时辅以脑室内或鞘内注射^[22]。例如文献分析中的 2 篇中文案例均为静脉滴注 (50 mg q12h) 辅以鞘内注射提高药效^[17, 19]。考虑到脑室内或鞘内注射的有效性和安全性尚未在对照试验中得到证实^[23]，另一些研究通过加大静脉输注剂量优化药代动力学特征，增

加替加环素进入中枢神经系统浓度,特别是广泛耐药鲍曼不动杆菌引发的颅内感染^[24]。一篇纳入 10 项研究的荟萃分析结果显示,比起常规剂量(100 mg 负荷剂量, 50 mg q12h),大剂量(200 mg 负荷剂量, 100 mg q12h)替加环素治疗的全因死亡率低[OR = 0.44, 95%CI (0.30 ~ 0.66), P < 0.0001]、临床治愈率高(OR = 3.43, 95%CI 2.09 ~ 5.63, P < 0.000 01)、微生物根除率高(OR = 2.25, 95%CI 1.44 ~ 3.50, P = 0.0003)、不良反应相当^[25]。综上,静脉滴注大剂量替加环素既可以在颅内达到有效剂量,不增加不良反应发生率,又可避免脑室内或鞘内注射风险,是一种可行的方案。

4 总结

本文是临床药师参与 1 例嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染的抗菌药物治疗临床实践与分析。临床药师结合患者临床表现和体外药敏试验结果,协助医师制订个体化抗感染方案和监测不良反应,体现了其在药物选择和药学监护上参与临床治疗以保障患者用药安全。静脉滴注大剂量替加环素一般用于治疗广泛耐药鲍曼不动杆菌致颅内感染,未见报道在中枢神经系统治疗嗜麦芽窄食单胞菌感染。本案例通过实践证明增加替加环素剂量能增加其在中枢神经系统的浓度,从而达到治疗效果,减少脑室内或鞘内注射带来的风险。

参考文献

- [1] Brooke JS. Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. Clin Microbiol Rev, 2021, 34 (3): e0003019.
- [2] Gibb J, Wong DW. Antimicrobial treatment strategies for *Stenotrophomonas maltophilia*: a focus on novel therapies [J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10 (10): 1226.
- [3] 周华, 李光辉, 卓超, 等. 中国嗜麦芽窄食单胞菌感染诊治和防控专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93 (16): 1203-1213.
- [4] Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, et al. Infectious Diseases Society of America 2023 Guidance on the Treatment of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Infections [J]. Clin Infect Dis, 2023, ciad428.
- [5] Platsouka E, Routsis C, Chalkis A, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis, bacteremia and respiratory infection [J]. Scand J Infect Dis, 2002, 34 (5): 391-392.
- [6] Caylan R, Aydin K, Koksali I. Meningitis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: case report and review of the literature [J]. Ann Saudi Med, 2002, 22 (3-4): 216-218.
- [7] Lo WT, Wang CC, Lee CM, et al. Successful treatment of multi-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis with ciprofloxacin in a pre-term infant [J]. Eur J Pediatr, 2002, 161 (12): 680-682.
- [8] Libanore M, Bicocchi R, Pantaleoni M, et al. Community-acquired infection due to *Stenotrophomonas maltophilia*: a rare cause of meningitis [J]. Int J Infect Dis, 2004, 8 (5): 317-319.
- [9] 黄秋妹. 新生儿嗜麦芽窄食单胞菌脑膜炎 1 例 [J]. 中国实用儿科杂志, 2004, 19 (6): 373.
- [10] Reddy P, Das S, Chandler JP, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis treated with moxifloxacin [J]. Infect Dis Clin Pract, 2006, 14 (3): 173-176.
- [11] Yemisen M, Mete B, Tunali Y, et al. A meningitis case due to *Stenotrophomonas maltophilia* and review of the literature [J]. Int J Infect Dis, 2008, 12 (6): e125-127.
- [12] Sood S, Vaid VK, Bhartiya H. Meningitis due to *Stenotrophomonas maltophilia* after a neurosurgical procedure [J]. J Clin Diagn Res, 2013, 7 (8): 1696-1697.
- [13] Correia CR, Ferreira ST, Nunes P. *Stenotrophomonas maltophilia*: rare cause of meningitis [J]. Pediatr Int, 2014, 56 (4): e21-22.
- [14] Wang CH, Hsu SW, Tsai TH, et al. An outbreak of trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis associated with neuroendoscopy [J]. J Med Sci, 2014, 34 (5): 235-237.
- [15] Ibrahim J, Hamwi N, Rabei H, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis in a term healthy neonate: a case report and literature review [J]. Case Rep Pediatr, 2018, 2018: 1543934.
- [16] Khanum I, Ilyas A, Ali F. *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis-a case series and review of the literature [J]. Cureus, 2020, 12 (10): e11221.
- [17] 王小刚. 替加环素联合头孢哌酮钠舒巴坦钠治疗嗜麦芽窄食单胞菌致颅内感染 1 例 [J]. 实用医药杂志, 2020, 37 (1): 41-42.
- [18] Manuel A, Jayachandran A, Harish S, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* as a rare cause of meningitis and ventriculoperitoneal shunt infection [J]. Access Microbiol, 2021, 3 (10): 000266.
- [19] 张艳利, 吕水利, 王鹏, 等. 替加环素鞘内注射治疗嗜麦芽窄食单胞菌颅内感染的药学实践 [J]. 药物流行病学杂志, 2022, 31 (5): 332-334.
- [20] Tekçe YT, Erbay A, Cabadak H, et al. Tigecycline as a therapeutic option in *Stenotrophomonas maltophilia* infections [J]. J Chemother, 2012, 24 (3): 150-154.
- [21] Entenza JM, Moreillon P. Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of in vitro, animal and case report studies [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34 (1): 8.e1-9.
- [22] Mastroianni A, Vangeli V, Mauro MV, et al. Intrathecal tigecycline is a safe and effective treatment for central nervous system infections [J]. Encephalitis, 2023, 3 (3): 87-93.
- [23] Tunkel AR, Hasbun R, Bhimraj A, et al. 2017 infectious diseases society of america's clinical practice guidelines for healthcare-associated ventriculitis and meningitis [J]. Clin Infect Dis, 2017, 64 (6): e34-e65.
- [24] 李晓军, 王洪生, 殷尚炯, 等. 超剂量替加环素治疗广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染 1 例报告并文献回顾 [J]. 临床神经外科杂志, 2020, 17 (4): 473-476.
- [25] Zha L, Pan LL, Guo J, et al. Effectiveness and safety of high dose tigecycline for the treatment of severe infections: a systematic review and meta-analysis [J]. Adv Ther, 2020, 37 (3): 1049-1064.

(收稿日期: 2024-07-11; 修回日期: 2024-09-04)

中药与临床

椿乳凝胶治疗中医湿热瘀阻证型阴道炎的临床疗效研究

姚亮元¹, 袁红波¹, 荣苑君¹, 朱美君¹, 邹斌彬¹, 马存¹, 刘朝晖^{2*}, 楼姣英³, 贺冰⁴, 宋殿荣⁵, 杨誉佳⁶ (1. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000; 2. 首都医科大学附属北京妇产医院, 北京 100000; 3. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 4. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005; 5. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300000; 6. 遵义医科大学附属医院, 贵州 遵义 563000)

摘要: **目的** 评价椿乳凝胶治疗中医湿热瘀阻证型阴道炎的有效性。**方法** 采用随机、阳性药平行对照、多中心临床非劣效研究; 比较椿乳凝胶组(试验组)和苦参凝胶组(对照组)治疗前后阴道微生态情况、中医证候积分、中医证候疗效以及疾病综合疗效。**结果** 对阴道微生态情况、中医证候疗效及疾病综合疗效进行比较, 两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 椿乳凝胶治疗中医湿热瘀阻证型阴道炎的临床疗效与苦参凝胶相当。

关键词: 椿乳凝胶; 细菌性阴道病; 老年性阴道炎; 外阴阴道假丝酵母菌病; 湿热瘀阻证; 临床疗效

中图分类号: R711.74

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0840-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.040

Clinical efficacy of Chunru gel in the treatment of vaginitis with traditional Chinese medicine dampness-heat and blood stasis syndrome

YAO Liang-yuan¹, YUAN Hong-bo¹, RONG Yuan-jun¹, ZHU Mei-jun¹, ZOU Bin-bin¹, MA Cun¹, LIU Zhao-hui^{2*}, LOU Jiao-ying³, HE Bing⁴, SONG Dian-rong⁵, YANG Yu-jia⁶ (1. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou Hunan 412000; 2. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100000; 3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078; 4. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005; 5. The Second Hospital of Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300000; 6. Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563000)

Abstract: Objective To evaluate the efficacy of Chunru gel in the treatment of vaginitis with traditional Chinese medicine (TCM) dampness-heat and blood stasis syndrome. **Methods** A randomized, active-controlled, parallel-group, multicenter clinical study was conducted. Patients were assigned to either the Chunru gel group (experimental group) or the Kushen gel group (control group). Vaginal microecology, TCM syndrome scores, TCM syndrome efficacy, and comprehensive disease efficacy were compared between the two groups before and after treatment. **Results** No statistically significant differences were observed between the two groups in vaginal microecology, TCM syndrome efficacy, or comprehensive disease efficacy (all $P > 0.05$). **Conclusion** Chunru gel demonstrates clinical efficacy equivalent to Kushen gel in the treatment of vaginitis with TCM dampness-heat and blood stasis syndrome.

Key words: Chunru gel; bacterial vaginosis; atrophic vaginitis; vulvovaginal candidiasis; dampness-heat and blood stasis syndrome; clinical efficacy

作者简介: 姚亮元, 女, 正高级工程师, 主要从事药品研发工作, email: yly733@163.com *通信作者: 刘朝晖, 女, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事妇产科感染领域的临床及基础研究, email: 23662161@qq.com

阴道炎是由于各种病因导致阴道内微生态平衡遭到破坏,使某一种或多种致病菌异常繁殖成为优势菌而引起的阴道炎症,为常见的妇科疾病之一。细菌、丝状真菌及滴虫是临床阴道炎常见感染病原体^[1]。目前临床上常见的阴道炎症包括细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)、需氧菌性阴道炎(aerobic vaginitis, AV)、阴道毛滴虫病(trichomoniasis)、外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)及老年性阴道炎等^[2]。

目前对于阴道炎多采用抗菌药物或者激素治疗,但单一采用西药治疗疗效欠佳,患者不但复发风险较高,而且长久使用还会产生耐药性,破坏阴道微生态平衡,不利于患者恢复。而随着中医药现代化的不断发展,中药制剂在临床上获得了广泛的认可及应用,其中阴道外用中药制剂在治疗阴道炎中表现出更好的依从性。阴道外用中药制剂能解决口服中药带来的不便,同时使药液直接接触阴道黏膜,能立即发挥药效,快速改善外阴、阴道的微环境,缓解患者的症状,具有疗效稳定、毒副作用低、不易耐药等优点。椿皮具有清热燥湿、收涩止带、止泻、止血的功效,药理研究表明,该植物还具有一定的抗肿瘤和抑菌活性^[3]。苦参是我国传统医学中常用的中药材之一,苦参总碱是其主要活性成分,现代药学将其制成苦参凝胶,具有抗炎、抗菌、解热镇痛、杀虫止痒等功效,近年来文献证明其具有改善阴道炎患者临床症状、恢复阴道微生态、提高治疗的有效率以及降低复发率的效果^[4-6]。现代药理研究表明,牡丹皮化学成分较多,以酚及酚苷类成分含量最高,单萜及其苷类成分次之,除此之外还含有甾醇、三萜及其苷类和挥发油类等多种有效成分,具有抗炎、抗凝血、降血糖、抑制神经中枢等作用^[7]。乳香有活血定痛、消肿生肌之功效,有研究发现乳香酸为最具代表性的药理活性成分,具有抗炎、抗溃疡、抗肿瘤、改善记忆、保护心肾等药理作用。有研究文献提出,乳香油脂质体对于提高抗肿瘤药物临床疗效与降低不良反应十分重要,在抗肿瘤治疗应用上具有极大的开发价值^[8-10]。

椿乳凝胶是株洲千金药业股份有限公司的已上市药物,由椿皮、苦参、牡丹皮、乳香、冰片组成,化学成分包括生物碱、黄酮、萜类、酚及酚苷、挥发油和五环三萜类等多种成分^[11]。具有清热燥湿,祛瘀生肌功效。用于慢性宫颈炎之宫颈糜烂、中医辨证属于湿热瘀阻所致者,症见带下量多、色黄或白,腰腹坠胀,口苦咽干,舌红苔黄腻,脉弦或滑。临床药理学研究报道,该方具有抗炎、活血化瘀、收敛消肿的

功效,能促进正常鳞状上皮细胞再生,消除病因,清除局部感染及坏死组织,促进正常宫颈细胞的修复再生^[12]。从中医理论的角度,临床上使用椿乳凝胶对阴道病可能具有一定的疗效,但缺少相关疗效数据,本研究采用椿乳凝胶治疗阴道炎患者,探究其疗效。

1 临床资料

于2021年9月—2023年1月,在首都医科大学附属北京妇产医院、北京中医药大学东方医院、湖南中医药大学第二附属医院、天津中医药大学第二附属医院、遵义医科大学附属医院等5家医院共入组222例常见类型的阴道炎病例,按SAS 9.4统计软件设计的分层区组随机方法制作盲表,试验组与对照组各111例,按1:1分配,其中对照组因受试者主动退出剔除3例,因违背方案剔除2例,因入组前两周内接受过抗感染治疗剔除1例,实际完成105例;试验组因灌肠无法按方案疗程用药剔除1例,因受试者重复入组剔除2例,因合并重度宫颈糜烂剔除1例,实际完成107例。分别比较两组治疗前后阴道微生态情况、中医证候积分、中医证候疗效以及疾病综合疗效。本研究已通过所有观察医院的伦理委员会批准:首都医科大学附属北京妇产医院(2021-YW-001-01、2021-YW-001-02);北京中医药大学东方医院(JDF-IRB-2021041502);湖南中医药大学第二附属医院(2021-YW-007);天津中医药大学第二附属医院(2021-045-01);遵义医科大学附属医院(伦审2021第050号)。

1.1 入选标准^[13-14]

①符合西医诊断标准常见类型的阴道炎(细菌性阴道病、外阴阴道假丝酵母菌病、老年性阴道炎)者;②符合中医湿热瘀阻证辨证标准者;③年龄18~65周岁,有性生活史者;④自愿参加并且签署知情同意书者。

1.2 排除标准

①细菌性阴道病:并发滴虫性阴道炎或霉菌性阴道炎患者;外阴阴道假丝酵母菌病:并发滴虫性阴道炎或细菌性阴道病患者;②合并支原体、衣原体等感染患者;③妊娠或准备妊娠,以及哺乳期妇女;④未绝经妇女月经不规律者,包括经期大于7d或月经周期<25d或月经周期>40d者;⑤长期使用雌激素治疗者;⑥过敏体质或对多种药物过敏者;⑦3个月内参加过其他药物试验者;⑧在2周内接受过抗感染、抗菌或菌群调节治疗者;⑨合并重度宫颈糜烂、子宫内膜炎、妇科肿瘤、盆腔炎、性病等引起的白带异常或阴

痒患者；⑩ 合并心脑血管病、肝肾及造血系统等原发性疾病、精神病患者。

2 方法

2.1 治疗方法

试验组采用椿乳凝胶（株洲千金药业，批号：20210401，每支装 4 g），阴道给药，晚上睡前将铝质药用软管内的药物注入给药器中，然后送入阴道深处。每次月经干净第 4 日后给药， $5\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ ，每个月经周期连续使用 10 d。对照组采用苦参凝胶（贵阳新天药业股份有限公司，批号：210117，每支装 5 g），每晚一支，注入阴道深处。每次月经干净第 4 日后给药， $5\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ ，每个月经周期连续使用 10 d。

2.2 观察指标及判定标准

2.2.1 阴道微生态情况 比较微生物镜检情况、微生态失调情况、白带增多等患者治疗前后变化情况。

2.2.2 中医证候积分比较 治疗前后分别评价患者中医证候积分，比较治疗前后中医证候积分变化情况。

2.2.3 中医证候疗效 临床痊愈：症状、体征消失或基本消失，证候积分减少 $\geq 95\%$ 。显效：症状、体征明显改善，证候积分减少 $\geq 70\%$ 。有效：症状、体征均有好转，证候积分减少 $\geq 30\%$ 。无效：症状、体征均无明显改善，甚或加重，证候积分减少不足 30%。计算公式（尼莫地平法）为：证候积分 = [(治疗前积分 - 治疗后积分) ÷ 治疗前积分]。

2.2.4 疾病综合疗效 临床痊愈：治疗后疾病相关症状积分消失，原疾病实验室检查阴性。显效：治疗后疾病相关症状积分明显减轻 $\geq 70\%$ ，原疾病实验室检查阴性。有效：治疗后疾病相关症状计分较治疗前减轻 $\geq 50\%$ ，原疾病实验室检查阴性；或原疾病实验室检查阴性，治疗前后疾病相关症状计分主要症状计分无改变。无效：治疗前后疾病相关症状计分主要症状计分无改变，原疾病实验室检查阳性。总有效率 (%) = (痊愈 + 显效 + 有效) / 总例数 × 100%。

2.3 统计学方法

采用 SAS 9.4 软件进行分析，计数资料以率或构成比 (%) 表示，组间比较采用卡方检验，等级资料采用 Wilcoxon 秩和检验。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用成组 *t* 检验，组内治疗前后比较采用配对 *t* 检验，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果及讨论

3.1 基线资料

3.1.1 一般资料 如表 1 所示，本次临床试验两组受试者一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，具有可比性。

表 1 患者一般资料比较
Tab 1 Baseline data between the two groups

指标	对照组 ($n = 105$)	试验组 ($n = 107$)	<i>P</i>
来源门诊 [n (%)]	105 (100.0)	106 (99.07)	1.000
年龄 / 岁	47.94 ± 12.55	47.12 ± 12.18	0.645
汉族 [n (%)]	100 (95.24)	105 (98.13)	0.239
已婚 [n (%)]	99 (94.29)	105 (98.13)	0.142
身高 / cm	160.02 ± 4.73	160.09 ± 4.93	0.750
体重 / kg	59.06 ± 8.01	60.47 ± 11.45	0.672
病程 / d	120.37 ± 840.09	86.97 ± 328.05	0.616
无过敏史 [n (%)]	103 (98.10)	105 (98.13)	0.985
无合并疾病 [n (%)]	88 (83.81)	92 (85.98)	0.659
无合并用药 [n (%)]	90 (85.71)	93 (86.92)	0.799

3.1.2 生命体征 如表 2 所示，本次临床试验两组受试者治疗前的基本生命指征如体温、呼吸、心率、血压等比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，具有可比性。

表 2 患者治疗前生命体征及基本病情资料比较
Tab 2 Patients' vital signs and basic condition data before the treatment

指标	对照组 ($n = 105$)	试验组 ($n = 107$)	<i>P</i>
收缩压 / mmHg	118.98 ± 10.81	120.74 ± 12.12	0.381
舒张压 / mmHg	76.54 ± 7.29	77.53 ± 7.72	0.393
呼吸 / 次	18.90 ± 1.27	18.99 ± 1.25	0.530
体温 / °C	36.25 ± 0.21	36.26 ± 0.18	0.877
心率 / (次·min ⁻¹)	73.97 ± 7.34	75.55 ± 7.49	0.124
中医证候积分	10.18 ± 3.13	10.73 ± 3.42	0.288

3.2 有效性分析

3.2.1 阴道微生态情况 由表 3 可知，两组治疗前阴道微生物检测症状（微生物镜检、微生物失调、外阴瘙痒灼痛、白带增多、阴道黏膜出血点、性交痛、尿频尿急尿痛等）差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，提示两组均衡可比；治疗后两组受试者阴道微生物检测症状差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与治疗前比，两组治疗后受试者阴道微生物检测症状均显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2.2 中医证候积分 由表 4 可知，两组受试者治疗前中医证候积分比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，提示两组均衡可比；治疗后两组中医证候积分比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，提示两组疗效差异无统计学意义；与治疗前比，治疗后两组受试者中医证候积分显著降低 ($P < 0.0001$)，提示治疗后症状较治疗前减轻。

表 3 治疗后阴道微生态情况 [n(%)]

Tab 3 Vaginal microbiological detection after the treatment [n(%)]

指标	对照组 (n = 105)		试验组 (n = 107)	
	治疗前	用药后	治疗前	用药后
微生物镜检阳性	97 (92.38)	57 (54.29) [△]	98 (91.59)	55 (51.40) [△]
微生态失调阳性	97 (92.38)	75 (71.43) [△]	101 (94.39)	70 (65.42) [△]
外阴瘙痒灼痛阳性	94 (89.52)	28 (26.67) [△]	96 (89.72)	28 (26.17) [△]
白带增多阳性	101 (96.19)	31 (29.52) [△]	105 (98.13)	20 (18.69) [△]
阴道黏膜出血点阳性	49 (46.67)	5 (4.76) [△]	55 (51.40)	5 (4.67) [△]
性交痛阳性	21 (20.00)	2 (1.90) [△]	27 (25.23)	3 (2.80) [△]
尿频尿急尿痛阳性	30 (28.57)	3 (2.86) [△]	39 (36.45)	3 (2.80) [△]

注：与治疗前比较，[△]P < 0.05。

Note: Compared with pre-treatment values, [△]P < 0.05.

表 4 中医证候积分治疗前后变化情况 (分)

Tab 4 TCM syndrome score changes before and after the treatment (score)

组别	治疗前	用药后	差值	t	P
对照组	10.18±3.13	5.00±2.80	5.18±2.48	21.442	< 0.0001
试验组	10.73±3.42	4.93±2.60	5.79±2.46	24.327	< 0.0001
Z	- 1.063	0.042	- 1.586		
P	0.288	0.967	0.113		

3.2.3 中医证候疗效 由表 5 可知，对照组总有效率为 82.86%；试验组总有效率为 91.59%，两组中医证候疗效差异无统计学意义 (P = 0.324)。

表 5 中医证候疗效评价 [n(%)]

Tab 5 Evaluation of curative effect of TCM syndrome [n(%)]

组别	n	痊愈	显效	有效	无效	总有效
对照组	105	1 (0.95)	20 (19.05)	66 (62.86)	18 (17.14)	87 (82.86)
试验组	107	0 (0.00)	21 (19.63)	77 (71.96)	9 (8.41)	98 (91.59)
Z						0.986
P						0.324

3.2.4 疾病疗效综合评价 由表 6 可知，对照组临床痊愈率为 18.10%，总有效率为 42.86%；试验组临床痊愈率为 23.36%，总有效率为 48.60%，两组的疾病疗效综合评价差异无统计学意义 (P = 0.284)。

表 6 疾病综合疗效评价 [n(%)]

Tab 6 Evaluation of comprehensive curative effect of disease [n(%)]

组别	n	痊愈	显效	有效	无效	总有效
对照组	105	19 (18.10)	14 (13.33)	12 (11.43)	60 (57.14)	45 (42.86)
试验组	107	25 (23.36)	18 (16.82)	9 (8.41)	55 (51.40)	52 (48.60)
Z						1.072
P						0.284

3.3 讨论

中医学认为阴道炎属于“带下病”“阴痒”范畴，历代医籍对本病的论述亦多责之肝、脾、肾、任、带。中医学认为本病主要与肾、脾、肝三脏及任、带二脉有关^[15]。如《素问·骨空论》云：“任脉为病……女子带下瘕聚”；《景岳全书·妇人规》

认为“总由命门不固”所致；《傅青主女科》认为：“夫带下俱是湿症”。《女科撮要·带下》言：“带下病，或因醉饱房劳，或因六因七情……，所致阳气下陷，肝脾亏损，湿痰蕴积而成”，指出带下病与水湿下注存在密切联系。现代医家在病因与病机的认识上高度一致，认为本病主要由湿浊内生、蕴而化热等所致。因此临床治疗以祛湿止带为基本原则^[16-18]。

椿乳凝胶处方是在湿浊内生、蕴而化热的病因基础上总结归纳而成，由椿皮、苦参、牡丹皮、乳香、冰片等药物组成，其中椿皮清热燥湿，收敛止带；苦参清热燥湿，利尿，杀虫止痒；牡丹皮清热凉血，活血化瘀；乳香行气通滞，散瘀止痛，活血消痛，祛腐生肌；冰片，开窍醒神，清热止痛。全方共 5 味药，组方符合中医理论，配伍严谨，诸药合用可达清热燥湿、祛瘀生肌之效。对带下病湿热瘀阻所引起的瘙痒、疼痛、阴道黏膜充血水肿、外阴抓痕皲裂糜烂等均有较好的治疗效果。同时，现代药理学研究表明，椿皮对于福氏痢疾杆菌、宋氏痢疾杆菌和大肠埃希菌有抑制作用；臭椿苦酮对阿米巴原虫有强烈的抑制作用^[19]；苦参煎剂及苦参碱对痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、乙型链球菌、结核分枝杆菌等有明显抑制作用；苦参碱、氧化苦参碱对毛癣菌、黄癣菌、红色表皮癣菌等皮肤真菌具有不同程度抑制作用；苦参碱、氧化苦参碱具有抗炎、抗过敏作用^[20]；冰片对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、草绿色链球菌、肺

炎球菌和大肠埃希菌等在试管内均有明显抗菌作用, 呈现出低浓度抑菌、高浓度杀菌的作用^[21]。

本次临床观察中, 对于细菌性阴道病、老年性阴道炎及外阴阴道假丝酵母菌病等常见类型的阴道炎的试验组及对照组患者均仅使用了单一的中药制剂, 未结合西医疗法, 两组治疗前所有指标差异均无统计学意义, 基线水平一致; 试验结束后观察指标结果差异无统计学意义, 提示两组疗效相当, 两组治疗前后观察指标差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示经椿乳凝胶及苦参凝胶治疗后, 两组均具有较好的疗效, 且本次观察过程中无病情加重及不良事件发生, 提示安全性好。

综上所述, 椿乳凝胶可有效改善细菌性阴道病、老年性阴道炎及外阴阴道假丝酵母菌病的阴道微生态环境, 中医证候积分、中医证候疗效及疾病综合疗效与苦参凝胶疗效相当, 同时由阴道微生态改善情况及中医证候积分可知, 试验组略有优于苦参凝胶的趋势, 提示椿乳凝胶对于中医湿热瘀阻证型阴道炎有较好的临床疗效, 值得推广应用。

参考文献

- [1] 梦蝶, 夏宇, 侯小龙, 等. 甲硝唑与中药在临床上的联合应用情况[J]. 中南药学, 2018, 16(3): 389-394.
- [2] 高月倩, 白君宜, 王辰, 等. 2021 年美国疾病控制和预防中心《性传播感染治疗指南》关于阴道炎症的诊治规范解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(11): 1141-1146.
- [3] 黄云, 刘逆夫, 林云, 等. 高效液相色谱法测定椿皮药材中铁屎米酮的含量[J]. 中南药学, 2018, 16(10): 1441-1443.
- [4] 鲍敏莹, 王海娜, 王宁宁. 苦参凝胶联合奥硝唑治疗耐药性滴虫性阴道炎的疗效及对炎症因子水平的影响研究[J]. 中国性科学, 2022, 31(2): 95-98.
- [5] 曹玉琴, 孙道宽. 苦参凝胶联合甲硝唑治疗细菌性阴道炎的临床疗效与安全性评价[J]. 中国实用医药, 2021, 16(31): 20-22.
- [6] 范琳媛, 白会会, 宗晓楠, 等. 细菌性阴道病患者的加德纳菌临床分离株对苦参凝胶和甲硝唑的敏感性分析[J]. 中国性科学, 2021, 30(11): 51-54.
- [7] 张留记, 周志敏, 屠万倩, 等. 反相高效液相色谱法测定牡丹皮中苯甲酸和苯甲酰基总苷[J]. 中南药学, 2017, 15(5): 671-673.
- [8] 魏龙吟, 毛民, 沙皓淳, 等. 基于 UPLC 指纹图谱、含量测定及化学计量学的乳香质量评价[J]. 中南药学, 2021, 19(5): 947-953.
- [9] 刘让如, 谭桂山, 贺凌云, 等. 乳香挥发油脂质体的制备及质量评价[J]. 中南药学, 2009, 7(3): 184-187.
- [10] 张金龙, 黄雨婷, 严国俊, 等. 乳香挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 中南药学, 2016, 14(4): 375-377.
- [11] 张逢雨, 彭静, 王雨馨, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析椿乳凝胶中的化学成分[J]. 中南药学, 2022, 20(11): 2580-2586.
- [12] 罗桂芳, 朱金鹏, 张鹏, 等. 椿乳凝胶调节宫颈病变细胞内人乳头瘤病毒表达与阴道菌群失调的机制研究[J]. 中南药学, 2020, 18(2): 222-227.
- [13] 王辰, 范爱萍, 薛凤霞. 《2015 年美国疾病控制和预防中心关于阴道炎症的诊治规范》解读[J]. 国际妇产科学杂志, 2015, 42(6): 676-679.
- [14] 王辰, 王慧慧, 李焕荣, 等. 《2018 欧洲国际性病控制联盟 / 世界卫生组织关于阴道分泌物 (阴道炎症) 管理指南》解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(12): 1360-1365.
- [15] 冯万喆, 闫平. 中西医诊治细菌性阴道病的研究进展[J]. 江西中医药, 2020, 51(9): 77-80.
- [16] 阮媛媛, 陈萍, 徐广立, 等. 清热祛湿法治疗外阴阴道假丝酵母菌病[J]. 中医学报, 2023, 38(5): 915-920.
- [17] 戴迪, 张大伟. 庞氏清热止带汤及其临床应用[J]. 国医论坛, 2019, 34(3): 53-54.
- [18] 张婧燕, 郭凤荷. 苍柏止带汤治疗湿热下注型带下病疗效观察[J]. 山西中医, 2018, 34(11): 39.
- [19] 麦景标. 椿皮的化学成分研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [20] 张晓娟, 于孙婉琪. 苦参化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2023, 40(12): 79-87.
- [21] 吴谕锋, 朱泽宇, 陈靖南, 等. 冰片药理作用及冰片酯的研究进展[J]. 药学研究, 2020, 39(4): 217-224.

(收稿日期: 2024-07-12; 修回日期: 2024-07-26)

药品不良反应

信迪利单抗在晚期非小细胞肺癌患者中致心肌炎、肌炎、重症肌无力 1 例

舒蕾, 何智辉* (中南大学湘雅三医院重症医学科, 长沙 410000)

关键词: 非小细胞肺癌; 心肌炎; 肌炎; 重症肌无力; 程序性死亡受体 -1 抑制剂

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)03-0845-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.041

1 病历资料

患者, 女, 55 岁, 2023 年 5 月 13 日因“咳嗽气促半年余, 痰中带血 3 d”于我院门诊就诊, 完善肺部增强 CT 提示: 左肺及左侧胸膜多发占位, 纵隔及左肺门多发淋巴结肿大 (见图 1), 考虑恶性肿瘤 (肺癌伴多发转移?)。为求治疗, 于 5 月 14 日入我院肿瘤科, 入科后完善头部 MRI 平扫+增强及全腹增强 CT 未见转移, 并于 5 月 16 日行肺穿刺活检提示涎腺型低级别癌。否认冠心病、高血压、糖尿病、自身免疫性疾病病史。否认长期服药史。入院诊断: ①肺涎腺型低级别癌 纵隔及左肺门多发淋巴结肿大; ②肺结节 LU-RADS 2 类; ③甲状腺结节 TI-RADS 3 类; ④脂肪肝; ⑤胆囊结石。排除相关禁忌后, 于 6 月 1 日行第 1 周期信迪利单抗联合卡铂、培美曲塞综合治疗: 信迪利单抗注射液 200 mg 静脉滴注, 治疗周期第 1 日使用; 卡铂 600 mg 静脉滴注, 治疗周期第 2 日使用; 培美曲塞 0.8 g 静脉滴注, 治疗周期第 3 日使用。治疗完成后患者无特殊不适, 予以出院。

6 月 18 日患者出现气促不适, 伴乏力大汗, 未予特殊处理。次日患者气促加重, 不能平卧。于 6 月 20 日至我院就诊, 就诊过程中患者突发心搏骤停, 立即转入急诊科并同时予心肺复苏, 11 min 后患者呼吸、心跳及意识恢复, 于当日收入重症医学科。入重症医学科时神志清楚, 四肢肌力 5 级, 肌张力无明显增强或减弱。入院后实验室化验及检查结果示, 心肌酶谱: 肌酸激酶 (CK) $9700 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($40 \sim 200 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$), 肌酸激酶同工酶 (CK-MB) $124 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0 \sim 24 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$), 肌钙蛋白 I (CTnI) $0.691 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

($\leq 0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 乳酸脱氢酶 (LDH) $1016 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($120 \sim 250 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$), 肌红蛋白 (MYO) $10278 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0 \sim 70 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); N-端脑利钠肽前体 $409.7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$; C-反应蛋白 (CRP) $29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0 \sim 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 红细胞沉降率 (ESR) $70 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0 \sim 40 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$); 肝功能: 谷丙转氨酶 $283 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($7 \sim 40 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$), 谷草转氨酶 $553 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ($13 \sim 35 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$); 自身抗体: 抗 RO-52 抗体阳性 (+)、抗 SS-A 抗体阳性 (+)、抗核抗体 (1:160) 阳性 (+)、抗核抗体 (1:320) 弱阳性、抗核抗体 (1:80) 阳性 (颗粒型); 乙酰胆碱受体 (AChR) 抗体阳性; 连接素阳性; 抗 SSA/RO 抗体阳性; 抗 Titin 抗体阳性。心电图: 窦性心动过速, 不完全性右束支传导阻滞。心脏彩超: 室壁运动减弱, 心功能减退。肺动脉 CTA 未见明显异常。

入院第 1 日 (6 月 21 日) 患者出现呼吸增快不能平卧, 查四肢肌力为 3 级, 动脉血气: 二氧化碳分压 (PaCO_2) 79 mmHg , 氧合指数 162, 考虑呼吸肌无力通气不足, 立即予以气管插管。当日下午患者出现双侧眼睑下垂, 肌力下降。排除冠脉综合征后, 考虑免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 相关心肌炎、肌炎、重症肌无力可能性大, 予甲泼尼龙 240 mg [$4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] 静脉滴注 5 d、免疫球蛋白 $25 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 静脉滴注 5 d 后, CK、CK-MB 及 MYO 均下降, 但 CTnI 仍呈上升趋势 (见图 2)。经多学科会诊 (肿瘤科、心内科、肾内科、神经内科、临床药学) 后, 诊断为 ICIs 相关心肌炎、肌炎、重症肌无力, 加用吗替麦考酚酯口服 ($0.5 \text{ g}/\text{次}$, $2 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$) 及血浆置换。甲泼尼龙

作者简介: 舒蕾, 女, 主要从事脓毒症相关研究, email: 3147588537@qq.com *通信作者: 何智辉, 女, 主任医师, 主要从事脓毒症相关研究, email: hzh703@csu.edu.cn

240 mg · d⁻¹ 静脉滴注 9 d、免疫球蛋白 25 g · d⁻¹ 静脉滴注 6 d、吗替麦考酚酯 1 g · d⁻¹ 口服 6 d、行 3 次血浆置换后，患者心肌酶谱较前明显下降（见图 2）。第 10 日患者四肢肌力下降至 1 级，感染加重，将甲泼尼龙剂量下调，并予美罗培南抗感染、溴吡斯的明对抗肌无力。第 15 日患者淋巴细胞绝对值较前下降（0.18 × 10⁹ · L⁻¹）（见图 3），且免疫功能严重抑制，继续下调甲泼尼龙剂量并停用吗替麦考酚酯（期间 CK 及 CTnI 呈下降趋势）。患者自入院起多次发生心律失常，予胺碘酮复律或电复律后可转为窦律。自第 5 日起间断行血浆置换，住院期间。第 30 日复查心肌酶谱（CK 232 ng · mL⁻¹、CK-MB 54 U · L⁻¹、CTnI 0.52 ng · mL⁻¹，LDH 574 U · L⁻¹，MYO 4726.3 ng · mL⁻¹）较前明显下降。但患者肌力无法恢复，不能脱离呼吸机，最终死亡。



图 1 患者 5 月 13 日肺部增强 CT 图片（箭头所指为左肺占位）

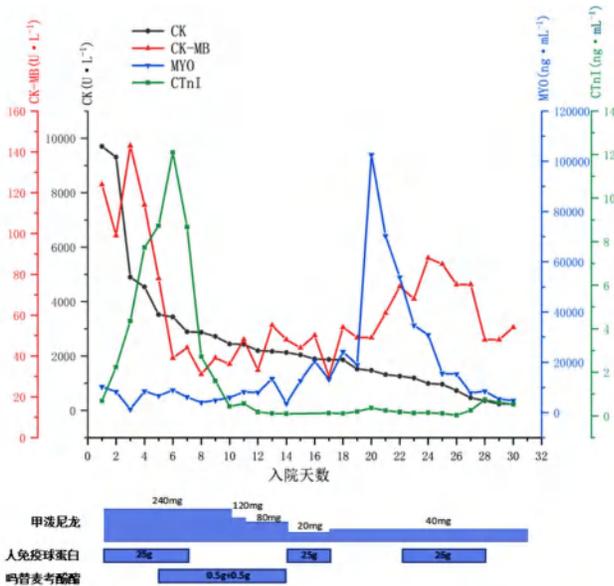


图 2 患者住院期间心肌酶谱主要指标变化及主要治疗情况

2 讨论

2.1 信迪利单抗与 ICIs 相关心肌炎、肌炎、重症肌无力的关联性评价

采用 Naranjo's 药物不良反应评估量表评价药物与不良反应之间的关系，结果见表 1。本例患者评分为 5 分，判定信迪利单抗与 ICIs 相关心肌炎、

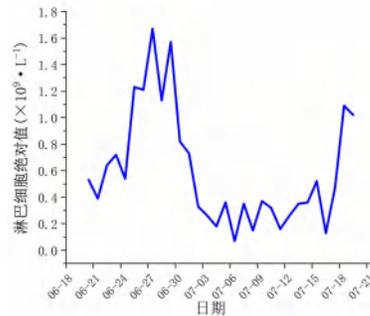


图 3 患者住院期间淋巴细胞绝对值变化情况

肌炎、重症肌无力的相关性为很可能。

表 1 Naranjo's 药物不良反应评估量表

相关问题	问题打分	评分
该 ADR 先前是否有结论性报告?	+1 0	0 +1
该 ADR 是否在使用可疑药物后发生?	+2 -1	0 +2
该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂得到缓解?	+1 0	0 +1
该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?	+2 -1	0 0
是否存在其他原因能单独引起该 ADR?	-1 +2	0 0
该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?	-1 +1	0 0
药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?	+1 0	0 0
该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解?	+1 0	0 0
患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?	+1 0	0 0
是否存在任何客观证据证实该反应?	+1 0	0 +1
总分值		+5

注：总分 ≥ 9 分，为“肯定”；5 ~ 8 分，为“很可能”；1 ~ 4 分，为“可能”；≤ 0 分，为“可疑”。

2.2 ICIs 相关心肌炎、肌炎、重症肌无力相关病例的文献回顾

通过在中国知网、万方、维普、PubMed 等数据库检索发表的肿瘤患者使用信迪利单抗后出现 ICIs 相关肌炎和 / 或心肌炎和 / 或重症肌无力的病例文献。最终检索出 17 篇文献，其中英文文献 5 篇^[1-5]，中文文献 12 篇^[6-17]。共纳入患者 17 例，其中肺癌 7 例，食管癌 2 例，胸腺瘤 2 例，肝癌、贲门癌、肝外胆管癌、卵巢癌、乳腺癌、肾癌各 1 例。男性 9 人，女性 8 人。发病年龄 48 ~ 85 岁。17 例患者中心肌炎合并肌炎和 / 或重症肌无力重叠综合征 7 例，心肌炎 9 例，肌炎 1 例。症状主要表现为乏力、肌痛、眼睑下垂和气促。治疗上，17 例患者均在发病后停药，并使用甲泼尼龙治疗，其中使用免疫球蛋白 6 例，使用免疫抑制剂（他克莫司 / 吗替麦考酚酯）2 例，血浆置换 2 例。经积极治疗后，最终症状缓解 15 例，死亡 2 例（见表 2）。

2.3 ICIs 相关心肌炎、肌炎、重症肌无力的诊断依据

表 2 17 例患者的临床特征

病例	性别	年龄 / 岁	原患疾病	免疫相关并发症	主要临床症状	主要治疗	结局
1 ^[1]	男	68	肺癌	心肌炎	进行性吞咽困难	甲泼尼龙	缓解
2 ^[2]	女	71	肝外胆管癌	重叠综合征	疲劳、腰痛、双下肢乏力酸痛、双眼睑下垂、呼吸困难	甲泼尼龙、免疫球蛋白、他克莫司	缓解
3 ^[3]	男	66	肺癌	重叠综合征	疲劳、肌痛、气促、进行性肌无力	甲泼尼龙、免疫球蛋白、血浆置换	缓解
4 ^[4]	男	60	肺癌	心肌炎	发现肌钙蛋白升高	甲泼尼龙	缓解
5 ^[5]	男	66	肺癌	心肌炎	胸痛、呼吸困难	甲泼尼龙、免疫球蛋白	缓解
6 ^[6]	女	68	卵巢癌	重叠综合征	乏力、胸闷、眼睑下垂、视物重影	甲泼尼龙、免疫球蛋白	缓解
7 ^[7]	女	63	乳腺癌	重叠综合征	眼睑下垂	甲泼尼龙	缓解
8 ^[8]	男	85	肝癌	重叠综合征	肌肉酸痛	甲泼尼龙	缓解
9 ^[9]	男	68	食管癌	肌炎	眼睑下垂、肌肉酸痛	甲泼尼龙	缓解
10 ^[10]	男	67	肺癌	重叠综合征	全身酸痛、胸闷气促	甲泼尼龙、免疫球蛋白、血浆置换	缓解
11 ^[11]	女	64	贲门癌	心肌炎	后背疼痛、气短	甲泼尼龙	缓解
12 ^[12]	女	79	食管癌	心肌炎	乏力、呼吸困难	甲泼尼龙	死亡
13 ^[13]	女	60	肺癌	心肌炎	乏力、食欲缺乏、胸闷气短	甲泼尼龙	缓解
14 ^[14]	女	84	肾癌	心肌炎	双眼睑下垂	甲泼尼龙	缓解
15 ^[15]	女	48	胸腺瘤	心肌炎	喘气、心慌	甲泼尼龙	缓解
16 ^[16]	男	49	胸腺瘤	心肌炎	眼睑下垂	甲泼尼龙、免疫球蛋白、吗替麦考酚酯	死亡
17 ^[17]	男	58	肺癌	重叠综合征	发现心肌标志物升高	甲泼尼龙	缓解

程序性死亡受体 -1 (PD-1) 是 T 细胞上重要的共抑制信号, PD-1 结合相应的抗体, 可发挥免疫抑制作用, 导致 T 细胞活性下调, 促进肿瘤细胞逃避免疫监视。而信迪利单抗作为 PD-1 抑制剂阻断了这一信号通路, 激活了免疫反应, 从而促进细胞介导的肿瘤细胞破坏。但随之带来的免疫治疗相关不良反应 (irAE) 几乎可以影响身体任何器官。

ICIs 相关重症肌无力是一种罕见的 irAE, 常见的临床表现包括上睑下垂、肢体无力和呼吸困难等。结合患者症状和 AChR 抗体阳性往往可确诊, 但抗体阴性不能排除 ICI 相关重症肌无力^[18], 有研究显示, AChR 抗体整体阳性率仅为 66%^[19]。结合本例患者双眼睑下垂、肌力下降及 AChR 抗体、抗 Titin 抗体阳性, ICI 相关重症肌无力诊断明确。ICI 相关肌炎的典型症状是肌无力, 常伴随心肌炎和重症肌无力样症状, 且病死率高于其他 irAEs^[20]。其中 CK、炎症标志物 (CRP 和 ESR) 均可升高。肌电图、MRI、肌肉活检也可用于辅助诊断^[18]。本例患者在使用信迪利单抗 17 d 后, 出现肌酶显著升高, 有明显的时间关联性, 符合 ICI 相关肌炎诊断。ICI 相关心肌炎是一种罕见但严重的 irAE, 其症状无特异性, 包括胸痛、心悸、头晕、心源性休克和猝死等。其典型特征之一是血清心脏生物标志物的升高, 如 CTnI、CK-MB 和脑利钠肽。据报道, 大部分患者心电图异常, 并可能出现各种心律失常或传导阻滞^[21-22]。ICI 相关心肌炎目前的诊断包括生

物标志物检测、超声心动图、心脏磁共振和活检等。结合本例患者入院时突发心搏骤停、心肌酶谱显著升高、反复出现心律失常, 可诊断为 ICI 相关心肌炎。

2.4 ICI 相关心肌炎、肌炎、重症肌无力的治疗及预防

心肌炎合并肌炎和 / 或重症肌无力重叠综合征患者住院死亡率高, 在一项纳入了 60 位重叠综合征患者的回顾性研究中, 死亡率接近 60%^[23]。指南指出对于重度 irAE 患者 (G4 级), 通常需要永久性停用 ICI, 并早期使用大剂量甲泼尼龙冲击, 必要时联合静脉用免疫球蛋白和血浆置换治疗^[18]。对于难治性或对激素耐药的 irAE 患者, 可考虑其他免疫抑制治疗, 包括利妥昔单抗、吗替麦考酚酯、抗胸腺细胞球蛋白^[24] 和阿巴西普^[25] 等。必要时予心脏起搏器及呼吸机支持治疗。该患者早期虽积极予大剂量甲泼尼龙冲击, 联合免疫球蛋白及吗替麦考酚酯治疗, 并多次行血浆置换, 但患者疾病发展迅速, 病情危重, 预后仍差。为降低 irAEs 风险, 患者在免疫治疗前应检测 AChR 抗体和肌肉特异性抗体谱等, 并评估心功能情况。在免疫治疗过程中, 应密切关注患者是否出现肌无力、肌痛、眼睑下垂、心悸和气促等症状, 并动态监测心肌酶谱、炎症指标和心电图等。

3 小结

ICI 使得越来越多的非小细胞肺癌和其他类型癌症患者获益, 但随之也出现了越来越多的不

不良反应/不良事件。我们需要时刻注意免疫治疗所带来的毒副作用，除了选择正确有效的免疫治疗方案外，在免疫治疗过程中，应做到积极预防、主动监测、早期发现、早期治疗，并高度警惕高危事件的发生。

参考文献

- [1] Bi HH, Ren DQ, Wang Q, et al. Immune checkpoint inhibitor-induced myocarditis in lung cancer patients: a case report of sintilimab-induced myocarditis and a review of the literature [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10 (1): 793-802.
- [2] Yin BB, Xiao JJ, Wang X, et al. Myocarditis and myositis/myasthenia gravis overlap syndrome induced by immune checkpoint inhibitor followed by esophageal hiatal hernia: a case report and review of the literature [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 950801.
- [3] Xing Q, Zhang ZW, Lin QH, et al. Myositis-myasthenia gravis overlap syndrome complicated with myasthenia crisis and myocarditis associated with anti-programmed cell death-1 (sintilimab) therapy for lung adenocarcinoma [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (5): 250.
- [4] Hu Y, Liu CX, Jin SJ, et al. A case of subclinical immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis in non-small cell lung cancer [J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23 (1): 119.
- [5] Lin YL, Yuan X, Chen LL. Immune myocarditis related to sintilimab treatment in a patient with advanced lung adenocarcinoma: a case report [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 955527.
- [6] 曾晨欣, 张霞, 朱亚兰. 信迪利单抗致免疫相关性肌炎伴心肌炎/重症肌无力 1 例及文献回顾 [J]. *实用药物与临床*, 2024, 27 (5): 350-355.
- [7] 王善贵, 王传艳, 迟玉华, 等. PD-1 抑制剂致肌炎/心肌炎伴上睑下垂 1 例 [J]. *潍坊医学院学报*, 2024, 46 (1): 78-79.
- [8] 徐芬芬, 赖林强, 涂建飞, 等. 信迪利单抗治疗肝癌导致的免疫相关性肌炎合并心肌炎 1 例 [J]. *温州医科大学学报*, 2022, 52 (12): 1014-1016.
- [9] 张双燕, 宋扬, 贺新, 等. PD-1 抑制剂治疗致眼睑下垂伴免疫相关性肌炎 1 例分析 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30 (22): 4170-4172.
- [10] 郭凯, 朱斌, 汪丰. PD-1 抑制剂致肌炎伴重症肌无力 1 例分析 [J]. *上海医药*, 2020, 41 (3): 56-59.
- [11] 张淞, 佟菲, 宁华, 等. 信迪利单抗联合奥沙利铂和替吉奥治疗贲门腺癌致免疫性心肌炎并文献分析 [J]. *肿瘤药学*, 2024, 14 (3): 278-281.
- [12] 赵玉英, 宫智, 郭晓影, 等. 表现为双向性室性心动过速的免疫检查点抑制剂相关性心肌炎一例 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2023, 25 (12): 1389-1390.
- [13] 刘斌, 杨毅, 朱自江. 信迪利单抗致免疫相关性心肌炎 1 例的报告 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2023, 30 (9): 1617-1620.
- [14] 陈敏, 张明伟, 安徽, 等. 肿瘤伴发糖尿病患者发生免疫相关性心肌炎 1 例 [J]. *药物流行病学杂志*, 2023, 32 (4): 471-475.
- [15] 戎佩佩. 信迪利单抗治疗胸腺瘤引发免疫性心肌炎 1 例 [J]. *安徽医药*, 2021, 25 (6): 1239-1241.
- [16] 李泞甫, 李智可, 陈旭澜, 等. 1 例复发性胸腺瘤患者信迪利单抗治疗过程中出现心肌损伤的原因及处理 [J]. *山东医药*, 2023, 63 (33): 76-79.
- [17] 张予, 李彭, 张旻, 等. 免疫检查点抑制剂相关心肌炎合并重症肌无力、肌炎 1 例及文献复习 [J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2023, 15 (8): 69-74.
- [18] Schneider Bj, Naidoo J, Santomaso Bd, et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune checkpoint inhibitor therapy: ASCO guideline update [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39 (36): 4073-4126.
- [19] Safa H, Johnson DH, Trinh VA, et al. Immune checkpoint inhibitor related myasthenia gravis: single center experience and systematic review of the literature [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7 (1): 319.
- [20] Anquetil C, Salem JE, Lebrun-Vignes B, et al. Immune checkpoint inhibitor-associated myositis: expanding the spectrum of cardiac complications of the immunotherapy revolution [J]. *Circulation*, 2018, 138 (7): 743-745.
- [21] Guo XX, Wang HP, Zhou JX, et al. Clinical manifestation and management of immune checkpoint inhibitor-associated cardiotoxicity [J]. *Thorac Cancer*, 2019, 11 (2): 475-480.
- [22] Johnson DB, Balko JM, Compton ML, et al. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (18): 1749-1755.
- [23] Pathak R, Katel A, Massarelli E, et al. Immune checkpoint inhibitor-induced myocarditis with myositis/myasthenia gravis overlap syndrome: a systematic review of cases [J]. *Oncologist*, 2021, 26 (12): 1052-1061.
- [24] Cautela J, Zeriuoh S, Gaubert M, et al. Intensified immunosuppressive therapy in patients with immune checkpoint inhibitor-induced myocarditis [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8 (2): e001887.
- [25] Salem Je, Allenbach Y, Vozy A, et al. Abatacept for severe immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380 (24): 2377-2379.

(收稿日期: 2024-07-08; 修回日期: 2024-09-02)

多种油脂肪乳注射液 (C₆~₂₄) 致脂肪超载综合征 1 例

张为好¹, 彭怀文¹, 王晓涛², 邓典峰^{3*} (1.安徽中医药大学第四临床医学院(六安市中医院)重症医学科, 安徽六安 237000; 2.无锡市锡山人民医院鹅湖分院中医科, 江苏 无锡 214116; 3.无锡市锡山人民医院鹅湖分院内科, 江苏 无锡 214116)

关键词: 多种油脂肪乳注射液; 脂肪超载综合征; 肠外营养; 药品不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)03-0849-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.042

多种油脂肪乳注射液(SMOF)是以30%大豆油、30%中链三酰甘油、25%橄榄油及15%鱼油等4种油为主要有效成分的新型复方静脉乳剂,相较于一般脂肪乳,SMOF加入了鱼油和橄榄油,减少了 ω -6与 ω -3多不饱和脂肪酸的比例,增加了 ω -9单不饱和脂肪酸含量,其配比更均衡,在供能的同时还可降低炎症反应、过氧化反应与血栓形成的风险,使SMOF达到了营养供能、免疫调节和治疗作用的协调统一^[1-3]。SMOF常用于内科急危重症或者围手术期患者,可以降低危重患者炎症因子水平和胃肠术后患者并发症发生率,在一定程度上改善预后^[3-4]。SMOF常见不良反应有恶心、呕吐、高血糖、体温轻度升高、寒战、颈部、背部、骨、胸和腰部疼痛及过敏反应(急性过敏反应、皮疹、风疹)等。作为一种新型均衡性脂肪乳剂,目前关于SMOF不良反应的报道较少,SMOF相关脂肪超载综合征十分罕见,国内未见文献报道。本文报道1例重症新型冠状病毒感染合并急性胃炎患者住院期间使用SMOF引起的罕见脂肪超载综合征,并进行文献复习,以期提高临床医师对SMOF相关脂肪超载综合征的认识,为临床规范用药提供参考。

1 病历资料

患者,男,81岁,因“间断发热伴呼吸困难10余日”于2023年5月14日入院。患者10余日前发热(体温最高38℃),当地卫生院输液治疗近1周(具体用药不详),体温降至正常,但呼吸困难症状逐渐加重。5月14日就诊于当地县人民医院,2次新型冠状病毒抗原呈阳性,胸部CT提示双肺多发弥漫性炎性病变并实变,诊断为重症肺炎,当日转入我院重症医学科。患者既往有冠心病史,具体用药不详;无高脂血症史。否认其他疾病史和药食过敏史。入院查体:体重80 kg,身高1.70 m,体质量指数(BMI)27.68

kg·m⁻²,体温36.6℃、心率108次·min⁻¹,呼吸32次·min⁻¹,血压149/80 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。神清,双侧瞳孔直径3 mm,光敏。双肺呼吸音粗,可闻及明显干湿啰音。心律齐,未及杂音。腹部平软,全腹无压痛、反跳痛,双下肢不肿,四肢肌力正常,双侧巴宾斯基征(-)。辅助检查:白细胞计数(WBC)14.59×10⁹个·L⁻¹↑、中性粒细胞百分比(N%)94.40%↑、血红蛋白(Hb)148.00 g·L⁻¹、血小板计数(PLT)139.00×10⁹·L⁻¹。C反应蛋白(CRP)284.22 mg·L⁻¹↑。降钙素原(PCT)0.13 ng·mL⁻¹。粪便颜色:褐色;隐血试验:阳性;红细胞:++++↑;白细胞:↑,余正常。肝功能:总胆红素(TBIL)29.29 μmol·L⁻¹↑、直接胆红素(DBIL)14.22 μmol·L⁻¹↑、白蛋白(ALB)32.15 g·L⁻¹,余正常。血脂:三酰甘油(TG)0.59 mmol·L⁻¹、总胆固醇(TC)4.01 mmol·L⁻¹。肌钙蛋白、肾功能、电解质、凝血功能、糖化血红蛋白、甲状腺功能以及免疫球蛋白正常。支气管镜肺泡灌洗液+咽拭子新型冠状病毒核酸检测阳性,TORCH十项、呼吸道九项检测阴性。血气分析pH 7.46、二氧化碳分压(PaCO₂)35.4 mmHg、氧分压(PaO₂)56.1 mmHg(FiO₂:80%)↓、剩余碱(BE)1.6 mmol·L⁻¹、碳酸氢根离子(26.4) mmol·L⁻¹、乳酸(Lac)1.2 mmol·L⁻¹。心电图提示窦性心律。床边胃镜提示急性胃黏膜弥漫性出血点,未见明显溃疡和出血。床边胸部DR:双肺感染伴左侧胸腔积液。入院诊断:①重症肺炎(新型冠状病毒感染,危重型);②I型呼吸衰竭;③胸腔积液;④冠心病;⑤急性胃炎。入院予气管插管+机械通气,胸腔穿刺引流。莫西沙星(0.4 g ivgtt qd)联合哌拉西林他唑巴坦(4.5 g ivgtt q8h)抗感染治疗,溴己新化痰,地塞米松磷酸钠注射液(5mg iv qd)

作者简介:张为好,男,呼吸治疗师,主要从事急危重病呼吸治疗与康复方面的研究, email: 945003724@qq.com *通信作者:邓典峰,男,主治医师,主要从事呼吸内科疾病诊疗方面的研究, email: ddfehu@163.com

减轻免疫炎症反应，奈玛特韦片 / 利托那韦片组合包装抗病毒治疗，奥美拉唑（40 mg ivgtt qd）护胃等对症治疗。营养方面，患者 NRS 2002 评分 4 分，NUTRIC 评分 6 分，存在营养风险。予三升袋全营养液肠外营养支持 [总能量 10 046 kJ，包含葡萄糖（Glu）279 g，20% SMOF（费森尤斯卡比华瑞制药有限公司，国药准字：J20171016）100 g，11.4% 氨基酸 96 g，多种电解质、维生素和微量元素]，总液体量 3000 mL 左右，经中心静脉输注，150 mL · h⁻¹。

住院第 2 日患者低热，体温 38℃，痰液呈白色丝状，痰中带血，复查血常规：WBC 12.71 × 10⁹ · L⁻¹ ↑、N% 88.00% ↑、Hb 130 g · L⁻¹、PLT 129.00 × 10⁹ · L⁻¹。CRP 122.45 mg · L⁻¹ ↑，PCT 0.24 ng · mL⁻¹。肺泡灌洗液培养以及血培养回报未见异常，予伏立康唑（200 mg ivgtt q12h）预防真菌感染治疗。住院第 6 日患者呼吸困难症状较前改善，复查血常规：WBC 2.88 × 10⁹ · L⁻¹ ↓、N% 88.60% ↑、Hb 76 g · L⁻¹ ↓、PLT 55.00 × 10⁹ · L⁻¹ ↓。粪便颜色：黄色；隐血试验：阴性。CRP 73.78 mg · L⁻¹，PCT 0.18 ng · mL⁻¹。凝血功能：D-二聚体 1.98 μg · mL⁻¹ ↑，凝血酶原时间（PT）20.50 s ↑、国际标准化比值（INR）1.94 ↑、活化部分凝血活酶时间（APTT）64.60 s ↑、凝血酶时间（TT）17.90 s ↑、纤维蛋白原（FIB）1.30 g · L⁻¹。肝功能：TBIL 100.82 μmol · L⁻¹ ↑、DBIL 85.46 μmol · L⁻¹ ↑、ALB 30.47 g · L⁻¹ ↓、谷草转氨酶（AST）102.41 U · L⁻¹ ↑、谷丙转氨酶（ALT）142.48 U · L⁻¹ ↑。AST/ALT 0.72、碱性磷酸酶（ALP）143.82 U · L⁻¹、γ-谷氨酰基转移酶（GGT）129.88 U · L⁻¹ ↑，余正常。心肌酶谱：乳酸脱氢酶（LDH）412.23 U · L⁻¹ ↑，肌酸激酶（CK）149.12 U · L⁻¹，余正常。血脂：TG 6.21 mmol · L⁻¹ ↑、TC 2.69 mmol · L⁻¹ ↓。肾功能和电解质正常。血气分析 pH 7.41、PaCO₂ 36.9 mmHg、PaO₂ 80.2 mmHg（FiO₂：80%）、BE 0.7 mmol · L⁻¹、24.3 mmol · L⁻¹、Lac 0.9 mmol · L⁻¹。复查床边胃镜见胃黏膜散在出血点，较前改善，无溃疡和出血。床边腹部超声提示：肝脾轻度肿大，未见肝内外胆管阻塞。经我院药学会会诊后诊断为 SMOF 导致的脂肪超载综合征，立即停用 SMOF，改肠内营养支持，悬浮红细胞 3 U + 新鲜冰冻血浆 500 mL 输注，余治疗方案不变。

住院第 9 日复查患者症状和氧合指数（PaO₂/FiO₂：137）较前进一步改善。血常规：WBC 13.70 × 10⁹ · L⁻¹ ↑、N% 93.80% ↑、Hb 99.00 g · L⁻¹ ↓、PLT 85.00 × 10⁹ · L⁻¹ ↓。白细胞介素（IL）-6 67.90

pg · mL⁻¹ ↑，CRP 43.34 mg · L⁻¹ ↑，PCT 0.34 ng · mL⁻¹。血脂：TG 1.69 mmol · L⁻¹、TC 3.13 mmol · L⁻¹。肝功能：TBIL 88.07 μmol · L⁻¹ ↑、DBIL 70.23 μmol · L⁻¹ ↑、ALB 28.84 g · L⁻¹ ↓、AST 47.92 U · L⁻¹、ALT 18.81 U · L⁻¹、AST/ALT 2.55、ALP 123.82 U · L⁻¹、GGT 134.34 U · L⁻¹ ↑，余正常。凝血功能、肾功能、电解质和正常。住院第 12 日复查血气分析 pH 7.42、PaCO₂ 35.4 mmHg、PaO₂ 76.2 mmHg（FiO₂：50%）。WBC 10.31 × 10⁹ · L⁻¹ ↑、N% 81.40% ↑、Hb 102.00 g · L⁻¹ ↓、PLT 100.00 × 10⁹ · L⁻¹。血脂：TG 1.15 mmol · L⁻¹、TC 4.78 mmol · L⁻¹。凝血功能、肾肝功能、电解质和正常。CRP 51.24 mg · L⁻¹ ↑，PCT 0.29 ng · mL⁻¹。住院第 16 日，患者拔出气管插管，序贯无创呼吸机支持，复查血脂基本正常，患者住院期间血脂及总胆红素变化见图 1。住院第 20 日改用经鼻高流量给氧（FiO₂：40%，流速 50 L · min⁻¹），复查胸片较前明显改善，住院第 22 日患者转呼吸科病房，患者住院期间使用药物情况见表 1。

表 1 患者住院期间使用药物情况

药物	用法	疗程
莫西沙星注射液	0.4 g ivgtt qd	d1 ~ d14
哌拉西林他唑巴坦钠	4.5 g ivgtt q8h	d1 ~ d21
盐酸溴己新	8 mg ivgtt q12h	d1 ~ d12
地塞米松磷酸钠注射液	5 mg iv qd	d1 ~ d10
奈玛特韦片 / 利托那韦片组合包装	3 片 po q12h	d1 ~ d5
注射用奥美拉唑	40 mg ivgtt qd	d1 ~ d12
依诺肝素	60 mg ih qd	d1 ~ d21
肠外营养（SMOF）	100 g ivgtt qd	d1 ~ d6
伏立康唑注射液	200 mg ivgtt q12h	d1 ~ d14

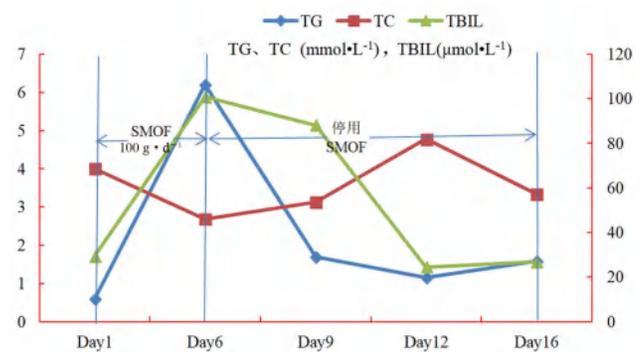


图 1 患者住院期间血脂和总胆红素变化情况

2 讨论

2.1 患者肠外营养处方分析

国内外指南都建议对所有入院 ICU 不能自主进食的患者进行营养风险评估，尽早启动营养支持（入院 24 ~ 48 h）可改善重症患者预后，缩短 ICU 住院时间和总住院时间，肠内营养支持优于肠外营养^[5-6]。对于不能通过肠内途径提供营养素者或有营养不良风险，NRS 2002 ≥ 5 分

或 NUTRIC ≥ 6 分, 48 ~ 72 h 内肠内营养无法满足能量与蛋白质目标需要量的患者 ($\leq 60\%$), 尽早启动肠外营养^[5-6]。同时指南建议有活动性消化道出血或各种胃肠道疾病导致消化吸收功能受损的患者应暂停肠内营养^[7]。该患者入院隐血试验: 阳性, 床边胃镜提示急性胃黏膜弥漫性出血点。患者 NRS 2002 评分 4 分, NUTRIC 评分 6 分, 存在营养不良风险, 因此入院早期予肠外营养支持。肠外营养处方包括碳水化合物、氨基酸、脂肪乳、电解质、维生素、微量元素和特殊营养素等。常规使用基于体重的方法计算总热量, 多数需求量在 25 ~ 126 kJ/(kg·d)。成人每日需水量 30 ~ 40 mL/(kg·d)。葡萄糖是首选供能物质, 占非氮热卡 (NPC) 50% ~ 70%, 脂肪乳占 NPC 30% ~ 50%, 糖脂比为 6 : 4, 热氮比为 100 : 1 ~ 150 : 1 时利用最佳。该患者依据指南肠外营养, 具体处方如下: 50% 葡萄糖注射液 (GS) 358 mL + 10% GS 750 mL + 5% 葡萄糖氯化钠注射液 (GNS) 500 mL + 20% SMOF 500 mL + 11.4% 氨基酸 850 mL + KCl 6 g + 20% 葡萄糖酸钙 20 mL + 25% 硫酸镁 5 mL + 三磷酸腺苷注射液 20 mL + 水溶性和脂溶性维生素 1 支, 微量元素针 1 支, 总热卡 10 046 kJ, 总液体量约为 3000 mL, 热氮比约为 131 : 1。所有营养物质混合于 3 L 输液袋中, 经过中心静脉输注, 输注速度 150 mL·h⁻¹。该患者肠外营养经过科学计算, 配比合理, 采用中心静脉输注, 因此可以排除处方配比和输注方式不合理引起的脂肪超载综合征。SMOF 说明书提示标准剂量为 1.0 ~ 2.0 g/(kg·d), 推荐输注速率为 0.125 g/(kg·h), 不超过 0.15 g/(kg·h)。该患者体重 80 kg, 每日剂量未超过 160 g·d⁻¹, 剂量在说明书推荐范围内, 输注速度为 0.0625 g/(kg·h), 亦在合理范围, 脂肪超载综合征属于不良反应范畴。

2.2 药品不良反应关联性评价

该患者入院初始血脂水平正常, 肠外营养支持 (SMOF, 500 mL·d⁻¹) 5 d 后患者出现低热, 复查血脂和胆红素明显升高 (TG 升高为主), 血常规 (三系减少) 和凝血功能严重异常, 不良反应与使用脂肪乳具有明显时间关联性, 且客观诊断证据充分。患者住院期间同时使用莫西沙星、哌拉西林他唑巴坦、溴己新、地塞米松磷酸钠、奈玛特韦片/利托那韦片、奥美拉唑和伏立康唑等治疗, 但是以上药品说明书以及相关文献均未提及高脂血症或脂肪超载综合征不良反应。患者镇静镇痛使用右美托咪定+瑞芬太尼+咪达唑仑, 未使用丙泊酚, 可以

排除丙泊酚的影响。患者既往无高脂病史, 发生不良反应时复查感染指标较入院时明显下降, 床边胃镜较前改善, 感染及消化道出血相关三系减少基本可以排除, 入院相关检查可排除其他疾病导致的脂肪超载综合征。国外文献曾报道 SMOF 导致脂肪超载综合征, 该患者停用 SMOF 后患者血脂、胆红素及凝血功能迅速恢复正常^[8]。根据诺氏药品不良反应评估量表评分为 7 分, 提示患者的脂肪超载综合征和 SMOF “很可能” 存在关联。

3 SMOF 相关不良反应和脂肪超载综合征的文献复习

脂肪超载综合征是一种静脉输注含有脂肪乳剂相关的罕见并发症, 临床特点为发热、头痛, 高血脂、黄疸、肝脾肿大、贫血、白细胞减少、血小板减少、凝血机制障碍、肝功能检查异常等, 严重者可出现呼吸窘迫、昏迷、多器官功能衰竭^[9]。脂肪超载综合征发生的主要原因包括不合理输注 (快速或大剂量) 及 TG 廓清能力下降 (儿童、高龄及肿瘤患者) 两个方面^[10-12]。

SMOF 是一种新型均衡性脂肪乳剂, 长期使用 (≥ 28 d) 的不良反应发生率较低, 在早产儿中具有很高的安全性^[13-16]。SMOF 相关脂肪超载综合征罕见, 笔者检索中国知网、万方、维普及 PubMed 等数据库, SMOF 相关脂肪超载综合征仅有 3 例国外文献报道, 具体见表 1。其中 2 例是婴幼儿, 合并有先天性疾病^[9, 17], 另外 1 例为高龄患者^[8]。脂肪廓清能力具有个体差异性, 高龄和婴幼儿对 SMOF 廓清能力下降, 这可能是本案例患者发生脂肪超载综合征的危险因素, 提示高龄或者婴幼儿输注 SMOF 应该调整剂量或加强监测, 避免不良反应发生。3 例患者均是快速或大量输注 20% SMOF 后出现脂肪超载综合征, 最短为 1 例使用 1 h 后发生^[9], 最长为 14 h^[17]。3 例患者都表现为发热和神志改变, 2 例婴幼儿除以上临床表现, 还有心动过速、呼吸困难等特征。本例患者气管插管, 本身有新型冠状病毒感染, 且处于药物镇静状态, 通过发热和神志改变判断是否发生脂肪超载综合征相对困难, 这可能是本案例患者发生不良反应的另一个危险因素, 提示对于感染性疾病气管插管患者接受 SMOF 治疗时可以通过监测相关指标 (如血脂、肝肾功能、血常规等) 及早发现不良反应。此外, 其中 1 例婴幼儿合并高脂性胰腺炎^[17]。3 例患者 TG 最高为 1398.23 mg·dL⁻¹ (15.8 mmol·L⁻¹), 最低为 934 mg·dL⁻¹ (10.55 mmol·L⁻¹)^[8-9, 17], 均超过本案例患者血脂水平。停药后予输液、输血等替

代治疗后症状迅速改善, 预后良好。关于 SMOF 率和临床特点需要进一步研究。导致脂肪超载综合征的大样本研究较少, 其发病

表 1 使用多种油脂脂肪乳致脂肪超载综合征的个案报道

文献	年龄/性别	输注速度/总量	使用时间/h	合并疾病	症状	TG/ (mg · dL ⁻¹)	预后
Schlegelmilch 等 ^[7]	11 个月/女	1.12 g/(kg · h), 15.68 g · kg ⁻¹	14	肠衰竭, 代谢性酸中毒、呼吸衰竭, 胰腺炎, 四肽重复结构域 7A (TTC7A) 突变结构域 7A (TTC7A) 突变	心动过速、呼吸急促、尿少、易怒、发热、酸中毒	1398.23	康复
Hojsak 等 ^[9]	2 岁/女	3.6 g/(kg · h), 20 g	1	短肠综合征, 肠衰竭肝病	呼吸困难、发热、心动过速	/	康复
Moon 等 ^[8]	72 岁/男	20 g · h ⁻¹ , 100 g	4	高血压, 糖尿病, 多发性骨髓瘤	肌肉疼痛、发热、嗜睡	934	康复

4 总结

目前已经报道的 SMOF 相关脂肪超载综合征患者几乎都是快速或者过量输注所致, 因此必须科学规范输注 SMOF, SMOF 标准剂量为 1.0 ~ 2.0 g/(kg · d), 不超过 3 g/(kg · d), 输注速度控制在 1.2 ~ 1.7 mg/(kg · min)。SMOF 相关的脂肪超载综合征虽罕见, 但应该引起足够的重视, 定期监测患者血脂、血常规、凝血功能及肝功能等指标, TG 大于 3 mmol · L⁻¹ 时, 停用或者减量输注脂肪乳剂, 避免不良反应发生。重症感染、肾衰竭、高龄、儿童等患者输注 SMOF 时应该减量。此外, 肝素会消耗脂蛋白酯酶, 导致 TG 代谢速度下降, 因此接受 SMOF 治疗期间应减少肝素用量。一旦发现脂肪超载综合征, 立即停药, 多数患者症状可快速逆转。合并血红蛋白严重降低、血小板计数 ≤ 30 × 10⁹ · L⁻¹、低白蛋白血症或凝血功能障碍者, 可输注红细胞、血小板和血浆 (10 mL · kg⁻¹); 低白蛋白血症可输注白蛋白 [0.5 g/(kg · d)]^[9]。严重高三酰甘油血症或合并急性胰腺炎者进行血浆置换治疗可以快速清除血脂, 改善预后^[18]。

参考文献

[1] 刘芙蓉, 王银, 杨雅静, 等. 多种油脂脂肪乳注射液制备工艺与质量评价的初步研究 [J]. 华西药学杂志, 2017, 32 (3): 234-237.

[2] 林海冠, 李宁, 王新颖, 等. SMOF 脂肪乳剂对腹部中等手术后病人脂肪酸和炎性介质的影响 [J]. 肠外与肠内营养, 2010, 17 (4): 195-198.

[3] 张志凯, 徐克成, 牛立志, 等. 多种油脂脂肪乳对胰腺癌患者免疫功能与炎性介质的影响 [J]. 广东医学, 2016, 37 (14): 2177-2179.

[4] 潘敦, 陈辉, 李良庆. 多种油脂脂肪乳在胃肠外科重症患者术后肠外营养中的应用 [J]. 南方医科大学学报, 2015, 35 (9): 1312-1315.

[5] 米元元, 黄海燕, 尚游, 等. 中国危重症患者肠内营养治疗常见并发症预防管理专家共识 (2021 版) [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (8): 903-918.

[6] 中华医学会肠外肠内营养学分会. 中国成人患者肠外肠内营养临床应用指南 (2023 版) [J]. 中华医学杂志, 2023, 103 (13): 946-974.

[7] 亚洲急危重症协会中国腹腔重症协作组. 重症病人胃肠功能障碍肠内营养专家共识 (2021 版) [J]. 中华消化外科杂志, 2021, 20 (11): 1123-1136.

[8] Moon HJ, Hwang IW, Lee JW, et al. A case of fat overload syndrome after rapid infusion of SMOF lipid emulsion in an adult [J]. Am J Emerg Med, 2017, 35 (4): 660. e663-660. e664.

[9] Hojsak I, Kolaček S. Fat overload syndrome after the rapid infusion of SMOF lipid emulsion [J]. JPEN, 2014, 38 (1): 119-121.

[10] Picon J, Carsin A, Baravalle-Einaudi M, et al. Fat overload syndrome [J]. Arch Pediatr, 2016, 23 (8): 836-839.

[11] 毕刚, 王久惠. 脂肪超载综合征伴乳糜血 1 例 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2014, 27 (1): 60-61.

[12] 范宝霞, 张文. 静脉输注脂肪乳注射液 (C14-24) 致高龄患者脂肪超载综合征 [J]. 药品不良反应杂志, 2018, 20 (1): 69-70.

[13] 张田, 王学阳, 倪倩, 等. 新型多种油脂脂肪乳注射液在早产儿肠外营养支持中的系统评价 [J]. 中华临床营养杂志, 2018, 26 (6): 354-360.

[14] 林惠玲, 陈文婵, 王小冰. 多种油脂脂肪乳剂对超未成熟儿肝功能影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (9): 954-956.

[15] Navaratnarajah N, Girard G, Sant'anna G, et al. The impact of a lipid injectable emulsion (SMOF) on conjugated bilirubin levels in children receiving prolonged parenteral nutrition: a large single center experience [J]. Clin Nutr ESPEN, 2022, 49: 289-294.

[16] 段玉会, 张霞, 王岩, 等. 多种油脂脂肪乳在早产儿肠外营养中应用及对营养状态影响 [J]. 临床军医杂志, 2023, 51 (4): 414-416, 420.

[17] Schlegelmilch M, Feder J, Creery D. Inadvertent acute lipid injectable emulsion overdose resulting in fat overload syndrome and pancreatitis in a patient with TPN dependence [J]. JPGN Rep, 2022, 3 (1): e146.

[18] Wu CX, Xu T, Yi ZM, et al. Double filtration plasmapheresis for hypertriglyceridemic acute pancreatitis caused by fat overload syndrome [J]. J Clin Pharm Ther, 2022, 47 (11): 1885-1887.

(收稿日期: 2024-07-11; 修回日期: 2024-09-06)

基于 FAERS 对儿童使用多西环素和米诺环素的 不良反应信号挖掘和分析

罗佳妮¹, 汪春燕^{2, 3}, 谭胜蓝^{1, 2, 3*} (1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541199; 2. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011; 3. 中南大学湘雅二医院临床药学研究所, 长沙 410011)

摘要: **目的** 利用美国食品药品监督管理局的不良事件报告系统 (FAERS) 挖掘儿童使用多西环素和米诺环素的不良反应 (ADR) 风险信号, 为儿童使用多西环素和米诺环素的安全性评估提供参考。 **方法** 使用 OpenVigil 检索 FAERS 数据库 2004 年第 1 季度至 2023 年第 3 季度以多西环素和米诺环素为首要怀疑药物的 8 岁以下和 8 岁及以上的儿童不良事件 (adverse drug event, ADE) 报告, 采用比例报告比值比法和报告比值比法挖掘多西环素和米诺环素 ADR 信号。 **结果** 经数据清洗, 检索到以多西环素和米诺环素为首要怀疑药物的 ADE 报告, 其中 8 岁以下儿童的分别为 67 份和 7 份, 8 岁及以上儿童的分别为 459 份和 781 份。8 岁以下儿童使用多西环素所累及的器官系统主要包括胃肠道系统、血液系统、神经系统; 在该年龄组中未观察到米诺环素的明显信号。 **结论** 本研究检索到的多西环素与米诺环素 ADR 信号基本与说明书一致。对于多西环素, 8 岁以下儿童使用时需注意未被说明书收录的霍纳综合征、肺部误吸等潜在风险; 8 岁及以上儿童使用时则需警惕赫氏反应、硬化性胆管炎等风险。对于米诺环素, 8 岁以下儿童使用时应注意未被说明书提及的先天性足部畸形和血压异常等风险; 8 岁及以上儿童使用时则要注意急性甲状腺炎、嗜酸性粒细胞性脑膜炎等风险。

关键词: 多西环素; 米诺环素; 儿童; 不良反应; 药物警戒

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)03-0853-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.043

Data mining of adverse reaction signals in children using doxycycline and minocycline based on FAERS

LUO Jia-ni¹, WANG Chun-yan^{2, 3}, TAN Sheng-lan^{1, 2, 3*} (1. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin Guangxi 541199; 2. Department of Pharmacy, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 3. Institute of Clinical Pharmacy, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011)

Abstract: Objective To elucidate the adverse drug reaction (ADR) risk profiles in children taking doxycycline or minocycline via data mining from the U. S. Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System (FAERS), and the evaluate safety of doxycycline and minocycline use in children. **Methods** OpenVigil was used to search adverse drug event (ADE) reports of children under 8 years of age and those 8 years and older, with doxycycline and minocycline as the primary suspected drugs from the FAERS database from Q1 2004 to Q3 2023. The proportional reporting ratio and reporting odds ratio methods were use to discern ADR signals associated with doxycycline and minocycline usage. **Results** After data cleaning, 67 and 7 ADE reports indicated doxycycline and minocycline as the primary suspects in children between 0 ~ 7 years, while 459 and 781 reports in children between 8 years and older, respectively. Predominant organ systems affected by doxycycline administration in children under 8 years included the gastrointestinal, hematologic, and nervous systems, no discernible

基金项目: 中南大学教育教学改革项目 (No.2023jy104); 中南大学研究生教育教学改革项目 (No.2023JGB097)。

作者简介: 罗佳妮, 女, 硕士, 主要从事临床药学研究, email: 947628547@qq.com *通信作者: 谭胜蓝, 女, 副主任药师, 硕士生导师, 主要从事临床药学研究, email: sltan@csu.edu.cn

signals of minocycline being observed in this age group. **Conclusion** The ADR signals for doxycycline and minocycline collected in this study are generally consistent with drug instructions. For doxycycline, children under 8 years of age should be aware of the potential risks of Horner's syndrome and aspiration, which are not included in the instruction manual; and children 8 years of age and older should be alert to the risks of jarisch-herxheimer reaction and cholangitis sclerosing when using the drug. For minocycline, children under 8 years of age should be aware of the risks of congenital foot deformities and blood pressure abnormal, which are not mentioned in the instruction manual; and children 8 years of age and older should be aware of the risks of thyroiditis acute and meningitis eosinophilic.

Key words: doxycycline; minocycline; child; adverse reaction; pharmacovigilance

肺炎支原体，是引发儿童上呼吸道及下呼吸道感染的重要病原体。研究显示，约 10% 的感染儿童可能会发展成肺炎，尤其在学龄儿童中，支原体肺炎的占比高达 20%^[1]。近年来，东亚地区耐药支原体肺炎的发病率有所上升，传统的大环内酯类药物治疗效果不佳，耐药菌的基因变异和强大的环境适应性给治疗带来了巨大挑战^[2]。多西环素和米诺环素这类四环素类药物虽在病程控制和快速退热上表现优异，但专家共识不建议 8 岁以下的儿童使用四环素类药物，仅在无其他更好的抗菌方案且权衡利弊后，方可考虑实施短期治疗方案^[3]。因此其安全性问题备受家长与医者关注。目前，关于这类特殊人群使用四环素类药物的安全性数据相对匮乏，多数证据来源于病例报告，缺乏真实世界研究的支持。为此，本研究收集并分析美国食品药品监督管理局的不良事件报告系统（Food and Drug Administration Adverse, FAERS）数据库中 8 岁以下和 8 岁及以上儿童使用四环素类药物的相关药物不良反应（adverse drug reaction, ADR）信号，旨在为儿童的临床用药安全提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源

本研究采用 OpenVigil 检索工具（<https://openvigil.sourceforge.net/>）对 FAERS 数据库进行相关数据检索，限定检索时间为 2004 年第 1 季度至 2023 年第 3 季度，限定目标药物名称为“doxycycline”和“minocycline”，设定年龄范围为“0~7 岁”（8 岁以下）和“8~17 岁”（8 岁及以上），最终获取了不同年龄组人群以上两种药物为首要怀疑药物的 ADR 报告。

1.2 数据标准化

本研究依据《国际医学用语词典》（MedDRA）25.1 版本，将属于同一个首选术语（PT）的 ADR 合并，再找到相应的系统/器官分类（SOC），对药物不良事件（adverse drug event, ADE）术语进行标准化和汉化。

1.3 数据处理

采用比例报告比值比法（PRR）和报告比值比法（ROR），基于比例失衡法四格表进行信号挖掘与统计分析^[4]。PRR 法的信号生成条件为报告数 ≥ 3 ，PRR 值 ≥ 2 且 $\chi^2 \geq 4$ ；ROR 法的信号生成条件为报告数 ≥ 3 ，且 95% 置信区间（CI）下限 > 1 。当以上条件均同时满足，则提示产生 1 个 ADR 信号，PRR 与 ROR 数值越大表示信号越强，说明目标药物与该 ADE 之间相关性越强。

2 结果

2.1 ADE 报告基本情况

经过数据筛选，检索以多西环素和米诺环素为首要怀疑药物 ADE 报告，其中 8 岁以下儿童的分别为 67 份和 7 份；8 岁及以上儿童的分别为 459 份和 781 份，结果见表 1。

表 1 不同年龄段儿童服用多西环素或米诺环素的 ADE 基本情况 [n(%)]

信息	多西环素		米诺环素		
	0 ≤ y < 8 (8 岁以下) (n = 67)	8 ≤ y < 18 (8 岁及以上) (n = 459)	0 ≤ y < 8 (8 岁以下) (n = 7)	8 ≤ y < 18 (8 岁及以上) (n = 781)	
性别	男	30 (44.78)	142 (30.94)	4 (57.14)	249 (31.88)
	女	19 (28.35)	165 (35.95)	3 (42.86)	393 (50.32)
	未知	18 (26.87)	152 (33.11)	—	139 (17.80)
给药方式	口服	11 (16.42)	248 (54.03)	2 (28.57)	282 (36.11)
	经静脉	3 (4.48)	5 (1.09)	—	1 (0.13)
	其他	53 (79.10)	206 (44.88)	5 (71.43)	498 (63.76)
	上报国家	美国	34 (50.75)	160 (34.86)	4 (57.14)
	英国	2 (2.99)	9 (1.96)	—	9 (1.15)
	加拿大	—	34 (7.41)	—	47 (6.02)
	法国	—	10 (2.18)	—	27 (3.46)
	日本	—	2 (0.44)	1 (14.29)	3 (0.38)

2.2 ADR 风险挖掘结果

排除与药物本身无关的信号，诸如用药错误、药物无效、超说明书使用等。最终，对于多西环素，挖掘出 8 岁以下、8 岁及以上儿童相关 ADR 信号分别为 13 个和 73 个；对于米诺环素，8 岁以下儿童未检测出 ADR 信号，8 岁及以上儿童 ADR 信号为 167 个。将上述不同人群 ADR 信号强度进行排序，

如表 2 所示,除了说明书已提示的 ADR,对于多西环素,说明书未收录的 8 岁以下儿童 ADR 包括喉部损伤、霍纳综合征、神经损伤、肺部误吸,8 岁及以上儿童 ADR 包括赫氏反应、醒前幻觉、睡前幻觉、玻璃体炎;对于米诺环素,说明书未收录的 8 岁及以上儿童 ADR 包括急性甲状腺炎、嗜酸性粒细胞增多性脑膜炎、多发性单神经病变、肠梗死、脑干梗死、甲状腺炎、肌腱损伤、动脉血栓形成。

此外,对系统中儿童使用两种药物发生 ADR 的频次进行排序(见表 3、4),除了说明书已提醒的 ADR,对于多西环素,8 岁以下儿童中说明书未收录的 ADR 包括肺部误吸、霍纳综合征、代谢性酸中毒,8 岁及以上儿童的包括赫氏反应、硬化性胆管炎、抑郁症;对于米诺环素,8 岁以下儿童的 ADR 包括先天性足部畸形、血压异常,8 岁及以上儿童的 ADR 包括甲状腺炎、甲状腺功能亢进症。

表 2 不同年龄段儿童服用多西环素和米诺环素的 ADR 信号强度前 10 位

Tab 2 Top 10 ADR signal strength for doxycycline and minocycline in children at different ages

排序	多西环素		米诺环素
	0 ≤ y < 8 (8 岁以下)	8 ≤ y < 18 (8 岁及以上)	8 ≤ y < 18 (8 岁及以上)
1	喉部损伤*	嗜中性皮肤病	急性甲状腺炎*
2	霍纳综合征*	光照性指甲松离	坏死性血管炎
3	神经损伤*	赫氏反应*	嗜酸性粒细胞性心肌炎
4	牙齿变色	食管损伤	嗜酸性粒细胞性脑膜炎*
5	高铁血红蛋白血症	指甲剥离	多发性单神经病变*
6	肺部误吸*	醒前幻觉*	肠梗死*
7	溶血性贫血	食管溃疡	脑干梗死*
8	失明	睡前幻觉*	甲状腺炎*
9	颅内压增高	玻璃体炎*	肌腱损伤*
10	吞咽困难	生殖器瘙痒	动脉血栓形成*

注 (Note): *为说明书中未提及的 ADR (* Means ADR not mentioned in the instruction)。

表 3 不同年龄段儿童多西环素不良事件报告频次前 10 位

Tab 3 Top 10 ADE reports frequency for doxycycline in children at different ages

排序	0 ≤ y < 8 (8 岁以下)				8 ≤ y < 18 (8 岁及以上)			
	不良反应	频次	PRR	ROR	不良反应	频次	PRR	ROR
1	肺部误吸*	10	63.307	73.503	嗜中性皮肤病	31	2420.65	2538.394
2	吞咽困难	6	23.61	25.949	赫氏反应*	26	1512.906	1606.004
3	高铁血红蛋白血症	6	95.241	103.227	呕吐	25	1.401	1.425
4	霍纳综合征*	5	538.109	573.917	溃疡性结肠炎	24	10.051	10.585
5	代谢性酸中毒*	4	13.185	13.997	硬化性胆管炎*	23	206.203	217.771
6	急性肾损伤	4	14.326	15.214	头痛	22	1.293	1.309
7	牙齿变色	4	95.664	101.975	抑郁症*	19	2.441	2.507
8	溶血性贫血	4	46.792	49.845	食管溃疡	19	396.106	413.326
9	呕吐	4	1.484	1.516	食管炎	18	161.377	163.259
10	失明	3	36.899	38.664	呼吸困难	18	2.124	2.167

注 (Note): *为说明书中未提及的 ADR (* Means ADR not mentioned in the instruction)。

表 4 不同年龄段儿童米诺环素不良事件报告频次前 10 位

Tab 4 Top 10 ADE reports frequency for minocycline in children at different ages

排序	0 ≤ y < 8 (8 岁以下)				8 ≤ y < 18 (8 岁及以上)			
	不良反应	频次	PRR	ROR	不良反应	频次	PRR	ROR
1	先天性足部畸形*	2	293.844	342.652	药物反应伴嗜酸性粒细胞增多和全身症状	90	26.617	29.824
2	出血性胃炎	2	615.237	717.609	发热	68	3.133	3.342
3	疼痛	2	19.358	22.418	头痛	58	2.085	2.177
4	腹痛	1	14.78	17.077	关节痛	56	6.85	7.328
5	特异性反应	1	3281.262	3827.972	良性颅内高压	41	75.421	79.633
6	血压异常*	1	703.128	820.149	甲状腺炎*	40	286.213	302.795
7	腹泻	1	7.009	8.01	甲状腺功能亢进症*	40	95.404	100.893
8	头晕	1	37.5	43.583	药物性肝损伤	40	29.846	31.479
9	头痛	1	12.564	14.491	狼疮样综合征	38	131.809	138.415
10	机械性荨麻疹	1	-1	-1	乏力	36	2.251	2.314

注 (Note): *为说明书中未提及的 ADR (* Means ADR not mentioned in the instruction)。

2.3 ADR 累及 SOC

挖掘出的有效 ADR 信号共累及 19 个 SOC。如表 5 所示,对于多西环素,8 岁以下儿童信号主要集中于各类神经系统疾病和呼吸系统、胸及纵隔疾病,8 岁及以上儿童信号主要集中于皮肤及皮下组织类疾病和胃肠系统疾病;对于米诺环素,8 岁及以上儿童信号主要集中于肝胆系统疾病、血液及淋

巴系统疾病、皮肤及皮下组织类疾病和眼器官疾病。

3 讨论

尽管四环素类药物的 ADR 已被广泛报道与研究,尚缺乏对 8 岁以下儿童使用四环素类药物(主要为多西环素和米诺环素)ADR 的全面探讨。本研究基于 FAERS 数据库,针对 8 岁以下和 8 岁及以上的儿童使用多西环素和米诺环素相关 ADR 首次进行了对比性

表 5 累及 SOC 的信号数
Tab 5 Signals number of for involving SOC

累及的 SOC	多西环素		米诺环素
	0 ≤ y < 8 (8 岁以下)	8 ≤ y < 18 (8 岁及以上)	8 ≤ y < 18 (8 岁及以上)
代谢及营养类疾病	2	1	4
耳及迷路类疾病	—	1	—
肝胆系统疾病	—	4	17
感染及侵染类疾病	—	—	9
各类检查	—	2	14
各类神经系统疾病	3	5	14
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	—	2	10
呼吸系统、胸及纵隔疾病	2	5	8
精神病类	—	7	—
良性、恶性及性质不明的肿瘤 (包括囊状和息肉状)	—	1	—
免疫系统疾病	—	1	7
皮肤及皮下组织类疾病	—	16	15
内分泌系统疾病	—	1	7
全身性疾病及给药部位各种 反应	—	4	10
肾脏及泌尿系统疾病	1	1	4
胃肠系统疾病	2	10	6
心脏器官疾病	—	1	8
血液及淋巴系统疾病	2	2	16
眼器官疾病	1	5	15

药物警戒研究。通过采用 PRR 法和 ROR 法，本研究评估了上述药品不良反应与特定年龄段儿童之间的相关性，并对这些药物在儿童中的安全性进行了评估。研究结果显示，FAERS 数据库所检索的 ADR 与药品说明书中列举的 ADR 大体相符，提示本研究数据挖掘方法有效。本研究还发现，8 岁以下儿童应用多西环素时还应注意未被说明书收录的霍纳综合征和肺部误吸等潜在风险；对于米诺环素，则应警惕未被药品说明书提及的先天性足部畸形、血压异常等风险。

3.1 多西环素相关 ADR 信号分析

说明书中提及的多西环素 ADR 所累及的 SOC 包括胃肠道系统、血液系统、神经系统等，在本研究中均检出较强信号。信号强度和报告频次前 10 位的 ADR 中，牙齿变色、高铁血红蛋白血症、溶血性贫血、颅内压增高、吞咽困难等与说明书一致，其余如霍纳综合征、神经损伤、肺部误吸等在说明书中尚未提及。

3.1.1 胃肠道系统 有报道认为多西环素是引起食管炎最常见的诱因之一，因为药物大小和辅料的影响，导致药物在食道长时间停留，多西环素溶于水后，其强酸性可引起局部腐蚀性损伤^[5]。因为未完全发育的生理结构和较低的依从性，儿童极易出现喉部损伤和吞咽困难。为了避免出现这类现象，建议服药时多喝水，采取直立姿势服药。

牙齿发黄和牙釉质发育不良是多西环素已知的不良反应之一，本研究也证实牙齿变色为显著

不良反应，信号强度和报告频次均居前 10 位。儿童在牙齿发育期间服用四环素，药物与牙齿中的钙结合，呈现黄色至深灰色，并可能影响骨骼发育^[6]。有研究认为多西环素并不易导致四环素牙，在平均接受 1.8 个疗程治疗的 8 岁以下儿童中未见明显牙齿变色^[7]，使用时间长达 21 d 也是相对安全的^[8]。但在明确证据前，对幼儿使用多西环素仍应持谨慎态度，尽量缩短疗程。

3.1.2 神经系统 假性脑瘤以颅内压升高为主要特征，典型表现为视神经盘水肿，伴随头痛、视觉障碍和光过敏等症^[9-10]。颅内高压虽常于停药后自行缓解，但可能导致永久性视力损害，因此必要时需行眼科评估^[10]。四环素类药物导致颅内压升高的机制可能与其影响蛛网膜颗粒处的环磷酸腺苷通路，进而干扰脉络丛过滤功能，减少脑脊液吸收有关^[11]。然而 Eldweik 等^[12]在排除混杂因素后，发现多西环素的使用与假性脑瘤 / 视神经盘水肿的发生并无统计学上的关联，并且在分析剂量 - 反应关系时也未观察到多西环素增加此类风险。

霍纳综合征和神经损伤虽未在多西环素药品说明书中明确列出，但本研究显示其信号强度和报告频次均较高。霍纳综合征是眼及眼附件交感神经麻痹所致，典型表现为同侧上睑下垂、瞳孔缩小及面部无汗^[13-16]。有报道显示，予淋巴管畸形婴幼儿多西环素硬化治疗后，出现罕见神经系统并发症霍纳综合征，对霍纳综合征的治疗主要针对原发病，部分病例需手术治疗上睑下垂^[17]。此外，多西环素硬化治疗还可能引起吞咽困难和肺部误吸，这可能与喉神经受损导致的咳嗽反应减弱有关^[18]。考虑到婴幼儿神经发育尚未成熟，此类神经并发症在婴幼儿中更为常见，但通常认为是可自愈的，归因于物理性压迫和局部炎症^[15]。

3.1.3 血液系统 本研究信号强度和报告频次排序表及药品说明书中均提示使用多西环素时可能增加 8 岁以下儿童发生高铁血红蛋白血症和溶血性贫血风险，研究发现这些 ADR 主要发生在多西环素对儿童颈部淋巴管畸形行硬化治疗的过程中^[15, 19-20]。婴幼儿更易患高铁血红蛋白血症，这可能与婴幼儿血红蛋白对氧的亲合力较成人更强，以及多西环素硬化治疗导致的酸中毒使患儿处于易感状态，进而形成过量的高铁血红蛋白有关^[19]。此外，多西环素行硬化治疗的同时，溶血性贫血的风险高达 4.1%，亦需重视^[15]。

3.2 米诺环素相关 ADR 信号分析

对于使用米诺环素的 8 岁以下儿童，本研究未检测到显著的不良反应信号，这可能与米诺环素在此年龄段儿童中的使用频率较低，或不良反应上报不够积极有关。8 岁及以上儿童使用米诺环素最常

见的不良反应为药物反应伴嗜酸性粒细胞增多和全身症状 (drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, DRESS)。DRESS 是一种严重的药物超敏反应, 可能导致发热、皮疹、嗜酸性粒细胞增多, 甚至并发心肌炎^[21]。当 DRESS 患者出现病情突然恶化和低血压时, 应使用大剂量糖皮质激素和循环辅助积极治疗^[22]。深色皮肤患者因肝脏代谢差异, 可能更易发生该反应^[21, 23], 但国内尚无米诺环素引起 DRESS 的病例报道^[24]。

3.3 局限性

本研究存在一定的局限性。首先, FAERS 数据库样本量大、覆盖人群广, 但这是一个自发呈报 ADE 的数据库, 上报人员复杂, 收集到的报告信息可能存在错报、漏报、信息模糊的情况。其次, 该数据库的数据主要来源于欧美地区, 亚洲地区的 ADE 报告数较少, 由于 ADE 可能存在种族差异, 本研究结论可能并不完全适用于我国人群, 但临床应用多西环素和米诺环素时需警惕这些潜在的 ADE。

4 结论

本研究检索到的多西环素与米诺环素 ADR 信号基本与说明书一致。对于多西环素, 8 岁以下儿童使用时需注意未被说明书收录的霍纳综合征、肺部误吸等潜在风险; 8 岁及以上儿童使用时则需警惕赫氏反应、硬化性胆管炎等风险。对于米诺环素, 8 岁以下儿童使用时应注意未被说明书提及的先天性足部畸形和血压异常等风险; 8 岁及以上儿童使用时则要注意急性甲状腺炎、嗜酸性粒细胞性脑膜炎等风险。

参考文献

- [1] Krafft C, Christy C. Mycoplasma pneumonia in children and adolescents [J]. *Pediatr Rev*, 2020, 41 (1): 12-19.
- [2] Li H, Li SK, Yang HJ, et al. Resurgence of mycoplasma pneumonia by macrolide-resistant epidemic clones in China [J]. *Lancet Microbe*, 2024, 5 (6): e515.
- [3] 临床常用四环素类药物合理应用多学科专家共识编写组, 中华预防医学会医院感染控制分会, 中国药理学会临床药理分会. 临床常用四环素类药物合理应用多学科专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2023, 103 (30): 2281-2296.
- [4] Moore N, Thiessard F, Begaud B. The history of disproportionality measures (reporting odds ratio, proportional reporting rates) in spontaneous reporting of adverse drug reactions [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2005, 14 (4): 285-286.
- [5] Zografos GN, Georgiadou D, Thomas D, et al. Drug-induced esophagitis [J]. *Dis Esophagus*, 2009, 22 (8): 633-637.
- [6] Ravindra D, Huang G, Hallett K, et al. Antibiotic exposure and dental health: a systematic review [J]. *Pediatrics*, 2023, 152 (1): e2023061350.
- [7] Todd SR, Dahlgren FS, Traeger MS, et al. No visible dental staining in children treated with doxycycline for suspected rocky mountain spotted fever [J]. *J Pediatr*, 2015, 166 (5): 1246-1251.
- [8] Lantos PM, Rumbaugh J, Bockenstedt LK, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA), American Academy of Neurology (AAN), and American College of Rheumatology (ACR): 2020 guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of Lyme disease [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 72 (1): e1-e48.
- [9] Beres SJ. Update in pediatric pseudotumor cerebri syndrome [J]. *Semin Neurol*, 2020, 40 (3): 286-293.
- [10] Angelette AL, Rando LL, Wadhwa RD, et al. Tetracycline-, doxycycline-, minocycline-induced pseudotumor cerebri and esophageal perforation [J]. *Adv Ther*, 2023, 40 (4): 1366-1378.
- [11] Thon OR, Gittinger JW Jr. Medication-related pseudotumor cerebri syndrome [J]. *Semin Ophthalmol*, 2017, 32 (1): 134-143.
- [12] Eldweik L, McClelland C, Stein JD, et al. Association between cycline antibiotic and development of pseudotumor cerebri syndrome [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2019, 81 (2): 456-462.
- [13] Wang KL, Chun RH, Kerschner JE, et al. Sympathetic neuropathy and dysphagia following doxycycline sclerotherapy [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2013, 77 (9): 1613-1616.
- [14] Shergill A, John P, Amaral JG. Doxycycline sclerotherapy in children with lymphatic malformations: outcomes, complications and clinical efficacy [J]. *Pediatr Radiol*, 2012, 42 (9): 1080-1088.
- [15] Cahill AM, Nijs E, Ballah D, et al. Percutaneous sclerotherapy in neonatal and infant head and neck lymphatic malformations: a single center experience [J]. *J Pediatr Surg*, 2011, 46 (11): 2083-2095.
- [16] Burrows PE, Mitri RK, Alomari A, et al. Percutaneous sclerotherapy of lymphatic malformations with doxycycline [J]. *Lymphat Res Biol*, 2008, 6 (3-4): 209-216.
- [17] Walton KA, Buono LM. Horner syndrome [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2003, 14 (6): 357-363.
- [18] Johnston DR, Donaldson J, Cahill AM. New onset dysphagia and pulmonary aspiration following sclerotherapy for a complex cervical venolymphatic malformation in an infant: case report and review of the literature [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2020, 128: 109694.
- [19] Coughlin K, Flibotte J, Cahill AM, et al. Methemoglobinemia in an infant after sclerotherapy with high-dose doxycycline [J]. *Pediatrics*, 2019, 143 (2): e20181642.
- [20] Kaczorowska-Hac B, Stefanowicz J, Stachowicz-Stencel T, et al. Methemoglobinemia in postchemotherapy stomatitis topical treatment: 2 pediatric cases [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2012, 34 (2): 137-139.
- [21] Shaughnessy KK, Bouchard SM, Mohr MR, et al. Minocycline-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome with persistent myocarditis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2010, 62 (2): 315-318.
- [22] Kanno K, Sakai H, Yamada Y, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome due to minocycline complicated by severe myocarditis [J]. *J Dermatol*, 2014, 41 (2): 160-162.
- [23] Zhao R, Pedersen EA, Mancuso JB. Minocycline induced drug rash with eosinophilia and systemic symptoms complicated by hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *JAAD Case Rep*, 2023, 32: 99-101.
- [24] 王樟根, 周峰, 周晓峰, 等. 四环素类药物致 DRESS 综合征的文献分析 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (10): 2801-2808.

(收稿日期: 2024-03-05; 修回日期: 2024-06-08)

脑苷肌肽致吉兰 - 巴雷综合征 1 例并文献复习

贾晓丽¹, 王姬², 张荣福³, 王桂芳⁴, 刘玲玲⁴, 张静静⁴, 陈德哲⁴ (1.聊城市人民医院脑科医院药剂科, 山东 聊城 252000; 2. 山东第二医科大学临床医学院, 山东 潍坊 261035; 3.青海大学附属医院神经内科, 西宁 810001; 4.聊城市人民医院脑科医院神经内科, 山东 聊城 252000)

关键词: 脑苷肌肽; 吉兰 - 巴雷综合征; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)03-0858-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.044

脑苷肌肽注射液是由家兔肌肉提取物和牛脑神经节苷脂提取物组成的复方制剂, 每 1 mL 含 0.24 mg 单唾液酸四己糖神经节苷脂 (monosialotetrahexosylganglioside, GM1), 用于多种原因引起的中枢神经损伤, 具有神经保护、神经修复、减轻神经细胞损伤的作用^[1-2]。国家食品药品监督管理总局 (现为药品监督管理局) 2016 年发布“总局关于修订单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射剂说明书的公告 (2016 年第 172 号)”, 提示使用神经节苷脂产品可能引起吉兰 - 巴雷综合征 (Guillain-Barré syndrome, GBS)。2024 年 5 月查询国家药品监督管理局官网, 现有单唾液酸四己糖神经节苷脂钠、脑苷肌肽、复方曲肽、复方脑肽苷脂用于临床。目前案例报道的不良反均为单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射剂型, 尚未见脑苷肌肽及其他神经节苷脂类相关药品导致 GBS 的报道。本文对 1 例应用脑苷肌肽注射液出现 GBS 的病例进行介绍, 对其相关性进行分析, 并检索国内外相关数据库, 对外源性神经节苷脂致 GBS 的文献资料进行复习, 以期临床提供参考。

1 病历资料

患者, 男性, 58 岁, 身高 172 cm, 体重 55 kg, 既往高血压病史。患者 24 d 前 (2023 年 12 月 9 日) 因“右侧肢体无力, 诊断左侧基底节区脑出血”入住外院, 12 月 10 日行脑出血引流术, 12 月 12 日患者脑出血量增加, 12 月 13 日转入我院监护室。12 月 9 日至 13 日在外院期间给予脑苷肌肽注射液 (规格: 2 mL/支, 吉林四环制药有限公司) 6 mL qd iv.drip, 共使用 5 d。患者入监护室时查体: 右侧肢体刺痛无反应, 左侧肢体刺痛可屈曲。12 月 17 日发现患者左侧肢体无力, 12 月 19 日左侧肢无力加重。12 月 22 日复查磁共振示脑出血引流术后, 未见新发病灶 (见图 1); 查体: 左上肢肌

力 1 级, 余肢体肌力 0 级, 四肢肌张力低。12 月 25 日颈髓磁共振显示: 颈髓内未见明显异常信号。12 月 27 日肌电图提示: 四肢多发对称性周围神经损伤, 四肢周围神经可见运动神经复合肌肉动作电位 (CMAP) 未引出, 所测神经的感觉传导速度均在正常范围。12 月 29 日脑脊液理化分析报告: 白细胞 $55 \times 10^6 \cdot L^{-1} \uparrow$, 红细胞 $3 \times 10^9 \cdot L^{-1} \uparrow$, 脑脊液蛋白定量 $417.9 \text{ mg} \cdot dL^{-1} \uparrow$, 葡萄糖 $3.33 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \uparrow$ 。12 月 29 日血清 GM1 抗体阳性。1 月 2 日转入神经内科治疗。

本患者急性运动轴索性 GBS 诊断依据: ① 急性起病, 四肢无力, 进行性加重; ② 四肢腱反射均消失; ③ 电生理检查提示四肢多发对称性周围神经损伤, 运动神经 CMAP 未引出, 轴索损伤为主, 感觉传导速度正常; ④ 抗神经节苷脂抗体血清 GM1 抗体阳性; ⑤ 脑脊液常规理化分析检查提示蛋白细胞分离; ⑥ 排除中枢神经系统疾病、脊髓病变、低钾性周期性麻痹、重症肌无力等鉴别诊断。

体格检查示体温 $36.3 \text{ } ^\circ\text{C}$, 心率 $62 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 血压 $122/79 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$), 患者神志恍惚, 言语不能, 左上肢肌力 1 级, 余肢体肌力 0 级, 四肢肌张力低, 双侧肱二头肌、肱三头肌反射消失, 双侧膝反射未引出。双侧 Babinski 征 (-), Oppenheim 征 (-), Chaddock 征 (-)。血液检查结果: 钾 $4.05 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$; 钠 $139.6 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。给予静脉注射人免疫球蛋白 (IVIG) 22.5 g ; 同时给予甲钴胺片 0.5 mg tid , 维生素 B_1 片 10 mg tid 胃管注入。请康复科会诊给予患者偏瘫肢体综合训练、浮针治疗。1 月 6 日, 患者神志清, 精神可, 言语不能, 听和理解能力较前有改善, 左上肢肌力 2 级, 余肢体肌力 0 级。连续应用人免疫球蛋白 5 d, 给予停药。1 月 15 日出院, 患者言语

作者简介: 贾晓丽, 女, 主管药师, 主要从事临床药学方面的工作, email: 1159825661@qq.com * 通信作者: 王桂芳, 女, 主任医师, 主要从事脑血管病及运动障碍性疾病方面的工作, email: wangguifang1974@163.com

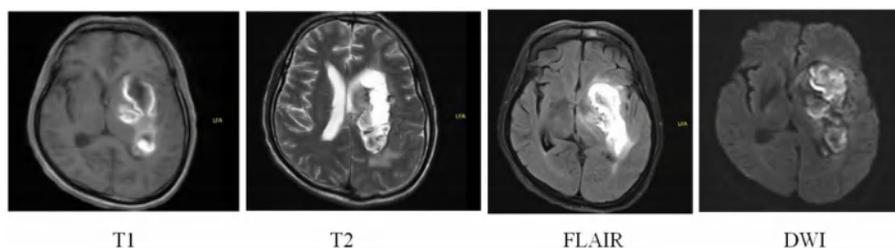


图 1 患者颅脑磁共振检查结果

注：T1. 加权成像 (T1WI)、T2. 加权成像 (T2WI)、液体衰减反转恢复 (FLAIR)、弥散加权成像 (DWI) 是磁共振核磁共振成像的四个序列，四个序列信号结合用于疾病诊断。本患者左侧放射冠、基底节、丘脑、左侧岛颞叶见大片状短 T1 信号、短 T2 信号，FLAIR 序列呈高低混杂信号，DWI 示边缘及内部环形、片状弥散受限，表示患者处于脑出血恢复期。病灶周围见少量水肿，左侧脑室、第三脑室及中脑受压，局部中线略右移。右侧大脑未见明显异常。

不清，可发音 1~2 字，患者左上肢肌力 2+ 级，左下肢肌力 1 级，四肢肌张力低。

2024 年 2 月 28 日随访：患者出院后于康复医院继续康复治疗 31 d，目前患者仍卧床，右侧肢体仍不能动，左侧肢体可抬离床面，日常需要家人照顾，MRS 评分为 4 分。

2 文献检索资料及方法

临床药师以“吉兰-巴雷综合征”“不良反应”“神经节苷脂”“复方脑肽节苷脂”“脑苷肌肽”“复方曲肽”“Guillain-Barré syndrome”“adverse drug reactions”“exogenous gangliosides”“compound troxerutin and porcine cerebroside injection”“compound porcine cerebroside and ganglioside injection”“cattle encephalon glycoside and igitonin injection”为中英文关键词，检索中国知网、中华医学期刊全文数据库、SinoMed、PubMed，检索时限均为 2014 年 1 月至 2024 年 4 月。收集相关文献，提取患者性别、年龄、用法用量、不良反应症状、发病时间、相关抗体等信息，去除重复发表的、二次文献研究、信息不详等文献。经检索和筛选，最终纳入相关案例报道 10 篇^[3-12]，含本文患者在内共计 17 例。纳入患者的主要信息见表 1。

文献复习分析外源性神经节苷脂相关 GBS 临床特点：① 男性多于女性，男性 13 例，女性 4 例；② 年龄 46~72 岁，均为中老年人群，可能与患者原发疾病好发年龄段相关；③ 发病时间集中在用药后第 6~12 日；④ 患者多以四肢无力、麻木/疼痛起病，呈进行性加重；⑤ 患者神经电生理显示多为运动神经轴索损伤，血清神经节苷脂抗体 GM1-IgM 抗体阳性率高；⑥ 外源性神经节苷脂相关 GBS 病情重，预后差。本文报道脑苷肌肽注射液致 1 例男性脑出血患者 GBS，其发生特点与之前文献报道 GM1 致 GBS 特点相似。

3 讨论

3.1 关联性分析^[13]

根据推理法：① 本患者左侧脑出血，右侧肢体无力，患者在使用脑苷肌肽注射液后第 9 日发现左侧肢体无力，2 d 后患者左侧肢体无力持续加重；② 脑苷肌肽注射液说明书中警示国内外药品上市后监测中发现可能与使用神经节苷脂产品相关的 GBS 病例；③ 患者停药后经过静脉注射免疫球蛋白、营养神经、康复治疗症状好转；④ 患者同时使用苯磺酸氨氯地平、丙泊酚注射液、右美托咪定注射液、甘露醇注射液、氨甲环酸注射液、苯巴比妥钠针、法莫替丁粉针、糜蛋白酶冻干粉针、吸入用七氟烷、硝普钠针、哌拉西林他唑巴坦钠，相关药品未见说明书标注 GBS 风险和文献报道；⑤ 患者为左侧大脑出血，右侧肢体无力，根据磁共振结果，患者左侧肢体无力无法用脑血管病解释；患者血钾 $4.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 排除低钾性周期麻痹；颈髓 MRI 未见明显异常，排除颈髓损伤。本患者推理法关联性评价分析为很可能。根据诺氏 (Naranjo's) 不良反应评估量表评价，评分为 7 分，详见表 2。结果提示脑苷肌肽注射液与本例患者 GBS 的关联性评价为“很可能”。

3.2 神经节苷脂相关性 GBS 的发病机制

GM1 能够透过血脑屏障，具有神经元保护和修复再生双重作用。20 世纪 80 年代 GM1 首先在意大利上市，广泛应用于周围神经病治疗，此后其与 GBS 的关系逐渐被报道。该药先后在西班牙、德国、意大利等欧洲国家撤市，至今未在美国批准上市^[14]。Landi 等^[15]报道了 24 例神经节苷脂相关 GBS，并估计使用神经节苷脂将使 GBS 发生风险增加近 200 倍。1996 年，神经节苷脂进入中国市场，截至 2024 年 5 月现有单唾液酸四己糖神经节苷脂钠、脑苷肌肽、复方曲肽、复方脑肽节苷脂用于临床。脑苷肌肽、复方曲肽、复方脑肽节苷脂中 GM1 含量较低，提取物来源不同 (见表 3)，临床关注度不足，目前未见其致 GBS 不良反应报道。

表 1 纳入患者的主要信息

No.	作者	性别	年龄 / 岁	原发病	具体药物用法用量	临床表现	神经电生理特点	发病时间	抗体	使用呼吸机	干预	转归
1	王雅敏 2016 ^[3]	男	56	右侧基底节区脑梗死	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠 40 mg qd 9 d	双下肢麻木, 逐渐四肢无力、吞咽障碍	未知	8 d	阳性, 类型不详	是	免疫球蛋白+甲强龙冲击治疗	30 d 后肌力恢复至 4 级
2	陈莉 2017 ^[4]	男	46	脑梗死	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液 40 mg qd 8 d	腹胀, 逐渐呼吸困难, 四肢无力	运动神经轴索损伤	7 d	血清及脑脊液 GM1-IgM 阳性	是	注射人免疫球蛋白	四肢肌力恢复至 4 级
3	胡方方 2018 ^[5]	男	56	头部外伤, 术后	神经节苷脂 40 mg qd 9 d	突发四肢无力, 不能活动, 后呼吸困难	未知	9 d	不详	是	免疫球蛋白+地塞米松	双上肢可抬至头部, 双足肌力 I 级, 余肌力 0 级
4	胡方方 2018 ^[5]	男	51	颅咽管瘤术后	神经节苷脂 100 mg qd 10 d	四肢无力, 2 d 后呼吸困难	未知	10 d	不详	是	免疫球蛋白+甲泼尼龙	至报道时未脱离呼吸机
5	尹航 2018 ^[6]	男	50	外伤后慢性硬膜下血肿	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠 100 mg qd 11 d	胸闷、呼吸困难、寒战、高热, 逐渐四肢无力	未知	8 d	不详	是	人免疫球蛋白+甲泼尼龙	未完全脱机, 四肢肌力 0~2 级
6	康健捷 2018 ^[7]	男	67	颈椎术后	单唾液酸四己糖神经节苷脂 120 mg qd 8 d	手脚麻痛、四肢乏力	运动神经髓鞘伴轴索损伤	8 d	不详	是	人免疫球蛋白+甲泼尼龙	1 月后肌力恢复为 2 级
7	王素红 2019 ^[8]	女	62	左侧半卵圆中心急性梗死	单唾液酸四己糖神经节苷脂 40 mg qd 10 d	突发呼吸困难、咳嗽无力, 四肢肌力 3 级	运动神经轴索损伤	10 d	血抗 GM1-IgG 抗体和 GD1a-IgG 抗体阳性	拒绝	人免疫球蛋白	四肢肌力 III 级
8	王素红 2019 ^[8]	女	65	外伤	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液 40 mg qd 14 d	突发呼吸困难、咳嗽无力、排尿困难, 后四肢完全瘫痪	运动神经轴索损伤	3 周	血抗 GM1-IgG 抗体和 GD1a-IgG 抗体阳性	是	人免疫球蛋白	死亡
9	张青青 2019 ^[9]	男	60	增生的炎性肉芽组织	单唾液酸四己糖神经节苷脂 40 mg qd 7 d	四肢无力, 进行性加重	运动神经髓鞘伴轴索损伤	7 d	不详	否	地塞米松磷酸钠	14 d 后四肢肌力 3+ 级
10	张青青 2019 ^[9]	男	60	颈椎术后	单唾液酸四己糖神经节苷脂 40 mg qd 6 d	突发颈部疼痛, 逐渐四肢无力	运动神经轴索损伤	6 d	不详	否	人血免疫球蛋白	53 d 肌力好转
11	张青青 2019 ^[9]	男	72	蝶鞍区病变并低钠血症	单唾液酸四己糖神经节苷脂 40 mg qd 8 d	突发四肢无力, 下肢为主	运动神经轴索损伤	10 d	不详	否	人血免疫球蛋白	双上肢肌力 4 级, 双侧下肢肌力 1+ 级
12	田璐璐 2020 ^[10]	男	74	经鼻蝶垂体瘤切除术	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液 80 mg qd 8 d	四肢无力, 小便困难	运动神经髓鞘伴轴索损伤	12 d	血 GM1-IgG	否	人免疫球蛋白	四肢肌力 2~3 级
13	王子焱 2020 ^[11]	女	72	急性脑梗死	神经节苷脂 40 mg qd 9 d	突然出现呼吸费力, 口唇发绀, 咳嗽无力	运动神经轴索损伤	9 d	血及脑脊液 GM1-IgG 阳性	是	人免疫球蛋白+甲强龙	50 d 后脱机, 四肢肌力 3 级
14	王子焱 2020 ^[11]	男	56	右侧基底节出血	神经节苷脂 80 mg qd 8 d	四肢无力伴呼吸困难	运动神经轴索损伤	8 d	血及脑脊液 GM1-IgG 阳性	是	人免疫球蛋白+甲强龙	50 d 四肢肌力恢复至 4 级
15	张立霞 2022 ^[12]	男	71	外伤	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液 40 mg qd 10 d	四肢麻木无力	运动神经轴索损伤	10 d	血清抗 GM1 抗体为阳性	否	人血免疫球蛋白	30 d 四肢肌力 2 级
16	张立霞 2022 ^[12]	女	71	外伤骨折术后	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液 40 mg qd 7 d	左侧肢体无力, 2 d 后右侧肢体无力	运动神经轴索损伤	10 d	不详	否	人血免疫球蛋白+地塞米松	15 d, 四肢肌力 2 级
17	本文患者	男	58	脑出血术后	脑苷肌肽注射液 6 mL qd 5 d	脑出血后右侧肢无力, 用药 9 d 后出现左侧肢无力, 并持续加重	运动神经轴索损伤	9 d	血 GM1-IgG 阳性	否	人血免疫球蛋白	左上肢肌力 2+ 级, 左下肢肌力 1 级

表 2 诺氏 (Naranjo's) 不良反应评估量表

相关性问题	问题分值			
	是	否	不知道	得分
1. 以前有类似的报道吗?	+ 1	0	0	+ 1
2. ADR 是在应用可疑药物之后出现的?	+ 2	- 1	0	+ 2
3. 当撤药后或应用特定的对抗药后 ADR 有所好转吗?	+ 1	0	0	+ 1
4. 当再次用药后, ADR 又出现吗?	+ 2	- 1	0	0
5. 有其他非药物因素可引起该 ADR 吗?	- 1	+ 2	0	+ 2
6. 使用安慰剂后, ADR 再次出现了吗?	- 1	+ 1	0	0
7. 药物血 (或其他体液) 浓度达到中毒浓度了吗?	+ 1	0	0	0
8. 增加 (或减少) 药物剂量, ADR 增加 (或减轻) 了吗?	+ 1	0	0	0
9. 患者以前暴露于该药或同类药有类似的反应吗?	+ 1	0	0	0
10. 该 ADR 可被其他客观证据证明吗?	+ 1	0	0	+ 1
总分				7

注: 总分 ≥ 9 分肯定; 5 ~ 8 分很可能; 1 ~ 4 分可能; ≤ 0 分可疑。

表 3 我国现有神经节苷脂类药品及含量

序号	药品通用名	GM1 含量	规格	提取物类型
1	注射用单唾液酸四己糖神经节苷脂钠		20 mg、40 mg、100 mg	猪脑提取物
2	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液		2 mL/20 mg、2 mL/40 mg、5 mL/100 mg	猪脑提取物
3	复方曲肽注射液	0.30 mg · mL ⁻¹	2 mL、5 mL、10 mL	猪脑提取物
4	复方脑肽节苷脂注射液	0.24 mg · mL ⁻¹	2 mL、5 mL、10 mL	家兔肌肉和猪脑提取物
5	脑苷肌肽注射液	0.24 mg · mL ⁻¹	2 mL、5 mL、10 mL	家兔肌肉和牛脑提取物

神经节苷脂相关性 GBS 的发病机制尚不明确, 目前倾向两种假设: ① 外源性神经节苷脂作为一种免疫原性物质激活自身免疫系统或类似于空肠弯曲菌导致 GBS 的“分子模拟”机制^[16]。Yuki 等^[17]通过对家兔注射牛神经节苷脂混合物, 成功建立了神经节苷脂诱导 AMAN 的动物模型, 同时证实外源性神经节苷脂与 GBS 相关性。② 神经节苷脂作为主要抗原靶点, 激活自身特异性免疫系统产生抗神经节苷脂抗体, 同时可能与自身神经节苷脂相互作用形成一种新抗原, 并能够促使病情加重^[10, 17-19]。接受外源性神经节苷脂治疗的 GBS 患者, 其神经节苷脂抗体检测的阳性率远高于未接受外源性神经节苷脂治疗的 GBS 患者^[19-20]。在动物实验中, 用弗氏佐剂中的 GM1 接种的兔子产生了抗 GM1 抗体, 但只表现出轻微的电生理和病理变化, 没有临床症状^[21]。与其他实验室之前的方案不同, Yuki 等^[17]建立 AMAN 动物模型的实验中, 加入了钥孔血蓝蛋白 (KLH) 作为载体。研究显示, 患病兔血清中的抗神经节苷脂免疫球蛋白 G (IgG) 抗体与 KLH 发生交叉反应, KLH 诱导产生足够高的抗神经节苷脂 IgG 抗体, KLH 免疫原性是疾病触发的必需条件^[21]。

3.3 外源性神经节苷脂相关性 GBS 的治疗

外源性神经节苷脂相关性 GBS 的治疗原则为立即停用神经节苷脂类药物, 并进行静脉注射免疫球蛋白 (IVIG) 冲击或血浆置换治疗, 通常不推荐单独应用糖皮质激素治疗 GBS^[18, 22-23]。IVIG 推荐剂量为每日 400 mg · kg⁻¹, 每日 1 次, 静脉推注, 连续 3 ~ 5 d。

综上所述, 本例脑苷肌肽注射液致 GBS 发病时间、类型、发病过程、治疗方案与 GM1 致 GBS 特点相似。不同神经节苷酯类药物 GM1 含量不同, 提取物来源不同, 但其发生机制可能存在一致性, 发病特点具有相似性。对于近期使用神经节苷脂类药物的患者, 当出现原发病无法解释的肢体无力/麻木/疼痛等类似症状时, 临床应考虑到 GBS 及时停用可疑药物, 给予有效诊治。

参考文献

- [1] 臧婷臻, 郝单单, 康德强, 等. 脑苷肌肽联合还原型谷胱甘肽和多巴丝肼治疗老年帕金森病患者的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (9): 1257-1261.
- [2] 赵艳淑. 吡拉西坦与脑苷肌肽治疗急性脑出血水肿分析 [J]. 中国卫生标准管理, 2020, 11 (8): 74-76.
- [3] 王雅敏. 神经节苷脂相关性急性吉兰-巴雷综合征 1 例报告 [J]. 实用医药杂志, 2016, 33 (2): 157-158.
- [4] 陈莉. 单唾液酸四己糖神经节苷脂相关性吉兰-巴雷综合征一例 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2017, 24 (3): 223-224.

- [5] 胡方方, 胡珍珠, 张尊胜. 神经节苷脂相关性 Guillain-Barré 综合征 2 例报告 [J]. 临床神经病学杂志, 2018, 31 (1): 22, 31.
- [6] 尹航, 于倩, 邵丹. 注射用单唾液酸四己糖神经节苷脂钠致格林-巴利综合征 1 例 [J]. 中国药物应用与监测, 2018, 15 (1): 64-66.
- [7] 康健捷, 杨红军, 邓兵梅, 等. 单唾液酸四己糖神经节苷脂相关性吉兰-巴雷综合征 1 例报告 [J]. 药学与临床研究, 2018, 26 (4): 314.
- [8] 王素红, 张哲成, 赵树新. 以呼吸肌麻痹起病的神经节苷脂相关性吉兰-巴雷综合征 2 例 [J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38 (1): 84-86.
- [9] 张青青, 郭孟敏, 马文彬, 等. 外源性神经节苷脂相关性吉兰-巴雷综合征的临床特征及肌电图表现 (附 3 例报道) [J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26 (3): 337-341, 345.
- [10] 田璐璐, 吴涓, 祝德秋. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠相关格林-巴利综合征 1 例 [J]. 药物流行病学杂志, 2020, 29 (8): 583-584.
- [11] 王子焱, 柳莉, 高彦露, 等. 以呼吸困难为首发症状的神经节苷脂相关性急性运动轴索性神经病 2 例及文献复习 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2020, 37 (5): 453-454.
- [12] 张立霞, 李贵阳. 神经节苷脂相关性吉兰-巴雷综合征: 3 例报道并文献复习 [J]. 现代电生理学杂志, 2022, 29 (2): 114-117.
- [13] 管玫, 钟光德, 黄文志, 等. 药品不良反应病例报告评价标准的探讨 [J]. 中国药房, 2008, 19 (26): 2054-2056.
- [14] 陈玥, 李佳安, 朱曼, 等. 神经节苷脂致吉兰巴雷综合征的文献分析 [J]. 临床药物治疗杂志, 2020, 18 (9): 53-57.
- [15] Landi G, D' Alessandro R, Dossi BC, et al. Guillain-Barré syndrome after exogenous gangliosides in Italy [J]. BMJ, 1993, 307 (6917): 1463-1464.
- [16] Yang B, Lian Y, Liu Y, et al. A retrospective analysis of possible triggers of Guillain-Barré syndrome [J]. J Neuroimmunol, 2016, 293: 17-21.
- [17] Yuki N, Yamada M, Koga M, et al. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside [J]. Ann Neurol, 2001, 49 (6): 712-720.
- [18] 李元贵, 杨晓苏. 外源性神经节苷脂相关性吉兰-巴雷综合征的发病机制及诊治研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2020, 47 (6): 633-636.
- [19] Illa I, Ortiz N, Gallard E, et al. Acute axonal Guillain-Barré syndrome with IgG antibodies against motor axons following parenteral gangliosides [J]. Ann Neurol, 1995, 38: 218-224.
- [20] Shi M, Zhu J, Deng H. Clinical characteristics of intravenous injection of monosialotetrahexosyl ganglioside sodium-related Guillain-Barré syndrome [J]. Front Neurol, 2019, 10: 225.
- [21] Funes SC, Chiari ME, Comín R, et al. Experimental Guillain-Barré syndrome induced by immunization with gangliosides: keyhole limpet hemocyanin is required for disease triggerin [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863 (6): 1473-1478.
- [22] 陈溪, 贾素洁, 廖音娟, 等. 临床药师参与格林巴利综合征患者的药学监护实践与分析 [J]. 中南药学, 2019, 17 (7): 1141-1143.
- [23] 郭军红, 庞效敏. 吉兰-巴雷综合征 [J]. 中华神经科杂志, 2023, 56 (8): 924-931.

(收稿日期: 2024-07-08; 修回日期: 2024-08-05)

卡瑞利珠单抗致糖尿病酮症酸中毒 1 例并文献复习

谢杏梅 (上海交通大学医学院附属松江医院药剂科, 上海 201600)

关键词: 免疫检查点抑制剂; 卡瑞利珠单抗; 糖尿病酮症酸中毒

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)03-0863-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.045

1 病历资料

患者, 男, 79 岁, 2021 年 9 月胸部 CT 提示右中肺占位性病变, 于 2021 年 10 月行“肺癌根治术”, 术后病理检查示右肺中叶低分化鳞状细胞癌, 术后病理分期 T2aN0M0 I B 期。2023 年 5 月因“痰中带血一月余”入院检查, 胸部 CT 提示左肺下叶背段空洞, 范围较前增大, 右肺上叶术后, 术区少许纤维灶, 考虑左肺继发恶性肿瘤。2023 年 6 月 14 日至 9 月 20 日行白蛋白紫杉醇 300 mg + 顺铂 60 mg + 卡瑞利珠单抗 200 mg (苏州盛迪亚生物医药有限公司, 批号: 202309019F, 规格: 200 mg/瓶) 方案治疗 5 个周期, 治疗顺利, 咯血好转, 评估疾病稳定。2024 年 2 月 28 日, 患者因“恶心、呕吐伴乏力、食欲缺乏 2 周”入院检查。患者既往高血压病史 30 年, 最高血压 180/90 mmHg (1 mmHg = 133.2 Pa), 规律服用厄贝沙坦, 冠心病及心律失常病史 20 年, 规律服用硝酸异山梨酯片和普罗帕酮, 否认糖尿病史及相关家族史, 否认烟酒等嗜好。入院检查体温 36.6 °C, 脉率 76 次·min⁻¹, 呼吸 20 次·min⁻¹, 血压 137/69 mmHg, 余无殊。诊断: 呕吐、左肺继发性恶性肿瘤、肺恶性肿瘤免疫治疗、高血压病 3 级 (高危)、冠状动脉粥样硬化性心脏病、心律失常。

2024 年 2 月 29 日, 患者精神萎靡, 神志清楚, 血常规: 白细胞 $10.47 \times 10^9 \cdot L^{-1} \uparrow$, C-反应蛋白 $125.28 \text{ mg} \cdot L^{-1} \uparrow$ 。尿液分析: 尿比重 1.034 \uparrow , 尿 pH 5.5, 尿糖 + + + +, 尿酮体 + + + +。生化报告: 血糖 $22.62 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \uparrow$, 血清尿素 $8.98 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \uparrow$, 二氧化碳结合力 $14.14 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$ 。血气报告示酸碱度 (pH) $7.241 \downarrow$; 二氧化碳分压 (PCO₂) $25.71 \text{ mmHg} \downarrow$; 氧分压 (PO₂) -POCT $106.21 \text{ mmHg} \uparrow$; 氧饱和度 (SO₂) -POCT 98.3%; 实际碳酸氢盐 (HCO₃) -POCT $10.8 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$; 实际碱剩余

(BE_{ecf}) -POCT $-16.6 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$ 。生化报告示: 钠 $151 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \uparrow$; 氯 $116.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \uparrow$; 无机磷 $0.3 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$; CO₂ 结合力 $19.3 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$ 。3 月 1 日, 血糖 $10.71 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \uparrow$, 糖化血红蛋白 10.8% \uparrow , 空腹 C 肽 $0.28 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$ ($0.78 \sim 1.89 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。患者入院多次查随机血糖 $> 11.1 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 糖尿病诊断明确, 伴恶心、呕吐, 尿糖 + + + +, 尿酮体 + + + +, 血气分析提示代谢性酸中毒, 无意识障碍, 故诊断糖尿病酮症酸中毒 (DKA), 考虑免疫治疗引起的内分泌不良反应。予人胰岛素注射液 (早 11 U, 中 13 U, 晚 10 U) 和地特胰岛素 (晚 14 U) 降低血糖, 碳酸氢钠注射液纠正酸中毒及补液支持治疗, 常规服用抗高血压、冠心病及心律失常药物。3 月 5 日复查, 病情好转, 血糖水平平稳下降, 血糖变化见图 1。患者一般情况尚可, 无特殊不适, 予出院。后续未再使用卡瑞利珠单抗。4 月 18 日入院复查, 患者血糖 $8.17 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 血糖 (2 h) $10.53 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 空腹 C 肽 $1.69 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 空腹 C 肽 (2 h) $3.33 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 余无殊。

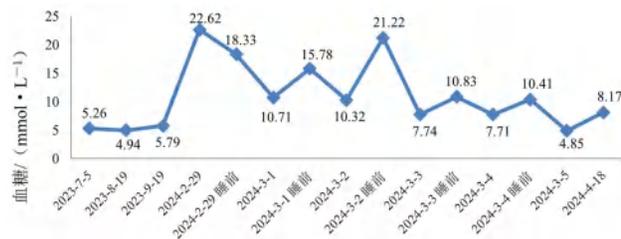


图 1 患者血糖变化情况

2 讨论

根据国家药品不良反应监测中心关于药品不良反应关联性评价方法^[1]评价:

① 患者既往无糖尿病史, 接受化学治疗前血糖正常, 行 5 周期卡瑞利珠单抗联合白蛋白紫杉醇 + 顺铂治疗后, 2024 年 2 月 29 日确诊 DKA; 说明书中提到卡瑞利珠单抗单药治疗中, 糖尿病发生率为 0.6%, 发生时间为 3.3 ~ 14.5 个月, 中

基金项目: 2018 年上海市临床药学重点专科建设项目 [编号: 沪卫计药政 (2018) 9 号]。

作者简介: 谢杏梅, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: m15026956267@163.com

位时间为 9.1 个月，本例患者不良反应发生时间约为 5 个月，符合该药说明书中已知不良反应且与不良反应的发生有合理的时间关系。② 停用卡瑞利珠单抗经胰岛素降血糖及对症治疗后病情好转，血糖平稳下降。③ 白蛋白紫杉醇和顺铂联合使用发生该不良反应鲜有报道。④ 患者高血压病史 30 年，规律服用厄贝沙坦片，冠心病及心律失常病史 20 年，规律服用硝酸异山梨酯片和普罗帕酮片，均未发生过糖尿病相关不良反应，查阅相关数据库未见以上三个药物引起高血糖、糖尿病及 DKA 的相关报道。综上，该患者发生 DKA 与卡瑞利珠单抗的关联性为“很可能”，根据《CSCO 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南》^[2]，该不良反应分级为 3 级。本文患者既往每周使用卡瑞利珠单抗前血糖检测均正常，第 5 周期使用卡瑞利珠单抗后 5 个月未常规入院检查治疗，居家期间未常规监测血糖变化，本次入院诊断 DKA，糖化血红蛋白 10.80%，说明患者既往 2~3 个月可能持续存在高血糖，因此对接受免疫检查点抑制剂 (ICIs) 治疗的患者进行有关糖尿病及 DKA 临床表现的健康宣教十分必要。

根据世界卫生组织 (WHO) 现行糖尿病分型有 4 类，分别为 1 型糖尿病、2 型糖尿病、特殊类型糖尿病、妊娠期糖尿病。该患者属于特殊类型糖尿病的亚型，由药物如 ICIs 所致的糖尿病。患者查随机血糖 $> 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，糖化血红蛋白为 10.80%，C 肽水平较低 ($0.28 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，表明起病时胰岛 β 细胞被迅速破坏，血糖迅速升高。临床上由药物引起的特殊型糖尿病患者血糖升高的一般机制为胰岛 β 细胞缺陷和周围组织胰岛素抵抗两个方面。ICIs 包括阻断程序性死亡蛋白 -1 (PD-1) 抑制剂、程序性死亡配体 -1 (PD-L1) 抑制剂及细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (CTLA-4) 抑制剂。PD-1 受体通过活化的 T 细胞表达，并结合 PD-L1，抑制 T 细胞增殖，而 CTLA-4 负性调节 T 细胞活化，抑制 T 细胞的活性^[3-4]。目前 ICIs 引起免疫性糖尿病的发病机制尚未明确，有研究表明免疫性糖尿病与遗传因素相关，人类白细胞抗原 (HLA) 与多种自身免疫性疾病有重要联系，HLA 是 1 型糖尿病的遗传易感基因，主要基因有 *HLA-DRB1*、*HLA-DQB1*、*HLA-A* 位点^[5-6]。在 ICIs 引起的糖尿病中，ICIs 可解除 T 细胞抑制，正向调节 T 细胞活化，导致胰岛 β 细胞被浸润破坏，造成胰岛素绝对缺乏，进而引起糖尿病发生^[5]。另有研究发现 2 型糖尿病患者中 PD-1

表达下调，PD-1 表达水平与胰岛素水平、糖尿病病程成正相关，与体质指数 (BMI) 成负相关，提示 PD-1 可能参与 2 型糖尿病的发病过程^[7]。一项研究在 6 年间收集并观察 2960 例接受 ICIs 治疗的患者，其中 27 例 (0.9%) 使用 PD-1 或 PD-L1 抑制剂后出现胰岛素依赖型糖尿病，糖尿病患者中 59% 表现为 DKA，42% 在诊断期间有胰腺炎证据^[6]。一项 ICIs 相关的内分泌不良事件的系统评价和荟萃分析共纳入 19 922 例患者，结果发现，纳武利尤单抗单药治疗导致的糖尿病发病率为 2.0%，帕博利珠单抗单药治疗导致的糖尿病发生率为 0.8%^[8]。另一项 ICIs 致糖尿病研究共纳入 137 例患者结果发现，接受 PD-1 抑制剂治疗的患者致糖尿病最常见 (96 例，占比 70.07%)，PD-1 抑制剂主要以纳武利尤单抗和帕博利珠单抗为主，可能因为这两个药是最早被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准投入临床使用的 PD-1 抑制剂，使用较广，因此国内外研究较多^[5]。糖尿病是 ICIs 治疗中少见的内分泌不良事件之一，主要发生在 PD-1 抑制剂治疗后，通常在用药后几周至 1 年发生，平均发病时间在 20 周左右^[6]，甚至在停止用药后数月发生^[9]；ICIs 相关糖尿病起病快，且发展迅速，通常表现为胰岛素缺乏和威胁生命的 DKA，大部分患者首发症状为 DKA^[6, 10]，临床可表现为“三多一少” (即烦渴多饮、多尿、多食、不明显体重下降)，严重者可出现恶心、呕吐、乏力、腹痛、心动过速、呼吸深快、呼吸有“烂苹果”味、昏睡或昏迷等 DKA 症状等^[11]。

卡瑞利珠单抗是 2019 年上市的广谱 PD-1 抑制剂，2023 年修订说明书中提及在接受卡瑞利珠单抗治疗的 2011 例患者中，致患者糖尿病 13 例 (0.6%)，均接受降糖治疗，其中发生 3~4 级糖尿病 9 例，1 例永久停药，而致 DKA 发生率未知。自卡瑞利珠单抗上市后，有关 DKA 的文献报道较少，如续广娟等^[12]报道了 1 例既往无糖尿病病史，且每周期免疫治疗前血糖均在正常范围内的患者接受卡瑞利珠单抗治疗胃癌 6 个周期后出现反应迟钝，伴恶心，呼之能应，呼吸声快，诊断 DKA，予胰岛素降糖，碳酸氢钠纠正酸中毒后好转，该患者既往每周免疫治疗前均常规进行血糖监测，均在正常范围；吕子彦等^[13]报道 1 例既往无糖尿病病史患者接受卡瑞利珠单抗治疗肺癌 3 个周期后致 3 级 DKA，临床表现为昏迷，呼吸有“烂苹果”气味，予胰岛素调控血糖

后整体平稳,且未再发生高血糖。

由 ICI 引起的特殊类型糖尿病以胰岛 β 细胞破坏为特征,一般按照 1 型糖尿病的原则处理。相关指南和专家共识指出^[2, 11],根据血糖水平进行病情分级:1 级(空腹血糖 $< 8.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 2 级(空腹血糖在 $8.9 \sim 13.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)患者部分可启用口服降糖药物或直接启用胰岛素治疗,可继续 ICI 治疗,治疗期间动态监测血糖,调整饮食和生活方式;3 级(空腹血糖在 $13.9 \sim 27.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)及以上(空腹血糖 $> 27.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的患者应完善血 pH、基础代谢组合检查、尿或血浆酮体、 β -羟基丁酸等,若尿或血酮体/阴离子间隙阳性,查 C 肽、抗谷氨酸脱羧酶抗体、抗胰岛细胞抗体,但若 DKA 检查阳性,暂停 ICI 治疗并及时启用胰岛素治疗,当血糖得到控制可继续开启 ICI 的治疗;若有 DKA 症状,应纠正酸脱水、电解质紊乱和高血糖,消除诱因,防治并发症^[11]。糖尿病发病后应制订个体化的血糖控制目标,老年糖尿病血糖控制目标可适当放宽至糖化血红蛋白 $8\% \sim 8.5\%$,空腹血糖 $5.6 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,睡前血糖 $6.1 \sim 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,血压控制目标小于 $150/90 \text{ mmHg}$ ^[14];可通过开展集体教育或个体教育等线下方式结合远程教育模式,如微信公众号、手机应用程序等线上方式传递健康知识,根据患者健康状态分层给予个体化的生活方式指导以降低糖尿病的风险^[15]。ICI 相关糖尿病一般为永久性,因此即使停止使用 ICI 也应持续监测血糖变化,及时调整糖尿病用药的剂量,并进行每 3 个月 1 次的糖化血红蛋白检测的随访^[16]。

ICI 引发的糖尿病是免疫相关性内分泌不良反应中少见但具有临床意义的事件,早期可能无明显症状,但起病迅速,首发症状即可出现酮症酸中毒,较为凶险。因此,使用 ICI 后应定期检测血糖变化及随访,临床医师及药师需加强对其认识及用药宣教,保障患者用药安全。本研究为个案报道,无法准确获取卡瑞利珠单抗致糖尿病的发生率及发病机制,未来临床实践中应加强不良反应的识别及归纳,探究 ICI 致糖尿病的作用机制,以便更好地防治。

参考文献

[1] 国家药品不良反应监测中心. 药品不良反应报告和监测工作手册 [EB/OL]. (2012-11-01) [2024-05-02]. [https://](https://www.doc88.com/p-94787554141946.html)

www.doc88.com/p-94787554141946.html.

- [2] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2023.
- [3] Lee HT, Lee SH, Heo YS. Molecular interactions of antibody drugs targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in immuno-oncology [J]. *Molecules*, 2019, 24 (6): 1190-1206.
- [4] 严婷, 廖德华, 符一岚, 等. 某肿瘤医院免疫检查点抑制剂超说明书用药分析 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (5): 1358-1364.
- [5] 高雅, 李乃适, 赵维纲. 免疫检查点抑制剂与糖尿病 [J]. *重庆医科大学学报*, 2021, 46 (5): 598-609.
- [6] Stamatouli AM, Quandt Z, Perdigoto AL, et al. Collateral damage: insulin-dependent diabetes induced with checkpoint inhibitors [J]. *Diabetes*, 2018, 67 (8): 1471-1480.
- [7] Sun P, Jin QY, Nie SN, et al. Unlike PD-L1, PD-1 is downregulated on partial immune cells in type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 5035261.
- [8] De Filette J, Andreescu CE, Cools F, et al. A systematic review and meta-analysis of endocrine-related adverse events associated with immune checkpoint inhibitors [J]. *Horm Metab Res*, 2019, 51 (3): 145-156.
- [9] Mae S, Kuriyama A, Tachibana H. Diabetic ketoacidosis as a delayed immune-related event after discontinuation of nivolumab [J]. *J Emerg Med*, 2021, 60 (3): 342-344.
- [10] Youssef N, Noureldein M, Daoud G, et al. Immune checkpoint inhibitors and diabetes: mechanisms and predictors [J]. *Diabetes Metab*, 2021, 47 (3): 101193.
- [11] 中华医学会内分泌学分会免疫内分泌学组. 免疫检查点抑制剂引起的内分泌系统免疫相关不良反应专家共识 (2020) [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2021, 37 (1): 1-16.
- [12] 续广娟, 周琴, 陈喆. 注射用卡瑞利珠单抗致糖尿病酮症酸中毒合并血小板减少 1 例 [J]. *中国药师*, 2021, 24 (3): 531-534.
- [13] 吕子彦, 黄雪飞, 任琳, 等. 卡瑞利珠单抗引起糖尿病酮症酸中毒后免疫再挑战 1 例 [J]. *医药导报*, 2023, 42 (10): 1578-1580.
- [14] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会, 中国住院患者血糖管理专家组. 中国住院患者血糖管理专家共识 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2017, 33 (1): 1-10.
- [15] 国家老年医学中心, 中华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 (2024 版) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2024, 16 (2): 147-189.
- [16] Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune check-point inhibitor therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36 (17): 1714-1768.

(收稿日期: 2024-05-03; 修回日期: 2024-08-02)

药学教育

药学教育教学法的文献计量学研究与可视化分析

陶旭锋, 席艳, 吕林林, 朱艳娜, 翟晓涵, 陈旭阳, 董得时* (大连医科大学附属第一医院药学部, 辽宁大连 116011)

摘要: **目的** 研究国际上药学教育教学法相关研究的前沿和热点方向, 为我国相关领域学者进行药学教育教学法的深入研究提供参考。**方法** 利用 Web of Science Core Collection (WoSCC) 数据库搜索药学教育教学法的相关文献, 并应用 VOSviewers 和 R package “bibliometrix” 等软件进行文献计量学研究和可视化分析。**结果** 本研究共搜索到来自美国、英格兰、澳大利亚、中国等 83 个国家的 772 篇文章。经过分析发现, 在过去 10 年中, 与药学教育相关的出版物数量呈现平稳略增的态势, 于 2019 年达到峰值; 美国在药学教育教学方面处于领先地位, 研究产出居于首位, 中国相关出版物数量位列全球第 4, 并与全球领先国家和周边国家都有着积极的合作关系。此外, 自主学习、模拟、分组学习、翻转课堂、PBL 学习等教育方法是热点内容, 职业认同则是 2023 年开始出现的热点关键词。**结论** 积极探索药学教育教学方法与药学学生职业认同教育相结合的教学模式, 可能是促进药学教育教学方法改革与创新的途径之一。

关键词: 药学教育教学法; 文献计量学; 可视化分析; WoSCC 数据库; 职业认同

中图分类号: G619; G642 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)03-0866-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.03.046

Bibliometric and visual analysis of teaching methods for pharmaceutical education

TAO Xu-feng, XI Yan, LYU Lin-lin, ZHU Yan-na, ZHAI Xiao-han, CHEN Xu-yang, DONG De-shi* (Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116011)

Abstract: Objective To determine the forefront and research directions, and provide reference for scholars in related fields in China to conduct in-depth research on pharmaceutical education teaching methods. **Methods** The Web of Science Core Collection (WoSCC) database was used to search for literatures on pharmaceutical education teaching methods. VOSviewers, and R package “bibliometrix” were used for bibliometric study and visualization analysis. **Results** Totally 772 articles from 83 countries were collected, the United States, England, Australia, China, etc. The number of publications related to pharmaceutical education showed a steady increase in the past 10 years, reaching its peak in 2019. The United States held a leading position in pharmaceutical education and teaching, with research output ranking the first. China ranked fourth in terms of the number of related publications and active cooperations with leading countries or neighboring countries. In addition, educational methods such as self-directed learning, simulation, group learning, flipped classroom, and PBL learning remained hot topics, while professional identity was a keyword since 2023. **Conclusion** Teaching models that combine pharmaceutical education with career identity for pharmaceutical students may promote the reform and innovation of pharmaceutical education teaching.

Key words: teaching method for pharmaceutical education; bibliometrics; visual analysis; WoSCC database; profession identity

基金项目: 药学专硕科研创新和实践能力培养的模式探索 (大连医科大学 2023 年教学改革一般项目)。

作者简介: 陶旭锋, 男, 主管药师, 主要从事胰腺炎及其恶性转化的分子机制和药物开发研究, email: taoxufeng.2008@163.com

***通信作者:** 董得时, 女, 主任药师, 教授, 主要从事医院药学和临床药学研究, email: dongdeshi@dmu.edu.cn

现今社会对高校人才的培养提出了更高的要求,药学相关教育既有基础学科的理论学习,又包含临床药学的实践技能培养,理论体系分散、内容繁多,传统的课堂教授模式存在一定的局限性,学生的学习兴趣没有得到充分的调动,实践应用能力的培养也就更难涉及,导致学生缺少批判性思维、书面交流和复杂的推理和实践技能,而这些技能被认为是高等教育的核心^[1-2]。与此同时,药学教育面临着医药技术发展和患者大量参与自我管理的双重挑战,亟待药学院校在药学教育教学法方面改革与创新。

当前,不少高校提倡理论学习与实践技能相结合的药学教育方法,主要包括翻转课堂、虚拟仿真教学、混合式教学等;同时也更侧重于提高教师的专业知识和个人教学能力^[3-4]。基于此,本研究拟对近 10 年全球发表的药学教育教学法相关文献进行计量学研究,以期发现国际上药学教育教学法相关研究的新观点和新方法,为我国相关领域学者深入研究提供参考,最终促进药学教育的发展。

1 资料与方法

1.1 资料来源

基于 Web of Science Core Collection (WoSCC) (<https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>) 数据库进行检索,检索条件:(TS = (teaching method) AND TS = (pharmacy) AND LA = (English), 文章类型只选择“article”和“review”,时间范围设置在 2014/01/01 至 2023/12/31。

1.2 研究方法

VOSviewer (Version 1.6.20) 是一种文献计量学分析和可视化软件,可以从诸多出版物中提取关键信息,以建立合作、共被引、共现网络信息^[5-7]。在本研究中,VOSviewer 主要用于完成下列分析内容:国家和机构分析、期刊和共被引期刊分析、作者和共被引作者分析以及关键词共现分析。在用 VOSviewer 生成的地图中,一个节点表示一个项目,如国家、机构、期刊、作者等;节点的大小和颜色表示这些项目的数量和分类;节点之间连线的粗细反映了项目间的协作和共被引的强度。R package “bibliometrix” (Version 3.2.1) (<https://www.bibliometrix.org>) 用于生成药学教育教学法趋势话题数据^[8]。期刊的分区和影响因子是来源于 Journal Citation Reports 2022。此外,本研究应用 Microsoft Office Excel 2021 进行出版物数量的分析。

2 结果

2.1 发文量分析

2014—2023 年,共有 772 篇关于药学教育教学法的研究,从 2014 年开始年度发文量处于缓慢上

升态势,2019 年发文量陡增至 101 篇,此后一直处于平稳的 80 篇左右,这表明药学教育教学领域近年来受到持续性的关注(见图 1)。

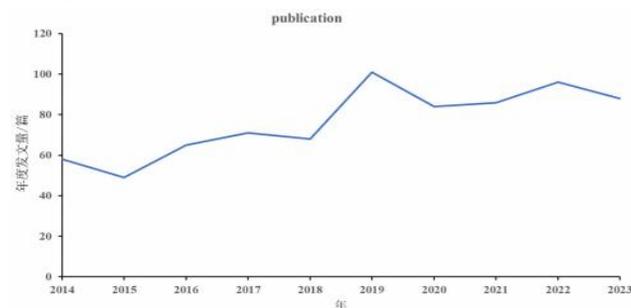


图 1 药学教育教学法研究的年度发文量

Fig 1 Annual publication volume of research on teaching methods for pharmaceutical education

2.2 出版国家和机构分析

药学教育教学法相关研究,前 10 位的出版国家分布在亚洲 ($n = 3$)、北美洲 ($n = 3$)、欧洲 ($n = 3$) 和大洋洲 ($n = 1$),其中最多的是美国,其次是英格兰、澳大利亚和中国;前 10 位的机构位于美国、澳大利亚、沙特阿拉伯以及卡塔尔,其中,北卡罗来纳大学、悉尼大学、沙特国王大学、*Am J Pharm Educ*、俄亥俄州立大学发表了较多的文章,如表 1 所示。如图 2 所示,对出版物数量 ≥ 6 篇的 45 个机构进行可视化分析,结果显示北卡罗来纳大学与德克萨斯大学奥斯汀分校、北卡罗来纳大学教堂山分校有着密切的合作关系;沙特国王大学、佛罗里达大学、奥克兰大学、多伦多大学以及英属哥伦比亚大学虽然也发表了很多论文,但是与其他机构几乎没有合作关系。

2.3 出版期刊分析

药学教育教学相关的文献主要发表在 217 个期刊上,其中 *Am J Pharm Educ* 发表文章数最多 ($n = 220$),在发文量前 10 的期刊中,影响因子最高的是 *Saudi Pharm J* (IF = 4.1),见表 2。依据相关出版物数量大于或等于 5 的条件筛选出 21 个期刊构建期刊耦合网络图(见图 3A),结果显示 *Am J Pharm Educ* 与 *Indian J Pharm Educ*、*BMC Med Educ* 和 *Int J Clin Pharm* 等期刊有活跃的引文关系。*Am J Pharm Educ* 被引次数最多,被引次数前 10 名的期刊中 *JAMA* 影响因子最高,见表 2。依据被引数量 ≥ 100 的条件,筛选出 22 个条目生成了期刊共被引网络图(见图 3B),结果显示 *Am J Pharm Educ* 与 *Acad Med*、*Am J Health Syst Pharm* 和 *Curr Pharm Teach Learn* 等期刊间有着积极的合作关系。

2.4 作者和被引作者以及被引文献

总计 3636 位作者参与药学教育教学法相关内容的研究,在发文数量排名前 10 的作者中,最多的 9 篇,最少的 4 篇(见表 3)。依据出版论文数 ≥ 2 篇的条件构建了作者关系网络,其中 Mclaughlin JE、

表 1 药学教育教学法研究出版国家和机构发文量 Top 10

Tab 1 Top 10 countries and institutions for publishing research on teaching methods for pharmaceutical education

排名	国家	发文量	百分比 /%	排名	机构	发文量	百分比 /%
1	USA (North America)	311	49.76	1	University of North Carolina (USA)	23	17.04
2	England (Europe)	58	9.28	2	University of Sydney (Australia)	17	12.59
3	Australia (Oceania)	54	8.64	3	King Saud University (Saudi Arabia)	14	10.37
4	China (Asia)	44	7.04	4	American Journal of Pharmaceutical Education (USA)	13	9.63
5	Saudi Arabia (Asia)	36	5.76	5	The Ohio State University (USA)	13	9.63
6	Canada (North America)	33	5.28	6	Qatar University (Qatar)	12	8.89
7	Malaysia (Asia)	24	3.84	7	Midwestern State University (USA)	11	8.15
8	France (Europe)	23	3.68	8	University of California, San Francisco (USA)	11	8.15
9	Netherlands (Europe)	23	3.68	9	University of Maryland (USA)	11	8.15
10	Brazi (South America)	19	3.04	10	Monash University (Australia)	10	7.41

表 2 药学教育教学法研究出版期刊和被引期刊 Top 10

Tab 2 Top 10 published journals and co-cited journals on teaching methods for pharmaceutical education

排名	出版期刊	发文量	影响因子	JCR 分区	排名	被引期刊	被引次数	影响因子	JCR 分区
1	<i>Am J Pharm Educ</i>	220	3.3	Q2	1	<i>Am J Pharm Educ</i>	2325	3.3	Q2
2	<i>Indian J Pharm Educ</i>	41	0.8	Q4	2	<i>Curr Pharm Teach Learn</i>	416	1.2	Q3
3	<i>BMC Med Educ</i>	40	3.6	Q1	3	<i>Acad Med</i>	363	7.4	Q1
4	<i>Int J Clin Pharm</i>	33	2.4	Q3	4	<i>Med Teach</i>	351	4.7	Q1
5	<i>Eur J Hosp Pharm</i>	24	1.7	Q4	5	<i>Am J Health Syst Pharm</i>	342	2.7	Q3
6	<i>Res Social Adm Pharm</i>	20	3.9	Q2	6	<i>Med Educ</i>	272	7.1	Q1
7	<i>Am J Health Syst Pharm</i>	19	2.7	Q3	7	<i>BMC Med Educ</i>	269	3.6	Q1
8	<i>PLoS One</i>	16	3.7	Q2	8	<i>J Interprof Care</i>	214	2.7	Q3
9	<i>Saudi Pharm J</i>	16	4.1	Q2	9	<i>JAMA</i>	192	120.7	Q1
10	<i>BMC Health Serv Res</i>	10	2.8	Q3	10	<i>Int J Clin Pharm</i>	181	2.4	Q3

表 3 药学教育教学法研究作者和被引作者 Top 10

Tab 3 Top 10 authors and co-cited authors of research on teaching methods for pharmaceutical education

排名	作者	发文量	排名	被引作者	被引次数
1	Mclaughlin JE	9	1	ACPE	85
2	Chen AM	6	2	WHO	83
3	Karapinar-Carkit F	6	3	Medina MS	59
4	Medina MS	6	4	Mclaughlin JE	35
5	Basheti IA	5	5	American Association of Colleges of Pharmacy	34
6	Desselle SP	5	6	Reeves S	32
7	O' Sullivan TA	5	7	Hepler CD	29
8	Persky AM	5	8	Braun V	28
9	van den Bemt BJF	5	9	Bandura A	27
10	Almaghaslah D	4	10	Cook DA	27

Chen AM、Medina MS、Desselle SP 和 O' Sullivan TA 等作者发表了较多的文章, Mclaughlin JE 与 Persky Adam、Minshew LM 和 Shepherd G 保持着密切的合作关系, O' Sullivan TA 与 Danielson J 和 Lau C 等作者之间的合作关系也很活跃。在 15 768 名被引作者中, 6 位作者被引用次数超过 30 (见表 3)。被引最多的是 *Accreditation Council for Pharmacy Education* (ACPE), 其次是 *World Health Organization* (WHO)、Medina MS 和 Mclaughlin JE。此外, 在前 10 名被引文献中, 所有文献最少被引用过 14 次, 最多被引用过 33 次 (见表 4)。

2.5 关键词分析

关键词分析发现“pharmacy education”“pharmacy”“education”出现次数较多, 说明药学教育

表 4 药学教育教学法研究被引文献 Top10

Tab 4 Top 10 co-cited references on teaching methods for pharmaceutical education

排名	被引用文献	被引频次
1	The impact of problem-solving feedback on team-based learning case responses	33
2	Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care	24
3	Using thematic analysis in psychology	21
4	Accreditation standards and key elements for the professional program in the pharmacy leading to the doctor of pharmacy degree, ACPE, 2015	19
5	Active-learning processes used in US pharmacy education	16
6	The flipped classroom: a course redesign to foster learning and engagement in a health professions school	15
7	Accreditation standards and key elements for the professional program in pharmacy leading to the doctor of pharmacy degree, ACPE, 2016	14
8	An active-learning strategies primer for achieving ability-based educational outcomes	14
9	Three approaches to qualitative content analysis	14
10	Consolidated criteria for reporting qualitative research (COREQ): a 32-item checklist for interviews and focus groups	14

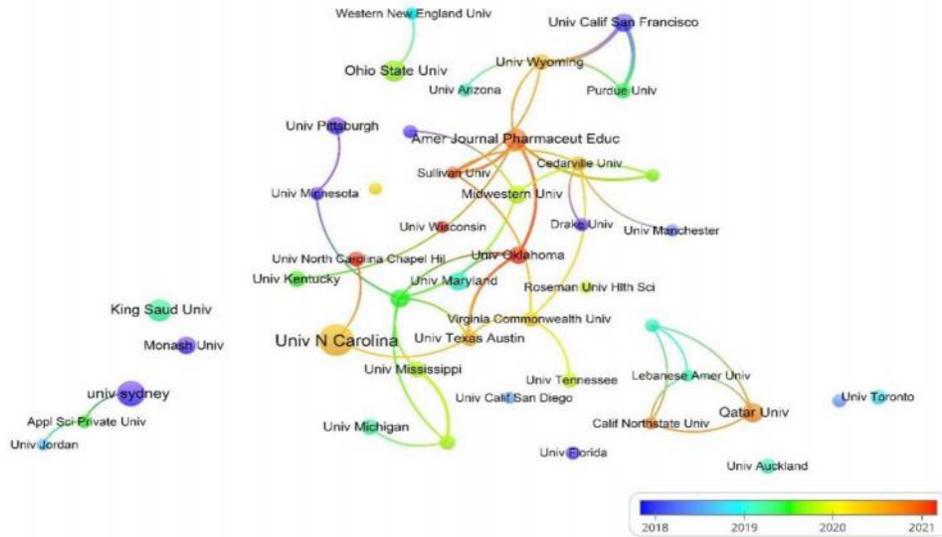


图 2 药学教育教学法研究出版机构的可视化图

Fig 2 Visualization of publishing institutions conducting research on teaching methods for pharmaceutical education

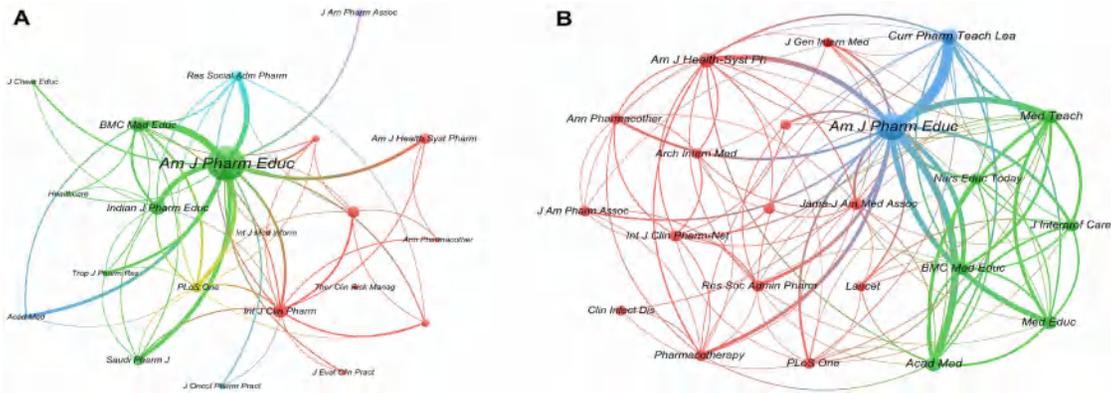


图 3 药学教育教学法研究出版期刊 (A) 和被引期刊 (B) 的可视化图

Fig 3 Visualization of published journals (A) and co-cited journals (B) on teaching methods for pharmaceutical education

教学法研究主要围绕“药学教育”主题开展。同时，“teaching”“team-based learning”“flipped classroom”“problem-based learning”等关键词出现频率也较高，表明“分组学习法”“翻转课堂”“PBL教学法”等具体教学方法也是药学教育教学法研究的重点（见表 5）。而在 2023 年新出现的“professional identity”“perception”体现出药学教育教学法最近一年的关注趋势。

3 讨论

3.1 全球药学教育发展的不平衡

全球各国间在经济、基础设施以及学术能力上有着显著的差异，不同的国家药学高等教育的发展水平也各不相同。本研究显示，美国在药学教育教学方面处于领先地位，英格兰、澳大利亚位列其后，并且与美国保持合作关系。药学教育教学法研究方面，我国的发文量排名第 4，并且保持着与美国、新加坡、巴基斯坦等国家的密切合作关系。然而，在高等教育国际化背景下，我国药学教育水平仍旧有着很大的提升空间，这要求我们进一步借鉴领先

表 5 药学教育教学法研究关键词 Top 30

Tab 5 Top 30 keywords for research on teaching methods for pharmaceutical education

序号	关键词	排名	序号	关键词	排名
1	pharmacy education	93	16	medication errors	14
2	pharmacy	82	17	qualitative research	14
3	education	55	18	team-based learning	14
4	curriculum	35	19	assessment	13
5	teaching	32	20	hospital	13
6	clinical pharmacy	29	21	pharmacists	13
7	active learning	24	22	students	12
8	pharmaceutical care	23	23	COVID-19	11
9	patient safety	22	24	flipped classroom	11
10	interprofessional education	21	25	medication safety	11
11	pharmacy students	21	26	pharmacy service	11
12	pharmacist	20	27	safety	11
13	simulation	20	28	training	11
14	medical education	19	29	antimicrobial stewardship	10
15	medication reconciliation	16	30	community pharmacy	10

国家的经验, 深化国际交流合作, 促进药学教育事业的高水平发展, 最终为国家培养出更多的具有国际竞争力的药学人才。

3.2 药学教育需要更多的关注和投入

从 JCR 分区来看, 发文量排名前 10 的期刊中仅有 1 个在 Q1 区, 被引期刊有 4 个在 Q1 区, 但是影响因子几乎都在 10 以下, 说明药学教育相关论文的质量和关注度都需要提升。近 10 年发表药学教育教学法研究论文最多的作者发表了 9 篇论文, 其他作者均不超过 6 篇, 提示对药学教育教学法持续并深入研究的人员及团队数量不足, 相关的研究较少, 但也意味着我国学者有更多的研究空间, 积极探索适合我国国情的药学教育教学方法更为重要和迫切。

3.3 教学方法与职业认同教育同样重要

关键词研究中, “自主学习” “模拟” “分组学习” “翻转课堂” 和 “PBL 学习” 等多为药学教育教学研究的相关方法。研究提示, 上课 10 min 之后, 学生的注意力会大幅且稳定地下降; 长达 1 h 的讲座中, 被动学习会消磨学生耐心, 带来较差的教学体验^[9]。在高等教育中, 大学生其实有着足够的自我学习能力, 教师的作用应该是教练和导师, 起到引导和激发的作用, 促进学生思考, 指导他们解决问题。分组学习、基于问题与案例结合以及翻转课堂等教学方法更能对学生产生积极的影响^[10], 均是值得推荐用于药学教育的教学方法。

此外, 关键词分析显示 “职业认同 (professional identity)” 是 2023 年的趋势主题。提到 “职业认同” 这个词, 就要回归教育的本质, “教育” 这两个字的组合最先出自《孟子》中 “得天下英才而教育之”, “教” 为传授知识, 而 “育” 为培养人格。国际上对 “职业认同” 解释是将职业的核心价值和信念内化的过程, 以便一个人思考、行动和感知自己是该职业的一员^[11]。因此教育的核心归根结底是育人, 影响人对自我的认知。有研究表明, 药学专业学生对自身专业角色的认知呈现理想化倾向, 同时揭示出他们对药师职业形象普遍存在误解、敌意感知及角色定位困惑^[12]。如何帮助药学专业学生解决学习经历和职业身份理解的不和谐可以作为未来药学教育的一个关注方向。加拿大 Kennie-Kaulbach 团队则提出了 “入门药学实践” 的概念, 研究对象为一、二年级药学院学生, 对他们进行共同体验式教育, 加深他们对包括专业自主性、责任感、跨专业协作和以患者为中心的监护在内的核心角色要素的理解, 从而影响药学学生对职业认同的塑造, 这些直接影响学生求知欲、能动性或未来行为的变

化^[11]。因此, 考虑教学方法的探讨与药学学生的职业认同之间的关联性, 对药学教育教学进行改革和创新, 确实可以成为药学教育教学领域的学者们关注的方向。

总之, 通过对药学教育教学相关文献的计量学分析, 讨论了全球药学教育教学发展的现状, 发现 “职业认同” 可能成为药学教育教学领域的最新趋势和热点。由于方法学的限制, 可能会有遗漏或选择偏倚, 不能完全反映事情全貌, 但本研究基本上反映了研究领域的全球宏观状况, 愿能为我国药学教育教学高质量发展提供参考。

参考文献

- [1] Arum R, Roksa J. Academically adrift: limited learning on college campuses [M]. Chicago: University of Chicago Press, 2010.
- [2] Pancrazio JJ. Academically adrift: limited learning on college campuses (review) [J]. Rev High Educ, 2012, 35 (4): 667-668.
- [3] 薛伟华. 药学教育发展的新策略 [Z]. 教育教学论坛, 2024 (2): 137-140.
- [4] Walden PR. Competency-based education: purposes and promises [J]. Semin Speech Lang, 2020, 41 (4): 289-297.
- [5] van Eck NJ, Waltman L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping [J]. Scientometrics, 2010, 84 (2): 523-538.
- [6] Yeung AWK, Mozos I. The innovative and sustainable use of dental panoramic radiographs for the detection of osteoporosis [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17 (7): 2449.
- [7] Synnstedt MB, Chen C, Holmes JH. CiteSpace II: visualization and knowledge discovery in bibliographic databases [J]. AMIA Annu Symp Proc, 2005, 2005: 724-728.
- [8] Aria M, Cuccurullo C. bibliometrix: an R-tool for comprehensive science mapping analysis [J]. J Informetr, 2017, 11 (4): 959-975.
- [9] McLaughlin JE, Roth MT, Glatt DM, et al. The flipped classroom: a course redesign to foster learning and engagement in a health professions school [J]. Acad Med, 2014, 89 (2): 236-243.
- [10] Xiao CL, Ren H, Chen HQ, et al. Multidimensional evaluation of teaching strategies for pharmacology based on a comprehensive analysis involving 21, 269 students [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1145456.
- [11] Kennie-Kaulbach N, Crespo K, Janke KK, et al. A narrative inquiry of critical events supporting professional identity formation in introductory pharmacy practice experiences [J]. Am J Pharm Educ, 2024, 88 (1): 100614.
- [12] Doctor N, Elder KG, Hafling B. Impact of pharmacy-related memes on students' professional identity formation [J]. Am J Pharm Educ, 2024, 88 (3): 100657.

(收稿日期: 2024-07-01; 修回日期: 2024-08-13)