



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第21卷 第11期(总第214期) 2023年11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>

email: znyxzz2003@vip.163.com

广告经 营许可 证: 4300004000764

中国标 准连续 出版物 号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2023 年 版 权 归 《 中 南 药 学 》

编辑 部 所 有

细胞代谢在重大疾病中的研究进展专题

(2821) 小胶质细胞糖代谢重编程在神经退行性疾病中的研究进展

..... 高原, 章越凡

(2828) 线粒体通信与心血管疾病..... 李慧敏, 祝德秋, 武丹

研究论文

(2834) 升清解毒微乳凝胶的制备工艺及处方优化研究

..... 王施元, 曹波, 李莹滢, 等

(2842) LC-MS/MS 法测定人血浆中阿托伐他汀及其代谢物的浓度及在中国健康志愿者中生物等效性研究的应用

..... 肖红梅, 刘金凤, 郑天东, 等

(2848) CD86、CD206 结直肠癌表达及其临床意义

..... 陆二光, 沈毅, 彭辉, 等

(2855) 延胡索总碱贴片的初步稳定性研究

..... 王梦琳, 魏晓彤, 石双慧, 等

(2861) 基于保肝降酶作用的舒肝宁注射液相对生物活性测定法的建立与生物均一性评价

..... 吴世豪, 张怡博, 李非凡, 等

(2868) 清热消炎宁片对幼龄大鼠的安全性评价

..... 扶丽君, 赵莉, 王衡新

(2875) 基于 LC-MS/MS 方法的大鼠血浆中舒必利的血药浓度检测药代动力学研究

..... 梁媛, 葛若衡, 舒畅

(2880) 绿花白千层精油化学成分及宫颈炎活性研究

..... 李婷, 李丽娟, 彭一桓, 等

(2887) 西藏 3 种乌头属植物的品质评价

..... 平措绕吉, 刘莹, 杨洲, 等

(2893) 五苓益肺汤对哮喘模型大鼠的免疫调节作用及对 TLR4/NF- κ B 通路的影响

..... 叶超雄, 何晓亮, 张色华, 等

(2901) 不同药对配伍对栀子引起的肝损伤的保护作用研究

..... 段晓梦, 马心予, 白天宇, 等

(2907) 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 方法分析清热祛湿凉茶化学成分

..... 陈玉娜, 盛小燕, 田海妍, 等

(2913) 基于网络药理学与实验验证探讨橙皮素治疗乳腺癌疾病的分子机制

..... 丁海文, 程小雨, 陈昭琳

(2920) 高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝大鼠模型的代谢组学研究

..... 赵驿歌, 赵一颖, 丰晨然, 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 朱荣华 向大雄 刘 娜
刘 韶 刘文虎 刘艺平 刘芳群
刘茂柏 刘建平 刘高峰 刘塔斯
刘雁鸣 汤海峰 孙 进 孙平华
孙国祥 孙铁民 劳海燕 苏薇薇
李 昕 李 勇 李文龙 李文莉
李顺祥 李晓宇 李健和 李湘平
杨志平 杨星钢 杨献文 肖 雪
肖贵南 何 丹 何江江 何鹤飞
余自成 谷福根 张 俐 张 峻
张毕奎 张洪文 陈 力 陈 琦
陈 碧 陈卫东 陈西敬 陈勇川
武新安 范国荣 金鹏飞 周 权
屈 建 孟宪生 赵立波 赵志刚
姜德建 姜月芬 宫 建 祝德秋
秦红岩 袁 成 袁 易 贾素洁
夏道宗 原永芳 徐 珽 徐 萍
徐必学 徐华丽 高利臣 郭 韧
郭怀忠 郭建军 唐 芳 曹 玲
常福厚 章越凡 巢志茂 彭文兴
董亚琳 董得时 蒋孟良 覃 丽
傅 强 温金华 谢 诚 谢奕丹
睢大箕 肇丽梅 翟 青 黎 敏
颜 苗 潘卫三 魏高文

- (2926) 大叶千斤拔不同部位对类风湿关节炎大鼠的治疗作用研究
..... 卢素云, 邓友田, 潘任桃, 等
- (2932) 葛根芩连片配伍后葛根素在大鼠体内药动学研究
..... 胡江玲, 周睿, 吴睿, 等
- (2937) 盐酸氨溴索溶液与 5 种常用雾化药物的配伍稳定性考察
..... 郭思瑞, 王月, 王晶, 等
- (2942) 维血宁合剂中抑菌剂使用现状分析及抑菌效力研究
..... 石蓉, 郑金凤, 张悦, 等
- (2947) 尼扎替丁分散片原辅料相容性研究 ... 易必新, 周明, 石笑弋, 等
- (2950) 瓦草中的化学成分及其抗炎活性研究
..... 侯士鑫, 杜昆泽, 常艳旭, 等
- (2957) 青柏散对口腔溃疡模型大鼠的药效学研究
..... 赵慧雯, 杨芮庚, 呼延铭, 等

综述

- (2964) 成纤维细胞生长因子 9: 治疗精神神经疾病药物新靶点
..... 赵丞, 王小青, 王宇红, 等
- (2969) 中药皂苷类成分治疗类风湿关节炎的作用机制
..... 刘亚斌, 李世兴, 唐家美, 等
- (2977) 二酮哌嗪类化合物的研究进展..... 李锟, 张静静, 陈林
- (2984) 多晶型对药物固体理化性质影响的研究进展
..... 周丰涛, 彭亚运, 蔡挺
- (2990) 抗血管生成药物联合免疫检查点抑制剂治疗晚期非小细胞肺癌的
协同作用机制及临床研究的新进展 魏佳, 丁晶晶

中药资源开发与利用

- (2996) 关黄柏历史沿革及产业发展现状与策略探析
..... 李先娜, 孙晖, 金爽, 等

药物分析与检验

- (3003) HPLC 法快速筛查祛痘抗粉刺类化妆品中盐酸米诺环素等 10 种
组分 高文分, 刘继华, 左文松, 等
- (3008) 小儿清咽颗粒中 8 个成分的含量测定及主成分分析
..... 张博, 智雪枝, 田兰, 等
- (3014) 疏清颗粒高效液相色谱指纹图谱的建立及相关性研究
..... 马思文, 车宏伟, 孟雅, 等
- (3020) 风湿骨痛片及其中间体的指纹图谱建立及指标成分含量测定
..... 刘焕起, 吴佩佩, 吴海峰, 等
- (3024) 高效液相色谱法同时测定桂芍镇痫片中 13 种成分的含量
..... 崔小丽, 孙宁, 赵瑞, 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 刘心如 刘丽华 刘宏飞
刘剑敏 刘梦扬 孙 逸 孙万阳
孙丙军 孙晓慧 苏 丹 杜恩明
李 丹 李 娟 李语玲 李新刚
肖朝江 吴成军 邱玉玲 何 艳
邹振兴 张 弘 张 凭 张妙红
张纯刚 张程亮 陈 倩 陈 璐
陈国宁 陈富超 呼庆勋 罗 聪
金 锐 周志旭 赵 亮 赵 娣
胡 楠 姜 雷 贾王平 徐 硕
徐文峰 郭海彪 黄 芳 黄亚辉
梅升辉 龚力民 梁光平 寇龙发
蒋跃平 蒋德旗 韩立峰 韩晓芳
韩晓鹏 舒 畅 曾贵荣 蒙光义
廖德华 潘 昊 魏 博

编辑: 邬志娟 彭金飞 李 科
陆窈窕

本刊声明:

本刊已入编中国知网等数据库,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。

(3030) 骨髓炎颗粒 HPLC 指纹图谱及一测多评法测定 7 种成分含量
..... 徐倩, 陆美霞, 周亚萍, 等

医院药学

- (3036) 5 种中成药外治放射性皮炎的网状 meta 分析
..... 杨涛, 郝力争, 陈健, 等
- (3045) 肾性高血压住院患者用药特点及经济负担研究
..... 刘俏, 许青青, 郑绘, 等
- (3051) 3 种碳青霉烯类药物联合头孢哌酮钠舒巴坦钠对泛耐药鲍曼不动杆菌感染的 PK/PD 研究 许亚洲, 石祥奎, 曹加, 等
- (3058) 基于治疗药物监测的齐拉西酮血药浓度 / 日剂量影响因素分析
..... 鲍爽, 李新刚
- (3062) 基于 FAERS 数据库的维得利珠单抗不良事件信号挖掘与分析
..... 普燕芳, 陈力, 曹玮

药物与临床

- (3068) 泊沙康唑对异体肾移植受者他克莫司血药浓度及肾功能的影响
..... 吉莉娜, 胡楠, 钱卿
- (3073) 奈玛特韦 / 利托那韦致新型冠状病毒感染患者肝功能异常的危险因素分析 胡锦涛, 顾圣莹, 姜静静, 等

临床药师在临床

- (3079) 以营养师为主导的营养支持团队在肝硬化失代偿期患者中的实践 杨香瑜, 陈露, 胡乃毅, 等
- (3085) 临床药师参与 1 例嗜蚀艾肯菌致肌腱感染患者治疗并文献复习
..... 蔡泽政, 廖倩倩

药事管理

- (3089) 试验用药品管理质量检查问题及解决对策
..... 蒋云, 冯娟, 龚倩, 等
- (3093) 我国执业药师职业资格考试现状的分析与思考
..... 温瑞睿, 许龙, 朱文静, 等

药品不良反应

- (3098) 奥希替尼致严重罕见肌酸激酶增高伴全身酸痛 1 例
..... 戎成婷, 张军娣, 罗晶晶, 等
- (3100) 1 例非诺贝特致血管神经性水肿的不良反应分析
..... 赖晓梅, 李春红

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*282*zh*P*25.0*48*2023-11

本期责任编辑: 李科, 陆窈窕, 彭金飞, 邬志娟

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 11 November 20 2023

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

- (2821) Research progress in glucose metabolism reprogramming of microglia in neurodegenerative diseases GAO Yuan, ZHANG Yue-fan
- (2828) Mitochondrial communication in cardiovascular diseases LI Hui-min, ZHU De-qiu, WU Dan
- (2834) Preparation and optimization of Shengqing Jiedu microemulsion gel WANG Shi-yuan, CAO Bo, LI Ying-ying, et al
- (2842) LC-MS/MS determination of atorvastatin and its metabolites in human plasma and bioequivalence in healthy Chinese volunteers XIAO Hong-mei, LIU Jin-feng, ZHENG Tian-dong, et al
- (2848) Expression of CD86 and CD206 in colorectal cancer and its clinical significance LU Er-guang, SHEN Yi, PENG Hui, et al
- (2855) Stability of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patch WANG Meng-lin, WEI Xiao-tong, SHI Shuang-hui, et al
- (2861) Relative biological activity determination and biological homogeneity of Shuganning injection based on liver protection and enzyme reduction WU Shi-hao, ZHANG Yi-bo, LI Fei-fan, et al
- (2868) Safety evaluation of Qingre Xiaoyanning tablets in juvenile rats FU Li-jun, ZHAO Li, WANG Heng-xin
- (2875) Determination of sulphiride concentration in rat plasma and pharmacokinetics by LC-MS/MS LIANG Yuan, GE Ruo-heng, SHU Chang
- (2880) Chemical constituents of essential oil from *Melaleuca viridiflora* and related cervicitis activity LI Ting, LI Li-juan, PENG Yi-huan, et al
- (2887) Quality evaluation of 3 species of Aconitum plants in Tibet PING-cuo-rao-ji, LIU Ying, YANG Zhou, et al
- (2893) Effect of Wuling Yifei decoction on the immunomodulation and TLR4/NF- κ B pathway in asthma model rats YE Chao-xiong, HE Xiao-liang, ZHANG Se-hua, et al
- (2901) Protective effect of different formula compatibilities on Fructus Gardeniae-induced hepatotoxicity DUAN Xiao-meng, MA Xin-yu, BAI Tian-yu, et al
- (2907) Chemical components in Qingre Qushi herbal tea by UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS CHEN Yu-na, SHENG Xiao-yan, TIAN Hai-yan, et al
- (2913) Potential molecular mechanism of hesperetin for breast cancer based on network pharmacology and experiment verification DING Hai-wen, CHENG Xiao-yu, CHEN Zhao-lin

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 2023 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.

- (2920) **Metabolomics of a rat model of non-alcoholic fatty liver induced by high-fat diet** ZHAO Yi-ge, ZHAO Yi-ying, FENG Chen-ran, et al
- (2926) **Therapeutic effect of different parts of *Flemingia macrophylla* Merr. on rats with rheumatoid arthritis** LU Su-yun, DENG You-tian, PAN Ren-tao, et al
- (2932) **Pharmacokinetics of puerarin in Gegen Qinlian tablets in compatibility with other drugs** HU Jiang-ling, ZHOU Rui, WU Rui, et al
- (2937) **Compatible stability of ambroxol hydrochloride solution for inhalation with 5 common nebulized drugs** GUO Si-rui, WANG Yue, WANG Jing, et al
- (2942) **Use of bacteriostatic agents and bacteriostatic efficacy in Weixuening mixture** SHI Rong, ZHENG Jin-feng, ZHANG Yue, et al
- (2947) **Drug-excipient compatibility of Nizatidine dispersible tablets** YI Bi-xin, ZHOU Ming, SHI Xiao-yi, et al
- (2950) **Chemical constituents in *Silene viscidula* and their anti-inflammatory activity** HOU Shi-xin, DU Kun-ze, CHANG Yan-xu, et al
- (2957) **Pharmacodynamics of Qingbai pulvis on oral ulcer in rat models** ZHAO Hui-wen, YANG Rui-geng, HU Yan-ming, et al
- (2964) **Fibroblast growth factor 9: a new target for psychoneurological disorders** ZHAO Cheng, WANG Xiao-qing, WANG Yu-hong, et al
- (2969) **Mechanism of action of Chinese medicine saponins for rheumatoid arthritis** LIU Ya-xiao, LI Shi-xing, TANG Jia-mei, et al
- (2977) **Research progress in diketopiperazine compounds** LI Kun, ZHANG Jing-jing, CHEN Lin
- (2984) **Progress in the effect of polymorphism on the physicochemical properties of pharmaceutical solids** ZHOU Feng-tao, PENG Ya-yun, CAI Ting
- (2990) **Synergistic mechanism and progress in clinical research of anti-angiogenic drugs combined with immune checkpoint inhibitors for advanced non-small cell lung cancer** WEI Jia, DING Jing-jing
- (2996) **Historical evolution, development status and strategies of *Phellodendron amurense* Rupr.** LI Xian-na, SUN Hui, JIN Shuang, et al
- (3003) **Rapid screening of 10 components such as minocycline hydrochloride in acne removing and anti-acne cosmetics by HPLC** GAO Wen-fen, LIU Ji-hua, ZUO Wen-song, et al
- (3008) **Determination and principal component analysis of 8 constituents in Xiaoe Qingyan granules** ZHANG Bo, ZHI Xue-zhi, TIAN Lan, et al
- (3014) **HPLC fingerprints and correlation of Shuqing granules** MA Si-wen, CHE Hong-wei, MENG Ya, et al
- (3020) **Fingerprints of Fengshi Gutong tablets and intermediates and content determination of index components** LIU Huan-qi, WU Pei-pei, WU Hai-feng, et al
- (3025) **Simultaneous determination of 13 components in Guishao Zhenxian tablets by HPLC** CUI Xiao-li, SUN Ning, ZHAO Rui, et al
- (3030) **HPLC fingerprint of osteomyelitis granules and the content of 7 components by QAMS** XU Qian, LU Mei-xia, ZHOU Ya-ping, et al
- (3036) **Network meta-analysis of 5 Chinese patent medicines for radiodermatitis** YANG Tao, HAO Li-zheng, CHEN Jian, et al

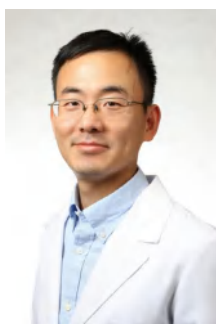
- (3045) Medication characteristics and economic burden of inpatients with renal hypertension *LIU Qiao, XU Qing-qing, ZHENG Hui, et al*
- (3051) Pharmacokinetics/pharmacodynamics of three carbapenems combined with cefoperazone sodium and sulbactam sodium against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* infection*XU Ya-zhou, SHI Xiang-kui, CAO Jia, et al*
- (3058) Influence factors of drug concentration/dose of ziprasidone based on therapeutic drug monitoring *BAO Shuang, LI Xin-gang*
- (3062) Data mining and analysis of adverse event signals of vedolizumab based on FAERS database*PU Yan-fang, CHEN Li, CAO Wei*
- (3068) Effect of posaconazole on the blood concentration of tacrolimus and renal function in allograft renal transplant recipients *JI Li-na, HU Nan, QIAN Qing*
- (3073) Risk factors associated with nirmatrelvir/ritonavir induced hepatic dysfunction in COVID-19 patients*HU Jin-hua, GU Sheng-ying, JIANG Jing-jing, et al*
- (3079) Practice of nutritional support teams led by nutritional pharmacists in patients with decompensated cirrhosis *YANG Xiang-yu, CHEN Lu, HU Nai-yi, et al*
- (3089) Problems and solutions to quality inspection of experiment drug management..... *JIANG Yun, FENG Juan, GONG Qian, et al*

细胞代谢在重大疾病中的研究进展专题

【编者按】

细胞代谢是各项生命活动的基础，其代谢紊乱会影响细胞稳态，进而导致组织器官结构和功能上的改变。针对特定的代谢途径或靶点进行精准干预细胞代谢重构，能对疾病产生治疗效果。目前细胞代谢与疾病的关系已经成为生物医学以及疾病研究的重要对象。因此，阐明细胞代谢在疾病中的作用，对进一步了解相关发病机制，探索新的防治方法具有重要意义。本专栏综述细胞代谢在多种重大疾病中的研究进展，旨在为研究细胞代谢机制和开发靶向细胞代谢的药物提供新思路。

【专题主持人简介】



呼庆勋，上海大学副教授，硕士研究生导师。研究领域专注于线粒体代谢监测与功能调控，一方面致力于发展新型遗传编码的荧光探针，用于在时间和空间尺度上解析生理及病理情况下心脑血管系统的复杂功能；另一方面，借助先进的工具建立高通量筛选全新受体及先导化合物分析系统，为心脑血管疾病的诊治提供新理论和新方法。近年研究成果在 *Cell Metabolism*, *Circulation Research*, *Developmental Cell*, *Cell Reports Methods*, *Redox Biology* 和 *Antioxidants and Redox Signaling* 等期刊发表学术论文。已授权国际 PCT 专利 2 项和中国发明专利 4 项。入选上海市海外高层次人才计划，主持国家自然科学基金项目 1 项。荣获上海药学科科技二等奖和美国心脏协会 New Investigator Travel Award。担任上海市生物工程学会一碳生物技术专业委员会委员，*Frontiers in Cardiovascular Medicine* 客座编辑。

小胶质细胞糖代谢重编程在神经退行性疾病中的研究进展

高原，章越凡* (上海大学医学院，上海 200444)

摘要：神经退行性疾病发病率日益升高，给患者造成认知功能障碍、运动功能障碍等。目前研究表明小胶质细胞在其疾病进程中发挥着重要作用。在神经退行性疾病中，小胶质细胞会被激活发生极化，糖代谢途径发生重编程，其主要供能途径发生变化，小胶质细胞的糖代谢关键酶和葡萄糖转运受体水平发生改变，涉及 AMPK、mTOR/HIF-1 α 等信号通路。本文主要综述了神经退行性疾病中小胶质细胞糖代谢途径的变化，相关糖代谢关键酶和信号通路的变化，以及相关药物研究，旨在为神经退行性疾病的研究奠定基础。

关键词：小胶质细胞极化；糖代谢重编程；神经退行性疾病

中图分类号：R742.5

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2023)11-2821-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.001

Research progress in glucose metabolism reprogramming of microglia in neurodegenerative diseases

GAO Yuan, ZHANG Yue-fan* (School of Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444)

Abstract: The incidence of neurodegenerative diseases is increasing, which causes cognitive impairments and motor impairments in patients. Current research suggests that microglia play an important role in the progression of these diseases. In neurodegenerative diseases, microglia are

作者简介：高原，女，硕士研究生，主要从事药物作用机制研究，email: gaoyuan12312000@163.com *通信作者：章越凡，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事药物作用机制及靶点研究，email: yuefanzhang@shu.edu.cn

polarized followed by glucose metabolism reprogramming, which results in main energy supply pathway changes. Glucose metabolism reprogramming of microglia can explain the regulatory effect of key enzymes and glucose transporters involved in glucose metabolism, signaling pathways such as AMPK and mTOR/HIF-1 α . This review mainly discussed the changes in key enzymes and signaling pathways related to glucose metabolism reprogramming of microglia, as well as relevant drug research, to facilitate study of neurodegenerative diseases.

Key words: microglia polarization; glucose metabolism reprogramming; neurodegenerative disease

神经退行性疾病 (neurodegenerative diseases, NDDs) 是一类由于神经元或髓鞘功能异常或缺失导致神经系统功能异常的异质性疾病^[1]。伴随着世界人口老龄化的进程加快,以阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 为代表的 NDDs 发病率日益攀升,严重影响了患者生命安全和生活质量,临床表现为认知功能障碍、运动功能障碍、失语、视神经受损等症状^[2-4]。NDDs 患者大脑中的蛋白质会发生错误折叠并聚集产生神经毒性,导致神经递质失衡、炎症反应和线粒体功能障碍,进而造成神经元损伤甚至死亡^[1, 5],其发病机制复杂,因此阐明 NDDs 的病理生理机制十分必要。

小胶质细胞作为大脑中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中的常驻免疫细胞,在 CNS 发育、稳态维持和 NDDs 等多个生理和病理进程中起关键作用。在正常生理条件下,小胶质细胞可以监控大脑微环境,维持神经系统稳态^[4, 6]。在病理条件下,聚集的蛋白体、炎症因子等可以使小胶质细胞激活并发生极化,小胶质细胞会分泌细胞因子以及发生糖代谢重编程维持其功能及能量需求^[6-8]。本文将对小胶质细胞糖代谢重编程在 NDDs 中的作用及机制进行综述,为 NDDs 的药物研究和靶点寻找提供一定的理论基础和研究方向。

1 小胶质细胞

1.1 小胶质细胞的功能

小胶质细胞是神经系统的一种特异性免疫细胞,可以参与神经炎症的调节,在多个生理和病理过程中发挥关键作用。小胶质细胞可以参与神经元的信号传递、监测脑内微环境的变化、分泌细胞因子、清除死亡细胞碎片、修复受损神经元,对病原体和大脑损伤迅速作出免疫应答,维持大脑稳态^[9-12]。同时,小胶质细胞在维持轴突髓鞘结构,调节相关认知功能以及髓鞘修复过程中也发挥重要作用。小胶质细胞可以合成和分泌髓鞘蛋白,将它们包裹在轴突周围形成髓鞘,保护神经元轴突免受损伤,还可以加快神经冲动的传递速度,保证神经传递的高效性^[13]。而 NDDs 患者髓鞘发生损伤,认知功能出现障碍^[14],因此可以通过调控小胶质

细胞改善 NDDs 中的认知功能障碍^[15]。

1.2 NDDs 中的小胶质细胞极化

在 NDDs 中,小胶质细胞被激活后会逐渐向轴突末端极化,极化过程对于髓鞘合成和神经冲动传递都十分重要。NDDs 表现为小胶质细胞激活、促炎细胞因子分泌增加、抑炎细胞因子分泌减少、血脑屏障被破坏、髓鞘损伤、神经元受损甚至死亡。而小胶质细胞是炎症因子的主要来源,在内源性或外源性致病因素的作用下,小胶质细胞发生极化,形态和功能发生改变,极化后有两种分型,分别是 M1 型 (促炎型) 和 M2 型 (抑炎型),分别发挥促进和抑制炎症的作用^[16]。M1 型小胶质细胞是一种经典激活的小胶质细胞,会启动炎症反应,小胶质细胞在暴露于促炎细胞因子 [白细胞介素 (interleukin) -1 β (IL-1 β), IL-6、干扰素 γ (interferon gamma, IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等] 以及细胞和细菌碎片之下会极化为 M1 型,这些细胞会反过来产生更多的促炎介质和趋化因子,进一步加重炎症,导致神经元凋亡。而 M2 型小胶质细胞是选择性激活的小胶质细胞,有助于抵御神经炎症,小胶质细胞在暴露于抗炎细胞因子 (IL-4、IL-10、IL-11 和 IL-13 等) 之下极化为 M2 型,表现出抗炎和促进组织修复的作用^[17]。在 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, A β)、 α -突触核蛋白 (α -syn) 等刺激下,脑内的小胶质细胞被激活发生极化。初始是由 M1 型小胶质细胞介导的促炎反应,随着时间的推移,会转变为 M2 型小胶质细胞介导的抗炎反应,这种转变有助于修复损伤神经元,挽救髓鞘损伤和维持脑内微环境。

2 NDDs 中小胶质细胞极化与糖代谢重编程

2.1 糖代谢重编程

在正常生理情况下,生物体的糖代谢能够保持稳定,同时也能够为机体提供足够的能量和代谢产物。机体的糖代谢途径主要有糖酵解、有氧化、磷酸戊糖途径,其中葡萄糖的氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 是最主要的产能过程。葡萄糖首先经过糖酵解途径,在关

键酶己糖激酶 (hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶 -1 (phosphofructokinase, PFK-1) 和丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 的催化下得到丙酮酸^[18]。在无氧条件下, 乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 作用于丙酮酸生成乳酸, 这个过程仅产生少量能量; 而在供氧充足时, 葡萄糖进行有氧氧化, 丙酮酸跨过线粒体膜脱羧产生乙酰辅酶 A, 参与三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环, 再进一步氧化磷酸化, 产生大量能量。此外, 在体内糖代谢受到抑制的情况下, 葡萄糖还可以通过磷酸戊糖途径直接脱氢和脱羧, 生成磷酸戊糖, 继续转变成 6-磷酸果糖, 产生还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, 使机体维持正常的代谢水平。

糖代谢重编程是指病理条件下细胞的糖代谢通路发生变化以维持供能, 其主要特征是线粒体通过减弱 OXPHOS 途径产能, 增强糖酵解或磷酸戊糖途径维持供能, 从而影响细胞的生长、分化和功能。这种糖代谢方式的转变可以改变能量供应, 其主要机制包括糖转运、糖酵解、糖异生和糖基化等过程的改变。糖代谢重编程是由多种生物学过程调控的, 糖代谢相关酶及信号分子的调节等^[19-20]在其中起到了重要的作用。

糖代谢重编程在肿瘤、糖尿病、心血管疾病等疾病的发生发展中扮演着关键的角色^[20]。有研究指出, 肿瘤细胞代谢过程存在着一种特殊的糖代谢重编程效应——“Warburg 效应”, 主要表现为 OXPHOS 速率下降, 而糖酵解速率上升^[21], 葡萄糖转运受体 (glucose transport receptor, GLUTs) 和糖酵解关键酶的表达水平升高^[22-23]。在糖尿病的发生发展过程中, 胰岛素缺乏或抵抗也会导致糖代谢重编程^[24], 且在胰岛素持续缺乏或抵抗的情况下, 代谢途径的调整将导致胰岛素抵抗的情况进一步恶化。此外, 在心血管疾病中也发现有糖代谢重编程。比如在动脉粥样硬化^[25]、主动脉瘤的形成^[26]和血管钙化^[27]等病理过程中发现有线粒体氧化过程受损并引起糖代谢途径发生变化的现象, 主要供能方式发生从线粒体 OXPHOS 到糖酵解的改变^[28]。以上研究表明, 在许多疾病的发生发展过程中常伴随有糖代谢重编程现象, 其病理进程很可能与糖代谢途径的改变有关, 因此研究糖代谢重编程对于深入理解疾病影响的糖代谢的分子机制以及发展新的治疗策略有重要意义。

2.2 NDDs 中小胶质细胞糖代谢重编程作用

小胶质细胞被激活后功能的改变离不开其内部糖代谢途径的变化, 其糖代谢重编程在 NDDs 中也发挥着重要作用。小胶质细胞在神经系统中承担了复杂的生物学功能, 对于能量有很大需

求。然而, 神经系统发生损伤以后, 小胶质细胞的能量代谢受到影响, 需改变糖代谢途径以维持其能量需求^[19]。正常情况下, 小胶质细胞主要依赖线粒体 OXPHOS 产生能量, 但在 AD、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、肌萎缩侧索硬化 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 和亨廷顿病 (Huntington's disease, HD) 等 NDDs 小鼠脑中发现, 神经元发生损伤, 受损的神经元会释放出一系列分子信号, 这些信号会导致周围的小胶质细胞被激活发生极化, 即使在有氧的条件下, 小胶质细胞发生了线粒体 OXPHOS 减弱、糖酵解增强的现象^[29]。在 NDDs 的病理过程中, 其主要能量供应途径从线粒体 OXPHOS 转换到有氧糖酵解, 这种转变不仅会使能量供应减少, 还会产生过量的乳酸。乳酸的堆积不仅会引起细胞内的炎症反应, 还可能影响神经元正常的功能。此外, 这种糖代谢途径的改变也会影响小胶质细胞的吞噬作用和引起氧化应激反应, 进一步加剧 NDDs 的病理进程。

但是在 NDDs 中, 受到刺激后两种极化亚型的小胶质细胞的糖代谢途径改变有所不同。有研究表明, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和 IFN- γ 刺激 BV2 小胶质细胞后, BV2 小胶质细胞发生 M1 型极化, 葡萄糖消耗有所增加, 葡萄糖转运体表达增加, 糖酵解关键酶活性增加, 乳酸产生增加, 线粒体三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的产生减少^[30-31]。同样在 LPS 刺激下, 小胶质细胞线粒体结构发生改变, 线粒体碎片增多, 细胞色素 C 氧化酶和琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 的活性降低, 柠檬酸和琥珀酸的代谢受到影响, 线粒体 ATP 的产生减少^[32], 表明小胶质细胞发生 M1 型极化后糖代谢途径发生重编程, 糖酵解功能增强, OXPHOS 功能减弱。因此当小胶质细胞极化成促炎型 M1 型小胶质细胞时, 糖酵解通量增加。即使在氧气充足条件下, 葡萄糖也会被优先用于糖酵解生成大量的乳酸, 但 OXPHOS 水平降低, 小胶质细胞的 TCA 受到抑制, 主要糖代谢途径发生从线粒体 OXPHOS 到有氧糖酵解的转变, 抑制 M1 型小胶质细胞的糖代谢重编程可能是一种治疗策略。相比之下, 在受到 IL-4 刺激后, BV2 小胶质细胞发生 M2 型极化, 小胶质细胞对于能量的需求降低, 糖酵解水平降低, 葡萄糖消耗和乳酸的产生减少, 其主要供能方式是 OXPHOS, 这种转变也是小胶质细胞极化后满足其自身增殖和能量需求所必需的, 糖代谢途径发生重编程以促进细胞能量代谢, 维持小胶质细胞的能量供应, 为

细胞吞噬细胞碎片、修复受损神经元等高耗能活动供能，促进 M2 型小胶质细胞糖代谢重编程可能是一种治疗策略。以上研究表明，NDDs 中糖代谢重编程与小胶质细胞极化密切相关，且在不同的刺激下发生的糖代谢重编程效应不同，通过调控两种亚型的小胶质细胞的糖代谢重编程是一种新的治疗策略，所以需要 NDDs 糖代谢重编程的机制进行进一步研究（见图 1）。

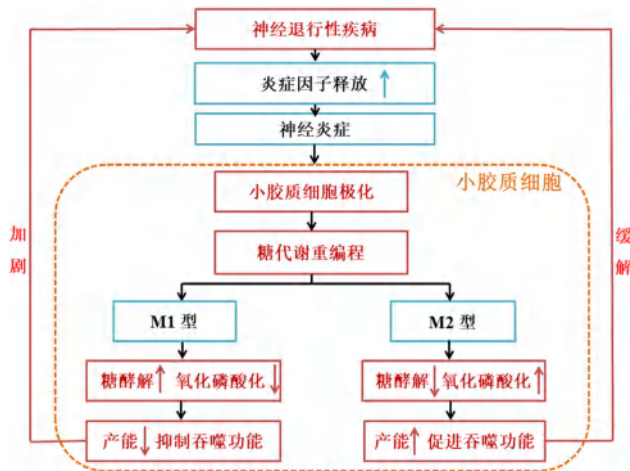


图 1 小胶质细胞糖代谢重编程

Fig 1 Glucose metabolism reprogramming of microglia

2.3 NDDs 中小胶质细胞糖代谢重编程的机制

NDDs 中小胶质细胞糖代谢重编程的机制复杂，主要涉及糖代谢关键酶、GLUTs 水平及糖代谢相关信号通路的变化。

2.3.1 糖代谢关键酶的变化 NDDs 中小胶质细胞极化时会伴随着糖代谢关键酶的变化。现有研究表明，在 NDDs 中，小胶质细胞极化引起 OXPHOS 途径减弱，糖酵解途径增强，如 HK、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PD）、PFK-1、PK、LDH 表达水平升高^[19-20]，糖代谢关键酶水平受到调控。有研究发现，AD 模型小鼠和 AD 患者的小胶质细胞中柠檬酸合酶（CS）、 α -酮戊二酸脱氢酶（KDH）、SDH 等 TCA 循环关键酶活性降低^[33]，己糖激酶 2（HK2）活性升高，小胶质细胞通过吞噬作用清除具有神经毒性的 $A\beta$ ，该过程需消耗大量 ATP。小鼠敲除 HK2 后其脑内淀粉样斑块堆积减少，小胶质细胞的增殖、迁移及吞噬功能增强，糖酵解通量减少，OXPHOS 途径增强，产能增加，进而改善了 AD 模型小鼠的认知功能障碍^[34]。细胞内错误折叠的 α -syn 具有神经毒性，被视为 NDDs 的重要关联分子。 α -syn 刺激的 PD 小鼠脑内活性氧（reactive oxygen species, ROS）水平升高，PD 患者的 NADH 脱氢酶活性降低，G6PD 活性升高^[35]。ALS 患者神经元

糖酵解水平上调，ALS 小鼠线粒体复合体活性下降^[36]。HD 患者脑内丙酮酸通过 LDH 产生的乳酸积累，SDH 活性下降，OXPHOS 效率低下^[37]。这表明 NDDs 中的糖酵解途径增强，OXPHOS 途径减弱，并且糖代谢关键酶的变化可能参与了调控小胶质细胞的糖代谢重编程过程。

2.3.2 GLUTs 的变化 NDDs 中小胶质细胞发生极化，GLUTs 水平发生变化。GLUTs 是细胞膜上一类能够转运葡萄糖进入胞内的受体，其中 GLUT1、GLUT2、GLUT3 和 GLUT4 与葡萄糖转运过程紧密相关。有研究表明， $A\beta$ 会抑制小鼠脑内 GLUT3 mRNA 的翻译和含 GLUT3 小泡与质膜的融合，从而导致神经元中 GLUT3 蛋白的减少，GLUT3 缺乏会导致脑葡萄糖摄取受损，并通过 Tau 蛋白的高磷酸化导致 AD 神经退行性病变。并且 AD 会下调被激活后的小胶质细胞 GLUT1 的表达，siRNA 转染 GLUT1 后小胶质细胞的糖酵解减弱^[38]。在 PD 中， α -syn 表达水平升高，在用 α -syn 刺激小胶质细胞后， α -syn 会与细胞中的 M2 型丙酮酸激酶（pyruvate kinase M2, PKM2）相互作用，进而触发 PKM2 磷酸化，GLUT1 和 GAPDH 的表达下调，促进小胶质细胞糖酵解过程，使小胶质细胞极化为 M1 型^[39-40]。HD 小鼠早期 GLUT3 蛋白水平正常，而在 HD 晚期 GLUT3 表达显著降低，神经元葡萄糖利用率降低^[38]。后续的研究还发现，小胶质细胞糖代谢重编程过程中增加的乳酸转运在一定情况下将会给神经元提供能量，从而对神经元代谢起到积极的影响。

2.3.3 糖代谢相关信号通路的变化 NDDs 中，小胶质细胞极化后能量代谢缺陷，并伴随着有自噬和吞噬功能障碍，小胶质细胞内的腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase, AMPK）、雷帕霉素靶蛋白（mechanistic target of rapamycin, mTOR）、低氧诱导因子 1 α （hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α ）等糖代谢相关信号通路也会发生变化。AMPK 信号通路是一个能量感知通路，通过调节糖酵解和糖异生过程来增加对葡萄糖的利用。有研究表明，在 AD 和 PD 中，AMPK 信号通路被抑制，小胶质细胞能够监测三磷酸腺苷/腺苷-磷酸（ATP/AMP）水平，当细胞内能量水平降低时，AMPK 信号通路会被激活，糖酵解和糖异生过程受到抑制，从而使葡萄糖更多地用于线粒体 OXPHOS 进行能量生产，进而起到调节糖代谢以维持能量平衡的作用^[41-43]。

mTOR 是磷脂酰肌 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）相关激酶家族的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，mTOR 信号通路参与调节神经

突触功能和大脑发育过程，并通过调控蛋白质翻译和自噬过程调节大脑认知和记忆能力。有研究发现 LPS 刺激小胶质细胞会增强糖酵解途径，抑制 OXPHOS 途径；ATP 刺激小胶质细胞会促进糖酵解和 OXPHOS 途径。LPS 和 ATP 刺激小胶质细胞都会激活 mTOR 信号通路，并增加细胞内的 ROS 的水平，在这两种情况下抑制 mTOR 信号通路都能抑制糖酵解和 ROS 的产生，但对 OXPHOS 的影响不同，抑制 mTOR 会削弱 ATP 引起的 OXPHOS 的升高，但对 LPS 抑制 OXPHOS 没有影响^[44]。以上结果提示 mTOR 信号通路可能介导小胶质细胞糖代谢重编程过程。

此外，mTOR/HIF-1 α 信号通路也与小胶质细胞极化过程中的糖代谢重编程相关，有研究表明 A β 会引发急性小胶质细胞炎症，并伴随着依赖于 mTOR/HIF-1 α 通路从 OXPHOS 转变为糖酵解的重编程^[45]。小胶质细胞极化为 M1 型后会促进从 OXPHOS 转变为糖酵解的重编程过程，抑制 mTOR 后 HIF-1 α 的表达下调，M1 型小胶质细胞极化减少，其糖酵解过程减弱，mTOR 过表达后则出现了相反的效果，表明 mTOR/HIF-1 α 诱导的有氧糖酵解可能会促进小胶质细胞向 M1 型极化^[46]。

TRPV1 通道在神经系统中可以调节突触传递、小胶质细胞与神经元之间的通信和大脑发育等，是 AD 治疗调节小胶质细胞功能糖代谢重编程的重要靶点。在 AD 中，小胶质细胞的 OXPHOS 途径被抑制，TRPV1 可以挽救能量代谢的缺陷，减少淀粉样蛋白斑块，增加小胶质细胞的自噬和吞噬功能，改善记忆功能，可能与抑制 mTOR-AKT-HIF-1 α 信号通路相关^[47]。并且通过控制小胶质细胞表面 TRPV1 通道的开放，增强其吞噬和降解 α -syn 的自噬作用，可以改善 PD^[48]。尽管 NDDs 中的小胶质细胞糖代谢重编程涉及到众多庞杂的蛋白分子和信号通路，但正由于存在这样精密的信号调控网络，小胶质细胞才能够有效地维持神经系统的稳态（见图 2）。

3 通过调控糖代谢重编程改善 NDDs 的相关药物研究

越来越多的研究表明，通过调节小胶质细胞糖代谢重编程可以减轻神经系统损伤，目前有一些通过调控糖代谢重编程改善 NDDs 的相关药物研究。比如在 AD 中，白藜芦醇可以通过激活 SIRT1，上调 NAD⁺ 合成酶、烟酰胺单核苷酸腺苷酸转移酶增加 NAD⁺/NADH 的比例，促进 OXPHOS，减少 α -syn 和 A β 诱导的细胞毒性^[49-50]。二甲双胍可以通过上调 GLUT3，下调 HK、HIF-1 α 和 PDK1 表达水平改善大脑的葡萄

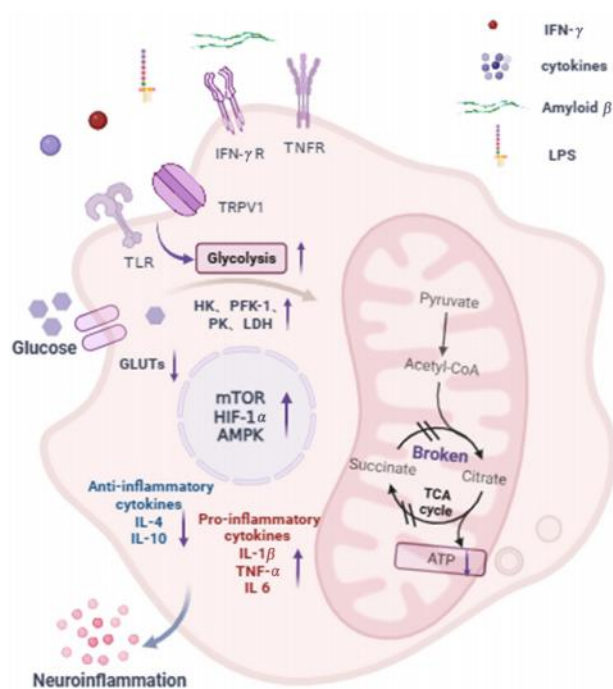


图 2 NDDs 中小胶质细胞糖代谢重编程机制

Fig 2 Mechanism of glucose metabolism reprogramming in microglia in NDDs

糖摄取、乳酸穿梭过程和能量供应，以产生足够的 ATP，改善 AD 小鼠的大脑损伤，恢复其认知功能^[51]。奥司莫亭可以通过激活 AdipoR1/AMPK/SIRT1 信号通路，显著减少 A β 的产生和聚集，同时改善 AD 小鼠的突触损伤、认知障碍和记忆缺陷^[52]。HK2 抑制剂氯尼达明可以显著促进 AD 小鼠中小胶质细胞对 A β 的吞噬，改善 AD 小鼠的认知功能障碍^[53]。和厚朴酚可以减轻 A β 诱导的 BV2 神经毒性，通过逆转从 OXPHOS 到糖酵解的代谢转换和增强 ATP 的产生来提高 BV2 细胞的吞噬效率，减少了线粒体 ROS 的产生并提高了线粒体膜电位，进而改善 AD，是一种能够增强线粒体功能从而促进小胶质细胞吞噬功能的天然产物^[54]。雷美替胺激活小胶质细胞中的褪黑素受体 1，通过上调 PDHA1 的表达来增强 OXPHOS 并抑制有氧糖酵解^[36]。IFN- γ 治疗可以逆转小胶质细胞的糖代谢缺陷，改善炎症水平，从而改善 AD 小鼠的病理过程^[45]。吡咯喹啉醌可以激活 PD 小鼠 AMPK 信号通路，并且用 AMPK 抑制剂多索吗啡预处理可显著削弱吡咯喹啉醌对 PD 小鼠的保护作用^[43]。2-脱氧酰-D-葡萄糖是一种糖酵解抑制剂，可以显著抑制 mTOR 磷酸化来减少多巴胺能神经元的死亡和小胶质细胞的激活，从而改善 PD^[55]。采用胰高血糖素样肽 1 受体激动剂 exendin-4 和二肽基肽酶 4 抑制剂利拉利汀进行治疗，可以减少促炎因子的分泌，诱导小胶质细胞

向抗炎型 M2 型极化, 抑制黑质中小胶质细胞的活化及多巴胺能神经元的死亡^[56]。以上研究提示糖代谢重编程在小胶质细胞极化过程中作用显著, 改善糖代谢过程可以改善小胶质细胞极化引起的神经炎症, 进而改善 NDDs 的神经损伤, 调节糖代谢过程可能是防治 NDDs 的新思路。

4 总结与展望

综上所述, 在 NDDs 中小胶质细胞会被激活, 小胶质细胞会极化成两种表型, 促炎型 M1 型和抗炎型 M2 型, 其糖代谢途径会发生重编程以维持能量供应, 糖代谢关键酶、葡萄糖转运体和糖代谢相关信号通路水平会发生改变, 通过调节关键酶和信号分子的水平可以改善小胶质细胞的炎症水平, 进而改善 NDDs 的神经损伤。因此针对小胶质细胞重编程过程调节糖代谢水平以维持大脑能量供应是一种治疗 NDDs 的新策略, 可以为研究 NDDs 的治疗药物提供新的研究方向, 其研究前景广阔, 但目前的研究较少, 还需进行更广泛的临床研究以阐明其病理生理机制。

参考文献

- [1] Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15 (10): 565-581.
- [2] Soininen H, Solomon A, Visser PJ, et al. 36-month LipiDiDiet multinutrient clinical trial in prodromal Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17 (1): 29-40.
- [3] van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, et al. Lecanemab in early Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388 (1): 9-21.
- [4] Peng C, Trojanowski JQ, Lee VM. Protein transmission in neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16 (4): 199-212.
- [5] Graff-Radford J, Yong KXX, Apostolova LG, et al. New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20 (3): 222-234.
- [6] Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia biology: one century of evolving concepts [J]. *Cell*, 2019, 179 (2): 292-311.
- [7] Borst K, Dumas AA, Prinz M. Microglia: immune and non-immune functions [J]. *Immunity*, 2021, 54 (10): 2194-2208.
- [8] Hickman S, Izzy S, Sen P, et al. Microglia in neurodegeneration [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21 (10): 1359-1369.
- [9] Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1995, 20 (3): 269-87.
- [10] Bruce-Keller AJ. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 58 (1): 191-201.
- [11] Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals [J]. *J Neurosci*, 2009, 29 (13): 3974-80.
- [12] Tremblay MÈ, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8 (11): e1000527.
- [13] McNamara NB, Munro DAD, Bestard-Cuche N, et al. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity [J]. *Nature*, 2023, 613 (7942): 120-129.
- [14] Chen JF, Liu K, Hu B, et al. Enhancing myelin renewal reverses cognitive dysfunction in a murine model of Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 2021, 109 (14): 2292-2307 e5.
- [15] Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, et al. Physiology of microglia [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91 (2): 461-553.
- [16] Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW. Microglia phenotype diversity [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011, 10 (1): 108-118.
- [17] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration [J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35: 441-468.
- [18] Newsholme P, Curi R, Gordon S, et al. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages [J]. *Biochem J*, 1986, 239 (1): 121-125.
- [19] Møller SH, Hsueh PC, Yu YR, et al. Metabolic programs tailor T cell immunity in viral infection, cancer, and aging [J]. *Cell Metab*, 2022, 34 (3): 378-395.
- [20] Karlstaedt A, Moslehi J, de Boer RA. Cardio-onco-metabolism: metabolic remodelling in cardiovascular disease and cancer [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19 (6): 414-425.
- [21] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324 (5930): 1029-1033.
- [22] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11 (5): 325-337.
- [23] Kaelin WG Jr, Thompson CB. Thompson, Q&A: cancer: clues from cell metabolism [J]. *Nature*, 2010, 465 (7298): 562-564.
- [24] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Nature*, 2001, 414 (6865): 799-806.
- [25] Ali L, Schnitzler JG, Kroon J. Metabolism: the road to inflammation and atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2018, 29 (6): 474-480.
- [26] Oller J, Gabandé-Rodríguez E, Ruiz-Rodríguez MJ, et al. Extracellular tuning of mitochondrial respiration leads to aortic aneurysm [J]. *Circulation*, 2021, 143 (21): 2091-2109.
- [27] Wang P, Zhang N, Wu B, et al. The role of mitochondria in vascular calcification [J]. *J Transl Int Med*, 2020, 8 (2): 80-90.
- [28] Jia Y, Mao C, Ma Z, et al. PHB2 maintains the contractile phenotype of VSMCs by counteracting PKM2 splicing [J]. *Circ Res*, 2022, 131 (10): 807-824.

- [29] Han R, Liang J, Zhou B. Glucose Metabolic dysfunction in neurodegenerative diseases-new mechanistic insights and the potential of hypoxia as a prospective therapy targeting metabolic reprogramming [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (11): 5887.
- [30] Voloboueva LA, Emery JF, Sun X, et al. Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/ mortalin [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587 (6): 756-762.
- [31] Gimeno-Bayón J, López-López A, Rodríguez MJ, et al. Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype [J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92 (6): 723-731.
- [32] Katoh M, Wu B, Nguyen HB, et al. Polymorphic regulation of mitochondrial fission and fusion modifies phenotypes of microglia in neuroinflammation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 4942.
- [33] Shoffner JM. Oxidative phosphorylation defects and Alzheimer's disease [J]. *Neurogenetics*, 1997, 1 (1): 13-19.
- [34] Hu Y, Cao K, Wang F, et al. Dual roles of hexokinase 2 in shaping microglial function by gating glycolytic flux and mitochondrial activity [J]. *Nat Metab*, 2022, 4 (12): 1756-1774.
- [35] Knight AL, Yan X, Hamamichi S, et al. The glycolytic enzyme, GPI, is a functionally conserved modifier of dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's models [J]. *Cell Metab*, 2014, 20 (1): 145-157.
- [36] Benchoua A, Trioulier Y, Zala D, et al. Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17 (4): 1652-1663.
- [37] Han R, Liang J, Zhou B. Glucose metabolic dysfunction in neurodegenerative diseases-new mechanistic insights and the potential of hypoxia as a prospective therapy targeting metabolic reprogramming [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (11): 5887.
- [38] Peng W, Tan C, Mo L, et al. Glucose transporter 3 in neuronal glucose metabolism: health and diseases [J]. *Metabolism*, 2021, 123: 154869.
- [39] Qiao H, He X, Zhang Q, et al. Alpha-synuclein induces microglial migration via PKM2-dependent glycolysis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 129: 601-607.
- [40] Sengupta U, Kaye R. Amyloid beta, Tau, and alpha-synuclein aggregates in the pathogenesis, prognosis, and therapeutics for neurodegenerative diseases [J]. *Prog Neurobiol*, 2022, 214: 102270.
- [41] 李虹莹, 沈缘, 吴巧凤, 等. 小胶质细胞极化信号通路在神经炎症中的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2022, 38 (14): 1838-1841, 1846.
- [42] 苏燕, 程晓雷, 周艺铭, 等. 神经退行性疾病中小胶质细胞糖代谢重编程的研究进展 [J]. *中国医药*, 2023, 18 (1): 143-147.
- [43] Cheng Q, Chen J, Guo H, et al. Pyrroloquinoline quinone promotes mitochondrial biogenesis in rotenone-induced Parkinson's disease model via AMPK activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (5): 665-678.
- [44] Hu Y, Mai W, Chen L, et al. mTOR-mediated metabolic reprogramming shapes distinct microglia functions in response to lipopolysaccharide and ATP [J]. *Glia*, 2020, 68 (5): 1031-1045.
- [45] Baik SH, Kang S, Lee W, et al. A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Cell Metab*, 2019, 30 (3): 493-507. e6.
- [46] Sun XG, Chu XH, Godje Godje IS, et al. Aerobic glycolysis induced by mTOR/HIF-1 α promotes early brain injury after subarachnoid hemorrhage via activating M1 microglia [J]. *Transl Stroke Res*, 2022. doi: 10.1007/s12975-022-01105-5.
- [47] Lu J, Zhou W, Dou F, et al. TRPV1 sustains microglial metabolic reprogramming in Alzheimer's disease [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22 (6): e52013.
- [48] Yuan J, Liu H, Zhang H, et al. Controlled activation of TRPV1 channels on microglia to boost their autophagy for clearance of alpha-synuclein and enhance therapy of Parkinson's disease [J]. *Adv Mater*, 2022, 34 (11): e2108435.
- [49] Albani D, Polito L, Batelli S, et al. The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide [J]. *J Neurochem*, 2009, 110 (5): 1445-1456.
- [50] Ribeiro R, Santos AC, Calazans MO, et al. Is resveratrol a prospective therapeutic strategy in the co-association of glucose metabolism disorders and neurodegenerative diseases? [J]. *Nutr Neurosci*, 2022, 25 (11): 2442-2457.
- [51] Song Y, Liu Z, Zhu X, et al. Metformin alleviates the cognitive impairment caused by aluminum by improving energy metabolism disorders in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 202: 115140.
- [52] Shah SA, Yoon GH, Chung SS, et al. Novel osmotin inhibits SREBP2 via the AdipoR1/AMPK/SIRT1 pathway to improve Alzheimer's disease neuropathological deficits [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22 (3): 407-416.
- [53] Han S, He Z, Jacob C, et al. Effect of increased IL-1 beta on expression of HK in Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (3): 1306.
- [54] Li W, Wang S, Zhang H, et al. Honokiol restores microglial phagocytosis by reversing metabolic reprogramming [J]. *Alzheimers Dis*, 2021, 82 (4): 1475-1485.
- [55] Cheng J, Zhang R, Xu Z, et al. Early glycolytic reprogramming controls microglial inflammatory activation [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18 (1): 129.
- [56] Yu HY, Sun T, Wang Z, et al. Exendin-4 and linagliptin attenuate neuroinflammation in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18 (8): 1818-1826.

(收稿日期: 2023-06-29; 修回日期: 2023-08-21)

线粒体通信与心血管疾病

李慧敏, 祝德秋, 武丹* (同济大学附属同济医院药剂科, 上海 200065)

摘要: 线粒体参与细胞内多种重要的生理活动, 并通过与细胞核、内质网、核糖体、溶酶体以及其他线粒体等细胞结构间的通信, 形成了一个维持细胞稳态的动态功能网络。通过线粒体通信的功能网络, 细胞能够应对各种环境变化。线粒体通信的失衡会导致细胞稳态的破坏, 诱导各种心血管疾病的发生。本文对线粒体与其他细胞结构的通信以及线粒体通信对心血管系统的影响进行了综述。

关键词: 心血管疾病; 线粒体; 细胞核; 内质网; 溶酶体; 核糖体

中图分类号: R54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-2828-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.002

Mitochondrial communication in cardiovascular diseases

LI Hui-min, ZHU De-qiu, WU Dan* (*Department of Pharmacy, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065*)

Abstract: Mitochondria participate in many important physiological activities in the cell, forming a dynamic functional network to maintain cell homeostasis through communication with cell structures such as nucleus, endoplasmic reticulum, ribosome, lysosome and other mitochondria. Via this communication network, cells cope with various environmental changes. Imbalance in mitochondrial communication can lead to the destruction of cell homeostasis and induce cardiovascular diseases. This paper reviewed the communication between the mitochondria and other cell structures and the effect of mitochondrial communication on the cardiovascular system.

Key words: cardiovascular disease; mitochondrion; nucleus; endoplasmic reticulum; lysosome; ribosome

《中国心血管健康与疾病报告 2022 概要》显示, 中国心血管疾病的发病率和致死率持续升高, 推算中国目前患病人数达 3.3 亿, 心血管疾病在中国疾病死亡构成比中占首位, 在不良生活习惯流行和人口老龄化加剧的社会状况下, 具有心血管疾病潜在风险的人群规模巨大^[1]。研究表明, 线粒体不仅提供了大量能量供心肌消耗, 还作为重要的生理结构参与一系列生物调节过程, 保障了心血管系统各项生理功能的正常运转, 其中线粒体与其他细胞器或细胞结构间的互相交流与调控形成了一个动态功能网络, 线粒体通信可能与心血管疾病的发生发展密切相关^[2-3]。本文介绍了线粒体与细胞核、内质网、溶酶体及线粒体间的通信与心血管疾病的联系, 以期治疗此类疾病提供新的思路。

1 线粒体与细胞核通信

线粒体和细胞核间的通信调控十分复杂, 可以简单概括为从细胞核到线粒体的顺向调节和从线粒体到细胞核的逆向调节。

顺向调节中, 不同的刺激 (如寒冷、剧烈运动等) 通过产生细胞核转录因子来调节线粒体功能, 确保线粒体内蛋白质的正常表达以及各项生理功能的正常进行, 顺向调节通过多种信号分子完成从细胞核到线粒体的指令发送, 调控线粒体的生物发生和线粒体功能, 以应对不同的环境刺激。顺向调节失控会导致线粒体稳态被破坏, 继而引发细胞各种功能障碍, 诱导心血管疾病的发生^[4]。本文总结了主要的转录因子及其对心血管系统的调控作用 (见表 1)。

基金项目: 上海市自然科学基金 (No. 22ZR1456900)。

作者简介: 李慧敏, 女, 硕士研究生, 主要从事心血管药理研究, email: lihuimini@163.com *通信作者: 武丹, 女, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管药理研究, email: wudan-hazzel@163.com

表 1 各转录因子在心血管系统中的生理功能和调控作用

Tab 1 Physiological function and regulation of transcription factors in the cardiovascular system

转录因子	生理功能	调控心血管系统
核呼吸因子 1 (NRF1)	调控线粒体氧化磷酸化; 促进线粒体生物发生	维持蛋白质中平衡和氧化还原平衡, 保护心肌细胞
核转录因子 E2 相关因子 2 (NRF2)	抗氧化	通过抗氧化作用, 改善心肌细胞的氧化应激
过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs)	参与线粒体脂肪酸氧化; 促进三磷酸腺苷 (ATP) 的生成	减轻血脂异常导致的动脉粥样硬化
雌激素相关受体 (ERRs)	调节三羧酸循环; 调节氧化磷酸化和脂肪酸氧化	调控心肌细胞成熟的关键因子

NRF1 激活线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 的表达, TFAM 进入线粒体后与 mtDNA 结合, 并在启动子处招募线粒体 RNA 聚合酶和线粒体转录因子 B2 (mitochondrial transcription factor B2, TFB2M) 来启动转录, 促进线粒体的生物发生^[5-7], NRF1 过表达能够激活心肌再生的转录程序, 诱导新生小鼠心肌细胞受损后的再生, 成年小鼠心脏中 NRF1 过表达能够减轻心肌缺血后再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)^[8]。

NRF2 是一种调控抗氧化应激的多功能转录因子, 能够与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 结合, 在稳态条件下, Keap1 与 NRF2 结合使其泛素化降解, 抑制 NRF2 的活性, 在应激反应中, Keap1 活性降低或与 NRF2 结合减弱, NRF2 逃避泛素化并在细胞内积累。累积的 NRF2 转运到细胞核后, 激活抗氧化反应元件 (antioxidant responsive element, ARE), 促进抗氧化程序^[9]。Keap1/NRF2 是人体内抗氧化的重要信号通路, 靶向 Keap1/NRF2 通路能够改善多种心血管疾病的症状, 如磷酸甘油酸变位酶家族 5 通过 Keap1/Nrf2 信号通路在小鼠心力衰竭时降低活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 诱导的氧化应激和铁死亡^[10], 靶向 Keap1/NRF2 信号通路减轻线粒体凋亡和氧化应激, 可提高 MIRI 大鼠的治疗效果^[11]。

PPARs 是调节全身代谢的脂肪酸传感器, 包括 PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 三种亚型, 在心脏中促进参与线粒体脂肪酸氧化的酶的表达, 促进 ATP 的生成^[12]。PPARs 能在血管和心脏水平上控制影响心血管疾病和心力衰竭的危险因素, 目前已有各类激活 PPARs 调控心血管系统的药物, 如贝特类药物可激活 PPAR α , 减轻动脉粥样硬化性血脂异常, 从而降低心血管疾病的风险。

ERRs 包括 ERR α 、ERR β 和 ERR γ 三种亚型, 与参与三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环、氧化磷酸化和脂肪酸氧化的核编码线粒体蛋白的表达有关。ERR α 和 ERR γ 是小鼠出生后心肌细胞成熟的关键调控因子^[13], 心脏特异性 ERR γ 过表达的小鼠, 会诱导心力衰竭 (heart failure, HF) 甚至死亡^[14]。

各种转录因子的活性受转录共激活因子的影响, 目前研究最多的是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活剂 -1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 alpha, PGC-1 α), PGC-1 α 通过调节转录因子的活性, 调节线粒体能量代谢^[15]。在运动状态下, ATP 消耗过快, ATP 水平降低或 AMP/ATP 比值升高会激活能量感受器 AMPK[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK], AMPK 激活使 PGC-1 α 水平升高^[16], PGC-1 α 激活其下游的 NRF1 和 NRF2 核基因, 进而促进线粒体生物合成和能量代谢以满足运动时的能量消耗^[17]。在血管平滑肌细胞中 PGC-1 α 通过与 NRF1 结合来调节小非编码 RNA——miR-378a, PGC-1 α /NRF1/miR-378a 轴能够保护血管免受游离脂肪酸诱导的平滑肌细胞增殖、迁移和炎症^[18], miR-378a 高表达具有预防动脉粥样硬化的功能, 与氧化型低密度脂蛋白共孵育的人类主动脉内皮细胞中 PGC-1 α 显著降低^[19], 导致 miR-378a 被抑制, 是动脉粥样硬化发生的可能原因。

逆向调节是由线粒体产生各种逆行信号, 通过这些信号调节各种细胞和生物活动, 并通过激活参与代谢重编程或应激防御的核基因表达来防止线粒体功能障碍^[20], 线粒体氧化磷酸化障碍或 mtDNA 突变等因素会触发线粒体应激, 进而启动从线粒体到细胞核的逆向调节。目前已知的逆行信号有 Ca²⁺ 代谢失衡、ROS 的生成等, 但逆行信号进行线粒体-细胞核的具体调控机制仍不明确, 且这些逆行信号缺乏特异性, 能够通过多种途径影响细胞进程。Ca²⁺ 代谢失衡、ROS 的过多生成与多种心血管疾病的发生发展相关。线粒体应激导致 ROS 生成增加, 激活 AMPK/PGC-1 α 通路, 促进核转录因子的生成, 进而促进线粒体生物发生和线粒体质量控制, ROS 生成增加还会导致氧化应激, 激活 Keap1/NRF2 抗氧化通路^[21], 逆向调节能够起到一定的心血管疾病预防作用。

上述线粒体与细胞核的通信过程示意图见图 1。

2 线粒体与内质网间的通信

Vance 在 1990 年首次提出线粒体相关内质网膜 (mitochondria associated membranes, MAMs) 的概念, MAMs 是内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 与线粒体之间紧密联系的脂筏样结构域, 参

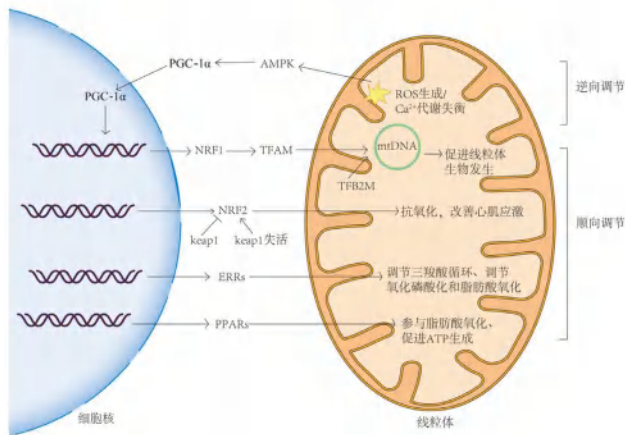


图 1 细胞核-线粒体通信示意图

Fig 1 Nucleus-mitochondria communication

与调节了多种细胞生物活动并介导线粒体与内质网间的通信^[22]。线粒体和内质网间的通信通过 MAMs 上诸多蛋白质结构来完成。MAMs 通过介导 Ca^{2+} 转运、诱导细胞凋亡和细胞自噬等生物过程来调控心血管系统。MAMs 的数量、结构或功能异常与心血管疾病的发生有关^[23]。高胆固醇血症是动脉粥样硬化的主要原因，高胆固醇血症增加了小鼠骨髓源性巨噬细胞中 MAMs 接触位点的数量，普伐他汀治疗能够减少 MAMs 的接触位点数量并改善疾病症状，MAMs 的改变与动脉粥样硬化进展和消退的机制可以联系起来^[24]。

2.1 MAMs 维持 Ca^{2+} 稳态保护心血管系统

MAMs 转运 Ca^{2+} 从内质网到线粒体能够维持心肌细胞功能，动态调节线粒体与内质网间的通信，使细胞维持正常的生理状态 (Ca^{2+} 转运示意图见图 2)，IP3R-GRP75-VDAC1 复合物和 IP3R2-FUNDC1 是转运 Ca^{2+} 从内质网到线粒体的主要通道。

MAMs 的距离会影响 Ca^{2+} 转运，MFN1 和 MFN2 是介导 MAMs 形成的调节因子，内质网内膜上的 MFN2 可以与线粒体外膜上的 MFN2 和 MFN1 形成同源或异源共聚体。MFN1 和 MFN2 表达下调时，线粒体和内质网之间偶联减少，距离变远，导致 Ca^{2+} 无法顺畅地从内质网转运到线粒体^[25]，MAMs 的微结构被破坏，线粒体 Ca^{2+} 处理异常，局部蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 活性改变，导致窦房结细胞中线粒体功能受损，影响心肌细胞的收缩和舒张^[26]。

MAMs 转运 Ca^{2+} 从内质网到线粒体能够维持心肌细胞功能，动态调节线粒体与内质网间的通信，使心肌细胞维持正常的生理状态，在 HF 的进展中起重要作用，HF 导致内质网迅速释放 Ca^{2+} ，过量的 Ca^{2+} 被转移到线粒体会引起线粒体 Ca^{2+} 超载^[27]，线粒体 Ca^{2+} 超载刺激线粒体通

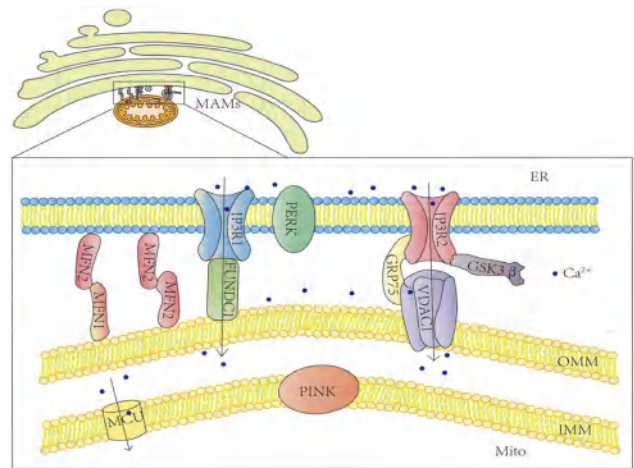


图 2 MAMs 的结构及 Ca^{2+} 转运途径示意图

Fig 2 Sketch map of MAMs structure and Ca^{2+} transport pathway

OMM. 线粒体外膜 (outer mitochondrial membrane); IMM. 线粒体内膜 (inner mitochondrial membrane); MCU. 线粒体钙单向转运蛋白 (mitochondrial calcium uniporter); MFN1. 线粒体融合蛋白 1 (mitofusin 1); MFN2. 线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2); GSK3 β . 糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β); PINK. PTEN 诱导假定激酶 1 重组蛋白 (PTEN induced putative kinase 1); FUNDC1. FUN14 结构域蛋白 1 (FUN14 domain containing protein 1); PERK. 蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase); IP3R1. 三磷酸肌醇受体 1 (inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 1); IP3R2. 三磷酸肌醇受体 2 (inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 2); GRP75. 葡萄糖调节蛋白 75 (75-kDa glucose-regulated protein); VDAC1. 电压依赖性阴离子通道 1 (voltage dependent anion channel 1)

透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 开放和线粒体肿胀，导致线粒体损伤、细胞凋亡、心脏重塑，最终发展为 HF^[28]。

2.2 MAMs 介导线粒体自噬调节心血管系统

MAMs 在线粒体自噬的诱导和执行中起着至关重要的作用^[29]，MAMs 通过 PINK1-MFN2-Parkin 通路、FUNDC1 蛋白等不同途径介导线粒体自噬来调节心血管系统。

PINK1 是一类位于线粒体内膜上能够感知线粒体损伤的蛋白质，参与构成了 MAMs。正常状态下，细胞中 PINK1 在线粒体内膜上被骨骼肌细胞线粒体膜蛋白 (mitochondrial intramembrane cleaving protease, PARL) 蛋白剪切并泛素化降解，当线粒体受损时，PINK1 会堆积并转移到线粒体外膜上，此时 PINK1 磷酸化线粒体外膜上的 MFN2 蛋白，并招募细胞质中的 Parkin 蛋白与磷酸化的 MFN2 结合并诱导细胞自噬^[30]。PINK1-MFN2-Parkin 通路介导的线粒体自噬对围产期小鼠心肌细胞线粒体成熟至关重要，是线粒体底物从碳水化合物转向脂肪酸所必需的，在小鼠围产期抑制 Parkin 介导的线粒体自噬会诱导致死性心肌病^[31]。

FUNDC1 不仅参与从内质网到线粒体的

Ca²⁺转运,还与线粒体自噬和细胞凋亡相关。FUNDC1 是受磷酸化调控活性的线粒体外膜蛋白,其氨基末端具有 LIR 结构,应激状态下,去磷酸化的 FUNDC1 能够通过 LIR 与吞噬囊泡上的微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3) 结合,导致线粒体自噬。在心肌缺血-再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 过程中,线粒体自噬可以保护微血管结构和功能,恩格列净能够通过激活 AMPK α 1/ULK1/FUNDC1 线粒体自噬途径减轻心脏微血管 MIRI^[32],缺氧适应可增加雄性小鼠心肌梗死后心肌组织中 FUNDC1 蛋白及 LC3 的表达,增加线粒体自噬,有效减少 MIRI 引起的心肌梗死面积,延缓 HF^[33]。

2.3 MAMs 介导细胞凋亡调节心血管系统

MAMs 结构中 PERK、GSK3 β 蛋白能够介导细胞凋亡,并与心血管疾病的发生密切相关。

PERK 是位于内质网膜上的一种 I 型跨膜蛋白,PERK 参与维持线粒体-内质网接触并增强 ROS 诱导的细胞凋亡。在糖尿病性心脏病大鼠模型中,过量的 ROS 导致内质网应激,并通过位于 MAMs 上的 PERK 信号通路诱导大鼠心肌细胞的凋亡,大鼠心脏中 PERK 特异性消融可防止高葡萄糖浓度下的细胞凋亡^[34]。

哺乳动物心脏中 GSK3 β 的一部分定位于内质网膜/肌浆网 (肌浆网是心脏和骨骼肌中的特殊内质网) 和 MAMs 上。GSK3 β 能特异性地与 MAMs 中的 IP3R1-GRP75-VDAC1 介导的 Ca²⁺ 通道复合物相互作用,在缺氧再氧化过程中,GSK3 β 活性增强,IP3R2 磷酸化程度增加,加快了 Ca²⁺ 向线粒体的转移,线粒体 Ca²⁺ 过载导致细胞死亡,再灌注时抑制 GSK3 β 会减少心脏 MAMs 中 IP3R2 的 Ca²⁺ 转运,避免了线粒体 Ca²⁺ 过载和随后的细胞死亡^[35]。

3 线粒体与其他细胞器间的通信

3.1 线粒体与核糖体间的通信

核糖体是生物体内蛋白质合成的唯一场所,位于细胞质和线粒体内。线粒体和核糖体间的通信通过核糖体合成维持线粒体功能所需的各种蛋白质进行。已知心肌肥厚预适应能够使心脏抵抗后续长时间的肥厚刺激,减缓 HF 进程^[36],使用线粒体蛋白质谱分析方法发现,心肌肥厚预适应刺激增强心肌线粒体功能与线粒体核糖体蛋白介导的线粒体氧化磷酸化复合体的转录加工和运输过程相关^[37]。

线粒体核糖体基因突变往往会带来严重的心脏功能损伤,核糖体基因突变会影响 mRNA 翻

译过程,影响线粒体功能,进而影响心血管系统^[38]。核糖体蛋白 L3 样蛋白 (ribosomal protein L3-like, RPL3L) 基因缺陷已在心肌病和房颤患者中被发现^[39],RPL3L 仅在骨骼肌和心脏组织中表达,是核糖体蛋白 L3 蛋白 (ribosomal protein L3, RPL3) 的同源物,心肌细胞中 RPL3L 的缺失会导致 RPL3 代偿性增加,含 RPL3 的核糖体与线粒体之间的物理接触增加^[40]。RPL3L 能够调节核糖体翻译延伸动力学,RPL3L 缺乏或 RPL3L 突变会降低小鼠的心脏收缩力,因为 RPL3L 突变会延迟 mRNA 上脯氨酸和丙氨酸密码子的翻译,导致长时间的翻译停顿,引起核糖体碰撞和错误的积累^[41]。另一项研究表明,线粒体核糖体蛋白 S5 (mitochondrial ribosomal protein S5, MRPS5) 突变会影响线粒体核糖体翻译的准确度^[42],小鼠心脏特异性缺失 MRPS5 导致线粒体核糖体翻译停滞,嵴结构塌陷,导致线粒体功能障碍,发育小鼠心脏中 MRPS5 缺失会导致心脏缺陷和胚胎死亡,在出生后缺失会导致心脏肥厚和 HF^[43]。

线粒体与核糖体通信保障了各类功能蛋白和结构蛋白的正常生成,对维持心血管系统的功能发挥了重要作用,通信失误会导致线粒体功能紊乱,与各类心血管疾病的发生密切相关。

3.2 线粒体与溶酶体间的通信

溶酶体主要负责清除细胞内失活的生物大分子或受损的细胞器。线粒体与溶酶体存在直接的物理接触,与溶酶体靶向受损线粒体所形成的接触不同,线粒体-溶酶体接触在正常细胞中不断形成和解离,功能上允许线粒体和溶酶体动力学的双向调节^[44]。在接触形成阶段,Ras 相关 GTP 结合蛋白 7 (Ras-related GTP binding protein 7, Rab7) 通过与溶酶体膜上的 GTP 结合,促进了接触发生。接触解除由线粒体分裂蛋白 1 (mitochondrial fission 1 protein, FIS1) 将 TBC1 域家族成员 15 (TBC domain family member 15, TBC1D15) 募集到线粒体,TBC1D15 通过与接触点处的 RAB7 结合,并将鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, GTP) 水解为鸟苷二磷酸 (guanosine diphosphate, GDP),驱动 RAB7-GTP 水解,从而解除接触^[45]。线粒体-溶酶体接触在急性心肌梗死诱导的心脏功能异常中起重要作用,在成年大鼠心肌梗死 3 d 后,线粒体-溶酶体接触异常,溶酶体增大,无法清除受损线粒体,这种功能异常与 TBC1D15 水平下调有关,TBC1D15 通过 FIS1/Rab7 途径解除线粒体-溶酶体接触,随后依赖溶酶体进行的线粒体自噬激活,TBC1D15 过表达可恢复心肌收缩功能,减轻心肌梗死面积和心肌间质纤维化^[46]。

3.3 心肌细胞内线粒体间的通信

心肌细胞正常的收缩活动需要线粒体提供能量,细胞内线粒体间的通信使大量线粒体形成一个动态连续的网络来传递和共享信号,保证心脏维持正常的收缩功能。在大多数类型的细胞内线粒体可自由活动,线粒体间能够通过运动、融合和分裂完成物质及信息交换,但心肌细胞内呈晶格状排列的收缩肌丝使线粒体活动受限,此时受限的线粒体之间主要通过线粒体吻合或形成动态纳米隧道进行通信,保证了心肌细胞线粒体间也能进行信息传递和物质交换,心肌细胞线粒体间通信失调可能与心血管疾病中线粒体功能障碍密切相关,研究发现,自发性高血压大鼠心肌细胞中线粒体通信受损^[47]。在电子显微镜下可以观察到形成吻合或纳米隧道的超微结构,具体是哪些蛋白介导了心肌细胞线粒体间的通信尚不清楚。有研究发现,线粒体外膜 Rho GTPase 2 蛋白 (mitochondrial Rho GTPase 2, Miro2) 可能与心肌细胞线粒体间的通信有关, Miro2 是位于线粒体外膜具有 Ca^{2+} 感应结构域的膜蛋白,在线粒体运动不受限的细胞中介导线粒体沿微管运输,以提供能量和控制线粒体质量,与微管与纳米隧道的形成有关;腺病毒介导的成人心肌细胞中 Miro2 过表达通过增加线粒体纳米隧道和线粒体吻合来加速线粒体间的通信,在小鼠主动脉弓缩窄引起的心肌肥厚中, Miro2 蛋白水平下降导致线粒体间通信减少, Miro2 高表达可改善小鼠在主动脉弓缩窄后的心功能,线粒体纳米管形成和线粒体间通信增加,线粒体功能改善^[48]。

线粒体功能障碍与多种心血管疾病的发生发展密切相关,而线粒体与细胞内其他成分间的通信对于心血管系统的影响仍需要更多的关注。心脏功能的正常运转需要线粒体与多种细胞器或细胞结构互相协调通信,例如 Ca^{2+} 是维持心脏节律跳动的重要离子,内质网和线粒体通信完成 Ca^{2+} 在细胞内的运输保证其发挥正常的生理功能, Ca^{2+} 失调还会影响对 Ca^{2+} 敏感的 Miro2 蛋白,扰乱心肌细胞线粒体间通信,是出现心血管疾病的重要诱因。在研究线粒体功能与心血管疾病间联系时,应该将细胞视为动态整体,多关注线粒体与其他细胞器间的通信网络,了解线粒体通信有助于我们在细胞层面上深入理解多种心血管疾病的发病机制,在未来可能为心血管疾病的治理提供新的思路。

参考文献

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病

- 报告 2022 概要 [J]. 中国循环杂志, 2023, 38 (6): 583-612.
- [2] Hamilton S, Terentyeva R, Clements RT, et al. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication; implications for cardiac arrhythmia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 156: 105-113.
- [3] Soledad RB, Charles S, Samarjit D. The secret messages between mitochondria and nucleus in muscle cell biology [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 666: 52-62.
- [4] Guajardo-Correa E, Silva-Agüero JF, Calle X, et al. Estrogen signaling as a bridge between the nucleus and mitochondria in cardiovascular diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 968373.
- [5] Popov LD. Mitochondrial biogenesis: an update [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (9): 4892-4899.
- [6] Cardanho-Ramos C, Morais VA. Mitochondrial biogenesis in neurons: how and where [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (23): 13059.
- [7] Quiros PM, Mottis A, Auwerx J. Mitonuclear communication in homeostasis and stress [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17 (4): 213-226.
- [8] Cui M, Atmanli A, Morales MG, et al. Nrf1 promotes heart regeneration and repair by regulating proteostasis and redox balance [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 5270.
- [9] Baird L, Yamamoto M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40 (13): e00099-20.
- [10] Li SF, Wen P, Zhang DY, et al. PGAM5 expression levels in heart failure and protection ROS-induced oxidative stress and ferroptosis by Keap1/Nrf2 [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2023, 45 (1): 2162537.
- [11] Yao H, Xie Q, He Q, et al. Pretreatment with panaxatriol saponin attenuates mitochondrial apoptosis and oxidative stress to facilitate treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury via the regulation of Keap1/Nrf2 activity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9626703.
- [12] Jiang Q, Ji A, Li DC, et al. Mitochondria damage in ambient particulate matter induced cardiotoxicity: roles of PPAR alpha/PGC-1 alpha signaling [J]. *Environ Pollut*, 2021, 288: 117792.
- [13] Sakamoto T, Matsuura TR, Wan S, et al. A critical role for estrogen-related receptor signaling in cardiac maturation [J]. *Circ Res*, 2020, 126 (12): 1685-1702.
- [14] Lasheras J, Pardo R, Velilla M, et al. Cardiac-specific overexpression of ERR γ in mice induces severe heart dysfunction and early lethality [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (15): 8047.
- [15] Zhu D, Li X, Tian Y. Mitochondrial-to-nuclear communication in aging: an epigenetic perspective [J]. *Trends Biochem Sci*, 2022, 47 (8): 645-659.
- [16] Zhang Y, Yin K, Wang DX, et al. Polystyrene microplastics-induced cardiotoxicity in chickens via the ROS-driven NF- κ B-NLRP3-GSDMD and AMPK-PGC-1 α axes [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 840: 156727.
- [17] Maldonado E, Rojas DA, Urbina F, et al. The use of antioxidants as potential co-adjuvants to treat chronic chagas disease [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10 (7): 1022.
- [18] Chong HS, Wei Z, Na MH, et al. The PGC-1 α /NRF1/miR-378a axis protects vascular smooth muscle cells from FFA-induced proliferation, migration and inflammation in atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 297: 136-145.

- [19] Wang CY, Wang J, Cao J, et al. Activating PGC-1 α -mediated signaling cascades in the aorta contributes to the amelioration of vascular senescence and atherosclerosis by 2, 3, 4', 5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glycoside [J]. *Phytomedicine*, 2022, 99: 154017.
- [20] Walker BR, Moraes CT. Nuclear-Mitochondrial interactions [J]. *Biomolecules*, 2022, 12 (3): 427.
- [21] Kong LM, Deng J, Zhou X, et al. Sitagliptin activates the p62-Keap1-Nrf2 signalling pathway to alleviate oxidative stress and excessive autophagy in severe acute pancreatitis-related acute lung injury [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (10): 928.
- [22] Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265 (13): 7248-7256.
- [23] Gao P, Yan ZC, Zhu ZM. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in cardiovascular diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 604240.
- [24] Assis LHP, Dorigheo GG, Rentz T, et al. In Vivo Pravastatin treatment reverses hypercholesterolemia induced mitochondria-associated membranes contact sites, foam cell formation, and phagocytosis in macrophages [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 839428.
- [25] Yuan M, Gong M, Zhang Z, et al. Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress in atrial cardiomyocytes, and mitofusin-2 downregulation prevents mitochondrial dysfunction and subsequent cell death [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6569728.
- [26] Ren L, Gopireddy RR, Perkins G, et al. Disruption of mitochondria-sarcoplasmic reticulum microdomain connectomics contributes to sinus node dysfunction in heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119 (36): e2206708119.
- [27] Godoy JA, Rios JA, Picón-Pagès P, et al. Mitostasis, calcium and free radicals in health, aging and neurodegeneration [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (7): 1012.
- [28] Xu HX, Cui SM, Zhang YM, et al. Mitochondrial Ca²⁺ regulation in the etiology of heart failure: physiological and pathophysiological implications [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41 (10): 1301-1309.
- [29] McLelland GL, Goiran T, Yi W, et al. Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy [J]. *Elife*, 2018, 7: e32866.
- [30] Chen Y, Dorn GW. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria [J]. *Science*, 2013, 340 (6131): 471-475.
- [31] Gong GH, Song MS, Csordas G, et al. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice [J]. *Science*, 2015, 350 (6265): aad2459.
- [32] Cai C, Guo ZZ, Chang X, et al. Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion through activating the AMPK α 1/ULK1/FUNDC1/mitophagy pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102288.
- [33] Li Q, Liu YH, Huang QQ, et al. Hypoxia acclimation protects against heart failure postacute myocardial infarction via fundc1-mediated mitophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8192552.
- [34] Belali OM, Ahmed MM, Mohany M, et al. LCZ696 protects against diabetic cardiomyopathy-induced myocardial inflammation, ER stress, and apoptosis through inhibiting AGEs/NF- κ B and PERK/CHOP signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 22 (3): 1288.
- [35] Gomez L, Thiebaut PA, Paillard M, et al. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3 β during reperfusion injury [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23 (2): 313-322.
- [36] Wei X, Wu B, Zhao J, et al. Myocardial hypertrophic preconditioning attenuates cardiomyocyte hypertrophy and slows progression to heart failure through upregulation of S100A8/A9 [J]. *Circulation*, 2015, 131 (17): 1506-1517.
- [37] 辛凯悦, 马雷雷, 董震, 等. 心肌肥厚适应小鼠线粒体蛋白质组学分析 [J]. *解剖学报*, 2020, 51 (3): 378-384.
- [38] Van Heesch S, Witte F, Schneider-Lunitz V, et al. The translational landscape of the human heart [J]. *Cell*, 2019, 178 (1): 242-260. e29.
- [39] Thoroldsdottir RB, Sveinbjornsson G, Sulem P, et al. Coding variants in RPL3L and MYZAP increase risk of atrial fibrillation [J]. *Commun Biol*, 2018, 1: 68.
- [40] Milenkovic I, Santos Vieira HG, Lucas MC, et al. Dynamic interplay between RPL3-and RPL3L-containing ribosomes modulates mitochondrial activity in the mammalian heart [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 7: gkad121.
- [41] Shiraishi C, Matsumoto A, Ichihara K, et al. RPL3L-containing ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 2131.
- [42] Akbergenov R, Duscha S, Fritz AK, et al. Mutant MRPS5 affects mitoribosomal accuracy and confers stress-related behavioral alterations [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19 (11): e46193.
- [43] Gao F, Liang T, Lu YW, et al. A defect in mitochondrial protein translation influences mitonuclear communication in the heart [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 1595.
- [44] Wong YC, Ysselstein D, Krainc D. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis [J]. *Nature*, 2018, 554 (7692): 382-386.
- [45] Onoue K, Jofuku A, Ban-Ishihara R, et al. Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126 (Pt 1): 176-185.
- [46] Yu WJ, Sun SQ, Xu HX, et al. TBC1D15/RAB7-regulated mitochondria-lysosome interaction confers cardioprotection against acute myocardial infarction-induced cardiac injury [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (24): 11244-11263.
- [47] Huang XH, Sun L, Ji SX, et al. Kissing and nanotunneling mediate intermitochondrial communication in the heart [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110 (8): 2846-2851.
- [48] Cao YP, Xu CL, Ye JJ, et al. Miro2 regulates inter-mitochondrial communication in the heart and protects Against TAC-induced cardiac dysfunction [J]. *Circ Res*, 2019, 125 (8): 728-743.

(收稿日期: 2023-06-14; 修回日期: 2023-08-17)

研究论文

升清解毒微乳凝胶的制备工艺及处方优化研究

王施元^{1, 2}, 曹波¹, 李莹滢¹, 林蒙蒙¹, 李春雨^{1*}, 李国辉^{1*} (1. 国家癌症中心, 国家肿瘤临床医学研究中心, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院, 北京 100021; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: **目的** 以挥发油成分为油相、水煎液为水相制备升清解毒微乳凝胶, 并对其处方优化和质量评价。**方法** 采用伪三元相图法优选微乳处方, 再采用 D-最优混料设计优化处方, 通过单因素法筛选凝胶基质及用量, 并对升清解毒微乳凝胶进行质量评价。**结果** 优化后的升清解毒微乳凝胶呈金黄色、半透明、均一稳定的黏稠状半固体, 有轻微花椒油气味, 均匀细腻, 易于涂展, pH 值为 (6.54±0.08), 黏度为 (15.33±0.15) Pa·s。处方组成: 水相 3.49 g, 油相 0.11 g, EL-35 0.27 g, 1, 2-丙二醇 0.13 g, 卡波姆 940 0.4 g, 三乙醇胺 0.5 g。**结论** 优化后的微乳凝胶制备工艺稳定可行, 初步质量评价符合皮肤外用制剂的要求。

关键词: 分子靶向药物相关皮炎; 升清解毒微乳凝胶; 处方工艺; D-最优混料设计; 质量评价
中图分类号: R283, R94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-2834-08
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.003

Preparation and optimization of Shengqing Jiedu microemulsion gel

WANG Shi-yuan^{1, 2}, CAO Bo¹, LI Ying-ying¹, LIN Meng-meng¹, LI Chun-yu^{1*}, LI Guo-hui^{1*} (1. National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract: Objective To prepare Shengqing Jiedu microemulsion gel with volatile oil as the oil phase and water decoction as the water phase, and to optimize its prescription and evaluate its quality. **Methods** Pseudo-ternary phase diagram was utilized to optimize the microemulsion formulation and D-optimal mixture design was used to screen the optimal formulation. The gel matrix and dosage were screened by single factor method, and the quality of Shengqing Jiedu microemulsion gel was evaluated. **Results** Shengqing Jiedu microemulsion gel was golden-yellow, translucent, uniform and stable viscous semi-solid, with a slight smell of peppercorn oil, uniform and delicate, and easy to spread. The pH value was (6.54±0.08), and the viscosity was (15.33±0.15) Pa·s. The prescription composition included water phase 3.49 g, oil phase 0.11 g, EL-35 0.27 g, 1, 2-propylene glycol 0.13 g, carbomer 940 0.4 g, and triethanolamine 0.5 g. **Conclusion** The optimized preparation of microemulsion gel is stable and feasible, and its preliminary quality meets the requirements of skin topical preparation.

Key words: molecular targeted drug-related dermatitis; Shengqing Jiedu microemulsion gel; prescription process; D-optimal mixture design; quality evaluation

肿瘤分子靶向药物相关皮炎主要表现为手足 患者的生活质量和用药依从性, 目前临床治疗以
皮肤水肿、水疱、红斑和疼痛等症状, 严重影响 激素和抗菌药物为主, 但效果并不理想, 尚缺乏

基金项目: 中国癌症基金会北京希望马拉松专项基金重点课题 (No.LC2020A28); 首都卫生发展科研项目 (No. 首发 2022-2-4028)。

作者简介: 王施元, 女, 博士研究生, 主要从事抗肿瘤药物不良反应研究, email: claudiawang1106@163.com *通信作者: 李春雨, 女, 副主任药师, 主要从事中医药防治抗肿瘤药物不良反应研究, email: chunyu_li@126.com; 李国辉, 女, 主任药师, 主要从事医院药学研究, email: lgh0603@cicams.ac.cn

有效的治疗药物^[1]。升清解毒洗剂由《金匱要略》中的经典名方“升麻鳖甲汤”化裁而来, 减去原方的剧毒药物雄黄, 显著降低了组方毒性, 具有清热解毒、活血化瘀、除湿止痒的功效^[2], 更加适合肿瘤分子靶向药物相关皮炎的治疗, 但升清解毒洗剂主要通过水煎液外洗法给药, 但洗剂的黏附性、延展性和持久性较差, 生物利用度低, 患者使用不便, 因此, 提高升清解毒洗剂的使用便利性和生物利用度是目前亟待解决的科学问题。

微乳是由水相、油相、表面活性剂和助表面活性剂组成的热力学稳定分散体系, 粒径在 10 ~ 100 nm, 可有效提高水难溶性药物的溶解度与稳定性, 但微乳的流动性较强, 难以在皮肤上涂布并长时间滞留^[3]。微乳凝胶 (microemulsion-based gels, MBGs) 作为一种新型经皮给药系统, 将微乳与凝胶相结合, 使微乳液均匀分散在凝胶基质的三维网状结构中, 可作为水难溶性药物的经皮给药载体, 既增加了体系的稳定性, 又具备滞留时间长、透皮吸收率高、真皮层储量高等优势^[4-5]。由于升清解毒方中含有挥发油成分, 所以提取其挥发油作为油相, 水煎液作为水相, 制成“药辅合一”的升清解毒微乳凝胶^[6]。D- 最优混料设计是将 D- 最优化方法应用到混料实验中, 考察产品的某种特性或综合性能与产品中各种混料成分之间的关系, 从而得到最优配方组合, 具有实验次数少、参数预测精度高、多目标同步优化等特点。微乳自身组成较多, 将 D- 最优混料设计与微乳处方工艺结合, 建立微乳各组分含量与微乳粒径之间的数学模型, 可以直观考察微乳各组分含量对其理化性质的影响, 从而优化升清解毒微乳处方工艺^[7-8]。

本实验将中药复方与微乳凝胶经皮给药技术相结合, 研究升清解毒微乳凝胶的制备工艺, 并对其进行处方优化和质量评价, 以期对中药复方新型给药系统的研究提供新思路和新方法。

1 材料

1.1 仪器

Legend Micro 21R 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司); Nicomp 380 ZLS 纳米粒径与电位分析仪 (美国 PSS 公司); 磁力搅拌器、pH 酸度计、NDJ-5S 型数字黏度计 (上海精密科学仪器有限公司); CP214 型万分之一电子分析天平 (上海奥豪斯仪器有限公司); Scout SE-SE402F 型电子天平 (常州奥豪斯仪器有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); UPT-I-5 型超纯水制备系统 (四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 试药

当归 (批号: 71041311)、甘草 (批号: 71020311)、花椒 (批号: 71021511)、醋鳖甲 (批号: 71051911)、升麻 (批号: 71031511) (国药集团北京华邈药业有限公司)。聚山梨酯 80 (Tween-80)、聚山梨酯 20 (Tween-20) (化学纯, 四川金山制药有限公司); 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (Cremophor RH-40)、聚氧乙烯蓖麻油 (Cremophor EL-35) (化学纯, 上海源叶生物技术有限公司); 辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯 (Labrasol, 化学纯)、二乙二醇单乙醚 (Transcutol) (法国嘉法狮公司); 无水乙醇 (分析纯, 北京化工厂); 1, 2-丙二醇、异丙醇 (化学纯, 国药集团化学试剂有限公司); PEG-400 (化学纯, 江西益普生药业有限公司); 羟丙基甲基纤维素 (HPMC, 上海凇恩科技发展有限公司); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 天津福晨化学试剂有限公司); 卡波姆 940 (北京索莱宝科技有限公司); 乙腈 (批号: F22M8I203)、甲醇 (批号: 213382)、磷酸 (批号: 210945) [HPLC 级, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。

1.3 动物

10 只雌性 SPF 级 SD 大鼠, 体重 (180±20) g [斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2019-0010]。本研究已通过中国医学科学院肿瘤医院动物伦理委员会审核批准 [SYXK (京) 2019-0019]。

2 方法与结果

2.1 升清解毒微乳的制备

2.1.1 升清解毒微乳油相的制备 按照处方量称取花椒和当归, 粉碎后加入适量蒸馏水, 浸泡 12 h, 参照 2020 年版《中国药典》挥发油测定法, 采用水蒸气蒸馏法在挥发油提取器中蒸馏 8 h, 收集精油馏分, 加等体积的乙醚萃取 3 次, 蒸发乙醚, 干燥后得到棕黄色透明油状物, 即得升清解毒微乳油相。

2.1.2 升清解毒微乳水相的制备 按照处方比例称取适量升麻、鳖甲、甘草、当归和花椒, 粉碎成粗粉, 加入 8 倍量蒸馏水, 浸泡 12 h, 加热提取 2 h, 向滤液中加入 75% 乙醇, 醇沉 12 h 后过滤, 回收乙醇, 得到水提液浸膏, 再用蒸馏水分别稀释至相当于原药材 0.5、1.0、1.5、2.0 g·mL⁻¹, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液, 即得升清解毒微乳水相。

2.1.3 表面活性剂与助表面活性剂的配伍实验 分别以 Tween-80、Tween-20、Cremophor RH-40、Cremophor EL-35、Labrasol 为表面活性剂, 以无水乙醇、1, 2-丙二醇、异丙醇、PEG-400、Transcutol 为助表面活性剂, 将油相、表面活性剂与助表面活性剂按质量比 1:2:2 混合, 固定总质量为 0.50 g, 混合均

匀，在室温、磁力搅拌下逐滴滴入 50 mL 蒸馏水中 乳化，以表 1 的评价指标进行综合评分，I ~ IV 评 分项的比例分别为 30%、30%、20%、20%，考察表 面活性剂与助表面活性剂的配伍情况^[9]。

表 1 表面活性剂与助表面活性剂配伍的评分标准

Tab 1 Scoring criteria for compatibility of surfactant and cosurfactant

No.	评分项	评分标准
I	700 nm 透光率	30 分: 100% ~ 98%; 25 分: 98% ~ 90%; 20 分: 90% ~ 80%; 15 分: 80% ~ 70%; 10 分: 70% ~ 60%; 0 分: < 60%
II	微乳的外观性状	30 分: 淡蓝色澄清透明; 25 分: 淡蓝色半透明; 15 分: 浅白色半透明; 10 分: 乳白色不透明; 0 分: 分层、油滴、絮状物
III	12 000 r · min ⁻¹ 离心 20 min 稳定性	20 分: 无变化; 0 分: 分层、油滴、絮状物
IV	常温避光静置 24 h 的外观性状	20 分: 澄清、无分层; 10 分: 浑浊、无分层; 0 分: 分层、油滴、絮状物

结果见表 2，序号 1、4、5、6、9、10、16、19、20 的综合评分均 ≥ 85 分，即以 Tween-80、Cremophor EL-35 与 Labrasol 为表面活性剂，以无水乙醇、1, 2-丙二醇、PEG-400 为助表面活性剂 配伍时，将油相、表面活性剂与助表面活性剂按 质量比 1 : 2 : 2 混合，均能形成澄清透明的微乳， 12 000 r · min⁻¹ 离心 20 min 后无分层，常温避光 静置 24 h 后微乳稳定。

表 2 表面活性剂与助表面活性剂的配伍结果

Tab 2 Compatibility of surfactant and cosurfactant

序号	药物用量 /g											各项评分 / 分				总分 / 分
	Tween-80	Tween-20	RH-40	EL-35	Labrasol	无水乙醇	1, 2-丙二醇	异丙醇	PEG-400	Transcutol	I	II	III	IV		
1	0.2	—	—	—	—	0.2	—	—	—	—	25	30	20	20	95	
2	—	0.2	—	—	—	0.2	—	—	—	—	20	25	20	10	75	
3	—	—	0.2	—	—	0.2	—	—	—	—	20	15	20	10	65	
4	—	—	—	0.2	—	0.2	—	—	—	—	25	25	20	20	90	
5	—	—	—	—	0.2	0.2	—	—	—	—	20	25	20	20	85	
6	0.2	—	—	—	—	—	0.2	—	—	—	25	25	20	20	90	
7	—	0.2	—	—	—	—	0.2	—	—	—	20	25	20	10	75	
8	—	—	0.2	—	—	—	0.2	—	—	—	20	25	20	10	75	
9	—	—	—	0.2	—	—	0.2	—	—	—	25	30	20	20	95	
10	—	—	—	—	0.2	—	0.2	—	—	—	20	25	20	20	85	
11	0.2	—	—	—	—	—	—	0.2	—	—	15	15	20	20	70	
12	—	0.2	—	—	—	—	—	0.2	—	—	20	15	20	10	65	
13	—	—	0.2	—	—	—	—	0.2	—	—	20	10	20	0	50	
14	—	—	—	0.2	—	—	—	0.2	—	—	25	15	20	10	70	
15	—	—	—	—	0.2	—	—	0.2	—	—	25	15	20	10	70	
16	0.2	—	—	—	—	—	—	—	0.2	—	20	25	20	20	85	
17	—	0.2	—	—	—	—	—	—	0.2	—	15	15	0	10	40	
18	—	—	0.2	—	—	—	—	—	0.2	—	10	15	20	10	55	
19	—	—	—	0.2	—	—	—	—	0.2	—	20	25	20	20	85	
20	—	—	—	—	0.2	—	—	—	0.2	—	20	25	20	20	85	
21	0.2	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	20	15	20	0	55	
22	—	0.2	—	—	—	—	—	—	—	0.2	15	10	20	10	55	
23	—	—	0.2	—	—	—	—	—	—	0.2	10	25	20	0	55	
24	—	—	—	0.2	—	—	—	—	—	0.2	20	25	20	10	75	
25	—	—	—	—	0.2	—	—	—	—	0.2	20	15	20	10	65	

2.1.4 助表面活性剂的筛选 以 Tween-80、Cremophor EL-35、Labrasol 为表面活性剂，以无水乙醇、1, 2-丙二醇、PEG-400 为助表面活性剂，将表面活性剂和助表面活性剂按照质量比 1 : 1 两两混合，共得到 9 种混合物，再将其与油相按照质量比 2 : 1 混合均匀，在室温、磁力搅拌下缓慢滴加蒸馏水，直至体系由澄清变浑浊后不再滴加，记录加水量并计算最大容水比，最大容水比 = 最大加水

量 / 微乳总质量，筛选最适合的助表面活性剂^[10]。结果如图 1 所示，9 种混合体系中，均以 1, 2-丙二醇为助表面活性剂的体系含水量最大，其次为无水乙醇，PEG-400 的含水量最小，差异有统计学意义，故选择 1, 2-丙二醇作为助表面活性剂。

2.1.5 表面活性剂的筛选 以 Tween-80、Cremophor EL-35、Labrasol 为表面活性剂，1, 2-丙二醇为助表面活性剂，分别按照质量比 1 : 1 混合均匀，

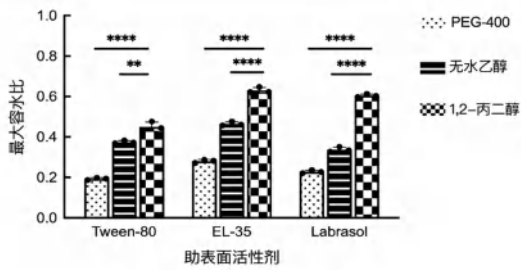


图 1 助表面活性剂的筛选 (** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$)

Fig 1 Screening of cosurfactants (** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$)

得到混合表面活性剂，再与油相分别按照 1 : 9、2 : 8、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1 的比例混匀，为了更准确地判断滴定终点，笔者先使用蒸馏水代替升清解毒水煎液作为水相，在室温、磁力搅拌下缓慢滴加蒸馏水，记录体系由澄清变混浊时的加水量^[1]。以水相为第一顶点，表面活性剂和助表面活性剂的总量为第二顶点，油相为第三顶点，用 Origin 8.0.6 软件作伪三元相图，确定微乳区域，筛选最适合的表面活性剂。

结果如图 2 所示，以 1, 2- 丙二醇为助表面活性剂时，Tween-80、Cremophor EL-35、Labrasol 三种表面活性剂均可与其形成微乳区。相较于 Labrasol 和 Tween-80，Cremophor EL-35 所形成的微乳区域面积最大，在此区域内油相能迅速乳化且乳化效果较好，故选择 Cremophor EL-35 作为表面活性剂。

2.1.6 最佳表面活性剂与助表面活性剂比例 (K_m) 的选择 固定 K_m 为 2 : 1、1 : 1、1 : 2，将油相与混合表面活性剂分别按照 1 : 9、2 : 8、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1 的比例混合均匀，在室温、磁力搅拌下缓慢滴加蒸馏水，记录体系由澄清变混浊的临界点，计算处于临界点时体系各组成部分的比例，用 Origin 8.0.6 软件作伪三元相图，比较不同 K_m 条件下形成的微乳区域面积，筛选最佳 K_m 。由图 3 可知， $K_m = 2 : 1 > K_m = 1 : 1 > K_m = 1 : 2$ ，即 K_m 为 2 : 1 时微乳区域面积最大，故最终确定 Cremophor EL-35 与 1, 2- 丙二醇的最佳 K_m 为 2 : 1。

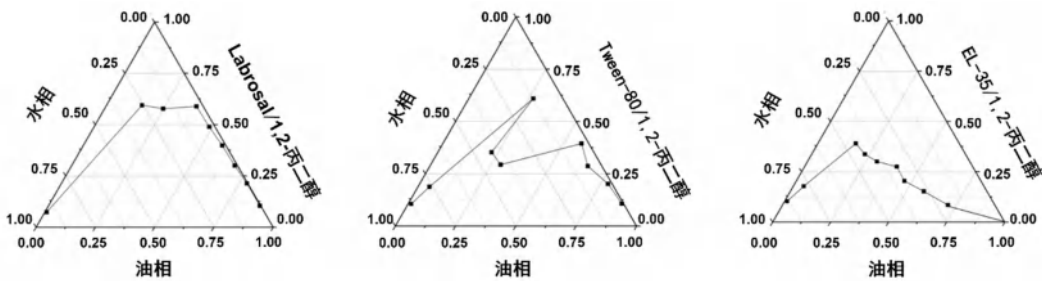


图 2 表面活性剂的筛选

Fig 2 Screening of surfactants

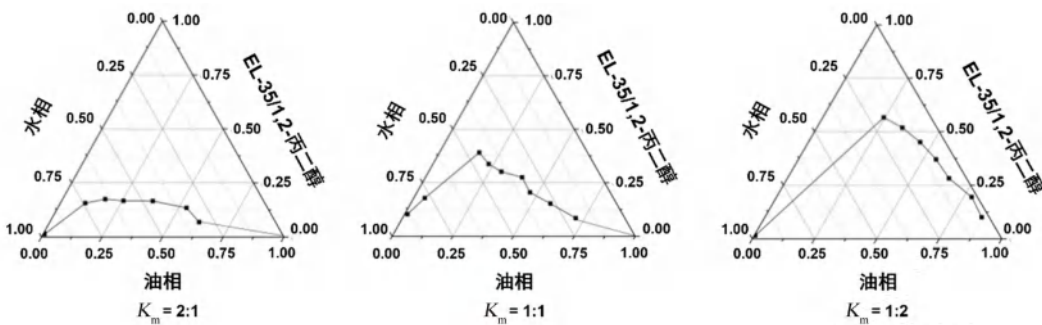


图 3 不同 K_m 值的伪三元相图

Fig 3 Pseudo ternary phase diagram with different K_m values

2.1.7 最佳水提液浓度的选择 将水相由蒸馏水替换成不同质量浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0 $g \cdot mL^{-1}$) 水提液，考察不同质量浓度水提液对微乳粒径的影响，从而确定最佳水提液浓度。

由表 3 可知，不同质量浓度水提液对微乳粒径的影响较大。由于 2.0 $g \cdot mL^{-1}$ 水提液较为黏稠，使微乳的粒径增大较多，而且其稳定性较差，室温下放置 24 h 后可见絮状沉淀，而 0.5、1.0、1.5

$g \cdot mL^{-1}$ 水提液制备的微乳从外观观察，均是澄清透明、均一连体的液体 (见图 4)，微乳粒径分别为 24.83、24.70 和 35.40 nm，均符合微乳的粒径要求，因此在保证载药量的前提下，选择 1.5 $g \cdot mL^{-1}$ 水提液作为最佳水提液浓度。

2.2 升清解毒微乳的质量评价

2.2.1 升清解毒微乳的类型鉴别 平行取 2 份相同体积的升清解毒微乳，分别加入等量的苏丹红

表 3 不同浓度水提液对微乳粒径的影响

Tab 3 Effect of different concentration of water extract on particle size

水提液质量浓度 / (g · mL ⁻¹)	微乳粒径 /nm
0.5	24.83 ± 0.21
1.0	24.70 ± 0.17
1.5	35.40 ± 0.26
2.0	253.50 ± 1.71

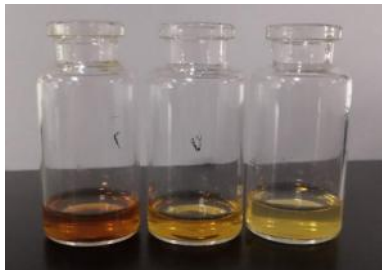


图 4 不同浓度水提液制备的升清解毒微乳的外观图 (从左至右, 依次为 1.5、1.0、0.5 g · mL⁻¹ 水提液)

Fig 4 Appearance of Shengqing Jiedu microemulsion prepared with different concentrations of liquid (from left to right, 1.5, 1.0, 0.5 g · mL⁻¹ liquid)

I 和亚甲蓝染料, 通过红色油性染料苏丹红 I 和蓝色水溶性染料亚甲蓝在微乳中的扩散速度来判断其类型, 如果亚甲蓝的扩散速度大于苏丹红 I, 则为 O/W 型微乳, 反之则为 W/O 型微乳^[12], 观察到亚甲基蓝在升清解毒微乳中的扩散速度明显大于苏丹红 I 染料, 可以判定升清解毒微乳为 O/W 型微乳。

2.2.2 升清解毒微乳的稳定性评价 取适量升清解毒微乳于西林瓶中, 室温下避光静置 24 h, 观察到升清解毒微乳未出现分层现象。取适量升清解毒微乳于离心管中, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 经高速离心后, 升清解毒微乳依然澄清透明, 未出现分层和沉淀现象, 可初步判断升清解毒微乳稳定性较好。

2.2.3 升清解毒微乳的粒径分布和电位 取适量升清解毒微乳, 通过纳米粒径与电位分析仪测定微乳粒径、多分散系数 (PDI) 和 Zeta 电位, 每个样品重复测定 3 次。结果如图 5 所示, 升清解毒微乳的粒径为 (35.40 ± 0.26) nm, PDI 值为 (0.125 ± 0.032), Zeta 电位为 (-12.57 ± 1.40) mV。

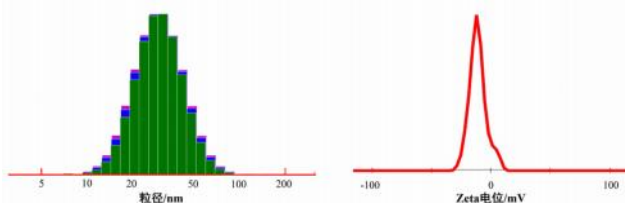


图 5 升清解毒微乳的粒径分布及 Zeta 电位

Fig 5 Particle size distribution and Zeta potential of Shengqing Jiedu microemulsion

2.3 D- 最优混料设计优化升清解毒微乳的制备工艺

采用 Design Expert 13 软件, 以微乳的 3 个体系组成部分水相 (A)、油相 (B)、混合表面活性剂 (C) 作为自变量, 设定三相质量分数总和为 1, 以微乳粒径为响应值 (Y), 得到优化实验方案, 再根据自变量与响应值之间的数学关系, 对升清解毒微乳的制备工艺进行优化。根据前期实验的结果, 确定水相 (A)、油相 (B)、混合表面活性剂 (C) 的用量范围分别为 75% ~ 89%、1% ~ 7.5%、10% ~ 17.5%, D- 最优混料实验设计和结果见表 4, 对实验结果进行拟合分析, 微乳粒径各拟合方程对比见表 5, 拟合方程为 $Y = 14.94A + 982.07B + 128.97C - 923.44AB - 127.44AC - 1645.20BC$, $P < 0.0001$, 失拟度 $P = 0.2007$, 相关系数 $R^2 = 0.9739$, 拟合方程的相关系数较好, 该模型与真实数据之间具有较高的拟合度, 模型预测的可信度良好, 可用于最优处方的分析及预测。根据回归模型绘制 3D 响应面图和等高线图 (见图 6), 可观察到随着油相用量的增加以及混合表面活性剂用量的减少, 微乳粒径随之增大。

表 4 D- 最优混料实验设计及结果 (n = 3)

Tab 4 Design and results of D-optimal mixing test (n = 3)

No.	A/%	B/%	C/%	粒径 /nm
1	81.36	4.73	13.91	35.67
2	80.34	2.16	17.50	33.90
3	87.24	2.76	10.00	28.91
4	81.80	7.50	10.70	226.80
5	84.21	4.46	11.33	85.66
6	83.24	1.00	15.76	20.82
7	75.35	7.50	17.15	131.22
8	85.76	1.00	13.24	27.61
9	81.36	4.73	13.91	69.00
10	87.24	2.76	10.00	25.47
11	79.74	7.36	12.89	151.20
12	77.80	4.70	17.50	26.66
13	85.76	1.00	13.24	21.63
14	77.49	7.51	15.00	144.30
15	81.36	4.73	13.91	59.60
16	81.80	7.50	10.70	223.40

表 5 微乳粒径各拟合方程的对比

Tab 5 Fitting equations of particle size microemulsion

方程	P	失拟度	调整后离差平方和	预计离差平方和	结论
线性	< 0.0001	0.0036	0.7513	0.6609	
二次方程	< 0.0001	0.2007	0.9609	0.9329	建议
特殊立方	0.0807	0.3137	0.9696	0.9455	

根据上述结果, 得到升清解毒微乳的最优处方: 水相质量分数为 87.24%、油相质量分数为 2.76%、混合表面活性剂质量分数为 10.0%, 预测

粒径大小为 35.04 nm。平行制备 3 份微乳样品并计算偏差，偏差 (%) = (预测值 - 实际值) / 预测值 × 100%，结果见表 6，粒径预测值与实测值的偏差较小，表明所建立的数学模型可以准确预测升清解毒微乳的最优处方。

表 6 优化处方的粒径预测值及测量值

Tab 6 Predicted and measured values of particle size

No.	预测值 /nm	测量值 /nm	偏差 /%
1	35.04	35.70	1.88
2	35.04	35.30	0.74
3	35.04	35.20	0.46

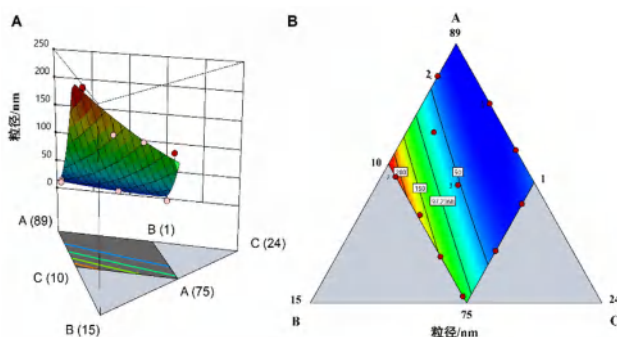


图 6 微乳粒径的 3D 响应面图 (A) 和等高线图 (B)

Fig 6 3D response surface diagram (A) and contour diagram (B) of particle size

2.4 升清解毒微乳凝胶的制备

2.4.1 凝胶基质的筛选 选取市面上常用的凝胶基质 HPMC、CMC-Na、卡波姆 940 作为筛选对象，各取 0.2 g 于烧杯中，加入 20 mL 蒸馏水使其溶胀，静置 24 h，再分别加入 1 g 升清解毒微乳，搅拌均匀，滴加三乙醇胺调节 pH 至 6.5 左右，得到不同凝胶基质的升清解毒微乳凝胶，以表 7 的评价标准进行综合评价^[13]。结果如表 8 所示，HPMC 和 CMC-Na 制备出的凝胶流动性较强、不挂壁、黏附性不佳，而卡波姆 940 制备的凝胶基质较为黏稠，质地均匀细腻，考虑到凝胶的黏度对制剂的涂展性和释放度均有影响，故选择卡波姆 940 作为凝胶基质。

2.4.2 凝胶基质用量的筛选 制备含有不同用量 (0.5%、1%、1.5%、2%) 卡波姆 940 的凝胶基质，根据“2.4.1”项下方法制备升清解毒微乳凝胶，并参照表 7 进行评分。结果如表 9 所示，当卡波姆 940 的用量为 2% 时，微乳凝胶的综合评分较高，故选择 2% 卡波姆 940 作为凝胶基质。

2.4.3 升清解毒微乳凝胶的制备工艺 称取 0.4 g 卡波姆 940，向其中加入蒸馏水至总体积为 10.0 g，室温静置过夜，待其充分溶胀后，向其中加入升清解毒微乳，搅拌均匀，加入适量三乙醇胺，调节 pH 至 6.5 左右，搅拌均匀，即得升清解

表 7 凝胶基质的评分标准

Tab 7 Scoring criteria for gel substrates

指标	优	良	中	差
	(1.5 ~ 2.0 分)	(1.0 ~ 1.5 分)	(0.5 ~ 1.0 分)	(0 ~ 0.5 分)
光泽度	表面亮泽	表面光滑	表面平整	表面有颗粒状
黏稠度	适度黏稠	比较黏稠	流浸膏状	清稀状
均匀度	细腻，无气泡	较为细腻，气泡少	较粗糙，气泡较多	粗糙，气泡过多
涂展性	易涂抹	可涂抹	较难涂抹	难涂抹
稳定性	均匀，外观无变化	无分层	轻微分层	分层明显

表 8 不同凝胶基质种类的评分结果 (分)

Tab 8 Score of different gel matrix types (score)

凝胶基质	光泽度	黏稠度	均匀度	涂展性	稳定性	综合评分
HPMC	1	0.5	2	1	1.5	6
CMC-Na	1	1	2	1.5	1.5	7
卡波姆 940	2	1	2	2	2	9

表 9 不同卡波姆 940 用量的评分结果 (分)

Tab 9 Score of different dosage of Carbomer 940 (score)

用量 /%	光泽度	黏稠度	均匀度	涂展性	稳定性	综合评分
0.5	2	0.5	2	1	1.5	7
1	2	1	2	2	2	9
1.5	2	1.5	2	2	2	9.5
2	2	2	2	2	2	10

毒微乳凝胶。本实验最终确定工艺如下：水相 3.49 g，油相 0.11 g，EL-35 0.27 g，1, 2-丙二醇 0.13 g，卡波姆 940 0.4 g、三乙醇胺 0.5 g。

2.5 升清解毒微乳凝胶的质量评价

取 3 g 升清解毒微乳凝胶置于小烧杯中，观察其外观性状、黏稠度、均匀度和涂展性。分别取 3 g 不同批次 (批号分别为 20220510001、20220515001、20220517002) 升清解毒微乳凝胶置于小烧杯中，加 20 mL 蒸馏水稀释，在室温下测定升清解毒微乳凝胶的 pH 值，每个样品重复 3 次。分别取 3 g 不同批次的升清解毒微乳凝胶置于小烧杯中，参考 2020 年版《中国药典》第四部黏度测定法第一法，以 $8 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速进行测定，每个样品重复 3 次，测定升清解毒微乳凝胶的黏度。如图 7 所示，肉眼可见升清解毒微乳凝胶为金黄色、半透明、均一稳定的黏稠状半固体，有轻微花椒油气味，均匀细腻，易于涂展。不同批次升清解毒微乳凝胶的平均 pH 值为 (6.54 ± 0.08) ，黏度为 $(15.33 \pm 0.15) \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。

2.6 升清解毒微乳凝胶的稳定性考察

2.6.1 高速离心实验 取 3 批升清解毒微乳凝胶适量，分别置于 10 mL 离心管中， $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min，观察微乳凝胶的外观稳定性。经高速离心实验后，升清解毒微乳凝胶的外观仍呈金黄色半透明半固体，均匀细腻，涂展性良好，无



图 7 升清解毒微乳凝胶的外观图

Fig 7 Appearance of Shengqing Jiedu microemulsion gel

分层、泛粗、浮油、变稀以及油水分离现象。

2.6.2 耐寒实验 取 3 批升清解毒微乳凝胶适量，置于 -4℃ 冰箱中 24 h，取出后恢复至室温，观察其是否出现分层、浮油、油水分离等现象，并测定其 pH 值及黏度。如表 10 所示，经耐寒实验后，升清解毒微乳凝胶的外观、pH 值和黏度与实验前无明显变化。

2.6.3 耐热实验 取 3 批升清解毒微乳凝胶适量，于 40℃ 烘箱中放置 24 h，取出后恢复至室温，观察其是否出现分层、浮油、油水分离等现象，并测定其 pH 值及黏度。如表 10 所示，经耐热实验后，升清解毒微乳凝胶的外观与实验前无明显差异，pH 值略有下降，黏度有所升高，但仍符合皮肤外用制剂的要求。

表 10 耐寒实验和耐热实验后微乳凝胶的外观性状及 pH 变化

Tab 10 Appearance and pH changes of microemulsion gel after cold and heat resistance tests

温度	批次	外观性状	pH	黏度 / (Pa·s)
-4℃	20220510001	澄清透明、均匀、无分层现象	6.49	15.3
	20220515001	澄清透明、均匀、无分层现象	6.52	15.3
	20220517002	澄清透明、均匀、无分层现象	6.60	15.7
40℃	20220510001	澄清透明、均匀、无分层现象	6.42	15.8
	20220515001	澄清透明、均匀、无分层现象	6.47	15.6
	20220517002	澄清透明、均匀、无分层现象	6.55	16.1

2.7 升清解毒微乳凝胶的体外透皮释放实验

2.7.1 制备离体鼠皮 取 10 只雌性 SD 大鼠，脱臼处死后固定于鼠板上，用脱毛膏去除大鼠胸骨至腹部的毛发，剪下大鼠腹部皮肤，去除皮下脂肪和结缔组织，用生理盐水将皮肤漂洗干净，展平并吸去多余水分后用锡箔纸包裹，置于 -20℃ 冰箱中冷藏备用，使用前检查离体鼠皮角质层的完整性。

2.7.2 体外透皮实验 将“2.7.1”项下制得的离体鼠皮于室温解冻，固定于立式 Franz 扩散池的供给池与接收池之间，角质层面向供给池，接收池中注入已超声脱气的甲醇-生理盐水 (4:6)，排尽接收池中的气泡，使接收池液面与离体鼠皮完全接触，供给池中分别放入等生药量的升清解毒洗剂和升清

解毒微乳凝胶。Franz 扩散池保持 (32±10)℃ 恒温水浴，磁力搅拌速度为 400 r·min⁻¹。

分别于实验开始后的 2、4、6、8、12、24 h 时间点，从接收池吸取 1 mL 接收液，同时向接收室中补加等温度等体积的接收液。将吸取的接收液用经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后，按课题组前期建立的色谱条件进样分析 [色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-C18 分析柱; 流动相: 乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B)，梯度洗脱 (0~55 min, 5%~90% A); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 215 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 5 μL]，以阿魏酸、异阿魏酸为指标成分，按下式计算累计渗透量 $Q_n = (C_n V + \sum C_i V_i) / A$ 和渗透速率常数 $J = d_Q / d_t$ ，式中， Q_n : 第 n 个时间点的累计面积透过量 (μg·cm⁻²); V : 接收池中接收液的总体积 (8 mL); V_i : 每次的取样体积 (0.5 mL); C_n : 第 n 个取样点测得的药物质量浓度 (μg·mL⁻¹); A : 有效扩散面积 (3.14 cm²)。以 Q_n 和 J 为指标，比较升清解毒洗剂和升清解毒微乳凝胶的透皮性能，结果如表 11 和图 8 所示。其中升清解毒微乳凝胶的渗透速率常数均大于升清解毒洗剂，表明升清解毒微乳凝胶的体外透皮特性优于升清解毒洗剂，适合开发成经皮给药制剂。

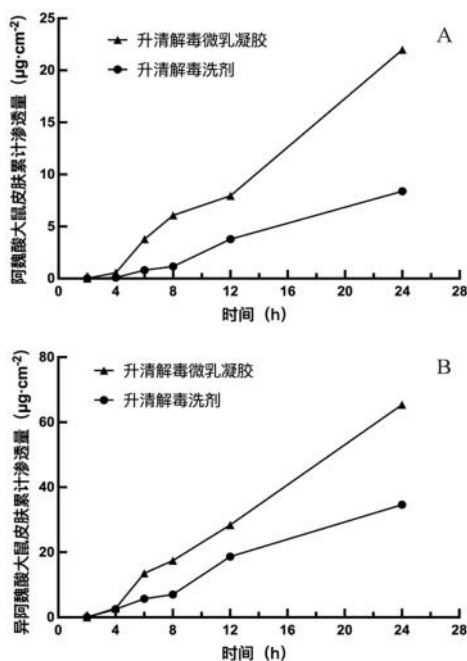


图 8 不同制剂中阿魏酸 (A)、异阿魏酸 (B) 的经皮渗透曲线

Fig 8 Percutaneous penetration curves of ferulic acid (A) and isoferulic acid (B) in different preparations

3 讨论

本实验以外用治疗分子靶向药物相关皮炎的升清解毒洗剂为模型药，由于处方中花椒和当归均含有挥发油成分，花椒挥发油和当归挥发油具有一定的抗炎和镇痛作用^[14-15]，但挥发油与水煎液不能混

表 11 不同制剂中阿魏酸、异阿魏酸的经皮渗透实验结果

Tab 11 Percutaneous penetration of ferulic acid and isoferulic acid in different preparations

制剂	化合物	经皮渗透回归方程	R ²	Q _{24h} / (μg · cm ⁻²)	J
升清解毒洗剂	阿魏酸	Q = 0.4046t - 1.4094	0.9813	8.3817	0.4046
	异阿魏酸	Q = 1.6251t - 3.7637	0.9834	34.602	1.6251
升清解毒微乳凝胶	阿魏酸	Q = 1.0083t - 2.6908	0.9875	21.979	1.0083
	异阿魏酸	Q = 2.9989t - 6.7528	0.9955	65.373	2.9989

溶, 故以处方水提取液为微乳水相, 以挥发油成分为微乳油相, 将挥发油以微乳形式包载于水提液中, 成功制备升清解毒微乳凝胶, 充分体现“药辅合一”理念, 实现中药与经皮给药递送系统的结合, 以期达到改善患者依从性的临床效果。

表面活性剂在微乳的形成、制备及稳定性方面发挥着重要作用, 它能有效降低液面的表面张力和表面自由能, 形成牢固的乳化膜^[16]。本实验共筛选了 5 种表面活性剂和 5 种助表面活性剂, 通过绘制伪三元相图, 以微乳区域面积为指标进行筛选, 最终选择微乳区域面积较大、皮肤刺激性较小、安全性更高的 EL-35 和 1, 2-丙二醇作为表面活性剂和助表面活性剂。

微乳粒径对经皮给药递送效率的影响较大, 通常情况下, 粒径越小, 透皮吸收效果越好^[17]。升清解毒微乳的粒径为 (35.40 ± 0.26) nm, 小于 100 nm, 符合微乳的粒径范围, 有利于有效成分进入皮肤深层发挥药理作用。

适宜的 pH 值范围有利于减小微乳凝胶的皮肤刺激性, 由于我们选用的凝胶基质卡波姆 940 的分子结构中含有一定比例的酸性基团, 需采用碱性的三乙醇胺中和后才能使黏度增加, 当 pH 值在 6.5 左右时, 微乳凝胶的黏度、涂展性和油腻感均较为适宜。稳定性实验结果表明, 升清解毒微乳凝胶在经过高速离心实验、耐寒实验和耐热实验后, 其 pH 值没有显著变化, 虽然经耐热实验后, 微乳凝胶的黏度有所升高, 但综合考虑其外观性状、稳定性和涂展性, 仍符合皮肤外用制剂的要求。

本实验制备的升清解毒微乳凝胶虽然具有较好的稳定性, 但其具体药效和质量控制评价方面仍需进一步考察和深入探索, 以期升清解毒微乳凝胶提供更为全面的研究资料, 同时为医院制剂的研发提供更具价值的参考。

参考文献

[1] 王致红, 张铭予, 李春雨, 等. 抗肿瘤分子靶向药物相关皮炎研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56 (19): 1551-1556.
 [2] 李栋梁, 魏鑫瑶, 武书澎, 等. 升麻鳖甲汤临床应用探讨 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18 (23): 79-81.
 [3] Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, et al. Micro-

emulsion utility in pharmaceuticals: implications for multi-drug delivery [J]. Int J Pharm, 2017, 526 (1-2): 425-442.
 [4] Vadlamudi HC, Narendran H, Nagaswaram T, et al. Microemulsions based transdermal drug delivery systems [J]. Curr Drug Discov Technol, 2014, 11 (3): 169-180.
 [5] Ashara KC, Paun JS, Soniwala MM, et al. Microemulgel: an overwhelming approach to improve therapeutic action of drug moiety [J]. Saudi Pharm J, 2016, 24 (4): 452-457.
 [6] 邹佳渝, 任舒静, 段艳冰, 等. 具有“药辅合一”特性的中药凝胶的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34 (6): 639-644.
 [7] 马书伟, 王永洁, 陈桢, 等. D-最优混料设计优化复方甘草微乳制备工艺的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (6): 1131-1138.
 [8] 张宇航, 高寒, 徐伟, 等. D-最优混料设计法优化刺五加总苷微乳制备工艺及肠吸收特性研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (12): 3233-3241.
 [9] 卢秀霞, 潘婷婷, 洪于琦, 等. 茶树油微乳凝胶的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2015, 46 (13): 1892-1900.
 [10] 王琼, 兰颐, 陈岩岩, 等. 止痛微乳制剂制备与处方优化 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (2): 222-229.
 [11] Du H, Feng QL, Yang XZ, et al. “Whole Chinese angelica” microemulsion: its preparation and in vivo and in vitro evaluations [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2014, 40 (10): 1330-1339.
 [12] 徐铃燕, 谢远平, 康倩, 等. 单纯形网格法优化外用中药不同油水分配系数多成分微乳制剂处方 [J]. 中草药, 2017, 48 (19): 3961-3969.
 [13] 王景雁, 马书伟, 赵馨雨, 等. 复方甘草微乳凝胶剂的制备与药效学评价 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (21): 5193-5199.
 [14] Nooreen Z, Kumar A, Bawankule DU, et al. New chemical constituents from the fruits of *Zanthoxylum armatum* and its in vitro anti-inflammatory profile [J]. Nat Prod Res, 2019, 33 (5): 665-672.
 [15] Jin ML, Zhao K, Huang QS, et al. Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: a review [J]. Carbohydr Polym, 2012, 89 (3): 713-722.
 [16] Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2006, 123-126: 369-385.
 [17] Verma DD, Verma S, Blume G, et al. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin [J]. Int J Pharm, 2003, 258 (1-2): 141-151.

(收稿日期: 2023-04-03; 修回日期: 2023-06-09)

LC-MS/MS 法测定人血浆中阿托伐他汀及其代谢物的浓度及在中国健康志愿者中生物等效性研究的应用

肖红梅¹, 刘金凤², 郑天东³, 唐智³, 陈露露^{3, 4}, 欧阳冬生^{2, 3*} (1. 邵阳学院附属第一医院, 湖南 邵阳 422000; 2. 中南大学湘雅医院临床药理研究所, 长沙 410000; 3. 复杂基质样本生物分析湖南省重点实验室长沙都正生物科技有限公司, 长沙 410000; 4. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423000)

摘要: **目的** 建立可测定人血浆中阿托伐他汀 (ATO) 及其代谢物浓度的 LC-MS/MS 分析方法, 并将其应用于人体生物等效性研究。**方法** 血浆中目标成分采用叔丁基甲基醚: 乙酸乙酯 (1:1) 萃取, 以 ATO-d5、邻位阿托伐他汀 (*o*-ATO)-d5、对位阿托伐他汀 (*p*-ATO)-d5 为内标, 流动相 A 为 2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵水溶液 - 乙腈 - 甲酸 (900:100:1), B 为乙腈, 梯度洗脱。采用电喷雾离子源, 正离子模式, MRM 监测, ATO 和内标的离子选择通道分别为 *m/z* 559.3 → 440.1 和 564.2 → 445.2。对健康受试者口服相同剂量的氨氯地平阿托伐他汀钙片 (5 mg/10 mg) 受试制剂或参比制剂后的血药浓度进行定量分析。**结果** ATO 和 *o*-ATO 的线性范围为 0.150 ~ 20.000 ng · mL⁻¹, *p*-ATO 的线性范围为 0.015 ~ 2.000 ng · mL⁻¹; ATO 和 *o*-ATO 的定量下限均为 0.150 ng · mL⁻¹, *p*-ATO 为 0.015 ng · mL⁻¹。此外, 批内和批间精密度的 *RSD* 均小于 15%。32 名健康受试者口服 5 mg/10 mg 氨氯地平阿托伐他汀钙片参与了该研究。受试者空腹和餐后状态下服用氨氯地平阿托伐他汀钙片受试制剂和参比制剂的血浆药物最大浓度 (*C*_{max})、时间 - 浓度曲线下面积 (*AUC*_{0~t} 和 *AUC*_{0~∞}) 的几何均值比值的 90% 置信区间均在 80% ~ 125% 内, 两制剂具有生物等效性。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 进样过程简单, 可用于人血浆中 ATO 及其代谢物的浓度测定。

关键词: 液相色谱 - 质谱联用; 阿托伐他汀; 邻位阿托伐他汀; 对位阿托伐他汀

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2842-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.004

LC-MS/MS determination of atorvastatin and its metabolites in human plasma and bioequivalence in healthy Chinese volunteers

XIAO Hong-mei¹, LIU Jin-feng², ZHENG Tian-dong³, TANG Zhi³, CHEN Lu-lu^{3, 4}, OU YANG Dong-sheng^{2, 3*} (1. The First Affiliated Hospital of Shaoyang University, Shaoyang Hunan 422000; 2. Department of Clinical Pharmacology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410000; 3. Hunan Key Laboratory for Bioanalysis of Complex Matrix Samples, Changsha 410000; 4. School of Pharmacy, Xiangnan Institute, Chenzhou Hunan 423000)

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method to determinate atorvastatin (ATO) and its metabolites in human plasma, and to determine its bioequivalence. **Methods** Atorvastatin-d5 (ATO-d5), ortho-hydroxy atorvastatin-d5 (*o*-ATO), and para-hydroxy atorvastatin-d5 (*p*-ATO) were used as the internal standard. Human plasma samples were extracted by tert-butyl methyl ether: ethyl acetate (1:1), with the mobile phase A (2 mmol · L⁻¹ aqueous ammonium acetate-acetonitrile-formic acid) and B (acetonitrile) with a gradient elution. An electrospray ionization source was also used, and multiple reaction monitoring were operated in the positive mode with a selective channel at *m/z* 559.3 → 440.1 and 564.2 → 445.2 for atorvastatin and its internal standard. Additionally, after the oral administration of the same dose of amlodipine atorvastatin calcium tablets (5 mg/10 mg), the blood concentration of

基金项目: 湖南省复杂基质样本生物分析国际科技创新合作基地 (No.2019CB1014); 国家自然科学基金项目 (No.81803837)。

作者简介: 肖红梅, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药理学研究, email: 147708775@qq.com ***通信作者:** 欧阳冬生, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事遗传药理学与药物基因组学、临床药理学研究, email: ouyangyj@163.com

the drug was quantitatively analyzed in healthy volunteers. **Results** The linear range of ATO and *o*-ATO was 0.150 ~ 20.000 ng · mL⁻¹, and that of *p*-ATO was 0.015 ~ 2.000 ng · mL⁻¹. The lower limit of quantification of ATO and *o*-ATO was 0.150 ng · mL⁻¹, and that of *p*-ATO was 0.015 ng · mL⁻¹. The linear range of ATO and *o*-ATO was 0.150 ~ 20.000 ng · mL⁻¹, and that of *p*-ATO was 0.015 ~ 2.000 ng · mL⁻¹. The lower limit of quantification of ATO and *o*-ATO were 0.150 ng · mL⁻¹, and that of *p*-ATO was 0.015 ng · mL⁻¹. Moreover, the relative standard deviation in and between batches was less than 15%. Totally 32 health subjects enrolled the pharmacokinetics study of oral 5 mg/10 mg amlodipine atorvastatin calcium tablets. The 90% confidence intervals of C_{max} , $AUC_{0\sim t}$ and $AUC_{0\sim \infty}$ of amlodipine atorvastatin calcium test and reference preparation under fasting and postprandial conditions were within 80% ~ 125%. The two preparations were bioequivalent. **Conclusion** This method is accurate, reliable, simple and reproducible, which can be used to determine the concentration of atorvastatin and its metabolites in human plasma.

Key words: LC-MS/MS; atorvastatin; *o*-hydroxy atorvastatin; *p*-hydroxy atorvastatin

阿托伐他汀 (atorvastatin, ATO) 是第三代他汀类药物^[1], 能可逆地抑制体内胆固醇合成的限速酶, 降低总胆固醇和血浆三酰甘油的水平, 具有较强的降脂作用^[2]。ATO 还可用于心脑血管疾病的早期预防手段和二期治疗药物, 有效降低了冠心病等各类心血管疾病的发病率和死亡率^[3]。ATO 以钙盐的形式口服给药, 主要由肝脏的 CYP3A4 酶代谢成邻位羟基代谢物 (ortho-hydroxy atorvastatin, *o*-ATO) 和对位羟基代谢物 (para-hydroxy atorvastatin, *p*-ATO)^[4]。ATO、*o*-ATO、*p*-ATO 可转化为相应的非活性内酯衍生物, 导致经由首过效应到达体循环的药物浓度低^[5], 无法准确监测其血药浓度, 从而不便观察 ATO 对疾病的治疗效果, 难以帮助患者及时调整用药剂量, 降低药物毒副作用。以往文献报道的 ATO 药物浓度检测方法大多仅测定其原形药的血药浓度^[6], 随着气相色谱-质谱联用 (GC-MS)、液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS)^[7] 技术的普及, 研究人员建立了可同时检测 ATO 及其代谢物血药浓度的方法, 但也暴露出一些问题, 如预处理烦琐、样品间偏差大、灵敏度低或分析时间长等^[8-9], 这些都可能影响分析方法的可靠性及定量的准确性。

因此, 本研究建立了一种检测人血浆中 ATO 及其代谢物的方法, 该方法简便易行, 减少了项目的分析时间和实施成本, 经过了全面验证且已应用于国产氨氯地平阿托伐他汀钙片 (amlodipine atorvastatin calcium tablets, AM-ATO, 5 mg/10 mg) 的生物等效性研究, 报道如下。

1 材料

1.1 仪器

ExionLC AD 液相色谱仪、Sciex Triple Quad

6500+ 质谱仪、数据处理软件 (Analyst 1.7.1) (Sciex); 医用低温保存箱、医用血液冷藏箱 (青岛海尔)。

1.2 试药

阿托伐他汀钙 (ATO, 批号: 100590-202005, 纯度: 94.9%, 中国食品药品检定研究院), 邻位羟基阿托伐他汀钙盐 (*o*-ATO, 批号: 3671-035A4, 纯度: 96.8%), 对位羟基阿托伐他汀钙盐 (*p*-ATO, 批号: 2891-061A1, 含量: 91.0%)(TLC Pharmaceutical Standards); ATO-d5 钙盐 (批号: 3-TIM-143-1, 纯度: 96.0%), *o*-ATO-d5 钙盐 (批号: 14-MMH-33-2, 纯度: 95.26%), *p*-ATO-d5 钙盐 (批号: 1897-074A1, 纯度: 98.0%)(Toronto Research Chemicals); 受试制剂: AM-ATO 片 (江苏诺泰澳赛诺生物制药股份有限公司, 规格: 每片 5 mg/10 mg, 批号: S20010211); 参比制剂: AM-ATO 片 (Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH, 规格: 每片 5 mg/10 mg, 批号: CK6505)。

甲醇、乙腈 (色谱纯, 德国 Merck); 乙酸铵 (LC/MS 级, 美国 ACS); 甲酸、乙酸 (色谱纯, 美国 ACS); 甲基叔丁基醚、无水乙酸钠 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品及质控工作液的配制

① 对照品溶液: 精密称取 ATO、*o*-ATO、*p*-ATO 对照品适量, 分别用含 0.1% 甲酸甲醇溶液溶解并定容, 得质量浓度均为 0.100 mg · mL⁻¹ 的 ATO、*o*-ATO、*p*-ATO 对照品储备液。以 50% 甲醇进行稀释, 得 ATO、*o*-ATO 质量浓度分别为 3.00、6.00、10.0、20.0、80.0、160、320 和 400 ng · mL⁻¹, *p*-ATO 质量浓度为 0.30、0.60、1.00、2.00、8.00、16.0、

32.0、40.0 的系列浓度标准曲线工作液。

② 质控工作液：同法配制 ATO、*o*-ATO 质量浓度分别 3.00、9.00、12.0、24.0、130、300 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，*p*-ATO 质量浓度为 0.30、0.90、1.20、2.40、13.0、30.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控工作液。

2.1.2 内标溶液的配制 精确称取一定量的内标物，用甲醇溶液进行溶解后移至 25 mL 量瓶，得 ATO-d5 钙盐、*o*-ATO-d5 钙盐、*p*-ATO-d5 钙盐对照品储备液，将储备液分装在合适规格的聚丙烯管中，放入冰箱冷藏备用。

取适量对照品储备液用 50% 甲醇进行稀释，得 ATO-d5 0.018 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、*o*-ATO-d5 0.036 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、*p*-ATO-d5 0.037 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标工作液。

2.1.3 标准曲线样品及质控样品配制 准确吸取人空白血浆 190 μL ，加质控工作液 10 μL ，涡旋混匀，得质量浓度为 0.015 ~ 20.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准曲线样品及 0.450 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (低浓度质控样品，LQC)、1.20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (中浓度质控样品，MQC)、6.50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (高中浓度质控样品，HMQC)、15.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (高浓度质控样品，HQC) 的质控样品。

2.2 血浆样品处理方法

血浆样本均来自于湖湘中医肿瘤医院的健康志愿者，共 20 份，全部储存于 -20°C 冰箱。取人空白血浆 100 μL ，加 20 μL 50% 甲醇、100 μL 醋酸-醋酸钠缓冲液、1000 μL 甲基叔丁基醚，振荡 10 min，离心 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 4°C ，15 min)，取上层有机相 700 μL ，氮气吹干 ($10 \sim 30^\circ\text{C}$)，加 200 μL 醋酸-醋酸钠缓冲液：乙腈 (4 : 1) 复溶，振荡 5 min 使其溶解，即得。

2.3 色谱条件

色谱柱：Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm \times 100 mm，1.7 μm)；流动相 A：2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液-乙腈-甲酸 (90 : 100 : 1)，流动相 B：乙腈，梯度洗脱 (0 ~ 4.1 min，65% \rightarrow 10%A，35% \rightarrow 90%B；4.11 ~ 5.0 min，10% \rightarrow 65%A，90% \rightarrow 35%B)；流速：0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；运行时间：5 min；进样量：20 μL ；柱温： 40°C 。

采用电喷雾离子源 (ESI)，正离子模式，MRM 监测，源喷射电压：5500 V；源温度： 550°C ；ATO、*o*-ATO、*p*-ATO、ATO-d5、*o*-ATO-d5、*p*-ATO-d5 在 ESI^+ 源电离方式下主要生成 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰，分别为 m/z 559.3、564.2、575.4、580.3、575.3 和 580.3，以此离子作为母离子，进行碰撞碎裂，碎裂后子离子分别为 m/z 440.1、445.2、440.3、445.2、440.2 和 445.3 (见表 1)。

表 1 离子对跃迁信息

化合物	离子对	去簇电 压 /eV	入口电 压 /eV	碰撞 能 /eV	驻留时 间 /ms
ATO	559.3 \rightarrow 440.1	60	10	31	100
ATO-d5	564.2 \rightarrow 445.2	50	13	31	100
<i>o</i> -ATO	575.4 \rightarrow 440.3	55	15	32	100
<i>o</i> -ATO-d5	580.3 \rightarrow 445.2	65	15	35	100
<i>p</i> -ATO	575.3 \rightarrow 440.2	55	15	32	100
<i>p</i> -ATO-d5	580.3 \rightarrow 445.3	65	15	35	100

2.4 方法专属性

取空白血浆、空白血浆加 ATO、*o*-ATO、*p*-ATO 和内标的血浆样品，进行 LC-MS/MS 分析，获得色谱图 (见图 1)。所有空白样品均未见干扰峰，各成分有效分离。

2.4.1 残留考察 将定量上限样品、空白样品、定量下限 (LLOQ) 样品按顺序进样，记录待测物与内标的色谱峰面积值，考量残留情况。结果显示待测物进样残留 $< 20\%$ 且内标进样残留 $< 5\%$ ，说明以本方法测试人血浆中 ATO 及其代谢物高浓度样品后，在系统中的残留对后续低浓度样品的测试无影响。

2.4.2 线性范围及 LLOQ 配制标准曲线血浆系列浓度样品，按“2.2”项下方法处理，ATO、*o*-ATO、*p*-ATO 的回归方程分别为 $Y = 0.402X + 0.0034$ ($r = 0.999$)， $Y = 0.865X + 0.0043$ ($r = 0.999$)， $Y = 2.46X + 0.0013$ ($r = 0.999$)，ATO 和 *o*-ATO 的线性范围均为 0.150 ~ 20.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、*p*-ATO 的线性范围为 0.015 ~ 2.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。ATO 及 *o*-ATO 的最低定量限 (LLOQ) 为 0.150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，*p*-ATO 的 LLOQ 为 0.015 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 准确度和精密度 配制 ATO、*o*-ATO 质量浓度为 0.150、0.450、0.60、1.20、6.50、15.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，*p*-ATO 质量浓度为 0.015、0.045、0.06、0.12、0.65、1.50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控标准血浆样品各 6 份，共 3 批，按“2.3”项下方法测试，ATO 的批内、批间变异系数为 1.6% ~ 3.2% 及 1.9% ~ 4.0%，*o*-ATO 的批内、批间变异系数为 1.8% ~ 3.1% 及 2.1% ~ 3.4%，*p*-ATO 的批内、批间变异系数为 1.8% ~ 9.0% 及 2.2% ~ 8.6%。

结果符合接受标准，LLOQ 测得浓度的均值在标示值的 80% ~ 120%，其他质控浓度标准血浆样品测得浓度的均值在标示值的 85% ~ 115%；批内变异系数均小于 15%，批间变异系数均小于 15%，表明质控标准血浆样品的批内和批间的精密度和准确度良好。

2.4.4 提取回收率 取人空白血浆配制浓度为 LQC、HMQC、HQC 的质控标准血浆样品进行处理分析，每个浓度平行 6 份。取空白血浆不加内标进行同样

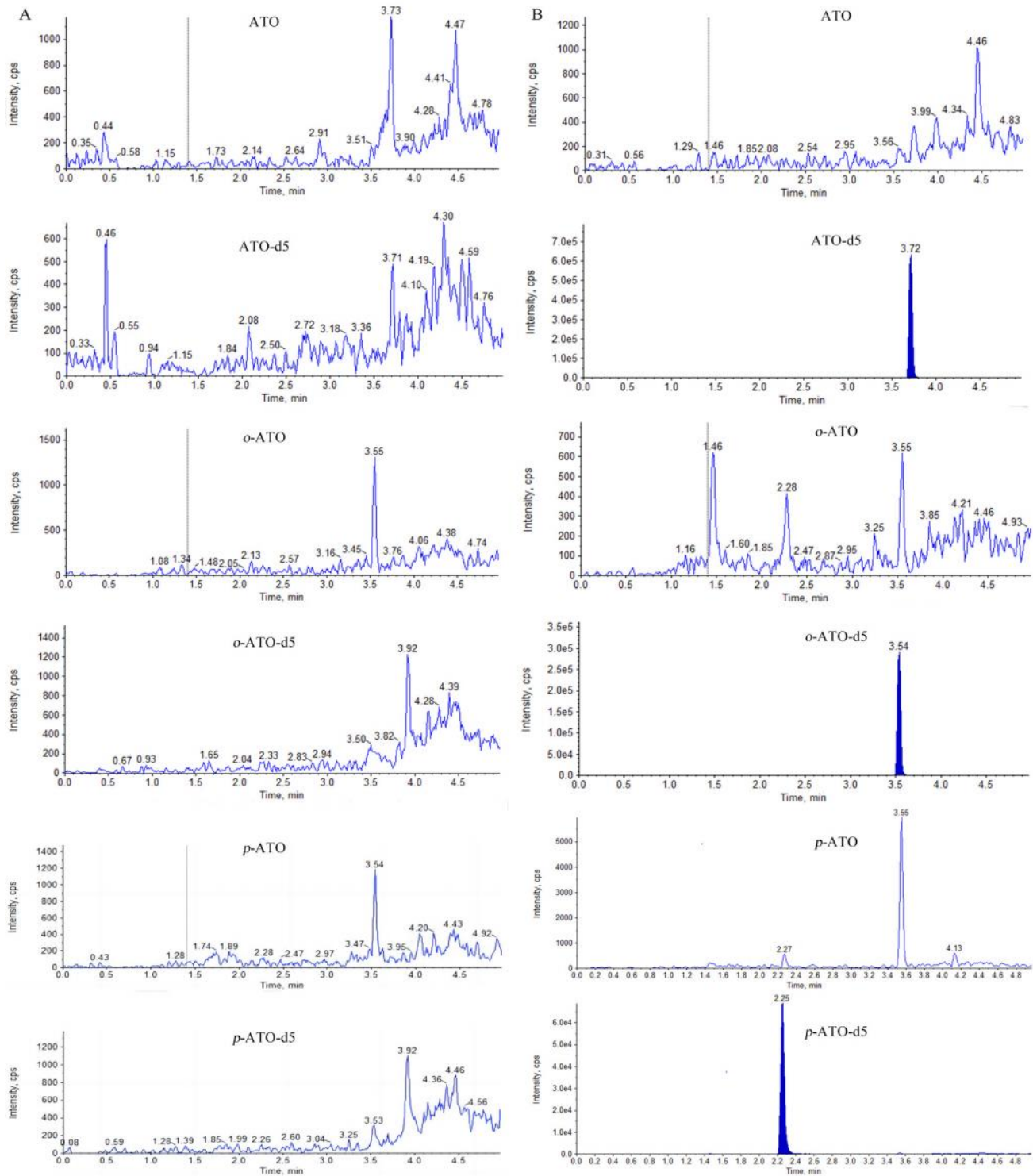


图 1 血浆中阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀、对位阿托伐他汀及其内标的色谱图

Fig 1 Chromatogram of ATO, *o*-ATO, *p*-ATO and its internal standard in human plasma

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆+待测物+内标 (blank human plasma + analyte + internal standard)

处理后, 加入待测物、内标, 使其理论终浓度与正常处理后的样品相同, 每个浓度平行 6 份。回收率 (%) = (提取样品的响应值) / (未提取样品的响应值) × 100%, ATO、*o*-ATO 和 *p*-ATO 的平均提取回收率分别为 61.69% ~ 65.88% (*RSD* 为 3.5% ~ 4.0%), 67.64% ~ 70.32% (*RSD* 为 3.9% ~ 4.2%),

67.54% ~ 70.43% (*RSD* 为 2.5% ~ 3.6%)。

2.4.5 基质效应 取血浆样品 200 μL 至玻璃小管, 处理后进样分析, 每一浓度进行 6 样本分析; 另取相同浓度的标准溶液 20 μL 和内标溶液 50 μL, 涡旋混匀, 加入 200 μL 流动相充分溶解后进样分析。计算每批基质下的峰面积与不含基

质的相应峰面积比值, 计算 ATO、*o*-ATO、*p*-ATO 基质因子。结果符合接受标准, 其中 ATO 的低、高质控样品经内标归一化的基质因子的变异系数分别为 2.7% 和 2.5%, *o*-ATO 的低、高质控样品经内标归一化的基质因子的变异系数分别为 2.3% 和 2.5%, *p*-ATO 的低、高质控样品经内标归一化的基质因子的变异系数分别为 3.2% 和 2.1%。

2.4.6 稳定性 均配制质量浓度为 0.150、16.0 ng · mL⁻¹ 的 ATO, *o*-ATO, *p*-ATO 质控样品, 分别考察待测物在冻融、生物样品前处理过程、重新进样及生物基质中待测物的长期稳定性。ATO、*o*-ATO、*p*-ATO 的变异系数分别为 1.2% ~ 3.5%、1.3% ~ 2.5%、2.3% ~ 4.5%。

2.4.7 稀释方法验证 ATO、*o*-ATO 及 *p*-ATO 的平均准确度偏差分别为 -1.4%、-0.14% 和 -3.1%, 符合接受标准。表明样品中 ATO 及其代谢物经人空白血浆稀释 5 倍后不影响测试准确度。

2.5 ATO 在中国健康人体内的药动学研究及生物等效性分析

2.5.1 试验对象 空腹试验入组 32 例健康受试者 (6 女, 26 男), 27 例为汉族, 5 例为其他民族, 年龄 (26 ± 6) 周岁, 体重为 (61.0 ± 6.8) kg, 身高为 (165.8 ± 7.0) cm, 体质指数为 (22.2 ± 1.7) kg · m⁻²。餐后试验入组 32 例健康受试者 (9 女, 23 男), 30 例为汉族, 2 例为其他民族, 年龄为 (29 ± 7) 周岁, 体重为 (61.7 ± 7.6) kg, 身高为 (167.2 ± 8.8) cm, 体质指数为 (22.0 ± 1.6) kg · m⁻²。受试者试验前两周内未服用过任何药物, 筛选期体格检查、生命体征、实验室检查等结果均正常或异常无临床意义。该试验方案经长沙市第三医院伦理委员会批准 (伦理批件号: CS3-2021EC-004), 受试者均签署知情同意书。

2.5.2 试验方案 本试验采用单中心、随机、开放、单剂量、两制剂、四周期、两序列完全重复交叉设计。空腹试验和餐后试验各 32 例健康受试者, 随机分配到两个给药程序 [受试制剂 (T), 参比制剂 (R), T-R-T-R、R-T-R-T], 每周期给药一次, 共 4 周期, 清洗期 14 d。受试者于每周期用药前 2 d 入住 I 期病房, 进行入住检查: 问诊、生命体征、烟检、尿毒筛试验、酒精呼气试验, 血妊娠 (女性) 在筛选期和每周期入住当日进行检测。每周期给药前禁食至少 10 h, 不禁水。次日晨, 空腹试验受试者在空腹状态下口服 1 片 (5 mg/10 mg) AM-ATO 片受试制剂或参比制剂, 使用 240 mL 水送服。给药前后 1 h 内禁止饮水, 给药 4、10 h 后统一进食标准餐。每周期给药前 (0 h) 及给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9、10、12、24、36、48、72 h 采集受试者静脉血约 4 mL, 采集后 1 h 内进行离心, 2 h 内储存至温度不高于 -60 °C 的超低温冰箱储存待测。餐后试验在试验当日早晨进食高脂餐 (30 min 内吃完), 餐后口服 1 片 (5 mg/10 mg) AM-ATO 片受试制剂或参比制剂, 使用 240 mL 水送服。每周期给药前 (0 h) 及给药后 0.33 (20 min)、0.67 (40 min)、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9、10、12、24、36、48、72 h 采集受试者静脉血约 4 mL, 其余操作同空腹试验。高脂餐能量要求满足我国人体生物等效性研究技术指导原则的相关规定^[10]。

2.5.3 药动学参数及生物等效性评价 空腹试验中 2 名受试者提前退出试验, 餐后试验 32 名受试者顺利完成四周期试验。平均血药浓度时间曲线图见图 2, ATO 及其代谢物的药动学参数见表 2。

表 2 健康志愿者口服 5 mg/10 mg AM-ATO 片后的主要药动学参数

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters after the oral administration of 5 mg/10 mg AM-ATO tablets in healthy volunteers

	样品		t_{max}/h	$C_{max}/(pg \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim t}/(h \cdot pg \cdot mL^{-1})$	$\lambda_z/(1 \cdot h^{-1})$	$t_{1/2}/h$
ATO	空腹	受试制剂	1.00	3323.25 ± 1464.79	22 162.8 ± 8336.5	0.08 ± 0.02	9.44 ± 2.50
		参比制剂	0.76	3388.73 ± 1357.53	22 833.0 ± 7863.1	0.08 ± 0.02	9.53 ± 3.39
	餐后	受试制剂	4.51	2053.48 ± 836.46	19 871.3 ± 7390.1	0.08 ± 0.02	8.70 ± 2.30
		参比制剂	4.51	2167.59 ± 920.21	21 022.7 ± 7131.8	0.08 ± 0.02	8.77 ± 2.12
<i>o</i> -ATO	空腹	受试制剂	2.51	1761.98 ± 690.08	26 644.5 ± 9977.9	0.07 ± 0.01	11.44 ± 2.88
		参比制剂	2.25	1751.13 ± 634.66	26 795.1 ± 10 624.2	0.07 ± 0.01	11.62 ± 2.79
	餐后	受试制剂	6.01	1477.13 ± 481.78	25 180.6 ± 10019.2	0.06 ± 0.01	12.08 ± 2.93
		参比制剂	6.01	1468.21 ± 492.77	25 180.0 ± 10 228.1	0.06 ± 0.01	12.70 ± 3.09
<i>p</i> -ATO	空腹	受试制剂	12.00	83.92 ± 28.49	3117.2 ± 1054.7	0.02 ± 0.01	34.50 ± 15.38
		参比制剂	12.00	84.79 ± 38.57	3124.1 ± 1013.1	0.02 ± 0.01	35.64 ± 21.06
	餐后	受试制剂	12.00	71.12 ± 34.78	2788.8 ± 1142.1	0.02 ± 0.01	51.02 ± 46.28
		参比制剂	12.00	72.32 ± 40.09	2802.6 ± 1201.5	0.02 ± 0.01	45.82 ± 31.27

空腹和餐后试验中, 氨氯地平阿托伐他汀钙片 (AM-ATO) 片的药动学参数统计分析结果显

示其受试制剂与参比制剂的 C_{max} 和 AUC 的最小二乘几何均值比的 90% 置信区间均落在 80% ~

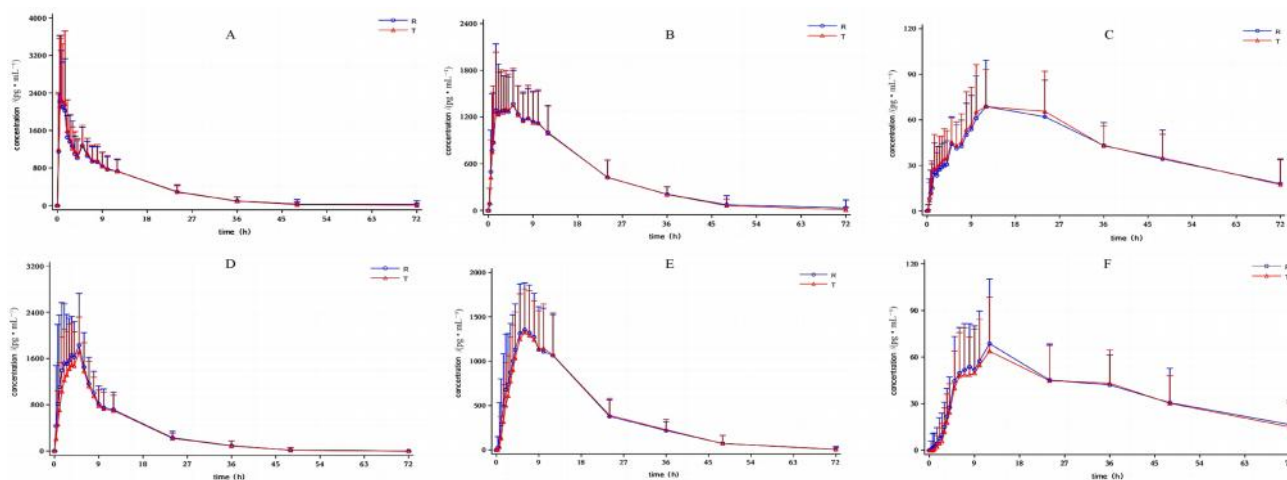


图 2 健康志愿者口服 5 mg/10 mg AM-ATO 片后的平均血药浓度 - 时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve after the oral administration of 5 mg/10 mg AM-ATO tablets in healthy volunteers

注 (Note): A. ATO (空腹, fasting); B. *o*-ATO (空腹, fasting); C. *p*-ATO (空腹, fasting); D. ATO (餐后, fed); E. *o*-ATO (餐后, fed); F. *p*-ATO (餐后, fed)。

125% 判定范围内, 表明两制剂在空腹和餐后给药时的吸收速度和程度上均生物等效。

3 讨论

本研究通过前期探索, 选用与待测物的理化性质相似的同位素标记物作为内标, 最大限度地降低基质效应。同时, 本研究建立了一种快速、灵敏和简单的 LC-MS/MS 方法, 能准确可靠地检测人血浆样品中 ATO 及其代谢物的血药浓度, 满足临床对他汀类药物的监测需求。且通过比较^[11]发现, 我们开发的检测方法中 *p*-ATO 的 LLOQ 更低, 使用的样本血浆更少, 减少了有机溶剂的消耗, 节约了分析时间及费用, 效果更优。

ATO 口服后有较强的首过效应, 其药动学参数在不同个体中变异较大, 有文献报道, ATO 及其代谢物的药动学参数 C_{max} 和 AUC 个体内变异系数为 28.1% ~ 112%, 属高变异药物^[12], 与本研究的结果基本一致。目前, 该方法已有效应用于 AM-ATO 片剂在人体血浆中的药动学和生物等效性研究, 可为临床试验评价提供更加详实可靠的血浆浓度数据。

参考文献

[1] Zhao Y, Peng R, Zhao W, et al. Zhibitai and low-dose atorvastatin reduce blood lipids and inflammation in patients with coronary artery disease [J]. *Medicine*, 2017, 96 (7): 1-6.
 [2] Ayushi D, Adriana A. A case of atorvastatin-associated necrotizing autoimmune myopathy, mimicking idiopathic polymyositis [J]. *Case Rep Rheumatol*, 2018, 2018: 1-3.
 [3] Grigoropoulou P, Tentolouris A, Eleftheriadou I, et al. Effect of 12-month intervention with low-dose atorvastatin on

pulse wave velocity in subjects with type 2 diabetes and dyslipidaemia [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2019 (1): 38-46.

[4] Park JE, Kim KB, Bae SK, et al. Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin [J]. *Xenobiotica*, 2008, 38 (9): 1240-1251.
 [5] Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44 (2): 379-387.
 [6] 孙斌, 魏振满, 郭晓东, 等. LC-MS/MS 定量测定人体血浆中阿托伐他汀浓度 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13 (13): 2565-2569.
 [7] 罗楠, 谭力, 张玫, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中阿托伐他汀及其活性代谢产物 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36 (9): 1029-1036.
 [8] Crevar-Sakač M, Vujić Z, Vujčić Z, et al. LC-MS/MS method for quantification of atorvastatin, *o*-hydroxyatorvastatin, *p*-hydroxyatorvastatin, and atorvastatin lactone in rat plasma [J]. *Acta Chromatogr*, 2016, 28 (3): 1-18.
 [9] Myles TR, Vanessa F, Mark B, et al. Development, validation and application of a novel HPLC-MS/MS method for the quantification of atorvastatin, bisoprolol and clopidogrel in a large cardiovascular patient cohort [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 159: 272-281.
 [10] 施孝金. 《以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则》解读 [J]. *上海医药*, 2016, 37 (7): 16-17.
 [11] 易志恒, 李筱旻, 申秋莹, 等. LC-MS-MS 法测定人血浆中阿托伐他汀, 邻位阿托伐他汀和对位阿托伐他汀的浓度 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (12): 2564-2568.
 [12] 刘文芳, 杜海燕, 仇琪, 等. 阿托伐他汀钙及其主要代谢物在中国健康成年男性中的药代动力学和生物等效性研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35 (10): 925-928.

(收稿日期: 2023-04-19; 修回日期: 2023-06-08)

CD86、CD206 结直肠癌表达及其临床意义

陆二光, 沈毅, 彭辉, 李子义, 刘举达, 王振, 于庆生* (安徽中医药大学第一附属医院普外一科, 安徽省中医药科学院中医外科研究所, 合肥 230000)

摘要: **目的** 探究结直肠癌间质中 CD86、CD206 表达与结直肠癌患者预后的相关性。**方法** 利用免疫组化技术检测 46 例结直肠癌患者组织中 CD86 和 CD206 的表达状态, 并比较其对预后的影响, 揭示其与临床因素的相关性。**结果** CD86、CD206 的表达水平与患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位以及分化程度均无关; 与结直肠癌组织的浸润深度、淋巴结转移、肿瘤远处转移以及 TNM 分期关联密切 ($P < 0.05$)。富集分析显示 CD86 和 CD206 主要富集在癌症相关免疫反应、信号通路的激活、细胞黏附等。单因素和多因素 COX 回归分析显示 CD86 表达是一个独立的预后因素 ($P < 0.01$); 而 CD206 分析结果差异无统计学意义。构建了用于预测结直肠癌患者总生存期的模型, 其结果显示 CD86 低表达患者总生存率优于高表达患者 ($P < 0.05$), 而 CD206 的结果并不理想。**结论** CD86 可能作为结直肠癌患者预后的有效标志物, 为结直肠癌预后提供了更多的可能, 而 CD206 作为患者预后指标有待进一步研究。

关键词: 结直肠癌; 肿瘤相关巨噬细胞; CD86; CD206; 预后

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2848-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.005

Expression of CD86 and CD206 in colorectal cancer and its clinical significance

LU Er-guang, SHEN Yi, PENG Hui, LI Zi-yi, LIU Ju-da, WANG Zhen, YU Qing-sheng* (*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine Surgery, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230000*)

Abstract: Objective To determine the correlation between the expression of CD86 and CD206 in the interstitial of colorectal cancer and the prognosis of patients with colorectal cancer. **Methods** The expression of CD86 and CD206 in the tissues of 46 patients with colorectal cancer was detected by immunohistochemistry. The influence of CD86 and CD206 expression on the prognosis was compared to reveal the correlation with clinical factors. **Results** The expression levels of CD86 and CD206 were not related to patients' age, sex, tumor size, tumor site and differentiation degree. However, they were closely associated with the depth of invasion, lymph node metastasis, distant tumor metastasis and TNM stage of colorectal cancer ($P < 0.05$). Cluster enrichment analysis showed that CD86 and CD206 were mainly enriched in cancer-related immune responses, signaling pathway activation, and cell adhesion. Univariate and multivariate COX regression showed that CD86 expression was an independent prognostic factor ($P < 0.01$), while CD206 expression had poor prognostic efficacy. A model was established to predict the overall survival rate of patients with colorectal cancer. Patients with low expression of CD86 had better overall survival ($P < 0.05$), while the CD206 were not satisfactory. **Conclusion** CD86 may be used as an effective marker, and provide reference for the prognosis of colorectal cancer patients, while CD206 as a prognostic

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81573987); 国家自然科学基金项目 (No.82174160); 十二五国家临床重点专科建设项目 (财社 [2013]239 号); 安徽省科研编制计划项目 (No.2022AH050447)。

作者简介: 陆二光, 男, 硕士研究生, 主要从事外科相关研究, email: 2451545998@qq.com *通信作者: 于庆生, 男, 教授, 主要从事外科肿瘤研究, email: qsy6312@163.com

indicator needs further verification.

Key words: colorectal cancer; tumor-associated macrophage; CD86; CD206; prognosis

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是我国临床最常见的消化道恶性肿瘤之一, 近年来其发病率和死亡率均居高不下^[1], 对我国国民健康造成了严重的威胁。据 2020 年全球癌症报告, 结直肠癌在恶性肿瘤中发病率居全球第三, 病死率居全球第二^[2]。目前, 手术、化疗、放疗和靶向治疗是结直肠癌患者常用的治疗选择^[3-8]。尽管在过去的二十年中, 新的治疗技术和策略有了显著进步, 但大约 30% 的患者存在术后复发^[9-11]。此外, 辅助化疗的益处仅在 5% 的 II 期和 15% ~ 20% 的 III 期患者中被观察到^[11-15]。相当比例的结直肠癌患者会经历化疗药物的不良反应^[9-16]。基于此, 我们仍然需要更好的、更有效的生物标志物来评估结直肠癌患者的预后。

巨噬细胞是人类肿瘤微环境中的主要细胞成分, 俗称肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs)^[17]。不同类型的巨噬细胞在肿瘤进展中具有不同的功能。M1 型巨噬细胞激活肿瘤杀伤机制, 并增强 Th1 免疫细胞反应, 在肿瘤发生中发挥抵抗作用。另一方面, M2 型巨噬细胞主要通过抑制肿瘤特异性免疫反应, 促进肿瘤生长和转移^[18]。CD86 为 M1 型巨噬细胞表面标志物, CD86 高表达的 M1 型巨噬细胞参与炎症反应、病原体清除和抗肿瘤免疫^[19-20]。研究发现, CD86 表达在胃癌、胰腺癌以及慢性淋巴细胞白血病等肿瘤中发挥着不可替代的作用^[21-23]。CD206 为 M2 型巨噬细胞表面标志物, CD206 高表达的 M2 型巨噬细胞在抗炎反应和伤口愈合中发挥关键作用^[24-25]。CD206 表达在消化系统肿瘤中亦占据了一定作用^[23, 25]。因此, CD86 和 CD206 的表达高低也会影响肿瘤患者的预后状态。然而, 检索发现, CD86 或 CD206 作为结直肠癌患者预后的研究明显不足, 亟须开展。

本文探究巨噬细胞标志物 CD86、CD206 在结直肠癌中的表达, 富集分析 CD86 和 CD206 的相关功能, 并且在此基础上进一步分析 CD86、CD206 的表达与临床病理参数及患者预后之间的关系, 为改善结直肠癌患者预后提供更有力的、更强大的支撑。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 12 月到 2018 年 12 月安徽中医

药大学第一附属医院收治的 46 例结直肠癌患者作为研究对象, 所有患者均进行手术治疗, 46 例患者中男性 31 例, 女性 15 例, 年龄在 45 ~ 93 岁, 平均年龄为 (70.3 ± 13.2) 岁。收集住院患者的一般资料, 主要包括患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、淋巴结转移、分化程度和随访数据等。肿瘤分期和肿瘤分化分级根据第七届美国癌症联合委员会 TNM 分级重新分类。纳入标准: ① 均符合结直肠癌的临床诊断标准; ② 术后病理均诊断明确; ③ 获得家属的完全同意与知情。排除标准: ① 未有完整的病理资料; ② 随访丢失; ③ 早期转院; ④ 存在严重的沟通障碍与精神疾病。

1.2 生信分析

TCGA-CESC 数据集含有 607 例结直肠癌患者信息, 获取其 CD86、CD206 表达情况以及总生存期 (overall survival, OS), 采用 Kaplan-Meier 曲线评价 CD86、CD206 表达与总生存期的相关性。采用 STRING 11.5 导出蛋白相互关系的数据文件 (阈值 5% highest confidence > 0.4); 随后使用 Cytoscape 3.9.0 软件计算 MCC 值, 以 MCC 值前 10 的基因为关键基因 (Hub)。利用 WebGestalt 网站, 将 10 个 Hub 基因进行 GO 和 KEGG 富集分析 (阈值 FDR < 0.05)。

1.3 免疫组化

免疫组化技术分析结直肠癌组织。将结直肠癌组织进行包埋, 将包埋的标本切成 5 μm 的切片, 室温放置 30 min, 0.3% X-Triton 通透 20 min, 3% H₂O₂ 阻断 10 min, 10% 山羊血清室温培养 30 min。将加入一抗的样品在 4 °C 冰箱中培养过夜, 后二抗室温孵育 60 min。显微镜下观测并记录目标样本, 检测 CD86 和 CD206 的表达情况, 并留存图片。结果判定: 随机选取 5 个高倍镜视野, 以染色深浅程度与阳性细胞所占百分比联合判定。染色强度: 无色 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 黄褐色 3 分; 按阳性细胞所占的百分比计分: ≤ 5% 为 0 分, > 5% 且 ≤ 25% 为 1 分, > 25% 且 ≤ 50% 为 2 分, > 50% 为 3 分。分别将染色强度及阳性细胞百分比计算乘积, 0 ~ 3 分记为阴性, 4 ~ 9 分记为阳性。以上结果判读由 2 名高年资病理科医师双盲法独立判读, 并通过判读结果取平均值。

1.4 随访

术后患者出院即随访开始，随访形式主要以门诊和电话进行，随访截至 2023 年 5 月 31 日。总生存期定义为从肿瘤确诊至与肿瘤相关原因或死亡的时间。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 26.0 及 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析，CD86 和 CD206 的表达情况与结直肠癌病理特征的关系采用 χ^2 检验，运用 COX 回归分析法对 CD86 及 CD206 对患者预后的预测价值进行分析，采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线， $P < 0.05$ 提示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TCGA-CESC 数据库中 CD86 及 CD206 的表达水平与结直肠癌患者预后的关系

根据生存分析结果显示，结直肠患者中 CD86 低表达组总生存期长于高表达组 ($P = 0.04$)，见图 1A；而 CD206 高表达组和低表达组的总生存期差异无统计学意义 ($P = 0.08$)，见图 1B。分析结果预示 CD86 的表达水平可能对结直肠癌患者生存预后产生一定影响，而 CD206 对结直肠癌患者预后影响不明确。

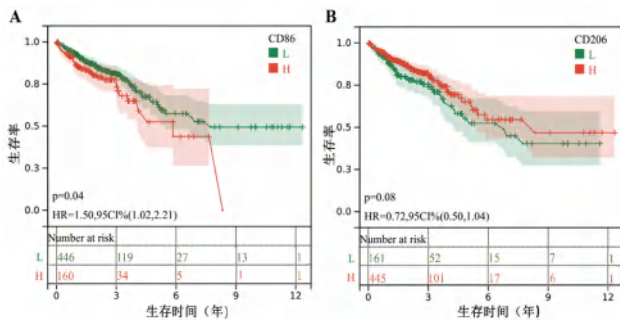


图 1 TCGA-CESC 中 607 例结直肠患者预后与 CD86、CD206 的表达关系

Fig 1 Relationship between prognosis and CD86 and CD206 expression in 607 colorectal patients in TCGA-CESC database

2.2 CD86、CD206 的 GO 富集分析

GO 富集分析显示，CD86 的生物过程 (BP) 在免疫反应、免疫系统过程、细胞的激活、免疫系统过程的调节中显著富集；细胞成分 (CC) 主要涉及膜的固有成分、质膜以及质膜的组成部分等；基因的分子功能 (MF) 主要包括信号受体活性、分子换能器活性、跨膜信号受体活性等。CD206 结果类似 (见图 2)。

2.3 CD86、CD206 的 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析显示，CD86 和 CD206 均在金黄色葡萄球菌感染、细胞黏附、肺结核、破骨细胞以及吞噬体作用等相关路径上明显富集 (见图 3)。

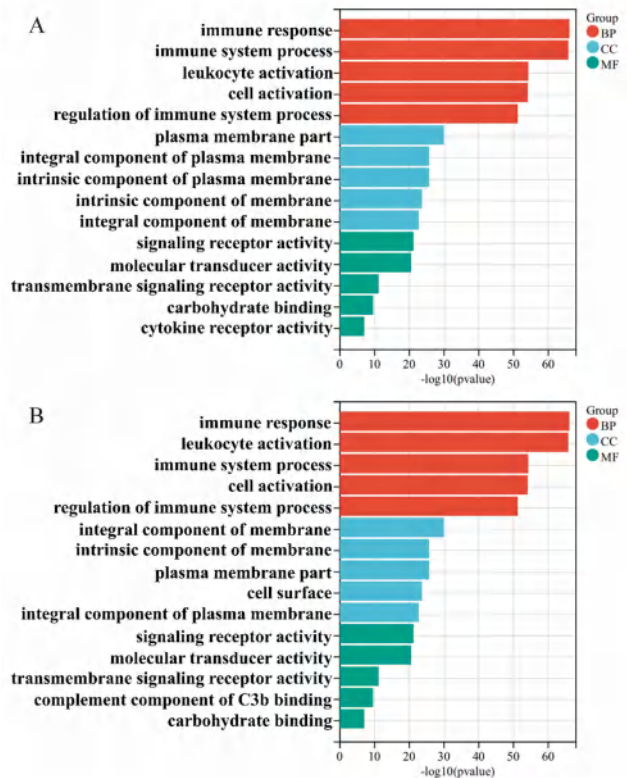


图 2 CD86、CD206 明显富集的 GO 结果

Fig 2 GO results of CD86 and CD206 enrichment

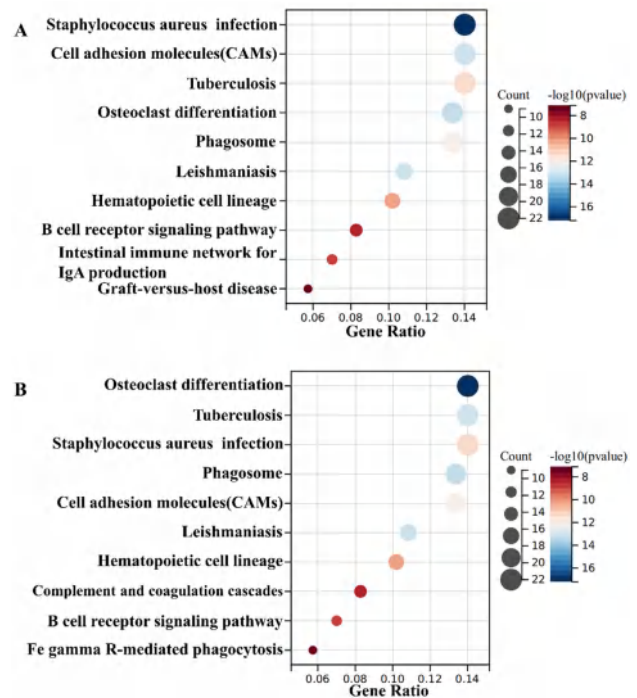


图 3 CD86、CD206 明显富集的 KEGG 结果

Fig 3 KEGG results of CD86 and CD206 enrichment

2.4 CD86、CD206 在结直肠癌组织中免疫组化结果分析

在收集的 46 例结直肠癌患者中，CD86 高表达 27 例，低表达 19 例；CD206 高表达 20 例，低表达 26 例。根据患者总生存期中位值将 46

例患者分为预后良好组与预后不佳组，结果发现预后良好组中 CD86 低表达 16 例、CD206 高表达 19 例，预后不佳组中 CD86 高表达 23 例、CD206 低表达 24 例（见图 4）。

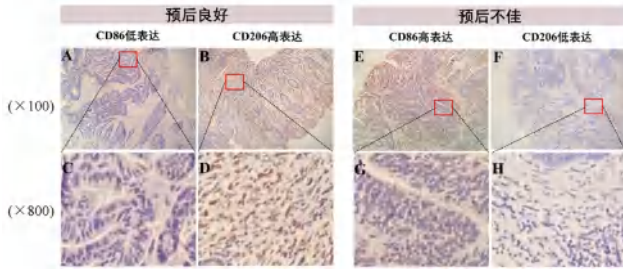


图 4 不同预后患者组 CD86、CD206 的表达水平
Fig 4 Expression levels of CD86 and CD206 in patients with different prognosis

2.5 结直肠癌患者 CD86、CD206 的表达与临床病理特征的关系

根据 CD86、CD206 的表达水平，将结直肠癌患者 CD86、CD206 分为高表达组和低表达组，两组年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位以及分化程度比较均无显著差异，而与结直肠癌组织的浸润深度、淋巴结转移、肿瘤远处转移以及 TNM 分期具有密切关联 ($P < 0.01$)。具体见表 1。

2.6 单因素、多因素 COX 分析结直肠癌患者预后的危险因素

单因素 COX 模型分析显示，结直肠癌患者的分化程度 ($P < 0.05$)、远处转移 ($P < 0.05$)、TNM 分期 ($P < 0.01$) 以及癌组织 CD86 表达 ($P < 0.01$) 均与患者较差预后相关联；多因素 COX 模型分析显示，结直肠癌患者的分化程度 ($P < 0.01$)、TNM 分期 ($P < 0.05$) 以及肿瘤组织中 CD86 表达 ($P < 0.01$) 是影响患者预后的危险因素，因而成为患者预后评估的独立指标，而肿瘤组织中 CD206 表达 ($P = 0.848$) 作为独立预测因子的价值有待进一步研究（见表 2）。

2.7 CD86、CD206 肿瘤相关巨噬细胞表达水平与结直肠癌患者预后之间的关系

本文收集的 46 例结直肠癌患者病例均有完整的生存数据。K-M 生存曲线结果显示，结直肠癌患者中 CD86 低表达组 5 年生存率明显优于高表达组 ($P = 0.015$ ，见图 5A)，这进一步印证了 CD86 的表达水平可能对结直肠癌患者生存预后产生一定影响。而 CD206 患者 5 年生存率差异无统计学意义 ($P = 0.104$ ，见图 5B)，提示对结直肠癌患者的生存预后无影响，这需要更进一步的研究。

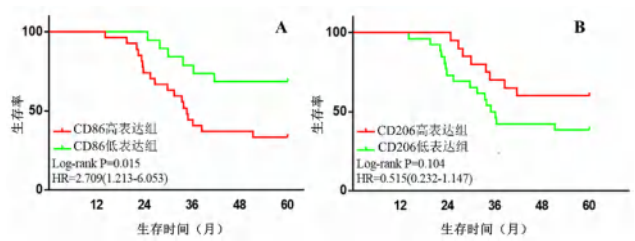


图 5 CD86、CD206 的表达与结直肠癌患者 5 年生存率的关系
Fig 5 Relationship between expression of CD86 and CD206 and 5-year survival rate in patients with colorectal cancer

3 讨论

已有研究表明结直肠癌是世界上癌症死亡的三大主要原因之一^[2]。已有认知中结直肠癌主要预后因素为 TNM 阶段，但它并不精确^[26]。癌症生物标志物是由肿瘤细胞直接产生或由非肿瘤细胞经肿瘤细胞诱导产生的物质，是可以客观检测到的物质或分子，表明癌症的存在或生存^[20]。因此，确认一个与结直肠癌预后最相关的生物标志物十分重要。

本研究基于生信分析 607 例结直肠癌患者预后与肿瘤相关巨噬细胞内 CD86、CD206 表达量的关系，结果提示 CD86 低表达组总生存期优于高表达组，CD206 高表达组总生存期略优于低表达组，但差异无统计学意义，这表明 CD86 表达水平可能对结直肠癌患者生存预后产生一定影响，但 CD206 表达影响不显著，这与先前的研究^[23, 25]不一致，本课题组将通过后续的研究加以验证。随后，我们对 CD86、CD206 进行富集分析。GO 富集分析显示 CD86 和 CD206 均在免疫反应、免疫系统过程、细胞的激活、信号受体活性等过程中显著富集。KEGG 富集分析显示 CD86 和 CD206 均在细胞黏附和吞噬体作用等相关路径上明显富集。上述 CD86、CD206 的富集结果刚好和肿瘤的发生、发展以及转移等过程相关联，而这种关联可能影响了结直肠癌患者的预后。

为验证上述猜想，本研究收集了 46 例结直肠癌患者组织以及临床病理资料：首先分析结直肠癌组织免疫组化结果，结果显示预后良好组中 CD86 低表达和 CD206 高表达居多，预后不佳组中 CD86 高表达和 CD206 低表达居多；随后进一步探究 CD86、CD206 表达水平与结直肠癌患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、淋巴结转移以及分化程度等各临床病理参数间的关系，结果发现 CD86、CD206 的表达水平与 T 分类、N 分类、淋巴结转移、肿瘤远处转移以及 TNM 分期之间存在强关联。以往研究显示结直肠癌远处

表 1 结直肠癌患者 CD86、CD206 表达与临床病理特征的关系 (n = 46)

Tab 1 Relationship between expression of CD86 and CD206 and clinic oopathological features in patients with colorectal cancer (n = 46)

变量	患者 [n (%)]	CD86 表达患者数			CD206 表达患者数		
		高表达 (n = 27)	低表达 (n = 19)	P	高表达 (n = 20)	低表达 (n = 26)	P
年龄 / 岁				0.492			0.425
< 60	11 (23.9)	7	4		4	7	
≥ 60	35 (76.1)	20	15		16	19	
性别				0.421			0.267
男	31 (67.4)	19	12		12	19	
女	15 (33.6)	8	7		8	7	
肿瘤大小 /cm				0.402			0.263
< 4.5	22 (47.8)	12	10		8	14	
≥ 4.5	24 (52.2)	15	9		12	12	
肿瘤部位				0.163			0.556
直肠	20 (43.5)	10	10		9	11	
升结肠	7 (15.2)	4	3		4	3	
横结肠	1 (2.2)	0	1		0	1	
降结肠	6 (13)	6	0		1	5	
乙状结肠	12 (26.1)	7	5		6	6	
分化程度				0.436			0.403
低分化	11 (23.9)	8	3		3	8	
中分化	30 (65.2)	17	13		14	16	
高分化	5 (10.9)	2	3		3	2	
T 分类				0.022			0.025
T1	4 (8.7)	0	4		3	1	
T2	5 (10.9)	2	3		3	2	
T3	22 (47.8)	13	9		12	10	
T4	15 (32.6)	12	3		2	13	
N 分类				0.034			0.001
N0	20 (43.5)	8	12		17	3	
N1	16 (34.8)	10	6		2	14	
N2	10 (21.7)	9	1		1	9	
远处转移				0.001			0.001
无	33 (71.7)	14	19		20	13	
有	13 (28.3)	13	0		0	13	
TNM 分期				0.001			0.001
I	6 (13)	0	6		6	0	
II	12 (26.1)	6	6		11	1	
III	15 (32.6)	8	7		3	12	
IV	13 (28.3)	13	0		0	13	

转移、TNM 分期等与 CD86 阳性肿瘤相关巨噬细胞之间存在差异性^[27-28]，与本研究结果吻合。通过对影响患者预后的危险因素进行评估，单因素和多因素 COX 分析显示 CD86 可以成为结直肠癌患者预后评估的独立指标，而 CD206 作为独立预测因子没有达到预期。同时本研究还发现肿瘤的分化程度也可作为预后指标^[27]。最后，本研究利用 K-M 生存曲线分析发现，结直肠患者中 CD86 低表达组 5 年生存率明显优于高表达组，这进

一步印证了我们的观点，即 CD86 的表达水平可能对结直肠癌患者生存预后产生一定影响^[29-30]。CD206 组 5 年生存率差异并不明显，需要进一步研究探究原因。

当然，本研究仍存在不足：第一，缺乏较完善的生信分析，我们只是片面地对 CD86、CD206 进行了富集分析，而忽略了其表达差异分析、分子互作分析；第二，收集临床样本较少；第三，没有进行 CD86 和 CD206 的相关性分析。

表 2 COX 模型单因素、多因素分析影响患者预后的危险因素 (n = 46)

Tab 2 COX model univariate and multivariate analysis of the risk factors affecting the prognosis of patients (n = 46)

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
年龄 / 岁		0.545		
< 60	1 (参考)			
≥ 60	0.793 (0.374 ~ 1.682)			
性别		0.548		
男	1 (参考)			
女	0.813 (0.413 ~ 1.598)			
肿瘤大小 /cm		0.530		
< 4.5	1 (参考)			
≥ 4.5	0.813 (0.425 ~ 1.553)			
分化程度		0.033		0.002
低 vs 中	0.683 (0.170 ~ 2.733)	0.589	0.079 (0.014 ~ 0.454)	0.004
低 vs 高	2.154 (0.644 ~ 7.204)	0.213	0.549 (0.135 ~ 2.233)	0.402
T 分类		0.056		
T1 vs T2	0.227 (0.051 ~ 1.021)	0.053		
T1 vs T3	0.200 (0.045 ~ 0.896)	0.035		
T1 vs T4	0.860 (0.426 ~ 1.739)	0.675		
N 分类		0.791		
N0 vs N1	0.751 (0.328 ~ 1.721)	0.498		
N0 vs N2	0.865 (0.368 ~ 2.035)	0.740		
远处转移		0.010		0.431
无	1 (参考)		1 (参考)	
有	0.396 (0.197 ~ 0.798)		0.674 (0.252 ~ 1.799)	
TNM 分期		0.009		0.032
I vs II	0.105 (0.023 ~ 0.478)	0.004	0.236 (0.032 ~ 1.749)	0.158
I vs III	0.744 (0.331 ~ 1.670)	0.473	2.310 (0.663 ~ 8.053)	0.189
I vs IV	0.368 (0.160 ~ 0.843)	0.018	不适用	不适用
CD86 表达		0.003		0.006
低表达	1 (参考)		1 (参考)	
高表达	2.854 (1.434 ~ 5.681)		3.923 (1.148 ~ 10.365)	
CD206 表达		0.154		0.848
低表达	1 (参考)		1 (参考)	
高表达	0.619 (0.320 ~ 1.197)		0.883 (0.248 ~ 3.145)	

综上所述, 结直肠癌组织中 CD86、CD206 的表达水平与结直肠癌组织的浸润深度、淋巴结转移、肿瘤远处转移以及 TNM 分期具有密切关联; 肿瘤相关巨噬细胞内 CD86 表达可作为结直肠癌患者预后的有效标志物, 而 CD206 作为预后标志物仍需进一步探究。本研究的发现为今后结直肠癌的诊断、治疗和预后提供了一个有希望的目标。

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] Liu ZC, Li ZX, Zhang Y, et al. 2020 global cancer sta-

tistics report interpretation [J]. JMCM, 2021, 7 (2): 1-14.
 [3] Guo L, Wang CL, Qiu X, et al. Colorectal cancer immune infiltrates: significance in patient prognosis and immunotherapeutic efficacy [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1052.
 [4] Liu KJ, Lei S, Kuang Y, et al. A novel mechanism of the c-Myc/NEAT1 axis mediating colorectal cancer cell response to photodynamic therapy treatment [J]. Front Oncol, 2021, 11: 652831.
 [5] Wang H. MicroRNAs and apoptosis in colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (15): 5353.
 [6] 王芳芳, 黄亚辉, 王孝清, 等. 产肠毒素脆弱拟杆菌在结直肠癌中致病机制和治疗策略研究进展 [J]. 中南药学, 2023, 21 (5): 1117-1124.
 [7] 漆婷婷, 金永东, 马雪, 等. 雷替曲塞联合替吉奥三线

- 治疗转移性结直肠癌的疗效观察及安全性评价[J]. 中南药学, 2021, 19(10): 2204-2208.
- [8] 雷振东, 赵华, 雷三林, 等. 曲古抑菌素 A 对结肠癌细胞细胞周期影响的机制研究[J]. 中南药学, 2010, 8(11): 869-872.
- [9] Giráldez MD, Lozano JJ, Cuatrecasas M, et al. Gene-expression signature of tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with 5' fluorouracil-based adjuvant chemotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(5): 1090-1097.
- [10] André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(19): 3109-3116.
- [11] O'Connell MJ, Campbell ME, Goldberg RM, et al. Survival following recurrence in stage II and III colon cancer: findings from the ACCENT data set [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(14): 2336-2341.
- [12] André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 2343-2351.
- [13] Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(28): 3768-3774.
- [14] Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(11): 1465-1471.
- [15] Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352: 2696-2704.
- [16] O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(25): 3381-3388.
- [17] Schmieider A, Michel J, Schönhaar K, et al. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(4): 289-297.
- [18] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 723-737.
- [19] Solinas G, Germano G, Mantovani A, et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(5): 1065-1073.
- [20] Cheng Y, Zhu Y, Xu JJ, et al. PKN2 in colon cancer cells inhibits M2 phenotype polarization of tumor-associated macrophages via regulating DUSP6-Erk1/2 pathway [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 13.
- [21] Xiang HG, Zhao W, Sun YP, et al. CD86 gene variants and susceptibility to pancreatic cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(12): 2061-2067.
- [22] Takács F, Tolnai-Kriston C, Hernádfői M, et al. The effect of CD86 expression on the proliferation and the survival of CLL cells [J]. *Pathol Oncol Res*, 2019, 25(2): 647-652.
- [23] Ren CX, Leng RX, Fan YG, et al. Intratumoral and peritumoral expression of CD68 and CD206 in hepatocellular carcinoma and their prognostic value [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 886-898.
- [24] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization; in vivo veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795.
- [25] Hu W, Li X, Zhang C, et al. Tumor-associated macrophages in cancers [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18: 251-258.
- [26] Benson AB, Venook AP, Cederquist L, et al. Colon cancer, version 1.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(3): 370-398.
- [27] Kou Y, Li ZQ, Sun QD, et al. Prognostic value and predictive biomarkers of phenotypes of tumour-associated macrophages in colorectal cancer [J]. *Scand J Immunol*, 2022, 95(4): e13137.
- [28] Sun DL, Luo TC, Dong PP, et al. CD86⁺/CD206⁺ tumor-associated macrophages predict prognosis of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Peer J*, 2020, 8: e8458.
- [29] Yang CG, Wei C, Wang SY, et al. Elevated CD163⁺/CD68⁺ ratio at tumor invasive front is closely associated with aggressive phenotype and poor prognosis in colorectal cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(5): 984-998.
- [30] Dong PP, Ma LJ, Liu LZ, et al. CD86⁺/CD206⁺, diametrically polarized tumor-associated macrophages, predict hepatocellular carcinoma patient prognosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 320.

(收稿日期: 2023-06-20; 修回日期: 2023-07-20)

延胡索总碱贴片的初步稳定性研究

王梦琳, 魏晓彤, 石双慧, 姜明瑞, 胡宇峰, 马思媛, 张婧秋, 王慧楠, 陈梦雨, 王英姿* (北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 研究延胡索总碱贴片中延胡索总碱在不同条件下的稳定性。**方法** 以延胡索总碱贴片中的延胡索甲素、延胡索乙素以及延胡索丑素的含量, 24 h 体外累积释放量及黏附力为指标, 进行了强光照、高温、高湿的影响因素试验、加速试验及长期留样试验。**结果** 制剂对光照、高温、高湿稳定, 加速试验、长期留样试验稳定性较好, 延胡索总碱贴片中的延胡索甲素、延胡索乙素和延胡索丑素的含量、24 h 体外累积释放量及延胡索总碱贴片黏附力无显著性变化。**结论** 延胡索总碱贴片质量可控, 稳定性良好。

关键词: 延胡索总碱; 贴片; 含量测定; 稳定性研究

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2855-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.006

Stability of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patch

WANG Meng-lin, WEI Xiao-tong, SHI Shuang-hui, JIANG Ming-rui, HU Yu-feng, MA Si-yuan, ZHANG Jing-qiu, WANG Hui-nan, CHEN Meng-yu, WANG Ying-zi* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the stability of total alkaloids from *Corydalis Rhizoma* in *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patches under different conditions. **Methods** The content of corydaline, tetrahydropalmatine and tetrahydrocolumbamine in *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patches, the 24 hours cumulative permeation in vitro and adhesion were taken as indicators. The influence factors test, accelerated test and long-term retention test of strong light, high temperature and high humidity were conducted. **Results** The preparation was stable under light, high temperature and high humidity, and was stable in the accelerated test and long-term retention test. The content and the 24 hours cumulative permeation in vitro of corydaline, tetrahydropalmatine and tetrahydrocolumbamine in *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patches, and the adhesion of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patches had no obvious change. **Conclusion** *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patches have controllable quality and good stability.

Key words: *Corydalis Rhizoma* total alkaloid; patch; content determination; stability

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang 的干燥块茎, 具有活气、行血、止痛等功效^[1], 可用于血瘀气滞诸痛证, 其主要活性成分为延胡索总碱, 包括延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素等^[2-7]。延胡索总碱贴片是由具有确切临床疗效的延胡索总碱、经皮给药系统、穴位贴敷疗法相结合制备而成, 避免了肝脏的首过效应, 且使用方便, 是一种新型透皮给药制剂^[8]。

稳定性决定药品的质量、有效性和安全性, 常被用来筛选制剂, 预测和确定药品的有效期, 并为药品的生产、包装、贮存、运输条件确定提供科学依据^[9-10]。延胡索总碱贴片是本实验室自制的中药制剂, 有效成分主要为延胡索总碱, 其具有治疗慢性疼痛作用。为了更好地控制延胡索总碱贴片的质量, 确保用药安全有效, 本文以延胡索总碱贴片中的延胡索甲素、延胡索乙素、延

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No.2018YFE0197900)。

作者简介: 王梦琳, 女, 硕士研究生, 主要从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究工作, email: mliliWang@163.com *通信作者: 王英姿, 女, 博士研究生导师, 教授, 主要从事中药制剂新技术与中药炮制原理研究工作, email: wangyzi@sina.com

胡索丑素的含量、24 h 体外累计释放量及黏附力为指标,对延胡索总碱贴片进行了影响因素试验(强光照射、高温、高湿)、加速试验以及长期留样试验等稳定性研究,以期延胡索总碱贴片的进一步开发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪、Chromleon 变色龙色谱数据系统(美国赛默飞公司);BSI10S 型万分之一电子天平(Sartorius 公司);KH7200DB 型数控超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司);Researchplus 单道可调量程移液器(德国 Eppendorf);TGL-16M 型高速离心机(湘仪实验室仪器有限公司);DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱(北京北方利辉试验仪器设备有限公司);HWS-50B 型恒温恒湿培养箱(北京市恒诺利兴科技有限公司);CZY-GY 型初黏仪、CZY-6S 型持黏仪、BLD-200N 型剥离机(济南兰光机电技术有限公司);TK-12D 型透皮吸收扩散仪(上海锴凯科技有限公司);药品强光稳定性试验箱(北京兰贝石恒温技术有限公司)。

1.2 试药

延胡索总碱贴片(自制,批号:20210421);延胡索甲素对照品(含量:98.0%,上海源叶生物科技有限公司,批号:Z25N8B49010);延胡索乙素对照品(含量:99.8%,中国食品药品检定研究院,批号:110726-201819);延胡索丑素对照品(含量:98.0%,成都德思特生物技术有限公司,批号:DST200321-157);甲醇(色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司);三乙胺、磷酸(分析纯,北京化工厂);生理盐水(石家庄四药有限公司);无水乙醇(上海国药试剂);水为去离子水以及娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 延胡索总碱贴片的制备^[11]

称取适量延胡索总碱,加入 Duro-Tak 87-4098 丙烯酸酯压敏胶及促透剂丙二醇,室温下磁力搅拌 3 h,使药物与压敏胶充分混合。将药液倾倒在离型膜上,涂布成一定厚度薄膜,80℃鼓风干燥固化 15 min 后放冷至室温,压覆背衬层,即得延胡索总碱贴片,裁剪成所需大小,放入干燥器备用(含延胡索总碱 $6 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$)。

2.2 HPLC 法测定延胡索总碱贴片中延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素的含量^[8]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.04 mol·L⁻¹磷酸水溶液(70:30),三乙胺调 pH 为 6.0;检测波长:281 nm;柱温:30℃;流速:1 mL·min⁻¹;进样量:10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素对照品适量,加甲醇超声定容至 5 mL,制得质量浓度分别为 1.8522、0.7804、0.6233 mg·mL⁻¹的母液,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取自制延胡索总碱贴片,除去防黏层,置于具塞锥形瓶中,加 4 mL 甲醇溶解后超声 60 min,确保贴片中的药物及压敏胶完全溶解在溶剂中。放至室温后,8000 r·min⁻¹离心(离心半径 9.46 cm)15 min,将上清液全部转移至 5 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 专属性考察 按照“2.2.3”项下方法制备空白贴片供试品溶液、延胡索总碱贴片供试品溶液,分别吸取混合对照品溶液、空白贴片供试品溶液以及延胡索总碱贴片供试品溶液,进样测定,结果见图 1,样品溶液在该色谱条件下的专属性良好。

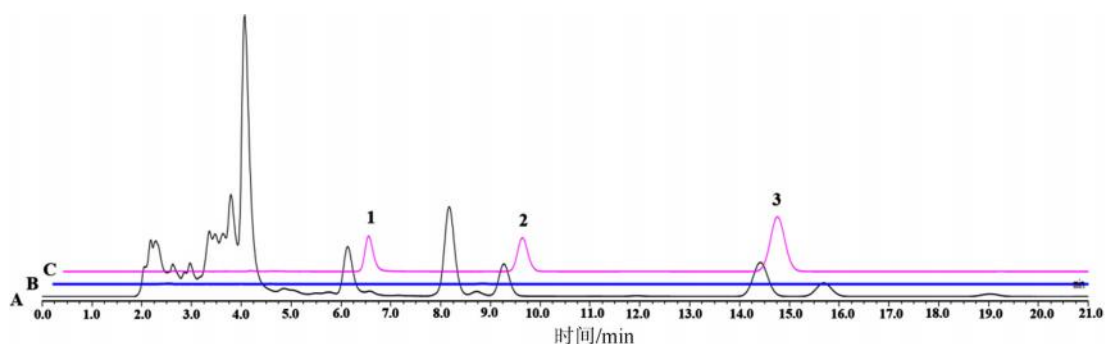


图 1 延胡索总碱贴片(A)、空白贴片(B)及混合对照品(C)的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patch (A), blank patch (B) and mixed control (C)

1. 延胡索丑素(corydaline); 2. 延胡索乙素(tetrahydropalmatine); 3. 延胡索甲素(tetrahydrocolumbamine)

2.2.5 线性关系考察 取混合对照品母液配制成浓度梯度的混合溶液,进样测定。结果延胡索甲

素的线性回归方程为 $Y = 169.10X - 0.2103$, $r = 0.9996$, 在 $0.0185 \sim 0.3704 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好; 延胡索乙素的线性回归方程为 $Y = 175.25X - 0.0611$, $r = 0.9998$, 在 $0.0078 \sim 0.1561 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好; 延胡索丑素的线性回归方程为 $Y = 185.65X + 0.0142$, $r = 0.9995$, 在 $0.00624 \sim 0.1247 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.2.6 精密度考察 取混合对照品溶液连续进样测定 6 次, 结果延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素峰面积的 *RSD* 值分别为 0.34%、0.36%、0.58%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性考察 按照“2.2.3”项下方法制备贴片的含量测定溶液, 在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样, 测定峰面积并计算 *RSD* 值, 结果延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素峰面积的 *RSD* 值均为 1.9%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 重复性考察 取同一批延胡索总碱贴片 6 片, 按照“2.2.3”项下方法制备贴片供试品溶液, 进样测定, 结果延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素含量 *RSD* 值分别为 2.2%、2.0%、2.3%, 表明重复性满足样品含量测定要求。

2.2.9 加样回收试验 取不含延胡索总碱的空白贴片 6 片, 除去防黏层, 加入混合对照品溶液, 按照“2.2.3”项下方法制备贴片供试品溶液, 进样测定, 结果延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素回收率在 98.0% ~ 104.0%, *RSD* 值在 1.9% ~ 2.1%, 表明回收率良好。

2.3 体外累计释放量测定

扩散池为体积约 8 mL 的垂直式扩散池, 接收池有效接触面积为 3.14 cm^2 。取半透膜置于供给池与接收池之间, 在接收池中放入磁力搅拌子并注入预热至 37°C 的接收液, 至液面恰与半透膜接触, 排净气泡。将扩散池置于 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 恒温水浴中, 以 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌, 分别于 1、2、4、6、8、12、24 h 吸取接收液 0.2 mL, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, HPLC 测定。单位面积累积渗透量 (Q_n) 按照公式 (1) 计算:

$$Q_n = (C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V) / A \quad (1)$$

式 (1) 中 Q_n 为累计释放量, C_n 和 C_i 分别是第 n 个和第 i 个取样点的药物浓度, V_0 为接收液体积 (8 mL), V 为取样体积 (0.2 mL), A 为有效扩散面积 (3.14 cm^2)。

以时间为横坐标, Q_n 为纵坐标绘制累计释放曲线, 见图 2, 并将延胡索总碱穴位贴片中 3 种指标成分的 24 h 累计释放度 (%) 分别以零级、一级、Higuchi、Ritger-Peppas、Weibull 动力学方程进行拟合, 初步研究延胡索总碱贴片的体外释放机制, 释放模型和拟合优度结果见表 2, 由相关系数 (r) 可以看出, 延胡索甲素与延胡索乙素拟合优度顺序为 Weibull > Ritger-Peppas > Higuchi > 一级 > 零级, 延胡索丑素的拟合顺序为 Higuchi > Weibull > Ritger-Peppas > 一级 > 零级。因此, 总碱贴片中延胡索甲素、延胡索乙素与延胡索丑素的体外释放分别最符合 Weibull、Weibull 与 Higuchi 释放模型。

表 2 延胡索总碱贴片中延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素的体外释放拟合结果

Tab 2 Fitting of corydaline, tetrahydropalmatine, and tetrahydrocolumbamine release in *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patch

化合物	模型	拟合方程	<i>r</i>
延胡索甲素	零级	$Q = 0.2671t + 0.5281$	0.9715
	一级	$\ln(1 - Q) = -0.0028t + 4.6000$	0.9735
	Higuchi	$Q = 1.3934t^{1/2} - 0.7142$	0.9798
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 1.1603 \ln t + 0.8285$	0.9923
	Weibull	$\ln\{\ln[1/(1 - Q)]\} = 1.1483 \ln t + 6.1088$	0.9926
延胡索乙素	零级	$Q = 0.9327t + 2.2672$	0.9693
	一级	$\ln(1 - Q) = -0.0106t + 4.5844$	0.9765
	Higuchi	$Q = 4.8947t^{1/2} - 2.134$	0.9833
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 1.3388 \ln t - 1.1173$	0.9964
	Weibull	$\ln\{\ln[1/(1 - Q)]\} = 1.2785 \ln t + 4.8259$	0.9967
延胡索丑素	零级	$Q = 0.2167t + 1.2948$	0.9343
	一级	$\ln(1 - Q) = -0.0022t + 4.5922$	0.9379
	Higuchi	$Q = 1.1964t^{1/2} - 0.1389$	0.9970
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 2.1638 \ln t - 0.6707$	0.9948
	Weibull	$\ln\{\ln[1/(1 - Q)]\} = 2.1307 \ln t + 9.1421$	0.9948

注: Q 为累计释放度, t 为时间。

Note: Q means the cumulative release degree, t means the time.

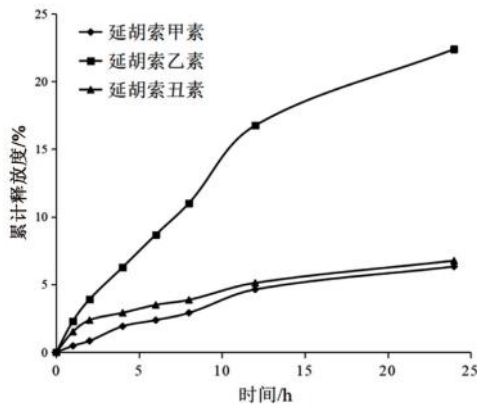


图2 延胡索总碱贴片中3种成分的体外释放曲线 ($n = 3$)
Fig 2 In vitro release and transdermal curves of three components in *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patch ($n = 3$)

2.4 黏附力测定

按照 2020 年版《中国药典》第四部通则 0952 项下的黏附力测定法对所制贴片的黏附力进行评价^[12]。

2.4.1 初黏力 初黏力为轻微压力作用下产生的剥离抵抗力，采用滚球斜坡停止法，对初黏力进行评价。试验前，将供试品于 18 ~ 25 °C、相对湿度 40% ~ 70% 下放置 2 h 以上。用蘸有无水乙醇的擦拭材料擦洗倾斜板和不锈钢钢球表面，用干净的无尘布仔细擦干，清洗 3 次以上，直至倾斜板和不锈钢球表面经目测检查达到洁净为止。取供试品，除去防黏层，固定于水平面上，压敏胶面向上，取适宜大小的不锈钢球进行试验，记录每次不锈钢球滚过的距离，求算平均值^[12]。

2.4.2 持黏力 持黏力为膏体抵抗持久性外力所引起变形或断裂的能力，采用悬挂法对持黏力进行评价。试验前，将供试品于 18 ~ 25 °C、相对湿度 40% ~ 70% 条件下放置 2 h 以上。用蘸有无水乙醇的擦拭材料擦洗试验板和加载板，用干净的无尘布仔细擦干，清洗 3 次以上，直至试验板和加载板表面经目测检查达到洁净为止。洁净后的试验板和加载板不得用手或其他物体接触。取供试品，将供

试品平行于板的纵向粘贴在紧挨着的试验板和加载板的中部，用压辊在供试品上来回滚压 3 次，供试品在板上粘贴后，在室温放置 20 min，固定于试验架，垂直放置，沿供试品的长度方向悬挂一规定质量的砝码，记录供试品滑移直至脱落的时间或在一定时间内位移的距离^[12]。

2.4.3 剥离强度 剥离强度指在适当压力下经一定粘贴时间后，贴剂与被粘表面之间抵抗界面分离的能力，采用 180° 剥离强度试验法对剥离强度进行测定。试验前，将供试品于 18 ~ 25 °C、相对湿度 40% ~ 70% 条件下放置 2 h 以上。将供试品黏性面与洁净的聚酯薄膜黏接，然后用 2000 g 重压辊在供试品上来回滚压 3 次，以确保黏接处无气泡存在。供试品粘贴后，在室温下放置 20 ~ 40 min 后进行试验。将聚酯薄膜自由端对折 (180°)，把薄膜自由端和试验板分别上、下夹持于试验机上。应使剥离面与试验基线保持一致。试验机以 (300 ± 10) mm · min⁻¹ 下降速度连续剥离，试验结果以仪器显示数值表示^[12]。

2.5 稳定性考察

2.5.1 影响因素试验 按照 2020 年版《中国药典》第四部通则 9001《原料药物与制剂稳定性试验指导原则》，将延胡索总碱贴片分别在高温、高湿和强光照照射环境下试验，对延胡索总碱贴片中延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素的含量，24 h 体外累计释放量及黏附力进行考察。

① 强光照照射试验：将延胡索总碱贴片置于 (4500 ± 500) lx 下光照 10 d，分别于第 5 日、第 10 日取样检测，结果见图 3。在强光照照射试验条件下，5 d、10 d 组中延胡索总碱贴片的延胡索甲素、延胡索乙素和延胡索丑素含量均呈下降趋势，差异不存在统计学意义。初黏力球号为 10 ~ 11，持黏力、剥离强度分别在 6.200 ~ 6.520 h 及 0.107 ~ 0.117 kN · m⁻¹ 内，各项指标均无明显变化。

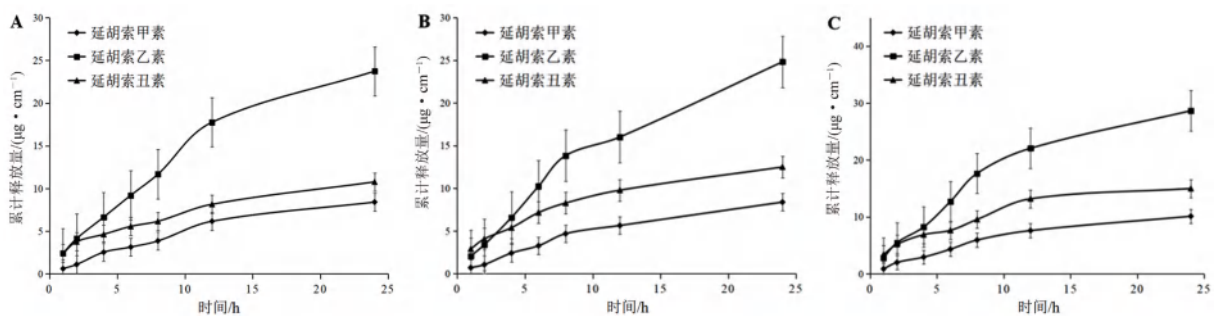


图3 强光照照射试验后的延胡索总碱贴片体外释放速率曲线图 ($n = 3$)

Fig 3 In vitro release rate curve of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patch after strong light irradiation test ($n = 3$)

A. 光照 0 d (strong light irradiation for 0 days); B. 光照 5 d (strong light irradiation for 5 days); C. 光照 10 d (strong light irradiation for 10 days)

② 高温试验：将延胡索总碱贴片放置在电热恒温鼓风干燥箱内部，60℃ 温度下放置 10 d，分别于第 5 日、第 10 日取样检测，结果见图 4。在高温试验条件下，5 d、10 d 组中，延胡索总碱贴

片的延胡索甲素、延胡索乙素和延胡索丑素含量呈下降趋势，但差异无统计学意义，初黏力球号均为 10，持黏力、剥离强度分别在 6.133 ~ 6.520 h 及 0.110 ~ 0.123 kN·m⁻¹ 内，各项指标均无明显变化。

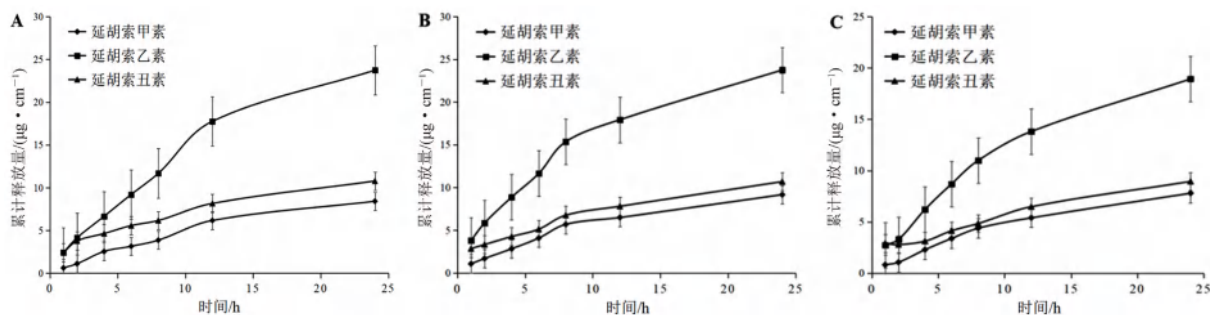


图 4 高温试验后的延胡索总碱贴片体外释放速率曲线图 (n = 3)

Fig 4 In vitro release rate curve of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patch after high temperature test (n = 3)

A. 高温 0 d (high temperature test for 0 day); B. 高温 5 d (high temperature test for 5 days); C. 高温 10 d (high temperature test for 10 days)

③ 高湿试验：将延胡索总碱贴片置于恒湿密闭容器中，分别于 25℃ 相对湿度 (90±5)% 条件下放置 10 d，分别于第 5 日、第 10 日取样，结果见图 5。在高湿试验条件下，5 d、10 d 组中，延胡索总碱贴片的延胡索甲素、延胡索乙素和延胡

索丑素含量呈下降趋势，但差异无统计学意义，初黏力球号为 10 ~ 11，持黏力、剥离强度分别在 6.333 ~ 6.520 h 及 0.100 ~ 0.110 kN·m⁻¹ 内，各项指标均无明显变化。

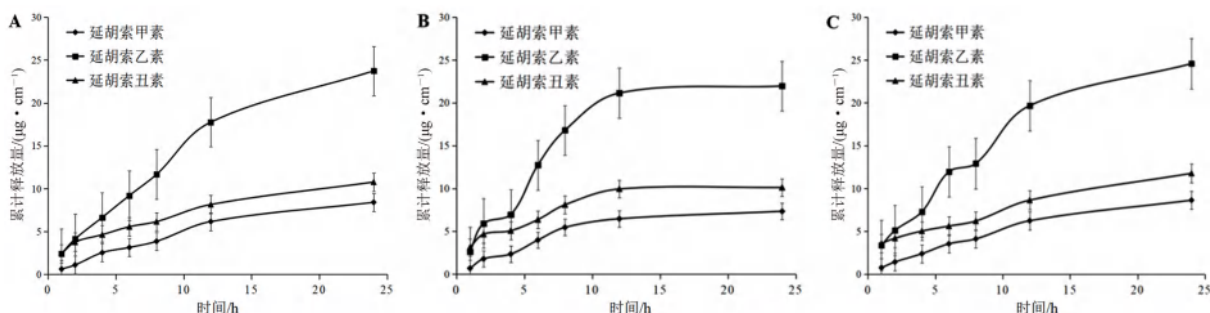


图 5 高湿试验后的延胡索总碱贴片体外释放速率曲线图 (n = 3)

Fig 5 In vitro release rate curve of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patch after high humidity test (n = 3)

A. 高湿 0 d (high humidity test for 0 day); B. 高湿 5 d (high humidity test for 5 days); C. 高湿 10 d (high humidity test for 10 days)

2.5.2 加速试验 取模拟上市包装的延胡索总碱贴片在温度 (40±2)℃，相对湿度 (75±5)% 的恒温恒湿箱中放置 6 个月，在试验期间第 0 个月、第 3 个月、第 6 个月末分别取样 1 次，检测结果见图 6。延胡索总碱贴片的延胡索甲素、延胡索乙素和延胡索丑素含量降低较少，差异无统计学意义。初黏力球号为 9 ~ 10，持黏力、剥离强度分别在 6.233 ~ 6.520 h 及 0.107 ~ 0.123 kN·m⁻¹ 内，各项指标均无明显变化。

和延胡索丑素含量降低较少，差异无统计学意义。初黏力球号为 9 ~ 10，持黏力、剥离强度分别在 6.033 ~ 6.367 h 及 0.103 ~ 0.127 kN·m⁻¹ 内，各项指标均无明显变化。

3 讨论

2.5.3 长期留样试验 取延胡索总碱贴片模拟上市包装，在温度 (25±2)℃、相对湿度 (60±10)% 下放置于药品稳定性试验箱中 12 个月，分别于 0、3、6、9、12、18 个月末取样 1 次，检测结果见图 7。延胡索总碱贴片的延胡索甲素、延胡索乙素

稳定性研究是提高中药制剂质量的保证，是确保其有效性和安全性的重要基础。本研究影响因素试验表明，在强光照射 (4500±500) lx、高温 (60℃)、高湿 [相对湿度 (90±5)%] 环境下，在加速试验 [温度 (40±2)℃、相对湿度 (75±5)%]、长期留样试验 [温度 (25±2)℃、相对湿度 (60±10)%] 的环境下，延胡索总碱贴片中延胡索甲素、延胡索乙素、延胡索丑素的含量、贴片的 24 h 累计释放量以及黏附力与制备初

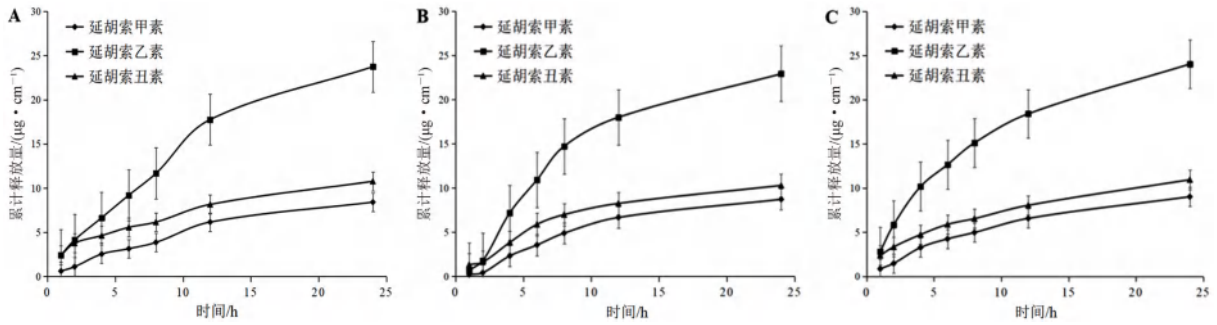


图 6 加速试验后的延胡索总碱贴片体外释放速率曲线图 ($n = 3$)

Fig 6 In vitro release rate curve of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patches after accelerated test ($n = 3$)

A. 加速 0 个月 (accelerated test for 0 month); B. 加速 3 个月 (accelerated test for 3 month); C. 加速 6 个月 (accelerated test for 6 month)

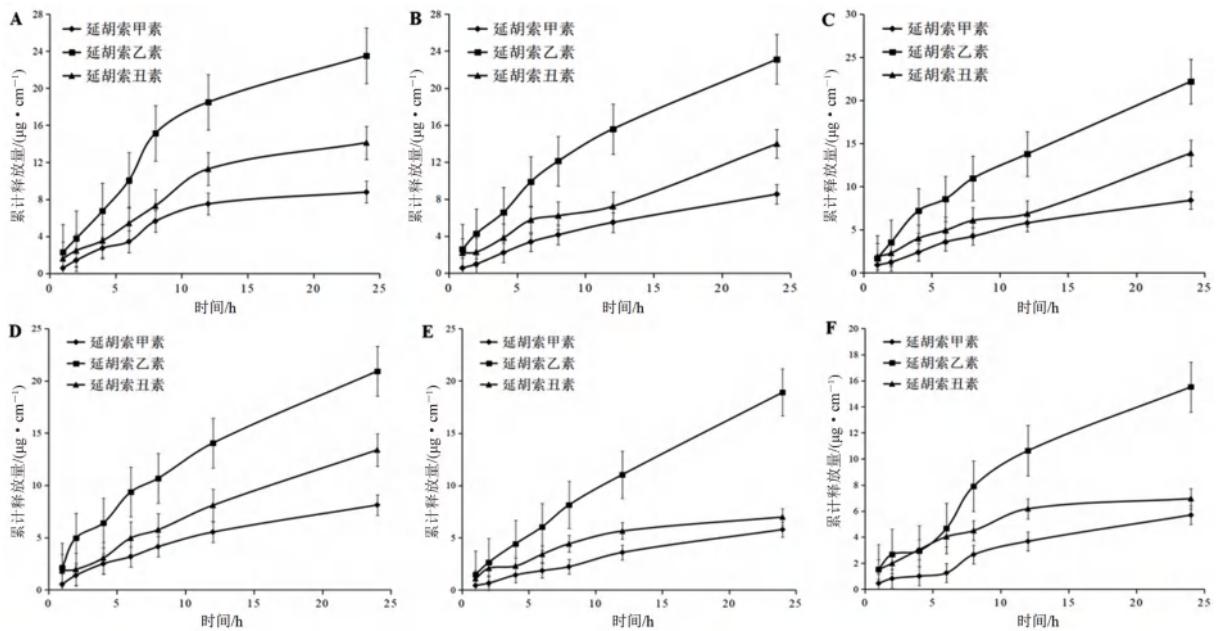


图 7 长期留样试验后的延胡索总碱贴片体外释放速率曲线图 ($n = 3$)

Fig 7 In vitro release rate curve of *Corydalis Rhizoma* total alkaloid patches after long-term retention test ($n = 3$)

A. 0 个月 (0 month); B. 3 个月 (3 month); C. 6 个月 (6 month); D. 9 个月 (9 month); E. 12 个月 (12 month); F. 18 个月 (18 month)

期相比差异无统计学意义, 表明延胡索总碱贴片具有较好的稳定性, 为今后确定该制剂的贮藏条件和有效期提供了参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 145-146.
 [2] 陈斯. 延胡索化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2021, 38 (7): 78-82.
 [3] 张天龙, 赵继荣, 陈祁青, 等. 延胡索化学成分及镇痛作用机制研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28 (5): 141-144.
 [4] 邵敬宝, 王群星, 石楠, 等. 延胡索总生物碱的急性毒性及其镇痛作用研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43 (10): 1156-1161.
 [5] 蔡梅超. 延胡索的化学成分及质量标准研究 [J]. 化工时刊, 2012, 26 (3): 45-46, 66.

[6] 林武霖, 王如伟, 孙柳燕. 延胡索质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42 (2): 409-412.
 [7] 吕子明, 孙武兴, 段绪红, 等. 延胡索化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (2): 235-237.
 [8] 姜明瑞, 王志成, 岳珠珠, 等. 延胡索总碱贴片经神阙穴与非穴位给药皮肤渗透性的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (19): 148-153.
 [9] 戴海韵. 药品稳定性在药品质量控制中的应用探析 [J]. 科技创新导报, 2015, 12 (14): 229.
 [10] 王弘, 刘饭阳, 张燕平. 药品稳定性实验研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15 (20): 1710-1715.
 [11] 王志成, 姜明瑞, 岳珠珠, 等. 延胡索总碱贴片安全性和对神经病理性疼痛大鼠镇痛作用研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32 (3): 336-341.
 [12] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 143.

(收稿日期: 2023-04-12; 修回日期: 2023-05-17)

基于保肝降酶作用的舒肝宁注射液相对生物活性测定法的建立与生物均一性评价

吴世豪¹, 张怡博¹, 李非凡¹, 刘张珍¹, 张昀², 朱金墙^{1*}, 何峰^{3*} (1. 天津中医药大学中医药研究院, 组分中药国家重点实验室, 天津市中药药理学重点实验室, 天津 301617; 2. 贵州瑞和制药有限公司, 贵州 550002; 3. 贵州医科大学, 贵州 550000)

摘要: **目的** 考察舒肝宁注射液 (SGN) 的保肝降酶退黄作用, 并基于保肝降酶作用, 以谷丙转氨酶 (ALT) 活性抑制率为指标建立 SGN 相对生物活性测定法, 评价其批内及批间的生物均一性。**方法** 采用 $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖 (LPS) 刺激人正常肝细胞 (L-O2) 12 h 建立体外急性肝损伤模型, 利用微板法考察 SGN 对谷草转氨酶 (AST)、ALT、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性和总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、丙二醛 (MDA) 含量的影响, 评价其保肝降酶退黄作用, 再通过考察 SGN 中 12 个主要成分 (黄芩苷、黄芩素、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、次黄嘌呤、L-亮氨酸、栀子苷、鸟苷、尿苷、腺苷、京尼平龙胆双糖苷) 对上述指标的影响, 筛选具有明显量效关系的成分与指标。通过可靠性检验筛选标准品和检测指标, 并标定效价, 按照“量反应平行线 (3, 3) 法”计算 SGN 保肝降酶生物活性相对效价, 并评价 SGN 批内和批间生物均一性。**结果** 与 Control 组比较, LPS 组 AST、ALT 活性明显增强, TBIL、DBIL、MDA 含量明显升高, GSH-Px 活性明显减弱; 与 LPS 组比较, SGN-M、SGN-H 组 AST、ALT 活性明显减弱, TBIL、DBIL、MDA 含量明显降低, GSH-Px 活性明显增强; SGN-L 组 TBIL、DBIL、MDA 含量明显降低。SGN 的 12 个成分中同时具有保肝降酶退黄作用的为黄芩苷和绿原酸, 并筛选出呈剂量依赖性的指标和成分。通过可靠性检验结果选择以 SGN 批次 (20210112) 为标准品, ALT 活性抑制率为检测指标, 建立基于保肝降酶作用的 SGN 生物活性测定法。利用“量反应平行线 (3, 3) 法”计算 SGN 保肝降酶生物活性相对效价, 同一批次 10 个不同 SGN (批次: 20210324) 保肝降酶生物效价在 95.6% ~ 111.9%; 不同批次的 9 个不同 SGN 保肝降酶生物效价在 95.6% ~ 103.8%。**结论** SGN 能减轻 LPS 诱导的 L-O2 细胞急性肝损伤, 改善肝功能, 降低胆红素及氧化应激水平, 从而发挥保肝降酶退黄作用。SGN 的 12 个主要成分中黄芩苷和绿原酸可以同时抑制 AST、ALT 活性, 降低 TBIL、DBIL、MDA 含量, 增强 GSH-Px 活性, 是其保肝降酶退黄的主要有效成分。建立的 SGN 生物活性测定方法精密度高、结果可靠, 可用于 SGN 生物学质量控制。

关键词: 舒肝宁注射液; 保肝降酶; 生物活性测定; ALT 活性抑制率; 生物均一性

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2861-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.007

Relative biological activity determination and biological homogeneity of Shuganning injection based on liver protection and enzyme reduction

WU Shi-hao¹, ZHANG Yi-bo¹, LI Fei-fan¹, LIU Zhang-zhen¹, ZHANG Yun², ZHU Jin-qiang^{1*}, HE Feng^{3*} (1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. Guizhou Ruihe Pharmaceutical Company Limited, Guizhou 550002; 3. Guizhou Medical University, Guizhou 550000)

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合成果 [2022] 一般 013)。

作者简介: 吴世豪, 男, 硕士, 主要从事中药药理药效及质量管理研究, email: wushihaolrc@163.com *通信作者: 朱金墙, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药防治心脑血管疾病的作用机制及药效物质基础研究、中药新药研究, email: zhujinqiang1860@163.com; 何峰, 男, 副教授, 主要从事中药药效物质基础及药动学研究, email: 838396231@qq.com

Abstract: Objective To determine the effect of Shuganning injection (SGN) on liver protection, enzyme and jaundice reduction, and based on liver protection and enzyme reduction, a relative biological activity assay of SGN was established with the inhibition rate of alanine aminotransferase (ALT) as the index to evaluate its biological uniformity within and between batches. **Methods** The acute liver injury lipopolysaccharide model was established by stimulating human normal hepatocytes (L-O2) with $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ lipopolysaccharide for 12 hours. The effect of SGN on aspartate aminotransferase (AST), ALT and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and the contents of total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL) and malondialdehyde (MDA) were determined by microplate method, and its effect on liver protection, enzyme and jaundice reduction was evaluated. The above indexes were detected from 12 components of SGN (baicalin, baicalein, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, hypoxanthine, L-leucine, geniposide, guanosine, uridine, adenosine, and genipin gentian disaccharide). The components and indexes with obvious dose-effect relationship were determined. The standard and detection indexes were screened by reliability test, and the titer was calibrated. The relative titer of SGN biological activity of liver protection and enzyme reduction enzyme was calculated according to the “parallel line of quantitative response (3, 3)”, and a method to measure SGN biological activity based on liver protection and enzyme reduction was established. The biological homogeneity within and between batches of SGN was evaluated. **Results** Compared with the control group, the activities of AST and ALT in the LPS group were much enhanced, the contents of TBIL, DBIL and MDA were greatly increased, the activity of GSH-Px weakened. Compared with the LPS group, the activities of AST and ALT in the SGN-M group and the SGN-H group were obviously weakened, the contents of TBIL, DBIL and MDA were reduced, and the activities of GSH-Px enhanced. The contents of TBIL, DBIL and MDA in the SGN-L group were decreased greatly. Baicalin and chlorogenic acid were among the 12 components of SGN to protect the liver, reduce the enzyme and eliminate jaundice at the same time. The indexes and components were screened out in a dose-dependent manner. Based on the reliability test, SGN batch 20210112 was selected as the standard, and the ALT activity inhibition rate was used as the detection index. The biological activity determination of SGN based on liver protection and enzyme reduction was established. The relative titer of SGN liver-protection and enzyme-reduction was calculated by “parallel lines of quantity responses (3, 3)”. The biological titer of 10 SGNs (batch number: 20210324) in the same batch ranged 95.6% ~ 111.9%. The biological potency of nine SGNs in different batches ranged 95.6% ~ 103.8%. **Conclusion** SGN can alleviate LPS-induced acute liver injury in L-O2 cells, improve the liver function, reduce bilirubin and oxidative stress levels, and reduce enzyme and jaundice levels. Baicalin and chlorogenic acid in the 12 main components of SGN can inhibit the activities of AST and ALT at the same time, reduce the contents of TBIL, DBIL and MDA, and enhance the activity of GSH-Px, which are the main effective components of SGN. With inhibition rate of ALT activity as the index, the SGN biological activity determination based on liver protection and enzyme reduction is precise and reliable, which can be used to control the biological quality of Shuganning injection.

Key words: Shuganning injection; liver protection and enzyme reduction; biological activity determination; ALT activity inhibition rate; biological homogeneity

舒肝宁注射液 (Shuganning injection, SGN) 是依据茵陈蒿汤加减而成的中药注射剂^[1], 主要成分为茵陈提取物、栀子提取物、灵芝提取物、板蓝根提取物和黄芩苷, 诸药配伍应用, 共奏保

肝护胆, 清热退黄之效^[2]。

质量控制是保障中药注射液安全有效的前提, 也是其质量评价研究的重要任务^[3]。SGN 成分较为复杂, 只有保证产品的质量一致性和临床

疗效一致性才能保证其安全性和有效性。目前基于化学基准的中药注射剂质量标准选择的成分不能反映中药注射剂的所有成分,且成分与疗效的相关性尚不清楚,这些方法侧重于检验中药注射剂的“真伪”,不足以反映中药注射剂的有效性^[4-7]。生物活性测定法是以药物的生物效应为基础,通过生物统计工具和特定的实验设计,测定药物有效性,从而控制药品质量的一种方法^[8]。以生物效价作为中药注射剂的质量评价指标已得到国内外认可。生物活性测定法分为生物效价测定法和生物活性限度测定法,一般优先选用前者^[9]。生物效价测定法应用于中药注射剂的质量控制将成为未来的发展趋势。

本研究采用脂多糖(LPS)刺激人正常肝细胞(L-O2)建立体外急性肝损伤模型,考察SGN的保肝降酶退黄作用;以SGN的保肝降酶作用为基础,选择谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)活性抑制率为检测指标,利用“量反应平行线(3,3)法”^[10]建立SGN的体外保肝降酶生物活性测定方法,测定其相对生物效价,用于其生物学质量控制,也为其他保肝降酶类注射剂的生物活性测定方法提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人正常肝细胞L-O2(北纳创联生物科技有限公司)。

1.2 试剂

SGN(贵州瑞和制药有限公司,批次分别为20210112,20210323,20210324,20210414,20210415,20210416,20210512,20210513,20210514);LPS(美国Sigma公司,批号:0000135218);黄芩苷(纯度:93.5%)、绿原酸(纯度:98%)、尿苷(纯度:98%)、腺苷(纯度:99%)、黄芩素(纯度:98%)、L-亮氨酸(纯度:98%)、次黄嘌呤(纯度:98%)、鸟苷(纯度:98%)、栀子苷(纯度:98%)(上海源叶生物科技有限公司),隐绿原酸(纯度:99%)、新绿原酸(纯度:98%)(成都曼斯特生物科技有限公司),京尼平龙胆双糖苷(纯度:98%,德思特生物科技有限公司)。磷酸缓冲液(PBS)、胎牛血清(以色列BI公司);青-链霉素、RPMI-1640培养基、0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司);MTT试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);CCK-8试剂盒(北仁化学科技有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒

(上海碧云天生物技术有限公司);谷草转氨酶(AST)、ALT、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司)。

1.3 仪器

CO₂恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司);多功能酶标仪(瑞士帝肯生物科技有限公司);低温高速离心机(德国艾本德股份公司);微型离心机(北京大龙兴创实验仪器股份公司);智能恒温培养振荡器(浙江欧诺机械有限公司);万分之一天平(北京欧信胜科技有限公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

L-O2细胞在含有10%胎牛血清和1%双抗(青霉素和链霉素)的RPMI-1640溶液中,于37℃、5%CO₂的培养箱内培养。

2.2 SGN有效剂量范围的确定

取对数生长期的L-O2细胞,按 8×10^4 个 \cdot mL⁻¹接种于96孔板中,培养24h后,将孔板中的完全培养基更换为含有120 μ g \cdot mL⁻¹LPS和不同质量浓度SGN(10、20、40、80、160、320、640、1280 μ g \cdot mL⁻¹)的RPIM-1640培养液,同时设置Control组和LPS组,每组6个复孔,置于培养箱中继续培养12h。按照MTT试剂盒说明书操作,在570nm波长处检测吸光度值,并计算细胞活力,确定SGN有效剂量范围。

2.3 实验分组

将细胞分为以下5组:Control组(RPIM-1640),LPS组(含120 μ g \cdot mL⁻¹LPS的RPIM-1640),SGN-L组(含120 μ g \cdot mL⁻¹LPS+80 μ g \cdot mL⁻¹SGN的RPIM-1640),SGN-M组(含120 μ g \cdot mL⁻¹LPS+160 μ g \cdot mL⁻¹SGN的RPIM-1640),SGN-H组(含120 μ g \cdot mL⁻¹LPS+320 μ g \cdot mL⁻¹SGN的RPIM-1640)。

2.4 考察SGN保肝降酶退黄作用

取对数生长期的L-O2细胞,按 8×10^4 个 \cdot mL⁻¹接种至96孔板中,按照“2.3”项下方法分组处理。收集各组细胞培养基的上清液,按照各试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪测定各组吸光度值,计算培养上清中AST、ALT、GSH-Px活性和TBIL、DBIL、MDA含量。并计算相对于LPS组,不同浓度SGN的AST、ALT活性抑制率,TBIL、DBIL、MDA含量降低率和GSH-Px活性增强率。

2.5 考察 SGN 中 12 个成分保肝降酶退黄作用

取对数生长期的 L-O2 细胞, 按 8×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种至 96 孔板中, 按“2.4”项下方法考察 SGN 中 12 个成分 (L-亮氨酸、次黄嘌呤、黄芩苷、黄芩素、京尼平龙胆双糖苷、绿原酸、鸟苷、尿苷、腺苷、新绿原酸、隐绿原酸、栀子苷) 对细胞活力及 AST、ALT、GSH-Px 活性和 TBIL、DBIL、MDA 含量的影响。

2.6 筛选 SGN 生物活性测定法标准品

根据 1431 生物检定统计法, 将 SGN 的 12 个成分中量效关系较好的指标与 SGN (批次: 20210112) 中量效关系较好的指标进行可靠性检验^[11], 利用 Microsot Excel 2000 软件, 将可靠性检验模板输入 Excel 表格中^[12], 利用“量反应平行线 (3, 3) 法”随机区组设计, 即 S (标准品) 和 T (供试品) 各设 3 个剂量组, 且相邻高低剂量组的比值 (r) 相等, 本实验 $r = 1 : 0.5$, 各剂量组反应个数 $n = 6$, 考察标准品与供试品间的试品间、回归、偏离平行、二次曲线、反向二次曲线、剂间和行间的差异, 即考察系统适用性和样品适用性。要求在所用剂量范围内, 对数剂量与反应 (或反应的函数) 呈直线关系, 供试品与标准品的直线满足平行性要求, 将符合要求者作为 SGN 的标准品。

2.7 筛选 SGN 生物活性测定法检测指标

以 SGN (批次: 20210112) 为标准品, SGN (批次: 20210324) 为供试品, 通过可靠性检验确定检测指标, 建立以 ALT 活性抑制率为检测指标, 基于保肝降酶作用的 SGN 生物活性测定法。

2.8 方法学考察

根据 2020 年版《中国药典》9401 生物制品生物活性/效价测定方法验证指导原则^[13], 以 SGN (批次: 20210112) 为标准品, SGN (批次: 20210324) 为供试品, 对基于保肝降酶作用的 SGN 生物活性测定方法进行方法学验证, 包括对相对准确度, 中间精密度, 重复性, 线性试验的考察。

2.9 不同批次和同一批次不同 SGN 保肝降酶生物效价的测定

以 SGN (批次: 20210112) 为标准品, 根据生物检定统计法中简化概率单位法, 定义该标准品效价为 $1000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按照上述建立的方法对同一批次的 10 个不同 SGN (批次: 20210324) 及 9 个不同批次的 SGN 进行对比检定, 再进行可靠性检验。

根据美国药典 1033 和 1034, 相对效价值的可接受标准为 $80\% \sim 120\%$ ^[11], 在此范围内认为产品的生物均一性良好。

2.10 统计学分析

生物效价使用 Microsot Excel 2000 办公软件计算^[12], 各组数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据采用单因素方差分析 (ANOVA) 检验, 应用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 SGN 有效剂量范围的确定

3.1.1 不同浓度 SGN 对 LPS 损伤后 L-O2 细胞活力的影响 与 Control 组比较, LPS 组细胞活力明显降低; 与 LPS 组比较, 80、160、320 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ SGN 可显著提高细胞活力, 见图 1。

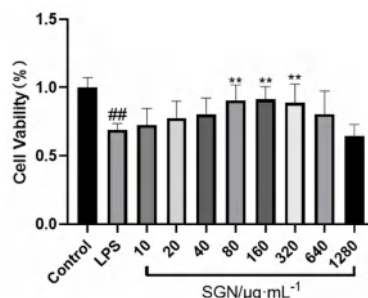


图 1 不同浓度 SGN 对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 1 Effect of SGN with different concentrations on the cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

注: 与 Control 组比较, ## $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ** $P < 0.01$ 。

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

3.1.2 不同浓度 SGN 对 L-O2 细胞上清液中 LDH 活性的影响 与 Control 组比较, LPS 组 LDH 活性明显提高; 与 LPS 组比较, 80、160、320 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ SGN 可明显降低 LDH 活性, 见图 2。因此, 选择 80、160、320 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为 SGN-L、SGN-M、SGN-H 进行后续实验。

3.2 SGN (批次: 20210112) 的保肝降酶退黄作用

与 Control 组比较, LPS 组 AST、ALT 活性、TBIL、DBIL、MDA 含量均显著升高, GSH-Px 活性显著降低; 与 LPS 组比较, 160、320 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ SGN 可显著降低 AST、ALT 活性和 TBIL、DBIL 含量, 升高 GSH-Px 活性, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ SGN 可显著降低 TBIL、DBIL 含量, 见图 3。

3.3 SGN 中 12 个成分保肝降酶退黄作用

结果显示, 呈剂量依赖性的指标分别是黄芩苷对 ALT、GSH-Px 活性和 DBIL 含量的影响; L-亮氨酸、次黄嘌呤对 DBIL 含量的影响; 黄芩素、

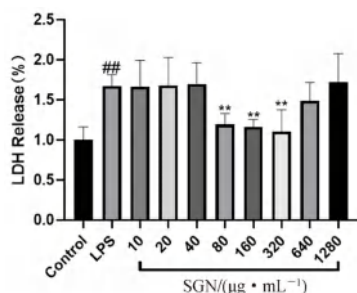


图 2 不同浓度 SGN 对 LPS 作用细胞 12 h 后 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 2 Effect of different concentrations of SGN on the LDH activity after 12 hours of LPS treatment ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

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

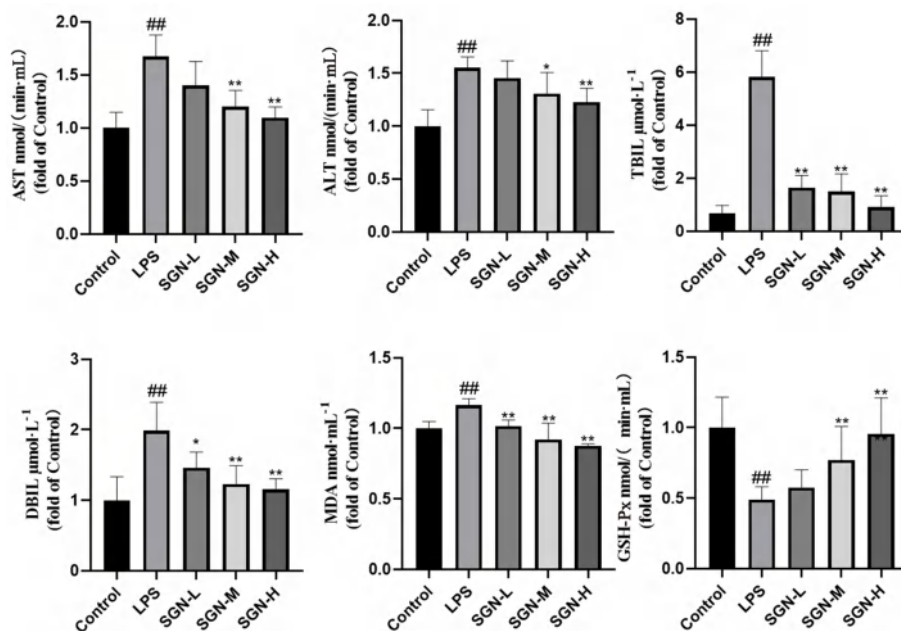


图 3 不同浓度 SGN (批次: 20210112) 对细胞上清液中 AST, ALT, GSH-Px 活性以及 TBIL, DBIL, MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 3 Effect of different concentrations of SGN (Lot: 20210112) on the activities of AST, ALT, GSH-Px and the contents of TBIL, DBIL, MDA in cell supernatant ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与 Control 组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Control group, ^{##} $P < 0.01$; compared with the LPS group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

(20210112) 为标准品, SGN (20210324) 为供试品, 并进行可靠性检验。可靠性检验结果显示只有基于 ALT 活性抑制率的生物活性测定可以通过可靠性检验, 见表 1。表明标准品 (S) 和供试品 (T) 是两条平行直线, 可以通过“量反应平行线 (3, 3) 法”计算相对生物效价, 因此建立以保肝降酶作用为基础的 SGN 相对生物效价测定方法。

3.5 方法学考察

3.5.1 相对准确度 结果表明不同效价水平相对偏倚均在 $\pm 12\%$ 范围内, 见表 2。以效价理论值的对数 (横坐标) 对其相应的效价测定值的

京尼平龙胆双糖苷、鸟苷、新绿原酸、隐绿原酸对 TBIL 含量的影响; 尿苷对 AST、GSH-Px 活性和 TBIL 含量的影响; 腺苷对 ALT 活性的影响; 栀子苷对 GSH-Px 活性和 TBIL 含量的影响。

3.4 SGN 生物活性测定法标准品和检测指标的确立

根据上述结果, 假设以呈剂量依赖性的成分为该指标的标准品, SGN (批次: 20210112) 为供试品, 进行可靠性检验。可靠性检验结果应为试品间差异显著, 回归和剂间差异非常显著, 偏离平行、二次曲线、反向二次曲线和行间差异不显著。结果显示, 所有成分均不能通过可靠性检验。因此选择保肝降酶退黄作用较好的 SGN 批次

对数 (纵坐标) 进行线性回归, 回归方程为 $y = 0.9748x - 0.02967$ 。斜率 0.9748 在 0.80 ~ 1.25, 相关系数为 0.99995。

3.5.2 中间精密度 结果表明每个效价水平 (25% ~ 100%) 相对效价测定值的几何变异系数分别为 6.06%, 5.09%, 4.01%。

3.5.3 重复性 结果表明 25% ~ 100% 效价水平测得结果均通过可靠性检验, 相对生物效价均值为 1032.19, RSD 为 5.2%, 该方法重复性较好。

3.6 SGN 的保肝降酶相对生物效价测定及均一性评价

表 1 不同检测指标的可靠性检验结果

Tab 1 Reliability test of different testing indicators

指标	变异来源						
	试品间	回归	偏离平行	二次曲线	反向二次曲线	剂间	行间
AST	不显著	非常显著	显著	不显著	不显著	非常显著	不显著
ALT	不显著	非常显著	不显著	不显著	不显著	非常显著	不显著
TBIL	显著	不显著	不显著	不显著	不显著	不显著	不显著
DBIL	不显著	非常显著	不显著	不显著	不显著	非常显著	非常显著
GSH-Px	显著	非常显著	不显著	不显著	不显著	非常显著	不显著
MDA	不显著	非常显著	显著	不显著	不显著	非常显著	不显著

表 2 基于 ALT 活性抑制率 SGN 保肝降酶生物活性测定结果

Tab 2 Determination of SGN's biological activity of protecting liver and reducing enzyme based on the ALT activity inhibition rate

效价水平 /%	对数效价			效价			相对偏倚		
	平均值	置信下限	置信上限	平均值 /%	置信下限 /%	置信上限 /%	平均值 /%	置信下限 /%	置信上限 /%
25	-1.3748	-1.4205	-1.3363	25.2	24.2	26.3	1.0	-3.36	5.13
50	-0.7107	-0.7462	-0.6751	49.2	47.5	50.9	-1.6	-5.16	1.81
100	-0.0270	-0.0551	0.0011	97.4	94.7	100.1	-2.6	-5.36	0.11

同一批次的 10 个不同 SGN (批次: 20210324), 全部通过可靠性检验, 其保肝降酶生物效价相对效价值范围为 95.6% ~ 111.9%, 均在 80% ~ 120%^[11], 表明生物均一性较好。

以不同批次的 9 个 SGN 全部通过可靠性检验, 其保肝降酶生物效价相对效价值范围为 95.6% ~ 103.8%, 均在 80% ~ 120%, 表明所选 SGN 生物均一性较好。

4 讨论

建立有效的中药注射剂的质量评价方法对于中药现代化发展至关重要。具有药效相关、整体可控等技术优势并且符合中医药特点的生物评价模式已成为中药质量标准化的重要发展方向^[14]。目前, 生物活性测定法已经用于多种注射剂的生物质量控制^[15-17]。SGN 广泛用于治疗急慢性病毒性肝炎、药物性肝炎、胆汁淤积性肝炎、肝硬化和肝功能衰竭等肝脏疾病, 具有清热解毒、利湿退黄、益气扶正和保肝护肝的功效^[18], 但缺乏有效的生物质量控制方法。本研究建立了 SGN 保肝降酶作用生物活性的测定方法, 并评价其批间和批内生物均一性, 可用于其生物学质量控制, 也为其他保肝降酶类注射剂的生物活性测定方法提供参考。

生物活性测定法的建立首先以注射剂的生物效应为基础, 筛选与药物功效相关的指标, 建立合适的药理实验方法学, 然后选择相应的标准品, 进行可靠性检验, 最后通过方法学考察进行验证^[19]。因此, 笔者认为生物活性测定法的建立主要需要解决以下几个问题: ① 药理实验方法的选择, 即“怎么比”的问题; ② 标准品的选择,

即“和谁比”的问题; ③ 检测指标的选择, 即“比什么”的问题。

药理实验方法是建立在药物药效基础上的, 选择生物活性测定法的基本原则包括检测指标灵敏度高、检测结果重现性好、实验操作简便^[20]。本研究以 SGN 的保肝降酶退黄作用为基础, 采用 LPS 诱导 L-O2 细胞建立体外急性肝损伤模型, 利用微板法考察 SGN 对 AST、ALT、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响评价其保肝降酶作用, 考察 SGN 对 TBIL、DBIL 含量的影响评价其退黄作用。结果显示, SGN 可以明显抑制 AST、ALT 活性, 增强 GSH-Px 活性, 降低 TBIL、DBIL、MDA 含量, 且呈剂量依赖性, 说明 SGN 具有较好的保肝降酶退黄生物活性。因此, 针对每个指标都需要确立一个标准品, 进行相对生物效价测定。

在中药注射剂生物效价测定法建立过程中, 标准品的选择至关重要, 它决定了最终测定的中药注射剂效价的可信性^[21]。李寒冰等^[22]参考国际标准品的通行原则, 总结出中药标准品的选择应该遵循同质性、代表性、均一性、稳定性和可延性原则。根据该原则, 目前标准品的选择范围主要是中药注射剂有效单体、中药注射剂自身及生物活性相似的中药注射剂^[23-25]。本研究通过考察 SGN 中 12 个成分与 AST、ALT、GSH-Px 活性和 TBIL、DBIL、MDA 含量的量效关系, 筛选出具有剂量依赖性的成分和指标, 但是通过可靠性检验和统计分析, 12 个成分都不能作为 SGN 保肝降酶退黄生物活性测定中的标准品^[25]。因此选择实验结果中保肝降酶退黄作用较好的 SGN

(20210112) 批次作为标准品^[24], 然而该标准品的选择可延性较差, 在实际生产操作中, 应注意其保质期限, 选择合适的中药注射剂批次进行研究。

本研究以 SGN (20210112) 作为标准品, SGN (20210324) 作为供试品, 考察 6 个指标的量效关系, 并通过可靠性检验, 得标准品和供试品符合平行线性关系的指标只有反映保肝降酶作用的指标——ALT 活性抑制率, 因此将其作为评价 SGN 保肝降酶生物活性指标。

本研究所建立的 SGN 保肝降酶生物活性测定法具有操作简单、结果稳定等优点。该方法建立在 SGN 保肝降酶生物活性的基础上, 比较直观地反映了药物的生物活性, 为其质量控制进行了补充。但是 SGN 作为一种中药注射液, 其功效不仅是保肝降酶作用, 还具有清热解毒、利湿退黄和益气扶正的作用, 因此可以根据这 3 个功效选择合适的药理实验和检测指标, 并选择与其同质的标准品设计实验, 进一步完善 SGN 的生物学质量控制。

参考文献

- [1] 梁海雄. 舒肝宁注射液治疗病毒性肝炎研究进展[J]. 大众科技, 2015, 17(12): 62-63.
- [2] 赵璐, 曾南, 刘晓帅, 等. 舒肝宁注射液对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2007, 132(6): 65-67.
- [3] 张波, 辛杰, 刘言娟, 等. 生物检定法在中药质量评价中的应用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(23): 6264-6270.
- [4] 李小锦, 黄莹莹, 杨珍, 等. 基于效应基准的中药质量生物标志物研究策略[J]. 药学报, 2019, 54(2): 204-210.
- [5] Hao HP, Cui N, Wang GJ, et al. Global detection and identification of nontarget components from herbal Preparations by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry and a strategy[J]. Anal Chem, 2008, 80(21): 8187-8194.
- [6] Fu HY, Fu WQ, Sun MJ, et al. Kinetic cellular phenotypic profiling: prediction, identification, and analysis of bioactive natural products[J]. Anal Chem, 2011, 83(17): 6518-6526.
- [7] 梁佳威, 黄佳雯, 万梅绪, 等. 基于生物活性测定的注射用丹参多酚酸质量控制方法研究[J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2408-2413.
- [8] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 155-168.
- [9] 王帅, 包永睿, 李天娇, 等. 中药质量评价关键问题与分析方法探讨[J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 132-138.
- [10] 周海钧. 药品生物检定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 127.
- [11] USP 41-NF 36. <1034> analysis of biological assays[S]. 2015: 6818.
- [12] 颜栋林. 应用 Excel 建立抗生素效价测定生物统计表[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(2): 143-147.
- [13] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 530-535.
- [14] 赵云生, 谢丽霞, 毛福英, 等. 基于平喘生物效价的麻黄品质评价研究[J]. 中草药, 2015, 46(24): 3695-3703.
- [15] 张宇航, 杨静, 吴宿慧, 等. 基于抗凝血活性的丹红注射液生物效价测定方法的建立[J]. 中草药, 2022, 53(8): 2348-2355.
- [16] 王碧松. 生物活性测定法用于活血化瘀类中药注射剂质量控制的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
- [17] 娄天宇, 李瑞吉, 刘金辉, 等. 基于体外抗血小板聚集活性的丹参注射液生物活性测定法[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(6): 875-879.
- [18] 于乐成, 程明亮. 舒肝宁注射液治疗急性和慢性肝病专家共识(2020 版)[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020, 14(5): 353-360.
- [19] 肖贵南, 李瑾翡, 陈浩桢. 生物活性测定在中药质量控制中应用的可行性及研究思路[J]. 中药材, 2008, 31(4): 473-475.
- [20] 游云, 廖福龙, 黄璐琦. 基于生物活性测定开展中药质量控制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 452-456.
- [21] 郭玉东, 王志斌, 周建平, 等. 中药生物活性测定法中标准品建立的研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(4): 706-708, 715.
- [22] 李寒冰, 鄢丹, 曹俊岭, 等. 中药生物效价检测用对照品的选择与标化[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 363-365.
- [23] 娄天宇, 梁耀月, 马贝贝, 等. 丹参注射液生物活性测定方法学研究[A]// 中国药理学学会药检药理专业委员会第十六届(2019 年)学术年会论文集[C] 2019: 216-221.
- [24] 郭玉东, 胡宇驰, 曹春然, 等. 舒肝宁注射液体外抑制血小板聚集的生物活性测定法[J]. 中成药, 2014, 36(5): 1008-1012.
- [25] 韩冰, 毛鑫, 韩淑娴, 等. 基于抑制血小板聚集活性检测的血栓通胶囊质量控制研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23): 4597-4602.

(收稿日期: 2023-03-30; 修回日期: 2023-05-02)

清热消炎宁片对幼龄大鼠的安全性评价

扶丽君, 赵莉, 王衡新* (天地恒一制药股份有限公司, 长沙 410331)

摘要: **目的** 评价清热消炎宁片(QRXYN)对幼龄SD大鼠发育的影响及其毒性反应,为儿童临床用药提供参考。**方法** 选取出生后第21日幼龄SD大鼠120只,随机分为空白对照组和QRXYN高、中、低剂量给药组,每日按26.5、51.5、102.9 g生药·kg⁻¹连续灌胃给予QRXYN 6周,并设停药恢复期5周。评价药物对幼龄大鼠常规毒性指标和生长发育、骨骼发育、行为学、免疫系统等指标的影响。**结果** QRXYN各剂量组对幼龄SD大鼠体重、摄食量、性征发育、行为学、血液学、血液生化学、眼科、生长激素、骨骼系统发育、免疫学、组织病理学等指标均未见明显毒性影响,仅幼龄大鼠尿常规指标可见剂量相关性的异常变化,停药5周恢复正常,考虑与QRXYN本身的理化性质有关,临床应用时可重点监测尿常规,以保护受试者的用药安全。**结论** 清热消炎宁片未见明显毒性,最大无毒性反应剂量(NOAE)为102.9 g生药·kg⁻¹,约为儿童临床剂量的59倍(按体重计算)。

关键词: 幼龄大鼠; 安全性评价; 清热消炎宁片

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2868-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.008

Safety evaluation of Qingre Xiaoyanning tablets in juvenile rats

FU Li-jun, ZHAO Li, WANG Heng-xin* (Hinye Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410331)

Abstract: Objective To evaluate the effect and toxicity of Qingre Xiaoyanning tablets (QRXYN) in juvenile rats, and to provide reference for clinical medication in children. **Methods** Totally 120 juvenile SD rats 21 days old were randomly divided into a blank control group and high, medium, low-dose groups of QRXYN at 26.5, 51.5, and 102.9 g·kg⁻¹ qd lasting 6 weeks respectively. A recovery period of 5 weeks was set for drug withdrawal. The growth development, skeletal development, behavioral testing, immune system and other indicators were evaluated. **Results** Each dose of QRXYN had no significant toxic effect on the weight, food intake, sexual development, behavior, hematology, serum biochemistry, ophthalmology, growth hormones, sex hormones, skeletal system development, immunology, histopathology, or other indicators of juvenile SD rats. Only the urine routine indicators of juvenile rats showed dose-related abnormal changes, and returned to normal after 5 weeks of drug withdrawal, which might be related to the physical and chemical properties of QRXYN. **Conclusion** In clinical application, it is important to focus on monitoring the urine routine to protect the medication safety of the subjects. QRXYN have no obvious toxic effect on juvenile SD rats, and the no observed adverse effect level (NOAEL) is 102.9 g·kg⁻¹, equivalent to 59 times the clinical dose of children (calculated by body mass).

Key words: juvenile rat; safety evaluation; Qingre Xiaoyanning tablet

清热消炎宁片(QRXYN)为已上市品种,功效为清热解毒、消炎止痛、舒筋活络,适用人群为成人。处方由单味药九节茶组成,九节茶在我国民间应用历史悠久,应用范围广泛,在保健

品、化妆品、药茶中都有应用,具有清热解毒、抗菌消炎、活血止痛的功效^[1],主要用于治疗肺炎、风湿疼痛、急性胃溃疡、细菌性痢疾、跌打损伤及骨折等^[2-4]。九节茶为药食同源品种,安

基金项目: 湖南省重点研发计划(No.2023SK2080); 湖南省重点研发计划(No.2023SK2080)。

作者简介: 扶丽君,女,硕士,主要从事中药药理毒理研究, email: Pharma.CM@hinye.com *通信作者: 王衡新,男,硕士研究生导师,高级工程师,主要从事中药制药研究, email: wanghx@hinye.com

全性高,推测其可用于儿童,缓解儿童用药短期现状,但尚未有其儿童及幼龄动物安全性方面的相关报道,为新增 QRXYN 儿童适用人群,规范其儿童临床应用,故开展 QRXYN 幼龄大鼠安全性评价研究。本研究通过 QRXYN 对幼龄大鼠常规毒性、生长发育、骨骼发育、行为学、性发育、免疫系统等指标的影响,系统评价 QRXYN 对幼龄大鼠重复给药的毒性靶器官或靶组织,为儿童临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 母鼠连同其分娩仔鼠,其中母鼠 13 只,体重 359.5 ~ 494.8 g,仔鼠 13 窝,每窝 10 只,体重 22.4 ~ 33.6 g,雌雄各半,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004;质量合格证号:430727211102278014。动物检疫和适应环境饲养 10 d,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2020-0015。实验期间环境温度 20 ~ 26 °C,相对湿度 40% ~ 70%。

1.2 试药

QRXYN [批号:090210606,天地恒一制药股份有限公司,成人临床剂量:一次 3 ~ 6 片,一日三次,规格:每片含 3.7 g 生药,1 g 干膏粉含 9.8 g 生药(清热消炎宁片的浸膏粉中间体),棕褐色粉末状,受试物临用前用纯水配制成所需浓度]。

血液学检验试剂(批号:2021072603,迈瑞南京生物技术有限公司),尿液检验试剂(批号:202107188,艾康生物技术有限公司);凝血检验试剂(批号:2001463,上海太阳生物技术有限公司),生化检验试剂(批号:201223,迈克生物股份有限公司);免疫细胞检测相关试剂盒(批号:11/2021,江苏酶免实业有限公司)。

1.3 仪器

PL203 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];B203LED 型生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);LABOSPECT003 型自动生化分析仪(日本日立);PL-1000A 型电解质分析仪(南京普朗);CS-1300 自动血凝分析仪(希森美康);Spectra Max i3x 型多功能酶标(上海美谷分子);UA-66 型尿液分析仪(深圳迈瑞);TP1020 型全自动脱水机、RM2235 型石蜡切片机、EG1150H + C 型组织包埋机、AutoStainer XL 自动载玻片染色机 + CV5030 自动盖片机(德国 Leica)。

2 方法

2.1 动物分组

选用检疫合格的 21 日龄(PND₂₁)幼龄 SD 大鼠 120 只,体重 45.1 ~ 63.5 g,检测其发育情况(下门齿萌出、睁眼、张耳)和神经反射指标(空中翻正反射、听觉惊愕反射、负向趋地性反射)均合格。根据按性别体重采用区段随机方法分组,分别为空白对照组,QRXYN 高、中、低剂量组,每组 30 只,雌雄各半。

2.2 剂量设计及给药方式

QRXYN 临床每日最大拟用剂量为 66.6 g 生药,根据体表面积计算 2 岁儿童等效剂量为 1.73 g 生药 · kg⁻¹(2 岁儿童体重以 15 kg 计),药物给予幼龄大鼠 26.5、51.5、102.9 g 生药 · kg⁻¹,分别约相当于人临床拟用剂量的 15、29、59 倍(按体重计)。灌胃给药,首次给药为 PND₂₁ 幼龄大鼠,每日给药 1 次,连续给药 6 周(43 d),同时设空白对照组(纯水),给药体积均为 15 mL · kg⁻¹。

2.3 观察及检测指标

一般临床观察(每日):行为活动、精神状况、外观、体征、呼吸分泌物、粪便性状、摄食量、死亡情况、体重(每周测 1 次);给药期第 6 周、恢复期第 5 周进行以下指标检查:生长发育指标检测(睾丸下降、包皮分离、阴道张开情况);行为学指标检测(检测自主活动指标、转棒);尿液检查、眼科检查、血液学检查、生化检查、激素检查、肝药酶检查、血清球蛋白指标;骨髓检查、骨密度检查、胫骨长度检测;脏器系数、组织病理学检查。

2.4 统计方法

采用 SPSS 23.0 进行统计分析。计量资料采用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,选用单因素方差分析(ANOVA)和非参数检验进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验。统计结果以 $\alpha = 0.05$ 为检验界限, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般临床观察

在给药期与恢复期 QRXYN 各剂量组对大鼠的外观体征、行为活动、分泌物、粪便及动物的一般状况未见明显影响。体重与摄食量分别与同期空白对照组比较,差异无统计学意义。

3.2 眼科检查

QRXYN 各剂量组及空白对照组眼科检查均未见明显异常。

3.3 尿液检查

如表 1 所示, 给药末期 QRXYN 部分剂量组动物尿液 pH、SG、KET、BIL、尿液颜色、

PRO 与同期空白对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。在恢复期, 各指标均恢复正常。

表 1 QRXYN 对幼龄大鼠尿液指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Effect of QRXYN on urine indexes in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	阶段	动物数	pH	尿比重 (SG)	尿蛋白 (PRO)					尿酮体 (KET)					
					-	±	+	++	+++	P 值	-	±	+	++	P 值
空白对照组	给药末期	30	8.4±0.5	1.023±0.006	17	7	5	1	0	-	25	5	0	0	-
	恢复期	10	7.5±1.0	1.025±0.006	3	2	4	1	0	-	5	3	2	0	-
QRXYN 低剂量组	给药末期	30	8.9±0.2**	1.028±0.004**	3	11	11	4	1	< 0.001	6	18	5	1	< 0.001
	恢复期	10	7.7±0.9	1.023±0.006	2	2	2	3	1	-	7	0	2	1	-
QRXYN 中剂量组	给药末期	30	8.7±0.7**	1.030±0.001**	7	13	7	3	0	0.127	3	21	6	0	< 0.001
	恢复期	10	7.0±1.0	1.027±0.005	1	2	5	2	0	-	5	3	1	1	-
QRXYN 高剂量组	给药末期	30	8.8±0.3**	1.030±0.001**	10	13	7	0	0	1	0	27	3	0	< 0.001
	恢复期	10	7.6±1.4	1.020±0.008	4	0	3	3	0	-	7	2	1	0	-

组别	阶段	动物数	pH	SG	胆红素 (BIL)					颜色			
					-	+	++	+++	P 值	淡黄色	黄色	棕色	P 值
空白对照组	给药末期	30	8.4±0.5	1.023±0.006	27	2	1	0	-	30	0	0	-
	恢复期	10	7.5±1.0	1.025±0.006	7	2	1	0	-	10	0	0	-
QRXYN 低剂量组	给药末期	30	8.9±0.2**	1.028±0.004**	10	10	4	6	< 0.001	10	20	0	< 0.001
	恢复期	10	7.7±0.9	1.023±0.006	6	0	4	0	-	10	0	0	-
QRXYN 中剂量组	给药末期	30	8.7±0.7**	1.030±0.001**	9	12	5	4	< 0.001	15	9	6	< 0.001
	恢复期	10	7.0±1.0	1.027±0.005	3	6	1	0	-	10	0	0	-
QRXYN 高剂量组	给药末期	30	8.8±0.3**	1.030±0.001**	14	8	6	2	0.009	12	13	5	< 0.001
	恢复期	10	7.6±1.4	1.020±0.008	6	1	2	1	-	10	0	0	-

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note: vs the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.4 血液学检查

如表 2 所示, 给药末期, QRXYN 低剂量组平均红细胞容积 (MCV) 与同期空白对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 恢复期, 高剂量组单核细胞百分数 (Mon) 与同期空白对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但无明显量效关系。

3.5 血液生化及电解质检查

如表 3 所示, QRXYN 部分剂量组给药末期谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总蛋白 (TP)、肌酸激酶 (CK)、三酰甘油 (TG)、葡萄糖 (GLU)、钠离子 (Na^+)、钙离子 (Ca^{2+}) 及恢复期总胆红素 (TBIL)、肌酐 (CRE)、氯离子 (Cl^-)、钙离子 (Ca^{2+}) 与同期空白对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但无明显剂量依赖关系。

3.6 胫骨长度、身长尾长变化情况

如表 4 所示, 给药末期及恢复期 QRXYN 各剂量组与空白对照组相比胫骨长度无统计学差异。给药 14 d, 低剂量组尾长及高剂量组身长与同期

空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 给药末期及恢复期正常, 无剂量时间依赖关系。

3.7 幼龄大鼠发育指标情况

3.7.1 睾丸下降、包皮分离与阴道张开的检测
如表 5 所示, QRXYN 各剂量组的雄性幼龄大鼠睾丸下降指标日数, 与同期空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但无剂量时间依赖关系。QRXYN 各剂量组的雄性幼龄大鼠包皮分离指标、雌性动物阴道张开指标与同期空白对照组比较, 差异无统计学意义。

3.7.2 雄鼠生殖能力及雌鼠动情周期的检测
与空白对照组比较, QRXYN 各剂量组对幼龄雄性大鼠的生殖能力、雌性大鼠动情周期差异均无统计学意义, 数据未列出。

3.8 幼龄大鼠行为学指标情况

与空白对照组比较, QRXYN 各剂量组动物自主活动时间、活动次数、活动距离、协调性转棒跌落次数差异均无统计学意义, 数据未列出。

3.9 肝药酶、免疫系统及激素指标

由表 6 可知, QRXYN 部分剂量组给药末期

表 2 QRXYN 对幼龄大鼠血液学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of QRXYN on hematology in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	阶段	动物数	白细胞 (WBC) / 中性粒细胞百分数 (Neu) / % 淋巴细胞百分数 (Lym) / % 单核细胞百分数 (Mon) / %				红细胞 (RBC) / 血红蛋白 (HGB) / (g·L ⁻¹)	
			(×10 ⁹ ·L ⁻¹)				(×10 ¹² ·L ⁻¹)	
空白对照组	给药末期	20	8.46±2.61	11.8±6.0	83.1±6.9	4.0±1.6	7.14±0.27	150±5
	恢复期	10	8.15±1.86	14.8±12.3	78.4±13.4	5.1±1.2	7.88±0.63	155±7
QRXYN 低剂量组	给药末期	20	8.57±2.19	11.5±4.4	83.8±5.2	3.7±1.0	7.22±0.34	149±4
	恢复期	10	7.84±2.24	14.5±6.0	79.9±6.4	3.9±1.1	7.73±0.51	153±5
QRXYN 中剂量组	给药末期	20	7.63±2.35	13.2±6.8	81.7±7.0	4.0±1.3	7.12±0.29	148±7
	恢复期	10	6.90±1.96	17.4±5.2	76.9±5.6	4.2±1.5	7.56±0.59	151±7
QRXYN 高剂量组	给药末期	20	8.35±2.09	14.3±8.5	80.7±8.8	4.0±1.2	7.28±0.33	151±6
	恢复期	10	7.14±2.10	16.0±4.8	78.8±5.2	3.9±0.7*	7.59±0.63	151±8

组别	阶段	动物数	平均红细胞	平均血红蛋白	血红蛋白浓度	血小板 (PLT) /	网织红细胞百分
			容积 (MCV) / fL	含量 (MCH) / pg	(MCHC) / (g·L ⁻¹)	(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	数 (RET) / %
空白对照组	给药末期	20	59.4±1.3	21.0±0.6	354±5	1087±104	1.59±0.66
	恢复期	10	55.0±2.4	19.7±0.9	358±5	1081±149	1.59±0.77
QRXYN 低剂量组	给药末期	20	58.1±2.1*	20.6±0.8	355±7	1108±75	1.75±0.59
	恢复期	10	55.5±1.6	19.9±0.7	359±6	1058±111	1.21±0.52
QRXYN 中剂量组	给药末期	20	58.9±1.4	20.8±0.5	354±4	1020±87	1.78±0.67
	恢复期	10	55.6±1.8	20.1±0.8	361±6	1075±115	1.78±0.85
QRXYN 高剂量组	给药末期	20	58.6±1.8	20.8±0.7	354±5	1035±125	1.58±0.75
	恢复期	10	55.5±1.9	20.0±0.8	360±6	1166±149	1.75±0.62

注: 与空白对照组比较, *P < 0.05。

Note: vs the blank control group, *P < 0.05.

表 3 QRXYN 对幼龄大鼠血液生化及电解质指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of QRXYN on serum biochemistry and electrolyte indexes in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	阶段	动物数	谷丙转氨酶	谷草转氨酶	白蛋白	总蛋白	总胆红素	肌酐	葡萄糖
			(ALT) / (U·L ⁻¹)	(AST) / (U·L ⁻¹)	(ALB) / (g·L ⁻¹)	(TP) / (g·L ⁻¹)	(TBIL) / (μmol·L ⁻¹)	(CRE) / (μmol·L ⁻¹)	(GLU) / (mmol·L ⁻¹)
空白对照组	给药末期	20	35±4	95±18	43.0±3.5	67±4	0.85±0.26	29.8±3.4	6.25±0.99
	恢复期	10	31±4	86±27	42.0±2.1	68±3	1.03±0.17	36.8±3.9	7.98±1.24
QRXYN 低剂量组	给药末期	20	34±7	92±14	42.0±2.7	65±4	0.77±0.18	28.6±2.9	5.90±0.78
	恢复期	10	30±7	79±16	42.0±2.7	69±3	0.79±0.26	35.4±4.0	7.84±1.25
QRXYN 中剂量组	给药末期	20	29±5**	79±12**	40.8±2.9	64±3*	0.72±0.31	28.5±3.0	6.91±0.98*
	恢复期	10	29±4	94±24	42.4±3.4	70±4	0.73±0.23*	34.5±4.5	7.19±1.32
QRXYN 高剂量组	给药末期	20	31±5*	83±11*	42.1±2.8	65±3	0.75±0.21	27.9±2.4	6.76±1.09
	恢复期	10	29±3	78±8	42.2±3.4	69±4	0.82±0.35	32.2±3.8*	7.48±1.29

组别	阶段	动物数	三酰甘油	肌酸激酶	钾离子	钠离子	氯离子	钙离子
			(TG) / (mmol·L ⁻¹)	(CK) / (U·L ⁻¹)	(K ⁺) / (mmol·L ⁻¹)	(Na ⁺) / (mmol·L ⁻¹)	(Cl ⁻) / (mmol·L ⁻¹)	(Ca ²⁺) / (mmol·L ⁻¹)
空白对照组	给药末期	20	0.23±0.09	598±253	4.21±0.36	134.6±1.2	108.9±2.7	2.178±0.063
	恢复期	10	0.41±0.09	488±300	4.47±0.32	134.3±1.3	107.3±1.4	2.429±0.053
QRXYN 低剂量组	给药末期	20	0.32±0.22	566±177	4.27±0.28	134.6±1.4	108.2±1.5	2.170±0.065
	恢复期	10	0.35±0.14	441±145	4.41±0.15	134.9±1.3	109.0±1.1**	2.330±0.056**
QRXYN 中剂量组	给药末期	20	0.28±0.10*	419±170**	4.32±0.35	134.0±1.1	108.7±2.2	2.231±0.048*
	恢复期	10	0.52±0.38	686±274	4.65±0.32	134.9±0.7	108.2±1.2	2.256±0.071**
QRXYN 高剂量组	给药末期	20	0.28±0.15	458±153	4.30±0.51	135.5±1.0**	107.7±1.6	2.279±0.086**
	恢复期	10	0.44±0.23	485±158	4.58±0.26	134.3±1.6	108.5±0.9*	2.304±0.065**

注: 与空白对照组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。

Note: vs the blank control group, *P < 0.05, **P < 0.01.

表 4 QRXYN 对幼龄大鼠身长、尾长、胫骨长度的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 4 Effect of QRXYN on the body, tail and tibia length in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	PND ₂₁		PND ₃₄		PND ₄₈	
	身长 /mm (n = 30)	尾长 /mm (n = 30)	身长 /mm (n = 30)	尾长 /mm (n = 30)	身长 /mm (n = 30)	尾长 /mm (n = 30)
空白对照组	92.99 ± 5.09	75.09 ± 3.98	148.53 ± 5.68	131.22 ± 4.54	166.44 ± 10.05	163.38 ± 8.65
QRXYN 低剂量组	95.16 ± 3.13	77.30 ± 4.32	148.23 ± 5.65	133.81 ± 5.34*	168.27 ± 8.68	166.87 ± 8.00
QRXYN 中剂量组	95.82 ± 4.09*	77.54 ± 3.00*	147.16 ± 5.21	132.47 ± 5.57	170.82 ± 9.59	165.47 ± 7.92
QRXYN 高剂量组	94.82 ± 4.91	76.47 ± 4.42	145.46 ± 5.02*	131.54 ± 6.08	171.29 ± 9.29	164.78 ± 8.47

组别	PND ₆₃		PND ₉₀			
	身长 /mm (n = 30)	尾长 /mm (n = 30)	胫骨长度 /cm (n = 20)	身长 /cm (n = 10)	尾长 /cm (n = 10)	胫骨长度 /cm (n = 10)
空白对照组	20.6 ± 1.2	18.4 ± 1.1	43.95 ± 2.35	22.7 ± 1.2	20.3 ± 1.3	51.77 ± 3.69
QRXYN 低剂量组	20.8 ± 1.5	18.5 ± 1.3	44.34 ± 2.33	22.9 ± 1.7	20.4 ± 1.2	52.50 ± 2.95
QRXYN 中剂量组	21.0 ± 1.6	18.6 ± 1.4	44.11 ± 2.36	22.9 ± 1.7	20.7 ± 1.4	52.97 ± 3.10
QRXYN 高剂量组	20.6 ± 1.4	18.2 ± 1.2	44.22 ± 2.00	22.1 ± 1.5	19.7 ± 1.4	52.26 ± 3.03

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ； n 表示统计动物数。

Note: vs the blank control group, * $P < 0.05$; n : represents the number of animals counted.

表 5 QRXYN 对幼龄大鼠发育指标结果统计表 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 5 Effect of QRXYN on the development index of juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	睾丸下降 (雄性)		包皮分离 (雄性)		阴道张开 (雌性)	
		日数 /d	检测次数	日数 /d	检测次数	日数 /d	检测次数
空白对照组	15	25 ± 0	2 ± 0	42 ± 0	1 ± 0	35 ± 0	1 ± 0
QRXYN 低剂量组	15	24 ± 2*	2 ± 0	42 ± 0	1 ± 0	35 ± 1	1 ± 0
QRXYN 中剂量组	15	24 ± 2*	2 ± 0	42 ± 0	1 ± 0	36 ± 2	1 ± 0
QRXYN 高剂量组	15	24 ± 2*	2 ± 0	42 ± 0	1 ± 0	36 ± 2	1 ± 0

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ 。

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

CYP2E1、IgG、GH、PROG、IgA、雄激素、ACTH 及恢复期，GH、IgG、E、CYP2E1、雄激素与同期空白对照组相比，差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。但变化幅度不大，且无剂量依赖性关系。

3.10 骨髓检查及骨密度检测

外周血常规检查未见与药物毒性有关的异常，故骨髓涂片未进行显微镜下观察。给药末期及恢复期，QRXYN 各剂量组骨密度、骨矿含量与空白对照组比较差异均无统计学意义。

3.11 脏器系数

如表 7 所示，给药末期 QRXYN 中剂量组肝脏系数及恢复期 QRXYN 高剂量组肾脏系数与同期空白对照组相比，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。但无剂量依赖性关系。

3.12 组织病理学检查

本次实验未见动物中途死亡。给药末期及恢复期计划解剖的动物组织器官大小、颜色及质地均未见明显异常。病理学镜检结果显示，空白对照组与 QRXYN 高剂量组各脏器均未发现与药物相关的组织病理学改变，部分病理组织切片见图 1。

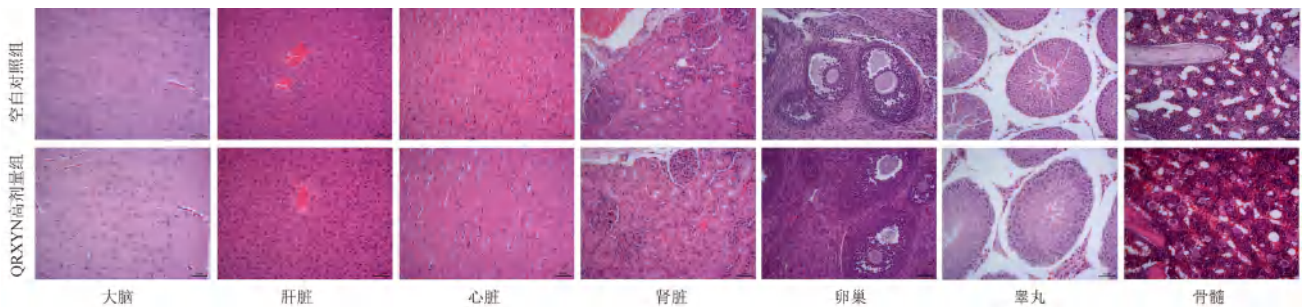


图 1 停药检查时空白对照组和 QRXYN 高剂量组幼龄大鼠各重要脏器病理学图片 ($\times 200$, HE 染色)

Fig 1 Histopathological images of important organs of juvenile SD rats in the control group and the QRXYN high-dose group during drug withdrawal ($\times 200$, HE staining)

表 6 QRXYN 对幼龄大鼠肝药酶、血清球蛋白及激素指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 6 Effect of QRXYN on liver drug enzyme, serum globulin and hormone index in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	阶段	动物数	细胞色素 P450	细胞色素 P450	孕激素	血清球蛋白 A	血清球蛋白 M
			1A2 (CYP1A2) / (ng · mL ⁻¹)	2E1 (CYP2E1) / (ng · mL ⁻¹)	(PROG) / (ng · mL ⁻¹)	(IgA) / (μg · mL ⁻¹)	(IgM) / (μg · mL ⁻¹)
空白对照组	给药末期	20	6.844 ± 0.592	37.349 ± 4.489	13.345 ± 0.726	293.702 ± 19.120	1296.199 ± 85.923
	恢复期	10	7.438 ± 0.642	35.974 ± 4.869	9.100 ± 2.601	283.346 ± 15.518	1370.992 ± 55.952
QRXYN 低剂量组	给药末期	20	7.234 ± 1.759	40.286 ± 6.716*	13.590 ± 0.930	307.457 ± 27.453	1291.132 ± 98.468
	恢复期	10	7.280 ± 0.772	33.447 ± 1.599	8.563 ± 1.626	272.346 ± 22.132	1341.510 ± 140.728
QRXYN 中剂量组	给药末期	20	7.079 ± 0.706	41.810 ± 9.835	13.988 ± 0.674*	316.173 ± 37.819	1255.330 ± 79.620
	恢复期	10	7.780 ± 0.623	36.146 ± 1.776	8.461 ± 1.408	282.153 ± 23.802	1424.728 ± 94.923
QRXYN 高剂量组	给药末期	20	7.215 ± 0.696	38.473 ± 2.782	13.460 ± 1.276	341.190 ± 20.037**	1310.300 ± 87.561
	恢复期	10	8.092 ± 0.676	37.397 ± 1.346*	8.549 ± 1.522	270.423 ± 28.535	1455.220 ± 81.112

组别	阶段	动物数	血清球蛋白 G (IgG) /	血清球蛋白 E (IgE) /	生长激素 (GH) /	雌激素 (E) /
			(mg · mL ⁻¹)	(μg · mL ⁻¹)	(ng · mL ⁻¹)	(pg · mL ⁻¹)
空白对照组	给药末期	20	13.145 ± 0.742	18.435 ± 1.412	21.684 ± 1.391	129.423 ± 9.949
	恢复期	10	14.773 ± 1.324	22.320 ± 1.465	20.598 ± 1.144	139.152 ± 12.461
QRXYN 低剂量组	给药末期	20	13.988 ± 0.838*	19.070 ± 1.768	22.708 ± 1.700*	126.740 ± 7.982
	恢复期	10	13.187 ± 0.517**	20.818 ± 1.598	23.290 ± 1.983*	140.697 ± 18.460
QRXYN 中剂量组	给药末期	20	13.900 ± 1.006*	18.995 ± 2.123	22.766 ± 2.148	125.389 ± 6.727
	恢复期	10	13.919 ± 1.058	21.751 ± 1.092	24.424 ± 2.760**	156.166 ± 16.149*
QRXYN 高剂量组	给药末期	20	14.714 ± 1.128**	19.116 ± 2.096	23.401 ± 2.026**	125.984 ± 6.773
	恢复期	10	14.631 ± 1.094	22.775 ± 1.065	24.947 ± 2.292**	155.799 ± 12.994

组别	阶段	动物数	雄激素 /	促皮质激素	三碘甲状腺原氨酸	四碘甲状腺原氨酸
			(ng · mL ⁻¹)	(ACTH) / (pg · mL ⁻¹)	(T ₃) / (ng · mL ⁻¹)	(T ₄) / (ng · mL ⁻¹)
空白对照组	给药末期	20	6.811 ± 0.405	69.375 ± 4.258	7.287 ± 0.611	190.961 ± 14.157
	恢复期	10	6.738 ± 0.346	80.390 ± 6.412	7.831 ± 0.561	217.527 ± 19.174
QRXYN 低剂量组	给药末期	20	7.195 ± 0.553	71.502 ± 4.823	7.298 ± 0.474	196.369 ± 14.433
	恢复期	10	6.598 ± 0.381	81.051 ± 9.423	7.862 ± 0.639	219.445 ± 13.957
QRXYN 中剂量组	给药末期	20	7.193 ± 0.632	72.074 ± 5.645	7.325 ± 0.401	184.509 ± 14.610
	恢复期	10	7.103 ± 0.555	83.239 ± 6.612	7.887 ± 0.569	227.497 ± 40.621
QRXYN 高剂量组	给药末期	20	7.500 ± 0.638**	74.236 ± 4.513**	7.473 ± 0.399	199.078 ± 27.194
	恢复期	10	7.569 ± 0.583**	88.176 ± 12.180	7.926 ± 0.647	229.600 ± 33.664

注：与空白对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01。

Note: vs the blank control group, *P < 0.05, **P < 0.01.

表 7 QRXYN 对幼龄大鼠脏器系数情况统计表 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 7 Effect of QRXYN on organ coefficient in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	阶段	动物数	脏器系数 / (g · 100 g ⁻¹)						
			脑	心脏	肝脏	肾脏	肾上腺	胸腺	脾脏
空白对照组	给药末期	20	0.658 ± 0.112	0.404 ± 0.042	3.057 ± 0.228	0.697 ± 0.040	0.020 ± 0.007	0.198 ± 0.043	0.211 ± 0.030
	恢复期	10	0.539 ± 0.097	0.343 ± 0.027	2.668 ± 0.228	0.568 ± 0.045	0.017 ± 0.006	0.127 ± 0.043	0.179 ± 0.035
QRXYN 低剂量组	给药末期	20	0.679 ± 0.133	0.381 ± 0.022	3.054 ± 0.197	0.706 ± 0.049	0.020 ± 0.007	0.201 ± 0.046	0.215 ± 0.027
	恢复期	10	0.521 ± 0.115	0.362 ± 0.033	2.623 ± 0.136	0.604 ± 0.043	0.017 ± 0.005	0.128 ± 0.045	0.173 ± 0.028
QRXYN 中剂量组	给药末期	20	0.658 ± 0.133	0.396 ± 0.029	3.252 ± 0.353*	0.717 ± 0.056	0.021 ± 0.009	0.196 ± 0.058	0.215 ± 0.033
	恢复期	10	0.534 ± 0.126	0.366 ± 0.056	2.762 ± 0.153	0.619 ± 0.047	0.018 ± 0.005	0.132 ± 0.043	0.180 ± 0.026
QRXYN 高剂量组	给药末期	20	0.678 ± 0.130	0.403 ± 0.053	3.199 ± 0.199	0.728 ± 0.053	0.021 ± 0.008	0.173 ± 0.037	0.214 ± 0.036
	恢复期	10	0.567 ± 0.130	0.367 ± 0.027	2.752 ± 0.268	0.642 ± 0.063**	0.019 ± 0.008	0.131 ± 0.039	0.187 ± 0.028

注：与空白对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01。

Note: vs the blank control group, *P < 0.05, **P < 0.01.

4 讨论

QRXYN 处方为九节茶, 为药食同源的中药材, 上市销售多年, 经公司主动收集、药监局系统反馈, 近 5 年来, QRXYN 发生不良反应的个案共有 30 例, 发生率为 0.000 88%, 不良反应报告率 < 0.01%, 属于十分罕见范围, 未发生群体不良反应, 说明其安全性高, 没有明确的毒性靶点。

儿童是特殊用药人群, 保障用药安全是首要考虑因素之一, 根据人与大鼠的年龄关系及大鼠的发育情况^[5-7], 本次实验选用 PND₂₁ 幼龄 SD 大鼠进行首次给药, 给药结束至 PND₆₃, 涵盖儿童及青少年 2 ~ 18 岁年龄段。毒理学终点指标选择主要根据对已有信息的认知 (如临床使用资料/成年动物毒性实验结果等), 针对性设计检测指标^[8-11], 分为一般评价指标和特殊系统指标, 本实验一般评价指标主要为体重和生长发育指标, 特殊指标主要为常规的性发育、免疫系统和骨骼系统评价指标。

本次实验未见动物中途死亡。给药末期、恢复期末计划解剖的动物组织器官大小、颜色及质地均未见明显异常。幼龄大鼠一般状况、体重、摄食量、发育指标、行为学指标、骨密度等均无异常。本次实验部分血液学及血液生化指标如 MCV、ALT、Ca²⁺ 等与空白对照组比较差异有统计学意义, 但均无明显量效时间关系, 故不考虑毒理学意义。部分肝药酶、血清球蛋白、激素指标如 CYP2E1、IgG、雄激素等与同期空白对照组相比差异有统计学意义, 但结合其他发育指标及行为学指标未见明显异常, 故认为该变化无毒理学意义。给药末期中剂量组肝脏及恢复期高剂量组肾脏脏系数与空白对照组比较差异有统计学意义, 但两者未见明显剂量时间关系, 结合组织病理学诊断未见相关联脏器有毒理学意义的改变, 故认为该变化与 QRXYN 作用无关, 无明显毒理学意义。QRXTN 各剂量组给药末期尿常规指标可见剂量相关性的异常变化, 主要表现为尿液颜色加深, 尿液中尿蛋白、尿酮体、胆红素出现阳性的动物数明显增加, 尿比重和 pH 略有升高, 但经停药 5 周后基本恢复正常。通常药物本身的理化性质 (pH、溶解性等) 可能影响尿常规指标^[12], 同时尿常规异常可能还与大鼠本身的特

性有关, 如大鼠本身的胆红素肾阈较低, 可大量从尿中排出, 此外, 大鼠尿液中通常还会自发的伴有少量蛋白质^[13], 结合本研究肾功能和组织病理学未见与 QRXYN 相关的异常改变, 故不考虑毒理学意义, 但临床应用时可重点监测尿常规, 以保护受试者的用药安全。

综上所述, 出生后第 21 日 (PND₂₁) 的幼龄 SD 大鼠经口灌胃给予 QRXYN 6 周 (43 d), 未见对其生殖系统、骨骼及生长发育等有明显影响, 则未见明显毒性, 最大无毒性反应剂量 (NOAEL) 为 102.9 g 生药 · kg⁻¹, 约为儿童临床剂量的 59 倍 (按体重计算)。提示 QRXYN 在 2 ~ 18 岁儿童及青少年应用中无明显安全性担忧, 为 QRXYN 制剂应用于儿科提供科学参考依据。

参考文献

- [1] 潘慧敏, 姜保平, 肖伟, 等. 九节茶的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2013, 15 (7): 614-619.
- [2] 刘爱华, 罗永明, 林燕华. 草珊瑚及同种植物的研究进展 [J]. 中医药通报, 2002, 1 (4): 50-53.
- [3] 梅全喜, 胡莹. 肿节风的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22 (1): 230-232.
- [4] 覃星柳. 肿节风制剂的研究进展及临床应用 [J]. 华夏医学, 2011, 24 (6): 738-740.
- [5] 光红梅, 王庆利. FDA 儿科药品的非临床安全性评价指导原则简介 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24 (6): 627-631.
- [6] 孙祖越, 周莉, 韩玲. 儿科用药非临床安全性评价要则及中药评价的特殊性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30 (1): 13-20.
- [7] 周莉, 孙祖越. 儿科用药发育毒性研究指标设定及中药安全性评价的特别关注点 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30 (1): 21-28.
- [8] 黄芳华, 朱飞鹏, 笪红远, 等. 中药儿科用药非临床安全性评价的一般考虑 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24 (24): 2779-2781.
- [9] 姜德建, 杨威. 中药儿科用药临床前评价策略 [J]. 中南药学, 2017, 15 (1): 1-3.
- [10] 高焕, 周玥, 柏冬. 儿科用药的非临床安全性评价要则综述 [J]. 世界最新医学信息文摘 (连续型电子期刊), 2019, 19 (30): 153-155, 161.
- [11] 陈琼芳, 张宗利. 小儿荆杏止咳颗粒对幼龄大鼠发育毒性的研究 [J]. 中南药学, 2021, 19 (10): 2076-2081.
- [12] 鞠健胜. 药物对尿液检验结果的影响 [J]. 中外健康文摘, 2012, 9 (28): 296-297.
- [13] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 224-225.

(收稿日期: 2023-04-14; 修回日期: 2023-06-09)

基于 LC-MS/MS 方法的大鼠血浆中舒必利的 血药浓度检测及药代动力学研究

梁媛^{1,2}, 葛若衡^{1,2}, 舒畅^{1,2*} (1. 中国药科大学药品质量控制与药物警戒教育部重点实验室, 南京 210009; 2. 中国药科大学药学院药物分析系, 南京 211198)

摘要: **目的** 建立一种 LC-MS/MS 方法用于大鼠血浆中舒必利血药浓度的测定及其药代动力学研究。**方法** 血浆样本经过液液萃取方法处理后, 采用电喷雾离子化 (ESI), 正离子多重反应监测模式 (MRM)。舒必利和奥美拉唑用于定量分析的离子对为 m/z 342.2 \rightarrow 112.2 和 346.4 \rightarrow 198.1。色谱柱为 Hadera ODS-2 柱 (150 mm \times 2.1 mm, 5 μ m), 流动相是甲醇 (含 0.1% 甲酸) - 水 (0.05% 甲酸铵和 0.1% 甲酸), 按照等度洗脱方式 (7 : 3, V/V) 进行。**结果** 该方法的定量下限是 0.5 ng \cdot mL⁻¹, 舒必利在 0.5 ~ 200 ng \cdot mL⁻¹ 内与峰面积比值线性关系良好, 舒必利和内标奥美拉唑的提取回收率在 70% ~ 80%, 批间和批内精密度均小于 15%, 方法学验证的结果符合生物样本分析指导原则要求。**结论** 建立的 LC-MS/MS 方法特异性强, 分析时间短, 适用于大量生物样本的检测, 成功应用于大鼠血浆样本的药代动力学研究, 可为舒必利的临床药物浓度监测方法的开发提供参考。

关键词: 舒必利; LC-MS/MS; 药代动力学; 血药浓度

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2875-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.009

Determination of sulpiride concentration in rat plasma and pharmacokinetics by LC-MS/MS

LIANG Yuan^{1,2}, GE Ruo-heng^{1,2}, SHU Chang^{1,2*} (1. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance in China Pharmaceutical University, Ministry of Education, Nanjing 210009; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: Objective To monitor the concentration of sulpiride in the plasma, and to conduct its pharmacokinetic by LC-MS/MS. **Methods** Plasma samples were collected by liquid-liquid extraction method. Sulpiride and omeprazole for quantitative analysis were m/z 342.2 \rightarrow 112.2 and 346.4 \rightarrow 198.1. The determination was performed on Hadera ODS-2 column (150 mm \times 2.1 mm, 5 μ m). The mobile phase was methanol (containing 0.1% formic acid) and water (0.05% ammonium formate and 0.1% formic acid) = (7 : 3, V/V). **Results** The lower limit of quantification of the method was 0.5 ng \cdot mL⁻¹, and the linearity was good at 0.5 ~ 200 ng \cdot mL⁻¹. The extraction recovery of sulpiride and internal standard omeprazole ranged 70% ~ 80%, and the *RSD* were less than 15%. The methodology verification was in line with the requirements of guidelines for biological sample analysis. **Conclusion** The LC-MS/MS method is suitable for the detection of large biological samples. It has been successfully used in the pharmacokinetic study and concentration monitoring of sulpiride.

Key words: sulpiride; LC-MS/MS; pharmacokinetic; plasma concentration

基金项目: 药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目 (No. DQCP20/21PQ02); 江苏省特色资源开发与药用研究重点实验室 (No. LPRK202102)。

作者简介: 梁媛, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析以及多肽药物成药性研究, email: 153305186175@163.com *通信作者: 舒畅, 女, 硕士研究生导师, 主要从事药物质量标准、体内药物分析新技术研究, email: shuchang@cpu.edu.cn

抑郁症是一种常见的精神疾病,具体表现为情绪低落、兴趣减弱、焦虑、易怒等,严重者会有自杀倾向,极大地影响了人们的生活和工作。到 2030 年,抑郁症将成为致残的主要原因^[1-3]。非典型抗精神病药物舒必利属于苯甲酰胺类化合物,作用于中枢多巴胺(D₂、D₃、D₄)受体,主要针对 D₂ 受体的选择性拮抗剂^[4-6],可以增加多巴胺的周转,从而具有抗抑郁作用,对淡漠、退缩、木僵、抑郁、幻觉、妄想等症状有较好的疗效^[7-10]。目前,关于 LC-MS/MS 方法测定血浆中舒必利的浓度的文献较少^[11-13]。在临床上由于使用不当造成严重不良反应甚至死亡的病例并不少见,例如,锥体外系副反应导致的肌肉僵直,发声困难;血药浓度过高引起的意识模糊,昏睡等^[14-15]。本文建立了 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中舒必利的浓度,并评价了舒必利在大鼠体内的药代动力学特征,为临床监测血药浓度及减少不良反应的发生奠定了基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

CPA225D 万分之一电子天平(德国赛多利斯公司);HC-2062 高速离心机(山东百欧医疗科技有限公司);Milli-Q 纯水仪(美国密理博公司);HPLC 液相色谱(美国安捷伦公司,配置高压二元泵、真空脱气机、自动进样器及色谱柱温度控制单元);AB 4000 质谱[美国 AB 公司,配置三重四极杆质谱检测器,配电喷雾离子源(ESI);数据采集系统为 Analyst 1.6.2 数据采集系统]。

1.2 试药

舒必利对照品(纯度:98%,批号:MO78933,北京迈瑞达试剂有限公司);奥美拉唑对照品(纯度:99.9%,批号:100367-201003,中国食品药品检定研究院);甲醇(色谱纯,德国默克试剂有限公司);乙酸乙酯(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);甲酸和甲酸铵(色谱纯,上海阿拉丁试剂有限公司);实验用水为纯水仪(美国密理博公司)制备的超纯水。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 舒必利储备液 精密称取 10.0 mg 舒必利对照品 2 份,分别置于 10 mL 量瓶中,各加入甲醇溶解,得到最终质量浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液。用甲醇依次稀释配制系列标准曲线样品工作溶液,质量浓度分别为 2000、1500、1000、500、100、50、5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.1.2 奥美拉唑(内标)储备液 精密称取 10.0 mg 对照品,置于 10 mL 棕色量瓶中,加入甲醇溶解,得到最终质量浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标储备液,用甲醇稀释储备液配制内标工作溶液,质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由于奥美拉唑具有光敏性,注意配制过程中全程避光。

2.1.3 标准曲线和质控样品溶液 精密量取 90 μL 大鼠空白血浆,分别加入 10 μL 的舒必利和奥美拉唑工作溶液,配成含有舒必利质量浓度分别为 200、150、100、50、10、5、0.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (定量下限, LLOQ) 的标准曲线样品,质控样品的质量浓度分别为 1 (低浓度质控, LQC), 80 (中浓度质控, MQC), 160 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (高浓度质控, HQC)。

2.2 生物样品前处理

100 μL 血浆置于 1.5 mL 棕色 EP 管中,加入 10 μL 的 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标奥美拉唑,再加入 400 μL 的乙酸乙酯,涡旋 5 min 后 15 300 g 离心 10 min,取 200 μL 的上清液,下层沉淀继续加入 400 μL 的乙酸乙酯,重复以上操作,合并上清液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流吹干,加入 100 μL 的甲醇,涡旋 5 min, 15 300 g 离心 5 min,取 80 μL 的上清液,进行 LC-MS/MS 分析,注意全程避光。

2.3 LC-MS/MS 条件

2.3.1 液相条件 色谱柱为 Hedera ODS-2 柱(150 mm \times 2.1 mm, 5 μm , Hanbon Science and Technology),柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相是甲醇(含 0.1% 甲酸)-水(0.05% 甲酸铵和 0.1% 甲酸),等度洗脱(7:3, V/V),流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。自动进样器温度 4 $^{\circ}\text{C}$,进样量 2 μL 。

2.3.2 质谱条件 采用气动辅助电喷雾离子化(ESI)正离子方式,多重反应监测(MRM)模式。舒必利和奥美拉唑的检测离子对分别为 342.2 \rightarrow 112.2, 346.4 \rightarrow 198.1 (见图 1);舒必利和奥美拉唑的去簇电压(DP)分别为 78 V, 80 V;入口电压(EP)分别为 4 V, 11 V;碰撞能量(CE)分别为 40 V, 20 V;碰撞出口电压分别为 7 V, 13 V。碰撞气压力 6 psi,气帘气压力 10 psi,离子源气体 1 压力 40 psi,离子源气体 2 压力 10 psi,离子喷射电压 5500 V,辅助加热温度 450 $^{\circ}\text{C}$ 。内标奥美拉唑及舒必利的结构及全扫描质谱图见图 1。

2.4 药代动力学研究

6 只雄性 Sprague Dawley 大鼠[许可证号 SYXK(苏)2021-0011],体重 180 ~ 200 g,实验前禁食 24 h。实验动物由中国药科大学动物实验中心提供。在持续温度(24 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度

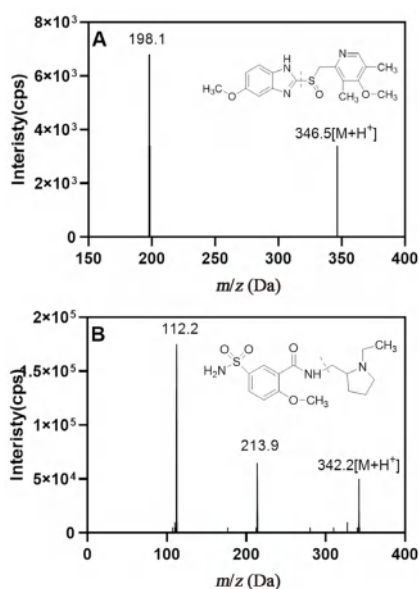


图 1 奥美拉唑 (A) 和舒必利 (B) 的结构及全扫描质谱图
Fig 1 Structure and full scan mass spectrometry of omeprazole (A) and sulpiride (B)

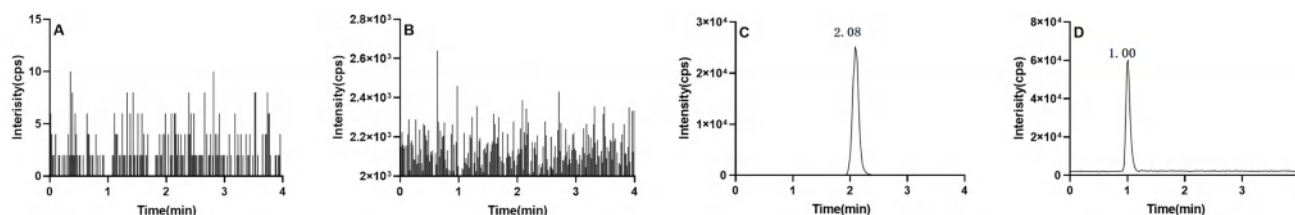


图 2 空白血浆 (A 和 B)、50 ng · mL⁻¹ 的舒必利 (C) 和 1 μg · mL⁻¹ 的奥美拉唑 (D) 的色谱图
Fig 2 Chromatogram of blank plasma (A and B), 50 ng · mL⁻¹ sulpiride (C), and 1 μg · mL⁻¹ omeprazole (D)

3.2 线性试验

取“2.1.3”项下操作绘制标准曲线样品,并同时制备空白样品,按“2.2”项下操作处理,进行 LC-MS/MS 分析,由 Analyst 软件分别计算待测物与内标(奥美拉唑)的峰面积比值 f ($f = A_j/A_i$),分别对舒必利的血药浓度 C 作权重 ($1/\chi^2$) 线性回归计算,得回归方程 $f = 0.027\ 67C + 0.1512$ ($R^2 = 0.9938$),线性范围在 $0.5 \sim 200\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 准确度与精密度

分别配制 4 个浓度水平的质控样品考察批内、批间准确度和精密度。使用分析批随行标准曲线对该分析批内的质控样品进行定量,计算质控样品的实际浓度。批内的准确度及精密度通过分析批内 5 个重复的质控样品(包括 LQC、MQC、HQC、LLOQ)进行评估。批间准确度和精密度通过 3 个分析批的质控样品(包括 LQC、MQC、HQC、LLOQ,每个浓度水平重复 5 次)进行评估。结果如表 1 所示,舒必利的高、中、低 3 个浓度水平的质控样品批内和批间精密度的 RSD 均小于 15.0%,准确度的偏差 (RE) 均在

(50 ± 10)% 和 12 h 昼夜周期下,每日给予充足的食物和水。动物实验按照美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》(NIH 出版物第 8023 号,1978 年修订)的指导方针进行,并得到中国药科大学动物伦理委员会的批准(受理号 2023-05-012)。分别腹腔注射 $2\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的舒必利,于 0、5、15、30 min 及 1、2、3、5、7、9、12、24 h 眼眶静脉丛取血后,按照“2.2”项下方法进行处理,进行 LC-MS/MS 分析。

3 结果

3.1 特异性

用 6 个不同来源的大鼠空白血浆来考察内源性干扰,空白样品在舒必利及内标奥美拉唑保留时间无显著干扰峰,内标奥美拉唑对舒必利无干扰,且舒必利与奥美拉唑检测离子对不同,虽然保留时间相似,但是对测定无影响(见图 2)。

$\pm 15.0\%$,定量下限质控样品的精密度的 RSD 均小于 20.0%,准确度的偏差均在 $\pm 20.0\%$ 。上述结果均符合生物样品分析的要求。

3.4 提取回收率

LQC、MQC、HQC 3 个浓度的质控样品各重复 5 次,经预处理后,作为测试样品进行 LC-MS/MS 分析,另将 15 个双空白样品进行样品预处理,向预处理后的双空白样品加入舒必利,奥美拉唑的溶液,使其最终浓度与 LQC、MQC、HQC 质控样品的进样浓度一致,作为对照品进行 LC-MS/MS 分析,内标的提取回收率考察质量浓度水平为 $1\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以样品峰面积与对照品峰面积的比值计算提取回收率。结果如表 2 所示,低质控浓度舒必利的提取回收率在 70.23% ~ 80.56%,中、高质控浓度的舒必利提取回收率在 77.93% ~ 81.67%,内标奥美拉唑提取回收率在 78.99% ~ 84.21%,且提取回收率的精密度均小于 15%,均符合生物样品测定的要求。

3.5 基质效应

使用 6 个不同来源的大鼠空白血浆(编号

表 1 舒必利的批内与批间准确度与精密度 (n = 5)

Tab 1 Accuracy and intra-batch and inter-batch precisions for sulphiride (n = 5)

质量浓度 / (ng · mL ⁻¹)	批内			批间		
	实际浓度 / (ng · mL ⁻¹)	准确度 (RE, %)	精密度 (RSD, %)	实际浓度 / (ng · mL ⁻¹)	准确度 / (RE, %)	精密度 / (RSD, %)
0.5	0.45 ± 0.01	89.7	3.2	0.47 ± 0.02	93.7	3.8
1	1.92 ± 0.20	95.7	11	1.90 ± 0.04	94.6	1.9
80	81.07 ± 7.30	101.3	9.1	76.24 ± 5.78	95.3	7.6
160	170.67 ± 22.23	97.3	13	167.22 ± 7.15	101.4	4.3

表 2 舒必利及内标奥美拉唑的提取回收率 (n = 5)

Tab 2 Recovery of sulphiride and omeprazole (IS) (n = 5)

化合物	质量浓度 / (ng · mL ⁻¹)	平均值 / %	RSD / %
舒必利	1	73.20	5.7
	80	80.25	1.9
奥美拉唑	160	79.83	1.4
	1000	77.65	2.6

A ~ F) 来考察内标工作浓度下和待测物 LQC、MQC、HQC 浓度水平的基质效应。基质样品的配制以 6 个来源的空白血浆制备双空白样品, 每个浓度水平下每个来源重复 3 次, 向制备后的双空白样品中加入一定量的待测物和内标, 使其浓度分别与 LQC、MQC、HQC 的进样浓度一致。同时配制含有待测物和内标的溶液样品作为对照, 对照溶液的浓度分别与 LQC、MQC、HQC 的进样浓度一致, 每个浓度水平的对照溶液重复进样 3 次。对于每个来源的血浆, 通过计算基质样品中待测物和内标峰面积与对照溶液中相应峰面积的比值, 分别得到舒必利和内标的基质因子, 进一步计算得到内标归一化的基质因子。结果表明, 低、中、高浓度水平下, 舒必利经内标归一化的基质因子的变异系数均不大于 15.0%, 与纯溶液的峰面积相比, 高、中、低浓度的质控样品分别在 6 种不同的空白血浆中基质因子在 89.5% ~ 114%, 表明基质效应对舒必利测定无干扰。

3.6 稳定性试验

配制 HQC 和 LQC 两个浓度水平质控样品, 每个浓度水平的质控样品混合均匀后, 分装成若干份, 每份 100 μL, 分别考察室温放置 6 h、-20 °C 放置 30 d、反复冻融 3 次及处理后样本 4 °C 自动进样器放置 24 h 后的稳定性。与新鲜配制的样本进行比较, 以确定其生物样本的稳定性。结果如表 3 所示, 含舒必利的血浆样品在室温下放置 6 h 稳定性良好, Diff% (与新鲜配制的样品相比的峰面积之差, 应小于 10%) 约为 6.99% ~ 8.44%; 血浆样品处理后的上清液在自动进样器中放置 24 h 稳定性良好, Diff% 为 3.43% ~ 4.40%, 在 -20 °C 条件下 3 次冻融循环

稳定性良好, Diff% 为 1.04% ~ 9.06%, -20 °C 放置 30 d 稳定性良好, Diff% 为 2.47% ~ 5.62%。

表 3 舒必利的稳定性 (n = 3)

Tab 3 Stability of sulphiride (n = 3)

条件	舒必利 / (ng · mL ⁻¹)	Diff / %
室温 6 h	1	2.90
	160	8.74
室温 6 h (血浆样本)	1	6.99
	160	8.44
-20 °C 冻融 3 次	1	1.04
	160	9.06
自动进样器 (24 h)	1	4.40
	160	3.43
-20 °C 放置 30 d	1	5.62
	160	2.47

3.7 药代动力学研究

用建立的 LC-MS/MS 方法测定大鼠血浆中舒必利的浓度, 得到血药浓度曲线, 如图 3 所示, 使用 DAS 3.2.7 进行药代动力学参数的计算, 舒必利消除采用非房室模型计算, 药代动力学参数见表 4, 半衰期 $t_{1/2}$ 为 (15.31 ± 10.28) h, 血药浓度峰值 C_{max} 是 (189.09 ± 66.70) μg · L⁻¹, 舒必利的药时曲线下的峰面积 $AUC_{0 \sim t}$ 是 (180.47 ± 57.00) μg / (L · h)。

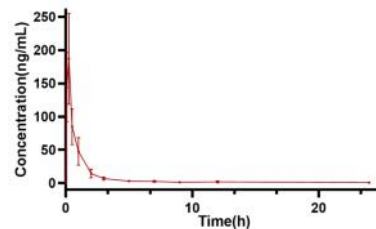


图 3 大鼠腹腔注射舒必利后的药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 3 Mean plasma concentration-time curve of sulphiride after intraperitoneal injection ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

液相条件优化时, 甲醇作为有机相, 含有甲酸铵和甲酸的水为水相, 采用梯度洗脱 (0 ~ 1.5 min, 30%B; 1.6 ~ 4 min, 70%B, 4 ~ 10 min, 30%B), 拖尾现象消失, 但是由于水相比比例升高, 内标奥美拉唑响应降低。所以, 在 1.6 ~ 4

表 4 大鼠腹腔注射舒必利后的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Tab 4 Pharmacokinetic parameters of sulpiride by intraperitoneal injection ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	舒必利
t_{\max}/h	0.22±0.07
$C_{\max}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	189.09±66.70
$t_{1/2}/h$	15.31±10.28
$AUC_{0 \sim t}/[\mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})]$	180.47±57.00
$AUC_{0 \sim \infty}/[\mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})]$	197.62±51.72
$MRT_{0 \sim t}/h$	2.65±0.88
$CL_z/F/[L/(\text{h} \cdot \text{kg})]$	10.76±2.98

min, 将有机相升高到 85%, 内标响应明显增强, 但是当生物样品被测定时, 舒必利出现峰裂, 当比例为 7:3 等度洗脱时, 两种化合物能得到很好的分离。此时舒必利色谱峰形拖尾, 向有机相中加入 0.1% 的甲酸时, 拖尾现象有所改善, 峰裂现象消失。

生物样品前处理条件进行优化时, 生物样品预处理的方法有蛋白沉淀法, 液液萃取法, 固相萃取法等, 本实验分别采用甲醇作为沉淀剂时, 舒必利和奥美拉唑峰形差, 从而选取乙酸乙酯进行液液萃取, 提取一次时, 提取回收率大约只有 50%, 向乙酸乙酯中加入二氯甲烷, 比例为乙酸乙酯-二氯甲烷=4:1 (V/V), 然而提取回收率也只有 60%。使用乙酸乙酯提取 2 次, 合并提取液, 提取回收率达到要求。

本实验建立了测定血浆中舒必利的 LC-MS/MS 方法, 该方法选择性良好, 内源性物质不干扰, 与已报道文献相比, 大大降低了检测限^[12], 提高了方法的灵敏度, 在 0.5 ~ 200 ng · mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。舒必利低、中、高浓度水平的质控样品检测结果的批内和批间精密度的 RSD 均小于 15%, 准确度在 85% ~ 115%, LLOQ 的批内和批间精密度 RSD 小于 20%, 准确度在 80% ~ 120%, 提取回收率较高, 符合生物样本测定的要求。

参考文献

- [1] 李超, 伍力, 余发春, 等. 抑郁障碍病因的单胺递质假说和舒肝解郁胶囊药理机制的简述[J]. 当代医学, 2016, 22(8): 13-14.
- [2] 尹一淑, 刘军莲, 王佳平, 等. 抑郁症相关发病机制研究进展[J]. 医学综述, 2022, 28(12): 2368-2372.
- [3] 杨潇, 董再全, 王瑜, 等. 抑郁病因学和治疗学的研究进展[J]. 中国科学(生命科学), 2022, 52(11): 1678-1691.
- [4] 杨琬芳, 王青, 杨智超, 等. 炎症驱动抑郁症发生发展的机制研究进展[J/OL]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(5): 449-454, 460.
- [5] Beurel E, Toups M, Nemeroff CB. The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble[J]. Neuron, 2020, 107(2): 234-256.
- [6] 余蕾, 武文志, 张云桥, 等. HPA 轴在抑郁症中的研究概述[J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(2): 166-171.
- [7] Wu Z, Xiao L, Wang H, et al. Neurogenic hypothesis of positive psychology in stress-induced depression: adult hippocampal neurogenesis, neuroinflammation, and stress resilience[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 97: 107653.
- [8] Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease[J]. Nat Neurosci, 2017, 20(2): 145-155.
- [9] 田明, 郑丹, 刘春龙. 肠道微生物参与抑郁症发病机制研究进展[J]. 临床军医杂志, 2022, 50(6): 658-660.
- [10] 陈洁瑜, 罗仁, 余克强, 等. 肠道微生物在抑郁症发病中的作用及其研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 5011-5014.
- [11] 黄怡菲, 马林, 黎维勇, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中左舒必利含量的不确定度评定[J]. 中国药师, 2016, 19(12): 2369-2372.
- [12] 赵丽蓉, 赵辉, 刘慧, 等. LC-MS/MS 法测定人体血浆中左旋舒必利的浓度及药物动力学应用[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(4): 304-310.
- [13] 邹尚荣, 温预关, 林琼英. LC-MS/MS 测定人血浆中阿米舒必利的浓度[J]. 中国现代应用药学, 2009, 26(6): 483-486.
- [14] 黄世伟, 刘铁榜, 武志伟. 舒必利致血药浓度增高 1 例[J]. 临床精神医学杂志, 2015, 25(2): 126.
- [15] 文隽. HPLC 法测定舒必利的血药浓度及其人体药动学研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2014, 29(1): 57.

(收稿日期: 2023-04-16; 修回日期: 2023-06-14)

绿花白千层精油化学成分及宫颈炎活性研究

李婷^{1,3}, 李丽娟³, 彭一桓⁴, 刘沁攸⁴, 苏敏², 杨孔^{2*} (1. 滇西应用技术大学健康科技学院, 云南 大理 671009; 2. 大理农林职业技术学院工程学院, 云南 大理 671003; 3. 大理大学护理学院, 云南 大理 671000; 4. 昆明瑞蓝健康管理服务有限公司, 昆明 650000)

摘要: **目的** 研究 4 种绿花白千层 (*Melaleuca viridiflora* Sol. ex Gaertn) 精油的化学成分及其治疗宫颈炎的活性。**方法** 采用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 鉴定其化学成分, 通过阴道灌注酚类黏液建立大鼠宫颈炎模型, 研究绿花白千层精油对宫颈炎的治疗作用。给药后 1 周监测外阴炎症、脏器、宫颈炎血清环氧合酶 2 (COX-2)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、血浆铜蓝蛋白 (CP) 水平, 确定精油的疗效。**结果** 对 4 种绿花白千层精油 Yk-2、Yk-10、Yk-11、Yk-17 进行了分析, 发现分别含有 34 个、25 个、28 个和 21 个化合物, 鉴定率均在 90% 以上。主要成分是桉油精、 α -蒎烯、 α -松油醇、 β -蒎烯、 γ -萜品烯、 α -萜品醇、 β -石竹烯和喇叭茶醇。研究发现, 以高、中、低剂量给药的 Yk-2 精油栓剂均可降低模型大鼠的外阴炎症评分, 与正常组相比, 可改善宫颈炎指数和血清生化因子 COX-2、SOD、MDA 和 CP 水平。**结论** 4 种绿花白千层精油成分丰富, 鉴别率高, Yk-2 精油栓剂对大鼠宫颈和阴道组织炎症表现出良好的治疗作用。

关键词: 绿花白千层精油; 化学成分; 栓剂; 宫颈炎

中图分类号: R284.1, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-2880-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.010

Chemical constituents of essential oil from *Melaleuca viridiflora* and related cervicitis activity

LI Ting^{1,3}, LI Li-juan³, PENG Yi-huan⁴, LIU Qin-you⁴, SU Min², YANG Kong^{2*} (1. College of Health Sciences and Technology, West Yunnan University of Applied Sciences, Dali Yunnan 671009; 2. School of Engineering, Dali Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Dali Yunnan 671003; 3. Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali Yunnan 671000; 4. Kunming Ruilan Health Management Service Co., Ltd., Kunming 650000)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of essential oil from *Melaleuca viridiflora* and related cervicitis activity. **Methods** Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to identify the chemical components, while rat cervicitis models were established through vaginal perfusion of phenol mucilage to determine the therapeutic effect of essential oil from *Melaleuca viridiflora* on cervicitis. The levels of serum cyclooxygenase-2 (COX-2), superoxide dismutase reagent (SOD), malondialdehyde reagent (MDA), and ceruloplasmin reagent (CP) in vulva inflammation, organs, and cervicitis were monitored one week after the administration to determine the efficacy of essential oil. **Results** Four types of *Melaleuca viridiflora* essential oils Yk-2, Yk-10, Yk-11, and Yk-17 were analyzed and found 34, 25, 28, and 21 chemical constituents were with identification rates above 90%. The main constituents included eucalyptol, α -pinene, β -pinene, γ -terpinene, α -terpineol, β -caryophyllene, and trumpet alcohol. The Yk-2 essential oil suppository,

基金项目: 云南省地方本科高校基础研究联合专项 (No.202001BA070001-172)。

作者简介: 李婷, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事妇产科护理, email: 43868083@qq.com * **通信作者:** 杨孔, 男, 硕士, 主要从事天然产物化学研究, email: yangkong7122@163.com

administered at high, medium, and low dosages, reduced vulvar inflammation scores in the model rats and improved cervicitis index and the serum levels of COX-2, SOD, MDA and CP, as compared with those of the normal group. **Conclusion** The four types of *Melaleuca viridiflora* essential oils have rich components and high identification rates. The Yk-2 essential oil suppository shows good therapeutic effect on rat cervical and vaginal tissue inflammation.

Key words: essential oil from *Melaleuca viridiflora*; chemical composition; suppository; cervicitis

绿花白千层 (*Melaleuca viridiflora* Sol. ex Gaertn) 隶属于桃金娘科白千层属乔木类植物, 原产澳大利亚, 后引种到我国广东、台湾、福建、广西等地栽种, 现已经扩展到海南、云南等地^[1]。白千层精油也称茶树精油, 最常见的提取方法为水蒸气蒸馏提取法, 具有特殊芳香气^[2]。白千层精油有抗菌、抗炎、杀虫、抗氧化、抗肿瘤等药理活性, 被开发为消毒剂、水果保鲜剂、治疗皮肤疾病及抗菌、抗炎的复合制剂等^[3]。目前在抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化等方面具有很好的应用前景^[4], 尤其在抗炎方面活性显著^[5], 但存在精油成分复杂, 不同来源的精油品质不一的情况。本研究选择了 4 种绿花白千层精油, 利用气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用技术进行成分分析, 并通过保留时间、匹配度定性分析和保留指数 (retention index, RI) 等进行多重指认。

宫颈炎是女性生殖器官炎症中发病率较高的炎症反应之一, 与创伤、细菌、病毒等感染密切相关, 主要表现为阴道分泌物增多、宫颈出血、水肿等^[6-8]。采用阴道局部给药, 药物通过阴道黏膜吸收进入局部组织或全身血液循环进一步实现治疗目的^[9]。栓剂是一种局部给药制剂, 由药物和适宜的基质制成的半固体制剂, 能在腔道发挥局部作用, 如润滑、抑菌、止痛等^[10], 中药栓剂在妇科疾病中应用广泛^[11]。目前用于治疗宫颈炎的 药物主要有保妇康栓剂、抗菌药物类药物^[12]、妇宁栓^[13]、苦参栓^[14]等, 其中保妇康栓剂在宫颈炎临床治疗中具有非常好的疗效^[15]。本实验将绿花白千层精油制成栓剂, 采用阴道灌注苯酚胶浆建立大鼠宫颈炎模型, 用保妇康栓剂作为阳性药物对照组, 绿花白千层精油栓剂高、中、低剂量组作为实验组, 探究绿花白千层精油对宫颈炎的治疗作用。通过大鼠血清生化因子和炎症因子评价宫颈炎的治疗作用^[16-19], 以期对宫颈炎的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 试药

Yk-2: 绿花白千层精油 (Frerihan NIAOULI 法国, 叶片蒸馏)、Yk-10: 绿花白千层精油 (Aroma eone 法国产, 叶片蒸馏)、Yk-11: 绿花白千层精油 (Doterra 多瑞特上海商贸有限公司)、Yk-17: 绿花白千层精油 (Satya 澳大利亚产, 叶片蒸馏) (样品均通过正规途径购买, 保存于大理大学护理学院)。环己烷 (分析纯, 阿拉丁); 苯酚 (阿拉丁, 批号: Q/12HB 4218-2017); 羧甲基纤维素钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20220810); 95% 乙醇 (云南杨林工业开发区油滇药业有限公司, 批号: 20211023); 丙三醇 (天津市风船化学试剂科技有限公司, 批号: 20120410); 保复康栓剂 (海南碧凯药业有限公司, 批号: 20211219); 环氧合酶-2 (COX-2) (上海酶联生物科技有限公司, 批号: 20221020A); 超氧化物歧化酶 (SOD)、铜蓝蛋白 (CP)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物科技有限公司)。单、双硬脂酸甘油酯 (国药集团化学试剂有限公司), 混合脂肪酸甘油酯 (湖北康明德医药化工有限公司)。

1.2 动物

SD 大鼠 48 只, 雌性未孕, 体重 220 ~ 240 g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物许可证号 SYXK (滇) 2018-0002], 饲养于大理大学实验动物中心动物房。

1.3 仪器

7890A GC/5975C MS 型气相色谱-质谱联用仪 (配有电子电离源 EI, 美国 Ailent Technologies 公司); DZG-303A 型艾柯超纯水机 (成都康宁实验专用纯水设备厂); BL-50A 型压力灭菌锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); HH-S2s 型数显恒温水浴锅 (金坛市精达仪器制造有限公司); LEiCA RM2016 型手动切片机 (上海徠卡仪器有限公司); 201 型奥地利安图斯 2010 酶标仪 (奥地利安图斯公司); JB-L5 型冷冻台、JB-L5 型生物组织包埋机、JK-6 型生物组织摊烤片机 (武汉俊杰电子有限公司) 等。

2 方法

2.1 GC-MS 样品溶液配制

4 种绿花白千层精油均用分析纯的环己烷溶剂配制为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液并使用聚醚砜针式过滤器 ($0.25 \mu\text{m}$) 过滤, 装到色谱分析瓶中备用。

2.2 GC-MS 分析方法

色谱柱 HP-5 MS 柱, 载气为氮气, 流速 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。进样口温度为 $240 \text{ }^\circ\text{C}$, 自动进样 $1.0 \mu\text{L}$, 后不分流。程序升温: 起始温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 2 min , 以 $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度升温至 $220 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 10 min , 后运行至 $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 1 min 。指认匹配度高于 80 的化学成分, 通过计算 RI 进行确认^[22]。

2.3 受试药物

2.3.1 空白栓剂 按照 1:4 的比例称取单、双硬脂酸甘油酯和混合脂肪酸甘油酯, 于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴熔化, 注入 0.2 g 模具中, 完全凝固后取出, 密封, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

2.3.2 Yk-2 精油栓剂 按照 1:4 的比例称取单、双硬脂酸甘油酯和混合脂肪酸甘油酯, 于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴熔化, 加入 Yk-2 精油 1.7 mg 、 3.4 mg 、 6.8 mg 分别制备成低、中、高剂量的栓剂 (规格: 0.2 g/粒), 完全凝固后取出, 密封, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用^[20]。

2.4 造模试剂

量取 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 液态苯酚 4 mL , 1 g 羧甲基纤维素钠, 6 mL 甘油在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴中充分搅拌混匀, 再

加入 9 mL 蒸馏水稀释混匀, 配制成 20% 苯酚胶浆, 密封 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 使用时放置至室温混匀^[21]。

2.5 造模

从 48 只雌性未孕 SD 大鼠中随机挑选 8 只作为正常组, 其余 40 只用于造模。用水合氯醛试剂将大鼠麻醉, 用带有灌胃钝性针头的一次性注射剂器将 20% 苯酚胶浆缓慢注入大鼠宫颈穹隆腔内, 后将大鼠头低尾高体位倾斜放置 5 min 。前 3 d 每日按上述方法注入苯酚胶浆 0.1 mL , 连续 3 次, 此后每 2 日造模 1 次, 注入苯酚胶浆 0.2 mL , 连续 3 次, 造模时间共 12 d ^[21, 23]。

2.6 分组及给药

造模结束后第 3 日, 参考《中药药理研究方 法学》中“中药阴道用制剂毒性实验方法”的炎症程度进行评分, 评分标准见表 1~2。根据红斑、水肿、分泌物的总分进行统计学分析, 以总分 $0 \sim 3$ 分为无炎症、 $4 \sim 6$ 分为轻度炎症、 $7 \sim 9$ 分为中度炎症、 $10 \sim 12$ 分为重度炎症。造模成功的大鼠随机分为模型组, 空白基质组, 保妇康栓剂组, Yk-2 精油栓剂低、中、高剂量组。Yk-2 精油低、中、高组 (每粒栓剂含药量分别是 1.7 mg 、 3.4 mg 、 6.8 mg), 保妇康栓剂组 (100 g 中含有 1.413 mg)、空白基质组 (给 0.2 g 空白基质), 每日给药 1 粒, 连续给药 7 d ^[20, 24]。

表 1 苯酚胶浆致大鼠宫颈炎外阴炎症反应指标

Tab 1 Inflammatory response index of vulvar caused by rats with phenol glue in cervicitis

红斑	分值	水肿	分值	分泌物	分值
无红斑	0	无水肿	0	无分泌物	0
极轻度的红斑	1	非常轻度的水肿	1	极少的分泌物	1
轻度红斑 (暗淡的红色)	2	轻度水肿	2	少量的分泌物	2
中度红斑 (明显的红色)	3	重度水肿 (凸出约 1 mm)	3	中等程度的分泌物	3
重度红斑 (甜菜红或紫红色)	4	严重度水肿 (凸出大于 1 mm , 有暴露范围)	4	大量的分泌物	4

表 2 苯酚胶浆宫颈炎大鼠外阴炎症反应分级标准

Tab 2 Grading criteria for vulvar inflammatory response in rats with phenol glue pulp cervicitis

分值	分级	分值	分级
$0 \sim 3$	正常 (无炎症)	$7 \sim 9$	中度炎症
$4 \sim 6$	轻度炎症	$10 \sim 12$	重度炎症

2.7 取样及指标检测

在给药治疗期间, 观察大鼠的形态外观、行为活动、饮食、饮水及自主活动功能是否异常; 观察大鼠阴道及宫颈口红斑、水肿及分泌物等进行评分。末次给药后, 禁食不禁水 12 h , 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 冰水浴放置

$4 \sim 6 \text{ h}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取适量血清, 按照 COX-2、CP、MDA、SOD 试剂盒说明书, 依次加入试剂, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育显色, 加入终止液, 酶标仪测定 OD 值; 取大鼠胸腺、肝脏、肾脏和宫颈组织, 于生理盐水中浸洗 $2 \sim 3$ 次, 滤纸吸干水分, 称定重量, 计算脏器指数, 脏器指数 (%) = 相应脏器重量 (mg) / 大鼠处死前体重 (g) $\times 100\%$; 完整分离各组大鼠宫颈组织, 经 10% 甲醛固定、梯度脱水、石蜡包埋、切片、苏木精 / 伊红染色、封片, 显微镜下观察宫颈组织的病理变化。

2.8 统计学方法

用统计分析软件 SPSS 26.0 进行统计学分析, 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 若方差齐, 组间两两比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 GC-MS 化学成分分析

GC-MS 分析结果见表 3。4 种绿花白千层精油 (Yk-2、Yk-10、Yk-11、Yk-17) 化合物鉴定率分别为 96.12%、97.47%、98.46%、92.36%, 分别指认了 34 个、25 个、28 个、21 个化合物, 化学成分涉及单萜烯、倍半萜烯、醇、醛、酯等, 其中主要成分有桉叶醇、 α -蒎烯、 β -蒎烯、 γ -萜品烯、 α -松油醇、 β -石竹烯、喇叭茶醇等。从分析结果中发现桉叶醇含量分别为 56.28%、56.03%、63.63%、66.41%, 在整个精油成分中比重较大, α -蒎烯、 α -松油醇在 4 种精油中含量相差不大。此外, Yk-2 样品中的特有成分 γ -古芸烯的含量为 6.04%, 特有成分还有香茅醛、2-蒎烯、古巴烯、柔拿烯等; Yk-10 样品中杜香醇的含量为 7.28%; Yk-11 样品特有成分有 β -萜品烯等。结果显示 4 种精油的主要化学成分基本相同, 含量存在一定差异, 其中 Yk-2 和 Yk-11 之间化学成分鉴定数量差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Yk-2 的化学成分丰富, 指认率较高, 故选择 Yk-2 精油制备成栓剂并探究其对宫颈炎的治疗作用。

3.2 绿花白千层精油栓剂对宫颈炎大鼠的状态影响

造模期间, 与正常大鼠比较, 造模后的大鼠饮食量减少, 喜扎堆、竖毛、易怒, 外阴及宫颈口可见明显的红肿, 伴有大量黄色或白色甚至血丝的黏性分泌物。经药物治疗后, 与模型组比较, 各组大鼠的症状均得到不同程度的改善, 其中 Yk-2 精油栓剂高剂量组药效最佳。

3.3 绿花白千层精油栓剂对宫颈炎大鼠外阴炎症的影响

与正常组比较, 模型组外阴炎症评分升高 ($P < 0.05$); 在给药第 7 日, 与模型组比较, 保复康栓剂及受试药各剂量组外阴炎症评分降低 ($P < 0.05$); 与保复康栓剂组比较, 低剂量组外阴炎症评分降低 ($P < 0.05$)。说明本模型造模成功, 结果见表 4。

3.4 绿花白千层精油栓剂对宫颈炎大鼠脏器指数的影响

与正常组比较, 模型组的肝脏指数降低 ($P < 0.05$), 其余组别对大鼠的宫颈组织、胸腺、

肝脏、脾脏和肾脏指数均无影响, 结果见表 5。

3.5 绿花白千层精油栓剂对宫颈炎大鼠血清 COX-2、CP、MDA、T-SOD 水平的影响

与正常组比较, 模型组 SOD 和 CP 表达降低, COX-2 和 MDA 表达水平升高; 与模型组比较, 给药组 CP、MDA、SOD 表达均有不同程度的升高, COX-2 表达水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05$); 与保复康栓剂组比较, 各给药组 COX-2 和 MDA 表达水平有不同程度降低 ($P < 0.05$), 中剂量组和低剂量组对 SOD 表达水平降低 ($P < 0.05$), 高剂量组和中剂量组 CP 表达水平增高 ($P < 0.05$), 见表 6。

3.6 绿花白千层精油栓剂对宫颈炎大鼠宫颈组织病理学的影响

正常组宫颈及阴道壁组织结构正常各层清晰可见, 未见鳞状上皮增生和破损, 未见柱状上皮鳞状化, 鳞柱结构正常, 宫颈黏膜下及阴道壁黏膜组织内有少许淋巴细胞和中性粒细胞分散浸润。模型组可见宫颈黏膜鳞状上皮增生, 阴道壁浅表有溃疡形成, 组织中有大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润, 可见血管充血及组织细胞状态异常。Yk-2 精油栓剂高、中剂量组可见宫颈黏膜各层组织结构清晰, 宫颈黏膜下层及阴道壁黏膜组织中有少量的中性粒细胞和淋巴细胞浸润。保复康栓剂组和 Yk-2 精油栓剂低剂量组可见宫颈黏膜有上皮增生的现象, 黏膜下有较多量的中性粒细胞和淋巴细胞浸润, 组织及血管有异常, 结果见图 1。

4 讨论

4 种绿花白千层的产地来源、提取工艺、储存过程的不同可能造成化学成分含量和数量上的差异, 主要成分有桉叶醇、 α -蒎烯、 β -蒎烯、 γ -萜品烯、 α -松油醇、 β -石竹烯、喇叭茶醇等。4 种精油的主要化学成分基本相同, 含量存在一定差异, Yk-10 中杜香醇的含量较高。Yk-2 和 Yk-11 之间化学成分鉴定数量差异较大。

绿花白千层精油 (Yk-2) 栓剂低、中、高剂量组均能降低造模大鼠的外阴炎症评分、肾脏指数、宫颈炎指数以及血清中 COX-2、SOD、MDA、CP 水平, 表明可改善宫颈以及阴道组织病理情况, 减轻宫颈组织充血水肿, 对宫颈炎模型大鼠有一定的药效作用。本研究充分利用绿花白千层精油的脂溶性, 机体更容易吸收, 发挥较好的治疗作用, 后续将进一步开展不同来源的精油对宫颈炎的治疗及作用机制的探究, 以期对宫颈炎的临床治疗提供科学依据。

表 3 4 种白千层精油 GC-MS 成分分析

Tab 3 Analysis the 4 essential oils from *Melaleuca viridiflora* by GC-MS

英文名	中文名	Yk-2	Yk-10	Yk-11	Yk-17	RI	文献 RI
xylene	二甲苯	0.12	0.14	0.20	0.16	—	—
4-methyl-1- (1-methylethyl) -bicyclo[3.1.0] hex-2-ene	4-甲基-1-(1-甲基乙基)双环[3.1.0]己烯-2-烯	0.06	0.07	0.07	0.09	926	—
α -pinene	α -蒎烯	7.58	7.92	7.34	7.26	933	938 ^[25]
β -pinene	β -蒎烯	1.89	2.05	1.56	2.34	974	978 ^[25]
γ -terpinene	γ -萜品烯	1.83	2.35	1.70	2.01	1056	1058 ^[26]
β -terpinene	β -萜品烯	—	—	0.57	—	976	980 ^[26]
α -terpinene	α -萜品烯	—	—	0.33	0.40	1013	1019 ^[27]
(+)-4-carene	4-萜烯	0.32	1.25	1.00	—	1012	1016 ^[27]
<i>p</i> -cymene	对伞花烃	0.90	0.85	0.63	—	1021	1027 ^[25]
eucalyptol	桉叶醇	56.28	56.03	63.63	66.41	1028	1023 ^[28]
α -terpinolene	α -异松油烯	1.20	—	—	1.08	1083	1089 ^[29]
linalool	芳樟醇	0.13	0.12	0.09	0.14	1095	1103 ^[30]
citronellal	香茅醛	0.24	—	—	—	1148	—
(-)-4-terpineol	4-松油醇	0.78	0.73	0.72	0.74	1172	1180 ^[25]
α -terpineol	α -松油醇	7.15	6.88	6.65	6.78	1185	1198 ^[25]
2-camphene	2-莰烯	0.94	—	—	—	1341	—
copaene	古巴烯	0.08	—	—	—	1367	—
epizonarene	柔拿烯	0.10	—	—	—	1369	—
α -terpinyl acetate	α -乙酸松油酯	—	—	1.57	1.24	1341	1345
α -gurjunene	α -古芸烯	3.94	3.95	2.58	0.16	1399	1405 ^[31]
β -caryophyllene	β -石竹烯	2.05	2.17	1.81	1.71	1409	1418 ^[25]
α -caryophyllene	α -石竹烯	0.48	0.49	0.38	0.37	1445	1460 ^[27]
decahydro-1, 1, 7-trimethyl-4-methylene-1H-cycloprop[<i>E</i>]azulene	十氢-1, 1, 7-三甲基-4-亚甲基-1H-环丙烯	0.58	—	—	—	1432	—
3, 3, 7, 11-tetramethyl-tricyclo[6.3.0.0(2, 4)]undec-8-ene	3, 3, 7, 11-四甲基三环[6.3.0.0(2, 4)]十一碳-8-烯	—	—	0.37	—	1431	—
β -famesene	金合欢烯	0.13	0.10	0.10	—	1448	1454 ^[26]
alloaromadendrene	香树烯	2.01	1.94	1.33	0.61	1452	1443 ^[32]
γ -selinene	γ -桉叶烯	0.14	0.15	4.48	—	1468	—
muurolene	衣兰油烯	0.14	0.50	0.08	0.07	1491	1492 ^[31]
α -selinene	α -桉叶烯	0.22	—	—	—	1497	1497 ^[26]
1-methyl-5-methylene-8- (1-methylethyl) -, [S- (<i>E</i> , <i>E</i>)]-1, 6-cyclodecadiene	1-甲基-5-亚甲基-8-(1-甲基乙基)-1, 6-环癸二烯	0.35	—	—	—	1504	—
1, 2, 3, 5, 6, 8 α -hexahydro-4, 7-dimethyl-1- (1-methylethyl) -, (1 <i>S</i> -cis) -naphthalene	1, 2, 3, 5, 6, 8 α -六氢-4, 7-二甲基-1-(1-甲基乙基)-1 <i>S</i> -顺式萘	0.42	0.44	0.33	0.27	1514	—
nerolidol	橙花醇	1.21	1.27	—	—	1554	1568 ^[30, 33]
(+)-palustrol	喇叭茶醇	—	0.27	0.19	—	1559	—
caryophyllene oxide	氧化石竹烯	0.28	0.54	0.37	0.13	1573	1587 ^[25]
γ -gurjunene	γ -古芸烯	6.04	—	—	—	1582	—
α -calacorene	白菖烯	0.13	0.26	—	—	1587	1549 ^[30]
ledol	杜香醇	1.07	7.28	0.72	0.56	1592	—
2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-bicyclo[4.4.0]dec-1-ene	2-异丙基-5-甲基-9-亚甲基双环[4.4.0]十烯-1-烯	0.18	—	0.10	—	1631	—
dibutyl phthalate	邻苯二甲酸二丁酯	0.25	0.25	0.22	0.23	1950	1968 ^[30]
合计	—	99.22	98.00	99.12	92.76	—	—

注：“—”表示无实际数据。

Note: “—” indicates no actual data.

表 4 Yk-2 精油栓剂对苯酚致宫颈炎大鼠外阴炎症的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 4 Effect of essential oil of Yk-2 suppository on vulvar inflammation in rats with phenol-induced cervicitis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	外阴炎症评分 / 分		
		第 1 日	第 4 日	第 7 日
正常组	—	0	0	0
模型组	—	6.44 ± 1.13 [△]	5.78 ± 1.39 [△]	6.00 ± 2.06 [△]
保妇康栓剂组	1.413 mg/100 g	4.88 ± 1.36 [*]	2.88 ± 0.64 [*]	2.75 ± 1.49 [*]
Yk-2 高剂量组	6.8 mg · kg ⁻¹	7.56 ± 2.35 ^{*△}	3.33 ± 0.71 [*]	1.44 ± 0.88 [*]
Yk-2 中剂量组	3.4 mg · kg ⁻¹	5.13 ± 1.73	4.00 ± 0.53 ^{*△}	2.38 ± 0.74 [*]
Yk-2 低剂量组	1.7 mg · kg ⁻¹	5.75 ± 1.16	3.13 ± 0.83 [*]	1.38 ± 0.92 ^{*△}

注：与正常组比较，[△]*P* < 0.05；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，与保妇康栓剂组比较，[△]*P* < 0.05。

Note: Compared with the normal group, [△]*P* < 0.05; compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05, compared with the Baofukang suppository group, [△]*P* < 0.05.

表 5 Yk-2 精油栓剂对苯酚致宫颈炎大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 5 Effect of essential oil of Yk-2 suppository on organ index of phenol-induced cervicitis rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	脏器指数 / (mg · g ⁻¹)				
		宫颈组织	胸腺	肝脏	脾脏	肾脏
正常组	—	2.30 ± 1.64	1.43 ± 0.41	30.94 ± 2.58	2.14 ± 0.15	7.32 ± 0.79
模型组	—	1.41 ± 0.29	1.52 ± 0.41	26.88 ± 3.10 [△]	2.30 ± 0.22	6.88 ± 0.82
保妇康栓剂组	1.413 mg/100 g	1.51 ± 0.20	1.43 ± 0.82	27.25 ± 2.96	1.93 ± 0.36	7.19 ± 0.58
Yk-2 高剂量组	6.8 mg · kg ⁻¹	1.43 ± 0.19	1.32 ± 0.27	27.56 ± 3.90	2.00 ± 0.21	6.61 ± 0.58
Yk-2 中剂量组	3.4 mg · kg ⁻¹	1.28 ± 0.31	1.66 ± 0.21	26.56 ± 1.53	2.12 ± 0.15	6.95 ± 0.34
Yk-2 低剂量组	1.7 mg · kg ⁻¹	1.15 ± 0.25	1.51 ± 0.36	27.24 ± 1.21	2.06 ± 0.19	6.96 ± 1.00

注：与正常组比较，[△]*P* < 0.05。

Note: Compared with the normal group, [△]*P* < 0.05.

表 6 Yk-2 精油栓剂对宫颈炎大鼠血清 COX-2、SOD、MDA、CP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 6 Effect of essential oil of Yk-2 suppository on serum COX-2, SOD, MDA, and CP levels in rats with cervicitis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	COX-2 / (ng · mL ⁻¹)	SOD / (U · mL ⁻¹)	MDA / (nmol · mL ⁻¹)	CP / (U · L ⁻¹)
正常组	—	50.42 ± 6.40	644.20 ± 174.64	4.23 ± 1.65	14.78 ± 3.42
模型组	—	70.71 ± 10.66 [△]	489.99 ± 24.29 [△]	6.52 ± 1.81 [△]	12.29 ± 1.78 [△]
保妇康栓剂组	1.413 mg/100 g	70.81 ± 19.22	620.98 ± 134.80 [*]	9.32 ± 4.81 [*]	12.58 ± 1.87
Yk-2 高剂量组	6.8 mg · kg ⁻¹	48.00 ± 5.96 ^{*△}	660.81 ± 63.67 ^{*△}	4.60 ± 1.35 ^{*△}	14.70 ± 2.56 ^{*△}
Yk-2 中剂量组	3.4 mg · kg ⁻¹	56.01 ± 7.51 ^{*△}	575.09 ± 131.45 ^{*△}	7.54 ± 1.55 ^{*△}	13.10 ± 3.30 ^{*△}
Yk-2 低剂量组	1.7 mg · kg ⁻¹	68.57 ± 3.08 ^{*△}	505.05 ± 157.04 ^{*△}	4.86 ± 1.23 ^{*△}	11.73 ± 2.34

注：与正常组比较，[△]*P* < 0.05；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，与保妇康栓剂组比较，[△]*P* < 0.05。

Note: Compared with the normal group, [△]*P* < 0.05; compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05, compared with the Baofukang suppository group, [△]*P* < 0.05.

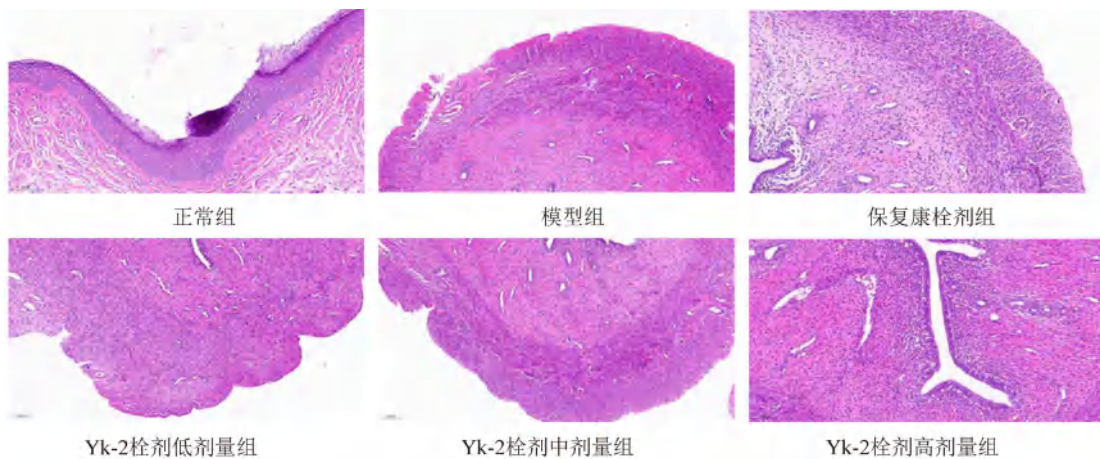


图 1 各组大鼠宫颈组织病理切片图 (HE, ×10)

Fig 1 Pathological sections of cervical histopathology of rats in each group (HE, ×10)

参考文献

- [1] 吴克刚. 精油植物互叶白千层[J]. 生命世界, 2021 (9): 28-29.
- [2] 牛彪, 刘宇, 梁剑平. 茶树油药理作用及其相关应用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (3): 790-797.
- [3] 宋吉明, 吴江敏, 朱泽华, 等. 互叶白千层精油的研究进展[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2019, 43 (6): 85-91.
- [4] 张坤, 崔云峰. 互叶白千层挥发油的化学成分及其抗肿瘤和抗虫生物活性[J]. 沈阳医学院学报, 2022, 24 (6): 571-577.
- [5] 刘胜帅, 薛楠楠, 段银祥, 等. 绿花白千层叶油的 GC-MS 分析及其体外抑菌、抗炎活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54 (16): 1292-1298.
- [6] 张春瓶. 浅谈宫颈炎的临床表现及治疗方案[J]. 中国保健营养, 2012, 22 (22): 5071-5072.
- [7] Swati S. Infectious vaginitis, cervicitis, and pelvic inflammatory disease[J]. Med Clin N Am, 2023, 107 (2): 299-315.
- [8] Kari M, Nikiya L. Evaluating vaginal discharge: distinguishing normal physiological discharge, vaginitis, and cervicitis[J]. J Nurse Pract, 2022, 18 (9): 1021-1023.
- [9] 刘玠, 翟春梅, 褚利娟. 中药凝胶剂在宫颈炎中的应用进展[J]. 中医药学报, 2011, 39 (5): 88-90.
- [10] 程慧玲, 童麒麟, 肖尧, 等. 新型栓剂的研究进展[J]. 药学研究, 2021, 40 (4): 211-215.
- [11] 宋治荣, 张兆芳, 王耀鹏, 等. 中药栓剂在治疗妇科疾病中的应用[J]. 中国医药科学, 2021, 11 (1): 66-68.
- [12] 张帝开, 秦君璞. 宫颈感染的抗生素应用[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28 (7): 491-493.
- [13] 富义稼. 妇宁栓临床观察[J]. 新医学, 1986, 17 (4): 211.
- [14] 郑灵阳, 杨淑焕. 苦参碱栓治疗阴道炎 285 例疗效观察[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2011, 9 (3): 44.
- [15] 董云山. 保妇康栓治疗慢性宫颈炎的效果分析[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8 (2): 162-163.
- [16] 李颖, 张霄峰, 赵敏, 等. 化癥宁坤汤对盆腔炎大鼠 TLR4/NF κ B/COX2 信号通路及炎症反应的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38 (2): 165-170.
- [17] 陈怀平, 朱建军. 结核性脑膜炎患者脑脊液中超氧歧化酶的活性[J]. 湖南医学, 1997 (S1): 45.
- [18] 阿布拉江·米吉提. 丙二醛在 GERD 食管黏膜炎症发生中的表达及作用机制[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
- [19] 谢俊大, 洪纛, 杜守颖. 宫炎净对宫颈炎模型大鼠的保护作用及其机理研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17 (12): 33-35.
- [20] Mitchell A. Administering a suppository: types, considerations and procedure[J]. Br J Nurs, 2019, 28 (5): 288-289.
- [21] Liu YH, Mou X, Zhou DY, et al. Extraction of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* and antitumor activity in vitro[J]. Exp Ther Med, 2018, 15 (2): 1203-1210.
- [22] 陈淑霞, 周颖, 吴涛, 等. 云木香精油的提取工艺参数研究及其化学成分分析比较[J]. 香料香精化妆品, 2020, (4): 5-9.
- [23] Duan XM, Xu YS, Li XQ, et al. To explore the therapeutic effect of Kangfuxiaomi shuan II on cervicitis in rats[J]. Acta Cir Bras, 2021, 36 (10): 361006.
- [24] Kyle G. Should a suppository be inserted with the blunt end or the pointed end first, or does it not matter? [J]. Nurs Times, 2009, 105 (2): 16.
- [25] 杨海宽, 温世钊, 章挺, 等. GC-MS 结合保留指数研究龙脑樟不同部位精油成分[J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39 (7): 130-135.
- [26] 刘红, 郝朝运, 尹桂豪, 等. 4 个杂交种质白胡椒精油化学成分的研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29 (15): 209-215.
- [27] 刘红, 宗迎, 尹桂豪, 等. 不同月份黑胡椒精油化学成分的研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34 (8): 1570-1575.
- [28] 田静, 张璐, 尹萌, 等. GC-MS 结合自动质谱退卷鉴定系统和保留指数用于毒芹子挥发油的定性分析[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36 (24): 3068-3071.
- [29] 薛淑娟, 杨江凯, 陈随清. GC-MS 结合保留指数法解析太行菊挥发油的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (15): 120-128.
- [30] 王延云, 胡强, 杨春林, 等. GC-MS 结合保留指数法分析南天竹叶、果挥发油成分[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33 (6): 197-207.
- [31] 张洪权, 刘文琪, 肖长生, 等. GC/MS 法结合保留指数分析车前叶黄腺香青花茎叶挥发油的化学成分[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30 (11): 1379-1384.
- [32] 尹浩, 王晨笑, 岳进, 等. 油樟叶精油的提取、化学成分、抗氧化以及抗菌活性研究[J]. 保鲜与加工, 2020, 20 (4): 183-191.
- [33] Hellyer R, Lassak E. The steam-volatile constituents of *Melaleuca viridiflora* Sol. ex Gaertn [J]. Aust J Chem, 1968, 21 (10): 2585-2587.

(收稿日期: 2023-04-17; 修回日期: 2023-06-14)

西藏 3 种乌头属植物的品质评价

平措绕吉¹, 刘莹^{2, 3}, 杨洲^{2, 3}, 王证德^{2, 3}, 海梅荣^{2, 3*} (1. 利美藏医院, 西藏 昌都 855600; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; 3. 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 昆明 650201)

摘要: **目的** 探究西藏不同地区乌头属药用植物的品质差异, 完善质量标准。**方法** 以西藏地区 3 种乌头属植物为研究对象, 采用药典方法测定其水分、灰分、浸出物; 利用青稞酒进行炮制, 采用 HPLC 法对其炮制前后生物碱的含量进行测定。**结果** 暂定铁棒锤、露蕊乌头、工布乌头水分含量分别不得超过 8.60%、7.86%、8.18%; 总灰分含量分别不得超过 3.38%、4.09%、4.86%; 酸不溶性灰分含量分别不得超过 0.29%、0.71%、1.48%; 浸出物含量分别不得低于 15.56%、7.34%、15.78%; 对比生品的生物碱质量分数发现, 经青稞酒炮制后生物碱质量分数均不同程度的明显下降。单酯型生物碱质量分数从高到低依次为工布乌头 > 铁棒锤 > 露蕊乌头, 双酯型生物碱质量分数从高到低依次为铁棒锤 > 工布乌头 > 露蕊乌头。**结论** 改进后的 HPLC 法可同时检测双酯型生物碱和单酯型生物碱, 方法易操作且准确可行。为西藏地区的乌头属药用植物的品质分析以及制定完善质量标准提供一定研究依据和数据支撑。

关键词: 西藏; 乌头属植物; 质量标准; 含量测定

中图分类号: R283, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-2887-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.011

Quality evaluation of 3 species of Aconitum plants in Tibet

PING-cuo-rao-ji¹, LIU Ying^{2, 3}, YANG Zhou^{2, 3}, WANG Zheng-de^{2, 3}, HAI Mei-rong^{2, 3*} (1. Limei Tibetan Hospital, Changdu Tibet 855600; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; 3. National-Local Joint Engineering Research Center for Germplasm Innovation & Utilization of Chinese Medicinal Materials in Southwestern China, Kunming 650201)

Abstract: Objective To determine the quality differences in Aconitum medicinal plants from different regions of Tibet and improve the quality standards. **Methods** Three species of Aconitum plants in Tibet were used as research objects. Pharmacopoeia methods were used to determine their moisture, ash and extracts. Barley wine was used for processing, and the alkaloid content before and after the processing was determined by HPLC. **Results** The moisture content of *Aconitum pendulum* Busch, *Aconitum gymnandrum* Maxim and *Aconitum kongboense* Lauener did not exceed 8.60%, 7.86% and 8.18%, respectively. The total ash content did exceed 3.38%, 4.09% and 4.86%. Acid insoluble ash content did not exceed 0.29%, 0.71%, and 1.48%. The extract content should no less than 15.56%, 7.34% and 15.78%, respectively. Compared with the alkaloid content of the raw products, the alkaloid content was decreased to different degrees after the processing of highland barley wine. The mass fraction of monoester alkaloids from high to low was *Aconitum kongboense* Lauener > *Aconitum pendulum* Busch > *Aconitum gymnandrum* Maxim. The mass fraction of diester alkaloids from high to low was *Aconitum pendulum* Busch > *Aconitum kongboense* Lauener > *Aconitum gymnandrum* Maxim. **Conclusion** The modified HPLC method can simultaneously detect diester alkaloids and monoester alkaloids. The method is easy to operate and accurate and feasible. It

基金项目: 蔓菁、红景天等药用植物种质资源保护及栽培技术研究 (No. KX132020033)。

作者简介: 平措绕吉, 男, 主要从事传统藏医药学、藏医诊治艾滋病的理论和实践研究工作, email: p28672654@163.com *通信作者: 海梅荣, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事作物生理生态学、民族医药、药用植物资源学的研究, email: 2250029499@qq.com

provides research basis and data support for the quality control of Aconitum medicinal plants in Tibet and the establishment of perfect quality standards.

Key words: Tibet; Aconitum plant; quality standard; content determination

乌头属植物自古以来应用广泛,其中可供药用的约有 76 种^[1]。在《神农本草经》《蒙医金匱》等多部古籍中均有详细记载^[2]。主要功效有扶阳救逆,补火助阳,祛风除湿,温经止痛^[3],作为药用植物被 2020 年版《中国药典》所收载^[4]。

西藏复杂的地理类型、多样的气候条件、较少的人为破坏等为其生境多样性提供了得天独厚的条件,使其蕴育了极为珍贵的乌头属植物种质资源^[5-6]。西藏乌头属植物除种类丰富外,还具有很强的特有性。在西藏乌头属植物中,已明确具有药用价值的有工布乌头、伏毛直序乌头、铁棒锤、船盔乌头等 13 种,仅占西藏乌头属植物总种数的 17.81%,西藏地区乌头属植物的开发前景十分可观。

目前,在原部颁标准中铁棒锤等药材只有性状、鉴别、性味、功能与主治等部分的简单规定。为完善该类药材的质量标准,依据《中国药典》方法测定水分、灰分、酸不溶性灰分以及浸出物的含量,为质量标准的制定提供一定的数据支撑;并采用当地藏民传统的青稞酒炮制方法,通过高效液相色谱法分析其炮制前后主要生物碱成分含量的变化,为后续西藏乌头属植物成分深入

研究和乌头属植物炮制方法提供新的研究思路。

1 材料

1.1 仪器

FW-400A 高速万能粉碎机(北京中兴伟业世纪仪器有限公司);101-1A 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);CY98-2L 旋转蒸发仪(上海诚育仪器设备有限公司);FA2104N 电子天平(上海菁海仪器有限公司);美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪;ULUP-I-10T 优普超纯水机(成都超纯科技有限公司);CQ-250 型超声波清洗器(上海必能信公司)。

1.2 试药

17 份供试样品于 2021 年 7 月至 8 月,采自于西藏自治区内昌都、拉萨、那曲、林芝等地,药材样品由云南农业大学郭凤根教授鉴定,具体信息见表 1。苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱对照品(四川维克奇生物科技有限公司, HPLC 纯度 $\geq 98.00\%$,批号分别为 wkq22052506、wkq22052505、wkq22052414、wkq23030203、wkq23030202、wkq22102401)。乙腈为色谱纯,水为超纯水。

表 1 样品编号及采集地信息

Tab 1 Sample number and collection location information

序号	采集地	经度	纬度	海拔/m	种名	拉丁名
A1	拉萨墨竹工卡县	91°53'38"	29°58'22"	3872	铁棒锤	<i>Aconitum pendulum</i> Busch
A2	那曲索县	93°45'19"	31°48'50"	3938	铁棒锤	<i>Aconitum pendulum</i> Busch
A3	昌都丁青县	94°52'43"	31°40'33"	3854	铁棒锤	<i>Aconitum pendulum</i> Busch
A4	昌都类乌齐县	96°9'29"	31°9'29"	3982	铁棒锤	<i>Aconitum pendulum</i> Busch
A5	昌都八宿县	96°47'14"	30°44'40"	4242	铁棒锤	<i>Aconitum pendulum</i> Busch
A6	昌都卡若区	96°38'25"	31°9'18"	3764	铁棒锤	<i>Aconitum pendulum</i> Busch
A7	林芝米林县	94°12'30"	29°10'23"	2278	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnantrum</i> Maxim
A8	那曲索县	91°57'28"	31°22'57"	4481	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnantrum</i> Maxim
A9	昌都丁青县	94°52'43"	31°40'33"	4475	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnantrum</i> Maxim
A10	昌都类乌齐县	96°38'36"	31°9'25"	3701	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnantrum</i> Maxim
A11	昌都八宿县	96°50'14"	30°44'38"	4370	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnantrum</i> Maxim
A12	昌都八宿县	96°37'29"	29°29'12"	4010	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnantrum</i> Maxim
A13	昌都卡若区	96°24'48"	31°4'56"	4381	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnantrum</i> Maxim
A14	昌都类乌齐县	96°38'33"	31°9'29"	3982	工布乌头	<i>Aconitum kongboense</i> Lauener
A15	昌都类乌齐县	96°38'39"	31°9'21"	3720	工布乌头	<i>Aconitum kongboense</i> Lauener
A16	昌都类乌齐县	96°37'33"	31°10'53"	3690	工布乌头	<i>Aconitum kongboense</i> Lauener
A17	昌都类乌齐县	96°38'38"	31°9'28"	3719	工布乌头	<i>Aconitum kongboense</i> Lauener

将采回来的植物样品(根部)(见图 1),用清水洗净,一部分在自然条件下阴干。另一部分用西藏昌都地区常用的青稞酒炮制法进行炮制,使

用青稞酒浸泡 24 h,取出晾干。将以上处理样品粉碎过 4 号筛,放置 4 °C 冰箱保存,备用。

2 方法与结果



图 1 17 份样品根

Fig 1 Seventeen sample roots

2.1 水分、灰分、酸不溶性灰分以及浸出物的测定 分别参考《中国药典》四部（2020）通则 0832 中水分测定的第二法、通则中 2302 的灰分及酸不溶性灰分的测定方法以及通则中 2201 的浸出物的测定方法^[7]，结果见表 2。根据测定结果，建议规

定铁棒锤、露蕊乌头、工布乌头的水分含量分别不得超过 8.60%、7.86%、8.18%；总灰分含量分别不得超过 3.38%、4.09%、4.86%；酸不溶性灰分含量分别不得超过 0.29%、0.71%、1.48%；浸出物含量分别不得低于 15.56%、7.34%、15.78%。

表 2 水分、灰分、酸不溶性灰分以及浸出物测定结果

Tab 2 Determination of moisture, ash, acid insoluble ash and extracts

编号	种名	水分含量 /%	总灰分含量 /%	酸不溶性灰分含量 /%	浸出物含量 /%	
					冷浸法	热浸法
A1	铁棒锤	5.34±0.23 ^d	2.08±0.04 ^c	0.24±0.02 ^c	14.53±0.22 ^b	19.92±0.32 ^{ab}
A2		6.18±0.21 ^{bc}	3.25±0.15 ^a	0.28±0.04 ^a	14.44±0.33 ^b	19.51±0.49 ^b
A3		6.47±0.15 ^b	3.18±0.11 ^a	0.23±0.05 ^c	15.57±0.41 ^a	20.77±0.36 ^a
A4		7.25±0.18 ^a	3.45±0.30 ^a	0.19±0.02 ^b	15.16±0.52 ^a	20.05±0.68 ^{ab}
A5		5.39±0.27 ^d	2.81±0.88 ^b	0.26±0.04 ^a	12.59±0.26 ^c	18.25±0.62 ^c
A6		6.05±0.18 ^c	2.21±0.21 ^c	0.23±0.03 ^c	13.01±0.27 ^c	18.19±0.20 ^c
A7	露蕊乌头	6.41±0.05 ^{cd}	4.79±0.15 ^a	0.68±0.03 ^b	8.59±0.41 ^b	10.23±0.63 ^a
A8		7.39±0.24 ^a	2.82±0.07 ^d	0.64±0.02 ^c	6.14±0.59 ^c	7.31±0.36 ^c
A9		6.09±0.20 ^e	2.25±0.22 ^c	0.58±0.02 ^c	8.23±0.56 ^b	9.76±0.58 ^a
A10		6.14±0.08 ^{de}	3.79±0.27 ^{bc}	0.70±0.14 ^a	7.52±0.64 ^c	9.12±0.47 ^b
A11		6.44±0.11 ^{bc}	2.89±0.15 ^d	0.43±0.04 ^e	7.08±0.48 ^{cd}	9.01±0.63 ^b
A12		6.69±0.18 ^{bc}	3.93±0.14 ^b	0.48±0.05 ^f	9.33±0.71 ^a	10.17±0.54 ^a
A13	工布乌头	6.70±0.14 ^b	3.51±0.07 ^c	0.62±0.12 ^d	6.74±0.29 ^d	8.59±0.23 ^b
A14		6.73±0.05 ^b	4.70±0.1 ^a	1.32±0.06 ^b	16.96±1.56 ^b	21.48±0.96 ^a
A15		6.79±0.05 ^{bc}	3.95±0.05 ^c	1.45±0.06 ^a	14.74±0.88 ^c	16.75±0.79 ^b
A16		6.84±0.06 ^{bc}	4.25±0.06 ^b	1.17±0.03 ^c	16.82±0.91 ^b	18.83±0.35 ^b
A17		6.90±0.06 ^a	3.29±0.13 ^d	0.88±0.02 ^d	20.56±1.21 ^a	21.84±0.83 ^a

注：不同字母代表样品之间差异有统计学意义。

Note: Different letters represent significant differences between samples.

2.2 6 种酯型生物碱含量的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX Extend-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1% (磷酸 - 三乙胺 = 1 : 5), B 为乙腈, 梯度洗脱 (见表 3); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 210 nm; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取各对照品适

量置于棕色量瓶中, 用 0.05% 盐酸 - 甲醇溶液定容至 10 mL, 分别制成质量浓度为 0.700、0.059、0.082、0.099、0.083、0.236 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下, 各成分能够很好地分离, 见图 2。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末 1 g, 置于锥形瓶中, 加入 3 mL 氨试液, 湿润 10

表 3 梯度洗脱方法

Tab 3 Gradient elution method

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	85	15
20	75	25
30	73	27
40	67	33
46	64	36
55	62	38
62	60	40
72	10	10
80	10	10

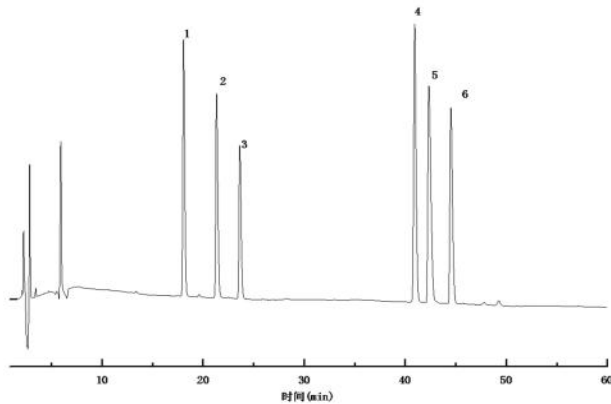


图 2 6 种乌头碱混合对照品的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatography of 6 aconitine mixed standards

1. 苯甲酰新乌头碱 (benzoylmesaconine); 2. 苯甲酰乌头碱 (benzoylaconitine); 3. 苯甲酰次乌头碱 (benzoylhypaconine); 4. 新乌头碱 (mesaconine); 5. 次乌头碱 (hypaconine); 6. 乌头碱 (aconitine)

min, 加入异丙醇-乙酸乙酯 (1:1) 溶液 40 mL, 称重并记录, 超声处理 30 min, 冷却后称重, 补足重量, 过滤, 精密吸取滤液 20 mL, 35 °C 减压回收溶液至干。加入 0.05% 盐酸-甲醇溶液进行溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 使用 0.45 μm 微孔滤膜进行过滤, 滤液作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液各 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、5.0、10 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.05% 盐酸-甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别吸取 20 μL 注入色谱仪, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归。结果见表 4, 表明各成分在对应线性范围内与峰面积线性关系良好。

表 4 6 种生物碱的线性范围和线性关系

Tab 4 Linearity of 6 alkaloids

对照品	回归方程	r 值	范围/μg
苯甲酰新乌头碱	$Y = 1.2019X + 1.9051$	0.9998	0.0175 ~ 1.4000
苯甲酰次乌头碱	$Y = 1.0841X + 1.5733$	0.9996	0.0150 ~ 1.2200
苯甲酰乌头碱	$Y = 1.1555X + 3.8862$	0.9999	0.0200 ~ 1.6000
新乌头碱	$Y = 1.0773X + 1.4267$	0.9995	0.0248 ~ 1.9800
次乌头碱	$Y = 1.1515X + 8.5335$	0.9997	0.0590 ~ 4.7200
乌头碱	$Y = 1.1738X + 3.9388$	0.9999	0.2075 ~ 1.6600

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品混合液按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱峰面积的 RSD 分别为 0.76%、0.75%、0.68%、1.0%、1.8%、0.84% (n = 5), 表明仪器的精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定, 并记录峰面积值, 计算 RSD 值, 结果样品中的苯甲酰新乌头碱、新乌头碱、次乌头碱均未检测到, 苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、乌头碱的 RSD 分别为 2.1%、2.3%、0.70%, 表明该测定方法稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批供试品溶液 6 份, 进样测定, 并记录峰面积值, 计算 RSD 值。结果苯甲酰新乌头碱、新乌头碱、次乌头碱均未检测到, 苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、乌头碱 RSD 值分别为 1.8%、2.0%、0.84%, 表明该测定方法重复性良好。

2.2.8 加样回收试验 称取 9 份已知含量的供试样品粉末 1 g, 精密称取一定量的对照品, 按照“2.2.3”项下方法配制供试品溶液, 检测并计算回收率。苯甲酰新乌头碱低、中、高浓度的平均回收率分别为 98.90%、99.29%、96.68%, RSD 值分别为 0.48%、0.27%、0.23%; 苯甲酰乌头碱低、中、高浓度的平均回收率分别为 105.83%、101.62%、101.72%, RSD 值分别为 1.7%、1.5%、1.4%; 苯甲酰次乌头碱低、中、高浓度的平均回收率分别为 102.08%、101.65%、100.23%, RSD 值分别为 0.52%、0.45%、0.39%; 新乌头碱低、中、高浓度的平均回收率分别为 99.53%、99.82%、99.18%, RSD 值分别为 0.29%、0.20%、0.37%; 次乌头碱低、中、高浓度的平均回收率分别为 99.42%、98.43%、99.53%, RSD 值分别为 0.38%、0.54%、0.17%; 乌头碱低、中、高浓度的平均回收率分别为 101.92%、101.83%、101.50%, RSD 值分别为 1.5%、1.9%、1.2%。6 种生物碱的加样回收率在 96.45% ~ 107.76%, RSD 值均小于 2%, 表明该方法回收率良好。

2.2.9 样品测定 按“2.2.1”项下色谱条件对 17 份炮制前后的乌头属植物进行检测, 结果见图 3。不同地区铁棒锤的单酯型生物碱的质量分数在 0.0473 ~ 0.2539 mg · g⁻¹, 平均质量分数为 0.1480 mg · g⁻¹, 最高值 A5 是最低值 A2 的 5.37 倍, 双酯型生物碱质量分数在 0.7600 ~ 2.6864 mg · g⁻¹, 平均质量分数为 1.6154 mg · g⁻¹, 最高值 A4 是最低值 A2 的 3.53 倍; 不同地区露蕊乌头的单酯型生物碱质量分数在 0 ~ 0.0747 mg · g⁻¹, 仅 A13 未检测出

单酯型生物碱，其平均质量分数为 $0.0394 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，最高值 A9 是最低值 A12 的 2.93 倍，双酯型生物碱质量分数在 $0.0440 \sim 0.4637 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，平均质量分数为 $0.2026 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，最高值 A13 是最低值 A12 的 10.54 倍。不同地区工布乌头的单酯型生物碱质量

分数在 $0.6252 \sim 1.8662 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，平均质量分数为 $1.0416 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，最高值 A14 是最低值 A17 的 2.98 倍，双酯型生物碱质量分数在 $0.8474 \sim 1.6053 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，平均质量分数为 $1.2276 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，最高值 A17 是最低值 A14 的 1.89 倍 (见表 5)。

表 5 6 种酯型生物碱含量测定结果
Tab 5 Determination of 6 ester alkaloids

编号	单酯型生物碱 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)				双酯型生物碱 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			
	苯甲酰新乌头碱	苯甲酰乌头碱	苯甲酰次乌头碱	总量	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	总量
A1	—	0.0911	0.0503	0.1414	—	—	1.3696	1.3696
A2	—	0.0176	0.0297	0.0473	—	—	0.7600	0.7600
A3	—	0.1409	0.0412	0.1821	—	—	1.2695	1.2695
A4	—	0.0555	0.0558	0.1113	—	—	2.6864	2.6864
A5	—	0.1706	0.0833	0.2539	—	—	2.5015	2.5015
A6	—	0.1082	0.0440	0.1522	—	—	1.1064	1.1064
A7	—	0.0147	0.0219	0.0366	0.0136	0.0728	0.0108	0.0972
A8	—	—	0.0471	0.0471	0.0180	0.2243	0.0142	0.2565
A9	—	0.0218	0.0529	0.0747	0.0174	0.1693	0.0292	0.2159
A10	—	0.0173	0.0193	0.0366	—	0.0692	—	0.0692
A11	—	—	0.0556	0.0556	—	0.2715	—	0.2715
A12	0.0124	0.0131	—	0.0255	0.0122	0.0239	0.0079	0.0440
A13	—	—	—	—	0.4510	0.0127	—	0.4637
A14	1.8071	0.0277	0.0314	1.8662	0.8206	0.0100	0.0168	0.8474
A15	0.7519	0.0062	0.0066	0.7647	1.3179	—	—	1.3179
A16	0.8932	0.0055	0.0116	0.9103	1.1398	—	—	1.1398
A17	0.6200	—	0.0052	0.6252	1.5984	—	0.0069	1.6053

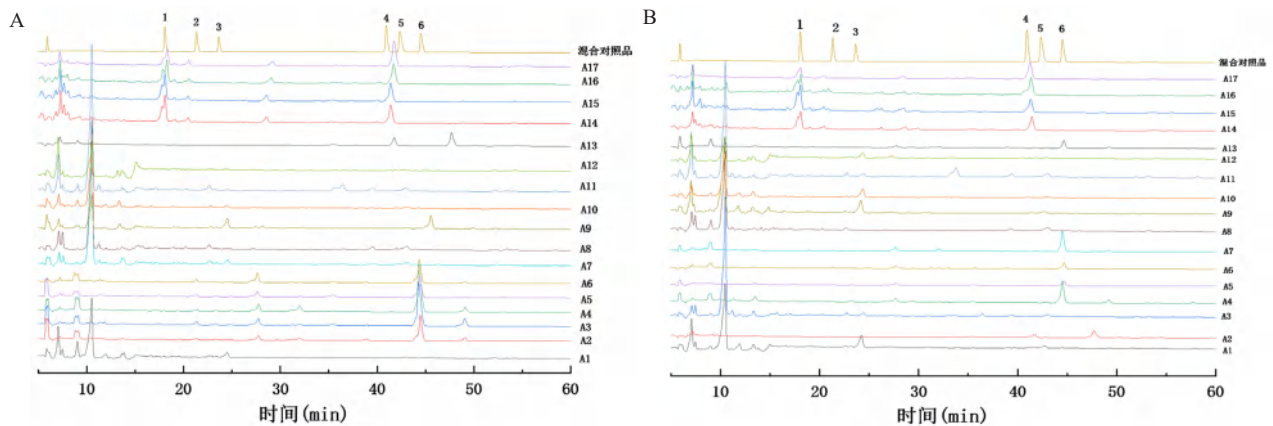


图 3 17 份炮制前 (A) 和炮制后 (B) 的乌头属植物及混合对照品的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of 17 Aconitum plants and mixed reference substances before (A) and after the processing (B)

1. 苯甲酰新乌头碱 (benzoylmesaconine); 2. 苯甲酰乌头碱 (benzoylaconitine); 3. 苯甲酰次乌头碱 (benzoylhypaconine); 4. 新乌头碱 (mesaconine); 5. 次乌头碱 (hypaconine); 6. 乌头碱 (aconitine)

对比生品的生物碱质量分数发现，青稞酒炮制后铁棒锤、露蕊乌头、工布乌头生物碱质量分数均不同程度地明显下降，单酯型生物碱平均质量分数分别下降 72.38%、44.83%、60.85%；双酯型生物碱平均质量分数分别下降 88.61%、46.49%、31.52% (见表 6)。

3 讨论与结论

3.1 水分、灰分及浸出物含量的分析研究

水分、灰分、浸出物等检查项在药材质量控

制中尤其重要。本试验结果与文献^[8-10]研究藏药铁棒锤、康定乌头和木里乌头所得结果低，但差距较小。差异的原因可能是药材种质、生境、海拔、采收时间以及储存运输方法的不同。在本试验中对水分、总灰分、酸不溶性灰分以及浸出物的平均值分别上浮 20%。初步制定了检查项的最高和最低限度，弥补了原质量标准中对铁棒锤等药材无检查项的缺陷，起到了补充和完善的作用。

3.2 6 种酯型生物碱含量炮制前后的变化分析研究

表 6 炮制后 6 种酯型生物碱含量测定结果

Tab 6 Content of 6 ester alkaloids after the processing

编号	单酯型生物碱 / (mg · g ⁻¹)				双酯型生物碱 / (mg · g ⁻¹)			
	苯甲酰新乌头碱	苯甲酰乌头碱	苯甲酰次乌头碱	总量	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	总量
A1	—	—	—	—	—	—	0.1892	0.1892
A2	—	0.0047	0.0173	0.0220	—	—	0.1401	0.1401
A3	—	0.0386	—	0.0386	—	—	0.2542	0.2542
A4	0.0087	0.0293	0.0654	0.1034	—	—	0.2185	0.2185
A5	0.0048	0.0111	0.0282	0.0441	—	—	0.0835	0.0835
A6	—	0.0166	0.0207	0.0373	—	—	0.2185	0.2185
A7	—	0.0060	0.0197	0.0257	0.0098	0.0496	—	0.0594
A8	0.0126	0.0054	—	0.0180	—	0.1646	—	0.1646
A9	—	0.0151	—	0.0151	—	—	—	—
A10	—	—	0.0149	0.0149	—	0.0056	—	0.0056
A11	0.0098	0.0094	0.0141	0.0333	—	0.1972	—	0.1972
A12	—	—	0.0143	0.0143	—	0.0138	—	0.0138
A13	0.0094	0.0217	—	0.0311	0.3182	—	—	0.3182
A14	0.5052	0.0158	—	0.5211	0.6946	—	—	0.6946
A15	0.4622	0.0218	—	0.4840	1.0524	—	—	1.0524
A16	0.6572	—	0.0234	0.6805	0.7302	—	—	0.7302
A17	0.4666	—	—	0.4666	0.8854	—	—	0.8854

注 (Note): “—” 代表未检测到 (Representative not detected)。

有研究表明, 植物体中的生物碱含量伴随生长发育过程中周围环境的变化而变化, 如光合作用越强, 促进植物有效成分转化含量越多^[11]; 通过聚类分析得知, 本研究中同种乌头之间的各类成分差异与海拔有一定相关性, 较高海拔样品的生物碱含量越高。不同种乌头之间的生物碱含量相差较大, 单酯型生物碱质量分数从高到低依次为工布乌头 > 铁棒锤 > 露蕊乌头, 双酯型生物碱质量分数从高到低依次为铁棒锤 > 工布乌头 > 露蕊乌头, 推测导致含量差异较大的原因可能是环境气候、土壤因素^[12]、采收时间及种源间^[13]的差异影响。

目前, 有关青稞酒炮制乌头属植物的生物碱含量变化的研究未见报道。在本研究中, 选用西藏当地青稞酒炮制乌头的方法, 发现经过青稞酒炮制后样品中生物碱含量明显下降, 推测可能是炮制时间过长, 导致生物碱大量被分解, 虽然毒性降低了, 但药效也随之下降^[14]。可以看出该炮制方法还不完善, 建议后期通过缩短炮制时间等方法, 使其达到毒性低、疗效好的最佳炮制程度。

3.3 高效液相色谱条件的选择

在本研究中参考了文献^[15]的色谱条件, 结果出现了基线下斜, 出峰过早, 拖尾及叠峰等现象。为了克服这种现象, 本研究对流动相的比例进行调整, 将三乙胺比例调高。改进后的 HPLC 方法克服了基线下斜现象, 且被测组分分离度较好, 峰展宽适中, 同时还增加了苯甲酰次乌头碱和次乌头碱两种酯型生物碱组分的检测, 易操作且准确可行。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 150-159.
- [2] 关文灵, 李世锋, 郑思乡. 云南乌头属花卉资源及其开发利用[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(6): 22-26.
- [3] 李谦, 过立农, 郑健, 等. 乌头属药用植物的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1129-1149.
- [4] 林瑞超. 中国药材标准名录[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [5] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [6] 刘治民. 藏药榜嘎、榜那的资源调查和药用合理性评价[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [7] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 114, 234, 232.
- [8] 王容. 藏药材榜那的质量控制及其抗炎关节炎药效物质基础研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2020.
- [9] 周礼仕, 王毓杰, 杜蕾蕾, 等. 藏药康定乌头质量标准研究[J]. 中药材, 2014, 37(6): 977-980.
- [10] 郑彩霞. 藏药木里乌头及甘青乌头的质量研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2016.
- [11] 秦利芬, 杨玉琴. 不同采收期的附子中 3 种乌头碱的含量比较[J]. 微量元素与健康研究, 2012, 29(6): 31-32.
- [12] 蔡仕珍, 李璟, 潘远智, 等. 不同种植密度对乌头生长发育的影响[J]. 草业学报, 2011, 20(2): 278-282.
- [13] 王瑞, 刘芳, 孙毅坤, 等. 不同附子炮制品中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(10): 1361-1363.
- [14] 王洪云, 左爱学, 孙赞, 等. 东川雪上一支蒿的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4324-4328.
- [15] 王容, 魏屹, 周春岚, 等. 基于指纹图谱结合化学计量法对乌头属藏药材榜那的多指标成分分析[J]. 中草药, 2020, 51(11): 3037-3044.

(收稿日期: 2023-04-09; 修回日期: 2023-07-07)

五苓益肺汤对哮喘模型大鼠的免疫调节作用及对 TLR4/NF- κ B 通路的影响

叶超雄¹, 何晓亮², 张色华³, 李俊雄¹, 潘倩榕¹, 熊天琴^{2*} (1. 广东省中西医结合医院, 广东 佛山 528200; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 3. 佛山市南海区桂城医院, 广东 佛山 528253)

摘要: **目的** 通过生物信息学分析以及动物实验验证相结合的方法, 探讨五苓益肺汤治疗哮喘的潜在关键靶点和相关的信号通路, 为该方的开发提供实验依据。**方法** 采用网络药理学方法筛选五苓益肺汤治疗哮喘的核心靶点和通路。雄性 SD 大鼠于第 1、8、15 日腹腔注射 1 mL 卵清蛋白致敏液, 第 22 ~ 28 日给予 10 μ L/ 鼻孔卵清蛋白激发液滴鼻。首次致敏后 2 h 给予相应药物灌胃治疗。最后一次滴鼻激发 24 h 内取血、取肺组织、取肺泡灌洗液, 检测免疫和炎症指标, 并观察肺组织 TLR4、NF- κ B 表达情况。**结果** 网络药理学筛选出五苓益肺汤治疗哮喘的核心靶点 AKT1、IL6、JUN、IL1B、IKKB、MAPK8 等 51 个, KEGG 富集分析获得 TLR4/NF- κ B 等通路 146 条。动物实验结果显示, 与模型组相比, 五苓益肺汤能升高胸腺指数, CD8⁺; 降低脾指数, 血清 IgE, CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和肺泡灌洗液中及肺组织匀浆中 SOD、白细胞、淋巴细胞数量和 TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β 、IL-6 水平及 MDA 表达; 减少肺组织炎症细胞浸润, 改善肺泡间隔增厚、结构不清晰情况; 减少肺组织中 TLR4 和 NF- κ B p65 的表达。**结论** 五苓益肺汤能有效减轻大鼠的哮喘, 其机制可能与调节 TLR4/NF- κ B 通路有关。

关键词: 五苓益肺汤; 哮喘; 网络药理学; TLR4; NF- κ B

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-2893-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.012

Effect of Wuling Yifei decoction on the immunomodulation and TLR4/NF- κ B pathway in asthma model rats

YE Chao-xiong¹, HE Xiao-liang², ZHANG Se-hua³, LI Jun-xiong¹, PAN Qian-rong¹, XIONG Tian-qin^{2*} (1. Guangdong Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Foshan Guangdong 528200; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 3. Guicheng Hospital of Nanhai District, Foshan City, Foshan Guangdong 528253)

Abstract: Objective To determine the potential key targets and related signaling pathways of Wuling Yifei decoction (WLYFT) for asthma and to provide an experimental basis for the development of this formula, through mutually integrated approach of bioinformatics analysis and animal experimental validation. **Methods** A network pharmacology approach was used to screen the core targets and pathways of WLYFT for asthma. Male SD rats were intraperitoneally injected 1 mL OVA sensitizing solution on day 1, 8 and 15, and nasal drops (10 μ L/nostril) OVA stimulating solution on day 22 ~ 28. Drugs were given orally 2 h after the first sensitization. Blood, lung tissue and alveolar lavage were collected within 24 hours after the last nasal drip to test the immune and inflammatory indexes and the expression of TLR4 and NF- κ B in the lung tissue were observed. **Results** Totally 51 core targets of WLYFT for asthma were screened by network pharmacology, including AKT1, IL6, JUN, IL1B, IKKB, MAPK8, etc, and 146 pathways such as TLR4/NF- κ B were obtained by KEGG analysis.

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (No.20212040)。

作者简介: 叶超雄, 男, 副主任中药师, 主要从事医院药事管理、名医方药搜集整理、中药配方研究等, email: nhzyycx@126.com

*通信作者: 熊天琴, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药药理研究, email: xiongtq020@gzucm.edu.cn

Compared with the model group, WLYFT increased thymic index, CD8⁺, SOD; decreased spleen index, serum IgE, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, IL-6, IL-1 β , TNF- α and TGF- β contents in alveolar lavage fluid, and MDA in the lung tissue homogenate; improved unclear lung tissue structure, bronchial wall smooth muscle thickening, alveolar lumen enlargement, alveolar wall thickening; and reduced the inflammatory cell infiltration, the expression of TLR4 and NF- κ B p65 in the lung tissues. **Conclusion** WLYFT can effectively alleviate asthma in rats, and the mechanism may be related to the regulation of TLR4/NF- κ B pathway.

Key words: Wuling Yifei decoction; asthma; network pharmacology; TLR4; NF- κ B

哮喘 (asthma) 是一种慢性和复发性的气道疾病, 以呼吸急促和胸闷为特征, 在严重的情况下, 哮喘发作可能导致死亡。目前哮喘仍是一种能控制不能根治的慢性疾病, 在接受一线药物治疗的患者中有一半以上对治疗没有反应^[1]。中医作为补充和替代医学的主要疗法之一, 在治疗疾病方面有着悠久的历史^[2]。使用中医药治疗哮喘已被许多临床试验证明有效^[3-5]。有研究报道, TLR4 通过识别细菌脂多糖进而激活 NF- κ B 信号通路^[6]。TLR4/NF- κ B 信号通路介导的炎症和抗炎因子失衡以及肺免疫系统失调可导致肺氧化应激和损伤^[7], 而抑制 TLR4/ROS/NF- κ B 信号通路有利于哮喘的治疗^[8]。此外, 右美托咪定可通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路来减轻气道高反应性和过敏性气道炎症^[9]。苦杏仁苷通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路能减轻咳嗽变异性哮喘的炎症发生^[10]。黄芩苷能通过上调 miR-103 和抑制 TLR4/NF- κ B 阻止小儿哮喘进展^[11]。

中药复方五苓益肺汤由五味子、茯苓、山药、白术、薏苡仁、黄芪、太子参、浮小麦组成, 是广东省中西医结合医院的临床经验方, 具有润肺生津, 益气健脾之功。近年来, 五苓益肺汤在支气管哮喘患者中广泛应用, 疗效明显, 但其作用机制尚不明确。本研究拟通过网络药理学分析以及动物实验验证相结合的方法, 探讨五苓益肺汤治疗哮喘的相关靶点通路及药效作用, 为该方的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 7~8 周龄 [质量合格证编号: No.44007200098935, 使用许可证号: SYXK (粤) 2019-0202, 广东省医学实验动物中心] 于 SPF 级环境中饲养。本实验通过广州中医药大学动物实验伦理审查。

1.2 试药

五苓益肺汤 (五味子 15 g、茯苓 15 g、山药 15 g、白术 15 g、薏苡仁 10 g、黄芪 10 g、太子参 10 g、浮小麦 10 g, 广东省中西医结合医院自制)。

卵清蛋白 (OVA, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: D2109064); 氢氧化铝佐剂 [Al (OH)₃, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号: WB317588]; 地塞米松片 (广东南国药业有限公司, 批号: 201101); 免疫球蛋白 E (IgE)、白介素 (IL) -6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 (TNF) - α 、转化生长因子 (TGF) - β 的 ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 批号: 01/2022); TLR4 抗体、NF- κ B 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 00048459、00106161); 丙二醛 (MDA) 测试盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒 (南京建成生物工程研究所有限公司, 批号分别为 20220112、20220311); APC anti-rat CD3 抗体、FITC anti-rat CD4 抗体、PE anti-rat CD8a 抗体 (美国 Biolegend 公司, 批号分别为 201413、201505、200607); 4% 多聚甲醛通用型组织固定液 (美国 Biosharp 公司, 批号: 21207613)。

1.3 仪器

NovoCyte Quanteon 流式细胞仪 (美国 Agilent 公司); BC-2800Vet 兽用全自动血液细胞分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); THM51119300 全波长酶标分析仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 数据库及软件 中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>); OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>); Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); David 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/summary.jsp>)。

2.1.2 五苓益肺汤活性成分及作用靶点筛选

以五苓益肺汤各味药为关键词在 TCMSP 平台检索,按口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$,类药性 (DL) ≥ 0.18 筛选其活性成分及靶点,对所得靶点在 Uniprot 数据库中进行注释。

2.1.3 哮喘疾病靶点筛选 以“asthma”为关键词在 OMID 数据库、Gene Cards 数据库中检索并整理得到哮喘疾病靶点。

2.1.4 五苓益肺汤-哮喘蛋白质互作网络构建与分析 对五苓益肺汤靶点和哮喘疾病靶点取交集,获得五苓益肺汤治疗哮喘潜在靶点。将潜在靶点导入 String 数据库,选择“multiple proteins”,种属设定为“homo sapiens”,设定中等置信度 (0.400),进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析,将结果导入 cytoscape 3.9.1 软件进行可视化。根据 degree 值从大到小,自内而外排列,以 2 倍节点度值 (degree) 的中位数为最低标准筛选出核心靶标蛋白^[12]。

2.1.5 五苓益肺汤核心靶点 GO 功能分析和 KEGG 富集分析 将核心靶点导入 David 数据库中,选择物种为 homo sapiens,对靶点进行 GO 和 KEGG 注释。以 $P < 0.01$ 为标准,选择 count 对 GO 功能和富集的 KEGG 通路进行排序,选择 10 个主要功能和通路绘图。

2.2 药物制备

以蒸馏水浸泡五苓益肺汤中药饮片 30 min,加热煮沸后改文火煎 30 min,滤除药液后复煎一次,所得药液合并浓缩为低剂量 $0.55 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、中剂量 $1.11 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、高剂量 $2.22 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,此为按体表面积等效剂量法进行人与大鼠给药剂量折算,分别相当于成人临床剂量的 0.5 倍、1 倍、2 倍。

2.3 动物分组、造模给药及取材

36 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为 6 组,分别为正常对照组、模型组、五苓益肺汤低剂量组、五苓益肺汤中剂量组、五苓益肺汤高剂量组、地塞米松组。参考相关文献制备大鼠哮喘模型^[13-14],除对照组外,其余各组于第 1、8、15 日腹腔注射 1 mL OVA 致敏液 [1 mL 生理盐水含 OVA 10 mg, $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 mg],致敏结束 1 周后,除正常对照组外,其余各组给予 10 μL /鼻孔 OVA 激发液 [1 mL 生理盐水含 OVA 100 mg, $\text{Al}(\text{OH})_3$ 1000 mg] 滴鼻,每日一次,持续 1 周,正常对照组给予等量生理盐水。五苓益肺汤组于首次致敏 2 h 后给予五苓益肺汤灌胃治疗,每日一次;地塞米松组于首次激发 2 h 后给予地塞米松 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,生理盐水溶解) 灌胃治疗,

每日一次;正常对照组、模型组给予生理盐水灌胃治疗。最后一次激发后 2 h 进行最后一次灌胃治疗。激发结束 24 h 内进行取材。实验期间观察和记录大鼠一般形态学情况,以大鼠出现气急喘促、腹式呼吸、口鼻发绀、烦躁不安、易怒等为造模成功。

腹主动脉取血,分离血清,ELISA 检测大鼠血清 IgE 水平。取胸腺、脾,称重,计算免疫器官指数,免疫器官指数 (%) = 免疫器官重量 / 体重 $\times 100\%$ 。收集肺泡灌洗液 (BALF),用于血细胞计数分析,ELISA 检测 IL-6、IL-1 β 、TGF- β 、TNF- α 水平。按重量比 1:9 肺组织匀浆,生化法检测 MDA、SOD 水平。流式细胞分析术检测肺组织 T 细胞亚群。HE 染色检测肺组织病变情况。免疫组化检测肺组织 TLR4 和 NF- κB p65 的表达。

2.4 统计学分析

各组数据采用 GraphPad Prism 9 进行单因素方差分析,并以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 五苓益肺汤成分靶点及哮喘疾病靶点结果

TCMSP 数据库筛选出五苓益肺汤有效潜在活性成分 94 个,其中五味子 9 个、茯苓 15 个、白术 14 个、黄芪 20 个、山药 16 个、薏苡仁 9 个、太子参 8 个、浮小麦 3 个。经过靶点预测,得到 292 个靶点。OMID 数据库、GeneCards 数据库获得哮喘疾病相关靶点 4971 个。将五苓益肺汤成分潜在作用靶点与哮喘相关靶点取交集,找到共同的蛋白靶点,共 226 个,将所得的共同靶点可视化。以 2 倍节点度值 (degree) 的中位数筛选核心靶点。核心靶点包括 AKT1、IL6、JUN、IL1B、IKBK、MAPK8 等 51 个,见图 1。

3.1.2 五苓益肺汤核心靶点 GO 功能分析和 KEGG 富集分析

以 $P < 0.01$ 为标准进行筛选后,条形图呈现 10 条主要 GO 功能条目。五苓益肺汤治疗哮喘的生物学过程 (BP) 包括细胞对活性氧、药物、异物刺激、肿瘤坏死因子、炎症、机械刺激的反应及对 NF- κB 转录因子活性的正向调节等 (见图 2)。

以 $P < 0.01$ 为标准进行筛选后,气泡图呈现 10 条主要 KEGG 通路条目。五苓益肺汤治疗哮喘的通路包括脂质和动脉硬化、IL-17 信号通路、TNF 信号传导途径、Th17 细胞分化、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号传导途径、T 细胞受体信号传导途径、NOD 样受体信号传导途径、Th1 和

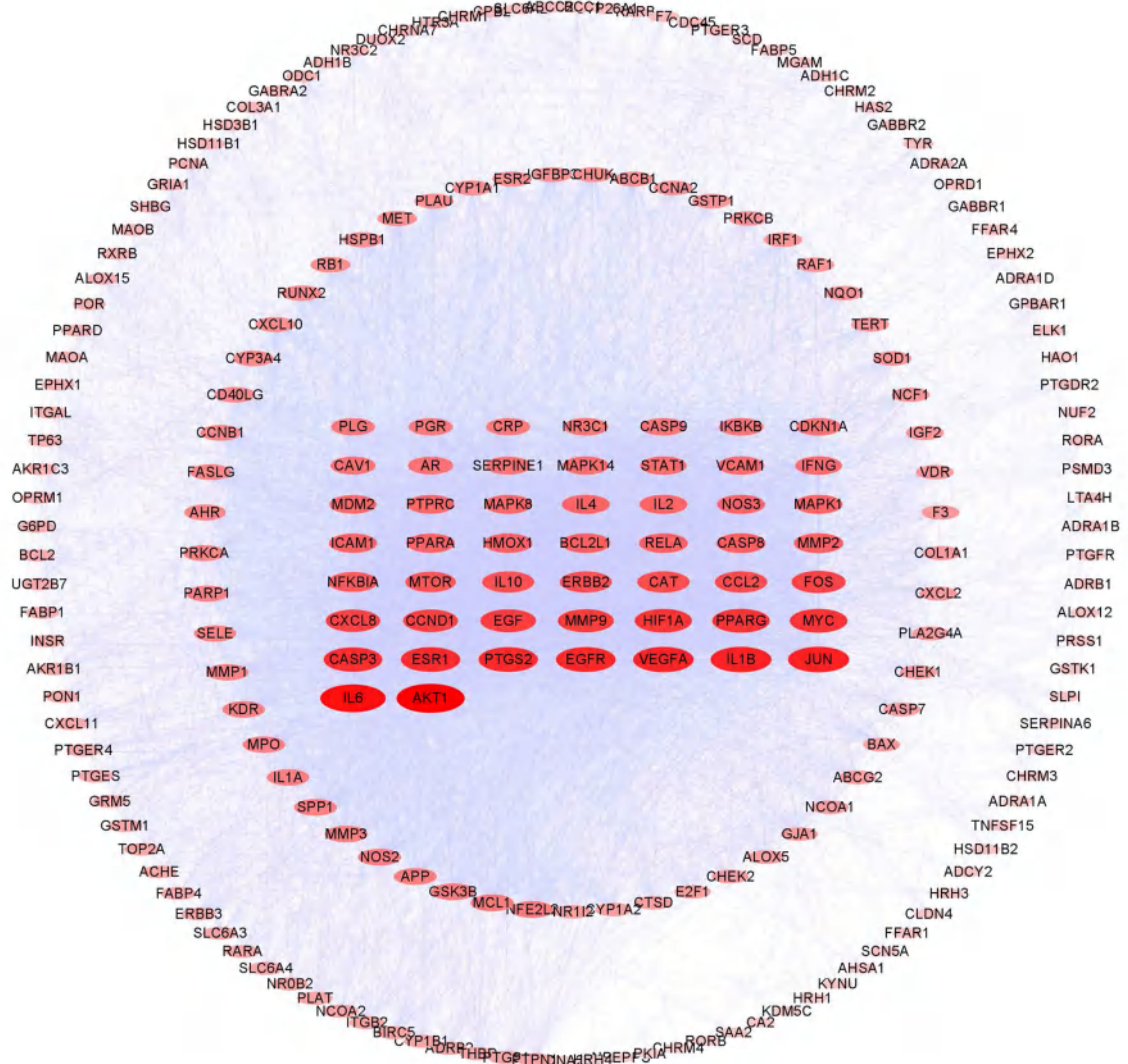


图 1 五苓益肺汤治疗哮喘潜在靶点 PPI 网络
Fig 1 PPI network of potential target for treating asthma by Wuling Yifei decoction

Th2 细胞分化、NF-κB 信号传导途径, 见图 3。

3.2 五苓益肺汤对哮喘大鼠肺组织病理结构的影响

如图 4 所示, 正常对照组大鼠肺组织支气管和肺泡结构清晰完整, 支气管绒毛排列整齐, 未见平滑肌层及管壁增厚, 无明显的炎症细胞浸润。模型组大鼠肺组织结构不清晰, 支气管壁平滑肌增厚, 肺泡腔扩大, 肺泡壁增厚, 壁周围炎性细胞浸润。给予药物治疗后肺组织结构较清晰, 肺泡腔扩大、肺泡壁增厚情况明显改善, 炎症细胞减少; 其中给予地塞米松治疗后无明显的炎症细胞浸润。

3.3 五苓益肺汤对哮喘大鼠免疫器官指数的影响

如表 1 所示, 造模后, 与正常对照组相比, 模型组大鼠胸腺指数降低, 脾指数升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 五苓益肺汤中剂量可明显升高大鼠胸腺指数, 降低脾指数 ($P < 0.05$); 给予五苓益肺汤高剂量后, 可明显升高大鼠胸腺指数

($P < 0.05$), 降低脾指数 ($P > 0.05$)。

3.4 五苓益肺汤对哮喘大鼠血清 IgE 含量的影响

如表 2 所示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠血清 IgE 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 地塞米松和五苓益肺汤低、中、高剂量组大鼠血清中 IgE 含量显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 五苓益肺汤对哮喘大鼠肺组织 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的影响

如表 3 所示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠 CD4⁺ 表达升高, CD8⁺ 表达下降, 并使得 CD4⁺/CD8⁺ 上升 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 给予地塞米松和五苓益肺汤低、中、高剂量治疗后, 均能显著降低 CD4⁺ 的表达 ($P < 0.01$), 上升 CD8⁺ 的表达, 并使得 CD4⁺/CD8⁺ 显著降低 ($P < 0.01$)。

3.6 五苓益肺汤对哮喘大鼠肺泡灌洗液中白细胞和淋巴细胞数量及炎症因子含量的影响

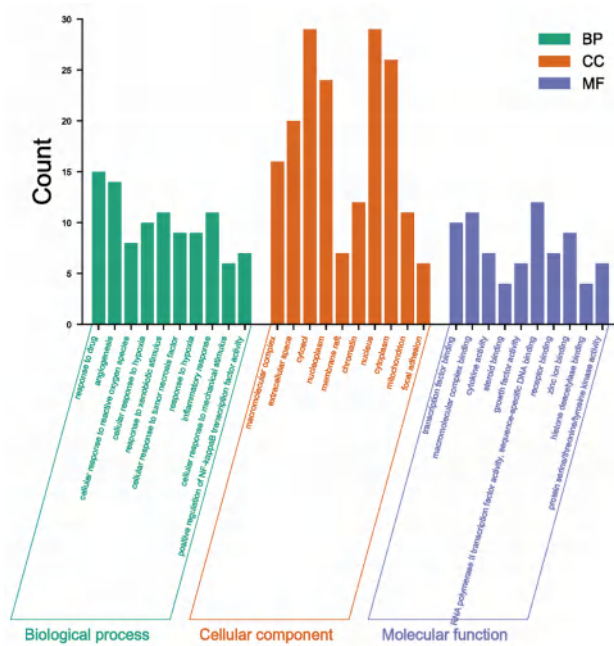


图 2 五苓益肺汤治疗哮喘的核心靶点 GO 功能分析结果
Fig 2 Core target GO function analysis of Wuling Yifei decoction in the treatment of asthma

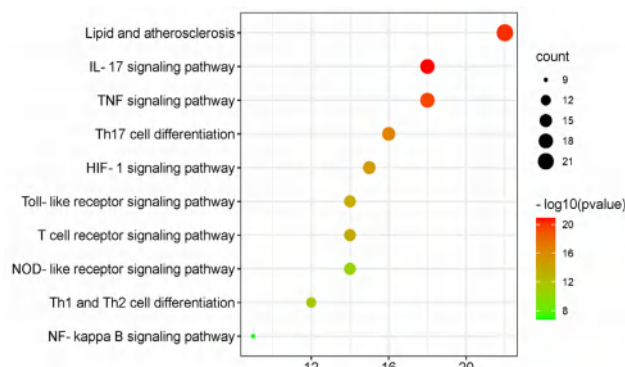


图 3 五苓益肺汤治疗哮喘的核心靶点 KEGG 富集分析结果
Fig 3 KEGG enrichment of the core target of Wuling Yifei decoction in the treatment of asthma

表 1 五苓益肺汤对哮喘大鼠免疫器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab 1 Effect of Wuling Yifei decoction on immune organ index of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	胸腺指数 /%	脾指数 /%
正常对照组	0.2000 ± 0.012	0.194 ± 0.010
模型组	0.139 ± 0.012 ^{###}	0.269 ± 0.026 ^{###}
五苓益肺汤低剂量组	0.171 ± 0.021	0.229 ± 0.027
五苓益肺汤中剂量组	0.196 ± 0.012 ^{**}	0.218 ± 0.029 [*]
五苓益肺汤高剂量组	0.185 ± 0.023 [*]	0.243 ± 0.026
地塞米松组	0.038 ± 0.010 ^{**}	0.110 ± 0.011 ^{**}

注：与正常对照组相比，^{###} $P < 0.01$ ；与模型组相比，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

Note: vs the normal control group, ^{###} $P < 0.01$; vs the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

表 2 五苓益肺汤对哮喘大鼠血清 IgE 含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab 2 Changes of serum IgE content in asthmatic rats induced by Wuling Yifei decoction ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	IgE / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常对照组	1.00 ± 0.10
模型组	2.27 ± 0.16 ^{###}
五苓益肺汤低剂量组	1.55 ± 0.39 ^{**}
五苓益肺汤中剂量组	1.52 ± 0.32 ^{**}
五苓益肺汤高剂量组	1.67 ± 0.15 ^{**}
地塞米松组	1.64 ± 0.25 ^{**}

注：与正常对照组相比，^{###} $P < 0.01$ ；与模型组相比，^{**} $P < 0.01$ 。

Note: vs the normal control group, ^{###} $P < 0.01$; vs the model group, ^{**} $P < 0.01$.

如表 4 所示，与正常对照组相比，模型组大鼠肺泡灌洗液中白细胞、淋巴细胞数量和 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 含量上升 ($P < 0.01$)。与模型组相比，给予地塞米松和五苓益肺汤低、中、高剂量治疗后，大鼠肺泡灌洗液中白细胞、淋巴细胞数量显著降低 ($P < 0.01$)，IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 含量降低 ($P < 0.05$)。

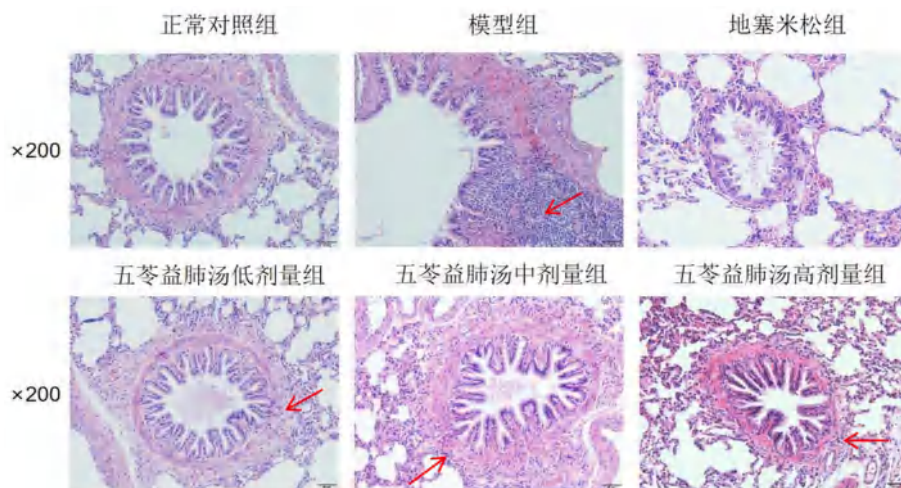


图 4 各组大鼠肺组织病理学变化 ($\times 200$)
Fig 4 Lung histopathological changes in each group ($\times 200$)

表 3 五苓益肺汤对哮喘大鼠肺组织 CD4⁺、CD8⁺T 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 3 Effect of Wuling Yifei decoction on CD4⁺ and CD8⁺T cells in lung tissue of asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常对照组	15.38±2.25	24.96±6.51	0.63±0.06
模型组	30.63±3.48 ^{###}	15.56±3.79 [#]	2.07±0.66 ^{###}
五苓益肺汤低剂量组	17.11±1.99 ^{**}	22.03±0.58	0.78±0.10 ^{**}
五苓益肺汤中剂量组	18.51±0.69 ^{**}	21.05±1.36	0.88±0.08 ^{**}
五苓益肺汤高剂量组	17.31±1.39 ^{**}	21.53±0.93	0.80±0.07 ^{**}
地塞米松组	21.10±0.48 ^{**}	24.98±3.00 [*]	0.85±0.11 ^{**}

注:与正常对照组相比, [#]*P* < 0.05, ^{###}*P* < 0.01;与模型组相比, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01。

Note: vs the normal control group, [#]*P* < 0.05, ^{###}*P* < 0.01; vs the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

表 4 五苓益肺汤对哮喘大鼠肺泡灌洗液中白细胞和淋巴细胞数量及炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 4 Effect of Wuling Yifei decoction on the leukocyte and lymphocyte count and the contents of IL-6, IL-1 β , TNF- α and TGF- β in asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	白细胞 ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	淋巴细胞 ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	IL-6/ (ng · mL ⁻¹)	IL-1 β / (ng · mL ⁻¹)	TNF- α / (ng · mL ⁻¹)	TGF- β / (pg · mL ⁻¹)
正常对照组	10.92±1.58	8.75±1.10	0.089±0.011	0.223±0.017	0.138±0.028	0.260±0.055
模型组	23.52±4.30 ^{###}	18.03±3.36 ^{###}	0.406±0.066 ^{###}	0.477±0.042 ^{###}	0.377±0.067 ^{###}	0.656±0.160 ^{###}
五苓益肺汤低剂量组	12.00±3.69 ^{**}	8.70±2.95 ^{**}	0.196±0.100 ^{**}	0.376±0.104	0.284±0.084	0.396±0.069 ^{**}
五苓益肺汤中剂量组	9.05±3.89 ^{**}	6.82±3.00 ^{**}	0.224±0.021 ^{**}	0.346±0.031 ^{**}	0.250±0.026 [*]	0.323±0.063 ^{**}
五苓益肺汤高剂量组	8.28±1.61 ^{**}	6.20±1.52 ^{**}	0.228±0.022 ^{**}	0.349±0.036 ^{**}	0.256±0.026 [*]	0.318±0.025 ^{**}
地塞米松组	5.65±2.29 ^{**}	4.68±2.15 ^{**}	0.184±0.051 ^{**}	0.326±0.085 [*]	0.209±0.084 [*]	0.317±0.066 ^{**}

注:与正常对照组相比, ^{###}*P* < 0.01;与模型组相比, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01。

Note: vs the normal control group, ^{###}*P* < 0.01; vs the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

强,给予五苓益肺汤和地塞米松治疗后,TLR4 和 NF- κ B p65 的表达有不同程度的降低,地塞米松组与五苓益肺汤组无明显差异。

表 5 五苓益肺汤对哮喘大鼠 MDA、SOD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 5 Effect of Wuling Yifei decoction on MDA and SOD in asthmatic rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	MDA/(nmol · mgprot ⁻¹)	SOD/(U · mgprot ⁻¹)
正常对照组	1.40±0.29	645.05±119.99
模型组	3.02±0.56 ^{###}	175.59±23.20 ^{###}
五苓益肺汤低剂量组	1.76±0.62 ^{**}	268.00±33.06 ^{**}
五苓益肺汤中剂量组	1.24±0.43 ^{**}	306.99±66.24 [*]
五苓益肺汤高剂量组	1.27±0.52 ^{**}	302.68±62.44 [*]
地塞米松组	1.69±0.37 ^{**}	324.91±50.33 ^{**}

注:与正常对照组相比, ^{###}*P* < 0.01;与模型组相比, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01。

Note: vs the normal control group, ^{###}*P* < 0.01; vs the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

4 讨论

过敏性哮喘是由辅助性 T 细胞 2 (T helper 2 cell, Th2) 驱动,通过分泌 Th2 型细胞因子刺激 B 细胞增殖活化并产生 IgE。Th2 反应中高水平

3.7 五苓益肺汤对哮喘大鼠肺组织脂质过氧化的影响

如表 5 所示,与正常对照组相比,模型组大鼠肺组织脂质过氧化 MDA 含量上升、SOD 含量降低 (*P* < 0.01)。与模型组相比,给予地塞米松和五苓益肺汤低、中、高剂量治疗后,大鼠肺组织脂质过氧化 MDA 含量降低 (*P* < 0.01),SOD 含量升高 (*P* < 0.05)。

3.8 五苓益肺汤对哮喘大鼠肺组织 TLR4/NF- κ B 通路的影响

实验中棕黄色为 TLR4、NF- κ B p65 阳性表达细胞。如图 5 和图 6 所示,对照组中 TLR4 和 NF- κ B p65 的表达呈弱阳性,而在模型组中则显著增

的 IgE 与肥大细胞上高亲和力的 Fc ϵ R1 受体结合,使其对过敏原敏感而产生炎症细胞募集、支气管收缩等过敏症状^[15-16]。根据 T 淋巴细胞功能和表型可分为 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞,CD4⁺/CD8⁺T 比例在一定程度上提示机体细胞免疫功能情况。TLR4 与接头蛋白 MyD88 频繁参与变应性气道疾病,特别是通过呼吸道黏膜或通过吸入抗原诱导 2 型免疫的变应性致敏^[17]。NF- κ B 是一种转录因子,通过调节 Th2 细胞因子和基因表达在炎症和免疫反应中起关键作用^[18]。有研究证实,OVA 激活 TLR4 通路及其下游靶点 NF- κ B,导致 Th2 相关的炎症反应加剧,促进炎症细胞因子的基因表达^[19-20]。IL-6 是一种促炎细胞因子,由 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞等产生,具有调节免疫应答的作用。IL-1 β 是一种参与促炎免疫反应的核心介质。TNF- α 被认为在炎症细胞信号传递中发挥重要作用,激活巨噬细胞,并通过触发其他细胞因子的分泌唤起免疫反应。TGF- β 是一种有效的免疫抑制细胞因子,通过影响细胞分化和细胞增殖。氧化应激被认为是哮喘病理生理学的一个重要特征。

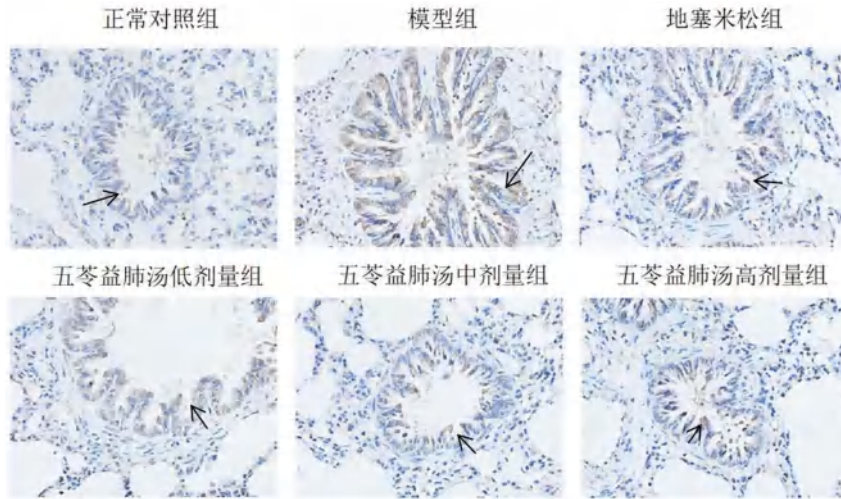


图 5 各组大鼠肺组织 TLR4 表达水平 (×400)

Fig 5 Expression level of TLR4 in lung tissues of rats in each group (×400)

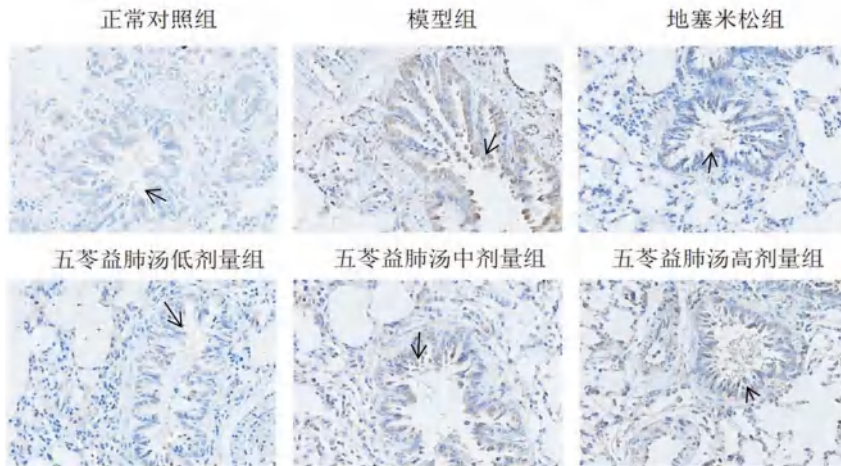


图 6 各组大鼠肺组织 NF-κB 表达水平 (×400)

Fig 6 Expression level of NF-κB in lung tissues of rats in each group (×400)

ROS 的过量产生导致 MDA 浓度增加以及抗氧化酶 SOD 活性降低。MDA 是一种氧化应激的生物标志物，可指示肺部脂质过氧化水平；SOD 通过清除超氧阴离子自由基，保护细胞免受损伤^[21]。

网络药理学分析结果显示，五苓益肺汤治疗哮喘的核心靶点包括 AKT1、IL6、JUN、IL1B、VEGFA、mTOR、NFKBIA、IL-4、MAPK8、IKBKB 等 51 个。对靶点进行 GO 和 KEGG 注释。GO 结果分析显示五苓益肺汤治疗哮喘的生物学过程主要涉及对药物的反应、血管生成、细胞对活性氧的反应、细胞对缺氧的反应、细胞对肿瘤坏死因子的反应、对缺氧的反应、炎症反应、细胞对机械刺激的反应、对 NF-κB 转录因子活性的正向调节等。KEGG 富集分析显示五苓益肺汤治疗哮喘的通路主要涉及脂质和动脉硬化、IL-17 信号通路、TNF 信号传导途径、Th17 细胞分化、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号传导途径、T 细胞受体信号

传导途径、NOD 样受体信号传导途径、Th1 和 Th2 细胞分化、NF-κB 信号传导途径等。网络药理学分析以及上述文献调研提示，抑制 TLR4/NF-κB 能有效缓解哮喘，这提示了五苓益肺汤可能通过 TLR4 和 NF-κB 信号通路对哮喘的缓解发挥积极作用。通过对大鼠肺组织分离出的单个细胞进行流式细胞术检测，发现造模成功后大鼠 CD4⁺表达升高，CD8⁺表达下降，并使得 CD4⁺/CD8⁺上升，从而导致 Th1/Th2 失衡，引发哮喘反应。经过治疗后 CD4⁺表达降低，CD8⁺表达上升，可恢复 Th1/Th2 比例，从而降低免疫细胞释放的炎症介质水平，改善哮喘病理状态。这也与文献报道的一致^[22]。五苓益肺汤降低了肺泡灌洗液中的炎症因子 TNF-α、TGF-β、IL-1β、IL-6 水平及白细胞、淋巴细胞的数量，提高肺组织中 SOD 水平、降低 MDA 水平改善氧化应激。免疫组化结果显示 TLR4 和 NF-κB p65 的表达在哮喘模型组中显著增强，给予五苓益

肺汤治疗后,降低了肺组织中 TLR4 和 NF- κ B p65 的表达。为进一步验证,后续实验将在对 TLR4 和 NF- κ B 基因干预情况下,探讨五苓益肺汤对哮喘模型动物的治疗作用。

本研究显示,五苓益肺汤方能有效减轻大鼠的哮喘表现,降低了肺组织中的炎症因子、氧化应激、TLR4 和 NF- κ B p65 的水平,这表明其机制可能与下调 TLR4/NF- κ B 的表达有关,动物实验结果与网络药理学分析结果相印证。

参考文献

- [1] Lertnimitphun P, Zhang WH, Fu WW, et al. Safranal alleviated OVA-induced asthma model and inhibits mast cell activation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 585-595.
- [2] Zhang TF, Srivastava K, Wen MC, et al. Pharmacology and immunological actions of a herbal medicine ASHMI on allergic asthma [J]. *Phytother Res*, 2010, 24 (7): 1047-1055.
- [3] Hsieh KH. Evaluation of efficacy of traditional Chinese medicines in the treatment of childhood bronchial asthma: clinical trial, immunological tests and animal study. *Taiwan Asthma Study Group [J]. Pediatr Allergy Immunol*, 1996; 7 (3): 130-140.
- [4] Li JY, Zhang FC, Li JY. The immunoregulatory effects of traditional Chinese medicine on treatment of asthma or asthmatic inflammation [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43 (6): 1059-1081.
- [5] 杨勤军, 杨程, 童佳兵, 等. 近 30 年中医药治疗支气管哮喘临床用药规律数据挖掘研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42 (8): 697-704.
- [6] Pan LY, Chen Y, Jiang YK, et al. Yanghe Pingchuan Granules alleviate airway inflammation in bronchial asthma and inhibit pyroptosis by blocking the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 2022: 6561048.
- [7] Wu ZW, Mehrabi NE, Arora P, et al. Study effect of probiotics and prebiotics on treatment of OVA-LPS-induced of allergic asthma inflammation and pneumonia by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Transl Med*, 2022, 20 (1): 130.
- [8] Ma B, Athari SS, Mehrabi Nasab E, et al. PI3K/AKT/mTOR and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling inhibitors attenuate pathological mechanisms of allergic asthma [J]. *Inflammation*, 2021, 44 (5): 1895-1907.
- [9] Xiao SL, Wang QY, Gao HB, et al. Dexmedetomidine alleviates airway hyperresponsiveness and allergic airway inflammation through the TLR4/NF- κ B signaling pathway in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25 (3): 1-10.
- [10] Si ZY, Zhang B. Amygdalin attenuates airway epithelium apoptosis, inflammation, and epithelial-mesenchymal transition through restraining the TLR4/NF- κ B signaling pathway on LPS-Treated BEAS-2B bronchial epithelial cells [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2021, 182 (10): 997-1007.
- [11] Zhai CH, Wang DB. Baicalin regulates the development of pediatric asthma via upregulating microRNA-103 and mediating the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2022, 42 (3): 230-240.
- [12] 沈浮, 付中应, 吴泳蓉, 等. 基于网络药理学及高通量分子对接研究金花清感颗粒中结合 SARS-CoV-2 特定靶蛋白的活性化合物干预 COVID-19 的潜在分子机制 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22 (3): 622-631.
- [13] 赵嘉庆, 史春丽, 王立英, 等. 枸杞果多糖对哮喘小鼠炎症损伤影响及作用机制 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33 (1): 23-28.
- [14] Sherkawy MM, Abo-youssef AM, Salama AAA, et al. Fluoxetine protects against OVA induced bronchial asthma and depression in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 837: 25-32.
- [15] Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, et al. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14 (6): 536-542.
- [16] Kirtland ME, Tsitoura DC, Durham SR, et al. Toll-like receptor agonists as adjuvants for allergen immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 599083.
- [17] Shalaby KH, Al Heialy S, Tsuchiya K, et al. The TLR4-TRIF pathway can protect against the development of experimental allergic asthma [J]. *Immunology*, 2017, 152 (1): 138-149.
- [18] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2 (8): 675-680.
- [19] Li HY, Meng JX, Liu Z, et al. Propofol attenuates airway inflammation in a mast cell-dependent mouse model of allergic asthma by inhibiting the Toll-like receptor 4/reactive oxygen species/nuclear factor κ B signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2018, 41 (3): 914-923.
- [20] Zhang H, Yang N, Wang TY, et al. Vitamin D reduces inflammatory response in asthmatic mice through HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (2): 2915-2920.
- [21] Kleniewska P, Pawliczak R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 100-108.
- [22] Singh GD, Kaiser P, Youssouf MS, et al. Inhibition of early and late phase allergic reactions by *Euphorbia hirta* L [J]. *Phytother Res*, 2006, 20 (4): 316-321.

(收稿日期: 2023-03-31; 修回日期: 2023-06-25)

不同药对配伍对栀子引起的肝损伤的保护作用研究

段晓梦, 马心予, 白天宇, 胡嘉欣, 沙金臻, 付芯雨, 王杰, 于青* (沈阳医学院中医药学院, 沈阳 110031)

摘要: **目的** 探讨不同药对配伍对栀子引起的大鼠肝损伤的保护作用。**方法** 大鼠随机分为正常对照组、栀子组 ($1.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、栀子+大黄组 (栀子-大黄=3:8)、栀子+黄连组 (栀子-黄连=1:1)、栀子+黄芩组 (栀子-黄芩=1:1)。按照上述配比, 各组大鼠每日灌胃给予相应药物 1 次, 连续进行 7 d。给药结束后检测血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6 (IL-6)、IL-1 β 水平; 计算脏器系数; HE 染色检测肝组织病理变化; 检测超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 及铁含量; Western blot 检测肝组织谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、血红素氧合酶 (HO-1)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 蛋白的表达; qRT-PCR 检测 GPX4 和 SLC7A11 mRNA 的水平。**结果** 与正常对照组比, 栀子组血清 ALT、AST、ALP、LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平明显上升; 肝脏系数显著上升, 胸腺系数明显下降; 病理切片检测发现明显的肝细胞坏死及炎性细胞浸润; GSH 和 SOD 水平显著下降; MDA 和铁含量显著升高。GPX4 和 SLC7A11 的蛋白及 mRNA 表达降低, HO-1 蛋白表达增加。与大黄、黄连、黄芩配伍后, ALT、AST、ALP、LDH、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平及肝脏系数明显降低, 肝组织病理得到改善; GSH 和 SOD 水平明显提升; MDA 和铁含量减少。GPX4、SLC7A11 的蛋白和 mRNA 及 HO-1 的蛋白表达水平升高。**结论** 大黄、黄连、黄芩与栀子药对配伍可有效减轻栀子肝脏毒性, 其作用机制与抑制氧化应激和铁死亡有关。

关键词: 栀子; 肝损伤; 药对配伍; 铁死亡; 氧化应激

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2901-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.013

Protective effect of different formula compatibilities on Fructus Gardeniae-induced hepatotoxicity

DUAN Xiao-meng, MA Xin-yu, BAI Tian-yu, HU Jia-xin, SHA Jin-zhen, FU Xin-yu, WANG Jie, YU Qing* (School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Medical College, Shenyang 110031)

Abstract: Objective To determine the protective effect of different formula compatibilities with Rhubarb, Rhizoma Coptidis or Scutellaria Baicalensis on Fructus Gardeniae-induced hepatotoxicity. **Methods** SD rats were randomly divided into a normal control, a Fructus Gardeniae ($1.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), a Fructus Gardeniae plus Rhubarb (3 : 8), a Gardeniae plus Rhizoma Coptidis (1 : 1), and a Gardeniae plus Scutellaria Baicalensis (1 : 1) group. The rats were administrated with the above drugs by gavage once daily for 7 days. After the administration, the activities of serum ALT, AST, ALP, LDH, TNF- α , IL-6, and IL-1 β were detected. The organ coefficient was calculated. The pathological changes in the liver tissues were evaluated by HE staining. The SOD activity, GSH, MDA, and iron levels were assessed. The protein levels of GPX4, SLC7A11, and HO-1 were determined by Western blot. The mRNA levels of GPX4 and SLC7A11 were evaluated by qRT-PCR. **Results** Compared

基金项目: 2022 年沈阳医学院大学生科研课题 (No.20229030/X202210164008); 2022 年辽宁省教育厅基本科研项目面上项目 (No. LJKMZ20221777)。

作者简介: 段晓梦, 女, 主要从事中药学研究, email: 1632337948@qq.com * 通信作者: 于青, 女, 副教授, 主要从事中药药理研究, email: 670045160@qq.com

with the control group, the serum levels of ALT, AST, ALP, LDH, TNF- α , IL-6, and IL-1 β , and the liver coefficient was increased in Fructus Gardeniae group, while the thymus coefficient were reduced. We also observed obvious necrosis of liver cells and inflammatory cell infiltration in the liver tissues. The levels of GSH and SOD were declined, but MDA and iron rose raised in the Fructus Gardeniae group. The protein and mRNA expression of GPX4 and SLC7A11 was declined and HO-1 expression was elevated in the Fructus Gardeniae group. After compatibility with Rhubarb, Rhizoma Coptidis or Scutellaria Baicalensis, the above changes induced by Fructus Gardeniae were partly reversed. **Conclusion** Compatibility with Rhubarb, Rhizoma Coptidis or Scutellaria Baicalensis effectively attenuates Fructus Gardeniae-induced hepatotoxicity via repressing the oxidative stress and ferroptosis.

Key words: Fructus Gardeniae; hepatotoxicity; drug compatibility; ferroptosis; oxidative stress

栀子原产于东亚亚热带地区,是一种应用广泛的中药和保健食品。目前,栀子已被广泛用于治疗各种疾病,例如发热性烦躁不安、湿热黄疸、霉菌性口腔炎等疾病^[1]。然而近年来,大量研究表明栀子提取物可引起肝毒性^[2-3]。之前的研究表明栀子中的主要活性成分京尼平苷及其代谢物京尼平是栀子产生肝毒性的直接物质基础^[4]。栀子引起肝毒性的相关作用机制与破坏细胞抗氧化防御系统,增加肝细胞的炎症损伤,导致细胞凋亡甚至坏死有关^[5]。

在临床应用中,中药配伍可有效减轻中药毒性作用。传统的中药复方可从多方面发挥减轻中药毒性并增效的作用。在栀子的临床应用中,为了减轻其毒性作用,可与其他中药组成复方以提高其临床应用的安全性。例如,研究发现与单独使用栀子相比,黄连解毒汤中黄连、黄芩等中药与栀子配伍可降低栀子的肝毒性^[6];栀子大黄汤中的大黄与栀子的配伍可以降低栀子活性成分京尼平苷的生物利用度^[7]。因此,本研究从动物水平探讨大黄、黄连、黄芩分别与栀子配伍后对栀子肝脏毒性的缓解作用及其相关的分子机制,以期进一步阐明栀子中药配伍减毒的机制并为其临床应用的安全性提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

健康的 SPF 级雄性成年 SD 大鼠,体重 200 ~ 220 g [北京维通利华,动物质量合格证号:SCXK(京)2016-0006],在 SPF 级实验室用无菌水和饲料适应性喂养 1 周后进行给药实验。

栀子提取物颗粒由本课题组从栀子饮片中提取;大黄、黄连、黄芩提取物颗粒购自神威药业,每 10 g 中药材饮片提取浓缩成 1 g 颗粒药物;苏木素伊红(HE)染色试剂盒、RIPA 裂

解液(碧云天生物技术有限公司);谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司);谷胱甘肽(GSH)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(SOD)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6(IL-6)、IL-1 β 试剂盒(南京建成生物工程研究所);碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司);铁检测试剂盒[艾博抗(上海)贸易有限公司];Trizol 试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司];通用 RT-PCR 试剂盒(M-MLV)和实时荧光定量 PCR 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);GAPDH 抗体(ab181602,兔单克隆抗体)、溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)抗体(ab175186,兔单克隆抗体)、血红素氧合酶(HO-1)抗体(ab68477,兔单克隆抗体)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)抗体(ab125066,兔单克隆抗体)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(ab6721)[艾博抗(上海)贸易有限公司]。

1.2 实验分组及给药

SD 大鼠 50 只随机分为正常对照组、栀子组、栀子+大黄组(根据栀子大黄汤组方配比,栀子-大黄=3:8)、栀子+黄连组(根据栀子黄连汤组方配比,栀子-黄连=1:1)、栀子+黄芩组(根据黄芩栀子汤组方配比,栀子-黄芩=1:1)。参考文献^[8],用栀子提取物颗粒(1.17 g·kg⁻¹)制备急性肝损伤动物模型。除正常对照组外,给药组大鼠每日灌胃给予 1.17 g·kg⁻¹ 栀子以及按照配比给予大黄、黄连、黄芩等药物,每日 1 次,连续灌胃 7 d。末次给药后 1 h,采血并安乐处死所有大鼠,取肝组织进行后续检测。

1.3 血清肝损伤指标及炎症细胞因子水平检测

将收集的血液标本,在 4℃,1000 r·min⁻¹ 离

心 20 min, 收集上清液。按照试剂盒说明书步骤使用酶标仪测定 ALT、AST、ALP、LDH、TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平。

1.4 脏器系数分析

测量大鼠体重、肝重、脾重、胸腺重, 并计算各组脏器系数。

1.5 HE 染色

取肝组织, 在 4% 多聚甲醛中固定过夜。随后采用梯度无水乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡, 用 HE 溶液染色, 脱水, 中性树脂封片。光学显微镜下观察大鼠肝组织的病理变化。

1.6 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

用 Trizol 试剂裂解肝组织并提取总 RNA, 采用通用 RT-PCR 试剂盒 (M-MLV) 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。随后以 β -actin 为内参基因, 用实时荧光定量 PCR 试剂盒对样本进行基因扩增, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	序列 (5'-3')
GPX4 F	GCCGGCTACAATGTCAGGT
GPX4 R	ACCACGCAGCCGTTCTTATC
SLC7A11 F	CCATCATCATCGGCACCGTCATC
SLC7A11 R	TACTCCACAGGCAGACCAGAACAC
β -actin F	GAAGATCAAGATCATTGCTCCT
β -actin R	TACTCCTGCTTGCTGATCCA

1.7 Western blot 法检测蛋白表达水平

将肝组织匀浆, 使用 RIPA 裂解液提取肝组织中总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将等量的蛋白样品进行 SDS-PAGE。蛋白转移到 PVDF 膜后, 在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 然后与一抗 (1:1000) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 随后与二抗 (1:3000) 于室温孵育 1 h; 洗膜三次后, 用 ECL 发光液显影蛋白条带。最后, 采用 Image J 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.8 试剂盒检测 GSH、MDA、SOD 水平及铁含量

取各组肝匀浆, 按照试剂盒说明书步骤使用酶标仪测定 GSH、MDA、SOD 及铁含量。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用方差分析进行多组比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清中肝损伤指标含量

与正常对照组相比, 连续给予栀子一周后大鼠 ALT、AST、ALP 及 LDH 水平显著上升; 与栀子组相比, 栀子+大黄组、栀子+黄连组、栀子+黄芩组 ALT、AST、ALP 及 LDH 水平均显著下降 (见图 1)。

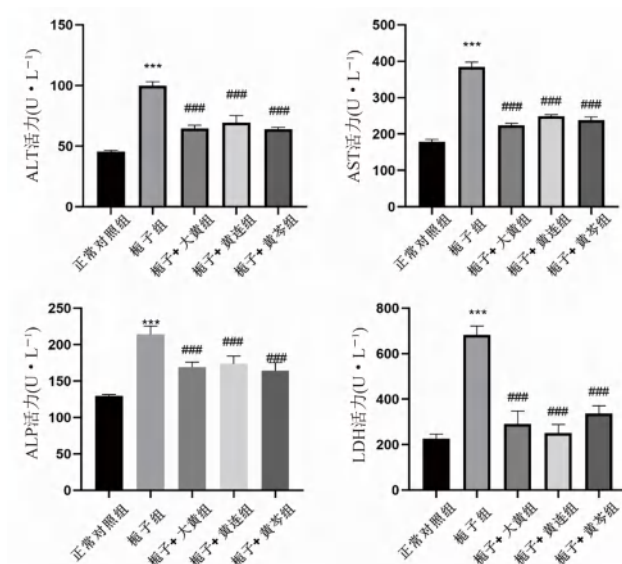


图 1 各组大鼠血清中肝损伤指标含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 1 Serum levels of liver injury markers in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与正常对照组相比, *** $P < 0.001$; 与栀子组相比, ### $P < 0.001$ 。

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

2.2 各组大鼠脏器系数分析

栀子组大鼠肝系数明显高于正常对照组, 而胸腺系数显著低于正常对照组, 这表明栀子组大鼠肝脏增大、胸腺萎缩; 栀子与大黄、黄连、黄芩配伍后可有效抑制肝脏增大和胸腺萎缩 (见图 2)。

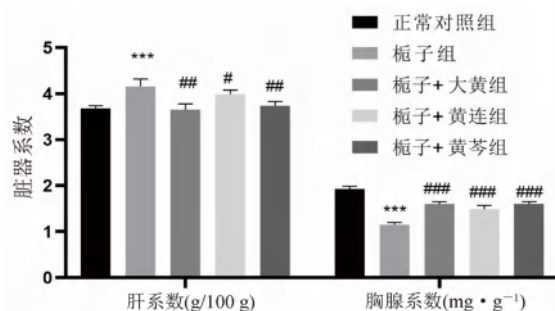


图 2 各组大鼠脏器系数分析 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 2 Organ coefficients of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与正常对照组相比, *** $P < 0.001$; 与栀子组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

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

2.3 各组大鼠肝组织病理变化

HE 染色后, 光学显微镜下观察可见正常对

照组大鼠肝组织结构清晰且完整，未见肝细胞坏死和炎细胞浸润；栀子组大鼠肝组织细胞排列紊乱并伴有肝细胞水肿，同时可见大量细胞坏死和

明显的炎性细胞浸润；而栀子引起的上述肝组织病理改变在栀子+大黄组、栀子+黄连组、栀子+黄芩组可显著改善或消失（见图 3）。

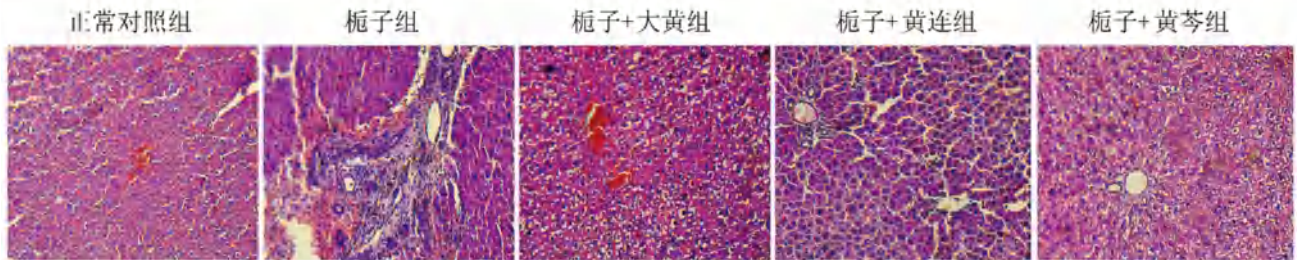


图 3 各组大鼠肝组织病理切片 (HE 染色, $\times 100$)

Fig 3 HE staining of liver tissues in each group of rats (HE, $\times 100$)

2.4 各组大鼠肝组织氧化应激损伤的情况
与正常对照组相比，栀子组肝组织 GSH 水平和 SOD 活力明显降低，而 MDA 含量显著升高；

而栀子与大黄、黄连或黄芩配伍后，肝组织 GSH 水平和 SOD 活力显著上升，而 MDA 含量明显下降（见图 4）。

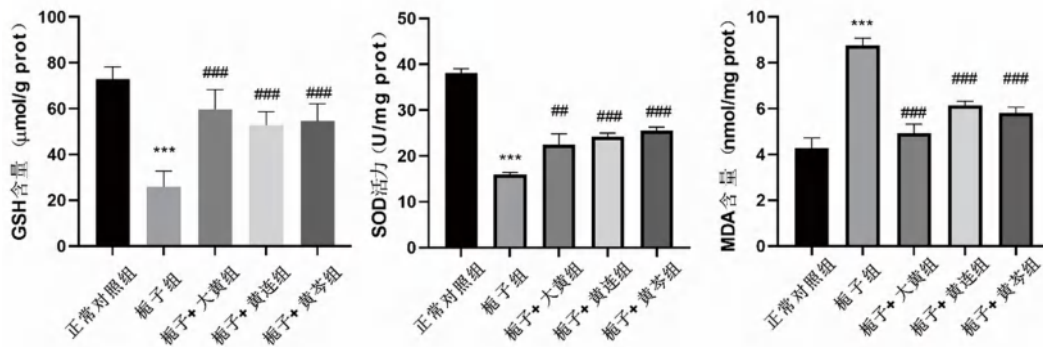


图 4 各组大鼠肝组织氧化应激水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 4 Oxidative stress level in liver tissues in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

注：与正常对照组相比， $***P < 0.001$ ；与栀子组相比， $##P < 0.01$ ， $####P < 0.001$ 。

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

2.5 各组大鼠血清中促炎性细胞因子水平的变化
与正常对照组相比，连续给予栀子一周可引起 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平明显升高；然而栀子

与大黄、黄连或黄芩配伍后 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 血清水平均显著下降（见图 5）。

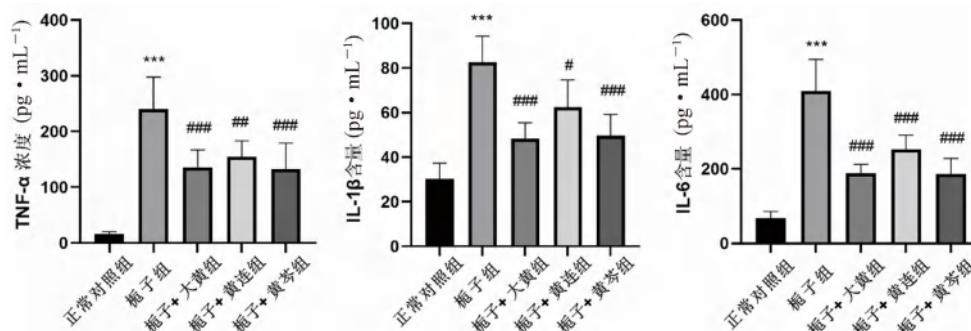


图 5 各组大鼠血清促炎性细胞因子表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 5 Serum levels of pro-inflammatory cytokines in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

注：与正常对照组相比， $***P < 0.001$ ；与栀子组相比， $^{\#}P < 0.05$ ， $##P < 0.01$ ， $####P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal control group, $***P < 0.001$; compared with the Fructus Gardeniae group, $^{\#}P < 0.05$, $##P < 0.01$, $####P < 0.001$.

2.6 各组大鼠肝组织相对铁含量的变化

栀子组大鼠肝组织相对铁含量显著高于正常对照组，而栀子与大黄、黄连或黄芩配伍后可有效降低肝组织相对铁含量（见图 6）。

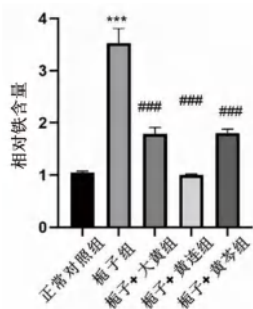


图 6 各组大鼠肝组织相对铁含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 6 Relative iron level in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

注：与正常对照组相比，*** $P < 0.001$ ；与栀子组相比，### $P < 0.001$ 。

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

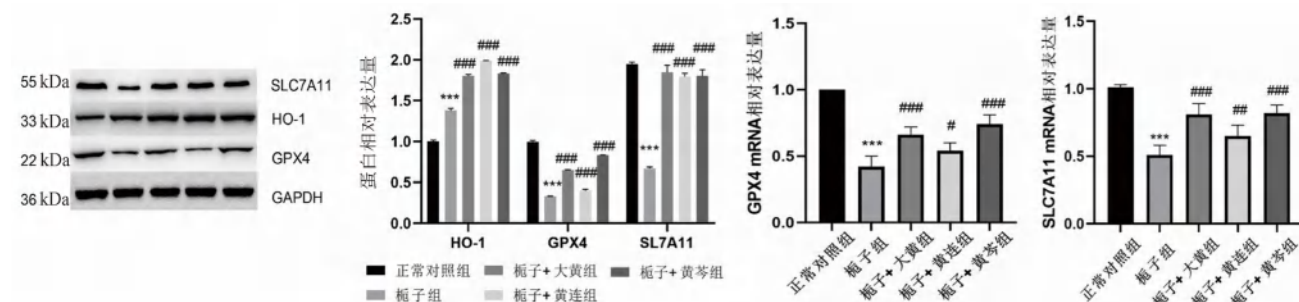


图 7 各组大鼠肝组织铁死亡相关分子表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 7 Expression levels of ferroptosis-related molecules in the liver tissues of each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注：与正常对照组相比，*** $P < 0.001$ ；与栀子组相比，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ ，#### $P < 0.001$ 。

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

用的保肝利胆中药，然而，大量研究证实其不当应用可引起肝损伤^[11]。因此，研究栀子的用药安全及其配伍减毒作用，对临床合理应用栀子具有极其重要的意义。

中药复方是中药临床应用的一个重要形式，通过中药配伍既可有效地增强药物疗效，还能明显减轻药物的毒副作用。但是，中药配伍减毒的分子机制，尤其是中药配伍缓解肝损伤的作用机制还有待深入研究。目前，已有相关研究探讨栀子的配伍减毒作用。例如，有研究发现大鼠给予 10 倍剂量的栀子可导致大鼠肝毒性，然而给予含有栀子的复方茵陈蒿汤（含有茵陈蒿、大黄等药物配伍）则没有引起肝毒性^[12]。另外，研究证明黄连解毒汤中栀子与黄芩、黄连、黄柏等中药配伍后，栀子引起的肝损伤也得到明显抑制^[6]。因此，本研究探究栀子分别与大黄、黄连、黄芩配

2.7 对铁死亡相关通路分子表达的影响

与正常对照组比较，栀子给药可导致肝组织 GPX4 和 SLC7A11 的蛋白水平明显降低，而 HO-1 蛋白水平升高；与栀子组相比，栀子+大黄组、栀子+黄连组、栀子+黄芩组 SLC7A11、GPX4 和 HO-1 的蛋白水平显著提高（见图 7）。GPX4 和 SLC7A11 mRNA 水平在栀子给药的大鼠肝脏组织中显著降低，而与大黄、黄连或黄芩配伍可有效地提高 GPX4 和 SLC7A11 mRNA 水平。

3 讨论

肝脏作为参与各种代谢的重要器官最易遭受内源性和外源性有毒物质和代谢物的损害。药物性肝损伤是一种常见的由生物制剂、传统中药、天然药物、保健品、膳食补充剂等引起的不良反应^[9]。其中，中草药和膳食补充剂被认为是引起药物性肝损伤的主要原因^[10]。栀子临床广泛使

伍后大鼠肝毒性的变化及其潜在的机制。血清中 ALT 和 AST 的浓度在肝损伤时会明显升高，因此 ALT 和 AST 的水平反映了肝损伤的严重程度^[13]。此外，肝功能障碍或肝细胞膜破坏可引起血清 ALP 升高，这表明排泄功能受到了影响^[14]。另一方面，LDH 是一种非特异性组织损伤生物标志物，可以通过检测 LDH 水平来确定身体组织损伤的严重程度^[15]。本实验结果显示大黄、黄连、黄芩分别与栀子配伍后，血清 ALT、AST、ALP、LDH 水平下降，肝脏系数降低；病理切片检测发现肝脏组织病理改变明显减轻。这些结果表明栀子与大黄、黄连或黄芩配伍可有效缓解栀子引起的肝损伤。

氧化应激损伤是药源性肝损伤的主要毒性机制之一。超剂量的中药可导致细胞内活性氧的过量释放并降低抗氧化能力，从而引起过氧化脂质

的堆积,造成肝细胞氧化应激损伤。Li等^[5]研究显示给予栀子的活性成分京尼平苷或京尼平可破坏肝细胞抗氧化防御系统。SOD和GSH是清除氧自由基的主要抗氧化酶和分子,大多数肝毒性药物都可引起它们的功能损害^[16]。MDA是氧自由基介导的脂质过氧化反应的产物,因此,被视为氧化应激的标志物^[17]。本实验结果显示栀子分别与大黄、黄连、黄芩配伍后显著提高了SOD和GSH水平,并且降低了MDA水平,证实配伍可通过抑制肝氧化应激损伤来缓解栀子引起的肝毒性。

铁死亡是一种以脂质过氧化物积累为特征的细胞死亡^[18]。以往的研究表明,铁死亡在肝损伤中起着重要作用^[19]。铁死亡的主要机制是催化脂质过氧化反应,降低谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的水平^[20]。GPX4是一种受GSH调节的脂质修复酶,可通过减少脂质过氧化产物和致命活性氧积累来阻止铁死亡^[21]。SLC7A11是一种多通道跨膜蛋白,以1:1的比例介导细胞内谷氨酸的输出和细胞外胱氨酸的输入^[22]。SLC7A11抑制可引起GSH耗损,下调GPX4,从而导致铁死亡的发生^[23]。此外,HO-1通路在铁死亡中同样发挥重要的调控作用。HO-1的表达在很大程度上依赖于细胞的氧化应激状态,其中HO-1的表达升高是宿主细胞应对细胞内氧化损伤的一种应激策略^[24]。有报道显示Maresin1通过激活HO-1/GPX4通路减轻铁死亡诱导的肝损伤^[25]。本研究结果显示,栀子单独给药大鼠肝组织中GPX4、SLC7A11的蛋白和基因水平显著下降,而由于应激反应HO-1水平明显升高;大黄、黄连、黄芩分别与栀子配伍后,肝组织GPX4、SLC7A11和HO-1水平均显著提高。这提示大黄、黄连、黄芩配伍对栀子引起的肝毒性的保护作用是通过激活SLC7A11/GPX4/HO-1信号通路,抑制铁死亡来实现的。

综上所述,本研究证明大黄、黄连、黄芩配伍是通过抑制氧化应激和铁死亡来缓解栀子引起的肝毒性,其机制与激活SLC7A11/GPX4/HO-1信号通路有关。

参考文献

[1] Chen LP, Li MX, Yang ZQ, et al. Gardenia jasminoides Ellis: ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological and industrial applications of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112829.
[2] Cui YZ, Sun R, Wang QJ, et al. Hepatotoxicity induced

by intragastrically administrated with Gardenia decoction in mice [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31 (23): 2824-2827.
[3] 杨洪军,付梅红,吴子伦,等.栀子对大鼠肝毒性的实验研究[J].*中国中药杂志*, 2006, 31 (13): 1091-1093.
[4] Luo YS, Gao FY, Chang RR, et al. Metabolomics based comprehensive investigation of Gardeniae Fructus induced hepatotoxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112250.
[5] Li CN, Lan M, Lv JW, et al. Screening of the hepatotoxic components in Fructus Gardeniae and their effects on rat liver BRL-3A cells [J]. *Molecules*, 2019, 24 (21): 3920.
[6] 王坤,金若敏,陈长勋.栀子与黄连解毒汤肝毒性的比较研究[J].*中国中药杂志*, 2013, 38 (14): 2365-2369.
[7] 王学全,冯芳,孙艳清.栀子大黄汤配伍变化对栀子中京尼平苷药动学的影响[J].*药学进展*, 2010, 34 (8): 371-376.
[8] 任艳青,甄亚钦,李葆林,等.淡豆豉与栀子配伍降低栀子肝脏毒性的研究[J].*中药药理与临床*, 2017, 33 (4): 94-97.
[9] Yu YC, Mao YM, Chen CW, et al. CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury [J]. *Hepatol Int*, 2017, 11 (3): 221-241.
[10] Shen T, Liu YX, Shang J, et al. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156 (8): 2230-2241 e11.
[11] Tian JJ, Zhu JJ, Yi Y, et al. Dose-related liver injury of Geniposide associated with the alteration in bile acid synthesis and transportation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 8938.
[12] 王坤,金若敏,陈长勋.茵陈蒿汤与栀子肝毒性的比较研究[J].*中药药理与临床*, 2013, 29 (1): 8-12.
[13] Adeyemi OS, Akanji MA. Biochemical changes in the kidney and liver of rats following administration of ethanolic extract of Psidium guajava leaves [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2011, 30 (9): 1266-1274.
[14] Buffenstein R, Skinner DC, Yahav S, et al. Effect of oral cholecalciferol supplementation at physiological and supraphysiological doses in naturally vitamin D₃-deficient subterranean damara mole rats (*Cryptomys damarensis*) [J]. *J Endocrinol*, 1991, 131 (2): 197-202.
[15] Xiong YY, Zheng Q, Wang C, et al. Organ damage evaluation in a temperature-controlled circulatory arrest rat model [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2022, 22 (1): 527.
[16] Sanjeev S, Bidanchi RM, Murthy MK, et al. Influence of ferulic acid consumption in ameliorating the cadmium-induced liver and renal oxidative damage in rats [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26 (20): 20631-20653.
[17] Wang YZ, Li YX, Xie JM, et al. Protective effects of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang against endotoxin- and d-galactosamine-induced liver injury in rats via anti-oxidative and anti-inflammatory capacities [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15 (1): 30-37.
[18] Angelova PR, Choi ML, Berezhnov AV, et al. Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of

- iron, calcium and lipid peroxidation [J]. Cell Death Differ, 2020, 27 (10): 2781-2796.
- [19] Wang C, Liu T, Tong YM, et al. Ulinastatin protects against acetaminophen-induced liver injury by alleviating ferroptosis via the SIRT1/NRF2/HO-1 pathway [J]. Am J Transl Res, 2021, 13 (6): 6031-6042.
- [20] Friedmann AJP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16 (12): 1180-1191.
- [21] Wei S, Qiu TM, Yao XF, et al. Arsenic induces pancreatic dysfunction and ferroptosis via mitochondrial ROS-autophagy-lysosomal pathway [J]. J Hazard Mater, 2020, 384: 121390.
- [22] Koppula P, Zhuang L, Gan BY. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. Protein Cell, 2021, 12 (8): 599-620.
- [23] Wu XG, Li Y, Zhang SC, et al. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease [J]. Theranostics, 2021, 11 (7): 3052-3059.
- [24] Rockwood N, Costa DL, Amaral EP, et al. Mycobacterium tuberculosis induction of heme oxygenase-1 expression is dependent on oxidative stress and reflects treatment outcomes [J]. Front Immunol, 2017, 8: 542.
- [25] Wang WC, Wang YX, Zhuang CG, et al. Maresin1 protect against ferroptosis-induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 activation [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 865689.
- (收稿日期: 2023-04-21; 修回日期: 2023-07-07)

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 方法分析 清热祛湿凉茶化学成分

陈玉娜^{1,2}, 盛小燕², 田海妍³, 黎赛², 陈泽平^{2,3*} (1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 2. 南方医科大学中西医结合医院, 广州 510315; 3. 暨南大学药学院中药及天然药物研究所, 广州 510632)

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱 (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS), 对清热祛湿凉茶的化学成分进行快速识别和鉴定。**方法** 采用 Luna C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 0.1% 甲酸水溶液-乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温为 35 °C, 采用正负离子检测模式。**结果** 共鉴定出清热祛湿凉茶中 33 种化学成分。包括糖类成分 2 个, 有机酸类成分 5 个, 香豆素类成分 1 个, 黄酮类成分 16 个, 苯丙素类成分 4 个和三萜类成分 5 个。**结论** 本研究首次采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术对清热祛湿凉茶的主要成分进行鉴定, 可为清热祛湿凉茶的药效成分研究提供科学依据。

关键词: 清热祛湿凉茶; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; 中药复方; 化学成分

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-2907-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.014

Chemical components in Qingre Qushi herbal tea by UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS

CHEN Yu-na^{1,2}, SHENG Xiao-yan², TIAN Hai-yan³, LI Sai², CHEN Ze-ping^{2,3*} (1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405; 2. Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315; 3. Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract: Objective To identify the chemical constituents in Qingre Qushi herbal tea by UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS. **Methods** Luna C₁₈ Column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was used with

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 82104420)。

作者简介: 陈玉娜, 女, 主管中药师, 主要从事中药学研究, email: chenyluna1991@163.com * **通信作者:** 陈泽平, 男, 博士研究生, 主要从事天然药物化学研究, email: 373068965@qq.com

0.1% formic acid solution and acetonitrile as the mobile with gradient elution. The flow rate was 0.3 mL · min⁻¹ and the column temperature was 35 °C. The mass spectrometry adopted the positive and negative mode. **Results** Totally 33 chemical constituents in Qingre Qushi herbal tea were identified, including 2 sugars, 5 organic acids, 1 coumarin, 16 flavonoids, 4 phenylpropanoids and 5 triterpenoids. **Conclusion** UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS technique has been established for the first time to identify the main components in Qingre Qushi herbal tea, providing a scientific basis for the study of pharmacodynamic components in Qingre Qushi herbal tea.

Key words: Qingre Qushi herbal tea; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; traditional Chinese medicine; chemical component

清热祛湿凉茶是南方医科大学中西医结合医院研制的具有自主知识产权的中药验方,由白茅根、夏枯草、甘草、香薷及藿香五种药材组成,辅料为蔗糖。作为保健饮品,清热祛湿凉茶具有清热解暑、祛湿健脾的功效,临床上主要用于外感湿热之邪或过食肥甘厚腻导致脾运失健、湿热内阻,从而引起的发热喉痛、湿热积滞、火气重、口干尿黄等一系列脾胃湿热症状。现代药理研究表明,清热祛湿凉茶能够显著改善脾胃湿热证模型大鼠症状,其作用机制可能与激活 Nrf2/HO-1 通路,提高机体抗氧化能力、降低氧化应激损伤有关^[1]。清热祛湿凉茶中成分复杂,关于其化学成分的研究尚未见文献报道。

本研究首次运用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱联用技术(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS),在正、负离子模式下采集数据,对清热祛湿凉茶的化学成分进行较为全面的分析,为进一步明确其药效物质及其作用机制提供科学的理论基础。

1 仪器与材料

万分之一分析天平(梅特勒 XA205DU 分析天平),BL-00AL 超声清洗器(上海标隆仪器有限公司),UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司),RE-2000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),Microfuge20 台式高速离心机(贝克曼库尔特公司)。

色谱级甲醇(德国 Merck 公司),色谱级乙腈(默克 Sigma-aldrich 试剂公司),色谱级甲酸(霍尼韦尔贸易有限公司),超纯水(由密理博 Milli-Q Advantage 超纯水机制备),清热祛湿凉茶(由南方医科大学中西医结合医院煎药室提供)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Luna C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相:0.1%甲酸水-乙腈,梯度洗脱,洗脱程序见表 1;流速:0.3 mL · min⁻¹;柱温:35 °C;进样量:2 μL。

表 1 梯度洗脱

时间/min	0.1%甲酸水/%	乙腈/%
0	90	10
8.0	65	35
11.0	35	65
11.5	0	100
12.5	0	100
12.6	90	10
15.0	90	10

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾电离源(ESI);扫描方式为正负离子切换扫描;检测方式为选择反应监测(PRM);质谱参数如下:质量范围为 150 ~ 2000;电喷雾电压为 3.2 kV;毛细管温度为 320 °C;碰撞气为高纯度氩气;鞘气为氮气:40 Arb;辅助气为氮气:350 °C,采用 Thermo Xcalibur Qual Browser 软件进行数据分析。

2.3 供试品溶液制备

取凉茶 200 mL,蒸干,加适量甲醇溶解,转移至 10 mL 离心管中,涡旋 1 min,超声 10 min,冷却至室温,10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液即得凉茶供试品溶液。

3 结果

3.1 清热祛湿凉茶化学成分定性分析

使用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术,对清热祛湿凉茶的化学成分进行定性分析,正负离子模式下的质谱的总离子流图见图 1。

3.2 基于裂解规律鉴定清热祛湿凉茶中的化学成分

通过使用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS,在正负离子模式扫描下,分别得到清热祛湿凉茶化学成分的质谱信息。根据 Xcalibur 软件计算出的高分辨精确质量数,根据实际测得的相对分子质量和理论相对分子质量两者偏差小于 5×10⁻⁶ 的原则及同位素峰的丰度比,从而确定对应的化合物的分子式。然后对此化合物进行二级图谱分析,

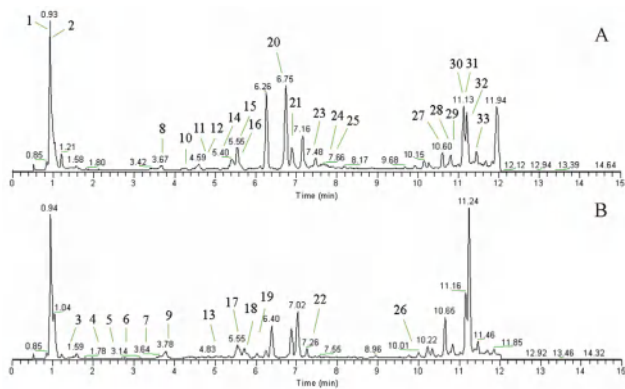


图 1 清热祛湿凉茶的正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下的 TIC 图
Fig 1 TIC of Qingre Qushi herbal tea in positive ion (A) and negative ion (B) mode

推测其结构的二级裂解过程是否吻合, 同时结合参考文献进行分析对比, 共鉴定了 33 个化合物。

3.2.1 三萜皂苷类化合物解析 从清热祛湿凉茶中分离出 5 个三萜皂苷类化合物, 都来自于甘草。该类化合物结构中有葡萄糖、葡糖醛酸、芹糖等, 常与糖结合形成苷, 裂解规律较为复杂, 易发生脱糖的中性丢失或连续脱糖的中性丢失而形成碎片离子。以甘草酸为例, 阐述三萜皂苷类化合物的裂解规律和结构鉴定的过程 (见图 2)。甘草酸的一级质谱图显示其实测分子离子峰 $[M+H]^+$ 823.4103, 计算值为 823.4111, 推测其分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$ 。二级质谱碎片信息有 $[M-Glc+H]^+$ m/z 647, $[M-Glc-Glc+H]^+$ m/z 471, $[M-Glc-Glc-H_2O+H]^+$ m/z 453, 碎片离子符合甘草酸的裂解规律并且与文献报道的一致^[2]。

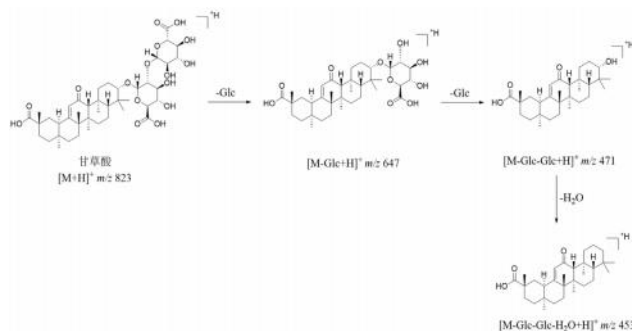


图 2 甘草酸的裂解规律
Fig 2 Fragmentation of glycyrrhizic acid

3.2.2 苯丙素类及其苷类化合物解析 从清热祛湿凉茶中鉴定了 4 个苯丙素类化合物, 以异迷迭香酸苷为例, 其一级质谱图显示实测分子离子峰 $[M-H]^-$ 521.1299, 计算值为 521.1295, 推测其分子式为 $C_{24}H_{26}O_{13}$ 。根据其二级质谱图显示碎片离子峰 $[M-Glc-H]^-$ m/z 359.0774, $[M-Glc-198-H]^-$ m/z 161.0235, $[M-Glc-180-H]^-$ m/z 179.0447, 符合异迷迭香酸苷的裂解规律 (见图 3)^[3]。

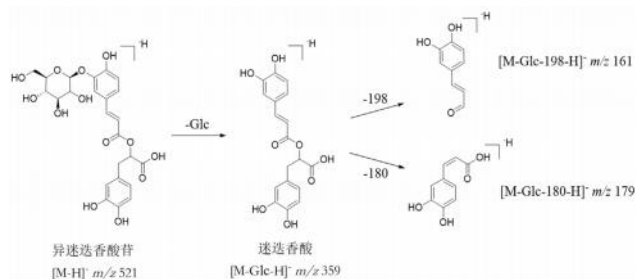


图 3 异迷迭香酸苷的裂解规律
Fig 3 Fragmentation of salviaflaside

3.2.3 有机酸类化合物解析 在质谱总离子流图中可以观察到峰 1 (1.79 min)、峰 2 (2.86 min) 和峰 3 (3.14 min) 的准分子离子峰均为 353.0879 $[M-H]^-$, 可以推测其为同分异构体。通过其二级质谱的离子碎片信息以及相对离子强度, 峰 1 的基峰为 191 $[quinic\ acid-H]^-$, 而且碎片离子 179 丰度达到 50%, 推测其为 3-O-咖啡酰奎尼酸 (3-CQA)。峰 2 的二级质谱基峰为 173, 推测其为 4-O-咖啡酰奎尼酸 (4-CQA)。峰 3 的基峰为 191, 且其他的碎片离子的相对丰度均 $< 5\%$, 推测其可能为 1-O-咖啡酰奎尼酸 (1-CQA) 或者 5-O-咖啡酰奎尼酸 (5-CQA) (见图 4 和图 5)。

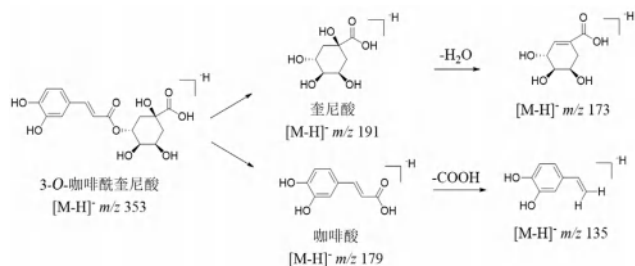


图 4 3-O-咖啡酰奎尼酸的裂解规律
Fig 4 Fragmentation of 3-O-caffeoylquinic acid

3.2.4 黄酮类化合物解析 黄酮苷的多级质谱可以得到糖脱去的碎片离子, 糖完全脱去后的苷元碎片的再次裂解与黄酮的裂解规律完全相同。以甘草苷为例, 阐述黄酮类化合物的裂解规律和结构鉴定的过程 (见图 6)。甘草苷的一级质谱图显示其实测分子离子峰 $[M-H]^-$ 417.1192, 计算值为 417.1180, 推测其分子式为 $C_{21}H_{22}O_9$ 。二级质谱碎片信息显示其首先脱去葡萄糖 $[M-Glc-H]^-$ m/z 255, 随后 C 环 C-O 键开环产生碎片离子 m/z 135, m/z 153 和 m/z 119, 碎片方式符合甘草苷的裂解规律并且和文献所报道的一致^[4]。

33 个化合物鉴定结果见表 2。

4 讨论

中药的化学成分是其发挥药效的物质基础, 在既往有关凉茶的化学成分研究中, 尽管各类凉

表 2 清热祛湿凉茶的成分鉴定

Tab 2 Clarify the chemical constituents in Qingre Qushi herbal tea

No.	t_R / min	分子式	m/z (理论值)	m/z (实测值)	误差/ ($\times 10^{-6}$)	离子模式	化合物	主要碎片离子	类型	来源
1	0.93	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	365.1054	365.1053	-0.27	[M+Na] ⁺	蔗糖 ^[5]	203.0528、185.0424	糖类	辅料
2	0.93	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	527.1583	527.1594	2.10	[M+Na] ⁺	松三糖	365.1055、347.0948	糖类	—
3	1.53	C ₇ H ₆ O ₄	153.0182	153.0185	1.96	[M-H] ⁻	原儿茶酸 ^[6]	108.0204、91.0176、81.0332	有机酸类	夏枯草
4	1.79	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0873	353.0879	1.70	[M-H] ⁻	3-O-咖啡酰奎尼酸 ^[7]	191.0553、179.0341、135.0440	有机酸类	白茅根
5	2.86	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0873	353.0879	1.70	[M-H] ⁻	1-O-咖啡酰奎尼酸或 5-O-咖啡酰奎尼酸	191.0554、173.0450、135.0440	有机酸类	白茅根
6	3.14	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0873	353.0879	1.70	[M-H] ⁻	4-O-咖啡酰奎尼酸	191.0553、179.0339、 173.0446、135.0440	有机酸类	白茅根
7	3.42	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	487.1452	487.1459	1.44	[M-H] ⁻	肉苁蓉苷 F 或异构体 ^[8]	179.0340、161.0233、135.0439	苯丙素及其苷类	—
8	3.67	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1657	595.1658	0.17	[M+H] ⁺	烟花苷	287.0549	黄酮及其苷类	—
9	3.76	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1501	593.1511	1.68	[M-H] ⁻	维采宁-2 ^[9]	473.1101、353.0667	黄酮及其苷类	香薷
10	4.24	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.1552	565.1557	0.88	[M+H] ⁺	夏佛塔苷或异构体 ^[10]	379.0815、295.0604	黄酮及其苷类	—
11	4.77	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1129	433.1133	0.36	[M+H] ⁺	异牡荆素 ^[11]	313.0708、283.0600	黄酮及其苷类	—
12	4.80	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0550	287.0553	0.92	[M+H] ⁺	木犀草素 ^[12]	241.0490	黄酮及其苷类	夏枯草
13	5.00	C ₉ H ₈ O ₃	163.0395	163.0391	-2.45	[M-H] ⁻	对香豆酸 ^[13]	119.0490、93.0332	苯丙素及其苷类	—
14	5.19	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1607	611.1609	0.33	[M+H] ⁺	芦丁 ^[10]	303.0499	黄酮及其苷类	甘草
15	5.50	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.0499	303.0497	-0.66	[M+H] ⁺	槲皮素 ^[12]	237.1434、153.0183、121.0286	黄酮及其苷类	甘草
16	5.56	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.0871	463.0867	-0.86	[M+H] ⁺	野黄芩苷 ^[14]	287.0549	黄酮及其苷类	—
17	5.57	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0652	255.0659	2.74	[M-H] ⁻	甘草素或异甘草素 ^[12]	135.0079、119.0491	黄酮及其苷类	甘草
18	5.62	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1180	417.1192	2.87	[M-H] ⁻	甘草苷或异甘草苷	255.0660、135.0076、119.0490、 91.0175	黄酮及其苷类	甘草
19	6.03	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	521.1295	521.1299	0.77	[M-H] ⁻	异迷迭香酸苷 ^[5]	359.0774、323.0774、 179.0341、161.0235	苯丙素及其苷类	夏枯草
20	6.66	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447.0922	447.0925	0.67	[M+H] ⁺	芹菜素-7-葡糖醛酸 ^[15]	271.0599	黄酮及其苷类	香薷
21	6.91	C ₉ H ₈ O ₄	181.0495	181.0494	-0.55	[M+H] ⁺	咖啡酸 ^[16]	135.0441	有机酸类	夏枯草
22	7.30	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₅	637.2132	637.2137	0.78	[M-H] ⁻	肉苁蓉苷 C 或异构体 ^[8]	461.1665、175.0392、 161.0235、135.0440	苯丙素及其苷类	—
23	7.37	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551.1759	551.1763	0.73	[M+H] ⁺	芹糖甘草苷	257.0808	黄酮及其苷类	甘草
24	7.66	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.1337	419.1335	-0.48	[M+H] ⁺	新甘草苷	257.0808、137.0233	黄酮及其苷类	甘草
25	7.71	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431.1337	431.1336	-0.23	[M+H] ⁺	芒柄花苷 ^[17]	269.0805	黄酮及其苷类	甘草
26	9.86	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0444	269.0450	2.23	[M-H] ⁻	芹菜素 ^[18]	117.0334、225.0524	黄酮及其苷类	香薷
27	10.56	C ₃₀ H ₄₅ O ₄	469.3312	469.3316	0.85	[M+H] ⁺	3-oxoglycyrrhetic acid	451.3222、433.3103、405.3145	三萜皂苷类	甘草
28	10.82	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	839.4060	839.4050	-1.19	[M+H] ⁺	甘草皂苷 G ₂ ^[19]	469.3316、451.3209、645.3610	三萜皂苷类	甘草
29	10.93	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.0808	269.0808	0	[M+H] ⁺	刺芒柄花素	253.0493、237.0544、197.0596	黄酮及其苷类	甘草
30	11.13	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₀	647.3790	647.3786	-0.62	[M+H] ⁺	单葡糖醛酸甘草次酸	453.3364、435.3292、407.3314	三萜皂苷类	甘草
31	11.13	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	823.4111	823.4103	-0.97	[M+H] ⁺	甘草酸 ^[20]	647.3764、453.3362、471.3473	三萜皂苷类	甘草
32	11.20	C ₁₂ H ₁₂ O ₄	221.0808	221.0807	-0.45	[M+H] ⁺	Siderin ^[21]	177.0546、162.0674	香豆素类	白茅根
33	11.44	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	453.3363	453.3362	-0.22	[M-H ₂ O+H] ⁺	甘草次酸	435.3278、407.3314	三萜皂苷类	甘草

茶的中药组方有所差异，但黄酮类和有机酸类成分是被分离和鉴定频率较高的化学成分。如本研究所鉴定的原儿茶酸、咖啡酸、迷迭香酸、甘草苷、芦丁等在王老吉凉茶的化学成分研究中也同样出现^[22]。另有文献报道的一款植物凉茶共鉴定出 43 个化合物，其中有机酸和黄酮类成分占比达 74.4%^[23]。在畚药食凉茶的化学成分中，槲皮

素和芦丁是其主要化学成分和药效物质基础^[24]。现代药理研究表明中医理论中的“上火”与氧化应激密切相关。凉茶通过清除自由基，提高抗氧化能力，调控氧化还原平衡^[25-26]，所以作为凉茶主要成分中的有机酸类、黄酮类可能是其发挥“下火”“泻火”的关键物质^[27]。

Keap1-Nrf2-ARE 信号通路是细胞防御氧化应

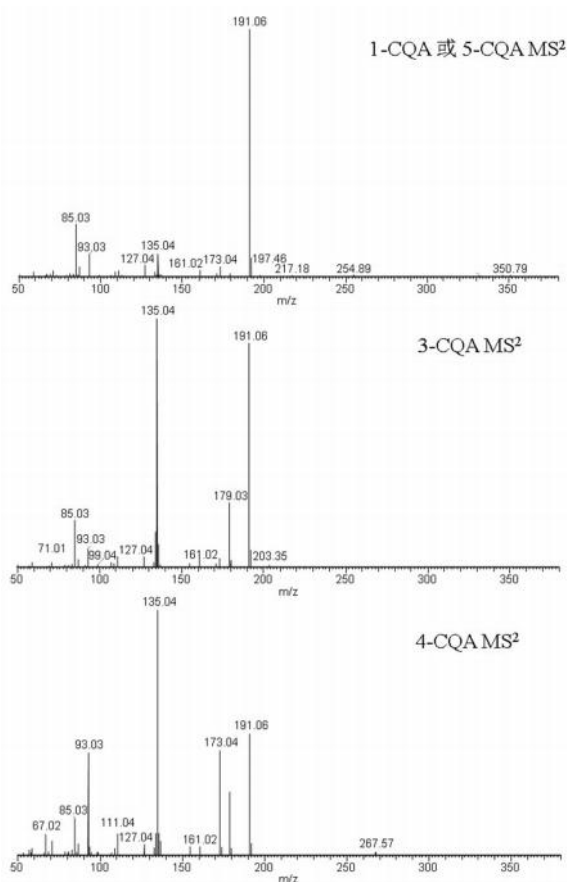


图 5 咖啡酰奎尼酸的二级质谱图

Fig 5 MS² spectra for caffeoylquinic acids

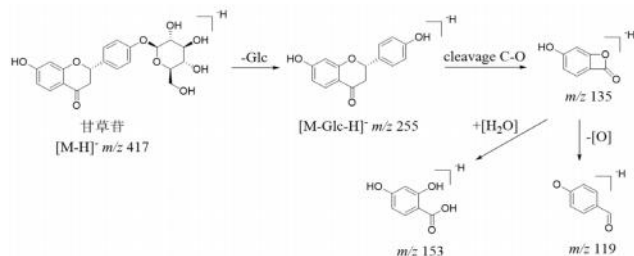


图 6 甘草苷的裂解规律

Fig 6 Fragmentation of liquiritin

激损伤的重要机制之一，Nrf2 信号通路已成为氧化应激相关疾病（如神经退行性疾病、癌症、心血管系统疾病、代谢和炎症等）预防和治疗的靶点。本次研究所鉴定出的黄酮类、苯丙素类、有机酸类和三萜皂苷类化合物，其抗氧化作用机制均已文献报道与上述信号通路相关。原儿茶酸是许多中药的活性成分，现代药理学证明原儿茶酸在抗氧化、消炎抗菌、抗动脉粥样硬化、抗衰老以及神经保护方面开发潜力巨大，具有强大的清除自由基能力以及抗氧化作用^[28]。已有研究显示原儿茶酸显著提高 Nrf2/HO-1 信号通路表达，可能是其抗心肌缺血和发挥神经保护作用的机制^[29-30]。咖啡酸是一种天然的酚类化合物，广泛存在于多种

植物中，是夏枯草的主要酚酸类成分之一，和异迷迭香酸苷组成其抗氧化物质基础^[31]。有研究显示夏枯草缓解葡聚糖硫酸钠对肠上皮细胞屏障功能的破坏与上调 Nrf2 抗氧化基因有关^[32]。

黄酮类成分是另一类在抗氧化和抗衰老研究中报道较多的天然成分。本次研究中所鉴定的槲皮素和芦丁已被广泛报道具有抗氧化，清除自由基，抑制脂质过氧化等药理活性^[33]。现有研究表明，激活 Nrf2/ARE 信号通路，抗氧化应激损伤，是槲皮素发挥多种药理作用的机制。野黄芩苷又称为灯盏乙素，它与黄芩素、黄芩苷等黄酮类成分通过激活 Nrf2/ARE 信号通路，构成了中药黄芩缓解氧化应激、清除活性氧、发挥神经保护作用的主要物质基础^[34]。

本研究采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析技术，通过选择正负离子两种扫描模式对清热祛湿凉茶进行定性分析，共鉴定了 33 种化学成分，包括糖类成分 2 个，有机酸类成分 5 个，香豆素类成分 1 个，黄酮类成分 16 个，苯丙素类成分 4 个和三萜类成分 5 个，同时对其中代表性成分的裂解规律进行了解析。由于藿香中主要有效成分是植物挥发油，针对这类极性很小的小分子化合物通常采用气相色谱-质谱联用（GC-MS）进行检测，所以结果中未检测到归属藿香的化合物^[35]。本研究快速准确地对清热祛湿凉茶的化学成分进行了鉴定，较为全面系统地阐明了清热祛湿凉茶的物质基础，为其质量控制和功能因子研究提供了依据。

参考文献

- [1] 盛小燕, 叶勇峰, 丁懿宁, 等. 清热祛湿凉茶对脾胃湿热证大鼠血清中 NO、SOD 和 MDA 水平以及结肠中 Nrf2/HO-1 表达影响[J]. 中南药学, 2019, 17(10): 1631-1636.
- [2] 何天雨, 王璐, 李林, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的经典名方竹茹汤化学成分鉴定及网络药理学研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5235-5245.
- [3] 耿丹丹, 董琦, 谭亮, 等. HPLC-DAD-ESI/MSⁿ-DPPH 在线筛选与鉴别丹参和康定鼠尾草中抗氧化活性成分[J]. 分析测试学报, 2015, 34(3): 314-320.
- [4] 周燕, 王明奎, 廖循, 等. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析[J]. 分析化学, 2004, 32(2): 174-178.
- [5] 王长生, 董红娇, 包雅婷, 等. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析粗茎秦艽化学成分[J]. 中草药, 2016, 47(18): 3175-3180.
- [6] 陈方超, 高守红, 王志鹏, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定藤梨根的化学成分[J]. 中国药房,

- 2020, 31 (14): 1725-1731.
- [7] 王征, Clifford MN. LC-MSⁿ 比较分析三种传统中草药中绿原酸及其衍生物组分 (英文) [J]. 药学报, 2008, 43 (2): 185-190.
- [8] 陈澜, 王允吉, 冯芳. 养阴清肺口服液化学成分的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析 [J]. 广州化工, 2019, 47 (9): 118-123.
- [9] 梁玉婷, 王静宇, 苏薇薇, 等. 基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 的壮药战骨化学成分分析 [J]. 中南药学, 2018, 16 (10): 1369-1373.
- [10] 邱佳佳, 刘军民, 詹若挺, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-DAD 的不同品种溪黄草主要化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (13): 3539-3547.
- [11] 冯广卫, 李翠兵, 廖尚高, 等. 荭草素和异荭草素、牡荆素和异牡荆素 2 对碳苷化合物的快速检测与鉴定 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31 (7): 1263-1268.
- [12] 常冠华, 薄颖异, 崔洁, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析甘草地上部分主要化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (6): 1449-1459.
- [13] Chen YH, Qi J, Hua J, et al. Structural characterization and identification of major constituents in Radix Scrophulariae by HPLC coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Chin J Nat Med, 2014, 12 (1): 47-54.
- [14] 焦燕, 王英锋, 刘锁兰. LC-MS/MS 法同时测定不同产地半枝莲中野黄芩苷和芹菜素含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (9): 1451-1453.
- [15] 张维冰, 王智聪, 张凌怡. 超高效液相色谱-二极管阵列检测-串联质谱法测定菊花中的 10 种咖啡酰基奎宁酸和 22 种黄酮类化合物 [J]. 分析化学, 2013, 41 (12): 1851-1861.
- [16] 高旭华, 冯欣, 毕玥琳, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的新黄片化学成分分析 [J]. 中南药学, 2021, 19 (9): 1792-1799.
- [17] 肖卫华, 韩鲁佳. 高效液相色谱-电喷雾质谱联用测定黄芪黄酮苷酶解产物 [J]. 分析化学, 2008, 36 (10): 1399-1402.
- [18] 陈钟文, 吴文茂, 刘华, 等. 药用香薷类植物化学成分的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (24): 260-264.
- [19] 杨学东, 唐绪岩, 桑琳. 高压固相萃取-高效液相色谱-质谱法快速鉴定甘草酸单铵原料中的微量成分 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (22): 3416-3421.
- [20] 何天雨, 王璐, 李林, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的经典名方竹茹汤化学成分鉴定及网络药理学研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (19): 5235-5245.
- [21] 马长振, 陈佩东, 张丽, 等. UPLC-ESI-MSⁿ 法分析白茅根中的化学成分 [J]. 中成药, 2010, 32 (4): 625-628.
- [22] 贺颖颖, 罗燕玉, 林朝展, 等. 王老吉凉茶化学成分研究 [J]. 中药材, 2018, 41 (4): 889-893.
- [23] 游飞祥, 韩彦琪, 龚苏晓, 等. HPLC-Q-TOF-MS 分析植物凉茶中的化学成分 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37 (8): 161-165.
- [24] 刘爽, 张晓芹, 陈礼平, 等. 番药食凉茶的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40 (3): 421-426.
- [25] 李亚英, 李燕, 付新梅, 等. 系统药理学法研究“上火”与氧化应激之间的关系 [J]. 分子科学学报, 2015, 31 (2): 108-114.
- [26] 周艾蓉, 李艳, 张玲玲, 等. 从现代科学视角阐释凉茶的败火功效 [J]. 中国现代中药, 2018, 20 (5): 622-625.
- [27] 何蓉蓉, 姚新生, 栗原博. 广东凉茶的“泻火”作用与物质基础研究 [J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2009, 11 (6): 834-839.
- [28] Shin S, Cho SH, Park D, et al. Anti-skin aging properties of protocatechuic acid in vitro and in vivo [J]. J Cosmet Dermatol, 2020, 19 (4): 977-984.
- [29] 奚之玉. 原儿茶酸在脑出血后继发性脑损伤中神经保护作用及机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2020.
- [30] 张艺翀. 原儿茶酸对实验性 MI 大鼠心脏的保护作用及机制的探讨 [D]. 新乡: 新乡医学院, 2022.
- [31] 何婷, 罗敏, 王艳, 等. 夏枯草 HPLC-ECD 指纹图谱建立及抗氧化谱效关系研究 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40 (8): 1021-1028.
- [32] 万正瑞, 李强强, 王凯, 等. 夏枯草蜂蜜提取物对硫酸葡聚糖诱导肠上皮细胞损伤的保护作用及其机制 [J]. 食品科学, 2020, 41 (19): 161-169.
- [33] 田蓉. 槲皮素抗氧化作用机制的探究 [D]. 南昌: 江西师范大学, 2021.
- [34] 杨萍. 灯盏乙素和黄芩苷衍生物 ARE 激活作用研究 [D]. 北京: 清华大学, 2011.
- [35] 刘志华, 周德英. GC-MS 法检测广藿香挥发油的化学成分 [J]. 中国农学通报, 2009, 25 (16): 95-98.

(收稿日期: 2023-04-11; 修回日期: 2023-05-25)

基于网络药理学与实验验证探讨橙皮素治疗 乳腺癌疾病的分子机制

丁海文, 程小雨, 陈昭琳* (中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)药学部, 合肥 230001)

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接和体外实验探讨橙皮素(Hes)治疗乳腺癌疾病的分子机制。**方法** 通过TCMSP、Swiss Target Prediction、PharmMapper数据库筛选Hes作用靶点, GeneCards、OMIM、TTD数据库检索乳腺癌疾病相关靶点。采用Venny 2.1在线获取药物与疾病共同靶点; Cytoscape 3.7.2软件建立药物-靶点-信号通路-疾病网络; STRING数据库在线绘制蛋白互作网络; Metascape数据库进行GO和KEGG通路富集分析; Pymol和AutoDock软件预测分子结合能力; 体外实验验证网络预测结果并探讨Hes抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞生长的潜在机制。**结果** 网络筛选Hes抗乳腺癌疾病共同靶点36个, GO富集获得487个条目, 包括生物过程414个、分子功能55个、细胞组分18个; KEGG通路富集获得40条通路, 大多涉及癌症相关途径和主要信号通路PI3K/AKT等; 分子对接显示Hes与PI3K/AKT信号通路的关键靶点具有良好结合活性。体外实验显示Hes能够抑制MDA-MB-231细胞增殖, 促进凋亡; 降低PI3K、AKT、Bcl-2和MET的表达。**结论** Hes可能通过多靶点抑制PI3K/AKT信号通路的激活, 影响乳腺癌细胞的增殖与凋亡。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 橙皮素; 乳腺癌; PI3K/AKT信号通路

中图分类号: R285, R22 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-2913-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.015

Potential molecular mechanism of hesperetin for breast cancer based on network pharmacology and experiment verification

DING Hai-wen, CHENG Xiao-yu, CHEN Zhao-lin* (*Department of Pharmacy, Anhui Provincial Hospital, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001*)

Abstract: Objective To determine the potential pharmacological mechanism of hesperetin (Hes) for breast cancer based on network pharmacology, molecular docking and in vitro experiments. **Methods** Potential targets of Hes were screened by TCMSP, Swiss Target Prediction and PharmMapper databases; Breast cancer disease targets were searched by GeneCards, OMIM and TTD databases. Venny 2.1 was used to obtain the common targets for drugs and diseases. The key target proteins were screened by Cytoscape 3.7.2 software to establish the drug-target-signaling pathway-disease network model. The protein interaction network was established through the STRING database; Metascape was used for Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment; and Pymol software and AutoDock software were used to predict the ability to combine. In vitro experiments verified the network prediction results and the potential mechanism of Hes inhibiting the growth of breast cancer MDA-MB-231 cells. **Results** Totally 36 common targets of Hes for anti-breast cancer disease were screened, and 487 items were enriched by GO, including 414 biological processes, 55 molecular functions and 18 cellular components. KEGG pathway enrichment uncovered 40 pathways, mostly involving cancer-related pathways and major signaling pathways such as PI3K/AKT. Molecular docking showed that Hes had good binding activity with key targets of PI3K/

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (No.WK911000073); 安徽省自然科学基金项目 (No.2208085MH252)。

作者简介: 丁海文, 男, 硕士, 药师, 主要从事网络药理学研究, email: heaven123d@163.com *通信作者: 陈昭琳, 女, 博士, 主管药师, 主要从事药理学研究, email: czl0808@ustc.edu.cn

AKT signaling pathway. In vitro experiments showed Hes inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells, promoted the apoptosis, and decreased the expression of PI3K, AKT, Bcl-2, and MET. **Conclusion** Hes may affect the proliferation and apoptosis of breast cancer cells by inhibiting the activation of PI3K/AKT signaling pathway through multiple targets.

Key words: network pharmacology; molecular docking; hesperetin; breast cancer; PI3K/AKT signaling pathway

乳腺癌是乳腺腺上皮组织的恶性肿瘤，国内每年发病率约 7.7%，病死率高达 0.81%^[1]。目前，主要以手术、化疗、内分泌治疗、靶向治疗为主。乳腺癌具有高度特异性、高侵袭力和高迁移等特性，治疗效果欠佳，且易复发、转移、产生耐受性^[2-3]。因此，寻找新的乳腺癌治疗药物具有重要意义。

植物提取物在人类疾病尤其是癌症中的应用极为突出，橙皮素 (Hes) 是类黄酮类橙皮苷的糖基配体，存在于柑橘等水果中^[4]。目前，Hes 已被证实具有广泛的药理作用，包括抗炎、抗氧化、抗病毒、心血管保护等^[5]。最近研究发现，Hes 在抗肿瘤方面发挥至关重要的作用。李晓媛等^[6]研究显示，Hes 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活调控肝癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移。Sambantham 等^[7]研究显示，Hes 能够通过上调基因 *BAD* 和 *BAX* 的表达诱导前列腺癌细胞凋亡；Wu 等^[8]研究显示，Hes 通过 PI3K/AKT 信号通路抑制食管癌细胞的增殖和侵袭，且体内可协同增强 5-氟尿嘧啶对食管癌的抗肿瘤作用。然而，目前尚未完全了解 Hes 对乳腺癌细胞生物学行为的影响及分子机制。因此，本研究利用网络药理学预测 Hes 抗乳腺癌的潜在靶点和信号通路，结合分子对接及体外实验验证其结果的可靠性，旨在临床上开发高效、低毒的抗乳腺癌候选药物提供参考。

1 材料

1.1 细胞

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。

1.2 试剂与仪器

Hes (西安小草植物科技有限责任公司，批号: xc20120920，纯度: 95%)，胎牛血清 (FBS)、DMEM 高糖培养基 (杭州四季青生物工程材料有限公司)；CCK-8 检测试剂盒 (日本 Dojido 公司)；anti-MET、anti-PI3K、anti-AKT、anti-Bcl-2 (美国 Abcam 公司)；Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司)；HRP 标记的 IgG 二抗 (美国

CST 公司)；二甲基亚砜 (DMSO，上海索莱宝生物科技有限公司)；SDS-PAGE 凝胶试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (上海碧云天生物技术研究)；PVDF 膜 (美国 Bio-Rad 公司)；ECL 显色试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司)；uQuant 全波长酶标仪 (德国 Sartorius 公司)；BX50 型倒置显微镜 (日本 Olympus 光学工业株式会社产品)；SW-CJ-IF 型超净工作台 (江苏苏州安泰空气技术有限公司)；水套式 CO₂ 培养箱 shallob2322 (广州南方生化医疗仪器有限公司)；Bio-RAD Powker Pac Basic 电泳仪、GL-20A 全自动冷冻高速离心机 (美国 Sartorius 公司)；Western blot 设备 (美国 Biorad 公司)。

2 方法

2.1 Hes 和乳腺癌相关靶点分析

通过 TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库，以口服生物利用度 (OB) $\geq 20\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.1 为标准，汇总去重获取 Hes 潜在靶点。通过 GeneCards、TTD、OMIM 数据库，其中 GeneCards 以基因关联性评分 ≥ 15 为筛选条件，汇总去重获取乳腺癌疾病相关靶点。通过软件 Venny 2.1 获取 Hes 抗乳腺癌共同靶点。

2.2 Hes 抗乳腺癌共同靶点蛋白互作网络 (PPI) 网络

将“2.1”项下收集的药物和疾病共同靶点基因导入 STRING 数据库^[9]，限定物种为人，设置置信值 > 0.4 ，删除无相互作用靶点，绘制共同靶点 PPI 网络，根据 Node degree distribution 值进行可视化。

2.3 核心靶点 GO 和 KEGG 富集分析

通过 Metascape 平台对核心基因进行 GO 和 KEGG 富集分析^[10]。筛选可能富集的信号通路和 *P* 值靠前的 10 个生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)；利用微生信网站绘制 GO 分析和 KEGG 富集分析气泡图。

2.4 Hes-靶点-信号通路-疾病网络模型构建

将 Hes、关键靶点及相关通路信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件^[11], 构建 Hes-靶点-信号通路-疾病网络模型。

2.5 分子对接

通过富集分析结果确定 Hes 治疗乳腺癌的相关通路和关键靶点, 从 RCSB PDB 数据库下载 PI3K、AKT、Bcl-2、IGF1R、KDR、MET、NTRK1、EFGR 蛋白质晶体结构, 从 PubChem 数据库获取 Hes 三维空间结构, 利用 AutoDock 4.2.6 软件进行分子对接^[12], PyMOL 进行可视化。

2.6 细胞增殖实验

利用 CCK-8 法检测 Hes 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响, 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 5×10^3 个细胞, 置于 37 °C 恒温培养箱。给药组加入 Hes (终浓度分别为 20、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预, 空白组加入 20 μL PBS, 每个药物浓度设 4 个复孔。预培养 24 h 后每孔细胞中加入含 10 μL CCK-8 试剂的 DMEM 培养液, 继续孵育 2 h, 使用酶标仪测定每孔细胞的光密度值 (OD 值), 计算不同浓度的 Hes 对细胞存活率的影响, 并计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

2.7 流式细胞术检测

取对数期 MDA-MB-231 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 96 孔板中, 按“2.6”项下方法分组及培养 24 h 后, 离心收集各组 MDA-MB-231 细胞, 加入 500 μL Binding buffer 重悬细胞制成单细胞悬液, 随后加入 Annexin V-FITC 和 PI 5 μL , 避光染色 15 min, 通过流式细胞仪测定并分析细胞凋亡率。

2.8 Western blot 实验

MDA-MB-231 细胞按照“2.6”项下方法分组及处理 24 h 后, 收集各组细胞, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。采用电泳法分离蛋白质, 然后电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗稀释液 (1 : 1000) 4 °C 孵育过夜, 再加入二抗稀释液 (1 : 8000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后用 ECL 化学发光试剂进行显色, 以 GAPDH 进行标定, 采用 Image J 软件分析各组细胞中目的蛋白 PI3K、AKT、Bcl-2、MET 的相对表达情况。

3 结果

3.1 Hes 和乳腺癌相关靶点分析

TCMSP、Swiss Target Prediction 数据库共获取 52 个 Hes 靶点基因; GeneCards、OMIM 数据库收集乳腺癌疾病相关靶点 1197 个。韦恩分析获得 36 个交集靶点, 根据 Node degree distribution 值进行可视化, 绘制 PPI 网络见图 1。

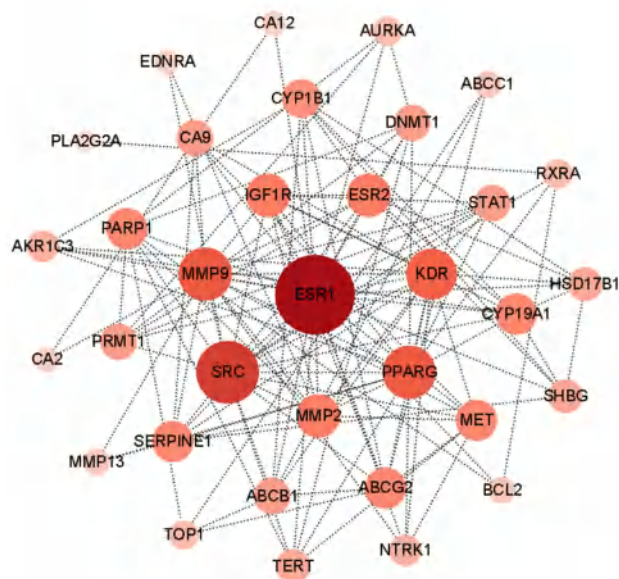


图 1 Hes 抗乳腺癌共同靶点基因 PPI 网络

Fig 1 PPI network of the common targets of Hes against breast cancer

3.2 GO 和 KEGG 富集分析

GO 分析得到 BP 414 条、CC 18 条、MF 55 条, 筛选前 10 条作富集分析图。其中 BP 包括对激素的反应、蛋白质磷酸化、对无机物质的反应等; CC 包括受体复合物、转录调节复合物、神经元细胞体等; MF 包括转录因子受体、核受体、转录共调控物受体等。KEGG 富集通路分析共获得 40 条通路, 大多涉及癌症相关途径、胰岛素抵抗和主要信号通路 PI3K/AKT 等。具体见图 2。

3.3 Hes-靶点-信号通路-疾病网络模型构建

将 Hes、靶点及相关通路信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件^[11], 构建 Hes-靶点-信号通路-疾病网络模型。其中 Bcl-2、IGF1R、KDR、MET、NTRK1、EFGR 靶点作用于 PI3K/AKT 信号通路, 从而干预乳腺癌疾病的发展。具体见图 3。

3.4 分子对接

选取与癌症显著关联的 PI3K/AKT 信号通路及作用靶点, 通过 Autodock Tools 软件将 Hes 与筛选出的靶蛋白进行分子对接分析, Pymol 进行可视化。结合能 $< 0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 说明有对接活性, 结合能 $< -4.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 说明有良好的对接活性^[13]。结果显示, 其中 PI3K、AKT、Bcl-2 与 MET 的结合能最低, 表明目标化合物 Hes 与其蛋白受体的结合活性越强。具体结果见表 1 及图 4。

3.5 Hes 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果显示, Hes 对 MDA-MB-231

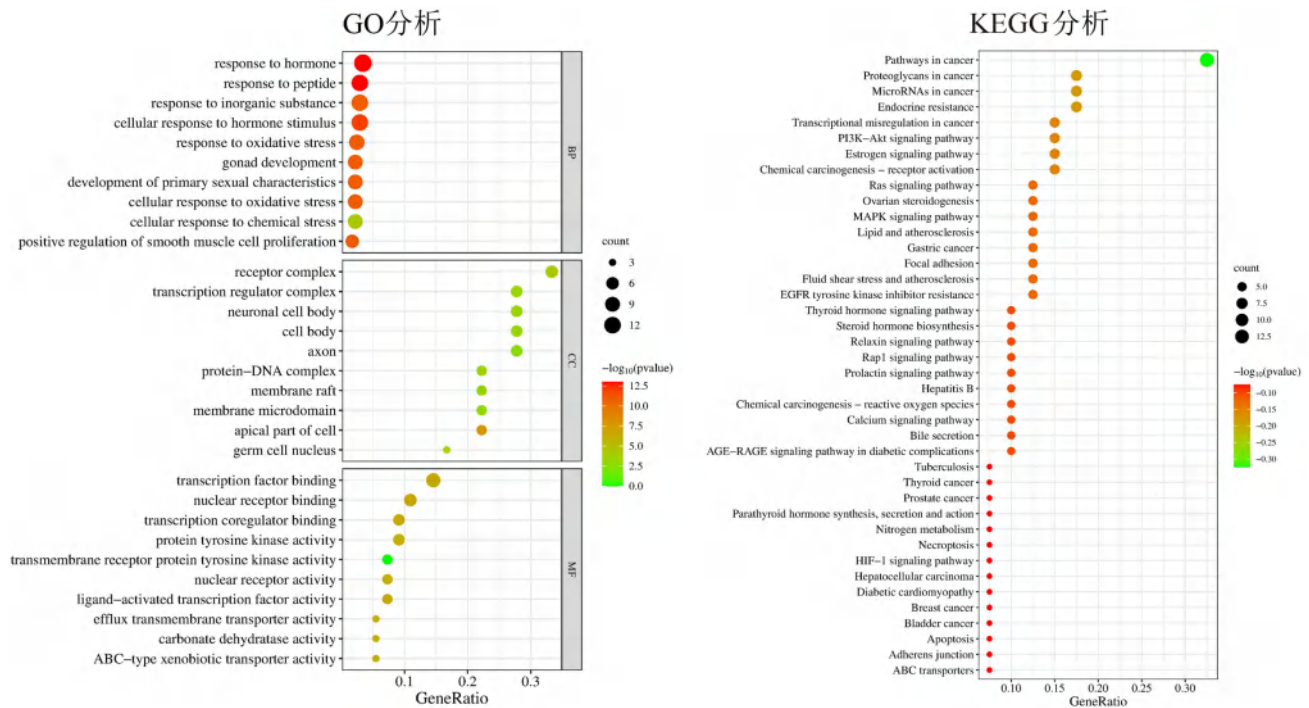


图 2 交集靶点的 GO 和 KEGG 富集分析
Fig 2 GO and KEGG enrichment analysis of the common targets

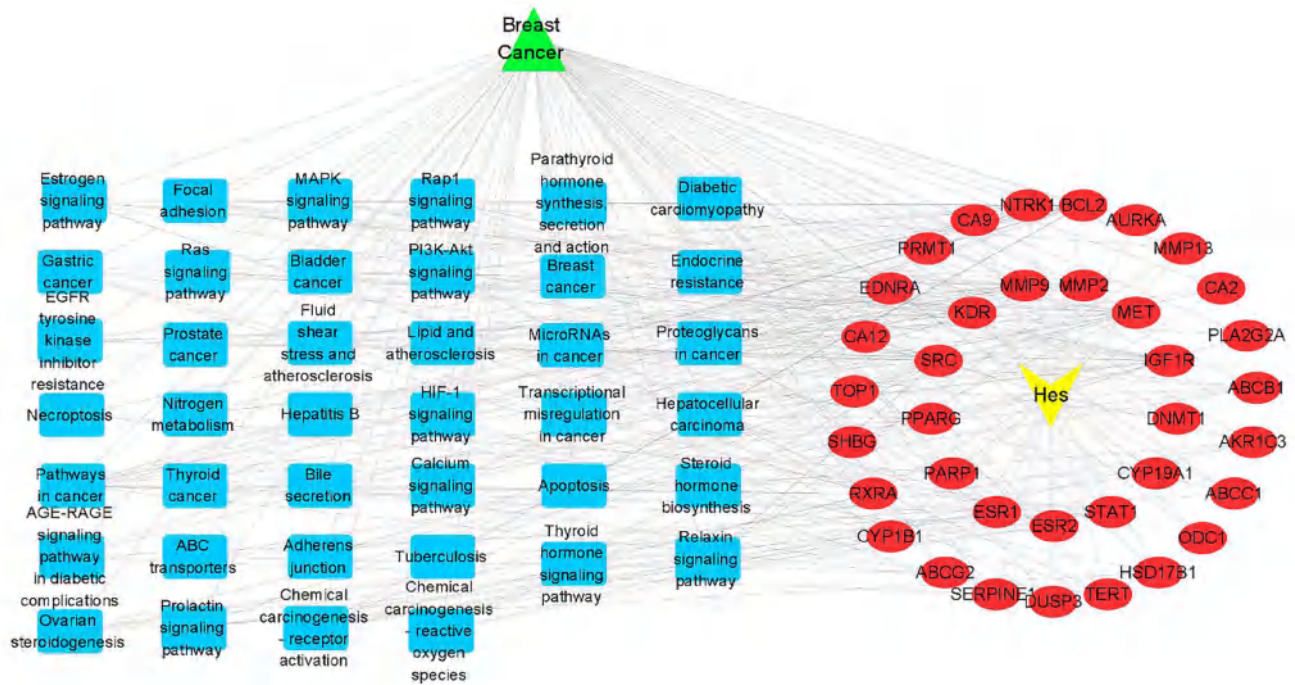


图 3 Hes 治疗乳腺癌的药物 - 靶点 - 信号通路 - 疾病网络
Fig 3 Compound-target-signaling pathway-disease network of Hes for breast cancer treatment

表 1 分子对接结合能
Tab 1 Binding energy of molecular docking

蛋白	PDB ID	结合能 / (kcal · mol ⁻¹)	蛋白	PDB ID	结合能 / (kcal · mol ⁻¹)
PI3K	2CHX	- 5.04	MET	1R1W	- 4.75
AKT	4WB5	- 4.72	NTRK1	1WWA	- 4.50
IGF1R	1JQH	- 4.48	KDR	1VR2	- 4.13
Bcl-2	1G5M	- 4.83	EGFR	1IVO	- 3.83

细胞存活率的影响与 Hes 呈浓度依赖性，与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hes 处理比较，随着 Hes 浓度增加，MDA-MB-231 细胞存活率降低，Hes 对 MDA-MB-231 细胞增殖的 IC_{50} 为 $6.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此选择 3.08 、 6.16 、 $12.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 即低浓度组 (Hes + L)、中浓度组 (Hes + M) 和高浓度组 (Hes + H) 进行后续实验，结果见图 5。

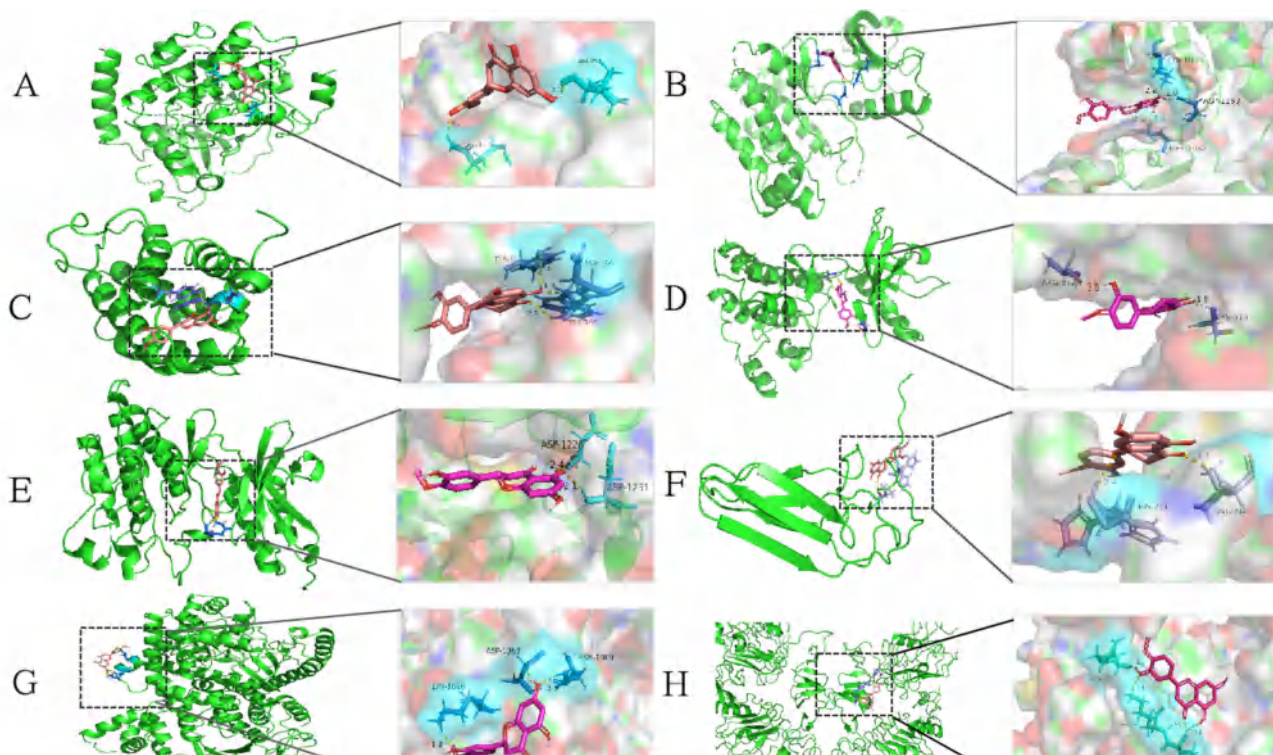


图 4 分子对接作用图

Fig 4 Molecular docking interaction diagram

A. AKT; B. IGF1R; C. Bcl-2; D. KDR; E. MET; F. NTRK1; G. PI3K; H. EGFR

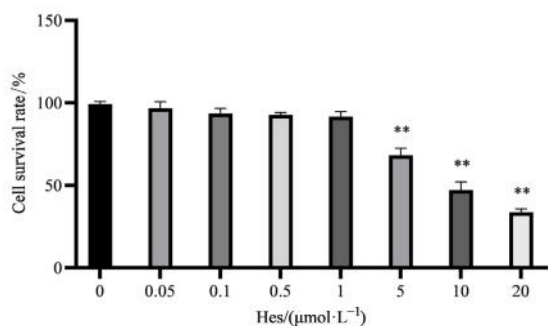


图 5 不同浓度 Hes 对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响

Fig 5 Effect of different concentrations of Hes on the survival rate of MDA-MB-231 cells

注 (Note): 与对照组 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 比较, ** $P < 0.05$ [Compared with the control group ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), ** $P < 0.05$].

3.6 Hes 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示, Hes 能够促进 MDA-MB-231 细胞凋亡。与对照组相比, Hes 对 MDA-MB-231 细胞凋亡率呈浓度依赖性, Hes + H 组的 MDA-MB-231 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 结果见图 6。

3.7 Hes 对相关蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示, 不同浓度 Hes 能下调 PI3K、AKT、Bcl-2、MET 蛋白的表达, 且呈现剂量依赖性。与对照组相比, Hes + M 组与 Hes + H 组处理均显著降低 PI3K、AKT、Bcl-2 蛋白的

表达, Hes + H 组能够显著降低 MET 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 见图 7。

4 讨论

本文采用网络药理学方法构建药物成分 - 靶点 - 信号通路网络, 从分子水平上探讨 Hes 抑制乳腺癌细胞生长的潜在靶点和作用机制。首先通过网络预测, Hes 可通过 36 个潜在靶点作用于乳腺癌。通过构建 PPI 网络分析, Bcl-2、IGF1R、KDR、MET、NTRK1、EGFR 等为治疗乳腺癌的核心靶点。Bcl-2 是一种原癌基因, 其蛋白能够对多种组织的细胞凋亡产生抑制作用, 参与肿瘤的发生与发展^[14]; IGF1R 是一种调节乳腺发育的小多肽, 与 IGF-1 联合在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 如调节肿瘤干细胞、上皮 - 间质转化和肿瘤微环境等, 进而影响肿瘤的进展、转移和血管生成^[15]; KDR 是血管生成调控因子, 其过表达可刺激乳腺组织新生血管形成, 促使肿瘤进展^[16]; MET 也称为 c-MET, 为原癌基因, 其编码的跨膜受体蛋白 MET 具有酪氨酸激酶活性, 调控肿瘤细胞的增殖与分化, 在乳腺癌组织异常高表达^[17]; NTRK1 是神经营养因子酪氨酸激酶受体, NGF 的特异性高亲和力受体, 在乳腺癌的发展中发挥重要作用^[18]; EGFR 是表皮生长因子受体, 已经被证明为包括乳腺癌在内的多种癌症治疗的分子靶

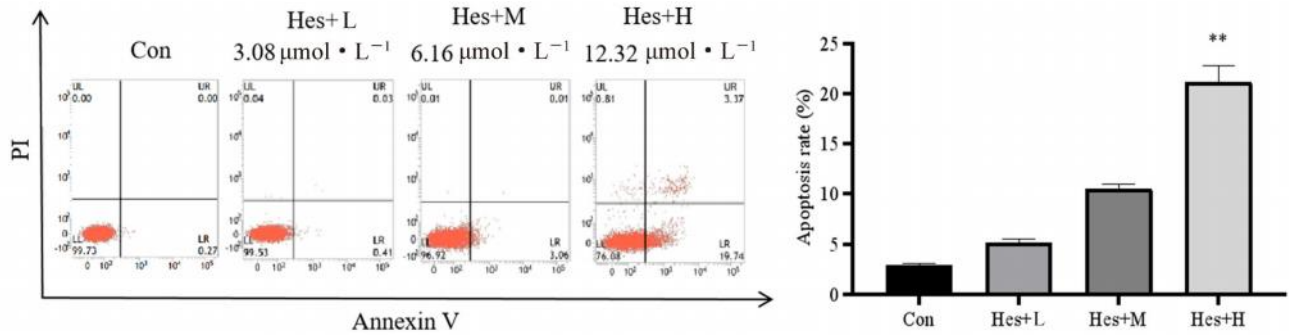


图 6 不同浓度 Hes 对 MDA-MB-231 细胞凋亡率的影响

Fig 6 Effect of different concentrations of Hes on the apoptosis rate of MDA-MB-231 cells

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

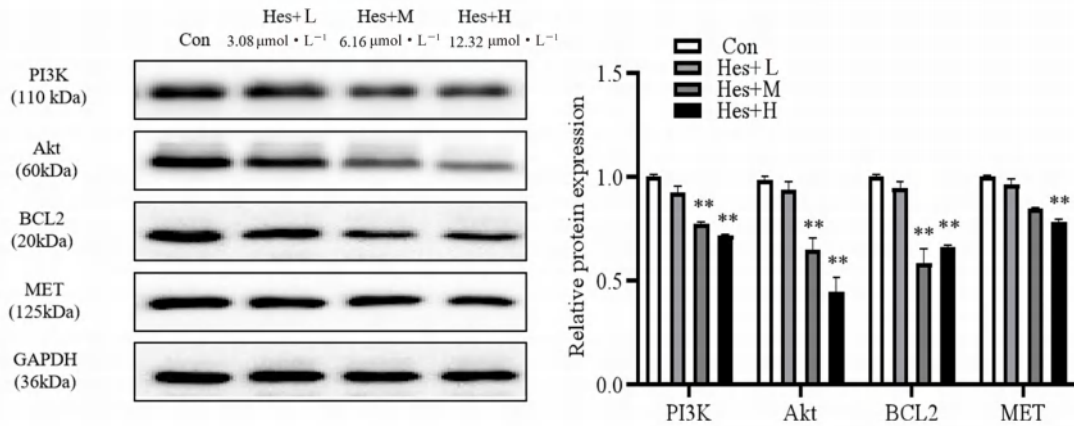


图 7 Hes 对 PI3K、AKT、MET 和 Bcl-2 表达的影响

Fig 7 Effect of Hes on the expression of PI3K, AKT, MET, and Bcl-2

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

点^[19]; 以上证据均提示基因 *Bcl-2*、*IGF1R*、*KDR*、*MET*、*NTRK1*、*EGFR* 通过多种途径影响乳腺癌疾病的发展。GO 功能富集分析主要涉及对激素的反应、蛋白质磷酸化、对无机物质的反应等过程; KEGG 通路富集分析主要涉及癌症相关的途径、胰岛素抵抗、PI3K/AKT 信号通路、雌激素信号通路、Ras 信号通路以及癌症中的 MicroRNA 等与治疗乳腺癌疾病相关通路; 表明 Hes 抗乳腺癌疾病的潜在作用机制主要集中在影响细胞增殖、转移以及凋亡等生物过程。

分子对接结果显示 Hes 与核心靶点 *Bcl-2*、*IGF1R*、*KDR*、*MET*、*NTRK1*、*EGFR* 及 *PI3K*、*AKT* 有良好的结合能; 其中与 *PI3K*、*AKT*、*Bcl-2*、*MET* 的结合能最佳, 提示目标化合物 Hes 与其蛋白受体的结合活性最强。同时 KEGG 通路富集分析也得到与乳腺癌相关的 *PI3K/AKT* 信号通路涉及以上基因, 进一步证明 Hes 可能通过这些关键靶点介导 *PI3K/AKT* 信号通路, 对乳腺癌疾病产生干预作用。

PI3K/AKT 是细胞内调控细胞增殖及细胞周期的关键信号通路, 参与多种癌症的发生发

展^[20]。李岩溪等^[21] 研究报道 Hes 能阻断 *AKT* 活性抑制结肠癌 HCT116 细胞增殖, 诱导其凋亡。另外 Hes 可通过 *PI3K/AKT* 信号通路和 *MAPK* 信号通路预防慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 及其向肺癌发展^[22], 提示 Hes 能够通过不同途径对不同类型癌症的发展和进程产生影响。本实验采用不同浓度 Hes 干预乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 结果显示, 在一定浓度范围内 Hes 能够抑制 MDA-MB-231 细胞的活性, 促进其凋亡。Western blot 检测结果显示, 高浓度的 Hes 干预处理能够明显下调 MDA-MB-231 细胞中 *PI3K* 和 *AKT* 的表达。进一步验证网络药理学的预测结果, Hes 可通过 *PI3K/AKT* 通路调控乳腺癌细胞的增殖与凋亡。

MET 受体可参与的信号通路包括 *PI3K-AKT-mTOR* 途径以及 *RAS-RAF-MEK-ERK* 途径, 在细胞存活、迁移、增殖和胚胎发育上有一定的作用。王国平等^[23] 研究表明, *MET* 为乳腺癌病理诊断的新型生物标志物, 在乳腺癌组织中异常高表达。卫华等^[24] 研究指出, *Bcl-2* 蛋白的表达水平与癌症的发展成正相关, 在乳腺癌组织的表达高于正常组织, 并且能够增加癌变部位细

胞数量,促使癌变的发生。因此, MET 和 Bcl-2 可作为治疗乳腺癌的潜在靶点。本研究结果显示, Hes 干预可以显著降低 MDA-MB-231 细胞中 MET、Bcl-2 的表达,为 Hes 成为治疗乳腺癌潜在靶点药物,提供了初步的细胞学依据。

综上,本研究应用网络药理学方法,通过 Hes、多靶点与乳腺癌之间的复杂网络关系进行梳理,初步阐述 Hes 治疗乳腺癌的主要作用靶点和相关通路,同时结合分子对接技术和细胞实验初步验证其抗肿瘤活性,结果表明 Hes 通过下调关键靶点 MET、Bcl-2 蛋白的表达,抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活,调控 MDA-MB-231 细胞的增殖与凋亡。本研究只进行了体外实验,未通过体内实验验证,后续将继续深入研究,以期为新药研发提供参考。

参考文献

- [1] 袁鑫怡,曾淑欣,杨润,等.基于网络药理学与分子对接的蒲公英抗乳腺癌的机制研究[J].天津中医药,2023,40(1):110-116.
- [2] 陈新璐,陈琳,左伟,等.MiR-326 调控 EphB3 抑制乳腺癌细胞的侵袭和转移[J].中国药理学通报,2023,39(4):665-672.
- [3] Chen J, Lai YH, Ooi S, et al. BTB domain-containing 7 predicts low recurrence and suppresses tumor progression by deactivating Notch1 signaling in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2020, 184(2): 287-300.
- [4] Muhammad T, Ikram M, Ullah R, et al. Hesperetin, a Citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling[J]. Nutrients, 2019, 11(3): 648.
- [5] Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models[J]. Phytother Res, 2015, 29(3): 323-331.
- [6] 李晓媛,郭昊翔,郭敏娟,等.橙皮素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控肝癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的机制研究[J].中国免疫学杂志,2022,38(3):348-352.
- [7] Sambantham S, Radha M, Paramasivam A, et al. Molecular mechanism underlying hesperetin induced apoptosis by in silico analysis and in prostate cancer PC-3 cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(7): 4347-4352.
- [8] Wu DD, Li J, Hu X, et al. Hesperetin inhibits Eca-109 cell proliferation and invasion by suppressing the PI3K/AKT signaling pathway and synergistically enhances the anti-tumor effect of 5-fluorouracil on esophageal cancer in vitro and in vivo[J]. RSC Adv, 2018, 8(43): 24434-24443.
- [9] Min LT, Wu Y, Cao G, et al. A network pharmacology strategy to investigate the anti-osteoarthritis mechanism of main lignans components of Schisandrae Fructus[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 98: 107873.
- [10] Zhang J, Zhou YT, Ma ZY. Multi-target mechanism of Tripterygium wilfordii Hook for treatment of ankylosing spondylitis based on network pharmacology and molecular docking[J]. Ann Med, 2021, 53(1): 1090-1098.
- [11] Dong YZ, Zhao QL, Wang YG. Network pharmacology based investigation of potential targets of astragalus membranaceous-angelica sinensis compound acting on diabetic nephropathy[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 19496.
- [12] Liu JQ, Liu J, Tong XL, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking based strategy to discover the potential pharmacological mechanism of Huai Hua San against ulcerative colitis[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3255-3276.
- [13] 李长健,马贤鹏,聂红.基于网络药理学和分子对接探究参芎葡萄糖注射液抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制[J].中国中药杂志,2022,47(10):2759.
- [14] 周璐,刘亚楠,靳晓冬.子宫内膜癌组织中 Bcl-2、Bmi-1 的表达情况及临床意义[J].实用癌症杂志,2023,38(2):223-226.
- [15] Zhang Q, Li TF, Wang ZC, et al. lncRNA NR2F1-AS1 promotes breast cancer angiogenesis through activating IGF-1/IGF-1R/ERK pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(14): 8236-8247.
- [16] 刘璇,吴建成.血管内皮生长因子和激酶功能受体在乳腺癌组织中的表达水平及其与局部血管生成的相关性分析[J].蚌埠医学院学报,2016,41(8):1056-1057,1060.
- [17] 刘海旺,张宏旭,刘燃,等.肝细胞生长因子/酪氨酸蛋白激酶 MET 信号通路与乳腺癌侵袭转移的相关性分析[J].安徽医药,2021,25(3):516-519.
- [18] Kyker-Snowman K, Hughes RM, Yankaskas CL, et al. TrkA overexpression in non-tumorigenic human breast cell lines confers oncogenic and metastatic properties[J]. Breast Cancer Res Treat, 2020, 179(3): 631-642.
- [19] Gumuskaya B, Alper M, Hucumenoglu S, et al. EGFR expression and gene copy number in triple-negative breast carcinoma[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 203(2): 222-229.
- [20] 周永君,潘永越,杨丽君,等.肉豆蔻木脂素通过 PI3K/AKT 信号通路诱导胃癌细胞凋亡的研究[J].四川大学学报(医学版),2023,54(1):136-141.
- [21] 李岩溪,张昊,国星奇,等.橙皮素对结肠癌 HCT116 细胞凋亡、迁移与侵袭的影响及机制研究[J].解剖科学进展,2020,26(2):196-200.
- [22] Zhou L, Gu WW, Kui FG, et al. The mechanism and candidate compounds of aged citrus peel (chenpi) preventing chronic obstructive pulmonary disease and its progression to lung cancer[J]. Food Nutr Res, 2021, 17: 65.
- [23] 王国平,张筱荻,寿春晖.酪氨酸激酶受体 RON 和 MET 在三阴性乳腺癌组织中的表达特征及临床意义[J].浙江中西医结合杂志,2023,33(5):422-442.
- [24] 卫华,赵子龙.细胞凋亡与 Bcl-2 蛋白的关系及两者在胃癌发生中的作用[J].临床医学研究与实践,2018,3(29):81-83.

(收稿日期:2023-04-26;修回日期:2023-06-12)

高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝大鼠模型的代谢组学研究

赵驿歌¹, 赵一颖¹, 丰晨然¹, 刘皓玲¹, 贺润铖¹, 尹纪元¹, 李青青¹, 罗睿¹, 张硕峰¹, 孙文燕^{1*}, 吴希^{2*} (1.北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2.北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

摘要: **目的** 构建高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 大鼠模型, 分析该模型大鼠肝脏的差异代谢物, 探究 NAFLD 大鼠模型代谢特征。**方法** SPF 级 SD 大鼠 12 只, 雌雄各半, 体重 90 ~ 110 g, 根据体重随机分为模型组和正常组。采用高脂饮食诱导法建立 NAFLD 大鼠模型, 正常组给予普通维持饲料, 模型组给予高脂饲料 (配方为: 78.8% 基础饲料 + 10% 猪油 + 10% 蛋黄粉 + 1% 胆固醇 + 0.2% 胆酸钠), 造模第 8 周取材, 生化法检测谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 等指标; HE 染色观察肝脏病理变化; 运用高效液相色谱-质谱联用技术分析大鼠肝脏非靶向代谢物变化。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏指数和肥胖指数显著升高 ($P < 0.05$ 或 0.01), 血清 TC、TG、LDL-C、ALT 显著升高 ($P < 0.05$ 或 0.01), 肝脏 TC、TG、LDL-C 显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 显著降低 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, 模型组大鼠肝组织脂肪变性、气球样变和炎细胞浸润, NAS 评分显著升高 ($P < 0.01$)。肝脏代谢组学共筛选出 253 个差异代谢物, 获取了视黄醇代谢、不饱和脂肪酸的生物合成等代谢通路。**结论** 高脂饮食 8 周可成功建立 NAFLD 大鼠模型, 其代谢组学变化涉及视黄醇代谢、不饱和脂肪酸的生物合成等多个代谢途径。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 高脂饮食; 肝脏代谢组学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2920-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.016

Metabolomics of a rat model of non-alcoholic fatty liver induced by high-fat diet

ZHAO Yi-ge¹, ZHAO Yi-ying¹, FENG Chen-ran¹, LIU Hao-ling¹, HE Run-cheng¹, YIN Ji-yuan¹, LI Qing-qing¹, LUO Rui¹, ZHANG Shuo-feng¹, SUN Wen-yan^{1*}, WU Xi^{2*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Oriental Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078)

Abstract: Objective To establish a high-fat diet induced rat model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), to analyze the differential metabolites in the liver of the model rat, and to explore the metabolic characteristics of the NAFLD rat model. **Methods** Totally 12 SPF SD rats, 6 males and 6 females, with the body weight of 90 ~ 110 g, were randomly divided into a model group and a normal group according to body weight. High-fat diet induction was used to establish a NAFLD rat model. The normal group was given regular maintenance feed, while the model group was given high-fat feed (high fat feed formula: 78.8% basic feed + 10% lard + 10% egg yolk powder + 1% cholesterol + 0.2% sodium cholate). At the 8th week of modeling, samples were taken, and alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and other indicators were biochemically detected. HE staining was used to detect the liver pathological changes, and analyze non-targeted changes in rat liver metabolites with high-performance liquid

基金项目: 兵团重大科技项目 (No.2020AA005)。

作者简介: 赵驿歌, 女, 硕士研究生, 主要从事中药消化药理、中药抗炎药理研究, email: zyg408716172@163.com *通信作者: 孙文燕, 男, 副教授, 主要从事中药抗炎与免疫药理、中药毒理研究, email: sunwy@bucm.edu.cn; 吴希, 女, 副主任医师, 主要从事针刺改善内分泌代谢性疾病研究, email: 2007wuxi@sina.com

chromatography mass spectrometry. **Results** Compared with the normal group, the liver index and obesity index of the model group were increased ($P < 0.05$ or 0.01), while TC, TG, LDL-C, and ALT in the serum of the model group were increased ($P < 0.05$ or 0.01). TC, TG, and LDL-C in the liver were increased ($P < 0.01$), while HDL-C was reduced ($P < 0.05$). HE staining showed that the NAS score of steatosis, ballooning and inflammatory cell infiltration in the liver tissue of rats in the model group increased significantly ($P < 0.01$). Totally 253 differential metabolites were screened out by liver metabolomics, and metabolic pathways such as retinol metabolism and unsaturated fat acid biosynthesis were obtained. **Conclusion** An NAFLD rat model is successfully established after 8 weeks of high-fat diet, whose metabonomic changes included retinol metabolism, unsaturated fat acid biosynthesis and other metabolic pathways.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease; high-fat diet; liver metabolomics

非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是排除酒精和其他明确肝损伤因素所导致的肝细胞内以脂肪过度沉积为主要特征的临床综合征。流行病学调查显示, 2015—2021 年 NAFLD 的总患病率由 25.24% 发展到 29.38%^[1], NAFLD 正在成为全球主要的慢性肝病, 占慢性肝病总死亡原因的 45.8%。NAFLD 早期无明显症状, 进展慢, 如不及时治疗, 最终可能演变为肝纤维化、肝硬化, 甚至肝癌^[2]。脂肪肝的发病机制目前尚未完全明确, 且无特效治疗药物^[3]。为深入探讨 NAFLD 的发病机制, 本研究采用高脂饮食诱导的 NAFLD 模型, 运用代谢组学技术初步揭示该模型的代谢特征。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 12 只, 雌雄各半, 体重 90 ~ 110 g [斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010, 质量合格证号: No.110324221102193267]。动物饲养温度为 $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $(60 \pm 10) \%$, 饲养期间大鼠自由进食饮水。

1.2 试药

大鼠普通维持饲料和高脂饲料 [斯贝福 (北京) 生物技术有限公司]。高脂饲料配方为: 78.8% 基础饲料 + 10% 猪油 + 10% 蛋黄粉 + 1% 胆固醇 + 0.2% 胆酸钠。总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.3 仪器

Triple TOF 5600⁺ 高分辨质谱系统 [美国 ABSCIEX 公司, 配备 LC-30 超高效液相系统 (日本岛津公司)]; 5424R 离心机 (德国 Eppendorf 公

司); ME204E102 电子天平 (梅特勒托利多公司); Tissuelyser-48 研磨仪 (上海净信科技有限公司); PS-60AL 超声仪 (深圳市雷德邦电子有限公司); CentriVap 冷冻离心浓缩仪 (美国 LABCONCO 公司); 迈瑞 BS-420 全自动生化仪 (武汉盛世达医疗设备有限公司)。

2 方法

2.1 实验分组与 NAFLD 模型建立

SD 大鼠按照体重随机分为正常组和模型组。动物适应性喂养 1 周后称重, 模型组开始高脂饲料过渡喂养, 高脂饲料占比为 10%、30%、60%、100%, 分别在第 1、3、5、7 日逐步递增, 直至过渡到全部高脂饲料喂养, 之后自由进食, 不限进食量。正常组给予普通维持饲料, 模型组给予高脂饲料, 持续 8 周。

2.2 样本采集

在喂养 8 周结束后, 将所有大鼠禁食 12 h, 按 $3.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠进行麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置 2 h, $4 ^\circ\text{C}$ 、 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。收集血清, 分装保存于 $-80 ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。迅速取出肝脏称重, 在左肝叶同一部位, 取一小块肝组织用 $4 ^\circ\text{C}$ 生理盐水冲洗, 滤纸吸干后, 以 4% 多聚甲醛溶液固定, 剩余部分分装后于 $-80 ^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.3 观察指标

观察大鼠的肝脏形态, 计算肝脏指数^[4]、Lee's 指数和肥胖指数^[5]。按照试剂盒说明书检测血清中 TC、TG、ALT、AST、HDL-C、LDL-C 的含量, 取 $-80 ^\circ\text{C}$ 冻存的部分肝脏, 加入液氮研磨, 冰浴条件下与生理盐水按照 1:9 的比例稀释, 在匀浆管中匀浆, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 取上清液, BCA 法测定蛋白含量, 比色法检测肝脏中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 的含量。

2.4 肝脏组织病理学观察

取肝组织脱水，石蜡包埋，切片，苏木素-伊红(HE)染色，显微镜下观察大鼠肝脂肪变性和炎症程度。采用NAFLD活动评分(NAFLD activity score, NAS)评价各组大鼠肝细胞脂肪变性、小叶内炎症和气球样变程度^[6]，NAS < 3分可排除非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)，NAS > 4分则可诊断为NASH，介于两者之间为有NASH可能。

2.5 代谢组提取

样本于冰上缓慢解冻，用50%甲醇水溶液(含同位素内标)提取样本中代谢物，取100 μL代谢物提取液，用400 μL预冷的50%甲醇乙腈混合液超声混合10 min，再于-20℃孵育1 h，4℃、2000 r·min⁻¹离心15 min，取上清液抽干过夜。加入50%乙腈水溶液复溶，超声10 min，4℃、20 000 r·min⁻¹离心15 min，取上清液装入上样瓶。另外，每个样本取10 μL混合成质控(QC)样本，装瓶。

2.6 检测条件

样本经ACQUITY-UPLC-T3色谱柱进行预分离。柱温为50℃，流速为0.3 mL·min⁻¹，流动相A为0.1%甲酸水，流动相B为0.1%甲酸乙腈，梯度洗脱(0~0.5 min, 5%B; 0.5~7.5 min, 5%~100%B; 7.5~8 min, 100%B; 8~8.5 min, 100%~5%B; 8.5~12 min, 5%B)。

预分离后的样本代谢分析物经高分辨率质谱TripleTOF5600⁺进行正离子模式和负离子模式各采集一次。仪器参数：气帘气为30 psi，辅气与鞘气分别为60 psi，离子源温度为650℃，喷雾电压在正离子模式下为5000 V，负离子模式下为4500 V。采集方式为信息依赖性采集(IDA)，一级扫描范围为60~1200 Da，采集时间为150 ms，从其中挑选12个强度最高的电荷为1且强度大于100 counts·s⁻¹的离子进行二级碎裂扫描，单个扫描循环周期为0.56 s。脉冲电的射率为11 kHz，TDC检测器频率为40 GHz，每次扫描的离子信号以4个通道分别记录再合并转换成数据，动态排除时间设定为4 s。

2.7 代谢组学数据处理

原始数据经ProteoWizard软件转成mzML格式后，使用自主编写的R程序包(内核为XCMS)进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理，然后使用内部MS²数据库(Allwegene.DB)进行代谢物注释。匹配进行物质注释，算法打分的Cutoff值设为0.7。

2.8 数据分析

使用SPSS 22.0软件进行数据分析。实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组数据比较

若服从正态分布且方差齐，采用单因素方差分析，否则采用非参数性检验；两组比较若服从正态分布且方差齐，采用Student's *t*检验，否则采用非参数性检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肝脏一般情况

正常组大鼠肝脏质地柔软，边缘锐利，呈均匀深红色。模型组大鼠肝脏体积增大，包膜紧张，边缘较钝，呈土黄色，表面呈花斑状，触之似泥块并有油腻感，部分大鼠肝脏有黄白色的局灶性脂肪沉积。

3.2 大鼠肝脏指数、Lee's指数和肥胖指数

模型组大鼠肝脏指数、肥胖指数较正常组显著升高($P < 0.01$)，Lee's指数无显著变化(见图1)。

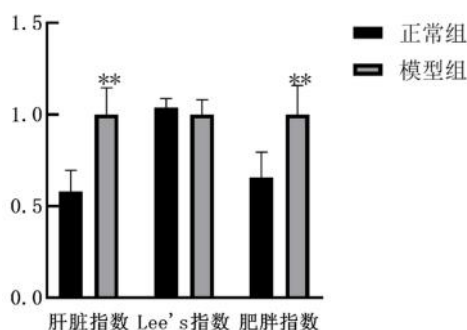


图1 高脂诱导8周大鼠一般指标变化情况($\bar{x}\pm s$, $n = 6$)

Fig 1 Changes in general indicators of rats after 8-week high-fat diet ($\bar{x}\pm s$, $n = 6$)

注：与正常组比较，** $P < 0.01$ 。

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

3.3 大鼠血清和肝脏生化指标检测结果

与正常组比较，模型组血清中TC、TG、LDL-C、ALT均显著升高($P < 0.05$ 或0.01)；HDL-C有降低趋势，AST有升高趋势，但差异无统计学意义(见图2)；模型组肝脏中TC、TG、LDL-C均显著升高($P < 0.01$)，HDL-C显著降低($P < 0.05$)(见图3)。总体数据体现了模型组大鼠具有脂质代谢紊乱的特征。

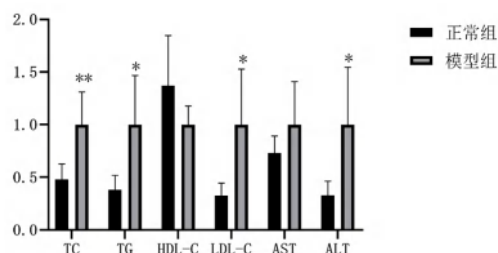


图2 高脂诱导8周大鼠血清生化指标变化情况($\bar{x}\pm s$, $n = 6$)

Fig 2 Changes in serum biochemical indicators in rats induced by high-fat diet for 8 weeks ($\bar{x}\pm s$, $n = 6$)

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

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

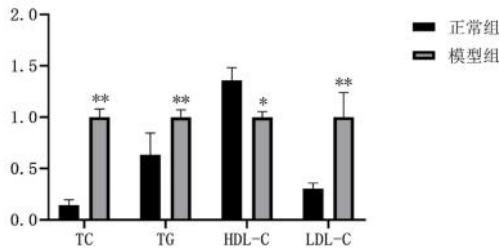


图 3 高脂诱导 8 周大鼠肝脏生化指标变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig 3 Changes in liver biochemical indicators in rats induced by high-fat diet for 8 weeks ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the normal group, * $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

3.4 肝脏组织病理学观察

正常组肝小叶结构完整，轮廓清晰，肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列，肝小叶肝细胞分界清晰，胞核圆，位于细胞中央，胞质丰富，肝窦中库普弗细胞清晰可见，汇管区偶见淋巴细胞浸润。模型组肝组织中可见大量肝细胞脂肪变性，胞质中可见大小不一的圆形空泡，多见肝细胞气球样变性，细胞肿胀，核居中，胞质空泡化；较大量的汇管区胆管周围可见淋巴细胞浸润（见图 4）。正常组 NAS < 3 ，模型组 NAS > 4 ；与正常组比较，模型组 NAS 评分显著升高 ($P < 0.01$)。

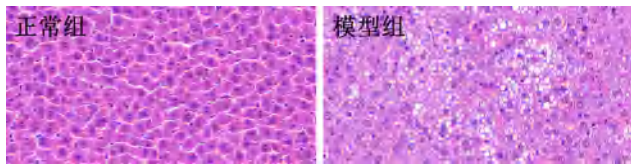


图 4 大鼠肝组织 HE 染色 ($\times 400$)
Fig 4 HE staining of rat liver tissue ($\times 400$)

3.5 大鼠肝脏代谢组多元数据分析

从正、负离子模式下 PCA 结果可以看到 QC 样本紧密聚集，表明测序重复性良好，可保证测定数据的可靠性。正常组和模型组的代谢物有显著性差异，说明模型组的代谢模式发生显著变化，3D PCA 得分图见图 5。对各组样本采用正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)，建立 OPLS-DA 模型并进行 200 次置换检验。从结果可以看出，两组样本得分非常显著，样本全部处 95% 置信区间内，见图 6。

3.6 差异代谢物的筛选

本研究以 $VIP \geq 1$ ， $P \leq 0.05$ 且 FC (fold change) < 0.67 或 > 1.5 为筛选标准，筛选各组间符合条件的差异代谢物。在正常组与模型组之间得到显著差异代谢物 253 个，其中 112 个上调，141 个下调，火山图显示了各组代谢物的水平差异，见图 7。以 VIP 值排序，前 25 个差异代谢物见表 1。

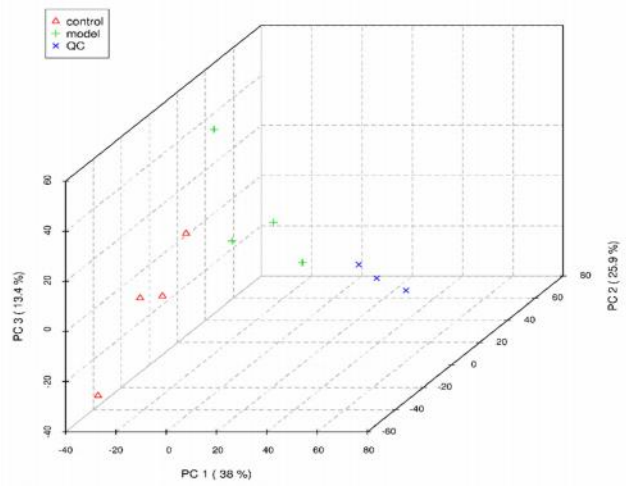


图 5 全部样本 (包括 QC 样本) 的 3D PCA 得分散点图
Fig 5 Scatter plot of 3D PCA scores of all samples (including QC samples)

注：图中每个点代表一个样品，不同颜色代表不同组别。

Note: Each point in the figure represents a sample, and different colors represent different groups.

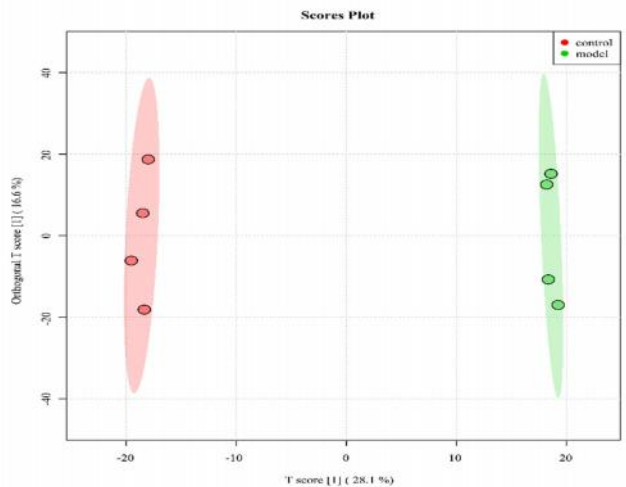


图 6 比较组合的 OPLS-DA 图
Fig 6 OPLS-DA diagrams of combinations

3.7 差异代谢物 KEGG 富集分析

差异代谢物的 KEGG 富集分析结果显示，模型组和正常组差异代谢物主要富集在视黄醇代谢 (retinol metabolism)、不饱和脂肪酸的生物合成 (biosynthesis of unsaturated fatty acids)、胆固醇代谢 (cholesterol metabolism)、脂肪消化和吸收 (fat digestion and absorption) 以及脂质与动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis) 等通路，见图 8。

4 讨论

本研究发现，高脂饲料喂养 8 周模型组大鼠肝脏 HE 染色均表现出脂肪堆积，符合 NAFLD 的诊断标准，提示成功构建单纯高脂饮食诱导的 NAFLD 动物模型^[7]。肝活检一直是 NASH 的诊断标准，然而由于活检的侵入性和采样的变异性，临

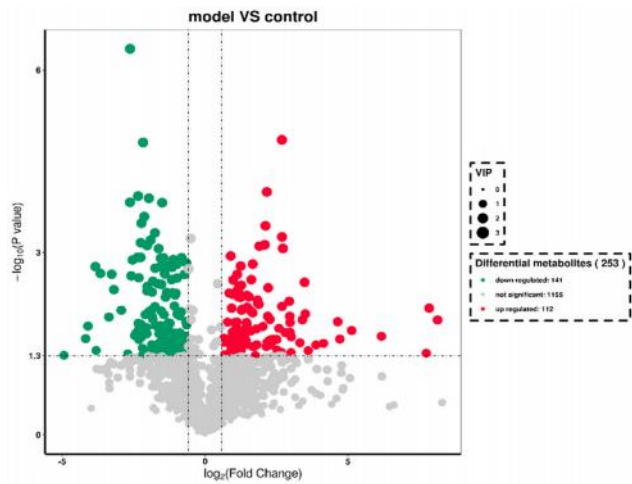


图 7 组间差异代谢物筛选火山图

Fig 7 Screening volcanic map for differential metabolites between combinations

床上有强烈的精确和准确的无创检测需求^[8]。代谢组学作为 NAFLD 领域一种有前途的诊断方法，因此亟须寻找经过可靠验证的生物标志物，用于诊断、预后和检测疾病进展^[9]。目前已有文献报道 NAFLD 小鼠的代谢组学研究^[10]。NAFLD 大鼠模型成模周期短于小鼠，使用率更高，但尚未见对大鼠模型的代谢组学研究。本研究采用 UHPLC-MS/MS 技术，分析了 NAFLD 大鼠模型的代谢产物变化以及代谢途径。结果发现，NAFLD 大鼠肝脏代谢物水平与正常组相比出现显著差异，得到 9- 顺-视黄醇、13- 二十二烯酸、13Z, 16Z- 二十二碳二烯酸、孕二醇、胆固醇硫酸盐、N- 花生四烯酰甘氨酸、羟基脂肪酸、N- 棕榈酰甘氨酸、N- 花生四烯酰基-L- 丝氨酸、二酰基甘油、磷酸黄质等差异代谢物；进一步分析发现以上代谢物主要调控视黄

表 1 模型组和正常组前 25 个肝脏差异代谢物

Tab 1 The first 25 liver differential metabolites between the model group and the normal group

化合物名称	m/z	保留时间 /min	P 值	差异倍数	VIP	分子式	趋势
N- 花生四烯酰甘氨酸	360.26	5.90	< 0.005	0.16	1.87	C ₂₂ H ₃₅ NO ₃	↓
羟基脂肪酸	477.40	6.66	< 0.005	6.45	1.86	C ₃₀ H ₅₄ O ₄	↑
cohibin A	549.49	7.85	< 0.005	0.22	1.85	C ₃₅ H ₆₄ O ₄	↓
N- 棕榈酰甘氨酸	312.26	6.34	< 0.005	0.35	1.81	C ₁₈ H ₃₅ NO ₃	↓
N- 花生四烯酰基-L- 丝氨酸	390.27	5.53	< 0.005	0.16	1.81	C ₂₃ H ₃₇ NO ₄	↓
papyriferic acid	605.40	8.13	< 0.005	0.23	1.80	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	↓
13Z, 16Z- 二十二碳二烯酸	335.30	9.07	< 0.005	4.33	1.79	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	↑
二酰基甘油	667.53	10.44	< 0.005	6.48	1.78	C ₄₃ H ₇₀ O ₅	↑
磷酸黄质	581.40	8.80	< 0.005	0.30	1.78	C ₄₀ H ₅₂ O ₃	↓
N- 油酰基-L- 丝氨酸	370.29	5.96	< 0.005	0.27	1.77	C ₂₁ H ₃₉ NO ₄	↓
四碳五烯酸	357.28	8.12	< 0.005	6.61	1.76	C ₂₄ H ₃₈ O ₂	↑
孕二醇	319.27	7.95	< 0.005	4.26	1.76	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	↑
二十二碳六烯酰甘氨酸	384.26	5.82	< 0.005	0.34	1.75	C ₂₄ H ₃₅ NO ₃	↓
N- 亚油酰牛磺酸	388.25	10.31	< 0.005	0.25	1.75	C ₂₀ H ₃₇ NO ₄ S	↓
N- 亚油酰甘氨酸	336.25	5.92	< 0.005	0.32	1.74	C ₂₀ H ₃₅ NO ₃	↓
花生四烯酰乙醇酰胺	348.29	5.96	< 0.005	0.20	1.74	C ₂₂ H ₃₇ NO ₂	↓
磷脂酰丝氨酸	708.49	5.33	< 0.005	0.36	1.73	C ₃₆ H ₇₀ NO ₁₀ P	↓
油酰酪氨酸	446.33	6.45	< 0.005	0.34	1.73	C ₂₇ H ₄₃ NO ₄	↓
N- 油酰蛋氨酸	414.31	7.33	< 0.005	0.35	1.73	C ₂₃ H ₄₃ NO ₃ S	↓
9- 顺- 视黄醇	285.22	7.68	< 0.005	0.07	1.72	C ₂₀ H ₂₈ O	↓
全反式-13, 14- 二氢视黄醇	289.25	7.53	< 0.005	2.18	1.71	C ₂₀ H ₃₂ O	↑
D- 泛酸	220.12	2.48	< 0.005	0.51	1.69	C ₉ H ₁₇ NO ₅	↓
13- 二十二烯酸	337.31	9.96	< 0.005	3.07	1.69	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	↑
胆固醇硫酸盐	465.30	3.55	< 0.005	4.62	1.65	C ₂₇ H ₄₆ O ₄ S	↑
胆固醇月桂酸酯	283.26	7.93	< 0.005	1.80	1.63	C ₃₉ H ₆₈ O ₂	↑

醇代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、胆固醇代谢等通路。

视黄醇代谢与肝脏功能密切相关，在代谢性疾病调控过程中发挥重要作用。临床研究表明，NAFLD 患者肝脏视黄醇代谢受损，肝脏全反式视黄酸、视黄醇和视黄醇棕榈酸酯的水平与疾病严重程度呈现显著的负相关^[11]。视黄醇可通过脂肪分化相关蛋白抑制肝脂肪变性，同时其代谢产物

视黄酸也可改善脂代谢紊乱，通过上调过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 以及类视黄酸受体促进脂肪酸氧化，并通过固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c) 和脂肪酸合成酶抑制脂肪酸合成^[12]。改善肝脏视黄醇代谢紊乱或激活肝脏视黄酸受体有可能成为 NASH 治疗的有效手段。在本研究中，NAFLD 大鼠肝脏中 9- 顺- 视黄醇含量出现显著下调。

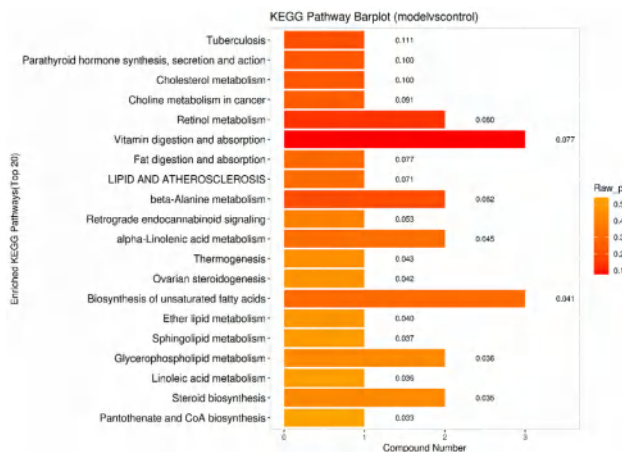


图 8 KEGG 富集柱状图

Fig 8 KEGG enrichment bar chart

注：颜色越深，P 值越小，关联越紧密。

Note: The darker the color, the smaller the P value, and the closer the correlation.

研究表明，长链脂肪酸的过氧化物酶体氧化通过刺激丙二酰辅酶 A 的形成来抑制线粒体脂肪酸氧化，丙二酰辅酶 A 可能在脂肪酸诱导的肝脂肪变性和相关代谢紊乱中发挥作用。13-二十二烯酸（芥酸）是一种不饱和脂肪酸。以往研究显示，喂食含高浓度芥酸的菜籽油会导致动物肝脂肪变性^[13]。线粒体脂肪酸氧化在肝脂质稳态中起核心作用，因此芥酸的肝脏代谢可能会减少线粒体脂肪酸氧化。芥酸的过氧化物酶体 β 氧化刺激肝脏中的丙二酰辅酶 A 形成，从而抑制线粒体脂肪酸氧化。芥酸的过氧化物酶体代谢也显著提高了胞质 NADH/NAD 比值，抑制了 sirtuin 1 (SIRT1) 活性，激活了乙酰辅酶 A 羧化酶，从而刺激了丙二酰辅酶 A 的生物合成。高脂饮食的长期喂养减少了线粒体脂肪酸氧化，并导致大鼠肝脂肪变性和胰岛素抵抗。本研究代谢通路富集分析结果显示，高脂饮食诱导大鼠 NAFLD 的机制可能与不饱和脂肪酸的生物合成有关，涉及的差异代谢物有 13-二十二烯酸、13Z, 16Z-二十二碳二烯酸等，该结果与文献研究结论基本一致^[13]。

当肝脏产生疾病时，常因肝脏对激素的灭活能力下降使类固醇激素在体内堆积，从而引起脂质代谢紊乱。有研究报道，从 NAFLD 患者血清与晚期纤维化相关的前 10 种代谢物中，鉴定出 8 种脂质，包括 5 α -雄甾烷-3 β 单硫酸盐、孕二醇-3-葡萄糖苷酸、硫酸雄酮、硫酸表雄酮、棕榈油酸酯、硫酸脱氢异雄酮、5 α -雄甾烷-3 β 二硫酸盐、甘胆酸，其中 6 种是胆固醇衍生的类固醇激素^[14]。本研究代谢通路富集分析结果显示，模型大鼠差异代谢物中的孕二醇和胆固醇硫酸盐含量显著上升，提示 NAFLD 大鼠成模的机制可能与

类固醇激素生物合成有关，该结果与以往研究结论基本一致^[14]。

综上，本研究结果初步揭示了高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠模型的代谢特征，可为 NAFLD 的发病机制以及药物干预研究提供有益参考。

参考文献

- [1] 李政, 陈莲如, 刘玉霞. 非酒精性脂肪肝病药物研究进展 [J]. 聊城大学学报 (自然科学版), 2023, 36 (2): 68-78.
- [2] 孙晓云, 孙殿兴. 非酒精性脂肪性肝病诊断的研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2017, 37 (3): 140-143, 89.
- [3] 马浩鑫, 朱桂达, 张晓霞, 等. 一种非酒精性脂肪肝病小鼠模型的建立方法 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49 (14): 80-84.
- [4] 陈素雯, 印国良, 宋超远, 等. 薯蓣皂苷元通过 mTOR/SREBP-1c/HSP60/MCAD/SCAD 信号通路缓解高脂饮食诱导的大鼠 NAFLD [J]. 中国中药杂志, doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20230601.705.
- [5] 张继红, 丁永红, 石孟琼, 等. 火麻仁油对代谢综合征大鼠 NF- κ B/MCP-1/CCR2 信号通路及促炎因子表达影响 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34 (4): 117-122.
- [6] Kobylak N, Abenavoli L. The role of liver biopsy to assess non-alcoholic fatty liver disease [J]. Rev Recent Clin Trials, 2014, 9 (3): 159-169.
- [7] 王妍璐, 彭伟康, 梁嘉乐, 等. 高脂饮食诱导沙鼠非酒精性脂肪性肝纤维化模型的建立 [J]. 广东医科大学学报, 2022, 40 (3): 263-266, 271.
- [8] Kim HY. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease metabolomics [J]. Clin Mol Hepatol, 2021, 27 (4): 553-559.
- [9] Masoodi M, Gastaldelli A, Hyötyläinen T, et al. Metabolomics and lipidomics in NAFLD: biomarkers and non-invasive diagnostic tests [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18 (12): 835-856.
- [10] Wang JH, Zheng JP, Ren XH, et al. Integrative analysis of hepatic metabolomic and transcriptomic data reveals potential mechanism of nonalcoholic steatohepatitis in high-fat diet-fed mice [J]. J Diabetes, 2021, 13: 390-401.
- [11] 赵卓慧. 泽泻醇 B 抗非酒精性脂肪性肝炎作用及机制研究 [D]. 北京: 中国科学院大学 (中国科学院上海药物研究所), 2022.
- [12] 程建安, 袁媛, 俞圆, 等. 赶黄草总黄酮对酒精性脂肪肝病小鼠肝保护作用的代谢组学研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (24): 3160-3166.
- [13] Chen XC, Shang L, Deng SV, et al. Peroxisomal oxidation of erucic acid suppresses mitochondrial fatty acid oxidation by stimulating malonyl-CoA formation in the rat liver [J]. J Biol Chem, 2020, 295 (30): 10168-10179.
- [14] Caussy C, Ajmera VH, Puri P, et al. Serum metabolites detect the presence of advanced fibrosis in derivation and validation cohorts of patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Gut, 2019, 68 (10): 1884-1892.

(收稿日期: 2023-04-25; 修回日期: 2023-07-07)

大叶千斤拔不同部位对类风湿关节炎大鼠的治疗作用研究

卢素云¹, 邓友田¹, 潘任桃¹, 白璐², 洪宝怡³, 黄魏⁴, 赵毅², 魏云¹, 刘进辉^{3*}, 吴梦瑶^{2*} (1. 湖南安生美药物研究院有限公司, 长沙 410125; 2. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000; 3. 湖南农业大学, 长沙 410125; 4. 湖南师范大学, 长沙 410081)

摘要: **目的** 探讨大叶千斤拔不同部位对类风湿关节炎大鼠的治疗作用, 为大叶千斤拔药用资源的开发利用提供实验依据。**方法** 选用雄性 SPF 级 SD 大鼠 90 只, 随机分为正常组, 模型组, 大叶千斤拔根低、中、高剂量组, 大叶千斤拔根茎低、中、高剂量组, 以及雷公藤多苷片组, 每组 10 只, 除正常组外其余各组均采用尾根部多点注射牛 II 型胶原和弗氏完全佐剂建立 II 型胶原诱导关节炎 (CIA) 模型, 造模的同时给予药物, 1 次·d⁻¹, 持续给药 35 d。各组大鼠每周称量体重并进行关节炎指数评分与左后足趾容积测量, 给药结束后酶联免疫吸附法检测血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子水平, HE 染色观察大鼠踝关节病变改善情况。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠血清中炎症因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 含量、关节炎指数评分与足趾容积均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎各剂量组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量, 关节炎指数评分, 足趾容积明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 踝关节滑膜及软骨病变明显改善。**结论** 大叶千斤拔根及大叶千斤拔根茎可明显减轻 CIA 大鼠关节炎症状及病理改变, 降低血清中炎症因子水平, 表明大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎对类风湿关节炎大鼠有明显的治疗作用。

关键词: 大叶千斤拔; 类风湿关节炎; 胶原诱导型关节炎; 细胞因子; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2926-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.017

Therapeutic effect of different parts of *Flemingia macrophylla* Merr. on rats with rheumatoid arthritis

LU Su-yun¹, DENG You-tian¹, PAN Ren-tao¹, BAI Lu², HONG Bao-yi³, HUANG Wei⁴, ZHAO Yi², WEI Yun¹, LIU Jin-hui^{3*}, WU Meng-yao^{2*} (1. Hunan Anshengmei Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Changsha 410125; 2. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou Hunan 412000; 3. Hunan Agricultural University, Changsha 410125; 4. Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect of different parts of *Flemingia macrophylla* Merr. on rats with rheumatoid arthritis, and to provide experimental basis for the development and utilization of medicinal resources of *Flemingia macrophylla* Merr.. **Methods** Totally 90 male SPF SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, low-dose, medium-dose and high-dose *Flemingia macrophylla* Merr. roots groups, low-dose, medium-dose and high-dose *Flemingia macrophylla* Merr. rhizomes groups, and a tripterygium wilford II polyglycoside tablet group (10 rats in each group). Except for the normal group, collagen induced arthritis (CIA) model was established by multi-point injection of bovine type II collagen and complete adjuvant. The drug was administered at the same time, once a day for 35 days. The rats in each group were weighed weekly and the arthritis index score and left posterior toe volume were measured. The levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay after the administration. The improvement in the ankle joint lesions was observed by HE staining. **Results** Compared with the normal group, the content of serum inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, and TNF- α), arthritis

基金项目: 湖南省科药联合基金 (No. 2022JJ80054)。

作者简介: 卢素云, 女, 硕士, 主要从事中药药理及毒理研究, email: lusuyun1019@163.com * 通信作者: 吴梦瑶, 女, 硕士, 主要从事中药药理作用研究, email: wmyao1995@qq.com

index score and toe volume of rats in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the content of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the serum, arthritis index score and toe volume of rats in the *Flemingia macrophylla* Merr. roots groups and the *Flemingia macrophylla* Merr. rhizomes groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The lesions of synovium and cartilage of ankle joint were significantly improved. **Conclusion** Extraction of *Flemingia macrophylla* Merr. roots or rhizomes can obviously reduce the CIA rats arthritis symptoms and pathological changes, lower the levels of inflammatory cytokines in the serum, indicating the therapeutic effect of *Flemingia macrophylla* Merr. roots and rhizomes on rat with rheumatoid arthritis. **Key words:** *Flemingia macrophylla* Merr.; rheumatoid arthritis; collagen induced arthritis; cytokine; rat

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性的、以炎性滑膜炎为主的自身免疫性疾病,其特征是关节肿胀、僵硬及滑膜炎症伴软骨和骨破坏,严重者可以导致关节畸形及功能丧失^[1-2]。临床上治疗 RA 的药物主要为非甾体抗炎药、糖皮质激素、生物工程药物等,但长期使用这些药物会出现明显不良反应甚至耐药^[3-5]。中药具有多成分、多靶点作用且整体调节、毒副作用小等优势,是目前治疗 RA 的一种有效途径^[6-7]。白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 是类风湿关节炎发生发展中的重要血清炎症因子, TNF- α 多由滑膜巨噬细胞产生,调控一系列以炎症因子为主的细胞因子以及蛋白酶,通过激活 NF- κ B 信号通路和 JNK 信号通路促进 RA 炎症反应发生; IL-1 β 是由单核细胞和巨噬细胞产生的,通过刺激骨吸收、介导组织破坏的破骨细胞活化因子,增强破骨膝盖活性,促进 RA 局部骨侵蚀, IL-6 主要由上游的 MAPK 和 NF- κ B 通路调控,与 IL-1 β 和 TNF- α 具有协同作用而加剧 RA 关节肿胀^[8-10]。

大叶千斤拔 [*Flemingia macrophylla* (Willd.) Kuntze ex Merr.] 为豆科千斤拔属直立或蔓性灌木,具有祛风除湿、强筋壮骨、活血解毒的功效,为我国西南瑶族、壮族、傣族、哈尼族等多个少数民族常用的药材,临床主要用于类风湿关节炎、风湿骨痛、腰肌劳损、偏瘫、痲肿、带下等症的治疗^[11-13]。目前对于大叶千斤拔的研究和药用部位主要为根,对大叶千斤拔茎、叶等药用资源浪费较为严重,本研究基于中药材大叶千斤拔不同药用部位,探讨大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎混合物对 II 型胶原诱导关节炎 (CIA) 大鼠的治疗作用,为大叶千斤拔药用资源的开发利用提供实验依据。

1 材料

1.1 试药

大叶千斤拔,临床用量为 10~30 g 生药 \cdot d⁻¹,大叶千斤拔根水提物 (FmT, 批号: ZS20210901)、

大叶千斤拔根茎混合水提物 [FmTS, 批号: Y005-2106008/2105007, 株洲千金药业股份有限公司, 制备过程为: 经过两次水提 (第一次加 3 倍量水, 煮提 2.5 h, 第二次加 2.5 倍量水, 煮提 2 h), 合并煮提液, 滤过, 浓缩, 干燥后得到所需受试物]。雷公藤多苷片 [临床用量为 1~1.5 mg/(kg \cdot d), 湖南千金协力药业有限公司, 批号: 20211002]。牛 II 型胶原 (Chondrex 公司, 批号: 220170), 弗氏完全佐剂 (Sigma 公司, 批号: SLCC7169), 异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 批号: 21101001), IL-1 β 检测试剂盒 (批号: 202203)、IL-6 检测试剂盒 (批号: 202205)、TNF- α 检测试剂盒 (批号: 202205) (江苏晶美生物科技有限公司)。

1.2 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体重 180~220 g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0004, 使用许可证号: SYXK (湘) 2018-0004, 质量合格证号: No.430727221100338765]。动物饲养在 SPF 级屏障环境, 温度为 20~26 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 40%~70%, 换气次数 \geq 15 次 \cdot h⁻¹, 每日 12 h/12 h 交替照明, 动物照度为 15~20 lx。实验前, 动物适应性饲养 1 周, 所有动物实验均经湖南安生美药物研究院有限公司实验动物福利伦理委员会批准 (编号: IACUC-2021039)。

1.3 仪器

ME1002E 型电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司], AE11003 型电子天平 (长沙高新开发区湘仪天平仪器设备有限公司), YSL-7C 型足趾容积测量仪 (济南益延科技发展有限公司), DNM-9606 型酶标分析仪 (北京普朗新技术有限公司), ECLIPSE Ci-L 型尼康生物正置显微镜 (日本 NIKON 公司), Image View DS-1600 型成像系统 (杭州图谱光电科技有限公司), RM2235 型手动轮转切片机 (德国徕卡公司), HP300 型组织脱水机 [达科为 (深圳) 医疗设备有限公司], JB-L6 型石蜡包埋机 (武汉俊杰电子有限公司), DP360 型染色机 + CS500 型

封片机 [达科为 (深圳) 医疗设备有限公司]。

2 方法与结果

2.1 动物分组、造模及给药

在冰浴条件下, 向含弗氏完全佐剂的离心管中缓慢滴加等体积的牛 II 型胶原液 ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 用电动匀浆器匀浆制备成含胶原 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乳剂。SD 大鼠 90 只, 随机分为正常组, 模型组, 大叶千斤拔根低、中、高剂量组 (2.7 、 5.4 、 $10.8 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别相当于人临床等效剂量的 1、2、4 倍), 大叶千斤拔根茎低、中、高剂量组 (2.7 、 5.4 、 $10.8 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于人临床等效剂量的 1、2、4 倍), 雷公藤多苷片组 ($18.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于人临床等效剂量的 2 倍), 每组 10 只。除正常组外, 其余各组在距离大鼠尾根部多点注射乳剂 $200 \mu\text{L}$ (含牛 II 型胶原 $200 \mu\text{g}$), 注射后按压针孔防止乳液流出, 7 d 后同样方法在距离尾根部多点注射乳剂 $100 \mu\text{L}$ (含胶原 $100 \mu\text{g}$)。各给药组动物在造模的同时按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予相应剂量的药

物, 正常组和模型组灌胃等体积 $0.5\% \text{ CMC-Na}$, $1 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$, 持续给药至初次免疫后第 35 日。

2.2 一般观察

造模后及给药后密切观察并记录各组动物外观体征、行为活动、分泌物、排泄物、饮食情况等, 每周对动物体重进行称量。初次免疫后第 10 日, 造模动物相继出现足趾皮肤发红、发热, 轻度肿胀; 致炎第 14 日, 足背及踝关节明显肿胀, 部分动物出现关节僵硬, 活动减少, 体重增长减慢, 毛发无光泽, 详见图 1。致炎第 14 日起, 模型组动物体重明显或显著下降, 各给药组动物体重较模型组明显或显著升高, 结果见表 1。



图 1 造模后动物踝关节肿胀情况

Fig 1 Ankle joint swelling of animals after the modeling

表 1 大叶千斤拔不同部位对大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effect of different parts of *Flemingia macrophylla* Merr. on the body weight of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	大鼠体重/g					
		用药前	第 7 日	第 14 日	第 21 日	第 28 日	第 35 日
正常组	—	201.4±8.3	263.0±14.8	316.3±11.0	348.1±11.5	387.9±13.9	413.9±18.3
模型组	—	201.0±8.4	264.0±9.8	296.4±19.0*	310.2±20.4**	334.1±20.7**	358.5±22.2**
FmT 低剂量组	$2.7 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$	200.9±8.1	265.6±11.5	290.3±19.0	321.6±29.3	349.7±35.6	380.9±28.8
FmT 中剂量组	$5.4 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$	200.7±8.1	254.6±17.1	300.1±24.0	324.1±25.1	354.9±31.7	383.8±26.0 ^Δ
FmT 高剂量组	$10.8 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$	200.5±8.0	255.9±14.0	304.0±19.0	336.5±31.9 ^Δ	370.0±39.0 ^{ΔΔ}	397.1±33.3 ^{ΔΔ}
FmTS 低剂量组	$2.7 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$	200.4±6.6	258.0±12.7	307.7±14.9	337.8±17.6 ^{ΔΔ}	382.9±22.2 ^{ΔΔ}	412.9±20.0 ^{ΔΔ}
FmTS 中剂量组	$5.4 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$	200.6±6.4	258.9±8.7	301.8±21.2	325.7±32.9	364.9±31.6 ^Δ	389.3±30.9 ^Δ
FmTS 高剂量组	$10.8 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$	200.7±6.4	256.4±5.4	290.9±23.3	328.6±29.9	355.5±37.1	385.7±35.3 ^Δ
雷公藤多苷组	$18.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	200.9±6.5	254.5±5.5	303.0±14.6	333.8±26.3 ^Δ	365.3±30.8 ^Δ	393.9±31.2 ^{ΔΔ}

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$.

2.3 关节炎指数评分^[14]

各组大鼠于造模前及初次免疫后第 7、14、21、28、35 日进行关节炎指数评分, 评价标准采用 0~4 分制, 最高评分为 4 分, 以双后足评分之和表示, 评分标准见表 2。结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠第 14、21、28、35 日关节炎指数评分显著升高; 与模型组比较, 大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎各剂量组关节炎指数评分均有不同程度降低, 结果见表 3。

表 2 关节炎指数评分标准

Tab 2 Arthritis index scoring standards

标准	评分
正常	0
踝关节或附骨单一部位轻微红斑、肿胀	1
踝关节到附骨轻度红斑、肿胀	2
踝关节到跖骨中度红斑、肿胀	3
踝关节到跖骨严重红斑、肿胀, 甚至变形	4

2.4 足趾容积

各组大鼠于造模前及初次免疫后第 7、14、21、28、35 日测量左后足趾容积。结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠第 14、21、28、35 日足趾容积均显著升高; 与模型组比较, 大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎各剂量组第 28、35 日大鼠足趾容积均有不同程度减小, 结果见表 4。

2.5 血清炎症因子含量检测

末次给药后次日, 异氟烷吸入麻醉, 腹主动脉采血, 室温存放 1~2 h 后, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血清, 采用 ELISA 试剂盒检测血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量, 用全自动酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 绘制标准曲线并计算各项指标的含量。结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著升

表 3 大叶千斤拔不同部位对大鼠关节炎指数评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Effect of different parts of *Flemingia macrophylla* Merr. on the arthritis index score in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	关节炎指数评分 / 分					
		用药前	第 7 日	第 14 日	第 21 日	第 28 日	第 35 日
正常组	—	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
模型组	—	0.0±0.0	0.0±0.0	3.5±2.3**	5.0±2.1**	4.5±2.1**	4.0±2.2**
FmT 低剂量组	2.7 g 生药 · kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	2.4±2.3	3.1±2.4	3.1±2.5	2.9±2.2
FmT 中剂量组	5.4 g 生药 · kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	2.2±2.0	3.1±2.3	2.4±2.1 ^Δ	2.2±2.1
FmT 高剂量组	10.8 g 生药 · kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	1.6±2.0 ^Δ	2.7±2.6 ^Δ	2.1±2.7 ^Δ	2.1±2.6 ^Δ
FmTS 低剂量组	2.7 g 生药 · kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	1.5±1.9 ^Δ	3.0±1.8	2.1±1.9 ^Δ	1.6±1.5 ^Δ
FmTS 中剂量组	5.4 g 生药 · kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	1.8±2.2	3.0±2.3	2.4±2.6 ^Δ	1.7±2.5 ^Δ
FmTS 高剂量组	10.8 g 生药 · kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	2.0±2.5	3.4±2.4	2.7±2.4	1.9±2.3 ^Δ
雷公藤多苷组	18.9 mg · kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	1.5±1.7 ^Δ	2.9±1.9 ^Δ	2.5±1.8	1.6±1.7 ^Δ

注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，^Δ $P < 0.05$ 。

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

表 4 大叶千斤拔不同部位对大鼠足趾容积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 4 Effect of different parts of *Flemingia macrophylla* Merr. on the volume of rats' toes ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	大鼠足趾容积 / mL					
		用药前	第 7 日	第 14 日	第 21 日	第 28 日	第 35 日
正常组	—	1.997±0.086	1.941±0.054	1.947±0.076	1.965±0.056	2.016±0.077	2.064±0.075
模型组	—	1.982±0.090	1.967±0.053	2.451±0.357**	2.751±0.389**	2.700±0.421**	2.666±0.377**
FmT 低剂量组	2.7 g 生药 · kg ⁻¹	1.950±0.103	2.013±0.053	2.252±0.368	2.384±0.452 ^Δ	2.489±0.570	2.475±0.589
FmT 中剂量组	5.4 g 生药 · kg ⁻¹	1.956±0.078	1.936±0.052	2.242±0.288	2.465±0.403	2.383±0.395	2.399±0.316
FmT 高剂量组	10.8 g 生药 · kg ⁻¹	1.937±0.095	1.980±0.042	2.157±0.189	2.369±0.306 ^Δ	2.336±0.396 ^Δ	2.302±0.256 ^Δ
FmTS 低剂量组	2.7 g 生药 · kg ⁻¹	1.944±0.052	1.953±0.053	2.161±0.239	2.319±0.171 ^Δ	2.286±0.207 ^Δ	2.227±0.172 ^{ΔΔ}
FmTS 中剂量组	5.4 g 生药 · kg ⁻¹	2.005±0.070	1.953±0.050	2.252±0.319	2.511±0.469	2.433±0.437	2.356±0.367 ^Δ
FmTS 高剂量组	10.8 g 生药 · kg ⁻¹	1.985±0.060	1.966±0.055	2.326±0.414	2.531±0.447	2.450±0.397	2.343±0.357 ^Δ
雷公藤多苷组	18.9 mg · kg ⁻¹	1.963±0.061	1.950±0.060	2.263±0.354	2.417±0.238 ^Δ	2.340±0.163 ^Δ	2.259±0.174 ^{ΔΔ}

注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，^Δ $P < 0.05$ ，^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$.

高；与模型组比较，大叶千斤拔根中、高剂量组 叶千斤拔根茎低剂量组能明显降低大鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量，大 1β、IL-6 含量，结果见表 5。

表 5 大叶千斤拔不同部位对大鼠血清炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 5 Effect of different parts of *Flemingia macrophylla* Merr. on serum inflammatory factors in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	IL-1β/ (pg · mL ⁻¹)	IL-6/ (pg · mL ⁻¹)	TNF-α/ (pg · mL ⁻¹)
正常组	—	260.5±88.5	139.1±82.2	372.6±223.2
模型组	—	678.2±311.8**	397.3±134.9**	740.4±220.0**
FmT 低剂量组	2.7 g 生药 · kg ⁻¹	524.9±212.4	295.3±128.2	530.7±212.2 ^Δ
FmT 中剂量组	5.4 g 生药 · kg ⁻¹	433.0±147.4 ^{ΔΔ}	270.4±127.9 ^Δ	456.2±262.2 ^{ΔΔ}
FmT 高剂量组	10.8 g 生药 · kg ⁻¹	502.3±143.7 ^Δ	234.1±126.3 ^{ΔΔ}	514.6±174.4 ^Δ
FmTS 低剂量组	2.7 g 生药 · kg ⁻¹	480.0±129.1 ^Δ	290.3±171.0 ^Δ	603.0±261.5
FmTS 中剂量组	5.4 g 生药 · kg ⁻¹	527.5±208.2	298.8±124.3	580.5±234.8
FmTS 高剂量组	10.8 g 生药 · kg ⁻¹	605.3±187.5	304.6±71.7	710.7±131.6
雷公藤多苷组	18.9 mg · kg ⁻¹	492.1±132.7 ^Δ	283.7±138.5 ^Δ	673.7±140.1

注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，^Δ $P < 0.05$ ，^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$.

2.6 踝关节组织病理学检查

采血后处死大鼠，取左后足踝关节部位于 10% 甲醛溶液中进行固定，并用 10% 乙二胺四乙酸二钠脱钙液进行脱钙处理，脱钙完成后，进行石蜡包埋，常规切片，HE 染色，光学显微镜下

观察关节腔中滑膜组织、软骨组织病变情况。结果显示，正常组大鼠踝关节结构完整，未见系膜增生，系膜下未见炎症细胞浸润，血管增生，关节软骨表面光滑，关节软骨及软骨下骨质无破坏，关节间隙正常。模型组动物踝关节系膜增生，系

膜下炎症细胞浸润,纤维结缔组织和小血管增生,代替原有脂肪组织,软骨结构破坏,纤维结缔组织增生;各药物病变类型与模型组相似,但病变程度明显降低,镜下观察动物踝关节滑膜增生及炎症细胞浸润减少,纤维结缔组织和小血管增生减少,软骨结构破坏减轻。病变程度按大叶千斤拔根低剂量组、大叶千斤拔根中剂量组、大叶千斤拔根茎中剂量组、大叶千斤拔根茎高剂量组、大叶千斤拔根高剂量组、雷公藤多苷组和大叶千斤拔根茎低剂量组依次降低。病理结果表明大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎对类风湿关节炎模型大鼠均有一定的治疗效果,其中大叶千斤拔根茎低剂量组治疗效果最佳,病理图片见图 2~3。

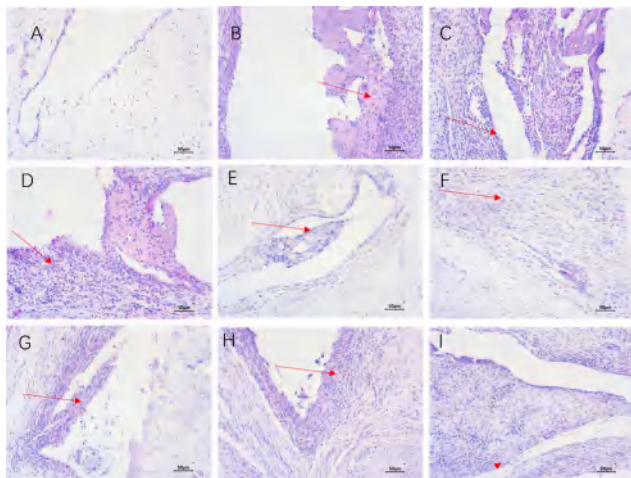


图 2 类风湿关节炎模型大鼠关节滑膜组织病理学图片 (HE, ×200)

Fig 2 Histopathological image of synovium of rheumatoid arthritis model rats (HE, ×200)

A. 正常组 (normal group); B. 模型组 (model group); C. FmT 低剂量组 (FmT low-dose group); D. FmT 中剂量组 (FmT medium-dose group); E. FmT 高剂量组 (FmT high-dose group); F. FmTS 低剂量组 (FmTS low-dose group); G. FmTS 中剂量组 (FmTS medium-dose group); H. FmTS 高剂量组 (FmTS high-dose group); I. 雷公藤多苷片组 (tripterygium wilfordii polyglycoside tablet group)

2.7 统计分析

采用 SPSS 23.0 软件进行数据统计,实验数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差进行分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 讨论

类风湿关节炎是一种以炎症和关节病变为特征的自身免疫性疾病,表现为关节的疼痛、肿胀、僵硬和滑膜炎(滑膜炎),严重时可导致关节畸形和功能丧失^[15-16]。该病的病理特点为滑膜增生、血管翳形成以及骨和软骨破坏^[17]。CIA 与人类 RA 有许多相似的病理和免疫学特征,CIA 模型的两个特点:即突破耐受性及产生针对自身和胶

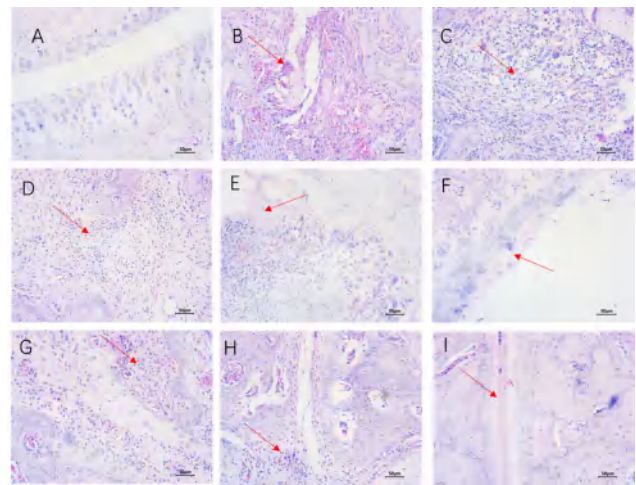


图 3 类风湿关节炎模型大鼠关节软骨组织病理学图片 (HE, ×200)

Fig 3 Histopathological image of articular cartilage of rheumatoid arthritis model rats (HE, ×200)

A. 正常组 (normal group); B. 模型组 (model group); C. FmT 低剂量组 (FmT low-dose group); D. FmT 中剂量组 (FmT medium-dose group); E. FmT 高剂量组 (FmT high-dose group); F. FmTS 低剂量组 (FmTS low-dose group); G. FmTS 中剂量组 (FmTS medium-dose group); H. FmTS 高剂量组 (FmTS high-dose group); I. 雷公藤多苷片组 (tripterygium wilfordii polyglycoside tablet group)

原蛋白的自身抗体,使 CIA 成为 RA 研究的金标准体内模型^[18-20]。RA 的临床治疗主要是化学药物(如非甾体抗炎药、抗风湿药、糖皮质激素等)和生物制剂,然而,生物制剂价格昂贵,而化学药物往往有不良反应,如心血管和胃肠道出血风险、肝肾毒性、生长抑制、感染和肿瘤风险等^[21]。中医学将 RA 归属于“痹症”“鹤膝风”等范畴,在治疗上以“治未病”以及“辨证论治”为诊疗特点,中药在临床使用上具有缓解疼痛、减轻药物不良反应、提高生活质量等方面的作用^[22]。大叶千斤拔始载于清朝吴其濬所编《植物名实图考》,是我国多民族常用药材,具有祛风除湿、强筋健骨、抗炎镇痛等作用^[23-24],为妇科千金片、正骨水等很多大品种中成药的主要原料。

本研究通过建立 CIA 模型,给予不同剂量的大叶千斤拔根水提物或大叶千斤拔根茎水提物,观察不同部位的大叶千斤拔对类风湿关节炎的治疗作用。实验结果表明,致炎第 10 日,模型组大鼠相继出现关节炎症状,致炎第 14 日,足背及踝关节部位肿胀明显,部分动物出现关节变形,活动及饮食减少,体重下降,关节炎指数显著升高。药物干预后,大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎各剂量组大鼠体重增长较快,关节炎评分及关节肿胀程度明显降低。镜下观察动物各组织病变明显减轻,大叶千斤拔根随着剂量增加症状改善越明显,大叶千斤拔根茎低剂量的治疗效果

最佳, 进一步说明大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎对类风湿关节炎具有较好的防治作用。

已有研究表明 TNF- α 和 IL-1 β 参与 RA 的发生发展全过程, 是 RA 发病机制中重要的促炎细胞因子^[25]。高浓度的 TNF- α 引起临床症状, 对关节组织造成一定的破坏, 同时可促进滑膜细胞中 IL-6 表达上升, 诱导破骨细胞的生成, 同时也能诱导其他炎症介质的生成, 进一步加重对骨组织的破坏^[26-28]。实验大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎能明显降低大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量, 从而抑制 RA 的发展。

综上所述, 大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎能降低类风湿关节炎大鼠血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及水平关节炎指数分值, 减轻足趾肿胀程度, 各给药组能不同程度地改善大鼠的踝关节病变程度, 说明大叶千斤拔根、大叶千斤拔根茎对类风湿模型大鼠具有明显的治疗作用, 作用机制可能与 T 细胞及相关细胞因子的调节相关, 具体作用机制有待进一步研究。本研究主要从大叶千斤拔的根及根茎混合物出发, 探讨其对类风湿关节炎模型大鼠的治疗作用, 但对于大叶千斤拔茎的药理作用未进行相应的研究, 后续可对大叶千斤拔茎的药理作用及机制进行更深入的探讨, 以期能对大叶千斤拔药材进行更好的开发利用。

参考文献

- 梁霄, 李娅兰, 张筠昊, 等. 用于治疗类风湿关节炎的微针经皮给药系统研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (1): 13-21.
- 杨丽, 刘荣华, 黄四碧, 等. 类风湿关节炎的发病机制及治疗药物研究进展 [J]. 中国药房, 2021, 32 (17): 2154-2159.
- 刘静, 燕雨君. 雷公藤内酯醇对类风湿关节炎模型大鼠血管新生和 PTEN/PI3K/AKT 通路的影响 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2020, 46 (6): 1227-1233, 1351.
- 曹庆勇, 王培源, 王巧云, 等. 通痹胶囊对类风湿关节炎模型兔关节病变的影响 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (5): 1034-1041.
- Heruth DP, Gibson M, Grigoryev DN, et al. RNA-seq analysis of synovial fibroblasts brings new insights into rheumatoid arthritis [J]. Cell Bioscience, 2012, 2 (1): 43.
- 常岑, 张润润, 时一鸣, 等. 中医疗法治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (2): 329-335.
- 叶梅芳, 刘媛媛, 丘琴, 等. 民族药抗类风湿关节炎作用机制的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (6): 55-60.
- Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (20): 10922.
- Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22 (4): 189-195.
- 罗帅, 李小枫, 黄成, 等. 炎症因子在类风湿关节炎中的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38 (3): 330-338.
- 王明杰, 王悦良, 张运佳, 等. 瑶药大叶千斤拔油针疗法对类风湿关节炎的疗效分析及细胞因子的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30 (9): 2172-2175.
- 乔雪, 卓桑, 杨子明, 等. 大叶千斤拔属植物化学成分及药理作用的国内外研究进展 [J]. 环球中医药, 2015, 8 (12): 1546-1550.
- 杜沛霖, 周雨晴, 黄贵华, 等. 大叶千斤拔属植物的化学成分·药理作用·临床应用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45 (6): 109-111.
- Calabrese G, Ardizzone A, Campolo M, et al. Beneficial effect of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on inflammation and osteoarthritis in in vitro models [J]. Bio-molecules, 2021, 25, 11 (3): 352.
- Radu AF, Bungau SG. Management of rheumatoid arthritis. an overview [J]. Cells, 2021, 23, 10 (11): 2857.
- 熊丽, 杜肖, 陈宝忠, 等. 脊痛宁胶囊对风寒湿痹型类风湿关节炎大鼠的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (1): 140-145.
- 张冬梅, 李宝丽. 痹祺胶囊治疗胶原诱导型关节炎大鼠的作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (4): 1059-1062.
- Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, et al. Animal models of rheumatoid arthritis [J]. Eur J Immunol, 2009, 39 (8): 2040-2044.
- Bessis N, Decker P, Assier E, et al. Arthritis models. usefulness and interpretation [J]. Semin Immunopathol, 2017, 39 (4): 469-486.
- 黄淑敏, 钟森杰, 廖晓倩, 等. 基于中西临床病症特点的类风湿关节炎动物模型分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (19): 5152-5158.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, et al. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2007, 370 (9602): 1861-1874.
- 王洪图. 内经选读 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 116.
- 严东, 夏伯侯, 李春, 等. 大叶千斤拔属药用植物的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47 (24): 4456-4471.
- 彭开锋, 张鹏, 阳苗, 等. 大叶千斤拔药理作用研究进展 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16 (S1): 251.
- Vielhauer V, Mayadas TN. Functions of TNF and its receptors in renal disease. distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation [J]. Semin Nephrol, 2007, 27 (3): 286-308.
- Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, et al. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity [J]. Curr Dir Autoimmun, 2010, 11: 1-26.
- Medoff BD, Seung E, Hong S, et al. CD11b⁺ myeloid cells are the key mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation [J]. J Immunol, 2009, 182 (1): 623-635.
- 赵美, 范福玲, 杨丹丹. 化痰通痹方对活动期类风湿关节炎疗效及血清内 TNF- α 、IL-1 β 、CRP 变化的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (3): 104-107.

(收稿日期: 2023-03-05; 修回日期: 2023-06-08)

葛根芩连片配伍后葛根素在大鼠体内药动学研究

胡江玲¹, 周睿¹, 吴睿², 陶善敏¹, 陈冠军^{3, 4}, 冯蕊^{1, 4}, 汪生^{3, 4*} (1. 安徽医科大学药学院, 合肥 230032; 2. 安徽医科大学第一临床学院, 合肥 230032; 3. 安徽医科大学科研实验中心, 合肥 230032; 4. 炎症免疫性疾病安徽省实验室, 合肥 230032)

摘要: **目的** 建立测定血浆中葛根素浓度的 UPLC-MS/MS 方法, 探究葛根芩连片复方配伍对葛根素在大鼠体内的药动学行为的影响。**方法** 采用甲醇沉淀蛋白法处理血浆样品, 以 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 进行分离; 电喷雾负离子化平行反应离子监测模式检测。**结果** 血浆中葛根素质量浓度在 2.500 ~ 300.0 ng·mL⁻¹ 与色谱响应线性关系良好, 最低定量限为 2.500 ng·mL⁻¹, 经方法学验证符合生物样本分析要求。大鼠灌胃葛根芩连片、葛根单味药和葛根素对照品后, C_{max} 分别为 (208.2±51.29)、(81.04±11.71)、(88.40±10.79) μg·L⁻¹, t_{max} 分别为 (0.5±0.0)、(0.6±0.4)、(0.2±0.0) h, t_{1/2} 分别为 (2.1±0.1)、(1.7±0.1)、(2.0±0.3) h, AUC_{0~8} 分别为 (186.3±18.98)、(140.0±21.45)、(124.2±44.04) μg·h·L⁻¹, AUC_{0~∞} 分别为 (199.0±16.85)、(144.3±22.42)、(133.1±44.90) μg·h·L⁻¹。**结论** 成功建立了血浆中葛根素的 UPLC-MS/MS 测定方法, 葛根芩连片复方配伍能够改善制剂中主成分葛根素在体内的代谢行为, 具有协同增效的作用。

关键词: 葛根素; 葛根芩连片; 葛根; 比较药动学

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2932-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.018

Pharmacokinetics of puerarin in Gegen Qinlian tablets in compatibility with other drugs

HU Jiang-ling¹, ZHOU Rui¹, WU Rui², TAO Shan-min¹, CHEN Guan-jun^{3, 4}, FENG Rui^{1, 4}, WANG Sheng^{3, 4*} (1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; 2. The First Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032; 3. Center for Scientific Research of Anhui Medical University, Hefei 230032; 4. Inflammation and Immune Mediated Disease Laboratory of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract: Objective To establish an LC-MS method to determine the concentration of puerarin in the plasma, and determine the effect of compound compatibility of puerarin in Gegen Qinlian tablets on the pharmacokinetics in rats. **Methods** Plasma samples were separated by Waters Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) after protein precipitation by methanol. **Results** Puerarin was determined by negative ion electrospray ionization in parallel reaction monitoring mode. Puerarin in the plasma showed a good linearity at 2.500 ~ 300.0 ng·mL⁻¹ with an lower limit of quantification of 2.500 ng·mL⁻¹. The method validation met the criteria for bio-sample analysis. The main pharmacokinetic parameters of single-dose Gegen Qinlian tablets, Puerariae Lobatae Radix and puerarin in the rats were as follows: C_{max} (208.2±51.29), (81.04±11.71), and (88.40±10.79) μg·L⁻¹; t_{max} (0.5±0.0), (0.6±0.4), and (0.2±0.0) h; t_{1/2} (2.1±0.1), (1.7±0.1), and (2.0±0.3) h; AUC_{0~8} (186.3±18.98), (140.0±21.45), and (124.2±44.04) μg·h·L⁻¹; AUC_{0~∞} (199.0±16.85), (144.3±22.42), and (133.1±44.90) μg·h·L⁻¹. **Conclusion** The UPLC-MS/MS method for the determination of puerarin in the plasma is established successfully. Compound compatibility of Gegen Qinlian tablets help improve the metabolic behavior of puerarin in vivo, with an obvious synergistic effect.

Key words: puerarin; Gegen Qinlian tablet; Puerariae Lobatae Radix; comparative pharmacokinetics

基金项目: 2020 年安徽医科大学创新创业训练计划 (No.184); 安徽高校自然科学研究重点项目 (No.KJ2021A0268)。

作者简介: 胡江玲, 女, 主要从事临床药学方面的研究, email: hujangling@163.com *通信作者: 汪生, 男, 硕士, 实验师, 主要从事质谱方面的研究, email: wangsheng_cpu@163.com

葛根是一种药用价值极高的中药材,其药理活性成分主要是异黄酮类化合物,而葛根素是葛根药材中含量最高的异黄酮化合物。现代药理学研究表明,葛根素具有保护心脑血管、神经细胞的作用,还可用于癌症、帕金森病、阿尔茨海默病和糖尿病等疾病的治疗,对人类健康有重要意义^[1-4]。

葛根芩连片是由葛根、黄芩、黄连、炙甘草 4 味药材组成的复方制剂,最早出自《伤寒论》的葛根芩连汤^[5-6],且收录在 2020 年版《中国药典》。葛根芩连片具有解肌清热、止泻止痢作用^[7],是当前中药治疗急性腹泻的经典方剂。药物的配伍可以影响药物的作用及药物的体内过程,故对药动学参数的影响十分显著^[8]。关于葛根素配伍对药动学的影响,袁丽君等^[9]采用高效液相色谱(HPLC)法,进行黄芪-葛根和单用葛根素在糖尿病大鼠体内的药动学比较,结果表明配伍后糖尿病大鼠对葛根素的吸收显著加快,有利于发挥其治疗作用。赵洁等^[10]采用 HPLC 法探究了葛根素与葛根提取物的药动学差异,发现两者之间的药动学行为存在较大差异,且葛根提取物中的某些成分可加快体内葛根素的清除,从而缩短其在体内的平均滞留时间。目前关于葛根芩连片复方配伍中葛根素药动学行为的研究报道少见,故本研究对葛根芩连片配伍后葛根素在大鼠体内比较药动学进行研究。

液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)以液相色谱作为分离系统,质谱为检测系统,灵敏度高、选择性好,可以简单有效地分析出血浆药物浓度^[11]。本研究针对葛根芩连片、葛根和葛根素开展大鼠体内的比较药动学研究,建立 UPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中葛根素浓度,方法简单、灵敏。

1 材料

1.1 试药

葛根芩连片(广西泰诺制药有限公司,规格:0.3 g,批号:210401);葛根饮片(安徽医科大学第一附属医院);葛根素(杨凌慈缘生物技术有限公司,纯度:98%,批号:202104);内标物马鞭草苷(成都埃法生物科技有限公司,批号:AF20050914,纯度:99.96%);甲醇、乙腈为质谱纯(赛默飞世尔科技);羧甲基纤维素钠(CMC-Na);自制去离子水;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Thermo Q-Exact plus 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪、Dionex Ultimate 3000 超高效液

相色谱仪(美国赛默飞公司);Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 美国沃特世公司);BS 210S 型电子分析天平(十万分之一,德国赛多利斯公司);5424R 台式高速冷冻离心机(美国艾本德公司);WX-80A 超声波清洗机(海门其林贝尔公司);XW-80C 型涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);Milli-Q Integral 5 超纯水系统(美国密理博公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 180~200 g,安徽医科大学动物实验中心提供。动物饲养于安徽医科大学动物实验中心,饲养温度为(23±3)℃,湿度为 40%~70%,12 h 照明。实验前动物禁食过夜 12 h,自由饮水。所有动物实验符合实验室动物饲养和使用指导原则,并经安徽医科大学动物实验伦理委员会通过(批文编号为 LLSC20211192)。

2 方法和结果

2.1 色谱和质谱条件

采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱,流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈,线性梯度(A:B)洗脱[0 min(80:20)→1.5 min(80:20)→2.0 min(40:60)→3.1 min(40:60)→3.4 min(80:20)→4.0 min(80:20)];流速:0.25 mL·min⁻¹,柱温:35℃。电喷雾负离子化,喷雾电压:4.50 kV,毛细管温度:350℃,雾化氮气压力:350 kPa,辅助气压力:70 kPa,离子扫尾气压力:3.5 kPa。平行反应监测(PRM)模式,葛根素母离子[M-H]⁻=415.10346,定量离子选择 295.0606;内标马鞭草苷母离子[M+HCOO]⁻=433.1352,定量离子选择 225.0763。碰撞能量 NCE 为 15/25/35 eV。

2.2 溶液配制

2.2.1 葛根素工作液 精密称取葛根素对照品约 10 mg,置 100 mL 量瓶中,以甲醇为溶剂溶解,定容至刻度,摇匀,作为储备液。再分别定量稀释成 5.000、15.00、30.00、75.00、150.0、300.0、600.0 ng·mL⁻¹ 标准曲线工作液。

2.2.2 内标工作液 精密称取 5.00 mg 马鞭草苷对照品,置 20 mL 量瓶中,以甲醇为溶剂溶解,定容至刻度,摇匀,作为储备液,再定量稀释配制成 150.0 ng·mL⁻¹ 的内标工作液。

2.2.3 葛根芩连片供试品溶液 葛根芩连片研磨成细粉,精密称取粉末约 0.2 g,加入 70% 甲醇 20 mL,超声 30 min 后 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤。

2.2.4 葛根供试品溶液 葛根饮片研磨成细粉,精密称取粉末 0.1 g,加入 50 mL 30% 乙醇,加热回流 30 min,放冷,补足减失的重量,12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤。

2.3 血浆样品处理方法

精密吸取 EDTA-2Na 稳定化血浆样品 60 μL ,置 1.5 mL 聚塑离心管中,精密加入乙腈(在标准曲线与质量控制样品制备时加入葛根素工作液)30 μL ,精密加入内标工作液 30 μL ,涡旋混匀 30 s,加入甲醇 150 μL ,涡旋混匀 2 min 后,12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液氮气流下吹干,加入 30% 甲醇 80 μL 溶解,12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液 50 μL 至带支架的玻璃内衬管中供 LC-MS/MS 分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 分别测定大鼠的空白血浆、加标准溶液和内标溶液的空白血浆样本、内标处理后的葛根芩连片组(0.5 h)血浆样本。葛根素和内标马鞭草苷的保留时间分别约为 2.91 min 和 2.63 min,且内源性物质无干扰。典型色谱图见图 1。

2.4.2 标准曲线及定量下限 精密量取空白血浆 60 μL ,分别精密加入各浓度葛根素对照品工作液 30 μL ,配制成葛根素质量浓度分别为 2.5、7.5、15.0、37.5、75.0、150.0、300.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列血浆标准样本,自加入内标溶液开始,按“2.3”项下方法操作,记录色谱图。以葛根素峰面积 A_s 和内标峰面积 A_r 的比值 $R(A_s/A_r)$ 对葛根素质量浓度 $C(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ 进行权重回归($1/C^2$)。结果表明,葛根素血浆浓度在 2.500 ~ 300.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与色谱响应线性关系良好,回归方程为: $R = 0.0681C + 0.1414 (r = 0.9935)$,最低定量限为 2.500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 精密度和准确度 在 7.500 和 150.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 两个浓度水平下分别考察了血浆样本的基质效应、绝对回收率;在 2.500、7.500、75.00 和 150.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4 个浓度水平下,分别考察了精密度和准确度,结果见表 1 及表 2。表明建立的方法无明显基质效应,绝对回收率稳定,方法的精密度和准确度良好,符合生物样品定量分析方法验证指导原则的要求^[12]。

2.4.4 稳定性 考察血浆质控样品于 -20°C 保存 10 d、经 3 次冻融和室温放置 2 h,处理后的血浆样品进样器(4°C)放置 8 h 的稳定性,结果见表 3。表明在以上 4 种条件下,葛根素的浓度均无明显改变,稳定性良好。

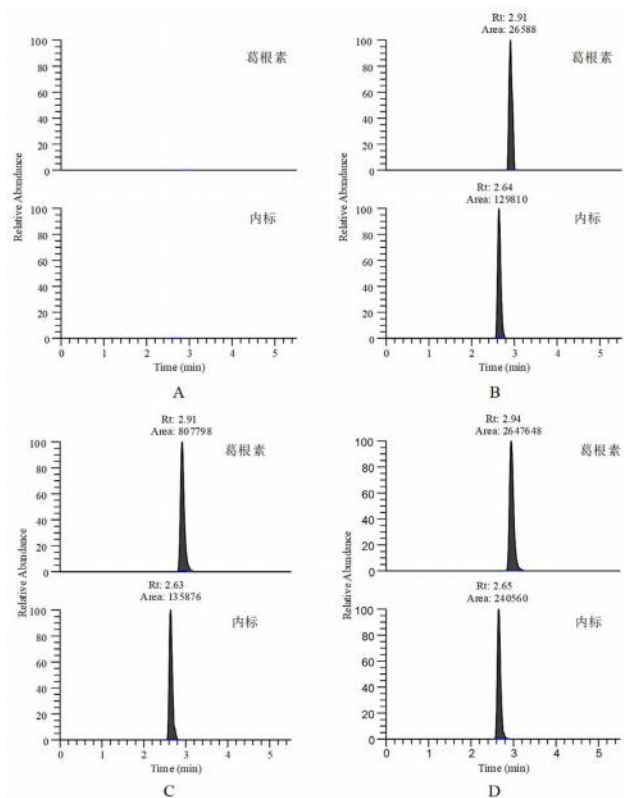


图 1 血浆中葛根素和内标的 UPLC-MS/MS 分析典型图

Fig 1 UPLC-MS/MS chromatograms of puerarin and IS in plasma A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆+葛根素 ($2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) + 内标 ($75.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) (blank plasma sample spiked with puerarin at $2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and IS at $75.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); C. 空白血浆+葛根素 ($150.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) + 内标 ($75.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) (blank plasma sample spiked with puerarin at $150.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and IS at $75.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$); D. 大鼠灌胃葛根芩连片后 0.5 h (puerarin in rat plasma at 0.5 h after a single dose)

2.5 葛根芩连片和葛根饮片中葛根素的含量测定

参照“2.2”项下方法,分别配制葛根芩连片供试品溶液 ($10.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、葛根供试品溶液 ($2.000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和葛根素对照品溶液 ($80.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),参照 2020 年版《中国药典》第四部中测定葛根芩连片和葛根中葛根素的含量方法,分别对两种供试品中葛根素的含量进行测定。结果采用峰面积进行外标法计算,葛根芩连片和葛根饮片中葛根素的含量分别为 4.09% 和 4.80%,均高于药典的最低限度,表明药材合格,该含量也为下一步药动学实验的给药剂量提供依据。

2.6 大鼠药动学应用

SPF 级雄性 SD 大鼠 18 只,随机分为 3 组,灌胃前 12 h 禁食禁水。第一组灌胃葛根芩连片 $102.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按人用临床等效日剂量进行换算,相当于葛根素 $4.21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,药片研碎后加 0.9% CMC-Na 溶液溶解配制),第二组葛根饮片 $87.71 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按葛根芩连片人用临床等效日剂

表 1 葛根素血浆样品批内和批间准确度与精密度

Tab 1 Precision and accuracy for the determination of puerarin in the plasma

加入浓度 / (ng · mL ⁻¹)	批次内 (n = 5)			批次间 (n = 15)		
	$\bar{x} \pm s$	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	$\bar{x} \pm s$	精密度 RSD/%	准确度 RE/%
2.5	2.435 ± 0.17	7.9	97.4	2.413 ± 0.28	11.9	96.5
7.5	7.583 ± 0.06	0.85	104.7	7.589 ± 0.19	2.6	104.8
75.0	76.63 ± 1.03	1.5	102.2	75.99 ± 1.64	2.2	101.3
150.0	152.9 ± 1.56	1.1	101.9	153.3 ± 2.44	1.7	102.2

表 2 葛根素血浆样品基质效应和回收率 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Tab 2 Matrix effect and recovery for the determination of puerarin in the plasma ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

加入浓度 / (ng · mL ⁻¹)	绝对回收率 /%	相对回收率 /%	基质效应 /%
7.5	75.94 ± 3.61	79.35 ± 5.20	83.63 ± 0.80
150.0	67.19 ± 4.03	72.22 ± 3.61	89.29 ± 2.45

表 3 血浆中葛根素稳定性考察 (n = 6)

Tab 3 Stability of puerarin in the plasma (n = 6)

保存条件	加入浓度 / (ng · mL ⁻¹)	准确度 /%	RSD/%
- 20 °C 保存 10 d	7.500	109.8	2.9
	150.0	110.1	8.6
3 次冻融循环	7.500	107.9	5.6
	150.0	113.0	4.6
室温放置 2 h	7.500	104.9	2.8
	150.0	100.4	1.9
处理后进样器放置 8 h	7.500	95.0	4.8
	150.0	85.8	8.4

量进行换算, 相当于葛根素 4.21 mg · kg⁻¹, 饮片研磨成粉后加 0.9% CMC-Na 溶液溶解, 离心后取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过获得), 第三组灌胃葛根素对照品 4.21 mg · kg⁻¹ (葛根素溶解于 0.9% CMC-Na 溶液获得)。于给药前 (0 h) 及给药后 0.083、0.167、0.500、0.750、1、2、3、4、6、8 h 采集大鼠静脉血 0.3 mL 至肝素化离心管中, 立即用冰水浴冷却, 经 4000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 分离血浆, 于 - 20 °C 冰箱中保存。照“2.3”项下方法处理后检测, 采用葛根素和内标峰面积比值, 代入标准曲线回归计算血药浓度, 采用 WinNonlin 7.0 软件, 非房室模型计算药动学参数, 平均血药浓度 - 时间曲线见图 2, 药动学参数结果见表 4。

3 讨论

3.1 检测方式的选择

在葛根定性研究中, 发现葛根中含有葛根素的同分异构体大豆苷 (C₂₁H₂₀O₉), 其母核与葛根素母核相同。葛根素的二级质谱图特征碎片为 267.0662 和 295.0611, 大豆苷的二级质谱图特征碎片为 252.0425 和 295.0634, 两者的二级质谱差异与文献报道一致^[13]。在开展葛根素药动学研究

时, 若采用 HPLC-UV 或三重四极杆质谱作为检测器, 检测结果可能会受到大豆苷元的干扰。因此本研究采用静电场轨道阱高分辨质谱的 PRM 模式, 通过二级质谱图的高分辨精密分子量, 可区分葛根素和大豆苷, 提高葛根素药动学定量检测的准确性。

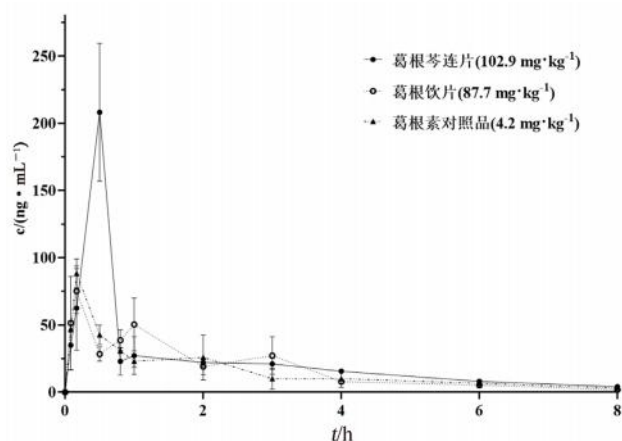


图 2 大鼠灌胃葛根苓连片、葛根单味药和葛根素对照品后的平均血药浓度 - 时间曲线

Fig 2 Average plasma concentration-time curves of puerarin in rat plasma after the single oral dose of Gegen Qinlian tablets, Puerariae Lobatae Radix and puerarin

3.2 色谱和质谱参数优化

葛根素的极性偏大, 研究比较了 Waters BEH C18 和 HSS T3 两种色谱柱, 葛根素在 C18 色谱柱上几乎无保留, 而在 HSS T3 色谱柱上的保留时间适宜, 有利于改善基质效应与增加检测的灵敏度。葛根素和内标马鞭草苷在正离子模式下响应弱, 负离子模式下响应较强。PRM 模式定量方式可以同时实现定性和定量的能力, 其灵敏度可以满足本研究需求。

3.3 样本前处理

葛根素的极性偏大, 不宜采取液液萃取的方式。而蛋白沉淀法成本低、步骤少, 结合预实验表明葛根素的最高血药浓度在 100 ~ 200 ng · mL⁻¹。在方法学验证过程中, 60 μL 血浆经甲醇沉淀蛋白后, 取上清液氮吹之后复溶的方法在低、高浓度质控样本的基质效应因子分别为 83.6% 和 89.3%,

表 4 大鼠灌胃葛根芩连片、葛根单味药和葛根素对照品后的药动学参数

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of puerarin in rat plasma after the single oral dose of Gegen Qinlian tablets, Puerariae Lobatae

参数	葛根芩连片	葛根	葛根素
$C_{max}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	208.2±51.29*	81.04±11.71	88.40±10.79 ^{^^}
t_{max}/h	0.5±0.00	0.6±0.4	0.2±0.0
$t_{1/2}/\text{h}$	2.1±0.1*	1.7±0.1 [#]	2.0±0.3
$CL/(\text{L}\cdot\text{kg}\cdot\text{h}^{-1})$	21.30±1.76*	29.88±4.56	35.75±12.3 [^]
$V_d/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	64.68±8.40	72.51±10.3	106.0±43.2
MRT/h	2.7±0.5	2.3±0.2 ^{##}	2.8±0.2
$AUC_{0-8}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1})$	186.3±18.98*	140.0±21.45	124.2±44.04 [^]
$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1})$	199.0±16.90*	144.3±22.42	133.1±44.90 [^]

注 (Note): 与葛根组相比, * $P < 0.01$; 与葛根素组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与葛根芩连片组相比, [^] $P < 0.05$, ^{^^} $P < 0.01$ (Compared with the Puerarin Lobatae Radix group, * $P < 0.01$; compared with the puerariae group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Gegen Qinlian group, [^] $P < 0.05$, ^{^^} $P < 0.01$)。

表明无明显的基质效应。方法的绝对回收率接近 70%, 灵敏度可达 $2.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 该前处理方法可以满足葛根素的药动学研究的需求。

3.4 药动学特征讨论

葛根芩连片和葛根药材组中葛根素均呈现明显的双峰吸收模式, 可能原因如下: ① 葛根素溶解性差, 灌胃给药采用 CMC-Na 作为助悬剂, 混悬给药, 葛根素并不呈溶解状态, 在胃肠道内可能缓慢溶解和溶出^[14]; ② 胃液的 pH 值及胃排空的速率^[15-16]; ③ 葛根素在动物体内的肠肝循环现象^[17]; ④ 葛根素和大豆苷元 (葛根素的苷元部分) 在动物体内互相代谢转换^[18-19]; ⑤ 在前期葛根定性研究中, 葛根中含有一定量的大豆苷, 大豆苷和葛根素为同分异构体, 在动物体内可能存在葛根素-大豆苷元-大豆苷之间的相互代谢转化^[20-21]; ⑥ 葛根中其他异黄酮化合物也可能与葛根素发生相互转换。

在相同条件下, 葛根芩连片复方配伍后葛根素的 C_{max} 提高了约 2.5 倍, 该药动学参数变化最为明显, 差异具有统计学意义; AUC_{0-8} 较葛根单味药材和葛根素明显增加, 证明配伍后葛根素的吸收明显加快, 能够显著增加葛根素在大鼠血浆中的血药浓度。根据图 3 及表观分布容积的差异, 可知配伍后药物在体内的分布加快, 使药物能够更快地到达相应的组织。表观清除率在配伍后明显减小, 证明配伍后葛根素的清除速率降低, 药物作用时间延长。此外, 血浆消除半衰期也有所延长。综上, 葛根芩连片配伍后具有明显的增效作用。

本研究通过比较药动学方法, 证明了葛根芩连片复方配伍能够改善制剂中主成分在体内的代谢行为, 证实中药配伍在用药中可起到增强疗效的作用。葛根芩连片复方配伍导致葛根素在大鼠体内的药动学参数变化的机制仍有待探索。此外, 在实际用药中, 不同药物采用的剂型、辅料可能不同, 这些因素对于药物作用、药动学参数是否产生影响, 同样需要进一步思考。

参考文献

- [1] 罗春, 步世忠, 王福艳. 葛根素治疗 2 型糖尿病的药理机制和临床进展 [J]. 基础医学与临床, 2016, 36 (11): 1582-1585.
- [2] 于心洋, 张贺齐, 刘云平, 等. 葛根素对缺血性脑卒中模型大鼠神经损伤的防护作用 [J]. 中国药业, 2022, 31 (4): 58-63.
- [3] 孔令娟, 计小清, 刘岩, 等. 葛根素通过调控 AMPK/GSK-3 β / β -catenin 信号通路缓解糖尿病大鼠心肌损伤 [J]. 中药材, 2023, 46 (2): 474-478.
- [4] 张驰, 徐莉, 任浩进, 等. 基于 Notch1/Hes1 信号通路探讨葛根素对心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和心室重构的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43 (3): 623-627.
- [5] 李丽莉, 吕轶峰, 朱雪妍. 葛根芩连片多成分含量测定的研究 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37 (9): 1607-1614.
- [6] 朱美玲, 刘洋, 曹燕飞, 等. 葛根芩连片主要活性成分的溶解度及油水分配系数的测定 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16 (12): 2686-2691.
- [7] 任伟光, 郭丽丽, 张翠英. 葛根芩连汤的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30 (18): 1675-1679.
- [8] 钟晓雨, 霍秀贞, 龚琼, 等. 基于药动学的中药配伍研究现状 [J]. 中草药, 2013, 44 (21): 3084-3088.
- [9] 袁丽君, 涂星, 佟智斌, 等. 黄芪-葛根配伍对葛根素在 2 型糖尿病大鼠体内药动学的影响 [J]. 重庆医学, 2018, 47 (31): 3982-3986.
- [10] 赵洁, 苏畅, 温德广, 等. 葛根素及葛根提取物在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中国药房, 2016, 27 (10): 1311-1314.
- [11] 陈慧慧, 孙付军, 李贵海. 中药药代动力学测定方法的研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (1): 217-219.
- [12] 张启云, 陈瑶, 姜丽, 等. 葛根芩连汤含药血清调节胰岛素抵抗脂肪细胞代谢机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (6): 14-18.
- [13] 王蕊, 李杨, 邓立萍, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析补肾活血方入血成分 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35 (9): 4637-4642.
- [14] 姜丽. 基于理化性质-药效-体内外吸收评价葛根素和天麻素配伍应用的合理性 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [15] 万凤. 酶联免疫吸附方法测定人唾液中葛根素、栀子苷浓度及其药代动力学 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [16] 魏凤环, 王永刚, 罗佳波. 药动学多峰现象研究概况 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40 (23): 1772-1774.

- [17] Mun JG, Grannan MD, Lachcik PJ, et al. In vivo metabolic tracking of ¹⁴C-radiolabelled isoflavones in kudzu (*Pueraria lobata*) and red clover (*Trifolium pratense*) extracts [J]. *Br J Nutr*, 2009, 102 (10): 1523-1530.
- [18] 崔升森, 赵春顺, 高坤, 等. 大鼠肝微粒体中葛根素的液相色谱-质谱测定法及药物代谢动力学 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24 (1): 32-36.
- [19] Namken S, Songvut P, Nuengchamnong N, et al. Comparative pharmacokinetics of puerarin alone and in pueraria mirifica extract in female cynomolgus monkeys [J]. *Planta Med*, 2021, 87 (5): 395-403.
- [20] Yan Y, Chai CZ, Wang DW, et al. Simultaneous determination of puerarin, daidzin, daidzein, paeoniflorin, albiflorin, liquiritin and liquiritigenin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of Ge-Gen decoction by a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 95: 76-84.
- [21] Kim M, Lee J, Han J. Deglycosylation of isoflavone C-glycosides by newly isolated human intestinal bacteria [J]. *J Sci Food Agric*, 2015, 95 (9): 1925-1931.
- (收稿日期: 2023-05-02; 修回日期: 2023-07-07)

盐酸氨溴索溶液与 5 种常用雾化药物的配伍稳定性考察

郭思瑞, 王月, 王晶, 徐文峰, 金鹏飞* (北京医院药学部, 国家老年医学中心, 中国医学科学院老年医学研究院, 北京市药物临床风险与个体化应用评价重点实验室(北京医院), 北京 100730)

摘要: **目的** 考察吸入用盐酸氨溴索溶液与 5 种临床常用雾化药物的配伍稳定性。**方法** 吸入用盐酸氨溴索溶液与硫酸沙丁胺溶液、吸入用异丙托溴铵溶液、吸入用布地奈德混悬液、丙酸氟替卡松雾化吸入用混悬液、吸入用丙酸倍氯米松混悬液配伍后, 室温下于 0、2、4、6 h 观察配伍液的外观变化, 测定其 pH 值, 并采用高效液相色谱法测定配伍液中各成分百分含量。**结果** 5 种配伍组合在 6 h 内, 外观均无明显变化, pH 值稳定, RSD 均在 1.0% 内。建立的高效液相色谱法中, 6 个成分的线性关系良好, 专属性强, 精密度、重复性及稳定性的 RSD 均小于 2.0%, 加样回收率良好, 符合方法学要求, 配伍组合中各成分 6 h 内峰面积变化 RSD 均小于 1.0%。**结论** 吸入用盐酸氨溴索溶液可与 5 种临床常用雾化药物稳定配伍, 符合临床用药安全要求。

关键词: 吸入用盐酸氨溴索溶液; 配伍稳定性; 雾化药物

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-2937-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.019

Compatible stability of ambroxol hydrochloride solution for inhalation with 5 common nebulized drugs

GUO Si-rui, WANG Yue, WANG Jing, XU Wen-feng, JIN Peng-fei* (*Department of Pharmacy, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Assessment of Clinical Drug Risks and Individual Application (Beijing Hospital), Beijing 100730*)

Abstract: Objective To determine the compatibility stability of ambroxol hydrochloride solution for inhalation with 5 common nebulized drugs. **Methods** After ambroxol hydrochloride solution for inhalation was combined with salbutamol sulfate solution, ipratropium bromide solution, budesonide suspension, fluticasone propionate suspension and beclomethasone dipropionate suspension, the appearance changes of the mixtures at room temperature were observed at 0, 2, 4 and 6 h, respectively. The pH values were determined, and the percentage contents of each component in the mixed

基金项目: 中央高水平医院临床科研业务费资助 (No.BJ-2021-211); 国家自然科学基金项目 (No.81803715)。

作者简介: 郭思瑞, 女, 博士, 主管药师, 主要从事医院药学和药物分析方面的研究, email: siruiguoguo@126.com *通信作者: 金鹏飞, 男, 主任药师, 主要从事医院药学与药物分析, email: j790101@163.com

solutions were determined by high performance liquid chromatography. **Results** The appearance of the 5 combinations had no obvious change within 6 h, the pH values were stable, and the RSDs were within 1.0%. In the established high performance liquid chromatography method, the linearity and specificity of the 6 components were satisfactory, and the RSDs of precision, repeatability and stability were less than 2.0%. The spiked recovery were good, all meeting the methodological requirements. The RSD of the peak area change of each component in the compatibility combinations within 6 h were less than 1.0%. **Conclusion** The ambroxol hydrochloride solution for inhalation can be stably compatible with 5 common nebulized drugs, which can meet the requirements of clinical safety.

Key words: ambroxol hydrochloride solution for inhalation; compatible stability; nebulization drug

盐酸氨溴索是一种临床常用的祛痰药,适用于伴有痰液分泌异常及排痰困难的患者^[1-2]。临床上多用于阻塞性细支气管炎、支气管扩张、肺炎等疾病的治疗,且在多个呼吸系统疾病的诊疗指南和专家共识中均有推荐^[3-5]。采用雾化祛痰的给药方式,可使盐酸氨溴索快速到达气道,全身不良反应小,尤其适合老人、儿童等配合治疗困难的患者^[6]。盐酸氨溴索雾化祛痰治疗已在临床中广泛应用^[7-9],但仍存在配伍药物选择不适宜、超说明书用药等问题^[10-12]。吸入用盐酸氨溴索溶液于2019年7月获批上市,是国内首个氨溴索雾化专用剂型,可解决临床中常将注射液剂型用于雾化的超说明书用药问题。但盐酸氨溴索配伍药物的选择多为经验用药,临床上常与 β_2 肾上腺素受体激动剂、M胆碱受体阻滞药以及糖皮质激素类药物配伍使用,用于黏液高分泌及痰液排出异常等多种呼吸系统疾病。吸入用盐酸氨溴索溶液作为新上市的剂型,相关配伍稳定性研究属于空白阶段。为了促进其规范、合理使用,本研究模拟吸入用盐酸氨溴索溶液与临床代表性雾化药物 β_2 肾上腺素受体激动剂吸入用硫酸沙丁胺醇溶液、M胆碱受体阻滞药吸入用异丙托溴铵溶液、糖皮质激素类药物吸入用布地奈德混悬液、丙酸氟替卡松雾化吸入用混悬液、吸入用丙酸倍氯米松混悬液进行配伍^[13],通过考察配伍药物的外观、pH值及含量变化,以确定吸入用盐酸氨溴索溶液的配伍稳定性,为临床用药安全提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); KQ-300DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Mettler Toledo XP205 型电子天平、Mettler Toledo Seven Multi 型 pH 测试仪(梅特勒)。

1.2 试药

硫酸沙丁胺醇(批号: 100328-201804, 纯度:

99.4%)、盐酸氨溴索(批号: 100599-201905, 纯度: 99.9%)、异丙托溴铵(批号: 100522-201802, 纯度: 95.8%)、布地奈德(批号: 100989-201502, 纯度: 98.9%)、丙酸氟替卡松(批号: 510021-201702, 纯度: 99.8%)及丙酸倍氯米松(批号: 100119-201805, 纯度: 98.8%)(中国食品药品检定研究院)。吸入用硫酸沙丁胺醇溶液(葛兰素史克, 批号: FW0553, 规格: 2.5 mL/5 mg); 吸入用盐酸氨溴索溶液(北京韩美药品有限公司, 批号: 067220181, 规格: 2 mL/15 mg); 吸入用异丙托溴铵溶液(勃林格殷格翰, 批号: 0981213, 规格: 2 mL/0.25 mg); 吸入用布地奈德混悬液(阿斯利康, 批号: 327258; 规格: 2 mL/1 mg); 丙酸氟替卡松雾化吸入用混悬液(葛兰素史克, 批号: GM6842, 规格: 2 mL/0.5 mg); 吸入用丙酸倍氯米松混悬液(意大利凯西制药公司, 批号: 1118278, 规格: 2 mL/0.8 mg)。甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯; 水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱选择 InertSustain C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(pH 3.2)(A)-乙腈(B), 梯度洗脱程序见表 1; 检测波长为 210 nm、246 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积为 10 μ L; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 经过 0.22 μ m 孔径滤膜滤过后进样。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0	85	15
5.0	70	30
6.0	58	42
10.0	58	42
16.0	35	65
34.0	35	65
36.0	85	15

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取硫酸沙丁胺醇 100.2 mg、异丙托溴铵 5.1 mg、盐酸氨溴索 300.1 mg、布地奈德 20.5 mg、丙酸氟替卡松 10.5 mg 和丙酸倍氯米松 16.1 mg，置于 100 mL 量瓶中，用 80% 甲醇水溶解并定容至刻度，摇匀，制成对照品储备液。精密量取对照品储备液 1.25、2.5、5.0、10.0、20.0 mL，分别置于 20 mL 量瓶中，加入 80% 甲醇水至刻度，制成系列混合对照品溶液（硫酸沙丁胺醇： $62.63 \sim 1002 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；异丙托溴铵： $3.188 \sim 51.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；盐酸氨溴索： $0.1876 \sim 3.001 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；布地奈德： $12.81 \sim 205.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；丙酸氟替卡松： $6.563 \sim 105.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；丙酸倍氯米松： $10.06 \sim 161.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）。

2.2.2 样品混合溶液 精取硫酸沙丁胺醇溶液 2.5 mL，异丙托溴铵溶液、盐酸氨溴索溶液、布地奈德混悬液、丙酸氟替卡松混悬液、丙酸倍氯米松混悬液各 2.0 mL，置于 20 mL 量瓶中，加适量甲醇，振荡使溶解，甲醇稀释并定容至刻度，混匀，即得。

2.2.3 阴性样品溶液 根据药品说明书中的辅料成分，配制不含待测成分的阴性样品溶液，按照“2.2.2”项下操作，即得。

2.2.4 配伍液制备 在室温条件下，取 6 种待测药物各 1 支，分别按表 2 进行配伍，振荡混匀，考察配伍

液的外观及 pH 值变化。再分别精密量取硫酸沙丁胺醇溶液 2.5 mL，异丙托溴铵溶液、盐酸氨溴索溶液、布地奈德混悬液、丙酸氟替卡松混悬液、丙酸倍氯米松混悬液各 2.0 mL，按照表 2 进行组合，置于 20 mL 量瓶中，甲醇稀释并定容至刻度，混匀，0.22 μm 滤膜过滤后进样，用于配伍液中药物含量考察。

表 2 临床常用配伍组合
Tab 2 Common clinical combinations

No	配伍组别
1	吸入用盐酸氨溴索溶液+吸入用硫酸沙丁胺醇溶液
2	吸入用盐酸氨溴索溶液+吸入用硫酸沙丁胺醇溶液+吸入用异丙托溴铵溶液
3	吸入用盐酸氨溴索溶液+吸入用硫酸沙丁胺醇溶液+吸入用布地奈德混悬液
4	吸入用盐酸氨溴索溶液+吸入用硫酸沙丁胺醇溶液+丙酸氟替卡松雾化吸入用混悬液
5	吸入用盐酸氨溴索溶液+吸入用硫酸沙丁胺醇溶液+吸入用丙酸倍氯米松混悬液

2.3 专属性考察

分别取阴性样品溶液、混合对照品溶液和供试品溶液进样分析，考察样品中辅料和其他成分对待测成分色谱峰是否存在干扰。结果显示：样品中辅料和其他成分不干扰硫酸沙丁胺醇、异丙托溴铵、盐酸氨溴索、布地奈德、丙酸氟替卡松和丙酸倍氯米松的测定（见图 1）。

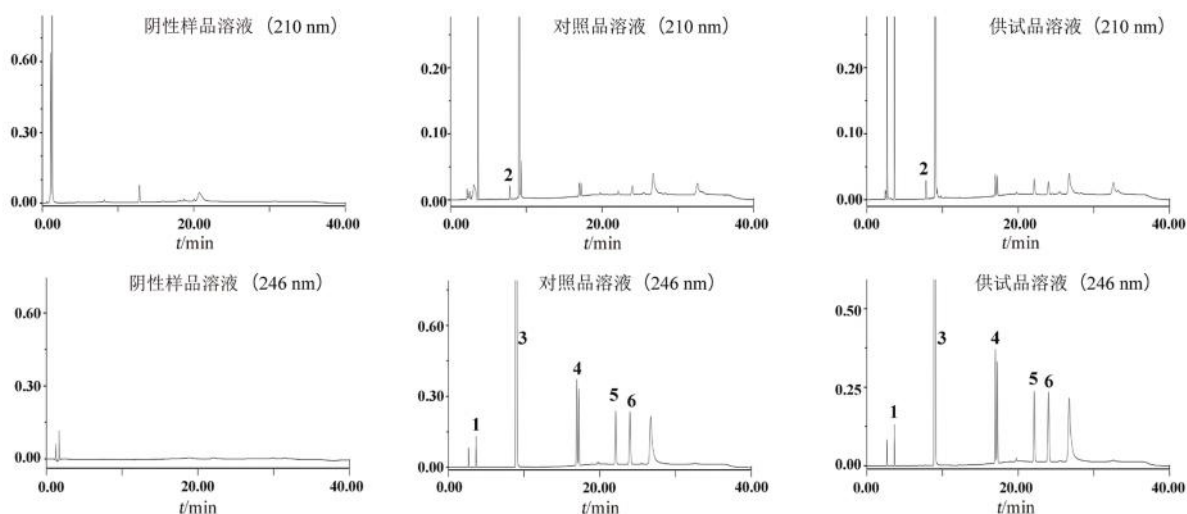


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram

1. 硫酸沙丁胺醇 (salbutamol sulfate); 2. 异丙托溴铵 (ipratropium bromide); 3. 盐酸氨溴索 (ambroxol hydrochloride); 4. 布地奈德 (budesonide); 5. 丙酸氟替卡松 (fluticasone propionate); 6. 丙酸倍氯米松 (beclometasone dipropionate)

2.4 系统适用性、线性与灵敏度考察

取“2.2.1”项下中间浓度的对照品溶液连续进样 6 次，记录平均理论塔板数和对称因子，考察方法的系统适用性。将“2.2.1”项下系列浓度对照品

溶液进样分析，记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (y)，待测物的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (x)，采用线性回归分析，得到待测物的标准曲线方程。将对照品溶液逐级稀释后，以信噪比

(S/N) 约为 3 时的浓度为检测限 (LOD), 以 S/N 约为 10 时的浓度为定量限 (LOQ)。各待测物标准曲线参数、定量限与检测限见表 3, 结果表明各待测物在浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表 3 系统适用性、线性及最低检测限

Tab 3 System suitability, linearity and limits of detection

成分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	LOQ / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
硫酸沙丁胺醇	$y = 2.351 \times 10^6 x + 5.816 \times 10^4$	62.63 ~ 1002	0.9999	6.263×10^{-2}	10.02
异丙托溴铵	$y = 1.042 \times 10^7 x + 1.920 \times 10^3$	3.188 ~ 51.00	0.9999	3.188×10^{-3}	101.4
盐酸氨溴索	$y = 4.477 \times 10^6 x + 7.198 \times 10^4$	187.6 ~ 3001	0.9999	0.1876	150.0
布地奈德	$y = 2.093 \times 10^7 x + 6.748 \times 10^3$	12.81 ~ 205.0	0.9999	1.281×10^{-2}	205.2
丙酸氟替卡松	$y = 2.399 \times 10^7 x + 3.110 \times 10^4$	6.563 ~ 105.0	0.9999	6.563×10^{-3}	1.048
丙酸倍氯米松	$y = 1.772 \times 10^7 x + 1.039 \times 10^4$	10.06 ~ 161.0	0.9999	1.006×10^{-2}	16.10

2.5 精密度、重复性和稳定性考察

取“2.2.1”项下中间浓度的对照品溶液连续进样 6 次, 测得各成分峰面积的相对标准偏差 (RSD) 作为精密度。结果显示硫酸沙丁胺醇、异丙托溴铵、盐酸氨溴索、布地奈德、丙酸氟替卡松及丙酸倍氯米松峰面积的 RSD 分别为 1.0%、0.82%、0.77%、0.92%、0.86%、0.89% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。按照“2.2.2”项下方法, 平行制备 6 份样品混合溶液, 结果显示 6 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.16%、0.23%、0.12%、0.18%、0.30%、0.14% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。将上述样品混合溶液置于自动进样器中, 分别于 0、12、24 h 进样分析, 结果显示 6 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.13%、0.090%、0.080%、0.37%、0.60%、0.15%, 表明待测样品在 24 h 内含量稳定。

2.6 回收率考察

精密量取硫酸沙丁胺醇溶液 2.5 mL, 异丙托溴铵溶液、盐酸氨溴索溶液、布地奈德混悬液、丙酸氟替卡松混悬液、丙酸倍氯米松混悬液各 2.0 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 分别精密加入 4.0、5.0 和 6.0 mL 对照品储备液, 配制成低、中、高浓度的加样回收溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱峰面积, 计算平均回收率。结果显示, 各成分低、中、高浓度的平均回收率分别在 98.2% ~ 100.2%、98.8% ~ 101.7%、99.2% ~ 101.8%, RSD 均 < 1.0%, 符合方法学要求。

2.7 配伍稳定性考察

2.7.1 外观及 pH 值变化 按照“2.2.4”项下方法制备用于外观和 pH 考察的配伍液, 每组平行制备 6 份, 分别于 0、2、4、6 h 用目测法观察配伍溶液的外观变化, 并在上述时间点测定各组溶液的 pH 值。结果显示盐酸氨溴索与 5 种配伍药物在 6 h 内外观无肉眼可见明显变化。药物配伍后 6 h 内 pH 值稳定, RSD 均 < 1.0%。

2.7.2 药物含量变化 按“2.2.4”项下方法制备用于含量测定的配伍液, 每组平行制备 6 份, 分别于 0、2、4、6 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果显示, 6 h 内各配伍液中盐酸氨溴索、沙丁胺醇、异丙托溴铵、布地奈德、丙酸氟替卡松及丙酸倍氯米松的百分含量分别为 97.8% ~ 100.5%、97.3% ~ 99.93%、100.8% ~ 101.4%、99.9% ~ 100.2%、100.6% ~ 101.1%、100.9% ~ 102.4%, RSD 均在 1.0% 内, 且百分含量均在质量规定范围内, 说明各配伍液在 6 h 内含量稳定。

3 讨论

雾化药物联合使用的前提是混合药物的相容性和稳定性符合规定, 无理化性质的配伍禁忌^[14-15]。为了保证吸入用盐酸氨溴索的临床用药安全, 本研究开展了吸入用盐酸氨溴索与 5 种临床常用雾化药物的配伍稳定性考察^[13, 16]。结合前期预试验结果, 为满足系统适用性要求, 在 2020 年版《中国药典》[以 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二铵溶液 (用磷酸调节 pH 值至 7.0) - 乙腈 (50 : 50) 为流动相] 的基础上调整了磷酸盐的选择, 并进行梯度洗脱, 最终将流动相确定为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液 (pH 3.2) - 乙腈梯度洗脱。异丙托溴铵在 200 ~ 400 nm 内无特征吸收峰, 故选择 210 nm 作为检测波长。硫酸沙丁胺醇、布地奈德、丙酸氟替卡松、丙酸倍氯米松及盐酸氨溴索分别在 276、246、236、239、246 nm 处有最大吸收, 考虑到 5 种成分在 246 nm 处均有较强吸收, 且干扰较小, 故选择 246 nm 作为检测波长。专属性考察结果显示, 6 种待测成分在该色谱条件下能够完全分离, 且不受其他物质的干扰, 该方法可用于盐酸氨溴索不同配伍液的含量测定。

本研究所选择配伍液的组合主要参考我院临床患者的治疗方案, 考虑到临床实际使用过程, 故选择考察了室温条件下各配伍液 6 h 内的稳定

性。结果表明,吸入用盐酸氨溴索溶液分别与 5 种临床常用雾化药物不同组合配伍后,在室温条件下,各配伍液 6 h 内外观无明显变化, pH 值稳定。6 h 内各配伍液中盐酸氨溴索、沙丁胺醇、异丙托溴铵、布地奈德、丙酸氟替卡松及丙酸倍氯米松的百分含量均符合药典要求,表明 6 h 内各配伍液的稳定性良好,可用于临床雾化配伍使用。

综上所述,本研究采用高效液相色谱法对吸入用盐酸氨溴索与 5 种临床常用雾化药物的配伍稳定性进行研究。结果显示,在室温条件下,各配伍液外观无明显变化、pH 值及含量均保持稳定,可满足配伍药物相容性及稳定性要求。吸入用盐酸氨溴索溶液的上市,填补了我国盐酸氨溴索药物雾化专用剂型的空缺,为临床用药安全提供了有力保障,也为相关药物使用指南的制定提供了数据参考。由于临床用途、患者自身情况的差异,给药剂量也会略有不同,但本研究仅考察了各药物单一剂量的稳定性,其他剂量的考察有待后续进一步探索。

参考文献

- [1] 刘雪琳. 盐酸氨溴索联合布地奈德治疗支气管肺炎对患儿肺功能及血清 IL-6、IL-8、CRP 水平的影响[J]. 中国现代药物应用, 2023, 17(3): 102-104.
- [2] Yu FF, Li CL, Liu MH, et al. Aerosol inhalation of ambroxol hydrochloride combined with terbutaline can promote recovery of children with severe pneumonia [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(5): 5019-5026.
- [3] 王丽雪. 盐酸氨溴索雾化吸入治疗对老年慢性支气管炎患者疗效和睡眠质量的影响[J]. 世界睡眠医学杂志, 2021, 8(6): 934-935.
- [4] 陈志文, 黄锡清, 叶茂清, 等. 盐酸氨溴索注射液辅助治疗支气管肺炎的临床效果[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(6B): 63-65.
- [5] 陈强, 陈志敏, 成焕吉, 等. 中国儿童慢性湿性咳嗽的诊断与治疗专家共识(2019年版)[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(4): 256-264.
- [6] 杜光, 赵杰, 卜书红, 等. 雾化吸入疗法合理用药专家共识(2019年版)[J]. 医药导报, 2019, 38(2): 135-146.
- [7] 肖学逊, 方洁生, 洪梦婕. 丙酸倍氯米松联合盐酸氨溴索雾化吸入在小儿肺炎中的应用效果研究[J]. 中国实用医药, 2019, 14(14): 130-131.
- [8] 陈涛. 盐酸氨溴索雾化吸入疗法治疗老年慢性支气管炎的临床疗效研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(83): 29.
- [9] Tang HW, Yuan Z, Li JJ, et al. The application of ambroxol hydrochloride combined with fiberoptic bronchoscopy in elderly patients with severe pneumonia: a meta-analysis and systematic review [J]. Medicine, 2022, 101(4): e28535.
- [10] 孙妍, 郭桐宇. 盐酸氨溴索超说明书用药的分析与临床管理方法研究[J]. 中国处方药, 2021, 19(5): 3-6.
- [11] 唐荣国, 赫倩, 付磊, 等. 长期雾化吸入 4 种非雾化剂型药物对健康 SD 大鼠肺组织的影响[J]. 中国药房, 2019, 30(9): 1214-1219.
- [12] 蓝彩凤, 王波. 盐酸氨溴索配伍禁忌的文献研究及合理安全用药指导[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2021, 27(3): 417-421.
- [13] 王晓玲, 许静, 季兴, 等. 儿童常用雾化吸入药物处方审核建议[J]. 中国实用儿科杂志, 2020, 35(2): 81-87, 136.
- [14] 林小明, 黄敏, 谢培德. 舒肝宁注射液与 3 种注射液配伍稳定性研究[J]. 中南药学, 2019, 17(5): 734-737.
- [15] 刘瀚旻, 符州, 张晓波, 等. 儿童呼吸系统疾病雾化治疗合理应用专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2022, 60(4): 283-290.
- [16] 中华医学会呼吸病学分会. 雾化祛痰临床应用的专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44(4): 340-348.

(收稿日期: 2023-04-25; 修回日期: 2023-06-08)

维血宁合剂中抑菌剂使用现状分析及抑菌效力研究

石蓉, 郑金凤*, 张悦, 刘雁鸣, 魏志刚, 尹林高 (湖南省药品检验检测研究院, 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** 考察不同企业维血宁合剂中抑菌剂使用情况和不同抑菌剂浓度下维血宁合剂的抑菌效力, 探索维血宁合剂中抑菌剂的最佳添加量。**方法** 采用高效液相色谱法测定不同企业维血宁合剂中抑菌剂含量, 结合生产工艺阶段各样品的抑菌剂测定结果, 对各生产企业样品中抑菌剂种类和含量进行分析; 对添加 0.026%、0.25% 苯甲酸钠的维血宁合剂, 进行抑菌效力检查。**结果** 21 批维血宁合剂中均未检出山梨酸, 对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯含量极低, 可能来自于原料药材, 苯甲酸钠含量介于 0.0197% ~ 0.2659%, 不同企业样品间含量差异显著; 维血宁合剂中苯甲酸钠浓度为 0.026%、0.25% 时, 均对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌达到杀菌效果, 14 d 后无菌生长, 对鲁氏酵母和白念珠菌达到口服制剂抑菌要求。**结论** 维血宁合剂各生产企业均以苯甲酸钠作为抑菌剂, 样品中苯甲酸钠含量差别较大, 说明各企业并未严格按照药典处方进行投料, 存在较大的随意性; 维血宁合剂中抑菌剂的使用浓度应结合产品本身的灭菌工艺、初始微生物负载、有效期、包装规格来综合考虑。

关键词: 维血宁合剂; 含量测定; 抑菌效力; 苯甲酸钠

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2942-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.020

Use of bacteriostatic agents and bacteriostatic efficacy in Weixuening mixture

SHI Rong, ZHENG Jin-feng*, ZHANG Yue, LIU Yan-ming, WEI Zhi-gang, YIN Lin-gao (Hunan Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha 410001)

Abstract: Objective To determine the use of bacteriostatic agents in Weixuening mixture from different enterprises and the bacteriostatic efficacy of Weixuening mixture under different concentrations of bacteriostatic agents, and determine the best dosage of bacteriostatic agents for Weixuening mixture. **Methods** The content of bacteriostatic agents in Weixuening mixture from different enterprises was determined by high performance liquid phase method. Based on the results of bacteriostatic agents in the samples of different stages of production process, the types and content of bacteriostatic agents in the samples of each enterprise were analyzed. The bacteriostatic efficacy of Weixuening mixture with 0.026% and 0.25% sodium benzoate was examined respectively. **Results** No sorbic acid was detected in the 21 batches of Weixuening mixture, and the content of methyl *p*-hydroxybenzoate and ethyl *p*-hydroxybenzoate was very low, possibly from the raw materials. The content of sodium benzoate ranged 0.0197% ~ 0.2659%, with much difference among samples from various enterprises. The bactericidal effect was achieved for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and no bacterial growth was found after 14 days, with the concentration of sodium benzoate of 0.026% or 0.25% in Weixuening mixture. The bacteriostatic efficacy on *Saccharomyces rouxii* and *Candida albicans* was also achieved. **Conclusion** Sodium benzoate is commonly in

基金项目: 湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目 (No.2022JJ80070)。

作者简介: 石蓉, 女, 主管药师, 主要从事药品微生物和药用辅料方面的研究, email: 343314868@qq.com * 通信作者: 郑金凤, 女, 副主任药师, 硕士, 主要从事化学药、药用辅料方面的研究, email: 332410419@qq.com

Weixuening mixture by all manufacturers as bacteriostatic agent and its content difference among samples vary, indicating that the enterprises do not strictly follow the pharmacopoeia prescriptions, but rather randomly add bacteriostatic agents. The sterilization process of the product itself, initial microbial load, expiration date and packaging specifications should all be taken into account as to the concentration of bacteriostatic agents in Weixuening mixture.

Key words: Weixuening mixture; content determination; bacteriostatic effect; sodium benzoate

维血宁合剂是由虎杖、炒白芍等八味中药制成的口服液体制剂,具有滋阴养血、清热凉血的功效,临床主要用于治疗阴虚血热所致的出血及血小板、白细胞减少症等,还可作为一般性贫血的补血健身剂^[1-2]。其制法是用八味中药加水进行煎煮,经多次醇提、浓缩,最终得到的清膏有效成分复杂,在生产、储存和使用过程中容易被微生物污染,产生沉淀、变色和腐败等现象,故需加入一定量的防腐剂来确保制剂的稳定性^[3]。维血宁合剂原质量标准收载于《卫生部药品标准中药成方剂第二册》WS₂-B-0429-90,其制法项下未规定防腐剂的品种和加入量。2010年10月1日,维血宁合剂执行标准变更为《中国药典》一部,现收载于《中国药典》2020年版一部^[4],其制法项下规定使用苯甲酸钠作为防腐剂,加入量为0.026%。《中国药典》2020年版一部共收载117个合剂品种,这些制剂处方中使用的抑菌剂主要为苯甲酸钠、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯等。其中以苯甲酸钠作为抑菌剂的投料一般为2~3.5g,相当于制剂中含量为0.20%~0.35%,远高于维血宁合剂中苯甲酸钠的处方用量。药物制剂中抑菌剂使用浓度应遵循最低有效原则,过少添加不能有效抑制微生物繁殖,过量添加则影响到药物质量和用药安全^[5]。故市面上维血宁合剂中抑菌剂实际使用情况,值得我们关注。现有文献中药品制剂中多采用高效液相色谱法进行抑菌剂含量测定^[6-9]和通过抑菌效力研究来评价中药合剂的微生物控制能力^[10-15]。故本文采用高效液相色谱法,对来自5家生产企业的21批维血宁合剂中的抑菌剂含量进行测定,并对维血宁合剂进行抑菌效力研究。通过对不同生产企业维血宁合剂中的抑菌剂种类和含量进行测定和分析,了解市场上维血宁合剂中抑菌剂使用现状,并通过抑菌效力试验评价其现有抑菌剂浓度的微生物控制水平,为维血宁合剂的质量控制和日常监管工作提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪、Openlab 色谱数据工作站(安捷伦公司);S220 pH计(Mettler Toledo公司);电子分析天平 MS205DU(岛津公司);高压蒸汽灭菌器 MLS-3751L-PC(日本SANYO);SW-CJ-2FD 洁净工作台(苏州净化有限公司);BSC-1300 II B2 生物安全柜[苏洁医疗器械(苏州)有限公司];SPX-380 细菌培养箱(宁波江南仪器有限公司);IPP260 plus 霉菌培养箱(mermmert);HTY-310 型微生物检验仪(浙江泰林生物技术有限公司)。

1.2 试药

甲醇(色谱纯, Honeywell);磷酸二氢钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);山梨酸(批号为190126-202102, 纯度为99.7%, 中国食品药品检定研究院);苯甲酸(批号为2202213, 纯度为99.9%)、对羟基苯甲酸甲酯(批号为2252850, 纯度为99.7%)、对羟基苯甲酸乙酯(批号为2252764, 纯度为99.9%)(上海安谱瑾世标准技术服务有限公司)。胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为2109232)、沙氏葡萄糖胨琼脂培养基(批号为2110252)、胰酪大豆胨液体培养基(批号为2207222)、沙氏葡萄糖胨液体培养基(批号为201013)和pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号为2101082)(北京三药科技开发公司);培养基适用性试验结果符合《中国药典》2020年版要求。

1.3 试验菌株

大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC (B) 44102, 批号: 44102-3A3-2]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003, 批号: 26003-9a7-2]、白念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC (F) 98001, 批号: 98001-2a25-1] (中国食品药品检定研究院; 鲁氏酵母菌(*Saccharomyces rouxii* Boutroux) (SHBCC D21885, 批号: 20220704, 上海保藏生物技术中心), 试验所用菌株均为第2代。

维血宁合剂样品来源5家生产企业,共21批次。

2 方法与结果

2.1 高效液相法测定抑菌剂含量

2.1.1 色谱条件 采用 Waters symmetry C18 (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm), 以 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液(用磷酸调节 pH 至 4.0) 为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 梯度洗脱 (0~2 min, 80%A; 2~12 min, 80%~65%A; 12~30 min, 65%~45%A; 30~35 min, 45%A); 柱温为 30℃; 流速为 1.2 mL·min⁻¹; 进样量为 20 μL; 检测波长为 230 nm (苯甲酸)、254 nm (山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯)。

2.1.2 溶液的制备

① 供试品溶液: 精密量取供试品 2.0 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

② 对照品溶液: 精密称取山梨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯对照品适量, 分别置不同 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得各对照品储备液 (约 12 mg·mL⁻¹), 精密量取各对照品储备液 0.25 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液 (约 0.03 mg·mL⁻¹)。以甲醇作为空白溶液, 以混合对照品溶液作为系统适用性溶液。

2.1.3 方法学验证及结果 参照《中国药典》2020 年版四部通则 9101 分析方法验证指导原则, 进行方法学验证。结果显示空白溶剂对测定无干扰, 相邻组分色谱峰分离度大于 1.5, 符合系统适用性要求; 各抑菌剂在 6~60 μg·mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好, *r* 值均为 1; 加样回收试验结果中, 苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯回收率 *RSD* 值分别为 1.1%、0.60%、1.0% 和 1.2%, 说明该方法准确度良好; 采用同一样品, 依法制备 6 份供试品溶液, 各抑菌剂重复性 *RSD* 值均小于 3%; 对照品溶液连续进样 6 次, 各抑菌剂峰面积的 *RSD* 值均小于 0.5%; 对照溶液中各抑菌剂在 12 h 内稳定, *RSD* 值均小于 0.3%; 供试品溶液各抑菌剂在 24 h 内稳定, *RSD* 值均小于 1.1%。

2.1.4 各企业样品测定 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.1”项下色谱条件对所有样品进行测定, 21 批次样品均检出苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯, 未检出山梨酸。其中各企业样品中对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯含量极低, 苯甲酸钠含量差异较大

(0.0197%~0.2659%)。不同企业样品间苯甲酸钠含量差异显著, E 企业样品的苯甲酸钠含量均值将近为 C 企业的 10 倍, 同一家生产企业样品中苯甲酸钠含量也有一定差别。具体结果见表 1 和图 1。

表 1 抑菌剂的含量测定结果
Tab 1 Content of bacteriostatic agent

生产企业	样品编号	抑菌剂浓度 /%			
		苯甲酸钠	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸乙酯	
A	W1	0.0285	0.0002	0.0006	
	W2	0.0325	0.0010	0.0011	
	W3	0.0356	0.0006	0.0011	
B	W4	0.0386	0.0020	0.0002	
	W5	0.0394	0.0010	0.0002	
C	W6	0.0236	0.0002	0.0008	
D	W7	0.0273	0.0010	0.0011	
	W8	0.0197	0.0006	0.0009	
	W9	0.0254	0.0006	0.0013	
	W10	0.0301	0.0008	0.0009	
	E	W11	0.2398	0.0009	0.0008
		W12	0.2367	0.0009	0.0003
		W13	0.2111	0.0010	0.0008
		W14	0.2659	0.0008	0.0008
		W15	0.2574	0.0009	0.0011
		W16	0.1887	0.0007	0.0007
W17		0.1974	0.0008	0.0007	
W18		0.2529	0.0009	0.0009	
W19	0.2186	0.0008	0.0008		
W20	0.2238	0.0025	0.0018		
W21	0.2010	0.0023	0.0016		

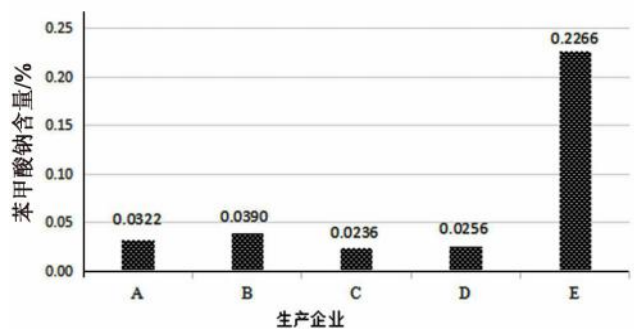


图 1 不同企业样品中苯甲酸钠含量均值对比图

Fig 1 Mean value of sodium benzoate content in samples from different enterprises

2.1.5 维血宁合剂生产工艺不同阶段样品的抑菌剂含量测定 维血宁合剂生产工艺不同阶段样品主要包括水提浓缩液、醇提清膏、加入抑菌剂后的成品, 取一批维血宁合剂成品在生产工艺不同阶段的样品 (样品由 A 生产企业提供), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.1”

项下条件对样品进样测定, 结果未添加抑菌剂之前, 该批维血宁合剂样品中就含有少量苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯。醇提后的清膏中各抑菌剂浓度均略高于水提浓缩液, 具体结果见表 2。

表 2 生产工艺不同阶段样品的抑菌剂含量测定结果

Tab 2 Content of bacteriostatic agent in samples at different stage of the production process

样品类型	抑菌剂浓度 /%		
	苯甲酸钠	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸乙酯
水提浓缩液	0.0159	0.0008	0.0014
醇提清膏	0.0240	0.0015	0.0020
加入 0.026% 苯甲酸钠的成品	0.0456	0.0014	0.0019
加入 0.25% 苯甲酸钠的成品	0.2552	0.0014	0.0018

2.2 抑菌效力研究

对市面上多家生产企业进行调研, 结果显示, 大多数维血宁合剂生产企业声称按现行标准处方 0.026% 进行投料, 有个别企业沿袭传统, 按苯甲酸钠 0.25% 进行投料。故采取 0.026%、0.25% 两种抑菌剂浓度进行抑菌效力试验研究。

2.2.1 菌液制备和样品 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌接种于胰酪大豆胨液体培养基, 30 ~ 35 °C 培养 18 ~ 24 h; 鲁氏酵母菌、白念珠菌接种于沙氏葡萄糖液体培养基, 20 ~ 25 °C 培养 48 h。取上述培养物, 分别用 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液稀释成含菌数约为 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 用于抑菌效力试验; 取上述培养物, 分别用 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液稀释成含菌数约为不大于 $100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 用于方法学适用性试验。取 2 个批次维血宁合剂样品, 其中苯甲酸钠添加量分别为 0.026%、0.25%, 规格均为 100 mL/瓶。

2.2.2 方法适用性试验 取供试品 10 mL, 用 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液稀释至 100 mL, 混匀, 作为 1 : 10 的供试液。依照《中国药典》2020 年版四部通则 1105, 分别采用平皿法和薄膜过滤法进行方法适用性考察, 方法适用性结果的回收率 = (试验组菌落数 - 供试品对照组菌落数) / 菌液对照组菌落数 $\times 100\%$ 。试验结果表明, 采用平皿稀释法难以有效去除样品的抑菌性, 各菌回收率均小于 50%。采用薄膜过滤法 (各组均用 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次, 每次 100 mL) 可有效去除样品的抑菌性, 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、鲁氏酵母菌和白念珠菌的回收率均大于 85%, 符合 2020 年版《中国药

典》中计数方法适用性的要求。

2.2.3 抑菌效力试验 取苯甲酸钠浓度为 0.026%、0.25% 的维血宁合剂各 4 瓶, 分别接种“2.2.1”项下制备的供抑菌效力试验用菌悬液, 每种浓度维血宁合剂每瓶分别接种一种试验菌悬液 1.0 mL, 使供试品中菌数在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 充分混匀, 然后将供试品置 25 °C 避光保存。分别于接种后 14 d 和 28 d 取样, 采用“2.2.2”项下验证过的薄膜过滤法进行计数, 与初始接种菌液浓度进行比较, 结果见表 3。抑菌效力判断参照《中国药典》2020 年版四部通则 1121 抑菌效力检查法口服制剂抑菌效力判断标准 (① 细菌菌数在第 14 日, 相比初始接种菌数减少 3 个 lg 值, 并且到第 28 日无增长; ② 真菌菌数在第 14 日, 相比初始菌数减少 1 个 lg 值, 并且到第 28 日无增长)。抑菌效力试验结果显示: 维血宁合剂中苯甲酸钠浓度为 0.026%、0.25% 时, 对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌均达到杀菌效果, 14 d 后无菌生长, 对鲁氏酵母菌和白念珠菌均达到抑菌效力标准要求。其中维血宁合剂中苯甲酸钠浓度为 0.25% 时, 对鲁氏酵母菌、白念珠菌的抑菌效果远大于苯甲酸钠浓度为 0.026%。

表 3 抑菌效力试验结果

Tab 3 Bacteriostatic efficacy test

菌株	苯甲酸钠 浓度 /%	减少的 lg 值	
		14 d	28 d
大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>)	0.026	8	未增加
	0.25	8	未增加
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	0.026	8	未增加
	0.25	8	未增加
鲁氏酵母菌 (<i>Saccharomyces rouxii</i> Boutroux)	0.026	3	未增加
	0.25	5	未增加
白念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)	0.026	3	未增加
	0.25	6	未增加

3 讨论

3.1 各企业样品中抑菌剂种类和含量分析

由“2.1.5”项下测定结果可见, 未添加抑菌剂之前, 维血宁合剂水提浓缩液和醇提清膏中就有少量苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯。维血宁合剂由多种中药制成, 以上抑菌剂可能由药材本身通过浸提带入成品中。21 批次维血宁合剂样品中测得对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯含量均极低, 各批次间差别不大, 故推测其均来自药材本身, 而非抑菌剂添加。各企业维血宁合剂样品中苯甲酸钠含量差别较大, 其中企业 C 和 D 样品中苯甲酸钠含量均值

低于 0.026%，企业 A 和 B 样品中苯甲酸钠含量均值分别为 0.0322% 和 0.0390%，这可能是企业未按处方添加，也有可能是药材本身带来的苯甲酸的影响。而企业 E 样品中苯甲酸钠含量均值为 0.2267%，远高于现行处方含量。这说明各企业并未严格按照药典处方进行投料，存在一定的随意性。

3.2 抑菌效力试验结果分析

抑菌效力试验表明，当维血宁合剂中苯甲酸钠浓度为 0.026%、0.25% 时，均能达到口服制剂的抑菌效力标准。因药物制剂中抑菌剂使用浓度应遵循最低有效原则，故按理论维血宁合剂中应用 0.026% 苯甲酸钠就可以达到产品抑菌要求。但通过企业调研发现，当维血宁合剂采用 100 ~ 150 mL 聚乙烯瓶包装时，添加 0.026% 苯甲酸钠常温贮存 6 个月后，就会因酸败产气导致瓶底突起。而采用 10 mL 安瓿瓶，因存在灭菌工序，添加 0.026% 苯甲酸钠常温贮存 6 个月后，无酸败现象。有文献称采用高温瞬时灭菌法，维血宁合剂中细菌数、霉菌数和酵母菌数明显下降至 10 以内，对营养物质影响较小，可延长保质期^[1]。故抑菌效力结果并不能确保在该浓度下，产品在货架期一直符合要求，还需要稳定性试验来佐证。维血宁合剂抑菌剂的使用浓度应结合产品本身的灭菌工艺、初始微生物负载、有效期、包装规格来综合考虑。

参考文献

[1] 袁武会. 维血宁合剂的灭菌工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(6): 563-565.

- [2] 曹瑞. 维血宁抗贫血药物质基础和质量评价研究[D]. 咸阳: 陕西中医学院, 2012.
- [3] 高敏, 石森林. 改善中药液体制剂稳定性的研究综述[J]. 中国药师, 2009, 12(5): 660-662.
- [4] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 802-803.
- [5] 甘永琦, 农浚, 朱荣, 等. 复方桔梗麻黄碱糖浆(II)的微生物污染状况分析及抑菌剂效力考察[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(11): 925-930.
- [6] 李秀婷. 糖浆剂、合剂中防腐剂测定[J]. 中国药业, 2005, 14(10): 55-56.
- [7] 李玲, 陈乃江, 姜燕. 高效液相色谱法测定对乙酰氨基酚口服溶液中苯甲酸钠含量[J]. 中国药业, 2016, 25(21): 63-65.
- [8] 肖璜, 戴翠, 杨美琴, 等. 国产滴眼中常用抑菌剂的应用分析与评价[J]. 药学研究, 2017, 36(9): 519-522.
- [9] 吴镁春, 王佳欢. UPLC 法检测四种口服液体制剂中苯甲酸钠的含量[J]. 广州化工, 2018, 46(23): 113-115.
- [10] 贺聪莹. 药品制剂中抑菌剂(防腐剂)效力测定及标准研究[D]. 西安: 西北大学, 2015.
- [11] 王银环, 张文婷, 王征南, 等. 健儿消食口服液中抑菌剂及抑菌效力研究[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 637-642.
- [12] 逢焕欢, 杨志宏, 宫丽婷, 等. 国产盐酸洛美沙星滴眼中抑菌剂使用现状分析[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(12): 2218-2224.
- [13] 张静, 罗跃华, 陈希, 等. 鲜竹沥抑菌效力研究及其抑菌剂使用情况分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 2088-2092.
- [14] 李辉, 周发友, 杨晓莉, 等. 中国药典 2020 年版抑菌效力检查法修订介绍[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 655-660.
- [15] 高翔, 余凡, 马鹏飞, 等. 小儿止咳糖浆苯甲酸钠处方添加量及抑菌效力评估[J]. 中国药业, 2021, 30(16): 71-74.

(收稿日期: 2023-07-02; 修回日期: 2023-08-20)

尼扎替丁分散片原辅料相容性研究

易必新¹, 周明², 石笑弋³, 谭英^{3*} (1. 湖南省药品审核查验中心, 长沙 410001; 2. 湖南省药品审评与不良反应监测中心, 长沙 410031; 3. 湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001)

摘要: **目的** 采用 HPLC-MS/MS 法考察尼扎替丁分散片中原辅料相容性。**方法** 将尼扎替丁原料药与各种辅料混合后, 通过稳定性影响因素试验, 采用 HPLC-MS/MS 法考察尼扎替丁中 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA) 含量的变化。**结果** 尼扎替丁分散片中羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素、硬脂酸镁、交联聚维酮、包衣粉对 NDMA 无促进作用。经碱水洗至中性的微晶纤维素比正常的微晶纤维素更能抑制尼扎替丁中 NDMA 的产生。**结论** 处方中所使用的微晶纤维素应尽可能接近中性条件以降低制剂中 NDMA 的含量。

关键词: HPLC-MS/MS; 尼扎替丁分散片; NDMA; 辅料; 微晶纤维素

中图分类号: R94, R927 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-2947-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.021

Drug-excipient compatibility of nizatidine dispersible tablets

YI Bi-xin¹, ZHOU Ming², SHI Xiao-yi³, TAN Ying^{3*} (1. Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410001; 2. Hunan Center for Drug Evaluation and Adverse Drug Reactions, Changsha 410031; 3. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001)

Abstract: Objective To determine the drug-excipient compatibility of Nizatidine dispersible tablets by HPLC-MS/MS method. **Methods** Nizatidine was mixed with various excipients, before the accelerated stability tests. Change of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) content in nizatidine was determined by HPLC-MS/MS. **Results** Sodium carboxymethyl starch, low-substituted hydroxypropyl cellulose, magnesium stearate, crosslinked povidone and powder coating did not promote the production of NDMA in Nizatidine dispersible tablets. The neutral microcrystalline cellulose washed with alkaline water better inhibited the production of NDMA in nizatidine dispersible tablets than normal microcrystalline cellulose. **Conclusion** Microcrystalline cellulose close to neutral conditions in the prescription is recommended is to reduce the content of NDMA.

Key words: HPLC-MS/MS; nizatidine dispersible tablet; *N*-nitrosodimethylamine; excipient; microcrystalline cellulose

N-亚硝基二甲胺 (NDMA), 又名 *N,N*-二甲基亚硝胺, 在世界卫生组织公布的致癌物清单中属于 2A 类致癌物^[1-5]。2020 年 4 月 1 日, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 要求药品制造商立即从美国市场撤回所有雷尼替丁产品, 包括处方药和非处方药, 原因是调查发现雷尼替丁药品中含有致癌物 NDMA, 而且当储藏温度高于室温时某些雷尼替丁药品中 NDMA 的含量会随着时间的延长而持续增加^[6-9]。尼扎替丁与雷尼替丁结构类似, 均为 H₂ 受体拮抗剂, 需严格控制 NDMA 的量, 每日最大摄入量/剂量控制在 96 ng 以内^[10-15]。根

据尼扎替丁的使用说明书, 尼扎替丁每日最大服用量为 300 mg, 故 NDMA 的限度为 0.32 ppm。本文对尼扎替丁分散片 (处方组成见表 1) 中尼扎替丁与辅料以及各辅料之间进行原辅料相容性试验, 通过 HPLC-MS/MS 法考察尼扎替丁中 NDMA 含量的变化, 为产品安全性的提高以及企业处方的优化提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC/MS-8050 液相色谱/质谱联用仪 (三重四极杆) (日本岛津), XP205 电子分析天平 (瑞士

作者简介: 易必新, 男, 副主任药师, 主要从事药物分析与质量标准研究, email: 48348469@qq.com *通信作者: 谭英, 女, 药师, 主要从事药物分析与质量标准研究, email: 1529978595@qq.com

表 1 尼扎替丁分散片处方组成

Tab 1 Formulation of Nizatidine dispersible tablets

原辅料	处方量(1000 片)
尼扎替丁	150 g
微晶纤维素	90 g
低取代羟丙纤维素	10 g
羧甲基淀粉钠	8 g
硬脂酸镁	1.3 g
交联聚维酮	适量
包衣材料(胃溶型薄膜包衣预混剂)	5.2 g
50%乙醇溶液	65 mL

梅特勒-托利多), 150TPST 强光稳定性试验箱、Labonco-250GS 药品稳定性试验箱(北京 Labonco), Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore)。

1.2 试药

尼扎替丁原料药(海南沙汀宁制药有限公司, 批号: 210301), 微晶纤维素(湖南九典宏阳制药有限公司, 批号: TF47201007), 羧甲基淀粉钠(安徽山河药用辅料股份有限公司, 批号: 200330), 低取代羟丙纤维素、硬脂酸镁、交联聚维酮(湖州展望药业有限公司), 胃溶型薄膜包衣预混剂(北京英茂药业有限公司), 纯水(超纯水机制备), 甲醇、甲酸均为色谱纯, NDMA(中国食品药品检定研究院, 批号: 510166-201902, 纯度: 97.8%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

参照中检化药函[2019]722号“关于印发替丁类药物中N-亚硝基二甲胺推荐检测方法的函”中提供的检测方法, 确定色谱条件如下: 色谱柱为ACE EXCEL 3 C₁₈-AR(4.6 mm×150 mm, 3 μm); 流动相A为0.1%甲酸的水溶液, 流动相B为0.1%甲酸的甲醇溶液, 按表2进行线性梯度洗脱; 流速为0.8 mL·min⁻¹; 柱温为40℃; 进样器温度为10℃; 进样量为5 μL。

表 2 梯度洗脱

Tab 2 Gradient elution

时间/min	流动相 A/%
0~1	95
1~2	95~87
2~6	87
6~6.1	87~0
6.1~10	0
10~10.1	0~95
10.1~14	95

2.2 质谱条件

离子源: 大气压化学电离源(APCI); 采集方式: 正离子模式; 干燥气温度: 300℃; 干燥气流量: 5 L·min⁻¹; 雾化器流速: 3 L·min⁻¹; 接口电压: 4.5 kV; 接口温度: 300℃; 扫描模式:

MRM; 碰撞能量: 16 V (*m/z* 74.95 → *m/z* 43.05), 16 V (*m/z* 74.95 → *m/z* 58.10)。

2.3 原辅料相容性样品制备

取尼扎替丁原料及相应辅料按表3进行配比, 配比后的各批次样品分别于高温(60℃)、光照(4500 lx)、高湿(75%)条件下放置5、10 d后, 取样进行研究。

表 3 原辅料配比情况

Tab 3 Drug-excipient ratio

批号	原辅料配比情况
210301	尼扎替丁
210305-2	尼扎替丁-微晶纤维素(碱水洗至中性)=1:5
210305-3	尼扎替丁-低取代羟丙基纤维素=20:1
210305-4	尼扎替丁-羧甲基淀粉钠=20:1
210305-5	尼扎替丁-硬脂酸镁=20:1
210305-6	尼扎替丁-交联聚维酮=20:1
210305-7	尼扎替丁-胃溶型薄膜包衣预混剂=20:1
210305-8	尼扎替丁-微晶纤维素(通用型)=1:5
210305-9	尼扎替丁-微晶纤维素(102型)=1:5

2.4 溶液制备与样品测定

2.4.1 供试品溶液 取“2.3”项下约相当于原料300 mg的原辅料相容性样品, 精密称定, 置10 mL量瓶中, 加水振摇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液。

2.4.2 线性溶液 取NDMA约100 mg, 精密称定, 加水溶解并定量稀释制成每1 mL中约含1、2、5、10、50、100、500 ng的溶液, 即得线性1~7溶液。

2.4.3 样品测定 精密量取供试品溶液、对照品溶液各5 μL注入液相色谱-质谱联用仪, 记录色谱图。对照品溶液以质量浓度对主峰面积作标准曲线, 得线性回归方程: $y = 5.142 \times 10^3 x - 1.797 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。

2.4.4 定量限和检测限 取“2.4.2”项下线性1溶液作为定量限溶液, 精密量取3 mL, 置10 mL量瓶中, 加水稀释至刻度, 作为检测限溶液。分别设定量限及检测限 $S/N = 10$ 、 $S/N = 3$, 结果NDMA的定量限为1.02 ng·mL⁻¹, 检测限为0.31 ng·mL⁻¹(折算成检测限为0.0103 ppm)。

2.5 影响因素试验

采用HPLC-MS/MS法对样品进行分析, 从表4结果可见210305-3、210305-4、210305-5、210305-6、210305-7批次在高温、光照、高湿的条件下经0、5、10 d检测到的NDMA含量与210301批次(原料)相比无明显变化, 表明低取代羟丙基纤维素、羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁、交联聚维酮与胃溶型薄膜包衣预混剂对尼扎替丁中NDMA的产生无促进作用; 高温和光照条件下210305-2批次检测到的NDMA

含量明显低于 210305-8、210305-9 批次，表明经碱水洗至中性的微晶纤维素比正常的微晶纤维素更能抑制尼扎替丁中 NDMA 的产生。

表 4 尼扎替丁与各辅料相容性试验结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 4 Compatibility of nizatidine and various excipients ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

批号	条件	0 d	5 d	10 d
210301	高温	0.81	0.60	0.90
	光照		0.63	1.83
	高湿		0.51	未检出
210305-2	高温	未检出	未检出	1.89
	光照		2.52	3.15
	高湿		未检出	0.24
210305-3	高温	1.92	1.62	2.04
	光照		1.35	1.86
	高湿		0.93	0.27
210305-4	高温	0.66	0.90	1.05
	光照		0.51	1.65
	高湿		0.48	1.65
210305-5	高温	未检出	0.42	0.69
	光照		0.60	1.53
	高湿		未检出	0.39
210305-6	高温	0.81	1.02	1.11
	光照		1.74	2.49
	高湿		0.69	0.60
210305-7	高温	未检出	0.45	1.50
	光照		0.57	2.04
	高湿		未检出	0.27
210305-8	高温	5.19	1.50	3.72
	光照		3.27	4.92
	高湿		未检出	0.45
210305-9	高温	2.58	2.34	36.3
	光照		4.08	6.24
	高湿		0.75	0.27

2.6 加速试验和长期试验

采用市售铝塑加防潮袋包装，进行加速试验 [(40±2) °C, (75±5) % RH]，长期稳定性试验 [(30±2) °C, (60±5) % RH]，结果 NDMA 均未检出。

3 讨论

本研究中尼扎替丁与各辅料相容性试验结果表明，尼扎替丁分散片中羧甲基淀粉钠、低取代羟丙基纤维素、硬脂酸镁、交联聚维酮、胃溶型薄膜包衣预混剂对 NDMA 无促进作用。经碱水洗至中性的微晶纤维素比正常的微晶纤维素更能抑制尼扎替丁中 NDMA 的产生，因此处方中所使用的微晶纤维素应尽可能接近中性条件。本研究可为尼扎替丁分散片生产企业处方工艺的优化，产品 NDMA 含量的控制和安全性提高提供一定参考。

参考文献

- [1] US Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS), Chemical Assessment Summary *N*-nitrosodimethylamine, CASRN 62-75-9, 2019 [EB/OL]. [2020-01-12]. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/045_summary.pdf.
- [2] US Environmental Protection Agency. Technical Fact Sheet *N*-nitroso-dimethylamine (NDMA) [EB/OL]. [2020-01-12]. https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/firfactsheet_contaminant_ndma_january_2014_final.pdf.
- [3] Sörgel F, Kinzig M, Abdel-Tawab M, et al. The contamination of valsartan and other sartans, part 1: new findings [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 172: 395-405.
- [4] Pottegård A, Kristensen KB, Ernst MT, et al. Use of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) contaminated valsartan products and risk of cancer: danish nationwide cohort study [J]. *BMJ*, 2018, 362: k3851.
- [5] 吕光, 林肖惠. 药物中 NDMA 的健康危害及检测技术的研究进展 [J]. *职业与健康*, 2021, 37 (12): 1720-1723.
- [6] 侯金凤, 李珉, 寇晋萍, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定缙沙坦原料中 4 种亚硝胺类基因毒性杂质 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56 (10): 842-848.
- [7] 魏志雄, 刘丹丹, 蓝明雄, 等. 液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定雷尼替丁及其制剂中的痕量 *N*-亚硝基二甲胺 [J]. *中国当代医药*, 2022, 29 (7): 15-19.
- [8] 于颖洁, 黄海伟, 张龙浩, 等. 高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定盐酸雷尼替丁和尼扎替丁中 *N*-亚硝基二甲胺 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41 (06): 1019-1023.
- [9] 于颖洁. 药物中 *N*-亚硝胺类杂质的检测方法研究 [D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2021.
- [10] 章为, 王晓菲, 易必新, 等. UPLC-APCI-MS/MS 法测定二甲双胍格列吡嗪片中 *N*-亚硝基二甲胺 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (9): 1568-1571.
- [11] 冯雨薇, 袁军, 刘峰, 等. LC-MS/MS 法测定尼扎替丁原料药中的 *N*-亚硝基二甲胺和 *N*-亚硝基二乙胺 [J]. *华西药理学杂志*, 2021, 36 (2): 202-205.
- [12] 魏志雄, 刘丹丹, 蓝明雄, 等. 液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定雷尼替丁及其制剂中的痕量 *N*-亚硝基二甲胺 [J]. *中国当代医药*, 2022, 29 (7): 15-19.
- [13] 杨越蕊, 郑枫, 蔡浒, 等. LC-MS/MS 法测定三甲基间苯三酚原料药中 *N*-亚硝基二甲胺和 *N*-亚硝基二乙胺的含量 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (2): 405-409.
- [14] 高杨, 梅丹, 张钰宣, 等. 国家医保目录与其他药品目录收录抗胃酸药品差异分析 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2021, 9 (12): 49-53.
- [15] 马春艳, 段琼, 高晋梅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定改善胃肠道功能类食品及中成药中非法添加的 15 种化学药物 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12 (12): 4998-5006.

(收稿日期: 2023-08-04; 修回日期: 2023-09-05)

瓦草中的化学成分及其抗炎活性研究

侯士鑫¹, 杜昆泽¹, 常艳旭¹, 周福军^{2*}, 房士明^{1*} (1.天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 301617; 2. 中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300110)

摘要: 目的 研究瓦草中的化学成分及其抗炎活性。方法 应用硅胶、ODS 及高效液相等多种色谱法对提取物进行分离纯化, 并通过核磁共振和质谱技术鉴定化合物的结构。采用环氧合酶-2 (COX-2) 试剂盒对分离得到的单体化合物进行抗炎活性筛选。结果 从瓦草的 70% 乙醇提取物中分离鉴定了 8 个单体化合物, 包括 5 个三萜皂苷类化合物 [sinocrassuloside VII (1)、sinocrassuloside VI (2)、sinocrassuloside IX (3)、sinocrassuloside VIII (4)、sinocrassuloside X (5)]; 2 个蜕皮激素类化合物 [蜕皮激素 (6)、蜕皮激素-3-O- α -D-甘露糖 (7)] 及 1 个吡伯啉生物碱类化合物 [1-乙酰基-3-甲酯基- β -吡啉 (8)], 其中, 化合物 7 为新化合物, 化合物 8 为首次从蝇子草属植物中分离得到。化合物 3 和 7 的抗炎活性较强, IC_{50} 值分别为 $9.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6.70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 瓦草化学成分具有多样性, 且分离出来的单体成分均具有一定的抗炎活性。

关键词: 瓦草; 化学成分; 抗炎活性

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2950-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.022

Chemical constituents in *Silene viscidula* and their anti-inflammatory activity

HOU Shi-xin¹, DU Kun-ze¹, CHANG Yan-xu¹, ZHOU Fu-jun^{2*}, FANG Shi-ming^{1*} (1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicinal Chemistry and Analytical Chemistry of Tianjin, Tianjin 301617; 2. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medicine Sciences, Tianjin 300110)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents and anti-inflammatory activities of *Silene viscidula*. **Methods** The extracts were isolated and purified by silica gel, ODS and HPLC, and their structures were identified by NMR and MS. The anti-inflammatory activity of those constituents was screened by COX-2. **Results** Totally 8 compounds were isolated and identified from 70% ethanol extract of *Silene viscidula*, including five triterpenoid saponins: sinocrassuloside VII (1), sinocrassuloside VI (2), sinocrassuloside IX (3), sinocrassuloside VIII (4), and sinocrassuloside X (5); two ecdystin compounds: hydroxyecdysone (6), hydroxyecdysone-3-O- α -D-mannose (7); one carboline alkaloid compound: 1-acetyl-3-methoxycarbonyl- β -carboline (8). Compound 7 was a new compound and compound 8 was first isolated from the genus of *Silene*. Compounds 3 and 7 had strong anti-inflammatory activities, with IC_{50} values of $9.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $6.70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** There are various chemical constituents in *Silene viscidula*, and the isolated compounds show certain anti-inflammatory activity.

Key words: *Silene viscidula*; chemical component; anti-inflammatory activity

蝇子草属 (*Silene*) 广泛分布于北半球温带和亚热带山地, 共有 800 余种, 是石竹科 (Caryophyllace-

ae) 的最大属^[1]。该属植物所含化学成分复杂, 以蜕皮激素类化合物以及皂苷类化合物为主, 其中蜕皮

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (No.2019YFC1711000)。

作者简介: 侯士鑫, 男, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制研究, email: zyhoux@163.com *通信作者: 房士明, 男, 副研究员, 主要从事药效物质基础研究, email: fang_shiming@163.com; 周福军, 女, 副研究员, 主要从事中药新药研究, email: zhoufj@tjipr.com

激素是该属植物的标志性化合物, 具有含量丰富、活性显著的特点^[2], 但是目前国内外对于蝇子草属植物中其他类型的化合物研究较少^[3]。

瓦草为石竹科蝇子草属植物滇白前 (*Silene viscidula* Franch.) 的干燥根^[4], 具有清热、镇痛的功效, 在云南民间广泛使用。其化学成分主要包括皂苷类化合物^[5]、蜕皮激素类化合物^[6], 药理学研究表明瓦草中的五环三萜皂苷具有治疗类风湿关节炎和降血糖的作用, 对于风湿疼痛和 2 型糖尿病具有很好的治疗效果^[7]。但是, 目前对于其化学成分的研究尚不深入, 并且对于瓦草中单体化合物抗炎活性的研究较少, 因此, 阐明瓦草的化学成分及抗炎活性对其进一步开发利用具有重要意义。本文对瓦草的 70% 乙醇提取物进行化学成分研究, 共分离鉴定了 8 个单体化合物, 分别为 sinocrassuloside VII (1)、sinocrassuloside VI (2)、sinocrassuloside IX (3)、sinocrassuloside VIII (4)、sinocrassuloside X (5)、蜕皮激素 (6)、蜕皮激素-3-*O*- α -D-甘露糖 (7) 及 1-乙酰基-3-甲酯基- β -咔啉 (8)。其中, 化合物 7 为新化合物, 化合物 8 为首次从蝇子草属植物中分离得到, 现报道如下。

1 材料

UHPLC-Q-TOF-MS (UHPLC: Agilent 1290 UHPLC; MS: Agilent 6546 Q-TOF mass spectrometer, 美国 Agilent 公司); 超导核磁共振波谱仪 (Burker 500 NMR, 德国 Bruker 公司); 多功能酶标仪 (Synergy NEO, 美国 BioTek 公司)。大孔吸附树脂 (净品级, 天津海光化工有限公司); 正相色谱用硅胶 (48 ~ 75 μ m, 青岛海洋化工厂); 反相 ODS (Chromatorex ODS MB, 40 ~ 75 μ m, 日本 Fuji Silisia Chemical 公司); 高效液相色谱法 (HPLC) 用分析柱及制备柱 [Cosmosil 5C₁₈-MS-柱 (250 mm \times 4.6 mm; 250 mm \times 20 mm, 5 μ m; 250 mm \times 10 mm, 5 μ m), 日本 Nacalai Tesque 公司; Kaseisorb LC NH₂-60-5 (4.6 mm \times 250 mm), 日本 Tokyo Kasei Co., Ltd.]; 氘代甲醇 (CD₃OD)、氘代三氯甲烷 (CDCl₃) 等氘代试剂 (北京崇熙科技孵化器公司); 分析及色谱纯二氯甲烷、正丁醇、甲醇、乙腈、冰乙酸等试剂 (天津康科德科技有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO) (北京索莱宝有限公司); 薄层色谱高效硅胶 GF254 (天津思利达科技有限公司); D-甘露糖 (中国食品药品检定研究院); 环氧化酶-2 (COX-2) 抑制剂筛选试剂盒 [碧云天生物科技有限公司, 内含阳性药塞来昔布 (Celecoxib)]; 96 孔全黑酶标板 (Corning, 美国)。

瓦草购买于云南省, 由天津中医药大学常艳旭教授鉴定为石竹科蝇子草属植物滇白前 (*Silene viscidula* Franch.) 的干燥根。样本保存于天津中医药大学中医药研究院。

2 提取分离

瓦草 (25.0 kg) 经 2 倍量 70% 乙醇溶液渗漉提取 4 次, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得到浸膏 9.3 kg。取上述浸膏 (9.0 kg) 用水分散后经二氯甲烷与水饱和正丁醇分别萃取 3 次, 分别得到二氯甲烷萃取物 (68.5 g) 和正丁醇萃取物 (632.4 g)。正丁醇萃取物 (632.4 g) 经 D101 大孔吸附树脂色谱柱分离 (H₂O \rightarrow 60% 乙醇 \rightarrow 95% 乙醇), 分别得到了 60% 乙醇洗脱物 (264.3 g) 和 95% 乙醇洗脱物 (101.0 g)。对大孔树脂 95% 乙醇洗脱物进行 ODS 柱色谱分离得到 1 个组分。经 pHPLC 分离制备 [甲醇-1% 乙酸 (78 : 22, *V/V*)], 得到化合物 1 (135.0 mg, *t_R* 27.0 min) 和化合物 2 (300.5 mg, *t_R* 20.1 min); 对大孔树脂 60% 乙醇洗脱物进行硅胶柱色谱分离得到 10 个组分, 其中第 6 个组分再经 ODS 柱色谱分离得到 5 个组分, 组分 2 经 pHPLC 分离制备 [乙腈-1% 乙酸 (50 : 50, *V/V*)], 得到化合物 3 (20.8 mg, *t_R* 27.3 min) 和化合物 4 (18.0 mg, *t_R* 20.2 min), 组分 3 经 pHPLC 分离制备 [乙腈-1% 乙酸 (55 : 45, *V/V*)], 得到化合物 5 (8.8 mg, *t_R* 23.0 min), 组分 4 经 pHPLC 分离制备 [乙腈-1% 乙酸 (17 : 83, *V/V*), Cosmosil 5C₁₈-MS- II], 得到化合物 6 (3.0 g, *t_R* 23.2 min), 组分 5 经 pHPLC 分离制备 [乙腈-1% 乙酸 (10 : 90, *V/V*)], 得到化合物 7 (12.5 mg, *t_R* 22.7 min), 对二氯甲烷部位进行 ODS 柱色谱分离得到 8 个组分, 组分 7 经 pHPLC 分离制备 [甲醇-1% 乙酸 (70 : 30, *V/V*)], 得到化合物 8 (11.5 mg, *t_R* 21.5 min)。化合物 1 ~ 8 的结构如图 1 所示。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末。[α]_D²⁵ - 17.6 (*c* 0.125, MeOH), HR-ESI-Q-TOF-MS 给出其准分子离子峰 *m/z* 1449.6321 [*M* - H]⁻ (calcd for C₇₁H₁₀₁O₃₁, *M_r* = 1449.6327), 确定其分子式为 C₇₁H₁₀₂O₃₁。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 1.09、1.71 (2H, both m, H₂-1), 1.77 (2H, m, H₂-2), 3.71 (1H, m, H-3), 1.31 (1H, m, overlapped, H-5), 0.91 (2H, m, H₂-6), 1.95 (2H, m, overlapped, H₂-7), 1.73 (1H, m, H-9), 1.93 (2H, m, H₂-11), 5.33 (1H, m, H-12), 1.18、1.38 (2H, both m,

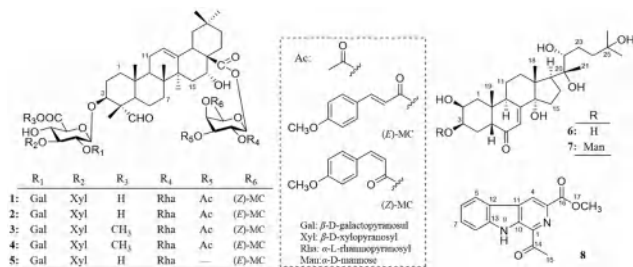


图 1 化合物 1 ~ 8 的结构

Fig 1 Structures of compounds 1 ~ 8

H₂-15), 3.35 (1H, m, H-16), 2.96 (1H, m, H-18), [1.06 (1H, m), 2.31 (1H, t, *J* = 13.0 Hz), H₂-19], [1.31 (1H, m, overlapped), 1.52 (1H, m), H₂-21], 1.77、1.95 (2H, both m, overlapped, H₂-22), 1.14 (3H, s, H₃-24), 0.99 (3H, s, H₃-25), 0.81 (3H, s, H₃-26), 1.40 (3H, s, H₃-27), 0.89 (3H, s, H₃-29), 0.98 (3H, s, H₃-30), 4.80 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1'), 4.47 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), 3.72、3.77 (2H, both m, H₂-6''), 4.58 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1'''), 5.51 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'''), 1.11 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₃-6'''), 4.94 (1H, brs, H-1'''), 1.22 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₃-6'''), 2.00 (3H, s, H₃-2'''), 5.94 (1H, d, *J* = 13.0 Hz, H-2'''), 7.00 (1H, d, *J* = 13.0 Hz, H-3'''), 7.77 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-5''', 9'''), 6.92 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-6''', 8'''), 3.83 (3H, s, H₃-7'''). 其 ¹H NMR、¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz, 见表 1) 谱数据与文献^[8-9]基本一致, 鉴定该化合物为 sinocrassuloside VI。

化合物 2: 白色粉末。[α]_D²⁵ + 16.4 (*c* 0.110, MeOH), HR-ESI-Q-TOF-MS 给出其准分子离子峰 *m/z* 1449.6318 [M - H]⁻ (calcd for C₇₁H₁₀₁O₃₁, *M_r* = 1449.6327), 确定其分子式为 C₇₁H₁₀₂O₃₁。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 1.07、1.60 (2H, both m, H₂-1), 1.69 (2H, m, H₂-2), 3.69 (1H, m, H-3), 1.29 (1H, m, H-5), 0.89 (2H, m, H₂-6), 1.93 (2H, m, overlapped, H₂-7), 1.71 (1H, m, H-9), 1.91 (2H, m, H₂-11), 5.40 (1H, m, H-12), 1.20、1.39 (2H, both m, H₂-15), 3.35 (1H, t, *J* = 10.0 Hz, H-16), 3.00 (1H, dd, *J* = 14.2、4.4 Hz, H-18), [1.08 (1H, m), 2.33 (1H, t, *J* = 13.5 Hz), H₂-19], 1.31、1.54 (2H, both m, H₂-21), [1.78 (1H, m), 1.93 (1H, m, overlapped), H₂-22], 1.10 (3H, s, H₃-24), 0.90 (3H, s, H₃-25), 0.82 (3H, s, H₃-26), 1.40 (3H,

s, H₃-27), 0.90 (3H, s, H₃-29), 1.00 (3H, s, H₃-30), 4.80 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1'), 4.47 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), 3.71、3.77 (2H, both m, H₂-6''), 4.58 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1'''), 5.56 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'''), 1.13 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H₃-6'''), 4.97 (1H, brs, H-1'''), 1.24 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H₃-6'''), 2.04 (3H, s, H₃-2'''), 6.48 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-2'''), 7.72 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-3'''), 7.60 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5''', 9'''), 6.48 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6''', 8'''), 3.84 (3H, s, H₃-7'''). 其 ¹H NMR、¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz, 见表 1) 谱数据与文献^[8-9]基本一致, 鉴定该化合物为 sinocrassuloside VI。

化合物 3: 白色粉末。[α]_D²⁵ - 26.7 (*c* 0.088, MeOH), HR-ESI-Q-TOF-MS 给出其准分子离子峰 *m/z* 1463.6478 [M - H]⁻ (calcd for C₇₂H₁₀₃O₃₁, *M_r* = 1463.6483), 确定其分子式为 C₇₂H₁₀₄O₃₁。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 1.10、1.71 (2H, both m, H₂-1), 1.70 (2H, m, H₂-2), 3.69 (1H, m, H-3), 1.31 (1H, m, H-5), 0.91 (2H, m, H₂-6), 1.93 (2H, m, overlapped, H₂-7), 1.72 (1H, m, H-9), 1.92 (2H, m, H₂-11), 5.33 (1H, m, H-12), 1.20、1.39 (2H, both m, H₂-15), 3.35 (1H, m, H-16), 2.96 (1H, dd, *J* = 14.0、3.5 Hz, H-18), [1.08 (1H, m), 2.31 (1H, t, *J* = 13.5 Hz), H₂-19], 1.32、1.53 (2H, both m, H₂-21), [1.78 (1H, m), 1.93 (1H, m, overlapped), H₂-22], 1.14 (3H, s, H₃-24), 1.00 (3H, s, H₃-25), 0.81 (3H, s, H₃-26), 1.40 (3H, s, H₃-27), 0.89 (3H, s, H₃-29), 0.98 (3H, s, H₃-30), 4.79 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-1'), 3.76 (3H, s, 6'-OCH₃), 4.47 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1''), [3.71 (1H, dd, *J* = 11.0、5.5 Hz), 3.77 (1H, m), H₂-6''], 4.57 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'''), 5.51 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'''), 1.11 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H₃-6'''), 4.93 (1H, brs, H-1'''), 1.23 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H₃-6'''), 2.00 (3H, s, H₃-2'''), 5.94 (1H, d, *J* = 13.0 Hz, H-2'''), 7.00 (1H, d, *J* = 13.0 Hz, H-3'''), 7.77 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5''', 9'''), 6.92 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6''', 8'''), 3.83 (3H, s, 7'''-OCH₃)。其 ¹H NMR、¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz, 见表 1) 谱数据与文献^[8]基本一致, 鉴定该化合物为 sinocrassuloside IX。

表 1 化合物 1 ~ 5 的 ^{13}C NMR 数据
 Tab 1 ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) data of compounds 1 ~ 5

No.	1	2	3	4	5	No.	1	2	3	4	5
1	39.3	39.2	39.2	39.2	39.2	3'-O- β -D-Xyl					
2	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	1'''	104.9	105.0	105.0	104.9	105.0
3	86.7	86.7	86.5	86.5	86.5	2'''	75.3	75.3	75.2	75.2	75.3
4	56.2	56.1	56.2	56.1	56.2	3'''	78.2	78.2	78.3	78.2	78.3
5	48.7	48.7	48.7	48.7	48.7	4'''	70.8	70.8	70.8	70.8	70.8
6	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	5'''	67.2	67.2	67.2	67.1	67.2
7	31.8	31.7	31.7	31.7	31.7	28-O- β -D-Fuc					
8	41.2	41.3	41.3	41.2	41.3	1''''	95.0	95.1	95.1	95.1	95.4
9	48.0	48.0	48.1	48.0	48.1	2''''	71.9	71.9	71.9	71.9	72.1
10	37.1	37.1	37.2	37.1	37.1	3''''	75.2	75.0	75.0	75.0	75.1
11	24.6	24.7	24.6	24.6	24.7	4''''	71.5	71.5	71.5	71.5	71.4
12	123.3	123.3	123.3	123.3	123.3	5''''	70.8	70.8	70.8	70.7	70.6
13	144.6	144.7	144.7	144.6	144.7	6''''	16.5	16.5	16.4	16.5	16.9
14	42.8	42.9	42.9	42.8	42.9	3'-O- β -D-Xyl					
15	36.5	36.4	36.5	36.4	36.5	1'''	104.9	105.0	105.0	104.9	105.0
16	73.7	73.7	73.8	73.7	73.9	2'''	75.3	75.3	75.2	75.2	75.3
17	50.3	50.3	50.3	50.3	50.3	3'''	78.2	78.2	78.3	78.2	78.3
18	42.4	42.6	42.5	42.5	42.6	4'''	70.8	70.8	70.8	70.8	70.8
19	48.0	48.1	48.1	48.1	48.1	5'''	67.2	67.2	67.2	67.1	67.2
20	31.4	31.4	31.4	31.4	31.4	28-O- β -D-Fuc					
21	33.4	33.5	33.6	33.6	33.6	1''''	95.0	95.1	95.1	95.1	95.4
22	36.5	36.5	36.5	36.4	36.5	2''''	71.9	71.9	71.9	71.9	72.1
23	210.7	210.7	210.7	210.7	210.7	3''''	75.2	75.0	75.0	75.0	75.1
24	10.9	10.9	10.9	10.9	10.9	4''''	71.5	71.5	71.5	71.5	71.4
25	16.4	16.5	16.5	16.5	16.5	5''''	70.8	70.8	70.8	70.7	70.6
26	18.1	18.2	18.1	18.2	18.4	6''''	16.5	16.5	16.4	16.5	16.9
27	27.3	27.3	27.2	27.3	27.2	2''''-O- α -L-Rha					
28	177.2	177.2	177.2	177.2	177.2	1''''	102.4	102.5	102.5	102.5	102.3
29	33.5	33.5	33.6	33.5	33.5	2''''	71.8	71.9	71.8	71.9	72.0
30	25.2	25.3	25.2	25.3	25.3	3''''	72.0	72.0	72.0	72.0	72.2
3-O- β -D-GlcA						4''''	73.6	73.6	73.6	73.5	73.6
1'	103.8	103.8	103.9	103.8	103.8	5''''	71.4	71.4	71.4	71.4	71.3
2'	78.2	78.2	78.2	78.2	78.1	6''''	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4
3'	86.3	86.3	86.4	86.3	86.4	3''''-O-Ac					
4'	71.0	71.1	71.1	71.0	71.0	1''''	171.5	171.6	171.5	171.6	—
5'	76.5	76.5	76.4	76.3	76.5	2''''	21.3	21.2	21.3	21.2	—
6'	172.2	172.1	170.8	170.8	172.0	4''''-O-MC					
Me	—	—	52.9	53.0	—	1''''	167.5	168.4	167.5	168.4	168.9
2'-O- β -D-Gal						2''''	116.5	115.4	116.5	115.4	116.2
1''	104.4	104.5	104.6	104.5	104.5	3''''	145.9	147.3	146.0	147.2	146.6
2''	74.1	74.6	74.1	74.6	74.6	4''''	128.6	128.2	128.7	128.2	128.5
3''	75.4	75.4	75.3	75.4	75.4	5''''	133.7	131.3	133.7	131.3	131.2
4''	71.0	71.0	71.1	71.0	71.0	6''''	114.6	115.6	114.7	115.5	115.5
5''	76.8	76.8	76.9	76.8	76.8	7''''	162.3	163.5	162.4	163.4	163.3
6''	62.3	62.3	62.4	62.3	62.3	8''''	114.6	115.6	114.7	115.5	115.5
						9''''	133.7	131.3	133.7	131.3	131.2
						4-OCH ₃	55.9	56.2	55.9	56.0	56.0

化合物 4: 白色粉末。 $[\alpha]_D^{25} + 10.4$ (c 0.173, MeOH), HR-ESI-Q-TOF-MS 给出其准分子离子峰 m/z 1463.6483 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{72}H_{103}O_{31}$, $M_r = 1463.6483$), 确定其分子式为 $C_{72}H_{104}O_{31}$ 。 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 1.06、1.60 (2H, both m, H_2-1), 1.69 (2H, m, H_2-2), 3.73 (1H, m, H_3-3), 1.29 (1H, m, H_3-5), 0.89 (2H, m, H_2-6), 1.94 (2H, m, overlapped, H_2-7), 1.70 (1H, m, H_2-9), 1.92 (2H, m, H_2-11), 5.40 (1H, m, H_2-12), 1.20、1.39 (2H, both m, H_2-15), 3.34 (1H, m, H_2-16), 3.01 (1H, dd, $J = 14.6$ 、 4.4 Hz, H_2-18), [1.09 (1H, m), 2.33 (1H, t, $J = 13.0$ Hz), H_2-19], 1.30、1.53 (2H, both m, H_2-21), [1.79 (1H, m), 1.94 (1H, m, overlapped), H_2-22], 1.11 (3H, s, H_3-24), 0.90 (3H, s, H_3-25), 0.81 (3H, s, H_3-26), 1.40 (3H, s, H_3-27), 0.90 (3H, s, H_3-29), 1.00 (3H, s, H_3-30), 4.79 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, $H-1'$), 3.78 (3H, s, $6'-OCH_3$), 4.49 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, $H-1''$), 3.72、3.77 (2H, both m, H_2-6''), 4.58 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, $H-1'''$), 5.56 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, $H-1''''$), 1.13 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H_3-6''''), 4.97 (1H, brs, $H-1''''$), 1.24 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H_3-6''''), 2.04 (3H, s, H_3-2''''''), 6.48 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, $H-2''''''$), 7.73 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, $H-3''''''$), 7.60 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, $H-5''''''$, $9''''''$), 6.98 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, $H-6''''''$, $8''''''$), 3.84 (3H, s, $7''''''-OCH_3$)。其 1H NMR、 ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz, 见表 1) 谱数据与文献^[8]基本一致, 鉴定该化合物为 sinocrassuloside VIII。

化合物 5: 白色粉末。 $[\alpha]_D^{25} + 7.8$ (c 0.150, MeOH), HR-ESI-Q-TOF-MS 给出其准分子离子峰 m/z 1407.6217 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{69}H_{99}O_{30}$, $M_r = 1407.6221$), 确定其分子式为 $C_{69}H_{100}O_{30}$ 。 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 1.02、1.51 (2H, both m, H_2-1), 1.66 (2H, m, H_2-2), 3.68 (1H, m, H_3-3), 1.28 (1H, m, H_3-5), 0.89 (2H, m, H_2-6), 1.94 (2H, m, overlapped, H_2-7), 1.68 (1H, m, H_2-9), 1.88 (2H, m, H_2-11), 5.40 (1H, m, H_2-12), 1.20、1.39 (2H, both m, H_2-15), 3.38 (1H, brd, $J = 10.0$ Hz, H_2-16), 3.01 (1H, dd, $J = 14.0$ 、 3.5 Hz, H_2-18), [1.07 (1H, m), 2.32 (1H, t, $J = 13.5$ Hz), H_2-19], 1.31、1.52 (2H, both m, H_2-21), [1.76 (1H, m), 1.94 (1H, m, overlapped), H_2-22], 1.09 (3H, s, H_3-

24), 0.86 (3H, s, H_3-25), 0.79 (3H, s, H_3-26), 1.39 (3H, s, H_3-27), 0.89 (3H, s, H_3-29), 1.00 (3H, s, H_3-30), 4.79 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, $H-1'$), 4.46 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, $H-1''$), 3.71、3.77 (2H, both m, H_2-6''), 4.58 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, $H-1'''$), 5.42 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, $H-1''''$), 1.07 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H_3-6''''), 5.23 (1H, brs, $H-1''''$), 1.26 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H_3-6''''), 6.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, $H-2''''''$), 7.70 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, $H-3''''''$), 7.59 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, $H-5''''''$, $9''''''$), 6.97 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, $H-6''''''$, $8''''''$), 3.83 (3H, s, $7''''''-OCH_3$)。其 1H NMR、 ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz, 见表 1) 谱数据与文献^[8]基本一致, 鉴定该化合物为 sinocrassuloside X。

化合物 6: 白色粉末 (甲醇)。 $[\alpha]_D^{25} + 79.2$ (c 0.053, MeOH)。HR-ESI-Q-TOF-MS 给出准分子离子峰 m/z 481.3203 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{27}H_{45}O_7$, $M_r = 481.3165$), 确定其分子式为 $C_{27}H_{44}O_7$ 。 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ [1.43 (1H, dd, $J = 12.9$ 、 12.5 Hz), 1.81 (1H, m, overlapped), H_2-1], 3.84 (1H, m, H_2-2), 3.95 (1H, m, H_2-3), 1.74 (2H, m, overlapped, H_2-4), 2.38 (1H, dd, $J = 12.9$ 、 4.2 Hz, H_2-5), 5.81 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H_2-7), 3.15 (1H, m, H_2-9), 1.70、1.80 (2H, both m, H_2-11), 1.87、2.11 (2H, both m, H_2-12), 1.60、1.97 (2H, both m, H_2-15), 1.73、1.97 (2H, both m, H_2-16), 2.39 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H_2-17), 0.89 (3H, s, H_3-18), 0.96 (3H, s, H_3-19), 1.19 (3H, s, H_3-21), 3.31 (1H, m, overlapped, H_2-22), 1.29、1.67 (2H, both m, H_2-23), [1.42 (1H, td, $J = 12.0$ 、 3.6 Hz), 1.81 (1H, m), H_2-24], 1.20 (3H, s, H_3-26), 1.20 (3H, s, H_3-27)。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ 37.2 (C-1), 68.7 (C-2), 68.5 (C-3), 32.8 (C-4), 51.7 (C-5), 206.5 (C-6), 122.1 (C-7), 168.0 (C-8), 35.1 (C-9), 39.3 (C-10), 21.5 (C-11), 32.5 (C-12), 48.5 (C-13), 85.2 (C-14), 31.8 (C-15), 21.5 (C-16), 50.5 (C-17), 18.1 (C-18), 24.4 (C-19), 77.9 (C-20), 21.1 (C-21), 78.4 (C-22), 27.3 (C-23), 42.4 (C-24), 71.3 (C-25), 29.0 (C-26), 29.7 (C-27)。以上与文献^[10]基本一致, 鉴定该化合物为蜕皮激素。

化合物 7: 淡黄色粉末 (甲醇), $[\alpha]_D^{25} + 57.5$ (c 0.080, MeOH), UV 显示该化合物在 244 nm

处有最大吸收, HR-ESI-Q-TOF-MS 给出准分子离子峰 m/z 687.3593 $[M + COOH]^-$ (calcd for $C_{34}H_{55}O_{14}$, $M_r = 687.3592$), 确定其分子式为 $C_{33}H_{54}O_{12}$ 。IR 吸收光谱提示其结构中存在羟基 (3382 cm^{-1})、双键 (1651 cm^{-1}) 及含氧糖苷键 (1060 cm^{-1})。该化合物经 $2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 水解, 水解产物用配有旋光检测器的 HPLC 分析 [分析色谱柱: Kaseisorb LC NH_2 -60-5 ($4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$); 流动相: 乙腈-水 (85:15, V/V); 流速: $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$], 通过与对照品比对在水解产物中发现了 D-甘露糖 (t_R 16.8 min) 的存在。分析其 $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) 和 HSQC 谱, 提示结构中除了 D-甘露糖信号外, 还存在 5 个甲基 [δ_H 0.89、0.98、1.195、1.187、1.20 (3H each, both s, H_3 -18, 19, 21, 26, 27)], 8 个亚甲基, 3 个连氧次甲基, 5 个季碳以及 1 个羰基 [δ_C 206.3 (C-6)], 通过与化合物 **6** 对比, 除 C-1, C-3, C-5 碳谱数据有微小差异以外, 其余氢谱和碳谱数据均与化合物 **6** 基本一致。结合水解糖分析结果初步判定其为化合物 **6** 的甘露糖苷。分析该化合物的 HMBC 谱, 发现 5.04 (1H, d, $J = 3.3\text{ Hz}$, H-1') 的氢信号与 79.5 (C-3) 碳信号存在相关信号, 确定了甘露糖连接在蜕皮激素 C-3 位。通过分析化合物的 1D 和 2D NMR 数据, δ [1.44 (1H, dd, $J = 13.2$ 、 12.5 Hz), 1.88 (1H, dd, $J = 13.2$ 、 4.0 Hz), H_2 -1], 3.86 (1H, m, H-2), 3.95 (1H, m, H-3), 1.75、1.94 (2H, both m, overlapped, H_2 -4), 2.31 (1H, dd, $J = 13.4$ 、 3.6 Hz , H-5), 5.82 (1H, brs, H-7), 3.14 (1H, m, H-9), 1.67、1.80 (2H, both m, H_2 -11), 1.88、2.14 (2H, both m, H_2 -12), 1.59、1.96 (2H, both m, H_2 -15), 1.73、1.98 (2H, both m, H_2 -16), 2.39 (1H, t, $J = 8.7\text{ Hz}$, H-17), 0.89 (3H, s, H_3 -18), 0.98 (3H, s, H_3 -19), 1.195 (3H, s, H_3 -21), 3.32 (1H, m, overlapped, H-22), 1.28、1.66 (2H, both m, H_2 -23), [1.43 (1H, td, $J = 12.6$ 、 3.8 Hz), 1.80 (1H, m), H_2 -24], 1.187 (3H, s, H_3 -26), 1.20 (3H, s, H_3 -27), 5.04 (1H, d, $J = 3.3\text{ Hz}$, H-1'), 3.79 (1H, m, overlapped, H-2'), 3.95 (1H, m, overlapped, H-3'), 3.80 (1H, m, overlapped, H-4'), 4.03 (1H, brt, $J = 6.1\text{ Hz}$, H-5'), 3.74 (2H, d, $J = 6.1\text{ Hz}$, H_2 -6')。 $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 39.0 (C-1), 69.0 (C-2), 79.5 (C-3), 32.2 (C-4), 53.0 (C-5),

206.3 (C-6), 122.1 (C-7), 168.5 (C-8), 35.2 (C-9), 39.3 (C-10), 21.6 (C-11), 32.0 (C-12), 48.5 (C-13, overlapped), 85.2 (C-14), 31.8 (C-15), 21.5 (C-16), 50.6 (C-17), 18.1 (C-18), 24.4 (C-19), 77.9 (C-20), 21.1 (C-21), 78.5 (C-22), 27.4 (C-23), 42.4 (C-24), 71.3 (C-25), 29.0 (C-26), 29.7 (C-27), 103.5 (C-1'), 71.8 (C-2'), 71.2 (C-3'), 70.9 (C-4'), 73.4 (C-5'), 62.9 (C-6')。因此该结构被鉴定为蜕皮激素-3- O - α -D-甘露糖。

化合物 **8**: 白色粉末。HR-ESI-Q-TOF-MS 给出其准分子离子峰 267.0780 $[M - \text{H}]^-$ (calcd for $C_{15}H_{11}N_2O_3$, $M_r = 267.0770$), 确定其分子式为 $C_{15}H_{12}N_2O_3$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.03 (H, s, H-4), 8.21 (1H, d, $J = 7.9\text{ Hz}$, H-5), 7.40 (1H, t, $J = 7.9\text{ Hz}$, H-6), 7.65 (1H, t, $J = 7.9\text{ Hz}$, H-7), 7.64 (1H, d, $J = 7.9\text{ Hz}$, H-8), 10.51 (1H, s, NH), 2.97 (3H, s, H_3 -15), 4.09 (3H, s, H_3 -18)。 $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 135.3 (C-1), 136.9 (C-3), 121.3 (C-4), 122.1 (C-5), 121.7 (C-6), 129.8 (C-7), 112.4 (C-8), 136.5 (C-10), 132.0 (C-11), 121.0 (C-12), 141.5 (C-13), 203.3 (C-14), 25.7 (C-15), 166.1 (C-16), 52.8 (C-18)。以上与文献^[11]基本一致, 鉴定该化合物为 1-乙酰基-3-甲酯基- β -咔啉。

4 抗炎活性筛选

4.1 溶液的配制

① 对照品溶液: 分别精密称取适量分离得到的 8 个单体化合物, 用 DMSO 溶解配制成质量浓度为 $2.0\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 然后用 DMSO 分别稀释至 1000、500、250、100、50、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 置于 4°C 冰箱备用。

② 阳性对照品溶液: 精确吸取塞来昔布 ($100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 适量, 用 DMSO 分别稀释至浓度为 100、50、25、10、5 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 置于 4°C 冰箱备用。

4.2 抗炎活性的测定

参考 COX-2 试剂盒使用说明, 对化合物 **1**~**8** 进行抗炎活性检测。使用 96 孔黑板设置对照组、100% 酶活性组和不同浓度的样品组, 每个浓度平行测定 3 次, 按照表 2 所示依次加入各溶液。加入样品后, 振荡混匀, 在 37°C 孵育 10 min。

表 2 96 孔黑板样品加入情况 (μL)
Tab 2 Sample addition of 96 well blackboard (μL)

试剂	空白组	100% 酶活性组	阳性抑制剂对照组	样品组
COX-2 Assay Buffer	80	75	75	75
COX-2 Cofactor 工作液	5	5	5	5
COX-2 工作液	—	5	5	5
样品溶剂	5	5	—	—
塞来昔布	—	—	5	—
样品溶液	—	—	—	5

孵育后在各孔中加入 COX-2 探针 5 μL, 再加入 COX-2 底物 5 μL, 振荡混匀, 37 °C 避光孵育 5 min 后进行荧光测定, 激发波长 560 nm, 发射波长 620 nm。计算阳性药塞来昔布的 IC_{50} 为 36.12 nmol · L⁻¹, 化合物 1 ~ 8 对 COX-2 抑制作用的 IC_{50} 值分别为 81.51、81.22、9.36、47.82、78.55、70.49、6.70、67.54 μmol · L⁻¹。

5 结果与讨论

本文采用多种色谱和波谱技术相结合的方法, 从瓦草中分离鉴定了 8 个单体化合物。通过 SciFinder 检索, 确定化合物 7 为新化合物, 化合物 8 首次从蝇子草属植物中分离得到, 进一步丰富了瓦草的化学物质基础。

本实验以化合物对 COX-2 酶的抑制率作为评价指标^[12], 对分离得到的 8 个单体化合物进行抗炎活性筛选, 发现 8 个化合物均具有不同程度的抗炎活性, 其中化合物 3 和 7 表现出较强的抗炎活性, 为瓦草的进一步开发和利用提供了方向。

参考文献

[1] 杨凤, 叶婧怡, 王焕冲. 中国石竹科蝇子草属一新记

录种——硬骨草叶蝇子草[J]. 西北植物学报, 2022, 42 (5): 884-887.

- [2] Olennikov ND. Ecdysteroids of *Silene repens* from Eastern Siberia [J]. Chem Nat Compd, 2019, 55 (4): 770-772.
- [3] 梁卓菲, 梁小飞, 吴国庆, 等. 蝇子草属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2021, 52 (7): 2184-2198.
- [4] 张冠庆. 瓦草皂苷抗炎镇痛活性研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2015.
- [5] Xu W, Wu JM, Zhu Z, et al. Pentacyclic triterpenoid saponins from *Silene viscidula* [J]. Helv Chim Acta, 2010, 93 (10): 2007-2014.
- [6] 金艺淑, 徐伟, 李玉山. 黏萼蝇子草蜕皮甾酮类成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28 (4): 269-271, 282.
- [7] Zhang CJ, Qiao SY, Wu JH, et al. A new insulin-sensitive enhancer from *Silene viscidula*, WPTS, treats type 2 diabetes by ameliorating insulin resistance, reducing dyslipidemia, and promoting proliferation of islet β cells [J]. Pharmacol Res, 2021, 165: e105416.
- [8] Zhao J, Nakamura N, Hattori M, et al. New triterpenoid saponins from the roots of *Sinocrassula asclepiadea* [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52 (2): 230-237.
- [9] 王童, 徐伟, 祝崢, 等. 瓦草化学成分研究 (I) [J]. 中国现代中药, 2009, 11 (1): 9-11, 15.
- [10] Budesínský M, Vokác K, Harmatha J, et al. Additional minor ecdysteroid components of *Leuzea carthamoides* [J]. Steroids, 2008, 73 (5): 502-514.
- [11] 王微, 袁琳, 顾雪竹, 等. 金铁锁中 1 个新 β- 咪啉生物碱 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (21): 3240-3242.
- [12] Talukder S, Ahmed KS, Hossain H, et al. *Fimbristylis aestivalis* Vahl: a potential source of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors [J]. Inflammopharmacology, 2022, 30 (6): 2301-2315.

(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-08-04)

青柏散对口腔溃疡模型大鼠的药效学研究

赵慧雯, 杨芮庚, 呼延铭, 赵锐帆, 雷丸, 潘雯, 张晓莉, 王济*, 冯斌* (军事口腔医学国家重点实验室, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 陕西省口腔生物工程技术研究中心, 第四军医大学口腔医院药剂科, 西安 710032)

摘要: **目的** 探讨青柏散对口腔溃疡模型大鼠的药效学作用。**方法** 将 126 只雄性 SD 大鼠随机均分为正常组, 模型组, 阳性药组, 青柏散低、中、高剂量组 (0.25、0.50、0.75 g·kg⁻¹)。每组取 18 只采用冰醋酸化学灼烧法建立口腔溃疡实验模型, 各药物组分别散布相应量药粉, 连续给药 4 d, 模型组和正常组不做任何处理。观察各组大鼠体质量变化以及创面愈合情况, 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察溃疡组织病理变化, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、白细胞介素 (IL)-2、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的含量。另每组取 3 只大鼠采用稳定开口法建立疼痛实验模型, Von Frey 法测定机械疼痛阈值。**结果** 与模型组相比, 给药组大鼠体质量下降的情况显著改善 ($P < 0.05$); 口腔溃疡区黏膜皮层明显修复, 溃疡部位炎性细胞浸润明显减少; 炎性因子 bFGF 和 IL-2 的含量显著增加 ($P < 0.05$), IL-6 和 TNF- α 的含量显著下降 ($P < 0.05$)。给药处理使大鼠口腔溃疡区机械疼痛阈值显著提高 ($P < 0.05$)。**结论** 青柏散可明显加快大鼠口腔溃疡的愈合, 减轻炎症反应并缓解疼痛程度。

关键词: 青柏散; 口腔溃疡; 药效学作用

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2957-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.023

Pharmacodynamics of Qingbai pulvis on oral ulcer in rat models

ZHAO Hui-wen, YANG Rui-geng, HU Yan-ming, ZHAO Rui-fan, LEI Wan, PAN Wen, ZHANG Xiao-li, WANG Ji*, FENG Bin* (State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi Engineering Research Center for Dental Materials and Advanced Manufacture, Department of Pharmacy, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

Abstract: Objective To determine the pharmacodynamics of Qingbai pulvis on oral ulcer in rat models. **Methods** Totally 126 male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a positive group, and Qingbai pulvis low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.25, 0.50, and 0.75 g · kg⁻¹). Eighteen rats in each group were used to induce the oral ulcer model by chemical burning with acetic acid. The administration groups were given corresponding medicine for 4 consecutive days, while the normal group and the model group had no treatment. The weight change and wound healing were observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the histopathological changes of oral ulcer, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the content of basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin (IL)-2, IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the ulcer tissues of rats. Another 3 rats in each group were used to induce a pain model by stable mouth opening method. Von Frey method was used to measure pain threshold. **Results** Compared with the model group, the weight loss was improved in

基金项目: 陕西省中医药管理局科研项目 (No.2021-ZZ-ZY001)。

作者简介: 赵慧雯, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事口腔制剂研发方面的研究, email: zhaohw928@163.com *通信作者: 王济, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事口腔制剂研发方面的研究, email: 494599576@qq.com; 冯斌, 男, 博士, 主管药师, 主要从事口腔制剂研发及神经药理学研究, email: kqyjkyx@163.com

the administration groups ($P < 0.05$). The mucosal cortex was greatly repaired and the infiltration of inflammatory cells at the ulcer was obviously reduced. The content of bFGF and IL-2 was significantly increased ($P < 0.05$), and the content of IL-6 and TNF- α was decreased ($P < 0.05$). The mechanical pain threshold of rat oral ulcer was significantly increased after the treatment ($P < 0.05$).

Conclusion Qingbai pulvis can accelerate the healing of rat oral ulcer, reduce inflammation and relieve pain.

Key words: Qingbai pulvis; oral ulcer; pharmacodynamics

复发性口腔溃疡 (RAU) 为口腔黏膜常见疾病, 具有局限性、自愈性、高发病率、高复发率等特点^[1-2]。发病时灼痛难忍, 影响患者日常生活, 长期反复发作将直接影响机体免疫功能, 还可能有诱发癌变的危险^[3]。目前临床上常用的口腔溃疡药物多以抗菌消炎药、免疫调节药、激素治疗药为主, 然而上述药物对溃疡修复无明显直接作用, 且治疗后复发率高, 长期使用不良反应较大。对于重型 RAU, 多采用局部注射肾上腺皮质激素治疗, 疗效显著, 但该方法易造成局部周围组织的损伤, 患者对局部注射激素具有恐惧感, 易产生心理负担, 应用受限, 因此临床上需要更加有效的治疗理念和手段。

近年来中医学领域陆续出现了一些根据中医辨证论治等原则治疗 RAU 的中药复方药物, 中药配伍已成为治疗口腔溃疡的研究热点。青柏散参考我国传统医学体系, 以《千金要方·口疮》中记载的青黛、黄柏两味药材为主, 进行组方, 黄柏清热燥湿, 青黛泻火解毒, 两药合用, 是为君, 协同作用清除脾胃积热、心火炽盛、阴虚火旺之病症根源, 平火生阴, 修复黏膜; 五倍子收湿敛疮, 止血生肌, 是为臣, 协助君药泻火除蒸, 消炎止痛; 同时, 佐以冰片和龙骨, 开窍醒神、散瘀杀菌; 再使以甘草, 调和诸药, 消除口腔溃疡之表象, 诸药合用, 共同达到治疗目的。为使更多患者获益, 我院拟对其进行制剂开发及成果转化, 前期已完成处方工艺及质量控制研究, 本研究通过建立大鼠口腔溃疡实验模型和机械刺激测量镇痛阈值实验模型, 进一步验证青柏散对口腔溃疡的治疗效果并探讨其作用机制, 为指导新药设计、提高药物安全性及有效性提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

126 只 SPF 级雄性 SD 大鼠 (空军军医大学实验动物中心, 动物生产许可证号为 SYXK-2019-001)。实验动物的使用遵循 3R 原则。所有实验操

作均获得空军军医大学实验动物伦理委员会的审批, 批件号为 20221109。

1.2 试药

青柏散 (批号: 220210, 规格: 5 g/瓶, 由空军军医大学第三附属医院药剂科研制); 桂林西瓜霜 (批号: 200903, 规格: 3.5 g/瓶, 桂林三金药业股份有限公司); 大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、大鼠白细胞介素 (IL)-2、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号分别为 R221024-102a、R221024-001a、R221024-003a, 欣博盛生物科技有限公司), 大鼠碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) ELISA 试剂盒 (批号: Oct2022, 上海酶联生物科技有限公司), NP-40 裂解液 (批号: P0013F, 碧云天生物技术有限公司); 4% 多聚甲醛溶液 (批号: SL321438100, 北京酷来搏科技有限公司); 舒泰 50 (批号: 7XDYA, 法国维克有限公司); 盐酸赛拉嗪注射液 (批号: 20201118, 吉林省华牧动物保健品有限公司); 生理盐水 (批号: 22070405, 四川科伦药业股份有限公司); 冰醋酸 (批号: 20191025, 天津市富宇精细化工有限公司); 水为纯净水 (实验室自制)。

1.3 仪器

RM2125RTS 型石蜡切片机、DMI6000B 型光学显微镜 (德国 Leica 公司); DKZ-2B 型数字显示隔水式电热恒温培养箱 (上海一恒科学技术有限公司); VARIOSKAN LUX 型酶标仪、MULTIFUGE X1R 型台式高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司); SCIENTZ-II D 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 101 型电热恒温鼓风干燥箱 (北京科伟永兴仪器有限公司); CP-213 型电子分析天平 (奥豪斯仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 青柏散对大鼠口腔溃疡的促愈合作用研究

2.1.1 口腔溃疡模型的建立 选用健康雄性 SD 大鼠 108 只, 将大鼠随机分为 6 组, 即正常组, 模型组, 阳性组 (桂林西瓜霜), 青柏散低、

中、高剂量组, 每组 18 只。放在昼夜交替, 温湿度分别为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和 40% ~ 70% 的房间适应性饲养 3 d, 正常饮食。将盐酸唑拉西泮 ($75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和盐酸赛拉嗪注射液 ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 按照 1 : 1 的比例混合, 以 $0.2 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 腹腔注射麻醉, 将 50% 冰醋酸浸润的直径为 5 mm 的脱脂棉球紧贴于大鼠下唇角黏膜处, 持续按压 60 s 后迅速移除棉球并用 5 mL 生理盐水冲洗, 建立口腔溃疡模型。正常组用生理盐水代替冰醋酸, 其他操作步骤一样。以造模当日作为实验第 1 日。24 h 后观察口腔局部黏膜的炎症情况, 如果观察到红肿假膜则表明溃疡形成。

2.1.2 给药方法 造模成功当日开始给药, 阳性组按 $2 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于 $0.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 散布给药, 青柏散低、中、高剂量组分别按 1、2、3 次 $\cdot \text{d}^{-1}$ (相当于 0.25、0.50、0.75 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 散布给药, 连续给药 4 d, 正常组、模型组不做任何处理。用药后 2 h 内禁食禁水, 其余时间自由进食进水。

2.1.3 大体观察 造模成功后观察大鼠外观、精神及一般状况的变化, 采用盲法进行, 结果显示, 正常组大鼠反应灵敏, 背毛光泽, 二便和活动正常; 模型组大鼠反应迟钝, 口唇边潮湿, 流口水, 毛发粗糙分叉, 大便偏稀; 阳性组和青柏散组大鼠反应灵敏, 背毛光泽, 活动正常。

2.1.4 体质量变化 实验开始后每日测量并记录大鼠体质量的变化。由图 1 可知, 实验第 2 日, 与正常组比较, 模型组、阳性组和青柏散各剂量组体质量变化均显著下降 ($P < 0.05$)。说明冰醋酸处理使大鼠产生疼痛与不适导致了大鼠体质量下降。与模型组比较, 实验第 3 日阳性组和青柏散各剂量组体质量变化均显著升高 ($P < 0.05$)。说明给予适量药物处理能够缓解大鼠口腔不适, 减少大鼠的体质量下降; 实验第 5 日, 青柏散高剂量组大鼠体质量变化显著升高 ($P < 0.05$); 实验第 7 日, 青柏散中剂量组大鼠体质量变化显著升高 ($P < 0.05$)。结果提示, 青柏散给药处理能够加快大鼠体质量的恢复。

2.1.5 创面愈合情况观察 实验第 3、6、9 日分别对各组大鼠口腔溃疡愈合情况进行观察。由图 2 可知, 正常组大鼠各时间点口腔黏膜表面光滑, 无水肿, 无充血现象。实验第 3 日, 模型组、阳性组和青柏散各剂量组造模区黏膜水肿, 形成黄白色假膜。实验第 6 日模型组黄白色假膜还未脱落, 局部充血严重; 阳性组和青柏散低、中剂量组黄白色假膜变薄并部分脱落; 青柏散高剂量

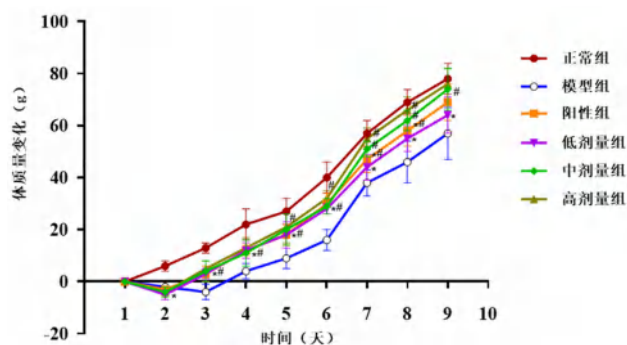


图 1 各组大鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 1 Changes in body mass of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

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

组黄白色假膜已完全脱落, 肿胀程度减轻, 组织周围充血减轻。实验第 9 日模型组黄白色假膜还未完全脱落, 与第 6 日相比有明显的好转; 阳性组和青柏散各剂量组假膜完全脱落, 溃疡基本愈合, 肿胀现象消失, 周围组织充血消失, 外观同正常组没有明显差异。

实验第 3、6、9 日分别对各组大鼠口腔溃疡面积进行测算。由图 3 可知, 与模型组相比, 实验第 6 日, 阳性组和青柏散各剂量组大鼠溃疡面积显著减小 ($P < 0.05$), 此外, 各组大鼠溃疡面积均随着给药时间增加而不断减小。

结果表明, 青柏散给药处理能够明显缩小大鼠口腔溃疡面积, 加速口腔溃疡愈合, 且高剂量组效果最为明显, 对发病初期作用显著, 同时验证口腔溃疡具有自愈性。

2.1.6 溃疡组织病理学观察 各组于实验开始后第 3、6、9 日分别随机选取 3 只大鼠处死, 取得黏膜标本, 用生理盐水冲洗干净后立即放入 4% 多聚甲醛溶液进行固定, 用石蜡对组织进行包埋, 连续 $5 \mu\text{m}$ 切片, HE 染色, 然后在光学显微镜下观察分析。

由图 4 可知, 正常组大鼠口腔黏膜上皮完整连续, 固有层无血管充血及大量炎性细胞浸润等病理改变。实验第 3 日, 模型组、阳性组和青柏散各剂量组黏膜上皮结构被破坏消失, 表面有纤维性渗出, 细胞出现空泡变性, 溃疡部位有密集的炎性细胞浸润, 以中性粒细胞和淋巴细胞为主。实验第 6 日, 模型组上皮呈现修复反应, 但炎性细胞浸润明显, 大多为淋巴细胞; 阳性组和青柏散低、中剂量组有新的肉芽组织产生, 上皮细胞层次增多, 但仍有炎性细胞浸润; 青柏散高剂量组基底层逐渐修复, 炎性细胞浸润明显减

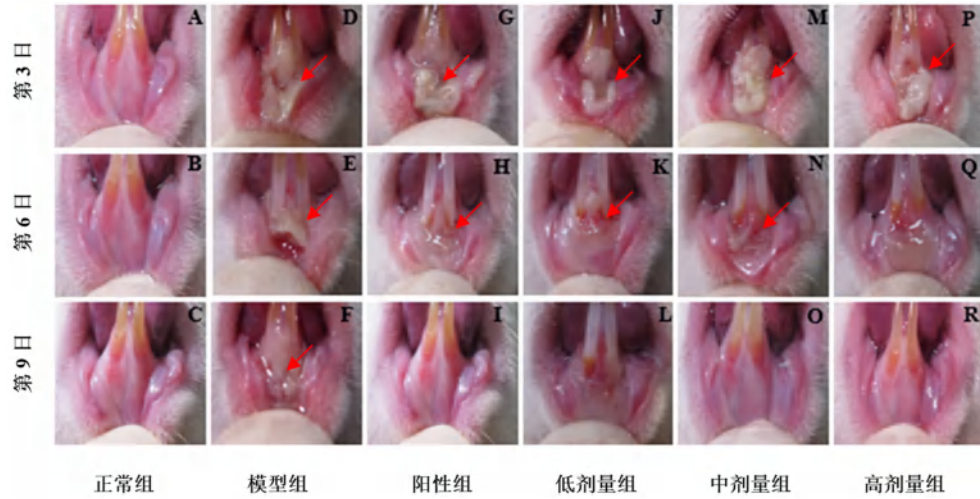


图 2 各组大鼠口腔溃疡愈合情况观察

Fig 2 Healing of oral ulcer of rats in each group

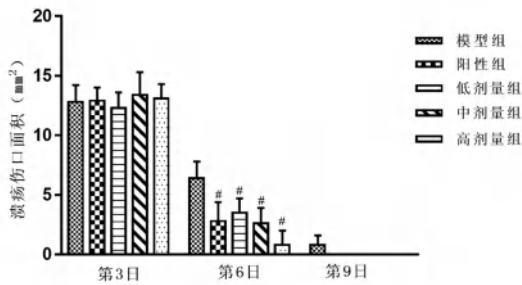


图 3 各组大鼠口腔溃疡伤口面积 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 3 Wound area of oral ulcer of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注：与模型组相比， $^{\#}P < 0.05$ 。

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

少，黏膜组织结构趋于完整。实验第 9 日，模型组黏膜上皮初步修复，但是厚度不一，层次紊乱；阳性组 and 青柏散各剂量组黏膜上皮完全愈合，厚度均匀，层次分明，与正常组无明显差异。结果表明，青柏散给药处理能够明显加速口腔溃疡的愈合，同时验证口腔溃疡具有自愈性。

2.1.7 溃疡局部组织中炎症因子 bFGF、IL-2、IL-6 和 TNF- α 含量测定 各组于实验开始后第 3、6、9 日分别随机选取 3 只动物处死。正常组切取正常黏膜，其余各组切取溃疡组织黏膜，用

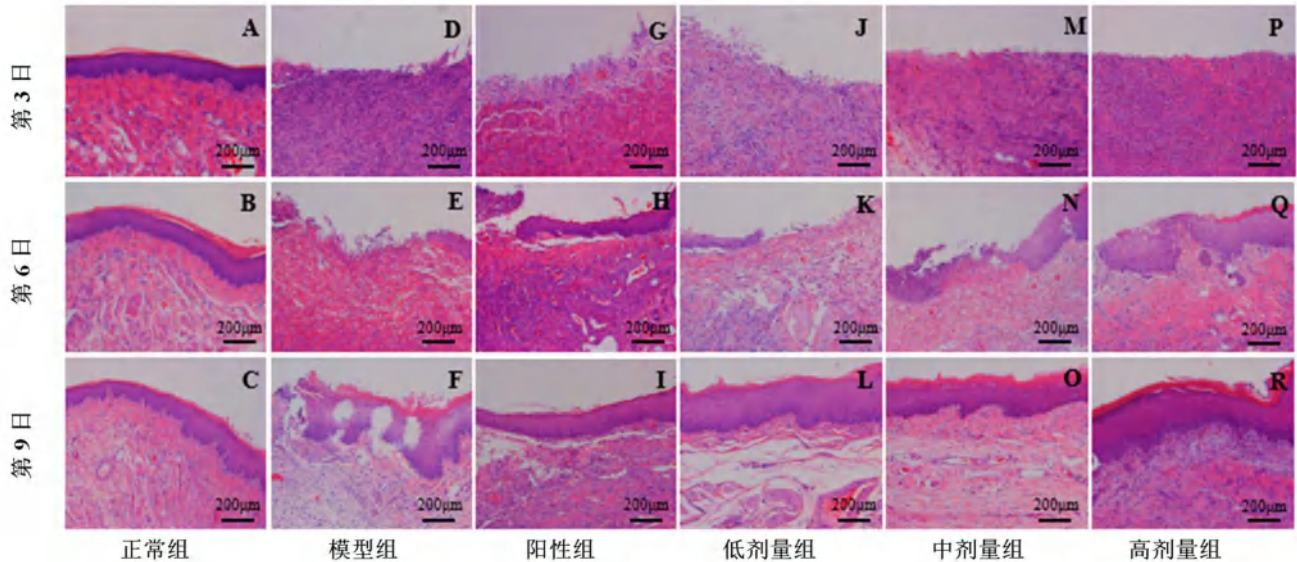


图 4 各组大鼠口腔组织病理学观察 ($\times 100$)

Fig 4 Histopathological observation of oral ulcer of rats in each group ($\times 100$)

预冷的生理盐水冲洗组织以去除残留血液，用眼科小剪将黏膜剪碎，操作在冰水浴中进行，置于 EP 管中称重后用移液枪加入黏膜重量 10 倍的 NP-40 裂解液，冰浴条件下，用细胞超微粉碎

机对黏膜进行充分粉碎。将粉碎得到的组织匀浆于 4°C 、 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min，用移液枪移取上清液，分装保存于 -20°C 冰箱中备用，按 ELISA 试剂盒说明书操作进行上清液中 bFGF、

IL-2、IL-6 和 TNF- α 含量的测定。由图 5 可知, 实验第 3 日, 与正常组相比, 模型组口腔溃疡组织中 bFGF 和 IL-2 的含量显著下降 ($P < 0.05$), IL-6 和 TNF- α 的含量显著增加 ($P < 0.05$), 说明造模成功。实验第 6、9 日, 与模型组相比, 阳性组和青柏散各剂量组 bFGF 和 IL-2 的含量显著增加 ($P < 0.05$), IL-6 和 TNF- α 的含量显著下降 ($P < 0.05$)。实验第 9 日, 与正常组相比, 阳性组和青柏散各剂量组口腔溃疡组织中 bFGF、IL-2、IL-6 和 TNF- α 的含量差异无统计学意义。

2.2 青柏散对大鼠口腔溃疡的镇痛作用研究

2.2.1 机械刺激测量疼痛阈值模型的建立

选用健康雄性 SD 大鼠 18 只, 随机分为 6 组, 即正常组, 模型组, 阳性组 (桂林西瓜霜), 青柏散低、中、高剂量组, 每组 3 只。放在昼夜交替, 温湿度分别为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和 40% ~ 70% 的房间适应性饲养 3 d, 正常饮食。为了稳定地暴露大鼠口腔黏膜的穹窿区域, 将盐酸唑拉西泮 ($75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和盐酸赛拉嗪注射液 ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 按照 1 : 1 的比例混合, 以 $0.2 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 腹腔注射麻醉, 然后给大鼠穿环, 大鼠穿环以后先适应一周, 待行为稳定后增加一个 6 g 的重物使其能够稳定暴露黏膜, 将大鼠放置在手工制作的黑色塑料盒中, 每日 10 min, 连续训练两周后, 按照“2.1.1”及“2.1.2”项下方法进行口腔溃疡造模及给药。穿环及开口行为训练情况见图 6, 具体实验流程见图 7。

2.2.2 Von Frey 法大鼠疼痛阈值测定

使用一组 Von Frey 丝 (0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1、2、4 和 6 g) 刺激口腔黏膜测量疼痛阈值。为了防止损伤黏膜最大使用 6 g 的 Von Frey 丝进行测量, 于实验第 1 日即造模当日, 实验第 2、5、9 日末次给药后进行测量。在测试前, 将大鼠置于自制的塑料盒中 10 min, 待大鼠行为稳定后采用 Von Frey 丝刺激稳定暴露的口腔溃疡区黏膜, 并将大鼠有挣扎和企图逃脱的行为定义为阳性反应。发现有阳性行为时选用小一个型号的针再试, 测量 5 次出现 3 次阳性行为就定义为机械阈值, 每次测量之间相隔至少 30 s。由图 8 可知, 实验第 2、5、9 日, 与正常组和模型组比较, 青柏散各剂量组机械刺激所致疼痛阈值均显著升高 ($P < 0.05$); 与阳性组比较, 青柏散各剂量组镇痛阈值略高, 但差异无统计学意义。说明适量青柏散给药处理能够明显缓解冰醋酸诱发的大鼠口腔溃疡区疼痛。

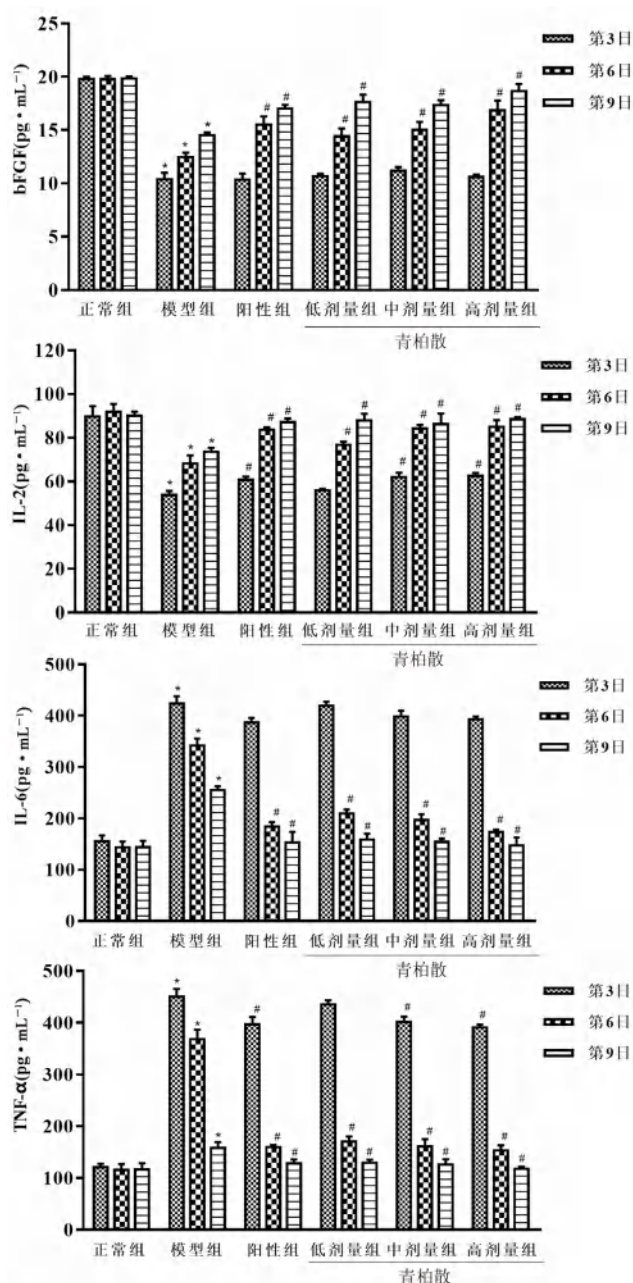


图 5 各组大鼠口腔溃疡组织中 bFGF、IL-2、IL-6 和 TNF- α 的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 5 Content of bFGF, IL-2, IL-6 and TNF- α in oral ulcer tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

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

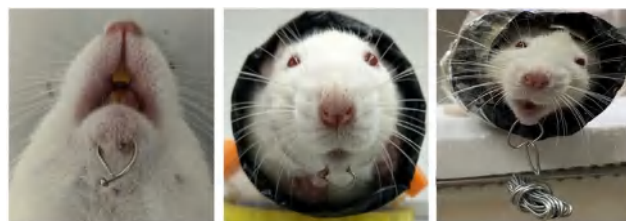


图 6 大鼠穿环及开口行为训练图片

Fig 6 Training of rats' ring piercing and mouth opening behavior

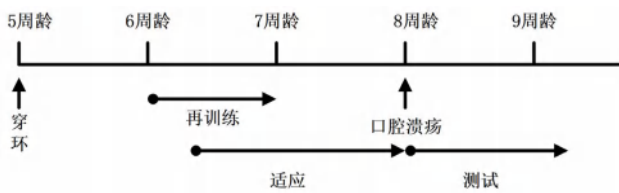


图 7 Von Frey 法检测流程图

Fig 7 Flow chart of Von Frey method

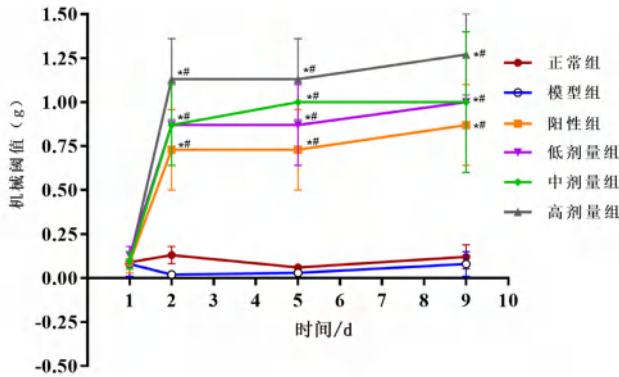


图 8 各组大鼠机械刺激所致疼痛阈值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 8 Pain threshold by mechanical stimulation of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

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

2.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD- t 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

现代医学研究显示，口腔溃疡的发生原因比较复杂，可能因素包括消化系统疾病及功能紊乱，内分泌变化，精神因素，遗传因素以及锌、铁等微量元素缺乏，叶酸、维生素 B₁₂ 等维生素缺乏，免疫功能降低，微生物作用等其他因素^[4]。由于口腔溃疡的发病是多种因素综合作用的结果，因此采用单一作用的药物难以达到良好的治疗效果。目前临床常用的口腔溃疡药多以抗菌消炎、抗过敏、免疫调节以及局部激素治疗药物为主^[5-8]，但长期用药存在复发率高，不良反应大等问题^[9]，因此临床上需要更加有效的治疗理念和手段。近年来中医学领域陆续出现了一些根据中医辨证论治等原则治疗此病的中药复方药物，中药配伍现已成为治疗口腔溃疡病的研究热点。黄柏清热燥湿，泻火解毒；青黛清热泻火，凉血解毒；二药合用，其清火之功效更著，治疗久而不瘥者。青柏散按照传统中医理论以黄柏和

青黛为主进行组方，多种成分协同发挥作用，治疗口腔溃疡具有良好疗效。

本研究采用冰醋酸化学灼烧法进行造模，通过大体观察、创面愈合观察以及组织病理学观察评价青柏散对口腔溃疡的治疗作用，结果发现青柏散能够减少口腔溃疡大鼠的体质量下降，促进创面组织愈合，推测可能与青柏散的抗炎及镇痛作用有关。

本研究还通过大鼠口腔溃疡组织中炎性因子的检测对青柏散的治疗作用机制进行了初步探索。研究证实，口腔溃疡病理过程中细胞因子如 TNF- α 、IL 等发挥着重要作用^[10-11]。TNF- α 主要由单核巨噬细胞产生，以自分泌和旁分泌的方式激活炎症反应，介导细胞凋亡；IL-6 属于多功能炎性细胞因子，可诱导 TNF 产生催化，放大炎症反应，损伤组织细胞；另外 IL-2 主要由 Th1 细胞产生，是引起 T 细胞增殖的主要细胞因子，可提高 T 细胞的数量，增强机体的免疫功能^[12-14]。本实验结果发现，青柏散可明显降低口腔溃疡组织区 TNF- α 和 IL-6 表达，增加 IL-2 表达，通过调节炎性因子表达水平，减少炎症发生和组织损伤。bFGF 存在于脑、垂体等组织，是一种能促进成纤维细胞生长的物质，其具有双重生物学效应，及很强的促进创伤愈合和组织再生能力^[15]。本实验结果发现，青柏散可以通过促进 bFGF 的表达，进一步修复受损组织，促进溃疡愈合。

此外，本研究还通过 Von Frey 法大鼠疼痛阈值的测定考察了青柏散的镇痛作用，实验结果发现，与正常组和模型组相比，青柏散能显著提高大鼠口腔溃疡组织区机械阈值，缓解冰醋酸所致溃疡疼痛。现代中药药理研究表明，青黛、黄柏、五倍子、冰片、甘草中含的生物碱、黄酮、皂苷等活性成分具有抗炎镇痛作用，当机体有炎症发生时损伤的组织会向细胞外液中释放一些能引起疼痛的内源性化学物质，如前列腺素 E₂ (PEG₂)、缓激肽等，这些物质能够改变生理环境，间接提高伤害性感受器的兴奋性产生疼痛，而黄柏能够显著抑制 PEG₂ 等炎性致痛物质的产生和释放^[16]，冰片还能够激活代谢型谷氨酸受体发挥镇痛作用^[17]，青柏散的镇痛作用可能与此相关，具体的机制有待进一步研究。

综上所述，青柏散对大鼠口腔溃疡组织区炎性因子 bFGF、IL-2、IL-6 和 TNF- α 的表达水平有一定影响，具有抗炎和镇痛双重作用，本实验为青柏散在治疗口腔溃疡方面的研究提供了参考，并为其后期临床应用和市场开发提供了依据。

参考文献

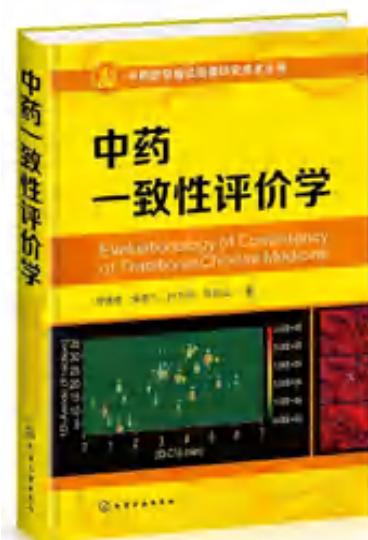
- [1] 杨婷. 口炎清颗粒联合康复新液治疗复发性口腔溃疡的临床效果[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(28): 127-129.
- [2] 樊春丽, 彭小飞, 谭华, 等. 中医口腔护理液辅治复发性口腔溃疡脾胃湿热型临床观察[J]. 实用中医药杂志, 2023, 39(1): 69-71.
- [3] 孙凤娟, 刘迪昕, 林晓萍. 复发性口腔溃疡患者的心理状况和人格特征分析[J]. 护理学报, 2016, 23(4): 65-67.
- [4] 张晓丽. 口腔溃疡的治疗方法及其研究进展探讨分析[J]. 临床医药文献杂志, 2018, 5(55): 191-192.
- [5] 黄纯艳. 复发性口腔溃疡的治疗与护理进展[J]. 全科护理, 2017, 15(19): 2332-2334.
- [6] Darshan DD, Kumar CN, Kumar D, et al. Clinical study to know the efficacy of amlexanox 5% with other topical antiseptic, analgesic and anesthetic agents in treating minor RAS[J]. J Int Oral Health, 2014, 6(1): 5-11.
- [7] Seçkin HY, Bütün I, Baş Y, et al. Effects of colchicine treatment on mean platelet volume and the inflammatory markers in recurrent aphthous stomatitis[J]. J Dermatol Treat, 2016, 27(4): 1-3.
- [8] Neelkamal S, Shashikanth MC, Priyanka K, et al. Levamisole and low dose prednisolone in the treatment of recurrent aphthous stomatitis[J]. J Oral Pathol Med, 2014, 43(4): 309-316.
- [9] 高峻鹰, 李庆隆. 理中汤加味治疗脾胃虚寒型复发性口腔溃疡疗效及对血清炎症因子和补体 C₃、C₄ 的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(9): 991-994.
- [10] Ficarra G, Baroni G, Massi D. Pyostomatitis vegetans: Cellular immune profile and expression of IL-6, IL-8 and TNF-alpha[J]. Head Neck Pathol, 2010, 4(1): 1-9.
- [11] Eguia-Del V, Martinez-Conde-Llamas R, Lopez-Vicente J, et al. Salivary levels of tumournecrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous stomatitis[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2011, 16(1): 33-36.
- [12] 唐志立, 彭贤东, 王娅俐, 等. 知黄溃疡合剂对口腔溃疡模型大鼠的药效学研究[J]. 中国药业, 2019, 28(7): 6-8.
- [13] 师海瑞, 孔义华, 王显河, 等. 既往种植牙合并复发性口腔溃疡患者的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、IL-2、IL-6、TNF- α 水平变化分析研究[J]. 中国口腔种植学杂志, 2019, 24(2): 55-58.
- [14] 刘珊. 加味六味地黄汤联合蒙脱石散治疗复发性口腔溃疡的疗效及对 TNF- α 、IL-1、IL-6 水平的影响[J]. 黑龙江医药, 2022, 35(6): 1375-1377.
- [15] 江焱, 李泽琼, 李静南, 等. 青光眼术后泪液内 IL-6 mRNA、bFGF mRNA 及 TNF- α mRNA 表达与感染性眼内炎发生的关系[J]. 中国医院感染学杂志, 2022, 33(6): 875-878.
- [16] 彭丹. 复方黄柏散的镇痛作用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(14): 1108-1111.
- [17] 张丹. 冰片(+ Borneol)对脊柱肿瘤术后病人切口疼痛的镇痛作用及其分子生物学机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2017.

(收稿日期: 2023-02-05; 修回日期: 2023-05-06)

热烈祝贺《中药一致性评价学》出版发行

中药一致性评价学是以中药主要化学成分的定性定量表征为基础和以主要药效组分在体内效应的定量作用一致性作为重点监控步骤, 以中药指纹信息学为评价手段获取关于中药质量一致性和药效一致性的评价理论和评价方法及评价技术的学科。它是新兴的交叉边缘学科, 主要包括样品制备、检测方法、评价模型、评价软件和评价结果报告。《中药一致性评价学》在 2023 年 11 月正式出版发行。该书以“中药指纹学”为学科基础, 对中药一致性控制方法提出等位等价理论, 以使用定量指纹图谱检查为核心, 为中药标准化问题提出了切实有效的解决方案。本书倡导的中药标准制剂控制模式兼顾中药原料现实, 在保证中药的基本疗效前提下, 充分考虑中药资源现状, 提出从中药主组分的化学指纹物质等位和中药主组分的体内活性效应等位两个方面实现中药一致性, 奠定了中药一致性评价目标理论。

本书系统科学、重点突出, 基于中药系统指纹定量法, 对中药投料一致性、中药固体制剂溶出一致性、中药谱效一致性等均进行了研究, 展示了中药一致性评价软件“中药主组分一致性数字化评价系统 3.0”“中药光谱量子指纹一致性数字化评价系统 4.0”, 实例介绍了中药指纹质控的应用, 对开展中药仿制、经典名方研究和中药一致性评价的试验具有指导意义。



综述

成纤维细胞生长因子 9：治疗精神神经疾病药物新靶点

赵丞^{1,2}, 王小青², 王宇红¹, 姜德建^{1,2*} (1. 湖南中医药大学科技创新中心&抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室, 长沙 410208; 2. 湖南省药物安全评价研究中心&新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410331)

摘要: 成纤维细胞生长因子 9 (FGF9) 是一种能调节细胞增殖、分化和凋亡的生长因子, 为成纤维细胞生长因子家族的重要一员。FGF9 在人体的细胞和组织中广泛分布, 在骨骼、胚胎的发育、血管形成、神经再生、肿瘤生长过程中发挥作用。近年来, 随着其在抑郁症、帕金森病、阿尔茨海默病、癫痫、焦虑症等精神神经疾病发病机制中的关键作用不断被认识, FGF9 被认为是一个潜在的治疗精神神经疾病药物开发的新靶点。

关键词: 成纤维细胞生长因子 9; 神经精神疾病; 药物开发

中图分类号: R971 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-2964-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.024

Fibroblast growth factor 9: a new target for psychoneurological disorders

ZHAO Cheng^{1,2}, WANG Xiao-qing², WANG Yu-hong¹, JIANG De-jian^{1,2*} (1. *Science and Technology Innovation Research Center, Hunan University of Chinese Medicine & Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Depressive Diseases, Changsha 410208*; 2. *Hunan Center for Safety Evaluation and Research of Drugs & Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331*)

Abstract: Fibroblast growth factor 9 (FGF9) is a growth factor that can regulate the cell proliferation, differentiation and apoptosis, and is an important member of the fibroblast growth factor family. FGF9 is widely distributed in human cells and tissues and plays a role in the bone and embryonic development, blood vessel formation, nerve regeneration and tumor growth. In recent years, with the increasing recognition of its key role in the pathogenesis of neuropsychiatric diseases such as depression, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, epilepsy and anxiety, FGF9 has been considered as a new potential target for drug development for neuropsychiatric diseases.

Key words: fibroblast growth factor 9; neuropsychiatric disease; drug development

精神神经疾病是指在各种生物学、心理学以及社会环境因素影响下, 大脑功能失调, 导致以认知、情感、意志和行为等精神活动出现不同程度障碍为临床表现的疾病。精神神经疾病按严重程度可分为轻型精神疾病(焦虑症、强迫症、抑郁症、恐怖症等)与重型精神疾病(精神分裂症、双相情感障碍等)。目前精神神经疾病的治疗主要采取心理治疗(精神治疗)和药物治疗相结合

的方法, 一般以药物治疗为主, 心理治疗为辅。

1 成纤维细胞生长因子 9 (FGF9) 的生物学特性

FGF9 是成纤维细胞生长因子家族 (FGFs) 的一员, 具有调节细胞的增殖、分化和凋亡等生理功能^[1]。FGF9 首先发现于人类神经胶质瘤细胞系, 因其具有神经胶原激活因子的活性, 最初被命名为胶质细胞激活因子^[1]。FGF9 是一种自分泌或旁分泌生长因子, 在人体的细胞和组织中广泛分布, 包括成

基金项目: 湖南省药物非临床研究科技创新创业团队 (No.2021)。

作者简介: 赵丞, 男, 在读硕士研究生, 主要从事抑郁发病机制研究, email: zhaocheng@hnse.org *通信作者: 姜德建, 男, 研究员, 主要从事抑郁发病机制研究与新药研发, email: jiangdejian@hnse.org

骨细胞、软骨细胞、血管内皮细胞、晶状体上皮细胞, 以及皮肤、肝、肾脏、胃、生殖系统、淋巴组织等^[2]。研究发现, FGF9 作为胞间信号传导分子参与了多种生理与病理过程, 如骨骼生长^[3]、胚胎发育^[4]、血管形成^[5]、神经再生^[6]和肿瘤生长^[7]等。

1.1 FGF9 的结构

人 FGF9 基因编码一个由 207 个氨基酸组成的蛋白质序列, 分子质量约为 23 kDa, 基因定位于 13 号染色体 q11 ~ q12 区域^[8]。小鼠 FGF9 基因有 208 个氨基酸, 定位于 14 号染色体上, 含有 3 个外显子和 2 个内含子^[9]。FGF9 基因的 5' 侧翼区含有潜在的 TATA 盒 (TBP 的共同序列结合部位)、C/EBP 结合部位、AP1 结合部位和 SP1 结合部位的调控元件^[10]。此外, FGF9 在不同的种属间具有很高的同源性, 人、鼠、蟾蜍之间的同源性为 93%, 人与鼠的 FGF9 的区别在于第 9 位氨基酸不一样, 前者为天冬酰胺, 后者为丝氨酸^[11]。

1.2 FGF9 的受体

FGFs 与 FGF 受体 (FGFR) 结合从而发挥生理病理作用。目前发现的 FGFR 有 4 种亚型, 编号为 FGFR1 ~ FGFR4。FGF9 是 FGFR3 的特异性高亲和力肝素依赖性配体, 它与 FGFR2 的亲和力稍低, 但不与 FGFR1 或 FGFR4 结合。PCR、RT-PCR 和免疫组化研究结果显示, 转基因小鼠的基因型以及内源性 FGFR3 在心、肝、脾、小脑、肾、肺、大脑、胸腺、骨骼肌、胃、关节、骨髓等组织中均有表达, 特别是在大脑中高表达^[12]。

2 FGF9 与精神神经系统类疾病

近年来研究显示, FGF9 在多种精神神经系统疾病的发生发展过程中起关键作用, 包括抑郁症、帕金森病、阿尔茨海默病、癫痫、焦虑症、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化症等。

2.1 FGF9 在抑郁症中的作用

生长因子在相应大脑组织的表达混乱和功能失调是抑郁症的病理学基础之一^[13-14]。抑郁症患者的尸检研究发现, FGF9 在背外侧前额叶皮层、前扣带回、蓝斑核和海马组织中表达均上调^[15-17]。而在抑郁模型大鼠海马组织中 FGF9 水平相对正常水平显著上升^[15]。利用 FGF9 基因敲除技术研究发现, FGF9 在抑郁行为中扮演着负调控的角色^[15]。本课题组研究结果显示, FGF9 在抑郁症患者血清中的^[18]及卒中后抑郁大鼠模型脑组织和血液中的水平显著增加^[19], 且用不可预知刺激所致的抑郁模型小鼠 FGF9 水平也显著增加^[20-21]。侧脑室注射 FGF9 能诱导小鼠抑郁样行为学改

变^[18, 22-23]。这些研究提示, FGF9 在调节抑郁行为中可能发挥着重要的作用。

2.2 FGF9 在焦虑症中的作用

有研究结果显示, 长期给予 FGF9 能够增加大鼠在高架十字迷宫上的焦虑样行为。与对照组相比, 微量注射 FGF9 的动物在高架十字迷宫上张开手臂花的时间更少。在强迫游泳实验中, 注射 FGF9 的动物攀登时间百分比减少, 不动时间百分比增多, 证明长期脑室注射 FGF9 会增加焦虑和抑郁的行为。后续研究又使用慢病毒载体下调海马齿状回中 FGF9 的表达, 通过检测增强的绿色荧光蛋白的表达来证实局部病毒注射的影响, 结果显示 FGF9 的表达降低了 30%。而与对照组相比, 敲除内源性 FGF9 的动物在高架十字迷宫上的闭合手臂上花费的时间显著减少, 表明 FGF9 改善了焦虑样行为。可见海马区 FGF9 的高表达在情绪和焦虑症的发展或表达中发挥着重要作用^[15]。而另一项研究通过对 FGF9 等位基因 *Y162C* 突变小鼠进行一系列情绪、认知行为和感觉运动测试, 研究 FGF9 在不同大脑功能中的作用, 结果表明 *FGF9Y162C* 的突变在新的压力环境的运动和焦虑反应, 过度活跃的听觉惊吓反应, 以及社交记忆受损中发挥了作用^[24]。因此, FGF9 的基因改变可能增加发生焦虑症的易感性。

2.3 FGF9 在帕金森病中的作用

有研究表明, 氧化应激^[25]和营养因子的下调^[26-31]参与了帕金森病黑质纹状体多巴胺 (DA) 能神经变性的发病。FGF9 是多种细胞类型的生存因子, 并且由神经元和神经胶质细胞表达, 以自分泌和 / 或旁分泌的方式支持神经元的存活和促进神经胶质细胞的增殖^[32-33]。有研究使用 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP^+) 在体内和体外诱导神经元死亡, 并研究了 FGF9 在 MPP^+ 中毒和褪黑素保护中的作用。研究发现 MPP^+ 以剂量和时间依赖的方式抑制 FGF9 mRNA 及其蛋白的表达, 并导致原代皮质神经元死亡。用 FGF9 蛋白处理培养的黑质细胞和中脑细胞可抑制 MPP^+ 诱导的 DA 神经元死亡。褪黑素联合治疗可减轻 MPP^+ 诱导的 FGF9 下调及体内外 DA 神经元的凋亡。褪黑素和 FGF9 中和抗体共同处理 DA 神经元可阻断褪黑素的保护作用。在没有 MPP^+ 的情况下, FGF9 中和抗体可诱导 DA 神经元的凋亡, 而 FGF9 蛋白则使其减少, 提示内源性 FGF9 是 DA 神经元的生存因子。综上所述, MPP^+ 下调 FGF9 表达, 导致 DA 神经元凋亡, 而 FGF9 保护 DA 神经元免受 MPP^+ 的中

毒, 并参与褪黑素的保护作用^[34]。

2.4 FGF9 在癫痫中的作用

有研究建立了在表达 Olig1 的少突胶质祖细胞中条件性敲除 FGF9 的基因小鼠, 通过行为学、电生理监测以及生长发育的结果确定了小鼠为癫痫发作^[35]。由于癫痫发作与皮层、海马和丘脑的病理改变有关, 该实验又研究了 Neun、Iba-1 和 GFAP 分别作为神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞的标志物在条件性敲除的 Olig1 小鼠中枢神经系统中的表达模式, 发现明显的炎症病理改变; 免疫组织化学染色发现在条件性敲除 Olig1 小鼠的大脑皮质中显示出异常的 Olig1 阳性细胞形态, 说明表达 Olig1 的少突胶质祖细胞中 FGF9 缺失导致了癫痫的发生, 并伴随大脑皮层的病理改变。在随后的机制研究中, 激活 G 蛋白 /AC/cAMP 信号通路阻断了 γ -氨基丁酸 (GABA) 合成, 使表达 Olig1 的少突胶质祖细胞中 FGF9 缺失, 导致海马中 GABA 和谷氨酸 (Glu) 的失衡并诱导小鼠癫痫发作。可见, FGF9 在 GABA 能神经元存活和癫痫病理过程中发挥着至关重要的作用。

2.5 FGF9 在阿尔茨海默病中的作用

有研究^[36]对 10 例阿尔茨海默病患者和 10 例正常对照组的枕颞叶海马区切片, 进行免疫组织化学染色, 结果显示, 含有 FGF9 免疫反应阳性营养不良突起和 tau 阳性营养不良突起的老年斑 (SPs) 数量基本相同。在正常对照组切片中, 也可观察到多个 FGF9 免疫反应阳性的 SPs, 但是数量明显少于阿尔茨海默病患者切片。阿尔茨海默病患者的切片中, 星形胶质细胞散在分布于灰质, 星形胶质细胞在 SPs 周围有增多的趋势, 皮质下白质内可见大量的星形胶质细胞。正常对照组灰质内可见少量的星形胶质细胞, 白质内未见明显的星形胶质细胞。FGF9 存在于阿尔茨海默病脑内 SP 营养不良的神经突起、星形胶质细胞、海马神经元和皮质神经元中, 提示 FGF9 参与了阿尔茨海默病的病理过程^[36]。Kanda 等^[37]研究了 FGF9 对原代培养的胚胎 17 d 大鼠基底前脑胆碱能神经元的影响, 结果发现, FGF9 增强了乙酰胆碱酶阳性神经元的存活率, 增加了平均体细胞大小, 并且调节了胆碱乙酰转移酶活性。

2.6 FGF9 在肌萎缩侧索硬化中的作用

肌萎缩侧索硬化是累及上下运动神经元的进行性进展的神经系统变性病^[38], 导致四肢、躯干、胸部、腹部肌肉逐渐无力并萎缩, 从而影响

运动、交流、吞咽和呼吸功能, 最终导致死亡。肌萎缩侧索硬化的病因仍然不清楚, 其发病可能涉及多种不同的细胞损伤机制, 包括氧化应激、蛋白的异常聚集、线粒体损伤、凋亡、遗传倾向等^[37]。有研究通过用稳定转染 TDP-25 的 NSC-34 细胞建立了肌萎缩侧索硬化细胞模型, 用不同浓度的 FGF9 处理 24 h 后, 检测其细胞活力、细胞损伤和细胞凋亡, 结果低剂量的 FGF9 可以使稳定转染 TDP-25 的 NSC-34 细胞的细胞活力增加, 促进细胞增殖, 并且能够降低细胞内乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, 其机制可能是通过降低细胞内氧化应激水平, 抑制细胞凋亡来保护细胞。该研究只在细胞水平上进行了研究, 没有进一步在动物模型中进行验证。虽然目前 FGF9 在肌萎缩侧索硬化的体内研究缺少有效的证据, 但也为肌萎缩侧索硬化的治疗带来了新的方向^[39]。

2.7 FGF9 在多发性硬化症中的作用

多发性硬化是以中枢神经系统白质炎性脱髓鞘病变为主要特点的自身免疫病。最常累及的部位为脑室周围白质、视神经、脊髓、脑干和小脑^[40], 主要临床特点为中枢神经系统白质散在分布的多病灶与病程中呈现的缓解复发, 症状和体征的空间多发性和病程的时间多发性。病因和发病机制至今尚未完全明确, 与免疫、感染、遗传、环境及个体易感因素综合作用的多因素有关。

对多发性硬化症的研究发现, 由于 FGF9 对星形胶质细胞的作用, 抑制髓鞘再生并产生促炎的趋化因子反应, 可能会加重轴突的缺失, 使得更多的炎症细胞向病灶聚集。总之, FGF9 在星形胶质细胞中的信号传导将成为多发性硬化再生和抗感染治疗的新靶点^[41]。

3 FGF9 与治疗精神神经疾病药物开发

随着研究技术的进步, 新的分子靶点被发现作为治疗的靶点, 以应对现有疗法的局限性。本课题组最近的研究发现, FGF9 在精神神经疾病中起到了重要作用。慢性不可预测性温和应激 (CUMS) 诱导的小鼠血浆和海马组织中 FGF9 水平显著升高^[20]; 抑郁症患者血浆中 FGF9 水平升高^[42]; 此外, 在脂联素敲除小鼠中, 侧脑室注射 FGF9 抗体可以显著减轻 CUMS 诱导的抑郁样行为, 与 FGF9 结合的受体 FGFR3 的蛋白表达在海马组织中显著上调^[42]。另一项研究还探讨了卒中后抑郁的影响与 FGF9 的关系, 发现卒中后抑郁大鼠海马区 FGF9 的表达较正常大鼠显著升高, 海马组织中 FGFR-3 的表达显著低于对照组

和假手术组^[19]。因此,通过一系列研究表明抗抑郁作用可能与降低 FGF9 有关,FGF9 及其受体 FGFR3 被认为是抑郁症发生的关键因子。目前,临床上的一些治疗精神神经疾病药物,如选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂氟西汀、三环类抗抑郁药丙咪嗪,存在严重的副作用,极大地限制了这些药物的临床应用^[43]。FGF9 为治疗精神神经疾病药物开发带来了一个新方向,具有重要的科学意义和临床价值。

4 总结与展望

FGF9 在不同精神神经疾病中的作用似乎不同。例如,FGF9 在抑郁症患者脑区表达上调;在抑郁症模型中,FGF9 水平升高,其受体 FGFR3 下降,它们存在相反关系,是抑郁症的关键前抑郁因子^[15, 19, 42];慢性应激增加了海马区 FGF9 的水平,而给予 FGF9 会导致抑郁和焦虑相关的行为。此外,敲除海马区 FGF9 对大鼠有抗焦虑作用;FGF9 缺失导致了癫痫的发生;FGF9 增强乙酰胆碱酶阳性神经元的存活率,增加了平均体细胞大小,并且调节了胆碱乙酰转移酶活性,参与了阿尔茨海默病的病理过程;低浓度的 FGF9 可通过降低细胞内氧化应激水平,增加肌萎缩侧索硬化细胞模型的细胞活力;FGF9 在星形胶质细胞中的信号传导在多发硬化再生和抗炎中发挥着重要作用。随着研究的深入,越来越多的研究证明 FGF9 在帕金森病、阿尔茨海默病、抑郁症、癫痫、焦虑症、肌萎缩侧索硬化、多发硬化症等精神神经疾病中扮演着重要角色,随着对 FGF9 信号通路及其生物学功能等研究的逐渐深入,FGF9 可为精神神经疾病提供新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, et al. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4 (6): e187.
- [2] 易善勇, 杨晶, 官丽莉, 等. 成纤维细胞生长因子 9 (FGF9) 的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35 (7): 94-101.
- [3] Hung IH, Yu K, Lavine KJ, et al. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod [J]. *Dev Biol*, 2007, 307 (2): 300-313.
- [4] Willerton L, Smith RA, Russell D, et al. Effects of FGF9 on embryonic Sertoli cell proliferation and testicular cord formation in the mouse [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48 (7): 637-643.
- [5] Frontini MJ, Nong Z, Gros R, et al. Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoresponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29 (5): 421-427.
- [6] Nakamura S, Todo T, Haga S, et al. Motor neurons in human and rat spinal cord synthesize fibroblast growth factor-9 [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 221 (2-3): 181-184.
- [7] Matsumoto-Yoshitomi S, Habashita J, Nomura C, et al. Autocrine transformation by fibroblast growth factor 9 (FGF-9) and its possible participation in human oncogenesis [J]. *Int J Cancer*, 1997, 71 (3): 442-450.
- [8] Mattei MG, Penault-Llorca F, Coulier F, et al. The human FGF9 gene maps to chromosomal region 13q11-q12 [J]. *Genomics*, 1995, 29 (3): 811-812.
- [9] 池亚菲, 卢静. 成纤维细胞生长因子 9 的研究进展 [J]. *实验动物科学*, 2012, 29 (4): 58-61.
- [10] Colvin JS, Feldman B, Nadeau JH, et al. Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene [J]. *Dev Dyn*, 1999, 216 (1): 72-88.
- [11] Tsai SJ, Wu MH, Chen HM, et al. Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor [J]. *Endocrinology*, 2002, 143 (7): 2715-2721.
- [12] 陈晓怡, 吴晓林, 顾鸣敏, 等. TGF β 9 转基因小鼠的功能及组织表达谱的研究 [J]. *诊断学理论与实践*, 2009, 8 (5): 496-501.
- [13] Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders [J]. *Biol Psychiatry*, 2006, 59 (12): 1116-1127.
- [14] Turner CA, Watson SJ, Akil H. The fibroblast growth factor family: neuromodulation of affective behavior [J]. *Neuron*, 2012, 76 (1): 160-174.
- [15] Aurbach EL, Inui EG, Turner CA, et al. Fibroblast growth factor 9 is a novel modulator of negative affect [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112 (38): 11953-11958.
- [16] Bernard R, Kerman IA, Thompson RC, et al. Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16 (6): 634-646.
- [17] Evans SJ, Choudary PV, Neal CR, et al. Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (43): 15506-15511.
- [18] 唐娅辉. ADPN/FGF9 通路在慢性应激致抑郁及其药物治疗中的作用研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [19] Azhar M, Zeng G, Ahmed A, et al. Carnosic acid ameliorates depressive-like symptoms along with the modulation of FGF9 in the hippocampus of middle carotid artery occlusion-induced Sprague Dawley rats [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (1): 384-391.
- [20] Wang XQ, Tang YH, Zeng GR, et al. Carnosic acid alleviates depression-like behaviors on chronic mild stressed

- mice via PPAR-gamma-dependent regulation of ADPN/FGF9 pathway [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2021, 238 (2): 501-516.
- [21] 吴莉峰, 石镇港, 曾贵荣, 等. 两种慢性应激对 ICR 小鼠抑郁样行为表现及海马中 FGF2/FGF9 含量的影响 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (3): 394-398.
- [22] 吴莉峰, 唐娅辉, 曾贵荣, 等. FGF9/ADPN 对 ICR 小鼠认知障碍的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32 (9): 702-703.
- [23] 吴莉峰, 唐娅辉, 曾贵荣, 等. FGF9/ADPN 对脂联素基因敲除小鼠认知障碍的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32 (9): 702.
- [24] Garrett L, Becker L, Rozman J, et al. Fgf9 (Y162C) mutation alters information processing and social memory in mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (6): 4580-4595.
- [25] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models [J]. *Neuron*, 2003, 39 (6): 889-909.
- [26] Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain [J]. *J Chem Neuroanat*, 2001, 21 (4): 277-288.
- [27] Collier TJ, Dung LZ, Carvey PM, et al. Striatal trophic factor activity in aging monkeys with unilateral MPTP-induced parkinsonism [J]. *Exp Neurol*, 2005, 191 (Suppl 1): S60-67.
- [28] Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, et al. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra [J]. *Exp Neurol*, 2000, 166 (1): 127-135.
- [29] Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease [J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7 (2): 105-110.
- [30] Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JI, et al. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival [J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11 (7): 755-761.
- [31] Porritt MJ, Batchelor PE, Howells DW. Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons [J]. *Exp Neurol*, 2005, 192 (1): 226-234.
- [32] Pataky DM, Borisoff JF, Fernandes KJ, et al. Fibroblast growth factor treatment produces differential effects on survival and neurite outgrowth from identified bulbospinal neurons in vitro [J]. *Exp Neurol*, 2000, 163 (2): 357-372.
- [33] Tagashira S, Ozaki K, Ohta M, et al. Localization of fibroblast growth factor-9 mRNA in the rat brain [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995, 30 (2): 233-241.
- [34] Huang JY, Hong YT, Chuang JI. Fibroblast growth factor 9 prevents MPP⁺-induced death of dopaminergic neurons and is involved in melatonin neuroprotection in vivo and in vitro [J]. *J Neurochem*, 2009, 109 (5): 1400-1412.
- [35] Guo M, Cui C, Song X, et al. Deletion of FGF9 in GABAergic neurons causes epilepsy [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (2): 196.
- [36] Nakamura S, Arima K, Haga S, et al. Fibroblast growth factor (FGF)-9 immunoreactivity in senile plaques [J]. *Brain Res*, 1998, 814 (1-2): 222-225.
- [37] Kanda T, Iwasaki T, Nakamura S, et al. Self-secretion of fibroblast growth factor-9 supports basal forebrain cholinergic neurons in an autocrine/paracrine manner [J]. *Brain Res*, 2000, 876 (1-2): 22-30.
- [38] Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17071.
- [39] 张明明. 成纤维细胞生长因子 9 在肌萎缩侧索硬化症细胞模型中的保护作用及机制探讨 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [40] 隋瑞娟, 邹伟. 针刺治疗缓解期多发性硬化症 24 例 [J]. *上海针灸杂志*, 2016, 35 (3): 332-323.
- [41] Lindner M, Thummler K, Arthur A, et al. Fibroblast growth factor signalling in multiple sclerosis: inhibition of myelination and induction of pro-inflammatory environment by FGF9 [J]. *Brain*, 2015, 138 (Pt 7): 1875-1893.
- [42] Wang XQ, Li WH, Tang YH, et al. The correlation between adiponectin and FGF9 in depression disorder [J]. *Brain Res*, 2020, 1729: 146596.
- [43] Cipriani A, Zhou X, Del Giovane C, et al. Comparative efficacy and tolerability of antidepressants for major depressive disorder in children and adolescents: a network meta-analysis [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10047): 881-890.

(收稿日期: 2023-04-23; 修回日期: 2023-05-23)

中药皂苷类成分治疗类风湿关节炎的作用机制

刘亚斌¹, 李世兴¹, 唐家美¹, 张东东^{1, 2}, 张化为^{1, 2}, 姜祎^{1, 2}, 宋小妹^{1, 2}, 李玉泽^{1, 2*}, 王薇^{1, 2*}

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省太白七药研究与重点研究室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 类风湿关节炎 (RA) 是一种慢性的自身免疫性疾病, 病因和病机复杂, 目前尚无完全治愈该病症的方法与药物, 对人体健康造成了严重威胁。研究表明, 中药皂苷类成分在 RA 防治中起重要作用, 主要通过靶向 NF- κ B、Wnt、PI3K-AKT 等信号通路发挥抗 RA 作用。本文通过对近 20 年的中药皂苷类成分治疗 RA 的作用机制以及信号通路进行归纳总结, 为其新药研发和临床应用提供更有力的理论支持。

关键词: 类风湿关节炎; 皂苷类成分; 作用机制; 信号通路

中图分类号: R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-2969-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.025

Mechanism of action of Chinese medicine saponins for rheumatoid arthritis

LIU Ya-xiao¹, LI Shi-xing¹, TANG Jia-mei¹, ZHANG Dong-dong^{1, 2}, ZHANG Hua-wei^{1, 2}, JIANG Yi^{1, 2}, SONG Xiao-mei^{1, 2}, LI Yu-ze^{1, 2*}, WANG Wei^{1, 2*} (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Key Laboratory of Research and Application of "Taibai Qi Yao", Xiayang Shaanxi 712046)

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease with complex etiology and pathogenesis. There is no complete cure for the condition, which poses a serious threat to human health. Many studies have shown that herbal saponin components play an important role in RA prevention and treatment, mainly exerting anti-RA effects by targeting NF- κ B, Wnt, PI3K-AKT and other signalling pathways. This paper summarized the mechanism of action as well as the signalling pathways of Chinese medicine saponin components for RA in the past 20 years, to provide strong theoretical support for the new drug development and application.

Key words: rheumatoid arthritis; saponins; mechanism of action; signalling pathway

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、全身性的自身免疫性疾病, 主要是由骨膜炎、关节积液以及骨与软骨侵蚀引起的^[1]。目前, 抑制炎症和滑膜细胞增殖被认为是治疗 RA 的主要办法。研究发现中药皂苷类成分具有抗炎、抗菌、增强免疫力等生物活性^[2], 可通过多机制、多靶点、多通道、多环节的方式来预防 RA 疾病的发生和发展, 但目前尚无系统的综述。本文以细胞信号通路为分类依据, 总结皂苷类化合物基于 NF- κ B、Wnt、PI3K-AKT 等信号通路, 抑制机体炎症反应、滑膜细胞增殖以及血管翳形成, 为 RA 防治提供新方法和思路, 同时为

其后续深入研究提供理论支持。

1 防治 RA 的皂苷类成分

皂苷类成分以单体或总皂苷的形式来发挥抗 RA 疗效, 表 1 对具有治疗 RA 作用的皂苷类化合物名称、植物来源、结构以及皂苷类型进行归纳^[3-56]。其按结构类型可分为齐墩果酸型 (1 ~ 35)、达玛烷型 (36 ~ 43)、熊果烷型 (44 ~ 45)、环菠萝蜜烷型 (46 ~ 47)、螺甾烷型 (48 ~ 50) 和异螺甾烷型 (51 ~ 53)。

2 中药皂苷类成分治疗 RA 的作用机制

2.1 核转录因子 (NF) - κ B 通路

基金项目: 陕西省教育厅课题 (No.22JK0344); 陕西中医药大学校级课题 (No.2021GP27); 陕西中医药大学创新团队项目 (No.2023-CXTD-05)。

作者简介: 刘亚斌, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中草药药效物质基础研究, email: 1216161802@qq.com *通信作者: 李玉泽, 男, 讲师, 主要从事中草药药效物质基础研究, email: lyz1990yeah@163.com; 王薇, 女, 教授, 主要从事中草药药效物质基础研究, email: 2051003@sntcm.edu.cn

表 1 对 RA 具有防治作用的皂苷类成分

Tab 1 Saponin constituents with preventive and curative effect against RA

化合物	皂苷名称	植物来源	结构类型	皂苷类型	文献	化合物	皂苷名称	植物来源	结构类型	皂苷类型	文献
1	桔梗皂苷 D	桔梗	a	A	[3]	40	人参皂苷 Rh ₂	人参	b	A	[23]
2	川续断皂苷 A	续断	a	A	[4]	41	人参皂苷 Re	人参	b	A	[23]
3	川续断皂苷 B	续断	a	A	[4]	42	人参皂苷 CK	人参	b	A	[24]
4	川续断皂苷 C	续断	a	A	[4]	43	三七皂苷 R ₁	三七	b	A	[25]
5	日本续断皂苷 E1	续断	a	A	[4]	44	羟基积雪草苷	积雪草	c	A	[26]
6	木通皂苷 D	续断	a	A	[4]	45	具柄冬青苷	救必应	c	A	[27]
7	灰毡毛忍冬皂苷甲	续断	a	A	[4]	46	黄芪甲苷	黄芪	d	A	[28]
8	灰毡毛忍冬皂苷乙	续断	a	A	[4]	47	玉叶金花皂苷 O	玉叶金花	d	A	[29]
9	常春藤皂苷元	类叶牡丹	a	A	[5]	48	龙舌兰皂苷	蒺藜	e	B	[30]
10	地乌皂苷 W3	地乌	a	A	[6]	49	剑麻皂苷元	剑麻	e	B	[30]
11	七叶皂苷	娑罗子	a	A	[7]	50	知母皂苷元	知母	e	B	[31]
12	竹节参皂苷 IV a	竹节参	a	A	[8]	51	重楼皂苷 VII	延龄草	f	B	[32]
13	商陆皂苷甲	商陆	a	A	[9]	52	薯蓣皂苷	穿山龙	f	B	[33]
14	楸木皂苷 A	楸木	a	A	[10]	53	薯蓣皂苷元	穿山龙	f	B	[34]
15	刺五加皂苷 B	刺五加	a	A	[11]	54	穿山龙总皂苷	穿山龙	—	—	[35]
16	刺五加皂苷 E	刺五加	a	A	[11]	55	威灵仙总皂苷	威灵仙	—	—	[36]
18	土贝母皂苷甲	土贝母	a	A	[12]	56	黄芪总皂苷	黄芪	—	—	[37]
19	类叶牡丹皂苷 B	类叶牡丹	a	A	[13]	57	金铁锁总皂苷	金铁锁	—	—	[18]
20	类叶牡丹皂苷 C	类叶牡丹	a	A	[13]	58	牛膝总皂苷	牛膝	—	—	[38]
21	类叶牡丹皂苷 D	类叶牡丹	a	A	[13]	59	延龄草总皂苷	延龄草	—	—	[39]
22	类叶牡丹皂苷 G	类叶牡丹	a	A	[13]	60	知母总皂苷	知母	—	—	[31]
23	葳岩仙皂苷 A	类叶牡丹	a	A	[13]	61	桔梗总皂苷	桔梗	—	—	[40]
24	葳岩仙皂苷 B	类叶牡丹	a	A	[14]	62	黑龙骨总皂苷	黑龙骨	—	—	[41]
25	葳岩仙皂苷 C	类叶牡丹	a	A	[14]	63	三七总皂苷	三七	—	—	[42]
26	葳岩仙皂苷 D	类叶牡丹	a	A	[14]	64	类叶牡丹总皂苷	类叶牡丹	—	—	[43]
27	葳岩仙皂苷 G	类叶牡丹	a	A	[14]	65	竹节参总皂苷	竹节参	—	—	[44]
28	葳岩仙皂苷 H	类叶牡丹	a	A	[14]	66	赤雹根总皂苷	赤雹	—	—	[45]
29	leonticin D	类叶牡丹	a	A	[14]	67	红景天总皂苷	红景天	—	—	[46]
30	刺楸根皂苷 I	刺楸	a	A	[15]	68	棘茎楸木总皂苷	楸木	—	—	[47]
31	anhuienoside C	地乌	a	A	[16]	69	葫芦巴总皂苷	葫芦巴	—	—	[48]
32	威灵仙皂苷 AR	威灵仙	a	A	[17]	70	木瓜总皂苷	木瓜	—	—	[49]
33	丝石竹皂苷元	金铁锁	a	A	[18]	71	开口箭皂苷	开口箭	—	—	[50]
34	细梗香草皂苷 A	细梗香草	a	A	[19]	72	瘤果黑种草子总皂苷	瘤果黑种	—	—	[51]
35	地榆皂苷 I	地榆	a	A	[20]	73	穿山龙水溶性总皂苷	穿山龙	—	—	[52]
36	人参皂苷 Rg ₁	人参	b	A	[21]	74	铁线莲总皂苷	铁线莲	—	—	[53]
37	人参皂苷 Rg ₃	人参	b	A	[22]	75	白头翁皂苷	白头翁	—	—	[54]
38	人参皂苷 Rg ₅	人参	b	A	[23]	76	地乌总皂苷	地乌	—	—	[55]
39	人参皂苷 Rb ₁	人参	b	A	[23]	77	过岗龙总皂苷	榭藤子	—	—	[56]

注 (Note): A. 三萜皂苷 (triterpenoid saponin); B. 甾体皂苷 (steroidal saponin); —. 总皂苷 (total saponin); a. 齐墩果酸型 (oleanolic acid type); b. 达玛烷型 (dammarane type); c. 熊果烷型 (ursane type); d. 环菠萝蜜烷型 (cycloartane type); e. 螺甾烷型 (spirostane type); f. 异螺甾烷型 (isospiritane type)。

研究表明, NF-κB 通路与 RA 的发展密切相关^[57], 当机体生理状况异常时, 机体内的 IκB 蛋白会被降解或磷酸化, 使得 NF-κB p65 含量增多, 从而调节机体炎症因子的生成以及关节结构重建, 加重 RA 病情的发展^[58]。Liu 等^[16]发现 anhuienoside C (31) 可以通过 NF-κB 及 MAPK 通

路抑制细胞内诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS)、环氧化酶 (COX)-2 以及促炎因子的产生, 改善机体炎症反应。同时, 薯蓣皂苷^[59] (52) 以及威灵仙皂苷 AR^[60] (32) 对胶原诱导性关节炎 (CIA) 模型大鼠的作用机制可能与抑制肿瘤坏死因子 (TNF)-α 和 COX-2 的表达有关。此外,

代艳文等^[44]发现不同浓度的竹节参总皂苷(65)(0.1、1、10、40 mg·L⁻¹)均可通过调控 NF- κ B 信号通路抑制脂多糖(LPS)刺激的 RAW264.7 细胞分泌一氧化氮(NO)、TNF- α 以及白细胞介素(IL)-1 β 等促炎因子,改善细胞内炎症环境。

糖皮质激素(GC)与糖皮质激素受体(GR)结合可以诱导 I κ B 转录,降低 NF- κ B 活性。研究发现七叶皂苷(11)联合低剂量 GC 可降低 NF- κ B p65 以及 p-I κ B 表达,增强机体抗炎作用,同时降低 GC 对机体的不良反应^[7]。此外,NLRP3 炎症小体受到 TNF- α 、LPS 等刺激后,会激活 I κ B 转录因子,产生炎症因子,破坏机体内炎症平衡^[61]。何志明^[18]研究发现丝石竹皂苷元(33)与金铁锁总皂苷(57)可抑制 MH7A 细胞中 NLRP3 的表达以及炎症因子产生,调节机体炎症环境,对治疗 RA 有效。

除此之外,人参皂苷 CK(42)通过抑制巨噬细胞 TLR4-Gai-NF- κ B 通路的信号传导与调节 TNF- α -TNFR2 通路上炎症因子的水平,调节机体内骨保护素(OPG)和核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)的分泌,发挥对骨关节的保护作用^[24]。威灵仙总皂苷^[36](55)和桔梗总皂苷^[62](61)抗 RA 作用机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B p65 信号通路有关。

2.2 Wnt 通路

在 RA 病程中,Wnt 信号通路激活不足或过度均会影响成纤维样滑膜细胞(FLS)的增殖与凋亡,加重骨关节损害^[63]。 β -catenin 是 Wnt 通路中的关键调控因子,可通过调节 β -catenin 转录,来调节机体内 FLS 的动态平衡^[64]。

研究发现,威灵仙总皂苷(55)可调节 LncRNA OIP5-AS1/miR-410-3p/Wnt7b 通路中 Wnt7b 和 Wnt 下游因子的释放或蛋白表达,使细胞阻滞在 G₂/M 期,进而抑制 FLS 增殖^[65]。王颖航^[46]发现红景天总皂苷(67)可抑制 α -SMA、MMP-7 和 β -catenin,进而抑制 FLS 增殖和生长。黄芪总皂苷(56)通过调节 miR-152/Wnt 信号通路,降低佐剂性关节炎(AA)大鼠体内 β -catenin、C-myc 与 Cyclin D1 等因子水平^[37]。此外,白头翁皂苷(75)可通过上调 RA 大鼠体内分泌型卷曲蛋白 2(SFRP2)含量,抑制 FLS 异常增殖^[54]。

2.3 AKT 通路

PI3K-AKT 信号通路在 RA 患者关节滑膜细胞增殖和凋亡失衡中发挥关键作用^[66]。研究发现,桔梗皂苷 D^[3](1)、延龄草总皂苷^[39](59)和威灵仙皂苷 AR^[17](32)可降低 p-PI3K、p-AKT 表

达水平,通过调节 Bcl-2 家族蛋白表达,诱导细胞凋亡。此外,AKT 的活性还会受到 PDK1 的调控。Jiang 等^[28]研究发现黄芪甲苷(46)可通过 PDK1/AKT 通路抑制 FLS 细胞增殖,对治疗 RA 起关键作用。

2.4 MAPK 通路

MAPK 通路主要参与细胞增殖、凋亡和迁移等多种生理过程,与 RA 患者机体的 T 淋巴细胞激活和细胞因子分泌有密切联系。具栖冬青苷^[27](45)和过岗龙总皂苷^[56](77)均可通过降低促炎细胞因子水平、抑制 p38 激活和细胞外信号调节激酶,来抑制牛 II 型胶原诱导性大鼠关节炎(CIA)大鼠滑膜炎和骨骼破坏。重楼皂苷 VII^[32](51)通过调控线粒体凋亡途径以及 JNK 和 p38 MAPK 途径,抑制 FLS 和 MH7A 细胞增殖,诱导 S 期阻滞并诱导细胞凋亡,缓解 RA 症状。

2.5 VEGF 通路

VEGF 与其滑膜细胞表面的受体结合,会引发一系列涉及血管生成的病症^[67]。RA 患者的滑膜组织处于炎症环境中,这种环境会刺激新血管生成,加快血管翳的形成,加剧骨关节病变^[68]。研究发现,穿山龙中的活性物质薯蓣皂苷元^[34](53)、穿山龙水溶性总皂苷^[52](73)以及穿山龙总皂苷^[69](54)均可降低 VEGF 含量。同时,Guo 等^[70]研究发现竹节参总皂苷(65)可作用于 VEGF 和低氧诱导因子(HIF)-1 通路上的关键靶标,降低 VEGF、HIF-1 α 、IL-1 β 等表达,减少血管翳的形成。

2.6 JAK/STAT 通路

JAK/STAT 途径是对各种胞外信号做出特异性应答的关键途径,该通路的持续激活会增加促炎因子含量^[71],使机体产生炎症反应,加重 RA 病症。Guo 等^[8]研究发现,竹节参皂苷 IVa(12)能够通过抑制该通路来减轻 CIA 小鼠体内的炎症以及骨破坏。邓龙飞^[72]发现威灵仙总皂苷(55)可通过降低 JAK2、STAT3 mRNA 表达并抑制 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 的相对表达,从而抑制炎症反应发生。

2.7 RANKL/RANK/OPG 通路

RANKL/核因子- κ B 受体活化因子(RANK)/OPG 通路会促进成骨细胞的增殖和分化,提高骨密度,调节破骨细胞的生成。研究发现,地乌总皂苷^[55](76)和赤芍根总皂苷^[73](66)通过上调 OPG/RANKL 比值来达到治疗 RA 目的。Zeng 等^[74]研究发现瘤果黑种草子总皂苷(72)通过 OPG/RANKL 途径来调节机体内炎症细胞因子的平衡,减少骨损伤。此外,木通皂苷 D(6)在体内外均可抑制

RANKL 诱导的破骨细胞分化, 保护骨关节^[75]。

2.8 Foxp3 通路

Foxp3 是控制 Treg 细胞发育和功能的关键转录因子之一, 可通过调节 Treg 稳定及 Th17 细胞增殖, 来维持机体免疫系统稳定^[76]。人参皂苷 R₃^[22] (37) 通过升高 IL-10 含量和降低 TNF- α 及 IL-6 水平, 来抑制炎症及增强机体免疫力。同时, 牛膝总皂苷 (58) 通过 Foxp3 信号通路逆转 Th17/Treg 失衡, 改善 RA 大鼠关节组织病理变化^[77]。此外, 薯蓣皂苷^[78] (52) 及其皂苷元^[65] (53) 可

抑制 Th17 细胞分化, 降低 ROR γ t 表达, 提高机体免疫活性, 发挥抗 RA 作用。

2.9 其他通路

除此之外, 还有一些相关通路值得关注。如 5-LO/LTB4^[33]、TGF- β /Smad^[35]、ERK^[20]、c-Fos/NFATc1^[29]、GRP78/XBP1/CHOP^[40] 等信号传导通路, 在防治 RA 中发挥重要作用。与治疗 RA 相关的信号通路、中药皂苷成分、作用机制及调节因子见图 1 和表 2^[79-85]。

表 2 皂苷治疗 RA 的信号通路与作用机制

Tab 2 Signalling pathways and action mechanisms of saponins for RA

信号通路	皂苷成分	机制	调节因子	文献
NF- κ B	anhuienoside C	A	iNOS \downarrow , COX-2 \downarrow , TNF- α \downarrow , IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow	[16]
	薯蓣皂苷	A	TNF- α \downarrow , IL-17 \downarrow , PGE2 \downarrow , COX-2 \downarrow	[59]
	威灵仙皂苷 AR	A	TNF- α \downarrow , IL-1 β \downarrow , NF- κ B p65 \downarrow , iNOS \downarrow , COX-2 \downarrow	[60]
		A、B、C、D	TNF- α \downarrow , VCAM-1 \downarrow , TCAM-1 \downarrow , NOX4 \downarrow , NADPH \downarrow , IL-17A \downarrow , Th17 \downarrow , O ₂ \uparrow , H ₂ O ₂ \uparrow , IL-10 \uparrow , Treg \uparrow	[79]
	竹节参总皂苷	A	iNOS \downarrow , TNF- α \downarrow , IL-1 β \downarrow , NF- κ B p65 \downarrow	[44]
	七叶皂苷	A	TNF- α \downarrow , p-p65 \downarrow , p-I κ B- α \downarrow	[7]
	金铁锁总皂苷	A、B、E	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-18 \downarrow , NLRP3 \downarrow , Caspase-1 \downarrow , c-Fos \downarrow	[18]
	丝石竹皂苷元	A、B	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-18 \downarrow , NLRP3 \downarrow , Caspase-1 \downarrow	[18]
	薯蓣皂苷元	A、C	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , NLRP3 \downarrow , Caspase-1 \downarrow , TNF- α \downarrow	[80]
	威灵仙皂苷 AR	A、E	TGF- β 1 \downarrow , NLRP3 \downarrow	[81]
	人参皂苷 CK	A、B	TNF- α \downarrow , IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-17 \downarrow , IFN- γ \downarrow , β -arrestin2 \downarrow , G α \downarrow , MMPs \downarrow , IL-10 \uparrow , G α s \uparrow , OPG/RANKL \uparrow	[24]
	细梗香草皂苷 A	A	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , TNF- α \downarrow , iNOS \downarrow	[19]
	威灵仙总皂苷	A	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , TNF- α \downarrow , MyD88 \downarrow , NF- κ B p65 \downarrow	[36]
	桔梗总皂苷	A	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , TNF- α \downarrow , MyD88 \downarrow , p-p65 \downarrow	[62]
	瘤果黑种草子总皂苷	A、F	IFN- γ \downarrow , TNF- α \downarrow , IL-1 β \downarrow , IL-17 \downarrow , p-p65 \downarrow , IL-4 \uparrow , IL-10 \uparrow	[51]
	薯蓣皂苷元	A、G	ROR γ t \downarrow	[82]
	赤芍根总皂苷	A、F	IL-6 \downarrow , NF- κ B p65 \downarrow	[45]
	穿山龙水溶性总皂苷	A、G	NF- κ B p65 \downarrow , TNF- α \downarrow , IL-1 β \downarrow , ICAM-1 \downarrow , p-I κ B \downarrow	[52]
	楸木皂苷 A	A、E	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , PGE2 \downarrow , NO \downarrow , p-p65 \downarrow , p-I κ B \downarrow	[10]
	羟基积雪草苷	B	IL-1 β \downarrow , p-p65 \downarrow , MMP-13 \downarrow	[83]
三七皂苷 R1	H	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , TNF- α \downarrow , NF- κ B p65 \downarrow	[25]	
黑龙江总皂苷	A	MYD88 \downarrow , IKK \downarrow , IKK \downarrow	[41]	
地乌总皂苷	A、G	TRAF6 \downarrow , c-Fos \downarrow , NFATc1 \downarrow	[55]	
土贝母皂苷甲	A、F	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-8 \downarrow , TNF- α \downarrow , MMP-9 \downarrow	[12]	
类叶牡丹总皂苷	A、E	TNF- α \downarrow , IL-6 \downarrow , NF- κ B p65 \downarrow , Bcl-2/Bax \downarrow	[43]	
地乌皂苷 W3	I	TRAF6 \downarrow , p-MAPKs \downarrow , p-I κ B \downarrow , NF- κ B p65 \downarrow	[6]	
Wnt	威灵仙总皂苷	B	LncRNA OIP5-AS1 \downarrow , Wnt7b \downarrow , β -catenin \downarrow , C-myc \downarrow , Cyclin D1 \downarrow , p-GSK-3 β (Ser9)/GSK-3 β \downarrow , miR-410-3p \uparrow , SFRP4 \uparrow	[65]
	红景天总皂苷	B	α -SMA \downarrow , MMP-7 \downarrow , β -catenin \downarrow , Cyclin D1 \downarrow	[46]
	白头翁皂苷	B、F	SFRP2 \uparrow , MeCP2 \downarrow , β -catenin \downarrow , C-myc \downarrow	[54]
	黄芪总皂苷	B	LncRNA56464.1 \downarrow , β -catenin \downarrow , C-myc \downarrow , CyclinD1mRNA \downarrow , p-GSK-3 β (Ser9)/GSK-3 β \downarrow , miR-152 \uparrow , SFRP4 \uparrow	[37]
AKT	桔梗皂苷 D	A、E	p-PI3K \downarrow , p-AKT \downarrow	[3]
	延龄草总皂苷	A、B	TNF- α \downarrow , IL-6 \downarrow , Bcl-2 \downarrow , p-PI3K \downarrow , p-AKT \downarrow	[39]
	威灵仙皂苷 AR	A、B	TNF- α \downarrow , p-PI3K \downarrow , p-AKT \downarrow	[17]
	黄芪甲苷	B	lncRNA LOC100912373 \downarrow , PDK1 \downarrow , p-AKT mRNA \downarrow , miR-17-5p \uparrow	[28]
MAPK	具栖冬青苷	A、E	IL-1 β \downarrow , IL-6 \downarrow , IL-8 \downarrow , TNF- α \downarrow , p38 \downarrow	[27]
	过岗龙总皂苷	A	IL-1 β \downarrow , IL-17 \downarrow , TNF- α \downarrow , p38 \downarrow , A20 \uparrow	[56]

续表 2

信号通路	皂苷成分	机制	调节因子	文献
VEGF	重楼皂苷 VII	A、E	TNF- α ↓, IL-1 β ↓, IL-6↓, Bcl-2↓, Bax↑, Caspase-3↑	[32]
	龙舌兰皂苷	A、E	p38↓, Caspase-3↑, Caspase-8↑	[30]
	剑麻皂苷元	E	p38↓, Caspase-3↑, Caspase-8↑, Caspase-9↑	[30]
	薯蓣皂苷元	F	VEGF↓	[34]
	穿山龙水溶性总皂苷	A、F	VEGF↓, MMP-9↓, TNF- α ↓	[52]
	穿山龙总皂苷	F	VEGF↓	[69]
JAK/STAT	竹节参总皂苷	F	VEGF↓, HIF-1 α ↓, IL-1 β ↓, 17A↓	[70]
	竹节参皂苷 IV a	A、G	IL-1 β ↓, IL-6↓, TNF- α ↓, IFN- γ ↓	[8]
RANKL	威灵仙总皂苷	A、F	JAK2↓, STAT3 mRNA↓, p-JAK2↓, p-STAT3↓, SOCS3↑, SHP-1↑	[72]
	地乌总皂苷	A、F、I	CTX-1↓, RANKL↓, RANK↓, TNF- α ↓, IL-1 β ↓, IL-6↓, IL-17↓, IL-23↓, OPG↑, OPG/RANKL↑	[55]
Foxp3	赤芍根总皂苷	I	OPG/RANKL↑	[73]
	瘤果黑种草子总皂苷	G	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs↑, Foxp3↑, OPG/RANKL↑	[74]
	木通皂苷 D	G	p-FAK↓, p-Src↓, MMP-9↓	[75]
	人参皂苷 R ₃	A、C	TGF- β ↑, IL-10↓, TNF- α ↓, IL-6↓	[22]
	牛膝总皂苷	A	IL-2↓, IL-6↓, TNF- α ↓	[77]
	薯蓣皂苷	A、C	ROR γ t↑, Foxp3↑	[78]
其他	薯蓣皂苷元	A、C	IL-10↑	[65]
	薯蓣皂苷	B	LTB4↓, BLT1↓, BLT2↓	[33]
	穿山龙总皂苷	J	Collagen↓, α -SMA↓, p-Smad2/3↓	[35]
	人参皂苷 CK	I	MMP-1↓, MMP-3↓, MMP-13↓	[84]
	地榆皂苷 I	B	ERK2↓, Blimp1↓	[20]
	玉叶金花皂苷 O	I	p38↓, p-JNK↓, c-Fos↓	[29]
	桔梗总皂苷	D	TNF- α ↓, IL-1 β ↓, GRP78↓, XBP1↓, CHOP↓	[40]
	楤木皂苷 A	E	Caspase-3↑, Caspase-7↑, Cyt C↑, Bcl-2↓	[10]
	知母皂苷元	B、E	PKM2↓, p-STAT3↓, Bcl-2↓	[85]
	牛膝总皂苷	A、C	硬脂酸↓, 棕榈酸↓, 皮质醇↓, AMP↓	[38]
	三七总皂苷	A、F	TNF- α ↓, IL-1 β ↓	[42]
	商陆皂苷甲	A	IL-1↓, TNF- α ↓	[9]
	刺五加皂苷 B、E	A、B	TNF- α ↓, IL-6↓	[11]
	棘茎楤木总皂苷	A	IL-1 β ↓, IL-8↓	[47]
	羟基积雪草苷	A	IL-3↑	[26]
铁线莲总皂苷	A	IgG↓, IL-1 β ↓, TNF- α ↓	[53]	

注 (Note): A. 抑制炎症 (suppression of inflammation); B. 抑制细胞增殖 (inhibition of cell proliferation); C. 增强免疫 (immune enhancement); D. 抑制氧化应激 (suppression of oxidative stress); E. 诱导细胞凋亡 (induction of apoptosis); F. 抑制血管新生 (inhibition of neovascularization); G. 抑制软骨细胞破坏 (inhibition of chondrocyte destruction); H. 调控淋巴回流 (regulation of lymphatic return); I. 抑制破骨细胞分化 (inhibition of osteoclast differentiation); J. 抑制细胞外基质积累 (inhibition of extracellular matrix accumulation)。

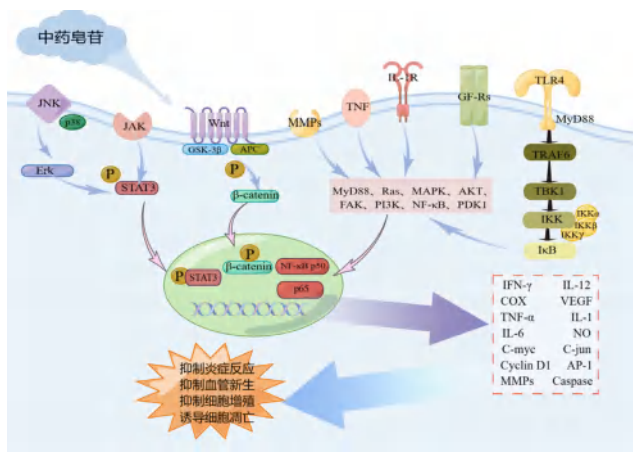


图 1 相关受体介导的皂苷治疗 RA 作用机制
Fig 1 Relevant receptor-mediated mechanism of saponins for RA

3 结语

RA 具有患病人群多, 病程长, 难治愈, 易复发的特点, 治疗 RA 已成为国际研究热点。本文通过对中药皂苷类成分治疗 RA 的作用机制总结, 发现中药皂苷通过调控 NF- κ B、Wnt、PI3K/AKT 等信号通路, 发挥抑制炎症反应与细胞增殖、诱导细胞凋亡等作用, 从而减轻 RA 疾病对骨关节的损害。

此外还发现, 当前对于皂苷防治 RA 的分子机制研究十分有限, 部分皂苷化合物虽有抗 RA 作用, 但并未对其机制进行系统研究。后续可结合现代技术手段和现有研究成果, 多学科交叉深入研究皂苷介导多种细胞信号通路的抗 RA 作用机制, 为含皂苷类中药临床应用提供理论支持。

参考文献

- [1] Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Immunity*, 2017, 46 (2): 183-196.
- [2] Xiang LM, Yi XM, Wang YH, et al. Antiproliferative and anti-inflammatory polyhydroxylated spirostanol saponins from *Tupistra chinensis* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31633
- [3] 王菊, 李龙, 曾家顺. 桔梗皂苷 D 对 MH7A 细胞迁移和侵袭的影响及其机制的研究 [J]. *贵州医药*, 2020, 44 (10): 1515-1517, 1681.
- [4] 吴丹, 陈鸿, 江红, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS/MS 和 TCMP 的续断治疗类风湿性关节炎活性成分筛选及作用机制分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (16): 131-140.
- [5] 赵诗雨, 笔雪艳, 杨炳友, 等. 基于 HDAC3/8 分子互作技术的类叶牡丹抗类风湿性关节炎有效部位活性成分分析 [J]. *中草药*, 2020, 51 (8): 2117-2124.
- [6] Kong XY, Yang Y, Wu WB, et al. Triterpenoid saponin W3 from *Anemone flaccida* suppresses osteoclast differentiation through inhibiting activation of MAPKs and NF- κ B pathways [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11 (10): 1204-1214.
- [7] 黄亚楠. 七叶皂苷与糖皮质激素联用对大鼠佐剂性关节炎的保护作用及其机制 [D]. 烟台: 烟台大学, 2019.
- [8] Guo X, Ji JY, Zhang JK, et al. Anti-inflammatory and osteoprotective effects of Chikusetsusaponin IVa on rheumatoid arthritis via the JAK/STAT signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153801.
- [9] 郑钦岳, 王慧峰, 郑向民, 等. 商陆皂苷甲对兔滑膜细胞产生 IL-1 和 TNF 的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2001 (5): 425-426.
- [10] Ding YJ, Zhao Q, Wang LF. Pro-apoptotic and anti-inflammatory effects of araloside A on human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 306 (4): 131-137.
- [11] 何春燕, 陈晓辉, 秦陈浩, 等. 刺五加皂苷 B 和皂苷 E 抑制巨噬细胞活化作用的实验研究 [J]. *江苏中医药*, 2013, 45 (12): 71-72.
- [12] Liu ZZ, Zhou L, Ma XM, et al. Inhibitory effects of tubeimoside I on synoviocytes and collagen-induced arthritis in rats [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (11): 8740-8753.
- [13] Lv SW, Dong SY, Xu D, et al. Spectrum-effect relationships between fingerprints of *caulophyllum robustum* maxim and inhibited pro-inflammation cytokine effects [J]. *Molecules*, 2017, 22 (11): 1-19.
- [14] Wang QH, Lv SW, Guo YY, et al. Pharmacological effect of *caulophyllum robustum* on collagen-induced arthritis and regulation of nitric oxide, NF- κ B, and inflammatory cytokines in vivo and in vitro [J]. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2017, 2017: 8134321.
- [15] Choi J, Huh K, Kim SH, et al. Antinociceptive and anti-rheumatoid effects of *Kalopanax pictus* extract and its saponin components in experimental animals [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79 (2): 199-204.
- [16] Liu Q, Xiao XH, Hu LB, et al. Anhuinoside C ameliorates collagen-induced arthritis through inhibition of MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 299.
- [17] Han W, Xiong Y, Li YM, et al. Anti-arthritic effects of clematichinenside (AR-6) on PI3K/Akt signaling pathway and TNF- α associated with collagen-induced arthritis [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51 (1): 13-22.
- [18] 何志明. 基于 MH7A 细胞增殖、迁移、凋亡及 NLRP3 炎性小体探讨金铁锁治疗 RA 的作用机制 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2021.
- [19] 沈宇航. 细梗香草皂苷 A 抗类风湿关节炎体内外药效活性及作用机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- [20] Sun HF, Wang MM, Su TT, et al. Ziyuglycoside I attenuates collagen-induced arthritis through inhibiting plasma cell expansion [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 294: 115348.
- [21] 刘喆, 夏楠楠, 刘农军, 等. 人参皂苷 Rg1 抑制滑膜细胞样成纤维细胞侵袭增殖及炎性因子释放的实验研究 [J]. *新中医*, 2022, 54 (11): 1-6.
- [22] Zhang Y, Wang S, Song S, et al. Ginsenoside Rg₃ alleviates complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in mice by regulating CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68 (17): 4893-4902.
- [23] 张梦. 人参皂苷对类风湿关节炎干预作用的实验研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [24] Tang MS, Xie X, Yang YY, et al. Ginsenoside compound K-a potential drug for rheumatoid arthritis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166: 105498.
- [25] 焦丹丽. 三七皂苷 R1 (NG-R1) 促进淋巴回流功能改善类风湿关节炎的作用机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [26] Wang T, Wei ZF, Dou YN, et al. Intestinal interleukin-10 mobilization as a contributor to the anti-arthritis effect of orally administered madecassoside: a unique action mode of saponin compounds with poor bioavailability [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 94 (1): 30-38.
- [27] Ma XM, Chen G, Wang J, et al. Pedunculoside attenuates pathological phenotypes of fibroblast-like synoviocytes and protects against collagen-induced arthritis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2019, 48 (5): 383-392.
- [28] Jiang H, Fan C, Lu YQ, et al. Astragaloside regulates lncRNA LOC100912373 and the miR-17-5p/PDK1 axis to inhibit the proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rats with rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48 (1): 1-10.
- [29] Gal M, Kim O, Tran PT, et al. Mussaendoside O, a N-triterpene cycloartane saponin, attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis and inhibits lipopolysaccharide-induced bone loss [J]. *Phytomedicine*, 2022, 105: 154378.
- [30] Liagre B, Vergne-Salle P, Leger DY, et al. Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregu-

- lation of cyclooxygenase-2 [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20 (4): 451-460.
- [31] 刘攀旺. 知母总皂苷抑制滑膜成纤维细胞病理性糖酵解抗 RA 滑膜增生的机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [32] Meng M, Yue ZG, Chang L, et al. Anti-rheumatoid arthritic effects of Paris saponin VII in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 683698.
- [33] 魏志萍. 薯蓣皂苷经 5-LO/LTB4 信号通路治疗 RA 的作用机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [34] 郭亚春, 梁秀军, 高亚贤, 等. 中药薯蓣皂苷元对 CIA 大鼠滑膜组织 VEGF 及 AP- I 表达的影响 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2015, 17 (9): 1801-1805.
- [35] 吴晓东, 徐胜梅, 杨智华, 等. 穿山龙总皂苷通过 TGF- β /Smad 信号通路减轻类风湿关节炎相关间质性肺病的肺纤维化 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41 (1): 99-102, 281-283.
- [36] 赵守彰, 孙秀业. 基于 Toll 样受体信号通路威灵仙总皂苷对类风湿关节炎大鼠踝关节病理学改变影响 [J]. *临床军医杂志*, 2022, 50 (7): 716-720, 724.
- [37] 姜辉. 实验性关节炎相关长链非编码 RNAs 的筛选、功能研究及黄芪总皂苷的干预作用 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2017.
- [38] 张衡, 吴虹, 卜妍红, 等. 微透析结合代谢组学探究佐剂性关节炎大鼠的代谢扰动及牛膝总皂苷的干预作用 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37 (6): 877-884.
- [39] 蒋安蓉. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨延龄草总皂苷在类风湿关节炎中的应用 [D]. 宜昌: 三峡大学, 2021.
- [40] 陈昭琳, 李俊, 马陶陶, 等. 桔梗总皂苷治疗大鼠佐剂性关节炎的作用及其对 GRP78/XBP1/CHOP 信号通路的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53 (3): 395-400.
- [41] 刘杨, 丁然, 江励华, 等. 黑龙骨总皂苷对 CIA 小鼠脾脏 MYD88、IKK- α 、IKB- α 蛋白表达的影响 [J]. *中药材*, 2018, 41 (6): 1444-1448.
- [42] 刘东京, 肖颖, 吴季霖. 三七总皂苷联合雷公藤多苷对胶原诱导性关节炎大鼠血清白细胞介素 -1 β 、肿瘤坏死因子 - α 表达及滑膜新生血管的影响 [J]. *中国医学工程*, 2018, 26 (7): 12-16.
- [43] 吕春艳, 吕邵娃, 郭玉岩, 等. 类叶牡丹总皂苷与总生物碱组分配伍治疗类风湿性关节炎的配伍增效机制研究 [J]. *河北中医药学报*, 2018, 33 (4): 5-9, 31.
- [44] 代艳文, 袁丁, 万静枝, 等. 竹节参总皂苷通过 NF- κ B 通路对 LPS 致 RAW264.7 细胞炎症的保护作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39 (11): 2076-2080.
- [45] 祝晴晴, 梅爱敏, 刘永平, 等. 赤芍根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠 NF- κ B p65 和 IL-6 表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31 (6): 62-66.
- [46] 王颖航. Wnt 信号转导通路在成纤维样滑膜细胞分化中的作用及红景天活性成分对其干预机制的研究 [D]. 长春: 长春中医药大学附属医院, 2017.
- [47] 金攀. 棘茎楸木总皂苷对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖与凋亡的影响 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2016.
- [48] 王然. 中药葫芦巴抗类风湿性关节炎的药效物质基础研究 [D]. 天津: 天津中医药大学第一附属医院, 2018-05-31.
- [49] 戴敏, 魏伟, 沈玉先, 等. 木瓜总皂苷对免疫性关节炎大鼠血液流变性的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2002 (12): 20-21.
- [50] 梁乐. 开口箭皂苷提取优化及其对关节炎小鼠的治疗研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2015.
- [51] Jiang HL, Xu F, Zeng L, et al. Saponins from *Nigella glandulifera* seeds attenuate collagen-induced rheumatoid arthritis in rats via the OPG/RANKL/NF- κ B and Ang/Tie-2 pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114714.
- [52] 段一娜, 王明娟, 杨佳琪, 等. 穿山龙水溶性总皂苷对类风湿患者成纤维样滑膜细胞核因子 κ B p65 的抑制作用 [J]. *广州中医药大学学报*, 2014, 31 (2): 243-246.
- [53] 孙晓博. 单叶铁线莲总皂苷提取纯化工艺及抗类风湿性关节炎的初步研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2011.
- [54] 缪成贵, 杨剑婷, 何华奇, 等. 白头翁皂苷调控 RA 模型大鼠 FLS SFRP2 表达 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38 (12): 1977-1981.
- [55] 杨悦. 基于骨免疫学探索地乌总皂苷对类风湿关节炎关节骨破坏的影响作用 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [56] Xiong H, Luo M, Ju YK, et al. Triterpene saponins from *Guo-gang-long* attenuate collagen-induced arthritis via regulating A20 and inhibiting MAPK pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 269: 113707.
- [57] Xia ZB, Meng FR, Fang YX, et al. Inhibition of NF- κ B signaling pathway induces apoptosis and suppresses proliferation and angiogenesis of human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis [J]. *Medicine*, 2018, 97 (23): e10920.
- [58] Duan WF, Li H. Combination of NF- κ B targeted siRNA and methotrexate in a hybrid nanocarrier towards the effective treatment in rheumatoid arthritis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16 (1): 1-9.
- [59] 魏志萍, 刘雅珺, 杨树龙. 薯蓣皂苷对 TNF- α 诱导的 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞 COX 表达的影响 [J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2020, 60 (4): 6-9.
- [60] Peng C, Perera PK, Li YM, et al. Anti-inflammatory effects of *Clematis chinensis* Osbeck extract (AR-6) may be associated with NF- κ B, TNF- α , and COX-2 in collagen-induced arthritis in rat [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32 (10): 3119-3125.
- [61] Man SM, Kanneganti TD. Gasdermin D: the long-awaited executioner of pyroptosis [J]. *Cell Res*, 2015, 25 (11): 1183-1184.
- [62] 何晓丽, 钟先锦, 龚菊梅, 等. 桔梗总皂苷对胶原性关节炎大鼠的抗炎作用及对 TLR/MyD88/NF- κ B 通路的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37 (8): 931-935.
- [63] 王颖旎, 武平, 余泽芸, 等. Wnt/ β -连环蛋白信号通路负调节蛋白 SOST 在类风湿关节炎中的研究进展 [J]. *现代免疫学*, 2021, 41 (5): 436-440.
- [64] Cai C, Zhu XH. The Wnt/ β -catenin pathway regulates

- self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5 (5): 1191-1196.
- [65] 孙远. LncRNA OIP5-AS1/miR-410-3p/Wnt7b 信号轴促进类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的机制及威灵仙总皂苷的干预研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.
- [66] Cai XY, Zheng Y, Ren FJ, et al. Secretory phosphoprotein 1 secreted by fibroblast-like synoviocytes promotes osteoclasts formation via PI3K/AKT signaling in collagen-induced arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113687.
- [67] 孙莉, 王晓非. IGFBP-6 与类风湿关节炎关系的研究进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25 (11): 2109-2114.
- [68] 王言, 吴虹, 邓然, 等. 关节滑膜炎性微环境对类风湿关节炎发生发展作用的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36 (6): 754-759.
- [69] 董文娟, 郭亚春, 宋鸿儒. 穿山龙总皂苷对胶原诱导关节炎大鼠滑膜血管内皮生长因子、血管生成素-2 及受体 Tie-2 表达的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48 (2): 101-105.
- [70] Guo X, Ji JY, Jose KSGS, et al. Computational prediction of antiangiogenesis synergistic mechanisms of total saponins of *Panax japonicus* against rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 566229.
- [71] Isomäki P, Junttila I, Vidqvist KL, et al. The activity of JAK-STAT pathways in rheumatoid arthritis: constitutive activation of STAT3 correlates with interleukin 6 levels [J]. *Rheumatology*, 2015, 54 (6): 1103-1113.
- [72] 邓龙飞. 基于 JAK2/STAT3 信号通路研究威灵仙总皂苷治疗类风湿关节炎作用机制 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.
- [73] 邹君, 刘永平, 顾士栋, 等. 赤芍根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠血清 OPG/RANKL 水平的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (8): 218-220.
- [74] Zeng L, Li CY, Jiang HL, et al. Total saponins from *Nigella glandulifera* seeds ameliorate adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats by inhibition of an inflammatory response and bone erosion [J]. *Bio Med Res Int*, 2021, 2021: 6613527.
- [75] Liu KF, Liu Y, Xu YT, et al. Asperosaponin VI protects against bone destructions in collagen induced arthritis by inhibiting osteoclastogenesis [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153006.
- [76] Chemin K, Gerstner C, Malmström V. Effector functions of CD4⁺ T cells at the site of local autoimmune inflammation—lessons from rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 353.
- [77] 宋献美, 许波, 张欢欢, 等. 牛膝总皂苷对类风湿关节炎大鼠 Th17/Treg 平衡和滑膜组织中 IL-2、IL-6、TNF- α 的影响 [J]. *中医研究*, 2020, 33 (3): 70-73.
- [78] 封桂英, 郭亚春, 邢恩鸿, 等. 薯蓣皂苷对胶原诱导型关节炎小鼠 ROR γ t、Foxp3 的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2015, 31 (12): 1077-1081.
- [79] Yan SM, Zhang X, Zheng HL, et al. Clematichinenside inhibits VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF- α -treated endothelial cells via NADPH oxidase-dependent I kappa B kinase/NF-kappa B pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 78 (11): 190-201.
- [80] 张华燕, 何援军. 薯蓣皂苷元改善类风湿关节炎模型大鼠关节肿胀的效果及作用机制研究 [J]. *中医正骨*, 2021, 33 (4): 44-50.
- [81] Li Y, Zheng JY, Liu JQ, et al. Succinate/NLRP3 inflammasome induces synovial fibroblast activation: therapeutic effects of Clematichinenside AR on arthritis [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 532.
- [82] 赵晓菲. 穿龙薯蓣皂苷元体外对胶原诱导性关节炎小鼠 Th1、Th2、Th17 细胞及特异性转录因子的影响 [D]. 承德: 承德医学院, 2016.
- [83] Yu WG, Shen Y, Wu JZ, et al. Madecassoside impedes invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocyte from adjuvant arthritis rats via inhibition of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-13 expression [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16 (5): 330-338.
- [84] Choi YS, Kang EH, Lee EY, et al. Joint-protective effects of compound K, a major ginsenoside metabolite, in rheumatoid arthritis: in vitro evidence [J]. *Rheumatol Int*, 2013, 33 (8): 1981-1990.
- [85] Dai Y, Liu PW, Wen W, et al. Sarsasapogenin, a principal active component absorbed into blood of total saponins of *Anemarrhena*, attenuates proliferation and invasion in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through downregulating PKM2 inhibited pathological glycolysis [J]. *Phytother Res*, 2023, 37 (5): 1951-1967.

(收稿日期: 2023-08-09; 修回日期: 2023-09-20)

二酮哌嗪类化合物的研究进展

李锬, 张静静, 陈林 (黄河科技学院 医学院, 郑州 450063)

摘要: 二酮哌嗪类化合物是一类由两个 α -氨基酸通过肽键缩合而成的二肽类化合物, 骨架为六元环, 具有两个氢键供体和两个氢键受体。此外, 二酮哌嗪类化合物的六元环构型稳定, 使得其在药理上具有非常重要的作用, 可作为 DNA 结合剂、微管蛋白解聚剂、rho 抑制剂、群体感应激动剂与拮抗剂、抗真菌剂、催产素拮抗剂、PDE5 抑制剂、神经保护剂等。如今二酮哌嗪已成为近年来化学生态学领域的一个热门课题, 本文对二酮哌嗪类化合物的研究进行总结, 并对今后的发展趋势进行探讨与展望。

关键词: 二酮哌嗪; 结构特点; 合成途径; 生物活性; 研究进展

中图分类号: R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-2977-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.026

Research progress in diketopiperazine compounds

LI Kun, ZHANG Jing-jing, CHEN Lin (School of Medicine, Huanghe Science and Technology University, Zhengzhou 450063)

Abstract: Diketopiperazines compounds are dipeptides synthesized by peptide bond condensation of two α -amino acids. The skeleton is a six-membered ring, with two hydrogen bond donors and two hydrogen bond receptors. In addition, the stable six-member ring configuration of diketopiperazines plays very important roles in pharmacology, such as DNA binding agents, tubulin depolymerization agents, rho inhibitors, quora-sensing agonists and antagonists, antifungal, oxytocin antagonists, PDE5 inhibitors, neuroprotective agents, etc. Diketopiperazines have become a hot topic in chemical ecology in recent years. This paper summarized the research progress in diketopiperazines and prospect.

Key words: diketopiperazine; structure feature; synthetic pathway; biological activity; research progress

二酮哌嗪类 (diketopiperazines, DKPs) 化合物是一类重要的天然产物, 主要由海洋微生物产生。近几年, 世界各国科学家陆续从海洋的细菌、真菌和放线菌中分离得到多种二酮哌嗪类活性成分^[1]。如来源于真菌 *Aspergillus ustus* 的二酮哌嗪类化合物 NPI-2358 具有明显的抗肿瘤活性, 是一类起效迅速的血管阻断剂, 对早期肿瘤有抗血管作用^[2]。由于二酮哌嗪类化合物具有广泛的药理活性与潜在的成药性, 近年来人们在二酮哌嗪类的合成方面, 发展了组合化学、固相合成、液相合成等技术, 成功合成了多种具有药理活性的二酮哌嗪类化合物^[3]。结合以往的研究, 该类化合物具有较好的开发潜力。因此, 本文综述近年来二酮哌嗪类化合物的结构特点、合成途径和生

物活性等方面的研究进展, 以期为其进一步的开发和临床应用提供参考。

1 二酮哌嗪类化合物结构特点

二酮哌嗪类化合物是一类由两个 α -氨基酸通过肽键缩合而成的最小环二肽, 基本结构式如图 1 所示。二酮哌嗪具多种药理活性, 在药物开发中占有重要地位, 其结构简单, 只有一个六元刚性环, 具有很好的稳定性。根据二酮哌嗪类化合物骨架的结构特点, 可以分为以下几类。

1.1 吡啶二酮哌嗪类化合物

典型的吡啶二酮哌嗪类化合物的结构式如图 2 所示。该类化合物具有广泛的生物活性, 如抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节、抗氧化和杀虫活性, 它们有作为药物或先导化合物的巨大潜

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (No. LHGJ20191520); 河南省高等学校重点科研项目 (No. 22B350002); 河南省科技攻关项目 (No. 222102310388)。

作者简介: 李锬, 男, 副教授, 主要从事天然产物活性成分研究, email: 13071000171@163.com

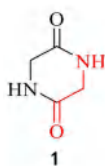


图 1 二酮哌嗪类化合物基本结构

Fig 1 Basic structure of diketopiperazines

力^[4]。另外,根据化学结构的差别,吡咯二酮哌嗪类化合物又可分为 Spirotryprostatin 类、Verruculogen 与 Fumitremorgin 类及 Tryprostatin 类。其中, Spirotryprostatin 类化合物中吡咯部分和二酮哌嗪结构以螺环形式连接,构成了螺环吡咯二酮哌嗪类化合物,如化合物 2 和 3; Verruculogen 与 Fumitremorgin 类化合物的吡咯环上 C2 位置与哌

嗪环上 N8 位置直接或间接相连,形成了闭环状态,构成了一个 β -卡波林结构单元,即闭环吡咯二酮哌嗪类化合物,如化合物 4~7; Tryprostatin 类化合物的吡咯环上 C2 位置与哌嗪环上 N8 位置无连接,形成了开环状态,即开环吡咯二酮哌嗪化合物^[5],如化合物 8 和 9。

此外,在自然界中还存在四氢- β -咔啉二酮哌嗪类化合物,是一种特殊的吡咯生物碱。如从古树大理茶优势内生真菌间座壳属菌株 *Diaporthe tectonicgena* 中分离得到的 Tectonicgenazine A (10) 就属于此类^[6]。目前,四氢- β -咔啉类化合物已经被用于治疗肿瘤、获得性免疫缺陷综合征、勃起功能障碍等多种疾病^[7]。

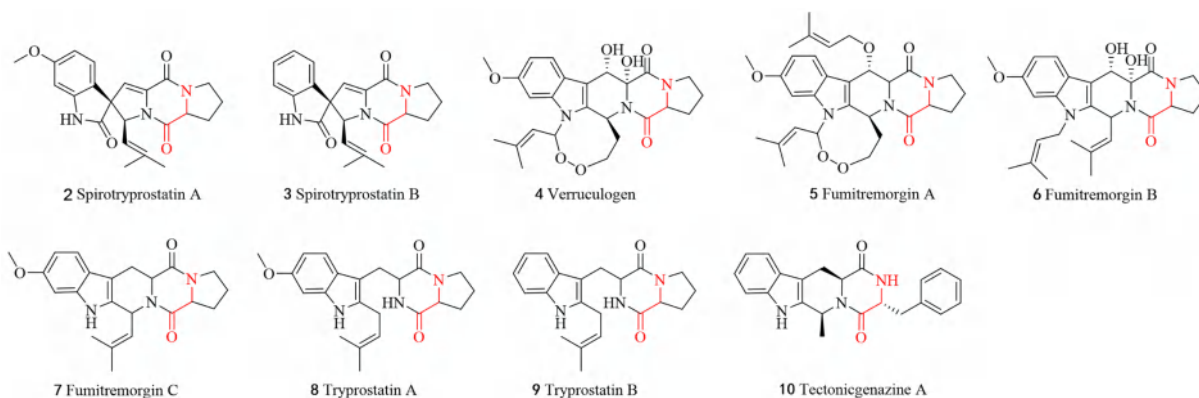


图 2 典型的吡咯二酮哌嗪类化合物

Fig 2 Representative indolyl DKPs

1.2 多硫代二酮哌嗪类化合物

多硫代二酮哌嗪类化合物 (epipolythiodioxopiperazines, ETPs) 是由丝状子囊菌产生的一类重要的活性次级代谢产物,其典型化合物的结构式如图 3 所示,具有抗肿瘤、免疫调节、抗菌、抗病毒及抑制多种酶活性等作用^[8]。其结构特征为二酮哌嗪母核中含硫桥键,去除或断裂硫桥通常会导致生物活性丧失。根据组成其母核(含硫桥的二酮哌嗪)的氨基酸种类、修饰方法以及各片段的连接方式,可分为 15 种类型,包括 gliotoxin、sirodesmin、sporidesmin、verticillin、chetomin、chaetocin、scabrosin、leptosin、aronatin、emetrin、epicorazine、gliocladine C、emethallicin、hyalodendrin 以及 dithiosilvatin^[9-10]。化合物 Emestrin J (17) 属于 emestrin 类型,具有一个二硫桥键,能够显著抑制 786-O 细胞克隆及迁移,诱导 786-O 细胞凋亡并阻滞细胞分裂在 G₂/M 期,是一个潜在的具有抗肿瘤活性的先导化合物^[11]。

1.3 脯氨酸类二酮哌嗪化合物

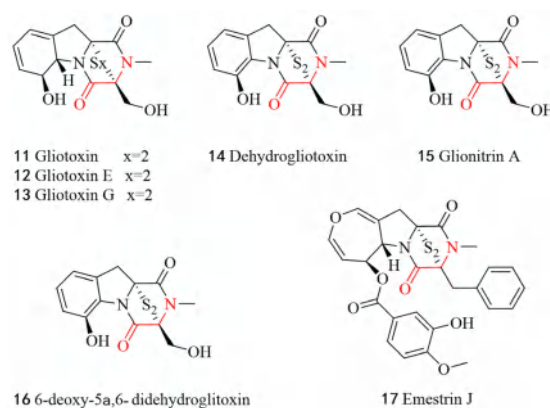


图 3 典型的多硫代二酮哌嗪类化合物

Fig 3 Representative ETPs

以脯氨酸为骨架的二酮哌嗪类衍生物在自然界、食品饮料中都有发现,其中芳香型和脂肪型类似物 Phe-Pro 型、Try-Pro 型、Leu-Pro 型以及 Val-Pro 型分布更为广泛^[12]。化合物 18 是从鲁杰氏菌属真菌 (*Ruegeria*) 以及兔子皮肤组织中分离出来的,具有调节植物的生长的作用^[13]。Phe-Pro 型的代表衍生物 19 是从乳酸菌 *Lactobacillus coryniformis*

以及 *L. plantarum* 中分离得到的。该化合物可有效抑制细菌真菌和其他病原体中的肠球菌 (VRE)。此外, 从大黄鱼内生菌 *B. coagulans* LL1103 发酵液中分离并鉴定的化合物 **31**, 通过抑菌圈实验, 发现其对大肠埃希菌有一定抑制作用^[14]。

王越等^[15]从 *A. terreus* HT-1 发酵产物的乙酸乙酯萃取物中分离得到了 15 个二酮哌嗪类化合物, 鉴定了 12 个脯氨酸类二酮哌嗪化合物, 结构式如图 4 所示, 分别为 bis (dethio) bis (methylsulfanyl) gliotoxin (**20**), 环 (*D*-4-羟基-脯氨酸-*L*-苯丙氨酸) 二肽 (**21**), 环 (*L*-4-羟基-脯氨酸-*L*-苯丙氨酸) 二肽 (**22**), 环 (*L*-4-羟基-脯氨酸-*L*-酪氨酸) 二肽 (**23**), 环 (*L*-4-羟基-脯氨酸-*L*-亮氨酸) 二肽 (**24**), 环 (*D*-4-羟基-脯氨酸-*D*-异亮氨酸) 二肽 (**25**), 环 (*D*-脯氨酸-*L*-酪氨酸) 二肽 (**26**), 环 (*L*-亮氨酸-*L*-脯氨酸) 二肽 (**28**), 环 (*L*-脯氨酸-*L*-苏氨酸) 二肽 (**29**), 环 (*L*-脯氨酸-甘氨酸) 二肽 (**30**), 环 (*L*-脯氨酸-甘氨酸) 二肽 (**31**)。

采用 MTT 法检测全部化合物的神经保护活性, 发现在 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 化合物 **20** 和 **24** 显示出较好的神经保护活性, 使 H_2O_2 诱导氧化损伤的神经细胞 (HT22) 的细胞存活率均从 44.06% 分别提高到 69.51% 和 76.75%。

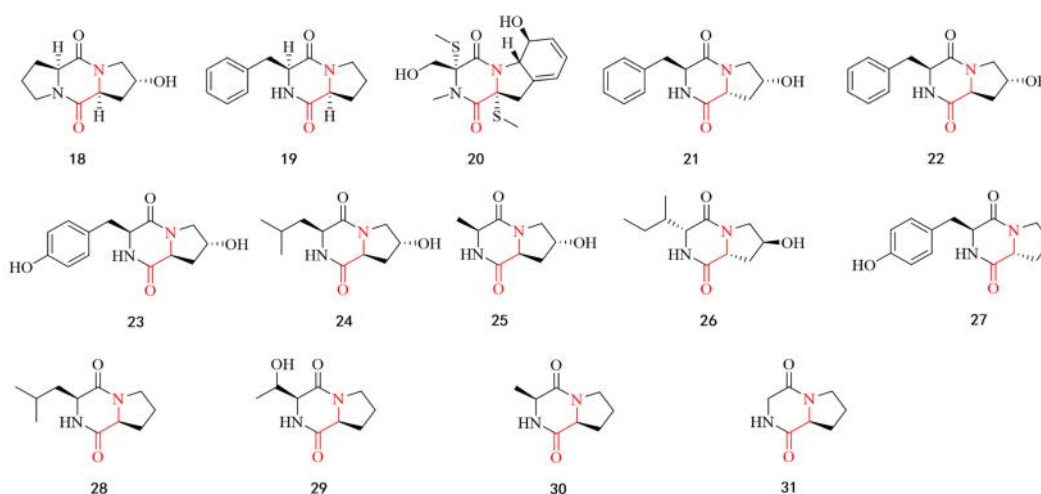


图 4 典型的脯氨酸类二酮哌嗪类化合物 (18 ~ 31)

Fig 4 Representative proline DKPs (18 ~ 31)

2 二酮哌嗪类化合物的合成途径

近年来, 国内外研究人员在二酮哌嗪类化合物有机合成方面建立了组合化学、固相合成和液相合成等一系列方法与技术, 成功获得具有多种药理活性的二酮哌嗪类化合物^[16]。与有机合成相比, 二酮哌嗪类化合物的生物合成研究起步较晚, 但随着现代生物技术和高通量测序技术的飞速发展, 若干二酮哌嗪类化合物的生物合成途径已被阐明, 分为非酶催化和酶催化途径。其中, 非酶催化途径为肽链的环化是自发的, 未经酶的参与。酶催化途径可分为非核糖体肽合成酶和环二肽合酶途径两大类^[17]。

2.1 有机化学合成

研究人员率先在二酮哌嗪类化合物的有机合成方面开展了大量的研究。随着液相、固相、组合化学和微波辅助合成方法的快速发展, 以及 2, 5-二酮哌嗪类化合物环的选择性官能化的进展, 研究人员已经能够全合成含有这种杂环骨架的复

杂结构 (见图 5)。二酮哌嗪类化合物具有一个刚性骨架, 可以模仿优先选择的多肽构象, 并在其结构中嵌入受限制的氨基酸。这些具有不同取代基团的三维分子骨架克服了传统药物化学试剂的局限性——典型平面性。这些手性丰富的分子使用化学方法很容易从现成的 α -氨基酸中合成, 并已被用作组合化学中构建文库的核心支架^[18-19]。随着药物合成和药物化学知识的丰富, 以及含有这种支架的化合物表现出的不断扩大的生物活性, 这种模板有望在药物研发方面进一步发展。

2.2 非核糖体肽合成酶 (non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs) 生物合成

目前, 已报道的 DPKs 主要是通过 NRPS 进行合成, 例如吡啶二酮哌嗪 (tryprostatins, fumitremorgins, notoamides, roquefortine)、多硫代二氧基哌嗪 (ETP) 化合物 (gliotoxin 和 sirodesmin)、铁载体 (dimenunic acid, erythrochelin 和 coprogens)、植物毒素 thaxtomin、麦角肽碱 ergopeptine 等^[20]。

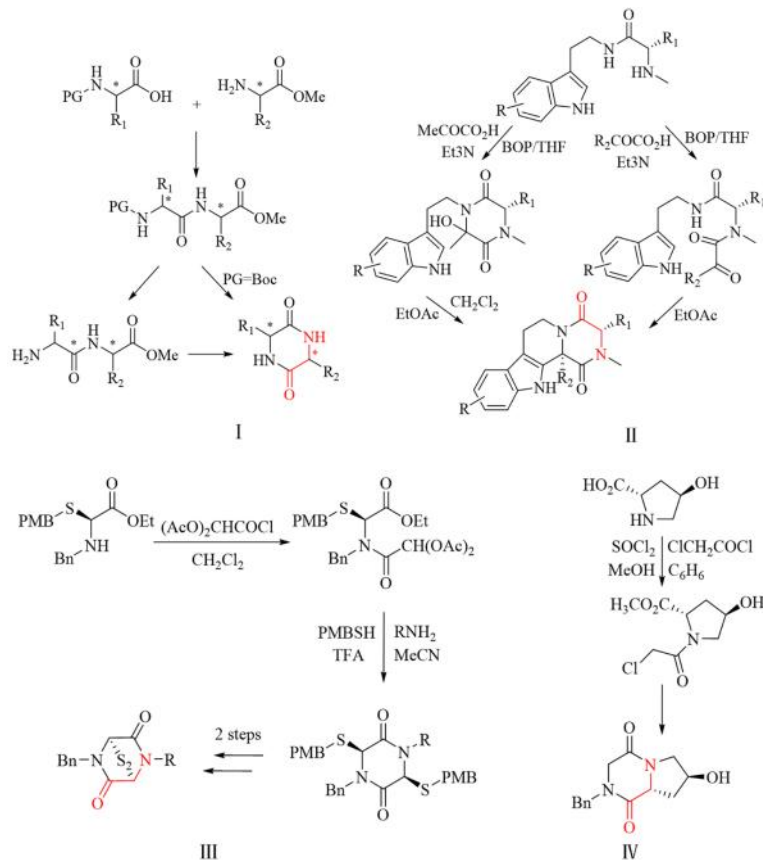


图 5 几种常见的二酮哌嗪类化合物的合成

Fig 5 Synthesis of several common DKPs compounds

典型的 NRPSs 每一模块含有一套独特的、非重复使用的催化功能域，至少包括 3 个催化功能域：缩合结构域（condensation domain, C domain）、腺苷化结构域（adenylation domain, A domain）和肽酰载体蛋白结构域（peptide carrier protein, PCP），其中 A domain 负责底物氨基酸的识别与活化，并将活化后的氨基酸转移至 PCP domain 上形成氨酰化硫酯，C domain 催化 PCP 上的氨（肽）酰化硫酯的氨基与上游模块中 PCP 上的氨酰化硫酯的羧基缩合形成肽键。

2.3 环二肽合酶（cyclodipeptide synthases, CDPSs）生物合成

对 CDPSs 生物合成途径的产物进行结构多样性的合理设计以期获得结构新颖或具有良好生物学活性的先导化合物，已成为热点之一。不同于 NRPSs 识别底物的多样性，某些 NRPSs 自身含有修饰氨基酸的结构域，CDPSs 生物合成途径的修饰发生在环二肽合成之后，由 CDPSs 生物合成基因簇中的后修饰酶对环二肽进行修饰^[21]。CDPSs 能够不经过 NRPSs 途径中腺苷酰化结构域活化氨基酸的步骤，利用现成的氨酰-tRNA（aa-tRNA）而不是游离的氨基酸作为底物得到 DKPs。

目前国内外经 CDPSs 途径合成的二酮哌嗪类化合物共报道了 7 种^[22]，包括 albonoursin、mycocyclusin、pulcherriminic acid、nocazine XR334、nocazine E、bicyclomycin 以及 drimentines。此外，甲基化双色氨酸及 nocardioazines A 和 B 的合成途径也已有报道^[23]。

3 二酮哌嗪类化合物的活性研究

二酮哌嗪类药物的生物活性普遍较好，作为抗肿瘤药物、抗菌药物、抗真菌药物以及催产素等广泛应用^[24]。

3.1 抗肿瘤药物

研究显示，多种二酮哌嗪类化合物具有抗肿瘤活性，且具有良好的细胞选择性，近年来已成为治疗肿瘤的候选药物。

3.1.1 DNA 结合剂 螺环二酮哌嗪是一种含有醌基的化合物，能有效地与 DNA 结合，其作用效果与阿霉素、米托蒽醌等药物相当，同时也能抑制对阿霉素、米托蒽醌等药物产生抗性的肿瘤细胞^[25]。3, 3'-取代基和立体构型是影响药物活性的重要因素。在抗结肠癌与乳腺癌的活性筛选中，3S, 3R 螺环二酮哌嗪异构体 **32**、**33**、**34** 以及 3R, 3S 异构体 **35**（结构式如图 6 所示）具有与

阿霉素相同甚至更强的效力^[26], 其中 **35** 对两种肿瘤细胞均有较强的抑制作用。

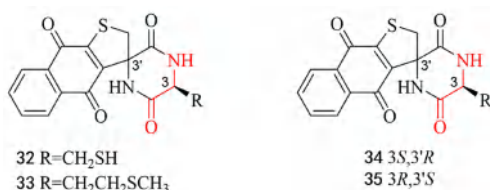


图 6 典型的作为 DNA 结合剂的二酮哌嗪类化合物 (32 ~ 35)

Fig 6 Representative DKPs as DNA binders (32 ~ 35)

3.1.2 微管蛋白解聚剂 由焦曲霉代谢生成的二酮哌嗪 (一)-Phenylahistin (**36**), 是一种具有广泛抗肿瘤作用的微管蛋白黏合剂。它的脱氢类似物 Dehydrophenylahistin (**37**) 相较于已知的许多抗肿瘤药拥有更强的细胞毒性, 如长春花碱、紫杉醇和长春新碱^[27]。含有叔丁基取代基的化合物 **38** (Plinabulin, NPI-2358/KPU-2) 是一种有效的抗肿瘤药物, 作用部位与秋水仙素相同。在临床试验中, 化合物 **38** 通过与微管蛋白结合对乳腺癌、实体肿瘤、结肠癌、前列腺癌均有良好的疗效^[28], 活性仅在肿瘤血管中生长的内皮细胞起作用, 对正常的血管组织没有损害, 现已进入 II 期临床研究 (结构式如图 7 所示)。

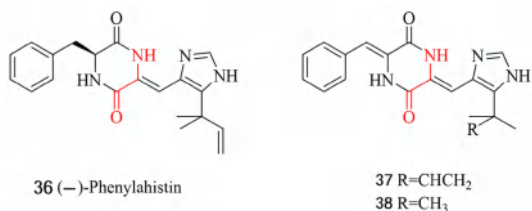


图 7 典型的作为微管蛋白解聚剂的二酮哌嗪类化合物 (36 ~ 38)

Fig 7 Representative DKPs as tubulin depolymerizing agents (36 ~ 38)

3.2 抗菌药物

二酮哌嗪类化合物是一类含有多种天然多肽的抗菌药物, 已被广泛用作多种抗菌剂^[29], 其结构式如图 8 所示。

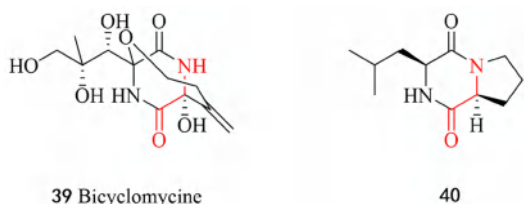


图 8 典型的作为抗菌药物的二酮哌嗪类化合物 (39 ~ 40)

Fig 8 Representative DKPs as antibacterial (39 ~ 40)

3.2.1 Bicyclomycine 化合物 **39** (Bicyclomycine) 是一种从 Sapporonesis 和 Aizumenses 中得到的抗菌药物, 其具有抗菌谱广、吸收迅速、毒性小的特点, 已被广泛应用于治疗人类腹泻及猪、牛的

细菌性痢疾等疾病。Bicyclomycine 是目前仅有的可以选择性地抑制 rho 的药物 (RecA 型 ATP 酶: 大肠埃希菌的转录终止因子)^[30]。

3.2.2 群体感应激动剂与拮抗剂 很多革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌通过释放并感知可传播的小分子信号进行沟通, 被称为“群体感知”。一些二酮哌嗪类物质可活化或抑制特定革兰氏阴性菌的群体感应。如化合物 **40** (化合物 **19** 的异丙基类似物) 能够抑制耐万古霉素肠球菌。化合物 **40** 和化合物 **19** 同时应用则具有协同抗菌效果, 有效抑制难辨的梭状芽孢杆菌 ($MIC_{50} = 0.064 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[31], 对厌氧革兰氏阴性菌及阳性菌的抑制作用优于目前已有的抗菌药物 (如头孢西丁、甲硝唑、克林霉素等)。

3.3 抗真菌药物

甲壳多糖酶抑制剂 (化合物 **41**) 是一种二酮哌嗪 (D-精氨酸和 D-脯氨酸的环二聚体), 可以阻止啤酒酵母菌的正常细胞分裂^[32], 作为具有潜力的抗真菌药、抗疟药和杀虫剂正日益引起学者的重视。化合物 **41** 的 LL 异构体 **42** 具有同样的酶抑制作用, 但是其 DL 异构体 **43** 的活力显著降低, 结构式如图 9 所示。近年来, 人们在沙雷氏菌壳多糖酶的研究中, 发现沙雷氏菌壳多糖酶具有的吡喃糖并噁唑啉的结构, 化合物 **41** 能与其很好地结合^[33]。

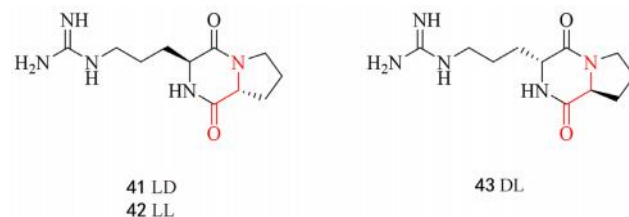


图 9 典型的作为抗真菌药物的二酮哌嗪类化合物 (41 ~ 43)

Fig 9 Representative DKPs as antifungal (41 ~ 43)

3.4 催产素拮抗剂

目前, 对非肽类、可口服和选择性催产素拮抗剂的研究越来越受到医药开发人员的重视。葛兰素史克公司研制的非肽类催产素拮抗剂化合物 **44** (Retosiban, GSK221149A), 对人体催产素受体 hOTR 的拮抗作用比阿托西班高 15 倍。另外, 其对加压素受体 (V1aR、V2R、V1bR) 也有一定的选择性, 与阿托西班相比, 对 V1a/V1b 的拮抗选择性超过 15 000 倍, 对 V2 的拮抗选择性超过 1400 倍。此外, 其溶解度更大 ($> 0.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 且口服生物利用率几乎为 100%^[34]。在对 Retosiban 构效关系研究中, 化合物 **45** (Epelsiban) 显示出

更好的拮抗性和类效性, 结构式如图 10 所示。其对 hOTR ($PK = 9.9$) 的拮抗能力比阿托西班牙强 100 倍, 对加压素受体具有更高的拮抗选择性^[35]。Epelsiban 对 Cyp450 的抑制效果不显著 ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 而且没有遗传上的毒性和明显的口服不良反应。

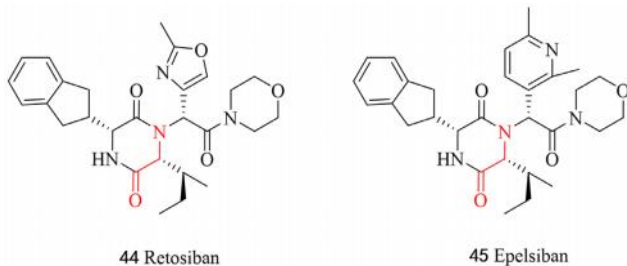


图 10 典型的作为催产素拮抗剂的二酮哌嗪类化合物 (44 ~ 45)
Fig 10 Representative DKPs as oxytocin receptor antagonist (44 ~ 45)

3.5 磷酸二酯酶 -5 (PDE5) 抑制剂

PDE5 抑制剂对男性勃起功能有重要影响。葛兰素史克公司以 β - 咪唑啉类结构为模板, 已成功设计合成了多种 PDE5 抑制剂。在这些药物中, 二酮哌嗪类 46 (Tadalafil, 也称为 Cialis, 结构式如图 11 所示) 是一种有效的 PDE5 抑制剂 ($IC_{50} = 5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 对其他的磷酸二酯酶也有很好的选择性 [PDE 1 ~ 4 (IC_{50} 比值 > 2000), PDE 6 (IC_{50} 比值 = 1000)], 但 IC_{50} 比值仅为 5^[36]。另外, 该药物具有良好的药代动力学指标, 口服生物利用度可达 80% 以上, 是西地那非的 2 倍, 血浆清除速度仅为 $5.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 代谢过程也不受饮食的影响。Tadalafil 是继西地那非后, 用于治疗勃起功能障碍的第二代口服药物^[37]。

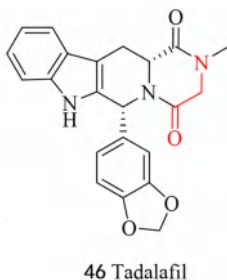


图 11 典型的作为 PDE5 抑制剂的二酮哌嗪类化合物 (46)
Fig 11 Representative DKPs as PDE5 inhibitor (46)

3.6 神经保护剂

食品中的外源化学物 47, 能够有效抑制自由基、钙动员和损伤后神经细胞的死亡。化合物 48 的酚基团可有效清除游离基, 从而保护神经细胞不受侵害。内源性化合物 31 对提高记忆力有促进作用。化合物 49 能提高帕金森病大鼠的运动症状, 同时也能通过调整乙酰胆碱神经传递素而

促进记忆力的恢复^[36], 结构式如图 12 所示。

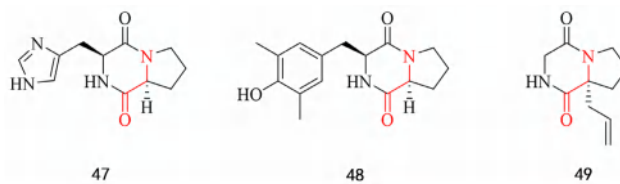


图 12 典型的作为神经保护剂的二酮哌嗪类化合物 (47 ~ 49)
Fig 12 Representative DKPs as neuroprotective agents (47 ~ 49)

4 展望

综上所述, 天然 DKPs 具有结构复杂性和生物学特性, 但未完全开发。随着一些新的合成及辅助方法的不断研究, DKPs 的合成及其在药学领域的应用将会得到较大发展^[38]。随着网络药理学技术的广泛应用, 已知天然产物可以通过全球天然产物社会 (GNPS) 分子网络技术初步消除^[39]。这将有助于直接定位于发现新的天然 DKPs, 减少对已知化合物分离纯化和结构鉴定带来的人力、物力和财力的浪费, 并进一步丰富 DKPs 化合物库, 进而加速 DKPs 的应用。另外, 基于分子遗传和合成生物学技术, 对产生 DKPs 的微生物进行基因改造, 通过表观遗传调控和异源表达等研究策略, 可以实现对具有应用价值的 DKPs 进行大量生产。天然 DKPs 独特的结构骨架、广泛的生物学和生态学功能, 必将在药学和农学领域的应用中取得重大突破。

参考文献

- [1] 申琪瑶. 海洋糖丝菌 D09 的天然产物挖掘及三联噻唑的生物合成研究 [D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [2] 沈媛媛, 刘成霞, Bertelsen LB, 等. 动态增强磁共振参数分析法评价 NPI-2358 对肿瘤的早期抗血管作用 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17 (7): 488-490, 494.
- [3] 郑梅. 二聚化环二肽类生物碱的生物合成研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2019.
- [4] 臧传丽. 基于 Brevianamide F 的新型咪唑二酮哌嗪类化合物合成及活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [5] 刘斌. 咪唑二酮哌嗪类化合物的合成及其抑菌活性研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2011.
- [6] 程璐瑶, 陈肖学, 张颖君, 等. 古树大理茶优势内生真菌 1 个新四氢- β -咪唑二酮哌嗪的分离鉴定 [J]. 广西植物, 2023, 43 (7): 1252-1257.
- [7] Airaghi F, Fiorati A, Lesma G, et al. The diketopiperazine-fused tetrahydro- β -carboline scaffold as a model peptidomimetic with an unusual α -turn secondary structure [J]. Beilstein J Org Chem, 2013, 9 (1): 147-154.
- [8] Park HB, Kwon HC, Lee CH, et al. Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes [J]. J Nat Prod, 2009, 72 (2): 248-252.

- [9] Jiang CS, Guo YW. Epipolythiodioxopiperazines from fungi: chemistry and bioactivities [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11 (9): 728-745.
- [10] Tu YQ, Yang JS, Lu K, et al. Chiral 1, 2, 3-triazolium salt catalyzed asymmetric mono-and dialkylation of 2, 5-diketopiperazines with the construction of tetrasubstituted carbon centers [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2022, 61 (9): 1-7.
- [11] Lin MP, Tang ZZ, Wang JX, et al. An epipolythiodioxopiperazine alkaloid and diversified aromatic polyketides with cytotoxicity from the Beibu Gulf coral-derived fungus *Emericella nidulans* GXIMD 02509 [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2023, 24 (3): 275-280.
- [12] 贾斌, 马养民, 陈楠, 等. 天然产物吡啶二酮哌嗪生物碱的结构及生物活性 [J]. *化学进展*, 2018, 30 (8): 1067-1081.
- [13] 王聪, 雷福厚, 谭学才, 等. 海洋真菌来源的抗植物病原菌活性天然产物 [J]. *中国海洋药物*, 2018, 37 (6): 74-79.
- [14] 郭庆丰, 陈林, 尹震花, 等. 大黄鱼共生菌 *Bacillus coagulans* LL1103 的代谢产物研究 [J]. *微生物学报*, 2020, 60 (2): 387-396.
- [15] 王越, 张玉琴, 徐喆菲, 等. 红榄李内生真菌 *Aspergillus terreus* HT-1 二酮哌嗪类次级代谢产物研究 [J]. *中国海洋药物*, 2022, 41 (6): 10-16.
- [16] Merwe EVD, Huang D, Peterson D, et al. The synthesis and anticancer activity of selected diketopiperazines [J]. *Peptides*, 2008, 29 (8): 1305-1311.
- [17] Moutiez M, Belin P, Gondry M. Aminoacyl-tRNA-utilizing enzymes in natural product biosynthesis [J]. *Chem Rev*, 2017, 117 (8): 5578-5618.
- [18] Borthwick AD. 2, 5-diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products [J]. *Chem Rev*, 2012, 112: 3641-3716.
- [19] Manavi B, Tejeneki HZ, Rominger F, et al. Copper (I)-catalyzed intramolecular cyclization of *O*-propargyloxy diketopiperazines to access diverse diazabicyclic and spiro-diketopiperazinochromanes [J]. *ACS Catalysis*, 2021, 363 (17): 4190-4196.
- [20] 汤勇, 廖升荣, 李晋昇, 等. 含氟二酮哌嗪衍生物的设计、合成及细胞毒活性 [J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47 (4): 412-421.
- [21] Belin P, Moutiez M, Lautru S, et al. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29 (9): 961-979.
- [22] Brockmeyer K, Li SM. Mutations of residues in pocket P1 of a cyclodipeptide synthase strongly increase product formation [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80 (11): 2917-2922.
- [23] James ED, Knuckley B, Alqahtani N, et al. Two distinct cyclodipeptide synthases from a marine actinomycete catalyze biosynthesis of the same diketopiperazine natural product [J]. *ACS Synth Biol*, 2016, 5 (7): 547-553.
- [24] Harken L, Li SM. Modifications of diketopiperazines assembled by cyclodipeptide synthases with cytochrome P450 enzymes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105 (6): 1-9.
- [25] 贾斌. Spirotryprostatin 类化合物的合成及生物活性 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2020.
- [26] 张京星, 姚婷婷, 刘晶, 等. 环二肽合酶生物合成途径研究进展 [J]. *有机化学*, 2019, 39 (2): 328-338.
- [27] Kanoh K, Kohno S, Katada J, et al. Antitumor activity of phenylhistin in vitro and in vivo [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 63 (6): 1130-1133.
- [28] Al-Shakliah NS, Kadi AA, AlSalahi R, et al. In vitro identification of potential metabolites of Plinabulin (NPI 2358) in hepatic preparations using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. *ACS Omega*, 2022, 7 (25): 21465-21472.
- [29] Mikkola R, Andersson MA, Hautaniemi M, et al. Toxic indole alkaloids avrainvillamide and stephacidin B produced by a biocide tolerant indoor mold *Aspergillus westerdijkiae* [J]. *Toxicon*, 2015, 99: 58-67.
- [30] 迟路坪. 四株深海真菌次级代谢产物化学多样性及生物活性研究 [D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2020.
- [31] 曲承蕾, 杨雪, 张淑敏, 等. 海洋源放线菌 *Streptomyces* sp. 223 中二酮哌嗪类成分的研究 [J]. *中国海洋药物*, 2015, 34 (3): 23-28.
- [32] 旷敏, 彭伟伟, 许立, 等. 植物根际土壤真菌 *Trichoderma velutinum* 的化学成分研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (9): 1975-1981.
- [33] 张弘弛, 刘瑞, 李慧, 等. 黄芪内生真菌 AR15 中吡啶二酮哌嗪及其对黄芪白粉病原菌的抑制作用 [J]. *西北林学院学报*, 2017, 32 (1): 197-202.
- [34] 韩立霞, 魏圣可, 冯文娟. 胶霉毒素菌渣的抗菌活性及其应用的研究 [J]. *中国农学通报*, 2021, 37 (30): 106-110.
- [35] 林宗豪, 丁文平, 李艳群, 等. 海洋来源放线菌 *Demequina litorisediminis* SCSIO 53428 的化学成分研究 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (2): 213-217.
- [36] Bhattacharya D, Sergio DLSV, Ruiz VV, et al. *Bacillus rugosus* sp. nov. producer of a diketopiperazine antimicrobial, isolated from marine sponge *Spongia officinalis* L. [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113 (11): 1675-1687.
- [37] Chhonker SK, Rawat D, Koiri RK. Repurposing PDE5 inhibitor tadalafil and sildenafil as anticancer agent against hepatocellular carcinoma via targeting key events of glucose metabolism and multidrug resistance [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36 (8): 23100-23112.
- [38] Song ZQ, Hou YG, Yang QR, et al. Structures and biological activities of diketopiperazines from marine organisms: a review [J]. *Mar Drugs*, 2021, 19 (8): 403-438.
- [39] Thi TD, Thi DD, Thi Thuy HD, et al. Diketopiperazines from *Rhabdastrella globostellata* [J]. *Vietnam J Chem*, 2022, 60: 27-31.

(收稿日期: 2023-04-28; 修回日期: 2023-06-27)

多晶型对药物固体理化性质影响的研究进展

周丰涛¹, 彭亚运¹, 蔡挺^{1, 2, 3*} (1. 中国药科大学药学院药剂系, 南京 210009; 2. 中国药科大学工学院, 南京 211198; 3. 中国药科大学教育部智能制药关键技术工程研究中心, 南京 211198)

摘要: 药物多晶型现象普遍存在于有机小分子药物当中, 由于多晶型分子构象和堆积方式存在差异, 同一种药物的多晶型物理化学性质会存在差异, 从而影响原料药和药物制剂的制剂学性能。因此在药物处方前研究中需要全面系统地筛选晶型, 并通过各种固态研究方法对这些晶型进行深入的研究和评估, 了解各个晶型的物理化学性质和相转变行为, 以选择后续开发的理想晶型。本文总结了近年来报道的多晶型影响药物溶解度、溶出速率、吸湿性、粉体学性质、机械性质、化学稳定性以及光学性质的案例, 期望能够加深对药物多晶型在制剂开发中作用的理解, 启发对多晶型药物新特性的探索及新应用的开发。

关键词: 药物; 多晶型; 理化性质; 晶体结构; 固体制剂

中图分类号: R94 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-2984-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.027

Progress in the effect of polymorphism on the physicochemical properties of pharmaceutical solids

ZHOU Feng-tao¹, PENG Ya-yun¹, CAI Ting^{1, 2, 3*} (1. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 2. School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 3. Engineering Research Center for Smart Pharmaceutical Manufacturing Technologies, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: Polymorphism is a common phenomenon in organic small molecule drugs, which arises from differences in molecular conformation and packing, resulting in distinct physical and chemical properties between different polymorphs. The presence of multiple polymorphs has a significant impact on the pharmaceutical properties of active pharmaceutical ingredients and the final drug product. It is important to conduct a comprehensive and systematic screening of polymorphs during the drug development, followed by a thorough evaluation and characterization of these polymorphs with solid-state analytical techniques to understand their physicochemical properties and phase transition behaviors to identify the ideal polymorph for further development. This review focused on the influence of polymorphism on various physical and chemical properties, including solubility, dissolution rate, hygroscopicity, powder properties, mechanical properties, and chemical stability, aiming to help understand the role of polymorphic drugs in the development of new dosage forms applications.

Key words: drug; polymorphism; physicochemical property; crystal structure; solid preparation

化学结构完全相同的一种药物在固体中具有两种或两种以上分子排列方式, 称为药物多晶型^[1]。根据分子构象的变化情况, 多晶型分为构象多晶型和构型多晶型, 前者是分子构象发生变

化导致分子堆积发生改变, 常见于柔性分子晶体内; 后者是分子构象发生微弱的变化, 堆积方式受到分子取向或分子间作用力影响从而发生改变, 主要存在于刚性结构的分子晶体内。研究表明,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82273880, No.82204291); 中国博士后基金面上项目 (No.2021M703597); 江苏省卓博计划 (No.286550)。

作者简介: 周丰涛, 男, 硕士研究生, 主要从事药物多晶型的研究, email: 1263584172@qq.com * **通信作者:** 蔡挺, 男, 博士研究生导师, 教授, 主要从事物理药剂学、药物晶体学、药物制剂工程、创新药物剂型设计和药物体内过程研究, email: tc ai@cpu.edu.cn

构象多晶型的部分物理性质相比构型多晶型存在更大的差别^[2]。1998 年, 抗反转录病毒药物利托那韦在储存过程中, 部分原料药晶型转变为更加稳定的晶型 II, 使得治疗效果降低, 导致被强制退市, 之后关于药物多晶型的研究逐渐受到重视, 成为了药物固态研究的一个重要方向^[3]。药物多晶型由于分子构象和堆积方式的差异, 导致各种多晶型之间表现出不同的物理化学性质, 进而可能对原料药的稳定性、制剂的生产工艺、溶出度以及生物利用度产生影响。最新版《中国药典》规定药品的药用晶型应选择临床疗效佳, 安全性和稳定性高, 且适合药物开发的优势晶型, 同时国家药品审评中心也要求仿制药开发过程中对药物晶型的制备、表征和理化性质进行充分研究。因此开展药物晶型的固态化学研究, 掌握各个晶型的物理化学特性, 评估多晶型在整个药品生命周期各个环节中产生的影响, 对确保药品成功上市具有重要作用。本综述围绕固体药品研发过程中主要关注的物理化学性质, 结合文献中报道的案例, 分析不同药物多晶型之间固态化学的差异。

1 多晶型的物理化学性质

1.1 溶解度和溶出速率

溶解度是药物开发过程中须优先考虑的重要理化性质之一, 近年来, 新化学实体药物研发得到了蓬勃发展, 而其中难溶性化合物的占比越来越多, 据统计, 目前上市的药物中, 40% 是难溶性药物, 处于研发阶段的药物中 90% 的药物存在难溶性的问题^[4]。同种药物不同晶型之间的溶解度存在差别, 对于难溶性的 BCS II 类药物而言, 可以选择高溶解度的晶型进行后续开发以期提高其口服生物利用度。Li 等^[5]研究发现, 在纯水、pH 6.8 和 pH 1.0 等介质中培马贝特晶型 II 的溶解度是晶型 I 的 2 倍左右。同时比格犬的药代动力学试验表明, 晶型 II 的 $AUC_{0\sim 24h}$ 和 C_{max} 分别是晶型 I 的 2.6 倍和 2.1 倍。Tempfli 等^[6]研究发现土霉素晶型 A 制备的片剂溶解度低于晶型 B 制成的片剂, 解释了为何不同厂家土霉素胶囊口服后血药浓度存在差异。药物各晶型溶解度的不同源自多晶型之间分子排列方式的差异^[7]。Chen 等^[8]以抗炎药物滨蒿内酯为研究对象, 制备了晶型 A 和晶型 B。粉末溶出试验表明, 在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液、pH 4.0 和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中晶型 A 的溶解度均大于晶型 B。晶体结构分析表明, 两种晶型都通过 π - π 相互作用形成稳定的三维堆积方式, 晶型 B 苯环之间的垂直距离为 3.35 \AA , 小于晶型 A $3.6 \sim 3.8 \text{ \AA}$ 的作用距离, 导致晶型 B 中的分子在溶出过程中需要克服较高的

π - π 相互作用, 才能从晶格中迁移到溶剂内, 降低了该晶型的溶解度。Surov 等^[9]研究了钙离子通道阻断剂非洛地平的四种晶型。溶出试验表明晶型 II 具有最高的溶解度和溶出速率, 晶型 II 表面活性官能团占比最高, 比例达到了 53%, 导致该晶型具有更高的润湿性, 在溶出过程中, 药物分子更容易与溶剂接触, 并脱离晶格溶解在溶剂内。Soto 等^[10]以抗胃酸分泌药法莫替丁为研究对象, 如图 1 所示, 在水溶液和其他极性有机溶剂中, 晶型 B 的溶解度均高于晶型 A, 且随着温度的升高, 两种晶型溶解度的差值增大。晶体结构分析表明, 晶型 A 中单个分子与周围的六个分子形成分子间氢键, 而晶型 B 中单个分子仅与四个分子形成氢键导致晶格能较高, 在溶出过程晶型 B 的分子仅需克服较低的能垒就能从晶格迁移到溶剂中, 从而具有更高的溶解度。难溶性药物存在溶解度低, 溶出速率慢的问题, 因此在处方前研究阶段, 可选择其溶解度较高的亚稳晶型进行开发, 但需充分考虑和控制亚稳晶型的物理稳定性。

1.2 吸湿性

原料药和制剂生产过程中经常会接触水分。水分的过量引入不利于药物粉末的上下游加工, 如药物粉末结块影响流动性, 提高样品的黏度增加制剂的加工难度, 或诱导药物转变成水合物影响药品的稳定性。受分子构象和堆积方式的影响, 多晶型之间的晶格空隙存在差异, 导致水分渗透进入晶体内部的速率各不相同。Chernyshev 等^[11]以抗焦虑药阿福巴唑盐酸盐为研究对象, 对比了晶型 II 和晶型 IV 的吸湿性差异, 结果在 55% 湿度的环境下, 接近 50% 的晶型 II 在放置 2 h 发生吸湿, 而晶型 IV 放置 8 h 依旧没有重量的变化。其原因在于晶型 II 的 (001) 晶面存在较大的空间间隙, 有利于水分扩散进入晶格。Zhu 等^[12]以抗炎药物黄芩苷为模型药物, 研究了晶型 α 、晶型 β 和半水合物的吸湿情况, 结果当环境中的水分含量达到 95%, 晶型 α 和晶型 β 吸附的水分含量少于 1%; 而半水合物的吸附能力较强, 在环境湿度在 10% 左右时就开始增重, 在湿度达到 40% 时样品出现重量的突跃, 转变为水合物晶型 I, 在湿度达到 80% 时半水合物已经完全吸湿转变为一水合物。晶体结构分析表明半水合物晶型属于通道型水合物, 分子之间存在大量的空隙, 使得水分子更容易渗透进入晶格。与之相比, 晶型 α 和晶型 β 上相邻分子的羟基和羰基都形成分子间和分子内氢键, 密度更高, 结构更加紧密, 导致水分在晶格内的扩散受到限制。

无水物和水合物构象的相似性也会影响药物对水分的吸收情况, Basford 等^[13]以抗菌药氟康

唑为研究对象,如图 2 所示,在 75%湿度的吸湿性试验中,晶型 A 和晶型 C 分别放置 60 d 和 120 d 就完全转变为水合物,晶型 B 放置 180 d 几乎没有增重。分子构象分析表明,在气相条件下构成晶型 A 和晶型 C 的氟康唑分子仅需克服 $11 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的能垒和实现苯环 100° 的转动就能转变为水合物的分子构象。而构成晶型 B 的氟康唑分子需要克服三重能垒,分别为 29、14、 $11 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,并实现三个官能团累计 450° 的旋转,其构象才能与水合物的相接近。在药物研发阶段,对高吸湿性药物进行全面的晶型筛选和固态研究,可有效考察及对比不同晶型的吸湿强度,并选择低引湿性的晶型进行后续产品的开发。

1.3 粉体学性质

现有的测量药物粉末流动性的方法包括测量粉末静止时的堆积角度以得到休止角;借助粉体测试仪,全方位考察粉体的休止角、压缩率、平板角和凝聚度;通过剪切试验测定粉体样品的内摩擦角、内聚力、壁摩擦角等指标并结合莫尔圆得到粉体的流动函数,量化地评价粉体流动性能。药物的粉体流动性特征受到颗粒尺寸、颗粒形状影响。药物多晶型之间分子堆积方式的差异会引起晶体结构的不同,从而在一定程度上影响晶体的形貌,并造成药物多晶型在粉体学性质上的显著差异^[14]。普伐他汀钠具有 16 种晶型,晶型 A 是最常见的晶型,但容易转变为晶型 B, Jia 等^[15]研究发现普伐他汀钠晶型 A 在异丙醇和水的混合溶剂中会转变为晶型 B,晶型 B 形状趋近于规则的棒状,比晶型 A 具有更好的流动性。Xu 等^[16]以口服降糖药格列吡嗪为研究对象,在生产过程中该药物一直以晶型 I 作为原料药,晶型 I 一般呈片状和矩形状,粉体流动性较差,且溶解度较低。在 35°C 下对晶型 I 湿法球磨 5 h 并将所得的悬浮液在水中搅拌,晶型 I 就会转变为流动性更好的棱柱状的晶型 III,同时溶出试验表明晶型 III 的表观溶解度是晶型 I 的 2 倍,具有更好的生物利用度。Prado 等^[17]以 β -受体阻断剂卡维地洛为研究对象,如图 3 所示,通过乙醇挥发得到晶型 II 和晶型 III,这两种晶型晶体形貌存在较大的差异,晶型 II 为长条状,晶型 III 为规则的四边形。根据 BFDH 模拟,晶型 II 的 (110) 和 (011) 晶面显示出与氢键受体的相互作用位点。晶型 III 的 (10-1)、(110) 和 (011) 晶面显示氢键供体的相互作用位点。因此,用于结晶的溶剂甲醇有望与这些表面发生相互作用,抑制晶面的生长并改变晶体的晶习,由于两种晶型暴露的晶面不同,导致最终挥发得到的晶体形貌上存在显著

差异,相比长条状的晶型 II,菱形的晶型 III 具有更好的流动性。固体口服制剂的开发,涉及药物粉末粉碎、混合和过筛等过程,药物粉体学特性在制剂过程中会改变产品的分装剂量、混合填充均匀性以及空隙率,从而影响药物制剂的质量。通过改变药物晶型有时可以改变药物晶习和晶体尺寸,从而改善药物粉末的流动性。

1.4 机械性质

在制剂开发过程中,不同多晶型的机械性质影响了药物的粉碎,研磨和压片等制剂加工工艺,深入理解晶体结构和机械性质的关系,可以为固体处方工艺开发提供理论指导。Di Martino 等^[18]通过熔融结晶的方法制备了对乙酰氨基酚晶型 II,晶型 II 存在滑移面,可压性和可塑性更好,克服了对乙酰氨基酚晶型 I 原料药可压性不佳的问题,同时相同处方制备的晶型 II 片剂的溶出速率与市售的对乙酰氨基酚片相近。Varughese 等^[19]通过纳米压痕考察了阿司匹林晶型 I 和晶型 II 的相互作用各向异性和剪切不稳定性。通过对两种晶型各自的主要晶面 (001) 和 (102) 进行纳米压痕分析,在增加荷载的情况下,晶型 I 首先发生断裂,晶型 II 的最大穿透深度高于晶型 I,潜在剪切力方向两者的弹性模量和硬度指数分别相差 48% 和 37%,晶型 I 具有比晶型 II 更高的硬度。根据晶体的微观排列方式,两种晶型都是通过羧基形成中心对称的 $\text{OH} \cdots \text{O}$ 二聚体,并构成了相似的二维分子层排列方式,因此机械性质的差异可归因于层间区域中相互作用强度和相对运动方向的不同。由于分子层间的相互作用类型和相关势能分布不同,晶型 I 相邻氢键层的相对运动受到两种反向作用力的阻碍,导致分子不易发生迁移,而晶型 II 不存在运动阻碍,因此具有更好的塑性形变。

药物的机械性质不仅影响固体的加工性质,在一定程度上也与晶体的热膨胀行为相关。这是因为分子的热膨胀行为与形变类似,都需要经历分子迁移的过程,分子间相互作用越强,硬度越大,热膨胀能力越小。Su 等^[20]考察了醋酸巴多昔芬晶型 A、晶型 B、晶型 D 的机械性质和热膨胀行为,如图 4 所示,对三种晶型的主要晶面进行纳米压痕分析,结果晶型 A、晶型 B、晶型 D 的弹性模量和硬度指数依次提高,这归因于三种晶型排列方式的显著差异:通过分子间氢键相互作用,晶型 B 形成了层间交联互锁的堆积结构,晶型 D 形成了螺旋状的堆积方式,受到外界机械力刺激后两种晶型形变较小,而晶型 A 的二维分子层之间仅通过范德华力相互作用连接,在受到外界机械力刺激后,分子层之间容易发生不可逆的滑移从而引起塑性形变,这意味着药物晶型 A 具有更好

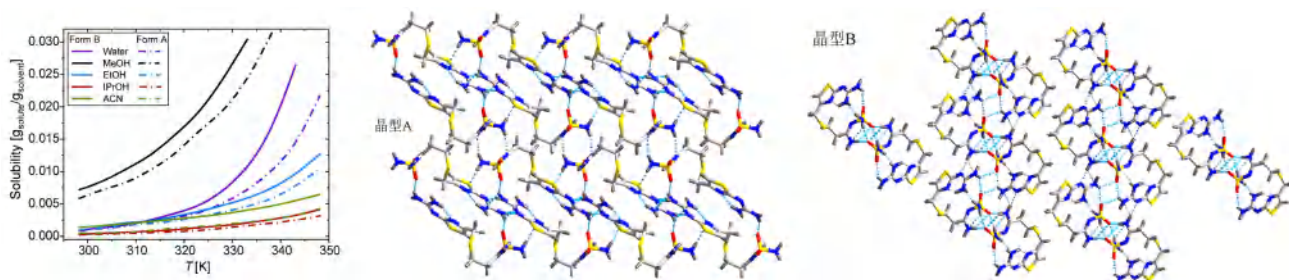


图 1 法莫替丁晶型 A 和晶型 B 的溶解度曲线和分子堆积结构^[8]

Fig 1 Solubility curves and molecular stacking structures of famotidine form A and form B^[8]

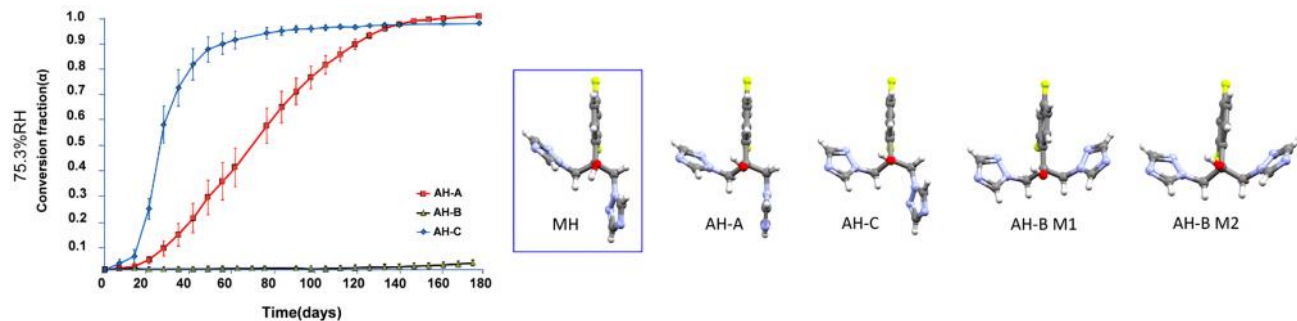


图 2 氟康唑晶型 A、晶型 B 和晶型 C 的水蒸气吸附速率和分子构象^[11]

Fig 2 Water vapor sorption and molecule conformations of fluconazole form A, form B and form C^[11]

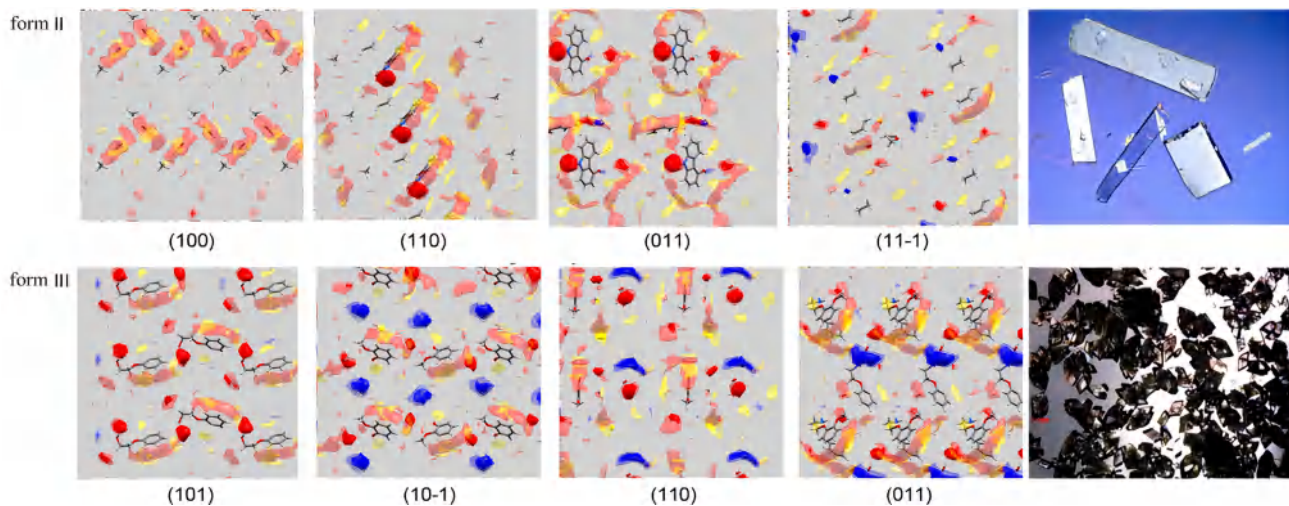


图 3 卡维地洛晶型 II 和晶型 III 主要晶面的相互作用和晶习^[15]

Fig 3 Interaction of dominant crystal faces and crystal habits of carvedilol form II and III^[15]

的可压性。同时该研究发现，升温过程中三种晶型的热膨胀系数与弹性模量成负相关，表明可以通过研究多晶型的热膨胀行为来比较晶型之间的机械性质^[18]。药物晶体自身硬度、塑性和弹性会改变粉末在压片过程中的结合面积，从而影响药物的可压性。药物多晶型之间由于分子堆积方式的不同，导致机械性质存在差异，因此可以选择塑性形变最佳的晶型，优化药物粉末的可压性。

1.5 化学稳定性

固体药物的化学降解一直是药物开发过程中不可忽视的问题，部分药物在无外界条件影响下就会自发降解。例如抗癫痫药加巴喷丁在储存过程中，其氨基和羧基会发生分子内缩合反应形成

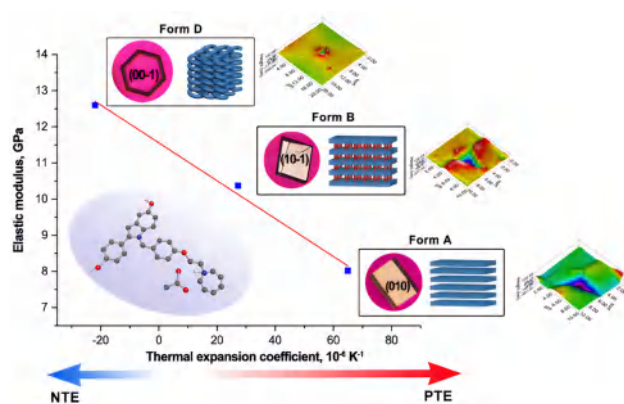


图 4 醋酸巴多昔芬三种晶型的形貌、堆积结构和纳米压痕^[18]

Fig 4 Morphology, stacking structure and nanoindentation of 3 crystal forms of bazedoxifene acetate^[18]

毒理性更高的加巴喷丁内酰胺^[21]。由于固体药物多晶型晶体结构存在差异,影响其触发化学反应的难易程度,因此不同药物晶型可能具有不同的化学稳定性。Chen等^[22]以非甾体抗炎药吲哚美辛为研究对象,如图5所示,对晶型 α 和晶型 γ 的化学稳定性进行了检测,结果发现在氨气氛围下在放置1h后,晶型 α 增重了3.81%,按理论值4.76%计算,80%的吲哚美辛已经与氨气反应成为铵盐;与之相比,晶型 γ 在1h内几乎没用增重,表明晶型 γ 对氨气极度惰性。晶体结构分析表明,在晶型 α 中羧基暴露在(100)晶面,能够与氨气反应,反应沿a轴进行,直到反应完全;而在晶型 γ 中存在中心对称结构,羧基之间通过氢键相互作用形成二聚体结构,导致晶型 γ 与氨气的反应活性更弱^[20]。Seethalekshmi等^[23]用紫外灯照射卡马西平晶型I、晶型II和晶型III,并结合傅里叶红外反射吸收光谱(FT-IR-RAS)和比色法评估三种晶型的表面降解程度,结果在照射一周之后,三种晶型的粉末都从白色转变成橙黄色,其中晶型II转变的速度最快,降解速率是晶型I和晶型III的5.1倍和1.5倍。Wang等^[24]以维生素D₃为研究对象对比晶型A和晶型B的化学稳定性,结果表明,晶型B相比于晶型A化学稳定性更差,晶型B具有较大的空间空隙,导致其吸湿程度远高于晶型A,同时晶型B中不稳定的 α 分子构象降低了药物抗化学降解能力。光降解和氧化是固体药物降解的两个主要途径,某些药物甚至会发生异构化、聚合、脱羧等化学反应。药物的化学降解既受到外部环境的影响,也取决于药物自身的化学结构和分子堆积方式。不同药物晶型结构中,由于分子官能团所处的微环境存在差异,有时会导致不同的晶型具有不同的化学稳定性。

2 光学性质

多晶型之间不同的分子堆积方式也会影响电子轨道的跃迁形式以及基团的振动模式,从而改变药物的光学性质。Kawakami等^[25]研究发现二氟尼柳晶型I、晶型II和晶型III的荧光发射波长都在425nm左右,而晶型IV的发射波长发生了30nm的红移。Wang等^[26]以抗炎药甲苯芬那酸为研究对象,发现晶型I和晶型II的荧光发射波长相差了50nm,这是因为晶型II相邻分子间更佳的共面性使得氮原子上的孤对电子与苯环发生共轭,促进了分子间电子转移。Kuang等^[27]以抗阿尔茨海默病的美金刚为研究对象,将其与帕莫酸反应制备得到相应的盐型,该盐型具有更低的溶解度和释放速率从而具备缓释的潜力;同时对

该盐型的四种多晶型进行了固态荧光表征,发现在366nm紫外光激发下,晶型I和晶型II都发射出橙黄色的荧光,最大发射波长为571nm,而晶型III和晶型IV的荧光波长分别发生了37nm和18nm的蓝移,这归因于多晶型之间荧光发色团堆积角度的不同导致荧光基团共轭程度的差异。Xu等^[28]以羟基茜草素为研究对象,采用二次谐波产生的非线性光学成像技术,观察含有不同比例晶型I的片剂。受分子堆积方式的影响该物质的晶型I为非对称的极性晶体且对二次谐波成像敏感,晶型II为中心对称的非极性晶体且没有二次谐波信号。二次谐波成像试验结果表明在含量仅有0.1%(w/w)的片剂中也能明显地观察到晶型I的存在,为检测痕量极性晶体提供了一种高响应性技术。借助药物自身的光学性质的差异,未来可通过直接观察药物自身荧光的差别来分辨药物晶型,并方便区别药物生产过程中是否发生了混晶的情况。同时基于荧光成像技术也可在观察药物溶出方面发挥作用,Chen等^[29]基于吲哚美辛和其糖精共晶荧光颜色的差别,通过倒置荧光显微镜,观察了吲哚美辛-糖精共晶溶出过程中荧光的变化从而用于表征共晶溶出过程中的相转变行为(见图6)。借助药物自身的光学性质,可以观察药物光学性质的变化简便区分药物多晶型,以及相关试验过程中的固相转变情况,为后续药物开发提供理论指导。

3 结语与展望

药物多晶型是影响药品质量和疗效的重要因素。近年来,随着我国相关法规 and 政策的出台,对药物晶型的重视程度逐渐提高。药物多晶型由于内部晶体结构的差异,相同固体药物的不同晶型之间通常表现出不同的物理化学性质,包括粉体学性质、熔点、溶解度、机械性质以及物理化学稳定性。同一种药物不同晶型之间可能具有显著的性质差异,并且不同晶型之间在一定条件下也存在相互转变的风险,从而直接影响产品的最终质量,并影响药物的治疗效果。开展关于药物多晶型固态性质的研究,掌握各种晶型的理化性质参数和相转变行为,可以为临床前优势晶型的选择,原料药生产工艺的探索,以及固体制剂的开发和质量控制提供重要指导。随着近年来计算机算力和算法的指数级发展,计算机科学在药物多晶型中的应用越发引起人们的关注。通过计算机晶体结构模拟、大数据分析、人工智能深度学习和多尺度建模等方法,预测药物多晶型的结构和稳定性关系,构建药物分子结构和固态化学之间的关系,可以为后续最佳晶型及其制剂条件的选择提供基础,解决药物晶型开发过程中

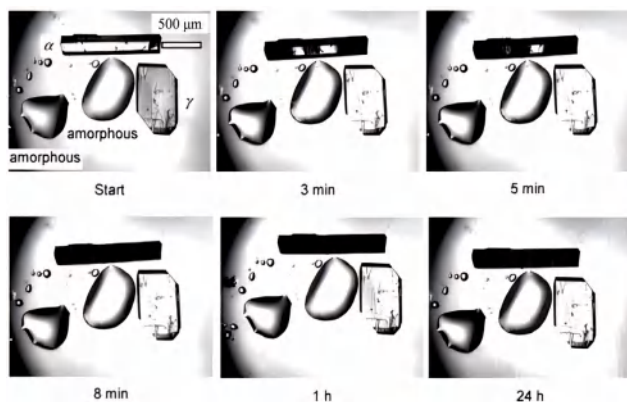


图 5 吲哚美辛无定型、晶型 α 和晶型 β 在氨气氛下的稳定性试验^[20]

Fig 5 Stability of indomethacin amorphous, form α and form β under ammonia atmosphere^[20]

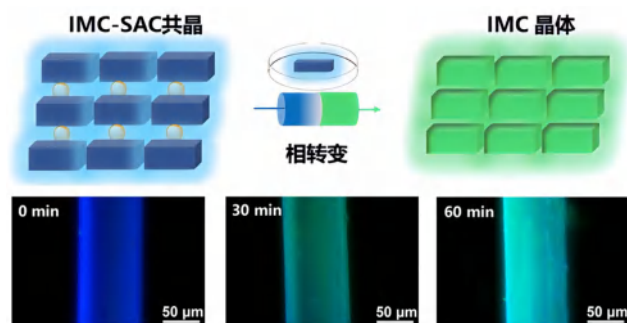


图 6 吲哚美辛-糖精共晶溶出过程中荧光颜色的变化^[29]

Fig 6 Change of fluorescence color during the dissolution of indomethacin saccharin cocrystal^[29]

耗时长, 成本高的缺点, 为开发新一代优良制剂提供技术支持。

参考文献

[1] Kenjirou H, Keisuke U, Kunikazu M. Recent progress of structural study of polymorphic pharmaceutical drugs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 117: 71-85.

[2] Cruz-Cabeza AJ, Bernstein J. Conformational polymorphism [J]. *Chem Rev*, 2014, 114 (4): 2170-2191.

[3] Parent SD, Smith PA, Purcell DK, et al. Ritonavir form III: a coincidental concurrent discovery [J]. *Cryst Growth Des*, 2022, 23 (1): 320-325.

[4] Sandeep K, Vijaykumar N. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2015, 5 (5): 442-453.

[5] Li L, Yin XH, Diao KS. Improving the solubility and bioavailability of pemafibrate via a new polymorph form II [J]. *ACS Omega*, 2020, 5 (40): 26245-26252.

[6] Tempfli D, Borbas E, Pataki H, et al. Revisit of solubility of oxytetracycline polymorphs. An old story in the light of new results [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 149: 105328.

[7] Bennema P, Van Eupen J, Van Der Wolf BM, et al. Solubility of molecular crystals: polymorphism in the light of solubility theory [J]. *Int J Pharm*, 2008, 351: 74-91.

[8] Chen JY, Wang XY, Hong MH, et al. Structure properties of scoparone: polymorphs and cocrystals [J]. *J Mol Struct*, 2019, 1191: 323-336.

[9] Surov AO, Solanko KA, Bond AD, et al. Crystallization and polymorphism of felodipine [J]. *Cryst Growth Des*, 2012, 12 (8): 4022-4030.

[10] Soto R, Svard M. Solubility and thermodynamic analysis of famotidine polymorphs in pure solvents [J]. *Int J Pharm*, 2021, 607: 121031.

[11] Chernyshev VV, Petkune S, Actins A, et al. Two polymorphs of afobazole from powder diffraction data [J]. *Acta Crystallogr C*, 2013, 69: 299-302.

[12] Zhu B, Wang JR, Mei X. Insight into the phase transformation among various solid forms of baicalin [J]. *Cryst. Growth Des*, 2015, 15 (10): 4959-4968.

[13] Basford PA, Back KR, Cram M, et al. Impact of crystal structure and molecular conformation on the hydration kinetics of fluconazole [J]. *Cryst Growth Des*, 2019, 19: 7193-7205.

[14] Zhou YA, Wang JK, Xiao Y, et al. The effects of polymorphism on physicochemical properties and pharmacodynamics of solid drugs [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24 (21): 2375-2382.

[15] Jia CY, Yin QX, Zhang MJ, et al. Polymorphic transformation of pravastatin sodium monitored using combined online FBRM and PVM [J]. *Org Process Res Dev*, 2008, 12: 1223-1228.

[16] Xu KL, Xiong XN, Li SS, et al. A new polymorph of glipizide with enhanced properties obtained using environmentally friendly methods [J]. *Cryst Eng Comm*, 2016, 18 (24): 4508-4512.

[17] Prado LD, Patricio BFDC, Gonçalves KM, et al. Pharmaceutical material engineering: evaluation of carvedilol polymorphs II and III surface by packing, modeling, and atomic force measurements [J]. *Cryst Growth Des*, 2020, 20 (12): 7901-7909.

[18] Di Martino P, Guyot Hermann AM, Conflant P, et al. A new pure paracetamol for direct compression: the orthorhombic form [J]. *Int J Pharm*, 1996, 128: 1-8.

[19] Varughese S, Kiran MSRN, Solanko KA, et al. Interaction anisotropy and shear instability of aspirin polymorphs established by nanoindentation [J]. *Chem Sci*, 2011, 2 (11): 2236-2242.

[20] Su Y, Bhunia S, Xu S, et al. Structure-Thermomechanical property correlation in polymorphic molecular crystals probed by the nanoindentation technique [J]. *Chem. Mater*, 2021, 33 (12): 4821-4829.

[21] Guo MS, Sun XJ, Zhang SZ, et al. Modulation of solid-state chemical stability of gabapentin by pyridinecarboxylic acid [J]. *Pharm Res*, 2022, 39 (9): 2305-2314.

[22] Chen X, Morris KR, Griesser UJ, et al. Reactivity differences of indomethacin solid forms with ammonia gas [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124 (50): 15012-15019.

[23] Seethalekshmi S, Thakur TS, Varughese S. Photoinstability in active pharmaceutical ingredients: crystal engineering as a mitigating measure [J]. *J Photochem Photobiol C*, 2021, 49: 100455.

- [24] Wang JR, Zhu B, Yu Q, et al. Selective crystallization of vitamin D₃ for the preparation of novel conformational polymorphs with distinctive chemical stability [J]. Cryst Eng Comm, 2016, 18 (7): 1101-1104.
- [25] Kawakami K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64 (6): 480-495.
- [26] Wang XY, Chen YF, Gong JB, et al. Aggregation-induced emission and polymorphism shape size-dependent emission behaviours of fenamates for potential drug evaluation [J]. Org Biomol Chem, 2019, 17 (13): 3409-3415.
- [27] Kuang WJ, Liu J, Lin X, et al. Insoluble salt of memantine with a unique fluorescence phenomenon [J]. Mol Pharm, 2022, 19 (5): 1389-1399.
- [28] Xu J, Chen A, Cai T. Polymorphism of purpurin and low-level detection of the noncentrosymmetric form by second harmonic generation microscopy [J]. J Pharm Sci, 2023, 112 (1): 282-289.
- [29] Chen JH, Guo MS, Fan RH, et al. Impact of bile salt on solution-mediated phase transformation of pharmaceutical co-crystals: the importance of cofomer release kinetics [J]. Chem Eng J, 2022, 435: 134928.
- (收稿日期: 2023-03-27; 修回日期: 2023-05-23)

抗血管生成药物联合免疫检查点抑制剂治疗晚期非小细胞肺癌的协同作用机制及临床研究的新进展

魏佳, 丁晶晶* (南京中医药大学鼓楼临床医学院呼吸与危重症医学科, 南京 210000)

摘要: 抗血管生成和免疫治疗是肺癌治疗的重要方法。抗血管生成治疗可以阻止肿瘤血管的形成, 增加免疫细胞的浸润, 将肿瘤微环境从免疫抑制转变为免疫支持。免疫治疗可以提高机体的免疫功能, 也可以促进血管“正常化”。抗血管生成药物和免疫检查点抑制剂具有协同作用。本文就抗血管生成联合免疫治疗的理论基础以及该联合策略在晚期非小细胞肺癌的研究进展进行综述。

关键词: 抗血管生成药物; 免疫检查点抑制剂; 晚期非小细胞肺癌

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-2990-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.028

Synergistic mechanism and progress in clinical research of anti-angiogenic drugs combined with immune checkpoint inhibitors for advanced non-small cell lung cancer

WEI Jia, DING Jing-jing* (*Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000*)

Abstract: Anti-angiogenic therapy and immunotherapy are important methods in the treatment of lung cancer. Anti-angiogenic therapy can prevent the formation of tumor blood vessels, increase the infiltration of immune cells, transform tumor microenvironment from immune suppression to immune support. Immunotherapy can improve the body's immune function and promote vascular normalization. Anti-angiogenic drugs and immune checkpoint inhibitors have synergistic effects. This article reviewed the theoretical basis of anti-angiogenic therapy combined immunotherapy and the research progress of this combined strategy for advanced non-small cell lung cancer.

Key words: anti-angiogenic drug; immune checkpoint inhibitor; non-small cell lung cancer

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82170077); 南京市医药卫生科研课题 (No.YKK20051)。

作者简介: 魏佳, 女, 硕士, 主要从事药理学方面的研究, email: 18875208318@163.com ***通信作者:** 丁晶晶, 女, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事临床呼吸疾病方面的研究, email: dingflower@hotmail.com

肺癌是中国癌症患者死亡的主要原因, 2020 年我国有 82 万新发肺癌病例, 72 万患者死于肺癌, 占全球肺癌死亡人数的 40%^[1]。非小细胞肺癌 (NSCLC) 占有肺癌的 85%, 包括鳞癌、腺癌和大细胞癌, 其中 70% 的患者在确诊时已有远处转移, 总体存活率非常低^[2]。抗血管生成和免疫治疗在 NSCLC 的治疗方面取得了重大进展, 通过联合策略提高治疗效果已成为该领域的主要方向。许多有关抗血管生成药物和免疫检查点抑制剂 (ICIs) 组合的临床试验已在 NSCLC 治疗中显示出有希望的结果。本文将阐述两者联合的作用机制, 并对相关临床研究的最新进展进行汇总分析。

1 肿瘤血管生成与抗血管生成药物

正常情况下, 血管生成发生在胚胎形成和伤口愈合等各种生理过程中。异常的血管是肿瘤发展的主要介质^[3]。血管内皮生长因子 (VEGF)-VEGF 受体 (VEGFR)、血小板衍生生长因子 (PDGF)-PDGF 受体 (PDGFR) 和成纤维细胞生长因子 (FGF)-FGF 受体 (FGFR) 等信号通路可参与血管生成的调节。其中 VEGF 家族, 由 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 和胎盘生长因子 (PLGF) 组成, 起着关键作用^[4]。VEGFR-2 是 VEGF 的主要功能受体, VEGF 与 VEGFR-2 结合可以调节血管内皮细胞 (EC) 的增殖和迁移, 促进肿瘤血管生成^[5]。抗血管生成通过阻断肿瘤微环境 (TME) 中活跃的信号通路来阻止异常血管生成, 使肿瘤缺乏营养和氧气。目前的抗血管生成药物主要包括针对 VEGF 的单克隆抗体和针对 VEGFR、PDGFR 和 FGFR 等多个靶点开发的酪氨酸激酶抑制剂。贝伐单抗是第一个被批准用于多种癌症的抗血管生成药物, 能与 VEGF 结合并阻断其生物活性。安罗替尼和阿帕替尼是临床上常用的小分子酪氨酸激酶抑制剂, 在 NSCLC 的治疗中表现出不错的疗效。然而, 有患者在治疗数月之后, 体内肿瘤能够适应抗血管生成药物的存在, 逃避抗血管生成治疗, 即产生了获得性耐药现象, 单独使用效果不佳^[6]。

2 免疫检查点分子和 ICIs

近年来, 免疫治疗逐渐兴起, NSCLC 的治疗局势发生改变。一系列免疫检查点分子, 如细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) 和程序性细胞死亡-1/程序性死亡配体 1 (PD-1/PD-L1) 在不同阶段发挥免疫抑制作用。CTLA-4 是一种独特的细胞外表面蛋白, 在免疫反应早期与 CD28 竞争结合 B7 分子, 限制细胞白介素-2 (IL-2) 的分泌, 抑制 T 细胞增殖^[7]。PD-1 在多种免疫细胞上表达,

如 T 细胞、NK 细胞、B 细胞等^[8]。与 CTLA-4 信号传导类似, PD-1 在免疫反应后期通过与其配体结合来抑制 T 细胞增殖, 减少干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-2 的分泌^[7]。

ICIs 通过阻断免疫检查点抑制通路来恢复机体的抗肿瘤免疫功能。多项临床研究证实, ICIs 可以改善晚期 NSCLC 的预后。KEYNOTE-042 研究对比派姆单抗组与化疗组的疗效, 结果显示在 PD-L1 表达 > 1%、> 20% 和 > 50% 的患者中, 派姆单抗组均优于化疗组^[9]。另外一项关于纳武单抗的真实世界研究评估了在铂类双药化疗失败后纳武单抗与多西他赛在该患者群体中的疗效, 与多西他赛相比, 纳武单抗组的患者生存时间更长^[10]。虽然免疫单药治疗的有效率达到 20%~30%, 传统化疗的有效率仅有 9%~10%, 但是优势并不明显, 所以联合用药是提高免疫治疗效果的主要手段^[11]。

3 抗血管生成药物与 ICIs 联合的作用机制

基础研究表明, 抗血管生成药物可以通过多种途径来恢复宿主的抗肿瘤免疫反应, ICIs 可以解除免疫抑制并增强抗血管生成药物的作用^[12]。有实验证明在肺癌小鼠模型中, 低剂量阿帕替尼能增加 T 细胞浸润, 减少相关抑制性免疫细胞向肿瘤募集, 并且降低肿瘤和血清中转化生长因子- β (TGF- β) 水平, 同时还发现与单用阿帕替尼相比, 阿帕替尼联合抗 PD-L1 抗体更能显著抑制肿瘤生长^[13]。另外, Tian 等^[14]报道抗 CTLA-4 疗法增加了乳腺肿瘤模型中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的浸润并促进 IFN- γ 等抗肿瘤细胞因子分泌, 起到抗异常血管生成的作用。

3.1 抗血管生成促进淋巴细胞的浸润

淋巴细胞是机体免疫应答的重要细胞成分, 其中 T 细胞通过直接杀死肿瘤细胞在抗肿瘤免疫反应中发挥主要作用。有效的肿瘤控制取决于反应性 T 细胞浸润肿瘤的能力。在小鼠模型中发现 VEGFR-A 降低了 EC 上对 T 细胞浸润至关重要的黏附分子的表达, 肿瘤脉管系统的异常结构和功能阻止 T 细胞浸润到实体瘤中^[15]。抗血管生成可以促进 T 细胞浸润到肿瘤中, 比如舒尼替尼可以减少 TME 中抑制性免疫细胞的数量并增加肿瘤部位 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞浸润, 同时还可以降低 T 细胞上 PD-1 的表达来促进 T 细胞增殖^[16]。

3.2 抗血管生成促进树突状细胞 (DC) 呈递肿瘤抗原

DC 是主要的抗原呈递细胞, 在抗肿瘤免疫

反应中起关键作用。肿瘤抗原通常被 DC 识别并通过主要组织相容性复合物-II (MHC-II) 呈递, 它启动 DC 将抗原加工成较小的肽, 这些肽与 MHC-II 分子一起呈递在表面上, 从而激活 T 细胞^[17]。由于缺乏表面 MHC-I、MHC-II 和共刺激分子的表达, 未成熟的 DC 无法将肿瘤抗原呈递给 T 细胞, 导致 T 细胞沉默。VEGF 可与 DC 表面的 VEGFR-2 结合, 增强 DC 中 PD-1 的表达, 抑制 DC 的发育, 减少 DC 的数量^[18]。抗血管生成可减轻 VEGF 对 DC 的抑制作用, 从而增强 DC 对抗原的呈递。有实验发现阻断 VEGF 信号通路可以在胶质母细胞瘤小鼠模型中看到更多成熟的 DC^[19]。

3.3 抗血管生成将 TME 由免疫抑制转变为免疫支持

TME 富含抑制性免疫细胞, 包括调节性 T 细胞 (Tregs)、髓源性抑制性细胞 (MDSCs)、肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 和未成熟树突状细胞 (imDC)。Tregs 能抑制辅助性 T 细胞的活性, 从而间接抑制 B 细胞的分化和 T 细胞的杀伤能力, 对机体免疫起负向调节作用。T 细胞不仅在淋巴结中需要被抗原呈递细胞激活, 在 TME 中也同样需要。Tregs 细胞可以抑制 DC 等抗原呈递细胞的发育来控制淋巴结和 TME 中 T 细胞的激活^[20]。抗血管生成可以抑制 Tregs 增殖, Yi 等^[21]研究发现, 仑伐替尼通过靶向 FGFR4 抑制信号传导和转录激活因子 5 (STAT5) 磷酸化来阻断 IL-2 介导的 Tregs 分化。

MDSCs 是一种异质的未成熟骨髓细胞群, 通过多种机制抑制肿瘤免疫反应。MDSCs 可以促进 Tregs 增殖, 分泌免疫抑制细胞因子, 还可以增加机体对 ICIs 产生耐药的风险^[22]。有研究发现在接受抗 PD-1 免疫治疗的晚期 NSCLC 患者中, 低 MDSCs 水平与更长的生存期有关^[23]。抗血管生成可以抑制 MDSCs 增殖, 在甲状腺癌小鼠模型中, 仑伐替尼与抗 PD-1 药物联用可以减少 MDSCs 的数量, 缩小肿瘤体积^[24]。

TAMs 在调节肿瘤血管生成方面表现出显著的可塑性。TAMs 有 M1 和 M2 样表型, M1 样 TAMs 抑制肿瘤血管生成, M2 样 TAMs 促进肿瘤血管生成。VEGF 信号传导可促进 TAMs 从 M1 表型向 M2 表型转化^[25]。M2 样 TAMs 通过产生细胞因子、趋化因子、生长因子并提高 T 细胞中免疫检查点分子的表达来抑制免疫功能^[26]。抗血管生成可以促进 TAMs 向 M1 样抗肿瘤表型转化^[27]。

3.4 ICIs 促进肿瘤血管正常化

ICIs 不仅有激活免疫细胞的作用, 还具有抑制异常肿瘤血管生成的功能。抗 PD-1/PD-L1 可以使 T 细胞从衰竭状态中恢复, 活化的 T 细胞可以分泌 IFN- γ , 直接促进肿瘤血管正常化^[28]。有实验证明, ICIs 可以促进原位乳腺癌和异位结肠癌模型中肿瘤脉管系统正常化^[14, 29]。在这两项研究中, 阻断 CTLA-4 或 PD-1 可降低肿瘤血管密度, 改善血流灌注, 增加组织含氧量。

4 抗血管生成药物与 ICIs 联合在晚期 NSCLC 中的应用

外科手术是可切除 NSCLC 患者的首选治疗方法, 不可切除的 NSCLC 患者可以通过药物治疗来延长生存时间。在近年的临床研究中, 抗血管生成药物联合 ICIs 在不可切除的 NSCLC 患者治疗中效果不错。

4.1 抗 VEGF 单抗与 ICIs

4.1.1 贝伐珠单抗+阿特殊单抗 IMpower150 是一项抗血管生成药物联合 ICIs 一线治疗晚期 NSCLC 的 III 期临床研究^[30]。1202 例患者被随机分为 3 组: 贝伐珠单抗+卡铂/紫杉醇 (BCP 组), 阿特殊单抗+卡铂/紫杉醇 (ACP 组), 阿特殊单抗+贝伐珠单抗+卡铂/紫杉醇 (ABCP 组)。相较于 BCP 组, ABCP 组的无进展生存期 (PFS) 和总生存期 (OS) 显著延长, 两组治疗药物不良事件 (AE) 的发生率无明显差异。在贝伐珠单抗联合标准化疗的基础上加用免疫治疗, 在任何 PD-L1 的表达及基因状态都可以改善患者的生存时间。在另外一项研究中, PD-L1 表达 $\geq 50\%$ 且无 *EGFR/ALK/ROS1* 突变的晚期非鳞状 NSCLC 患者使用贝伐珠单抗联合阿特殊单抗治疗方案, 结果显示, 39 名患者中 25 人疾病得到控制, 发生率 $\geq 5\%$ 的 AE 为高血压 (15.4%)、谷丙转氨酶升高 (7.7%)、谷草转氨酶升高 (5.1%)、肺部感染 (5.1%) 和结肠炎 (5.1%), 3 级 AE 的发生率为 38.5%, 未观察到 4 级 AE, 整体安全性良好^[31]。该研究表明阿特殊单抗联合贝伐单抗是一种潜在的治疗高 PD-L1 表达的晚期非鳞状 NSCLC 的方法。

4.1.2 贝伐单抗+纳武单抗 在一项国际、随机、双盲 III 期研究里, 患者以 1:1 的比例随机分配接受纳武单抗或安慰剂联合卡铂、紫杉醇和贝伐单抗, 结果纳武单抗组的中位无进展生存期 (mPFS) 显著长于安慰剂组 (12.1 个月 vs 8.1 个月, $P < 0.0001$), 并且在任何 PD-L1 表达水平的患者 (包括 PD-L1 阴性患者) 中都观察到了生存获益。纳武单抗和安慰

剂组的客观缓解率 (objective response rate, ORR) 分别为 61.5% 和 50.5%, 3 级或 4 级 AE 发生率相当^[32]。由此可见对于晚期非鳞状 NSCLC 患者而言, 纳武单抗联合化疗和贝伐单抗是一种可行的治疗策略。

4.2 抗 VEGFR 单抗与 ICIs

4.2.1 雷莫芦单抗+派姆单抗 II 期 Lung-MAP S1800A 试验

评估了雷莫芦单抗联合派姆单抗治疗既往接受过 ICIs 或者化疗后进展的晚期 NSCLC 患者的效果, 初步结果显示雷莫芦单抗联合派姆单抗显著延长了患者的 OS^[33]。JVDF 研究探索雷莫芦单抗与派姆单抗联合应用的疗效与安全性, 该项研究涉及多种肿瘤, 包括 NSCLC、胃或食管胃结合部腺癌、尿路上皮癌, 共纳入 92 例患者 (其中 NSCLC 患者为 27 名), 数据分析显示雷莫芦单抗联合派姆单抗在 NSCLC 患者中有良好的抗肿瘤活性, 最常见的 AE 为乏力和心肌梗死, 不良反应多为 1~2 级, 耐受性良好^[34]。也有关于雷莫芦单抗联合派姆单抗治疗 PD-L1 阳性晚期 NSCLC 的报道: 在多中心、I a/b 期试验中, PD-L1 表达高水平 (TPS \geq 50%) 和低水平 (TPS 1%~49%) 的患者的 ORR 分别为 56.3% 和 22.2%, 说明雷莫芦单抗联合派姆单抗在 PD-L1 高表达的晚期 NSCLC 患者中疗效更强^[35]。

4.2.2 雷莫芦单抗+德瓦鲁单抗 一项 I a/b 期单臂、多队列研究

在晚期疾病患者中进行, 所有患者使用雷莫芦单抗联合德瓦鲁单抗治疗方案, 结果 NSCLC 患者的 mPFS 和中位总生存期 (mOS) 分别为 2.7 个月和 11 个月; 胃或食管胃结合部腺癌患者为 2.6 个月和 12.4 个月; 肝细胞癌患者为 4.4 和 10.7 个月。NSCLC、胃或食管胃结合部腺癌、肝细胞癌患者 \geq 3 级 AE 发生率分别是 32.1%、37.9% 和 42.9%^[36]。雷莫芦单抗和德瓦鲁单抗联用在所有队列中均表现出抗肿瘤效果。

4.3 酪氨酸激酶抑制剂与 ICIs

4.3.1 安罗替尼与 ICIs

在 Chu 等^[37] 的关于信迪利单抗联合安罗替尼作为未接受治疗且患有不可切除的 III B/C 或 IV 期 NSCLC 患者一线治疗的 I 期研究中, 共有 22 名患者接受信迪利单抗和安罗替尼治疗。在这 22 名患者中, ORR 为 72.7%, 疾病控制率 (DCR) 高达 100%。最常见的 AE 为出血 (59.1%)、甲状腺功能减退 (50.0%) 和尿酸增高 (40.9%), 3 级及以上 AE 的发生率为 54.5%, 毒性可控。虽然在数据截止时的 PFS 还不成熟, 但是可以得出信迪利单抗加安罗替尼在该患者群体中能有效控制疾病进展的结论。

4.3.2 阿帕替尼与 ICIs

NCT03083041 研究将阿帕替尼联合卡瑞利珠单抗作为晚期 NSCLC 二线及以上治疗方案, 25 名患者每两周静脉注射一次 200 mg 卡瑞利珠单抗和每日一次口服阿帕替尼 250 mg^[38]。患者的 ORR 为 40.0%, DCR 为 92.0%, mPFS 为 9.6 个月, 并且在不同 PD-L1 表达水平都可以观察到类似的 ORR 和 PFS。该研究得出在晚期 NSCLC 患者中使用卡瑞利珠单抗加低剂量阿帕替尼有良好的临床效果。

5 疗效预测指标

抗血管生成药物联合 ICIs 为晚期 NSCLC 患者提供了新的治疗选择。但是由于临床上缺乏相关的生物标志物, 实际的临床治疗结果达不到预期效果, 如何识别药物治疗的潜在获益人群是临床面临的巨大挑战。探索生物标志物有助于确定哪些患者可以在联合治疗中获益最多。

一项包含 69 名 NSCLC 患者的真实世界研究中, 患者接受纳武单抗或派姆单抗联合抗血管生成治疗。亚组分析得出, 与 EGFR 突变的 NSCLC 患者相比, EGFR 野生型患者的 PFS 显著延长^[39]。Lu 等^[40] 发现安罗替尼通过下调血清中趋化因子 (CCL2) 的表达来抑制肿瘤血管生成, 并且其诱导的血清 CCL2 水平下降与患者的 PFS 和 OS 显著延长相关。此外, PD-L1 表达水平与 ICIs 单药或 ICIs 联合抗血管生成药物治疗的疗效也有关。JVDF 研究 (NCT02443324) 中 PD-L1 高表达的患者预后更好^[35]。2020 年欧洲肿瘤内科学会上公布的数据显示 PD-L1 表达阳性的 NSCLC 患者使用阿帕替尼联合 ICIs 可以观察到更好的临床疗效^[41]。部分血液指标或许可以作为潜在的预测生物标志物。有研究发现较高水平的总胆固醇、低密度脂蛋白以及外周血中性粒细胞计数的患者的 PFS 和 OS 较差^[42-43]。

6 总结与讨论

大量临床前研究揭示了抗血管生成与免疫治疗的协同机制。已公布的临床试验数据也表明两者联用是治疗晚期 NSCLC 的一种有前景的方法且总体安全性较好。在临床上, 严重的不良反应是导致 ICIs 治疗中断的一个重要因素, 大多数不良反应与过度活跃的免疫反应有关, 免疫性不良反应可以通过暂停 ICIs 或降低 ICIs 剂量缓解, 由于抗血管生成能促进药物向肿瘤部位输送, 在联合策略中或许可以使用较小剂量的 ICIs, 减少不良反应的发生^[28], 能够提示患者预后的生物标志物有限且不足。目前用药的最佳组合、给药时间、顺序和剂量等也尚未明确。因此, 需要更

多的基础实验和临床研究来探讨这些问题,探索生物标志物,拟订个体化治疗方案,使患者获益最大化。

参考文献

- [1] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134 (7): 783-791.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69 (1): 7-34.
- [3] Li TL, Kang GB, Wang TY, et al. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16 (1): 687-702.
- [4] Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (9): 1745-1770.
- [5] Gao F, Yang C. Anti-VEGF/VEGFR2 monoclonal antibodies and their combinations with PD-1/PD-L1 inhibitors in clinic [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2020, 20 (1): 3-18.
- [6] Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T, et al. Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer-alterations to anti-VEGF pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (4): 1232.
- [7] Callahan MK, Wolchok JD. At the bedside: CTLA-4 and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy [J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 94 (1): 41-53.
- [8] Dermani FK, Samadi P, Rahmani G, et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: potential target for cancer therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (2): 1313-1325.
- [9] Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2019, 393 (10183): 1819-1830.
- [10] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373 (17): 1627-1639.
- [11] Yu YF, Zeng DQ, Ou QY, et al. Association of survival and immune-related biomarkers with immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis and individual patient-level analysis [J]. *JAMA Netw Open*, 2019, 2 (7): e196879.
- [12] Song YX, Fu Y, Xie Q, et al. Anti-angiogenic agents in combination with immune checkpoint inhibitors: a promising strategy for cancer treatment [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1956.
- [13] Zhao S, Ren SX, Jiang T, et al. Low-dose apatinib optimizes tumor microenvironment and potentiates antitumor effect of PD-1/PD-L1 blockade in lung cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7 (4): 630-643.
- [14] Tian L, Goldstein A, Wang H, et al. Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming [J]. *Nature*, 2017, 544 (7649): 250-254.
- [15] Schaaf MB, Garg AD, Agostinis P. Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (2): 115.
- [16] Bourhis M, Palle J, Galy-Fauroux I, et al. Direct and indirect modulation of T cells by VEGF-A counteracted by anti-angiogenic treatment [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 616837.
- [17] Rocha N, Neefjes J. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation [J]. *Embo J*, 2008, 27 (1): 1-5.
- [18] Zhao YS, Guo SP, Deng J, et al. VEGF/VEGFR-targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: targeting the tumor microenvironment [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18 (9): 3845-3858.
- [19] Malo CS, Khadka RH, Ayasoufi K, et al. Immunomodulation mediated by anti-angiogenic therapy improves CD8 T cell immunity against experimental glioma [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 320.
- [20] Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: can Treg cells be a new therapeutic target? [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110 (7): 2080-2089.
- [21] Yi CH, Chen LR, Lin ZF, et al. Lenvatinib targets FGF receptor 4 to enhance antitumor immune response of anti-programmed cell death-1 in HCC [J]. *Hepatology*, 2021, 74 (5): 2544-2560.
- [22] Tesi RJ. MDSC; the most important cell you have never heard of [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40 (1): 4-7.
- [23] Koh J, Kim Y, Lee KY, et al. MDSC subtypes and CD39 expression on CD8⁺ T cells predict the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy in patients with advanced NSCLC [J]. *Eur J Immunol*, 2020, 50 (11): 1810-1819.
- [24] Gunda V, Gigliotti B, Ashry T, et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy augments lenvatinib's efficacy by favorably altering the immune microenvironment of murine anaplastic thyroid cancer [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144 (9): 2266-2278.
- [25] Tamura R, Tanaka T, Yamamoto Y, et al. Dual role of macrophage in tumor immunity [J]. *Immunotherapy*, 2018, 10 (10): 899-909.
- [26] Lin YX, Xu JX, Lan HY. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12 (1): 76.
- [27] Ren SJ, Xiong XX, You H, et al. The Combination of immune checkpoint blockade and angiogenesis inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 689132.
- [28] Yi M, Jiao DC, Qin S, et al. Synergistic effect of immune checkpoint blockade and anti-angiogenesis in cancer treatment [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18 (1): 60.
- [29] Zheng XC, Fang ZX, Liu XM, et al. Increased vessel perfusion predicts the efficacy of immune checkpoint block-

- ade [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128 (5): 2104-2115.
- [30] Reck M, Mok TSK, Nishio M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer (IMpower150): key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised, open-label phase 3 trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7 (5): 387-401.
- [31] Seto T, Nosaki K, Shimokawa M, et al. Phase II study of atezolizumab with bevacizumab for non-squamous non-small cell lung cancer with high PD-L1 expression (@Be Study) [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10 (2): e004025.
- [32] Sugawara S, Lee JS, Kang JH, et al. Nivolumab with carboplatin, paclitaxel, and bevacizumab for first-line treatment of advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2021, 32 (9): 1137-1147.
- [33] Reckamp KL, Redman MW, Dragnev KH, et al. Phase II randomized study of ramucirumab and pembrolizumab versus standard of care in advanced non-small-cell lung cancer previously treated with immunotherapy-lung-MAP S1800A [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40 (21): 2295-2306.
- [34] Herbst RS, Arkenau HT, Santana-Davila R, et al. Ramucirumab plus pembrolizumab in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer, gastro-oesophageal cancer, or urothelial carcinomas (JVDF): a multicohort, non-randomised, open-label, phase 1a/b trial [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20 (8): 1109-1123.
- [35] Herbst RS, Arkenau HT, Bendell J, et al. Phase 1 expansion cohort of ramucirumab plus pembrolizumab in advanced treatment-naive NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16 (2): 289-298.
- [36] Bang YJ, Golan T, Dahan L, et al. Ramucirumab and durvalumab for previously treated, advanced non-small-cell lung cancer, gastric/gastro-oesophageal junction adenocarcinoma, or hepatocellular carcinoma: an open-label, phase I a/b study (JVDJ) [J]. *Eur J Cancer*, 2020, 137: 272-284.
- [37] Chu TQ, Zhong RB, Zhong H, et al. Phase 1b study of sintilimab plus anlotinib as first-line therapy in patients with advanced NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16 (4): 643-652.
- [38] Ren SX, He JX, Fang Y, et al. Camrelizumab plus apatinib in treatment-naive patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer: a multicenter, open-label, single-arm, phase 2 trial [J]. *JTO Clin Res Rep*, 2022: 100312.
- [39] Qiu LP, Zhao X, Shi WW, et al. Real-world treatment efficacy of anti-programmed death-1 combined with anti-angiogenesis therapy in non-small cell lung cancer patients [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (24): e20545.
- [40] Lu J, Zhong H, Chu TQ, et al. Role of anlotinib-induced CCL2 decrease in anti-angiogenesis and response prediction for nonsmall cell lung cancer therapy [J]. *Eur Respir J*, 2019, 53 (3): 1801562.
- [41] Gao GH, Zhao J, Ren SX, et al. Efficacy and safety of camrelizumab plus apatinib as second-line treatment for advanced squamous non-small cell lung cancer [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10 (8): 441.
- [42] Tang MQ, Song C, Zhang YW, et al. Levels of pretreatment blood lipids are prognostic factors in advanced NSCLC patients treated with anlotinib [J]. *Lipids Health Dis*, 2021, 20 (1): 165.
- [43] Chen R, Lu FY, Liu B, et al. Absolute neutrophil count in the peripheral blood predicts prognosis in lung cancer patients treated with anlotinib [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 3619-3627.

(收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-03-02)

中药资源开发与利用

关黄柏历史沿革及产业发展现状与策略探析

李先娜, 孙晖, 金爽, 王志刚, 董辉, 杨波* (黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 关黄柏为东北三大珍贵阔叶树种之一, 具有较高的药用价值、生态价值及经济价值, 市场需求量极大, 为国家珍贵的药用保护树种。目前, 关黄柏资源短缺、供给关系失衡、质量控制薄弱、衍生品种类不足、资金投入不足、政策支持不够等问题严重制约了关黄柏产业的可持续性高质量发展。本文通过对关黄柏本草考证、资源现状、产业发展等方面的研究进展进行综述, 全面分析关黄柏全产业链发展现状, 并提出相应的发展策略, 为关黄柏资源可持续利用及产业高质量发展提供参考。

关键词: 关黄柏; 中药产业; 资源利用; 高质量发展; 策略与方法

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-2996-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.029

Historical evolution, development status and strategies of *Phellodendron amurense* Rupr.

LI Xian-na, SUN Hui, JIN Shuang, WANG Zhi-gang, DONG Hui, YANG Bo* (College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstracts: *Phellodendron amurense* Rupr. is one of the three precious broad-leaved tree species in Northeast China, which has high medicinal value, ecological value and economic value with great market demand. It is the precious medicinal tree species under national protection. At present, due to the shortage of resources, imbalance of supply and demand, poor quality evaluation methods, insufficient derivative category, inadequate investment, and policy support, the development of *Phellodendron amurense* Rupr. industry has been limited. This paper reviewed the progress in historical evolution, resource status, and industrial development of *Phellodendron amurense* Rupr., comprehensively, and analyzed the development status of the whole product chain and industrial chain of *Phellodendron amurense* Rupr. Some development strategies were put forward to provide reference and scientific basis for the sustainable utilization of resources and the high-quality development of *Phellodendron amurense* Rupr.

Key words: *Phellodendron amurense* Rupr.; traditional Chinese medicine industry; resource utilization; high-quality development; strategy and method

关黄柏为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮, 是我国传统大宗中药材, 在我国已有 2000 多年药用历史, 最早记载于《神农本草经》, 原名“檗木”, 列上品^[1]。关黄柏性寒、味苦, 归肾、膀胱经, 具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的功效, 收载于历版《中国药

典》^[2]。文献记载, 关黄柏主要分布于东北三省(黑龙江、吉林、辽宁), 大约占全国总产量的 90%, 是著名的东北道地药材之一, 具有较高的经济价值^[3]。关黄柏以野生品供应国内外医药市场, 其药用价值、生态价值、保健作用及道地性为市场所青睐。本文从本草历史沿革、植物资源、化学成分、

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.82204690); 黑龙江省自然科学基金项目 (No.LH2023H069); 黑龙江省中医药经典普及化研究专项课题 (No.ZYW2022-065)。

作者简介: 李先娜, 女, 博士, 讲师, 主要从事中药质量标准化研究、中药血清药物化学、方剂药效物质基础及配伍规律研究, email: 435317443@qq.com *通信作者: 杨波, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及配伍规律研究, email: 56024955@qq.com

药用分析、产品链及产业链等方面对关黄柏进行系统分析，对关黄柏本草考证、资源利用、活性成分、临床应用、新药及衍生品研发等方面的研究发展现状进行综述，分析关黄柏产业发展过程中遇到的瓶颈与挑战，以期对关黄柏资源的可持续利用及产业高质量发展提供参考。

1 关黄柏本草考证与资源研究现状

黄柏最早记载于《神农本草经》：“檿木味苦寒，主五脏，肠胃中结热，黄疸，肠痔，止泻利，

女子漏下赤白，阴伤蚀疮”；汉代《名医别录》中称黄柏为“黄檿”；《本草经集注》中称黄柏为“檿木”^[4-5]。从历代本草文献中对黄柏植物描述及附图中发现，古时药用“檿木”“黄檿”或“黄柏”与芸香科黄柏属植物特征相符，系“川黄柏”。关黄柏起源较晚且历代本草中无记载，最早记载于《朝鲜药局方》，后在《辽宁药材》中有所记载，功能主治同川黄柏^[6]。经查阅古籍文献，记载黄柏的主要文献沿革见表 1。

表 1 黄柏的文献沿革^[7-13]

Tab 1 Historical document of *Phellodendron amurense* Rupr.^[7-13]

时间	文献名称	文献描述
东汉	神农本草经	原名“檿木”，檿木味苦寒，主五脏，肠胃中结热，黄疸，肠痔，止泻利，女子漏下赤白，阴伤蚀疮
南北朝	名医别录	称为黄檿，生汉中山谷及永昌
	本草经集注	今出邵陵者，轻薄色深为胜，出东山者，厚而色浅
五代后蜀	蜀本草	黄檿树高数丈，叶似吴茱萸，今所在有，出房、商、合等州山谷中，以蜀中者为佳
唐代	新修本草	生汉中山谷及永昌；今出昭陵者，轻薄色深为胜；出山东者，厚重而色浅
	药性论	主男子阴痿，治下血如鸡鸭肝片；及男子茎上疮，屑末敷之
	本草拾遗	主热疮疱起，虫疮，痢，下血，杀蛀虫；煎服，主消渴
宋代	本草图经	今处处有之，以蜀中者佳
	证类本草	檿木，黄檿也，生汉中川谷及永昌，今处处有之，以蜀中者为佳
明代	本草乘雅半偈	出汉中山谷及永昌、邵陵、山东诸处，今唯蜀中者皮厚色深为佳
清代	本草崇原	黄柏木出汉中山谷及永昌、邵陵、房商、山东诸处皆有；今以蜀中出者
	本草便读	黄柏其质虽皮，其气味皆苦寒沉降，故独入肾与膀胱，清泄下焦湿火
	本草备要	川产肉浓色深者良；生用降实火，蜜炙则不伤胃，炒黑能止崩带
	本草害利	川产肉浓色深者良；生用降实火，酒制治上，蜜制治中，盐制治下
	植物名实图考	檿木，本经上品，即黄檿，根名檀桓，湖南辰沅山中所产极多
1928	增订伪药条辨	四川顺庆府南充县出者为川黄柏，色老黄，内外皮黄黑，块片小者，可作染料用；湖南及关东出者，为关黄柏，块片甚大而薄，色淡黄者次
1963—1985 年版	中国药典	黄柏：本品为芸香科（Rutaceae）的植物黄皮树 <i>Phellodendron chinense</i> Schneid. 或黄檿 <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. 除去栓皮的干燥树皮；多系野生，主产于四川、云南、贵州、辽宁、吉林等地；4~7 月间将树皮剥，刮去外面粗皮，晒干即得
1990—2005 年版	中国药典	黄柏：芸香科植物黄皮树 <i>Phellodendron chinense</i> Schneid. 或黄檿 <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. 的干燥树皮，前者习称“川黄柏”，后者习称“关黄柏”；剥取树皮后，除去粗皮，晒干
2005—2020 年版	中国药典	黄柏：芸香科植物黄皮树 <i>Phellodendron chinense</i> Schneid. 的干燥树皮，习称“川黄柏” 关黄柏：芸香科植物黄檿 <i>Phellodendron amurense</i> Rupr.，其干燥树皮入药，习称“关黄柏”

“黄柏”名称历经“檿木 - 黄檿 - 黄柏”的演变，南北朝《本草纲目》中明确记载黄柏为黄檿的错误省略写法。唐宋时期《新修本草》记载为“檿木，黄檿也”，明清时期使用“檿木”替代“檿木”，明代后期本草著作将黄柏正名变更为“黄檿”。民国时期黄柏逐渐在《增订伪药条辨》及《药物出产辨》等本草文献中记载为“黄柏”。现代《中国药典》等均收录“黄柏”为正名，“檿木”“檿木”“黄檿”等鲜见。

根据历代本草文献，黄柏基原历经 3 个时期变化，唐代黄柏统称“檿木”，形态描述为“小树、皮黄而苦，称为子檿；另一种小树，多刺，皮黄”，

推测其基于来源于小檗科小檗属 *Berberis* 植物。宋朝时期《本草图经》对黄柏植物描述发生改变：“木高数丈，复叶，无刺，四川产地品质较好”，推测其基原归属于芸香科黄檿属 *Phellodendron* 植物相似。明清以川产为黄柏道地药材，其种质为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid.。根据《增订伪药条辨》记载，可知黄柏在用药过程中分为川黄柏、关黄柏和洋黄柏，洋黄柏进口自日本，尚未得到广泛应用便消失。因此自民国以后，市场黄柏药材品种主要分为川黄柏及关黄柏，1963—2005 年版《中国药典》将关黄柏与川黄柏统一收载于“黄柏”项下^[12]。自 2005 年起《中国药典》记载“黄柏”

为川黄柏，而关黄柏作为另一品种单独列出。关黄柏来源于黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮，药材呈板片状或浅槽状，外皮呈黄绿色或淡棕黄色，平坦，有不规则纵裂纹，皮孔痕少，或有粗皮残留，内表面呈黄色或黄棕色，主要产于辽宁、黑龙江、吉林、河北等地，产地以东北三省为主，其植物标本（采自黑龙江省茄子河区）、药用部位及饮片形态见图 1。而川黄柏来源于黄树皮 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮，主产于四川、贵州、重庆、云南等地。



图 1 关黄柏植物标本、药用部位及饮片形态图
Fig 1 Morphology of *Phellodendron amurense* Rupr. plants and medicinal parts and slices

关黄柏除具有较高的药用价值外，还具有生

态价值和经济价值。近年来，在经济利益驱使下，关黄柏资源违规砍伐情况严重，而黄柏植株增长更新速率缓慢，导致野生资源量逐渐降低。1987 年国务院颁布了《野生药材资源保护管理条例》，关黄柏被列为国家第一批重点保护野生药材（保护级别：二级），随着关黄柏野生资源稀缺，《中国植物红皮书》（1998 版）、《国家重点保护野生植物名录》（1999 版）、《中国植物红色名录》（2004 版）先后将黄檗植株列为国家易危保护物种^[14]。尽管黄檗资源保护成为国内外关注热点问题，且黄檗皮多采用环剥法进行制取，有效延长了关黄柏植株树龄，提高药用部位产量至 20 kg/株左右，保证野生关黄柏五年内总产量约 6000 吨，但现有的野生资源量依旧很难满足较高的市场需求，市场零售价格不断攀升，大规模滥砍滥伐现象日趋严重^[15]。因此，以人工栽植关黄柏代替野生资源成为关黄柏产业可持续性发展的主要途径之一。

2 关黄柏化学成分与质量控制研究现状

随着现代分析技术的提升，研究发现关黄柏的化学成分主要包括生物碱类、内酯类、柠檬苦素类、黄酮类、萜类、多酚类、甾醇类、木质素类、酰胺类、挥发类、糖类和糖苷等，其中生物碱类、柠檬苦素类成分为关黄柏的主要有效成分，具体见表 2。

表 2 关黄柏主要化学成分^[16-17]

Tab 2 Chemical constituents of *Phellodendron amurense* Rupr.^[16-17]

类别	主要化学成分
生物碱类	1. 小檗碱 (berberine); 2. 黄柏碱 (phellodendrine); 3. 药根碱 (jatrorrhizine); 4. 表小檗碱 (epiberberine); 5. 小檗红碱 (berberrubine); 6. 氧化小檗碱 (oxyberberine); 7. 二羟基药根碱 (dihydroxyl-jatrorrhizine); 8. 四氢药根碱 (tetrahydrojatrorrhizine); 9. 木兰花碱 (magnoflorine); 10. 蝙蝠葛碱 (menisperine); 11. 木兰箭毒碱 (magnocurarine); 12. 莲心季铵碱 (lotusine); 13. N-甲基大麦芽碱 (candicine); 14. 四氢番荔枝碱 (tetrahydroreticuline); 15. 四氢巴马汀 (tetrahydropalmatine); 16. 羟基巴马汀 (hydroxyl-palmatine); 17. 掌叶防己碱 (palmatine); 18. 非洲防己碱 (columbamine); 19. 竹叶椒碱 (xanthoplanine); 20. N-甲基福林得碱 (N-methyl-flindersine); 21. 藤泊它碱 (tembetarine); 22. 茵芋碱 (skimmianine); 23. 白鲜明碱 (dasycarpamin); 24. 异阔果芸香碱 (pilocarpine); 25. 白藜碱 (dictamnine); 26. N-甲基四氢非洲防己碱 (N-methyltetrahydrocolumbamine); 27. γ -崖椒碱 (γ -fagarine); 28. 网叶番荔枝碱 (tembetarine); 29. 芬式唐松草定碱 (thalifendine); 30. 唐松草芬宁碱 (thalisopine); 31. 吴茱萸碱 (evodiamine) 等
内酯类	1. 黄柏酮 (obacunone); 2. 吴茱萸苦素 (rutaevin); 3. 诺米林 (nomilin); 4. 三棱酸 (sanleng acid); 5. 黄柏内酯 (obaculactone); 6. 白鲜交酯 (dictamnolide); 7. 黄檗萜内酯 A/B; 8. 黄檗宁 A/B; 9. 柠檬苦素 (limonin); 10. 17- β -D-吡喃葡萄糖 (17- β -D-glucopyranoside) 等
多酚类	1. 黄柏苷 (phellamurin); 2. 松柏苷 (coniferin); 3. 四甲氧基-野黄芩苷 (tetramethyl-O-scutellarin); 4. 黄酮金丝桃 (hyperin); 5. 紫丁香苷 (syringin); 6. 黄柏兹德 (phellozide); 7. 阿魏酸 (ferulic acid); 8. 绿原酸 (chlorogenic acid); 9. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 10. 3-O-阿魏酰奎尼酸 (3-O-feruloylquinic acid); 11. 黄柏酮酸 (obacunonic acid); 12. 黄柏内酯 A/B (amurenlaetone A/B) 等
萜类	1. 木栓酮 (friedelin); 2. 无羁萜 (friedelin); 3. 赛奥林 (cneorin); 4. 黄柏呈 (phellochin); 5. 尼洛替星乙酰酯 (niloticin acetate); 6. 鬃毛酮 (hispidone); 7. 尼洛替星 (niloticin); 8. 二氢尼洛替星 (dihydroniloticin); 9. 苦楝酮 (melianone) 等
甾醇类	1. 菜油甾醇 (campesterol); 2. β -谷甾醇 (β -sitosterol); 3. 7-脱氢豆甾醇 (7-dehydrostigmasterol); 4. β -豆甾醇 (β -stigmasterol); 5. 菜油甾醇 (campesterol) 等
其他类	1. (-)-丁香脂素-4, 4'-O-双- β -D-葡萄糖苷 [(-)-syringaresinol-4, 4-O-bis- β -D-lucoside]; 2. (±)-南烛木树脂酚 [(±)-lyoniresinol]; 3. (±)-5, 5-二甲氧基树脂酚-4-O- β -D-葡萄糖 [(±)-5, 5-dimethoxyariciresinol-4-O- β -D-glucoside]; 4. 月桂烯 (myroene); 5. 8-十一烯醛 (8-undecenal); 6. 柠檬烯 (limonene); 7. 硬脂酸 (stearic acid); 8. 油酸 (oleic acid); 9. 十二醇 (dodecanol); 10. β -月桂烯 (β -myroene); 11. β -香茅醇 (β -citronellol); 12. α -蒎烯 (α -pinene) 等

2005 年版《中国药典》首次将关黄柏与川黄柏分类列为两种中药材,其中“川黄柏”列在“黄柏”项下,关黄柏则单独列出。《中国药典》以盐酸小檗碱含量差异作为两者鉴别标准,其中川黄柏中小檗碱含量 $\geq 3.0\%$,关黄柏中小檗碱含量 $\geq 0.60\%$ 。然而,盐酸小檗碱非黄柏独有成分,黄连、淫羊藿、唐松草、羊不食、三颗针等中药材中均含有,因此以小檗碱作为黄柏质量评价指标成分并不具有专属性^[18]。随着现代化学分析技术的迅猛发展,国内外学者对关黄柏及川黄柏化学成分进行了深入的定性及定量研究,以寻找关黄柏及川黄柏差异性指标成分,结果显示包括吴茱萸次碱、白藜碱、7-羟基吴茱萸次碱、黄嘌呤 A/B 等成分仅在关黄柏中存在,而内酯类成分黄嘌呤内酯 A/B 等仅在川黄柏中存在。差异性成分研究结果为鉴别两者并避免临床混用现象提供了科学依据^[19]。虽然关黄柏与川黄柏化学成分相似但含量差异较大,例如,川黄柏中黄柏碱含量约是关黄柏的 2~4 倍;盐酸巴马汀为关黄柏特异性指标成分,其在川黄柏中含量极低或检测不到^[20]。因此,以盐酸小檗碱、黄柏碱、盐酸巴马汀三种成分作为区分川黄柏及关黄柏的指标性化合物具有一定的科学依据。为此,2010 年版《中国药典》对于关黄柏和川黄柏鉴别项下,除原收录的盐酸小檗碱含量外,川黄柏增加黄柏碱含量测定标准(黄柏碱 $\geq 0.34\%$),关黄柏增加巴马汀含量测定标准(巴马汀 $\geq 0.30\%$),且沿用至今。袁汉文等^[21]建立了川黄柏的特征图谱及一测多评方法,可有效区分关黄柏与川黄柏,促进了关黄柏临床用药过程中的合理性、有效性及安全性。

3 关黄柏药理活性与临床应用研究现状

关黄柏作为临床常用具有清热燥湿、泻火解毒功效的中药,临床常用于治疗下焦湿热、阴虚火旺、盗汗骨蒸等症。现代药理研究表明,关黄柏具有抗菌、抗炎、解热、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、降血脂、抗心律失常、免疫调节等活性^[22]。

3.1 抗菌作用

关黄柏中黄酮类、生物碱类、黄酮苷类及酚酸类等成分具有广谱抗菌作用,可抑制多种细菌、真菌及病毒的生长。其中小檗碱为关黄柏抗菌的主要活性成分,可有效抑制痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌、炭疽杆菌、肺炎双球菌、大肠埃希菌、白喉杆菌的生长、繁殖,其可通过调控 HOG-MAPK 通路中 *SLN1*、*SSK2*、*HOG1* 基因及 *ATP11* 和 *SOD2* 等多个能量代谢相关靶点,增加细胞内渗透压及活性

氧积累,破坏细菌细胞壁的形成,干扰细菌能量代谢、抑制细菌生物膜形成,发挥广谱抗菌或杀菌作用^[23]。此外,药根碱可通过调节肠道微生物群和 NOS2 的表达起到抑制溃疡性结肠炎作用^[24]。临床上广泛用于治疗胃肠道及其他组织器官感染性疾病,如细菌性痢疾、急慢性尿路感染、肾盂肾炎、胃肠炎、中耳炎及眼结膜炎等症。

3.2 抗炎作用

关黄柏具有显著体内调节肿瘤坏死因子(TNF- α)、环氧合酶-2(COX-2)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-6、IL-8)等炎症因子异常表达的作用,可抑制炎症的发生与发展^[1]。孙晖等^[25]研究发现,关黄柏生物碱类成分可通过调节亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、脂肪酸代谢、甘油磷脂代谢、嘌呤代谢等通路,有效逆转前列腺腺炎模型大鼠体内异常代谢物表达水平,进而干预前列腺炎的发生与发展。研究表明,慢性炎症疾病的产生可能与 IL-6 作用并增加赖氨酰羟化酶 2(LH2)的表达,促进炎症因子的扩散相关。小檗碱可降低炎症因子 IL-6 表达,阻断 LH-2 介导的糖酵解调控代谢重编程,进而抑制体内炎症反应并降低细胞活化所引起的免疫效应,起到抗三阴性乳腺癌作用^[26]。

3.3 抗肿瘤作用

Ludmila 等^[27]通过研究关黄柏提取物对人肺癌、乳腺癌、结直肠癌和宫颈癌细胞的增殖抑制效应,发现关黄柏加药组可显著抑制肿瘤细胞增殖及肿瘤内血管生成,具有显著抗癌作用^[28]。关黄柏中小檗碱、 β -谷甾醇、豆甾醇和黄柏内酯、巴马汀等成分可以通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖与侵袭等机制起到抗胃癌、结肠癌、肾癌、肺癌、宫颈癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌作用。Liu 等^[29]研究发现,小檗碱由于具有抗肿瘤、抗炎、抗溃疡等活性,其在胃癌发生初期可抑制幽门螺杆菌感染,控制胃黏膜炎症产生,促进溃疡愈合,起到预防胃癌的作用;在胃癌发生发展过程中,小檗碱通过作用于 NF- κ B、PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路传导,调控炎症性细胞因子,起到促进肿瘤细胞凋亡,调控巨噬细胞极化及自噬过程,逆转胃黏膜萎缩的作用,进而抑制胃癌发展与恶化。

3.4 其他

关黄柏还具有抗痛风、降血糖、抗病毒、抗溃疡、保护心脑血管等药理作用^[30]。临床上关黄柏常与知母、地黄等合用,以关黄柏作为药味之一的中成药制剂主要用于治疗结核病、阴道炎、脂溢性皮炎、创面感染、肛周湿疹、静脉性溃疡、

前列腺炎、骨髓炎及梦遗滑精等症。

4 黄柏中成药产品及其他衍生品开发现状

川黄柏和关黄柏临床主要用于治疗湿热泻痢, 黄疸尿赤, 带下阴痒, 热淋涩痛, 脚气痿蹙, 骨蒸劳热, 盗汗, 遗精, 疮疡肿毒, 湿疹湿疮等症, 两者功能主治虽相近, 但药理活性强度稍有差异。药品名称中多以“黄柏”作为关黄柏与川黄柏药品的统称, 以“黄柏”为关键词在国家药品监督管理局网站数据查询模块国产药品、中药保护品种、中药配方颗粒备案信息、非处方药中药目录中进行检索。结果显示, 黄柏中药制剂共有 39 种获批上市销售, 其中山东汉方制药有限公司研制的复方黄柏液涂剂被定为中药保护品种。此外, 有 87 种黄柏中药配方颗粒已备案上市。从时间跨度来看, 最早在 1995 年卫生部首次批准“复方黄柏液涂剂”上市销售, 后陆续出现黄柏胶囊、黄柏片、复方黄柏祛癣搽剂、黄柏果油软胶囊、黄柏八味散、复方黄柏液涂剂等剂型药品, 制剂类型主要以胶囊剂为主, 功效主治包括清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮^[31-32]。

基于“未病先防”的中医辨证施治诊疗思维, 中药衍生品近年来越来越受到消费者的青睐。基于国家知识产权局-中国专利公布公告查询模块 (<http://epub.cnipa.gov.cn>)、智慧芽公司的 PatSnap 全球专利数据库 (<https://www.zhuhuiya.com>) 数据平台, 结合《国际专利分类表》(IPC 分类) 数据库, 以“关黄柏”作为检索词进行专利检索, 结果显示, 关黄柏凭借显著的抗炎、抗菌、抗肿瘤、降压、抗溃疡、免疫调节等活性, 其衍生品在大健康产品、保健食品、动物趋避剂、杀生剂、植物生长调节剂、化妆品及动物饲料等应用领域备受青睐, 相关衍生品类别及专利授权主要以医药产品为主, 其次为食品及饲料产品, 关黄柏 IPC 应用分类分析图见图 2^[33]。市场上黄柏衍生品主要以黄柏作为关黄柏及川黄柏的统称, 以黄柏总提取物、生物碱类、黄酮类及多糖类等组分作为主要成分。例如, 黄柏精华素为黄柏的高浓度总提取物, 具有较强的抗炎、抗菌、抗氧化作用, 常被制成外用产品, 主要用于预防及改善皮肤炎症、痤疮、湿疹、癣等问题。此外, 黄柏生物碱类及多糖类成分作为黄柏主要有效成分, 具有抗菌、抗炎、抗癌等活性, 目前已被研发为保健产品, 如黄柏口服液、黄柏胶囊、黄柏片、复方黄柏洗液等, 通过调节机体内炎症环境、提高机体免疫力、调节肝肾功能、降低血压等途

径, 发挥防治前列腺炎、胃肠炎、肝炎、阴道炎、前列腺癌等作用。近年来, 以关黄柏抗菌、抗肿瘤、抗炎、降糖等功效申请的保健功能食品、化妆品、食品添加剂、动物饲料、动物驱避剂、杀生剂、厨房用具、卫生设备等共 110 余项专利, 产品类别主要包括复方茶、饮料、药酒、洗手液、洗液、足浴包、面膜粉、拖鞋、保健枕、床单、坐垫、被、防治绵羊痘的饲料、鱼出血病防治饲料、防治牛蓝舌病饲料、中药饲料添加剂等。可见, 关黄柏具有良好的衍生价值及广阔的市场前景。

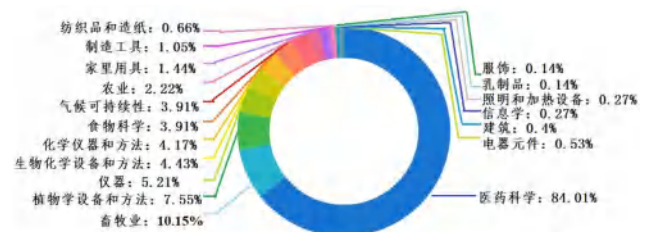


图 2 关黄柏相关专利 IPC 应用分类分析图

Fig 2 IPC diagram of *Phellodendron amurense* Rupr. patent

5 关黄柏产业高质量发展策略探析

关黄柏作为东北“三大硬阔”树种之一, 其科学价值、药用价值及产业价值极高, 合理规划关黄柏全产业链发展路径, 有助于带动地方经济稳步提升, 推进中医药的传承与创新。关黄柏产业链上游为中药材供应商, 主要包括关黄柏种植业、野生抚育及资源开发领域。产业链中游是中药生产加工企业, 主要涉及关黄柏饮片炮制、生产及成分提取, 此阶段将关黄柏加工为中药饮片、中成药及相关衍生产品。关黄柏产业链下游为终端销售业, 中药饮片、中成药及相关产品经流通运输至医疗机构、药店、商场等销售场所, 最终到达消费者手中, 用于疾病的预防及诊疗过程。随着关黄柏及其提取物在新药研发、大健康产品研发及现代医学临床治疗、康复养生等方面的开发价值不断提高, 当前关黄柏产业供给关系失衡, 野生资源遭受严重破坏, 严重遏制了关黄柏产业可持续发展。为此, 我们建议从政策制定及科学管理等方面加大改革及扶持力度, 以促进关黄柏产业高质量发展。

5.1 政策引导, 建立道地药材资源培育基地

黑龙江作为中药资源大省, 为了保护和发省内道地药材资源, 政府先后出台了《黑龙江省“十四五”中药材发展规划》《黑龙江省关于加快中医药特色发展的若干政策措施的通知》等相关政策, 建立了中药材种植养殖体系, 并加大野生

药材资源保护力度,推动了黑龙江省中医药种植技术向着规范化、科学化方向发展进程。关黄柏作为黑龙江省道地药材之一,开展关黄柏资源繁育及建设特色药用经济生态林是对关黄柏药用资源的有效补充。关黄柏属被子植物门,双子叶植物纲,喜生长在寒冷、湿润、光照强的山地杂木林及河谷区域。研究发现,关黄柏栽培品小檗碱积累与光照、地域温度成正相关;巴马汀的积累主要与相对湿度成负相关,且与降水量、生长海拔成正相关。ArcGIS 空间计算预测关黄柏最佳种植密度应选择植株行距 3 m×2 m,栽种地点宜选在平原或中下腹坡地及河流区域等地^[34]。因此,关黄柏种植过程的生长环境及人文环境严重影响小檗碱、黄柏碱及巴马汀等主要活性成分的含量,也是导致栽培品与野生品疗效品质差异的主要因素^[35-36]。建议借鉴中草药仿野生生态化种植技术,结合现代农业、生物领域新技术,通过融合、创新及发展,建立关黄柏“仿真+创新”培育体系,科学人工培育关黄柏种子种苗,选择生长适宜区定植培育,结合现代生物学技术手段进行动态抚育管理与病虫害防治监测,培育高质量关黄柏植株,建立关黄柏规范化、标准化种植基地,保证关黄柏资源可持续利用。

5.2 政策支持,促进关黄柏质量评控方法建立

关黄柏与川黄柏具有相似的生物活性和药理作用,临床调剂过程中常出现混用现象,以往的含量测定、薄层色谱、指纹图谱等成分分析鉴别方法无法甄别同源近属品种的真伪优劣,制约了关黄柏质量的提升。因此,建立有效、可控及易于操作的关黄柏质量评控方法,是促进关黄柏临床用药安全性与有效性,推动关黄柏产业高质量发展的主要途径。为此,政府部门可以联合乡镇中药材种植基地、医药企业、高校、医院等部门建立“政-校-企联合实验室”,形成“政-产-学-研-医”多方合作机制,整合优质资源,集聚科研创新团队,基于科研联合攻关模式,针对关黄柏资源保护、质量标准建立、评价与控制、不同黄柏基原品种鉴别、栽培品与野生品质量等同性研究等方面创建科研联合攻关专项课题,促进科研创新成果转化,加强关黄柏基础研究投入。建立关黄柏及其相关制剂多层次、多元化的质量评价体系,提升关黄柏产业标准化、规范化和国际化水平,以质量标准体系建立促进产业创新发展,以技术创新指导产业高质量发展,以产业发展推动关黄柏可持续利用进程。

5.3 宏观指导,推动中药及衍生品创新研发

近年来,全球病原微生物种类多样化及细菌微生物耐药问题日渐严重,由病原菌引起的免疫受损宿主增加、合并其他疾病比率增加等因素,感染类疾病的诊疗难度增大。因此,抗菌药物的研究已成为药学领域研究的重点^[37]。研究显示,关黄柏及其果实具有较强抗菌活性,对金黄色葡萄球菌、甲型链球菌、白色葡萄球菌的生长与产毒有明显抑制作用,其作用机制主要是通过破坏细胞膜通透性,加快菌体细胞质渗透速率,降低菌体内三磷酸腺苷(ATP)含量及活性,促进细菌细胞损伤,进而发挥抗菌、抗炎、抗感染等药理作用^[38]。因此,基于关黄柏在抗菌、抗炎、抗感染类的中药新药研发的市场前景,建议联合高校、科研院所及企业共建关黄柏新产品开发与应用技术联盟,拟在关黄柏应用领域、新药研发、仿制药研究与产业发展等方面开展系统研究。加强关黄柏及其类方的中药创新药物研发力,特别是结合经典名方及名老中医经验方,深度挖掘黄柏配伍药对,包括“黄柏-当归”“黄柏-知母”“黄柏-黄芩”等药对组合的用药规律及其功效取向相关性研究,分析不同配伍下关黄柏不同功效的药效物质及作用机制,为关黄柏治疗不同类型疾病药物的研发提供基础数据,增加药物剂型研发种类,促进以关黄柏为处方药材之一的经典名方、院内制剂、中药创新药、中药改良药等新药的研发上市进程,引领及促进关黄柏产业实现高质量发展。

6 结语

关黄柏作为最常用的清热药之一,具有清热燥湿、泻火解毒、消肿疗疮等功效,现代药理研究表明,关黄柏具有抑菌、抗炎、抗氧化、保护心血管、调节免疫系统、抗肿瘤、降血糖等作用。关黄柏不仅具有较高的药用价值,其木材还可用作装饰用材,嫩芽及叶亦可食用及药用,黄柏汁可作为防蛀纸张原材料,种子及果实可用于制作驱虫剂及精油等产品。但由于关黄柏培育周期长,生长更新速度慢,市场需求量高,导致其野生资源濒临枯竭,制约了关黄柏产业可持续性发展。本研究通过对关黄柏本草考证、资源现状、基础研究现状、全产业链进行整合分析,为关黄柏品种培育、药物研发及大健康产业发展提供指导性意见,促进关黄柏完整产业链的形成,保证关黄柏高质量产业绿色发展,对推动东北地区道地药材资源保护与利用具有重要意义。

参考文献

- [1] Liu SB, Lu SW, Sun H, et al. Deciphering the Q-markers of nourishing kidney-yin of Cortex Phellodendri amurense from Zhibai Dihuang pill based on chinmedomics strategy [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153690.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 146.
- [3] He LH, Fan YF, Zhang Z, et al. Identifying genes associated with female flower development of *Phellodendron amurense* Rupr. using a transcriptomics approach [J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14 (3): 661.
- [4] 阙涵韵, 罗秋林, 王楠, 等. 盐黄柏炮制历史沿革和机制的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53 (22): 7242-7253.
- [5] 陶弘景. 本草经集注 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [6] 张丽月, 刘秀峰. 黄柏的本草考证 [J]. *亚太传统医药*, 2019, 15 (5): 94-96.
- [7] 苏颂. 本草图经 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994.
- [8] 唐慎微. 证类本草 [M]. 北京: 华夏出版社, 1993.
- [9] 程铭恩, 詹志来, 张卫, 等. 经典名方中黄柏的本草考证 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44 (21): 4768-4771.
- [10] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [11] 寇宗奭. 本草衍义 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- [12] 中国药典 1963 年版. 一部 [S]. 1963: 266.
- [13] 中国药典 2005 年版. 一部 [S]. 2005: 214.
- [14] 魏颖. 关黄柏叶不同炮制品的抗急性痛性关节炎作用研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
- [15] 杨俐. 基于 GIS 技术的黄柏和关黄柏产地生态适宜性研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2019.
- [16] Li XN, Zhang AH, Sun H, et al. Rapid discovery of absorbed constituents and metabolites in rat plasma after the oral administration of Zi Shen Wan using high-throughput UHPLC-MS with a multivariate analysis approach [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39 (24): 4700-4711.
- [17] 李先娜. 大补阴丸等含关黄柏系列类方体内成分分析 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2014.
- [18] Sun H, Wang HY, Zhang AH, et al. Chemical discrimination of Cortex Phellodendri amurense and Cortex Phellodendri chinensis by multivariate analysis approach [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12 (45): 41-49.
- [19] Zhang H, Zhang S, Wang W, et al. Characterizing metabolites and potential metabolic pathways changes to understanding the mechanism of medicinal plant *Phellodendri Amurense* cortex against doxorubicin-induced nephritis rats using UPLC-Q/TOF-MS metabolomics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 188: 113336.
- [20] 张楠. 地道药材关黄柏的资源与质量标准研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [21] 袁汉文, 吕梦颖, 罗江溢, 等. 基于特征图谱和一测多评法的黄柏质量控制研究 [J]. *中草药*, 2022, 53 (17): 5491-5496.
- [22] 彭秘, 张增珠, 李刚, 等. 基于 UPLC-QTOF/MS 的关黄母颗粒主要化学成分及脑组织移行成分研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (2): 298-306.
- [23] Huang XX, Zheng DM, Yong JY, et al. Antifungal activity and potential mechanism of berberine hydrochloride against fluconazole-resistant *Candida albicans* [J]. *J Med Microbiol*, 2022, 71 (6): 1542.
- [24] Zhang JL, Zhang MN, Wang HG, et al. Jatroerrhizine alleviates ulcerative colitis via regulating gut microbiota and NOS2 expression [J]. *Gut Pathog*, 2022, 14 (1): 41.
- [25] 孙晖, 李先娜, 张颖, 等. 利用血液代谢组学研究关黄柏生物碱对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠的干预作用 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2016, 18 (10): 1709-1719.
- [26] Du Y, Kha M, Fang NN, et al. Berberine attenuates cell motility via inhibiting inflammation-mediated lysyl hydroxylase-2 and glycolysis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 856777.
- [27] Ludmila B, Slavomír K, Martin K, et al. Antiproliferative effect of *Phellodendron amurense* Rupr. based on angiogenesis [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12 (5): 767.
- [28] 刘顺, 邹恺平, 董辰, 等. 基于网络药理学的黄柏-知母药对药效物质基础及作用机制研究 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (1): 147-153.
- [29] Liu QS, Tang JY, Chen SL, et al. Berberine for gastric cancer prevention and treatment: multi-step actions on the Correa's cascade underlie its therapeutic effects [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184: 106440.
- [30] Ai G, Huang R, Xie J, et al. Hypouricemic and nephroprotective effects of palmatine from Cortex Phellodendri Amurense: a uric acid modulator targeting Keap1-Nrf2/NLRP3 axis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 30 (301): 115775.
- [31] 戴雅琴, 杜崇民, 谢惠平. 黄柏胶囊联合盐酸奥洛他定对急性湿疹模型大鼠的干预作用及抗过敏机制探讨 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30 (9): 926-930.
- [32] 乔志威, 王洋, 张晓燕. 龙胆泻肝汤加减联合复方黄柏液涂剂治疗肛窦炎湿热内蕴证疗效观察 [J]. *实用中医药杂志*, 2023, 39 (3): 448-450.
- [33] 顾健, 罗秋林, 王楠, 等. 基于专利视角的黄柏产业链 SWOT 分析 [J]. *西南民族大学学报 (自然科学版)*, 2023, 49 (1): 40-52.
- [34] 杨俐, 孟祥霄, 李洪运, 等. 川黄柏和关黄柏全球产地生态适宜性分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (4): 167-174.
- [35] 陈瑶, 张志鹏, 张昭, 等. 土壤因子对关黄柏 10 种化学成分含量的影响 [J]. *植物科学学报*, 2019, 37 (6): 797-807.
- [36] 郭梓茵. 土壤类型对黄柏幼苗生长、营养元素积累与分配特征的影响 [D]. 成都: 四川农业大学, 2020.
- [37] Ortmayr K, de la Cruz Moreno-R, Zampieri M. Expanding the search for small-molecule antibacterials by multidimensional profiling [J]. *Nat Chem Biol*, 2022, 18 (6): 584-595.
- [38] Choi J, Moon MY, Han GY, et al. *Phellodendron amurense* extract protects human keratinocytes from PM2.5-induced inflammation via PAR-2 signaling [J]. *Bio-molecules*, 2020, 11 (1): 23.

(收稿日期: 2023-03-13; 修回日期: 2023-05-08)

HPLC 法快速筛查祛痘抗粉刺类化妆品中 盐酸米诺环素等 10 种组分

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

摘要: **目的** 建立一种快速筛查祛痘抗粉刺类化妆品中盐酸米诺环素等 10 种组分的高效液相色谱方法。**方法** 本研究采用 SHISEIDO C18 MG S5 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以 0.01 mol·L⁻¹ 草酸溶液 (磷酸调节溶液的 pH 至 2.0) - 甲醇 - 乙腈 (67 : 11 : 22) 为流动相, 流速: 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 268 nm, 进样量 10 μL, 根据高效液相色谱和紫外光谱定性, 峰面积定量, 标准曲线法计算含量。**结果** 盐酸米诺环素等 10 种抗感染药物在 1.479 ~ 335.152 μg·mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好, 相关系数均大于 0.9997; 平均回收率为 96.4% ~ 108.2%, 相对标准偏差为 1.1% ~ 3.3%; 检测限为 1 ~ 20 μg·g⁻¹; 定量限为 3.3 ~ 50 μg·g⁻¹。**结论** 该方法操作简便, 实用性强, 分析速度快, 具有良好的选择性、灵敏度及准确度, 能够提高检验效率, 节省试验成本, 可用于祛痘抗粉刺类化妆品中抗感染类药物的快速筛查。

关键词: 化妆品; 祛痘抗粉刺类; 抗感染类药物; 米诺环素; 高效液相色谱法

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3003-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.030

Rapid screening of 10 components such as minocycline hydrochloride in acne removing and anti-acne cosmetics by HPLC

GAO Wen-fen¹, LIU Ji-hua¹, ZUO Wen-song¹, QIAN Min², ZHANG Zhi-yuan², LU Fu-qing², YAN Run-wen¹, YUAN Wen-juan^{2*} (1. *Public Service Platform for Industrial Technology Foundation of the Ministry of Industry and Information Technology, Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650106*; 2. *College of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201*)

Abstract: Objective To rapidly screen 10 anti-infection drugs in acne removing and anti acne cosmetics by HPLC method. **Methods** The samples were extracted and separated on SHISEIDO C18 MG S5 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with gradient elution program. The mobile phase consisted of 0.01 mol·L⁻¹ oxalic acid solution (adjusting the pH to 2.0 with phosphoric acid)-acetonitrile-methanol (67 : 11 : 22). The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 268 nm, and the injection volume was 10 μL. The samples were qualitatively detected by HPLC and UV spectrum, and quantified by the external standard. **Results** The linear relationship of the 10 anti-infection drugs was good within the concentration range of 1.479 ~ 335.152 μg·mL⁻¹, with correlation coefficients greater than 0.9997. The relative standard deviations were 1.1% ~ 3.3% and the average recoveries were within 96.4% ~ 108.2%. The limits of detection were 1 ~ 20 μg·g⁻¹. The limit of quantitation were 3.3 ~ 50 μg·g⁻¹. **Conclusion**

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.32060084); 云南省农业联合专项重点项目 (No.202301BD070001-025); 云南农业大学科研启动基金项目 (No.KY2018-20); 国家大学生创新创业训练计划支持项目 (No.202210676023, No.X202210676105); 云南省药品监督管理局项目 (No.YB2021003)。

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

The method is simple, practical, fast, selective, sensitive and accurate, and can be used to screen anti-infection drugs efficiently with low cost.

Key words: cosmetics; acne removing and anti-acne; anti-infection drug; minocycline; HPLC

化妆品作为人们使用频率越来越高的产品,其安全性也越来越受到人们的关注。从国家药品监督管理局网站公布的化妆品监督抽检结果来看,2016—2021 年涉及检出抗菌药物的不合格化妆品共计 83 批次,涉及的化妆品产品共计 72 个^[1]。抗感染类药物在《化妆品安全技术规范》(2015 版)中作为禁止添加的物质^[2],明确规定在化妆品中禁止使用。但是一些不法商家为了追求见效快,谋求最大利益,在一些化妆品中违规添加抗感染类药物。抗感染类药物具有良好的抗菌作用,虽然用在人体皮肤上可以达到立竿见影的效果,但是如果长期使用违规添加抗感染类药物的化妆品会破坏皮肤表面正常菌群,导致出现皮疹、速发型过敏等不良反应,甚至有时还会出现贫血、胃肠道反应等情况,长期使用也会出现耐药性,增加后期治疗难度^[3-6]。本研究是基于 2018 年至 2020 年我院开展国家化妆品安全监督抽检的检验工作中发现的一些问题,针对性地开展非法添加抗感染类药物研究,为《化妆品安全技术规范》(2015 版)在修订或新版中提供必要的数据,使其在保持科学性、先进性和规范性的基础上,重点加强对化妆品中安全性风险物质和准用组分的管理,并充分借鉴国际化妆品质量安全控制技术和经验,推动我国化妆品科学监管,促进化妆品行业健康发展,提升我国化妆品技术规范权威性和国际影响力等方面发挥重要作用。

本方法是在《化妆品安全技术规范》(2015 版) 2.2 盐酸米诺环素等 7 种组分的基础上,按标准检验整体情况比较好,但在色谱图中出现与原标准色谱图中不一致的色谱峰,通过分离制备后进行核磁鉴定,发现有少部分样品存在添加原标准之外的成分,如替硝唑、氟康唑和酮康唑等具有祛痘抗粉刺功能的物质。基于此本文建立了祛痘抗粉刺类化妆品中盐酸米诺环素等 10 种组分的液相色谱检测方法,增加了替硝唑、氟康唑和酮康唑 3 种组分的测定,同时修订了检测限和定量限,增加了标准曲线配制浓度,对标准进行修订和完善,并进行相关组分的补充^[7],通过一个检测方法进行快速筛查检测,避免多次处理样品,提高试验效率,节省试验成本,方便推广使用。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器)(Thermo-U3000,美国热电公司;Agilent-1020,美国安捷伦公司);CPA225D 型电子天平(瑞士赛多利斯仪器公司);涡旋混合器(德国 IKA 公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);PURELAB flex 超纯水机(英国 ELGA 公司);0.45 微米滤膜(天津津腾公司)。

1.2 试剂

盐酸米诺环素(批号: C0006510, 纯度: 98.2%)、甲硝唑(批号: D0017141, 纯度: 99.3%)、二水土霉素(批号: B0001608, 纯度: 95.8%)、盐酸四环素(批号: D0021831, 纯度: 96.6%)、盐酸金霉素(批号: D0017651, 纯度: 94.0%)、氯霉素(批号: D0016017, 纯度: 99.4%) (BePure 公司);多西环素(批号: 941644, 纯度: 99.3%, Dr 公司);替硝唑(批号: 100336-200703, 纯度: 99.8%)、氟康唑(批号: 100314-201605, 纯度: 99.7%)、酮康唑(批号: 100294-200602, 纯度: 99.9%)(中国食品药品检定研究院)。试验所用化妆品样品均为 2020 年、2021 年和 2022 年云南省国家及省级监督抽检祛痘抗粉刺类化妆品样品和市场自购样品,阴性样品为市售薇诺娜净痘清颜洁面乳(规格: 80 g/支,批号: 191007J1S,昆明贝泰妮生物技术有限公司)。磷酸、甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其余为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 SHISEIDO C18 MG S5 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;以 0.01 mol·L⁻¹ 草酸溶液(磷酸调节溶液的 pH 至 2.0)-甲醇-乙腈(67:11:22)为流动相,经 0.45 μm 滤膜过滤后真空脱气;流速: 0.8 mL·min⁻¹;柱温: 30 ℃;检测波长: 268 nm;进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备溶液的制备 分别准确称取盐酸米诺环素、二水土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素、甲硝唑、替硝唑各 10 mg(精确到 0.000 01 g)和氟康唑、酮康唑

各 100 mg (精确到 0.000 01 g), 置 50 mL 量瓶中, 用适量流动相溶解, 并定容至刻度, 摇匀; 精密量取 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释并定容至刻度, 摇匀; 配制成含盐酸米诺环素、二水土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素、甲硝唑、替硝唑各组分质量浓度为 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和含氟康唑、酮康唑各组分质量浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备溶液。

混合对照品溶液: 精密量取混合对照品储备溶液适量, 用流动相稀释成含盐酸米诺环素、甲硝唑、二水土霉素、盐酸四环素、替硝唑、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素的质量浓度均为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 氟康唑、酮康唑的标准曲线质量浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取样品 1 g (精确到 0.001 g) 于 10 mL 具塞比色管中, 加入流动相溶液至刻度, 涡旋 3 min, 超声提取 20 ~ 30 min, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 滤液作为待测溶液。

2.2.4 空白溶液制备 以流动相为空白溶液。

2.2.5 阴性样品溶液制备 称取阴性样品 1 g (精确到 0.001 g) 精密称定, 照“2.2.3”项下供试品溶液方法同法制备。

2.3 系统适用性及专属性试验

精密量取空白溶液、混合对照品溶液以及供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 进样分析, 结果见图 1。在系统适用性试验中, 理论板数均大于 6000, 与相邻峰的分度均大于 2.0。在供试品溶液色谱中, 供试品溶液 1 检出氟康唑、酮康唑, 保留时间分别为 11.9、20.5 min; 供试品溶液 2 检出替硝唑, 保留时间为 5.9 min; 样品色谱峰与制剂中其他成分峰完全分离, 表明空白溶液、原料与辅料不干扰 10 种抗感染类药物的测定。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品储备溶液适量, 用流动相逐级稀释成含盐酸米诺环素、甲硝唑、二水土霉素、盐酸四环素、替硝唑、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素质量浓度均为 2、5、10、15、20 和 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 氟康唑、酮康唑质量浓度均为 20、50、100、150、200 和 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的一系列混合溶液。以峰面积 (y) 为纵坐标, 质量浓度 (x) 为横坐标进行线性回归, 定量限 (LOQ)、检测限 (LOD) 分别以信噪比 (S/N) 为 10、3 计算, 结果见表 1。

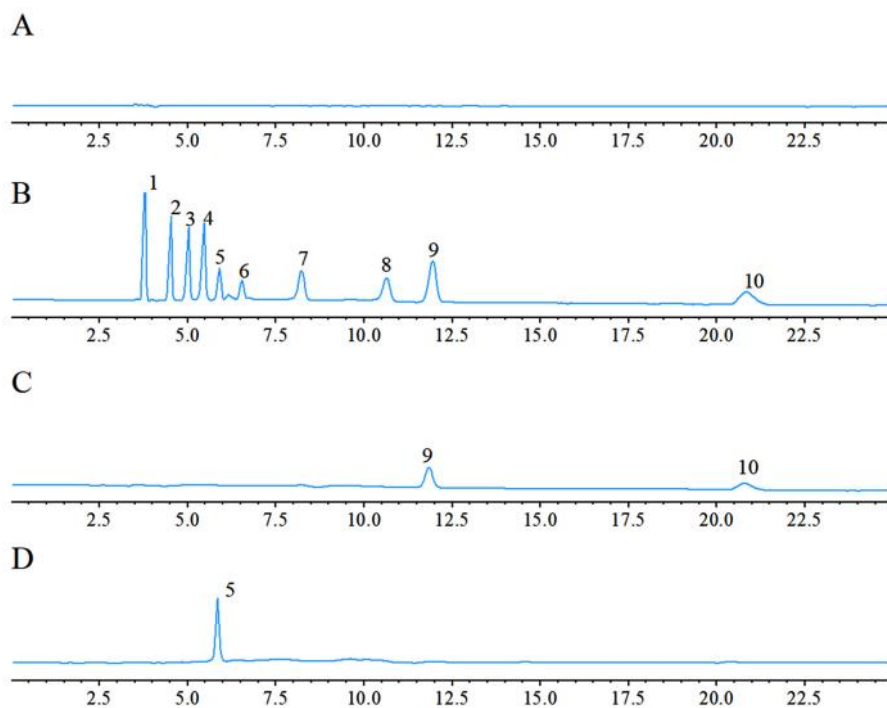


图 1 空白溶液 (A)、混合对照品溶液 (B)、供试品溶液 1 (C) 和供试品溶液 2 (D) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of blank solution (A), mix standard solution (B), test solution 1 (C) and test solution 2 (D)

1. 盐酸米诺环素 (melomycin hydrochloride); 2. 甲硝唑 (metronidazole); 3. 二水土霉素 (dihyromycin); 4. 盐酸四环素 (tetracycline hydrochloride); 5. 替硝唑 (tinidazole); 6. 氟康唑 (fluconazole); 7. 盐酸金霉素 (aureomycin hydrochloride); 8. 盐酸多西环素 (doxycycline hydrochloride); 9. 氟康唑 (fluconazole); 10. 酮康唑 (ketoconazole)

表 1 各目标组分线性范围、线性方程、相关系数 (r)、检测限及定量限

化合物	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性方程	r	LOD/ng	LOQ/ng
盐酸米诺环素	1.658 ~ 33.154	$y = 27.76x - 2.02$	1.000	1	3.3
甲硝唑	2.606 ~ 52.112	$y = 15.26x - 1.99$	1.000	1	3.3
二水土霉素	1.479 ~ 29.584	$y = 28.17x - 1.36$	1.000	1	3.3
盐酸四环素	1.708 ~ 34.158	$y = 28.64x - 2.81$	1.000	1	3.3
替硝唑	2.818 ~ 56.368	$y = 6.82x + 1.21$	0.9999	2	6
氟康唑	16.758 ~ 335.152	$y = 7.47x - 3.21$	1.000	20	50
盐酸金霉素	1.707 ~ 34.140	$y = 17.01x - 2.35$	0.9999	2	6
盐酸多西环素	1.859 ~ 37.178	$y = 15.24x - 4.14$	0.9998	2	6
氯霉素	2.688 ~ 53.756	$y = 18.92x - 5.64$	1.000	2	6
酮康唑	14.737 ~ 294.74	$y = 2.02x - 2.00$	0.9998	20	50

2.5 加样回收试验

取已知膏霜类阴性样品进行平行浓度 ($10 \times \text{LOD}$) 的加标回收试验, 并计算平均回收率, 每个加标浓度法做 6 次平行, 测得平均回收率和相对标准偏差 (RSD)。在加标浓度范围内, 化妆品中盐酸米诺环素、甲硝唑、二水土霉素、盐酸四环素、替硝唑、氟康唑、盐酸金霉素、盐酸多西环素、氯霉素和酮康唑的平均回收率分别为 98.9%、101.6%、96.4%、102.6%、103.7%、108.2%、98.1%、97.4%、102.3% 和 107.5%, RSD 分别为 1.4%、1.1%、2.2%、2.3%、2.1%、3.3%、2.3%、1.8%、1.5% 和 3.2%, 表明该方法具有良好的回收率。

2.6 精密度与稳定性

分别取添加水平为 $10 \times \text{LOD}$ 的水剂、膏霜和乳液类样品连续进样 6 次, 重复测定 3 d, 计算各目标化合物色谱峰的保留时间与峰面积的日内与日

间精密度, 结果为日内精密度的 0.1% ~ 1.9%, 日间精密度为 0.1% ~ 2.8%, 表明仪器精密度良好, 含 10 种目标化合物的供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.7 样品的测定

2.7.1 物质定性 高效液相色谱仪分离后, 样品溶液中色谱峰与标准溶液色谱峰保留时间相同的峰, 进行紫外光谱定性。

2.7.2 含量测定 紫外光谱定性后, 峰面积定量, 以标准曲线计算含量。采用本方法对 50 批祛痘抗粉刺类化妆品中盐酸米诺环素等 10 种组分进行检测, 均未检出盐酸米诺环素、二水土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸多西环素, 甲硝唑、替硝唑、氟康唑、氯霉素及酮康唑检出含量超过 LOQ 的上限水平共 5 批次, 并与《化妆品安全技术规范》(2015 版) 国家规定的检测方法^[2] 进行比较, 结果一致 (见表 2)。

表 2 样品检验结果

Tab 2 Sample test

样品名称	检测方法	检测指标测得值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)				
		甲硝唑	替硝唑	氟康唑	氯霉素	酮康唑
S1	本研究方法 (HPLC)	4267.1	未检出	未检出	未检出	未检出
	国家规定检测方法 (LC-MS)	4264.4	未检出	未检出	未检出	未检出
S2	本研究方法 (HPLC)	未检出	未检出	未检出	4652.3	2209.4
	国家规定检测方法 (LC-MS)	未检出	未检出	未检出	4644.8	2205.5
S3	本研究方法 (HPLC)	未检出	未检出	31.8	未检出	未检出
	国家规定检测方法 (LC-MS)	未检出	未检出	32.2	未检出	未检出
S4	本研究方法 (HPLC)	未检出	2157.9	未检出	未检出	未检出
	国家规定检测方法 (LC-MS)	未检出	2455.4	未检出	未检出	未检出
S5	本研究方法 (HPLC)	未检出	未检出	20.6	未检出	未检出
	国家规定检测方法 (LC-MS)	未检出	未检出	20.3	未检出	未检出

3 讨论

本试验进一步优化了色谱条件, 包括检测波长、色谱柱以及溶剂的选择。在检测波长方面, 综合考虑新增 3 种目标物的最大波长吸收^[8-10], 以及

兼顾各化合物的最大吸收^[11-13] 检测灵敏度, 最终选取 268 nm 为检测波长^[14-15]; 其次, 考察了 Agilent SB-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), Thermo-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), Waters Sunfire-C18 (250

mm×4.6 mm, 5 μm) 和 SHISEIDO C18 MG S5 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 4 种不同品牌的色谱柱, 在相同流动相条件下, 对 10 种目标组分保留和分离效果均能满足要求, 考虑长时间耐受高比例酸性, 样品检测中无明显干扰, 耐用性满足试验要求, 故最终采用 MG S5 柱。在流动相方面, 流动相为水-甲醇-乙腈时, 10 种组分色谱峰无法完全分离, 不能满足分离度的要求; 而流动相为 0.01 mol·L⁻¹ 草酸溶液 (磷酸调节溶液的 pH 至 2.0)-甲醇-乙腈, 等度洗脱和梯度洗脱均能有效分离 10 种目标物, 考虑梯度洗脱时仪器平衡时间过长, 从节能环保的角度, 选择 0.01 mol·L⁻¹ 草酸溶液 (磷酸调节溶液的 pH 至 2.0)-甲醇-乙腈 (67:11:22) 等度洗脱。最后, 本试验采取超声提取法作为样品的提取方法, 考察不同配比的 0.01 mol·L⁻¹ 草酸溶液 (磷酸调节溶液的 pH 至 2.0)-甲醇-乙腈为提取溶剂的影响, 结果显示 0.01 mol·L⁻¹ 草酸溶液 (磷酸调节溶液的 pH 至 2.0)-甲醇-乙腈 (67:11:22) 为提取溶剂可以将目标组分提取完全, 且待测样品中含有甘油、纤维素等辅料, 可以减少基质干扰, 使样品提取完全。

本研究建立高效液相色谱法快速筛查祛痘抗粉刺类化妆品中盐酸米诺环素等 10 种抗感染药物的研究方法, 将《化妆品安全技术规范》(2015 版) 中“盐酸米诺环素等 7 种组分”标准进行修订和完善, 并进行相关组分的补充, 该方法操作简便, 实用性强, 分析速度快, 具有良好的稳定性、选择性、灵敏度及准确度, 能够提高检验效率, 节省试验成本, 可用于祛痘抗粉刺类化妆品中抗感染类药物的快速筛查^[16]。目前化妆品检验标准大多数是采用超高效液相色谱质谱联用方法, 对仪器的要求较高, 相应的地市、州及县的检验机构普遍不具备此条件。可适当地制定部分对仪器要求不太高的标准来满足检验机构, 推动化妆品检验检测范围, 提高检验机构化妆品检测能力。化妆品质量安全问题一直是国家药品监督管理局监管的重中之重, 但化妆品违禁添加、假冒问题却屡禁不止。2021 年新《化妆品监督管理条例》的正式实施, 标志着化妆品监管进入最严

厉时期, 希望化妆品企业遵守化妆品行业相关标准, 不要知法犯法, 切勿因小失大。

参考文献

- [1] 李莉, 李硕, 王海燕, 等. 化妆品中抗生素类药物非法添加情况 [J]. 香料香精化妆品, 2022 (3): 10-12.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范 (2015 版) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [3] 王庆龄, 裘钧陶, 詹越城, 等. 超高效液相色谱串联质谱法结合分散固相萃取技术快速测定化妆品中 36 种抗感染类药物残留 [J]. 农产品加工, 2021 (18): 43-47.
- [4] 陈静, 郑荣, 毛北萍, 等. 高效液相色谱-质谱联用法同时测定化妆品中 19 种喹诺酮类抗生素 [J]. 分析化学研究简报, 2013, 41 (6): 931-935.
- [5] 吕丹丹, 张含智, 杨金延, 等. 液相色谱结合液质联用法测定酮康唑原料药及复方酮康唑软膏中的有关物质 [J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46 (7): 686-693.
- [6] 汪鑫, 陈蓉. 液相色谱-串联质谱法同时检测膏霜类化妆品中的 41 种禁用抗感染药物 [J]. 中国药师, 2018, 21 (8): 1388-1392.
- [7] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 61-65.
- [8] 李亮亮. HPLC 法同时测定复方替硝唑含漱液中替硝唑和醋酸氯己定的含量 [J]. 中国药师, 2013, 16 (6): 928-930.
- [9] 中国药典 2020 年版. 二部 [S]. 2020: 1502-1503.
- [10] 高磊, 贾燕花, 王晓青, 等. RP-HPLC 同时测定复方替硝唑溶液中替硝唑和醋酸氯己定的含量 [J]. 河北医药, 2015, 1 (37): 290-291.
- [11] 肖亭, 马步芳, 王晨, 等. HPLC 标准曲线法测定氟康唑杂质校正因子的测量不确定度评定 [J]. 中国药科大学学报, 2022, 53 (3): 306-313.
- [12] 王颖, 曾含清, 肖轶雯, 等. 早产儿氟康唑 2D-HPLC 血药浓度测定方法研究 [J]. 中南药学, 2021, 19 (7): 1299-1303.
- [13] 李成斌, 陈超丽, 丁志新, 等. HPLC 法测定福司氟康唑含量及有关物质 [J]. 化学工程师, 2022, 324 (9): 40-43.
- [14] 贾燕花, 高磊, 王晓青, 等. RP-HPLC 同时测定复方氯倍他索乳膏中甲硝唑、丙酸氯倍他索及酮康唑含量 [J]. 河北医药, 2015, 37 (2): 285-287.
- [15] 胡志飞, 杜建红, 谢晓玲. HPLC 法测定复方益肤乳膏中酮康唑和丙酸氯倍他索含量 [J]. 西南国防医药, 2017, 27 (10): 1043-1046.
- [16] 谢志洁. 健康产品中非法添加化学成分快速筛查方法理论与实践 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2011.

(收稿日期: 2023-04-10; 修回日期: 2023-06-01)

小儿清咽颗粒中 8 个成分的含量测定及主成分分析

张博, 智雪枝, 田兰, 刘惠军* (上海市松江食品药品检验所, 上海 201600)

摘要: **目的** 建立同时测定小儿清咽颗粒中哈巴苷、(R, S)-告依春、连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄苷和丹皮酚含量的高效液相色谱方法。**方法** 采用 Merck Purospher C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈 (A)-0.05% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 210 nm (哈巴苷、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄苷、丹皮酚)、245 nm [(R, S)-告依春]、327 nm (菊苣酸)。再用 SPSS 20.0 统计软件对结果进行聚类分析和主成分分析。**结果** 各待测组分分离度良好; 哈巴苷、(R, S)-告依春、连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄苷和丹皮酚 8 个成分在相应的范围内均与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数 (*r*) 均不低于 0.9997, 低、中、高浓度的平均加样回收率均在 96.9% ~ 100.1%, *RSD* 均小于 1.3%。**结论** 该方法完善了现行标准, 可用于小儿清咽颗粒的质量控制。

关键词: 小儿清咽颗粒; 中成药; 多组分含量测定; 高效液相色谱法; 聚类分析; 主成分分析
中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-3008-06
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.031

Determination and principal component analysis of 8 constituents in Xiaoer Qingyan granules

ZHANG Bo, ZHI Xue-zhi, TIAN Lan, LIU Hui-jun* (Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201600)

Abstract: Objective To establish an HPLC method to simultaneously determinate harpagide, (R, S)-goitrin, forsythoside A, chicoric acid, forsythin, arctiin, harpagoside and paeonol in Xiaoer Qingyan granules. **Methods** The samples were separated on a Merck Purospher C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) by a gradient elution with acetonitrile (A) and 0.05% phosphoric acid (B) as the mobile phase at the flow rate of 0.8 mL · min⁻¹. The column temperature was 30 °C. The eluate was detected by multiple wavelength at 210 nm for harpagide, forsythoside A, forsythin, arctiin, harpagoside, and paeonol; 245 nm for (R, S)-goitrin, and 327 nm for chicoric acid. The principal component analysis and cluster analysis were conducted for the content determination by SPSS 20.0. **Results** Excellent chromatographic separation was achieved with good linearity (*r* ≥ 0.9997) within the linear range of harpagide, (R, S)-goitrin, forsythoside A, chicoric acid, forsythin, arctiin, harpagoside and paeonol, respectively. The average recovery of low, medium and high concentrations was within 96.9% ~ 100.1%, with *RSD* less than 1.3%. **Conclusion** The method improves the existing standards, which is suitable for the quality control of Xiaoer Qingyan granules.

Key words: Xiaoer Qingyan granule; Chinese patent medicine; multicomponent analysis; HPLC; cluster analysis; principal component analysis

小儿清咽颗粒收载于《卫生部药品标准中药成方制剂 (第六册)》, 该方由玄参、蒲公英、牛蒡子 (炒)、板蓝根、连翘、牡丹皮、薄荷、蝉蜕、青黛共九味药组成, 有清热解表、解毒利咽之功效, 用于小儿外感风热引起的发热头痛、咳嗽音哑、咽喉肿痛^[1]。现代研究表明, 小儿清咽颗粒

作者简介: 张博, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事中药质量控制研究, email: zhangbo019@163.com * **通信作者:** 刘惠军, 男, 副主任药师, 主要从事药物分析研究, email: shsjlhj@126.com

对疱疹性咽峡炎有较好的治疗效果^[2]。方中,蒲公英和板蓝根善清热解毒,还凉血利咽、散结消肿,共为君药;牛蒡子疏散风热,解毒利咽;连翘清热解毒,疏散风热;玄参清利咽喉,滋阴降火;牡丹皮清热凉血。诸药合用,共奏解表清热、解毒利咽之功。

在现行法定标准《卫生部药品标准中药成方制剂(第六册)》中,仅对牛蒡子和青黛有薄层色谱鉴别,对其余药既没有鉴别项目,也没有含量测定项目,文献中对小儿清咽颗粒质量控制方面的研究也较少,已有的报道多数只测其中的一类化学成分^[3-8],不能提供完整的质量评价体系。为了弥补这方面研究的不足,本研究按照“首选君药并兼顾臣佐使药”的原则,建立了同时测定多组分的含量测定方法,覆盖了方中 6 味药材的 8 个指标性成分:蒲公英(菊苣酸)、板蓝根[(*R,S*)-告依春]、牛蒡子(牛蒡苷)、连翘(连翘酯苷 A、连翘苷)、玄参(哈巴苷、哈巴俄苷)、牡丹皮(丹皮酚),同时结合聚类分析和主成分分析对其含量测定结果进行综合分析,为完善小儿清咽颗粒的质量标准提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 II 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器,美国安捷伦公司);KQ5200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D 型电子天平(德国赛多利斯公司, $d = 0.01 \text{ mg}$)。

1.2 试药

小儿清咽颗粒 7 批,分别来自 5 家公司:A 厂家(批号: X210405); B 厂家(批号: 221213、220813、220821, 编号分别为 B1、B2、B3); C 厂家(批号: 21102211); D 厂家(批号: 220803); E 厂家(批号: 220906)。哈巴苷(批号: 111729-201506, 含量: 95.9%)、(*R,S*)-告依春(批号: 111753-201304, 含量: 99.9%)、连翘酯苷 A(批号: 111810-202108, 含量: 96.2%)、菊苣酸(批号: 111752-202105, 含量: 98.3%)、连翘苷(批号: 110821-201816, 含量: 95.1%)、牛蒡苷(批号: 110819-201812, 含量: 95.0%)、哈巴俄苷(批号: 111730-201709, 含量: 95.9%)、丹皮酚(批号: 110708-201908, 含量: 99.8%)(中国食品药品检定研究院)。乙腈、磷酸均为色谱纯(Merck),超纯水由 Milli Q 超纯水机制得,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Merck Purospher C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A) - 0.05% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0 ~ 10 min, 5%A; 10 ~ 28 min, 5% → 8%A; 28 ~ 29 min, 8% → 16%A; 29 ~ 49 min, 16% → 21%A; 49 ~ 51 min, 21% → 26%A; 51 ~ 64 min, 26% → 32%A; 64 ~ 86 min, 32% → 36%A; 86 ~ 88 min, 36% → 45%A; 88 ~ 95 min, 45%A; 流速 0.8 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量: 10 μL; 检测波长为 210 nm (哈巴苷、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄苷、丹皮酚)、245 nm [(*R,S*)-告依春]、327 nm (菊苣酸), 理论塔板数均不低于 20 000, 8 个待测成分色谱峰与相邻峰的分度均大于 1.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取各对照品适量,加 80% 甲醇制成每 1 mL 含哈巴苷、(*R,S*)-告依春、连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄苷、丹皮酚分别为 103.7638 μg、42.1578 μg、175.084 μg、52.2956 μg、96.6216 μg、320.72 μg、28.1946 μg、126.3468 μg 的混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 取本品 10 袋内容物,混匀,研细,取 2.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 20 mL,密塞,称定重量,超声处理(250 W, 50 kHz) 45 min,放至室温,再称重并用 80% 甲醇补重,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按小儿清咽颗粒的处方工艺分别制备缺少蒲公英、板蓝根、牛蒡子(炒)、连翘、玄参、牡丹皮的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制成阴性样品溶液,进样测定,结果见图 1,可知阴性样品不干扰哈巴苷、(*R,S*)-告依春、连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄苷、丹皮酚的测定。

2.3 线性关系、检测限和定量限

精密量取混合对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、8.0、10.0 mL 置 10 mL 量瓶中,用 80% 甲醇定容,得到系列混合对照品溶液,分别进样测定,以质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,计算回归方程。并分别按照信噪比 $S/N = 3$ 和 $S/N = 10$ 时测定检测限和定量限,结果见表 1。

2.4 精密度试验

精密量取同一份混合对照品溶液,连续进样 6 次,记录 8 个成分的峰面积,结果哈巴苷、(*R,S*)-告依春、连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为

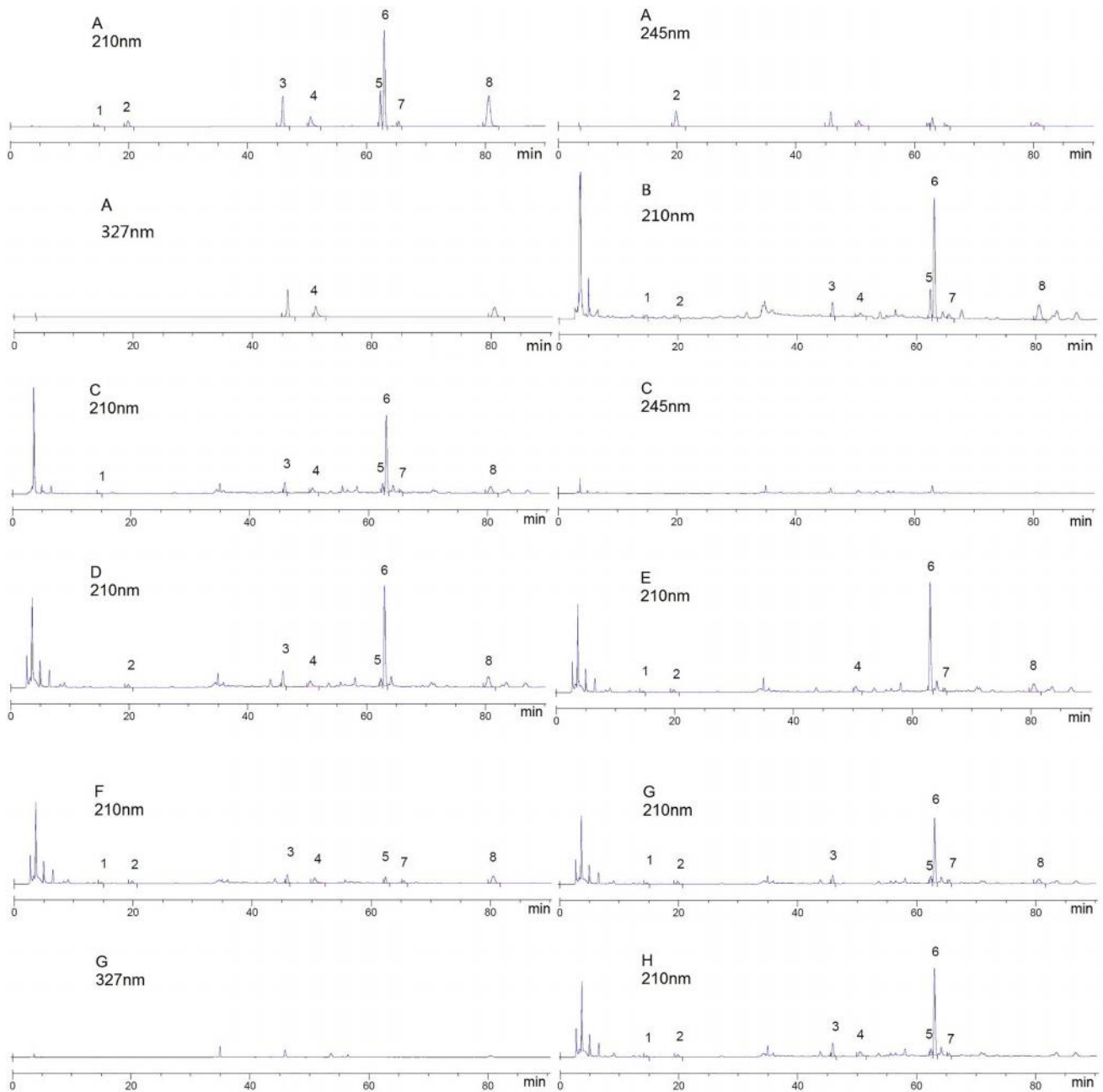


图 1 混合对照品 (A)、小儿清咽颗粒样品 (B)、缺板蓝根阴性样品 (C)、缺玄参阴性样品 (D)、缺连翘阴性样品 (E)、缺牛蒡子阴性样品 (F)、缺蒲公英阴性样品 (G)、缺牡丹皮阴性样品 (H) 的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of mixed reference (A), Xiaoer Qingyan granules (B), negative sample without Isatidis Radix (C), negative sample without Scrophulariae Radix (D), negative sample without Forsythiae Fructus (E), negative sample without Arctii Fructus (F), negative sample without Taraxaci Herba (G), and negative sample without Moutan Cortex (H)

1. 哈巴苷 (harpagide); 2. (R, S)-告依春 [(R, S)-goitrin]; 3. 连翘酯苷 A (forsythoside A); 4. 菊苣酸 (chicoric acid); 5. 连翘苷 (forsythin); 6. 牛蒡苷 (arctiin); 7. 哈巴俄苷 (harpagoside); 8. 丹皮酚 (paeonol)

1.2%、0.76%、0.23%、0.65%、0.34%、0.16%、1.1%、0.49%，表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一批小儿清咽颗粒 (批号: 21102211), 按“2.2.2”项下方法制备, 分别在 0、4、8、12、16、24、48 h 进样测定, 测得供试品溶液中哈巴苷、(R, S)-告依春、连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡

苷、哈巴俄苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 1.0%、0.53%、0.43%、0.87%、0.11%、0.45%、1.1%、1.3%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.6 重复性试验

取同一批小儿清咽颗粒 (批号: 21102211), 按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 结果哈巴苷、(R, S)-告依春、连翘酯苷

表 1 8 个成分的回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Tab 1 Regression equation, correlation coefficient, linearity, LOD and LOQ of 8 components

成分	回归方程	<i>r</i>	范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
哈巴苷	$Y = 2.802X + 4.762$	0.9997	5.188 ~ 103.8	0.200	0.670
(<i>R, S</i>)-告依春	$Y = 132.1X - 3.567$	1.000	1.109 ~ 22.18	0.0046	0.015
连翘酯苷 A	$Y = 22.77X + 0.2789$	0.9999	8.754 ~ 175.1	0.092	0.310
菊苣酸	$Y = 47.69X - 11.52$	0.9999	2.615 ~ 52.30	0.040	0.130
连翘苷	$Y = 40.16X + 20.23$	0.9999	4.831 ~ 96.62	0.025	0.083
牛蒡苷	$Y = 33.42X + 95.81$	0.9998	16.04 ~ 320.7	0.030	0.100
哈巴俄苷	$Y = 19.24X - 0.4160$	0.9999	1.410 ~ 28.19	0.054	0.180
丹皮酚	$Y = 64.00X - 5.840$	1.000	3.154 ~ 63.07	0.023	0.077

A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄苷、丹皮酚的含量平均值分别为 3.23、0.28、2.31、0.056、1.20、10.45、0.60、0.12 mg/袋, RSD 分别为 1.0%、1.3%、1.1%、1.7%、1.5%、0.46%、1.2%、1.2%, 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收试验

取已知含量的样品 9 份 (批号: 21102211), 每份取约 1.25 g, 精密称定, 分为 3 组, 每组 3 份, 分别加入“2.2.1”项下混合对照品储备液 1.0、5.0、10.0 mL, 按照“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液, 分别进样, 计算回收率。结果哈巴苷、(*R, S*)-告依春、连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛

蒡苷、哈巴俄苷、丹皮酚在低、中、高浓度的平均加样回收率 ($n = 3$) 分别为 97.4% ~ 99.8%、97.7% ~ 98.8%、98.1% ~ 99.2%、96.9% ~ 99.0%、99.0% ~ 99.3%、98.2% ~ 100.1%、97.5% ~ 99.5%、97.8% ~ 99.4%, RSD 分别为 0.17% ~ 1.2%、0.16% ~ 1.2%、0.25% ~ 0.92%、0.11% ~ 0.44%、0.19% ~ 1.3%、0.14% ~ 1.3%、0.52% ~ 1.2%、0.25% ~ 0.59%。

2.8 样品含量测定

分别取 5 个厂家的 7 批样品, 按照“2.2.2”项下方法进行制备, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 各成分含量测定结果见表 2。

表 2 7 批样品中 8 种成分含量测定结果 (mg/袋, $n = 3$)

Tab 2 Content of 8 component in 7 batches of samples (mg/袋, $n = 3$)

编号	哈巴苷	(<i>R, S</i>)-告依春	连翘酯苷 A	菊苣酸	连翘苷	牛蒡苷	哈巴俄苷	丹皮酚
A	0.95	0.11	4.53	0.23	1.08	6.67	0.19	0.017
B1	1.65	0.12	4.03	0.072	1.67	9.19	0.31	0.010
B2	1.75	0.13	4.39	0.077	1.51	10.16	0.26	0.012
B3	1.82	0.13	4.51	0.075	1.55	9.89	0.29	0.011
C	3.23	0.28	2.31	0.056	1.20	10.45	0.60	0.120
D	1.67	0.25	12.76	0.1	2.17	5.71	0.38	0.049
E	2.60	0.15	11.37	0.7	2.21	0.96	0.52	0.022

2.9 聚类分析

为考察不同批次小儿清咽颗粒中 8 个成分的含量差异, 本试验采用 SPSS 20.0 软件进行系统聚类分析 (聚类方法: 组间连接; 测量区间: 欧氏距离), 结果见图 2。由图 2 可知, 样品 B1、B2、B3 最早聚为一类, 说明同一厂家的原料接近、生产工艺相同, 具有较高的稳定性。而不同厂家的产品存在明显的差异, 可能受投料的药材品质、生产工艺等影响。当类间距离为 10 时, 7 批样品可聚为两类, 样品 A、B1、B2、B3 和 C 聚为第一类, 样品 D 和 E 聚为第二类。

2.10 主成分分析

2.10.1 求解主成分 将 7 批样品的 8 个成分的含量测定结果导入 SPSS 20.0 软件, 运用主成分分析对原始数据进行处理, 提取到两个特征值大于 1 的因子 (F_1 、 F_2) 作为主成分 (见表 3), 其累计贡献率达 83.463%, 说明这两个主成分能够代表原来 8 个成分信息的 83.463%。其中, F_1 的特征值为 3.512, 贡献率为 43.903%; F_2 的特征值为 3.165, 贡献率为 39.560%。以主成分因子为变量绘制碎石图 (见图 3), 可以看出特征值较高的两个主成分和第三个主成分的斜率更大, 因此, 提取前两个主成分进行分析更加合适。

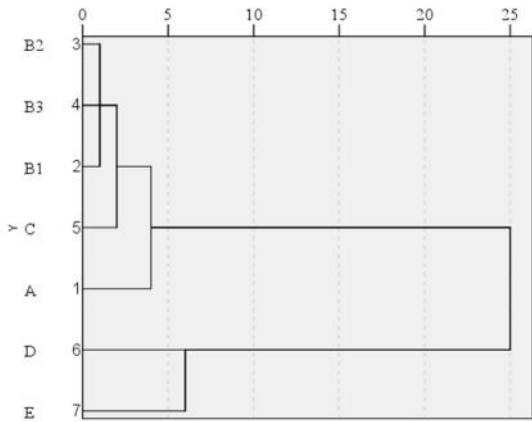


图 2 7 批样品聚类树状图
Fig 2 Cluster dendrogram of 7 batches of samples

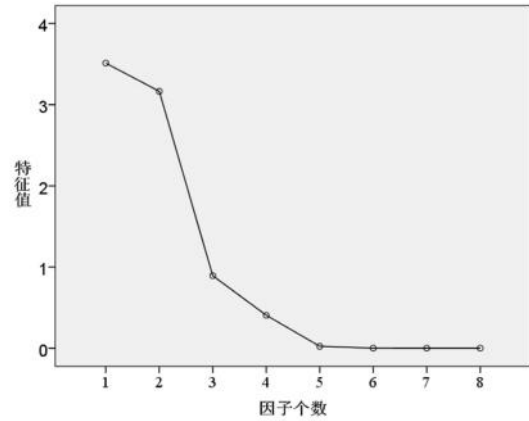


图 3 碎石图
Fig 3 Scree plot

表 3 主成分的特征值和方差贡献率

Tab 3 Total variance contribution rate and characteristic value of principal components

成分	初始特征值			提取主成分结果		
	成分的特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%	成分的特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	3.512	43.903	43.903	3.512	43.903	43.903
2	3.165	39.560	83.463	3.165	39.560	83.463
3	0.893	11.159	94.622			
4	0.406	5.073	99.695			
5	0.024	0.294	99.989			
6	0.001	0.011	100.000			

2.10.2 主成分表达 对初始因子的载荷如表 4 所示, 为了更好地解释各项因子的意义, 采用 Kaiser 标准化的四分旋转法进行旋转。从表 4 中可以看出, 哈巴昔、(R, S)-告依春、哈巴俄昔、丹皮酚在第一主成分上有较高的载荷, 连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷在第二主成分上有较高的载荷, 说明第一主成分主要反映哈巴昔、(R, S)-告依春、哈巴俄昔、丹皮酚的信息, 第二主成分主要反映连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷的信息。

表 4 因子载荷矩阵
Tab 4 Component matrix

化学成分	初始因子载荷		旋转后因子载荷	
	1	2	1	2
哈巴昔	0.739	0.522	0.900	0.092
(R, S)-告依春	0.667	0.604	0.899	-0.017
连翘酯苷 A	0.623	-0.652	0.041	0.901
菊苣酸	0.554	-0.636	-0.001	0.843
连翘苷	0.616	-0.601	0.069	0.858
牛蒡苷	-0.606	0.734	0.025	-0.951
哈巴俄昔	0.888	0.397	0.930	0.284
丹皮酚	0.540	0.801	0.933	-0.248

2.10.3 主成分得分和综合得分 根据成分系数和成分特征值计算出两个主成分系数, 得出两个

主成分 (F_1 、 F_2) 的函数表达式: $Y_1 = 0.394X_1 + 0.356X_2 + 0.332X_3 + 0.296X_4 + 0.329X_5 - 0.323X_6 + 0.474X_7 + 0.288X_8$

$Y_2 = 0.293X_1 + 0.34X_2 - 0.366X_3 - 0.357X_4 - 0.338X_5 + 0.413X_6 + 0.223X_7 + 0.45X_8$

根据主成分方程和标准化后的成分数据 (Z-Score), 得出 Y_1 和 Y_2 的主成分得分, 以各主成分方差贡献率占两个主成分总方差贡献率的比率为权重计算综合得分 $Y (Y = 0.526Y_1 + 0.474Y_2)$, 结果见表 5。Y 值越大, 综合得分越高, 说明该批次的小儿清咽颗粒质量越好, 由表 5 可见, 综合得分从高到低依次为 C、D、E、B3、B1、B2、A。

表 5 小儿清咽颗粒主成分得分、综合得分和排序
Tab 5 Principal component score, comprehensive score and ranking of Xiaoer Qingyan granules

编号	主成分 Y_1 得分	主成分 Y_2 得分	综合得分	排序
A	-1.935	-0.733	-1.365	7
B1	-1.206	-0.172	-0.715	5
B2	-1.423	0.065	-0.718	6
B3	-1.234	0.056	-0.623	4
C	1.558	3.619	2.535	1
D	1.442	-0.612	0.469	2
E	2.797	-2.223	0.418	3

3 讨论

3.1 指标成分、提取溶剂和提取方法的选择

在 2020 年版《中国药典》中, 哈巴昔和哈巴俄昔、(R, S)-告依春、连翘酯苷 A 和连翘苷、菊苣酸、牛蒡苷、丹皮酚分别是玄参、板蓝根、连翘、蒲公英、牛蒡子、牡丹皮的质控成分, 多选用甲醇、80% 甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇等有机溶剂来提取^[9-12], 本试验考察上述 4 种溶剂, 结果发现 80% 甲醇提取杂质峰干扰最少、提取率较高, 故本试验选取 80% 甲醇为提取溶剂。本试验验证了超声、振摇、回流提取 3 种提取方法, 结果发现振摇提取效率较低, 超声提取和回流提取差异不大, 由于超声提取更加方便, 本试验选择超声提取作为样品处理方法。

3.2 色谱条件的选择

本试验同时测定多种化合物, 对色谱条件要求较高, 流动相考察了甲醇、乙腈、磷酸水溶液、冰醋酸水溶液等多种比例的组合, 结果发现乙腈-0.05% 磷酸溶液系统分离效果好、干扰小、峰形好。同时, 为了实现 8 种成分的同时测定, 考虑到有的成分含量较低, 试验使用二极管阵列检测器光谱扫描, 结合各成分的峰强度和干扰情况, 选择 210 nm 作为哈巴昔、连翘酯苷 A、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄昔、丹皮酚的检测波长, 245 nm 作为 (R, S)-告依春的检测波长, 327 nm 作为菊苣酸的检测波长。

3.3 结论

本研究结合中医理论“首选君药并兼顾臣佐使药”的原则, 建立了同时测定小儿清咽颗粒中哈巴昔、(R, S)-告依春、连翘酯苷 A、菊苣酸、连翘苷、牛蒡苷、哈巴俄昔和丹皮酚含量的高效液相色谱方法, 通过对 5 个厂家的 7 批样品进行测定分析, 发现 7 批样品中 8 种成分的含量均有差异, 结合主成分分析, 可为初步判定其质量提供参考。由于活性成分是中药疗效的物质基础, 各成分含量存在较大差异可能会导致药品的疗效有较大的差异, 也会导致用药剂量难以把控, 而小儿清咽颗粒作为儿童常用药物, 理应让用药剂量

更加规范更加精准^[13-14]。本研究建立的多组分质量控制的方法专属性强, 简单易操作, 结果重现性好, 能弥补小儿清咽颗粒现行质量标准的不足, 确保实现小儿清咽颗粒质量的稳定性和一致性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂 (第六册) [S]. 1992: 23.
- [2] 陈颖育. 小儿清咽颗粒联合核黄素磷酸钠、干扰素治疗疱疹性咽峡炎的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践, 2019, 4 (8): 113-114.
- [3] 邱燕. 高效液相色谱法测定小儿清咽颗粒中咖啡酸的含量 [J]. 海峡药学, 2017, 29 (4): 72-74.
- [4] 张晓南, 毛云宏, 游燕, 等. 小儿清咽颗粒中青黛的薄层色谱鉴别研究 [J]. 中国民族民间医药, 2015, 24 (22): 21-22.
- [5] 李冲, 李云贵, 徐望龙, 等. HPLC 法测定小儿清咽颗粒中连翘苷的含量 [J]. 广州化工, 2013, 41 (6): 113-115.
- [6] 杨志一, 王汉平. HPLC 法测定小儿清咽颗粒中牛蒡苷的含量 [J]. 中国药师, 2006 (1): 44-45.
- [7] 胡艳红, 李志浩. HPLC 测定小儿清咽颗粒中靛蓝和靛玉红的含量 [J]. 现代仪器与医疗, 2013, 19 (4): 58-61.
- [8] 方铁铮, 黎志坚, 谭银合. 高效液相色谱法测定小儿清咽颗粒中哈巴俄昔的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (8): 20-22.
- [9] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 73, 121, 177, 179, 214, 367.
- [10] 李盛建, 王慧, 吕磊, 等. HPLC-DAD 法同时测定蒲公英配方颗粒中 6 种成分的含量 [J]. 中南药学, 2019, 17 (10): 1714-1717.
- [11] 张博, 刘惠军, 田兰, 等. HPLC-DAD 法同时测定人参再造丸中 11 个成分的含量 [J]. 实用药物与临床, 2020, 23 (10): 913-920.
- [12] 陈玉璞. 高效液相色谱法同时测定银翘解毒丸中 3 种成分含量 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46 (8): 1703-1706.
- [13] 徐梦莎, 江方方, 张楠. 基于药品说明书的儿童用中成药用药剂量安全性探讨 [J]. 中医药管理杂志, 2023, 31 (4): 170-172.
- [14] 褚新颖, 杨娜, 刘炳林. 基于中成药在治疗儿童呼吸系统疾病中的现状浅析儿童中成药研发情况 [J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53 (11): 1643-1647.

(收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-04-03)

疏清颗粒高效液相色谱指纹图谱的建立及相关性研究

马思文^{1,2}, 车宏伟¹, 孟雅¹, 李志辉^{1,2}, 焦杨², 金立群³, 郑稳生^{1*} (1. 北京协和医学院 中国医学科学院 药物研究所, 药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050; 2. 广西医科大学, 南宁 530021; 3. 吉林华康药业股份有限公司, 吉林 敦化 133722)

摘要: **目的** 建立疏清颗粒高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 为疏清颗粒标准提供参考。**方法** 采用 HPLC 法, 利用 Inertsil-ODS-3 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.3% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 242 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量为 10 μL。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)”评价 10 批疏清颗粒指纹图谱的相似度。**结果** 10 批疏清颗粒相似度大于 0.98, 标出了 31 个共有峰, 指认出甘草苷、甘草酸、芦丁、阿魏酸、绿原酸 5 个成分。**结论** 该方法具有良好的稳定性和重复性, 可用于疏清颗粒的质量评价。

关键词: 疏清颗粒; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相关性; 指标成分

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-3014-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.032

HPLC fingerprints and correlation of Shuqing granules

MA Si-wen^{1,2}, CHE Hong-wei¹, MENG Ya¹, LI Zhi-hui^{1,2}, JIAO Yang², JIN Li-qun³, ZHENG Wen-sheng^{1*} (1. *Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation, Beijing 100050*; 2. *Guangxi Medical University, Nanning 530021*; 3. *Jilin Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Dunhua Jilin 133722*)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint detection method for Shuqing granules and to provide reference for the standards of Shuqing granules. **Methods** HPLC was used. Inertsil-ODS-3 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-0.3% phosphoric acid solution. The detection wavelength was 242 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 10 μL. Similarity evaluation system of chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2004A Edition) was used to analyze the chromatographic data of 10 batches of Shuqing granules. **Results** The similarities of the 10 batches of samples were greater than 0.98, and 31 common peaks were marked. Five components including licorice side, glycyrrhizic acid, rutin, ferulic acid and chlorogenic acid were identified. **Conclusion** The method can be used for the quality evaluation of Shuqing granules owing to good great stability and reproducibility.

Key words: Shuqing granule; HPLC; fingerprint; correlation; indicator component

疏清颗粒是在经典名方“白虎汤”的基础上, 具有清热解毒、宣肺润胃的功效^[1], 主要用于治疗小儿急性上呼吸道感染属风热证, 证见发热、调整了药味后应用于热症相关症状治疗的方剂, 由石膏、大青叶、桑叶、芦根、甘草五味药组成, 鼻塞、咽痛、流涕、口渴、咳嗽、汗出、舌红或

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程基金资助 (No.2021-I2M-1-028); 科技部十三五重大新药创制科技重大专项 (No.2018ZX09721003-009-003)。

作者简介: 马思文, 女, 硕士研究生, 主要从事新药研发与生产, email: 1137687848@qq.com * **通信作者:** 郑稳生, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中西药物新制剂及新释药系统关键技术研究, email: zhengwensheng@imm.ac.cn

苔薄黄。疏清颗粒不仅携带方便、吸收较快,且临床评价表明疏清颗粒能提高临床疗效,缓解症状,缩短病程,值得临床进一步推广应用^[2-3]。但是疏清颗粒开发较早,制备工艺较为简单,相关质量标准单一,考虑到是儿童用药,同时鉴于国家对中药质量提出了更加严格的要求,因此,疏清颗粒的质量标准应进一步提高。本研究采用 HPLC 技术结合中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对疏清颗粒的质量进行全面评估,拟建立相关制剂质量控制的方法,提高制剂质量。

甘草味甜、气微,其主要功效有祛痰止咳、益气补中、缓急止痛、缓和药性和清热解毒等,主要药用成分包括甘草黄酮、甘草酸、甘草多糖、甘草次酸等^[4],且基于网络药理学研究的结果表明甘草苷、甘草酸等成分在“成分-靶点-通路”网络中具有高连接度,是其主要活性成分^[5],其中甘草酸具有抗炎、解热消毒、抗肿瘤、抗过敏和保肝等作用^[6];芦丁和绿原酸是桑叶中含量较多的化学成分^[7-8],林闪闪^[9]通过网络药理学预测并结合各单体化合物的体外药效学结果确定了绿原酸和芦丁为桑叶抗炎的质量标志物;阿魏酸是芦根主要有效成分之一,具有抗自由基、形成保护膜等功效^[10],因此本文着重对上述成分与制剂相关性进行分析评价。

指纹图谱技术是通过相应的技术手段来对中药饮片、中药配方颗粒、中药提取物、中成药等进行处理,再通过色谱或者光谱进行分析,以得到准确对应中药中的不同成分的光谱或色谱^[11]。指纹图谱的出现以及运用可以帮助研究人员了解中药化学特征并将中药质量控制要求在要求范围内,促进中药市场发展^[12]。现有的大量研究表明,指纹图谱在中药研究方面发挥了极其重要的作用,可以有效解决中药质量控制中因成分复杂而导致分析困难的问题,科学地用以评价中药制备工艺的稳定性^[13-26]。本文建立了疏清颗粒的 HPLC 指纹图谱的研究方法,以期为提高药品质量和工业化生产提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国沃特世公司);ME104 102 型万分之一天平($d = 0.1 \text{ mg}$);XS105DU 型十万分之一天平($d = 0.01 \text{ mg}$)(梅特勒-托利多仪器有限公司);DTC-27 型超声波清洗机(鼎泰生化设备制造有限公司)。

1.2 试药

大青叶、甘草、芦根、桑叶(吉林华康药业股份有限公司)。甘草苷(纯度: $\geq 98\%$,阿拉丁)、

阿魏酸(纯度: 99% ,阿拉丁);甘草酸铵(纯度: 98% ,ORGANICS);绿原酸(纯度: 96.3%)、芦丁(纯度: 91.7%)(中国食品药品检定研究院)。疏清颗粒 10 批(批号分别为: 220124、220125、220126、220211、220212、220213、220324、220325、220412、220413,吉林华康药业股份有限公司);乙腈、甲醇(百灵威);纯水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: GL Sciences Inertsil-ODS-3 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$);流动相: 乙腈(A)- 0.3% 磷酸溶液(B),梯度洗脱($0 \sim 10 \text{ min}$, $5\% \rightarrow 10\% \text{A}$; $10 \sim 15 \text{ min}$, $10\% \rightarrow 15\% \text{A}$; $15 \sim 20 \text{ min}$, $15\% \rightarrow 20\% \text{A}$; $20 \sim 55 \text{ min}$, $20\% \rightarrow 50\% \text{A}$; $55 \sim 60 \text{ min}$, $50\% \rightarrow 5\% \text{A}$; $60 \sim 65 \text{ min}$, $5\% \text{A}$);检测波长: 242 nm ;流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温: $35 \text{ }^\circ\text{C}$;进样量: $10 \mu\text{L}$ 。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 单一对照品溶液 取适量甘草苷(10.13 mg)、甘草酸铵(10.08 mg)、绿原酸(10.09 mg)、芦丁(10.11 mg)、阿魏酸(10.04 mg)对照品,精密称定,分别置于 25 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇,摇匀,定容,制成质量浓度约为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一对照品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液 取“2.2.1”项下单一对照品溶液各 3 mL 置于同一量瓶中(25 mL),加入 50% 甲醇,稀释为每 1 mL 含甘草苷、甘草酸铵、绿原酸、芦丁、阿魏酸约 $48 \mu\text{g}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 疏清颗粒供试品溶液 取 10 批疏清颗粒约 2.0 g ,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇溶解,超声处理(功率 500 W , 频率 25 kHz) 15 min ,放冷,用 50% 甲醇补足重量,定容,摇匀,滤过(尼龙滤膜 $0.22 \mu\text{m}$),取续滤液,即得。

2.3.2 药材供试品溶液 分别称取大青叶、甘草、芦根、桑叶粉末各 0.5 g ,置于 25 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇 20 mL ,称重,超声处理(功率 500 W , 频率 25 kHz) 15 min ,放冷,用 50% 甲醇补足重量,定容,摇匀,滤过(尼龙滤膜 $0.22 \mu\text{m}$),取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 按照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,连续 6 次进样测定,考察仪器的精密度。结果显示各主要峰的相对保留时间的 RSD 为 $0.020\% \sim 0.32\%$,相对保留峰面积的 RSD 为 $0.81\% \sim 2.0\%$,表明仪器具有良好的精密度。

2.4.2 重复性试验 按照“2.3.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，连续进样测定，考察方法重复性。结果显示各主要峰的相对保留时间的 *RSD* 为 0.010% ~ 0.24%，相对保留峰面积的 *RSD* 为 0.86% ~ 1.9%，说明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 按照“2.3.1”项下方法制备供试品，分别于制备后的 0、4、8、12、30 h 进样分析，考察供试品溶液的稳定性。结果显示各主要峰的相对保留时间的 *RSD* 为 0.21% ~ 1.4%，相对保留峰面积的 *RSD* 为 1.4% ~ 2.0%，说明供试品溶液在 30 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立

取 10 批疏清颗粒，按照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，进样测定，将所得图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004 A 版）”软件中，采用多点校正，时间窗宽度 0.1，对照图谱生成方法为中位数，将谱峰自动匹配，对比 10 批疏清颗粒指纹图谱的出峰趋势，并计算指纹图谱的相似度。

2.5.1 相关性评价 选择吸收信号较强、峰形明显、稳定性较好的共有峰进行标定，检测出共有峰 31 个，且 10 批疏清颗粒 HPLC 指纹图谱显示出峰情

况一致，结果见图 1 ~ 2；系统自动计算 10 批疏清颗粒指纹图谱的相似度均达到 0.98 以上，结果见表 1，说明疏清颗粒的制剂工艺具有良好的稳定性。

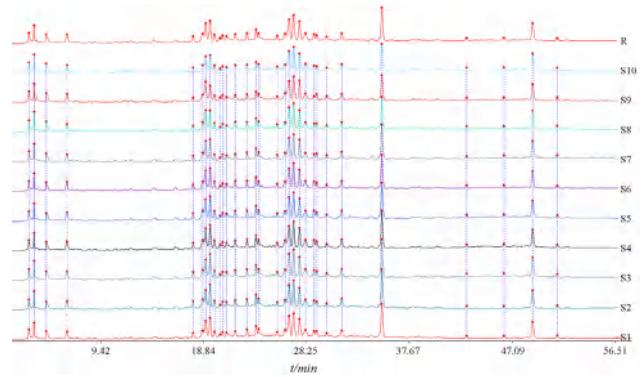


图 1 10 批疏清颗粒 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprint of 10 batches Shuqing granules

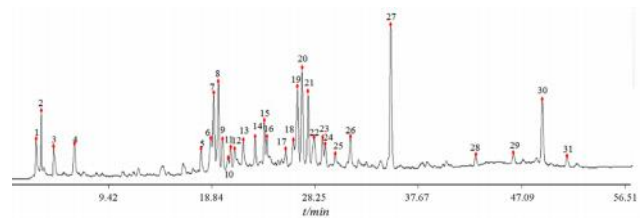


图 2 指纹图谱共有峰标识

Fig 2 Shared peak identification in the fingerprint

表 1 10 批疏清颗粒 HPLC 指纹图谱相似度

Tab 1 Similarity of 10 batches of Shuqing granule for HPLC fingerprint

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1	0.995	0.988	0.990	0.987	0.990	0.987	0.985	0.986	0.993	0.996
S2	0.995	1	0.993	0.991	0.994	0.990	0.989	0.978	0.979	0.988	0.995
S3	0.988	0.993	1	0.985	0.989	0.984	0.985	0.973	0.975	0.982	0.991
S4	0.990	0.991	0.985	1	0.996	0.999	0.993	0.986	0.976	0.995	0.997
S5	0.987	0.994	0.989	0.996	1	0.995	0.994	0.982	0.972	0.991	0.996
S6	0.990	0.990	0.984	0.999	0.995	1	0.994	0.988	0.979	0.995	0.997
S7	0.987	0.989	0.985	0.993	0.994	0.994	1	0.99	0.984	0.993	0.997
S8	0.985	0.978	0.973	0.986	0.982	0.988	0.990	1	0.986	0.992	0.991
S9	0.986	0.979	0.975	0.976	0.972	0.979	0.984	0.986	1	0.982	0.987
S10	0.993	0.988	0.982	0.995	0.991	0.995	0.993	0.992	0.982	1	0.997
R	0.996	0.995	0.991	0.997	0.996	0.997	0.997	0.991	0.987	0.997	1

2.5.2 指标成分鉴定 取单一对照品和混合对照品溶液，进样测定，对比各成分色谱峰保留时间，结果显示，绿原酸、芦丁、甘草苷、阿魏酸和甘草酸铵对照品峰分离度符合要求。以甘草苷相对保留时间为参照，其中绿原酸、芦丁、阿魏酸和甘草酸相对保留时间分别为 0.703、0.973、1.037、1.810，见图 3。在疏清颗粒剂提取样品中共检测出的 31 个共有峰，可以确认峰 7 为绿原酸、峰 18 为芦丁、峰 20 为甘草苷、峰 22 为阿魏酸、峰 30 为甘草酸铵，结果见图 4。

2.5.3 峰归属 按照“2.3.2”项下方法制备出大青叶、甘草、芦根、桑叶 4 份药材供试品溶液，

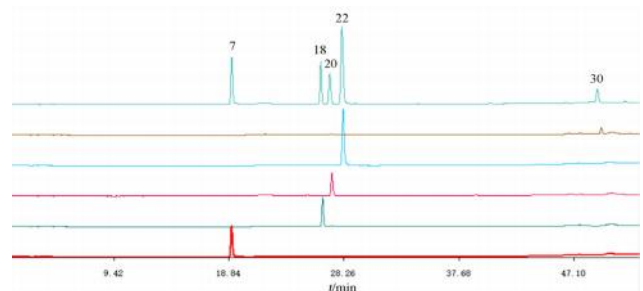


图 3 混合对照品峰定位

Fig 3 Peak localization of the mixed control

7. 绿原酸 (chlorogenic acid); 18. 芦丁 (rutin); 20. 甘草苷 (licorice glycoside); 22. 阿魏酸 (ferulic acid); 30. 甘草酸铵 (ammonium glycyrrhizin)

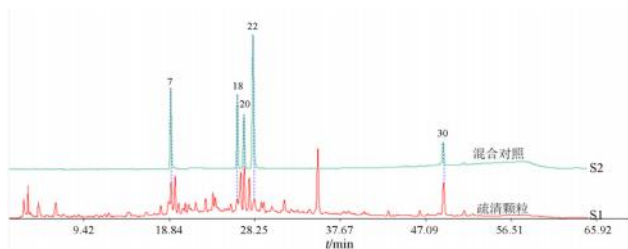


图 4 混合对照品和疏清颗粒提取液 HPLC 图

Fig 4 HPLC chromatogram of mixed control and Shuqing granules extract

7. 绿原酸 (chlorogenic acid); 18. 芦丁 (rutin); 20. 甘草苷 (licorice glycoside); 22. 阿魏酸 (ferulic acid); 30. 甘草酸铵 (ammonium glycyrrhizin)

进样测定。将单味药材的色谱图与指纹图谱参照峰进行比对, 对指纹图谱中的共有峰进行归属, 结果见图 5。

其中 5、6、9、13、14、23、26 号峰来源于大青叶并且是大青叶的特征峰; 28、29、30、31 号峰来源于甘草并且是甘草的特征峰; 7、10、11、18、24、25 号峰来源于桑叶并且是桑叶的特征峰; 芦根药材未出现特征峰。1、2、3、4 号峰是大青叶、甘草、芦根、桑叶 4 种药材来源的共有峰; 8 号峰来源于大青叶、甘草和桑叶; 峰 15、19、20、27 来源于大青叶和甘草, 峰 21 来源于大青叶和桑叶。从峰来源归属可知, 疏清颗粒中的大部分成分是来自大青叶, 并且来源于大青叶的特征峰多于其他三味药材。

2.5.4 颗粒剂主要特征峰分析 按照“2.3.1”项下方法制备 10 批疏清颗粒供试品溶液, 在检测出的 31 个共有峰中选择吸收信号较强、峰形明显、稳定性和分离度较好的峰进行标定, 作为颗粒剂特征峰。将满足要求的 4、5、13、14、20、21、22、26、27、30 号峰作为疏清颗粒的特征峰, 其中, 以 30 号峰作为参照峰, 计算其他 9 个特征峰的相对保留时间, 并计算相对保留时间的 *RSD*, 结果见表 2 ~ 3。结果显示, 10 批疏清颗粒的相对保留时间的 *RSD* 为 0.30% ~ 0.58%, 说明 10 批疏清颗粒供试品溶液之间的成分没有差异; 同时也说明了检测的系统符合 10 批疏清颗粒成分的测定要求, 此次建立的 10 批疏清颗粒成分的 HPLC 指纹图谱方法可作为参考, 用于控制疏清颗粒的质量。

2.5.5 统计分类分析

① K- 平均值聚类分析: 以 10 批疏清颗粒指纹图谱中 31 个共有峰峰面积为变量, 运用 SPSS Statistics 22 软件对数据进行描述统计 - 标准化处理后, 将标准化后的峰面积数据进行 K- 平均值聚类分析, 以 10 为最大迭代次数时, 结果显示共有峰可分为 3 类, 其中第 1 类有 3 个峰, 第 2

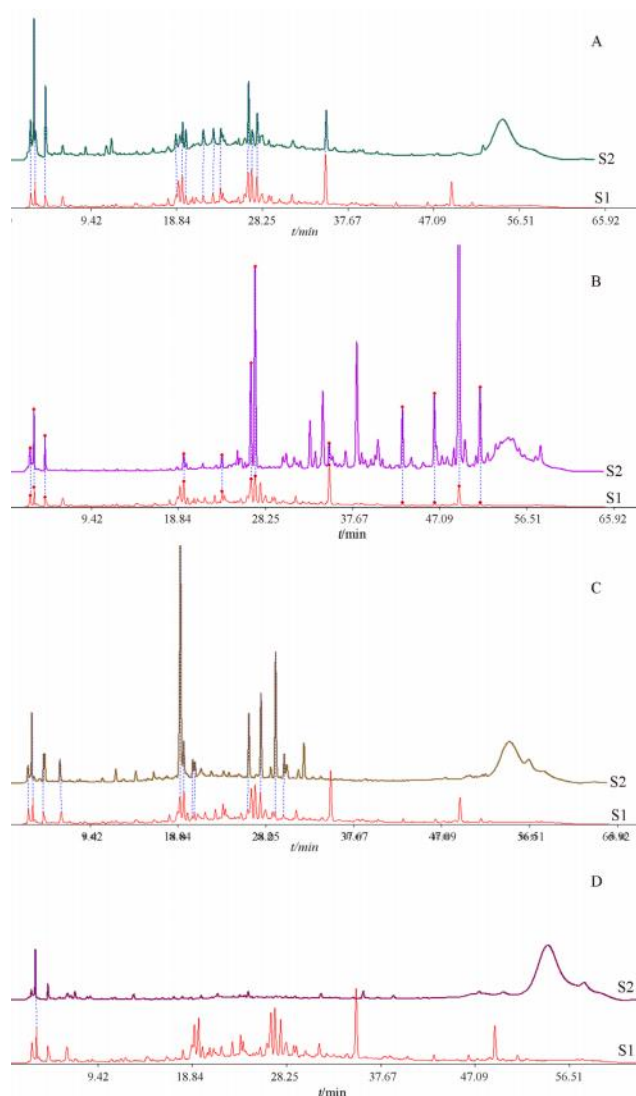


图 5 供试品溶液和疏清颗粒供试品溶液 HPLC 图

Fig 5 HPLC chromatogram of dgers woad leaf sample and Shuqing granules solution

A. 大青叶 (dgers woad leaf); B. 甘草 (licorice); C. 桑叶 (mulberry leaf); D. 芦根 (reed root)

表 2 疏清颗粒特征峰相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of characteristic peaks of Shuqing granules

峰号	保留时间 / min	相对保留时间	峰号	保留时间 / min	相对保留时间
峰 4	6.329	0.129	峰 21	27.664	0.564
峰 5	17.904	0.365	峰 22	28.213	0.575
峰 13	21.747	0.443	峰 26	31.524	0.642
峰 14	22.847	0.466	峰 27	35.222	0.718
峰 20	27.107	0.552	峰 30	49.066	1

类有 4 个峰, 第 3 类有 24 个峰, 即 10 批疏清颗粒中每一批的 31 个共有峰按照峰面积大小的相似程度均可分为三类, 运行结果见表 4。

② 系统聚类分析: 将标准化后的峰面积数据继续进行系统聚类分析, 以聚类数为 2 ~ 5 进行

表 3 10 批疏清颗粒特征峰相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of the characteristic peaks of 10 batches Shuqing granules

批号	峰 4	峰 5	峰 13	峰 14	峰 20	峰 21	峰 22	峰 26	峰 27	峰 30
220124	0.129	0.365	0.443	0.466	0.552	0.564	0.575	0.642	0.718	1.000
220125	0.130	0.366	0.445	0.467	0.553	0.565	0.576	0.643	0.718	1.000
220126	0.131	0.369	0.448	0.470	0.558	0.569	0.581	0.649	0.725	1.000
220211	0.129	0.365	0.443	0.466	0.553	0.564	0.575	0.643	0.718	1.000
220212	0.129	0.365	0.443	0.466	0.552	0.564	0.575	0.643	0.718	1.000
220213	0.128	0.363	0.443	0.465	0.552	0.564	0.575	0.642	0.718	1.000
220324	0.129	0.364	0.443	0.466	0.553	0.564	0.575	0.643	0.718	1.000
220325	0.128	0.365	0.443	0.466	0.552	0.563	0.575	0.642	0.717	1.000
220412	0.129	0.364	0.443	0.465	0.552	0.563	0.575	0.642	0.717	1.000
220413	0.129	0.365	0.443	0.465	0.552	0.563	0.575	0.642	0.717	1.000
RSD/%	0.58	0.38	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32	0.31	0.30	0

表 4 共有峰标准化数据

Tab 4 Common peak-normalized data

聚类	每一个聚类中的观值数目	
	1	3.000
2	4.000	
3	24.000	
有效	31.000	
遗漏	0.000	

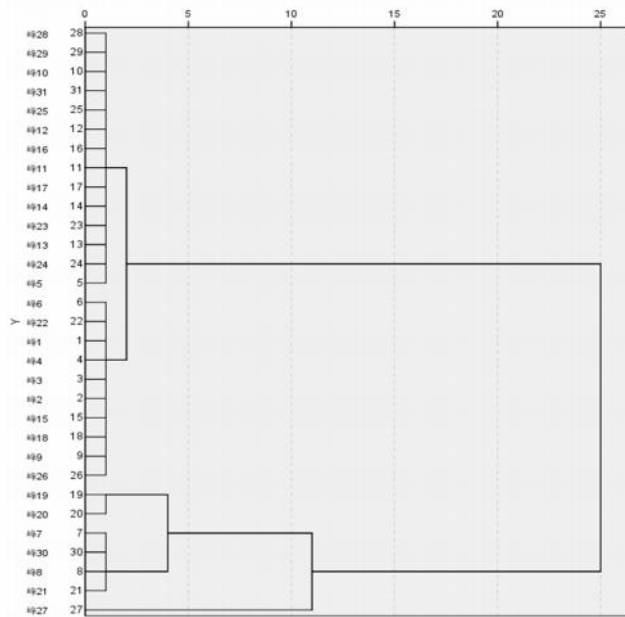


图 6 共有峰聚类分析图

Fig 6 Common peak cluster analysis plot

聚类统计, 结果见图 6。当类间距为 10 时, 31 个共有峰按照峰面积被分为 3 类, 其中 7、8、19、20、21、30 号峰为第 2 类, 27 号峰为第 3 类, 其余为第 1 类。31 个共有峰按照峰面积大小相似程度依然是分作 3 类, 虽然每一类的峰个数与 K-平均值聚类分析结果略有差异, 但都在可容许差异范围内, 在 10 批颗粒中不同批次之间的 31 个共有峰其成分含量不具有统计学的差异。其中, 以 7、8、19、20、21、27、30 号峰的峰面积数据对

10 批疏清颗粒进行聚类分析, 当类间距为 10 时, 峰面积被聚类为 2 类 (即第 3 类的 27 号峰和第 2 类的 7、8、19、20、21、30 号峰), 在结果见图 7。该结果验证了 10 批疏清颗粒批次之间对应的共有峰面积相近, 与相似度分析结果基本一致。

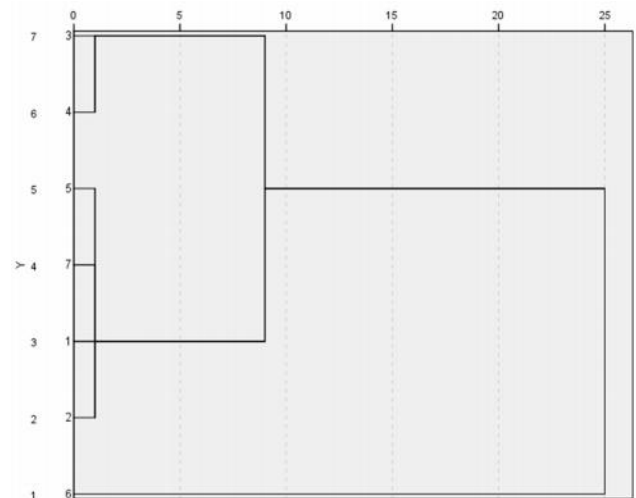


图 7 10 批疏清颗粒聚类分析图

Fig 7 Cluster analysis plot of 10 batches of Shuqing granules

3 讨论

3.1 提取方式考察

笔者曾考察了纯水、75%乙醇、50%甲醇和纯甲醇对供试品溶液出峰的影响, 结果表明 50% 甲醇作为提取溶剂时的出峰数量较多, 峰形较好、峰信号较强; 对供试品的提取方式和提取时间进行考察, 通过对回流提取和超声提取两种提取方式的结果比较可知两者的出峰情况没有差别, 峰宽几乎一致, 但是超声提取的某些主成分峰的峰高相对于回流提取更突出, 且超声的提取方式更方便; 继续考察不同超声功率 (300、400、500 W) 和超声时间 (10、15、20 min) 的出峰效果, 结果显示不同频率和超声时间, 出峰的个数几乎没有差异, 峰形、峰高和峰数也几乎相同, 即超声时间和超声频率对疏清颗

粒的溶解性影响不大, 故选择超声提取频率 25 kHz, 功率 500 W, 超声时间 15 min 为最佳提取方式。

3.2 色谱条件考察

曾考察了不同流动系统(水-乙腈系统、水-甲醇系统、水-磷酸盐系统)和不同比例的差异性, 结果显示以乙腈-0.3%磷酸为流动相时峰分离度较好, 梯度洗脱的出峰个数和峰分离效果更为突出, 故选择梯度洗脱, 同时不断调整乙腈-0.3%磷酸的比例使出峰最优; 考察了安捷伦、Kromasil、GL Sciences、AKZONOBEL、YMC 的色谱柱结合 PDA 检测器的紫外全波长扫描, 结果显示使用 GL Sciences 色谱柱在 242 nm 检测时出现最大吸收的成分较多, 且出峰峰高均匀, 峰形美观, 干扰较少, 因此, 采用 242 nm 作为检测波长、GL Sciences 柱作为色谱柱。

4 结语

本研究建立了 10 批疏清颗粒 HPLC 指纹图谱并对其相关性研究, 结果指纹图谱相似度均高于 0.98, 说明 10 批疏清颗粒的物质组分基本一致, 疏清颗粒的制剂工艺具有良好的稳定性; 且聚类分析结果说明 10 批样品批次与批次之间对应的成分峰含量相近, 相似度高。共有峰结合混合对照品定位的结果分别指认了甘草苷、甘草酸、芦丁、阿魏酸、绿原酸 5 种指标成分, 其中 7 号峰绿原酸、20 号峰甘草苷、30 号峰甘草酸属于药材指标物质, 是控制疏清颗粒质量值得关注的成分。通过单味药材与颗粒剂的指纹图谱比对, 对共有峰进行了来源归属, 并分别确定了 4 种药材的特征峰和疏清颗粒的特征峰。相关的精密度、重复性和方法学考察中的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 结果均 < 2.0%, 说明本研究所建立的分析方法稳定可行、重复性良好, 能反映疏清颗粒的质量, 可为相关的质量研究和评价提供参考。

参考文献

[1] 车宏伟, 杨海宁, 王登才, 等. 疏清颗粒质量标准提高研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(31): 34-37, 52.
 [2] 马融, 胡思源, 李新民, 等. 疏清颗粒治疗小儿急性上呼吸道感染的上市后再评价[J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 513-518.
 [3] 李若蒙, 常冬梅, 王悦. 疏清颗粒治疗小儿外感风热证 45 例[J]. 中西医结合研究, 2019, 11(4): 215-216.
 [4] 由笑蕊, 宋惠霄, 李燕宁. 基于网络药理学探讨甘草活性成分对小儿肺炎的作用机制[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(32): 3583-3591.
 [5] 李欢欢, 林丽, 郭爽, 等. 基于网络药理学及定性定量研究的甘草质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2020, 51

(10): 2680-2688.
 [6] 张浩. HPLC 法测定甘草中甘草苷和甘草酸含量[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(48): 10, 21.
 [7] 程聪梅, 毛菊华, 余乐. HPLC 法同时测定桑叶药材及其炮制品中绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(21): 2990-2992.
 [8] 戴开金, 罗奇志, 侯连兵. HPLC 法测定桑叶中芦丁、绿原酸和槲皮素[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(3): 579-580.
 [9] 林闪闪. 桑叶饮片质量控制及其抗炎质量标志物研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
 [10] 牛颖. 芦根药材中阿魏酸含量的测定[J]. 中国化工贸易, 2019, 11(35): 141.
 [11] 陈静. 新型指纹图谱技术在中药分析中的应用进展[J]. 黑龙江科学, 2021, 12(6): 38-39.
 [12] 张畅然. 指纹图谱在中药质量控制中的应用探讨[J]. 内蒙古中医药, 2022, 41(6): 124-125.
 [13] 陈金娜, 万齐越, 刘向红. 化痰无糖颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(5): 642-646, 672.
 [14] 杨耘, 卢雪蕊, 宋平顺, 等. 甘草 HPLC 指纹图谱及抗氧化活性的谱效关系[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(4): 607-617.
 [15] 陈丹, 戚建中, 符国成, 等. 复方板蓝根颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(9): 40-44.
 [16] 李佳, 王玉, 金华. 稚儿灵颗粒 HPLC 指纹图谱及多指标成分的含量测定[J]. 药学与临床研究, 2022, 30(2): 135-139.
 [17] 全立国, 牛艳艳, 吉海杰, 等. 扶正固本颗粒 HPLC 指纹图谱建立[J]. 中成药, 2022, 44(1): 211-214.
 [18] 于海洲, 鲁凯强, 冯巧巧, 等. 双丹颗粒 HPLC 指纹图谱研究及 7 个成分的含量测定[J]. 中国药师, 2022, 25(6): 1082-1087.
 [19] 余欣彤, 钟文峰, 黎桃敏, 等. 薏苡仁饮片、水煎液、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 中国药师, 2022, 25(8): 1352-1357.
 [20] 覃柳莹, 蔡梦如, 姚宇, 等. 藏药四臣止咳颗粒的指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2021, 19(3): 507-512.
 [21] 王隆隆, 贾庆涵, 袁会莹, 等. 芪苓益肾颗粒传统制备方法与其配方颗粒的指纹图谱差异性研究[J]. 中南药学, 2022, 20(1): 39-44.
 [22] 王辙远, 张璠璠, 王隆隆, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱的天麻饮片-标准汤剂-配方颗粒对比研究[J]. 中南药学, 2022, 20(5): 985-991.
 [23] 钟文峰, 张兰兰, 胡懿, 等. 甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 中南药学, 2022, 20(9): 2123-2128.
 [24] 周丽娟, 杨芮平, 杜守颖. 儿童清咽解热口服液高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2019, 17(7): 1124-1128.
 [25] 郭庆, 许东亚, 程世云. 肺宁颗粒高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2019, 17(10): 1695-1698.
 [26] 于颖超, 倪健, 高利利, 等. 芪箭颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2020, 18(2): 231-234.

(收稿日期: 2023-01-02; 修回日期: 2023-05-01)

风湿骨痛片及其中间体的指纹图谱建立及指标成分含量测定

刘焕起¹, 吴佩佩², 吴海峰³, 余世春^{1, 2*}, 许旭东³ (1. 安徽中医药大学, 合肥 230011; 2. 安徽科创药物研究所有限责任公司, 合肥 230088; 3. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100093)

摘要: **目的** 建立风湿骨痛片及其中间体的指纹图谱, 并建立指标成分含量测定的高效液相色谱方法, 为其质量控制提供参考。**方法** 采用 HPLC 法建立风湿骨痛片中间体的指纹图谱, 以对照品进行共有峰指认, 通过相似度评价分析 16 批样品的质量差异, 同时以盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱为指标性成分, 建立其含量测定方法。**结果** 建立了 16 批风湿骨痛片中间体的指纹图谱与对照图谱, 各批次样品间相似度均大于 0.90, 标定出中间体中的 12 个共有峰、风湿骨痛片中的 17 个共有峰; 5 种成分在相应的质量浓度范围内与峰面积的线性关系良好 ($r \geq 0.999$), 加样回收率均在 98.39% ~ 101.09%。盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱含量平均值分别为 3.51、2.50、0.36、2.48、2.05 mg · g⁻¹。**结论** 所建立的指纹图谱及含量测定方法易行、可靠, 可用于风湿骨痛片生产过程的跟踪控制, 为建立更全面的质量控制标准提供依据。

关键词: 风湿骨痛片; 中间体; 高效液相色谱; 指纹图谱; 含量测定

中图分类号: R284.3, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)11-3020-04
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.033

Fingerprints of Fengshi Gutong tablets and intermediates and content determination of index components

LIU Huan-qi¹, WU Pei-pei², WU Hai-feng³, YU Shi-chun^{1, 2*}, XU Xu-dong³ (1. *Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230011*; 2. *Anhui Kechuang Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd., Hefei 230088*; 3. *Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100093*)

Abstract: Objective To establish the fingerprints of Fengshi Gutong tablets and intermediates, develop an HPLC method to simultaneously determinate five components, and provide a reference for the quality control. **Methods** The fingerprints of Fengshi Gutong tablets and intermediates were established by HPLC method. The common peaks were identified with the reference substances. The quality difference of 16 batches of samples was analyzed by similarity evaluation. At the same time, ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, chlorogenic acid, glycyrrhizin and benzoylneaconitine were used as the index components and their content was determined. **Results** The similarity between the fingerprints of 16 batches of Fengshi Gutong tablets and intermediates and the control maps was greater than 0.90, with 12 common peaks identified in the intermediates and 17 common peaks identified in Fengshi Gutong tablets. The linearity between 5 components and the peak area was good ($r \geq 0.999$) in the corresponding concentration range, and the recoveries ranged 98.39% ~ 101.09%. The average contents of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, chlorogenic acid, liquiritin and benzoylneaconitine were 3.51, 2.50, 0.36, 2.48, and 2.05 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion** The established fingerprints and content determination method are easy and reliable, and can provide evidence for the quality control and evaluation of Fengshi Gutong tablets.

Key words: Fengshi Gutong tablet; intermediate; HPLC; fingerprint; content determination

基金项目: 国家重大新药创制 - 创新药物研究开发技术平台建设 (No. 2012ZX09301002-001)。

作者简介: 刘焕起, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药物物质基础研究与新药开发研究, email: 806748639@qq.com *通信作者: 余世春, 男, 研究员, 主要从事中药有效成分与创新药物研究, email: 2114659801@qq.com

风湿骨痛片收载于《中国药典》2020 年版一部, 是国家基本药物, 由制川乌 (90 g)、制草乌 (90 g)、红花 (90 g)、乌梅 (90 g)、木瓜 (90 g)、甘草 (90 g) 和麻黄 (90 g) 7 味中药组成, 功能温经散寒、通络止痛, 主治寒湿痹所致的手足四肢腰脊疼痛, 以及风湿性关节炎见以上证候者^[1]。

目前, 风湿骨痛片化学成分及质量控制方面的研究, 主要集中在单个成分含量测定^[2-3]、临床验证研究^[4-5]等, 没有涉及其整体质量控制方法方面。考虑到中成药化学成分较为复杂, 为保证其成品的质量与疗效稳定, 有必要建立一种可行的、反映整体成分状态的质量控制方法。在中药整体控制评价体系中, 指纹图谱技术应用较广^[6-9]。根据风湿骨痛片处方各味药有效成分的理化性质和含量的多少, 经过多次摸索性试验, 最终确定以盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱为指标性成分和含量测定成分。

本研究根据国家药典委员会颁布的《中国注射剂特征图谱研究的技术要求(暂行)》, 建立风湿骨痛片的中间体及成品的 HPLC 指纹图谱, 并对 5 种主要成分的含量进行测定, 从定性和定量两方面, 为该制剂生产全过程中的质量控制提供依据并建立方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), AG135 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), KQ5200E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品盐酸麻黄碱 (批号: 171241-201809, 纯度: 100.0%)、盐酸伪麻黄碱 (批号: 171237-201510, 纯度: 99.8%)、绿原酸 (批号: 110753-201415, 纯度: 96.2%)、甘草苷 (批号: 111610-201106, 纯度: 93.7%)、苯甲酰新乌头原碱 (批号: 111795-202106, 纯度: 99.5%)(中国食品药品检定研究院); 磷酸 (分析纯, 上海苏懿化学试剂有限公司, 批号: 20160302); 麻黄 (太和县美欣制药有限公司, 批号: 211201); 木瓜 (批号: 210806029b)、乌梅 (批号: 211130172b)、红花 (批号: 211202007e)(安徽新盛中药饮片有限公司) 上述饮片均经安徽中医药大学刘守金教授鉴定; 风湿骨痛片 (安徽美欣制药有限公司, 规格: 0.37 g/片, 批号分别为 201030、210310、211210、220212、220215、220307、220326、220408、220412、220506、230301、230303、230307、230309、230316、230413, 编号为 Y1 ~ Y16);

甲醇、乙腈为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent 5 TC-C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈为流动相 A, 以 0.05% 磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5%A; 10 ~ 25 min, 5% ~ 15%A; 25 ~ 30 min, 15% ~ 18%A; 30 ~ 37 min, 18%A; 37 ~ 40 min, 18% ~ 20%A; 40 ~ 55 min, 20% ~ 28%A; 55 ~ 60 min, 28% ~ 34%A; 60 ~ 70 min, 34% ~ 60%A; 70 ~ 80 min, 60% ~ 95%A); 检测波长 210 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷和苯甲酰新乌头原碱对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 0.198、0.275、0.183、0.099、0.502 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液; 精密量取各储备液 1.0 mL 加甲醇定容于 50 mL 量瓶中即得混合对照品溶液, 4 °C 储藏备用。

2.2.2 中间体样品制备 按《中国药典》2020 年版一部收载的“风湿骨痛片”质量标准, 称取乌梅、麻黄、红花和木瓜各药 90.0 g, 按标准【制法】, 即将红花等 4 味药材加水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至稠膏状, 制备中间体浸膏, 得到 16 批中间体样品 (批号分别为 230201 ~ 230216, 编号为 S1 ~ S16)。

2.2.3 供试品溶液制备 取风湿骨痛片 (Y1) 2.0 g 样品及相当于 2.0 g 样品的中间体样品, 加入 70% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min、放冷, 加 70% 甲醇补足减失的重量, 过滤, 取续滤液为供试品溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度试验 取同一批中间体 (S1) 供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下连续进样测定 6 次, 选择 6 号峰 (绿原酸) 为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间 *RSD* 均 ≤ 0.18%, 相对峰面积 *RSD* 均 ≤ 2.9%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一批中间体 (S1) 供试品溶液, 于 0、2、4、6、12、24 h 在“2.1”项下色谱条件进样测定, 选择 6 号峰 (绿原酸) 为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间 *RSD* 均 ≤ 3.0%, 相对峰面积 *RSD* 均 ≤ 3.0%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批中间体 (S1), 平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件

进样测定,选择 6 号峰(绿原酸)为参照峰,测得各共有峰的相对保留时间 *RSD* 均 ≤ 0.65%,相对峰面积 *RSD* 均 ≤ 3.0%,表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的研究

2.4.1 参照峰的选择 在供试品溶液色谱峰中,绿原酸的峰面积较大,峰形较好,保留时间适中,分离度理想,故选择其作为参照峰。

2.4.2 指纹图谱的建立 按“2.2.3”项下方法制备中间体供试品 16 批(S1~S16)及风湿骨痛片 16 批(Y1~Y16),进样测定,记录色谱图,建立指纹图谱。结果 16 批中间体供试品共标定 12 个共有峰,风湿骨痛片共标定 17 个共有峰,见图 1。

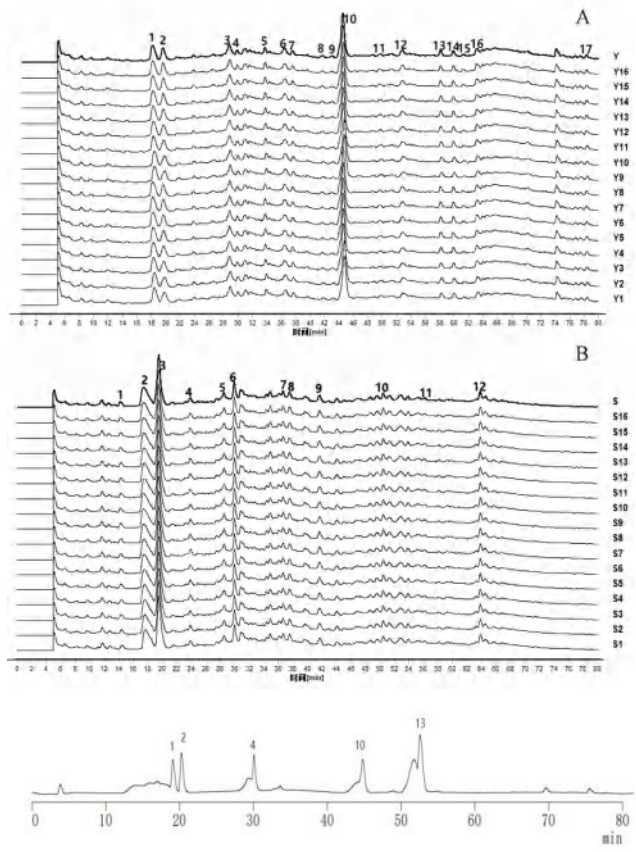


图 1 16 批风湿骨痛片(A)、中间体(B)供试品及混合对照品(C)的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of 16 batches of Fengshi Gutong tablet (A), intermediate (B) and mixed control product (C)

2.4.3 指纹图谱的相似度评价结果 将相关指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)”进行相似度分析,以中位数法生成对照图谱,以对照图谱(R)为参照,测得中间体、成品相似度均在 0.90 以上,说明各批样品的化学成分具有良好的一致性,见表 1。

2.4.4 共有峰指认 取混合对照品溶液进样测定,对比各色谱峰保留时间,见图 1。风湿骨痛片样品中共检测出 17 个共有峰,可以确认峰 1

表 1 相似度评价结果

Tab 1 Similarity			
中间体批号	相似度	风湿骨痛片批号	相似度
230201	0.952	201030	0.993
230202	0.941	210310	0.987
230203	0.934	211210	0.995
230204	0.996	220212	0.996
230205	0.997	220215	0.994
230206	0.910	220307	0.988
230207	0.908	220326	0.988
230208	0.929	220408	0.987
230209	0.925	220412	0.984
230210	0.925	220506	0.986
230211	0.936	230301	0.982
230212	0.956	230303	0.978
230213	0.975	230307	0.985
230214	0.943	230309	0.983
230215	0.935	230316	0.983
230216	0.928	230413	0.986

为盐酸麻黄碱、峰 2 为盐酸伪麻黄碱、峰 4 为绿原酸、峰 10 为甘草苷、峰 12 为苯甲酰新乌头原碱。风湿骨痛片中间体样品中共检测出 12 个共有峰,可以确认峰 2 为盐酸麻黄碱、峰 3 为盐酸伪麻黄碱、峰 6 为绿原酸。

2.5 多成分含量测定

2.5.1 线性关系的考察 精密量取“2.2.1”项下各对照品储备液 1、3、5、10、15、20 mL 置于 20 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,进样测定,以质量浓度为横坐标(X),峰面积积分为纵坐标(Y),进行线性拟合,结果见表 2。

表 2 5 种成分的线性关系考察

Tab 2 Linearity of 5 components			
成分	线性方程	r	线性范围/μg
盐酸麻黄碱	$y = 1.946 \times 10^4 x + 5.070 \times 10^4$	0.9993	0.1003 ~ 2.006
盐酸伪麻黄碱	$y = 3.315 \times 10^3 x + 1.360 \times 10^4$	0.9991	0.1643 ~ 3.286
绿原酸	$y = 2.967 \times 10^4 x + 6.886 \times 10^3$	0.9991	0.1023 ~ 2.046
甘草苷	$y = 3.923 \times 10^4 x + 9.314 \times 10^3$	0.9993	0.526 ~ 10.52
苯甲酰新乌头原碱	$y = 6.300 \times 10^3 x - 2.398 \times 10^3$	0.9992	5.02 ~ 100.5

2.5.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(Y1) 10 μL,进样测定 6 次,测得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱的峰面积 *RSD* 分别为 1.8%、2.6%、1.4%、1.1%、1.6% (n = 6),表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(Y1) 10 μL,于 0、2、4、6、12、24 h 进样测定,测得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱的含量 *RSD* 分别为 2.2%、1.7%、0.28%、0.95%、1.7% (n = 6),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批供试品(Y1),按

“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，测得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱的峰面积 *RSD* 分别为 2.9%、1.8%、0.87%、0.96%、1.8% ($n = 6$)，表明方法重复性良好。

2.5.5 加样回收试验 取同一批各成分含量已知的风湿骨痛片 (Y1) 6 份，每份 1.0 g，精密称定，精密加入混合对照品溶液 (与样品中各待测成分的含量相当) 5 mL，按“2.2.3”项下方法制备，进样测定，计算回收率。结果盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱平均加样回收率分别为 98.39%、101.09%、99.08%、99.25%、99.43%，*RSD* 分别为 0.57%、1.3%、0.80%、1.1%、1.1%，表明方法回收率良好。

2.5.6 含量测定 对 16 批中间体和风湿骨痛片样品进行含量测定，结果中间体中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸含量平均值分别为 11.11、15.46、1.82 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，风湿骨痛片样品中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱含量平均值分别为 3.51、2.50、0.36、2.48、2.05 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (见表 3)。风湿骨痛片制备过程中，需在中间体样品之后加入制川乌、制草乌和甘草粉，故中间体样品中未检测到甘草苷和苯甲酰新乌头原碱。计算中间体及成品中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸的转移率，发现其转移率均低于 50% (分别为 31.59%、16.17% 和 19.78%)，原因可能与该制剂提取工艺有关。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本研究考察了不同流动相包括甲醇-0.1% 磷酸溶液、甲醇-0.05% 磷酸溶液、甲醇-水溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.05% 磷酸溶液、乙腈-水溶液流动相，分析中间体和成品液相色谱图分离效果，最终选定乙腈-0.05% 磷酸溶液为流动相系统。在已确定流动相前提下，查阅文献^[10-12]发现，210、265、280、403 nm 为其常用波长，比较 4 个波长下的指纹图谱，结果表明在 210 nm 波长下指纹图谱中色谱峰最多，基线平稳且分离度较好，故选择 210 nm 作为检测波长。同时参照文献^[13]对洗脱程序进行优化，选择了最合适的洗脱程序。

3.2 指标成分选定

风湿骨痛片由 7 味中药组成，制川乌、制草乌散寒除痹、通络止痛，为君药；麻黄、木瓜和乌梅发汗解表、舒筋缓急，为臣药；红花佐以活血通脉、消肿止痛；使以甘草调和诸药。在《中国药典》中，制川乌、制草乌的指标成分是苯甲酰新乌头原碱，麻黄的指标成分是盐酸麻黄碱和盐酸

表 3 16 批风湿骨痛片及其中间体含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 3 Determination of 16 batches of Fengshi Gutong tablets and their intermediates ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

名称	批号	盐酸麻黄碱	盐酸伪麻黄碱	绿原酸	甘草苷	苯甲酰新乌头原碱
中间体	230201	11.13	15.48	1.82	/	/
	230202	11.12	15.46	1.84	/	/
	230203	11.12	15.42	1.80	/	/
	230204	11.10	15.49	1.83	/	/
	230205	11.11	15.46	1.85	/	/
	230206	11.10	15.42	1.84	/	/
	230207	11.12	15.40	1.80	/	/
	230208	11.13	15.41	1.79	/	/
	230209	11.07	15.44	1.76	/	/
	230210	11.09	15.47	1.84	/	/
	230211	11.10	15.49	1.83	/	/
	230212	11.12	15.46	1.84	/	/
	230213	11.14	15.49	1.80	/	/
	230214	11.12	15.47	1.84	/	/
	230215	11.09	15.50	1.81	/	/
	230216	11.16	15.49	1.84	/	/
风湿骨痛片	201030	3.51	2.54	0.35	2.47	2.02
	210310	3.54	2.53	0.38	2.44	2.06
	211210	3.52	2.48	0.36	2.48	2.04
	220212	3.55	2.50	0.34	2.49	2.05
	220215	3.57	2.46	0.36	2.45	2.06
	220307	3.50	2.48	0.35	2.49	2.03
	220326	3.52	2.49	0.38	2.51	2.03
	220408	3.56	2.51	0.37	2.50	2.06
	220412	3.51	2.53	0.32	2.49	2.04
	220506	3.49	2.48	0.34	2.47	2.03
	230301	3.48	2.49	0.33	2.49	2.05
	230303	3.50	2.53	0.37	2.48	2.07
	230307	3.52	2.48	0.37	2.46	2.07
	230309	3.48	2.48	0.35	2.49	2.08
	230316	3.49	2.46	0.35	2.47	2.07
	230413	3.47	2.49	0.38	2.47	2.06

伪麻黄碱，木瓜的指标成分是熊果酸和齐墩果酸，乌梅的指标成分是枸橼酸，红花的指标成分是羟基红花黄色素 A 和山柰酚，甘草的指标成分是甘草苷和甘草酸。由于在选定的检测波长下，熊果酸、齐墩果酸、枸橼酸、羟基红花黄色素 A、山柰酚和甘草酸没有被检测到，故根据处方君臣佐使以及含量的大小原则，优先选择苯甲酰新乌头原碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、甘草苷为本研究的指标成分。另外绿原酸是木瓜^[14]、乌梅^[15]中的重要成分。因此，从整体组成出发，本项研究选择苯甲酰新乌头原碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、甘草苷、绿原酸作为含量测定指标成分。

4 结论

本研究首次同步建立了风湿骨痛片及其中间体的 HPLC 指纹图谱。中间体指纹图谱确定 12 个共有峰, 风湿骨痛片指纹图谱确定了 17 个共有峰, 并指认了 5 个成分。16 批及其指纹图谱相似度在 0.90 以上, 表明建立的指纹图谱方法可行, 可实现生产风湿骨痛片从提取到压片至成品等整个过程的跟踪控制, 达到批次间无显著差异、药效稳定的目的。同时, 为提升风湿骨痛片的质量标准提供了依据; 但中间体和成品指纹图谱部分成分色谱峰仍有待于进一步研究后指认。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 724.
 [2] 岳超, 张文婷, 高杰, 等. SPE 技术在风湿骨痛片麻黄含量测定中的应用 [J]. 西北药学杂志, 2016, 31 (1): 45-48.
 [3] 史煜华, 黄文康, 黄琴伟, 等. SPE-HPLC 测定风湿骨痛片中 6 种生物碱类物质的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35 (12): 1797-1800.
 [4] 胡锐. 风湿骨痛片联合双氯芬酸钠片治疗退行性骨关节炎的疗效分析 [J]. 中国现代药物应用, 2023, 17 (5): 17-20.
 [5] 王善娟, 朱军. 风湿骨痛片联合羟氯喹治疗类风湿关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34 (4): 1153-1156.
 [6] 米卓尔, 崔雨晴, 陈方超, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及 9 个成分含量测定的通天口服液质量评价研究 [J]. 现代中药

研究与实践, 2022, 36 (4): 42-47.
 [7] 佟志军, 魏晓雨, 王美慧, 等. 五味子糖浆原药材、中间体及成品的 HPLC 指纹图谱相关性研究 [J]. 中草药, 2016, 47 (17): 3032-3038.
 [8] 张建平, 杨非凡, 任杰, 等. 基于指纹图谱、含量测定及多元统计分析的银花感冒颗粒质量评价研究 [J]. 中南药学, 2023, 21 (7): 1926-1930.
 [9] 王隆隆, 贾庆涵, 袁会莹, 等. 芪苓益肾颗粒传统制备方法方法与配方颗粒的指纹图谱差异性研究 [J]. 中南药学, 2022, 20 (1): 39-44.
 [10] 吴孟霏, 李春玲, 任河, 等. 不同产地红花指纹图谱建立及其抗氧化活性研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2021, 52 (1): 123-128.
 [11] 张亚莉, 李宗金, 朱丽丽, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的木瓜饮片及其混伪品的鉴别 [J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34 (6): 41-45.
 [12] 薛靛嫣, 高颖, 胡剑虹. 木瓜配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 海峡药学, 2019, 31 (8): 65-67.
 [13] 陈良妮, 程雪梅, 王琳, 等. HPLC 指纹图谱结合模式识别分析评价风湿骨痛胶囊的批间一致性 [J]. 中成药, 2021, 43 (12): 3446-3449.
 [14] 黄家钰, 王玉丽, 李婷, 等. 木瓜的化学成分、药理作用及加工利用研究进展 [J]. 中南农业科技, 2023, 44 (1): 241-245, 253.
 [15] 杨亚焱, 王瑞, 钱程程, 等. 乌梅化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测 [J]. 中成药, 2023, 45 (5): 1583-1588.

(收稿日期: 2023-06-08; 修回日期: 2023-07-20)

高效液相色谱法同时测定桂芍镇痫片中 13 种成分的含量

崔小丽, 孙宁, 赵瑞, 蒋锋, 张强, 贾瑞华* (陕西省人民医院神经内一科, 西安 710068)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定桂芍镇痫片中的 13 种成分的含量, 并结合主成分分析与聚类分析对其进行质量评价研究。方法 采用 Shim-pack Scepter C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱, 乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm; 柱温 30℃, 进样量 10 μL。结果 没食子酸、羟基芍药苷、没食子酸甲酯、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、黄芩苷、桂皮酸、汉黄芩苷、苯甲酰芍药苷、黄芩素、甘草酸、汉黄芩素的质量浓度分别在 2.36~235.59、4.10~409.64、1.84~184.04、1.41~140.53、2.65~265.19、1.91~191.10、0.85~85.46、1.59~159.05、0.74~74.19、0.83~83.40、1.06~105.64、6.92~691.88、0.98~97.51 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好 ($r > 0.9990$); 13 种成分的平均回收率均在 95%~102%, 其 RSD 均 < 2%。10 批样品聚为 2 类, 前 3 个主成分累计贡献率达 89.297%。结论 该方法操作简便、稳定可靠、重复性好, 可作为桂芍镇痫片质量控制方法, 并为其临床应用提供科学依据。

关键词: 桂芍镇痫片; 高效液相色谱; 活性成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3024-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.034

基金项目: 陕西省人民医院 2022 年科技人才支持计划 (No.2022JY-61)。

作者简介: 崔小丽, 女, 副主任医师, 主要从事癫痫重症疾病方面的研究, email: lili6416669@126.com *通信作者: 贾瑞华, 男, 主治医师, 主要从事癫痫方面的研究, email: jiarh8@163.com

Simultaneous determination of 13 components in Guishao Zhenxian tablets by HPLC

CUI Xiao-li, SUN Ning, ZHAO Rui, JIANG Feng, ZHANG Qiang, JIA Rui-hua* (First Department of Neurology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of 13 components (gallic acid, hydroxypaeoniflorin, methyl gallate, albiflorin, paeoniflorin, gallic peoniflorin, baicalin, cinnamic acid, wogonoside, benzoyl paeoniflorin, baicalein, glycyrrhizic acid, and wogonin) in Guishao Zhenxian tablets, and to evaluate the quality of the product by principal component analysis and cluster analysis. **Methods** A Shim-pack Scepter C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for HPLC, with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase in gradient elution at 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** Gallic acid, hydroxypaeoniflorin, methyl gallate, albiflorin, paeoniflorin, gallic peoniflorin, baicalin, cinnamic acid, wogonoside, benzoyl paeoniflorin, baicalein, glycyrrhizic acid, and wogonin showed good linearity at 2.36 ~ 235.59, 4.10 ~ 409.64, 1.84 ~ 184.04, 1.41 ~ 140.53, 2.65 ~ 265.19, 1.91 ~ 191.10, 0.85 ~ 85.46, 1.59 ~ 159.05, 0.74 ~ 74.19, 0.83 ~ 83.40, 1.06 ~ 105.64, 6.92 ~ 691.88, and 0.98 ~ 97.51 μg·mL⁻¹, respectively (*r* > 0.9990). The average recoveries were at 95% ~ 102%, with the *RSD* less than 2%. The 10 batches of samples were grouped into two categories, and the cumulative contribution rate of the first three principal components reached 89.297%. **Conclusion** The method is simple, stable, reliable and reproducible, which can be used for the quality evaluation of Guishao Zhenxian tablets, and provides scientific basis for its clinical application.

Key words: Guishao Zhenxian tablet; HPLC; active component

桂芍镇痫片收载于 2020 年版《中国药典》一部的中药复方制剂, 由桂枝、白芍、党参、半夏(制)、柴胡、黄芩、甘草、生姜、大枣 9 味药组成, 用于治疗各种发作类型的癫痫^[1]。研究报道桂芍镇痫片具有较好的临床疗效^[2-5], 本品中柴胡皂苷、人参皂苷、芍药苷等成分的含量已有研究报道^[6-8]。本制剂由全部药材水提后浓缩、制粒、干燥等工艺制成^[1]。目前未见采用高效液相色谱(HPLC)法同时分析该制剂中 13 个成分即没食子酸、羟基芍药苷、没食子酸甲酯、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、黄芩苷、桂皮酸、汉黄芩苷、苯甲酰芍药苷、黄芩素、甘草酸、汉黄芩素等的研究报道, 而这些成分具有不同药理作用如抗菌、消炎、镇痛、神经保护等^[9-14]。因此笔者采用 HPLC 法测定桂芍镇痫片中的活性成分, 并进行主成分分析与聚类分析。

1 材料

1.1 仪器

SPD-M10Avp 二极管阵列检测器高效液相色谱仪(日本岛津公司); BILON6-180C 型台式数控超声波清洗器(上海比朗仪器制造有限公司); EX1205 型电子分析天平(上海赞维衡器有限公司)。

1.2 试药

乙腈、甲醇(HPLC 级, 美国 Honeywell 公司); 纯净水(杭州娃哈哈启力营养食品有限公司); 其余试剂为分析纯。对照品: 没食子酰芍药苷(批号: HG003027)、黄芩苷(批号: RG158H8)、桂皮酸(批号: HA062811)、没食子酸(批号: HG230820)、没食子酸甲酯(批号: HA063031)、羟基芍药苷(批号: HO003023)、汉黄芩苷(批号: HW158601)、芍药苷(批号: HP003024)、芍药内酯苷(批号: HA003021)、甘草酸(批号: HG042714)、苯甲酰芍药苷(批号: HB003022)、汉黄芩素(批号: HW158604)、黄芩素(批号: RG158H2)(纯度均 ≥ 98%, 宝鸡晨光生物科技有限公司); 桂芍镇痫片[规格: 0.35 g/片, 批号: 220905(S1)、221106(S2)、230102(S3), 陕西君碧莎制药有限公司; 规格: 0.3 g/片, 批号: 221104(S4)、221105(S5), 通化金马药业集团股份有限公司; 规格: 0.3 g/片, 批号: 221012(S6)、221013(S7), 上海和黄药业有限公司; 规格: 0.3 g/片, 批号: 221208(S8)、221209(S9), 吉林省天泰药业股份有限公司; 规格: 0.32 g/片, 批号:

220904 (S10), 长春海外制药集团有限公司]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shim-packed Scepter C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 3%→8%A; 5~30 min, 8%→20%A; 30~42 min, 20%→21%A; 42~49 min, 21%→25%A; 49~100 min, 25%→60%A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30℃; 检测波长 230 nm; 进样量 10 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取对照品没食子酸 12.02 mg、没食子酸甲酯 9.39 mg、芍药苷 13.53 mg、没食子酰芍药苷 9.75 mg 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度即为溶液 I; 精密称取对照品甘草酸 12.12 mg、羟基芍药苷 8.26 mg 于 2 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度即为溶液 II; 分别精密称取对照品芍药内酯苷 14.34 mg、桂皮酸 16.23 mg、苯甲酰芍药苷 8.51 mg、黄芩苷 8.72 mg、汉黄芩苷 7.57 mg、黄芩素 10.78 mg、汉黄芩素 9.95 mg 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度即为溶液 III; 再分别精密量取 1 mL 溶液 I、II、III 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 即得 13 种对照品的混合溶液, 质量浓度依次为没食子酸 235.59 μg·mL⁻¹、羟基芍药苷 409.64 μg·mL⁻¹、没食子酸甲酯 184.04 μg·mL⁻¹、芍药

内酯苷 140.53 μg·mL⁻¹、芍药苷 265.19 μg·mL⁻¹、没食子酰芍药苷 191.10 μg·mL⁻¹、黄芩苷 85.46 μg·mL⁻¹、桂皮酸 159.05 μg·mL⁻¹、汉黄芩苷 74.19 μg·mL⁻¹、苯甲酰芍药苷 83.40 μg·mL⁻¹、黄芩素 105.64 μg·mL⁻¹、甘草酸 691.88 μg·mL⁻¹、汉黄芩素 97.51 μg·mL⁻¹, 作为对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 10 片, 除去薄膜衣, 研细, 称取 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 100 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 45 min, 放冷, 再称定重量, 用 75% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按处方比例^[1]分别制成缺白芍, 缺黄芩, 缺桂枝, 缺甘草及缺党参、红枣和生姜样品, 再按“2.3”项下方法, 制备阴性样品溶液; 另取空白辅料制备空白辅料溶液。

2.5 线性关系考察

分别精密量取储备液 0.01、0.05、0.25、0.50、1.00 mL 置于各 1 mL 量瓶中, 分别加甲醇定容, 混匀, 即得系列混合对照溶液。进样测定, 以各对照品的质量浓度 (μg·mL⁻¹) 为横坐标 (x), 峰面积值为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得回归方程、线性范围及相关系数 (r) 见表 1。结果表明, 13 种对照品在相应质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表 1 各化合物的线性关系、精密度、稳定性、重复性及加样回收率试验结果

Tab 1 Linear relationship, precision, stability, repeatability, and sample recovery of each compound

化合物	线性关系			RSD/%			加样回收率/%	
	线性方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	精密度	稳定性	重复性	平均值	RSD
没食子酸	$y = 2.16 \times 10^4 x + 6.62 \times 10^3$	0.9998	2.36 ~ 235.59	1.1	0.77	1.2	99.55	1.8
羟基芍药苷	$y = 2.50 \times 10^3 x + 1.26 \times 10^3$	0.9998	4.10 ~ 409.64	1.8	1.4	1.3	98.61	1.0
没食子酸甲酯	$y = 1.88 \times 10^4 x + 890$	0.9995	1.84 ~ 184.04	1.7	1.6	1.1	98.76	1.1
芍药内酯苷	$y = 1.06 \times 10^4 x + 572$	0.9998	1.41 ~ 140.53	1.6	1.7	1.8	98.09	1.2
芍药苷	$y = 1.07 \times 10^4 x + 9.95 \times 10^3$	0.9998	2.65 ~ 265.19	1.1	1.1	0.45	98.06	0.58
没食子酰芍药苷	$y = 1.14 \times 10^4 x + 1.83 \times 10^3$	0.9997	1.91 ~ 191.10	1.4	1.4	1.4	98.78	1.3
黄芩苷	$y = 1.39 \times 10^4 x + 2.62 \times 10^3$	0.9996	0.85 ~ 85.46	1.5	1.5	1.4	98.39	1.6
桂皮酸	$y = 1.14 \times 10^4 x + 1.06 \times 10^3$	0.9999	1.59 ~ 159.05	1.5	1.5	1.7	99.29	1.2
汉黄芩苷	$y = 1.59 \times 10^4 x + 5.94$	0.9998	0.74 ~ 74.19	1.9	1.7	1.7	98.23	1.7
苯甲酰芍药苷	$y = 2.50 \times 10^4 x + 627$	0.9995	0.83 ~ 83.40	1.7	1.7	1.3	98.33	1.0
黄芩素	$y = 2.46 \times 10^4 x + 4.31 \times 10^3$	0.9998	1.06 ~ 105.64	1.6	1.8	1.7	98.03	0.75
甘草酸	$y = 1.47 \times 10^3 x - 721$	0.9999	6.92 ~ 691.88	1.5	1.5	1.4	99.73	1.3
汉黄芩素	$y = 2.21 \times 10^4 x + 4.30 \times 10^3$	0.9997	0.98 ~ 97.51	1.7	1.7	1.9	99.46	1.1

2.6 专属性试验

分别精密量取混合对照溶液、供试品溶液、各阴性样品溶液及空白辅料溶液各 10 μL 进样, 分别记录色谱图。结果见图 1, 阴性样品无干扰,

方法专属性强。

2.7 精密度试验

精密吸取上述供试品溶液 (批号: 220905), 重复进样 6 次, 测定各成分峰面积, 计算其

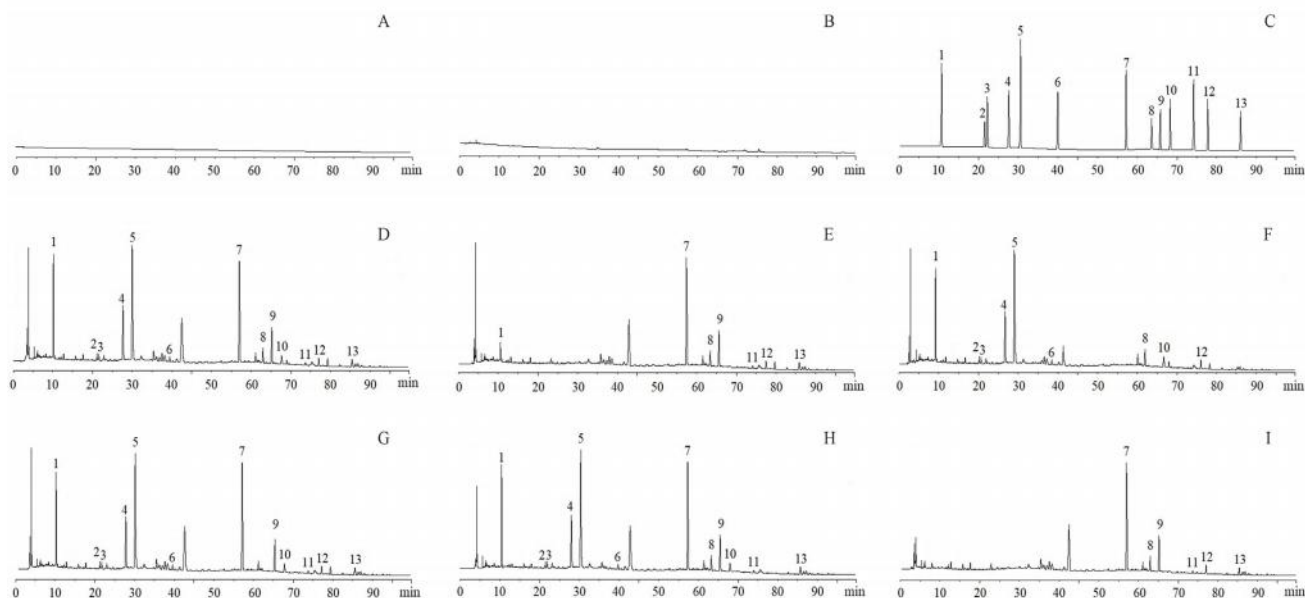


图 1 空白对照、混合对照、供试品与阴性样品 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of blank control, mixed control, test samples and negative samples

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 空白辅料 (blank excipient); C. 混合对照品 (mixed reference); D. 桂芍镇痫片样品 (sample of Guizhao Zhenxian tablets); E. 缺白芍样品 (negative sample without paeony); F. 缺黄芩样品 (negative sample without scutellaria scutellaria); G. 缺桂枝样品 (negative sample without cassia branch); H. 缺甘草样品 (negative sample without licorice); I. 缺白芍、党参、红枣、生姜样品 (negative sample without paeony, codonopsis, red dates and ginger); 1. 没食子酸 (gallic acid); 2. 羟基芍药苷 (hydroxypaeoniflorin); 3. 没食子酸甲酯 (methyl gallate); 4. 芍药内酯苷 (albiflorin); 5. 芍药苷 (paeoniflorin); 6. 没食子酰芍药苷 (gallic paeoniflorin); 7. 黄芩苷 (baicalin); 8. 桂皮酸 (cinnamic acid); 9. 汉黄芩苷 (wogonoside); 10. 苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin); 11. 黄芩素 (baicalein); 12. 甘草酸 (glycyrrhizic acid); 13. 汉黄芩素 (wogonin)

RSD。结果见表 1, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密吸取上述供试品溶液 (批号: 220905), 在第 0、3、6、9、16、24 h 进样, 测定各成分峰面积, 计算其 RSD。结果见表 1, 表明该溶液在 24 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取本品 (批号: 220905) 内容物 1 g, 精密称定, 共 6 份, 分别按“2.3”项下方法制备供试品, 进样测定各成分峰面积, 计算其含量的 RSD。结果见表 1, 表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收试验

取本品 (批号: 220905) 内容物 0.5 g, 精密称定, 共 6 份, 添加对照品 (没食子酸 1.510 mg、羟基芍药苷 1.060 mg、没食子酸甲酯 0.086 mg、芍药内酯苷 3.540 mg、芍药苷 8.570 mg、没食子酰芍药苷 0.530 mg、黄芩苷 3.480 mg、桂皮酸 1.550 mg、汉黄芩苷 0.044 mg、苯甲酰芍药苷 0.440 mg、黄芩素 0.084 mg、甘草酸 2.640 mg、汉黄芩素 0.190 mg), 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各成分的平均回收率及其 RSD。结果见表 1, 表明该方法回收率良好。

2.11 含量测定

精密称取 10 批样品, 分别按“2.3”项下方法制备供试品, 进样测定。结果见表 2。

2.12 聚类分析

以表 2 中 10 批样品各成分含量为变量, 运用 SPSS 26.0 软件, 以 10 批次桂芍镇痫片 13 种功效成分的含量为数据样本, 采用组间联接法, 以欧氏距离为测度, 进行系统聚类分析, 结果见图 2。依据聚类分析树状图, 当类间距离为 10 时, 10 批样品可聚为两类, S1~S5、S7~S10 为第 I 类, S6 为第 II 类; 结果显示桂芍镇痫片中所测 13 种成分的含量差异可能与桂芍镇痫片生产所用原药材的种属来源、产地、生长年限、采收季节及加工炮制方式等因素有关。

2.13 主成分分析

以表 3 中 10 批样品各成分含量为变量, 采用 SPSS 26.0 软件对 10 批次桂芍镇痫片中 13 种成分进行主成分分析, 主成分特征值和方差贡献率见表 3, 初始因子载荷矩阵见表 4。由表 3 可知, 以累积方差贡献率 > 87%, 初始特征值 > 1 为提取标准, 前 3 个主成分初始特征值分别为: 5.658、3.655、2.296, 对应方差贡献率分别为 43.523%、28.115%、17.659%。由表 4 可知: 苯甲酰芍药苷、黄芩苷、芍药内酯苷、芍药苷、汉黄芩苷、没食

表 2 10 批桂芍镇痫片中 13 种成分含量测定结果 (mg·g⁻¹)

Tab 2 Content of 13 components in 10 batches of Guishao Zhenxian tablets (mg·g⁻¹)

编号	没食子酸	羟基芍药苷	没食子酸甲酯	芍药内酯苷	芍药苷	没食子酰芍药苷	黄芩苷	桂皮酸	汉黄芩苷	苯甲酰芍药苷	黄芩素	甘草酸	汉黄芩素
S1	2.87	2.10	0.16	6.75	16.32	1.04	6.62	2.93	0.08	0.83	0.16	5.04	0.35
S2	2.83	2.04	0.16	6.92	16.50	0.97	6.69	2.96	0.08	0.84	0.17	5.12	0.36
S3	2.92	1.94	0.17	6.72	16.35	1.04	6.73	2.99	0.08	0.85	0.16	5.20	0.35
S4	2.83	2.02	0.16	6.79	16.35	1.04	6.63	2.91	0.08	0.83	0.17	5.00	0.34
S5	2.92	1.95	0.17	6.91	16.41	1.04	6.78	2.98	0.09	0.84	0.17	5.07	0.36
S6	3.01	2.10	0.17	6.57	16.18	0.92	6.10	2.93	0.08	0.79	0.16	5.48	0.36
S7	2.85	2.15	0.17	6.73	16.33	0.99	6.53	2.86	0.08	0.82	0.15	4.92	0.34
S8	2.84	2.04	0.16	6.92	16.53	0.97	6.70	2.96	0.08	0.84	0.17	5.09	0.36
S9	2.92	1.94	0.17	6.72	16.36	1.04	6.74	2.99	0.08	0.85	0.16	5.09	0.36
S10	2.83	2.02	0.16	6.79	16.35	1.04	6.63	2.91	0.08	0.83	0.17	5.02	0.34

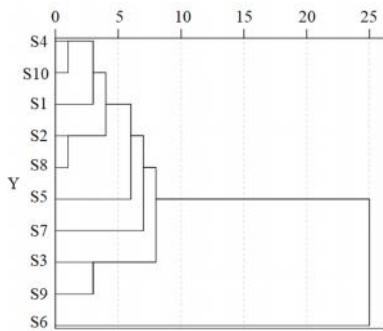


图 2 10 批桂芍镇痫片聚类分析树状图

Fig 2 Cluster analysis of 10 batches of Guishao Zhenxian tablets

子酰芍药苷、黄芩素对主成分 1 贡献率高, 没食子酸、汉黄芩素、桂皮酸、甘草酸、没食子酸甲酯对主成分 2 贡献率高, 黄芩素、汉黄芩素、芍药内酯苷、芍药苷、羟基芍药苷、汉黄芩苷、甘草酸对主成分 3 贡献率显著。各成分与特征值的关系可通过 PCA 碎石图表示, 见图 3。

3 讨论

3.1 HPLC 方法分析

采用全波长对桂芍镇痫片样品进行测定, 各成分的最大吸收分别在 220 ~ 322 nm, 综合分

表 3 主成分方差分析

Tab 3 Analysis of variance for PCA

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%	合计	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%
1	5.658	43.523	43.523	5.658	43.523	43.523
2	3.655	28.115	71.638	3.655	28.115	71.638
3	2.296	17.659	89.297	2.296	17.659	89.297
4	0.747	5.743	95.040			
5	0.467	3.594	98.634			
6	0.157	1.208	99.842			
7	0.020	0.151	99.992			
8	0.001	0.008	100.000			
9	1.514 × 10 ⁻⁷	1.165 × 10 ⁻⁶	100.000			
10	4.065 × 10 ⁻¹⁶	3.127 × 10 ⁻¹⁵	100.000			
11	1.171 × 10 ⁻¹⁶	9.012 × 10 ⁻¹⁶	100.000			
12	1.435 × 10 ⁻¹⁷	1.104 × 10 ⁻¹⁶	100.000			
13	-1.631 × 10 ⁻¹⁶	-1.254 × 10 ⁻¹⁵	100.000			

析结果在 230 nm 时分离度与柱效较为理想, 故将其作为 HPLC 测定 13 种成分的检测波长。采用梯度洗脱的方法, 对不同品牌的色谱柱 (Shim-pack Scepter C₁₈、Intersil C₁₈、Kromasil C₁₈) 与规格 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm、250 × 4.6 mm, 5 μm) 进行了比较, 结果采用 Shim-pack Scepter C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 时各目标峰分离度较为理想; 根据文献^[1]选择乙腈-1.0 mg · L⁻¹ 磷酸水溶液流动相系统等, 比较不同柱温 (25、30、35 °C)、不

同流速 (0.6、0.8、1.0 mL · min⁻¹), 结果柱温为 30 °C、流速为 1.0 mL · min⁻¹ 时分离度与柱效较为理想, 故将此条件作为检测色谱条件。在专属性试验中, 芍药含有羟基芍药苷、没食子酸甲酯、芍药内酯苷、芍药苷、没食子酰芍药苷、苯甲酰芍药苷^[13-14]; 桂枝中含有桂皮酸^[10]; 甘草中含有甘草酸^[12, 15]; 黄芩中含有黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素^[11]; 党参、红枣、生姜、白芍均含没食子酸^[13-14, 16-18], 制备阴性样品时需要相应减去。

表 4 初始因子载荷矩阵

Tab 4 Initial factor load matrix

成分	主成分		
	1	2	3
苯甲酰芍药苷	0.958	0.053	-0.071
黄芩苷	0.956	-0.162	-0.196
芍药内酯苷	0.824	-0.229	0.430
芍药苷	0.801	-0.169	0.482
羟基芍药苷	-0.707	-0.524	0.264
汉黄芩苷	0.649	0.387	-0.537
没食子酰芍药苷	0.632	-0.227	-0.623
黄芩素	0.602	0.309	0.579
没食子酸	-0.465	0.849	-0.207
汉黄芩素	0.160	0.802	0.553
桂皮酸	0.571	0.789	0.048
甘草酸	-0.503	0.785	0.279
没食子酸甲酯	-0.042	0.608	-0.571

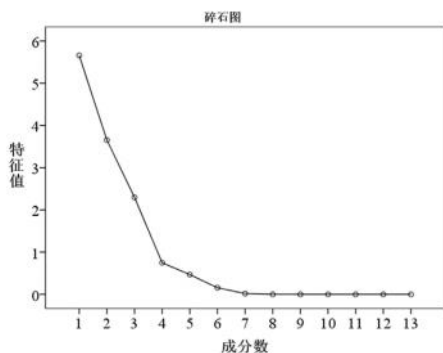


图 3 样品 PCA 碎石图

Fig 3 PCA scree plot of various samples

3.2 主成分与聚类分析

通过对桂芍镇痫片中所测 13 种成分的含量聚类分析,分为两大类,含量差异可能与桂芍镇痫片生产所用原药材的种属来源、产地、生长年限、采收季节及加工炮制方式等因素有关。主成分分析显示,前 3 个主成分基本可反映各成分全部信息,能以其对样品质量进行控制,其中主成分 1 主要反映苯甲酰芍药苷、黄芩苷、芍药内酯苷、芍药苷、汉黄芩苷、没食子酰芍药苷、黄芩素含有量信息,主成分 2 主要反映没食子酸、汉黄芩素、桂皮酸、甘草酸、没食子酸甲酯含有量信息,主成分 3 主要反映黄芩素、汉黄芩素、芍药内酯苷、芍药苷、羟基芍药苷、汉黄芩苷、甘草酸含有量信息。

本研究建立了桂芍镇痫片的 13 种成分 HPLC 含量测定方法,该方法专属性强、操作简单、易于实施、准确稳定且重复性好,因此该方法可作为桂芍镇痫片质量控制方法;13 种成分的定量也为临床用药提供了科学依据,也为体内药代动力学的研究奠定了基础。本品为中药复方制剂,成

分复杂,后续研究将通过液质联用作进一步分析。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 1433.
- [2] 马婷. 桂芍镇痫片联合左乙拉西坦治疗癫痫的疗效及对血清炎症因子的影响[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(10): 1632-1634.
- [3] 徐琴. 桂芍镇痫片联合卡马西平片对癫痫患者认知功能及血清 NSE、S100 β 水平的影响[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2021, 5(4): 108-110.
- [4] 连新生, 孙思胜, 申金星, 等. 桂芍镇痫片联合丙戊酸钠治疗小儿癫痫的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(7): 1377-1380.
- [5] 张小红, 张淑琴, 吴丹, 等. 桂芍镇痫片联合卡马西平治疗癫痫的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(12): 3139-3142.
- [6] 高森, 白雪, 文柳静, 等. 基于一测多评法桂芍镇痫片中 8 种成分定量质量控制研究[J]. 中草药, 2018, 49(12): 2883-2889.
- [7] 管清香, 岳峻威, 刘昕, 等. 桂芍镇痫片质量标准研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(1): 56-57.
- [8] 刘献洋, 蒋道英, 侯佳伟, 等. HPLC 测定桂芍镇痫片中芍药苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(4): 630-632.
- [9] 肖垚垚, 朱菁, 刘心雨, 等. 芍药甘草汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(24): 7960-7969.
- [10] 陈洁莹, 陈琏, 张煜帆, 等. HPLC 法同时测定桂枝散结丸中桂皮醛和肉桂酸的含量[J]. 实验与检验医学, 2022, 40(4): 474-476.
- [11] 王云, 陈影, 黄琪, 等. 基于一测多评法研究黄芩酒炙前后 12 个黄酮类成分的含量变化[J]. 世界中医药, 2022, 17(9): 1233-1239, 1245.
- [12] 许小芳, 鲍明敏, 张秀娟. HPLC 法测定当归调经颗粒中阿魏酸、甘草苷和芍药苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(5): 666-669.
- [13] 梁伟龙, 林钦贤, 王斌, 等. 地道与非道地产区白芍药材质量的比较[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(24): 3000-3004.
- [14] 林秀敏, 张振凌, 王胜超, 等. 白芍饮片的 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[J]. 中国药房, 2019, 30(24): 3375-3382.
- [15] 钟文峰, 张兰兰, 胡懿, 等. 甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱相关性研究[J]. 中南药学, 2022, 20(9): 2123-2128.
- [16] 李子璇, 李勇, 罗超, 等. 高效液相对不同厂家十八味党参丸中党参炔苷及没食子酸水平的检测研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(20): 2809-2811.
- [17] 张向前, 陈宗礼, 杨选文, 等. 陕北红枣中酚类物质的紫外光谱分析[J]. 国农学报, 2010, 26(24): 83-88.
- [18] 刘军萍, 黄德春, 陈贵堂. 不同产地生姜营养成分分析及生姜多糖性质研究[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(9): 35-40.

(收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-05-03)

骨髓炎颗粒 HPLC 指纹图谱及一测多评法测定 7 种成分含量

徐倩¹, 陆美霞², 周亚萍¹, 陈志唯², 叶喜德^{2*} (1. 南昌市洪都中医院, 南昌 330008; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

摘要: **目的** 建立骨髓炎颗粒的 HPLC 指纹图谱及一测多评法 (QAMS) 测定骨髓炎颗粒中绿原酸、连翘酯苷、芦丁、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷、党参炔苷等 7 种主要成分的含量。**方法** 采用 Diamonsil-C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 4 μm), 以乙腈-0.1% 的磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 280 nm, 建立骨髓炎颗粒 HPLC 指纹图谱与测定绿原酸、连翘酯苷、芦丁、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷、党参炔苷等 7 种主要成分含量。**结果** 10 批样品共标定了 26 个共有峰, 指认了 7 个峰, 相似度均大于 0.995。以黄芩苷为内参物, 分别建立绿原酸、芦丁、连翘酯苷、黄芩素、汉黄芩苷、党参炔苷的相对校正因子分别为 2.3131、4.1377、2.1300、0.7248、1.9161、8.1718; 其校正因子在不同色谱条件下的 RSD 均小于 2%。该 6 种成分含量用外标法进行测定, 与 QAMS 法比较成分含量结果无明显差异。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱及 7 种成分 QAMS 法, 科学合理、简便易行, 可用于骨髓炎颗粒中有效成分含量的测定, 为深入研究其质量标准奠定基础。

关键词: 骨髓炎颗粒; 指纹图谱; 相对校正因子; 一测多评; 外标法; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3030-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.035

HPLC fingerprint of osteomyelitis granules and the content of 7 components by QAMS

XU Qian¹, LU Mei-xia², ZHOU Ya-ping¹, CHEN Zhi-wei², YE Xi-de^{2*} (1. Nanchang Hongdu Hospital of TCM, Nanchang 330008; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of osteomyelitis granules and determine the contents of chlorogenic acid, forsythiaside, rutin, baicalein, baicalin, wogonoside and lobetyolin in osteomyelitis granules by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS). **Methods** Diamonsil-C18 (150 mm×4.6 mm, 4 μm) column was used, acetonitrile-0.1% phosphoric acid was used as mobile phase, gradient elution was performed, the volume flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C and the detection wavelength was 280 nm. **Results** Totally 26 common peaks were identified in 10 batches of samples, and 7 peaks were identified, with the similarity greater than 0.995. Using baicalin as internal reference, the relative correction factors of chlorogenic acid, rutin, forsythiaside, baicalein, wogonin side and lobetyolin were 2.3131, 4.1377, 2.1300, 0.7248, 1.9161 and 8.1718, respectively. The RSD of the correction factor under different chromatographic conditions was less than 2%. The contents of the 6 components were determined by external standard method, and there was no obvious difference compared with that of QAMS method. **Conclusion** The HPLC fingerprint and 7 components QAMS method of osteomyelitis granules have been established. The method is scientific, reasonable, simple and accurate, and can be used for the content determination of components in osteomyelitis granules, lay a foundation for further study of

基金项目: 江西省中医药管理局科技计划项目 (No.2020A0353); 江西省中医药管理局科技计划重点项目 (No.2022Z010)。

作者简介: 徐倩, 女, 副主任药师, 主要从事中药制剂研究, email: 10731972@qq.com ***通信作者:** 叶喜德, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药质量标准研究, email: 552376722@qq.com

the quality standard of its quality standards.

Key words: osteomyelitis granules; fingerprint; relative correction factor; multi-components by single marker; external standard method; content determination

骨髓炎是骨科急症中较难治愈的病证之一,其病机复杂,病程长。目前临床主要采用抗菌药物抗炎、手术清创等治疗,但疗程长、肝肾毒性大、易产生耐药性等。而中药复方制剂,具药物多靶点、疗效高、毒副作用小等优点,日益成为当前研究的焦点。如五味消毒饮(金银花、野菊花、蒲公英、紫背天葵、紫花地丁)联合手术治疗慢性胫骨骨髓炎可降低复发率,且可减少长期使用抗菌药物致菌群紊乱带来的副作用^[1]。研究表明,中药复方制剂联合抗菌药物治疗创伤性骨髓炎,较单纯使用抗菌药物疗效好^[2]。显然,采用中药复方干预,可有效提高骨髓炎的治疗效果。

由南昌市洪都中医院名老中医多年的临床经验,以金银花、十大功劳、黄芪、大黄、黄芩、连翘、白花蛇舌草、淮牛膝、川芎、生地、党参、红花、白芷等 13 味药材制备的骨髓炎颗粒,可用于治各种急慢性骨髓炎。方以金银花、连翘、白芷为君药,具清热解毒、消肿散结之功;以大黄、黄芩、白花蛇舌草为臣药而发挥活血化瘀之效;佐以淮牛膝、川芎、红花等发挥整体药效。药效研究表明,金银花、连翘中绿原酸和芦丁,有抗菌、抗病毒、抗氧化和抗炎等作用^[3-4];黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和党参炔苷常作为黄芩和党参的指标性成分^[5-6]。这些活性成分经配伍后可产生协同作用而对骨髓炎有效。为优化该制剂质量,本研究选择绿原酸、连翘酯苷、芦丁、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、党参炔苷等各组方中的主要有效活性成分为质量评价指标,采用 HPLC 法,建立骨髓炎颗粒 HPLC 指纹图谱及多种含量测定方法,以便为骨髓炎颗粒的质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), KQ-500E 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司), FA1004N 万分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试药

芦丁(批号: wkq20030203, 纯度: 98%), 黄芩素(批号: wkq21030203, 纯度: 98%)、汉黄芩苷(批号: wkq20040108, 纯度: 98%)(四川省维克奇生物科技有限公司); 连翘酯苷(批号:

CHB201203, 纯度: 98%)(成都克洛玛生物科技有限公司), 党参炔苷(批号: MUST-20061010, 纯度: 98%)、黄芩苷(批号: 110756-200110, 纯度: 98%)、绿原酸(批号: 110753-200413, 纯度: 98%)(中国食品药品检定研究院)。乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯(西陇科学股份有限公司)。纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

骨髓炎颗粒(批号: 20220410 ~ 20220420, 编号为 S1 ~ S10, 南昌市洪都中医院)。白花蛇舌草(产地: 江西, 批号: 2102019064)、白芷(产地: 安徽, 批号: 2106018140)、大黄(产地: 甘肃, 批号: 2104018069)、黄芪(产地: 内蒙古, 批号: 2103018113)、连翘(产地: 山西, 批号: 2105013057)、川芎(产地: 四川, 批号: 2108018023)、淮牛膝(产地: 河南, 批号: 2104015045)、金银花(产地: 河北, 批号: 21070130134)、十大功劳(产地: 广西, 批号: 2105018087)、黄芩(产地: 山东, 批号: 2105014123)、生地(产地: 河南, 批号: 2106015238)、党参(产地: 云南, 批号: 2107013067)、红花(产地: 新疆, 批号: 2104014157)均购于安徽省亳州中药饮片有限公司, 经江西中医药大学中药鉴定教研室刘应蛟副教授鉴定均为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil-C18 (150 mm×4.6 mm, 4 μm), 进样量为 10 μL, 检测波长为 280 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸(B), 梯度洗脱(0~5 min, 5%~10%A, 5~10 min, 10%~15%A; 10~15 min, 15%~23%A; 15~20 min, 23%~25%A; 20~25 min, 25%~30%A; 25~30 min, 30%~35%A; 30~40 min, 35%~70%A; 40~42 min, 70%~10%A)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取绿原酸、芦丁、连翘酯苷、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷、党参炔苷对照品适量, 加甲醇定容制成质量浓度分别为 0.64、1.32、0.666、1.335、1.40、0.151、0.86 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液 精密称取骨髓炎颗粒 1.0 g,

放入锥形瓶中,加入 20 mL 50% 乙醇,超声处理 20 min (功率 500 W, 频率 40 kHz), 过滤, 滤液蒸干, 残渣用 70% 甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中, 0.22 μm 滤膜过滤即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按骨髓炎颗粒处方制备工艺, 分别制备缺金银花-连翘、黄芩、党参的阴性骨髓炎颗粒样品, 分别按“2.2.2”项方法操作, 即得。

2.3 处方制备工艺

按处方量称取金银花、十大功劳、黄芪、大黄、黄芩等 13 味药材, 加 10 倍量水, 煎煮 3 次, 每次 1 h, 合并煎液, 过滤, 滤液浓缩至 1.20 ~ 1.30, 加入糊精和糖粉 (浸膏: 糊精: 糖粉比例为 1 : 1.5 : 3.5), 混匀, 以 70% 乙醇作湿润剂, 制成颗粒, 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥, 即得。

2.4 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度考察 精密称取骨髓炎颗粒 (S1) 1.0 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以黄芩苷为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积, 各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 *RSD* 值范围为 0.40% ~ 1.7%, 说明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性考察 精密称取骨髓炎颗粒 (S1) 1.0 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 时, 按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 以黄芩苷为参照峰, 计算得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值为 0.32% ~ 1.2%, 说明在 24 h 内供试品溶液具有良好的稳定性。

2.4.3 重复性考察 精密称取骨髓炎颗粒同一批次 (S1) 骨髓炎颗粒 1.0 g, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以黄芩苷为参照峰, 计算得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值范围 0.56% ~ 1.9%, 说明该方法具有良好的重复性。

2.4.4 指纹图谱的建立及相似度评价 将 10 批样品按“2.2.2”项下方法制备, 在“2.1”项色谱条件下测定, 记录色谱图。将 10 批样品图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版)》, 将 S1 设为参照图谱, 设定漂移时间为 0.1 min, 采用多点校正平均数矢量法, 得骨髓炎颗粒指纹图谱及共有模式, 指纹图谱有 26 个共有峰, 见图 1。

将 10 批次图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版)》, 对指纹图谱进行相似度评价。结果 10 个批次样品的相似度分别

为 0.999、0.997、0.9997、0.996、0.997、0.996、0.996、0.997、0.997、0.999, 均大于 0.995, 表明骨髓炎颗粒各批次间共有成分基本一致。

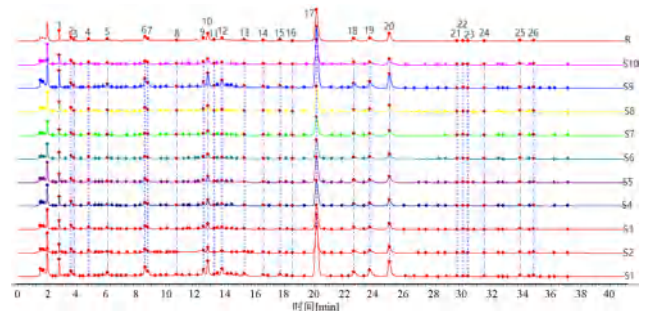


图 1 10 批骨髓炎颗粒 HPLC 指纹图谱 (S1 ~ S10) 和对照指纹图谱 (R)

Fig 1 HPLC fingerprint of 10 batches osteomyelitis granules (S1 ~ S10) and control fingerprint (R)

2.4.5 主要特征峰归属 精密吸取混合对照品溶液 10 μL 进样测定, 色谱图见图 2, 与指纹图谱各主要共有峰进行对比, 确认其中 6 号峰为绿原酸、10 号峰为芦丁、11 号峰为连翘酯苷、16 号峰为党参炔苷、17 号峰为黄芩苷、20 号为汉黄芩苷、22 号为黄芩素。

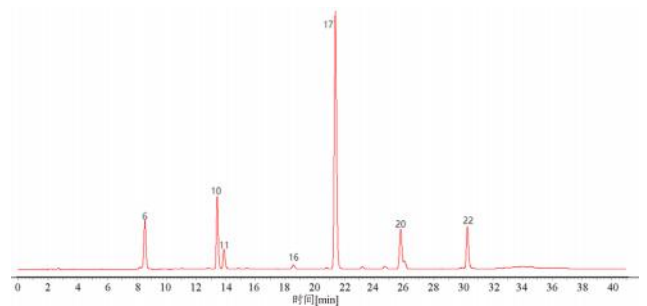


图 2 混合对照品溶液色谱图

Fig 2 Chromatogram of the mixed control solution

6. 绿原酸 (chlorogenic acid); 10. 芦丁 (rutin); 11. 连翘酯苷 (forsythiaside); 16. 党参炔苷 (lobetyolin); 17. 黄芩苷 (baicalin); 20. 汉黄芩苷 (wogonoside); 22. 黄芩素 (baicalein)

2.5 QAMS 测定 7 种成分含量

2.5.1 专属性试验 精密吸取供试品溶液、混合对照品和阴性样品溶液各 10 μL , 根据“2.1”项色谱条件分别进样分析, 结果各成分色谱峰均具有良好分离度, 供试品和对照品色谱保留时间相同, 阴性样品不干扰测定, 见图 3。

2.5.2 线性关系考察 溶液分别精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品 100、200、300、400、500 μL 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 制成不同浓度的混合对照品溶液 I ~ V, 进样测定, 以色谱峰面积 (*Y*) 为纵坐标, 对照品质量浓度 (*X*, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 进行线性回归, 结果见表 1。

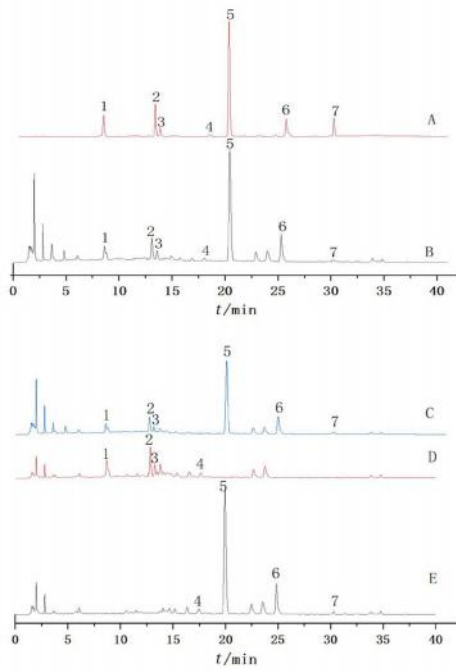


图 3 样品和混合对照品的 HPLC 图

Fig 3 HPLC chromatogram of the samples and the mixed controls

A. 混合对照品 (mixed control); B. 供试品 (test sample); C. 缺党参阴性样品 (negative sample without *Codonopsis pilosula*); D. 缺黄芩阴性样品 (negative sample without *scutellaria baicalensis*); E. 缺金银花-连翘阴性样品 (negative sample without *honeysuckle-forsythia suspensa*); 1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 2. 芦丁 (rutin); 3. 连翘酯苷 (forsythiaside); 4. 党参炔苷 (lobetyolin); 5. 黄芩苷 (baicalin); 6. 汉黄芩苷 (wogonoside); 7. 黄芩素 (baicalin)

表 1 7 种成分的回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linearity for 7 components

化合物	回归方程	R^2	范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
绿原酸	$Y = 8.106 \times 10^3 X + 2.844 \times 10^3$	0.9997	12.80 ~ 64.0
芦丁	$Y = 4.546 \times 10^3 X + 1.946 \times 10^3$	0.9999	26.40 ~ 132.0
连翘酯苷	$Y = 8.854 \times 10^3 X + 993.1$	0.9996	13.32 ~ 66.60
黄芩素	$Y = 2.614 \times 10^4 X - 825$	0.9998	26.70 ~ 133.50
黄芩苷	$Y = 1.879 \times 10^4 X + 9.326 \times 10^3$	0.9996	28.0 ~ 140.0
汉黄芩苷	$Y = 9.883 \times 10^3 X - 8.746$	0.9995	3.02 ~ 15.10
党参炔苷	$Y = 2.305 \times 10^3 X - 563.4$	0.9998	17.20 ~ 86.0

2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.5.2”项下混合对照品溶液 V 10 μL , 连续进样 6 次, 测得绿原酸、芦丁、连翘酯苷、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷和党参炔苷峰面积 RSD 分别为 0.62%、0.37%、0.31%、0.55%、0.42%、0.51%、0.21%, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 精密称取同一批供试品 (S1) 1 g, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备样品, 测得绿原酸、芦丁、连翘酯苷、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷和党参炔苷平均含量分别为 0.2184、1.2572、

0.1972、0.0271、2.1835、0.8805、0.3730 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.87%、0.72%、0.60%、0.70%、0.14%、0.89%、0.47%, 表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 精密称取同一批供试品溶液 (S1) 1 g, 置于室温下, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行测定, 测得绿原酸、芦丁、连翘酯苷、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷和党参炔苷峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.1%、1.3%、1.4%、1.6%、1.7%、0.93%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.5.6 加样回收试验 称取同一批供试品 6 份 (S1), 每份 1 g, 将一定量混合对照品溶液分别精密加入, 按“2.2.2”项下方法制备, 测定并计算加样回收率, 绿原酸、芦丁、连翘酯苷、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷和党参炔苷的回收率分别为 98.1%、100.1%、102.5%、99.8%、99.3%、100.3%、103.6%, RSD 分别为 1.2%、1.1%、0.87%、0.91%、1.4%、0.75%、1.4%。

2.6 相对校正因子 ($f_{s/i}$) 的建立

2.6.1 相对校正因子的计算 精密吸取“2.5.2”项下 5 种不同浓度的混合对照品溶液, 在“2.1”项下色谱条件进样测定, 以黄芩苷为内参物, 根据公式 $f_{s/i} = f_s/f_i = (A_s/C_s) / (A_i/C_i)$ 计算其他 6 种成分校正因子, 其中 A_s 表示内参物的峰面积, C_s 表示内参物的浓度, A_i 表示待测成分 i 的峰面积, C_i 表示待测成分 i 的浓度。结果见表 2。

表 2 黄芩苷对各成分的相对校正因子

Tab 2 Relative correction factors for baicalin for each component

混合对照 品溶液	相对校正因子					
	绿原酸	芦丁	连翘酯苷	黄芩素	汉黄芩苷	党参炔苷
I	2.3443	4.1414	2.1256	0.7281	1.9241	8.2686
II	2.2939	4.1519	2.1418	0.7293	1.9277	8.0819
III	2.3041	4.1501	2.1290	0.7243	1.9123	8.2277
IV	2.2957	4.0883	2.1294	0.7201	1.9134	8.0996
V	2.3275	4.1569	2.1242	0.7224	1.9031	8.1812
平均值	2.3131	4.1377	2.1300	0.7248	1.9161	8.1718
$RSD/\%$	0.95	0.68	0.33	0.53	0.51	0.98

2.6.2 不同仪器和色谱柱的考察 精密吸取“2.5.2”项下混合对照品溶液 V, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 分别采用 Waters Tnature C18 (A)、Diamonsil-C18 (B)、红中谱 RD-C18 色谱柱 (C), 在 Waters 2695 和 Agilent 1260 高效液相色谱仪上进行样品测定, 求算以黄芩苷为内参物, 6 种成分的 $f_{s/i}$ 。结果表明使用不同高效液相色谱仪时的耐用性良好, 见表 3。

2.6.3 不同柱温的考察 精密吸取“2.4.2”项下的混合对照溶液 V, 根据“2.1”项下色谱条件, 在

表 3 不同仪器、色谱柱对校正因子的影响
Tab 3 Effect of different instruments and columns on correction factors

仪器	色谱柱	相对校正因子					
		绿原酸	芦丁	连翘酯苷	黄芩素	汉黄芩苷	党参炔苷
Waters 2695	A	2.3131	4.1331	2.1239	0.7264	1.9174	8.1758
	B	2.2969	4.1183	2.1303	0.7239	1.9078	8.1918
	C	2.3464	4.1294	2.1525	0.7376	1.9339	8.1605
Agilent 1260	A	2.3047	4.0995	2.1541	0.7176	1.9168	8.1525
	B	2.2918	4.1343	2.1368	0.7223	1.8821	8.0476
	C	2.3234	4.2894	2.1896	0.7086	1.8920	8.0801
平均值		2.3127	4.1507	2.1479	0.7228	1.9083	8.1347
RSD/%		0.86	1.7	1.1	1.3	0.98	0.71

柱温分别为 25、30、35 °C 条件下进样测定，考察以黄芩苷为内参物，6 种成分的 $f_{s/i}$ 。结果表明不同柱温对于相对校正因子的影响不显著，见表 4。

表 4 不同柱温对相对校正因子的影响
Tab 4 Effect of different column temperature on the relative correction factors

柱温 / °C	相对校正因子					
	绿原酸	芦丁	连翘酯苷	黄芩素	汉黄芩苷	党参炔苷
25	2.2986	4.1263	2.1718	0.7354	1.9419	8.3124
30	2.3311	4.1546	2.1506	0.7265	1.9218	8.1816
35	2.3287	4.1549	2.1848	0.7343	1.8823	8.1612
平均值	2.3195	4.1453	2.1690	0.7321	1.9153	8.2184
RSD/%	0.78	0.40	0.80	0.66	1.6	1.0

2.7 待测成分色谱峰的定位

以黄芩苷色谱峰为参照，根据公式 $r_{s/i} = t_{Ri} / t_{Rs}$ 分别计算待测成分绿原酸、芦丁、连翘酯苷、黄芩素、汉黄芩苷和党参炔苷的相对保留时间，式中 t_{Rs} 为内参物黄芩苷的保留时间， t_{Ri} 表示待测物的保留时间。结果各个待测成分的相对保留时间波动无显著差异（见表 5）。

表 5 各成分相对保留时间
Tab 5 Relative retention time of each component

仪器	色谱柱	相对保留时间					
		绿原酸	芦丁	连翘酯苷	黄芩素	汉黄芩苷	党参炔苷
Waters 2695	A	2.0537	1.3723	1.3839	0.7643	0.8558	1.0669
	B	2.1082	1.3780	1.3907	0.7655	0.8572	1.0702
	C	2.1025	1.3870	1.3901	0.7638	0.8551	1.0673
Agilent 1260	A	2.1029	1.3733	1.3862	0.7639	0.8553	1.0673
	B	2.0939	1.3708	1.3824	0.7647	0.8557	1.0666
	C	2.1027	1.3744	1.3846	0.7714	0.8587	1.0869
平均值		2.0940	1.3767	1.3868	0.7658	0.8564	1.0717
RSD/%		0.97	0.43	0.25	0.38	0.16	0.74

2.8 QAMS 法与外标法测定结果比较

精密称取 10 批骨髓炎颗粒 (S1 ~ S10)，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色

谱条件下进行测定，记录色谱峰面积，7 种成分含量分别采用 QAMS 法和外标法 (ESM) 计算，并计算 RSD 值，结果见表 6，两种方法所得结果没有明显的差异。

3 讨论

骨髓炎颗粒是以金银花、十大功劳、黄芪、大黄、黄芩、连翘、白花蛇舌草等为主组成，具有质量可控、疗效确切、携带方便等特点。QAMS 是以某种成分为内参物，通过建立成分之间的相对校正因子，然后通过相对校正因子计算其他成分的含量，目的是解决有些中药材标准品制备困难、不稳定、难获得等问题^[7]。为此，本研究通过 QAMS 法同时测定骨髓炎颗粒中 7 种成分，以全面评价骨髓炎颗粒质量，为其深入开发及临床应用提供科学依据。

研究考察了提取溶剂 (70% 甲醇、80% 甲醇、纯甲醇、50% 乙醇、70% 乙醇) 和提取时间 (10、20、30 min) 的影响，发现提取时间对有效成分提取影响较小，但 50% 乙醇影响较大，故选择 50% 乙醇超声提取 20 min。考察甲醇-磷酸、甲醇-甲酸、乙腈-磷酸及乙腈-甲酸等流动相梯度洗脱分离效果，结果发现甲醇-磷酸、甲醇-甲酸、乙腈-甲酸基线不稳定，部分峰杂乱且未完全分离。同时对 0.05% 和 0.1% 磷酸水的溶液进行考察，结果发现 0.1% 磷酸水分离效果更好。考察了 7 种成分分别在 254、264、280、330 nm 波长下的响应值^[8-15]，综合考虑各成分分离度、峰面积、保留时间，最终选择检测波长为 280 nm。

本研究建立了骨髓炎颗粒 HPLC 指纹图谱以及有效成分及指标成分的 QAMS 法。10 批样品指纹图谱共标定了 26 个共有峰，指认了 7 个成分，相似度均大于 0.995，表明骨髓炎颗粒不同批次间质量稳定。处方中黄芩苷含量较大，且为黄芩质量控制成分^[16]，其色谱峰峰形较好，保留时间适中，故选择黄芩苷作为内参物，并建立了绿原酸、芦丁、连翘酯苷、黄芩素、汉黄芩苷和党参炔苷等相对校正因子。结果所测得的相对校正因子，在 2 种不同型号的高效液相色谱仪及 3 种不同色谱柱上耐用性良好，且分别用 QAMS 法和外标法测定 10 批骨髓炎颗粒中 7 个成分含量，结果 QAMS 法与外标法的 RAD 值均小于 3%，两者无明显差异，说明建立的 QAMS 法的准确性，且重复性良好。结果显示 QAMS 法计算含量结果和外标法测定含量结果相差较小，无显著差异，故可利用黄芩苷 1 个对照品，采用相对校正因子计算其他 6 个成分的含量，可为骨髓炎颗粒质量控制研究提供科学依据。

表 6 各批次各成分含量测定结果 (mg · g⁻¹)
Tab 6 Content of each components in each batch (mg · g⁻¹)

批号	绿原酸			芦丁			连翘酯苷		
	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%
S1	0.2146	0.2143	0.11	1.2862	1.2728	0.11	0.2168	0.2171	0.74
S2	0.1889	0.1890	0.04	1.1575	1.1459	0.15	0.1971	0.1975	0.71
S3	0.2139	0.2136	0.11	1.3237	1.3099	0.11	0.2198	0.2201	0.75
S4	0.2395	0.2388	0.23	1.5539	1.5368	0.25	0.1559	0.1565	0.78
S5	0.2473	0.2464	0.26	1.5190	1.5024	0.03	0.2755	0.2757	0.78
S6	0.1895	0.1896	0.04	1.1064	1.0955	0.16	0.1887	0.1892	0.70
S7	0.2082	0.2080	0.08	0.9921	0.9828	0.20	0.1737	0.1742	0.67
S8	0.2132	0.2129	0.10	0.9457	0.9370	0.24	0.1601	0.1606	0.65
S9	0.2425	0.2417	0.24	1.5319	1.5151	0.03	0.2772	0.2773	0.78
S10	0.2211	0.2206	0.14	1.4219	1.4067	0.07	0.2409	0.2412	0.76

批号	黄芩苷		黄芩素		汉黄芩苷			党参炔苷		
	ESM	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%
S1	2.0402	0.0275	0.0269	1.5	0.8852	0.8783	0.11	0.4276	0.4245	0.52
S2	1.8272	0.0261	0.0255	1.6	0.7958	0.7896	0.55	0.3727	0.3703	0.46
S3	2.0989	0.0291	0.0285	1.5	0.9155	0.9084	0.55	0.4418	0.4385	0.53
S4	2.4543	0.0345	0.0338	1.4	1.0687	1.0604	0.55	0.5094	0.5052	0.59
S5	2.3821	0.0337	0.0331	1.4	1.0416	1.0335	0.55	0.5305	0.5260	0.60
S6	1.8284	0.0251	0.0246	1.6	0.8195	0.8131	0.55	0.3857	0.3831	0.48
S7	1.7883	0.0245	0.0240	1.6	0.8075	0.8012	0.55	0.3850	0.3824	0.48
S8	1.8928	0.0198	0.0193	1.9	0.6573	0.6522	0.55	0.2990	0.2975	0.35
S9	2.3945	0.0309	0.0303	1.4	1.0283	1.0203	0.55	0.4990	0.4949	0.58
S10	2.2592	0.0321	0.0314	1.4	0.9792	0.9716	0.55	0.5057	0.5015	0.58

参考文献

[1] 张自强, 于继岗, 祁文兵. 五味消毒饮在成人慢性胫骨骨髓炎治疗中的应用[J]. 陕西中医, 2015, 36 (8): 991-992.

[2] 吴阳. 中药内服外敷结合抗菌药物治疗创伤性骨髓炎的临床疗效[J]. 内蒙古中医药, 2021, 40 (7): 130-131.

[3] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展[J]. 药学学报, 2020, 55 (10): 2273-2280.

[4] 杨诗宇, 宋基正, 杨山景, 等. 芦丁药理作用与新剂型的研究进展[J]. 中国现代应用学, 2022, 39 (10): 1360-1370.

[5] 王云, 陈影, 黄琪, 等. 基于一测多评法研究黄芩酒炙前后 12 个黄酮类成分的含量变化[J]. 世界中医药, 2022, 17 (9): 1233-1239, 1245.

[6] 张文新, 杨翠玲. HPLC 测定黄芩不同部位、不同炮制品中 4 种黄酮类成分的含量[J]. 食品与药品, 2022, 24 (4): 339-343.

[7] 闫艳, 杜晨晖. 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24 (6): 2378-2387.

[8] 陈家仪, 栗建明, 顾利红, 等. 一测多评法同时测定祛痰止咳颗粒中 7 种成分的含量[J]. 药学学报, 2022, 57 (11): 3405-3410.

[9] Hou JJ, Zhang JQ, Yao CL, et al. Deeper chemical perceptions for better traditional Chinese medicine standards [J]. Engineering, 2019, 5 (1): 83-97.

[10] Zhang YB, Da J, Zhang JX, et al. A feasible, economical, and accurate analytical method for simultaneous determination of six alkaloid markers in Aconiti Lateralis Radix Praeparata from different manufacturing sources and processing ways [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2017, 15 (4): 301-309.

[11] 李小阳, 翟小林, 王丹, 等. 基于一测多评法的当归药材质量控制研究[J]. 中草药, 2022, 53 (20): 6354-6360.

[12] 姬翔宇, 张子雯, 陈姿伊, 等. 一测多评法同时测定雷公藤药材及制剂雷公藤多苷片中 7 个质控成分[J]. 中草药, 2022, 53 (17): 5338-5347.

[13] 成铭, 皮文霞, 陆兔林, 等. 党参地上部分的党参炔苷、多糖含量测定及影响因素分析[J]. 中药材, 2020, 43 (5): 1092-1098.

[14] Wang SJ, Li SF, Zhang LW. Optimization of method for determination of Forsythia Fructus and discussion on the establishment of quality control standard for green (old) Forsythia Fructus [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43 (15): 3157-3162.

[15] 任月, 陈晓虎, 李青, 等. 双标多测法在党参 5 个成分含量测定中的应用[J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (6): 1087-1095.

[16] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 168-169.

(收稿日期: 2023-08-11; 修回日期: 2023-09-12)

5 种中成药外治放射性皮炎的网状 meta 分析

杨涛^{1,2}, 郝力争³, 陈健⁴, 马思懿¹, 姜敏^{1,2*} (1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院中医科, 北京 100038; 2. 北京中西医结合肿瘤研究所, 北京 100038; 3. 中国人民解放军空军特色医学中心肿瘤内科, 北京 100142; 4. 中国康复研究中心北京博爱医院中医康复科, 北京 100068)

摘要: **目的** 应用网状 meta 分析对 5 种常用中成药外治放射性皮炎的疗效进行评价。**方法** 计算机检索中国知网 (CNKI)、万方 (Wanfang)、中国生物医学文献服务系统 (SinoMed)、维普 (VIP)、PubMed、Cochrane Library、Embase、Web of Science 等数据库, 搜索有关中成药治疗放射性皮炎的随机对照试验 (RCTs)。采用 Stata 15.1 软件进行网状 meta 分析。**结果** 最终纳入 30 项研究, 共包含 2793 例患者, 网状 meta 分析显示, 临床总有效率累计概率排序为三黄膏 (81.8%) > 金黄散 (80.6%) > 康复新液 (71%) > 复方紫草油 (64.9%) > 射线防护剂 (56.9%) > 湿润烧伤膏 (46.1%) > 生长因子 (27.6%) > 抗菌药物 (16.5%) > 常规护理 (4.6%); 皮肤损伤愈合时间累计概率排序为康复新液 (98%) > 抗菌药物 (66.1%) > 湿润烧伤膏 (35.9%) > 常规护理 (0%); 重度皮炎发生率累计概率排序为三黄膏 (78.6%) > 湿润烧伤膏 (57%) > 康复新液 (56.2%) > 医用射线防护剂 (51.4%) > 常规护理 (6.9%); 结果提示, 与常规护理、抗菌药物和生长因子相比, 5 种中成药均能改善临床总有效率; 与常规护理比较, 康复新液和湿润烧伤膏可缩短皮肤损伤愈合时间; 在控制重度皮炎发生率方面, 三黄膏、湿润烧伤膏和康复新液均优于医用射线防护剂和常规护理。**结论** 5 种中成药外治放射性皮炎的临床疗效较常见西医治疗更佳, 其中三黄膏的疗效可能更为突出。但鉴于不同治疗措施间纳入的质量、研究数量存在较大差异, 本研究中成药的 SUCRA 累计概率排序需谨慎参考。

关键词: 网状 meta 分析; 放射性皮炎; 中成药

中图分类号: R285.64

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3036-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.036

Network meta-analysis of 5 Chinese patent medicines for radiodermatitis

YANG Tao^{1,2}, HAO Li-zheng³, CHEN Jian⁴, MA Si-yi¹, JIANG Min^{1,2*} (1. Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038; 2. Beijing Tumor Research Institute of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Beijing 100038; 3. Department of Oncology, Air Force Characteristic Medical Center, PLA, Beijing 100142; 4. Department of Chinese Medicine Rehabilitation, Beijing Boai Hospital, China Rehabilitation Research Center, Beijing 100068)

Abstract: Objective To systematically evaluate the efficacy of 5 commonly used Chinese patent medicines for radiodermatitis by network meta-analysis. **Methods** Randomized controlled trials (RCTs) of commonly used Chinese patent medicines for radiodermatitis were collected via computer retrieval from CNKI, Wanfang, SinoMed, VIP, PubMed, Cochrane Library, Embase, and Web of Science. Network meta-analysis was performed in Stata 15.1. **Results** Totally 30 RCTs involving 2793 patients

基金项目: 国家中医药管理局基本中医药循证能力建设 (No.2019XZZX-JB004); 首都医科大学附属北京世纪坛医院青年基金项目 (No.2021-q12)。

作者简介: 杨涛, 男, 住院医师, 博士, 主要从事中医药防治肿瘤方面的研究, email: yangtao@bjsjth.cn ***通信作者:** 姜敏, 女, 主任医师, 主要从事中医药防治内分泌、肿瘤及中医体质学方面的研究, email: jiangmin545@bjsjth.cn

were included. The network meta-analysis showed that Sanhuang ointment (81.8%) had the best effect, followed by Jinhuang powder (80.6%), Kangfuxin solution (71%), compound zicao oil (64.9%), medical radiation protective agent (56.9%), MEBO (46.1%), growth factor (27.6%), antibiotic (16.5%), and conventional nursing (4.6%). As for N-terminal healing time of skin injury, Kangfuxin solution (98%) was most effective, followed by antibiotics (66.1%), MEBO (35.9%), and conventional nursing (0%). For incidence of severe dermatitis, Sanhuang ointment (78.6%) was most effective, followed by MEBO (57%), Kangfuxin solution (56.2%), medical radiation protective agent (51.4%), and conventional nursing (6.9%). Compared with conventional nursing, antibiotics and growth factors alone, the 5 Chinese patent medicines improved the total effective rate. Compared with conventional nursing, Kangfuxin solution and MEBO shortened the healing time in skin injury. In controlling the incidence of severe dermatitis, Sanhuang ointment, MEBO and Kangfuxin solution were superior to medical radiation protective agents and conventional nursing. **Conclusion** The clinical efficacy of 5 Chinese patent medicines for radiodermatitis is better than that of the common western medicine, with Sanhuang ointment the most prominent. However, given the differences in the quality and number of studies included, the ranking of SUCRA cumulative probability of Chinese patent medicines in this study awaits further verification.

Key words: network meta-analysis; radiodermatitis; Chinese patent medicine

放射治疗是恶性肿瘤最常用的治疗手段之一,约 50% 肿瘤患者在不同治疗阶段需要接受放射治疗,放射治疗患者中放射性皮炎发生率达 95%,以头颈部肿瘤、乳腺和肺部肿瘤最为常见^[1]。20%~25% 放射性皮炎患者会出现皮肤糜烂,甚者发生皮肤溃疡,重度皮炎更多见于头颈部肿瘤患者,约 49% 头颈部放射治疗患者发生 III~IV 级放射性皮炎^[2]。放射性皮炎作为放射治疗最为常见的并发症,不仅严重影响患者身心健康和生活质量,还可能阻碍肿瘤治疗的进程和疗效。

近年来中医药外治放射性皮炎的研究逐渐增多,并显示出一定疗效,中药单味药、油膏、散剂、溶液剂等,均体现出中医药外治的特色和优势^[3]。目前,中医药外治放射性皮炎多以自拟处方为主,存在可推广性差、安全性不明确等问题。而中成药外用治疗放射性皮炎同样取得较大进展,结合目前专家共识推荐、《中国药典》、药品说明书及临床研究进展^[4-6],外用治疗放射性皮炎的中成药主要有康复新液、复方紫草油、金黄散、湿润烧伤膏、三黄膏。本研究旨在通过网状 meta 分析,客观比较 5 种中成药外治放射性皮炎的临床疗效,为优化临床治疗策略提供参考。

1 资料和方法

1.1 文献检索

计算机检索中英文 8 个数据库:中国知网(CNKI)、万方(Wanfang)、维普(VIP)、中国生物医学文献服务系统(SinoMed)、PubMed、

Cochrane Library、Embase 和 Web of Science,检索时限截至 2022 年 10 月 31 日,检索采用主题词和自由词相结合的形式。中文检索词:放射性皮炎、放射性皮肤损伤、辐射性皮炎、随机、对照、临床、随机对照试验(RCT)、康复新液、复方紫草油、金黄散、湿润烧伤膏、三黄膏等。英文检索词:Radiodermatitis、Radiodermatitides、Radiation-Induced Dermatitis、randomized controlled trial、randomized clinical trial、random、Rehabilitation new fluid、Kangfuxin solution、compound zicao oil、Golden powder、MEBO、Sanhuang ointment 等。

1.2 纳入标准

① 研究类型:RCT,语言限定为中、英文;② 研究对象:符合恶性肿瘤和放射性皮炎诊断的患者,不限肿瘤类型;③ 干预措施:外用康复新液、复方紫草油、金黄散、湿润烧伤膏、三黄膏治疗,或常规护理、抗菌药物、生长因子、医用射线防护剂等西药外用治疗;④ 结局指标:至少包含临床有效率、皮炎愈合时间和重度皮炎发生率中的一项。

1.3 排除标准

① 重复发表的文献;② 多种干预措施联合治疗的文献;③ 无法获取全文、无法提取数据的文献。

1.4 诊断标准

提取符合要求患者的文献:临床确诊为放射性皮炎,参考放射性皮肤疾病诊断标准(GBZ106—2002 中华人民共和国卫生部),身体局部受到一次

或短时间(数日)内多次大剂量(X 、 γ 及 β 射线等)外照射所引起的皮肤损伤。

1.5 资料提取

由两名研究人员独立筛选文献,提取数据并进行交叉检验。获得检索文献题录后,采用 NoteExpress 3.2.0 软件剔除重复文献,根据标题和摘要筛除明显与本研究不相关的文献,最终通过阅读全文确定纳入文献,提取纳入文献的数据:① 纳入研究的基本信息(样本量、年龄、结局指标等);② 研究方法学内容(随机序列产生方法、随机序列隐藏方法、盲法、随访、脱落与退出);③ 干预措施;④ 结局指标。采用 Cochrane 推荐的偏倚风险评估工具(ROB)^[7]进行文献质量评价。

1.6 统计分析

采用频率学进行网状 meta 分析,运用 Stata 15.1 软件绘制网络关系图并进行统计分析,对于二分类变量,采用比值比(OR)计算,连续型变量采用均数差(MD)计算,各效应量均以 95% 置信区间(95%CI)表示。使用累计概率排名曲线下面积(SUCRA)预测各治疗措施的疗效并进行排序,用百分数表示。采用节点劈裂法进行不一致检验和收敛性检验。绘制临床总有效率漏斗图评价纳入文献的发表偏倚。

2 结果

2.1 文献检索结果

通过检索 8 个数据库,初步纳入 662 篇文献,经过逐步筛选,最终纳入 30 项研究,且均为中文文献,具体文献筛选流程见图 1。

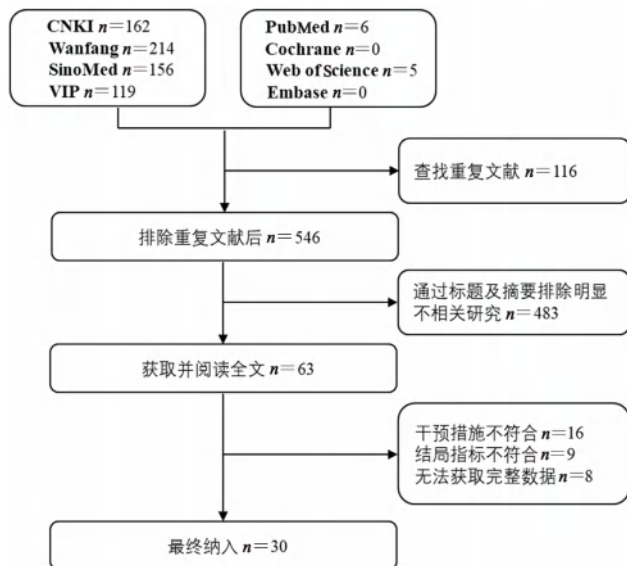


图 1 文献筛选流程

Fig 1 Study screening process

2.2 纳入文献的基本特征

纳入的 30 项研究共包含 2793 例放射性皮炎患者,干预措施涉及 5 种中成药、常规护理(生理盐水、碘伏等)、外用抗菌药物(庆大霉素、红霉素等)、生长因子(重组人表皮生长因子外用溶液)、医用射线防护剂(三乙醇胺),所纳入病例的肿瘤类型主要包含头颈部肿瘤、乳腺癌、肺癌、宫颈癌等。纳入文献基本特征见表 1。

2.3 纳入研究质量评价

对纳入的研究进行质量评价,在随机序列产生方面,共有 15 项研究提及了具体采用的随机方法,其中 12 项研究^[12, 15-16, 19-21, 23, 25-27, 30, 37]采用随机数字表或抽签方式,评价为低风险;另有 3 项^[29, 32, 34]研究根据患者就诊顺序或日期随机分组,评价为高风险;其余研究仅描述为“随机”或未提及具体随机方法,评为风险未知。在盲法评价方面,所有研究均未提及盲法,评为风险未知。具体偏倚风险评价见图 2。

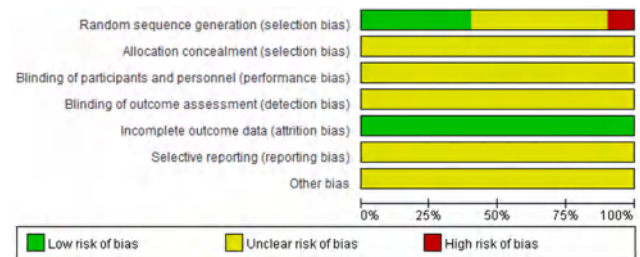


图 2 纳入文献偏倚风险比例

Fig 2 Percentages of items producing risks of bias in included studies

3 网状 meta 分析

3.1 临床总有效率

3.1.1 证据网络 24 项研究

报告了临床总有效率,为客观反映研究结果,本研究统一采用二分类标量,即将临床总有效率按照有效(包含痊愈、显效、有效)和无效进行统计。所纳入研究共涉及 9 种干预方式,即康复新液、复方紫草油、金黄散、湿润烧伤膏、三黄膏、抗菌药物、常规护理、生长因子和医用射线防护剂。由证据网络可知,湿润烧伤膏组样本量最多(节点最大),湿润烧伤膏与康复新液比较的研究最多(两节点间的线段最粗)(见图 3)。

3.1.2 网状 meta 分析 临床总有效率的网状 meta 分析结果显示,9 种干预措施共 12 个两两比较,不一致性检验及节点劈裂法显示一致性良好,研究间无异质性出现($P > 0.05$)。康复新液外用治疗放射性皮炎与湿润烧伤膏 [$OR = 2.90, 95\%CI (1.05, 7.98)$]、抗菌药物 [$OR = 12.13,$

表 1 纳入文献的基本特征
Tab 1 Basic characteristics of included studies

作者	干预措施 (T/C)	样本量 (T/C)	年龄		用药频率/h	皮炎分级	分级标准	肿瘤类型	结局指标
			T	C					
李万胜 ^[8]	复方紫草油 / 常规护理	30/30	55.6	55.6	72	II~IV级	RTOG	头颈部肿瘤	①
逯敏 ^[9]	复方紫草油 / 抗菌药物	32/30	52.4	52.4	72	II~III度	UICC	头颈部肿瘤、乳腺癌、骨肉瘤	①
欧微 ^[10]	复方紫草油 / 抗菌药物	40/38			24~48	I~III级	RTOG	头颈部肿瘤	①
丁繁 ^[11]	金黄散 / 医用射线防护剂	31/31	44.5	45.5	24	I~II级	RTOG	头颈部肿瘤、胸部肿瘤、皮肤癌	①
罗宏涛 ^[12]	金黄散 / 医用射线防护剂	30/30	49.5±11.6	51.2±11.8	24	III级	RTOG	食管癌、肺癌、乳腺癌	①
王俐 ^[13]	金黄散 / 医用射线防护剂	41/41	52.7±4.3	52.7±4.3	12	/	/	肺癌、乳腺癌、直肠癌、食管癌	①
魏世鸿 ^[14]	金黄散 / 常规护理	58/58	41.5	42.5	24	II~III级	RTOG	头颈部肿瘤、乳腺癌、直肠癌	①
谌科霞 ^[15]	康复新液 / 湿润烧伤膏	59/59			8~12	II级	RTOG	头颈部肿瘤	①②
冯媛 ^[16]	康复新液 / 湿润烧伤膏	32/32	42.31±5.3	43.65±4.9	4~6	II~III级	RTOG	乳腺癌、肺癌、直肠癌、食管癌	①②
盖龙娟 ^[17]	康复新液 / 常规护理	64/64	48	48	12	I~II级	RTOG	宫颈癌	③
刘江玲 ^[18]	康复新液 / 湿润烧伤膏	25/25	48.03±2.7	48.03±2.7	8	II~III级	RTOG	乳腺癌	①②
刘志野 ^[19]	康复新液 / 生长因子	45/45	45.23±3.90	45.12±3.87	8~12	/	/	头颈部肿瘤	①
吕燕 ^[20]	康复新液 / 常规护理	42/42	53.1±1.9	56.7±2.0	8~12	/	/	/	①
马瑞兰 ^[21]	康复新液 / 湿润烧伤膏	70/70			8	II~III级	RTOG	乳腺癌	①②
修穆群 ^[22]	康复新液 / 生长因子	52/46	49	49	24	I~IV级	RTOG	乳腺癌	①
张红 ^[23]	康复新液 / 抗菌药物	56/56	49.6	50.5	12	III度	UICC	头颈部肿瘤	①②
张惠敏 ^[24]	康复新液 / 抗菌药物	20/20	51	51	6	IV级	RTOG	乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、宫颈癌	①
王惠萍 ^[25]	三黄膏 / 医用射线防护剂	58/62	43.1±4.9	42.7±5.3	24	/	/	乳腺癌	①
徐彦 ^[26]	三黄膏 / 医用射线防护剂	50/50	59.93±9.9	55.12±10.3	12	I~IV级	RTOG	乳腺癌	③
高丽 ^[27]	湿润烧伤膏 / 常规护理	60/60	38.05±0.24	38.13±0.56	12	I~IV级	RTOG	乳腺癌	③
黄珊 ^[28]	湿润烧伤膏 / 生长因子	25/25	44.12	47.16	12	II级	RTOG	鼻咽癌	①
吕伟华 ^[29]	湿润烧伤膏 / 抗菌药物	36/36	27~74	26~70	12~24	I~III度	UICC	乳腺癌、头颈部肿瘤、直肠癌	①
牛丽英 ^[30]	湿润烧伤膏 / 医用射线防护剂	32/31	47	47	6~12	I~II级	RTOG	鼻咽癌	③
彭雷 ^[31]	湿润烧伤膏 / 常规护理	40/40	31~82	31~82	12	III度	UICC	乳腺癌、头颈部肿瘤、食管癌、直肠癌	①
王景花 ^[32]	湿润烧伤膏 / 抗菌药物	41/41	31~76	31~76	8~12	II~III度	UICC	乳腺癌、直肠癌、食管癌	①
王友军 ^[33]	湿润烧伤膏 / 抗菌药物	36/30	17~73	17~73	12~24	II~III度	UICC	乳腺癌、头颈部肿瘤、皮肤癌、软组织肿瘤	①
邢爱民 ^[34]	湿润烧伤膏 / 常规护理	40/40	51	51	24	I~III级	RTOG	鼻咽癌	③
战秀华 ^[35]	湿润烧伤膏 / 常规护理	172/172	6~82	6~82	8~24	/	/	头颈部肿瘤、胸部肿瘤	①
张续兰 ^[36]	湿润烧伤膏 / 常规护理	38/38	62.63±7.47	63.66±7.63	6~8	I~III级	RTOG	/	①
赵新华 ^[37]	湿润烧伤膏 / 常规护理	48/48	41.2	38.6	12	IV级	RTOG	鼻咽癌	②

注: T. 试验组; C. 对照组; RTOG. 美国放射肿瘤协作组急性放射损伤分级标准; UICC. 国际抗癌联盟急性放射反应分级标准; ① 临床有效率, ② 皮炎创面愈合时间, ③ 重度皮炎发生率。

Notes: T. the treatment group; C. the control group; RTOG. Radiation Therapy Oncology Group; UICC. Union for International Cancer Control; ① clinical effective rate, ② healing time of dermatitis wound, ③ incidence of severe dermatitis.

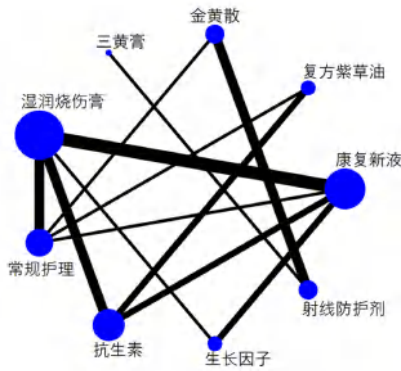


图 3 临床总有效率的证据网络

Fig 3 Evidence network of clinical total effective rate

95%CI (3.41, 43.19)、生长因子 [OR = 7.12, 95%CI (1.77, 28.65)] 和常规护理 [OR = 25.22, 95%CI (6.26, 101.65)] 比较, 其临床总有效率更高; 复方紫草油比抗菌药物 [OR = 9.89, 95%CI (1.70, 57.52)] 和常规护理 [OR = 20.56, 95%CI (2.55, 165.48)] 的临床总有效率更高; 此外, 金黄散 [OR = 67.07, 95%CI (2.33, 1926.89)]、三黄膏 [OR = 94.69, 95%CI (1.15, 7787.44)] 和湿润烧伤膏 [OR = 8.70, 95%CI (2.56, 29.57)] 的临床总有效率也明显高于常规护理。其余干预措施间两两比较均未见显著差异, 详见表 2。

表 2 临床总有效率的网状 meta 分析

Tab 2 Network meta-analysis of clinical effective rate

OR (95%CI)	康复新液	复方紫草油	金黄散	三黄膏	湿润烧伤膏	抗菌药物	生长因子	射线防护剂	常规护理
康复新液	1								
复方紫草油	1.23 (0.16, 9.47)	1							
金黄散	0.38 (0.01, 14.26)	0.31 (0.01, 15.96)	1						
三黄膏	0.27 (0.00, 27.11)	0.22 (0.00, 28.50)	0.71 (0.04, 12.36)	1					
湿润烧伤膏	2.90 (1.05, 7.98)*	2.36 (0.32, 17.43)	7.71 (0.22, 274.59)	10.88 (0.11, 1054.70)	1				
抗菌药物	12.13 (3.41, 43.19)*	9.89 (1.70, 57.52)*	32.25 (0.79, 1318.08)	45.53 (0.42, 4921.16)	4.19 (1.22, 14.36)*	1			
生长因子	7.12 (1.77, 28.65)*	5.81 (0.51, 65.49)	18.94 (0.40, 892.87)	26.74 (0.22, 3242.78)	2.46 (0.48, 12.51)	0.59 (0.09, 3.65)	1		
射线防护剂	1.05 (0.02, 59.98)	0.86 (0.01, 65.26)	2.80 (0.48, 16.49)	3.95 (0.42, 37.27)	0.36 (0.01, 19.58)	0.09 (0.00, 5.30)	0.15 (0.00, 10.28)	1	
常规护理	25.22 (6.26, 101.65)*	20.56 (2.55, 165.48)*	67.07 (2.33, 1926.89)*	94.69 (1.15, 7787.44)*	8.70 (2.56, 29.57)*	2.08 (0.43, 10.09)	3.54 (0.53, 23.46)	23.95 (0.54, 1066.79)	1

注: OR 小于 1 表示数据所在列的药物劣于所在行的药物, OR 大于 1 表示数据所在列的药物优于所在行的药物; *P < 0.05。

Note: OR less than 1 indicates that the drug listed in the column is inferior to the drug listed in the row. OR greater than 1 indicates that the drug listed in the column is superior to the drug listed in the row; *P < 0.05.

3.1.3 SUCRA 概率排序 在临床总有效率方面, 由高到低概率排序为三黄膏 (81.8%) > 金黄散 (80.6%) > 康复新液 (71.0%) > 复方紫草油 (64.9%) > 射线防护剂 (56.9%) > 湿润烧伤膏 (46.1%) > 生长因子 (27.6%) > 抗菌药物 (16.5%) > 常规护理 (4.6%), 见表 3。各干预措施的累计概率图见图 4。

3.2 皮肤损伤愈合时间

3.2.1 证据网络 6 项研究 [15-16, 18, 21, 23, 37] 报告了皮肤损伤愈合时间, 其中 1 项 [16] 研究按照不同分级皮炎愈合时间进行报告, 无法与其他研究合并分析。其余 5 项研究均以天 (d) 为单位报告皮炎愈合时间, 共涉及 4 种干预方式, 即康复新液、湿润烧伤膏、抗菌药物和常规护理。通过证据网络可知

表 3 临床总有效率的 SUCRA 概率排序

Tab 3 SUCRA probability ranking of clinical effective rates

干预措施	SUCRA/%	最佳干预措施概率/%	平均排名
康复新液	71.0	13	3.3
复方紫草油	64.9	13.5	3.8
金黄散	80.6	26	2.6
三黄膏	81.8	46.4	2.5
湿润烧伤膏	46.1	0.1	5.3
常规护理	4.6	0	8.6
抗菌药物	16.5	0	7.7
生长因子	27.6	0	6.8
射线防护剂	56.9	1	4.4

(见图 5), 湿润烧伤膏与康复新液比较的研究最多。

3.2.2 网状 meta 分析 皮肤损伤愈合时间的网状 meta 分析结果显示, 4 种干预措施共 3 个两两

比较, 不一致性检验及节点劈裂法显示一致性良好, 研究间无异质性出现 ($P > 0.05$)。与常规护理 [$MD = -11.32, 95\%CI (-15.37, -7.27)$] 和湿润烧伤膏 [$OR = -5.62, 95\%CI (-7.61, -3.63)$] 比较, 康复新液外用治疗放射性皮炎的皮损愈合时

间更短。此外, 湿润烧伤膏 [$MD = -5.70, 95\%CI (-9.23, -2.17)$] 和抗菌药物组 [$MD = -8.56, 95\%CI (-13.85, -3.27)$] 的皮肤损伤愈合时间均明显短于常规护理组。其余干预措施间两两比较均未见显著差异, 详见表 4。

表 4 皮肤损伤愈合时间的网状 meta 分析

Tab 4 Network meta-analysis of healing time of skin injury

MD (95%CI)	康复新液	湿润烧伤膏	抗菌药物	常规护理
康复新液	1			
湿润烧伤膏	-5.62* (-7.61, -3.63)	1		
抗菌药物	-2.76 (-6.16, 0.64)	2.86 (-1.08, 6.80)	1	
常规护理	-11.32* (-15.37, -7.27)	-5.70* (-9.23, -2.17)	-8.56* (-13.85, -3.27)	1

注: MD 小于 0 表示数据所在列的药物优于所在行的药物, MD 大于 0 表示数据所在列的药物劣于所在行的药物; * $P < 0.05$ 。

Note: MD less than 0 indicates that the drug listed in the column is inferior to the drug listed in the row. MD greater than 0 indicates that the drug listed in the column is superior to the drug listed in the row; * $P < 0.05$.

3.2.3 SUCRA 概率排序 在皮肤损伤愈合时间方面, 由高到低概率排序为康复新液 (98%) > 抗菌药物 (66.1%) > 湿润烧伤膏 (35.9%) > 常规护理 (0%), 见表 5。各干预措施的累计概率曲线见图 6。

表 5 皮肤损伤愈合时间的 SUCRA 概率排序

Tab 5 SUCRA probability ranking of healing time of skin injury

干预措施	SUCRA/%	最佳干预措施概率/%	平均排名
康复新液	98	94.1	1.1
湿润烧伤膏	35.9	0	2.9
常规护理	0	0	4
抗菌药物	66.1	5.9	2

3.3 重度皮炎发生率

3.3.1 证据网络 5 项研究^[17, 26-27, 30, 34] 报告了皮

肤损伤分级, 所有研究均参考 RTOG 对放射性皮炎的分级标准^[38], 共分为 5 个等级, 一般认为 II 级以下属轻度皮肤损伤, III ~ IV 级属重度皮肤损伤, 本研究针对重度皮炎发生率进行统计分析。5 项研究共涉及 5 种干预方式, 即康复新液、湿润烧伤膏、三黄膏、常规护理和医用射线防护剂。证据网络显示 (见图 7), 湿润烧伤膏与常规护理之间比较的研究最多。

3.3.2 网状 meta 分析 重度皮炎发生率的网状 meta 分析结果显示, 5 种干预措施共 4 个两两比较, 不一致性检验及节点劈裂法显示一致性良好, 研究间无异质性出现 ($P > 0.05$)。各措施两两比较均未见显著差异, 详见表 6。

表 6 重度皮炎发生率的网状 meta 分析

Tab 6 Network meta-analysis of the incidence of severe dermatitis

OR (95%CI)	康复新液	三黄膏	湿润烧伤膏	射线防护剂	常规护理
康复新液	1				
三黄膏	7.08 (0.00, 36336.01)	1			
湿润烧伤膏	1.09 (0.00, 240.44)	0.15 (0.00, 116.90)	1		
射线防护剂	1.06 (0.00, 1948.00)	0.15 (0.00, 8.70)	0.97 (0.01, 182.65)	1	
常规护理	0.03 (0.00, 2.84)	0.00 (0.00, 6.75)	0.03 (0.00, 0.62)	0.03 (0.00, 13.08)	1

注: OR 小于 1 表示数据所在列的药物劣于所在行的药物, OR 大于 1 表示数据所在列的药物优于所在行的药物; * $P < 0.05$ 。

Note: OR less than 1 indicates that the drug listed in the column is inferior to the drug listed in the row. OR greater than 1 indicates that the drug listed in the column is superior to the drug listed in the row; * $P < 0.05$.

3.3.3 SUCRA 概率排序 在重度皮炎发生率疗效方面, 由高到低概率排序为三黄膏 (78.6%) > 湿润烧伤膏 (57%) > 康复新液 (56.2%) > 医用射线防护剂 (51.4%) > 常规护理 (6.9%), 详见表 7。各干预措施的累计概率曲线见图 8。

3.4 发表偏倚

选择临床总有效率为代表绘制漏斗图 (见图

表 7 重度皮炎发生率的 SUCRA 概率排序

Tab 7 SUCRA probability ranking of the incidence of severe dermatitis

干预措施	SUCRA/%	最佳干预措施概率/%	平均排名
康复新液	56.2	25.1	2.8
三黄膏	78.6	55.6	1.9
湿润烧伤膏	57	13	2.7
常规护理	6.9	0	4.7
射线防护剂	51.4	6.3	2.9

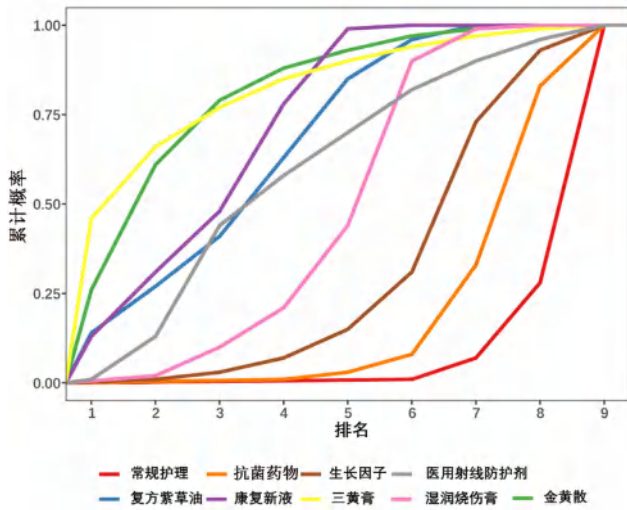


图 4 临床总有效率累计概率曲线
Fig 4 Cumulative probability curves of clinical effective rate

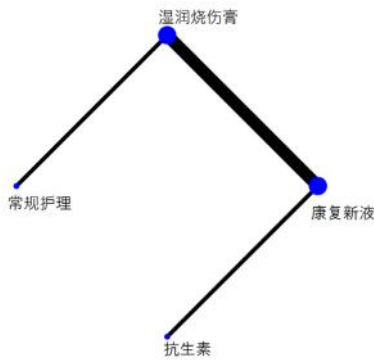


图 5 皮肤损伤痊愈时间的证据网络
Fig 5 Evidence network of healing time of skin injury

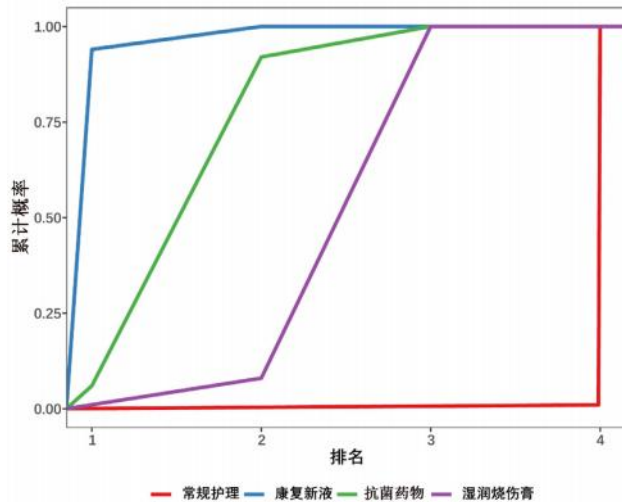


图 6 皮肤损伤愈合时间累计概率曲线
Fig 6 Cumulative probability curves of healing time of skin injury

9)。图中不同颜色的点表示两种不同干预措施的直接比较，漏斗图分布基本对称，说明发表偏倚的可能性较小。

4 讨论

本病可归属于中医“疮疡”“湿疮”“烧烫

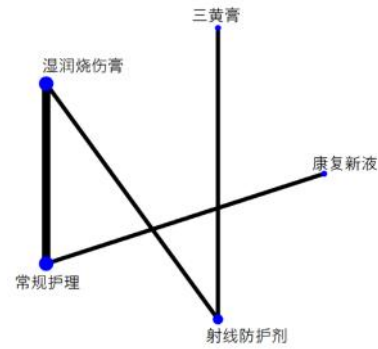


图 7 重度皮炎发生率的证据网络
Fig 7 Evidence network of healing time of skin injury

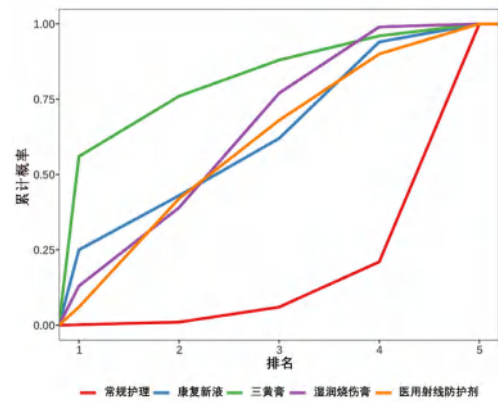


图 8 重度皮炎发生率累计概率曲线
Fig 8 Cumulative probability curves of the incidence of severe dermatitis

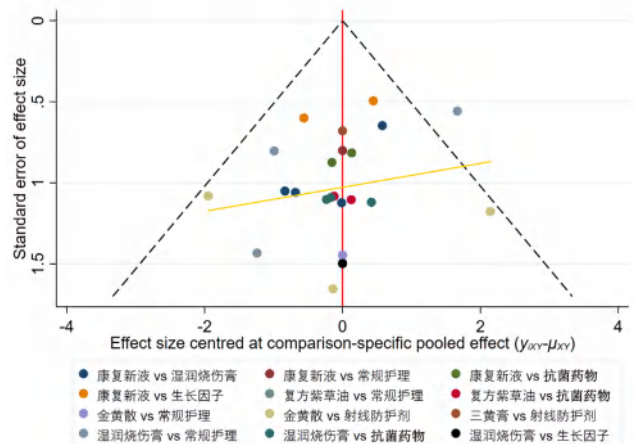


图 9 临床总有效率的漏斗图
Fig 9 Funnel plot of clinical effective rate

伤”“痈疽”“火痍疮”等范畴^[39]，中医认为放射线为“火毒”之邪^[40]，是除六淫邪气外的特殊外邪，其致病具有伤津性、灼络性、耗气性、峻烈性、稽留性和渐进性等特点。火热毒邪侵犯肌肤，热毒积聚，肌肤腠理受损，则见皮肤红斑、肿胀等表现。热入营血，血热互结，经脉阻塞，则见皮肤灼痛、麻木等。毒邪由表及里，伤津耗血，气血津液输布异常，肌肤濡养失司，则导致皮肤破溃难愈。综上，火热毒邪伤阴导致的“阴虚燥

热”是放射性皮炎的基本病机。故本病治疗当以清热解毒、养阴生津、祛瘀生肌为主^[41]。

外用中成药治疗放射性皮炎具有剂型及药效稳定、涂抹方便、易于贮存、毒副作用明确等优点,目前临床常用的有康复新液、复方紫草油、金黄散、湿润烧伤膏和三黄膏 5 种中成药。其中,康复新液主要成分是美洲大蠊(蟑螂)的提取物,《神农本草经》谓其“味咸,寒。主治血瘀症坚寒热,破积聚,喉咽闭,内寒,无子”。现代药理学证明康复新液具有促进皮肤黏膜、抗炎镇痛等作用,可用于皮肤、消化系统、口腔及耳鼻喉等疾病^[42]。复方紫草油由《幼科金针》中的紫草润肌膏化裁而来,由紫草、白芷、忍冬藤、冰片组成,具有清热凉血、解毒止痛之功效,临床常用于治疗水火烫伤,药理研究表明其具有抑菌、抗炎、调节免疫、镇痛、促进伤口愈合等作用^[5, 43]。金黄散出自明代陈实功的《外科正宗》,并收录于《中国药典》2015 年版中,该方由姜黄、大黄、黄柏、苍术、厚朴、陈皮、甘草等组成,具消肿止痛之功,临床多用于糖尿病足溃疡、静脉炎、带状疱疹等的治疗^[44-45]。湿润烧伤膏由著名烧伤学科专家徐荣祥教授发明,主要由黄连、黄柏、黄芩、地龙、罂粟壳等组成,具有清热解毒、止痛生肌、活血化瘀之功效,能抑菌、改善局部微循环、促进组织愈合等^[46]。三黄膏是清热解毒、消散疔毒的经典处方,由黄柏、黄芩、黄连等组成,具有抗炎、抑菌等药理作用,对于急慢性软组织感染、烧伤、软组织损伤等均有良好疗效。近年来临床研究显示,以上 5 种中成药单独使用或联合西药治疗放射性皮炎,可提高临床有效率、缩短皮损愈合时间、降低重度皮炎发生率。

本研究结果显示,在临床总有效率方面,5 种中成药均较西药抗菌药物、生长因子和常规护理治疗具有优势,排名前 3 的干预措施是三黄膏、金黄散和康复新液;皮损愈合时间方面,涉及康复新液和湿润烧伤膏 2 种中成药,两者均较常规护理有优势,排名前 3 的干预措施是康复新液、抗菌药物和湿润烧伤膏;重度皮炎发生率方面,涉及三黄膏、湿润烧伤膏和康复新液 3 种中成药,与医用射线防护剂和常规护理比较,三者均能更好地降低放疗患者重度皮炎发生率,排名前 3 的干预措施是三黄膏、湿润烧伤膏和康复新液。三黄膏在临床总有效率和重度皮炎发生率疗效排名中均列首位,提示三黄膏在 5 种中成药中疗效较为突出。

综上,与常规护理、抗菌药物、生长因子等西医治疗比较,三黄膏在提高临床总有效率和控制重度皮炎发生率方面体现出优势,康复新液则在促进皮肤损伤愈合方面体现出优势,值得临床推广使用。但本研究仍存在一些不足之处:第一,所纳入研究的随机方法、分配隐藏、盲法等文献质量评价多为风险未知,潜在的偏倚风险可能会对检验效能产生影响;第二,纳入研究人群放射性皮炎分级主要采用 RTOG 和 UICC 的分级标准,各研究皮炎分级存在一定异质性;第三,一些品类中成药的文献数量较少,如三黄膏 2 篇、复方紫草油 3 篇,一定程度上影响了结果的可信性。故应谨慎看待排序结果,临床应用时需结合实际情况、专家共识和指南等综合考虑。

参考文献

- [1] 中华医学会医学美容与美学分会皮肤美容学组. 放射性皮炎诊疗专家共识[J]. 中华医学美容美容杂志, 2021, 27(5): 353-357.
- [2] Yokota T, Zenda S, Ota I, et al. Phase 3 randomized trial of topical steroid versus placebo for prevention of radiation dermatitis in patients with head and neck cancer receiving chemoradiation [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2021, 111(3): 794-803.
- [3] 黄从书, 朱贵花, 谢光辉, 等. 中医药防治放射性皮肤损伤的研究进展[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2021, 41(3): 229-233.
- [4] 柳华锋, 于然, 陈辰, 等. 中医药治疗放射性皮炎的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4568-4570.
- [5] 孙占学, 李元文, 张丰川, 等. 复方紫草油在皮肤科临床应用专家共识[J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 301-304.
- [6] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2015: 892-893.
- [7] Cochrance Collaboration. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions [EB/OL]. [2022-10-20]. <https://training.cochrane.org/cochranehandbook>.
- [8] 李万胜, 唐庆祥, 赵斌. 复方紫草油治疗颈部放射性皮炎的临床观察[J]. 中国社区医师(医学专业), 2012, 14(11): 240-241.
- [9] 逯敏, 徐凯, 郭明. 复方紫草油治疗 II-III 度放射性皮炎 32 例[J]. 陕西中医, 2008, 29(5): 569-570.
- [10] 欧微. 复方紫草油治疗放射性皮肤损伤的疗效观察[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(5): 96.
- [11] 丁繁, 王小虎, 单晓梅. 金黄散对肿瘤患者放射性皮肤损伤的疗效观察[J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(1): 22-24.
- [12] 罗宏涛. 金黄散对比医用射线防护剂治疗渗出性放射性皮炎的临床疗效观察[A]/ 中华中医药学会 2018 年中医肿瘤青年论坛[C]. 2018, 兰州.

- [13] 王俐. 金黄散与比亚芬治疗放射性皮炎的疗效及安全性比较[J]. 中外医疗, 2015, 34(15): 100-101.
- [14] 魏世鸿, 单晓梅, 王小虎, 等. 蜂蜜调和金黄散外敷治疗急性放射性皮肤损伤的临床观察[J]. 新中医, 2010, 42(12): 74-75.
- [15] 谌科霞, 肖泽民, 彭红梅, 等. 康复新液湿敷治疗放射性皮炎的疗效观察[J]. 当代护士(专科版), 2011(4): 79-80.
- [16] 冯媛. 康复新液对治疗放射性皮炎的治疗效果观察[J]. 药品评价, 2019, 16(1): 28-30, 36.
- [17] 盖龙娴, 武霞. 康复新液冲洗会阴部防治宫颈癌放疗致放射性皮肤损伤的疗效[J]. 实用医药杂志, 2017, 34(8): 713-715.
- [18] 刘江玲. 康复新液防治乳腺癌放射性皮炎的效果观察[J]. 养生保健指南, 2017(18): 162.
- [19] 刘志野, 李娜. 康复新液治疗头颈部肿瘤放射性皮炎的临床效果分析[J]. 继续医学教育, 2020, 34(6): 162-163.
- [20] 吕燕. 康复新液对治疗放射性皮炎的治疗作用研究与分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(48): 9438-9439.
- [21] 马瑞兰, 徐晓颖. 康复新液治疗乳腺癌放射性皮炎的疗效观察[J]. 医药前沿, 2012(28): 199-200.
- [22] 修穆群, 熊彬, 熊娟. 康复新液对治疗放射性皮炎的效果观察[J]. 江西医药, 2009, 44(10): 1045-1046.
- [23] 张红, 苏志新. 康复新液联合冰液治疗Ⅲ度急性放射性皮肤损伤临床观察[J]. 中国中医急症, 2009, 18(2): 215-216.
- [24] 张惠敏, 冯丽. 康复新联合维生素 B₁₂ 溶液治疗Ⅳ度放射性皮炎的临床疗效[J]. 北方药学, 2015, 12(8): 21-22.
- [25] 王惠萍, 梅金莲, 王海玲, 等. 三黄膏调和蜂蜜防治乳腺癌放疗致放射性皮炎的观察[J]. 中国临床研究, 2014, 27(4): 483-484.
- [26] 徐彦, 赵致臻, 杨巍娜, 等. 三黄膏调合蜂蜜对放疗患者放射性皮肤损伤的防治效果观察[J]. 中国药房, 2013, 24(31): 2957-2958.
- [27] 高丽, 武霞. 湿润烧伤膏防治乳腺癌改良根治术后放射性皮肤损伤疗效观察[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2019, 31(3): 170-173.
- [28] 黄珊, 罗慧, 郑莉茗. 金因肽治疗Ⅱ级急性放射性皮炎的临床观察[J]. 中国临床实用医学, 2007, 1(10): 73-74 页.
- [29] 吕伟华, 徐秀梅. 湿润烧伤膏治疗放射性皮炎的临床观察[J]. 中国医药导刊, 2016, 18(8): 822-823.
- [30] 牛丽英. 比亚芬与美宝防治鼻咽癌放射性皮炎的疗效对比[J]. 西部医学, 2013, 25(11): 1626-1627, 1631.
- [31] 彭雷, 焦英华, 王霞, 等. 湿润烧伤膏治疗Ⅲ度急性放射性皮肤损伤的疗效观察[J]. 社区医学杂志, 2009, 7(24): 20-21.
- [32] 王景花. 美宝湿润烧伤膏治疗放射性皮炎的疗效观察[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(1): 157.
- [33] 王友军, 郭明, 逯敏, 等. 湿润烧伤膏治疗放射性皮炎临床观察[J]. 中国医药学报, 2004, 19(9): 575-576.
- [34] 邢爱民, 赵静, 刘英杰. 湿润烧伤膏防治鼻咽癌放疗皮肤损伤的效果观察[J]. 医学信息(下旬刊), 2011, 24(9): 5752-5753.
- [35] 战秀华, 付学华. 湿润烧伤膏在放射性皮肤损伤中的应用[J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(11): 1623.
- [36] 张续兰, 张红, 高欣, 等. 湿润烧伤膏在放疗患者皮肤损伤中的临床应用[J]. 甘肃医药, 2015, 34(4): 284-286.
- [37] 赵新华, 张宜生, 张华, 等. MEBO 治疗鼻咽癌放射性皮炎的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2006, 11(1): 55-56.
- [38] Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995, 31(5): 1341-1346.
- [39] 王玉华, 林岫, 付丽佳, 等. 中药防治放射性皮肤损伤的研究进展[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2014, 34(4): 314-317.
- [40] 江虹霖, 姜欣, 杨鸣, 等. 从火毒论治放射性肠炎[J]. 中医杂志, 2021, 62(19): 1732-1735.
- [41] 冷启宁, 蒋元品, 宋丹, 等. 放射性皮肤损伤的中医诊治探讨[J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(3): 126-127.
- [42] 周丽华, 杨硕, 张英. 康复新液药理作用及临床应用的研究进展[J]. 养生保健指南, 2019(5): 228.
- [43] 汤典慧, 许敏, 雷群芳, 等. 复方紫草油微乳的药效学考察[J]. 中南药学, 2018, 16(7): 954-957.
- [44] 张斯琪, 曾臣红, 陈冲, 等. 如意金黄散的现代研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(2): 411-415.
- [45] 邢竹兰, 王敏. 如意金黄散联合抗菌药物治疗皮肤软组织感染的临床研究[J]. 中南药学, 2021, 19(12): 2695-2699.
- [46] 张盈, 崔光怀, 刘飞飞, 等. 美宝湿润烧伤膏在创面修复中的应用研究进展[J]. 国际医药卫生导报, 2022, 28(8): 1134-1137.

(收稿日期: 2023-04-10; 修回日期: 2023-05-29)

肾性高血压住院患者用药特点及经济负担研究

刘俏^{1,2}, 许清青³, 郑绘⁴, 易利丹^{1,2}, 罗霞^{1,2*} (1. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011; 2. 中南大学临床药学研究所, 长沙 410011; 3. 中南大学公共管理学院, 长沙 410002; 4. 成都中医药大学附属医院, 成都 610075)

摘要: **目的** 分析肾性高血压住院患者的用药特点与经济负担, 为减轻患者经济负担及优化卫生资源的合理配置提供依据。**方法** 回顾性收集整理某大型综合医院 2019 年 1 月 1 日至 2022 年 9 月 30 日的肾性高血压住院患者信息, 分析用药特点、逐年住院费用变化、各项住院费用变化、各临床特征与住院费用的相关关系, 多元逐步回归分析住院费用影响因素。**结果** 共纳入 3286 例患者, 以男性、30~60 岁、湖南患者居多。用药种类数为 (2.69±1.51) 种, 使用两类药物进行治疗的患者最多。以 DDDs 总值为指标排序, 使用最多的是钙离子通道阻滞剂、 α 受体阻滞和血管紧张素 II 受体拮抗剂类。住院总费用均值为 (39 690.53±85 305.44) 元, 中位数为 10 797.83 元, $P_{25} \sim P_{75}$ 为 7130.48~20 677.13 元; 西药费均值为 (10 206.41±24 170.42) 元, 中位数为 1961.61 元, $P_{25} \sim P_{75}$ 为 857.25~5012.93 元。单因素回归分析结果提示患者性别、年龄、住院天数、是否进行肾移植以及当前肾脏病所处分期对住院总费用的影响差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。多元逐步回归分析结果提示对人均住院总费用的影响程度从大到小依次为住院天数、是否进行肾移植、当前肾脏病所处分期、性别和年龄。**结论** 肾性高血压患者由于需要多种药物联合治疗, 住院天数以及是否进行肾移植是肾性高血压患者住院总费用影响程度最大的因素, 通过早筛查早诊断早治疗、制订合理的和个性化的药物治疗方案、进行药物经济学研究等措施可以在一定程度上降低肾性高血压患者的经济负担。

关键词: 肾性高血压; 经济负担; 住院费用; 药物治疗

中图分类号: R284.1, R917.101 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)11-3045-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.037

Medication characteristics and economic burden of inpatients with renal hypertension

LIU Qiao^{1,2}, XU Qing-qing³, ZHENG Hui⁴, YI Li-dan^{1,2}, LUO Xia^{1,2*} (1. Department of Pharmacy, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 2. Institute of Clinical Pharmacy, Central South University, Changsha 410011; 3. School of Public Administration, Central South University, Changsha 410002; 4. Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

Abstract: Objective To analyze the medication characteristics and economic burden of inpatients with renal hypertension to reduce the economic burden of patients and better allocate health resources. **Methods** The information of inpatients with renal hypertension from January 1st, 2019 to September 30th, 2022 in a major hospital was retrospectively collected. The medication characteristics, year-by-year changes in hospitalization costs, changes of items costs in various inpatients, the relationship between various clinical features and inpatient costs were determined, and the influencing factors of inpatient costs were analyzed by multiple stepwise regression. **Results** Totally 3286 patients were included, mostly males, aged 30~60 and from Hunan. The number of drug types was (2.69±1.51), the two-drug combination regimen was most common in the medication regimen. With the ranking of

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No. 2021JJ40817, No. 2022JJ80040); 湖南省卫健委科研项目 (No. 202113050611, No. 202113050283, No. 202213053462)。

作者简介: 刘俏, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事药物经济学研究, email: liuqiao6767@csu.edu.cn *通信作者: 罗霞, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事药物经济学研究, email: luoxia@csu.edu.cn

total value of DDDs as an indicator, the drugs used most frequently included calcium channel blocker (CCB), alpha-blockers and angiotensin receptor blocker (ARB). The mean total cost of hospitalization was (39 690.53 ± 85 305.44) yuan (median: 10 797.83 yuan; $P_{25} \sim P_{75}$: 7130.48 ~ 20 677.13) yuan. The mean cost of western drug was (10 206.41 ± 24 170.42) yuan, (median: 1961.61 yuan, $P_{25} \sim P_{75}$: 857.25 ~ 5012.93 yuan). Univariate regression showed that the effects of gender, age, the number of hospitalization days, whether undergoing kidney transplantation, and current stage of renal disease on the total cost of hospitalization were statistically significant ($P < 0.05$). The multiple stepwise regression showed that the impact on the total cost of hospitalization per capita was the number of hospitalization days, whether undergoing kidney transplantation, stage of current kidney disease, gender and age in order of strong to weak. **Conclusion** Due to the need for a combination of drugs, the number of hospitalization days and whether or not to undergo kidney transplantation are the most important factors for the total cost of hospitalization of patients with renal hypertension. The economic burden of patients with renal hypertension can be reduced by early screening, diagnosis and treatment, reasonable and individualized drug treatment, etc. **Key words:** renal hypertension; economic burden; hospitalization cost; drug therapy

我国慢性肾脏疾病 (CKD) 患病率高达 10.8%^[1], 高血压是 CKD 最常见的并发症之一^[2]。由肾脏系统疾病引起的高血压称为肾性高血压, 该病位居继发性高血压首位。肾性高血压可发生在 CKD 的任一阶段, 其可加剧肾脏病变引起肾功能减退, 肾功能的减退又会导致血压的进一步升高, 从而形成恶性循环。肾性高血压治疗难度高, 通常需多种药物治疗^[3], 患者经济负担重。目前国内外对于该病的经济负担研究鲜见报道, 本研究收集某大型综合医院 2019 年 1 月 1 日至 2022 年 9 月 30 日收治的 3286 例肾性高血压住院患者资料, 分析患者用药情况、各项费用占比及变化趋势, 探究影响肾性高血压经济负担的因素, 以期促进合理用药, 减轻经济负担, 优化卫生资源的合理配置。

1 资料与方法

1.1 数据来源

本研究数据来源于某大型综合医院的住院病案系统 [伦理批件号: (2023) 伦审【临研】第 (124) 号]。通过收集 2019 年 1 月 1 日至 2022 年 9 月 30 日就诊的所有符合纳入标准的患者数据, 对数据进行清洗、整理, 得到 3286 例肾性高血压患者资料, 包括性别、年龄、籍贯、医保类型、诊断、各项医疗费用、药品名称及数量等, 用于后续分析。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ① 入院诊断为肾性高血压; ② 出院诊断包含肾性高血压。排除标准: ① 合并有心、脑、肝、内分泌、造血系统等严重原发性疾病; ② 合并恶性肿瘤; ③ 继发性高血压但没有肾脏病史者。

1.3 研究方法

本研究采用回顾性分析方法, 通过 SPSS 和 Excel 对收集的数据进行整理, 统计出患者基本情况、用药情况和各项医疗费用, 其中用药情况通过 DDDs 值来反映, 而医疗费用中的总住院费用包括中成药费、化验费、床位费、手术费、护理费、检查费、治疗费、特殊材料费、草药费、西药费、诊查费、陪护费。对定量统计资料采用平均数、标准差等指标进行统计, 对分类统计资料采用频数及频率 (%) 进行统计描述。通过单因素方差回归和多元逐步回归分析方法分析各因素对住院费用是否有影响且影响程度大小。

DDD_s 计算主要参考 WHO 推荐的限定日剂量 (DDD)^[4], 如 WHO 没有提供 DDD 值的药品, 则取《新编药理学》(第 18 版)^[5] 及药品说明书中成人维持剂量^[6-7], 具体计算如下:

$$\text{总用量} = \text{规格} \times \text{所用次数} \times \text{一次用量};$$

$$\text{DDD}_s = \text{总用量} / \text{该药的 DDD 值}.$$

2 结果

2.1 患者基本情况

研究对象性别相对均衡, 年龄主要集中在 30 ~ 60 岁, 住院天数主要集中在 1 ~ 15 d, 地域主要集中在湖南省, 见表 1。

2.2 患者用药情况

所用药物根据药理作用分类^[8-9] 总数为 1 ~ 9 种, 平均用药类别数为 (2.69 ± 1.51) 种, 62.51% 的患者用药类别总数为 2 ~ 4 种, 见表 2。

按照药理作用分类^[8-9] 使用药物 DDD_s 总值前三类依次为钙离子通道阻滞剂 (CCB)、 α 受体阻滞剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB); 以

表 1 肾性高血压住院患者基本情况

Tab 1 Basic information of inpatients with renal hypertension

项目	例数	百分比 /%
性别		
男	1930	58.73
女	1356	41.27
年龄段 / 岁		
≤ 18	72	2.19
19 ~ 30	317	9.65
31 ~ 45	1096	33.35
46 ~ 60	1246	38.92
> 60	555	16.89
住院天数 /d		
1 ~ 5	947	28.82
6 ~ 10	1234	37.55
11 ~ 15	533	16.22
16 ~ 20	237	7.21
21 ~ 25	135	4.10
26 ~ 30	75	2.28
> 30	125	3.80
医保类型		
自费	748	22.76
异地医保	592	18.02
城镇居民基本医疗保险	3	0.09
城镇职工基本医疗保险	539	16.40
新农合	267	8.13
其他	1137	34.60
是否进行肾移植		
否	2951	89.81
是	335	10.19
肾脏病分期		
其他	890	27.08
三期	38	1.16
四期	44	1.34
五期	2314	70.42
地区		
湖南省	2948	89.71
其他地区	338	10.29

注：异地医保包括长沙市以外的湖南省某些地区的医保。

Note: Non-local medical insurance includes medical insurance in certain areas of Hunan Province outside Changsha.

药品统计 DDDs 总值前三分别是硝苯地平控释片、哌唑嗪片和阿罗洛尔片；沙库巴曲缬沙坦钠片 DDDs 逐年增加，见表 3。

2.3 医疗费用情况

2019 年 1 月到 2022 年 9 月住院总费用均值为 (39 690.53 ± 85 305.44) 元，中位数为 10 797.83 元， $P_{25} \sim P_{75}$ 为 7130.48 ~ 20 677.13 元，医保费用均值为 (10 077.58 ± 22 081.21) 元，中位数为 3236.10 元， $P_{25} \sim P_{75}$ 为 0 ~ 7888.45 元，西药费均值为 (10 206.41 ± 24 170.42) 元，中位数为 1961.61 元， $P_{25} \sim P_{75}$ 为 857.25 ~ 5012.93 元。在 2019—2022 年间，人均住院总费用及日人均住院费用基本呈下降趋势，详见表 4。

表 2 2019—2022 年肾性高血压患者治疗药物分类汇总情况

Tab 2 Summary of category drug for patients with renal hypertension from 2019 to 2022

用药方案	例数	构成比 /%
一类药品	1248	25.10
CCB	894	
利尿剂	150	
ARB	85	
β受体阻滞剂	72	
血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂 (ARNI)	16	
其他	31	
两类药品	1346	27.07
CCB + 利尿剂	407	
CCB + β受体阻滞剂	305	
CCB + α受体阻滞剂	174	
ARB + CCB	172	
CCB + α&β受体阻滞剂	76	
其他	212	
三类药品	1066	21.44
CCB + β受体阻滞剂 + 利尿剂	216	
CCB + β受体阻滞剂 + α受体阻滞剂	162	
CCB + α受体阻滞剂 + 利尿剂	137	
ARB + CCB + 利尿剂	82	
ARB + CCB + β受体阻滞剂	78	
其他	391	
四类药品	696	14.00
五类药品	376	7.56
六类药品	135	2.72
七类药品	76	1.53
八类药品	24	0.48
九类药品	5	0.10

注：前三类药品仅列出前五，其他组合归为其他类，四~九类药品的占比较小，略过详情。

Note: Top 5 drugs are only listed for the first 3 categories, and other combinations are classified as other categories. The percentage of drugs in categories 4 ~ 9 is relatively small, so details are omitted.

所有住院费用分成六大类，2019 年、2020 年和 2022 年西药类费用占比为第一，中成药及草药类费用在 2019—2022 年均占比最低，见表 5。

2.4 患者住院直接经济负担的单因素回归分析

当检验水准 $\alpha = 0.05$ 时，患者人均住院总费用单因素回归分析结果见表 6。所有纳入变量对人均住院总费用的影响差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 住院患者住院直接经济负担的多因素回归分析

为了进一步明确各因素对住院总费用的影响，以人均住院总费用 (对数转换值) 为因变量，以单因素回归分析中有统计学意义的因素作为自变量进行赋值，如表 7 所示。

多元逐步回归分析模型建立成功 ($F = 1214.29$, $P < 0.001$)，可解释程度较高 ($R^2 = 0.6493$ ，可解释因变量 64.93% 的变异)，各个自变量之间无共线性关系 (各自变量的 VIF 值均小于 5)。多元逐步回归分

表 3 2019—2022 年肾性高血压患者药品 DDD 值及 DDDs 排序
Tab 3 Drug DDD values and DDDs ranking in patients with renal hypertension from 2019 to 2022

药品名称	DDD/mg	合计		2019 年		2020 年		2021 年		2022 年	
		DDD _s	排序	DDD _s	排序	DDD _s	排序	DDD _s	排序	DDD _s	排序
CCB		117 843	1	31 832.5	1	27 666.12	1	33 422.08	1	24 929.32	1
硝苯地平控释片	30	80 296	1	24 179	1	18 804	2	22 182	1	15 131	1
苯磺酸左氨氯地平片	5	13 268.5	2	1608	3	3812.5	3	5104.5	3	2743.5	3
氨氯地平片	5	13 248	3	9715	2	22 825	1	22 080	2	11 620	2
其他		24 278.52		6045.5		5049.62		6135.58		7054.817	
α 受体阻滞剂		64 376.08	2	16 712.58	2	14 168.67	2	20 259.33	2	13 235.5	2
哌唑嗪片	1.5	58 997.33	1	15 137.33	1	12 858.67	1	18 861.33	1	12 140	1
特拉唑嗪片	8	5378.75	2	1575.25	2	1310	2	1398	2	1095.5	2
ARB		34 011.85	3	10 448	3	9275.12	3	9417.58	3	4871.15	5
奥美沙坦酯片	20	10 654	1	4631	1	2776	1	2098	1	1149	2
缬沙坦胶囊	80	6541	2	1221	2	1487	3	1875	3	1958	1
厄贝沙坦片	150	5780	3	1192	3	1738	2	2077	2	773	3
其他		11 036.85		3404		3274.12		3367.58		991.15	
利尿剂		23 838.5	4	3586.5	5	3672.5	5	9076.5	4	7503	3
呋塞米片	40	14 591.5	1	1382.5	2	1015.5	2	6505.5	1	5688	1
托拉塞米片	10	6930	2	2062	1	1982	1	1577	2	1309	2
氢氯噻嗪片	25	1221	3	17	3	499	3	287	3	418	3
其他		1096		125		176		707		88	
α & β 受体阻滞剂		18 083	5	4686	4	3999	4	5653	5	3745	6
阿罗洛尔片	10	18 083	1	4686	1	3999	1	5653	1	3745	1
血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI)		11 644.83	6	1197.67	7	3047.67	6	5178.83	6	2220.67	8
氨氯地平贝那普利片	12.5	8774	1	0	3	2367	1	4449	1	1958	1
贝那普利片	7.5	1043.333	2	330.67	1	338.67	2	299.33	2	74.67	3
依那普利片	10	777	3	271	2	254	3	120	3	132	2
其他		1050.5		596		88		310.5		56	
β 受体阻滞剂		11 271.5	7	2461.62	6	2292.63	7	3473	7	3044.25	7
琥珀酸美托洛尔缓释片	95	6680.5	1	1619.5	1	1534	1	1641	1	1886	1
富马酸比索洛尔片	10	2395	2	341	3	238.5	3	1077.5	2	738	2
酒石酸美托洛尔片	200	2196	3	501.12	2	520.13	2	754.5	3	420.25	3
ARNI		8900.75	8	988	8	1190.5	8	1607.25	9	5115	4
沙库巴曲缬沙坦钠片	200	8900.75	1	988	1	1190.5	1	1607.25	1	5115	1
醛固酮受体拮抗剂		3412	9	171.7333	9	277.8667	9	1755.733	8	1206.667	9
螺内酯片	75	3412	1	171.7333	1	277.8667	1	1755.733	1	1206.667	1

注：氨氯地平贝那普利复方制剂按照成分归属于 CCB 和 ACEI 进行统计。各类药品仅列出前三，剩余归为“其他”；因“其他”的 DDDs 为该类药物 DDDs 之和，故不列序号。

Note: Amlodipine benazepril compound preparations are summarized according to the compositions of CCB and ACEI. Only the top 3 categories are listed and the top 3 drugs in each category are listed, and the rest are classified as “others”. The DDDs of others are the sum of DDDs of the remaining drugs in the category, no the serial number is listed.

析提示，对人均住院直接经济负担有影响作用的因素从大到小（以 β 排序）排列详见表 8。

3 讨论

未检索到其他针对肾性高血压进行经济负担研究的文献报道，本研究结果示研究对象年龄主要集中在 30 ~ 60 岁，年龄分布基本符合《中国肾性高血压管理指南 2016（简版）》的描述，指南提到年龄增长是肾性高血压的重要危险因素，40 岁后肾小球滤过率每年下降约 1%^[10]。

本研究根据 WHO 推荐的 DDDs 值对用药进行分析^[11]，发现肾性高血压需要多种药物联合治疗，其中使用两类药品联合治疗的最多；所用药

品类别中 DDDs 总值排序前三的药品是 CCB、 α 受体阻滞剂和 ARB。究其原因可能是因为 CCB 主要经过肝脏排泄，治疗肾性高血压无绝对禁忌证，且可与其他药物联合使用^[12]。而指南推荐的治疗肾性高血压中占有重要地位的 ACEI 和 ARB 类药物的使用相对没有那么多，可能是因为这两类药物药理作用接近，一般只选其中一种；同时研究所在医院为三级甲等医院，接收的患者肾功能大部分为终末期（70.42% 为五期），ACEI/ARB 类药物存在相对禁忌的问题。本研究显示沙库巴曲缬沙坦钠片越来越受欢迎，有文献报道长期应用沙库巴曲缬沙坦钠片可缓解血液透析患者心力

表 4 2019—2022 年各项医疗费用统计情况

Tab 4 Statistics on various medical expenses from 2019 to 2022

年份	住院总费用 / 元			医保费用 / 元			日人均住院费用 / 元
	$\bar{x} \pm s$	中位数	$P_{25} \sim P_{75}$	$\bar{x} \pm s$	中位数	$P_{25} \sim P_{75}$	
2019	28 220.50 ± 63 731.25	11766.48	7521.07 ~ 19 277.06	9479.61 ± 22 525.75	3883.46	0 ~ 8429.04	2783.91
2020	24 521.65 ± 52 708.32	11334.28	7469.94 ~ 18 522.07	8373.37 ± 19 385.83	3674.72	0 ~ 7710.45	2262.83
2021	15 452.16 ± 28 925.85	9606.79	6554.58 ~ 14 612.99	4928.80 ± 9958.31	2617.92	0 ~ 5570.21	1769.60
2022	19 349.22 ± 35 053.97	9769.79	6239.34 ~ 17 008.87	7274.06 ± 13 458.85	3618.17	1544.66 ~ 7490.08	2053.84

年份	西药费 / 元			住院天数 / d			日人均住院费用 / 元
	$\bar{x} \pm s$	中位数	$P_{25} \sim P_{75}$	$\bar{x} \pm s$	中位数	$P_{25} \sim P_{75}$	
2019	8197.59 ± 23 805.74	2226.30	1165.43 ~ 4980.66	10.14 ± 9.60	8.00	6.00 ~ 12.00	2783.91
2020	6965.58 ± 22 368.00	2064.74	1048.81 ~ 4435.07	10.42 ± 9.22	8.00	6.00 ~ 12.00	2262.83
2021	4206.27 ± 11 428.32	1805.87	844.27 ~ 3515.32	8.73 ± 6.14	7.00	5.00 ~ 11.00	1769.60
2022	6134.39 ± 15 587.94	1932.32	962.37 ~ 4188.67	9.42 ± 8.32	7.00	5.00 ~ 11.00	2053.84

表 5 2019—2022 年患者人均住院费用及构成

Tab 5 Per capita hospitalization cost and composition of inpatients from 2019 to 2022

年份	诊断类			治疗类			西药类		
	均数 / 元	中位数 / 元	占比 / %	均数 / 元	中位数 / 元	占比 / %	均数 / 元	中位数 / 元	占比 / %
2019	6042.15	4541.75	21.41	3870.13	1928.00	13.71	8197.59	2226.30	29.05
2020	5952.44	4709.50	24.42	3520.96	1762.00	14.44	6965.58	2064.74	28.57
2021	5136.28	4241.50	33.24	2804.72	1521.50	18.15	4206.27	1805.87	27.22
2022	5348.49	4173.50	27.64	3230.34	1561.00	16.69	6134.39	1932.32	31.70

年份	中成药及草药类			耗材类			其他类		
	均数 / 元	中位数 / 元	占比 / %	均数 / 元	中位数 / 元	占比 / %	均数 / 元	中位数 / 元	占比 / %
2019	177.98	32.24	0.63	3083.84	771.36	10.93	6848.81	964.00	24.27
2020	161.94	109.44	0.66	2875.10	657.70	11.22	5042.28	938.00	20.68
2021	134.60	64.38	0.87	1876.99	288.75	12.15	1293.31	812.00	8.37
2022	129.60	32.19	0.67	2500.68	292.42	12.92	2005.73	816.00	10.37

表 6 肾性高血压患者直接经济负担的单因素回归分析

Tab 6 Univariate regression analysis of direct economic burden for patients with renal hypertension

变量	住院总费用 / 元			χ^2/t (取对数)	P 值				
	$\bar{x} \pm s$	中位数	$P_{25} \sim P_{75}$						
性别	男	45 247.68 ± 93 737.30	11 013.90	7355.34 ~ 22 770.98	4.32	< 0.001			
	女	31 781.01 ± 70 898.63	10 463.38	6749.44 ~ 18 751.94					
年龄 / 岁	≤ 18	97 807.36 ± 122 072.05	23 364.25	8710.91 ~ 164 481.48	- 6.71	< 0.001			
	19 ~ 30	48 093.49 ± 87 412.86	12 025.49	7227.35 ~ 47 290.05					
	31 ~ 45	47265.42 ± 96 648.35	10 468.935	6782.01 ~ 22 298.20					
	46 ~ 60	35 221.62 ± 82 507.34	10 231.535	7178.94 ~ 18 131.27					
	> 60	22 425.67 ± 46 736.21	11 582.64	7512.83 ~ 18 689.74					
住院天数 / d	1 ~ 5	7129.24 ± 4932.59	6209.39	4467.51 ~ 8789.73	65.15	< 0.001			
	6 ~ 10	11 656.85 ± 9854.51	9809.02	7477.63 ~ 12 898.33					
	11 ~ 15	41 894.44 ± 70 800.28	18 419.8	13 307.89 ~ 29 819.60					
	16 ~ 20	112 320.70 ± 124 587.72	48 462.78	22 835.09 ~ 181 635.50					
	21 ~ 25	154 184.77 ± 139 636.59	76 920.51	37 597.47 ~ 309 030.00					
	26 ~ 30	149 525.10 ± 132729.32	78 546.01	53 730.88 ~ 302 719.28					
	> 30	226 463.81 ± 161 998.44	170 352.23	90 427.34 ~ 361 347.11					
	医保类型	新农合	23 922.08 ± 51515.79	9782.36			5859.31 ~ 17 490.99	- 6.24	< 0.001
		城镇居民基本医疗保险	9925.33 ± 6175.03	11 217.34			*		
城镇职工基本医疗保险		29 803.74 ± 66 794.70	10159.12	6147.13 ~ 17897.38					
异地医保		31 186.58 ± 60 576.35	11 293.01	7235.44 ~ 22 064.45					
自费		32 732.45 ± 77 487.93	9948.05	7337.83 ~ 16 207.89					
是否进行肾移植	其他	59 240.56 ± 110 146.35	12 731.68	7854.71 ~ 33 828.97	6.56	< 0.001			
	是	55 185.02 ± 98 962.60	18 351.03	8272.2 ~ 53 810.55					
肾脏病分期	否	37 931.58 ± 83 451.78	10461.97	7070.49 ~ 18 637.04	5.10	< 0.001			
	五期	46 591.65 ± 96 659.96	11 060.98	7454.00 ~ 20 152.11					
	四期	13 837.57 ± 16 030.57	8976.68	6099.69 ~ 13 565.11					
	三期	15 494.45 ± 18 044.05	8311.62	5801.45 ~ 18 730.3					
	其他	24 058.82 ± 46 131.29	9908.66	6273.36 ~ 23 219.88					

注 (Note): * 代表医保类型为城镇居民基本医疗保险患者仅为 3 例, 故四分位数显示结果不完整 (* represent only 3 patients have urban residents' basic medical insurance, so the Quartile display is incomplete).

表 7 肾性高血压患者直接经济负担影响因素及赋值

Tab 7 Influencing factors and assignments of direct economic burden in patients with renal hypertension

因素	变量名	量化方法或单位
人均住院总费用(对数转换值)	Y	元
性别	X ₁	0 = 女; 1 = 男
年龄	X ₂	1 = 18 岁及以下; 2 = 19 ~ 30 岁; 3 = 31 ~ 45 岁; 4 = 46 ~ 60 岁; 5 = 60 岁以上
住院天数	X ₃	0 = 1 ~ 5 d; 1 = 6 ~ 10 d; 2 = 11 ~ 15 d; 3 = 16 ~ 20 d; 4 = 21 ~ 25 d; 5 = 26 ~ 30 d; 6 = 30 d 以上
是否进行肾移植	X ₄	0 = 否; 1 = 是
医保类型	X ₅	0 = 其他; 1 = 异地医保; 2 = 城镇职工基本医疗保险; 3 = 城镇居民基本医疗保险; 4 = 新农合; 5 = 自费
慢性肾脏病分期	X ₆	0 = 其他; 1 = 慢性肾脏病三期; 2 = 慢性肾脏病四期; 3 = 慢性肾脏病五期

表 8 肾性高血压患者直接经济负担多元逐步回归分析

Tab 8 Multiple linear regression analysis of direct economic burden in patients with renal hypertension

变量	偏回归系数β	偏回归系数标准误	标准偏回归系数β'	t 值	P 值
(常量)	3.729	0.024		152.776	< 0.001
住院天数	0.266	0.004	0.789	74.722	< 0.001
是否进行肾移植	0.053	0.019	0.032	2.720	0.007
慢性肾脏病分期	0.045	0.004	0.118	10.283	< 0.001
性别	0.035	0.011	0.034	3.246	0.001
年龄	- 0.017	0.006	- 0.032	- 3.111	0.002

衰竭症状的严重程度^[13-14]。

研究结果提示人均住院总费用构成中西药费用占比 3 年居首位, 住院天数越长、进行肾移植及慢性肾脏病分期靠后等因素会导致总住院费用增加。因此, 可通过以下措施降低肾性高血压患者的经济负担: ① 早筛查早诊断早治疗, 延缓 CKD 进展; ② 优化用药方案和治疗方案, 缩短住院时间; ③ 积极开展药物经济学评价, 完善社会基本医疗保险和医疗保障制度, 优化卫生资源的配置。

本研究对肾性高血压的用药情况和经济负担展开研究, 对该病的临床决策及医保相关政策的制定均有重要指导意义。但本研究也存在一定的局限性: 首先, 研究中约 90% 的患者来自湖南, 对全国的代表性较差; 其次, 本研究主要考虑直接经济负担, 如医药费、检查费、治疗费、护理费等, 未考虑间接经济负担, 如患者本人及陪护人员的误工费; 最后, 未对治疗方案进行详细的合理性分析, 未来可进行更深入的研究, 以便为合理用药方案提供参考。

参考文献

[1] 彭晖, 张俊, 张悦阳. 慢性肾脏病患者降压药物使用指引[J]. 今日药学, 2022, 33 (2): 81-94.
 [2] 汤曦, 石运莹, 王俭勤, 等. 中国成人慢性肾脏病及其并发症早期筛查临床路径专家建议(2023 版)[J]. 中国实用内科杂志, 2023, 43 (3): 198-205.
 [3] 余乐, 俞雨生. 血管紧张素受体-脑啡肽酶抑制剂在肾性高血压的应用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2021, 30 (5): 485-490.

[4] WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. ATC/DDD Index 2023 [EB/OL]. (2023-01-23) [2023-04-20]. https://www.whocc.no/atc_ddd_index/.
 [5] 陈新谦. 新编药理学[M]. 18 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
 [6] Yan Z, Wang Y, Li SM, et al. hypertension control in adults with ckd in China: baseline results from the Chinese cohort study of chronic kidney disease (C-STRIDE) [J]. Am J Hypertens, 2018, 31 (4): 486-494.
 [7] 韦凤桥. 我院 2017—2018 年口服降压药用药分析[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13 (22): 82-83, 86.
 [8] 中华医学会肾脏病学分会专家组. 中国慢性肾脏病患者高血压管理指南(2023 年版)[J]. 中华肾脏病杂志, 2023, 39 (1): 48-80.
 [9] 《中国高血压防治指南》修订委员会. 中国高血压防治指南(2018 年修订版)[J]. 中国心血管杂志, 2019, 24 (1): 24-56.
 [10] 中国医师协会肾脏内科医师分会, 中国中西医结合学会肾脏疾病专业委员会. 中国肾性高血压管理指南 2016 (简版)[J]. 中华医学杂志, 2017, 97 (20): 1547-1555.
 [11] 李丹, 宫建, 孙晓辉, 等. 住院高血压患者的药物利用研究[J]. 中南药学, 2017, 15 (10): 1470-1472.
 [12] 刘菁, 曾筱茜, 程一鸣, 等. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂相关联合用药策略的降压疗效及肾脏保护作用[J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39 (5): 470-473.
 [13] 汪雪华, 官红权, 陈志坚. 血管紧张素受体-脑啡肽酶抑制剂在高血压及其并发症中的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2022, 38 (2): 95-100.
 [14] 田丹, 李静, 李晓桦, 等. 沙库巴曲缬沙坦钠处方点评及用药合理性分析[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (17): 1837-1841.

(收稿日期: 2023-03-27; 修回日期: 2023-05-18)

3 种碳青霉烯类药物联合头孢哌酮钠舒巴坦钠对泛耐药鲍曼不动杆菌感染的 PK/PD 研究

许亚洲¹, 石祥奎¹, 曹加², 刘杰³, 刘莹^{3*} (1. 徐州市妇幼保健院药事科, 江苏 徐州 221009; 2. 南京医科大学第一附属医院药学部, 南京 210029; 3. 徐州市妇幼保健院检验科, 江苏 徐州 221009)

摘要: **目的** 探讨亚胺培南 (IMP)、美罗培南 (MEN)、比阿培南 (BMP) 3 种碳青霉烯类与头孢哌酮钠舒巴坦钠 (CFS) 单用和联合用药对泛耐药鲍曼不动杆菌 (XDR-AB) 的体外抑菌作用, 通过蒙特卡罗模拟评价筛选最佳给药方案。**方法** 分离收集 54 株 XDR-AB, 基于微量肉汤稀释法测定单独及联合用药的最低抑菌浓度值 (MIC), 上计算抑菌浓度指数 (FIC), 结合药动学/药效学 (PK/PD) 参数, 通过蒙特卡罗模拟对治疗方案进行优化。**结果** 联合用药主要显示为协同作用和相加作用, 与单用药相比, 联合用药的累积抑菌百分率曲线左移。蒙特卡罗模拟结果显示, 在限定用药剂量范围内通过延长静脉滴注时间, 5 种亚胺培南和 2 种比阿培南联合用药方案可获得有效的累积反应分数 (CFR) 目标值; 在联合用药方案中, 延长 CFS 静脉滴注时间并使舒巴坦钠用量达到 $9 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 可获得有效的 CFR 目标值。**结论** 体外研究结果显示, CFS 联合 3 种碳青霉烯类对 XDR-AB 有效, 但蒙特卡罗模拟显示需增加其给药次数、延长静脉滴注时间并加大用药剂量对 XDR-AB 才可获得有效的 CFR 目标值。

关键词: 碳青霉烯类; 头孢哌酮钠舒巴坦钠; 蒙特卡罗模拟; 泛耐药鲍曼不动杆菌

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3051-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.038

Pharmacokinetics/pharmacodynamics of three carbapenems combined with cefoperazone sodium and sulbactam sodium against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* infection

XU Ya-zhou¹, SHI Xiang-kui¹, CAO Jia², LIU Jie³, LIU Ying^{3*} (1. Department of Pharmacy, Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital, Xuzhou Jiangsu 221009; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; 3. Department of Laboratory Medicine, Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital, Xuzhou Jiangsu 221009)

Abstract: Objective To evaluate three carbapenems (imipenem, meropenem, and biapenem) used alone or in combination with cefoperazone sodium and sulbactam sodium (CFS) against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* (XDR-AB). Monte Carlo simulation (MCS) was used to evaluate the optimal dosing regimen. **Methods** Totally 54 isolates of XDR-AB were collected. The minimum inhibitory concentration (MIC) was tested by agar dilution method and the fractional inhibitory concentration (FIC) calculated. According to the MIC and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) parameters, dosing regimens were optimized by MCS. **Results** Carbapenems in combination with CFS mainly showed synergistic effect and additive effect. Cumulative bacteriostatic percentage curve of drugs in combination obviously moved to the left compared with drugs used alone. Within maximum daily dose, five imipenem and two biapenem regimens in combination with prolonged intravenous infusion time obtained cumulative fraction of response value (CFR) by MCS. In addition, increased dose of CFS

基金项目: 江苏省研究型医院学会精益化用药-石药专项科研基金项目 (No.JY202026)。

作者简介: 许亚洲, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药学方面的研究, email: 15062103820@163.com *通信作者: 刘莹, 女, 硕士, 主管技师, 主要从事细菌耐药与临床合理用药方面的研究, email: 18000115591@163.com

in combination with sulbactam sodium ($9 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$) with prolonged intravenous infusion time obtained effective CFR. **Conclusion** Prolonged intravenous infusion time, high dose and increased frequency of administration result in effective CFRs for carbapenems in combination with CFS against XDR-AB.

Key words: carbapenems; cefoperazone sodium and sulbactam sodium; Monte Carlo simulation; extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*

泛耐药鲍曼不动杆菌 (XDR-AB) 作为一种临床常见的耐药严重的革兰氏阴性菌, 仅对 1~2 种潜在抗不动杆菌活性的药物敏感, 2019 年 CHINET 耐药监测结果显示鲍曼不动杆菌对绝大多数药物的耐药率在 50% 以上^[1], 且耐药呈逐年上升趋势, 一旦感染, 临床治疗难度大, 导致患者死亡的风险较高, 因此有必要对其进行重点研究^[2]。

对于这种病原菌感染的治疗, 国内专家共识推荐联合治疗用药^[3], 包括以舒巴坦钠或含舒巴坦钠的复合制剂、多黏菌素类、替加环素为基础的联合用药方案。头孢哌酮钠舒巴坦钠 (CFS) 因其舒巴坦钠成分对鲍曼不动杆菌具有一定的抗菌作用, 国内常用于治疗鲍曼不动杆菌感染; 碳青霉烯类也常作为治疗鲍曼不动杆菌感染的一线药物。相关研究证实碳青霉烯类药物联合 CFS 具有协同作用^[4-5], 但这种联合用药方案在用药剂量、静脉滴注时间以及给药间隔等方面缺乏明确的规定, 相关的药动学/药效学 (PK/PD) 评价研究也较为少见。蒙特卡罗模拟 (MCS) 通过结合抗菌药物的 PK 参数和 PD 参数, 计算目标获得概率 (PTA) 或对最低抑菌浓度值 (MIC) 群体获得的累积反应分数 (CFR) 目标值的大小, 从而确定最佳给药方案^[6-8], 现已作为一个快速、确切的 PK/PD 评价工具, 大量应用于抗菌方案的优化和疗效评价^[9-10]。本文在研究过程中利用抗菌药物在人体内的 PK 参数与 MIC, 结合药物稳定性, 基于蒙特卡罗方法进行模拟研究, 确定最佳给药方案, 为临床治疗用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 MIC 值的测定

54 株 XDR-AB 均经过法国梅里埃公司 Vitek 细菌鉴定系统鉴定。采用棋盘设计微量肉汤稀释法对亚胺培南 (IMP, 规格: 0.5 g/支, 深圳市海滨制药有限公司, 批号: H20059131), 美罗培南 (MEN, 规格: 0.5 g/支, 珠海联邦制药股份有限公司, 批号: H20113179), 比阿培南 (BMP, 规格: 0.3 g/支, 江苏正大天晴药业股份有限公司, 批号: H20080743), 三种碳青霉烯类与 CFS (2:1, 规格: 1.5 g/支, 哈药集团三精明水药业有限公司, 批号: H20054454)。进行单药和联合药敏 MIC 测定, 基

于 CLSI 标准^[11], 确定菌株的 MIC 值。

1.2 抑菌浓度指数 (FIC)

基于单独和联合用药测定的 MIC 值, 计算 FIC, $FIC = (\text{甲药联合用药 MIC 值} / \text{甲药单独用药 MIC 值}) + (\text{乙药联合用药 MIC 值} / \text{乙药单独用药 MIC 值})$ 。FIC ≤ 0.5 表示协同作用; $0.5 < FIC \leq 1$ 表示相加作用; $1 < FIC \leq 2$ 表示无关作用; FIC > 2 表示拮抗作用^[12]。

1.3 药动学参数确定

IMP、MEN、BMP 3 种碳青霉烯类与 CFS 均属于时间依赖性抗菌药物, PK/PD 评价指标为: $f\%T > MIC$; 可按照下列公式计算^[13]: $f\%T > MIC = \ln \{ (\text{Dose} \times f) / (V_d \times MIC) \} \times (t_{1/2} / 0.693\tau) \times 100\%$ 。Dose 代表每次用药剂量, f 代表游离药物百分率, V_d 代表表观分布容积, MIC 代表最低抑菌浓度, 指药敏测定所获得的 MIC 群体数据^[14], $t_{1/2}$ 代表药物生物半衰期, τ 代表用药时间间隔。在研究过程中根据相关资料, 明确每种药物在人体的 PK 参数、日最大用药剂量以及药物稳定性^[15-18], 具体见表 1。

1.4 MCS

模拟分析应用水晶球软件, $40\%T > MIC$ 代表碳青霉烯类对 XDR-AB 的杀菌 PD 目标^[19], 在特定部位感染时, PD 目标为 $60\% \sim 100\%T > MIC$ ^[20]。CFS 参照头孢哌酮的 PD 目标为 $50\%T > MIC$ 。研究过程中假设 V_d 、 $t_{1/2}$ 遵循对数正态分布, f 遵循均匀分布, MIC 遵循自定义分布。模拟次数为 10 000 次, 模拟结果采用 CFR 描述, 当用药方案获得的 CFR $\geq 90\%$ 可认为其可能有效, 给药方案最优。

参考相关文献及药物说明书^[21-22], IMP、MEN 以及 BMP 每日最大用药剂量应分别低于 4 g、6 g 以及 1.2 g, 在室温条件下的稳定时间为 4 h、4 h (1 h/5% 葡萄糖溶媒) 以及 5 h (10 h/0.9% 氯化钠注射液溶媒)。舒巴坦钠在专家共识中推荐的最大用药剂量为 6~8 g; CFS 在室温条件下的稳定时间为 3~3.5 h, 详见表 1。参考以上因素以及输液配置时间, 设定 IMP 静脉滴注最长时间为 3.5 h, MEN 静脉滴注最长时间为 3.5 h (0.5 h/5% 葡萄糖溶媒), BMP 静脉滴注最长时间为 4.5 h (9.5 h/0.9% 氯化钠注射液溶媒), CFS 静脉滴注最长时间为 3 h。

表 1 IMP、MEN、BMP 与头孢哌酮钠相关参数

Tab 1 Parameters for imipenem, meropenem, biapenem and cefoperazone sodium

药物	V_d/L	$t_{1/2}/h$	f	稳定时间/h	可选溶媒	日最大剂量/g
IMP	12.53±9.58	1.17±0.07	0.8 ~ 0.95	4	0.9%SCS, 5%GS, 5%GSC, 10%GS	4
MEN	13.48±2.94	1.08±0.198	0.85 ~ 0.98	4 (1)	0.9%SCS (5%GS)	6
BMP	21.51±5.75	1.04±0.17	0.898 ~ 0.963	5 (10)	5%GS, 5%GSC, 10%GS (0.9%SCS)	1.2
CFS 中头孢哌酮	10.99±0.62	1.55±0.75	0.065 ~ 0.3	3 ~ 3.5	0.9%SCS, 5%GS, 5%GSC, 10%GS	8

注 (Note): SCS. 氯化钠溶液 (sodium chloride solution); GS. 葡萄糖溶液 (glucose solution); GSC. 葡萄糖氯化钠 (glucose and sodium chloride)。

1.5 统计分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 单独用药与联合用药的 MIC 差异对比应用 t 检验, FIC 差异对比应用卡方检验。

2 结果

2.1 单独用药与联合用药的 MIC 值

IMP、MEN、BMP 与 CFS 单独用药的 MIC 范围、MIC 均值、MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 相关指标明显高于联合用药 ($P < 0.01$), 由此可推断联合用药可取得更好的效果, 相关结果见表 2。

表 2 IMP、MEN、BMP 和 CFS 单独用药及联合用药的 MIC 值

Tab 2 MIC distribution of imipenem, meropenem, biapenem singly and in combination with CFS against XDR-AB

药物	单独用药				联合方案	联合用药				P
	MIC 范围	MIC 均值	MIC ₅₀	MIC ₉₀		MIC 范围	MIC 均值	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
IMP	8 ~ 64	27.85	32	32	IMP + CFS	0.125 ~ 16	4.45	1	16	< 0.01
CFS	16 ~ 128	52.44	128	256		1 ~ 32	10.02	8	16	< 0.01
MEN	16 ~ 256	119.41	128	256	MEN + CFS	1 ~ 64	29.54	32	64	< 0.01
CFS	32 ~ 256	155.26	128	256		1 ~ 128	72.39	32	64	< 0.01
BMP	4 ~ 64	18.15	16	32	BMP + CFS	2 ~ 16	4.30	2	16	< 0.01
CFS	32 ~ 256	96.89	128	256		2 ~ 64	9.19	2	32	< 0.01

2.2 单独用药与联合用药的浓度累积抑菌百分率曲线

与单独用药相比, IMP、MEN、BMP 与 CFS 联合用药所获得的累积抑菌百分率曲线明显左移, 由此可推断联合用药可取得更好的效果, 见图 1 ~ 3。

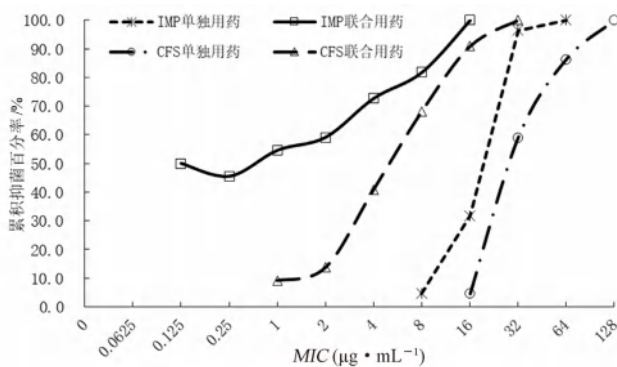


图 1 IMP 与 CFS 单独用药及联合用药的累积抑菌百分率曲线
Fig 1 Cumulative bacteriostatic percentage curve of IMP and CFS used alone or in combination against XDR-AB

2.3 FIC

3 种联合用药方案抑菌浓度指数所得结果主要为协同作用, 其次表现为相加作用, 不存在拮抗作用, FIC 值分布差异无统计学意义 ($\chi^2 = 6.406, P = 0.143$), 见表 3。

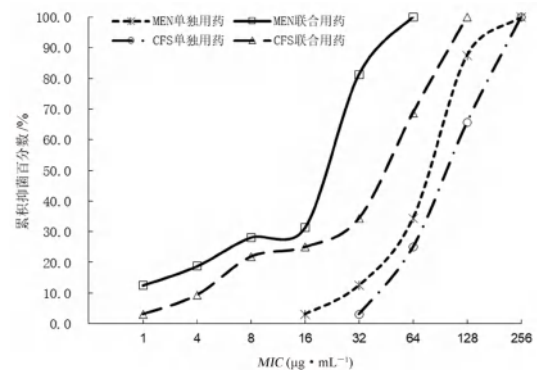


图 2 MEN 与 CFS 单独用药及联合用药的累积抑菌百分率曲线
Fig 2 Cumulative bacteriostatic percentage curve of MEN and CFS alone or in combination against XDR-AB

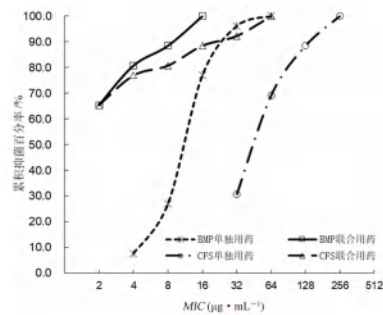


图 3 BMP 与 CFS 单独用药及联合用药的累积抑菌百分率曲线
Fig 3 Cumulative bacteriostatic percentage curve of BMP and CFS alone or in combination against XDR-AB

表 3 3 种联合用药方案抑菌浓度指数 (FIC) 分布

Tab 3 Fractional inhibitory concentration of 3 combination regimens

联合方案	协同 /%	相加 /%	无关 /%	拮抗 /%	P
IMP + CFS	79.63	12.96	7.41	0	0.143
MEN + CFS	40.74	38.89	20.37	0	
BMP + CFS	75.93	24.07	0	0	

2.4 IMP 与 CFS 单独用药及联合用药的 CFR 值

IMP 与 CFS 单独用药对 XDR-AB 不同用药方案所得 CFR 值远低于 90%，结果显示无效 (略)。

IMP 与 CFS 联合用药所得 CFR 值结果表明，仅一种 IMP 联合用药方案 (1 g q6h ivd) 可获得 40%T > MIC 有效 CFR 目标值，当延长 IMP 静脉滴注时间达到 1 ~ 3.5 h 可另外获得 4 种有效治疗方案 (0.5 g q6h ivgtt, 1 g q8h ivgtt, 1.5 g q12h ivgtt, 2 g q12h ivgtt)。联合治疗中舒巴坦钠在限定剂量范围内 CFS 显示无效，不过提高舒巴坦钠剂量至 9 g · d⁻¹，延长静脉滴注达到 3 h，CFS 获得的 CFR 值为 91.72% (见表 4)。

表 4 IMP 联合 CFS 对 XDR-AB 不同用药方案的 CFR 目标值 (%)

Tab 4 CFR target values of IMP in combination with CFS against XDR-AB in different dosage regimens (%)

		IMP 联合用药方案						CFS 联合用药方案					
总剂量 (≤ 4 单剂 g · d ⁻¹) /g	单剂量 /g	用药间隔 (τ) /h	静脉滴注时间 (T) /h	目标值 (CFR)				舒巴坦总剂量 (≤ 8 g · d ⁻¹) /g	舒巴坦单剂量 /g	头孢哌酮单剂量 /g	用药间隔 (τ) /h	静脉滴注时间 (T) /h	目标值 CFR 50%T > MIC
				40%T > MIC	60%T > MIC	80%T > MIC	100%T > MIC						
2	0.5	q6h	—	77.20				4	1	2	q6h	—	44.47
			1	86.89								1	54.19
			2	90.54								3	71.45
			3	93.39								—	44.02
			3.5	94.63	90.74							1	50.59
3	1	q8h	—	85.64				5	1.25	2.5	q6h	—	52.74
			1	90.35								1	60.16
			2	92.85								3	79.56
			3	95.87								—	59.70
			3.5	96.87	90.25							6	59.70
3	1.5	q12h	—	76.50				6	2	4	q8h	—	52.18
			1	81.25								1	67.47
			3.5	90.17								3	83.80
			—	93.09								—	59.80
			1	95.44								3	75.23
4	1	q6h	—	93.09				8	2	4	q6h	—	66.70
			1	95.44								3	75.23
			2	97.38	93.17							—	66.70
			3	98.78	96.12	92.62						1	75.08
			3.5	98.98	97.80	95.45	91.58					3	88.63
4	2	q12h	—	81.89				9	2.25	4.5	q6h	—	69.96
			1	85.58								1	79.35
			2	89.31								2	85.88
			3	92.74								3	91.72
			3.5	94.11								—	91.72

注 (Note)：—：表示无静脉滴注时间 (“—” means without intravenous infusion time)。

2.5 MEN 与 CFS 单独用药及联合用药的 CFR 值

MEN 与 CFS 单独用药对 XDR-AB 不同用药方案所获得的 CFR 值均较低，结果显示无效 (略)。联合用药结果显示，MEN 与 CFS 在限定剂量条件下，均无法获得有效 CFR 目标值 (见表 5)。

2.6 BMP 与 CFS 单独用药与联合用药的 CFR 值

BMP 与 CFS 单独用药对 XDR-AB 不同用药方案所得 CFR 值均远低于 90%，结果显示无效 (略)。两者联合用药结果表明：在限定剂量条件

下，当选择 0.9% 氯化钠为溶媒，其稳定性可达 10 h，BMP 2 种联合用药方案 (0.3 g q6h/ivgtt 5.8 h、0.6 g q12h/ivgtt 9.5 h) 可获得有效 CFR 目标值，见表 6。

3 讨论

本文结果显示，IMP、MEN、BMP 和 CFS 单独用药均无法获得有效的 CFR 目标值，而 3 种联合用药方案所获得的相关指标均明显降低，其累积抑菌百分率曲线也明显左移，从而说明联合用药对

表 5 MEN 联合 CFS 对 XDR-AB 不同用药方案的 CFR 目标值 (%)

Tab 5 CFR attainment of MEN in combination with CFS against XDR-AB for different dosage regimens (%)

MEN 联合用药方案					CFS 联合用药方案					
总剂量 (≤ 6 g · d ⁻¹)/g	单剂量/g	用药间隔 (τ)/h	静脉滴注时间 (T)/h	目标值 (CFR) 40%T > MIC	舒巴坦总剂量 (≤ 8 g · d ⁻¹)/g	舒巴坦单剂量/g	头孢哌酮单剂量/g	用药间隔 (τ)/h	静脉滴注时间 (T)/h	目标值 (CFR) 50%T > MIC
6	1.5	q6h	—	37.31	6	2	4	q8h	—	23.75
			3.5	84.84					3	36.66
6	2	q8h	—	30.92	8	2	4	q6h	—	33.21
			3.5	37.88					3	50.53

注 (Note): —: 表示无静脉滴注时间 (“—” means without intravenous infusion time)。

表 6 BMP 联合 CFS 对 XDR-AB 不同用药方案的 CFR 目标值 (%)

Tab 6 CFR attainment of BMP in combination with CFS against XDR-AB for different dosage regimens (%)

BMP 联合用药方案					CFS 联合用药方案					
总剂量 (≤ 1.2 g · d ⁻¹)/g	单剂量/g	用药间隔 (τ)/h	静脉滴注时间 (T)/h	目标值 (CFR) 40%T > MIC	舒巴坦总剂量 (≤ 8 g · d ⁻¹)/g	舒巴坦单剂量/g	头孢哌酮单剂量/g	用药间隔 (τ)/h	静脉滴注时间 (T)/h	目标值 (CFR) 50%T > MIC
1.2	0.3	q6h	—	51.27	6	1.5	3	q6h	—	74.94
			1	66.38					3	86.73
			5.5	89.17					—	69.72
			5.8	90.08					3	83.56
1.2	0.6	q12h	—	7.76	8	2	4	q6h	—	78.52
			1	15.66					3	89.14
			9	89.14					—	81.48
			9.5	91.64					1	84.04
									3	91.67

注 (Note): —: 表示无静脉滴注时间 (“—” means without intravenous infusion time)。

XDR-AB 的疗效显著提高。另外, 3 种联合用药方案的 FIC 结果主要显示为协同和相加作用, 较单药用药有显著优势。

MCS 结果显示, 碳青霉烯类在限定剂量条件下, 仅一种 IMP 联合用药方案可获得有效 CFR 目标值, 另外 6 种联合有效治疗方案均需要延长静脉滴注时间, 包括 4 种 IMP 以及 2 种 BMP 联合用药方案, 表明对于 XDR-AB 的治疗, 应该在联合用药的基础上, 适当地延长静脉滴注时间才可满足有效治疗要求。

提高联合用药方案中 CFS 的用药剂量、缩短用药间隔以及延长静脉滴注时间, 可获得 2 种有效治疗方案, 但舒巴坦钠剂量均达到 9 g · d⁻¹, 稍高于指南推荐的剂量, 一些学者认为目前 XDR-AB 耐药性明显增高, 在进行抗感染治疗时可以使舒巴坦钠的剂量高于 8 g · d⁻¹[23]。

通过对 3 种联合用药方案所获得的 MCS 结果进行对比分析, 可以看出, MEN 联合用药所获得的 CFR 值较其他 2 种碳青霉烯类偏低, 联合用药方案中 CFS 也无法获得有效的 CFR 目标值, 而且其 MIC 均值、MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 均高于 IMP 与 BMP, 由此可推断 XDR-AB 对 MEN 的耐药性较强, 有

研究表明 MEN 的使用与耐药率的增长存在显著相关性, 而其他碳青霉烯类却显示无相关性, 对鲍曼不动杆菌的防突变浓度, MEN 也高于 IMP, 较其他碳青霉烯类产生耐药的可能性更高 [24-26]。另外, 有研究表明鲍曼不动杆菌 AdeABC 外排泵系统对 MEN 具有更为显著的外排作用 [27], 这些原因可能造成 MEN 对鲍曼不动杆菌耐药性偏高。总的来说, 3 种碳青霉烯类药物对 XDR-AB 的耐药性均很高, 药物使用量接近限定剂量上限才可获得有效的 CFR 目标值, 因此增加了 XDR-AB 的治疗难度, 应引起临床注意。

舒巴坦钠可影响鲍曼不动杆菌的青霉素结合蛋白 PBP2, 表现出特有的抗菌作用 [28-29]。这种酶抑制剂在治疗过程中还可抑制细菌分泌的多种 β -内酰胺酶 (TEM1、TEM2、SHV1 等) 以及多种水解酶等, 体外研究也发现其能够抑制细菌的外排系统 [30]。鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药的最重要机制是产生 D 类碳青霉烯酶, 主要包括 OXA-23、OXA-24、OXA-51 等亚型。有研究显示 OXA-23 亚型在我国的阳性检出率最高, 达到 80% [31], 并且耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌菌株均携带 OXA-23 和 OXA-51 这 2 种碳青霉烯酶, 而

舒巴坦钠对产 OXA-23 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌表现出抑制作用并且在较高浓度时可能减少 D 类碳青霉烯酶对碳青霉烯抗菌药物的破坏作用^[32-34], 这些可能是碳青霉烯联合 CFS 对 XDR-AB 治疗有效的原因。

碳青霉烯联合 CFS 治疗方案多用于同时合并多重耐药肠杆菌科细菌感染的患者^[3], 对 XDR-AB 引起的肺部感染及呼吸机相关性肺炎也具有疗效确切、安全性好等优势, 并且对肝肾功能无明显副作用, 尤其适用于肝肾功能不良或潜在不良患者^[35-37], 因舒巴坦钠具有较高的血脑屏障透过率, 可提高术后 XDR-AB 颅内感染的治疗效果^[38]。对于以多黏菌素或替加环素为基础的联合治疗方案, 临床上多黏菌素 B 曾因具有很高的肾毒性和神经毒性被禁用, 但随着细菌耐药不断增加, 多黏菌素 B 在治疗耐药鲍曼不动杆菌方面的研究逐渐增多^[39]。替加环素主要批准应用于腹腔及皮肤软组织感染, 虽然替加环素并未批准应用于 XDR-AB 感染的肺炎, 但经验性治疗显示出较好的治疗效果^[40]。目前以多黏菌素或替加环素为基础的联合治疗仍是重要选择方案, 临床有治疗成功的病例, 但仍缺乏大规模临床研究^[3, 41]。

MCS 模拟通过结合药物 PK/PD 参数计算出 CFR 目标值, 为临床抗菌药物治疗方案的优化提供了一种新的研究思路。但本文也存在一定的不足: 首先 PK 参数来源于肝、肾功能正常的健康人群, 与临床实际感染患者的 PK 参数存在差异, 另外细菌 MIC 结果为体外实验获得, 因此 MCS 模拟结果不能完全代表临床实际治疗结果, 仍需临床大样本研究进行进一步验证。

总之, 碳青霉烯联合含舒巴坦钠酶抑制剂对于 XDR-AB 的体外治疗研究显示有效, 但 MCS 模拟结果表明需增加给药次数、延长静脉滴注时间并加大用药剂量才可获得有效 CFR 目标值, 本研究可为临床治疗提供参考, 也为同类型研究提供借鉴。

参考文献

- [1] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2019 年 CHINET 中国细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20 (3): 233-243.
- [2] Wood CR, Mack LE, Actis LA. An update on the *Acinetobacter baumannii* regulatory circuitry [J]. Trends Microbiol, 2018, 26 (7): 560-562.
- [3] 陈佰义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2012, 92 (2): 76-85.
- [4] Chen F, Wang L, Wang M, et al. Genetic characterization and in vitro activity of antimicrobial combinations of multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* from a general hospital in China [J]. Oncol Lett, 2018, 15 (2): 2305-2315.
- [5] 黎金海, 司徒冰, 郭旭光, 等. 舒巴坦钠联合 9 种抗菌药物对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌体外抗菌活性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (7): 676-681.
- [6] 周静超, 易萍, 陈琛, 等. 蒙特卡罗模拟在抗菌药物治疗方面的应用 [J]. 国际呼吸科杂志, 2014, 34 (2): 141-145.
- [7] Zhou JC, Ma P, Chen C, et al. Application of Monte Carlo simulation in antimicrobial agents therapy [J]. Int J Respir, 2014, 34 (2): 141-145.
- [8] Yu GH, Yi ZG, Gao CX, et al. Optimization of imipenem/cilastatin regimen by Monte Carlo simulation base on PK/PD [J]. Chin J Hosp Pharm, 2009, 29 (17): 1495-1497.
- [9] 刘峰, 邓贵新, 李雪芹, 等. PK/PD 模型结合蒙特卡罗模拟评价和优化耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌抗菌药物给药方案 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40 (20): 2126-2131.
- [10] 肖永红. 利用抗菌药物 PK/PD 优化感染治疗 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42 (12): 1033-1039.
- [11] M100S National Committee for Clinical Laboratory Standards [S]. CLSI, 2021.
- [12] 薛娜丽, 何艳佩, 范德平, 等. 亚胺培南、美罗培南、比阿培南联合头孢哌酮-舒巴坦钠对医院获得性 MRAB 的抗菌效果分析 [J]. 检验医学, 2021, 36 (8): 814-817.
- [13] Frei RC, Wiederhold NP, Burgess DS. Antimicrobial breakpoints for Gram-negative aerobic bacteria based on pharmacokinetic-pharmacodynamic models with Monte Carlo simulation [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61 (4): 621-628.
- [14] Wang H, Zhang B, Ni YX, et al. Pharmacodynamic target attainment of seven antimicrobials against Gram-negative bacteria collected from China in 2003 and 2004 [J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30 (5): 452-457.
- [15] 曹国颖, 孙春华, 万一英, 等. 健康人静脉滴注泰能的药代动力学研究 [J]. 中国新药杂志, 1992, 1 (6): 50-53.
- [16] 赵彩芸, 李家泰, 张莉, 等. 单次静脉美洛培南在健康人体的药代动力学 [J]. 中国临床药理学杂志, 2004, 20 (3): 189-192.
- [17] 胡毛钦, 张运好, 杨汉煜, 等. 注射用比阿培南的健康人体药代动力学研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26 (10): 742-756.
- [18] 魏敏吉, 赵彩芸, 齐慧敏, 等. 头孢哌酮钠舒巴坦钠 (1:1) 在健康成年与老年人的药代动力学 [J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23 (1): 28-32.
- [19] Samtani MN, Flamm R, Kaniga K, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic-model-guided doripenem dosing

- in critically ill patients [J]. *Antimicrobi Agents Chemother*, 2010, 54 (6): 2360-2364.
- [20] Craig WA. The pharmacology of meropenem, a new carbapenem antibiotic [J]. *Clin Infect Dis*, 1997, 24 (2): 266-275.
- [21] 黄品芳, 刘亦伟, 王长连, 等. 注射用比阿培南与 5 种输液配伍稳定性考察 [J]. *海峡药学*, 2011, 23 (9): 44-46.
- [22] 郑晓娟, 夏运岳, 金卫坤. 头孢哌酮钠/舒巴坦钠 3 种输液中的稳定性考察 [J]. *苏州大学学报 (医学版)*, 2002, 22 (6): 790-793.
- [23] Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, et al. Multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* resistance mechanisms and implications for therapy [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010, 8 (1): 71-93.
- [24] Sakyo S, Tomita H, Tanimoto K, et al. Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: the high potency of a new carbapenem doripenem [J]. *Antibiot*, 2006, 59 (4): 220-228.
- [25] Tanimoto K, Tomita H, Fujimoto S, et al. Fluoroquinolone enhances the mutation frequency for meropenem-selected carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but use of the high-potency drug doripenem inhibits mutant formation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52 (10): 3795-3800.
- [26] Credito K, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC. Mutant prevention concentrations of four carbapenems against Gram-negative rods [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (6): 2692-2695.
- [27] 豆清娅, 邹明祥, 李军, 等. AdeABC 外排泵系统与鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类药物耐药的关系 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2017, 42 (4): 426-433.
- [28] Penwell WF, Shapiro AB, Giacobbe RA, et al. Molecular mechanisms of sulbactam antibacterial activity and resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59 (3): 1680-1689.
- [29] Laishram S, Anandan S, Devi BY, et al. Determination of synergy between sulbactam, meropenem and colistin in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* isolates and correlation with the molecular mechanism of resistance [J]. *J Chemother*, 2016, 28 (4): 297-303.
- [30] Fass RJ, Gregory WW, D'Amato RF, et al. In vitro activities of cefoperazone and sulbactam singly and in combination against cefoperazone-resistant members of the family *Ectero bacteriaceae* and nonfermenters [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34 (11): 2256-2259.
- [31] 曹静平, 景春梅. 儿童感染碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌耐药性及耐药基因型分析 [J]. *重庆医学*, 2019, 48 (20): 3503-3506.
- [32] 王博, 磨国鑫, 周光, 等. 鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶对舒巴坦钠联合碳青霉烯类抗生素协同作用的影响 [J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42 (4): 438-450.
- [33] Oliveira MS, Prado GV, Costa SF, et al. Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp [J]. *Antimicrob Chemother*, 2008, 61 (6): 1369-1375.
- [34] Li T, Sheng MY, Gu TZ, et al. In vitro assessment of cefoperazone-sulbactam based combination therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10 (3): 1370-1376.
- [35] 王悦华, 于翠香, 孙淑娟, 等. 泛耐药鲍曼不动杆菌感染的治疗药物选择 [J]. *泰山医学院学报*, 2018, 39 (5): 598-600.
- [36] 凌双, 林尚奋, 杨春万, 等. 美罗培南联合头孢哌酮舒巴坦钠延长输注时间治疗泛耐药鲍曼不动杆菌性肺炎的临床研究 [J]. *临床医学工程*, 2018, 25 (3): 327-328.
- [37] 黄剑林. 碳青霉烯联合头孢哌酮舒巴坦钠治疗泛耐药鲍曼不动杆菌呼吸机相关性肺炎临床观察 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2017, 15 (5): 35-38.
- [38] 高靛, 司延斌. 舒巴坦钠联合美罗培南治疗泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染的用药分析 [J]. *药品评价*, 2017, 14 (22): 38-42.
- [39] 王妍, 郭晓芳, 陈显成, 等. 多粘菌素 B 为基础联合治疗泛耐药菌重症肺炎的临床观察 [J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19 (11): 976-980.
- [40] 金刚, 周倩倩, 王文昊, 等. 替加环素治疗老年泛耐药鲍曼不动杆菌肺部术后感染的临床分析 [J]. *中华肺部疾病杂志 (电子版)*, 2021, 14 (4): 469-471.
- [41] 李燕菊, 汪海涛, 马新萍, 等. 多粘菌素 B 联合头孢哌酮舒巴坦钠和替加环素治疗多重耐药鲍曼不动杆菌肺炎的疗效观察 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44 (2): 376-380.

(收稿日期: 2023-04-01; 修回日期: 2023-06-13)

基于治疗药物监测的齐拉西酮血药浓度 / 日剂量影响因素分析

鲍爽^{1,2}, 李新刚^{1*} (1. 首都医科大学附属北京友谊医院药学部, 北京 100050; 2. 首都医科大学附属北京安定医院, 北京 100088)

摘要: 目的 分析精神障碍患者服用齐拉西酮后血药浓度 / 日剂量 (C/D) 的影响因素, 为齐拉西酮的合理用药提供参考。方法 回顾性收集首都医科大学附属北京安定医院 2019—2021 年服用齐拉西酮的 185 例住院患者病历资料, 采用 SPSS 21.0 分析性别、年龄、体质指数 (BMI)、日剂量以及联合用药对齐拉西酮 C/D 的影响。结果 齐拉西酮血药浓度 (116.19 ± 73.73) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, C/D (1.21 ± 0.72) ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) / ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$)。女性组齐拉西酮 C/D 显著高于男性组, 体重正常组 C/D 显著高于超重组, 联合使用丙戊酸组显著低于未联合使用组, 联合使用劳拉西泮组显著高于未联合使用组 (P 均 < 0.05); 年龄和日剂量对齐拉西酮 C/D 无显著影响。结论 齐拉西酮血药浓度个体间差异大, 影响因素复杂, 性别、BMI 及联合用药均可能引起血药浓度变化, 临床应用时应结合疗效与治疗药物监测进行治疗方案的优化。

关键词: 齐拉西酮; 治疗药物监测; 血药浓度; 合理用药

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3058-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.039

Influence factors of drug concentration/dose of ziprasidone based on therapeutic drug monitoring

BAO Shuang^{1,2}, LI Xin-gang^{1*} (1. Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050; 2. Beijing Anding Hospital, Capital Medical University, Beijing 100088)

Abstract: Objective To determine the factors affecting the serum concentration/dose (C/D) of ziprasidone in patients with mental disorders, and to provide reference for clinical rational drug use. **Methods** We retrospectively collected the medical records of 185 inpatients with mental disorders who received ziprasidone treatment in Beijing Anding Hospital, Capital Medical University from 2019 to 2021. The effect of gender, age, body mass index (BMI), dosage and drug combination on C/D was statistically analyzed by SPSS 21.0. **Results** The serum concentration and C/D of ziprasidone was (116.19 ± 73.73) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (1.21 ± 0.72) ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) / ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) respectively. The C/D of ziprasidone in the female group was higher than that in the male group, the C/D of the normal weight group was higher than that of the overweight group, the C/D of valproate group was lower than that of the non-valproate group, the C/D of lorazepam group was higher than that of the non-lorazepam group (P all < 0.05). No significant difference in C/D between age and dosage was found. **Conclusion** The serum concentrations of ziprasidone vary greatly among individuals with complicated influential factors. Gender, BMI and medication combination might cause fluctuations in the serum concentration of ziprasidone. We should combine clinical efficacy and therapeutic drug monitoring to optimize therapeutic regimen.

Key words: ziprasidone; therapeutic drug monitoring; serum concentration; rational drug use

精神分裂症是一种临床常见的精神障碍, 我国成人患病率为 0.6%^[1]。目前, 临床一般推荐第

二代抗精神病药物用于治疗精神分裂症。齐拉西酮作为临床常用的第二代抗精神病药物, 广泛用

基金项目: 北京市属医院科研培育计划 (No.PZ2020031)。

作者简介: 鲍爽, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: baoshuang2010@163.com * 通信作者: 李新刚, 男, 主任药师, 主要从事药事管理及药代动力学研究, email: lxg198320022003@163.com

于精神分裂症和双相情感障碍的治疗^[2], 此外, 还可用于治疗抑郁障碍^[3] 以及改善认知功能^[4]。齐拉西酮主要不良反应为嗜睡、头晕、恶心和头重脚轻, 偶有心动过速、直立性低血压和便秘, 还可引起轻度至中度的、剂量依赖性的 QTc 间期延长^[2]。为了保障患者用药的安全性, 神经精神药理学与药物精神病学协会 (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie, AGNP) 2017 版共识指南^[5] 推荐在临床应用过程中对齐拉西酮进行常规的血药浓度监测。齐拉西酮治疗参考浓度范围为 50 ~ 200 ng · mL⁻¹, 警戒浓度为 400 ng · mL⁻¹, 血药浓度 / 日剂量 (C/D) 参考范围为 1.14 ~ 2.03 (ng · mL⁻¹) / (mg · d⁻¹)^[5]。目前, 关于齐拉西酮药代动力学与治疗药物监测的研究较少, 本研究通过收集病历资料, 回顾性分析影响齐拉西酮 C/D 的因素, 为齐拉西酮的个体化用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

回顾性收集 2019 年 1 月至 2021 年 12 月于首都医科大学附属北京安定医院住院接受齐拉西酮治疗并进行血药浓度监测的精神障碍患者的人口学资料以及用药信息, 包括性别、年龄、身高、体重、给药剂量、给药频率、联合用药以及血药浓度等资料。本研究方案已获得首都医科大学附属北京安定医院伦理委员会批准 [伦理批件号: (2022) 科研第 (154) 号]。

纳入标准: ① 临床诊断符合《国际疾病分类 (第 10 版)》精神疾病诊断标准; ② 住院口服齐拉西酮且血药浓度达到稳态; ③ 年龄 18 ~ 65 岁。排除标准: ① 患者信息不全; ② 血药浓度数据低于检测下限; ③ 严重肝肾功能不全者; ④ 合并其他严重躯体疾病者。

1.2 血液样本的采集与血药浓度测定

患者连续服用齐拉西酮, 经过 5 个半衰期后体内齐拉西酮血药浓度达到稳态, 于清晨服药前采集患者静脉血 3 ~ 5 mL, 采用二维液相色谱法检测齐拉西酮血药浓度。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 计数资料以频数 (%) 表示, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。符合正态分布的资料采用单因素方差分析进行组间比较, 否则采用 Mann-Whitney, C/D 的影响因素采用多重线性回归分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共纳入 185 例患者, 共 547 例次符合纳入标准的齐拉西酮血药浓度数据, 其中, 男性 70 例 (195 例次, 占 35.65%), 女性 115 例 (352 例次, 占 64.35%), 年龄 (34.32 ± 12.93) 岁。齐拉西酮剂量 (100.26 ± 38.78) mg · d⁻¹, 剂量范围为 20 ~ 160 mg · d⁻¹; 齐拉西酮血药浓度 (116.19 ± 73.73) ng · mL⁻¹, 血药浓度范围 5.16 ~ 433.04 ng · mL⁻¹, 其中, 380 例次 (69.47%) 在治疗参考浓度范围内, 104 例次 (19.01%) 低于治疗参考浓度范围下限, 61 例次 (11.15%) 高于治疗参考浓度范围上限, 2 例次 (0.37%) 超过警戒浓度; 齐拉西酮 C/D (1.21 ± 0.72) (ng · mL⁻¹) / (mg · d⁻¹), C/D 范围 0.10 ~ 4.74 (ng · mL⁻¹) / (mg · d⁻¹)。患者 BMI (26.48 ± 6.08) kg · m⁻², 范围 15.6 ~ 58.8 kg · m⁻² (见表 1)。

表 1 患者的一般资料

Tab 1 Basic information of patients

项目	结果
性别 (男 / 女) / 患者数 (例次数)	70 (195) / 115 (352)
年龄 / 岁	34.32 ± 12.93
日剂量 / (mg · d ⁻¹)	100.26 ± 38.78
血药浓度 / (ng · mL ⁻¹)	116.19 ± 73.73
C/D [(ng · mL ⁻¹) / (mg · d ⁻¹)]	1.21 ± 0.72
BMI / (kg · m ⁻²)	26.48 ± 6.08

2.2 性别、年龄、BMI、日剂量以及联合用药对齐拉西酮 C/D 的影响

2.2.1 性别对 C/D 的影响 将患者按照性别分为男性组 (n = 195) 和女性组 (n = 352), 经比较, 女性患者 C/D 显著高于男性 (P < 0.05), 提示给予相同剂量的齐拉西酮, 女性患者具有更高的稳态谷浓度 (见表 2)。

2.2.2 年龄对 C/D 的影响 将患者按照年龄分为青年组 (< 40 岁, n = 356) 和中年组 (≥ 40 岁, n = 191)。经比较, 两组间差异无统计学意义 (P > 0.05), 说明年龄不影响患者齐拉西酮 C/D (见表 2)。

2.2.3 BMI 对 C/D 的影响 将患者按照中国 BMI 标准^[6] 分为 4 组: 体重过低 (< 18.5 kg · m⁻², n = 44), 体重正常 (18.5 ~ 23.9 kg · m⁻², n = 154), 超重 (24.0 ~ 27.9 kg · m⁻², n = 150) 和肥胖 (≥ 28.0 kg · m⁻², n = 199)。经比较, 体重正常组齐拉西酮 C/D 显著高于超重组 (P < 0.05) (见表 2)。

2.2.4 日剂量对 C/D 的影响 将患者按照日剂量分为低剂量组 (< 100 mg · d⁻¹, n = 247) 和高剂量组 (≥ 100 mg · d⁻¹, n = 300), 经比较, 两组间差异无统计学意义 (见表 2)。

2.2.5 联合用药对 C/D 的影响 本研究共涉及联合用药 32 种, 表 2 仅列出了与齐拉西酮联合使用频次排名前三位的药物分别为丙戊酸 ($n = 308$)、劳拉西泮 ($n = 227$) 和碳酸锂 ($n = 201$), 分别联合使用丙戊酸、劳拉西泮和碳酸锂组与对应

的未联合使用组之间的 C/D 进行比较, 结果发现, 齐拉西酮联合使用丙戊酸组显著低于未联合使用组, 联合使用劳拉西泮组显著高于未联合使用组 ($P < 0.05$), 碳酸锂对齐拉西酮的 C/D 无影响 (见表 2)。

表 2 性别、年龄、BMI、日剂量以及联合用药对齐拉西酮 C/D 的影响
Tab 2 Effect of sex, age, BMI, dosage and combination on C/D of ziprasidone

项目		n (%)	日剂量 / (mg · d ⁻¹)	血药浓度 / (ng · mL ⁻¹)	C/D / (ng · mL ⁻¹) / (mg · d ⁻¹)
性别	男	195 (35.65)	105.64 ± 38.25	105.01 ± 73.26	1.02 ± 0.65
	女	352 (64.35)	97.27 ± 38.81	122.39 ± 73.35	1.31 ± 0.74 [*]
年龄 / 岁	< 40	356 (65.08)	102.98 ± 37.73	121.32 ± 72.41	1.22 ± 0.68
	≥ 40	191 (34.92)	95.18 ± 40.29	106.63 ± 75.39	1.18 ± 0.79
BMI / (kg · m ⁻²)	< 18.5	44 (8.04)	90.00 ± 46.95	114.55 ± 77.78	1.43 ± 0.87
	18.5 ~ 23.9	154 (28.15)	96.10 ± 39.68	122.80 ± 83.52	1.35 ± 0.87
	24.0 ~ 27.9	150 (27.42)	107.47 ± 35.11	116.19 ± 76.86	1.06 ± 0.57 [*]
	≥ 28.0	199 (36.38)	100.30 ± 38.06	111.44 ± 61.50	1.16 ± 0.62
日剂量 / (mg · d ⁻¹)	< 100	247 (45.16)	64.29 ± 19.49	78.05 ± 53.64	1.27 ± 0.84
	≥ 100	300 (54.84)	129.87 ± 22.04	147.59 ± 73.27	1.16 ± 0.60
联合用药	合用丙戊酸	308 (56.31)	100.32 ± 37.94	107.17 ± 65.66	1.09 ± 0.57
	未合用丙戊酸	239 (43.69)	100.17 ± 39.92	127.81 ± 81.66	1.36 ± 0.85 [△]
	合用劳拉西泮	227 (41.50)	94.19 ± 38.53	121.27 ± 82.23	1.34 ± 0.82
	未合用劳拉西泮	320 (58.50)	104.56 ± 38.44	112.59 ± 66.95	1.11 ± 0.63 [#]
	合用碳酸锂	201 (36.75)	102.69 ± 35.59	113.65 ± 65.08	1.16 ± 0.63
	未合用碳酸锂	346 (63.25)	98.84 ± 40.50	117.66 ± 78.37	1.24 ± 0.77

注: 与男性组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 BMI 18.5 ~ 23.9 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与合用丙戊酸组比较, [△] $P < 0.05$; 与合用劳拉西泮组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with male group, ^{*} $P < 0.05$; compared with BMI 18.5 ~ 23.9 group, ^{*} $P < 0.05$; compared with valproate group, [△] $P < 0.05$; compared with lorazepam group, [#] $P < 0.05$.

2.3 齐拉西酮 C/D 影响因素多重线性回归分析

本研究将性别、年龄、BMI、日剂量以及联合用药作为自变量纳入回归方程中, 探讨影响齐拉西酮 C/D 的因素。结果表明, 性别、超重以及联合 (丙戊酸、劳拉西泮、氯氮平、坦度螺酮、度洛西汀或氯丙嗪) 是影响齐拉西酮 C/D 的因素, 差异具有统计学意义 ($R^2 = 0.142$, $F = 12.300$, $P < 0.001$), 见表 3。其中, 女性比男性的 C/D 更高, 超重组相比体重正常组 C/D 较低, 联合使用丙戊酸或氯氮平可降低 C/D, 联合使用劳拉西泮、坦度螺酮、度洛西汀或氯丙嗪可升高 C/D。

3 讨论

在多重线性回归分析中, 本研究探讨了性别、年龄、BMI、日剂量以及联合用药对齐拉西酮 C/D 的影响, 结果显示, 性别、超重、联合用药 (丙戊酸、劳拉西泮、氯氮平、坦度螺酮、度洛西汀或氯丙嗪) 仅能解释 14.2% 的原因, 表明齐拉西酮血药浓度影响因素复杂, 其药代动力学存在较大个体间差异。因此, 建议临床在使用齐

表 3 不同协变量对齐拉西酮血药浓度的影响的多重线性回归分析

Tab 3 Regression analysis of effect of different covariates on plasma concentration of ziprasidone

模型	非标准化系数		标准系数	t	P
	B	标准误差	(β)		
常数项	1.360	0.058	—	23.395	< 0.001
性别	- 0.219	0.062	- 0.146	- 3.517	< 0.001
超重	- 0.138	0.065	- 0.085	- 2.129	0.034
丙戊酸	- 0.214	0.061	- 0.147	- 3.502	< 0.001
劳拉西泮	0.180	0.060	0.123	3.015	0.003
氯氮平	- 0.392	0.145	- 0.112	- 2.714	0.007
坦度螺酮	0.627	0.212	0.133	2.962	0.003
度洛西汀	0.811	0.311	0.117	2.611	0.009
氯丙嗪	1.322	0.671	0.078	1.971	0.049

注: 性别, 女 = 0, 男 = 1; BMI, 正常 = 0, 超重 = 1。

Note: Sex, female = 0, male = 1; BMI, normal = 0, overweight = 1.

拉西酮时进行常规的血药浓度监测, 此外, 由于联合使用氯氮平 ($n = 24$)、坦度螺酮 ($n = 13$)、度洛西汀 ($n = 6$)、氯丙嗪 ($n = 1$) 的样本较少, 因此需增加样本量进行进一步研究。

本研究进一步探讨了性别、年龄、BMI、日剂量以及联合用药对齐拉西酮 *C/D* 的影响。结果显示, 女性患者齐拉西酮 *C/D* 显著高于男性。Jönsson 等^[7] 收集了 12 种抗精神病药的血液浓度数据, 比较了性别、年龄和剂量对 *C/D* 的影响, 结果也发现女性患者的 *C/D* 较高, 这可能与女性肝脏体积较小、细胞色素 P450 酶和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 (UGT) 的表达差异有关^[8-9]。根据 BMI 分组发现, 体重正常组 *C/D* 显著高于超重组。精神分裂症患者肥胖的患病率为 40% ~ 60%^[10], 这可能与精神疾病患者不良的饮食与生活习惯有关。肥胖可影响体质和酶的功能^[11-12], 因此可以影响药物的药代动力学和相应的疗效。其他抗精神病药也有相似报道, 周谢海等^[13] 对 4458 例次利培酮血液浓度数据分析发现, BMI 与 *C/D* 成负相关。Paulzen 等^[14] 研究结果显示 BMI 与利培酮活性代谢产物 9-羟利培酮和活性成分利培酮+9-羟利培酮的 *C/D* 成正相关。另一项基于 72 例次利培酮血液浓度数据的研究结果发现, BMI 与 *C/D* 无相关性^[15]。齐拉西酮和利培酮均为 CYP3A4 的底物, CYP3A4 活性的改变可影响其血液浓度。有研究表明, BMI 较高的患者 CYP3A4 活性增加, 从而导致底物血液浓度降低^[16]。Zareza-deh 等^[17] 发现, 肥胖可降低 CYP3A4/5、CYP1A2 和 CYP2C9 的活性, 从而导致底物血液浓度的升高。BMI 对 CYP3A4 的影响尚未达成共识, 对齐拉西酮药代动力学的影响也需要进一步的研究探讨。

本研究将联合使用丙戊酸、劳拉西泮和碳酸锂与相应未使用组对比发现, 联合使用丙戊酸的患者具有更低的 *C/D*, 联合使用劳拉西泮则具有更高的 *C/D*。精神疾病患者常伴随多种精神症状, 因此, 临床上常采取联合用药, 如与抗抑郁药、抗焦虑药以及心境稳定剂等联用。药物在体内的药代动力学过程十分复杂, 合并用药可通过影响齐拉西酮的吸收、分布、代谢、排泄过程引起血液浓度的变化, 从而影响药物的疗效与安全性。齐拉西酮经 CYP3A4 代谢, 联合使用经 CYP3A4 代谢的药物、CYP3A4 诱导剂或抑制剂都可能引起齐拉西酮血液浓度的改变。丙戊酸为 CYP2C9 的抑制剂, 在体内主要经葡萄糖醛酸化、线粒体 β -氧化、次要经 CYP450 酶介导代谢^[18], 劳拉西泮则是在肝脏与葡萄糖醛酸直接结合成为非活性的葡萄糖苷酸劳拉西泮^[19]。丙戊酸与劳拉西泮对 CYP3A4 无明显的抑制或诱导作用, 与齐拉西酮合用时, 不会因竞争性与 CYP3A4 结合而影响齐拉西酮的代谢。有研究指出, 不同个体间 CYP3A4 酶活性可存在 5 ~ 60

倍的差异, 遗传因素或环境因素都可造成不同个体 CYP3A4 的基因变异, 从而引起酶活性的差异, 使体内由它催化的许多代谢和效应存在着明显的差别, 对不同个体的药物治疗作用、药品不良反应及药物毒性均产生重要影响^[20]。由于本研究未收集患者的代谢酶基因型, 因此, CYP3A4 基因型对齐拉西酮 *C/D* 的影响仍有待挖掘。

综上所述, 齐拉西酮血液浓度个体差异大, 影响因素复杂, 在临床应用中应定期监测血液浓度, 结合患者具体情况制订个体化的治疗方案。对于女性、超重以及合并使用丙戊酸或劳拉西泮的患者可能需要调整齐拉西酮剂量并密切监测。同时, 药师也应加强对患者的用药教育, 提高患者的用药依从性, 保障药物的合理使用。

参考文献

- [1] Huang YQ, Wang Y, Wang H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6 (3): 211-224.
- [2] 赵靖平, 施慎逊. 中国精神分裂症防治指南 [M]. 2 版. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2015: 73-74.
- [3] Papakostas GI, Fava M, Baer L, et al. Ziprasidone augmentation of escitalopram for major depressive disorder: efficacy results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Am J Psychiatry*, 2015, 172 (12): 1251-1258.
- [4] 高敏. 盐酸齐拉西酮片联合奥氮平对老年重症精神分裂症患者认知功能及血清 BDNF 水平的影响 [J]. *医学理论与实践*, 2020, 33 (1): 47-49.
- [5] Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: update 2017 [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2018, 51 (1-2): 9-62.
- [6] 中华人民共和国卫生部疾病控制司. 中国成人超重和肥胖症预防控制指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [7] Jönsson AK, Spigset O, Reis M. A compilation of serum concentrations of 12 antipsychotic drugs in a therapeutic drug monitoring setting [J]. *Ther Drug Monit*, 2019, 41 (3): 348-356.
- [8] Bartkowiak-Wieczorek J, Wolski H, Bogacz A, et al. Gender-specific implications for pharmacology in child-bearing age and in postmenopausal women [J]. *Ginekol Pol*, 2015, 86 (2): 143-149.
- [9] Meibohm B, Beierle I, Derendorf H. How important are gender differences in pharmacokinetics? [J]. *Clin Pharmacokinetics*, 2002, 41 (5): 329-342.
- [10] Esan O, Esan A. Body mass index (BMI) and obesity in Nigerians with schizophrenia [J]. *Nord J Psychiatry*, 2022, 76 (1): 12-17.
- [11] Tomankova V, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Effects of obesity on liver cytochromes P450 in various

- animal models [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2017, 161 (2): 144-151.
- [12] Brill MJ, Diepstraten J, van Rongen A, et al. Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children [J]. Clin Pharmacokinet, 2012, 51 (5): 277-304.
- [13] 周谢海, 夏清荣, 单锋, 等. 某三甲精神病院利培酮血药浓度监测现状及影响因素分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (23): 2474-2477, 2499.
- [14] Paulzen M, Haen E, Stegmann B, et al. Body mass index (BMI) but not body weight is associated with changes in the metabolism of risperidone: a pharmacokinetics-based hypothesis [J]. Psychoneuroendocrinology, 2016, 73: 9-15.
- [15] Warrings B, Samanski L, Deckert J, et al. Impact of body mass index on serum concentrations of antidepressants and antipsychotics [J]. Ther Drug Monit, 2021, 43 (2): 286-291.
- [16] Rahmioglu N, Heaton J, Clement G, et al. Genetic epidemiology of induced CYP3A4 activity [J]. Pharmacogenet Genomics, 2011, 21 (10): 642-651.
- [17] Zarezaeh M, Saedisomeolia A, Shekarabi M, et al. The effect of obesity, macronutrients, fasting and nutritional status on drug-metabolizing cytochrome P450s: a systematic review of current evidence on human studies [J]. Eur J Nutr, 2021, 60 (6): 2905-2921.
- [18] de Leon J. The effects of antiepileptic inducers in neuropsychopharmacology, a neglected issue. Part I: a summary of the current state for clinicians [J]. Rev Psiquiatr Salud Ment, 2015, 8 (2): 97-115.
- [19] 司天梅, 刘铁桥, 张朝辉, 等. 苯二氮草类药物的药理学 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2017, 23 (2): 70-74.
- [20] 林高通, 王晨明, 莫菊彩. CYP3A4 基因多态性对药物代谢及其个体化给药的影响 [J]. 海峡药学, 2013, 25 (4): 1-3.

(收稿日期: 2023-04-14; 修回日期: 2023-06-05)

基于 FAERS 数据库的维得利珠单抗不良事件信号挖掘与分析

普燕芳¹, 陈力^{2, 3*}, 曹玮¹ (1. 云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院药学部, 昆明 650032; 2. 四川大学华西第二医院药学部, 成都 610041; 3. 四川大学华西第二医院循证药学中心, 成都 610041)

摘要: **目的** 利用美国食品药品监督管理局 (FDA) 不良事件报告系统 (FAERS) 数据库挖掘维得利珠单抗的药品不良事件 (ADE) 信号, 为该药的临床安全使用提供参考。**方法** 采用报告比值比 (ROR) 法和综合标准 (MHRA) 法, 对 FAERS 中 2017 年至 2021 年共 19 个季度的报告进行数据挖掘, 采用世界卫生组织药品不良反应术语集累及的系统器官对报告中的 ADE 描述用语进行标准化, 筛选出 ROR 法和 MHRA 法共有信号进行分析。**结果** 筛选得到维得利珠单抗 ADE 报告 8563 例, 涉及 19 905 个 ADE, 共挖掘出维得利珠单抗 ADE 信号 228 个, 主要累及 19 个器官系统, 包括胃肠道系统疾病、全身性疾病及给药部位各种反应、感染及侵袭类疾病等。按信号强度排序, 前 30 中有 8 个信号未在药品说明书中出现, 有待进一步确认。**结论** 使用维得利珠单抗前应加强感染相关风险的评估, 用药过程中加强监护, 警惕药物诱发胰腺炎, 并加强儿童等特殊人群超说明书用药评价, 确保患者用药安全。

关键词: 维得利珠单抗; 不良事件信号; 比例失衡法

中图分类号: R979.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3062-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.040

Data mining and analysis of adverse event signals of vedolizumab based on FAERS database

PU Yan-fang¹, CHEN Li^{2, 3*}, CAO Wei¹ (1. Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Yunnan Province, the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032; 2. Department of Pharmacy, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041; 3. Center for Evidence-Based Pharmacy, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041)

基金项目: 四川省科技计划项目 (No.2019JDR0163); 白求恩医学科学研究基金 (No.B19112DS)。

作者简介: 普燕芳, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事医院药学和临床药学研究, email: 841475074@qq.com *通信作者: 陈力, 男, 硕士, 主任药师, 主要从事临床药学与医院合理用药研究, email: 13674852@qq.com

Abstract: Objective To mine and analyze the signals of adverse drug event (ADE) of vedolizumab by using the US FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) database, and to provide reference for the safe clinical use of this drug. **Methods** Reporting odds ratio (ROR), medicines and healthcare products regulatory agency (MHRA) method were used for the data mining on the 19 quarterly reports of the FAERS database (the first quarter of 2017 to the third quarter of 2021). The ADE descriptive terminologies in the report were standardized with the World Health Organization Adverse Reaction Terminology (System-Organ Class). Common signals by ROR and MHRA methods were screened. **Results** After screening, we obtained 8563 ADE reports of vedolizumab, involving 19 905 ADEs. A total of 228 ADE signals of vedolizumab were collected, mainly covering 19 organ systems, including diseases of the gastrointestinal system, general disorders and administration site conditions, infections and infestations diseases, etc. Ranked by signal strength, 8 of the top 30 signals did not appear in the drug instructions and need further confirmation. **Conclusion** Before using vedolizumab, we should assess infection-related risks, monitor the medication process, watch out for drug-induced pancreatitis, and evaluate off-label medication use in children and other populations to ensure the safe use.

Key words: vedolizumab; ADE signal; measures of disproportionality

维得利珠单抗是一种人源化的单克隆抗体, 为特异性的 $\alpha 4\beta 7$ 整合素抑制剂, 可阻断 $\alpha 4\beta 7$ 与黏膜地址素细胞黏附分子-1 (MAdCAM-1) 相互作用, 阻断淋巴细胞向肠道迁移来减轻肠道炎症, 从而达到治疗炎症肠病的目的^[1]。2014年5月该药经美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准在美国上市, 2020年3月经国家药品监督管理局批准在中国上市, 用于治疗对传统治疗或肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 抑制剂应答不充分、失应答或不耐受的中/重度活动性溃疡性结肠炎和克罗恩病的成年患者。维得利珠单抗是目前炎症性肠病治疗领域唯一的肠道选择性生物制剂, 已在全球 60 多个国家得到广泛应用^[2]。因其独特的肠道靶向性, 被称为迄今为止最安全的生物制剂^[3]。近年来, 随着使用人群的增加, 维得利珠单抗的不良反应报告逐渐增多, FDA 也于 2021 年 8 月对该药进行了说明书修订^[4]。本研究依托美国 FDA 不良事件报告系统 (FAERS) 数据库, 对收集到的药品不良事件 (ADE) 信号进行挖掘, 分析维得利珠单抗可疑的 ADE 信号, 为临床用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

从 FAERS 数据库提取 2017 年第一季度至 2021 年第三季度共 19 个季度的数据, 包括人口信息、药物使用信息、ADE、患者结局、报告来源及报告日期等内容, 导入 MySQL 数据库进行分类汇总处理, 得到“首要怀疑药物”的 ADE 报告, 再以维得利珠单抗通用名“VEDOLIZUMAB”和商品名“ENTYVIO”为检索词, 得到首要怀疑药

物为维得利珠单抗的 ADE 报告进行分析。

1.2 方法

1.2.1 数据标准化 FAERS 的数据来自于自主呈报系统, 报告人员背景复杂, 对 ADE 的描述可能复杂多样。本研究采用《国际医学用语词典》(MedDRA 24.0 版) 中的系统器官分类 (SOC) 和首选术语 (PT), 对筛选得到的描述用语进行标准化^[5], 将相同的项目进行合并计算, 便于后续研究。

1.2.2 数据计算及统计方法 目前常用于药品不良反应信号检测的数据挖掘方法包括比例失衡法、综合标准法 (MHRA 法) 和贝叶斯可信传播神经网络法 (BCPNN) 等^[6-7]。比例失衡法包括报告比值法 (ROR) 和比例报告比值法 (PRR)。本研究采用 ROR 法和 MHRA 法, 先基于四格表的算法, 获取首要怀疑药物为维得利珠单抗的目标 ADE 报告数及 ADE 发生的背景数等数据, 再根据相关公式计算 ROR 值、PRR 值、两者的 95% 置信区间 (95%CI) 和卡方 (χ^2) 值。计算后将 ROR 法中 95%CI 下限 > 1 且报告数不少于 3 例的事件和 MHRA 法中 $PRR \geq 2$, $\chi^2 \geq 4$ 且报告数不少于 3 例的事件定义为 ADE 信号。其中 ROR 95%CI 下限越大, 表示信号越强, 即目标药物与目标 ADE 之间的联系越强。所有统计分析采用 Microsoft Excel 软件完成。

2 结果

2.1 ADE 报告的情况

从 FAERS 数据库中提取 2017 年第一季度至 2021 年第三季度共 19 个季度的数据, 得到首要怀疑药物相关的 ADE 报告 6 900 469 例次。以“VEDOLIZUMAB”和“ENTYVIO”为检索词, 得

到首要怀疑药物为维得利珠单抗的 ADE 报告 19 905 个, 涉及 8563 例患者, 其中女性占 48.46%, 男性占 34.78%, 性别不清楚的占 16.76%。报告数据来源于 57 个国家, 其中美国报告的数量最多, 占 68%, 中国报告的数量仅为 10 例, 占 0.12%。维得利珠单抗相关 ADE 报告的基本信息详见表 1。

表 1 筛选得到的维得利珠单抗相关 ADE 报告基本信息表
Tab 1 Basic information for adverse events of vedolizumab after screening

信息	分类	报告例数 [n (%)]
性别	女性	4150 (48.46)
	男性	2978 (34.78)
	不清楚	1435 (16.76)
年龄 / 岁	< 18	201 (2.35)
	18 ~ 64	2927 (34.18)
	≥ 65	605 (7.07)
	不清楚	4830 (56.41)
报告国家 (前 5)	美国	5823 (68.00)
	英国	430 (5.02)
	日本	356 (4.16)
	德国	246 (2.87)
	法国	213 (2.49)
报告年份	2017 年	1423 (16.62)
	2018 年	1835 (21.43)
	2019 年	2142 (25.01)
	2020 年	1755 (20.50)
	2021 年	1407 (16.43)
	不清楚	1 (0.01)

2.2 ADE 信号累及的器官和系统

本研究共得到首要怀疑药物为维得利珠单抗的 ADE 报告 19 905 个, 经过 ROR 法、MHRA 法计算, 按阈值进行信号筛选。而后使用 MedDRA 系统器官分类将有信号的 PT 进行分类, 去除各类损伤 / 中毒及操作并发症、产品问题和社会环境、各类手术及医疗操作等与药品无关的信号, 最终得到有效的信号 PT 和对应的 SOC。共筛选出与维得利珠单抗相关的 ADE 信号 228 个, 来自 5625 例次 ADE 报告, 涉及 19 个 SOC, 详见表 2。SOC 项下“胃肠系统疾病”的 ADE 累计报告数量最多, 其次是全身性疾病及给药部位各种反应。

2.3 前 30 位 ADE 报告情况

将筛选得到的维得利珠单抗 ADE 有效信号分别按报告例次、ROR95%CI 下限降序排序, 去除“无不良事件、治疗反应时间缩短、妊娠、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病”等与药品无关的 ADE 信号后, 分别取排名前 30 位展示, 如表 3 所示。报告例次最多的 ADE 为关节痛, 与说明书提示的不良反应该相似。便血、难辨梭状芽孢杆菌感染、

表 2 维得利珠单抗累及系统信号数与 ADE 构成比

Tab 2 Proportion of vedolizumab involving system signals and ADE

序号	SOC	维得利珠单抗 ADE		
		信号数	例次	构成比 / %
1	胃肠系统疾病	54	1681	29.88
2	全身性疾病及给药部位各种反应	19	1631	29.00
3	感染及侵袭类疾病	51	527	9.37
4	妊娠期、产褥期及围产期状况*	7	481	8.55
5	各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	9	478	8.50
6	各类检查*	19	255	4.53
7	皮肤及皮下组织类疾病	13	150	2.67
8	良性、恶性及性质不明的肿瘤 (包括囊状和息肉状)	16	118	2.10
9	血管与淋巴管类疾病*	3	64	1.14
10	血液及淋巴系统疾病*	6	41	0.73
11	呼吸系统、胸及纵隔疾病	8	40	0.71
12	肾脏及泌尿系统疾病*	2	35	0.62
13	心脏器官疾病*	3	33	0.59
14	肝胆系统疾病	3	29	0.52
15	各类神经系统疾病	6	28	0.50
16	生殖系统及乳腺疾病*	3	11	0.20
17	各种先天性家族性遗传性疾病*	3	11	0.20
18	免疫系统疾病	2	8	0.14
19	内分泌系统疾病*	1	4	0.07
	合计	228	5625	100.00

注 (Note): *为说明书中未提及的器官系统分类 (*means SOC not mentioned in instruction)。

自发流产、带状疱疹、小管间质性肾炎、硬化性胆管炎等 6 个信号属于药品说明书未出现的信号。依据信号强度进行排名, 治疗反应丧失强度最强, 随后是胃肠细胞化生不良、直肠狭窄等, 多考虑与原发疾病治疗出现耐受或并发症相关。另有硬化性胆管炎、类固醇依赖、前庭神经元炎、弯曲杆菌感染、坏疽性脓皮病等 8 个信号属于药品说明书未出现的信号, 有待进一步研究确认。

2.4 不良结局中死亡病例 ADE 报告情况

维得利珠单抗的 ADE 报告中, 根据患者转归代码为“DE (死亡)”筛选得到 156 例报告进行信号分析, 结果如表 4 所示。

3 讨论

3.1 维得利珠单抗 ADE 的人口学特征

本研究对 19 905 个 ADE 信号进行挖掘和分析, 从报告的人群特征来看, 女性比例大于男性, 提示维得利珠单抗的不良反应该可能存在性别差异。但 ADE 中有相当数量的报告为患者用药期间怀孕, 这可能是造成本研究中女性报告多于男性的原因。

从报告的年龄来看, 18 岁以下的患者有 201 例, 占总体报告人群的 2.35%, 虽不具备代表性, 但注射用维得利珠单抗的说明书提示该药尚未确

表 3 维得利珠单抗 ADE 报告数和信号强度前 30 的 PT

Tab 3 Top 30 PT of vedolizumab ADE frequency and signal strength

序号	ADE 报告数前 30 位的 PT			ADE 信号强度前 30 位的 PT		
	PT	报告数	95%CI (ROR) 下限	PT	报告数	95% CI (ROR) 下限
1	关节痛	395	2.35	治疗反应丧失	18	27.53
2	治疗失败	125	1.96	胃肠细胞化生不良	3	22.44
3	治疗无反应者	97	3.52	直肠狭窄	6	20.21
4	药物水平降低	95	19.55	药物水平降低	95	19.55
5	便血*	92	3.38	输液部位发凉	3	17.82
6	难辨梭状芽孢杆菌感染*	85	6.59	硬化性胆管炎*	22	17.58
7	排便频率增加	80	6.29	类固醇依赖*	7	17.16
8	自发流产*	65	3.23	肛门脓肿	44	14.53
9	治疗反应减弱	56	1.99	巨细胞病毒性小肠结肠炎	8	13.96
10	带状疱疹*	51	1.57	黏液便	31	12.43
11	瘙痒性皮炎	49	1.94	前庭神经炎*	5	11.38
12	直肠出血	48	2.10	假息肉	4	11.30
13	肛门脓肿	44	14.53	胃肠道淋巴瘤	4	10.51
14	静脉通路不良	44	9.26	弯曲杆菌感染*	7	10.35
15	肠梗阻	43	2.10	肠狭窄	25	9.59
16	C 反应蛋白升高	42	2.12	坏疽性脓皮病*	20	9.35
17	胰腺炎	41	1.85	静脉通路不良	44	9.26
18	输液部位渗出	37	9.13	巨细胞病毒性肝炎*	4	9.23
19	炎症性肠病	34	10.79	输液部位渗出	37	9.13
20	瘘管	33	6.32	紧急排便感	30	8.63
21	黏液便	31	12.43	自身免疫胰腺炎	5	8.33
22	紧急排便感	30	8.63	肛门狭窄	4	8.01
23	出血性腹泻	30	5.48	结节性红斑	15	7.70
24	小管间质性肾炎*	29	1.85	结肠腺癌	13	7.68
25	胃肠炎症	27	5.22	胆管上皮细胞癌*	10	7.46
26	肠狭窄	25	9.59	组织胞浆菌病*	10	7.13
27	治疗部分应答者	25	4.04	会阴脓肿	4	7.11
28	脓肿	24	2.74	粪便钙卫蛋白增加	16	7.09
29	结肠癌	24	2.50	肛瘘	22	7.01
30	硬化性胆管炎*	22	17.58	大肠狭窄	11	6.95

注 (Note): * 为说明书中未提及的不良反应 (* means ADR not mentioned in instruction)。

表 4 维得利珠单抗 ADE 死亡病例信号分析

Tab 4 Signal analysis of vedolizumab ADE death cases

序号	SOC	PT	例次	占比/%
1	感染及侵袭类疾病	脓毒症、感染性休克、难辨梭状芽孢杆菌感染、念珠菌感染、奴卡菌病、新型冠状病毒 (COVID-19) 感染、克雅氏病、脑膜炎、脑脓肿、耶氏肺孢子虫肺炎等	34	21.79
2	良性、恶性及性质不明的肿瘤 (包括囊状和息肉状)	淋巴瘤、结肠癌、结直肠癌、肺恶性肿瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、膀胱癌、乳腺癌、胰腺癌等	34	21.79
3	全身性疾病及给药部位各种反应	死亡、猝死、多器官功能不全综合征	34	21.79
4	心脏器官疾病	急性心肌梗死、心肌梗死、心肌缺血、心力衰竭、心脏停搏	19	12.18
5	呼吸系统、胸及纵隔疾病	间质性肺疾病、呼吸衰竭、肺纤维化、肺栓塞等	9	5.77
6	胃肠系统疾病	溃疡性结肠炎、结肠炎、克罗恩病、急性胰腺炎、巨结肠	9	5.77
7	各类神经系统疾病	脑血管意外、蛛网膜下腔出血、基底动脉瘤、癫痫持续状态等	5	3.21
8	各类损伤、中毒及操作并发症	血管损伤、用药过量、道路交通事故和跌倒	4	2.56
9	各种先天性家族性遗传性疾病	胎儿染色体异常、先天性异常	2	1.28
10	精神病类	自杀既遂	2	1.28
11	免疫系统疾病	移植物抗宿主病	1	0.64
12	妊娠期、产褥期及围产期状况	脐带异常	1	0.64
13	肾脏及泌尿系统疾病	尿路疾病	1	0.64
14	血管与淋巴管类疾病	主动脉夹层	1	0.64

立在儿童中使用的安全性和有效性。提示超说明书用药值得关注，应加强监测，收集更多的信息

用于评价儿童患者应用的疗效和安全性

3.2 维得利珠单抗 ADE 累及系统器官的特点

注射用维得利珠单抗说明书提到的不良反应主要累及 SOC 包括感染及侵袭类疾病、免疫系统疾病、神经系统疾病、胃肠系统疾病和呼吸、胸部和纵隔疾病等, 这些不良反应在本研究中都有相应的信号出现, 说明本研究的数据还是比较可靠的。

本研究胃肠系统共检出 54 个信号, 涉及 1681 例次患者的 ADE 报告。排除与原发疾病相关的溃疡性结肠炎、克罗恩病、排便频率增加、结肠炎和肠梗阻外, 报告例次较多的是胰腺炎, 共 68 例次, 包括胰腺炎、急性胰腺炎和自身免疫性胰腺炎 3 个信号。Sparrow 等^[8-11]于 2018 年开始报道维得利珠单抗诱发的急性胰腺炎, Yang 等^[12]的动物实验揭示用抗 $\alpha 4\beta 7$ 整合素或黏膜地址素细胞黏附分子 1 (MAdCAM-1) 抗体治疗非肥胖糖尿病小鼠, 对胰岛细胞的炎症具有显著和持久的保护作用, 推测维得利珠单抗可能通过特异性结合 $\alpha 4\beta 7$ 整合素, 并阻断 $\alpha 4\beta 7$ 整合素与 MAdCAM-1 的结合后扰乱了胰腺功能, 从而导致胰腺炎的发生。FDA 于 2021 年 8 月更新注射用维得利珠单抗药品说明书, 在“6.3 上市后经验”项下增加“胃肠系统疾病: 急性胰腺炎”, 充分体现利用 FAERS 数据库挖掘 ADE 信号, 有助于加强药品安全性评价。

“全身性疾病及给药部位各种反应”位居第二, 涉及报告 1631 例次, 占 29.00%, 其中“无不良事件”最多见。通过该 PT 对应的患者信息, 逐条查找同一患者所报告的全部 ADE 信号, 发现共有 969 例次 (969/1631, 59.41%) 患者报告用药“无不良事件”同时报告用药期间发现妊娠或合并超说明书用药 (包括超年龄用药、超适应证用药等), 这可能源于自发呈报系统的要求, 或源于药物临床试验的相关要求^[13], 提示应进一步关注特殊人群、关注超说明书用药情况, 做好监测和评价。

本研究发现, 感染及侵袭类疾病在累及 SOC 排序中占第三位, 涉及报告 527 例次, 信号数多达 51 个, 包括难辨梭状芽孢杆菌感染 (85 例)、带状疱疹 (51 例)、肛门脓肿 (44 例) 等。Colombel 等^[14]的研究提示维得利珠单抗并不增加感染或严重感染的风险, 美国 VICTOERY 联盟的真实世界研究^[15]显示, 接受维得利珠单抗治疗的炎症性肠病 (IBD) 患者与抗 TNF- α 单药治疗者相比, 发生严重感染和严重不良事件 (SAE) 的比例更低, 但本研究挖掘到的信号提示用药过程

中仍不容忽视感染风险, 应加强监测。FDA 药品说明书^[4]也特别提示: 在感染得到控制之前, 不建议对有活动性、严重感染的患者用药, 若用药治疗期间发生严重感染的患者应及时停药治疗。

肌肉骨骼及结缔组织系统筛选到 9 个信号, 除了说明书中提到的关节痛 (395 例次) 最常见外, 还发现类狼疮综合征 (16 例次)、强直性脊柱炎 (12 例次) 是值得关注的信号。说明书中未出现的 ADR 信号累及器官系统有 9 个, 除妊娠期产褥期及围产期状况、各类检查外, 还包括血液及淋巴系统疾病、血管与淋巴管类疾病、肾脏及泌尿系统疾病、心脏器官疾病等, 应持续关注。

3.3 维得利珠单抗 ADE 信号分析

在 ADE 信号排名中, 报告例次较多的便血、难辨梭状芽孢杆菌感染、自发流产、小管间质性肾炎等信号, 说明书中均没有提及, 有待进一步研究。另有相当例次的患者报告“治疗失败、治疗无反应、药物水平降低、治疗无应答、治疗反应丧失”等情况, 可能与治疗中出现药物耐受相关, 提示进行维得利珠单抗相关的抗体检测和治疗药物浓度监测, 结合临床症状和内镜下的缓解情况共同评估, 可能更有助于优化治疗。

从信号强度排序来看, 硬化性胆管炎 (22 例次) 报告例次不多, 但信号强度较强, 说明相关性较大。有研究发现合并原发性硬化性胆管炎的 IBD 患者癌变的风险超过 50%, 临床诊疗过程中应加以重视^[16]。类固醇依赖、前庭神经炎、坏疽性脓皮病报告例次不多, 但信号强度较强, 临床用药过程中应加强监测评价。

3.4 死亡病例相关 ADE 信号分析

与死亡病例相关的 ADE 信号累及系统前 3 位依次是感染及侵袭类疾病, 良性、恶性及性质不明的肿瘤和全身性疾病及给药部位各种反应 (死亡、猝死或多器官功能不全综合征), 这些表现多与原发疾病相关, 或因资料不全, 无法进行明确的因果关系界定。本研究发现累及心脏器官系统的 PT 信号多表现为急性心肌梗死、心肌梗死、心肌缺血、心力衰竭和心脏停搏, 共涉及 19 例次, 占死亡病例的 12.18%。此信号在药品说明书中并未提及, 可能是新的且重要的信号, 提示在药物使用的过程中应加强心血管系统监护, 避免恶性心血管事件威胁患者安全。

3.5 本研究的局限性

本研究基于 FAERS 数据库进行分析, 通过大数据挖掘风险信号, 有效弥补了药品上市前临

床试验样本量少、研究对象要求严格、用药观察时间短等缺陷,可获得药品上市后真实世界下用药反应的真实情况。但因该数据库来源于 ADE 自发呈报系统,不可避免地存在漏报、误报、少报、信息不全等情况,可能给研究带来偏倚。同时,FAERS 数据库上报国家以美国为主,得到的数据可能不一定适合中国人群。另外,本研究采用的 ROR 法和 MHRA 法计算简单,随时可用,但如果数据库中某一目标药物的反应报告数目太多或太少,可能会影响其他不良反应信号检测的效能或信号挖掘结果的稳定性^[7]。因此,本研究存在一定的局限性。

4 结论

本研究提取 FAERS 数据库相关数据,利用 ROR 法和 MHRA 法对维得利珠单抗上市后的 ADE 信号进行挖掘和分析,有效弥补了药物上市前临床试验的局限。研究提示,维得利珠单抗用于治疗炎症性肠病,不能忽视感染的风险,也验证了可能诱发胰腺炎的风险信号,同时发现便血、难辨梭状芽孢杆菌感染、硬化性胆管炎等新的需要临床重点关注的 ADE 信号。挖掘到的信号提示有相当数量患者用药期间发现妊娠,并有超说明书用于儿童的情况,提示应收集更多的信息用于评价特殊人群应用的疗效和安全性。通过研究维得利珠单抗相关的死亡病例,发现心脏器官系统中心肌梗死、心肌缺血、心力衰竭等可能是导致患者死亡的重要原因,需要加强用药监护。当然,由于研究的局限性,这些信号还需在真实世界中不断收集、整理和验证,以为患者安全用药提供更好的保障。

参考文献

[1] 靳琦文,王晓娣. 维得利珠单抗治疗炎症性肠病的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2021, 29(5): 248-255.
 [2] Entyvio® (vedolizumab) Approved in Japan for the Treatment of Patients with Moderately to Severely Active Crohn's Disease[EB/OL]. [2019-5-22]/[2022-3-21]. <https://www.takeda.com/newsroom/newsreleases/2019/entyvio-vedolizumab-approved-in-japan-for-the-treatment-of-patients-with-moderately-to-severely-active-crohns-disease/>.

[3] 王英德. 新型生物制剂在炎症性肠病中的临床应用: 现状与未来[J]. 中国全科医学, 2021, 24(21): 2629-2633.
 [4] FDA-label (注射用维得利珠单抗药品说明书). [DB/OL]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/125476s038s039lbl.pdf.
 [5] Tieu C, Breder CD. A critical evaluation of safety signal analysis using algorithmic standardised MedDRA queries[J]. Drug Saf, 2018, 41(12): 1375-1385.
 [6] 任经天,王胜锋,侯永芳,等. 常用药品不良事件信号检测方法介绍[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(5): 294-298.
 [7] 张婧媛,白羽霞,韩晟,等. 数据挖掘方法检测药品不良反应信号的应用研究[J]. 药物不良反应杂志, 2016, 18(6): 412-416.
 [8] Sparrow M. Positioning biologics-a case-based discussion: vedolizumab[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(Suppl 3): 15.
 [9] Lopez RN, Gupta N, Lemberg DA. Vedolizumab-associated pancreatitis in paediatric ulcerative colitis: functional selectivity of the $\alpha 4\beta 7$ integrin and MAdCAM-1 pathway? [J]. J Crohns Colitis, 2018, 12(4): 507-508.
 [10] Lin E, Katz S. Acute pancreatitis in a patient with ulcerative colitis on vedolizumab[J]. Inflamm Bowel Dis, 2020, 26(5): e44.
 [11] Jakimiec P, Zdanowicz K, Kwiatek-Sredzinska K, et al. Pancreatic disorders in children with inflammatory bowel disease[J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(5): 473.
 [12] Cohen RD, Bhayat F, Blake A, et al. The safety profile of vedolizumab in ulcerative colitis and Crohn's disease: 4 years of global post-marketing data[J]. J Crohns Colitis, 2020, 14(2): 192-204.
 [13] Colombel JF, Sands BE, Rutgeerts P, et al. The safety of vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. Gut, 2017, 66(5): 839-851.
 [14] Narula N, Peerani F, Meserve J, et al. Vedolizumab for ulcerative colitis: treatment outcomes from the VICTORY consortium[J]. Am J Gastroenterol, 2018, 113(9): 1345.
 [15] Yang XD, Sytwu HK, McDevitt HO, et al. Involvement of beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in the development of diabetes in obese diabetic mice[J]. Diabetes, 1997, 46: 1542-1547.
 [16] Garg SK, Velayos FS, Kisiel JB. Intestinal and non-intestinal cancer risks for patients with Crohn's disease[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2017, 46(3): 515-529.

(收稿日期: 2023-04-07; 修回日期: 2023-05-25)

药物与临床

泊沙康唑对异体肾移植受者他克莫司血药浓度及肾功能的影响

吉莉娜, 胡楠, 钱卿* (常州市第一人民医院药学部, 江苏 常州 213003)

摘要: **目的** 探讨抗真菌药物泊沙康唑对肾移植受者他克莫司血药浓度的影响, 为临床科学制订给药方案提供依据。**方法** 回顾性收集同时接受他克莫司抗排异治疗和泊沙康唑口服混悬液抗真菌治疗的肾移植受者共计 24 例, 统计受者合用泊沙康唑前与合用后 1 ~ 14 d 内不同时间段的他克莫司血药谷浓度 (C_0)、谷浓度剂量比 (C_0/D)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、血清肌酐 (SCR)、血清尿酸 (UA) 等临床指标, 比较两药合用前后他克莫司的剂量和浓度变化, 以及受者的肝肾功能变化。**结果** 肾移植受者合用泊沙康唑口服混悬液后, 他克莫司的 C_0/D 为合用前的 3.13 倍 ($P < 0.05$), 他克莫司的给药剂量平均下降 40.1%。在合用泊沙康唑后的 4 个时间段中, 合用后 8 ~ 10 d 的 C_0/D 上升最为显著, 达 3.30 倍, 他克莫司的给药剂量平均下降 47.1%。合用泊沙康唑前后, 患者肝肾功能无显著差异。**结论** 临床合用泊沙康唑时, 应预先降低他克莫司的给药剂量, 但说明书建议的剂量调整方案不一定适用于所有受者, 合用期间需密切监测他克莫司血药浓度并及时调整剂量, 实现个体化用药。

关键词: 异体肾移植受者; 泊沙康唑; 他克莫司; 浓度剂量比

中图分类号: R979.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3068-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.041

Effect of posaconazole on the blood concentration of tacrolimus and renal function in allograft renal transplant recipients

Ji Li-na, HU Nan, QIAN Qing* (Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Changzhou, Changzhou Jiangsu 213003)

Abstract: Objective To determine the effect of antifungal drug posaconazole on the blood concentration of tacrolimus in renal transplant recipients, and to provide reference for individualized therapy in clinical practice. **Methods** The clinical data of 24 renal transplant recipients who used tacrolimus and posaconazole were retrospectively analyzed. The concentrations of tacrolimus (C_0), concentration/dose ratio (C_0/D), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), serum creatinine (SCR) and uric acid (UA) of the recipients before and after (1 ~ 14 days) the co-administration of posaconazole were collected. The dose and concentration of tacrolimus were compared before and after the co-administration of both drugs, as well as the changes in the liver and kidney function of the recipients. **Results** The C_0/D of tacrolimus after the co-administration of posaconazole was 3.13 times of before ($P < 0.05$), while the average dose of tacrolimus decreased by 40.1%. In the four periods after the co-administration of posaconazole treatment, the C_0/D at 8 ~ 10 days increased most significantly to 3.30 times, and the dose of tacrolimus decreased by 47.1% on average. There was not much difference in the liver and kidney function before and after the co-administration. **Conclusion** The dose of tacrolimus should be reduced before starting

基金项目: 江苏省药学会 - 奥赛康医院药学基金项目 (No. A202021); 常州市科技基础设施建设计划 - 常州市临床药学重点实验室 (No. CM20223005)。

作者简介: 吉莉娜, 女, 主管药师, 主要从事临床药学 (咳喘药学方向) 研究, email: 12586086@qq.com *通信作者: 钱卿, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学 (免疫系统药物方向) 研究, email: april_qing@163.com

the co-administration of posaconazole in clinical practice. Recommended dose adjustment in the instructions may not be appropriate for all recipients. It is necessary to monitor the blood concentration of tacrolimus and adjust the dose timely in individualized therapy.

Key words: allogenic renal transplant recipient; posaconazole; tacrolimus; concentration-dose ratio

侵袭性真菌病 (IFD) 是实体器官移植受者发病和死亡的重要原因, 且非白念珠菌、曲霉及毛霉等真菌感染的比例在血液科、呼吸科、器官移植科等科室普遍呈上升趋势^[1-5]。泊沙康唑属于第 2 代三唑类抗真菌药物, 其抗菌谱包含毛霉、球孢子菌、镰刀菌、尖端赛多孢子菌等罕见真菌, 与棘白菌素和其他三唑类药物相比, 泊沙康唑抗菌谱更广, 抗菌活性较强^[6-7]。

肾移植作为终末期肾脏病患者最理想的肾脏替代疗法, 在全球范围内已广泛开展。随着手术技术的成熟和新型免疫抑制剂的应用, 肾移植的近期存活率得到显著提高, 但是远期存活情况仍然不容乐观, 移植后期受者的排斥反应和免疫抑制治疗仍是临床面临的重要问题。他克莫司是实体器官移植的主要免疫抑制剂之一, 属 23 元大环内酯结构, 比环孢素 A 具有更强的免疫抑制效力和更低的不良反应发生率。目前他克莫司已被推荐作为肾移植后的一线治疗药物, 是免疫抑制三联疗法 (环孢素 A 或他克莫司+霉酚酸类药物+泼尼松) 的重要组成部分。他克莫司显著改善了器官移植受者的抗排斥疗效和生存率, 但是他克莫司的治疗范围较窄, 浓度超出治疗范围后可出现头痛、震颤、心动过速、贫血、诱发感染等不良反应, 而免疫抑制不足会导致移植排斥反应的发生。他克莫司通过 CYP3A 酶系代谢, 而泊沙康唑是 CYP3A 酶系的强效抑制剂, 两者合用存在相互作用。目前, 关于泊沙康唑对他克莫司血药浓度影响的数据有限, 本研究旨在评价泊沙康唑对肾移植受者他克莫司血药浓度及给药剂量的影响, 从而避免其浓度的异常波动对移植肾功能产生不良影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

对 2018 年 1 月至 2022 年 12 月于常州市第一人民医院泌尿外科接受异体肾移植手术的 24 名住院受者进行回顾性研究。纳入标准: ① 在住院期间接受口服他克莫司胶囊 (规格: 0.5 mg/1 mg, 杭州中美华东制药有限公司) 免疫抑制治疗, 他克莫司血药浓度达到稳态; ② 因预防或治

疗 IFD 目的合用泊沙康唑口服混悬液 (规格: 40 mg · mL⁻¹, Patheon Inc., Whitby Operations) 200 mg tid, 随餐服用; ③ 合并用药疗程超过 14 d; ④ 服药期间无呕吐、腹泻等影响药物吸收的胃肠道症状。排除标准: ① 在观察期内因各种原因调整免疫抑制治疗方案的受者, 如改用环孢素等; ② 排除肝功能异常受者, 以及使用其他显著影响泊沙康唑或他克莫司血药浓度的药物 (如利福平、卡泊芬净、地尔硫草、五酯胶囊等) 的受者。

1.2 免疫抑制方案

所有受者采用他克莫司+霉酚酸类药物+泼尼松的免疫抑制三联疗法。在维持治疗中, 他克莫司的起始剂量为 0.15 mg/(kg · d), 分 2 次给药, 目标谷浓度为术后 1 个月内 8 ~ 15 ng · mL⁻¹[8]; 吗替麦考酚酯胶囊 (规格: 0.25 g, 上海罗氏制药有限公司) 的剂量为 750 ~ 1000 mg bid, 空腹服用; 麦考酚钠肠溶片 (规格: 180 mg, Novartis Pharma Schweiz AG) 的剂量为 540 ~ 720 mg bid, 空腹服用; 注射用甲泼尼龙琥珀酸钠于手术当日及术后第 1 日、第 2 日分别给予 500 mg · d⁻¹ 冲击治疗, 之后逐渐递减至醋酸泼尼松片 20 mg · d⁻¹ 维持治疗。

1.3 他克莫司血药浓度测定

受者每日早 8 时和晚 8 时分别服用他克莫司。次日早上服药前抽取外周血 2 mL, 采用均相酶扩大免疫分析法 (EMIT) 测定他克莫司血药浓度 [西门子 Syva 药物浓度分析仪 (Viva-E), 配套的 Emit2000 他克莫司试剂盒、标准曲线和质控药盒 (西门子医学诊断产品有限公司)]。

1.4 观察指标

收集统计受者合用泊沙康唑前与合用后 1 ~ 3 d、4 ~ 7 d、8 ~ 10 d、11 ~ 14 d 的他克莫司血药浓度 C_0 (ng · mL⁻¹)、剂量 D (mg · kg⁻¹)、血清肌酐 (SCR)、血清尿酸 (UA)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST), 并计算谷浓度剂量比 C_0/D , 具体计算公式如下: $C_0/D =$ 血药谷浓度水平 (ng · mL⁻¹) / 日剂量 (mg · kg⁻¹)。

1.5 统计方法

采用 SPSS 29.0 统计学软件进行数据分析,

分类变量比较采用 χ^2 检验, 连续变量比较首先考察数据分布的正态性和方差齐性, 两者均满足者采用 t 检验; 正态分布但方差不齐, 则采用 t' 检验; 非正态分布数据采用非参数检验 (Mann-Whitney 检验); 符合正态分布的数据表示为 $(\bar{x} \pm s)$; 不符合正态分布的数据表示为 $M(Q_{25}, Q_{75})$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受者人口学特征

本研究共 24 例受者满足入排标准, 其人口学资料见表 1。24 例受者均为经验性选用泊沙康唑进行抗真菌治疗, 16 例受者在合用泊沙康唑前按说明书推荐经验性降低他克莫司日剂量至原剂量的 1/3 左右, 8 例未进行剂量调整, 而是根据合用后他克莫司的监测结果进行剂量调整。所有受者在治疗期间均使用了奥美拉唑肠溶胶囊 (规格: 20 mg, 常州四药制药有限公司) 20 mg qd, 餐前服用。质子泵抑制剂如奥美拉唑或兰索拉唑对 CYP3A4 存在一定抑制作用, 可能会对他克莫司的浓度造成影响^[9], 研究中所有纳入受者均使用了奥美拉唑, 故不同患者间不存在其他药物相互作用导致的结果偏倚。

表 1 纳入研究的受者人口学资料 ($n = 24$)

Tab 1 Demographic data of the participants included in the study ($n = 24$)

项目	数值
性别 (男/女)	13/11
年龄/岁	43.50 (27.75 ~ 52.00)
体重/kg	60.85 ± 12.32
住院天数/d	34.0 (26.3 ~ 46.5)
泊沙康唑用药疗程/d	19.5 (15.0 ~ 25.8)
SCR/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	170.50 (143.80 ~ 405.30)
UA/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	348.80 ± 103.70
ALT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	12.50 (6.00, 18.90)
AST/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	14.00 (8.50, 22.45)

2.2 合用泊沙康唑后对他克莫司血药浓度、给药剂量和浓度剂量比的影响

在合用泊沙康唑前, 他克莫司的平均给药日剂量为 $(0.08 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 合用泊沙康唑后, 他克莫司的给药剂量整体呈下降趋势 ($P < 0.05$), 给药剂量平均下降 40.1%。比较各阶段他克莫司给药剂量调整情况, 合用 8 ~ 10 d 他克莫司给药剂量降低最为显著, 为 $(0.04 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 较合用前平均降低了 47.1%。

他克莫司的浓度剂量比 (C_0/D) 变化如图 1 所示。 C_0/D 在合用泊沙康唑后的 4 个时间段均显

著高于合用前, 平均为合用前的 3.13 倍, 范围为 1.40 ~ 6.95 倍 (见表 2)。16 例 (66.7%) 受者合用泊沙康唑后他克莫司的 C_0/D 增加至 3 倍以上, 2 例 (8.3%) 受者 C_0/D 超过合用前 5 倍。合用后 8 ~ 10 d 的 C_0/D 升高最为显著, 平均为合用前的 3.30 倍, 达 (292.75 ± 163.66) 。合用后各时间段相互之间的 C_0/D 无显著差异。

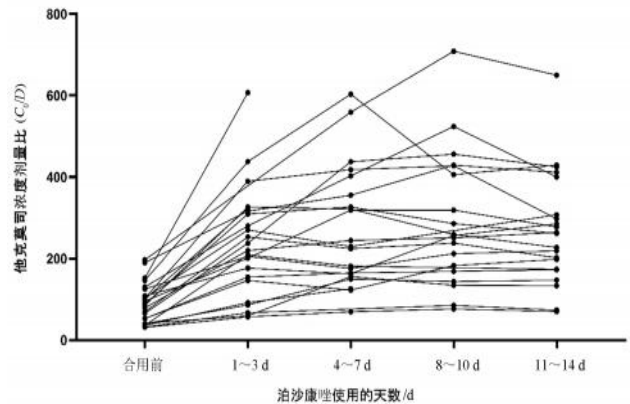


图 1 他克莫司浓度剂量比 (C_0/D) 在泊沙康唑使用前后的变化
Fig 1 Changes in C_0/D before and after the co-administration of posaconazole

表 2 泊沙康唑对他克莫司剂量和浓度剂量比的影响

Tab 2 C_0 and C_0/D of tacrolimus before and after the combination with posaconazole in the recipients ($n = 24$)

时间	血药谷浓度 C_0 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	给药剂量 D / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	浓度剂量 比 (C_0/D)
合用前	6.25 ± 2.74	0.08 ± 0.03	89.91 ± 48.19
合用 1 ~ 3 d	$9.72 \pm 3.93^*$	$0.06 \pm 0.04^*$	$235.83 \pm 133.07^*$
合用 4 ~ 7 d	$10.43 \pm 4.03^*$	$0.05 \pm 0.03^*$	$273.70 \pm 146.87^*$
合用 8 ~ 10 d	$9.11 \pm 2.64^*$	$0.04 \pm 0.03^*$	$292.75 \pm 163.66^*$
合用 11 ~ 14 d	$8.58 \pm 2.33^*$	$0.04 \pm 0.03^*$	$267.86 \pm 137.60^*$

注: 与泊沙康唑合用前相比, $*P < 0.05$ 。

Note: vs before the co-administration of posaconazole, $*P < 0.05$.

2.3 合用泊沙康唑对肝、肾功能的影响

泊沙康唑的严重不良反应包括过敏反应、心律失常和 QT 间期延长以及肝毒性^[10]。联用泊沙康唑治疗后会引他克莫司血药浓度的异常波动, 可能导致受者肾功能的损伤^[11]。因此, 本研究在合用泊沙康唑期间密切监测受者肝肾功能, 结果显示, 使用泊沙康唑后未有受者出现肝功能异常, 亦无受者因他克莫司浓度升高而出现急性肾损伤, 见表 3。

3 讨论

三唑类抗真菌药物对 CYP3A4 均有不同程度的抑制作用, 除泊沙康唑外, 所有三唑类抗真菌药物都是 CYP3A4 的底物, 但是亲和力不尽相同^[12]。根据 FDA 和 EMA 的分类, 时间 - 浓度曲线下的面积 (AUC) 增加 ≥ 5 倍的药物被认为是

表 3 合用泊沙康唑前和合用后肝肾功能的变化 ($n = 24$)Tab 3 Changes in SCR, UA, ALT and AST before and after the co-administration of posaconazole ($n = 24$)

时间	SCR/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	UA/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ALT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	AST/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
合用前	183.00 (147.30, 405.30)	350.80 (270.60, 421.60)	11.00 (6.00, 22.00)	14.00 (8.50, 22.00)
合用 1 ~ 3 d	173.00 (135.80, 336.80)	327.90 (256.80, 390.80)	11.00 (4.25, 17.48)	16.20 (10.10, 20.00)
合用 4 ~ 7 d	178.00 (131.30, 268.00)	325.50 (264.00, 400.50)	13.50 (6.00, 22.35)	15.50 (11.40, 27.50)
合用 8 ~ 10 d	167.00 (118.80, 224.00)	330.30 (263.40, 401.50)	12.50 (7.25, 19.05)	17.20 (13.03, 27.48)
合用 11 ~ 14 d	141.50 (113.0, 231.80)	314.10 (256.30, 403.30)	13.45 (8.50, 22.00)	17.45 (12.50, 25.50)

强抑制剂, AUC 增加 ≥ 2 倍但 < 5 倍的药物被认为是中度抑制剂, AUC 增加 ≥ 1.25 倍但 < 2 倍的药物被认为是弱抑制剂。Groll 等^[11]的研究显示, 伏立康唑、泊沙康唑和伊曲康唑是 CYP3A 同工酶的强抑制剂, 而艾沙康唑是中度抑制剂。因此, 联合使用泊沙康唑可显著增加主要通过 CYP3A4 代谢的药物的血浆浓度^[13-14]。

他克莫司和三唑类抗真菌药物之间存在显著的相互作用。他克莫司经 CYP3A 酶 (包括 CYP3A4 和 CYP3A5) 在肝脏和小肠代谢, 同时也是药物转运体 P-糖蛋白 (P-gp) 的代谢底物和抑制剂^[13, 15]。泊沙康唑公开的处方信息建议, 在开始泊沙康唑治疗时, 将他克莫司的剂量减至初始剂量的约 1/3。Peksa 等^[16]的研究报道认为, 当与泊沙康唑合用时, 他克莫司给药剂量降低 (范围为 74% ~ 75%); 另有一项系统综述得出结论, 当与泊沙康唑联合用药时, 他克莫司的剂量应减少 60% ~ 70%^[17]。Berge 等^[18]发现联合用药时他克莫司 C_0/D 增加至单用时的 3.29 倍; Vanhove 等^[19]的研究结果显示, 联合使用泊沙康唑和伏立康唑后, 分别使他克莫司的 C_0/D 增加至 2.7 倍和 3.6 倍, 42% 的泊沙康唑联合用药者和 57% 的伏立康唑联合用药者的 C_0/D 增加了 4 倍以上 (联合用药第 14 日与合用前进行比较)。本研究结果显示异体肾移植受者合用泊沙康唑后, 他克莫司的给药剂量平均下降 40.1%, 他克莫司 C_0/D 为合用前的 3.13 倍 (范围为 1.40 ~ 6.95 倍), 66.7% 的受者他克莫司 C_0/D 增加至合用前的 3 倍以上, 8.3% 的受者 C_0/D 增加至合用前的 5 倍以上。有文献研究了他克莫司 - 三唑类之间相互作用的影响因素, CYP3A5 表达者 C_0/D 的变化减弱 (影响效果: -43% , $P = 0.017$), 并受红细胞压积 ($+8\%$, $P = 0.004$)、基线 C_0/D (-14% , $P < 0.001$) 和年龄 ($+1\%$, $P = 0.008$) 的影响。然而, 上述这些影响因素也只能解释 22% 的 C_0/D 的个体间变异^[19]。综上所述, 本研究中 C_0/D 在合用前后的变化与既往文献报道相似,

但给药剂量的下降幅度与文献数据相比偏小, 可能还受到基因型和其他临床指标的影响。

三唑类抗真菌药物的半衰期较长, 泊沙康唑治疗 5 ~ 7 d 达到稳态浓度后才能发挥最大作用^[16]。Cho 等^[15]的研究中, 泊沙康唑启动后 9 ~ 12 d 他克莫司的 C_0/D 最高。因此, 本研究纳入泊沙康唑用药疗程超过 14 d 的受者, 主要是考虑泊沙康唑达稳态浓度的时间较长, 并参考了既往文献中考察两种药物相互作用的疗程。合用泊沙康唑后分为 4 个时间段, 结果表明合用 8 ~ 10 d 他克莫司给药剂量降低最为显著, 较合用前平均降低了 47.1%, C_0/D 升高最为显著, 平均为合用前的 3.30 倍, 结果与以往的研究较为一致。

泊沙康唑联合治疗时, 减少免疫抑制剂的给药剂量可以降低与免疫抑制剂浓度增加相关的不良反应 (如肾毒性) 的发生风险^[20]。本研究在合用后的 14 d 内密切监测受者肾功能水平, 显示所有受者用药期间 SCR 未出现明显升高, 无受者出现急性肾损伤。

美国传染病学会建议在治疗期间, 应监测三唑类抗真菌药物 (伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑、艾沙康唑) 和任何可能相互作用的药物 (包括环孢素、他克莫司和西罗莫司) 的血药浓度^[21]。本项研究存在一定的局限性, 未能监测泊沙康唑的血药浓度, 但肝功能相关指标监测结果显示在泊沙康唑使用期间, 未有受者出现药源性肝损伤。

根据本中心研究结果, 说明书推荐的经验性剂量调整方案不一定适用于所有肾移植受者, 他克莫司和泊沙康唑之间药物相互作用的程度还受到两药合用时间的长短、CYP3A 的基因分型及其他临床指标等因素的影响。因此, 两药合用后, 仍需进行密切的血药浓度监测来及时调整方案。综上所述, 在肾移植受者中, 泊沙康唑和他克莫司之间相互作用的管理仍然具有一定的挑战性, 后续将进一步扩大样本量并开展药物基因组学对相互作用影响的研究, 为临床提供更精准的参考依据。

参考文献

- [1] Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology [J]. *Mayo Clin Proc*, 2011, 86 (8): 805-817.
- [2] Brown GD, Denning DW, Gow NA, et al. Hidden killers: human fungal infections [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4 (165): 165rv13.
- [3] Vallabhaneni S, Benedict K, Derado G, et al. Trends in hospitalizations related to invasive Aspergillosis and Mucormycosis in the United States, 2000—2013 [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2017, 4 (1): ofw268.
- [4] Kennedy KJ, Daveson K, Slavin MA, et al. Mucormycosis in Australia: contemporary epidemiology and outcomes [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22 (9): 775-781.
- [5] Liu W, Tan JW, Sun JM, et al. Invasive candidiasis in intensive care units in China: in vitro antifungal susceptibility in the China-SCAN study [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69 (1): 162-167.
- [6] Leung S, Poulakos MN, Machin J. Posaconazole: an update of its clinical use [J]. *Pharmacy (Basel)*, 2015, 3 (4): 210-268.
- [7] Gilbert DN. 热病——桑福德抗微生物治疗指南 [M]. 范洪伟, 译. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2019: 83.
- [8] 中国药理学会. 实体器官移植他克莫司个体化治疗专家共识 (2021 年版) [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2021, 21 (12): 1409-1424.
- [9] 李红莲, 张峻, 李骞, 等. 质子泵抑制剂对器官移植患者他克莫司血药浓度的影响 [J]. *国际药学研究杂志*, 2019, 46 (12): 912-917.
- [10] Raad II, Graybill JR, Bustamante AB, et al. Safety of long-term oral posaconazole use in the treatment of refractory invasive fungal infections [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42 (12): 1726-1734.
- [11] Groll AH, Townsend R, Desai A, et al. Drug-drug interactions between triazole antifungal agents used to treat invasive aspergillosis and immunosuppressants metabolized by cytochrome P450 3A4 [J]. *Transpl Infect Dis*, 2017, 19 (5). doi: 10.1111/tid.12751. Epub 2017 Sep 28.
- [12] Nivoix Y, Ubeaud-Sequier G, Engel P, et al. Drug-drug interactions of triazole antifungal agents in multimorbid patients and implications for patient care [J]. *Curr Drug Metab*, 2009, 10 (4): 395-409.
- [13] Saad AH, DePestel DD, Carver PL. Factors influencing the magnitude and clinical significance of drug interactions between azole antifungals and select immunosuppressants [J]. *Pharmacotherapy*, 2006, 26 (12): 1730-1744.
- [14] Morris MI. Posaconazole: a new oral antifungal agent with an expanded spectrum of activity [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2009, 66 (3): 225-236.
- [15] Cho E, Chan H, Nguyen HM, et al. Management of drug interaction between posaconazole and sirolimus in patients who undergo hematopoietic stem cell transplant [J]. *Pharmacotherapy*, 2015, 35 (6): 578-585.
- [16] Peksa GD, Schultz K, Fung HC. Dosing algorithm for concomitant administration of sirolimus, tacrolimus, and an azole after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2015, 21 (6): 409-415.
- [17] Fu CC, Chen J, Xu Y, et al. Dose adjustment of immunosuppressants during co-administration of posaconazole: a systematic review [J]. *Clin Invest Med*, 2018, 41 (1): E5-E15.
- [18] Berge M, Chevalier P, Benammar M, et al. Safe management of tacrolimus together with posaconazole in lung transplant patients with cystic fibrosis [J]. *Ther Drug Monit*, 2009, 31 (3): 396-399.
- [19] Vanhove T, Bouwsma H, Hilbrands L, et al. Determinants of the magnitude of interaction between tacrolimus and voriconazole/posaconazole in solid organ recipients [J]. *Am J Transplant*, 2017, 17 (9): 2372-2380.
- [20] de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future [J]. *Am J Kidney Dis*, 2000, 35 (2): 333-346.
- [21] Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, et al. Practice guide-lines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 up-date by the Infectious Diseases Society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63: e1-e60.

(收稿日期: 2023-06-23; 修回日期: 2023-08-19)

奈玛特韦 / 利托那韦致新型冠状病毒感染患者肝功能异常的 危险因素分析

胡锦涛¹, 顾圣莹², 姜静静¹, 范国荣², 娄月芬^{1*} (1. 同济大学附属上海市第四人民医院药剂科, 上海 200434; 2. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学科, 上海 200080)

摘要: **目的** 分析新型冠状病毒感染患者使用奈玛特韦 / 利托那韦片出现肝功能指标异常升高的危险因素。**方法** 收集本院奈玛特韦 / 利托那韦治疗患者 1529 例, 采用病例对照研究设计, 纳入奈玛特韦 / 利托那韦用药后肝功能异常且 RUCAM 量表评分 ≥ 3 分的患者为病例组, 根据年龄、性别、入院新型冠状病毒诊断分型、基础疾病数量、合并用药个数进行 1:1 倾向性评分匹配对照组。使用单因素分析和 Logistic 回归方法, 研究奈玛特韦 / 利托那韦治疗后肝功能异常的危险因素。**结果** 共纳入 88 例患者, 肝功能异常组 44 例, 匹配对照组 44 例。Logistic 回归结果显示奈玛特韦 / 利托那韦用药疗程 ($OR = 1.234, 95\%CI 1.015 \sim 1.500, P = 0.035$)、合并用药数量 ($OR = 4.582, 95\%CI 1.225 \sim 17.131, P = 0.024$)、新型冠状病毒疫苗接种情况 ($OR = 0.446, 95\%CI 0.200 \sim 0.994, P = 0.048$) 是肝功能异常升高的影响因素。**结论** 建议群众积极接种新型冠状病毒疫苗, 对使用奈玛特韦 / 利托那韦治疗的新型冠状病毒感染患者开展多重用药评估、短疗程用药 ($\leq 5 d$)、加强肝功能的监护, 以确保用药安全。

关键词: 奈玛特韦 / 利托那韦; 新型冠状病毒感染; 肝功能; 危险因素

中图分类号: R563.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3073-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.042

Risk factors associated with nirmatrelvir/ritonavir induced hepatic dysfunction in COVID-19 patients

HU Jin-hua¹, GU Sheng-ying², JIANG Jing-jing¹, FAN Guo-rong², LOU Yue-fen^{1*} (1. School of Pharmacy, Shanghai Fourth People's Hospital, Affiliated to Tongji University, Shanghai 200434; 2. Department of Clinical Pharmacy, Shanghai General Hospital, School of Medicine Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080)

Abstract: Objective To analyse the risk factors for hepatic dysfunction in COVID-19 patients treated with nirmatrelvir/ritonavir. **Methods** We collected the data of 1529 COVID-19 patients treated with nirmatrelvir/ritonavir. A case-control study was designed. The patients with hepatic dysfunction and RUCAM score ≥ 3 were divided into an experimental group. The control group was matched with 1:1 ratio with propensity score matching in age, sex, diagnostic classification of COVID-19 on admission, number of primary diseases and drug combination. Univariate analysis and binary Logistic regression were used to analyse the risk factors for abnormal liver function in the patients. **Results** Totally 88 patients receiving nirmatrelvir/ritonavir therapy were included (44 in the hepatic dysfunction group and 44 patients in the control group). Logistic regression showed that treatment course of nirmatrelvir/ritonavir ($OR = 1.234, 95\%CI 1.015 \sim 1.500, P = 0.035$), combined medications ($OR = 4.582, 95\%CI 1.225 \sim 17.131, P = 0.024$) and COVID-19 vaccination ($OR = 0.446, 95\%CI 0.200 \sim 0.994, P = 0.048$) were risk factors for hepatic dysfunction caused by nirmatrelvir/ritonavir. **Conclusion** COVID-19 vaccination is recommended. Assessment of drug combination, short medication course (

基金项目: 上海市科委生物医药科技支撑专项项目 (No.23S21900900); 上海市第四人民医院学科助推计划项目 (No.SY-XKZT-2020-1014)。

作者简介: 胡锦涛, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学方面的研究, email: hjhhujinhua@163.com *通信作者: 娄月芬, 女, 主任药师, 主要从事药事管理方面的研究, email: louyuefen@sina.cn

≤ 5 days), and liver function monitoring in COVID-19 patients treated with nirmotenvir/ritonavir help ensure medication safety.

Key words: nirmatrelvir/ritonavir; COVID-19; liver function; risk factor

新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 已经造成全球新型冠状病毒感染 (COVID-19) 大流行, 带来巨大的生命健康威胁。病毒暴发初期使用的广谱抗病毒药物如瑞德西韦、法匹拉韦等发挥了重要作用^[1]。其后新型冠状病毒的疫苗和抗体药物研发开展, 但不断出现的新型冠状病毒变异毒株也对新型冠状病毒防治效果造成重要影响。小分子抗病毒药物应运而生, 其具有作用靶点明确, 化学结构简单稳定, 口服给药方便等诸多优势。2021 年 12 月 22 日 FDA 批准 Paxlovid 上市^[2], 2022 年 2 月 11 日, 国家药品监督管理局 (NMPA) 紧急附条件批准奈玛特韦/利托那韦进口注册^[3]。其后奈玛特韦/利托那韦也被列入《新型冠状病毒感染诊疗方案 (试行第九版)》^[4], 奈玛特韦/利托那韦正式投入临床使用, 治疗发病 5 d 以内的轻型和普通型 COVID-19, 且伴有进展为重型高风险因素的成人和青少年患者。

临床研究发现奈玛特韦/利托那韦片的主要不良事件为味觉障碍 (5.6%)、腹泻 (3.1%)、D-二聚体增加 (1.9%), 该项研究报告了谷丙转氨酶 (ALT) 升高 (1.5%), 但研究者却认为药物与转氨酶升高不相关^[5]。LiverTox 数据库亦报告患者口服奈玛特韦/利托那韦片 5 d, 与血清转氨酶升高或临床明显的肝损伤无关^[6]。但其说明书中却仍然提到口服奈玛特韦片/利托那韦片会产生肝转氨酶升高、临床肝炎和黄疸, 不推荐用于严重肝功能损害患者^[2]。本研究回顾分析奈玛特韦/利托那韦片在治疗 COVID-19 患者时与肝功能异常的关联性, 并研究药物致肝功能异常的可能危险因素, 为临床用药作参考。

1 材料与方法

1.1 病例来源与研究设计

病例来自于 2022 年 4~6 月期间本院收治确诊的 COVID-19 患者, 参照《新型冠状病毒感染诊疗方案 (试行第九版)》^[4] 的诊断标准将患者分为轻型、普通型、重型、危重型。采用回顾性病例对照研究设计。

1.2 病例组纳排标准

纳入标准: ① 按照《新型冠状病毒感染诊疗方案 (试行第九版)》^[4] 确诊的 COVID-19 患者; ② 使用奈玛特韦/利托那韦片前后至少 2 次肝生化

检查; ③ 用药后 ALT、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、 γ 谷氨酰转肽酶 (GGT)、总胆红素 (TB) 其中至少有一项升高至正常值上限 2 倍以上; ④ 采用 RUCAM^[7] 量表评分鉴别奈玛特韦/利托那韦与肝功能异常存在可能的因果关系, RUCAM 评分 ≥ 3 分者纳入。

排除标准: ① 入院即肝功能一项升高至正常值上限 2 倍以上; ② 合并病毒性肝炎、肝脏免疫性疾病、酒精性肝病、肝硬化、肝脏肿瘤等肝脏疾病者; ③ 病程中发生多器官衰竭导致肝功能异常。

1.3 对照组获取方法

奈玛特韦/利托那韦片用药后肝功能正常的 COVID-19 患者, 根据患者年龄、性别、入院新型冠状病毒诊断分型、基础疾病个数、合并用药个数与病例组进行 1:1 倾向性评分匹配 (PSM) 获得对照组, 卡钳值 0.10。

1.4 资料收集

查阅病历, 收集患者一般资料、既往病史、住院期间肝功能指标、血常规、肾功能、C 反应蛋白、降钙素原、白细胞介素-6、铁蛋白、奈玛特韦/利托那韦使用剂量和疗程、合并用药等数据。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 27.0 软件进行数据统计。正态分布计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 偏态分布计量资料以中位数 [$M (P_{25}, P_{75})$] 表示, 组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。等级资料以例数和百分比表示 ($n, \%$), 采用 Wilcoxon 秩和检验。分类资料以例数和百分比表示 ($n, \%$), 采用卡方检验或 Fisher 精确检验。影响患者肝功能异常的独立危险因素采用 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 使用奈玛特韦/利托那韦后肝功能异常患者临床特征

1529 例使用奈玛特韦/利托那韦片的 COVID-19 患者中, 44 例患者出现不同程度肝功能异常, 发生率 2.88%。最早发生于用药后 2 d, 最迟发生于用药后 19 d, 中位数 7.5 (6, 9) d。据 RUCAM 评分^[7], 药物性肝损伤可能 35 例, 可能性大 9 例。根据 DILI 判断标准^[8], 肝细胞型 12 例, 胆汁淤积型 13 例,

混合型 19 例。具体见表 1。

表 1 44 例使用奈玛特韦 / 利托那韦片肝功异常患者的 RUCAM 评分及 DILI 分型

Tab 1 RUCAM scores and patterns of DILI hepatotoxicity injury in 44 patients with hepatic dysfunction after nematrivir/ritonavir treatment

项目	例数 (%)
RUCAM 评分	
3 ~ 5 分	35 (79.6)
6 ~ 8 分	9 (20.4)
> 8 分	0 (0.0)
DILI 临床分型	
肝细胞型	12 (27.27)
胆汁淤积型	13 (29.55)
混合型	19 (43.18)

2.2 一般资料

肝功能异常患者与正常患者在年龄、性别、入院诊断分型、基础疾病数量分布上差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但两组合并用药数量分布差异存在统计学意义 ($P < 0.001$), 见表 2。经过倾向性评分匹配后, 纳入对照组 44 例和病例组 44 例患者为研究对象, 未能平衡合并用药数量的基线差异 ($Z = 2.309, P = 0.021$)。

2.3 合并用药情况

病例组 44 例患者, 合并使用的前几位的药品分别是肝素类 (86.4%)、莲花清瘟颗粒 (61.4%)、中药饮片 (54.5%) 等, 详见图 1。

2.4 奈玛特韦 / 利托那韦引起肝功能异常的单因素分析

表 2 患者一般资料

Tab 2 Characteristic of the patients

特征	全部患者				纳入研究			
	肝功能正常 ($n = 1485$)	肝功能异常 ($n = 44$)	Z/χ^2	P 值	对照组 ($n = 44$)	病例组 ($n = 44$)	Z/χ^2	P 值
年龄	77 (67, 87)	80 (69, 86)	0.588	0.557	72 (65, 88)	80 (69, 86)	0.889	0.374
性别								
男	628 (42.3)	22 (50.0)	1.040	0.308	19 (43.2)	22 (50.0)	0.411	0.521
女	857 (57.7)	22 (50.0)			25 (56.8)	22 (50.0)		
入院分型								
轻型	971 (65.4)	24 (54.5)	1.220	0.223	31 (70.4)	24 (54.5)	1.380	0.167
普通型	427 (28.8)	19 (43.2)			11 (25.0)	19 (43.2)		
重型	67 (4.5)	1 (2.3)			1 (2.3)	1 (2.3)		
危重型	19 (1.3)	0 (0.0)			1 (2.3)	0 (0.0)		
基础疾病	2 (1, 3)	2 (1, 3)	0.343	0.732	2 (1, 3)	2 (1, 3)	0.164	0.870
合并用药	6 (4, 9)	10 (7, 14.5)	5.712	< 0.001	7 (4, 11.8)	10 (7, 14.5)	2.309	0.021

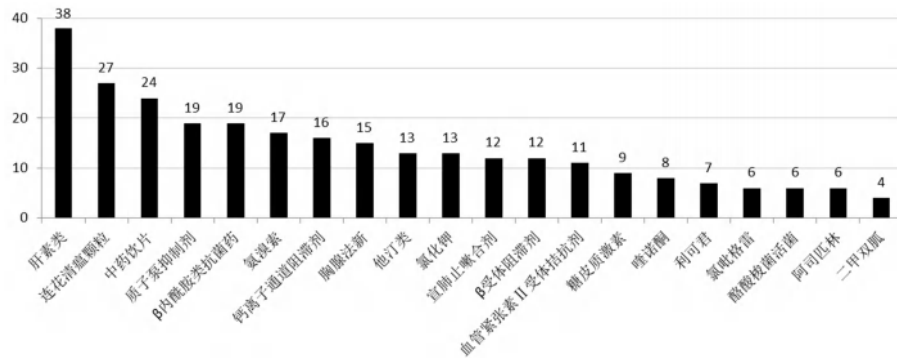


图 1 44 例奈玛特韦 / 利托那韦使用后发生肝功能异常患者前 20 名合并用药频数分布

Fig 1 Top 20 medication combinations in 44 patients with hepatic dysfunction after nematrivir/ritonavir

与对照组相比, 病例组出院 COVID-19 诊断分型、合并用药数量、新型冠状病毒疫苗接种、奈玛特韦 / 利托那韦用药疗程、淋巴细胞计数、C 反应蛋白、降钙素原差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 3。

2.5 奈玛特韦 / 利托那韦引起肝功能异常的 Logistic 回归分析

将单因素分析差异有统计学意义的指标进行 Logistic 回归分析, 建立的预测模型 Omnibus 检验 $P < 0.001$, -2 对数似然值 93.096, 总体预测百分比 67.8%。最终结果显示合并用药数量超过 5 种、奈玛特韦 / 利托那韦用药长疗程、未接种新型冠状病毒疫苗是服用奈玛特韦 / 利托那韦片后发生肝功能异常的独立危险因素 ($P < 0.05$), 详见表 4。

表 3 奈玛特韦 / 利托那韦致肝功能异常相关变量的单因素分析

Tab 3 Univariate analysis of related risk factors for hepatic dysfunction caused by nirmatrevir/ritonavir

临床特征	对照组	病例组	$t/Z/\chi^2$	P 值
身高 /cm	163.51 ± 9.553	163.03 ± 8.131	0.214	0.831
体重 /kg	58.629 ± 9.8394	58.172 ± 9.1381	0.191	0.849
体质量指数 (BMI) / (kg · m ⁻²)	21.94 ± 3.10	21.90 ± 3.16	0.045	0.965
出院 COVID-19 诊断分型				
轻型	28 (63.6)	15 (34.1)	2.371	0.018
普通型	11 (25.0)	23 (52.3)		
重型	3 (6.8)	5 (11.4)		
危重型	2 (4.5)	1 (2.3)		
合并疾病				
高血压	26 (59.1)	23 (52.3)	0.414	0.520
冠心病	9 (20.5)	9 (20.5)	0.000	1.000
糖尿病	7 (15.9)	5 (11.4)	0.386	0.534
脑血管病	4 (9.1)	10 (22.7)	3.058	0.080
慢性肾病	1 (2.3)	0 (0)		1.000
慢性肺疾病	5 (11.4)	6 (13.6)	0.104	0.747
肿瘤	4 (9.1)	4 (9.1)	< 0.001	1.000
免疫缺陷	2 (4.5)	0 (0)		0.494
合并用药数				
≤ 5	17 (38.6)	6 (13.6)	7.122	0.008
> 5	27 (61.4)	38 (86.4)		
发病入院时间 /d	3 (1.25, 6.25)	2 (1, 3)	1.958	0.050
疫苗接种				
0 剂	19 (43.2)	30 (68.2)	6.132	0.047
1 ~ 3 剂	19 (43.2)	9 (20.5)		
不详	6 (13.6)	5 (11.4)		
用药剂量				
300 mg/150 mg q12h	37 (84.1)	42 (95.5)	1.980	0.159
150 mg/150 mg q12h	7 (15.9)	2 (4.5)		
用药疗程 /d	5 (5, 5)	5 (5, 10)	3.649	< 0.001
≤ 5	39 (88.6)	30 (68.2)	5.437	0.020
> 5	5 (11.4)	14 (31.8)		
白细胞计数 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)	4.91 (3.99, 6.43)	5.05 (3.34, 6.71)	0.451	0.652
红细胞计数 / (×10 ¹² · L ⁻¹)	4.29 (3.93, 4.54)	4.28 (3.865, 4.685)	0.317	0.751
血小板计数 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)	192.84 ± 55.28	170.66 ± 61.41	1.781	0.078
淋巴细胞计数				
正常	31 (70.5)	21 (29.5)	4.701	0.030
异常	13 (47.7)	23 (52.3)		
血清肌酐 / (μmol · L ⁻¹)	58.60 (48.68, 70.9)	62 (50.05, 79.08)	0.530	0.596
估算肾小球滤过率 [mL / (min · 1.73 m ²)]	107.5 (83, 122)	98.5 (80, 129.5)	0.588	0.556
总蛋白 / (g · L ⁻¹)	62.01 ± 5.45	63.04 ± 6.66	- 0.793	0.430
白蛋白 / (g · L ⁻¹)	40.25 ± 4.50	39.53 ± 5.36	0.684	0.496
C 反应蛋白 / (mg · L ⁻¹)	4.89 (1.98, 13.28)	14.10 (4.79, 33.52)	2.972	0.003
降钙素原 / (ng · L ⁻¹)	0.02 (0.02, 0.041)	0.026 (0.02, 0.041)	2.328	0.020
白细胞介素 -6 / (pg · mL ⁻¹)	36.69 (17.29, 145)	47.17 (21.67, 145)	0.520	0.603
铁蛋白 / (μg · L ⁻¹)	221 (110, 336)	773 (266, 996)	1.736	0.094
乳酸 / (mmol · L ⁻¹)	2.47 ± 0.91	2.2 ± 0.90	0.803	0.429

表 4 奈玛特韦 / 利托那韦致肝功能异常相关变量的 Logistic 回归分析

Tab 4 Logistic regression analysis of related risk factors to hepatic dysfunction caused by nirmatrevir/ritonavir

变量	<i>b</i> 值	<i>b</i> 值标准误	Wald 卡方值	<i>P</i> 值	OR 值 (95%CI)
出院 COVID-19 诊断分型	-0.579	0.436	1.760	0.185	0.561 (0.238 ~ 1.318)
合并用药	1.522	0.673	5.117	0.024	4.582 (1.225 ~ 17.131)
新型冠状病毒疫苗接种	-0.808	0.409	3.895	0.048	0.446 (0.200 ~ 0.994)
用药疗程	0.210	0.100	4.437	0.035	1.234 (1.015 ~ 1.500)
淋巴细胞计数	0.709	0.520	1.855	0.173	2.032 (0.733 ~ 5.634)
C 反应蛋白	0.034	0.018	3.341	0.068	1.034 (0.998 ~ 1.072)
降钙素原	-0.560	0.691	0.656	0.418	0.571 (0.147 ~ 2.215)

3 讨论

奈玛特韦是 SARS-CoV-2 主蛋白酶 (Mpro) 抑制剂, 通过抑制此蛋白酶介导的蛋白质前体合成有效阻断病毒复制^[9]。利托那韦为人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 蛋白酶抑制剂和 CYP3A4 抑制剂^[10]。利托那韦减缓 CYP3A4 介导的奈玛特韦的代谢, 帮助奈玛特韦在体内保持较高浓度, 增加其抗病毒活性。药品说明书建议奈玛特韦 / 利托那韦的使用疗程是 5 d, 虽作为短期治疗疗程, 也很可能与通过 CYP3A4 代谢的其他药物发生相互作用^[11]。此外利托那韦还进一步表现出对 CYP2D6、CYP2C19、CYP2C8、CYP2C9 的抑制作用, 及对 CYP1A2、CYP2B6、葡糖醛酸基转移酶 (UGT) 的诱导作用^[12]。奈玛特韦 / 利托那韦是否存在更多有临床价值的潜在药物相互作用尚未可知, 更多药物相互作用也在利物浦大学 COVID-19 药物相互作用网站上持续更新^[13]。

奈玛特韦 / 利托那韦主要在肝脏中进行代谢, 本研究发现合并用药数量增加是使用奈玛特韦 / 利托那韦后发生肝功能异常的独立危险因素。在肝功能异常的患者合并使用的前 20 位药物中, 氯吡格雷与钙离子通道阻滞剂、他汀类、 β 受体阻滞剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂、糖皮质激素的个别品种存在与奈玛特韦 / 利托那韦已知的潜在药物相互作用甚至用药禁忌。合并用药导致的药物相互作用风险增加或许可以部分解释奈玛特韦 / 利托那韦用药后肝功能异常的风险增加。

本研究发现用药疗程是奈玛特韦 / 利托那韦致肝功能异常的独立危险因素。在奈玛特韦 / 利托那韦片 II / III 期临床研究中发生肝酶异常概率为 1.5%, 该研究的用药疗程为 5 d^[5]。而本项回顾性研究用药疗程最长 25 d, 报告肝酶异常概率 2.88%, 高于 RCT 研究, 或许与长疗程 (> 5 d) 用药相关。长疗程使用奈玛特韦 / 利托那韦片较短疗程使用发生肝功能异常的风险更高 (OR =

3.64, 95%CI = 1.18 ~ 11.23, $P < 0.001$)。目前无支持奈玛特韦 / 利托那韦片长疗程 (> 5 d) 使用的研究报道, 建议临床用药过程中考虑长疗程使用发生药物不良反应的风险, 谨慎用药。

严重 COVID-19 患者线粒体功能障碍和肝脏解毒功能降低, 临床观察到的肝脏功能障碍似乎更显著^[14]。COVID-19 患者的肝功能异常可能与病毒的直接细胞病变效应、免疫反应、全身炎症、缺血和缺氧、心理应激、药物诱导的肝损伤等诸多因素相关^[15-16]。有研究报道在 2021 年 12 月 2 日至 2022 年 5 月 13 日期间, 上海 612 597 例奥密克戎相关 COVID-19 患者中 1485 例进展为重症和危重症, 568 例患者死亡, 并得出结论虽然灭活疫苗预防奥密克戎感染能力较差, 但可预防重症及死亡。疫苗预防重症和死亡的有效率为 88.6% (95%CI = 85.8% ~ 90.9%)^[17]。本研究纳入的 49 例未接种疫苗的患者中, COVID-19 病情进展患者 13 例 (26.5%), 28 例接种 1 ~ 3 针新型冠状病毒疫苗的患者中, COVID-19 病情进展 2 例 (7.1%), 两组病情进展差异存在统计学意义 (OR = 0.213, 95%CI = 0.044 ~ 1.026, $P = 0.039$)。新型冠状病毒疫苗接种 (OR = 0.446, 95%CI = 0.200 ~ 0.994, $P = 0.048$) 是肝功能的保护因素, 这或许与疫苗接种可预防 COVID-19 患者病情进展有关。

本研究存在局限性。研究纳入的患者数量少, 结果的稳健性可能存在欠缺。患者基线特征中合并用药数量采用倾向性评分匹配后仍然无法完全平衡基线, 研究结果发现联合用药多是使用奈玛特韦 / 利托那韦的 COVID-19 患者发生肝功能异常的危险因素, 结果的准确和是否具有临床价值有待进一步验证。目前的研究证据尚不足以解释疫苗与肝功能两者之间的因果关联。但是我们仍然建议 COVID-19 患者使用奈玛特韦 / 利托那韦时采取干预措施预防肝功能异常的发生, 如开展

多重用药评估精简合并用药数量、短疗程 (≤ 5 d) 用药、积极接种新型冠状病毒疫苗; 同时建议临床使用奈玛特韦 / 利托那韦片后加强患者肝功能的监护, 确保患者用药安全。

参考文献

- [1] Li G, De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19 (3): 149-150.
- [2] FDA. Fact sheet for healthcare providers: emergency use authorization for paxlovid [EB/OL]. <https://www.fda.gov/media/155050/download>. (2021-12-12) / [2022-10-10].
- [3] 国家药品监督管理局. 国家药监局应急附条件批准辉瑞公司新冠病毒治疗药物奈玛特韦片 / 利托那韦片组合包装进口注册 [EB/OL]. <https://www.nmpa.gov.cn/zhuanti/yqyjzxd/yqyjzxd/20220212085753142.html>, (2022-02-12) / [2022-10-10].
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染诊疗方案 (试行第九版) [J]. *传染病信息*, 2022, 35 (2): 97-106.
- [5] Hammond J, Leister-tebbe H, Gardner A, et al. Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386 (15): 1397-1408.
- [6] LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury. Paxlovid [M/OL]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK577815/> (2022-01-31) / [2022-10-10].
- [7] 药物性肝损伤专业网. RUCAM 量表 [DB/OL]. <https://www.hepatox.org/rucam>, (2018-10-03) / [2022-10-10].
- [8] Chalasani NP, Maddur H, Russo MW, et al. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury [J]. *Am J Gastroenterol*, 2021, 116 (5): 878-898.
- [9] Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, et al. An oral SARS-CoV-2 M (pro) inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19 [J]. *Science*, 2021, 374 (6575): 1586-1593.
- [10] Sevrioukova IF, Poulos TL. Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (43): 18422-7.
- [11] Marzolini C, Kuritzkes DR, Marra F, et al. Recommendations for the management of drug-drug interactions between the COVID-19 antiviral nirmatrelvir/ritonavir (paxlovid) and comedications [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2022, 77 (5): 509-521.
- [12] Heskin J, Pallett SJC, Mughal N, et al. Caution required with use of ritonavir-boosted PF-07321332 in COVID-19 management [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10319): 21-22.
- [13] University of Liverpool. COVID-19 Drug interaction database [EB/OL]. (2022-03-24) [2022-10-10]. <https://www.covid19-druginteractions.org/checker>.
- [14] Hammoudeh SM, Hammoudeh AM, Bhamidimarri PM, et al. Insight into molecular mechanisms underlying hepatic dysfunction in severe COVID-19 patients using systems biology [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27 (21): 2850-2870.
- [15] Jothimani D, Venugopal R, Abedin MF, et al. COVID-19 and the liver [J]. *J Hepatol*, 2020, 73 (5): 1231-1240.
- [16] Saeed U, Piracha ZZ, Uppal SR, et al. SARS-CoV-2 induced hepatic injuries and liver complications [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 726263.
- [17] Huang Z, Xu S, Liu J, et al. Effectiveness of inactivated and Ad5-nCoV COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 Omicron BA. 2 variant infection, severe illness, and death [J]. *BMC Med*, 2022, 20 (1): 400.

(收稿日期: 2023-04-24; 修回日期: 2023-05-17)

临床药师在临床

以营养药师为主导的营养支持团队在肝硬化失代偿期患者中的实践

杨香瑜¹, 陈露², 胡乃毅², 胡伟², 张韶辉^{1*} (1.药学部, 2.消化内科, 武汉市第一医院, 武汉 430022)

摘要: **目的** 建立以营养药师为主导的营养支持团队, 探究其在肝硬化失代偿期患者中的实践效果。 **方法** 选择 2021 年 6 月至 2022 年 6 月在我院消化内科确诊住院治疗的肝硬化失代偿期患者, 结合患者就诊顺序及意愿进行分组, 分为干预组和对照组。干预组采取以营养药师为主导的营养支持团队进行营养管理, 对照组采取传统模式进行营养管理。分别比较两组患者基线资料、营养管理临床指标和药学指标。 **结果** 干预组患者白蛋白、血红蛋白、总淋巴细胞计数水平平均高于对照组 ($P < 0.01$), Child-Pugh 评分及患者半年内再入院次数低于对照组 ($P < 0.01$), 平均住院日、出院前血氨水平低于对照组, 但差异无统计学意义。干预组患者营养制剂使用率高于对照组 ($P < 0.01$), 营养支持方案不合理使用率低于对照组 ($P < 0.01$), 但两组患者的不良反应发生率无明显差异。 **结论** 通过建立以营养药师为主导的营养支持团队, 可提高肝硬化失代偿期患者营养支持的效果, 同时保证营养支持方案的合理使用, 以期帮助患者更好地改善营养状态。

关键词: 营养药师; 营养支持团队; 肝硬化失代偿期

中图分类号: R473.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3079-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.043

Practice of nutritional support teams led by nutritional pharmacists in patients with decompensated cirrhosis

YANG Xiang-yu¹, CHEN Lu², HU Nai-yi², HU Wei², ZHANG Shao-hui^{1*} (1. Department of Pharmacy, 2. Department of Gastroenterology, The First Hospital of Wuhan, Wuhan 430022)

Abstract: Objective To establish a nutritional support team led by nutritional pharmacists to determine the practical effect on patients with decompensated cirrhosis. **Methods** Patients with decompensated cirrhosis admitted to the Department of Gastroenterology in our hospital from June 2021 to June 2022 were divided into an intervention group and a control group based on patient visit order and willingness. The intervention group received nutrition support from the team led by nutritional pharmacists for nutrition management, while the control group adopted the traditional mode for nutrition management. Baseline data, nutritional management clinical indexes and pharmaceutical indexes of both groups were compared. **Results** The albumin level, hemoglobin level and total lymphocyte count in the intervention group were higher than those in the control group ($P < 0.01$), the Child-Pugh score and the number of readmissions in half a year was lower than that in the control group ($P < 0.01$), and the average hospitalization days and blood ammonia level before the discharge were lower than those in the control group, without significant difference. The utilization rate of nutritional preparations in the intervention group was higher than that in the

基金项目: 湖北省卫生健康委员会科研项目 (No.WJ2021M005); 湖北省卫生健康委员会科研项目 (No.WJ2019F037)。

作者简介: 杨香瑜, 女, 主管药师, 主要从事临床药学及肠外肠内营养支持方面的研究, email: 358752306@qq.com *通信作者: 张韶辉, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学及合理用药管理方面的研究, email: zshjtjmu@hotmail.com

control group ($P < 0.01$), and the irrational utilization rate of nutritional support programs was lower than that in the control group ($P < 0.01$), but there was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups. **Conclusion** Establishing a nutritional support team led by nutritional pharmacists helps improve the effect of nutritional support on patients with decompensated cirrhosis, and ensure the rational use of nutritional support, which ultimately improve patients' nutritional status.

Key words: nutritional pharmacist; nutrition support team; decompensation of cirrhosis

肝硬化为临床常见慢性进行性肝病, 流行病学调查发现, 近年来其发病率呈逐年上升趋势^[1]。肝硬化起病隐匿, 病程进展缓慢, 多数患者就诊时已到肝硬化失代偿期。肝硬化失代偿期患者中营养不良十分常见, 蛋白质-能量营养不良的发生率高达 50%~90%^[2], 主要与肝硬化患者肝脏代谢功能障碍有关。营养不良与腹水、肝性脑病等其他并发症一样, 是影响肝硬化失代偿期患者临床结局重要的预后因素^[3], 如何保证该类患者的营养支持有效实施, 改善其营养状况及生存质量, 是目前肝硬化诊治领域关注的热点。

由于肝硬化患者临床治疗周期长, 住院期间仅能给予针对性治疗方案控制病情, 更为关键的是营养风险的早期识别及营养支持规范化治疗。因此, 提高医师、患者对营养治疗的重视程度、改善营养治疗依从性尤为重要。有报道, 临床药师在协助医疗团队延缓疾病(如糖尿病、心血管疾病等)进展中发挥了重要作用^[4-5]。目前肝病营养支持/干预已经由单纯的营养师负责制逐渐过渡到“营养师-临床主管医师-临床药师-责任护士”组成的“营养支持小组”模式。我院成立了以肠外肠内营养专科临床药师(以下简称营养药师)为主导的“营养药师-主管医师-责任护士”营养支持团队, 在该模式下可以更大程度地优化营养支持方案, 保障方案的实施, 并能及时反馈和调整支持方案。这种营养干预模式的改进通过提高营养支持的有效性、合理性, 帮助患者更好地改善营养状态, 促进病情恢复。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选自 2021 年 6 月至 2022 年 6 月在我院消化内科确诊住院治疗的肝硬化失代偿期患者为研究对象。纳入标准: ①符合《中国肝硬化临床诊治共识意见》^[6]中有关肝硬化失代偿期诊断标准且资料完整; ②入院当天通过英国皇家自由医院营养优先工具(royal free hospital-nutritional prioritizing tool, RFH-NPT)筛查确定有营养风险, 评估后得分为 2~7 分(高度营养风险)者。排除标准:

①精神障碍, 意识不清者; ②肝癌或其他肿瘤患者; ③入院合并食管静脉曲张破裂出血、肝性脑病 3~4 级、严重肝肾综合征需要限制饮食者。本研究通过我院医学伦理委员会审核(武大一院伦审[2023]17号)。

1.2 研究方法

根据纳入排除标准, 最终入组 100 例肝硬化失代偿期患者。干预组 44 例, 对照组 56 例, 两组患者在性别、年龄、病因分布等一般统计学资料方面差异均无统计学意义。两组患者均维持原肝硬化失代偿期治疗方案, 对照组主要根据患者病情分别给予护肝、利尿、抗感染、降氨、止血、补充白蛋白等基础治疗, 若涉及营养支持用药仅由临床医师根据既往用药经验自行制订方案, 全程无营养药师参与。干预组在上述方案的基础上, 纳入以营养药师为主导的营养支持团队进行营养管理。

1.3 肝硬化失代偿期患者营养管理方案

1.3.1 成立以营养药师为主导的营养支持团队

我院营养药师在消化内科驻科后开展相关工作得到了消化内科主任的支持及认可, 并在主任的牵头下成立了肝硬化营养支持团队, 成员包括消化内科医师、营养药师、护理人员等。营养药师在团队中起主导作用, 主要负责营养评估、营养支持方案的优化及建议、监护营养制剂的疗效与并发症、营养用药宣教等。临床医师主要负责病情诊治、营养治疗实施等, 护师主要负责营养风险筛查、营养制剂喂养及输注等。

1.3.2 建立营养支持规范化服务路径

我院营养药师基于肝硬化失代偿期患者疾病特点及营养支持原则, 参照国内外相关指南及文献^[7-11], 制订肝硬化失代偿期患者营养支持服务流程, 具体见图 1, 患者入院后由临床医师开具“营养风险筛查与营养测评医嘱”, 开具医嘱后 24 h 内由护士进行营养风险筛查。目前我院采用优化的 RFH-NPT 进行筛查并记录, 筛查后评分 $\geq 2 \sim 7$ 分的患者在 24~48 h 内请营养药师采用皇家自由医院全面评定表(royal free hospital-global as-sess-

ment, RFH-GA) 进行营养评估, 评估需要营养支持的患者由营养师和临床医师共同商讨, 制订该患者的营养支持治疗方案。最终临床医师开具相关药物医嘱, 并放置肠内营养管或中心静脉置管等, 护士执行后, 由营养师进行疗效监护、并发症监护、依从性监护及营养支持方案的制订及动态调整, 同时建立肝硬化失代偿期患者营养支持标准化药学服务路径, 具体见表 1。

1.3.3 制订营养支持方案 团队根据肝病相关指南制订营养治疗方案。在胃肠功能允许的情况下, 患者营养摄入的首要途径是经口补充/鼻饲, 推荐白天均匀小餐和夜间加餐。通常推荐首选整蛋白型肠内营养配方, 根据患者并发症的不同, 由营养师与临床医师商讨选择合适的肠内营养制剂品种。若患者肠内营养不能耐受或无法达标, 开启肠外营养支持。失代偿期患者目标热卡 125.58 ~ 146.5

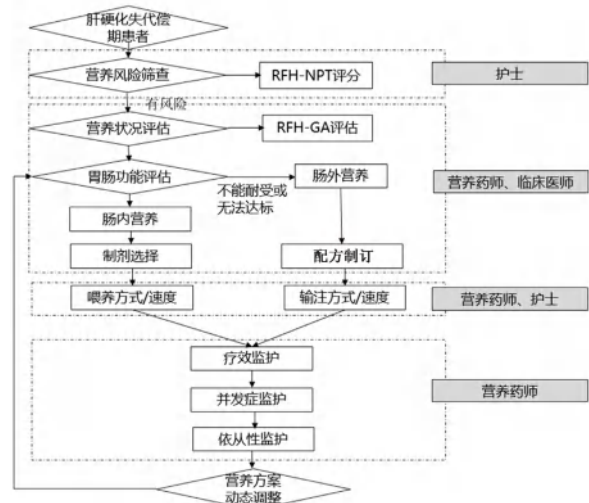


图 1 肝硬化失代偿期患者营养支持服务流程

Fig 1 Procedures of nutrition support services for patients with decompensated cirrhosis

表 1 肝硬化失代偿期患者营养支持标准化药学服务路径

Tab 1 Standardized pharmaceutical service of nutritional support for patients with decompensated cirrhosis

服务路径	入院药学营养评估 (住院第 1 ~ 2 日)	在院药学营养监护 (住院第 2 日到出院前 1 日)	出院药学营养指导 (出院当天)
主要药学 监护工 作	<input type="checkbox"/> 入院药学评估 <input type="checkbox"/> 询问病史及用药史、膳食摄入情况 <input type="checkbox"/> 营养评估 <input type="checkbox"/> 评价初始治疗方案, 制订药学监护计划	<input type="checkbox"/> 住院期间营养支持方案评估 (关注营养支持途径、制剂选择、用量、输注方式和输注速度等) <input type="checkbox"/> 营养用药咨询服务 <input type="checkbox"/> 对营养用药方案变更的评价和监护 (关注疗效、药物不良反应及相互作用)	<input type="checkbox"/> 出院前用药教育及家庭 (或转诊机构) 营养建议 <input type="checkbox"/> 药学营养门诊随访
药学监护 内容	<input type="checkbox"/> 入院药学评估表 <input type="checkbox"/> RFH-GA 营养评估 <input type="checkbox"/> 营养团队介绍和初步指导 介绍疾病情况及治疗方案 营养膳食及用药指导 <input type="checkbox"/> 制订药学监护计划	<input type="checkbox"/> 医嘱审核、与医师沟通营养方案 <input type="checkbox"/> 在院药学指导单 介绍疾病情况及治疗方案 医嘱是否按时执行 肠外营养输注的注意事项 肠内营养制剂用药教育 不良反应监护和自我预防 药物 - 药物及药物 - 食物相互作用 特殊患者, 如肝肾功能减退药学监护 <input type="checkbox"/> 用药变更随时监护 <input type="checkbox"/> 记录不良反应 (ADR) <input type="checkbox"/> 提供用药咨询服务 <input type="checkbox"/> 患者营养治疗依从性的评估及干预	<input type="checkbox"/> 发放出院指导单 出院带药指导 (包括营养用药) 生活方式教育及营养膳食教育 确定随访计划 <input type="checkbox"/> 药学营养门诊随访建议

签名

kJ/(kg·d), 肥胖患者能量摄入减少至 104.65 kJ/(kg·d)。每日葡萄糖供给量应少于 180 ~ 200 g, 脂肪乳供给量应少于 1.0 g/(kg·d) 目标蛋白质 1.2 ~ 1.5 g/(kg·d), 并发肝性脑病患者适当限制蛋白摄入为 0.5 ~ 1.2 g/(kg·d)。肠外营养开始时每日给予维生素、微量元素。营养师及时审核全肠外营养各配方浓度、保证全肠外营养液的稳定性、相容性, 同时根据患者热量及蛋白需求、具体血管条件、液体入量等情况审核优化配方中的糖脂比、热氮比、渗透压等。出院后根据患者饮食恢复情况决定患者家庭营养支持方案 (定期营养咨询或

口服肠内营养支持), 详见图 2。

1.4 考察指标

收集两组患者年龄、性别、体质量指数 (body mass index, BMI)、RFH-NPT 评分、RFH-GA 评价结果、是否输血、是否输注白蛋白、是否合并并发症等作为基线数据, 分别统计两组患者营养管理临床指标和药学指标。其中营养管理临床指标包括患者住院期间白蛋白水平、血红蛋白水平、总淋巴细胞计数、谷丙转氨酶水平、谷草转氨酶水平、总胆红素水平、凝血酶原时间、Child-Pugh 分级及血氨

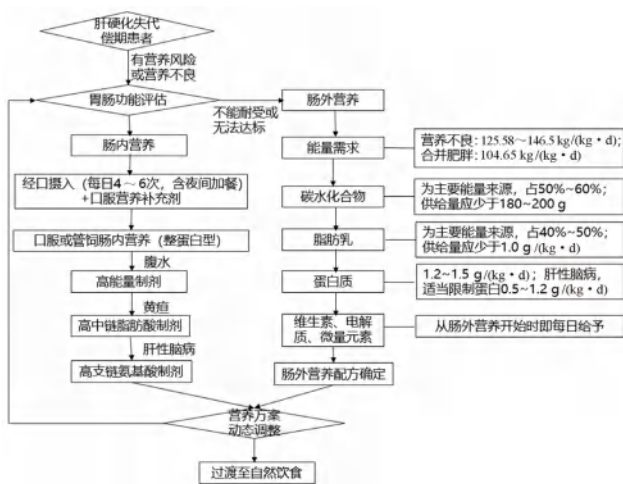


图 2 肝硬化失代偿期患者营养支持方案
Fig 2 Nutritional support for patients with decompensated cirrhosis

水平、平均住院天数、半年内患者因同一疾病再入院次数。营养管理药学指标包括营养制剂使用情况(肠内营养、肠外营养、联合使用等)、营养支持方案不合理使用率及肠内外营养药品不良反应发生率。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较符合正态分布的采用 *t* 检验, 偏态分布使用秩和检验; 计数资料以例数 (*n*)、百分数 (%) 进行描述, 组间比较采用 χ^2 检验。 *P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料

入组 100 例患者, 干预组 44 例, 男 25 例, 女 19 例, 对照组 56 例, 男 30 例, 女 26 例; 两组患者的性别、年龄、BMI、RFH-NPT 评分、RFH-GA 评级、住院期间是否接受输血治疗、是否接受白蛋白治疗及是否合并并发症等基线资料比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 有可比性 (见表 2)。

表 2 两组患者一般资料比较
Tab 2 General data between the two groups

项目	干预组	对照组
例数	44	56
年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	65.07 ± 10.26	64.95 ± 11.12
性别 [n (%)]		
男	25 (56.82)	30 (53.57)
女	19 (43.28)	26 (46.43)
BMI / (kg · m ⁻² , $\bar{x} \pm s$)	22.01 ± 3.93	21.48 ± 2.57
RFH-NPT 评分 / (分, $\bar{x} \pm s$)	3.39 ± 1.51	3.39 ± 1.52
RFH-GA 评级 [n (%)]		
营养良好	3 (6.82)	4 (7.14)
中度或可疑营养不良	34 (77.27)	43 (76.79)
重度营养不良	7 (15.91)	9 (16.07)
输血治疗 [n (%)]	6 (13.64)	12 (21.43)
白蛋白治疗 [n (%)]	24 (54.55)	27 (48.21)
并发症 [n (%)]	25 (56.82)	30 (53.57)

2.2 两组患者营养管理指标

对两组患者治疗前后营养指标进行比较, 与本组治疗前相比, 干预组患者白蛋白、血红蛋白、总淋巴细胞计数明显提升 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与对照组治疗后比较, 干预组白蛋白水平、血红蛋白水平、总淋巴细胞计数水平均高于对照组 (*P* < 0.01), 见表 3。

表 3 两组患者治疗前后营养指标

Tab 3 Nutritional indexes of the two groups before and after the treatment

组别	时间	白蛋白 / (g · L ⁻¹)	血红蛋白 / (g · L ⁻¹)	总淋巴细胞计数 / (× 10 ⁹ · L ⁻¹)
干预组	治疗前	26.90 ± 4.50	97.16 ± 22.89	1.08 ± 0.73
	治疗后	30.37 ± 4.43** $\Delta\Delta$	101.75 ± 22.44** $\Delta\Delta$	1.20 ± 0.68** $\Delta\Delta$
对照组	治疗前	28.21 ± 3.01	90.44 ± 20.73	0.96 ± 0.51
	治疗后	27.35 ± 3.77	87.42 ± 19.65	0.88 ± 0.45

注: 与治疗前比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01; 与对照组比较, $\Delta\Delta$ *P* < 0.01。

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

对两组患者治疗前后肝功能指标进行比较, 与本组治疗前相比, 干预组患者总胆红素、Child-Pugh 评分、凝血酶原时间均有明显改善 (*P* < 0.05, *P* < 0.01); 对照组患者谷草转氨酶、总胆红素、Child-Pugh 评分与治疗前相比有一定改善 (*P* < 0.05)。两组治疗后数据比较, 干预组 Child-Pugh 评分低于对照组 (*P* < 0.01), 见表 4。

对两组患者营养管理其他临床指标进行比较, 干预组患者半年内因同一疾病再入院次数少

于对照组 (*P* < 0.01)。干预组患者平均住院日、出院前血氨水平均低于对照组, 但差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 5。

对两组患者营养管理药学指标进行比较, 干预组患者营养制剂使用率明显高于对照组 (*P* < 0.01), 干预组患者以肠内营养支持为主, 对照组患者以肠外营养(单瓶或多瓶串输)为主, 两组数据差异有统计学意义 (*P* < 0.01); 干预组患者营养支持方案不合理使用率明显低于对照组 (*P* < 0.01), 但两组

表 4 两组患者治疗前后肝功能指标

Tab 4 Liver function indexes of the two groups before and after the treatment

组别	时间	谷丙转氨酶 / (U · L ⁻¹)	谷草转氨酶 / (U · L ⁻¹)	总胆红素 / (μmol · L ⁻¹)	凝血酶原时间 / s	Child-Pugh / 分
干预组	治疗前	26.52 ± 16.57	56.72 ± 34.34	41.90 ± 21.18	14.35 ± 1.94	9.25 ± 1.66
	治疗后	25.86 ± 16.98	47.98 ± 27.25	28.89 ± 15.80**	13.33 ± 1.88*	7.20 ± 1.27** ^{△△}
对照组	治疗前	26.48 ± 18.19	64.32 ± 28.47	34.01 ± 22.39	13.89 ± 3.10	8.45 ± 1.39
	治疗后	25.88 ± 16.52	52.61 ± 30.55*	26.36 ± 14.01*	13.94 ± 1.81	7.95 ± 1.18*

注：与治疗前比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01；与对照组比较，^{△△}*P* < 0.01。

Note: Compared with before the treatment, **P* < 0.05, ***P* < 0.01; compared with the control group, ^{△△}*P* < 0.01.

表 5 两组患者营养管理其他临床指标

Tab 5 Other clinical indicators of nutritional management in the two groups

项目	出院前血氨水平 / (μmol · L ⁻¹)	平均住院日 / d	半年内再入院次数 / 次
干预组	48.23 ± 28.58	11.61 ± 4.27	0 (0.00, 1.00)**
对照组	51.77 ± 44.01	11.92 ± 4.83	1 (0.00, 1.25)

注：与对照组比较，***P* < 0.01。

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

患者的不良反应发生率无明显差异 (见表 6)。

表 6 两组患者营养管理药学指标 [n(%)]

Tab 6 Pharmaceutical indexes of nutrition management in the two groups [n(%)]

项目	干预组	对照组	<i>P</i> 值
营养制剂使用例数 [n (%)]	40 (90.91)	27 (48.21)	< 0.01
肠内营养	31 (77.50)	5 (18.52)	< 0.01
肠外营养 (全合一配方)	4 (10.00)	0 (0.00)	
肠外营养 (单瓶或多瓶串输)	0 (0.00)	22 (81.48)	
肠内营养 + 肠外营养	5 (12.50)	0 (0.00)	
营养支持方案不合理使用率 / %	0 (0.00)	22 (39.29)	< 0.01
不良反应发生率 / %	2 (5.00)	1 (3.70)	> 0.05

3 讨论

营养不良一直被认为是影响肝硬化失代偿期患者结局和治疗效果的重要因素，营养支持治疗是其诊治工作中的重要一环。2019 年欧洲临床营养和代谢学会发布肝病临床营养指南^[12]，首次建议成立包括医师、营养师、护士等在内的多学科团队共同实施营养管理，提高患者营养管理质量。目前我国药师相关法律法规尚不完善，处方权缺失，单纯的临床药师角色参与临床营养治疗管理较为困难。2014 年美国肠外肠内营养学会 (ASPEN) 在其官方网站和期刊上更新了《营养支持药师执业标准》^[13]，包括公认的营养支持药师执业准则，并从进行营养评估、营养监护计划的开展与实施、医嘱审核以及配方的配置和发放、药学相关监测、营养支持服务的组织和管理、营养支持药学实践的改进、营养支持药学的相关研究及道德规范等八个方面开展工作。因我院无专职营养师在临床开展工作，本研究在此基础上加入营养师角色，成立以肠外肠内营养专科临床药师为主导的营养支持团队，确定营养

药师干预的重点环节及内容，并总结形成标准化药学服务路径，使药师服务相对同质化。本研究中营养师全程参与肝硬化患者营养支持路径的拟定，并结合患者疾病特点营养状况，进行针对性调整用药。在每日例行查房过程中主任会重点向患者介绍营养师的角色及工作内容，通过入院药学营养评估、在院药学营养监护、出院药学营养指导等，帮助患者提供个性化的营养干预方案，降低不合理用药发生率，同时提高患者对营养支持治疗的认可度和积极性，对其预后及并发症的预防都有着积极的意义。

查询国内外文献，关于肝病的营养管理研究更多地集中在营养风险的筛查和评估。国内对肝硬化患者“规范应用、患者受益”相关的临床营养研究相对较少。熊万银^[14]团队介绍了营养支持小组在肝硬化患者营养管理中的应用效果分析，以护士为主导，且该模式下营养风险筛查采用传统的 NRS2002 筛查工具，未探究不同组别营养管理效率指标。陈大宇团队^[15]介绍了营养师参与肝癌肝切除围术期的规范化营养药物治疗服务模式的研究，结果提示在药师监护下，肝癌肝切除围术期规范化营养治疗模式有良好的临床及经济学收益。笔者所在的研究团队一直关注于肝病领域的营养支持研究，前期研究成果提示序贯联合应用 RFH-NPT 及 RFH-GA 适用于评价肝硬化失代偿期患者的营养状况^[16]。因此在本研究中，仍采用此优化的筛查和评估工具，以快速识别有风险的肝硬化失代偿期患者并进行早期营养干预。

在肝硬化失代偿期患者中由于蛋白合成速率低于其分解速率，同时摄入蛋白减少，低蛋白血症是肝硬化失代偿期患者营养不良的主要表现。淋巴细胞计数反映了患者体内淋巴细胞数量及免疫功能，营养不良会导致免疫功能及相关指标下降^[17]。本研究结果显示与对照组相比，干预组白蛋白、血红蛋白及总淋巴细胞计数水平均有明显提升，同时基线数据显示两组患者住院期间接受输血或者白蛋白治疗的比例无显著差异，说明以营养师为主导的营养支持团队可有效改善肝硬化失代偿期患者的营养状况。肝脏合成大部分凝血因子，凝血酶原时间是反映机

体凝血功能及评估肝功能可靠且灵敏的指标之一^[18], Child-Pugh 分级标准是临床上常用的对肝硬化患者的肝脏储备功能进行量化评估的分级标准, 分数越高, 肝脏储备功能越差。本研究中经过治疗后干预组患者的凝血酶原时间、Child-Pugh 评分均低于对照组, 提示在常规药物治疗基础上, 在营养团队指导下给予个体化营养治疗更能够改善肝硬化失代偿期患者的肝功能。本研究结果还显示两组患者出院前血氨水平差异无统计学意义, 说明该模式下, 营养支持不会增加患者肝性脑病发生风险, 在肝硬化失代偿期患者营养管理方面安全有效。

李梦等^[19]介绍了中国医院营养支持治疗现状, 主要表现在营养支持不足与过度并存、肠外肠内营养应用结构不合理、肠外营养输注有待规范、肠外营养处方合理性有待提高等。本研究结果显示, 营养药师参与后, 肝硬化患者接受营养支持治疗的比例明显上升, 约 90.91% 的患者接受了营养药物使用, 其余患者接受了营养咨询和膳食指导。接受营养治疗的患者中约 77.50% 的患者给予肠内营养, 体现了肠内营养优先使用的营养支持原则。同时干预组营养支持方案不合理使用率明显降低。干预组患者肠外营养(全合一配方)均由营养药师参与制订, 对照组患者没有使用全合一配方, 因此对照组营养支持方案不合理使用主要体现在临床单瓶或多瓶串输单一成分营养制剂。

我院营养药师充分发挥专业优势, 借鉴现阶段较为新颖的营养多学科管理模式, 在此基础上加入营养药师角色, 探索性地构建了以营养药师为主导的肝硬化失代偿期患者营养支持规范化服务路径, 协助临床进行合理规范的营养治疗。通过建立规范化药学服务项目, 保证了药学服务工作的规范化、标准化、专科化, 促进临床药师与诊疗团队的融合, 提高患者营养支持的及时性、有效性、合理性。但本研究为单中心研究, 后续可通过扩大研究样本、调整研究方式、延长研究时间等方式进行深入研究, 从而为肝硬化患者的长期营养管理提供新的方法策略, 解决临床难点问题。

参考文献

[1] 刘林玲, 颜琼, 汪敏, 等. 肝硬化营养支持治疗的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(15): 2418-2420.
 [2] Plauth M, Cabré E, Riggio O, et al. ESPEN guidelines on enteral nutrition: liver disease[J]. Clin Nutr, 2006, 25(2): 285-294.
 [3] Kalafateli M, Mantzoukis K, Yan CY, et al. Malnutrition

and sarcopenia predict post-iver transplantation outcomes independently of the model for end-stage liver disease score[J]. J Cachexia, 2017, 8(1): 113-121.
 [4] 黎奔, 钟玲, 翁贤, 等. 中医院住院糖尿病患者药学监护模式的构建与实施[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(21): 2205-2209.
 [5] 侯丽丽, 王金丽, 张鹏宇, 等. 肾内科临床药师教学模式及药学监护体系的探索[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(3): 291-295.
 [6] 中华医学会消化病学分会. 中国肝硬化临床诊治共识意见[J]. 中华消化杂志, 2023, 43(4): 227-247.
 [7] Amodio P, Bemeur C, Butterworth R, et al. The nutritional management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: international society for hepatic encephalopathy and nitrogen metabolism consensus[J]. Hepatology, 2013, 58(1): 325-336.
 [8] Morgan MY, Madden AM, Soulsby CT, et al. Derivation and validation of a new global method for assessing nutritional status in patients with cirrhosis[J]. Hepatology, 2010, 44(4): 823-835.
 [9] Plauth M, Bernal W, Dasarathy S, et al. ESPEN guideline on clinical nutrition in liver disease[J]. Clin Nutr, 2019, 38(2): 485-521.
 [10] 中华医学会肝病学会, 中华医学会消化病学分会. 终末期肝病临床营养指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(5): 330-342.
 [11] 北京医学会肠外肠内营养学专业委员会. 《慢性肝病患者肠外肠内营养支持与膳食干预专家共识》专家委员会. 慢性肝病患者肠外肠内营养支持与膳食干预专家共识[J]. 中华临床营养杂志, 2017, 25(1): 1-11.
 [12] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on nutrition in chronic liver disease[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 172-193.
 [13] Tucker A, Ybarra J, Bingham A, et al. American society for parenteral and enteral nutrition (a.s.p.e.N) standards of practice for nutrition support pharmacists[J]. Nutr Clin Pract, 2015, 30(1): 139-146.
 [14] 熊万银, 高莉. 营养支持小组在肝硬化病人营养管理中的应用效果分析[J]. 全科护理, 2022, 20(5): 619-621.
 [15] 陈大字, 卞晓洁, 刘金春, 等. 肝癌肝切除围术期的规范化营养药物治疗服务模式的研究[J]. 药学与临床研究, 2021, 29(3): 193-198.
 [16] 杨香瑜, 陈露, 彭随风, 等. RFH-NPT 及 RFH-GA 在失代偿期肝硬化患者营养评估中的应用价值[J]. 临床消化病杂志, 2022, 34(2): 106-110.
 [17] Zhang ZY, Suzette P, Menghua L, et al. Evaluation of blood biomarkers associated with risk of malnutrition in older adults: a systematic review and meta-analysis[J]. Nutrients, 2017, 9(8): 829.
 [18] 李琴, 贾继东, 王宝恩. 凝血酶原时间及凝血因子在肝病中的应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(12): 767-768.
 [19] 李梦, 杜光. 中国医院营养支持治疗的相关思考[J]. 医药导报, 2019, 38(12): 1685-1689.

(收稿日期: 2023-04-07; 修回日期: 2023-05-09)

临床药师参与 1 例嗜蚀艾肯菌致肌腱感染患者治疗并文献复习

蔡泽政¹, 廖倩倩^{2*} (1.贵州省黔东南苗族侗族自治州人民医院药剂科, 贵州 凯里 556000; 2.桂林市人民医院药学部, 广西 桂林 541002)

关键词: 嗜蚀艾肯菌; 肌腱感染; 临床药师

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3085-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.044

嗜蚀艾肯菌 (*Eikenella corrodens*) 是一种革兰氏阴性兼性厌氧杆菌, 且为苛养菌, 对营养要求高, 培养困难, 容易漏检、漏诊^[1]。嗜蚀艾肯菌通常栖息在牙菌斑中^[2], 还存在于口腔、呼吸道、消化道及泌尿道等处, 属于条件致病菌, 常与其他细菌混合感染^[1]。近期我院骨科收治 1 例手指肌腱脓肿患者, 并从其伤口分泌物中分离出嗜蚀艾肯菌 1 株, 经过临床药师会诊调整治疗方案后伤口好转出院。本文报道该病例并将嗜蚀艾肯菌感染的国内外文献进行复习并总结。

1 病例资料

患者, 女性, 44 岁, 体重 53 kg, 既往体健, 1 月余前右手中指不慎被牙签刺伤, 随后出现中指肌腱组织感染, 外院行清创术, 术后规律换药和口服阿莫西林胶囊 (具体方案不详), 但中指肌腱仍持续肿痛、渗液, 未见好转, 于 2023 年 3 月 3 日就诊我院骨科。入院后患者生命体征平稳, 诉患肢伤口疼痛, 焦虑面容。查体可见右手掌、中指、环指呈红、肿、热表现, 中指掌侧近节、掌指关节处见 1.0 cm×1.0 cm、0.5 cm×0.5 cm 大小破口, 大量脓性渗出, 脓性肌腱外露, 压痛明显, 挤压见大量脓液流出, 右手中指各关节屈曲活动受限, 皮温高, 指端感觉及血运可。辅助检查: 2023 年 3 月 3 日, 白细胞 $5.68 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 中性粒细胞百分比 56.9%, 血红蛋白 $111 g \cdot L^{-1}$ ↓, 血小板计数 $230 \times 10^9 \cdot L^{-1}$; C 反应蛋白 $1.40 mg \cdot L^{-1}$; 血清肌酐 $74 \mu mol \cdot L^{-1}$; 肝功能、凝血功能、尿常规、粪常规等均无异常; 胸部平片: 心、肺、膈未见明显异常; 手掌平片: 右手中指感染表现并软组织肿胀。

入院当日行右手中指、右手掌感染切开清创术, 术中探查见中指屈指肌腱 II 区肌腱长节段腐

朽坏死并断裂, 周围组织炎性水肿明显, 术中 will 坏死腐朽肌腱完整切除至正常腱性组织, 清除周围炎性水肿感染组织。并取伤口分泌物行细菌培养。术后诊断: ① 右手中指感染术后; ② 右手中指屈指肌腱感染后腐朽缺损; ③ 右手掌部感染。术后经验性予以针对金黄色葡萄球菌的头孢唑林 1 g q8h ivgtt 治疗。3 月 6 日, 伤口分泌物培养结果显示嗜蚀艾肯菌, 药敏结果显示其对青霉素 G、头孢曲松、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、复方磺胺甲噁唑、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸钾、四环素、氯霉素、氨基糖苷类均敏感。

3 月 7 日, 临床药师会诊后结合患者病史、嗜蚀艾肯菌的生物特点和药敏结果, 判断该细菌为感染致病菌, 建议临床医师更换抗感染方案为注射用阿莫西林钠/克拉维酸钾 1.2 g + 0.9% 氯化钠注射液 100 mL ivgtt q8h 继续抗感染治疗, 临床医师采纳。3 月 9 日, 手指伤口无明显流脓、渗液。3 月 13 日, 术区疼痛较前明显好转, 无渗液、流脓等不适, 予以右手中指清创缝合术。3 月 20 日, 患者精神、食欲好, 右手敷料干燥固定在位, 无松动, 中指呈伸直状, 打开敷料见术区切口对合可, 无渗出、红肿, 稍压痛, 食指、环指屈伸功能较前改善, 中指无屈伸功能, 指端血运、感觉可, 予以出院并嘱咐出院后继续口服阿莫西林钠/克拉维酸钾片 1.0 g tid 治疗。2 周后随访, 患者诉伤口无恶化, 持续好转中。

2 文献复习与讨论

嗜蚀艾肯菌是人类黏膜表面正常菌群的一部分, 经常从上呼吸道标本中分离出该菌, 也可从胃肠道或泌尿生殖道标本中分离得到, 通常不致病, 只形成带菌状态, 当机体免疫力下降或黏膜表面破损时, 此菌进入周围组织引起感染, 如软

基金项目: 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题 (No.Z20211001)。

作者简介: 蔡泽政, 男, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: 550591195@qq.com * **通信作者:** 廖倩倩, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: 1254168100@qq.com

组织脓肿、中耳炎、鼻窦炎、肺炎、心内膜炎、脑膜炎、败血性关节炎及术后感染等，且该菌常与其他细菌一起引起混合感染，在人咬伤感染标本中经常分离到此菌^[1]。嗜蚀艾肯菌感染的治疗原则主要是使用敏感抗菌药物并辅以及时、适当的脓肿引流及坏死组织清除。既往报道显示该菌对青霉素 G、阿莫西林、头孢西丁、头孢噻肟、头孢吡肟、环丙沙星和亚胺培南等抗菌药物敏感，但对头孢呋辛、克林霉素、甲硝唑、头孢噻吩耐药^[3]。有文献报道，已检测到β-内酰胺酶阳性的菌株，但其酶活性可被克拉维酸钾或舒巴坦等β-内酰胺酶抑制剂抑制^[4-5]。

近 10 年有关嗜蚀艾肯菌的国内外文献报道逐渐增多：2007 年报道了一例 83 岁女性罹患嗜蚀艾肯菌慢性尿路感染^[6]。2010 年报道了一例嗜蚀艾肯菌致儿童急性化脓性甲状腺炎^[7]。2011 年报道了一例 17 岁甲状腺脓肿患儿的脓液同时检出嗜蚀艾肯菌、咽峡炎链球菌及消化链球菌^[8]。2020 年报道了一例成人罹患嗜蚀艾肯菌致急性化脓性甲状腺炎^[9]。2013 年报道了一例妇女先后两

次住院，第一次诊断右侧肺炎合并胸腔积液和出血性心包炎，第二次诊断无结石性胆囊炎、出血性心包炎及脓毒症^[10]。2015 年报道了一例患有高血压、糖尿病、慢性肾脏病和冠心病病史的 71 岁患者，感染后致 L2-L3 脊椎椎间盘炎、椎骨骨髓炎和连续性腰肌脓肿^[11]。2023 年报道了一例女性患者盆腔炎继发嗜蚀艾肯菌菌血症^[12]。嗜蚀艾肯菌感染大多数呈慢性且可得到有效控制，但也可引起临床症状迅速恶化，2019 年报道了一例 63 岁化脓性心包炎患者，尽管使用了敏感抗菌药物，但临床状况迅速恶化，在入院第三日死亡^[13]。国内报道了一例 23 岁女性患者入院后考虑自发性食管破裂、右侧液气胸，胸腔穿刺引流脓液两次均检出嗜蚀艾肯菌和咽峡炎链球菌^[14]。也有引起腹腔感染^[15]、菌血症^[16]、鼻咽颅底感染^[17]、脓毒血症^[18]、耳后脓肿^[19]、肝脓肿^[20]等部位感染的报道，积极治疗后均好转，未见死亡案例报道。各案例中患者性别、年龄、临床表现、合并感染微生物、治疗方案及结局等临床特征见表 1。

表 1 嗜蚀艾肯菌致临床感染患者的临床特征

文献(岁)/性别	年龄	基础疾病	其他相关微生物	相关感染	治疗方案(疗程)	外科手术	结局	敏感性	耐药
[6]	83/女	慢性淋白血病	无	尿路感染	环丙沙星 0.4 g bid (3 d)	无	治愈	青霉素、头孢噻吩、头孢呋辛、头孢西丁、头孢曲松、头孢他啶、环丙沙星、庆大霉素、复方磺胺甲噁唑、黏菌素	
[7]	6/男	无	无	急性化脓性甲状腺炎	帕尼培南/倍他米隆 100 mg·kg ⁻¹ (7 d)	脓肿抽吸术	治愈	氨苄西林、头孢美唑、头孢他啶、亚胺培南、米诺环素	头孢唑林、阿米卡星
[8]	14/女	无	咽峡炎链球菌、消化链球菌	甲状腺脓肿	不详(2周)	脓肿抽吸术+引流术	治愈	不详	不详
[9]	31/男	无	无	急性化脓性甲状腺炎	氨苄西林/舒巴坦 1.5 g qid (14 d)	脓肿抽吸术	治愈	氨苄西林	不详
[10]	29/女	无	无	肺炎合并胸腔积液、出血性心包炎、无结石胆囊炎、脓毒症	阿莫西林/克拉维酸+莫西沙星，头孢曲松 1 g·d ⁻¹ (4周)	开胸脓肿抽吸术+引流术、心包穿刺术	治愈	不详	不详
[11]	71/女	高血压、糖尿病、慢性肾脏病、冠心病	无	脊椎椎间盘炎、椎骨骨髓炎和连续性腰肌脓肿	厄他培南(8周)	腰椎间盘摘除术+脓肿引流+椎间盘融合术	治愈	不详	不详
[12]	49/女	无	无	盆腔炎	哌拉西林/他唑巴坦 4.5 g q8h (7 d)、阿莫西林/克拉维酸 1.0 g q8h (7 d)	子宫次全切除术和双侧腹腔附件切除术	治愈	氟喹诺酮类、除氨苄西林外所有β-内酰胺类抗菌药物	氨苄西林、克林霉素

续表 1

文献(岁)/性别	年龄	基础疾病	其他相关微生物	相关感染	治疗方案(疗程)	外科手术	结局	敏感性	耐药
[13]	63/男	糖尿病、食管切除术、食道癌放疗后	咽峡炎链球菌	肺脓肿、胸腔积液、心包积液、脓毒症、呼吸衰竭	头孢曲松 2 g qd (1 d)、亚胺培南 0.5 g q8h (1 d)	无	死亡	头孢曲松、亚胺培南	克林霉素、阿米卡星
[14]	65/男	无	无	急性阑尾炎伴腹膜炎	头孢他啶+甲硝唑 (7 d)	阑尾切除术	治愈	不详	不详
[15]	23/女	无	咽峡炎链球菌	自发性食管破裂、右侧液气胸	阿莫西林/克拉维酸钾 2.4 g q8h、奥硝唑 0.5 g q12h (2 周)	胸腔穿刺引流术	治愈	不详	不详
[16]	57/男	无	无	菌血症	头孢曲松(剂量及疗程不详)	无	治愈	阿莫西林/克拉维酸钾、头孢曲松、美罗培南、四环素、左氧氟沙星	青霉素
[17]	63/女	糖尿病、高血压	无	鼻咽颌底脓肿	阿莫西林/克拉维酸钾片 0.914 g q12h (4 周)	鼻咽颌底病损清创引流	治愈	不详	不详
[18]	2/男	无	星座链球菌	面部软组织蜂窝织炎、脓毒症	美罗培南 (13 d)、头孢曲松 (3 d)	无	治愈	氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸钾、氯霉素、头孢噻肟、头孢曲松、青霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、美罗培南、亚胺培南	四环素、复方磺胺甲噁唑、利福平
[19]	6/女	无	无	耳后脓肿	青霉素 G 150 万 U q12h + 头孢唑肟 0.75 g q12h (7 d)、头孢克洛 (不详)	右耳后脓肿切开引流术	治愈	阿莫西林/克拉维酸钾	不详
[20]	67/女	无	无	肝脓肿	阿莫西林/克拉维酸钾片 0.914 g q12h (28 d)	脓肿置管引流术	治愈	不详	不详

通过表 1 可知, 该细菌可导致全年龄段、全身多部位的急性感染和慢性感染, 部分患者混合链球菌属细菌感染; 在某些免疫抑制人群(老年患者、合并糖尿病、放化疗后)中病情可快速进展; 多数案例给予了适当的穿刺引流手术(少数采用外科手术); 绝大多数根据药敏结果选择敏感抗菌药物治疗后好转, 符合《热病》^[21] 推荐意见: 首选阿莫西林/克拉维酸钾, 次选复方磺胺甲噁唑、氟喹诺酮类抗菌药物, 不推荐苯唑西林、头孢唑林、头孢氨苄、头孢呋辛、头孢地尔、阿米卡星、阿奇霉素、万古霉素、多黏菌素、磷霉素等药物; 多数抗感染治疗疗程在 2 ~ 8 周, 有学者认为由于此菌有反复发作的临床特征, 建议药物治疗持续 6 周以上时间^[22]。

本例患者为年轻女性, 既往体健, 无传染病、慢性病、遗传病等相关病史, 因右中指被牙签刺破致手指肌腱脓肿, 于院外经手术及口服阿莫西林胶囊治疗后仍有伤口渗液、流脓、疼痛等症状, 推测可能与其不规律服用抗菌药物及护理

不当有关。入院后其伤口分泌物培养检出嗜蚀艾肯菌, 临床药师会诊后考虑为致病菌, 因头孢唑林对其不敏感, 故推荐予以注射用阿莫西林/克拉维酸钾 1.2 g ivgtt q8h 及阿莫西林/克拉维酸钾片 1.0 g po tid 先后治疗 4 周, 最终取得了良好的治疗效果。

通过本例病例报道和文献复习可知, 嗜蚀艾肯菌具有较强的致病力, 可导致免疫功能正常人群的感染, 而伴有严重基础疾病或创伤的免疫力低下人群感染程度通常更重。临床医师需要关注嗜蚀艾肯菌, 重视严重创伤性患者感染该菌的可能。临床药师参与临床抗感染方案制订, 通过结合致病菌本身特点、抗菌药物特性、相关指南以及患者实际情况, 给出了合理的抗感染治疗方案, 提高了患者的治愈率及临床合理用药水平。

参考文献

[1] 陈东科, 孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.

- [2] Chen CKC, Dunford RG, Reynolds HS, et al. *Eikenella corrodens* in the human oral cavity [J]. J Periodontol, 1989, 60 (11): 611-616.
- [3] Sheng WS, Hsueh PR, Hung CC, et al. Clinical features of patients with invasive *Eikenella corrodens* infections and microbiological characteristics of the causative isolates [J]. Eur J Clin Microbiol, 2001, 20: 231-236.
- [4] Lacroix JM, Walker C. Characterization of a beta-lactamase found in *Eikenella corrodens* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35 (5): 886-891.
- [5] Perez Trallero E, Garcia Arenzana JM, Cilla Eguiluz G, et al. Beta-lactamase-producing *Eikenella corrodens* in an intraabdominal abscess [J]. J Infect Dis, 1986, 153 (2): 379-380.
- [6] Hombach M, Frey HR, Pfyffer GE. Urinary tract infection caused by *Eikenella corrodens* [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45 (2): 675.
- [7] Yoshino Y, Inamo Y, Fuchigami T, et al. A pediatric patient with acute suppurative thyroiditis caused by *Eikenella corrodens* [J]. J Infect Chemother, 2010, 16: 353-355.
- [8] Bravo E, Grayev A. Thyroid abscess as a complication of bacterial throat infection [J]. J Radiol Case Rep, 2011, 5 (3): 1-7.
- [9] Akhanlı P, Bayır Ö, Bayram SM, et al. Acute spontaneous suppurative thyroiditis caused by *Eikenella corrodens* presented with thyrotoxicosis [J]. Einstein (São Paulo), 2020, 18: eRC5273.
- [10] Dézsi CA, Kullmann T, Issekutz Á, et al. Empyema thoracis, hemorrhagic pericarditis and acalculous cholecystitis caused by *Eikenella corrodens* sepsis [J]. Orvosi Hetilap, 2013, 154 (47): 1873-1876.
- [11] Latta TN, Scalera NM, Myers JP. Infectious spondylodiscitis due to *Eikenella corrodens*: report of a case and review of the literature [J]. Infect Dis Clin Pract, 2015, 23 (4): 176-179.
- [12] Gutiérrez MJU, Muro FEC, Hidalgo GI. Bacteremia caused by *Eikenella corrodens* in a patient with pelvic inflammatory disease [J]. Rev Esp Quimioter, 2023, 36 (3): 329-331.
- [13] Wei W, Nie H. Severe purulent pericarditis caused by invasive *Eikenella corrodens*: case report and literature review [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19 (1): 657.
- [14] 张继东. 腹水检出嗜蚀艾肯菌 1 例 [J]. 临床检验杂志, 2014, 32 (2): 160.
- [15] 巢世兰, 徐雯, 刘国伟, 等. 侵蚀艾肯菌致胸部感染 1 例并文献复习 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41 (6): 766-768.
- [16] 安超, 毛雪, 施嘉楠, 等. 嗜蚀艾肯菌引起菌血症 1 例 [J]. 宁夏医科大学学报, 2022, 44 (11): 1186-1187.
- [17] 陈瑞恩, 林巧如, 李波波, 等. 嗜蚀艾肯菌致鼻咽颅底感染 1 例报道 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2022, 28 (4): 100-103.
- [18] 林慧珍, 李泰阶, 林青, 等. 1 例侵蚀艾肯菌与星座链球菌混合感染致儿童脓毒血症的分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43 (12): 1531-1533.
- [19] 李丽娟, 王吉生, 周华强, 等. 侵蚀艾肯菌致儿童耳后脓肿 1 例 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20 (6): 692-693.
- [20] 王文俊, 武文华, 薛红安. 嗜蚀艾肯菌肝脓肿 1 例报告 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36 (10): 2279-2282.
- [21] 桑福德. 热病: 桑福德抗微生物治疗指南 [M]. 48 版. 范洪伟, 王焕玲, 周宝桐译. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2018: 68.
- [22] Dong XY, Gong L. Chronic meningitis caused by *Eikenella corrodens* [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2013, 29 (8): 466-467.

(收稿日期: 2023-08-18; 修回日期: 2023-09-18)

试验用药品管理质量检查问题及解决对策

蒋云, 冯娟, 龚倩, 王晖* (湖南省肿瘤医院 药物临床试验机构, 长沙 410006)

摘要: **目的** 通过质量检查, 发现试验用药品管理中存在的问题, 找到解决对策, 提高管理质量, 提升药物临床试验管理水平, 保证受试者用药安全。**方法** 收集 2021 年 11 月至 2022 年 10 月本院承担的 788 项药物临床试验项目共 788 次试验用药品管理质量检查的问题数据, 总结与分析, 并提出解决措施和建议。**结果** 从 2021—2022 年, 药物临床试验用药品完成质量检查 788 次, 发现存在的不合格问题 33 项, 共计 361 条, 其中药物的接收、储存、发放、使用、回收与退回等环节中问题发生频率最高。**结论** 管理的各个环节都直接影响了药品质量, 由此提出建立试验用药品标准化管理流程、重视人员培训、注重信息化建设等策略, 提高试验用药品管理水平, 保障受试者用药安全。

关键词: 药物临床试验; 试验用药品; 质量控制; 解决对策

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3089-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.045

Problems and solutions to quality inspection of experiment drug management

JIANG Yun, FENG Juan, GONG Qian, WANG Hui* (*Good Clinical Practice Center of Hunan Cancer Hospital, Changsha 410006*)

Abstract: Objective To find problems in the management of experiment drugs through quality inspection and countermeasures, improve the management quality and level of clinical trials, and ensure the safe use of drugs. **Methods** The data of drug management quality inspections of 788 drug clinical trials by our hospital from November 2021 to October 2022 were collected, summarized and analyzed, and corresponding solutions were provided. **Results** From 2021 to 2022, 788 quality inspections were completed for drug clinical trials. Totally 361 problems were found in 33 categories. Among them, the reception, storage, distribution and use, recovery and return of drugs were the most frequent problems in the management of experiment drugs. **Conclusion** All aspects of management directly affect the drug quality. We should establish standardized management for experiment drugs, pay attention to personnel training and information network construction to improve the management level and ensure drug safety.

Key words: drug clinical trial; trial drug; quality control; solution

临床试验是指以人体(患者或健康受试者)为对象的试验, 以确定药物的疗效与安全性的系统性试验^[1]。试验用药品是用于临床试验的试验药物、对照药品。质量控制是指在临床试验质量保证系统中, 为确证临床试验所有相关活动是否符合质量要求而实施的技术和活动^[2]。试验用药品管理是质量管理中的关键环节, 质量控制是保证

数据真实、科学可靠的重要手段。药物临床试验的全过程应按照国家药品监督管理局 2020 年颁布的《药物临床试验质量管理规范》进行^[1]。我院自设立药物临床试验机构之日起, 制订了试验药物相关管理制度及标准操作规程(SOP), 用来规范试验药物的管理。但在运行管理过程中存在不少问题, 目前, 我院采用的是药物临床试验质量管

基金项目: 湖南省自然科学基金-科药联合基金(No.2021JJ80053)。

作者简介: 蒋云, 女, 硕士, 主要从事新药临床研究, email: jiangyun@hnca.org.cn *通信作者: 王晖, 男, 主任医师, 主要从事新药临床研究, email: 28826672@qq.com

理规范 (GCP) 药房中心化管理模式, 将全院的试验用药品集中管理。本文主要收集 2021—2022 年期间对试验用药品管理质量检查时发现的问题, 按照 2020 版《药物临床试验质量管理规范》, 对存在的问题汇总分析, 并提出解决对策。

1 资料与方法

1.1 资料来源

收集 2021 年 11 月至 2022 年 10 月医院 788 个项目共 788 次试验用药品管理质量检查中存在的问题。

1.2 数据的归类分析

问题涉及试验用药品管理的入库前准备、接收、储存、发放、使用、回收与退回 7 个环节, 本研究对收集到的数据进行细分并归类统计。

1.3 数据处理

用 Excel 软件录入数据并对不合格问题进行汇总分析^[3]。

2 结果

汇总不合格项共 33 项 361 条。其中使用环节问题发生频率最高, 占比为 55.68%, 其次为回收和接收环节问题, 占比分别为 11.63% 和 11.08%, 储存和发放环节问题占比为 7.2%, 入库前准备问题和退回申办方环节的问题发生频率相对较低, 为 4.99% 和 2.22%。

2.1 入库前准备

入库前准备的不合格项共 3 项, 占不合格总项数的 9.09% (3 项 /33 项); 共计 18 条, 占总不合格数的 4.99% (18 条 /361 条)。药物管理员未授权问题发现频率最高, 详见表 1。

表 1 入库前准备中存在的问题

Tab 1 Problems in the preparation before storage

序号	质控发现的问题	发现问题数 [n (%)]
1	药物首次入库时, 未按照“药物临床试验机构试验药物入库所供资料”提供, 资料不全	7 (1.94)
2	药物管理员未被主要研究者授权	10 (2.77)
3	药物管理员未经过 GCP 和项目方案培训	1 (0.28)
合计		18 (4.99)

2.2 药物接收

涉及药物接收的不合格项共 7 项, 占不合格总项数的 21.21%; 共计 40 条, 占总不合格数 11.08%。其中发现频率较高的问题为药物运输温控温度缺失, 相关记录不全 (包含标识、隔离、报告、反馈、处理等记录), 药物接收记录不完整或有误, 详见表 2。

2.3 药物储存

表 2 药物接收中存在的问题

Tab 2 Problems in drug reception

序号	质控发现的问题	发现问题数 [n (%)]
1	药物运输温控温度缺失	11 (3.05)
2	药物运输温度超温, 相关记录不全 (包含标识、隔离、报告、反馈、处理等记录)	10 (2.77)
3	药品包装及标识不符合要求 (药物信息不全)	2 (0.55)
4	不合格入库药物相关处理记录不完整 (包含标识、隔离、报告、反馈、处理等记录)	3 (0.83)
5	寄送药物与运送清单不一致, 未见相关处理记录	3 (0.83)
6	药物接收记录不完整或有误	10 (2.77)
7	药检报告缺失	1 (0.28)
合计		40 (11.08)

药物储存的不合格项共 8 项, 占不合格总项数的 24.24%; 共计 26 条, 占总不合格数的 7.20%。其中药物盘点库存数量与记录不一致, 药物储存温湿度缺失, 药物丢失 (相关记录缺失) 等问题发生频率较高, 详见表 3。

表 3 药物储存中存在的问题

Tab 3 Problems in drug storage

序号	质控发现的问题	发现问题数 [n (%)]
1	储存冰箱未校准	2 (0.55)
2	院内转运温度计未校准	3 (0.83)
3	药物储存温湿度缺失	4 (1.11)
4	药物盘点库存数量与记录不一致	7 (1.94)
5	药物盘点记录不完整或有误 (1 次 / 季度)	3 (0.83)
6	超温药物处理记录不完整 (包含标识、隔离、报告、反馈、处理等记录)	2 (0.55)
7	药物丢失 (相关记录缺失)	4 (1.11)
8	药物破损 (相关记录缺失)	1 (0.28)
合计		26 (7.20)

2.4 药物发放

药物发放的不合格项共 5 项, 占不合格总项数的 15.15%; 共计 26 条, 占总不合格数的 7.20%。其中药物随机页未打印签字, 药物处方缺失或有误问题发生频率较高, 详见表 4。

表 4 药物发放中存在的问题

Tab 4 Problems in drug delivery

序号	质控发现的问题	发现问题数 [n (%)]
1	药物随机页未打印签字	12 (3.32)
2	发错药 (未按实际随机号发药)	3 (0.83)
3	近效期药发放给受试者	1 (0.28)
4	药物发放记录不完整或有误	2 (0.55)
5	药物处方有错误	8 (2.22)
合计		26 (7.20)

2.5 药物使用

药物使用的不合格项共 5 项, 占不合格总项数

的 15.15%；共计 201 条，占总不合格数的 55.68%。其中日记卡记录不完整或有误频率发生最高，详见表 5。

表 5 药物使用中存在的问题
Tab 5 Problems in drug use

序号	质控发现的问题	发现问题数 [n (%)]
1	药物用法用量不符合方案规定	28 (7.76)
2	服药数量与日记卡记录用药数不相符	43 (11.91)
3	日记卡记录不完整或有误	95 (26.32)
4	药物或包装盒丢失，相关记录缺失	32 (8.86)
5	专业科室暂存药物条件不符要求，导致超温——超温相关处理记录缺失	3 (0.83)
合计		201 (55.68)

2.6 药物回收

药物回收的不合格项共 3 项，占不合格总项数的 9.09%；共计 42 条，占总不合格数的 11.63%，其中药物发放数量与回收数量不一致问题频率最高，详见表 6。

表 6 药物回收中存在的问题
Tab 6 Problems in drug recovery

序号	质控发现的问题	发现问题数 [n (%)]
1	药物发放数量与回收数量不一致	21 (5.82)
2	药物回收数量与日记卡记录不一致	12 (3.32)
3	药物回收记录有误或不完整	9 (2.49)
合计		42 (11.63)

2.7 药物退回

药物退回的不合格项共 2 项，占不合格总项数的 6.06%；共计 8 条，占总不合格数的 2.22%，其中药物实际退回数量与（药物接收 - 发放）数量不一致发生频率最高，其次为药物退回记录不完整或有误（见表 7）。

表 7 药物退回中存在的问题
Tab 7 Problems in drug return

序号	质控发现的问题	发现问题数 [n (%)]
1	药物退回记录不完整或有误	2 (0.55)
2	药物实际退回数量与（药物接收 - 发放）数量不一致	6 (1.66)
合计		8 (2.22)

3 讨论

试验用药品管理是药物临床试验的核心，如何规范试验用药品的全过程管理，杜绝问题产生，从而保证临床试验的安全、有效和可靠，保护受试者的用药安全和权益，是药物临床试验机构应该重点关注的问题^[4]。

3.1 建立标准化管理流程，强调各方职责

开展药物临床试验，首先是建立规范化、标准化试验管理流程。申办方负责按照《药物临床试验

生产管理规范》（简称 GMP）生产试验用药，并保证药品的质量和稳定性^[5]。启动前，申办者组织相关研究者进行方案、药物管理培训，应包括药物接收、储存、配置使用、回收等注意事项，明确分工。GCP 药房按照 GCP 法规要求开展试验用药品管理，建立药物相关管理制度、标准操作流程和人员职责，如药物接收、储存、发放、使用、回收、退回标准操作流程，超温药物处理及报告流程等，明晰各方职责，督促落实，确保各研究人员按照国家法律法规和机构制定的规章制度实施。研究人员应熟悉法规要求，掌握试验方案及药物管理相关知识，了解药物药理特性、不良反应、用法用量、禁忌等，熟悉试验用药品管理流程，从而确保各个环节操作准确，避免出现发错药、药物储存管理不当、药物配置使用不符合方案等问题^[6]。

3.2 重视人员培训

培训是培养研究者专业技能，将知识转化为业务能力，使其更好地胜任现在的工作，从而提高临床试验管理水平。研究人员参加临床试验的启动会，接受项目培训，熟悉方案要求、药品管理流程，药品不良反应等。每周组织研究者利用线上线下结合的方式进行培训，包括法规政策解读、业务流程培训、临床试验质量控制、职责定位、资料管理、药品管理、样本管理、稽查核查问题、药物临床试验全过程管理等各个环节的具体实施等。每年邀请国内外知名专家学者在全院内开展培训。通过对临床试验多学科的深入学习，加强与同行交流，总结药物临床试验管理经验。培训不但要覆盖法律法规、制度、SOP、职责，而且要对试验用药品管理每个环节进行专题培训，强调管理中容易出现的问题，管理重点、难点尽量做到人人知晓。

3.3 做好试验用药品全程动态管理质量控制

根据 GCP 法规，申办方和机构应制订监查和质控计划，对试验用药品管理的全过程进行监查和质量检查，以保障药物临床试验质量，保证临床试验受试者用药安全。申办者应建立对临床试验的质量控制和质量保证系统，可组织对临床试验的稽查以保证质量。监查员监督临床试验的进展，并保证临床试验按照试验方案、标准操作规程和相关法律法规要求实施、记录和报告^[7]。承担质控的人员应具备丰富的 GCP 管理经验，熟悉法规要求、管理制度和 SOP、药品管理要求，责任心强，具有良好的沟通协调能力，按照时间节点，深入到药品每个管理环节中，包括入库前准备、药物接收、药物储存、药物发放、药物使用、药物回收和退回^[8]。如入库前准备时，应按照药物入库提供所需资料；

药品储存时,应实地检查药品存储条件是否符合要求,温湿度监控系统、冷藏箱、温度计、阴凉箱、不间断电源等是否正常使用,药品库存实际余数与系统记录是否一致,近效期药品、不合格药品是否按照 SOP 规定管理等。发现问题及时沟通整改,并提出合理的解决措施,从源头上杜绝问题的产生,持续改善和提高试验用药品管理质量。收集质控发现的问题作为典型性案例用于培训的真实素材,督促全院以案促改。试验用药品采取全程动态管理质量控制模式^[9],试验用药品质量控制由事后提至事前,及时发现问题,降低风险,保证药物临床试验数据真实、可靠,进一步提升临床试验管理质量,保障受试者健康权益。

3.4 加强受试者宣教

受试者是否依从是影响临床试验结果的关键因素,因此加强受试者宣教是临床试验的重要工作。研究者应向患者详细交代访视程序、服药方法及注意事项、日记卡填写、药物保存及回收、紧急医学不良事件报告等^[10]。质量检查中发现受试者未按要求填写日记卡,日记卡是受试者记录服药情况的工具,是药物临床试验重要的数据载体,受试者依从性可通过日记卡反映,研究者认真审阅受试者日记卡填写情况,发现问题及时沟通并教育,指导受试者认真填写,对于文盲受试者,应加强对其家属的培训与宣教,力求填写的每个数据真实、及时和准确。药品回收也是出现问题频次较高的一个环节,研究者应教育受试者如实记录服药情况,剩余药和药品包装待访视时退回。

3.5 注重药品管理信息化建设

随着药物临床试验监管政策的不断出台,药物临床试验要求越来越严,标准越来越高,建设规范化和标准化的药物临床试验管理模式是目前机构的主要任务。GCP 信息化建设能提高药物临床试验工作效率,有利于机构规范化管理,加快流程改造,加速临床试验发展。GCP 药房管理系统一般有药品温湿度监控系统、临床试验管理系统、温湿度自动调节系统,不间断电源系统等^[11]。将药物入库、发放、电子审方、回收、退回、温湿度管理、药物超温隔离、药物过期下架等环节融入至信息系统进行管理^[12],系统自动记录,减少人为出错,提高药物临床试验质量^[13]。由于药品温湿度监控系统与临床试验管理系统分别是两个独立系统,将两套系统对接,温湿度数据实时传输至临床试验管理系统,若药品超温,系统接

收超温数据,自动将对应区域内的项目药物下架隔离,防止超温不合格药物发放给受试者使用,保证了受试者用药安全,大大降低了药品管理人员的工作量,提高了药物临床试验管理效率。

4 小结

试验用药品管理是药物临床试验的重中之重,管理的各个环节都直接影响了药品质量,决定了药物临床试验项目的好坏^[14]。只有在管理过程中不断地发现问题、分析问题,探讨可能发生问题的原因,才能解决问题^[15]。相关机构应建立标准化、规范化管理流程,信息化助力临床试验高质量发展,以提高试验用药品管理水平,保障受试者用药安全。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局. 药物临床试验质量管理规范[S]. 2020.
- [2] 詹惠中, 陆瑶, 曹钰然, 等. 药物临床试验质量检查中存在的问题及预防改进措施[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(19): 2.
- [3] 雷宇, 吴琼, 梁雪红, 等. 肿瘤药物临床试验质控检查问题回顾性分析[J]. 中国药业, 2020, 29(18): 5-8.
- [4] 刘好, 陆明莹, 张田香, 等. 临床试验用药品管理模式的探讨[J]. 中国新药与临床杂志, 2017, 36(9): 522-525.
- [5] 黄燕, 曾定元, 石映梅, 等. 浅析临床试验过程中试验用药品的管理[J]. 大众科技, 2021, 23(4): 64-65, 124.
- [6] 陈杰, 肖律, 杨文, 等. 临床试验用药品规范化管理的实践[J]. 中国当代医药, 2020, 27(36): 202-204.
- [7] 黄小小, 张秀华, 陈华芳. 过程动态管理在 GCP 药房的应用与效果分析[J]. 医院管理论坛, 2020, 37(8): 46-49.
- [8] 刘泽干, 蔡蒋帆, 马俊龙, 等. 医疗机构临床试验质量控制标准实践研究[J]. 中国药物评价, 2021, 38(1): 79-84.
- [9] 冯惠平, 翁小香, 刘艺群, 等. 全程动态管理模式在我院药物临床试验质量控制中的应用[J]. 海峡药学, 2020, 32(1): 212-213.
- [10] 谭婷, 李静, 姚澜, 等. 规范研究者依从性对提高药物临床试验质量的探索与实践[J]. 中国医院管理, 2022, 42(7): 62-64.
- [11] 朱露莎, 季晓慧, 孔敏, 等. 试验用药品超温原因分析和处理对策[J]. 中医药管理杂志, 2021, 29(23): 168-169.
- [12] 蔡君龙, 周晶晶, 李晓晖, 等. 临床试验用药品信息系统管理专家共识[J]. 药物评价研究, 2021, 44(5): 917-923.
- [13] 郭小娜, 郁长治, 袁明奎, 等. 关于我院 PIVAS 试验用药品管理的探讨[J]. 农垦医学, 2019, 41(5): 467-471.
- [14] 刘韬, 王艺, 邓丽婷, 等. 我院临床试验用药品管理模式的构建[J]. 中国药房, 2015, 26(34): 4766-4769.
- [15] 刘琳, 李琴, 李娜, 等. 临床试验机构发起第三方质控检查模式初探[J]. 中国药物评价, 2022, 39(4): 351-354.

(收稿日期: 2023-04-18; 修回日期: 2023-05-29)

我国执业药师职业资格考试的现状分析与思考

温瑞睿, 许龙, 朱文静, 杨建伟 (国家药品监督管理局执业药师资格认证中心, 北京 100061)

摘要: 目的 为进一步完善我国执业药师职业资格考試制度及修订考试大纲提供参考。方法 通过问卷星向已参加或正备考国家执业药师职业资格考試的人员, 发放有针对性的客观问题的调查问卷, 问题包括国家执业药师职业资格考試评价、建议及考试大纲内容修订意见, 回收问卷后对数据进行统计和分析, 进而提出建议。结果 共收到有效填写人次 1047 份。63.75% 的受调查者认为第八版考试大纲贴近执业药师实际的工作需求; 60.54% 认为目前各科目 120 道题, 题量合适; 药学类 3 个科目的平均难度分值均高于中药学类 3 个科目。591 人次药学类受调查者认为药物治疗学在基础专业知识中最重要, 82% 认为有必要继续强化药物临床药理学内容, 90% 认为有必要增加常见病症健康管理内容, 86% 认为有必要突出体现慢性疾病药物治疗管理以及加大对执业药师实践能力的考核。结论 我国现有的执业药师职业资格考試制度比较合理, 为推动执业药师高质量发展, 需在考试大纲修订时进一步优化知识结构, 合理设置和调整各学科知识体系; 突出强调社会药房药学实际服务内容; 探索体现执业药师能力与水平考核的形式与内容; 关注执业药师职业新领域的发展与要求。

关键词: 执业药师; 考试大纲; 调查; 评价; 建议

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)11-3093-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.046

我国执业药师职业资格制度是 2012 年人力资源和社会保障部在对全国职业资格进行清理规范后予以核准并公告的第一批职业准入类职业资格^[1], 经过多年清理规范, 在 2021 年人力资源和社会保障部公布的《国家职业资格目录(2021 年版)》中, 执业药师职业资格制度列入全国准入类 33 项资格制度考试之一^[2]。自 1994 年建立起至 2023 年, 我国执业药师资格制度已整整走过 29 年的发展历程。截至 2023 年 7 月, 全国通过执业药师职业资格考試的人员累计已达 147 万^[3]。截至 2023 年 6 月底, 全国累计在注册有效期内的执业药师 750 198 人, 每一万人口中执业药师为 5.3 人, 注册在药品零售企业的执业药师, 占注册总数的 90.8%^[4]。

随着深化医药卫生体制改革的不断深入, 明确社会药店纳入门诊统筹^[5], DTP 药房、“双通道”药店、慢病管理药房等专业药房逐渐发展, 对执业药师的专业素养、高质量药学服务及职业新领域执业能力需求尤为迫切。国家执业药师职业资格《考试大纲》作为执业药师基础知识及能力要求的指挥棒, 对执业药师人才队伍建设以及我国药学服务型人才培养导向至关重要。为推动执业药师队伍高质量发展, 进一步增强《考试大纲》的实用性, 国家药品监督管理局执业药师资

格认证中心面向全国开展国家执业药师职业资格考試现状和考试大纲调查问卷研究。本研究主要针对既往参加过执业药师职业资格考試的人员, 就其对执业药师考試评价及考试大纲内容修订意见进行调查和分析, 并结合实际情况存在的不足提出建议, 以期优化执业药师考試和修订新版考试大纲提供借鉴与参考。

1 对象与方法

1.1 调查对象

本次调查面向全国进行, 调查对象为已参加或备考国家执业药师职业资格考試的人员。

1.2 调查方法

由国家药品监督管理局执业药师资格认证中心设计调查问卷, 问卷内容包括受调查者的基本情况、对国家执业药师职业资格考試的整体评价及相关建议以及对考试大纲内容的评价、修订建议等。本次调查通过各省执业药师协会及问卷星小程序发布电子调查问卷, 受调查者登录后在线填写问卷。调查时间段为 2023 年 7 月 10 日—8 月 9 日。

1.3 数据处理方法

电子问卷回收汇总后, 由问卷星小程序生成调查统计报告。

2 结果

基金项目: 国家社会科学青年基金项目 (No. 11CGL097)。

作者简介: 温瑞睿, 女, 主管药师, 主要从事药事管理研究, email: 694540425@qq.com

2.1 受调查者的基本情况

共收到有效填写人次 1047 份。在受调查者中, 中药学类略高于药学类, 有近 20% 的人员为既参加药学类又参加中药学类; 超过 80% 为已通过执业药师职业资格考试, 且绝大部分为 2015 年之后参加的考试 (采用第七版、第八版考试大纲); 本科学历占到一半, 大专学历占到三分之一; 药学类专业占比超过一半, 其次是中药学类、医学类; 绝大部分人员的药学岗位工作年限都超过 5 年, 其中 6~10 年占比最多, 近三分之一; 有近一半的人员来自药品零售企业, 其次是医疗机构、药品批发企业。受调查者的基本情况见表 1。

表 1 受调查者的基本情况

项目	分项	人数 [n (%)]	
考试类别	药学	394 (38.29)	
	中药学	438 (42.57)	
	药学及中药学类	197 (19.14)	
是否已通过考试	是	864 (82.52)	
	否	50 (4.78)	
	未参加	133 (12.70)	
参加考试的年度	2020—2022 年	302 (28.84)	
	2015—2019 年	349 (33.33)	
	2015 年之前	263 (25.12)	
	复习备考中	133 (12.70)	
学历	中专	75 (7.29)	
	大专	362 (35.18)	
	本科	553 (53.74)	
	硕士研究生及以上	39 (3.79)	
专业	药学类	538 (52.28)	
	中药学类	245 (23.81)	
	医学类	128 (12.44)	
	化学类	47 (4.57)	
	生物学类	27 (2.54)	
	护理学类	28 (2.72)	
	其他	16 (1.55)	
	从事药学或中药学专业 岗位工作的时间	1~2 年	37 (3.60)
		3~5 年	114 (11.08)
		6~10 年	308 (29.93)
11~15 年		224 (21.77)	
16~20 年		148 (14.38)	
21 年以上		198 (19.24)	
工作单位	医疗机构	234 (22.35)	
	药品零售企业	516 (49.28)	
	药品批发企业	175 (16.71)	
	药品生产企业	58 (5.54)	
	其他	64 (6.11)	

2.2 受调查者对执业药师职业资格考试的整体评价及建议

63.75% 的受调查者认为第八版考试大纲 (现行版, 2020 年开始使用) 贴近实际的工作需求, 这与第七版考试大纲 (2015—2019 年) 评价调研中 69% 认为考试大纲具有指导实际作用基本保持

一致^[6]。目前, 现有国家执业药师职业资格考试共设有 4 种题型, 包括单选题、配伍选择题、综合分析选择题、多选题, 60.54% 认为目前各科目均为 120 道题, 题量合适 (见图 1); 约一半的人员认为目前各题型题量合适, 无需调整, 建议增加题量占比最多的是综合分析选择题, 建议减少题量占比最多的是多选题 (见图 2)。综合分析选择题对综合能力的考察较为全面, 从 2015 年增设该题型后, 得到了社会各界的肯定; 多选题由于错选、多选、少选均不得分, 尽管有着较好的区分度, 但在试题难度上也有所增加。

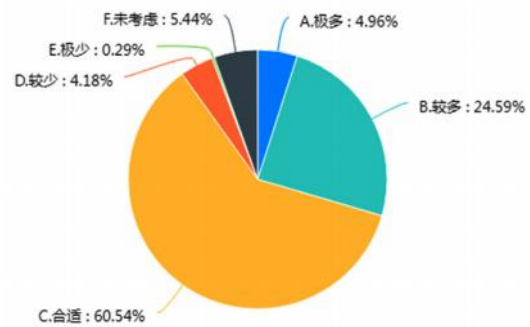


图 1 考试题量的调查

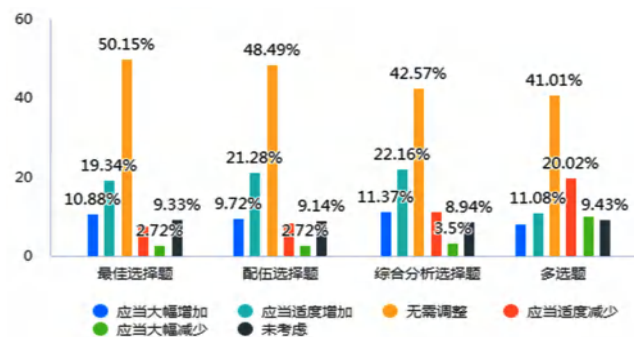


图 2 4 种题型题量的增减建议

在题型方面, 建议增加最多的 2 个题型分别是判断题和主观题。判断题评价标准非对即错的单一模式和一定的随机性在职业资格准入考试评价中存在不足^[7]。主观题确实一定程度上可以考查考生的综合实践能力及逻辑思维水平, 但从目前主观题命题风险的角度及评阅试卷科学公正性上评估, 认为其在命题环节上会存在不可控因素而暂时没有将其纳入考试题型范围。随着信息技术的快速发展, 计算机化考试模式取代传统的纸笔考试已成为必然趋势^[8], 71% 的受调查者赞成计算机化考试替代现有执业药师纸笔考试形式。具体情况见表 2。

受调查者在对执业药师职业资格考试 7 个科目整体难度的打分评价中 (1~10 分, 分值越高, 难度越大), 药学 3 个科目的平均难度分值均高于中药学 3 个科目的平均难度分值, 药事管理与法规科目难度最低。在药学科目中, 受调查者认为

表 2 受调查者对国家执业药师职业资格考试整体评价及建议

项目	分项	人数 [n (%)]
第八版考试大纲是否贴近您的实际工作需求	非常贴近	192 (18.66)
	比较贴近	464 (45.09)
	一般	182 (17.69)
	不贴近	42 (4.08)
	不了解	149 (14.48)
建议增加的题型	未考虑	56 (5.44)
	不定项选择题	277 (26.92)
	主观题	367 (35.67)
	改错题	217 (21.09)
	判断题	401 (38.97)
是否赞成计算机化考试替代纸笔考试	其他未考虑	340 (33.04)
	非常赞成	311 (30.22)
	可以接受	420 (40.82)
	无所谓	85 (8.26)
	不太接受	143 (13.9)
	强烈反对	30 (2.92)
	未考虑	40 (3.89)

《药学专业知识(一)》最难,其次是《药学专业知识(二)》《药学综合知识与技能》。但分值差异不明显,波动范围在 1 分以内,各科目平均打分值见图 3。

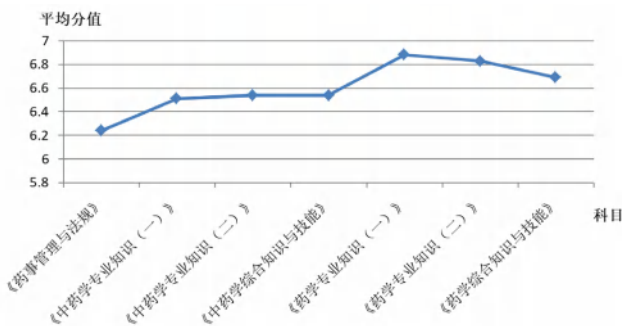


图 3 各科目的平均打分值

国家药监局执业药师中心对 2022 年执业药师职业资格考试进行各科目通过率统计的数据中,实际测得《药学专业知识(二)》科目通过率较低,导致整体药学平均通过率低于中药学平均通过率;此外,《药事管理与法规》科目的通过率低于《药学综合知识与技能》和《中药学专业知识(二)》。2022 年各科目实际通过率见图 4。

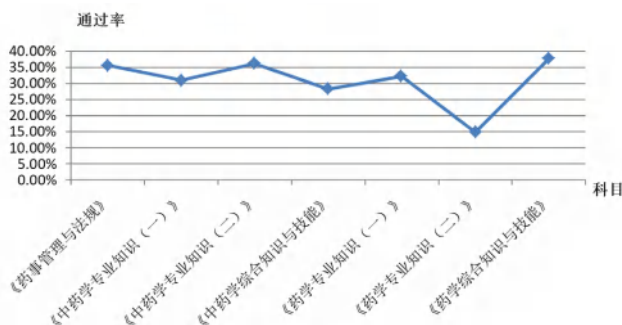


图 4 2022 年各科目的实际通过率

通过与实考数据对比可以看出,受调查者在对各科目难度的评价中,个人主观看法可能与实际考试测评结果有所差异,这与学科本身特点有关。近年来,化学药及其相关疾病用药治疗指南不断推陈出新,相较于中医药变化较大,同时,考试大纲及指南也在不断地跟进增补,因此对于药学类别人员来说,可能难度有所增加。药品管理相关法律条款近些年变化也较大,法规科目的难度也比参与调查人员实际的评价要高。

2.3 受调查者对药学科目内容的评价与建议

本次参与调查研究的 1047 人次中,有 591 人次对药学类 3 个科目提出意见。

2.3.1 受调查者对《药学专业知识一》科目内容的评价与建议 《药学专业知识(一)》主要考查药学类执业药师从事药品质量监管和药学服务工作所必备的专业知识,用于评价执业药师对药学各专业知识的基本理论、基本知识和基本技能的识记、理解、分析和应用能力。这部分的知识内容是药学学科的重要组成部分,也是执业药师的执业技能的基础,体现了药师知识素养和业务水准^[9]。受调查者在对涵盖《药学专业知识(一)》科目的 8 个方面内容的重要性进行打分,包括药品质量标准、药物构效关系、药物治疗学、基础药理学、药物毒理学、生物药剂学、药物体内代谢过程、临床药剂学,1~10 分,分值越高、权重越大。认为药物治疗学在基础专业知识中最重要,药物构效关系打分最低,最高与最低分相差近 2 分,具体各部分内容平均得分见图 5。

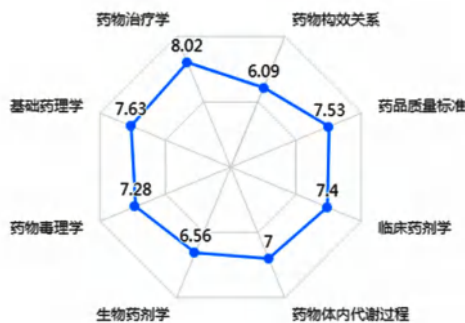


图 5 《药学专业知识(一)》各部分内容的平均得分

2.3.2 受调查者对《药学专业知识(二)》科目内容的评价与建议 《药学专业知识(二)》是在《药学专业知识(一)》对药学基本理论、基本知识和基本技能做系统要求的基础上,从临床药理学角度考查考生系统认识药品和合理用药的专业知识。这部分内容是执业药师专业知识的基础和核心,直接反映执业药师核心知识和能力要求^[9]。《药学专业知识(二)》中个药部分的内容,是药

品说明书重点内容与形式的体现。在受调查者中，94.24%认为在实际执业过程中可以读懂专业的药品说明书，一定程度上反映出参与调查群体具备基本的药学专业素养；关于《药专业知识(二)》与《药学综合知识与技能》学科界限，61.42%能够分清药理学以及药物治疗学的概念与边界；82.07%认为有必要继续强化药物临床药理学内容。具体见表3。

表3 受调查者对《药专业知识(二)》整体评价及建议

项目	分项	人数 [n (%)]
是否有必要强化药物临床药理学内容	非常有必要	220 (37.23)
	有必要	265 (44.84)
	没必要	55 (9.31)
	完全没必要	14 (2.37)
	无所谓	11 (1.86)
	未考虑	26 (4.4)
在实际工作中是否能够读懂药品说明书	完全能够	222 (37.56)
	能够	335 (56.68)
	不太能够	26 (4.4)
	不能够	7 (1.18)
《药专业知识(二)》与《药学综合知识与技能》学科界限是否清晰	非常清晰	84 (14.21)
	清晰	279 (47.21)
	不太清晰	195 (32.99)
	非常不清晰	10 (1.69)
	不了解	23 (3.89)

2.3.3 受调查者对《药学综合知识与技能》科目内容的评价与建议 《药学综合知识与技能》主要考查药学类考生综合运用所学的各项知识和技能，正确分析、处理和解决在开展药品质量管理和指导合理用药工作中所遇到的各种实际问题的能力。集中反映执业药师理论联系实际、有效开展药学服务工作所需综合知识与技能的要求^[9]。近94.92%受调查者认为能够按照药品说明书的内容向患者进行用药指导，可以看出具备一定专业基础的执业药师通过执业药师职业资格考试后，基本可以满足指导患者合理用药的需求。近年来，社会药房在承担慢病管理及常见小病防治方面发挥的作用越来越重要，90.35%受调查者认为有必要增加常见病症健康管理部分内容，86.63%认为有必要突出体现慢性疾病药物治疗管理以及加大对执业药师实践能力的考核。具体见表4。

受调查者关于《药学综合知识与技能》大纲具体内容建议中(可多项)，建议最多的是增加慢病用药指导内容，其次是同类药物的比较与选择、用药咨询相关内容，有近63%的受调查者希望增加社会药店常用中成药的用药知识与指导。具体见图6。

表4 受调查者对《药学综合知识与技能》整体评价及建议

项目	分项	人数 [n (%)]
是否有必要增加常见病症健康管理部分内容	非常有必要	238 (40.27)
	有必要	296 (50.08)
	没必要	26 (4.40)
	完全没必要	8 (1.35)
	无所谓	9 (1.52)
	未考虑	14 (2.37)
是否有必要独立章节体现慢性疾病药物治疗管理内容	非常有必要	223 (37.73)
	有必要	289 (48.90)
	没必要	34 (5.75)
	完全没必要	11 (1.86)
	无所谓	10 (1.69)
	未考虑	24 (4.06)
是否有必要加大对实践能力考核	非常有必要	207 (35.03)
	有必要	282 (47.72)
	没必要	50 (8.46)
	完全没必要	17 (2.88)
	无所谓	9 (1.52)
	未考虑	26 (4.40)
是否能够按照药品说明书的内容向患者进行用药指导	完全能够	198 (33.50)
	能够	363 (61.42)
	不太能够	25 (4.23)
	不能够	4 (0.68)
	不了解	1 (0.17)

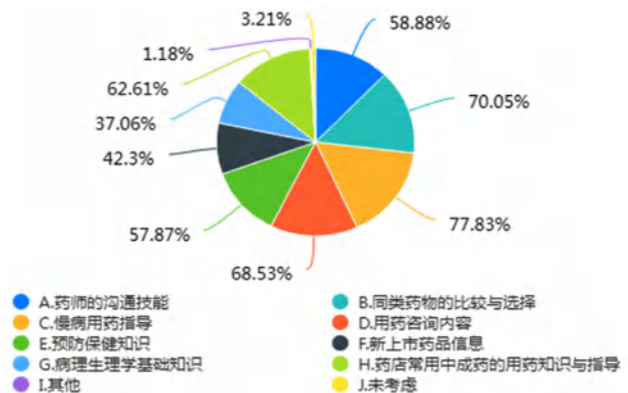


图6 《药学综合知识与技能》科目应侧重的考核内容

受调查者关于《药学综合知识与技能》科目应侧重的考核内容中(可多选)，认为药物合理使用作为该科目考核重点的比例最高，之后依次是用药注意事项、特殊人群用药指导与药物治疗方案的设计与调整。具体见图7。

3 讨论

我国执业药师职业资格《考试大纲》自1994年发布以来，每五年修订一次，逐步由最初的学院式考试发展到面向执业需求的应知、应懂、应会的知识和能力考核转变。2015年修订的第七版《考试大纲》在探索和落实“以用定考、学以致用”方面进行许多务实改革和创新，能较好地满足执业药师职责和岗位能力要求。行业内从业人员、考生及相关专家都对2015年国家执业药师资格考

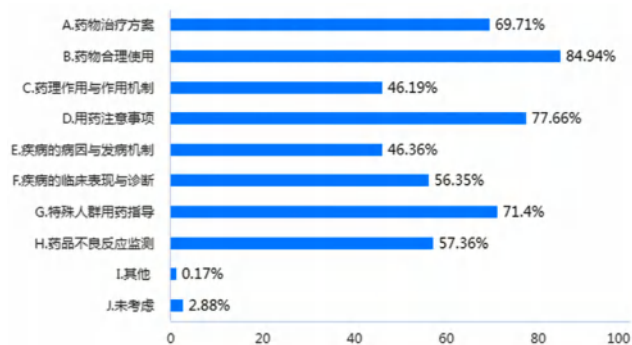


图 7 《药学综合知识与技能》大纲建议增加的具体内容

试大纲落实和执行情况给予了高度肯定^[10]。在体例上,取消了前几版大纲中强调对知识点的“掌握”“熟悉”和“了解”的标题式要求;在大纲内容上,对知识结构的要求更为综合,相比以往具有很大进步。执业药师这支队伍在指导公众合理用药、保障公众用药安全有效、促进公众身体健康的中正不断凸显并发挥重要作用^[11]。

为推动执业药师队伍高质量发展,进一步发挥执业药师职业资格《考试大纲》药学服务型人才培养的导向作用,在第七、八版《考试大纲》的基础上,国家药品监督管理局执业药师中心即将启动新版国家执业药师职业资格《考试大纲》(2024年版,第九版)修订工作。修订原则为“以确保药品质量安全及用药安全为核心,从药学服务实际需求出发,更加强调药学专业实践服务能力,引导执业药师作为药品使用全周期的参与者与管理者,从而满足人民群众用好药、用对药的健康管理需求”。

结合此次问卷调查结果,具体药学 3 个科目的修订思路为:

① 优化知识结构,合理设置和调整各学科知识体系,考核基础理论的同时注重应用能力的培养。如药物构效关系,在不突破现有药物化学学科知识体系的基础上,理论指导实践,尽可能贴近临床用药实际需求;生物药剂学与药代动力学部分,重点围绕临床说明书内容,强调执业药师解读药品说明书的能力与运用;继续加强药物治疗学与临床药理学的考核广度,突出执业药师的执业能力与价值。② 强化药学服务意识,突出药品使用全周期管理和药学服务内容,增加常见病症的管理,突出强调慢病管理及特殊人群疾病用药管理的内容与实践。③ 融合实践技能,“以考代培”增加临床实际案例分析内容,提高执业药师解决问题实践的综合能力;逐步探索体现执业

药师能力与水平考核的形式与内容。④ 目前,中西药联合使用的情况不断增加,但中药和西药各自有不同的理论体系,还未有成熟的理论指导中西药联用^[12]。因此结合我国社会药房实际药学服务需求与特点,探索将常见中成药使用与系统疾病药物治疗管理相结合,以用定考体现药学综合实际服务能力的考核。⑤ 关注执业药师职业新领域,如智慧医疗、DTP 药房、慢病管理药房、互联网医疗等新业态新模式对药品质量管理与药学服务的新要求。

参考文献

- [1] 中华人民共和国人力资源和社会保障部. 人社部拟批发布职业资格清理结果 [EB/OL]. (2012-05-11) [2023-08-11]. http://www.mohrss.gov.cn/SYrlzyhshbzb/dongtaixinwen/buneyiaowen/201205/t20120511_94975.html
- [2] 中华人民共和国人力资源和社会保障部. 国家职业资格目录 [EB/OL]. (2021-12-02) [2023-08-11]. http://www.mohrss.gov.cn/SYrlzyhshbzb/SYgundongxinwen/201710/t20171024_280005.html
- [3] 国家药品监督管理局执业药师资格认证中心. 2022 年度执业药师资格考试结果公布 [EB/OL]. (2023-08-10) [2023-08-11]. <http://www.cqjp.org.cn/info/link.aspx?id=3224&page=1>. <http://www.cqjp.org/info/link.aspx?id=6880&page=1#>
- [4] 国家药品监督管理局执业药师资格认证中心. 2023 年 6 月全国执业药师注册情况 [EB/OL]. (2023-07-13) [2023-08-11]. <http://www.cqjp.org/info/link.aspx?id=6859&page=1>
- [5] 中华人民共和国中央人民政府. 国家医疗保障局办公室关于进一步做好定点零售药店纳入门诊统筹管理的通知 [EB/OL]. (2023-02-15) [2023-08-11]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2023-02/16/content_5741663.htm
- [6] 温瑞睿, 徐敢, 江滨. 我国考生对执业药师资格考试相关制度的评价调研 [J]. 中国药房, 2017, 28 (33): 4613-4617.
- [7] 褚亚杰. “判”出能力, “断”出素养——核心素养本位下判断命题特点 [J]. 思想政治课教学, 2018 (4): 87-90.
- [8] 李京忠, 李建志, 郑德志, 等. 执业医师资格计算机化考试环境快速部署的实施方法 [J]. 中国医学教育技术, 2020, 34 (6): 768-772.
- [9] 国家食品药品监督管理总局, 国家人力资源和社会保障部. 国家执业药师资格考试第七版考试大纲 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2023: 89-140.
- [10] 徐敢, 陈皎, 李黎, 等. 第七版《国家执业药师资格考试大纲》修订说明和评价 [J]. 中国药师, 2017, 20 (4): 714-716.
- [11] 温瑞睿, 许龙, 朱文静. 国家执业药师资格考试药理学类考试大纲的分析与思考 [J]. 药学实践杂志, 2022, 40 (4): 383-386.
- [12] 龚博, 王静, 马秀菊, 等. 基于“三位一体”的优质中药服务路径探索 [J]. 中医药管理杂志, 2021, 29 (10): 115-116.

(收稿日期: 2023-08-04; 修回日期: 2023-09-26)

药品不良反应

奥希替尼致严重罕见肌酸激酶增高伴全身酸痛 1 例

戎成婷, 张军娣, 罗晶晶, 王菲菲, 吴新安* (合肥京东方医院药学科, 合肥 230011)

关键词: 奥希替尼; 肌酸激酶; 肌炎; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)11-3098-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.047

奥希替尼为第三代不可逆的酪氨酸激酶抑制剂 (TKI), 可用于治疗表皮生长因子受体 (EGFR) 特异性突变的非小细胞肺癌 (NSCLC), 被批准作为 EGFR 突变的晚期 NSCLC 的一线治疗药物。奥希替尼在体内通过 CYP3A4 和 CYP3A5 代谢, 主要经肝脏消除。常见的不良反应发生在呼吸系统、消化系统、心血管系统、血液系统、皮肤及黏膜等^[1-7], 奥希替尼导致肌酸激酶增高的不良反应文献报告较少^[8], 特别是导致住院治疗的严重的肌酸激酶增高伴全身酸痛的更是少见。本文报道 1 例奥希替尼致罕见肌酸激酶增高伴全身酸痛并入院治疗的案例, 探讨患者肌酸激酶增高与奥希替尼的相关性, 以期为临床安全和合理使用药物提供参考。

1 病例资料

患者, 男, 57 岁, 因“左肺癌术后 28 月余, 全身酸痛 1 周”于 2022 年 8 月 13 日入院。患者 2020 年 3 月因体检发现左肺结节就诊于某三甲医院, 2020 年 3 月 30 日胸部 CT 提示: 左肺上叶结节, 考虑周围型肺癌, 两肺多发小结节。4 月 3 日该院行左上肺叶切除术, 病理提示: (左上肺结节) 浸润性腺癌, 以实性生长方式占 10%, 腺泡生长方式占 60%, 乳头生长方式占 30%, 胸膜未见侵犯, 切缘未见癌, 周围查见淋巴结 1 枚, 未见癌转移。免疫组化结果: CK7 (+), CK20 (-), Napsin-A (+), TTF-1 (+), CDX2 (-), Ki-67 (+, 15%), ALK (-)。基因突变检测提示: 19 号外显子缺失突变 (p.E746_A750del)。术后复查胸部 CT 检查提示两肺下叶散在微小结节, 纵隔淋巴结肿大, 考虑存在高危因素, 于 5 月 22 日予以厄洛替尼靶向治疗, 治疗期间患者面部及躯干部出现大量皮疹, 伴瘙痒。7 月 4 日患者门诊复查肺癌五项: 鳞状细胞癌相关抗原 $4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 神经元特异性烯醇化酶 $10.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 考虑肿瘤标

志物升高, 胸部 CT 检查提示两肺下叶散在微小结节, 纵隔淋巴结肿大, 2020 年 7 月至 2021 年 9 月间先后予以患者培美曲塞 0.9 g ivgtt 化疗 4 程, 同时厄洛替尼 150 mg po qd 。患者因厄洛替尼片不良反应较大, 不能耐受, 在这期间自行改用甲磺酸奥希替尼 80 mg qd 。2022 年 7 月患者自觉全身酸痛, 于 8 月 13 日门诊复查肌酸激酶 $1632.2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 肌酸激酶同工酶 $26.8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 为求进一步诊治收入我院。

入院查体: 体温 $36.3 \text{ }^\circ\text{C}$; 脉搏 $80 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$; 呼吸 $18 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$; 血压 $132/77 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)。入院诊断: ① 肌酸激酶增高; ② 左肺恶性肿瘤 (腺癌术后 pT1N0M0 IA 期); ③ 肺结节; ④ 完全性右束支传导阻滞。

治疗经过: 入院后停用奥希替尼, 积极完善相关检查, 入院第 1 日肺癌五项: 无异常。生化全套 I: 谷草转氨酶 (AST) $40.5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 肌酸激酶 $1632.2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 肌酸激酶同工酶 $26.8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 镁 $1.03 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 葡萄糖 $6.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 其余正常。床边 12 导联心电图检查: ① 窦性心律; ② 完全性右束支传导阻滞。治疗予以大量补液, 同时利尿促进排泄等支持治疗。

第 2 日生化全套 I: 肌酸激酶 $1420.4 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 肌酸激酶同工酶 $25.0 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 指标降低。肌酸激酶升高, 提示心肌损伤可能, 予以完善心肌酶谱、心脏彩超等相关检查, 持续补液利尿促进排泄。

第 3 日超声心动图: 左室舒张功能减低主动脉瓣反流 (少量), 除补液利尿促进药物排泄外, 予以磷酸肌酸钠营养心肌。

第 4 日心肌梗死三项 (急) + N 端脑钠肽前体 (急): 肌酸激酶同工酶 $8.00 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$, 肌钙蛋白 I $< 0.012 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 肌红蛋白 $32.10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, N 端脑钠肽前体 $66 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。生化全套 I: 肌酸

作者简介: 戎成婷, 女, 副主任药师, 主要从事医院药学、药事管理工作, email: rongchengting@boe.com.cn * 通信作者: 吴新安, 男, 副主任药师, 主要从事药事管理、医院药学、临床药学工作, email: wuxinan@boe.com.cn

激酶 $348.0 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑。未见心肌损伤，患者好转，要求出院，予以办理。

2 讨论

本例患者既往用药史为甲磺酸奥希替尼 80 mg，每日一次。此次因肌酸激酶增高伴全身酸痛入院治疗。肌酸激酶通常存在于心脏、肌肉以及脑等组织的细胞质和线粒体中，是一个与细胞内能量运转、肌肉收缩、三磷酸腺苷（ATP）再生有直接关系的重要激酶^[9]。肌酸激酶同工酶在临床诊断中有十分重要的意义，在各种病变包括肌肉萎缩和心肌梗死发生时，血清中的水平迅速提高。肌酸激酶高多见于心肌损伤的疾病，如心肌炎、心肌梗死、不稳定型心绞痛等，也可以见于一些内分泌的疾病，比如甲状腺功能异常或者是肌营养不良的患者，在大量运动等情况下也会有肌酸激酶增高，还有病毒性肝炎、脑组织损伤、平滑肌损伤等也会导致肌酸激酶增高。患者入院前复查甲状腺功能正常，无乙肝，脑磁共振（MRI）无明显异常，无大量运动史，心肌酶谱及心脏彩超超声未见异常，且正在服用甲磺酸奥希替尼靶向治疗，未与其他药物同时使用，基本排除疾病诱导的可能性。综上，参照诺氏不良反应评估量表进行关联性评分，得分为 6 分，判断患者肌炎与奥希替尼很可能有关。

2017 年 3 月奥希替尼在中国获批上市，该药一般耐受性良好，不良反应报道较少。其常见的不良反应包括腹泻、皮疹、甲沟炎、皮肤干燥和口腔黏膜炎等^[10]。FLAURA 研究中 3~4 级不良事件发生率为 42%，其中腹泻最为常见，肌肉骨骼疼痛发生率为 10%^[11]。肌酸激酶增高是奥希替尼罕见的不良反应，一般较为轻微，停药即可恢复，而本例患者自觉全身酸痛症状较重，入院进行治疗，属于严重不良反应。肌肉酸痛为肌炎的表现，肌炎为一组具有异质性的疾病，包括慢性肌肉无力，肌肉耐力降低，或无症状性肌酸激酶升高。AURA2 研究报道了 2 例（1%）患者发生肌酸激酶升高，均为 2 级而无横纹肌溶解^[12]。一项病例系列报道了 4 例奥希替尼导致的肌炎病例，发生率高达 10.5%，其中 2 例具有轻度症状，2 例单纯通过肌酸激酶监测发现，主要发生在用药后 2~11 周，均为 1~2 级，有 1 例肌酸激酶发展为 4 级（ $2511 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ）但依旧无症状。

目前关于奥希替尼导致肌炎的报道有限，具体机制仍不明确^[13-14]。而免疫检查点抑制剂（ICI）导致的肌炎研究却有很多。尽管两者发生机制可能不同，但也有可借鉴之处。ICI 相关肌炎

研究显示如果治疗前检测抗体阳性，接受 ICI 治疗后可导致爆发性起病，因此有学者建议基线时检测相关抗体。而奥希替尼导致肌炎罕见，因此基线常规检测的性价比较低。但是医师应有此意识，并做好患者教育，告知其治疗的注意事项和不良反应的临床表现，一旦发生，患者可积极配合处理，医师则可使用肌酸激酶、红细胞沉降率、C 反应蛋白等指标进行病情监测，这些指标可以反映治疗的有效性。

患者于服用甲磺酸奥希替尼片一个月左右发生严重的肌酸激酶增高并全身酸痛入院，经停药、对症支持治疗后好转。建议在应用奥希替尼治疗前，临床医务工作者应高度警惕奥希替尼致肌炎的不良反应，掌握肌炎的临床特征和特异性检查指标，做好用药宣教，有利于肌炎的早发现、早治疗。一旦发生肌炎，需动态监护患者临床症状和检验指标，采取合理的处理措施，保障患者用药安全。

奥希替尼作为第三代 EGFR-TKI 的代表药物，在 NSCLC 治疗领域具有重要地位。由于肺癌的人群基数较大，奥希替尼的临床应用也较为广泛，其导致不良反应的报道也陆续增多，医务人员应予以充分重视。另外，奥希替尼作为一种口服给药的靶向制剂，院外自服增加了患者的用药风险，且该严重不良反应发生率较低，报道较少，临床医师及药师应告知患者奥希替尼诱发肌炎的可能，加强用药教育，并叮嘱其定期进行检查，保障用药安全。

参考文献

- [1] 王华玉, 杜芃, 刘乐, 等. 甲磺酸奥希替尼不良反应文献分析[J]. 中国药房, 2019, 30(3): 109-114.
- [2] 陈泳伍, 沈爱宗. 奥希替尼致不良反应文献分析[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(24): 2576-2579
- [3] 李国银, 林淑媛, 卞丽, 等. 奥希替尼致晚期肺腺癌患者心肌损伤 1 例[J]. 药物流行病学杂志, 2023, 32(2): 233-236.
- [4] 刘秀坤, 马雷, 陈雷, 等. 奥希替尼致罕见的中毒性表皮坏死松解症 1 例[J]. 实用药物与临床, 2022, 25(10): 958-960.
- [5] 陈永邦, 万宁, 王冰, 等. 1 例奥希替尼致间质性肺炎患者再用 EGFR-TKI 治疗的病例分析[J]. 中国药房, 2023, 34(5): 595-599.
- [6] 杨强, 顾宇彤, 吕迁洲, 等. 甲磺酸奥希替尼致严重肝损伤 1 例[J]. 药物流行病学杂志, 2022, 31(7): 500-502.
- [7] 杨飒, 蒲兴祥, 王倩之, 等. 1 例奥希替尼致神经毒性不良反应报道[J]. 肿瘤药学, 2022, 12(2): 272-276.
- [8] Fujioka S, Kitajima T, Itotani R. Myositis in a patient with

- advanced lung cancer treated with osimertinib [J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13 (8): e137-e139.
- [9] 樊桂萍. 中暑致肌酸激酶升高 1 例 [J]. *实用医技杂志*, 2008 (15): 2031-2032.
- [10] Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall survival with osimertinib in untreated, EGFR-mutated advanced NSCLC [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (1): 41-50.
- [11] Cheng Y, He Y, Li W, et al. Osimertinib versus comparator EGFR TKI as first-line treatment for EGFR-mutated advanced NSCLC:FLAURA China, a randomized study [J]. *Target Oncol*, 2021, 16 (2): 165-176.
- [12] Jenkins S, Yang JC, Jänne PA, et al. EGFR mutation analysis for prospective patient selection in two phase II registration studies of osimertinib [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12 (8): 1247-1256.
- [13] Li Y, Liu Y, Zhao ZC, et al. Rhabdomyolysis in a patient with advanced lung cancer treated with osimertinib: a case report [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2023, 12 (3): 629-636.
- [14] Parafianowicz P, Krishan R, Beutler BD, et al. Myositis-a common but underreported adverse effect of osimertinib: case series and review of the literature [J]. *Cancer Treat Res Commun*, 2020, 25: 100254.

(收稿日期: 2023-05-06; 修回日期: 2023-06-13)

1 例非诺贝特致血管神经性水肿的不良反应分析

赖晓梅¹, 李春红² (暨南大学附属顺德医院, 1.药剂科, 2.皮肤科, 广东 佛山 528305)

关键词: 高三酰甘油血症性急性胰腺炎; 非诺贝特; 血管神经性水肿; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)11-3100-03

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.11.048

血管神经性水肿也叫血管性水肿, 是一种发生于皮下疏松组织或黏膜的局限性水肿, 包括获得性血管神经性水肿和遗传性血管神经性水肿。多发生于眼睑、口唇、舌及呼吸道等部位, 也可发生于全身各个部位, 引起不同的后果^[1], 药物是其常见诱因^[2]。

目前, 临床针对高三酰甘油血症性急性胰腺炎多采取贝特类药物治疗, 可有效降低三酰甘油水平及复发率, 达到减轻胰腺组织损伤目的^[3]。常见的不良反应有全身症状, 如背痛、头痛、腹痛、肝功能异常, 严重不良反应有横纹肌溶解。药品说明书及《中国药典》均未提及血管神经性水肿的不良反应。本文通过临床药师监护 1 例使用非诺贝特期间出现罕见不良反应血管神经性水肿的案例, 对该药引起的不良反应进行分析, 提出合理有效处置建议, 保障患者安全。

1 病例资料

患者, 男, 35 岁。于 2022 年 8 月 14 日入院。入院前一日无明显诱因突发左上腹剑突下疼痛, 为持续性隐痛, 无放射痛, 无畏寒、发热, 不伴有皮肤、巩膜黄染、尿黄。入院前 2 h 上腹部疼痛加重, 伴恶心, 无呕吐, 门诊完善腹部 CT 提

示“胰腺周围渗出, 考虑胰腺炎”。诊断“急性胰腺炎”收入院。患者平日体健, 无高血压、糖尿病等基础疾病。否认既往有药物过敏史。入院查体: 体温 36.5℃, 脉搏 97 次·min⁻¹, 呼吸 18 次·min⁻¹, 血压 123/77 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。血清淀粉酶 57 U·L⁻¹, 血常规: 白细胞计数 9.15×10⁹·L⁻¹, 中性粒细胞百分比 67.1%。患者专科检查: 急性病容, 腹稍胀, 未见腹壁静脉曲张, 未见胃肠型或蠕动波, 上腹部腹肌稍紧张, 全腹未扪及包块, 肝、脾肋下未触及, 墨菲征阴性, 上腹部压痛, 以左上腹部为主, 肝区稍叩击痛, 肝浊音界存在, 移动性浊音阴性, 肠鸣音正常。8 月 15 日肝功能+肝酶+血脂生化检查结果: 总胆固醇 6.57 mmol·L⁻¹, 谷草转氨酶 51 U·L⁻¹, 三酰甘油 13.00 mmol·L⁻¹, *r*-谷氨酰基转移酶 91 U·L⁻¹。

入院后予以抗感染、利胆解痉、护胃等对症支持治疗。入院时医嘱使用注射用奥美拉唑钠、注射用生长抑素、注射用间苯三酚及注射用哌拉西林钠舒巴坦钠。8 月 15 日根据血脂检验结果, 考虑为高三酰甘油血症性急性胰腺炎, 为尽快降低三酰甘油水平, 新增医嘱使用非诺贝特胶囊

作者简介: 赖晓梅, 女, 副主任药师, 主要从事抗感染临床药学工作, email: 455763900@qq.com

(RECIPHARM FONTAINE, 批号: 32798) 200 mg po qd, 余治疗方案同前。8 月 16 日继续前一日的治疗方案, 服药后患者出现面部肿胀, 上唇水肿, 左足水肿性红斑, 伴瘙痒。患者自诉 8 月 15 日夜已出现足底疼痛僵硬。皮肤科会诊意见为急性荨麻疹, 血管性水肿, 建议予以依巴斯汀抗过敏及糖皮质激素抗感染治疗。经临床药师会诊, 考虑为非诺贝特引起的不良反应可能性大, 建议停用非诺贝特胶囊, 更改为他汀类药物口服降脂, 降脂目标为三酰甘油降至 $5.65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下。同时尽量精简停用可疑药物。医师接受建议, 医嘱立即停用非诺贝特胶囊, 同时停用注射用生长抑素及注射用间苯三酚, 继续使用注射用哌拉西林钠舒巴坦钠及注射用奥美拉唑钠。8 月 17 日查房时见患者面部及口唇肿胀较前消退, 足底疼痛僵硬感减轻。8 月 18 日查房时查体见患者口面部及下肢肿胀已完全消退, 自诉足底已无疼痛僵硬。8 月 19 日患者腹痛症状缓解, 复查血淀粉酶、尿淀粉酶、血常规基本恢复正常。患者一般情况好, 无诉其他明显不适, 要求出院准允。

2 非诺贝特相关血管神经性水肿不良反应的相关性分析

2.1 药品不良反应评价

根据国家药品不良反应检测中心制定的《药品不良反应报告和监测工作手册》中关联性评价标准及诺氏评估^[4], 对使用该药与其不良反应之间的相关性进行关联性评价:

① 在服用非诺贝特的次日开始出现不良反应, 非诺贝特与不良反应之间有时间相关性。② 患者停用非诺贝特, 并予以抗过敏治疗后不良反应逐渐缓解, 次日基本消失。院期间未再使用该药, 不良反应未再发生。③ 根据非诺贝特的体内药代动力学可知, 非诺贝特在服药后 5 h 可达到最大血浆浓度, 在血液中的消除半衰期可达到 20 h。根据时间判断, 患者首次出现不良反应的时间发生于非诺贝特在用药后的 20 h 之内, 且第 2 次服药后血管神经性水肿的症状最严重。④ 患者原患疾病为急性胰腺炎, 无导致发生该不良反应的疾病因素。诺氏不良反应评估量表^[5]评分为 5 分, 考虑该患者出现该不良反应“很可能”是由非诺贝特所引起。

2.2 并用药品的影响

患者入院后使用注射用哌拉西林钠舒巴坦钠、注射用奥美拉唑、注射用生长抑素和注射用间苯三酚, 未诉不适。在联合使用非诺贝特胶囊当日夜间开始出现足底疼痛等不适感, 次日再次用药

后不良反应症状加重。经抗过敏治疗以及停用上述相关可疑药物后过敏反应减轻。注射用奥美拉唑说明书中提及“可偶见皮炎、荨麻疹等”; 注射用生长抑素说明书中提及“可见皮疹、瘙痒”; 注射用间苯三酚“极少有过敏反应, 如皮疹、荨麻疹等”, 且均未查询到国内外上述几种药物引起血管神经性水肿的报道。临床药师判断认为非诺贝特引起此次不良反应为“很可能”, 上述合用药物引起不良反应为“可能”。注射用哌拉西林钠舒巴坦钠有发生血管神经性水肿的报道^[6], 但患者整个治疗过程中未停用此药, 该不良反应不考虑由注射用哌拉西林钠舒巴坦钠引起。

2.3 非诺贝特发生不良反应的国内外文献复习

胡耀中^[7]研究发现, 非诺贝特在临床上主要出现狼疮样综合征、多尿、记忆损伤、肝损伤、肌痛和肌无力等不良反应, 且不良反应的出现和给药剂量的多少不存在相关性。李岚^[8]的一篇回顾性研究中提到在非诺贝特引起的变态反应中, 皮疹最为常见, 主要表现在患者头面部、颈部、四肢出现粟粒样红色皮疹, 伴或不伴有瘙痒。2018 年 5 月美国 FDA 官网 (FDA.gov) 批准斯基制药 (SkyePharma) 公司的非诺贝特 (通用名: Fenofibrate, 商品名: Triglide) 片剂修订说明书, 修订信息包括该药可引起严重的皮肤药物不良反应、过敏反应、血管神经性水肿及光敏性的风险。经查询, 国内药品说明书及文献均未见该药引起血管神经性水肿及脚底僵硬疼痛等神经方面不良反应的相关报道。

3 讨论

血管神经性水肿临床特点为: 突然发作、真皮深层和皮下组织水肿; 痒不明显, 常表现为疼痛; 常累及黏膜组织, 多于 72 h 内消退^[9]。发生血管神经性水肿的机制主要是由真皮深部和皮下组织血管扩张, 渗出液自血管进入疏松组织中形成局限性水肿所致^[10]。现有研究显示, 血管神经性水肿是由血管内皮细胞通透性的可逆性异常改变引起; 而血管本身并不存在持续性的炎症反应、退行性病变、缺血性损伤等病理改变。面部为血管神经性水肿高发部位, 尤其是眼睑、唇、面颊及外生殖器等组织疏松的部位, 皮肤颜色正常或淡红, 多单发, 有肿痛感, 轻症持续 1~2 d 可自然消退^[11]。该患者面部严重红肿伴轻微疼痛, 且全身皮疹, 尤其以眼睑处为主, 2 d 后水肿消退, 符合血管性水肿的诊断, 足底疼痛僵硬符合神经性伤害的表现。

血脂控制不理想是急性胰腺炎控制不理想及

病情加重的重要因素^[12-13]。根据《中国急性胰腺炎诊治指南(2021)》诊断标准,急性胰腺炎合并静脉乳糜状血或血三酰甘油 $> 11.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可诊断高三酰甘油血症性急性胰腺炎,需采用综合治疗手段以快速降低三酰甘油水平^[14]。本例患者入院后诊断为急性胰腺炎,在此基础上查三酰甘油水平为 $13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,符合高三酰甘油血症性急性胰腺炎的诊断。快速将三酰甘油水平降至 $5.65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下是治疗的关键。早期治疗包括使用降血脂药物及其他辅助降脂手段实现血脂的控制。贝特类降脂药物不仅可减少肝脏三酰甘油的合成,且可促使三酰甘油逆向转运,进而显著降低三酰甘油水平。其中非诺贝特为最常用的贝特类血脂调节药,可作为高三酰甘油血症性急性胰腺炎的首选药物。

有多项研究对非诺贝特胶囊不良反应的发生情况进行了分析^[15],发现该药物的不良反应主要表现为勃起功能障碍、多尿、狼疮样综合征、急性胰腺炎、血小板减少性紫癜、肝损伤、记忆损伤以及横纹肌溶解等。临床上认为非诺贝特胶囊出现以上不良反应的主要机制在于:①该药物和抑制细胞色素 P450 代谢途径的药物进行相互作用之后,使肌肉毒性增加;②使细胞膜的不稳定性和通透性增加;③使细胞内的钙离子浓度增加;④在线粒体的某些环节进行作用,消耗细胞能量,促使其死亡。

4 小结

一旦发生血管神经性水肿应停用一切可疑药物,并查找引起血管神经性水肿的可疑药物。一般患者在停用可疑药物后可自行恢复,其他较严重者可用肾上腺素、激素、抗组胺等药物治疗。本例患者年轻,既往体健,入院后治疗药物简单,并用药物影响小,容易判断不良反应由哪种药物引起。经过临床药师干预并及时调整治疗方案,患者预后良好,对原发疾病没有明显影响。临床药师应加强药品不良反应的用药监护,尽早发现药物引起的不良反应并及时治疗,减少不良反应带来的严重后果,确保临床用药安全、有效

和合理。

参考文献

- [1] 钟松阳,毛晓华,周美娟.药源性血管神经性水肿 122 例分析[J].海峡药学,2007,12(2):97-98.
- [2] 张学军,郑捷.皮肤性病学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2019:115-116.
- [3] 彭长维,刘秋均,冯定奇.非诺贝特治疗急性高脂血症性胰腺炎临床研究[J].检验医学与临床,2015,12(7):963-964.
- [4] Gerstein W, Colombo E, Harji F. Documented vancomycin-induced severe immune-mediated thrombocytopenia [J]. BMJ Case Rep, 2018, 2018: bcr2018224682.
- [5] 郑飞跃,吴燕,饶跃峰,等.诺氏评估量表在药物不良反应评价中的作用及实例分析[J].中国药理学杂志,2012,47(8):650-652.
- [6] 高爱霞,陈惠芬,华少鹏,等.哌拉西林舒巴坦致迟发性血管神经性水肿 1 例[J].实用医学杂志,2012,28(1):17.
- [7] 胡耀中.非诺贝特胶囊治疗高脂血症的不良反应研究[J].北方药学,2017,14(1):115.
- [8] 李岚.非诺贝特致不良反应 46 例文献分析[J].医药导报,2010,29(3):397-398.
- [9] 任华丽,王学艳.EAACI/GA2LEN/EDF/WAO 荨麻疹及血管性水肿诊疗指南(2009 版)解读[J].实用医学杂志,2010,26(3):531-534.
- [10] 刘艳,王启华.荨麻疹和血管性水肿的鉴别和治疗[J].山东医学高等专科学校学报,2021,43(5):359-361.
- [11] 王丹丹.瑞舒伐他汀致单侧面部血管神经性水肿 1 例[J].临床合理用药杂志,2016,9(28):94-95.
- [12] 刘月宾.高脂血症相关性胰腺炎患者血清脂肪酶升高特点及其与血脂的关系[J].西南军医,2018,20(1):68-70.
- [13] 黄桔秀,章赛军,阮潇潇,等.高脂血症性及非高脂血症性急性胰腺炎患者的临床特点与 C-反应蛋白对其严重程度评估[J].中华医院感染学杂志,2018,28(6):893-895,903.
- [14] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组.中国急性胰腺炎诊治指南(2021)[J].中华外科杂志,2021,59(7):578-587.
- [15] 白云,宋晓峰,马勇.非诺贝特治疗高脂血症的不良反应分析[J].西南国防医药,2013,23(12):1329-1330.

(收稿日期:2023-05-01;修回日期:2023-06-10)