

- ◆ 中国科技核心期刊
- ◆ 美国CA、波兰IC收录期刊
- ◆ 中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊
- ◆ 科技期刊世界影响力指数收录期刊



ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药
学

第二十卷
第十期

第2217~2454页

二〇二二年十月

中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

2022年10月 第20卷 第10期

Volume 20 Number 10 October 2022

CENTRAL

SOUTH

PHARMACY

- ◆ 植物内生真菌活性次生代谢产物研究专题
- ◆ 我国慢性阻塞性肺疾病的特点及治疗现状专题
- ◆ 基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS技术的二至丸入血入脑成分分析
- ◆ I类及II类组蛋白去乙酰化酶在心力衰竭中的作用及机制的研究进展

ISSN 1672-2981



9 771672 298224

10
2022



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

中南药学

经过多项学术指标综合评定及同行专家
评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期
刊”（中国科技论文统计源期刊）。

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038 www.istic.ac.cn

2021年12月

证书编号: 2020-G599-2463
有效期至: 2022年12月





中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第20卷 第10期(总第201期) 2022年10月20日出版

目 次

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民 中路 139 号中南

大学湘雅二医院内

出版: 中南药 学杂志社

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 25.00 元, 全年 300.00 元

邮编: 410011

电话: (0731) 82258487/84895602

传真: (0731) 82258487

邮发代 号: 42-290

投稿网 址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

E-mail: znyxzz2003@vip.163.com

广告经 营许可 证: 4300004000764

中国标 准连续 出版物 号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2022 年 版 权 归 《 中 南 药 学 》

编辑 部 所 有

植物内生真菌活性次生代谢产物研究专题

(2217) 香青内生真菌 *Metapochonia bulbilosa* XQ-4 的次级代谢产物研究 罗荣耀, 张颖帆, 陈德坤, 等

(2223) 亚麻叶白千层内生真菌 *Penicillium citrinum* YMY-1 次生代谢产物研究 张莎, 邓小华, 旷敏, 等

我国慢性阻塞性肺疾病的特点及治疗现状专题

(2228) 我国慢性阻塞性肺疾病的特点及治疗现状 成玮, 陈平

(2231) 真实世界使用双联支气管扩张剂治疗慢性阻塞性肺疾病患者的临床特征及治疗规范性分析 易荣, 许玉竹, 冯玲, 等

研究论文

(2236) 环裂松萝化学成分的研究 郝昱, 王璐, 郝怡萌, 等

(2242) 瑞格列奈在人肝微粒体中的酶促反应动力学及葛根素对其代谢的影响 何文娟, 刘秀菊, 孙倩, 等

(2247) 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术的二至丸入血入脑成分分析 林雪, 薛傲, 徐艳明, 等

(2253) 基于 HPLC-CAD 指纹图谱结合化学计量学方法分析不同产地北柴胡药材质量 周丽娟, 杨晓宁, 王雅芝, 等

(2259) 吴茱萸碱通过 Stat3 信号通路增强鼻咽癌细胞的辐射敏感性 王桂华, 王妮拉, 阳帆帆, 等

(2265) 补阳还五汤治疗阿尔茨海默病的网络药理学研究及实验验证 李金尧, 王雅梦, 雷霞, 等

(2272) 木榄胚轴总黄酮通过调节 PI3K/Akt 信号通路诱导人结肠癌 HT-29 细胞凋亡 陈美先, 卓清缘, 柴民伟, 等

(2279) 粗壮润楠化学成分及其活性研究 里艳茹, 黄胜男, 寻园, 等

(2286) 两种外泌体提取方法的比较以及外泌体对低氧肺动脉高压肺血管重构的作用 郭峰, 黄宁, 胡长平

(2295) 基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的苦黄注射液化学成分分析 王允吉, 王海丹, 刘璐, 等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编 (按姓氏笔画排列)

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

编委 (按姓氏笔画排列)

丁劲松 于海洋 马恩龙 王 玉
王 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 向大雄 刘 韶 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 何江江 何鸽飞 余自成
谷福根 张 俐 张 峻 张毕奎
张洪文 陈 力 陈 琦 陈 碧
陈卫东 陈西敬 陈勇川 武新安
范国荣 金鹏飞 周 权 屈 建
孟宪生 赵立波 赵志刚 姜德建
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
高利臣 郭 韧 郭怀忠 郭建军
唐 芳 曹 玲 常福厚 巢志茂
彭文兴 董亚琳 董得时 蒋孟良
傅 强 温金华 谢 诚 谢奕丹
睢大箕 肇丽梅 翟 青 黎 敏
颜 苗 潘卫三 魏高文

- (2305) 干姜和炮姜高效液相色谱指纹图谱与色度值对比研究
..... 余凌英, 李星, 强梦琴, 等
- (2312) 甘草药渣发酵工艺优化及成分分析、抗氧化活性的研究
..... 吕丽静, 屈青松, 周晴, 等
- (2318) 一种盐酸普拉克索片降解杂质 BI-II546CL 的制备方法
..... 刘旭, 戴华山, 尹利献, 等
- (2321) 甘草素固体分散体的制备及体内药动学研究
..... 张军, 唐粤鹏, 陈剑
- (2326) 免疫抑制剂吗替麦考酚酯 Z-异构体的制备
..... 邓雪, 徐美玲, 郭邻霞, 等

综述

- (2329) I 类及 II 类组蛋白去乙酰化酶在心力衰竭中的作用及机制的研究进展 高文聪, 马昕, 陈鹏, 等
- (2336) 硫化氢的病理生理功能、检测方法及其供体药物研究进展
..... 赵迎汐, 佟杰, 李达翔, 等
- (2343) DJ-1 蛋白在程序性细胞死亡中的作用
..... 王英迪, 付宇, 程润, 等
- (2350) 北沙参真伪鉴定和质量评价方法研究进展
..... 刘言娟, 薛涛, 辛杰, 等
- (2356) 靶向 B 淋巴细胞治疗系统性红斑狼疮的生物制剂: 贝利尤单抗与泰它西普 张莹莹, 王世颖, 束庆, 等
- (2363) 二甲双胍治疗呼吸系统疾病的研究进展 李森, 吴桂甫
- (2368) 重楼皂苷抗肺癌作用机制的研究进展
..... 何娜, 杨洋, 朱婧, 等
- (2373) 咀嚼片的研发要点及研究进展 孙秉喆, 邢嘉萌, 严真, 等

药物分析与检验

- (2379) UPLC 与 HPLC 测定创新药 LW33 中有关物质的对比研究
..... 张容华, 杨放, 郑艾妮, 等
- (2385) 高效液相色谱指纹图谱结合一测多评法评价扶正救肺颗粒的质量 郭燕, 孙岚萍, 顾志荣, 等
- (2390) HPLC 法同时测定乳酸中 L-乳酸及 6 种有机酸杂质的含量
..... 谢莹莹, 张悦, 刘雁鸣, 等
- (2394) 抗栓胶囊中黄曲霉毒素的含量测定及安全性评价
..... 薛平, 顾峥嵘, 刘旻虹, 等
- (2399) 液质联用法测定富马酸替诺福韦艾拉酚胺中 L-丙氨酸异丙酯
..... 李昌亮, 尚金凤, 廖正华, 等

青年编委 (按姓氏笔画排列)

丁 骁 于世慧 王 刚 王 洪
王春江 方伟进 孔维军 朱志红
刘 宏 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 娟
李语玲 李新刚 肖朝江 吴成军
邱玉玲 何 艳 邹振兴 张 凭
张妙红 张纯刚 张程亮 陈国宁
陈富超 罗 聪 金 锐 周志旭
赵 亮 赵 娣 胡 楠 姜 雷
贾王平 徐 硕 徐文峰 郭海彪
黄 芳 梅升辉 龚力民 梁光平
寇龙发 蒋跃平 蒋德旗 韩立峰
韩晓芳 韩晓鹏 程汝滨 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。

(2403) 基于高效液相色谱指纹图谱和化学模式识别的至宝三鞭丸质量一致性评价 王官连, 张咏梅, 高文雅, 等

(2409) 高效液相色谱法同时测定杜仲平压分散片中 6 种成分的含量 胡小祥, 王继威, 刘冠琼, 等

医院药学

(2413) 黄芪及其复方辅助常规降糖药治疗 2 型糖尿病的 Meta 分析 王锴华, 邵文钰, 韩暖, 等

(2420) 欧洲医药保健网分类系统在产科药物相关问题中的应用 孙玉鹤, 吕景娣, 王婷, 等

(2426) 基于 RIGHT 膀胱癌临床实践指南报告质量研究 张爱玲, 罗旭飞, 李朵璐, 等

临床药师在临床

(2432) 1 例卵巢癌伴不完全性肠梗阻患者化疗止吐方案的制订及用药分析 蔡先惠, 叶轶青

(2436) 临床药师与妇科医师合作进行更年期患者门诊管理的药学实践 金杨红, 崔晓飞, 王淑贞, 等

药品不良反应

(2440) 1 例乳腺癌患者使用哌柏西利和依西美坦致永久性神经性耳聋的病例分析 周佳琦, 王岩, 刘浩然, 等

(2443) 雷贝拉唑致急性间质性肾炎 1 例 张新然, 徐德宇, 杭永付, 等

(2446) 莫西沙星致药物超敏反应综合征 1 例 张登亮, 周安琴

经验介绍

(2448) 象皮粉治疗烧伤后慢性瘢痕溃疡 1 例 罗浩铭, 白钦钦, 胡俊, 等

药事管理

(2451) 风险管理在静脉药物配置中心提高成品输液质量的应用 何斌, 王雅棋

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*238*zh*P*25.0*44*2022-10

本期责任编辑: 陆窈窕, 彭金飞, 邬志娟, 李科

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 10 October 20 2022

Consultant

ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief

LI Huan-de

Chief of Editorial Office

ZHANG Bi-kui

Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

Directed by

Food and Drug Administration of
Hunan Province

Edited by

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

Tel

(0731) 82258487/84895602

Fax

(0731) 82258487

Website of Authors

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

Email

znyxzz2003@vip.163.com

Published by

Central South Pharmacy
Publishing House

Advertisement Publishing

Certification

4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

- (2218) Secondary metabolites of endophytic fungus *Metapochonia bulbilosa* XQ-4 from medicinal plants *Anaphalis sinica* Hance
..... LUO Rong-yao, ZHANG Ying-fan, CHEN De-kun, et al
- (2223) Secondary metabolites of endophytic fungus *Penicillium citrinum* YMY-1 from *Melaleuca linariifolia*
..... ZHANG Sha, DENG Xiao-hua, KUANG Min, et al
- (2231) Clinical characteristics and therapy norms for patients with COPD treated with LAMA/LABA fixed-dose combination in the real world
..... YI Rong, XU Yu-zhu, FENG Ling, et al
- (2236) Chemical constituents from the lichen *Usnea diffracta*
..... HAO Yu, WANG Lu, HAO Yi-meng, et al
- (2243) Effect of puerarin on the metabolism of repaglinide in human liver microsomes by CYP 450
..... HE Wen-juan, LIU Xiu-ju, SUN Qian, et al
- (2247) Blood and brain components in Erzhi pills based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technology LIN Xue, XUE Ao, XU Yan-ming, et al
- (2253) Quality analysis of *Bupleurum chinense* from different origins by HPLC-CAD fingerprint combined with chemometric
..... ZHOU Li-juan, YANG Xiao-ning, WANG Ya-zhi, et al
- (2259) Evodiamine enhances the radiosensitivity through the Stat3 signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells
..... WANG Gui-hua, WANG Ni-la, YANG Fan-fan, et al
- (2265) Network pharmacology research and experimental verification of Buyang Huanwu decoction for Alzheimer's disease
..... LI Jin-yao, WANG Ya-meng, LEI Xia, et al
- (2272) Total flavonoids from *Bruguiera gymnorrhiza* hypocotyls induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by regulating of PI3K/Akt signaling pathway
..... CHEN Mei-xian, ZHUO Qing-yuan, CHAI Min-wei, et al
- (2279) Chemical constituents of *Machilus robusta* and their biological activities
..... LI Yan-ru, HUANG Sheng-nan, XUN Yuan, et al
- (2286) Two extraction methods for exosomes and the role of exosomes on pulmonary arterial remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension
..... GUO Feng, HUANG Ning, HU Chang-ping

Postal code

42-290

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

¥ 25.00 an issue

¥ 300.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2022 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.

- (2295) Identification of chemical components in Kuhuang injection by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS
..... WANG Yun-ji, WANG Hai-dan, LIU Lu, et al
- (2305) HPLC fingerprint and chromatic value of dried ginger and processed ginger
..... YU Ling-ying, LI Xing, QIANG Meng-qin, et al
- (2312) Optimization of licorice residue fermentation and analysis of its compositions and antioxidant activity
..... LYU Li-jing, QU Qing-song, ZHOU Qing, et al
- (2318) Synthesis of pramipexole tablets to degrade impurity BI-II546CL
..... LIU Xu, DAI Hua-shan, YIN Li-xian, et al
- (2321) Preparation and in vivo pharmacokinetics of liquiritigenin solid dispersion
..... ZHANG Jun, TANG Yue-peng, CHEN Jian
- (2326) Synthesis of immunosuppressant mycophenolate mofetil Z-isomer
..... DENG Xue, XU Mei-ling, GUO Lin-xia, et al
- (2329) Research progress in the role and mechanism of class I and II histone deacetylase for heart failure
..... GAO Wen-cong, MA Xin, CHEN Peng, et al
- (2336) Research progress in pathophysiological functions, determination and donor drugs of hydrogen sulfide
..... ZHAO Ying-xi, TONG Jie, LI Da-hong, et al
- (2343) Role of DJ-1 protein in programmed cell death
..... WANG Ying-di, FU Yu, CHENG Run, et al
- (2350) Research progress in identification and quality evaluation of Glehniae Radix
..... LIU Yan-juan, XUE Tao, XIN Jie, et al
- (2356) B-lymphocyte-targeted biologics for systemic lupus erythematosus: belimumab and telitacicept
..... ZHANG Ying-ying, WANG Shi-ying, SHU Qing, et al
- (2363) Research progress in metformin for respiratory diseases
..... LI Miao, WU Gui-fu
- (2368) Research progress in the mechanism of anti-lung cancer effect of polyphyllin
..... HE Na, YANG Yang, ZHU Jing, et al
- (2373) Key points in development and research progress in chewing tablets
..... SUN Bing-zhe, XING Jia-meng, YAN Zhen, et al
- (2379) Determination of related substances in LW33 by UPLC and HPLC
..... ZHANG Rong-hua, YANG Fang, ZHENG Ai-ni, et al
- (2385) HPLC fingerprint combined with quantitation analysis of multi-components by single marker in quality evaluation of Fuzheng Jiufei granules
..... GUO Yan, SUN Lan-ping, Gu Zhi-rong, et al
- (2390) Simultaneous determination of L-lactic acid and 6 organic acid impurities in lactic acid with HPLC
..... XIE Ying-ying, ZHANG yue, LIU Yan-ming, et al
- (2394) Content determination and safety evaluation of aflatoxin in Kangshuan capsules XUE Ping, GU Zheng-rong, LIU Min-hong, et al

- (2399) **Determination of *L*-alanine isopropyl ester in tenofovir alafenamide fumarate by LC-MS method**
..... *LI Chang-liang, SHANG Jin-feng, LIAO Zheng-hua, et al*
- (2403) **Quality consistency of Zhibao Sanbian pills by HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition**
..... *WANG Guan-lian, ZHANG Yong-mei, GAO Wen-ya, et al*
- (2409) **Simultaneous determination of 6 components in Duzhong Pingya dispersible tablets by HPLC**
..... *HU Xiao-xiang, WANG Ji-wei, LIU Guan-qiong, et al*
- (2413) **Meta-analysis of astragalus and its prescriptions combined with conventional hypoglycemic for diabetes mellitus type 2**
..... *WANG Kai-hua, TAI Wen-yu, HAN Nuan, et al*
- (2421) **Role of classification system in Pharmaceutical Care Network Europe in the drug related problems in the Obstetrics Department**
..... *SUN Yu-he, LYU Jing-di, WANG Ting, et al*
- (2426) **Evaluation of the reporting quality of clinical practice guidelines on bladder cancer with RIGHT checklist**
..... *ZHANG Ai-ling, LUO Xu-fei, LI Duo-lu, et al*
- (2436) **Pharmaceutical care for menopausal outpatients by cooperation between clinical pharmacists and gynecologists**
..... *JIN Yang-hong, CUI Xiao-fei, WANG Shu-zhen, et al*

植物内生真菌活性次生代谢产物研究专题

【编者按】

植物内生真菌作为一类独特的微生物,其生境的独特性和物种的多样性造就了其次生代谢产物结构与生物学功能的多样性,是具有重大潜在应用价值、尚待开发的天然药物资源宝库。过去半个世纪,天然药物化学的研究主要集中在传统药用植物的活性成分研究,而对处于植物内部的特殊生存环境中的内生真菌研究相对较少,至今被系统研究过的植物内生真菌不到其全部的 20%,因此以植物内生真菌为研究对象,发掘具有重要生理活性的天然小分子化合物的研究成为近年来天然药物化学领域的研究热点。本课题组近年来一直从事传统药用植物及其内生真菌活性化学成分研究,本专题主要是对几株药用植物来源的内生真菌次生代谢产物的相关研究成果进行报道。

【专题主持人】



邹振兴,男,博士后,副教授,硕士研究生导师,中南大学湘雅药学院药学实验中心副主任,湖南省药学会第七届中药与天然药物委员会青年委员会副主任委员,国家自然科学基金/湖南省科技厅评审专家。主要从事天然药物化学教学科研工作,研究方向为传统中药和重要药用植物及其内生真菌新颖活性先导化合物的发现。近 5 年发表 SCI 论文 40 余篇,担任《中南药学》青年编委以及 *Chin Chem Lett*、*Fitoterapia*、*Molecules* 等国际期刊审稿专家;主持国家自然科学基金青年基金,湖南省自然科学基金面上基金和青年基金,湖南省高新技术产业科技创新引领计划子课题,河南省“揭榜挂帅”科技项目,海南省重点研发项目,中国博士后基金面上项目,以及企业合作横向课题等;申请国家发明专利 5 项,已授权 1 项。

香青内生真菌 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 的次级代谢产物研究

罗荣耀¹,张颖帆³,陈德坤^{2,3},张莎²,旷敏²,彭伟伟²,黄琪^{2,3*},邹振兴^{2*}(1.大理大学药学院,云南 大理 671000;2.中南大学湘雅药学院,长沙 410013;3.中南大学湘雅医院,长沙 410008)

摘要:目的 研究香青 (*Anaphalis sinica* Hance) 泛普可尼亚菌属内生真菌 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 的化学成分。方法 采用大孔树脂、硅胶、ODS、Sephadex LH-20 柱色谱和半制备高效液相色谱等分离方法,从香青内生真菌 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 的代谢产物活性部位分离单体化合物,利用理化性质和波谱技术鉴定化合物结构。初步评价化合物对两株人源性肝癌细胞系 (SMMC7721 和 HepG2) 的细胞毒活性,以及对 4 种常见致病菌 [金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、粪肠球菌 (*E. faecalis*)、大肠埃希菌 (*E. coli*) 以及铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)] 的抑菌活性。结果 从内生真菌 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 固体发酵物乙酸乙酯部位分离得到 8 个化合物,分别鉴定为 sescandelin B (1)、diorcinol (2)、cordyol E (3)、5-羟基-2,3-二甲基-7-甲氧基色原酮 (4)、(-)-terpestacin (5)、对-羟基苯甲醛 (6)、2,10,12-十三碳三烯-6,7-二元醇 (7)、十八碳二烯酸单甘油酯 (8)。活性实验结果显示化合物 1、3、4、6、7 和 8 对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 均具有抑制活性 (对 *P. aeruginosa* 的 MIC 值均为 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 *S. aureus* 的

基金项目:湖南省自然科学基金 (No. 2021JJ30917);湖南省高新技术产业科技创新引领计划 (No. 2020GK4083)。

作者简介:罗荣耀,男,硕士研究生,主要从事天然药物化学研究, email: lry3283187687@163.com *通信作者:黄琪,男,博士,主管药师,主要从事中药药效物质基础研究, email: huangqi20021986@163.com;邹振兴,男,副教授,硕士研究生导师,主要从事天然药物化学研究, email: zouzhenxing@csu.edu.cn

MIC 值分别为 16、16、4、16、32、4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。化合物 **8** 对 SMMC-7721、HepG2 细胞具有细胞毒性 [IC_{50} 值分别为 (58.01 \pm 1.62) 和 (53.30 \pm 2.97) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]。结论 化合物 **1** ~ **8** 均为首次从香青内生真菌 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 中分离得到。

关键词: 香青; 内生真菌; *Metapochonia bulbillosa* XQ-4; 次级代谢产物

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2218-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.001

Secondary metabolites of endophytic fungus *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 from medicinal plants *Anaphalis sinica* Hance

LUO Rong-yao¹, ZHANG Ying-fan³, CHEN De-kun^{2,3}, ZHANG Sha², KUANG Min², PENG Wei-wei², HUANG Qi^{2,3*}, ZOU Zhen-xing^{2*} (1. College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013; 3. Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008)

Abstract: Objective To determine the secondary metabolites of endophytic fungus *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 from medicinal plants *Anaphalis sinica* Hance. **Methods** The compounds were isolated and purified from ethyl acetate extraction of the endophytic fungus *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 from medicinal plant *Anaphalis sinica* Hance by macroporous resin, silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatographies and semi-preparative HPLC. The structures of these compounds were elucidated by physicochemical properties and spectral data analysis. Activities of the compounds against humanogenous hepatoma cells SMMC7721, HepG2, and four pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) were evaluated. **Results** Eight compounds were obtained and identified as sescandelin B (**1**), diorcinol (**2**), cordyol E (**3**), 5-hydroxy-2, 3-dimethyl-7-methoxychromone (**4**), (–)-terpestacin (**5**), *p*-hydroxybenzaldehyde (**6**), 2, 10, 12-triene-6, 7-diol (**7**), and glycerol-1-lino-leate (**8**). Compounds **1**, **3**, **4**, **6**, **7**, and **8** exhibited moderate activities against *S. aureus* (with MIC values at 16, 16, 4, 16, 32, and 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively), and *P. aeruginosa* (with MIC values at 64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Compound **8** displayed moderate cytotoxic activities against SMMC-7721 and HepG2 cell lines [IC_{50} being (58.01 \pm 1.62) and (53.30 \pm 2.97) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively]. **Conclusion** Compounds **1** – **8** have been isolated from endophytic fungal *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 for the first time.

Key words: *Anaphalis sinica* Hance; endophytic fungus; *Metapochonia bulbillosa* XQ-4; secondary metabolite

植物内生真菌是与健康植物共生的一类微生物群落, 同时也是天然药用资源研究与开发的一大热点^[1]。研究表明植物内生真菌的次级代谢产物种类繁多且具有丰富多样的生物活性, 其在发现新药或药物先导化合物的研究中具有广阔的应用前景^[2]。

香青 (*Anaphalis sinica* Hance) 是菊科香青属多年生草本植物, 以全草入药, 具有祛痰、镇咳、平喘、止痢的功效, 常用于外感咳嗽、支气管炎、肠炎、痢疾等症^[3-4]。目前香青属植物主要见于植物化学及中医药利用, 而对其内生真菌的研究

还比较薄弱。为了进一步开发利用香青内生真菌资源, 本研究从香青叶片组织中分离得到一株真菌 XQ-4, 依据菌种 ITS 测序并与 GenBank 数据库比对分析鉴定为 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4。内生真菌 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 隶属于麦角菌科泛普可尼亚菌属, 该菌为首次从香青中分离得到^[5], 且国内外目前尚未有针对其次级代谢产物的相关报道。香青对葡萄球菌和植物病原真菌有一定的抑制作用^[6-8], 本研究基于香青的抗菌活性, 选取其内生真菌 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4 为研究对象, 以期探索该真菌的次级代谢

产物中是否有结构新颖、抗菌活性优良的先导化合物。采用色谱技术从该菌大米发酵产物乙酸乙酯萃取部位分离得到 8 个化合物(见图 1), 经分析波谱数据后鉴定为 sescandelin B (1)、diorcinol (2)、cordyol E (3)、5-羟基-2, 3-二甲基-7-甲氧基色原酮(4)、(-)-terpestacin (5)、对-羟基苯甲醛(6)、2, 10, 12-十三碳三烯-6, 7-二元醇(7)、十八碳二烯酸单甘油酯(8), 并初步对它们的肿瘤细胞毒活性和抗菌活性进行评价。

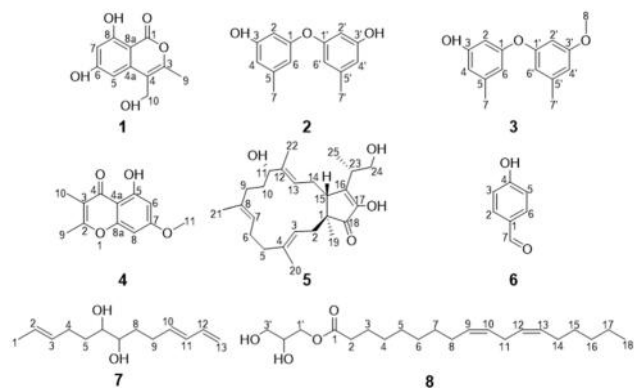


图 1 化合物 1 ~ 8 的化学结构示意图

Fig 1 Chemical structures of compounds 1 ~ 8

1 材料

核磁共振波谱仪 (Bruker AV-600, Bruker 公司); Agilent 6500 系列 Q-TOF 质谱仪 (Agilent 1290 UPLC-6545 accurate mass Q-TOF、分析型高效液相色谱仪 (Agilent 1200/1100 series, 配备 DAD 紫外检测器); YMC-Pack ODS A 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、半制备型高效液相色谱仪 (Agilent 1100 series, 配备 VWD 紫外检测器)(Agilent 科技公司); Autopol IV-T 全自动旋光仪 (美国鲁道夫公司); ODS 反相 C₁₈ 填料 (日本 YMC 公司); 柱色谱用硅胶 (200 ~ 300 目、80 ~ 100 目, 青岛永海硅胶有限公司); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (美国 GE 公司); HPD-100 型大孔吸附树脂 (沧州宝恩吸附材料科技有限公司); 薄层色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂); EYELA NN-1100S-W 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。抗菌活性实验菌株 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC29213)、*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (ATCC29212)、*Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC25922) 及 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (ATCC27853) 均来源于中南大学湘雅二医院; 细胞毒活性实验人源肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 来源于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

香青植株于 2019 年 8 月采自湖南省常德市

石门县壶瓶山峰顶, 经中南大学湘雅药学院徐康平副教授鉴定。实验目标菌株分离自香青叶片组织, 委托擎科生物有限公司进行 ITS 测序, 将 DNA 测序结果与 GenBank 数据库比对, 鉴定为 *Metapochonia bulbillosa* XQ-4, GenBank 登录号为 No.7X9904XT013。目前菌种保存于中南大学湘雅药学院天然药物化学实验室。

2 方法与结果

2.1 菌株发酵

在酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂液体培养基 (YPD 培养基) 中植入 XQ-4 菌株, 于 25 °C、180 r·min⁻¹ 振荡培养 7 d 后得到真菌种子液, 平均倒入 20 瓶装有固体培养基的 500 mL 锥形瓶 (每瓶加入 250 g 大米, 250 g 超纯水, 121 °C 高压蒸汽灭菌 25 min, 冷却至室温后即得固体培养基), 密封后于 28 °C 恒温下静置培养 28 d。

2.2 发酵产物的分离纯化

待 XQ-4 菌株在 5 kg 固体培养基发酵 28 d 后, 用乙酸乙酯冷浸萃取菌丝体和固体发酵物并减压浓缩得到 45.8 g 浸膏, 采用大孔树脂色谱柱以 20%、80% 和 100% 乙醇三个梯度进行洗脱。80% 乙醇洗脱部位采用硅胶柱色谱 (200 ~ 300 目), 以石油醚-乙酸乙酯体系梯度洗脱, 经 TLC 点板监测合并, 共得到 8 个流分 (Fr.1 ~ Fr.8)。其中 Fr.2 经 ODS 色谱柱, 以甲醇-水体系梯度洗脱, 得到 4 个流分 (Fr.2-1 ~ Fr.2-4)。Fr.2-1 经半制备高效液相色谱 (以乙腈-纯水为流动相, 20% ~ 40% 乙腈洗脱 30 min, 3 mL·min⁻¹) 制备得到化合物 6 (7.2 mg), Fr.2-2 经半制备高效液相色谱 (以乙腈-纯水为流动相, 30% ~ 60% 乙腈洗脱 30 min, 3 mL·min⁻¹) 制备得到化合物 2 (5.1 mg), Fr.2-3 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇为洗脱剂纯化, 最后经半制备高效液相色谱 (以乙腈-纯水为流动相, 30% ~ 70% 乙腈洗脱 40 min, 3 mL·min⁻¹) 制备得到化合物 3 (4.3 mg)、4 (4.7 mg) 和 7 (8.0 mg)。Fr.6 采用硅胶柱色谱 (300 ~ 400 目) 分离, 以二氯甲烷-甲醇体系梯度洗脱, TLC 点板监测合并, 得到 6 个流分 (Fr.6-1 ~ Fr.6-6), 其中 Fr.6-6 经半制备高效液相色谱 (以乙腈-纯水为流动相, 60% ~ 95% 乙腈洗脱 30 min, 3 mL·min⁻¹) 制备得到化合物 8 (5.1 mg)。Fr.7 经 ODS 色谱柱, 以甲醇-水体系梯度洗脱, 得到 4 个流分 (Fr.7-1 ~ Fr.7-4)。Fr.7-3 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇为洗脱剂纯化, 最后经半制备高效液相色谱 (以乙腈-纯水为流动相, 50% ~ 95% 乙腈洗脱 30 min, 3

mL · min⁻¹) 制备纯化得到化合物 **1** (5.8 mg), Fr.7-4 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以甲醇为洗脱剂纯化, 最后经半制备高效液相色谱 (以乙腈-纯水为流动相, 50% ~ 95% 乙腈-水洗脱 30 min, 3 mL · min⁻¹) 制备纯化得到化合物 **5** (5.8 mg)。

2.3 结构鉴定

化合物 **1**: 棕色固体, 易溶于甲醇。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 2.30 (3H, s, H-9), 4.42 (2H, s, H-10), 6.32 (1H, s, H-7), 6.63 (1H, s, H-5); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 17.1 (C-9), 56.4 (C-10), 98.5 (C-8a), 101.7 (C-7), 102.0 (C-5), 113.7 (C-4), 140.1 (C-4a), 152.9 (C-3), 163.4 (C-8), 165.5 (C-1), 166.6 (C-6)。以上数据与文献^[9]报道基本一致, 故化合物 **1** 鉴定为 *sescandelin B*。

化合物 **2**: 棕色固体, 易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* [M + H]⁺ 231.1017 (Calcd. for C₁₄H₁₅O₃, 231.1016), 推测分子式为 C₁₄H₁₄O₃; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 2.18 (6H, t, *J* = 1.8 Hz, H-7, H-7'), 6.16 (2H, s, H-2, H-2'), 6.24 (2H, s, H-4, H-4'), 6.34 (2H, s, H-6, H-6'), 9.48 (2H, s, 3-OH, 3'-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 21.6 (C-7, C-7'), 103.4 (C-2, C-2'), 110.5 (C-6, C-6'), 111.6 (C-4, C-4'), 140.5 (C-5, C-5'), 158.1 (C-3, C-3'), 158.9 (C-1, C-1')。以上数据与文献^[10]报道基本一致, 故化合物 **2** 鉴定为 *diorcinol*。

化合物 **3**: 棕色固体, 易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* [M + H]⁺ 245.1174 (Calcd. for C₁₅H₁₇O₃, 245.1172), 推测分子式为 C₁₅H₁₆O₃; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 2.18 (3H, s, H-7'), 2.24 (3H, s, H-7), 3.71 (3H, s, H-8), 6.16 (1H, t, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.24 (1H, brs, H-4'), 6.34 (1H, brs, H-2), 6.36 (1H, brs, H-6, H-6'), 6.53 (1H, brs, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 21.6 (C-7), 21.7 (C-7'), 55.6 (C-8), 102.6 (C-2), 103.3 (C-2'), 110.2 (C-4), 110.3 (C-4'), 111.7 (C-6'), 112.0 (C-6), 140.6 (C-5'), 140.8 (C-5), 158.0 (C-1, C-3'), 159.0 (C-1'), 160.9 (C-3)。以上数据与文献^[11]报道基本一致, 故化合物 **3** 鉴定为 *cordyol E*。

化合物 **4**: 棕色固体, 易溶于二氯甲烷。HR-ESI-MS 显示 *m/z* [M + H]⁺ 221.0810 (Calcd. for C₁₂H₁₃O₄, 221.0808), 推测分子式为 C₁₂H₁₂O₄; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 1.93 (3H, s, H-10), 2.40 (3H, s, H-11), 3.84 (3H, s,

H-12), 6.34 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.56 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 9.3 (C-11), 18.7 (C-10), 56.4 (C-12), 92.3 (C-4), 98.1 (C-2), 104.2 (C-6), 114.9 (C-8), 157.6 (C-7), 161.6 (C-5), 164.2 (C-1), 165.3 (C-3), 181.7 (C-9)。以上数据与文献^[12]报道基本一致, 故化合物 **4** 鉴定为 5-羟基-2, 3-二甲基-7-甲氧基色原酮 (5-hydroxy-2, 3-dimethyl-7-methoxychromone)。

化合物 **5**: 白色固体, 易溶于二氯甲烷。HR-ESI-MS 显示 *m/z* [M + H]⁺ 403.2853 (Calcd. for C₂₅H₃₉O₄, 403.2843), 推测分子式为 C₂₅H₃₈O₄, 比旋光度为 -17.674 (*c* 0.17, MeOH); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 0.85 (3H, s, H-19), 1.16 (3H, d, *J* = 5.4 Hz, H-25), 1.46 (3H, s, H-22), 1.49 (2H, m, H-10), 1.58 (6H, s, H-20, H-21), 1.63, 2.18 (2H, m, H-2), 1.65, 1.97 (2H, m, H-9), 1.80, 2.30 (2H, m, H-14), 1.97, 2.23 (2H, m, H-5), 2.17, 2.23 (2H, m, H-6), 2.50 (1H, m, H-23), 2.62 (1H, brd, *J* = 11.4 Hz, H-15), 3.48, 3.60 (2H, dd, *J* = 7.8, 9.0 Hz, H-24), 3.81 (1H, m, H-11), 5.11 (1H, m, H-7), 5.22 (1H, m, H-13), 5.26 (1H, m, H-3); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 10.8 (C-22), 14.7 (C-25), 16.5 (C-19), 16.1 (C-21), 15.5 (C-20), 23.8 (C-6), 29.0 (C-14), 30.7 (C-10), 34.9 (C-9), 37.8 (C-23), 39.5 (C-2), 40.5 (C-5), 48.5 (C-15), 49.0 (C-1), 64.3 (C-24), 74.7 (C-11), 122.6 (C-3), 123.8 (C-7), 127.5 (C-13), 132.9 (C-8), 137.0 (C-4), 137.2 (C-12), 147.7 (C-17), 150.9 (C-16), 207.7 (C-18)。以上核磁和旋光数据与文献^[13]报道基本一致, 故化合物 **5** 鉴定为 (-)-*terpestacin*。

化合物 **6**: 白色固体, 易溶于二氯甲烷。HR-ESI-MS 显示 *m/z* [M + H]⁺ 123.0449 (Calcd. for C₇H₇O₂, 123.0441), 推测分子式为 C₇H₆O₂; ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ_H: 7.01 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3, H-5), 7.84 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2, H-6), 9.70 (1H, s, H-7); ¹³C-NMR (150 MHz, D₂O) δ_C: 118.9 (C-3, C-5), 131.4 (C-1), 136.0 (C-2, C-6), 165.6 (C-4), 197.7 (C-7)。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 故化合物 **6** 鉴定为对-羟基苯甲醛 (*p*-hydroxybenzaldehyde)。

化合物 **7**: 白色固体, 易溶于二氯甲烷。HR-ESI-MS 显示 *m/z* [M + H]⁺ 211.1686 (Calcd. for

C₁₃H₂₃O₂, 211.1693), 推测分子式为 C₁₃H₂₂O₂; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 1.61 (3H, d, *J* = 5.4 Hz, H-1), 1.64 ~ 1.55 (1H, m, H-5a), 1.35 ~ 1.24 (1H, m, H-5), 2.20 ~ 2.26 (2H, m, H-9), 5.10, 4.96 (2H, dd, *J* = 16.8, 10.2 Hz, H-13), 5.40 (1H, dq, *J* = 16.0, 7.0 Hz, H-2), 5.42 (1H, dq, *J* = 16.0, 7.0 Hz, H-3), 5.77 (1H, m, H-10), 6.07 (1H, dd, *J* = 15, 10.2 Hz, H-11), 6.31 (1H, ddd, *J* = 16.8, 10.2, 6.6 Hz, H-12); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 18.3 (C-1), 28.9 (C-9), 32.8 (C-8), 33.3 (C-5), 73.6 (C-7), 73.7 (C-6), 115.3 (C-13), 124.5 (C-2), 131.1 (C-11), 132.2 (C-3), 136.3 (C-10), 137.8 (C-12)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 故化合物 7 鉴定为 2, 10, 12-十三碳三烯-6, 7-二元醇 (2, 10, 12-triene-6, 7-diol)。

化合物 8: 黄色油状物, 易溶于二氯甲烷。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 0.86 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, H-18), 1.26 (8H, m, H-4 ~ 7, H-15 ~ 17), 1.51 (2H, m, H-3), 2.02 (2H, m, H-8, H-14), 2.28 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-2), 2.74 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-11), 3.63, 3.90 (2H, m, H-3'), 4.03 (2H, m, H-2'), 4.85, 4.61 (2H, m, H-1'), 5.34 (4H, m, H-9, 10, 12, 13); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 14.4 (C-18), 22.4 (C-17), 24.9 (C-3), 25.7 (C-11), 27.1 (C-8), 27.1 (C-14), 28.9 (C-4), 29.0 (C-5), 29.1 (C-15), 29.2 (C-6), 29.5 (C-7), 31.4 (C-16), 33.9 (C-2), 63.1 (C-1'), 66.0 (C-3'), 69.8 (C-2'), 128.2 (C-10), 128.2 (C-12), 130.2 (C-9), 130.2 (C-13), 173.4 (C-1)。以上数据与文献^[16]报道一致, 故化合物 8 鉴定为十八碳二烯酸单甘油酯 (glycerol-1-linoleate)。

2.4 生物活性评价

2.4.1 细胞毒活性 将两株人源性肝癌细胞系 HepG2 和 SMMC-7721 植入含 10% 胎牛血清及 100 U · mL⁻¹ 青霉素 / 链霉素的 RPMI-1640 培养基、37 °C 下培养, 制成 1 × 10⁵ 个 · mL⁻¹ 细胞悬浮液接种于 96 孔板中 (100 μL · 孔⁻¹), 于培养箱中 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 24 h 后, 用 1.25 ~ 80 μmol · L⁻¹ 的目标化合物和 1.25 ~ 80 μmol · L⁻¹ 的阳性对照药索拉非尼处理细胞。继续培养 48 h 后每孔加入 50 μL MTT (2 mg · mL⁻¹), 37 °C 下反应 4 h 后加入 200 μL 二甲基亚砷 (DMSO) 溶解甲瓏晶体, 在 450 nm 处测定吸光度值 (OD₄₅₀), 平

行测定 3 次, 取平均值^[17]。计算化合物对肿瘤细胞的增殖抑制率, 抑制率 (%) = [1 - (OD_{实验孔} - OD_{空白孔}) / (OD_{对照孔} - OD_{空白孔})] × 100%, 并采用非线性回归模型绘制 S 型剂量 - 抑制率曲线, 计算各化合物的 IC₅₀ 值。结果显示化合物 8 对 SMMC-7721、HepG2 细胞增殖具有抑制活性 [IC₅₀ 值分别为 (58.01 ± 1.62) 和 (53.30 ± 2.97) μmol · L⁻¹], 具体结果见表 1。

表 1 部分化合物细胞毒活性 (x̄ ± s, n = 3)

Tab 1 Cytotoxicities of compounds against two human tumor cell lines (x̄ ± s, n = 3)

化合物	IC ₅₀ / (μmol · L ⁻¹)	
	HepG2	SMMC7721
化合物 1	—	—
化合物 3	—	—
化合物 4	—	—
化合物 6	—	—
化合物 7	—	—
化合物 8	53.30 ± 2.97	58.01 ± 1.62
索拉非尼 (阳性对照)	2.19 ± 0.04	4.80 ± 0.08

2.4.2 抗菌活性 将 4 种致病菌株分别植入 Mueller-Hinton 肉汤培养基 (MHB), 37 °C 下培养, 制成 1 × 10⁶ CFU · mL⁻¹ 的菌液接种于 96 孔板 (50 μL / 孔), 用 1 ~ 64 μg · mL⁻¹ 的目标化合物及相同浓度梯度的阳性对照药万古霉素、硫酸阿米卡星处理后, 再于各孔中加入 50 μL 刃天青显色液, 35 °C 下培养 8 h 后目视观察法读取结果。结果显示化合物 1、3、4、6、7、8 对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 具有抑制活性, 对 *P. aeruginosa* 的 MIC 值均为 64 μg · mL⁻¹, 对 *S. aureus* 的 MIC 值分别为 16、16、4、16、32、4 μg · mL⁻¹。所有被测化合物在最大浓度 64 μg · mL⁻¹ 下对 *E. faecalis* 和 *E. coli* 均未显示抑菌活性, 结果见表 2。

表 2 部分化合物抗菌活性

Tab 2 Antimicrobial activities of compounds against 4 pathogenic bacteria

化合物	MIC / (μg · mL ⁻¹)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
化合物 1	16	—	64	—
化合物 3	16	—	64	—
化合物 4	4	—	64	—
化合物 6	16	—	64	—
化合物 7	32	—	64	—
化合物 8	4	—	64	—
万古霉素 (阳性对照)	1	1	/	/
硫酸阿米卡星 (阳性对照)	/	/	1	1

3 讨论

药用植物内生真菌是与植物共生的一类种群庞大的微生物群体, 能够产生结构丰富及活性多

样的次级代谢产物,如萜类、生物碱类、黄酮类、苯丙素类和肽类等,具有优良的抗菌、抗肿瘤等生物活性。近年来,国内外学者已陆续在药用植物内生真菌的次级代谢产物中发现了紫杉醇等与宿主植物相同或相似的活性物质。药用植物香青中主要含有黄酮类、糖苷类及甾体类等化学成分,其中槲皮素、山柰酚等黄酮类物质具有明显的抗肿瘤活性^[17-18];亦含有萜类及萜型衍生物等丰富的挥发油成分,其中 α -葑草烯、 α -蒎烯等多种萜类物质具有明显的抗菌、抗肿瘤、抗炎及镇咳祛痰等作用,萜型衍生物具有抗菌、抗肿瘤及杀虫等作用^[19-21]。本研究基于药用植物香青的抗菌活性,以前期活性筛选得到的内生真菌 *Metapochonia bulbilosa* XQ-4 为研究对象,以期探索该真菌次级代谢产物中是否有结构新颖、生物活性优良的先导化合物。本研究首次从中分离出内生真菌 *Metapochonia bulbilosa* XQ-4,并对该真菌的次级代谢产物进行研究,从香青中分离得到 1 个香豆素(1)、2 个二苯醚(2 和 3)、1 个色原酮(4)、1 个萜类(5)、1 个苯酚类(6)和 2 个长链化合物(7 和 8)。体外活性测试结果显示,化合物 1、3、4、6、7 和 8 对 *S. aureus*、*P. aeruginosa* 均具有不同程度的抑制活性,化合物 8 对 SMMC-7721 和 HepG2 细胞的增殖有微弱的细胞毒活性。通过比较内生真菌 *Metapochonia bulbilosa* XQ-4 次级代谢产物与其宿主植物香青的化学成分,发现其间并没有表现出明显的产物结构相似性,但对该菌株次级代谢产物的研究表明,其中次级代谢产物结构类型丰富、生物活性多样,这为后续对该菌株及香青的其他内生真菌的深入研究奠定了一定的实验基础。

本研究首次对真菌 *Metapochonia bulbilosa* XQ-4 次级代谢产物和生物活性进行研究,丰富了药用植物香青的内生真菌资源多样性,同时为真菌 *Metapochonia bulbilosa* XQ-4 次级代谢产物的进一步研究与利用提供参考。

参考文献

- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83 (3): 770-803.
- 郭顺星. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势 [J]. *菌物学报*, 2018, 37 (1): 1-13.
- 江苏新医学院. 中药大辞典(下册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1986: 1821-1825.
- 方志先, 廖朝林. 湖北恩施药用植物志(下册) [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2006: 448-450.
- Hyblerová S, Medo J, Barta M. Diversity and prevalence of entomopathogenic fungi (Ascomycota, Hypocreales) in epidemic populations of bark beetles (Coleoptera, Scolytinae) in spruce forests of the Tatra National Park in Slovakia [J]. *Ann For Res*, 2021, 64 (1): 28-36.
- 防治慢性气管炎 72 年全国新苗头方剂摘抄 [J]. *重庆新医药学*, 1972 (3): 64-71.
- 杨茜, 王晶, 达娃, 等. 14 种高原植物抑制植物病原菌活性的初步研究 [J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2011, 48 (3): 720-724.
- 高宁馨, 曹慧, 杨凌云. 香青中抗植物真菌活性物质的研究 [J]. *北京农业*, 2015 (12): 5-6.
- Kimura Y, Nakadoi M, Shimada A, et al. Biosyntheses of sescandelin and sescandelin B: new isocoumarin compounds produced by the fungus, *Sesquicilium candelabrum* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58 (8): 1525-1526.
- Takenaka Y, Tanahashi T, Nagakura N, et al. Phenyl ethers from cultured lichen mycobionts of *Graphis scripta* var. *serpentina* and *G. rikuzensis* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51 (7): 794-797.
- Chen M, Shao CL, Fu XM, et al. Bioactive indole alkaloids and phenyl ether derivatives from a marine-derived *Aspergillus* sp. fungus [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76 (4): 547-553.
- Tanahashi T, Takenaka Y, Nagakura N, et al. 2, 3-dialkyl chromones from mycobiont cultures of the Lichen *Graphis scripta* [J]. *Heterocycles*, 2000, 53 (7): 1589-1593.
- Schlegel B, Schmidtke M, Dörfelt H, et al. (-)-terpestacin and L-tenuazonic acid, inducers of pigment and aerial mycelium formation by *Fusarium culmorum* JP 15 [J]. *J Basic Microbiol*, 2001, 41 (3-4): 179-183.
- 夏文斌, 薛震, 李帅, 等. 杜鹃兰化学成分及肿瘤细胞毒活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30 (23): 1827-1830.
- Li B, Huang QX, Gao D, et al. New C₁₃ lipids from the marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17 (5): 468-474.
- 徐寅鹏, 石金敏, 郭明明, 等. 黄秋葵乙酸乙酯部位化学成分的研究 [J]. *天然产物研究与发*, 2013, 25 (1): 56-59.
- 滑艳, 何荔, 汪汉卿. 香青黄酮类化合物的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28 (6): 4-5.
- 滑艳, 何荔, 汪汉卿. 香青化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2004, 35 (2): 28-29.
- 滑艳, 汪汉卿. 甘肃产香青挥发油成分分析 [J]. *中草药*, 2003, 34 (1): 22-24.
- 张洪权, 余嘉祎, 杨英, 等. GC/MS 法结合保留指数分析香青花与叶挥发油的化学成分 [J]. *化学研究与应用*, 2020, 32 (8): 1334-1340.
- 张洪权, 杨英, 余嘉祎, 等. 两种香青属植物挥发油的化学成分及抗肿瘤活性 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31 (12): 2087-2092.

(收稿日期: 2022-07-10; 修回日期: 2022-08-17)

亚麻叶白千层内生真菌 *Penicillium citrinum* YMY-1 次生代谢产物研究

张莎^{1,2}, 邓小华³, 旷敏^{1,2}, 彭伟伟^{1,2}, 郑雨婷^{1,2}, 许立^{1,2}, 曾广源^{1,2}, 艾卫敏^{4*}, 邹振兴^{1,2*}
(1.中南大学湘雅药学院, 长沙 410013; 2. 慢病诊疗小分子药物发现与转化湖南省重点实验室, 长沙 410013; 3. 中南大学基础医学院人体解剖学与神经生物学系, 长沙 410013; 4. 湘潭医卫职业技术学院医学基础课部人体解剖学与生理学教研室, 湖南湘潭 411012)

摘要: 目的 研究亚麻叶白千层植物内生真菌 *Penicillium citrinum* YMY-1 的化学成分。方法 采用大孔树脂、硅胶、ODS、Sephadex-LH-20 柱色谱及 Pre-HPLC 现代色谱方法进行分离纯化, 并通过 HR-ESI-MS、NMR 等波谱手段对所得化合物进行结构鉴定。结果 从中分离出 12 个化合物, 分别鉴定为 chromosulfine (1)、methyl 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate (2)、penicitrinone A (3)、rubasperone B (4)、quinolactacin A1 (5)、quinolactacin A2 (6)、3, 4, 5-三甲基-1, 2-苯二酚 (7)、12-hydroxysorbicillin (8)、2-(hept-5-enyl)-3-methyl-4-oxo-6, 7, 8, 8a-tetrahydro-4H-pyrrolo[2, 1-b]-1, 3-oxazine (9)、dihydrocitrinone (10)、6, 8-dihydroxy-3, 4, 5, 7-tetramethyl-3, 4-dihydroisocoumarin (11) 和 β -麦角甾醇 (12)。结论 化合物 4 和 8 为首次从青霉属真菌中分离得到。

关键词: 内生真菌; 亚麻叶白千层; 青霉属; *Penicillium citrinum* YMY-1; 化学成分

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)10-2223-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.002

Secondary metabolites of endophytic fungus *Penicillium citrinum* YMY-1 from *Melaleuca linariifolia*

ZHANG Sha^{1,2}, DENG Xiao-hua³, KUANG Min^{1,2}, PENG Wei-wei^{1,2}, ZHENG Yu-ting^{1,2}, XU Li^{1,2}, ZENG Guang-yuan^{1,2}, AI Wei-min^{4*}, ZOU Zhen-xing^{1,2*} (1. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013; 2. Hunan Key Laboratory of Diagnostic and Therapeutic Drugs for Chronic Diseases, Changsha 410013; 3. Department of Human Anatomy and Neurobiology, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410013; 4. Department of Human Anatomy and Physiology, Section of Basic Medical Science, Xiangtan Medical and Health Vocational and Technical College, Xiangtan Hunan 411012)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of endophytic fungus *Penicillium citrinum* YMY-1 from *Melaleuca linariifolia*. **Methods** The fermentation of *Penicillium citrinum* YMY-1 was isolated and purified with macroporous resin, silica gel, ODS, Sephadex-LH-20 column chromatography as well as pre-HPLC, and the structures of obtained compounds were identified by HR-ESI-MS and NMR. **Results** Totally 12 compounds were isolated and identified as chromosulfine (1), methyl 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate (2), penicitrinone A (3), rubasperone B (4), quinolactacin A1 (5), quinolactacin A2 (6), 3, 4, 5-trimethyl-1, 2-benzenediol (7), 12-hydroxysorbicillin (8), 2-(hept-5-enyl)-3-methyl-4-oxo-6, 7, 8, 8a-tetrahydro-4H-pyrrolo[2, 1-b]-1, 3-oxazine (9), dihydrocitrinone (10), 6, 8-dihydroxy-3, 4, 5, 7-tetramethyl-3, 4-dihydroisocoumarin (11), and β -ergosterol (12). **Conclusion**

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No. 2021JJ30917); 湖南省高新技术产业科技创新引领计划 (No. 2020GK4083); 河南省“揭榜挂帅”科技项目 (No. 211110110300); 海南省重点研发项目 (No. ZDYF2022SHFZ048); 湖南省科教联合基金 (No. 2019JJ70043)。

作者简介: 张莎, 女, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究, email: ad8879789@163.com *通信作者: 艾卫敏, 女, 副教授, 主要从事中药和天然药物神经生物学研究, email: 357053938@qq.com; 邹振兴, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然药物化学研究, email: zouzhenxing@csu.edu.cn

Compounds **4** and **8** have been isolated from the genus of *Penicillium* for the first time.

Key words: endophytic fungus; *Melaleuca linariifolia*; *Penicillium*; *Penicillium citrinum* YMY-1; chemical composition

青霉属 (*Penicillium*) 真菌是广泛存在于自然环境中的一类腐生类真菌, 目前在植物^[1]、动物^[2]、海洋^[3]、土壤^[4]中均被报道过。青霉属真菌也是目前研究最多的菌属之一, 被认为是药物发现的主要来源, 包括来自 *Penicillium chrysogenum* 的抗生素青霉素和来自 *Penicillium griseofulvum* 的抗真菌药物灰黄霉素^[5], 其还能产生纤维素酶、蛋白酶和脂肪酶等具有应用前景的酶类, 因此在药物的研制、工业原材料的制备、新型酶制剂的筛选以及食品加工业等领域广泛应用^[6]。青霉属真菌是多种活性代谢产物的主要生产者, 因此目前仍然是广大药物研究者的关注焦点。

课题组前期对亚麻叶白千层 (*Melaleuca linariifolia*) 植株进行了系统的化学成分研究, 从中分离鉴定出多个活性天然产物^[7-9]。为了进一步寻找和发现更多活性天然产物, 我们选取亚麻叶白千层植物作为分菌对象, 从中分离出多株内生真菌, 经活性筛选及 TLC 薄层分析发现, 有多株菌株代谢产物丰富, 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 显示出较好的抑制活性。菌株 *Penicillium citrinum* YMY-1 是其中一株青霉属真菌, 对 MRSA 的最小抑菌浓度 (MIC) 值为 $0.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此, 为了进一步深入挖掘其次级代谢产物, 本实验对该菌株化学成分进行研究, 从中分离鉴定出 12 个化合物 (见图 1)。

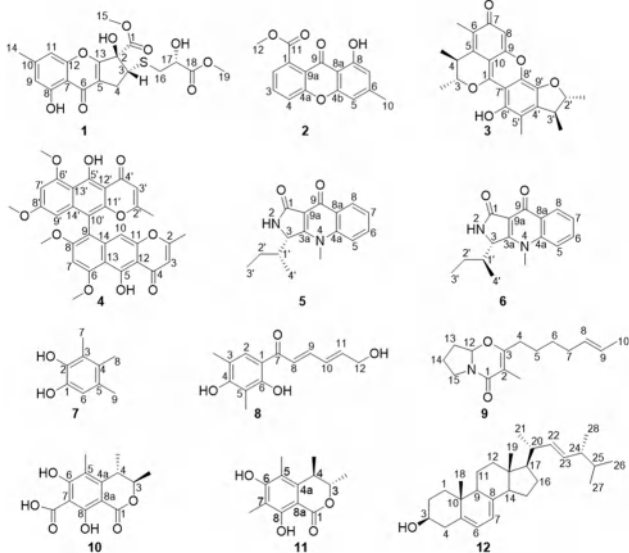


图 1 化合物 1 ~ 12 的化学结构

Fig 1 Structures of compounds 1 ~ 12

1 材料

Bruker AV-400/AV-500/AV-600 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Agilent 1290 UPLC-6545 accurate mass Q-TOF 色谱-质谱联用仪、Agilent 1200 型分析高效液相色谱仪、Agilent 1100 型半制备高效液相色谱仪 (美国 Agilent 科技公司); YMC-pack ODS-A 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); YMC-pack ODS-A 色谱柱 (250 mm × 10 mm, 10 μm); 大孔树脂脂 D101 (安徽三星树脂科技有限公司); C₁₈ 反相硅胶 (40 ~ 75 μm, 日本 Kasugai); 硅胶 (60 ~ 100 目, 200 ~ 300 目, 青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 凝胶 (德国 Healthcare Uppsala Swedeb); 所用试剂均为分析纯。

实验目标菌株分离自亚麻叶白千层枝叶, 亚麻叶白千层枝叶于 2019 年 11 月采自中国科学院华南植物园, 由华南植物园谭海波副研究员鉴定。该真菌由北京擎科新业生物技术有限公司经 ITS 序列分析鉴定为 *Penicillium citrinum* YMY-1, 目前该样品标本保存于中南大学湘雅药学院天然药物化学实验室。

2 菌株的发酵、萃取及其代谢产物的分离

用接种环挑取适量菌丝接种至装有 200 mL 马铃薯葡萄糖水 (PDB) 培养基的三角瓶中, 在恒温培养摇床中培养 5 d (28 °C, 130 r · min⁻¹), 制备得种子液。将种子液接种至无菌大米培养基中, 共培养 60 瓶, 室温下静态发酵培养 30 d, 得到固体发酵物。发酵完成后用乙酸乙酯将大米发酵物萃取 3 次, 并将有机溶剂在减压下蒸发以获得粗提物浸膏 (60 g)。

乙酸乙酯浸膏经大孔树脂柱层析, 采用 20%、80% 和 100% 乙醇水洗脱。80% 部分经硅胶柱层析, 以二氯甲烷-甲醇 (100 : 0 ~ 0 : 100) 梯度系统, TLC 点板合并得 8 个组分 (Fr. A ~ Fr. H)。Fr. C 经 ODS 柱层析, 采用 30% ~ 100% 甲醇水梯度洗脱得 5 个组分 (Fr. C-1 ~ Fr. C-5), 化合物 **12** (54 mg) 在过柱中析出白色固体。Fr. C-1 经 Sephadex LH-20 柱层析, 最后经 Pre-HPLC 得化合物 **5** (13.1 mg) 和 **6** (15.2 mg)。Fr. C-2 经硅胶柱层析, 再经 Pre-HPLC 得化合物 **2** (9.5 mg) 和 **7** (3.2 mg)。

Fr. E 经 ODS 柱层析, 采用 20% ~ 100% 甲醇水梯度洗脱得 8 个组分 (Fr. E-1 ~ Fr. E-8)。Fr. E-3 经硅胶柱层析, 以石油醚-乙酸乙酯

(20 : 1 ~ 0 : 100) 梯度洗脱, 得 5 个组分 (Fr. E-3-1 ~ Fr. E-3-5)。Fr. E-3-3 经 Sephadex LH-20 柱层析, 再经 Pre-HPLC 得化合物 **3** (30.6 mg)、**10** (16.1 mg) 和 **11** (5.7 mg)。Fr. E-3-4 经 Pre-HPLC 得化合物 **1** (22.4 mg)。Fr. E-4 经 Sephadex LH-20 柱层析, 以甲醇为洗脱剂, 得 4 个组分 (Fr. E-4-1 ~ Fr. E-4-4)。Fr. E-4-2 经反复硅胶柱层析, Pre-HPLC 得化合物 **8** (7.8 mg)。Fr. E-4-3 经反复硅胶柱层析, Pre-HPLC 得化合物 **4** (15.0 mg) 和 **9** (6.2 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 棕色无定型粉末, 易溶于甲醇和二甲基亚砜 (DMSO), HR-ESI-MS m/z : 447.0727 [M + Na]⁺。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 12.24 (1H, br s, 8-OH), 6.95 (1H, s, H-11), 6.69 (1H, s, H-9), 5.99 (1H, br s, 17-OH), 5.88 (1H, br s, 2-OH), 4.24 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, H-17), 4.00 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-3), 3.71 (3H, s, H-15), 3.66 (3H, s, H-19), 3.47 (1H, dd, $J = 17.4, 8.4$ Hz, H-4 β), 3.07 (1H, dd, $J = 17.4, 9.0$ Hz, H-4 α), 2.87 (1H, dd, $J = 13.2, 4.8$ Hz, H-16 α), 2.79 (1H, dd, $J = 13.8, 7.2$ Hz, H-16 β), 2.38 (3H, s, H-14)。¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 172.8 (C-1), 79.8 (C-2), 51.5 (C-3), 38.0 (C-4), 122.1 (C-5), 178.7 (C-6), 108.7 (C-7), 160.4 (C-8), 112.9 (C-9), 147.8 (C-10), 108.5 (C-11), 157.0 (C-12), 172.3 (C-13), 22.2 (C-14), 53.0 (C-15), 35.1 (C-16), 71.2 (C-17), 172.3 (C-18), 52.1 (C-19)。以上数据与文献^[10]报道基本一致, 化合物 **1** 鉴定为 chromosulfine。

化合物 **2**: 黄色固体, 易溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 285.0752 [M + H]⁺。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 7.93 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H-3), 7.73 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4), 7.45 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2), 6.92 (1H, s, H-5), 6.68 (1H, s, H-7), 3.90 (3H, s, -OCH₃), 3.40 (3H, s, 6-CH₃)。¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 133.4 (C-1), 123.3 (C-2), 136.4 (C-3), 120.0 (C-4), 155.9 (C-4a), 155.9 (C-4b), 107.0 (C-5), 150.1 (C-6), 111.9 (C-7), 161.0 (C-8), 108.0 (C-8a), 180.4 (C-9), 117.1 (C-9a), 22.5 (6-CH₃), 169.2 (-COO-), 53.2 (OCH₃)。以上数据与文献^[11]报道基本一致, 化合物 **2** 鉴定为 methyl 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate。

化合物 **3**: 深褐色无定型粉末, 易溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 381.1697 [M +

H]⁺。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 6.28 (1H, s, H-8), 5.21 (1H, q, $J = 6.5$ Hz, H-3), 4.62 (1H, m, H-2'), 3.36 (1H, m, H-3'), 3.26 (1H, m, H-4), 2.22 (3H, s, 5'-CH₃), 2.12 (3H, s, 6-CH₃), 1.43 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 3-CH₃), 1.38 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 2'-CH₃), 1.35 (6H, d, $J = 6.5$ Hz, 4-CH₃, 3'-CH₃)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 158.9 (C-1), 83.0 (C-3), 34.6 (C-4), 130.1 (C-5), 133.4 (C-6), 184.2 (C-7), 102.4 (C-8), 159.9 (C-9), 99.3 (C-10), 87.9 (C-2'), 44.5 (C-3'), 140.8 (C-4'), 117.3 (C-5'), 148.1 (C-6'), 101.4 (C-7'), 135.9 (C-8'), 137.6 (C-9'), 19.7 (3-CH₃), 17.9 (4-CH₃), 9.4 (6-CH₃), 17.4 (2'-CH₃), 18.0 (3'-CH₃), 10.5 (5'-CH₃)。以上数据与文献^[12]报道基本一致, 化合物 **3** 鉴定为 penicitrinone A。

化合物 **4**: 深黄色无定型粉末, 易溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 571.1601 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 15.17 (1H, br s, 5'-OH), 15.01 (1H, br s, 5-OH), 6.94 (1H, s, H-7), 6.54 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7'), 6.19 (1H, s, H-10), 6.18 (1H, s, H-3'), 6.11 (1H, s, H-3), 5.93 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-9'), 4.08 (3H, s, 6-OCH₃), 3.93 (3H, s, 6'-OCH₃), 3.83 (3H, s, 8-OCH₃), 3.47 (3H, s, 8'-OCH₃), 2.20 (3H, s, 2-CH₃), 2.04 (3H, s, 2'-CH₃)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 169.1 (C-2), 107.0 (C-3), 184.1 (C-4), 163.4 (C-5), 161.7 (C-6), 93.8 (C-7), 160.1 (C-8), 107.5 (C-9), 98.3 (C-10), 153.0 (C-11), 103.6 (C-12), 108.0 (C-13), 139.5 (C-14), 169.1 (C-2'), 107.2 (C-3'), 184.5 (C-4'), 162.6 (C-5'), 161.5 (C-6'), 97.0 (C-7'), 161.9 (C-8'), 96.9 (C-9'), 106.9 (C-10'), 151.0 (C-11'), 104.0 (C-12'), 108.2 (C-13'), 140.6 (C-14'), 20.4 (2-CH₃), 56.6 (6-OCH₃), 56.7 (8-OCH₃), 20.6 (2'-CH₃), 56.5 (6'-OCH₃), 55.4 (8'-OCH₃)。以上数据与文献^[13]报道基本一致, 化合物 **4** 鉴定为 rubasperone B。

化合物 **5**: 黄色固体, 易溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 271.1452 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 8.24 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.83 (1H, m, H-6), 7.50 (3H, m, H-6, H-8, -NH-), 4.92 (1H, s, H-3), 3.85 (3H, s, 4-CH₃), 2.18 (1H, m, H-1'), 1.59 (1H, m, H-2'a), 1.39 (1H, m, H-2'b), 1.14 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-4'), 0.65 (3H, t, $J = 7.2$ Hz,

H-3')。 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 169.1 (C-1), 57.4 (C-3), 36.2 (4- CH_3), 117.6 (C-5), 133.1 (C-6), 124.8 (C-7), 126.3 (C-8), 172.1 (C-9), 164.7 (C-3a), 141.7 (C-4a), 128.4 (C-8a), 110.7 (C-9a), 36.3 (C-1'), 27.8 (C-2'), 12.0 (C-3'), 12.4 (C-4')。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 化合物 5 鉴定为 quinolactacin A1。

化合物 6: 黄色固体, 易溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 271.1449 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 8.24 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 7.82 (1H, m, H-6), 7.50 (3H, m, H-6, H-8, -NH-), 4.84 (1H, s, H-3), 3.83 (3H, s, 4- CH_3), 2.18 (1H, m, H-1'), 1.00 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-3'), 0.87 (1H, m, H-2'a), 0.81 (1H, m, H-2'b), 0.44 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-4')。 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 169.0 (C-1), 59.5 (C-3), 36.5 (4- CH_3), 117.7 (C-5), 133.1 (C-6), 124.9 (C-7), 128.4 (C-8), 172.1 (C-9), 165.0 (C-3a), 141.7 (C-4a), 126.3 (C-8a), 110.8 (C-9a), 36.6 (C-1'), 21.3 (C-2'), 12.1 (C-3'), 18.0 (C-4')。以上数据与文献^[14]报道基本一致, 化合物 6 鉴定为 quinolactacin A2。

化合物 7: 白色固体, 溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 153.0915 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 6.20 (1H, s, H-6), 2.13 (3H, s, H-9), 2.04 (3H, s, H-7), 2.03 (3H, s, H-8)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 154.6 (C-1), 154.2 (C-2), 135.3 (C-3), 115.6 (C-4), 110.2 (C-5), 109.8 (C-6), 11.9 (C-7), 9.0 (C-8), 20.3 (C-9)。以上数据与文献^[15]报道基本一致, 化合物 7 鉴定为 3, 4, 5-三甲基-1, 2-苯二酚。

化合物 8: 黄色固体, 易溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 249.1112 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.56 (1H, s, H-6), 7.45 (1H, q, $J = 10.8$ Hz, H-9), 7.23 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-8), 6.63 (1H, m, H-10), 6.36 (1H, m, H-11), 4.24 (2H, dd, $J = 4.8, 1.8$ Hz, H-12), 2.18 (3H, s, 3- CH_3), 2.08 (3H, s, 5- CH_3)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 112.5 (C-1), 162.3 (C-2), 110.7 (C-3), 161.2 (C-4), 116.0 (C-5), 127.9 (C-6), 192.3 (C-7), 123.9 (C-8), 142.9 (C-9), 143.0 (C-10), 128.7 (C-11), 62.9 (C-12), 6.6 (3- CH_3), 15.0 (5- CH_3)。以上数据与文献^[16]报道基本一致, 化合物 8 鉴定为 12-hydroxysorbicillin。

化合物 9: 黄色油状, 易溶于甲醇和 DMSO,

HR-ESI-MS m/z : 250.1805 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 5.39 (2H, m, H-8, H-9), 5.22 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-12), 3.51 (1H, m, H-15a), 3.25 (1H, m, H-15b), 2.28 (2H, m, H-13a, H-4a), 2.16 (1H, m, H-4b), 2.00 (1H, m, H-13b), 1.98 (2H, m, H-7), 1.88 (1H, m, H-14a), 1.79 (1H, m, H-14b), 1.67 (3H, s, 2- CH_3), 1.61 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, H-10), 1.45 (2H, m, H-5), 1.34 (2H, m, H-6)。 ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 162.6 (C-1), 106.1 (C-2), 163.5 (C-3), 30.2 (C-4), 26.3 (C-5), 28.9 (C-6), 32.1 (C-7), 131.5 (C-8), 125.1 (C-9), 18.2 (C-10), 87.8 (C-11), 31.6 (C-12), 21.7 (C-13), 44.3 (C-14), 10.4 (C-15)。以上数据与文献^[17]报道基本一致, 化合物 9 鉴定为 2-(hept-5-enyl)-3-methyl-4-oxo-6, 7, 8, 8a-tetrahydro-4H-pyrrolo[2, 1-b]-1, 3-oxazine。

化合物 10: 白色粉末, 易溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 267.0873 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 4.43 (1H, dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz, H-3), 2.95 (1H, dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz, H-4), 1.98 (3H, s, 5- CH_3), 1.16 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 3- CH_3), 1.14 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 4- CH_3)。 ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 166.4 (C-1), 77.0 (C-3), 35.0 (C-4), 111.3 (C-5), 164.7 (C-6), 100.3 (C-7), 161.3 (C-8), 146.5 (C-9), 102.4 (C-10), 20.1 (3- CH_3), 19.3 (4- CH_3), 10.3 (5- CH_3), 175.8 (-COOH)。以上数据与文献^[18]报道基本一致, 化合物 10 鉴定为 dihydrocitronone。

化合物 11: 黄色油状, 易溶于甲醇和 DMSO, HR-ESI-MS m/z : 223.0965 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 4.67 (1H, qd, $J = 6.5, 1.0$ Hz, H-3), 3.07 (1H, qd, $J = 6.5, 1.0$ Hz, H-4), 2.10 (3H, s, 7- CH_3), 2.08 (3H, s, 5- CH_3), 1.28 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 3- CH_3), 1.26 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 3- CH_3)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 171.1 (C-1), 81.7 (C-3), 35.8 (C-4), 140.9 (C-4a), 115.2 (C-5), 161.6 (C-6), 110.6 (C-7), 162.6 (C-8), 99.9 (C-8a), 20.3 (3- CH_3), 20.1 (4- CH_3), 10.9 (5- CH_3), 8.3 (7- CH_3)。以上数据与文献^[19]报道基本一致, 化合物 11 鉴定为 6, 8-dihydroxy-3, 4, 5, 7-tetramethyl-3, 4-dihydroisocoumarin。

化合物 12: 白色固体, 易溶于氯仿, HR-ESI-MS m/z : 397.3476 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600

MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.57 (1H, dd, $J = 6.0, 2.4$ Hz, H-6), 5.39 (1H, m, H-7), 5.19 (1H, m, H-22), 5.19 (1H, m, H-23), 3.64 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28), 0.83 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27, H-26), 0.63 (3H, s, H-19)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 38.4 (C-1), 32.0 (C-2), 70.5 (C-3), 40.8 (C-4), 139.8 (C-5), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 141.4 (C-8), 46.3 (C-9), 37.0 (C-10), 21.1 (C-11), 39.1 (C-12), 42.8 (C-13), 54.6 (C-14), 23.0 (C-15), 28.3 (C-16), 55.7 (C-17), 12.1 (C-18), 16.3 (C-19), 40.4 (C-20), 21.1 (C-21), 135.1 (C-22), 132.0 (C-23), 42.8 (C-24), 33.1 (C-25), 20.0 (C-26), 19.7 (C-27), 17.6 (C-28)。以上数据与文献^[20]报道基本一致, 化合物 **12** 鉴定为 β - 麦角甾醇。

4 讨论

本研究从亚麻叶白千层植物内生真菌 *Penicillium citrinum* YMY-1 乙酸乙酯提取物中分离鉴定出 12 个化合物, 主要为聚酮和生物碱类成分, 其中化合物 **4** 和 **8** 为首次从青霉属真菌中分离得到。经文献检索发现, 化合物 **1** 和 **2** 具有抗肿瘤活性^[10, 17]; 化合物 **3**、**5** 和 **6** 对乙酰胆碱酯酶具有抑制活性^[14, 21]; 化合物 **7**、**9** 和 **10** 具有抗菌活性^[15, 22]; 化合物 **8** 具有抗炎活性^[16]。本研究结果不仅丰富了青霉属真菌的化学成分多样性, 亦为该真菌的进一步开发利用提供了一定的实验依据。

参考文献

- Wang ZF, Sun ZC, Xiao L, et al. Herbicidal polyketides and diketopiperazine derivatives from *Penicillium viridicatum* [J]. J Agr Food Chem, 2019, 67 (51): 14102-14109.
- Lamsal K, Kim SW, Nacimi S, et al. Three new records of *Penicillium* species isolated from insect specimens in Korea [J]. Mycobiology, 2013, 41 (2): 116-119.
- Ma HG, Liu Q, Zhu GL, et al. Marine natural products sourced from marine-derived *Penicillium* fungi [J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18 (1): 92-115.
- Idrees M, Ahmad B, Ahmad K, et al. Anti-tuberculous, phytotoxic and insecticidal activities of secondary metabolites obtained from *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from soil [J]. J Pak Med Assoc, 2018, 68 (7): 1024-1028.
- Youssef DTA, Alahdal AM. Cytotoxic and antimicrobial compounds from the marine-derived fungus, *Penicillium* species [J]. Molecules, 2018, 23 (2): 394.
- 罗清, 彭程, 叶波平. 青霉属真菌研究新进展 [J]. 药物生物技术, 2016, 23 (5): 452-456.
- 张莎, 董春茅, 徐杨蕊, 等. 亚麻叶白千层化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (11): 3180-3186.
- 伊哲, 张琦, 黎思露, 等. 引种亚麻叶白千层三萜类化学成分研究 [J]. 中南药学, 2020, 18 (12): 1982-1985.
- Deng YH, Zhang S, Hu W, et al. Triterpenoids with antiproliferative activities from the twigs and leaves of *Melaleuca linariifolia* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2021, 23 (8): 796-802.
- Yi L, Cui CB, Li CW, et al. Chromosulfine, a novel cyclopentachromone sulfide produced by a marine-derived fungus after introduction of neomycin resistance [J]. RSC Adv, 2016, 6: 43975-43979.
- Shao C, Wang C, Wei M, et al. Structure elucidation of two new xanthone derivatives from the marine fungus *Penicillium* sp. (ZZF 32#) from the South China Sea [J]. Magn Reson Chem, 2008, 46 (11): 1066-1069.
- Xu LL, Cao F, Tian SS, et al. Alkaloids and polyketides from the soil fungus *Aspergillus terreus* and their antibacterial activities [J]. Chem Nat Compd, 2017, 53 (6): 1212-1215.
- Huang HB, Feng XJ, Liu L, et al. Three dimeric naphtho- γ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Pongamia pinnata* [J]. Planta Med, 2010, 76: 1888-1891.
- Kim G, Song NK, Yoo ID. Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum* [J]. J Antibiot, 2001, 54 (10): 831-835.
- 崔海滨, 梅文莉, 韩壮, 等. 海洋真菌 095407 的抗菌活性代谢产物的研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18 (2): 131-134.
- Zhang P, Deng Y, Lin X, et al. Anti-inflammatory mono- and dimeric sorbicillinoids from the marine-derived fungus *Trichoderma reesei* 4670 [J]. J Nat Prod, 2019, 82 (4): 947-957.
- Lai DW, Brotz-Oesterhelt H, Muller WEG, et al. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum* [J]. Fitoterapia, 2013, 91: 100-106.
- 肖娜娜, 高俊平, 蔡小玲, 等. 南海红树林内生真菌 SK5 次级代谢产物研究 [J]. 中药材, 2009, 32 (12): 1843-1845.
- Khamthong N, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, et al. Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51 [J]. Tetrahedron, 2012, 68 (39): 8245-8250.
- 万辉. 褐圆孔牛肝菌化学成分的研究 [J]. 中草药, 2000, 31 (5): 10-12.
- Guo TT, Song MM, Han WR, et al. New *N*-methyl-4-quinolone alkaloid and citrinin dimer derivatives from the sponge-derived fungus *Penicillium* sp. SCSIO 41303 [J]. Phytochem Lett, 2021, 46: 29-35.
- Yang JK, Zhang B, Gao T, et al. A pair of enantiomeric 5-oxabicyclic [4.3.0] lactam derivatives and one new polyketide from the marine-derived fungus *Penicillium griseofulvum* [J]. Nat Prod Res, 2018, 32 (19): 2366-2369.

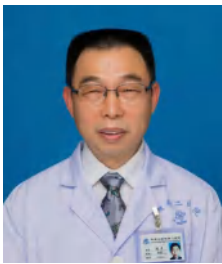
(收稿日期: 2022-07-05; 修回日期: 2022-08-10)

我国慢性阻塞性肺疾病的特点及治疗现状专题

【编者按】

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种常见的、可预防和治疗的慢性气道疾病。我国 40 岁及以上人群 COPD 患病率达 13.7%，估算 COPD 患者近 1 亿。COPD 现已成为全球第三位死亡原因，以 COPD 为主的呼吸慢病已被列为我国四大慢病之一。但目前真实世界研究表明我国对 COPD 的疾病认知仍存在不足，临床医师针对患者的治疗主要侧重于药物治疗，且药物治疗与指南推荐有一定差距。本专题将从我国 COPD 患者的特点及治疗现状进行总结和评价，希望增强临床工作者对国内 COPD 患者特点及治疗现状的了解，进一步提升 COPD 患者的管理水平，从而更好地改善患者症状并降低疾病进展风险。

【专题主持人】



陈平，男，医学博士，教授，一级主任医师，博士研究生导师，湘雅名医，中国优秀呼吸医师。现为中南大学呼吸疾病研究所所长，兼任中华医学会呼吸分会委员，中国医师协会呼吸医师分会常务理事，海峡两岸医药卫生交流协会呼吸病学专业委员会常务委员，湖南省呼吸疾病专业委员会名誉主委，中国慢阻肺联盟常委兼湖南省慢阻肺联盟主席。主持国家自然科学基金 6 项，国内外杂志发表论文 480 余篇，其中 SCI 收录 170 余篇，主编参编临床著作 30 余部，获省部级科技进步奖 6 项。

我国慢性阻塞性肺疾病的特点及治疗现状

成玮，陈平*（中南大学湘雅二医院呼吸与危重症医学科，中南大学呼吸疾病研究所，长沙 410011）

关键词：慢性阻塞性肺疾病；特点；治疗现状

中图分类号：R563

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2022)10-2228-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.003

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种常见的、可预防和治疗的慢性气道疾病，其特征是持续存在的气流受限和相应的呼吸系统症状，通常与显著暴露于有害颗粒或气体相关^[1]。我国 40 岁及以上人群 COPD 患病率达 13.7%，以 COPD 为主的呼吸慢病已被列为我国四大慢病之一^[2]。本文将从我国 COPD 患者的特点及治疗现状进行总结和评价，以期增强临床工作者对国内 COPD 患者特点及治疗现状的了解，进一步加强对 COPD 患者的管理。

1 我国 COPD 的特点

研究调查显示，我国 ≥ 40 岁居民的 COPD 疾病名称知晓率为 9.2%，肺功能检查知晓率仅 3.6%^[3]。国内不同等级医院就诊 COPD 诊断延迟的中位持续时间达 230 d，仅 47.3% 的患者在第一次就诊接受了肺功能检查^[4]。对 COPD 的认知

调查显示，仅 60% 的医师认为肺功能检查是诊断 COPD 的重要依据^[5]，由此可见我国医务人员对 COPD 疾病的认知不足，进而导致疾病的诊断延迟。绝大部分医师认可主动吸烟是导致 COPD 的危险因素，但对空气污染、生物燃料暴露、被动吸烟等危险因素认识不足^[5]。国内一项多中心的横断面研究纳入 5183 例 COPD 患者，男性占比超过 80%，危险因素分布中香烟暴露比例达 71.16%，职业因素暴露比例达 38.87%，生物燃料暴露比例达 15.32%，进一步分析发现仅暴露于生物燃料的 COPD 以女性多见，其临床症状比吸烟或职业因素暴露相关 COPD 更重，同时暴露于多种危险因素的患者比仅暴露于香烟的患者临床症状更重^[6]。职业粉尘暴露与没有粉尘暴露的患者相比，呼吸道症状及气流受限更重，生活质量更差^[7]。及时并充分地识别 COPD 患者的危险因素，

基金项目：国家自然科学基金项目 (No.81970044)。

作者简介：成玮，女，博士研究生，主要从事慢性阻塞性肺疾病临床及基础研究，email: 208202035@csu.edu.cn ***通信作者：**陈平，男，博士，教授，一级主任医师，博士研究生导师，主要从事慢性阻塞性肺疾病临床及基础研究，email: pingchen0731@csu.edu.cn

并进行肺功能检查,对实施疾病的早预防、早发现、早治疗至关重要。

COPD 患者主诉有多种不同的症状,不仅限于咳嗽、咳痰和呼吸困难等常见症状,还包括乏力、睡眠障碍、焦虑抑郁和疼痛等非典型症状^[8-9]。此外,COPD 晨间症状明显,高晨间症状患者占比达 50%^[10]。医务人员在 COPD 的识别和管理中除了关注咳嗽、咳痰等典型症状外,也需重视非典型症状。

2 我国 COPD 的治疗现状

稳定期 COPD 的治疗主要分为药物治疗和非药物治疗两大类,治疗旨在减轻当前症状和降低未来疾病进展、急性加重及死亡风险^[11]。

COPD 的治疗依从性与急性加重风险、再入院率、病死率、经济成本密切相关,在现实世界中 COPD 患者对吸入药物的依从性欠佳^[12]。国内一项研究报道 COPD 患者在 4 周、12 周和 24 周药物治疗依从率分别为 74.65%、49.63% 和 33.61%,其中缓解后停药是依从性差的最常见原因^[13],治疗依从性随着时间的推移出现逐渐下降的趋势,因此在疾病管理中应从治疗开始就制订提高治疗依从性的措施。除药物治疗依从性外,非药物治疗依从性对疾病的控制也至关重要。国内一项 COPD 戒烟治疗依从性的随机对照试验(RCT)研究发现,48.5%的参与者戒烟依从性良好,其中年龄越大、受教育程度越高、既往戒烟尝试次数越多、戒烟准备程度越高、认识到吸烟的危害、COPD 病程越长与良好的依从性相关^[14]。治疗依从性评估是 COPD 患者治疗策略中的一个基本要素,也是目前临床工作中对 COPD 患者个体化治疗面临的挑战。医务人员应当考虑与临床实践中依从性欠佳相关的因素,及早识别存在低依从性风险的患者,进而进行个体化的干预优化 COPD 的管理。

2014—2015 年中国居民 COPD 监测调查显示,40 岁及以上 COPD 患者的药物治疗率仅 11.7%,吸入药物治疗率为 3.4%,其中了解自身患病情况,存在呼吸道症状是影响 COPD 药物治疗率的重要相关因素^[15]。因此,未来应当进一步增强疾病宣教从而提高居民对 COPD 的知晓率,进而改善我国 COPD 患者药物治疗率低的现状。2022 年 GOLD 文件及 2021 年中国慢性阻塞性肺疾病诊治指南建议对重度急性加重、频繁急性加重、合并哮喘、嗜酸性粒细胞 ≥ 300 个 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的患者推荐使用吸入糖皮质激素(ICS)^[1]。国内一项针对 COPD 治疗现状的多中心研究发现 A 组和 B 组初诊患者中 ICS 过度使用的比例达 55%^[16]。随着双联支气管扩张剂(LABA + LAMA, 双支扩剂)在中国的上市及应用,COPD 患者使用的前三位吸入药物类型从 LAMA(长效抗胆碱能药物),ICS +

LABA(长效 β_2 受体激动剂) + LAMA, ICS + LABA 转变为 ICS + LABA + LAMA, LAMA, LAMA + LABA^[16-17],提示双支扩剂在临床实践中的地位逐步提升。2022 年 GOLD 文件及 2021 年中国 COPD 诊治指南推荐 COPD 评估测试(CAT) > 20 分的 COPD 患者初始使用 LAMA + LABA 联合治疗,CAT > 20 分和嗜酸性粒细胞计数 ≥ 300 个 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 COPD 的 D 组患者初始使用 ICS + LABA + LAMA 三联治疗^[1]。双支扩剂在国内上市之后,真实世界研究发现临床实践中推荐了部分 A 组和 C 组的患者使用双支扩剂进行初始治疗^[18]。此外,国内研究还发现 A 组、B 组、C 组中分别有 18.3%、17.0%、15.7% 的患者第一次就诊使用三联吸入药物治疗^[19]。上述药物的过度使用可能与临床医师对 COPD 指南的用药推荐认知不足有关。因此需进一步提高临床医师对 COPD 诊治规范的认识,从而提高 COPD 的规范化诊疗水平,减少 ICS、双支扩剂及三联吸入药物在 COPD 治疗中的过度使用。COPD 患者在治疗后症状逐渐改善^[17],且急性加重率也明显下降。国内一项多中心研究发现既往有急性加重病史的 COPD 患者占比 53.7% (533/993),随访 18 个月期间发生急性加重史的患者仅占 24.9% (197/792)^[20]。在临床实践中,医务工作人员应加强对 COPD 的疾病宣教,提高患者的药物治疗率及治疗依从性,并对患者进行规范化治疗,有利于改善患者症状、降低急性加重风险。

除药物治疗外,非药物治疗也是稳定期 COPD 治疗的重要组成部分,主要包括患者教育、危险因素的管理、肺康复治疗、疫苗接种等。一项共纳入 16 479 例 COPD 患者的观察性队列研究显示,戒烟者发生住院及死亡的风险明显低于吸烟者^[21]。虽然已经明确戒烟有利于改善 COPD 患者的预后,但国内研究发现戒烟的现状并不理想,吸烟 COPD 患者的戒烟率仅 25.0%^[22],提示我国 COPD 患者的戒烟率低,应加强 COPD 患者戒烟的健康教育,督促医务人员在诊疗过程中积极开展戒烟劝诫并提供多种戒烟途径从而提高患者戒烟率。调查数据显示,COPD 患者流感疫苗接种率为 3.6%,5 年内肺炎疫苗接种率仅 0.8%^[23]。未接种的原因主要是接种费用问题和对流感疫苗缺乏认识^[24]。除了疫苗接种率低之外,国内肺康复的应用也不理想,治疗率仅 0.8%^[25]。综上所述,我国 COPD 患者非药物治疗比例低,需要采取多种措施加强对 COPD 患者的健康教育与非药物治疗的推荐,进一步提升 COPD 患者的管理水平,从而更好地改善症状并降低疾病进展风险。

3 结论

我国对 COPD 的认知存在不足,COPD 诊断延迟时间长,药物治疗依从性差。COPD 患者的

治疗主要侧重于药物治疗, 非药物治疗的临床使用比例较低, 药物治疗与指南推荐有一定差距。卫生保健部门应当加强对 COPD 相关知识的宣传及推广, 从而提高 COPD 的知晓率。医务人员应当采取多种措施提高 COPD 患者的治疗依从性, 加强对非药物治疗的推荐力度, 进一步提升对患者的管理水平, 从而更好地改善患者的症状并降低疾病进展风险。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组, 中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2021年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44: 170-205.
- [2] Wang C, Xu JY, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study[J]. Lancet, 2018, 391(10131): 1706-1717.
- [3] 樊静, 王宁, 方利文, 等. 2014年中国40岁及以上人群慢性阻塞性肺疾病知识知晓率及其影响因素[J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(5): 586-592.
- [4] Dai Z, Ma Y, Zhan Z, et al. Analysis of diagnostic delay and its influencing factors in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 14213.
- [5] 周晓明, 吴岑, 赵立, 等. 我国北部地区部分三级医院医生对慢性阻塞性肺疾病认知现状的横断面调查[J]. 中华内科杂志, 2016, 55(9): 717-720.
- [6] Duan JX, Cheng W, Zeng YQ, et al. Characteristics of patients with chronic obstructive pulmonary disease exposed to different environmental risk factors: a large cross-sectional study[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 15: 2857-2867.
- [7] Oh Y, Bhome A, Boonsawat W, et al. Characteristics of stable chronic obstructive pulmonary disease patients in the pulmonology clinics of seven Asian cities[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2013, 8: 31-39.
- [8] Eléonore F van Dam van Isselt, Karin H Groenewegen-Sipkema, Monica Spruit-van Eijk, et al. Pain in patients with COPD: a systematic review and meta-analysis[J]. BMJ Open, 2014, 4(9): e005898.
- [9] Lee AL, Harrison SL, Goldstein RS, et al. Pain and its clinical associations in individuals with COPD: a systematic review[J]. Chest, 2015, 147(5): 1246-1258.
- [10] Sun T, Li X, Cheng W, et al. The relationship between morning symptoms and the risk of future exacerbations in COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 15: 1899-1907.
- [11] Singh D, Agustí A, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the GOLD science committee report 2019[J]. Eur Respir J, 2019, 53(5):
- [12] López-Campos JL, Gallego EQ, Hernández LC. Status of and strategies for improving adherence to COPD treatment[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2019, 14: 1503-1515.
- [13] Zhang M, Tang T, Wan M, et al. Self-reported reasons for treatment nonadherence in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients: a 24-week prospective cohort study in China[J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(5): 3495-3505.
- [14] Qin R, Liu Z, Zhou X, et al. Adherence and efficacy of smoking cessation treatment among patients with COPD in China[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 1203-1214.
- [15] 张阳, 王宁, 樊静, 等. 2014—2015年中国40岁及以上慢性阻塞性肺疾病患者药物治疗率及其影响因素分析[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(5): 678-684.
- [16] Zeng Y, Cai S, Chen Y, et al. Current status of the treatment of COPD in China: a multicenter prospective observational study[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 15: 3227-3237.
- [17] Cheng W, Duan J, Zhou A, et al. Real-world effectiveness of inhalation therapy among patients with symptomatic COPD in China: a multicenter prospective study[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 753653.
- [18] 易荣, 许玉竹, 冯玲, 等. 真实世界使用双联支气管扩张剂治疗慢性阻塞性肺疾病患者的临床特征及治疗规范性分析[J]. 中南药学, 2022, 20(10): 2231-2235.
- [19] Yang T, Cai B, Cao B, et al. Severity distribution and treatment of chronic obstructive pulmonary disease in China: baseline results of an observational study[J]. Respir Res, 2022, 23(1): 106.
- [20] Song Q, Zhao YY, Zeng YQ, et al. The characteristics of airflow limitation and future exacerbations in different GOLD groups of COPD patients[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 1401-1412.
- [21] Josephs L, Culliford D, Johnson M, et al. Improved outcomes in ex-smokers with COPD: a UK primary care observational cohort study[J]. Eur Respir J, 2017, 49(5): 1602114.
- [22] 樊静, 丛舒, 王宁, 等. 2014—2015年中国40岁及以上慢性阻塞性肺疾病患者戒烟状况[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(7): 1021-1027.
- [23] Fan J, Cong S, Wang N, et al. Influenza vaccination rate and its association with chronic diseases in China: results of a national cross-sectional study[J]. Vaccine, 2020, 38(11): 2503-2511.
- [24] 杨文彬, 徐玉慧, 解晔, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者流感疫苗接种意愿及影响因素调查[J]. 中国初级卫生保健, 2021, 35(3): 55-57.
- [25] 丛舒, 王宁, 樊静, 等. 2014—2015年中国40岁及以上慢性阻塞性肺疾病患者呼吸康复治疗情况[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(7): 1014-1020.

(收稿日期: 2022-02-05; 修回日期: 2022-07-05)

真实世界使用双联支气管扩张剂治疗慢性阻塞性肺疾病患者的临床特征及治疗规范性分析

易荣¹, 许玉竹¹, 冯玲¹, 曾玉琴^{2, 3}, 颜又新¹, 成玮^{2, 3}, 刘毅^{1*}, 陈平^{2, 3*} (1.株洲市中心医院呼吸与危重症医学科, 湖南 株洲 412000; 2.中南大学湘雅二医院呼吸与危重症医学科, 长沙 410011; 3.中南大学呼吸疾病研究所, 长沙 410011)

摘要: **目的** 观察真实世界中使用长效 β_2 受体激动剂(LABA)和长效抗胆碱能药物(LAMA)(LABA/LAMA, 双支扩剂)固定剂量联合制剂(FDC)治疗的慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者的临床特征, 并分析上述患者使用LABA/LAMA FDC是否遵循指南的推荐意见。**方法** 选取2018年12月—2021年12月于呼吸科就诊并予以LABA/LAMA FDC治疗的COPD患者, 按照入组前是否使用其他维持治疗药物分为初始组和原LAMA组、原ICS(吸入性糖皮质激素)/LABA组、原ICS/LABA+LAMA组, 分析各组基线特征, 包括COPD评估测试(CAT)评分、呼吸困难指数(mMRC)评分, 年中度、重度急性加重次数, 肺功能等。**结果** 本研究共纳入691名COPD患者, 平均年龄为(65.67±8.28)岁, CAT<10分的患者占比23.59%, 10~19分占55.43%, ≥20分占20.98%, 平均CAT为(14.63±6.57)分, B组(mMRC≥2分, CAT评分≥10分, 且0~1次中度急性加重)患者占比42.11%, D组(mMRC≥2分, CAT评分≥10分, 且≥2次中度急性加重或≥1次重度急性加重)占比37.19%, 80.75%患者的肺功能为GOLD2~3级。初始组占总研究人群75.69%, CAT<10分的患者占24.67%, 10~19分占55.45%, ≥20分占19.88%, 平均CAT为(14.28±6.34)分, 43.40%的患者分在B组, 31.93%为D组患者; 原LAMA组、原ICS/LABA组、原ICS/LABA+LAMA组在总研究人群占比分别为7.53%、10.56%、6.22%。**结论** 在真实世界中, 双支扩剂主要用于COPD患者的初始启动维持治疗, 其中绝大部分双支扩剂治疗患者为中度和重度COPD, 临床症状较重, 一部分用于调整治疗, 基本与GOLD推荐一致。但临床实践中, 临床医师处方部分双支扩剂患者的症状较GOLD推荐轻, 甚至推荐了部分症状轻的患者使用双支扩剂。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 长效 β_2 受体激动剂; 长效抗胆碱能药物; 临床特征

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2231-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.004

Clinical characteristics and therapy norms for patients with COPD treated with LAMA/LABA fixed-dose combination in the real world

YI Rong¹, XU Yu-zhu¹, FENG Ling¹, ZENG Yu-qin^{2, 3}, YAN You-xin¹, CHENG Wei^{2, 3}, LIU Yi^{1*}, CHEN Ping^{2, 3*} (1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou Hunan 412000; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 3. Research Institute of Respiratory Diseases, Central South University, Changsha 410011)

Abstract: Objective To describe the clinical characteristics in the real world chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients treated with long-acting β_2 -agonist and long-acting muscarinic antagonist (LABA/LAMA) fixed-dose combination (FDC). **Methods** Patients were included in the study cohort if they had a diagnosis of COPD and at least one prescription of LABA/LAMA FDC

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81970044)。

作者简介: 易荣, 女, 主治医师, 主要从事呼吸系统疾病的诊治, email: bd183293181@163.com *通信作者: 刘毅, 男, 硕士研究生导师, 主任医师, 主要从事呼吸系统疾病的诊治, email: flzzxy@163.com; 陈平, 男, 教授, 一级主任医师, 博士研究生导师, 主要从事慢阻肺凋亡机制及慢阻肺相关临床研究, email: pingchen0731@csu.edu.cn

therapy between December 2018 and December 2021. According to whether another maintenance medication was used before the enrollment, they were divided into an initial group, a prior LAMA group, a prior ICS/LABA group, and a prior ICS/LABA plus LAMA group. The baseline clinical characteristics of each group were analyzed, including CAT, mMRC score, moderate or severe acute exacerbations over the past year, and spirometry results. **Results** Totally 691 COPD patients were included, with an average age of (65.67 ± 8.28) years. The mean CAT score was (14.63 ± 6.57) , with $CAT < 10$ accounting for 23.59%, $CAT 10 \sim 19$ accounting for 55.43% and $CAT \geq 20$ about 20.98%. The distribution of patients according to GOLD stage and classification was 80.75% from 2 to 3, 42.11% in group B ($0 \sim 1$ moderate exacerbations per year, $mMRC \geq 2$ and or $CAT \geq 10$) and 37.19% in group D (≥ 2 moderate exacerbations per year, ≥ 1 severe exacerbation, $mMRC \geq 2$ and or $CAT \geq 10$) respectively, 75.69% of participants initiating LABA/LAMA FDC treatment had a mean CAT (14.28 ± 6.34) , with classifications as follows: $CAT < 10$ (24.67%), $CAT 10 \sim 19$ (55.45%), and $CAT \geq 20$ (19.88%). 43.40% of patients in the initial group were in GOLD B group and 31.93% in GOLD D group, The proportion of patients who switched from the LAMA group, the ICS/LABA group, or the ICS/LABA + LAMA group to LABA/LAMA FDC was 7.53%, 10.56%, and 6.22%, respectively. **Conclusion** In the real world, LABA/LAMA FDC is mainly used for initial maintenance therapy in COPD patients and the majority were moderate and severe COPD with multi-symptoms. A small part of patients change from other prescriptions to double bronchodilators. The application of LABA/LAMA FDC follows the recommendations of the GOLD. But in the real world, LABA/LAMA FDC were prescribed to patients with fewer symptoms than recommendations, even some patients with mild symptoms were treated with LABA/LAMA FDC.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; long-acting β_2 -agonist; long-acting muscarinic antagonist; clinical feature

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种常见病, 它以持续呼吸症状和气流受限为特征。慢性阻塞性肺疾病全球倡议 (GOLD) 推荐支气管扩张剂为稳定期 COPD 患者治疗的基石。GOLD 文件推荐的两类长效支气管扩张剂分别为: 长效 β_2 受体激动剂 (LABA) 和长效抗胆碱能药物 (LAMA) (双支扩剂)^[1]。LABA 联合 LAMA 为改善 COPD 患者症状核心药物。目前, 国内关于 LABA/LAMA 固定剂量联合制剂 (fixed-dose combination, FDC) 的现状研究较少, 本研究旨在了解在真实世界中, COPD 的初始及调整治疗中应用 LABA/LAMA FDC 的患者的临床特征, 并分析临床医师应用 LABA/LAMA FDC 是否遵循 GOLD 推荐。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取 2018 年 12 月—2021 年 12 月至中南大学湘雅二医院或株洲市中心医院呼吸科就诊并予以 LABA/LAMA FDC 治疗的 COPD [具备 COPD 危险因素暴露史、慢性呼吸道症状、吸入支气管舒张剂后第一秒用力呼气容积 (FEV₁) 占用力肺活量比值 (FVC) < 0.7]^[2] 的患者, 在入组时进

行问卷调查及肺功能检查, 排除认知功能障碍、不能交流、不能配合完成肺功能的 COPD 患者。

纳入人群按照入组前是否使用 COPD 维持治疗药物分为 4 个亚组: ① 初始组 (初始维持用药就是 LABA/LAMA FDC: 包括乌美溴胺维兰特罗吸入粉雾剂 62.5/25 μg (每次 1 吸, 每日 1 次, 葛兰素史克)、茚达特罗格隆溴铵吸入粉雾剂 110/50 μg (每次 1 吸, 每日 1 次, 诺华公司)、格隆溴铵福莫特罗吸入气雾剂 7.2 μg /5.0 μg (每次 2 吸, 每日 2 次, 阿斯利康); ② 原 LAMA 组 (噻托溴铵粉雾剂 18 μg , 每次 1 吸, 每日 1 次, 正大天晴); ③ 原 ICS/LABA 组 (沙美特罗替卡松粉吸入剂 50 μg /250 μg 、50 μg /500 μg , 每次 1 吸, 每日 2 次, 葛兰素史克), 布地奈德福莫特罗粉吸入剂 160 μg /4.5 μg 、320 μg /9 μg (每次 1 吸, 每日 2 次, 阿斯利康); ④ 原 ICS (吸入性糖皮质激素) /LABA + LAMA 组 (沙美特罗替卡松粉吸入剂 50 μg /250 μg 、50 μg /500 μg , 每次 1 吸, 每日 2 次, 葛兰素公司史克) 或者布地奈德福莫特罗粉吸入剂 160 μg /4.5 μg 、320 μg /9 μg (每次 1 吸, 每日 2 次, 阿斯利康) 分别联合噻托溴铵粉雾剂 18 μg (每次 1 吸, 每日 1 次, 正大天晴)。本研

究通过中南大学湘雅二医院伦理委员会批准及同意 [(2016) 伦审 (科) 第 (076) 号]。

1.2 观察指标

人口学特征包括年龄、性别、体质量指数 (BMI)、吸烟情况; 临床特征包括过去一年出现中度、重度急性加重次数、COPD 评估测试 (CAT) 评分、呼吸困难指数 (mMRC) 评分, FEV₁, FEV₁%Pred。

急性加重指患者呼吸道症状超过日常变异范围的持续恶化, 并需调整药物治疗方案^[2]。CAT 评分包括咳嗽、咳痰、胸闷、爬坡或上一层楼梯的感觉、家务活动、离家外出信心程度、睡眠和精力 8 个项目, 每个项目 0~5 分, 总分 0~40 分^[2]。

1.3 COPD 分组及肺功能分级标准

1.3.1 COPD 分组 根据患者症状及急性加重的风险将 COPD 患者分为 A~D 组。A 组: mMRC 0~1 分, CAT 评分 < 10 分, 且 0 或 1 次中度急性加重; B 组: mMRC ≥ 2 分, CAT 评分 ≥ 10 分, 且 0 或 1 次中度急性加重; C 组: mMRC 0~1 分, CAT 评分 < 10 分, 且 ≥ 2 次中度急性加重或 ≥ 1 次重度急性加重; D 组: mMRC ≥ 2 分, CAT 评分 ≥ 10 分, 且 ≥ 2 次中度急性加重或 ≥ 1 次重度急性加重^[2]。

1.3.2 肺功能分级 根据吸入万托林 400 μg 后 FEV₁% 预计值比值分为 GOLD1 级: FEV₁% ≥ 80%Pred; GOLD2 级: 50% ≤ FEV₁ < 80%Pred; GOLD3 级: 30% ≤ FEV₁ < 50%Pred; GOLD4 级: FEV₁ < 30%Pred^[2]。

1.4 GOLD 推荐 COPD 用药原则

推荐 LABA/LAMA 初始治疗用于 B、D 组症状多的患者 [如 CAT ≥ 20 分]; 随访治疗中, 如果使用 LAMA 治疗后, 仍然有持续呼吸困难或运动受限症状和 / 或急性加重, 推荐调整治疗方案为 LABA/LAMA。如应用 ICS/LABA、ICS/LABA/LAMA 仍有持续呼吸困难或运动受限和 / 或急性加重病史, 出现反复肺炎、ICS 用于无急性加重病史患者的症状治疗或 ICS 治疗无反应, 可调整治疗方案为 LABA/LAMA^[3]。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 25.0 统计软件, 计量资料进行正态检验, 参数呈正态分布时, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 非正态分布数据以中位数和四分位数表示 [median (P_{25}, P_{75})]。当各组数据呈正态分布且方差齐时采用两样本 *t* 检验, 当数据部分和正态分布且方差不齐时采用 Mann-Whitney 检验。计数资料用率 (%) 表示, 采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总体研究人群一般资料

研究最终纳入 691 人, 平均年龄为 (65.67 ± 8.28) 岁, 87.70% 为男性, 平均 BMI 为 (22.5 ± 3.5), 83.21% 患者有吸烟史, 详见表 1。

表 1 总体研究人群的人口学特征 (n = 691)

Tab 1 Demographic characteristics of total COPD patients (n = 691)

人口及临床特征	结果
年龄 / 岁	65.67 ± 8.28
男性 [n (%)]	606 (87.70)
女性 [n (%)]	85 (12.30)
BMI	22.5 ± 3.5
吸烟指数 [median (IQR)]	40 (34.25)
吸烟状态	
目前或既往吸烟 [n (%)]	575 (83.21)
从不吸烟 [n (%)]	116 (16.79)

注: 吸烟指数即每天吸烟包数 × 年数。

Note: Smoking index means packs per day multiply smoking years.

2.2 不同情况下使用双支扩剂治疗的 COPD 患者的临床特征

总体纳入人群中, CAT < 10 分的患者占比 23.59%, 10~19 分占 55.43%, ≥ 20 分占 20.98%, 平均 CAT 为 (14.63 ± 6.57) 分, 72.65% 的患者 mMRC ≥ 2 分, 47.47% 无中重度加重史, 75.54% 患者无频繁急性加重, B 组患者占比 42.11%, D 组占比 37.19%。80.75% 患者的肺功能为 GOLD2~3 级, 中位 FEV₁ 1.15 L, 中位 FEV₁ 50%Pred。

初始组 523 人, 占总研究人群 75.69%, CAT < 10 分的患者占比 24.67%, 10~19 双支扩剂分占 55.45%, ≥ 20 分占 19.88%, 平均 CAT 为 (14.28 ± 6.34) 分, 70.94% 的患者 mMRC ≥ 2 分, B 组患者占比 43.40%, D 组占比 31.93%; 51.05% 的患者无加重史; 该组中也观察到 24.67% 的患者 (A 组及 C 组) 初始治疗使用 LABA/LAMA FDC。

原 LAMA 组、原 ICS/LABA 组、原 ICS/LABA + LAMA 组分别占总研究人群 7.53%、10.56%、6.22%, 见表 2。

2.3 治疗规范性

总体纳入人群中 81.33% 使用 LABA/LAMA FDC 符合 GOLD 推荐, 初始组中 16.64% 的 A 组患者和 8.03% C 组患者初始治疗使用 LABA/LAMA FDC, 治疗方案不符合 GOLD 推荐。

3 讨论

支气管扩张剂是稳定期 COPD 患者的基础用药, LABA 作用于气道平滑肌细胞膜上的 β_2 受体,

表 2 不同情况下使用双支扩剂治疗的 COPD 患者的临床特征

Tab 2 Clinical characteristics among total and subgroup patients with COPD treated with LAMA/LABA FDC

指标	总人群 (n = 691)	初始组 (n = 523)	原 LAMA 组 (n = 52)	原 ICS/LABA 组 (n = 73)	原 ICS/LABA + LAMA 组 (n = 43)
CAT 评分					
< 10 [n (%)]	163 (23.59)	129 (24.67)	6 (11.54)	21 (28.77)	7 (16.28)
10 ~ 19 [n (%)]	383 (55.43)	290 (55.45)	34 (65.38)	35 (47.94)	24 (55.81)
≥ 20 [n (%)]	145 (20.98)	104 (19.88)	12 (23.08)	17 (23.29)	12 (27.91)
mean ± SD	14.63 ± 6.57	14.28 ± 6.34	16.40 ± 7.27	15.05 ± 7.15	16.09 ± 6.95
mMRC [median (P ₂₅ , P ₇₅)]					
2 (1, 3)	2 (1, 3)	2 (1, 3)	2 (1, 3)	2 (2, 3)	2 (2, 3)
0 或 1 分 [n (%)]	189 (27.35)	152 (29.06)	14 (26.92)	16 (21.92)	7 (16.28)
≥ 2 分 [n (%)]	502 (72.65)	371 (70.94)	38 (73.08)	57 (78.08)	36 (83.72)
年急性加重次数 [median (P ₂₅ , P ₇₅)]					
1 (0, 1)	1 (0, 1)	0 (1, 0)	1 (0, 1)	1 (0, 2)	1 (1, 3)
无中重度急性加重 [n (%)]					
328 (47.47)	267 (51.05)	21 (40.38)	23 (31.51)	17 (39.53)	
有中重度急性加重 [n (%)]					
363 (52.53)	256 (48.95)	31 (59.62)	50 (68.49)	26 (60.47)	
无频繁急性加重 (0 ~ 1) [n (%)]					
522 (75.54)	411 (78.59)	40 (76.92)	49 (67.12)	22 (51.16)	
频繁急性加重 ≥ 2 次 [n (%)]					
169 (24.46)	112 (21.41)	12 (23.08)	24 (32.88)	21 (48.84)	
无重度加重 [n (%)]					
454 (65.70)	361 (69.02)	32 (61.54)	35 (47.95)	26 (60.47)	
有重度加重 [n (%)]					
237 (34.30)	162 (30.98)	20 (38.46)	38 (52.05)	17 (39.53)	
肺功能 [median (P ₂₅ , P ₇₅)]					
FEV1 (L)	1.15 (0.88, 1.51)	1.15 (0.88, 1.51)	1.19 (0.76, 1.56)	1.23 (0.86, 1.62)	1.15 (0.94, 1.37)
FEV1%Pred (%)	50.00 (37.40, 63.10)	49.50 (37.23, 63.00)	50.65 (35.00, 62.20)	52.50 (37.90, 65.03)	50.90 (44.00, 66.70)
GOLD 分级 [n (%)]					
1 级	59 (8.54)	48 (9.18)	2 (3.85)	7 (9.59)	2 (4.65)
2 级	288 (41.68)	210 (40.15)	24 (46.15)	34 (46.57)	20 (46.52)
3 级	270 (39.07)	213 (40.73)	16 (30.77)	24 (32.88)	17 (39.53)
4 级	74 (10.71)	52 (9.94)	10 (19.23)	8 (10.96)	4 (9.30)
GOLD 分组 [n (%)]					
A 组	93 (13.46)	87 (16.64)	0 (0.00)	3 (4.11)	3 (6.98)
B 组	291 (42.11)	227 (43.40)	25 (48.08)	24 (32.88)	15 (34.88)
C 组	50 (7.24)	42 (8.03)	1 (1.92)	6 (8.22)	1 (2.33)
D 组	257 (37.19)	167 (31.93)	26 (50)	40 (54.79)	24 (55.81)

使气道平滑肌舒张^[4]。LAMA 阻断 M 受体，抑制乙酰胆碱释放，达到舒张支气管的作用，而且能减少黏液分泌，从而减少气道阻力。LABA 主要作用于小气道，LAMA 主要作用在大中气道，联合使用 LABA 和 LAMA 这两种作用机制不同、作用部位不同的药物，不仅能增加支气管舒张程度，而且起效快，作用时间延长，也能最大限度减少药物不良反应^[5]。目前，针对 LABA/LAMA FDC 的研究主要为干预性及疗效分析的研究，在真实世界中研究较少，美国首个关于真实世界中使用 LABA/LAMA FDC 的人口特征和临床特征的研究表明：患者一般为老年人和超重者，并伴有冠心病、高血压和高脂血症^[6]。英国一项真实世界中关于 LAMA/LABA/ICS 与 LAMA/LABA 疗效对比

的观察性研究（该研究纳入 1932 名使用 LAMA/LABA 的患者）显示，使用 LAMA/LABA 的患者老年人为主，大部分患者为男性，肺功能为中-重度阻塞性通气功能障碍，59.3% 为急性加重低风险^[7]。因国内 LABA/LAMA FDC 上市时间不长，国内关于 LABA/LAMA FDC 的研究主要是荟萃分析和疗效分析^[8-9]，研究表明 LABA/LAMA FDC 治疗 COPD 安全有效，而缺少真实世界研究。本研究描述分析了真实世界中使用 LABA/LAMA FDC 的 COPD 患者的特征，结果表明，总体研究人群中，LABA/LAMA FDC 主要用于症状较重的 COPD 患者的初始治疗，绝大多数为 B、D 组患者，这符合 GOLD 推荐。

但在初始治疗时，GOLD 推荐 LABA 联合

LAMA 用于症状严重, 例如 CAT ≥ 20 分的 COPD 患者, A 组用短效或一种长效支气管扩张剂, C 组推荐初始治疗使用单支气管扩张剂。在本研究中, LABA/LAMA FDC 初始治疗中 CAT ≥ 20 比例仅 19.88%, 有 24.64% CAT < 10 分, 其症状较 GOLD 推荐为轻, 甚至推荐了部分症状轻的患者使用。德国一项真实世界研究中也发现, 初始使用 LABA/LAMA FDC 的 COPD 患者中也只有 40.4% 基线 CAT > 20 分, 有 16.7% 患者 CAT < 10 分^[10]。目前对于症状不严重的患者, 起始治疗是采用双支扩剂, 还是先用单支气管扩张剂, 效果不佳再升级为双支扩剂, 目前尚无定论, 但在一项为期 12 周的随机平行对照研究中, 用乌美溴铵/维兰特罗替代噻托溴铵治疗, 患者的 FEV1 谷值和缓解药物使用情况得到显著改善, 呼吸困难改善 (TDI 改善 ≥ 1) 的概率是噻托溴铵的 1.78 倍 ($OR = 1.78$; 95%CI 为 1.21 和 2.64; $P = 0.004$)。该研究结果提示, 尽早使用双支扩剂, 患者生活质量改善更早, 对于患者的症状控制有重要意义^[11]。

本研究中, 由少部分由 LAMA、ICS/LABA 或 ICS/LABA + LAMA 调整为 LABA/LAMA FDC, 符合 GOLD 文件 COPD 随访调整治疗推荐。一项真实世界研究发现, 双支扩剂治疗 6 个月后, COPD 患者 CAT 评分改善率 (治疗前后 CAT 差值 ≥ 2 分) 明显高于 LAMA 和 ICS + LABA 治疗组, 这提示双支扩剂治疗改善患者症状明显优于 LAMA 和 ICS + LABA 治疗^[12]。FLAME 研究表明, 针对急性加重低风险的 COPD 患者, LABA/LAMA 与 ICS/LABA 比较, 可显著减少患者中重度急性加重及肺炎的发生风险, 延缓至首次急性加重的时间^[13]。部分患者由 ICS/LABA + LAMA 调整为 LABA/LAMA FDC, 目前撤除吸入性激素的证据有限, 该部分患者调整用药可能原因是使用 ICS/LABA + LAMA 治疗效果不佳, 或 ICS 用于 COPD 无使用 ICS 指征, 其疗效及预后有待进一步观察。

本研究的不足: 纳入病例数较少; 没有纳入合并症分析; 也没有分析医师选择其方案的原因。在今后的研究中需进一步完善。

4 结论

在真实世界中, 双支扩剂主要用于 COPD 患者的初始启动维持治疗, 其中绝大部分双支扩剂治

疗患者为中度和重度 COPD, 临床症状较重, 一部分用于调整治疗, 基本与 GOLD 推荐一致。但临床实践中, 临床医师处方部分双支扩剂患者的症状较 GOLD 文件推荐轻, 甚至推荐了部分症状轻的患者使用双支扩剂。

参考文献

- [1] 陈亚红. 2019 年 GOLD 慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗及预防全球策略解读 [J]. 中国医学前沿杂志 (电子 [1] 版), 2019, 11 (1): 1-14.
- [2] 慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2013 年修订版) [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2014, 6 (2): 67-80.
- [3] 童朝晖. 慢性阻塞性肺疾病维持治疗期吸入药物的研究进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42 (5): 398-400.
- [4] 陈平. β_2 受体激动药在慢性阻塞性肺疾病中应用现状 [J]. 中南药学, 2003, 1 (5): 293-295.
- [5] 徐永健. 抗胆碱药物在慢性阻塞性肺疾病中的应用现状与展望 [J]. 中南药学, 2003, 1 (5): 290-292.
- [6] Ding B, Kallenbach L, Slipski L, et al. Patient characteristics and healthcare resource utilization among patients with COPD new to LAMA/LABA fixed-dose combination treatment in us-based real-world practice [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 16 (15): 775-786.
- [7] Suissa S, Dell'Aniello S, Ernst P. Comparative effects of LAMA-LABA-ICS vs LAMA-LABA for COPD: cohort study in real-world clinical practice [J]. Chest, 2020, 157 (4): 846-855.
- [8] 李倩, 毛山. 双长效支气管扩张剂在慢性阻塞性肺疾病治疗中的研究进展 [J]. 世界临床药物, 2020, 41 (2): 149-154.
- [9] 陈荣, 王沛. 长效 β_2 -受体激动剂联合长效抗胆碱能药物治疗慢性阻塞性肺疾病对肺功能的影响 [J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3 (10): 36-37.
- [10] Worth H, Buhl R, Crieé CP, et al. GOLD 2017 treatment pathways in 'real life': an analysis of the DACCORD observational study [J]. Respir Med, 2017, 131: 77-84.
- [11] Kerwin EM, Kalberg CJ, Galkin DV, et al. Umeclidinium, vilanterol as step-up therapy from tiotropium in patients with moderate COPD: a randomized, parallel-group, 12-week study [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016, 2017 (12): 745-755.
- [12] Cheng W, Duan J, Zhou A, et al. Real-world effectiveness of inhalation therapy among patients with symptomatic COPD in China: a multicenter prospective study [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 753653.
- [13] Wedzicha JA, Banerj D, Chapman KR, et al. Indacaterolglycopyrronium versus salmeterol-fluticasone for COPD [J]. N Eng J Med, 2016, 374 (23): 2222-2234.

(收稿日期: 2022-06-08; 修回日期: 2022-08-10)

研究论文

环裂松萝化学成分的研究

郝昱, 王璐, 郝怡萌, 张晴, 刘冰倩, 王莉宁* (天津中医药大学中药学院, 天津 301617)

摘要: **目的** 研究环裂松萝干燥地衣体的化学成分及抗菌活性。**方法** 采用开放柱色谱和制备液相进行分离纯化, 根据波谱数据鉴定化合物结构。通过纸片扩散法初步筛选抗金黄色葡萄球菌的活性成分, 并通过分子对接青霉素结合蛋白 PBP2a 虚拟筛选抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的活性成分。**结果** 分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为扁枝衣酸乙酯 (1)、扁枝衣酸 (2)、atraric acid (3)、 α -亚麻酸甲酯 (4)、2'-*O*-methyleveranol (5)、 α -亚麻酸 (6)、亚油酸 (7)、苔色醛 (8)、3-羟基-5-甲基苯基-2-羟基-4-甲氧基-6-甲基苯甲酸酯 (9)、苔色酸 (10)、瘤网地衣素 (11)、苔黑酚 (12)、5-羟甲基糠醛 (13)、4-(乙酰氨基)丁酰胺 (14)、尿嘧啶核苷 (15)。化合物 5、8、9 在 $128.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度下, 抑菌圈直径分别为 6.4、6.6、6.6 mm。分子对接结果显示, 化合物 6、7、11 与 PBP2a 对接打分值较高 (> 40)。**结论** 化合物 4、5、8、13 ~ 15 为首次从松萝属植物中分离得到。化合物 5、8、9 对金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用; 化合物 6、7、11 可能具有抗 MRSA 的活性。

关键词: 环裂松萝; 化学成分; 分离鉴定; 抗菌活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2236-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.005

Chemical constituents of lichen *Usnea diffracta*

HAO Yu, WANG Lu, HAO Yi-meng, ZHANG Qing, LIU Bing-qian, WANG Li-ning* (School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents and antibacterial activity of lichen *Usnea diffracta*. **Methods** The ethanolic extract from lichen *Usnea diffracta* was isolated and purified by column chromatography and preparative RP-HPLC. The chemical structures were identified based on their spectroscopic data. The active ingredients against *Staphylococcus aureus* were screened by paper diffusion method. The active anti-MRSA ingredients were screened by molecular docking with penicillin-binding protein 2a (PBP2a). **Results** Totally 15 compounds were isolated and identified as ethyl everninate (1), evernic acid (2), atraric acid (3), α -linolenic acid methyl ester (4), 2'-*O*-methyleveranol (5), α -linolenic acid (6), linoleic acid (7), orsellinaldehyde (8), 3-hydroxy-5-methylphenyl-2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate (9), orsellinic acid (10), lecanorin (11), orcinol (12), 5-hydroxymethylfurfural (13), 4-(acylamino) butyramides (14), and uridine (15). Compounds 5, 8, 9 showed the inhibition circle of 6.4 mm, 6.6 mm and 6.6 mm respectively, against *Staphylococcus aureus* at $128.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Molecular docking showed that compounds 6, 7, 11 had high scoring values (> 40) for docking with PBP2a. **Conclusion** Compounds 4, 5, 8, and 13 — 15 have been isolated from genus *Usnea* for the first time. Compounds 5, 8, and 9 have inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*. Compounds 6, 7, and 11 might have anti-MRSA activity.

Key words: *Usnea diffracta*; chemical constituent; separation and identification; antibacterial activity

基金项目: 国家重点研发计划资助 (No. 2019YFC1711000); 天津市应用基础及前沿技术研究计划面上基金项目 (No. 18JCYBJC28900)。

作者简介: 郝昱, 男, 硕士研究生, 主要从事天然药物及中药药效物质基础研究, email: haoyu19970421@163.com *通信作者: 王莉宁, 男, 博士, 副教授, 主要从事天然药物及中药药效物质基础研究, email: lining.wang@tjucm.edu.cn

环裂松萝 *Usnea diffracta* 是一种具有较高药用价值的地衣类中药^[1], 隶属于地衣门松萝科松萝属, 主要分布在中国内蒙古、吉林、四川等地^[2]。《全国中草药汇编》记载其性平, 味甘, 归心、肾、肺经, 具有清热解毒、清肝明目、止咳化痰、舒筋活血等功效^[3-4]。其主要化学成分包括缩酚酸类、多取代单苯环类、二苯并呋喃类、脂

肪酸类以及其他类^[5], 具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒和抗炎等药理活性^[6-7]。环裂松萝具有广谱抗菌活性^[7], 且不易导致耐药^[8]。本文对环裂松萝的化学成分进行分离(见图 1), 通过体外实验初步筛选抗金黄色葡萄球菌的活性成分, 并通过分子对接 CDocker 虚拟筛选抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的活性成分。

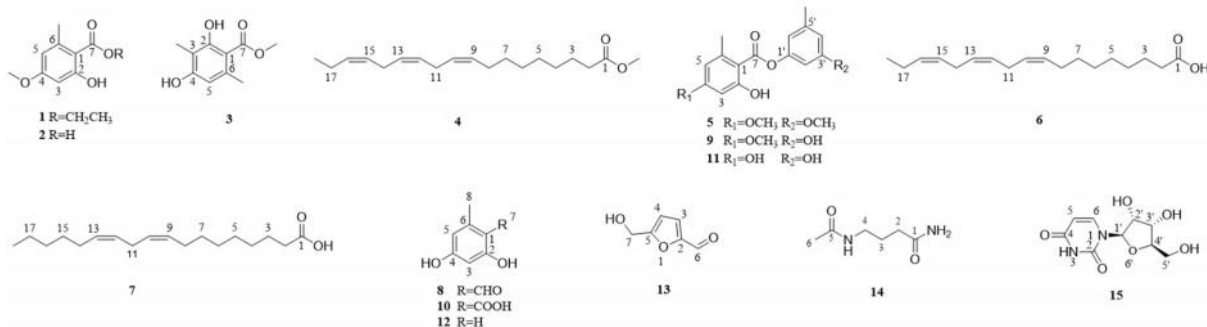


图 1 化合物 1 ~ 15 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of compounds 1 - 15

1 仪器与试剂

Bruker AVANCE III600 MHz/500 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); Waters Xevo G2-SUPPLC-Q/TOF-MS(美国 Waters); 岛津 LC-20AP 制备型高效液相色谱仪(日本岛津); ZHJH-C1112B 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司); HNYC-2102C 恒温培养振荡器(天津欧诺仪器仪表有限公司); YXQ-LS-75S11 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司); GENESYS 10S 紫外-可见分光光度计(美国 ThermoFisher Scientific 公司); BHI 脑心浸液肉汤、BHI 脑心浸液琼脂(青岛海博生物科技有限公司); 硫酸庆大霉素(上海晶纯生化科技股份有限公司); 200 ~ 300 目柱层析硅胶及薄层硅胶板 GF-254(青岛海洋化工有限公司); Sephadex-LH-20(Pharmacia 生物技术有限公司); AB-8 大孔吸附树脂(天津赛智维科技有限公司); 柱层析 ODS、YMC-pack-A(5 μm, 10 mm×250 mm)半制备型色谱柱(日本 YMC 公司); 色谱级甲醇、乙腈, 分析级石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、甲酸(天津市康科德科技有限公司); 水(杭州娃哈哈公司)。

药材于 2018 年在保定安国中药材市场购买, 经天津中医药大学张丽娟教授鉴定其为松萝科松萝属植物环裂松萝 *Usnea diffracta* 的干燥地衣体。药材标本(编号: UD-2018-C412-1)存放于天津中医药大学中药学院中药化学科研实验室。

2 方法

2.1 提取与分离

取粉碎后的干燥环裂松萝地衣体(4.0 kg), 用

95% 乙醇加热回流提取 3 次, 合并浓缩得 1.7 kg 浸膏。将浸膏制成水混悬液后分别用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取。水层经大孔树脂(乙醇-水分别为 30:70, 60:40, 100:0)依次洗脱, 得到相应部位浸膏。取石油醚部位浸膏 2.0 g 经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯分别为 100:1, 14:1, 7:1, 3:1)依次洗脱得 12 个流分(Fr1 ~ Fr12)。Fr2 中结晶经石油醚除杂后得化合物 1(100.0 mg)。Fr3 中结晶经二氯甲烷除杂后得化合物 2(40.0 mg)。Fr7 经 Sephadex-LH-20 柱色谱(二氯甲烷-甲醇=1:1)洗脱得到 8 个流分(Fr7.1 ~ Fr7.8)。Fr7.7 经石油醚重结晶后得化合物 3(4.7 mg)。取乙酸乙酯部位浸膏 100.0 g 经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯分别为 150:1, 100:1, 50:1, 10:1, 1:1)梯度洗脱得到 10 个流分(Fr1 ~ Fr10)。Fr2 经硅胶柱(石油醚)等度洗脱得到 4 个流分(Fr2.1 ~ Fr2.4)。Fr2.3 经制备液相(甲醇-水为 70:30 ~ 100:0, 50 min)梯度洗脱得 7 个流分(Fr2.3.1 ~ Fr2.3.7)。取 Fr2.3.7 经硅胶制备薄层(石油醚-乙酸乙酯=25:1)得化合物 4(2.2 mg)。Fr3 经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯=120:1)等度洗脱得到 4 个流分(Fr3.1 ~ Fr3.4)。Fr3.3 经制备液相(甲醇-水为 70:30 ~ 100:0, 50 min)得化合物 5(3.1 mg, $t_R = 35$ min)。Fr4 经硅胶柱(石油醚-乙酸乙酯分别为 120:1, 60:1, 30:1)梯度洗脱得到 6 个流分(Fr4.1 ~ Fr4.6)。Fr4.4 经制备液相(甲醇-水为 70:30 ~ 100:0, 50 min)后经硅胶制备薄层[石油醚-乙酸乙酯=8:1(含 0.01% 甲酸)]得化合物 6(3.5 mg)和化合物 7(4.8 mg)。

Fr6 经硅胶柱 (石油醚 - 乙酸乙酯 30 : 1 + 0.01% 甲酸) 梯度洗脱得到 6 个流分 (Fr6.1 ~ Fr6.6)。Fr6.3 经制备液相 (甲醇 - 水为 70 : 30 ~ 100 : 0, 50 min) 得化合物 **8** (2.8 mg, $t_R = 13.5$ min) 和化合物 **9** (70.1 mg, $t_R = 25.5$ min)。Fr8 经制备液相 (甲醇 - 水为 30 : 70 ~ 70 : 30 洗脱 30 min 后又经甲醇 - 水为 70 : 30 ~ 100 : 0 洗脱 30 min) 得到 8 个流分 (Fr8.1 ~ Fr8.8)。Fr8.3 重结晶后经制备液相 (甲醇 - 水 = 40 : 60) 纯化得化合物 **10** (12.8 mg, $t_R = 18$ min)。Fr8.6 经制备液相 (乙腈 - 水 = 60 : 40) 得化合物 **11** (16.8 mg, $t_R = 20$ min)。取 30% 乙醇部位浸膏 75.5 g 经硅胶柱 (二氯甲烷 - 甲醇分别为 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1) 依次洗脱得到 6 个流分 (Fr1 ~ Fr6)。Fr1 经硅胶柱 (二氯甲烷 - 甲醇分别为 80 : 1, 20 : 1, 8 : 1) 依次洗脱得到 5 个流分 (Fr1.1 ~ Fr1.5)。Fr1.2 经制备液相 (甲醇 - 水 = 40 : 60) 洗脱得化合物 **12** (6.7 mg, $t_R = 21$ min)。Fr1.3 经 ODS 柱 (甲醇 - 水分别为 10 : 90, 40 : 70, 100 : 0) 依次洗脱得到 10 个流分 (Fr1.3.1 ~ Fr1.3.10)。Fr1.3.1 经制备液相 (甲醇 - 水 = 55 : 45) 洗脱得化合物 **13** (5.8 mg, $t_R = 10$ min)。Fr1.3.3 经制备液相 (甲醇 - 水 = 5 : 95) 洗脱得化合物 **14** (3.0 mg, $t_R = 20$ min) 和化合物 **15** (2.0 mg, $t_R = 26$ min)。

2.2 分子对接

在 chemdraw 中画出所有化合物的结构, 在 PubChem 中下载苯唑西林 (青霉素类抗菌药物) 的结构, 将每个结构保存为 SDF 格式文件, 建立小分子配体数据库。将小分子配体数据库导入 Discovery Studio (DS) v 17.2.0 软件, 使用 Prepare Ligands 功能优化小分子构象。从蛋白结构数据库 PDB 中下载 PBP2a (编号: 3ZFZ) 的晶体结构^[9] (青霉素结合蛋白 PBP2a 与抗菌药物的低亲和力是其产生广泛临床耐药性的关键因素^[10])。将蛋白结构导入到 DS 进行去水、加氢、加电荷等优化后, 提取原配体 (头孢洛林酯) 作为对接的活性位点。将小分子配体数据库与 PBP2a 在 DS 中使用 CDocker 模块进行半柔性对接, 以结合能作为打分函数评判配体与蛋白的结合能力, 以苯唑西林和头孢洛林酯为阳性对照。打分值越高的配体代表其与 PBP2a 的结合能力越强, 化合物则可能具有抗 MRSA 的活性, 有一定的开发潜力。

2.3 体外抗菌活性的测定

2.3.1 菌悬液的制备 取适量金黄色葡萄球菌 (bio-00018) 接种于 BHI 液体培养基, 恒温 37 °C 摇床培养 24 h。以每 0.1 OD_{600} 相当于 1×10^8 CFU \cdot mL⁻¹ 为标准^[11], 用新鲜灭菌的 BHI 液体

培养基将菌液稀释至吸光度值为 0.5, 现配现用。

2.3.2 抑菌圈的测定 参照文献的方法^[12-13], 采用纸片扩散法来测定化合物的抑菌圈直径。在无菌超净工作台中, 两次取 500 μ L 配好的菌悬液均匀涂抹在灭菌固体培养基中制成含菌平皿。用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解化合物配成质量浓度为 128.0 μ g \cdot mL⁻¹ 的样品。取 25 μ L 样品置于直径 6 mm 的滤纸片上后等距贴于含菌平皿上。硫酸庆大霉素和 DMSO 滤纸片分别作为阳性对照和阴性对照。将平皿于 37 °C 恒温培养 18 h, 每份样品平行操作 3 次, 测量抑菌圈直径后结果取平均值。

3 结果

3.1 化合物结构鉴定

化合物 1: 无色结晶。HR-ESI-MS: m/z 211.0966 [M + H]⁺ (Calcd. 211.0970), 分子式为 C₁₁H₁₄O₄。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 11.86 (1H, s, 2-OH), 6.33 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-5), 6.28 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3), 4.39 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, H-8), 3.79 (3H, s, 4-OCH₃), 2.51 (3H, s, 6-CH₃), 1.41 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-9)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 171.7 (C-7), 165.6 (C-2), 163.8 (C-3), 143.1 (C-6), 111.1 (C-5), 105.4 (C-1), 98.7 (C-3), 61.2 (C-8), 55.3 (4-OCH₃), 24.4 (6-CH₃), 14.2 (C-9)。以上波谱数据与文献报道^[6]一致, 故鉴定化合物 **1** 为扁枝衣酸乙酯。

化合物 2: 无色结晶。HR-ESI-MS: m/z 183.0655 [M + H]⁺ (Calcd. 183.0657), 分子式为 C₉H₁₀O₄。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 11.54 (1H, s, 2-OH), 6.35 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.33 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 3.82 (3H, s, 4-OCH₃), 2.58 (3H, s, 6-CH₃)。¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 175.7 (C-7), 166.6 (C-4), 165.0 (C-2), 144.7 (C-6), 111.7 (C-5), 103.8 (C-1), 98.8 (C-3), 55.4 (4-OCH₃), 24.4 (6-CH₃)。以上波谱数据与文献报道^[14]一致, 故鉴定化合物 **2** 为扁枝衣酸。

化合物 3: 无色结晶。HR-ESI-MS: m/z 197.0805 [M + H]⁺ (Calcd. 197.0814), 分子式为 C₁₀H₁₂O₄。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 12.03 (1H, s, 2-OH), 6.21 (1H, s, H-5), 5.14 (1H, s, 4-OH), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃), 2.46 (3H, s, 6-CH₃), 2.10 (3H, s, 3-CH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 172.6 (C-7), 163.2 (C-4), 158.0 (C-2), 140.1 (C-6), 110.5 (C-5), 108.5 (C-3), 105.2 (C-1), 51.8 (7-OCH₃), 24.1 (6-CH₃), 7.7 (3-CH₃)。以上波谱数据与文献报道^[15]一致, 故鉴定化合物 **3** 为 atraric acid。

化合物 4: 无色油状。HR-ESI-MS: m/z

293.2475 [M + H]⁺ (Calcd. 293.2481), 分子式为 C₁₉H₃₂O₂。IR (KBr): ν_{\max} 2929, 2853, 1732, 1266, 729 cm⁻¹。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.32 ~ 5.40 (6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 3.66 (3H, s, 1-OCH₃), 2.81 (4H, t, $J = 5.6$ Hz, H-11, 14), 2.30 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 2.07 (4H, m, H-8, 17), 1.64 (2H, m, H-3), 1.29 ~ 1.37 (8H, m, H-4, 5, 6, 7), 0.98 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 174.3 (C-1), 132.0 (C-16), 130.3 (C-9), 128.3 (C-13), 128.3 (C-12), 127.7 (C-10), 127.1 (C-15), 51.5 (1-OCH₃), 34.1 (C-2), 29.7 (C-7), 29.6 (C-6), 29.2 (C-5), 29.1 (C-4), 27.2 (C-8), 25.6 (C-11), 25.2 (C-14), 25.0 (C-3), 20.6 (C-17), 14.3 (C-18)。以上数据与文献报道^[16]一致。根据红外光谱 (IR) 数据, ν_{\max} 2929, 2853 cm⁻¹ 为亚甲基 (C-H) 伸缩振动信号, 1732 cm⁻¹ 为羰基 (C=O) 伸缩振动信号, 1266 cm⁻¹ 为 C-O 伸缩振动信号, 729 cm⁻¹ 为顺式烯烃面外 C-H 弯曲振动信号 (顺式: 730 ~ 665 cm⁻¹; 反式: 980 ~ 960 cm⁻¹)。顺式脂肪酸室温下呈液态、油状, 而反式脂肪酸室温下呈固态^[17]。根据波谱数据以及理化性质, 鉴定化合物 4 为 α -亚麻酸甲酯。

化合物 5: 无色油状。HR-ESI-MS: m/z 303.1223 [M + H]⁺ (Calcd. 303.1232), 分子式为 C₁₇H₁₈O₅。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.71 (1H, s, H-4'), 6.63 (1H, s, H-6'), 6.61 (1H, s, H-2'), 6.42 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 6.39 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 3.84 (3H, s, 4-OCH₃), 3.80 (3H, s, 3'-OCH₃), 2.62 (3H, s, 6-CH₃), 2.36 (3H, s, 5'-CH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ : 171.3 (C-7), 166.4 (C-2), 165.9 (C-4), 162.0 (C-3'), 152.3 (C-1'), 144.3 (C-6), 141.7 (C-5'), 115.7 (C-6'), 113.6 (C-4'), 112.0 (C-5), 106.7 (C-1), 106.0 (C-2'), 99.9 (C-3), 55.9 (4-OCH₃), 55.9 (3'-OCH₃), 24.3 (6-CH₃), 21.5 (5'-CH₃)。氢谱数据与文献报道^[18]一致, 结合 HSQC 和 HMBC 谱经 SciFinder 数据库检索确定化合物 5 为 2'-O-methyleveranol。

化合物 6: 无色油状。HR-ESI-MS: m/z 279.2321 [M + H]⁺ (Calcd. 279.2324), 分子式为 C₁₈H₃₀O₂。IR (KBr): ν_{\max} 2925, 2854, 1712, 1260, 722 cm⁻¹。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.32 ~ 5.40 (6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 2.81 (4H, t, $J = 5.6$ Hz, H-11, 14), 2.35 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 2.09 (2H, m, H-8),

2.05 (2H, m, H-17), 1.64 (2H, m, H-3), 1.29 ~ 1.37 (8H, m, H-4, 5, 6, 7), 0.98 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 178.8 (C-1), 132.0 (C-16), 130.2 (C-9), 128.3 (C-12), 128.2 (C-13), 127.7 (C-15), 127.1 (C-10), 33.8 (C-2), 29.6 (C-7), 29.1 (C-5), 29.1 (C-6), 29.0 (C-4), 27.2 (C-8), 25.6 (C-11), 25.5 (C-14), 24.7 (C-3), 20.6 (C-17), 14.3 (C-18)。以上数据与文献报道^[19]一致。根据红外光谱 (IR) 数据, ν_{\max} 2925, 2854 cm⁻¹ 为亚甲基 (C-H) 伸缩振动信号, 1712 cm⁻¹ 为羰基 (C=O) 伸缩振动信号, 1260 cm⁻¹ 为 C-O 伸缩振动信号, 722 cm⁻¹ 为顺式烯烃面外 C-H 弯曲振动信号。根据波谱数据以及理化性质, 鉴定化合物 6 为 α -亚麻酸。

化合物 7: 无色油状。HR-ESI-MS: m/z 281.2487 [M + H]⁺ (Calcd. 281.2481), 分子式为 C₁₈H₃₂O₂。IR (KBr): ν_{\max} 2930, 2855, 1710, 1220, 725 cm⁻¹。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.32 ~ 5.38 (4H, m, H-9, 10, 12, 13), 2.77 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-11), 2.35 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2), 2.05 (2H, m, H-14), 2.04 (2H, m, H-8), 1.62 (2H, m, H-3), 1.28 ~ 1.37 (14H, m, H-4, 5, 6, 7, 15, 16, 17), 0.89 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H-18)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 179.3 (C-1), 130.2 (C-13), 130.0 (C-9), 128.1 (C-10), 127.9 (C-12), 33.9 (C-2), 31.5 (C-16), 29.6 (C-7), 29.4 (C-15), 29.2 (C-6), 29.1 (C-5), 29.0 (C-4), 27.2 (C-14), 27.2 (C-8), 25.6 (C-11), 24.7 (C-3), 22.6 (C-17), 14.1 (C-18)。以上数据与文献报道^[20]一致。根据红外光谱 (IR) 数据, ν_{\max} 2930, 2855 cm⁻¹ 为亚甲基 (C-H) 伸缩振动信号, 1710 cm⁻¹ 为羰基 (C=O) 伸缩振动信号, 1220 cm⁻¹ 为 C-O 伸缩振动信号, 725 cm⁻¹ 为顺式烯烃面外 C-H 弯曲振动信号。根据波谱数据以及理化性质, 鉴定化合物 7 为亚油酸。

化合物 8: 白色粉末。HR-ESI-MS: m/z 153.0433 [M + H]⁺ (Calcd. 153.0552), 分子式为 C₈H₈O₃。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 10.07 (1H, s, H-7), 6.22 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-5), 6.11 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3), 2.51 (3H, s, 6-CH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ : 194.3 (C-7), 167.5 (C-4), 167.2 (C-2), 146.3 (C-6), 114.1 (C-1), 111.8 (C-5), 101.5 (C-3), 18.3 (6-CH₃)。以上波谱数据与文献报道^[21]一致, 故鉴定化合物 8 为苔色醛。

化合物 9: 无色结晶。HR-ESI-MS: m/z

289.1070 $[M + H]^+$ (Calcd. 289.1076), 分子式为 $C_{16}H_{16}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 11.48 (1H, s, 2-OH), 6.59 (1H, s, H-6'), 6.58 (1H, s, H-4'), 6.50 (1H, s, H-2'), 6.38 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3), 6.36 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-5), 3.83 (3H, s, 4-OCH₃), 2.63 (3H, s, 6-CH₃), 2.33 (3H, s, 5'-CH₃)。 ^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.4 (C-7), 166.3 (C-2), 164.6 (C-4), 156.3 (C-3'), 150.6 (C-1'), 143.5 (C-6), 141.0 (C-5'), 114.8 (C-6'), 114.2 (C-4'), 111.8 (C-5), 106.5 (C-1), 104.5 (C-2'), 98.9 (C-3), 55.4 (4-OCH₃), 24.6 (6-CH₃), 21.4 (5'-CH₃)。以上波谱数据与文献报道^[6]一致, 故鉴定化合物 **9** 为 3-羟基-5-甲基苯基-2-羟基-4-甲氧基-6-甲基苯甲酸酯。

化合物 **10**: 无色结晶。HR-ESI-MS: m/z 169.0495 $[M + H]^+$ (Calcd. 169.0501), 分子式为 $C_8H_8O_4$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.19 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.14 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 2.48 (3H, s, 6-CH₃)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 175.1 (C-7), 167.0 (C-4), 163.7 (C-2), 145.3 (C-6), 112.3 (C-5), 105.4 (C-1), 101.6 (C-3), 24.3 (6-CH₃)。以上波谱数据与文献报道^[22]一致, 故鉴定化合物 **10** 为苔色酸。

化合物 **11**: 无色结晶。HR-ESI-MS: m/z 275.0906 $[M + H]^+$ (Calcd. 275.0910), 分子式为 $C_{15}H_{14}O_5$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.55 (1H, s, H-6'), 6.49 (1H, s, H-4'), 6.43 (1H, s, H-2'), 6.28 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 6.21 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 2.56 (3H, s, 6-CH₃), 2.29 (3H, s, 5'-CH₃)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 174.3 (C-7), 166.6 (C-4), 164.4 (C-2), 159.4 (C-3'), 152.2 (C-1'), 144.7 (C-6), 141.8 (C-5'), 114.8 (C-6'), 114.5 (C-4'), 112.8 (C-5), 107.3 (C-2'), 105.4 (C-1), 101.8 (C-3), 24.3 (6-CH₃), 21.4 (5'-CH₃)。以上波谱数据与文献报道^[23]一致, 故鉴定化合物 **11** 为瘤网地衣素。

化合物 **12**: 白色粉末。HR-ESI-MS: m/z 125.0595 $[M + H]^+$ (Calcd. 125.0603), 分子式为 $C_7H_8O_2$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.12 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-4), 6.12 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.07 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, H-2), 2.17 (3H, s, 5-CH₃)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 157.8 (C-1, 3), 139.7 (C-5), 107.1 (C-4, 6), 99.2 (C-2), 20.1 (5-CH₃)。以上波谱数据与文献报道^[24]一致, 故鉴定化合物 **12** 为苔黑酚。

化合物 **13**: 黄色油状。HR-ESI-MS: m/z

127.0388 $[M + H]^+$ (Calcd. 127.0395), 分子式为 $C_6H_6O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 9.53 (1H, s, H-6), δ : 7.38 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3), 6.58 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-4), 4.61 (2H, s, H-7)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 179.4 (C-6), 163.2 (C-2), 153.9 (C-5), 124.8 (C-3), 110.9 (C-4), 57.5 (C-7)。以上波谱数据与文献报道^[25]一致, 故鉴定化合物 **13** 为 5-羟甲基糠醛。

化合物 **14**: 无色油状。HR-ESI-MS: m/z 167.0787 $[M + Na]^+$ (Calcd. 167.0796), 分子式为 $C_6H_{12}N_2O_2$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 3.12 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-4), 2.15 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 1.86 (3H, s, H-6), 1.71 (2H, m, H-3)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 178.4 (C-1), 173.4 (C-5), 39.9 (C-4), 33.7 (C-2), 26.6 (C-4), 22.5 (C-6)。以上波谱数据与文献报道^[26]一致, 故鉴定化合物 **14** 为 4-(乙酰氨基)丁酰胺。

化合物 **15**: 无色油状。HR-ESI-MS: m/z 245.0759 $[M + H]^+$ (Calcd. 245.0774), 分子式为 $C_9H_{12}N_2O_6$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.03 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 5.90 (1H, d, $J = 4.6$ Hz, H-1'), 5.70 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 4.17 (1H, m, H-2'), 4.14 (1H, m, H-3'), 4.00 (1H, m, H-4'), 3.84 (1H, dd, $J = 12.2, 2.0$ Hz, H-5'a), 3.73 (1H, dd, $J = 12.2, 2.6$ Hz, H-5'b)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 164.8 (C-4), 151.1 (C-2), 141.3 (C-6), 101.2 (C-5), 89.2 (C-1'), 84.9 (C-4'), 74.3 (C-3'), 69.9 (C-2'), 60.8 (C-5')。以上波谱数据与文献报道^[27]一致, 故鉴定化合物 **15** 为尿嘧啶核苷。

3.2 分子对接结果

基于分子对接虚拟筛选环裂松萝中与 PBP2a 结合能力较强的化学成分, 对接结果如表 1。打分值高于苯唑西林的有候选化合物 **6**、**7**、**11**, 其中化合物 **11** 的打分值最高。化合物 **11** 与 PBP2a 对接的相互作用力分析如图 2。

PBP2a 与头孢洛林酯(原配体)结合的关键氨基酸残基 LYS273、ASN146、TYR105 形成常规氢键。由图 2 可知, 在配体与蛋白的相互作用中, 化合物 **11** 可与 PBP2a 的氨基酸残基 ARG298 形成盐桥, 与 TYR105、SER306、ASN307 之间形成常规氢键、与 ASN146 之间形成 π -供体氢键、与 ILE309 之间形成 π -烷基作用。

3.3 抗菌活性测定结果

采用纸片扩散法对化合物 **1** ~ **15** 进行活性测试。结果表明化合物 **5**、**8**、**9** 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 6.4、6.6、6.6 mm, 小于阳

表 1 配体与 PBP2a 的对接结果

Tab 1 Docking results of the ligands with PBP2a		
配体	化合物名称	打分值
1	扁枝衣酸乙酯	23.4733
2	扁枝衣酸	23.8979
3	Atracic acid	32.4074
4	α -亚麻酸甲酯	37.2521
5	2'-O-methylevermol	29.1176
6	α -亚麻酸	42.9878
7	亚油酸	47.3481
8	苔色醛	37.7835
9	3-羟基-5-甲基苯基-2-羟基-4-甲氧基-6-甲基苯甲酸酯	32.1030
10	苔色酸	24.6105
11	瘤网地衣素	49.4877
12	苔黑酚	25.4853
13	5-羟甲基糠醛	17.5403
14	4-(乙酰氨基)丁酰胺	23.5375
15	尿嘧啶核苷	26.7108
阳性药	头孢洛林酯	50.6928
阳性药	苯唑西林	41.0939

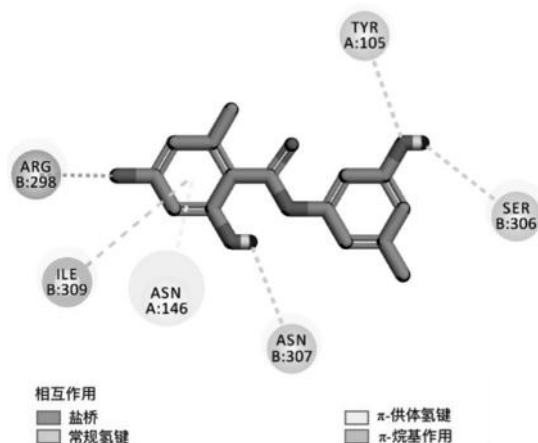


图 2 化合物 11 与 PBP2a 的相互作用分析图

Fig 2 Analysis plot of the interaction between compound 11 and PBP2a

性对照药(硫酸庆大霉素)的 12.3 mm。其余化合物未表现出明显的抑菌圈。

4 讨论

环裂松萝作为传统地衣类中药,具有广谱抗菌活性,但其药效物质基础仍然需要进一步明确。本研究从环裂松萝的乙醇提取物中分离得到 15 个化合物,包括多取代单苯环类 1~3、8、10、12,缩酚酸类 5、9、11,脂肪酸类 4、6、7,糠醛类 13,氨基酸类 14,核苷类 15。化合物 4、5、8、13~15 为首次从松萝属中发现。

采用分子对接虚拟筛选与 PBP2a 亲和力较高的配体。化合物 6、7 和 11 与 PBP2a 的结合能力强于阳性药苯唑西林,证明其可能具有抗 MRSA 的活性,有一定的开发潜力。化合物 6、7 广泛存在于自然界,可与 PBP2a 特异性结合以及与 MRSA 体内的烯酰-ACP 还原酶(FabI)、FabI-NADPH 复合物结合

以改变细菌细胞膜结构从而发挥抗菌作用,其顺式构型以及长链结构能增加抗 MRSA 的活性^[28-32]。化合物 11 与 PBP2a 的结合能力最强,而相关的抑制 MRSA 活性研究尚未报道,本课题组正在对其进行研究。化合物 5、8、9 对金黄色葡萄球菌有一定的抑制作用。3 个缩酚酸类化合物,2 个脂肪酸类化合物,1 个单苯环类化合物可能对金黄色葡萄球菌或变异后的耐药菌有抑制活性。根据分子对接结果,预测羟基是其发挥抗菌作用的关键活性基团。上述化合物结构中不含内酰胺基团,单独或与抗菌药物协同使用以及探索构效关系可作为进一步研究方向。

参考文献

- 林源. 松萝的研究现状 [J]. 中国药业, 2011, 20 (19): 84-86.
- 彭锋, 边静, 彭湃, 等. 松萝属地衣植物的研究进展 [J]. 林产化学与工业, 2012, 32 (1): 111-118.
- Singh S, Khatoun S, Joshi Y, et al. A validated HPTLC densitometric method for simultaneous determination of evernic and usnic acids in four *Usnea* species and comparison of their antioxidant potential [J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54 (9): 1670-1677.
- 李荣钦, 苏印泉, 玉泉幸一郎, 等. 松萝研究利用现状及前景 [J]. 西藏科技, 2007, 173 (8): 21-24.
- Qi HY, Jin YP, Shi YP. A new depsidone from *Usnea diffracta* [J]. Chin Chem Lett, 2009, 20 (2): 187-189.
- 于学龙, 杨鑫瑶, 高小力, 等. 长松萝中酚类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (10): 1864-1869.
- 刘冰倩, 王晶晶, 贾妍, 等. 松萝属地衣化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51 (13): 3585-3595.
- 刘洋, 张立伟, 郝贺, 等. 中药逆转大肠杆菌耐药性研究进展 [J]. 今日畜牧兽医, 2019, 35 (9): 74-76.
- Goel M, Kalra R, Ponnann P, et al. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of oxacillin and a bioactive compound from *Ramalina roesleri* [J]. Microb Pathog, 2021, 150: 104676.
- Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Annu Rev Biochem, 2015, 84: 577-601.
- 姜力荣. 大蓟地上部分化学成分分离鉴定及其抗菌活性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- 周娟. 补骨脂乙素抗菌机制研究 [D]. 郑州: 河南大学, 2016.
- 康文艺, 刘瑜新, 宋艳丽, 等. 尼泊尔酸模 α -葡萄糖苷酶抑制活性及抗菌活性研究 [J]. 中成药, 2010, 32 (7): 1249-1251.
- Nishitoba Y, Nishimura I, Nishiyama T, et al. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima* [J]. Phytochemistry, 1987, 26 (12): 3181-3185.
- 冯洁, 杨秀伟, 苏思多, 等. 长松萝化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (6): 708-711.
- 邹娟, 毛效贤, 何康, 等. 全缘凤尾蕨化学成分的研究 [J]. 广西植物, 2021, 41 (7): 1046-1053.
- 孙艳艳. 反式脂肪酸对人体健康的影响 [J]. 食品安全导刊,

- 2016, 159 (36): 85.
- [18] Huneck S, Schmidt J, Tabacchi R. Thermal decomposition of lichen depsides [J]. *Z Naturforsch*, 1989, 44 (10): 1283-1289.
- [19] 曾金祥, 许兵兵, 毕莹, 等. 车前子化学成分研究 (II) [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (4): 81-84.
- [20] Zhao CN, Yao ZL, Yang D, et al. Chemical constituents from *Fraxinus hupehensis* and their antifungal and herbicidal activities [J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (1): 74-83.
- [21] 郑永标, 鲁春华, 许莉, 等. 猴头菌液体静置发酵液的化学成分与细胞毒活性 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24 (12): 1703-1706.
- [22] 王立东, 吴少华, 陈有为, 等. 一株印楝植物内生真菌 *Epicoccum* sp 次生代谢产物的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21 (6): 916-918.
- [23] Nahrstedt A, Economou D, Wray V. 2-Methylbutan-1-yl- β -D-glucoside, a hemiterpene glucoside from *Bystropogon plumosus* [J]. *J Nat Prod*, 1990, 53 (5): 1387-1389.
- [24] Eliwa E, Abdel-Razek A, Frese M, et al. New naturally occurring phenolic derivatives from marine *Nocardiopsis* sp. AS23C: structural elucidation and in silico computational studies [J]. *Vietnam J Chem*, 2019, 57 (2): 164-174.
- [25] 冯宝民, 刘菁琰, 王惠国, 等. 红麻化学成分分离与鉴定 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2011, 28 (5): 364-367.
- [26] Graham DW, Ashton WT, Barash L, et al. Inhibition of the mammalian β -lactamase renal dipeptidase (dehydropeptidase-I) by Z-2-(acylamino)-3-substituted-propenoic acids [J]. *J Med Chem*, 1987, 30 (6): 1074-1090.
- [27] 顾晓玲, 金阳, 张丽颖, 等. 白附子正丁醇部位化学成分研究 [J]. *现代中药研究与实践*, 2017, 31 (4): 30-32.
- [28] 李丰名, 陈嘉颖, 吕镇城, 等. 酸模内生镰刀菌 HU0298 抗 MRSA 活性代谢成分 [J]. *菌物学报*, 2021, 40 (5): 1140-1147.
- [29] Ohta S, Chang T, Kawashima A, et al. Anti methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity by linolenic acid isolated from the marine microalga *Chlorococcum* HS-101 [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1994, 52 (5): 673-680.
- [30] Raychowdhury MK, Goswami R, Chakrabarti P. Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria [J]. *J Appl Bacteriol*, 1985, 59 (2): 183-188.
- [31] McDonald MI, Graham I, Harvey KJ, et al. Antibacterial activity of hydrolysed linseed oil and linolenic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Lancet*, 1981, 2 (8254): 1056.
- [32] Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG, et al. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579 (23): 5157-5162.
- (收稿日期: 2022-03-07; 修回日期: 2022-03-31)

瑞格列奈在人肝微粒体中的酶促反应动力学 及葛根素对其代谢的影响

何文娟, 刘秀菊, 孙倩, 李丹, 王淑梅* (河北医科大学第二医院药学部, 石家庄 050000)

摘要: 目的 通过体外人肝微粒体孵育实验考察瑞格列奈的酶促反应动力学, 并研究葛根素对瑞格列奈代谢的影响。方法 以阿托伐他汀为内标, 建立 UPLC 法测定人肝微粒体中瑞格列奈的浓度。建立人肝微粒体体外孵育体系, 确定最佳蛋白浓度和孵育时间; 采用原形药物减少法, 通过 GraphPad Prism 5.0 软件计算酶促反应动力学参数 (V_{\max} 和 K_m); 系列浓度葛根素 ($0 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与瑞格列奈 ($5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在肝微粒体孵育体系中于 37°C 水浴共同孵育, 测定肝微粒体中瑞格列奈的浓度, 并计算减少量, 从而考察葛根素对瑞格列奈代谢的影响。结果 瑞格列奈在人肝微粒体的最佳蛋白质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最佳孵育时间为 40 min; 酶促反应动力学参数 $V_{\max} = 1.71 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg} \cdot \text{protein})^{-1}$, $K_m = 5.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 UPLC 法测定人肝微粒体中瑞格列奈的浓度, 灵敏度高、操作简便。通过人混合肝微粒体孵育实验得到瑞格列奈的酶促反应动力学参数, 且进一步研究显示葛根素对瑞格列奈在人肝微粒体未产生显著的抑制作用, 可为两药的联合应用提供参考。

关键词: 瑞格列奈; 葛根素; 人肝微粒体; UPLC; 酶促反应动力学

中图分类号: R96, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2242-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.006

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划课题 (No.2021132)。

作者简介: 何文娟, 女, 主管药师, 主要从事药物相互作用与药物评价, email: hebhewj@126.com *通信作者: 王淑梅, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事药物相互作用与体内药物分析, email: aaaa2089@126.com

Effect of puerarin on the metabolism of repaglinide in human liver microsomes by CYP 450

HE Wen-juan, LIU Xiu-ju, SUN Qian, LI Dan, WANG Shu-mei* (Department of Pharmacy, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Abstract: Objective To obtain the enzymatic kinetic parameters of repaglinide by human liver microsome incubation experiment, and determine the effect of puerarin on the metabolism of repaglinide. **Methods** The UPLC method was established to determine the concentration of repaglinide in human liver microsomes with atorvastatin as the internal standard. The human liver microsomes incubation system was established and the optimal protein concentration and incubation time were determined. The enzymatic kinetic parameters of V_{\max} and K_m were calculated by GraphPad Prism 5.0 software based on the reduction of repaglinide. Repaglinide ($5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was co-incubated with puerarin ($0 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) at 37°C water bath. The concentrations of repaglinide were detected. The effect of puerarin on the metabolism of repaglinide was measured by calculating the reduction of repaglinide. **Results** The optimal incubation time and protein concentration in human liver microsomes were 40 min and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The enzyme kinetics of repaglinide were $V_{\max} = 1.71 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg} \cdot \text{protein})^{-1}$, and $K_m = 5.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** The UPLC method can determine the concentration of repaglinide in human liver microsomes, which is simple and sensitive, and the enzyme kinetic parameters of repaglinide are obtained. Puerarin dose not obviously inhibit repaglinide in human liver microsomes, which may provide support for the combination of the two drugs.

Key words: repaglinide; puerarin; human liver microsome; UPLC; enzyme kinetics

随着人们生活水平的提高, 糖尿病发病率不断攀升, 成为继心血管疾病和癌症之后, 威胁人类生命健康的第三大杀手^[1]。葛根味甘、辛, 性凉, 具有解肌退热、生津止渴、升阳止泻的功效^[2-3]。已有研究显示, 葛根主要通过减轻 β 细胞氧化应激损伤, 保护胰岛 β 细胞功能, 改善胰岛素抵抗, 促进糖代谢等多种途径发挥降糖作用^[4]。目前, 葛根已成为多种治疗糖尿病中成药的主要成分, 如玉泉丸、芪药消渴胶囊、复方葛根胶囊等, 并在糖尿病心脑血管并发症的治疗上取得了一定疗效。因此, 研究葛根活性成分与降糖药合用的相互作用对糖尿病患者的用药安全具有重大意义。

瑞格列奈为临床常用的降糖药, 是一种胰岛素促分泌剂, 其主要通过 CYP2C8 和 CYP3A4 进行代谢^[5]。葛根素 (puerarin) 是葛根的主要活性成分, 具有降血糖和改善患者糖尿病并发症等作用^[6]。临床治疗过程中, 葛根素和瑞格列奈会经常出现合用的情况。且已有研究表明, 葛根素对 CYP2B6、CYP2C9 及 CYP3A4 均有一定的抑制作用, 葛根素对肝组织 CYP3A4 蛋白的表达具有明显的抑制作用^[7-8]。因此, 本实验将基于人肝微

粒体孵育实验研究葛根素对瑞格列奈酶促反应动力学的影响, 进而考察葛根素对瑞格列奈代谢的影响, 为两药合用的安全性提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 冷冻离心机 (GL-20G-II, 上海安亭科学仪器厂); 超低温冰箱 (MDF-U 3386S, Panasonic); 恒温混匀仪 (MTH-100, 杭州米欧仪器有限公司); 涡旋混合器 (XW-80A, 上海医科大学仪器厂); 电子分析天平 (CPA225D, 德国 Sartorius); 恒温氮吹仪 (KL512J, 北京康林科技有限公司); 超声波清洗器 (KQ-300B, 昆山市超声仪器有限公司); 台式酸度计 (哈纳 PH213)。

1.2 试剂

瑞格列奈 (批号: 100753-201303, 纯度: 99.8%)、葛根素 (批号: 110752-201816, 纯度: 95.4%)、阿托伐他汀 (批号: 100590-201804, 纯度: 95.0%)(中国食品药品检定研究院)。混合 SD 人肝微粒体原液 ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), NADPH 发生系统 [NRS (A) M10001.2018001, 武汉普莱

特生物医药有限公司)。乙酸乙酯(天津市永大化学试剂有限公司,批号:20161203);乙酸铵(Aladdin,批号:I1903034);高纯氮气(石家庄京联实用气体有限公司,批号:20211110),乙腈(HPLC级)、甲酸(色谱纯)(Fisher Chemical),水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 瑞格列奈对照品溶液 称取瑞格列奈对照品适量,乙腈溶解,定容,制成浓度为 $1.1 \times 10^4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,依次精密量取储备液适量,用乙腈稀释成 8800.00、6600.00、4400.00、2200.00、1100.00、550.00、27.50、13.75 和 $6.87 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

2.1.2 葛根素对照品溶液 称取葛根素对照品适量,乙腈溶解,定容,制成浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,依次精密量取储备液适量,用乙腈稀释成 50、25、10、5、 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

2.1.3 阿托伐他汀(内标)对照品溶液 称取阿托伐他汀对照品适量,乙腈溶解,定容,稀释成浓度为 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

2.1.4 空白温孵液 取肝微粒体,经高温灭活后,采用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH 7.4)稀释成蛋白质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的空白温孵液。

2.2 人肝微粒体温孵实验

2.2.1 温孵条件 K_2HPO_4 缓冲液(pH 7.4) 176 μL , NADPH 发生系统 12 μL (A 液 10 μL , B 液

2 μL), 人肝微粒体 10 μL , 底物瑞格列奈 ($5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL 。以上试剂均置于 37°C 水中,预热 5 min 后混合,得到肝微粒体孵育体系,终体积为 200 μL 。该体系于 37°C , 恒温震荡 ($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 一定时间后,取出并立即放至 -40°C 冰箱,冷冻 10 min 终止反应,每个样品平行处理 3 次。为排除肝微粒体内基质及 NADPH 发生系统成分的干扰,配置灭活肝微粒体 + NADPH 发生系统 + 等量溶剂作为空白温孵样品。

2.2.2 样品处理 从冰箱中取上述处理后的温孵反应体系,迅速解冻,加入阿托伐他汀溶液 2 μL , 涡旋混匀,加入乙酸乙酯 1000 μL , 涡旋 5 min, 进行萃取, $10800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 900 μL , 于 40°C 水浴下氮气吹干,用乙腈 50 μL 复溶,再次涡旋振荡、离心,取上清液进样分析。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters C_{18} 柱 ($2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, 1.7 μm), 流动相: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵 (pH 4.0) - 乙腈 (45:55), 流速: $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温: 30°C , 进样量: 2 μL , 检测波长: 245 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取肝微粒体温孵样品,按“2.2.2”项下方法处理后测定;用等量溶剂替代瑞格列奈溶液制备空白样品,按“2.2.2”项下方法处理后测定(不加内标);取等量的瑞格列奈对照品溶液和阿托伐他汀对照品溶液进样测定。结果表明,瑞格列奈和阿托伐他汀的保留时间分别为 6.25 min 和 2.34 min,与其他杂质峰分离良好,结果见图 1。

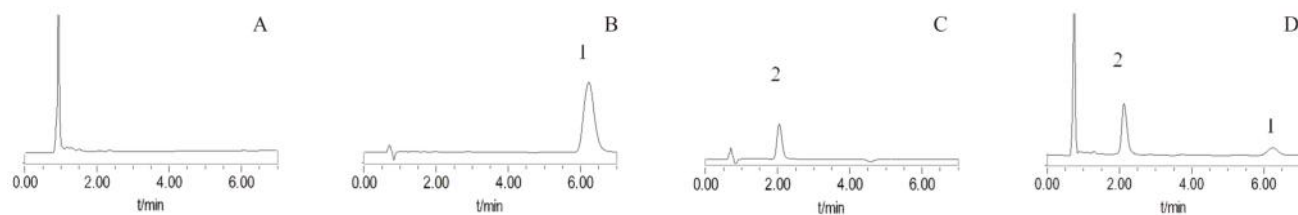


图 1 高效液相特征色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram

A. 空白溶液 (blank solution); B. 瑞格列奈对照品溶液 (repaglinide control solution); C. 阿托伐他汀对照品溶液 (atorvastatin control solution); D. 人肝微粒体孵育后样品溶液 (sample solution); 1. 瑞格列奈 (repaglinide); 2. 阿托伐他汀 (atorvastatin)

2.4.2 标准曲线的绘制 以灭活的肝微粒体制备空白温孵液,加入系列浓度的瑞格列奈对照品溶液,配制成终浓度分别为 0.6875、1.375、2.75、4.4、 $5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的模拟温孵样品,按照“2.2.2”项下方法处理后测定。瑞格列奈与阿托伐他汀峰面积比值为纵坐标,横坐标为瑞格列奈浓度,绘制标准曲线,计算回归方程。结果表明,瑞格列

奈在 $0.6875 \sim 5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好 ($Y = 0.2138X - 0.0135$, $R^2 = 0.9995$)。

2.4.3 精密度 制备温孵体系,其中瑞格列奈高、中、低浓度分别为 4.4、2.75、 $1.375 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每个浓度制备 6 份,按照“2.2.2”项下方法于同一日进行处理并测定,计算日内精密度;连续测定 5 d,计算日间精密度。结果见表 1。

2.4.4 回收试验 制备温孵体系，其中瑞格列奈高、中、低浓度分别为 4.4、2.75、1.375 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的温孵体系，每个浓度制备 6 份，按照“2.2.2”项下方法处理并测定；根据标准曲线计算得到的测得浓度与相应理论浓度的比值，计

算方法回收率；分别进样等量的瑞格列奈对照品溶液和内标对照品溶液，根据温孵体系中瑞格列奈或内标峰面积与等量瑞格列奈或内标对照品溶液峰面积的比值，计算提取回收率。结果见表 1。

表 1 精密度、准确度和提取回收率

Tab 1 Precision, accuracy and extraction recovery

药物	浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	精密度 RSD/%		准确度 /%		提取回收率 /%	
		日内	日间	平均值	RSD	平均值	RSD
瑞格列奈	4.40	4.7	4.3	107.7	4.7	76.3	6.3
	2.75	2.7	2.7	96.3	6.6	72.7	3.2
	1.375	1.4	1.4	99.4	9.9	69.2	4.7
阿托伐他汀	300	3.3	4.1	98.1	3.3	60.3	5.1

2.5 酶促反应动力学研究

2.5.1 温孵时间的影响 人肝微粒体孵育体系中，瑞格列奈的浓度为 5.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，人肝微粒体蛋白质量浓度为 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，37℃温孵，分别于 10、20、30、40、60 min 取样，处理后进样测定 ($n = 3$)。最终选择 40 min 为最佳反应孵育时间。结果见图 2。

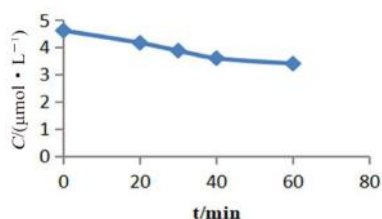


图 2 孵育时间对人肝微粒体中瑞格列奈浓度的影响
Fig 2 Effect of incubation time on the concentration of repaglinide in human liver microsomes

2.5.2 蛋白浓度的影响 人肝微粒体孵育体系中，肝微粒体蛋白质量浓度依次为 1.0、0.7、0.5、0.2、0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，瑞格列奈浓度为 5.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，温度 37℃孵育 40 min，孵育完成后，处理并进样测定 ($n = 3$)，计算瑞格列奈的减少量。瑞格列奈减少量在肝微粒体蛋白质量浓度为 0.1 ~ 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内增加，结果见图 3。

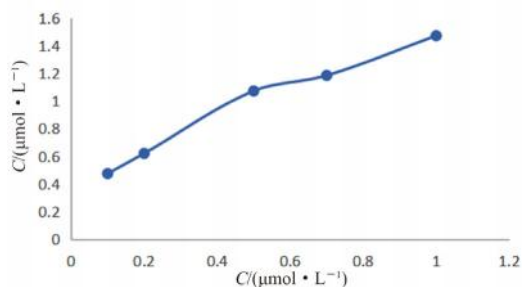


图 3 蛋白浓度对人肝微粒体中瑞格列奈浓度的影响
Fig 3 Effect of protein concentration on the concentration of repaglinide in human liver microsomes

2.5.3 酶促反应动力学参数的测定 孵育体系中瑞格列奈的初始浓度依次为 5.5、4.4、2.75、1.76、1.375、0.6875 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，人肝微粒体蛋白质量浓度均为 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，37℃孵育 40 min，按照“2.2.2”项下方法处理并测定。每个浓度处理 3 份样品，计算瑞格列奈平均剩余量。采用底物消除法，应用 GraphPad Prism 5.0 软件处理，计算最大反应速率 (V_{max}) 和米氏常数 (K_m)，结果 K_m 值为 5.66 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ， V_{max} 为 1.71 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg} \cdot \text{protein})^{-1}$ 。结果见图 4。

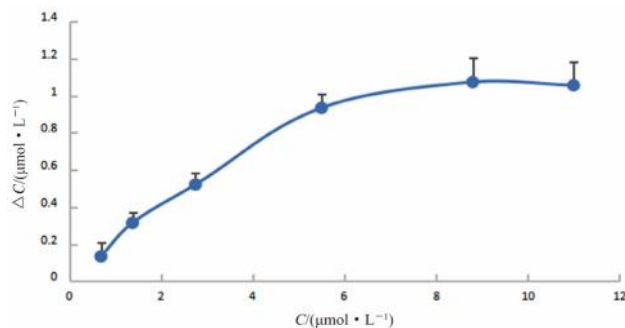


图 4 瑞格列奈在人肝微粒体中酶促反应动力学
Fig 4 Enzymatic kinetics of repaglinide in human liver microsomes

2.6 葛根素对瑞格列奈代谢的影响研究

肝微粒体孵育体系中，葛根素的浓度分别 50、25、10、5、2.5、0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，瑞格列奈的浓度为 5.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，蛋白质量浓度为 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，37℃孵育 40 min，处理后进样测定，计算瑞格列奈剩余量。结果葛根素对瑞格列奈的代谢未产生明显影响 (见图 5)。

3 讨论

目前，基于药物代谢酶的体外药物代谢方法得到广泛应用，如体外肝微粒体孵育、器官灌流、重组肝微粒体酶、细胞模型等。肝微粒体孵育法，不仅操作简便，实验周期短，且重现性好，故本

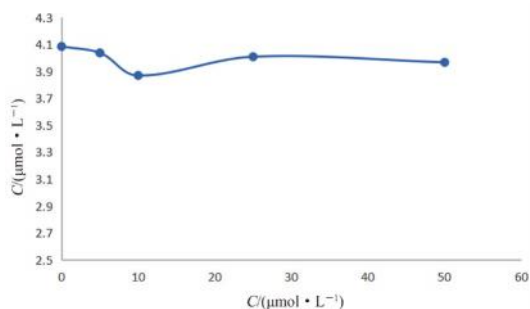


图5 葛根素对瑞格列奈在人肝微粒体中代谢的影响

Fig 5 Effect of puerarin on the metabolism of repaglinide in human liver microsomes

实验选择肝微粒体孵育法进行研究。

孵育时间 0 ~ 40 min, 瑞格列奈的减少量呈线性减少, 40 ~ 60 min 减少速率减慢。为了实现底物耗尽方法的最佳效用, 应使用低酶浓度和短孵育时间^[9]。因此, 本实验选择 40 min 为最佳孵育时间。对于微粒体孵育, 使用较低的酶浓度可以更好地预测体内值, 且根据所研究的化合物类别, 理想条件是酶质量浓度低于 0.5 mg · mL⁻¹^[9]。综合考虑酶蛋白质量浓度对反应速率的影响, 本实验选择 0.5 mg · mL⁻¹ 作为最佳反应蛋白浓度。

瑞格列奈可作为 CYP2C8 的探针底物, 故通过考察葛根素对瑞格列奈的影响, 可进一步考察葛根素对 CYP2C8 活性的影响。细胞色素 CYP2C8 占人体 CYP 酶系总量的 6% ~ 7%, 代谢至少 1% 经 I 相代谢的药物。但目前对于中药及其有效成分对 CYP2C8 介导的药物相互作用研究尚不完善。已有研究显示, 同为黄酮类化合物的苦参酚 I、苦参黄酮 G 等对 CYP2C8 的活性具有较强的抑制作用。然而尚未见葛根素对 CYP2C8 活性影响的研究^[10]。

本实验结果得出 $K_m = 5.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 K_m 值的大小与酶的亲和力成反比, 与先前的大鼠肝微粒体孵育实验相比^[11], 提示瑞格列奈与人肝微粒体具有更强的亲和性。本实验以瑞格列奈为底物, 通过建立葛根素与瑞格列奈在人肝微粒体中的共同孵育体系, 考察葛根素对瑞格列奈代谢的影响。结果显示, 葛根素在 0 ~ 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 瑞格列奈在人肝微粒体中的代谢没有发生明显变化。因 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} < IC_{50} < 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

即为弱抑制作用^[12], 故葛根素对瑞格列奈几乎未产生抑制作用。两药联用可能不会因药物代谢性相互作用而影响疗效和患者的安全性。

当然, 体外研究结果并不能代表体内过程, 有时与体内过程存在差异。因此, 尚需体内研究进行进一步的验证。但体外实验可为体内研究提供理论基础及作用机制分析, 对体内研究具有重要意义。

参考文献

- [1] 谭哲谓, 许利嘉, 陈四保. 植物来源 α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究新进展 [J]. 中南药学, 2018, 16 (7): 982-987.
- [2] 治丁铭, 隋殿军, 岂蕊, 等. 基于网络药理学探讨葛根治疗高脂蛋白血症的潜在作用靶点 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2018, 44 (4): 724-730, 891.
- [3] 黄晓巍, 张丹丹, 王晋冀, 等. 葛根化学成分及药理作用 [J]. 吉林中医药, 2018, 38 (1): 87-89.
- [4] 张洪敏, 曹世杰, 邱峰, 等. 葛根和葛根素治疗糖尿病及并发症的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38 (6): 607-615.
- [5] Kudo T, Goda H, Yokosuka Y, et al. Estimation of the contribution of CYP2C8 and CYP3A4 in repaglinide metabolism by human liver microsomes under various buffer conditions [J]. J Pharm Sci, 2017, 106 (9): 2847-2852.
- [6] Bai YL, Han LL, Qian JH, et al. Molecular mechanism of puerarin against diabetes and its complications [J]. Front Pharmacol, 2022, 4 (12): 780419.
- [7] Guo YJ, Liang DL, Xu ZS, et al. In vivo inhibitory effects of puerarin on selected rat cytochrome P450 isoenzymes [J]. Pharmazie, 2014, 69 (5): 367-370.
- [8] Chen X, Li R, Liang T, et al. Puerarin improves metabolic function leading to hepatoprotective effects in chronic alcohol-induced liver injury in rats [J]. Phytomedicine, 2013, 20 (10): 849-852.
- [9] Jones HM, Houston JB. Substrate depletion approach for determining in vitro metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations [J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32 (9): 973-982.
- [10] 张绮悦, 杨长青. 食物、中药及其有效成分单体对 CYP2C8 的抑制作用研究进展 [J]. 中国当代医药, 2020, 24 (27): 33-36.
- [11] 何文娟, 董维冲, 赵晓娟, 等. 细胞色素 P450 介导的氯沙坦钾对瑞格列奈在大鼠肝微粒体中代谢的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (13): 1577-1581.
- [12] 高琳, 宋可心, 任纪平, 等. Cocktail 探针药物法评价木犀草素对大鼠 CYP450 酶活性影响 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31 (6): 590-595.

(收稿日期: 2022-03-27; 修回日期: 2022-04-19)

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术的 二至丸入血入脑成分分析

林雪¹, 薛傲¹, 徐艳明², 孙琪², 徐红丹^{1, 2}, 薛慧¹, 杨波^{1*}, 张宁^{1, 2*} (1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: **目的** 利用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对二至丸在 *D*-半乳糖模型大鼠体内的成分进行辨识分析, 阐明其治疗阿尔茨海默病的药效物质基础。**方法** SD 大鼠连续 4 周腹腔注射 *D*-半乳糖构建学习记忆障碍模型, 实验前灌胃给予二至丸药液, 以空白 SD 大鼠为对照, 采集血浆和脑脊液样品, 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 以甲酸-水和 0.1% 的甲酸-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL, 电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子模式下采集。**结果** 共鉴定出木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素等 25 种原形入血成分和木犀草素、红景天苷和蟛蜞菊内酯 3 种原形入脑成分。**结论** 初步确定了二至丸的入血入脑成分, 它们可能是二至丸治疗阿尔茨海默病的直接作用物质。

关键词: 二至丸; 入血入脑成分; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; 阿尔茨海默病; 物质基础
中图分类号: R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2247-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.007

Blood and brain components in Erzhi pills based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technology

LIN Xue¹, XUE Ao¹, XU Yan-ming², SUN Qi², XU Hong-dan^{1, 2}, XUE Hui¹, YANG Bo^{1*}, ZHANG Ning^{1, 2*} (1. *School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040*; 2. *School of Jiamusi, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi Heilongjiang 154007*)

Abstract: Objective To determine the constituents in compound Erzhi pills in *D*-gal model rats by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS, and briefly clarify the effective substance basis of its medicine for Alzheimer's disease. **Methods** SD rats were intraperitoneally injected with *D*-gal for 4 weeks to establish the learning and memory impairment model. Before the experiment, Erzhi pills were given intragastrically, and blank SD rats were used as controls. The plasma and cerebrospinal fluid samples were collected. The separation were performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). Formic acid-water and 0.1% formic acid-acetonitrile was used as the mobile phase with gradient elution. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹ and the injection volume was 5 μL. Electrospray ion source and acquisition in the positive and negative ion modes were used. **Results** Totally 25 prototypic hematogenous components (such as luteolin-7-*O*-glucoside, cosmosiin, luteolin and apigenin), and 3 prototypic intracerebral components (luteolin, salidroside and wedelolactone) were identified. **Conclusion** This experiment preliminarily confirms the blood and brain components of Erzhi pills, which might be the direct acting substances in Erzhi pills for Alzheimer's disease.

Key words: Erzhi pill; blood and brain component; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; Alzheimer's disease; substance base

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82174007); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.82003975); 黑龙江省卫生健康委科研课题 (No.2020-303); 黑龙江中医药大学基金项目 (No.2018RCD19, No.2018pt04, No.2019BJP01)。

作者简介: 林雪, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究, email: 617681469@qq.com ***通信作者:** 张宁, 男, 教授, 主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究, email: zhangning0454@163.com; 杨波, 男, 博士, 副教授, 主要从事中药药效物质基础及质量标准研究, email: 56024955@qq.com

二至丸由墨旱莲、女贞子两味药组成, 具有补益肝肾、滋阴止血的功效。现代药理学研究表明, 二至丸在抗衰老、益智等方面作用显著^[1], 能够治疗阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)^[2], 但其发挥药效的活性成分尚未明确。UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术以其高分辨率、高质量精度的特点, 在中药成分定性定量分析领域具有独特优势^[3]。药物转运到作用部位才能发挥作用, 吸收入血尤其入脑的成分可能是二至丸治疗 AD 的潜在药效成分。目前对于二至丸入血入脑成分的研究相对较少, 基于此, 本实验运用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对给予二至丸的 *D*-半乳糖 (*D*-gal) 模型大鼠的体内成分进行分析, 以期阐明二至丸治疗 AD 的药效物质基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Dionex UltiMate 3000 戴安高效液相色谱仪, Q-Exactive Focus 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (赛默飞世尔科技公司); Bionoon-VAC1 型真空浓缩仪 (上海般诺生物科技有限公司); Mikro 200R 型离心机 (德国 Hettich 公司)。女贞子 (酒)、墨旱莲 [北京同仁堂, 经黑龙江中医药大学陈效忠副教授鉴定符合 2020 年版《中国药典》要求]。HPLC 级甲醇 (美国 Dikma 公司); HPLC 级乙腈 (美国 Fisher 公司); HPLC 级甲酸 (美国 Tedia 公司)。*D*-gal (上海吉至生化科技有限公司, 批号: D96420, 纯度 99%)。红景天苷 (批号: B20504)、特女贞苷 (批号: B21240)、木犀草素 (批号: A0108)、蟛蜞菊内酯 (批号: B20934)、芹菜素 (批号: B20981)、齐墩果酸 (批号: BP1026) (上海源叶生物科技有限公司, 纯度均大于 98%)。

1.2 动物

SD 大鼠, 雌性, SPF 级, 12 只, 210 ~ 250 g [黑龙江中医药大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (黑) 2018-004]。

2 方法

2.1 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 检测条件

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 35 °C, 流速 0.3 mL · min⁻¹, 进样量 5 μL, 流动相为 0.1% 的甲酸-水 (A 相) 和 0.1% 的甲酸-乙腈 (B 相), 梯度洗脱 (0 ~ 3.5 min, 5% ~ 15%B; 3.5 ~ 6.5 min, 15% ~ 30%B; 6.5 ~ 12.5 min, 30% ~ 70%B; 12.5 ~ 18 min, 70% ~ 100%B)。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 采用正、负离子检测模式; 扫描范围 *m/z* 50 ~ 1500 Da;

喷雾电压 (+) 3.5 kV, (-) 3.2 kV; 离子传输管温度 320 °C, AUG 气体加热温度 350 °C; 碰撞能量 20、40、60 eV; 鞘气 40 psi, 辅助气 20 psi, 吹扫气 10 psi; RF 镜头振幅 (s-lens) 60; 分辨率一级高分辨质谱 70 000 FWHM, 二级高分辨质谱 17 500 FWHM; 动态排除时间 5 s。

2.2 二至丸样品及体外对照品溶液的制备

女贞子 (酒)、墨旱莲 1 : 1 比例混合, 加入 10 倍量的水, 煎煮 2 h, 收集滤液, 残渣加等量水继续煎煮 1 h, 过滤后合并滤液, 浓缩成 1 g · mL⁻¹ (以生药量计) 的药液。取上述药液适量加 70% 的甲醇溶液稀释 10 倍, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得二至丸样品溶液。

精密称定红景天苷、特女贞苷、木犀草素、蟛蜞菊内酯、芹菜素、齐墩果酸对照品各 1 mg 于量瓶中, 以 70% 甲醇稀释 10 倍, 配成 0.1 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得体外对照品溶液。

2.3 血液、脑脊液样品的采集和前处理

SD 大鼠适应性饲养 7 d, 按体质量随机分为模型组、空白组, 每组 6 只, 连续 4 周模型组腹腔注射 *D*-gal 250 mg / (kg · d), 空白组腹腔注射等量的生理盐水。实验前禁食 12 h, 正常饮水, 模型组灌胃给予二至丸药液 4.86 g · kg⁻¹, 给药后 60 min, 微量乙醚麻醉, 眼底静脉丛取血, 置于肝素化离心管中, 3000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清置 - 80 °C 冰箱保存。取血后, 固定大鼠头部, 75% 乙醇对颈后部皮肤消毒, 微量输液针从枕骨大孔刺入小脑延髓池, 抽取脑脊液于预冷的离心管中, 3000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上层脑脊液, - 80 °C 冰箱保存。

取空白血浆和含药血浆各 500 μL 于离心管中, 加入 2 mL 甲醇, 30 μL 乙酸溶液涡旋混合 1 min, 超声 1 min, 13 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 真空浓缩离心仪 1500 r · min⁻¹、40 °C 浓缩至干燥, 用 150 μL 70% 甲醇溶液复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得血浆待测样品溶液。取空白脑脊液和含药脑脊液各 200 μL 于离心管中, 加入 800 μL 甲醇, 涡旋混合 1 min, 超声 1 min, 13 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液, 真空浓缩离心仪 1500 r · min⁻¹、40 °C 浓缩至干燥, 用 60 μL 70% 甲醇溶液复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得脑脊液待测样品溶液。

2.4 二至丸成分数据库的建立及数据处理

在 TCMID (<http://www.megabionet.org/tcmid/>)、TCMSP (<http://www.tcmsp-e.com/>) 等中药成分数据库中检索二至丸及其单味药成分结合相关文献补

充, 对二至丸的化学成分信息进行整合汇总建成分数据库。数据处理采用 Xcalibur 软件, 通过分析保留时间、精确分子质量、元素组成、同位素丰度和一级质谱图、二级质谱图, 结合二至丸成分数据库、Pubchem 数据库、对照品和相关文献, 对化学成分进行辨识分析。

3 结果

3.1 二至丸入血入脑原形化合物的鉴定

应用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术, 在正、负离子模式下, 对二至丸样品溶液、大鼠血浆和脑脊液中的成分进行检测, 结果二至丸样品溶液、血浆和脑脊液总离子流图见图 1。共发现原形入血成分 25 种, 原形入脑成分 3 种, 见表 1。

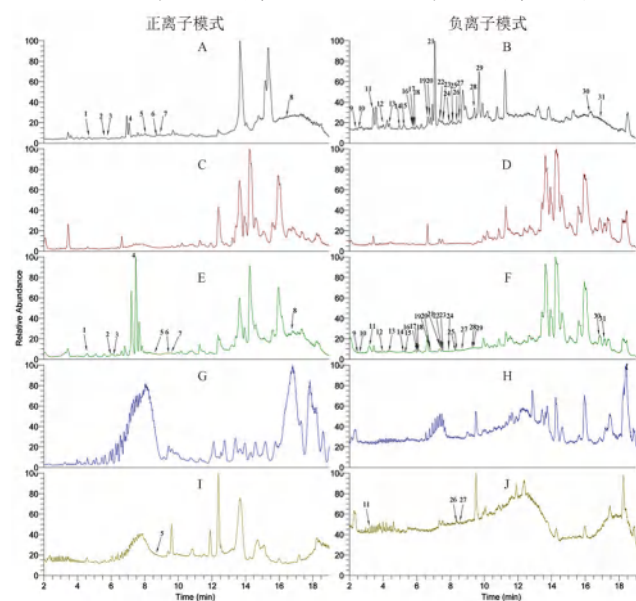


图 1 正、负离子模式下二至丸 TIC 图

Fig 1 TIC for Erzhi pills in both positive and negative ion modes

A, B. 样品 (sample); C, D. 空白血浆 (blank plasma); E, F. 给药血浆 (administration plasma); G, H. 空白脑脊液 (blank cerebrospinal fluid); I, J. 给药脑脊液 (administration cerebrospinal fluid)

3.2 二至丸入血入脑原形成分解析

3.2.1 黄酮类化合物

黄酮类化合物结构与雌激素相似, A、B 环上常被甲基、甲氧基等基团取代。在质谱的高强度碰撞过程中, RDA 裂解。CO、CO₂ 等中性分子的丢失是黄酮类化合物的主要裂解特征^[20]。实验中从二至丸给药血浆中鉴别出黄酮类成分 8 个, 包括化合物 3 (20)、4 (23)、5 (26)、6 (28)、7 (29)、15、18、24; 从给药脑脊液中鉴别出黄酮类成分 1 个, 为化合物 5 (26)。以化合物 26 (5) 和化合物 28 (6) 为例来说明黄酮类化合物的鉴定过程。化合物 26 (5) 保留时间 8.52 min, 准分子离子峰 m/z 285.0401 [M-H]⁻, 软件推测分子式为 C₁₅H₁₀O₆, 主要碎片离子包括 m/z 151.00 和 m/z 133.03, 是准分子离子峰 m/z 285.04

通过黄酮类化合物的特征性裂解方式 RDA 裂解得到的。与文献报道^[9]基本一致, 故将其鉴定为木犀草素, 二级碎片离子和可能的裂解途径见图 2。化合物 28 (6) 保留时间为 9.26 min, 准分子离子峰 m/z 269.0452 [M-H]⁻, 软件推测分子式为 C₁₅H₁₀O₅, 主要碎片离子包括 m/z 225.06、201.06、181.06、159.04、117.03 等, 其中 m/z 225.06 是准分子离子峰失去一个中性的 CO₂ 分子所得, 进而再失去一个 CO₂ 得到 m/z 181.06 碎片离子。 m/z 201.06 离子是准分子离子峰丢失 C₃O₂ 后经氢重排所得, 但其结构不稳定易丢失 C₂H₂O 形成稳定的具有共轭结构的离子 m/z 159.04, m/z 159.04 又可丢失 C₂H₂O 生成碎片离子 m/z 117.03, 碎片信息与文献报道^[9]基本一致, 故将其鉴定为芹菜素, 二级碎片离子和可能的裂解途径见图 3。

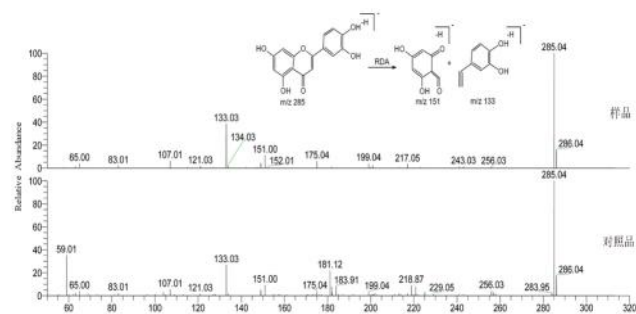


图 2 木犀草素二级碎片离子和可能的裂解途径

Fig 2 Secondary fragment ion and possible cleavage pathways of luteolin

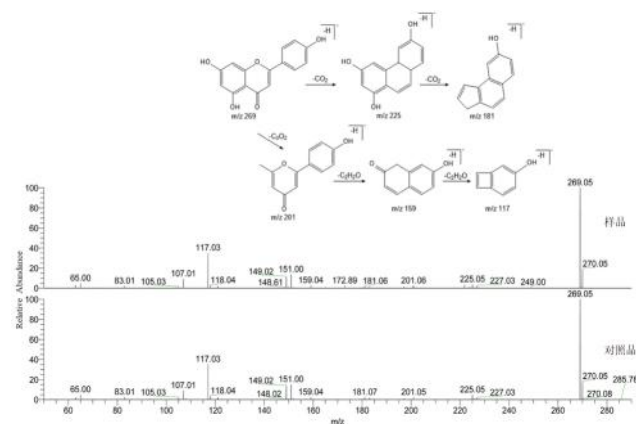


图 3 芹菜素二级碎片离子和可能的裂解途径

Fig 3 Secondary fragment ion and possible cleavage pathways of apigenin

3.2.2 香豆素类化合物

香豆素类化合物结构与雌二醇相似, 结构中的内酯和咪喃骨架容易发生 CO₂ 和 CO 的中性丢失^[17]。从二至丸给药血浆中鉴别出香豆素类成分 2 个, 即化合物 22 和 27; 从给药脑脊液中鉴别出香豆素类成分 1 个, 为化合物 27。以化合物 27 为例, 说明香豆素类化合物的鉴定过程。化合物 27 保留时间为 8.78 min, 软

表 1 二至丸原形入血、入脑原形化合物信息表

Tab 1 Information of prototype blood and brain compounds of Erzhi pills

序号	t_R /min	分子式	质荷比/(m/z)	电离模式	误差/ $\times 10^{-6}$	主要二级碎片/(m/z)	化合物	化合物类型
1	5.30	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	387.1385	[M+H] ⁺	-0.011	225.15, 207.14	长寿花糖苷 ^[4]	倍半萜
2	6.22	C ₉ H ₈ O ₄	181.0493	[M+H] ⁺	-0.029	167.03, 153.05	咖啡酸 ^[5]	酚酸类
3	6.57	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1078	[M+H] ⁺	-0.017	287.05, 153.02	木犀草素-7-O-葡萄糖苷 ^[6]	黄酮类
4	7.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1128	[M+H] ⁺	-0.007	271.06, 153.09	大波斯菊苷 ^[6]	黄酮类
5*	8.51	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0547	[M+H] ⁺	-0.016	161.02, 179.03	木犀草素 ^[6]	黄酮类
6	9.28	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.0599	[M+H] ⁺	-0.037	153.02, 119.05	芹菜素 ^[6]	黄酮类
7	9.51	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.0704	[M+H] ⁺	-0.015	286.05, 269.04	红车轴草素 ^[7]	黄酮类
8	16.47	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	457.0948	[M+H] ⁺	-0.004	163.01	齐墩果酸 ^[8]	三萜类
9	2.46	C ₇ H ₆ O ₄	153.0181	[M-H] ⁻	-0.622	109.03, 91.02	原儿茶酸 ^[9]	酚酸类
10	2.69	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	315.1091	[M-H] ⁻	3.478	135.04	北升麻宁 ^[10]	苯乙醇苷类
11*	3.39	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	299.1153	[M-H] ⁻	3.646	179.05, 119.05	红景天苷 ^[10]	苯乙醇苷类
12	4.37	C ₉ H ₈ O ₄	179.0339	[M-H] ⁻	0.362	135.04, 107.05	咖啡酸 ^[11]	酚酸类
13	4.67	C ₁₇ H ₂₆ O ₉	373.0759	[M-H] ⁻	2.924	172.08, 167.03	二氢紫丁香苷 ^[12]	苯丙醇苷类
14	4.91	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.1242	[M-H] ⁻	1.092	223.06, 179.06	8-表金银花苷 ^[10]	环烯醚萜类
15	4.96	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1505	[M-H] ⁻	1.844	285.06, 255.03	山柰酚-3-O-芸香糖苷 ^[13]	黄酮类
16	5.93	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	387.1305	[M-H] ⁻	2.833	341.12, 101.02	栀子苷 ^[14]	裂环环烯醚萜类
17	5.99	C ₁₆ H ₂₂ O ₈	341.0907	[M-H] ⁻	3.213	179.07	松柏苷 ^[15]	苯丙素类
18	6.02	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.1496	[M-H] ⁻	5.256	259.04	圣草酚 ^[13]	黄酮类
19	6.58	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	555.1724	[M-H] ⁻	1.9600	151.04, 123.04	10-羟基橄榄苦苷 ^[9]	裂环环烯醚萜类
20	6.70	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0927	[M-H] ⁻	2.443	285.04, 256.04	木犀草素-7-O-葡萄糖苷 ^[11]	黄酮类
21	7.03	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇	685.5621	[M-H] ⁻	1.188	523.18, 453.14	特女贞苷 ^[9]	裂环环烯醚萜类
22	7.18	C ₁₅ H ₈ O ₇	299.0194	[M-H] ⁻	3.649	271.02, 254.93	去甲基蟛蜞菊内酯 ^[16]	香豆素类
23	7.20	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0979	[M-H] ⁻	2.544	268.04, 240.04	大波斯菊苷 ^[9]	黄酮类
24	7.79	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539.1752	[M-H] ⁻	2.027	377.12, 307.08	橄榄苦苷 ^[17]	黄酮类
25	8.49	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	523.2207	[M-H] ⁻	2.078	361.12, 291.08	女贞苷 ^[9]	苯丙醇苷类
26*	8.52	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0401	[M-H] ⁻	2.686	151.00, 133.03	木犀草素 ^[9]	黄酮类
27*	8.78	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	313.0351	[M-H] ⁻	3.485	298.01, 270.02	蟛蜞菊内酯 ^[17]	香豆素类
28	9.26	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0452	[M-H] ⁻	3.123	225.06, 117.03	芹菜素 ^[9]	黄酮类
29	9.49	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0556	[M-H] ⁻	3.663	284.03, 183.04	红车轴草素 ^[18]	黄酮类
30	16.45	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.3531	[M-H] ⁻	2.653	391.23	齐墩果酸 ^[8]	三萜类
31	17.03	C ₁₀ H ₁₆	136.0394	[M-H] ⁻	8.089	134.89, 99.92	α -蒎烯 ^[19]	单萜类

注 (Note): *表示即入血又入脑成分 (*means the components absorbed into the brain and blood)。

件得到准分子离子峰为 m/z 313.0351[M-H]⁻, 推测分子式为 C₁₆H₁₀O₇, 质谱扫描获得碎片离子 m/z 298.01、270.02、254.02 等, 分别是准分子离子峰依次丢失 CH₃、CO、CO₂ 所得, 与文献报道^[17] 基本一致, 故将其鉴定为蟛蜞菊内酯, 二级碎片离子和可能的裂解途径见图 4。

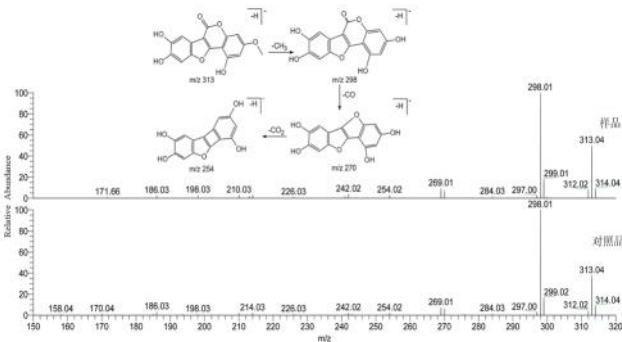


图 4 蟛蜞菊内酯二级碎片离子和可能的裂解途径

Fig 4 Secondary fragment ion and possible cleavage pathways of wedelolactone

3.2.3 苯乙醇苷类化合物 苯乙醇苷是一类以取代苯乙醇为苷元的苷, 其成苷的中心葡萄糖基常连有芳香酰基^[10]。实验从二至丸给药血浆中鉴别出苯乙醇苷类化合物 2 个, 即化合物 **10** 和 **11**; 从给药脑脊液中亦鉴别到化合物 **11**。化合物 **11** 保留时间为 3.39 min, 准分子离子峰为 m/z 299.1153 [M-H]⁻, 软件推测分子式为 C₁₄H₂₀O₇, 质谱扫描得到碎片离子 m/z 179.05 和 m/z 119.05, 分别为葡萄糖基碎片和酪醇-OH 的碎片离子, 与文献报道^[10] 基本一致, 故鉴定其为红景天苷, 二级碎片离子和可能的裂解途径见图 5。

3.2.4 萜类化合物解析 萜类以异戊二烯单位 (C₅ 单位) 为基本骨架^[8], 根据分子中 C₅ 单位的数量分为单萜、二萜、三萜等, 在二至丸给药血浆中共鉴别出萜类化合物 3 种, 即化合物 **1**、**8** (**30**)、**31**。以化合物 **30** 为例, 说明萜类化合物的鉴定过程。化合物 **30** 保留时间为 16.45 min, 准分子离子峰 m/z 455.3531 [M-H]⁻, 软件推测分

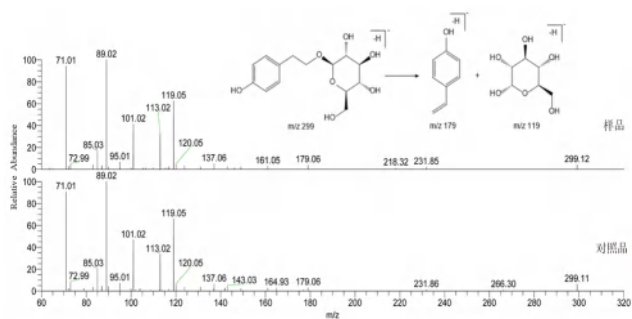


图 5 红景天苷二级碎片离子和可能的裂解途径
Fig 5 Secondary fragment ion and possible cleavage pathways of salidroside

分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$, m/z 391.23 是准分子离子峰失去一分子 H_2O 和 $HCOOH$ 得到的离子碎片, 与文献报道^[8] 基本一致, 故将其鉴定为齐墩果酸, 二级碎片离子和可能的裂解途径见图 6。

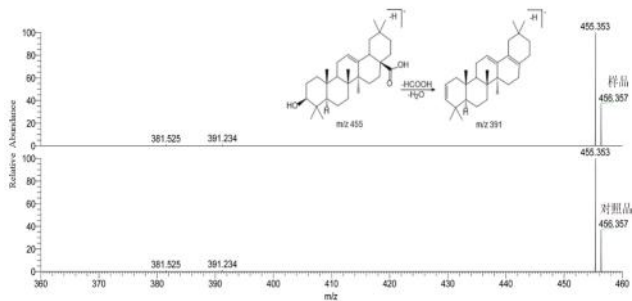


图 6 齐墩果酸二级碎片离子和可能的裂解途径
Fig 6 Secondary fragment ion and possible cleavage pathways of oleanolic acid

3.2.5 裂环烯醚萜类化合物 环戊并吡喃是裂环烯醚萜类化合物的特征结构, 在质谱碰撞过程中该结构的键会发生断裂。裂环烯醚萜类化合物侧链上的官能团也常以 CH_3OH 、 H_2O 、 CO_2 和糖分子的形式丢失^[9]。在二至丸给药血浆中共鉴别出裂环烯醚萜类化合物 3 种, 即化合物 **16**、**19**、**21**。化合物 **21** 保留时间为 7.03 min, 准分子离子峰为 m/z 685.5621 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{31}H_{42}O_{17}$, 质谱扫描获得主要离子碎片包括 m/z 523.18、453.14、421.15 等。准分子离子峰失去一分子 C_4H_6O 产生 m/z 453.14 碎片, 再失去一分子 CH_3OH 得到 m/z 421.15 碎片, m/z 453.14、 m/z 421.15 及分子离子峰失去一分子葡萄糖得到的 m/z 523.18 碎片都是裂环烯醚萜类裂解的典型片段。与文献报道^[9] 基本一致, 故将其鉴定为特女贞苷, 二级碎片离子和可能的裂解途径见图 7。

4 讨论

多成分、多靶点是二至丸复方体系的重要特点, 也给二至丸治疗 AD 的药效物质基础研究带来了挑战。经典复方体系研究往往以体外成分为

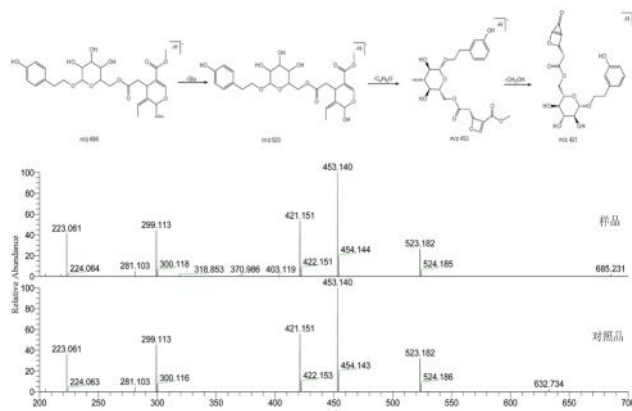


图 7 特女贞苷二级碎片离子和可能的裂解途径
Fig 7 Secondary fragment ion and possible cleavage pathways of nuezhenide

研究对象^[13], 血浆等内环境对中药复方成分的影响就很容易被忽视。因此, 实验采用具有较强分离、检测能力的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对二至丸的入血入脑成分进行检测。二至丸成分复杂多样, 在血浆和脑脊液的复杂体系影响下更容易发生改变, 为了最大程度获取样品中化合物的质谱信息, 实验采用了正、负两种离子化采集模式。结果在给药血浆中鉴定出黄酮类、香豆素类、苯乙醇苷类、三萜类等多种类型的成分, 研究发现黄酮类成分木犀草素和芹菜素都具有促进神经元修复和再生的神经保护作用^[21-22]。香豆素类成分螞蟥菊内酯具有调节氧化应激和线粒体功能障碍从而保护神经退行性病变的作用^[23]。苯乙醇苷类成分红景天苷对大脑神经可塑性的调节作用也不容忽视, 神经元突触的活性依赖降低能够被其抑制^[24]。Guo 等^[25] 研究发现三萜类成分齐墩果酸能够调节亚锡钙蛋白 -1 和解偶联蛋白 -2 信号而缓解 AD 中的氧化应激和 $A\beta$ 沉积。Zhang 等^[26] 研究发现裂环烯醚萜类成分栀子苷能够下调 mTOR 信号, 使 $A\beta$ 纤维的自噬和溶酶体清除增强。酚酸类成分原儿茶酸和咖啡酸也被证实具有改善神经炎症^[27], 减少 $A\beta$ 聚集^[28], 进而改善 AD 学习记忆障碍的药理作用。此外, 在给药脑脊液中还鉴定出木犀草素、红景天苷、螞蟥菊内酯 3 种成分, 提示它们对改善 *D-gal* 模型大鼠学习记忆障碍的过程中的贡献可能更大。

目前, 关于二至丸发挥改善 *D-gal* 模型大鼠学习记忆障碍的具体作用机制和代谢途径研究还不明确, 在后续研究中, 作者将进一步考察这些入血尤其是入脑成分的生物活性和代谢途径, 并进行血液和脑脊液的药理学监测, 明确具体的量效关系, 为更好地阐明二至丸治疗 AD 的体内药效物质和作用机制提供实验依据。

参考文献

- [1] Feng L, Gao M, Zhai Y, et al. A novel strategy based on targeted cellular metabolomics for quantitatively evaluating anti-aging effect and screening effective extracts of Erzhi Wan [J]. *J Chromatogr B*, 2021, 1178: 122857.
- [2] Xie Y, Yan B, Hou M, et al. Erzhi pills ameliorate cognitive dysfunction and alter proteomic hippocampus profiles induced by *D*-galactose and $A\beta_{1-40}$ injection in ovariectomized Alzheimer's disease model rats [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59 (1): 1402-1414.
- [3] 曾彬, 刘红梅, 刘晓梅, 等. UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术在中药分析中的应用 [J]. *中药材*, 2020, 43 (9): 2312-2318.
- [4] Shi XY, Miao QY, Liu XG, et al. Screening safflower injection for constituents with activity against stroke using comprehensive chemical profiling coupled with network pharmacology [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2021, 7 (3): 347-360.
- [5] 董世奇, 赵鹿, 张东旭, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的扎冲十三味丸化学成分分析 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (6): 1546-1557.
- [6] 李焕茹, 冯志毅, 赵迪, 等. 基于多元统计分析的制剂前后女贞子成分差异分析 [J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34 (1): 102-113.
- [7] Zhang J, Xu XJ, Xu W, et al. Rapid characterization and identification of flavonoids in Radix Astragali by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53 (6): 945-952.
- [8] 史静超, 张淑蓉, 柴智, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术的芪蛭降糖胶囊化学成分分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (16): 116-123.
- [9] Li H, Yao W, Liu Q, et al. Application of UHPLC-ESI-Q-TOF-MS to identify multiple constituents in processed products of the herbal medicine Ligustri Lucidi Fructus [J]. *Molecules*, 2017, 22 (5): 689.
- [10] 肖雪, 许思敏, 高映敏, 等. 盐制女贞子化学成分的 UPLC-Q/TOF MS 鉴定研究 [J]. *现代食品科技*, 2019, 35 (10): 253-260.
- [11] Abdelhady N, Abdallah G. HPLC-MS/MS study of phenolic compounds of leucaena leucocephala legumes monitored with their in vitro antihyperglycemic activity [J]. *European J Med Plants*, 2016, 17 (4): 1-9.
- [12] 周洁, 汤维维, 陈君. 基于 UPLC-QTOF-MS/MS 法的茅苍术与北苍术化学成分分析 [J]. *药学与临床研究*, 2020, 28 (5): 321-328.
- [13] 姬瑞芳, 全庆华, 郭晓宇, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法快速分析鬼箭羽中的化学成分 [J]. *质谱学报*, 2018, 39 (5): 540-551.
- [14] Zhou J, Zhang Y, Li N, et al. A systematic metabolic pathway identification of Common Gardenia Fruit (Gardenia Fructus) in mouse bile, plasma, urine and feces by HPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1145: 122100.
- [15] 程宇欣, 陈两绵, 王智民, 等. UHPLC-QTOF-MS 法分析鉴定吴茱萸水提物在大鼠血浆、尿液和粪便中的原形成分及其代谢产物 [J]. *药学学报*, 2017, 52 (7): 1157-1164.
- [16] 王美玲, 张清清, 付爽, 等. UPLC-Q-TOF MS^E 技术结合 UNIFI 数据库筛查方法快速分析巴戟天化学成分 [J]. *质谱学报*, 2017, 38 (1): 75-82.
- [17] 钟询龙, 王若伦, 段炼, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术分析女贞子与墨旱莲配伍协同增效的物质基础 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37 (19): 1887-1891.
- [18] Xu T, Zuo L, Sun Z, et al. Chemical profiling and quantification of ShenKang injection, a systematic quality control strategy using ultra high performance liquid chromatography with Q exactive hybrid quadrupole orbitrap high-resolution accurate mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40 (24): 4872-4879.
- [19] 刘香易, 曾锐, 杨长传, 等. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 技术的三草保肝汤化学成分分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26 (7): 141-147.
- [20] Aziz N, Khan MN, Ali A, et al. Rapid analysis of flavonoids based on spectral library development in positive ionization mode using LC-HR-ESI-MS/MS [J]. *Arab J Chem*, 2022, 15 (4): 103734.
- [21] Wang Y, Wu Y, Liang C, et al. Pharmacodynamic effect of ellagic acid on ameliorating cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Pharmacology*, 2019, 104 (5-6): 320-331.
- [22] Dourado NS, Souza CDS, de Almeida MMA, et al. Neuroimmunomodulatory and neuroprotective effects of the flavonoid apigenin in in vitro models of neuroinflammation associated with Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 119.
- [23] Sharma S, Trivedi S, Pandey T, et al. Wedelolactone mitigates parkinsonism via alleviating oxidative stress and mitochondrial dysfunction through NRF2/SKN-1 [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58 (1): 65-77.
- [24] Concerto C, Infortuna C, Muscatello MRA, et al. Exploring the effect of adaptogenic Rhodiola Rosea extract on neuroplasticity in humans [J]. *Complement Ther Med*, 2018, 41: 141-146.
- [25] Guo Q, He J, Zhang H, et al. Oleanolic acid alleviates oxidative stress in Alzheimer's disease by regulating stanniocalcin-1 and uncoupling protein-2 signalling [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47 (7): 1263-1271.
- [26] Zhang Z, Wang X, Zhang D, et al. Geniposide-mediated protection against amyloid deposition and behavioral impairment correlates with downregulation of mTOR signaling and enhanced autophagy in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (2): 536-548.
- [27] Choi JR, Kim JH, Lee S, et al. Protective effects of protocatechuic acid against cognitive impairment in an amyloid beta-induced Alzheimer's disease mouse model [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 144: 111571.
- [28] Andrade S, Loureiro JA, Pereira MC. Caffeic acid for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: the effect of lipid membranes on the inhibition of aggregation and disruption of $A\beta$ fibrils [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 190: 853-861.

(收稿日期: 2022-03-30; 修回日期: 2022-06-13)

基于 HPLC-CAD 指纹图谱结合化学计量学方法分析 不同产地北柴胡药材质量

周丽娟¹, 杨晓宁^{1*}, 王雅芝¹, 张超¹, 王玉龙², 孙欣光^{1*} (1. 北京振东光明药物研究院有限公司, 北京 100085; 2. 山西振东地道药材开发有限公司, 山西 长治 047100)

摘要: **目的** 建立不同产地北柴胡药材高效液相色谱串联电喷雾式检测器 (HPLC-CAD) 指纹图谱, 为北柴胡药材的质量研究及评价提供参考。**方法** 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱; 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相梯度洗脱; 柱温 40 °C; 流速 1.4 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL, CAD 雾化室温度 50 °C。采用相似度评价、聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 对 16 批不同产地北柴胡进行系统比较及评价。**结果** 标定了北柴胡药材 HPLC-CAD 指纹图谱中 22 个共有指纹峰, 并指认了其中的 5 个峰; 16 批北柴胡药材与对照图谱的相似度为 0.904 ~ 0.991; CA 可以将不同产地北柴胡药材区分开, 结合 PCA 和 PLS-DA 分析筛选出 9 个差异标志物, VIP 值从大到小分别为色谱峰 6 (柴胡皂苷 c)、色谱峰 16、色谱峰 3、色谱峰 18、色谱峰 14、色谱峰 7 (柴胡皂苷 f)、色谱峰 8 (柴胡皂苷 a)、色谱峰 1、色谱峰 5。**结论** 建立的 HPLC-CAD 指纹图谱方法具有良好的灵敏度、精密度、重复性和稳定性, 结合化学计量学分析可用于不同产地北柴胡的成分表征及差异研究, 为北柴胡的质量控制提供科学依据。

关键词: 北柴胡; HPLC-CAD 指纹图谱; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘判别分析

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2253-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.008

Quality analysis of *Bupleurum chinense* from different origins by HPLC-CAD fingerprint combined with chemometric

ZHOU Li-juan¹, YANG Xiao-ning^{1*}, WANG Ya-zhi¹, ZHANG Chao¹, WANG Yu-long², SUN Xinguang^{1*} (1. Beijing Zhendong Guangming Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Beijing 100085; 2. Shanxi Zhendong Genuine Medicinal Materials Development Co., Ltd., Changzhi Shanxi 047100)

Abstract: Objective To establish the HPLC-CAD fingerprint of *Bupleurum chinense* for component analysis and quality control of *Bupleurum chinense* from different origins together with chemometrics. **Methods** The determination was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) with mobile phase consisting of acetonitrile-0.1%formic acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.4 mL·min⁻¹. The column temperature was 40 °C and the sample volumn was 20 μL. The CAD temperature was 50 °C. Similarity evaluation, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used to recognize the pattern of 16 batches of *Bupleurum chinense* from different origins. **Results** HPLC-CAD fingerprints of *Bupleurum chinense* were established and 22 were selected as the common peaks, and 5 peaks were identified according to reference. The similarity of 16

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No.2019YFC1710800)。

作者简介: 周丽娟, 女, 硕士, 主要从事中药质量研究, email: zlj5221@sina.com *通信作者: 杨晓宁, 女, 硕士, 主要从事中药新药的开发与应用, email: yangxiaoning@zjdt.com; 孙欣光, 男, 博士, 主要从事中药药效物质基础及质量研究, email: sxgzhuwu07@163.com

batches of *Bupleurum chinense* ranged 0.904 ~ 0.991. CA could distinguish *Bupleurum chinense* from different origins, and 9 differential markers were screened by PCA and PLS-DA analysis. VIP values from large to small were peak 6 (saikosaponin c), peak 16, peak 3, peak 18, peak 14, peak 7 (saikosaponin f), peak 8 (saikosaponin a), peak 1 and peak 5. **Conclusion** The established HPLC-CAD fingerprint method shows good sensitivity, precision, repeatability and stability. Combined with chemometrics, it can be used for the composition analysis and differentiation of *Bupleurum chinense* from different origins, which provides scientific basis for the quality evaluation and clinical application of *Bupleurum chinense*.

Key words: *Bupleurum chinense*; HPLC-CAD fingerprint; similarity valuation; hierarchical cluster analysis; principle components analysis; partial least squares discriminant analysis

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. 的干燥根, 前者习称北柴胡, 春秋二季采挖, 除去茎叶和泥沙, 干燥。柴胡具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气等功效, 临床用于感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛、月经不调、子宫脱垂、脱肛等^[1]。药理学研究表明, 柴胡具有解热、抗炎、抗肿瘤、保肝、免疫调节等药理作用^[2-4]。我国柴胡资源丰富, 分布广泛, 人工栽种主要以北柴胡为主, 且在山西和甘肃等地的栽种面积最大。

柴胡药材含有皂苷、黄酮、挥发油、多糖等多种活性成分^[2, 5-6], 目前多以柴胡皂苷来评价柴胡的质量, 2020 年版《中国药典》一部“柴胡”药材项下, 仅以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 作为质控指标^[1]。中药成分复杂多样, 其临床药效的发挥是所含化学成分共同作用的结果, 因此, 单一或几个成分的含量测定很难全面地评价中药质量, 而中药指纹图谱可以从整体上对中药的成分进行分析, 能较全面地反映中药质量, 体现中药材质量的整体性^[7-8], 因此本研究建立了柴胡药材的指纹图谱, 并对不同产地的柴胡药材进行了研究。

目前关于柴胡药材指纹图谱的研究大多采用紫外检测器 (UV) 或蒸发光散射检测器 (ELSD)^[9-12]。UV 灵敏度高、噪声低、线性范围宽, 但是不适用于无紫外吸收或弱紫外吸收化合物的分析; ELSD 为通用检测器, 但其灵敏度低、重现性较差。电喷雾检测器 (CAD) 作为一种通用型检测器, 其检测不依赖于分析物的分子结构, 尤其适用于皂苷类、糖类、生物碱类、脂类化合物等无紫外吸收或弱紫外吸收成分的分析^[13-14]。同时 CAD 是一个质量敏感型检测器, 其检测的响应值与进样成分的含量相关,

且具有较高的灵敏度和较低的检测限^[15-16], 特别适合中药指纹图谱的全面成分分析, 可量化表征其中的化学成分, 在中药成分检测及质量研究方面得到广泛应用^[17-21]。柴胡皂苷类成分具有较弱的紫外吸收, 不适合采用 UV 检测, 与 ELSD 相比 CAD 具有更高的灵敏度和更低的检测限, 因此选择 HPLC-CAD 法建立柴胡药材的指纹图谱。

本研究建立了北柴胡 HPLC-CAD 药材指纹图谱方法, 标定共有峰, 并结合相似度分析、聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法 - 判别分析 (PLS-DA) 对不同产地北柴胡成分进行成分表征及质量差异研究, 为北柴胡药材的质量评价和质量控制提供科学依据。

1 材料

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); ME204/02 型万分之一电子天平 (瑞士梅特勒 - 托利多公司); MSA36S-0CE-DH 型百万分之一电子天平 (德国赛多利斯公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)。

色谱乙腈、甲醇 (FEPRUE); 分析纯甲酸 (MREDA); 纯水 (Milli-Q 制备)。柴胡皂苷 a (批号: 110777-201912, 纯度: 94.8%)、柴胡皂苷 d (批号: 110778-201912, 纯度: 96.3%) (中国食品药品检定研究院); 柴胡皂苷 c (批号: PS000193, 纯度: 99.65%)、柴胡皂苷 e (批号: PS200702-15, 纯度: 99.94%) (成都普思生物科技股份有限公司); 柴胡皂苷 f (批号: 6131, 纯度: 99.7%, 上海诗丹德标准技术服务有限公司)。北柴胡药材均购自安国药材市场, 经山西医科大

学高建平教授鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm× 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 10% ~ 30%B; 20 ~ 35 min, 30% ~ 35%B; 35 ~ 60 min, 35% ~ 40%B; 60 ~ 65 min, 40% ~ 45%B; 65 ~ 70 min, 45%B; 70 ~ 85 min, 45% ~ 65%B; 85 ~ 90 min, 65% ~ 85%B; 90 ~ 100 min, 85% ~ 90%B; 100 ~ 105 min, 90% ~ 95%B); 柱温 40 °C; 流速 1.4 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL, CAD 雾化室温度 50 °C。

2.2 对照品溶液的制备

取柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 e、柴胡皂苷 f 对照品, 分别精密称定, 加 80% 甲醇制成每 1 mL 分别含 0.10 mg、50 μg、0.15 mg、20 μg、50 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取柴胡药材粉末 (过 3 号筛), 约 1.0 g, 精密称定, 加 80% 甲醇 25 mL, 称重, 超声处理 (500 W, 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 用 80% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 方法学验证

2.4.1 精密度试验 取柴胡药材 (S1), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次。以柴胡皂苷 d (13 号峰) 的保留时间和峰面积为参照, 计算 22 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的相对峰面积 *RSD* 均小于 5.0%, 相对保留时间 *RSD* 均小于 1.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取柴胡药材 (S1), 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液。进样检测。以柴胡皂苷 d (13 号峰) 的保留时间和峰面积为参照, 计算 22 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰的相对峰面积 *RSD* 均小于 5.0%, 相对保留时间 *RSD* 均小于 1.0%, 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取柴胡药材 (S1), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、20、30、48 h 进样检测。以柴胡皂苷 d (13 号峰) 的保留时间和峰面积为参照, 计算 22 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰

的相对峰面积 *RSD* 均小于 5.0%, 相对保留时间 *RSD* 均小于 1.0%, 表明室温放置 48 h 内稳定性良好。

2.5 柴胡指纹样品图谱的建立

取 16 批不同产地的北柴胡药材, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样检测。将指纹图谱依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2012.0 版本) 中, 以 S1 为参考图谱, 手动匹配 16 批指纹图谱, 见图 1, 根据匹配结果确定 22 个共有峰, 并生成对照指纹图谱, 见图 2。通过对照品比对, 指认了其中的 5 个峰, 其中 13 号峰 (柴胡皂苷 d) 峰形好, 峰面积稳定, 分离度较好, 选定为指纹图谱的参照峰 (S), 见图 3。

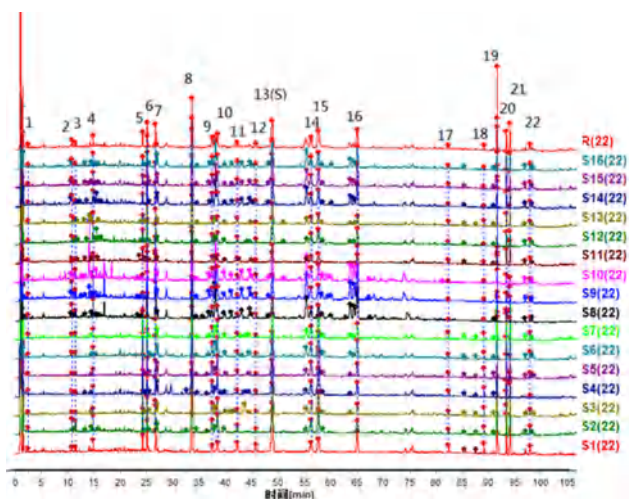


图 1 16 批北柴胡药材的指纹图谱

Fig 1 Fingerprints for 16 batches of *Bupleurum chinense*

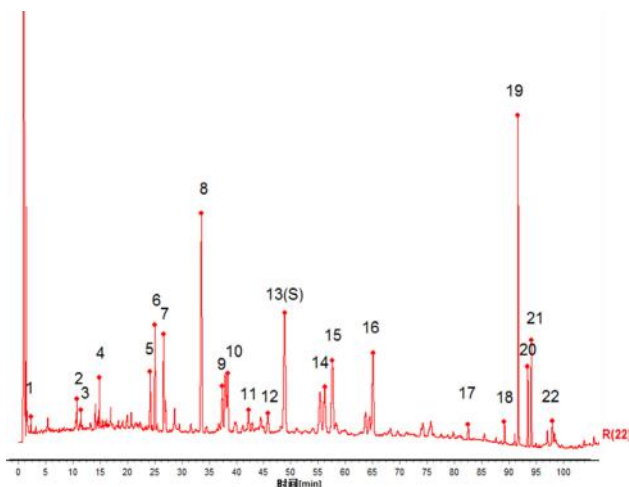


图 2 北柴胡药材对照指纹图谱

Fig 2 Reference fingerprint of *Bupleurum chinense*

2.6 化学模式识别分析

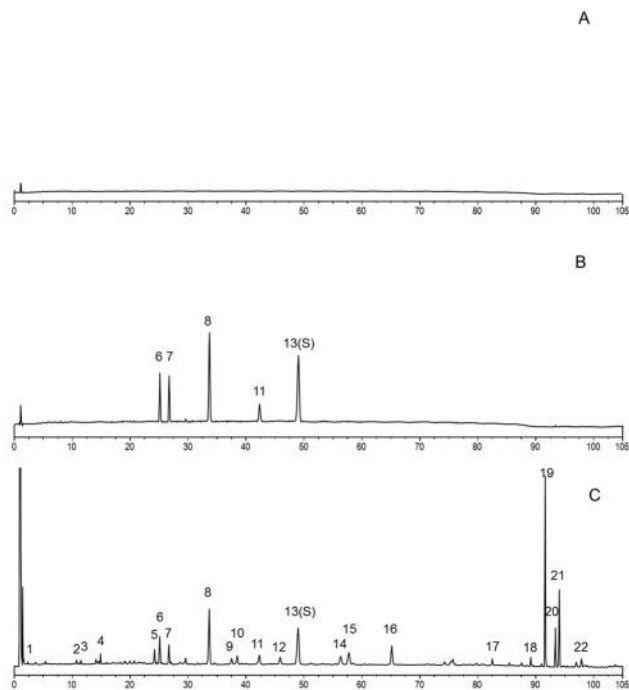


图 3 空白溶剂 (A)、对照品 (B) 和样品 (C) 的色谱图
Fig 3 Reference chromatogram of blank solvent (A), control (B) and sample (C)

6. 柴胡皂苷 c (saikosaponin c); 7. 柴胡皂苷 f (saikosaponin f); 8. 柴胡皂苷 a (saikosaponin a); 11. 柴胡皂苷 e (saikosaponin e); 13. 柴胡皂苷 d (saikosaponin d)

2.6.1 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》计算 16 批北柴胡药材与对照指纹图谱的相似度, 结果见表 1。16 批北柴胡药材与对照指纹图谱的相似度均大于 0.90, 除样品 S8 和 S9 外 (产地均为陕西), 其他 14 批样品与对照指纹图谱的相似度在 0.919 ~ 0.991, 可见不同产地的柴胡药材质量相对稳定。

表 1 16 批北柴胡样品相似度结果

Tab 1 Similarity evaluation of 16 batches of *Bupleurum chinense*

编号	产地	相似度	编号	产地	相似度
S1	山西长治	0.925	S9	陕西商洛	0.905
S2	山西运城	0.975	S10	陕西宝鸡	0.919
S3	山西长治	0.978	S11	河北邯郸	0.953
S4	山西长治	0.970	S12	河北邯郸	0.991
S5	山西运城	0.965	S13	河北保定	0.987
S6	山西闻喜	0.980	S14	甘肃兰州	0.984
S7	山西闻喜	0.946	S15	甘肃陇南	0.981
S8	陕西商洛	0.904	S16	甘肃陇南	0.985

2.6.2 CA 将 16 批样品的 22 个共有峰峰面积数据导入 SPSS 软件进行 CA, 采用组间连接法结合欧氏距离的方法对数据进行分析, 结果见图 4, 16 批柴胡药材大致可以被分成两大类 (山西一

类, 陕西、河北和甘肃为一类), 其中陕西、河北和甘肃 3 个产地的药材中陕西的药材可以单独分成一小类, 甘肃和河北的药材没有明显区分。不同产地的北柴胡药材虽然相似度较高, 但不同产地的北柴胡药材化学成分仍存在一定差异, 从热图可知, 22 个指纹特征峰在不同柴胡药材中存在一定差异 (见图 5)。

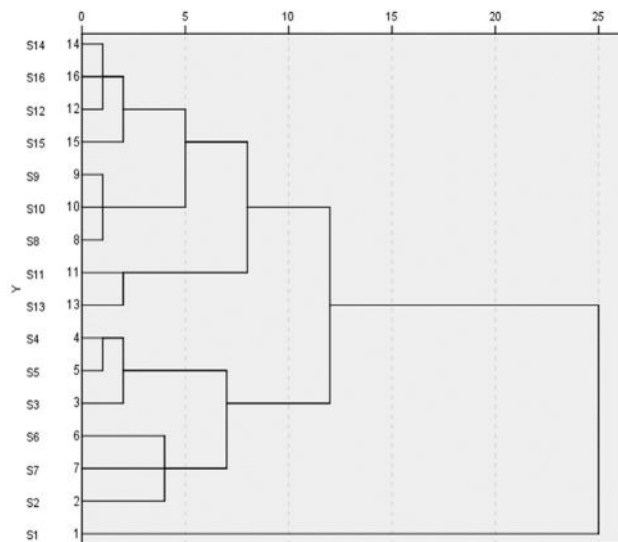


图 4 16 批北柴胡药材的聚类分析
Fig 4 Cluster analysis based on 16 batches *Bupleurum chinense*

2.6.3 PCA、PLS-DA 为寻找不同产地柴胡的质量差异成分, 将 16 批北柴胡样品的 22 个共有峰的峰面积导入 SIMCA-P14.1 软件进行 PCA, 得到 PCA 得分图, 再进行监督模式识别方法 PLS-DA 建模分析, 获得相应的模型^[22-24], 如图 6 所示。4 个产地的 16 批北柴胡药材聚类趋势明显, 可以分为三类, S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7 分为一类 (产地均为山西)、S8、S9、S10 分为一类 (产地均为陕西)、其余样品分为一类 (产地为甘肃和河北), 与聚类分析结果基本一致。

为进一步说明各个共有峰变量差异大小, 采用变量重要性投影 (VIP) 法筛选导致样品分类差异较大的成分, 各成分的 VIP 值见图 7。VIP 是筛选差异性化合物的重要指标, VIP 值越高, 对组间差异的影响越大。以 $VIP > 1$ 为标准, 筛选出对样品分类起关键性作用的 9 个成分, 按照 VIP 大小依次为色谱峰 6 (柴胡皂苷 c)、色谱峰 16、色谱峰 3、色谱峰 18、色谱峰 14、色谱峰 7 (柴胡皂苷 f)、色谱峰 8 (柴胡皂苷 a)、色谱峰 1、色谱峰 5, 这些成分初步拟订为不同产地柴胡药材质量差异的主要化学标志物。

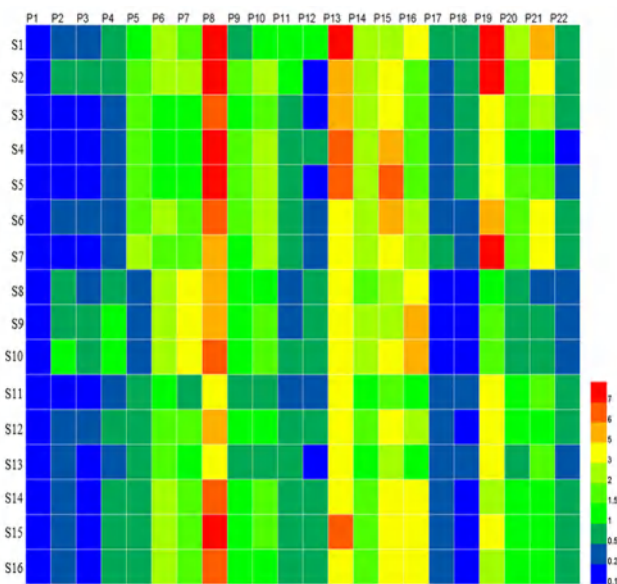


图 5 16 批北柴胡药材的 22 个指纹特征峰热图
Fig 5 Heat-map of 22 comment peaks in 16 batches *Bupleurum chinense*

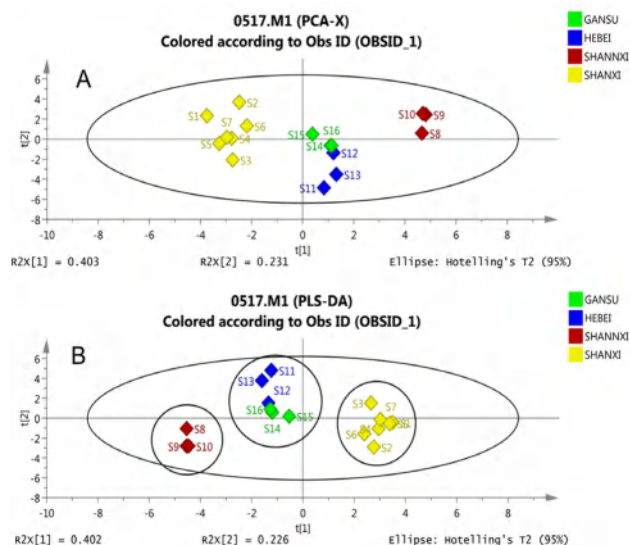


图 6 16 批北柴胡药材的 PCA (A) 和 OPLS-DA (B) 得分图
Fig 6 PCA (A) and OPLS-DA (B) scores plots from principle components analysis of *Bupleurum chinense*

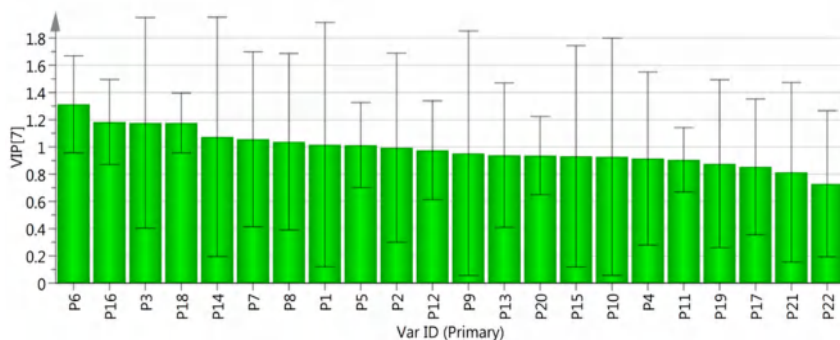


图 7 北柴胡 PLS-DA 的 VIP 值
Fig 7 PLS-DA VIP value diagram of *Bupleurum chinense*

3 讨论

建立药材系统、全面的指纹图谱是进行药材质量评价的有效办法之一^[25-26]。本研究建立了基于 HPLC-CAD 的柴胡指纹图谱方法，对收集于具有代表性地域的北柴胡药材进行全面成分表征及质量评价，能够表征出柴胡药材更加全面的色谱峰信息，特别是具有弱紫外吸收的皂苷类成分在 CAD 检测器下得到了良好的检测和分离。近年来，CAD 检测器因其自身特点，在中药皂苷类检测方面具有明显的优势而被广泛使用^[27-29]。

本研究采用指纹图谱结合相似度评价、CA、PCA 和 PLS-DA 等多元统计分析方法，对不同产地的柴胡药材进行分析评价，结果具有良好的一致性，说明此方法能够对药材质量进行全面反映，可以用作中药整体质量控制的有效方法^[24]。

北柴胡药材之间的相似度较高，但不同产地的北柴胡药材在成分含量上仍存在差异^[30-31]。本

研究建立的 HPLC-CAD 指纹图谱结合 PCA 分析表明不同产地北柴胡药材化学成分存在差异，同时利用 PLS-DA 分析筛选出造成不同产地北柴胡差异性的 9 个成分，其中包括 2020 年版《中国药典》一部项下柴胡药材的含量检测指标柴胡皂苷 a。后续还需对不同产地北柴胡药材成分含量差异进行更深入的研究，以期为北柴胡的质量控制以及资源利用提供依据。

综上所述，本文建立了一种简便、高效的 HPLC-CAD 指纹图谱方法，结合化学计量学方法可用于北柴胡药材差异分析及质量评价。所建立的 HPLC-CAD 指纹图谱可全面科学地为北柴胡药材质量评价体系建立提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 293.
[2] Ashour ML, Wink M. Genus *Bupleurum*: a review of its

- phytochemistry, pharmacology and modes of action [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 63 (3): 305-321.
- [3] Sun XP, Shi Z, Li TF, et al. Antidepressant like effects of total saikosaponins of *Bupleurum yinchowense* in mice [J]. *J Med Plants Re*, 2012, 6 (26): 4308-4016.
- [4] Fang W, Yang YJ, Guo BL, et al. Anti-influenza triterpenoid saponins (saikosaponins) from the roots of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, (27): 1654-1659.
- [5] Chiang LC, Ng LT, Liu LT, et al. Cytotoxicity and antihepatitis B virus activities of saikosaponins from *Bupleurum* species [J]. *Planta Med*, 2003, 69 (8): 705-709.
- [6] Guo H, Zhang Y, Cheng CY, et al. Comparison of the chemical profiles and inflammatory mediator-inhibitory effects of three Siegesbeckia herbs used as Herba Siegesbeckiae (Xixiancao) [J]. *Bmc Compleme Altern M*, 2018, 18 (1): 141.
- [7] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. *中草药*, 2016, 47 (22): 4085-4094.
- [8] 李凤丽, 李进, 吴娇, 等. 指纹图谱技术在中药领域研究中应用现状 [J]. *天津药学*, 2014, 26 (3): 52-57.
- [9] 王启帅, 杨云, 肖功胜, 等. 北柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及色谱数据的分析 [J]. *中成药*, 2011, 33 (3): 373-378.
- [10] 赵建军, 高晓娟, 雍婧姣, 等. 宁夏产柴胡药材与其对照药材的 HPLC 指纹图谱及近红外光谱比较 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (8): 50-56.
- [11] 丛梦雨, 龚彦溶, 梁莎碧, 等. HPLC-ELSD 指纹图谱分析提取与炮制对柴胡中化学成分的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (7): 13-17.
- [12] 颜倩, 蓝琪, 何晓燕, 等. HPLC-ELSD 指纹图谱分析柴胡配伍牡蛎后对柴胡皂苷类成分溶出的影响 [J]. *中国药师*, 2020, 23 (7): 1340-1344.
- [13] 周玥, 姚书扬, 吴斌, 等. 检测器的种类及其在药物分析中的应用 [J]. *中国医药指南*, 2015, 13 (12): 294-295.
- [14] 施磊, 马宇佳, 金燕. 电雾式检测器的应用进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2020, 47 (7): 514-521.
- [15] 李心怡, 蒋运斌, 马逾英. 电喷雾检测器在药物 HPLC 分析中的优势及应用进展 [J]. *中国药房*, 2017, 28 (15): 2152-2156.
- [16] 冯鑫, 程睿, 王珮玥, 等. 电喷雾检测器、蒸发光散射检测器与示差折光检测器测定食品中 5 种糖成分的方法比较 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12 (4): 1513-1518.
- [17] 白钢钢, 袁斐, 叶慧, 等. HPLC-CAD 法测定 4 种银杏叶制剂中萜类内酯类成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2019, 39 (6): 1102-1107.
- [18] 祝乃强, 刘金欣, 马桂云, 等. HPLC-CAD 同时测定骨疏康胶囊中 6 种成分的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (19): 42-46.
- [19] 邢晔忠, 宋韶锦. HPLC-CAD 法同时测定千柏鼻炎片中 7 个活性成分的含量 [J]. *中国药师*, 2020, 23 (6): 1216-1219.
- [20] 姚静, 孙欣光, 董蓉, 等. HPLC-CAD 一测多评法同时测定黄芪中 6 种成分含量 [J]. *药学学报*, 2021, 56 (2): 557-564.
- [21] 张春泥, 王英姿, 孙欣光, 等. HPLC-CAD 结合化学计量学的川楝子饮片指纹图谱研究 [J]. *药学学报*, 2017, 52 (3): 456-461.
- [22] 林林, 于凤蕊, 徐丽华, 等. 女金丸 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析 [J]. *中国药房*, 2019, 30 (10): 1339-1343.
- [23] 王玉勤, 范国荣. 基于指纹图谱结合多模式化学计量学方法评价补骨脂药材质量 [J]. *中草药*, 2021, 52 (4): 1143-1150.
- [24] 任明军, 胡云飞, 朱永波, 等. 基于色谱指纹图谱和含量测定相结合的青风藤质量控制方法研究 [J]. *中草药*, 2022, 53 (5): 1338-1344.
- [25] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. *中草药*, 2013, 44 (22): 3095-3104.
- [26] 王越欣, 苗雨露, 王梅, 等. 青翘和老翘的 HPLC 指纹图谱比较及聚类分析、主成分分析 [J]. *中国药房*, 2021, 32 (6): 663-668.
- [27] 南易, 郑伟, 马凤霞, 等. HPLC-CAD 同时测定知母中芒果苷和知母皂苷 B II 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41 (1): 111-116.
- [28] 马凤霞, 孙欣光, 张洁, 等. HPLC-CAD 同时测定知母根茎与须根中 5 种呋甾皂苷的含量 [J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44 (6): 642-646.
- [29] Xu XY, Wang SM, Wang HM, et al. Simultaneous quantitative assays of 15 ginsenosides from 119 batches of ginseng samples representing 12 traditional Chinese medicines by ultra-high performance liquid chromatography coupled with charged aerosol detector [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1655: 462504.
- [30] 叶耀辉, 史毅, 张博文, 等. 不同产地北柴胡药材的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (18): 124-129.
- [31] 侯会平, 赵士博, 于康平, 等. 北柴胡不同产地、不同采收期和不同炮制品中 6 种柴胡皂苷的含量测定 [J]. *药学学报*, 2018, 53 (11): 1887-1893.

(收稿日期: 2022-03-17; 修回日期: 2022-05-12)

吴茱萸碱通过 Stat3 信号通路增强鼻咽癌细胞的辐射敏感性

王桂华¹, 王妮拉², 阳帆帆¹, 宋颖辉³, 柴琴^{1*} (1.南华大学附属长沙中心医院, 长沙 410004; 2.福州肺科医院, 福州 350008; 3.湖南省人民医院, 长沙 410000)

摘要: 目的 探讨吴茱萸碱 (EVO) 对鼻咽癌 5-8F 和 6-10B 细胞辐射敏感性的影响及其作用机制。方法 CCK-8 法检测 EVO 对 5-8F 和 6-10B 细胞的毒性, 克隆集落形成实验评估 EVO 对 5-8F 和 6-10B 细胞的辐射敏感性, 流式细胞术检测细胞周期分布和细胞凋亡, 分析 EVO 对 5-8F 和 6-10B 细胞的辐射敏感性。结果 EVO 抑制鼻咽癌细胞增殖, 呈现时间和剂量依赖性。与照射组相比, 照射联合 EVO 组细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$)。5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EVO 对 5-8F 和 6-10B 细胞的辐射增敏比分别为 1.24 和 1.35。照射联合 EVO 组的 G₂/M 期细胞比例、凋亡细胞比例和活性氧产生明显高于照射组 ($P < 0.05$)。结论 EVO 抑制 5-8F 和 6-10B 细胞增殖并诱导 G₂/M 期细胞周期阻滞和凋亡, 提示 EVO 可能通过下调 Stat3 信号通路增强了鼻咽癌细胞的辐射敏感性。

关键词: 吴茱萸碱; 辐射敏感性; 鼻咽癌; Stat3 信号通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2259-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.009

Evodiamine enhances the radiosensitivity through the Stat3 signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells

WANG Gui-hua¹, WANG Ni-la², YANG Fan-fan¹, SONG Ying-hui³, CHAI Qin^{1*} (1. Changsha Central Hospital Affiliated to South China University, Changsha 410004; 2. Fuzhou Hospital of Pulmonary Disease, Fuzhou 350008; 3. Hunan People's Hospital, Changsha 410000)

Abstract: Objective To determine the effect of evodiamine (EVO) on the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma 5-8F and 6-10B cells and its mechanism. **Methods** CCK-8 assay was used to evaluate the cytotoxicity of the EVO on 5-8F and 6-10B cells. Colony-forming assay was used to evaluate the radiosensitivity of EVO to 5-8F and 6-10B cells. Flow cytometry was used to detect the cell cycle distribution and apoptosis to analyze the radiationsensitivity of EVO to 5-8F and 6-10B cells. **Results** EVO inhibited the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells in both time-and dose-dependent manner. Compared with the radiation therapy (RT) group, the RT combined EVO (EVO + RT) group significantly lowed ($P < 0.05$). The radiation sensitization ratios of 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EVO to 5-8F and 6-10B cells were 1.24 and 1.35. The G₂/M phase cell ratio, apoptotic cell ratio and reactive oxygen species (ROS) production in the EVO + RT group were significantly higher than those in the RT group ($P < 0.05$). Meanwhile, the pro-survival signaling pathway members including Stat3 of EVO + RT group were significantly decreased compared with the RT group ($P < 0.05$). **Conclusion** EVO can inhibit the proliferation and induce the cell cycle arrest in the G₂/M phase and apoptosis of 5-8F and 6-10B cells. EVO may enhance the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells via the downregulation of Stat3 signaling pathway.

Key words: evodiamine; radiosensitivity; nasopharyngeal carcinoma; Stat3 signaling pathway

基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目 (No.20201372); 湖南省中医药科研课题计划项目 (No.2019135); 长沙市科研计划项目 (No. kq1901014)。

作者简介: 王桂华, 男, 博士, 主任医师, 主要从事中药抗肿瘤作用机制研究, email: doctorwang_031@163.com *通信作者: 柴琴, 女, 副主任医师, 主要从事中药抗肿瘤作用机制研究, email: chaiqin9@126.com

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma) 主要见于北非、中东和亚洲, 尤其是我国的华南地区^[1]。在临床上, 大多数鼻咽癌都是低分化鳞状细胞癌或未分化癌^[2]。鼻咽癌易发生转移, 且鼻咽部结构复杂难以手术, 因此化学治疗和放射治疗已成为鼻咽癌治疗的主要方法, 且放射治疗是首选^[3]。近年来随着免疫治疗的出现和发展, 其逐渐成为复发和转移性鼻咽癌的一种可选治疗手段。此外, 放射治疗已经被证实能通过 DNA 损伤和旁路效应激活免疫系统, 从而提高免疫治疗疗效^[4-5]。放射治疗可以单独应用、联合化疗、联合靶向治疗以及联合免疫治疗等手段抗肿瘤, 表明放射治疗在鼻咽癌的治疗中起着至关重要的作用。虽然放射治疗技术在最近几年得到了极大的改善, 特别是调强放射治疗 (intensity-modulated radiation therapy, IMRT) 技术的应用^[6], 但仍然存在一定的瓶颈, 肿瘤细胞的辐射抗性造成鼻咽癌局部复发或转移的主要原因^[7]。因此, 迫切需要探索提高放射治疗敏感性的新药物, 从而提高患者的生存期。

引起鼻咽癌辐射抗性的机制非常复杂, 其中最主要的是信号转导子和转录激活子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, Stat3) 的异常激活。已证实 Stat3 信号通路的持续激活涉及肿瘤促进活动中的细胞增殖、转移、血管生成、宿主免疫逃避和对细胞凋亡的抵抗^[8-9]。Stat3 被持续激活并在鼻咽癌细胞的细胞核中表达^[10]。最近, 有报道称 Stat3 抑制剂 Stattic 增强了鼻咽癌的辐射敏感性^[11]。Stat3 抑制剂似乎是鼻咽癌细胞辐射敏感性的一种重要靶向抑制剂。

吴茱萸碱 (evodiamine, EVO) 是从芸香科植物吴茱萸中提取出的活性生物碱, 具有多重药理作用, 包括抗炎、降压、镇痛、抗过敏等^[12]。同时, EVO 具有抗前列腺癌、乳腺癌、黑素瘤和结肠癌等活性^[13]。然而, EVO 在鼻咽癌中对辐射敏感性的影响和潜在机制仍不清楚。本研究以鼻咽癌细胞 5-8F 和 6-10B 为对象, 探讨 EVO 对鼻咽癌细胞的辐射敏感性影响及其作用机制, 从而为鼻咽癌放射治疗提供新的增敏药物。

1 材料与方法

1.1 细胞系

鼻咽癌细胞系 5-8F 和 6-10B 从湘雅医学院细胞库获得^[14]。鼻咽癌细胞在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的培养基中生长。所有培养基均添加 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素 / 链霉素, 细胞在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$

的培养箱中培养。

1.2 试剂

EVO (上海爱必信生物科技有限公司), CCK-8 试剂盒 (日本熊本同仁化学研究所), AnnexinV/FITC 检测试剂盒 (北京佳美生物科技有限公司)。

1.3 细胞照射

细胞按分组在 6 MV X 线 (Varian Accelerator 600 C) 室温下在 $0 \sim 8 \text{ Gy}$ 内分别照射, 受照射的细胞与其他实验组平行运输, 剂量率: $250 \text{ MU} \cdot \text{min}^{-1}$, 照射野: $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$, 源皮距: 100 cm 。所有平板在再次照射时均涂上一层补偿胶。

1.4 CCK-8 检测细胞增殖

将指数生长期收集的鼻咽癌细胞接种在 96 孔板中, 每孔密度为 5000 个细胞, 分为对照组 (0.1% DMSO) 或 EVO 组 (不同浓度), 每组设置 5 个孔。EVO 组用 EVO 处理细胞 24 h、48 h 或 72 h 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂, 并将细胞继续培养 3 h, 用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度 (A) 值, 每组实验重复 3 次。

1.5 克隆集落形成实验检测细胞存活率

将细胞重新计数、接种到 6 孔板上, 密度为每孔 500 个细胞, 加 2 mL 培养基培养, 待培养 24 h 后进行分组, 实验分为对照组、EVO 组 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、照射组 (2、4、6、8 Gy) 以及 EVO 联合照射组。培养 48 h 后弃去培养基, 加入不含药物的新鲜培养基, 细胞继续培养 12 d 后, 用甲醇固定细胞、Giemsa 染色, 计算细胞数超过 50 个的集落视为克隆存活。每组实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测细胞周期和凋亡

对照组、EVO 组 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、照射组 (6 Gy) 及 EVO 联合照射组培养 24 h 后, 收集并固定在 70% 乙醇中, 4°C 保存 24 h。移去固定液后, 细胞用含 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PI 和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RNase 溶液 (Sigma Aldrich 试剂) 染色, 在室温条件下避光固定 30 min。然后使用 FACSuite 分析软件 (BD 生物科学) 对细胞周期分布进行精确分析, 对细胞周期不同阶段的细胞百分比进行统计和比较。每组实验重复 3 次。细胞分组及处理方法同前, 然后用 0.25% 胰蛋白酶消化、收集, 冰 PBS 洗涤 2 次, 用 $300 \mu\text{L}$ Binding Buffer 重悬, 加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin-V 和 $5 \mu\text{L}$ PI 避光染色 15 min, 在上机分析前加入 $200 \mu\text{L}$ Binding Buffer 重悬, 使用 FACSuite 分析软件对细胞凋亡情况进行分析, 每组实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测活性氧

使用活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒检测细胞 ROS 水平, 使用 FACSuite 分析软件分析 ROS 水平, 每组实验重复 3 次。

1.8 Western blot 法检测蛋白表达程度

首先加入细胞裂解液提取所有细胞蛋白, 然后使用 Micro BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度, 将总蛋白质 (20 μg) 上样到每个样孔中。使用以下抗体和稀释液用作上样对照: 抗 stat3 抗体 (1 : 1000)、抗磷酸化 stat3 抗体 (1 : 1000), 抗 GAPDH 抗体 (1 : 2000)。

1.9 统计学分析

每组数据均经过 3 次独立重复实验后得出, 实验结果用均数 ± 标准差表示, 用统计学软件 SPSS 进行数据分析。采用单因素方差分析对各组之间的差异进行统计显著性检验, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。图表使用 GraphPad Prism 5 软件生成, 放射生物学参数用 Sigmaplot 10.0 软件线性二次方程计算模型, 辐疗增敏比 (SER) D_0/D_q 由照射的细胞与 EVO 联合照射的细胞计算得出。

2 结果

2.1 EVO 对鼻咽癌细胞的抑制作用

用不同浓度的 EVO ($0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 5-8F 和 6-10B 细胞, 分别培养 24、48 和 72 h, 用 CCK-8 测定细胞活力, 结果见图 1。结果表明, 该药物对 5-8F 和 6-10B 细胞的增殖具有显著的抑制作用, 且呈时间依赖性。根据细胞增殖抑制实验, EVO 浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、培养 48 h 的细胞更接近 IC_{20} 值, 选择该浓度进行后续实验, 以验证 EVO 对鼻咽癌细胞辐射敏感性的影响和机制。5-8F 细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 (49.648 ± 8.394)、(9.378 ± 2.569)、(5.297 ± 1.476) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 6-10B 细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 (73.667 ± 10.285)、(15.289 ± 3.648)、(7.676 ± 2.574) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 EVO 对鼻咽癌细胞辐射敏感性的影响

与对照组相比, 5-8F 细胞照射组的存活率有所下降 (见图 2A)。此外, 在该细胞系中, EVO 联合照射组较照射组细胞存活率显著下降 ($P < 0.05$)。在 6-10B 细胞系也显示出同样的下降趋势 (见图 2B)。这些结果表明, EVO 可以增强对照射引起的细胞克隆形成的抑制作用, 导致 5-8F 和 6-10B 细胞的辐射敏感性增加。5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EVO 在 5-8F 和 6-10B 细胞上的 D_0 计算的 SER 分别为 1.24 和 1.35, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EVO 在 5-8F 和 6-10B 细胞上的 D_q 计算的 SER 分别为

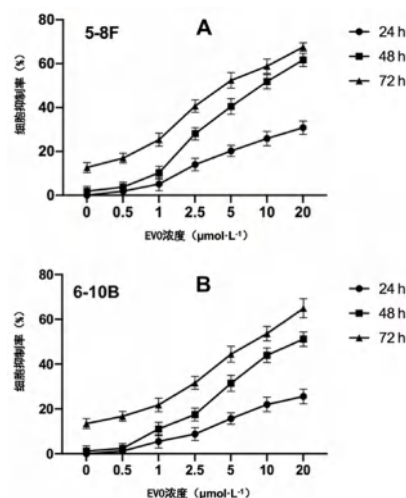


图 1 不同浓度 EVO 对鼻咽癌细胞的抑制率
Fig 1 Inhibitory rate of different concentrations of EVO on NPC cells
A.5-8F 细胞 (5-8F cell); B.6-10B 细胞 (6-10B cell)

2.26 和 1.60。

2.3 EVO 对鼻咽癌细胞周期分布的影响

一般认为细胞周期分布会影响细胞的辐射敏感性, 而 G_2/M 期是对照射最敏感的细胞周期^[15]。PI 染色结果表明, 与照射组相比, EVO 可诱导鼻咽癌细胞抑制在 G_2/M 期、EVO 联合照射可能会将更多鼻咽癌细胞阻滞在 G_2/M 期 ($P < 0.05$) (见图 3)。

2.4 EVO 对鼻咽癌细胞凋亡的影响

细胞凋亡是照射后引起细胞死亡的主要形式, 暴露于照射后的细胞凋亡是评估辐射敏感性的重要指标^[16]。PI/FITC-Annexin V 染色对细胞凋亡的分析表明, 与 EVO 组及照射组相比, EVO 可诱导鼻咽癌细胞凋亡, 而 EVO 联合照射可诱导更多细胞凋亡 ($P < 0.05$) (见图 4)。

2.5 EVO 对鼻咽癌细胞 ROS 水平的的影响

照射通过诱导 ROS 激活内源性细胞凋亡级联反应导致细胞凋亡^[16], ROS 的量可以部分反映照射引起的细胞死亡程度。ROS 水平检测显示 EVO 可以增加 ROS 的产生, EVO 联合照射较 EVO 组或照射组增加更多的 ROS 产生 ($P < 0.05$) (见图 5)。这些结果表明 EVO 和照射对 ROS 的产生具有协同作用。

2.6 EVO 对 X 线照射后 Stast3 的活化程度的影响

采用 Western blot 分析 EVO 联合照射后鼻咽癌细胞信号通路分子的变化。结果发现 Stat3 在 24 h 后被单剂量 6 Gy 照射激活。EVO 可以下调 5-8F 细胞和 6-10B 细胞中的磷酸化 -Stat3 的表达。此外, EVO 可以降低鼻咽癌细胞中 X 线照射后 Stat3 的活化程度 (见图 6)。

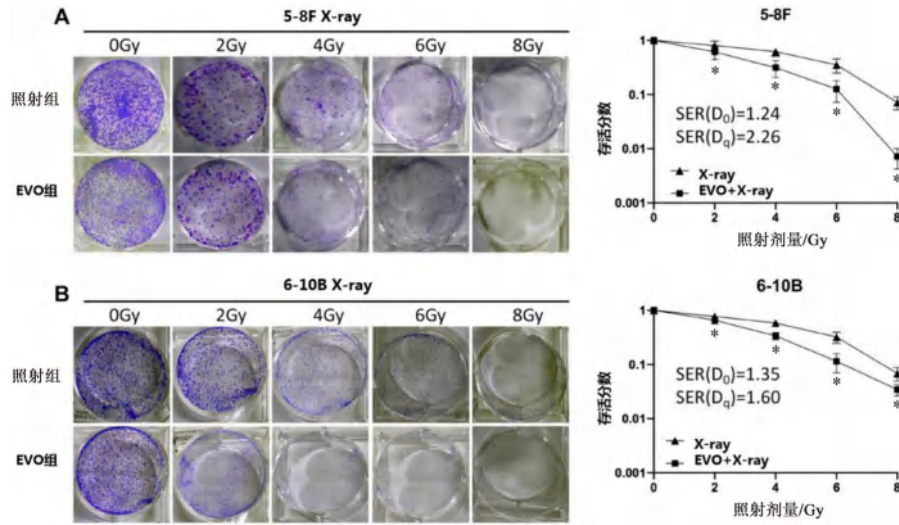


图 2 不同照射剂量对鼻咽癌细胞存活率的影响

Fig 2 Effect of different irradiation doses on the survival rate of NPC cells

A. 5-8F 细胞 (5-8F cell); B. 6-10B 细胞 (6-10B cell)

注 (Note): 与照射组比较, * $P < 0.05$ (compared with the X-ray group, * $P < 0.05$)

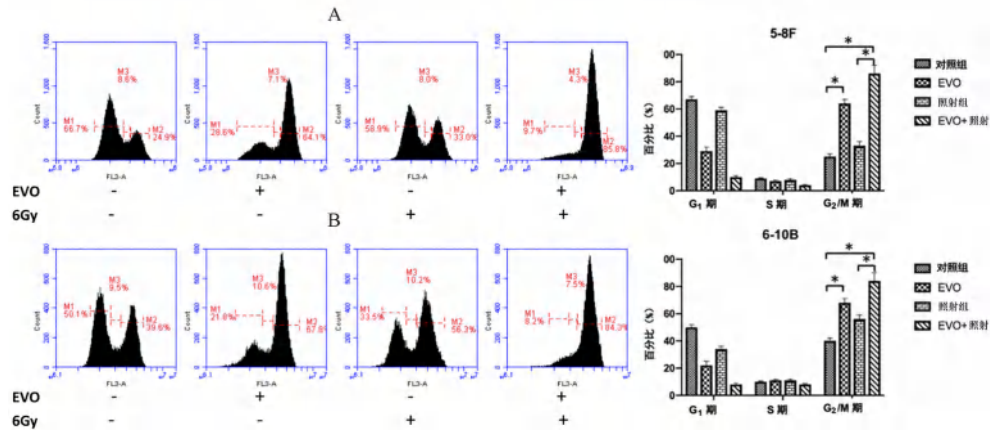


图 3 EVO 对鼻咽癌细胞周期分布的影响 (* $P < 0.05$)

Fig 3 Effect of EVO on the distribution of NPC cell cycle (* $P < 0.05$)

A. 5-8F 细胞 (5-8F cell); B. 6-10B 细胞 (6-10B cell)

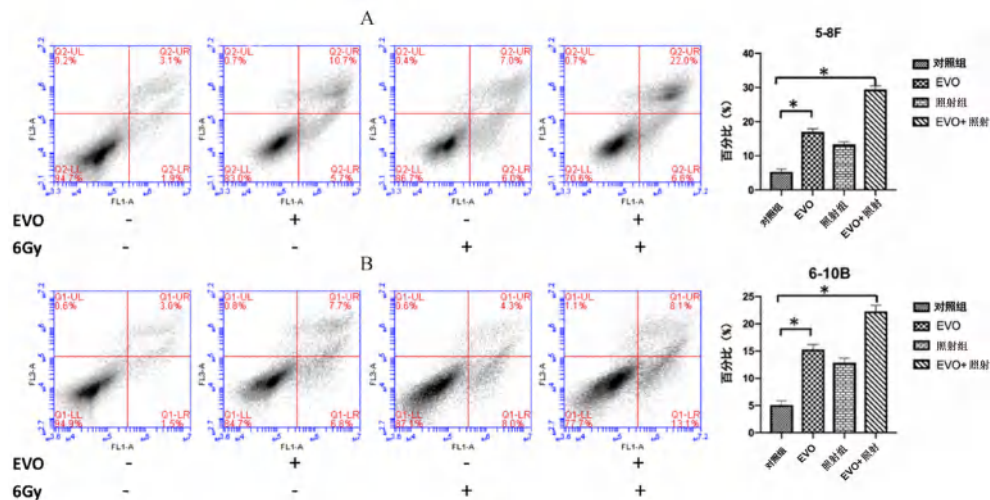


图 4 EVO 对鼻咽癌细胞凋亡的影响 (* $P < 0.05$)

Fig 4 Effect of EVO on apoptosis of NPC cells (* $P < 0.05$)

A. 5-8F 细胞 (5-8F cell); B. 6-10B 细胞 (6-10B cell)

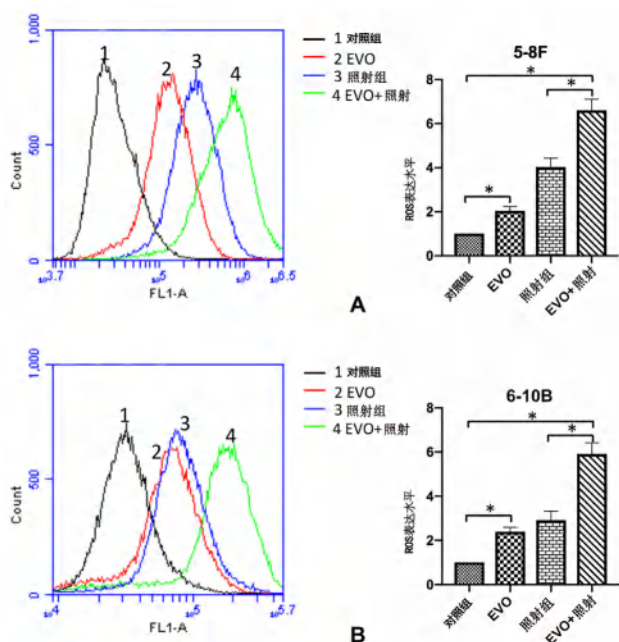


图 5 EVO 增强 X 线照射诱导鼻咽癌细胞 ROS 的表达水平 ($^*P < 0.05$)
Fig 5 EVO enhances the expression level of ROS in NPC cells induced by X-ray irradiation ($^*P < 0.05$)
A. 5-8F 细胞 (5-8F cells); B. 6-10B 细胞 (6-10B cells)

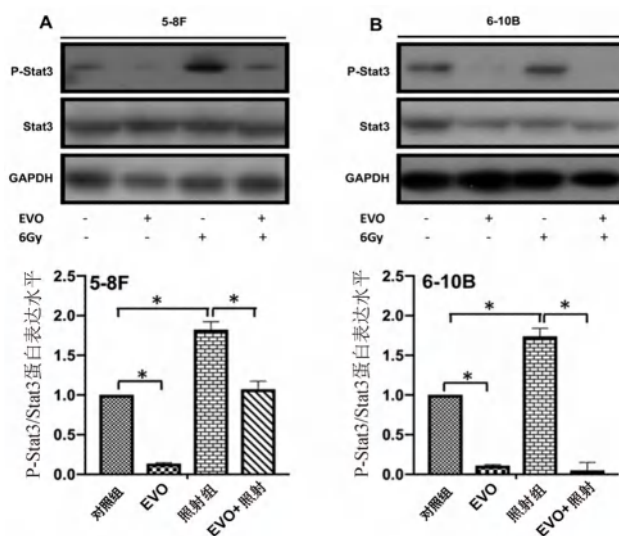


图 6 X 线照射后鼻咽癌细胞 Stat3 的活化程度 ($^*P < 0.05$)
Fig 6 Activation of Stat3 in NPC cells after X-ray irradiation ($^*P < 0.05$)
A. 5-8F 细胞 (5-8F cells); B. 6-10B 细胞 (6-10B cells)

3 讨论

辐射抗性是晚期鼻咽癌预后不良的主要原因^[2], 辐射增敏剂已被广泛探索以证明其在临床鼻咽癌中的应用价值。在本研究中, EVO 可抑制 5-8F 和 6-10B 细胞增殖, 诱导细胞周期阻滞于 G₂/M 期, EVO 增强了鼻咽癌细胞的辐射敏感性。

评估细胞存活最可靠方法之一是克隆集落形成实验, 这是检测辐射敏感性的金标准^[17]。本研究显示, EVO 联合照射组较照射组的细胞存活分

数显著降低, 因此, EVO 可能会对鼻咽癌细胞具有辐射增敏作用。多项研究表明 EVO 可以增强各种肿瘤细胞的辐射敏感性^[18-19]。EVO 通过下调 Her-2/AKT/Bcl-2 信号增强食管鳞状细胞癌 Eca-109 细胞和胃癌 BGC-823 细胞的辐射敏感性^[20], 这表明 EVO 的放射增敏作用可能在许多类型的癌症中普遍存在, 其在包括鼻咽癌在内的癌症中的机制值得广泛研究。肿瘤辐射敏感性与许多因素有关, 包括肿瘤微环境、细胞凋亡、细胞周期调控和 DNA 修复功能障碍^[21]。细胞凋亡是照射后细胞死亡的重要机制, 并且凋亡与肿瘤辐射敏感性成正相关^[16]。本研究中, EVO 联合照射组细胞的凋亡率较单纯照射组显著增加, 说明其对鼻咽癌细胞具有潜在的放射增敏作用, 具体相关机制有待进一步研究。G₂/M 期细胞对放射最敏感, 而 S 期细胞则具有放射抗性^[15]。本研究表明, 小剂量单独照射可以诱导鼻咽癌细胞进入 G₂/M 期, 且 EVO 联合照射可诱导更多鼻咽癌细胞阻滞于 G₂/M 期, 这可能是另一个潜在放射增敏作用机制。此外, ROS 也是公认的辐射敏感性指标。一般认为, 照射诱导的 ROS 的产生与照射后细胞的损伤直接相关^[22]。关于 EVO 与 ROS 的关系的研究较多, 但 EVO 是增加还是减少 ROS, 目前还没有一致的结论^[23-24]。在本研究中, 与对照组相比, 单独应用 EVO 可以显著增加 ROS 的产生, 与照射组或 EVO 组相比, EVO 预处理后照射组使鼻咽癌细胞 ROS 的产生显著增加。

值得注意的是, 照射后会触发一系列促生存信号通路, 从而导致细胞辐射抗性。以往的研究已明确了照射可以激活肺癌细胞中的 NF- κ B 和 P38/MAPK 信号通路^[25]。此外, 我们在鼻咽癌细胞中发现了类似的现象, 即 P-Stat3 在照射后表达上调。有大量研究表明 EVO 可以减少 Stat3 的激活^[26-27], 因此, 本研究探讨了 EVO 联合照射治疗是否可以减少照射对信号通路的激活, 发现单独应用 EVO 可以显著降低 P-Stat3 的表达, 联合照射可以抵消照射对 Stat3 的激活, 这与其他研究一致。推测 EVO 可能通过减少照射后促生存信号通路的激活来发挥放射增敏作用。

总之, EVO 可抑制鼻咽癌细胞增殖并诱导细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 且 EVO 增强了鼻咽癌细胞的辐射敏感性。基于本研究的发现, EVO 有望开发成为放射增敏剂的重要药物之一。但本研究仍存在不足之处, 具体 EVO 的放射增敏机制还有待进一步探讨, 包括其相关分子机制及信号传导通路等。

参考文献

- [1] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview [J]. *Int J Cancer*, 2021, 149 (4): 778-789.
- [2] Chen YP, Chan ATC, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10192): 64-80.
- [3] Wang S, Pan Y, Zhang R, et al. Hsa-miR-24-3p increases nasopharyngeal carcinoma radiosensitivity by targeting both the 3' UTR and 5' UTR of Jab1/CSN5 [J]. *Oncogene*, 2016, 35 (47): 6096-6108.
- [4] Campbell AM, Decker RH. Harnessing the immunomodulatory effects of radiation therapy [J]. *Oncology*, 2018, 32 (7): 370-374.
- [5] Nardone V, Pastina P, Giannicola R, et al. How to increase the efficacy of immunotherapy in NSCLC and HNSCC: role of radiation therapy, chemotherapy, and other strategies [J]. *Front Immunol*, 2018, 9 (2941): 1-5.
- [6] Fatima K, Andleeb A, Sofi MA, et al. Clinical outcome of intensity-modulated radiotherapy versus two-dimensional conventional radiotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: comparative study at SKIMS tertiary care institute [J]. *J Cancer Res Ther*, 2022, 18 (1): 133-139.
- [7] Yao JJ, Qi ZH, Liu ZG, et al. Clinical features and survival outcomes between ascending and descending types of nasopharyngeal carcinoma in the intensity-modulated radiotherapy era: a big-data intelligence platform-based analysis [J]. *Radiother Oncol*, 2019, 137 (12): 137-144.
- [8] 桂孟炫, 黄彬, 王瑞国, 等. 齐墩果酸通过调控 IL-6/STAT3 信号通路影响结肠癌细胞的增殖和凋亡 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (3): 444-449.
- [9] Wang T, Niu G, Kortylewski M, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (1): 48-54.
- [10] Lui V, Wong E, Ho Y, et al. STAT3 activation contributes directly to Epstein-Barr virus-mediated invasiveness of nasopharyngeal cancer cells in vitro [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125 (8): 1884-1893.
- [11] Pan Y, Zhou F, Zhang R, et al. Stat3 inhibitor Stattic exhibits potent antitumor activity and induces chemo- and radio-sensitivity in nasopharyngeal carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (1): e54565.
- [12] Yu H, Jin H, Gong W, et al. Pharmacological actions of multi-target-directed evodiamine [J]. *Molecules*, 2013, 18 (2): 1826-1843.
- [13] Zhang Y, Wu LJ, Tashiro SI, et al. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25 (1): 83-89.
- [14] Wang Z, Xiang YG, Zhang Z, et al. Pharmacological inhibition of GSK3 promotes TNF α -induced GM-CSF via up-regulation of ERK signaling in nasopharyngeal carcinoma (NPC) [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106447.
- [15] Liu C, Nie J, Wang R, et al. The cell cycle G₂/M block is an indicator of cellular radiosensitivity [J]. *Dose Response*, 2019, 17 (4): 1-7.
- [16] Xie XH, Zheng WL, Chen T, et al. CDK4/6 inhibitor palbociclib amplifies the radiosensitivity to nasopharyngeal carcinoma cells via mediating apoptosis and suppressing DNA damage repair [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 11107-11117.
- [17] Miyamoto A, Shibamoto Y, Sugie C, et al. Absence of radioadaptive responses in four cell-lines in vitro as determined by colony formation assay [J]. *Kurume Med J*, 2006, 53: 1-5.
- [18] 汉媛媛, 张凯亮, 高雪翔, 等. 吴茱萸碱不同加药时序对胃癌 SGC7901 细胞辐射敏感性的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27 (10): 1723-1727.
- [19] 冯蕊. 甘氨双唑钠和吴茱萸碱对 Tca-8113 细胞放射增敏作用的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [20] Hu CQ, Gao XX, Han YY, et al. Evodiamine sensitizes BGC-823 gastric cancer cells to radiotherapy in vitro and in vivo [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (1): 413-419.
- [21] Chen H, Wei L, Luo M, et al. PAD4 inhibitor promotes DNA damage and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36 (11): 2291-2301.
- [22] Zhou J, Ding J, Ma X, et al. The NRF2/KEAP1 pathway modulates nasopharyngeal carcinoma cell radiosensitivity via ROS elimination [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 9113-9122.
- [23] Shi Y, Hua Q, Li N, et al. Protective effects of evodiamine against LPS-induced acute kidney injury through regulation of ROS-NF- κ B-mediated inflammation [J]. *Evi Based Complement Alternat Med*, 2019, 1: 1-9.
- [24] Yang J, Wu LJ, Tashiro SI, et al. Protein tyrosine kinase pathway-derived ROS/NO productions contribute to G₂/M cell cycle arrest in evodiamine-treated human cervix carcinoma HeLa cells [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44 (7): 792-802.
- [25] Song YH, Chai Q, Wang NL, et al. X-rays induced IL-8 production in lung cancer cells via p38/MAPK and NF- κ B pathway [J]. *Int J Rad Biol*, 2019, 96 (6): 1-23.
- [26] Peng X, Zhang Q, Zeng Y, et al. Evodiamine inhibits the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells in vitro via repressing MMP-2 expression [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76 (6): 1173-1184.
- [27] Yang J, Cai X, Lu W, et al. Evodiamine inhibits STAT3 signaling by inducing phosphatase shatterproof 1 in hepatocellular carcinoma cell [J]. *Cancer Lett*, 2013, 328 (2): 243-251.

(收稿日期: 2022-05-08; 修回日期: 2022-07-02)

补阳还五汤治疗阿尔茨海默病的网络药理学研究及实验验证

李金尧¹, 王雅梦¹, 雷震², 赵晨宇¹, 董晓红², 刘国良², 张宁^{1, 2*}, 刘斌^{2*} (1.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: **目的** 基于网络药理学和动物实验, 探讨补阳还五汤 (BYHWD) 治疗阿尔茨海默病 (AD) 的作用机制。**方法** 通过 TCMSP、HERB 数据库和文献检索筛选 BYHWD 的活性成分和作用靶点; 运用 UniProt 校正作用靶点基因名, SwissADME 和 SwissTargetPrediction 平台预测地龙作用靶点; 利用 OMIM、TTD、DisGeNET、HPO 数据库获取 AD 的相关靶点, 借助 Venny 平台选取 BYHWD 与 AD 的交集靶点; 采用 STRING 11.5 在线数据库构建 PPI 网络; 使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“组方药材-活性成分-疾病靶点”网络图; 通过 Metascape 数据库对交集靶点进行 GO 注释和 KEGG 通路富集分析, 借助微生信平台将其可视化。动物实验通过新物体识别、避暗实验检测 APP/PS1 小鼠学习记忆能力; 苏木精-伊红染色观察海马神经元细胞形态; 免疫组化法检测海马中 RAGE、LRP1、ApoE 和 VCAM-1 蛋白表达。**结果** 筛选出 163 个 BYHWD 抗 AD 的潜在靶点, 如 ApoE、VCAM-1, 主要富集在癌症、AD、胆固醇代谢、脂质和动脉粥样硬化、AGE-RAGE 等信号通路; 行为学实验显示 BYHWD 给药后 APP/PS1 小鼠的新物体识别指数有所改善、避暗潜伏期增长, 错误次数减少; HE 染色显示 BYHWD 可以改善海马形态结构; IHC 结果显示, 给药后海马 LRP1、ApoE 表达水平升高, RAGE、VCAM-1 表达水平降低。**结论** 本文结合动物实验对网络药理学预测结果进行验证, 发现 BYHWD 可能通过调控 RAGE/LRP1 转运体改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆障碍。

关键词: 补阳还五汤; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 血脑屏障; RAGE/LRP1 转运体

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2265-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.010

Network pharmacology research and experimental verification of Buyang Huanwu decoction for Alzheimer's disease

LI Jin-yao¹, WANG Ya-meng¹, LEI Xia², ZHAO Chen-yu¹, DONG Xiao-hong², LIU Guo-liang², ZHANG Ning^{1, 2*}, LIU Bin^{2*} (1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Jiamusi of College, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Jiamusi Heilongjiang 154007)

Abstract: Objective To determine the mechanism of action of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) against Alzheimer's disease (AD) based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** The active components and targets of BYHWD were screened by TCMSP, HERB database and literature search. The target gene names were corrected by UniProt, and the targets of earthworm were supplemented by the SwissADME and SwissTargetPrediction platforms. The OMIM, TTD, DisGeNET, and HPO databases were used to obtain the AD-related targets, and the Venny platform was used to select the intersection targets of BYHWD and AD. The PPI network was constructed by using the STRING online database. The network of "recipe herbs-active ingredients-disease targets" was constructed by Cytoscape 3.7.2 software. GO annotation and KEGG pathway enrichment analysis were performed on the intersection targets through the Metascape database, and were visualized with

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (No. H2018058, No. LH2020H101); 黑龙江省中医药管理局科研课题 (No. ZHY202087); 黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划 (No. 2018RCD19); 黑龙江中医药大学基金项目 (No.2017xy04, No.2018pt04, No. 2017SEC02)。

作者简介: 李金尧, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药防治精神性疾病的研究, email: 2659230898@qq.com *通信作者: 张宁, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究, email: zhangning0454@163.com; 刘斌, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中医药防治老年性疾病的研究, email: liubin169@163.com

the help of the WeChat. In animal experiments, the learning and memory ability of APP/PS1 mice was detected by novel object recognition and dark avoidance experiments. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphology of hippocampal neurons. Immunohistochemical (IHC) method was used to detect hippocampal RAGE, LRP1, ApoE and VCAM-1 protein expression. **Results** BYHWD has 118 active components, of which 163 intersected with AD, which were mainly enriched in cancer, Alzheimer's disease, cholesterol metabolism, lipid and atherosclerosis, AGE-RAGE signaling pathways, etc. The behavioral experiments showed that the novel object recognition index of APP/PS1 mice was improved after the BYHWD administration, the dark avoidance latency increased, and the number of mistakes decreased. HE staining showed that BYHWD improved the morphological structure of the hippocampus. IHC showed that the expression levels of LRP1 and ApoE in the hippocampus were increased. While the expression levels of RAGE and VCAM-1 were decreased after the administration. **Conclusion** Network pharmacology combined with animal experiments has been verified. BYHWD may improve the learning and memory impairment of APP/PS1 mice by regulating the RAGE/LRP1 transporter.

Key words: Buyang Huanwu decoction; Alzheimer's disease; network pharmacology; blood-brain barrier; RAGE/LRP1 transporter

补阳还五汤 (BYHWD) 为传统中药方剂, 由生黄芪、当归尾、赤芍、川芎、地龙、桃仁、红花组成, 具有补气养血、通经活络的作用, 临床上常用于治疗血管性痴呆、动脉粥样硬化等心脑血管疾病^[1-2]。有研究表明, BYHWD 对阿尔茨海默病 (AD) 也具有较好的治疗效果, 但其作用机制尚不明确^[3-4]。网络药理学以生物数据库及组学实验数据为基础, 融合多学科原理和技术, 可以预测参与机体生物学过程的作用靶点和通路途径, 为揭示中医药疗效的多靶点机制研究提供新的方法和思路^[5]。Qu 等^[6]发现黄芪甲苷可以降低血脑屏障 (BBB) 的通透性, 减少外周有毒物质进入大脑, 保护神经元。因此推测 BYHWD 的神经保护作用可能与 BBB 有关, 通过网络药理学预测 BYHWD 治疗 AD 的作用机制, 并用动物实验对网络药理学结果进行验证, 探讨 BYHWD 如何达到治疗 AD 的效果。

1 材料

1.1 仪器与试药

新物体识别设备 (货号: RD1121-NR-M)、避暗设备 (货号: RD1106-SB-M) (上海移数); 光学显微镜 (货号: IX-71-21PH, 奥林巴斯); 转轮式切片机 (货号: RM2016, 德国 LEICA)。苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号: C0105S, 碧云天生物技术); 兔抗-晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 多克隆抗体 (货号: 125422)、兔抗-低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP1) 多克隆抗体 (货号: 124368)、兔抗-血管内皮细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 多克隆抗体 (货号: 11989)、兔抗-

载脂蛋白 E (ApoE) 多克隆抗体 (货号: 119748) (爱必信); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (货号: PV-6001, 中杉金桥); 山羊血清 (货号: SL038, 北京 Solarbio); 二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (货号: W026, 南京建成); 盐酸多奈哌齐 (货号: S60449, 源叶生物); 生黄芪、当归尾、赤芍、川芎、地龙、桃仁、红花均购自黑龙江中医药大学附属第一医院, 由黑龙江中医药大学实验中心田明教授鉴定生黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 当归尾为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hor 的干燥根茎, 地龙为巨蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体, 桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子, 红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。取生黄芪 1200 g、当归尾 60 g、赤芍 45 g、川芎 30 g、地龙 30 g、桃仁 30 g、红花 30 g 制备成 BYHWD 水煎剂, 经冷冻干燥制为干粉, 出粉率是 34.11%, 得到干粉 486 g, 于 4 °C 冰箱密封保存备用。

1.2 实验动物

APP/PS1 双转基因小鼠和 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 [北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK (京) 2015-0001 号], 雄性, 7 月龄, 体质量为 (40 ± 10) g。于无菌环境饲养, 温度保持在 (21 ± 1) °C, 相对湿度 (60 ± 10) %, 动

物自由饮水进食。

1.3 数据库及软件

TCMSP 数据库 (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>), HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>), UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>), SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>), SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>), OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>), DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>), HPO 数据库 (<https://hpo.jax.org/>), STRING 11.5 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>), Cytoscape 3.7.2 软件。

2 方法与结果

2.1 网络药理学

2.1.1 BYHWD 成分收集及靶点预测 运用 TCMSP、HERB 数据库筛选黄芪、当归、赤芍、川芎、桃仁、红花的化学成分信息,以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 为标准筛选有效成分和作用靶点。由于 TCMSP 数据库未收录地龙, HERB 数据库相关化学成分信息较少,其化学成分信息通过文献检索获得,在 SwissADME 平台以可透过 BBB、胃肠道吸收活性高、“Druglikeness”项有两个及以上“Yes”为标准筛选有效成分,通过 SwissTargetPrediction 平台预测其作用靶点,用 UniProt 数据库校正为官方基因名。共收集到 BYHWD 活性成分 118 个,其中黄芪 20 个、当归 2 个、赤芍 29 个、川芎 7 个、桃仁 23 个、红花 22 个、地龙 15 个,删除重复值后得到 744 个作用靶点。

2.1.2 AD 靶点预测 分别登录 TTD、OMIM、DisGeNET、HPO 数据库,以“Alzheimer’s disease”为关键词搜索 AD 的作用靶点,将四个数据库得到的靶点整合取交集,并用 UniProt 数据库校正为官方基因名,最终整理出 1607 个 AD 作用靶点。

2.1.3 BYHWD 抗 AD 潜在靶点的筛选 将 BYHWD 的作用靶点和 AD 作用靶点分别录进 Venny 作图工具,取交集,得到 163 个 BYHWD 抗 AD 的潜在作用靶点,潜在作用靶点对应 BYHWD 的 89 个活性成分。

2.1.4 PPI 网络的构建 将潜在作用靶点上传至 STRING 11.5 数据库,将蛋白种属设置为“Homo sapiens”,其余设置默认,进行 PPI 网络的构建和分析,利用 Cytoscape 3.7.2 可视化处理,见图 1。如图 1 所示,该交互网络中有 163 个节点和 2103 个连线(颜色越深、节点越大表示连接度越高)。

2.1.5 “组方药材-活性成分-疾病靶点”网络图的构建 运用 Cytoscape 3.7.2 软件将 7 个组方药材、89 个活性成分、163 个交集靶点构建组方药材-活性成分-疾病靶点网络图,见图 2(颜色越深、节点越大表示节点越重要)。

2.1.6 GO 及 KEGG 富集分析 将潜在作用靶点输入 Metascape 基因富集在线工具,限定物种为“Homo sapiens”,进行 GO 及 KEGG 富集分析,以 $P < 0.05$ 筛选排名前 10 的信息作 GO 柱状图和 KEGG 气泡图,借助微生信平台将其可视化。GO 富集结果表示,生物过程主要涵盖激酶活性调节、蛋白质磷酸化正调节、细胞对氮化合物的反应、MAPK 级联调节等;细胞成分主要包括树突、树突树、突触后膜等;分子功能主要涉及蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性、激酶活性等(见图 3)。KEGG 富集分析发现癌症、AD、胆固醇代谢、脂质和动脉粥样硬化、AGE-RAGE 信号通路等与 AD 密切相关(见图 4)。

2.2 动物实验

2.2.1 动物分组及给药 实验小鼠随机分为 6 组,20 只 C57BL/6J 小鼠作为对照组,APP/PS1 双转基因小鼠按照每组 20 只,随机分为模型组,阳性药多奈哌齐组, BYHWD 高剂量、中剂量和低剂量组。模型组和对照组每日灌胃同样体积的生理盐水,多奈哌齐组小鼠灌胃 0.001 g/(kg·d) 剂量的多奈哌齐, BYHWD 高剂量、中剂量和低剂量组分别灌胃 37.06、18.53、9.26 g/(kg·d) 剂量的 BYHWD(生药量),灌胃持续 35 d。

2.2.2 新物体识别实验 将两个完全相同的物体放置在旷场箱内,距离为 25 cm,放入小鼠让其自由探索 10 min,取出,将其中一个物体替换为不同颜色、形状和材质的新物体。让小鼠休息 5 h 后,再放在与上次一样的位置,自由移动 10 min。记下对新鲜物体的探索时间 (T_n) 和熟悉物体的探索时间 (T_f),用识别指数 (T_i) [$T_i = T_n / (T_n + T_f) \times 100\%$] 表示小鼠对物体识别的能力,结果见表 1。与对照组相比,模型组小鼠的新物体识别指数下降 ($P < 0.001$);与模型组相比, BYHWD 各剂量组新物体识别指数上升 ($P < 0.001$)。

2.2.3 避暗实验 训练前将小鼠背向洞口放置于明室,适应 2 min 后,暗室通 40 V 电流,记录下每只小鼠潜伏期(即小鼠第一次进入暗室的时间)。每次训练 5 min,每日训练 3 次,连续训练 2 d 以改善小鼠的避暗行为。若小鼠在 5 min 内没有入洞,则弃去。24 h 后开始测试,记录小鼠的避暗潜伏期和 5 min 内的进入次数(即错误次数)。结果见表 2。与对照组相比,模型组小鼠避暗潜

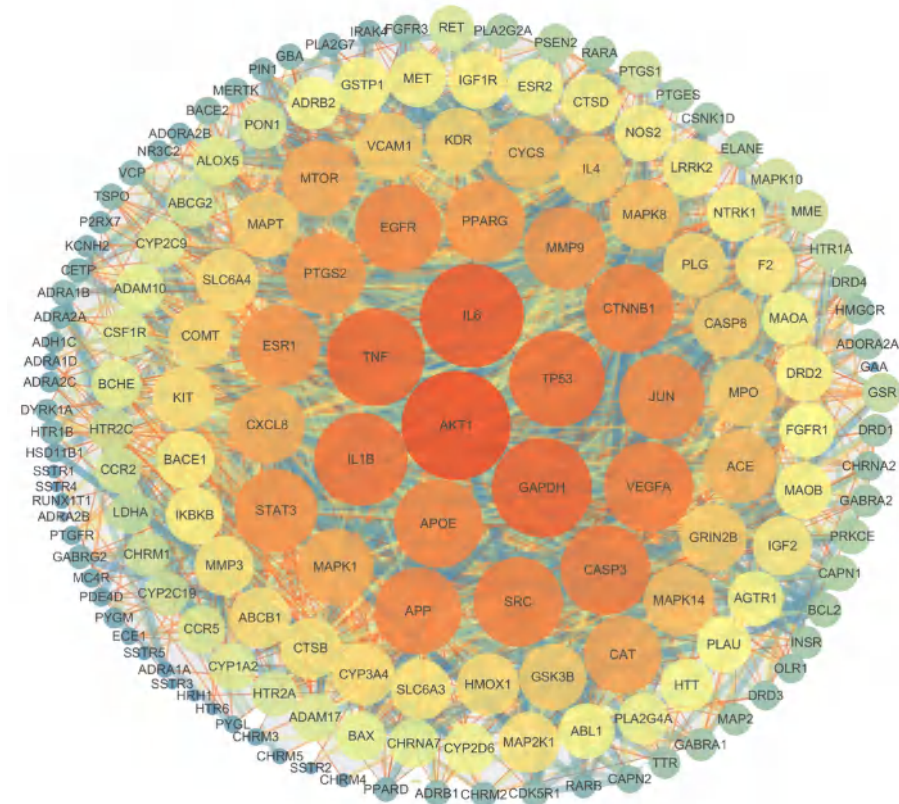


图 1 BYHWD 抗 AD 作用靶点的 PPI 网络

Fig 1 PPI network of anti-AD targets of BYHWD

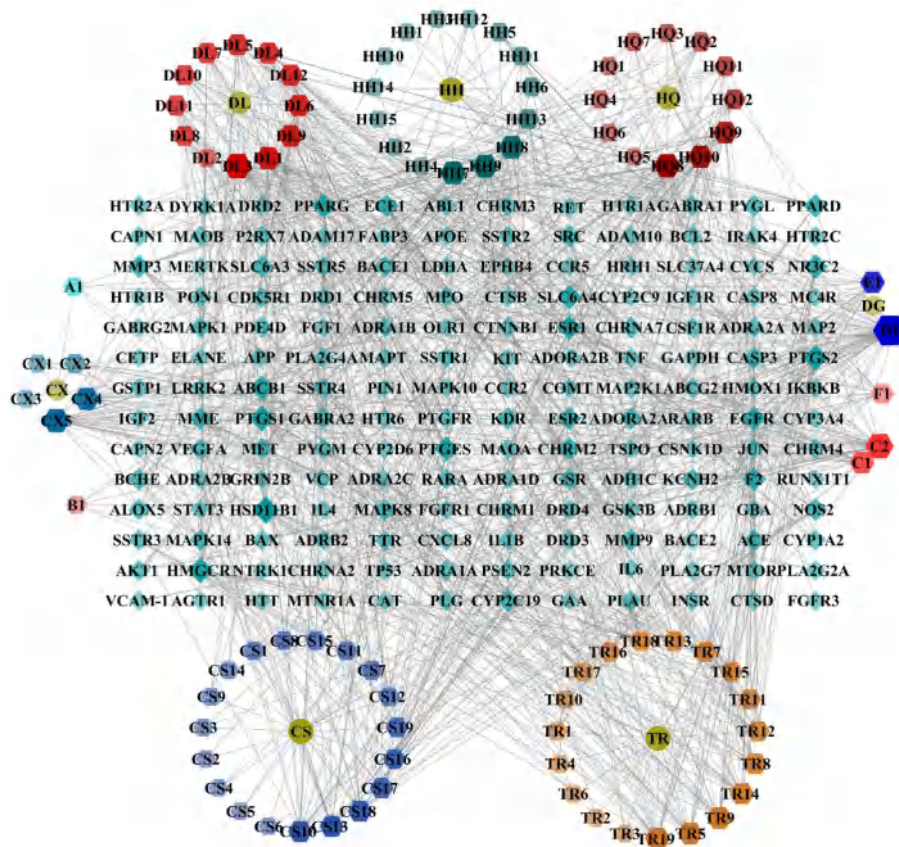


图 2 组方药材 - 活性成分 - 疾病靶点网络

Fig 2 Medicinal material-active ingredient-disease target network

表 1 BYHWD 对 APP/PS1 小鼠新物体识别实验的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 1 Effect of BYHWD on novel object recognition experiments in the APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	识别指数 /%
对照组	37.59 ± 2.15
模型组	14.94 ± 2.29***
多奈哌齐组	29.73 ± 1.89###
BYHWD 高剂量组	32.47 ± 2.02###
BYHWD 中剂量组	31.39 ± 1.78###
BYHWD 低剂量组	25.10 ± 1.68###

注: 与对照组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, ### $P < 0.001$ 。

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

伏期减短, 错误次数增多 ($P < 0.001$); 与模型组相比, BYHWD 各剂量组避暗潜伏期增长, 错误次数减少 ($P < 0.001$)。

表 2 BYHWD 对 APP/PS1 小鼠避暗实验的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 2 Effect of BYHWD on dark avoidance experiments in the APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	避暗潜伏期 /s	错误次数
对照组	263.43 ± 14.55	1.15 ± 0.32
模型组	124.00 ± 20.11***	2.80 ± 0.48***
多奈哌齐组	234.54 ± 20.20###	1.61 ± 0.31###
BYHWD 高剂量组	228.17 ± 17.10###	1.68 ± 0.30###
BYHWD 中剂量组	220.35 ± 17.34###	1.78 ± 0.20###
BYHWD 低剂量组	212.72 ± 17.26###	1.79 ± 0.27###

注: 与对照组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, ### $P < 0.001$ 。

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

表 3 BYHWD 对 APP/PS1 小鼠海马 RAGE、LRP1、ApoE 及 VCAM-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 3 Effect of BYHWD on the expressions of RAGE, LRP1, ApoE and VCAM-1 in the hippocampus of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	RAGE	LRP1	ApoE	VCAM-1
对照组	22.75 ± 1.45	86.86 ± 3.37	42.55 ± 3.20	48.29 ± 10.59
模型组	48.79 ± 3.11***	12.39 ± 1.05***	8.72 ± 1.94***	363.30 ± 5.28***
多奈哌齐组	26.03 ± 2.35###	67.80 ± 4.04###	33.58 ± 1.91###	123.50 ± 1.20###
BYHWD 高剂量组	24.03 ± 1.04###	48.74 ± 3.17###	25.03 ± 2.57###	64.51 ± 2.48###
BYHWD 中剂量组	34.07 ± 3.48###	25.56 ± 2.13###	18.54 ± 1.82###	182.90 ± 10.90###
BYHWD 低剂量组	32.83 ± 2.36###	35.36 ± 0.57###	15.05 ± 1.39###	234.60 ± 25.50###

注: 与对照组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, ### $P < 0.001$ 。

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

2.3 数据处理

采用统计学软件 SPSS 18.0 分析处理实验数据, 均值加减标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行表示, 实验数据符合正态分布, 方差齐, 采用单因素方差分析进行比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

气虚血瘀, 脑络瘀阻, 脑失濡养是 AD 发生发展的重要病机, 与之相适应, 益气活血通络为其主要治则^[7]。BYHWD 中君药黄芪补气行血, 臣药当归活血祛瘀, 佐以赤芍、川芎、桃仁、红花

2.2.4 HE 染色 取出海马组织, 4% 多聚甲醛固定 48 h, 梯度乙醇及二甲苯脱水, 每步 15 ~ 20 min, 石蜡包埋备用。切片后用苏木素 - 伊红进行染色、封片, 在显微镜下观察小鼠海马的病理学改变, 结果见图 5。对照组小鼠海马 CA1 区细胞体积较大, 结构清晰, 染色均匀。模型组 CA1 区细胞数量少, 体积小, 胞质不丰富, 可见空泡类物质。多奈哌齐组细胞与模型组相比数量较多, 排列紧密, 结构清晰。BYHWD 高剂量组 CA1 区细胞数量多, 体积大, 结构清晰; BYHWD 中剂量组 CA1 区细胞略多, 体积略大, 结构清晰; BYHWD 低剂量组 CA1 区细胞排列分散无序, 结构不清晰。

2.2.5 IHC 法 取海马组织切片进行脱蜡、脱水, 抗原修复后用 3% H_2O_2 孵育 10 min, PBS 清洗 3 次; 滴加血清封闭 20 min, 弃去血清; 加入 50 μ L PBS 稀释过的一抗 (1 : 300), 室温静置 1 h, PBS 清洗 3 次; 滴加 50 μ L 二抗 (1 : 500), 室温静置 30 min, PBS 清洗 3 次; DAB 显色 5 ~ 10 min, 流水冲洗终止显色; 苏木精复染, 脱水、透明、封片。显微镜观察海马区 RAGE、LRP1、ApoE 和 VCAM-1 阳性细胞, 利用取上不取下的方法对压边线的细胞计数。结果见表 3 及图 6, 与对照组相比, 模型组 LRP1、ApoE 阳性细胞数表达降低, RAGE、VCAM-1 阳性细胞数表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与模型组相比, BYHWD 各剂量组 LRP1、ApoE 阳性细胞数表达增加, RAGE、VCAM-1 阳性细胞数表达显著降低 ($P < 0.001$)。

助当归活血化瘀, 地龙通经活络, 全方共奏补气、活血、化瘀通络之效。已有研究证实 BYHWD 对 AD 有很好的作用^[3-4], 但作用机制尚不明确。而祛瘀通络药可以通过改善 BBB 对脑源性疾病进行治疗^[8]。BYHWD 作为祛瘀通络药, 很有可能通过改善 BBB 治疗 AD, 本文运用网络药理学和动物实验探究 BYHWD 治疗 AD 的作用机制。

与前期 BYHWD 网络药理学研究相比^[9], 本文补充了 AD 靶点, 通过文献检索等方法丰富了组方药材的活性成分及作用靶点, 将 BYHWD 抗

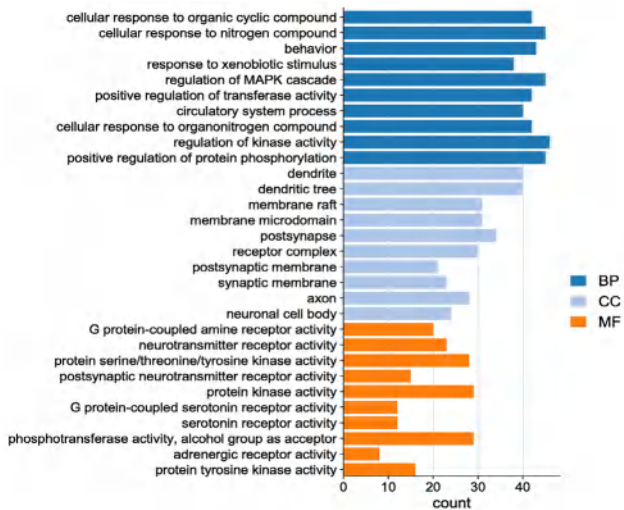


图 3 GO 富集分析结果

Fig 3 GO enrichment analysis

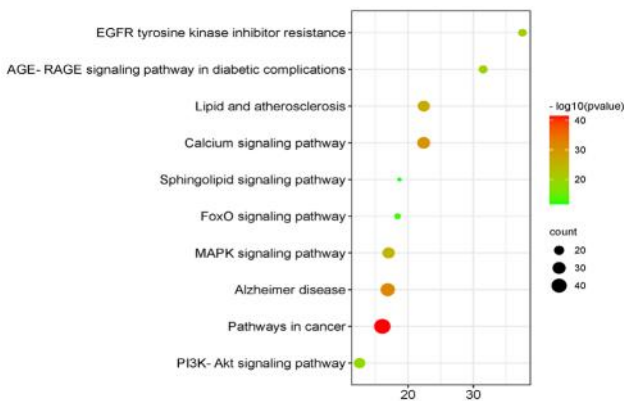


图 4 KEGG 富集分析结果

Fig 4 KEGG enrichment analysis

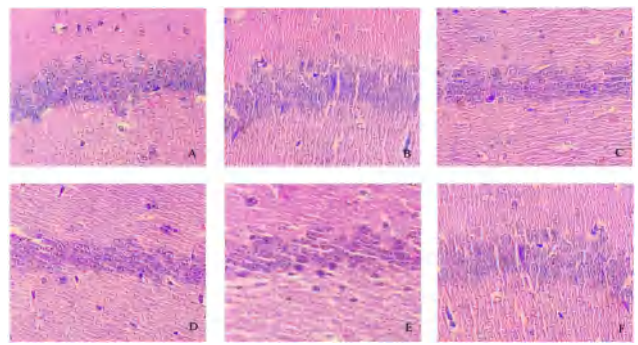


图 5 BYHWD 对 APP/PS1 小鼠海马形态的影响 (×400)

Fig 5 Effect of BYHWD on the hippocampal morphology in the APP/PS1 mice (×400)

A. 对照组 (control group); B. 模型组 (model group); C. 多奈哌齐组 (donepezil group); D. BYHWD 高剂量组 (BYHWD-H group); E. BYHWD 中剂量组 (BYHWD-M group); F. BYHWD 低剂量组 (BYHWD-L group)

AD 的潜在靶点由 33 个丰富至 163 个。KEGG 分析结果发现 BYHWD 主要通过 AD、胆固醇代谢、脂质和动脉粥样硬化、AGE-RAGE 等信号通路治疗 AD。潜在核心靶点 VCAM-1、ApoE 与这些通路密切相关。AD 通路中 VCAM-1、ApoE 的上游，RAGE/LRP1 转运体已被证实可以介导 $A\beta$ 跨 BBB 转运，RAGE 介导 $A\beta$ 的内吞转运，LRP1 介导 $A\beta$ 的外排转运^[10]，这与前期猜想一致，说明 BYHWD 可通过改善 BBB 达到治疗 AD 的作用。

目前，AD 的主要病理特征是脑内 $A\beta$ 异常沉积形成的老年斑和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结，中枢 $A\beta$ 含量是核心发病因

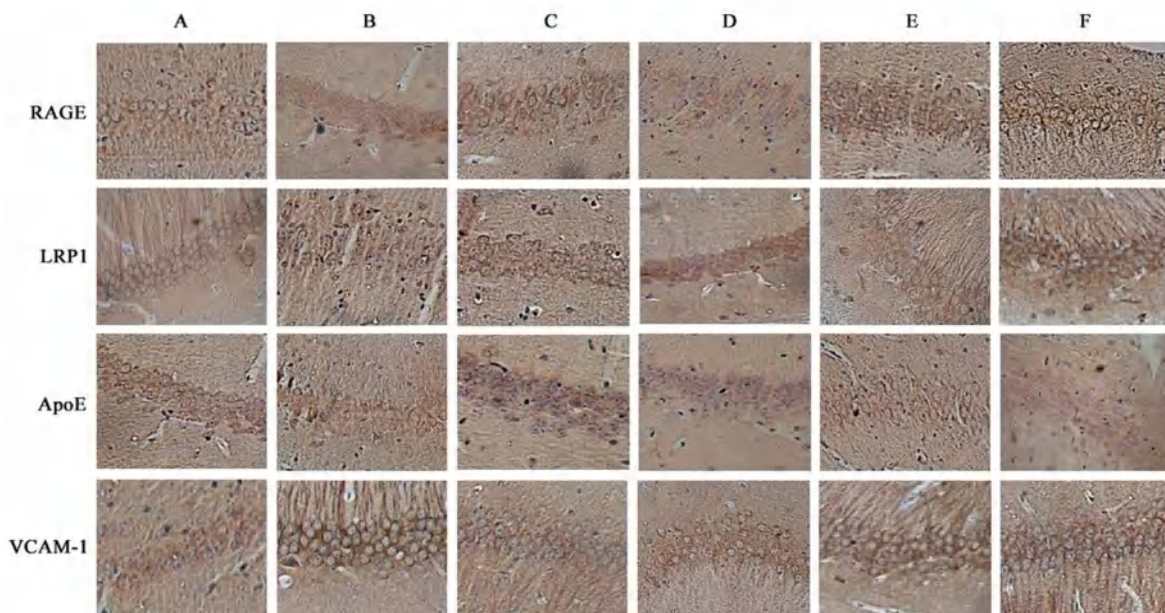


图 6 BYHWD 对 APP/PS1 小鼠海马 RAGE、LRP1、ApoE、VCAM-1 蛋白表达的影响 (×400)

Fig 6 Effect of BYHWD on the expressions of RAGE, LRP1, ApoE and VCAM-1 in the hippocampus of the APP/PS1 mice (×400)

A. 对照组 (control group); B. 模型组 (model group); C. 多奈哌齐组 (donepezil group); D. BYHWD 高剂量组 (BYHWD-H group); E. BYHWD 中剂量组 (BYHWD-M group); F. BYHWD 低剂量组 (BYHWD-L group)

素。VCAM-1 是 RAGE 的配体^[11]，为可诱导的血管细胞黏附分子，研究证实 AD 患者 RAGE 水平升高，A β 内吞转运增强，A β 过度沉积可刺激 VCAM-1 表达，其表达水平还与炎症细胞因子相关^[12-13]。ApoE 是 LRP1 的配体，可与 A β 结合成复合物，通过 BBB 跨膜转运进入外周血液或被溶酶体吞噬降解^[14-15]。高度脂化的 ApoE 可以大幅增强与 A β 的亲水性，从而促进胰岛素降解酶对 A β 的降解能力，有效清除脑内 A β 。

本文利用动物实验检测 BYHWD 给药后 RAGE、LRP1、ApoE、VCAM-1 的表达水平，对网络药理学预测结果进行实验验证，进一步探究 BYHWD 是否通过调节 RAGE/LRP1 转运体，改善 BBB 转运异常，发挥抗 AD 的作用。

基于 APP/PS1 小鼠的特点，该动物模型适用于药物对 AD 预防及治疗的基础性研究^[16]。学习和记忆障碍是 AD 早期出现的临床表现^[17]，且贯穿于整个疾病过程中，本文根据学习记忆障碍的改善情况来评价 BYHWD 对 APP/PS1 小鼠的治疗效果。与空间学习记忆相关的主要区域位于海马区，海马区对于情绪记忆方面也具有调节作用。研究表明，随着海马区损毁程度加大，空间学习记忆能力会不断下降直至丧失，而且对于情绪记忆的能力也随之下降^[18-19]。故本文先通过行为学实验发现给药后 APP/PS1 小鼠的新物体识别指数得到改善，避暗潜伏期上升，错误次数下降，表明 BYHWD 可改善动物的学习记忆能力。又利用 HE 染色观察海马神经元结构，从形态学角度再次验证 BYHWD 对 APP/PS1 小鼠的治疗效果。IHC 结果表明，经 BYHWD 干预后，海马 LRP1、ApoE 表达水平上调，RAGE、VCAM-1 表达水平下调，证明 BYHWD 可通过调节 RAGE/LRP1 转运体，改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力。

综上，本文根据 BYHWD 传统功效猜测其可能通过改善 BBB 治疗 AD，网络药理学筛选出 BYHWD 抗 AD 潜在核心靶点 VCAM-1、ApoE，研究证明它们的上游——RAGE/LRP1 转运体已明确可以介导 A β 跨 BBB 转运。经过动物实验发现 BYHWD 给药后可以改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力，治疗机制与调节 RAGE/LRP1 转运体关键蛋白表达有密切关联，即上调 LRP1、ApoE，下调 RAGE、VCAM-1，验证了网络药理学的预测及前期猜想。本研究为 BYHWD 治疗 AD 提供了理论基础，但其具体机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 刘婉沂, 张英丰, 周欣, 等. 补阳还五汤抗脑缺血的

作用机制研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(3): 411-418.

[2] 陈博威, 徐雅倩, 唐荣梅, 等. 基于 miRNA 微阵列探讨补阳还五汤对脑缺血大鼠神经血管单元的保护机制[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(3): 333-341.

[3] 费洪新, 周忠光, 姜波, 等. 补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠学习记忆及海马 β 淀粉样前体蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 125-128.

[4] 张春梅. 补阳还五汤治疗阿尔茨海默病的疗效及对 MMSE 积分、ADL 评分的影响研究[J]. 中国现代医生, 2016, 54(31): 126-128.

[5] 毛丽斯, 朱晓红. 网络药理学在中药领域的应用进展[J]. 中医药管理杂志, 2021, 29(13): 98-102.

[6] Qu YZ, Li M, Zhao YL, et al. Astragaloside IV attenuates cerebral ischemia-reperfusion-induced increase in permeability of the blood-brain barrier in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 606(1/3): 137-141.

[7] 黄洋, 孙英新, 曾妙, 等. 补阳还五汤及其组分治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19): 212-218.

[8] 逯锐锐, 龚圆渊, 张力华. 中医药对血脑屏障通透性影响的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(7): 187-189.

[9] 薛慧, 安丽凤, 曲岩, 等. 基于网络药理学的补阳还五汤治疗阿尔兹海默症的作用机制研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(11): 1692-1697.

[10] 武彩霞, 刘睿. 神经血管单元 RAGE/LRP-1 受体系统与阿尔兹海默病[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2012, 34(5): 387-390.

[11] Denys A, Clavel G, Lemeiter D, et al. Aortic VCAM-1: an early marker of vascular inflammation in collagen-induced arthritis [J]. Cell Mol Med, 2016, 20(5): 855-863.

[12] Soto-Rojas LO, Pacheco-Herrero M, Martínez-Gómez PA, et al. The neurovascular unit dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 2022.

[13] 隋艳玲, 潘旭东, 马爱军, 等. 脑缺血患者微栓子检测与黏附分子的相关性研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 27(4): 345-348.

[14] 杨从. 当归芍药散及拆方对痴呆小鼠学习记忆的影响及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.

[15] 李芙. 电针对 APP/PS1 双转基因鼠海马 A β 及 LRP1 水平的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[16] 徐慧琳, 范震, 冯成强. 中药对阿尔兹海默症 APP/PS1 转基因小鼠的治疗作用研究进展[J]. 实验动物科学, 2020, 37(1): 69-73.

[17] Tsuda L, Lim YM. Alzheimer's disease model system using drosophila [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1076: 25-40.

[18] Opalka AN, Wang DV. Hippocampal efferents to retrosplenial cortex and lateral septum are required for memory acquisition [J]. Learn Mem, 2020, 27(8): 310-318.

[19] 邵亚杰, 唐娅辉, 曾贵荣, 等. 慢性束缚应激对小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中南药学, 2017, 15(4): 455-458.

(收稿日期: 2022-04-06; 修回日期: 2022-05-25)

木榄胚轴总黄酮通过调节 PI3K/Akt 信号通路 诱导人结肠癌 HT-29 细胞凋亡

陈美先¹, 卓清缘¹, 柴民伟², 王健松¹, 王羚郦^{1*} (1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 北京大学深圳研究生院环境与能源学院, 广东 深圳 518055)

摘要: **目的** 研究木榄胚轴总黄酮 (TFBH) 对人结肠癌 HT-29 细胞增殖和迁移的影响及其诱导细胞凋亡的作用机制。**方法** MTT 法检测 TFBH 对细胞增殖的影响。划痕实验观察 TFBH 对细胞迁移的影响。流式细胞术检测 TFBH 对细胞周期和细胞凋亡的影响。Hoechst 33258 荧光染色观察 TFBH 对细胞核荧光强度的影响。Western blot 法检测 TFBH 处理细胞后, 凋亡相关蛋白以及 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达情况。**结果** 不同浓度的 TFBH 处理 HT-29 细胞后, 细胞活力随着其浓度的增加而降低。与对照组比较, 50、62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TFBH 组能够抑制 HT-29 细胞发生迁移。进一步的流式细胞术和 Hoechst 33258 检测表明 TFBH 可以诱导细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期, 并诱导细胞凋亡, 凋亡细胞核的荧光强度与 TFBH 给药浓度成正相关。Western blot 结果显示, TFBH 能够使凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2、cleaved caspase-3/caspase-3 以及 cleaved caspase-9/caspase-9 的相对蛋白表达水平增加, 并抑制 PI3K/Akt 信号通路蛋白 p-PI3K、p-Akt 的表达。**结论** TFBH 可以在体外抑制人结肠癌 HT-29 细胞的增殖和迁移, 其诱导细胞凋亡机制与抑制 PI3K/Akt 信号通路、调控 Bcl-2 凋亡蛋白家族并激活 caspase 级联反应有关。

关键词: 木榄胚轴总黄酮; HT-29 细胞; 增殖; 迁移; 凋亡; PI3K/Akt 通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2272-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.011

Total flavonoids from *Bruguiera gymnorrhiza* hypocotyls induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by regulating of PI3K/Akt signaling pathway

CHEN Mei-xian¹, ZHUO Qing-yuan¹, CHAI Min-wei², WANG Jian-song¹, WANG Ling-li^{1*} (1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 2. School of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen Guangdong 518055)

Abstract: Objective To determine the effect of total flavonoids from *Bruguiera gymnorrhiza* hypocotyls (TFBH) on the proliferation and migration of human colon cancer HT-29 cells and its apoptosis mechanism. **Methods** HT-29 cells were treated with TFBH and at various concentrations. The proliferation of cells treated with TFBH were checked by MTT assay. Scratch assay was used to observe the effect of TFBH on cell migration. Flow cytometry and Hoechst 33258 fluorescence staining were used to detect the effect on the cell cycle and apoptosis. Western blot was used to evaluate the expression level of apoptosis-related proteins as well as PI3K/Akt signaling pathway proteins. **Results** After the treatment with different concentrations of TFBH in HT-29 cells, the cell viability decreased in a dose-dependent manner. Compared with the control group, the 50 and 62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TFBH groups inhibited the migration of HT-29 cells. Further evaluation with flow

作者简介: 陈美先, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新药筛选与开发研究, email: 1226761697@qq.com *通信作者: 王羚郦, 女, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药新药开发研究, email: wlingli@gzucm.edu.cn

cytometry and Hoechst 33258 confirmed that TFBH induced the cell cycle arrest at G₀/G₁ and G₂/M phase and apoptosis, and the fluorescence intensity of apoptotic cell nucleus was positively correlated with the TFBH administration concentration. Western blot showed that TFBH up-regulated the expression of apoptosis-related proteins Bax/Bcl-2, cleaved caspase-3/caspase-3 and cleaved caspase-9/caspase-9, and significantly inhibited the expression of p-PI3K and p-Akt. **Conclusion** TFBH can inhibit the proliferation and migration of human colon cancer HT-29 cells in vitro. TFBH-induced apoptosis is related to the suppression of PI3K/Akt signaling pathway and thereafter activation of Bcl-2 apoptosis protein family and the caspase cascade reactions.

Key words: total flavonoids from *Bruguiera gymnorrhiza* hypocotyl; colon cancer HT-29 cell; proliferation; migration; apoptosis; PI3K/Akt pathway

据世界卫生组织统计, 2020 年结直肠癌在全球的发病率排第三, 病死率排第二^[1]。目前西医治疗肿瘤以手术、放化疗、分子靶向、内分泌治疗及一些新辅助治疗等综合治疗为主^[2-3], 但因其毒副作用大且预后差而具有一定的局限性。因此, 在植物中寻找天然抗肿瘤活性物质一直是抗肿瘤药物研究的热点。

木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza*) 是红树科木榄属植物, 是一种传统海洋药用植物, 已被《中国药用植物志》《海洋药物》《现代本草纲目》等中草药专著记载。据记载, 木榄的叶、胚轴、树皮等部位均可入药, 主要功效有清热解毒、止泻、消炎、收敛、止血、截疟等^[4-6]。目前已有研究表明木榄胚轴中的一些化合物具有体外抑制肺癌细胞增殖的作用^[7], 但对其他肿瘤细胞是否具有生长抑制作用, 未见相关报道, 抗肿瘤的分子机制也尚未完全阐明。

细胞周期和细胞凋亡在人类组织的正常发育和平衡中发挥着重要作用, 同时也与许多疾病状态有关, 包括癌症^[8]。中药总黄酮提取物是一类潜在的抗肿瘤有效成分^[9-11]。在前期研究中初步发现了木榄胚轴的总黄酮 (total flavonoids from *Bruguiera gymnorrhiza* hypocotyls, TFBH) 成分具有体外抗结肠癌活性。因此, 本研究从木榄胚轴中提取、富集了总黄酮成分, 首次探究 TFBH 对人结肠癌 HT-29 细胞增殖和迁移的影响, 并结合细胞周期和细胞凋亡共同探究其作用机制, 为进一步阐明木榄胚轴的抗肿瘤活性及其作用机制提供参考和依据。

1 材料

1.1 细胞株

人结肠癌细胞株 HT-29 (武汉普诺赛生命科技有限公司)。采用含 10% 胎牛血清和含 1% 双抗生素的 McCoy's 5A 培养基培养细胞, 置于

37 °C、5%CO₂ 培养箱中常规培养。

1.2 试药

TFBH: 用 10 倍量的 70% 乙醇在室温下超声提取 1.0 kg 木榄胚轴干燥粉末, 过滤后将提取液旋转蒸发浓缩, 用适量的水将浓缩后的浸膏溶解, 于 D101 大孔树脂上分离, 分离条件为 50% 乙醇, 低温浓缩干燥后用二甲基亚砜 (DMSO) 制备成 125 μg · mL⁻¹ 的储备液, 置于 4 °C 密封保存; 以芦丁为对照品, 采用 NaNO₂-Al (NO₃)₃-NaOH 法^[12] 测定 TFBH 的总黄酮含量为 83.02%。所用植物部位于 2021 年采于深圳福田红树林保护区, 经北京大学环境与能源学院柴民伟教授鉴定。

McCoy's 5A 培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 双抗生素 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 胎牛血清 (德国 PAN-Biotech 公司); 芦丁 (HPLC ≥ 98%)、D101 大孔吸附树脂 (上海源叶生物科技有限公司); MTT (德国 BioFroxx 公司); DMSO (MP Biomedicals LLC.); Hoechst 33258、Tris-甘氨酸-SDS-电泳缓冲液 (Biosharp 生物科技有限公司); 细胞周期试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海贝博生物公司); RIPA 裂解液、蛋白上样缓冲液 (5×)、无蛋白快速封闭液 (5×) (上海雅酶生物科技有限公司); 无蛋白快速转膜液 (20×) (苏州新赛美生物科技有限公司); 胰酶消化液、蛋白 marker (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); ECL 化学发光液、Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-9、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、β-actin 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (Affinity Biosciences LTD)。

1.3 仪器

多功能酶标仪 (型号 Multiskan GO, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BD LSRFortessa 流式

细胞仪(美国 BD 公司); 荧光显微镜[型号 BX53, 奥林巴斯(中国)有限公司]; SDS-PAGE 电泳仪[型号 EP300, 韦克斯(北京)科技有限公司]; 全自动化学曝光分析系统(型号 COMPLEX2000, Bioworld 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖情况

取对数生长期的 HT-29 细胞以合适的细胞密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的恒温培养箱中贴壁培养 24 h。弃去原培养基并加入含 0.2% DMSO 的培养基和不同质量浓度 TFBH (25、50、100、200、250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的含药培养基, 每组 6 个复孔, 继续培养 12 h、24 h 和 48 h, 倒置显微镜下观察细胞的形态变化后, 每孔加入 20 μL MTT (PBS 稀释至 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 置于恒温箱中继续培养 4 h。4 h 后吸弃上清, 每孔加 150 μL 的 DMSO 以溶解由活细胞代谢产生的甲瓚产物, 摇床上震荡 10 min, 用多功能酶标仪在 570 nm 波长处检测各孔的吸光度 (A)。使用 GraphPad 软件计算细胞增殖抑制率及 IC_{50} 值。

2.2 划痕实验

将 HT-29 细胞以合适密度接种于 6 孔板中, 置于培养箱中培养, 待细胞密度至 90% 左右, 使用直尺和 200 μL 枪头在每个孔中进行轻微的直线划痕, 用 PBS 清洗细胞碎片。根据给药浓度分为 3 组, 以接近 1 倍 IC_{50} 值作为高剂量组 (62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 以接近 4/5 倍 IC_{50} 值作为中剂量组 (50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 以接近 3/5 倍 IC_{50} 值作为低剂量组 (37.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。加入含有 TFBH 药物 (37.5、50、62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的完全培养基 2 mL, 对照组加入等体积的培养基, 在显微镜下进行拍照, 记录细胞 0 h、24 h 的迁移距离, 用 Image J 软件分析迁移能力, 计算 HT-29 细胞的迁移率。

2.3 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期的 HT-29 细胞消化并计数, 接种于 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入质量浓度分别为 37.5、50、62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TFBH, 对照组加入等体积的培养基, 每组设 3 个复孔, 处理细胞 24 h。胰酶消化细胞, 计数, 离心。用 500 μL PBS 重悬细胞, 缓慢滴加 2 mL 预冷的无水乙醇固定细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。根据细胞周期试剂盒步骤进行染色, 流式细胞仪检测结果。每组实验重复 3 次, Modfit 软件分析细胞生长各期的所占比例。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

选取生长状态良好的 HT-29 细胞消化并计

数, 接种于 6 孔板中, 接种密度 5×10^6 个/孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入质量浓度分别为 37.5、50、62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TFBH, 对照组加入等体积的培养基。作用 24 h 后使用无 EDTA 的胰酶消化并收集细胞。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒说明书操作细胞染色, 流式细胞仪分析结果。每组实验重复 3 次, Flow Jo V10 软件分析 Annexin V-FITC 阳性细胞所占比例, 即细胞凋亡率。

2.5 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡

取对数生长期的 HT-29 细胞, 调整密度为 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液。将制备好的细胞悬液接种于加入细胞爬片的 12 孔板, 每孔 1 mL, 轻微晃动, 使细胞均匀铺在爬片上。24 h 后弃去原培养液, 加入 1 mL 质量浓度分别为 37.5、50、62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TFBH, 对照组加入等体积的培养基, 培养 24 h。吸弃培养液, PBS 漂洗 1 min \times 2 次; 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 3 min \times 2 次; 每孔加入 Hoechst 33258 染色剂 30 μL , 室温条件下避光染色 10 min。染色完毕, PBS 漂洗 3 min \times 2 次。在紫外光 340 nm 的波长处激发, 显微镜下观察不同组别的荧光强度情况。

2.6 Western blot

取对数生长期的 HT-29 细胞, 接种于 6 孔板中, 接种密度 5×10^6 个/孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。加入质量浓度分别为 37.5、50、62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TFBH, 对照组加入等体积的培养基, 处理 24 h 后提取细胞总蛋白。将细胞置于冰上, 加入 RIPA 裂解液裂解 30 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min。取上清液分装于 1.5 mL 离心管中, BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白变性后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。蛋白上样后 SDS-PAGE 电泳, 快速转膜, 转膜后快速封闭 10 min; 孵育一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, TBST 清洗 10 min \times 3 次; 二抗室温孵育 1.5 h, TBST 清洗 10 min \times 3 次; ECL 化学发光, 于全自动化学曝光分析系统内进行曝光, 分析各组蛋白表达情况。

2.7 统计学分析

应用 SPSS 22.0、GraphPad Prism 7.0、Image J 等软件对实验数据进行分析, 每组实验重复 3 次, 结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析, 如满足方差齐性用 LSD 分析, 若不满足方差齐性则用 Dunnett T3 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TFBH 对 HT-29 细胞增殖能力的影响

结果显示, TFBH 对 HT-29 细胞有生长抑制作用, 呈时间和浓度依赖关系 (见图 1)。TFBH 作用于结肠癌 HT-29 细胞 12 h、24 h 和 48 h 后的 IC_{50} 值分别为 (307.80 ± 4.28) 、 (178.30 ± 7.00) 、 $(63.37 \pm 8.42) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 可见 TFBH 对 HT-29 细

胞增殖抑制的最佳时间为 48 h。在光学显微镜下观察 TFBH 作用 HT-29 细胞 48 h 后的细胞形态, 结果显示随着给药浓度增大, 细胞界限模糊, 细胞皱缩变小的程度逐渐加深, 见图 1。

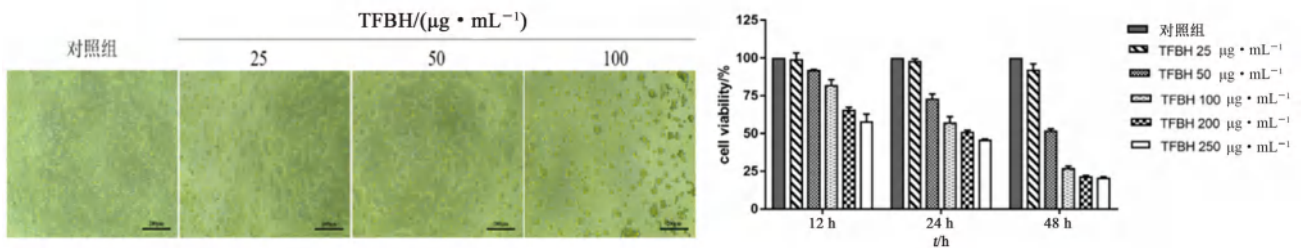


图 1 TFBH 对 HT-29 细胞增殖的影响 ($\times 100$)
Fig 1 Effect of TFBH on the proliferation of HT-29 cells ($\times 100$)

3.2 TFBH 对 HT-29 细胞迁移率的影响

利用划痕实验检测 TFBH 是否抑制 HT-29 细胞发生迁移, 结果见图 2, 细胞迁移率随 TFBH 给药浓度的增加而降低。与对照组比较, 50、

$62.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TFBH 组的细胞迁移率差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 可见 TFBH 能够抑制 HT-29 细胞发生迁移。

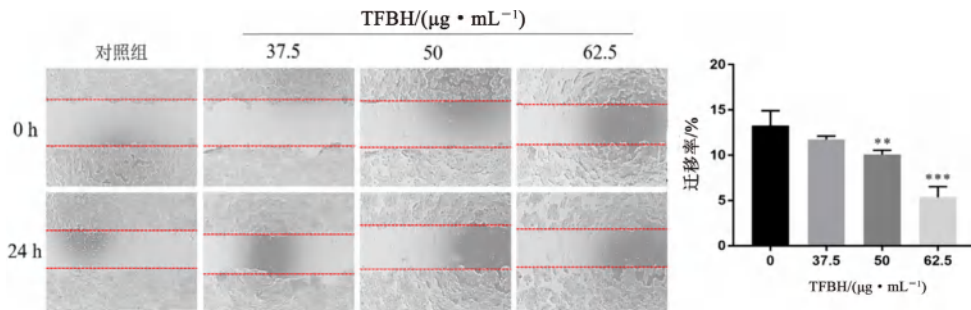


图 2 TFBH 对 HT-29 细胞迁移的抑制作用 ($\times 40$)
Fig 2 Inhibitory effect of TFBH on HT-29 cell migration ($\times 40$)

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

3.3 TFBH 对 HT-29 细胞周期的影响

TFBH 对 HT-29 细胞周期中各个时期所占比例的影响见图 3。结果显示, 与对照组相比, TFBH 给药组的 G_0/G_1 期和 G_2/M 期的比例呈上升趋势, S 期的比例呈下降趋势, 其中 TFBH 62.5

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。以上结果说明, TFBH 可诱导 HT-29 细胞周期发生 G_0/G_1 期和 G_2/M 期阻滞。

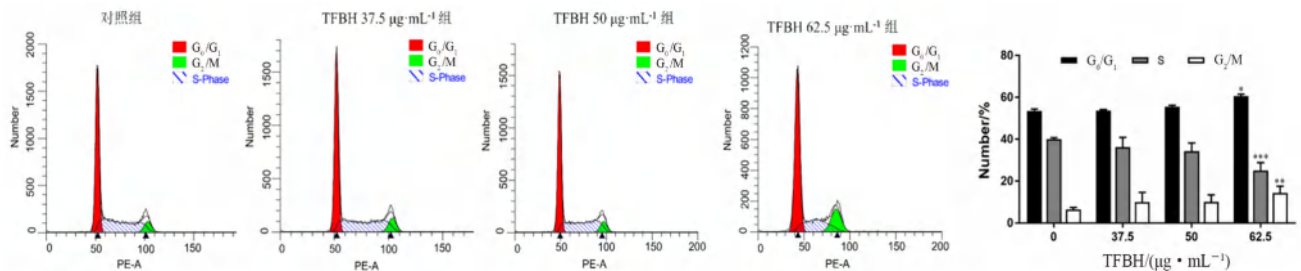


图 3 TFBH 对 HT-29 细胞周期的影响
Fig 3 Effect of TFBH on cell cycle of HT-29 cells

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

3.4 TFBH 对 HT-29 细胞凋亡率的影响
Annexin V-FITC/PI 双染法检测结果如图 4 所示。TFBH 给药组均可诱导 HT-29 细胞发生不同

程度的凋亡。与对照组比较, TFBH 各给药组的凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

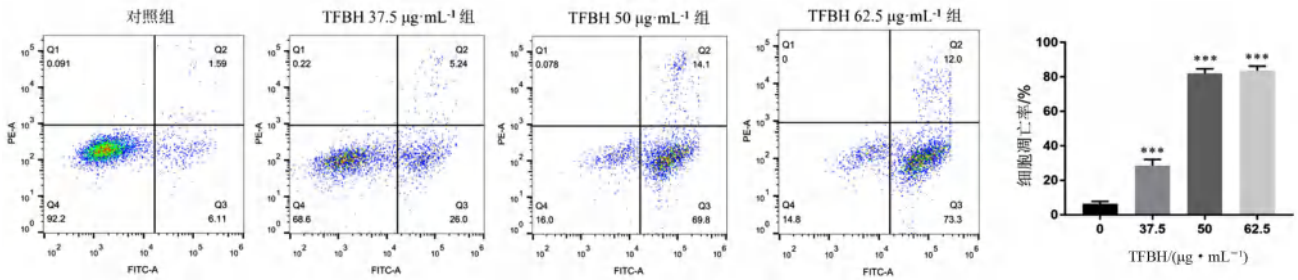


图 4 TFBH 对结肠癌 HT-29 细胞凋亡的影响

Fig 4 Effect of TFBH on apoptosis of HT-29 cells

注: 与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

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

3.5 TFBH 对细胞凋亡形态的影响

Hoechst 33258 染色后在荧光显微镜下可观察到活细胞细胞核呈弥散均匀的弱蓝色荧光, 凋亡细胞核可见致密浓染的亮蓝色荧光。结果显示, 对照组细胞核形态较为一致, 显弱蓝色荧光。与对照组相比, TFBH 各给药组处理细胞后, 均能观察到亮蓝色荧光的细胞核数量有所增加 (见图 5), 各组凋亡细胞核的荧光强度与 TFBH 给药浓度成正相关。

果如图 7 所示。与对照组相比, TFBH 处理 24 h 后, 该通路关键蛋白 p-PI3K 和 p-Akt 的表达量显著降低, TFBH 各给药组的 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 相对蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

4 讨论

4.1 实验方法分析

MTT 实验证明 TFBH 抑制 HT-29 细胞增殖的最佳时间为 48 h, 而本研究在其他实验中的药物处理时间为 24 h 的原因是, 在实验过程中, 当给药处理时间为 48 h 时, 6 孔板中的中、高剂量组的贴壁细胞出现大片脱落, 悬浮在培养液中, 这种情况对细胞凋亡指标的检测会产生较大的影响和误差; 而当处理时间为 24 h 时, 贴壁细胞发生脱落的情况较少、程度较轻, 综合流式细胞实验的结果可以看出, 给药处理 24 h 后, 低、中、高剂量组的凋亡率与对照组间有明显的差异, 所以统一将给药处理时间定为 24 h。

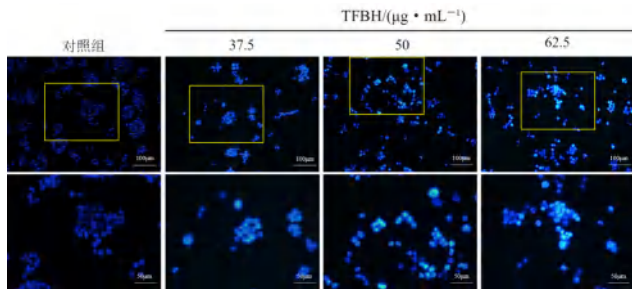


图 5 TFBH 对 HT-29 细胞凋亡形态学的影响 ($\times 200$, $\times 400$)

Fig 5 Effect of TFBH on morphological features of apoptosis of HT-29 cells ($\times 200$, $\times 400$)

4.2 实验结果分析

本研究从细胞周期、细胞凋亡表型实验评价 TFBH 抑制 HT-29 细胞增殖和迁移的主要作用。从实验结果来看, TFBH 能明显抑制 HT-29 细胞增殖, 但抑制 HT-29 细胞的迁移能力相对较弱。TFBH 可以阻滞 HT-29 细胞周期中的 G_0/G_1 期和 G_2/M 期, 但仅高剂量组的作用效果较为明显。本研究中的 Hoechst 33258 细胞核染色和流式细胞术实验共同证明了 TFBH 各剂量组均可诱导 HT-29 细胞发生凋亡, 并且提示在给药时间为 24 h 时, TFBH 主要诱导 HT-29 细胞发生早期凋亡。以上结果表明, TFBH 诱导 HT-29 细胞发生凋亡比阻滞其细胞周期的作用更为明显。因此, 本研究中机制探究的重点在于 TFBH 如何诱导 HT-29

3.6 TFBH 对凋亡相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, TFBH 各给药组作用 HT-29 细胞 24 h 后, 凋亡相关蛋白 Bax、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3 表达均有上调趋势, Bcl-2 蛋白表达下调, 并且存在浓度依赖性。与对照组相比, TFBH 各给药组的 cleaved caspase-3/caspase-3 以及 50、62.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TFBH 组的 Bax/Bcl-2、cleaved caspase-9/caspase-9 相对蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。

3.7 TFBH 对 PI3K/Akt 信号通路蛋白的影响

通过检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平探究其是否参与 TFBH 对细胞凋亡的影响, 结

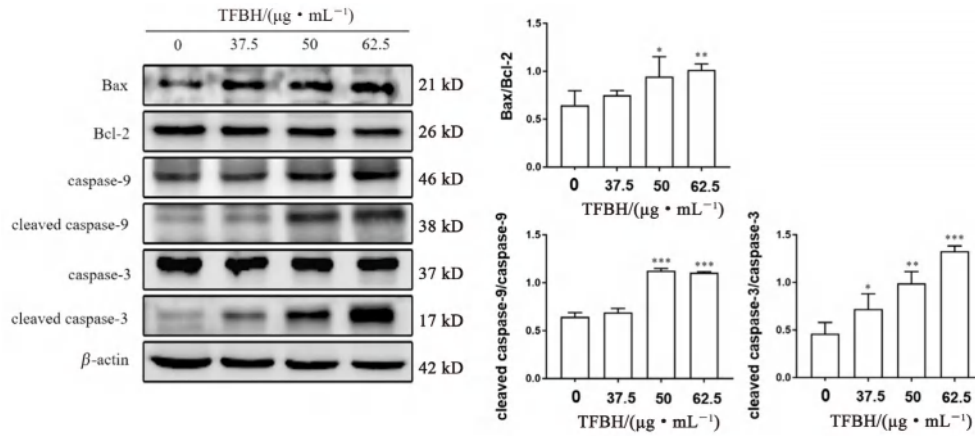


图 6 TFBH 对细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

Fig 6 Effect of TFBH on the expression levels of cell apoptosis related proteins

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

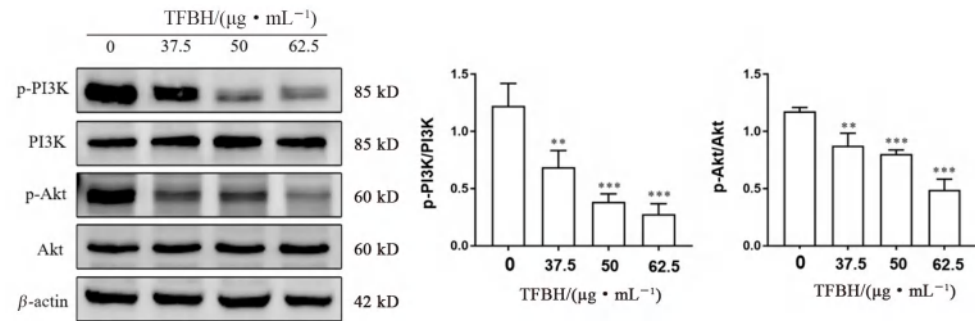


图 7 TFBH 对 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平的影响

Fig 7 Effect of TFBH on the expression levels of related proteins in the PI3K/Akt signaling pathway

注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

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

细胞发生凋亡。

4.3 机制研究

PI3K/Akt 信号通路作为一个关键的信号传导通路，在控制细胞生长、增殖和凋亡中扮演着重要的角色。PI3K 激活后可以通过磷酸化 Akt 的 thr308 位点激活 Akt^[13]。磷酸化 Akt 通过调节 Bcl-2 蛋白家族来控制细胞凋亡^[14]。活化的 Akt 可以磷酸化 Bad 蛋白的 ser136 位点，导致 Bcl-2 的释放，与 Bax 结合形成二聚体，或者磷酸化 Bax 蛋白的 ser184 位点，与 Bcl-2 结合形成二聚体。因此，上述两种由 Akt 引起的 Bcl-2 蛋白家族的磷酸化方式都可以起到抑制凋亡的作用^[15-16]。另一方面，细胞凋亡是一种自主细胞程序性死亡，受外源途径和内源途径控制，其中涉及线粒体的内源途径是细胞凋亡的重要途径之一^[17]。Bcl-2 蛋白家族与线粒体凋亡途径密切相关，是改变线粒体内膜通透性的重要调控因子，称为线粒体通透性转换孔^[18]。根据细胞凋亡过程中不同的功能，Bcl-2 蛋白家族可分为促进细胞

凋亡的 Bax 蛋白亚家族和抑制细胞凋亡的 Bcl-2 蛋白亚家族^[19]，通过调节促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白的比例，特别是 Bax/Bcl-2 的比例，可以促进或抑制凋亡。本研究表明，TFBH 可通过上调 Bax/Bcl-2 的比例从而促进凋亡。

Caspase 是一个在细胞凋亡过程中起重要作用的蛋白酶家族。当 Bcl-2 蛋白家族诱发线粒体凋亡时，线粒体受损释放细胞色素 C，pro caspase-9 可以和细胞色素 C 以及 Apaf1 形成复合物，同时被激活。激活的 caspase-9 (cleaved caspase-9) 可以激活细胞凋亡的关键酶 caspase-3，进一步激活后续的细胞凋亡信号^[20]。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最关键的执行分子之一，可以剪切细胞凋亡过程中的许多关键蛋白，例如 PARP。Caspase-3 的激活需要从没有活性的全长 caspase-3，在 asp28 和 ser29 之间及 asp175 和 ser176 之间进行剪切，产生有活性的 cleaved caspase-3。因此 caspase-3 的激活常被作为细胞凋亡的一个重要指标^[21]。本研究结果显示，TFBH 各给药组中的 cleaved caspase-9/

caspase-9、cleaved caspase-3/caspase-3 相对蛋白表达上升,说明 TFBH 很可能是通过 caspase 级联反应激活 caspase-9,然后激活 caspase-3,从而促进细胞凋亡。

4.4 总结

本研究发现,TFBH 可以在体外抑制人结肠癌 HT-29 细胞的增殖和迁移。TFBH 能通过阻滞 HT-29 细胞周期的 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期以及诱导 HT-29 发生凋亡抑制细胞生长。TFBH 诱导细胞凋亡的作用机制与抑制 PI3K/Akt 信号通路有关,通过上调 Bax/Bcl-2、cleaved caspase-9/caspase-9 以及 cleaved caspase-3/caspase-3 的表达激活线粒体内源性凋亡途径并进一步激活 caspase 级联反应,诱发细胞凋亡。但本研究并未考察 TFBH 对 HT-29 细胞侵袭的作用,也没有深入探究 TFBH 阻滞细胞周期的作用机制,这将成为今后研究的方向。另有研究表明,PI3K/Akt 与 mTOR 蛋白的关系密切,PI3K/Akt/mTOR 通路同样可以调控细胞凋亡,甚至是细胞自噬^[22-25]。因此在今后的研究中,还可结合相关实验证明 TFBH 在抑制肿瘤生长过程中是否促进或抑制细胞发生自噬。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] 张晗, 李兴, 韩鹏飞. 环状 RNA CDR1as: 恶性肿瘤的新型调控因子 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37 (10): 1329-1335.
- [3] 李凡, 任国胜. 乳腺癌诊治现状与展望 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2019, 26 (12): 1393-1397.
- [4] 范润珍, 宋文东, 韩维栋, 等. 红树植物木榄叶的基本化学成分的分析 [J]. *理化检验 (化学分册)*, 2008, 44 (8): 754-756.
- [5] 易湘茜, 高程海, 龙彬, 等. 红树木榄胚轴中化学成分研究 [J]. *中药材*, 2015, 38 (1): 85-88.
- [6] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第 52 卷. 北京: 科学出版社, 1983: 35-36.
- [7] 易湘茜, 高程海, 何碧娟, 等. 红树植物木榄胚轴中苯丙素类化学成分研究 [J]. *广西植物*, 2013, 33 (2): 191-194, 257.
- [8] Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 682: 3-13.
- [9] 王帅, 吴海霞, 楼泰岑, 等. 野马追总黄酮的体内外抗乳腺癌活性及机制研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37 (17): 2073-2080.
- [10] 聂锦涛, 钱瑞华, 黄婧, 等. 土荆芥种子总黄酮提取物通过诱导细胞凋亡、自噬和周期阻滞抑制人肝癌 SMCC-7721 细胞增殖 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48 (15): 2808-2814.
- [11] 汪小玉, 李婷, 税丕先, 等. 仙茅总黄酮提取纯化工艺及其抗氧化、抗肿瘤活性 [J]. *中成药*, 2022, 44 (3): 907-912.
- [12] 刘晓梅, 李沛霞, 甘蓝湘, 等. 川麦冬须根总黄酮和总皂苷提取和富集工艺研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32 (8): 1285-1294.
- [13] Ruicci KM, Plantinga P, Pinto N, et al. Disruption of the RICTOR/mTORC2 complex enhances the response of head and neck squamous cell carcinoma cells to PI3K inhibition [J]. *Mol Oncol*, 2019, 13 (10): 2160-2177.
- [14] Huang DH, Jian J, Li S, et al. TPX2 silencing exerts antitumor effects on hepatocellular carcinoma by regulating the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44 (6): 2113-2122.
- [15] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9 (1): 59-71.
- [16] Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. BCL-2, BCL-X (L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX-and BAK-mediated mitochondrial apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2001, 8 (3): 705-711.
- [17] Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, et al. A cell's fate: an overview of the molecular biology and genetics of apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (17): 4133.
- [18] Hird AW, Tron AE. Recent advances in the development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 198: 59-67.
- [19] Popgeorgiev N, Jabbour L, Gillet G. Subcellular localization and dynamics of the Bcl-2 family of proteins [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 13.
- [20] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2002, 9 (3): 459-470.
- [21] Wang R, Song F, Li S, et al. Salvianolic acid A attenuates CCl₄-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR, Bcl-2/Bax and caspase-3/cleaved caspase-3 signaling pathways [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 1889-1900.
- [22] 闫圣玉, 谢亚锋, 刘英, 等. 红景天苷抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人结肠癌细胞凋亡和自噬 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37 (1): 61-65.
- [23] 赵革, 张丹, 杨小会, 等. 丁香活性组分抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (5): 1197-1204.
- [24] Rong L, Li Z, Leng X, et al. Salidroside induces apoptosis and protective autophagy in human gastric cancer AGS cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109726.
- [25] Zhou J, Jiang YY, Chen H, et al. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53 (2): e12739.

(收稿日期: 2022-03-09; 修回日期: 2022-04-10)

粗壮润楠化学成分及其活性研究

里艳茹^{1,2}, 黄胜男³, 寻园², 程林友⁴, 谢百波^{2,4*} (1. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 天然活性物质与功能国家重点实验, 北京 100050; 2. 北京慧宝源生物技术股份有限公司, 北京 102206; 3. 中国中医科学院广安门医院南区, 北京 102618; 4. 广西慧宝源医药科技有限公司, 广西 钦州 535008)

摘要: **目的** 研究粗壮润楠的化学成分, 并对分离得到的化学成分进行生物活性筛选, 为寻找新的生物活性成分、建立药材的质量标准奠定基础。**方法** 采用乙醇提取、乙酸乙酯萃取、硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、反相中压柱色谱、闪式柱色谱以及反相 HPLC 柱色谱分离等方法进行分离纯化; 运用波谱数据分析鉴定化合物的结构。在细胞水平模型上, 筛选化合物在神经保护、抗氧化、肿瘤细胞毒、肝保护和抗人类免疫缺陷病毒等方面的活性。**结果** 从粗壮润楠的乙酸乙酯部位共分离得到 19 个化合物, 分别为 α - 芒柄花萜醇 (1)、熊果酸 (2)、白桦脂酸 (3)、熊果醇 (4)、8- (3, 5- 二羟基苯基) -1- 丙基辛醇 2, 4- 二羟基 -6- 十一烷基苯甲酸酯 (5)、大黄素甲醚 (6)、 β - 谷甾醇 (7)、(+)- (7S, 8R) -4- 羟基 -3, 7- 二甲氧基 -1', 2', 3', 4', 5', 6', 7'- 降七碳木脂烷 -8'- 酮 (8)、(+)- 去氢催吐萝芙木醇 (9)、3- 羟基 -4- 甲氧基苯丙烯酸乙酯 (10)、4- 羟基 -3- 甲氧基苯丙烯酸乙酯 (11)、7- 甲氧基香豆素 (12)、5, 7- 二甲氧基 -6- 羟基香豆素 (13)、4- 羟基 -3, 5- 二甲氧基苯甲酸 (14)、苯甲酸 (15)、对羟基苯甲醛 (16)、对羟基苯乙醇 (17)、3, 4- 二羟基苯甲酸 (18) 和 3- 羟基 -4- 甲氧基苯甲酸 (19)。**结论** 化合物 1 和 5 为首次从樟科植物中分离得到, 其余化合物均为首次从该植物中分离得到。化合物 9 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对去血清诱导的 PC12 细胞损伤有保护作用, 其相对保护率为 (76.60 \pm 10.67)%。

关键词: 润楠属; 粗壮润楠; 化学成分; 活性筛选

中图分类号: R285, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2279-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.012

Chemical constituents of *Machilus robusta* and their biological activities

LI Yan-ru^{1,2}, HUANG Sheng-nan³, XUN Yuan², CHENG Lin-you⁴, XIE Bai-bo^{2,4*} (1. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Function of Natural Medicine, Ministry of Education, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050; 2. Beijing Hebabiz Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102206; 3. South Section of Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 102618; 4. Guangxi Hebabiz Pharmaceutical Co., Ltd., Qinzhou Guangxi 535008)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of *Machilus robusta* and screen their bioactivities to find new bioactive components, establish the quality standard of medicinal materials.

Methods The constituents were isolated with a combination of various chromatographic techniques including column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, C-18, and MCI gel (CHP20P) as well as reversed-phase HPLC. The bioactivities of the compounds on neuroprotection, antioxidation, tumor cytotoxicity, liver protection and anti-HIV were screened in vitro. **Results** The structures of 19 isolates were identified by spectroscopic data analysis: α -onocerin (1), ursolic acid (2), betulinic acid (3), uvaol (4), 8- (3, 5-dihydroxyphenyl)-1-propyloctyl-2, 4-dihydroxy-6-undecylbenzoate (5), 3-methyl-6-methoxy-1, 8-dihydroxy-9, 10-antraquinone (6), β -sitosterol (7), (+)- (7S, 8R)-4-

基金项目: 广西“创新驱动发展”科技重大专项 - 东盟药物创新中心建设及新药开发 (No. 桂科 AA19254033)。

作者简介: 里艳茹, 女, 博士, 主要从事中药活性成分、质量控制及新药研究, email: yanruli2003@163.com *通信作者: 谢百波, 男, 副研究员, 主要从事中药天然药物药效物质基础、质量控制及新药研发, email: baiboxie@163.com

hydroxy-3, 7-dimethoxy-1', 2', 3', 4', 5', 6', 7'-heptanorlignan-8'-one (**8**), (+)-dehydrovo-mifoliol (**9**), ethyl 3-hydroxy-4-methoxyphenylpropionate (**10**), ethyl ferulate (**11**), 7-methoxycoumarin (**12**), 5, 7-dimethoxy-6-hydroxycoumarin (**13**), syringic acid (**14**), benzoic acid (**15**), *p*-hydroxybenzaldehyde (**16**), *p*-hydroxybenzoic ethanol (**17**), 3, 4-dihydroxybenzoic acid (**18**), and 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (**19**). **Conclusion** Compounds **1** and **5** have been obtained from Lauraceae for the first time. Other compounds are obtained from *Machilus robusta* for the first time. Compound **9** shows neuroprotective activity against PC12 cell damage induced by the MPP⁺ with relative protective rate of (76.60 ± 10.67)% at 10 μmol · L⁻¹.

Key words: *Machilus*; *Machilus robusta*; chemical constituent; bioactivity

润楠属 (*Machilus*) 植物为常绿乔木或灌木, 在全世界约有 100 余种, 分布于亚洲东南部和东部的热带、亚热带, 中国西南部及印度为其主要产地。我国约有 68 种 3 变种, 产于长江流域及以南各省区和山东东部, 以云南和华南为主要产地, 是当地主要的经济林木^[1]。粗壮润楠为高大乔木, 树皮粗糙, 灰黑色。我国主要分布于云南南部、贵州南部、广西、广东^[2]。润楠属植物资源丰富, 在我国民间作为草药广泛使用, 具有温中顺气、舒筋活血、消肿止痛等较强的生物活性, 治疗各种皮肤病和风湿性疾病, 临床上用于治疗胃呆食少、腹胀、腹泻、扭挫伤等^[3]。前文主要报道了粗壮润楠中的木脂素和苷类化合物的分离和结构鉴定及其神经细胞保护和保肝活性^[4-6]。本文继续报道该植物化学成分分离和结构鉴定及其活性筛选结果。

1 材料

Perkin-Elmer 343 型旋光测定仪; 美国 Varian 公司 Mercury-300、Mercury-400、Inova-500 或 SYS-600 核磁共振仪 (测定温度 297 K, 以溶剂峰信号作为参照); Micromass Autospec-Ultima ETOF 型质谱仪和 Q-Trap LC/MS/MS (Turbo Ionspray source) 型质谱仪 (Waters 公司); R-205 型旋转蒸发器 (Buchi 公司); 闪式快速分离系统 (AB SCIEX 公司); Waters 600 高效液相色谱仪和 Agilent HP 1100、1200 型高效液相色谱仪; 柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目) (青岛海洋化工厂); 高效制备薄层硅胶板 (HSGF) (烟台江友硅胶发展有限公司); Sephadex LH-20 (瑞典 Amersham Pharmacia 公司); MCI Gel CHP-20 树脂 (70 ~ 150 μm) (日本三菱公司); Thermo SKANIT SOFTWARE 3.2 (Thermo 公司); DMEM 及马血清 (Gibco 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 细胞株 PC12 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

植物样品采自广西壮族自治区大瑶山, 经广

西林业局龙光日工程师鉴定为粗壮润楠 *Machilus robusta*, 标本现存于中国医学科学院药物研究所标本室, 标本号为 (No.041)。

2 提取与分离

称取粉碎干燥的粗壮润楠茎皮 5.3 kg, 用 95% 乙醇 45 L 于室温浸渍提取 3 次, 每次 48 h。提取液减压浓缩, 得干浸膏 535.0 g, 混悬于 2000 mL 水中, 用乙酸乙酯萃取 (8 × 2000 mL), 乙酸乙酯萃取部分 (261.0 g) 进行硅胶柱 (100 ~ 200 目, 1000 g, 8 cm × 100 cm) 色谱分离, 用石油醚 - 丙酮 (100 : 0 ~ 0 : 100) 梯度洗脱, 最后用甲醇洗脱; 洗脱液经薄层色谱检测, TLC 暗斑在紫外灯 254 nm 或 365 nm 下观察, 通过碘熏或喷 5% 硫酸乙醇溶液后加热显色检测。合并组成相似的流分, 回收溶剂得到 9 个部分 (Fr. A ~ Fr. I)。

Fr. B (石油醚 - 丙酮 = 20 : 1 洗脱) 部分析出红色针晶, 经过滤, 用石油醚反复洗涤得到化合物 **6** (2 mg)。剩余 Fr. B 母液减压蒸干 (17.5 g), 经硅胶柱 (200 ~ 300 目, 150 g) 色谱分离, 石油醚 - 乙酸乙酯 (100 : 5 ~ 100 : 20) 梯度洗脱得到 5 个洗脱部分 (B₁ ~ B₅), B₁ 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (石油醚 - 氯仿 - 甲醇 = 5 : 5 : 1 洗脱) 分离纯化析出白色结晶, 经石油醚 - 丙酮重结晶纯化得化合物 **14** (5053 mg), B₂ 硅胶柱色谱分离 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 50 : 1 洗脱), 经反相 HPLC 半制备色谱 (MeOH-H₂O = 91 : 9) 洗脱, 分离纯化得化合物 **10** (2.5 mg) 和 **11** (1.6 mg)。B₃ 部分经反相 Flash 柱色谱分离, 50% ~ 100% 甲醇水溶液洗脱得到 6 个亚组分 (B₃₋₁ ~ B₃₋₆)。B₃₋₂ 部分析出白色结晶, 经石油醚 - 丙酮重结晶纯化得化合物 **15** (25 mg) 和 **16** (20 mg)。B₄ 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (石油醚 - 氯仿 - 甲醇 = 5 : 5 : 1 洗脱) 分离纯化, 再经反相 HPLC 半制备 (C₁₈, 5 μm, 10 mm × 250 mm) 色谱, 以 MeOH-H₂O (89 : 11) 为

流动相, 制备纯化得到化合物 **8** (2 mg)。B₅ 经硅胶柱色谱 [氯仿 - 丙酮 (0% ~ 100%)] 洗脱, 得到 B₅₋₁ ~ B₅₋₄。B₅₋₂ 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (石油醚 - 氯仿 - 甲醇 = 5 : 5 : 1 洗脱) 分离纯化, 得到 B₅₋₂₋₁ ~ B₅₋₂₋₁₁, B₅₋₂₋₃ 再经反相 HPLC 半制备 (C₁₈, 5 μm, 10 mm × 250 mm) 色谱, 以 MeOH-H₂O (93 : 7) 为流动相, 制备纯化得到化合物 **3** (1.5 mg) 和 **4** (2 mg)。Fr.C (70 g) 经 MCI 凝胶柱色谱 (以 30% ~ 100% 甲醇梯度洗脱), 除去色素, 分成两部分 C₁ 和 C₂, C₂ 部分经硅胶柱色谱分离 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 50 : 1 洗脱), 经反相 HPLC 半制备色谱 (MeOH-H₂O = 95 : 5 洗脱) 分离纯化得化合物 **1** (1.0 mg) 和 **2** (3.0 mg)。

Fr.D (2.0 g) 经 MCI 凝胶柱色谱 (30% ~ 100% 甲醇梯度洗脱), 分成 6 个部分 (D₁ ~ D₆)。D₅ 部分经反复硅胶柱色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯体系洗脱) 和反相 HPLC 半制备色谱 (MeOH-H₂O 系统洗脱) 分离纯化得到化合物 **5** (2.0 mg)。

Fr.E (15.0 g) 经 MCI 凝胶柱色谱 (10% ~ 100% 甲醇梯度洗脱) 得到 5 个部分 (E₁ ~ E₅)。E₁ 部分经 Sephadex LH-20 柱色谱 (石油醚 - 氯仿 - 甲醇 = 2 : 2 : 1) 洗脱, 分离纯化得到化合物 **19** (4.1 mg)。E₂ 部分再经反相 Flash 柱色谱分离, 30% ~ 70% 甲醇水溶液洗脱得到 3 个洗脱部分 (E₂₋₁ ~ E₂₋₃), E₂₋₁ 经反相 HPLC 半制备 (C₁₈, 5 μm, 10 mm × 250 × 250 mm) 色谱, 以 MeOH-H₂O = 8 : 2 为流动相, 制备纯化得到化合物 **12** (1.0 mg) 和 **13** (1.1 mg)。E₄ 反复经 Sephadex LH-20 柱色谱 (石油醚 - 氯仿 - 甲醇 = 2 : 2 : 1) 洗脱, 得到化合物 **17** (4.5 mg) 和 **18** (3.0 mg)。E₅ 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (石油醚 - 氯仿 - 甲醇 = 2 : 2 : 1) 洗脱, 再经反相 HPLC 半制备色谱 (MeOH-H₂O = 58 : 42 洗脱) 分离纯化得到化合物 **9** (1.1 mg)。

Fr.F (25.0 g) 经 MCI 凝胶柱色谱 (10% ~ 100% 甲醇梯度洗脱), 分成 5 个部分 (F₁ ~ F₅)。F₃ 部分经 Sephadex LH-20 柱色谱 (氯仿 - 甲醇 = 5 : 1) 洗脱, 分离纯化得到化合物 **7** (5.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色结晶 (氯仿); ESI-MS m/z 465 [M + Na]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.84 (2H, s, H-26a, H-27a), 4.56 (2H, s, H-26b, H-27b), 3.25 (2H, dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, H-3 和 H-21), 2.41 (2H, d, $J = 13.0$ Hz, H-5 和 H-15), 1.97 (2H, dt, $J = 13.0, 5.0$ Hz,

H-7 和 H-15), 1.75 (2H, m, H-6 和 H-16), 1.72 (2H, m, H-1 和 H-19), 1.67 (2H, m, H-2 和 H-20), 1.57 (2H, m, H-10 和 H-18), 1.55 (2H, m, H-6 和 H-16), 1.53 (2H, m, H-11 和 H-12), 1.38 (2H, m, H-1 和 H-19), 1.11 (2H, m, H-5 和 H-17), 0.99 (2H, s, H-23 和 H-30), 0.76 (2H, s, H-24 和 H-29), 0.64 (2H, s, H-25 和 H-28); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 37.0 (C-1 和 C-19), 28.0 (C-2 和 C-20), 78.9 (C-3 和 C-21), 39.1 (C-4 和 C-22), 54.7 (C-5 和 C-17), 24.0 (C-6 和 C-16), 38.3 (C-7 和 C-15), 148.4 (C-8 和 C-14), 57.6 (C-9 和 C-13), 39.3 (C-10 和 C-18), 22.6 (C-11 和 C-12), 28.3 (C-23 和 C-30), 15.4 (C-24 和 C-29), 14.5 (C-25 和 C-28), 106.7 (C-26 和 C-27)。上述数据与文献^[7-8]报道的 α- 芒柄花萜醇数据基本一致, 确定化合物 **1** 为 α- 芒柄花萜醇。

化合物 **2**: 白色无定形粉末; (-) -ESI-MS m/z 455 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ 5.49 (1H, brs, H-12), 3.46 (1H, m, H-3), 2.64 (1H, m, H-18), 1.24 (3H, s, H-27), 1.23 (3H, s, H-26), 1.05 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-30), 1.00 (3H, s, H-25), 0.95 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-29), 0.88 (3H, s, H-24); ¹³C NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅) δ 39.2 (C-1), 28.0 (C-2), 77.9 (C-3), 38.9 (C-4), 55.6 (C-5), 18.6 (C-6), 33.4 (C-7), 39.8 (C-8), 47.9 (C-9), 39.2 (C-10), 17.3 (C-11), 125.4 (C-12), 139.1 (C-13), 42.3 (C-14), 28.6 (C-15), 24.7 (C-16), 47.9 (C-17), 53.4 (C-18), 39.3 (C-19), 37.3 (C-20), 30.9 (C-21), 37.1 (C-22), 28.5 (C-23), 16.4 (C-24), 15.5 (C-25), 17.3 (C-26), 23.7 (C-27), 179.9 (C-28), 23.4 (C-29), 21.2 (C-30)。以上数据与文献^[9-10]报道的熊果酸的数据基本一致, 确定化合物 **2** 为熊果酸。

化合物 **3**: 白色结晶 (氯仿); ESI-MS m/z 455 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.19 (1H, dd, $J = 11.0, 4.5$ Hz, H-3), 3.00 (1H, ddd, $J = 10.0, 10.0, 6.0$ Hz, H-19), 0.94 (3H, s, H-23), 0.75 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 0.97 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-27), 4.61, 4.74 (each, 1H, brs, H₂-29), 1.67 (3H, s, H-30); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 38.8 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3),

38.7 (C-4), 55.3 (C-5), 19.4 (C-6), 34.3 (C-7), 40.7 (C-8), 50.5 (C-9), 37.2 (C-10), 20.8 (C-11), 25.5 (C-12), 38.4 (C-13), 42.4 (C-14), 30.5 (C-15), 32.1 (C-16), 56.2 (C-17), 46.9 (C-18), 49.3 (C-19), 150.4 (C-20), 29.7 (C-21), 37.0 (C-22), 28.0 (C-23), 15.3 (C-24), 16.0 (C-25), 16.1 (C-26), 14.7 (C-27), 180.1 (C-28), 18.2 (C-29), 109.7 (C-30)。上述数据与文献^[11]报道的白桦脂酸数据基本一致, 确定化合物 **3** 为白桦脂酸。

化合物 **4**: 白色晶体 (丙酮), ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.14 (1H, t, *J* = 3.5 Hz, H-12), 3.53 (1H, q, *J* = 11.0 Hz, H-28), 3.24 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, H-3), 3.19 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-28), 1.10 (3H, s, Me-27), 1.00 (3H, s, Me-26), 0.98 (3H, s, Me-25), 0.96 (3H, s, Me-23), 0.94 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, Me-29), 0.81 (3H, d, *J* = 5.5 Hz, Me-30), 0.79 (3H, s, Me-24); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 38.8 (C-1), 27.2 (C-2), 79.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.2 (C-5), 18.3 (C-6), 32.8 (C-7), 40.0 (C-8), 47.7 (C-9), 36.9 (C-10), 23.4 (C-11), 125.0 (C-12), 138.7 (C-13), 42.0 (C-14), 26.0 (C-15), 23.3 (C-16), 38.0 (C-17), 54.0 (C-18), 39.4 (C-19), 39.4 (C-20), 30.6 (C-21), 35.2 (C-22), 28.1 (C-23), 15.6 (C-24), 15.7 (C-25), 17.3 (C-26), 23.3 (C-27), 69.9 (C-28), 21.3 (C-29), 16.8 (C-30)。以上数据与文献^[12]报道的熊果醇数据基本一致, 确定化合物 **4** 为熊果醇。

化合物 **5**: 无色粉末, ESI-MS *m/z*: 571 [M + H]⁺, 593 [M + Na]⁺, 569 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.30 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-4'), 6.25 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6), 6.22 (2H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2' 和 H-6'), 6.19 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-4), 5.25 (1H, m, H-14'), 2.88 (2H, m, H-7), 2.49 (2H, m, H-7'), 1.67 ~ 1.74 (4H, m, H-8 和 H-8'), 1.39 ~ 1.60 (26H, m, H-9 ~ H-16 和 H-9' ~ H-12'), 1.33 (2H, m, H-16'), 1.31 (2H, m, H-13'), 0.88 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-17'), 0.85 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-17); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 149.0 (C-1), 105.4 (C-2), 160.1 (C-3), 101.4 (C-4), 165.2 (C-5), 101.4 (C-6), 34.2 (C-7), 32.2 (C-8), 28.8 ~ 30.1 (C-9 ~ C-14 和

C-9' ~ C-12'), 31.9 (C-15), 22.7 (C-16), 13.9 (C-17), 171.7 (C = O), 146.0 (C-1'), 110.8 (C-2' 和 C-6'), 156.6 (C-3' 和 C-5'), 108.0 (C-4'), 36.6 (C-7'), 30.8 (C-8'), 25.3 (C-13'), 75.8 (C-14'), 37.0 (C-15'), 18.8 (C-16'), 14.1 (C-17')。以上数据与文献^[13-14]报道的 8-(3, 5-二羟基苯基)-1-丙基辛醇 2, 4-二羟基-6-十一烷基苯甲酸酯的数据基本一致, 确定化合物 **5** 为 8-(3, 5-二羟基苯基)-1-丙基辛醇 2, 4-二羟基-6-十一烷基苯甲酸酯。

化合物 **6**: 红色针晶; ESI-MS *m/z*: 283 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 12.31 (1H, s, OH), 12.12 (1H, s, OH), 7.63 (1H, s, 4-H), 7.37 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, 5-H), 7.08 (1H, s, 2-H), 6.69 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, 7-H), 3.94 (3H, s, OMe), 2.45 (3H, s, Ar-CH₃)。 ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 165.2 (C-1), 124.5 (C-2), 148.4 (C-3), 121.3 (C-4), 133.2 (C-4a), 110.3 (C-5), 162.5 (C-6), 106.8 (C-7), 166.5 (C-8), 108.2 (C-8a), 190.8 (C-9), 113.7 (C-9a), 182.0 (C-10), 135.2 (C-10a), 56.1 (OMe), 22.2 (Me)。以上数据与文献^[15-16]报道的大黄素甲醚基本一致, 确定化合物 **6** 为大黄素甲醚。

化合物 **7**: 白色针状结晶; ESI-MS *m/z* 433 [M + Na]⁺; 在 3 种不同展开溶剂 (氯仿-乙酸乙酯 = 4 : 1, *R_f* 值为 0.5; 正己烷-乙酸乙酯 = 2 : 1, *R_f* 值为 0.5; 氯仿-甲醇 = 40 : 1, *R_f* 值为 0.7) 系统中, 其薄层色谱 *R_f* 值与对照品 β-谷甾醇一致, 确定化合物 **7** 为 β-谷甾醇。

化合物 **8**: 无色油状物; [R]_D²⁰ + 11 (c 0.03, CHCl₃); ESI-MS *m/z* 261 [M + Na]⁺, 237 [M-H]⁻; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.82 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 6.89 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.78 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, H-6), 4.11 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-7), 2.84 (1H, dq, *J* = 7.5, 10.0 Hz, H-8), 2.26 (3H, s, H₃-9'), 0.77 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₃-9), 3.91 (3H, s, OMe-3), 3.10 (3H, s, OMe-7); ¹³C NMR (125 MHz, acetone-*d*₆) δ 212.1 (C-8'), 146.9 (C-3), 145.6 (C-4), 131.2 (C-1), 121.2 (C-6), 113.9 (C-5), 108.9 (C-2), 86.3 (C-7), 56.5 (OMe-3), 56.0 (OMe), 53.5 (C-8), 29.9 (C-9'), 13.7 (C-9)。以上数据与文献^[17]报道的 (+)-(7*S*, 8*R*)-4-羟基-3, 7-二甲氧基-1', 2', 3', 4', 5', 6', 7'-降七碳木脂烷-8'-酮的数据基本一致, 确定化合物 **8**

为 (+) - (7*S*, 8*R*) -4-羟基-3, 7-二甲氧基-1', 2', 3', 4', 5', 6', 7'-降七碳木脂烷-8'-酮。

化合物 **9**: 无色胶状物; (+) -ESI-MS m/z 245 $[M + Na]^+$; 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ 7.05 (1H, d, $J = 15.1$ Hz, H-7), 6.44 (1H, d, $J = 15.1$ Hz, H-8), 5.89 (1H, s, H-4), 2.62 (1H, d, $J = 18.5$ Hz, H-2a), 2.10 (1H, d, $J = 18.5$ Hz, H-2b), 2.40 (3H, s, H₃-10), 1.85 (3H, s, H₃-13), 1.18 (3H, s, H₃-11), 0.96 (3H, s, H₃-12); ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6) δ 42.0 (C-1), 50.2 (C-2), 196.9 (C-3), 127.9 (C-4), 167.4 (C-5), 79.6 (C-6), 136.9 (C-7), 131.6 (C-8), 201.2 (C-9), 24.5 (C-10), 23.8 (C-11), 23.5 (C-12), 19.5 (C-13)。以上数据与文献^[18]中报道的 (+) -去氢催吐萝芙木醇数据基本一致, 确定化合物 **9** 为 (+) -去氢催吐萝芙木醇。

化合物 **10**: 白色粉末, ESI-MS 223 $[M + H]^+$, 245 $[M + Na]^+$; 1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃), 3.93 (s, 3H, ArOCH₃), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 5.83 (s, 1H, ArOH), 6.29 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, ArCH = CH), 6.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 6-ArH), 7.08 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H, 5-ArH), 7.03 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, 2-ArH), 7.61 (d, $J = 16.2$ Hz, ArCH = CH); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 125.6 (C-1), 114.7 (C-2), 148.5 (C-3), 146.7 (C-4), 115.7 (C-5), 123.0 (C-6), 144.7 (C-7), 109.3 (C-8), 178.5 (C-9), 60.4 (C-10), 14.4 (C-11), 55.9 (-OCH₃)。以上数据与文献^[19-20]报道的 3-羟基-4-甲氧基苯丙烯酸乙酯的数据基本一致, 确定化合物 **10** 为 3-羟基-4-甲氧基苯丙烯酸乙酯。

化合物 **11**: 白色粉末; ESI-MS 223 $[M + H]^+$, 245 $[M + Na]^+$; 1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃), 3.93 (s, 3H, ArOCH₃), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 5.83 (s, 1H, ArOH), 6.29 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, ArCH = CH), 6.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 6-ArH), 7.08 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H, 5-ArH), 7.03 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, 2-ArH), 7.61 (d, $J = 16.2$ Hz, ArCH = CH); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 127.1 (C-1), 115.7 (C-2), 147.9 (C-3), 146.7 (C-4), 114.7 (C-5), 123.0 (C-6), 144.6 (C-7), 109.3 (C-8), 168.0 (C-9), 60.3 (C-10), 55.9 (-OCH₃), 14.4 (C-11)。

以上数据与文献^[20-23]报道的 4-羟基-3-甲氧基苯丙烯酸乙酯 ethyl ferulate 的数据基本一致, 确定化合物 **11** 为 4-羟基-3-甲氧基苯丙烯酸乙酯。

化合物 **12**: 白色针晶 (丙酮); EIMS 176 $[M]^+$; 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 7.58 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-4), 7.26 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.22 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 6.60 (1H, s, H-8), 6.54 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3), 3.58 (3H, s, OMe)。以上数据与文献^[24]报道的 7-甲氧基香豆素的数据基本一致, 确定化合物 **12** 为 7-甲氧基香豆素。

化合物 **13**: 黄色无定形固体; (+) -ESI-MS m/z 223 $[M + H]^+$, 245 $[M + Na]^+$; 1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 6.28 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 6.65 (1H, s, H-8), 3.94 (3H, s, OMe-5), 3.88 (3H, s, OMe-7)。以上数据与文献^[25]报道的 5, 7-二甲氧基-6-羟基香豆素的数据基本一致, 确定化合物 **13** 为 5, 7-二甲氧基-6-羟基香豆素。

化合物 **14**: 白色针晶 (氯仿); ESI-MS m/z 197 $[M-H]^-$; 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 7.37 (2H, s, H-2, H-6), 3.88 (6H, s, OMe-2)。以上数据与文献^[26]报道的 4-羟基-3, 5-二甲氧基苯甲酸的数据基本一致, 确定化合物 **14** 为 4-羟基-3, 5-二甲氧基苯甲酸。

化合物 **15**: 白色针状结晶 (氯仿); (-) -ESI-MS m/z 121 $[M-H]^-$; 1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 12.40 (1H, brs, COOH), 8.14 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2, 6), 7.63 (1H, m, H-4), 7.49 (2H, m, H-3, 5)。以上数据与文献^[27]报道的苯甲酸的数据基本一致, 确定化合物 **15** 为苯甲酸。

化合物 **16**: 白色无定型粉末; ESI-MS m/z 123 $[M + H]^+$, 145 $[M + Na]^+$, 121 $[M-H]^-$; 1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.88 (1H, s, H-7), 7.81 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2, H-6), 6.95 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3, H-5)。以上数据与文献^[28]报道的对羟基苯甲醛的数据基本一致, 确定化合物 **16** 为对羟基苯甲醛。

化合物 **17**: 白色无定型粉末; ESI-MS m/z 139 $[M + H]^+$, 161 $[M + Na]^+$; 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ 8.08 (1H, s, HO-6), 7.03 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2, H-6), 6.73 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3, H-5), 3.66 (2H, m, H-8), 2.69 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 3.57 (1H, m, HO-8); ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6) δ 131.0

(C-1), 130.7 (C-2, C-6), 115.8 (C-3, C-5), 156.5 (C-4), 39.4 (C-7), 64.2 (C-8)。以上数据与文献^[29]报道的对羟基苯乙醇的数据基本一致, 确定化合物 **17** 为对羟基苯乙醇。

化合物 **18**: 白色针状结晶 (丙酮); ESI-MS m/z 153 $[M-H]^-$; 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 10.8 (1H, s, COOH), 9.19 (2H, s, OH), 7.52 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 7.48 (1H, dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, H-6), 6.89 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5)。以上数据与文献^[30]报道 3, 4-二羟基苯甲酸的数据基本一致, 确定化合物 **18** 为 3, 4-二羟基苯甲酸。

化合物 **19**: 白色针状结晶 (氯仿); (-)-ESI-

MS m/z 167 $[M-H]^-$; 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 10.82 (1H, brs, COOH), 8.34 (1H, brs, HO-3), 7.59 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-6), 7.55 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 6.90 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 3.90 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6) δ 124.8 (C-1), 115.5 (C-2), 148.0 (C-3), 152.0 (C-4), 113.4 (C-5), 122.8 (C-6), 167.4 (C-7), 56.3 (OMe)。以上数据与文献^[31]报道的 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸的数据基本一致, 确定化合物 **19** 为 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸。

各化合物的化学结构见图 1。

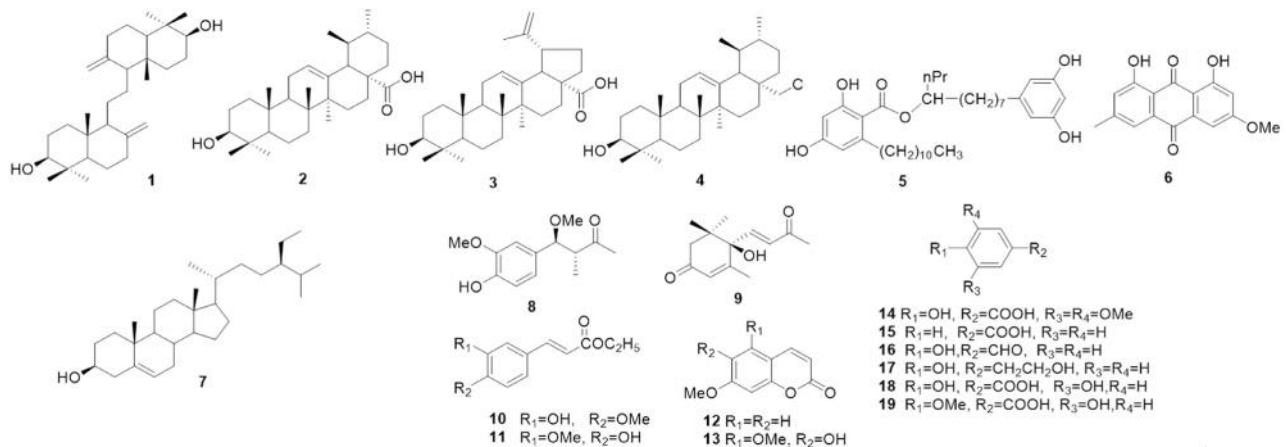


图 1 各化合物的结构

Fig 1 Structure of compounds

4 生物活性测定

4.1 神经细胞保护活性筛选

PC12 细胞接种至多聚赖氨酸包被的 96 孔板中, 密度为每孔 3.0×10^4 个。培养 24 h 细胞贴壁后, 换液, 对照组加入含 5% 胎牛血清、5% 马血清的高糖 DMEM 培养基, 模型组加入终浓度为 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MPP⁺ 的 DMEM 完全培养基, 各给药组在 MPP⁺ 模型基础上加入终浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的化合物 **1** ~ **19** (用 DMSO 配制); 于 37 °C、CO₂ 培养箱中培养 48 h。每孔加入 MTT (终浓度 $0.5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 再培养 4 h。酶标仪于 570 nm 处测定吸光度 (A)。细胞活力以相对保护率评价^[32]。

相对保护率 (%) = $[\text{样品组的 } OD (\text{光密度}) \text{ 值} - \text{模型组 } OD \text{ 值}] / [\text{对照组的 } OD \text{ 值} - \text{模型组的 } OD \text{ 值}] \times 100\%$

测定化合物 **1** ~ **19** 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞损伤保护的影响, 结果表明, 在 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下, 化合物 **9** 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞损伤显示出一定的保护作用, 其相对保护率为

(76.60 ± 10.67) %。与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4.2 其他生物活性筛选

与此同时, 对得到的单体化合物分别进行了抗氧化^[33]、人肿瘤细胞毒 (HCT28、Bel-7402、BGC-823、A549 和 A2780 细胞株)^[34]、肝细胞保护^[35] 和抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) (VsVG/HIV 模型)^[36] 等生物活性筛选。在相同浓度下, 所有化合物在药理模型筛选中均未显示明显活性。

5 讨论

本研究对樟科植物粗壮润楠中的化学成分及其生物活性进行探讨。首次从该科中分离得到 α -芒柄花萜醇和 8-(3, 5-二羟基苯基)-1-丙基辛醇 2, 4-二羟基-6-十一烷基苯甲酸酯。并对分离得到的化合物进行生物活性筛选。在 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下, (+)-去氢催吐萝芙木醇 (**9**) 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞损伤显示出一定的保护作用, 其相对保护率为 (76.60 ± 10.67) %。下一步应通过更广泛的生物活性及其作用机制的深入研究, 明确其药效物质基础及作用靶点, 为后续

临床应用及质量控制提供科学依据, 促进民间习用药材粗壮润楠的药学研究及资源开发利用。

参考文献

- [1] 李锡文. 中国植物志 [M]. 31 卷. 北京: 科学出版社, 1982: 7-14.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑编委会. 中国植物志 [M]. 第 31 卷. 北京: 科学出版社, 1982: 62-63.
- [3] Liu MT, Lin S, Wang YH, et al. Two novel glycosidic triterpene alkaloids from the stem barks of *Machilus yaoshansis* [J]. *Org Lett*, 2007, 9 (1): 129-132.
- [4] Li YR, Cheng W, Zhu CG, et al. Bioactive neolignans and lignans from the bark of *Machilus robusta* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74 (6): 1444-1452.
- [5] Bu PB, Li YR, Jiang M, et al. Glycosides from the bark of *Machilus robusta* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15 (5): 482-491.
- [6] 卜鹏滨, 里艳茹, 姜明, 等. 粗壮润楠中的木脂素类成分 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38 (11): 1740-1746.
- [7] Pauli GF. Comprehensive spectroscopic investigation of α -onocerin [J]. *Planta Med*, 2000, 66 (3): 299-302.
- [8] Mi Y, Schreiber JV, Corey EJ. Total synthesis of (+)- α -onocerin in four steps via four-component coupling and tetracyclization steps [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124 (38): 11290-11291.
- [9] Lin CN, Chung MI, Gan KH, et al. Xanthenes from formosan *Gentianaceous* plants [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26 (8): 2381-2384.
- [10] 张祖湘, 王亚凤, 张璞, 等. 黑蛭螭化学成分研究 (II) [J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34: 63-69.
- [11] Siddiqui S, Hafeez F, Begum S, et al. Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* [J]. *J Nat Prod*, 1988, 51 (2): 229-233.
- [12] 谢光波, 周思祥, 雷连娣, 等. 猫耳刺中三萜类化合物的结构研究 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32 (18): 1890-1892.
- [13] Oyama M, Xu ZH, Lee KH, et al. Fungal metabolites as potent protein kinase inhibitors: identification of a novel metabolite and novel activities of known metabolites [J]. *Lett Drug Des Discov*, 2004, 1 (1): 24-29.
- [14] Cordula H, Martin K, Mark B, et al. Hydroxyphenylundecane derivatives, a process for their production and their use: Canada. PCT Int. Appl. CA2498337A1 [P]. 2004-04-15.
- [15] 敏德, 徐丽萍, 张治针, 等. 天山大黄的化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23 (7): 416-418.
- [16] 高亮亮, 许旭东, 南海江, 等. 唐古特大黄化学成分研究 [J]. *中草药*, 2011, 42 (3): 443-446.
- [17] Cheng W, Zhu CG, Xu WD, et al. Chemical constituents of the bark of *Machilus wangchiana* and their biological activities [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72 (12): 2145-2152.
- [18] Kai H, Baba M, Okuyama T. Two new megastigmanes from the leaves of *Cucumis sativus* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2007, 55 (1): 133-136.
- [19] 付红伟, 郑春辉, 曹家庆, 等. 落花生枝叶化学成分的研究 (II) [J]. *中国药物化学杂志*, 2006, 16 (5): 309-310.
- [20] 秦汝兰, 吕重宁, 于洋, 等. 兴安升麻中酚酸类化学成分分离与鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (21): 112-117.
- [21] 曾庆友, 许瑞安. 阿魏酸乙酯的一锅法合成 [J]. *中国医药工业杂志*, 2010, 41 (4): 255-256.
- [22] 韦玮, 邓家刚, 郝二伟, 等. 黄红钻乙酸乙酯萃取部位化学成分分离鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (21): 51-55.
- [23] 王洪玲, 梁文娟, 钟国跃, 等. 小大黄根部酚类成分的研究 [J]. *中成药*, 2016, 38 (10): 2197-2200.
- [24] 温晶, 史海明, 管珂, 等. 刘寄奴的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2010, 41 (6): 870-873.
- [25] 孙辉, 李茜, 叶文才, 等. 兴安白头翁根茎的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2008, 39 (6): 819-822.
- [26] Chang YC, Chang FR, Wu YC. The constituents of *Lindera glauca* [J]. *J Chin Chem Soc*, 2000, 47 (2): 373-380.
- [27] Laurent P, Lebrun B, Braekman JC, et al. Biosynthetic studies on adaline and adalinine, two alkaloids from ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57 (16): 3403-3412.
- [28] Staddon BW, Weatherston J. Constituents of the stink glands of *Ilyocoris cimicoides* (Heteroptera: Naucoridae) [J]. *Tetrahedron Lett*, 1967, 8 (46): 4567-4571.
- [29] 冯卫生, 苏芳谊, 郑晓珂, 等. 华北楼斗菜的化学成分研究 [J]. *中国药学杂志*, 2011, 46 (7): 496-499.
- [30] Kim SY. Chemical constituents from *Dipsacus asper* [J]. *Saengyak Hakhoechi*, 1999, 30 (4): 420.
- [31] 石磊, 康文艺. 蝉翼藤根茎化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33 (7): 780-782.
- [32] 樊晓娜, 林生, 朱承根, 等. 小花异裂菊中的萜类成分及其活性 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35 (3): 315-322.
- [33] Wang Y, Shang XY, Wang SJ, et al. Structures, biogenesis, and biological activities of pyrano [4, 3-c] isochromen-4-one derivatives from the Fungus *Phellinus igniarius* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70 (2): 296-299.
- [34] Mo SY, Wang SJ, Zhou GX, et al. Phelligridins C-F: cytotoxic pyrano[4, 3-c] [2] benzo-pyran-1, 6-dione and furo[3, 2-c] pyran-4-one derivatives from *Phellinus igniarius* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67 (5): 823-828.
- [35] Li Y, Zhang DM, Li JB, et al. Hepatoprotective sesquiterpene glycosides from *Sarcandra glabra* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69 (4): 616-620.
- [36] Fan XN, Zi JC, Zhu CG, et al. Chemical constituents of *Heteroplexis microcephala* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72 (6): 1184-1190.

(收稿日期: 2022-03-19; 修回日期: 2022-04-08)

两种外泌体提取方法的比较以及外泌体对低氧肺动脉 高压肺血管重构的作用

郭峰¹, 黄宁^{1, 2*}, 胡长平^{2*} (1. 郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450052; 2. 中南大学湘雅药学院药理学系, 长沙 410078)

摘要: **目的** 比较超高速差速离心法和试剂盒法提取肺动脉平滑肌细胞 (PASMCs) 源性外泌体的纯度, 并评价超高速差速离心法提取外泌体的稳定性和适用性。探究低氧肺动脉高压 (PH) 大鼠血浆源性外泌体对 PASMCs 表型转化和肺动脉内皮细胞 (PAECs) 内皮间质转化的作用。**方法** ① 收集 PASMCs 培养基上清液, 分别用超高速差速离心法和试剂盒法提取外泌体, 通过透射电子显微镜观察外泌体形态、纳米微粒示踪分析检测外泌体粒径分布、蛋白质免疫印迹法检测外泌体标志蛋白表达, 评估外泌体纯度; ② 收集 PAECs 培养基上清液和大鼠血浆, 超高速差速离心法分别提取外泌体并评估外泌体纯度; ③ 构建低氧 PH 大鼠模型, 超高速差速离心法分别提取常氧和低氧大鼠血浆源性外泌体并作用于 PASMCs 和 PAECs, 免疫荧光检测各标志蛋白表达以评估外泌体对 PASMCs 表型转化和 PAECs 内皮间质转化的影响。**结果**

① 超高速差速离心法提取的 PASMCs、PAECs 和血浆源性外泌体形态典型, 纯度较高; 而试剂盒法提取的 PASMCs 源性外泌体纯度较低。② 低氧 PH 大鼠血浆源性外泌体诱导 PASMCs 发生表型转化和 PAECs 发生内皮间质转化。**结论** 超高速差速离心法提取外泌体纯度优于试剂盒法, 实验方法稳定且适用性强。低氧 PH 大鼠血浆源性外泌体可诱导 PH 肺血管重构。

关键词: 外泌体; 超高速差速离心法; 试剂盒法; 肺动脉内皮细胞; 肺动脉平滑肌细胞

中图分类号: R563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2286-09

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.013

Two extraction methods for exosomes and effect of exosomes on pulmonary arterial remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension

GUO Feng¹, HUANG Ning^{1, 2*}, HU Chang-ping^{2*} (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; 2. Department of Pharmacology, Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078)

Abstract: Objective To compare the purity of exosomes derived from pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) by ultra-high speed differential centrifugation method and kit method, assess the stability and applicability of ultra-high speed differential centrifugation method for exosomes extraction, and determine the effect of plasma-derived exosomes extracted from hypoxic-induced pulmonary hypertension (PH) rats on the phenotypic transformation of PASMCs and the endothelial-mesenchymal transition (EndMT) of pulmonary artery endothelial cells (PAECs). **Methods** ① Ultra-high speed differential centrifugation method and kit method were used respectively to obtain the PASMCs-derived exosomes. Transmission electron microscope was used to observe the morphology of exosomes; nanoparticle tracing was used to observe the particle size distribution of exosomes; Western blot was used to detect the expression of exosomes biomarkers, and the purity of exosomes was ultimately evaluated. ② Ultra-high speed differential centrifugation method was used to obtain the PAECs-derived and plasma-derived exosomes, and to evaluate the purity of exosomes. ③ The hypoxia-induced PH

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 82173817)。

作者简介: 郭峰, 男, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: 13949127402@126.com * **通信作者:** 黄宁, 女, 博士, 主要从事心血管药理研究, email: nhuang2021@163.com; 胡长平, 男, 博士, 二级教授, 主要从事心血管药理研究, email: huchangping@csu.edu.cn

model of rats was constructed. The plasma-derived exosomes from normoxic rats and hypoxic rats were obtained by ultra-high speed differential centrifugation, and were used to treat primary normoxic cultured PASMCs and PAECs derived from the pulmonary arteries of SD rats. The expression of various marker proteins was detected to assess the effect of exosomes on the phenotypic switching of PASMCs and PAECs-EndMT. **Results** ① The morphology of PASMCs, PAECs and plasma-derived exosomes extracted by ultra-high-speed differential centrifugation was typical, and the purity of exosomes was high. The purity of the PASMCs-derived exosomes extracted by the kit method was low. ② The plasma-derived exosomes of hypoxic rats promoted the phenotypic switching of PASMCs and PAECs-EndMT. **Conclusion** The purity of exosomes extracted by ultra-high-speed differential centrifugation is higher than that by the kit method, and the method is stable and applicable. The plasma-derived exosomes of hypoxic rats may promote the pulmonary arterial remodeling in rat with PH.

Key words: exosome; ultra-high speed differential centrifugation method; kit method; pulmonary artery endothelial cell; pulmonary artery smooth muscle cell

外泌体 (exosomes, Exos) 是细胞膜向内凹陷形成包含管腔小体的多泡体, 并通过与细胞膜融合释放到细胞外的异质性细胞外囊泡, 异质体体现在其细胞起源、大小、内容物和对靶细胞的作用^[1]。细胞膜向内凹陷时的不均一性导致了外泌体大小的异质性, 通常认为外泌体是直径为 40 ~ 160 nm 的膜性囊泡^[1]。提取高纯度外泌体是外泌体相关研究的首要环节, 而外泌体大小的异质性是导致提取外泌体纯度不足的主要原因。目前, 常用的外泌体提取方法包括超高速差速离心法、试剂盒法、蔗糖密度梯度离心法和免疫磁珠捕获法等, 其中超高速差速离心法和试剂盒法在基础性研究中应用最为广泛。本研究对比了超高速差速离心法和试剂盒法对外泌体的提取效果, 以期为后续外泌体相关研究奠定基础。

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一种静息状态下平均肺动脉压力 > 20 mmHg, 肺血管阻力 ≥ 3 Wood 单位的进行性疾病^[2]。肺血管重构是 PH 的典型病理特征, 是引起肺血管压力和阻力升高的主要原因, 其潜在机制尚未完全阐明^[3]。肺动脉内皮细胞 (pulmonary artery endothelial cells, PAECs) 和肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs) 在 PH 肺血管重构中均发挥重要作用。PH 时, 内膜损伤可致 PAECs 发生内皮间质转化 (endothelial-mesenchymal transition, EndMT), 发生 EndMT 后的 PAECs 肿胀变大且失去紧密连接, 增殖和促炎能力增强, 最终导致内皮屏障破坏和内皮功能紊乱^[4-5]; PASMCs 由收缩型转化为合成型, 获得增殖、迁移、分泌活性物质和胞外基质等特点, 从

而促进中膜肥厚^[6-7]。本课题组前期研究表明, PAECs-EndMT 和 PASMCs 表型转化均可促进低氧 PH 肺血管重构^[8-9]。据文献报道, 外泌体通过直接作用于肺血管细胞或介导肺血管细胞相互作用而参与 PH 肺血管重构^[10-14]。然而, 外泌体是否通过调控 PAECs-EndMT 和 PASMCs 表型转化从而促进 PH 肺血管重构, 目前尚未见报道。本研究提取低氧 PH 大鼠血浆源性外泌体并分别作用于 PASMCs 和 PAECs, 检测其对 PASMCs 表型转化和 PAECs-EndMT 的作用, 以期进一步阐明 PH 的发病机制, 为 PH 的防治提供参考和新思路。

1 材料

1.1 仪器与试剂

胎牛血清、DMEM 高糖培养基 (以色列 Bioind 公司), EGM2 内皮培养基 (瑞士 LonZa 公司), Exo-Quick-TC 试剂盒 (美国 SBI 公司), CD63 抗体、PCNA 抗体 (武汉 Proteintech 公司), CD9 抗体、TSG101 抗体、CD31 抗体 (美国 Abcam 公司), PKH67 (美国 Sigma 公司), α -SMA 抗体 (美国 CST 公司), SM22 α (武汉 ABclonal 公司)。

小动物超声影像系统 (Vevo2100)、超高速离心机 (美国 Beckman 公司), IJ-6A 台式冷冻离心机 (美国 Beckman-Coulter 公司), 激光共聚焦显微镜、倒置显微镜 (德国蔡司公司), 生物型透射电子显微镜 (美国 FEI 公司), Zetasizer 粒径分析仪 (英国 Malvern 公司), 低氧舱 (长沙长锦科技有限公司), ChemiDoc XRS + 成像系统 (美国 Bio-Rad 公司), 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司)。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 180 ~ 220 g (动物

许可证号: No. CSU2017009, 中南大学实验动物学部), 常规饲养 1 周。

2 方法

2.1 低氧诱导 PH 大鼠模型

SD 大鼠按照体质量随机分为常氧对照组和低氧模型组, 每组 10 只。校准并设置低氧仓氧含量为 10%, 低氧 3 周以建立低氧 PH 大鼠模型^[8, 15]。模型建立期间, 将钠石灰和无水氯化钙置于低氧舱底部以吸收二氧化碳和水分, 并及时更换。常氧对照组大鼠以氧含量 21% 处理 3 周。实验期间, 大鼠自由进食、饮水。

2.2 大鼠右心室收缩压测定方法

称量大鼠体质量, 2% 戊巴比妥钠 ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 腹腔注射) 麻醉, 固定麻醉大鼠于解剖板上。右心导管法测定右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP)。大鼠颈正中偏右找到并钝性分离右颈总静脉, 丝线结扎静脉远心端, 用眼科镊挑起右颈总静脉并用显微剪刀剪出 V 型切口, 将 PE 软导管 (外径为 0.96 mm, 内径为 0.58 mm) 从 V 型切口插入, 并缓慢推进, 用成都泰盟 BL410 系统记录波形。导管首先到达右心房并出现心房波, 此时轻微地上下、旋转导管以进入右心室, 直至出现心室波, 待波形稳定 1 min 左右后, 记录 RVSP。

2.3 原代大鼠 PSMCs 的培养

采用贴壁法培养常氧大鼠原代 PSMCs。雄性 SD 大鼠, 180 ~ 220 g, 称重, 麻醉, 取出肺动脉置于磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液中; 快速去除肺动脉纤维外膜, 转移至干净培养皿, 加入适量含 20% 血清的高糖培养基; 沿主干和分支轻柔地剪开肺血管, 小心刮落内皮层细胞, 用剪刀将处理后的肺血管剪碎; 利用牙科探针将剪碎的肺血管碎块快速在培养瓶底部铺开; 加入含 20% 血清的高糖培养基, 置于培养箱中培养约 5 d; 牙科探针小心去除组织块, 加入 20% 血清的高糖培养基, 置于培养箱中培养 1 ~ 2 d; 胰酶消化, 使用第 3 ~ 6 代 PSMCs 进行后续实验。

2.4 原代大鼠 PAECs 的培养

采用免疫磁珠分选法培养常氧大鼠原代 PAECs。雄性大鼠, 250 ~ 300 g, 称重, 麻醉, 取出肺动脉置于 PBS 中; 快速去除肺动脉纤维外膜, 转移至干净培养皿, 加入适量胶原酶, 剪碎肺动脉, 37℃ 消化 1 h, 每 5 min 振荡混匀一次; 加入适量 5% EGM2 内皮培养基终止消化, 200 目筛网过滤以去除未完全消化的组织块; 加

入 CD31-FITC 内皮细胞标志蛋白抗体, 室温避光孵育 15 min; 加入 10 μL 免疫磁珠, 室温避光孵育 15 min; 2500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 500 μL buffer 重悬; 约 3 mL buffer 润洗分选柱, 将 buffer 重悬的细胞悬液加入分选柱, 自由留下, 3 mL buffer 清洗分选柱 3 次; 加入 5 mL 5% EGM2 内皮培养基, 使用活塞快速推出细胞; 将推出的细胞悬液置于培养箱中培养。胰酶消化, 使用第 1 ~ 6 代 PAECs 进行后续实验。

2.5 试剂盒法提取 PSMCs 源性外泌体

收集 PSMCs 细胞培养上清液, 4℃ 300 g 离心 10 min; 3000 g 离心 15 min; 12 000 g 离心 45 min; 0.22 μm Millipore 过滤器过滤; 将上清液转移至超滤管, 3000 g 离心 20 min, 浓缩细胞上清液; 将浓缩后的细胞上清液转移至 1.5 mL EP 管, 加入 Exo-Quick-TC 试剂, 翻转混匀, 4℃ 过夜; 1500 g 离心 30 min, 沉淀外泌体; 100 μL PBS 重悬外泌体, 4℃ 冰箱备用。为避免引入杂质, 本课题中凡涉及外泌体所使用的 PBS, 均用 0.22 μm Millipore 过滤器过滤。

2.6 超高速差速离心法提取外泌体

2.6.1 超高速差速离心法提取 PSMCs 源性外泌体 收集 PSMCs 细胞培养上清液, 4℃ 300 g 离心 10 min; 3000 g 离心 15 min; 12 000 g 离心 45 min; 120 000 g 离心 2 h; 移液枪小心移除废弃上清, PBS 重悬外泌体; 0.22 μm Millipore 过滤器过滤外泌体重悬溶液; 吸取过滤后的外泌体重悬溶液于干净超速离心管中, PBS 配平, 4℃ 120 000 g 离心 70 min; 100 μL PBS 重悬外泌体, 4℃ 冰箱备用。

2.6.2 超高速差速离心法提取 PAECs 源性外泌体 收集 PAECs 细胞培养上清液, 提取方法同“2.6.1”项下 PSMCs 源性外泌体。

2.6.3 超高速差速离心法提取血浆源性外泌体 收集常氧和低氧大鼠血浆于含抗凝剂 EDTA 的采血管, 4℃, 2000 g 离心 10 min 获得血浆; 提取方法同“2.6.1”项下 PSMCs 源性外泌体。

2.7 透射电子显微镜观察外泌体形态

外泌体悬液和 2% 多聚甲醛按 1 : 1 混合, 滴于干净塑料薄膜上, 将正面电镜碳网扣在液滴上, 4℃ 静置 20 min, 去离子水洗涤; 1% 戊二醛处理 2 min, 去离子水洗涤; 醋酸双氧铀负染 90 s, 烤干碳网, 上机检测。

2.8 Western blot 分析检测外泌体标志蛋白的表达 用 50 μL 蛋白裂解液重悬外泌体, 冰上涡旋

裂解 30 min; $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 将上清液吸取至干净的 200 μL EP 管。按照 BCA 试剂盒法测定蛋白质浓度。配制 SDS-PAGE, 电泳, 转膜, 孵育一抗 CD9 (1:2000)、CD63 (1:2000)、TSG101 (1:2000) 过夜, 孵育二抗, 显影, 成像。

2.9 粒径分析仪检测外泌体粒径

将超高速差速离心得到的外泌体重悬于 PBS 溶液, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存; 选择一次性干净的样品池, 对光使用无尘纸擦拭确保光路上无颗粒附着外管壁; 缓慢注入外泌体并避免气泡, 盖子封住样品池; 将样品池放入仪器, 按照标准操作规程进行仪器检测。

2.10 激光共聚焦检测 PSMCs 和 PAECs 对外泌体的摄取

超高速差速离心法得到外泌体后, 小心去除上清液, 用 0.5 mL Diluent C 重悬外泌体; 加入 4 μL PKH67 至重悬了外泌体的 Diluent C 溶液中, 混匀, 常温避光孵育 4 min; 2 mL 1% BSA 溶液终止染色; 转移染色后的外泌体溶液于干净的超离管中, PBS 配平, $4\ ^\circ\text{C}$ 120 000 g 离心 70 min, 以去除残余染料; 小心移除废弃上清液, 100 μL PBS 重悬外泌体; 将 PKH67 标记的外泌体加入激光共聚焦培养皿培养的 PSMCs 或 PAECs 中, 培养箱中孵育 12 h; 加入 500 μL 4% 多聚甲醛固定液, 室温固定 20 min; 加入 500 μL DAPI 染色液, 室温染色 5 min; 激光共聚焦拍照, 记录。

2.11 免疫荧光检测 PSMCs 表型转化和 PAECs-EndMT 标志蛋白的表达

从培养箱中取出处理完成的 96 孔细胞培养板, 弃培养基, PBS 洗涤; 每孔加入 100 μL 4% 多聚甲醛, 室温固定 20 min, PBS 洗涤; 每孔加入 100 μL TritonX-100, 室温透化 10 min, PBS 洗涤; 每孔加入 100 μL 1% BSA, 室温封闭 1 h; $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育一抗 CD31 (1:200)、 α -SMA (1:200)、PCNA (1:400) 过夜, PBS 洗涤; 室温孵育相应二抗 1 h, PBS 洗涤; 每孔加入 50 μL DAPI 染液, 室温染色 5 min, PBS 洗涤; 显微镜拍照、记录。

2.12 统计学分析

所有数据均以平均值 \pm 标准误表示。两组均数比较采用独立样本的 Student's *t* 检验。统计分析采用 SPSS 19.0 软件, 双侧 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 试剂盒法提取 PSMCs 源性外泌体的鉴定

透射电子显微镜结果显示, 提取的 PSMCs 外泌体样本中仅观察到直径约 10 nm 的囊泡, 而未观察到直径为 40 ~ 160 nm 的膜性囊泡 (见图 1A)。Western blot 结果显示, 提取的外泌体样本中检测不到外泌体标志蛋白 CD63 和 TSG101 的表达 (见图 1B)。纳米微粒示踪分析结果显示, 粒径 40 ~ 160 nm 的颗粒仅占 33%, 其余颗粒粒径分布于 3 ~ 10 nm 或 160 ~ 600 nm (见图 1C)。综上, 试剂盒法提取的 PSMCs 源性外泌体纯度不高。

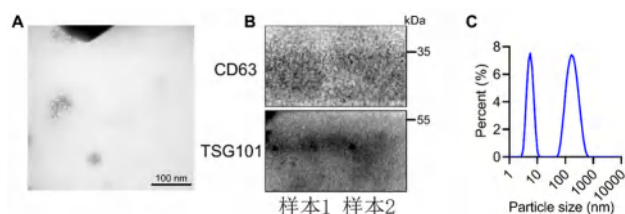


图 1 透射电子显微镜 (A)、蛋白质免疫印迹 (B) 和纳米微粒示踪分析 (C) 鉴定试剂盒法提取的 PSMCs 源性外泌体

Fig 1 Transmission electron microscope (A), Western blot (B) and nanoparticle tracing analysis (C) to identify PSMCs-derived exosomes by the kit method

3.2 超高速差速离心法提取 PSMCs 源性外泌体的鉴定

透射电子显微镜结果显示, 外泌体呈典型的“杯状”结构, 粒径约为 100 nm (见图 2A)。Western blot 检测外泌体标志蛋白 CD63 和 TSG101, 发现 CD63 和 TSG101 在外泌体中呈高表达 (见图 2B)。纳米微粒示踪分析结果显示, 粒径 40 ~ 160 nm 的颗粒所占百分比大于 98% (见图 2C)。综上所述, 超高速差速离心法提取的 PSMCs 源性外泌体纯度较高, 优于试剂盒法。

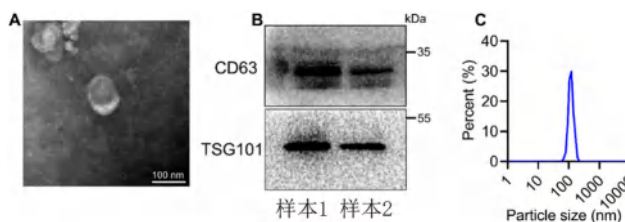


图 2 透射电子显微镜 (A)、蛋白质免疫印迹 (B) 和纳米微粒示踪分析 (C) 鉴定超高速差速离心法提取的 PSMCs 源性外泌体

Fig 2 Transmission electron microscope (A), Western blot (B) and nanoparticle tracing analysis (C) to identify PSMCs-derived exosomes by the ultra-high speed differential centrifugation

3.3 超高速差速离心法提取 PAECs 源性外泌体的鉴定

Western blot 检测外泌体标志蛋白 CD9, 发现 CD9 在提取的外泌体中呈高表达, 而在 PAECs 细胞碎片中基本不表达 (见图 3A)。纳米微粒示踪分析结果显示, 粒径 40 ~ 160 nm 的颗粒所占百

分比大于 99% (见图 3B)。综上所述,超高速差速离心法提取的 PAECs 源性外泌体纯度较高。

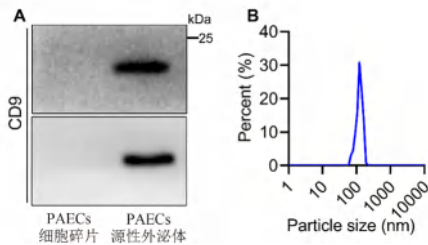


图 3 蛋白质免疫印迹 (A) 和纳米微粒示踪分析 (B) 鉴定超高速差速离心法提取的 PAECs 源性外泌体

Fig 3 Western blot (A) and nanoparticle tracing analysis (B) to identify PAECs-derived exosomes by the ultra-high speed differential centrifugation

3.4 超高速差速离心法提取血浆源性外泌体鉴定

以常氧为例,透射电子显微镜结果显示,外泌体呈典型的“杯状”结构,粒径约为 100 nm (见图 4A)。Western blot 检测外泌体标志蛋白 CD9,发现 CD9 在血浆源性外泌体中呈高表达 (见图 4B)。纳米微粒示踪分析结果显示,粒径 40 ~ 160 nm 的颗粒所占百分比大于 98% (见图 4C)。综上所述,超高速差速离心法提取的血浆源性外泌体纯度较高。

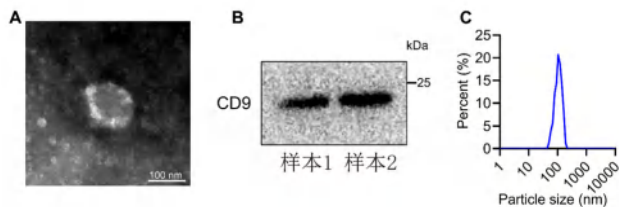


图 4 透射电子显微镜 (A)、Western blot (B) 和纳米微粒示踪分析 (C) 鉴定超高速差速离心法提取的大鼠血浆源性外泌体

Fig 4 Transmission electron microscope (A), Western blot (B) and nanoparticle tracing analysis (C) to identify plasma-derived exosomes by the ultra-high speed differential centrifugation

3.5 低氧构建 PH 大鼠模型

与常氧对照组 (21%O₂, 21 d) 相比,低氧模型组 (10%O₂, 21 d) 大鼠体重显著降低, RVSP 显著升高,右心室重量 / (左心室 + 室间隔) 重量 RV / (LV + S)、右心室重量 / 胫骨长度 (RV/tibial length) 显著升高 (见图 5A ~ E)。同时,多普勒超声检测结果显示,与常氧对照组相比,低氧模型组大鼠肺动脉壁厚度 (PAWT) 与右心室壁厚度 (RVWT) 显著升高,而肺动脉血流加速时间 / 肺动脉血流射血时间 (PAT/PET) 与三尖瓣环收缩期位移 (TAPSE) 显著降低 (见图 5F ~ M)。HE 染色结果显示,与常氧对照组相比,低氧模型组大鼠肺血管明显增厚,管腔狭窄 (见图 5N ~ P)。综上,

低氧诱导 PH 大鼠模型成功。

3.6 血浆源性外泌体对 PSMCs 表型转化的作用

首先,用 PKH67 标记的血浆源性外泌体孵育 SD 大鼠原代 PSMCs 12 h,激光共聚焦实验证明外泌体可进入原代大鼠 PSMCs (见图 6A)。接下来,分别用常氧大鼠血浆源性外泌体 (Exos-Normoxia) 和低氧大鼠血浆源性外泌体 (Exos-Hypoxia) 孵育常氧培养的大鼠 PSMCs 24 h。免疫荧光结果显示,相对于 Exos-Normoxia, Exos-Hypoxia 处理的 PSMCs 中收缩型标志蛋白 α -SMA 表达显著降低,而增殖型标志蛋白 PCNA 表达显著升高 (见图 6B ~ C)。由此认为, Exos-Hypoxia 可诱导 PSMCs 发生表型转化。

3.7 血浆源性外泌体对 PAECs-EndMT 的作用

首先,用 PKH67 标记的血浆源性外泌体孵育 SD 大鼠原代 PAECs 12 h,激光共聚焦实验证明外泌体可进入原代大鼠 PAECs (见图 7A)。接下来,分别用 Exos-Normoxia 和 Exos-Hypoxia 孵育常氧培养的大鼠 PAECs 24 h。免疫荧光结果显示,相对于 Exos-Normoxia, Exos-Hypoxia 处理的 PAECs 中内皮细胞标志蛋白 CD31 表达显著降低,而间质样细胞标志蛋白 α -SMA 表达显著升高 (见图 7B ~ C)。由此认为, Exos-Hypoxia 可诱导 PAECs 发生 EndMT。

4 讨论

本研究旨在比较试剂盒法和超高速差速离心法提取外泌体的纯度,并探究血浆源性外泌体在 PH 发病机制中的作用,揭示外泌体调控 PH 肺血管重构的潜在机制,结果发现:① 相较于试剂盒法,超高速差速离心法提取外泌体的纯度显著升高;② 超高速差速离心法可提取高纯度的 PSMCs、PAECs 和血浆源性外泌体,适用性强;③ Exos-Hypoxia 可进入 PSMCs,诱导 PSMCs 发生表型转化;④ Exos-Hypoxia 可进入 PAECs,诱导 PAECs 发生 EndMT。

外泌体相关研究的首要环节是提取高纯度外泌体。目前,常用的外泌体提取方法有超高速差速离心法、试剂盒法、蔗糖密度梯度离心法和免疫磁珠捕获法等。现将上述几种方法进行如下对比 (见表 1)。虽然蔗糖密度梯度离心法和免疫磁珠捕获法能够得到更高纯度外泌体,但耗时长、费用高且操作复杂,不适于大规模开展实验。本研究比较了超高速差速离心法和试剂盒法,通过透射电子显微镜观察外泌体形态、纳米微粒示踪分析检测外泌体粒径分布、蛋白质免疫印迹检测

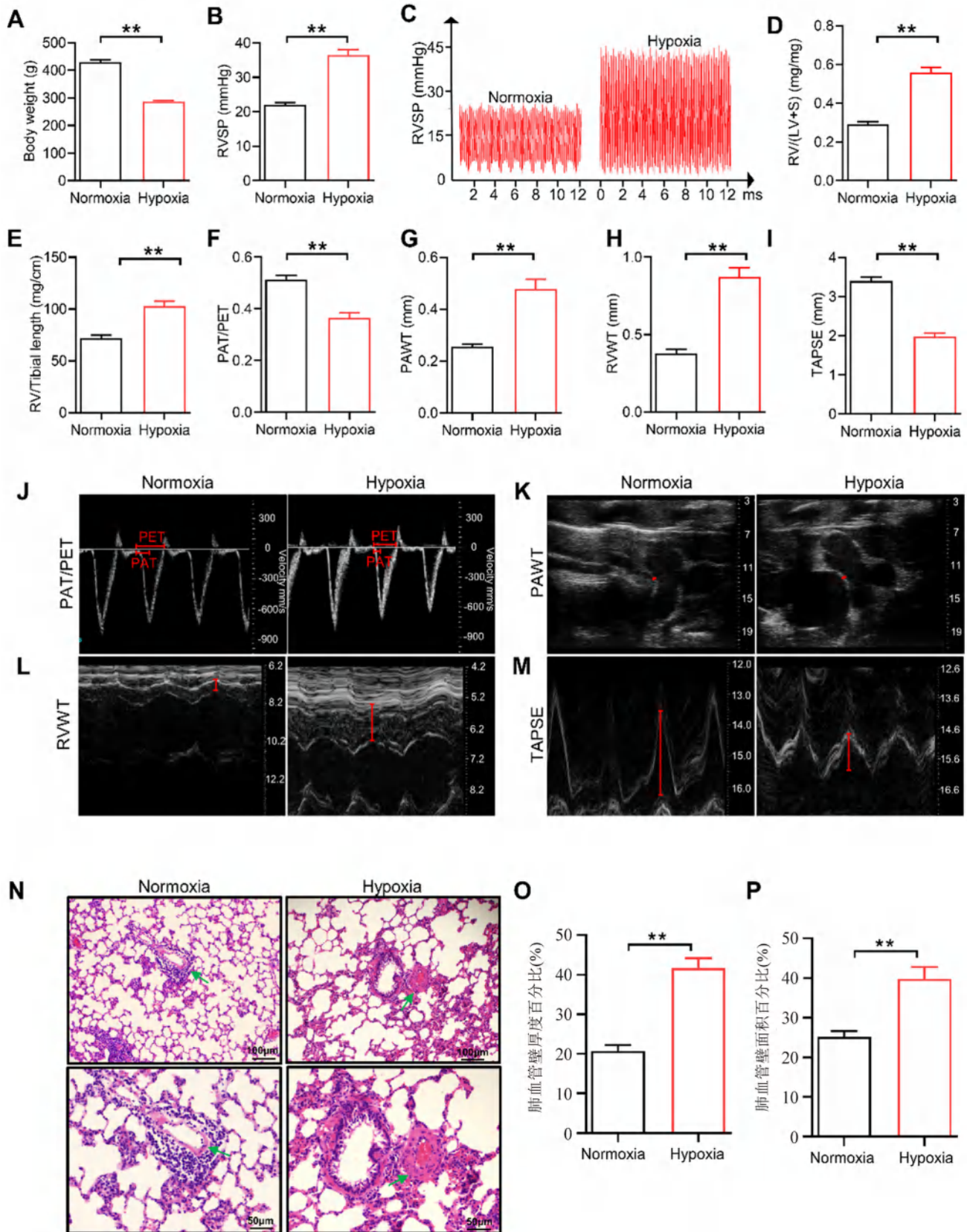


图 5 体质量 (A)、右心室收缩压 (B ~ C)、右心室重构指数 (D ~ E)、超声心动图指标 (F ~ M) 及肺血管重构指标 (N ~ P) 确认低氧 (10%O₂, 21 d) 诱导 PH 大鼠模型构建成功 (**P < 0.01)

Fig 5 Body weight (A), right ventricular systolic pressure (B ~ C), indexes of right heart remodeling (D ~ E), indexes of echocardiography (F ~ M) and indexes of pulmonary arterial remodeling (N ~ P) to confirm the successful construction of PH rat model induced by hypoxia (10%O₂, 21 d) (**P < 0.01)

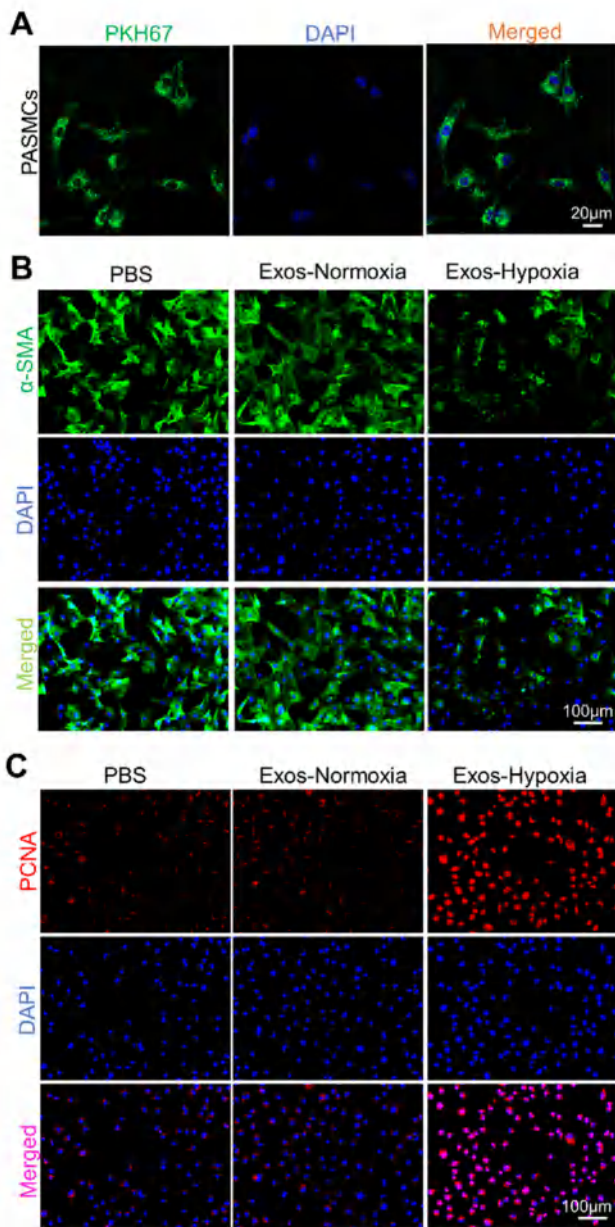


图 6 激光共聚焦和免疫荧光分别检测 PASMCS 对 PKH67 标记外泌体的摄取 (A) 和低氧大鼠血浆源性外泌体对 PASMCS 表型转化标志蛋白 α -SMA 和 PCNA 表达的影响 (B ~ C)

Fig 6 Laser confocal microscopy for the uptake of PKH67-labeled exosomes by PASMCS (A) and immunofluorescence for the expression of phenotypic transformation biomarkers α -SMA and PCNA in PASMCS (B ~ C)

外泌体标志蛋白表达,提示超高速差速离心法提取的外泌体纯度显著优于试剂盒法。此外,本研究也利用超高速差速离心法分别提取 PASMCS、PAECs 和血浆源性外泌体,发现均能得到较高纯度的外泌体。提示超高速差速离心法实验方法稳定,适用性强,操作性高,提取外泌体的纯度理想,可用于各项外泌体相关基础性研究中。

外泌体作为一种 40 ~ 160 nm 的膜性囊泡,

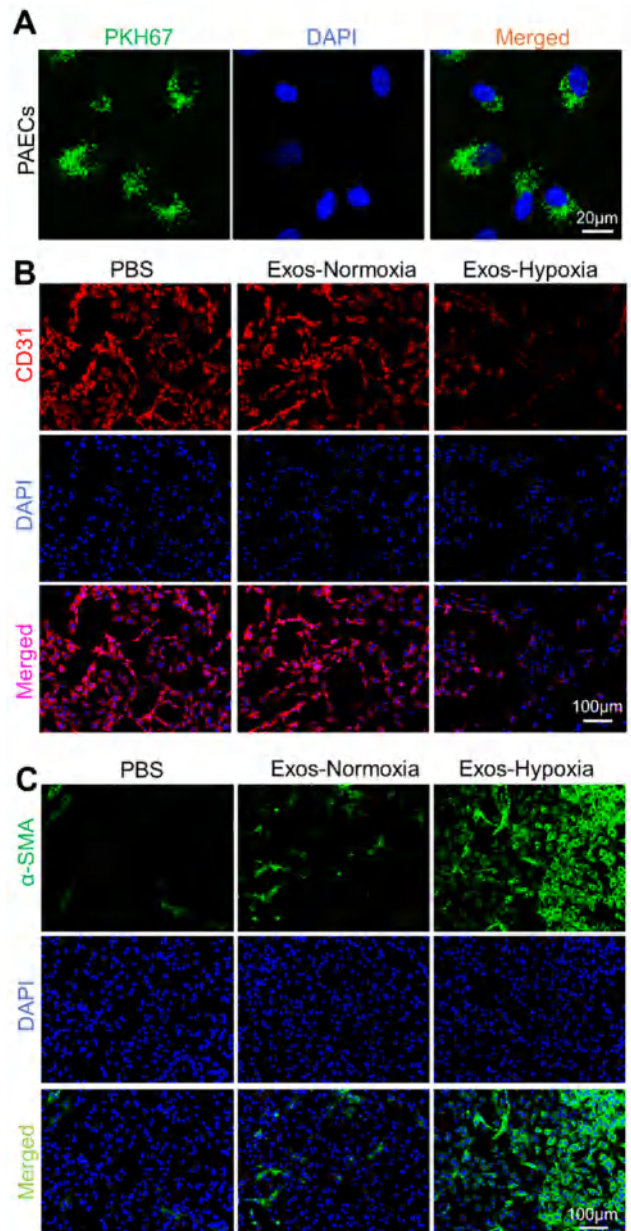


图 7 激光共聚焦和免疫荧光分别检测 PAECs 对 PKH67 标记外泌体的摄取 (A) 和低氧大鼠血浆源性外泌体对 PAECs 间质转化标志蛋白 CD31 和 α -SMA 表达的影响 (B ~ C)

Fig 7 Laser confocal microscopy for the uptake of PKH67-labeled exosomes by PAECs (A) and immunofluorescence for the expression of EndMT biomarkers CD31 and α -SMA in PAECs (B ~ C)

通过其丰富的蛋白质、脂质及核酸内容物对毗邻或远端的靶细胞发挥多样的生物学作用如炎症反应、免疫应答、细胞分化、细胞死亡、细胞增殖与迁移、血管新生等,从而参与高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、心肌梗死、心肌肥大等心血管疾病的进程^[16-19]。研究表明,外泌体也参与介导 PH 的发生、发展,这可能与外泌体中的微小 RNA 和蛋白质内容物相关。外泌体可调控多种细胞的表型转化进程,包括间质细胞上皮化、

表 1 几种常用外泌体提取方法的对比

Tab 1 Several extraction methods for exosomes

提取方法	提取原理	提取时长	优点	缺点
超高速差速离心法	通过由低速到高速反复离心, 沉淀悬液中不同大小的颗粒	约 3 h	操作简单; 保证颗粒形态完整性; 无外源添加物	效率低; 可能存在大小接近的微粒或蛋白团
试剂盒法	聚乙二醇可与疏水性蛋白和脂质分子结合, 形成网状结构, 进而捕获外泌体	约 12 h	效率高; 操作简单	费用高; 纯度低; 杂蛋白较多
蔗糖密度梯度离心法	在超速离心力的作用下, 蔗糖介质形成密度阶层, 通过密度梯度离心, 使外泌体沉降在某一个密度范围	约 18 h	纯度高	操作复杂; 存在蛋白质或核酸降解
免疫磁珠捕获法	在超高速离心获取外泌体基础上, 表面包被外泌体标志物的抗体磁珠与外泌体共孵育, 特异性识别外泌体	约 5 h (超高速离心获取外泌体) 或 20 h (蔗糖密度梯度离心获取外泌体)	纯度高	成本高; 产量少; 只能收集一类 exosomes; 损失多; 步骤烦琐; 受种属特异性限制

上皮间质转化、EndMT 和平滑肌细胞表型转化等^[20-22]。但目前外泌体与平滑肌细胞表型转化和 EndMT 间的相关报道较少。人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 源性外泌体可上调人主动脉平滑肌细胞 (human aortic smooth muscle cells, HASMCs) 中收缩型标志蛋白 (α -SMA、Smoothelin、Calponin) 的表达^[23]; miR143/145 可通过 HUVECs 源性细胞外囊泡传递至 HASMCs, 从而调控 HASMCs 表型转化^[24]; 外泌体可促进血管平滑肌细胞向钙化表型转化^[25-26]。视网膜上皮细胞源性外泌体抑制高糖诱导的 HUVECs 发生 EndMT, 这可能是因为外泌体中的 miR-202-5p 传递至 HUVECs 并调控 TGF/Smad 信号通路^[27]。黑色素瘤细胞源性外泌体可促进 HUVECs 发生 EndMT^[28]。MSC 源性外泌体可抑制 PAECs 和视网膜微血管内皮细胞发生 EndMT^[20, 29]。在上述研究基础上, 本课题构建了低氧 PH 大鼠模型, 并提取 Exos-Normoxia 和 Exos-Hypoxia。将 Exos-Normoxia 和 Exos-Hypoxia 孵育常氧培养的大鼠 PSMCs 和 PAECs, 通过免疫荧光检测 PSMCs 和 PAECs 中表型转化和 EndMT 标志蛋白表达变化, 证明 Exos-Hypoxia 可促进 PSMCs 表型转化, 也可促进 PAECs 发生 EndMT。

综上所述, 超高速差速离心法虽然需要配备超高速离心机, 但获得的外泌体纯度显著优于试剂盒法。试剂盒法提取外泌体的纯度不理想, 且价格昂贵, 研究者应斟酌使用。此外, 超高速差速离心法提取的低氧大鼠血浆源性外泌体可进入 PSMCs 和 PAECs, 促进 PSMCs 表型转化和 PAECs 发生 EndMT, 从而促进 PH 肺血管重构。此研究进一步阐明了 PH 的发病机制, 为防治 PH 提供参考和新思路。

参考文献

- [1] Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367 (6478): eaau6977.
- [2] Galie N, Mclaughlin VV, Rubin LJ, et al. An overview of the 6th world symposium on pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2019, 53 (1): 1802148.
- [3] Hassoun PM. Pulmonary arterial hypertension [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385 (25): 2361-2376.
- [4] Gorelova A, Berman M, Al Ghoulh I. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 34 (12): 891-914.
- [5] Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2015, 131 (11): 1006-1018.
- [6] Stenmark KR, Frid MG, Graham BB, et al. Dynamic and diverse changes in the functional properties of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114 (4): 551-564.
- [7] Lechartier B, Berrebeh N, Huertas A, et al. Phenotypic diversity of vascular smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension: implications for therapy [J]. *Chest*, 2022, 161 (1): 219-231.
- [8] Zhang W, Zhu T, Wu W, et al. LOX-1 mediated phenotypic switching of pulmonary arterial smooth muscle cells contributes to hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 84-95.
- [9] Liu T, Zou XZ, Huang N, et al. MiR-27a promotes endothelial-mesenchymal transition in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension by suppressing BMP signaling [J]. *Life Sci*, 2019, 227: 64-73.
- [10] Sindi HA, Russomanno G, Satta S, et al. Therapeutic potential of KLF2-induced exosomal microRNAs in pulmonary hypertension [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 1185.
- [11] Deng L, Blanco FJ, Stevens H, et al. MicroRNA-143 activation regulates smooth muscle and endothelial cell crosstalk in pulmonary arterial hypertension [J]. *Circ Res*,

- 2015, 117 (10): 870-883.
- [12] Zhang M, Xin W, Ma C, et al. Exosomal 15-LO2 mediates hypoxia-induced pulmonary artery hypertension in vivo and in vitro [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (10): 1022.
- [13] Yuan K, Shamskhou EA, Orcholski ME, et al. Loss of endothelium-derived wnt5a is associated with reduced pericyte recruitment and small vessel loss in pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2019, 139 (14): 1710-1724.
- [14] Ferrer E, Dunmore BJ, Hassan D, et al. A potential role for exosomal translationally controlled tumor protein export in vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 59 (4): 467-478.
- [15] Ge X, Zhang W, Zhu T, et al. Hypoxia-activated platelets stimulate proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells by phosphatidylserine/LOX-1 signaling-impelled intercellular communication [J]. *Cell Signal*, 2021, 87: 110149.
- [16] Wang C, Li Z, Liu Y, et al. Exosomes in atherosclerosis: performers, bystanders, biomarkers, and therapeutic targets [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (8): 3996-4010.
- [17] Xiong YY, Gong ZT, Tang RJ, et al. The pivotal roles of exosomes derived from endogenous immune cells and exogenous stem cells in myocardial repair after acute myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (3): 1046-1058.
- [18] Zheng D, Huo M, Li B, et al. The role of exosomes and exosomal microRNA in cardiovascular disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 616161.
- [19] Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871 (2): 455-468.
- [20] Zhang S, Liu X, Ge LL, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes improve pulmonary hypertension through inhibition of pulmonary vascular remodeling [J]. *Respir Res*, 2020, 21 (1): 71.
- [21] Hu JL, Wang W, Lan XL, et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18 (1): 91.
- [22] Xu H, Lan Q, Huang Y, et al. The mechanisms of colorectal cancer cell mesenchymal-epithelial transition induced by hepatocyte exosome-derived miR-203a-3p [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21 (1): 718.
- [23] Lin X, He Y, Hou X, et al. Endothelial cells can regulate smooth muscle cells in contractile phenotype through the miR-206/ARF6&NCX1/exosome axis [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0152959.
- [24] Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14 (3): 249-256.
- [25] Tong Y, Ye C, Ren XS, et al. Exosome-mediated transfer of ACE (angiotensin-converting enzyme) from adventitial fibroblasts of spontaneously hypertensive rats promotes vascular smooth muscle cell migration [J]. *Hypertension*, 2018, 72 (4): 881-888.
- [26] Zhu J, Liu B, Wang Z, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation [J]. *Theranostics*, 2019, 9 (23): 6901-6919.
- [27] Gu S, Liu Y, Zou J, et al. Retinal pigment epithelial cells secrete miR-202-5p-containing exosomes to protect against proliferative diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 201: 108271.
- [28] Yeon JH, Jeong HE, Seo H, et al. Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts [J]. *Acta Biomater*, 2018, 76: 146-153.
- [29] Cao X, Xue LD, Di Y, et al. MSC-derived exosomal lncRNA SNHG7 suppresses endothelial-mesenchymal transition and tube formation in diabetic retinopathy via miR-34a-5p/XBP1 axis [J]. *Life Sci*, 2021, 272: 119232.

(收稿日期: 2022-07-02; 修回日期: 2022-08-10)

基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的苦黄注射液化学成分分析

王允吉¹, 王海丹², 刘璐¹, 张引兰¹, 童宁¹, 曹辉^{1*} (1. 南京中医药大学附属南京医院 / 南京市第二医院药学部, 南京 210003; 2. 南京中医药大学附属江苏省中医院药理实验室, 南京 210029)

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS) 快速表征和识别苦黄注射液中的化学成分。**方法** 采用纯乙醇沉淀苦黄注射液后的上清液, 利用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 对样品进行定性分析, 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 流速 0.35 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 5 μL, 采用正、负离子监测模式。根据 Xcalibur 软件的精确相对分子质量、准分子离子峰、碎片离子, 相关文献和数据库对苦黄注射液中的化学成分进行识别和鉴定。**结果** 从苦黄注射液的醇提液中共鉴定出 123 个化学成分, 包括黄酮类、酚酸类、生物碱类、萜醌类、萜类、氨基酸和核苷类等各种化合物。**结论** 首次采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 对苦黄注射液的化学成分进行了研究, 为苦黄注射液的药效物质基础及作用机制研究提供了理论依据。

关键词: 苦黄注射液; 液相色谱-质谱联用技术; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2295-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.014

Identification of chemical components in Kuhuang injection by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

WANG Yun-ji¹, WANG Hai-dan², LIU Lu¹, ZHANG Yin-lan¹, TONG Ning¹, CAO Hui^{1*} (1. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Nanjing, Nanjing Unniversity of Chinese Medicine, Nanjing 210003; 2. Pharmacology Laboratory, Jiangsu Hospital of Chinese Medicine, Nanjing Unniversity of Chinese Medicine, Nanjing 210029)

Abstract: Objective To rapidly characterize and identify the components of Kuhuang injection with UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** The supernatant of Kuhuang injection was precipitated by ethanol. The samples were analyzed by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS comprehensively. Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used for gradient elution with 0.1% formic acid-acetonitrile as the mobile phase in both positive and negative ion modes. The flow rate was 0.35 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 °C and the injection volume was 5 μL. The components were identified according to the accurate relative molecular weight, excimer ion peak, fragmentation in Xcalibur software and other information in literature data and database. **Results** Totally 123 components were rapidly identified, including flavonoids, phenolic acids, alkaloids, anthraquinones, terpenoid saponins, amino acids and nucleosides, etc. **Conclusion** The chemical components in Kuhuang injection are determined by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS for the first time, which provides the theoretical basis for the study of pharmacodynamic materials basis and mechanism of Kuhuang injection.

Key words: Kuhuang injection; liquid chromatography-mass spectrometry; chemical component

作者简介: 王允吉, 男, 主管药师, 博士, 主要从事中药分析学、药代动力学研究, email: wangyunji1984@126.com * 通信作者: 曹辉, 男, 副主任药师, 主要从事临床药理学研究, email: caohui171717@sina.com.

苦黄注射液源于张仲景《伤寒论》的茵陈蒿汤(茵陈、大黄、山栀),邹良才老中医改良茵陈蒿汤而得到由大黄、苦参、茵陈、柴胡和大青叶组成的苦黄注射液。该药具有清热利湿、疏肝退黄的功效,主治湿热型黄疸,即因湿热内蕴引起的黄疸型病毒性肝炎患者的退黄^[1-2]。目前,有关苦黄注射液的研究多集中于临床疗效观察,研究表明苦黄注射液对黄疸型病毒性肝炎^[3]、胆汁淤积性肝病^[4]、原发性胆汁性肝硬化^[5]等疾病均有较好的疗效。

关于苦黄注射液中的化学成分研究仅有针对某类或某几个特征性成分进行定量分析的报道^[6-7],尚未见对苦黄注射液中化学成分进行全面分析的研究。超高效液相色谱-四极杆-静电轨道场离子阱质谱(UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术具有高分离性能、高灵敏度及高检测能力,可以进行高精度的定量和定性分析,已广泛用于中药成分分析、药物动力学、体内药物分析等领域^[8]。本研究首次采用UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS对苦黄注射液中化学成分进行全面分析,并对其进行药材归属,为明确苦黄注射液药效物质基础,阐明其药理学作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Q-Exactive 液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪(含高压二元泵、自动进样器、柱温箱、四极杆-静电场轨道阱质量分析器)、Xcalibur 3.1 数据分析系统(美国 Thermo 公司); Heraeus Multifuge X1R 冷冻离心机(美国 Thermo 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, 美国 Waters 公司); Milli-Q Direct 超纯水仪(德国默克 Millipore 公司)。

1.2 试剂

苦黄注射液(常熟雷允上制药有限公司,批号:2106281,规格:10 mL);乙腈、乙醇(HPLC级,德国 Merck 公司);甲酸(HPLC级,美国 Sigma-Aldrich 公司);纯水取自超纯水仪。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

吸取苦黄注射液 1 mL,加入纯乙醇溶液 3 mL 沉淀后,于 2~8℃ 冰箱中放置 24 h 后,离心 5 min(4℃、12 000 r·min⁻¹),吸取上清液后经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后得到供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流速: 0.35 mL·min⁻¹; 柱温: 35℃; 0.1% 甲酸水为流动相 A, 乙腈为流

动相 B, 梯度洗脱(0~8 min, 0%~25%A; 8~23 min, 25%~55%A; 23~25 min, 55%~80%A; 25~26 min, 80%~100%A; 26~27 min, 100%A; 27~28 min, 100%~0%A; 28~30 min, 0%A); 进样量: 5 μL。

2.3 质谱条件

离子源为 HESI 源,正、负离子检测模式,毛细管电压为 3500 V,毛细管温度为 350℃,离子源温度为 350℃,鞘气流速为 9 L·min⁻¹,辅助气流速为 3 L·min⁻¹,阶梯碰撞能量: 25、35、45 eV,检测方式为 Full MS/dd-MS²,一级质谱分辨率 Full MS 70 000 FWHM(Full Width at Half Maximum),二级质谱分辨率 dd-MS² 17 500 FWHM,扫描范围 *m/z* 100~1000 Da。

2.4 数据处理

通过查阅 Scifinder、Chemspider 数据库和相关文献,收集整理了苦黄注射液中各类化学成分的结构式以及化合物的裂解规律。运用 Xcalibur 3.0 软件进行质谱数据处理,通过高分辨质谱计算出分子式(误差范围 ±1×10⁻⁵),结合目前已有文献信息推测可能的化合物的裂解规律,并根据相同类型的化合物的裂解规律对化合物进行质谱鉴定。

3 结果

3.1 苦黄注射液中化学成分分析

采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 正负离子模式分析苦黄注射液乙醇沉淀后的(+) HESI-MS、(-) HESI-MS 的质谱总离子流图(TIC)(见图 1),通过 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术检测得到离子流峰的保留时间和质谱数据信息,进行数据处理,共鉴定出苦黄注射液中化学成分 123 个^[9-25],其中包括黄酮类 36 个、酚酸类 20 个、生物碱类 19 个、萜醌类 15 个、氨基酸 11 个、核苷类 8 个、萜类 6 个、脂肪酸类 3 个、糖类 1 个等,化合物结果见表 1。

3.2 苦黄注射液中主要化合成分的质谱裂解规律

3.2.1 黄酮类化合物的分析鉴定

苦黄注射液中共鉴定出黄酮类化合物 36 种,该类成分主要来自于大黄、茵陈和大青叶。现以芫花素、柚皮素为例,依据多级碎片信息,解析苦黄注射液中黄酮类成分的质谱裂解规律。

峰 84 保留时间为 12.82 min,可观察到准分子离子峰 *m/z* 285.0754 [M+H]⁺,同时可观察到主要的碎片离子分别为 *m/z* 270.0518、255.0651、242.0573、225.0544、163.0390、151.0390、123.0442,分别对应的分子式为 [M+H-CH₃]⁺、[M+H-CH₂O]⁺、[M+H-C₂H₂O]⁺、[M+H-

表 1 苦黄注射液中化学成分的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 鉴定结果
 Tab 1 Identified chemical constituents in Kuhuang injection by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

峰号	t_R /min	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 / ($\times 10^{-6}$)	准分子离子峰	分子式	碎片离子 (m/z)	化合物	归属
1	0.93	175.1189	175.1190	0.57	175.1190[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₅ N ₃ O ₂	158.0925, 130.0975, 116.0708, 112.0871, 70.0658, 60.0564	精氨酸	所有药材
2	0.99	104.0706	104.0710	3.84	104.0706[M+H] ⁺	C ₄ H ₁₀ NO ₂	87.0446, 86.0606, 69.0342, 60.0816	γ -氨基丁酸	所有药材
3	1.06	116.0706	116.0709	2.58	116.0709[M+H] ⁺	C ₅ H ₉ NO ₂	70.0659	脯氨酸	所有药材
4	1.20	132.0291	132.0290	-0.76	132.0290[M-H] ⁻	C ₄ H ₇ NO ₄	115.0022, 88.0390, 70.0284	天冬氨酸	所有药材
5	1.41	118.0862	118.0864	1.69	118.0864[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂	72.0815, 55.0551	缬氨酸	所有药材
6	1.68	146.0448	146.0446	-1.37	146.0446[M-H] ⁻	C ₅ H ₉ NO ₄	129.0180, 102.0182, 85.0280, 73.0280, 58.0283	谷氨酸	所有药材
7	1.76	136.0618	136.0618	0.00	136.0618[M+H] ⁺	C ₅ H ₉ N ₅	119.0354, 109.0511, 94.0405	腺嘌呤	所有药材
8	1.82	152.0567	152.0566	-0.66	152.0567[M+H] ⁺	C ₅ H ₆ N ₅ O	135.0301, 110.0351, 82.0405	鸟嘌呤	所有药材
9	1.87	146.0448	146.0449	0.68	146.0449[M-H] ⁻	C ₅ H ₉ NO ₄	129.0180, 103.0387, 85.0281, 57.0332	谷氨酸异构体	所有药材
10	1.89	244.0928	244.0925	-1.23	244.0925[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	226.0832, 112.0508, 95.0244	胞苷	所有药材
11	2.50	137.0458	137.0458	0.00	137.0458[M+H] ⁺	C ₅ H ₉ N ₄ O	119.0353, 110.0351, 94.0403	次黄嘌呤	所有药材
12	2.89	132.1019	132.1020	0.76	132.1020[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ NO ₂	86.0970	异亮氨酸	所有药材
13	2.92	281.1860	281.1856	-1.42	281.1856[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	263.1748, 245.1648, 166.1225, 152.0930, 112.0759, 98.0604	氧化槐醇	苦参
14	3.16	132.1019	132.1020	0.76	132.1020[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ NO ₂	86.0970	亮氨酸	所有药材
15	3.42	205.1335	205.1335	0.00	205.1335[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	146.0601, 108.0810, 58.0660	N-甲基雀花碱	苦参
16	3.74	243.0612	243.0611	-0.41	243.0611[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	200.0556, 152.0339, 140.0341, 110.0234	尿苷	所有药材
17	3.95	191.1179	191.1178	-0.52	191.1178[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	148.0756, 120.0809, 98.0967	雀花碱	苦参
18	4.00	493.1188	493.1202	2.84	493.1202[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	433.0980, 373.0768, 331.0667, 271.0456, 211.0240, 169.0132, 125.0230	没食子酸-O-二葡萄糖苷	大黄
19	4.08	261.1597	261.1598	0.38	261.1598[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	114.0916, 164.1069, 96.0812	腺苷叶碱	苦参
20	4.18	268.1040	268.1035	-1.86	268.1035[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	136.0618, 85.0290	腺苷	所有药材
21	4.18	265.1910	265.1910	0.00	265.1910[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	247.1803, 188.1438, 176.1067, 148.1120, 112.0760, 98.0605	氧化槐定碱	苦参
22	4.26	169.0131	169.0132	0.59	169.0132[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	125.0231, 97.0281, 69.0331	没食子酸	大黄
23	4.29	282.0833	282.0839	2.13	282.0839[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	150.0409, 133.0143	鸟苷	所有药材
24	4.31	153.0407	153.0406	-0.65	153.0406[M+H] ⁺	C ₅ H ₉ N ₄ O ₂	136.0140, 126.0550, 110.0351	黄嘌呤	所有药材
25	4.31	265.1910	265.1908	-0.75	265.1908[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	247.1805, 176.1070, 148.1118, 136.1120, 98.0964	氧化苦参碱	苦参
26	4.32	493.1188	493.1202	2.84	493.1202[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	433.0980, 373.0768, 331.0667, 271.0456, 211.0240, 169.0132, 125.0230	没食子酸-O-二葡萄糖苷	大黄
27	4.32	178.0710	178.0724	7.86	178.0724[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₃ NO ₅	149.0331, 133.0143, 106.0271, 88.0106, 59.0124	氨基葡萄糖	所有药材
28	4.44	245.1648	245.1648	0.00	245.1648[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	98.0966, 122.0599, 174.0910, 227.1542	槐胺碱	苦参
29	4.50	263.1754	263.1751	-1.14	263.1751[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	247.1801, 166.1225, 150.1277, 122.0965, 96.0812	氧化槐果碱	苦参
30	4.52	493.1188	493.1217	5.88	493.1217[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	433.0979, 373.0772, 331.0665, 271.0455, 211.0240, 169.0132, 125.0230	没食子酸-O-二葡萄糖苷	大黄
31	4.60	249.1961	249.1959	-0.80	249.1959[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	231.1853, 218.1537, 148.1116, 112.0758, 136.1117	槐定碱	苦参
32	4.61	331.0661	331.0669	2.42	331.0669[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	271.0456, 211.0240, 169.0132, 125.0232	没食子酸-O-葡萄糖苷	大黄
33	4.68	164.0706	164.0706	0.00	164.0706[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₁ NO ₂	147.0439, 91.0541, 72.0076	苯丙氨酸	所有药材
34	4.69	249.1961	249.1961	0.00	249.1961[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	247.1801, 230.1536, 150.1275, 148.1120, 112.0759	苦参碱	苦参
35	4.95	247.1805	247.1804	-0.40	247.1804[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	179.1541, 136.1119	槐果碱	苦参
36	4.96	373.0765	373.0770	1.34	373.0770[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₁	329.0873, 167.0338, 149.0231, 123.0437	没食子酸乙酯葡萄糖苷	大黄
37	5.00	315.0722	315.0721	-0.32	315.0721[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	195.0290, 153.0181, 135.0074, 109.0281, 91.0176	原儿茶酸-4-葡萄糖苷	大黄
38	5.16	331.0661	331.0666	1.51	331.0666[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	211.0614, 169.0131, 125.0230	没食子酰葡萄糖苷	大黄
39	5.54	315.0710	315.0717	2.22	315.0717[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	193.7345, 153.0182, 109.0282	没食子酯	大黄

续表 1

峰号	t_R/min	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 / ($\times 10^{-6}$)	准分子离子峰	分子式	碎片离子 (m/z)	化合物	归属
40	5.64	451.1244	451.1235	-2.00	451.1235[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	289.0715, 245.0814, 203.0705, 179.0341	儿茶素-O-葡萄糖苷 / 表儿茶素-O-葡萄糖苷	大黄
41	5.88	247.1805	247.1804	-0.40	247.1804[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	229.1697, 204.1366, 176.1071, 148.1120, 136.1119, 98.0601	7, 11-去氢苦参碱	苦参
42	5.90	353.0867	353.0874	1.98	353.0872[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0551, 179.0339, 173.0441, 161.0231, 135.0438	绿原酸	茵陈
43	6.00	205.0971	205.0971	0.00	205.0971[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂	188.0705, 146.0600, 118.0653	色氨酸	所有药材
44	6.19	289.0707	289.0713	2.08	289.0713[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	245.0816, 227.0704, 203.0706, 187.0393, 179.0341, 125.0231, 109.0281, 97.0281	儿茶素	大黄
45	6.45	387.1286	387.1294	2.07	387.1294[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	369.0802, 327.0488, 268.0311, 231.0303, 225.0400, 207.0290, 181.0499, 151.0027	马鞭草苷	大青叶
46	6.48	289.0707	289.0716	3.11	289.0716[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	245.0806, 203.0706, 179.0340, 161.0231, 125.0231, 109.0281, 79.9559	表儿茶素	大黄
47	6.55	355.1023	355.1033	2.82	355.1033[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	193.0497, 178.0261, 149.0596, 134.0361	阿魏酸-O-葡萄糖苷	大黄
48	6.71	353.0867	353.0871	1.13	353.0876[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	233.0448, 205.0497, 191.0436, 163.0502	5-咖啡酰奎宁酸	茵陈
49	6.74	451.1244	451.1241	-0.67	451.1235[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	423.3927, 304.9953, 227.1189, 191.8879	儿茶素-O-葡萄糖苷 / 表儿茶素-O-葡萄糖苷	大黄
50	6.87	353.0867	353.0876	2.55	353.0876[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0552, 179.0340, 161.0233	4-咖啡酰奎宁酸	茵陈
51	7.05	281.1860	281.1857	-1.07	281.1857[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	263.1750, 245.1644, 193.0971, 150.1276, 116.0708, 87.0446	5 α , 9 α -异二羟基苦参碱	苦参
52	7.06	353.0867	353.0874	1.98	353.0874[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0551, 179.0338, 161.0228, 135.0437	异绿原酸	茵陈
53	7.10	367.1024	367.1031	1.91	367.1031[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	193.0497, 173.0442, 155.0338, 134.0360	阿魏酰奎宁酸-1	茵陈
54	7.11	281.1860	281.1857	-1.07	281.1857[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	263.1750, 245.1644, 193.0971, 150.1276, 116.0708, 87.0446	5 α , 9 α -异二羟基苦参碱异构体	苦参
55	7.44	179.0338	179.0340	-1.12	179.0340[M+H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₄	161.0816, 151.0391, 137.0822, 105.0703, 95.0608	6, 7-二羟基香豆素	茵陈
56	7.45	177.0182	177.0182	0.00	177.0182[M-H] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	149.0223, 133.0281, 116.0492, 105.0331	6, 7-二羟基香豆素异构体	茵陈
57	7.71	593.1501	593.1504	0.51	593.1504[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	503.1190, 473.1073, 383.0756, 365.0652, 353.0660, 325.0706, 311.0567, 297.0763	红花黄色素 A	茵陈
58	7.79	181.0495	181.0496	0.55	181.0496[M+H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₄	149.0596, 137.0598, 121.0649, 110.0602, 93.0704	咖啡酸	茵陈
59	8.33	367.1024	367.1031	1.91	367.1031[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	193.0497, 173.0442, 155.0338, 134.0360, 111.0439	阿魏酰奎宁酸-2	茵陈
60	8.71	179.0338	179.0334	2.23	179.0337[M+H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₄	161.0960, 133.1012, 105.0702, 93.0704	7, 8-二羟基香豆素	茵陈
61	8.78	137.0597	137.0597	0.00	137.0597[M+H] ⁺	C ₈ H ₆ O ₂	120.0445, 107.0857, 91.0547, 79.0547	对羟基苯乙酮	茵陈
62	8.98	623.1607	623.1611	0.64	623.1611[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₆	501.9908, 424.3440, 283.0607, 268.0372	水仙苷	茵陈
63	9.02	477.1391	477.1398	1.47	477.1398[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	431.0977, 269.0450, 169.0131, 151.0025, 125.0231, 107.0125	异莲花掌苷	大黄
64	9.08	477.1391	477.1403	2.51	477.1398[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	431.0977, 269.0450, 169.0131, 151.0025, 125.0231, 107.0125	莲花掌苷	大黄
65	9.15	233.0444	233.0452	3.43	233.0444[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	189.0547	2-甲基-5-羧甲基-7-羟基原酮	大黄
66	9.20	271.0601	271.0597	-1.48	271.0597[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	253.0492, 241.0493, 225.0545	芹菜素	大青叶
67	9.29	433.1129	433.1122	-1.62	433.1122[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	415.1018, 397.0903, 379.0797, 283.0598, 271.0600, 195.0283	山柰酚-鼠李糖苷	大青叶
68	9.44	445.0765	445.0770	1.12	445.0770[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	307.0244, 283.0244, 239.0343, 211.0391, 164.0461	大黄酸-8-O-葡萄糖苷	大黄
69	9.49	193.0495	193.0495	0.00	193.0495[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₈ O ₄	177.0546, 163.0388, 149.0597, 145.0283, 133.0284, 117.0337, 95.0495	萹苈亭	茵陈
70	9.52	177.0546	177.0547	0.56	177.0547[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₈ O ₃	163.0388, 149.0596, 135.0441, 117.0336	7-羟基, 6-甲基香豆素	茵陈
71	9.93	515.1184	515.1196	2.33	515.1196[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.0869, 191.0551, 179.0339, 173.0443, 161.0231, 135.0438, 111.0439	异绿原酸 A	柴胡

续表 1

峰号	t_R/min	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 / ($\times 10^{-6}$)	准分子离子峰	分子式	碎片离子 (m/z)	化合物	归属
72	10.61	515.1184	515.1191	1.36	515.1191[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	451.2009, 353.0876, 191.0551, 179.0339, 173.0444, 135.0439, 111.0440, 93.0331	异绿原酸 B	柴胡
73	10.74	941.5104	941.5086	-1.91	941.5086[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	615.3866, 428.7520	柴胡皂苷 s	柴胡
74	10.78	267.0652	267.0659	2.62	267.0659[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	252.0423, 223.0390, 205.0861, 132.0202	芒柄花黄素立体异构体	苦参
75	11.00	267.0652	267.0659	2.62	267.0659[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	252.0422, 223.0393, 132.0203	芒柄花黄素	苦参
76	11.08	561.1603	561.1608	0.89	561.1608[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	295.0615, 267.0659, 252.0421, 158.9594	7-羟基-3-甲基-4'-甲氧基黄酮-7-樱草糖苷	苦参
77	11.20	431.0972	431.0978	1.39	431.0978[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	269.0452, 240.0422, 225.0549	大黄素-1-O-葡萄糖苷	大黄
78	11.43	253.0495	253.0502	2.77	253.0502[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₀ O ₄	225.0548, 209.0603	7, 4'-二羟基异黄酮	苦参
79	11.47	593.1501	593.1501	0.00	593.1501[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	269.0451, 253.0501, 225.0551	大黄素-O-2-葡萄糖苷	大黄
80	11.60	593.1501	593.1507	1.01	593.1507[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	269.0454, 239.0708, 225.0551	大黄素-O-2-葡萄糖苷 异构体	大黄
81	11.73	301.0343	301.0348	1.66	301.0348[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	284.0314, 273.0379, 255.0295, 217.0496	槲皮素	苦参
82	11.75	301.0706	301.0702	-1.33	301.0702[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	286.0467, 257.0441, 201.0547, 173.0596	金圣草素	大青叶
83	12.80	183.0288	183.0288	0.00	183.0288[M-H] ⁻	C ₈ H ₆ O ₅	154.9974, 139.0387, 111.0074, 65.0018	没食子酸甲酯	大黄
84	12.82	285.0757	285.0754	-1.05	285.0754[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	270.0518, 255.0651, 242.0573, 225.0544, 163.0390, 151.0390, 123.0442	芫花素	茵陈
85	12.84	329.0656	329.0661	1.52	329.0661[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	284.0322, 267.0297, 243.0292, 255.0294	7, 3'-二甲氧基槲皮素	柴胡
86	13.00	285.0394	285.0402	2.81	285.0402[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	269.0436, 256.0376, 239.0337, 150.6811	山柰酚	大青叶
87	13.17	415.1024	415.1028	0.96	415.1028[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	253.0500, 225.0544	大黄酚-1-O-葡萄糖苷	大黄
88	13.24	431.0972	431.0964	-1.86	431.0964[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	268.0372	芦荟大黄素-3-羟甲基-O-葡萄糖苷	大黄
89	13.35	271.0601	271.0598	-1.11	271.0598[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	229.0453, 201.0546, 137.0597, 95.0131	2'-羟基大豆苷元	大青叶
90	13.41	431.0972	431.0973	0.23	431.0972[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	269.0452, 240.0419, 225.0551	大黄素-8-O-葡萄糖苷	大黄
91	13.57	415.1024	415.1026	0.48	415.1026[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	253.0500, 225.0544	大黄酚-8-O-葡萄糖苷	大黄
92	14.69	447.0922	447.0922	0.00	447.0922[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	327.0501, 298.0472, 285.0402, 269.0454	荜苳苷	大青叶
93	14.69	283.0601	283.0607	2.12	283.0607[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	268.0374, 240.0423	毛蕊异黄酮立体异构体	苦参
94	14.83	271.0601	271.0609	2.95	271.0609[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	253.0500, 227.0712, 177.0180, 151.0025, 119.0489, 93.0332	柚皮素	茵陈
95	15.16	285.0757	285.0755	-0.70	285.0755[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	267.0649, 255.0642, 242.0572, 211.0753	大豆黄素	大青叶
96	15.18	283.0601	283.0608	2.47	283.0608[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	268.0345, 240.0422	毛蕊异黄酮	苦参
97	15.67	285.0394	285.0403	3.16	285.0401[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	268.0358, 257.0441, 241.0494, 158.9626	木犀草素	大青叶
98	16.02	369.1333	369.1340	1.90	369.1340[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	341.1385, 325.1438, 283.0604, 261.0756, 247.0606, 207.1018, 192.0782, 161.0234, 138.0310	(2R, 3R)-8-异戊烯基-7, 4'-二羟基-5-甲氧基二氢黄酮醇	苦参
99	16.26	445.1129	445.1129	0.00	445.1129[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	283.0608, 254.0582, 239.0710	大黄素甲醚-O-葡萄糖苷	大黄
100	16.33	329.2332	329.2330	-0.61	329.2330[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	240.0778, 229.1437, 211.1331, 183.1381, 158.9709, 145.2103, 127.1108, 109.7910, 99.0801, 69.2205	9, 10, 13-三羟基-十八碳烯酸酯	所有药材
101	16.59	207.0652	207.0650	-0.97	207.0650[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	192.0416, 175.0389, 164.0467, 147.0439, 121.0651, 91.0547	滨蒿内酯	茵陈
102	16.68	369.1333	369.1327	-1.63	369.1334[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	341.1390, 325.1436, 283.0621, 261.0764, 247.0609, 219.0654, 207.1018, 192.0782, 177.0184, 138.0311	2'-羟基异黄酮醇	苦参
103	16.74	297.0394	297.0406	4.04	297.0406[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	253.0501, 225.0548	6-甲基大黄酸	大黄
104	16.90	177.0546	177.0546	0.00	177.0546[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₈ O ₃	163.0388, 149.0597, 135.0442, 117.0337	7-甲氧基香豆素	茵陈
105	17.95	249.0659	249.0656	-1.20	249.0656[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₈ N ₂ O ₂	221.0703, 148.1119, 130.0228, 121.1011, 107.0858	色胺酮	大青叶
106	18.04	353.1383	353.1391	2.27	353.1391[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	295.0599, 251.0922, 233.0813, 189.0912, 165.0909, 133.0646, 119.0489	异黄酮醇	苦参
107	18.85	283.0237	283.0246	3.18	283.0246[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₈ O ₆	257.0451, 239.0344, 227.0345, 211.0391, 183.0441, 167.0492	大黄酸	大黄
108	19.09	779.4573	779.4576	0.38	779.4573[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	738.3099, 617.4003, 386.4617, 276.8144, 226.4879, 145.0496	柴胡皂苷 a	柴胡

续表 1

峰号	t_R/min	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差/ ($\times 10^{-6}$)	准分子离子峰	分子式	碎片离子 (m/z)	化合物	归属
109	19.30	779.4575	779.4576	0.13	779.4575[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	738.3099, 617.4003, 386.4617, 276.8144, 226.4879, 145.0496	柴胡皂苷 g	柴胡
110	20.15	779.4570	779.4576	0.77	779.4570[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	738.3099, 617.4003, 386.4617, 276.8144, 226.4879, 145.0496	柴胡皂苷 b	柴胡
111	20.36	779.4577	779.4576	-0.13	779.4577[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	738.3099, 617.4003, 386.4617, 276.8144, 226.4879, 145.0496	柴胡皂苷 d	柴胡
112	20.50	269.0444	269.0453	3.35	269.0453[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	254.0214, 240.0428, 226.0266, 201.0491	芦荟大黄素	大黄
113	21.06	437.1959	437.1960	0.23	437.1960[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₉ O ₆	301.1437, 275.1647, 161.0232	苦参酮	苦参
114	23.44	269.0444	269.0452	2.97	269.0452[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	241.0504, 225.0553, 210.0307, 197.0596, 181.0647, 127.8844	大黄素	大黄
115	25.78	353.1383	353.1390	1.98	353.1390[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	295.0607, 251.0919, 233.0813, 218.0575, 189.0910, 163.0030, 133.0646, 119.0489	黄腐醇	苦参
116	25.81	283.0601	283.0606	1.77	283.0606[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	255.0655, 239.0703	山槐素	苦参
117	26.19	283.0601	283.0608	2.47	283.0608[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	255.0608, 239.0706, 211.0389	山槐素异构体	苦参
118	26.33	253.0495	253.0503	3.16	253.0501[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	225.0503, 183.0665, 165.0557	大黄酚	大黄
119	26.48	279.2318	279.2316	-0.72	279.2316[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	261.2208, 243.2103, 223.1680, 209.1532, 187.1486, 173.1322, 149.0231, 137.1325, 123.1170, 109.1015, 95.0860, 81.0705, 67.0550	亚麻酸或其同分异构体	茵陈
120	26.53	437.1959	437.1962	0.69	437.1962[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₆	301.1437, 275.1647, 161.0232, 151.0388, 135.0438	苦参啶	苦参
121	26.65	279.2318	279.2317	-0.36	279.2317[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	261.2201, 243.2089, 223.1688, 209.1530, 173.1323, 137.1325, 123.1165, 109.1014, 95.0860, 81.0705, 67.0550	亚麻酸或其同分异构体	茵陈
122	27.07	283.0601	283.0609	2.83	283.0609[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	269.0452, 240.0422	大黄素甲醚	大黄
123	9.03	587.3273	587.3265	-1.36	587.3265[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₅₀ O ₁₄	155.0702, 133.0859, 111.0443, 99.0444, 89.0602 ~ 745.4185,	聚山梨酯 -80	表面活性剂
	9.33	631.3535	631.3527	-1.27	631.3527[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₅₄ O ₁₅	701.3925, 657.3652, 613.3386,		
	9.58	675.3797	675.3787	-1.48	675.3787[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₈ O ₁₆	569.3153, 525.2874, 481.2612,		
	9.84	719.4060	719.4049	-1.53	719.4049[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₆₂ O ₁₇	437.2352, 393.2079, 349.1825,		
	10.07	763.4322	763.4307	-1.96	763.4307[M+H] ⁺	C ₃₄ H ₆₆ O ₁₈	305.1565, 261.1309, 177.1121,		
	10.30	807.4584	807.4565	-2.35	807.4565[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₇₀ O ₁₉	133.0860		
	10.53	851.4846	851.4822	-2.82	851.4822[M+H] ⁺	C ₃₈ H ₇₄ O ₂₀			
	10.73	895.5108	895.5081	-3.02	895.5081[M+H] ⁺	C ₄₀ H ₇₈ O ₂₁			
	10.96	939.537	939.5346	-2.55	939.5346[M+H] ⁺	C ₄₂ H ₈₂ O ₂₂			
	11.15	983.5633	983.5599	-3.46	983.5599[M+H] ⁺	C ₄₄ H ₈₆ O ₂₃			

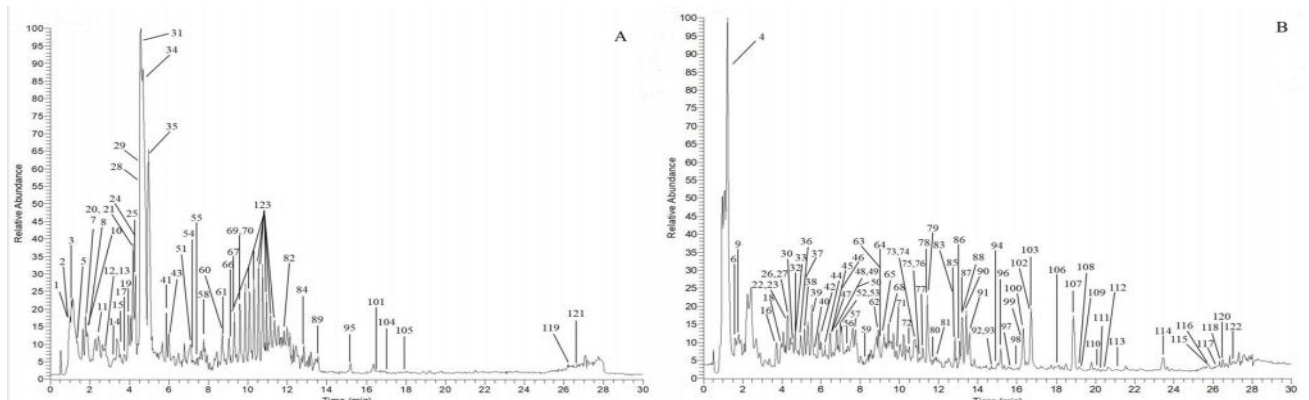


图 1 ESI⁺模式 (A) 和 ESI⁻模式 (B) 下苦黄注射液的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of Kuhuang injection under the positive ion (A) and the negative ion (B) modes

$\text{CO}_3]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^+$ ，根据正离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量，结合相关文献^[9-11]可判断该化合物为荜花素，其裂解规律见图 2。

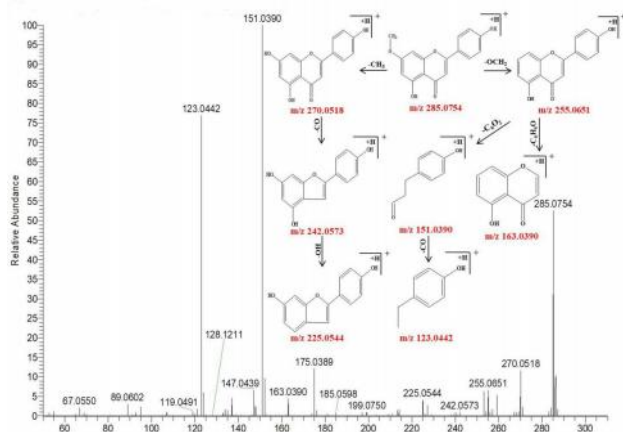


图 2 荜花素可能的裂解途径

Fig 2 Possible fragmentation pathways of genkwanin

峰 94 保留时间为 14.83 min，可观察到准分子离子峰 m/z 271.0609 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 253.0500、227.0712、177.0180、151.0025、119.0489、93.0332，分别对应的分子式为 $[\text{M}-\text{H}-\text{OH}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4]^-$ ，根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量，结合相关文献^[9-11]可判断该化合物为柚皮素，其裂解规律见图 3。

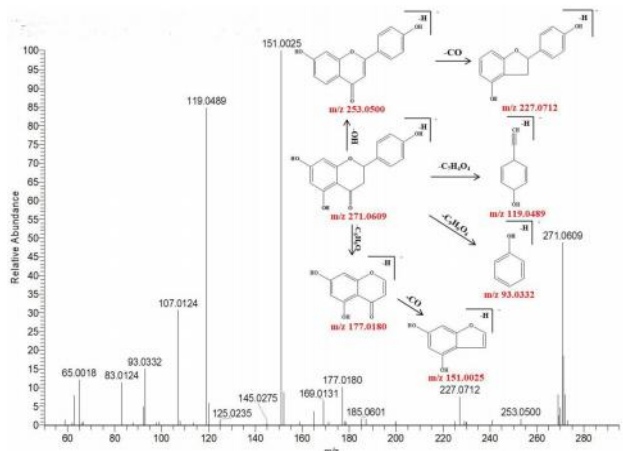


图 3 柚皮素可能的裂解途径

Fig 3 Proposed fragmentation pathways of naringenin

3.2.2 酚酸类及其化合物的分析鉴定 苦黄注射液中共鉴定出酚酸类成分 20 种，该类成分主要存在于该组方中的大黄、柴胡和茵陈。

峰 42 保留时间为 5.90 min，可观察到该化合物的准分子离子峰为 m/z 353.0872 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，与其分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ 相符，其主要的碎片离子分别为 m/z

191.0551、179.0339、173.0441、161.0231、135.0438，归属各碎片离子分别为 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_7]^-$ ，根据负离子模式下精确相对分子质量和二级质谱碎片信息，结合相关文献^[10, 12-13]可判断该化合物为绿原酸，其裂解规律见图 4。

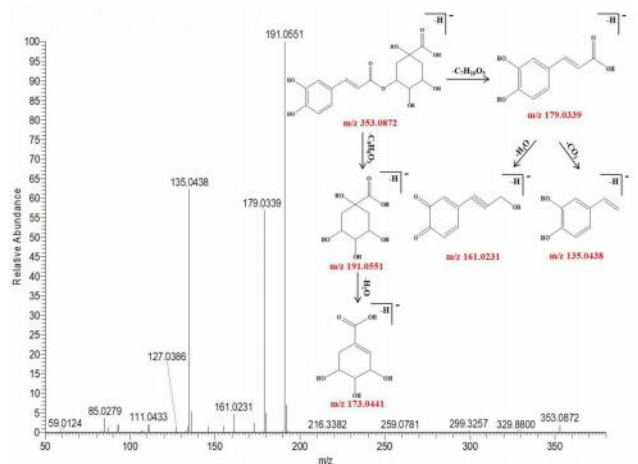


图 4 绿原酸可能的裂解途径

Fig 4 Proposed fragmentation pathways of chlorogenic acid

峰 22 保留时间为 4.26 min，可观察到该化合物的准分子离子峰为 m/z 169.0132 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，与其分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ 相符，其主要的碎片离子分别为 m/z 125.0231、97.0281、69.0331，归属各碎片离子分别为 $[\text{M}-\text{H}-\text{CHO}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{O}_4]^-$ ，根据负离子模式下精确相对分子质量和二级质谱碎片信息，结合相关文献^[15-17, 21-22]可判断该化合物为没食子酸，其裂解规律见图 5。

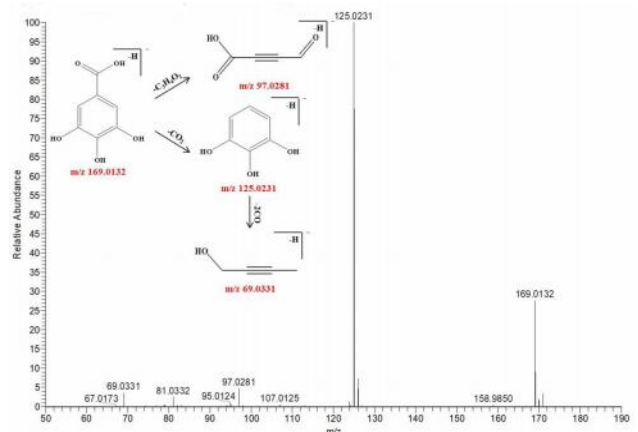


图 5 没食子酸可能的裂解途径

Fig 5 Proposed fragmentation pathways of gallic acid

3.2.3 生物碱类化合物的分析鉴定 苦黄注射液中共鉴定出种生物碱类化合物 19 种，该类成分主要来自于苦参和大青叶。峰 17 保留时间为 3.95 min，可观察到该化合物的准分子离子峰为 m/z 191.1178 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，与其 $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ 分子式相符，

其主要的碎片离子分别为 m/z 148.0756、120.0809，归属各碎片离子分别为 $[M+H-C_2H_5N]^+$ 、 $[M+H-C_3H_5NO]^+$ ，结合相关文献^[18-19]可判断该化合物为金雀花碱，其裂解规律见图 6。

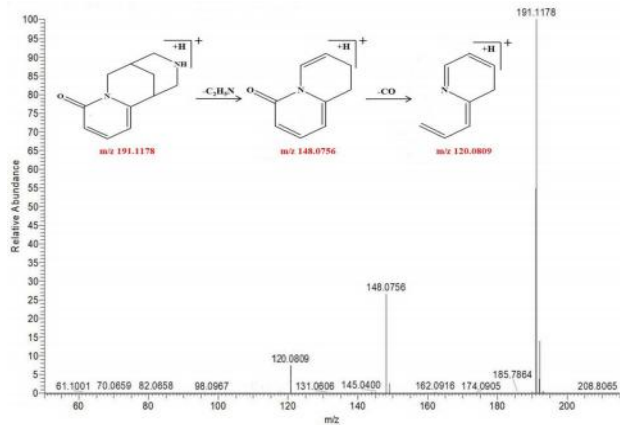


图 6 金雀花碱可能的裂解途径
Fig 6 Proposed fragmentation pathways of cytosine

峰 34 保留时间为 4.69 min，可观察到该化合物的准分子离子峰为 m/z 249.1961 $[M+H]^+$ ，与其 $C_{15}H_{24}N_2O$ 分子式相符，其主要的碎片离子分别为 m/z 247.1801、230.1536、150.1275、148.1120、112.0759，归属各碎片离子分别为 $[M+H-H_2]^+$ 、 $[M+H-OH]^+$ 、 $[M+H-C_5H_8NO]^+$ 、 $[M+H-C_5H_{10}NO]^+$ 、 $[M+H-C_8H_{10}NO]^+$ ，结合相关文献^[18-20]可判断该化合物为苦参碱，其裂解规律见图 7。

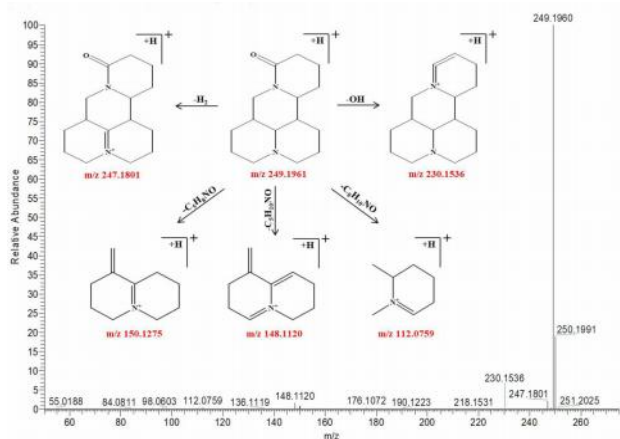


图 7 苦参碱可能的裂解途径
Fig 7 Proposed fragmentation pathways of matrine

3.2.4 蒽醌类化合物的分析鉴定 苦黄注射液中共鉴定出种蒽醌类化合物 15 种，该类成分主要来自于大黄。现以大黄酸、大黄素、大黄酚为例，依据多级碎片信息，解析苦黄注射液中蒽醌类成分的质谱裂解规律。

其中峰 107 保留时间为 18.85 min，可观察到准分子离子峰 m/z 283.0246 $[M-H]^-$ ，同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 239.0344、211.0391、

183.0441，分别对应的分子式为 $[M-H-CO_2]^-$ 、 $[M-H-C_2O_3]^-$ 、 $[M-H-C_3O_4]^-$ ，根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量，结合相关文献^[15-17, 21-22]可判断该化合物为大黄酸，其裂解规律见图 8。

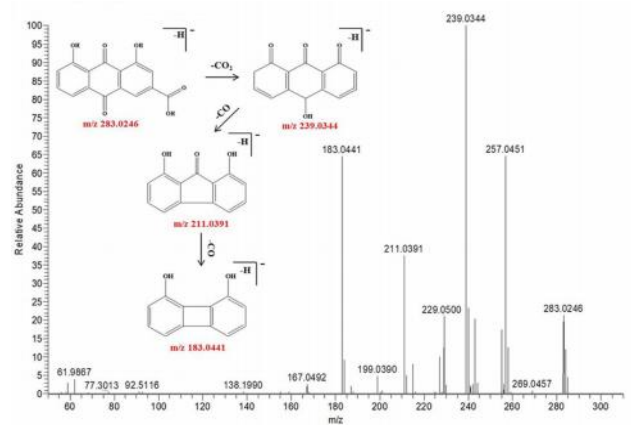


图 8 大黄酸可能的裂解途径
Fig 8 Proposed fragmentation pathways of rhein

峰 114 保留时间为 23.44 min，可观察到准分子离子峰 m/z 269.0452 $[M-H]^-$ ，可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 241.0504、225.0553、210.0307、197.0596、181.0647，分别对应的分子式为 $[M-H-CO]^-$ 、 $[M-H-CO_2]^-$ 、 $[M-H-C_2H_3O_2]^-$ 、 $[M-H-C_2O_3]^-$ 、 $[M-H-C_3H_3O_3]^-$ ，根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量，结合相关文献^[15-17, 21-22]可判断该化合物为大黄素，其裂解规律见图 9。

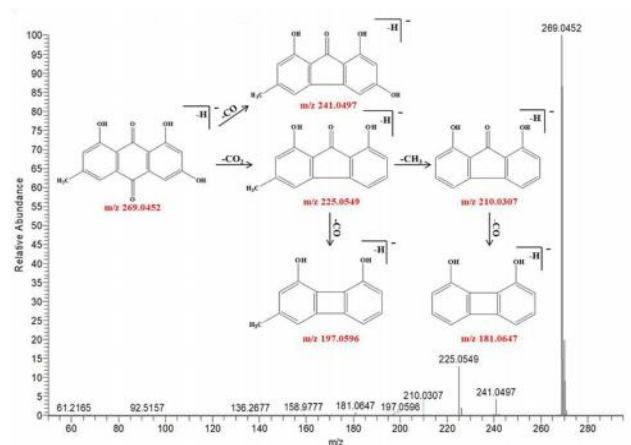


图 9 大黄素可能的裂解途径
Fig 9 Proposed fragmentation pathways of emodin

峰 118 保留时间为 26.33 min，可观察到准分子离子峰 m/z 253.0501 $[M-H]^-$ ，可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 225.0503、183.0665，分别对应的分子式为 $[M-H-CO]^-$ 和 $[M-H-C_3H_3O_3]^-$ ，根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量，结合相关文献^[15-17, 21-22]可判断该化合物为大黄酚，其裂解规律见图 10。

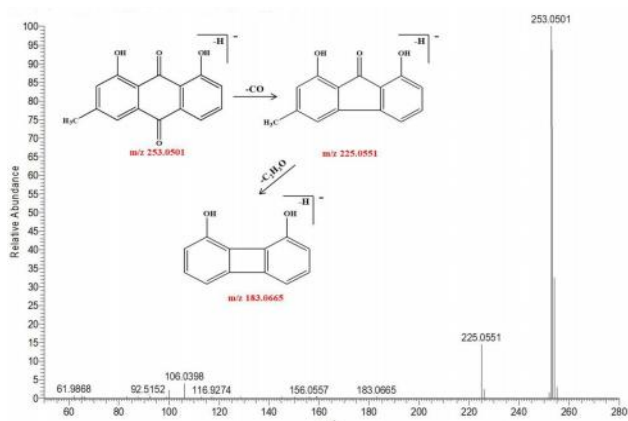


图 10 大黄酚可能的裂解途径

Fig 10 Proposed fragmentation pathways of chrysoaphanol

3.2.5 氨基酸与核苷类化合物分析鉴定 苦黄注射液中共鉴定出氨基酸与核苷类成分分别为 11 种和 8 种，该类成分主要存在于本组方中的各味中药材。

峰 1 保留时间为 0.93 min，可观察到该化合物的准分子离子峰为 m/z 175.1190 $[M+H]^+$ ，与其分子式 $C_6H_{15}N_4O_2$ 相符，其主要的碎片离子分别为 m/z 158.0925、130.0957、116.0708、112.0871、70.0658、60.0564，归属各碎片离子分别为 $[M+H-OH]^+$ 、 $[M+H-COOH]^+$ 、 $[M+H-CH_6N_3]^+$ 、 $[M+H-CH_6NO_2]^+$ 、 $[M+H-C_2H_8N_3O_2]^+$ 、 $[M+H-C_5H_{10}NO_2]^+$ ，根据正离子模式下精确相对分子质量和二级质谱碎片信息，结合数据库 HMDB 和文献^[23]中化合物信息，可判断该化合物为精氨酸，其裂解规律见图 11。

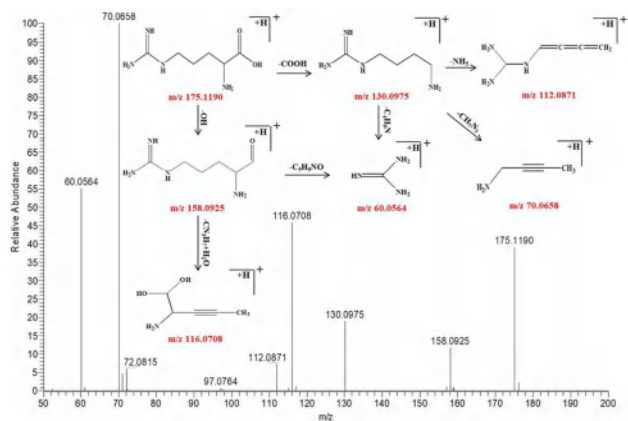


图 11 精氨酸可能的裂解途径

Fig 11 Proposed fragmentation pathways of arginine

峰 7 保留时间为 1.76 min，可观察到该化合物的准分子离子峰为 m/z 136.0618 $[M+H]^+$ ，与其分子式 $C_5H_5N_5$ 相符，其主要的碎片离子分别为 m/z 119.0354、109.0511、94.0405，归属各碎片离子分别为 $[M+H-NH_3]^+$ 、 $[M+H-CHN]^+$ 、 $[M+H-CH_3N_2]^+$ ，结合数据库 HMDB 和文献^[23]中化合物

信息，可判断该化合物为腺嘌呤，其裂解规律见图 12。

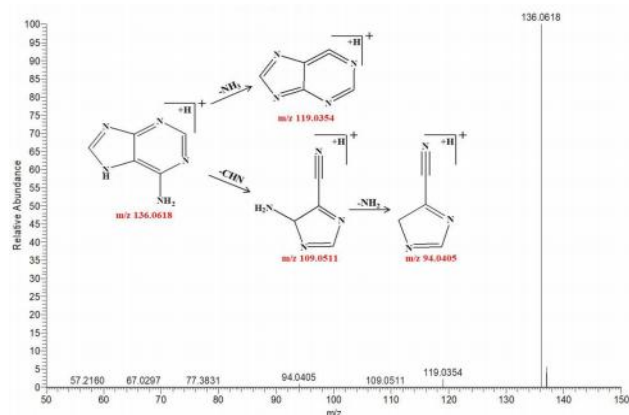


图 12 腺嘌呤可能的裂解途径

Fig 12 Proposed fragmentation pathways of adenine

4 讨论

本研究利用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术对苦黄注射液的化学成分进行了系统分析，通过分析正负离子模式下质谱提供的准分子离子 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$ 数据，并结合质谱的高分辨率可得到化合物的可靠相对分子质量，从而快速分析苦黄注射液中的组分结构，并对其中 12 种主要成分可能的裂解规律进行了描述，以期苦黄注射液的质量控制以及后续阐明苦黄注射液的药效物质基础提供了详实的数据支撑。

本次研究中鉴定出的化合物中，黄酮类、酚酸类、生物碱类和蒽醌类成分中有保肝退黄的相关报道^[26-33]。如苦参的生物碱类化学成分苦参碱和氧化苦参碱可通过抑制 Notch 信号通路促进肝卵圆细胞向肝细胞分化，减轻肝损伤^[26]；也可通过与表皮生长因子受体 (EGFR) 结合在细胞表面，抑制其功能，阻断与 EGFR 相关的下游信号通路，可减缓肝纤维化的发生和发展，保护肝实质细胞，从而改善肝功能^[27]；还具有抗乙型肝炎病毒活性作用^[28]。柴胡的主要成分柴胡皂苷对胆碱酯酶有抑制作用，能发挥拟胆碱样作用，调节消化系统和神经系统的功能^[29]，也可抑制机体脂质过氧化作用的发生，对生物细胞膜产生保护作用，减少自由基与生物细胞膜的接触，避免自由基对细胞膜的破坏从而降低肝损伤^[30-31]。茵陈中主要活性物质绿原酸能减轻肝组织的慢性炎性反应及汇管区胆管增生反应，减缓肝纤维化进程^[32]。大黄中的大黄素、大黄酸、芦荟大黄素和鞣质等成分能促进胆汁、胆汁酸和胆红素分泌，引起胆囊收缩，增强十二指肠和胆管舒张，疏通胆道和微细胆管内淤积的胆汁，而起利胆、退黄作用^[33]。上述化合物的药理作用与苦黄注射液清热利湿、

疏肝退黄的功效一致,且在谱图中有明显的峰形,可能是苦黄注射液主要的药效物质基础。

参考文献

- [1] 李永康. 苦黄注射液的药理与临床[J]. 中国药房, 1993, 4(3): 40.
- [2] 张磊. 中医药治疗重型肝炎研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2020, 34(12): 37-40.
- [3] 马晓华, 杨淑娟, 刘小毛, 等. 苦黄注射液联合异甘草酸镁对急性黄疸型病毒性肝炎患者的疗效观察[J]. 世界中医药, 2018, 13(12): 2991-2994.
- [4] 肖苗苗. 苦黄注射液治疗乙型肝炎肝硬化并胆汁淤积性肝病疗效观察[J]. 医药论坛杂志, 2017, 38(10): 151-152.
- [5] 王瑛, 袁鹤立, 马向明, 等. 苦黄注射液联合熊去氧胆酸对原发性胆汁性肝硬化患者肝功能、免疫因子及炎症介质水平的影响[J]. 中国药物经济学, 2021, 16(6): 31-34.
- [6] 李宵, 吴茵, 支旭然, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定苦黄注射液中 7 种成分的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(15): 2108-2112.
- [7] 吴飞跃, 俞松林. HPLC 同时测定苦黄注射液中生物碱和大黄蒽醌类成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(1): 79-83.
- [8] 贺美莲, 郭常川, 石峰, 等. Orbitrap 高分辨质谱技术在药物分析领域中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 105-110.
- [9] 欧阳文竹, 尚展鹏, 王文建, 等. 茵陈提取物中化学成分的 UHPLC-LTQ-Orbitrap 快速鉴定[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 523-530.
- [10] 于红红, 高晓燕. 基于 UPLC-Q-TOF/MSE 快速分析茵陈中化学成分[J]. 中南药学, 2019, 17(5): 656-661.
- [11] 马宏宇, 孙奕, 吕阿丽, 等. 茵陈蒿化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(1): 61-63.
- [12] 曹妍, 李婷, 许霞, 等. 利用反相色谱-亲水作用色谱-预测多反应监测方法快速鉴定中药茵陈的化学成分组成[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2667-2674.
- [13] Clifford MN, Johnston KL, Knight S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(10): 2900-2911.
- [14] 罗思妮, 彭致铖, 范倩, 等. 经典名方小承气汤中化学成分的 UPLC-Q-Orbitrap-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23): 1-10.
- [15] 董红娇, 陈晓虎, 曾锐. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析民族药小大黄的化学成分[J]. 中草药, 2016, 47(14): 2428-2435.
- [16] 曹瑞, 窦志华, 倪丽丽, 等. HPLC 指纹图谱、Q-TOF/MS 定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1100-1110.
- [17] 王晴, 卢志威, 刘月红, 等. UPLC-Q-TOF/MSE 结合诊断离子过滤方法快速分析大黄中酚类成分[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1922-1931.
- [18] 李晓娜, 董馨, 张屏, 等. 基于 Q-Exactive 高分辨质谱的蒙中药材苦参化学成分的快速分析鉴定[J]. 中药材, 2019, 42(1): 103-109.
- [19] 赵琴琴, 张玉峰, 范晓辉. 高效液相色谱多级质谱联用法同时鉴定苦参中的两大类活性成分[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 762-769.
- [20] 陈怀侠, 韩凤梅, 陈勇, 等. 苦参生物碱电喷雾质谱分析[J]. 分析化学研究简报, 2006, 34(2): 205-208.
- [21] 彭春, 唐玲, 王燕. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的三黄片化学成分解析[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(7): 757-764.
- [22] Zhu TT, Liu X, Wang XL, et al. Profiling and analysis of multiple compounds in rhubarb decoction after processing by wine steaming using UHPLCQ-TOF-MS coupled with multiple statistical strategies[J]. J Sep Sci, 2016, 39(15): 3081-3090.
- [23] 闫峻, 顾娟, 冯硕, 等. 大青叶化学成分及抗氧化活性研究[J]. 质谱学报, 2019, 40(4): 381-390.
- [24] 刘瑞, 袁波, 李发美, 等. HPLC-MS2 鉴定大青叶水提液中的 5 种化学成分[J]. 中药材, 2005, 28(9): 772-774.
- [25] 何雨晴, 陈迪路, 张忠勤, 等. UPLC-Q-TOF-MS 联合 UNIFI 筛查平台快速分析湘产大青叶化学成分[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(5): 33-37.
- [26] Shi JF, Han GJ, Wang JF, et al. Matrine promotes hepatic oval cells differentiation into hepatocytes and alleviates liver injury by suppression of Notch signalling pathway[J]. Life Sci, 2020, 261: 118354.
- [27] Feng Y, Ying HY, Qu Y, et al. Novel matrine derivative MD-1 attenuates hepatic fibrosis by inhibiting EGFR activation of hepatic stellate cell[J]. Protein Cell, 2016, 7(9): 662-672.
- [28] Zhang YB, Luo D, Li Y, et al. Matrine-type alkaloids from the roots of *Sophora flavescens* and their antiviral activities against the hepatitis B virus[J]. J Nat Prod, 2018, 81(10): 2259-2265.
- [29] 彭丽华. 柴胡皂苷对阻塞性黄疸肝细胞保护机制分析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(24): 56.
- [30] 谢东浩, 袁冬平, 蔡宝昌, 等. 春柴胡及北柴胡对二甲基亚硝胺所致大鼠肝纤维化的保护作用比较[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(23): 2006-2009.
- [31] 卫冰, 李晓坤, 杨云, 等. 北柴胡正丁醇部位保肝作用及其化学成分特征初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 141-144.
- [32] 唐丽明, 李婉华, 宋宁, 等. 绿原酸对慢性胆汁淤积所致大鼠肝纤维化模型胆管及胶原增生的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(3): 423-428.
- [33] 华圆, 冯健, 李范珠. 茵陈蒿汤利胆退黄物质基础的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7): 1520-1521.

(收稿日期: 2022-01-05; 修回日期: 2022-02-08)

干姜和炮姜高效液相色谱指纹图谱与色度值对比研究

余凌英, 李星, 强梦琴, 蔡平君 (成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137)

摘要: **目的** 建立干姜和炮姜饮片指纹图谱, 结合化学模式识别分析和色度值相关分析, 探索炮姜的质量评价方法。**方法** 干姜和炮姜各 10 批, 采用 HPLC 法建立指纹图谱, 测定色度值 [明度值 (L^*)、红绿色值 (a^*)、黄蓝色值 (b^*)] 并计算总色值 (E^*), 运用统计分析、聚类分析、主成分分析和偏最小二乘 - 判别分析评价干姜与炮姜质量差异, 寻找不同炮制品间质量差异性成分并与色度值进行相关性分析, 再以市售炮姜验证。**结果** 干姜指纹图谱共有峰 25 个, 炮姜共有峰 27 个, 相似度均在 0.9 以上。色度值和 13 个色谱峰峰面积有显著差异。聚类分析将干姜、炮姜分为两大类, 主成分分析提取 5 个成分方差贡献率为 93.13%, 偏最小二乘 - 判别分析将两种饮片区分, 并根据 VIP > 1 原则筛选出 14 个成分和色度值为主要影响质量的差异标志物, 并指认了姜酮、6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚和 10-姜烯酚等与炮制品质量有关的 6 个成分, 差异标志物除峰 13 与 b^* 外, 均与色度值有显著的相关性。市售炮姜与炮姜对照指纹图谱相似度低于 0.8, 色度值有差异。**结论** 建立的干姜和炮姜 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析、色度值方法简便、准确、可行, 可为炮姜质量评价提供参考依据。

关键词: 干姜; 炮姜; 指纹图谱; 色度值; 化学模式识别; 炮制

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2305-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.015

HPLC fingerprint and chromatic value of dried ginger and processed ginger

YU Ling-ying, LI Xing, QIANG Meng-qin, CAI Ping-jun (College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Characteristic Chinese Drug Resources in Southwest China, Chengdu 611137)

Abstract: Objective To establish the fingerprint of dried ginger and processed ginger, and explore the quality evaluation of processed ginger by chemical pattern recognition and correlation of chromatic value. **Methods** HPLC fingerprints of 10 batches of dried ginger and processed ginger were established. Chromatic values, such as lightness value (L^*), red green value (a^*), yellow blue value (b^*) and total chromatic value (E^*) were determined. Multivariate analysis, cluster analysis, principal component analysis and partial least squares discriminant analysis were used to evaluate the quality difference, find the quality difference in the main components of different processed products, and verify with ginger from different enterprises. **Results** There were 25 common peaks in dried ginger fingerprints and 27 common peaks in processed ginger fingerprints, with similarity higher than 0.9. The chromatic values and peak area of 13 peaks were significantly different. The ginger was divided into two categories with cluster analysis. Principal component analysis showed that the variance contribution rate of the first five components reached 93.13%. Two kinds of decoction pieces were effectively distinguished, and fourteen main markers and chromatic values were screened out according to VIP > 1 in partial least squares discriminant analysis. Six chemical components related to the quality of processed production were identified, including zingiberone, 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol and 10-shogaol. Significant correlation was found between different markers and chromatic values except peak 13 and b^* . The similarity between market dried ginger and reference ginger was lower than 0.8, different in chromatic values. **Conclusion** The established HPLC fingerprints of dried ginger and processed ginger

combined with chemical pattern recognition and chromatic value are simple, accurate and feasible, which provides a reference for the quality evaluation of processed ginger.

Key words: dried ginger; processed ginger; fingerprint; chromatic value; chemical pattern recognition; processing

干姜是姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎。炮姜是干姜的炮制加工品, 具有温经止血、温中止痛作用, 用于阳虚失血, 吐衄崩漏, 脾胃虚寒, 腹痛吐泻。《中国药典》2020 年版中干姜和炮姜的指标成分为 6-姜辣素(又称 6-姜酚), 只是含量限度有所不同^[1]。有文献报道干姜和炮姜的 6-姜酚成分含量差异较大^[2-4], 并通过指纹图谱分析干姜与炮姜峰个数差异^[5-7]。指纹图谱结合化学模式识别越来越多地应用于中药材的不同产地、不同炮制品、不同品种等研究^[8-10]。炮姜炮制程度主要通过性状颜色主观判断, 市场上的炮姜颜色深浅不同, 其他指标如含量测定仅规定 6-姜酚最低含量, 对炮姜质量评价不足, 故临床实际应用的炮姜性状差异较大。王维皓等^[11]研究结果也表明来源于市场的炮姜相似度较低。目前评价炮姜质量的指标并不完善, 本研究通过对炮姜色度值检测、建立指纹图谱结合化学模式识别分析, 筛选炮姜质量差异标志物, 并对市售炮姜进行验证, 以期为进一步评价炮姜质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030C 3D 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); CR-400 色彩色差计(日本柯尼卡美能达公司); BP110S 十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司); KQ-300E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); QE-100 高速中药粉碎机(浙江屹立工贸有限公司); 5 型多功能炒货机(常州迈斯机械有限公司)。

1.2 试药

姜酮(批号: 18070502)、6-姜烯酚(批号: 19052704)、8-姜烯酚对照品(批号: 19072304)、10-姜烯酚(批号: 19080802)对照品(纯度 > 98%, 成都普菲德生物技术有限公司); 6-姜酚(批号: 21010402)、10-姜酚(批号: 20070809)(纯度 > 98%, 成都市卓谱仪器有限公司); 8-姜酚对照品(批号: CHB180305, 纯度 > 98%, 成都克洛玛生物科技有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Sigma 公司); 冰乙酸(色谱纯, 成都市科隆化学品有限公司)。10 批干姜饮片(G1 ~ G3

产地四川; G4 ~ G6 产地云南; G7 ~ G10 产地贵州), 经成都中医药大学兰志琼副教授鉴定为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎。10 批炮姜(自制, 采用河砂于 195 °C 炒制 7.5 min 即得, 编号 P1 ~ P10)。7 批市售炮姜购买于企业、药店(编号为 S1 ~ S7)。

2 方法与结果

2.1 色度值测定

2.1.1 测定方法与条件^[12] 测量光源为 D65, 视场选择近似 2° 观察角。分别取各炮制品粉末(过三号筛)适量, 将样品粉末置于色彩色差计中, 测定样品粉末颜色, 平行测定 3 份, 经白板校正后, 测得各样品 L^* 、 a^* 、 b^* 。其中 L^* 代表明暗度, 正值偏亮, 负值偏暗; a^* 为红绿色, 正值偏红, 负值偏绿; b^* 为黄蓝色, 正值偏黄, 负值偏蓝。

2.1.2 样品测定与分析 取干姜和炮姜样品, 按“2.1.1”项下测定条件测定样品 L^* 、 a^* 、 b^* , 总色值(E^*) = $(L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, 总色差(ΔE^*) = $(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$, ΔL^* 、 Δa^* 、 Δb^* 分别是炮姜与同批次干姜数据的差值。其中 10 批干姜和炮姜样品检测结果见表 1, 市售炮姜样品检测结果见表 2。从表 1 数据可以看出: 干姜 L^* 为 65.56 ~ 76.88, a^* 为 3.35 ~ 7.74, b^* 为 31.29 ~ 36.38, E^* 为 73.67 ~ 84.23; 炮姜 L^* 为 34.56 ~ 44.30, a^* 为 12.82 ~ 14.39, b^* 为 25.68 ~ 31.37, E^* 为 45.10 ~ 56.04。干姜制成炮姜后 ΔL^* 、 Δb^* 均为负值, 平均分别下降了 34.09 和 5.01, 表明炮姜颜色明显偏黑; Δa^* 为正值, 平均增加 8.96, 样品偏红; ΔE^* 平均增加 35.68, 色差明显, 干姜与炮姜可以明显区分。

从表 2 数据可以看出市售炮姜 L^* 、 E^* 均高于样品炮姜, 表明市售品颜色比样品炮姜颜色明亮, 色泽偏黄。市售炮姜 a^* 、 b^* 均有 1 份样品检测数据在样品炮姜数据范围内。S3、S4 两份样品色度值与样品炮姜最接近, 但仍高于样品。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 InertSustain AQ-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈(A) - 0.1% 乙酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 10 min,

表 1 干姜和炮姜色度值检测结果

Tab 1 Chromatic values of dried ginger and processed ginger

编号	L^* _{干姜}	a^* _{干姜}	b^* _{干姜}	E^* _{干姜}	L^* _{炮姜}	a^* _{炮姜}	b^* _{炮姜}	E^* _{炮姜}	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
1	67.94	7.74	36.38	77.45	41.50	13.77	29.13	52.54	-26.44	6.03	-7.25	28.07
2	74.22	3.84	33.76	81.63	38.42	13.80	28.84	49.98	-35.8	9.96	-4.92	37.48
3	68.99	5.43	33.83	77.03	35.76	13.61	26.56	46.74	-33.23	8.18	-7.27	34.98
4	76.84	4.43	34.21	84.23	41.01	14.17	30.34	52.94	-35.83	9.74	-3.87	37.33
5	74.47	4.10	33.32	81.69	34.56	13.41	25.68	45.10	-39.91	9.31	-7.64	41.69
6	65.56	5.85	33.08	73.67	42.61	12.82	29.75	53.53	-22.95	6.97	-3.33	24.22
7	76.88	4.15	33.06	83.79	34.68	13.57	26.98	45.99	-42.20	9.42	-6.08	43.66
8	76.52	3.35	31.29	82.74	39.23	14.39	29.34	51.06	-37.29	11.04	-1.95	38.94
9	76.38	3.83	33.28	83.40	44.30	13.91	31.37	56.04	-32.08	10.08	-1.91	33.68
10	72.04	4.39	32.78	79.27	36.90	13.23	26.95	47.57	-35.14	8.84	-5.83	36.70
均值	72.98	4.71	33.50	80.49	38.90	13.67	28.50	50.15	-34.09	8.96	-5.01	35.68
极差	11.32	4.39	5.09	10.56	9.74	1.57	5.69	10.94	19.25	5.01	5.73	15.59

表 2 市售炮姜色度值检测结果

Tab 2 Chromatic values of processed ginger from market

编号	L^*	a^*	b^*	E^*
S1	58.83	11.55	33.56	68.71
S2	54.90	13.12	34.49	66.15
S3	49.56	12.73	31.61	60.15
S4	51.89	12.64	33.04	62.80
S5	65.10	9.22	31.21	72.83
S6	62.96	9.94	32.74	71.66
S7	65.81	9.36	32.36	73.93

10% ~ 25%A; 10 ~ 30 min, 25% ~ 40%A; 30 ~ 70 min, 40% ~ 80%A; 70 ~ 83 min, 80% ~ 90%A; 83 ~ 98 min, 90% ~ 100%A); 检测波长 280 nm, 柱温 30℃, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 取姜酮、6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚、8-姜烯酚、10-姜烯酚对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.0602、0.294、0.129、0.093、0.295、0.060、0.048 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别取干姜和炮姜粉末(过三号筛)约 0.30 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 称定质量, 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz)处理 40 min, 取出, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 精密度试验 取“2.2.3”项下溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录各共有峰的峰面积, 结果各共有峰峰面积的 RSD 值为 0.50% ~ 0.72%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取“2.2.3”项下溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录各共有峰的峰面积, 结果共

有峰峰面积的 RSD 值为 0.47% ~ 1.2%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取炮姜粉末 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录各共有峰的峰面积, 结果各共有峰峰面积的 RSD 值为 1.4% ~ 2.8%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 指纹图谱的建立及相似度评价 取 10 批干姜和炮姜饮片按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 将 10 批干姜和 10 批炮姜色谱图分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)”软件进行相似度评价, 干姜的相似度为 0.918 ~ 0.993, 炮姜的相似度为 0.904 ~ 0.993, 相似度均大于 0.9。10 批干姜和 10 批炮姜饮片 HPLC 指纹图谱见图 1, 干姜的共有峰为 25 个, 炮姜的共有峰为 27 个, 其中峰 2、21、23 为干姜的特有峰, 峰 1、3、5、16、28 为炮姜的特有峰。通过对照品指出了其中 7 个色谱峰, 结果见图 1。

2.3 统计分析

以炮姜确定的 27 个共有峰为研究对象, 采用 SPSS 26.0 软件对 10 批干姜与 10 批炮姜中共有峰的峰面积数据均一化处理后与色度值 L^* 、 a^* 、 b^* 、 E^* 进行独立样本 t 检验分析, 结果见表 3。炮姜与干姜相比, 色谱峰 4、6、7、12(6-姜酚)、13、14(8-姜酚)、15(6-姜烯酚)、18(10-姜酚)、19(8-姜烯酚)、24(10-姜烯酚)、26、27、29 等 13 个峰的峰面积差异有统计学意义, 其中峰 4、13、15、19、24、27 炮制后峰面积明显增加。峰 1、3、5、16、28 为炮制后新产生的成分。色度值 L^* 、 a^* 、 b^* 、 E^* 差异均有统计学意义, 其中 L^* 、

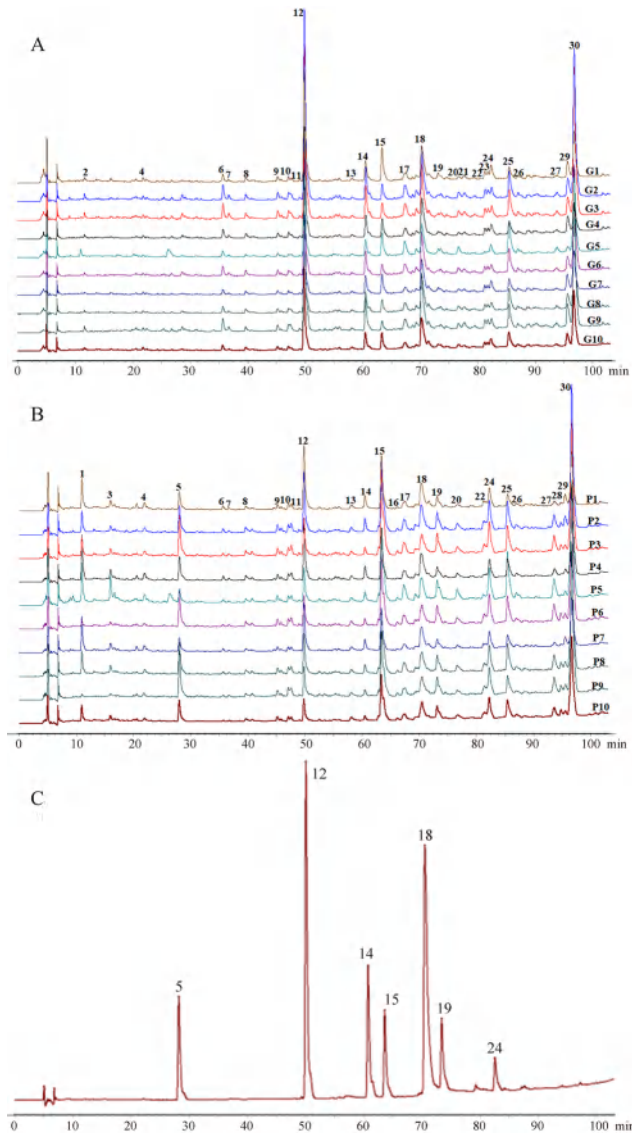


图1 干姜(A)、炮姜(B)、混合对照品(C) HPLC图
 Fig 1 HPLC chromatogram of dried ginger (A), processed ginger (B) and mixed reference substance (C)
 5. 姜酮 (zingiberone); 12. 6-姜酚 (6-gingerol); 14. 8-姜酚 (8-gingerol); 15. 6-姜烯酚 (6-shogaol); 18. 10-姜酚 (10-gingerol); 19. 8-姜烯酚 (8-shogaol); 24. 10-姜烯酚 (10-shogaol)

b^* 、 E^* 在炮制后显著降低, a^* 在炮制后显著升高。

2.4 聚类分析

利用 SIMCA 14.1 软件, 以 10 批干姜和 10 批炮姜的 HPLC 指纹图谱的色谱峰面积标准化处理后进行聚类分析, 结果见图 2。当平方欧氏距离为 20 时, 10 批干姜聚为一类, 10 批炮姜聚为一类, 说明不同炮制品之间质量存在明显的差异。

2.5 主成分分析

将 10 批干姜及 10 批炮姜饮片 HPLC 指纹图谱中的 27 个色谱峰的峰面积及色度值 (L^* 、 a^* 、 b^* 、 E^*) 经数据处理后导入 SIMCA 14.1 软件中进行主成分分析, 部分批次色谱峰缺失的峰面积以

表 3 干姜和炮姜峰面积、色度值平均值 t 检验结果

Tab 3 t test of mean peak area and chromatic value of dried ginger and processed ginger

指标	干姜	炮姜	指标	干姜	炮姜
峰 1 [△]	/	18 5391.40	峰 18 [△]	775 223.10	448 180.90**
峰 3 [△]	/	65 046.70	峰 19 [△]	117 916.60	230 872.50**
峰 4 [△]	29 683.80	50 234.20**	峰 20 [△]	62 063.90	72 557.30
峰 5 [△]	/	299 950.70	峰 22 [△]	80 587.90	82 443.20
峰 6 [△]	104 501.00	26 053.30**	峰 24 [△]	183 855.90	324 854.90**
峰 7 [△]	47 886.60	17 396.90**	峰 25 [△]	283 985.10	279 281.80
峰 8 [△]	60 297.90	51 147.50	峰 26 [△]	60 069.70	50 317.90 [†]
峰 9 [△]	62 152.50	53 626.20	峰 27 [△]	51 467.40	150 023.30**
峰 10 [△]	58 553.40	53 634.90	峰 28 [△]	/	57 215.90
峰 11 [△]	49 098.40	66 221.00	峰 29 [△]	272 405.60	98 758.40**
峰 12 [△]	1 605 533.70	487 013.60**	峰 30 [△]	1 043 061.50	1395 120.30
峰 13 [△]	42 811.30	57 253.70**	L^*	72.98	38.90**
峰 14 [△]	303 184.50	98 289.90**	a^*	4.71	13.67**
峰 15 [△]	249 728.90	702 435.40**	b^*	33.50	28.49**
峰 16 [△]	/	32 425.80	E^*	80.49	50.15**
峰 17 [△]	198 070.80	166 090.30			

注: 与干姜比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ ($^{\Delta}$ 表示对应峰面积)。

Note: vs dried ginger, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ ($^{\Delta}$ means related peak area) .

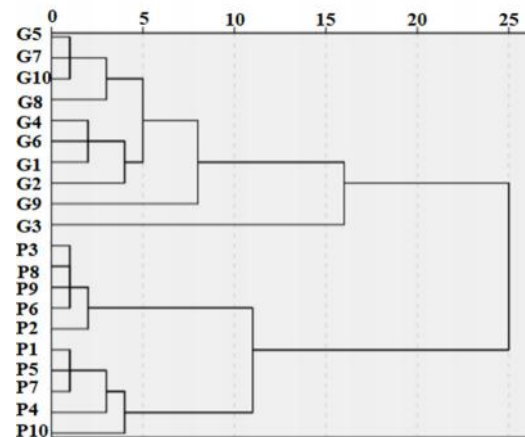


图2 聚类分析树状图
 Fig 2 Dendrogram of cluster analysis

0 计。当特征值 > 1 时, 共提取 5 个主成分因子, 其特征值和方差贡献率见表 4, 前 5 个主成分可用于反映干姜和炮姜指纹图谱整体 93.13% 的信息。主成分分析二维得分图见图 3, 干姜与炮姜被明显地分在坐标轴的两侧, 互不交叉, 说明干姜和炮姜具有明显的差异性, 与聚类分析结果一致。

2.6 偏最小二乘 - 判别分析

为了进一步寻找干姜和炮姜的差异标志物, 采用 SIMAC 14.1 软件对样品数据进行偏最小二乘 - 判别分析。将 10 批干姜和 10 批炮姜的 27 个共有峰的峰面积和色度值 (L^* 、 a^* 、 b^* 、 E^*) 导入 SIMAC 14.1 软件中, 建立偏最小二乘 - 判别

表 4 特征值及方差贡献率

Tab 4 Characteristic value and variance contribution rate

主成分因子	特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	16.06	51.80	51.80
2	5.98	19.28	71.08
3	3.39	10.93	82.01
4	2.12	6.83	88.84
5	1.33	4.29	93.13

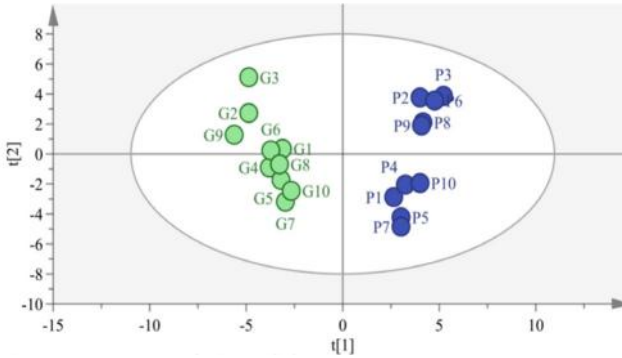


图 3 干姜和炮姜的主成分分析得分图
Fig 3 Score plot of principal component analysis for dried ginger and processed ginger

分析模型，模型得分图见图 4，所得结果与主成分分析和聚类分析结果均一致，可以很好地将两者进行分类。其中 R^2Y 达到 0.978，表示模型拟合程度好， Q^2 达到 0.944，表示该模型预测能力强。10 批干姜和 10 批炮姜饮片的分类聚集明显。对模型中 31 个变量的重要度 (VIP) 进行分析，结果见图 5，选择 $VIP > 1$ 的成分作为区分干姜和炮姜饮片的重要特征数据，依次为 a^* ($VIP = 1.39$)、 L^* ($VIP = 1.39$)、 E^* ($VIP = 1.38$)、峰 3 ($VIP = 1.32$)、峰 29 ($VIP = 1.28$)、峰 5 (姜酮， $VIP = 1.25$)、峰 14 (8-姜酚， $VIP = 1.23$)、峰 6 ($VIP = 1.22$)、 b^* ($VIP = 1.21$)、峰 12 (6-姜酚， $VIP = 1.20$)、峰 18 (10-姜酚， $VIP = 1.20$)、峰 16 ($VIP = 1.17$)、峰 28 ($VIP = 1.17$)、峰 15 (6-姜烯酚， $VIP = 1.16$)、峰 7 ($VIP = 1.09$)、峰 1 ($VIP = 1.07$)、峰 24 (10-姜烯酚， $VIP = 1.06$)、峰 13 ($VIP = 1.04$)。

2.7 差异标志物与色度值相关性分析

利用 SPSS 26.0 对 14 个差异标志物峰面积与色度值 L^* 、 a^* 、 b^* 、 E^* 进行相关分析，结果见表 5。一般认为，相关系数 $|r| \geq 0.8$ 时高度相关； $0.5 \leq |r| < 0.8$ 中度相关； $0.3 \leq |r| < 0.5$ 时低度相关； $|r| < 0.3$ 时基本不相关。除 13 号峰与 b^* 不相关外，其余各色谱峰与色度值均有相关性，其中峰 1、3、5、15、16、24、28 与 a^* 成显著正相关，与 L^* 、 b^* 、 E^* 成显著负相关；峰 6、7、12、

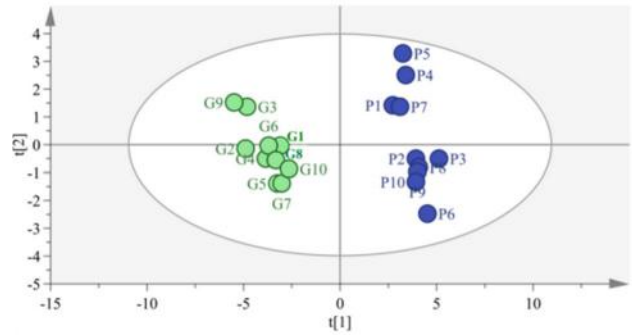


图 4 偏最小二乘 - 判别分布图
Fig 4 Score plot of partial least

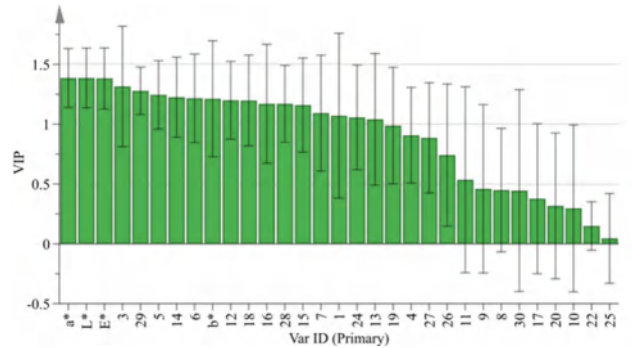


图 5 VIP 值分布图
Fig 5 VIP score plot squares-discriminant analysis

14、18、29 与之相反，与 a^* 成显著负相关，与 L^* 、 b^* 、 E^* 成显著正相关。表明干姜炮制过程中，差异标志物与颜色变化有较好的相关性。

表 5 差异标志物峰面积与色度值相关性分析

Tab 5 Correlation analysis between marker peak area and chromatic value

峰号	L^*	a^*	b^*	E^*
峰 1	-0.522**	0.570**	-0.438*	-0.524**
峰 3	-0.575**	0.694**	-0.389*	-0.568**
峰 5	-0.804**	0.731**	-0.667**	-0.801**
峰 6	0.794**	-0.796**	0.695**	0.796**
峰 7	0.692**	-0.756**	0.555**	0.689**
峰 12	0.763**	-0.770**	0.682**	0.765**
峰 13	-0.598**	0.741**	-0.252	-0.577**
峰 14	0.778**	-0.733**	0.731**	0.783**
峰 15	-0.763**	0.805**	-0.502**	-0.752**
峰 16	-0.788**	0.718**	-0.657**	-0.785**
峰 18	0.730**	-0.725**	0.627**	0.730**
峰 24	-0.701**	0.686**	-0.475*	-0.689**
峰 28	-0.728**	0.662**	-0.659**	-0.733**
峰 29	0.757**	-0.819**	0.621**	0.757**

注 (Note): $P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

2.8 市售炮姜数据分析

将 7 批市售炮姜饮片按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。将市售炮姜与炮姜对照指纹图谱进行

相似度评价, S1~S7 相似度分别是 0.617、0.593、0.746、0.795、0.580、0.512、0.565, 相似度均小于 0.8。根据“2.5”项下筛选 VIP > 1 差异标志物的色谱峰, 以其峰面积分别与样品姜(建立指纹图谱的干姜、炮姜)峰面积进行比较, 其与干姜峰面积差异有统计学意义, 其与炮姜峰面积差异有统计意义的是峰 5、6、12、14、16、24、28。市售炮姜峰面积与样品炮姜对比, 范围不同的色谱峰有峰 5、16、28, 全部重叠的色谱峰为峰 7、13, 峰面积比较见表 6, 色谱图见图 6。

市售炮姜色度值与样品炮姜有差异, 相似度也较低; 差异标志物峰面积部分成分有差异, 采用不同条件炮制炮姜, 成分变化未达到样品炮姜的炮制程度。

表 6 市售炮姜与样品炮姜差异标志物峰面积比较

Tab 6 Marker peak area between processed ginger from market and processed ginger

样品	峰号													
	3	29	5	14	6	12	18	16	28	15	7	1	24	13
S1	↑	+	↓	↑	↑	↑	+	↓	↓	+	+	+	+	+
S2	+	↑	↓	↑	↑	↑	+	↓	↓	+	+	+	+	+
S3	+	+	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	+	+	+	+	+
S4	↑	↑	↓	↑	↑	↑	+	↓	↓	+	+	+	+	+
S5	+	+	↓	+	+	+	↓	↓	↓	+	+	+	↓	+
S6	+	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	+	↑	↓	+
S7	↑	+	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	+	+	↑	+	+

注: 与样品炮姜峰面积范围比较, “+”表示相同; “↑”表示高于; “↓”表示低于。

Note: Compared peak area range with processed ginger, “+” means same; “↑” means higher; “↓” means lower.

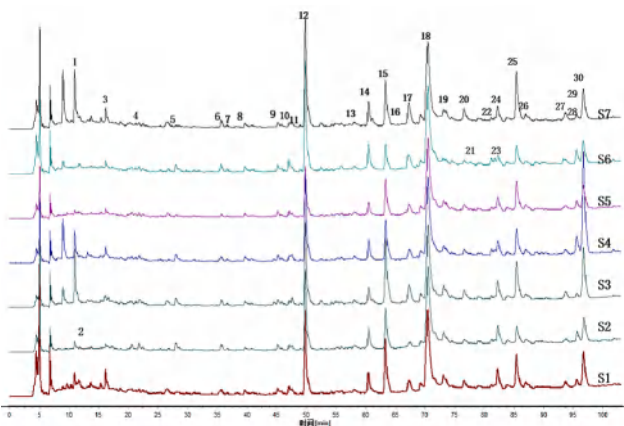


图 6 市售炮姜色谱图

Fig 6 HPLC fingerprint of processed ginger from market

3 讨论

本研究考察了不同提取溶剂(50% 甲醇、75% 甲醇、甲醇)、不同流动相(乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 乙酸水溶液)、

不同检测波长(240、254、280 nm)、不同流速(0.6、0.8、1.0 mL · min⁻¹)对色谱图的影响, 最终确定了研究用色谱条件。

本研究对干姜和炮姜指纹图谱进行了相似度和化学模式识别分析。两种炮制品相似度均 > 0.9, 表明炮制品各批次间成分差异不明显, 质量相对稳定。市售炮姜相似度在 0.512 ~ 0.795, 炮姜来源不同质量差异大, 可能与炮制工艺参数不一致, 在炮制过程中化学成分变化程度不同有关。采用化学模型识别分析与相似度评价结果基本一致, 说明本研究采用的分析方法用于炮姜质量评价是可行的。

基于 VIP > 1 的筛选原则, 发现了 14 个化学成分可作为区分干姜和炮姜的标志物, 并指认了姜酮、6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚和 10-姜烯酚等 6 个成分。14 个成分中, 色谱峰 1、3、5、16、28 为新增加成分, 市售炮姜中峰 5、16、28 峰面积均低于样品炮姜, 表明上述成分可能与炮制程度关系更密切, 是炮制程度潜在评价指标。5 号峰为姜酮, 具有抗炎、抗氧化、止血等作用^[13-16], 是炮姜温经止血成分之一, 姜酮含量与炮制温度、时间均有关系^[17]。炮姜中姜酚类成分含量降低, 姜烯酚类和姜酮成分含量增加, 其变化可能与姜酚类成分在炒制过程中转化为姜烯酚、姜酮等物质有关^[18-20]。姜烯酚类成分抗炎作用强于姜酚类^[21]。课题组对脾胃虚寒型胃溃疡大鼠进行抗溃疡实验, 优选工艺制得样品^[22]药效优于炮制太过或不及的样品。说明以差异标志物作为质量评价指标是科学的。

颜色是传统中药质量评价的指标之一, 辨色论质经过长期的发展应用, 有丰富的理论, 但主观性强, 缺乏客观标准。颜色量化值能反映炮制品颜色变化, 通过比较粉末与饮片的色度值, 粉末均匀, 重现性好, 选择粉末为本研究对象进行实验, 检测数据与差异标志物关联。结果表明炮姜色度值与差异标志物有明显相关性, 可以通过表观颜色推测内在成分高低, 评价炮姜质量。市售炮姜数据也说明以色度值作为炮姜质量评价指标具有合理性, 且操作方便、快捷, 为炮姜质量快速评价以及在线监测提供了思路, 但是合适的色度范围还需要扩大样本量, 进一步检测分析确定。

综上, 建立的干姜和炮姜 HPLC 指纹图谱并结合色度值、化学模式识别分析, 将外观颜色与内在质量进行了关联, 明确了炮制品质量差异, 为炮姜质量评价提供了参考。初步分析了质量差

异标志物与炮制程度的关系, 但需要深入研究相关性; 其他未知标志物, 有必要进行进一步研究, 如采用 HPLC-MS-MS 等技术研究结构与功效, 并确认标志物的合理控制条件, 有利于更全面地评价炮姜质量。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 15-16.
- [2] 张永鑫, 李俊松, 陈丽华, 等 . 高效液相色谱法同时测定姜及其不同炮制品中 5 种姜辣素的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47 (6): 471-474.
- [3] 高伟城, 王小平, 沈晓华, 等 . 不同干姜炮制品姜酚类成分含量的研究 [J]. 中医临床研究, 2020, 12 (34): 22-25.
- [4] 林华坚, 张梓豪, 孟江, 等 . 干姜及其炮制品色差值与活性成分含量的相关性研究 [J]. 中国药房, 2020, 31 (10): 1197-1202.
- [5] 申玲玲, 纪彬, 段红福, 等 . 姜的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (7): 69-73.
- [6] 韩燕全, 洪燕, 桂洁, 等 . 不同产地生、干、炮姜的 UPLC 指纹图谱比较研究 [J]. 中成药, 2013, 35 (2): 356-359.
- [7] 龙全江, 李文涛, 张颖, 等 . 不同加工法制得的干姜片及炮制品高效液相色谱指纹图谱比较研究 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2019, 36 (2): 23-27.
- [8] 谢苏梦, 季巧遇, 吕尚, 等 . 不同产地野菊花 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (24): 7616-7623.
- [9] 裴科, 宁燕, 蔡皓, 等 . 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的川芎炮制前后对比研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (5): 1274-1283.
- [10] 张桐, 王玥玥, 王康宇, 等 . 基于化学模式识别法的不同品种木通药材指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (9): 1590-1597.
- [11] 王维皓, 李娟, 高慧敏, 等 . 从 HPLC 特征图谱分析姜在炮制过程中的化学成分变化 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (8): 1248-1252.
- [12] 李星, 敖明月, 强梦琴, 等 . 炮姜饮片炮制过程中颜色变化与其成分含量的相关性分析 [J]. 中药材, 2022, 45 (5): 1099-1106.
- [13] Zhang ZC, Cui YQ, Liu SY, et al. Short-term treatment with zingerone ameliorates dextran sulfate sodium-induced mice experimental colitis [J]. J Sci Food Agr, 2022, 102 (11): 4873-4882.
- [14] Upadhyaya K, Sharma PK, Akhtar A, et al. Protective effects of zingerone against depression-like behavior and biochemical changes in chronic stressed rats: antioxidant effects [J]. J Med Food, 2022, 25 (6): 576-587.
- [15] Sistani KN, Arzi A, Rezaie A, et al. Gastroprotective effect of zingerone on ethanol-induced gastric ulcers in rats [J]. Medicina, 2019, 55 (3): 64.
- [16] 黄宇婷, 孙悦, 孟江, 等 . 姜炭炮制前后饮片差异质量标志物研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (7): 1765-1775.
- [17] 徐晓青, 洪燕, 夏伦祝, 等 . 不同炮制温度和时间对炮姜中姜酮含量的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33 (5): 86-88.
- [18] 严辉, 李鹏辉, 周桂生, 等 . 不同产地、规格姜类药材及饮片质量评价 [J]. 中药材, 2020, 43 (4): 817-823.
- [19] 卢泰, 谢正江, 刘霖, 等 . 中药辣味的主要物质、形成机制与掩蔽技术研究概况 [J]. 中国中药杂志, 2021. DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20211123.302.
- [20] Jung MY, Lee MK, Park HJ, et al. Heat-induced conversion of gingerols to shogaols in ginger as affected by heat type (dry or moist heat), sample type (fresh or dried), temperature and time [J]. Food Sci Biotechnol, 2017, 27 (3): 687-693.
- [21] 陈琛, 耿剑亮, 匡海学, 等 . UHPLC-Oribtrap/HRMS 技术分析干姜中非挥发性化学成分在炮制前后的变化 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36 (3): 387-395.
- [22] 李星, 强梦琴, 蔡平君, 等 . 基于多指标评价优选炮姜砂烫工艺 [J]. 中药与临床, 2022, 13 (3): 24-30.

(收稿日期: 2022-06-24; 修回日期: 2022-08-18)

甘草药渣发酵工艺优化及成分分析、抗氧化活性的研究

吕丽静¹, 屈青松¹, 周晴², 盛梦柯¹, 李智勋², 石艳双¹, 卢建秋^{1*}, 史新元^{1*} (1.北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2.北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488)

摘要: 目的 优化复合益生菌发酵甘草药渣工艺, 并分析发酵前后物质成分含量的变化及体外抗氧化活性。方法 以酿酒酵母菌与植物乳杆菌为发酵菌株对甘草药渣进行协同发酵, 以总黄酮含量为响应值, 对接种比例、接种量、发酵温度、发酵时间进行中心组合 Box-Behnken 试验设计, 并进行响应面分析; 采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法及高效液相色谱法分别对发酵前后总黄酮、甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草酸的含量进行测定。同时还考察了甘草药渣发酵物对 DPPH 自由基和羟自由基的清除作用。结果 最佳发酵条件为: 酿酒酵母菌与植物乳杆菌接种比例 1:3、接种量 8%、发酵时间 48 h、温度 34 °C, 在此条件下甘草总黄酮含量为 $(1.98 \pm 0.02)\%$ 。发酵后总黄酮、甘草素及异甘草素的含量升高, 而甘草苷、甘草酸含量有所下降。甘草药渣发酵物对 DPPH 及羟自由基具有明显的清除能力且在相同浓度下强于未发酵组。结论 复合益生菌发酵甘草药渣发酵工艺合理可行, 发酵产物具有良好的抗氧化活性, 在资源再利用方面具有积极意义。

关键词: 益生菌; 甘草药渣; 发酵; 工艺优化; 抗氧化

中图分类号: R284, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)10-2312-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.016

Optimization of licorice residue fermentation and analysis of its compositions and antioxidant activity

LYU Li-jing¹, QU Qing-song¹, ZHOU Qing², SHENG Meng-ke¹, LI Zhi-xun², SHI Yan-shuang¹, LU Jian-qiu^{1*}, SHI Xin-yuan^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To optimize the fermentation of licorice residue by compound probiotics and analyze the chemical compositions and in vitro antioxidant activity before and after the fermentation. **Methods** *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* were used as fermentation strains for the co-fermentation of licorice residue. With the total flavonoid content as the response value, the central combination Box-Behnken experiment design was used for the inoculation ratio, inoculation amount, fermentation temperature and fermentation time. Response surface analysis was conducted. The content of total flavonoids, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, and glycyrrhizic acid were determined by $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ colorimetric method and high performance liquid chromatography before and after the fermentation, respectively. The scavenging effect of fermented licorice residues on DPPH radicals and hydroxyl radicals was determined. **Results** The optimal fermentation conditions included inoculation ratio of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* at 1:3, inoculation amount at 8%, fermentation for 48 h, and fermentation temperature at 34 °C. Under these conditions, the total flavonoid content was $(1.98 \pm 0.02)\%$. After the fermentation, the content of total flavonoids, liquiritigenin, and isoliquiritigenin was increased, while the content of liquiritin, and

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.8217141690)。

作者简介: 吕丽静, 女, 硕士, 主要从事药物分析学研究, email: 1752032062@qq.com *通信作者: 卢建秋, 男, 博士, 研究员, 主要从事中药制剂分析和中医药文化研究, email: lujq@vip.sina.com; 史新元, 女, 博士, 教授, 主要从事中药生物技术研究, email: xys_2019@126.com

glycyrrhizic acid was decreased. The fermented licorice residue had significant scavenging effect on DPPH and hydroxyl radicals, stronger than the unfermented group at the same concentration.

Conclusion The fermentation of licorice residue by complex probiotics is reasonable and feasible, and the fermentation product has good antioxidant activity, which promotes reuse of resources.

Key words: probiotics; licorice residue; fermentation; process optimization; antioxidant activity

随着中医药事业的蓬勃发展, 中药制造业产生了大量中药药渣。中药提取后的药渣大多被作为废弃物处理, 造成环境污染和资源浪费, 药渣的处理成为目前中药制药企业面临的难题^[1-2]。药渣中除了残留的药用成分外, 还含有许多有价值的成分, 可通过不同的方法将其充分利用。研究表明, 药渣可作为饲料添加剂用于养殖业^[3-4]。但药渣中纤维含量较高, 将其直接作为饲料添加剂, 活性成分的吸收利用率低, 且适口性差^[4], 在一定程度上限制了其在养殖业中的应用。

现代微生物发酵技术因其安全、无毒、简单、效果理想等诸多优点, 被广泛用于农业、医药、食品、化工等领域^[5]。采用微生物发酵技术对药渣进行发酵, 微生物产生的多种酶系可降低药渣中纤维素的含量, 促进有效成分的析出, 提高药渣利用率^[6]。益生菌具有改善或维持健康的功能, 可抑制有害细菌增殖, 调节肠道菌群平衡, 从而发挥机体调节、预防疾病等功效^[7]。有研究发现益生菌发酵蒲公英可以提高其抗氧化活性^[8]。鉴于上述特点, 益生菌可被用作中药药渣发酵的菌种。

甘草是常用大宗药材, 有“十方九草”“国老”之美誉。现代研究表明, 甘草主要活性成分是三萜皂苷、黄酮和多糖类, 具有抗氧化、调节免疫、保肝、抗炎抑菌等多种药理活性^[9-10]。每年有大量甘草被用于生产, 随之产生了大量的甘草固体废弃物^[11]。本文以农业部发布的第 2045 号公告中规定的可用于饲料微生物添加剂的两种益生菌(植物乳杆菌和酿酒酵母)作为发酵菌种进行混合发酵, 以甘草药渣作为发酵基质, 以甘草总黄酮含量为检测指标, 采用响应面法优化最佳发酵条件, 并分析发酵前后成分含量的变化及抗氧化活性, 为甘草药渣开发利用提供依据, 使药渣的利用更加高效、环保。

1 材料

1.1 仪器

FW-100 型高速粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司), Synergy-2 型多功能酶标仪(美国 BIO-TEK 公司), PB303-S 型电子天平(北京赛多利斯

科学仪器有限公司), KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 2695 型高效液相色谱仪(Waters 美国公司), BBS-DDC 型超净工作台(北京哈东联仪器制造有限公司)。

1.2 试药

甘草药渣(北京康仁堂药业有限公司)。植物乳杆菌(批号: cf201109, 江苏菌钥生命科技发展有限公司), 酿酒酵母(批号: ky2008613, 中国典型培养物保藏中心)。对照品甘草酸、甘草苷、甘草素、异甘草素(批号分别为 B20417、B20414、B20416、B21525, 纯度 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 甲醇、乙腈(Fisher, 色谱级)。

2 方法与结果

2.1 菌种活化及种子液制备

将植物乳杆菌、酿酒酵母菌悬液分别划线于 MRS、YM 固体培养基中, 并分别于 37 °C、30 °C 静置培养 36 h, 分离得到单一菌落。挑取单一菌落接种于 MRS、YM 液体培养基中, 37 °C、160 r · min⁻¹ 培养 2 d, 获得发酵用种子液, 冷藏备用。

2.2 发酵甘草药渣培养基的制备

将甘草药渣粉碎并过 40 目筛, 称定 10.00 g 置于 250 mL 锥形瓶中, 加去离子水调整料水比为 1 : 1, 121 °C、20 min 高压蒸汽灭菌备用。

2.3 甘草总黄酮含量测定

采用 70% 的乙醇超声提取样品中的总黄酮^[12], 利用 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 比色法测定总黄酮含量^[13]。建立回归方程: $A = 6.5C + 0.0186$, $R^2 = 0.9996$, 利用回归方程计算总黄酮含量。

2.4 发酵条件优化

2.4.1 单因素试验 以接种比例酿酒酵母与植物乳杆菌 = 1 : 1、接种量 10%、发酵温度 30 °C、发酵时间 24 h 为初始发酵条件, 分别考察接种比例(3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3)、接种量(2%、4%、6%、8%、10%、12%)、发酵温度(22、26、30、34、38 °C)、发酵时间(12、24、36、48、72 h)对甘草总黄酮含量的影响, 结果见图 1。根据试验结果, 选择接种比例酿酒酵母菌:植物乳杆

菌为 1 : 2、接种量 10%、发酵温度 30 °C、发酵时间 36 h 作为响应面法的考察水平。

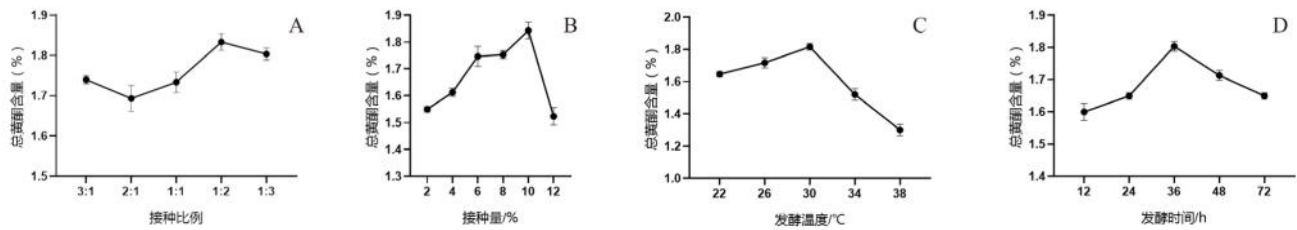


图 1 单因素优化试验结果

Fig 1 Single-factor optimization experiment results

2.4.2 响应面优化 依据单因素试验结果, 对接种比例、接种量、发酵温度、发酵时间 4 个因素, 各选 3 个水平, 分别以 - 1、0、1 进行编码。采用 Box-Behnken 响应面设计模型, 设计 4 因素 3 水平中心组合试验条件, 以总黄酮含量为评价指标, 优化复合益生菌发酵甘草药渣工艺条件。试验因素水平及编码见表 1, 结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 的中心组合因素水平表

Tab 1 Factor and level of the central composition of Box-Behnken

水平	接种比例 (A)	接种量 (B) /%	发酵温度 (C) /°C	发酵时间 (D) /h
- 1	1 : 1	8	26	24
0	1 : 2	10	30	36
1	1 : 3	12	34	48

应用 Design-expert 8.0.6 软件对试验数据进行二次多元回归拟合, 得到二次多项回归方程为:

$$Y = 1.81 + 0.046A + 0.078B + 0.061C + 0.046D + 0.041AB - 0.055AC + 0.01AD + 0.14BC - 0.11BD - 0.2CD + 0.047A^2 - 0.17B^2 - 0.14C^2 - 0.13D^2$$

由表 3 可知, 回归模型 F 值为 19.63, P 值 < 0.0001 , 表明回归模型极显著。方程的相关系数 $R^2 = 0.9515$, $R^2 > 0.95$, 说明此模型拟合度较好, 能很好地反映真实的实验情况。失拟项 $P = 0.0960 > 0.05$, 模型失拟项不显著。模型的调整复相关系数 $R_{adj}^2 = 0.9030$, 说明该模型能解释约 90.30% 响应值的变化。

根据 F 值的大小, 得出总黄酮含量受各因素的影响次序为: 发酵时间 (B) $>$ 发酵温度 (C) $>$ 接种比例 (A) $>$ 接种量 (D)。各因素之间两两交互作用对甘草总黄酮含量的影响见图 2。由软件分析得到, 益生菌发酵甘草药渣最优发酵工艺条件是接种比例酿酒酵母与植物乳杆菌为 1 : 3、发酵时间 48 h、发酵温度 34 °C、接种量 8%, 在此条件下甘草总黄酮含量的预测值为 1.99%。

2.4.3 回归模型的验证 为验证模型的可靠性及

表 2 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Tab 2 Box-Behnken experiment design and results

试验号	接种比例 (A)	发酵时间 (B) /h	发酵温度 (C) /°C	接种量 (D) /%	总黄酮含量 /%
1	1 : 1	24	30	10	1.61
2	1 : 3	24	30	10	1.68
3	1 : 1	48	30	10	1.58
4	1 : 3	48	30	10	1.82
5	1 : 2	36	26	8	1.20
6	1 : 2	36	34	8	1.78
7	1 : 2	36	36	12	1.71
8	1 : 2	36	34	12	1.41
9	1 : 1	36	30	8	1.67
10	1 : 3	36	30	8	1.66
11	1 : 1	36	30	12	1.76
12	1 : 3	36	30	12	1.79
13	1 : 2	24	26	10	1.52
14	1 : 2	48	26	10	1.42
15	1 : 2	24	34	10	1.29
16	1 : 2	48	34	10	1.74
17	1 : 1	36	26	10	1.53
18	1 : 3	36	26	10	1.75
19	1 : 1	36	34	10	1.82
20	1 : 3	36	34	10	1.82
21	1 : 2	24	30	8	1.25
22	1 : 2	48	30	8	1.70
23	1 : 2	24	30	12	1.56
24	1 : 2	48	30	12	1.58
25	1 : 2	36	30	10	1.85
26	1 : 2	36	30	10	1.79
27	1 : 2	36	30	10	1.78
28	1 : 2	36	30	10	1.83
29	1 : 2	36	30	10	1.78

有效性, 对优化后的最佳条件进行 3 次重复试验, 得到总黄酮含量为 (1.98 ± 0.02) %, 与预测值相比无显著差异, 表明预测值和实际值相吻合, 优化模型可靠, 对实际生产具有一定的指导意义。

此外, 试验测得发酵前总黄酮含量为 (1.46 ± 0.09) %, 发酵后比发酵前增加了 35.62%,

表 3 方差分析

Tab 3 Variance analysis

来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值
回归模型	0.89	14	0.064	19.63	< 0.0001
A- 接种比例	0.026	1	0.026	7.89	0.0139
B- 发酵时间	0.073	1	0.073	22.39	0.0003
C- 发酵温度	0.044	1	0.044	13.65	0.0024
D- 接种量	0.025	1	0.025	7.75	0.0146
AB	0.006 806	1	0.006 806	2.09	0.1701
AC	0.012	1	0.012	3.72	0.0743
AD	0.0004	1	0.0004	0.12	0.7311
BC	0.076	1	0.076	23.25	0.0003
BD	0.046	1	0.046	14.21	0.0021
CD	0.19	1	0.19	59.51	< 0.0001
A ²	0.015	1	0.015	4.48	0.0526
B ²	0.19	1	0.19	57.68	< 0.0001
C ²	0.13	1	0.13	38.78	< 0.0001
D ²	0.11	1	0.11	33.41	< 0.0001
残差	0.046	14	0.003 253		
失拟项	0.041	10	0.004 143	4.02	0.0960
净误差	0.004 12	4	0.001 03		
总离差	0.94	28			
相关系数	0.9515				
调整复相关系数	0.9030				
(R _{adj} ²)					

说明优化方案设计合理有效，所获得的培养条件能够显著提高总黄酮含量。

2.5 HPLC 测定甘草酸及 3 种黄酮类成分含量

2.5.1 色谱条件 采用高效液相色谱法测定甘草酸及 3 种黄酮类成分的含量^[14]。安捷伦 C₁₈ 色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 的色谱柱，流动相：0.1% 磷酸水 (A) - 乙腈 (B)，洗脱梯度 (0 ~ 10 min, 14% ~ 26%B; 10 ~ 24 min, 26% ~ 30%B; 24 ~ 30 min, 30% ~ 34%B; 30 ~ 35 min, 34% ~ 36%B; 35 ~ 42 min, 36% ~ 42%B; 42 ~ 45 min, 42% ~ 50%B; 45 ~ 60 min, 50% ~ 45%B); 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 35 °C, 检测波长: 254、276、376 nm, 进样体积: 20 μL。

2.5.2 对照品溶液的制备 称定甘草酸对照品 7.97 mg、甘草素对照品 2.05 mg、异甘草素对照品 2.03 mg、甘草苷对照品 2.03 mg, 精密加入 50% 甲醇溶液 2 mL 溶解, 配制对照品储备液。

2.5.3 供试品溶液的制备 称定未发酵甘草药渣及发酵甘草药渣 0.50 g, 加入 25 mL 50% 甲醇溶液, 称重, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称重, 用 50% 甲醇补足

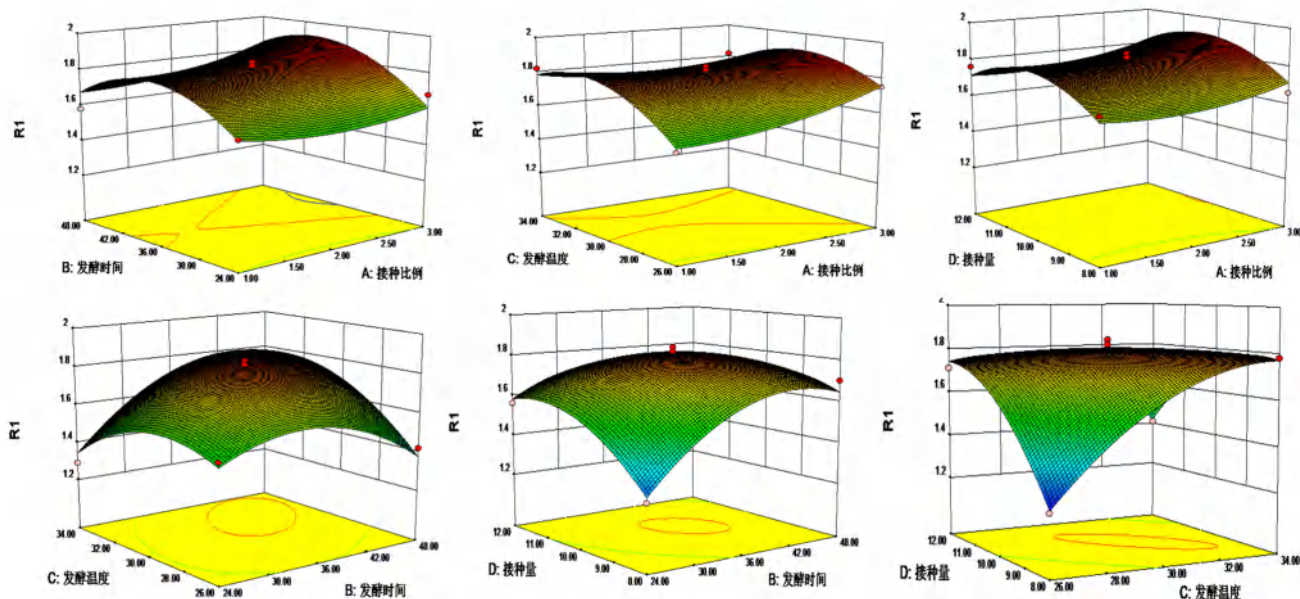


图 2 不同因素对甘草总黄酮含量影响的响应面分析图

Fig 2 Response surface analysis of the effect of different factors on the total flavonoid content of licorice

减失的重量，离心，取上清液，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，得供试品溶液。

2.5.4 样品成分测定分析 精密吸取对照品溶液和供试品溶液进行测定，记录峰面积，计算各成分的含量，色谱图见图 3，含量结果见表 4，可

见经过发酵后各成分的含量发生了变化。甘草苷及甘草酸含量有所下降，分别下降了 63.79%、2.361%；而甘草素和异甘草素的含量有显著增加，分别增加了 855.9%、86.21%。

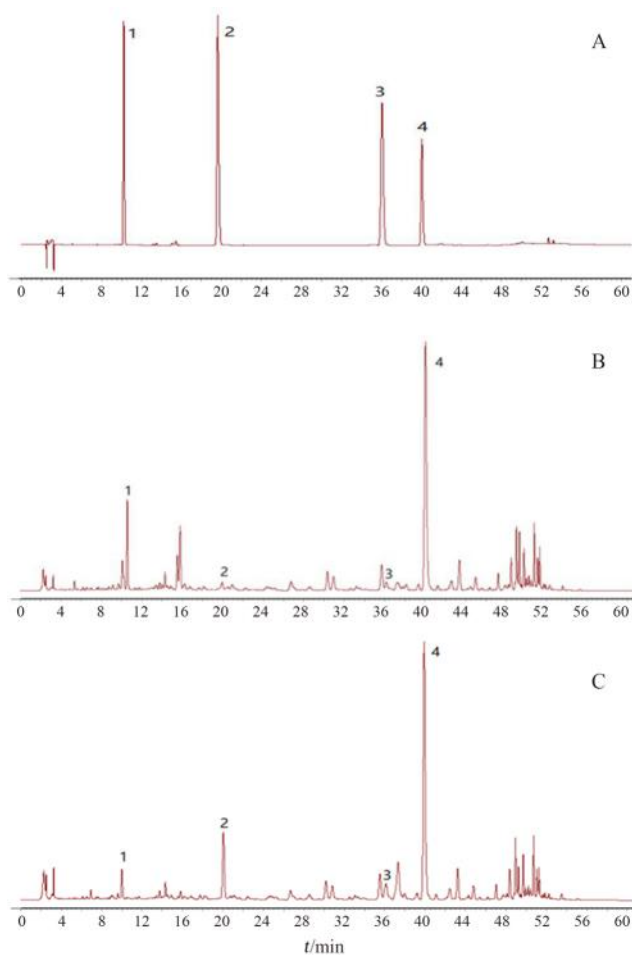


图 3 混合对照品 (A)、未发酵甘草药渣 (B)、发酵甘草药渣 (C) 中 4 种成分 HPLC 图

Fig 3 HPLC of 4 components of mixed reference substance (A), unfermented licorice residue (B), and fermented licorice residue (C) 1. 甘草苷 (liquiritin); 2. 甘草素 (liquiritigenin); 3. 异甘草素 (isoliquiritigenin); 4. 甘草酸 (glycyrrhizic acid)

表 4 发酵前后 4 种成分的含量变化

Tab 4 Content changes of 4 components before and after the fermentation

名称	发酵前含量 /%	发酵后含量 /%	变化
甘草苷	0.406 ± 0.003	0.147 ± 0.001	↓
甘草素	0.034 ± 0.003	0.325 ± 0.001	↑
异甘草素	0.058 ± 0.001	0.108 ± 0.001	↑
甘草酸	1.821 ± 0.004	1.778 ± 0.003	↓

2.6 抗氧化活性测定

分别称取一定量的甘草药渣及发酵产物，加入 20 倍去离子水，回流提取 2 h，抽滤，滤液冷冻干燥。将冷冻干燥样品用去离子水制备成不同质量浓度的样品溶液进行抗氧化活性测定。

2.6.1 DPPH 自由基清除能力 参照申梦娜等^[15]的方法，取 DPPH 溶液 2 mL，加入不同浓度的样品溶液 2 mL，摇匀，在 25 °C 避光放置 30 min，在 517 nm 波长处测定其吸光度 (A_1)。以无水乙醇作

为空白对照测定其吸光度 (A_0)，以无水乙醇代替 DPPH 测定吸光度 (A_2)，计算 DPPH 清除率。

DPPH 清除率 (%) = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。

2.6.2 羟自由基清除能力 参照沈明花等^[16]的方法，依次加入 9 mmol · L⁻¹ FeSO₄ 溶液 500 μL，9 mmol · L⁻¹ 水杨酸 - 乙醇溶液 500 μL，8.8 mmol · L⁻¹ H₂O₂ 溶液，37 °C 水浴 15 min 后取出，测定 510 nm 下吸光度。清除率计算同“2.6.1”项下。数据以平均值 ± 标准差表示，并采用 *t* 检验进行分析。P < 0.05 认为差异具有统计学意义。

由图 4 可知，在一定的浓度范围内，随着药物浓度的增加，其对 DPPH、羟自由基的清除率呈上升趋势，且发酵后甘草药渣的 DPPH、羟自由基清除能力比同浓度的发酵前清除能力显著提高。说明经过益生菌发酵，甘草药渣的 DPPH 自由基清除能力显著提升，抗氧化活性增强。

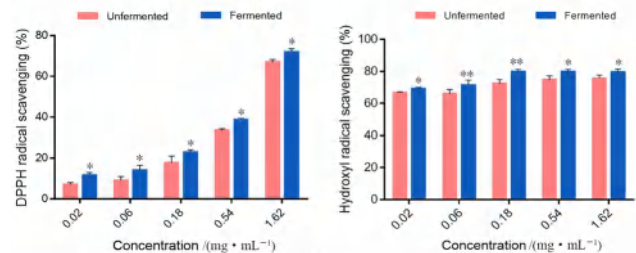


图 4 甘草药渣发酵前后对 DPPH 和羟自由基清除能力

Fig 4 Scavenging effect of licorice residue before and after the fermentation on DPPH and hydroxyl radicals

注：与未发酵组比，*P < 0.05，**P < 0.01。

Note: Compared with the unfermented group, *P < 0.05, **P < 0.01.

3 讨论

黄酮类成分具有抗氧化、增强免疫功能、抗肿瘤等药效作用^[17]。中药发酵具有提高药物有效成分含量，增强药效的作用。经过复合益生菌发酵，甘草药渣中总黄酮含量增加，通过对发酵工艺的优化，提取液中总黄酮含量得以提升。根据微生物的生长代谢特点，推测造成总黄酮含量提升可能是由于发酵过程中微生物分泌的酶类破坏了植物细胞壁，从而提高了提取率。利用微生物发酵甘草药渣，提高药渣中活性物质的溶出，可促进药渣的吸收利用，为生产药渣饲料添加剂提供参考，实现资源再利用。

发酵应用于中药，能利用微生物分解转化能力，增强或产生新的功效，使得中药更适应于临床用药的需要。马超等^[18]研究用酵母发酵大黄使结合型蒽醌分解或者转化成游离型蒽醌，从而减轻大

黄的峻烈泻下作用。杜静^[19]研究发现冠突散囊菌可使中药三七皂苷类成分发生转化作用。甘草药渣发酵前后物质成分发生变化,可能是由于益生菌生物使这几种物质成分之间发生了相互转化。

甘草中的黄酮类物质分为游离苷元和结合型糖苷两大类。为进一步研究益生菌发酵过程对甘草渣中黄酮类成分的转化作用,本文通过高效液相色谱分析发现,经发酵后 3 种黄酮类成分含量均有一定的变化。糖苷类成分甘草苷含量降低,苷元类成分甘草素和异甘草素含量增加。造成这种现象的原因可能是益生菌分泌的纤维素酶等酶分解了糖苷类成分,转化为更易被吸收的游离性苷元,从而使甘草素和异甘草素含量增加。大分子的黄酮糖苷类被分解成小分子苷元更容易被机体吸收^[20],可进一步提高饲料利用率。

研究表明,氧化应激与疾病有直接关系,氧化与抗氧化机制失衡会造成动物抗病能力下降,从而引起疾病的发生^[21]。因此增强机体抗氧化能力,可提高动物健康水平。陈学红等^[22]发现乳酸菌发酵能提高金银花的抗氧化活性。本研究发现复合益生菌发酵后的甘草药渣对 DPPH 自由基、羟自由基有一定的清除能力,且在相同浓度下都强于未发酵组。可能是由于益生菌的生物转化作用,物质成分发生变化并产生初级、次级代谢产物,从而发挥抗氧化作用^[23];同时益生菌产生 SOD 酶等酶类发挥作用,从而增强抗氧化活性^[24]。

但不同企业之间产生的药渣在成分方面是否有差异尚未知。关于益生菌发酵药渣的应用范围需进一步深入研究。

综上所述,复合益生菌发酵甘草药渣具有较大的应用价值,为甘草药渣的再利用提供了可能。本研究也可以为企业的药渣资源再利用提供新思路,提高中药资源的综合利用价值。

参考文献

[1] 杨冰,丁斐,李伟东,等.中药渣综合利用研究进展及生态化综合利用模式[J].中草药,2017,48(2):377-383.
 [2] 段金殿,宿树兰,郭盛,等.中药资源产业化过程废弃物的产生及其利用策略与资源化模式[J].中草药,2013,44(20):2787-2797.
 [3] 冯智茂,袁勇,张云飞,等.中草药药渣在动物生产中的应用[J].饲料工业,2020,41(10):16-18.
 [4] 桂干北,张华琦,毛同辉,等.药渣在畜牧养殖中的应

用[J].养殖与饲料,2018(8):53-55.
 [5] 李亚新.两种复合菌剂及酶制剂发酵四种中草药药渣的效果研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2018.
 [6] 朱彬,田小仙.中药药渣的综合利用[J].遵义师范学院学报,2013,15(5):78-81.
 [7] 刘波,张鹏翼,孟祥瑞,等.益生菌发酵中药方法概述及其应用研究进展[J].中国现代中药,2020,22(10):1741-1750.
 [8] 傅杰.益生菌发酵对蒲公英黄酮含量、组成及抗氧化和抑菌活性的影响研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2019.
 [9] 王钧楠,周永峰,崔园园,等.甘草增强免疫的物质基础及其作用机制研究进展[J].中草药,2021,52(6):1844-1850.
 [10] 李葆林,麻景梅,田宇柔,等.甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展[J].中草药,2021,52(8):2438-2448.
 [11] 方诗琦.甘草药渣中黄酮类活性成分研究[D].南京:南京中医药大学,2016.
 [12] 张军武,赵琦.乙醇回流提取黄芪总黄酮最佳温度考察[J].辽宁中医杂志,2012,39(6):1133-1134.
 [13] 冯薇,王文全,赵平然.甘草总黄酮含量测定方法研究[J].时珍国医国药,2007,18(11):2608-2610.
 [14] 张艳聪,马维维,张洪梅,等.蝉拟青霉-甘草渣双向发酵过程中成分含量变化的研究[J].中华中医药学刊,2017,35(7):1902-1904.
 [15] 申梦娜,陈哲,杨润,等.囊麦冬黄酮提取及其体外活性研究[J].食品研究与开发,2020,41(3):19-23,122.
 [16] 沈明花,崔海丹,王欣彤.榛蘑多糖的抗氧化作用研究[J].食品科技,2010,35(5):77-79.
 [17] 韦梦莹.“甘草附子汤”中甘草及黄酮类组分的药效学研究[D].长春:吉林大学,2016.
 [18] 马超,胡珊,李学如,等.酵母转化大黄结合型蒽醌研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2013,15(6):1333-1337.
 [19] 杜静.冠突散囊菌对中药材三七成分的转化及机理研究[D].贵阳:贵州师范大学,2020.
 [20] 许伯慧,严菲.黄芩苷及其苷元黄芩素体内过程的研究进展[J].南通大学学报(医学版),2010,30(3):220-223.
 [21] 林巍,景艳,孙美佳,等.饲料添加剂玉米浆体内外抗氧化活性研究[J].北方牧业,2019(13):23-24.
 [22] 陈学红,秦卫东,马利华,等.乳酸菌发酵对金银花抗氧化活性的影响[J].农业机械,2013(26):84-87.
 [23] 殷红,冉淦侨,韩姗姗,等.微生物多级发酵对八珍汤中有效成分的影响[J].时珍国医国药,2021,32(6):1368-1371.
 [24] 贺驭,孔祥峰,王振勇,等.益生菌抗氧化机制的研究进展[J].中国家禽,2017,39(24):41-44.

(收稿日期:2022-03-07;修回日期:2022-04-12)

一种盐酸普拉克索片降解杂质 BI-II546CL 的制备方法

刘旭, 戴华山, 尹利献, 梁慧兴, 罗宏军* (扬子江药业集团有限公司, 江苏 泰州 225321)

摘要: **目的** 建立一种高效的盐酸普拉克索片降解杂质 BI-II546CL 的制备方法。**方法** 由 7-羟基普拉克索经氨基保护、酰胺化、氧化、水解制得。**结果** 氧化过程得到了优化, 避免产生多种氧化杂质, 总收率达到 54.7%。**结论** 合成路线安全、环保、高效, 收率得到明显提升。杂质 BI-II546CL 经液质联用、红外光谱、核磁共振进一步表征确证。

关键词: BI-II546CL; 普拉克索; 降解杂质; 合成

中图分类号: TQ463.53 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)10-2318-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.017

Synthesis of pramipexole tablets to degrade impurity BI-II546CL

LIU Xu, DAI Hua-shan, YIN Li-xian, LIANG Hui-xing, LUO Hong-jun* (Yangtze River Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taizhou Jiangsu 225321)

Abstract: Objective To develop a highly effective preparation method for pramipexole hydrochloride tablets to degrade impurity BI-II546CL. **Methods** The preparation was obtained from 7-hydroxypramipexole by amino protection, amidation, oxidation and hydrolysis. **Results** The oxidation process was optimized to avoid various oxidation impurities, and the total yield reached 54.7%. **Conclusion** The synthesis route is safe, environmentally friendly and efficient, and the yield is improved significantly. The structure of impurity BI-II546CL is further confirmed by LC-MS, IR and NMR.

Key words: BI-II546CL; pramipexole; degradation impurity; synthesis

帕金森病是继阿尔茨海默病之后的第二大中枢神经退行性疾病, 主要病理特征包括神经元内出现路易小体、多巴胺能神经细胞凋亡等, 运动失调和神经功能紊乱是其最常见的临床症状。多巴胺能神经元减少, 直接导致动作迟缓、静止震颤、姿势步态障碍等症^[1-2]。

盐酸普拉克索片是由勃林格英格翰公司 (BOEHRINGER INGELHEIM) 研制的一种新型治疗帕金森病的药物, 1997 年在美国和欧洲上市, 并于 2005 年在中国上市, 商品名: 森福罗^[3-6]。该药物属于新一代非麦角类选择性多巴胺 D₂ 和 D₃ 受体激动剂, 可有效改善早期和晚期帕金森病患者的运动症状, 延缓和减轻相关运动并发症的发生, 发挥保护神经、延缓疾病进展的作用^[7-11]。

《化学药物杂质研究的技术指导原则》中提及

临床使用过程中产生的不良反应很有可能与药品中存在的杂质有关, 因此需对药品中的杂质进行充分研究。杂质 BI-II546CL (见图 1) 为盐酸普拉克索片高温及光照条件下的降解杂质, 若制剂分析方法无法有效检测出该杂质, 将会给患者带来安全风险。为了保证制剂产品的质量, 需获得杂质 BI-II546CL 对照品, 用于制剂分析方法的研究, 并作为已知杂质订入制剂质量标准。Hu 等^[12]报道了杂质 BI-II546CL 的制备方法 (见图 2), 但该方法制备过程中使用到液溴和浓硫酸, 安全隐患大, 收率也较低, 最后一步收率仅有 14.2%。

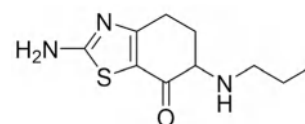


图 1 杂质 BI-II546CL 结构式

Fig 1 Structure of impurity BI-II546CL

作者简介: 刘旭, 男, 硕士研究生, 工程师, 主要从事化学药物研发, email: liuxu@yangzijiang.com * 通信作者: 罗宏军, 男, 硕士研究生, 工程师, 主要从事化学药物研发, email: luohongjun@yangzijiang.com

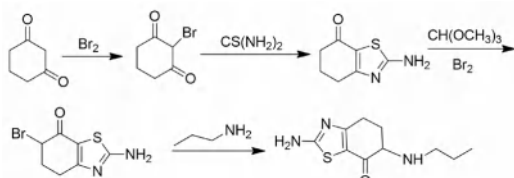


图 2 文献报道的杂质 BI-II546CL 合成路线^[12]
Fig 2 Synthetic route of impurity BI-II546CL reported^[12]

本研究报道了一种杂质 BI-II546CL 的高效合成方法, 该方法安全环保, 未使用到高危、高毒试剂, 且收率较高。制备路线如下: 以 7-羟基普拉克索 (5) 为原料, 经与 (Boc)₂O 反应制得 *N*-正丙基-*N*-6-(2-氨基-7-羟基-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (4), 4 与乙酰氯反应制得 *N*-正丙基-*N*-6-(2-乙酰氨基-7-羟基-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (3), 3 被二氧化锰氧化制得 *N*-正丙基-*N*-6-(2-乙酰氨基-7-氧代-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (2), 2 再在酸性条件下脱除保护基, 最终制得盐酸普拉克索片降解杂质 BI-II546CL。合成路线见图 3。

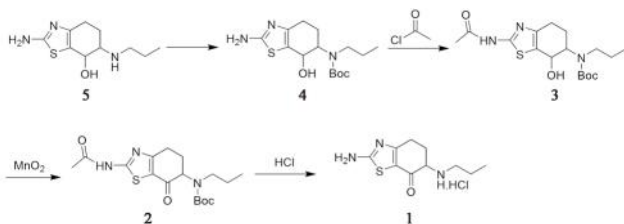


图 3 杂质 BI-II546CL 合成路线
Fig 3 Synthetic route of impurity BI-II546CL

1 仪器与试剂

BRUKER AV-400 型核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); Thermo Nicolet is5 红外吸收光谱仪 (ThermoFisher SCIENTIFIC 公司); Agilent 1200-6100 LC-MS/MS 联用仪 (Agilent Technologies 公司)。

7-羟基普拉克索 (四川蓝励医药科技有限公司, 药用级); 二碳酸二叔丁酯 (TCI); 乙酰氯 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 二氧化锰 (上海麦克林生化科技有限公司)。

2 合成过程

2.1 *N*-正丙基-*N*-6-(2-氨基-7-羟基-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (4) 的合成

将 2-氨基-4, 5, 6, 7-四氢-6-丙胺-苯并噻唑-7-醇 (即 7-羟基普拉克索, 5) (13.3 g, 58.5 mmol)、三乙胺 (8.9 g, 87.8 mmol)、四氢呋喃 (225 mL) 分别加入反应瓶中, 20 ~ 30 °C 条件下滴加 (Boc)₂O (18.4 g, 84.3 mmol), 保温反应 5 h,

TLC 监测至反应完毕。加入饱和食盐水 (150 mL), 分液, 收集水相, 乙酸乙酯萃取 (200 mL × 3), 浓缩有机相, 浓缩物柱层析 (洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯体积比 2 : 1) 得白色固体 *N*-正丙基-*N*-6-(2-氨基-7-羟基-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (4) (16.3 g, 收率 85.1%)。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 6.84 (s, 2H), 5.04 ~ 5.05 (d, 1H), 4.41 (s, 1H), 3.92 ~ 4.04 (m, 1H), 3.11 (m, 2H), 2.49 ~ 2.53 (m, 3H), 2.12 ~ 2.16 (m, 1H), 1.61 ~ 1.64 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 0.77 ~ 0.81 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H)。

2.2 *N*-正丙基-*N*-6-(2-乙酰氨基-7-羟基-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (3) 的合成
将 *N*-正丙基-*N*-6-(2-氨基-7-羟基-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (4) (12.0 g, 36.6 mmol)、三乙胺 (9.3 g, 91.9 mmol)、二氯甲烷 (200 mL) 分别加至反应瓶中, 20 ~ 25 °C 条件下滴加乙酰氯 (5.2 g, 66.2 mmol), 保温反应 2 h, TLC 监测至反应完毕。加入甲醇 (6.3 mL) 淬灭反应, 加纯化水 (200 mL) 洗涤, 有机相减压浓缩。浓缩物柱层析 (洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯体积比 1 : 1) 得白色固体 *N*-正丙基-*N*-6-(2-乙酰氨基-7-羟基-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (3) (11.5 g, 收率 84.9%)。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 11.99 (s, 1H), 5.33 ~ 5.35 (d, 1H), 4.60 (s, 1H), 3.98 ~ 4.11 (m, 1H), 3.14 (m, 2H), 2.65 ~ 2.73 (m, 2H), 2.11 ~ 2.23 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.63 ~ 1.75 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 0.78 ~ 0.82 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H)。

2.3 *N*-正丙基-*N*-6-(2-乙酰氨基-7-氧代-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (2) 的合成
将 *N*-正丙基-*N*-6-(2-乙酰氨基-7-羟基-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (3) (4.4 g, 11.9 mmol)、二氧化锰 (30 g, 345 mmol)、二氯甲烷 (226 mL) 分别加至反应瓶中, 20 ~ 30 °C 条件反应, 过滤, 滤液减压浓缩。向浓缩物中加入二氯甲烷 (5 mL) 和正庚烷 (50 mL), 打浆 3 h, 过滤, 滤饼真空干燥得固体 *N*-正丙基-*N*-6-(2-乙酰氨基-7-氧代-4, 5, 6, 7-四氢苯并噻唑) 氨基甲酸叔丁酯 (2) (3.6 g, 收率 82.3%)。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 12.61 (s, 1H), 2.95 ~ 3.20 (m, 4H), 2.50 (s, 1H), 2.19 (s, 4H), 1.39 ~ 1.44 (m, 6H), 1.23 (s, 6H), 0.83 ~ 0.87 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H)。

2.4 盐酸普拉克索片降解杂质 BI-II546CL (1) 的合成

将 *N*-正丙基-*N*-6-(2-乙酰氨基-7-氧代-4,5,6,7-四氢苯并噻唑)氨基甲酸叔丁酯(2)(2.9 g, 7.9 mmol) 加至 1,4-二氧六环 (30 mL) 中, 滴加浓盐酸 (15.0 g, 152 mmol), 15 ~ 25 °C 反应。用饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 为 3, 有固体析出, 过滤, 滤饼用甲醇 (126 mL) 溶解, 减压浓缩至无液体下滴, 加入甲醇 5 mL, 搅拌均匀, 再加入纯化水 (50 mL), -10 ~ -20 °C 冷冻干燥, 得类白色固体杂质 BI-II546CL (1.9 g, 收率 92.0%), 总收率 54.7%。

杂质 BI-II546CL: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9.25 ~ 9.49 (m, 2H), 8.61 (s, 2H), 4.20 ~ 4.24 (m, 1H), 2.88 ~ 3.01 (m, 4H), 2.51 ~ 2.56 (m, 1H), 2.11 ~ 2.21 (m, 1H), 1.65 ~ 1.78 (m, 2H), 0.90 ~ 0.94 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 182.89, 175.21, 169.60, 116.13, 58.82, 46.41, 25.54, 25.11, 19.05, 10.96; IR (KBr): ν 3116, 2935, 2718, 1636, 1519 cm⁻¹; MS (ESI⁺): [M + H]⁺ = 226, 与本品游离碱分子量 225 相符。

3 结果与讨论

制备杂质 BI-II546CL 时, 首先尝试使用二氧化锰氧化 7-羟基普拉克索, 达到直接将苯并噻唑环上的羟基氧化成羰基的效果, 从而只需一步反应即可完成目标杂质的制备。但是实际合成过程中, 目标杂质 BI-II546CL 含量很低, 体系中存在多种氧化杂质, 典型的杂质为 7-羟基普拉克索氮氧化物、杂质 BI-II546CL 的氮氧化物和羟胺 (见图 4), 此类杂质基本都是支链上的仲胺或苯并噻唑环上的伯胺被氧化的产物。基于以上研究结果, 尝试将仲胺和伯胺进行保护, 待氧化完毕后再脱除保护基。然而苯并噻唑环上的伯胺活性较低, 无法达到被氨基 Boc 保护的效果, 因此选择了活性更强的保护基乙酰氯。试验发现该方式效果较好, 氧化过程氨基未受影响, 氧化产物再在酸性条件下脱除保护基, 最终可得到高产率的目标杂质 BI-II546CL。

4 结论

本研究以 7-羟基普拉克索为原料, 经氨基 Boc 保护、酰胺化、氧化、水解 4 步反应制得盐

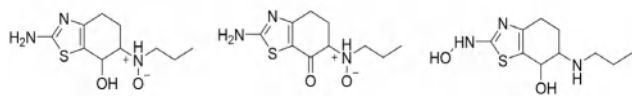


图 4 副反应杂质结构

Fig 4 Impurity structure of side reaction

酸普拉克索片降解杂质 BI-II546CL。LC-MS 确认了制备得到的化合物分子式 C₁₀H₁₅N₃OS 与质谱数据相吻合; IR 谱、¹H NMR 和 ¹³C NMR 进一步确认, 最终确证化合物结构为 2-氨基-6-(丙胺基)-5,6-二氢苯并[d]噻唑-7-酮 (杂质 BI-II546CL)。

本文报道的杂质 BI-II546CL 制备工艺条件温和, 与现有文献路线相比, 避免了使用高危和高毒试剂, 从而保证了路线的绿色环保及安全, 收率也得到了极大的提高。本研究为制备盐酸普拉克索片杂质 BI-II546CL 提供了一条便捷、高效的合成路径, 对盐酸普拉克索片的质量控制具有重要的参考价值。

参考文献

- [1] 王林, 杨洁, 杜磊, 等. 帕金森病研究中 LRRK2 激酶抑制剂的进展 [J]. 中南药学, 2015, 13 (10): 1009-1016.
- [2] Chaudhuri KR, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment [J]. Lancet Neurol, 2009, 8 (5): 464-474.
- [3] 汪文婷, 宁剑波, 王凌云, 等. 盐酸普拉克索的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43 (7): 524-526.
- [4] 宋波, 张志伟, 李日东, 等. 盐酸普拉克索降解杂质 BI-IO460BS 的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46 (1): 17-19.
- [5] 曹丽丽, 郑忠辉, 李进都, 等. 盐酸普拉克索的合成工艺研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2014, 24 (3): 201-204.
- [6] 毛远湖, 汤磊, 王建塔. 盐酸普拉克索的合成 [J]. 广州化工, 2014, 42 (12): 84-85.
- [7] 王艳峰, 张丽华, 赵宏伟, 等. 盐酸普拉克索中间体的合成方法: 中国, CN105936629 [P]. 2016-09-14.
- [8] 金华, 李建其. 盐酸普拉克索的合成 [J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21 (6): 430-432.
- [9] 赵孝杰, 刘远慧. 一种关于普拉克索杂质 C 的合成方法: 中国, CN105481792 [P]. 2016-04-13.
- [10] 魏曼, 胡霞敏. 盐酸普拉克索缓释骨架片的制备 [J]. 中南药学, 2016, 14 (11): 1198-1201.
- [11] 李景, 赵娟芝, 黄斌, 等. 顶空毛细管气相色谱法测定盐酸普拉克索原料药中有机溶剂残留量 [J]. 中南药学, 2018, 16 (11): 1608-1611.
- [12] Hu TW, Yang FP, Jiang T, et al. Synthesis of impurities of pramipexole dihydrochloride [J]. Org Process Res Dev, 2016, 20 (11): 1899-1905.

(收稿日期: 2022-07-26; 修回日期: 2022-08-19)

甘草素固体分散体的制备及体内药动力学研究

张军¹, 唐粤鹏², 陈剑^{2*} (1. 大理大学 药学院, 云南 大理 671000; 2. 上海交通大学 药学院, 上海 200240)

摘要: 目的 制备甘草素固体分散体, 提高其口服生物利用度。方法 使用聚乙烯吡咯烷酮 K30 (PVP K30) 和介孔二氧化硅, 采用溶剂挥发法制备甘草素固体分散体。通过测定 PVP K30 对甘草素的增溶效果, 筛选出甘草素与 PVP K30 的最佳比例; 使用介孔二氧化硅作为吸收剂, 除去有机溶剂后, 得到固体分散体。以差示扫描量热法、X 射线衍射分析和红外光谱对固体分散体进行表征; 对比了甘草素原料药与固体分散体的体外溶出, 并通过体内药代动力学评价固体分散体的生物利用度。结果 当甘草素与 PVP K30 比例为 1:8 时, PVP K30 对甘草素的增溶效果最好; 加入介孔二氧化硅作为吸收剂, 制备出的固体分散体, 经过表征, 甘草素能够以无定型状态分布其中; 体外溶出时, 在 60 min 内的累积溶出率可达到 95%, 有效提高了甘草素的溶出度, 并且进行大鼠体内药代动力学的结果验证, 固体分散体的相对生物利用度增加至 7.08 倍。结论 将甘草素制备成固体分散体, 能够显著提高其溶出度和口服生物利用度。

关键词: 甘草素; 聚乙烯吡咯烷酮 K30; 固体分散体; 介孔二氧化硅

中图分类号: R96, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)10-2321-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.018

Preparation and in vivo pharmacokinetics of liquiritigenin solid dispersion

ZHANG Jun¹, TANG Yue-peng², CHEN Jian^{2*} (1. School of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract: Objective To prepare liquiritigenin solid dispersion and improve its oral bioavailability. **Methods** Liquiritigenin solid dispersion was prepared by solvent evaporation method with polyvinylpyrrolidone K30 (PVP K30) and mesoporous silica. According to the solubilizing effect of PVP K30 on liquiritigenin, the optimal ratio of liquiritigenin and PVP K30 was screened out. Mesoporous silica was used as the absorbent. After the removal of organic solvents, solid dispersion was obtained. Differential scanning calorimetry, X-ray diffraction analysis and infrared spectroscopy were used to characterize the solid dispersion. The in vitro dissolution rate of the solid dispersion and pure liquiritigenin was compared, and the bioavailability of the solid dispersion was evaluated by in vivo pharmacokinetics. **Results** When the optimal ratio of liquiritigenin and PVP K30 was 1:8, PVP K30 had the best solubilizing effect on liquiritigenin. The characterization indicated that liquiritigenin formed solid dispersion with PVP K30 and was distributed in the mesoporous silica in an amorphous state. The cumulative dissolution rate reached over 95% within 60 min, greatly improving the solubility. The in vivo pharmacokinetics in rats verified that the relative bioavailability of the solid dispersion increased to 7.08 times. **Conclusion** Liquiritigenin solid dispersion can greatly improve its solubility and oral bioavailability.

Key words: liquiritigenin; polyvinylpyrrolidone K30; solid dispersion; mesoporous silica

甘草素 (liquiritigenin, LQ) 是一种从豆科植物中提取的二氢黄酮单体化合物, 在自然界中主要以糖苷元形式存在。目前发现甘草素具有抗

肿瘤^[1]、抗炎^[2]、抗抑郁^[3]、抗过敏^[4]、保护成骨细胞^[5]等作用。甘草素为生物药剂学分类系统 (BCS) 中 II 类化合物, 其溶解度低导致口服生物

基金项目: 重大新药创制科技重大专项 (No.2017ZX09201004-021); 转化医学国家重大科技基础设施 (上海) 开放课题 (No.TMSK-2021-104)。

作者简介: 张军, 男, 硕士研究生, 主要从事药物制剂方面的研究, email: Super_junzai008@163.com *通信作者: 陈剑, 男, 副研究员, 主要从事药物新型给药系统研究, email: chenjian@sjtu.edu.cn

利用度很低,限制了该化合物的进一步临床应用。

为解决这一问题,研究者将其溶于 pH 4.0 ~ 6.0, 含量为 40% 的丙二醇溶液中制备为注射液^[6]。在口服制剂方面,该团队开发了甘草素的磷脂复合物和亚微米乳液,将其口服生物利用度提高至 2.39 倍和 5.95 倍^[7-8]。

制备固体分散体是增加难溶性药物的溶解度,提高其口服生物利用度的常见方法。该技术简单、高效,通过将药物转化为无定型状态,增强药物的溶出。截至 2020 年, FDA 已经批准 26 种通过该技术上市的药物^[9]。其中,多数制剂使用聚乙烯吡咯烷酮 K30 (PVP K30) 作为载体。PVP 是最常研究的亲水性聚合物载体之一^[10],具有良好的稳定性和溶解性,可防止无定形药物结晶。PVPK30 广泛地应用于各种难溶性药物的固体分散体中,如尼索地平^[11], 吡喹酮^[12], 姜黄素^[13] 等。

目前尚未见甘草素口服固体制剂的报道,本研究拟采用溶剂蒸发法,以 PVP K30 为载体,介孔二氧化硅为吸收剂^[14-15],制备了一种能够提高口服生物利用度的口服固体制剂甘草素固体分散体。以差示扫描量热法 (DSC)、X 射线衍射分析 (XRD) 和红外光谱 (IR) 对固体分散体进行表征,并通过体外溶出和体内药代动力学实验,考察该制剂的溶出行为和口服生物利用度。

1 材料

1.1 仪器

RC806 型溶出试验仪 (天津市天大天发科技有限公司); STA449F3 型同步热分析仪 (德国耐驰公司); D8DaVinci 型多功能 X 射线衍射仪 (德国布鲁克公司); BZF-30 型真空干燥箱 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); 1290 型超高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); Nicolet 6700 型红外光谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); 5415 R 型高速离心机 (德国艾本德股份公司)。

1.2 试药

甘草素原料药 (HPLC \geq 98%, 四川维克奇生物科技有限公司); 聚乙烯吡咯烷酮 K30 (批号: 010420001, 重庆斯泰克瑞登梅尔材料技术有限公司); 介孔二氧化硅 (批号: 1000356636, 德国 Syloid 公司); 氢氯噻嗪 (HPLC \geq 98%, 上海易恩化学技术有限公司); 无水乙醇 (上海麦克林生化公司); 乙腈为色谱级。

1.3 动物

SPF 级健康 SD 大鼠, 雄性, 体质量 200 ~ 230 g [上海吉辉实验动物饲养有限公司, 许可证号: SCXK (沪) 2017-0012]。所有涉及大鼠的操作

均按照《实验动物护理与使用指南》及相关中国法律法规的要求进行,并经上海交通大学机构动物护理与使用委员会批准 (批准号 A2021052)。

2 方法

2.1 甘草素的分析方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m); 流动相: 0.1% 乙酸溶液 - 乙腈 (60 : 40); 流速: 0.1 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 278 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 5.0 μ L。

2.1.2 线性关系 精密称取 100 mg 甘草素于 100 mL 量瓶,加入甲醇完全溶解并定容,得到 1 mg \cdot mL⁻¹ 的对照品储备液;用流动相依次稀释,得到 1、5、10、25、50、100、150 μ g \cdot mL⁻¹ 的对照品溶液,进样测定。以其质量浓度 (X) 对甘草素峰面积 (Y) 进行回归,得到回归方程 $Y = 153.4X + 59.01$ ($R^2 = 0.9998$),甘草素在 1 ~ 150 μ g \cdot mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。甘草素理论塔板数为 2455。

2.1.3 方法学验证 取上述 1、25、150 μ g \cdot mL⁻¹ 的甘草素对照品溶液,平行进样测定 6 次,测定 RSD 分别为 0.19%、0.19%、0.30%,表明仪器精密密度良好。取“2.2”项下 10 mg 甘草素固体分散体于 100 mL 量瓶,加入流动相超声溶解、定容,使用 0.22 μ m 滤膜过滤,得到供试品溶液。取续滤液,于 0、2、4、6、12、24 h 进样测定,测得 RSD 为 0.61%,表明溶液在 24 h 内稳定性良好。取 10 mg 甘草素固体分散体 6 份,制备成供试品溶液,进样测定,测得 RSD 为 0.57%,表明该方法重复性良好。取 10 mg 甘草素固体分散体于 100 mL 量瓶,分别加入“2.1.2”项下对照品储备液 2、4、6 mL,加入流动相超声溶解并定容,使用 0.22 μ m 滤膜过滤,得到 9 份供试品溶液,进样测定,测得低、中、高浓度甘草素的平均加样回收率为 99.72%、100.75%、101.50%,RSD 为 1.6%、2.0%、0.73%。

2.2 甘草素固体分散体的制备

按 LQ : PVPK30 为 1 : 1、1 : 4、1 : 6、1 : 8、1 : 12 的比例称取原料于烧杯中,加入适量的无水乙醇密封,于室温下,磁力搅拌 1 h;加入 50% (w/w) 的介孔二氧化硅作为吸收剂,继续搅拌 2 h 后,于 40 $^{\circ}$ C 旋转蒸发仪除去大部分溶剂,残余溶剂于 40 $^{\circ}$ C 真空干燥过夜。将所得固态混合物转移至研钵中,粉碎,过 60 目筛,即得甘草素固体分散体。

2.3 物理混合物的制备

称取 100 mg 甘草素原料药、800 mg PVP K30 和 450 mg 介孔二氧化硅,采用等量倍增法混合均

匀, 过 60 目筛, 置于干燥器中保存, 备用。

2.4 含量测定

精密称取适量甘草素固体分散体分散于乙醇中, 水浴超声 10 min 后, 用乙醇定容至 10 mL, 摇晃均匀后, 过 0.22 μm 滤膜, 用流动相稀释适当倍数, 进样测定。

2.5 体外溶出研究

参照《中国药典》(2020 年版) 中的“溶出度与释放度测定法”第三法小杯法, 测定甘草素固体分散体的体外溶出度。转速为 50 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 溶出介质为含 0.25% Tween 80 的 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 介质体积为 150 mL。取甘草素和各处方量制备得到的固体分散体 (相当于甘草素 20 mg), 置于溶出杯中, 分别于 5、15、30、45、60、90、120 min 取样, 每次每缸取样 2 mL (同时补充等量同温介质), 经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤, 取续滤液 1.0 mL, 进样测定, 计算溶出度, 绘制溶出曲线, 并采用非模型依赖法—— f_2 法对溶出曲线进行评价^[6]。

2.6 DSC 分析

取适量甘草素原料药、PVP K30、介孔二氧化硅、物理混合物、甘草素固体分散体, 放于氧化铝坩埚内, 在纯氮气下升温, 温度范围为 40 ~ 250 $^\circ\text{C}$, 速度 10 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 进行 DSC 分析。

2.7 XRD 分析

为测定药物的结晶特征, 取适量甘草素原料药、PVP K30、介孔二氧化硅、物理混合物、甘草素固体分散体粉末, 进行 XRD 分析。测定条件为 X 线光源 Cu 靶, 陶瓷 X 光管, 电压 ≤ 40 kV, 电流 ≤ 40 mA; 扫描速度 0.2 S; 扫描范围 2θ $5^\circ \sim 60^\circ$ 。

2.8 IR 分析

取适量甘草素原料药、PVP K30、介孔二氧化硅、物理混合物、甘草素固体分散体, 分别与溴化钾研磨并充分混合, 用液压机压制成片后, 以 2 cm^{-1} 的分辨率在 400 ~ 4000 cm^{-1} 波长内扫描。

2.9 体内药代动力学

2.9.1 给药方案及血浆样品的采集 取健康 SD 雄性大鼠 6 只, 随机分为实验组和对照组, 每组 3 只大鼠, 给药前禁食不少于 12 h, 自由饮水, 进行单次、单剂量给药实验。对照组灌胃给予相当于 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的纯甘草素混悬液, 实验组灌胃给予相当于 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的甘草素固体分散体混悬液。给药后, 分别于 5、15、30、45、60 min 及 1.5、2、3 h, 眼眶取血 0.5 mL, 置于 EDTA 抗凝管中, 于 4 $^\circ\text{C}$ 、4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5

min, 取上层血清, 于 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻备用。

2.9.2 血浆样品的处理 取血浆样品 100 μL , 置于 1.5 mL 离心管中, 加入内标溶液 (氢氯噻嗪, 37.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 40 μL , 涡旋混合 30 s。加入 1 mL 乙醚, 涡旋混合 3 min, 4 $^\circ\text{C}$ 、1 610 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 5 min 后, 转移上层溶液, 于常温真空干燥箱 40 $^\circ\text{C}$ 挥干。用 30 μL 流动相复溶, 涡旋 5 min 后, 10 000 g 离心 5 min, 取上清液, 待测。

2.9.3 血药浓度分析方法

① 线性关系考察: 配制质量浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甘草素溶液, 使用甲醇稀释至 0.02、0.08、0.15、0.3、0.6、1.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 体积为 100 μL 。氮气吹干后加入 100 μL 空白血浆, 按照“2.9.2”项下方法对样品进行处理, 进样测定。以甘草素质量浓度为横坐标 (X), 甘草素与内标物的峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 得到线性回归方程: $Y = 1.595 \times 10^{-4}X + 0.06625$, $R^2 = 0.9997$, 线性范围为 20 ~ 1200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

② 方法学考察: 制备质量浓度 0.02、0.3、1.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆对照品溶液, 进样测定 6 次, 测定甘草素与内标峰面积比值 RSD 分别为 7.1%、2.3%、1.3%, 表明仪器精密度良好。取一份血浆样品, 于 0、2、4、6、12、24 h 冷冻溶解后, 按照“2.9.2”项下方法进行处理, 进样检测, 测得 RSD 为 9.0%, 表明血浆样品在 24 h 内具有良好的稳定性。取空白血浆, 配制 20、300、1200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度的血浆对照品溶液, 按照“2.9.2”项下方法进行处理, 进样测定, 计算加样回收率分别为 83.80%、88.85%、94.83%, RSD 分别为 3.8%、1.6%、0.42%。取 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 经过流动相逐级稀释, 以信噪比 3、10 为检测限、定量限, 测得两者分别为 5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

③ 数据处理: 统计分析采用 DAS 2.0 软件计算药代动力学参数。所有数值均以均值 \pm 标准差 (SD) 表示。采用 t 检验进行统计分析。 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体外溶出实验结果

如图 1 所示, 物理混合物和固体分散体均可以提高甘草素的溶出效率, 而固体分散体相较于物理混合物更加显著。原料药、物理混合物在 120 min 内的累积溶出率分别为 $(30.10 \pm 1.95)\%$ 、 $(45.33 \pm 4.93)\%$; 而在制备为固体分散体后, 药物的溶出率显著增强, 并且随着 PVP K30 用量的增加, 药物的溶出速度与累积溶出率逐渐提高。

当 LQ : PVP K30 为 1 : 8、1 : 12 时, 前 45 min 内的累积溶出率超过 80%, 前 120 min 内累积溶出率达到 95%。对几个处方在前 45 min 的溶出曲线进行了相似因子 f_2 的计算。当 f_2 在 50 ~ 100 内时, 认为两条溶出曲线相似^[16]。通过计算发现, LQ : PVP K30 比例为 1 : 6 和 1 : 8 的两个处方溶出曲线之间的 f_2 是 49.79, 而 1 : 8 和 1 : 12 之间的 f_2 是 55.81。因此, 可以认为当两者比例达到 1 : 8 之后, 溶出速度不再有显著的增长, 后期实验中选择 LQ : PVP K30 比例为 1 : 8 作为制剂处方。

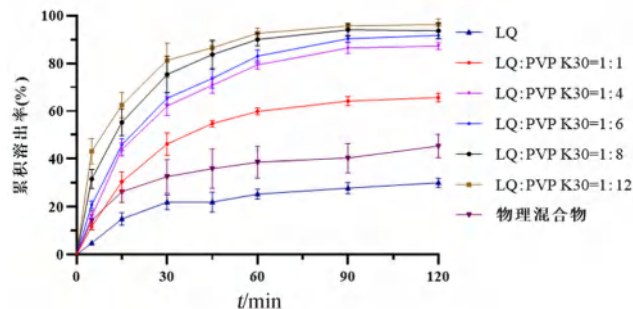


图 1 甘草素各制剂处方溶出曲线 ($n = 3$)
Fig 1 In vitro release curve of liquiritigenin and its preparation ($n = 3$)

3.2 DSC 分析结果

在 DSC 结果中, 甘草素原料药在 212.19 °C 处有一个明显的尖峰, 此为甘草素的熔点峰; PVP K30 和介孔二氧化硅在 40 ~ 250 °C 没有明显的吸收峰; 甘草素固体分散体和原料药相比, 在 212.19 °C 处的吸收峰消失, 表明甘草素在固体分散体中是以无定型的状态分布 (见图 2)。

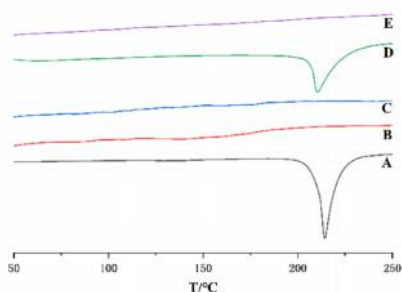


图 2 甘草素原料药 (A)、PVP K30 (B)、介孔二氧化硅 (C)、物理混合物 (D)、固体分散体 (E) 的 DSC 图谱
Fig 2 DSC curves of liquiritigenin (A), PVP K30 (B), SiO₂ (C), physical mixture (D) and LQ-SD (E)

3.3 XRD 分析结果

甘草素原料药在 2θ 为 10.8° 和 16.0° 附近有较强的吸收峰, 在 16° ~ 29.3° 附近存在一系小峰, 表明原料药中甘草素以结晶状态存在; PVP K30 及介孔二氧化硅并未出现明显的吸收峰。物理混合物中, 甘草素的吸收峰仍然存在, 表明简单的物理混合过程并没有改变甘草素的晶型存在状态。

在甘草素固体分散体中, 甘草素的特征吸收峰完全消失, 表明经过制剂加工, 甘草素失去了原有的晶型状态, 以无定型的形式分散其中 (见图 3)。

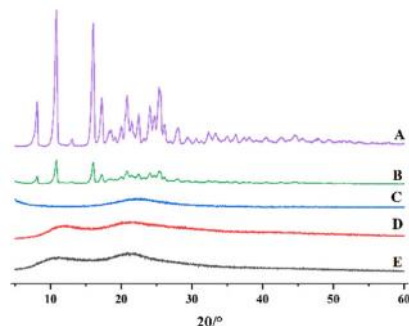


图 3 甘草素原料药 (A)、物理混合物 (B)、PVP K30 (C)、介孔二氧化硅 (D)、固体分散体 (E) 的 XRD 图谱
Fig 3 XRD curves of liquiritigenin (A), physical mixture (B), PVP K30 (C), SiO₂ (D), and LQ-SD (E)

3.4 IR 分析结果

在甘草素红外谱图中 (见图 4), 3414 ~ 3000 cm^{-1} 处的强峰以及 1600 ~ 1000 cm^{-1} 内的强峰, 是由甘草素分子中 O-H、C-O 以及苯环上 C = C 伸缩振动引起的, 验证了分子中苯环和酚羟基的存在; 在 1650 cm^{-1} 处有一个较强吸收峰, 为 C = O 的伸缩振动引起, 并且其与苯环相邻, 由于共轭效应的存在, 使羰基的吸收向低波数移动。在 PVPK30 的谱图中, 3423 cm^{-1} 和 1647 cm^{-1} 处的吸收峰是由 O-H、C = O 的伸缩振动引起的^[17]。对比物理混合物和固体分散体的谱图, 固体分散体的图谱中 C = O 的吸收峰从 1650 cm^{-1} 移至 1661 cm^{-1} , 表明甘草素与载体之间发生了相互作用力^[7, 18-19]; 两者中仍然可以看到甘草素的特征吸收峰, 表明甘草素在制备处理过程中未受到影响。

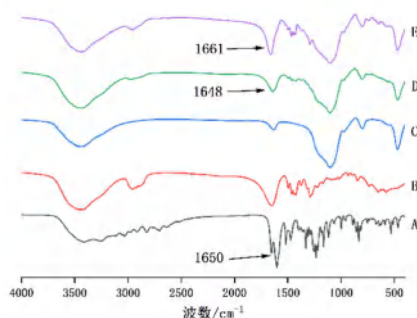


图 4 甘草素原料药 (A)、PVP K30 (B)、介孔二氧化硅 (C)、物理混合物 (D)、固体分散体 (E) 的红外图谱
Fig 4 IR of liquiritigenin (A), PVP K30 (B), SiO₂ (C), physical mixture (D) and LQ-SD (E)

3.5 体内药代动力学

血药浓度 - 时间曲线如图 5 所示, DAS 软件处理得到的药代动力学参数如表 1 所示。与甘草

素原料药相比,口服固体分散体后,最大血药浓度提高至 6.14 倍,相对生物利用度增加至 7.08 倍,表明该制剂可以促进甘草素的吸收。

表 1 甘草素原料药和固体分散体的主要药代动力学参数 (n = 3)
Tab 1 Main pharmacokinetic parameters for LQ and LQ-SD (n = 3)

药物	t_{max}/h	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim t}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim \infty}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$
LQ	0.583±0.144	161.355±67.287	109.331±45.891	114.013±46.233
LQ-SD	0.5	991.903±94.669*	701.420±94.478*	807.710±89.522*

注:与甘草素原料药相比,*P < 0.01。

Note: Compared with the LQ, *P < 0.01.

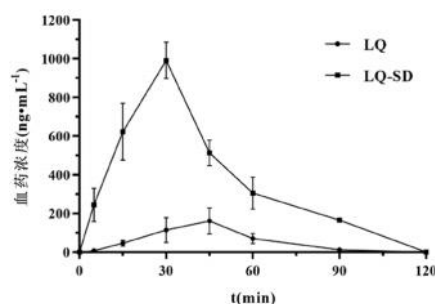


图 5 甘草素血药浓度-时间曲线 (n = 3)

Fig 5 Plasma concentration-time curves for LQ and LQ-SD (n = 3)

4 讨论

固体分散体技术在药学领域的应用已经十分广泛。很多研究表明,将难溶性药物制备成固体分散体,能够显著提高药物在生物体内的生物利用度。甘草素作为 BCS 中的 II 类化合物,也具有溶解性差的显著特点。由于目前对其固体分散体的剂型研究较少,本研究采用 PVP K30 为载体,制备出甘草素固体分散体制剂。

在研究过程中,考察了 PVP K30 的用量对甘草素溶出行为的影响,药物的溶解随着载体含量的增加而增加,高比例的 PVP K30 在固体分散体中的溶解速率显著提高,原因可能是 PVP K30 是一种亲水性聚合物,能够与药物作用形成氢键,并且对介质的表面张力有降低作用,导致疏水药物表面的润湿,扩大了溶解的表面积,从而提高固体分散体样品的溶出速率^[10]。在制备过程中,加入介孔二氧化硅作为吸收剂,可以有效地抑制无定型的药物析出结晶^[20],二氧化硅表面的硅烷醇基团还可以通过提高药物颗粒的润湿性而加快溶解速度^[21]。

经过各项试验证明,甘草素能够以无定型状态分布于固体分散体中,体外溶出可达到 95%,有效提高了甘草素的溶出度。之前有文献报道将甘草素制成磷脂复合物,相对生物利用度提高至 239%^[7]。本研究大鼠体内药代动力学的结果显示,甘草素固体分散体相对生物利用度增加至 7.08 倍,有更好的改善效果。

综上所述,本研究制备出的甘草素固体分散

体溶解性好、相对生物利用度高,为提高甘草素的口服生物利用度提供了新的思路。

参考文献

- [1] Liang F, Zhang H, Gao H, et al. Liquiritigenin decreases tumorigenesis by inhibiting DNMT activity and increasing BRCA1 transcriptional activity in triple-negative breast cancer [J]. *Exp Biol Med*, 2021, 246 (4): 459-466.
- [2] Zhu X, Shi J, Li H. Liquiritigenin attenuates high glucose-induced mesangial matrix accumulation, oxidative stress, and inflammation by suppression of the NF-κB and NLRP3 inflammasome pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 976-982.
- [3] Tao W, Dong Y, Su Q, et al. Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 308: 177-186.
- [4] Zeng HJ, Yang R, You J, et al. Spectroscopic and docking studies on the binding of liquiritigenin with hyaluronidase for anti-allergic mechanism [J]. *Sci Rep*, 2016, 2016: 9178097.
- [5] Choi EM, Suh KS, Lee YS. Liquiritigenin restores osteoblast damage through regulating oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. *Phytother Res*, 2014, 28 (6): 880-886.
- [6] 黄雨婷, 顾杰, 姚仲青, 等. 甘草素注射液制备工艺研究 [J]. *中国药学杂志*, 2016, 51 (4): 289-292.
- [7] Shi CC, Qin KM, Xu K, et al. Development of liquiritigenin-phospholipid complex with the enhanced oral bioavailability [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18 (12): 916-921.
- [8] Shi C, Wu H, Xu K, et al. Liquiritigenin-loaded sub-micron emulsion protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activity [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 1101-1115.
- [9] 罗怡婧, 黄桂婷, 郑琴, 等. 药物固体分散体技术回顾与展望 [J]. *中国药学杂志*, 2020, 55 (17): 1401-1408.
- [10] Sharma A, Jain CP. Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with PVP K30 [J]. *Res Pharm Sci*, 2010, 5 (1): 49-56.
- [11] Kyaw OM, Mandal UK, Chatterjee B. Polymeric behav-

- ior evaluation of PVP K30-poloxamer binary carrier for solid dispersed nisoldipine by experimental design [J]. Pharm Dev Technol, 2017, 22 (1): 2-12.
- [12] Zhang W, Zhang CN, He Y, et al. Factors affecting the dissolution of indomethacin solid dispersions [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2017, 18 (8): 3258-3273.
- [13] Wu R, Mei X, Ye Y, et al. Zn (II) -curcumin solid dispersion impairs hepatocellular carcinoma growth and enhances chemotherapy by modulating gut microbiota-mediated zinc homeostasis [J]. Pharmacol Res, 2019, 150: 104454.
- [14] 李钦, 原永芳, 杨刚. 冬凌草甲素 - 介孔二氧化硅固体分散体的制备及体外性质评价 [J]. 中南药学, 2021, 19 (10): 2013-2017.
- [15] 付训忠, 邹杰, 尹珍, 等. 介孔二氧化硅咪唑美辛固体分散体复合物的制备及质量评价 [J]. 西南大学学报 (自然科学版), 2019, 41 (8): 74-81.
- [16] 尹婕, 金方方, 南楠, 等. 劳拉西洋片具有区分力溶出度方法的建立和溶出曲线相似性评价 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52 (8): 1069-1077.
- [17] 孙彩霞, 尹蓉莉, 赵俊霞, 等. 水蜈蚣总黄酮固体分散体的制备及其性质研究 [J]. 中草药, 2014, 45 (14): 2018-2021.
- [18] 任丽霞, 王柏. 卡维地洛 - 中空介孔二氧化硅固体分散体的制备与表征 [J]. 中国药科大学学报, 2014, 45 (1): 59-64.
- [19] 何黎黎, 袁志翔, 郑云, 等. 姜黄素 - 介孔二氧化硅纳米粒固体分散体的制备与表征 [J]. 中草药, 2016, 47 (13): 2283-2287.
- [20] 刘文利, 魏振平. 新型固体分散体技术改善水难溶药物溶解度的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51 (22): 1901-1906.
- [21] Planinšek O, Kovačič B, Vrečer F. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica [J]. Int J Pharm, 2011, 406 (1): 41-48.

(收稿日期: 2022-03-20; 修回日期: 2022-05-12)

免疫抑制剂吗替麦考酚酯 Z-异构体的制备

邓雪¹, 徐美玲¹, 郭邻霞¹, 翁明君^{2*} (1. 重庆市急救医疗中心, 重庆 400016; 2. 重庆圣华曦药业股份有限公司, 重庆 401336)

摘要: **目的** 制备吗替麦考酚酯 Z-异构体。**方法** 以霉酚酸为起始物料, 以四氢呋喃为溶剂, 在 45 °C 紫外光照下反应 20 h, 得到 Z-霉酚酸, 然后与 2-吗啉乙醇进行缩合反应得到目标化合物吗替麦考酚酯 Z-异构体。**结果** 制备得到纯度为 97.0% 的吗替麦考酚酯 Z-异构体。**结论** 本工艺能够获得高纯度的吗替麦考酚酯 Z-异构体, 为吗替麦考酚酯的质量研究提供杂质对照品。

关键词: 吗替麦考酚酯 Z-异构体; 制备工艺; 免疫抑制剂

中图分类号: TQ463.53 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)10-2326-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.019

Synthesis of immunosuppressant mycophenolate mofetil Z-isomer

DENG Xue¹, XU Mei-ling¹, GUO Lin-xia¹, WENG Ming-jun^{2*} (1. Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400016; 2. Chongqing Shenghuaxi Pharmaceutical Co., Ltd, Chongqing 401336)

Abstract: Objective To determine the synthetic route for mycophenolate mofetil Z-isomer. **Methods** Mycophenolic acid was used, with tetrahydrofuran (THF) as the solvent. Z-mycophenolic acid was obtained under UV at 45 °C for 20 h, which further reacted with 2-morpholine ethanol to obtain the target compound mycophenolate mofetil Z-isomer after the condensation. **Results** By this method, the Z-isomer of mycophenolate mofetil with a purity of 97% can be prepared. **Conclusion** High purity mycophenolate mofetil Z-isomer is obtained, providing impurity reference substance for the quality study of mycophenolate mofetil.

Key words: mycophenolate mofetil Z-isomer; preparation progress; immunosuppressant

作者简介: 邓雪, 女, 硕士, 主要从事新型纳米制剂在难溶性药物中的应用, email: 852694772@qq.com *通信作者: 翁明君, 男, 硕士, 主要从事药物合成研究, email: 849942089@qq.com

吗替麦考酚酯 (mycophenolate mofetil, MMF) 是由瑞士罗氏 (Roche) 公司研发的一种新型的免疫抑制剂, 于 1995 年首次在美国上市, 在体内水解后形成具有免疫抑制活性的代谢产物霉酚酸 (mycophenolic acid, MPA, **2**)。吗替麦考酚酯最初是作为一种抗菌药物, 20 世纪 80 年代其抑制免疫的作用被发现, 1995 年, 吗替麦考酚酯获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于预防肾移植急性排异反应。吗替麦考酚酯能特异性地抑制淋巴细胞嘌呤从头合成途径中次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 (IMPDH) 的活性, 具有强大的抑制淋巴细胞增殖的作用。目前广泛应用于肾脏、心脏、肝脏和胰腺等器官移植方面。可用于预防同种肾移植患者的排斥反应及治疗难治性排异反应^[1-3]。

吗替麦考酚酯制备的方法主要有两种, 专利 US4753935^[4] 报道了由霉酚酸制备为酰氯, 然后与 2-吗啉乙醇进行缩合反应得到吗替麦考酚酯; 专利 US5247083^[5]、WO2009003878^[6] 报道了由霉酚酸与 2-吗啉乙醇在有机溶剂中, 经过缩合反应得到吗替麦考酚酯。

通过对比各国药典对麦考酚酸酯有关物质^[7]的控制, 其中英国药典中杂质 C 是吗替麦考酚酯的异构体杂质 (化合物 **1**), 化学名称为 2-(吗啉-4-基)乙基(4Z)-6-(4-羟基-6-甲氧基-7-甲基-3-羰基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-4-甲基己-4-烯酸酯。研究表明, 采用吗替麦考酚酯直接进行双键异构化反应制备化合物 **1**, 反应转化率低, 只有 10% 左右, 反应后处理烦琐, 不易得到高纯度的杂质对照品。本文拟对化合物 **1** 的制备方法进行研究, 以霉酚酸为起始物料, 先对霉酚酸的双键进行异构体化反应得化合物 **3** (Z-霉酚酸)^[8-11], 然后再与 2-吗啉乙醇反应成酯^[12]得到目标产物。具体合成路线见图 1。

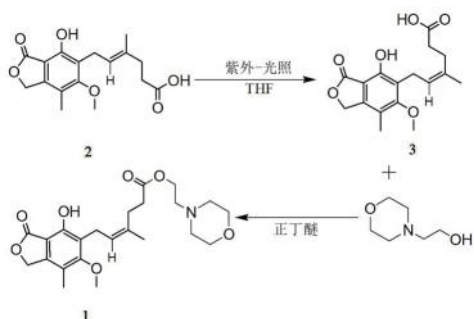


图 1 吗替麦考酚酯 Z-异构体的合成路线
Fig 1 Synthetic route of mycophenolate mofetil Z-isomer

1 材料

质谱 (LCMS-IT-TOF, 岛津公司); 核磁共振仪 (Burker AVANCE III 600 M, 瑞士 Burker 公司); 电子分析天平 (Balance XPR106DUHQ, 梅特勒公司); 液相色谱仪 (2030plus, 岛津公司); 色谱柱 (Welch XB C₁₈, 4.6 mm×250 mm, 5 μm, 月旭公司); 旋转蒸发仪 (日本 EYELA); 霉酚酸 (纯度: 98.0%, 重庆大新药业股份有限公司); 2-吗啉乙醇 (纯度: 98.0%, 阿拉丁试剂)。

2 方法与结果

2 方法与结果

2.1 Z-霉酚酸的制备

将霉酚酸 (50 g, 0.156 mol), 四氢呋喃 400 mL, 依次加入到反应瓶中。置于紫外光照反应箱中, 升温至 45 °C 搅拌反应 20 h, 反应结束后, 减压浓缩四氢呋喃, 剩余物加入无水乙醇 200 mL, 进行室温打浆, 过滤得到 45 g 白色固体 **3** (Z-霉酚酸), 收率 90%, 液相色谱测得纯度为 97.8% (见图 2) [HPLC 峰面积归一化法: 色谱柱 Welch Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 流动相 A 为 0.77 g 乙酸铵溶于 600 mL 水中, 用 60 g·L⁻¹ 冰醋酸溶液将 pH 调节至 4.86, 用水稀释至 1000 mL, 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱 (0~25 min, 71%A; 25~44 min, 71%~21%A; 44~45 min, 71%A); 检测波长 250 nm; 柱温 45 °C; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 化合物 **3** 的保留时间为 23.887 min, 化合物 **2** 和化合物 **3** 的分离度为 2.170, 符合要求]。

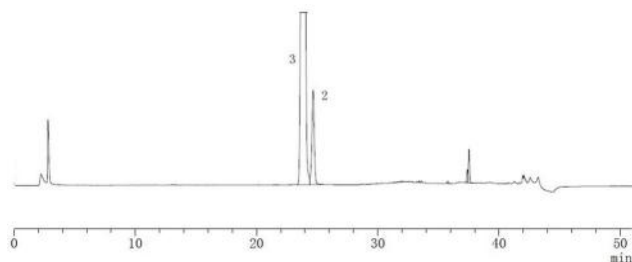


图 2 霉酚酸 Z-异构体液相色谱图
Fig 2 HPLC chromatogram of Z-mycophenolic acid

2.2 吗替麦考酚酯 Z-异构体的制备

将化合物 **3** (45 g, 0.140 mol), 2-吗啉乙醇 (98.0%, 19.7 g, 0.150 mol), 正丁醚 270 mL 依次加入到反应瓶中。加热回流分水, 反应 20 h 后, 反应完全, 将反应冷却至室温, 分层后除去正丁醚层, 剩余物加入二氯甲烷 200 mL, 用氨水 100 mL (1.0%) 洗涤, 分层除去水层后得到二氯甲烷层, 将有机相减压浓缩, 剩余物加乙酸乙酯 120 mL 搅拌析晶, 过滤得到白色固体 49.9 g, 收率 82%, 液相色谱测得吗替麦考酚酯 Z-异构体的纯度为 97.0% (见图 3) [HPLC 峰面积归一化法: 色

谱柱中谱 RD-C₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为三乙胺水溶液 (3.2 mL 三乙胺, 加入 1040 mL 水中, 磷酸调 pH 5.8), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱 (0~25 min, 65%A; 25~45 min, 65%~20%A; 45~46 min, 65%A) 检测波长 250 nm; 柱温 45 °C; 流速 1.5 mL·min⁻¹; 结果化合物 1 的保留时间为 21.845 min, 吗替麦考酚酯的保留时间为 20.207 min]。

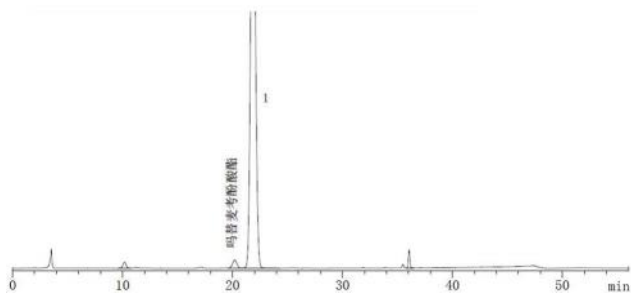


图 3 吗替麦考酚酯 Z-异构体 (1) 的液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of mycophenolate mofetil Z-isomer (1)

2.3 结构鉴定

化合物 1: 类白色粉末, HR-EI-MS 理论分子量 434.2173 [M+H]⁺, 实测分子量 434.2150 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO) δ_H: 11.63 (1H, s, H-6), 9.38 (1H, s, H-12), 5.11 (3H, m, H-11), 4.46 (2H, t, H-8), 3.89 (2H, m, H-10), 3.85 (2H, m, H-18), 3.44 (10H, m, H-19、H-20、H-21、H-22、H-23), 3.12 (2H, t, H-16), 2.45 (2H, t, H-15), 2.08 (3H, s, H-9), 1.63 (3H, s, H-14); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 172.33 (C-17), 170.09 (C-7), 162.52 (C-4), 152.64 (C-6), 145.89 (C-2), 133.21 (C-13), 124.20 (C-12), 122.30 (C-5), 116.00 (C-1), 107.03 (C-3), 68.60 (C-8), 63.08 (C-21、22), 60.73 (C-11), 58.19 (C-18), 54.37 (C-19), 51.33 (C-20、23), 31.93 (C-10), 26.56 (C-16), 22.74 (C-15), 22.19 (C-14), 11.06 (C-9)。推测为 2-(吗啉-4-基)乙基(4Z)-6-(4-羟基-6-甲氧基-7-甲基-3-羰基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-基)-4-甲基己-4-烯酸酯。

化合物 3: 类白色粉末, HR-EI-MS 理论分子量 321.1333 [M+H]⁺, 实测分子量 321.1388 [M+H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO) δ_H: 12.09 (1H, s, H-17), 9.36 (1H, s, H-6), 5.24 (2H, s, H-8), 5.09 (1H, t, H-12), 3.71 (3H, s, H-9), 3.31 (2H, d, H-10), 2.40 (2H, t, H-15), 2.32 (2H, t, H-16), 2.08 (3H, s, H-11), 1.62 (3H,

S, H-14); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ_C: 174.32 (C-17), 170.11 (C-7), 162.52 (C-4), 152.70 (C-6), 145.83 (C-2), 133.58 (C-13), 123.89 (C-12), 122.37 (C-5), 115.99 (C-1), 107.00 (C-3), 68.60 (C-11), 60.68 (C-8), 32.23 (C-16), 26.91 (C-15), 22.80 (C-14), 22.17 (C-10), 11.06 (C-9)。推测其为 Z-霉酚酸。

3 结论

本工艺以霉酚酸为起始物料, 用四氢呋喃为溶剂, 在温度 45 °C 条件下进行紫外光照反应 20 h, 后处理得到纯度 97.8% 的 Z-霉酚酸, 然后与 2-吗啉乙醇进行缩合反应得到目标化合物吗替麦考酚酯 Z-异构体, 纯度为 97.0%。Z-霉酚酸与吗替麦考酚酯 Z-异构体通过高分辨质谱、碳谱、氢谱结构确证。本方法能够获得高纯度的吗替麦考酚酯 Z-异构体, 为吗替麦考酚酯的质量研究提供杂质对照品。

参考文献

- [1] 许建军. 吗替麦考酚酯在肾移植患者中的应用[J]. 中国医药导刊, 2003, 5(3): 174-176.
- [2] 徐敏华. 吗替麦考酚酯分散片的研制[J]. 海峡药学, 2007, 19(5): 11-14.
- [3] Iaccarino L, Rampudda M, Canova M, et al. Mycophenolate mofetil: what is its place treatment of autoimmune rheumatic diseases[J]. Autoimmun Rev, 2007, 6(3): 190-195.
- [4] Peter HN, Chee LG, Anthony CA, et al. Morpholinoethylesters of mycophenolic acid and pharmaceutical compositions: US, 4753935 [P]. 1988-07-28.
- [5] Martin K, Gregory D, Dennis AS. Direct esterification of mycophenolic acid: US, 5247083 [P]. 1992-12-18.
- [6] Pater D, Robertus M, Vos B. Method for the preparation of mycophenolate mofetil: WO, 2009003878 [P]. 2009-08-01.
- [7] 王鹏远, 童元峰, 张金兰, 等. 应用 LC-ESI-FTICRMS/MSn 技术研究吗替麦考酚酯原料药中有关物质[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(1): 54-59.
- [8] Karl H. Novel photosensitizers for the E/Z-Isomerization of Trienes. Part 1. syntheses and application [J]. J Chem Soc, 1991, 2: 523-526.
- [9] Chen RL, Liu RSH. New hindered isomers of 3-dehydroretinal (vitamin A2) [J]. Tetrahedron, 1996, 52(23): 7809-7816.
- [10] 王娅莉, 牛长群, 张惠敏. 吗替麦考酚酯及其有关物质的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(10): 780-781.
- [11] Zúñiga AC, Lucas AG, Mireya M, et al. Total synthesis of mycophenolic acid [J]. Tetrahedron, 2003, 59(11): 1989-1994.
- [12] Gulyas E, Balogh G, Erdei J, et al. Method for reducing imputity level in mycophenolic acid fermentation: US, 082484 [P]. 2008-10-16.

(收稿日期: 2022-03-26; 修回日期: 2022-05-16)

综述

I 类及 II 类组蛋白去乙酰化酶在心力衰竭中的作用及机制的研究进展

高文聪, 马昕, 陈鹏*, 郑昌博* (昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500)

摘要: 心力衰竭是一种复杂且危及生命的综合征, 探索其发病机制和发现药物新靶点具有重要意义。近来研究发现, I 类和 II 类组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 能显著调控心脏肥大和心肌纤维化, 这可能是防治心力衰竭的关键。本综述简要介绍了 HDAC 的结构和功能, 并重点围绕 I、II 类 HDAC 和 HDAC 抑制剂在心脏肥大和心肌纤维化疾病中的作用及机制展开论述, 为心力衰竭的治疗提供新思路。

关键词: 心力衰竭; 心脏肥大; 心肌纤维化; 组蛋白去乙酰化酶; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2329-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.020

Research progress in the role and mechanism of class I and II histone deacetylase for heart failure

GAO Wen-cong, MA Xin, CHEN Peng*, ZHENG Chang-bo* (School of Pharmaceutical Science, Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500)

Abstract: Heart failure is a complex and life-threatening disease. Understanding its underlying pathogenesis and discovering new therapeutic targets for it are important. Recent studies have revealed that class I and class II histone deacetylase (HDAC) can effectively regulate cardiac hypertrophy and fibrosis which might be key to preventing heart failure. This review briefly introduced the structure of HDAC and their function in cardiovascular diseases. Additionally, the roles of HDAC and HDAC inhibitors in regulating cardiac hypertrophy and fibrosis were discussed to provide evidence and ideas for future research of heart failure.

Key words: heart failure; cardiac fibrosis; myocardial hypertrophy; histone deacetylase; histone deacetylase inhibitor

心血管疾病是导致人类死亡的主要原因。据《中国心血管健康与疾病报告 2019 概要》报告, 中国心血管疾病患病人数推算已达到 3.30 亿, 心血管疾病患病率及病死率仍处于持续上升阶段, 并且发病趋于年轻化, 因此心血管疾病的防治显得尤为重要。在心血管疾病中, 心脏肥大和心肌纤维化会逐渐发展成心脏功能障碍或心力衰

竭, 甚至死亡。近年来研究发现, 蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 在心血管疾病中扮演着重要角色。目前, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市的 HDAC 抑制剂有 6 种: 伏立诺他 (vorinostat, SAHA)、贝利司他 (beli-nostat, PXD101)、帕比司他 (panobinostat, LBH589)、罗米地辛 (romidepsin, FK228)、西

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81960662); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项 [No.2019FE001 (-133)]。

作者简介: 高文聪, 女, 博士研究生, 主要从事心血管药理研究, email: gao_wc@126.com *通信作者: 陈鹏, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事老年心血管病药理研究, email: 13908713337@qq.com; 郑昌博, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事分子心血管药理研究, email: zhengchangbo@kmmu.edu.cn

达本胺 (chidamide) 和莫西司他 (mocetinostat, MGCD0103), 主要用于治疗 T 细胞淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤和前列腺癌等恶性肿瘤^[1], 而 SAHA 除了可抑制喉癌细胞增殖外^[2], 还能有效舒张小鼠血管主动脉^[3]。大量研究表明, 调节 HDAC 可改善心脏肥大、心力衰竭、心律失常、心肌梗死、高血压、动脉粥样硬化和纤维化等心血管疾病^[3-5]。HDAC 在心血管疾病中的作用研究已引起广泛关注, 有望成为防治心力衰竭的新途径。

1 HDAC 的结构与功能

HDAC 催化去除组蛋白赖氨酸残基上的乙酰基, 导致染色质浓缩和抑制 mRNA 合成。HDAC 除了抑制转录基因表达外, 还参与了翻译后修饰 (PTM) 的调节。最近研究发现, HDAC2 发生 S-亚硝基化修饰促进了心脏肥大的发展^[6], HDAC 的功能与心血管疾病的发展息息相关。已发现的 18 种 HDAC 被分为 I ~ IV 类 (见图 1)。I 类和 II 类 HDAC 主要在组蛋白尾端的赖氨酸脱乙酰基中起作用^[7]。II 类 HDAC 进一步分为 2 个亚组: II a 类具有 C-末端, II b 类具有 2 个脱乙酰酶结构域。I、II 和 IV 类 HDAC 需要锌离子 (Zn^{2+}) 并且具有用于乙酰基-赖氨酸水解的类似催化核心, 而 III 类 HDAC 需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+) 才能发挥其酶活性^[8]。

尽管 I 类和 II 类 HDAC 都具有保守的 HDAC 域, 但具有完全不同的特征。I 类 HDAC 普遍存在, 具有促心脏肥大效应; 而 II 类 HDAC 相对以组织特异性方式表达^[9], 具有抗心脏肥大效应。I 类 HDAC 主要位于核苷酸中, II 类 HDAC 在蛋白激酶 C 或蛋白激酶 D 磷酸化后经历从细胞核到细胞质的穿梭^[10-11], I 类、II 类 HDAC 过表达或缺失是调控心力衰竭的主要因素。

依赖于 NAD^+ 的 III 类 HDAC 也被称为沉默调节蛋白 (Sirtuins), 具有脱乙酰基酶活性, 在细胞质和细胞核中都发现有 SIRT 1、2、6 和 7 定位于胞浆或细胞核, 而 SIRT 3、4 和 5 定位于线粒体^[12-13], 这些蛋白参与调节了细胞存活、衰老和新陈代谢相关过程^[14], 如心血管疾病和糖尿病等。

IV 类 HDAC 的相关研究主要集中于免疫反应。HDAC11 与 I 类和 II 类 HDAC 同源^[15], HDAC11 在多个组织和细胞中表达, 并调节免疫细胞中的分化、迁移和炎症反应^[16], 除此之外, HDAC11 在恶性肿瘤甚至其他疾病的病理生理学过程中也起着重要作用^[17], 但 HDAC11 在心血管疾病中的作用目前尚未见报道。

2 心力衰竭与心脏肥大和纤维化

心力衰竭通常被分为收缩性心力衰竭和舒张性心力衰竭。在细胞水平上, 收缩性心力衰竭与心肌细胞肥大和死亡有关, 通常导致间质纤维化, 房室扩张和心室壁变薄。舒张性心力衰竭的典型特征是心脏肥大和纤维化而无室扩张^[19]。心脏肥大被视为一种补偿机制, 左心室肥大是对压力和容量超负荷的适应性反应, 如果不及时治疗就会出现适应不良, 病理性心脏肥大则成为心力衰竭发展的重要危险因素。抑制左心室肥大可以降低心血管疾病患者的发病率和病死率^[20-21], 然而目前没有控制心脏肥大的有效手段。因此, 对心脏肥大疾病的控制及靶点的研究亟待开展。

心脏重塑也是加重心力衰竭的关键机制, 心肌纤维化是心肌重塑的重要病理特征之一^[22]。纤维化是由于细胞外基质 (ECM) 过度沉积以响应组织损伤而产生的可逆性瘢痕形成反应, 导致靶器官的生理功能受损并导致心律失常、心力衰竭, 甚至猝死。在纤维化中, 肌成纤维细胞是关键效应细胞, 其特征在于 ECM 的产生和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达^[23]。在所有类型的心脏疾病中几乎都会发生 ECM 成分如纤连蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白和蛋白多糖等的过度积累^[24], 包括心肌梗死、主动脉瓣狭窄、扩张型心肌病、糖尿病性心肌病和肥厚型心肌病^[25]等。长期以来, 心脏成纤维细胞被视为纤维化过程中 ECM 的主要生产者。心脏肥大和心肌纤维化是心力衰竭的主要病症之一, 抑制心脏肥大和心肌纤维化可有效降低心力衰竭的风险。

3 HDAC 在心脏肥大中的作用及机制

在所有类别的 HDAC 中, I 类和 II a 类 HDAC 都与心脏肥大的发展有关, 但它们在调节心脏肥大中的作用却相反。

I 类中的 HDAC2 心脏特异性过表达诱导心脏肥大, 具有促肥大的作用, HDAC2 基因缺失则会对各类肥大刺激产生抗性。在生理条件下, HDAC2 与 HDAC5 和蛋白磷酸酶相互作用。HDAC5 和蛋白磷酸酶都会使 HDAC2 失活。蛋白磷酸酶通过使心脏中的 HDAC2 丝氨酸 394 (S394) 磷酸化来调节肥大反应^[26]。当心肌应激时, 酪蛋白激酶 2 α 1 (CK2 α 1) 通过磷酸化被激活进入细胞核。HDAC2 的乙酰化先于磷酸化, p300/CBP 相关因子 (pCAF) 与 HDAC2 结合并使其脱乙酰基化, 使 CK2 α 1 在 S394 处磷酸化 HDAC2^[27], 热激蛋白 HSP70 在细胞核中被诱导, 特异性结合 S394 磷酸化的 HDAC2^[28], 导致 HDAC2 活化和心脏肥大的发展 (见图 2)。因此, 通过抑制 I 类 HDAC 可以

HDAC分类	HDAC	结构域	氨基酸数	亚细胞定位	
I	HDAC1		482	细胞核	
	HDAC2		488	细胞核	
	HDAC3		428	细胞核/胞浆	
	HDAC8		377	细胞核	
II	II a	HDAC4		1048	细胞核/胞浆
		HDAC5		1122	细胞核/胞浆
		HDAC7		952	细胞核/胞浆
		HDAC9		1011	细胞核/胞浆
	II b	HDAC6		1215	细胞核/胞浆
IV	HDAC10		699	细胞核/胞浆	
	HDAC11		347	细胞核	
III	SIRT1		747	细胞核/胞浆	
	SIRT2		389	胞浆	
	SIRT3		399	细胞核/线粒体	
	SIRT4		314	线粒体	
	SIRT5		310	线粒体	
	SIRT6		355	细胞核/胞浆	
	SIRT7		400	细胞核	

锌依赖性HDAC结构域

NAD⁺依赖性SIRT结构域

MEF2结合结构域

核定位信号

核输出信号

锌指结合结构域

图 1 HDAC 分类与结构^[18]

Fig 1 Classification and structure of HDAC^[18]

抑制酪蛋白激酶 (CK) 2 α 1 的激活, 阻止该酶对 HDAC2 的磷酸化, 从而抑制心脏肥大的形成。酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 (CKIP-1) 也可通过抑制 HDAC4 磷酸化来调节生理性心脏肥大^[29]。

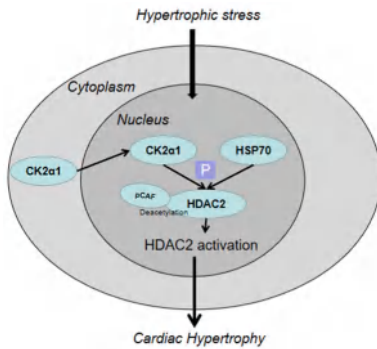


图 2 I 类 HDAC 参与心脏肥大的过程^[27]

Fig 2 Class I HDAC in cardiac hypertrophy^[27]

然而, II a 类 HDAC 对心脏肥大具有负向调节作用。II a 类 HDAC 通过抑制心肌细胞增强因子 2 (MEF2) 依赖性基因的活性来严格调节心脏功能, 蛋白激酶 D (PKD) 和 Ca²⁺/钙调蛋白依赖性激酶 II (CaMK II) 通过磷酸化不同的 HDAC 异构体来激活 MEF2, 从而为核质穿梭创建 14-3-3 结合位点^[30]。在生理条件下, 蛋白激酶 A (PKA) 依赖性抑制 PKD 磷酸化 HDAC5 并阻止其核-质穿梭, HDAC4 捕获 MEF2 并干扰其基序的结合, 抑制 MEF2 的转录活性^[30-31], 从而抑制基因转录和心脏肥大。G 蛋白偶联受体 (GPCR) 的刺激导致 cAMP 水平升高和 PKD 激活, PKA 诱导的 PKD 抑制有助于响应 cAMP 信号传导的 HDAC5 积累和 MEF2 抑制, PKA 还激活脂滴相关蛋白酶

ABHD5 以切割 HDAC4 的 N 端片段, 因 HDAC4 的 N 端缺乏 14-3-3 结合位点, 该片段通过对 PKD 和 CaMK II 信号传导无反应的独特机制来抑制 MEF2 从而发挥抗肥大效应 (见图 3)^[30]。在苯肾上腺素刺激下, HDAC5 在心肌细胞中会经历磷酸化诱导的核-质穿梭, 释放 MEF2 与 HDAC5 结合促进基因转录从而失去其抗肥大效应^[32]。

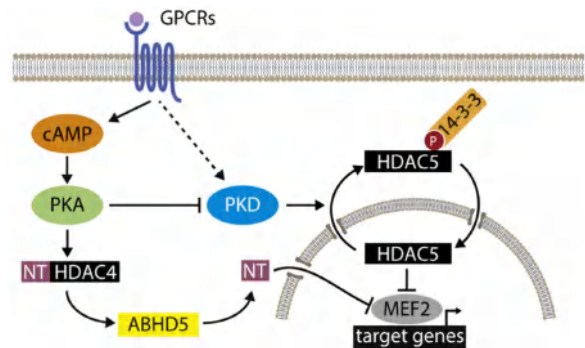


图 3 II 类 HDAC 参与心脏肥大的过程^[30]

Fig 3 Class II HDAC in cardiac hypertrophy^[30]

在现有 HDAC 抑制剂中, I 类 HDAC 抑制剂 RGFP966 通过双特异性磷酸酶 5 (DUSP5) - 细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 途径的表观遗传调节可以预防糖尿病引起的心脏肥大^[33]。在肥大心脏中, NF- κ B 靶基因的启动子上的组蛋白乙酰化增加, 曲古菌素 A (TSA, I/II a 类 HDAC 抑制剂) 能减轻压力超负荷引起的心脏肥大并抑制 NF- κ B 靶基因来保护心脏^[34]。抑制依赖结节性硬化复合物 2 (TSC2) 的 mTOR 作用也可以减轻心脏肥大^[35]。在乙酸脱氧皮质酮 (DOCA) 诱发的高血压大鼠中, 泛 HDAC 抑制剂 CG200745, 通

过 CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP)- β /TSC2 途径抑制了 mTORC1 信号传导,改善了心脏肥大^[36]。在血管紧张素 II (Ang II) 诱导小鼠的病理性心脏肥大模型中,泛 HDAC 抑制剂大黄素可通过抑制 I、II a 和 II b 类 HDAC 的活性改善其肥大^[37]。已上市药物替格列汀是一种二肽基肽酶-4 (DPP-4) 抑制剂,通过下调 DPP-4 的表达,激活胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体,抑制心肌细胞中的 Nox4-HDAC4 轴,减轻 Ang II 诱导的心脏肥大^[38];同样,泛 HDAC 抑制剂丁酸钠和丙戊酸镁降低了肥大性 HDAC2 的表达,防止心肌细胞的氧化应激并增加线粒体 DNA 浓度,从而减轻心脏肥大^[39-40]。因此, I 类 HDAC 可作为控制心脏肥大的转录程序信号的响应剂。

一般来说, II a 类 HDAC 具有抗心脏肥大效应,但其中的 HDAC7 却可促进心脏肥大^[41]。HDAC7 定位于心肌细胞质,HDAC7 的过表达会诱导心脏肥大和心力衰竭相关基因如心钠素 A (*Nppa*) 和心钠素 B (*Nppb*) 等的表达;同时, CaMK 组员的盐诱导激酶 1 (SIK1) 对 HDAC7 的磷酸化作用稳定了去乙酰基酶,使 *c-Myc* 基因表达增加,进而激活病理性心脏肥大^[42]。

综上所述, I 类 HDAC 能加重心脏肥大, II 类 HDAC 能减轻心脏肥大 (HDAC7 除外)。由于这两类 HDAC 具有相反的功能,两类 HDAC 抑制剂在心脏肥大中的作用可能会引发不良反应。因此,为了最大程度地减少药物不良反应,开发亚型特异性抑制剂显得尤为重要,可以将属于 I 类抑制剂和 II 类启动子的新型 HDAC 抑制剂设计为双重 HDAC 调节剂。

4 HDAC 在心肌纤维化的作用及机制

HDAC 同样参与心肌纤维化。在心脏成纤维细胞中, I 类 HDAC 过表达会显著增强心脏成纤维细胞的增殖以及与纤维化相关蛋白如胶原蛋白 I (collagen-I)、转化生长因子- β (TGF- β) 和胞内信号蛋白分子磷酸化 Smad2/3 (p-Smad2/3) 的水平^[43]。敲低 HDAC1/2/3 后,减少了胶原蛋白和细胞外基质的表达,表现出抗纤维化^[44],并且沉默 HDAC3 可上调 miR-18a,降低 ADRB3 表达,从而抑制心肌细胞的纤维化与肥大^[45];在心肌细胞特异性过表达 HDAC4 的转基因小鼠中, II a 类 HDAC4 的激活使间质胶原蛋白的表达增加,心脏因子纤维蛋白 III 型结构域 (FNDC5) 减少,促进了进行性心脏肥大和纤维化^[46], HDAC4 的敲低则会逆转心脏肥大与纤维化^[47]。此外, II b 类中的 HDAC6 敲低会升高 Ras 结构域家族蛋白 1 亚型 A (RASSF1A) 的表达,减轻心脏成纤维细胞增殖

和纤维化^[48], 综上, HDAC 对心肌纤维化大多为负向调节作用 (见表 1)。

表 1 I、II 类 HDAC 调节心肌纤维化的靶点及通路
Tab 1 Targets and pathways of class I and II HDAC regulating cardiac fibrosis

HDAC 亚族	HDAC	作用靶点/通路	文献
I 类 HDAC	HDAC1	p53	[49]
	HDAC2	COL1a1 和 α -SMA	[50]
	HDAC1/HDAC3	collagen I, TGF- β 和 p-Smad2/3	[43]
	HDAC3	collagen 和 ECM	[44]
II a 类 HDAC	HDAC4	FNDC5	[46]
		MAPK/ERK	[47]
II b 类 HDAC	HDAC6	RASSF1A	[48]

在 I 类 HDAC 抑制剂中,没食子酸可通过调节 HDAC1 或 HDAC2 的酶活性减轻 NG-硝基-L-精氨酸甲酯诱导的高血压小鼠心肌纤维化^[51], HDAC8 抑制剂 PCI34051 可通过 p38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38 MAPK) 途径减弱异丙肾上腺素诱导的心脏肥大和纤维化^[52],也通过下调 Ace1 缓解小鼠横向主动脉收缩诱导的心肌纤维化^[53]。MGCD0103 可调节 HDAC1 和 HDAC2 酶活性,通过介导经典 TGF- β 信号刺激的 SMAD 途径来增加纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1) 的表达,减轻心肌纤维化^[54];也通过调节 HDAC1 和 HDAC2 的表达,介导 IL-6/STAT3 信号通路减轻了心肌纤维化^[55];在横向主动脉缩窄 (TAC) 诱导的压力超负荷心脏肥大大鼠中, MGCD0103 可降低血清中的肾素、Ang II 和醛固酮水平,减轻大鼠心脏肥大与纤维化^[56]; MGCD0103 也能抑制纤维细胞前体中的 ERK1/2 磷酸化,表现出抗纤维化作用^[44]; MGCD0103 与抑制剂 TSA、apicidin 三者的抗纤维化作用与增强的组蛋白乙酰化和抗增殖基因 *p57* 的表达有关^[54]。在 I/II a 类 HDAC 抑制剂中,具有抗纤维化作用的药物主要有丙戊酸及 TSA。其中,丙戊酸调节依赖 HDAC4 的 MAPK/ERK 磷酸化抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化^[47],也通过自发性高血压大鼠的盐皮质激素受体 (MR) 乙酰化和下调 DOCA-盐高血压大鼠的 I 型胶原蛋白、结缔组织生长因子 (CTGF) 和纤维蛋白 (fibronectin, FN) 的表达来减轻和预防纤维化^[57-58]。此外, TSA 通过抑制激活蛋白 1 (AP-1) 与反转录富含半胱氨酸蛋白 (RECK) 启动子的结合,逆转了 Ang II 诱导的 RECK 抑制, ECM 的产生、纤维化标志物 MMP9、IL-18 的表达以及成纤维细胞的迁移和增殖,产生抗纤维化作用^[59]。在泛 HDAC 抑制剂中, CG200745 可减少 DOCA-盐高血压大鼠心脏中肥大性标志物如胶原蛋白、

结缔组织生长因子、纤连蛋白和纤维化基因（如 *Nppa*、*Nppb*）的表达^[60]。吉维司他（givinostat）可促进上皮-间质转化（MET）调节内皮-间质转化（EndMT）减轻心肌纤维化^[61]。SAHA 通过上

调 DUSP4 抑制心脏成纤维细胞中的 TGF- β 1/p38 途径，改善心肌梗死损伤模型的心肌纤维化^[62]。经典 HDAC 抑制剂在心脏肥大及心肌纤维化中的作用总结见表 2。

表 2 HDAC 抑制剂在心脏肥大及心肌纤维化中的作用

Tab 2 Effect of HDAC inhibitors on cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis

分类	化合物	疾病	作用的 HDAC	作用靶点 / 通路	文献	
I 类 HDAC 抑制剂	没食子酸 (gallic acid)	心脏肥大	HDAC1、HDAC2	ANP 和 BNP	[51]	
		心肌纤维化	HDAC1、HDAC2	TGF- β 1, collagen I, collagen III	[51]	
	肽酶抑制因子 16 (PI16)	心脏肥大	HDAC1	<i>NFAC1</i> 和 <i>MEF2c</i>	[43]	
		心肌纤维化	HDAC1	collagen I, α -SMC 和 p-Smad2/3	[43]	
	恩替诺特 (entinostat)	心肌纤维化	HDAC1	p53	[63]	
	莫西司他 (MGCD0103)	心脏肥大	/	RAS 活性	[59]	
		心肌纤维化	/	ERK1/2, p15, p57 和 RAS 活性	[44, 56]	
	PCI34041			HDAC1	MMP9, IL-18 和 ECM	[59]
				HDAC1、HDAC2	p57, PAI-1, collagen I, FN, CTGF 和 IL-6/STAT3	[54-55]
			心脏肥大	HDAC8	p38 MAPK	[52]
I / II a 类 HDAC 抑制剂	丙戊酸 (VPA)	心脏肥大	HDAC3	p38 MAPK, Ace1	[52-53]	
		心肌纤维化	HDAC6/8	MR, <i>Nppa</i> 和 <i>Nppb</i>	[57]	
		心脏肥大	HDAC3	β -MHC	[58]	
		心肌纤维化	HDAC3	MR	[57]	
				HDAC4	MAPK/ERK	[47]
				HDAC6/8	FN 和 collagen I	[58]
	曲古菌素 A (TSA)	心肌纤维化	HDAC1、HDAC2	MMP9, IL-18 和 RECK	[59]	
	泛 HDAC 抑制剂	吉维司他 (givinostat)	心肌纤维化	HDAC3	TGF- β	[61]
			心脏肥大	/	<i>Nppa</i> 和 <i>Nppb</i>	[60]
		心肌纤维化	/	collagen I, collagen III, FN 和 CTGF	[60]	
大黄素 (emodin)		心脏肥大	I、II a 和 II b 类 HDAC	/	[37]	
伏立诺他 (SAHA)	心肌纤维化	HDAC1	DUSP4, TGF- β 1/p38	[62]		

总之，I、II 类 HDAC 在心肌纤维化的发展中扮演着重要角色，其能负向调控心肌纤维化，I、II 类 HDAC 抑制剂可以通过不同的信号通路来抑制成纤维细胞的增殖及向肌成纤维细胞的转化，具有抗纤维化效应，但其确切机制及作用通路还有待进一步阐明。

5 结语

HDAC 及其抑制剂在心血管疾病的防治中具有重要意义。美国 FDA 批准上市的 HDAC 抑制剂主要用于抗肿瘤，但研究证明一些 HDAC 抑制剂能够有效减轻心脏肥大和心肌纤维化进程。由于 I 类 HDAC 具有促肥大效应，而 II 类 HDAC 具有负调节心脏肥大效应，故研究双重 HDAC 调节剂或开发亚型特异性抑制剂在临床治疗上显得尤为重要。HDAC 抑制剂有利于心肌纤维化，但其在心肌纤维化中的研究机制与通路较少，主要集中在心脏肥大性指标与纤维化指标，且对这些抑制剂的研究尚处在临床前研究，在心血管领域表现遗传疗法仍然有限，因此，需要广泛的研究来了解与探索 HDAC 抑制剂在心脏肥大和心肌纤维化

中扮演的角色，包括其作用、安全性和长期效果，但 HDAC 抑制剂已经表现出了极大的治疗价值，极有可能成为心力衰竭临床干预的新治疗策略。

参考文献

- [1] 马宇, 洪谦, 陈亚东, 等. 组蛋白去乙酰化酶 6 选择性抑制剂的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45 (11): 824-833.
- [2] Grabarska A, Łuszczki JJ, Nowosadzka E, et al. Histone deacetylase inhibitor SAHA as potential targeted therapy agent for larynx cancer cells [J]. J Cancer, 2017, 8 (1): 19-28.
- [3] Zheng CB, Zhong MK, Qi ZH, et al. Histone deacetylase inhibitors relax mouse aorta partly through their inhibitory action on L-type Ca²⁺ channels [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2017, 363 (2): 211-220.
- [4] Wallner M, Eaton DM, Berretta RM, et al. HDAC inhibition improves cardiopulmonary function in a feline model of diastolic dysfunction [J]. Sci Transl Med, 2020, 12 (525): eaay7205.
- [5] Yusoff SI, Roman M, Lai FY, et al. Systematic review and meta-analysis of experimental studies evaluating the organ protective effects of histone deacetylase inhibitors [J]. Transl Res, 2019, 205: 1-16.

- [6] Yoon S, Kim M, Lee H, et al. S-nitrosylation of histone deacetylase 2 by neuronal nitric oxide synthase as a mechanism of diastolic dysfunction [J]. *Circulation*, 2021, 143 (19): 1912-1925.
- [7] Jung H, Lee E, Kim I, et al. Histone deacetylase inhibition has cardiac and vascular protective effects in rats with pressure overload cardiac hypertrophy [J]. *Physiol Res*, 2019, 68: 727-737.
- [8] Merarchi M, Sethi G, Shanmugam MK, et al. Role of natural products in modulating histone deacetylases in cancer [J]. *Molecules*, 2019, 24 (6): 1047.
- [9] Liu L, Dong L, Bourguet E, et al. Targeting class II a HDAC: insights from phenotypes and inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28 (42): 8628-8672.
- [10] Abend A, Shkedi O, Fertouk M, et al. Salt-inducible kinase induces cytoplasmic histone deacetylase 4 to promote vascular calcification [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18 (7): 1166-1185.
- [11] Wang Y, Abrol R, Mak JYW, et al. Histone deacetylase 7: a signalling hub controlling development, inflammation, metabolism and disease [published online ahead of print] [J]. *FEBS J*, 2022, Doi: 10.1111/febs.16437.
- [12] Kristian T, Karimi AJ, Fearnow A, et al. Perturbed brain glucose metabolism caused by absent SIRT3 activity [J]. *Cells*, 2021, 10 (9): 2348.
- [13] Huang FY, Wong DK, Seto WK, et al. Tumor suppressive role of mitochondrial sirtuin 4 in induction of G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7 (1): 88.
- [14] Li Y, Seto E. HDAC and HDAC inhibitors in cancer development and therapy [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6 (10): a026831.
- [15] Hull EE, Montgomery MR, Leyva KJ. HDAC inhibitors as epigenetic regulators of the immune system: impacts on cancer therapy and inflammatory diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 8797206.
- [16] Yanginlar C, Logie C. HDAC11 is a regulator of diverse immune functions [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2018, 1861 (1): 54-59.
- [17] Liu SS, Wu F, Jin YM, et al. HDAC11: a rising star in epigenetics [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110607.
- [18] Kwon DH, Ryu J, Kim YK, et al. Roles of histone acetylation modifiers and other epigenetic regulators in vascular calcification [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (9): 3246.
- [19] McKinsey TA. Targeting inflammation in heart failure with histone deacetylase inhibitors [J]. *Mol Med*, 2011, 17 (5-6): 434-441.
- [20] Liu T, Wen H, Li H, et al. Oleic acid attenuates Ang II (angiotensin II)-induced cardiac remodeling by inhibiting FGF23 (fibroblast growth factor 23) expression in mice [J]. *Hypertension*, 2020, 75 (3): 680-692.
- [21] Gardin JM, Lauer MS. Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer? [J]. *JAMA*, 2004, 292 (19): 2396-2398.
- [22] Liu T, Song D, Dong J, et al. Current understanding of the pathophysiology of myocardial fibrosis and its quantitative assessment in heart failure [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 238.
- [23] Lyu X, Hu M, Peng J, et al. HDAC inhibitors as antifibrotic drugs in cardiac and pulmonary fibrosis [J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2019, 10: 2040622319862697.
- [24] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease [J]. *Nat Med*, 2012, 18 (7): 1028-1040.
- [25] Herum KM, Lunde IG, McCulloch AD, et al. The soft and hard-heartedness of cardiac fibroblasts: mechanotransduction signaling pathways in fibrosis of the heart [J]. *J Clin Med*, 2017, 6 (5): 53.
- [26] Yoon S, Kook T, Min HK, et al. PP2A negatively regulates the hypertrophic response by dephosphorylating HDAC2 S394 in the heart [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50 (7): 1-14.
- [27] Eom GH, Cho YK, Ko JH, et al. Casein kinase-2 α 1 induces hypertrophic response by phosphorylation of histone deacetylase 2 S394 and its activation in the heart [J]. *Circulation*, 2011, 123 (21): 2392-2403.
- [28] Yoon S, Kim M, Min HK, et al. Inhibition of heat shock protein 70 blocks the development of cardiac hypertrophy by modulating the phosphorylation of histone deacetylase 2 [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115 (13): 1850-1860.
- [29] Zhao Y, Ling S, Zhong G, et al. Casein kinase-2 interacting protein-1 regulates physiological cardiac hypertrophy via inhibition of histone deacetylase 4 phosphorylation [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 678863.
- [30] He T, Huang J, Chen L, et al. Cyclic AMP represses pathological MEF2 activation by myocyte-specific hypo-phosphorylation of HDAC5 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 145: 88-98.
- [31] Backs J, Worst BC, Lehmann LH, et al. Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4 [J]. *J Cell Biol*, 2011, 195 (3): 403-415.
- [32] Ha CH, Kim JY, Zhao J, et al. PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (35): 15467-15472.
- [33] Xu Z, Tong Q, Zhang Z, et al. Inhibition of HDAC3 prevents diabetic cardiomyopathy in OVE26 mice via epigenetic regulation of DUSP5-ERK1/2 pathway [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131 (15): 1841-1857.
- [34] Ooi JY, Tuano NK, Rafahi H, et al. HDAC inhibition attenuates cardiac hypertrophy by acetylation and deacetylation of target genes [J]. *Epigenetics*, 2015, 10 (5): 418-430.
- [35] Morales CR, Li DL, Pedrozo Z, et al. Inhibition of class I histone deacetylases blunts cardiac hypertrophy through TSC2-dependent mTOR repression [J]. *Sci Signal*, 2016, 9 (422): ra34.
- [36] Lee E, Lee HA, Kim M, et al. Upregulation of C/EBP β and TSC2 by an HDAC inhibitor CG200745 protects heart from DOCA-induced hypertrophy [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46 (3): 226-236.
- [37] Evans LW, Bender A, Burnett L, et al. Emodin and emodin-rich rhubarb inhibits histone deacetylase (HDAC) ac-

- tivity and cardiac myocyte hypertrophy [J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 79: 108339.
- [38] Okabe K, Matsushima S, Ikeda S, et al. DPP (dipeptidyl peptidase)-4 inhibitor attenuates Ang II (angiotensin II)-induced cardiac hypertrophy via GLP (glucagon-Like Peptide)-1-dependent suppression of Nox (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)-4-HDAC (histone deacetylase)-4 pathway [J]. *Hypertension*, 2020, 75 (4): 991-1001.
- [39] Patel BM. Sodium butyrate controls cardiac hypertrophy in experimental models of rats [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 18 (1): 1-8.
- [40] Raghunathan S, Goyal RK, Patel BM. Selective inhibition of HDAC2 by magnesium valproate attenuates cardiac hypertrophy [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95 (3): 260-267.
- [41] Travers JG, Hu T, McKinsey TA. The black sheep of class II a: HDAC7 SIKens the heart [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130 (6): 2811-2813.
- [42] Hsu A, Duan Q, McMahon S, et al. Salt-inducible kinase 1 maintains HDAC7 stability to promote pathologic cardiac remodeling [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130 (6): 2966-2977.
- [43] Deng M, Yang S, Ji Y, et al. Overexpression of peptidase inhibitor 16 attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis via regulating HDAC1 of cardiac fibroblasts [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (9): 5249-5259.
- [44] Williams SM, Golden-Mason L, Ferguson BS, et al. Class I HDAC regulate angiotensin II-dependent cardiac fibrosis via fibroblasts and circulating fibrocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 67: 112-125.
- [45] Na J, Jin H, Wang X, et al. The crosstalk of HDAC3, microRNA-18a and ADRB3 in the progression of heart failure [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11 (1): 31.
- [46] Zhang LX, Du J, Zhao YT, et al. Transgenic overexpression of active HDAC4 in the heart attenuates cardiac function and exacerbates remodeling in infarcted myocardium [J]. *J Appl Physiol*, 2018, 125 (6): 1968-1978.
- [47] Zhang Y, Gao F, Tang Y, et al. Valproic acid regulates Ang II-induced pericyte-myofibroblast trans-differentiation via MAPK/ERK pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10 (7): 1976-1989.
- [48] Tao H, Yang JJ, Hu W, et al. HDAC6 promotes cardiac fibrosis progression through suppressing RASSF1A expression [J]. *Cardiology*, 2016, 133 (1): 18-26.
- [49] Moore JBT, Zhao J, Keith MC, et al. The Epigenetic regulator HDAC1 modulates transcription of a core cardiogenic program in human cardiac mesenchymal stromal cells through a p53-dependent mechanism [J]. *Stem Cells*, 2016, 34 (12): 2916-2929.
- [50] Yang X, Yu T, Zhang S. MicroRNA-489 suppresses isoproterenol-induced cardiac fibrosis by downregulating histone deacetylase 2 [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19 (3): 2229-2235.
- [51] Jin L, Lin MQ, Piao ZH, et al. Gallic acid attenuates hypertension, cardiac remodeling, and fibrosis in mice with NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension via regulation of histone deacetylase 1 or histone deacetylase 2 [J]. *J Hypertens*, 2017, 35 (7): 1502-1512.
- [52] Zhao T, Kee HJ, Bai L, et al. Selective HDAC8 inhibition attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis via p38 MAPK pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 677757.
- [53] Zhao T, Kee HJ, Kee SJ, et al. HDAC8 inhibitor alleviates transverse aortic constriction-induced heart failure in mice by downregulating Ace1 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6227330.
- [54] Schuetz KB, Stratton MS, Blakeslee WW, et al. Overlapping and divergent actions of structurally distinct histone deacetylase inhibitors in cardiac fibroblasts [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 361 (1): 140-150.
- [55] Nural-Guvener H, Zakharova L, Feehery L, et al. Anti-fibrotic effects of class I HDAC inhibitor, mocetinostat is associated with IL-6/Stat3 signaling in ischemic heart failure [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (5): 11482-11499.
- [56] Kim GJ, Jung H, Lee E, et al. Histone deacetylase inhibitor, mocetinostat, regulates cardiac remodeling and renin-angiotensin system activity in rats with transverse aortic constriction-induced pressure overload cardiac hypertrophy [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2021, 22 (3): 1037-1045.
- [57] Kang SH, Seok YM, Song MJ, et al. Histone deacetylase inhibition attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis through acetylation of mineralocorticoid receptor in spontaneously hypertensive rats [J]. *Mol Pharmacol*, 2015, 87 (5): 782-791.
- [58] Kee HJ, Bae EH, Park S, et al. HDAC inhibition suppresses cardiac hypertrophy and fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats via regulation of HDAC6/HDAC8 enzyme activity [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2013, 37 (4-5): 229-239.
- [59] Somanna NK, Valente AJ, Krenz M, et al. Histone deacetyltransferase inhibitors trichostatin A and mocetinostat differentially regulate MMP9, IL-18 and RECK expression, and attenuate angiotensin II-induced cardiac fibroblast migration and proliferation [J]. *Hypertens Res*, 2016, 39 (10): 709-716.
- [60] Lee E, Song MJ, Lee HA, et al. Histone deacetylase inhibitor, CG200745, attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in DOCA-induced hypertensive rats [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2016, 20 (5): 477-485.
- [61] Milan M, Pace V, Maiullari F, et al. Givinostat reduces adverse cardiac remodeling through regulating fibroblasts activation [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (2): 108.
- [62] Wang K, Tang R, Wang S, et al. SAHA could inhibit TGF- β 1/p38 pathway in MI-induced cardiac fibrosis through DUSP4 overexpression [J]. *Heart Vessels*, 2022, 37 (1): 152-160.
- [63] Moore JBT, Tang XL, Zhao J, et al. Epigenetically modified cardiac mesenchymal stromal cells limit myocardial fibrosis and promote functional recovery in a model of chronic ischemic cardiomyopathy [J]. *Basic Res Cardiol*, 2018, 114 (1): 3.

(收稿日期: 2022-04-09; 修回日期: 2022-07-11)

硫化氢的病理生理功能、检测方法及供体药物研究进展

赵迎汐¹, 佟杰², 李达翊¹, 王立辉^{1*} (1. 沈阳药科大学生命科学与制药学院, 沈阳 110000; 2. 沈阳市红十字会医院, 沈阳 110000)

摘要: 硫化氢 (H₂S) 作为内源性气体递质家族成员, 近年来逐渐成为研究热点。H₂S 水平的异常变化已被证实能介导多种疾病。随着对 H₂S 调控作用的深入了解, 在体内释放 H₂S 的供体化合物已成为多种疾病治疗靶点的备选药物。但文献报道的不同方法检测内源性 H₂S 的释放量及浓度有较大差异。本文综述了 H₂S 在各种疾病模型中的调控机制并对其在某些疾病调控中的矛盾现象进行分析, 总结了亚甲蓝法、H₂S 离子选择性电极法、色谱法和 H₂S 荧光探针法等多种检测 H₂S 含量的方法, 并归纳了各种方法的优势及局限性。此外, 在讨论了传统 H₂S 供体药物缺陷的基础上, 总结了能够模拟内源性 H₂S 释放并进入临床研究的化合物, 以供参考。

关键词: 硫化氢; 病理生理功能; 检测方法; 供体药物

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2336-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.021

Research progress in pathophysiological functions, determination and donor drugs of hydrogen sulfide

ZHAO Ying-xi¹, TONG Jie², LI Da-hong¹, WANG Li-hui^{1*} (1. College of Life Science and Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110000; 2. Shenyang Red Cross Hospital, Shenyang 110000)

Abstract: Hydrogen sulfide (H₂S), a member of the endogenous gasotransmitter family, has gradually become a research highlights in recent years. Numerous studies have shown that abnormal changes in H₂S levels may mediate many diseases. With the further understanding of the regulatory role of H₂S, donor compounds that release H₂S in vivo have become candidates for therapeutic targets of many diseases. However, the release amount and concentration of endogenous H₂S reported in the literatures are significantly different. This paper reviewed the regulatory mechanism of H₂S in various disease models, and analyzed its contradictions in the regulation of some diseases. Several methods for detecting H₂S content, including methylene blue method, H₂S ion selective electrode method, chromatography method and H₂S fluorescent probe method were summarized, as well as their advantages and limitations. Besides discussing the defects of traditional H₂S donor drugs, we summarized compounds that could simulate endogenous H₂S release in clinical research.

Key words: hydrogen sulfide; pathophysiological function; determination method; donor drug

硫化氢 (H₂S) 作为内源性气体递质家族成员, 是重要的信号分子。体内 H₂S 水平的变化已被证实能介导包括动脉粥样硬化、帕金森综合征 (PD)、阿尔茨海默病 (AD)、癌症在内的多种疾病。其调控机制复杂, 影响因素多样。近年来, H₂S 的供体化合物已成为多种疾病治疗靶点的备

选药物。此外, 在肿瘤中 H₂S 低促高抑的“钟形调控”使抑制 H₂S 生物合成和补充外源性 H₂S 成为癌症治疗的两种不同方式。然而, 已经问世的胱硫醚 γ -裂解酶 (CSE) 抑制剂活性低、选择性差, 使得 H₂S 供体药物异军突起。目前文献报道的不同方法检测内源性 H₂S 的释放量及浓度有

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 82073320)。

作者简介: 赵迎汐, 女, 硕士, 主要从事肿瘤药理研究, email: 1684232089@qq.com *通信作者: 王立辉, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事肿瘤药理研究, email: wlhcw@163.com

较大差异,各有利弊,尚无统一标准。本文概述了 H₂S 在疾病中的调控机制,归纳检测 H₂S 释放方法的优势及局限性,同时总结能够模拟内源性 H₂S 释放并进入临床研究的化合物,以期 H₂S 供体药物的临床前研究提供参考。

1 H₂S 在疾病中的调控作用

H₂S 是继一氧化碳 (CO) 与一氧化氮 (NO) 之后的第三种气体信号递质^[1],自 1996 年 Ade 和 Kimura 对内源性 H₂S 进行研究以来^[2],越来越多的研究阐明了内源性 H₂S 的调控作用以及治疗前景。内源性 H₂S 的释放主要归因于体内的 CSE、胱硫醚-β-合成酶 (CBS) 与 3-巯基丙酮

酸硫转移酶 (3-MST) 的作用^[3]。据报道, CBS 主要存在于中枢神经系统与肝脏中^[4], CSE 则更多地出现在心血管系统中^[5],而 3-MST 位于肝、肾、心、肺、胸腺、睾丸和脑中^[6],因此 H₂S 在人体不同组织中广泛表达,主要存在于血液、血浆、肠道和大脑中。H₂S 在哺乳动物血液中的浓度为 30 ~ 100 mmol · L⁻¹,在大脑中为 50 ~ 160 mmol · L⁻¹^[7]。H₂S 作为经典气体递质之一,参与调节包括肠道疾病^[8]、心血管疾病^[9]、神经退行性疾病^[10]、炎症^[11]、肿瘤^[12]等在内的多种病理过程,如表 1 所示。H₂S 在体内的持续、可控释放的研究对临床具有重要的价值。

表 1 H₂S 在生理病理中的调控作用
Tab 1 Regulatory role of H₂S in physiological pathology

种类	调控方式
中枢神经系统	cAMP↑, NMDA 受体对 Thr 的敏感性 ↑, 诱导海马体的长时程 ↑
抗炎	促炎性细胞因子 (IL-6、IL-8) ↓, 抗炎趋化因子 (IL-10) ↑; NF-κB、IRF-3↑; 白细胞浸润 ↓, 粒细胞髓过氧化物酶活性 ↓
促炎	高浓度的 H ₂ S 扩张血管、促进水肿、触发痛觉
心血管系统	血管 KV7 电压门控钾通道 ↑、抗纤维化和抗凋亡作用 ↑; 诱导 miR-640 ↓, 缺氧诱导因子 (HIF1α) ↑, 血管生成 ↑; 肾上腺素 (ADR)、二磷酸腺苷 (ADP)、花生四烯酸 (ARA)、血栓素模拟物 (U46619) ↓, 引起血管平滑肌松弛
三阴性乳腺癌	NF-κB、PI3K/AKT/mTOR、Ras/Raf/MEK/ERK ↓, 凋亡标志物 (caspase-3/9、PARP) ↑, β-catenin 异常激活 ↓, 基质金属蛋白酶 (MMP2/9) ↓
胰腺癌	高浓度 H ₂ S 促使 ERK1/2 磷酸化 ↓, 凋亡标志物 (caspase-3/7) ↓, 诱导细胞凋亡

1.1 H₂S 与神经退行性疾病

H₂S 作为中枢神经系统中调节功能的关键因子,通过提高环磷酸腺苷 (cAMP) 生成,增强中枢神经系统神经元中 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (NMDA 受体) 对谷氨酸 (Thr) 的敏感性^[13],诱导海马体的长时程增强^[14],从而实现学习以及记忆突触的可塑性过程。内源性 H₂S 在 PD、AD 等中枢神经退行性疾病中的生成通常被严重抑制。Xie 等^[15]在 6-羟基多巴胺诱导的 PD 大鼠模型中发现内源性 H₂S 的产生随 PD 的发展减少,给予硫化钠 (NaHS) 可以减少该模型大鼠的行为症状和多巴胺能神经元的变性,在 AD 患者中也观察到了类似的现象。受其启发,Giuliani 等^[16]在脑内注射 β-淀粉样蛋白 1-40 (Aβ) 或链脲佐菌素诱导的 AD 大鼠与含有人类转基因 PS1M146V、tauP301L 的 AD 小鼠模型中使用硫化钠 (Na₂S) 进行短期或长期治疗后,均发现 AD 模型鼠的学习能力增强,记忆障碍降低,这也表明促进 H₂S 释放能够减缓 AD 的进展。

1.2 H₂S 与炎症

在炎症的调节中, H₂S 的促炎和抗炎活性都有相关报道^[17-19]。首先以急性肺损伤 (ALI) 为例,有研究表明,静脉注射 NaHS 可显著降低血浆以及肺组织中的促炎性细胞因子 (IL-6、IL-8),同时增加抗炎趋化因子 (IL-10),由此减轻

ALI 程度 (如图 1A 所示)^[17]。而在呼吸道炎症中, Esechie 团队^[18]在感染呼吸道合胞病毒的小鼠鼻内注射 H₂S 供体药物 GYY4137 (见图 2),其持续释放的 H₂S 通过促进 NF-κB 以及激活 IRF-3 的方式,抑制病毒复制,减少促炎介质,发挥抗炎作用。还有研究表明, H₂S 可通过减少黏附分子抑制白细胞浸润,抑制粒细胞髓过氧化物酶活性以及诱导巨噬细胞对促炎刺激 (如细菌内毒素的低反应性) 影响炎症细胞的一系列功能^[19]。以上结果均表明 H₂S 供体可成为有效的抗炎剂。

H₂S 还表现出一定的促炎作用。如高浓度的 H₂S^[20]可以通过扩血管、促进水肿以及触发痛觉的方式在内毒素休克动物模型中产生促炎作用。此外,在类似的几种炎症动物模型中,血浆中 H₂S 浓度、组织中 H₂S 合成能力以及 CSE 表达均增强,表明内源性 H₂S 可能具有促炎作用^[21]。这些矛盾的结论意味着除了已被证实的机制外,还存在一些未知的机制。观察到的结果可能来自多种机制平衡的结果,且 H₂S 的作用受浓度、反应时间以及疾病类型的影响。因此, H₂S 是在炎症中调控的确切机制还需要进一步研究。

1.3 H₂S 与心血管疾病

H₂S 在控制心血管内稳态方面具有生物学意义。H₂S 主要通过激活血管 KV7 电压门控钾通道,抗纤维化和抗凋亡作用,减少氧化应激和炎

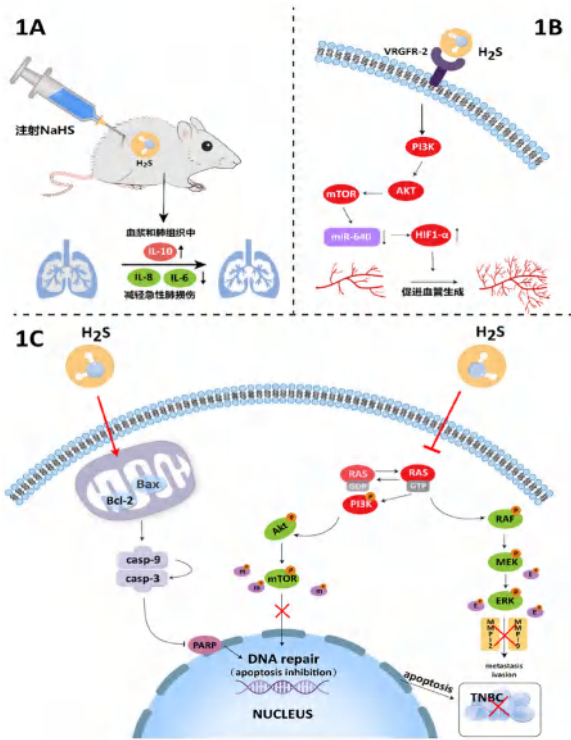


图 1 H₂S 在疾病中的调控作用
Fig 1 Regulation of H₂S in diseases

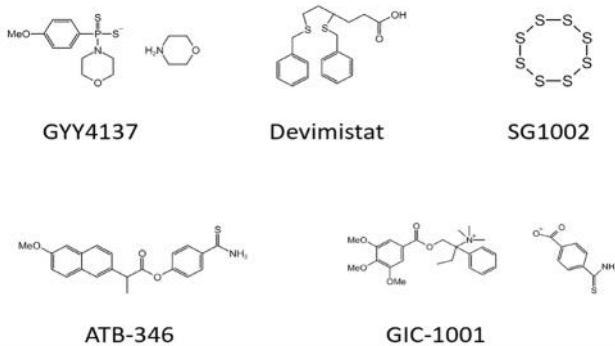


图 2 H₂S 供体药物结构式
Fig 2 Structural formula of H₂S donor drugs

症反应，调控 microRNA 表达以及促进血管生成，从而实现对心脏的保护作用^[9]。一方面，H₂S 通过 VEGFR2-mTOR 途径^[22]，诱导人微血管内皮细胞 HMEC-1 与人脐静脉内皮细胞 HUVECs 中调节血管生成的关键因子 miR-640 的表达降低，进而导致缺氧诱导因子 (HIF1 α) 表达增加，最终促进血管生成；另一方面，H₂S 通过抑制肾上腺素 (ADR)、二磷酸腺苷 (ADP)、花生四烯酸 (ARA)、血栓素模拟物 (U46619) 以及凝血酶诱导的血小板聚集或黏附而引起血管平滑肌的松弛效应 (如图 1B 所示)^[23]。CSE 是心血管系统中产生 H₂S 进而舒张平滑肌最主要的胞质酶^[24]，其 mRNA 在血管平滑肌中高表达^[25]。经证实，小鼠敲除 CSE 基因后，其血清、心脏以及主动脉中

的 H₂S 水平均显著降低，且表现出内皮功能受损，进一步发展为高血压和动脉粥样硬化^[26]。H₂S 具有松弛大鼠胸主动脉、门静脉和肠系膜动脉的能力，其扩张血管作用可能与高血压治疗的潜力密切相关^[27]。因此，H₂S 经常被描述为“有效的血管舒张剂”^[28]，为治疗动脉粥样硬化、心肌缺血等心血管疾病药物的研发提供了新的选择。

1.4 H₂S 与肿瘤

H₂S 在肿瘤领域中扮演着复杂且重要的角色，其在肿瘤治疗中呈现钟形模式。低水平的 H₂S 通过诱导血管生成、加速细胞周期和抑制细胞凋亡，从而促进肿瘤的发生发展。以在结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 中的调控为例，目前研究主要集中于合成 H₂S 的三种关键酶对结直肠癌的影响。Szabo 团队研究显示，CRC 肿瘤组织中 CBS 选择性表达升高，CSE 和 3-MST 的表达水平保持不变^[29]。用 shRNA 敲除 CBS 基因后，PI3K 激活以及结肠癌细胞 HCT116 中的氧化磷酸化、糖酵解被抑制从而显著降低结肠癌细胞 HCT116 的增殖侵袭能力。也有研究显示，过表达 CSE、3-MST 也能促进结肠癌细胞的增殖、侵袭以及迁移^[30]。上述研究显示通过靶向抑制 H₂S 合成酶进而抑制 H₂S 的内源性合成对抗肿瘤有着巨大潜力。

从供体中释放的高浓度外源性 H₂S 可通过诱导多种通路磷酸化选择性地抑制肿瘤的进展^[31]，例如在三阴性乳腺癌 (TNBC) 中，一方面，H₂S 供体及其衍生物通过抑制 NF- κ B、PI3K/AKT/mTOR 和 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路相关蛋白的磷酸化表达以及上调 caspase-3/9、PARP 等凋亡标志物水平，有效抑制三阴性乳腺癌细胞的侵袭转移^[32]；另一方面，H₂S 供体及其衍生物通过抑制 β -catenin 通路的异常激活，抑制基质金属蛋白酶 MMP2/9 的表达，从而产生较强的抗肿瘤作用 (如图 1C 所示)。Chattopadhyay 团队^[33]在体内外实验均验证了阿司匹林 H₂S 供体衍生物 HS-ASA 可通过抑制 NF- κ B 通路以及硫氧还蛋白还原酶 -1 (TrxR) 活性，上调活性氧 (ROS) 水平进而有效抑制 TNBC 的进展，且无明显不良影响。在胰腺癌中也是如此，Citi 团队^[34]报道高浓度的 H₂S 供体 Erucin (30 ~ 100 μ mol \cdot L⁻¹) 可在胞内释放 H₂S，通过降低 ERK1/2 的磷酸化，上调 caspase-3 和 caspase-7 的表达进而诱导细胞凋亡。目前市场上有 200 余种 FDA 批准的含硫小分子药物，广泛用于治疗各种疾病。Devimistat (见图 2) 是 H₂S 供体 lipoate 的类似物，已被欧洲药品管理局 (EMA) 批准为孤儿药物，通过激活

AMPK 信号通路^[35]、触发 ROS 相关的细胞凋亡、增加自噬、抑制脂质代谢进而治疗转移性胰腺癌。此外 Venetoclax、Trabectedin、博来霉素等也已应用于肿瘤治疗^[36]。

正是受这种钟形模式调控的启发，内源性 H₂S 合成酶抑制剂 (CBS、CBE 和 3-MST 抑制剂) 以及 H₂S 供体为肿瘤治疗开辟了两种截然不同的抗肿瘤策略。但内源性 H₂S 合成酶抑制剂选择性较差，活性低，而开发 H₂S 供体在体内选择性释放一定浓度的 H₂S 更容易实现，在肿瘤治疗领域具有更加广阔的前景。H₂S 供体可以作为候选药物与市场上销售的抗肿瘤药物相结合，以达到提高疗效，增加选择性并降低不良反应的功效。但目前缺少对 H₂S 供体药物的给药剂量、与化疗药物的联合治疗方案以及疗程长短方面的研究。

2 H₂S 的检测方法

目前筛选 H₂S 供体药物主要通过检测其在体内释放 H₂S 的能力。但文献报道的不同方法检测内源性 H₂S 的释放量及浓度有较大差异。迅速、实时及准确监测体内及外源性供体释放的 H₂S 水平仍是富有挑战性的课题。目前，检测 H₂S 的常规方法包括亚甲蓝法、H₂S 离子选择性电极法、色谱法 [高效液相色谱法 (HPLC) 和气相色谱法 (GC)] 和 H₂S 荧光探针法^[37]，其优势以及局限性见图 3。

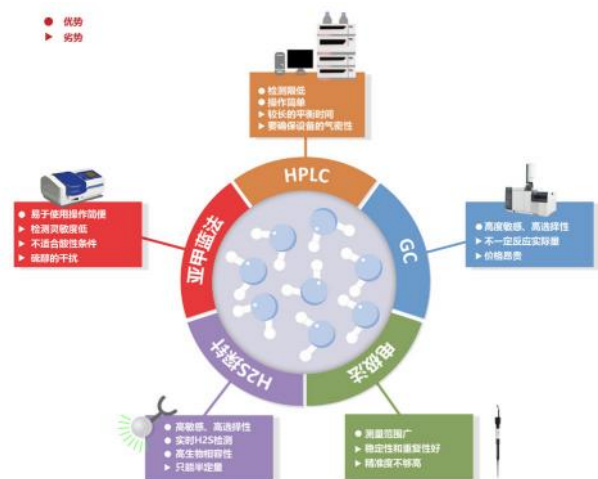


图 3 H₂S 检测方法的优势及局限性

Fig 3 Advantages and limitations of H₂S determination method

2.1 亚甲蓝法

亚甲蓝法是最为简便的检测 H₂S 释放的方法，其原理是 H₂S 在 pH < 7 及三氯化铁 (FeCl₃) 共同存在的条件下与 N, N-二甲基对苯二胺溶液反应生成亚甲基蓝，通过检测亚甲基蓝在 670 nm 附近的吸光度对 H₂S 进行定量^[38]。但由于亚甲蓝法的检测灵敏度低 (仅限 μmol · L⁻¹ 范围)，并且生理性 H₂S 是在酸性条件下释放的，储存不稳

定，因此 H₂S 的浓度可能会被错误估计。

2.2 敏感硫电极法

敏感硫电极法具有测量范围广，稳定性与重复性良好等特点。近年来已应用于大鼠心脏、脑、肾脏、肝脏、骨骼肌等组织中 H₂S 的测定^[39]，通常用来测定大鼠及人血浆中内源性 H₂S 的浓度。其原理是将以化学形式存在的 H₂S 与抗氧化液反应生成硫离子 (S²⁻)，取抗氧化液与血浆 (1 : 1) 组成的混合溶液，将敏感的银 / 硫电极 (pAg/S-1) 与参比电极共同浸入样品中，用无机固体电解质 (ISE) 分析仪检测微量 S²⁻，然后根据 S²⁻ 溶液标准曲线计算测试样品中的 H₂S 水平。但其检测 H₂S 含量精确度不够高。

2.3 气相色谱 - 硫化学发光联用气相法

气相色谱 - 硫化学发光联用法检测是利用气相色谱结合硫化学发光检测法分析生物样品中的 H₂S 水平。该方法测定生物样品中的 H₂S 含量依赖于密封样品室中液体样品和气相之间的 H₂S 平衡。样品中的 H₂S 经气相色谱与其他硫化物分离后在检测器中燃烧，产生一氧化硫 (SO)，再与反应池中臭氧 (O₃) 反应后生成能发光的二氧化硫 (SO₂)，使用光电倍增管测量光强，其信号与 SO₂ 的浓度成线性^[40]。该方法具有检测限低、灵敏度高 (在 nmol · L⁻¹ 范围内) 等优势，但要确保设备的气密性，且需要较长的平衡时间。因此在内源性 H₂S 的含量测定中并没有得到广泛应用。

2.4 溴甲烷高效液相色谱分析法

溴甲烷是巯基特异性荧光标记试剂，一分子 H₂S 同两分子的溴甲烷发生反应生成特异性的标记产物硫化乙硼烷，能与谷胱甘肽 (GSH)、半胱氨酸 (Cys) 等其他具有巯基结构的物质进行分离，可以采用荧光和质谱联用的方法进行分析定量，该方法灵敏度、选择性更高^[41]。但由于需要破碎细胞或组织，所以检测结果并不一定能真实反映实际 H₂S 水平。

2.5 荧光探针法

近几年相继报道了百余种灵敏的、可实时监测的、结构新颖的荧光探针用于 H₂S 检测。良好的 H₂S 荧光探针要求其在高浓度的硫醇或还原剂的存在下仅与 H₂S 反应，在生理 H₂S 浓度范围内呈现线性响应，有良好的通透性和细胞内稳定性，便于储存或可商业化等。这些优势使荧光探针法成为检测 H₂S 含量方法的“后起之秀”。目前已研发的 H₂S 荧光探针分为三类：① 通过亲核反应与 H₂S 反应的探针；② 被 H₂S 选择性还原的探针；③ 使用配位金属捕获 H₂S 的探针^[42]。例如 SPF1 ~ 5, WSP1 ~ 5, DSP, MBB, CAY,

P3 等, 其中 WSP1、WSP5、CAY 和 P3 是近年来已经实现商业化的探针, 均属于基于亲核进攻机制的探针。有团队对它们进行系统的评估, 发现 CAY 仅在高浓度 H_2S 下产生荧光信号, P3 和 WSP1 显示出 $0 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的窄线性范围, 相比而言 WSP5 的线性范围较宽 ($0 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。且当存在少量表面活性剂 CTAB 时, 可增强 WSP5 探针溶解度, 荧光强度达到峰值的时间从 30 min 降为 5 min。WSP5 对 H_2S 具有更宽的灵敏度线性范围, 受硫醇和其他活性硫物质的干扰最小, 在不同 pH 环境中最稳定并且能够在活细胞中对 H_2S 进行荧光成像。目前 WSP5 在国内外已广泛用于测试内源性或外源性 H_2S 的释放。

3 H_2S 供体药物研究进展

随着对 H_2S 调控作用的深入了解, 释放 H_2S 的供体化合物已成为将 H_2S 用于疾病的治疗的备选药物。增加 H_2S 生物利用度的策略是可行的治疗方法, 但是目前文献中描述的符合该要求的 H_2S 供体非常少。研究普遍选择用硫化物盐 (NaHS 、 Na_2S) 充当实验中内源性释放 H_2S 的工具, 尽管这些盐价格便宜、容易获得且使用方便, 但 NaSH 和 Na_2S 是简单的盐, H_2S 生成依赖于 pH 的解离, 且产生的 H_2S 是瞬时短暂的, 无法进行持续性研究。其次由于硫化物盐缺乏靶向能力, 只能用于全身给药, 且由于这些硫酸盐产生的 H_2S 在几秒钟内就会消散, 因此 H_2S 生物学研究经常需要使用高剂量 ($> 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 才能在细胞或组织中引发生物反应, 这会导致血液和组织中 H_2S 浓度飙升, 远超生理水平, 然后迅速下降。由于硫化物无机盐 H_2S 释放的即时性和易氧化性, 其使用受到严重限制。这些局限性促使研究工作者不断寻找可控、缓释、靶向释放的 H_2S 供体。目前具有一定研究基础的模拟内源性 H_2S 释放的化合物主要包括 H_2S 供体中的先驱化合物 GYY4137, 表现出抗炎作用的萘普生 H_2S 供体衍生物 ATB-346, 可用作结肠镜检查中镇静剂的马来酸曲美布汀盐 H_2S 供体衍生物 GIC-1001 以及有心脏保护作用的 SG1002 (见图 2)。

3.1 GYY4137

二硫代磷酸酯 GYY4137 是第一个水溶性缓释型 H_2S 供体^[43], 是缓释 H_2S 供体中的先驱化合物。其 H_2S 的生成速度更容易模拟从 CSE、CBS 和 3-MST 等酶中内源性合成的 H_2S , 更加准确地模拟内源生成的 H_2S , 而不是将 H_2S 作为单一的浓缩剂输送。且 GYY4137 的高水溶解性使其用于细胞、组织和动物实验更加方便。但由于其与水接触时就会开始产生 H_2S , 且产生效率较低,

因此应避免冻融和重复使用储存液, 并且应在高浓度或高剂量下使用^[44]。

从目前研究情况来看, GYY4137 在高血压、动脉粥样硬化^[45]、脑缺血再灌注 (I/R) 损伤^[46]、肺损伤及多种癌症的细胞和动物疾病模型中显示出良好的治疗效果。GYY4137 在不同浓度 ($100 \sim 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可诱导结直肠癌 (HCT-116)、肝癌 (HepG2)、乳腺癌 (MCF-7)、骨肉瘤 (U2OS)、急性早幼粒细胞白血病 (HL-60) 的人癌细胞系发生显著的 G₂/M 期细胞周期阻滞以及依赖于 PARP/Caspase-9 的凋亡细胞死亡, 在体内外均显示出显著的抗肿瘤活性。

3.2 SG1002

SG1002 是一种可以缓慢产生 H_2S 而不产生副产物的 H_2S 供体药物。SG1002 在心脏病、心力衰竭、动脉粥样硬化等小鼠模型中显示出对心脏、血管的保护作用^[47]。SG1002 在健康志愿者以及心力衰竭患者身上已完成了为期 21 d 的 I 期临床试验, 该结果揭示了 SG1002 的心脏保护作用, 包括减少心肌纤维化、增加心肌血管供应以及 NO 生物利用度等^[48]。目前 II 期临床试验正在计划中。

3.3 ATB-346

ATB-346 是一种基于萘普生的 H_2S 供体非甾体抗炎药 (H_2S -NSAID)^[49]。ATB-346 避免了 NSAID 由于对环氧合酶 (COX)-1 或 COX-2 的单一抑制, 在不同组织器官中表达失衡而产生的不良反应。其在被酶分解时通过释放 H_2S 达到对胃和心脏等器官的保护作用, 在炎症途径的多个潜在方面发挥作用。一项 244 名健康志愿者参与的 II 期临床试验中提供了明确证据, ATB-346 ($250 \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 对 COX-2 的抑制作用与萘普生 ($550 \text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 的抑制程度相同^[50]。与萘普生相比, ATB-346 显示出了更高的镇痛与抗炎作用, 而且不影响受试者血细胞比容参数, 无严重的不良反应^[51]。还有研究显示 ATB-346 具有诱导人黑色素瘤细胞凋亡和预防结直肠癌的功效。ATB-346 对骨关节炎相关疼痛的 II 期临床研究已于 2016 年完成。

3.4 GIC-1001

GIC-1001^[49] 是一种新的曲美布汀 H_2S 供体衍生物。马来酸曲美布汀是 FDA 批准的一种用于治疗接受非镇静结肠镜检查患者的解痉剂。在一项多中心、双盲、随机、安慰剂对照的 II a 期临床试验中显示出明显优于母体化合物的镇痛效果, 能有效减轻内脏疼痛与腔扩张引起的不适, 且引起的伤害性刺激反应与母体化合物相比显著减少^[52]。因此 GIC-1001 有望成为一种新型的全套结肠镜检查期间静脉镇静的替代药物。

4 总结与展望

H₂S 作为内源性递质家族成员, 参与心血管疾病、胃肠道疾病、中枢神经系统神经退行性疾病以及多种肿瘤的调控。H₂S 在体内的调节较为复杂, 在多个病理过程中具有双向调控作用, 这可能受其浓度、反应时间、疾病类型以及多种信号转导机制的影响。H₂S 在多种疾病的调控中均显示出巨大潜力, 特别是在肿瘤中与致癌通路 NF-κB、PI3K/AKT/mTOR 和 Ras/Raf/MEK/ERK 的激活息息相关, 且 H₂S 供体药物在动物模型内无明显不良反应发生。随着分子靶向药物和免疫治疗的深入应用, 其与化疗的联合方案在临床上展现出巨大的治疗潜力, 但各类药物的耐药现象频发且逆转手段有限, 因此将 H₂S 供体药物作为现有的治疗策略的辅助药物以提高药物敏感性, 降低不良反应, 为克服肿瘤耐药提供一个新思路。

近年来发展起来的 H₂S 荧光探针检测法, 表现出更高的灵敏度、选择性、光稳定性以及更低的细胞毒性, 便于储存, 可商业化。基于此, 越来越多的研究人员将视线转向对 H₂S 供体药物的筛选及开发并取得了阶段性的成果。目前 ATB-346、GIC-1001、SG1002 已进入临床试验, 治疗效果显著且不良反应小。能够模拟内源性 H₂S 在体内持续缓慢释放的供体药物, 未来可能广泛应用于多种疾病的治疗, 但针对 H₂S 供体药物的给药策略及药物联合治疗方案还有待研究。

参考文献

- [1] Jin Z, Chan H, Ning J, et al. The role of hydrogen sulfide in pathologies of the vital organs and its clinical application [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2015, 66 (2): 169-179.
- [2] Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator [J]. *J Neurosci*, 1996, 16 (3): 1066-1071.
- [3] Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2011, 51: 169-187.
- [4] Gong QH, Wang Q, Pan LL, et al. S-propargyl-cysteine, a novel hydrogen sulfide-modulated agent, attenuates lipopolysaccharide-induced spatial learning and memory impairment: involvement of TNF signaling and NF-kappaB pathway in rats [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25 (1): 110-119.
- [5] Wang R. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2011, 20 (2): 107-112.
- [6] Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions [J]. *Amino Acids*, 2011, 41 (1): 113-121.
- [7] Pofi R, Feliciano C, Sbardella E, et al. The short synacthen (Corticotropin) test can be used to predict recovery of hypothalamo-pituitary-adrenal axis function [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103 (8): 3050-3059.
- [8] Wallace JL, Vong L, Mcknight W, et al. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137 (2): 569-578, 571-578.
- [9] Chen Y, Zhang F, Yin J, et al. Protective mechanisms of hydrogen sulfide in myocardial ischemia [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (12): 9059-9070.
- [10] Zhong H, Yu H, Chen J, et al. Hydrogen sulfide and endoplasmic reticulum stress: a potential therapeutic target for central nervous system degeneration diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 702.
- [11] Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, et al. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346) [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 159 (6): 1236-1246.
- [12] Li H, Xu F, Gao G, et al. Hydrogen sulfide and its donors: novel antitumor and antimetastatic therapies for triple-negative breast cancer [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101564.
- [13] Jia J, Xiao Y, Wang W, et al. Differential mechanisms underlying neuroprotection of hydrogen sulfide donors against oxidative stress [J]. *Neurochem Int*, 2013, 62 (8): 1072-1078.
- [14] Kimura H, Nagai Y, Umemura K, et al. Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7 (5-6): 795-803.
- [15] Xie L, Hu LF, Teo XQ, et al. Therapeutic effect of hydrogen sulfide-releasing L-Dopa derivative ACS84 on 6-OHDA-induced Parkinson's disease rat model [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e60200.
- [16] Giuliani D, Ottani A, Zaffe D, et al. Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2013, 104: 82-91.
- [17] Li T, Zhao B, Wang C, et al. Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008, 233 (9): 1081-1087.
- [18] Citi V, Martelli A, Brancaleone V, et al. Anti-inflammatory and antiviral roles of hydrogen sulfide: rationale for considering H₂S donors in COVID-19 therapy [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177 (21): 4931-4941.
- [19] Liu H, Anders F, Thanos S, et al. Hydrogen sulfide protects retinal ganglion cells against glaucomatous injury in vitro and in vivo [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (12): 5129-5141.
- [20] Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2007, 102 (1): 261-268.
- [21] Mok YY, Moore PK. Hydrogen sulphide is pro-inflammatory in haemorrhagic shock [J]. *Inflamm Res*, 2008, 57 (11): 512-518.
- [22] Kang SC, Sohn EH, Lee SR. Hydrogen sulfide as a po-

- tential alternative for the treatment of myocardial fibrosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4105382.
- [23] Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 559 (1): 65-68.
- [24] Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, et al. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression [J]. *Biochem J*, 2004, 381 (Pt 1): 113-123.
- [25] Mikami Y, Kimura H. A mechanism of retinal protection from light-induced degeneration by hydrogen sulfide [J]. *Commun Integr Biol*, 2012, 5 (2): 169-171.
- [26] Yang G, Wu L, Jiang B, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase [J]. *Science*, 2008, 322 (5901): 587-590.
- [27] Sowmya S, Swathi Y, Yeo AL, et al. Hydrogen sulfide: regulatory role on blood pressure in hyperhomocysteinemia [J]. *Vascul Pharmacol*, 2010, 53 (3-4): 138-143.
- [28] Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction; the link between homocysteine and hydrogen sulfide [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21 (32): 3662-3672.
- [29] Szabo C, Coletta C, Chao C, et al. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-beta-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (30): 12474-12479.
- [30] Fan K, Li N, Qi J, et al. Wnt/beta-catenin signaling induces the transcription of cystathionine-gamma-lyase, a stimulator of tumor in colon cancer [J]. *Cell Signal*, 2014, 26 (12): 2801-2808.
- [31] Reis A, Stern A, Monteiro HP. S-nitrosothiols and H₂S donors: potential chemo-therapeutic agents in cancer [J]. *Redox Biol*, 2019, 27: 101190.
- [32] Chattopadhyay M, Kodela R, Nath N, et al. Hydrogen sulfide-releasing aspirin suppresses NF-kappaB signaling in estrogen receptor negative breast cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83 (6): 723-732.
- [33] Akbari M, Sogutdelen E, Juriasingani S, et al. Hydrogen sulfide: emerging role in bladder, kidney, and prostate malignancies [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2360945.
- [34] Pirnia F, Schneider E, Betticher DC, et al. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9 (9): 905-914.
- [35] Gao L, Xu Z, Huang Z, et al. CPI-613 rewires lipid metabolism to enhance pancreatic cancer apoptosis via the AMPK-ACC signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39 (1): 73.
- [36] Gibson SB, Oyer R, Spalding AC, et al. Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (1): 205-212.
- [37] Li H, Fang Y, Yan J, et al. Small-molecule fluorescent probes for H₂S detection: advances and perspectives [J]. *Trends Analyt Chem*, 2021, 134: 116117.
- [38] Zheng Y, Liao F, Du JB, et al. Modified methylene blue method for measurement of hydrogen sulfide level in plasma [J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2012, 64 (6): 681-686.
- [39] 耿彬, 杜军保, 唐朝枢. 敏感硫电极法在测定心血管组织细胞及血浆胱硫醚-γ-裂解酶/硫化氢的应用 [J]. *北京大学学报 (医学版)*, 2005, 37 (5): 545-548.
- [40] Levitt MD, Furne J, Springfield J, et al. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104 (8): 1107-1114.
- [41] Shen X, Pattillo CB, Pardue S, et al. Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50 (9): 1021-1031.
- [42] Wang K, Peng H, Ni N, et al. 2, 6-dansyl azide as a fluorescent probe for hydrogen sulfide [J]. *J Fluoresc*, 2014, 24 (1): 1-5.
- [43] Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide [J]. *Circulation*, 2008, 117 (18): 2351-2360.
- [44] Whiteman M, Perry A, Zhou Z, et al. Phosphinodithioate and phosphoramidodithioate hydrogen sulfide donors [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 230: 337-363.
- [45] Karwi QG, Whiteman M, Wood ME, et al. Pharmacological postconditioning against myocardial infarction with a slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137 [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 442-451.
- [46] Han X, Mao Z, Wang S, et al. GYY4137 protects against MCAO via p38 MAPK mediated anti-apoptotic signaling pathways in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 158: 59-65.
- [47] Polhemus DJ, Li Z, Pattillo CB, et al. A novel hydrogen sulfide prodrug, SG1002, promotes hydrogen sulfide and nitric oxide bioavailability in heart failure patients [J]. *Cardiovasc Ther*, 2015, 33 (4): 216-226.
- [48] Kondo K, Bhushan S, King AL, et al. H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Circulation*, 2013, 127 (10): 1116-1127.
- [49] Muellner MK, Schreier SM, Laggner H, et al. Hydrogen sulfide destroys lipid hydroperoxides in oxidized LDL [J]. *Biochem J*, 2009, 420 (2): 277-281.
- [50] Wallace JL, Vaughan D, Dickey M, et al. Hydrogen sulfide-releasing therapeutics: translation to the clinic [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28 (16): 1533-1540.
- [51] De Cicco P, Panza E, Ercolano G, et al. ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma development in vivo [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 114: 67-73.
- [52] Cenac N, Castro M, Desormeaux C, et al. A novel orally administered trimebutine compound (GIC-1001) is anti-nociceptive and features peripheral opioid agonistic activity and hydrogen Sulphide-releasing capacity in mice [J]. *Eur J Pain*, 2016, 20 (5): 723-730.

(收稿日期: 2022-04-01; 修回日期: 2022-05-27)

DJ-1 蛋白在程序性细胞死亡中的作用

王英迪¹, 付宇¹, 程润¹, 刘伟洁¹, 缪明星², 颜天华^{1*} (1.中国药科大学基础医学与临床药学院生理教研室, 南京 210009; 2.中国药科大学国家药理学实验教学示范中心, 南京 210009)

摘要: 程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 是由细胞内特定基因调控的分子程序介导的细胞死亡过程, 在多细胞生物的正常发育过程和体内稳态维持中发挥至关重要的作用。*PARK7* 基因, 编码 DJ-1 蛋白, 最初是作为与 *RAS* 基因一起显示转化活性的致癌基因发现的, 后来被鉴定为常染色体隐性早发性帕金森病的致病基因, 在调节 PCD 方面有显著作用。DJ-1 蛋白可通过正负两种方式调节自噬, 通过一系列信号转导途径调节凋亡, 还可调节焦亡、铁死亡等过程, 在神经退行性疾病、癌症和其他疾病中发挥重要作用。本文探讨 DJ-1 蛋白在 PCD 中的作用及分子机制, 可为相关疾病的治疗提供新思路。

关键词: DJ-1 蛋白; 程序性细胞死亡; 治疗

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2343-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.022

Role of DJ-1 protein in programmed cell death

WANG Ying-di¹, FU Yu¹, CHENG Run¹, LIU Wei-jie¹, MIAO Ming-xing², YAN Tian-hua^{1*} (1. Department of Physiology and Pharmacology, College of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, Nanjing 210009; 2. National Pharmacy Experimental Teaching Demonstration Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

Abstract: Programmed cell death (PCD) is a process of cell death mediated by a molecular program regulated by specific genes in the cell. It plays a vital role in the normal development of multicellular organism and the maintenance of homeostasis. The *PARK7* gene, encoding the DJ-1 protein, was originally discovered as an oncogene showing transforming activity together with the *RAS* gene, and was later identified as a causative gene for autosomal recessive early-onset Parkinson's disease, playing a significant role in regulating PCD. DJ-1 can regulate autophagy in both positive and negative ways, and regulate apoptosis through a series of signal transduction pathways, pyroptosis and ferroptosis, playing an important role in neurodegenerative diseases, cancer and other diseases. The role and molecular mechanism of DJ-1 in PCD were discussed in this paper to provide new ideas for the treatment of related diseases.

Key words: DJ-1 protein; programmed cell death; treatment

迄今为止, 已经有至少五种主要的程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 被发现和深入研究, 包括凋亡、自噬或自噬性细胞死亡、坏死性凋亡、焦亡和铁死亡。PCD 受基因或信号转导通路的调控, 对体内平衡的维持发挥着重要作用, 而当 PCD 失调时, 则会引起神经退行性疾病、癌症和一系列其他疾病, 因此针对细胞死亡途径的治疗有着巨大的前景^[1]。

1997 年, Nagakubo 等^[2]发现了一种新的与 c-myc 相互作用的蛋白, 将其命名为 DJ-1 蛋白, 之后越来越多的研究表明该蛋白介导多种信号转导通路, 参与多种细胞死亡方式, 从而影响疾病状态^[3-4]。DJ-1 蛋白与自噬之间的关系在许多研究中已经得到了证明, 即 DJ-1 蛋白对自噬产生正负调节两种相反的作用, 这种差异可能是由于 DJ-1 蛋白在不同细胞类型中的作用不同所致^[4]。

作者简介: 王英迪, 女, 硕士研究生, 主要从事药理学研究, email: 3462679381@qq.com *通信作者: 颜天华, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药理学研究, email: 13016931191@126.com

DJ-1 蛋白已经被证明通过下游调节因子, 如凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)、Akt、死亡域相关蛋白 Daxx 和 P53 等, 防止由多种凋亡刺激物触发的细胞凋亡^[5]。研究发现 DJ-1 蛋白还可对凋亡^[6]、铁死亡^[7]及坏死性凋亡^[8]产生影响。总之, DJ-1 蛋白参与 PCD 过程 (见表 1), 现就 DJ-1 蛋白在 PCD 中的作用进行综述, 以期为靶向 DJ-1 蛋白的药物研发及临床应用提供借鉴。

表 1 DJ-1 蛋白在 PCD 中的作用
Tab 1 Role of DJ-1 protein in PCD

PCD	调节方式 / 机制	作用
自噬	正调节 负调节	清除细胞内有毒物质, 发挥细胞保护作用; 参与肿瘤增殖和耐药
凋亡	PI3K/Akt P53 ASK1 其他	抑制细胞凋亡, 发挥细胞作用, 促进细胞存活及肿瘤耐药
其他	焦亡 铁死亡 坏死性凋亡	负调节 保护细胞 负调节 保护细胞 负调节 保护细胞

1 DJ-1 蛋白概述

1.1 DJ-1 蛋白结构

DJ-1 蛋白由 189 个氨基酸残基组成, 分子量在 20 kDa 左右, 属于 ThiJ/PfpI 超家族, 主要以同型二聚体形式存在, 最初被鉴定为癌基因产物, 后来发现 DJ-1 蛋白的基因 *PARK7* 突变时可导致常染色体隐性早发性帕金森病^[3]。编码 DJ-1 蛋白的基因——*PARK7*, 在人类 1 号染色体 1p36.23 处, 包含 17 个内含子和 7 个外显子, 在小鼠染色体 4E 上发现了基因同源物。当 DJ-1 蛋白的基因发生突变时, 将会影响 DJ-1 蛋白的二聚化、蛋白的稳定性及其他功能, 目前已经发现了 DJ-1 蛋白的几种突变, 包括 M26I、A104T、D149A、E163K 和 L166P 等^[4]。DJ-1 蛋白单体蛋白具有螺旋-折叠-螺旋结构, 包含 11 个 β 链 ($\beta 1 \sim \beta 11$) 和 8 个 α -螺旋 ($\alpha A \sim \alpha H$)。 β -折叠位于结构中心, 分子的一端是 α -螺旋和一个 $\beta 3-4$ 发夹, 另一端是 triple parallel β -折叠^[3-4]。

1.2 DJ-1 蛋白功能

DJ-1 蛋白作为一种高度保守且广泛表达的蛋白质, 在人体胰腺、肾脏、肝脏、睾丸和心脏等器官组织中存在^[3], 具有多种功能, 参与多种生物学过程, 如调节线粒体功能、参与氧化还原平衡、调节凋亡和自噬等。就其分子功能而言, DJ-1 蛋白可介导 PI3K/Akt、ASK1、丝裂原活化蛋白激

酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)、P53 等信号通路, 在细胞存活、抗氧化防御和细胞应激反应中起重要作用^[5]。

1.2.1 氧化还原调节 在氧化应激状态下, DJ-1 蛋白作为一种抗氧化剂, 在对氧化最为敏感的 106 位半胱氨酸 (Cysteine 106, Cys106) 残基处发生氧化。Cys106 可在轻度氧化应激下从还原形式 (Cys106-SH) 氧化为亚硫酸 (Cys106-SO₂H), 并可在更强烈的氧化条件下进一步氧化为磺酸 (Cys106-SO₃H), 使 DJ-1 蛋白的等电点从 6.2 变化至 5.8^[9]。既往研究认为, 线粒体参与许多关键的细胞调控过程, 如活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成, 因此, 确保线粒体功能正常对维持氧化还原平衡至关重要。在生理条件下, DJ-1 蛋白主要存在于细胞质中, 在细胞核和线粒体中仅少量存在, 然而在氧化应激时, DJ-1 蛋白可易位到线粒体的不同部位, 对调节线粒体稳态和功能及对细胞的存活起重要作用^[3-4]。此外, DJ-1 蛋白可以抑制 Nrf2 (抗氧化转录调控因子) 与其抑制剂 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 的相互作用, 从而抑制 Nrf2 的降解, 导致 II 期解毒酶和抗氧化酶的上调^[9]。在缺氧条件下, DJ-1 蛋白还可以稳定缺氧诱导因子 -1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 并增加其转录活性, 从而增加细胞对缺氧应激的抗性^[10]。

1.2.2 MAPK 通路 MAPK 信号通路是调节细胞增殖、分化、凋亡等胞内信号传导的重要通路, 通过高度保守的三级激酶级联传递信号, 包括 MAPK 激酶的激酶 (MAPKKK)、MAPK 激酶 (MAPKK) 和 MAPK^[5]。MAPK 主要包括 3 个亚族: ERK、JNK 和 P38MAPK。DJ-1 蛋白可直接与 c-Raf 结合激活 MEK 和 ERK1/2; 也可作用于 ERK 的上游或直接与 ERK 结合激活 ERK1/2; 还可作用于 P53, 抑制 DUSP1 (一种丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶, 介导 MAPK 去磷酸化) 的表达, 从而激活 ERK1/2^[11]。ASK1 是 MAPKKK, 其下游是 MAPKK, 可以激活 JNK 和 P38MAPK, 在应激诱导的细胞凋亡中起关键作用。DJ-1 蛋白可通过与 ASK1 直接结合、增加 ASK1 抑制剂 Trx1 的表达或在细胞核中与 Daxx 相互作用, 阻止 Daxx 向细胞质转运来抑制 ASK1 活化并减少细胞死亡^[11]。

1.2.3 PI3K/Akt DJ-1 蛋白通过与 10 号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,

PTEN) 结合并抑制其磷酸酶活性来抑制 PTEN 的功能, 使得 PI3K 和 Akt 磷酸化激活, 有利于细胞存活^[9]。DJ-1 蛋白还可在 S/G2 核自身抗原 (SG2NA) 的作用下, 与 Akt 相互作用形成复合物, 促进 Akt 信号传导活性。P53、DJ-1 蛋白和 Akt 之间可能存在复杂的相互调节。P53 能够抑制 DJ-1 蛋白的表达和活化, 而 DJ-1 蛋白能与 P53 结合或通过 PI3K/Akt 途径抑制 P53 活性; P53 通过增加靶基因如 *IGF-BP3* 或 *PTEN* 的转录来负调节 PI3K/Akt 途径, 而 Akt 激活 E3 泛素连接酶 MDM2, 诱导 P53 降解^[5]。此外, DJ-1 蛋白还可通过 PI3K/Akt 信号通路调节其下游凋亡抑制因子 survivin 的表达, 从而抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖^[12]。

1.2.4 P53 P53 调节细胞周期停滞, 诱导细胞凋亡。DJ-1 蛋白通过与 P53 的 DNA 结合区结合来抑制 P53 转录活性; DJ-1 蛋白还可以直接与沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, Sirt1) 结合并激活 Sirt1 的去乙酰酶活性, 随后, Sirt1 作用于 P53 并抑制 P53 的转录。此外, DJ-1 蛋白还可与 Topors/P53BP3 结合, 从而释放 P53 的泛素化形式, 促进 P53 的转录^[13]。

2 DJ-1 蛋白与 PCD

2.1 DJ-1 蛋白与自噬

自噬是将细胞组分或整个细胞器送入到溶酶体中以降解的过程, 是应对细胞应激时的自我保护现象。迄今为止, 已经鉴定了三种不同形式的自噬——大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)^[14]。

2.1.1 DJ-1 蛋白正调节自噬 DJ-1 蛋白通过促进自噬对神经细胞产生保护作用, 并因此改善疾病状态。 α -syn 的沉积是帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的典型病理学特征, 且 α -syn 主要通过 CMA 途径降解, 因此, CMA 的损伤与 PD 的发病机制密切相关。研究表明, 使用 shRNA 敲除溶酶体相关膜蛋白 2A (lysosome-associated membrane protein 2A, LAMP2A) 可使 DJ-1 蛋白表达下调, 使神经元细胞对氧化应激的刺激敏感, 影响神经元稳态; 然而 DJ-1 蛋白表达的下调也可加速 LAMP2A 的降解, 抑制 CMA 途径, 增加 α -syn 的积累^[15-16]。DJ-1 蛋白敲除还使自噬受体蛋白 P62 和细胞自噬蛋白 LC3 的自噬依赖性降解受损, 不仅导致 α -syn 积聚, 还更容易对 α -syn 产生促炎反应, 使炎症因子 IL-6 和 IL-1 β 的分泌增加, 产生神经毒性, 加重 PD^[17]。此外, DJ-1 蛋白还可通过 ERK 途径, 增加自噬水平, 保护

小鼠中脑多巴胺能神经元细胞 (MN9D) 免受鱼藤酮的侵害, 保护神经元^[18]。总之, 这些研究证明了 DJ-1 蛋白在自噬反应中的重要性, 为 PD 治疗策略的发展提供了新的视角。

DJ-1 蛋白上调自噬还可在其他疾病中发挥保护作用。如 Chen 等^[19] 研究表明, DJ-1 蛋白的过表达通过 p-VHL 上调 IKK β 的表达 p-Tau, 逆转了 A β ₁₋₄₂ 抑制的自噬和下调了 A β ₁₋₄₂ 诱导的 P-Tau 蛋白表达, 改善了阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD)。DJ-1 蛋白还可通过 AMPK/mTOR 信号通路上调自噬, 发挥糖尿病大鼠缺血后处理诱导的心脏保护作用^[20]。而 DJ-1 蛋白敲除导致的自噬受损, 可恶化心肌肥厚^[21]。

2.1.2 DJ-1 蛋白负调节自噬 自噬水平的降低与肿瘤密切相关, 许多癌基因产物抑制自噬, 如 DJ-1 蛋白就可抑制自噬。DJ-1 蛋白过表达通过介导 JNK/Bcl2/Beclin1 信号通路, 抑制 JNK 的磷酸化和 Bcl2 的表达, 抑制 Beclin1 和 Bcl2 的解离, 从而抑制自噬过程, 促进肿瘤细胞增殖, 而沉默 DJ-1 蛋白的效果则完全相反^[22]。自噬还可以增强某些肿瘤细胞在化疗期间获得的抵抗力, 从而限制抗肿瘤药物的疗效, 产生化疗耐药性。Zhou 等^[23] 研究表明抗肿瘤药物环吡洛胺 (ciclopirox olamine, CPX) 可下调 DJ-1 蛋白, 激活 AMPK 通路和抑制 mTOR, 诱导结肠直肠癌细胞 (colorectal cancer, CRC) 发生自噬, 发挥细胞保护作用, 促进细胞存活。因此, 靶向 DJ-1 蛋白为肿瘤发生和耐药性的研究提供了新的方向。此外, DJ-1 蛋白过表达还可通过 PTEN/PI3K/Akt 促生存途径通路来抑制自噬, 减少细胞死亡, 降低 C2-神经酰胺诱导的神经毒性^[24]。也可降低 DJ-1 蛋白, 增强自噬, 改善肝缺血再灌注损伤^[25]。

2.2 DJ-1 蛋白与凋亡

细胞凋亡是一个依赖半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 高度调控的细胞死亡过程, 不会引起炎症反应, 有内源性和外源性两种途径^[1]。细胞凋亡的失衡可导致许多疾病, 如凋亡过激会导致神经退行性疾病, 而凋亡功能失活会导致肿瘤不受控制的增殖和耐药。因此, 了解凋亡机制对于开发有效的化学治疗剂非常重要。

2.2.1 DJ-1 蛋白/PI3K/Akt DJ-1 蛋白过表达可能通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路改善线粒体功能, 降低 ROS 的产生, 降低促凋亡蛋白 p-P53 和活化的 caspase-3 的表达, 保护视网膜周细胞免受高糖诱导的凋亡^[26]。DJ-1 蛋白还可调节 HIF-1 α 的表达促进 CRC 细胞在缺氧条件下存活, 而当

DJ-1 蛋白敲除后, 细胞凋亡率明显增加^[10]。DJ-1 蛋白的下调可降低肿瘤细胞中 K-RAS、H-RAS 和 N-RAS 的表达, 其下游通路 ERK1/2 和 Akt 的磷酸化均下降, 且用厄洛替尼处理后, Akt 和 ERK1/2 的磷酸化进一步降低, 细胞凋亡增加^[27]。此外, miR142 还可与 DJ-1 蛋白结合, 抑制 DJ-1 蛋白的表达, 使抗凋亡蛋白 survivin 的表达降低, 从而增加胰腺癌细胞的凋亡, 降低对化疗药的耐药性^[12]。表明 DJ-1 蛋白可通过抑制凋亡来促进肿瘤细胞存活及增强化疗耐药, 因此靶向 DJ-1 蛋白可能为肿瘤的治疗提供新的思路。

2.2.2 DJ-1 蛋白/P53 DJ-1 蛋白可通过与 P53 直接作用来抑制 P53 的转录活性, 降低促凋亡蛋白 Bax 的表达, 抑制 caspase 的活化, 从而抑制细胞凋亡, 发挥细胞保护作用。而 DJ-1 蛋白的敲除则上调了 Bax 蛋白表达并加速了紫外线照射诱导的细胞死亡^[28]。DJ-1 蛋白还可维持结肠炎上皮屏障的稳态, Zhang 等^[29]研究表明炎症性肠病患者和急性结肠炎小鼠模型的肠道 DJ-1 蛋白表达降低, 导致 P53 和 P21 的表达增加, 肠上皮细胞凋亡增加, 从而导致肠上皮屏障的破坏, 加重炎症性肠病。因此, DJ-1 蛋白表达的调节可能是炎症性肠病的潜在治疗策略。此外, 有研究表明白藜芦醇可通过 DJ-1 蛋白/Sirt1/P53 通路, 减少缺氧/复氧诱导的 H9c2 细胞的凋亡, 增强细胞活力, 产生心脏保护作用, 而 DJ-1 蛋白敲除则抵消了白藜芦醇的抗凋亡和心脏保护作用^[30]。

2.2.3 DJ-1 蛋白/ASK1 DJ-1 蛋白是 P38 调节活化蛋白激酶 (P38 regulated/activated protein kinase, PRAK) 的下游相互作用靶点, 在氧化应激反应中, PRAK 可能通过促进 DJ-1 蛋白和细胞核 Daxx 相互作用, 阻止 Daxx 的易位, 从而发挥细胞保护作用, 抑制细胞死亡^[31]。DJ-1 蛋白过表达转染的细胞, 在 H₂O₂ 诱导情况下, 与未转染的细胞相比, DJ-1 蛋白的过度表达抑制了 ASK1 及 P38 MAPK 的激活。Gao 等^[32]研究同样表明 DJ-1 蛋白通过 Akt 磷酸化抑制 P38MAPK 的激活, 对 ROS 诱导的细胞凋亡具有预防作用, 并起到神经保护的作用。

2.2.4 其他 在人子宫内膜癌细胞中发现, DJ-1 蛋白可与 Cezanne 相互作用并负调节 Cezanne, 激活非经典 NF- κ B 通路, 抑制细胞凋亡并促进其增殖^[33]。DJ-1 蛋白与 pro-caspase-8 竞争结合 Fas 相关死亡域蛋白 (Fas-associated protein death domain, FADD) 的 DED 结构域, 通过阻断 FADD 和 pro-caspase-8 之间的相互作用来调节

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 诱导的细胞凋亡^[34], 对 TRAIL 诱导的细胞死亡具有抗性。DJ-1 蛋白上调还可激活 Nrf2 通路, 抑制氧化应激, 保护 SH-SY5Y 细胞免受利多卡因诱导的凋亡, 发挥神经保护作用^[35]; 诱导 Nrf2 依赖的 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 和 Bcl-2 的表达, 促进药物主动外排, 增强细胞的抗凋亡能力^[36]。

综上, DJ-1 蛋白可通过不同的信号通路抑制细胞凋亡发挥细胞保护作用或增加肿瘤细胞的增殖及耐药, 因此, 靶向 DJ-1 蛋白为不同疾病治疗药物的研究提供了方向。

2.3 DJ-1 蛋白与其他 PCD

2.3.1 DJ-1 蛋白与焦亡 与凋亡不同, 焦亡是促炎性的 PCD, 且依赖的是 caspase-1 (经典途径) 和 caspase-4/5/11 (非经典途径)。Ji 等^[37]研究表明 DJ-1 蛋白敲除显著抑制 Nrf2 的表达, 同时促进 NLRP3 的表达, 增加炎症反应, 加重 PD 症状。而脑内 DJ-1 蛋白的过表达可降低氧化应激, 降低 caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的水平, 同时减少转基因小鼠的神经元死亡和 A β 沉积, 并改善认知功能, 但不影响 caspase-3 的表达, 表明 DJ-1 蛋白对 AD 的保护作用可能与抑制焦亡有关^[6]。

2.3.2 DJ-1 蛋白与铁死亡 铁死亡是一种铁依赖性的脂质过氧化物水平积累所致的新的细胞死亡形式。DJ-1 蛋白 C 末端最后 3 个氨基酸 (DJ-1 蛋白 Δ C3) 对其同型二聚化非常重要, 当 DJ-1 蛋白 Δ C3 缺失时, 对由 erastin (一种铁死亡诱导剂) 诱导的脂质 ROS 的积累几乎没有影响, 对铁死亡的抑制作用消除^[38]。DJ-1 蛋白还被证明通过抑制 S-腺苷-同型半胱氨酸水解酶 (SAHH, 在转硫途径中催化 S-腺苷-同型半胱氨酸水解为同型半胱氨酸和腺苷酸) 和 S-腺苷同型半胱氨酸水样蛋白 1 (AHCYL1, 负调节 SAHH) 的相互作用, 恢复 SAHH 的四聚体结构和 SAHH 活性, 维持转硫途径中合成的半胱氨酸水平来降低脂质 ROS, 从而抑制 erastin 诱导的铁死亡^[39]。值得注意的是, DJ-1 蛋白低表达显著增强了体内外肿瘤细胞对铁死亡诱导剂的敏感性, 表明 DJ-1 蛋白可作为肿瘤治疗的潜在靶标, 且靶向 DJ-1 蛋白二聚化的抑制剂可作为肿瘤治疗的新药物。此外, DJ-1 蛋白通过调节 Nrf2/GPX4 信号通路抑制铁死亡, 在子痫前期的发病机制中发挥保护作用^[7]。

2.3.3 DJ-1 蛋白与坏死性凋亡 坏死性凋亡是一种不依赖于 caspase 酶的促炎性细胞死亡。使

用 DJ-1 蛋白 siRNA 转染骨髓瘤细胞后, 测量 caspase-3 活性, 作为凋亡的指标, 但是未观察到 caspase-3 活性的显著增加, 而用 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ necrostatin-1 (坏死性凋亡抑制剂) 处理后, 显著降低了 DJ-1 蛋白 siRNA 转染引起的细胞死亡^[8], 表明 DJ-1 蛋白是通过抑制坏死性凋亡来发挥抗肿瘤作用的。

3 治疗药物

DJ-1 蛋白是一种多功能蛋白, 参与调节多种信号转导通路, 并对不同形式的 PCD 产生影响, 从而影响多种疾病状态。目前, 已有许多靶向 DJ-1 蛋白的药物处于临床试验中, 包括中药和小分子化合物 (见表 2)。

表 2 靶向 DJ-1 蛋白的治疗药物
Tab 2 Therapeutic drugs targeting DJ-1 protein

药物分类	药物名称	作用疾病
中药	姜黄素	肝癌
	迷迭香酸	骨肉瘤
	白藜芦醇	心肌缺血
	肉桂	PD
	苯甲酸钠	创伤性脊髓损伤
	肉苁蓉	PD
	小分子化合物	富马酸二甲酯
双硫仑		多种癌症
N, N, N', N' - 四 (2-吡啶甲基) 乙二胺 (TPEN) / D- α 维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS)		白血病
DPMQ		PD
紫杉醇		乳腺癌
CPX		结直肠癌
UCP0054278		局灶性缺血
ND-13		局灶性缺血
DM10		多种癌症

姜黄素和迷迭香酸是酚类化合物, 可靶向抑制 DJ-1 蛋白的表达, 通过外源性和内源性两种途径诱导细胞凋亡, 还可抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭, 发挥抗肿瘤作用^[40-41]。白藜芦醇可上调 DJ-1 蛋白的表达, 并促进 DJ-1 蛋白与 Sirt1 的相互作用, 恢复 Sirt1 活性和降低 P53 的乙酰化水平, 抑制细胞凋亡, 对心脏起到保护作用^[30]。肉桂可在体内代谢成苯甲酸钠 (natrium benzoate, NaB), 并且能够进入中枢神经系统, 通过上调 DJ-1 蛋白, 在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中发挥神经保护作用, 改善运动功能, 并减少多巴胺能神经元的死亡, 同时使 PD 小鼠模型的黑质和纹状体中的多巴胺水平正常化, 且研究过程中小鼠没有表现出任何药物相关的不良反应^[42]。此外, NaB 还能减轻大鼠创伤性脊髓损伤中 ROS 诱导的神经细

胞凋亡^[32]。肉苁蓉提取物可改善突变型 DJ-1 蛋白转染的 SH-SY5Y 细胞中过氧化氢诱导的神经毒性, 为 PD 的治疗提供可能^[43]。

富马酸二甲酯 (dimethyl fumarate, DMF, 商品名 Tecfidera), 用于治疗复发型多发性硬化症和银屑病, 最近在临床试验用于治疗淋巴瘤和白血病^[44]。DJ-1 蛋白可能是 DMF 的直接靶标, 高浓度的 DMF 降低 DJ-1 蛋白的表达, 引起氧化应激, 发挥抗肿瘤作用^[45]。FDA 批准的一种戒酒药物双硫仑 (disulfiram, DSF) 可以与 DJ-1 蛋白 -Cys 残基的巯基共价结合, 显著抑制 DJ-1 蛋白的功能, 增强不同类型肿瘤细胞中 N- (4-羟苯基) 维生素甲酰胺 [N- (4-hydroxyphenyl) retinamide, 4-HPR] 诱导的凋亡, 从而发挥抗肿瘤作用, 为肿瘤的协同治疗提供选择^[46]。TPEN 和 TPGS 的联合治疗可以显著诱导 DJ-1 蛋白 -Cys106 残基处的氧化, 增加细胞内氧化应激, 从而诱导白血病细胞的凋亡, 为不同类型的白血病患者开发更有效的治疗策略^[47]。DPMQ [2- (二甲基氨基) 苯基亚氨基) 甲基] 喹啉 -8- 醇] 以 Cu^{2+} 依赖性方式稳定 DJ-1 蛋白, 增加 Nrf2 的核转位和 SOD1 的表达, 抑制鱼藤酮或过氧化氢处理后的氧化应激并改善线粒体功能, 降低神经元细胞的凋亡^[48]。紫杉醇和褪黑素联合使用显著降低 DJ-1 蛋白, 减少乳腺癌细胞的迁移和侵袭, 且优于使用单一药物^[49]。环吡酮胺 (ciclopirox, CPX) 是一种合成的抗真菌药物, 能剂量依赖性地降低 DJ-1 蛋白的表达, 从而诱导细胞内 ROS 积累, 促进细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作用^[23]。

通过计算机虚拟筛选技术, Yanagida 等^[50] 发现了一个可以和 DJ-1 蛋白相互作用的小分子化合物 UCP0054278, 可显著地抑制 ROS 的产生, 抑制神经细胞的死亡并改善局灶性缺血损伤。Molcho 等^[51] 基于 DJ-1 蛋白的结构, 设计了一种命名为 ND-13 的肽, 并用 ND-13 处理内皮素 -1 诱导的局灶性缺血小鼠模型, 发现参与调节线粒体功能的几种蛋白质的表达改变, 使线粒体功能恢复, 显著改善小鼠局灶性缺血后的运动功能。同时, 有学者基于 DJ-1 蛋白的同源二聚体结构, 设计合成了一系列双靛红衍生物, 如 DM2、DM4、DM6、DM8、DM10 和 DM12, 其中 DM10 对 DJ-1 蛋白同源二聚体抑制作用最显著, 还可以显著增强 4-HPR 诱导的细胞凋亡和 erastin 诱导的核死亡, 为抗肿瘤药物的协同治疗提供了可能^[52]。

4 小结与展望

细胞不适当的死亡可导致许多疾病的产生, 目

前已经研究了多种疾病状态下细胞的不同死亡方式及死亡机制。DJ-1 蛋白对自噬和凋亡的调节, 可对神经退行性疾病及癌症产生重要影响, DJ-1 蛋白还可调节其他死亡方式, 但目前相关的研究比较少, 还需要进一步研究。已经有许多靶向 DJ-1 蛋白的药物被研究, 尤其是中药, 其不良反应少, 具有很大的临床价值。此外, 体外 DJ-1 蛋白 siRNA 的研究为其辅助治疗选择的潜在应用奠定了基础。总之, DJ-1 蛋白可调控细胞内相关因子的表达, 改变细胞的存活状态, 对疾病的研究及靶向治疗药物的开发和临床应用具有重要意义。

参考文献

- [1] Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2020, 21 (11): 678-695.
- [2] Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231 (2): 509-513.
- [3] Zhang LL, Wang JC, Wang JJ, et al. Role of DJ-1 in immune and inflammatory diseases [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 994.
- [4] Tsoporis JN, Drosatos IA, Gupta S, et al. Cytoprotective mechanisms of DJ-1: implications in cardiac pathophysiology [J]. *Molecules*, 2021, 26 (13): 3795.
- [5] Oh SE, Mouradian MM. Regulation of signal transduction by DJ-1 [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1037: 97-131.
- [6] Cheng L, Zhang W. DJ-1 affects oxidative stress and pyroptosis in hippocampal neurons of Alzheimer's disease mouse model by regulating the Nrf2 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (6): 557.
- [7] Liao T, Xu X, Ye X, et al. DJ-1 upregulates the Nrf2/GPX4 signal pathway to inhibit trophoblast ferroptosis in the pathogenesis of preeclampsia [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 2934.
- [8] Raninga PV, Di Trapani G, Vuckovic S, et al. Targeted knockdown of DJ-1 induces multiple myeloma cell death via KLF6 upregulation [J]. *Apoptosis*, 2016, 21 (12): 1422-1437.
- [9] Huang MX, Chen SD. DJ-1 in neurodegenerative diseases: pathogenesis and clinical application [J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 204: 102114.
- [10] Zheng H, Zhou C, Lu X, et al. DJ-1 promotes survival of human colon cancer cells under hypoxia by modulating HIF-1 α expression through the PI3K-AKT pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 4615-4629.
- [11] Oh SE, Mouradian MM. Cytoprotective mechanisms of DJ-1 against oxidative stress through modulating ERK1/2 and ASK1 signal transduction [J]. *Redox Biol*, 2017, 14: 211-217.
- [12] Han GY, Cui JH, Liang S, et al. Increased miR-142 and decreased DJ-1 enhance the sensitivity of pancreatic cancer cell to Adriamycin [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (22): 11464.
- [13] Cao J, Chen X, Ying M, et al. DJ-1 as a therapeutic target against cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1037: 203-222.
- [14] D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43 (6): 582-592.
- [15] Brekk OR, Makridakis M, Mavroei P, et al. Impairment of chaperone-mediated autophagy affects neuronal homeostasis through altered expression of DJ-1 and CRMP-2 proteins [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2019, 95: 1-12.
- [16] Xu CY, Kang WY, Chen YM, et al. DJ-1 inhibits α -synuclein aggregation by regulating chaperone-mediated autophagy [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 308.
- [17] Nash Y, Schmukler E, Trudler D, et al. DJ-1 deficiency impairs autophagy and reduces alpha-synuclein phagocytosis by microglia [J]. *J Neurochem*, 2017, 143 (5): 584-594.
- [18] Gao H, Yang W, Qi Z, et al. DJ-1 protects dopaminergic neurons against rotenone-induced apoptosis by enhancing ERK-dependent mitophagy [J]. *J Mol Biol*, 2012, 423 (2): 232-248.
- [19] Chen WP, Zhang G, Cheng ZJ, et al. Inhibitor Kappa B Kinase β , modulated by DJ-1/p-VHL, reduces phosphorylated Tau (p-Tau) accumulation via autophagy in Alzheimer's Disease model-ScienceDirect [J]. *Neuroscience*, 2021, 452: 1-12.
- [20] Zhao B, Lei S, Xue R, et al. DJ-1 overexpression restores ischaemic post-conditioning-mediated cardioprotection in diabetic rats: role of autophagy [J]. *Clin Sci*, 2017, 131 (11): 1161-1178.
- [21] Xue RC, Jiang JZ, Dong B, et al. DJ-1 activates autophagy in the repression of cardiac hypertrophy [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 633: 124-132.
- [22] Qin XC, Lu AM, Ke ML, et al. DJ-1 inhibits autophagy activity of prostate cancer cells by repressing JNK-Bcl2-Bcl-1 signaling [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44 (4): 937-946.
- [23] Zhou J, Zhang L, Wang M, et al. CPX targeting DJ-1 triggers ROS-induced cell death and protective autophagy in colorectal cancer [J]. *Theranostics*, 2019, 9 (19): 5577-5594.
- [24] Jaramillo-Gómez J, Nino A, Arboleda H, et al. Overexpression of DJ-1 protects against C2-ceramide-induced neuronal death through activation of the PI3K/AKT pathway and inhibition of autophagy [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 603: 71-76.
- [25] Xu M, Hang HL, Huang M, et al. DJ-1 deficiency in hepatocytes improves liver ischemia-reperfusion injury by enhancing mitophagy [J]. *Cell Mol Gastroenterol*, 2021, 12

- (2): 567-584.
- [26] Zeng J, Zhao H, Chen BH, et al. DJ-1/PARK7 inhibits high glucose-induced oxidative stress to prevent retinal pericyte apoptosis via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2019, 189: 107830-107830.
- [27] He XY, Sun YW, Fan R, et al. Knockdown of the DJ-1 (PARK7) gene sensitizes pancreatic cancer to erlotinib inhibition [J]. *Mol Ther-Oncolytics*, 2021, 20: 364-372.
- [28] Fan J, Ren HG, Jia NL, et al. DJ-1 decreases Bax expression through repressing p53 transcriptional activity [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (7): 4022-4030.
- [29] Zhang J, Xu M, Zhou WH, et al. Deficiency in the anti-apoptotic protein DJ-1 promotes intestinal epithelial cell apoptosis and aggravates inflammatory bowel disease via p53 [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295 (13): 4237-4251.
- [30] Xu RY, Xu XW, Deng YZ, et al. Resveratrol attenuates myocardial hypoxia/reoxygenation-induced cell apoptosis through DJ-1-mediated SIRT1-p53 pathway [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2019, 514 (2): 401-406.
- [31] Tang J, Liu JH, Li X, et al. PRAK interacts with DJ-1 and prevents oxidative stress-induced cell death [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 735618.
- [32] Gao LS, Zhang ZY, Xu WL, et al. Natrium benzoate alleviates neuronal apoptosis via the DJ-1-related anti-oxidative stress pathway involving Akt phosphorylation in a rat model of traumatic spinal cord injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 42.
- [33] Zhu QZ, Liu HY, Zhao XY, et al. DJ-1 activates the noncanonical NF- κ B pathway via interaction with Cezanne to inhibit the apoptosis and promote the proliferation of Ishikawa cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48 (8): 6075-6083.
- [34] Fu K, Ren H, Wang Y, et al. DJ-1 inhibits TRAIL-induced apoptosis by blocking pro-caspase-8 recruitment to FADD [J]. *Oncogene*, 2012, 31 (8): 1311-1322.
- [35] Xue Y, Wang AZ. DJ-1 plays a neuroprotective role in SH-SY5Y cells by modulating Nrf2 signaling in response to lidocaine--mediated oxidative stress and apoptosis [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36 (8): 630-639.
- [36] Qiu LJ, Ma ZX, Li XR, et al. DJ-1 is involved in the multidrug resistance of SGC7901 gastric cancer cells through PTEN/PI3K/Akt/Nrf2 pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52 (11): 1202-1214.
- [37] Ji YJ, Wang HL, Yin BL, et al. Down-regulation of DJ-1 augments neuroinflammation via Nrf2/Trx1/NLRP3 Axis in MPTP-induced Parkinson's disease mouse model [J]. *Neuroscience*, 2020, 442: 253-263.
- [38] Jiang L, Chen XB, Wu Q, et al. The C terminus of DJ-1 determines its homodimerization, MGO detoxification activity and suppression of ferroptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (7): 1150-1159.
- [39] Cao J, Chen X, Jiang L, et al. DJ-1 suppresses ferroptosis through preserving the activity of S-adenosyl homocysteine hydrolase [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 1251.
- [40] Ma Z, Yang J, Yang Y, et al. Rosmarinic acid exerts an anticancer effect on osteosarcoma cells by inhibiting DJ-1 via regulation of the PTEN-PI3K-Akt signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153186.
- [41] Han L, Wang Y, Sun S. Curcumin inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells through down regulation of DJ-1 [J]. *Cancer Biomark*, 2020, 29 (1): 1-8.
- [42] Khasnavis S, Pahan K. Cinnamon treatment upregulates neuroprotective proteins parkin and DJ-1 and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Neuroimmune Pharm*, 2014, 9 (4): 569-581.
- [43] An C, Pu X, Wang Q, et al. Cistanche extracts ameliorates the neurotoxicity induced by hydrogen peroxide in new mutant DJ-1-transfected neuroblastoma cellular models [J]. *Brain Behav*, 2019, 9 (7): e01304.
- [44] Jin W. Novel insights into PARK7 (DJ-1), a potential anti-cancer therapeutic target, and implications for cancer progression [J]. *J Clin Med*, 2020, 9 (5): 1256.
- [45] Saidu NE, Noé G, Cerles O, et al. Dimethyl fumarate controls the NRF2/DJ-1 axis in cancer cells: therapeutic applications [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16 (3): 529-539.
- [46] Wu Q, Zhang M, Wen Y, et al. Identifying chronic alcoholism drug disulfiram as a potent DJ-1 inhibitor for cancer therapeutics [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 926: 175035.
- [47] Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Combinational treatment of TPEN and TPGS induces apoptosis in acute lymphoblastic and chronic myeloid leukemia cells in vitro and ex vivo [J]. *Med Oncol*, 2022, 39 (7): 1-11.
- [48] Chin TY, Wang CC, Ma KH, et al. Antioxidative effect of DJ-1 is enhanced in NG108-15 cells by DPMQ-induced copper influx [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320 (4): C635-C651.
- [49] El-Sokkary GH, Ismail IA, Saber SH. Melatonin inhibits breast cancer cell invasion through modulating DJ-1/KLF17/ID-1 signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (3): 3945-3957.
- [50] Yanagida T, Kitamura Y, Yamane K, et al. Protection against oxidative stress-induced neurodegeneration by a modulator for DJ-1, the wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7 [J]. *Pharmacol Sci*, 2009, 109 (3): 463-468.
- [51] Molcho L, Ben-Zur T, Barhum Y, et al. DJ-1 based peptide, ND-13, promote functional recovery in mouse model of focal ischemic injury [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (2): e0192954.
- [52] Chen XB, Zhu HY, Bao K, et al. Bis-isatin derivatives: design, synthesis, and biological activity evaluation as potent dimeric DJ-1 inhibitors [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (7): 1160-1170.

(收稿日期: 2022-03-20; 修回日期: 2022-06-19)

北沙参真伪鉴定和质量评价方法研究进展

刘言娟¹, 薛涛¹, 辛杰¹, 董红敬², 张文玉¹, 张效振¹, 于元帅¹, 张波^{1*}, 李新朋^{1*} (1. 临沂大学药学院, 山东 临沂 276005; 2. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省分析测试中心, 山东省大型精密分析仪器应用技术重点实验室, 济南 250014)

摘要: 北沙参药理活性丰富, 属于常用中药材, 且是“药食同源”中药材之一, 是我国主要出口创汇中药材产品之一。但《中国药典》对北沙参没有明确的质量控制指标, 且鉴别方法简单, 亟待完善。因此, 加强北沙参的真伪鉴定和质量评价方法研究, 对于保障北沙参质量, 进而保障其临床用药的安全有效及促进其国际贸易均具有重要意义。本文分别从性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定和分子鉴定等方面对其真伪鉴定方法进行了总结, 并对北沙参的品质优劣评价方法(如薄层色谱法、紫外分光光度法、高效液相色谱法、指纹图谱法和气相色谱-质谱联用技术等)进行了概括, 同时就北沙参的重金属及农药残留等安全性评价方法进行了介绍, 以期为其相关研究及应用提供参考。

关键词: 北沙参; 真伪鉴定; 品质优劣评价; 安全性评价

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2350-07
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.023

Research progress in identification and quality evaluation of *Glehniae Radix*

LIU Yan-juan¹, XUE Tao¹, XIN Jie¹, DONG Hong-jing², ZHANG Wen-yu¹, ZHANG Xiao-zhen¹, YU Yuan-shuai¹, ZHANG Bo^{1*}, LI Xin-peng^{1*} (1. School of Pharmacy, Linyi University, Linyi Shandong 276005; 2. Key Laboratory for Applied Technology of Sophisticated Analytical Instruments of Shandong Province, Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014)

Abstract: *Glehniae Radix* is a common traditional Chinese medicine (TCM) as well as food. It has many pharmacological activities and is a main TCM for export. However, there is no quality evaluation method of it in Chinese pharmacopoeia. The identification also needed improvement. Thus, it is important to establish the quality control methods of *Glehniae Radix*, to ensure the safety of clinical use and to promote its international trade. This paper summarized the identification methods of *Glehniae Radix* including morphological identification, microscopic identification, physiochemical identification and molecular identification. Evaluation methods such as thin-layer chromatography, ultraviolet spectroscopy, high performance liquid chromatography, fingerprint chromatography and gas chromatography-mass spectrometry were also concluded. Finally, the detection methods for heavy metals and pesticide residues detection used for *Glehniae Radix* were introduced to provide reference for the standard construction of *Glehniae Radix*.

Key words: *Glehniae Radix*; identification; quality evaluation; safety evaluation

北沙参为伞形科植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 的干燥根, 具有养阴清肺、益胃生津之功, 中医临床多用其治疗劳嗽痰血、肺热燥咳, 胃阴不足, 咽干口渴, 热病津伤等

基金项目: 山东省自然科学基金联合基金 (No.ZR2021LZY030); 山东省自然科学基金面上项目 (No.ZR2020MC019); 山东省重大科技创新工程项目 (No.2021CXGC010508)。

作者简介: 刘言娟, 女, 讲师, 博士, 主要从事中药质量控制与资源研究, email: liuyanjuan@lyu.edu.cn *通信作者: 张波, 男, 副教授, 博士, 主要从事中药质量控制与品质评价, email: zhangboyxy@lyu.edu.cn; 李新朋, 男, 讲师, 博士, 主要从事中药多糖活性研究, email: lixinpeng@lyu.edu.cn

症^[1]。现代研究表明,北沙参具有多糖类、香豆素类、木脂素类、单萜、聚炔类、黄酮类及脂肪酸类等多种化学成分^[2],且具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、免疫调节等多种药理活性^[3]。

北沙参多生于海边沙滩土质,北自辽宁,南至海南,分布十分广泛。目前,北沙参多以栽培为主,山东莱阳、内蒙古赤峰和河北安国为北沙参的三大主产区,其中山东莱阳为其道地产区^[4]。北沙参不仅是常用中药,也是常用蒙药,同时还是“药食同源”药材之一,且一直是出口日本、韩国和东南亚等地区的主要出口创汇中药材之一^[5]。因此,加强北沙参的真伪鉴定和质量评价方法研究,对保障北沙参的临床安全有效以及促进北沙参的国际贸易均具有重要意义。但在 2020 年版《中国药典》^[1]中对北沙参的鉴定要求仅有性状鉴定和显微鉴定,没有质量评价方法的规定,难以满足北沙参的质量控制需要。鉴于以上因素,本文分别从北沙参的真伪鉴定方法、品质优劣评价方法和安全性评价方法等三个角度对北沙参进行文献综述,以期提供有益参考。

1 真伪鉴定方法

“沙参”之名始见《神农本草经》,而“北沙参”首见《本草汇言》,两者产地、植物形态和功效均有一定差异,后经学者考证^[6-8],原“沙参”实为今之南沙参[桔梗科植物轮叶沙参 *Adenophora tetraphylla* (Thunb.) Fisch 或沙参 *Adenophora stricta* Miq. 的干燥根],“北沙参”则为伞形科植物珊瑚菜 (*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.) 的干燥根。但在临床上,南、北沙参仍有混淆,且与其性状相似者,如明党参 (*Changium smyrnioides* Wolff)、川明参 (*Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan)、田贡蒿 (*Carum buiriaticum* Tcz.)、迷果芹 [*Sphallerocarpus gracilis* (Bess.) K. Pol.]、硬阿魏 (*Ferul abungeana* Kitag.)、绳子草 (*Silene tatarinowii* Regel) 等植物的干燥根也会造成误用或混用,甚至冒充北沙参正品销售,给北沙参的药材质量和临床应用带来了较大隐患。真伪鉴定是质量保障的第一步,目前北沙参的鉴定方法主要包括性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定和分子鉴定等。

1.1 性状鉴定

通过对比北沙参及其常见混伪品的性状鉴定特征(见表 1)可知,在药材的性状、大小及其表面颜色等方面,北沙参及其混伪品较为相似,不易区分。表皮特征上北沙参“有纵沟和纵皱纹,且有棕黄色点状细根痕”,而明党参、川明参、

绳子草等药材表皮偏光滑;此外,南沙参、川明参、田贡蒿、迷果芹等根头部或下部可见“环状纹理”,但北沙参没有此特征,是重要的鉴别特征之一。北沙参“断面木部呈黄色,质地脆易折断,气特异”等性状特征也与其混伪品有一定差异。可见,通过综合比较表皮特征、断面特征、质地及其气味等可实现北沙参及其混伪品的真伪鉴定。

1.2 显微鉴定

北沙参粉末呈黄白色,粉末中主要可见网纹导管、分泌道细胞(内含黄色块状分泌物)和糊化淀粉粒(不规则块状,多存在于薄壁细胞中),这些显微特征与明党参、川明参、田贡蒿、迷果芹等均较相似,不易区分;但南沙参、硬阿魏、绳子草等无分泌道细胞,可据此实现与这 3 种混伪品的区分^[9-12]。

1.3 理化鉴定

将北沙参及其伪品通过乙醚浸提后,过滤,蒸干,用氯仿复溶作为供试液,同时以欧前胡素为对照品,在硅胶 G 薄层板上展开,展开剂为石油醚-乙酸乙酯(3:1),于 365 nm 下检视,仅北沙参可见与欧前胡素相应的荧光斑点,而明党参、川明参、田贡蒿、迷果芹及硬阿魏等无此现象,可作为北沙参的理化鉴别特征^[9-10]。

1.4 分子鉴定

相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)主要基于基因外显子含有丰富的核苷酸 G 和 C,而启动子和内含子含有较多核苷酸 A 和 T 这一特征,通过引物设计和扩增后,不同个体启动子、内含子与间隔区长度不等而产生多态性^[13]。齐树杰等^[14]构建了北沙参的 SRAP 反应体系,其中北沙参 DNA 量为 80 ng, Mg²⁺、dNTPs 的浓度分别为 2.5 mmol·L⁻¹、0.25 mmol·L⁻¹, Taq DNA 聚合酶 1 U, 正反向引物浓度均为 0.1 μmol·L⁻¹, 该体系为北沙参遗传多样性的分析和真伪鉴定等提供了参考。

内部转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2) 序列是常用的 DNA 条形码通用序列之一,具有较高的种间鉴别能力^[15]。研究基于 ITS2 引物对北沙参 DNA 提取物进行 PCR 扩增,然后进行基因测序,并建立了 K2P 模型(Kimura 双参数遗传距离)NJ 树,通过遗传距离大小差异可实现北沙参与南沙参、党参、川明参、祁木香等伪品的鉴定^[16-17]。

相较于性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定而言,

表 1 北沙参与其常见混伪品性状鉴定特征表

Tab 1 Characters of *Glehniae Radix* and common counterfeits

名称	形状	大小	表面颜色	表皮特征	断面特征	质地	气味	文献
北沙参	长圆柱形偶有分枝	长 15 ~ 45 cm 直径 0.4 ~ 1.2 cm	淡黄白色； 不去皮者 黄棕色	有纵皱纹和纵沟，并有棕黄色点状细根痕；顶端常留有黄棕色根茎残基	断面皮部浅黄白色，木部黄色	质脆易折 断	气特异味微甘	[1]
南沙参	圆锥形或圆柱形略弯曲	长 7 ~ 27 cm 直径 0.8 ~ 3 cm	黄白色或淡 棕黄色	凹陷处常有残留粗皮，上部多有深陷横纹，呈断续的环状，下部有纵纹和纵沟	断面不平整，黄白色，多裂隙	体轻质松 泡	气微微味甘	[1]
明党参	细长圆柱形、长纺锤形或不规则条块	长 6 ~ 20 cm 直径 0.5 ~ 2 cm	黄白色或淡 棕色	光滑或有纵沟纹和须根痕，有的具有红棕色斑点	角质样，皮部较薄，黄白色，木部类白色	质硬脆	气微味淡	[1]
川明参	长圆条形	长 7 ~ 30 cm 直径 0.8 ~ 1.2 cm	黄棕色至淡 黄棕色	略光滑，有极稀疏环状纹理，环纹凹陷处下方常见粗皮	黄白色，内心有数圈白色透明的层状环纹，中央略显白色	质硬不易 折断	气微味微甜	[9-10]
田贡蒿	长圆柱形	长 8 ~ 20 cm 直径 0.5 ~ 1.5 cm	黄白色	有残存的浅棕色外皮，根头较细，可见密集环纹，顶端残存淡棕色纤维状叶基	角质样，皮部黄白色，易与木部剥离，木部浅黄色	质硬脆	气特异味淡、微甜	[9-10]
迷果芹	长圆柱形	长 8 ~ 20 cm 直径 0.5 ~ 2 cm	黄白色	根头顶端钝圆，密集环纹，顶端可见茎残基；全体有明显纵皱纹和横长皮孔样突起	断面乳白色	质硬易折 断	气微，具胡萝卜样香气，味淡、微甜	[10-11]
硬阿魏	长圆柱形	长 8 ~ 20 cm 直径 0.5 ~ 2 cm	黄白色；未 去皮者淡 黄棕色	有纵皱纹和横长皮孔样突起	断面乳白色	体轻、质 脆易折 断	气微味淡	[10-11]
绳子草	长圆柱形	长 10 ~ 15 cm 直径 0.2 ~ 0.8 cm	类白色或淡 黄白色	光洁细腻，偶有灰棕色栓皮残存，有点状皮孔样突起及纵沟	断面类白色或淡黄白色，皮部薄，有的与木部分离	质硬脆易 折断	气微、嚼之微 有香气	[10-11]

北沙参分子鉴定技术鉴定结果准确性更高，样品量需求低，且该技术适用于生药、饮片及其炮制品和中成药等多种形式样品的鉴定，是现阶段中药鉴定领域的研究热点。

1.5 其他鉴定方法

石俊英等^[18]以北沙参中的可溶性蛋白质和过氧化物酶（peroxidase, POD）同工酶为鉴定指标，分别建立了北沙参蛋白质和 POD 同工酶的 PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）指纹图谱，用以鉴别 3 种不同的北沙参农家品种，结果发现北沙参蛋白质电泳指纹图谱和 POD 同工酶电泳指纹图谱均有一定差异，可通过谱带数量和谱带位置差异准确区分这 3 个品种。

郭怀忠等^[19]以北沙参中的多糖为研究对象，通过将多糖降解成寡糖，建立了寡糖的毛细管区带电泳特征图谱，进一步对图谱信息进行聚类分析，结果发现北沙参单独聚为一类，该方法可实现北沙参与南沙参、党参、黄精、玉竹、天门冬等药材的区分。多糖类成分是中药的重要活性成分之一，其多作为质量评价的指标，而基于寡糖指纹图谱技术的中药鉴定方法研究为中药鉴定提供了新思路。

2 品质优劣评价

北沙参为临床常用中药材之一，是沙参麦冬汤、益胃汤、一贯煎、桑杏汤等古代经典明方的重要组成部分^[20]，但 1963—2020 年间历版《中国药典》均没有明确北沙参的质量评价依据，导致北沙参的质量评价缺乏法定标准。针对此问题，诸多学者通过薄层色谱法（TLC）、紫外可见分光光度法（UV）、高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）、指纹图谱技术和其他技术开展了北沙参的质量评价，可为法定标准的制定提供参考。

2.1 TLC 检测法

法卡林二醇具有抗炎、抗菌和抗乳腺癌等药理作用^[21]，是北沙参的活性成分之一。平晓秋^[22]建立了北沙参中法卡林二醇的薄层扫描测定方法，北沙参经甲醇提取后挥干，用水溶解，然后用乙酸乙酯萃取，萃取液为供试品；以硅胶 H 板为固定相，氯仿:乙酸乙酯:甲醇（24 : 2 : 0.2）为展开剂，浓硫酸溶液（含 1% CeSO₄）为显色剂，经薄层扫描结果发现法卡林二醇 R_f 为 0.33，且在 1.2 ~ 34.8 μg 内线性良好，该方法可用于北沙参中法卡林二醇的含量测定。

2.2 UV 检测法

UV 检测法多用于一类成分的总量测定, 可从宏观层面对药材质量进行评价, 具有简便、快速等优点。香豆素类成分是北沙参中的主要化学成分之一, 苏柯萌等^[23]以总香豆素含量为北沙参质量评价指标, 建立了以补骨脂素为对照品的 UV 法以测定总香豆素含量, 该方法线性范围为 3.07 ~ 13.31 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经检测, 22 批北沙参样品中总香豆素的含量范围为 1.18 ~ 2.73 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 且以河北产北沙参的总香豆素含量较高。

北沙参多糖具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、免疫调节等多种药理活性^[24-25], 黄贤荣等^[26]建议增加“多糖含量测定”作为北沙参质量评价的依据之一, 并采用硫酸蒽酮染色-UV 检测法探讨了不同加工方式对北沙参多糖含量的影响, 结果发现北沙参多糖含量丰富, 其中晒干品多糖含量最高 (79.3%), 且未水洗并带皮的北沙参较水洗或去皮的北沙参多糖含量高。

2.3 HPLC 检测法

HPLC 具有灵敏度高、重复性好、检测结果准确、自动化能力强等优势, 在中药质量评价领域应用广泛。而基于 HPLC 开展的北沙参质量评价方法研究 (见表 2) 多以香豆素类成分 (补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前

胡素、蛇床素等) 为指标^[27-32], 其次为炔萜类成分 [法卡林二醇、人参炔醇、(8E)-1, 8-heptadecadiene-4, 6-diyne-3, 10-diol]^[30, 33] 及腺苷^[34] 等。

此外, HPLC 还可与质谱串联 (HPLC-MS), 将 HPLC 的高效分离能力与质谱的高灵敏度、结构信息丰富的优点相结合, 可提高 HPLC 的检测灵敏度或实现多成分的同时检测^[35]。徐智宇等^[36]建立了北沙参中欧前胡素和异欧前胡素的 HPLC-MS 含量测定方法, 该检测方法对这两种成分的检测范围为 10 ~ 5000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其灵敏度较常规 HPLC 检测方法提高了约 10 倍。Yang 等^[37]建立的 HPLC-MS 检测方法可实现北沙参中 15 种化学成分的同时检测, 包括腺苷、东莨菪亭、花椒毒素、花椒毒醇、补骨脂素、异茴芹内酯、佛手柑内酯、氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、蛇床素、绿原酸、咖啡酸、香草酸和阿魏酸等, 极大地提高了北沙参质量评价的全面性。

HPLC 及 HPLC-MS 技术在北沙参的质量评价中优势明显, 但目前仍未明确北沙参质量控制的指标性成分, 而从现有的研究中可知, 欧前胡素既可用于北沙参的理化鉴别又是其主要活性成分之一, 因此其作为质量评价的潜质较大, 可尝试建立基于 HPLC 检测欧前胡素的质量评价体系。

表 2 HPLC 检测北沙参中的化学成分信息表
Tab 2 HPLC determination of chemical components in Glehniae Radix

检测方法	目标成分	色谱柱	流动相	波长 / 柱温 / 文献
				nm / °C
HPLC-DAD	补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素、蛇床素	Ultimate C ₁₈ (250 mm×4 mm, 5 μm)	乙腈:水, 梯度洗脱	310 30 [27]
HPLC-UV	补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素	Hypersil C ₁₈ (250 mm×4 mm, 5 μm)	乙腈: 0.1% 磷酸, 梯度洗脱	295 30 [28]
HPLC-DAD	补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素、蛇床素	Kinetex core shell C ₁₈ (50 mm×4.6 mm, 2.6 μm)	乙腈:水, 梯度洗脱	310 30 [29]
HPLC-UV	补骨脂素、花椒毒素、欧前胡素、异欧前胡素、法卡林二醇、人参炔醇、(8E)-1, 8-heptadecadiene-4, 6-diyne-3, 10-diol	Agilent SB C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	乙腈:水, 梯度洗脱	250 30 [30]
HPLC-DAD	补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素	Agilent C ₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)	甲醇:水, 梯度洗脱	250 30 [31]
HPLC-DAD	补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素	Phenomenex C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	甲醇:水 (65 : 35)	248 30 [32]
HPLC-DAD	法卡林二醇、人参炔醇	SinoChrom C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	乙腈: 0.3% 磷酸水, 梯度洗脱	254 25 [33]
HPLC-DAD	腺苷	Discovery C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	甲醇:水 (15 : 85)	260 未明确 [34]

2.4 GC-MS 检测法

不同产地的北沙参所含挥发油类成分的含量及其成分组成差异明显, 可作为产地质量评价的依据之一^[38]。王辉明等^[39]利用 GC-MS 技术分析

比较了山东莱阳、内蒙古赤峰和河北安国 3 个产地的北沙参挥发油成分, 结果山东莱阳产北沙参挥发油含量最高, 内蒙古赤峰北沙参最低, 且从 3 个产地的北沙参中分别鉴定出 15 个、27 个和

18 个化合物, 其中镰叶芹醇是三者共有且相对含量最高的化合物。

此外, 王辉明等^[40]还利用 GC-MS 分析比较了山东莱阳、河北安国、内蒙古赤峰 3 个主产地北沙参的脂肪酸差异, 发现 3 个产地北沙参的脂肪酸种类相近, 而亚油酸、棕榈酸和油酸是北沙参主要的脂肪酸类成分, 占脂肪酸总量的 80% 以上。

2.5 指纹图谱

对于中药化学成分复杂且活性成分未知等问题, 采用一种或一类化学成分来评价药材质量有所片面, 而指纹图谱技术可从多化学成分角度对中药进行评价, 具有全面性、重现性和特征性等特点, 在国内外中药质量评价领域具有较高认可度^[41]。目前, 针对北沙参的指纹图谱研究有 TLC 指纹图谱^[42]、HPLC 指纹图谱^[43-44]、磁共振 (NMR) 指纹图谱^[45-46]等。

苏星等^[42]采用 TLC 法对 13 批次不同采集地的北沙参药材进行分析, 采用双波长扫描法 (260 nm 为参比波长, 300 nm 为检测波长) 进行扫描, 结果发现 13 批样品有 8 个共有峰, 其中 4 个分别为法卡林二醇、东莨菪素、异欧前胡素和伞形花内酯, TLC 技术操作简单、成本低廉, 是一种便于推广的北沙参质量评价方法。

相较于 TLC 法, HPLC 检测法的灵敏度、重复性、稳定性和准确性更高。郑旭光等^[43]采用 HPLC-PDA 法建立了河北产北沙参的指纹图谱, 结果从 13 批道地药材中确立了 17 个共有峰, 并指认了补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和异欧前胡素等 5 个成分, 13 批道地药材相似度均在 0.9 以上, 而与其他产地北沙参相似度均小于 0.39, 该指纹图谱为北沙参药材产地鉴定提供了有益参考。苏本正等^[44]利用 HPLC-ELSD 技术建立了北沙参多糖类成分的指纹图谱, 通过对 10 批次不同来源的北沙参进行检测, 共确立了 6 个共有峰, 且 10 批北沙参的相似度较好 (平均 0.98), 说明该指纹图谱可作为北沙参的质量评价依据之一。

NMR 图谱信息量多、重现性好, 因此基于 NMR 建立的指纹图谱具有全面性好、重现性高、特征性强等优点^[45]。时新刚等^[46]建立了北沙参的¹H-NMR 指纹图谱, 从图谱中共确定了 21 个特征峰, 其中 $\delta 3 \sim \delta 4$ 的信号特征最为明显, 4 批北沙参¹H-NMR 指纹图谱相似度均大于 0.88。刘静等^[47]则是建立了北沙参的¹³C-NMR 指纹图谱, 共确定了 17 个特征峰, 均集中在 $\delta 104 \sim \delta 81$ 和 $\delta 177 \sim \delta 115$,

4 批北沙参¹³C-NMR 指纹图谱相似度均大于 0.80。

2.6 其他

刘曼等^[48]采用未涂层融硅石英毛细管柱, 并以硼砂溶液 - 十二烷基磺酸钠 - 15% 乙腈为缓冲液, 建立了可同时检测北沙参中 5 种香豆素类成分 (补骨脂素、异茴芹内酯、花椒毒素、东莨菪内酯、佛手柑内酯) 的胶束电动毛细管电泳法, 该方法可在 7 min 内完成 5 种成分的快速测定, 简便高效。

李宝国等^[49-50]以北沙参中的氨基酸为研究对象, 通过氨基酸自动分析仪对不同产地和不同加工方法的北沙参药材进行了比较研究发现: ① 不同产地北沙参均含有 19 种氨基酸, 但氨基酸总量和组成比例差异显著, 其中山东莱阳产北沙参氨基酸总含量最高, 且以精氨酸含量产地差异最为显著^[49]; ② 在带皮烘干、带皮晒干、烫去皮晒干等不同加工方法中, 以烫去皮后晒干的加工炮制方法氨基酸总量最高^[50]。

3 安全性评价

北沙参野生资源匮乏, 现在多以栽培为主, 但过度追求产量和经济效益而滥用农药的问题也时有发生, 李乌云塔娜等^[51]采用 Elite-1701 毛细管色谱柱联合 ECD 检测器建立了北沙参中 9 种有机氯农药残留的 GC 检测方法, 该方法对有机氯的检测范围为 $1.5 \sim 250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 通过对 8 批样品的检测发现北沙参均有不同程度的有机氯农药残留。此外, 由于生长环境污染或加工不当也会引起重金属污染, 叶国华等^[52]分别采用火焰原子吸收法、石墨炉原子吸收法和原子荧光光谱法对不同产地的北沙参中的铜、铅、镉、砷、汞等 5 种重金属进行了检测, 发现部分产区北沙参铅、镉含量高于国家标准。可见, 在北沙参栽培及加工过程中应重视农药残留及重金属超标等问题, 以保证药材的安全性。

4 总结

现有北沙参真伪鉴定方法包括性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别、分子鉴别及电泳鉴别技术等。在性状鉴别中北沙参的“表面特征”和“断面特征”与其混伪品有一定差异, 可作为主要鉴别特征; 显微鉴别中, 北沙参含网纹导管、分泌道细胞和糊化淀粉粒三大主要特征; 理化鉴别可以欧前胡素为对照品进行鉴别; 分子鉴别技术目前主要基于 SRAP 和 ITS2 两种鉴别手段; 此外, 还可以北沙参中的蛋白质或多糖差异为切入点, 通过电泳技术予以鉴别。

北沙参的质量评价方法包括 TLC 法、UV 法、HPLC 法、GC-MS 法和指纹图谱技术等。而这些技术多以香豆素类成分为评价依据，其次为多糖类成分、挥发油性成分以及少部分呋喃类成分。此外，北沙参存在一定的有机氯农药残留和重金属残留超标问题，在栽培管理和应用过程中应加以重视。

综上，为保障北沙参的质量，在现有《中国药典》的结构框架上建议在北沙参标准中添加 TLC 鉴别方法，以及水浸出物含量测定（主要检测多糖）和 HPLC 法（主要检测香豆素类成分）作为质量评价方法。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 105.
- [2] 李彩峰, 伊乐泰, 李旻辉. 北沙参化学成分及影响因素研究进展[J]. 中药材, 2019, 42(7): 1697-1701.
- [3] Yang M, Li X, Zhang L, et al. Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus *Glehnia*: a systematic review [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 1253493.
- [4] 崔宁, 高婷, 孟祥霄, 等. 北沙参无公害栽培技术体系研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(12): 2956-2961.
- [5] 王智超. 安国百种出口中药材中重金属镍的含量分析及出口贸易措施的建议[D]. 保定: 河北大学, 2019.
- [6] 邱玢, 胡艳红, 严孜, 等. 南、北沙参的本草考证[J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(5): 89-92.
- [7] 陈苇, 李玉丽, 文维农, 等. 沙参本草沿革及其临床应用[J]. 中医学报, 2020, 35(8): 1656-1659.
- [8] 许保海, 赵惠萍, 李静. 北沙参本草考证及道地产地探源[J]. 中国药业, 2017, 26(23): 28-30.
- [9] 王琳. 北沙参及其混淆品的鉴别[J]. 中国医药指南, 2012, 10(35): 14-16.
- [10] 杨成俊. 北沙参及其 6 种混淆品的鉴别[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(31): 15189-15190.
- [11] 毕春玲. 北沙参及其伪品的鉴别[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(3): 154.
- [12] 屠鹏飞, 冷青松, 徐国钧, 等. 莱阳参的生药鉴定[J]. 中药材, 1999, 22(4): 174-176.
- [13] 张迎辉, 杜溶讷, 凡莉莉, 等. 石斛属部分植物 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 热带作物学报, 2021, 42(1): 25-32.
- [14] 齐树杰, 沈镡, 李颖, 等. 北沙参 SRAP 分子标记体系的建立与优化[J]. 中国农学通报, 2009, 25(24): 73-77.
- [15] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8613.
- [16] 李忠祥, 王育莹, 原忠. 北沙参及易混品的 ITS2 分子鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(10): 803-806.
- [17] 韩晓伟, 曹楸伟, 严玉平, 等. 基于 ITS2 的北沙参药材及其伪品的分子鉴定[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(17): 71-75.
- [18] 石俊英, 卢燕, 李渤文. 蛋白质电泳指纹图谱对北沙参栽培品种鉴定的研究[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(3): 11-13.
- [19] 郭怀忠, 吴芳, 张伟泉, 等. 聚类分析辅助中药寡糖电泳分析鉴定中药[J]. 色谱, 2013, 31(10): 1001-1004.
- [20] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[OL]. (2018-04-16) <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [21] 芦婷婷, 田欣, 王竞. 法卡林二醇单药及与其他药物联用对乳腺癌细胞凋亡的影响[J]. 山东医药, 2018, 58(28): 56-58.
- [22] 平晓秋. 北沙参中法卡林二醇的含量测定[J]. 辽宁中医杂志, 2003, 30(7): 579-580.
- [23] 苏柯萌, 温爱平, 刘锦霞. 北沙参药材中总香豆素的含量测定[J]. 北方药学, 2019, 16(3): 1-2.
- [24] Du BX, Fu YP, Wang X, et al. Isolation, purification, structural analysis and biological activities of water-soluble polysaccharide from *Glehniae radix* [J]. Int J Bio Macromol, 2019, 128(128): 724-731.
- [25] Wang LL, Yuan Z. Research progress in polysaccharide compositions of *Glehnia littoralis* [J]. Asian J Tra Med, 2020, 15(3): 146-155.
- [26] 黄贤荣, 宋健, 石俊英. 北沙参不同加工方法对多糖及浸出物含量的影响[J]. 山东中医杂志, 2012, 31(2): 134-136.
- [27] Zheng XG, Zhang XW, Shen XN, et al. Simultaneous determination of six major active furocoumarins in *Radix Glehniae* by HPLC-DAD [J]. J Chromatogr Sci, 2011, 48(3): 209-213.
- [28] 牛韬. HPLC 法测定硫磺熏蒸与未熏蒸北沙参中 5 种香豆素类成分的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(27): 3836-3838.
- [29] 李德强, 肖媛媛, 戴荣源, 等. 加压溶剂提取-HPLC 法测定北沙参中 6 种香豆素类化合物[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(24): 2433-2436.
- [30] 冯子晋, 卢小玲, 张建鹏, 等. 北沙参中香豆素类与聚炔类成分的含量测定研究[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(3): 20-26.
- [31] 董芳, 刘汉柱, 辛华. 不同生长年份北沙参中香豆素含量的比较研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(19): 295-297.
- [32] 李宝国, 石俊英. HPLC 法测定不同产地北沙参药材中香豆素的含量[J]. 中药材, 2005, 28(6): 475-476.
- [33] 张样柏, 李国强, 管华诗. HPLC 法同时测定北沙参中法卡林二醇和人参炔醇的含量[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(S1): 127-130.
- [34] 原忠, 董焱, 朱静娟. HPLC 测定北沙参中腺苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(17): 1391-1392.
- [35] 吴凡, 刘继华, 陈祖芬. 高效液相色谱法及超高效液相色谱-质谱联用法在多种肾上腺皮质激素检测中的应用价值[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(33): 166-167.
- [36] 徐智宇, 王巍嵩. 高效液相色谱-质谱联用法测定北沙参中欧前胡素和异欧前胡素的含量[J]. 中南药学, 2018, 16(1): 114-116.
- [37] Yang W, Feng C, Kong DZ, et al. Simultaneous determination of 15 components in *Radix Glehniae* by high perfor-

- mance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2010, 120: 886-894.
- [38] 张艺馨, 卢小玲, 刘小宇. 北沙参中挥发油成分的鉴定 [J]. 第二军医大学学报, 2013, 34 (11): 1271-1275.
- [39] 王辉明, 吕志强, 张颢儿, 等. 不同产地北沙参药材的挥发油成分比较分析 [J]. 中国药房, 2019, 30 (22): 3109-3112.
- [40] 王辉明, 吕志强, 陈嘉鹏, 等. 北沙参的脂肪酸特征及产地差异性分析 [J]. 中国海洋药物, 2020, 39 (3): 58-63.
- [41] 鄢海燕, 邹纯才. 《中国药典》(2010 年版~2020 年版) 中药指纹 (特征) 图谱应用进展与展望 [J]. 南方医科大学学报, 2022, 42 (1): 150-155.
- [42] 苏星, 李相坤, 吴弢, 等. 北沙参药材的薄层色谱指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2012, 35 (2): 210-213.
- [43] 郑旭光, 陈钟, 项峰, 等. 河北道地药材北沙参 HPLC-PDA 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31 (9): 1683-1688.
- [44] 苏本正, 都波, 周建永. 高效液相色谱法测定北沙参中的蔗糖及其指纹图谱 [J]. 化学分析计量, 2021, 30 (6): 26-30.
- [45] 徐博, 吴翠, 李卓俊, 等. ¹H-NMR 技术在中药分析领域的应用现状 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (10): 1663-1669.
- [46] 时新刚, 李淑娥, 孙庆雷, 等. 北沙参的 ¹H-NMR 指纹图谱研究 [J]. 山东科学, 2009, 22 (3): 24-26.
- [47] 刘静, Dan S, 孙庆雷, 等. 北沙参的碳-13 核磁共振指纹图谱研究 [J]. 山东科学, 2012, 25 (2): 26-29.
- [48] 刘曼, 孔德志, 杨维, 等. 胶束电动毛细管电泳分离测定北沙参中 5 种香豆素类成分 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (14): 1840-1844.
- [49] 李宝国, 李军, 欧阳兵. 不同产地北沙参的氨基酸检测分析 [J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37 (5): 444-445.
- [50] 李宝国, 李军, 欧阳兵. 不同加工莱阳沙参的氨基酸检测分析 [J]. 医药论坛杂志, 2014, 35 (1): 22-23.
- [51] 李乌云塔娜, 云文洁, 李旻辉, 等. 气相色谱法测定北沙参中有机氯农药的残留量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9 (10): 2507-2511.
- [52] 叶国华, 张钦德, 许一平, 等. 不同产地北沙参中重金属含量的测定 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24 (4): 407-410.

(收稿日期: 2022-02-03; 修回日期: 2022-05-01)

靶向 B 淋巴细胞治疗系统性红斑狼疮的生物制剂： 贝利尤单抗与泰它西普

张莹莹¹, 王世颖², 束庆^{3, 4}, 严晶², 葛卫红^{3, 4}, 华冰珠^{2*} (1. 中国药科大学南京鼓楼医院, 南京 210008; 2. 南京鼓楼医院风湿免疫科, 南京 210008; 3. 南京鼓楼医院药学部, 南京 210008; 4. 南京临床药学中心, 南京 210008)

摘要: 目前国内批准用于系统性红斑狼疮的以 B 淋巴细胞为治疗靶点的生物制剂仅有贝利尤单抗和泰它西普。本文通过比较两种生物制剂的作用机制、用法用量、药代动力学、有效性、安全性等方面的数据, 以便临床更全面地了解两个药物。

关键词: B 淋巴细胞; 系统性红斑狼疮; 生物制剂; 贝利尤单抗; 泰它西普

中图分类号: R593.24 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2356-07
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.024

B-lymphocyte-targeted biologics for systemic lupus erythematosus: belimumab and telitacicept

ZHANG Ying-ying¹, WANG Shi-ying², SHU Qing^{3, 4}, YAN Jing², GE Wei-hong^{3, 4}, HUA Bing-zhu^{2*} (1. China Pharmaceutical University Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008; 2. Department of Rheumatology, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008; 3. Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008; 4. Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy, Nanjing 210008)

基金项目: 江苏省医院协会管理创新研究课题基金 (No.JSYGY-3-2020-657); 南京市医学科技发展资金项目 (No.QRX17140); 江苏省研究型医院学会精益化用药科研基金项目 (No.JY202002)。

作者简介: 张莹莹, 女, 硕士, 主要从事临床药学相关研究, email: 15890936619@163.com ***通信作者:** 葛卫红, 女, 博士研究生导师, 主任药师, 主要从事医院药学研究, email: glg6221230@163.com; 华冰珠, 女, 硕士, 主任医师, 主要从事风湿病学研究, email: pinker68@163.com

Abstract: At present, the biological agents approved for the treatment of systemic lupus erythematosus with B lymphocyte as the therapeutic target included belimumab and telitacicept. This article compared the mechanism of action, usage and dosage, pharmacokinetics, effectiveness, safety and other data of the two biological agents to more comprehensively understanding the two drugs.

Key words: B lymphocyte; systemic lupus erythematosus; biologics; belimumab; telitacicept

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种系统性自身免疫病, 以全身多系统多脏器受累、反复复发与缓解、体内存在大量自身抗体为主要临床特点, 如不及时治疗, 会造成受累脏器的不可逆损害, 最终导致患者死亡^[1]。SLE 致病原因较为复杂, 其中 B 淋巴细胞过度激活导致的免疫复合物 (IgM、IgA、IgG) 大量沉积至关重要^[2]。目前临床的传统治疗药物主要为糖皮质激素、免疫抑制剂、抗疟药等^[3]。但是以上传统的药物治疗存在以下几点问题: ①除糖皮质激素外, 绝大多数药物治疗起效较慢; ②约有 60% 的患者疗效不佳; ③药物不良反应多等^[4]。因此, 临床亟待发现新的治疗药物。

随着 SLE 发病机制的研究进展, 研究者发现使用靶向 B 淋巴细胞的治疗不仅能达到与传统疗法相似甚至更好的疗效, 且不良反应更小, 起效更快^[5]。目前国内批准靶向 B 淋巴细胞治疗 SLE 的生物制剂仅有贝利尤单抗及泰它西普两种。本文将从作用机制、用法用量、药动学、有效性、安全性等方面讨论两者的临床特征, 帮助临床医师了解最新的研究进展。

1 作用机制

B 淋巴细胞刺激物 (B lymphocytes stimulator, BLyS) 又称 B 细胞激活因子 (B-cell activation factor, BAFF), 与增殖诱导配体 (a proliferation inducing ligand, APRIL) 同属肿瘤坏死因子配体家族^[6]。研究表明在 SLE 患者中 BLyS 与 APRIL 水平升高, 且高水平的 BLyS 及 APRIL 与 SLE 患者的高疾病活动度和高复发率密切相关, 可能原因为 BLyS 与 APRIL 共同调控 B 淋巴细胞存活、增殖、分化及抗体分泌^[7-8]。具体作用机制主要与 BLyS 和 APRIL 的下游调控靶点有关, 研究显示按照结合强度由强至弱 BLyS 依次与 BAFF 受体 (BAFF receptor, BAFFR)、B 淋巴细胞成熟抗原 (B-cell maturation antigen, BCMA) 及跨膜蛋白活化物 (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor, TACI) 结合, APRIL 依次与 BCMA、TACI 结合^[9]。其中 BAFFR 分布于除浆细胞外的所有 B 淋巴细胞中, 研究表明 BAFFR 通过介导 I κ B 激酶 1 和

I κ B 激酶 2 激活非经典和经典 NF- κ B 通路, 该通路能够维持 B 淋巴细胞凋亡抑制因子水平, 从而促使幼稚 B 淋巴细胞成熟和记忆细胞存活^[10-11]; BAFFR 缺乏或抗 BLyS 治疗将阻滞未成熟 B 淋巴细胞发育和抑制记忆细胞的存活, 这导致成熟 B 淋巴细胞、浆细胞和记忆细胞循环量减少, 进一步降低 IgM (主要由从头激活的幼稚 B 淋巴细胞分泌) 及 IgG (主要由记忆细胞重新激活分泌) 水平, 而 IgA 的分泌不受 BAFFR 的影响, 表现为 IgA 水平正常或升高^[10, 12]。TACI 主要分布于边缘区 B 淋巴细胞、滤泡性 B 淋巴细胞和浆细胞中^[6], 研究表明 TACI 可介导 B 淋巴细胞转录因子诱导浆细胞分化, 影响 NF- κ B 通路和抑制促凋亡蛋白共同促进浆细胞存活^[13-15]; 此外, 边缘区 B 淋巴细胞和滤泡性 B 淋巴细胞中 TACI 水平上调后, IgA 和 IgG 分泌随之增加^[6, 16], 原因可能是 BLyS 和 / 或 APRIL 与 TACI 的结合增加了激活诱导的胞苷脱氨酶转录水平, 导致多糖特异性抗体同种型转换为 IgA 和 IgG^[6]; 记忆细胞中虽表达 TACI, 但其如何影响记忆细胞尚未可知^[6]。BCMA 主要分布于浆细胞, 研究表明 BCMA 也可以通过影响 NF- κ B 通路及上调抗凋亡蛋白促进浆细胞的存活^[6, 15], 尤其是长寿浆细胞的存活^[17]。BAFFR、BCMA、TACI 三种受体作用于 B 淋巴细胞发育的不同时期, 共同发挥促进 SLE 患者抗体异常分泌的作用。泰它西普及贝利尤单抗均为靶向 B 淋巴细胞的生物制剂, 具体作用机制见图 1。

泰它西普于 2021 年 3 月在国内上市, 它是非传统单抗类的新型融合蛋白生物制剂, 由 BLyS 及 APRIL 的共同配体 TACI 蛋白基因片段与人体 IgG 蛋白的可结晶片段 (Fc) 融合构成, 能够同时阻滞 BLyS 及 APRIL 与 TACI 结合而抑制浆细胞分化和存活、边缘区 B 淋巴细胞和滤泡性 B 淋巴细胞的抗体同种型转换发挥治疗 SLE 的作用^[13-16, 18-19], 对 BAFFR 特异性影响的幼稚 B 淋巴细胞及 BCMA 影响的长寿浆细胞作用较小^[10, 17]。临床用于治疗常规治疗基础上仍有高疾病活动的活动性、自身抗体阳性的成年 SLE 患者。临床禁忌证参考贝利尤单抗。

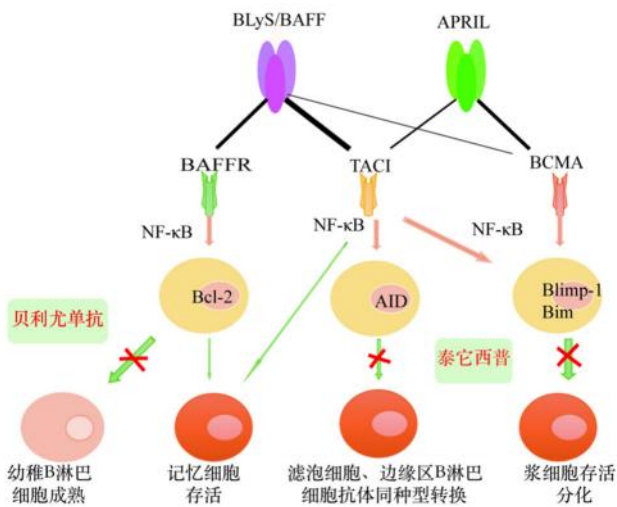


图1 泰它西普及贝利尤单抗靶向B淋巴细胞治疗SLE的机制
Fig 1 Mechanism of telitacicept and belimumab targeting B lymphocytes in the treatment of SLE

贝利尤单抗是一种重组的完全人源化 IgG2 λ 单克隆抗体，靶向结合 BLyS 并抑制 BAFFR、TACI 和 BCMA 对幼稚 B 淋巴细胞、记忆细胞、浆细胞、边缘区 B 淋巴细胞和滤泡性 B 淋巴细胞的分化、存活和抗体分泌作用^[20-21]。鉴于 APRIL 仍可与 TACI 和 BCMA 结合，贝利尤单抗治疗中以幼稚 B 淋巴细胞减少最为常见^[22]。临床用于治疗 5 岁及以上儿童及成年人的活动性、自身抗体阳性的成年 SLE 患者及联合免疫抑制剂治疗活动性狼疮的成年患者^[23-24]。过敏、合并重度活动性中枢神经系统狼疮、重度活动性狼疮肾炎、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、感染、结核、乙肝、丙肝、低丙种球蛋白血症及器官或细胞移植史患者禁用^[23-24]。

2 用法用量

泰它西普和贝利尤单抗在用法、用量、用时间和用药频次方面存在明显差异。泰它西普目前仅有皮下注射的给药方式，推荐剂量为每次 160 mg^[25]，每周一次。贝利尤单抗有静脉和皮下注射两种不同给药方式，静脉注射或滴注贝利尤单抗推荐剂量为 10 mg · kg⁻¹^[26]；皮下注射贝利尤单抗推荐剂量为每次 200 mg^[24]；使用频次均为每周一次，皮下用药时间一般为几分钟，静脉用药时间最少 1 h^[25, 27]。

3 药代动力学

中国人群药代动力学临床试验表明，每周皮下注射泰它西普显示一级动力学吸收的二室靶点介导药物代谢动力学模型^[28]。在此模型下，泰它西普吸收和转运速率与其剂量成正比，进入人体后以高亲和力与 BLyS 紧密结合后转化为结合

型泰它西普并通过内化作用消除，消除程度由泰它西普暴露量及其靶点量的相对大小而定。当泰它西普暴露量大于靶点量时，该消除途径达到饱和，表现为清除率随着剂量的增大而减小，药物代谢曲线呈现出非线性特征，反之呈现为线性药动学特征^[29-30]。此外，因泰它西普进入人体后与 BLyS 结合转化成结合型泰它西普，因此人体内的泰它西普一般描述为总泰它西普、游离型泰它西普和结合型泰它西普三种类型^[30]。首次给药后，血清总泰它西普和游离型泰它西普浓度在 1 ~ 2 d 内达到峰浓度 (C_{max})，经多次皮下注射后，患者体内药物积蓄， C_{max} 随之升高^[19]，达 C_{max} 后呈指数下降，消除半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 19.8 d 和 11.7 d，且 C_{max} 和药时曲线 (AUC) 变化趋势近似^[19, 30]。结合型泰它西普形成和消除均较缓慢，皮下注射泰它西普后 17 ~ 63 d 后才可达 C_{max} ，同时存在蓄积现象，维持 7 周后逐渐下降， $t_{1/2}$ 为 19.4 d，且其 $t_{1/2}$ 随泰它西普剂量增加而增加^[19]；但也有研究表明结合型泰它西普在连续 4 周每周皮下 180 mg 后，第 84 日测得结合型泰它西普浓度仍大于 C_{max} 的 50%^[19]，此现象提醒临床医师在应用泰它西普治疗 SLE 时应特别注意剂量及蓄积效应。此外，研究表明在类风湿关节炎 (RA) 患者中，泰它西普也表现出与 SLE 患者相似的药物代谢动力学特征^[18-19]。

贝利尤单抗静脉注射 10 mg · kg⁻¹ 或皮下注射每周 200 mg 患者血清药物浓度相当，但皮下注射给药方案血清浓度的波动较小^[27]。目前仅有静脉注射用的贝利尤单抗 (倍力腾) 在中国上市。中国人群的群体药代动力学临床试验表明，静脉用贝利尤单抗是无吸收的线性二室药代动力学模型^[31]。在此模型中，贝利尤单抗在输注完成时或完成后不久即可达 C_{max} (约为 221 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，而后向外周组织分布和消除， $t_{1/2}$ 约为 14.6 d^[32]；在日本人群中的药代动力学特征与之相近 (C_{max} 222 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $t_{1/2}$ 15.7 d)^[33]，在美国人群中的数据略有不同 (C_{max} 为 192 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $t_{1/2}$ 为 10.6 d)^[34]。皮下注射贝利尤单抗仅有国外研究数据，显示一级动力学吸收的线性二室药代动力学模型，此模型中吸收滞后时间为 4.25 h，贝利尤单抗的生物利用度为 74%，首次给药达峰时间 (t_{max}) 为 5.1 d， $t_{1/2}$ 为 18.7 ~ 19.4 d^[21, 27]。两种药物的具体药代动力学特点对比见表 1。

4 有效性和安全性

目前，泰它西普虽尚未有 III 期临床试验结果发布，但泰它西普 I、II 期临床试验都显示出

表 1 泰它西普与贝利尤单抗药代动力学特点对比

Tab 1 Pharmacokinetic characteristics of telitacicept and belimumab

疾病	药物用法用量	药动力学模型	体内药物类型	$t_{max}/$ d	$C_{max}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$AUC/$ ($\text{d} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	半衰 期/d	清除率/ ($\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$)	表观分布容 积/L
SLE ($n = 9$)	泰它西普, 每 周皮下注射, 180 mg, 4 周	一级动力学 吸收的二 室靶点介 导药物代 谢动力学 模型	总泰它西普	1.0 (1.0 ~ 2.0)	5.4 (2.4 ~ 8.1)	44.3 (29.2 ~ 61.9)	19.8 (11.4 ~ 26.4)	8.7 (5.2 ~ 15.2)	254.1 (135.8 ~ 513.9)
			游离型泰它西普	1.0 (1.0 ~ 2.0)	4.5 (2.1 ~ 6.2)	16.8 (11.0 ~ 23.6)	11.7 (2.4 ~ 26.5)	13.6 (8.9 ~ 21.4)	221.5 (38.3 ~ 545.0)
			结合型泰它西普	17 ~ 63	30.3 (14.2 ~ 46.2)	1683.7 (975.8 ~ 2579.4)	19.4 (18.8 ~ 20.0)	—	—
RA ($n = 4$)	泰它西普, 每 周皮下注射, 180 mg, 3 周	—	总泰它西普	1.0 (1.0 ~ 1.5)	8.5 (23.9%)	63.1 (24.3%)	15.7 (5.0%)	8.5 (23.9%)	193.4 (23.4%)
			游离型泰它西普	1.0 (0.3 ~ 1.0)	5.5 (17.5%)	34.6 (30.9%)	6.0 (50%)	10.6 (27.0%)	92.3 (33.7%)
			结合型泰它西普	56 (56 ~ 56)	29.3 (14.2%)	1800.5 (14.9%)	—	—	—
SLE ($n = 20$)	贝利尤单抗, 每 周静脉注射, 10 mg · kg ⁻¹ , 12 周	无吸收的线 性二室药 代动力学 模型	—	—	221 (208 ~ 235)	2395 (2151 ~ 2667)	14.6 (12.5 ~ 17.2)	—	—

对 SLE 患者治疗的有效性和安全性。研究人群集中于 18 ~ 65 岁符合 SLE 诊断标准、SELENA-SLEDAI ≥ 8 且 ANA 和 / 或抗 dsDNA 抗体阳性、有稳定传统治疗方案的 SLE 患者, 排除过敏、禁忌证、妊娠及哺乳、入组前 3 个月内使用任何靶向 B 淋巴细胞生物制剂及入组前 1 个月内行血浆置换或注射疫苗的患者; 治疗方案为实验组在传统治疗基础上加用泰它西普, 对照组在传统治疗基础上加用安慰剂^[19, 25, 35]。在泰它西普 I 期单中心、随机、单盲和安慰剂临床试验中, 实验组 ($n = 9$) SLE 患者病情稳定, 而对照组 ($n = 3$) 患者病情恶化, 具体免疫学表现为实验组患者 B 淋巴细胞数量及 IgM、IgA、IgG 水平降低, 补体 C3、C4 水平增加^[19]; 安全性方面, 大多数不良事件为轻中度, 其中实验组咽炎、头痛、疲乏、恶心发生率小于对照组^[19][(33.3% vs 66.7%)、(22.2% vs 66.7%)、(33.3% vs 66.7%)、(22.2% vs 66.7%)]; 上呼吸道感染(33.3% vs 33.3%)、肌肉骨骼疼痛(33.3% vs 33.3%)发生率一致, 腰肋骨痛(44.4% vs 0%)、带状疱疹(22.2% vs 0%)、皮疹(55.6% vs 33.3%)等发生率高于对照组^[19]。泰它西普 II b 期多中心、随机、双盲、安慰剂临床试验部分实验结果显示, 泰它西普 80 mg ($n = 62$)、160 mg ($n = 63$)、240 mg ($n = 62$) 均观察到了相似的疗效和安全性, 实验组以批准的每周皮下注射泰它西普 160 mg 治疗方案为例, 在 48 周时 SLE 患者反应指数 4 (SRI 4)、SELENA-SLEDAI 评分降低 ≥ 4 分、研究者总体评价 (PGA) 无进展率均显著高于对照组 [(68.3% vs 33.9%)、(77.8% vs 50%)、(92.1% vs 75.8%)]^[25]; 实验组和对照组不良事件发生率相近 (92.1% vs

82.3%), 常见不良事件主要是上呼吸道感染和注射部位反应, 其中严重不良事件发生率也无显著性差异 (15.9% vs 16.1%)^[25]。此外, 国内泰它西普 II b 期单中心临床试验中也观察到了与上述 II b 期多中心临床试验相似的疗效与安全性^[35], 不同的是实验组在上呼吸道感染、带状疱疹、过敏性皮炎发生率高于对照组 [(28.6% vs 0%)、(28.6% vs 0%)、(14.3% vs 0%)]^[35]。值得注意的是泰它西普也可有效降低 RA 患者 IgM、IgG 和 IgA 水平, 但其对甲氨蝶呤或 TNF- α 抑制剂反应不足的活动性 RA 患者无效^[18, 30], 在 SLE 人群中暂未发现此种趋势, 有待进一步研究确认。

目前贝利尤单抗在临床应用较为成熟, 禁忌和慎用人研究较为明确。在中、日、韩开展的一项多中心随机、双盲、安慰剂 III 期临床试验中, 实验组 ($n = 451$) 在传统治疗基础上加用每周静脉用贝利尤单抗 10 mg · kg⁻¹, 对照组 ($n = 226$) 在传统治疗基础上加用安慰剂, 实验组 52 周时 SRI4 反应指数、SLE 患者反应指数 7 (SRI7)、SELENA-SLEDAI 评分降低 ≥ 4 分均高于对照组 [(53.8% vs 40.1%)、(32.4% vs 23.5%)、(55.7% vs 42.2%)]^[36]; 糖皮质激素用量也显著低于对照组 ($P < 0.01$); 实验组与对照组总体不良事件发生率无显著性差异 (75.7% vs 74.9%), 其中实验组上呼吸道感染 (13.8% vs 16.6%)、鼻咽炎发生率 (11.1% vs 11.9%), 与对照组无显著性差异, 且其余不良事件 (腹泻、带状疱疹、恶心等) 发生率均小于 10%, 然而严重不良事件发生率实验组低于对照组 (12.3% vs 18.3%)^[36]。两种药物的疗效与安全性对比见表 2。

表 2 泰它西普与贝利尤单抗疗效与安全性对比
Tab 2 Efficacy and safety of telitacicept and belimumab

研究对象	研究药物	研究类型	观察终点	用法	用量	占比/%				发生率/%		常见不良事件举例
						SRI4	SRI7	SELENA-SLEDAI 评分降低 ≥ 4 分	PGA 评分未恶化	不良事件	严重不良事件	
中国人群 SLE 患者	泰它西普	Ⅱ期临床 试验 (n = 249)	48 周	每周皮下注射	80 mg (n = 62)	71.00	—	75.80	96.80	90.30	12.90	腰肋骨痛、上呼吸道感染、带状疱疹、皮疹、肌肉骨骼疼痛、注射部位反应等
					160 mg (n = 63)	68.30	—	77.80	92.10	92.10	15.90	
					240 mg (n = 62)	75.80	—	79.00	96.80	93.50	12.90	
					安慰剂 (n = 62)	33.90	—	50.00	75.80	82.30	16.10	
中、日、韩人群 SLE 患者	贝利尤单抗	Ⅲ期临床 试验 (n = 702)	52 周	每周静脉注射	10 mg · kg ⁻¹ (n = 468)	53.80	32.40	55.70	—	75.70	12.30	上呼吸道感染、鼻咽炎、发热、注射部位反应等
					安慰剂 (n = 234)	40.10	23.50	42.20	—	74.90	18.30	

5 其他

泰它西普及贝利尤单抗在妊娠、哺乳、儿童、老年等人群方面的研究尚不明确。两种药物虽均未开展药物相互作用研究，但也没有证据表明两者与 SLE 常用治疗药物糖皮质激素、免疫抑制剂（如羟氯喹、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤等）合用时产生药物相互作用^[25, 37]。

6 结论

从作用机制上看，泰它西普作用于 B 淋巴细胞的两个调控因子 BLYS 及 APRIL，贝利尤单抗仅靶向 BLYS 因子。从用法用量对比看，泰它西普皮下注射仅需几分钟，而贝利尤单抗为静脉滴注时间多为 1 h 以上。从药代动力学对比看，静脉用贝利尤单抗吸收及消除速度均快，便于剂量调控和停药，而泰它西普 T_{max} 最快也需要 1 ~ 2 d，连续使用蓄积且因存在结合型泰它西普而消除速度较慢，不利于及时调控药物作用。从药效学对比来看，泰它西普在升高患者 SRI4 应答率和降低 SELENA-SLEDAI 评分等方面均优于贝利尤单抗。从安全性对比来看，泰它西普和贝利尤单抗的总体不良事件发生率与对照组相比无显著性差异，但泰它西普组中带状疱疹、上呼吸道感染发生率高于对照组，且出现了不同于贝利尤单抗的腰肋骨痛不良事件。

值得注意的是 Atacicept 作为首个进入临床试验的靶向 BLYS 及 APRIL 的生物制剂，其结构与泰它西普相似，区别仅在于泰它西普与 Fc 结合的 TACI 片段稍长于 Atacicept^[38-39]，该结合方式显著增强 TACI 与 BLYS、APRIL 的结合力^[18]。既往研究表明 Atacicept 在降低中、重度 SLE 患者复发率方面的作用较显著，在降低轻度 SLE 患者复发率方面的作用不明显，甚至会因过度抑制 B 淋巴细胞功能而增加不良反应发生风险和复发

率^[8]。此外 Atacicept Ⅲ期临床试验疗效与安全性方面数据表明，SLE 患者每周应用 Atacicept 150 mg 时，虽能显著降低 SLE 患者 B 淋巴细胞数量及 IgG、IgA、IgM、抗 dsDNA 抗体水平、升高补体 C3、C4 水平，却因其出现致命性肺部感染及严重的丙种球蛋白血症，导致实验终止^[38]。然而有研究表明出现此种现象可能与合用狼疮肾炎首选药物吗替麦考酚酯有关，联合 Atacicept 时导致自身感染风险加剧^[40-42]。而目前的泰它西普临床试验中未曾提到合用吗替麦考酚酯的相关信息，因此作为相似结构和作用机制的泰它西普在后续临床试验或治疗中可能呈现出相似的治疗效果和不良事件，医师应特别注意。

相比泰它西普，2011 年已在海外批准用于治疗 SLE 的贝利尤单抗在临床应用已较为成熟^[3]。开展的多项大型多中心、随机、双盲、对照的贝利尤单抗 Ⅲ期临床试验和上市后临床试验表明^[43-45]，在美洲、亚洲、欧洲、非洲等人群中应用贝利尤单抗治疗活动性 SLE（尤其是血清学活动、疲劳、皮肤关节受累的患者）均可显著降低疾病活动度、预防疾病严重发作、减少糖皮质激素剂量、改善患者疲劳和健康评分，且患者不良反应可耐受。尤其对于非重度活动性的狼疮肾炎患者，贝利尤单抗（联合或不联合吗替麦考酚酯）可显著降低蛋白尿、减少器官损伤^[4, 46]；2019 年 EULAR 发布的 SLE 治疗指南也肯定了贝利尤单抗作为一线治疗后疾病仍持续活动或反复发作或糖皮质激素不能减量至 ≤ 7.5 mg · d⁻¹ 的狼疮肾炎患者的备选治疗药物^[47]。然而 SLE 患者累及脑部出现神经、精神方面的症状时，应用贝利尤单抗易出现严重不良事件（如进展性多灶性脑白质病、抑郁、自杀）^[48]，因此应用前需认真权衡。

综上所述, 结合泰它西普及贝利尤单抗作用机制、用法用量、药代动力学、有效性和安全性, 医师应在充分考虑患者病情严重程度、疾病表现、紧急情况等诸多因素, 选择最适药物, 保证临床用药安全有效。但泰它西普研究数据有限, 且缺乏直接比较两种生物制剂疗效与安全性方面的数据, 因此后续应继续开展大型临床试验进一步验证。

参考文献

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 2020 中国系统性红斑狼疮诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2020, 59 (3): 172-185.
- [2] Durcan L, Owyer T, Petri M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults [J]. *Lancet*, 2019, 393 (10188): 2332-2343.
- [3] Basta F, Fasola F, Triantafyllias K, et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) therapy: the old and the new [J]. *Rheumatol Ther*, 2020, 7 (3): 433-446.
- [4] Furie R, Rovin BH, Houssiau F, et al. Two-year, randomized, controlled trial of belimumab in lupus nephritis [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (12): 1117-1128.
- [5] Harvey PR, Gordon C. B-cell targeted therapies in systemic lupus erythematosus: successes and challenges [J]. *Bio Drugs*, 2013, 27 (2): 85-95.
- [6] Sakai J, Akkoyunlu M. The role of BAFF system molecules in host response to pathogens [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, 30 (4): 991-1014.
- [7] Salazar DC, Ortiz PC, Cruz A, et al. Association of BAFF, APRIL serum levels, BAFF-R, TACI and BCMA expression on peripheral B-cell subsets with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2016, 25 (6): 582-592.
- [8] Gordon C, Wofsy D, Wax S, et al. Post Hoc analysis of the phase II/III APRIL-SLE study: association between response to Atacicept and serum biomarkers including BlyS and APRIL [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, 69 (1): 122-130.
- [9] Vincent FB, Saulep D, Figgett WA, et al. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24 (3): 203-215.
- [10] Müller J, Mitter R, Rappe J, et al. Critical requirement for BCR, BAFF, and BAFFR in memory B cell survival [J]. *J Exp Med*, 2021, 218 (2): e20191393.
- [11] Derudder E, Herzog S, Labi V, et al. Canonical NF- κ B signaling is uniquely required for the long-term persistence of functional mature B cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (18): 5065-5070.
- [12] Smulski CR, Eibel H. BAFF and BAFF-receptor in B cell selection and survival [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2285.
- [13] Salzer U, Grimbacher B. TACI deficiency-a complex system out of balance [J]. *Curr Opin Immunol*, 2021, 71: 81-88.
- [14] Garcia-Carmona Y, Cols M, Ting AT, et al. Differential induction of plasma cells by isoforms of human TACI [J]. *Blood*, 2015, 125 (11): 1749-1758.
- [15] Cornelis R, Chang HD, Radbruch A. Keeping up with the stress of antibody production: BAFF and APRIL maintain memory plasma cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2021, 71: 97-102.
- [16] Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, et al. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF-and APRIL-mediated immunoglobulin secretion [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37 (7): 1785-1795.
- [17] Schweighoffer E, Vanes L, Nys J, et al. The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway [J]. *Immunity*, 2013, 38 (3): 475-488.
- [18] Chen X, Hou Y, Jiang J, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of single ascending doses of RCT-18 in Chinese patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 2014, 53 (11): 1033-1044.
- [19] Zhao Q, Chen X, Hou Y, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and clinical activity of multiple doses of RCT-18 in Chinese patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Clin Pharmacol*, 2016, 56 (8): 948-959.
- [20] Wise LM, Stohl W. Belimumab and rituximab in systemic lupus erythematosus: a tale of two B cell-targeting agents [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 303.
- [21] Blair HA, Duggan ST. Belimumab: a review in systemic lupus erythematosus [J]. *Drugs*, 2018, 78 (3): 355-366.
- [22] Regola F, Piantoni S, Lowin T, et al. Association between changes in BlyS levels and the composition of B and T cell compartments in patients with refractory systemic lupus erythematosus treated with belimumab [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 433.
- [23] Benlysta prescribing information. Research Triangle Park, NC: GlaxoSmithKline, 2019 (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/125370s067_761043s0051bl.pdf. pdf. opens in new tab).
- [24] European Medicines Agency. Benlysta (belimumab): summary of product characteristics. 2017 [EB/OL]. <http://www.ema.europa.eu>. Accessed 01 Aug 2021.
- [25] Wu D, Li J, Xu D, et al. A human recombinant fusion protein targeting B lymphocyte stimulator (BlyS) and a proliferation-inducing ligand (APRIL), telitacicept (RC18), in systemic lupus erythematosus (SLE): results of a phase 2b study [C]//*Arthritis & Rheumatology*. 111 River St, Hoboken 07030-5774, NJ USA: WILEY, 2019, 71.
- [26] Burness CB, McCormack PL. Belimumab: in systemic lupus erythematosus [J]. *Drugs*, 2011, 71 (18): 2435-2444.
- [27] Yapa SW, Roth D, Gordon D, et al. Comparison of intravenous and subcutaneous exposure supporting dose selection of subcutaneous belimumab systemic lupus erythematosus Phase 3 program [J]. *Lupus*, 2016, 25 (13): 1448-1455.

- [28] Yao X, Ren Y, Zhao Q, et al. Pharmacokinetics analysis based on target-mediated drug distribution for RC18, a novel BLYS/APRIL fusion protein to treat systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 159: 105704.
- [29] 季双敏, 朱校. 靶点介导的药物处置模型在单克隆抗体药物研发中应用的探讨 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23 (3): 241-246.
- [30] Chen X, Zhao Q, Hou Y, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, short term efficacy and safety of RCT-18, a novel BLYS/APRIL fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 82 (1): 41-52.
- [31] Struemper H, Chen C, Cai W. Population pharmacokinetics of belimumab following intravenous administration in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 53 (7): 711-720.
- [32] Zhang J, Wan W, Miao L, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of belimumab in chinese patients with systemic lupus erythematosus: a phase I, open-label study [J]. *Rheumatol Ther*, 2020, 7 (1): 191-200.
- [33] Yamada M, Akita M, Nakagawa T, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of belimumab in Japanese patients with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus [J]. *J Drug Assess*, 2013, 2 (1): 40-48.
- [34] Furie R, Stohl W, Ginzler EM, et al. Biologic activity and safety of belimumab, a neutralizing anti-B-lymphocyte stimulator (BLYS) monoclonal antibody: a phase I trial in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10 (5): R109.
- [35] 江文静, 何德宁, 胡建康, 等. 泰它西普治疗中重度活动性系统性红斑狼疮的疗效及全安性观察 [J]. *江西医药*, 2020, 55 (11): 1637-1641, 1671.
- [36] Zhang F, Bae SC, Bass D, et al. A pivotal phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab in patients with systemic lupus erythematosus located in China, Japan and South Korea [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77 (3): 355-363.
- [37] Manzi S, Sánchez-Guerrero J, Merrill JT, et al. Effects of belimumab, a B lymphocyte stimulator-specific inhibitor, on disease activity across multiple organ domains in patients with systemic lupus erythematosus: combined results from two phase III trials [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71 (11): 1833-1838.
- [38] Isenberg D, Gordon C, Licu D, et al. Efficacy and safety of ataccept for prevention of flares in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus (SLE): 52-week data (APRIL-SLE randomized trial) [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74 (11): 2006-2015.
- [39] 房健民. 注射用重组人B淋巴细胞刺激因子受体-抗体融合蛋白(泰爱) [R]. 山东省, 荣昌生物制药, 2019-01-13.
- [40] Parikh SV, Almaani S, Brodsky S, et al. Update on lupus nephritis: core curriculum 2020 [J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76 (2): 265-281.
- [41] Ginzler EM, Wax S, Rajeswaran A, et al. Ataccept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14 (1): R33.
- [42] Yap DY, Chan TM. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis-role in pathogenesis and effect of immunosuppressive treatments [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (24): 6231.
- [43] Navarra SV, Guzmán RM, Gallacher AE, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2011, 377 (9767): 721-731.
- [44] Strand V, Levy RA, Cervera R, et al. Improvements in health-related quality of life with belimumab, a B-lymphocyte stimulator-specific inhibitor, in patients with autoantibody-positive systemic lupus erythematosus from the randomised controlled BLISS trials [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73 (5): 838-844.
- [45] Ginzler EM, Wallace DJ, Merrill JT, et al. Disease control and safety of belimumab plus standard therapy over 7 years in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Rheumatol*, 2014, 41 (2): 300-309.
- [46] Margiotta DPE, Basta F, Batani V, et al. Belimumab and low-doses of mycophenolate mofetil as induction therapy of class IV lupus nephritis: case series and literature review [J]. *BMC Nephrol*, 2018, 19 (1): 54.
- [47] Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78 (6): 736-745.
- [48] 谢文慧, 张卓莉. 贝利尤单抗治疗系统性红斑狼疮: 现状与展望 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2020, 24 (7): 495-499.

(收稿日期: 2022-01-05; 修回日期: 2022-03-05)

二甲双胍治疗呼吸系统疾病的研究进展

李淼, 吴桂甫* (梧州市工人医院, 广西 梧州 543000)

摘要: 二甲双胍是目前临床上最常用的降血糖药之一, 经过 60 多年的临床实践, 已经成为治疗 2 型糖尿病的首选用药。近年来, 越来越多的研究发现二甲双胍不仅降糖作用确切, 其在临床上的降糖外作用也得到广泛的关注, 目前已经有研究证明二甲双胍对肿瘤、心血管系统、神经精神系统、呼吸系统等疾病的潜在治疗作用。本文通过检索国内外文献, 对二甲双胍在呼吸系统疾病中的相关临床研究进行综述, 为进一步实验研究及指导临床用药提供科学依据。

关键词: 二甲双胍; 肺肿瘤; 肺纤维化; 肺动脉高压; 哮喘; 肺结核

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2363-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.025

Research progress in metformin for respiratory diseases

LI Miao, WU Gui-fu* (Wuzhou Gongren Hospital, Wuzhou Guangxi 543000)

Abstract: Metformin is the most frequently used hypoglycemic drugs in clinical practice, and it has been the first line drug for diabetes after more than 60 years of clinical use. Recently, researchers have found that metformin not only is effective for diabetes, but also can assist the treatment of cancer or other diseases. This article reviewed the relevant clinical research of metformin in respiratory diseases in recent years to provide scientific basis for further experimental research and clinical medication.

Key words: metformin; lung neoplasm; pulmonary fibrosis; pulmonary hypertension; asthma; pulmonary tuberculosis

全球每年都会新增大量的慢性呼吸系统疾病患者, 世界卫生组织 (WHO) 将慢性呼吸系统疾病与心脑血管疾病、恶性肿瘤、糖尿病与代谢性疾病共同列为全球四大慢性非传染性疾病。在我国, 慢性呼吸系统疾病是我国居民主要死因之一, 其病死率仅次于心脑血管疾病和癌症^[1]。二甲双胍作为临床上治疗 2 型糖尿病的一线药物, 主要通过抑制体内线粒体呼吸链复合物 I, 并活化腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK), 达到降低血糖的目的^[2]。近年来, 随着对二甲双胍研究的深入, 其越来越多的降糖外作用被揭示, 二甲双胍在肿瘤、心血管系统、神经精神系统、呼吸系统等疾病中的治疗作用也成为近年来的热门研究领域。本文就二甲双胍在呼吸系统疾病中的治疗作用及其研究进展进行综述, 为呼吸系统疾病的诊治提供新的治疗方向。

1 二甲双胍对呼吸系统疾病的治疗作用

1.1 二甲双胍对肺肿瘤的治疗作用

研究显示二甲双胍具有间接 (依赖胰岛素) 和直接 (不依赖胰岛素) 抗肿瘤作用^[3]。二甲双胍的间接抗肿瘤作用是通过增加胰岛素敏感性和降低循环胰岛素水平来减弱高胰岛素血症对肺癌生长的刺激作用^[4]。相比之下, 二甲双胍的直接作用是由 AMPK 的激活引起的。AMPK 是一种高度保守的真核蛋白激酶, 在细胞能量稳态方面起着至关重要的作用。AMPK 信号的失调是癌症尤其是肺癌最常见的机制, AMPK 失活可以激活机体上皮细胞-间充质转化 (EMT) 诱导肺癌转移^[5]。二甲双胍通过破坏线粒体电子传递链 (ETC) 复合物 I 间接激活 AMPK, 导致 ATP 合成减少, 细胞 AMP/ATP 比率增加而抑制肿瘤细胞的生长和转移^[6-7]。除 AMPK 途径外, 二甲双胍还能够通过独立的信号通路抑制雷帕霉素靶蛋白复合体 1 (mTORC1) 靶点, 从而发挥抗肿瘤作用^[8]。二甲双胍通过破坏 ETC I 干扰细胞能量代谢, 诱导 AMPK 活化并间接抑制 mTORC1 以

作者简介: 李淼, 女, 主管药师, 主要从事医院药学工作, email: 396854994@qq.com *通信作者: 吴桂甫, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 595940274@qq.com

抑制肿瘤细胞中的蛋白质合成和增殖,减少肺癌细胞的局部侵袭性和转移^[9]。Chuang 等^[10]在一项回顾性队列研究中发现,在无法手术的糖尿病合并非小细胞肺癌患者中使用二甲双胍可带来生存获益,表明二甲双胍具有潜在的抗肿瘤作用。Zhang 等^[11]在体外细胞实验中发现二甲双胍与培美曲塞联合使用比单独使用二甲双胍或培美曲塞更能诱导肿瘤细胞凋亡,这些结果表明,二甲双胍和培美曲塞的组合通过诱导细胞凋亡或阻断细胞周期对非小细胞肺癌的治疗具有协同作用。

放射疗法是一种通过电离辐射的生物学效应破坏肿瘤的方法,但辐射对正常肺实质的损伤仍然是胸部相关放疗的剂量限制因素。Wink 等^[12]发现,在同步放化疗期间使用二甲双胍可提高糖尿病和局部晚期非小细胞肺癌患者的无进展生存期。Hansel 等^[13]使用放射诱导的肺损伤小鼠模型,发现二甲双胍能有效地限制放疗诱导的正常肺细胞衰老和衰老相关的分泌表型(SASP)表达水平,从而有效地限制了血管功能障碍,即与辐射后早期循环免疫和肿瘤细胞外渗增加相关的血管通透性增加(急性效应),实验结果表明二甲双胍对正常肺组织具有辐射防护作用,可能使放疗使用更高的辐射剂量,增加肿瘤控制的可能性和存活率。Wang 等^[14]通过大鼠模型,发现二甲双胍可显著降低大鼠放疗期间 I 型胶原蛋白水平和转化生长因子 β (TGF- β)表达,并抑制磷酸化信号转导分子 2(p-Smad2)和磷酸化信号转导分子 3(p-Smad3)表达,减轻辐射诱导的肺纤维化,表明二甲双胍可作为肺癌治疗中的辐射防护剂。王晔等^[15]探讨了二甲双胍对大鼠放射性肺纤维化的防治效果及机制,发现二甲双胍可显著减轻由于射线造成的影像学和组织学的纤维化表现以及肺密度,并以剂量依赖的方式抑制非小细胞肺癌 A549 和 H460 细胞的活性。

1.2 二甲双胍对慢性阻塞性肺疾病的治疗作用

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续气流受限和异常炎症反应为特征的常见慢性呼吸系统疾病^[16]。Wang 等^[17]通过一项巢式病例对照研究,发现二甲双胍的使用能明显降低 COPD 急性加重的风险,降低患者全因死亡率。Tao 等^[18]通过建立 COPD 大鼠模型并予二甲双胍进行干预,发现二甲双胍能上调 COPD 模型大鼠核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1)、多药耐药相关蛋白 1(MRP1)和组蛋白脱乙酰基酶 2

(HDAC2)的表达,改善模型大鼠肺功能,减少其肺部病理损伤,降低炎症和氧化应激水平以及由香烟烟雾提取物诱导的糖皮质激素抵抗。

Saito 等^[19]通过建立 COPD 小鼠模型及体外细胞实验,发现暴露于香烟烟雾提取物的 COPD 模型小鼠肺内核纤层蛋白 B1(Lamin B1)及 DEPTOR(含有 mTOR 相互作用蛋白的 DEP 结构域)蛋白水平降低,同时雷帕霉素激酶(mTOR)激活并伴随着线粒体质量和细胞衰老的增加,而二甲双胍可通过增加 DEPTOR 表达来防止香烟烟雾提取物诱导的人支气管上皮细胞(HBEC)衰老和线粒体积累,减缓 COPD 发病过程中细胞衰老的进展。

1.3 二甲双胍对肺纤维化的治疗作用

特发性肺纤维化(IPF)是一种进行性和不可逆的间质性肺病,其特征是肺成纤维细胞的增殖和分化以及细胞外基质的积累,导致肺组织结构破坏、功能受损。该病预后极差,目前临床主要采用激素、免疫抑制剂或肺移植手术等方式治疗,但均存在一定的临床风险,并不能达到理想的治疗效果^[20],研究表明大多患者确诊后中位生存时间仅 2~3 年^[21]。Cheng 等^[22]通过二氧化硅诱导的肺纤维化小鼠模型,发现二甲双胍给药质量浓度为 300 mg·kg⁻¹时,可显著降低二氧化硅灌注小鼠早期和晚期纤维化阶段的肺部炎症和纤维化。此外,二甲双胍还可逆转二氧化硅诱导的细胞毒性、氧化应激和上皮细胞中的上皮间充质转化过程,抑制巨噬细胞(THP-1)的炎症反应,并减轻 TGF- β 1 通过 AMPK 依赖性途径刺激人胚肺成纤维细胞(MRC-5)中的成纤维细胞活化。

Wang 等^[23]采用博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型及 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡实验发现二甲双胍可通过抑制转谷氨酰胺酶 2 和 TGF- β 1 通路减轻肺纤维化的进展。郝伟等^[24]在体外细胞实验中发现二甲双胍(10、100 μ mol·L⁻¹)可显著抑制 TGF- β 1 诱导的大鼠肺泡上皮 II 型细胞的增殖及间质转分化而改善肺纤维化。Xiao 等^[25]通过博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型,发现二甲双胍的抗纤维化作用与吡非尼酮无明显差异,可显著抑制博来霉素诱导的小鼠肺纤维化。Tang 等^[26]通过体外细胞实验发现,二甲双胍以浓度依赖的方式显著降低线粒体呼吸链复合物 I 活性并上调 p-AMPK/AMPK 的表达并通过调节 AMPK/mTOR 通路来阻止 6-磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶 3(PFKFB3)相关的有氧糖酵解增强 MRC-5 中的胶原蛋白合成。

1.4 二甲双胍对肺动脉高压 (PAH) 的治疗作用

PAH 是由多种因素引起的肺血管功能及结构性异常, 导致肺血管阻力增加, 引起肺动脉压力升高的临床综合征, 严重者可导致右心衰竭甚至死亡。尚文丽等^[27]通过给野百合碱 (MCT) 诱导的 PAH 大鼠模型腹腔注射二甲双胍, 发现二甲双胍可通过激活 AMPK 调控 Skp2/P27 信号通路, 降低右心室收缩压及右心室肥大指数, 减轻肺血管管壁增厚, 降低 S 期蛋白相关激酶 2 (Skp2) 表达及 AMPK 的磷酸化, 增高 P27 蛋白水平, 抑制 PAH 大鼠模型中肺动脉平滑肌细胞的增殖及肺血管重塑的发生。

Dean 等^[28]通过予 PAH 大鼠口服二甲双胍 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 发现二甲双胍治疗可降低 PAH 大鼠右心室收缩压、逆转右心室肥大和减少肺血管重构。此外, 二甲双胍还可增加大鼠肺 AMP 激活的蛋白激酶信号传导, 降低肺和循环中的芳香化酶 (雌激素代谢酶) 水平, 抑制及逆转 PAH 的发展。Rana 等^[29]通过予持续性肺动脉高压 (PPHN) 新生羔羊注射二甲双胍处理, 发现二甲双胍可增加 PPHN 新生羔羊肺动脉内皮细胞 (PAEC) 中线粒体复合蛋白数量和血管密度, 减缓及逆转 PPHN 的进展。

1.5 二甲双胍对急性肺损伤 (ALI) 的治疗作用

ALI 是临床上重症患者常见的并发症, 是导致临床死亡的重要原因之一。Zhang 等^[30]通过给脂多糖 (LPS) 诱导的 ALI 大鼠模型注射二甲双胍, 发现二甲双胍可以减少炎症细胞因子和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 蛋白表达的释放, 改善模型大鼠肺干/湿比, 并显著改善 ALI 期间 LPS 诱导的肺部破坏。此外, 二甲双胍抑制 LPS 诱导的中性粒细胞和巨噬细胞浸润, 降低髓过氧化物酶 (MPO) 活性, 并促进肺组织中 AMPK- $\alpha 1$ 的表达以减轻 ALI 期间的毛细血管损伤。

Wu 等^[31]采用百草枯暴露法建立大鼠 ALI 模型和急性 II 型肺泡上皮细胞 (RLE-6TN) 损伤模型, 并用二甲双胍进行干预, 发现其可激活 AMPK/核因子 κB (NF- κB) 途径, 下调炎症介质如白细胞介素 -6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 并上调超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 氧化指数, 有效减轻百草枯中毒引起的 ALI。王贵佐等^[32]通过给 ALI 大鼠模型腹腔注射二甲双胍 ($250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 发现二甲双胍通过上调 SOD1 的表达, 可有效抑制 LPS 诱发的肺泡过氧化损伤及肺组织炎性浸

润, 减轻 ALI 期间的毛细血管损伤。

1.6 二甲双胍在哮喘中的治疗作用

哮喘是一种以气道高反应性和气道重塑为特征的慢性炎症性气道疾病。有队列研究显示糖尿病患者哮喘发病率显著高于非糖尿病患者, 且胰岛素可促进气道平滑肌收缩并增强气道高反应性, 进一步增加哮喘发生的风险^[33], 而二甲双胍的使用能降低与哮喘相关就诊和住院的风险^[34]。马文娟等^[35]采用卵白蛋白 (OVA) 致敏并激发制备慢性哮喘小鼠模型并给予二甲双胍进行干预, 发现二甲双胍可抑制哮喘小鼠气道壁炎症细胞浸润、杯状细胞增生、上皮下胶原沉积等病理改变, 增加气道上皮下新生血管数目和面积。

Sun 等^[36]通过体外细胞实验首次证实二甲双胍可通过抑制 NF- κB 信号传导, 抑制由 LPS 诱导的 TNF- α 、IL-6、细胞间黏附分子 -1 (ICAM-1) 和血管细胞黏附分子 -1 (VCAM-1) 的分泌, 改善 LPS 诱导的支气管上皮细胞损伤而缓解哮喘症状。Guo 等^[37]通过高脂饮食 (HFD) 和 OVA 致敏, 建立了肥胖哮喘小鼠模型并予二甲双胍干预, 发现二甲双胍能显著增加肥胖哮喘小鼠调节性 T 细胞 (Treg) 水平及 Treg 相关转录因子 Foxp3 和 STAT5 的百分比, 降低炎症细胞因子 IL-4 和 TNF- α 水平, 减轻了肥胖哮喘小鼠的气道炎症。

1.7 二甲双胍对支气管肺发育不良 (BPD) 的治疗作用

BPD 是引起持续性呼吸窘迫的慢性肺部疾病, 以 X 线下实质性条纹变化和过度膨胀为其特征, 其特点是早产儿肺泡和血管发育受阻。Xiang 等^[38]通过高氧导致新生小鼠肺发育受损模型, 发现皮下注射二甲双胍 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 可增强高氧暴露新生小鼠中 CD31 及血管内皮细胞中 Ki-67 和 Gli1 的表达, 改善人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的增殖, 促进高氧致新生小鼠肺发育受损中肺血管发育。而接下来的小鼠实验进一步证实二甲双胍可通过调节机体巨噬细胞极化, 以改善 BPD 的肺血管发育^[39]。

Chen 等^[40]通过给 BPD 的大鼠模型皮下注射 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 二甲双胍, 发现实验大鼠病死率、肺泡间隔厚度、肺部炎症和纤维化均减少, 证明二甲双胍可通过减少肺部炎症和纤维化以及影响血管形成来改善 BPD。

1.8 二甲双胍对肺结核 (TB) 的治疗作用

有研究表明, 糖尿病患者患 TB 的风险比非糖尿病患者高出 2 ~ 3 倍, 且二甲双胍的使用

能明显降低糖尿病患者 TB 的患病率^[41]。Degner 等^[42]通过一项回顾性队列研究发现, 糖尿病会增加 TB 治疗不良结果的风险, 在 TB 治疗期间, 二甲双胍的使用与 TB 患者病死率降低之间存在显著相关性, 这表明二甲双胍在 TB 治疗中存在辅助性的潜在作用。

在一项回顾性研究中发现二甲双胍能抑制分枝杆菌的细胞内生长, 在空洞性肺结核合并糖尿病的患者中, 二甲双胍治疗可提高患者痰培养转阴率及降低病死率^[43]。李青等^[44]通过一项横断面研究发现, 二甲双胍对于抗结核治疗和结核病灶的愈合有辅助作用, 有利于血糖的控制, 促进结核空洞的闭合。杨万福等^[45]发现二甲双胍能明显提高肺结核患者痰菌转阴率, 减少肺空洞形成、耐药菌产生及肺结核复发。Rodriguez-Carlos 等^[46]通过体外细胞实验发现二甲双胍能上调 β -防御素 -2、 β -防御素 -3 和 β -防御素 -4 的水平, 减少巨噬细胞和肺上皮细胞的非结核分枝杆菌负荷, 通过调节先天性免疫分子水平促进机体对分枝杆菌的杀伤作用。

2 小结

目前, 二甲双胍仍主要作为治疗 2 型糖尿病的一线药物, 其药品说明书并未更新适应证。但随着二甲双胍药理作用研究的不断深入, 其越来越多的降糖外作用被不断发掘。二甲双胍主要通过调节 AMPK 信号通路, 发挥抗氧化、抗炎、免疫系统调节、调节细胞增殖凋亡等作用, 对呼吸系统疾病产生治疗作用。

在呼吸系统疾病的诊疗过程中, 临床医师一直在寻找疗效更佳不良反应更小的药物, 虽然二甲双胍对呼吸系统疾病的治疗作用仍处在研究阶段, 还未应用于临床, 但随着其临床药理的不断深入研究, 相信二甲双胍可为临床呼吸系统疾病的治疗提供新的策略。

参考文献

[1] 卢一, 杨达性, 齐栩. 我国呼吸系统疾病负担状况分析[J]. 中国卫生产业, 2019, 16(20): 3-7.
 [2] Feng J, Wang X, Ye X, et al. Mitochondria as an important target of metformin: the mechanism of action, toxic and side effects, and new therapeutic applications [J]. Pharmacol Res, 2022, 177: 106114.
 [3] Li C, Xue Y, Xi YR, et al. Progress in the application and mechanism of metformin in treating non-small cell lung cancer [J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 2873-2880.
 [4] Frasca F, Pandini G, Sciacca L, et al. The role of insulin

receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases [J]. Arch Physiol Biochem, 2008, 114(1): 23-37.
 [5] Xia YC, Zha JH, Sang YH, et al. AMPK activation by ASP4132 inhibits non-small cell lung cancer cell growth [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4): 365.
 [6] Griss T, Vincent EE, Egnatchik R, et al. Metformin antagonizes cancer cell proliferation by suppressing mitochondrial-dependent biosynthesis [J]. PLoS Biol, 2015, 13(12): e1002309.
 [7] Krall AS, Mullen PJ, Surjono F, et al. Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth [J]. Cell Metab, 2021, 33(5): 1013-1026. e6.
 [8] Jang SK, Hong SE, Lee DH, et al. Inhibition of mTORC1 through ATF4-induced REDD1 and Sestrin 2 expression by metformin [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 803.
 [9] Tran S, Killeen DE, Qazi S, et al. Association of metformin with the growth of vestibular schwannomas [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2021, 164(1): 182-187.
 [10] Chuang MC, Yang YH, Tsai YH, et al. Survival benefit associated with metformin use in inoperable non-small cell lung cancer patients with diabetes: a population-based retrospective cohort study [J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191129.
 [11] Zhang Y, Feng X, Li T, et al. Metformin synergistic pemetrexed suppresses non-small-cell lung cancer cell proliferation and invasion in vitro [J]. Cancer Med, 2017, 6(8): 1965-1975.
 [12] Wink KC, Belderbos JS, Dieleman EM, et al. Improved progression free survival for patients with diabetes and locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) using metformin during concurrent chemoradiotherapy [J]. Radiother Oncol, 2016, 118(3): 453-459.
 [13] Hansel C, Barr S, Schemann AV, et al. Metformin protects against radiation-induced acute effects by limiting senescence of bronchial-epithelial cells [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 7064.
 [14] Wang J, Wang Y, Han J, et al. Metformin attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis in a murine model [J]. Radiat Res, 2017, 188(1): 105-113.
 [15] 王晔, 熊咏超, 薛少博, 等. 二甲双胍对大鼠放射性肺纤维化的防治作用机制 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2017, 37(10): 736-741.
 [16] 李若瞳, 饶蓁蓁, 傅晏红, 等. 2030 年中国慢性阻塞性肺疾病的疾病负担预测与危险因素控制效果模拟 [J]. 中华流行病学杂志, 2022, 43(2): 201-206.
 [17] Wang MT, Lai JH, Huang YL, et al. Use of antidiabetic medications and risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation requiring hospitalization: a disease risk score-matched nested case-control study [J]. Respir Res, 2020, 21(1): 319.
 [18] Tao F, Zhou Y, Wang M, et al. Metformin alleviates chronic obstructive pulmonary disease and cigarette smoke extract-induced glucocorticoid resistance by activating the nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase-1 signal-

- ing pathway [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2022, 26 (2): 95-111.
- [19] Saito N, Araya J, Ito S, et al. Involvement of lamin B1 reduction in accelerated cellular senescence during chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis [J]. *J Immunol*, 2019, 202 (5): 1428-1440.
- [20] 郑东梅, 王星晨, 张莹, 等. 黄芪-知母药对肺纤维化大鼠的抗炎作用及机制研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (2): 297-303.
- [21] 张雪, 张群霞. 超声在肺纤维化中的应用进展 [J]. *临床超声医学杂志*, 2021, 23 (4): 300-302.
- [22] Cheng D, Xu Q, Wang Y, et al. Metformin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis via AMPK signaling [J]. *J Transl Med*, 2021, 19 (1): 349.
- [23] Wang Y, Lin C, Han R, et al. Metformin attenuates TGF- β 1-induced pulmonary fibrosis through inhibition of transglutaminase 2 and subsequent TGF- β pathways [J]. *3 Biotech*, 2020, 10 (6): 287.
- [24] 郝伟, 左东泽, 张俊秀, 等. 二甲双胍对 TGF- β 1 诱导的大鼠肺泡上皮 II 型细胞间质转分化的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26 (7): 744-752.
- [25] Xiao H, Huang X, Wang S, et al. Metformin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by suppressing IGF-1 [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 12 (3): 940-949.
- [26] Tang CJ, Xu J, Ye HY, et al. Metformin prevents PFK-FB3-related aerobic glycolysis from enhancing collagen synthesis in lung fibroblasts by regulating AMPK/mTOR pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (6): 581.
- [27] 尚文丽, 张莹莹, 陈芬芬, 等. 二甲双胍通过激活 AMPK 抑制肺动脉高压大鼠的肺血管重塑 [J]. *山西医科大学学报*, 2020, 51 (11): 1201-1205.
- [28] Dean A, Nilsen M, Loughlin L, et al. Metformin reverses development of pulmonary hypertension via aromatase inhibition [J]. *Hypertension*, 2016, 68 (2): 446-454.
- [29] Rana U, Callan E, Entringer B, et al. AMP-kinase dysfunction alters notch ligands to impair angiogenesis in neonatal pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62 (6): 719-731.
- [30] Zhang X, Shang F, Hui L, et al. The alleviative effects of metformin for lipopolysaccharide-induced acute lung injury rat model and its underlying mechanism [J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25 (4): 666-670.
- [31] Wu L, Cen Y, Feng M, et al. Metformin activates the protective effects of the ampk pathway in acute lung injury caused by paraquat poisoning [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1709718.
- [32] 王贵佐, 韩冬, 马惠辉, 等. 二甲双胍对小鼠急性肺损伤的保护作用及可能机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36 (8): 919-922.
- [33] Chen C, Hsu C, Li C, et al. Insulin use increases risk of asthma but metformin use reduces the risk in patients with diabetes in a Taiwanese population cohort [J]. *J Asthma*, 2017, 54 (10): 1019-1025.
- [34] Wu TD, Keet CA, Fawzy A, et al. Association of metformin initiation and risk of asthma exacerbation. a claims-based cohort study [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2019, 16 (12): 1527-1533.
- [35] 马文娴, 郭海琴, 韩新鹏, 等. 二甲双胍抑制慢性哮喘小鼠气道炎症、重塑及新生血管形成 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33 (4): 590-595.
- [36] Sun J, Huang N, Ma W, et al. Protective effects of metformin on lipopolysaccharide-induced airway epithelial cell injury via NF- κ B signaling inhibition [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19 (3): 1817-1823.
- [37] Guo Y, Shi J, Wang Q, et al. Metformin alleviates allergic airway inflammation and increases Treg cells in obese asthma [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (4): 2279-2284.
- [38] Xiang X, Wang L, Zhou L, et al. Metformin upregulates the expression of Gli1 in vascular endothelial cells in hyperoxia-exposed neonatal mice [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12 (10): 6092-6106.
- [39] Xiang X, Zhou L, Lin Z, et al. Metformin regulates macrophage polarization via the Shh signaling pathway to improve pulmonary vascular development in bronchopulmonary dysplasia [J]. *IUBMB Life*, 2021, 74 (3): 259-271.
- [40] Chen X, Walther FJ, Sengers RMA, et al. Metformin attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by reducing the inflammatory response [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309 (3): L262-270.
- [41] Marupuru S, Senapati P, Pathadka S, et al. Protective effect of metformin against tuberculosis infections in diabetic patients: an observational study of south Indian tertiary healthcare facility [J]. *Braz J Infect Dis*, 2017, 21 (3): 312-316.
- [42] Degner NR, Wang JY, Golub JE, et al. Metformin use reverses the increased mortality associated with diabetes mellitus during tuberculosis treatment [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66 (2): 198-205.
- [43] Lee YJ, Han SK, Park JH, et al. The effect of metformin on culture conversion in tuberculosis patients with diabetes mellitus [J]. *Korean J Intern Med*, 2018, 33 (5): 933-940.
- [44] 李青, 贾俊楠, 安军, 等. 二甲双胍对肺结核合并 2 型糖尿病患者辅助治疗的横断面研究 [J]. *中国热带医学*, 2018, 18 (6): 609-613.
- [45] 杨万福, 张菊侠. 二甲双胍对肺结核合并糖尿病患者痰菌转阴的影响 [J]. *临床内科杂志*, 2020, 37 (3): 184-186.
- [46] Rodriguez-Carlos A, Valdez-Miramontes C, Marin-Lu- evano P, et al. Metformin promotes *Mycobacterium tuberculosis* killing and increases the production of human β -defensins in lung epithelial cells and macrophages [J]. *Microbes Infect*, 2020, 22 (3): 111-118.

(收稿日期: 2022-03-26; 修回日期: 2022-05-12)

重楼皂苷抗肺癌作用机制的研究进展

何娜^{1,2}, 杨洋², 朱婧^{1,2}, 张静媚^{1,2}, 陈琴华², 杨光义^{1*} (1. 广州中医药大学第七临床医学院, 广东 深圳 518000; 2. 深圳市宝安纯中医治疗医院, 广东 深圳 518102)

摘要: 重楼皂苷是中药重楼发挥抗肺癌作用的主要活性成分。现代药理学研究表明, 重楼皂苷能够通过抑制肿瘤细胞增殖生长、诱导肿瘤细胞程序性死亡、逆转肿瘤细胞耐药性、抗肿瘤细胞迁徙和侵袭、调节机体免疫等机制发挥抗肺癌作用, 然而目前尚无有关重楼皂苷抗肺癌作用机制的系统梳理。本文综述了国内外有关重楼皂苷抗肺癌作用及作用机制的研究进展, 为重楼皂苷的抗肺癌药物研发提供参考。

关键词: 重楼皂苷; 肺癌; 作用机制; 内质网应激; PI3K 通路; STAT3 通路

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2368-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.026

Research progress in the mechanism of anti-lung cancer effect of polyphyllin

HE Na^{1,2}, YANG Yang², ZHU Jing^{1,2}, ZHANG Jing-mei^{1,2}, CHEN Qin-hua², YANG Guang-yi^{1*}
(1. *The Seventh Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518000*; 2. *Shenzhen Bao'an Hospital of Authentic Traditional Chinese Medicine Therapy, Shenzhen Guangdong 518102*)

Abstract: Polyphyllin, the main active component in Chinese medicine *Rhizoma Paridis*, plays an anti-lung cancer effect. Modern pharmacological studies have shown that polyphyllin exert anti-lung cancer effect by inhibiting the proliferation and growth of tumor cells, inducing programmed death, reversing drug resistance, anti-migration and invasion, regulating body immunity and so on. However, no systematic review on the anti-lung cancer mechanism of polyphyllin was found. This paper reviewed the research progress on the anti-lung cancer effect and mechanism of polyphyllin home and abroad, providing reference for the research and development of anti-lung cancer drugs of polyphyllin.

Key words: polyphyllin; lung cancer; action mechanism; endoplasmic reticulum stress; PI3K pathway; STAT3 pathway

重楼是百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎, 具有清热解毒、消肿止痛和凉肝定惊的功效, 为中医临床常用的抗肺癌中药^[1]。重楼皂苷为重楼的主要活性成分, 具有抗肿瘤、止血、镇静止痛、抗菌、抗炎等多种药理作用, 对肺癌、肝癌、胃癌等多种恶性肿瘤均具有抑制效应。国际癌症研究机构 (IARC) 发布的 2020 年全球癌症数据表明, 在所有恶性

肿瘤中, 肺癌的病死率位居第一, 5 年生存率仅为 30% ~ 60%^[2]。传统的手术、化疗、放疗以及新兴的免疫治疗和靶向治疗, 均存在着细胞耐药及毒性等局限性, 新的肺癌治疗方案亟待开发。中医药治疗因其辨证论治的独特理念及天然低毒等优势, 已成为肺癌综合治疗中的重要组分。研究表明, 重楼皂苷 I、II、III、V、VI、VII、H, 纤细薯蓣皂苷, 17-羟基纤细薯蓣皂苷以及重楼总皂苷等 (见图 1) 均具有抑制肺癌作用^[3]。目前尚无关于重楼皂苷抗肺癌作用机制的系统综述,

基金项目: 广东省中医药局项目 (No. 20221340); 深圳市科创委项目 (No. JCYJ20210324142012033); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目资助 (No. SZZYSM202106004)。

作者简介: 何娜, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 1031284788@qq.com * **通信作者:** 杨光义, 男, 博士, 主要从事医院药学管理、中药活性成分与药代动力学研究, email: 13971908298@163.com

鉴于此, 本文综述了国内外关于重楼皂苷抗肺癌作用及其作用机制方面的相关研究, 以期为临床

更好地利用重楼皂苷治疗肺癌, 以及抗肺癌新药的研发提供理论支持。

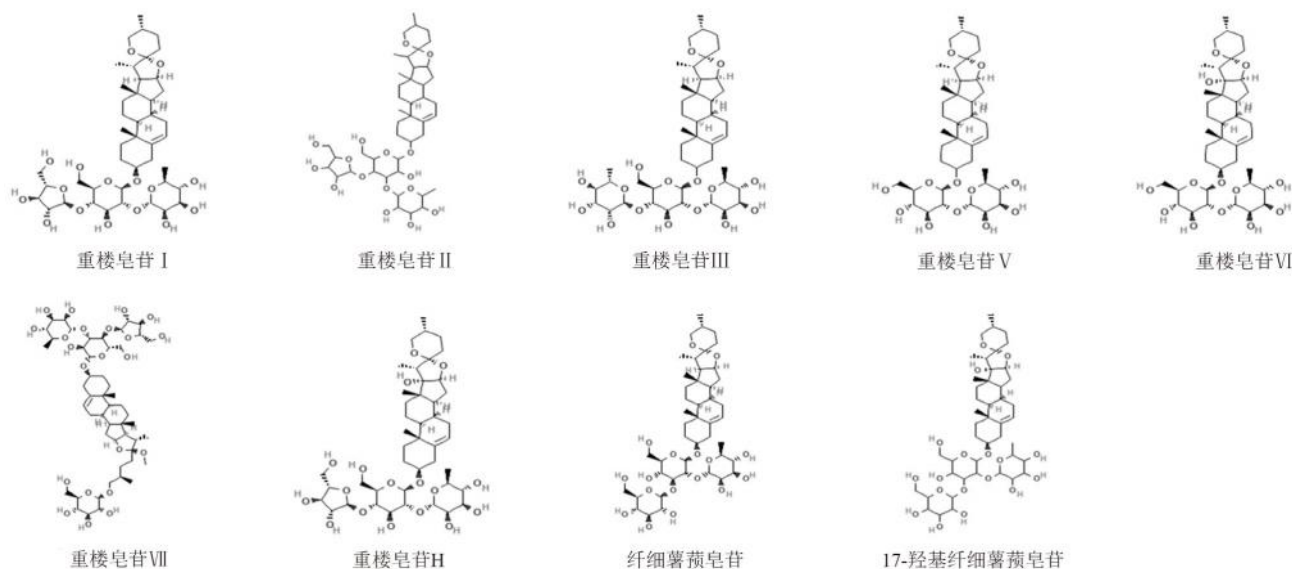


图 1 常见的抗肺癌重楼皂苷结构式

Fig 1 Common structural formula of polyphyllin with anti-lung cancer effect

1 重楼皂苷抗肺癌作用机制

1.1 抑制肿瘤细胞增殖

重楼皂苷可将不同的肿瘤细胞阻滞在不同的细胞周期, 进而抑制肿瘤细胞的增殖。细胞周期蛋白 B1 (Cyclin B1) 是控制 G₂/M 检查点的关键因子^[4], 肿瘤抑制基因 P53 能够调控细胞周期阻滞、DNA 损伤和细胞凋亡^[5]。Lin 等^[6]发现重楼皂苷 VI 和 VII 能够显著抑制肺癌 A549 细胞和 H1299 细胞的生长, 将并细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 其机制可能与上调肿瘤抑制受体 P53, 死亡受体 DR3、DR5、Fas, cleaved PARP, cleaved caspase-3 的表达水平, 下调 Cyclin B1 的表达水平有关。Liu 等^[7]发现重楼皂苷 I 能够将肺癌细胞的细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 其作用与下调 Ki-67、PCNA、Cyclin B1、Cyclin D1 的 mRNA 及蛋白的表达水平, 上调 P15 和 P21 的表达水平, 提高活性氧 (ROS) 的水平有关。同时, 在内质网应激的情况下, 重楼皂苷 I 还能够保护 C/EBP α 同源蛋白 (CHOP) 免受 GRP78 诱导的泛素化和降解, 进而促进细胞死亡。zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 的过表达能促使肿瘤发生, 推动肿瘤的恶性进展^[8]。重楼皂苷 I 还能将肺癌细胞系 PC-9 细胞的细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 其机制可能为重楼皂苷 I 通过促进 SAPK/JNK 的磷酸化, 下调 P53、DNMT1 的蛋白表达来实现对 EZH2 的抑制作用, 进而抑制非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞的生长并诱导细胞周期阻滞^[9]。HOTAIR 是

一种长链非编码 RNA, 在各种类型肿瘤的发生发展中起着驱动作用^[10], c-Jun 是第一个发现的纯致癌因子^[11]。重楼皂苷 I 作用于 PC9、H1650 细胞后, 通过上调 c-Jun 蛋白的表达, 下调 HOTAIR 的表达, 从而诱导 P21 蛋白的表达, 抑制 NSCLC 细胞的生长。HOTAIR、c-Jun 和 p21 调节轴之间的相互作用在重楼皂苷 I 的整体抗肺癌作用中趋于一致^[12]。郭慧敏等^[13]将重楼皂苷 II 与喜树碱联用于 H460 细胞、H446 细胞, 发现两者联用能够协同激活 p38 MAPK 信号通路, 抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡。

重楼皂苷主要通过下调细胞周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin D1 的表达来实现对肺癌细胞的周期阻滞。同时, 重楼皂苷还能够通过下调增殖相关抗原 Ki-67、PCNA、P65、DNMT1、HOTAIR、EZH2 的表达; 上调 P53、P15、P21、DR3、DR5、Fas、cleaved caspase-3、cleaved PARP、c-Jun 的表达; 激活 SAPK/JNK、P38 MAPK 通路; 增加细胞内 ROS 含量; 保护 CHOP 等途径抑制细胞生长, 促进细胞死亡。

1.2 诱导肿瘤细胞程序性死亡

细胞程序性死亡的表现形式包括细胞凋亡、细胞焦亡、细胞自噬等, 诱导细胞程序性死亡是抗肿瘤的主要手段之一。Nlr3 炎症小体的激活和 Gsdmd 的裂解是细胞焦亡的两个核心步骤^[14]。Teng 等^[15]研究发现重楼皂苷 VI 能够激活 ROS/NF- κ B/Nlr3/Gsdmd 信号轴, 引发 caspase-1 介

导的细胞焦亡, 最终导致 A549 细胞和 H1299 细胞死亡。Li 等^[16]的研究表明, EZH2 的过度表达显著增加 A549 细胞和 NCI-358 细胞中 Bcl-2、CDK2 和 Cyclin A2 的表达, 减少 Bax、cleaved caspase-3 的表达, 从而促使肿瘤发生, 而重楼皂苷 I 能通过调节 STAT3/HOTAIR 轴抑制 EZH2 的表达, 逆转 EZH2 的影响。另有研究发现, 重楼皂苷 I 与 AMPK 具有良好亲和力, 可直接结合 AMPK 上的变构药物和代谢物的结合位点并形成氢键, 降低 mTORC1 复合物及其靶标的磷酸化水平, 可能通过直接靶向激活 AMPK 来诱导 NSCLC 细胞发生自噬, 进而抑制 NSCLC 细胞生长和增殖^[17]。PI3K/Akt 信号通路是调控细胞生长、迁移、增殖和代谢的重要通路^[18], NF- κ B 可通过对其他靶基因的调控作用抑制细胞凋亡、促使肿瘤发生^[19]。在 A549 细胞中, 重楼皂苷 VII 可通过 PI3K/Akt 轴介导的对 NF- κ B p56 的抑制作用导致线粒体功能障碍, 诱导 A549 细胞凋亡^[20]。王青等^[21]发现重楼总皂苷能够以剂量依赖的方式抑制 A549 细胞的生长, 诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与上调 caspase-3 的表达, 下调 Bcl-2 的表达有关。而游丽娇等^[22]将不同浓度的重楼皂苷 II 作用于 A549 细胞 48 h, 发现其能够降低 A549 细胞的存活率, 机制可能为重楼皂苷 II 降低细胞线粒体膜电位 (MMP), 提高细胞内 Ca^{2+} 水平, 增加细胞内 ROS 含量, 调节凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 表达, 促进 A549 细胞凋亡。

大多数重楼皂苷均可诱导肺癌细胞凋亡, 其中重楼皂苷 VI 兼可诱导细胞焦亡, 重楼皂苷 I 兼可诱导细胞自噬。重楼皂苷诱导细胞程序性死亡的机制主要为调节凋亡相关蛋白的表达, 同时 ROS 含量、STAT3/HOTAIR 通路、PI3K/Akt/NF- κ B 通路以及 MMP 亦与其诱导作用密切相关。

1.3 逆转肿瘤细胞耐药性

重楼皂苷 I 和 VII 可增强耐顺铂细胞系 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性, 其机制为重楼皂苷 I 和 VII 增加 P53 和 Bax 的表达, 减少 Bcl-2 的表达, 导致 PARP 和 caspase-3 激活, 最终引发细胞凋亡。此外, 重楼皂苷 I、VII 与顺铂联用后, 能够增强顺铂对 CIP2A 及其下游 Akt/mTOR 信号级联的抑制作用, 进而逆转 A549/DDP 细胞的上皮间质转化 (EMT)^[23]。重楼皂苷 II 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 提高耐药 PC-9 细胞对吉非替尼的敏感性^[24]。

在重楼皂苷的耐药性逆转研究中, 重楼皂苷 I 的研究最广泛。与厄洛替尼联用, 重楼皂苷

I 可通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路, 逆转厄洛替尼耐药肺癌细胞的上皮间质转化 (EMT), 进而逆转肺癌细胞对厄洛替尼的 EMT 相关耐药性^[25]; 与吉非替尼联用, 重楼皂苷 I 可通过调控 MALAT1/STAT3 信号通路, 减少 MALAT1 表达, 诱导 STAT3 磷酸化, 进而抑制吉非替尼耐药的 PC-9ZD 细胞的生长, 并诱导其凋亡^[26]; 与帕博西尼联用, 重楼皂苷 I 能够通过调控 P21/CDK2/Rb 信号通路, 上调 P21, 干扰 CDK2 功能, 进而抑制 NSCLC 细胞的视网膜母细胞瘤抑制蛋白 Rb, 逆转肺癌细胞对帕博西尼的耐药性^[27]; 与奥希替尼联用, 重楼皂苷 I 可通过抑制 PI3K/Akt 通路并上调凋亡相关蛋白 Fas、cleaved caspase-3、cleaved PARP 的表达, 在体内外逆转耐药细胞系 PC-9/OR、H1975/OR 对奥希替尼的耐药性^[28]。

重楼皂苷可作为多种化疗药物的增敏剂。重楼皂苷 I 可调控 IL-6/STAT3、MALAT1/STAT3、P21/CDK2/Rb、PI3K/Akt、CIP2A/Akt/mTOR 信号通路, 重楼皂苷 II 可调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 重楼皂苷 VII 可调控 CIP2A/Akt/mTOR 信号通路, 进而逆转肺癌细胞对化疗药物的耐药性。值得注意的是, PI3K/Akt 信号通路为重楼皂苷发挥逆转耐药性作用的关键通路。

1.4 抗肿瘤细胞迁徙、侵袭

S100A8 在 NSCLC 患者肿瘤组织中高表达, 且其可能参与免疫抑制, 促进肿瘤细胞逃逸^[29]。罗斌等^[30]将重楼皂苷 VII 给药于 C57BL/B 小鼠皮下移植瘤模型, 发现重楼皂苷 VII 能够降低肺脏模型中髓源性抑制细胞 MDSCs 分泌的吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (IDO) 含量以及 S100A8 的表达, 提示其可能通过影响 MDSCs 的免疫抑制作用, 进而抑制转移前微环境 (PMN) 形成, 预防肿瘤肺转移, 但具体机制仍待进一步研究。基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一类细胞外基质降解酶, 参与肿瘤细胞生长、迁移、侵袭、肿瘤血管新生等过程^[31]。重楼皂苷 I 能够剂量依赖性地抑制 A549 细胞的侵袭和转移, 其机制可能与降低 MMP-9 的表达^[32], 或上调 E-cad 的表达有关^[33], 且重楼皂苷 I 联合顺铂对诱导人肺腺癌细胞凋亡及降低其迁徙转移有协同作用^[34]。何昊等^[35]的研究进一步发现, 重楼皂苷 VII 作用于 H460 细胞后, 能够显著下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达, 同时, 上调 cleaved caspase-3、Bax 表达, 下调 ICAD、Bcl-2 表达, 表明重楼皂苷 VII 在体外可能通过调节 MMPs 抑制 H460 细胞的迁移和侵袭, 促使凋亡发生。血管内皮生长因子 (VEGF) 是最具代

表性的促血管生长因子,能刺激血管内皮细胞增殖、迁移、侵袭,增加血管通透性^[36]。重楼皂苷 I 在缺氧条件下能抑制 VEGF 的表达^[37]。邓日强等^[38]将重楼皂苷 III 和顺铂联用于小鼠肺癌皮下移植瘤,发现重楼皂苷 III 可通过下调 VEGF 的表达,减慢新生肿瘤的生成速度,抑制肺癌生长及转移。而王青等^[39]发现重楼皂苷 I 能够剂量依赖性地诱导肺循环肿瘤细胞 CTC 凋亡,将 CTC 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期。这提示重楼皂苷 I 可能通过抑制 CTC,进而抑制肺肿瘤的迁移和侵袭,但其分子机制仍有待进一步揭示。

重楼皂苷主要通过影响肿瘤微环境的形成来抑制肺癌细胞的迁移侵袭,能够调节 MMP-2、MMP-9、IDO、S100A8、VEGF 以及 E-cad 的表达,进而发挥迁移抑制作用。

1.5 协同抗肿瘤

协同用药即不同药物通过作用于不同靶点或提高成分溶解度等方式发挥不对称作用,达到协同增效的目的。重楼皂苷的协同用药方式主要包括:

① 重楼皂苷与化疗手段联用:如重楼皂苷 III 与顺铂联用后对 Lewis 皮下移植肺癌瘤的生长和转移抑制作用增强;顺铂、重楼皂苷 I 联合应用于 A549 细胞,诱导凋亡及抗迁徙作用优于两者单独应用^[40];重楼皂苷 II 与喜树碱(CPT)联合用于 H460、H446 细胞系,能够增加 H460、H446 的晚期凋亡率,且显著降低 H446 的早期凋亡率。

② 重楼皂苷单体间联用:如 Formosanin C 和重楼皂苷 II 联用后,通过激活 Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-8 和 cleaved caspase-9,进而触发 Beclin1 的裂解以抑制 Formosanin C 诱导的自噬并促进凋亡,两者联用具有协同抗肿瘤作用^[41]。

③ 重楼皂苷与其他中药单体联用:张丽丽^[42]的研究表明,0.125 ~ 2 μmol · L⁻¹ 的重楼皂苷单体 I、II、VII、H 和 15 μmol · L⁻¹ 姜黄素进行非等比联合应用具有协同抗肿瘤作用。其中,实验浓度的重楼皂苷 II 与姜黄素联合能够促进姜黄素的细胞吸收,其机制可能是通过 MAPK/PI3K/Akt 途径诱导细胞凋亡,进而发挥协同抗肿瘤作用。

肿瘤免疫逃逸是恶性肿瘤的重要特征,重楼皂苷能通过调节机体免疫发挥抗肿瘤作用。STING/IRF3 通路可通过上调 I 型干扰素刺激基因表达来启动细胞毒性 T 细胞,进而发挥肿瘤抑制作用^[43]。重楼皂苷 VII 能够使巨噬细胞转化为 STING 控制的 M1 型免疫激活巨噬细胞,促进 M1 巨噬细胞分泌的促炎细胞因子,招募颗粒酶 B⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞进行肿瘤内浸润,从而发

挥抗肿瘤免疫逃逸的作用;同时能够抑制 STAT3 激活的巨噬细胞分泌的 IL-10 和 TGF-β,进而抑制 STAT3 激活,以旁分泌方式抑制 A549 及 LLC 肿瘤细胞的增殖和侵袭。这些过程均依赖于 STING 通路,且伴随 PD-L1 升高,提示重楼皂苷 VII 还可能有利于免疫检查点阻断治疗^[44]。

2 小结

综上所述,重楼皂苷能够以剂量或时间依赖的方式,通过多种作用机制发挥抗肿瘤作用。需要注意的是,重楼皂苷作用于不同细胞能够发挥不同的效应,在同一细胞中亦能够同时产生多种效应与机制,如增殖抑制常伴随着侵袭抑制等;然而目前重楼皂苷的抗肿瘤作用机制研究大多将重点放在单个成分作用后产生的某一作用机制或信号通路上,鲜有人探讨重楼皂苷在肿瘤细胞中产生不同机制的根本原因。重楼皂苷是否通过作用浓度、作用时间或作用方式等因素产生不同的效应,还需要进一步探讨。目前大多数研究并未进行重楼皂苷作用的直接靶点确证,其作用是直接或是间接、作用的具体环节等仍有待考量。因缺乏临床研究,使得单一成分作用于人体后是否能发挥预期的作用仍然存疑。因此,笔者认为,在现有的研究基础上,利用信息学手段、蛋白水平靶点确证技术、基因水平靶点确证技术等进行药物直接靶点确证,并进行重楼皂苷的成分群研究、关联机制研究、临床研究具有重要意义。同时,重楼皂苷具有一定的肝、肾、心血管毒性,且其毒性机制与作用机制存在重合^[45];而大多数研究均表明重楼皂苷无明显的肝肾毒性,这提示重楼皂苷量效毒关系的研究仍存在空缺,有待进一步补充。

相较于化疗药物,重楼皂苷的作用优势在于其能够诱导多种肿瘤细胞死亡,而无明显耐药性及毒副作用。重楼皂苷可通过诱导细胞凋亡、焦亡、自噬等方式导致肿瘤细胞死亡,还能够调控内质网应激;内质网应激对上述细胞死亡方式具有重要调控作用且其与肺癌的发生、发展密切相关,这提示内质网应激可能为重楼皂苷发挥抗肿瘤作用的关键节点;因此,未来针对于重楼皂苷调控内质网应激及其对下游细胞死亡方式诱导的机制研究对于重楼皂苷的疗效阐明及肺癌治疗具有重要意义。综合现有研究发现,PI3K/Akt 通路在重楼皂苷抗肺癌的作用机制网络中占有关键地位,且两个通路之间存在串扰作用,而目前尚无相关研究;未来或可进一步探讨重楼皂苷单体或重楼皂苷成分群作用于肺癌模型后,PI3K/Akt 通路与 STAT3 通路之间的串扰作用

以及单体与成分群的作用差异,进一步完善重楼皂苷的抗肺癌作用机制网络。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020: 271-272.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [3] 王林娜.重楼皂苷 II 体外抗肺癌活性、分子机制及其制剂处方前研究[D].武汉:湖北中医药大学,2019.
- [4] Petrachkova T, Wortinger LA, Bard AJ, et al. Lack of Cyclin B1 in zebrafish causes lengthening of G₂ and M phases [J]. *Dev Biol*, 2019, 451 (2): 167-179.
- [5] Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20 (8): 471-480.
- [6] Lin Z, Liu Y, Li F, et al. Anti-lung cancer effects of polyphyllin VI and VII potentially correlate with apoptosis in vitro and in vivo [J]. *Phytother Res*, 2015, 29 (10): 1568-1576.
- [7] Liu M, Zhu M, Dong R, et al. Polyphyllin I promotes cell death via suppressing UPR-mediated CHOP ubiquitination and degradation in non-small cell lung cancer [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19 (4): 255-266.
- [8] Huang X, Yan J, Zhang M, et al. Targeting epigenetic crosstalk as a therapeutic strategy for EZH2-aberrant solid tumors [J]. *Cell*, 2018, 175 (1): 186-199.
- [9] Li L, Wu JJ, Zheng F, et al. Inhibition of EZH2 via activation of SAPK/JNK and reduction of p65 and DNMT1 as a novel mechanism in inhibition of human lung cancer cells by polyphyllin I [J]. *J Exp Clin Canc Res*, 2016, 35 (1): 112.
- [10] Rajagopal T, Talluri S, Akshaya RL, et al. HOTAIR LncRNA: a novel oncogenic propellant in human cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 503: 1-18.
- [11] Manios K, Tsiambas E, Stavrakis I, et al. c-Fos/c-Jun transcription factors in non-small cell lung carcinoma [J]. *J Buon*, 2020, 25 (5): 2141-2143.
- [12] Zhao Y, Tang X, Huang Y, et al. Interaction of c-Jun and HOTAIR-increased expression of p21 converge in polyphyllin I -inhibited growth of human lung cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 10115-10127.
- [13] 郭慧敏,李祎亮,刘振.重楼皂苷 II 联合喜树碱对肺癌 H460、H446 细胞凋亡及信号通路的影响 [J]. *天津中医药*, 2019, 36 (2): 165-170.
- [14] Wang Y, Shi P, Chen Q, et al. Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. [J] *J Mol Cell Biol*, 2019, 11 (12): 1069-1082.
- [15] Teng JF, Mei QB, Zhou XG, et al. Polyphyllin VI induces Caspase-1-mediated pyroptosis via the induction of ROS/NF- κ B/NLRP3/GSDMD signal axis in non-small cell lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (1): 193.
- [16] Li HS, Xu Y. Inhibition of EZH2 via the STAT3/HOTAIR signaling axis contributes to cell cycle arrest and apoptosis induced by polyphyllin I in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Steroids*, 2020, 164: 108729.
- [17] 彭鹏,金鑫,申杰,等.重楼皂苷 I 通过激活 AMPK 信号通路诱导非小细胞肺癌自噬的作用机制 [J]. *湖北医药学院学报*, 2021, 40 (1): 1-6, 15, 113.
- [18] Pompura SL, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function [J]. *J Leukoc Biol*, 2018. Doi: 10.1002: 2MIR0817-349R.
- [19] Li S, Lv M, Qiu S, et al. NF- κ B p65 promotes ovarian cancer cell proliferation and migration via regulating mortalin [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (6): 4338-4348.
- [20] He H, Xu C, Zheng L, et al. Polyphyllin VII induces apoptotic cell death via inhibition of the PI3K/Akt and NF- κ B pathways in A549 human lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21 (2): 597-606.
- [21] 王青,蔡剑峰,郑婷婷,等.重楼总皂苷对 A549 细胞凋亡及 Caspase3、Bcl-2 蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35 (7): 1708-1710, 1929.
- [22] 游丽娇,孙芳园,杨小芳,等.重楼皂苷 II 对人非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28 (10): 81-85.
- [23] Feng F, Cheng P, Wang C, et al. Polyphyllin I and VII potentiate the chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin by enhancing apoptosis, reversing EMT and suppressing the CIP2A/AKT/mTOR signaling axis [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18 (5): 5428-5436.
- [24] Zheng R, Jiang H, Li J, et al. Polyphyllin II restores sensitization of the resistance of PC-9/ZD cells to gefitinib by a negative regulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2017, 17 (4): 376-385.
- [25] Lou W, Chen Y, Zhu KY, et al. Polyphyllin I overcomes EMT-associated resistance to erlotinib in lung cancer cells via IL-6/STAT3 pathway inhibition [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40 (8): 1306-1313.
- [26] Yang Q, Chen W, Xu Y, et al. Polyphyllin I modulates MALAT1/STAT3 signaling to induce apoptosis in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 356: 1-7.
- [27] Shen Z, Wang J, Ke K, et al. Polyphyllin I, a lethal partner of Palbociclib, suppresses non-small cell lung cancer through activation of p21/CDK2/Rb pathway in vitro and in vivo [J]. *Cell Cycle*, 2021, 17: 1-13.
- [28] Lai L, Shen Q, Wang Y, et al. Polyphyllin I reverses the resistance of osimertinib in non-small cell lung cancer cell through regulation of PI3K/Akt signaling [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 419: 115518.
- [29] 苏星星,金铮,贾馨竹,等.S100A8 作为非小细胞肺癌免疫检查点抑制剂治疗疗效预测指标的研究 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37 (3): 256-262.
- [30] 罗斌,姚望,阙祖俊,等.重楼皂苷 VII 下调 S100A8 抑制肺癌转移前微环境形成 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37 (4): 454-458, 462.
- [31] 刘明明,李爱玲,修瑞娟.基质金属蛋白酶的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34 (10): 1914-1920.
- [32] 吕芸,李晓玲.重楼皂苷 D 抑制 A549 细胞转移作用及

- 机制研究[J].中国药业, 2015, 24(22): 35-36.
- [33] 牟海军, 赵丹, 石寒冰, 等. 重楼皂苷 I 抑制肺腺癌 A549 细胞侵袭转移作用机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(9): 1309-1314.
- [34] 牟海军, 石寒冰, 赵丹, 等. 重楼皂苷联合顺铂对人肺腺癌 A549 细胞凋亡及迁徙转移的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017, 38(19): 2243-2244.
- [35] 何昊, 钱小英, 靳曼菲, 等. 重楼皂苷 VII 抑制肺腺癌 H460 细胞增殖和迁移能力研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(3): 433-439.
- [36] Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) -key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. Rom J Morphol Embryol, 2018, 59(2): 455-467.
- [37] 龙剑文, 皮先明, 王玉英, 等. 重楼皂苷 I 对缺氧诱导 HaCaT 细胞 VEGF 表达的影响[J]. 中国皮肤性病学期刊, 2015, 29(9): 891-893, 909.
- [38] 邓日强, 程江涛, 张宏华, 等. 蚤休薯蓣皂苷联合顺铂抑制小鼠移植瘤生长及转移[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(5): 504-509.
- [39] 王青, 阙祖俊, 罗斌, 等. 重楼皂苷, 对肺癌循环肿瘤细胞凋亡及周期的影响[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(5): 77-81.
- [40] 石寒冰, 牟海军, 赵丹, 等. 重楼皂苷 I 联合顺铂抗肺癌的体内外协同增效研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017, 38(19): 2236-2237.
- [41] Cui J, Man S, Cui N, et al. The synergistic anticancer effect of formosanin C and polyphyllin VII based on caspase-mediated cleavage of Beclin1 inhibiting autophagy and promoting apoptosis [J]. Cell Proliferation, 2018, 52(1): e12520.
- [42] 张丽丽. 楼黄配伍的抗肺癌机制研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- [43] larquist J, Hennies CM, Lehn MA, et al. STING-mediated DNA sensing promotes antitumour and autoimmune responses to dying cells [J]. J Immunol, 2014, 193: 6124-6134.
- [44] Yu J, Deng H, Xu Z. Targeting macrophage priming by polyphyllin VII triggers anti-tumor immunity via STING-governed cytotoxic T-cell infiltration in lung cancer [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 21360.
- [45] 王文平. 重楼皂苷 I、II、VII 的毒性评价及重楼皂苷 I 的肝毒性机制探究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- (收稿日期: 2022-04-02; 修回日期: 2022-05-31)

咀嚼片的研发要点及研究进展

孙秉喆¹, 邢嘉萌¹, 严真², 尹莉芳^{1, 2*} (1. 中国药科大学药学院药剂系, 南京 210009; 2. 江苏省缓释智能制剂及关键功能性辅料开发与评价工程研究中心, 南京 210009)

摘要: 相对于传统片剂, 咀嚼片因其易于递送, 提高了患者顺应性, 在 2 岁及以上儿童、老人等吞咽困难的患者中具有显著优势。随着人口老龄化和三孩政策的推进, 掌握咀嚼片的研制开发显得更为重要。咀嚼片相较于普通片剂因服药方式的不同在辅料选择和质量评价过程中存在一些需要关注的问题。随着研发的不断深入, 关于咀嚼片的释药方式、释药位置等方面的研究也在不断拓展。本文总结了咀嚼片研发相关要点包括常用辅料和质量控制, 并对咀嚼片研究进展进行总结, 为咀嚼片的研制开发提供参考。

关键词: 咀嚼片; 常用辅料; 质量控制; 研发进展

中图分类号: R944.4, TQ460.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)10-2373-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.027

Key points in development and research progress in chewing tablets

SUN Bing-zhe¹, XING Jia-meng¹, YAN Zhen², YIN Li-fang^{1, 2*} (1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 2. Engineering Research Center for Development and Evaluation of Intelligent Sustained-Release Preparations and Key Functional Excipients of Jiangsu, Nanjing 210009)

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”项目 (No.2017ZX09101001-004)。

作者简介: 孙秉喆, 男, 硕士研究生, 主要从事口服固体制剂研究, email: bbingzhe75@naver.com *通信作者: 尹莉芳, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物新剂型、缓控释给药系统、药物掩味技术等研究, email: lifangyin_@163.com

Abstract: Compared with the traditional tablets, chewing tablets have significant advantages in pediatric patients and elderly patients due to their easy delivery and convenience in patient compliance. With the ageing population and the third child policy, it is even more important to understand the development of chewing tablets. Attention to needs to be paid to the excipient selection and quality evaluation of chewing tablets. At the same time, research on the release route and location of chewing tablets is also expanding. This review summarizes the commonly used excipients, quality control and research progress in chewing tablets, aiming to provide reference for further research.

Key words: chewing tablet; commonly used excipient; quality control; research progress

咀嚼片是指于口腔中咀嚼后吞服的片剂^[1]。目前上市的咀嚼片种类多样, 主要包括制酸类、维生素类、钙片类等, 能够满足不同用药人群的需求。相较于传统片剂, 咀嚼片可以弥补其吞咽困难、服用不便等缺陷, 提高患者的顺应性, 特别是对于儿童、老人等吞咽困难的患者, 一定程度上解决了儿童用药品种单调的缺陷, 同时提高了老年患者的用药安全性^[2]。咀嚼片的制备工艺和辅料大多与普通片剂相似, 但因在口腔中咀嚼后服用, 对口感要求更高, 如何提高咀嚼片的口感是制备过程中的重点和难点。本文总结了咀嚼片的常用辅料和质量控制的一些注意事项, 同时对现阶段研发进展进行了综述。

1 咀嚼片的常用辅料

相较于普通片剂, 咀嚼片在口腔中嚼碎停留, 对口感要求相对更高。为实现更好的顺应性, 咀嚼片通常选用具有矫味功能、水溶性较好的辅料, 并通过添加合适的矫味剂或其他掩味技术改善口感^[3]。不同辅料的使用应熟悉辅料的优势和适用范围, 以期更好地指导制剂的研发与生产。

1.1 填充剂

咀嚼片中常用的填充剂包括甘露醇、葡聚糖、微晶纤维素、乳糖、木糖醇等。甘露醇是一种存在于动物和植物中的天然糖醇, 是咀嚼片中最常用的填充剂, 一般处方占比为 10% ~ 90%。甘露醇理化性质稳定, 不易吸湿, 常与湿敏性药物合用, 用甘露醇制备的颗粒易于干燥^[4]。甘露醇还可以用作咀嚼片中的矫味剂, 其甜度是蔗糖的一半, 且溶解会吸热, 产生凉爽的口感, 麻痹味蕾, 起到矫味作用, 目前多用于制酸类、维生素类、硝酸甘油类药物中。

葡聚糖也可以用作咀嚼片的填充剂, 多用于粉末直压工艺。Luca 等^[5]对不同分子量的葡聚糖作填充剂对片剂的影响进行了研究, 发现低分子量的葡聚糖拥有良好的食用性和快速的溶出速

率, 更适合作为咀嚼片的填充剂; 高分子量的葡聚糖吸水会发生溶胀, 还可以用作崩解剂。武田制药上市产品碳酸镧咀嚼片 (Fosrenol[®]) 使用了葡聚糖作为填充剂。

微晶纤维素是一种机械强度高、流动性好的填充剂, 与甘露醇等填充剂以一定比例混合后可以改善甘露醇等脆性辅料造成的咀嚼片脆碎度较差的缺陷。Dastjerdi 等^[6]指出, 合用微晶纤维素和甘露醇, 可以增加最终颗粒的可压性, 降低制剂在储存时发生硬度变化的风险。此外, 微晶纤维素吸水膨胀, 在咀嚼片中还可以起到一定的崩解作用。默克的上市产品孟鲁司特钠咀嚼片 (Singulair[®]) 和拜耳的上市产品氯雷他定咀嚼片 (Claritin[®]) 均使用了微晶纤维素作为填充剂。

除此之外, 乳糖、木糖醇等也可以在咀嚼片中作填充剂。值得注意的是, 先天性乳糖酶缺乏者进食含乳糖的药品时可能导致乳糖不耐受, 因此, 对于乳糖不耐受人群尤其是儿童患者, 应尽量或完全避免使用含有乳糖的咀嚼片^[7]。木糖醇与甘露醇类似, 因具有甜味且溶解吸热, 使口腔产生凉爽感, 在用作填充剂的同时也可以矫味。但过量食用木糖醇可能升高三酰甘油水平, 引起心血管疾病, 故不常使用^[4]。

1.2 甜味剂

咀嚼片还需加入甜味剂进行矫味, 优良的甜味剂应具有甜度适宜、不产生或产生少量热量、不致龋齿、不引起血糖波动及代谢紊乱等特性。根据来源不同, 甜味剂可分为天然甜味剂和人工合成甜味剂。常用的天然甜味剂有蔗糖、山梨醇、麦芽糖醇等。近年来, 人工合成甜味剂在咀嚼片中的应用愈加广泛, 使用较多的有阿司帕坦、糖精钠等。大部分甜味剂可掩盖原料药的苦味, 但在制剂的应用中受到不良反应的限制^[8], 进行药物设计时应应对甜味剂严加筛选, 确保用药安全。部分国内外上市产品处方中所用甜味剂汇总见表 1。

表 1 部分国内外上市产品处方中所用甜味剂

Tab 1 Flavoring agents used in the formulation of some marketed products at home and abroad

商品名	活性成分	厂家	甜味剂
迪巧	维生素 D、碳酸钙	A&Z Pharmaceutical Inc.	山梨醇、水果香精
Ibuprofen	布洛芬	L Perrigo Co.	无水柠檬酸、香橙香精、阿司帕坦
Vermox	苯达唑	Janssen Pharmaceuticals Inc.	糖精钠
Antivert	盐酸美利嗪	Casper Pharma Llc.	蔗糖
Dilantin	苯妥英钠	Pharmacia and Upjohn Co Llc.	糖精钠
Femcon Fe	炔诺酮、炔雌二醇	Allergan Pharmaceuticals International Ltd.	薄荷香精、三氯蔗糖
Talcid	铝碳酸镁	Bayer Bitterfeld GmbH	糖精钠、薄荷香精、香蕉香精

1.2.1 天然甜味剂 蔗糖可以作为咀嚼片的矫味剂。当蔗糖的含量较高时，片剂的硬度可能会增大，导致崩解变慢、咀嚼困难。高浓度蔗糖可能会引起儿童龋齿，过度使用会在一定程度上导致肥胖、代谢紊乱、血糖波动等不良反应，对于 1 型糖尿病患者，应尽量或完全避免使用含蔗糖的药物^[9]。

其他天然甜味剂包括异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇、山梨醇等，较蔗糖甜度低，但可以在矫味的同时，不引起血糖波动。

异麦芽酮糖醇是蔗糖的转化产物，有令人愉悦的甜味，甜度约为蔗糖的 50% ~ 60%。异麦芽酮糖醇热量低，不会导致血糖的突然升高，是一种非致龋性辅料。同时，其溶解吸热可以忽略不计，温和的甜味口感使其适于作为咀嚼片的矫味剂^[4]。

麦芽糖醇作为蔗糖的替代品，是一种非致龋性、无毒、无过敏性和无刺激性的天然甜味剂，常用于儿童药物制剂。有研究证明，在相同的甜度条件下，与麦芽糖醇和其他强力甜味剂的联合使用相比，麦芽糖醇和三氯蔗糖的组合使用能更加有效地掩盖对乙酰氨基酚咀嚼片原料药的不良气味^[10]。

山梨醇也常用作咀嚼片的矫味剂，其在口腔中溶解后吸热，产生凉爽感，掩盖不良气味，不产生热量且不易导致龋齿。成人建议用量为每周 2 g · kg⁻¹^[11]，因含有山梨醇的药物会引起儿童腹泻和吸收不良等胃肠道不良反应，故在儿童群体中使用受限。

1.2.2 人工合成甜味剂 为达到更好的矫味效果，高强度合成甜味剂被越来越多地应用于咀嚼片中，合成甜味剂的优点有热量较低、甜度更高、升糖作用不明显等^[12]。

阿司帕坦是咀嚼片中最常用的一种人工合成甜味剂，甜度是蔗糖的 150 ~ 200 倍。阿司帕坦具有非致龋性的特性，且不会升高血糖，适用于糖尿病和肥胖症患者；吸湿性低，可用于湿敏性药物的制备；理化性质稳定，与大部分药物不发

生反应^[4]。阿司帕坦与蔗糖或糖精钠等甜味剂具有协同效应，联合使用后可以掩盖糖精等的不良口感。在儿童用药中使用阿司帕坦需要注意，阿司帕坦日剂量大于 57 mg · kg⁻¹ 时，可能会引起癫痫患儿相关不良反应^[13]。此外，阿司帕坦热稳定性差，摄入后在体内迅速代谢成苯丙氨酸、甲醇等，故不可用于苯丙酮尿症患者^[14]。

三氯蔗糖也是一种常用的人工合成甜味剂，甜度约为蔗糖的 600 倍。与许多高效甜味剂不同，三氯蔗糖没有明显的苦味，加上其在各种条件下的高稳定性，是许多制剂的首选甜味剂^[15]。

常用的合成甜味剂还有糖精钠。糖精钠的甜度是蔗糖的 200 ~ 700 倍，是一种高效甜味剂，常与单糖浆、甜蜜素合用。需注意当用量增加时，甜味会和苦味一起增加，每次用量应不超过 0.015 g。糖精钠属于磺胺类，磺胺类药物过敏的患者应避免使用^[4]。

1.3 芳香剂

咀嚼片中常加入芳香剂，如薄荷香精、苹果香精、橘子香精、草莓香精等，以改善口感，提高顺应性。香精较多地应用于食品，国家药品监督管理局药品审评中心原辅包登记信息中香精登记相对较少。国家药品监督管理局药品审评中心在《实行关联审评审批的药用辅料范围（试行）》中提出，已在批准上市的药品中长期使用，且用于局部经皮或口服途径风险较低的辅料，如矫味剂、甜味剂、香精、色素等执行相应行业标准，不纳入本目录。药品中香精的选择范围可以拓宽到食用级香精。

1.4 其他掩味技术

柠檬酸无臭，有强烈的酸味。张键^[16]使用柠檬酸作阿司匹林咀嚼片的矫味剂和稳定剂，加入柠檬酸后，阿司匹林的酸味被掩盖，不再对咽喉产生刺激。此外，柠檬酸对阿司匹林的水解反应也有一定的抑制作用。口服摄入的柠檬酸易被吸收，且无毒，但过量或频繁食用柠檬酸可能会造成牙齿腐蚀。柠檬酸和柠檬酸盐会增强肾病患者

肠道对铝的吸收,因此,服用铝化合物来控制磷酸盐吸收的肾衰竭患者不建议服用柠檬酸或含柠檬酸盐的产品^[17]。

明胶、黄原胶等因其形成的胶浆剂黏稠,可以干扰味蕾,起到掩味作用。甘油本身的甜味使其也可用于矫味,例如诺华的上市制剂卡马西平咀嚼片(Tegretol[®])使用明胶和甘油进行矫味。还有品种使用醋酸纤维素直接将颗粒包衣进行掩味,代表制剂为法莫替丁咀嚼片(Pepcid AC[®])。

Tanikan 等^[18]使用聚合物 Eudragit EPO 和蜡质材料(十六醇、硬脂酸或蜂蜡)包裹药物进行掩味。最终选择十六醇将 Eudragit EPO 和扑热息痛进行包裹,扑热息痛咀嚼片原料药的不良气味得到有效掩盖。利用此法进行掩味的材料还可以替换成醋酸纤维素、氨基磺酸等。

除上述矫味技术之外,将药物制成微囊或微球等中间体也可以阻滞药物在口腔释放,减少药物与味蕾的直接接触,从而掩盖不良气味。离子交换技术通过离子交换过程充分吸附可解离药物,使患者不会感受到药物的苦味。利用环糊精将药物包入其分子内部空腔并形成稳定的包合物,可以降低药物在口腔的溶解,起到掩味的作用。沸石、活性炭、二氧化硅等具有多孔的物质也可以作为药物的吸附载体,降低药物在口中的浓度,在掩味的同时还可以起到缓、控释作用^[19]。

2 咀嚼片的质量控制

2018 年 8 月,美国食品药品监督管理局(FDA)出台了《咀嚼片的质量属性工业指南》。该指南对咀嚼片的质量属性提出了相关要求^[20],其中关键属性主要包括硬度、脆碎度、崩解时限、溶出等,应予以重视。另外,需关注咀嚼片在模拟生理介质中的性能变化,为制剂临床研究提供更加科学和全面的体外评估。

2.1 硬度

咀嚼片的硬度控制是其制备过程中的重要环节。过大的硬度会导致牙齿损伤、义齿断裂、食道刺激等不良反应。尤其对于儿童和老年患者,咀嚼片的硬度过大可能会显著降低用药顺应性。咀嚼片的硬度也不宜过小,硬度过小可能导致咀嚼片的脆碎度不合格,继而导致在包装、运输、贮存过程中受撞击易发生破碎。

《咀嚼片的质量属性工业指南》中要求,咀嚼片的硬度应能承受严格的制造、包装、运输和分销过程,并且易于被患者咀嚼。将片剂硬度与压碎片剂的载荷相结合,在保证制备、包装、运输过程中片剂完整性的条件下,建议咀嚼片的硬度

应较小($< 12 \text{ kp}$),在合理的情况下,也可以考虑更大的硬度($> 12 \text{ kp}$)^[20]。因人类咬合力存在很大差异^[21],故咀嚼片的硬度不宜过大。咬合力较小的患者服用硬度过大的咀嚼片可能会导致咀嚼不完全,引起药物吸收不完全,甚至肠梗阻等风险。咀嚼片会在接触人类唾液时膨胀、崩解和软化,有助于患者将其完全咀嚼。有研究证明咀嚼片在咀嚼前短暂(约 30 s)暴露于唾液中可有效促进崩解,降低硬度^[20]。

FDA 指出咀嚼片的硬度和咀嚼困难程度的关系可以通过公式 Chewing difficulty index (咀嚼困难指数) = $F_d t$ 计算得到,其中 F_d 为片剂硬度, t 为片剂厚度^[22]。

2.2 脆碎度

脆碎度是反映片剂抗震耐磨能力的指标,也是咀嚼片的重要工艺参数,一般使用片剂脆碎度测定仪测定。咀嚼片需要在兼顾易咀嚼的同时,避免因生产、运输等过程中震动或摩擦作用产生破损。咀嚼片脆碎度受多个因素影响。

2.2.1 制粒过程 目前常用的制粒工艺有高速剪切制粒和流化床制粒。高速剪切制粒混合效果好、速度快、能耗低,可用于高黏度物料制粒,当速度过快时,可能导致细粉过多从而使脆碎度变差,当速度过慢时,颗粒大小不一,均匀度较差。流化床制得的颗粒粒度均匀、流动性和压缩成型好,但当物料粒径过小时,细粉易通过抖袋孔隙被吹走,或因静电吸附作用吸附在抖袋上,导致收率降低^[23]。应根据物料性质的不同选择不同的制粒方法。

2.2.2 干燥方式 常用的干燥设备有厢式干燥机和流化床。厢式干燥机干燥时水分不均匀的现象常有发生,使得咀嚼片的脆碎度相对较差^[24];流化床干燥制得的粒子水分较为均匀,但流化床干燥会破坏易碎的颗粒^[25],同时当制得的颗粒水分较高、批量较大时,容易在流化床内板结,不利于流化。

2.2.3 其他因素 除上述影响因素外,原辅料的晶型、压缩成型性等对咀嚼片的脆碎度均有影响。药物晶型可能随生产工艺的不同发生变化。立方晶系的结晶对称性好、表面积大,压缩时易于成型,脆碎度较小;鳞片状或针状结晶容易形成层状排列,故压缩后的药片容易裂片,脆碎度较大,需要经粉碎工序粉碎,以打破晶体,降低脆碎度。

2.3 崩解时限

对于咀嚼片,崩解时间应该足够短,以防止

在患者没有完全咀嚼片剂的情况下发生胃肠道阻塞。体外崩解试验时,咀嚼片应在规定的时间内在合适的介质中完全崩解,FDA并未对咀嚼片的崩解时限作出要求^[20]。Nasser等^[26]提出,咀嚼片的崩解时限与片剂的硬度有关,一般来说,大小和成分相似的片剂,硬度增加和孔隙率降低会降低水穿透片剂的速度,从而减缓崩解速度。

2.4 溶出

咀嚼片的药物吸收取决于完整吞咽或咀嚼后片剂中药物的释放,因此,咀嚼片需要进行体外溶出度测试,其体外溶出试验与普通片剂相似。对于开发过程中咀嚼片的产品表征应至少在4种介质中进行,如水、pH为1.2的酸性介质、pH为4.5和6.8的缓冲介质。FDA通常不建议在体外溶出试验前粉碎咀嚼片,不同患者的咀嚼模式不同,不同产品特性也存在较大差异,需视具体情况而定^[20]。

2.5 模拟生理介质中的性能

药物开发过程中,需要对影响药物体内性能的因素进行充分的评估。利用模拟生理介质的体外方法,可以评估口服剂型的体内可能性,例如硬度项下提到的暴露于人体模拟唾液进行硬度变化测试,还有使用模拟禁食和进食状态的含酶胃液和肠液对制剂进行评估^[20]。

3 相关研究进展

将临床不良反应较多的传统片剂改良成咀嚼片,可以有效减小胃肠道刺激性,使药物在体内迅速发挥作用的同时提高生物利用度。目前上市的咀嚼片大多发挥全身作用,近年来,为进一步拓宽咀嚼片的用药领域,实现药物释药速度的控制和靶向治疗等更高的需求,许多国内外学者对此进行了研究。

3.1 缓释咀嚼片

注意缺陷多动障碍(ADHD)是儿童和青少年中最常见的神经发育障碍,盐酸哌甲酯缓释咀嚼片(Quillichew[®])经FDA批准,用于治疗6周岁及以上的ADHD患者^[27]。盐酸哌甲酯缓释咀嚼片中哌甲酯离子与聚苯乙烯磺酸钠颗粒的磺酸盐基团离子结合,以离子交换树脂的形式达到缓释效果^[28],聚苯乙烯磺酸钠颗粒本身不会被人体吸收,进入胃肠道中会与胃肠液中的离子发生交换,盐酸哌甲酯从树脂酸盐中释放出来,然后进行扩散^[29]。该品种进行了咀嚼和整体吞咽的药理学试验,结果显示两者生物等效,且耐受性良好。

3.2 结肠靶向咀嚼片

Nour等^[30]制备了一种新型的结肠靶向咀

嚼片,以非甾体抗炎药布马地宗钙为主药,选用了两种pH依赖性聚合物:Eudragit[®] S100和Eudragit[®] L100,作为微球的制备材料,将药物包裹于微球后进行压片。其体外释放结果表明,该制剂能够充分调节药物释放,达到靶区前最小释放和靶区最大释放。其在家兔体内的药理学试验也证明,与市售布马地宗钙片(Octomol[®])相比,该制剂具有良好的结肠靶向性。

3.3 胃滞留咀嚼片

胃溃疡发生在胃黏膜内层,引起灼痛、胃部不适、胃灼热和消化不良。Suputra等^[31]开发了一种胃滞留型咀嚼片,使用槲皮素和聚乙烯吡咯烷酮(PVP K30)的固体分散体来提高活性药物成分(API)的溶解性;以海藻酸钠为凝胶形成剂;以碳酸钙为钙源和二氧化碳产生剂,增加制剂的滞留效果;以羟丙甲纤维素K100M为药物缓释聚合物,延长槲皮素在胃中的释放时间,提高咀嚼片对于胃溃疡的治疗效果,表现出优异特性,达到缓释效果。

3.4 可咀嚼凝胶片

美国药典中称为咀嚼片的制剂除了普通的硬咀嚼片外还有软咀嚼片。软咀嚼片是一种凝胶基片剂,类似于口香糖,质地柔软、有弹性,一般通过模制或挤出工艺制成。软咀嚼片常使用具有凝胶特性的辅料,如明胶、果胶、黄芩、淀粉、琼脂等,且通常含有超过10%的水,以助于保持柔软,因此,为了防止细菌生长,需要添加大量的防腐剂^[32]。目前已上市的软咀嚼片大多为维生素类制剂,例如成长快乐[®]复合维生素软片、Vitafusion[®]维生素B₁₂软糖等。

4 展望

咀嚼片由于携带方便,生物利用度高,服用时无需水等优点受到了国内外各大制药企业的广泛关注,尤其在儿童用药方面值得进一步开发,具有广阔的市场前景。本文从上市产品入手,结合现阶段关于咀嚼片的研究,分析了咀嚼片制备常用辅料和关键质量参数,为咀嚼片的研究开发提供参考。但咀嚼片研发中仍存在待解决的问题,如咀嚼片的口感问题。将现有矫味剂进行筛选、组合使用,或开发新型矫味剂和掩味技术,以改善咀嚼片口感、减少不良反应的工作仍需要进行。此外,如何与新型制剂手段结合以拓宽咀嚼片的用药领域等问题仍需探讨。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 1.

- [2] Paradiso LM, Roughead EE, Gilbert AL, et al. Crushing or altering medications: what's happening in residential aged-care facilities? [J]. *Australas J Ageing*, 2002, 21: 123-127.
- [3] Nyamweya NN, Kimani SN. Chewable tablets: a review of formulation considerations [J]. *Pharm Technol*, 2020, 44: 38-44.
- [4] Paul JS, Walter GC, Colin GC. Handbook of pharmaceutical excipients [M]. 8th ed. Washington: Pharmaceutical Press, 2017: 88, 487, 583, 820, 1033.
- [5] Luca C, Giulia B, Gordon AM. Dextran and its potential use as tablet excipient [J]. *Powder Technol*, 2017, 273: 125-132.
- [6] Dastjerdi S, Naeijian F, Akgz B. Effect of spray-dried mannitol on the performance of microcrystalline cellulose-based wet granulated tablet formulation [J]. *Pharm Dev Technol*, 2010, 4 (15): 339-345.
- [7] Listed NA. Saccharin: review of safety issues [J]. *JAMA*, 1985, 254 (18): 2622-2624.
- [8] Rivero R, Archaina D, Sosa N, et al. Development of healthy gummy jellies containing honey and propolis [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100: 1030-1037.
- [9] Aires CP, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, et al. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization [J]. *Caries Res*, 2006, 40 (1): 28-32.
- [10] Cai L, Feng J, Regenstein J, et al. Confectionery gels: effects of low calorie sweeteners on the rheological properties and microstructure of fish gelatin [J]. *Food Hydrocoll*, 2017, 67: 157-165.
- [11] Whittaker A, Currie AE, Turner MA, et al. Toxic additives in medication for preterm infants [J]. *Arch Dis Child*, 2009, 94 (4): 236-240.
- [12] Christine B, Fabrice N, Louc B. Sweeteners and sweetness enhancers [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2017, 4 (20): 279-285.
- [13] Lipton RB, Newman LC, Cohen JS, et al. Aspartame as a dietary trigger of headache [J]. *Headache J Head Face Pain*, 1989, 29 (2): 90-92.
- [14] Suez J, Korem T, Zeevi D, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota [J]. *Nature*, 2014, 514: 181-186.
- [15] Margaux R, MoraRobin D. The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2021, 2 (20): 1554-1583.
- [16] 张键. 使用柠檬酸作为阿司匹林咀嚼片的矫味剂和稳定剂: CN, 106166298A [P]. 2016-11-30.
- [17] Main I, Ward MK. Potentiation of aluminium absorption by effervescent analgesic tablets in a haemodialysis patient [J]. *Br Med J*, 1992, 304: 1686.
- [18] Tanikan S, Kampanart H. Development and evaluation of taste-masked paracetamol chewable tablets using a polymer and/or wax dispersion technique [J]. *J Drug Delivery Sci Technol*, 2019, 54: 101361-101366.
- [19] 王俊杰, 冯怡, 徐德生. 药物掩味技术的研发进展与应用 [J]. *中国药学杂志*, 2006, 41 (19): 1444-1448.
- [20] MD-20993-0002, Quality Attribute Considerations for Chewable Tablets Guidance for Industry [S]. 2018: 1-13.
- [21] Bonakdarchian M, Askari N, Askar M. The effect of face form on maximal molar bite force with natural dentition [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 3 (54): 201-204.
- [22] Gupta A, Chidambaram N, Khan MA. An index for evaluating difficulty of chewing the chewable tablets [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2018, 2 (41): 239-243.
- [23] 王月茹. 制粒工艺对盐酸二甲双胍片压缩性的影响 [J]. *中国医药工业杂志*, 2017, 48 (7): 1042-1047.
- [24] Bakre LG, Jaiyeoba KT. Effects of drying methods on the physicochemical and compressional characteristics of okra powder and the release properties of metronidazole tablet formulation [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 32 (2): 259-267.
- [25] Sze NC, Anne LJ, Li G. Microwave drying of granules containing a moisture-sensitive drug [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53 (7): 770-775.
- [26] Nasser NN, Kimani SN, Abuga K. Chewable antacid tablets: are disintegration tests relevant? [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2020, 21: 139-143.
- [27] Wigal S, Childress A, Berry S, et al. Efficacy and safety of chewable methylphenidate extended-release tablet in children with attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 2017, 8 (27): 690-699.
- [28] Samuele C, Giulia DA, Eric K. New formulations of methylphenidate for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: pharmacokinetics, efficacy, and tolerability [J]. *CNS Drugs*, 2017, 31 (2): 149-161.
- [29] Richat A, Ann CC, Praneeta N, et al. Relative bioavailability of methylphenidate extended-release chewable tablets chewed versus swallowed whole [J]. *Clin Ther*, 2018, 40 (5): 733-740.
- [30] Nour SA, Abdelmalak NS, Naguib MJ, et al. Novel chewable colon targeted tablets of bumadizone calcium for treatment of ulcerative colitis: formulation and optimization [J]. *J Drug Delivery Sci Technol*, 2016, 35: 172-183.
- [31] Suputra B, Teerapat N, Ousanee I, et al. Development of raft-forming liquid and chewable tablet formulations incorporating quercetin solid dispersions for treatment of gastric ulcers [J]. *Saudi Pharm J*, 2021, 10 (29): 1143-1154.
- [32] Inga M, Akvile M, Saule VE, et al. The effect of myristica fragrans texture properties and shelf-life of innovative chewable gel tablets [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (6): 238-253.

(收稿日期: 2022-02-05; 修回日期: 2022-05-30)

药物分析与检验

UPLC 与 HPLC 测定创新药 LW33 中有关物质的对比研究

张容华^{1,2}, 杨放^{1,2}, 郑艾妮^{1,2}, 鲍颖霞^{1,2}, 赖焯才^{1,2}, 余华³, 陈绮玲³, 王健松^{1,2*} (1. 广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂, 广州 510515; 2. 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; 3. 澳门大学中华医药研究院, 中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078)

摘要: **目的** 建立一种超高效液相色谱 (UPLC) 法测定创新药 LW33 中有关物质, 并与其高效液相色谱法 (HPLC) 进行对比研究。**方法** UPLC 法采用 Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流速 0.21 mL·min⁻¹; HPLC 法采用 SHISEIDO CAPCELL PAK C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 两种方法均以水溶液 (用冰醋酸调 pH 值至 3.0)(A) - 甲醇 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 257 nm, 柱温 25 °C。**结果** UPLC 法和 HPLC 法测定的有关物质在一定范围内均呈现良好线性, 准确度、精密度和样品测定结果基本无差异; UPLC 法运行时间为 16 min, HPLC 法运行时间为 40 min, UPLC 法溶剂使用量为 HPLC 法的 1/10。**结论** UPLC 和 HPLC 两种方法的准确度、精密密度、线性等验证结果以及样品测定结果基本一致, UPLC 法与 HPLC 法相比, 分析快速, 节省溶剂, 适用于快速检测 LW33 中的有关物质, 提高研发的效率。

关键词: LW33; 有关物质; 超高效液相色谱法; 高效液相色谱法; 梯度洗脱; 方法比较

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2379-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.028

Determination of related substances in LW33 by UPLC and HPLC

ZHANG Rong-hua^{1,2}, YANG Fang^{1,2}, ZHENG Ai-ni^{1,2}, BAO Ying-xia^{1,2}, LAI Ye-cai^{1,2}, YU Hua³, CHEN Qi-ling³, WANG Jian-song^{1,2*} (1. Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Guangzhou 510515; 2. Key Laboratory of Key Technology Research on Chemical Raw Materials and Preparations of Guangdong, Guangzhou 510515; 3. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao 999078)

Abstract: Objective To develop and validate a stable UPLC method for the determination of related substances in LW33, and to compare the results with those by HPLC method. **Methods** A gradient UPLC system was used in the quantitative analysis of related substances on Waters Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm). Mobile phase A consisted of aqueous solution (adjusting pH to 3.0 with glacial acetic acid), and mobile phase B consisted of methanol, under a flow rate of 0.21 mL·min⁻¹. An HPLC method was conducted on SHISEIDO CAPCELL PAK C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), based on the same mobile phases as the UPLC method, with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The wavelength and column temperature were set at 257 nm and 25 °C, respectively for both methods. **Results** The linear relationship between the concentration and peak areas of the compounds was all satisfactory. The analytical validation (accuracy and repeatability) and detection results for impurities showed no significant difference in both methods. UPLC method showed shorter

基金项目: 科技部重大新药创制专项 (No.2019ZX09301-104); 广东省科技厅粤澳科技创新联合资助项目 (No.2021A0505080010); 澳门科学技术发展基金 (No.FDCT 0058/2020/AGJ)。

作者简介: 张容华, 女, 硕士, 主要从事药品的质量研究, email: camilla123@126.com * **通信作者:** 王健松, 男, 博士, 主要从事药物新剂型与质量标准研究, email: wangjs@byszc.com

analysis time (2/5 of HPLC method), and less solvent used (1/10 that of HPLC method). **Conclusion** Both methods showed similar results. The UPLC method is more time saving, and solvent saving, which is suitable for rapid detection of related substances in LW33, with better efficiency.

Key words: LW33; related substance; UPLC; HPLC; gradient elution; comparison of method

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种慢性进行性神经退行性疾病, 以记忆和认知能力的进行性减退为主要临床特征^[1]。据统计, 全球 AD 患者已超过 5000 万人, 预计 2050 年将突破 1.52 亿人^[2-3]。我国已经进入老龄化社会, 预计到 2050 年, 我国 AD 患病人数超过 3000 万, 是新发病例全球增速最快的国家之一^[4-5]。而现有药物主要是改善或延缓症状, 对初期和中期患者起治疗作用, 维持患者认知状态^[6-10]。LW33 是由我公司与中山大学联合开发的磷酸二酯酶 9A (PDE9A) 抑制剂, 为一类创新药, 其结构式见图 1。磷酸二酯酶 (PDE) 抑制剂能够有效抑制 PDE 对于环磷酸腺苷 (cAMP) 和 / 或环磷酸鸟苷 (cGMP) 的降解, 使得人体与认知相关的生理功能得以正常表达, 因此 PDE 抑制剂可用于治疗学习记忆障碍等中枢神经系统疾病^[11-16]。LW33 具有良好的类药性、成药性特征和药动学性质, 是高效价、多靶点抗 AD 的候选药物^[17]。

LW33 作为一个非常有潜力的候选药物, 其有关物质检测方法在国内外均未有报道, 本文建立了检测 LW33 有关物质的 HPLC 法和 UPLC 法, 两种方法学经验证均符合要求, 且 UPLC 法分析快速, 节省溶剂, 适用于快速检测 LW33 中的有关物质, 提高研发的效率。

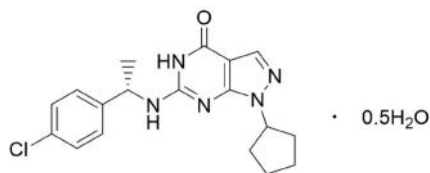


图 1 LW33 化学结构式

Fig 1 Chemical structure formula of LW33

1 材料

Waters Acquity UPLC 液相色谱仪 (包括 Quaternary Solvent Manager 四元溶剂管理器, Sample Manager-FIN 样品管理器, 二极管阵列检测器 PDA, 美国 Waters 公司); Waters Alliance e2695 液相色谱仪 (包括 Separations Module, 2998 二极管阵列检测器 PDA, 美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); P30H 超声波清洗器 (德国 Elma 公司)。

对照品 LW33 (批号: ZS1904001, 含量:

97.55%, 自制标定), 杂质 A 对照品 (批号: ZS1904001, 含量: 96.41%, 自制标定), 杂质 B 对照品 (批号: ZS1904001, 含量: 98.75%, 自制标定)。甲醇 (色谱纯, 德国 Merck 公司), 冰醋酸 (分析纯, 广州化学试剂厂), 超纯水 (Milli-Q 制备)。3 批 LW33 原料供试品 (批号: ZS1904001、ZS1904002、ZS1904003, 广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 色谱条件 (UPLC) 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流速为 0.21 mL · min⁻¹; 进样量 1 μL; 柱温 25 °C; 检测波长为 257 nm; 流动相系统为水溶液 (用冰醋酸调 pH 值至 3.0)(A) - 甲醇 (B); 梯度洗脱程序如下: 0 ~ 12 min, 70% ~ 90%B; 12 ~ 14 min, 90% ~ 70%B; 14 ~ 16 min, 70%B。

2.1.2 色谱条件 (HPLC) 色谱柱为 SHISEIDO CAPCELL PAK C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 进样量 10 μL; 柱温 25 °C; 检测波长为 257 nm; 流动相系统为水溶液 (用冰醋酸调 pH 值至 3.0)(A) - 甲醇 (B); 梯度洗脱程序如下: 0 ~ 30 min, 70% ~ 90%B; 30 ~ 35 min, 90% ~ 70%B; 35 ~ 40 min, 70%B。

2.2 溶液的制备

2.2.1 溶剂的制备 取流动相 A 与流动相 B 按比例 30 : 70 (v/v) 混合制成。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取 LW33 和杂质 B 适量, 置于同一量瓶中, 加溶剂超声溶解, 放冷, 并稀释制成质量浓度分别为约 75、35 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品适量, 精密称定, 加溶剂超声溶解, 放冷, 并稀释制成质量浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的溶液。

2.2.4 自身对照溶液的制备 精密量取供试品溶液 0.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀。

2.2.5 系统适用性溶液的制备 精密称取 LW33 对照品、杂质 A 对照品和杂质 B 对照品适量, 加溶剂超声溶解, 放冷, 并稀释制成质量浓度分别为约 1、0.01、0.01 mg · mL⁻¹ 的溶液。

2.3 专属性试验

按“2.1.1”项下的色谱条件 (UPLC) 和“2.1.2”项下的色谱条件 (HPLC), 分别取空白溶剂、供试品溶液进行检测, 记录色谱图, 色谱图见图 2。结果表明, 空白溶剂均无干扰。

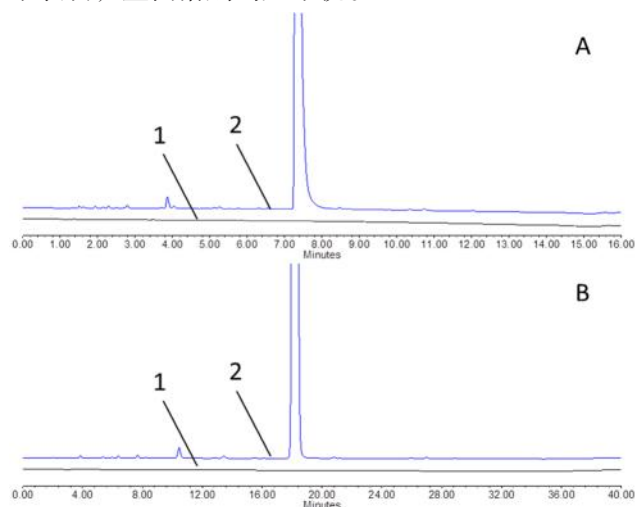


图 2 专属性色谱图

Fig 2 Chromatograms of specificity

A. UPLC 色谱图 (UPLC chromatogram); B. HPLC 色谱图 (HPLC chromatogram); 1. 空白溶剂 (blank solvent); 2. 供试品溶液 (test solution)

2.4 系统适用性试验

取“2.2.5”项下系统适用性溶液, 分别在“2.1.1”项的色谱条件 (UPLC) 和“2.1.2”项的色谱条件 (HPLC) 下进样分析, 记录色谱图, 色谱图见图 3。结果表明, 在 UPLC 和 HPLC 系统下, 主成分峰与相邻杂质 A 峰的分离度分别为 2.5 和 3.0, 系统适用性均符合要求。

2.5 强制降解试验

取 LW33 分别用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液、30% 过氧化氢溶液、高温 60°C 、高湿 92.5% 等进行降解试验。按“2.1.1”项下的色谱条件 (UPLC) 和“2.1.2”项下的色谱条件 (HPLC), 进行检测, 记录色谱图。结果表明, 在所有强制降解条件下, 空白溶剂均不影响杂质检测, 降解产物与主峰的分离度均符合要求, 主峰纯度角均小于纯度阈值, 各强制降解条件前后的物料平衡在 90% ~ 110%, 均符合要求。两种方法测得的杂质谱相似, 降解试验色谱图见图 4、5。

2.6 标准曲线、定量限和检测限

精密量取“2.2.2”项下的混合对照品溶液, 用溶剂稀释为一系列质量浓度的对照品溶液, 按“2.1.1”项下的色谱条件 (UPLC) 和“2.1.2”项下的色谱条件 (HPLC) 检测, 以化合物的峰面积为

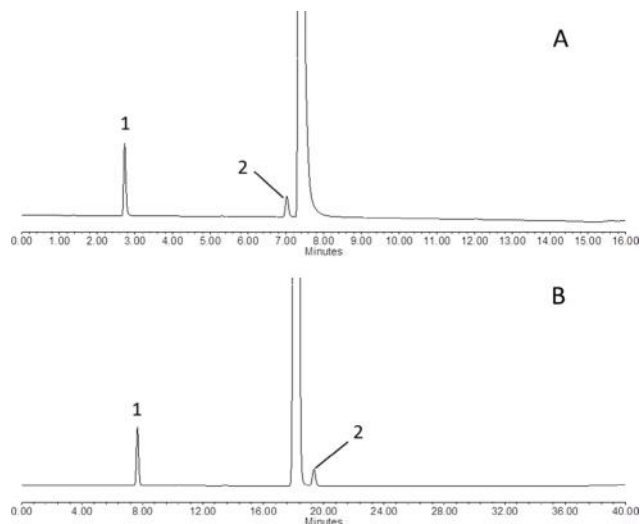


图 3 系统适用性色谱图

Fig 3 Chromatograms of system applicability

A. UPLC 色谱图 (UPLC chromatogram); B. HPLC 色谱图 (HPLC chromatogram); 1. 杂质 B (impurity B); 2. 杂质 A (impurity A)

纵坐标, 相对应的化合物质量浓度为横坐标, 建立标准曲线, 得回归方程, 结果见表 1。试验结果显示, LW33 在 $1.568 \sim 31.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好; 杂质 B 在 $0.7094 \sim 14.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。在 UPLC 系统和 HPLC 系统下, 线性关系均符合要求。

另取混合对照品溶液稀释, 分别进样分析, 取信噪比值为 10 ($S/N = 10$) 的质量浓度为定量限 (LOQs), $S/N = 3$ 的质量浓度为检测限 (LODs)。结果见表 1, 灵敏度均符合要求。

2.7 重复性

按“2.2.3”和“2.2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液及自身对照溶液, 分别在“2.1.1”项下的色谱条件 (UPLC) 和“2.1.2”项下的色谱条件 (HPLC) 下进样分析, 以杂质含量的 RSD 考察。结果表明, 在 UPLC 系统下, 杂质 B 含量的 RSD 为 12%, 其他最大单个杂质含量的 RSD 为 0.0%, 总杂质量的 RSD 为 3.8%; 在 HPLC 系统下, 杂质 B 含量的 RSD 为 0.0%, 其他最大单个杂质含量的 RSD 均为 2.6%, 总杂质量的 RSD 为 1.8%。在 UPLC 系统和 HPLC 系统下, 6 份供试品杂质含量的 RSD 均不大于 15%, 重复性符合要求。

2.8 中间精密度

取“2.7”重复性项下供试品溶液及自身对照溶液, 分别在“2.1.1”项的色谱条件 (UPLC) 和“2.1.2”项的色谱条件 (HPLC) 下进行样品检测, 记录色谱图。结果表明, 在 UPLC 系统下, 杂质 B 含量的 RSD 为 12%, 其他最大单个杂质含量的 RSD 为 0.0%, 总杂质量的 RSD 为 3.8%; 在 HPLC 系统下, 杂质 B 含量的 RSD 为 0.0%, 其他最大单

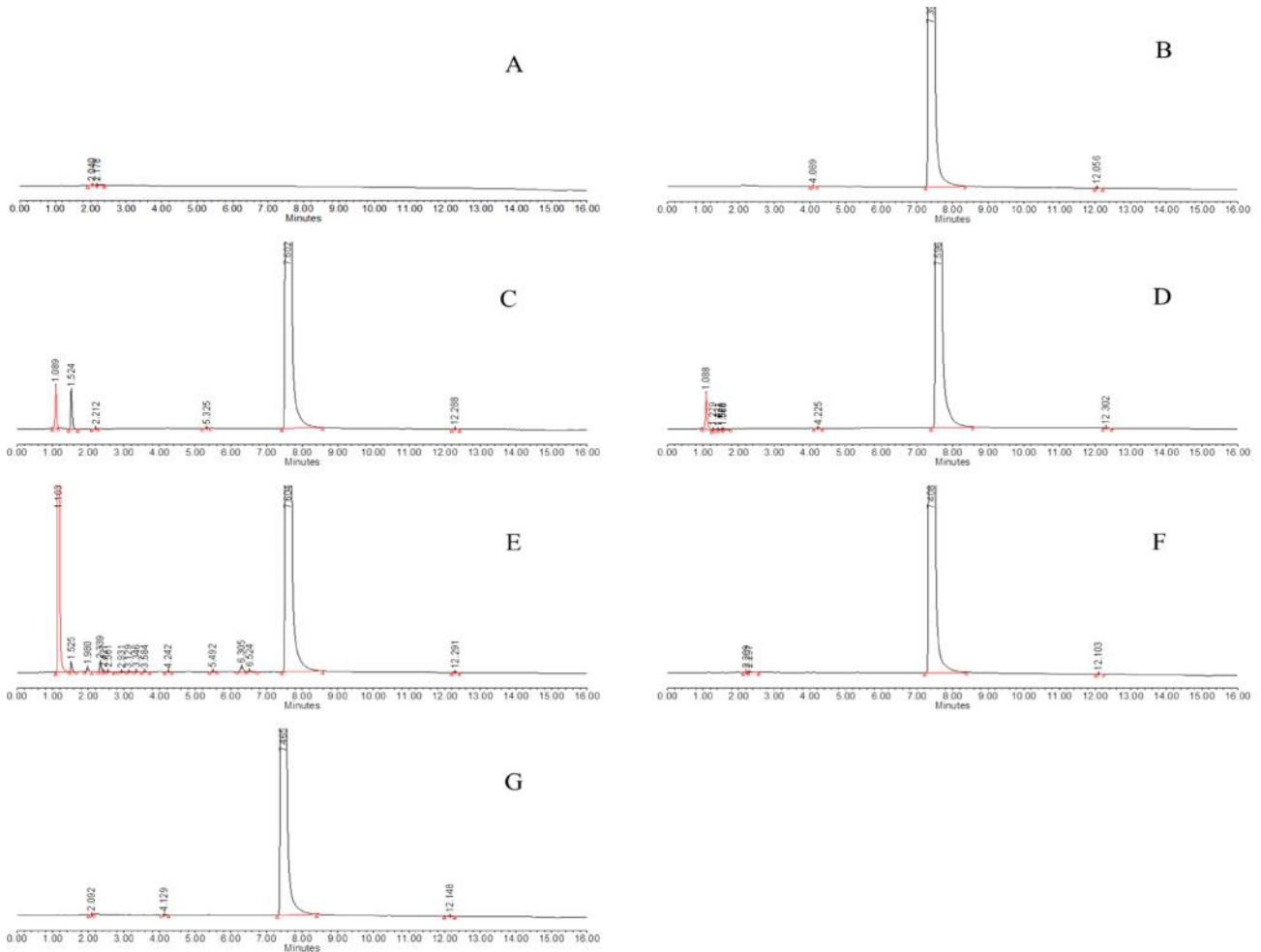


图 4 强制降解试验 UPLC 色谱图

Fig 4 UPLC chromatograms of forced degradation test

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 供试品溶液 (test solution); C. 酸降解供试品 (degradation sample by acid); D. 碱降解供试品 (degradation sample by alkali); E. 氧化降解供试品 (degradation sample by oxidation); F. 高温降解供试品 (degradation sample by high temperature); G. 高湿降解供试品 (degradation sample by high wet)

表 1 LW33 和杂质 B 的回归方程、定量限和检测限

Tab 1 Regression equation, LOQs and LODs of LW33 and impurity B

方法		回归方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
UPLC	LW33	$Y = 1.192 \times 10^4 X + 2371.5$	0.9999	1.568 ~ 31.36	0.3136	0.1568
	杂质 B	$Y = 8.572 \times 10^3 X + 36.846$	1.0000	0.7094 ~ 14.19	0.1419	0.0709
HPLC	LW33	$Y = 2.439 \times 10^4 X + 1470.4$	0.9999	1.568 ~ 31.36	0.3136	0.1568
	杂质 B	$Y = 1.744 \times 10^4 X - 375.54$	1.0000	0.7094 ~ 14.19	0.1419	0.0709

个杂质含量的 *RSD* 为 2.6%，总杂质量的 *RSD* 为 1.8%。12 个杂质含量数据中，杂质 B 含量的 *RSD* 为 9.5%，其他最大单个杂质含量的 *RSD* 为 10%，总杂质量的 *RSD* 为 12%，12 个杂质含量数据的 *RSD* 均不大于 20%，精密度符合要求。

2.9 准确度

称取 LW33 共 9 份，置于 25 mL 量瓶中，分别加入已知量的杂质 B 对照品溶液，相当于杂质限度的 15%、100%、200% 水平的溶液。分别精密量取空白溶剂、本底溶液、上述各加标供试品

溶液及自身对照溶液，在“2.1.1”项的色谱条件 (UPLC) 和“2.1.2”项的色谱条件 (HPLC) 下进样分析，记录色谱图，考察平均回收率和 *RSD*。结果表明，在 UPLC 系统下，杂质 B 低、中、高质量浓度的平均回收率分别为 107.6%、104.1%、103.0%，*RSD* 分别为 2.1%、1.5%、1.9%；在 HPLC 系统下，杂质 B 低、中、高质量浓度的平均回收率分别为 101.7%、101.8%、99.3%，*RSD* 分别为 0.78%、0.27%、0.87%。在 UPLC 系统和 HPLC 系统下，准确度符合要求。

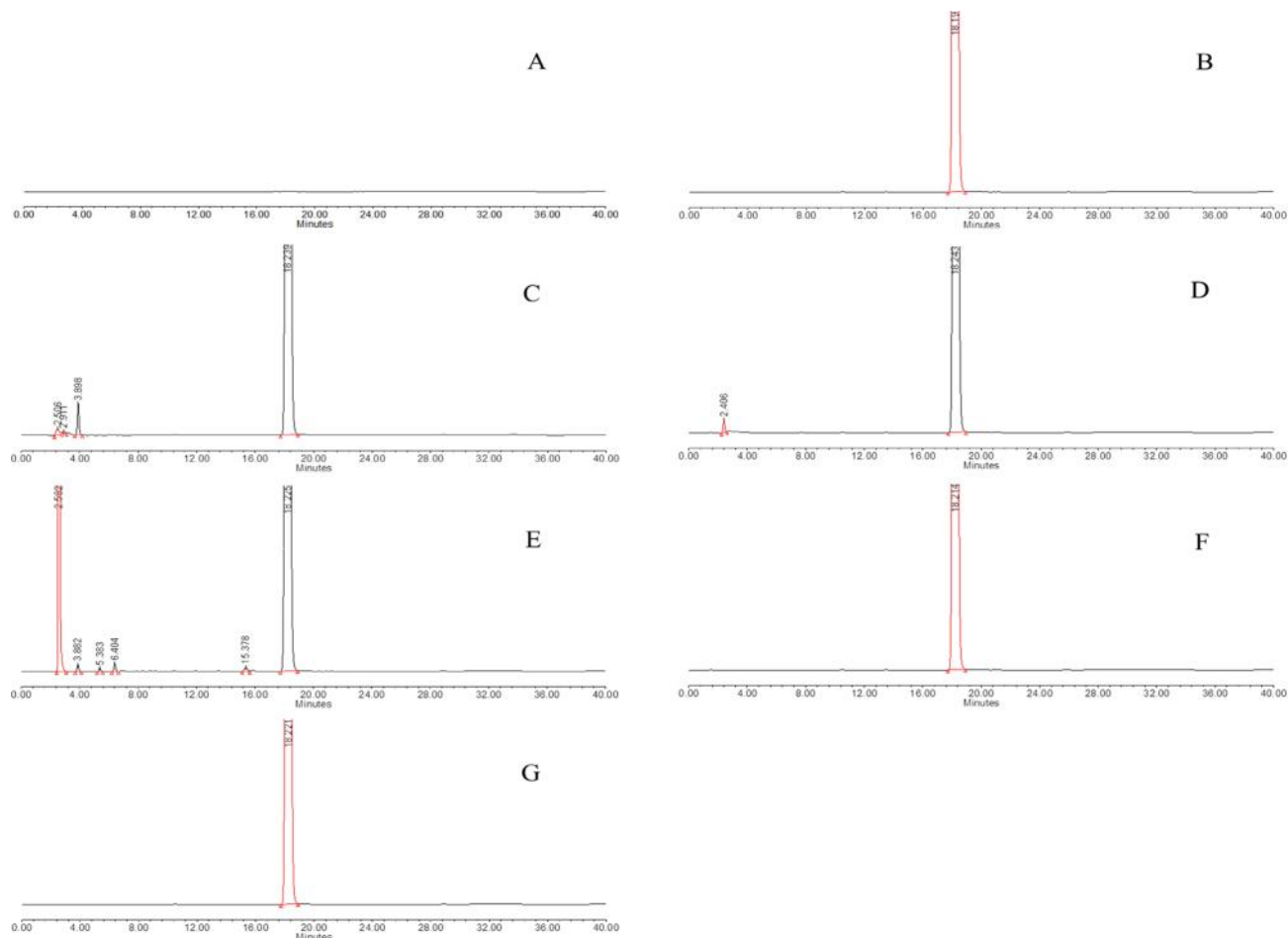


图 5 强制降解试验 HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of forced degradation test

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 供试品溶液 (test solution); C. 酸降解供试品 (degradation sample by acid); D. 碱降解供试品 (degradation sample by alkali); E. 氧化降解供试品 (degradation sample by oxidation); F. 高温降解供试品 (degradation sample by high temperature); G. 高湿降解供试品 (degradation sample by high wet)

2.10 稳定性

取“2.7”项下供试品溶液及自身对照溶液在室温下放置 24 h, 按“2.1.1”项下的色谱条件 (UPLC), 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样分析。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.11 样品的检测

取 3 批样品 (批号: ZS1904001, ZS1904002, ZS1904003) 按“2.2.3”项下的方法平行制备供试品溶液, 在“2.1.1”项的色谱条件 (UPLC) 和“2.1.2”项的色谱条件 (HPLC) 下进样分析, 记录化合物峰面积。有关物质的结果见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本试验首先优化了流动相系统。在纯水-甲醇流动相系统中, 色谱峰峰形不够理想。因此在水相中加入冰醋酸, 结果显示, 峰形和分离度均有较好的改善。其次筛选适用 HPLC 系统的色谱柱, 分别采用了 Luna C18 (2) 100A (4.6 mm×250

表 2 样品检测结果 (%)

Tab 2 Sample detection (%)

方法	批号	杂质 B	其他最大单个杂质	总杂质
UPLC	ZS1904001	未检出	未检出	未检出
	ZS1904002	未检出	0.02	0.03
	ZS1904003	未检出	0.01	0.01
HPLC	ZS1904001	未检出	未检出	未检出
	ZS1904002	未检出	0.01	0.02
	ZS1904003	未检出	0.01	0.01

mm, 5 μm) 和 SHISEIDO CAPCELL PAK C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱进行试验, 系统适用性溶液的进样结果显示, Luna C18 色谱柱未达基线分离的要求, 而 SHISEIDO CAPCELL PAK C18 色谱柱则能达到基线分离的要求。之后进行波长优化, 采用 PDA 检测器得到 LW33 和杂质 A、B 的紫外吸收图, 试验结果显示最大或较大吸收波长分布在 216 ~ 220 nm 以及 256 ~ 271 nm。因甲醇截止波长为 210 nm, 综合考虑为使 LW33 和各杂质均处于较大吸收范围, 同时避免溶剂末端吸

收效应,故选用主成分最大吸收波长 257 nm 作为检测波长。最后进行供试品溶剂的筛选,为避免溶剂效应,供试品溶剂选择水(用冰醋酸调节 pH 值至 3.0)-甲醇(30:70)。

3.2 方法的对比

本研究中 UPLC 和 HPLC 两种方法的准确度、精密度、线性等方法学验证结果基本一致,杂质谱相似,可以互相替代。由系统适用性色谱图可见,杂质 A 紧邻主峰,在 HPLC 色谱图中,杂质 A 位于主峰后;在 UPLC 色谱图中,杂质 A 位于主峰前。分析出峰顺序变化的原因:杂质 A 的极性与主成分的极性较为接近,两者与固定相之间作用力的少许差别会影响它们在色谱柱上的保留。尽管本研究中 HPLC 与 UPLC 两种色谱柱的填料类型均为十八烷基硅烷键合硅胶,但是为不同的品牌。通常,不同品牌甚至同一品牌的不同系列色谱柱,会采用不同的硅胶基质、键合技术和封端技术,其疏水作用、空间位阻、氢键作用、静电作用等能力的差异,使各色谱柱表现出不一样的选择性^[18]。

HPLC 具有普遍适用性,但分析时间长,且与质谱联用时需分流。与之相比,UPLC 具有分析时间短,溶剂需要量较少,分离度好,灵敏度高,质谱接口良好的优点;但同时分析应用上仍存在仪器相对贵,样品前处理要求严格,峰面积重现性相对稍差,市场所供应的不同分离机制的小颗粒填料的色谱柱较少等缺点^[19]。

在一类新药 LW33 研发的过程中,我们先开发的是普通的 HPLC 法,符合方法学验证要求,在实际应用中,该方法不仅要用于最终成品的有关物质的检测,还用于合成工艺中的中间体控制、工艺优化中的杂质对比等过程,工作量较大,为了提高检测的及时性和研发效率,进一步开发了 UPLC 法,在以上 UPLC 具备的众多优点中,分析时间是首要考虑的因素。与 HPLC 法相比,UPLC 法缩短了一半以上的运行时间,溶剂使用量仅为 HPLC 法的 1/10,提高了效率,节省溶剂;且 UPLC 可直接与质谱联用,无需分流,为杂质的后续研究提供极大方便^[20]。

参考文献

[1] 刘睿婷,吕秋军.抗阿尔茨海默病的多靶向药物研究进展[J].药学学报,2009,44(3):258-263.
[2] Alzheimer's Disease International. World Alzheimer report 2019. attitudes to dementia [R]. Alzheimers Dement, 2019.
[3] Alzheimer's Association. 2020 Alzheimer's disease facts and

figures [J]. Alzheimers Dement, 2020, 16(3): 391-460.
[4] Alzheimer's Disease International, Patterson C. World Alzheimer report 2018. the state of the art of dementia research: new frontiers [R]. Alzheimers Dement, 2018.
[5] 王英全,梁景宏,贾瑞霞,等.2020—2050 年中国阿尔茨海默病患病情况预测研究[J].阿尔茨海默病及相关病,2019,2(1):289-298.
[6] Shoji M. Drug therapy for Alzheimer's disease [J]. Brain Nerve, 2010, 62(7): 777-785.
[7] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2011, 377(9770): 1019-1031.
[8] Berk C, Paul G, Sabbagh M. Investigational drugs in Alzheimer's disease: current progress [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2014, 23(6): 837-846.
[9] Abhyankar D, Shedage A, Gole M, et al. Bioequivalence study of rivastigmine 6 mg capsules (single dose) in healthy volunteers [J]. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2017, 32(6): 360-366.
[10] 李倩倩,杨珊珊,黄硕,等.加兰他敏抗β淀粉样蛋白的神经保护机制研究[J].脑与神经疾病杂志,2017,25(2):110-115.
[11] Kaundal M, Zameer S, Najmi AK, et al. Betulinic acid, a natural PDE inhibitor restores hippocampal cAMP/cGMP and BDNF, improve cerebral blood flow and recover memory deficits in permanent BCCAO induced vascular dementia in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 832: 56-66.
[12] 赵卫丽.治疗阿尔茨海默症的磷酸二酯 9 (PDE9A) 抑制剂的合成与筛选研究[D].济南:山东中医药大学,2018.
[13] Prickaerts J, Heckman PRA, Blokland A. Investigational phosphodiesterase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2017, 26(9): 1033-1048.
[14] Kroker KS, Mathis C, Marti A, et al. PDE9A inhibition rescues amyloid beta-induced deficits in synaptic plasticity and cognition [J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(9): 2072-2078.
[15] Reyes-Irisarri E, Markerink-Van Ittersum M, Mengod G, et al. Expression of the cGMP-specific phosphodiesterases 2 and 9 in normal and Alzheimer's disease human brains [J]. Eur J Neurosci, 2007, 25(11): 3332-3338.
[16] Huang MN, Shao YX, Hou JY, et al. Structural asymmetry of phosphodiesterase-9A and a unique pocket for selective binding of a potent enantiomeric inhibitor [J]. Mol Pharmacol, 2015, 88(5): 836-845.
[17] 钱日彬,王健松,叶海鸿,等.磷酸二酯酶 9A 抑制剂 LW33 的合成[J].中国新药杂志,2021,30(2):114-118.
[18] 洪小棚,石莹,宋雪结,等.液相色谱柱进展及其在药品标准中的应用[J].药物分析杂志,2017,37(2):191-201.
[19] 张帅,丛海林,于冰.超高效液相色谱的发展及在分析领域的应用[J].分析仪器,2017,(6):16-27.
[20] 毛琼丽,石豪,严玲,等.超高效液相色谱仪的应用及前景展望[J].化学分析计量,2021,30(11):95-102.

(收稿日期:2022-03-29;修回日期:2022-06-10)

高效液相色谱指纹图谱结合一测多评法 评价扶正救肺颗粒的质量

郭燕¹, 孙岚萍¹, 顾志荣^{2*}, 杨浩¹, 葛斌^{2*} (1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院药剂科, 兰州 730000)

摘要: **目的** 建立扶正救肺颗粒 HPLC 指纹图谱, 并采用一测多评法测定其中 4 种成分(毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、橙皮苷、芒柄花素)的含量。**方法** 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰, 确定共有峰, 建立扶正救肺颗粒的 HPLC 指纹图谱; 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为内标, 确定毛蕊花糖苷、橙皮苷、芒柄花素的相对校正因子并进行含量计算; 同时采用外标法测定 4 种成分的含量, 比较计算值和实测值的差异。**结果** 15 批样品相似度均在 0.92 以上。以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为内标建立的毛蕊花糖苷、橙皮苷、芒柄花素的相对校正因子分别为 0.9331、0.8916、1.7119, 5 批扶正救肺颗粒一测多评法计算值与实测值无显著差异, 相对平均偏差小于 2%。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱和一测多评法可用于扶正救肺颗粒的质量评价。

关键词: 扶正救肺颗粒; 高效液相色谱指纹图谱; 相似度; 一测多评法; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 毛蕊花糖苷; 橙皮苷; 芒柄花素

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)10-2385-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.029

HPLC fingerprint combined with quantitation analysis of multi-components by single marker in quality evaluation of Fuzheng Jiufei granules

GUO Yan¹, SUN Lan-ping¹, GU Zhi-rong^{2*}, YANG Hao¹, GE Bin^{2*} (1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000; 2. Department of Pharmacy, Gansu People's Hospital, Lanzhou 730000)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of Fuzheng Jiufei granules and to develop quantitation analysis of multi-components by single marker (QAMS) to determine the content of 4 components (calycosin 7-*O*- β -*D*-glucoside, verbascoside, hesperidin, and formononetin). **Methods** Calycosin 7-*O*- β -*D*-glucoside was used as the reference peak to establish HPLC fingerprint of Fuzheng Jiufei granules. Calycosin 7-*O*- β -*D*-glucoside was selected as the internal reference and the relative correction factors (RCF) of the other 3 components were calculated. Content of the other 3 components was calculated by QAMS. Meanwhile, the content of the 4 components was determined by external standard method. The accuracy and feasibility of QAMS were evaluated by comparing the results between the measured values by external standard method and QAMS. **Results** The similarity of the fingerprints of 15 sample batches was above 0.92. The relative correction factor of verbascoside, hesperidin, and formononetin to calycosin 7-*O*- β -*D*-glucoside was 0.9331, 0.8916, and 1.7119 respectively. The content of the 4 components showed no significant difference between the external standard method and the QAMS, with relative average deviation < 2%. **Conclusion** HPLC fingerprint and QAMS can be used to evaluate the quality of Fuzheng Jiufei granules.

Key words: Fuzheng Jiufei granule; HPLC fingerprint; similarity; QAMS; calycosin 7-*O*- β -*D*-glucoside; verbascoside; hesperidin; formononetin

基金项目: 甘肃省中医药管理局科研项目 (No.GZK-2019-41); 甘肃省人民医院研发攻关项目 (No.18GSSY2-3)。

作者简介: 郭燕, 女, 硕士, 主要从事中药质量控制与制剂开发研究, email: gy013963@163.com *通信作者: 顾志荣, 男, 主管药师, 主要从事中药质量控制与制剂开发研究, email: guzr8817@163.com; 葛斌, 男, 主任药师, 主要从事中药制剂开发研究, email: gjy0630@163.com

扶正救肺颗粒是甘肃省人民医院的临床经验方, 益气、健脾、活血是其基本治法, 由黄芪、炒白术、生地、当归等 14 味药物组成。方中黄芪^[1]、白术^[2]补正气之虚为君药; 北沙参^[3]、麦冬、地黄养阴清肺为臣药; 丹参^[4]、川芎^[5]、当归^[6]等活血化瘀为佐药; 甘草补脾益气为使药。具有清热活血、益气的功效, 治疗特发性肺间质纤维化疗效显著^[7], 目前已在临床应用十余年。扶正救肺颗粒由 14 味中药提取而成, 其有效成分复杂多样, 仅对单一成分进行定量分析, 难以全面、真实地评价其整体质量。王智民等^[8]率先提出一测多评法 (QAMS), 利用中药及复方制剂中的一种成分的对照品作为内参物, 建立该成分与其他成分之间的相对校正因子, 通过相对校正因子计算其他成分含量, 来实现多个成分的同步测定, 具有快速、简便、成本低等优点, 近年来在中药复方制剂质量评价中得以推广应用^[9-11]。本研究在建立 HPLC 指纹图谱的基础上, 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照物, 应用 QAMS 测定扶正救肺颗粒中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、橙皮苷、芒柄花素 4 种成分的含量, 为全面、准确地控制和评价扶正救肺颗粒的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

十万分之一 Sartorius BT 125D 型精密电子天平 (德国 Sartorius 公司); HH-4 型数显水浴锅 (西安超杰仪器有限公司); SB25-12DTD 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 岛津 LC-16 型高效液相色谱仪 (岛津仪器有限公司); YC-1000 实验室喷雾制粒包衣机 (上海雅程仪器设备有限公司)。

1.2 试药

黄芪、炒白术、北沙参、地黄、麦冬、丹参、川芎、当归、陈皮、桔梗、瓜蒌、紫菀、款冬花、甘草 14 味中药饮片 (甘肃陇脉药材有限公司, 经甘肃省人民医院郑秀丽副主任中药师鉴定); 橙皮苷 (批号: 110721-201316)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号: CHB171102)、毛蕊花糖苷 (批号: CHB171103)、芒柄花素 (批号: CHB171026) 对照品 (纯度 $\geq 98\%$, 成都克洛玛生物科技有限公司); 乙腈、甲酸为色谱纯 (天津大茂有限公司); 其余试剂均为分析纯; 扶正救肺颗粒 (甘肃省人民医院制剂室制备, 编号: S1 ~ S15, 规格: 15 g/袋)。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 反相 WondaSil C18-WR 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) - 0.2% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 8% ~ 13%A; 10 ~ 20 min, 13% ~ 20%A; 20 ~ 40 min, 20% ~ 40%A; 40 ~ 50 min, 40% ~ 55%A); 检测波长 300 nm; 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、橙皮苷、芒柄花素对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 0.9520、0.1596、2.5080、0.0532 mg \cdot mL⁻¹ 混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取 10 g 样品, 置包有遮光纸的具塞锥形瓶中, 加甲醇 50 mL, 超声 60 min, 3000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 溶剂回收至干, 以甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。按最佳工艺^[12] 制得缺地黄、黄芪、陈皮的阴性样品溶液, 进样测定, 色谱图见图 1。

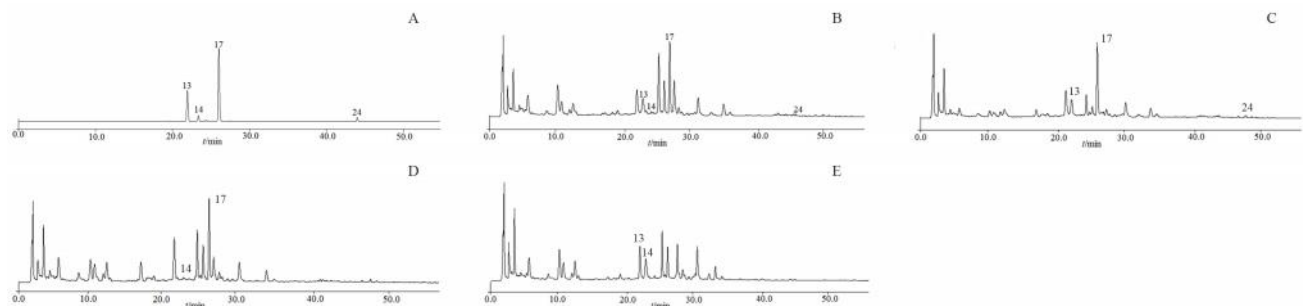


图 1 混合对照品 (A)、样品 (B)、缺地黄阴性样品 (C)、缺黄芪阴性样品 (D)、缺陈皮阴性样品 (E) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of mixed reference (A), sample (B), negative sample without *Rehmanniae Radix* (C), negative sample without *Astragali Radix* (D), and negative sample without *Citri Reticulatae Pericarpium* (E)

13. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin 7-*O*- β -D-glucoside); 14. 毛蕊花糖苷 (verbascoside); 17. 橙皮苷 (hesperidin); 24. 芒柄花素 (formononetin)

2.1.4 线性关系考察 取混合对照品溶液, 用甲醇分别稀释系列成系列对照品溶液, 进样测定,

以质量浓度 X (mg \cdot mL⁻¹) 为横坐标、峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 1。

表 1 各成分线性关系

Tab 1 Linearity of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (mg · mL ⁻¹)
毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	$Y = 1.429 \times 10^7 X - 3.927 \times 10^4$	0.9996	0.0272 ~ 0.952
毛蕊花糖苷	$Y = 1.309 \times 10^7 X - 787.070$	0.9995	0.0045 ~ 0.1596
橙皮苷	$Y = 6.571 \times 10^6 X + 2.893 \times 10^5$	0.9997	0.0716 ~ 2.5080
芒柄花素	$Y = 2.431 \times 10^7 X - 411.9$	0.9997	0.0015 ~ 0.0532

2.1.5 精密度试验 取混合对照品溶液，连续进样 6 次，结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、橙皮苷和芒柄花素的峰面积 *RSD* 分别为 0.37%、0.75%、0.53%、0.44%，表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取供试品溶液 6 份，进样测定，结果样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、橙皮苷和芒柄花素含量 *RSD* 分别为 0.32%、0.85%、0.37%、1.0%，表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取 S1 号供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、橙皮苷和芒柄花素的峰面积 *RSD* 分别为 3.0%、2.6%、2.0%、1.6%，表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收试验 称取已知含量的扶正救肺颗粒 6 份，精密称定，置于具塞锥形瓶中，分别加入一定量的对照品溶液 (1 : 0.5、1 : 1、1 : 1.5)，按“2.1.3”项下方法制备，进样测定，结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、橙皮苷和芒柄花素的平均回收率分别为 100.11%、100.45%、99.38%、100.28%，*RSD* 分别为 1.4%、2.0%、0.79%、2.1%。

2.2 指纹图谱

2.2.1 指纹图谱共有模式的建立 取 15 批扶正救肺颗粒 (S1 ~ S15) 样品，按“2.1.3”项下方法制备，进样测定，记录色谱图，通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 年版进行分析，通过检测得到的共有峰与混合对照品保留时间对比指认了 4 个成分，分别是 13 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷、14 号峰毛蕊花糖苷、17 号峰橙皮苷、24 号峰芒柄花素，保留时间分别为 22.578、23.786、26.484、44.683 min。结果见图 2。

2.2.2 14 味处方药材溶液的制备 分别称取黄芪、炒白术、北沙参、地黄、麦冬、丹参、川芎、当归、陈皮、桔梗、瓜蒌、紫菀、款冬花、甘草适量，粉碎，按“2.1.3”项下方法制备每味药材的供试品溶液。

2.2.3 指纹图谱的相似度评价与聚类分析 以 S1 扶正救肺颗粒指纹图谱作为参照图谱，绘制 15 批颗粒的指纹图谱，见图 3。指纹图谱共确定 24 个共有峰，将 13 号峰作为指纹图谱为参照峰；通过

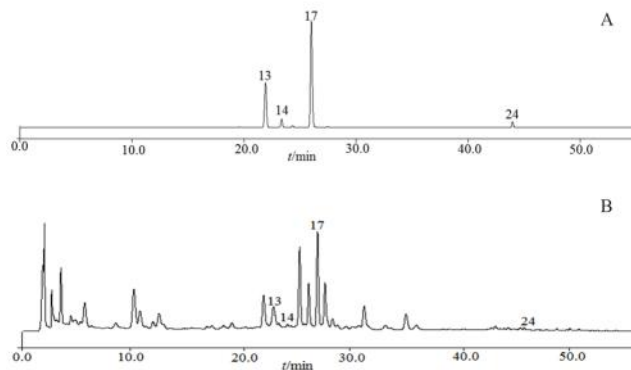


图 2 混合对照品 (A) 和代表性样品 (B) HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC of mixed reference substance (A) and representative sample (B)

13. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin 7-*O*-β-*D*-glucoside); 14. 毛蕊花糖苷 (verbascoside); 17. 橙皮苷 (hesperidin); 24. 芒柄花素 (formononetin)

保留时间及紫外光谱确定了其中 5 个峰所对应的成分，分别是阿魏酸 (12 号峰)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (13 号峰)、毛蕊花糖苷 (14 号峰)、橙皮苷 (17 号峰) 及芒柄花素 (24 号峰)。计算 15 批扶正救肺颗粒指纹图谱的相似度，结果见表 2。15 批供试品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 > 0.92，表明制备工艺所得的颗粒质量稳定、均一。

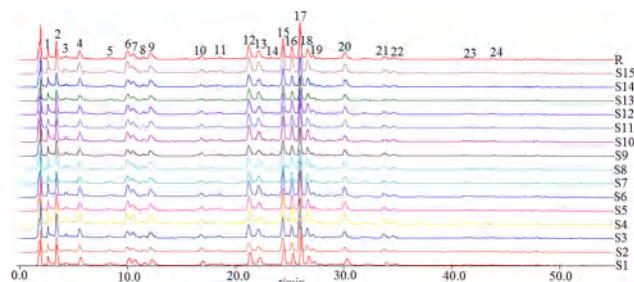


图 3 15 批扶正救肺颗粒 HPLC 指纹图谱

Fig 3 HPLC fingerprints of 15 batches of Fuzheng Jiufei granules

将 15 批扶正救肺颗粒的共有峰峰面积进行数据标准化，进行系统聚类分析，聚类方法为“最短距离法”，结果见图 4。当距离为 10 时，除 S1、S2 外，其余 13 批样品被分为一类，进一步说明不同批次颗粒质量稳定、均一。聚类结果与相似度分析结果基本一致，S1、S2 相似度较小。

2.2.4 共有峰的归属 取 14 味药材的供试品溶液，分别按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，通过各单味药的色谱峰保留时间及紫外光谱，分析各色谱峰的药材来源，结果见图 5 及表 3。

2.3 一测多评法

2.3.1 相对校正因子 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为内标，按公式计算其他 3 种成分的相对校正因子， $(f_{s/k}) = f_k/f_s = (C_s A_k) / (C_k A_s)$ (C_s 为内参物质量

表 2 15 批扶正救肺颗粒指纹图谱的相似度

Tab 2 Similarity of fingerprints of 15 batches of Fuzheng Jiufei granules

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
S1	1														
S2	0.933	1													
S3	0.927	0.988	1												
S4	0.926	0.989	0.993	1											
S5	0.923	0.992	0.985	0.992	1										
S6	0.925	0.986	0.992	0.992	0.992	1									
S7	0.924	0.988	0.981	0.988	0.996	0.99	1								
S8	0.925	0.988	0.991	0.991	0.994	0.994	0.995	1							
S9	0.924	0.987	0.992	0.994	0.989	0.992	0.986	0.992	1						
S10	0.933	0.988	0.992	0.990	0.989	0.996	0.987	0.993	0.992	1					
S11	0.927	0.993	0.991	0.991	0.995	0.995	0.994	0.997	0.991	0.994	1				
S12	0.924	0.987	0.987	0.990	0.992	0.993	0.995	0.993	0.990	0.991	0.996	1			
S13	0.920	0.981	0.981	0.981	0.989	0.990	0.993	0.993	0.982	0.988	0.994	0.991	1		
S14	0.920	0.979	0.984	0.987	0.987	0.991	0.993	0.993	0.987	0.987	0.991	0.995	0.991	1	
S15	0.921	0.984	0.989	0.990	0.989	0.996	0.988	0.992	0.989	0.995	0.993	0.990	0.988	0.988	1
R	0.938	0.992	0.994	0.995	0.996	0.997	0.995	0.997	0.995	0.997	0.998	0.996	0.992	0.993	0.995

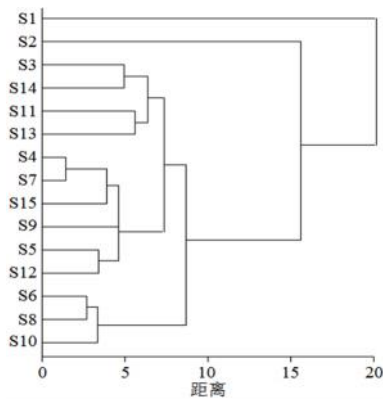


图 4 15 批扶正救肺颗粒聚类树状分析图

Fig 4 Cluster dendrogram of 15 batches of Fuzheng Jiufei granules

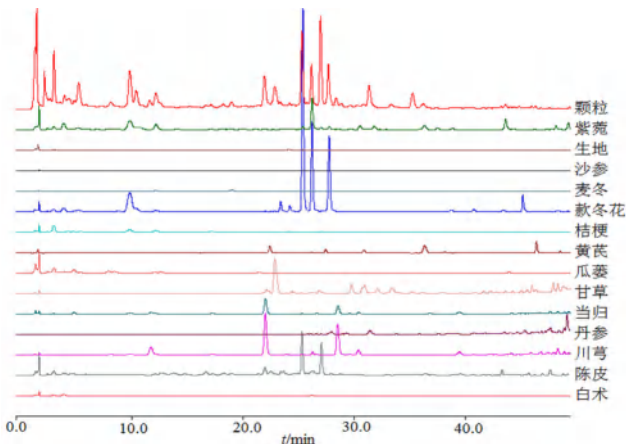


图 5 扶正救肺颗粒 HPLC 指纹图谱共有峰药材归属

Fig 5 Common peak attribution in fingerprints of Fuzheng Jiufei granules

浓度, A_s 为内参物峰面积, C_k 为待测成分质量浓度, A_k 为待测成分峰面积), 结果见表 4。

2.3.2 样品测定 取 5 批扶正救肺颗粒制备供试品溶液进样检测, 采用外标法 (ESM) 同时测定

表 3 共有峰的来源

Tab 3 Sources of common peak

色谱峰号	药材来源	色谱峰号	药材来源
2、3、6、7、9、18	紫菀、款冬花、桔梗	8、19	川芎
10、11、17	陈皮	13、24	黄芪
12	川芎、当归、陈皮、甘草	14	生地黄
15、16	紫菀、款冬花、陈皮	22、23	紫菀
1、4、5、19、21	合煎后新峰		

表 4 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照的相对校正因子

Tab 4 Relative correction factor of calycosin 7-O-β-D-glucoside as reference

化合物	相对校正因子
毛蕊化糖苷	0.9331
橙皮苷	0.8916
芒柄花素	1.7119

4 种成分的含量, 用 QAMS 法建立各待测物的相对校正因子测定 3 种待测成分量, 比较 2 种方法测定结果的差异。结果 2 种方法所测得各成分的含量基本一致, 相对平均偏差 (RAD) < 2.0%, 结果见表 5。表明 QAMS 可用于扶正救肺颗粒中 4 个化学成分的含量测定。

3 讨论

黄芪作为该方君药, 内能补脾肺之气, 外可固表止汗, 主要化学成分为多糖、黄酮、皂苷等, 黄芪中的总黄酮有抑制肺纤维化上皮-间质转化 (EMT) 作用^[13]。橙皮苷为陈皮主要活性成分, 现代药理研究发现橙皮苷具有抗炎、抗菌、调节免疫等药理活性^[14-15], 可抑制肺成纤维细胞活化^[16]。同时, 张慧等^[17]发现毛蕊花糖苷对于内毒素诱导的小鼠急性肺损伤有保护作用。因此, 选取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、芒柄花素和橙皮苷 4 种成分作为扶正救肺颗粒质量控制的

表 5 QAMS 法与 EMS 法测定扶正救肺颗粒各成分的含量

Tab 5 Content of components in Fuzheng Jiufei granules by QAMS method and ESM method

序号	毛蕊异黄酮		毛蕊花糖苷 / (mg · g ⁻¹)			橙皮苷 / (mg · g ⁻¹)			芒柄花素 / (mg · g ⁻¹)		
	葡萄糖苷 / (mg · g ⁻¹)	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	
S ₁	0.5393	0.1498	0.1463	1.18	1.9452	1.9039	1.07	0.0274	0.0268	1.11	
S ₂	0.5391	0.1312	0.1307	0.19	1.9294	1.8959	0.87	0.0226	0.0231	1.09	
S ₃	0.5349	0.1401	0.1392	0.32	1.9668	1.9054	1.59	0.0228	0.0234	1.29	
S ₄	0.5341	0.1409	0.1398	0.39	1.9374	1.8976	1.04	0.0255	0.0253	0.39	
S ₅	0.5401	0.1502	0.1498	0.13	2.0266	1.9620	1.61	0.0302	0.0297	0.83	

指标成分。

检测了不同波长下 (220、280、300 nm) 的指纹图谱, 结果发现检测波长为 300 nm 时, 基线平稳, 各峰形较好, 标定出 24 个共有峰, 能较多地反映出扶正救肺颗粒的内在质量信息。

QAMS 法和外标法测得毛蕊花糖苷、芒柄花素和橙皮苷含量的偏差均不高于 2.0%, 测定结果无明显差异, 表明 QAMS 法准确且可靠。在含量测定的基础上, 建立指纹图谱, 15 批样品指纹图谱相似度均在 0.92 以上, 表明不同批次样品的化学成分具有较好的一致性。

指纹图谱技术具有模糊性、整体性和专属性, 能全面反映扶正救肺颗粒的内在化学特征^[18]; 同时, 选取 4 种活性成分进行 QAMS 法多指标定量, 可在缺少对照品的条件下以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为内标, 准确定量其他组分, 降低了分析检测成本。本研究将指纹图谱和 QAMS 法相结合, 既考察了样品中多个指标性成分的含量, 又考察了其指纹图谱整体相似度, 建立的分析方法简便、准确、重复性好^[19], 为扶正救肺颗粒质量控制与评价提供了一定的参考。

参考文献

[1] 顾志荣, 葛斌, 许爱霞, 等. 基于本草考证的黄芪功效主治及用药禁忌挖掘[J]. 中成药, 2018, 40 (11): 2524-2530.

[2] 黄启迪, 苏洁, 刘静, 等. 白术水提物对自然衰老小鼠的作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (6): 72-77.

[3] 何军伟, 朱继孝, 杨丽, 等. 北沙参不同部位提取物镇咳祛痰作用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22 (8): 2864-2869.

[4] 刘磊, 张光霁, 楼招欢, 等. 丹参有效成分防治恶性肿瘤作用机制的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (6): 2472-2475.

[5] 周利, 赵曼茜, 王升, 等. 川芎中无机元素的分布及积累规律[J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (9): 1793-1798.

[6] 樊秦, 张延英, 陈辉萍, 等. 基于 OPLS 模型分析生态因子对当归质量的影响[J]. 中成药, 2021, 43 (5): 1226-1230.

[7] Wakamatsu K, Nagata N, Kumazoe H, et al. Prognostic value of serial serum KL-6 measurements in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Investig*, 2017, 55 (1): 16-23.

[8] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (23): 1925-1928.

[9] 许伟. 一测多评法同时测定宁神定志丸中 8 种成分[J]. 中成药, 2019, 41 (11): 2586-2590.

[10] 谭丙寅, 吴明波, 袁芳杰. 一测多评法同时测定安中片中 8 种成分[J]. 中成药, 2019, 41 (11): 2581-2586.

[11] 张立群, 何胜利. 一测多评法同时测定参桂理中丸中 6 种成分的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33 (5): 34-39.

[12] 沈丹丹, 顾志荣, 马天翔, 等. 扶正救肺颗粒成型工艺的均匀设计优选[J]. 时珍国医国药, 2019, 30 (5): 1122-1124.

[13] 徐昌君, 王鹏飞, 黄薇薇, 等. 黄芪总黄酮对特发性肺纤维化 miRNA-21、let-7 d 及 TGF-β/smad 信号干预作用[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (6): 1308-1311.

[14] Tejada S, Pinya S, Martorell M, et al. Potential anti-inflammatory effects of hesperidin from the genus citrus [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25 (37): 4929-4945.

[15] 李丽, 任周新, 赵鹏, 等. 橙皮苷及橙皮素抗肿瘤药理学活性研究进展[J]. 中医学报, 2018, 33 (12): 2304-2308.

[16] 任周新, 赵丹瑞, 李丽, 等. 橙皮苷对 TGF-β1 诱导的人胚肺成纤维细胞活化的影响[J]. 中国现代中药, 2017, 19 (9): 1270-1272.

[17] 张慧, 于澎, 张楠, 等. 毛蕊花糖苷对内毒素诱导的急性肺损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2015, 31 (3): 41-43.

[18] 张慧, 陈燕, 汪佳楠, 等. 指纹图谱技术在中药配方颗粒质量评价及过程控制中的应用[J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (19): 3822-3827.

[19] 楚淑芳, 陈秋谷, 胡兆流, 等. 基于高效液相色谱法指纹图谱和一测多评法的荷芪散质量评价[J]. 世界中医药, 2019, 14 (8): 1983-1989.

(收稿日期: 2022-03-23; 修回日期: 2022-05-25)

HPLC 法同时测定乳酸中 L- 乳酸及 6 种有机酸杂质的含量

谢莹莹^{1,2}, 张悦^{1,2*}, 刘雁鸣^{1,2}, 赵勇^{1,2}, 郑金凤^{1,2}, 蒋贇^{1,2}, 周颖^{1,2} (1.湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001; 2.国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室, 长沙 410001)

摘要: 目的 建立同时测定乳酸中 L- 乳酸及 6 种有机酸杂质含量的 HPLC 法。方法 采用 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm, 9 μm) 色谱柱, 以 5 mmol·L⁻¹ H₂SO₄ 为流动相, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 柱温 55 °C, 检测波长 210 nm。结果 在该色谱条件下, 空白溶剂对测定没有干扰, 6 种有机酸杂质与 L- 乳酸均能完全分离; 磷酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、L- 乳酸、冰醋酸、己二酸质量浓度分别在 0.0925 ~ 0.9250、0.1010 ~ 1.0100、0.0595 ~ 0.5952、0.1024 ~ 1.0245、0.6663 ~ 6.6634、0.2551 ~ 2.5514 和 0.1941 ~ 1.9410 mg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 103.1%、102.5%、101.5%、100.5%、99.8%、96.2% 和 101.1%, RSD 值均小于 2.0%。结论 本方法检出限低、重现性好, 可用于乳酸中 L- 乳酸及 6 种有机酸杂质的测定。

关键词: 乳酸; L- 乳酸; 有机酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R917, R927 文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2390-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.030

Simultaneous determination of L-lactic acid and 6 organic acid impurities in lactic acid with HPLC

XIE Ying-ying^{1,2}, ZHANG yue^{1,2*}, LIU Yan-ming^{1,2}, ZHAO yong^{1,2}, ZHENG Jin-feng^{1,2}, JIANG yun^{1,2}, ZHOU Ying^{1,2} (1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001; 2. NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha 410001)

Abstract: Objective To determine L-lactic acid and 6 organic acid impurities in lactic acid by HPLC. **Methods** HPLC was adopted on a Bio-Rad Aminex HPX-87H column (300 mm×7.8 mm, 9 μm) with the mobile phase system 5 mmol·L⁻¹ H₂SO₄. The flow rate was 0.6 mL·min⁻¹, the column temperature was 55 °C, and the detection wavelength was 210 nm. **Results** Under this chromatographic condition, the blank solvent had no interference to the determination, and the 6 organic acid impurities and L-lactic acid were separated completely. The concentrations of phosphoric acid, oxalic acid, citric acid, tartaric acid, L-lactic acid, glacial acetic acid and adipic acid were 0.0925 ~ 0.9250, 0.1010 ~ 1.0100, 0.0595 ~ 0.5952, 0.1024 ~ 1.0245, 0.6663 ~ 6.6634, 0.2551 ~ 2.5514, and 0.1941 ~ 1.9410 mg·mL⁻¹; the average recoveries were 103.1%, 102.5%, 101.5%, 100.5%, 99.8%, 96.2% and 101.1% respectively. RSD were all less than 2.0%. **Conclusion** The method has low detection limit and good reproducibility, which can be used to determine the content of L-lactic acid and 6 organic acid impurities in lactic acid.

Key words: lactic acid; L-lactic acid; organic acid; HPLC

乳酸又名 2- 羟基丙酸, 是一种天然存在的重
要有机酸, 作为消毒防腐剂、pH 调节剂、助溶剂
等, 可用于肌肉注射、静脉注射、皮下注射、口
服糖浆、片剂、外用和阴道用制剂^[1-2]。乳酸按其

旋光性通常可以分为 D- 乳酸、L- 乳酸以及外消
旋型 DL- 乳酸 3 种, 因人体内只有 L- 乳酸脱氢酶
可分解自身产生或摄入的 L- 乳酸, 如过量摄入 D
型、DL 型乳酸会产生酸中毒等代谢紊乱症状, 故

基金项目: 湖南省自然科学基金——科药联合基金项目 (No. 2022JJ80014)。

作者简介: 谢莹莹, 女, 工程师, 实验员, 主要从事药用辅料检验检测工作, email: 276468687@qq.com *通信作者: 张悦, 女, 主管药师, 实验员, 主要从事药用辅料检验检测工作, email: 873813723@qq.com

医药行业原辅料只用 *L*-乳酸^[3-4]。乳酸在发酵过程中, 伴随产物乳酸生成的同时还有其他一些有机酸副产物, 有机酸的含量是评价发酵工艺的重要指标^[5-6]。其中《中国药典》2020 年版乳酸品种项下采用化学反应控制枸橼酸、草酸、磷酸或酒石酸项^[7]; 日本药典 (JP17.0) 对挥发性脂肪酸进行了控制^[8]。为明确乳酸中可能含有的有机酸类型, 参考相关文献^[9-10], 建立了 HPLC-UV 法测定乳酸中其他有机酸, 并采用液质联用确认 *L*-乳酸二聚体的结构, 确定该方法可有效排除影响有机酸分离因素的干扰, 具有检测限低、重现性好的特点, 可以用于乳酸的质量控制, 现报道如下。

1 材料

LC-20A 岛津高效液相色谱仪 (日本岛津); MS105DU 电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。草酸 (批号: 101097-201702, 纯度: 100.0%)、柠檬酸 (批号: 111679-201602, 纯度: 97.0%)、冰醋酸 (批号: 190079-202002, 纯度: 99.9%) 对照品 (中国食品药品检定研究院); 酒石酸 (批号: 20180923)、己二酸 (批号: 20190407)、磷酸 (批号: 20200108) 对照品 (均为优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); *L*-乳酸对照品 (批号: LRAC 7354, 纯度: 93.3%, Sigma-Alorich 公司); 水为实验室自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm, 9 μm); 流动相: 5 mmol · L⁻¹ H₂SO₄; 流速: 0.6 mL · min⁻¹; 检测波长: 210 nm; 柱温: 55 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液制备 取本品 0.25 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取磷酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、*L*-乳酸、冰醋酸、己二酸对照品各适量, 加流动相溶解, 并逐步稀释得到系列标准工作溶液 (STD1 ~ STD5) (见表 1)。

表 1 7 种物质的标准工作溶液 (mg · mL⁻¹)

成分	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
磷酸	0.0925	0.2312	0.4625	0.6937	0.9250
草酸	0.1010	0.2525	0.505	0.7575	1.0100
柠檬酸	0.0595	0.1488	0.2976	0.4464	0.5952
酒石酸	0.1024	0.2561	0.5122	0.7684	1.0245
<i>L</i> -乳酸	0.6663	1.6658	3.3317	4.9976	6.6634
冰醋酸	0.2551	0.6378	1.2757	1.9135	2.5514
己二酸	0.1941	0.4852	0.9705	1.4557	1.9410

2.3 系统适用性试验

取空白溶液 (流动相)、供试品溶液、对照品溶液 (STD3), 进样测定, 记录色谱图, 结果显示, 空白溶液对样品测定无干扰, 各成分之间分离度均能达到药典要求^[11]。典型图谱见图 1。

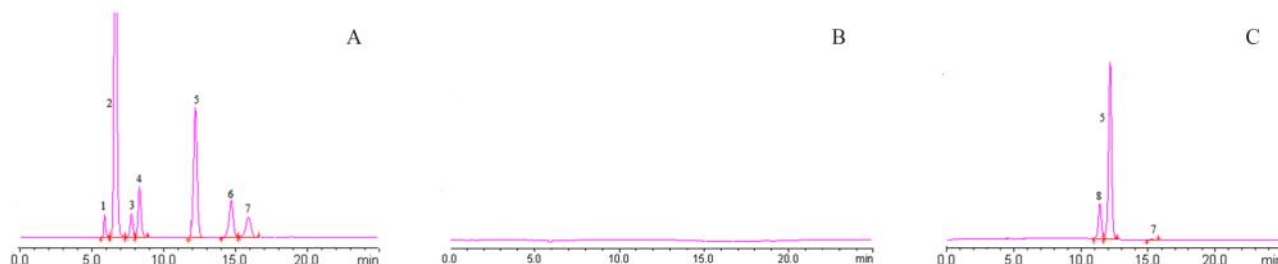


图 1 对照品溶液 (A)、空白溶液 (B) 和供试品溶液 (C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of reference solution (A), blank solution (B) and test solution (C)

1. 磷酸 (phosphoric acid); 2. 草酸 (oxalic acid); 3. 柠檬酸 (citric acid); 4. 酒石酸 (tartaric acid); 5. *L*-乳酸 (*L*-lactic acid); 6. 冰醋酸 (glacial acetic acid); 7. 己二酸 (adipic acid); 8. 乳酸二聚体 (lactic acid dimer)

2.4 线性关系的考察

取“2.2.2”项下的系列标准工作溶液, 进样测定, 记录色谱图, 以质量浓度对相应的峰面积进行回归, 结果见表 2。

2.5 精密度试验

取“2.2.2”项下 STD3 标准工作溶液, 连续进样 6 次, 结果磷酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、*L*-乳酸、冰醋酸、己二酸峰面积 *RSD* 分别为 0.23%、0.036%、0.14%、0.11%、0.064%、0.13%、0.52%。

2.6 重复性试验

取本品 (批号: CD190602C) 按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算含量, 结果杂质仅检出己二酸, 含量为 0.22%, *RSD* 为 4.7%, *L*-乳酸含量为 64.5%, *RSD* 为 0.86%。

2.7 稳定性试验

取“2.6”项下供试品溶液和“2.2.2”项下的 STD3 溶液在室温 (25 °C) 放置 0、2、4、6、8、12、24 h 后测定, 结果各成分峰面积的 *RSD* 均小于 5%, 说明供试品及对照品溶液在 24 h 内稳定。

表 2 各成分线性关系

Tab 2 Linearity of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
磷酸	$Y = 5.579 \times 10^5 X - 1.075 \times 10^4$	0.9989	0.0925 ~ 0.9250
草酸	$Y = 1.000 \times 10^7 X + 8.512 \times 10^4$	1.000	0.1010 ~ 1.0100
柠檬酸	$Y = 1.000 \times 10^6 X - 1.344 \times 10^3$	1.000	0.0595 ~ 0.5952
酒石酸	$Y = 1.000 \times 10^6 X - 209.9$	1.000	0.1024 ~ 1.0245
L-乳酸	$Y = 7.552 \times 10^5 X + 6.618 \times 10^4$	1.000	0.6663 ~ 6.6634
冰醋酸	$Y = 6.698 \times 10^5 X - 6.416 \times 10^3$	1.000	0.2551 ~ 2.5514
己二酸	$Y = 6.247 \times 10^5 X - 7.199 \times 10^3$	1.000	0.1941 ~ 1.9410

2.8 定量限、检测限

取“2.2.2”项下 STD1 溶液适量，逐级稀释，并进样测定，以信噪比 $S/N = 10$ 和 $S/N = 3$ 时各对照品的量为定量限和检测限，结果除主峰（L-乳酸）外，各杂质磷酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、冰醋酸、己二酸检测限分别为 2.7、0.15、2.0、5.2、5.4、7.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；定量限分别为 9.1、0.50、6.9、17.6、18.2、25.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.9 回收试验

分别称取本品（批号：CD190602C）适量，精密称定，置 50 mL 量瓶中，分别依次加入磷酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、L-乳酸、冰醋酸、己二酸对照品各适量，用流动相稀释并定容至刻度，平行制备 6 份；分别精密量取上述溶液各 10 μL 进样测定，并计算回收率，结果磷酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、L-乳酸、冰醋酸、己二酸的平均回收率分别为 103.1%、102.5%、101.5%、100.5%、99.8%、96.2%、101.1%，RSD 分别为 1.4%、0.80%、1.1%、0.26%、0.59%、0.23%、0.36%。

2.10 耐用性考察

改变柱温（ $\pm 5^\circ\text{C}$ ）、流速（ $\pm 0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ）和不同品牌的液相色谱仪，结果不同品牌的仪器对结果无影响；柱温和流速会影响各组分的分离，但各组分间的最低分离度均大于 1，能够基本分离，对结果无明显影响，表明该方法耐用性较好。

2.11 样品测定

取 33 批乳酸样品各适量，分别按“2.2.1”项下方法制备，再进样测定，计算样品中有机酸含量，结果见表 3。

2.12 液质联用确认主峰附近峰的结构

2.12.1 液相色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)；流速：0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；柱温：30 $^\circ\text{C}$ ；流动相：0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 梯度洗脱，程序见表 4。

2.12.2 质谱条件 离子源：电喷雾离子源 (ESI)；源电压 4 kV；氮气流速：3 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ；

加热气流速：10 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ；干燥器气流速：10 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ；接口温度：300 $^\circ\text{C}$ ；离子传输管温度：250 $^\circ\text{C}$ ；加热模块温度：400 $^\circ\text{C}$ ，负离子模式；一级质谱扫描范围 50 ~ 1000；二级质谱碰撞电压：15 eV。

2.12.3 供试品的制备 单独收集图 1 中供试品溶液的峰 8 组分，作为供试品溶液。

2.12.4 L-乳酸对照品溶液 取 L-乳酸对照品 10 mg，加水溶解并稀释成 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液，即得。

2.12.5 碎片离子确认 精密量取供试品溶液、L-乳酸对照品溶液各 3 μL ，注入液质联用色谱仪，记录质谱图。结果显示，峰 8 母离子一级质谱图中出现了 m/z 161.15，推测峰 8 可能为两个乳酸分子聚合，脱去一分子水，生成乳酸二聚体，分子量为 162，在负离子模式下 $[\text{M-H}]^-$ 为 161。峰 8 母离子经碰撞室碰撞后生成了 m/z 89.45 的碎片离子，即为 L-乳酸的碎片离子，证实峰 8 为乳酸二聚体。

3 讨论

3.1 检测器的选择

有文献^[12]提出有机酸的检测可采用示差检测器，故课题组对该文献方法进行优化，使各成分分离能基本达到《中国药典》2020 年版四部通则 0512 分离度的要求后，采用同一混合标准溶液在示差检测器和紫外检测器上进行测定，结果 7 个成分在示差检测器上的检测限明显高于紫外检测器，且示差检测器影响因素多，所以选择紫外检测器进行检测。

3.2 检测波长的选择

对 6 种有机酸杂质及 L-乳酸的标准溶液进行波长全扫描，发现各成分在 210 nm 附近均有最大吸收，所以选取 210 nm 作为检测波长。

3.3 结论

该方法不仅可检测出乳酸中 6 种有机酸杂质，还可将 L-乳酸单体及 L-乳酸二聚体区分开来，而《中国药典》2020 年版乳酸品种项下^[7]的含量测定采用滴定法，其原理是用过量氢氧化钠将乳酸中聚合体水解成乳酸单体后，再用硫酸滴定液返滴定，测定的是样品中乳酸及其聚合体的总和，不能反映样品中乳酸单体的含量；乳酸在高浓度下会发生聚合反应，生成乳酸聚合物^[13]，与现行标准对乳酸的定义相吻合，因此该方法测定 L-乳酸单体含量相比于滴定法专属性更强。

4 小结

本研究建立了一种可有效检测乳酸中 L-乳酸单体及 6 种有机酸杂质的高效液相色谱法，该方法简便、准确，可有效分离各有机酸杂质并应用于乳酸中 L-乳酸单体的批量检测，为乳酸标准的科学性和质量可控性提供参考。

表 3 样品中的 L-乳酸单体及 6 种有机酸杂质检验结果 (%)

Tab 3 Test results of L-lactic acid monomer and 6 organic acid impurities (%)

生产企业	批号	己二酸	草酸	磷酸	酒石酸	冰醋酸	柠檬酸	L-乳酸
A	CD190602C	0.22	ND	ND	ND	ND	ND	64.5
A	CD190603C	0.21	ND	ND	ND	ND	ND	65.4
B	201201	ND	ND	ND	ND	ND	ND	64.3
B	200801	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65.1
B	200801	ND	ND	ND	ND	ND	ND	64.2
B	201201	ND	ND	ND	ND	ND	ND	64.1
A	CD200404C	0.16	ND	ND	ND	ND	ND	64.3
C	20050588	ND	ND	ND	ND	ND	ND	64.6
A	CD190603C	0.13	ND	ND	ND	ND	ND	65.0
D	L20032385J	0.078	ND	ND	ND	ND	ND	63.9
A	CD190502C	0.18	ND	ND	ND	ND	ND	63.7
A	CD190604C	0.15	ND	ND	ND	ND	ND	63.8
B	210201	ND	ND	ND	ND	ND	ND	64.7
E	2021032931	0.14	ND	ND	ND	ND	ND	62.9
F	105920201201	0.18	ND	ND	ND	ND	ND	64.8
A	CD190602C	0.09	ND	ND	ND	ND	ND	63.9
A	CD190605C	0.17	ND	ND	ND	ND	ND	63.3
B	200401	0.087	ND	ND	ND	ND	ND	64.3
A	CD200403C	0.13	ND	ND	ND	ND	ND	64.1
D	L200912J	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65.3
F	105920180501	0.14	ND	ND	ND	ND	ND	64.8
F	105920210201	0.23	ND	ND	ND	ND	ND	67.4
F	105920210301	0.21	ND	ND	ND	ND	ND	64.3
G	X210401	0.18	ND	ND	ND	ND	ND	63.8
G	X210402	0.12	ND	ND	ND	ND	ND	62.7
G	X210403	0.21	ND	ND	ND	ND	ND	64.2
E	乳酸(原料药)样 1	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	63.9
E	乳酸(原料药)样 2	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	63.2
E	食品级乳酸 85%样 1	0.16	ND	ND	ND	ND	ND	65.0
E	食品级乳酸 85%样 2	0.15	ND	ND	ND	ND	ND	63.0
E	乳酸(工业级)80%样 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65.4
E	乳酸(工业级)80%样 2	0.084	ND	ND	ND	ND	ND	66.1
H	K53288666	ND	ND	ND	ND	ND	ND	62.9

注 (Note): ND 表示未检出 (ND means not detected)。

表 4 梯度洗脱表

Tab 4 Gradient elution

时间 /min	流动相 A (0.1% 甲酸) /%	流动相 B (乙腈) /%
0 ~ 3	98	2
3 ~ 10	98 → 10	2 → 90
10 ~ 13	10	90
13.01 ~ 17	98	2

参考文献

[1] 燕丰. 乳酸的生产应用及市场前景 [J]. 化工中间体网刊, 2002 (5): 17-20.

[2] 姚静. 药用辅料应用指南 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 142.

[3] 任保增. “L-乳酸产业化关键技术研究与应用” 科技成果获河南省科技进步一等奖 [J]. 河南化工, 2011, 1 (1): 9.

[4] 舒英, 余宁兰, 龚蓉, 等. 乳酸性酸中毒的危险因素分析 [J]. 华西医学, 2011, 26 (6): 835-836.

[5] 闫智慧, 高静, 周丽亚, 等. 乳酸的应用与发酵生产工艺 [J]. 河北工业大学学报, 2004, 33 (3): 15-19.

[6] 于华, 唐姣, 赵佳丽, 等. 四川麸醋发酵过程中醋酸理化指标及有机酸变化分析 [J]. 中国酿造, 2020, 39 (7): 51-55.

[7] 中国药典 2020 年版. 二部 [S]. 2020: 831.

[8] JP X VII. [S]. 2017: 1151.

[9] Park JM, Shin JA, Lee JH, et al. Development of a quantitative method for organic acid in wine and beer using high performance liquid chromatography [J]. Food Sci Biotechnol, 2017, 26 (2): 349-355.

[10] 王乃平, 袁艳, 江海燕, 等. 液质联用法测定广山楂有机酸含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (10): 77-78.

[11] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 61.

[12] 马瑞, 欧阳嘉, 李鑫, 等. 高效液相色谱法同时测定物质乳酸发酵液中有有机酸及糖类化合物 [J]. 色谱, 2012, 30 (1): 62-66.

[13] 王勤, 张娟. 乳酸缩聚反应动力学 [J]. 应用化学, 1994, 11 (1): 76-79.

(收稿日期: 2022-03-31; 修回日期: 2022-05-11)

抗栓胶囊中黄曲霉毒素的含量测定及安全性评价

薛平, 顾峥嵘, 刘旻虹, 李莉* (常州市食品药品纤维质量监督检验中心, 江苏 常州 213000)

摘要: 目的 测定抗栓胶囊中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的含量, 评价抗栓胶囊中黄曲霉毒素的安全性。方法 70% 乙腈提取样品, 免疫亲和柱净化提取液, 采用高效液相色谱柱后衍生荧光法和液相色谱-串联质谱法两种方法测定。结果 两种测定方法线性关系均良好, 进样精密密度、重复性、稳定性和加样回收率均符合要求。29 批次样品中 10 个批次样品黄曲霉毒素 B₁ 超过 5 μg, 黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂ 和 B₁ 的总量超过 10 μg; 1 个批次样品黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂ 和 B₁ 的总量超过 10 μg。结论 抗栓胶囊中黄曲霉毒素污染的原因可能是处方中多种高危原料药药材共同导致的。本方法可以用于抗栓胶囊中的黄曲霉毒素含量测定及质量控制。

关键词: 抗栓胶囊; 黄曲霉毒素; 含量测定

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2394-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.031

Content determination and safety evaluation of aflatoxin in Kangshuan capsules

XUE Ping, GU Zheng-rong, LIU Min-hong, LI Li* (*Changzhou Institute for Food, Drug and Fiber Control, Changzhou Jiangsu 213000*)

Abstract: Objective To determine the content of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in Kangshuan capsules and to evaluate its safety. **Methods** The samples were extracted with 70% acetonitrile, purified by immunoaffinity column, and determined by both HPLC with fluorescence detection after photochemical derivation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Results** Both detection methods showed good linearity, and the repeatability, stability and sample recovery all met the requirements. The content of aflatoxin B₁ in 10 out of the 29 batches samples was more than 5 μg. The total amount of aflatoxin G₂, G₁, B₂ and B₁ in these samples exceeded 10 μg. The total amount of aflatoxin G₂, G₁, B₂ and B₁ in 1 batch exceeded 10 μg. **Conclusion** The pollution of aflatoxin in Kangshuan capsules may be caused by various high-risk raw materials in the prescription. The method can be used to determine the content of aflatoxin in Kangshuan capsules, a suitable reference for the quality control of this drug.

Key words: Kangshuan capsule; aflatoxin; content determination

抗栓胶囊由当归尾、水蛭、土鳖虫、丹参、乌梢蛇、麝香、马钱子、骨碎补、僵蚕、蜈蚣、延胡索、蟾酥等 19 味药材制成, 具有活血化瘀、抗栓通脉之功效; 一般用于血栓闭塞性脉管炎瘀血阻络证, 常用于辅助治疗脑血栓、心肌梗死、血栓性静脉炎等疾病^[1-3]。

目前抗栓胶囊的质量研究主要是针对当归尾、丹参和甘草等药材的薄层色谱鉴别及丹参酮 II_A、土的宁等标志成分的含量测定, 而安全性探索相对较少^[1-3]。抗栓胶囊中含有土鳖虫生药

粉末, 关于土鳖虫黄曲霉毒素超标的现象时有报道^[4-5]。中药外源性有害物质黄曲霉毒素的检测和控制是药品质量控制的重中之重^[6], 目前该药仍未进行过黄曲霉毒素的安全性评估。

黄曲霉毒素 (AFT) 是公认的超级毒性致癌物, 其种类较多, 黄曲霉毒素的种类主要有黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)、B₂ (AFB₂)、G₁ (AFG₁)、G₂ (AFG₂)、M₁ (AFM₁) 和 M₂ (AFM₂) 等, 其中 AFB₁ 毒性最强, 中药制剂主要涉及 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂^[5-7]。本文采用免疫亲和柱净

基金项目: 国家药品监督管理局 2021 年国家药品抽检计划 (序号 7)。

作者简介: 薛平, 男, 硕士, 副主任中药师, 主要从事中药分析与质量控制, email: xuepinggo@163.com *通信作者: 李莉, 女, 主任药师, 主要从事中药分析与质量控制, email: 379584176@qq.com

化高效液相色谱柱后衍生荧光法 (HPLC-FLD) 和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS) 测定抗栓胶囊中 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 的残留量。两种检测方法互相验证, 排除干扰, 在符合《中国药典》2020 年版要求的前提下, 完善检测方法^[7]。通过测定抗栓胶囊样品中黄曲霉毒素的残留量, 为该药的质量控制和监管提供参考。

1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪、RF-20AXS 荧光检测器 (日本岛津有限公司); 光化学衍生器 (美国 AURA); LCMS-8060 高效液相色谱质谱联用仪 (日本岛津); XP504 电子天平 (万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); KQ5200DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); IKA T25 分散机 [艾卡 (广州) 仪器设备有限公司]; Thermo Scientific Multifuge X4R Pro 台式冷冻离心机 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。黄曲霉毒素混合对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 610001-202107: AFB₁ 以 1.08 μg · mL⁻¹ 计算; AFB₂ 以 0.33 μg · mL⁻¹ 计算; AFG₁ 以 1.01 μg · mL⁻¹ 计算; AFG₂ 以 0.30 μg · mL⁻¹ 计算)。4 种不同品牌 3 mL 规格的免疫亲和柱 [厂家分别为 VICAM (维康)、ROMER、华安麦科和青岛普瑞邦 (Pribolab)], 甲醇、乙腈和乙酸铵均为色谱纯, 水为去离子水, 氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾和吐温 20 均为分析纯。抗栓胶囊样品来自全国 20 个省级行政区, 涉及 9 家生产企业 (编号 A ~ I), 共 29 批次样品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[7-10]

2.1.1 HPLC-FLD 色谱柱: Agilent ZORBAX SB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-水 (16:16:68); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 柱后光化学衍生法: 光化学衍生器 (254 nm); 检测器: 荧光检测器, 激发波长 λ_{ex}: 360 nm, 发射波长 λ_{em}: 450 nm。

2.1.2 LC-MS 色谱柱: Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm); 流动相: 10 mmol · L⁻¹ 醋酸铵溶液为流动相 A, 以甲醇为流动相 B; 流速: 0.3 mL · min⁻¹, 梯度洗脱 (0 ~ 4.5 min, 65% → 15%A; 4.5 ~ 6 min, 15% → 0%A; 6 ~ 6.5 min, 0% → 65%A; 6.6 ~ 10 min, 65%A); 柱温: 25 °C; 进样量: 5 μL。

离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 离子源接口温度: 300 °C; 脱溶剂温度: 526 °C; DL 管温度: 250 °C; 载气流速: 2 L · min⁻¹; 加热器流量: 10 L · min⁻¹; 加热块温度: 400 °C; 干燥气流速:

10 L · min⁻¹; 采集模式为正离子模式; 各化合物监测离子对和碰撞电压 (CE) 见表 1。

表 1 监测离子对、碰撞电压

Tab 1 Monitor ion pair and collision voltage

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE/V	离子对类别
AFG ₂	331.20	245.10	30	定量
	331.20	313.00	26	定性
AFG ₁	329.20	242.95	28	定量
	329.20	310.90	23	定性
AFB ₂	315.20	258.90	30	定量
	315.20	287.10	27	定性
AFB ₁	313.05	240.95	38	定量
	313.05	285.00	24	定性

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密量取黄曲霉毒素混合对照品溶液 1 mL, 置 20 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 作为对照品储备液。

HPLC-FLD 对照品溶液: 精密量取上述对照品储备液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 即得。

LC-MS 系列对照品溶液: 精密量取对照品储备液适量, 用 70% 甲醇稀释成含 AFB₂、AFG₂ 质量浓度为 0.03 ~ 0.6 ng · mL⁻¹, 含 AFB₁、AFG₁ 质量浓度为 0.12 ~ 2 ng · mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 见表 2。

表 2 系列混合对照品溶液质量浓度 (ng · mL⁻¹)

Tab 2 Concentration of series mixed reference solution (ng · mL⁻¹)

序号	AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁
1	0.030	0.101	0.033	0.108
2	0.075	0.253	0.083	0.270
3	0.150	0.505	0.165	0.540
4	0.300	1.010	0.330	1.080
5	0.600	2.020	0.660	2.160

2.2.2 供试品溶液^[7-8] 取抗栓胶囊样品内容物粉末约 5 g, 精密称定, 置于均质瓶中, 精密加入 70% 乙腈溶液 75 mL, 高速搅拌 2 min (11 000 r · min⁻¹), 4000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 精密量取上清液 7 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用缓冲液 (称取 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾, 加水 990 mL 使溶解, 用盐酸调节 pH 值至 7.0, 加水稀释至 1000 mL, 即可) 稀释至刻度, 摇匀, 离心 10 min, 过滤 (用玻璃纤维滤纸过滤), 精密量取上清液 20 mL, 通过免疫亲和柱, 流速 3 mL · min⁻¹, 用 10 mL 含 1% 吐温 20 的水洗脱, 再用 20 mL 水洗脱, 弃去洗脱液, 再用 1.5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 置 2 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 系统适用性试验

2.3.1 HPLC-FLD 取“2.2.1”项下 HPLC-FLD 对照品溶液按“2.1.1”项下色谱条件进样 5 μL ；阴性样品（未检出 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂）和供试品溶液各进样 20 μL 测定，黄曲霉毒素两个相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，典型色谱图见图 1。

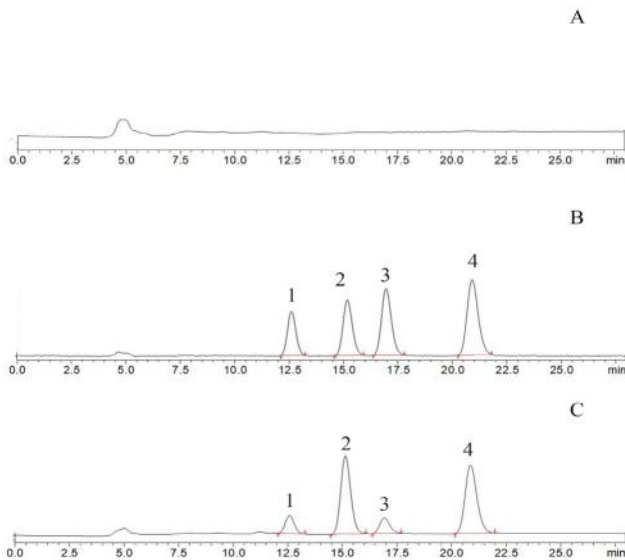


图 1 阴性样品 (A)、对照品 (B)、供试品 (C) 的液相荧光色谱图
Fig 1 Liquid phase fluorescence chromatogram of negative sample (A), reference (B), and sample (C)
1. AFG₂; 2. AFG₁; 3. AFB₂; 4. AFB₁

2.3.2 LC-MS 取表 2 中的 3 号对照品溶液、阴性样品（未检出 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂）和供试品溶液按“2.1.2”项下色谱条件进样 5 μL 测定，结果各峰形良好，响应高，试验条件满足测定要求，典型色谱图见图 2。

2.4 线性关系考察

2.4.1 HPLC-FLD 分别精密吸取“2.2.1”项下 HPLC-FLD 对照品溶液 1、2、5、10、15、20、25 μL ，注入液相色谱仪，测定峰面积，以峰面积 (Y) 为纵坐标，进样量 (X , μL) 为横坐标，绘制标准曲线，结果见表 3。

2.4.2 LC-MS 分别精密吸取“2.2.1”项下 LC-MS 系列对照品溶液进样 5 μL ，测定峰面积，以峰面积 (Y) 为纵坐标，进样质量浓度 (X , $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标，绘制标准曲线，结果见表 3。

2.5 精密度试验

2.5.1 HPLC-FLD 取“2.2.1”项下的 HPLC-FLD 对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 针，结果峰面积 RSD ，AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 峰面积 RSD 分别为 1.2%、0.92%、0.75% 和 0.59%，表明仪器精密度良好。

2.5.2 LC-MS 取表 2 中的 3 号对照品溶液，按

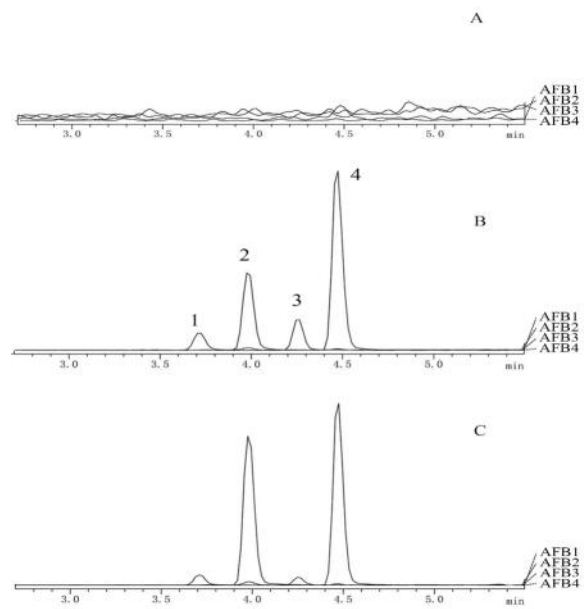


图 2 阴性样品 (A)、对照品 (B)、供试品 (C) 质谱 MRM 的 TIC 色谱图
Fig 2 TIC chromatogram of mass spectrometry MRM of negative sample (A), reference (B), and sample (C)
1. AFG₂; 2. AFG₁; 3. AFB₂; 4. AFB₁

“2.1.2”项下色谱条件连续进样 6 针，计算峰面积 RSD ，结果 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 峰面积 RSD 分别为 6.9%、4.1%、5.1% 和 2.9%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取抗栓胶囊样品（生产企业 F，批号：200510），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别按“2.1”项下色谱条件进行分析，HPLC-FLD 进样 20 μL ，LC-MS 进样 5 μL ，平行操作 6 份。HPLC-FLD 法测得 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 含量的 RSD 分别为 5.2%、5.3%、4.3% 和 4.1%；LC-MS 测得 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 含量的 RSD 分别为 7.9%、5.9%、6.6% 和 5.9%， RSD 均小于 10%，表明本方法重复性良好，两种检测方法均可行。

2.7 检测限与定量限

2.7.1 HPLC-FLD 取“2.2.1”项下 HPLC-FLD 对照品溶液稀释至一定的浓度，在“2.1.1”项下色谱条件进样分析。以信噪比为 10 : 1 时相应浓度计算定量限，以信噪比为 3 : 1 时相应浓度计算检测限，定量限与检测限均折算到试样中被测物能被检测出的量，结果见表 3。

2.7.2 LC-MS 取“2.2.1”项下 LC-MS 系列对照品溶液中浓度最低的对照品溶液稀释至一定的浓度，在“2.1.2”项下色谱条件进样分析。以信噪比为 10 : 1 时相应浓度计算定量限，以信噪比为 3 : 1 时相应浓度计算检测限，结果见表 3。

表 3 线性关系、检测限和定量限

Tab 3 Linear, LOD and LOQ

化合物	HPLC-FLD					LC-MS				
	线性方程	<i>r</i>	线性范围 / 围 / μg	LOD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	线性方程	<i>r</i>	线性范围 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
AFG ₂	$Y = 1847.97X - 323.69$	1.000	0.60 ~ 15.00	0.116	0.231	$Y = 7.75 \times 10^4 X - 645.673$	0.9984	0.030 ~ 0.600	0.064	0.129
AFG ₁	$Y = 2574.73X - 409.45$	1.000	2.02 ~ 50.50	0.035	0.071	$Y = 1.44 \times 10^5 X - 1473.97$	0.9995	0.101 ~ 2.020	0.022	0.087
AFB ₂	$Y = 3231.14X - 409.32$	1.000	0.66 ~ 16.50	0.108	0.216	$Y = 1.67 \times 10^5 X - 1076.35$	0.9998	0.033 ~ 0.660	0.014	0.141
AFB ₁	$Y = 4196.36X - 707.60$	1.000	2.16 ~ 54.00	0.064	0.064	$Y = 2.16 \times 10^5 X - 2243.22$	0.9999	0.108 ~ 2.160	0.035	0.069

2.8 稳定性试验

取抗栓胶囊样品(生产企业 F, 批号: 200510), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。在 0、2、4、6、10、12、16、24 h 时分别按“2.1”项下两种色谱条件进行分析, HPLC-FLD 进样 20 μL , LC-MS 进样 5 μL , 计算峰面积 *RSD*。HPLC-FLD 法测得 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 峰面积的 *RSD* 分别为 1.5%、0.83%、0.57% 和 0.56%; LC-MS 测得 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 峰面积的 *RSD* 分别为 4.7%、3.3%、6.0% 和 2.0%, 表明供试品溶液稳定性良好, 检测方法可行。

2.9 加样回收试验

取抗栓胶囊空白样品(不含黄曲霉毒素) 5 g, 平行 6 份, 精密称定, 精密加入对照储备液 0.5 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液后, 分别按“2.1”项下两种色谱条件进行分析, HPLC-FLD 进样 20 μL , LC-MS 进样 5 μL , 结果 HPLC-FLD 法平均加样回收率 (*RSD*) 分别为 AFG₂ 91.79% (1.3%)、AFG₁ 88.29% (2.1%)、AFB₂ 98.48% (1.3%)、AFB₁ 98.82% (1.1%); LC-MS 法平均加样回收率 (*RSD*) 分别为 AFG₂ 91.31% (5.8%)、AFG₁ 92.54% (4.1%)、AFB₂ 99.62% (4.4%)、AFB₁ 94.03% (2.8%), 表明本试验准确度良好。

2.10 样品测定

取不同生产企业的抗栓胶囊样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别采用“2.1”项下色谱条件进行分析, HPLC-FLD 进样 20 μL , LC-MS 进样 5 μL , 计算样品中 4 种黄曲霉毒素的含量及其总量, 结果见表 4。部分超出线性范围的供试品溶液稀释后进样测定。

HPLC-FLD 和 LC-MS 两种方法测定结果相对一致, 其中液相色谱光化学衍生法 HPLC-FLD 成本低, 可成为生产企业质量控制方法的首选。《中国药典》2020 年版中将 LC-MS 作为黄曲霉毒素测定的验证结果, 故以 LC-MS 测定结果统计。AFG₂ 的含量为 0 ~ 28.946 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, AFG₁ 的含量为 0 ~ 496.11 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, AFB₂ 的含量为 0.029 ~ 37.751 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, AFB₁ 的含量为 1.115 ~ 481.879 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 4 种黄曲霉毒素的总量为 1.442 ~ 1044.686 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

29 批次样品中黄曲霉毒素检出率极高, 其中 AFB₁ 检出率 100%。《中国药典》2020 年版中有关黄曲霉毒素的规定均为每 1000 g 含 AFB₁ 不得过 5 μg , AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 的总量不得过 10 μg 。参考此限度, 按药典的数据修约规则, 29 批次样品其中 10 个批次样品 AFB₁ 超过 5 μg , 且 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 的总量超过 10 μg ; 1 批次样品 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 的总量超过 10 μg 。29 批次样品中黄曲霉毒素的不合格率为 38%, 其中一批次黄曲霉毒素残留量远超参考限度, 安全风险相对较高。

3 讨论

3.1 测定方法的优化

本试验测定方法主要参考《中国药典》2020 年版 2351 真菌毒素测定法项下的黄曲霉毒素测定法, 同时进行了部分优化。优化原因主要是抗栓胶囊基质复杂, 预试验发现杂质对待测成分测定干扰较大。免疫亲和柱一般要求过柱的作业溶液 pH 值为中性, 抗栓胶囊初始提取液 pH 值大约为 5.3, 整体偏酸性; 过柱的作业溶液要求含甲醇量不超过 20%, 含乙腈不得过 10%。作业溶液 pH 值过低或者过高, 含有机相过高均不利于免疫亲和柱吸附黄曲霉毒素。

前期试验考察了提取溶剂 70% 甲醇、80% 甲醇、70% 乙腈、80% 乙腈和 1% 甲酸的 70% 甲醇的提取效果, 发现 70% 乙腈提取效率最高。

考察测定量和取样量的影响: 取混合好的抗栓胶囊内容物各 5、10、15 g, 比较样品中待测成分的含量, 试验总体结果表明测定称样量为 5 g 时, 已经可以达到测定要求, 但每盒样品中的内容物可能会出现不均匀现象。对比了取样 10、50、100、200 g 的试验结果, 建议每个批次样品内容物取样量不少于 100 g。

选择市场上常见的 4 种不同品牌的免疫亲和柱进行比较, 结果表明不同品牌的亲和柱对测定影响较小, 本试验方法兼容性良好。

3.2 建议与存在的不足

黄曲霉毒素毒性极强, 目前大多不建议设定黄曲霉毒素的安全耐受量和无毒作用剂量, 限量

表 4 样品测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Tab 4 Sample determination results ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

生产 企业	批号	AFG ₂		AFG ₁		AFB ₂		AFB ₁		总量	
		HPLC-FLD	LC-MS	HPLC-FLD	LC-MS	HPLC-FLD	LC-MS	HPLC-FLD	LC-MS	HPLC-FLD	LC-MS
A	191105	6.336	5.602	80.836	76.780	4.043	3.536	45.486	42.435	136.701	128.353
A	200301	1.494	0.257	22.388	24.539	1.063	1.064	14.036	14.586	38.981	40.446
B	C03041	0.831	0.835	4.422	4.670	0.833	0.834	5.396	5.684	11.482	12.023
B	C03033	ND	0.123	0.679	0.513	0.571	0.553	5.131	5.217	6.381	6.406
B	C03030	ND	ND	0.340	0.350	0.228	0.267	2.329	2.397	2.897	3.014
B	C03036	0.893	0.987	4.781	5.190	0.888	0.866	6.206	6.060	12.768	13.103
B	C03031	ND	ND	0.495	ND	0.307	0.174	2.515	2.400	3.317	2.574
C	201102	0.321	0.383	3.776	3.800	0.478	0.437	2.560	4.700	7.135	9.320
C	200901	0.269	0.362	2.949	3.184	0.400	0.428	4.495	4.623	8.113	8.597
C	200903	0.364	0.391	3.589	4.020	0.484	0.483	4.578	4.627	9.015	9.521
C	200902	0.310	0.310	3.893	4.162	0.507	0.471	5.020	5.278	9.730	10.221
C	200501	0.220	0.273	2.656	2.933	0.359	0.326	4.239	4.556	7.474	8.088
C	201101	0.320	0.341	3.833	4.244	0.481	0.476	4.892	5.187	9.526	10.248
C	210101	0.610	0.626	6.853	8.006	0.415	0.366	3.922	4.482	11.800	13.480
C	191002	0.439	0.486	4.557	5.108	0.449	0.531	4.632	4.750	10.077	10.875
C	201001	0.395	0.480	4.448	4.887	0.588	0.580	5.794	5.313	11.225	11.260
C	200904	0.303	0.369	3.275	3.612	0.472	0.468	4.570	4.374	8.620	8.823
C	210102	1.054	0.987	10.993	10.839	0.514	0.447	4.324	4.383	16.885	16.656
D	200302	0.134	0.139	1.196	1.137	0.204	0.138	2.718	2.481	4.252	3.895
D	200202	ND	ND	0.418	0.298	ND	0.029	0.826	1.115	1.244	1.442
D	191001	ND	0.082	0.874	1.144	0.258	0.151	2.445	2.436	3.577	3.813
E	2011207	0.339	0.410	3.310	3.472	0.394	0.360	4.090	4.182	8.133	8.424
F	200510	1.432	1.593	15.655	17.576	0.942	0.876	11.345	12.508	29.374	32.553
F	200309	16.323	16.146	178.79	181.274	7.728	7.934	91.417	92.982	294.258	298.336
F	200308	ND	0.089	2.057	2.919	2.116	2.385	36.613	38.203	40.786	43.596
G	201004	0.162	0.155	1.114	1.433	0.296	0.251	6.208	6.762	7.780	8.601
H	190402	31.504	28.946	537.383	496.11	45.290	37.751	559.353	481.879	1173.53	1044.686
I	20191001	0.238	0.234	0.603	0.651	0.234	0.286	1.556	1.518	2.631	2.689
I	20191002	0.331	0.294	0.759	1.027	0.257	0.240	2.112	1.835	3.459	3.396

注 (Note): ND 为未检出 (ND means no detection)。

越低越好^[10]。抗栓胶囊组方复杂,组方中有大量的原料药按《中国药典》2020年版需要进行黄曲霉毒素限量检查,限量检查的品种包括土鳖虫、蜈蚣、水蛭、蜂房、地龙、醋延胡索、制马钱子(药材及生马钱子饮片要求检验)和麸炒僵蚕(药材及僵蚕饮片要求检验)。

部分样品 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 含量残留量极高原因跟生产企业的风险意识不强有关,客观原因是此次抽检的样品生产日期处于 2020 年版《中国药典》换版期间,生产企业原料药均按《中国药典》2015 年版检验,这些高危品种大部分在 2015 年版药典均未要求进行黄曲霉毒素限量检查,存在一定的安全监控的漏洞。

为分析抗栓胶囊黄曲霉毒素含量过高的原因,对收到的生产企业 B 和企业 E 寄送的部分原料和小样进行了检测,发现生产企业 B 提供的原料蜂房 AFG₂、AFG₁、AFB₂ 和 AFB₁ 残留量较高,严重超过了《中国药典》2020 年版蜂房下的

标准限度。遗憾的是未能获得黄曲霉毒素残留量较高样品相对应的原料药,生产企业寄送的部分原料不具有显著代表性,抗栓胶囊黄曲霉毒素污染的具体原因仍需进一步探究。课题组根据与相关企业沟通、日常相关饮片检验的数据和文献^[9-12]推测抗栓胶囊黄曲霉毒素污染是上述多种高危原料饮片共同导致的结果,其中土鳖虫、醋延胡索和蜂房可能是最主要的源头,蜈蚣、水蛭、地龙、制马钱子和麸炒僵蚕可能是次要源头。

抗栓胶囊主要服用人群为老年人,黄曲霉毒素是中药外源性有害物质质量控制的重中之重。基于上述试验结果,抗栓胶囊存在黄曲霉毒素污染的安全风险,课题组已向国家药品监督管理局建议增加抗栓胶囊的黄曲霉毒素限量检查,加大该药的安全监控;但此药的安全质量更需要相关企业加强黄曲霉毒素方面的质量控制意识,严格把控原料的质量,保证用药安全。

参考文献

- [1] 李冬梅, 刘永利, 赵艳普, 等. 抗栓胶囊质量标准研究 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27 (5): 425-429.
- [2] 李楠楠, 耿虹. 高效液相色谱法测定抗栓胶囊中士的宁含量 [J]. 中国卫生工程学, 2013, 12 (6): 497-498.
- [3] 张文琦, 王静. HPLC 法测定抗栓胶囊中丹参酮 II A 的含量 [J]. 天津药学, 2015, 27 (5): 27-28.
- [4] 刘晶晶, 李耀磊, 王晶娟, 等. HPLC 柱后光化学衍生荧光检测法检测 3 种含土鳖虫中成药的黄曲霉毒素 [J]. 中国药事, 2021, 35 (3): 307-314.
- [5] 刘蕊, 赵新悦, 毛雯雯, 等. 中药材中黄曲霉毒素及赭曲霉毒素 A 污染的研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2020, 17 (2): 117-120, 128.
- [6] 马双成, 王莹, 魏锋. 中药质量控制未来发展方向的思考 [J]. 中国药学杂志, 2021, 56 (16): 1273-1281.
- [7] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 280-285, 520-522.
- [8] 倪倩, 南文萍, 张俐. 筋骨宁膏中黄曲霉毒素的测定 [J]. 中南药学, 2021, 19 (12): 2662-2665.
- [9] 张伟, 湛宇, 施思, 等. 黄曲霉毒素提取与净化技术用于延胡索药材中黄曲霉毒素检测 [J]. 中国药师, 2019, 22 (10): 1810-1814.
- [10] 左甜甜, 刘丽娜, 孙磊, 等. 动物药中黄曲霉毒素 B₁ 的定量风险评估探索 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (7): 1267-1271.
- [11] 刘丽娜, 李耀磊, 金红宇, 等. 免疫亲和净化 HPLC 柱后光化学衍生荧光法测定动物药中黄曲霉毒素 [J]. 中草药, 2017, 48 (6): 1220-1224.
- [12] 张慧, 白桂昌, 罗轶, 等. 启脾丸中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 含量测定及安全性评价 [J]. 中南药学, 2022, 20 (3): 613-616.

(收稿日期: 2022-01-05; 修回日期: 2022-04-08)

液质联用法测定富马酸替诺福韦艾拉酚胺中 L-丙氨酸异丙酯

李昌亮^{1,2}, 尚金凤³, 廖正华³, 蔡立荣^{1,2}, 易必新¹, 马晓宁^{1,2*} (1.湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001; 2.药用辅料工程技术研究重点实验室, 长沙 410001; 3.天地恒一制药股份有限公司, 长沙 410331)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法检测富马酸替诺福韦艾拉酚胺中 L-丙氨酸异丙酯的含量。**方法** 色谱柱为 ACE Excel 3 C18-AR (4.6 mm×150 mm, 3 μm), 流动相为 0.1% 甲酸溶液 (A)-乙腈 (B), 按程序进行梯度洗脱, 离子源为 ESI 源, 以正离子、多重反应监测模式进行检测。**结果** L-丙氨酸异丙酯在 0.06 ~ 1.19 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好, 回收率在 102.3% ~ 108.3%, 检测限为 0.02 μg·mL⁻¹, 定量限为 0.06 μg·mL⁻¹。**结论** 该方法专属性强, 灵敏度高, 适用于富马酸替诺福韦艾拉酚胺中 L-丙氨酸异丙酯的测定。

关键词: 液质联用法; 富马酸替诺福韦艾拉酚胺; L-丙氨酸异丙酯

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)10-2399-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.032

Determination of L-alanine isopropyl ester in tenofovir alafenamide fumarate by LC-MS method

LI Chang-liang^{1,2}, SHANG Jin-feng³, LIAO Zheng-hua³, CAI Li-rong^{1,2}, YI Bi-xin¹, MA Xiaoning^{1,2*} (1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001; 2. NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha 410001; 3. Hinye Pharmaceutical Co., Ltd, Changsha 410331)

Abstract: Objective To determine L-alanine isopropyl ester in tenofovir alafenamide fumarate by LC-MS. **Methods** ACE Excel 3 C18-AR column (4.6 mm×150 mm, 3 μm) was used, with gradient

基金项目: 湖南省科技厅科药联合基金 (No.2021JJ80032)。

作者简介: 李昌亮, 男, 主任药师, 主要从事药品质量控制与标准研究工作, email: 21405563@qq.com *通信作者: 马晓宁, 女, 副主任药师, 主要从事药品质量控制与标准研究工作, email: 5967120@qq.com

elution of 0.1% formic acid solution and acetonitrile as mobile phase. The analytes were detected in an ESI under positive ion mode with multip reaction monitoring. **Results** The linear range was 0.06 – 1.19 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the recovery between 102.3% – 108.3%, the LOD was 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the LOQ was 0.06 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion** The method is specific and sensitive, and can be used for the determination of *L*-alanine isopropyl ester in tenofovir alafenamide fumarate.

Key words: LC-MS; tenofovir alafenamide fumarate; *L*-alanine isopropyl ester

富马酸替诺福韦艾拉酚胺是美国吉利德公司在富马酸替诺福韦二吡啶酯基础上所开发的新一代核苷类逆转录酶抑制剂(见图 1)。吉利德公司报道合成富马酸替诺福韦艾拉酚胺的工艺路线主要有两条,一条是 2001 年报道的早期合成路线,一条是 2012 年报道的一种制备光学纯替诺福韦艾拉酚胺的不对称合成工艺^[1-2]。两条合成路线中均使用了 *L*-丙氨酸异丙酯盐酸盐作为反应物,用量较大会有残留^[3-7]。富马酸替诺福韦艾拉酚胺在放置过程中也可能降解产生 *L*-丙氨酸异丙酯。检索发现, *L*-丙氨酸异丙酯的检测方法较少,虽然有报道高效液相色谱法检测本品中的有关物质,但未将 *L*-丙氨酸异丙酯作为特定杂质进行检测^[8],尚未发现有采用高效液相色谱-串联质谱法检测富马酸替诺福韦艾拉酚胺中 *L*-丙氨酸异丙酯含量的报道^[9-12]。因此本研究建立一种液质联用法测定富马酸替诺福韦艾拉酚胺中的 *L*-丙氨酸异丙酯含量,以保障药品质量安全及满足药品监管需要。

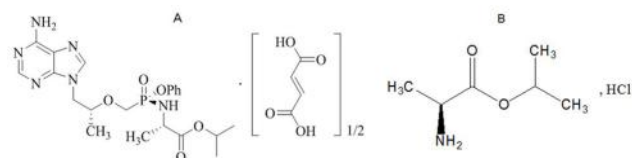


图 1 富马酸替诺福韦艾拉酚胺(A)和 *L*-丙氨酸异丙酯盐酸盐(B)的结构式

Fig 1 Structural of tenofovir alafenamide fumarate (A) *L*-alanine isopropyl ester hydrochloride (B)

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Thermo TSQ Endura 三重四极杆质谱仪(美国赛默飞); Mettler Toledo XP205 电子分析天平(美国梅特勒)。

1.2 试剂

富马酸替诺福韦艾拉酚胺(批号: 200501、200502、200601, 含量: 98.8%、99.2%、99.7%, 天地恒一制药股份有限公司); *L*-丙氨酸异丙酯

盐酸盐对照品(批号: 1-WS-117-1, 来源: TRC, 纯度: 98%); 甲酸、乙腈均为色谱纯; 纯化水为 Thermo Scientific Barnstead Genpure 纯化水系统制得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ACE Excel 3 C18-AR (4.6 mm×150 mm, 3 μm); 流动相: 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(见表 1); 流速: 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样器温度: 10 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 1 μL 。

表 1 梯度洗脱程序
Tab 1 Gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
4	90	10
7	2	98
9	2	98
9.1	90	10
15	90	10

2.2 质谱条件

离子源: ESI 源; 检测模式: 正离子模式, 多重反应监测(MRM); 离子对: 母离子 m/z 132, 子离子 m/z 90、44; 接口电压为 4.5 kV, 接口温度为 300 $^{\circ}\text{C}$, DL 管温度为 180 $^{\circ}\text{C}$, 加热块温度为 200 $^{\circ}\text{C}$, 干燥器流速为 5 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, m/z 132/90 碰撞能量为 16 V, m/z 132/44 碰撞能量为 16 V, 碰撞气体为高纯氩气。

2.3 溶液配制

2.3.1 空白溶剂 即稀释剂, 为 20% 乙腈水溶液。

2.3.2 供试品溶液 取富马酸替诺福韦艾拉酚胺约 15 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加稀释剂适量, 超声使溶解, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.3 对照品溶液 取 *L*-丙氨酸异丙酯盐酸盐(分子量: 167.6) 对照品约 15 mg, 精密称定, 置 200 mL 量瓶中, 用稀释剂适量超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品储备液 [*L*-丙氨酸异丙酯(分子量: 131.1) 质量浓度约为 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]; 精密量取

对照品储备液 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释剂至刻度, 摇匀, 制成对照品溶液 (*L*-丙氨酸异丙酯质量浓度约为 $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.4 专属性

分别取空白溶剂、供试品溶液和对照品溶液进样分析并记录色谱图, 结果供试品溶液色谱图中 *L*-丙氨酸异丙酯的保留时间与对照品一致, 空白溶剂无干扰, 表明方法专属性良好, 见图 2。

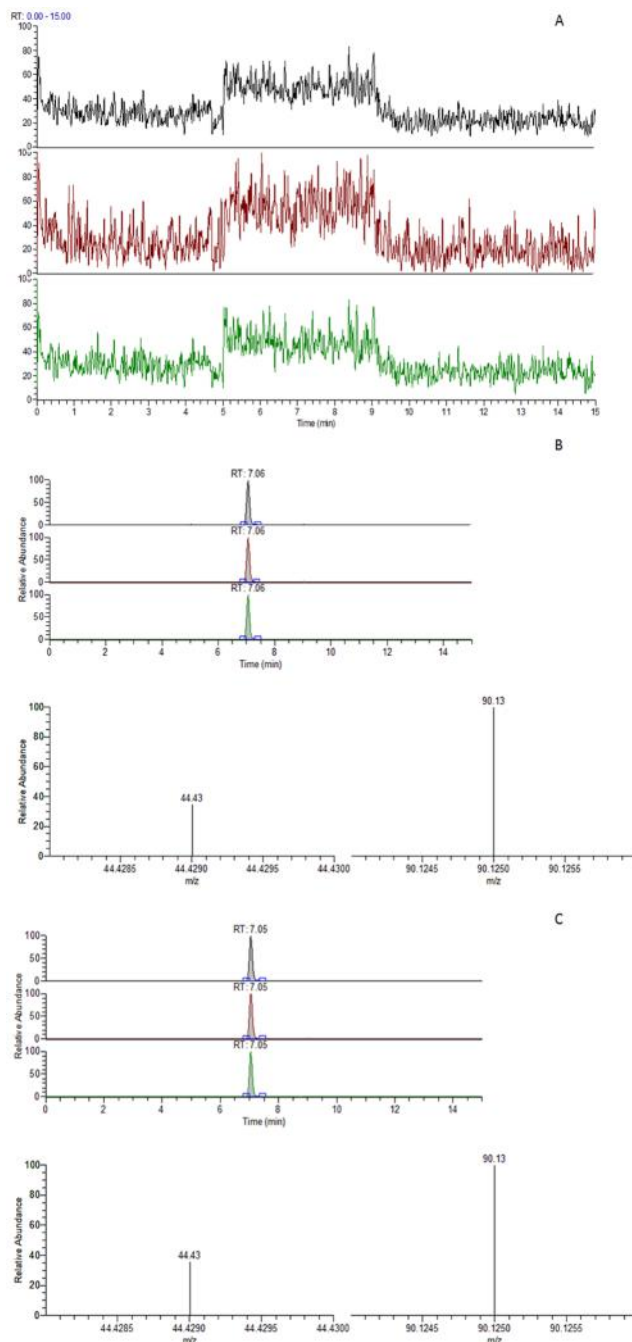


图 2 *L*-丙氨酸异丙酯测定的典型色谱图

Fig 2 Typical chromatogram of *L*-alanine isopropyl ester

A. 空白溶剂 (blank solution); B. 对照品溶液 (reference solution); C. 供试品溶液 (sample solution)

2.5 检测限和定量限

精密移取“2.3.3”项下对照品溶液, 逐级稀释合适倍数后进样, 分别将信噪比 (S/N) 为 3 和 10 的质量浓度作为检测限和定量限。结果 *L*-丙氨酸异丙酯的检测限为 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量限为 $0.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 线性关系考察

分别精密移取“2.3.3”项下对照品储备液 0.1、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 制得系列线性溶液。以 *L*-丙氨酸异丙酯峰面积 (Y) 为纵坐标, 质量浓度 (X) 为横坐标, 进行线性回归计算, 结果回归方程为 $Y = 1.821 \times 10^7 X - 1.568 \times 10^5$, $r = 0.9994$, 线性范围为 $0.06 \sim 1.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7 精密度

取“2.3.3”项下对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录 *L*-丙氨酸异丙酯的峰面积和保留时间。结果显示, *L*-丙氨酸异丙酯峰面积的 RSD 为 1.5%, 保留时间的 RSD 为 0.12%, 表明仪器精密度良好。

2.8 重复性和中间精密度

按“2.3.2”项下方法平行配制 6 份供试品溶液, 进样测定, 结果 *L*-丙氨酸异丙酯含量的 RSD 为 2.8%, 表明方法重复性良好。不同分析人员在不同日期重复上述试验, 结果显示两人共 12 份重复性供试品溶液中 *L*-丙氨酸异丙酯含量的 RSD 为 2.9%, 表明方法中间精密度良好。

2.9 回收试验

精密称取样品 9 份 (批号: 200501), 每份约 60 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 分别加入一定量对照品储备液, 制成 *L*-丙氨酸异丙酯浓度相当于对照品溶液的 50%、150%、200% 的供试品加标溶液, 进样测定, 结果 *L*-丙氨酸异丙酯的回收率在 102.3% ~ 108.3%, RSD 均 < 2.0%。

2.10 稳定性

取“2.3.2”项下供试品溶液和“2.3.3”项下对照品溶液, 在 10°C 条件下放置, 分别于 0、2、4、6、10 和 14 h 进样分析, 结果各溶液中 *L*-丙氨酸异丙酯的峰面积 RSD 均小于 5.5%, 表明溶液在 10°C 条件下稳定性良好。

2.11 耐用性

改变柱温、流速和不同型号色谱柱以考察分析环境的微小变动对方法的影响, 发现在各个色谱条件下 *L*-丙氨酸异丙酯的检测均不会受到干扰, 方法耐用性良好, 结果见表 2。

表 2 耐用性试验结果

Tab 2 Robustness		
色谱条件	含量 /%	RSD/%
柱温 38 °C	0.043	3.6
柱温 40 °C	0.044	
柱温 42 °C	0.041	
流速 0.38 mL · min ⁻¹	0.040	5.0
流速 0.40 mL · min ⁻¹	0.044	
流速 0.42 mL · min ⁻¹	0.041	
色谱柱 1	0.044	3.3
色谱柱 2	0.042	

2.12 样品检测

分别取 3 批富马酸替诺福韦艾拉酚胺样品(批号: 200501、200502、200601)进行检测,结果分别为 0.044%、0.052%、0.054%,结果均低于拟订限度 0.10%。

3 讨论

3.1 流动相选择

本研究在前期方法摸索时分别考察了水-甲醇、0.1% 甲酸溶液-甲醇和 0.1% 甲酸溶液-乙腈溶液 3 种流动相。经比较发现,水-甲醇体系下 *L*-丙氨酸异丙酯峰形矮胖、响应较低,通过在水相中添加甲酸能够明显改善上述问题。而在 0.1% 甲酸溶液-甲醇体系下基线噪音较大,不利于 *L*-丙氨酸异丙酯的检出。因此,为保证试验结果准确,最终选择 0.1% 甲酸溶液-乙腈。

3.2 离子源选择

在离子源的选择上,先后比较了电喷雾电离源(ESI)和大气压化学电离源(APCI)两种常用的离子源。使用 APCI 时发现 *L*-丙氨酸异丙酯响应较低,灵敏度较差;而 ESI 可以较好地解决这一问题,因此,最终选择 ESI⁺为电离方式。

3.3 小结

本研究建立了液质联用色谱法检测富马酸替诺福韦艾拉酚胺原料药中 *L*-丙氨酸异丙酯并完成了

相应的方法学验证。结果显示,该方法可以对富马酸替诺福韦艾拉酚胺原料药中的 *L*-丙氨酸异丙酯进行准确定量分析,可为富马酸替诺福韦艾拉酚胺的质量研究提供参考,保障药品质量安全。

参考文献

- [1] Becker MW, Chapman HH, Cihlar T, et al. Prodrugs of phosphonate nucleotide analogues and methods for selecting and marking same: WO, 0208241A2 [P]. 2001-07-20.
- [2] Colby DA, Martins AA, Roberts BJ, et al. Methods for preparing antiviral nucleotide analogs: WO, 2013052094A2 [P]. 2012-10-03.
- [3] 孔叶青. 替诺福韦酯艾拉酚胺合成工艺改进[J]. 化工管理, 2021, 17: 148-149.
- [4] 冉艳, 陈恬, 李建学, 等. 替诺福韦酯艾拉酚胺的合成工艺改进[J]. 化学研究与应用, 2020, 32(4): 677-683.
- [5] 金磊, 金爱民, 刘平. 替诺福韦艾拉酚胺合成路线图解[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(12): 923-926.
- [6] 毛侦军. 替诺福韦艾拉酚胺的化学拆分研究[J]. 产业科技创新, 2019, 20: 115-116.
- [7] 薛金辉, 刘景, 柯永新. 替诺福韦艾拉酚胺的合成[J]. 浙江化工, 2018, 49(4): 16-19.
- [8] 韩抒真, 胡菲菲, 林丽娅, 等. HPLC 法检测富马酸丙酚替诺福韦中的有关物质[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(6): 836-841.
- [9] 马子娇, 王小雷, 汪鹏, 等. 采用手性固定相高效液相色谱法拆分富马酸丙酚替诺福韦及其对映异构体[J]. 山东化工, 2021, 50(24): 58-61.
- [10] 王玲兰, 宿亮, 章海云, 等. UPLC-MS/MS 法测定富马酸丙酚替诺福韦及其片剂中基因毒性杂质 9-丙烯基腺嘌呤[J]. 海峡药学, 2021, 33(11): 85-88.
- [11] 胡伟, 杨乐婷, 蒋学华, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中替诺福韦艾拉酚胺及其代谢物替诺福韦的浓度和临床应用[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(7): 1200-1206.
- [12] 李文莉, 赵书文, 楚亮, 等. LC-MS/MS 测定富马酸替诺福韦二吡啶酯中的 (*E*)-9-(丙-1-烯基)-9H-嘌呤-6-胺[J]. 华西药理学杂志, 2021, 36(3): 308-310.

(收稿日期: 2022-07-01; 修回日期: 2022-09-05)

基于高效液相色谱指纹图谱和化学模式识别的 至宝三鞭丸质量一致性评价

王官连^{1,2}, 张咏梅², 高文雅¹, 刘佳霖², 鲍磊², 刘传文², 赵小亮³, 焦玥³, 刘洋³, 王志国³, 李涛^{1,3*}, 杜茂波^{1*} (1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 烟台中亚至宝药业有限公司, 山东 烟台 264000; 3. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

摘要: **目的** 建立至宝三鞭丸的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 并结合化学模式识别技术对不同批次制剂进行质量一致性评价。**方法** 采用 HPLC 法建立指纹图谱, 以 0.1% 甲酸水和甲醇为流动相进行梯度洗脱, 色谱柱为 BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流速为 0.2 mL·min⁻¹; 检测波长为 203 nm; 使用相似度评价、聚类分析和主成分分析等化学模式识别技术评价 15 批次至宝三鞭丸制剂的质量一致性。**结果** 在指纹图谱中, 共标定了 32 个共有峰, 其中 5 个色谱峰被指认为芍药苷、远志吡酮Ⅲ、丹皮酚、淫羊藿苷和蛇床子素。15 批次至宝三鞭丸制剂相似度为 0.841~0.979, 15 批次至宝三鞭丸制剂基本聚为一类, 表明至宝三鞭丸的质量一致性尚可。**结论** 本研究建立的 HPLC 指纹图谱分析方法操作简单、准确、重复性好, 结合化学模式识别分析可用于至宝三鞭丸整体质量的一致性评价。

关键词: 至宝三鞭丸; 高效液相色谱指纹图谱; 化学模式识别; 制剂质量标志物

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2403-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.033

Quality consistency of Zhibao Sanbian pills by HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition

WANG Guan-lian^{1,2}, ZHANG Yong-mei², GAO Wen-ya¹, LIU Jia-lin², BAO Lei², LIU Chuan-wen², ZHAO Xiao-liang³, JIAO Yue³, LIU Yang³, WANG Zhi-guo³, LI Tao^{1,3*}, DU Mao-bo^{1*} (1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700*; 2. *Yantai Zhongya Zhibao Pharmaceutical, Yantai Shandong 264000*; 3. *Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700*)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint method for Zhibao Sanbian pill (ZBSBP), and to evaluate the quality consistency in different batches of ZBSBP with chemical pattern recognition. **Methods** HPLC was used to establish the fingerprint of ZBSBP. Gradient elution was performed on a BEH C18 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid water and methanol as the mobile phase, and the flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 203 nm. The consistency of 15 batches of ZBSBP was evaluated by chemical pattern recognition techniques including similarity evaluation, cluster analysis and principal component analysis. **Results** Totally 32 common peaks were calibrated in the HPLC fingerprint, and 5 identified components were paeoniflorin, polygalaxanthone III, paeonol, icariin and osthole. The similarity of the 15 batches of samples was between 0.841 to 0.979. Cluster analysis and principal component analysis revealed that the 15 batches of ZBSBP belonged to the same category. The quality of ZBSBP was consistent.

基金项目: 中国中医科学院创新工程项目 (No. CI2021A04313); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. ZZ2019004; No. ZZ2019008); 中国中医科学院中药研究所横向课题 (No.H2021042)。

作者简介: 王官连, 男, 高级工程师, 主要从事中药生产及研究, email: 1143246299@qq.com ***通信作者:** 李涛, 男, 硕士, 副研究员, 主要从事中药药效物质基础及药代动力学研究, email: hndxlitao@163.com; 杜茂波, 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药制剂及外用新剂型研究, email: mbdu@icmm.ac.cn

Conclusion The established HPLC combined with chemical pattern recognition is simple, accurate and reproducible, and can be used to evaluate the overall quality consistency of ZBSBP.

Key words: Zhibao Sanbian pill; HPLC fingerprint; chemical pattern recognition; preparation quality marker

中药丸剂系指原料药物与适宜的辅料制成的球形或类球形固体制剂, 主要包括蜜丸、水蜜丸、水丸等^[1]。中药丸剂的使用历史悠久, 众多使用至今的中医名方如六味地黄丸、逍遥丸等均为丸剂。据统计, 2020 年版《中国药典》一部收录的 1607 种成方或单味制剂中, 丸剂有 412 种, 占比达 25%^[2]。中药丸剂的配伍药味一般较多, 且多以饮片细粉直接入药, 辅料用量大, 各药味占比相对较低, 所以中药丸剂的物质基础研究更为复杂和困难^[2]。高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱分析技术由于其覆盖性强、操作简单、使用经济等特点, 在中药的物质基础研究方面显示出巨大的优势^[3]。化学模式识别可以对指纹图谱进行数据降维、识别和分类, 强调其相似性和差异性^[4]。通过 HPLC 指纹图谱等现代分析技术对中药的化学组成进行全面表征, 进一步利用化学模式识别技术对其相似性或差异性进行分析, 是建立中药丸剂质量评价和控制体系、提升制剂批次间一致性的有效途径。

至宝三鞭丸, 收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》(第十六册), 是由海狗鞭、狗鞭、鹿鞭、人参、淫羊藿等 40 多味中药配伍而成的中药蜜丸, 具有补血生精、健脑补肾等功效^[5], 用于治疗体质虚弱、腰背酸痛、肾亏遗精、神经衰弱等症^[6-7]。据统计, 至宝三鞭丸已在日本、东南亚、欧美等 30 多个国家和地区销售, 使用相当广泛, 对其制剂质量的一致性进行评价至关重要。目前, 对至宝三鞭丸的质量控制和物质基础有一定的研究, 如使用薄层色谱对其当归的定性鉴别、HPLC 对其山茱萸中马钱苷的含量测定等^[8-9], 但这些方法远不能全面表征其化学组成, 制约了至宝三鞭丸制剂批间一致性的评价和进一步质量提升的要求。

前期, 本课题组提出了应用“制剂质量标志物”进行中药制剂质量评价和控制的思路^[10-12], 其主要包含以下特点: 制剂质量标志物在中医药理论的指导下, 依据临床适应证的要求, 按照君-臣-佐-使配伍后产生; 制剂质量标志物不在原料阶段产生, 而在制剂阶段产生, 由工艺所决定;

制剂质量标志物可用于制剂的工艺筛选、质量评价及质量控制; 制剂质量标志物与临床适应证直接相关, 其含量高低反映了药效的高低, 也就是产品的优劣。本研究以已上市销售且广泛应用的中成药制剂至宝三鞭丸为研究对象, 利用 HPLC 指纹图谱分析和化学模式识别等技术, 对多个批次至宝三鞭丸制剂进行分析, 探索中药丸剂物质基础全面表征、质量一致性评价策略, 为筛选至宝三鞭丸制剂质量标志物提供前期研究基础。

1 材料

1260 Infinity II 液相系统 (美国 Agilent 公司), 包括 G7111B 四元泵、G7129A 进样器、G7116A 柱温箱、G7115A DAD 检测器和 OpenLAB CDS 色谱数据系统等; SCIENTZ-18N 型冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q Integral 5 超纯水制备仪 (美国 Millipore 公司); 甲醇、甲酸 (北京 Dikma 公司), 其他试剂均为色谱级。

15 批次至宝三鞭丸样品由同一生产厂家按相同的制剂工艺制备, 样品编号 (批号) 分别为 S1 (批号: 200710)、S2 (批号: 200811)、S3 (批号: 200814)、S4 (批号: 200815)、S5 (批号: 201018)、S6 (批号: 201019)、S7 (批号: 201123)、S8 (批号: 201124)、S9 (批号: 201125)、S10 (批号: 201126)、S11 (批号: 201128)、S12 (批号: 201129)、S13 (批号: 201130)、S14 (批号: 210301) 和 S15 (批号: 210403) (烟台中亚医药保健酒有限公司); 人参对照药材 (批号: Y09S11H124052)、淫羊藿对照药材 (批号: O21GB165114) (上海源叶生物科技有限公司); 远志吡酮Ⅲ、丹皮酚、淫羊藿苷等对照品 (成都普思生物科技股份有限公司), 芍药苷、蛇床子素等对照品 (成都曼思特生物科技有限公司)。

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); 流动相为 0.1% 甲酸溶液 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 2%B; 5 ~ 15 min, 2% ~ 50%B; 15 ~ 45 min, 50% ~ 98%B;

45 ~ 50 min, 98%B; 50 ~ 50.1 min, 98% ~ 2%B; 50.1 ~ 60 min, 2%B); 流速为 0.2 mL · min⁻¹; 柱温为 35 °C; 样品室温度为 6 °C; 检测波长为 203 nm; 进样量为 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取至宝三鞭丸小蜜丸, 剪碎。取剪碎后的小蜜丸样品约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇溶液 10 mL, 称定重量, 振荡至全部溶散, 室温超声 30 min 后, 取出, 放冷, 再次称定重量, 并用 75% 甲醇补足失重, 摇匀, 滤过, 再取续滤液 2 mL, 用水定容至 10 mL, 摇匀, 于 20 000 g 离心 15 min, 上清液即为至宝三鞭丸供试品溶液。

2.3 人参、淫羊藿对照药材溶液的制备

取人参和淫羊藿对照药材粉末约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇溶液 10 mL, 称定重量, 室温超声 30 min 后, 取出, 放冷, 再次称定重量, 并用 75% 甲醇补足失重, 摇匀, 滤过, 再取续滤液 2 mL, 用水稀释合适倍数, 摇匀, 于 20 000 g 离心 15 min, 上清液即为人参 (0.005 g · mL⁻¹) 和淫羊藿 (0.002 g · mL⁻¹) 对照药材溶液。

2.4 对照品溶液的配制

精密称取各对照品约 20 mg, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解, 配制成单个对照品储备液, 稀释合适倍数备用。其中, 淫羊藿苷使用 50% 甲醇溶解和配制。上述对照品溶液均低温密封保存。

2.5 精密度试验

精密吸取同一批次至宝三鞭丸供试品溶液, 按“2.2”项下方法制备, 连续进样 6 次, 以 18 号淫羊藿苷色谱峰作为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间 *RSD* < 0.12%, 相对峰面积 *RSD* < 1.5%, 相似度在 0.996 以上, 表明该仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批次至宝三鞭丸样品, 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 以 18 号淫羊藿苷色谱峰作为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间 *RSD* < 0.10%, 相对峰面积 *RSD* < 2.7%, 相似度在 0.994 以上, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一批次至宝三鞭丸样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在制备后 0、4、8、12 和 24 h 进行测定, 以 18 号淫羊藿苷色谱峰作为参照

峰, 计算得各共有峰相对保留时间 *RSD* < 0.11%, 相对峰面积 *RSD* < 3.1%, 相似度在 0.984 以上, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 指纹图谱研究

2.8.1 指纹图谱共有峰的标定

根据 15 批次至宝三鞭丸样品检测的 HPLC 图谱, 选择稳定性、重复性较好及特征明显的色谱峰作为共有峰, 共标定 32 个 (峰面积均大于总峰面积 0.6%), 典型的样品色谱图见图 1。其中, 18 号色谱峰的分离度好、峰高适中、峰面积稳定和保留时间居中 (28.5 min), 且已鉴定为淫羊藿苷, 为至宝三鞭丸功效相关的活性成分^[13], 因此选择 18 号峰作为参照峰, 计算至宝三鞭丸指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 1。

2.8.2 指纹图谱色谱峰的归属和成分指认

取至宝三鞭丸供试品溶液, 人参、淫羊藿对照药材溶液以及各对照品溶液, 进样测定。结果归属了淫羊藿和人参对照药材在至宝三鞭丸中的特征峰, 见图 1, 可知淫羊藿药材对至宝三鞭丸的 6 号、7 号、12 号、18 号、20 号、23 号、27 号、29 号、30 号和 32 号峰有贡献, 人参药材对 27 号、28 号、29 号和 30 号峰有贡献。在至宝三鞭丸指纹图谱标定的共有峰中, 淫羊藿药材至少贡献了 10 个峰, 占总数的近 33.3%。通过至宝三鞭丸样品与对照品的保留时间、紫外吸收光谱特征的比对, 指认了至宝三鞭丸指纹图谱中 5 个色谱峰, 分别是芍药苷 (7 号峰)、远志吡酮Ⅲ (11 号峰)、丹皮酚 (16 号峰)、淫羊藿苷 (18 号峰) 和蛇床子素 (21 号峰), 见图 1。

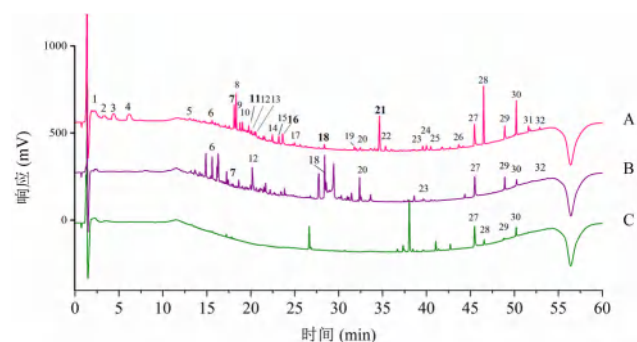


图 1 至宝三鞭丸 (A)、淫羊藿对照药材 (B) 和人参对照药材 (C) 的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of Zhibao Sanbian pill (A), Epimedium Folium (B) and Ginseng Radix Et Rhizoma (C)

7. 芍药苷 (paeoniflorin); 11. 远志吡酮Ⅲ (polygalaxanthone III); 16. 丹皮酚 (paeonol); 18. 淫羊藿苷 (icariin); 21. 蛇床子素 (osthole)

2.8.3 指纹图谱的分析与相似度计算

取 15 批次至宝三鞭丸供试品溶液, 按建立的指纹图谱

表 1 至宝三鞭丸指纹图谱各共有峰的相对保留时间与相对峰面积

Tab 1 Relative retention time and relative peak area of the common peak in fingerprint of Zhibao Sanbian pill

峰号	t_R/min	不同批次样品相对峰面积														
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
1	0.078	34.850	39.776	33.759	35.943	21.840	33.933	37.883	34.154	28.522	32.078	41.141	44.770	33.145	29.019	20.202
2	0.117	1.432	2.540	1.887	1.897	1.485	1.900	2.900	2.924	1.792	1.708	17.155	18.729	1.779	12.048	1.170
3	0.152	2.265	5.525	6.115	3.967	5.922	1.367	7.760	6.446	7.427	6.424	7.365	6.573	6.728	7.040	5.017
4	0.218	3.911	5.826	6.865	4.893	7.636	4.717	7.499	8.399	10.324	9.429	9.810	10.195	10.800	12.859	8.995
5	0.459	0.045	1.416	1.340	1.152	1.076	1.173	1.100	1.554	1.443	1.349	1.552	1.465	1.482	1.260	1.111
6	0.550	1.259	1.132	1.024	0.989	0.797	0.996	0.979	1.046	0.896	0.833	0.783	0.780	0.743	0.808	0.659
7	0.638	5.783	5.695	4.639	4.901	3.608	4.966	5.648	7.005	5.830	6.483	6.149	7.165	6.406	4.672	3.633
8	0.646	6.957	7.220	6.264	8.200	5.759	8.578	7.274	6.590	5.704	6.135	6.256	6.418	5.984	3.782	4.557
9	0.661	1.608	1.633	1.306	1.430	0.853	1.448	1.617	2.224	1.777	2.188	2.113	2.603	2.252	1.282	1.021
10	0.671	1.152	1.214	2.203	2.176	1.252	2.233	2.473	2.256	1.839	2.098	2.016	2.106	1.825	1.236	1.164
11	0.697	1.529	1.554	1.473	1.652	1.217	1.748	2.515	1.614	1.409	1.538	2.124	1.506	1.371	1.645	1.188
12	0.708	1.889	1.855	1.270	1.286	1.048	1.311	1.092	1.017	1.017	0.970	0.968	0.909	0.919	0.989	0.829
13	0.725	1.153	1.153	0.964	1.178	0.793	1.231	1.119	1.011	0.910	0.927	0.952	0.971	0.912	0.821	0.841
14	0.791	2.907	2.909	2.535	2.419	1.888	2.438	2.590	1.826	1.833	1.615	1.638	1.736	1.603	1.609	2.004
15	0.817	3.024	2.854	2.357	2.242	1.850	2.304	2.670	1.926	1.887	1.355	1.671	1.650	1.550	1.917	1.829
16	0.832	3.990	3.978	3.359	3.226	1.962	3.241	4.270	5.309	4.008	4.671	3.719	4.355	3.966	3.868	2.963
17	0.880	1.533	1.521	1.453	1.353	0.931	1.264	0.961	0.800	0.736	0.699	0.708	0.673	0.679	0.220	0.148
18	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
19	1.120	1.580	1.564	1.308	1.293	0.674	1.308	1.213	1.433	1.004	1.330	0.991	1.101	0.981	0.698	0.704
20	1.144	1.164	1.144	1.288	0.833	0.525	0.809	1.022	1.071	0.843	0.939	0.876	0.850	0.766	0.654	0.574
21	1.221	12.407	12.572	10.809	10.360	7.924	10.387	11.209	12.787	10.191	11.871	10.362	9.456	8.913	9.652	7.949
22	1.245	1.173	1.199	1.158	1.131	0.799	1.139	1.595	1.899	1.618	1.858	1.873	2.139	1.875	1.313	0.872
23	1.394	1.136	1.134	1.202	1.212	0.816	1.275	1.732	1.958	1.513	1.895	1.839	2.190	1.902	1.122	0.864
24	1.409	1.034	1.027	1.000	1.037	0.698	1.055	1.596	1.653	2.408	2.456	2.224	2.544	2.489	0.912	0.636
25	1.426	0.796	0.792	0.778	0.765	0.572	0.771	1.220	1.209	1.226	1.338	1.348	1.556	1.361	0.887	0.796
26	1.538	0.723	0.735	0.735	0.718	0.536	0.727	0.996	1.118	1.042	1.152	1.114	1.333	1.195	0.777	0.425
27	1.602	10.755	7.967	7.003	7.115	4.915	6.908	8.342	7.694	6.509	7.051	7.508	7.915	6.892	5.590	4.429
28	1.638	11.901	12.111	11.948	11.543	8.759	11.712	15.684	17.583	14.510	16.855	17.470	19.490	17.024	10.284	6.691
29	1.723	4.441	4.403	3.816	3.588	2.794	3.548	3.694	2.873	2.477	2.637	3.839	3.898	3.686	2.319	2.158
30	1.769	9.943	9.875	8.447	7.333	5.853	7.074	7.117	5.569	4.737	5.143	7.725	7.874	7.404	4.559	4.431
31	1.818	2.133	2.178	1.788	1.545	1.213	1.522	1.579	1.512	1.252	1.391	1.800	1.954	1.750	1.036	0.982
32	1.864	1.772	8.703	0.490	1.678	5.211	10.066	1.176	4.821	9.677	4.640	5.138	9.133	8.095	6.011	4.862

方法进行分析, 将采集到 15 批次指纹图谱数据以 AIA 格式导入《中药指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》, 以 S12 为参照图谱, 利用中位数法, 设置时间窗为 0.1 min, 进行全谱峰匹配, 对色谱峰进行多点校正后自动匹配, 并进一步手动检查, 生成至宝三鞭丸指纹图谱叠加图, 见图 2A。对 15 批次至宝三鞭丸的指纹图谱与生成的对照图谱进行相似度计算, 结果相似度为 0.841 ~ 0.979, 见表 2, 表明至宝三鞭丸各批次样品制剂的质量一致性尚可。

2.9 化学模式识别研究

至宝三鞭丸指纹图谱中 32 个共有峰的峰面积相差较大(相对峰面积范围 0.05 ~ 44.77), 因

此对各共有峰的峰面积进行均一化处理, 即用每批次各峰的峰面积值除以 15 批次峰面积均值结果表示, 进行后续化学模式识别研究。

2.9.1 系统聚类分析(HCA) 以 15 批次至宝三鞭丸指纹图谱中 32 个共有峰均一化后的峰面积为变量, 输入 OriginPro 2019b 软件进行 HCA 分析, 采用平均聚合聚类方法, 以平方欧氏距离为分类依据, 绘制至宝三鞭丸聚类分析图, 结果见图 2B, 可知当欧氏距离为 4 时, 15 批次至宝三鞭丸制剂聚为一类; 当欧氏距离为 3 时, 15 批次至宝三鞭丸制剂聚为两类: S14、S12、S11 聚为一类, 其他聚为一类。

2.9.2 主成分分析(PCA) 以 15 批次至宝三鞭

表 2 15 批次至宝三鞭丸指纹图谱的相似度分析结果
Tab 2 Similarity of fingerprint of Zhibao Sanbian pill

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照指 纹图谱
S1	1															
S2	0.901	1														
S3	0.921	0.961	1													
S4	0.922	0.967	0.983	1												
S5	0.820	0.853	0.857	0.842	1											
S6	0.890	0.931	0.934	0.944	0.881	1										
S7	0.917	0.949	0.976	0.959	0.852	0.944	1									
S8	0.895	0.955	0.955	0.95	0.852	0.931	0.958	1								
S9	0.920	0.945	0.968	0.962	0.865	0.944	0.96	0.962	1							
S10	0.928	0.939	0.951	0.956	0.867	0.933	0.959	0.978	0.966	1						
S11	0.762	0.712	0.694	0.703	0.839	0.681	0.711	0.688	0.716	0.783	1					
S12	0.784	0.769	0.751	0.763	0.882	0.722	0.743	0.728	0.756	0.808	0.98	1				
S13	0.921	0.96	0.944	0.944	0.818	0.908	0.955	0.927	0.954	0.937	0.744	0.774	1			
S14	0.765	0.697	0.709	0.707	0.896	0.741	0.726	0.709	0.742	0.795	0.951	0.949	0.734	1		
S15	0.929	0.921	0.954	0.956	0.871	0.918	0.948	0.952	0.968	0.98	0.775	0.805	0.919	0.781	1	
对照指纹图谱	0.944	0.955	0.962	0.962	0.926	0.946	0.962	0.952	0.967	0.979	0.841	0.874	0.956	0.855	0.970	1

丸指纹图谱中 32 个共有峰均一化后的峰面积为变量，输入 OriginPro 2019b 软件进行 PCA 分析，得到 PCA 得分图。结果见图 2C，可知 15 批至宝三鞭丸样品基本归为一类，其中 S1、S12、S14 和 S15 相对中心距离较远，PCA 结果与 HCA 结果具有一定相似性。另外，主成分因子载荷矩阵结果表明，14 号峰、28 号峰、15 号峰等对分类有重要贡献。

3 讨论

中药丸剂的制备工艺大多以饮片原粉形式入药，在 2020 年版《中国药典》收录的中药丸剂中以原粉形式入药的制剂约占 68.93%^[1-2]，所以在色谱分析前需要对丸剂的提取方法进行考察。研究考察了热水、25% 甲醇、50% 甲醇、75% 甲醇和纯甲醇作为提取溶剂，提取时间 15、30、60 min 的提取效果，结果使用 75% 甲醇提取时样品的色谱峰数目更多、峰更高，30 min 后各峰基本不再变化。但使用 75% 甲醇提取后，指纹图谱色谱图前段有一定的溶剂效应，出现色谱峰开裂等现象，所以续滤液进一步用纯水稀释 5 倍后再进样分析。并且在进行人参、淫羊藿对照药材与至宝三鞭丸制剂比对时，其供试品溶液的制备方法和上述一致，以更客观分析两味药材对至宝三鞭丸指纹图谱的贡献。

至宝三鞭丸由 40 多味中药配伍而成，其化学组成极其复杂，每一类成分的最大吸收波长都不同，所以在指纹图谱的分析中还考察了样品在 203、230、256 和 280 nm 波长下检测效果，结果在 203 nm 检测波长下样品色谱峰信息最为丰富。这可能是至宝三鞭丸中萜类、苷类成分众多的缘故^[14-15]，因此本研究选择人参、淫羊藿作为单味对照药材进行至宝三鞭丸指纹图谱中各色谱峰的比对，归属主要色谱峰。通过优化流动相的梯度洗脱方法，至宝三鞭丸和人参、淫羊藿等样品中主要色谱峰可在 60 min 内分离完成。结果

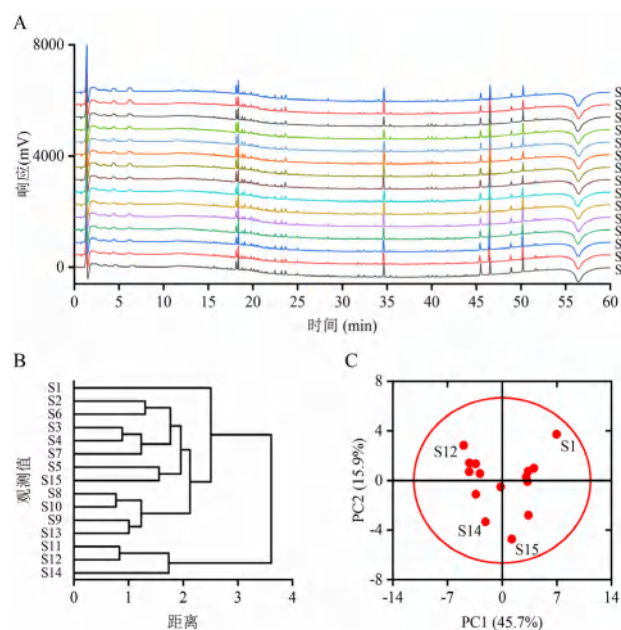


图 2 至宝三鞭丸指纹图谱及对照指纹图谱 (A)、系统聚类分析 (B) 和主成分分析 (C) 结果

Fig 2 HPLC fingerprints (A), cluster analysis (B) and principal component analysis (C) of Zhibao Sanbian pill

发现,淫羊藿贡献了共有峰总数的近 33.3%。另外,通过至宝三鞭丸指纹图谱与人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、淫羊藿苷等 30 多种对照品的分析比对,在至宝三鞭丸指纹图谱中指认了芍药苷、远志吡啶酮Ⅲ、丹皮酚、淫羊藿苷和蛇床子素等色谱峰,这些成分分别是白芍/芍药、远志、牡丹皮、淫羊藿和蛇床子等药材的特征性成分。研究表明,淫羊藿苷、芍药苷、远志吡啶酮Ⅲ、丹皮酚和蛇床子素等均具有一定的神经保护作用^[13, 16-19],与至宝三鞭丸的药效相关,因此本研究建立的至宝三鞭丸的指纹图谱具有一定的代表性。

本研究结果表明 15 批次至宝三鞭丸制剂的质量一致性尚可。但是,由于 HPLC 指纹图谱的局限性,“三鞭”中海狗鞭、狗鞭、鹿鞭等的成分可能无紫外吸收,本研究的分析方法尚不能全部表征至宝三鞭丸的化学组成,并且也未对主要色谱峰进行鉴定和定量分析,如对聚类有重要影响的 14 号、28 号和 15 号峰,所以至宝三鞭丸的物质基础研究仍需进一步深入。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 10-11.
- [2] 尹兴斌, 曲昌海, 董晓旭, 等.《中国药典》2020 年版一部收录中成药制法规律分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(16): 4529-4535.
- [3] 孙国祥, 闫波, 侯志飞, 等. 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展[J]. 中南药学, 2015, 13(7): 673-681.
- [4] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂. 第五册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963.
- [6] 危北海. 至宝三鞭丸的临床应用及药理作用[J]. 山东中医杂志, 1987, 7(3): 31-33.
- [7] 王龙, 郑宝灿, 董再珍, 等. 至宝三鞭丸的药理作用研究[J]. 中成药研究, 1983, 6(12): 27.
- [8] 田华, 毕俊英. 出口至宝三鞭丸的质量研究[J]. 山东医药工业, 2002, 21(2): 12-14.
- [9] 姜慧祯, 林娜. 至宝三鞭丸中马钱苷的含量测定[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(1): 31-33.
- [10] 杜茂波, 李涛, 沈硕, 等. 黄连汤的定性“制剂质量标志物”筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 101-109.
- [11] 李涛, 赵小亮, 沈硕, 等. 黄连汤的定量“制剂质量标志物”研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2728-2736.
- [12] 冉庆森, 穆婧, 李涛, 等. 黄连汤的抗炎活性“制剂质量标志物”研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(11): 2947-2954.
- [13] Zhang B, Wang G, He J, et al. Icariin attenuates neuroinflammation and exerts dopamine neuroprotection via an Nrf2-dependent manner[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16: 92.
- [14] 王静, 姚长良, 张建青, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的人参配方颗粒化学成分及指纹图谱研究[J]. 中草药, 2022, 53(11): 3286-3294.
- [15] Chen XJ, Tang ZH, Li XW, et al. Chemical constituents, quality control, and bioactivity of Epimedii Folium (Yinyanghuo)[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(5): 783-834.
- [16] Guo K, Zhang Y, Li L, et al. Neuroprotective effect of paeoniflorin in the mouse model of Parkinson's disease through α -synuclein/protein kinase C δ subtype signaling pathway[J]. Neuroreport, 2021, 32(17): 1379-1387.
- [17] 刘露, 冯伟红, 刘晓谦, 等. 中药远志的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5744-5759.
- [18] Tseng YT, Hsu YY, Shih YT, et al. Paeonol attenuates microglia-mediated inflammation and oxidative stress-induced neurotoxicity in rat primary microglia and cortical neurons[J]. Shock, 2012, 37(3): 312-318.
- [19] Li K, Ding D, Zhang M. Neuroprotection of osthole against cerebral ischemia/reperfusion injury through an anti-apoptotic pathway in rats[J]. Biol Phar Bull, 2016, 39(3): 336-342.

(收稿日期: 2022-06-17; 修回日期: 2022-08-01)

高效液相色谱法同时测定杜仲平压分散片中 6 种成分的含量

胡小祥¹, 王继威¹, 刘冠琼¹, 何艳^{2*} (1. 郴州市食品药品检验检测中心, 湖南 郴州 423000; 2. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423099)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定杜仲平压分散片中京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量。方法 色谱柱为 Thermo Hypersil Gold-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 (A)-0.1% 磷酸 (B) 流动相, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 30℃, 检测波长为 238 nm (京尼平苷酸)、327 nm (新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸)、354 nm (芦丁、异槲皮苷); 进样量为 10 μL。结果 京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷分别在 2.688~26.88、9.967~99.67、13.62~136.2、10.53~105.3、2.162~21.62、2.065~20.65 μg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系 ($r \geq 0.9991$); 平均回收率为 99.16%~104.76%, RSD 为 1.1%~2.3%。结论 该方法重复性好、准确度高, 可作为杜仲平压分散片的质量控制。

关键词: 杜仲平压分散片; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2409-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.034

Simultaneous determination of 6 components in Duzhong Pingya dispersible tablets by HPLC

HU Xiao-xiang¹, WANG Ji-wei¹, LIU Guan-qiong¹, HE Yan^{2*} (1. Chenzhou Center for Food and Drug Control, Chenzhou Hunan 423000; 2. School of Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou Hunan 423099)

Abstract: Objective To simultaneously determine geniposidic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin and isoquercetin in Duzhong pingya dispersible tablet by HPLC. **Methods** HPLC analysis was conducted on Thermo Hypersil Gold-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid solution (B) as the mobile phase in gradient elution at 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. The detection wavelength was 238 nm for geniposidic acid, 327 nm for neochlorogenic acid, chlorogenic acid, and cryptochlorogenic acid, 354 nm for rutin, isoquercetin. **Results** Geniposidic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin and isoquercetin showed good linearity at 2.688~26.88, 9.967~99.67, 13.62~136.2, 10.53~105.3, 2.162~21.62, and 2.065~20.65 μg·mL⁻¹ respectively ($r \geq 0.9991$). The average recoveries were at 99.16%~104.76%, with the RSDs of 1.1%~2.3%. **Conclusion** The method is accurate and reproducible, and can be used for the quality control of Duzhong Pingya dispersible tablets.

Key words: Duzhong Pingya dispersible tablet; HPLC; content determination

杜仲平压分散片是由杜仲叶单味药材经水煎煮、醇沉、浓缩制成的片剂, 具降血压, 强筋健骨之功效, 临床用于治疗高血压和骨质疏松病。

杜仲叶含有多种有效成分, 主要有苯丙素类、环烯醚萜类和黄酮类成分^[1], 其中苯丙素类主要有绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸等^[2-3], 环烯醚萜类

基金项目: 湖南省自然科学基金科药联合项目 (No. 2021JJ80023); 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目 (No. 20B543)。

作者简介: 胡小祥, 男, 硕士, 主管技师, 主要从事中药检验与质量标准研究, email: hxx3318@126.com *通信作者: 何艳, 女, 硕士, 实验师, 主要从事中药资源开发与利用, email: 526378710@qq.com

主要有京尼平苷酸等^[4], 黄酮类主要有芦丁、异槲皮苷等^[5-6]。现代药理学研究表明, 绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸具有利胆、抗炎、抗病毒、降血压等功效^[7-8]。京尼平苷酸具有抗炎、抗骨质疏松等功效^[9-10]。芦丁、异槲皮苷具有降血压、抗骨质疏松等作用^[11-12]。杜仲平压分散片现行质量标准仅对绿原酸进行含量测定, 而相关文献也仅测定绿原酸的含量^[13], 涉及的活性成分有限。因此, 为了更加全面地反映该制剂的内在质量, 本研究采用 HPLC 法同时测定制剂中京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量, 以期完善该制剂的质量控制方法提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Mettler XSE-205 型十万分之一电子天平 (精度: 0.01 mg, 瑞士梅特勒公司); KQ-500D 超声清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品京尼平苷酸 (批号: 111828-201805, 纯度: 98.1%)、绿原酸 (批号: 110753-202018, 纯度: 96.1%)、芦丁 (批号: 100080-201811, 纯度: 92.4%)、异槲皮苷 (批号: 111809-201804, 纯度: 97.2%) (中国食品药品检定研究院), 对照品新绿原酸 (批号: MUST-21030108, 纯度: 99.67%)、隐绿原酸 (批号: MUST-21082601, 纯度: 99.88%) (成都曼思特生物科技有限公司)。乙腈、甲醇 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 磷酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为怡宝纯净水。杜仲平压分散片 (批号: 201105、210101、210601、210701, 规格: 0.55 g/片, 湖南方盛制药股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo Hypersil Gold-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 5%~18%A; 18~25 min, 10%~16%A; 25~35 min, 16%A; 35~40 min, 16%~25%A, 40~41 min, 25%~5%A, 41~45 min, 5%A); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 238 nm (京尼平苷酸)、327 nm (新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸)、354 nm (芦丁、异槲皮苷); 柱温为 30℃; 进样体积为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取对照品京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷 6.85、12.50、11.81、13.18、5.85、5.31 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成各对照品储备液。分别精密吸取各储备液 1、2、3、2、1、1 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇定容至刻度, 得质量浓度分别为 26.88、99.67、136.2、105.3、21.62、20.65 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取杜仲平压分散片 10 片, 研细, 取约 1.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称重, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按杜仲平压分散片处方工艺, 制成只含辅料的阴性样品。取阴性样品适量, 按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制成阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

分别取“2.2”项下的 3 种溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品色谱图中京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁和异槲皮苷 6 个成分在与混合对照品色谱图相同的保留时间上有色谱峰出现, 与相邻色谱峰之间达到较为理想的分离效果, 分离度均大于 1.5, 阴性样品无干扰, 表明方法专属性良好, 见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、检测限和定量限考察 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 分别精密吸取 1、2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度得系列对照品溶液, 分别取适量, 进样测定峰面积。以质量浓度 (μg·mL⁻¹) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程和线性相关系数。结果 6 种成分在各自线性范围内与峰面积呈良好的线性关系, 见表 1。另取混合对照品溶液适量, 用 50% 甲醇逐步稀释, 当 S/N 为 3:1 时测得检测限 (LOD), 当 S/N 为 10:1 时测得定量限 (LOQ), 见表 1。

2.4.2 精密度试验 取线性曲线第 3 个点的对照品溶液适量, 连续进样测定 6 次, 测定各成分的峰面积, 计算 RSD。结果京尼平苷酸、新绿原酸、

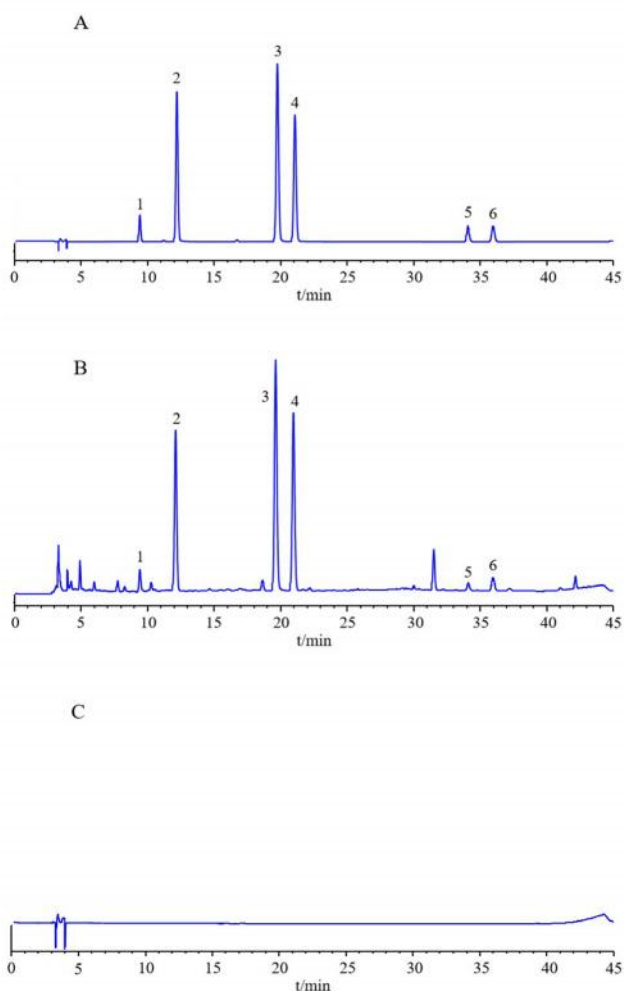


图 1 杜仲平压分散片的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of Duzhong Pingya dispersible tablets

A. 混合对照品 (mixed reference); B. 供试品 (sample); C. 阴性样品 (negative sample); 1. 京尼平苷酸 (geniposidic acid); 2. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 3. 绿原酸 (chlorogenic acid); 4. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid); 5. 芦丁 (rutin); 6. 异槲皮苷 (isoquercetin)

绿原酸、隐绿原酸、芦丁和异槲皮苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.24%、0.10%、0.43%、0.28%、0.26% 和 0.21%，表明仪器的精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取批号为 210101 的样品适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、3、6、12、16、21 h 进样测定，结果供试品中京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁和异槲皮苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.95%、0.29%、0.32%、0.27%、0.62% 和 0.69%，表明供试品溶液在 21 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取批号为 210101 的样品适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算各成分含量。结果京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁和异槲皮苷含量的平均值分别为 0.2402、1.338、2.380、1.629、0.1395、0.2066 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，*RSD* 分别为 0.17%、0.43%、0.65%、0.61%、1.2%、1.6%，表明方法的重复性良好。

2.4.5 加样回收试验 取含量已知的杜仲平压分散片 (批号: 210101) 的样品，研细，取约 0.75 g，精密称定，共 6 份。按上述 6 个成分含量的 100% 分别加入各单一对照品溶液 (0.1882 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 京尼平苷酸 1 mL、0.3321 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 新绿原酸 3 mL、0.4540 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 绿原酸 4 mL、0.4099 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 隐绿原酸 3 mL、0.1081 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芦丁 1 mL、0.1652 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 异槲皮苷 1 mL)，剩余体积用 50% 甲醇补足，然后按“2.2.2”项下方法制备，进样测定，计算各成分的回收率。结果京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷平均加样回收率分别为 99.16%、100.86%、104.76%、104.12%、101.13%、101.80%，*RSD* 分别为 1.6%、1.8%、1.1%、1.1%、2.3%、2.0%。

表 1 6 种成分的线性关系、检测限和定量限

Tab 1 Linearity, LOD and LOQ of 6 components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
京尼平苷酸	$Y = 14.24X + 4.748$	0.9991	2.688 ~ 26.88	0.0823	0.2472
新绿原酸	$Y = 29.48X - 1.339$	0.9999	9.967 ~ 99.67	0.0535	0.1783
绿原酸	$Y = 29.94X - 4.218$	0.9998	13.62 ~ 136.2	0.0654	0.2179
隐绿原酸	$Y = 27.64X - 1.570$	0.9999	10.53 ~ 105.3	0.0707	0.2356
芦丁	$Y = 17.16X + 0.5175$	0.9998	2.162 ~ 21.62	0.1179	0.3931
异槲皮苷	$Y = 21.57X + 0.0372$	0.9999	2.065 ~ 20.65	0.1087	0.3623

2.5 样品含量测定

取杜仲平压分散片样品 4 批，分别按“2.2.2”项下方法制备，进样测定，记录峰面积，通过回归方程计算供试品中各成分的含量，结果见表 2。

3 讨论

3.1 测定波长的选择

采用 DAD 检测器分别对 6 个成分在 200 ~ 400 nm 内进行扫描，结果京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁和异槲皮苷分别在 238、327、327、327、354、354 nm 处有最

表 2 杜仲平压分散片中各成分含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 2$)Tab 2 Content of each ingredient in Duzhong Pingya dispersible tablets ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 2$)

批号	京尼平苷酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	芦丁	异槲皮苷
201105	0.2073	1.197	2.094	1.453	0.1276	0.1927
210101	0.2395	1.348	2.372	1.642	0.1401	0.2015
210601	0.5278	2.223	3.560	2.938	0.2010	0.2964
210701	0.5223	2.594	3.983	3.209	0.2469	0.3865

大吸收, 兼顾各色谱峰出峰时间, 故选择 238 nm (检测京尼平苷酸)、327 nm (检测新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸)、354 nm (检测芦丁、异槲皮苷) 作为检测波长。

3.2 色谱条件的优化

采用甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.1%磷酸作为流动相体系进行考察^[14-16], 结果以乙腈-0.1%磷酸为流动相体系时, 6个成分色谱峰峰形、分离度最好, 当增加磷酸浓度时, 6个成分色谱峰峰形无明显变化, 故选择乙腈-0.1%磷酸作为流动相。再考察不同色谱柱 [Agilent ZORBAX SB C₁₈、Waters sunfire C₁₈、Thermo Hypersil Gold-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)]、不同温度 (25、30、35℃)、不同流速 (0.9、1.0、1.1 mL·min⁻¹) 对 6 个成分测定的影响, 结果在上述条件下, 6 个成分均达到了较好的分离, 说明方法耐受性较好。

3.3 提取方法的选择

预试验考察了不同提取溶剂 (乙醇、70%乙醇、50%乙醇、甲醇、70%甲醇) 对 6 个成分提取效果的影响, 结果不同乙醇浓度提取的供试品色谱峰峰形有不同程度的拖尾, 而以 50% 甲醇提取的供试品各成分峰形较佳, 提取率最高。还考察了超声和回流两种提取方式, 发现超声提取用时明显短于回流提取, 且超声提取 30 min 时, 6 个成分基本提取完全。最后考察 50% 甲醇用量 (50、100 mL) 对 6 个成分提取的影响, 发现两种体积下 6 种成分的含量基本成比例, 故最终确定供试品溶液制备方法为 50% 甲醇 50 mL 超声提取 30 min。

3.4 小结

本试验建立了 HPLC 法同时测定杜仲平压分散片中京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿

原酸、芦丁和异槲皮苷的含量, 涵盖了该制剂中与功能主治一致的主要有效成分, 该方法简单准确、重复性好, 可为该制剂质量控制方法的完善提供依据。

参考文献

- [1] 余莲. 杜仲叶中五种活性成分的高效提取与分离工艺研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- [2] 何艳, 胡小祥. HPLC 法同时测定杜仲平压片中 6 种成分 [J]. 中成药, 2020, 42 (1): 41-44.
- [3] 成军, 白焱晶, 赵玉英, 等. 杜仲叶苯丙素类化学成分研究 [J]. 中药材, 2014, 37 (3): 421-423.
- [4] 左月明, 张忠立, 王彦彦, 等. 杜仲叶环烯醚萜类化学成分研究 [J]. 中药材, 2014, 37 (2): 252-254.
- [5] 成军, 赵玉英, 崔育新, 等. 杜仲叶黄酮类化合物的研究 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (5): 284-286.
- [6] 屠万倩, 李宁, 张留记, 等. 不同加工方式生产的杜仲叶中 8 种化学成分的含量及抗氧化活性研究 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29 (16): 1863-1867.
- [7] 朱鹏, 苗潇磊, 陈勇, 等. 绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸在中性和碱性 pH 条件下的降解动力学 [J]. 药学学报, 2016, 51 (1): 122-126.
- [8] 李旭, 刘停, 陈时建, 等. 杜仲叶绿原酸提取工艺优化及对自发性高血压大鼠的降压作用 [J]. 食品科学, 2013, 34 (14): 30-34.
- [9] 刘俊伶. 杜仲鲜叶中车叶草苷、京尼平苷酸和绿原酸提取及富集工艺研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- [10] 杨志友, 马智慧, 邓嘉航, 等. 药食同源植物杜仲叶中有效成分京尼平苷酸的抗炎作用研究 [J]. 广东化工, 2020, 47 (22): 47-48.
- [11] 陈燕, 詹羽姣, 李晨阳, 等. 异槲皮苷的生物活性研究进展 [J]. 中国现代中药, 2018, 20 (12): 1579-1582.
- [12] 袁真, 闵珺, 王恺, 等. 杜仲黄酮类 3 种药物成分治疗大鼠骨质疏松的比较研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24 (2): 244-248.
- [13] 陈泽彬, 刘敏, 张尚斌. 杜仲平压分散片的制备及其质量标准研究 [J]. 中国药房, 2009, 20 (18): 1395-1397.
- [14] 张留记, 李宁, 屠万倩, 等. HPLC 法同时测定杜仲叶中 8 种成分的含量 [J]. 中国药房, 2019, 30 (24): 3383-3387.
- [15] 李田洋, 杨婷婷, 张琪, 等. 高效液相色谱法同时测定骨炎消方中 8 种有效成分的含量 [J]. 中南药学, 2021, 19 (8): 1666-1669.
- [16] 王慧, 辛爱玲, 冯璐杰, 等. 高效液相色谱法同时测定红旱莲中 5 个黄酮类成分的含量 [J]. 中南药学, 2021, 19 (9): 1911-1914.

(收稿日期: 2022-01-05; 修回日期: 2022-04-08)

黄芪及其复方辅助常规降糖药治疗 2 型糖尿病的 Meta 分析

王锴华¹, 邵文钰¹, 韩暖¹, 冯林¹, 陈南溪¹, 陈智超¹, 刘东春^{1*}, 赵亮² (1. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 2. 京都大学大学院综合生存学馆, 日本 京都 606-8306)

摘要: **目的** 系统评价黄芪及其复方在辅助常规降糖药治疗 2 型糖尿病 (T2DM) 中的作用。**方法** 在 PubMed、CNKI 数据库上检索 2000 年 1 月—2020 年 12 月发表的关于临床使用黄芪及其复方辅助常规降糖药治疗 T2DM 的随机对照试验 (RCT) 的文献, 利用 Revman 5.3 和 R 语言进行 Meta 分析。**结果** 与对照组相比, 黄芪及其复方辅助常规降糖药可降低 T2DM 患者空腹血糖 (FPG)、餐后 2 h 血糖 (2 h-PG)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、总胆固醇 (TCHO)、三酰甘油 (TG), 并且不会增加不良反应发生率, 其加权均数差值 (WMD) 和 95% 的可信区间 (CI) 分别为 -0.86 (-1.06, -0.66, $P < 0.000\ 01$)、-1.19 (-1.35, -1.02, $P < 0.000\ 01$)、-0.56 (-0.72, -0.40, $P < 0.000\ 01$)、-0.54 (-0.76, -0.33, $P < 0.000\ 01$)、-0.30 (-0.50, -0.10, $P = 0.003$)、0.76 (0.53, 1.08, $P = 0.13$)。**结论** 黄芪及其复方辅助常规降糖药比单用常规降糖药对改善 2 型糖尿病患者的血糖 (FPG、2 h-PG、HbA1c)、血脂 (TCHO、TG) 作用更佳, 可以在临床上更加广泛地使用。

关键词: 黄芪; 2 型糖尿病; Meta 分析; 血糖; 血脂

中图分类号: R58, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2413-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.035

Meta-analysis of astragalus and its prescriptions combined with conventional hypoglycemic for diabetes mellitus type 2

WANG Kai-hua¹, TAI Wen-yu¹, HAN Nuan¹, FENG Lin¹, CHEN Nan-xi¹, CHEN Zhi-chao¹, LIU Dong-chun^{1*}, ZHAO Liang² (1. College of Traditional Chinese Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 2. Graduate School of Advanced Integrated Studies in Human Survivability, Kyoto University, Kyoto Japan 606-8306)

Abstract: Objective To systematically evaluate the effectiveness of astragalus and its prescriptions combined with conventional hypoglycemic for diabetes mellitus type 2 (T2DM). **Methods** We searched the PubMed and CNKI databases to identify randomized controlled trials (RCT) published from January 2000 to December 2020, and compared the effectiveness of astragalus and its prescriptions combined with conventional hypoglycemic for T2DM. Meta-analysis was performed with Revman 5.3 and R language. **Results** Compared with the control group, astragalus and its prescriptions combined with conventional antidiabetic agents greatly reduced the level of fasting plasma glucose (FPG), 2-hour postprandial blood glucose (2 h-PG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), total cholesterol (TCHO) and triacylglycerol (TG). Astragalus did not increase the incidence of adverse reactions. The weighted mean difference (WMD) and 95% confidence interval (95%CI) were -0.86 (-1.06, -0.66, $P < 0.000\ 01$), -1.19 (-1.35, -1.02, $P < 0.000\ 01$), -0.56 (-0.72, -0.40, $P < 0.000\ 01$), -0.54 (-0.76, -0.33, $P < 0.000\ 01$), -0.30 (-0.50, -0.10, $P = 0.003$), and 0.76 (0.53, 1.08, $P =$

基金项目: 沈阳药科大学 2020 年度本科教育教学改革与研究项目 (No.2020-08)。

作者简介: 王锴华, 女, 硕士, 主要从事生药活性成分发掘及新药开发与代谢性疾病研究, email: wkh0220@163.com *通信作者: 刘东春, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新型制剂研究与开发、功能性化妆品、生药活性成分发掘及新药开发的研究, email: liudongchun@outlook.com

0.13) respectively. **Conclusion** The combined use of astragalus with conventional hypoglycemic can effectively improve the blood glucose (FPG, 2 h-PG, and HbA1c), and blood lipid levels (TCHO and TG) than conventional hypoglycemic alone.

Key words: astragalus; diabetes mellitus type 2; meta-analysis; blood glucose; blood lipid

2 型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM) 是一种主要由胰岛素功能障碍导致的内分泌代谢紊乱疾病^[1], 根据世界卫生组织的统计, 90% 的糖尿病患者属于 2 型糖尿病^[2]。中医学认为, 糖尿病是由于素体阴虚, 饮食不节, 劳欲伤气, 情志失调所致, 与机体的免疫和血瘀有密切关系^[3], 此外, 饮食结构不合理、心理因素、药物作用及其他疾病等都有可能引起 2 型糖尿病^[4]。

黄芪及其复方在 2 型糖尿病的治疗过程中有着广泛的应用, 与不同中药的相互联用, 可以通过不同的信号通路调控改善胰岛素抵抗^[5], 并且有学者通过代谢组学的方式筛选到了多个靶点来调节糖代谢^[6]。有研究发现, 黄芪中三萜皂苷类、黄酮类、多糖类等活性物质可以改善肠菌群^[7], 并且对肠脑轴的调节、修复脑损伤起着关键作用^[8], 同时还可以促进胰岛素分泌^[9], 从多方面治疗 2 型糖尿病。目前, 黄芪及其复方已经成为治疗 2 型糖尿病的常用中药及复方, 常规降糖药联合中药方剂的降糖效果会显著提高^[10]。目前为止, 虽然有多种随机对照试验考察两者联用的疗效, 但并无系统的评价, 因此, 本研究拟采用 Meta 分析评价黄芪及其复方辅助常规降糖药治疗 2 型糖尿病的有效性和安全性, 为黄芪及其复方在临床上的应用提供科学的依据以及新的思路。

1 资料和方法^[11-12]

1.1 纳入与排除标准

1.1.1 研究类型 使用了黄芪及其复方联合常规降糖药和仅使用常规降糖药治疗 2 型糖尿病的随机对照试验。

1.1.2 研究对象 西医按照《中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)》^[13], 中医按照《糖尿病周围神经病变中医诊疗指南 (2016 年版)》^[14], 满足两者或两者其一。

1.1.3 排除标准 ① 1 型糖尿病患者; ② 患有严重的肝肾功能障碍患者, 患有恶性肿瘤、神经系统疾病患者; ③ 哺乳、妊娠期女性; ④ 近一个月服用其他影响观察效果的药物治疗疾病的患者; ⑤ 近一个月有糖尿病酮症酸中毒等急性代谢紊乱以及合并感染的患者; ⑥ 对试验药物过敏的患者; ⑦ 个别案例、非随机试验等情况。

1.1.4 观察指标 主要观察指标有空腹血糖 (FPG)、餐后 2 h 血糖 (2 h-PG)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、总胆固醇 (TCHO)、三酰甘油 (TG)。

1.2 检索策略

在 PubMed、中国知网等数据库上检索 2000 年 1 月—2020 年 12 月发表的关于临床上使用黄芪及其复方辅助常规降糖药治疗 2 型糖尿病的随机对照试验的文献。中文检索词: “黄芪” “2 型糖尿病” “临床” 等; 英文检索词: “HuangQi” “type 2 diabetes mellitus” “clinic” “Astragalus” 等, 检索范围为全文。中文检索式: SU% = ‘黄芪’ AND SU% = ‘2 型糖尿病’ AND SU% = ‘临床’; 英文检索式: ((diabetes mellitus type 2) AND (Astragalus)) AND (clinic)。此外, 还采用高级检索以 FPG 为关键词, 主题不含数据挖掘、妊娠、大鼠、小鼠, 进行文献补充。同时, 还增加了机检后人工复查的方式来纳入文献, 并且为提高文献查全率, 按照纳入与排除标准筛选了全部纳入文献所引用的参考文献。

1.3 文献质量评价

首先由两名评审员独立进行文献选择、质量分析, 交换评审, 若有不同意见, 请第三人判断。最终被纳入的随机对照试验采用 Cochrane 偏倚风险评估表进行评价, 内容包括随机序列的产生、分配隐藏、研究者和受试者施盲、研究结局盲法评价、数据完整性、报告偏倚和其他偏倚七项内容, 每项分为高风险 (红色)、不清楚 (黄色)、低风险 (绿色) 三种评价, 高风险 0 分、不清楚 1 分、低风险 2 分, 总分 14 分, 其中总分为 0~4 分为低质量文献, 5~9 分为中质量文献, 10~14 分为高质量文献。

1.4 统计分析方法

Meta 分析采用软件为 Revman 5.3, 用加权均数差值 (weight mean difference, WMD) 和 95% 的可信区间 (confidence interval, CI) 表示连续型变量。采用 Cochrane Q 检验分析各研究间的异质性, $P < 0.1$, 认为研究间异质性存在统计学意义。异质性大小使用 I^2 进行评估, 同质性研究结果为 $I^2 < 50%$, 分析时采用固定效应模型; 反之采用随机效应模型, 并使用 R 语言 (R 4.2.0) 进

行发表偏倚分析^[15]。在进行组间治疗前后差值比较时,对只知道治疗前后均数 ± 标准差的资料,根据 Cochrane 手册采用以下公式计算治疗前后差值的均数 ± 标准差^[16]:

$$\text{均数差值} = \text{均数治疗后} - \text{均数治疗前}$$

$$\text{标准差: } SD = (\text{SD}_{\text{治疗前}}^2 + \text{SD}_{\text{治疗后}}^2)^{1/2}$$

2 结果

2.1 文献流程图

共检索文献 700 篇,初步筛选,排除 69 篇综述文献,127 篇重复文献以及 40 篇其他原因不符合要求的文献,最后筛选出 464 篇符合要求,并记录检查。其次,通过阅读摘要,排除 104 篇重复研究,174 篇非联合常规降糖药或常规治疗方法研究和 110 篇其他原因排除的研究,最后获取 76 篇全文,排除 16 篇非随机对照试验和 24 篇其他原因排除,最终纳入 36 篇符合要求的随机对照试验^[17]。

2.2 研究描述及质量评价

纳入的 36 篇文献中,患者共 2986 名,其中使用黄芪及其复方联合常规降糖药治疗的患者 1505 例,只使用常规降糖药治疗的患者 1481 例。纳入研究的基本特征见表 1,偏倚风险评估表见图 1。在患者的纳入方面中增加了中医的诊断,不排除有主观性的差异,在一些文献中增加了“适当运动”的项目,并且不同的黄芪及复方药物成分复杂,药物品质、成分及剂型各有不同,可能会使不同的研究之间存在异质性。

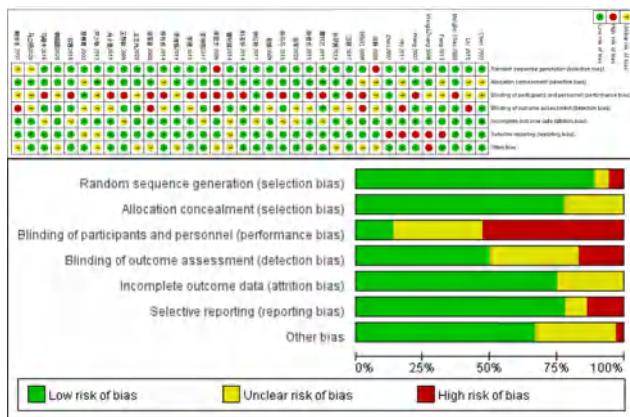


图 1 纳入研究的偏倚风险评估
Fig 1 Risk of bias in included studies

2.3 分析结果

2.3.1 对 2 型糖尿病患者 FPG 的影响 共纳入了 29 个研究,对照组与试验组治疗前后的 2 型糖尿病患者 FPG 变化情况在这些研究中均进行了比较。异质性检验表明各研究数据之间有显著异质性 ($P = 0.0002$, $I^2 = 55\%$),故进行 Meta 分析时使

用随机效应模型,结果显示两组 FPG 差异有统计学意义 [$WMD = -0.86$, $95\%CI (-1.06, -0.66)$, $P < 0.0001$] (见图 2),可以认为试验组降低 2 型糖尿病患者 FPG 的作用比对照组更明显。

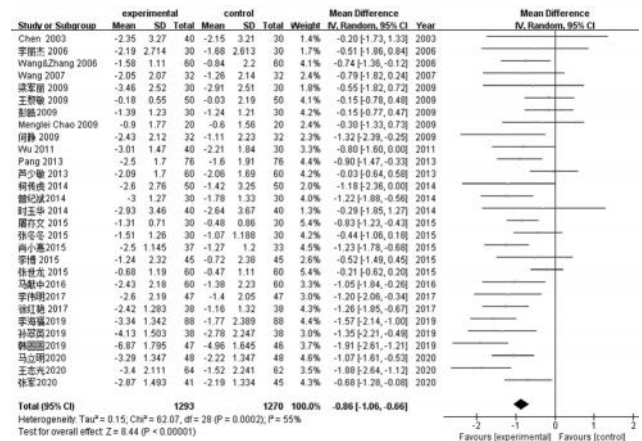


图 2 试验组与对照组中 2 型糖尿病患者 FPG 的比较
Fig 2 FPG of T2DM patients in the treatment group and control group

2.3.2 对 2 型糖尿病患者 2 h-PG 的影响 共纳入 29 个研究,对照组与试验组治疗前后的 2 型糖尿病患者 2 h-PG 变化情况在这些研究中均进行了比较。异质性检验表明各研究数据之间没有显著异质性 ($P = 0.10$, $I^2 = 26\%$),故进行 Meta 分析时使用固定效应模型,结果显示两组差异有统计学意义 [$WMD = -1.19$, $95\%CI (-1.35, -1.02)$, $P < 0.0001$] (见图 3),可认为试验组降低 2 型糖尿病患者 2 h-PG 的作用比对照组更明显。

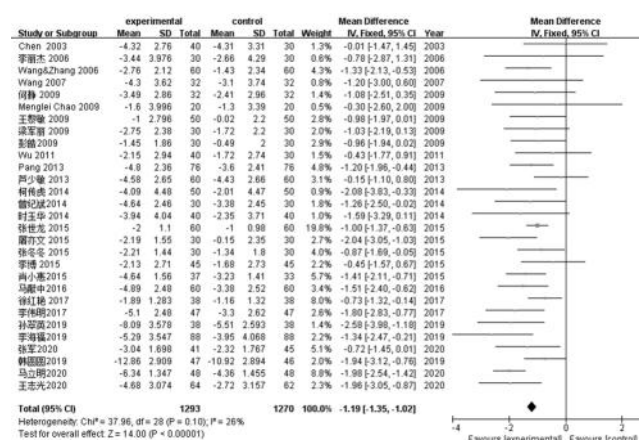


图 3 试验组与对照组中 2 型糖尿病患者 2 h-PG 的比较
Fig 3 2 h-PG of T2DM patients in the treatment group and control group

2.3.3 对 2 型糖尿病患者 HbA1c 的影响 共纳入 23 个研究,对照组与试验组治疗前后的 2 型糖尿病患者 HbA1c 变化情况在这些研究中均进行了比较。异质性检验表明各研究数据之间有显著异质性 ($P = 0.03$, $I^2 = 39\%$),故进行 Meta 分析时使用随机效应模型,结果显示两组差异具有统

表 1 纳入研究的基本特征

Tab 1 Basic characteristics of included studies

研究	方剂组成	试验组 / 对照组		疗程 / 月	干预措施		观察指标
		例数	平均年龄 / 岁		试验组	对照组	
蔡寒青 2003 ^[18]	天芪降糖胶囊	30/30	51/53.5	2	天芪降糖胶囊 320 mg tid + OADs	OADs	③⑥
刘仪红 2005 ^[19]	AI	23/23	46.0±13.6/48.1±12.8	3	AI 50 mL iv drip + OADs	OADs	③④⑤⑥
李丽杰 2006 ^[20]	金梅消渴方	30/30	53.92±9.15/55.87±10.36	3	金梅消渴汤丸 1 剂 qd 或金梅消渴汤 1 剂 tid + CT	CT	①②③④⑤⑥
鲍余生 2007 ^[21]	AI、葛根素注射液	26/26	47±11/46±12	0.6	AI、葛根注射液 20 mL + 4 mL iv drip + CT	CT	④⑤
彭皓 2009 ^[22]	加味补阳还五汤	30/30	52.7±50.8±12.4	3	加味补阳还五汤 1 剂 bid + OADs	OADs	①②④⑤⑥
梁军丽 2009 ^[23]	黄芪知母参七汤	32/32	55.03±9.78/53.17±9.63	3	黄芪知母参七汤 1 剂 bid + OADs	OADs	①②③④⑤⑥
何静 2009 ^[24]	健脾补肾方	32/32	40.40±0.7/40.52±0.5	2	健脾补肾方 1 剂 bid + OADs	OADs	①②③④⑤⑥
王黎敏 2009 ^[25]	AI	50/50	未说明	1	AI 60 mL iv drip + CT	CT	①②③④⑤
马献中 2016 ^[26]	黄芪乌梅汤	60/60	53.6/53.7	3	黄芪乌梅汤 1 剂 tid + OADs	OADs	①②⑥
曾纪斌 2014 ^[27]	黄芪消渴方	30/30	53.34/56.66	3	黄芪消渴方 1 剂 bid + OADs	OADs	①②
芦少敏 2013 ^[28]	糖痹康汤	60/60	55.23±4.71/58.68±3.22	3	糖痹康汤 1 剂 bid + CT	CT	①②③④⑤
时玉华 2014 ^[29]	补脾益气活血汤	40/40	52.5±3/51.5±4.5	1	补脾益气活血汤 1 剂 tid + OADs	OADs	①②③⑥
屠亦文 2015 ^[30]	加味黄芪竹叶汤	30/30	62.80±10.5/58.25±7.85	2	加味黄芪竹叶汤 1 剂 bid + CT	CT	①②③⑥
柯传虎 2014 ^[31]	益气活血汤	50/50	45.21±24.26/44.24±23.15	2	益气活血汤 1 剂 bid + OADs	OADs	①②④⑤⑥
张冬冬 2015 ^[32]	健脾通络方	30/30	55.83±8.321/56.37±7.963	1	健脾通络方 1 剂 bid + OADs	OADs	①②③
李博 2015 ^[33]	养阴补肾活血汤	45/45	61.3±10.9/60.5±10.2	3	阴补肾活血汤剂 1 剂 bid + CT	CT	①②③④⑤⑥
张世龙 2015 ^[34]	养阴止渴丸	60/60	50.61±9.26/51.06±8.65	1	养阴止渴丸 10 g bid + OADs	OADs	①②
肖小惠 2015 ^[35]	活血降糖饮	37/33	54.61±9.75/55.13±9.65	8	活血降糖饮 1 剂 bid + CT	CT	①②③④⑤⑥
郭茜 2016 ^[36]	黄芪饮片	20/20	50.40/51.35	2	黄芪饮片 20 g tid + OADs	OADs	③④⑤⑥
徐红艳 2017 ^[37]	AI	38/38	52.36/51.94	3	AI 20 mL iv drip + CT	CT	①②③
李伟明 2017 ^[38]	黄芪乌梅汤	47/47	53.5/53.1	3	黄芪乌梅汤 1 剂 tid + OADs	OADs	①②
卫薇 2017 ^[39]	黄芪复方	40/40	N/A	6	黄芪复方 1 剂 bid + CT	CT	④⑤
孙翠英 2019 ^[40]	黄芪消渴方	38/38	54.8±6.5	2	黄芪消渴方 1 剂 bid + OADs	OADs	①②③
李海福 2019 ^[41]	黄芪乌梅汤	88/88	56.7±13.5	3	黄芪乌梅汤 1 剂 (代替日常饮水) + OADs	OADs	①②③
韩圆圆 2019 ^[42]	黄芪葛根汤	47/46	56.23±5.90/56.01±5.45	4	黄芪葛根汤 bid + CT	CT	①②③
张军 2020 ^[43]	益气活血汤	41/45	20 ~ 69/23 ~ 68	3	益气活血汤 1 剂 bid + CT	CT	①②③
王志光 2020 ^[44]	参芪降糖颗粒	64/62	50.53±6.80/50.19±6.78	3	参芪降糖颗粒 tid + CT	CT	①②③
马立明 2020 ^[45]	五黄养阴颗粒	48/48	56.48±3.25/56.85±3.18	2	五黄养阴颗粒 qd + OADs	OADs	①②③⑥
Chen 等 2003 ^[46]	AI	40/30	56.6/57.0	1	AI 40 mL iv drip + CT	CT	①②③
Wang 等 2006 ^[47]	AI	60/60	58.2±10.6	0.5	AI 30 mL iv drip + CT	CT	①②
Zhou 等 2007 ^[48]	ADD	42/42	58.6±10.9/59.8±8.62	4	ADD 50 g + CT	PBO + CT	②
Wang 等 2007 ^[49]	ADD	32/32	65.8	1	ADD 60 g + OADs	PBO + OADs	①②
Chao 等 2009 ^[50]	黄芪复方	21/20	54±7/53±10	3	中药混合物 + CT	PBO + CT	①②③④⑤
Wu 2011 ^[51]	AI	40/30	61	1	AI 300 mg iv drip + CT	CT	①②⑥
Fang 2013 ^[52]	ADD	76/76	62.1±11.8/60.8±13.5	3	ADD 20 g qd + CT	CT	①②
Liu 等 2015 ^[53]	AI	28/28	66.8±5.8/67.2±5.4	1	AI 40 mL (80 g) + CT	CT	②

注 (Note): ① FBG; ② 2 h-PG; ③ HbA1c; ④ TCHO; ⑤ TG; ⑥ 不良反应 (ADR); OADs. 口服降糖药 (oral hypoglycemic); CT. 常规处理 (conventional treatment); AI. 黄芪注射液 (astragalus injection); AAD. 黄芪水煎剂 (astragalus aqueous decoction); PBO. 安慰剂 (placebo)。

计学意义 [$WMD = -0.56, 95\%CI (-0.72, -0.40), P < 0.000 01$] (见图 4), 试验组降低患者 HbA1c 的作用比对照组更明显。

2.3.4 对 2 型糖尿病患者 TCHO 的影响 共纳入 9 个研究, 对照组与试验组治疗前后的 2 型糖尿病患者 TCHO 变化情况在这些研究中均进行了比较。异质性检验表明各研究数据之间没有显著异质性 ($P = 0.32, I^2 = 14\%$), 故进行 Meta 分析时使用固定效应模型, 结果显示两组差异有统

计学意义 [$WMD = -0.54, 95\%CI (-0.76, -0.33), P < 0.000 01$] (见图 5), 可认为两组均可降低 2 型糖尿病患者的 TCHO 水平, 但试验组降低 2 型糖尿病患者 TCHO 的作用比对照组更明显。

2.3.5 对 2 型糖尿病患者 TG 的影响 共纳入 9 个研究, 对照组与试验组治疗前后的 2 型糖尿病患者 TG 变化情况在这些研究中均进行了比较。异质性检验表明各研究数据之间没有显著异质性 ($P = 0.62, I^2 = 0\%$), 故进行 Meta 分析时使

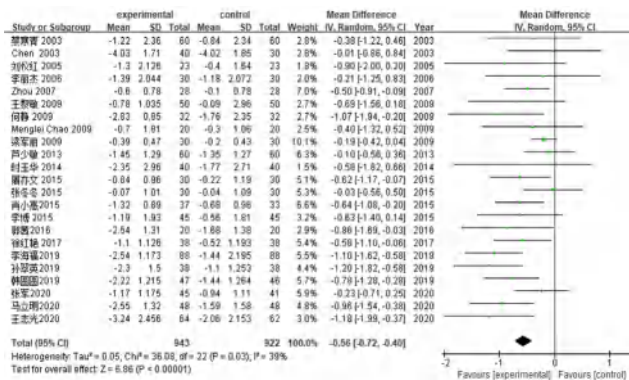


图 4 试验组与对照组中 2 型糖尿病患者 HbA1c 的比较

Fig 4 HbA1c of T2DM patients in the treatment group and control group

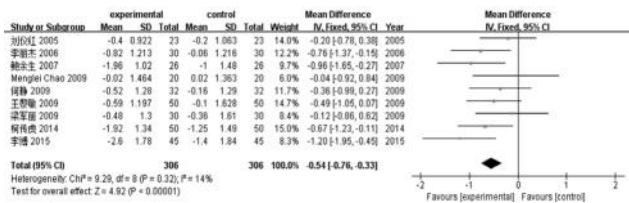


图 5 试验组与对照组中 2 型 TCHO 的比较

Fig 5 TCHO of T2DM patients in the treatment group and control group

用固定效应模型, 结果显示两组差异有统计学意义 [$WMD = -0.30, 95\%CI (-0.50, -0.10), P = 0.003$] (见图 6), 可以认为两组均可降低 2 型糖尿病患者的 TG 水平, 但试验组降低 2 型糖尿病患者 TG 的作用比对照组更明显。

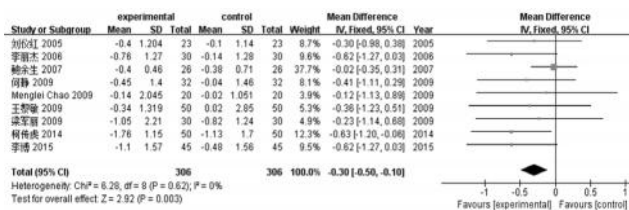


图 6 试验组与对照组中 2 型糖尿病患者 TG 的比较

Fig 6 TG of T2DM patients in the treatment group and control group

2.3.6 不良反应 共有 15 项研究中考察了药物不良反应, 共有 4 项研究中受试者出现了不良反应。异质性检验表明各研究数据之间没有显著异质性 ($P = 0.43, I^2 = 0\%$), 故进行 Meta 分析时使用固定效应模型, 结果显示两组差异无统计学意义 [$WMD = 0.76, 95\%CI (0.53, 1.08), P = 0.13$] (见图 7), 可以认为在联用黄芪及其复方后, 不会增加不良反应发生率。



图 7 药物相关不良反应直接 Meta 分析结果

Fig 7 Direct meta-analysis of drug-related adverse reactions

2.4 倒漏斗图分析及发表偏倚

分别对 FPG、2 h-PG、HbA1c、TCHO、TG 的指标绘制了倒漏斗图 (见图 8) 并进行 Egger 检验。结果显示, FPG、2 h-PG、TCHO 所有数据点均分布在倒漏斗图对称轴两侧, Egger 检验结果显示 $P = 0.6705, P(2\text{ h-PG}) = 0.7610$ 提示纳入研究发表偏倚性较小, 而 HbA1c、TG 数据分布不对称 Egger 检验结果显示 $P(\text{HbA1c}) = 0.0313$, 提示可能存在一定的发表偏倚 [54-55]。

3 讨论

2 型糖尿病是最常见的代谢疾病之一, 本研究发现黄芪及其复方在临床联合常规降糖药治疗 2 型糖尿病中可以显著降低 FPG 和 2 h-PG, 并通过分析发现, 其存在的发表偏倚较小, 具有一定的可信性。血糖调节主要与机体糖代谢和胰岛素调节有关, 黄芪作为方剂中的君药, 通过多靶点调节上述功能。

糖代谢是血糖调节的最主要方式, 在 2 型糖尿病模型中, 黄芪的所有主要成分均已被证明可显著降低血糖水平和体质量, 并改善葡萄糖耐量受损 [56], 例如黄芪多糖可以通过恢复葡萄糖转运受体和蛋白激酶 B 磷酸化活性来增加糖耐量 [57], 与此同时, 黄芪多糖可以维持葡萄糖稳态和降低内质网应激 [58], 起到增加糖耐量和调节糖代谢的作用。

胰岛素信号传导是调节血糖的重要途径, 如二甲双胍主要以增加外周组织的胰岛素敏感性从而进行血糖调节, 但其严重的胃肠道反应使患者依从性降低。如果二甲双胍辅以黄芪方剂治疗, 方中黄芪多糖可以通过肠道中和胰腺的甜味受体调节葡萄糖摄取以及胰岛素分泌, 并通过逆转 GLUTs 和 STRs/GLP-1/GLP-1R 通路激活来缓解 2 型糖尿病 [59-60], 其降糖作用明显优于单独使用二甲双胍 [61]。另外, 黄芪中的三萜皂苷 - 黄芪甲苷可以激活抑制 mTOR 的磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK), 从而进一步改善胰岛素抵抗和血脂异常, 并反应在 TG 和 TCHO 指标的降低上 [62]。除此之外, 黄芪也在肠道菌群 [63]、炎症 [64]、细胞凋亡 [65] 等方面发挥着协同改善糖脂代谢的作用。

本研究共纳入了 36 项关于黄芪及其复方联合常规降糖药在 2 型糖尿病的临床相关研究, 结果表明, 相对常规降糖药, 联用黄芪或其复方后, 疗效更加明显, 对 FPG、2 h-PG、HbA1c、TCHO、TG 指标均有较为显著的改善, 并且在经

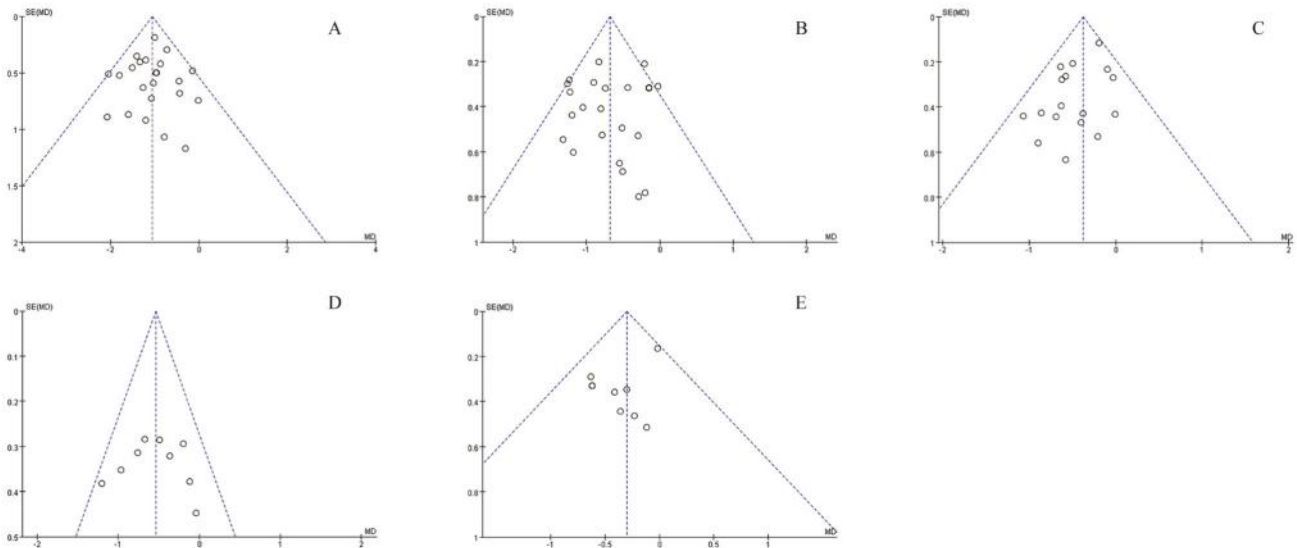


图 8 主要评价指标倒漏斗图分析

Fig 8 Funnel plot of main evaluation indicators

A.FPG; B.2 h-PG; C.HbA1c; D.TG; E.TC

过 Egger 检验, FPG 和 2 h-PG 的数据并不存在显著的发表偏倚, 进一步说明黄芪在辅助常规降糖药的治疗中有着更好的疗效。对于 HbA1c 来说, 可能存在一定的发表偏倚, 有待进一步研究。在不良反应的汇总中, 虽然马立明等^[45]在试验中发现联合黄芪及其复方后, 患者不良反应显著降低, 但经过对多项研究的汇总发现该项数据极有可能为特殊现象, 多数试验表明联用黄芪及其复方对常规治疗产生的不良反应并无显著影响。

本研究的局限性: ① 纳入研究的文献主要以国内机构为主, 对国外机构的研究纳入较少; ② 各项研究中干预项不同, 使用的降糖药机制也不同, 对指标可能产生影响; ③ 文中并未汇总黄芪和黄芪方中主要活性物质联合常规降糖药的研究, 结果可能存在疏漏。

综上所述, 本研究的证据表明, 黄芪及其复方在辅助常规降糖药治疗糖尿病时, 能在单独使用降糖药的基础上降低 2 型糖尿病患者的血糖 (FPG、2 h-PG、HbA1c)、血脂 (TCHO、TG), 值得临床上进一步的研究和推广。

参考文献

- Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16 (7): 349-362.
- WHO. Classification of diabetes mellitus [N]. World Health Organization. 21 April 2019.
- Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes [J]. *BMC Med*, 2017, 15 (1): 131.
- Sun XQ, Wang L, Obayomi S, et al. Epigenetic regulation of β cell identity and dysfunction [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 725131.
- Mao ZJ, Lin M, Zhang X, et al. Combined use of astragalus polysaccharide and berberine attenuates insulin resistance in ir-hepg2 cells via regulation of the gluconeogenesis signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1508.
- Guo Q, Niu WL, Li XJ, et al. study on hypoglycemic effect of the drug pair of astragalus radix and dioscoreae rhizoma in T2DM rats by network pharmacology and Metabonomics [J]. *Molecules*, 2019, 24 (22): 4050.
- Gong P, Xiao XY, Wang S, et al. Hypoglycemic effect of astragaloside IV via modulating gut microbiota and regulating AMPK/SIRT1 and PI3K/AKT pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 114558.
- Li X, Zhao TT, Gu JL, et al. Intake of flavonoids from *Astragalus membranaceus* ameliorated brain impairment in diabetic mice via modulating brain-gut axis [J]. *Chin Med-UK*, 2022, 17 (1): 22.
- Deng SF, Yang L, Ma K, et al. Astragalus polysaccharide improve the proliferation and insulin secretion of mouse pancreatic β cells induced by high glucose and palmitic acid partially through promoting miR-136-5p and miR-149-5p expression [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (2): 9872-9884.
- 林兰. 现代中医糖尿病学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 215-253.
- 王世谦, 梅勇, 宋世震. 补肾益气活血类中药联合 RAAS 阻断剂治疗早期糖尿病肾病的荟萃分析 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28 (12): 3068-3071.
- 王凤, 宋花铃, 马燕云, 等. 中药复方治疗非增殖期糖尿病视网膜病变的 Meta 分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*,

- 2017, 23 (15): 202-210.
- [13] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)(上) [J]. 中国实用内科杂志, 2021, 41 (8): 668-695.
- [14] 方朝晖, 吴以岭, 赵进东. 糖尿病周围神经病变中医临床诊疗指南 (2016 年版) [J]. 中医杂志, 2017, 58 (7): 625-630.
- [15] 杨涛, 李潇然, 王世东, 等. 活血消癥中药治疗糖尿病肾病的随机对照临床试验系统综述及 Meta 分析 [J]. 世界中医药, 2017, 12 (1): 5-15.
- [16] 沈艳. 二甲双胍治疗非酒精性脂肪肝病的 Meta 分析 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.
- [17] 陈赫军, 孙红爽, 方妍, 等. 复方丹参滴丸辅助治疗糖尿病肾病疗效的 Meta 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (11): 215-220.
- [18] 蔡寒青, 葛焕琦, 张秀娟, 等. 天芪降糖胶囊治疗 2 型糖尿病 60 例临床观察 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2003, 29 (5): 669-671.
- [19] 刘仪红, 杨丽, 刘炬, 等. 黄芪注射液与卡托普利联合治疗早期糖尿病肾病的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25 (11): 993-995.
- [20] 李丽杰. 金梅消渴汤 (丸) 对 2 型糖尿病的临床研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2006.
- [21] 鲍余生, 邓长春, 谌曦. 黄芪注射液并葛根素注射液治疗 2 型糖尿病临床观察 [J]. 中医药临床杂志, 2007, 19 (4): 369-370.
- [22] 彭皓. 加味补阳还五汤治疗糖尿病周围神经病变临床观察 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009.
- [23] 梁军丽. 黄芪知母参七汤治疗糖尿病肾病 III 期 (气阴两虚型) 的临床疗效观察 [D]. 福州: 福建中医学院, 2009.
- [24] 何静. 健脾补肾法治疗糖尿病肾病的临床研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009.
- [25] 王黎敏, 陈传琦, 张宏美, 等. 黄芪对糖尿病肾病患者肝细胞生长因子的影响极其意义 [J]. 实用临床医药杂志, 2009, 13 (5): 37-39.
- [26] 马献中, 王世彪, 方玲. 黄芪乌梅汤治疗气阴两虚型 2 型糖尿病 60 例 [J]. 西部中医药, 2016, 29 (4): 92-93.
- [27] 曾纪斌, 潘艳, 黄寅鑫, 等. 黄芪消渴方对气阴两虚型 2 型糖尿病患者中医症状改善的影响 [J]. 新中医, 2014, 46 (4): 146-148.
- [28] 芦少敏, 张定华, 张雅娴. 糖痹康汤治疗 2 型糖尿病周围神经病变气阴两虚兼血瘀证 60 例 [J]. 中医研究, 2013, 26 (12): 16-19.
- [29] 时玉华. 补脾益气活血汤联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28 (9): 20-23.
- [30] 屠亦文, 郝瑞福, 孙鼎. 加味黄芪竹叶汤治疗 2 型糖尿病气阴两虚证的疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10 (8): 1139-1142.
- [31] 柯传虎, 何文华, 戴倩雅. 益气活血汤联合诺和灵治疗糖尿病随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29 (2): 96-98.
- [32] 张冬冬. 阳和汤合补阳还五汤治疗糖尿病周围神经病变临床观察 [J]. 承德医学院学报, 2015, 32 (3): 220-221.
- [33] 李博. 养阴补肾活血方配西药治疗早期糖尿病肾病疗效观察 [J]. 陕西中医, 2015, 36 (4): 393-396.
- [34] 张世龙, 马登娟, 姚鹏, 等. 养阴止渴丸联合二甲双胍片治疗 2 型糖尿病 60 例 [J]. 中医研究, 2015, 28 (5): 10-12.
- [35] 肖小惠, 李惠林, 刘德亮, 等. 益气养阴活血法治疗 2 型糖尿病的临床疗效观察 [J]. 世界中医药, 2015, 10 (3): 363-366.
- [36] 郭茜, 陈永华, 杨娟, 等. 黄芪泡服联合黄葵胶囊治疗早期糖尿病肾病的临床观察 [J]. 黑龙江医学, 2016, 40 (3): 243-245.
- [37] 徐红艳. 黄芪注射液辅助治疗肺结核并糖尿病患者的临床效果 [J]. 中国医药导报, 2017, 14 (11): 140-143.
- [38] 李伟明. 黄芪乌梅汤化裁联合西医治疗气阴两虚型 2 型糖尿病疗效观察 [J]. 广西中医药, 2017, 40 (2): 28-29.
- [39] 卫薇. 中药治疗糖尿病肾病 80 例观察 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 21 (36): 17-18.
- [40] 孙翠英, 刘建玲. 黄芪消渴汤联合盐酸二甲双胍片治疗气阴两虚型 2 型糖尿病 38 例临床研究 [J]. 新中医, 2019, 51 (1): 108-111.
- [41] 李海福. 2 型糖尿病采用黄芪乌梅汤的辅治效果分析 [J]. 中国医药指南, 2019, 17 (31): 174-175.
- [42] 韩圆圆. 黄芪葛根汤辅助治疗 2 型糖尿病的作用研究 [J]. 中国医药指南, 2019, 17 (35): 184-185.
- [43] 张军, 王顺意, 戴金颖. 益气养阴活血法治疗 2 型糖尿病临床观察 [J]. 光明中医, 2020, 35 (3): 374-376.
- [44] 王志光. 中西医结合治疗 2 型糖尿病 64 例临床观察 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29 (7): 102-104.
- [45] 马立明, 吴新华, 严妍. 五黄养阴颗粒联合吡格列酮治疗 2 型糖尿病的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35 (1): 122-126.
- [46] 陈锦海, 黄荣桂, 施亚雄. 黄芪注射液治疗早期糖尿病肾病疗效观察 [J]. 中国误诊学杂志, 2003, 3 (8): 1156-1158.
- [47] 王正英, 张黔丽. 黄芪注射液配合西药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗 60 例 [J]. 陕西中医, 2006, 27 (12): 1535-1537.
- [48] 周俐, 张曙辉, 于珍, 等. 黄芪对糖尿病胰岛素抵抗及血清脂联素影响的临床研究 [J]. 新中医, 2007, 39 (5): 82-83.
- [49] Wang XX, Min LI, Yan M, et al. Effect of Astragalus-supplemented enteral nutrition on nutritional metabolism in type-2 diabetic patients with ischemic stroke [J]. JPEN-Parenter Enter, 2007, 14 (2): 108-110.
- [50] Chao ML, Zou DJ, Zhang YF, et al. Improving insulin resistance with traditional Chinese medicine in type 2 diabetic patients [J]. Endocrine, 2009, 36: 268-274.
- [51] 吴巨表. 黄芪对 2 型糖尿病的辅助治疗 [J]. 中国医学工程, 2011, 19 (6): 139, 141.
- [52] 庞芳. 黄芪改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能的临床研究 [J]. 中国医药导刊, 2013, 15 (8): 1420-1421.

- [53] 刘珊, 张明霞, 杨晓芬, 等. 厄贝沙坦联合黄芪注射液对老年糖尿病肾病患者结缔组织生长因子的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35 (1): 108-110.
- [54] 甄玲, 李璐, 刘吉羊, 等. 小剂量阿奇霉素联用辛伐他汀治疗慢性阻塞性肺病合并肺动脉高压的系统评价[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35 (1): 111-116.
- [55] Zhang Y, Lu J, Dai WQ, et al. Combination therapy of ursoderoxycholic acid and corticosteroids for primary biliary cirrhosis with features of autoimmune hepatitis: a meta-analysis [J]. Gastroent Res Pract, 2013, 1-9.
- [56] Agyemang K, Han L, Liu E, et al. Recent advances in Astragalus membranaceus anti-diabetic research: pharmacological effects of its phytochemical constituents [J]. Evid-Based Compl Alt, 2013, 2013654643.
- [57] Liu M, Wu K, Mao X, et al. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice: regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 127 (1): 32-37.
- [58] Wang N, Zhang D, Mao X, et al. Astragalus polysaccharides decreased the expression of PTP1B through relieving ER stress induced activation of ATF6 in a rat model of type 2 diabetes [J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 307 (1): 89-98.
- [59] Mao XQ, Yu F, Wang N, et al. Hypoglycemic effect of polysaccharide enriched extract of Astragalus membranaceus in diet induced insulin resistant C57BL/6J mice and its potential mechanism [J]. Phytomedicine, 2009, 16 (5): 416-425.
- [60] Yang ZM, Wang Y, Chen SY. Astragalus polysaccharide alleviates type 2 diabetic rats by reversing the glucose transporters and sweet taste receptors/GLP-1/GLP-1 receptor signaling pathways in the intestine-pancreatic axis [J]. J Funct Foods, 2021, 76: 104310.
- [61] Cui K, Zhang SB, Jiang X, et al. Novel synergic antidiabetic effects of Astragalus polysaccharides combined with Crataegus flavonoids via improvement of islet function and liver metabolism [J]. Mol Med Rep, 2016, 13 (6): 4737-4744.
- [62] Zhu YF, Su YF, Zhang J, et al. Astragaloside IV alleviates liver injury in type 2 diabetes due to promotion of AMPK/mTOR-mediated autophagy [J]. Mol Med Rep, 2021, 23 (6): 1791-3004.
- [63] Li XY, Shen L, Ji HF. Astragalus alters gut-microbiota composition in type 2 diabetes mice: clues to its pharmacology [J]. Diabet Metab Syndr Ob, 2019, 12: 771-778.
- [64] Zhang Y, Tao C, Xuan C, et al. Transcriptomic analysis reveals the protection of astragaloside IV against diabetic nephropathy by modulating inflammation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 9542165.
- [65] Sun S, Yang S, An N, et al. Astragalus polysaccharides inhibits cardiomyocyte apoptosis during diabetic cardiomyopathy via the endoplasmic reticulum stress pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 238: 111857.

(收稿日期: 2022-03-26; 修回日期: 2022-06-16)

欧洲医药保健网分类系统在产科药物相关问题中的应用

孙玉鹤¹, 吕景娣², 王婷³, 丁楠^{4*}, 毕娟^{4*} (1. 郑州市第二人民医院药学部, 郑州 450000; 2. 驻马店市中心医院药学部, 河南 驻马店 463300; 3. 安徽医科大学第一附属医院高新区药剂科, 合肥 230088; 4. 海军军医大学长海医院药学部, 上海 200433)

摘要: **目的** 探讨欧洲医药保健网 (Pharmaceutical Care Network Europe, PCNE) 分类系统在产科药物相关问题 (DRPs) 中的应用。**方法** 采用 PCNE 分类系统 (9.1 版) 对产科患者进行药学监护, 分析其中的 DRPs, 并对存在的 DRPs 进行系统的分析、归类及干预, 实现持续的药学监护模式。**结果** 药师借助 PCNE 系统快速判断, 并通过告知医师或患者、与医师协同制订药物治疗方案等措施进行干预。**结论** PCNE 分类系统有助于实现药学监护模式的精准化与标准化。临床药师以 PCNE 分类系统为依托, 建立完善的药学监护系统, 精确分析 DRPs, 促进合理用药, 保障药物对母体、胎儿及婴儿的安全。

关键词: 欧洲医药保健网; 药物相关问题; 产科患者; 药学监护

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2420-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.036

作者简介: 孙玉鹤, 女, 硕士, 主管药师, 妇产专业临床药师, 主要从事医院药学研究, email: 645578556@qq.com *通信作者: 丁楠, 女, 主管药师, 主要从事妊娠哺乳期用药门诊评估方面研究, email: 609123572@qq.com; 毕娟, 女, 主管药师, 主要从事妇产科用药安全研究, email: bjfclys@163.com

Role of classification system in Pharmaceutical Care Network Europe in the drug related problems in the Obstetrics Department

SUN Yu-he¹, LYU Jing-di², WANG Ting³, DING Nan^{4*}, BI Juan^{4*} (1. Department of Pharmacy, Zhengzhou Second Hospital, Zhengzhou 450000; 2. Department of Pharmacy, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian Henan 463300; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University High-tech Zone, Hefei 230088; 4. Department of Pharmacy, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433)

Abstract: Objective To determine the role of Pharmaceutical Care Network Europe (PCNE) classification system in drug related problems (DRPs) in the Obstetrics Department. **Methods** The PCNE (version 9.1) classification system was used to provide pharmaceutical care to obstetrics patients, and DRPs were analyzed. To achieve a coherent pharmaceutical care model, systematic and standardized analysis was used for the existing drug-related problems, and the problems were classified and intervened. **Results** Pharmacists used the PCNE system to quickly judge and intervene by informing doctors or patients, and collaborating with doctors to formulate drug treatment programs. **Conclusion** PCNE system helps realize the precision and standardization of pharmaceutical care model. Clinical pharmacists can establish a perfect pharmacy monitoring system based on the PCNE classification system, and analyze the DRPs which promotes rational medication use and ensures the drug safety for mothers and infants.

Key words: Pharmaceutical Care Network Europe; drug related problem; obstetrics patient; pharmaceutical care

妊娠期和哺乳期用药存在普遍性，随着女性生育年龄增高及生育时间延长，有调查显示，我国妊娠期平均用药比例为 75.9%^[1]，社会、家庭对这一群体用药都十分关注。随着女性生育年龄增大，内科合并症的比例增加，其妊娠期、哺乳期用药更为复杂，药物相关问题 (drug related problems, DRPs) 的发生率也不断增加。妊娠期及哺乳期特殊的生理状态及药物对胎儿、幼儿安全性具有不明确，临床医师在开具医嘱时存在疑虑。

患者的用药管理是一个复杂的过程，存在一定的医源性风险，尤其对产科患者，药物的安全性、有效性及患者依从性均是合理用药的重要内容。欧洲医药保健网 (Pharmaceutical Care Network Europe, PCNE) 在 1994 年建立了 PCNE 分类系统，该分类系统经过多次修改和不断完善，至今已发展成为相对成熟的分类工具。PCNE 分类系统能够更加清楚和完整分类所有 DRPs^[2]，并为 DRPs 提供科学、清晰的划分标准，实用性强，为药学监护工作的开展提供了新思路^[3]。本文采用 PCNE 分类系统 (9.1 版) 对产科患者药学监护中典型的 DRPs 进行分析，探讨 PCNE 分类系统在药学监护中的作用，促进临床合理用药，减少

DRPs 的发生。

1 PCNE 分类系统概述与方法

PCNE 分类系统主要有 5 个部分：① 问题 (problem, P)；② 原因 (cause, C)；③ 介入方案 (intervention, I)；④ 介入方案的接受 (acceptance, A)；⑤ DRPs 状态 (outcome, O)。每一部分均包含详细的二、三级目录。在分析 DRPs 时，通过 PCNE 分类系统依次分析每一部分，并对相应内容进行勾选，实现对 DRPs 的定性和研究。临床药师在参与产科查房过程中，通过收集患者用药信息，识别 DRPs，根据 PCNE 分类系统 (9.1 版) 对 DRPs 的问题 (3 个方面) 及原因 (9 个方面) 进行分析，从医师、患者、药物等层面提供介入方案 (5 个方面)，随访介入方案的接受程度 (3 个方面) 和 DRPs 状态 (4 个方面)。一个问题可以有多个原因、导致多个介入方案，但只会有一个解决状态。运用 PCNE 分析 DRPs 的流程见图 1。

2 采用 PCNE 分类系统进行药学监护

2.1 妊娠期用药安全性

妊娠期是女性特殊的生理过程，在此过程中由于病理、生理或意外情况，用药的现象非常普遍。妊娠期用药需要考虑药物对母体的治疗作用和对胎

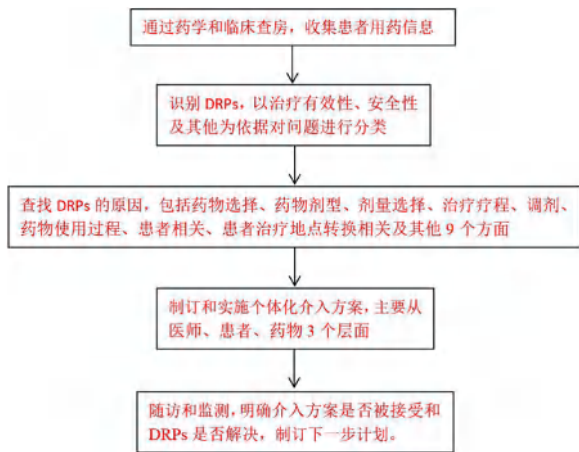


图 1 运用 PCNE 分类系统分析 DRPs 的流程

Fig 1 Process for analyzing DRPs by the PCNE classification system

儿的潜在影响, 这取决于很多因素, 如药物种类、剂量、疗程和暴露时间及妊娠期药物的代谢特点等, 药物的固有属性是妊娠期用药安全的首要考虑因素。

例 1: 患者, 女, 25 岁, 因停经 37⁺² 周, 间断性上腹部疼痛 3 d 入院, 入院诊断: ①孕 37⁺² 周 G3P0 LOA 先兆临产; ②上腹部疼痛原因待查: 急性胆囊炎? 入院血生化检查: 谷丙转氨酶 112 U·L⁻¹, 谷草转氨酶 66 U·L⁻¹, 碱性磷酸酶 531 U·L⁻¹, γ -谷氨酸转氨酶 93 U·L⁻¹, 总胆红素 60.8 μ mol·L⁻¹, 未结合胆红素 21.7 μ mol·L⁻¹, 结合胆红素 17.7 μ mol·L⁻¹。腹部 B 超显示: 胆囊内胆汁淤积。给予患者熊去氧胆酸胶囊和多烯磷脂酰胆碱注射液降酶保肝治疗。

采用 PCNE 分类系统进行分析, 首先明确问题分类。治疗妊娠期肝内胆汁淤积症可选用熊去氧胆酸, 对肝酶水平升高的患者可加用护肝药物^[4]。多烯磷脂酰胆碱通过使受损的肝功能和肝酶恢复正常、调节肝脏能量平衡、促进肝细胞再生等途径起到保肝作用, 可用于治疗妊娠期肝内胆汁淤积症合并肝酶异常^[5]。但多烯磷脂酰胆碱注射液含有苯甲醇, 国家药监局关于修订多烯磷脂酰胆碱注射液说明书的公告(2020 年第 60 号)指出苯甲醇可能会透过胎盘屏障, 不建议孕妇使用, 也有研究指出苯甲醇分子量(108 Da)较低, 其注射剂妊娠期应禁用^[6]。结合该患者确定其 DRPs 为治疗安全性(P2)中(可能)发生药物不良事件(P2.1), 原因是药物剂型(C2)中药物剂型不适宜(C2.1)。明确原因后, 临床药师在医师层面(I1)提供介入方案给医师(I1.3)进行干预, 建议临床医师将多烯磷脂酰胆碱注射剂更换为安全性较好的口服制剂如多烯磷脂酰胆碱胶囊, 也可换用其他药物如丁二磺酸腺苷

蛋氨酸。在干预接受方面为干预被接受(A1)并完全执行(A1.1), 停用多烯磷脂酰胆碱注射剂, 加用丁二磺酸腺苷蛋氨酸。药物治疗 10 d 后患者肝功能较前明显好转后出院。

2.2 用药疗程

用药疗程是指结合患者病情用药一定时间, 然后再决定是否开始新的治疗方案, 妊娠期女性补铁治疗需要按疗程用药。

例 2: 患者, 女, 33 岁, 因停经 31 周, 产检胎心基线偏高 2 d 入院。入院诊断: ①胎儿窘迫? ②单绒双羊双胞胎妊娠; ③中度缺铁性贫血; ④孕 31 周 G1P0 双胎头位/头位。入院后患者病情平稳, 胎心、胎动正常, 胎监反应型, 生物物理评分 10 分。患者孕 26 周: 铁 3.89 μ mol·L⁻¹, 不饱和铁结合力 80.23 μ mol·L⁻¹, 总铁结合力 84.12 μ mol·L⁻¹, 转铁蛋白饱和度 4.6%, 诊断为缺铁性贫血, 因患者无法耐受口服铁剂, 给予调整饮食结构, 其他未予特殊处理。孕 30⁺² 周: 血红蛋白 98 g·L⁻¹。孕 31⁺² 周: 血红蛋白 89 g·L⁻¹、铁蛋白 10.52 μ g·L⁻¹, 铁 4.34 μ mol·L⁻¹, 不饱和铁结合力 74.50 μ mol·L⁻¹, 总铁结合力 78.84 μ mol·L⁻¹, 转铁蛋白饱和度 5.5%。此次患者孕 31⁺³ 周入院接受蔗糖铁注射液 0.2 g qod ivgtt 治疗, 累积补铁 1 g。患者孕 32⁺⁵ 周复查静脉补铁治疗效果: 铁蛋白 531.99 μ g·L⁻¹, 铁 42.72 μ mol·L⁻¹, 不饱和铁结合力 9.37 μ mol·L⁻¹, 总铁结合力 52.09 μ mol·L⁻¹, 转铁蛋白饱和度 82.0%, 血红蛋白 86 g·L⁻¹。血清铁及铁代谢指标异常升高、血红蛋白变化不大, 临床医师咨询药师是否继续静脉补铁治疗。

采用 PCNE 分类系统进行分析, 首先明确问题分类。妊娠期孕妇血容量增加及胎儿生长发育均需要铁剂, 妊娠晚期对铁的需求达高峰, 而来源于食物的铁剂吸收有限, 因此缺铁性贫血较为常见, 占妊娠期贫血的 95%^[7]。对于不能耐受口服铁剂者可选择注射铁剂, 注射铁剂的用量可根据公式计算: 总注射铁剂量(mg) = 体质量(kg) × (Hb 目标值 - Hb 实际值)(g·L⁻¹) × 0.24 + 储存铁量(mg); 储存铁量 = 500 mg^[8]。结合该患者计算得静脉补铁量为 47.5 × (110 - 89) × 0.24 + 500 = 739.4 mg。根据铁需求简化量表^[9], 对于血红蛋白 < 100 g·L⁻¹, 体质量 50 ~ 70 kg 的患者, 可给予 1500 mg 静脉补充铁剂。在临床实践中, 一般将元素铁的剂量固定在 1000 mg 左右, 既可纠正贫血(典型的红细胞缺铁的缺铁

量为 500 ~ 1000 mg), 还能提供额外的铁储备, 同时也不会引起铁过载^[10]。结合该患者确定其 DRPs 问题属于治疗效果 (P1) 中的治疗效果不佳 (P1.2), 即患者静脉补铁后, 血红蛋白持续偏低, 铁代谢指标异常偏离正常值。原因是其他 (C9) 中没有适当的疗效监测 (C9.1)。临床药师分析静脉补充铁剂会干扰大多数铁代谢检测, 一般建议在治疗后 4 ~ 8 周复查铁代谢指标^[11]。明确原因后, 临床药师给予在医师层面 (I1) 医师请药师会诊 (I1.2) 进行干预。药师建议目前该患者静脉补铁 1000 mg, 可停静脉补铁, 4 周后复查血常规及铁代谢指标。在干预接受方面为干预被接受 (A1) 并完全执行 (A1.1), 即给予该患者停用静脉铁剂并出院。4 周后复查, 患者: 铁 $14.55 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 不饱和铁结合力 $40.78 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 总铁结合力 $55.33 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 转铁蛋白饱和度 26.3%, 血红蛋白 $109 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。血清铁及其代谢产物检测值升高且在正常范围, 血红蛋白也明显升高。

2.3 药物相互作用

临床上多药联用的情况非常普遍, 药物间发生相互作用, 可导致药效降低或失效, 不良反应甚至毒性增加等。药物间的相互作用往往比较隐匿, 临床应用过程中容易忽视, 常常在对患者造成有害影响时才被关注。临床药师在参与临床治疗的过程中, 可以充分运用所掌握的药学知识, 对患者用药进行重整, 发现潜在药物相互作用并及时给予临床合理化建议, 确保患者用药安全。

例 3: 患者, 女, 29 岁, 因停经 9^{+2} 周, 间断性呕吐 1 个月, 加重 1 周入院, 入院诊断: ①妊娠剧吐; ②妊娠期甲状腺毒症; ③宫内孕 9^{+2} 周 G1P0; ④ IVF-ET 术后; ⑤双胎妊娠。患者特发性高催乳素血症 3 年, 入院时在服甲磺酸溴隐亭片 ($2.5 \text{mg}/\text{片}$) $1 \text{片} \cdot \text{d}^{-1}$ 。入院后给予甲氧氯普胺、维生素 B₆ 等止吐、补液治疗。

采用 PCNE 分类系统进行分析, 首先明确问题分类, 结合患者确定该问题属于治疗安全性 (P2) 中可能发生药物不良事件 (P2.1)。甲磺酸溴隐亭片为多巴胺受体激动剂, 甲氧氯普胺为多巴胺受体拮抗剂, 两者均可作用于下丘脑多巴胺受体, 存在药理学上的拮抗作用, 可能发生药物不良事件。原因是药物选择 (C1) 中不适当的组合 (C1.3), 药师分析甲磺酸溴隐亭片为多巴胺 D1、D2 受体激动剂, 与多巴胺受体结合, 可抑制催乳素的合成和分泌, 是治疗高催乳素血症最常用的药物。溴隐亭可通过胎盘, 原则上妊娠期胎儿暴露于药物的时间应

尽量缩短, 不推荐整个妊娠期服用溴隐亭, 除非是未经治疗的大腺瘤伴有视交叉压迫症状的患者服用溴隐亭后妊娠才考虑整个妊娠期使用溴隐亭^[12], 现有资料建议一旦妊娠, 应停止使用本药^[13]。妊娠剧吐发生于妊娠早期, 甲氧氯普胺在整个孕期均适用, 没有证据显示对胚胎、胎儿、新生儿有不良影响^[14], 美国妇产科医师学会 (ACOG) 指南将甲氧氯普胺作为妊娠呕吐二线用药^[7]。明确原因后, 临床药师在医师层面 (I1) 与医师讨论介入方案 (I1.4) 进行干预。药师建议停用溴隐亭, 既可避免药物对胎儿的潜在影响, 也可减少药物间的相互作用。在干预接受方面为干预被接受 (A1) 并完全执行 (A1.1), 临床医师关注到溴隐亭片和甲氧氯普胺存在药理上的拮抗作用, 并经内分泌科、生殖中心会诊后停用溴隐亭片。

2.4 哺乳期用药

对于哺乳期女性, 因服药拒绝哺乳的现象较为普遍, 药物本身的结构、性质及给药途径等均会影响药物进入乳汁的含量, 中断母乳对母亲及婴幼儿来说均不是第一选择, 是否继续母乳喂养应充分考虑药物、母体疾病及婴幼儿月龄等因素。临床药师在对患者进行用药宣教时, 提供合理性建议, 帮助患者把握好疾病治疗与母乳喂养之间的关系。

例 4: 患者, 女, 34 岁, 因“停经 36^{+3} 周, 产检发现血压升高”入院, 入院诊断: ①孕 36^{+3} 周 G3P1 LOA 先兆临产; ②妊娠期高血压; ③瘢痕子宫; ④系统性红斑狼疮 (SLE); ⑤房性早搏; ⑥高脂血症。7 年前该患者诊断为 SLE, 孕期口服硫酸羟氯喹片 0.2g bid , 醋酸泼尼松片 10mg qd , 阿司匹林 75mg qd 。入院后停用阿司匹林, 孕 37^{+3} 周剖宫产一男婴, 新生儿一般状况良好。从手术当日开始, 激素调整情况依次为甲泼尼龙 40mg qd ivgtt (3 d), 甲泼尼龙 20mg qd ivgtt (3 d), 泼尼松片 15mg qd po (10 d), 之后恢复至泼尼松片 10mg qd po , 羟氯喹的用法用量无调整。患者咨询, 服用羟氯喹和泼尼松期间是否可以哺乳? 何时能够哺乳?

采用 PCNE 分类系统进行分析, 首先明确问题分类, 结合患者确定该问题属于治疗安全性 (P2) 中可能发生药物不良事件 (P2.1), 原因是其他 (C9) 中其他原因 (C9.2), 即患者担心药物对新生儿产生不良影响。明确原因后, 临床药师给予在患者层面 (I2) 聆听患者药物咨询 (I2.1) 进行干预。对无禁忌的 SLE 患者, 推荐长期使用羟氯喹作为基础治疗, 羟氯喹可降低妊娠期和产后 SLE

的复发^[15]，妊娠期和哺乳期均可服用羟氯喹^[16]。羟氯喹的哺乳分级为 L2 级，可分泌进入乳汁，其相对婴儿剂量 (RID) = 2.9%，因其分布容积较大 (8.3 ~ 11.6 L · kg⁻¹)，故母乳中含量较低，美国儿科学会认为哺乳期可以使用，目前没有其经乳汁导致婴儿不良反应的报道^[17]。激素类药物泼尼松龙、泼尼松、甲泼尼松龙即使在每次 1 g 且连续 2 周的高剂量，也不应限制母乳喂养，当重复给予高剂量时，建议等待 3 ~ 4 h 再母乳喂养^[18]。SLE 患者口服泼尼松或甲基泼尼松龙可以进行母乳喂养，但对于服用泼尼松剂量超过 20 mg · d⁻¹ 或相当剂量者，应弃去服药后 4 h 内的乳汁，并在服药 4 h 后再进行哺乳^[19]。泼尼松的哺乳分级为 L2 级，半衰期为 2 ~ 3 h，血浆达峰时间为 1 ~ 2 h，乳汁中达峰时间为 1 h，相对婴儿剂量为 1.8% ~ 5.3%。

用药 4 h 后哺乳，可减少婴儿的摄入量，尽可能减少药物暴露的程度和持续时间，目前没有经乳汁导致婴儿不良反应的报道^[17]。因此，药师认为羟氯喹不影响哺乳；建议甲泼尼松治疗期间，停药 4 h 后再哺乳，同时排空乳房。当激素治疗调整为泼尼松后，不必刻意暂停哺乳，为尽可能减少药物对婴儿的影响，可在服药前或口服药物后立即哺乳。

在干预接受方面为干预被接受 (A1) 并完全执行 (A1.1)。通过临床药师的讲解，消除了患者对用药后不能哺乳的错误观念，帮助患者树立在治疗自身疾病的前提下，坚持母乳喂养的信心，同时注意母亲服药与哺乳的技巧，降低药物对婴儿潜在的不良影响。

采用 PCNE 分类系统对 4 例产科患者 DRPs 的分析情况汇总见表 1。

表 1 4 例产科患者 DRPs 分析及干预情况
Tab 1 Analysis and intervention of DRPs in 4 obstetrics patients

	分类	问题	病例 1	病例 2	病例 3	病例 4
问题	P1 治疗效果	P1.2 治疗效果不佳	否	是	否	否
	P2 治疗安全	P2.1 (可能) 发生药物不良事件	是	否	是	是
原因	C1 药物选择	C1.3 不适当的组合	否	否	是	否
	C2 药物剂型	C2.1 剂型不适宜 (对该患者而言)	是	否	否	否
	C9 其他	C9.1 没有进行或没有适当的疗效监测	否	是	否	否
		C9.2 其他原因	否	否	否	是
介入方案	I1 医师层面	I1.2 医师请药师会诊	否	是	否	否
		I1.3 提供介入方案给医师	是	否	否	否
		I1.4 与医师讨论介入方案	否	否	是	否
	I2 患者层面	I2.1 患者 (药物) 咨询				是
接受程度	A1	A1.1 接受介入方案并完全执行	是	是	是	是
DRP 状态	O1	O1.1 问题已全部解决	是	是	是	是

3 讨论

随着生活观念的转变，晚婚晚育及高龄孕产妇越来越多，孕产妇合并症也会随之增加，其妊娠哺乳期用药也更为复杂，医师、患者及家属对妊娠哺乳期用药均有疑虑。一方面是因为妊娠哺乳期患者用药存在多样性和复杂性，药物对胎儿及新生儿的安全性尚不明确甚至存在危险；另一方面临床专科化程度的提高，医师在跨专科用药方面可能存在不足，由此导致妊娠哺乳期患者因担心药物对胎儿的影响而拒绝用药的现象较为常见。临床药师如何发挥药学专业特长，发现潜在的 DRPs，开展标准化药学监护成为目前亟待解决的问题。各国对于 DRPs 的理解不同，目前尚无统一的分类标准，PCNE 分类系统为 DRPs 提供了一个科学、细致、清晰的划分标准，相较其他分类系统实用性更强。PCNE 分类系统最大的优势在于能够将治疗过程中

的 DRPs 和原因明确区分，药师可借助该系统进行详细的 DRPs 分类分组和有针对性的干预^[3]。国内已有研究证实，在肿瘤科、呼吸科、心内科等患者中使用 PCNE 分类系统对 DRPs 进行分析，帮助临床药师明确 DRPs 并及时干预，促进临床合理用药^[20-22]。国外基于 PCNE 分类系统分析门诊及住院患者的 DRPs 并提出介入方案，干预措施总体接受率高，药学服务效果良好^[23-24]。

本研究中 4 个病例均为产科患者且存在合并疾病，采用 PCNE 分类系统分析后发现，产科患者发生的 DRPs 集中在药物对胎儿的安全性和对母体治疗的有效性。一项横断面、多中心研究发现产科病房中 40% 的女性存在 DRPs，患者及家属对妊娠哺乳期使用药物对胎儿或新生儿的安全性存在担忧^[25]。本文临床药师采用 PCNE 分类系统对产科患者 DRPs 进行系统性描述、分析，并进行有效干

预, 从妊娠期用药安全性、用药疗程、药物相互作用、哺乳期用药四个方面进行监护, 避免潜在的 DRPs 发生。在临床实际工作中, 作者将 PCNE 分类系统应用于产科 DRPs 中, 有效促进了妊娠期、哺乳期患者合理用药, 保障胎儿及婴幼儿安全。

临床药师以 PCNE 分类系统为依托, 可实现在药学监护过程中发现问题 - 分析问题 - 解决问题 - 评价结果的闭环管理, 使得药学监护模式趋于标准化、规范化, 医师及患者接受度高。此次研究发现, 运用 PCNE 分类系统, 可从用药安全性、用法用量及药物相互作用等方面发现潜在的 DRPs, 进而优化产科患者治疗方案。在以后的研究中, 可考虑将 PCNE 分类系统与医院信息系统结合, 建立 DRPs 数据库, 更快提高药师专业基础知识素养, 发挥临床药师专长, 在实践中发现、解决、预防潜在的或者实际存在的临床用药问题, 减少 DRPs 的发生, 为患者提供药学支持。

参考文献

- [1] 张川, 张伶俐, 陈力, 等. 妊娠期用药调查研究的系统评价 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47 (11): 858-862.
- [2] Yailian AL, Revel E, Tardy C, et al. Assessment of the clinical relevance of pharmacists' interventions performed during medication review in a rheumatology ward [J]. Eur J Intern Med, 2019, 59: 91-96.
- [3] 李慧馨, 蔡俊, 张雨昇, 等. 欧洲药学监护联盟分类系统在住院患者药物相关问题中的应用研究进展 [J]. 临床药物治疗杂志, 2021, 19 (4): 72-75.
- [4] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠期肝内胆汁淤积症诊疗指南 (2015) [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31 (10): 1575-1578.
- [5] 多烯磷脂酰胆碱肝病临床应用专家委员会. 多烯磷脂酰胆碱在肝病临床应用的专家共识 [J]. 临床消化病杂志, 2017, 29 (6): 331-338.
- [6] Gerald GB, Roger KF, Craig VT, et al. Drugs in pregnancy and lactation [M]. 11th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017: 269-271.
- [7] 徐丛剑, 华克勤. 实用妇产科学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 248.
- [8] 中华医学会围产医学分会. 妊娠期铁缺乏和缺铁性贫血诊疗指南 [J]. 中华围产医学杂志, 2014, 17 (7): 451-454.
- [9] 中华医学会血液学分会红细胞疾病 (贫血) 学组. 静脉铁剂应用中国专家共识 (2019) [J]. 中华血液学杂志, 2019, 40 (5): 358-362.
- [10] 钟华 (译). 成人缺铁性贫血的治疗 [Z]. Uptodate, 2021.07.
- [11] Kitsati N, Liakos D, Ermeidi E, et al. Rapid elevation of transferrin saturation and serum hepcidin concentration in hemodialysis patients after intravenous iron infusion [J]. Haematologica, 2015, 100 (3): 80-83.
- [12] 中华医学会妇产科学分会内分泌学组. 女性高催乳素血症诊治共识 [J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51 (3): 161-168.
- [13] 乔杰, 马彩虹, 刘嘉茵, 等. 辅助生殖促排卵药物治疗专家共识 [J]. 生殖与避孕, 2015, 35 (4): 211-222.
- [14] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠剧吐的诊断及临床处理专家共识 [J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50 (11): 801-804.
- [15] 中华医学会风湿病学分会. 2020 中国系统性红斑狼疮诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2020, 59 (3): 172-185.
- [16] Julia F, Sonia P, Alice H, et al. BSR and BHPR guideline on prescribing drugs in pregnancy and breastfeeding—Part I: standard and biologic disease modifying anti-rheumatic drugs and corticosteroids [J]. Rheumatology, 2016, 55 (9): 1693-1697.
- [17] 托马斯. W. 黑尔, 希拉里. E. 罗. 药物与母乳喂养 [M]. 17 版. 上海: 上海世界图书出版公司, 2019: 722-723.
- [18] 吴效科, 黄志超 (译). 孕期与哺乳期用药 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 2021: 556-557.
- [19] 中国系统性红斑狼疮研究协作组专家组. 中国系统性红斑狼疮患者围产期管理建议 [J]. 中华医学杂志, 2015, 95 (14): 1056-1060.
- [20] 吕丹, 李玲, 胡学谦, 等. 欧洲医药保健网分类系统在肿瘤科药物相关问题中的应用 [J]. 中国药师, 2017, 20 (12): 2198-2200.
- [21] 瞿慧君, 廖赟, 李琴, 等. 欧洲医药保健网分类系统用于解决呼吸科药物相关问题的效果 [J]. 中国药房, 2018, 29 (2): 276-279.
- [22] 郭小易, 刘安昌. PCNE 分类体系在心内科药物相关问题中的探索与实践 [J]. 现代医药卫生, 2021, 37 (4): 576-583.
- [23] Kusumawardani LA, Andrajati R, Nusaibah A. Drug-related problems in hypertensive patients: a cross-sectional study from indonesia [J]. J Res Pharm Pract, 2020, 9 (3): 140-145.
- [24] Nielsen TRH, Andersen SE, Rasmussen M, et al. Clinical pharmacist service in the acute ward [J]. Int J Clin Pharm, 2013, 35 (6): 1137-1151.
- [25] Smedberg J, Brathen M, Waka MS, et al. Medication use and drug-related problems among women at maternity wards—a cross-sectional study from two Norwegian hospitals [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2016, 72 (7): 849-857.

(收稿日期: 2022-03-19; 修回日期: 2022-05-19)

基于 RIGHT 膀胱癌临床实践指南报告质量研究

张爱玲¹, 罗旭飞², 李朵璐¹, 时程程¹, 李纳¹, 陈耀龙^{2, 3}, 周玉冰^{1*} (1. 郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450052; 2. 兰州大学公共卫生学院, 兰州 730000; 3. 兰州大学基础医学院循证医学中心, 兰州 730000)

摘要: **目的** 采用 RIGHT 对膀胱癌临床实践指南的报告质量进行评价, 为医师临床决策提供参考。**方法** 计算机检索 PubMed、EMbase、The Cochrane Library、中国生物医学文献数据库、中国知网、万方、医脉通、NICE、SIGN 和 GIN 等数据库和指南相关网站, 查找关于膀胱癌的临床实践指南。由两位研究者独立筛选文献、提取资料, 采用 RIGHT 清单评估指南报告质量。**结果** 共纳入 17 部膀胱癌临床实践指南, 17 部指南的报告率介于 17.1% ~ 82.9%, 平均报告率为 52.8%; 纳入指南的 7 个领域的平均报告率分别为 56.9%、57.4%、54.1%、58.8%、17.6%、51.5% 和 41.2%; 仅一部指南报告了条目 17: 应描述指南是否经过了质量控制程序, 如果是, 则描述其过程。**结论** 膀胱癌临床实践指南的报告质量仍有待提高, 建议膀胱癌指南制订者严格按照 RIGHT 清单规范、全面报告指南信息和推荐意见, 提高膀胱癌指南报告的质量。

关键词: 膀胱癌; RIGHT 清单; 报告质量; 临床实践指南

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2426-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.037

Evaluation of the reporting quality of clinical practice guidelines on bladder cancer with RIGHT checklist

ZHANG Ai-ling¹, LUO Xu-fei², LI Duo-lu¹, SHI Cheng-cheng¹, LI Na¹, CHEN Yao-long^{2, 3}, ZHOU Yu-bing^{1*} (1. *Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052*; 2. *School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000*; 3. *Evidence-based Medicine Center, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000*)

Abstract: Objective To assess the reporting quality of clinical practice guidelines on bladder cancer by RIGHT to provide a reference for physicians' clinical decisions. **Methods** We searched PubMed, EMbase, and the Cochrane Library, CBM, CNKI, Wanfang, Medlive, National Institute for Health and Care Excellence (NICE), Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) and Guidelines International Network (GIN). Two researchers independently screened the literature and cross-checked, and then evaluated the reporting quality of bladder cancer guidelines with RIGHT. **Results** Totally 17 bladder cancer clinical practice guidelines were included, and reporting rates for the 17 guidelines ranged 17.1% ~ 82.9%, with an average reporting rate of 52.8%. The average reporting rates of the 7 domains of the guidelines were 56.9%, 57.4%, 54.1%, 58.8%, 17.6%, 51.5% and 41.2%, respectively. Besides, only one guideline reported item 17: namely whether the guideline was subjected to a quality control process. If yes, the process should be described. **Conclusion** The reporting quality of clinical practice guidelines for bladder cancer needs improvement. It is recommended that guideline developers strictly follow the RIGHT checklist to standardize and comprehensively report information to improve the reporting quality of guidelines for bladder cancer. **Key words:** bladder cancer; reporting item for practice guidelines in healthcare checklist; reporting quality; clinical practice guideline

基金项目: 白求恩·求索-药学科研能力建设项目 (No.B-19-H-20200622)。

作者简介: 张爱玲, 女, 主管药师, 主要从事临床药学与循证药学研究, email: ailing87613@163.com *通信作者: 周玉冰, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事肿瘤临床药学研究, email: fcczhouyb@zzu.edu.cn

膀胱癌是常见的癌症。据 2020 年全球癌症统计结果显示, 每年膀胱癌新增病例约 57.3 万人, 死亡约 21.3 万人^[1], 男性的发病率和死亡率均高于女性^[1]。然而, 一项荟萃分析显示女性患者病情更严重且存活率更低^[2]。大量研究表明, 烟草、化学试剂的职业暴露、放射治疗、饮食、膀胱血吸虫病、慢性尿路感染、性别和遗传可能是膀胱癌的危险因素^[2-7]。此外, 膀胱癌好发于老年人^[1], 随着老龄化的加剧, 膀胱癌可能成为严重影响人类寿命的疾病之一^[8]。因此, 制订高质量的膀胱癌临床实践指南是世界各国应对该问题的最佳选择之一。

众所周知, 标准化的指南可帮助医师更快、更准确地掌握疾病, 并根据指南做出全面客观的决策。尽管一些国家制订了膀胱癌临床实践指南, 但这些指南的质量参差不齐, 仍需要对指南的质量进行评价。目前仅有两种关于指南评价的工具, 分别是 AGREE II (the Appraisal of guidelines for Research and Evaluation)^[9] 和 RIGHT (the reporting items for practice guidelines in Healthcare)^[10], 现已有采用 AGREE II 工具评价膀胱癌临床实践指南的报道^[11]。但是, 目前尚无采用 RIGHT 清单对膀胱癌临床实践指南的质量进行评价的研究。本研究采用 RIGHT 工具评估膀胱癌的临床实践指南报告质量, 以期为临床医师的决策提供参考。

1 资料与方法

1.1 检索策略

计算机检索 PubMed、EMbase、The Cochrane Library、中国生物医学文献数据库、中国知网和万方数据库; 指南相关网站如医脉通、英国国家卫生与临床优化研究所 (National Institute of Clinical Evidence, NICE)、苏格兰学会联合指南网络 (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, SIGN)、国际指南协作网 (Guidelines International Network, GIN)、美国国立指南文库 (National Guideline Clearinghouse, NGC); 同时手动检索百度、谷歌学术搜索引擎; 检索时限均从建库至 2021 年 10 月 27 日。检索词为 “Bladder cancer” “Clinical practice guideline” 及其相应的不同表达方式; 同时结合自由词和各数据库的主题词, 运用逻辑符、通配符和范围运算符等制订检索策略。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ① 国内外公开发表的有关膀胱癌的临床指南 (最新版本); ② 关于膀胱癌的推荐意见的指南信息相对完整, 包括名称、目录、推

荐意见、证据级别等详细信息; ③ 指南存在多个版本时选择最新版本; ④ 语种限定为中文或英文。

排除标准: ① 信件、个案、综述、会议摘要、社论、简短调查、临床试验、机制研究; ② 膀胱癌的专家共识或临床规范; ③ 膀胱癌指南摘要或解读; ④ 有更新版的旧版指南; ⑤ 无法获得全文的指南。

1.3 文献筛选与资料提取

按照 RIGHT 清单设计资料提取表, 由两名研究者独立完成文献筛选和资料提取, 并交叉核对, 若遇到分歧, 交由第三名研究者裁决。提取内容包括指南名称、发布机构、发布年份、更新年份、指南类型、目标人群等。

1.4 指南的质量评价

RIGHT 清单涉及 7 大领域的 35 个条目, 分别为指南的基本信息 (条目 1~4)、背景 (条目 5~9b)、证据 (条目 10a~12)、推荐意见 (条目 13a~15)、评审和质量保证 (条目 16~17)、资金资助与利益冲突声明和管理 (条目 18a~19b)、其他方面 (条目 20~22)。以 “报告” 和 “未报告” 对每个条目进行评价, “报告” 指该条目的相关信息部分或完整呈现; “未报告” 指该条目的相关信息完全缺失。对于 RIGHT 报告率, 并以 60% 作为报告率的合格阈值^[12]。在指南评价前对两位研究者进行 RIGHT 清单的培训, 并完成两轮预试验, 以确保研究人员对每个条目的理解基本一致。两名研究者分别对纳入的指南进行评价, 对于出现分歧的问题可通过协商解决, 否则由第三名研究者裁决。

1.5 统计学方法

采用 Microsoft Excel 2016 版软件对资料进行汇总整理, 计算纳入指南的 RIGHT 清单涉及 7 大领域的 35 个条目的百分比, 用图表表示。

2 结果

2.1 文献检索结果

本文最终检索到 2942 篇文献。去除重复性文献后剩余 2074 篇, 通过筛选最终纳入 17 部指南^[13-29], 文献筛选流程见图 1。

2.2 纳入指南基本特征

膀胱癌临床实践指南特征见表 1, 在发表年份方面, 2018—2021 年间发表较多; 其中有 1 部指南发表于 2014 年、1 部指南发表于 2015 年、1 部指南发表于 2016 年、3 部指南发表于 2018 年、2 部指南发表于 2019 年、3 部指南于 2020 年、6 部指南发表于 2021 年。在发表机构方面, 大多数指南由学会或协会发表 ($n = 15$), 剩余 2 篇指南由政府机构发布。在发表国家方面, 美国 ($n =$

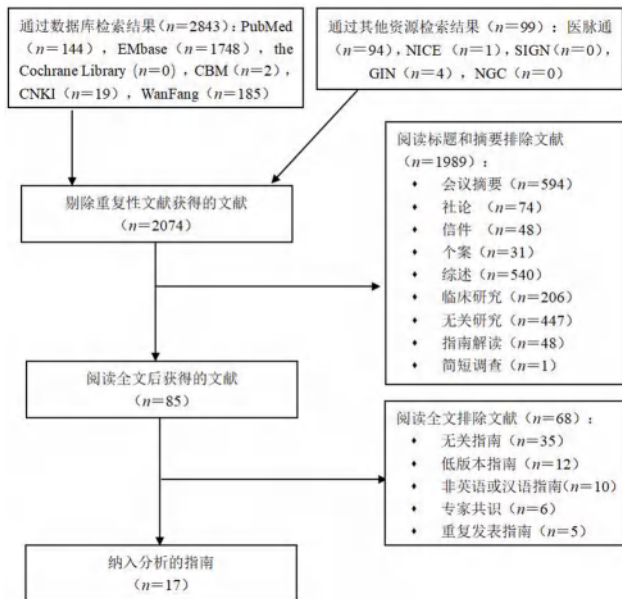


图 1 文献筛选流程图
Fig 1 Flow chart of study selection

4)、欧洲 ($n = 4$) 和中国 ($n = 3$) 发表较多。关于指南资金资助方面, 6 部指南接受政府或社会资助, 9 部指南未报告是否接受资助, 2 部指南未接受资助。在指南更新方面, 9 部指南为原版, 8 部指南有更新版。

2.3 膀胱癌临床实践指南报告质量总体情况

采用 RIGHT 报告清单对 17 部膀胱癌临床实践指南进行评价, 其平均报告率显示 7 个领域中 5 个领域的报告率大于 50% (见图 2), 其中领域一 (基本信息) 为 56.9%, 领域二 (背景) 为 57.4%, 领域三 (证据) 为 54.1%, 领域四 (推荐意见) 为 58.8%, 领域六 (资助与利益冲突声明和管理) 为 51.5%; 而领域五 (评审和质量保证) 和领域七 (其他方面) 分别为 17.6% 和 41.2%。17 部膀胱癌实践指南的 35 个清单条目的报告率介于 17.1% ~ 82.9%, 平均报告率为 52.8% (见表 2)。其中 7 部膀胱癌指南的报告率低于 50%, 4 部指南为 50% ~ 60%, 2 部为 60% ~ 70%, 3 部为 70% ~ 80%, 仅 1 部指南高于 80% (见图 3)。此外, 仅 1 部指南对条目 17 (条目内容: 应描述指南是否经过了质量控制程序, 如果是, 则描述其过程) 进行了报告。

3 讨论

本文采用 RIGHT 报告清单评价 17 部膀胱癌临床实践指南的报告质量, 结果显示指南的报告率介于 17.1% ~ 82.9%, 平均报告率为 52.8%; 整体来看, 领域一、二、四的报告率较高, 领域五和七的报告率较低; 此外, 3、8b、14c、17 和 21 条目的报告率非常低; 由此可以看出指南的报

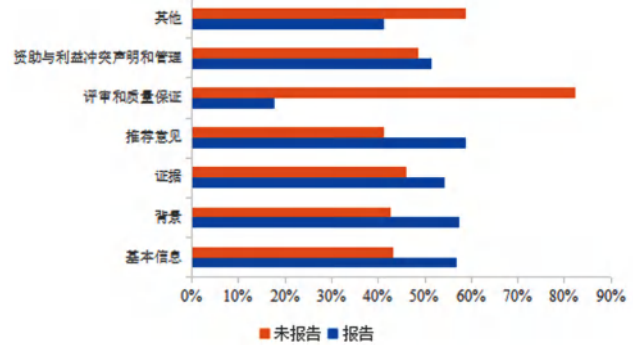


图 2 纳入指南 RIGHT 清单中七大领域的报告率
Fig 2 Reporting rates of the seven RIGHT checklist domains in the included clinical practice guidelines

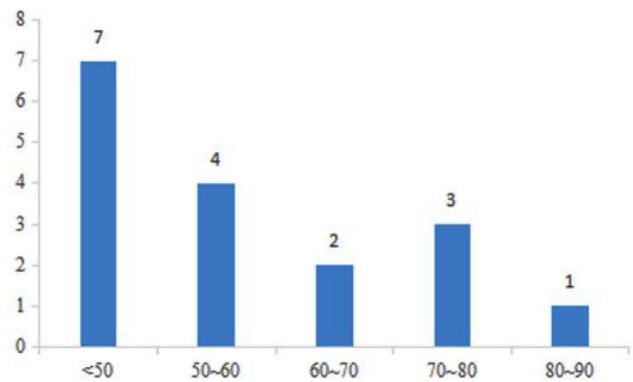


图 3 各个指南总报告率分布图 (%)
Fig 3 Number of guidelines by overall reporting rates (%)

告质量存在较大差异。我们发现美国泌尿外科学会 / 美国放射治疗及肿瘤学会 / 泌尿科肿瘤学会的指南^[14] 和美国泌尿外科协会 / 泌尿外科肿瘤学会^[26] 的指南总报告率较高并且指南推荐意见的报告质量较高, 可以作为临床医师和膀胱癌患者的参考依据。已发表采用 AGREE II 工具对膀胱癌指南评价结果指出指南中方法学质量具有非常大的异质性^[11]; AGREE II 纳入的 16 部指南中, 仅 5 部被作为强推荐, 分别为美国国家综合癌症网络指南、英国国家卫生和临床优化研究所指南、美国泌尿外科学会以及欧洲泌尿外科学会的两部指南。此外, 有研究采用 AGREE II 工具对非肌层浸润性膀胱癌临床实践指南进行评价^[36], 结果发现英国国家卫生和临床优化研究所指南, 美国泌尿外科学会指南, 欧洲泌尿外科学会的临床指南的得分较高。以上的研究结果之间存在部分分歧, 主要是体现在评价结果不同, 最终的推荐意见也不一致, 可能是因为 AGREE II 工具是对指南方法学质量进行评价, 对指南的证据质量和推荐内容的可靠性评价存在不足^[37]; 而 RIGHT 清单是对临床实践指南的报告质量进行评价。因此, 对膀胱癌临床实践指南进行 RIGHT 评价非常有

表 1 纳入指南基本信息特征

Tab 1 Characteristics of the included clinical practice guidelines

指南	国家	年份	发布机构	作者数	目标人群	基金	指南类型
1 ^[13]	欧洲	2014	欧洲肿瘤内科学会	6	膀胱癌	未报告	初始版
2 ^[14]	美国	2020	美国泌尿外科学会 / 美国放射治疗及肿瘤学会 / 泌尿科肿瘤学会	14	非转移性肌肉浸润性膀胱癌	是	初始版
3 ^[15]	加拿大	2021	加拿大泌尿外科协会	19	非肌肉浸润性膀胱癌	未报告	更新版
4 ^[16]	加拿大	2019	加拿大泌尿外科协会	10	肌肉浸润性膀胱癌	未报告	初始版
5 ^[17]	欧洲	2021	欧洲泌尿外科学会	18	上尿路尿路上皮癌	否	更新版
6 ^[18]	中国	2019	中华医学会泌尿外科分会	10	膀胱癌	未报告	更新版
7 ^[19]	中国	2018	中华人民共和国卫健委	NA	膀胱癌	未报告	初始版
8 ^[20]	沙特阿拉伯	2021	沙特肿瘤学会和沙特泌尿外科协会	13	膀胱尿路上皮细胞癌	否	初始版
9 ^[21]	西班牙	2018	西班牙肿瘤内科学会	10	肌肉浸润性和转移性膀胱尿路上皮癌	未报告	初始版
10 ^[22]	日本	2020	日本泌尿外科学会	23	膀胱癌	是	更新版
11 ^[23]	美国	2016	美国临床肿瘤学协会	8	肌肉浸润性和转移性膀胱癌	未报告	初始版
12 ^[24]	中国	2018	中国研究型医院学会泌尿外科专业委员会等	37	非肌肉侵入膀胱癌	是	初始版
13 ^[25]	英国	2015	英国国家卫生和临床优化研究所	15	膀胱癌	未报告	初始版
14 ^[26]	美国	2020	美国泌尿外科协会 / 泌尿外科肿瘤学会	12	非肌肉浸润性膀胱癌	是	更新版
15 ^[27]	欧洲	2021	欧洲泌尿外科学会	15	肌肉浸润性和转移性膀胱癌	是	更新版
16 ^[28]	欧洲	2021	欧洲泌尿外科学会	17	非肌肉浸润性膀胱癌 (TaT1 和 CIS)	是	更新版
17 ^[29]	美国	2021	美国国家综合癌症网络	36	膀胱癌	未报告	更新版

表 2 膀胱癌临床实践指南报告质量评价结果

Tab 2 Reporting quality evaluation of clinical practice guidelines for bladder cancer

领域	纳入指南																	报告	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	率/%	
基本信息	1a 能够通过题目判断为指南	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	100.0
	1b 报告指南的发表年份	否	否	是	否	是	是	是	否	是	是	否	是	是	否	是	是	是	64.7
	1c 报告指南的分类	是	是	是	否	否	是	是	是	否	是	是	是	是	是	是	是	是	82.4
	2 对指南推荐意见进行汇总呈现	否	是	是	否	否	否	否	否	否	是	否	是	是	是	是	是	是	47.1
	3 报告术语定义及缩略语全称	否	否	是	否	否	否	否	否	是	否	是	否	否	否	否	否	否	17.6
	4 通讯指南制订者或作者	是	否	是	否	是	否	否	是	是	是	是	否	是	否	否	否	否	52.9
	报告率/%	50.0	50.0	100.0	16.7	50.0	50.0	50.0	50.0	66.7	66.7	66.7	83.3	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	56.9
背景	5 基本的流行病学	是	是	是	是	是	是	是	是	否	是	否	是	是	是	是	是	是	88.2
	6 指南的总目标和具体要达到的目的	否	是	是	否	是	是	是	否	是	否	是	是	是	是	是	是	是	76.5
	7a 指南拟实施的主要目标人群	否	是	是	否	是	否	否	是	是	否	是	是	是	是	是	是	是	70.1
	7b 指南拟实施的需要特别考虑的亚组人群	否	否	是	否	否	否	否	否	否	是	是	是	否	是	是	是	是	41.1
	8a 指南的主要使用者及其他潜在使用人员	否	是	否	否	否	是	否	是	否	否	是	是	否	是	否	否	否	35.3
	8b 指南针对的具体环境	否	否	否	否	否	否	否	否	否	否	是	是	否	否	否	否	否	11.8
	9a 参与指南制订的所有贡献者及其作用	否	是	否	否	是	是	否	否	否	是	是	是	否	是	是	是	否	52.9
	9b 参与指南制订的所有个人	是	是	是	是	是	否	否	否	是	是	是	是	是	是	是	是	是	82.4
	报告率/%	25.0	75.0	62.5	25.0	62.5	50.0	25.0	37.5	50.0	25.0	100.0	87.5	62.5	75.0	75.0	75.0	62.5	57.4
证据	10a 指南推荐意见所基于的关键问题	否	是	是	是	是	否	否	否	否	是	是	是	是	是	是	是	是	76.5
	10b 结局遴选和分类的方法	否	是	否	否	否	否	否	否	否	否	是	否	是	否	否	否	是	23.5
	11a 基于的系统评价	否	是	否	是	是	是	否	否	否	否	是	否	否	是	是	是	是	52.9
	11b 如何检索和评价纳入的系统评价	否	是	否	是	是	否	否	否	否	是	是	否	否	是	是	是	是	52.9
	12 对证据质量评价和分级的方法	是	是	是	是	是	否	否	否	是	是	否	是	否	是	是	是	是	70.6
	报告率/%	20.0	100.0	40.0	80.0	80.0	20.0	0	0	20.0	60.0	60.0	60.0	20.0	100.0	80.0	80.0	100.0	54.1
推荐意见	13a 清晰、准确且可实施的推荐意见	是	是	是	是	是	否	否	是	是	是	是	是	是	是	是	是	是	88.2
	13b 单独提供针对亚组人群的推荐意见	是	是	是	否	否	是	是	否	是	是	是	是	是	是	是	是	是	82.4
	13c 描述推荐的强度及证据质量	是	是	是	是	是	否	否	否	是	是	否	是	否	是	是	是	是	70.6
	14a 目标人群的价值观念和偏好	是	是	是	否	否	否	是	否	否	否	否	否	是	是	是	是	否	47.1
	14b 成本和资源利用	是	是	是	否	否	否	否	否	否	是	否	否	是	是	是	是	否	47.1
	14c 公平性、可行性和可接受性	否	是	是	是	否	否	否	否	否	否	否	否	否	是	否	否	否	23.5
	15 决策过程和方法	否	是	否	否	否	是	否	否	否	是	是	是	是	是	否	是	是	52.9

续表 2

领域	纳入指南																	报告率/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
报告率/%	71.4	100	85.7	42.9	28.6	28.6	28.6	14.3	42.9	71.4	42.9	57.1	71.4	100	71.4	85.7	57.1	58.8
评审和质 16 独立评审	否	是	否	否	否	否	否	否	否	否	否	是	否	是	是	是	否	29.4
量保证 17 质量控制程序	否	否	否	否	否	否	否	否	否	否	否	是	否	否	否	否	否	5.9
报告率/%	0	50.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	0	50.0	50.0	50.0	0	17.6
资助与利 18a 资金来源情况	是	是	否	否	是	否	是	是	否	否	是	否	是	是	是	是	否	58.8
益冲突 18b 资金在传播和实施过程中的作用	否	否	否	否	是	否	否	否	否	否	否	否	是	否	是	是	否	23.5
声明和 19a 利益冲突的类型	是	是	否	否	是	是	是	是	是	否	是	是	是	是	是	是	否	76.5
管理 19b 利益冲突的评价和管理方法	否	是	否	否	是	否	是	否	否	否	是	否	是	是	是	是	否	47.1
报告率/%	50.0	75.0	0	0	100.0	25.0	75.0	50.0	25.0	0	75.0	25.0	100.0	75.0	100.0	100.0	0	51.5
其他 20 指南及相关文件的获取	否	是	是	是	是	是	否	是	否	否	是	是	是	是	是	是	是	76.5
21 当前实践与研究证据之间的差异	否	是	否	否	否	否	否	否	否	否	是	否	否	是	否	否	否	17.6
22 指南制订过程中所有局限性	否	是	否	否	否	否	否	否	否	否	是	否	是	是	是	否	否	29.4
报告率/%	0	100	33.3	33.3	33.3	33.3	0	33.3	0	0	100	33.3	66.7	100	66.7	33.3	33.3	41.2
平均报告率/%	37.1	80.0	57.1	31.4	54.3	34.3	48.6	17.1	37.1	20.0	68.6	65.7	60.0	82.9	74.3	74.3	54.3	52.8

必要。本文通过对 17 部指南的报告质量进行评价，得出几条关于膀胱癌临床指南的建议：

第一，合格的指南制订团队应包括多个学科如临床专家、患者、方法学家、流行病学专家等^[30]；建议不同背景的团队参与指南的制订，减少指南的片面性。

第二，目前大多指南由各学会和领域的专家参与制订，较少考虑患者意愿，符合专家观点的指南不一定适用于患者^[31-32]。建议向公众广泛招募患者参与指南制订，并鼓励患者为指南的制订作出积极贡献。因此，今后在制订指南时应充分认识到多学科成员对指南制订的重要性，在形成建议时应考虑不同的价值观和偏好。

第三，利益冲突报告不完整会降低指南的质量、可信度和权威性，也是指南制订过程中最常见的偏倚来源^[33-34]。能够得到财务支持且有效报告利益冲突声明是指南制订过程中的难题。因此，为了便于评估指南的质量，建议在全球范围内使用统一的规则报告利益冲突，例如每个参与者的利益关系以及是否存在外部赞助支持，以提高指南的透明度。

第四，外部审查是指在正式发布指南全文之前，由专家或开发团队之外的其他利益相关者对指南及其建议进行的预发布审查。我们建议审查小组应评估指南方法、指南推荐和指南相关因素，质疑指南制订团队，并在每条推荐意见公开发布前对其提出质疑^[35]，以提高指南的整体可信度。

当然，本研究也存在一定的局限性。首先，本文仅检索了英文和中文的膀胱癌指南，可能会导致部分以其他语种发表的指南被漏掉，导致评价的偏倚。其次，在评价指南之前，制订并测试了一系列全面的膀胱癌检索标准，仍然可能存在

部分指南漏检。再者，RIGHT 清单目前仅用于规范指南的撰写，对已发表指南的评价的研究尚少，仍然需要进一步的推广。

4 结论

本研究采用 RIGHT 清单对膀胱癌临床实践指南进行报告质量评价，发现大部分指南的质量仍然需要提高和规范。建议指南制订者掌握指南的报告规范和评价工具，比如 AGREE II 工具和 RIGHT 报告规范，以减少指南报告的偏差。因此，加强指南的规范性报告，可提高指南的报告质量，进而更好地服务临床疾病的诊断和治疗。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] Liu SH, Tian Y, Na R, et al. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27, 912 patients [J]. Int Urol Nephrol, 2015, 47 (6): 951-958.
- [3] Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, et al. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women [J]. JAMA, 2011, 306 (7): 737-745.
- [4] Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, et al. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer [J]. J Urol, 2005, 179 (1): S7-S11.
- [5] Zamora-Ros R, Sacerdote C, Ricceri F, et al. Flavonoid and lignan intake in relation to bladder cancer risk in the european prospective investigation into cancer and nutrition (epic) study [J]. Br J Cancer, 2014, 111 (9): 1870-1880.
- [6] Martin C, Leiser CL, Neil BO, et al. Familial cancer clustering in urothelial cancer: a population-based case-control study [J]. J Natl Cancer Inst, 2018, 110 (5): 527-533.
- [7] Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Bladder can-

- cer incidence and mortality: a global overview and recent trends [J]. *Eur Urol*, 2017, 71 (1): 96-108.
- [8] Richters A, Aben KKH, Kiemeny LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update [J]. *World J Urol*, 2020, 38 (8): 1895-1904.
- [9] Brouwers MC, Kho ME, Browman GP, et al. AGREE II: advancing guideline development, reporting and evaluation in health care [J]. *CMAJ*, 2010, 182 (18): E839-842.
- [10] Chen Y, Yang K, Marusic A, et al. A reporting tool for practice guidelines in health care: the RIGHT statement [J]. *Ann Intern Med*, 2017, 166 (2): 128-132.
- [11] Maisch P, Retz M, Gschwend JE, et al. Clinical practice guidelines for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis using the AGREE II instrument [J]. *Urol Int*, 2021, 105 (1-2): 31-40.
- [12] 卢姝亚, 赵思雅, 吴守媛, 等. 2019 年期刊公开发表的中国临床实践指南文献调查与评价——证据质量和推荐强度 [J]. *协和医学杂志*, 2022, 13(1): 8.
- [13] Bellmunt J, Orsola A, Leow JJ, et al. Bladder cancer: esmo practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25 (Suppl 3): iii40-48.
- [14] Chang SS, Bochner BH, Chou R, et al. Treatment of non-metastatic muscle-invasive bladder cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline [S/OL]. (Amended 2020). Available online: <https://www.auanet.org/guidelines/guidelines/bladder-cancer-non-metastatic-muscle-invasive-guideline>.
- [15] Bhindi B, Kool R, Kulkarni GS, et al. Canadian urological association guideline on the management of non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *Can Urol Assoc J*, 2021, 15 (8): E424-E60.
- [16] Kulkarni GS, Black PC, Sridhar SS, et al. Canadian urological association guideline: muscle-invasive bladder cancer [J]. *Can Urol Assoc J*, 2019, 13 (8): 230-238.
- [17] Roupriet M, Babjuk M, Burger M, et al. European association of urology guidelines on upper urinary tract urothelial carcinoma: 2020 update [J]. *Eur Urol*, 2021, 79 (1): 62-79.
- [18] 黄健. 中国泌尿外科和男科疾病诊断治疗指南 [M]. 2019.
- [19] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 膀胱癌诊疗规范 (2018 年版) [S/OL]. Available online: <http://zs.kaipuyun.cn/s>.
- [20] Alharbi H, Alkhateeb S, Murshid E, et al. Saudi oncology society and saudi urology association combined clinical management guidelines for urothelial cell carcinoma of the urinary bladder 2017 [J]. *Urol Annals*, 2018, 10 (2): 133-137.
- [21] González del Alba A, De Velasco G, Lainez N, et al. SEOM clinical guideline for treatment of muscle-invasive and metastatic urothelial bladder cancer (2018) [J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, 21 (1): 64-74.
- [22] Matsumoto H, Shiraishi K, Azuma H, et al. Clinical practice guidelines for bladder cancer 2019 update by the japanese urological association: summary of the revision [J]. *Int J Urol*, 2020, 27 (9): 702-709.
- [23] Milowsky MI, Bryan RR, Booth CM, et al. Guideline on muscle-invasive and metastatic bladder cancer (european association of urology guideline): American society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34 (16): 1945-1952.
- [24] Jin YH, Zeng XT. Treatment and surveillance for non-muscle-invasive bladder cancer in China: an evidence-based clinical practice guideline (2018 simplified version) [J]. *J Evid Based Med*, 2018, 18 (12): 1267-1272.
- [25] National Institute for Health and Care Excellence. Bladder cancer: diagnosis and management of bladder cancer: NICE (2015) [S/OL]. Available online: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng2>.
- [26] Chang SS, Boorjian SA, Chou R, et al. Diagnosis and treatment of non-muscle invasive bladder cancer: AUA/SUO joint guideline (2020) [S/OL]. Available online: <https://www.auanet.org/guidelines/guidelines/bladder-cancer-non-muscle-invasive-guideline>.
- [27] Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, et al. European association of urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2020 guidelines [J]. *Eur Urol*, 2021, 79 (1): 82-104.
- [28] Babjuk M, Burger M, Capoun O, et al. European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1, and carcinoma in situ) [J]. *Eur Urol*, 2021, S0302-2838: 1978-1973.
- [29] National Comprehensive Cancer Network. Bladder cancer, version 5.2021[S/OL]. Available online: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder.pdf.
- [30] Pagliari C, Grimshaw J. Impact of group structure and process on multidisciplinary evidence-based guideline development: an observational study [J]. *J Eval Clin Pract*, 2002, 8 (2): 145-153.
- [31] Armstrong MJ, Mullins CD, Gronseth GS, et al. Impact of patient involvement on clinical practice guideline development: a parallel group study [J]. *Implement Sci*, 2018, 13 (1): 55.
- [32] Brouwers MC, Vukmirovic M, Spithoff K, et al. Engaging cancer patients in clinical practice guideline development: a pilot study [J]. *Curr Oncol*, 2018, 25 (4): 250-256.
- [33] Norris SL, Holmer HK, Ogden LA, et al. Conflict of interest disclosures for clinical practice guidelines in the national guideline clearinghouse [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (11): e47343.
- [34] Tonelli MR. Conflict of interest in clinical practice [J]. *Chest*, 2007, 132 (2): 664-670.
- [35] Scottish Intercollegiate Guidelines Network. A guideline developer's handbook [EB/OL]. https://www.sign.ac.uk/media/1050/sign50_2019.pdf.
- [36] Zhang J, Wang Y, Weng H, et al. Management of non-muscle-invasive bladder cancer: quality of clinical practice guidelines and variations in recommendations [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19 (1): 1054.
- [36] 王琪. 中国临床实践指南质量评价研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.

(收稿日期: 2022-01-05; 修回日期: 2022-03-25)

1 例卵巢癌伴不完全性肠梗阻患者化疗止吐方案的制订及用药分析

蔡先惠¹, 叶轶青^{2*} (1. 浙江大学医学院附属第一医院临床药学部, 杭州 310003; 2. 浙江大学医学院附属妇产科医院药剂科, 杭州 310006)

摘要: 以 1 例晚期卵巢癌伴不完全性肠梗阻的患者为例, 临床药师通过查阅相关指南及文献资料, 归纳不同止吐药物对肠梗阻的影响, 最终选择帕洛诺司琼、阿瑞匹坦和地塞米松联合止吐方案, 使患者顺利完成此次化疗, 保障了化疗的可持续性。

关键词: 卵巢癌; 肠梗阻; 止吐药物; 合理用药; 药学监护

中图分类号: R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2432-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.038

卵巢癌 (ovarian cancer) 是常见的妇科肿瘤, 绝大多数患者确诊时已存在局部或远处播散, 五年生存率仅为 49%^[1]。恶性肠梗阻 (malignant bowel obstruction, MBO) 是晚期卵巢癌常见的并发症, 发生率约为 20% ~ 50%^[2-4]。化疗是卵巢癌治疗的重要手段, 能够延缓复发, 延长生存期。临床上合并肠梗阻的肿瘤患者, 在身体可耐受时通常继续化疗; 而体质较差的则可能因无法耐受正规化疗而最终死于这种并发症。因此, 除积极治疗外, 尽量消除可能加重肠梗阻的因素来保证化疗的可持续性显得尤为重要。止吐药物是卵巢癌化疗过程中不可或缺的辅助药物, 在发挥抑制恶心呕吐作用的同时, 部分药物可能通过影响肠道蠕动加重肠梗阻。然而, 目前尚未见专门针对此类患者如何选择化疗止吐药物的报道。因此, 本文通过 1 例晚期卵巢癌伴不完全性肠梗阻患者的药学监护实例, 探讨临床药师如何通过参与化疗止吐方案的制订, 保障用药的安全有效, 改善患者的生存质量。

1 病例资料

患者, 女, 年龄 58 岁, 身高 163 cm, 体质量 52 kg, 体表面积 1.56 m²。2021 年 10 月 21 日于本院行经腹卵巢癌肿瘤细胞减灭术, 手术过程顺利。术后病理诊断: 卵巢恶性肿瘤 III C 期 (浆液性癌, G3), 建议术后行辅助化疗。2021 年 10 月 28 日患者胃纳不佳, 进食后中下腹部持续性

胀痛, 伴恶心呕吐, 肛门排气排便减少。10 月 30 日因行化疗入院。既往史: 既往体健, 无高血压病、肾病、糖尿病史; 否认肝炎、结核等传染病史; 否认药物过敏史; 家族史: 父亲 15 年前患食道癌, 已行手术。入院诊断: ① 不完全性肠梗阻; ② 卵巢恶性肿瘤 III C 期 (浆液性癌, G3) 术后。

2 治疗经过

入院第 1 ~ 2 日: 患者体温正常, 感腹胀, 偶有恶心呕吐, 有少量排气排便。入院血常规: 白细胞计数 $12.7 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 血小板计数 $520 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 血浆 D-二聚体测定 (D-Dimer) $2.78 \text{ mg} \cdot L^{-1}$, 纤维蛋白原 $4.35 \text{ g} \cdot L^{-1}$; 生化指标: 降钙素原 (PCT) $0.07 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) $8.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 全腹部 CT 平扫: 阴道残端, 盆底及肠系膜符合术后炎症表现, 不排除小肠梗阻可能; VTE 评分中危。禁食, 予氨基酸注射液 (250 mL ivgtt qd) 联合 20% 脂肪乳 (C14-24) (100 mL ivgtt qd) 肠外营养支持; 予那屈肝素钙注射液 (4100 IU sc qd) 预防性抗凝治疗; 予注射用头孢西丁钠 (2 g ivgtt q8 h) 预防感染。

入院第 3 ~ 7 日: 第 3 日, 患者体温正常, 腹胀较前好转, 无恶心呕吐, 有少量排气排便。血液生化指标: 谷丙转氨酶 (ALT) $57 \text{ U} \cdot L^{-1}$, 谷草转氨酶 (AST) $45 \text{ U} \cdot L^{-1}$ 。改流食, 予复方甘草酸苷注射液 (60 mL ivgtt qd) 改善肝功能。

基金项目: “十三五”浙江省中医药 (中西医结合) 重点学科建设计划 (No.2017-XK-A37)。

作者简介: 蔡先惠, 女, 硕士, 药师, 主要从事肿瘤药理与临床药学工作, email: xianhui0201@163.com * **通信作者:** 叶轶青, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事新型递药系统及临床药学工作, email: yiqing_ye@163.com

第 4 日, 患者生命体征平稳, 留置导尿通畅, 尿色淡血性。尿常规示: 潜血++++。临床药师考虑尿路出血可能由那屈肝素钙注射液导致, 建议医师停用该药, 医师采纳建议。第 7 日患者一般情况可, 行化疗。化疗方案选择 TC 方案: 紫杉醇 (270 mg ivgtt once) + 卡铂 (500 mg ivgtt once)。化疗前 12 h 及 6 h 分别予醋酸地塞米松片 (20 mg po) 预防紫杉醇溶媒过敏, 帕洛诺司琼注射液 (0.25 mg iv, d1)、阿瑞匹坦 (125 mg po, d1; 80 mg po, d2 ~ 3)、地塞米松磷酸钠注射液 (10 mg iv, d1) 及醋酸地塞米松片 (3.75 mg po, d2 ~ 4) 预防性止吐; 氨磷汀 (400 mg ivgtt once) 联合还原型谷胱甘肽 (1.2 g ivgtt once) 护肝减毒。

化疗后患者无明显不适, 于第 2 日出院。出院后第 5 日电话随访, 患者无明显恶心呕吐及其他不适。

3 用药分析

3.1 化疗止吐方案制订

卵巢癌的初次治疗原则: 以手术为主, 辅助化疗, 强调综合治疗^[5]。根据我国《卵巢恶性肿瘤诊断与治疗指南 (2021 年版)》: 紫杉醇联合卡铂为一线化疗首选方案。本例患者遵循指南选用 TC 方案 (紫杉醇 $175 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$, ivgtt; 卡铂: $AUC = 5$, ivgtt) 合理。

目前, 国内外指南对于普通患者的化疗止吐方案都有明确的推荐^[6-10]。然而, 对于合并肠梗阻的肿瘤患者, 如何选择化疗止吐药物并未提及。根据作用机制, 临床上常用的止吐药物大致分为 5-HT₃ 受体拮抗剂、NK-1 受体拮抗剂、糖皮质激素、非典型抗精神病药物、苯二氮草类药物、吩噻嗪类药物、其他类型的止吐药物等^[9]。根据《肿瘤药物治疗相关恶心呕吐防治中国专家共识 (2019 版)》以及《化疗所致恶心呕吐的药物防治指南》^[9-10]: 紫杉醇属于低致吐风险药物, 卡

铂 ($AUC = 5$) 属于高致吐风险药物, 首选 5-HT₃ 受体拮抗剂、地塞米松和 NK-1 受体拮抗剂的联用方案。而对于该患者, 该方案是否合适以及如何选择具体药物仍是亟待解决的问题。

3.2 具体止吐药物选择

3.2.1 地塞米松

糖皮质激素最初作为抗炎药物广泛应用于临床, 早期有学者发现地塞米松在预防化疗药物引起的恶心呕吐方面有良好的效果^[11-12]。糖皮质激素预防恶心呕吐的具体机制目前尚不明确, 可能与减少化疗过程中的炎症反应, 直接作用于孤束核, 减少 5-HT 的分泌等作用相关^[13]。根据 2021 年国外相关指南, 对于恶性肠梗阻的晚期癌症患者, 控制恶心呕吐时可考虑用地塞米松^[14]。有回顾性队列研究发现, 对于晚期上皮性卵巢癌合并小肠肠梗阻的患者, 地塞米松能够很好地控制肠梗阻的症状^[15]。

考虑患者用药依从性及便利性, 以及止吐方案中阿瑞匹坦与地塞米松的相互作用, 选择化疗当日肌内注射地塞米松 10 mg, 第 2 ~ 4 日每日早晨口服地塞米松 3.75 mg 的给药方案, 该方案符合指南高致吐方案推荐用法。

3.2.2 帕洛诺司琼等 5-HT₃ 受体拮抗剂

自第一个 5-HT₃ 受体拮抗剂昂丹司琼问世以来, 其良好的止吐效果使得 5-HT₃ 受体拮抗剂逐渐成为化疗止吐药物的基石^[16]。5-HT₃ 受体位于延髓最后区的催吐化疗感受区中央和外周迷走神经末梢。该药物通过抑制中央和周围神经局部神经元的 5-HT₃ 受体, 抑制呕吐^[17]。5-HT₃ 受体广泛存在于胃肠道, 能否使用此类药物以及如何选择具体药物尚未知。笔者先研读药品说明书, 总结归纳这类药物使用禁忌和相关注意事项 (见表 1), 发现不同厂家的说明书存在一定出入: 昂丹司琼、格拉司琼及阿扎司琼的国产品种禁用于肠梗阻, 而原研药则未有此项禁忌。

表 1 5-HT₃ 受体拮抗剂类药物说明书禁忌证信息归纳

Tab 1 Summary of contraindications for 5-HT₃ receptor antagonists

通用名	上市企业	注意事项或禁忌 (原研药)	国内厂家 (举例)	禁忌 (国产药)
昂丹司琼	葛兰素史克	有亚急性肠梗阻的患者应在一定监护条件下使用本品	齐鲁制药	肠梗阻、过敏
格拉司琼	罗氏	患者若有亚急性肠梗阻, 用本品时应严密观察	扬子江药业	肠梗阻、过敏
阿扎司琼	日本吉富制药	未提及	扬子江药业	肠梗阻、过敏
托烷司琼	诺华	过敏	三联药业	过敏
雷莫司琼	日本山之内	过敏	大红鹰药业	过敏
多拉司琼	赛诺菲 - 安万特	过敏	海思科制药	过敏
帕洛诺司琼	瑞士 Helsinn	过敏	正大天晴药业	过敏

搜索 PubMed、中国知网、万方数据、维普医药等数据库, 2014 年一篇案例报道提到, 一名 29 岁妊娠 21 周的孕妇连续 3 个月口服 $4 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量的昂丹司琼后发生肠梗阻, 怀疑与昂丹司琼有关^[18]。与之相矛盾的是, 有研究发现在术后肠梗阻的小鼠模型上, 分别皮下注射昂丹司琼、托烷司琼和帕洛诺司琼, 能够改善肠道局部炎症, 促进胃肠功能的恢复^[19]。此外, 并未发现更多 5-HT₃ 受体拮抗剂导致肠梗阻的病例报道。

基于目前的数据资料, 药师认为常规剂量的 5-HT₃ 受体拮抗剂短期用于卵巢癌伴不完全肠梗阻的患者可能是安全的。相较于第一代 5-HT₃ 受体拮抗剂, 第二代药物帕洛诺司琼具有受体亲和力强、半衰期长的优点^[20]; 且国内外药品说明书中肠梗阻均非使用禁忌, 目前也尚未有其导致或加重肠梗阻的相关报道。因此药师建议选择帕洛诺司琼。根据国内指南, 高致吐用药方案中帕洛诺司琼可选择首日静脉推注 0.25 mg 或者口服 0.5 mg, 该患者采取第一种给药方案。

3.2.3 阿瑞匹坦等其他 NK-1 受体拮抗剂 NK-1 受体拮抗剂在不同止吐指南中均为一线推荐药物, 其止吐机制为神经递质 P 物质通过与中枢系统 NK-1 受体结合将信号传递到催吐化学感受区和呕吐中枢从而引发恶心呕吐, 而 NK-1 受体拮抗剂通过阻断 P 物质的结合发挥作用^[21]。然而, 目前关于 NK-1 受体拮抗剂在肠梗阻患者中的安全有效性的研究较少。

据文献报道, 阿瑞匹坦 $300 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 口服的耐受性良好, 且不良反应与安慰剂相比差异无统计学意义^[22]。同时, 在一项随机双盲对照试验中发现, 阿瑞匹坦在健康受试者中不会引起胃、小肠或结肠推进功能的重大改变^[23]。此外, 也尚未见到引起或加重肠梗阻的病例报道。就有限资料评估, 目前该药相对安全。因此药师建议选择阿瑞匹坦。根据药品说明书, 阿瑞匹坦的用法为首日口服 125 mg, 第 2~3 日每日口服 80 mg, 该患者用药方案遵循这一用法。

3.3 止吐方案的药学监护

止吐药物的主要不良反应包括胃肠道不适、心血管异常、代谢异常等, 临床药师制订了详细的药学监护计划。除常规监测患者基本体征、实验室指标外, 因该患者存在肠梗阻, 应特别关注是否出现腹胀腹痛等消化道症状, 并及时采取相应措施。同时, 做好患者及家属的沟通工作, 减轻患者的恐慌焦虑情绪, 并通过随访的方式了解

患者止吐治疗的情况, 并根据患者情况予以相应指导。

3.4 其他止吐药物分析

MASCC《晚期癌症患者恶性肠梗阻的药物管理》2021 年更新版推荐甲氧氯普胺、氟哌啶醇、奥氮平用于止吐^[14], 因此药师也对以上药物是否适用于肠梗阻患者进行分析。

3.4.1 甲氧氯普胺 甲氧氯普胺为多巴胺 D₂ 受体抑制剂、5-HT₃ 受体弱抑制剂, 同时还具有 5-HT₄ 受体激动效应^[24]。止吐的同时能够促进胃蠕动和排空, 提高肠内容物的通过率, 适用于不完全性肠梗阻; 但因可能引起锥体外系不良反应并不作为常规预防药物, 可在出现恶心呕吐时选用^[25]。

3.4.2 氟哌啶醇 氟哌啶醇为经典抗精神病药物, 通过阻断多巴胺 D₂ 受体发挥作用^[26]。在恶性肠梗阻中, 通常用于突发性恶心和呕吐。有案例报道, 氟哌啶醇在治疗 1 名 74 岁术后谵妄症时患者发生肠梗阻, 可能与肾功能不全导致氟哌啶醇在体内累积有关^[27]。此外, 还有 1 名 83 岁的老年患者在使用氟哌啶醇治疗精神分裂症期间发生麻痹性肠梗阻^[28]。虽然在恶性肠梗阻的姑息治疗中氟哌啶醇止吐疗效不错, 但在有其他药物可选择时, 不推荐氟哌啶醇。

3.4.3 奥氮平 奥氮平是第二代抗精神病, 它对多巴胺、5-HT、肾上腺素 α 、组胺以及毒蕈碱等多种受体都具有中度到高度的亲和力, 可用于难治性恶心的治疗^[26]。药品说明书提到, 因其抗胆碱能活性, 建议前列腺肥大或麻痹性肠梗阻以及相关病症的患者慎用奥氮平。一项回顾性研究探讨奥氮平在合并不完全性肠梗阻的肿瘤患者中的止吐效果, 发现其有潜在疗效^[29]。此外, 未见奥氮平引起肠梗阻或加重肠梗阻的相关报道。因此, 在止吐效果不佳时, 可考虑应用奥氮平。

3.5 治疗药物建议

奥曲肽是恶性肠梗阻的一线用药, 它能够抑制胃肠道消化液分泌, 减轻肠扩张, 减慢肠道蠕动和缓解肠壁水肿, 通常也能够很好地减轻恶心呕吐^[30]。药师建议在该患者的初始治疗中, 可加用奥曲肽治疗肠梗阻。然而, 奥曲肽用于肠梗阻的治疗仍属于超说明书用药, 用药前需与患者签署知情同意书, 规避相应医疗纠纷隐患。

4 结论

合并肠梗阻的卵巢癌患者在临床上并不少见, 合理的止吐药物选择对于提高这类患者的生存质量、保障化疗的可持续性具有重要意义。本案例

中, 临床药师通过查房参与卵巢癌伴不完全性肠梗阻患者的化疗过程, 利用药学专业知识从化疗止吐方案的制订、止吐药物的选择、治疗药物的调整等方面给予医师建议, 并对患者进行相应的药学监护, 帮助患者顺利完成治疗, 促进临床合理用药, 以期为此类患者的止吐治疗提供参考。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72 (1): 7-33.
- [2] Ripamonti CI, Easson AM, Gerdes H. Management of malignant bowel obstruction [J]. Eur J Cancer, 2008, 44 (8): 1105-15.
- [3] Huang X, Xue J, Gao M, et al. Medical management of inoperable malignant bowel obstruction [J]. Ann Pharmacother, 2021, 55 (9): 1134-1145.
- [4] Tuca A, Guell E, Martinez-Losada E, et al. Malignant bowel obstruction in advanced cancer patients: epidemiology, management, and factors influencing spontaneous resolution [J]. Cancer Manag Res, 2012, 4: 159-169.
- [5] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会. 卵巢恶性肿瘤诊断与治疗指南 (2021 年版) [J]. 中国癌症杂志, 2021, 31 (6): 490-500.
- [6] Hesketh PJ, Kris MG, Basch E, et al. Antiemetics: ASCO guideline update [J]. J Clin Oncol, 2020, 38 (24): 2782-2797.
- [7] National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Antiemesis (Version 2.2022) [EB/OL]. [2022-3-23]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/antiemesis.pdf
- [8] Davis M, Hui D, Davies A, et al. MASCC antiemetics in advanced cancer updated guideline [J]. Support Care Cancer, 2021, 29 (12): 8097-8107.
- [9] 姜文奇, 巴一, 冯继锋, 等. 肿瘤药物治疗相关恶心呕吐防治中国专家共识 (2019 年版) [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2019, 11 (11): 16-26.
- [10] 张玉. 化疗所致恶心呕吐的药物防治指南 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (5): 457-473.
- [11] Baker JJ, Lokey JL, Price NA, et al. Nabilone as an antiemetic [J]. N Engl J Med, 1979, 301 (13): 728.
- [12] Aapro MS, Alberts DS. High-dose dexamethasone for prevention of cis-platin-induced vomiting [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1981, 7 (1): 11-14.
- [13] Chu CC, Hsing CH, Shieh JP, et al. The cellular mechanisms of the antiemetic action of dexamethasone and related glucocorticoids against vomiting [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 722: 48-54.
- [14] Davis M, Hui D, Davies A, et al. Medical management of malignant bowel obstruction in patients with advanced cancer: 2021 MASCC guideline update [J]. Support Care Cancer, 2021, 29 (12): 8089-8096.
- [15] Jones APM, McGauran MFG, et al. Efficacy of dexamethasone in the management of malignant small bowel obstruction in advanced epithelial ovarian cancer [J]. Support Care Cancer, 2022, 30 (3): 2821-2827.
- [16] Navari RM, Aapro M. Antiemetic prophylaxis for chemotherapy-induced nausea and vomiting [J]. N Engl J Med, 2016, 374 (14): 1356-1367.
- [17] Machu TK. Therapeutics of 5-HT3 receptor antagonists: current uses and future directions [J]. Pharmacol Ther, 2011, 130 (3): 338-347.
- [18] Cohen R, Shlomo M, Dil DN, et al. Intestinal obstruction in pregnancy by ondansetron [J]. Reprod Toxicol, 2014, 50: 152-153.
- [19] Maehara T, Matsumoto K, Horiguchi K, et al. Therapeutic action of 5-HT3 receptor antagonists targeting peritoneal macrophages in post-operative ileus [J]. Br J Pharmacol, 2015, 172 (4): 1136-1147.
- [20] Yang LP, Scott LJ. Palonosetron: in the prevention of nausea and vomiting [J]. Drugs, 2009, 69 (16): 2257-2278.
- [21] Karthaus M, Schiel X, Ruhlmann CH, et al. Neurokinin-1 receptor antagonists: review of their role for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in adults [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2019, 12 (7): 661-680.
- [22] Kramer MS, Cutler N, Feighner J, et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors [J]. Science, 1998, 281 (5383): 1640-1645.
- [23] Muñoz M, Coveñas R. Safety of neurokinin-1 receptor antagonists [J]. Expert Opin Drug Saf, 2013, 12 (5): 673-685.
- [24] Al-Saffar A, Lennernäs H, Hellström PM. Gastroparesis, metoclopramide, and tardive dyskinesia: risk revisited [J]. Neurogastroenterol Motil, 2019, 31 (11): e13617.
- [25] 于世英, 王杰军, 王金万, 等. 晚期癌症患者合并肠梗阻治疗的专家共识 [J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29 (8): 637-640.
- [26] Wickham RJ. Nausea and vomiting: a palliative care imperative [J]. Curr Oncol Rep, 2020, 22 (1): 1.
- [27] Sirois FJ. Haloperidol-induced ileus [J]. Psychosomatics, 2005, 46 (3): 275-276.
- [28] Gaszner G, Kosza P. Paralytic ileus haloperidol terápia alatt [Paralytic ileus during haloperidol therapy] [J]. Neuro-psychopharmacol Hung, 2004, 6 (1): 36-38.
- [29] Kaneishi K, Imai K, Nishimura K, et al. Olanzapine versus metoclopramide for treatment of nausea and vomiting in advanced cancer patients with incomplete malignant bowel obstruction [J]. J Palliat Med, 2020, 23 (7): 880-881.
- [30] Krouse RS. Malignant bowel obstruction [J]. J Surg Oncol, 2019, 120 (1): 74-77.

(收稿日期: 2022-06-05; 修回日期: 2022-08-10)

临床药师与妇科医师合作进行更年期患者门诊管理的药学实践

金杨红¹, 崔晓飞¹, 王淑贞², 李东^{1*}, 许利敏¹ (1. 濮阳市油田总医院药学部, 河南 濮阳 457001; 2. 濮阳市油田总医院妇科, 河南 濮阳 457001)

摘要: **目的** 总结本院临床药师在更年期门诊开展药学实践的经验, 分析该实践模式的必要性和有效性。**方法** 通过医药联合门诊的形式, 由临床药师对更年期患者进行药物治疗管理, 总结合作近一年以来更年期医药联合门诊开展的情况。**结果** 临床药师结合自己的专业特长, 在医药联合门诊成功摸索出为更年期患者提供药学服务的方法, 得到了患者和医师的认可。**结论** 在更年期医药联合门诊, 临床药师通过提供药学服务和治疗建议, 能够提高患者自身的药物治疗管理水平, 起到积极的治疗效果, 提高患者就诊的满意度。

关键词: 临床药师; 医药联合门诊; 更年期; 药学实践

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2436-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.039

Pharmaceutical care for menopausal outpatients by cooperation between clinical pharmacists and gynecologists

JIN Yang-hong¹, CUI Xiao-fei¹, WANG Shu-zhen², LI Dong^{1*}, XU Li-min¹ (1. Department of Pharmacy, Puyang Oilfield General Hospital, Puyang Henan 457001; 2. Department of Gynecology, Puyang Oilfield General Hospital, Puyang Henan 457001)

Abstract: Objective To summarize the experience of clinical pharmacists in our hospital in providing pharmaceutical care for menopause outpatients, and determine the necessity and effectiveness of this model. **Methods** Through joint clinics with gynecologists, the clinical pharmacists provided pharmaceutical care in the management of menopausal patients by managing the drug treatment. We summarized the cooperation of physician-pharmacist joint clinics outpatients for nearly a year. **Results** Clinical pharmacists successfully provided pharmaceutical care for menopausal patients and were recognized by both patients and doctors. **Conclusion** Clinical pharmacists help improve menopausal patients' treatment management level. With positive therapeutic effect this mode also improves patients' satisfaction.

Key words: clinical pharmacist; physician-pharmacist joint outpatient; menopause; pharmacy practice

目前, 药学门诊已成为医院药学发展的重要方向, 可以为患者提供更好的药学服务, 有助于提高药物治疗的准确性^[1]。医药联合门诊是药学门诊的模式之一, 更强调与医师的合作与配合, 利于优化患者的治疗方案^[2]。

更年期是指女性绝经及其前后的一段时间, 包括绝经过渡期和绝经后期^[3], 需要对该阶段女性进行全面生活方式指导和健康管理, 并指导适宜人群开展绝经激素治疗 (menopause hormone

therapy, MHT)^[4]。绝经的本质是卵巢功能衰竭, 卵巢功能衰竭导致的雌激素水平下降使绝经后女性全身各系统、器官加速衰老。在这个生理阶段, 女性常常出现骨质疏松、高血压、糖尿病、血脂紊乱等多种疾病的困扰^[5], 时常就诊于多个不同科室, 应用多种药物, 心理上承受很大压力, 非常需要专业的药物应用指导。

本文就本院临床药师与妇科医师合作进行更年期患者用药管理的工作模式进行总结, 探讨临

基金项目: 2018 年度河南省医学科技攻关计划项目 (No.2018020966); 中国药学会全国医药经济信息网 2020 年度科普研究重点项目 [No.CMEI2020KPYJ (ZAMM) 00201]。

作者简介: 金杨红, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事内分泌临床药学, email: yangzi709431893@126.com *通信作者: 李东, 女, 主任药师, 主要从事药事管理和临床药学, email: lidongpy@outlook.com

床药师在更年期患者用药管理中的作用，以期为患者提供更优质的药学服务。

1 更年期医药联合门诊工作模式构建

1.1 服务对象

就诊于更年期门诊的所有围绝经期及绝经后有更年期综合征表现的患者。尤其关注合并心血管疾病、糖尿病、血脂异常和骨质疏松的患者。

1.2 硬件设施和具备条件

妇科更年期门诊诊室和宣教室；诊室具备门诊医师工作病历系统和合理用药信息支持系统；绝经相关症状的诊疗流程、围绝经期女性 Kupperman 量表；宣教室配备示教电子屏、更年期保健科普知识手册等。

1.3 团队构成

由 1 名妇科主任医师和 1 名内分泌临床药师组成。

1.4 药物治疗管理工作流程

首先，由医师问诊，患者回答，药师根据问诊内容记录患者基本信息；然后，在医师制订患者个体化治疗方案后，对患者进行药学服务，流程图见图 1。药学服务内容主要是：① 填写“药物治疗指导记录表”，补充患者个人信息（包括患者姓名、年龄、身高、体重、文化程度、联系方式、既往病史、用药史等）和目前药物治疗方案；② 用药指导和用药宣教；③ 患者用药咨询问题解答；④ 患者生活方式指导；⑤ 引导患者扫描“秋日思语”微信公众号和本院更年期微信患者群，关注更年期科普知识。最后，药师整理患者信息并归档保存，患者进行药学服务满意度评价。

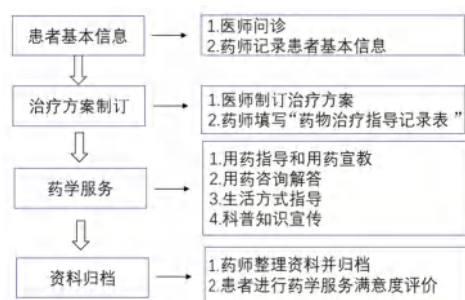


图 1 药物治疗管理流程图

Fig 1 Flow chart of medication therapy management

2 药物治疗管理结果与分析

2.1 基本信息

自 2021 年 2 月至 2022 年 2 月共接诊女性更年期患者 327 人，416 人次，年龄 (48.0±7.9) 岁。对接诊并建档的 327 例患者数据进行统计分析，数据输入和统计软件为 EXCEL 2021。

2.2 合并疾病情况

统计发现，更年期患者人群中约 36.4% 的患

者合并阴道炎、骨量减少、高血压、血脂紊乱、糖尿病等疾病（见表 1）。更年期合并疾病与更年期女性雌激素水平下降相关，雌激素对女性的生殖和泌尿系统、心血管、骨骼、神经系统等都有诸多的益处。由于雌激素的缺乏，更年期症状逐渐出现，严重影响女性的身心健康和生活质量，需要专业医师和药师的指导。

表 1 更年期合并疾病

合并疾病	人数	比例 /%
阴道炎	45	13.76
泌尿系感染	16	4.89
骨量减少	15	4.59
高血压	14	4.28
甲状腺疾病	9	2.75
血脂紊乱	7	2.14
糖尿病	6	1.83
焦虑症	4	1.22
慢性阻塞性肺疾病	3	0.92

2.3 用药情况

2.3.1 MHT 药物使用情况 327 例患者中，使用 MHT 方案治疗的患者 245 例，未使用 MHT 方案治疗的患者对其进行健康生活方式指导。我院 MHT 药物选择合理，符合指南推荐使用天然的或接近天然的孕激素。药师需要掌握性激素药物的用法用量、禁忌证、用药注意事项等（见表 2）。

表 2 绝经激素治疗药物使用情况

绝经激素药物	例数 /n	占比 /%
雌二醇片 / 雌二醇地屈孕酮复合包装 (2 mg)	63	25.71
地屈孕酮	60	24.49
雌二醇片 / 雌二醇地屈孕酮复合包装 (1 mg)	45	18.37
替勃龙	37	15.10
普罗雌烯阴道胶丸	16	6.53
黄体酮	13	5.31
戊酸雌二醇	11	4.49

2.3.2 常用药物种类 更年期患者症状颇多，常常同时使用多种药物，根据“用药治疗记录表”统计常用药物，结果见表 3。

更年期患者常用药物构成与合并疾病相关。阴道炎和泌尿系感染用药多涉及抗菌药物的合理使用。降压药、降糖药和降脂药的使用，要结合患者的临床症状，在健康生活方式的基础上，进行用药指导和用药宣教。同时，正确的补钙方式和抗骨质疏松药物治疗也是药师药学服务工作的重点。

2.4 药物治疗相关问题

对这 327 例患者存在的药物治疗相关问题进行总结分析，结果见表 4。结果发现平均每位患者存

表 3 更年期患者常用药物种类

Tab 3 Types of common drugs in menopausal patients

合并疾病	常用药物	例次	比例 /%
阴道炎	奥硝唑、氟康唑、克霉唑阴道片、 阴道用乳杆菌活菌胶囊	16	22.22
骨量减少	碳酸钙 D ₃ 、阿仑膦酸钠	10	13.89
泌尿系感染	头孢克洛、左氧氟沙星	9	12.50
高血压	依那普利、硝苯地平、氨氯地平、 缬沙坦	7	9.72
甲状腺疾病	左甲状腺素钠、甲硫咪唑	6	8.33
血脂紊乱	阿托伐他汀、瑞舒伐他汀	4	5.56
糖尿病	二甲双胍、阿卡波糖	3	4.17
焦虑症	艾司唑仑	2	2.78
其他	阿司匹林、甲钴胺、坤泰胶囊、 香芍颗粒、谷维素等	15	20.83

在 1.43 个药物治疗相关问题，排名前 3 位的问题依次是用药依从性差 (40.13%)、药物治疗不当和无效的药物 (31.12%)、药物治疗不足 (16.74%)。用药依从性差是更年期患者普遍存在的问题；药物治疗不当和无效的药物主要体现在自行购买中药或保健品进行治疗等；药物治疗不足主要体现在不能长期坚持绝经激素治疗，降压药、降糖药未规律服用。这些问题均反映出药师用药宣教及正确用药指导的必要性，这也是药师药学服务的重点内容。

2.5 药学服务内容

327 例更年期患者均接受临床药师个体化的用药指导，对药学服务满意度为 100%。具体药学服务内容详见表 5。

表 4 药物治疗相关问题分析汇总 [n(%)]

Tab 4 Summary of medication-related problems [n(%)]

项目	药物治疗相关问题	常见原因	发现问题	解决问题
适应证	药物治疗不当；无效的药物	自行购买中药或保健品；其他科室就诊用药；无适应证用药	145 (31.12)	102 (70.34)
有效性	药物治疗不足	未按周期服药；随意停药	78 (16.74)	78 (100)
安全性	药物治疗过度；药品不良反应 (ADR)	没有通过系统检查就用药；不知道 ADR 引起的不适	56 (12.02)	56 (100)
依从性	用药依从性差	不了解激素补充的意义；忘记服药；担心长期用药安全性； 觉得药物太贵	187 (40.13)	106 (56.68)
合计			466 (100)	342 (73.39)

表 5 具体药学服务内容总结及举例

Tab 5 Summary and examples of specific pharmaceutical care contents

药学服务类型	例次	举例	说明
用药指导	327	正确的用法用量 (如替勃龙建议在每天同一时间服药；阿卡波糖应随第一口饭嚼服)；可能出现的 ADR；药物保存；特殊剂型药物的正确使用等	详细的用药指导是慢病患者的重点需求 ^[5]
药物重整	39	协助优化治疗方案，梳理合并用药，判断药物相互作用 (如使用黄体酮头晕明显，建议以地屈孕酮替代；使用二甲双胍胃肠道不耐受，建议饭后服用)等	药物重整有利于患者获得更大的临床获益 ^[6]
用药咨询	153	性激素治疗的利与弊；激素使用是否有依赖性；饮食对激素的影响；中成药长期使用的影响；哪种钙剂最好等	使患者正确认识更年期激素治疗，增加依从性
ADR 分析	5	硝苯地平出现脚踝、手踝水肿；胺碘酮出现嘴麻、口腔无味等	ADR 的正确判断与分析，帮助患者解决用药疑惑
生活方式指导	327	合理饮食、适当运动	增强患者治疗信心，提高用药依从性

更年期患者对性激素治疗缺乏正确的认识，不清楚药物正确的用法用量，同时要考虑用药禁忌，因此，性激素治疗知识宣教和用药指导是药学服务工作的重点，有利于提高患者用药依从性。其次，由于更年期患者合并用药种类较多，药师根据合并用药进行药物重整，使患者临床获益最大化。最后，更年期症状的改善是需要综合管理的，健康的生活方式是基础，因此健康生活方式指导也是药学服务工作的一部分，有利于增强患者治疗的信心。

3 经验总结与思考

药物治疗管理 (medication therapy management, MTM) 是药师为患者提供全流程的药物治疗管理

服务，以帮助患者建立用药记录、纠正用药差错、调整治疗药物而最大程度地实现合理用药^[7]。

MTM 药学管理模式在国内外备受关注，是美国目前最主要的药学服务模式^[8-9]。国内医院经 MTM 模式干预后，慢性病患者的用药管理水平平均显著升高^[5]。在医药联合门诊，药师通过 MTM 模式，能提升患者用药的合理性、安全性和有效性^[10]。

笔者在更年期医药联合门诊，借鉴 MTM 模式，结合自身专业知识为更年期患者提供用药治疗指导，同时总结经验和思考现状。

3.1 医药联合门诊开设的必要性

目前我国还没有临床药学服务的标准化模

式, 如何发挥药师的专业能力, 保障患者用药安全, 门诊药学服务是药学服务转型的切入点^[10]。药师加入医疗团队, 可以协作对药物的安全、有效、经济使用进行专业指导。

3.2 更年期门诊药学服务的必要性

随着人类寿命的延长, 更年期已成为女性生命周期中一个重要阶段, 其健康管理也越来越受到重视。药师参与不仅可缓解医师工作压力, 同时可对患者用药进行专业、细致的指导。目前已有多种形式的面向更年期女性的药学服务开展^[10], 如代表性的北京大学第一医院更年期联合门诊, 是一种团队协作模式, 由医师、药师、营养师和护士组成, 共同为更年期女性提供系统和个体化诊疗服务, 并实现了药学服务收费^[11-12]。这体现了更年期患者群体对门诊药学服务的需求。同时, 实现药学服务收费也是药师工作的目标和方向, 是药师自我价值的体现。

3.3 开展过程中遇到的问题及解决措施

3.3.1 服务时长问题 从表 4 药物治疗相关问题分析可以看出, 更年期患者健康管理指导和性激素知识宣教非常重要, 但是门诊的时间毕竟有限。因此, 我们建立了患者微信群, 给予患者解疑解惑。并且, 医师和药师会举办更年期知识和用药知识宣讲活动, 为广大更年期患者提供帮助。

3.3.2 全程监护问题 由于更年期激素替代治疗需要精细权衡利弊, 定期监测生化、妇科检查、乳腺检查等, 因此需要全过程监测管理。但是更年期患者对自身疾病和治疗存在很多盲区和误区^[11], 需要临床药师建立档案, 对重点患者进行长期追踪管理。

3.4 更年期患者 MTM 效果

更年期患者合并疾病比较多样^[13], 临床药师不仅要关注患者绝经激素治疗用药, 同时要帮助患者重整合并用药, 进行用药指导、相互作用的审核和安全性监测。如何正确服用药物是患者迫切的用药指导需求, 与文献报道一致^[14]。本文收集到的 ADR 信息, 均是药师主动询问得知, 而患者本身尚未识别。因此, 药师不仅需要告知患者可能出现的常见 ADR, 而且需要帮助医师和患者提高对 ADR 的敏感程度和上报意识。研究也表明, 医药联合门诊, 药师的参与有利于及时发现 ADR, 帮助患者重新评估和优化用药治疗方案, 使患者临床获益最大化^[15]。结果显示, 患者对更年期基本认知、激素治疗、药师的认知均有提高。

3.5 未来发展和努力方向

临床药师在医药联合门诊可以直面患者提供药学服务, 深入参与患者的 MTM, 并有利于实现专病药学门诊的开设和药学服务收费。但目前, 患者对临床药师工作认知度还有待提高, 临床药师对患者用药有效性、安全性和依从性的评估仍需要长期追踪和关注。

参考文献

- [1] Dempsey JT, Matta LS, Carter DM, et al. Assessment of drug therapy-related issues in an outpatient heart failure population and the potential impact of pharmacist-driven intervention [J]. *J Pharm Pract*, 2017, 30 (3): 318-323.
- [2] Hwang AY, Gums TH, Gums JG. The benefits of physician-pharmacist collaboration [J]. *J Fam Pract*, 2017, 66 (12): 1-8.
- [3] 中国医师协会全科医师分会, 北京妇产学会社区与基层分会. 更年期妇女健康管理专家共识 (基层版) [J]. *中国全科医学*, 2021, 24 (11): 1317-1324.
- [4] 华医学会妇产科学分会绝经学组. 中国绝经管理与绝经激素治疗指南 (2018) [J]. *中华妇产科杂志*, 2018, 53 (11): 729-739.
- [5] 王冬梅, 庞冰, 曹振民, 等. 药物治疗管理服务在心血管疾病患者治疗中的研究 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2020, 41 (19): 2446-2448.
- [6] 范小飞, 郭道华, 范国荣, 等. 临床药师在消化科病房开展闭环式药学服务模式的探讨及案例分析 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (10): 1754-1758.
- [7] 中国药物治疗管理联盟. 中国药物治疗管理培训与实践专家共识 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2020, 18 (3): 21-25.
- [8] 葛佳佳, 宋维, 郑胜男, 等. 美国药物治疗管理实施现状 [J]. *医药导报*, 2021, 40 (3): 348-351.
- [9] Rodis JL, Sevin A, Awad MH, et al. Improving chronic disease outcomes through medication therapy management in Federally Qualified Health Centers [J]. *J Prim Care Community Health*, 2017, 8 (4): 324-331.
- [10] 赵雯, 佟铸, 褚燕琦, 等. 联合门诊工作模式下 1 例妊娠深静脉血栓患者的药物治疗管理 [J]. *中国药学杂志*, 2020, 55 (14): 1163-1166.
- [11] 路敏, 周颖, 金鸿雁, 等. 更年期门诊团队协作服务的药学实践 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2016, 14 (5): 61-64.
- [12] 路敏, 周颖, 程小侠, 等. 女性更年期患者的用药特征与药学管理 [J]. *中国药房*, 2014, 25 (10): 935-937.
- [13] 席思思, 白文佩. 更年期患者的就诊特点研究 [J]. *中国全科医学*, 2017, 20 (7): 804-807.
- [14] 潘裕华, 曾英彤, 林璐, 等. 以药物治疗管理为核心的药学门诊的构建与应用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40 (1): 111-116.
- [15] 何兴美, 陆旭萍, 詹寒明, 等. 社区医院医师药师联合门诊工作模式中药学服务的实践和探讨 [J]. *中国药事*, 2021, 35 (6): 681-689.

(收稿日期: 2022-01-02; 修回日期: 2022-04-20)

药品不良反应

1 例乳腺癌患者使用哌柏西利和依西美坦致永久性神经性耳聋的病例分析

周佳琦¹, 王岩², 刘浩然³, 苏颖杰^{4*} (1. 南通市第一人民医院药剂科, 江苏 南通 226001; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院乳腺外科, 上海 200127; 3. 复旦大学附属妇产科医院药学部, 上海 200011; 4. 上海交通大学医学院附属仁济医院药学部, 上海 200127)

关键词: 乳腺癌; 抗肿瘤药物; 神经性耳聋; 不良反应; 哌柏西利; 依西美坦

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2022)10-2440-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.040

乳腺癌是女性发病率和病死率最高的癌症^[1]。随着治疗手段的发展, 乳腺癌患者的生存率逐步上升, CONCORD-3 研究显示, 多数国家乳腺癌患者 5 年生存率已超过 80%^[2]。然而, 随着生存期的延长, 长期治疗导致的毒性风险也进一步增加。骨髓抑制、心脏毒性、周围神经毒性、骨质疏松等是乳腺癌治疗过程中常见的不良反应, 而听力损伤在乳腺癌患者中罕见。本文就 1 例乳腺癌患者经长期抗肿瘤治疗后导致神经性耳聋的病例进行分析, 以为临床安全、合理用药提供参考。

1 病史摘要

患者, 女, 51 岁, 身高 158 cm, 体质量 43 kg, 已绝经, 因“确诊乳腺癌 8 年, 复发转移 2 年余”于 2021 年 7 月 22 日入院。患者主诉 6 月初出现听力下降, 7 月 20 日听力检查提示听力丧失。

患者于 2013 年 3 月体检时发现乳房结节。2013 年 4 月行左乳癌改良根治术, 术后病理: 浸润性小叶癌, 大小 4 cm×3 cm×3 cm, 淋巴结 (12/20) 见癌转移, 免疫组化: ER (90%, 强)、PR (70%, 强)、HER2 (1+)、KI67 (30%), FISH: 无扩增。诊断为“左乳腺浸润性小叶癌 (pT2N3M0, III C 期, HR + /HER2 - 型)”。术后行辅助化疗, 具体方案为: CEP 方案 (环磷酰胺+表柔比星+顺铂) 4 周期, 后序贯单周紫杉醇方案 3 周期 (12 次)。化疗后服用他莫昔芬 5 年。2018 年 11 月患者肿瘤指标明显升高, PET-CT 示腹主动脉左旁多发微小淋巴结。MRI 见左侧脑膜异常强化结节, 性质

待排。提示复发转移可能, 遂换用氟维司群。2019 年 6 月复查腹部 MRI: 腹膜后见散在小淋巴结, 较前增大。头颅 MRI: 左颞叶脑膜强化结节伴邻近颅骨信号异常, 同前相仿, 脑膜转移待排。疗效评估 PD (疾病进展), 改用卡培他滨至 2020 年 11 月; 期间因肿瘤标志物 CA153 明显升高 (111 U·mL⁻¹) 于 2020 年 7 月加用来曲唑, 服用 3 个月。2020 年 11 月患者 CA153 进一步升高至 220 U·mL⁻¹, 卡培他滨改为口服长春瑞滨, 治疗期间 CA153 等肿瘤标志物下降。2021 年 5 月肿瘤标志物再次升高, CA153 > 300 U·mL⁻¹。复查腹部 MRI: 升结肠壁增厚强化, 转移累及肠壁可能; 右侧结肠旁沟区局限腹膜增厚和小结节较前相仿。头颅 MRI: 未见颅内转移。PET-CT: ① 右侧内乳淋巴结转移; ② 多处肠道肠壁增厚, 建议行肠镜及 ¹⁸F-脱氧葡萄糖正电子发射计算机断层扫描 (¹⁸F-FDG PET); ③ 腹膜多发结节, 转移可能; ④ 左侧颞叶脑膜结节, 右侧头顶部皮下结节, 请结合头颅 MRI 判断; 考虑右侧内乳淋巴结、结肠转移, 2021 年 5 月 28 日开始服用哌柏西利联合依西美坦治疗。6 月初患者双耳听力开始下降, 未予重视, 进一步加重后 7 月 20 日于耳鼻喉科就诊, 行双耳听力检查, 诊断为双侧感音神经性耳聋不可逆, 纯音听阈测定: 右耳听力 51 dB、左耳听力 43 dB, 为中度耳聋。

患者既往健康状况良好, 否认高血压、糖尿病病史, 否认耳聋耳鸣史, 近期无感冒发烧, 除抗肿瘤药物外近期未服用其他药物。

2 分析与讨论

基金项目: 南通市卫生和计生委员会青年医学人才科研基金 (No. QB2019002)。

作者简介: 周佳琦, 女, 主要从事抗肿瘤临床药学工作, email: 441714238@qq.com * 通信作者: 苏颖杰, 女, 副主任药师, 主要从事抗肿瘤临床药学工作, email: suyongjie@renji.com

2.1 患者听力损失的原因分析

感音神经性听力损失与内耳病变有关，常见的病因有感染、肿瘤、噪音暴露、气压伤、创伤、自身免疫性听力损失、代谢性疾病、神经系统疾病、耳毒性物质以及放疗等^[3]。本例患者无耳聋耳鸣史，根据头颅 MRI 结果，颅内病变导致耳聋的可能性小；此外，患者近期未发生感染，否认自身免疫病、卒中、糖尿病、甲亢等可能引起听力损失的疾病，也未暴露在噪音、强气压、放疗等危险因素下；询问患者用药史，排除氨基糖苷类药物、速尿等耳毒性药物导致听力受损的可能。

化疗药物是导致听力损失最常见的药物种类

之一，内分泌药物则可能通过影响雌激素水平而损伤听力，该患者基本排除其他可能造成听力损伤的原因，对可能导致本例患者出现神经性耳聋的药物分析如下。

2.1.1 抗肿瘤药物耳毒性分析 患者因乳腺癌长期接受抗肿瘤药物治疗，病程较长，多种药物均可能引起神经性耳聋。根据诺氏 (Naranjo's) 评分量表^[4]对不良反应进行关联性评价，本例患者听力损伤与哌柏西利和依西美坦“可能有关”，长春瑞滨和顺铂等细胞毒药物为“可疑”药物，具体见表 1。

表 1 诺氏药物不良反应评估量表及各药物得分情况 (分)

相关问题	哌柏西利和依西美坦	长春瑞滨	顺铂	卡培他滨
该 ADR 先前是否有结论性报告	否 (0)	是 (+1)	是 (+1)	否 (0)
该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	是 (+2)	否 (-1)	否 (-1)	否 (-1)
该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	未知 (0)	否 (0)	否 (0)	否 (0)
该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	未知 (0)	未知 (0)	否 (0)	否 (0)
是否存在其他原因能单独引起该 ADR	是 (-1)	是 (-1)	是 (-1)	是 (-1)
该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	未知 (0)	未知 (0)	未知 (0)	否 (0)
药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	未知 (0)	未知 (0)	未知 (0)	否 (0)
该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	未知 (0)	未知 (0)	未知 (0)	否 (0)
患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	否 (0)	否 (0)	否 (0)	否 (0)
是否存在任何客观证据证实该反应	是 (+1)	是 (+1)	是 (+1)	是 (+1)
总得分	2	0	0	-1
关联性判断	可能有关	可疑	可疑	可疑

哌柏西利和依西美坦是治疗激素受体阳性乳腺癌的两种常用药物。哌柏西利为细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6 (cyclin-dependent kinase 4/6, CDK4/6) 抑制剂，常见的不良反应为中性粒细胞减少^[5]；依西美坦属于甾体类芳香化酶抑制剂，主要不良反应包括潮热、关节痛、疲劳、头痛等^[6]。检索国内外文献，发现目前尚无哌柏西利和依西美坦或同类药物导致听力损伤的报道。本例患者使用这两种药物 1 周后开始出现听力下降，并随着服用时间的延长，听力损伤逐渐加重，连续用药 1 个多月后诊断为中度神经性耳聋不可逆。从不良反应的出现和进展上看，与这两种药物有合理的时间关系。除这两种药物之外，患者曾使用过长春瑞滨、顺铂等耳毒性药物，不能完全排除这些药物导致或加重听力损伤的可能。根据患者症状及纯音听阈测定，该不良反应有客观证据支持。综合以上，哌柏西利和依西美坦的诺氏量表得分为 2 分，判定不良反应与这两种药物“可能有关”。

与本例患者听力损伤发生时间相近的另一药物为长春瑞滨。长春瑞滨属于长春碱类，该类物质已有致听力损伤的报道，包括长春新碱^[7-10]、

长春碱^[11]和长春瑞滨^[12]。根据已有文献，长春碱类相关耳毒性通常发生在化疗后的 4 周期内，一般表现为双侧感音神经性耳聋，可引起一过性的轻度听力下降，也可导致重度或不可逆的耳聋，这可能与药物品种、累积剂量、患者年龄和基线听力水平等有关^[7-12]。目前，关于长春瑞滨致耳毒性的报道仅有 1 例，且该例患者合并使用了听力损伤更为常见的紫杉醇，该名 54 岁的乳腺癌患者在使用长春瑞滨和紫杉醇治疗 2 周期后出现双侧急性耳鸣和轻度听力丧失，第 3 周期化疗后症状进一步加重，由于内耳感音神经结构发生了不可逆的损伤，停药后患者的听力损失和耳鸣并没有减轻^[12]。本例患者服用长春瑞滨半年余，用药期间未发生听力相关不良反应，患者出现听力降低时已停药 1 周余。根据诺氏评分量表，得分为 0 分，判断为“可疑”。

顺铂是临床应用中最具耳毒性的药物之一，可导致永久性双侧感音神经性听力损失，发生率在 20% ~ 75%^[13]，通常在治疗后的几天至几周后出现^[14]，但也可能出现在顺铂停药 2 年后^[15]。研究显示，顺铂具有长期耳毒性，较高水平的血清残留铂可在治疗后持续 5 ~ 20 年，并有可能加

重耳毒性^[16-17]。本例患者 2013 年曾使用顺铂进行术后辅助化疗,距今已有 8 年,与不良反应发生的时间间隔较长,但参考相关文献结果,考虑顺铂导致或加重该患者神经性耳聋亦不排除。根据诺氏评分量表,得分为 0 分,判断为“可疑”。

该患者还曾使用过卡培他滨、紫杉醇、环磷酰胺和表柔比星等细胞毒药物,但目前尚无卡培他滨导致听力损伤的报道,其他药物也无停药多年后出现耳毒性的报道,因此这些药物导致耳聋的可能性小。

2.1.2 内分泌药物引起听力损伤的机制分析 目前尚无文献表明内分泌药物与耳毒性相关。但几项评估乳腺癌治疗对听力水平影响的研究显示,乳腺癌患者在接受化疗和内分泌治疗后较治疗前听力敏感度降低,其可能原因是乳腺癌治疗导致雌激素水平的变化^[18-19]。近年来的研究发现,雌激素可通过雌激素受体对听力产生影响、促进内耳感觉上皮细胞的修复和生成、维持耳蜗内血管纹的正常功能、对听神经的保护等,雌激素缺失会导致听力受损^[20]。内分泌药物中,芳香化酶抑制剂通过阻断身体组织中雌激素的产生而起作用,选择性雌激素受体调节剂可阻断雌激素受体^[19],最终对听力产生影响。本例患者已绝经,术后长期使用内分泌药物,先后应用他莫昔芬、氟维司群、来曲唑,更换为哌柏西利和依西美坦后不久出现听力下降,存在雌激素水平下降或阻断了雌激素受体通路导致患者听力损伤的可能性。

2.2 神经性耳聋的处理与建议

患者乳腺癌晚期且已行多线治疗,目前可用药物有限,鉴于哌柏西利和依西美坦是引起耳聋的可能药物,可根据患者意愿和生存结局综合考虑是否继续维持原方案或更换为其他药物进行治疗。若选择更换治疗方案,吉西他滨无耳毒性且患者既往未使用过该药,可考虑换用该药治疗^[21-22]。新型抗肿瘤药物艾立布林和优替德隆亦是可选择的有效药物,但由于均属于微管蛋白抑制剂,与紫杉类药物作用相似,亦有损伤听神经的可能,因此应谨慎使用。药物导致的神经性耳聋破坏的是感知声音最重要又最脆弱的部位耳蜗毛细胞,很难治愈,目前尚无理想的治疗方法^[22-23]。患者目前已产生不可逆的听力下降,因此建议尽早佩戴助听器或植入人工耳蜗以提高生活质量^[22-23]。

3 小结

本案例是 1 例乳腺癌患者并发神经性耳聋的

罕见病例,患者最初出现听力下降未予重视,导致神经性耳聋无法逆转。该患者出现不可逆神经性耳聋的因素较为复杂,根据患者疾病史、用药史,结合相关检查,听力损伤可能与哌柏西利和依西美坦有关,进一步分析原因发现这可能也与雌激素水平降低相关。此外,长春瑞滨及顺铂引起耳毒性的可能性亦不完全排除。

因为尚无有效的治疗药物,所以预防耳聋的发生更为关键。尽管已有研究使用硫代硫酸钠和氨磷汀等药物预防或减少耳毒性^[22],但目前尚未批准肿瘤患者可使用的耳保护剂,因此不推荐患者在使用耳毒性药物的同时使用耳保护剂来预防。医务人员应提醒患者在治疗期间若出现听力下降需及时就诊,并根据患者意愿、生存结局、生活质量等综合考虑是否需继续使用可疑药物,从而使获益最大化。

参考文献

- [1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
- [2] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [3] Etiology of hearing loss in adults. UpToDate 临床顾问 [EB/OL]. (2020-12-16) [2022-03-17]. https://www.uptodate.com/contents/etiology-of-hearing-loss-in-adults?search=hearing%20loss&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1.
- [4] 袁立,张顺芝,何鸽飞,等. 诺氏评估量表评价氮氮平诱导的免疫性溶血性贫血[J]. 中南药学, 2017, 15(11): 1658-1661.
- [5] Desnoyers A, Nadler MB, Kumar V, et al. Comparison of treatment-related adverse events of different cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in metastatic breast cancer: a network meta-analysis [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 90: 102086.
- [6] Pfizer Italia s. r. l. 依西美坦片使用说明书 [Z]. 进口药品注册证号: H20160052.
- [7] Aydogdu I, Ozturan O, Kuku I, et al. Bilateral transient hearing loss associated with vincristine therapy: case report [J]. *J Chemother*, 2000, 12(6): 530-532.
- [8] Lugassy G, Shapira A. Sensorineural hearing loss associated with vincristine treatment [J]. *Blut*, 1990, 61(5): 320-321.
- [9] Lugassy G, Shapira A. A prospective cohort study of effect of vincristine on audition [J]. *Anticancer Drugs*, 1996, 7: 525-526.
- [10] Kalcioğlu MT, Kuku I, Kaya E, et al. Bilateral hearing

- loss during vincristine therapy: a case report [J]. *J Chemother*, 2003, 15 (3): 290-292.
- [11] Moss PE, Hickman S, Harrison BR. Ototoxicity associated with vinblastine [J]. *Ann Pharmacother*, 1999, 33 (4): 423-425.
- [12] Tibaldi C, Pazzagli I, Berrettini S, et al. A case of ototoxicity in a patient with metastatic carcinoma of the breast treated with paclitaxel and vinorelbine [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34 (7): 1133-1134.
- [13] Chovanec M, Abu Zaid M, Hanna N, et al. Long-term toxicity of cisplatin in germ-cell tumor survivors [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28 (11): 2670-2679.
- [14] Lanvers-Kaminsky C, Zehnhoff-Dinnesen AA, Parfitt R, et al. Drug-induced ototoxicity: mechanisms, pharmacogenetics, and protective strategies [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 101 (4): 491-500.
- [15] Yasui N, Adachi N, Kato M, et al. Cisplatin-induced hearing loss: the need for a long-term evaluating system [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2014, 36 (4): e241-245.
- [16] Sprauten M, Darrah TH, Peterson DR, et al. Impact of long-term serum platinum concentrations on neuro-and ototoxicity in cisplatin-treated survivors of testicular cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30 (3): 300-307.
- [17] Hjelle LV, Gundersen PO, Oldenburg JM, et al. Long-term platinum retention after platinum-based chemotherapy in testicular cancer survivors: a 20-year follow-up study [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35 (3): 1619-1625.
- [18] Jenkins V, Beveridge H, Low R, et al. Atypical hearing loss in women with breast cancer receiving adjuvant treatment [J]. *Breast*, 2006, 15 (3): 448-451.
- [19] Jenkins V, Low R, Mitra S. Hearing sensitivity in women following chemotherapy treatment for breast cancer: results from a pilot study [J]. *Breast*, 2009, 18 (5): 279-283.
- [20] 刁嵩, 赵立东, 白文佩. 雌激素对听力损失影响的研究进展 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2019, 20 (4): 382-384.
- [21] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 乳腺癌诊疗指南 (2021) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2021.
- [22] Landier W. Ototoxicity and cancer therapy [J]. *Cancer*, 2016, 122 (11): 1647-1658.
- [23] 司继刚. 药源性耳聋防治研究进展 [J]. *中国药物警戒*, 2013, 10 (12): 730-733.
- (收稿日期: 2022-02-10; 修回日期: 2022-06-05)

雷贝拉唑致急性间质性肾炎 1 例

张新然^{1, 2}, 徐德宇³, 杭永付^{1*}, 沈蕾³, 沙文刚³, 任天然³ (1. 苏州大学附属第一医院药学部, 江苏 苏州 215006; 2. 天津市第一中心医院药学部, 天津 300192; 3. 苏州大学附属第一医院肾内科, 江苏 苏州 215006)

关键词: 雷贝拉唑; 急性肾损伤; 急性间质性肾炎; 糖皮质激素; 不良反应

中图分类号: R969.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1672-2981(2022)10-2443-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.041

质子泵抑制剂 (proton pump inhibitors, PPIs) 与 H^+/K^+-ATP 酶结合, 减少胃酸的分泌, 在临床用于治疗胃食管反流病、酸相关性消化不良、胃十二指肠溃疡、根除幽门螺旋杆菌及预防非甾体抗炎药、皮质类固醇、抗凝剂或抗血小板治疗的患者发生应激性溃疡。PPIs 常见的不良反应包括头痛、腹痛、肠胃胀气、腹泻、便秘、恶心和皮疹等, PPIs 导致急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 并不多见, 以急性间质性肾炎 (acute interstitial nephritis, AIN) 为主^[1], 主要为

奥美拉唑和兰索拉唑, 雷贝拉唑较为罕见, 本文报道 1 例雷贝拉唑导致 AIN 的病例, 以期临床安全使用雷贝拉唑提供参考。

1 病例资料

患者, 男, 27 岁, 因“腹部疼痛 13 d”于 5 月 10 日转入肾内科治疗。患者 2021 年 4 月 27 日进食螺蛳粉后出现腹部疼痛, 当天伴有腹泻, 偶伴有腹胀, 无腰背部疼痛, 无恶心呕吐, 当地予口服硫糖铝混悬凝胶 (1 g bid, 昆明积大制药股份有限公司, 批号不详) 联合雷贝拉唑肠溶

基金项目: 国家临床重点专科 (临床药学) 建设项目资助 (No. 国卫办医函 [2018]292 号); 江苏省药学会 - 恒瑞医院药学基金科研项目 (No.H202032)。

作者简介: 张新然, 女, 硕士, 主要从事药理学研究, email: xinran@nankai.edu.cn * **通信作者:** 杭永付, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: hangyongfu1986@163.com

片 [20 mg qd, 卫材 (中国) 药业有限公司, 批号: 2003028] 护胃治疗 7 d 后自行停药, 因仍有腹痛, 5 月 4 日于上级医院就诊, 查白蛋白 $39.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿素 $8.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 肌酐 $210 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, β_2 -微球蛋白 $3.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 尿隐血+, 尿蛋白++, 白细胞酯酶+, 尿葡萄糖++; 血红蛋白 $130 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 血小板 $367 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$, 白细胞 $9.1 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$, C 反应蛋白 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $4.87 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 糖化血红蛋白 5.2%。未服用药物, 2 d 后复查, 尿素 $7.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 肌酐 $201 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 尿酸 $161 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, β_2 -微球蛋白 $3.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 肝胆胰脾超声: 胆囊壁毛糙。肾输尿管膀胱前列腺超声无异常。二便正常, 体重无明显变化。患者既往体健, 自述 2019 年体检肾功能正常, 具体不详, 平素偶有胃痛, 进食辛辣后有腹泻, 未行胃镜检查。

患者查体一般情况好, 体温 $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$, 心率 $80 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 呼吸 $18 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 血压 $126/89 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)。入院诊断为 AKI, 给予口服金水宝 1.68 g tid 、尿毒清 5 g tid 保肾治疗。2021 年 5 月 11 日复查肌酐 $230.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 尿素 $8.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 胱抑素 C $1.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 钾 $3.40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 钙 $2.57 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 尿常规: 颗粒管型 $10.36 \text{ 个} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 尿糖+++ , 白细胞 $43.88 \text{ 个} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 透明管型 $1.73 \text{ 个} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 尿隐血++, 尿蛋白质++, 尿比重 1.017, 24 h 尿蛋白 $1.12 \text{ g}/24 \text{ h}$; 血红蛋白 $119 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ↓; 血沉 $53 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$; 肾脏超声示双肾大小正常, 回声无明显增强。5 月 15 日肾活检病理结果示: AIN, 免疫荧光染色阴性, 肾间质极大量炎细胞浸润, 单个核细胞为主, 未见明显间质纤维化, 偏振光阴性。遂加用甲泼尼龙琥珀酸钠 (40 mg ivgtt qd) 及对症治疗。5 月 18 日患者肌酐 $168 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 较前明显下降, 钾 $3.48 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 较前回升, 于 5 月 19 日好转出院。出院后继续服用泼尼松片 40 mg qd , 枸橼酸钾补钾, 替普瑞酮护胃和碳酸钙 D_3 补钙治疗, 肾内科门诊随访。5 月 24 日查肌酐 $145.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 6 月 7 日泼尼松调整为 30 mg qd , 查肌酐 $123.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 6 月 21 日泼尼松调整为 25 mg qd , 查肌酐 $118.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 7 月 5 日泼尼松调整为 20 mg qd , 查肌酐 $107.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 钾 $3.71 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿隐血(-), 尿蛋白+。7 月 19 日泼尼松调整为 15 mg qd , 查肌酐 $113 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 尿隐血(-), 尿蛋白

弱阳性。8 月 2 日泼尼松调整为 5 mg qd , 9 月 27 日查肌酐 $107.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 尿蛋白阴性。

2 讨论

2.1 国内外文献分析及作用机制

Ruffenach 等^[2]在 1992 年首次报道了 1 例 74 岁老年女性患者使用奥美拉唑致 AIN 的案例, 停药后肾功能恢复。张晓东等^[3]报道了 5 例奥美拉唑导致的 AIN 的病例, 随后其他 PPIs 相继被报道^[4], 几乎所有 PPIs 都有可能引起 AKI, 常见的为奥美拉唑和兰索拉唑。据统计, AIN 占 AKI 中的 8%, 其中 70%~90% 是由药物引起的, PPIs-AIN 是药物诱导性 AIN 的第二大病因^[1]。一项大型病例对照研究发现高龄 (> 60 岁) 是 PPIs-AIN 的危险因素, 且近期使用 PPIs 与过去使用相比, AIN 的风险显著增加^[5]。一项纳入 19 522 例 PPIs-AKI 患者的真实世界研究表明, 中年患者发病率高于老年患者 ($53.04\% \text{ vs } 33.94\%$); 女性比男性更易受到影响 ($55.42\% \text{ vs } 44.58\%$); 发生 AKI 的中位时间为服用 PPIs 后 446 ($16 \sim 2176$) d; PPIs-AKI 的病死率一般为 5.69%, 住院率为 8.94%^[4]。另有研究报道 PPIs-AIN 的发生时间在使用药物后的 1 周~9 个月, 通常为 10~11 周, 停药后再次接触致病药物发病较为迅速^[6]。

PPIs-AIN 的发病机制并不明确, 可能与 PPIs 介导的免疫炎性造成的肾毒性有关。研究认为 PPIs-AIN 是由 PPIs 产生的免疫复合物沉积在肾间质中, 或以半抗原的形式结合在肾小管基底膜, 诱导免疫反应的发生^[7]。此外, 肾间质中的炎性反应会激活巨噬细胞, 继而释放蛋白溶解酶、活性氧等物质加重肾损害^[8]。研究发现 PPIs-AIN 相关炎症效应通路包括 Th1 及 Th17 通路^[9]。奥美拉唑对外周血单核巨噬细胞功能有增强作用, 并可能影响 T 细胞功能^[10], 但有报道显示, 在奥美拉唑治疗期间, 外周血 CD4^+ 细胞不受影响, Th-1 通路受到抑制^[11]。因此, 需要进一步研究阐明 PPIs 免疫介导的肾毒性机制。

2.2 不良反应相关性分析

根据药物不良反应关联性分析标准, 本例患者服用硫糖铝和雷贝拉唑肠溶片 7 d 后检查发现血肌酐升高, 存在时间相关性。硫糖铝混悬凝胶的说明书及文献均没有引起 AIN 的相关报道, 因此相关性很小。美国食品药品监督管理局发布的雷贝拉唑严重的不良反应包括 AIN, 且有相关文献报道^[12-14]。本例患者服用雷贝拉唑引起的 AIN 符合该药已知的不良反应类型。患者停药后明确

诊断, 给予糖皮质激素积极治疗, 3 d 后血肌酐下降 27%, 症状减轻, 未再使用雷贝拉唑。药物不良反应关联性评分为很可能, 诺氏评分 8 分, 也为很可能。另患者因食用螺蛳粉后出现腹痛、腹泻, 经查询螺蛳粉主要食材为米粉、螺蛳、腐竹及其他常见调料, 文献未见螺蛳粉引起肾损伤的报道, 故予以排除。综上, 本例患者的 AIN 考虑由雷贝拉唑引起。

药物是引起 AKI 的主要原因, Chen 等^[5] 研究报道, 雷贝拉唑导致 AKI 的平均发生时间为 9 d (3 ~ 25 d), 病死率为 15.35%, 高于其他 PPIs。本例患者为青年男性, 无其他基础疾病, 服用雷贝拉唑 7 d 后发现肌酐升高、低钾、轻度贫血、血尿、蛋白尿、尿糖等特征。患者无容量减少, 肾、输尿管、膀胱、前列腺超声无异常, 遂排除肾前性、肾后性 AKI, 推断为肾性 AKI, 最终病理结果证实为 AIN。

2.3 AIN 的治疗建议

考虑到 PPIs-AIN 潜在的免疫机制, 及时停用可疑药物, 同时皮质类固醇给药被认为是治疗的选择, 但缺乏大型随机对照研究^[15]。一项多中心回顾性研究显示, 在接受糖皮质激素治疗的患者中, 超过一半的患者基本肾完全恢复, 而其余患者仍处于肾衰竭状态, 而几乎一半未接受糖皮质激素治疗的患者仍在进行透析, 但早期治疗能延缓间质纤维化的进展^[16]。该患者停用雷贝拉唑且予甲泼尼龙琥珀酸钠及对症治疗, 治疗 5 周后复查血肌酐下降到 $107.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与最高值相比下降了 53%, 尿素氮、血钾恢复正常。

3 小结

PPIs-AKI 后若未及时处理, 随着时间的推移, 急性炎症和肾小管间质损伤会导致肾间质纤维化和慢性间质性肾炎, 最终发展成终末期肾病^[17]。在临床工作中, 应严格把握 PPIs 适应证, 避免合用其他肾毒性药物, 定期监测肾功能。

参考文献

[1] Morschel CF, Mafra D, Eduardo JCC. The relationship between proton pump inhibitors and renal disease [J]. *J Bras Nefrol*, 2018, 40 (3): 301-306.
 [2] Ruffenach SJ, Siskind MS, Lien YH. Acute interstitial nephritis due to omeprazole [J]. *Am J Med*, 1992, 93 (4): 472-473.
 [3] 张晓东, 方敬爱, 武明虎. 奥美拉唑导致间质性肾炎的临床分析 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2006, 7 (9):

543.

[4] Blank ML, Parkin L, Paul C, et al. A nationwide nested case-control study indicates an increased risk of acute interstitial nephritis with proton pump inhibitor use [J]. *Kidney Int*, 2014, 86 (4): 837-844.
 [5] Chen G, Ning LJ, Qin Y, et al. Acute kidney injury following the use of different proton pump inhibitor regimens: a real-world analysis of post-marketing surveillance data [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2021, 36 (1): 156-162.
 [6] Praga M, Sevillano A, Auñón P, et al. Changes in the aetiology, clinical presentation and management of acute interstitial nephritis, an increasingly common cause of acute kidney injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30 (9): 1472-1479.
 [7] Sierra F, Suarez M, Rey M, et al. Systematic review: proton pump inhibitor-associated acute interstitial nephritis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007, 26 (4): 545-553.
 [8] Brewster UC, Perazella MA. Acute kidney injury following proton pump inhibitor therapy [J]. *Kidney Int*, 2007, 71 (6): 589-593.
 [9] Berney-Meyer L, Hung N, Slatter T, et al. Omeprazole-induced acute interstitial nephritis: a possible Th1-Th17-mediated injury? [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2014, 19 (6): 359-365.
 [10] Kountouras J, Boura P, Apostolides G, et al. In vivo effect of omeprazole on HLA-DR expression and the monocyte-macrophage function in patients with duodenal ulcer disease [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1994, 16 (3): 437-448.
 [11] Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Omeprazole and regulation of cytokine profile in helicobacter pylori-infected patients with duodenal ulcer disease [J]. *Hepatogastroenterology*, 2000, 47 (35): 1301-1304.
 [12] Geevasinga N, Coleman PL, Roger SD. Rabeprazole-induced acute interstitial nephritis [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2005, 10 (1): 7-9.
 [13] Härmark L, van der Wiel HE, de Groot MC, et al. Proton pump inhibitor-induced acute interstitial nephritis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64 (6): 819-823.
 [14] 庞尚一, 刘超. 雷贝拉唑钠肠溶片致急性间质性肾炎 [J]. *药物不良反应杂志*, 2017, 19 (4): 312-313.
 [15] Moledina DG, Perazella MA. Drug-induced acute interstitial nephritis [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12 (12): 2046-2049.
 [16] González E, Gutiérrez E, Galeano C, et al. Early steroid treatment improves the recovery of renal function in patients with drug-induced acute interstitial nephritis [J]. *Kidney Int*, 2008, 73 (8): 940-946.
 [17] Moledina DG, Perazella MA. PPIs and kidney disease: from AIN to CKD [J]. *J Nephrol*, 2016, 29 (5): 611-616.

(收稿日期: 2021-12-01; 修回日期: 2022-03-04)

莫西沙星致药物超敏反应综合征 1 例

张登亮¹, 周安琴^{2*} (1. 泸州市人民医院药学部, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院临床药学办公室, 四川 泸州 646000)

关键词: 莫西沙星; 药物超敏反应综合征; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2022)10-2446-02

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.042

药物超敏反应综合征 (drug induced hypersensitivity syndrome, DIHS) 是一种罕见但可能危及生命的不良反应^[1]。可引起 DIHS 的常见药物有抗癫痫药物 (卡马西平、苯妥英钠、拉莫三嗪)、抗菌药物 (β -内酰胺类、磺胺类、抗结核药、四环素)、别嘌醇等。本文就 1 例莫西沙星致 DIHS 进行报道, 以期临床合理用药提供参考。

1 临床资料

患者女, 35 岁, 157 cm, 体质量 53 kg, 因“血肌酐升高 6 年, 咳嗽、咳痰 2 周”于 2021 年 11 月 12 日入院。入院测体温 36.6℃, 血压 202/133 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。血常规: 白细胞计数 (WBC) $5.67 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 中性粒细胞百分比 (N%) 77.6% \uparrow , 红细胞计数 $2.82 \times 10^{12} \cdot L^{-1}$ \downarrow , 血红蛋白 $77 g \cdot L^{-1}$ \downarrow , 嗜酸性粒细胞 (EO) $0.14 \times 10^9 \cdot L^{-1}$; 肝功能: 谷丙转氨酶 (ALT) $44 U \cdot L^{-1}$ \uparrow , 谷草转氨酶 (AST) $26 U \cdot L^{-1}$, 碱性磷酸酶 (ALP) $126 U \cdot L^{-1}$ \uparrow , 谷氨酰转肽酶 (GGT) $80 U \cdot L^{-1}$ \uparrow , 乳酸脱氢酶 (LDH) $253 U \cdot L^{-1}$ \uparrow ; C 反应蛋白 (CRP) $23.05 mg \cdot L^{-1}$ \uparrow ; 降钙素原 (PCT) $0.57 ng \cdot L^{-1}$ \uparrow ; 肌酐 $1045 \mu mol \cdot L^{-1}$ \uparrow 。胸部 CT 提示双肺炎症及条索灶。痰培养阴性。入院诊断: ①慢性肾脏病 5 期、肾性贫血、肾性高血压、高血压心脏病; ②肺部感染; ③中度肺动脉高压伴三尖瓣、二尖瓣中度关闭不全。否认吸烟、饮酒史, 否认食物、药物过敏史。入院后立即给予莫西沙星 (拜耳医药, 批号: BXJB62) 400 mg ivgtt qd 抗感染, 硝苯地平+特拉唑嗪降压, 重组人促红素+多糖铁复合物纠正贫血, 呋塞米利尿, 碳酸氢钠碱化尿液, 并规律进行血液透析。11 月 18 日血压 198/124 mmHg, 加用厄贝沙坦降压。

11 月 18 日患者开始发热 (38.4℃), 查感染指标无明显异常, 血培养阴性。抗菌药物调整为哌拉西林他唑巴坦后仍发热, 复查血培养阴性, G 试验、GM 试验阴性。抗菌药物升级为美罗培南后仍反复发热 (37.4~40.4℃), 12 月 4 日查 WBC $1.04 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ \downarrow , PCT $0.93 ng \cdot mL^{-1}$ \uparrow , CRP < 10

$mg \cdot L^{-1}$, EO $0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 。肥达试验阴性。临时给予重组人粒细胞刺激因子升白细胞。

12 月 5 日加用莫西沙星 (拜耳医药, 批号: BXJB62) 400 mg ivgtt qd。12 月 6 日患者诉皮肤瘙痒, 左上肢及胸腹部散在红斑样皮疹。考虑莫西沙星过敏, 停药并加用氯雷他定。

12 月 8 日皮疹加重, 布及全身。停用美罗培南, 给予地塞米松 5 mg iv qd + 地奈德软膏外用 bid。12 月 10 日患者出现颜面部水肿, 眼睑处紫红斑, 伴皮肤触痛及关节痛。临床药师建议使用甲泼尼龙 40 mg ivgtt bid 及静注人免疫球蛋白 10 g ivgtt qd, 医师采纳。

12 月 11 日查肝功能示: ALT $8 U \cdot L^{-1}$, AST $46 U \cdot L^{-1}$ \uparrow , ALP $146 U \cdot L^{-1}$ \uparrow , GGT $154 U \cdot L^{-1}$ \uparrow , LDH $441 U \cdot L^{-1}$ \uparrow 。心肌酶: 肌红蛋白 (MYO) $76.5 \mu g \cdot L^{-1}$ \uparrow , 肌钙蛋白 T (cTNT) $0.19 \mu g \cdot L^{-1}$ \uparrow 。12 月 13 日患者未再发热, 双眼分泌物增多伴红肿卡痛, 双耳暗黄色分泌物, 胸部可见少量小水疱, 双耳廓及口唇黏膜糜烂。经全院会诊后加用依那西普 50 mg ih qw, 甲泼尼龙减量为 40 mg ivgtt qd, 给予生理盐水冲洗眼部, 康复新液漱口等处理, 患者因经济原因拒绝继续使用免疫球蛋白。12 月 14 日未见新发皮疹, 皮疹颜色较前变淡、疼痛减轻, 眼睛及外耳道分泌物减少, 血常规: WBC $5.65 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, EO $0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 单核细胞 (MONO) $0.22 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 未查见异型淋巴细胞。

12 月 17 日患者眼睑红肿及面部水肿较前减轻, 皮肤瘙痒及疼痛明显减轻, 面颈部及上肢可见脱屑, 无表皮松解, 停用甲泼尼龙及依那西普。患者全身皮疹逐渐消退、脱屑, 12 月 22 日基本恢复为正常皮肤。

2 讨论

2.1 诊断

DIHS 发病机制尚未完全阐明, 目前认为是由 CD8⁺T 细胞介导的迟发型超敏反应。在皮疹出现数天前, 常出现瘙痒和发热的前驱症状, 持续数周。DIHS 目前尚无统一的诊断标准, 根据专家共识^[2], 其特点包括: ①迟发性皮疹; ②淋巴结

作者简介: 张登亮, 男, 药师, 主要从事临床药学工作, email: 714652263@qq.com *通信作者: 周安琴, 女, 药师, 主要从事临床药学工作, email: 273755212@qq.com

大；③ 发热；④ 内脏损害：肝酶升高、间质性肾炎、间质性肺炎或心肌炎；⑤ 血液学异常：白细胞升高或降低，嗜酸性粒细胞升高或异型淋巴细胞升高；⑥ 停用诱发药物病情复发或加重。本患者使用莫西沙星 24 d 后再次使用该药时出现皮疹；皮疹出现之前有反复发热；病程中出现肝酶升高、心肌酶异常、白细胞降低；停药后病情仍继续加重。根据欧洲诊断 DIHS 的 RegiSCAR 评分系统^[3]，该患者得分为 4 分，评价为“很可能”。DIHS 通常伴有嗜酸性粒细胞升高，但本患者未见嗜酸性粒细胞升高，可能与 DIHS 临床表现个体差异有关^[4-5]。

2.2 关联性评价

该不良反应发生后，临床药师对患者所用药物进行排查，通过文献检索，未发现硝苯地平、特拉唑嗪、厄贝沙坦、重组人促红素、多糖铁复合物、呋塞米及碳酸氢钠引起 DIHS 的报道，患者初次使用莫西沙星后出现发热，再次使用时又出现严重过敏反应，考虑为莫西沙星引起的可能性较大。根据诺氏评估量表法^[6]对莫西沙星药品不良反应进行评估，得分为 7 分，评价结果为“很可能”。同时，根据我国不良反应监测中心关联性评价法^[7]，评价结果亦为“很可能”。因此高度怀疑该例 DIHS 为莫西沙星所致。

2.3 DIHS 的治疗

目前，糖皮质激素及免疫球蛋白在 DIHS 的治疗中应用广泛^[8-9]。全身性糖皮质激素治疗是改善 DIHS 急性期临床症状的标准疗法^[1]。中等剂量糖皮质激素可显著改善临床症状，可口服 1.0 mg/(kg·d) [儿童 1.5 mg/(kg·d)] 泼尼松或同等剂量其他糖皮质激素，若症状无改善或出现加重，可考虑静脉给予 0.5~1.0 g·d⁻¹ [儿童 20 mg/(kg·d)] 甲泼尼龙冲击治疗 3 d^[2]。注射免疫球蛋白在 DIHS 急性期有效^[10]，一般用量为 0.2~0.4 g/(kg·d)，3 d 后如果效果不明显，可增至 0.6~0.8 g/(kg·d)，联用糖皮质激素疗效更优^[1]。本例患者初始使用地塞米松 5 mg iv qd，治疗效果不佳，因此临床药师建议给予甲泼尼龙联合静注人免疫球蛋白。

患者在使用了糖皮质激素联合静注人免疫球蛋白 3 d 后病情无明显缓解，遂给予依那西普治疗。依那西普为一种肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 抑制剂，目前国内外有少数研究报道 TNF-α 拮抗剂可作为 DIHS 的替代治疗^[12-14]。一项随机对照试验显示与系统性皮质类固醇治疗相比，依那西普治疗可降低史-约综合征/中毒性表皮坏死松解症的病死率和皮肤愈合时间，可作为治疗细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 介导的严重皮肤不良反应的有效替代品^[15]。Kim 等^[14]报道 1 例皮质类固醇诱导的 DIHS 使用依那西普 3 d 后，生命体征稳定，皮疹也明显好转。但目前依那西普未获批用于治疗 DIHS 的适应证，属于超说明书用药。

该患者使用依那西普后病情逐渐好转。

3 小结

该患者所有病原学检测均为阴性，感染指标不高，使用抗菌药物后仍反复发热，此类情况应及时考虑药物因素，而非一味地加强抗感染，以免使病情复杂化、严重化。患者在药物治疗过程中若出现疑似 DIHS 相关症状，早期诊断和及时停用致敏药物对改善患者的预后至关重要，临床应引起重视。

参考文献

- [1] Shiohara T, Mizukawa Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DiHS) /drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): an update in 2019 [J]. *Allergol Int*, 2019, 68 (3): 301-308.
- [2] 宋志强, 郝飞. 药物超敏反应综合征诊治专家共识 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2018, 51 (11): 787-790.
- [3] 李小乐, 郭伟, 宁静, 等. 头孢菌素致儿童 DRESS 综合征 2 例 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42 (6): 673-674.
- [4] Kardaun SH, Sekula P, Valeyrie-Allanore L, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): an original multisystem adverse drug reaction. Results from the prospective RegiSCAR study [J]. *Br J Dermatol*, 2013, 169 (5): 1071-1080.
- [5] 徐昌静, 钟晓燕, 李梦雅, 等. 头孢曲松致儿童药物超敏反应综合征 1 例 [J]. *儿科药学杂志*, 2022, 28 (3): 65-66.
- [6] 雷海波, 刘湘. 哌拉西林他唑巴坦致药物超敏反应综合征 1 例 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (8): 1748-1750.
- [7] 国家食品药品监督管理局药品评价中心. 《药品不良反应报告和监测管理办法》培训教材 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 47-49.
- [8] 华夏, 刘宏杰, 张敏, 等. 药物超敏反应综合征 55 例临床分析 [J]. *中国皮肤性病杂志*, 2015, 29 (3): 262-264.
- [9] 刘聪, 许红梅, 谭利平, 等. 儿童药物超敏反应综合征 22 例临床分析 [J]. *临床儿科杂志*, 2017, 35 (7): 522-524.
- [10] Isaacs M, Cardones AR, Rahnema-Moghadam S, et al. DRESS syndrome: clinical myths and pearls [J]. *Cutis*, 2018, 102 (5): 322-326.
- [11] Shioham T, Kano Y. Drug reaction with eosinophilia and svstemic symptoms (DRESS): incidence, pathogenesis and management [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16 (2): 139-147.
- [12] 陈玲玲, 路丹丹, 施辛, 等. 肿瘤坏死因子 α 拮抗剂治疗一例伴嗜酸性粒细胞增多和系统症状药疹的临床观察 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2013, 46 (9): 621-625.
- [13] Lemam RE, Chen LL, Shi X, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) successfully treated with tumor necrosis factor-α inhibitor [J]. *JAAD Case Rep*, 2017, 3 (4): 332-335.
- [14] Kim S, Joo EJ, Kim UJ, et al. Corticosteroid-induced drug reaction with eosinophilia and systematic symptoms successfully treated with a tumor necrosis factor alpha inhibitor [J]. *APJ AI*, Doi: 10.12932/AP-210819-0628.
- [15] Wang CW, Yang LY, Chen CB, et al. Randomized, controlled trial of TNF-α antagonist in CTL-mediated severe cutaneous adverse reactions [J]. *Clin Invest*, 2018, 128 (3): 985-996.

(收稿日期: 2022-04-07; 修回日期: 2022-05-17)

经验介绍

象皮粉治疗烧伤后慢性瘢痕溃疡 1 例

罗浩铭¹, 魏子人², 白钦钦³, 徐涛¹, 胡俊¹, 唐平¹, 黄国宝⁴, 王金晶⁴, 盛健峰^{1*} (1. 绵阳市第三人民医院·四川省精神卫生中心甲状腺头颈颌面外科, 四川 绵阳 621054; 2. 绵阳市人民医院烧伤整形外科, 四川 绵阳 621000; 3. 贵州医科大学附属医院儿科, 贵阳 550004; 4. 济南市中心医院烧伤整复外科, 济南 250013)

关键词: 瘢痕溃疡; 象皮粉; 创面愈合; Marjolin 溃疡

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2448-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.043

烧伤事故一直是一个严重的公共卫生问题, 虽然其发生率随着社会经济的发展不断降低, 但在经济较落后的地区一直居高不下。烧伤患者的瘢痕发病率高达 91%, 烧伤后瘢痕通常会反复破溃难以愈合, 且存在恶变的可能。慢性瘢痕溃疡愈合速度较慢, 使用常规促愈合药物效果欠佳。象皮粉是将大象皮经多道工序炮制而成的粉末状外用药物, 在慢性创面的治疗中能发挥其独特的优势。本文报道 1 例 97% 总体表面积 (TBSA) 大面积深度烧伤患者 4 处慢性瘢痕溃疡应用象皮粉后获得的良好疗效, 通过分析整个用药过程及慢性瘢痕溃疡发生机制, 并与 Marjolin 溃疡相鉴别, 以期为慢性瘢痕溃疡的治疗提供一定参考。

1 病例资料

患者, 男性, 42 岁, 67 kg。因“全身多处烧伤 5 年余, 瘢痕溃疡 2 月余”于 2021 年 10 月 5 日入院。患者 5 年前不慎掉入铁水中, 致全身 97% TBSA 三度烧伤后行分次分期削痂植皮手术封闭创面。此后一直行硅酮凝胶、压力疗法、光电治疗和手术等抗瘢痕综合治疗以及功能部位康复训练。2 个月前因瘢痕瘙痒, 抓挠致瘢痕皮肤破溃, 未给予正规治疗。患者无糖尿病、免疫功能障碍等影响创面愈合的疾病。入院查体: 体温 36.6℃, 脉搏 86 次·min⁻¹, 呼吸频率 17 次·min⁻¹, 血压 112/77 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。血细胞分析: 白细胞计数 5.3×10⁹·L⁻¹, 中性粒细胞百分比 51.40%, C 反应蛋白 3.20 mg·L⁻¹。创面分泌物培养: 金黄色葡萄球菌 (++)。瘢痕溃疡边缘组织活检: 上方为数层上

皮细胞, 下层为胶原纤维伴少量炎性细胞, 未见异型增生的鳞状细胞, 可排除 Marjolin 溃疡。专科查体: 瘢痕溃疡主要位于左肘部和右下肢, 左肘部可见 4 cm×6 cm 大小溃疡创面, 右下肢大腿内侧见一处 2 cm×6 cm 和两处 1 cm×2 cm 大小溃疡创面, 创面坏死组织覆盖, 少量渗出, 创周稍红肿。患者全身广泛瘢痕增生, 多处瘢痕高出体表 5~10 mm, 部分成条索状, 充血明显, 表皮菲薄, 双侧大腿可见粗大增生的血管网。入院诊断: ①慢性瘢痕溃疡; ②全身多处瘢痕增生。

药物治疗过程: 患者全身多处瘢痕反复破溃, 形成时愈时发的不稳定性瘢痕溃疡。因患者全身正常皮肤少, 手术治疗创伤较大, 入院后以换药治疗为主。换药时通常先以锐器刮去溃疡表面坏死组织, 使创面新鲜出血, 这样能使内源性细胞因子释放从而加速创面愈合。清创消毒后以重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子凝胶 (rhGM-CSF)、重组人碱性成纤维细胞生长因子 (rh-bFGF) 及多黏菌素 B 软膏外用后, 再以无菌纱布包扎。在此前瘢痕溃疡的治疗中, 使用该药物组合治疗, 大部分溃疡在 1 个月内就能愈合。而本次左肘部和右下肢大腿内侧瘢痕溃疡经上述换药治疗效果欠佳, 换药治疗 2 个月未显示出愈合倾向 (见图 1A, 1C)。因此, 笔者尝试单用象皮粉 (规格: 1 g/袋, 北京华邈中药工程技术开发中心) 换药治疗, 换药时先清创消毒, 再以象皮粉覆盖于瘢痕溃疡表面, 厚度 3~5 mm, 换药间隔为 2~3 d。创面经过 3 次换药后呈现出愈合趋势, 换药 1 个月后基本愈合 (见图 1B, 1D)。

作者简介: 罗浩铭, 男, 住院医师, 主要从事烧伤、慢性创面和头颈部常见病的治疗, email: luohaoming1022@163.com

*通信作者: 盛健峰, 男, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事甲状腺疾病、头颈部及颌面部肿瘤的防治, email: 1078388932@qq.com

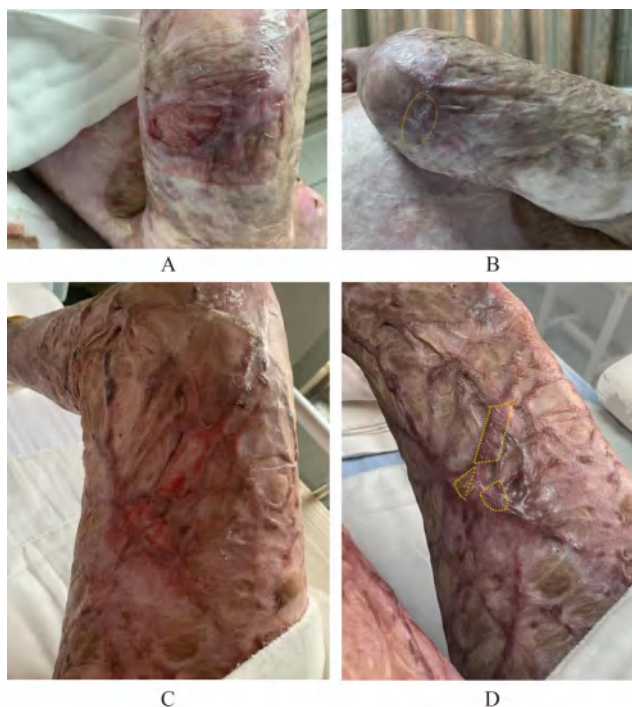


图1 象皮粉治疗烧伤后慢性瘢痕溃疡

A. 左肘部约 4 cm×6 cm 大小慢性瘢痕溃疡；B. 左肘部瘢痕溃疡经象皮粉换药 1 个月后基本愈合；C. 右下肢大腿内侧一处约 2 cm×6 cm，两处瘢痕溃疡 1 cm×2 cm 大小溃疡；D. 右下肢瘢痕溃疡经象皮粉换药 1 个月后基本愈合

2 讨论

瘢痕的产生机制尚不明确，可能与纤维蛋白原、胶原异常沉积、毛细血管异常增生等因素有关^[1]。其严重程度与患者种族、年龄、激素水平、伤口大小和深度、受影响的解剖区域以及伤口的机械张力等多种因素相关^[2]。瘢痕愈合是一种不完善的愈合方式，伤及真皮网状层的伤口都会伴有不同程度的瘢痕增生。其特征是以胶原蛋白和纤维蛋白为主的细胞外基质（ECM）过度沉积，而纤维蛋白原是这一过程的关键效应细胞，其合成的 I、III 型胶原蛋白通过释放转化生长因子（TGF）- β 1 和金属蛋白酶等多种细胞因子来调控 ECM 的代谢，该过程的失调导致了 ECM 的堆积和瘢痕的形成^[3]。瘢痕由于缺乏正常的皮肤组织，破溃后通常难以愈合。在临床中不稳定性瘢痕溃疡的治疗非常棘手。

该患者因大面积三度烧伤，早期采用自体微粒皮联合异体皮移植的方法来封闭创面，但这使愈合后瘢痕增生挛缩严重，瘢痕表皮较薄且与皮下组织连接不紧密，导致瘢痕溃疡发病率较高。患者瘢痕溃疡多位于功能部位，常因活动摩擦、抓挠而引起瘢痕破溃，同时存在创面感染及免疫功能降低而导致瘢痕溃疡经久不愈。研究表明，

血管紧张素 II 可能通过血管紧张素 I 型受体和 II 型受体参与不稳定性瘢痕溃疡的形成^[4]。由于长期的刺激、创面释放的组织毒素及内源性促生长因子、感染、免疫缺陷、免疫防御功能障碍等可使瘢痕溃疡呈现异型增生，甚至发生癌变^[5]。Marjolin 溃疡是一种罕见的侵袭性鳞状细胞癌，起源于慢性不愈合的皮肤炎症或外伤，在烧伤后发病率高达 2%^[6]，在慢性难愈性溃疡中发病率更高^[7]。Marjolin 溃疡通常出现以下三联征：结节形成、硬结和瘢痕溃疡^[8]。Pekarek 等^[9]提出超过 3 个月的慢性溃疡出现边缘外翻、肉芽组织增生活跃、化脓及疼痛等特征，必须进行溃疡边缘组织活检。Marjolin 溃疡也是导致创面不愈合的因素之一，笔者在患者溃疡边缘切除小块组织进行活检，最终排除了 Marjolin 溃疡。

象皮粉治疗创面在始载于 1575 年《医学入门》，后在《本草新编》及《开宝本草》中都有详细的记载，并提及其可治疗疮疡经久不愈。象皮的主要成分含有肌酸、激动蛋白、维生素等，外用可刺激毛细血管再生从而改善创面组织血供、促进表皮细胞分化及肉芽组织再生。该患者瘢痕反复破溃，基底肉芽老化，细菌繁杂，形成慢性不稳定性瘢痕溃疡创面。外用药物的选择是治疗慢性创面的一个重要因素^[10]，常规使用 rhGM-CSF 和 rh-bFGF 换药，溃疡创面面积未见缩小，因此改用象皮粉行换药治疗，每次换药前均测量创面大小，大致估算溃疡创面面积，并与前次进行对照。我们发现每次使用象皮粉换药后，创面均较前次缩小，直至创面完全上皮化。象皮粉作为象皮生机膏的君药，可减少白细胞介素-6（IL-6）、肿瘤坏死因子（TNF- α ）等炎症因子的产生，减少创面组织渗液，加速肉芽化进程，并且能在糖尿病皮肤溃疡、下肢静脉性溃疡等慢性创面的治疗中起到良好的效果^[11-12]。

总结该病例的治疗经验，我们认为该患者瘢痕溃疡的治疗关键环节在于：① 每次换药均使用锐器清创，慢性创面表面约 78.2% 会形成细菌生物膜，从而阻止创面愈合^[13]，常规的消毒无法破坏细菌生物膜，所以换药时使用锐器清创，在破坏细菌生物膜的同时使瘢痕愈合重新启动炎症期、细胞增殖期及组织修复期这一急性创面的正常愈合流程；② 该瘢痕溃疡创面渗出较多，过度湿润会导致创面浸渍，不利于创面愈合，象皮粉可部分中和渗液，收敛伤口，加速创面愈合；③ 创面包扎固定牢固，嘱患者减少活动，避免摩擦导致

创面破溃。因象皮粉治疗慢性创面的报道较少，其作用机制还需要更多资料支持，本文希望通过报道该例患者的使用情况及治疗效果，为临床工作者提供一定参考。

参考文献

- [1] 岑瑛, 刘睿奇. 瘢痕的研究新进展及临床治疗[J]. 中华烧伤杂志, 2019, 35(12): 839-841.
- [2] Niessen FB, Spauwen PH, Schalkwijk J, et al. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 104(5): 1435-1458.
- [3] Hayakawa T, Hashimoto Y, Myokei Y, et al. Changes in type of collagen during the development of human post-burn hypertrophic scars[J]. *Clin Chim Acta*, 1979, 93(1): 119-125.
- [4] 刘宏伟, 程飏, 付小兵, 等. 血管紧张素 II 受体在人不稳定慢性瘢痕溃疡中的表达[J]. 中国临床康复, 2006, 10(20): 86-88, 198.
- [5] 张家平, 江旭品. 瘢痕癌性溃疡诊断与治疗专家共识(2020年版)[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2020, 15(4): 264-267.
- [6] Kheiri B, Osman M, Al Hadidi S. From a burn scar to malignancy! Marjolin's ulcer, a disease of wound neglect[J]. *Oxf Med Case Reports*, 2018, 2018(8): omy044.
- [7] Das KK, Chakaraborty A, Rahman A, et al. Incidences of malignancy in chronic burn scar ulcers: experience from Bangladesh[J]. *Burns*, 2015, 41(6): 1315-1321.
- [8] Sisti A, Pica Alfieri E, Cuomo R, et al. Marjolin's ulcer arising in a burn scar[J]. *J Burn Care Res*, 2018, 39(4): 636-639.
- [9] Pekarek B, Buck S, Osher L. A comprehensive review on Marjolin's ulcers: diagnosis and treatment[J]. *J Am Col Certif Wound Spec*, 2011, 3(3): 60-64.
- [10] Fujimoto M, Asai J, Asano Y, et al. Wound, pressure ulcer and burn guidelines-4: guidelines for the management of connective tissue disease/vasculitis-associated skin ulcers[J]. *J Dermatol*, 2020, 47(10): 1071-1109.
- [11] 雷宇, 周忠志, 兰宏伟, 等. 象皮生肌膏对糖尿病皮肤溃疡修复的效果及其机理探究[J]. 中国美容医学, 2022, 31(1): 89-92.
- [12] 褚美玲. 黄连膏联合象皮粉治疗下肢静脉性溃疡的临床疗效观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [13] 罗浩铭, 王金晶, 白钦钦, 等. 肾移植术后合并气性坏疽一例[J]. 临床外科杂志, 2020, 28(11): 1031-1032.

(收稿日期: 2022-04-02; 修回日期: 2022-04-20)

《中南药学》2023 年“毕业季”论文征稿

为了促进药学学术交流, 本刊现在开始启动 2023 年“毕业季”论文征稿。凡在校全日制药理学硕、博毕业研究生的研究论文、综述, 一经录用, 即可在我刊 2023 年 1—6 月刊刊出。

《中南药学》杂志是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊, 被美国 CA 和波兰 IC 等国外知名数据库收录, 被中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊光盘版、万方数据库和解放军医学图书馆数据库等收录。内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、医院药学、生化药物、中药与天然药物等各个方向。

具体要求及处理如下:

1. 与药学相关的研究论文或综述;
2. 在论文正文标题前及注册投稿时标题前标注“毕业季”;
3. 全日制硕士、博士毕业研究生;
4. 文章将快速处理、优先刊登、按时出版;
5. 投稿时间: 即日起至 2023 年 2 月底;
6. 出刊时间: 2023 年 1 月 20 日、2 月 20 日、3 月 20 日、4 月 20 日、5 月 20 日和 6 月 20 日, 共 6 期, 请至少提前 3 个月投稿, 带基金项目文章优先刊登;
7. 投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>, 请注册投稿。

如有任何疑问可联系我们:

Tel: 0731-82258487, 0731-84895602

E-mail: znyxzz2003@vip.163.com

风险管理在静脉药物配置中心提高成品输液质量的应用

何斌, 王雅棋* (郴州市第一人民医院, 湖南 郴州 423000)

摘要: **目的** 探究风险管理在静脉药物配置中心 (PIVAS) 提高成品输液质量的应用效果。**方法** 采用医疗失效模式与效应分析 (HFMEA) 法, 全面识别、分析我院 PIVAS 日常管理中影响成品输液质量的风险, 针对各个风险点采取风险控制措施, 改良工作环节, 并评估此次风险管理的成果。**结果** 对 PIVAS 成品输液质量进行风险管理后, 成品输液不良事件发生率、配置差错率明显降低, 临床满意度明显上升, 同时相关人员风险意识、团队精神等也有所加强。**结论** 通过风险管理法的应用, 有效保障成品输液质量, 促进临床医护人员的满意度上升, 提高 PIVAS 日常管理。

关键词: 医疗失效模式与效应分析; 风险管理; 成品输液质量; 静脉药物配置中心

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)10-2451-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.10.044

在新医改的背景下, 医院静脉药物配置中心 (PIVAS) 想要平稳可持续发展, 风险管理是不可或缺的环节。风险管理的工具有很多, 21 世纪初, 美国医疗机构联合评审委员会 (JCAHO) 推荐医疗行业使用失效模式及效果分析 (failure mode and effect analysis, FMEA) 法来开展医院的风险管理, 即形成了医疗 FMEA (Healthcare Failure Mode and Effect Analysis, HFMEA)。HFMEA 法是一种系统性、前瞻性的基于团队的风险管理方法, 强调事前预防, 不仅关注风险的危害程度, 还关注风险发生的概率和风险的可测性。可优先处理一些危害程度大, 又难以发现的风险, 这是 HFMEA 的优势所在^[1-2]。医院 PIVAS 的建立是为临床提供安全、有效的静脉药物, 成品输液质量是实现这一目的的关键因素。在控制成品输液质量的过程中往往存在许多潜在的风险, 目前国内针对提高成品输液质量前瞻性风险控制的研究较少, 故本文尝试应用 HFMEA 法量化各个风险点, 预先发现潜在的风险环节, 并制订相关的改进措施, 取得了一定的成果。

1 研究背景

我院是国家三级甲等综合医院, 2014 年 2 月, 我院建立 PIVAS 并投入使用, 目前共有 93 名在岗人员承担 90 个临床科室的药品调配及配送工作, 包括普通药物、细胞毒性药物、抗菌药物及

全静脉营养液, 平均日调配量达 8000 袋, 其中普通药物的日均调配量已近 6000 袋。由于人员多, 工作量大, 加上 PIVAS 本身工作流程复杂, 环节比较多, 在各个环节中都可能存在影响成品输液质量的风险因素, 因此, 在我院 PIVAS 进行风险管理尤为重要。

2 风险管理

2.1 组建团队

组建由 PIVAS 负责人 (药学部副主任)、护士长、药师和调配人员组成的风险管理小组, 共 16 人, 平均年龄为 (25±4.3) 岁, 学历为本科及以上。确定 PIVAS 负责人为组长, 负责对整个风险管理的实施过程进行指导与监督, 并组织小组成员学习 HFMEA 法的相关知识。小组成员收集并查看 2020 年 6 月 1 日—12 月 31 日 (风险管理实施前)、2021 年 3 月 1 日—9 月 30 日 (风险管理实施后) PIVAS 成品输液配置数量、配置差错登记本、成品输液不良事件登记本、临床反馈信息登记本等信息。

2.2 风险识别

2.2.1 绘制流程图 按照《静脉用药集中调配质量管理规范》的要求, 结合我院 PIVAS 实际, 绘制工作流程图 (见图 1)。

2.2.2 风险认知与评估 风险管理小组成员通过

基金项目: 郴州市科技计划项目 (No.1cy12021003)。

作者简介: 何斌, 男, 主管药师, 主要从事 PIVAS 管理工作, email: 312309666@qq.com *通信作者: 王雅棋, 女, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 1595445255@qq.com

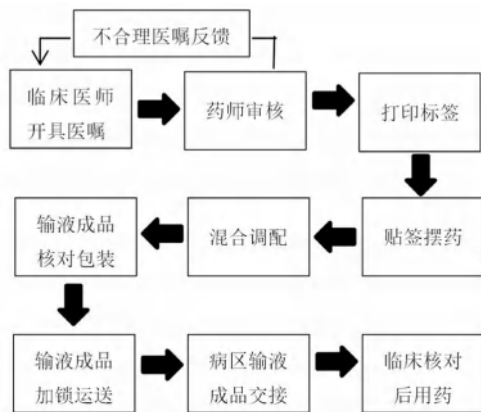


图 1 医院 PIVAS 工作流程

收集到的信息以及与病区医师、护士、PIVAS 药师、配置人员等成品输液过程中涉及的相关人员沟通，查阅资料并采用头脑风暴法发现并列举影响 PIVAS 成品输液质量的要因，共有 8 个，然后运用风险管理工具——HFMEA 法对各风险因素进行风险评估，并根据其风险严重性 (S)、风险发生的可能性 (P) 和风险的可测性 (D) 进行评判，计算出风险优先系数 (RPN) [RPN = 严重性 (S) × 可能性 (P) × 可测性 (D)]，对各风险环节进行评分，取风险小组中各成员所打分数的平均值 (四舍五入法去小数点) 计算最终 RPN 值。将 RPN 值排序，值越大说明风险越高，RPN > 20 风险评定为高，10 < RPN ≤ 20 风险评定为中，RPN ≤ 10 风险评定为低 [3-5]，见表 1。

表 1 PIVAS 成品输液质量风险因素的风险评估表

风险环节	严重性 评分 (S)	可能性 评分 (P)	可测性评分 (D)		RPN	风险水平
			措施准备	执行程度		
配置错误	3	3	2	2	36	高
洁净区环境控制	3	2	2	2	24	高
成品输液发放	3	2	2	2	24	高
临床使用不当	3	2	2	2	24	高
设备	3	2	2	1	12	中
流程及规章制度	3	1	2	2	12	中
医嘱审核错误	3	1	2	2	12	中
物品管理	3	2	1	1	6	低

注：可测性评分=措施准备 × 执行程度；风险发生的严重性高、中、低级别对应的分数分别为 3、2、1；风险发生的可能性高、中、低级别对应的分数分别为 3、2、1；措施的准备程度差、一般、好对应分数分别为 3、2、1；措施的执行程度高、中、低对应的分数分别为 1、2、3。

2.3 风险应对

根据风险优先系数筛选出优先解决的 4 个高风险因素，分别是配置错误、洁净区环境控制、成品输液发放及临床使用不当。对高风险因素进

行原因分析并确定针对性措施 (见表 2)，通过这些措施的有效实施可以将高风险因素所带来的损失降至最低程度 [6-7]。为保证针对性措施的实施，对每个措施拟定责任人以及预期改善期限。

除表 2 相关措施外，风险管理小组成员还实施以下对策：① 对药品核对、排药、贴签实施分组复核，调配药品采用双人组合，舱内即时复核；② 组织工作人员学习“三查八对”制度，每日加强对此制度执行情况的督查；③ 定期组织学习各种操作标准规程并进行操作比赛，筛选出操作能手做新员工及“短板”员工的带教老师；④ 设立激励机制，根据工作质量评选“优秀员工”，给予一定的奖励；⑤ 更改派班模式，根据工作人员特点，将科室成员按业务能力强弱搭配；⑥ 加强新员工的各项业务培训及考核；⑦ 成立沟通小组，通过与临床电话或者当面沟通等方式，加强有关质量信息的沟通。比如将常见静脉用药有特殊使用要求 (避光输注、输注时间及时限、输注浓度及速度等) 的药品进行总结并提供给临床参考，通过相互交流，建立 PIVAS 与临床科室良好的交流平台。

2.4 对策实施与监督

风险管理小组运用 PDCA 循环理念，每月开展分析会议，对风险因素的改进措施制度化并定期检查实施情况，记录其实施效果 [8]。将上个月的工作进行分析与总结，保证措施的落实，根据措施实施过程中出现的问题及时进行调整，比如我院 PIVAS 没有设立“二级药库”，无法直接获取院内药品更换信息，新进药品的学习往往不及时，小组成员会议决定：① 对每日排药、贴签人员发现的新进药品当日组织学习；② 每月由审方药师与药库对接，对每月的新进药品 (已学除外) 当月组织学习。切实做到预防控制风险。定期对高风险因素进行再次风险评估和分析，若 RPN 值仍然大于 20 则继续改进，达到持续改进的目的。

2.5 评估指标

经风险管理小组成员讨论，确定将实施风险管理前、后 PIVAS 登记的成品输液不良事件发生率、配置差错率、临床满意度作为此次风险评估的评估指标。成品输液不良事件是指漏液，输液有异物、沉淀或变色，药物配置相关的输液反应，因临床未及时使用或使用不当造成药液变质等。配置差错包括未准确调配药品品种、剂量、规格，残余药液过多，非整支药品剂量有误等。同时，统计医院 90 个临床科室 (共计 450 名医务人员) 实施风险管理前后，对 PIVAS 工作质量的满意度。采取问卷

表 2 影响 PIVAS 成品输液质量的高风险因素的原因分析及拟订措施

高风险因素	原因分析	拟订措施
配置错误	排药贴签不规范	1. 将排药、贴签工作分开进行，排药、贴签区域按科室分组、分批、定位，避免集中操作造成拥挤 2. 排药、贴签时核实药品数量、规格、剂型、厂家
	调配差错	1. 输液标签上圈出特殊剂量，做好标识 2. 规范摆台，交叉调配留有足够间隙，避免拥挤 3. 将易混淆的输液袋予以分开摆放，已配与未配的药袋分行放置 4. 医嘱、收费错误及时交接班
	剂量计算错误	1. 配置仓内备好计算器 2. 特殊剂量的配置经第二人核对 3. 配置仓内准备常用静脉用药的特殊剂量换算公式及计算方法表，并加强工作人员的学习
	药品容易混淆	1. 对常用的易混淆静脉用药按“一品多规、看似、听似”进行分类后组织学习 2. 针对易发生混淆的药物和溶剂，制作图文手册及卡片便签注明，工作人员需随身携带，定期学习 3. 排药时将外观相似或一品多规的药品分开放置 4. 新进药品及时组织学习，更新、完善相关信息
洁净区环境控制	过滤器未及时更换	1. 增加清洗、更换初、中、高过滤器频次，定期检测沉降菌、尘埃粒子和风速
	监测设备异常	2. 加强洁净区空调系统清洗人员的业务培训
	洁净区空调系统清洗人员不专业 维保人员未及时维保	3. 制订 PIVAS 净化维保计划，定期检查、清理、更换新风机组以及循环机组过滤器 4. 做好温度、湿度监测工作
成品输液发放	成品输液未复核	1. 成品输液进行复核，检查有无漏液、异物、沉淀，颜色是否正常
	玻璃制品、避光药品未做保护措施	2. 成品复核时将玻璃制品与软装袋分开放置，避光药品使用黑色避光包装袋
	装箱过满挤压	3. 成品装箱时玻璃制品用可立袋做好防护，以防运输造成破损 4. 成品运输外箱做“易破损”等标识字样
	临床使用不当	1. 提前与病患做好沟通 2. 与临床沟通，调整调配批次 3. 输液标签上对特殊使用药品进行标识提醒
	病患擅离病房或输流量多导致成品 输液未及时使用 特殊使用药品（输注避光、成品输 液储存时限等）未按规定使用	

调查的方式，根据五点划分法（非常不满意、不满意、一般、满意、非常满意）进行评估。

2.6 统计学方法

采用 SPSS21.0 软件对数据进行统计分析，计数资料以 $[n(\%)]$ 表示，采用 χ^2 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

采取风险管理防范措施后，连续 6 个月监测 PIVAS 成品输液不良事件发生率、配置差错率，与实施前 6 个月的参数比较有明显差异 ($P < 0.05$)，见表 3。同时临床各科室对 PIVAS 的满意度由 80.0% 上升至 88.4% (见表 4)，有较大的提升。由此可见引入 HFMEA 法降低差错发生，提高成品输液质量是有效的。

表 3 风险管理实施前后的效果对比

时间	成品输液例数	不良事件 $[n(\%)]$	配置差错 $[n(\%)]$
实施前	167 839	101 (0.060)	94 (0.056)
实施后	167 839	52 (0.031)	32 (0.019)
χ^2		15.7000	30.5194
P		< 0.0001	< 0.0001

表 4 风险管理实施前后临床各科室对 PIVAS 的满意度比较

时间	份数	对 PIVAS 工作质量评价情况					满意度 $[n(\%)]$
		非常满意	满意	一般	不满意	非常不满意	
实施前	450	159	201	53	20	17	360 (80.0)
实施后	450	237	161	41	8	3	398 (88.4)
χ^2							12.074
P							0.001

此外，风险管理小组成员通过此次活动后，风险意识、团队精神、专业知识、沟通协调能力及解决问题的能力及责任感等均有不同程度的改善 (见图 2)，这对于今后提高 PIVAS 日常管理，促进其健康发展是积极有利的。

4 讨论

不少医院将风险管理引入医院管理中，在风险管理理念下建立起预防事故的保护机制，以降低医疗风险^[9]。PIVAS 是一个风险与压力并存的医疗部门，成品输液的质量管理是 PIVAS 的核心工作，在 PIVAS 控制成品输液质量的管理中引入风险管理，通过在风险事件出现前开展预测评

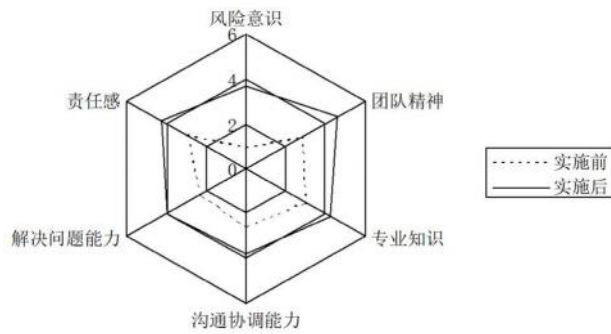


图2 风险管理活动无形成果雷达图

估,并制订针对性应对策略,以最大程度控制风险事件的发生,可促进合理用药,保障患者用药安全。

HFMEA能前瞻性地发现可能发生的失效模式、原因及影响,并提前进行有效干预,防患于未然。在应用HFMEA法进行风险管理时,小组成员需结合实际工作对流程中的每一个步骤进行仔细审查,并对潜在的问题细化分析,这就非常有利于流程的改进。如细化分析我院PIVAS排药、贴签工作时,发现由于工作量大,在同一时间段进行时易造成拥挤,导致药品放错筐,于是提出将排药、贴签工作分开进行(中班人员负责排药,下午上班人员负责贴签),同时将排药、贴签区域按照科室分组、分批,进行定位。这样可有效避免拥挤造成的混乱,使排药、贴签工作现场安静有序,降低配置差错。其次,应用HFMEA管理进行流程优化,执行整改措施时,需要多方合作,可引导全员积极参与,包括临床科室的医护人员,在此过程中不断发现问题、提出问题、解决问题,进行持续的“认识-实践-总结”的循环。不但可有效构建PIVAS与临床之间相互沟通交流

的平台,也可促进PIVAS形成持续改进工作的良性循环,增强整体凝聚力,提高PIVAS日常管理水平^[10]。

综上,对我院PIVAS开展风险管理的效果显著,下一步还应对PIVAS整个工作中的各种风险进行评估和干预。

参考文献

- [1] 董培智,王慧.基于FMEA方法对药品检验过程的风险分析[J].中国药事,2020,34(7):766-775.
- [2] 洪志达,陈权耀,张雯雯,等.FMEA与FMECA在PIVAS事前防范用药错误中的应用[J].中国现代应用药学,2019,36(11):1425-1429.
- [3] 范静,乔永洁,贾秀玲,等.失效模式和效应分析在PIVAS全肠外营养液调配全流程风险管理的应用[J].中国医院药学杂志,2020,40(17):1881-1886.
- [4] 邱妮娜,武夏明,肖玉良,等.应用失效模式与影响分析方法降低PIVAS危害药品调配中的职业暴露风险[J].中国药房,2018,29(14):1873-1876.
- [5] 徐加佳,孙翠萍,吴青.基于FMEA的PIVAS不合理医嘱风险评估和管理[J].中国现代应用药学,2018,35(10):1564-1568.
- [6] 肖玲芳,李湘平,石茵,等.降低静脉输液药学相关风险发生率的品管圈实践[J].中国医院药学杂志,2019,39(5):512-514,520.
- [7] 张旭,吴晓彧,汪宇.我院静脉用药调配中心成品输液质量管理实践[J].中国药房,2015,26(10):1373-1376.
- [8] 马昭朝,司延斌,庆昕,等.PDCA模式在静脉用药调配中心风险评估及管控中的应用研究[J].中国药理学杂志,2020,55(16):1381-1385.
- [9] 张幸国,楼燕,羊红玉,等.失效模式与效应分析在医疗风险管理中的应用[J].中国药理学杂志,2016,48(10):832-834.
- [11] 钟丽君,廖紫琼,赖宝龙.风险管理在静脉用药调配中心的应用[J].中国处方药,2020,18(9):36-38.

(收稿日期:2022-03-16;修回日期:2022-05-13)

致 谢

中南大学湘雅二医院
江苏恒瑞医药股份有限公司
长沙市中心医院

副理事长及单位

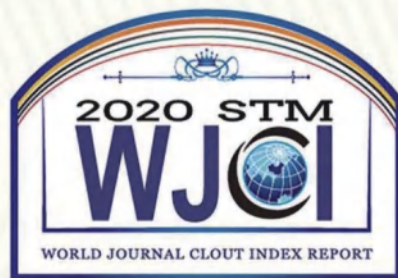
曾春辉 湖南天士力民生药业有限公司总经理
黎鸠鸠 湖南一格制药有限公司总经理

常务理事及单位

刘若辉 湖南千金湘江药业股份有限公司总经理
欧阳荣 湖南中医药大学第一附属医院药学部主任
雷艳青 湖南省脑科医院药学部主任
周玉生 南华大学附属第二医院副院长
李 专 长沙市第三医院副院长
田其学 湖南省中医药研究院附属医院药剂科主任
袁群莉 华润湖南瑞格医药有限公司副总经理
阳 波 南华大学附属第一医院药学部主任

理事及单位

周运奇 湖南五洲通药业有限责任公司董事长
杨贞皓 湖南省湘中制药有限公司总经理
刘 湘 湘潭市中心医院药学部
曾 强 岳阳市第一人民医院党委书记
吴吉明 常德市第一人民医院副院长
谭东辉 湘南学院附属医院院长
肖政辉 湖南省儿童医院副院长
李 勇 南华大学附属南华医院临床药学科主任
林承雄 湖南怀仁大健康产业发展有限公司董事长
何 毅 株洲市中心医院副院长
彭 宏 新邵县人民医院院长
郭建军 湖南恒兴医药科技有限公司总经理



世界期刊影响力指数 (WJCI) 报告 (2020科技版)

收录证书



This is certificate for

中南药学

(ISSNS: 1672-2981)

to be indexed in

World Journal Clout Index Report(2020 STM)



项目联合研发单位 Project research units:

中国科学技术信息研究所 Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition)

Electronic Publishing House Co.ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals