2023年中国药学大会

实施创新驱动发展战略 推动生物医药高质量发展

论文集

主办单位：中国药学会　江苏省科学技术协会
承办单位：中国药科大学　江苏省药学会
协办单位：南京圣和药业股份有限公司
南京圣和药物研发有限公司

2023年9月8-10日 · 南京



目　次

1.预测拉氧头孢致凝血功能异常列线图模型的建立与验证..... 白荷荷等 1

2.注射用兰索拉唑有关物质测定方法改进及杂质考察..... 蔡丹宁等 10

3.临床药师在单病种付费实施中的作用..... 曹晶晶 20

4.GC-MS-MS 法测定甲磺酸帕珠沙星中 3 种基因毒性杂质..... 陈鸿玉等 24

5.HPLC 法测定盐酸雷尼替丁胶囊溶出度..... 陈鸿玉等 31

6.肿瘤光治疗纳米药物..... 陈华兵 37

7.某医院抗菌药物预防性用药时间分析与对策..... 陈剑锋 38

8.基于 2-（2-羟基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮（HPQ）结构的荧光探针的研究进展..... 陈盼盼等 41

9.武当山茱萸鞣质调控“LARA”型星形胶质细胞活化的抗脑衰老作用机制研究..... 陈　鹏等 51

10.c-Met 靶向近红外荧光分子探针在结肠癌成像中的应用..... 陈淑莹等 52

11.Efficacy of spirulina in treatment of oral submucous fibrosis: a meta-analysis of randomised controlled clinical trials..... 陈雪茹等 53

12.新型抗精神障碍药鲁拉西酮个体化用药研究进展…..... 陈玉清等 62

13.Elabela-Apelin/APJ system promotes platelet aggregation and thrombosis via activating PANX1-P2X7 signalling pathway..... 陈　哲等 70

14.雏菊叶龙胆酮抑制 SIRT1 诱导调节性 T 细胞干预过敏性鼻炎的研究..... 程保辉等 72

15.基于 GPCR 结构和功能的抗精神疾病药物发现..... 程建军 73

16.突发公共卫生事件下国内外药品应急审批制度对比研究..... 崔俐俊等 74

17.Fabrication of soy protein isolate-glycyrrhizin composite complex for enhancing the bioavailability of resveratrol via its retarding characteristic..... 崔庆宸等 80

18.Simple but novel ICA-loaded pro-glycymicelles for hyperlipidemic prevention: Physicochemical characteristics and *in vitro* and *in vivo* animal evaluations..... 崔庆宸等 81

19.干血斑采样联合 LC-MS/MS 法同时测定早产儿体内咖啡因及其三种代谢产物的浓度..... 代浩然等 82

20.咖啡因用于早产儿的群体药动学模型：一项系统综述和外部评价..... 代浩然等 84

21.基于 TOPSIS 法建立注射用齐拉西酮药物利用评价标准及其应用结果分析..... 戴　彪等 86

22.铁死亡药物在膀胱癌中的治疗进展..... 单正达 94

23.氨基葡萄糖类药物的来源、结构及其鉴别技术研究进展..... 但晓梦等 95

24.Developing an electronic medication adjustment tool and evaluating its effectiveness in detecting DRPs and creating medication schedules..... 邓　敏等 101

25.基于网络药理学大黄治疗急性胰腺炎的机制研究..... 丁伟超 110

26.染料木苷通过降解 c-Myc 下调 PD-L1 和 CD47 发挥抗肿瘤免疫作用研究..... 董靖雯等 111

27.Mixed micelles loaded with hesperidin protect against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting the mtDNA-cGAS-STING pathway..... 董可红等 112

28.胰岛素集中带量采购后我院胰岛素类药品的使用情况分析..... 董雅芬等 113

29.医疗机构急救药品规范管理在优化急救流程中的实践..... 杜汝琼 122

30.医疗机构做好药品经营企业资质审核工作的探讨..... 杜兆松等 126

31.新冠肺炎疫情下精神专科互联网医院的药学服务实践与处方分析..... 杜志强等 128

32.精神专科医院药物滥用监测工作的探索与实践..... 杜志强等 134

33.何首乌中中性和酸性多糖的结构表征及其抗衰老活性研究..... 范　晶等 142

34.心外科患者万古霉素高谷浓度发生率及影响因素研究..... 范淑盼等 143

35.万古霉素治疗药物监测的热点与进展..... 范淑盼等 145

36.应急状态下药品专利强制许可的几点思考..... 费永和等 146

37.唐古特大黄蒽醌类成分在线近红外光谱监测研究..... 冯　丹等 152

38.临床药师参与智能化前置审方系统的优化及实施效果评价..... 冯林林 153

39.HDAC6 非酶功能的研究进展：结构，作用机制，靶向策略..... 冯梦凯等 154

40.替加环素致低纤维蛋白原血症相关风险预测模型的建立与内部验证..... 伏　安等 155

41.中国住院患者中头孢哌酮/舒巴坦致凝血功能障碍相关风险预测模型的建立与内部验证——单中心病例对照研究..... 伏　安等 156

42.SRSF6 影响 RNA 可变剪切作为耐 ADT 前列腺癌的一个潜在治疗靶点..... 付　晨等 167

43.甘露聚糖、叶酸双靶向物质修饰甲基澳瑞他汀 E 抗肿瘤机制的研究..... 高迪迪 168

44.CD36 靶向近红外荧光分子探针在肺癌成像诊断中的应用..... 高敏芳等 169

45.三取代哌嗪类非共价 SARS-CoV-2 主蛋白酶抑制剂的设计、合成和生物学评价..... 高升华等 170

46.岩藻多糖/咖啡酸纳米颗粒调控 cGAS/STING 通路发挥抗肿瘤作用和缓解肾损伤机制研究..... 高新涛等 171

47.Plant spore shells & alginate nanocomplexes hydrogel enhances intestinal delivery of probiotics by resistance to gut pH and on-demand disintegration..... 葛生婵等 172

48.纳米颗粒的响应性释放用于治疗胶质母细胞瘤的研究..... 龚若涵 173

49.酒石酸托特罗定片有关物质的超高效液相-质谱鉴定..... 顾　霄等 174

50.Investigating the enhancement of human immunity by Huang Qi Oral (HO) via 16S rRNA gene sequencing and UPLC/ MS-based metabolomics..... 桂婉玉 180

51.具有竞争性抑制 eIF4E/eIF4G 相互作用的“双亲性”模拟肽分子的设计、合成及抗肿瘤机制研究..... 郭传龙 181

52.Study on the Mechanism of Crizotinib Inducing Ferroptosis via Stat1/Nrf2 Pathway Resulting in Hepatotoxicity..... 郭　林等 182

53.Detection of Depression Marker ASS1 in Urine by Gold Nanoparticles Based Dual Epitope-peptides Imprinted Sensor..... 郭　敏等 183

54.Pivotal role of Ubiquitin-Specific Protease 7 in protein homeostasis and cancers..... 郭宁杰等 196

55.时空定量观测 ADC 旁观者杀伤效应用于提高实体肿瘤渗透性..... 郭　鹏等 197

56.近红外光免疫疗法的细胞焦亡机制研究..... 郭　鹏等 198

57.靶向治疗基因组稳定型胃癌的核素偶联药物研究..... 郭　鹏等 199

58.1 例新型冠状病毒感染合并常见慢病患者的药物治疗评价和药学监护..... 郭西芮等 200

59.监管科学视角下美国 FDA 紧急使用授权制度研究及启示..... 韩　丹等 204

60.我院腹膜透析患者全程智慧化药学服务模式的建立..... 杭永付等 215

61.新型核苷抗肿瘤药物的设计、合成及活性研究..... 郝二军等 224

62.药品品质安全以及药品短缺应对方法与措施..... 郝胜杰 225

63.利格列汀治疗初诊 2 型糖尿病的临床疗效研究..... 何楚哲 226

64.基于仿生及细胞搭便车的缺血性脑卒中药物递送系统研究..... 何文秀等 230

65.涉药第三方检测机构加强能力建设的措施探讨..... 何英梅等 231

66.Dual-functional nanoparticles with anti-angiogenic and tumor cell-killing properties for the treatment of the malignant tumor..... 侯慧文等 235

67.HPV 四价疫苗体外相对效力标准化检测方法的建立及初步验证..... 胡金盼等 236

68.Identification of New Ergosterol Derivatives Associated with Anti-Neuroinflammation Activity in MPP+-Induced Parkinson’s Disease Model..... Zhou Tong 等 237

69.基于美国 FAERS 数据的索磷布韦/维帕他韦与来迪派韦/索磷布韦不良事件安全警戒研究..... 黄李梧等 246

70.核磁共振技术用于盐酸阿芬太尼注射液质量分析..... 黄　滔等 254

71.畲药小香勾治疗痛风性关节炎有效部位筛选及作用机制研究..... 黄玉龙等 266

72.橙皮素对 mRNA 疫苗的免疫增强作用及其机制研究..... 季阿芳 279

73.Utilization Patterns and Costs of BTK Inhibitors in B-cell Lymphoma: A Retrospective Analysis from Real-Word Data..... 姜　丹等 287

74.基于网络药理学和实验验证瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 改善高糖诱导的内皮功能障碍..... 蒋诗情等 288

75.A nature molecule Notopterol alleviate the amyloid-β, tau and neuroinflammation pathophysiology in Alzheimer’s disease mice A BACE1 and GSK3β dual inhibitor Notopterol..... 蒋晓文 302

76.基于网络药理学联合实验验证探讨除烦益神合剂改善抗氧化应激反应和调节 VEGFA 水平治疗抑郁症的作用机制..... 蒋　颖等　321

77.疫情期间精神专科医院独立药学门诊服务的探讨与实践..... 蒋　颖等　334

78.选择性 HDAC6 抑制剂通过上调食管癌 MHC-Ⅱ型复合物的表达增强抗肿瘤免疫反应..... 康慧琴等　341

79.美国化生放核及新发传染病医学对策产品及监管进展..... 蒯丽萍　342

80.免疫检查点抑制剂致大疱性类天疱疮：基于真实世界的药物警戒研究..... 郎晓琴等　346

81.基于苦豆子衍生的新骨架化合物在非小细胞肺癌中的功能及机制研究..... 雷　颖等　347

82.基于“互联网+”的龙泉地区门诊儿童分剂量用药安全管理模式初步构建及效果评价..... 李丹妮等　348

83.气相色谱法测定八角茴香中反式茴香脑不确定度的评定与表示..... 李飞飞　357

84.介孔型纳米光敏剂的构建及其光诱导肿瘤高效治疗..... 李红宇等　362

85.二芳基酰胺衍生物的合成、抗新型冠状病毒生物学评价和多靶点作用研究..... 李佳玉等　363

86.四逆散调控脂代谢稳态改善肥胖症与“透邪”、“疏肝”传统功效相关性研究..... 李建超等　364

87.桂枝葛根汤结合温针灸对颈性眩晕患者 IL-6、hs-CRP 和 ET-1、NO 的影响..... 李　明等　365

88.基于网络药理学和实验验证的清肺排毒汤抗新冠肺炎和急性肺损伤机制研究.... 李明会等　372

89.住院患者格拉司琼相关心律失常的临床特征分析及预测模型的构建..... 李　鹏等　373

90.基于人群特征的心律失常自动监测模块功能拓展与优化..... 李　鹏等　383

91.Impact of clinical pharmacist intervention on proper inhaler use among Chinese chronic obstructive pulmonary disease patients..... 李沙沙等　387

92.靶向 c-Met 的近红外荧光探针用于胃癌分子成像..... 李舒欣等　402

93.相变材料在医药冷链中的应用..... 李双梅等　403

94.微针阵列贴片耐热疫苗的使用分析..... 李双梅等　407

95.苦鬼臼毒素靶向 HSP90 抑制胃癌生长的作用机制研究..... 李晓莉等　411

96.糖尿病患者冠脉造影或经皮介入治疗发生造影剂发生肾损危险因素..... 李晓烨等 412

97.应用单中心的病例验证 Mehran 积分预测冠心病合并糖尿病患者造影剂肾病发生的风险..... 李晓烨等 421

98.大黄-甘草治疗溃疡性结肠炎作用机制的网络药理学研究..... 李　秀等 427

99.中医药牵头紧密型医疗集团中药数据共享机制研究：基于扎根理论创新视角..... 李雪燕等 437

100.溶瘤纳米药物的设计与抗肿瘤应用..... 李亚超等 438

101.CD44 targeting nanodrug based on chondroitin sulfate for melanoma therapy by inducing mitochondrial apoptosis pathways..... 李　妍等 439

102.中药及复方药效物质基础研究新技术与新方法..... 李耀磊等 440

103.NPHP3 基因突变致婴幼儿肝肾损害伴贫血的铁治疗..... 李紫薇等 441

104.基因多态性对药物代谢的影响..... 练　勇等 445

105.药物基因组学在全球医疗健康中的应用和前景..... 练　勇 446

106.靶向制剂治疗婴幼儿血管瘤的研究进展..... 梁恬恬等 447

107.白芍总苷经活性氧-线粒体途径改善骨关节炎软骨细胞自噬性死亡..... 廖太阳等 448

108.乳香-没药通过抑制 TLR4/MyD88/TRPV1 通路介导的神经胶质细胞活化治疗神经病理性疼痛..... 廖禹程 457

109.肉苁蓉通过 HMGB1/TLR4/NLRP3 调节小胶质细胞介导的神经炎症减轻缺血性脑卒中引起的血脑屏障损伤..... 廖禹程 463

110.一例华法林致急性肾损伤的病例分析..... 林晓霞 468

111.临床药师参与主动脉瓣置换术后华法林致消化道出血的病例分析..... 林晓霞 472

112.中国医务人员头孢菌素类药物皮试知信行的调查研究..... 刘佳明等 476

113.妇产专业药学门诊线上咨询的实践与探索..... 刘　静等 484

114.Reporting of Tumor Lysis Syndrome with targeted therapy for hepatic cancer in the FAERS database..... 刘　灵等 488

115.成人实体器官移植患者基因多态性对他克莫司浓度影响的研究..... 刘若琳等 489

116.基于单细胞转录组测序揭示乳香-没药协同配伍抗缺血性脑卒中的新机制..... 刘天龙等 491

117.鸭跖草及混淆品饭包草的鉴定..... 刘　祥 492

118.2D-LC-QTOF-MS 鉴定酒石酸托特罗定片辅料中未知杂质及来源分析..... 刘晓佳等 514

119.Enantioselective Effect of Chiral Small Molecules in SARS-CoV-2 Vaccine-Induced Immune Response..... 刘　野 524

120.脱水穿心莲内酯对 Poly(I:C) 引起的小鼠急性肺损伤的改善作用及体内药代动力学特性研究..... 刘永广等 525

121.肿瘤微环境敏感的透明质酸化促凋亡肽 KLA 构建及抗肿瘤作用研究..... 刘增美 526

122.PF4 与 VWF 诱导和加速免疫相关血栓的形成..... 刘志艳等 527

123.肝素诱导性血小板减少症临床危险因素分析与 4T 评分系统预测效能评价..... 刘志艳等 528

124.肾透明细胞癌 E2F 家族的生物信息学综合分析..... 刘治国等 529

125.Tenovin-3 抑制肺癌血管新生的作用和机制研究..... 卢渭金等 530

126.磺胺嘧啶锌软膏质量评价..... 卢玉凤等 541

127.精神专科医院互联网+药学咨询服务实践和探索..... 陆荣荣等 554

128.“4+7”带量采购政策下精神药物不良反应回顾性分析..... 陆荣荣等 560

129.难溶性肾上腺素原料药细菌内毒素检查方法学研究..... 吕晓君等 565

130.基于 FARES 数据库对可乐定治疗注意力缺陷多动障碍的安全警戒信号分析.... 马　欢等 575

131.药师助力高龄住院患者多学科评估与管理..... 马志会等 583

132.我院围术期气道管理药物临床路径的建立与分享..... 马志会等 588

133.某三甲医院 5 年间临床常见细菌分布及耐药性分析..... 莫双铭等 593

134.围产期居家药学服务模式的构建和实践..... 沐　宇等 603

135.IL4I1 在癌症免疫逃逸中的作用机制及其抑制剂的研究进展..... 聂海倩等 609

136.高场核磁波谱仪在生命及化学科学研究中的应用..... 牛晓刚 610

137.Quantitative acetylproteomic analysis reveals the effect of metformin hyperacetylated H3K9 and H3K56 on cervical cancer growth Running title: Metformin hyperacetylates H3K9 and H3K56..... 潘博桃等 611

138.感染性心内膜炎患者万古霉素相关急性肾损伤：一项大型回顾性队列研究..... 潘坤明等 634

139.摄影技术在中药标本数字化信息采集的应用..... 潘银蕉等 645

140.医防协同，击破疫苗犹豫促进老年人群疫苗接种..... 潘志强 651

141.医药类高校参与社区居民药学服务初探..... 潘志强 655

142.齐墩果酸治疗缺血性心力衰竭的作用研究..... 钱　铭等 658

143.The activation of PPAR γ by natural flavonoids protects myocardial ischemia-reperfusion injury..... 钱星凯等 659

144.药学监护对 2 型糖尿病患者治疗效果及并发症发生率的影响..... 乔熙雯等 660

145.基于“单胺假说”研发快速起效抗抑郁新靶标 SERT-nNOS 及其干预药物..... 秦亚娟 666

146.基于 ECRSI 法的口服药品单剂量配方制自动核对模式的建立与优化..... 邱婷婷等 668

147.基于 MBO 的住院药房岗位胜任力分级分类培养教学体系的构建和实施..... 邱婷婷等 675

148.顶空气相色谱法同时测定氢溴酸伏硫西汀原料药中 6 种溶剂残留量..... 邱妍川等 682

149.参麦注射液临床研究进展..... 邱　粤等 689

150.某院肠外营养多腔袋临床应用现状调查：单中心回顾性研究..... 屈　伟 697

151.超高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时检测滋肾健脑颗粒中的龟甲和鹿角.... 曲范娜等 703

152.ANG-1 诱导骨髓间充质干细胞成脂分化促进 CML 对 TKIs 抵抗的机制研究.... 冉允盛等 708

153.飞行人员救生急救药品配置现状及展望..... 任　磊等 709

154.端粒与端粒酶在结肠癌发生发展中的最新研究进展..... 任凝慧等 715

155.Dangshen Huangjiu exerts prevention of gastric mucosal injury and inhibits Akt/NF-κB pathway..... 邵亚洲等 723

156.他扎罗汀凝胶处方及微观结构特性评价的比较研究..... 沈丹丹等 745

157.GSTO1 aggravates EGFR inhibitors resistance and tumor metastasis in lung adenocarcinoma..... 沈 瑛等 754

158.ICP-MS法测定玉屏风制剂中元素组成及玉屏风丸中20种元素含量..... 施 贝等 755

159.全新 10, 12-双取代苦豆碱衍生物的合成及抗人类β冠状病毒活性研究..... 施宇龙等 762

160.药用辅料聚乙二醇 6000 中醛类测定方法的比较研究..... 石 蓉 774

161.在药学监护和咨询中发现的重症监护病房肝移植受者的药物相关问题：以提高医疗保健质量..... 石晓萍等 781

162.艾沙康唑、泊沙康唑和伏立康唑治疗侵袭性真菌感染的药物经济学评价：在中国鉴别诊断病原体前的发热驱动或诊断驱动治疗..... 石晓萍等 792

163.生理药动学模型预测国产左羟丙哌嗪胶囊体外溶出特性及对体内药动学影响.. 石笑弋等 802

164.机器学习与 REIMS 技术在不同形态浙贝母与湖北贝母的鉴别分析中的应用研究..... 石 岩等 809

165.基于 CiteSpace 的炭疽病文献计量学分析..... 宋 凯等 820

166.生防药物的储备与应急保障..... 宋亚彬等 831

167.2022 西医临床药师在职规范化培训的线上实践调查：一项混合式研究..... 苏成新 835

168.免疫治疗后晚期胃癌人群生存预后模型研究..... 孙明敏等 836

169.超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中 23 种非甾体抗炎成分..... 孙树妍等 859

170.用于治疗多形性胶质母细胞瘤的纳米结构脂质载体..... 谭建美 873

171.搭载中性粒细胞递送药物减少中性粒细胞外陷阱用于脑损伤的治疗..... 唐龙光等 874

172.临床药师参与 1 例肾功能不全患者抗感染治疗的个体化方案制定..... 唐文娟等 875

173.Methotrexate-loaded chitosan oligosaccharide-ES2 for targeted cancer therapy..... 唐 雯等 879

174.水痘疫苗研究进展..... 田 辉等 880

175.尿石素类药物与 Keap1-Kelch 结构域亚区结合及其激活细胞抗氧化的比较研究..... 万盛杨等 886

176.探索实践新的药品监督检验策略..... 万　鑫　887

177.Effect of CYP3A5 gene polymorphisms on tacrolimus blood concentrations and adverse events in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients..... 汪　盛等　889

178.受体偏向性肿瘤免疫治疗白介素-2 类似物的研究进展..... 汪　熙等　896

179.黄芩素通过调节 SIRT1/P53 乙酰化抑制铁死亡减轻多黏菌素 B 导致的急性肾损伤..... 王博颖等　904

180.2006-2020 年湖南省儿童医院注射用炎琥宁致 132 例患儿不良反应分析..... 王方杰等　905

181.3720 例儿科住院不合理医嘱 Pareto 分析..... 王方杰等　911

182.DNA 兼容的可控氨化反应构建烯胺酮结构..... 王辉宏等　918

183.罕见病酶替代疗法药物重组人α-糖苷酶 A 酶活性测定方法研究? ..... 王绿音等　919

184.体外仿生骨肉瘤模型的构建和在发掘新型药物分子靶标上的应用..... 王美棱等　929

185.基于代谢组学研究甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的个体差异..... 王　敏等　932

186.复杂体系抗体药物分析新方法研究..... 王启钦等　941

187.The Dynamic Duo: Combining Gabapentin and Pregabalin for Postherpetic Neuralgia..... 王双英等　942

188.采用平行人工仿生膜法初步预测格列吡嗪片的生物等效性..... 王　松等　947

189.“4+7”注射类带量采购药品在我院的实施现状..... 王　新等　953

190.Electrochemical immunosensor AuNPs/NG-PANI/ITO-PET for the determination of BDNF in depressed mice serum..... 王燕萍等　959

191.Qige Tablets—A new dosage form of Huangqi and Gegen for the treatment of chemotherapy-induced intestinal mucositis..... 王艺璇等　975

192.Repurposing CRISPR/Cas to Discover SARS-CoV-2 Detecting and Neutralizing Aptamers..... 王　宇等　977

193.通过式固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时测定动物源性食品中 10 种利尿剂类药物残留..... 王展华等　1006

194.基于天然小分子的超分子抗菌水凝胶研究进展..... 王志家等 1015

195.“实战型”审方药师培养新模式的构建与实践..... 翁 琰等 1022

196.新医改下医院药学药事质控实践探索与研究..... 翁 琰等 1026

197.人血管内皮因子 165 的 ssDNA 适配体半理性筛选与稳定性改造..... 吴风梅等 1027

198.银杏达莫注射液安全性实验研究..... 吴 森等 1028

199.The study of Promoting the Rational Use of Sodium Valproate in the Intensive Care Unit..... 吴 胜等 1032

200.基于风险矩阵法分析某院近三年药品不良反应现状与风险水平评估研究..... 吴永森等 1041

201.临床药师参与多途径联合用药治疗广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染 1 例并文献复习..... 吴永森等 1063

202.1 例头孢哌酮钠舒巴坦钠致患者血小板急剧下降的用药分析与监护..... 吴永森等 1068

203.基于真实世界研究 VKORC1 基因分型对华法林起始抗凝治疗的影响和临床指导意义..... 吴永森等 1069

204.基因多态性对氯吡格雷个体化用药方案的影响和临床结果..... 吴永森等 1070

205.基于 CYP2C9/VKORC1 基因检测指导静脉血栓患者的华法林个体化用药研究..... 吴永森等 1071

206.1 例别嘌醇致严重皮肤过敏及相关基因 HLA-B*58:01 的检测..... 吴永森等 1072

207.口服阿托品致反复心肌梗死 1 例..... 伍建中等 1073

208.基于 HPLC 特征图谱分析黄芩及其常用炮制品化学成分的变化..... 武开智等 1078

209.玉米淀粉、硬脂酸镁对阿莫西林胶囊成品的影响研究..... 向延树等 1087

210.十种畲药提取物的化学成分含量与体外抗氧化活性及其关联性分析..... 肖冰颖等 1094

211.Unraveling the Nexus of Meteorological Dynamics, and Socio-economic Factors in MRSA Resistance in China..... 肖明漩等 1103

212.HPLC-RID 法测定不同来源右旋糖酐 40 中主要糖类残留物含量及其差异分析.. 谢升谷等 1104

213.他克莫司个体内变异的文献计量学及可视化分析..... 谢文敏等 1113

214.抗结核药物性肝损伤风险因素预测模型研究..... 徐 璐等 1114

215.临床药师对乙肝肝硬化患者的药学服务模式探索及评价..... 徐 璐等 1120

216.斑蝥酸钠维生素 B6 注射液致痉挛 1 例..... 徐 璐等 1128

217.仿生免疫凝胶体系在乳腺癌类器官构建和药敏检测中的应用研究..... 徐念远等 1131

218.从多肽药物到多肽制剂一体化研究..... 徐翔晖 1134

219.抗肿瘤多肽药物与靶向递送系统..... 徐翔晖 1135

220.两种血小板减少标准下利奈唑胺致重症患者血小板减少相关因素的回顾性研究..... 徐吟秋 1136

221.浅析医药行业合规管理促进机制及合规体系建设路径..... 徐瑜蔓 1143

222.左氧氟沙星在前列腺组织的分布及其受发育阶段与感染的影响..... 徐子扬等 1148

223.从西南植物药中找到 first-in-class 药物的研发密码..... 许 敏 1151

224.临床药师参与一例疑似普罗帕酮引起肉眼血尿的病例分析..... 杨 慧等 1152

225.*In vitro* study on antitumor activity of aurantiamide acetate extracted from Polygonum capitatum..... 杨 洁等 1158

226.基于二维码技术在门诊药学服务中的应用研究..... 杨 敏等 1172

227.非甾体类抗炎滴眼液围手术期防治白内障术后并发症的研究进展..... 杨诗语等 1185

228.低氮低热卡肠外营养对胃肠癌患者术后恢复的影响..... 杨 婷 1190

229.协同激活自体 NK 细胞和 cGAS-STING 通路的生物脂质体用于肿瘤免疫治疗的研究..... 杨 学等 1191

230.金丝桃苷对高脂饮食引起的肥胖伴胰岛素抵抗小鼠的保护作用..... 杨 雪等 1192

231.Triptolide induces liver injury by promoting ferroptosis via suppressing Nrf2 activation..... 杨 艳等 1193

232.结直肠癌免疫治疗的毒性研究进展..... 杨 洋等 1195

233.性别和 BMI 指数对氟伏沙明药代动力学的影响：中国精神科患者的群体药代动力学模型..... 杨　烨等　1205

234.醒脑再造丸质量标准研究..... 杨一荻等　1207

235.Antitumor Drug - Liposome triggered release..... Tan Jianmei 等　1212

236.瑞香素化学结构、药理活性、生物活性及其制剂的研究进展..... 叶　芳等　1219

237.1 例吸入特布他林致双手震颤的不良反应病例分析..... 易志攀　1234

238.Daurisoline 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制自噬诱导胶质瘤细胞凋亡并促进 TMZ 化疗敏感性..... 殷海棠等　1238

239.我院 2023 年 1-5 月份重点监控品种盐酸左氧氟沙星注射液用药合理性专项点评分析..... 尹　权　1239

240.Analysis of adverse drug reactions/events of cancer chemotherapy and intervention mechanism research for danggui buxue decoction in bone marrow suppression..... 余　彬　1243

241.一例氯苯那敏治疗耳鸣患者的药物治疗分析..... 余　伟等　1252

242.抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体的质量评价..... 俞小娟等　1255

243.突发事件中军队医疗机构药品应急保障的思考与实践..... 袁海龙　1266

244.叶酸与奥美沙坦酯夜间联用对非杓型 H 型高血压患者血压、炎症因子及内皮功能的影响..... 袁　龙　1269

245.某三甲医院 2022 年麻醉和第一类精神药品使用情况分析..... 袁　龙　1270

246.利用信息化手段推动药品集中带量采购工作..... 袁　龙　1271

247.基于一测多评法的玉屏风剂中 8 个成分的测定及其质量评价..... 岳　超　1272

248.主动靶向脂质体在结直肠癌基因与免疫治疗中的研究进展..... 张　婵等　1284

249.头孢克洛原料中聚合物杂质研究..... 张丹丹等　1285

250.吉非替尼抑制 EPHA2 表达导致皮肤屏障功能受损的机制研究..... 张江源等　1299

251.HIV 感染合并糖脂代谢异常患者血清氨基酸谱的靶向代谢组学研究..... 张　婧等　1316

252.临床药师引导住院患者参与用药安全的模式及应用评价..... 张　磊等　1317

253.DRG 模式下临床药师在神经内科开展按病种分组进行用药医嘱点评的模式探讨..... 张　磊等　1321

254.应对药品短缺的策略思考..... 张利利　1327

255.基于 FAERS 数据库的免疫检查点抑制剂神经毒性信号挖掘与分析..... 张　亮等　1328

256.国家药品集中采购政策对钙离子拮抗剂使用的影响—以江苏省某胸部专科医院为例..... 张　亮等　1338

257.Diterpene profiles of the South China Sea soft coral Sarcophyton mililatensis and their TNF-α inhibitory activities..... 张　玲等　1346

258.复方重楼凝胶治疗虫咬皮炎的药效学研究..... 张梦迪等　1367

259.治疗青少年和成人重度斑秃新药：Ritlecitinib..... 张明名等　1368

260.头孢他定阿维巴坦临床应用评价标准建立和应用..... 张乃菊等　1372

261.基于微信小程序的 OTO 药学服务在抗菌药物科学化管理中的应用..... 张　玮等　1383

262.慢阻肺患者“4+6 科普干预”管理路径构建与应用..... 张　玮等　1391

263.基于知识与数据双驱动的全覆盖药学科普体系构建与应用..... 张　玮等　1401

264.药师对重性精神病居家患者开展远程药学服务管理的效果分析..... 张玉良等　1412

265.疏肝解郁胶囊联合帕罗西汀治疗居家抑郁症患者的效果分析..... 张玉良等　1417

266.药师基于 PK/PD+TDM 理论在药物超常量治疗老年精神病的应用实践..... 张玉良　1421

267.药学人员线上指导精神病患者居家防控感染的实践分析..... 张玉良等　1426

268.药师线上指导利培酮口服液精准治疗老年精神障碍的效果分析..... 张玉良等　1430

269.Skp2 与肿瘤..... 赵　静等　1433

270.肠道微生物在肿瘤免疫治疗中的研究新进展..... 赵　娟等　1436

271.维生素 D 用于新冠防治的研究进展..... 郑冬妮等　1444

272.米格列奈钙及其降解产物分离的研究..... 郑　航等　1448

273.热毒宁注射液治疗老年急性肺炎的临床疗效及其对血清炎症因子的影响..... 郑　宏等　1454

274.PDCA 循环在我院静配中心感染管理中的应用研究..... 郑晓阳　1457

275.AGTR1 靶向近红外荧光探针用于结肠癌分子成像..... 周坤城等　1460

276.Carbamazepine induced Adverse Drug Reactions: A simple, economical detection to identify patients carrying the HLA-B*15:02 allele using PCR-RFLP method..... 周　旋　1461

277.成都市某三甲医院门诊患者用药风险 KAP 调查和影响因素分析..... 周　杨　1467

278.近红外漫反射光谱法在西红花质量检测中的应用..... 周　颖等　1475

279.代谢障碍相关脂肪性肝病：铁死亡相关机制及潜在药物..... 朱宝强等　1481

280.新型双重内皮素受体拮抗剂：Aprocitentan..... 朱宝强等　1494

281.精神专科医院中成药安全性评价分析..... 朱浩浩等　1499

282.基于 COSO-ERM 视角的疫苗企业风险评价体系构建与实证研究..... 朱　价等　1505

283.大陆首例 Dinutuximab beta 治疗神经母细胞瘤药学监护..... 邹　俊等　1514

284. Activity-preserved stabilization of mRNA lipoplexes by lyophilization in dextran solution for room temperature storage..... He Mu 等　1515

预测拉氧头孢致凝血功能异常列线图模型的建立与验证

白荷荷，王金萍，聂晓静，马莉，彭莉蓉*

（西安市中心医院药剂科，西安 710003）

【摘要】目的：探讨成人住院患者拉氧头孢致凝血功能异常的预测因子，构建简便易行的列线图模型，为临床决策提供参考。**方法：**回顾性分析2021年1月至2022年12月西安市中心医院成人住院患者资料，基于中国药物警戒系统主动监测拉氧头孢致凝血功能异常的病例。对拉氧头孢致凝血功能异常及非拉氧头孢致凝血功能异常的患者进行1:4倾向匹配，以7:3随机构建训练组和验证组。采用logistic回归分析筛选拉氧头孢致凝血功能异常的独立预测因子，利用R软件rms包构建列线图模型，通过受试者工作曲线（receiver operating characteristic curve, ROC）和校正曲线对列线图模型进行评价。**结果：**拉氧头孢致凝血功能异常的发生率为7.09%。手术（*OR*=7.030, 95%*CI* 3.172-15.580）、肝功能不全（*OR*=3.558, 95%*CI* 1.113-11.369）、肾功能不全（*OR*=2.492, 95%*CI* 1.110-5.593）、累积DDDs（*OR*=1.155, 95%*CI* 1.075-1.240）和营养风险（*OR*=10.127, 95%*CI* 4.488-22.851）是拉氧头孢致凝血功能异常的独立预测因子。根据独立预测因子构建的列线图模型显示，训练组和验证组ROC曲线下面积（area under the curve, AUC）分别为0.902（95%*CI* 0.864-0.940）和0.904（95%*CI* 0.832-0.944），具有良好的区分度。校准曲线显示，拉氧头孢致凝血功能异常的预测概率与实际观测概率具有叫较好的一致性。**结论：**本研究构建的列线图模型具有良好的预测性能，有助于临床医生更快、更准确地识别拉氧头孢致凝血功能异常的潜在风险。

【关键词】拉氧头孢；凝血功能异常；列线图；预测模型；药物不良反应；中国药物警戒系统

Development and Validation of a Nomogram for Predicting Latamoxef-Induced Coagulation Disorders

Bai Hehe, Wang Jinping, Nie Xiaojing, Ma Li, Peng Lirong*

Department of Pharmacy, Xi'an Central Hospital, Shaanxi Xi'an 710003, China

【Abstract】Objective：To explore the predictive factors of latamoxef-induced coagulation disorders in adult inpatients, and construct a simple and feasible nomogram model, which can provide reference for clinical decision-making. **Methods：**The data of adult inpatients in Xi 'an Central Hospital from January 2021 to December 2022 were retrospectively analyzed, and the cases of latamoxef-induced coagulation disorders were actively monitored based on the Chinese pharmacovigilance system(CHPS). The patients with and without latamoxef-induced coagulation disorders were matched 1:4 preferentially, and the training group and the verification group were randomly constructed at 7:3. Logistic regression

基金项目：陕西省科技项目（2020JQ-933）、西安市科技项目（22YXYJ0015）、西安市中心医院科研项目（2022YB06）。

Fund program: Shaanxi Province Science and Technology Project (2020JQ-933), Xi'an City Science and Technology Project (22YXYJ0015), and Xi'an Central Hospital Research Program (2022YB06).

通讯作者：彭莉蓉，E-mail: 2725433862@qq.com，电话：029-62614509

Corresponding author: Lirong Peng, E-mail: 2725433862@qq.com, Tel：029-62614509

analysis was used to screen independent predicators of latamoxef-induced coagulation disorders, and the rms package of R software was used to construct nomogram model. The nomogram model was evaluated by receiver operating characteristic curve (ROC) and correction curve. **Results**：The incidence of latamoxef-induced coagulation disorders was 7.09%. Surgery (*OR*=7.030, 95%*CI* 3.172-15.580), hepatic dysfunction (*OR*=3.558, 95%*CI* 1.113-11.369), renal dysfunction (*OR*=2.492, 95%*CI* 1.110-5.593), cumulative DDDs (*OR*=1.155, 95%*CI* 1.075-1.240) and nutritional risk (*OR*=10.127, 95%*CI* 4.488-22.851) were independent predictors of latamoxef-induced coagulation disorders. The nomogram model constructed based on independent predictive factors showed that the area under the curve (AUC) of the training group and the validation group were 0.902 (95%*CI* 0.864-0.940) and 0.904 (95%*CI* 0.832-0.944), respectively, with good discrimination. The calibration curve showed that the predicted probability of latamoxef-induced coagulation disorders was in good agreement with the actual observation probability. **Conclusions**：The nomogram model constructed in this study had good predictive performance, which helped clinicians to identify the potential risks of latamoxef-induced coagulation disorders more quickly and accurately.

【Key words】Latamoxef; Coagulation Disorders; Nomogram; Prediction model; Adverse drug reaction; Chinese pharmacovigilance system

拉氧头孢是一种广谱氧头孢烯类半合成抗菌药物，临床广泛用于呼吸道、腹腔内及泌尿生殖系统的中致重度感染，其结构中含有 N-甲基硫代四唑（N-methylthiotetrazole, NMTT）侧链，被认为是导致维生素 K 缺乏、凝血功能异常、血小板减少和出血的关键基团[1]。已证实含有 NMTT 侧链的头孢菌素类抗菌药物导致凝血功能异常的发生率为 4%~68%[2]。凝血功能障碍似乎是拉氧头孢治疗过程中较为常见的不良事件，与患者治疗难度增加和住院时间延长有关[3-4]。早期发现具有拉氧头孢诱发凝血功能障碍风险的患者，有助于有效利用医疗资源，及时采取干预措施，规避严重出血事件的发生。近年来，关于拉氧头孢致凝血功能障碍的研究多倾向于影响因素分析[5]，而如何定量评价拉氧头孢致凝血功能障碍发生风险和为临床医生提供直观评估方法的研究甚少。因此，开发一种方便、准确、高效的模型用于预测拉氧头孢致凝血功能障碍就显得尤为重要。目前，列线图具有直观易懂的特点被广泛应用于预测疾病的发生、复发和预后[6-7]，但很少用于预测药物不良反应（adverse drug reaction, ADR）的发生风险。本研究旨在了解成人住院患者拉氧头孢致凝血功能障碍的发生率，探讨拉氧头孢致凝血功能障碍的临床特征，运用列线图定量分析其发生风险，为临床决策提供依据。

资料与方法

一、对象

本研究为单中心回顾性队列研究，纳入了 2021 年 1 月 1 日至 2022 年 12 月 31 日在西安市中心医院就诊且符合下列标准的患者。纳入标准：（1）年龄≥18 岁；（2）静脉注射拉氧头孢疗程≥24 小时。排除标准：（1）基线凝血参数超过正常上限的 25%；（2）缺乏基线或随访凝血参数；（3）拉氧头孢处方间隔>7 天或联合使用其他抗菌药物；（4）接受肝素、低分子肝素、华法林或新型口服抗凝药；（5）临床资料不完整。样本量估算公式[8]：$n=\frac{\mu_{\alpha/2}^2\ p(1-p)}{\delta^2}$，n 为样本容量，α 为检验水准，*P* 为拉氧头孢致凝血功能异常发生率的估计值，δ 为容错误差。α 取值 0.05，则 $\mu_{\alpha/2}$=1.96；*P* 估计为 20%[9-11]，δ 为 0.15p，经计算最小样本量为 683。本研究经西安市中心医院伦理委员会批准（审批号：LW-2021–001），因为回顾性研究，患者知情同意豁免。

二、研究方法

本研究基于国家药品不良反应监测中心建立的中国药物警戒系统（Chinese hospital pharmacovigilance system, CHPS），智能搜索和主动监测拉氧头孢致凝血功能异常的电子诊疗数据，并在触发监测计划时发出预警信号。拉氧头孢致凝血功能异常定义为服用拉氧头孢后凝血酶原时间（prothrombin time, PT）、活化部分凝血活酶时间（activated partial thromboplastin time, APTT）或凝血酶时间（thrombin time, TT）的基线值增加 25%[13]。经两名

临床药师对预警信号进行独立审查，以确认监测结果。采用 Naranjo 概率评估量表分析药物与不良事件之间的因果关系[12]。Naranjo 评分结果判定：总分≥9 分为肯定；5~8 分为很可能；1~4 分为可能；≤0 分为可疑。评分≥1 的患者被认为发生拉氧头孢致凝血功能异常。如结果不一致，则将病例转交临床专家进行最终判定。采用倾向匹配方法对拉氧头孢致凝血功能异常患者和非拉氧头孢致凝血功能异常患者进行 1:4 倾向匹配，以平衡年龄、性别、科别和住院时间造成的混杂偏倚。最后将匹配的入组患者按 7:3 随机分为训练组和验证组，训练组用于建立拉氧头孢致凝血功能异常的列线图预测模型，验证组用于交叉验证模型的预测效能。

三、资料收集

收集患者以下临床资料：年龄、性别、科别、手术、肿瘤、出血史、住院天数、合并症（高血压、糖尿病、心血管疾病、慢性肾脏病）、感染部位（呼吸道、腹腔内、泌尿系统、皮肤软组织、颅内、骨关节）、营养风险（营养风险筛查 2002（nutrition risk screening 2002, NRS 2002）量表[14]得分≥3 分为有营养风险，得分<3 分为无营养风险）。实验室数据包括血小板计数、血红蛋白、血清白蛋白、肝功能不全（定义为基线总胆红素>3.0 mg/dL[51.3μ/L]或天门冬氨酸转氨酶>250 U/L）、肾功能不全（定义为基线血肌酐>3.0 mg/dL [270 mol/L]或血清尿素氮>80 mg/dL [28.6 mmol/L]）。抗菌药物暴露情况包括整个住院期间拉氧头孢的累积剂量、疗程、每日用量和累积限定日剂量数（defined daily doses, DDDs）（定义为累积剂量/限定日剂量[defined daily dose，DDD]）。

四、统计学处理

采用 SPSS 24.0 和 R 4.0.3 软件进行数据分析和模型构建。所有计量资料经正态检验均不符合正态分布，以中位数（四分位数）[M（Q_1，Q_3）]表示，组间比较采用 Mann-Whitney U 检验；计数资料以例（%）表示，组间比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法。为平衡组间基线差异，应用 R 语言 MatchIt 包进行 1:4 倾向评分匹配，卡钳值为 0.02。单因素 Logistic 回归分析筛选训练组的预测因子，P<0.20 的预测因子被认为显著并纳入多因素 Logistic 回归分析，基于 Logistic 回归分析确定的独立预测因子构建列线图预测模型。利用 R 语言 rms 包建立列线图，计算受试者工作特征（receiver operator characteristic, ROC）曲线下面积（area under the curve, AUC）以评估列线图的预测性能，AUC>0.7 表明预测模型具有良好的区分度；绘制校正曲线并通过 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验（自举样本 1000 次），以减少模型过度拟合偏差，当 P>0.05 时表明模型具有较好的一致性。P<0.05 为差异有统计学意义。

结果

一、临床基线资料

在 2020 年 1 月至 2022 年 12 月收治的住院患者中，共 6294 例患者使用拉氧头孢，4997 例（79.39%）不符合纳入标准，1297 例（20.61%）纳入研究。CHPS 抓取到 258 个预警信号，经两名临床药剂师使用 Naranjo 量表进行独立审查，确定 92 例（7.09%）为拉氧头孢致凝血功能异常。对拉氧头孢致凝血功能异常患者和非拉氧头孢致凝血功能异常患者进行 1:4 倾向匹配，匹配后共纳入 432 例患者，以 7:3 随机分为训练组（n=302）和验证组（n=130）。患者筛选流程图见图 1。训练组和验证组分别有 64 例和 28 例患者发生拉氧头孢致凝血功能异常。训练组和验证组的临床特征见表 1。

表 1 训练组和验证组的临床基线特征

Tab1 The clinical baseline characteristics of the training and the validation group

预测因子	训练组（n=302）			验证组（n=130）		
	凝血功能异常（n=64）	非凝血功能异常（n=238）	P值	凝血功能异常（n=28）	非凝血功能异常（n=102）	P值
性别（男性）[a]	40（62.5）	142（59.7）	0.894	16（57.1）	67（65.7）	0.506

年龄（岁）[b]	48.0（43.3-61.0）	49.0（42.8-58.0）	0.969	49（44-55）	44（33-57）	0.580
科室（内科）[a]	39（60.9）	152（63.7）	0.664	19（67.9）	67（65.7）	1.000
手术[a]	40（62.5）	74（31.1）	<0.001	16（57.1）	34（33.3）	0.028
癌症[a]	21（32.8）	56（23.5）	0.147	8（28.6）	28（27.5）	1.000
出血史[a]	4（6.3）	1（0.4）	0.008	1（3.6）	0	0.215
住院天数（天）[b]	17.5（14.0-21.8）	16（12-21）	0.136	16.5（15.0-21.8）	16.5（12.0-22.0）	0.592
高血压[a]	15（23.4）	47（19.7）	0.492	2（7.1）	21（20.6）	0.160
糖尿病[a]	14（21.9）	55（23.1）	1.000	5（17.9）	27（26.5）	0.460
心血管疾病[a]	10（15.6）	43（18.1）	0.715	6（21.4）	14（13.7）	0.375
慢性肾脏病[a]	8（12.5）	19（8.0）	0.321	1（3.6）	7（6.9）	1.000
呼吸系统[a]	42（65.6）	146（61.3）	0.564	20（74.2）	64（62.7）	0.505
消化系统[a]	16（25.0）	49（20.6）	0.494	7（25.0）	15（14.7）	0.254
泌尿生殖系统[a]	6（9.4）	23（9.7）	1.000	4（14.3）	7（6.9）	0.250
皮肤软组织[a]	1（1.7）	11（4.6）	0.472	0	10（9.8）	0.118
颅内[a]	1（1.7）	9（3.8）	0.694	0	2（2.0）	1.000
骨关节[a]	6（9.4）	14（5.9）	0.393	2（7.1）	6（5.9）	0.682
肝功能不全[a]	12（18.8）	17（7.1）	0.008	7（25.0）	4（3.9）	0.002
肾功能不全[a]	24（37.5）	13（5.5）	<0.001	11（39.3）	14（13.7）	0.005
白蛋白<30g/L[a]	29（45.3）	50（21.0）	<0.001	20（71.4）	24（23.5）	<0.001
血小板计数（$\times10^9$/L）[b]	181.5（115.8-239.3）	153.0（105.0-206.3）	0.143	164.5（82.5-254.0）	153（107-235）	0.977
血红蛋白（g/L）[b]	107（92-126）	110（89-122）	0.911	97（87-1114）	110（87-124）	0.134
疗程（天）[b]	12（8-15）	10（6-15）	0.006	12（9-16）	9（6-14）	0.058
累积 DDDs[b]	11.0（8.3-15.0）	8.0（4.5-10.3）	<0.001	12.0（8.1-16.9）	7.5（5.8-12.8）	0.003
营养风险[a]	50（78.1）	74（31.1）	<0.001	23（82.1）	34（33.3）	<0.001

注：DDDs 为限定日剂量数，[a]为例（%），[b]为 M（Q_1，Q_3）

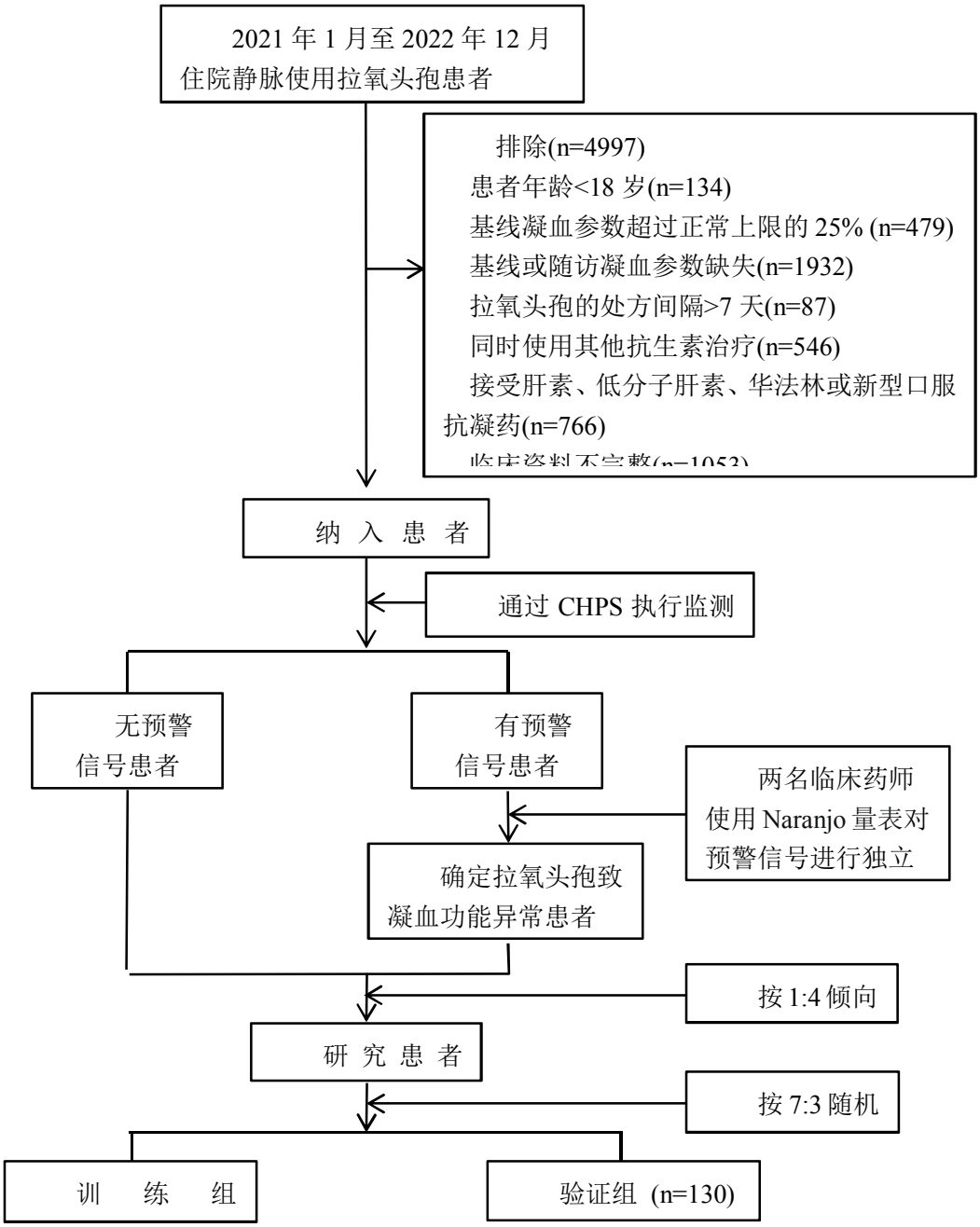


图 1 患者筛选流程图

Fig1 The flowchart of patient collection

二、Logistic 回归分析独立预测因子

单因素分析显示，拉氧头孢致凝血功能异常的潜在预测因子为手术、癌症、出血史、住院天数、肝功能不全、肾功能不全、白蛋白<30g/L、血小板计数、拉氧头孢使用疗程、累积 DDDs 及营养风险。在多因素分析中，手术（*OR*=7.030, 95% *CI* 3.172-15.580）、肝功能不全（*OR*=3.558, 95% *CI* 1.113-11.369）、肾功能不全（*OR*=2.492, 95% *CI* 1.110-5.593）、累积 DDDs（*OR*=1.155, 95% *CI* 1.075-1.240）和营养风险（*OR*=10.127, 95% *CI* 4.488-22.851）是拉氧头孢致凝血功能异常的独立预测因子。见表 2。

表 2 拉氧头孢致凝血功能异常的单因素和多因素 Logistic 回归分析

Tab 2 Univariate and multivariate logistic regression analysis of latamoxef-induced coagulation disorders

预测因子	单因素分析		多因素分析	
	OR (95% *CI*)	*P* 值	*OR* (95% *CI*)	*P* 值
手术	7377(3.112-17.486)	<0.001	7.030(3.172-15.580)	<0.001
癌症	1.725(0.722-4.117)	0.220		
出血史	4.944(0.217-112.761)	0.316		
住院天数	0.941(0.871-1.017)	0.127		
肝功能不全	4.943(1.398-17.479)	0.013	3.558(1.113-11.369)	0.032
肾功能不全	13.2826(4.359-40.473)	<0.001	2.492(1.110-5.593)	<0.001
白蛋白<30g/L	1.020(0.411-2.530)	0.966		
血小板计数	0.998(0.994-1.003)	0.452		
疗程	0.876(0.746-1.029)	0.107		
累积 DDDs	1.386(1.176-1.635)	<0.001	1.155(1.075-1.240)	<0.001
营养风险	11.372(4.400-29.390)	<0.001	10.127(4.488-22.851)	<0.001

注：DDDs 为限定日剂量数

三、列线图的建立与验证

基于拉氧头孢致凝血功能异常的独立预测因子构建预测模型和列线图。Logistic 预测模型方程为：In（p/1−p）=1.950×手术+ 1.269×肝功能异常+ 2.374×肾功能异常+0.144×累积 DDDs+2.315×营养不良–5.526。列线图模型基于回归系数对每个因子赋予 0~100 连续评分，根据各因子分数求和得到总分，并将总分转换为风险预测概率（图 2）。

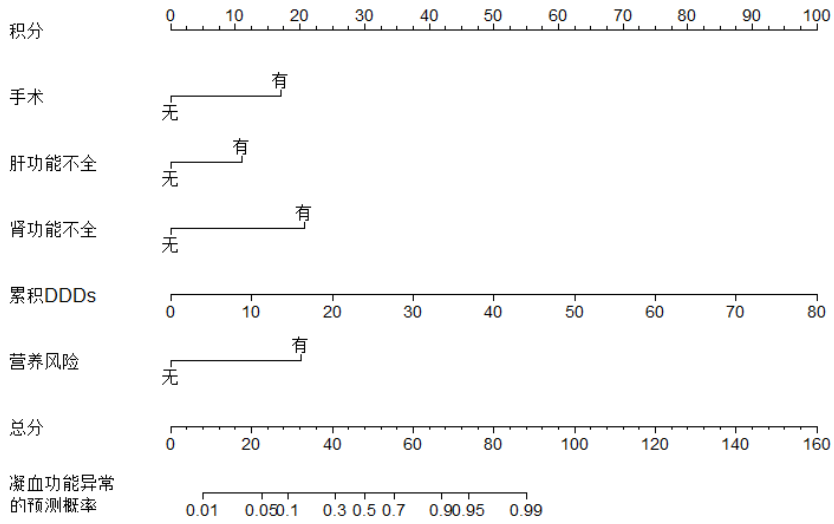


图 2 预测拉氧头孢致凝血功能异常的列线图

Fig 2 The nomogram for predicting latamoxef-induced coagulation disorders

训练组和验证组的 ROC 曲线如图 3 所示，AUC 分别为 0.902(95% *CI* 0.864-0.940)和 0.904 (95% *CI* 0.832-0.944)，列线图模型显示出良好的区分度。列线图预测概率的最佳临界值为 0.126，训练组估计拉氧头孢致凝血功能异常风险的特异度、敏感度和准确度分别为 74.8%、89.1%和 77.8%，验证组分别为 83.3%、82.1%和 83.1%。

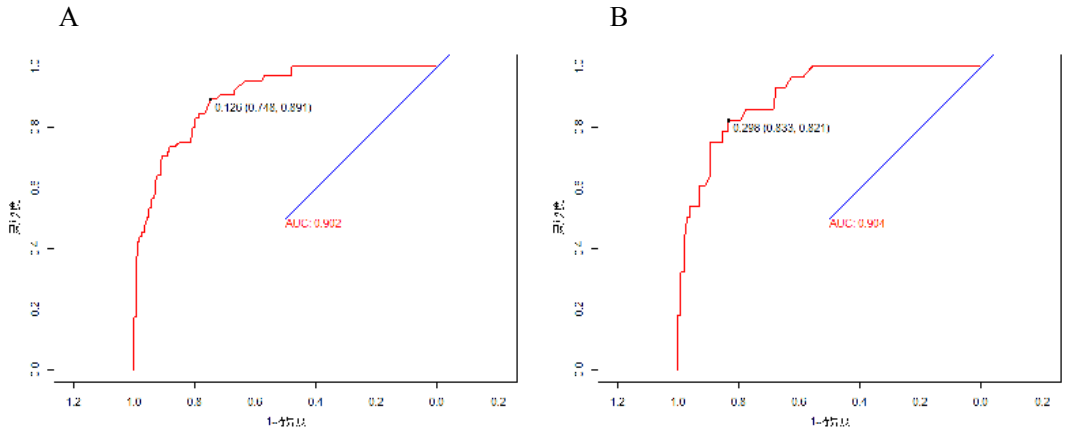


图 3 训练组（A）和验证组（B）的 ROC 曲线

Fig 3 The ROC curves in the training (A) and validation (B) groups

Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验在训练组和验证组中的结果分别为 χ^2=2.331（*P*=0.312>0.05）和 χ^2=1.030（*P*=0.597>0.05），表明列线图模型对拉氧头孢致凝血功能异常的预测概率与实际观测概率之间具有较好的一致性（图 4）。

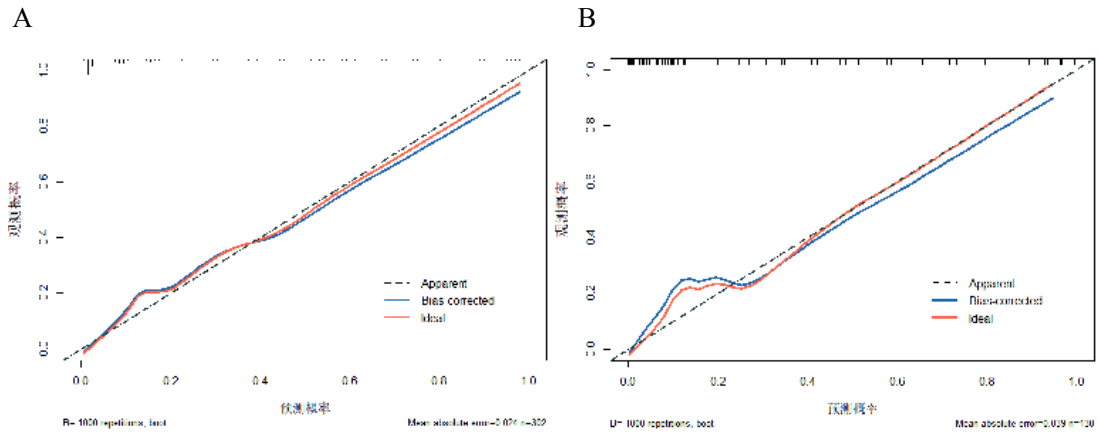


图 4 训练组（A）和验证组（B）的校正曲线

Fig 4 The calibration curves in the training (A) and validation (B) groups

讨论

本研究构建了基于成人住院患者拉氧头孢致凝血功能异常风险预测列线图。ROC 曲线下训练组和验证组的 AUC 分别为 0.902 和 0.904，拟合优度检验 *P* 值均大于 0.05，证实列线图模型能很好地区分是否发生拉氧头孢致凝血功能异常的患者，且不会高估或低估其发生风险。拉氧头孢致凝血功能异常的发生率为 7.09%，略低于文献报道的 10.71%~40.43%[9-11]，可能与凝血功能异常的定义及研究人群纳排标准的不同有关。其发生机制可能是拉氧头孢抑制维生素 K 依赖性凝血因子 II、VII、IX 和 X 的活性，并通过 NMTT 侧链干扰维生素 K 代谢，诱导维生素 K 缺乏，从而导致 PT 延长和出血风险增加[16-17]。然而，体内含有足够维生素 K 的患者可抵消 NMTT 浓度的影响[18]。此外，与抗凝剂不同，含有 NMTT 侧链的抗菌药物没有足够的潜力在健康志愿者中诱导凝血功能异常[19]，且凝血功能异常在没有临床危险因素的患者中很少见[20]。这表明临床危险因素可能是拉氧头孢致凝血功能异常发生的关键。

本研究基于手术、肝功能不全、肾功能不全、累积 DDDs 和营养风险构建了列线图风险预测模型。与之前

发表的研究结果相契合[5, 13]，肾功能不全、累积 DDDs 和营养风险是拉氧头孢致凝血功能异常的独立危险因素。拉氧头孢主要经过肾脏排泄，肾功能不全的患者会显著延长半衰期，使肝肠循环中拉氧头孢及 NMTT 浓度增加，抑制肠道菌群合成维生素 K，导致维生素 K 缺乏、PT 延长、出血风险增加[21-22]。多因素 Logistic 回归分析显示，肝功能不全与较高的凝血功能异常发生风险有关。拉氧头孢在体内不被代谢，血药浓度不受肝功能影响。但存在严重肝功能不全的患者，凝血因子合成能力受损，导致凝血时间增加[20]。同时使用拉氧头孢会进一步阻碍肝脏凝血因子的合成。本研究发现手术和营养风险分别对列线图风险预测总分贡献了 17 分和 20 分。手术是拉氧头孢致凝血功能异常的常见危险因素[23]，尤其是胃肠道手术。这可归因于术后饮食摄入减少和胃肠道功能受损导致维生素 K 吸收减少，增加凝血功能异常发生风险。据推测，手术患者对维生素 K 的每日需求量可能是正常成人的 10 倍[20]。其次，营养风险与凝血功能异常增加显著相关。在几乎所有 β-内酰胺抗菌药物相关的凝血功能异常病例中，至少存在一种营养不良的危险因素[24]。营养状况较差的患者维生素 K 摄入不足，可能加剧含有 NMTT 侧链头孢菌素发生凝血功能异常风险。此外，累积 DDDs 是拉氧头孢致凝血功能异常的独立预测因子。研究显示[19]，每日给予 4 g 拉氧头孢，不会影响出血时间；但每日 6g 剂量下，连用 6 天可引起出血时间延长；每日 12g 剂量下，连用 4 天出血时间显著增加[19]。另有报道显示，拉氧头孢平均日剂量为（5.2±1.8）g，出血事件的发生风险为 22.2%[10]。考虑拉氧头孢日剂量和疗程的影响，本研究使用 DDD 计算拉氧头孢的累积 DDDs，发现累积 DDDs>12 的患者更容易发生凝血功能异常。因此，可以推测拉氧头孢与凝血功能异常之间存在显著剂量依赖关系，随着累积 DDDs 增加，凝血功能异常发生风险增加。

由于列线图加入假设因子之前需去除混杂因子的干扰，最终模型中不包括癌症、出血史、住院天数、白蛋白<30g/L、血小板计数及拉氧头孢使用疗程等预测因子，以使得列线图简便易行，方便临床应用。患者在住院期间的风险分层对临床管理具有重要指导意义。早期评估拉氧头孢致凝血功能异常的潜在风险，可以使临床医生个体化调整凝血参数监测频率，提高对存在营养风险和高剂量拉氧头孢暴露患者的警惕。然而，拉氧头孢用药期间是否需要给予维生素 K 以预防凝血功能异常的发生风险仍存在争议[20]。在我们的研究中，通过早期筛查确定为高风险的患者建议给予维生素 K 以预防凝血功能异常的发生。如果发生拉氧头孢致凝血功能异常，应及时停药并给予维生素 K 或新鲜冷冻血浆以逆转病情。

本研究存在一些局限性。首先，本研究为单中心回顾性队列研究，有必要在其他医院验证结果；其次，近三分之一的患者因缺乏基线或随访凝血参数而未纳入研究，可能引入样本选择偏倚；第三，由于仅通过 APTT、PT 和 TT 的变化来判断凝血功能异常，有可能遗漏部分阳性病例，低估整体发生率。最后，需要前瞻性、多中心、大样本研究以进一步证实列线图的预测性能。

综上所述，本研究首次借助 CHPS 制定了拉氧头孢致凝血功能异常的监测计划，基于手术、肝功能不全、肾功能不全、累积 DDDs 和营养风险构建了成人住院患者拉氧头孢致凝血功能异常的风险预测列线图。该预测模型具有良好的预测性能，有助于临床医生更快、更准确地识别拉氧头孢致凝血功能异常的潜在风险。

参考文献

[1] Park GH, Kim S, Kim MS, et al. The Association Between Cephalosporin and Hypoprothrombinemia: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(20):3937. DOI:10.3390/ijerph16203937.

[2] Sattler FR, Weitekamp MR, Ballard JO. Potential for bleeding with the new beta-lactam antibiotics[J]. Ann Intern Med, 1986, 105(6):924-931. DOI:10.7326/0003-4819-105-6-924.

[3] Zhu Y, Shen J, Wu W, et al. Latamoxef induced a severe coagulation disorder in older patients in China: Two case reports[J]. J Clin Pharm Ther, 2021, 46（1）:227-229. DOI:10.1111/jcpt.13266.

[4] MacLennan FM, Ah-See AK, Wong AE, et al. Severe depletion of vitamin-K-dependent clotting factors during postoperative latamoxef therapy[J]. Lancet, 1983, 1(8335):1215. DOI:10.1016/s0140-6736（83）92486-8.

[5] 马明华,余自成,薛冬梅,等. 拉氧头孢钠致凝血功能异常的危险因素分析[J]. 世界临床药物, 2020, 09:719-722.

[6] Nie Z, Zhao P, Shang Y, et al. Nomograms to predict the prognosis in locally advanced oral squamous cell carcinoma after curative resection[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1):372. DOI:10.1186/s12885-021-08106-x.

[7] Silva-Figueroa AM. A Nomogram for Relapse/Death and Contemplating Adjuvant Therapy for Parathyroid Carcinoma[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2023, 32(2):251-269. DOI:10.1016/j.soc.2022.10.003.
[8] 孙振球，徐勇勇. 医学统计学[M]. 北京：人民卫生出版社，2014:524-525.
[9] Yangco BG, Baird I, Lorber B, et al. Comparative efficacy and safety of ceftizoxime, cefotaxime and latamoxef in the treatment of bacterial pneumonia in high risk patients[J]. J Antimicrob Chemother, 1987, 19(2):239-248. DOI:10.1093/jac/19.2.239.
[10] McGregor JA. Enhanced bleeding with cefoxitin or moxalactam: statistical analysis within a defined population of 1493 patients[J]. Arch Intern Med, 1987, 147(10):1859.
[11] Baxter JG, Marble DA, Whitfield LR, et al. Clinical risk factors for prolonged PT/PTT in abdominal sepsis patients treated with moxalactam or tobramycin plus clindamycin[J]. Ann Surg, 1985, 201(1):96-102.
[12] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions[J]. Clin Pharmacol Ther, 1981, 30(2):239-245. DOI:10.1038/clpt.1981.154.
[13] Cai Y, Zhang M, Wang Y, et al. Latamoxef-induced coagulation disorders: Incidence and risk factors[J]. J Clin Pharm Ther, 2021, 46(5):1382-1386. DOI:10.1111/jcpt.13435.
[14] Kondrup J, Allison SP, Elia M, et al. Educational and Clinical Practice Committee, European Society of Parenteral and Enteral Nutrition （ESPEN） [J]. Clin Nutr, 2003, 22(4):415-421. DOI:10.1016/s0261-5614(03)00098-0.
[15] Pond GR, Siu LL, Moore M, et al. Nomograms to predict serious adverse events in phase II clinical trials of molecularly targeted agents[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(8):1324-1330. DOI:10.1200/JCO.2007.14.0673.
[16] Shearer MJ, Bechtold H, Andrassy K, Koderisch J, McCarthy PT, Trenk D, et al. Mechanism of cephalosporin-induced hypoprothrombinemia: relation to cephalosporin side chain, vitamin K metabolism, and vitamin K status[J]. J Clin Pharmacol, 1988, 28: 88-95. DOI:10.1002/j.1552-4604.1988.tb03106.x.
[17] Park GH, Kim S, Kim MS, et al. The Association Between Cephalosporin and Hypoprothrombinemia: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(20):3937. DOI:10.3390/ijerph16203937.
[18] Schentag JJ, Welage LS, Williams JS, et al. Kinetics and action of N-methylthiotetrazole in volunteers and patients. Population-based clinical comparisons of antibiotics with and without this moiety[J]. Am J Surg, 1988, 155: 40-44. DOI:10.1016/s0002-9610(88)80210-1.
[19] Weitekamp MR, Caputo GM, Al-Mondhiry HA, et al. The effects of latamoxef, cefotaxime, and cefoperazone on platelet function and coagulation in normal volunteers[J]. J Antimicrob Chemother, 1985, 16: 95-101. DOI:10.1093/jac/16.1.95.
[20] Schentag JJ, Welage LS, Grasela TH, et al. Determinants of antibiotic-associated hypoprothrombinemia[J]. Pharmacotherapy, 1987, 7: 80-86. DOI:10.1002/j.1875-9114.1987.tb03522.x.
[21] Uchida K, Nakamura M, Konishi M, et al. Effect of latamoxef on platelet function and prothrombin time in partially nephrectomized rats[J]. Jpn J Pharmacol, 1987, 43(1):9-16. DOI:10.1254/jjp.43.9.
[22] D'Elia JA, Kaldany A, Miller DG, et al. Moxalactam, bleeding, and renal insufficiency[J]. JAMA, 1983, 249(12):1565.
[23] MacLennan FM, Ah-See AK, Wong AE, et al. Severe depletion of vitamin-K-dependent clotting factors during postoperative latamoxef therapy[J]. Lancet, 1983, 1(8335):1215. DOI:10.1016/s0140-6736(83)92486-8.
[24] Chen LJ, Hsiao FY, Shen LJ, et al. Use of Hypoprothrombinemia-Inducing Cephalosporins and the Risk of Hemorrhagic Events: A Nationwide Nested Case-Control Study[J]. PloS one, 2016, 11: e0158407. DOI:10.1371/journal.pone.0158407.

注射用兰索拉唑有关物质测定方法改进及杂质考察

蔡丹宁，孙春艳

（湖北省药品监督检验研究院，武汉，430075）

【摘要】目的：开展注射用兰索拉唑中有关物质的定性定量研究，分析各企业杂质分布情况。**方法：**采用资生堂 SPOLAR C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5μm)，以 0.01 mol•L^{-1} 醋酸铵溶液（调 pH 至 7.3）为流动相 A, 乙腈为流动相 B，梯度洗脱，流速为 1.0 mL·min^{-1}，检测波长为 285 nm。采用加校正因子的主成分自身对照法对制剂及加速试验样品的有关物质进行定量测定。利用相关分析及特征选择对各企业杂质测定结果进行分析。采用质谱法推测样品中共有未知杂质的结构。**结果：**拟定方法中兰索拉唑与六个已知杂质分离良好，检出杂质个数增加，杂质定量更为准确。制剂杂质总量在 0.10 %~ 0.40 %之间，杂质 B 为最大单杂。杂质 A 与杂质 B，杂质 C 与杂质 E 间具有较强的相关性，厂家、原料药来源为杂质 B 和杂质总量的主要影响因素，杂质含量较高的企业需优化相关处方工艺。加速实验表明，除少数企业外，多数企业有关物质无明显变化。**结论：**本文建立的方法可有效地分离和测定不同企业注射用兰索拉唑中的有关物质，从而进一步分析并比较其分布规律。通过应用多变量数据分析方法，可实现数据的深度利用。

【关键词】兰索拉唑；有关物质；高效液相色谱；多变量分析

兰索拉唑是一种质子泵抑制剂，能抑制胃内 H^+-K^+-ATP 酶的活性，从而减少乙酰胆碱、胃泌素和组胺等化学介质所致胃酸分泌，有强烈而持久的抑酸作用[1]。注射用兰索拉唑于 1992 年由武田制药厂在法国上市，2008 年国内首仿上市，用于口服疗法不适用的伴有出血的胃、十二指肠溃疡、急性应激溃疡、急性胃粘膜损伤等。

文献报道，与同类药物相比，兰索拉唑对酸、光、热尤为敏感[2]，且易氧化。原研产品除处方设计外，还在包装上采取了相应措施，如充氮、以覆有无色透明防紫外线薄膜的西林瓶包装等[3]。调研显示，国内产品基本工艺类似，但制剂处方各异，尚无特殊包装措施。目前，中国药典收载的注射用兰索拉唑有关物质项仅控制最大单杂和杂质总和[4]，而多数企业虽执行高于中国药典的注册标准，但企业间测定方法相差较大、限度不尽相同，实际执行标准达十余种。国外药典均未收载注射用兰索拉唑, 仅收载兰索拉唑原料及口服制剂[5-9]。目前，文献中兰索拉唑有关物质测定集中于方法研究[10-13]，且对注射剂型的报道较少，更未见对其杂质谱结果的比较分析。

因此有必要基于法定检验建立统一的检测方法，对不同企业注射用兰索拉唑的杂质情况进行考察。所得杂质数据为多维数据，适宜利用多变量数据分析方法进行分析挖掘[14]，从而揭示杂质间、杂质与处方工艺间的相关关系，为发现生产中存在的问题提供线索，并针对性地提出改进质量的建议。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

安捷伦公司 Agilent 1260 液相色谱仪；赛默飞 UltiMate 3000/LTQ Orbitrap XL 液相色谱质谱联用仪；瑞士 Mettler-Toledo 公司 XS201 电子天平。

1.2 试剂

兰索拉唑对照品（批号：100709-201304，纯度：99.8%）,杂质 A 对照品（批号：510046-201401，纯度：100%）、杂质 B 对照品（批号：510047-201401,100%）、杂质 C 对照品（批号：510048-201401，100%）、杂质 D 对照品（批号：510049-201401，100%）、杂质 E 对照品（批号：510050-201401，100%）均来自中国食品药品检定研究院；兰索拉唑杂质 F 对照品（批号：LS20160801，纯度：99.7%）来自华威科技。甲醇、乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.3 样品收集

37 批次注射用兰索拉唑来自全国 11 家制剂生产企业（企业 2-企业 12），为 2016 年国家药品抽检样品。1

批次原研制剂（企业 1），规格均为 30mg。批号信息详见下文。

2 方法与结果

2.1 各法定质量标准比较

注射用兰索拉唑的法定标准有中国药典 2015 年版二部[15]（有关物质项与中国药典 2020 年版二部[4]相同）及各企业注册标准。各类标准间主要差异如下：固定相不同，分为氨基柱和碳十八柱；色谱条件不同，分为等度洗脱和梯度洗脱；流动相不同，分为甲醇-三乙胺水溶液和乙腈-三乙胺水溶液体系。前期试验显示氨基柱和碳十八柱检测结果无明显差异，因此将色谱柱固定为碳十八柱。主要考察流动相为乙腈-三乙胺溶液的等度洗脱及梯度洗脱方法，流动相为甲醇-三乙胺溶液的等度洗脱方法。结果发现，乙腈-三乙胺溶液体系下，等度洗脱时，已知杂质虽与主成分分离良好，但洗脱能力不足：出峰较晚的杂质（如杂质 C 等）存在漏检风险；梯度洗脱时，主峰出峰时间较晚，分离效果不佳。甲醇-三乙胺溶液体系下，系统适用性溶液不够稳定，且杂质 D、E 无法完全分离。

2. 2 拟定方法

2. 2. 1 色谱条件　色谱柱资生堂 SPOLAR C18 柱（250 mm×4.6 mm, 5 μm）；流动相 0.01 mol•L-1 醋酸铵（氨水调 pH 值 7.3）溶液（A）-乙腈（B）梯度洗脱（0~7 min, 17%→35% B；7~20 min, 35% B；20~25 min, 35%→70% B；25~40 min, 70% B；40~41 min, 70%→17% B；41~51 min, 17% B）；流速:1.0 mL•min-1；柱温 35 ℃；进样量 10 μL；检测波长 285 nm。

2. 2. 2 溶液的制备　供试品溶液：取装量差异项下内容物，混合均匀，精密称取适量（约相当于兰索拉唑 50 mg），置 25 mL 量瓶中，加入稀释溶剂[0.01 mol•L-1 的醋酸铵溶液（用氨水调 pH 值 10.5）-乙腈(65:35)]溶解并稀释至刻度，作为供试品溶液。

对照溶液：精密量取供试品溶液适量，用稀释溶剂定量稀释制成每 1mL 中约含兰索拉唑 2 μg 的对照溶液。

系统适用性溶液：取杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F 和兰索拉唑对照品各适量，加稀释溶剂溶解并稀释制成每 1mL 中约含兰索拉唑 2.0 mg、各杂质 2 μg 的混合溶液。

2. 2. 3 系统适用性试验　精密量取系统适用性溶液 10 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图见图 2。可见兰索拉唑保留时间约 15 min，各已知杂质之间及杂质与主峰间均能有效分离，峰形良好。

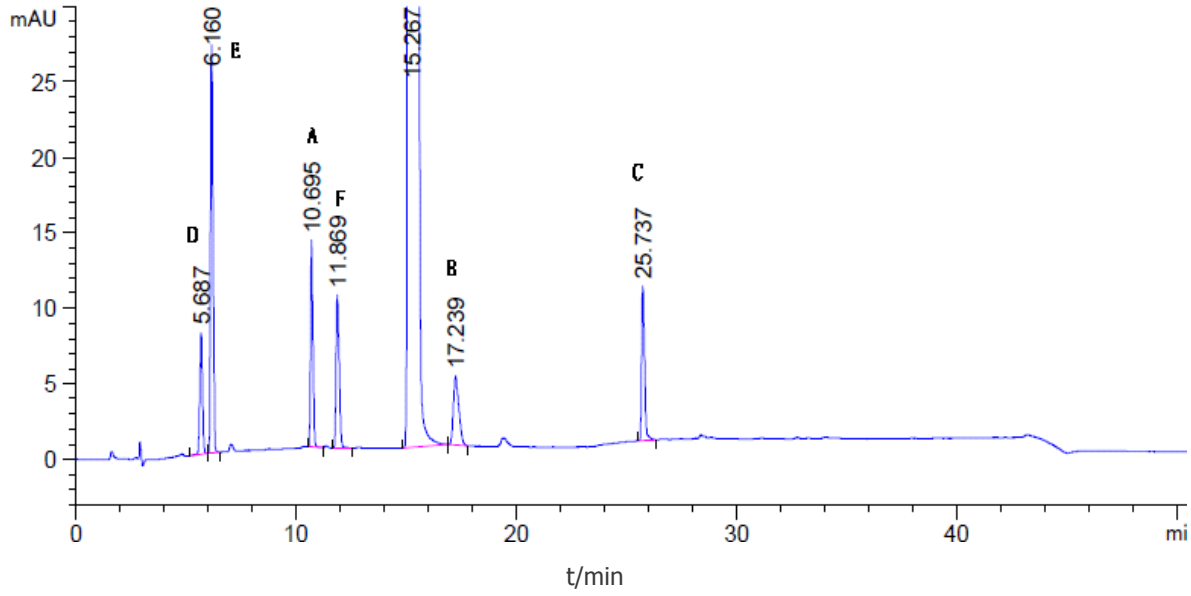
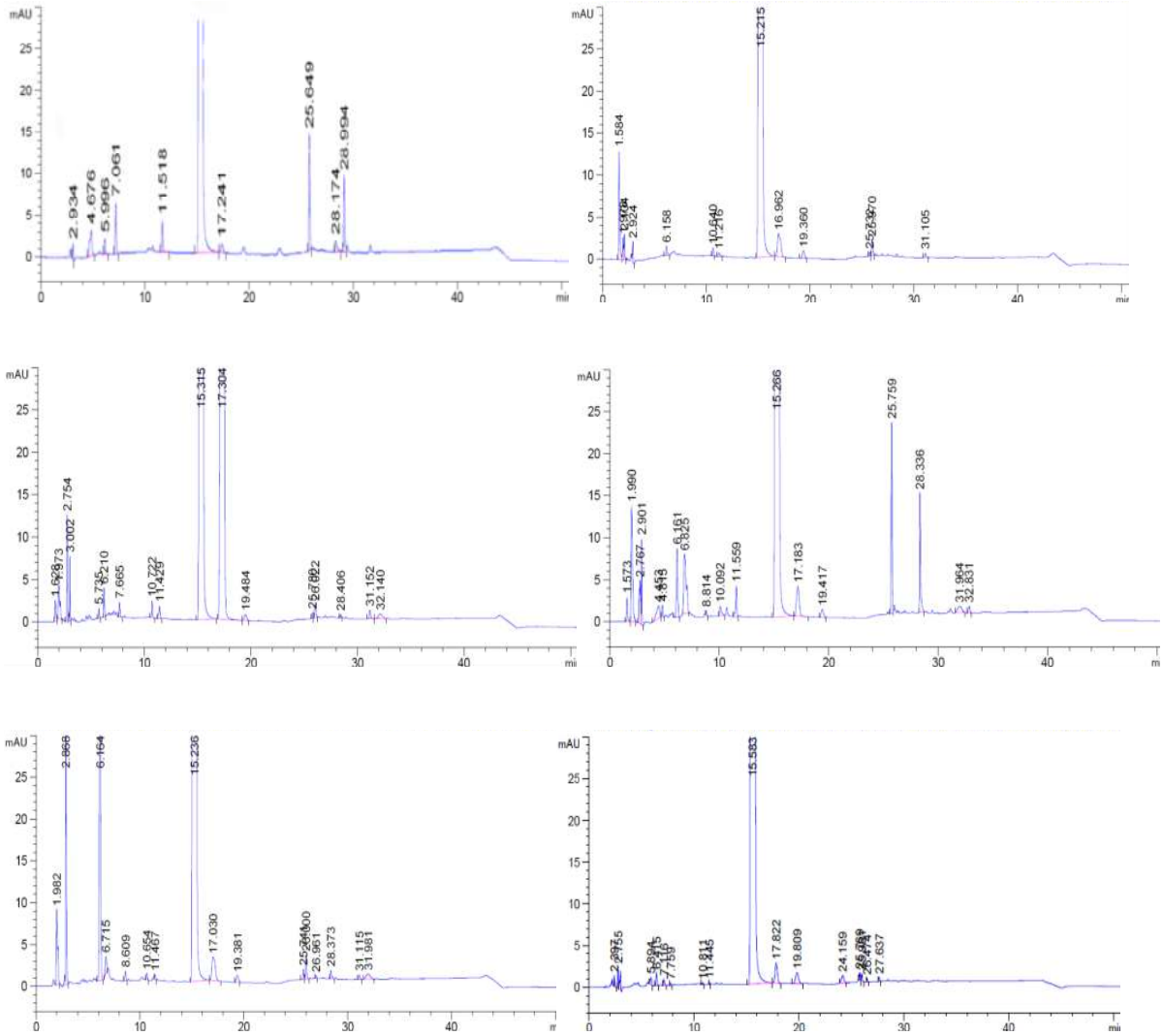


图 1　系统适用性色谱图

Fig. 1　Chromatogram of system suitability

2.2.4 破坏试验 精密称取装量差异项下内容物适量（约相当于兰索拉唑 20mg），共 5 份。分别置 10 mL 容量瓶中，进行酸破坏（加 0.01 mol•L^{-1}的盐酸 1 滴，放置 2 min）、碱破坏（加 0.1 mol•L^{-1}的氢氧化钠 1 mL，放置 10 min）、氧化破坏（加 0.3 mol•L^{-1}的过氧化氢溶液酸 1 mL，放置 2 min）、高温破坏（加适量稀释溶剂使溶解，60 ℃水浴加热 30 min）、光照破坏（加适量稀释溶剂使溶解，紫外灯 254 nm 下照射 2 h），破坏结束后，用稀释溶剂稀释至刻度。分别取未破坏溶液及各破坏样品溶液，按“2.2.1”项色谱条件实验，记录色谱图。结果表明，制剂在碱性条件下相对稳定，在酸、氧化、光照、高温条件下很不稳定，酸破坏条件下产生的最大杂质为杂质 C；氧化条件下主要产生杂质 B；高温条件下杂质 B、杂质 C 均有增加；光照条件下杂质 E 明显增加，还有部分未知杂质产生。原料药与制剂的破坏结果基本相同，杂质变化规律与文献报道一致[16]。



A 酸破坏 B 碱破坏 C 氧化破坏 D 高温破坏 E 光照破坏 F 未破坏

图 2 破坏试验色谱图

A acid degradation B alkali degradation C oxidative degradation D thermal degradation E light degradation F undestroyed

Fig. 2 HPLC chromatogram of forced degradation test

2. 2.5 线性关系考察 分别取杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F 和兰索拉唑对照品约 5 mg，精密称定。置同一 50 mL 量瓶，加稀释溶剂溶解并定容。分别精密量取适量，稀释制成 1.0,2.0,4.0,8.0,10.0 和 20.0

μg•mL^{-1} 的系列标准曲线溶液。按“2.2.1”项色谱条件，进样，记录色谱图。以峰面积值为纵坐标(Y)，各对照品溶液的浓度为横坐标（X）进行线性回归，结果表明兰索拉唑及各杂质在浓度范围内呈良好的线性关系，见表1。根据上述回归方程计算杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F 的校正因子分别为 1、1.32、1、1.27、0.46、1。

表 1　兰索拉唑及其杂质的线性回归方程和线性范围

Tab. 1 Linear regression equations and linear range of lansprazole and its impurities

化合物	线性方程	r^2	线性范围/(μg•ml^{-1})
兰索拉唑	Y=21.15X+3.468	1.000	1.092 ~21.84
杂质 A	Y=22.03X+0.181	1.000	1.094 ~21.88
杂质 B	Y=15.30X−0.315	1.000	1.048 ~20.96
杂质 C	Y=20.22X+0.061	0.999	1.034 ~20.68
杂质 D	Y=16.61X+0.204	1.000	1.014 ~20.28
杂质 E	Y=45.62X−0.781	1.000	1.128 ~22.56
杂质 F	Y=22.44X+0.181	1.000	1.078 ~21.56

2. 2.6 检出限　取“2.2.5”项下最低浓度的混合对照品溶液，稀释 10 倍，进样 5 μL,测得兰索拉唑信噪比为 3.3，故检测限为 0.546 ng。供试品溶液浓度为 2.0 mg•mL^{-1}时，相当于 0.0027 %的杂质 A、0.0036 %的杂质 B、0.0027 %的杂质 C、0.0034 %的杂质 D、0.0013 %的杂质 E、0.0027 %的杂质 F 能被检出。

2. 2. 7 精密度试验 取“2. 2. 2”项下对照溶液，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，计算兰索拉唑峰面积的 RSD 为 1.45% ，表明该方法精密度良好。

2. 2. 8 重复性实验　按“2.2.2”项下方法平行配制供试品溶液和对照溶液各 6 份。按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，按加校正因子的主成分自身对照法计算各杂质的含量，结果 6 份供试品溶液中杂质 A、B、C、D、E、F 及杂质总量基本一致，说明重复性良好。

2. 2. 9 样品测定　按“2.2.2”项下溶液制备方法分别配制 12 个企业（含原研企业）共 38 批样品的供试品溶液和对照溶液，按“2.2.1”项下色谱条件检测，以加校正因子的主成分自身对照法计算杂质的含量，结果见表 2。由于杂质 F 含量较低，许多企业中未检出，且法定标准均未予控制，故未予列出。与法定检验结果相比，杂质个数有所增加，表现为主峰后的杂质检出增多（如杂质 C 检出率提高）；各杂质定量更为准确，为下一步比较各企业杂质分布情况奠定了基础。如表 2 所示，注射用兰索拉唑的杂质总量在 0.10 %~ 0.40 %之间，杂质 B 为最大杂质，含量为 0.03%~0.26%。

2.2.10 杂质考察　采用拟定方法对 12 个企业共 38 批样品进行检测，对杂质进行两两相关性分析，如图 3 所示，杂质 A 与杂质 B，杂质 C 与杂质 E 间具有较强的相关性。究其原因，在兰索拉唑的合成路线中，杂质 C 与杂质 E 分别为缩合反应的产物及反应物，杂质 A 和杂质 B 则同为最后一步氧化反应的副产物。

杂质总量较大的企业 3、7、9 中，企业 7、9 的杂质 B 含量也较高，而企业 3 则表现为其他未知杂质的和较高。由此可见，不同企业产品的杂质分布规律有所不同。以各企业杂质总量及含量较高的杂质 B 为输出变量，利用 Clementine 的特征选择算法[17]，考察了厂家、原料药来源、pH 值、辅料种类、水分、装量差异等影响因素，结果发现，厂家、原料药来源为杂质 B 和杂质总量的主要影响因素，辅料、装量差异和水分对杂质 B 含量也有影响。

对部分企业样品进行的加速试验表明，在温度为 40℃、湿度为 80 %的条件下放置 3 个月后，多数企业仅杂质 C 含量少量增加，加速后在 0.01 % ~ 0.06 %之间；而企业 2、3 的杂质总量增长较明显，表现为杂质 B、C 及其他杂质有明显增加，其中企业 3 的样品杂质总量从试验前的 0.20 %增至 0.51 %。而企业 7、8、10、12 的杂质总量与加速前基本持平或略有升高。

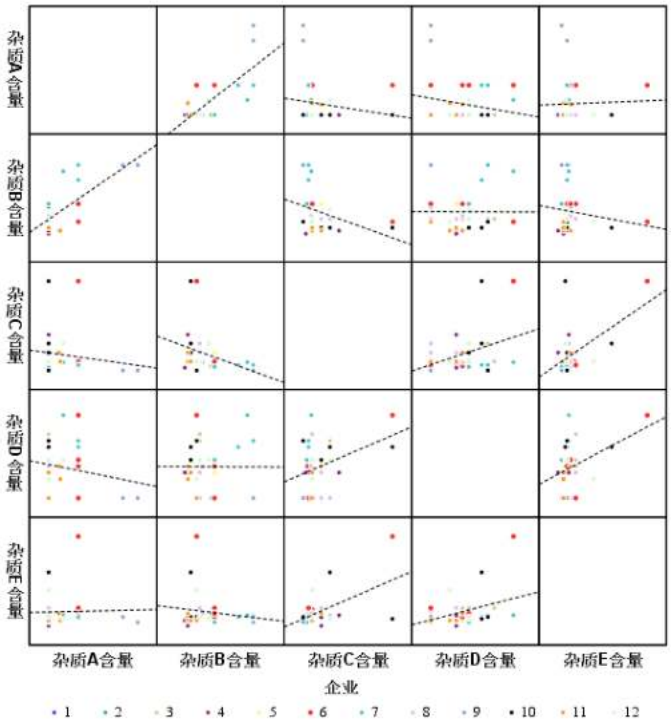


图 3 注射用兰索拉唑杂质的相关性分析结果

Fig. 3 Correlation analysis of related substances of lansoprazole for injection

2.2.11 最大未知杂质的结构推测 在样品测定过程中发现，绝大多数供试品溶液中还出现一个与杂质 B 相邻的杂质，含量为 0.03%～0.05%，为最大未知杂质。该杂质在其他文献中也有报道[10]。取企业 5 的一批样品(批号：160410104)配制供试品溶液，得典型色谱图（图 4）。取“2.2.2”项下供试品溶液及系统适用性溶液分别进样。采用以下色谱条件和质谱条件测定，推测其结构。

色谱条件：采用 CAPCELL PAK C_{18} 色谱柱（4.6 mm×150 mm，3μm），梯度程序微调为（0~10 min, 35%→60% B；10~15 min, 60% B；15~18 min, 60%→70% B；18~25 min, 70% B；25~26 min, 70%→35% B；26~30 min, 35% B）；进样量 5 μL。其余同 2.2.1 项下。质谱条件：离子化方式为 ESI（+），喷雾电压 3.5kV，毛细管温度 350℃；鞘气和辅助气均为氮气，流速分别为 40 arb、10 arb；碰撞气为氦气；采用 FTMS 模式进行全扫描, 扫描范围 *m/z* 50～600；子离子扫描范围 *m/z* 100~400。

如图 5 所示，该未知杂质的分子离子峰为 384.1016，推测其结构见图 6。由于其在强制降解试验中基本无变化，应归属为工艺杂质。

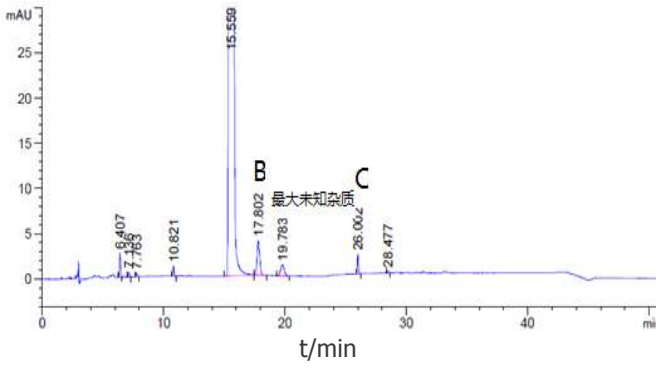


图 4 典型样品溶液色谱图

Fig. 4 Typical Chromatogram of sample solution

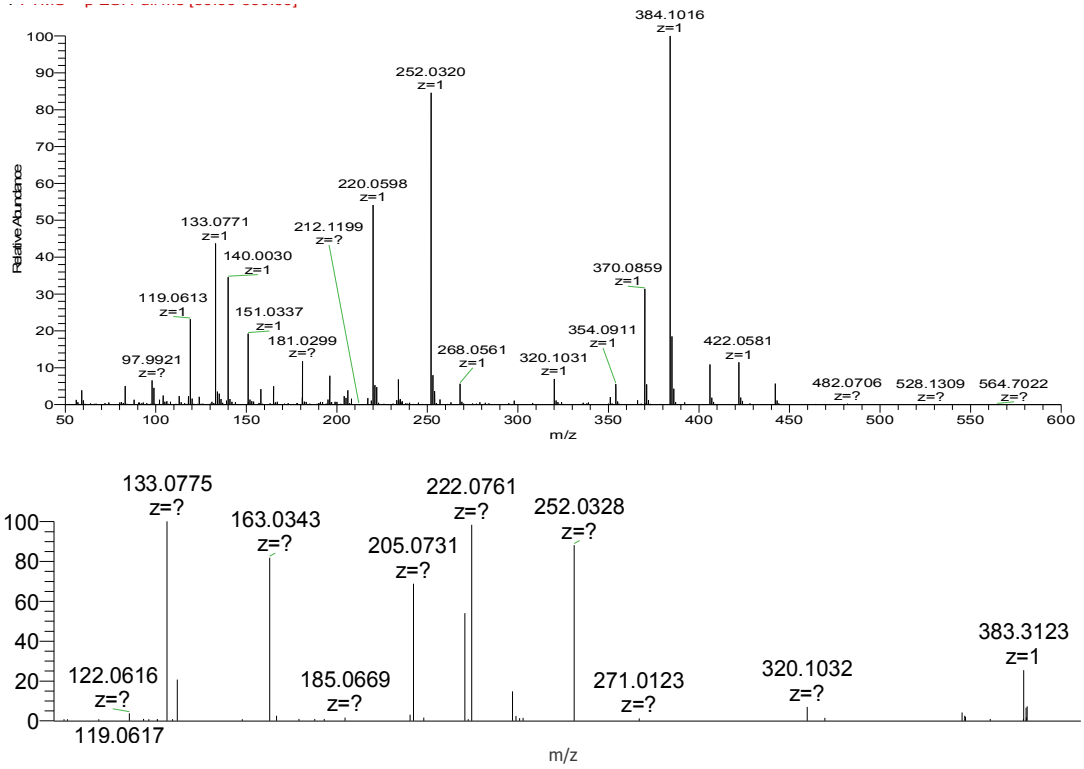


图 5 未知杂质质谱图

Fig. 5 MS spectrograms of the unknown impurity

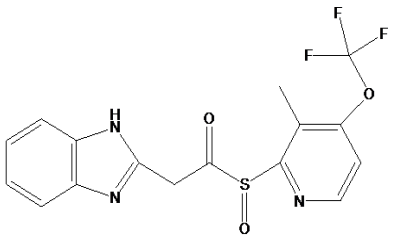


图 6 未知杂质的推测结构

Fig. 6 Speculative structures of the unknown impurity

3 讨论

本研究建立的有关物质测定方法采用梯度洗脱，制剂中各杂质分离更完全，且随着梯度程序有机相比例的增加，主峰后杂质检出数量增加，能更真实地反映供试品中各杂质水平，为进一步分析比较不同企业产品杂质分布规律奠定了基础。该方法亦可用于 LC-MS/MS，分析共有未知杂质，完善本品的杂质谱研究。

各企业有关物质的分析结果显示，杂质 B 和杂质总量的主要影响因素为厂家及原料药来源，加速实验中，除少数企业外，多数企业杂质总量及杂质 B 含量无明显变化。提示注射用兰索拉唑的杂质主要来源于原料，制剂具有较好的稳定性。注射用兰索拉唑的杂质相关性研究也支持上述结论。此外，经查询全国药品抽检数据库[18]，目前尚无注射用兰索拉唑有关物质不合格的记录，证明该制剂在生产流通使用各环节较稳定。

结合调研情况，对杂质水平较高的企业分析如下：企业 3、7、9 杂质总量较高，其中，企业 3 的原料经过重结晶处理，而兰索拉唑为多晶型药物[5]；企业 9 的原料为企业自产；企业 7 虽与另两家企业共用原料供应商，但该企业的装量为所抽品种中最大。加速实验中，企业 3 的杂质明显增长，企业 7 杂质无明显变化。企业 9 虽未进行加速试验，但调取该品种 2016～2019 年的省级抽检数据，分析发现其杂质含量与其放置时间并无相关性，提示企业 7 和 9 产品中杂质 B 虽初始含量较高，但后期无明显增长。企业 2、3 杂质总和在加速后明显

增长，或与其处方组成有关。调研发现，与原研企业相比，企业 2、3 处方中均未加入葡甲胺，而代之以依地酸二钠。据文献报道[19-20]，葡甲胺不仅是 pH 调节剂与增溶剂，也可用作还原剂。而依地酸二钠则通过螯合催化自氧化反应的金属离子发挥抗氧剂增效剂的作用。提示上述厂家制剂稳定性存在缺陷，需进一步优化处方。目前，该品种已通过一致性评价的产品均已调整处方与原研一致。此外，原研产品在西林瓶中还充入氮气[3]，而国产品种均无此工艺描述，若终产品真空度未控制好，很容易影响制剂的稳定性[21]。同时，原研产品使用了内径较大的西林瓶，在氮气保护下能明显缩短冻干时间并获得良好冻干效果；国产品种的西林瓶内径均小于原研产品，在装量较高、液层较厚的情况下会明显延长冻干时间，而溶液状态的兰索拉唑更易降解。最后，文献报道[22]，兰索拉唑本身对湿度不敏感，但在高温及光照条件下，湿度可加速其降解，应注意控制成品水分。综上，上述处方和工艺因素解释了为何厂家也是影响杂质含量的主要因素。

历年来的国家药品抽检，通过精心选择抽检品种，科学规划抽检方案，积累了大量数据[23]。目前，该项工作主要集中于某一品种当年各项检验数据的分析，而对历史数据的回顾及对比研究较少。随着大数据、机器学习等信息技术的迅猛发展，多样高效的分析工具不断涌现，从而为进一步挖掘过往检验数据中蕴含的质量信息提供了可能。本文基于 2016 年国家药品抽检历史数据，以有关物质为切入点，通过运用分析工具及数据可视化技术[14]，尝试对影响产品质量的处方和工艺因素进行探讨，可为药品抽检数据的挖掘和综合利用提供参考。

参考文献

1.陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药物学[M]. 第 18 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 546.

2.FANG Y,WANG GZ,2 ZHANG R,et al. Eudragit L/HPMCAS Blend Enteric-Coated Lansoprazole Pellets: EnhancedDrug Stability and Oral Bioavailability[J]. AAPS Pharm Sci Tech,2014,15(3):513

3. 武田テバ薬品株式会社. タケプロン静注用 30mg_IF[EB/OL].(2019-05)[2023-07-17]https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch

4.中国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020:286

5.BP 2023.Vol II[S].2023:83

6.JP ⅩⅤⅢ[S]. 2021:1241-1244

7.EP 11.2[S].2023:3204

8.USP-NF 2023. Lansoprazole[DB/OL].(2021-07-01)[2023-07-29]https://doi.org/10.31003/ USPNF_M44344_03_01

9.USP-NF 2023. Lansoprazole Delayed-Release Capsules[DB/OL].(2022-10-01)[2023-07-29]https://doi.org/10.31003/USPNF_M44347_07_01

10.张晓睿,何仲贵. HPLC 法测定兰索拉唑肠溶片中 13 种有关物质[J]. 沈阳药科大学学报, 2020,37 (07):603-610

11.曾垂宇, 杨启家, 隋杨. HPLC 法测定右兰索拉唑缓释胶囊的含量及其有关物质[J]. 中国新药杂志,2018,27(06):724-728

12.张余霞, 谭定渊, 史朝晖. HPLC 法对注射用右兰索拉唑中有关物质的测定[J]. 中国合理用药探索, 2021,18(8):106-111

13.赵建辉，马壹文，李士桥, 等. 在线固相萃取-高效液相色谱法测定兰索拉唑中 7 种氮氧化物基因毒性杂质[J].中国医药工业杂志, 2022, 53(1) :101-107

14.赵瑜，胡昌勤，姚尚辰，等. 多变量数据分析方法在抗生素注射剂工艺评价中的应用[J]. 中国新药杂志, 2020,29(12):1355-1362

15.中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015:235-236

16.BONCIARELLI S, DESANTIS J, GORACCI L, et al.Automatic Identification of Lansoprazole Degradants under Stress Conditions by LC-HRMS with MassChemSite and WebChembase[J]. J Chem Inf Model, 2021, 61(6):2706-2719

17.薛薇, 陈欢歌. 基于 Clementine 的数据挖掘[M].北京：中国人民大学出版社, 2012：24,184, 238

18.国家药品监督管理局.全国药品抽检[DB/OL].(2023-07-17)[2023-07-17]https://www.nmpa. gov.cn/datasearch/search-result.html

19.RC 罗，PJ 舍斯基，PJ 韦勒. 药用辅料手册[M]. 第四版. 北京:化学工业出版社,2005:261,440

20.United States Environmental Protection Agency. 2020 CDR data[EB/OL].(2023-01-26)[2023-07-17] https://www.epa.gov/chemical-data-reporting/access-cdr-data#2020

21.刘善萍. 利用充氮法提升注射用氨苄西林钠(冻干法)的质量[J].生物技术世界, 2015(05):102

22.国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部注释(2015 年版)[M].北京:中国医药科技出版社,2019:1633-1635

23.刘文, 王翀, 冯磊, 等. 基于国家药品抽检的药品标准提高分析[J]. 中国药业, 2022,31(9):26-30

表 2 注射用兰索拉唑有关物质法定检验与探索性研究结果对比表

Tab. 2 Comparison of related substance of lansoprazole for injection obtained with legal standards and exploratory studies

生产企业	批号	杂质个数		A		B		C		D		E		其他单杂		总杂	
		非标	法检	非标	法检	非标	法检	非标	法检	非标	法检	非标	法检	非标	法检	非标	法检
企业 1	H470	11	/[a]	ND[b]	/	0.13%	/	0.007%	/	0.004%	/	0.005%	/	0.04%	/	0.20%	/
企业 2	1603091011	7	6	ND	/	0.12%	/	0.005%	/	ND	/	0.007%	/	0.04%	0.10%	0.30%	0.30%
企业 3	20160601	10	8	ND	/	0.08%	0.20%	0.03%	/	0.009%	/	0.006%	/	0.07%	0.05%	0.30%	0.30%
企业 3	20151204	12	8	ND	/	0.08%	0.20%	0.02%	/	0.006%	/	0.01%	/	0.07%	0.05%	0.40%	0.40%
企业 3	20160501	11	8	ND	/	0.08%	0.20%	0.02%	/	0.005%	/	0.01%	/	0.06%	0.05%	0.40%	0.40%
企业 3	20150504	10	7	ND	/	0.08%	0.20%	0.01%	/	0.01%	/	0.01%	/	0.03%	0.03%	0.30%	0.30%
企业 4	B1607022	8	2	ND	/	0.04%	/	0.04%	/	0.004%	/	0.006%	/	0.01%	0.04%	0.12%	0.05%
企业 4	F1605082	10	4	ND	/	0.04%	/	0.02%	/	0.004%	/	ND	/	0.02%	0.04%	0.10%	0.10%
企业 4	B1604082	6	4	ND	/	0.03%	/	0.003%	/	0.004%	/	0.003%	/	0.02%	0.04%	0.10%	0.10%
企业 4	F1606012	10	4	ND	/	0.04%	/	0.02%	/	0.005%	/	0.005%	/	0.03%	0.03%	0.20%	0.10%
企业 5	151210103	7	7	ND	ND	0.13%	0.10%	0.006%	ND	0.005%	ND	0.003%	0.003%	0.05%	0.04%	0.20%	0.20%
企业 5	160410104	9	9	ND	ND	0.13%	0.10%	0.02%	ND	0.004%	0.002%	0.01%	0.005%	0.05%	0.03%	0.22%	0.20%

企业 6	11951117	13	5	0.02%	0.02%	0.13 %	0.10 %	0.005 %	0.01%	0.005 %	/	0.005 %	/	0.03 %	0.03%	0.30 %	0.20 %
企业 6	11851122	10	5	0.02%	0.02%	0.07 %	0.10 %	0.10%	0.01%	0.013 %	/	0.05%	/	0.03 %	0.03%	0.30 %	0.20 %
企业 6	11951123	11	5	0.02%	0.02%	0.13 %	0.10 %	0.01%	0.004 %	ND	/	0.009 %	/	0.03 %	0.03%	0.25 %	0.20 %
企业 6	11951119	8	5	0.02%	0.02%	0.13 %	0.10 %	0.006 %	0.01%	ND	/	0.01%	/	0.03 %	0.03%	0.22 %	0.20 %
企业 6	11851120	9	6	0.02%	0.02%	0.13 %	0.10 %	0.01%	0.01%	0.006 %	/	0.007 %	/	0.03 %	0.03%	0.23 %	0.20 %
企业 7	20160507	10	6	ND	ND	0.13 %	0.10 %	0.004 %	ND	0.006 %	0.003 %	0.002 %	0.005 %	0.01 %	0.02%	0.20 %	0.20 %
企业 7	20160111	12	8	0.02%	ND	0.26 %	0.30 %	0.006 %	ND	0.009 %	0.005 %	0.006 %	0.006 %	0.04 %	0.04%	0.38 %	0.40 %
企业 7	20160102	11	10	0.02%	ND	0.21 %	0.20 %	0.006 %	ND	0.008 %	0.004 %	0.005 %	0.008 %	0.04 %	0.05%	0.30 %	0.30 %
企业 7	20160507	12	6	0.01%	ND	0.24 %	0.20 %	0.009 %	ND	0.013 %	ND	0.006 %	0.003 %	0.06 %	0.07%	0.35 %	0.30 %
企业 8	4160307	9	8	ND	ND	0.08 %	0.06 %	0.03%	ND	ND	ND	0.006 %	0.004 %	0.02 %	0.09%	0.20 %	0.20 %
企业 8	3151104	12	12	ND	ND	0.0 8%	0.07 %	0.02%	ND	0.004 %	ND	0.01%	0.006 %	0.07 %	0.07%	0.30 %	0.30 %
企业 8	3160303	12	6	ND	ND	0.08 %	0.07 %	0.02%	ND	ND	ND	0.006 %	0.003 %	0.03 %	0.03%	0.23 %	0.10 %
企业 8	4160307	12	7	ND	ND	0.09 %	0.07 %	0.009 %	ND	0.005 %	ND	0.007 %	0.005 %	0.02 %	0.03%	0.20 %	0.10 %
企业 9	20160601	7	7	0.05%	0.05%	0.26 %	0.30 %	ND	0.004 %	ND	0.001 %	0.005 %	0.002 %	0.02 %	0.006 %	0.35 %	0.40 %

企业 9	20160401	7	7	0.06%	0.05%	0.26 %	0.20 %	ND	0.002 %	ND	0.001 %	0.002 %	0.002 %	0.02 %	0.01%	0.40 %	0.30 %
企业 10	516045252	11	10	ND	/	0.05 %	/	0.10%	/	0.008 %	/	0.004 %	/	0.02 %	0.05%	0.29 %	0.10 %
企业 10	515105154	12	10	ND	/	0.07 %	/	ND	/	0.009 %	/	0.005 %	/	0.06 %	0.10%	0.20 %	0.30 %
企业 10	516045243	12	11	ND	/	0.05 %	/	0.02%	/	0.006 %	/	0.005 %	/	0.04 %	0.05%	0.20 %	0.10 %
企业 10	516045273	10	9	ND	/	0.05 %	/	0.03%	/	0.008 %	/	0.03%	/	0.03 %	0.04%	0.20 %	0.10 %
企业 11	13151108	12	11	0.007%	0.003 %	0.04 %	0.04 %	0.02%	0.006 %	0.005 %	/	0.007 %	/	0.02 %	0.02%	0.14 %	0.10 %
企业 11	13160504	7	9	ND	ND	0.07 %	0.06 %	0.009 %	0.007 %	ND	/	0.003 %	/	0.01 %	0.02%	0.10 %	0.10 %
企业 11	13160501	11	11	0.008%	0.002 %	0.04 %	0.03 %	0.01%	0.01%	0.003 %	/	0.003 %	/	0.01 %	0.02%	0.11 %	0.10 %
企业 11	13160514	8	9	ND	0.004 %	0.05 %	0.05 %	0.01%	0.01%	0.004 %	/	0.003 %	/	0.03 %	0.04%	0.11 %	0.20 %
企业 12	160304-8	7	6	0.01%	/	0.11 %	/	0.03%	/	0.006 %	/	0.004 %	/	0.05 %	0.20%	0.23 %	0.30 %
企业 12	160703-3	8	6	ND	/	0.08 %	/	0.01%	/	0.006 %	/	0.005 %	/	0.03 %	0.05%	0.15 %	0.10 %
企业 12	160703-5	12	9	ND	/	0.07 %	/	0.01%	/	0.003 %	/	0.02%	/	0.03 %	0.05%	0.17 %	0.10 %

a: 质量标准中未规定该杂质限度

b:该杂质未检出

临床药师在单病种付费实施中的作用

曹晶晶

（1. 河南省人民医院药学部，郑州大学人民医院，郑州，450003；2. 郑州大学药学院，河南，郑州，450001）

【摘要】目的：探讨临床药师在单病种付费实施过程中的作用。方法：结合心血管内科实际案例，探讨单病种付费这一形势下临床药师的工作模式。结果：在单病种付费的实施过程中，临床药师的参与有重要的意义。结论：单病种付费即将在我国日益推广，临床药师应积极参与到其过程中，通过开展药事服务，使临床药师成为实施单病种付费不可替代的重要组成部分。

【关键词】单病种付费；临床药师；心血管内科

2017 年，我省政府办公厅印发《关于进一步深化基本医疗保险支付方式改革的实施意见》（以下简称《意见》），进一步改革基本医疗保险支付方式。《意见》提出，全面推行以按病种付费为主的多元复合式医保支付方式。完善按人头、按床日等多种付费方式，开展按疾病诊断相关分组（DRGs）付费等试点。 2018 年，人社部网站发布《人力资源和社会保障部办公厅关于发布医疗保险按病种付费病种推荐目录的通知》（简称《通知》），并推荐性公布《医疗保险按病种付费病种推荐目录》（简称《目录》），《通知》提出，要在加强医保基金预算管理基础上，全面推行以按病种付费为主的多元复合式医保支付方式，提高按病种付费的覆盖面。 在此形势下，进行医保支付方式的改革就是解决公立医院医疗费用的不合理增长，减轻患者医药费用的方法之一，而建立以按病种付费的医保支付方式也因此顺应而生。在此背景下，本文以心血管内科实际案例作参考，探讨临床药师在单病种付费这一医疗模式的转变下，如何开展药事服务，为患者提供安全、有效的药学服务，切实降低患者医药负担。

1、单病种付费方式的定义

单病种付费是指通过统一的疾病诊断分类，科学地制定出每一种疾病的定额偿付标准，社保机构按照该标准与住院人次向定点医疗机构支付住院费用，而医疗机构的收入仅与每个病例及其诊断有关，而与医疗机构治疗该病例所花费的实际成本无关，从而使得医疗资源利用标准化[1]。

2、国内外单病种付费方式的发展

最早出现单病种付费的是哈尔滨医科大学附属第一医院，他们在 80 年代初期对普外科 20 种常见病的各个环节都确定了相对应的收费标准，运用经济学理论使得这 20 种常见病都有“有效治疗平均住院费用标准”。相关部门分别在 1992、2004、2011、2012、2016、2017 以及 2018 年分别出台了按病种收费的相关通知，通知中均指出在全国各地推行以按病种付费为主的多元复合式医保支付方式，鼓励实施按病种付费[2-4]。

单病种付费发源于美国，始于 1983 年，现在已在世界很多国家发展为分类定额预付（DRGs）。最初，DRGs 作为医院管理者与医疗保险有效的沟通工具仅用于住院患者，而随着时代的发展，美国又将 DRGs 扩展到门诊患者[5-7]，这也使得病人有了公平付费的方法。澳大利亚和韩国于 20 世纪 90 年代初应用 DRGs，而在欧洲各国 DRGs 系统差异很大，也因此应用了了不同的路径实现了不同的 DRGs 系统[8]。

3、临床药师在实施单病种付费形势下的作用

3.1 做好参与的准备

临床药师首先要参与到单病种的制定中，并做好参与的准备。例如，在我院心血管内科开展了急性 ST 段抬高型心肌梗死、不稳定型心绞痛等 14 个单病种。针对这 14 个单病种，临床药师首先要查阅国内外的指南及最新文献，对 14 个单病种的入选标准、诊断依据、药物治疗方案等充分了解。而针对单病种中常用药品的适应症、用法用量、给药疗程、不良反应等进行定期培训，以便让临床药师参与到单病种给药方案的制定、药学监护、药物应用评价、用药教育等一系列药学服务。

对于诊断为非 ST 段抬高型心肌梗死、急性 ST 段抬高型心肌梗死、不稳定型心绞痛的患者，国内外指南建议一入院就给予抗凝治疗，而在临床中发现，大多患者是在冠脉支架植入术（PCI）术后才开始应用。针对这一问题，临床药师进行文献和循证查证，建议将抗凝治疗纳入此三种疾病的初始治疗方案中。

3.2 参与单病种付费的的实施

临床药师可通过以下方式建立与单病种相匹配的药学监护路径，从而有效规范单病种治疗过程中药品的使用。

3.2.1 前置审方系统

首先应用前置审方系统，医嘱开立后，审方系统即刻审查药物相互作用、药物的配伍禁忌、给药剂量、给药途径、肝肾损害的用药剂量、过敏史、药物禁忌症、特殊人群等。审查结果实时传到审方中心工作站，问题医嘱人工审核，对不合理医嘱进行拦截，并将存在问题实时反馈给医生，医生及时对问题医嘱进行修改或双签填写用药理由，药师再次进行复核，如果合理给予通过，若仍存在问题，药师会再次跟医师沟通，循环上述审查流程，直至医嘱修改合理，减少单病种中不合理用药现象的发生。

如心内科医嘱，注射用磷酸肌酸钠 2g/bid，审方系统预判为单次剂量偏大，临床药师及时查看患者病例及医嘱信息，发现此例可加入高血压这一单病种，药师及时与临床医生沟通，查阅指南、文献查看注射用磷酸肌酸钠是否为高血压的必须用药，并告知医师注射用磷酸肌酸钠 2g/bid，单次剂量偏大，单次剂量应为 1g。

3.2.2 药物重整

在单病种付费的大形式下，临床药师参与负责病区的药物重整可以避免药疗偏差，保障用药安全，确保患者得到多有必须的药物，没有误用不需要的药物，节约医疗成本[9-12]。

如心内科的冠心病患者通常合并多种基础疾病，治疗用药复杂，在患者医疗交接（如入院、转科或出院）的过程中，由于治疗方式的改变，往往产生用药差错。所以临床药师在入院时收集患者用药史，获取患者完整用药清单，并于入院医嘱对比；在患者住院期间，审核医嘱，识别用药差错，并优化治疗方案；患者出院时整理患者用药清单，并及时进行出院用药教育。

如患者男，56 岁，诊断为冠心病 不稳定型冠心病、高血压 3 级 很高危。既往用药史为阿司匹林肠溶片 100mg qd po，硫酸氢氯吡格雷片 75mg qd po，阿托伐他汀钙片 10mg qn po，硝苯地平控释片 30mg qd po，住院时药物治疗方案为阿司匹林肠溶片 100mg qd po，硫酸氢氯吡格雷片 75mg qd po，美托洛尔缓释片 23.75mg qd po，单硝酸异山梨酯注射液 20mg 静脉泵入，硝苯地平控释片 30mg qd po，丹参多酚酸盐针 200mg 静脉滴注。临床药师与医师充分沟通后，根据非 ST 段抬高型急性冠脉综合症诊断和治疗指南[13]和硝酸酯类药物静脉应用建议[14] 将住院药物单硝酸异山梨酯注射液重整为硝酸异山梨酯注射液静脉泵入，加用低分子肝素钙 4000IU Q12 ih,培哚普利片 2mg qd po，将硝苯地平控释片 30mg qd po 调整为硝苯地平缓释片 10mg bid po，因患者自诉曾用丹参多酚酸针发生皮肤瘙痒、红疹的现象，故建议停用丹参多酚酸盐针。其他药物继续应用。患者出院诊断为冠心病 不稳定型冠心病 PCI 术后、高血压 3 级 很高危。临床药师与医师协商后将出院药物调整为阿司匹林肠溶片 100mg qd po，硫酸氢氯吡格雷片 75mg qd po，阿托伐他汀钙片 10mg qn po，硝苯地平缓释片 10mg bid po，培哚普利片 2mg qd po，单硝酸异山梨酯片 20mg bid po。医师批准后，又对此患者做出院用药指导。随访：患者病情稳定、血压控制良好。

3.2.3 开展辅助用药点评

目前，辅助用药在临床不合理应用现象较普遍，辅助用药的过度使用不仅易导致药品不良反应发生率增加及机体的损害，而且会加重患者经济负担，造成医疗资源浪费，特别是在单病种付费这种形势下，临床药师可以通过开展辅助用药点评以减少辅助用药的使用，从而降低医疗成本。

如每月应用合理用药监测系统（PASS）抽取心内科排名前 10 的辅助用药，每个药物抽取 10 份病历进行点评分析。统计分析 2018 年每月心内科排名前 10 的辅助用药，发现存在问题如下：注射用红花黄色素单次用量为 200mg，剂量偏大；银杏二萜内酯葡胺注射液选用 5%葡萄糖注射液，溶媒不适宜；前列地尔注射液用于冠心病患者，超适应症用药；脑苷肌肽注射液和单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液重复用药等。国内外指南和专家共识并无推荐这些辅助用药用于心内科患者，临床药师可将每月辅助用药点评结果反馈给临床医师，并及时与医师进行沟通，在单病种的药物治疗方案中去掉没必要应用的辅助用药，从而减轻患者经济负担。

3.2.4 国家基本药物

国家基本药物（以下简称国基药）是指适应基本医疗卫生需求、剂型适宜、 价格合理、 能够保障供应、

公众可公平获得的药品。而为了加大医疗机构使用有效、价廉的基本药物的比例，切实解决百姓看病难、看病贵问题，卫计委要求三级医疗机构使用国基药的比例不低于 25%，真正降低患者的用药负担。在单病种付费的形势下，临床药师可以向医师提供国基药清单，将其纳入单病种药物治疗方案中，即可以增高国基药的使用比例，又能降低患者的住院费用。

如临床药师每月分析心内科使用量排名靠前的药物，查看有无可替代的国基药，例如，调脂药可选用国基药阿托伐他汀钙片、瑞舒伐他汀钙片，血管紧张素酶抑制剂（ACEI）可选用卡托普利片、依那普利片；血管紧张素受体阻滞剂（ARB）：可选用缬沙坦片、缬沙坦氨氯地平片。

3.3 参与单病种付费的评估

对于入单病种的患者，临床药师要对患者的整个治疗过程进行用药评价。如患者 1，女，65 岁，慢性心力衰竭 心功能 III 级（NYHA 心功能分级），住院 9 天，总药费 4713 元。患者 2，女，59 岁，慢性心力衰竭 心功能 III 级（NYHA 心功能分级），入慢性心力衰竭单病种，共住院 7 天，总药费 3421 元。临床药师评估患者 1 和患者 2 在治疗效果相同的条件下，其住院时间、用药疗程、药品费用等之间的差异，发现如下，1、同种类治疗慢性心力衰竭的药物之间费用的差异；2、医生用药习惯导致的药品费用的差异；3、辅助药品费用的差异。这也提醒着临床药师要运用药物经济学原理将临床用药的经济分析纳入到药学服务中去，考察如何有效利用有限的药物资源，使患者满意以及达到最佳的临床治疗效果，并对药物使用的经济和合理性提出有依据的见解[13-14]。

3.4 参与单病种付费的修正和持续改进

当然，单病种付费存在着很多不足的地方，首先单病种覆盖范围窄，控制费用增长作用有限。如心内科很多病例并不属于单病种，患有心血管疾病的患者大多存在着并发症，患者合并症也比较多；其次，单病种付费可能会降低医疗质量，限制新医疗技术的使用；第三，如果患者涉及转科，那么费用如何计算？第四，单病种付费推行下，会不会导致医生拒绝收治重症患者？所以，对于单病种付费的实际实施过程中，肯定会存在一定的问题，这也就需要我们收集实际案例、查阅文献去修正和改进它。

单病种中各个病种的药物治疗方案也是需要医学知识及医疗技术的发展去完善，临床药师要经常查阅最新国内外指南和专家共识，分析目前药物治疗方案的效果，评价药物的作用和疗效，再运用药物经济学原理等对单病种的药物治疗方案提出改进意见[15-16]。

4、临床药师参与单病种付费的思考

目前我国医疗费用不合理增长的问题仍然比较普遍，在这种形势下，单病种付费这一医保付费方式的改革即将作为一种全新的医疗模式应用于临床，其意义重大。实施单病种付费的改革方式可以控制医疗费用的不合理增长，避免医疗浪费，促进合理用药，防止药品滥用，切实减轻群众医药费用负担。同时，单病种付费也存在着一定的缺点，它的制定、实施和改进需要多学科的合作，在单病种付费的具体实施过程中，临床药师的参与具有重要的意义，因药物治疗是单病种付费中重要的组成部分，临床药师可以全程参与单病种付费的过程中，开展药事服务，如参与制订给药方案，提供药物重整，药品评价，用药监护以及用药教育等，使自己成为临床医疗团队中的必不可少的成员，发挥自身优势，更好地服务于患者[17-18]。

参考文献

[1] 武平，曹建文．我国现行医疗保险制度下的单病种管理研究[J]．中国卫生资源，2007，10 (1) ：37-38.

[2] 臧素洁，岳彩宾．某院单病种费用控制的实践和探索[J]．中国医疗保险，2018，11(11) ：52-55.

[3] 杨天桂，石应康，莫春梅．单病种管理研究综述[J]．中国卫生质量管理，2010，17(6) ：53-56.

[4] 谭礼萍，赵卉生．国际疾病分类与医疗保险病种付费的关系[J]．中国病案，2009，10(3) ：25-26.

[5] AMERICAN JOURNAL OF NURSING．How DRGs work in a hospital ：issue & answers for provide[J]．Am J Nurs，1983，83(11) ：1608-1609 ，1621.

[6] KNAPP R E．The development of outpatient DRGs[J]．J Ambul Care Manage，1983，6(2) ：1-11.

[7] GOOGE M C．The dilemma of DRGs[J]．Orthop Nurs，1984，3(4) ：48.

[8] NORBERT G．The evolution of diagnosis-related groups(DRGs)：From its beginnings in case-mix and resource use

theory，to its implementation for payment and now for its current utilization for quality within and outside the hospital[J]．Q Manage Health Care，2010，19(1) ：3-16．
[9] 刘治军．国外临床药师药物重整工作简介[J]．药品评价，2012，9(32) ：6-9．
[10] 李义秀，王永龙，章新晶，等．临床药师开展药物重整的药学服务实践[J]．中国医院药学杂志，2016，36(12) ：1028-1031．
[11] Sen S ，Siemiano wski L，Murohy M，*et al*．Implementation of a pharmacy technician-centered medication reconciliation program at an urban teaching medical center[J]．Am J Health-sysph，2014，71(1) ：51-56．
[12] Magalhaes GF ，Santos GN，Roses MB，*et al*．Medication reconciliation in patients hospitalized in a cardiology unit[J]．Plos One，2014，9(12) ：0115491．
[13] 中华医学会心血管病学分会，中华心血管病杂志编辑委员会．非 ST 段抬高型急性冠脉综合症诊断与治疗指南[J]．中华心血管病杂志，2017，45（5）359-376．
[14] 杨艳敏，方全，王斌，等．硝酸酯类药物静脉应用建议，中华内科杂志，2014，53（1）74-78．
[15] 孟莉，唐静，孙登昆，等．医院药师参与临床路径工作的体会[J]．中国药房，2012，23(182) ：1644-1645．
[16] 褚燕琦，王育琴，程红勤，等．以临床药师为核心的病房药房药学服务新模式探讨[J]．药物流行病学杂志，2010，19(9) ：507．
[17] 曾波涛，许婷婷，陈晓阳，等．临床路径在单病种质量和费用管理中的应用[J]．中国医院管理，2006，26(7) ：40-42．
[18] 武广华，郑红，刘国祥，等．论临床路径在医院实施“单病种限价”中的作用[J]．中国医院管理，2007，27(9) ：21-22．
[19] 刁继红，金英顺．临床路径实践与全程化药学服务[J]．中国药学杂志，2005，4(40) ：637-638．
[20] 王志宏，张亚同，邵宏．临床药师在临床路径中的作用[J]．中国药事，2007，21(12) ：1018-1022．

GC-MS-MS 法测定甲磺酸帕珠沙星中 3 种基因毒性杂质

陈鸿玉[1]，韩海燕[1*]，李昌亮[1]，王晓菲[1]，李帅[1]，李钰鑫[1]，王皖[1]，刘雁鸣[1]

（1 湖南省药品检验检测研究院，湖南省药品质量评价工程技术研究中心，国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，湖南 长沙 410001）

【摘要】目的：建立甲磺酸帕珠沙星中 3 种甲磺酸类遗传毒性杂质（甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯）的含量，确保甲磺酸帕珠沙星的质量安全。**方法：**采用气相色谱-三重四极杆质谱联用法（GC-MS-MS 法）测定甲磺酸帕珠沙星中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯的含量，色谱柱为 HP-1MS （0.250mm ×30m, 膜厚 0.50μm），质谱采用正离子 MRM 扫描方式。**结果：**3 种成分在 50ng·mL^{-1} ~ 1000ng·mL^{-1} 范围内线性关系良好，高、中、低回收率在 75.35% ~ 106.73 %之间，RSD 均小于 10.0%。用建立的方法测定了 2 家企业共 9 批甲磺酸帕珠沙星样品，所有企业样品均未检出。**结论：**所建立的方法经方法学验证，该方法专属性强，可用于甲磺酸帕珠沙星中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯的含量测定，为甲磺酸帕珠沙星的质量控制及标准研究提供参考。

【关键词】甲磺酸帕珠沙星；甲磺酸甲酯；甲磺酸乙酯；甲磺酸异丙酯；遗传毒性；遗传毒性杂质；GC-MS-MS 法；含量测定

Determination of 3 Genotoxic Impurities in Pazufloxacin Mesylate by GC-MS-MS

Chen Hongyu[1], Hang Haiyan[1*], Li Changliang[1] , Wang Xiaofei[1], Li Shuai[1], Li Yuxin[1] , Wang Wan[1], Liu Yanming[1]

（1.Hunan Institute for Drug Control, Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation,Key Laboratory of pharmaceutical excipients engineering technology of State Drug Administration, Hunan Changsha 410001, China）

【Abstract】OBJECTIVE：To establish the content of three methanesulfonic acid genotoxic impurities （methyl mesylate, ethyl mesylate and isopropyl mesylate） in pazufloxacin mesylate to ensure the quality and safety of pazufloxacin mesylate. **METHODS：**Gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry （GC-MS-MS） was used to determine the content of methyl mesylate, ethyl mesylate and isopropyl mesylate in pazufloxacin mesylate. The column was HP-1MS（0.250mm×30m, Film thickness 0.50μm）, scanning mode is MRM mode. **RESULTS：**The results showed the concentrations of three methanesulfonic acid genotoxic impurities have a good linear relationship in the range from 50ng ·mL^{-1} to 1000ng ·mL^{-1}, high, medium and low recovery rate recovery rate is between 75.35% and 106.73% , the RSD is less than 10.0%. Nine batches of pazufloxacin mesylate samples from two companies detected NDMA by the established method , and none of the samples were detected.**CONCLUSION：**The established method has strong specificity and can be used for the determination of methyl mesylate, ethyl mesylate and isopropyl mesylate in pazufloxacin mesylate. It can provide reference for the quality control and standard improvement of pazufloxacin mesylate.

基金项目：湖南科药联合基金（2021JJ80003）

作者简介：陈鸿玉，女，硕士，湖南省药品检验检测研究院，副主任药师，主要从事药物分析与质量标准研究，E-mail：649409690@qq.com

*通讯作者：韩海燕

【Key words】pazufloxacin mesylate; methyl mesylate; ethyl mesylate; isopropyl mesylate ; Genotoxicity ; Genotoxic impurities ; GC-MS-MS ; content determination

甲磺酸帕珠沙星是新型注射用氟喹诺酮类抗菌剂，具有广谱、高效、低毒及交叉耐药性弱的特点，且血药浓度高，组织分布好，中枢神经系统作用弱，副作用低，对轻至重度呼吸系统感染、尿路感染、肝胆系统感染、创伤及术后感染均有较好疗效，是喹诺酮类抗生素注射给药的理想替代品[1-4]。甲磺酸与低级醇（甲醇、乙醇和异丙醇等）易生成磺酸酯类物质如甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯等，磺酸酯类物质可与 DNA 发生烷基化反应，可能引发癌症，属于基因毒性杂质[5-7]。在甲磺酸帕珠沙星合成工艺中其成盐后需要在乙醇中重结晶，乙醇试剂中残留甲醇，故存在乙醇、甲醇与游离甲磺酸生成甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯的风险[8-9]。根据 2020 版《中华人民共和国药典》中“遗传毒性杂质控制指导原则”以及美国食品药品监督管理局（FDA）指南草案和欧洲医药评价署（EMEA）要求，必须对药物或药品中任何可能存在或未在早期合成步骤中予以清除的所有基因毒性杂质进行监测[10]。

多数文献报道采用衍生化法测定甲磺酸烷基脂类方法，容易出现检测灵敏度低、衍生方法操作复杂且易残留干扰测定的问题[11-14]。本方法采用具备灵敏度高、准确性和特异性强等优势的多反应监测（MRM）模式监测，能够降低药物基体效应对待测成分的干扰，从而保证检测方法灵敏度高、专属性强，达到了在微量水平上准确检测甲磺酸酯类杂质的要求，为保障用药安全提供技术参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

GC-MS-MS 8890-7010B 三重四极杆气质联用仪（安捷伦）；电子分析天平为 METTLER TOLEDO XP205、METTLER TOLEDO XSE205DU；甲磺酸帕珠沙星共 8 批，来源于 2 家生产企业，生产企业分别为湖南华纳大药厂手性药物有限公司（批号为 SI002012110004、SA00101220803、211101、211102、211103）和九典宏阳制药有限公司（批号为 T202105R01、T202105R02、T202105R03）；甲磺酸甲酯（来源为 MACKU，批号为 C12932845，纯度为 99%）、甲磺酸乙酯（来源为 MACKU，批号为 C12932845，纯度为 99%）、甲磺酸异丙酯（来源为 MACKU，批号为 C12932845，纯度为 99%）；水为超纯水；二氯甲烷为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 GC-MS 条件 气相色谱条件：采用 HP-1MS （30m ×0.25mm，0.50 μm） 色谱柱，进样口温度为 260℃，隔垫吹扫为 3ml·min^{-1}，分流比为 10:1，淬灭气为 4ml·min^{-1}，碰撞气为 1.5ml·min^{-1}，柱温/程序升温：50 ℃保持 1 分钟，以 15℃升温至 230℃保持 2 分钟，柱流量 1.5ml·min^{-1}，恒流。

质谱条件：传输线温度为 280℃，离子源（EI）为 250℃，电子能量为 70eV，增益因子为 1，选择离子监测为 MRM，质谱 MRM 监测离子信息见表 1。

表 1 质谱 MRM 监测离子信息

Tab.1 Compound Parameters

待测目标物	定量		定性 1		定性 2	
	离子对（m/z）	CE（ev）	离子对（m/z）	CE（ev）	离子对（m/z）	CE（ev）
甲磺酸甲酯	79.5→64.8	9	79.9→64.9	5	109→78.9	3
甲磺酸乙酯	109.0→78.9	3	97.0→78.9	9	97.0→64.9	41
甲磺酸异丙酯	123.0→78.9	7	123.0→59.0	3	97.0→78.9	7

1.2.2 线性范围 精密称取甲磺酸甲酯 20.76mg，甲磺酸乙酯 21.66mg，甲磺酸异丙酯 19.49mg，置于同一 100mL 容量瓶中，用二氯甲烷溶解并稀释刻度，摇匀；精密量取 5ml，置 100ml 量瓶中，加二氯甲烷稀释至刻度，摇匀；精密量取 5ml，置 100ml 量瓶中，加二氯甲烷稀释至刻度，摇匀，作为线性储备液。分别精密量取线性储

备液 0.5ml、1ml、2.5ml、5ml、10ml，分别置 100ml 量瓶中，加二氯甲烷稀释至刻度，作为线性储备液①②③④⑤⑥。精密量取储备液①②③④⑤⑥各 5ml，分别置于分液漏斗中，精密加入 5ml 水，振摇提取，静置使分层，取下层溶液作为线性溶液①②③④⑤⑥。按“1.2.1”项方法测定，以浓度为横坐标、待测组分峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 2。

1.2.3 定量限和检测限 精密量取“1.2.2”项线性范围项下线性溶液⑦适量，逐级稀释后进样分析以信噪比约为 10：1 时的溶液浓度作为定量限溶液，以信噪比约为 3：1 时的溶液浓度作为检测限溶液，结果见表 2。

表 2 线性关系

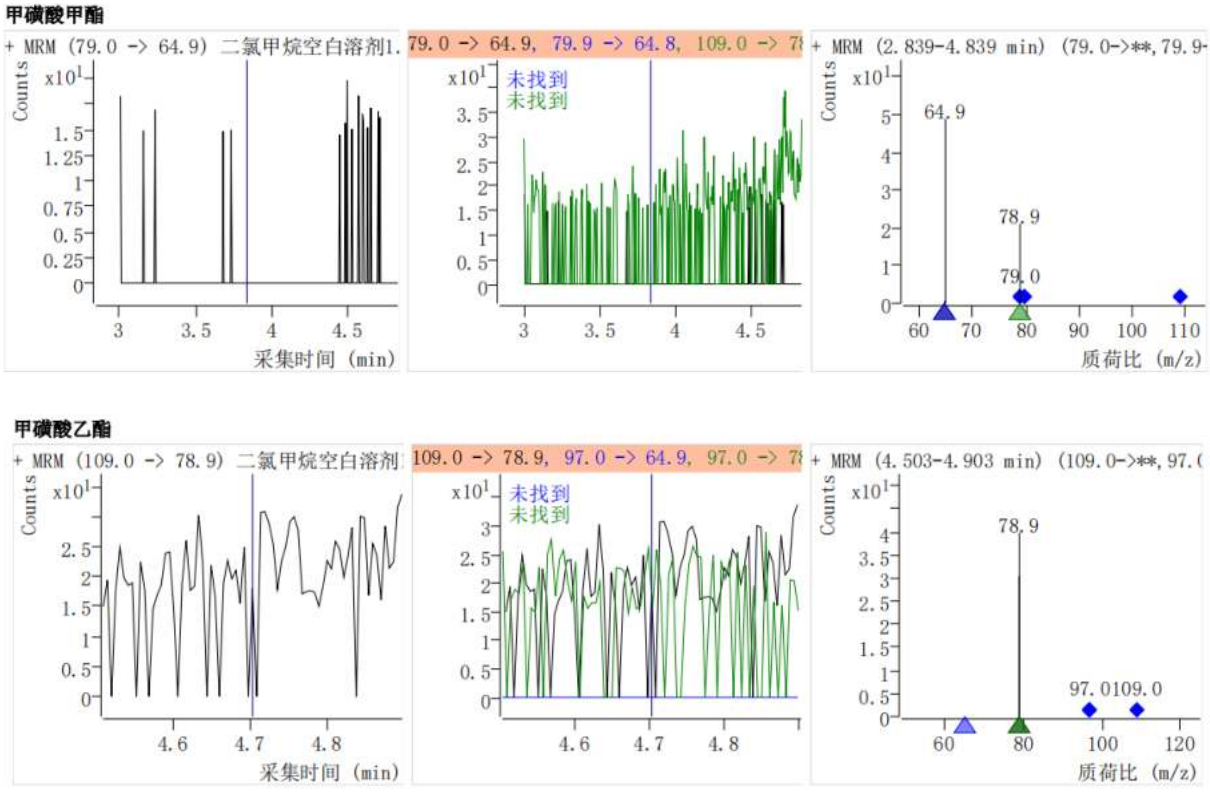
Tab.2 Standard curve data

Name	Linear equation	Correlation coefficient	Linear range/ng·mL^{-1}	Limit of quantitation/ng·mL^{-1}	Detection limit/ng·mL^{-1}
甲磺酸甲酯	Y=22.950X-152.43	0.9985	48.2～964	38.60	12.03
甲磺酸乙酯	Y=920.25X -13359	0.9984	52.1～1042	25.17	9.49
甲磺酸异丙酯	Y=74.342 X -479.90	0.9988	50.3～1006	125.42	30.07

1.2.4 供试品溶液的制备 取本品适量（约 0.25g），精密称定，置于分液漏斗中，精密加入 5ml 水使溶解，精密加入 5ml 二氯甲烷，振摇提取，静置使分层，取下层溶液作为供试品溶液。

1.2.5 对照品溶液的制备 精密量取“1.2.2”项线性范围项下线性溶液③，作为对照品溶液。

1.2.6 专属性试验 精密量取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液分别按“1.2.1”项方法进样测定，记录色谱图，结果表明空白溶剂不干扰待测组分测定，见图 1~图 3。



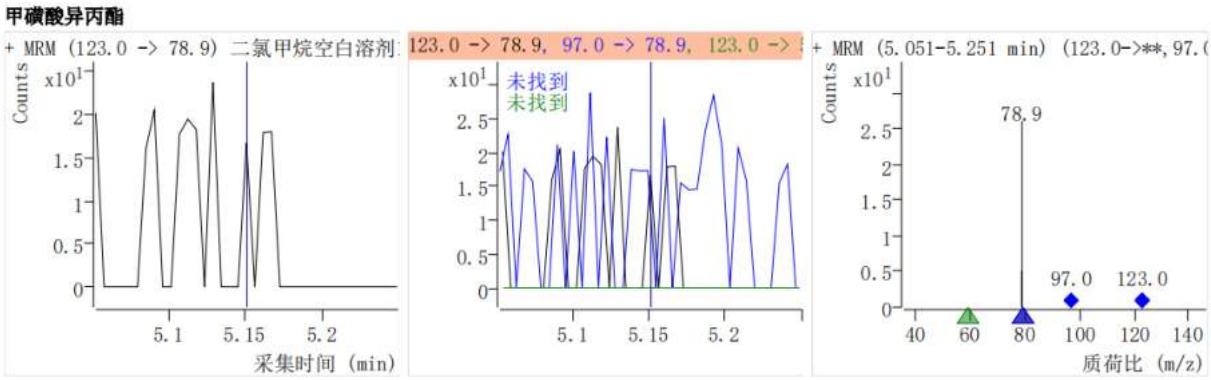


图 1 空白溶液离子提取色谱图

Fig. 1 The ion extraction chromatogram of blank solution

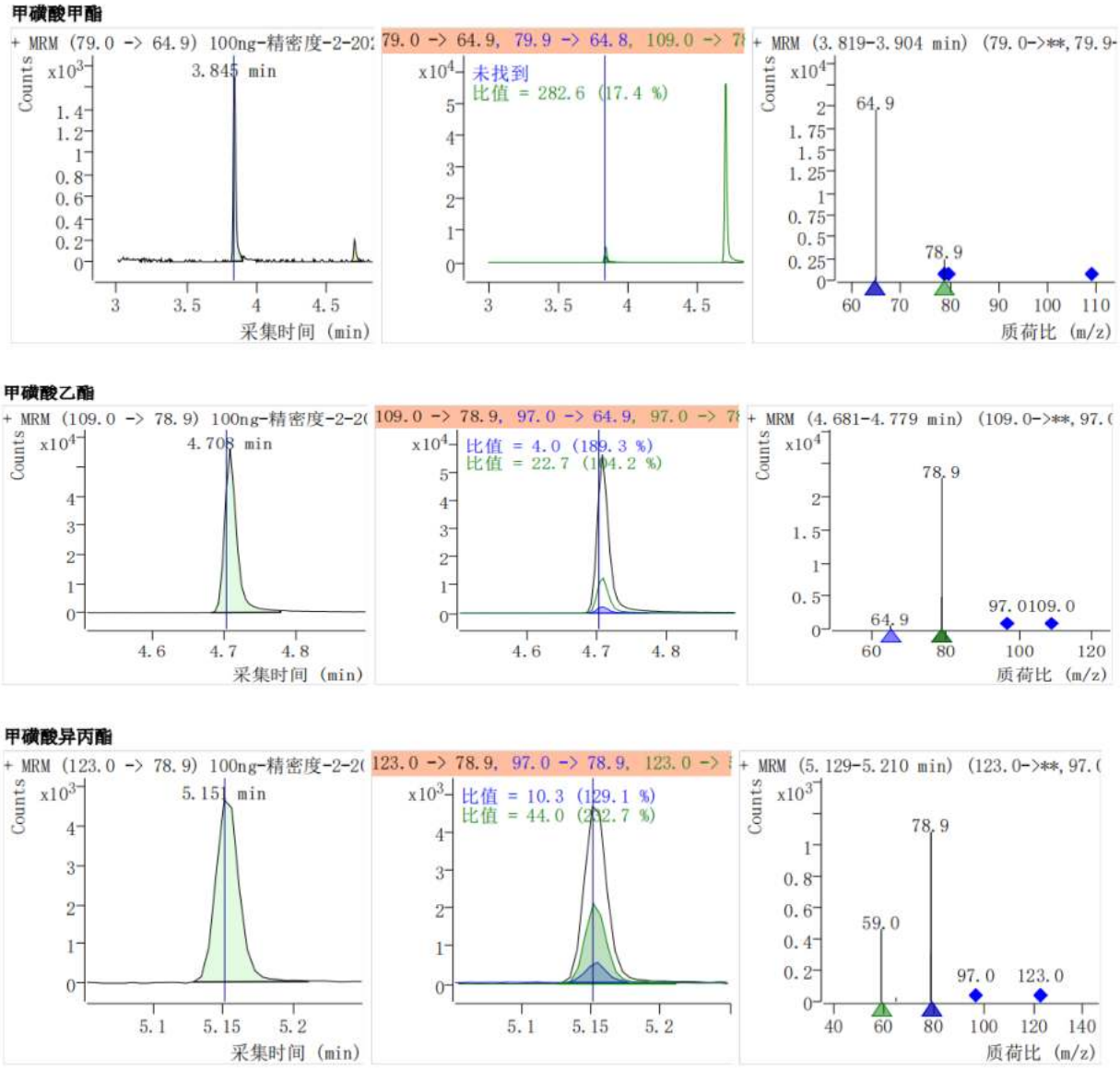


图 2 对照品溶液离子提取色谱图

Fig. 2 The ion extraction chromatogram of control substance solution

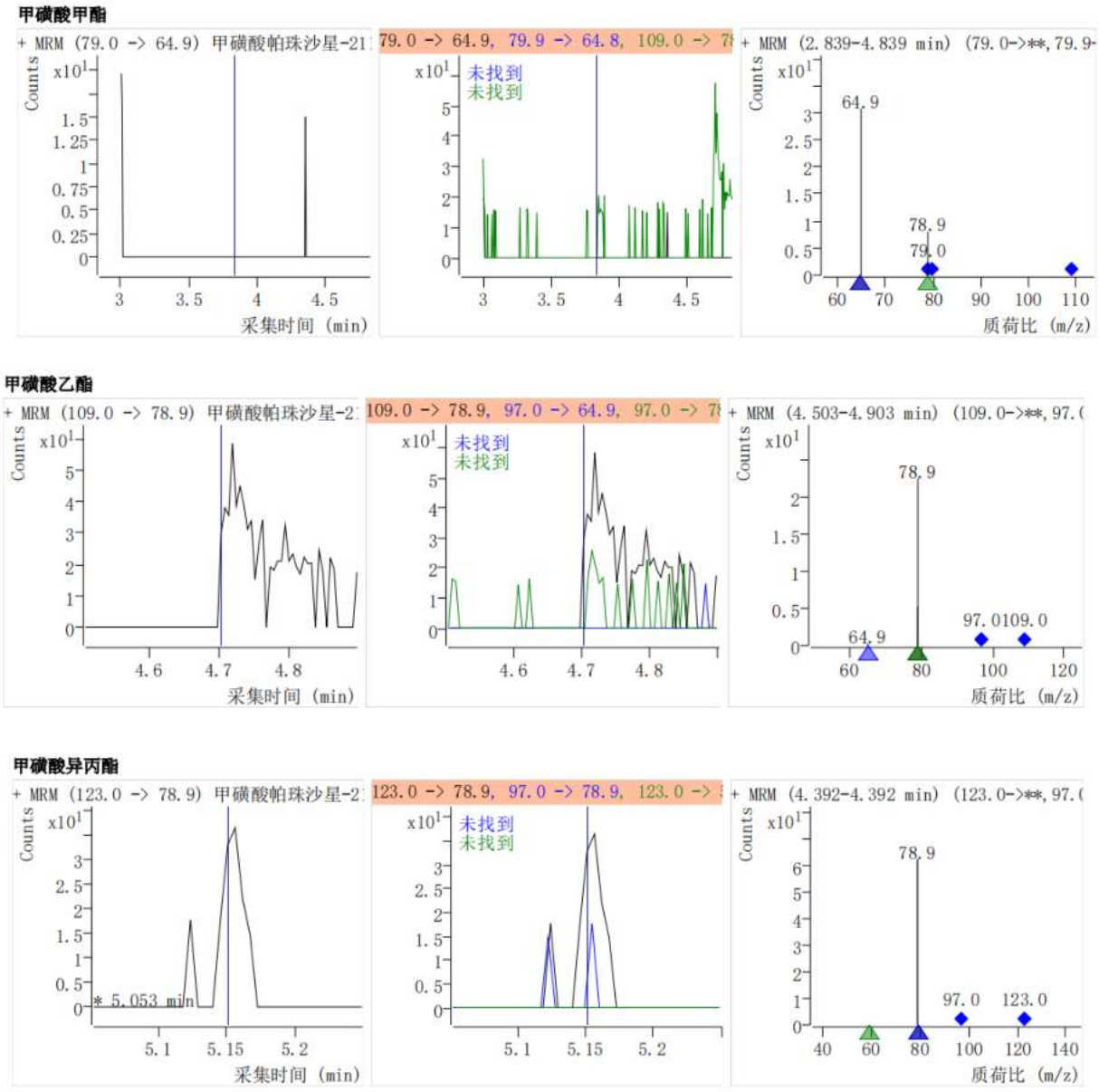


图 3 供试品溶液离子提取色谱图

Fig. 3 The ion extraction chromatogram of sample solution

1.2.7 精密度试验 精密量取“1.2.2”线性范围项下线性溶液③，按“1.2.1”项方法测定，连续进样 5 针，甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯响应值 RSD 分别为 7.63%、7.33%、8.24%；RSD 均小于 10%，表明该方法精密度良好。

1.2.8 稳定性试验 精密量取“1.2.2”线性范围项下线性溶液③，在室温放置 0 分钟、15 分钟、40 分钟、60 分钟、2.5 小时、5 小时、8 小时、11 小时、24 小时的稳定性，分别在取样时间点，精密量取供试品溶液按“1.2.1”项方法进样测定，记录气相色谱-质谱图。在室温条件下放置 60 分钟甲磺酸异丙酯 RSD 为 6.07%，均小于 10%，结果表明 60 分钟内甲磺酸异丙酯稳定；在室温条件下放置 5 小时，甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯 RSD 分别为 7.39%、9.34%，均小于 10%，结果表明 5 小时内甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯稳定。

1.2.9 重复性试验 按“1.2.4”制备方法平行制备供试品溶液 6 份，分别进样测定，记录色谱图。结果甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯均未检出，结果表明该方法重复性良好。

1.2.10 回收率试验 分别精密称取供试品约 0.25g，精密称定，置于分液漏斗中，精密加入 5ml 水使溶解，分别

精密量取“1.2.2”项线性范围项下线性溶液①、线性溶液②和线性溶液③各 5ml，振摇提取，静置使分层，取下层溶液分别作为低、中、高浓度供试品溶液。每个浓度平行配制 3 份。分别进样测定，记录色谱图，结果表明回收率均在 75%~110%，该方法准确可靠，详见表 3。

表 3 回收率试验结果

Tab.3 Results of recovery rate

Name	category	Weigh/g	Added/ng	Detected/ng	Recovery（%）	Average recovery/%	RSD/%
甲磺酸甲酯		0.2536	241.18	221.11	91.67		7.72
	低浓度	0.2532	241.18	257.43	106.73	100.20	
		0.2465	241.18	246.54	102.22		
		0.2549	482.37	463.77	96.14		
	中浓度	0.2487	482.37	457.23	94.78	94.04	2.71
		0.2514	482.37	440.04	91.22		
		0.2546	1205.94	971.63	80.57		
	高浓度	0.2487	1205.94	965.57	80.06	84.20	8.00
		0.2571	1205.94	1109.19	91.97		
甲磺酸乙酯		0.2536	260.61	226.81	87.03		8.63
	低浓度	0.2532	260.61	265.83	102.00	96.63	
		0.2465	260.61	262.89	100.87		
		0.2549	521.23	495.12	94.99		
	中浓度	0.2487	521.23	488.55	93.73	94.46	0.70
		0.2514	521.23	493.44	94.66		
		0.2546	1303.08	1033.93	79.34		
	高浓度	0.2487	1303.08	1070.48	82.14	85.15	9.12
		0.2571	1303.08	1224.54	93.97		
甲磺酸异丙酯	低浓度	0.2536	251.71	212.21	84.30	93.95	9.48
		0.2532	251.71	240.93	95.71		
		0.2465	251.71	256.37	101.85		
		0.2549	503.43	472.94	93.94		
	中浓度	0.2487	503.43	445.81	88.55	91.12	2.97
		0.2514	503.43	457.6	90.89		
		0.2546	1258.57	948.37	75.35		
	高浓度	0.2487	1258.57	968.97	76.98	79.96	8.29
		0.2571	1258.57	1101.96	87.55		

1.2.11 样品测定　采用本方法测定了来自 2 家企业，8 批次甲磺酸帕珠沙星原料均未检出甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯成分。

2 讨论

2.1 色谱柱优化　通过对 3 根不同极性填料的毛细管色谱柱进行色谱柱优化，色谱柱分别是色谱柱①VF-WAXms（30m×0.25mm，1μm）；色谱柱②HP-5M（30m×0.25mm，1μm）、色谱柱③HP-1MS（30m ×0.25mm，0.50 μm）。试验结果表明色谱柱①和色谱柱②分离效果差，色谱柱③能实现甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯较好

分离，且溶剂峰不会干扰待测成分的测定，最终选择色谱柱③。

2.2 溶剂选择 甲磺酸帕珠沙星为水溶性，而甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯水溶性较差，考察了乙酯、环已烷、二氯甲烷和三氯甲烷共 4 种溶剂进行萃取，甲磺酸乙酯和环已烷均对甲磺酸甲酯测定有干扰，且色谱峰前后噪声较大，可选择二氯甲烷和三氯甲烷为溶剂，考虑三氯甲烷毒性较大，故最终选择微溶于水，与酯类互溶，沸点适宜的二氯甲烷作为萃取溶剂。

2.3 质谱定量离子的确定 本试验采用 MRM 监测模式进行测定，在确定定性和定量离子对过程中，主要考虑甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯特征碎片离子均小于 m/z150 且部分碎片离子相同，故本试验采用一个定量离子对和 2 个定性离子能够更准确地测定。

2.4 方法学验证 本研究建立了甲磺酸帕珠沙星 3 种甲磺酸类化合物含量测定方法，专属性好、线性范围宽且线性关系良好，该方法灵敏准确可靠，操作简单，可以较好地满足甲磺酸帕珠沙星生产中遗传毒性杂质 3 种磺酸酯类化合物的检测，帮助企业进行生产工艺控制以及为药监部门进行监管提供参考。

参考文献

[1] 于万大.观察甲磺酸帕珠沙星配合常规治疗对绿脓杆菌下呼吸道感染患者的疗效[J].论著·临床论坛,2021,37（23）:68-69.

[2] 楼永军,左丽丽.甲磺酸帕珠沙星滴眼液中抑菌剂含量的考察[J].中国卫生检验杂志,2019,29（2）:166-167.

[3] 胡菁.甲磺酸帕珠沙星治疗非淋菌性宫颈炎合并盆腔炎疗效分析[J].北方药学,
2016,13（1）:27-28.

[4] 陈丽华.甲磺酸帕珠沙星对留置导尿管患者泌尿系统感染的预防作用及其临床护理对策[J].抗感染药学,2015,12（1）:115-116.

[5] 陈忆铃,冯江江,杨海雪,等.GC-MS 法测定甲磺酸中 3 种甲磺酸烷基脂类遗传毒性杂质[J].中国药科大学学报,2020,51（4）:472-478.

[6] 鲁晶晶，冯芳.磺酸酯类基因毒性杂质研究进展[J].广州化工,2019,47（9）:20-22.

[7] 刘雪薇,厉程,韩海云,等.药物中磺酸酯类基因毒性杂质研究进展[J].色谱,2018,
36（10）:952-961.

[8] 易大为,邹宇,赵晓东,等.GC-MS 法测定甲磺酸培氟沙星中甲磺酸酯杂质的研究[J].中国抗生素杂质,2017,42（6）:521-525.

[9] 申绪湘,彭晓春,龚兴浪,等. 抗菌药甲磺酸帕珠沙星的合成[J]. 吉首大学学报（自然科学版）,2009,30（5）:96-100.

[10] 钟振华,陈雨萍,程奇珍,等.GC-MS/MS 法测定注射用盐酸吉西他滨中五种甲磺酸酯类基因毒性杂质[J].药品评价,2022,19（20）:1233-1237.

[11] 裴丽娟,牛春艺,王成慧,等.顶空气相色谱－质谱法测定布南色林原料药中遗传毒性杂质[J].中国医院药学杂质,2019,39（7）:704-707.

[12] 刘小琼,曹永杰,刘春亮,等.气相色谱-质谱法测定沙格列汀中的 3 种甲磺酸酯类杂质[J].中南药学,2022,20（9）:2151-2154.

[13] 王少敏,牛颖,代敏,等.顶空-气相色谱-质谱法同时测定 7 种甲磺酸酯类杂质[J].郑州大学学报（理学版）,2019,51（3）:104-108.

[14] 侯奇伟,梁伟,杜建.衍生气相色谱法测定草酸艾司西酞普兰中甲磺酸烷基酯类[J].广东化工,2020,47（8）:174-175.

HPLC 法测定盐酸雷尼替丁胶囊溶出度

陈鸿玉[1,2,3]，韩海燕[1,2,3*]，袁婧[4]，李帅[1,2,3]，李钰鑫[1,2,3]，李昭[1,2,3]，李昌亮[1,2,3]，黄钢[5]

（1 湖南省药品检验检测研究院，湖南 长沙 410001 ；2 湖南省药品质量评价工程技术研究中心，湖南 长沙 410001；3 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室；4 长沙市食品药品检验所，湖南 长沙 410036；5 岛津企业管理（中国）有限公司广州分公司分析中心 广东 广州 510656）

【摘要】目的：建立盐酸雷尼替丁胶囊溶出度的测定方法。**方法：**采用转篮法，以 pH1.2 盐酸溶液为溶出介质，转速为 50r·min^{-1}。高效液相色谱法（HPLC）测定盐酸雷尼替丁胶囊溶出度，色谱柱为 JADE PAK C_{18}（4.6mm × 250mm，5μm），流动相为 0.1%甲酸的乙腈溶液-5mmol·L^{-1} 甲酸铵溶液（10:90），柱温为 35℃，流速为 1mL·min^{-1}，波长为 314nm。**结果：**雷尼替丁在 27.189 μg·mL^{-1}~203.91μg·mL^{-1} 范围内，线性关系良好（r=0.9998），平均回收率为 100.3%，RSD 为 0.6%（n=9）。测定 13 家企业 158 批次样品，其中 56 批次与参比制剂溶出行为不一致。**结论：**该方法经方法学验证，可用于盐酸雷尼替丁胶囊的溶出度测定，为盐酸雷尼替丁胶囊的质量控制及标准研究提供参考。

【关键词】盐酸雷尼替丁胶囊；高效液相色谱法；溶出度；溶出曲线；参比制剂；转篮法

HPLC determination of dissolution of ranitidine hydrochloride capsules

CHEN Hongyu[1,2,3], HAN Haiyan[1,2,3*], YUANjing[4], LI Shuai[1,2,3], LI Yuxing[1,2,3],LI Zhao[1,2,3], LI Changliang[1,2,3], HUANG Gang[5]

1.Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001,China；2. Hunan Engineering ＆Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation, Changsha 410001,China;3.Key Laboratory of pharmaceutical excipients engineering technology of State Drug Administration, Changsha 410001,China;4.Changsha Institute for Food and Drug Control,Changsha 410036,China; 5.Analytical Applications Center, Shimadzu （China） Co.Ltd. Guangzhou 510656,China）

【Abstract】Objective: To establish a method for determination of dissolution of ranitidine hydrochloride capsules. **Methods:** The basket method was adopted with pH1.2 hydrochloric acid solution as dissolution medium and the rotation speed as 50 r·min^{-1}.The dissolution rate of ranitidine hydrochloride capsules was determined by HPLC.The column is JADE PAK C18 column（4.6×250mm, 5μm）;The mobile phase was consisted of acetonitrile solution of 0.1% formic acid -5mmol·L^{-1} ammonium formate solution（10:90）.The column temperature was at 35℃ and the flow rate was 1mL·min^{-1}. The wavelength was 314nm. **Results:**Ranitidine showed a good linear relationship within the range of 27.189 μg·mL^{-1}-203.91μg·mL^{-1} ,with the average recovery as 100.3% and RSD as 0.6% （n=9）.The established HPLC method was used to determine 158 batches of ranitidine hydrochloride capsules from 13 enterprises. The dissolution behavior of 56 batches of samples was inconsistent with the reference preparation.**Conclusions:**The method has been validated by methodology and is highly specific. It can be used for the dissolution determination of ranitidine hydrochloride capsules , which can provide reference for the quality control and standard research of ranitidine hydrochloride capsules.

【 Keywords 】 ranitidinehy drochloride capsules; hplc; dissolution degree ； dissolution curve;reference preparation;rotating basket method

*基金项目：2022 年国家药品评价性抽验专项（国药监药管[2022]1 号）。

第一作者简介：陈鸿玉，副主任药师; 研究方向：药物分析与质量标准;湖南省药品检验检测研究院。E-mail：649409690@qq.com

*通讯作者简介：韩海燕，药师; 研究方向：药物分析与质量标准。

盐酸雷尼替丁是一种在临床上广泛应用的胃药，为组胺 H_2 受体拮抗剂，可缓解胃酸过多所致的胃痛、胃灼热、反酸等，用于治疗十二指肠溃疡、胃溃疡、反流性食管炎、卓-艾（ Zollinger-Ellison） 综合征及其他高胃酸分泌疾病[1-2]。盐酸雷尼替丁与双黄连口服液联用治疗口腔溃疡，与生长抑素或奥曲肽注射液联用治疗胰腺炎[3-5]。

《中华人民共和国药典》（简《中国药典》称）2020 年版中崩解是指口服固体制剂在规定条件下全部崩解溶散或成碎粒，除不溶性包衣材料或破碎的胶囊壳外，应全部通过筛网。溶出度指活性药物从片剂、胶囊剂或颗粒剂等普通制剂在规定条件下溶出的速度和程度，在缓释制剂、控释制剂、肠溶制剂及透皮贴剂等制剂中也称释放度[6]。盐酸雷尼替丁胶囊现行质量标准为《中国药典》2020 年版二部，质量标准仅规定了崩解时限项，无溶出度项，崩解时限项无法反映药物活性成分从制剂中溶出的速率与程度，有必要建立检测方法测定溶出度。

据报道，测定盐酸雷尼替丁胶囊溶出度方法多为紫外分光光度法[7-9]，紫外分光光度法专属性较差，当药物中辅料有紫外吸收时，可能会干扰主药成分测定。本试验采用高效液相色谱法测定盐酸雷尼替丁胶囊溶出度，并对不同生产企业多批次样品的测定结果进行了统计分析。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT 液相色谱仪（日本岛津公司，PDA 检测器）；RT612 自动溶出仪（锐拓科技有限公司）；XS205DU 电子天平（精度：十万分之一，梅特勒-托利多）。

1.2 试药

甲酸铵（分析纯，成都市科隆化学品有限公司）、氨水（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；乙腈（色谱纯，Honeywell）；甲酸（质谱级，Aladdin）；盐酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。158 批次盐酸雷尼替丁胶囊样品来源于全国 13 个生产企业，规格均为 300mg。盐酸雷尼替丁胶囊参比制剂（规格为 300mg，批号：FZ044，来源：SANDOZ INC 公司）。盐酸雷尼替丁对照品（批号：100163-201607，含量：99.9%，来源：中国食品药品检定研究院） 。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：JADE PAK C_{18}（4.6mm×250mm，5μm），流动相：0.1%甲酸的乙腈溶液-5mmol·L^{-1} 甲酸铵溶液（10∶90），柱温：35℃，流速：1mL·min^{-1}，波长：314nm，进样量：5μL。

2.2 溶出条件

转篮法，以 pH1.2 盐酸溶液（取 7.65mL 盐酸，加水稀释至 1000mL）900mL 为溶出介质，转速为 50 r •min^{-1}，测定温度为 37±0.5℃，经 15min 取样。

2.2 溶液的配制

2.2.1 溶剂（pH1.2 盐酸溶液） 取 7.65mL 盐酸，加水稀释至 1000mL。

2.2.2 对照品溶液 精密称取盐酸雷尼替丁对照品 29.15mg，置 200mL 量瓶中，加溶剂适量，超声处理 10min 使溶解，用溶剂稀释至刻度，制成每 1mL 含盐酸雷尼替丁 130μg 溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取处方辅料适量，加溶剂溶解制成空白辅料溶液。取溶剂、空白辅料溶液、对照品溶液和“2.4”项下的供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。溶剂和空白辅料溶液在雷尼替丁主峰处未检出相应的峰。结果表明溶剂和辅料均不干扰主峰测定。典型色谱图见图 1。

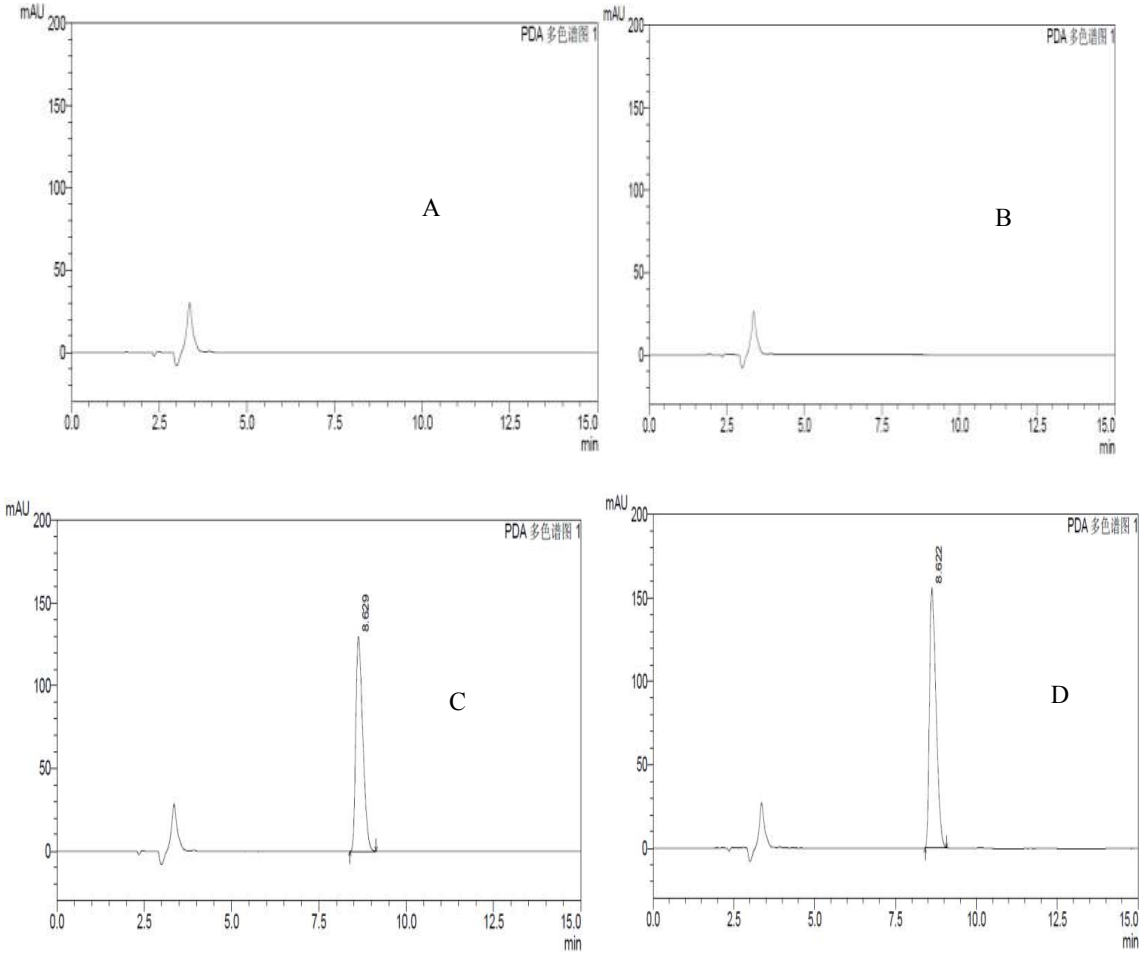


图 1 溶剂（A）空白混合辅料（B）对照品溶液（C）供试品溶液（D）色谱图

Fig1 HPLC chromatograms of dissolvant（A）blank mixed excipient solution（B）reference solution（C）and sample solution（D）

2.3.2 线性关系考察 精密称取盐酸雷尼替丁对照品 75.93mg，置 50mL 量瓶中，加溶剂适量，超声处理 10min 使溶解，用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 1、2.5、4、5、6、7.5mL，分别置于 50mL 量瓶中，加溶剂稀释至刻度，摇匀，作为线性①②③④⑤⑥溶液。按照“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，以峰面积（*A*）为纵坐标，以盐酸雷尼替丁计浓度（*C*）为横坐标进行线性回归计算。结果盐酸雷尼替丁的回归方程为 *A*=13956*C*+2624（*r*=0.9998），结果表明雷尼替丁在 27.189~203.91μg·mL^{-1} 范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 精密量取“2.2.2”项下对照品溶液，按照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，峰面积 RSD 为 0.13%，结果表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取盐酸雷尼替丁胶囊（批号：210307-1），按照“2.4”溶出度测定法，在 15min 时取样 10mL，取续滤液作为供试品溶液。取供试品溶液适量，分别于室温下放置 0、1、2、4、8、12、16、24h，按照“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。结果表明供试品溶液在室温下放置 24h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收试验 模拟胶囊剂处方比例制备混合辅料，精密称定混合辅料适量 9 份（每份相当于 1 粒盐酸雷尼替丁胶囊量），置 25mL 量瓶中，分别精密加入“2.3.2”项下对照品储备液 2、2.5、3mL，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，制备 80%（低）、100%（中）、120%（高）3 个浓度的溶液，每个浓度平行制备 3 份，按“2.1”项下色谱条件进行测定，计算平均回收率。结果：低浓度、中浓度和高浓度平均回收率分别为 100.5%、100.8%、99.7%，9 份加样回收溶液的平均回收率为 100.3%；RSD 分别为 0.34%、0.39%、0.50%，9 份加样回收溶液的

RSD 为 0.56%。

2.3.6 定量限和检测限试验　精密称取盐酸雷尼替丁对照品 29.15mg，置 200mL 量瓶中，加溶剂适量，超声处理 10min 使溶解，用溶剂稀释至刻度，摇匀，逐级稀释后进样分析以信噪比约为 3∶1 时的溶液浓度作为检测限溶液，以信噪比约为 10∶1 时的溶液浓度作为定量限溶液。结果：盐酸雷尼替丁检测限和定量限分别为 0.025mg·mL^{-1} 和 0.19mg·mL^{-1}，表明该方法的检测灵敏度高，满足测定要求。

2.4 溶出条件确定

盐酸雷尼替丁 BCS 分类为 3 类，属于高溶解性药物。参考《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》选用纯化水、盐酸溶液（pH1.2，取 7.65mL 盐酸，加水稀释至 1000mL）、醋酸盐缓冲液（pH4.5）、磷酸缓冲液（pH6.8）。溶出条件为《中国药典》2020 年版四部通则 0931 第一法转篮法，溶出体积为 900mL，转数 50r·min^{-1}，测定温度为 37±0.5℃。取参比制剂和供试品（批号：210307-1）各 6 片，依法操作，分别经 5min、10min、15min、20min、30min 时，取溶出液 10mL，滤过，取续滤液作为参比制剂溶液和供试品溶液。以时间（min）为横坐标，以取样时间点的平均溶出量（%）为纵坐标绘制溶出曲线，见图 2。结果参比制剂溶液和供试品溶液在 4 种溶出介质的溶出行为无明显差别，且 15min 溶出量均达到 95%以上，属于快速溶出。当受试样品和参比样品在 15min 的平均溶出量均不低于 85%时，可认为溶出曲线相似，故供试品与参比制剂溶出曲线相似，选择试验时间为 15 分钟。盐酸雷尼替丁是一种抑制胃酸分泌药，属于 H_2 受体抑制剂，主要作用于胃 H_2 受体，胃内为强酸环境，故试验选择溶出介质为 pH1.2。

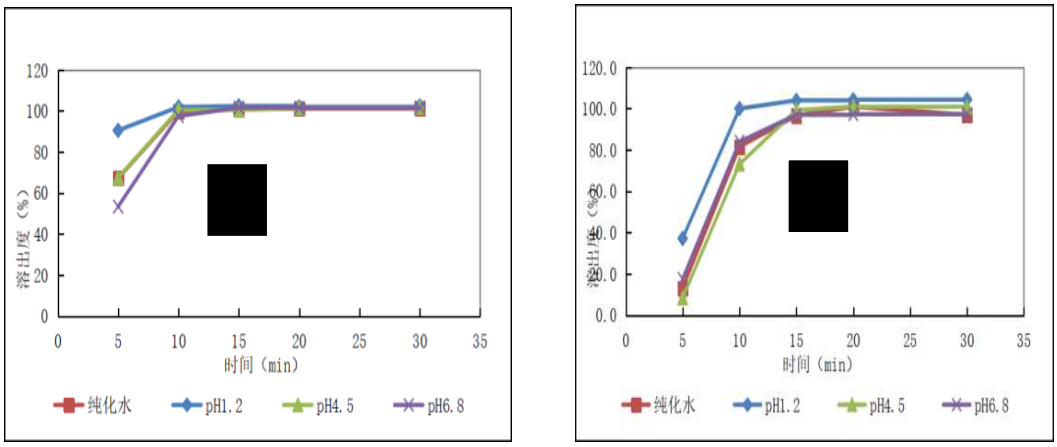


图 2 参比制剂溶液（A）供试品溶液（B）溶出曲线图

Fig.2 Dissolution of reference preparation solution（A）sample solution（B）curves

2.5 样品测定

按“2.2”和“2.4”项下方法制备对照品溶液和供试品溶液，对 158 批次样品进行测定。盐酸雷尼替丁胶囊参比制剂属于快速溶出，供试品测定结果为溶出量大于 85%，判定为与参比制剂溶出行为一致。结果 158 批次盐酸雷尼替丁胶囊中 102 批次样品 15min 溶出量达 85%以上，与参比制剂溶出一致。

表 1　样品测定结果

Tab.1 Sample determination results table

序号（No.）	生产企业（production enterprise）	总批次数（total number of batches）	15 分钟溶出量大于 85%批次数（The number of batches with dissolution rate greater than 85% in 15 minutes）	与参比制剂一致比例（consistent proportion with reference preparation）/%
1	A	3	0	0
2	B	4	4	100
3	C	19	19	100

4	D	2	2	100
5	E	20	0	0
6	F	3	3	100
7	G	8	0	0
8	H	20	13	65.0
9	I	14	13	92.6
10	J	34	32	94.1
11	K	29	14	48.3
12	L	1	1	100
13	M	1	1	100

3 结果与讨论

3.1 结果分析

采用新建溶出度方法对 158 批次胶囊进行检验，共 56 批次样品 15min 溶出量为 29%～84%，其中 35 批次溶出量小于 80%，56 批次样品均未达 85%以上，与参比制剂溶出行为不一致。其中生产企业 A、E、G 所有批次样品均与参比制剂溶出行为不一致；生产企业 H、I、J、K 部分批次样品与参比制剂溶出行为不一致；生产企业 A 涉及 3 批次溶出量均小于 85%，且样品未全部溶解。结果表明不同生产企业样品和同一生产企业不同批次样品溶出行为均有不同，分析原因可能与产品制粒方式（湿法制粒和干法制粒）、处方辅料（不溶或者微溶于水的辅料）、生产工艺等有关，建议生产企业与参比制剂处方工艺进行比较，优化处方和生产工艺。

3.2 色谱条件选择

3.2.1 色谱条件的选择[10,12] 在流动相方面，主要考察了①0.1%甲酸的乙腈溶液-水（10∶90），②0.1%甲酸的乙腈溶液-5mmol·L^{-1} 甲酸铵（10∶90），③乙腈-水（10∶90），试验结果表明②峰型较好。在柱温方面，考察了柱温为 30℃、35℃、40℃对色谱分离效果的影响，试验结果表明柱温对分离效果和峰型影响不大，本实验选柱温为 35℃。色谱柱方面，考察了 2 个规格的色谱柱，分别是①JADE PAK C18 （4.6mm × 250mm，5μm） 和②CZPCELL PAK C18 （4.6mm × 250mm, 5μm） ，盐酸雷尼替丁为碱性化合物，色谱峰易拖尾，导致峰型不好且对色谱柱损伤较大，色谱柱①峰型较好且耐碱性，故选择色谱柱①。

3.2.2 波长选择 本试验考察了盐酸雷尼替丁对照品紫外吸收光谱，盐酸雷尼替丁在 228nm 和 314nm 处有最大吸收，且吸收值相差不大，见图 3，但 228nm 为低波长，干扰因素更多，故最终试验波长为 314nm。

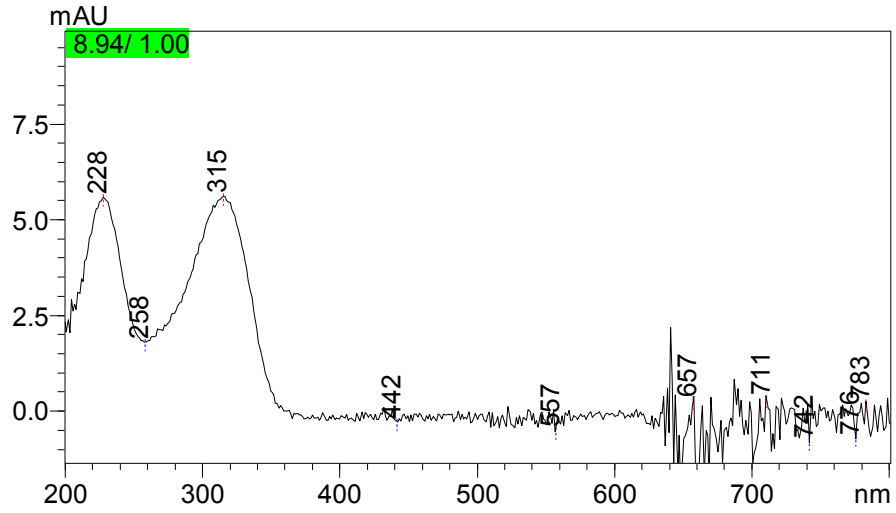


图 3 对照品溶液紫外光谱图

Fig.3 UV spectrogram of reference solution

3.3 方法选择

在 314nm 波长处，分别采用紫外分光光度法和本试验新建 HPLC 法测定生产企业 F 共 3 批次样品溶出度含量，结果平均溶出量分别为 123%~136%和 94%~100%。结果采用紫外分光光度法测定盐酸雷尼替丁胶囊溶出度的含量远远大于标示含量，表明样品中辅料可能干扰测定，故采用紫外分光光度法测定结果不准确。本试验采用 HPLC 法测定盐酸雷尼替丁胶囊溶出度，具有分离效果好、排干扰能力强、专属性高等特点，能够更加准确测定盐酸雷尼替丁胶囊溶出度[12]。

参考文献

[1] 胡永泉,杨涛.消化内镜联合雷尼替丁治疗十二指肠溃疡对胃泌素、AMCA 及 Th1 /Th2 细胞因子的影响[J].中国老年学杂志,2021,41（2）:277　HU YQ , YANG T.The effects of digestive endoscopic combined with Rennidine for the treatment of duodenal ulcers on gastrin, AMCA and TH1 /TH2 cytokine [J].Chin J Gerontol,2021,41（2）:277

[2]李潇潇.铝碳酸镁咀嚼片联合雷尼替丁治疗胃食管反流病的疗效观察[J].现代药物与临床,2018,33（5）:1068 Li X X.Clinical observation of hydrotalcite chewable tablets combined with ranitidine in treatment of gastroesophageal reflux disease[J].Drugs Clin,2018, 33（5）:1068.

[3]王诗恒,刘剑锋,秦培洁,等.双黄连口服液或者联合雷尼替丁治疗口腔溃疡的临床疗效和安全性的 Meta 分析[J].中药药理与临床,2020,36（1）:182 Meta-analysis of the clinical efficacy and safety of shuanghuanglian oral solution or it combined with ranitidine in the treatment of oral ulcers[J].Pharmacol Clin Chin Mater, 2020,36（1）:182

[4]李剑.盐酸雷尼替丁联合生长抑素对急性胰腺炎患者炎症反应及急性呼吸窘迫综合征发生的影响[J].当代医学,2022,28（14）:153-155．Li J.Ranitidine hydrochloride combined with somatostatin on inflammatory response and acute respiratory embarrassment in patients with acute pancreatitis Influence of compulsion syndrome occurrence[J].Contemporary Medicine,2022, 28（14）:153-155．

[5]王润之,孙强.盐酸雷尼替丁胶囊联合奥曲肽注射液治疗胰腺炎患者的临床研　究[J].中国临床药理学杂志,2021,37（15）:11967-1973．Wang R Z,Sun Q.Clinical trial of ranitidine hydrochloride capsules combined with octreotide injectiong in the treatment of patients with pancreatitis[J].Chin J Clin Pharmacol,2021,37（15）:11967-1973．

[6] 中华人民共和国药典 2020 年版.四部[S].2020:132 The People's Republic of China Pharmacopoeia 2020 edition. Four parts[S].2020:132

[7] 邓回香,王西凤.盐酸雷尼替丁胶囊体外溶出一致性评价方法的建立[J].海峡药学,2021,33（11）:89-92. Deng H X,Wang X F.Consistency Evaluation of the dissolution of generic and original drugs of ranitidine hydrochloride caosules in ritro [J].Strait Pharma-ceutical Journal,2021,33（11）:89-92.

[8] 袁艳.不同溶出介质评价盐酸雷尼替丁胶囊内在质量[J]. 海峡药学,2014,26（11）:94-96． Yuan Y.Evaluation the quality of ranitidine hydrochloride capsule in different mediums [J].Strait Pharmaceutical Journal,2014,26（11）:94-96．

[9] 文丽丽,柏学敏,吕文军,等.盐酸雷尼替丁胶囊溶出度检查方法研究[J].黑龙江医学,2011,24（6）:879-880. Wen L L, Bo X M , Lv W J ,et al.Study on dissolution method of ranitidine Hydrochride capsule[J].Heilongjiang Medicine Journal ,2011,24（6）:879-880.

[10] 吴红英,徐道华,邱栋樑.HPLC 测定盐酸雷尼替丁胶囊的含量[J].中国医药导报,2009,6（26）:50-51. Wu H Y,XU D H,Qiu D L.Determination of ranitidine hydrochloride capsules by HPLC [J].China Medican Herald,2015,2009,6（26）:50-51.

[11] 黄晓龙，雷继峰.溶出度在药品评价中的作用探讨[J].Chinese Joural of New Drugs,2015,24（14）:1584-1589. Huang X L,Lei J F.Discussion on importance of dissolution test method in drug evaluation [J].Chinese Joural of New Drugs,2015,24（14）:1584-1589.

[12] 张曼曼.HPLC 法分析盐酸雷尼替丁胶囊中有关物质[J].山西化工,2022,（1）:64-65,72. Zhang M M.Determination of related substances in ranitidine hydrochloride capsules by HPLC [J].Shanxi Chemical Indusiry,2022,（1）:64-65,72.

肿瘤光治疗纳米药物

陈华兵 [1,*]

[1] 苏州大学医学院药学院，江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号，215000

用于肿瘤光治疗的纳米药物是当前的研究热点。本文主要围绕氟硼二吡咯（BODIPY）纳米光敏剂的设计与肿瘤治疗应用开展工作，通过分子间弱相互作用（如 π-π 堆叠、疏水相互作用等）、化学结构设计（如重原子调控、空间构象、共轭结构等）等策略诱导光敏剂的可控组装，提升其单线态氧量子产率和光热转换系数，并增强肿瘤靶向性及瘤内深部渗透作用，实现了原位乳腺癌及其肺转移瘤的高效抑制作用。在此基础上，进一步通过光治疗调控肿瘤微环境及免疫抑制微环境，并探索其协同增效新机制等，诱导肿瘤光治疗与其它疗法如免疫治疗、化疗及分子靶向治疗等的协同治疗效应，为高致死、难治性肿瘤如胰腺癌等的高效治疗提供新策略。

【关键词】纳米药物；自组装；光敏剂；光治疗，协同治疗

参考文献

[1] Liu, B.; Jiao, J.; Xu, W.; Zhang, M.; Cui, P.; Guo, Z.; Deng, Y.; Chen, H.; Sun, W. Adv Mater, 2021, 33, 2100795.

[2] Guo, Z.; He, H.; Zhang, Y.; Rao, J.; Yang, T.; Li, T.; Wang, L.; Shi, M.; Wang, M.; Qiu, S.; Song, X.; Ke, H.; Chen, H. Adv Mater, 2021, 33, 2004225.

[3] Li, T; Jiang, S; Zhang, Y; Luo, J; Li, M; Ke, H; Deng, Y; Yang, T; Sun, X; Chen, H. Nat Commun, 2023, 14: 2498.

某医院抗菌药物预防性用药时间分析与对策

陈剑锋

（泉州市正骨医院药学部，福建 泉州 362000）

【摘要】目的：对抗菌药物预防性用药时间进行统计分析，为抗菌药物临床应用管理工作的改进提供参考。**方法：**从2021年1-6月出院患者使用抗菌药物的病历中，每月等比分层随机抽取50份病历进行点评，对抗菌药物使用强度排名前列的临床科室抗菌药物预防性用药时间进行统计。**结果：**所调查科室非手术抗菌药物平均预防用药时间4.49天，Ⅰ、Ⅱ类切口手术抗菌药物平均预防用药时间3.55天，Ⅲ类切口手术抗菌药物平均预防用药时间5.79天。**结论：**抗菌药物临床应用管理是一个长期持续的过程，应定期分析、评估，制定方案，持续改进。

【关键词】抗菌药物；预防性应用；用药时间

《抗菌药物临床应用指导原则（2015年版）》[1]中对于非手术患者抗菌药物预防性应用的时间仅有指导性原则，并未作详细规定，而对于围手术期抗菌药物预防性应用维持时间有明确规定，要求不以预防手术部位感染（SSI）为目的延长术后预防性抗菌药物使用时间，但在临床中发现仍有各种原因导致延长抗菌药物预防性使用时间。本文对我院抗菌药物预防性应用情况进行点评和分析，提出进一步改进措施。

1 资料与方法

1.1 一般资料

根据各临床科室出院患者使用抗菌药物例数，以住院号为目标，利用Microsoft Excel 2010软件生成不重复随机数字，从2021年1月至6月出院患者使用抗菌药物的病历中，每月等比分层随机抽取50份病历。采集病历的出院时间、住院号、科室，患者性别、年龄、体质量，出院诊断，手术信息包括手术名称、切口类别、手术时间、有植入物与否，抗菌药物医嘱及执行时间、起止时间，患者相关症状、体征、实验室检查、影像学检查等。

排除标准：有明确感染诊断的病例，Ⅳ类切口手术。

1.2 统计方法

围手术期预防用药时间=术后长期医嘱停止时间或最后一次临时医嘱执行时间 - 术前首次给药时间（取自手术护理记录单），准确到小时（折算成天数）。每次手术分别统计。仅术前给药一次的用药时间计为0。

非手术预防用药时间=长期医嘱停止时间或最后一次临时医嘱执行时间 - 长期医嘱开始时间或首次临时医嘱执行时间，准确到小时（折算成天数）。

临时医嘱间隔时间超过48小时的算作两次用药。

1.3 点评方式

点评双人复核，出现分歧通过双方讨论或由上级药师协助解决。

2 结果

共抽取出院患者抗菌药物病历300份，含抗菌药物医嘱664条。对其中抗菌药物使用强度＞40DDDs的外科、手外科、脊柱科、下肢二科，以及小儿骨科抗菌药物预防性用药时间进行统计。结果非手术平均预防用药时间4.49天，Ⅰ、Ⅱ类切口手术平均预防用药时间3.55天，Ⅲ类切口手术平均预防用药时间5.79天，见表1。

作者简介：陈剑锋（1982年5月生），男，副主任药师，硕士，研究方向：临床药学。

联系电话：13799571023；工作电话：0595-22576473；Email:75991238@qq.com。

表 1 抗菌药物预防性应用情况

切口类别	科室	例数	平均用药时间（天）	合计平均用药时间（天）
非手术预防	手外科	1	2.89	4.49
	外科	8	5.43	
	下肢二科	2	4.23	
	小儿骨科	3	3.99	
0 类切口手术	脊柱科	2	3.47	3.47
Ⅰ、Ⅱ类切口手术	外科	4	7.46	3.55
	下肢二科	34	1.49	
	小儿骨科	16	4.95	
	脊柱科	28	5.71	
	手外科	10	0.55	
Ⅲ类切口手术	手外科	30	6.14	5.79
	外科	5	7.13	
	下肢二科	8	3.87	
	小儿骨科	1	3.96	

3 分析与对策

3.1 非手术抗菌药物预防性应用

所调查病例中，非手术抗菌药物预防性应用主要用于皮肤软组织损伤、肋骨骨折（肺挫伤、肺裂伤）、血/气胸（胸腔积液）、上、下颌骨骨折、颌面部创伤、鼻骨骨折、颅脑损伤（头皮裂伤）、泌尿系损伤等情况，抗菌药物的使用往往贯穿整个治疗过程，常从患者入院用到出院，平均用药时间达到了 4.49 天。《抗菌药物临床应用指导原则（2015 年版）》[1] 对于非手术患者抗菌药物预防性应用仅有指导性原则，对于抗菌药物选择、用法用量、用药疗程、停药指征等均未给出建议。《创伤后抗菌药物预防性应用专家共识》[2]建议抗菌药物的短期应用，如：皮肤软组织损伤清创后一般不超过 3d；Ⅲ型开放性骨折应持续 72h，软组织已覆盖创面者则不应超过 24h；开放性颅脑创伤一般持续 3-5d；开放性颌面部骨折一般 3-5d；下颌骨骨折 （术后）无须超过 24h；开放性胸腔损伤一般不超过 2d，等。《中国开放性骨折诊断与治疗指南（2019）版》[3]则推荐抗菌药物使用至创面闭合（无张力缝合、植皮、皮瓣等覆盖）后 48h。

笔者认为对于非手术抗菌药物预防性应用应根据患者的症状、体征、实验室检查、影像学检查等情况，进一步规范预防用药时间，提倡短期预防，例如肋骨骨折在排除肺挫伤、肺裂伤等脏器损伤后应予停用预防性抗菌药物，非感染性胸腔积液也不是抗菌药物的应用指征。

3.2 围手术期抗菌药物预防性应用

所调查病例中，术后延长抗菌药物预防性用药时间主要有以下几种情况：①无论术后第一天/第二天有或没有揭开伤口敷料检视，术后未再复查实验室检查，医生认为该类手术需要延长抗菌药物使用；②无论术后第一天/第二天有或没有揭开伤口敷料检视，只要术后当天/第一天（或术后几天内）实验室检查感染相关标志物升高即予延长抗菌药物使用；③术后第一天/第二天没有拆开伤口敷料检查（石膏外固定等原因），术后＞24h 复查实验室检查，在复查实验室检查之前不停药；④术后第一天/第二天拆开伤口敷料检查，发现伤口有异常而延长抗菌药物使用；⑤因为转科沿用（未及时停止）抗菌药物医嘱。

《抗菌药物临床应用指导原则（2015 年版）》[1]对于各类切口手术的围手术期抗菌药物预防性应用维持时间均有明确的规定，手术时间短的Ⅰ切口手术结束后即停药，Ⅰ、Ⅱ类切口手术不超过 24h，Ⅲ类切口手术可延长至 48h，“过度延长用药时间并不能进一步提高预防效果”。本次调查Ⅰ、Ⅱ类切口手术和Ⅲ类切口手术围手术期抗菌药物的平均预防用药时间均超过了该规定。然而其他诊疗指南也存在不同的意见，例如《骨科择期手术

加速康复预防手术部位感染指南》[4]建议：“术后如有切口渗液、肿胀等情况可适当延长至 72h”。《国家抗微生物治疗指南第 2 版》[5]推荐“围手术期预防性应用，病人有明显感染高位因素或使用了人工植入物者，可延长到手术后 48h；粉碎性骨折内固定术后继续用药 1-3d，开放性骨折内固定术后继续用药 5-10d。《实用骨科学第 4 版》[6]建议断肢再植术后，全身应用广谱抗生素一般通过静脉滴注 5-7d。

笔者认为，从科学角度，《指导原则》的规定是基于循证医学证据的国内外权威指南推荐，从行政权威角度，《指导原则》的规定高于各专业的临床路径或诊疗指南，当存在冲突时，应以《指导原则》规定为准。2018 年世界卫生组织手术部位感染预防指南（第 2 版）[7]及 2019 年《中国手术部位感染预防指南》[8]建议预防性抗菌药物术前给药即可，在手术结束后，不以预防 SSI 为目的继续给药。

白细胞计数及中性粒细胞比例、C 反应蛋白（CRP）、红细胞沉降率（ESR）的升高受感染之外的多种因素影响，其中就包括创伤和手术应激[9]，手术后短时间内复查这些指标对于感染诊断的临床意义不大，不应单独以感染相关标志物检查升高为由延长抗菌药物用药时间。降钙素原（PCT）虽对感染的特异性较强，但手术后、严重创伤、多发伤等因素同样会导致 PCT 升高[10]。如果术后发现手术部位有化脓性液体渗出，局部有红、肿、热等感染症状或体征，结合实验室检查或其他感染证据考虑为细菌性感染，此时抗菌药物的使用属于治疗性应用范畴，应在病程记录中注明。对于单一抗菌药物不存在治疗+预防的应用，不应以治疗+预防为由延长用药。

3.3 对策

一是抗菌药物管理工作组对各临床科室有针对性的开展反馈、沟通、培训和交流。二是药学部会同医务部根据各临床科室病种及手术特点，制定符合本院临床实际的抗菌药物预防性应用规范。三是坚持将抗菌药物处方专项点评结果纳入临床科室综合目标绩效考核和学科带头人的绩效考核，进一步加强奖惩措施。四是对于不合理情况仍较多的科室采取临床药师会诊后再给药的流程。五是对于再三不整改的医师限制其抗菌药物处方权乃至暂停处方权。六是运用 PDSA 等质量管理工具，制定改进目标，查找分析影响因素，提出改进措施并落实。

参考文献

[1]《抗菌药物临床应用指导原则》修订工作组.抗菌药物临床应用指导原则：2015 年版[M].第 1 版.北京：人民卫生出版社,2015,1-129.

[2]中华医学会创伤学分会创伤感染学组,中华医学会急诊医学分会创伤学组.创伤后抗菌药物预防性应用专家共识[J].中华急诊医学杂志,2016.10,25(10):1224-1228.

[3]中华医学会骨科学分会创伤骨科学组,中华医学会骨科学分会外固定与肢体重建学组,中国医师协会创伤外科医师分会创伤感染专业委员会，等.中国开放性骨折诊断与治疗指南（2019 版）[J].中华创伤骨科杂志,2019.11,21(11):921-928.

[4]黄强,杨惠林,康鹏德，等. 骨科择期手术加速康复预防手术部位感染指南[J].中华骨与关节外科杂志,2020.1,13(1):1-7.

[5]国家卫生计生委医政医管局,国家卫生计生委合理用药专家委员会.国家抗微生物治疗指南第 2 版[M].第 2 版.北京：人民卫生出版社,2017,133.

[6]胥少汀,葛宝丰,徐印坎.实用骨科学第 4 版[M].第 4 版.北京：人民军医出版社,2012,1091.

[7]World Health Organization.Global guidelines for the prevention of surgical site infection, second edition[R].Geneva: World Health Organization,2018:71.

[8]中华医学会外科学分会外科感染与重症医学学组,中国医师协会外科医师分会,肠瘘外科医师专业委员会.中国手术部位感染预防指南[J].中华胃肠外科杂志,2019.4,22(4):301-314.

[9]中国医药教育协会感染疾病专业委员会. 感染相关生物标志物临床意义解读专家共识[J].中华结核和呼吸杂志,2017.4,40(4):243-257.

[10]降钙素原急诊临床应用专家共识组.降钙素原（PCT）急诊临床应用的专家共识[J].中华急诊医学杂志,2012.9,21(9):944-950.

基于 2-（2-羟基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮（HPQ）结构的荧光探针的研究进展[1]

陈盼盼[1,2]，冯晓伟[1]，陆智彭[1]，秦亚娟[1,2]，厉廷有[1,2]*

（[1]南京医科大学药学院，南京 211166； [2]南京医科大学核医药临床转化中心，南京 210029）

【摘要】2-（2-羟基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮（HPQ）是一种具备聚集诱导发光（AIE）和激发态分子内质子转移（ESIPT）双重特性的小分子化合物，其在固态下能够发出荧光，且其脂溶性和水溶性均较弱，适合于在生物体系中原位响应后产生不易扩散的沉淀而进行长时荧光显像。本文首先介绍了 HPQ 的固态发光机制，其次对其在金属离子的检测和其在生命分析化学中的可视化显像的应用进行了综述，以期为开发更加安全有效的荧光显像剂提供参考。

【关键词】2-（2-羟基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮；聚集诱导发光；激发态分子内质子转移；长时荧光显像

Research progress of fluorescent probes based on 2- (2-hydroxyphenyl) -4 (3H) - Quinazolinone (HPQ) structure

CHEN Pan-pan[1,2]，Feng Xiao-wei[1]，Lu Zhi-peng[1]，Qin Ya-juan[1,2]，Li Ting-you[1,2]*

([1]School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Jiangsu 211166, China; [2]Clinical Transformation Center of Nuclear Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【**Abstract**】2- (2-hydroxyphenyl) -4 (3H) - Quinazolinone (HPQ) is a small chemical entity with the simultaneous characteristics of aggregation induced luminescence (AIE) and excited state intramolecular proton transfer (ESIPT). Featured with emitting fluorescence in solid state and anti-diffusion ability due to weak lipophilicity and hydrophily, it is suitable for in situ long-term fluorescence imaging after response to the corresponding analytes in biological systems. We first elucidated the luminescence mechanism of HPQ in solid state, then summarized its application in the detection of metal ions and the visual imaging of biomarkers in physiological and pathological processes, in order to provide some references for the development of more safe and effective fluorescent imaging agents based on HPQ.

【**Key words**】2- (2-hydroxyphenyl) -4 (3H) - Quinazolinone; Aggregation induced luminescence; Excited state intramolecular proton transfer; Long term fluorescence imaging

对分析化学中各种成分的定性与定量分析及生命科学中具体生物学时间进行可视化呈现符合人类的认知倾向，因此在各种荧光探针应运而生。目前应用的花菁等染料存在稳定性差、聚集荧光淬灭效应（ACQ）、显像亮度不够等诸多问题。具备聚集诱导发光（AIE）特性的染料具备亮度大、光稳定性高、显像灵敏度高、分辨率高等优点。多年来，表现出激发态分子内质子转移（ESIPT）特性的荧光染料因其发光强度强、光稳定性强、斯托克斯位移较大而备受关注， 2-（2-羟基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮（HPQ）是一种既能表现出典型的 ESIPT 效应

基金项目：南京医科大学内涵建设重点项目；中国博士后科学基金（No.2022M711419）；南京医科大学科技发展基金（No.NMUB20210013）；

第一作者：陈盼盼，男，Tel:13783691430, Email:pharmchen@njmu.edu.cn

*通讯作者：厉廷有 ，男，教授 Tel：15951939432，Email：l_tingyou@njmu.edu.cn

又具备 AIE 效应的化合物，因此正在被广泛地用来开发各种荧光检测试剂和显像试剂。

1.HPQ 与 HPQ 的发光机理

HPQ 是 2-（2-羟基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮的英文简称，其中的酚羟基可以与喹唑啉酮上的氮原子形成分子内氢键，处于基态 S_0 的烯醇型 HPQ 吸收紫外光后到达激发态 $S^{\#}$，之后在激发态下发生分子内质子转移转变为激发态 S*的酮型 HPQ，分子从激发态 S*回到基态 S0’的过程中产生荧光发射，最后再次发生分子内质子转移回到基态 S_0 的烯醇型 HPQ，从而完成一次光的吸收与发射过程。[1]Liu 等人采用密度泛函理论（DFT）和时变密度泛函理论（TDDFT）方法研究了 2-（2-羟基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮（HPQ）体系在不同溶液中的光物理性质和光化学反应。计算结果证实了超快无障碍激发态分子内质子转移（ESIPT）过程的发生和在电子激发态中构型扭曲的存在。在极性质子甲醇溶液中，由 HPQ 和两个甲醇分子（HPQ-2M）组成的氢键配合物可以在基态下稳定存在。在受到光激发时，HPQ 单体最初被激发到第一激发态，而 HPQ-2M 系统首先被激发到 S_3 状态并经历内部转换 （IC） 到达 S_1 状态，分子间氢键在激发态下得到加强，模拟电子光谱与实验结果吻合较好，振动光谱的计算结果也证实了分子间氢键的增强。[2]

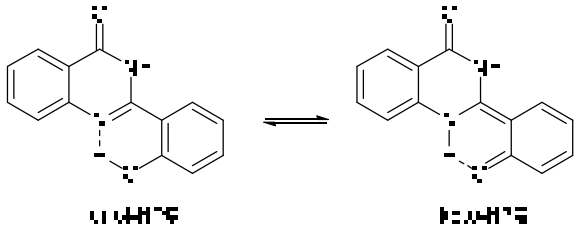


图 1. 烯醇型-酮型 HPQ 的互变异构

2.HPQ 用于金属离子的检测

Fe^{3+}能够阻断 HPQ 的 ESIPT 效应从而导致 HPQ 固态荧光强度降低，Zhang 等人制备了 HPQ 固态膜作为荧光离子载体用于 Fe^{3+}浓度的定量测定，通过对含 HPQ 传感膜组成和实验条件的优化，传感器可在 2.5 - 4.5 的 pH 范围内，在 3.7×1^{-10} M 至 7.1×4^{-10} M 的浓度范围对 Fe^{3+}产生特异性的良好线性响应，检测限为 8.0×10^{-8} M，该传感器可应用于药物制剂样品中铁离子含量的测定。[3]

HPQ 的苯基环和喹唑啉酮环之间的构象扭曲导致固态中的分子堆积不同，从而导致其荧光光谱中有 497 和 511 nm 两处发射峰。Anthony 发现 HPQ 在二甲基甲酰胺（DMF）溶液中也显示出强烈的荧光，并能够选择性地检测 DMF 中微摩尔浓度的 Zn^{2+}和 Cd^{2+}离子。HPQ 不仅可以选择性地检测 Zn^{2+}和 Cd^{2+}离子，还可以根据加入上述金属离子后的荧光光谱 497 nm 处吸收峰的变化来对两者进行精准区分：Zn^{2+}会导致其蓝移至 420 nm，Cd^{2+}会导致其蓝移至 426 nm。因此，作者发现了一种在溶液中利用 HPQ 的可调谐固态荧光对 Zn^{2+}和 Cd^{2+}离子进行精准检测的方法。[1]

3.HPQ 用于生物体系中的各种生物标志物的可视化显像

Huang 等人报道了利用 HPQ 的衍生物 2-（2'-磷酸氧基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮（PPQ）可用于可视化磷酸酶的活性，可溶性和无色 PPQ 可以通过酸性和碱性磷酸酶特异性水解成不溶性产物 HPQ，沉淀后发出荧光，表明 PPQ 可以作为一类新型底物型染料，用于在荧光组织化学和细胞化学对固定化磷酸酶活性进行原位检测，例如在碱性磷酸酶辅助下对静态刀豆球蛋白 A 受体进行可视化检测。[4]

Zhou 等人基于 HPQ 开发了原位光激活的双光子探针 PHPQ，光切割后，PHPQ 释放出沉淀的 HPQ 荧光团，该荧光团同时显示单光子和双光子激发的黄绿色荧光，从而产生可定位的荧光信号，具有超过 200 倍的单光子和 150 倍的双光子荧光增强，能够为高空间分辨率生物显像提供便利。[5]

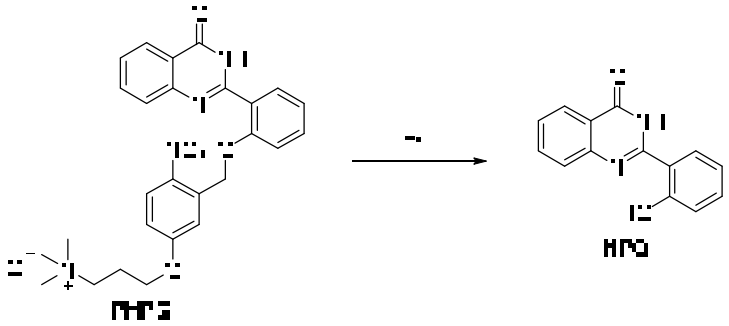


图 2. 探针 PHPQ 的光致激活

Zhou 等人通过 2-（2-羟基苯基）喹唑啉-4（3H）-酮荧光团和线粒体靶向的花菁基团的碳碳双键缩合反应制备得到了探针 HPQ-Cy2，探针的 Stokes 位移达到了 210 nm，两个发射峰的峰间隔达到了 140 nm，带正电荷的假吲哚模块可靶向活细胞线粒体，具备响应快、高灵敏度、高特异性等优点，可用于对活细胞中的次氯酸进行进行高分辨率地显像。[6]

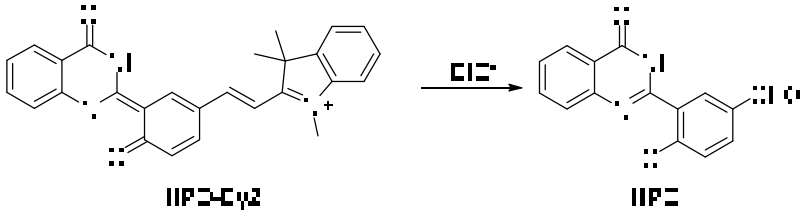


图 3. 探针 HPQ-Cy2 对次氯酸的响应

Li 等人基于静电相互作用触发的 HPQ-TBP/肝素复合物的形成和荧光淬灭碘离子的置换，开发了一种聚集诱导发射（AIE）探针 HPQ-TBP-I 用于肝素的可视化检测。探针在 0 -14 μM 浓度范围内的肝素的检测表现出了良好的线性关系，最低检测限可达 22 nM，可覆盖整个临床剂量范围（1.7-10 μM），具备临床应用潜力。[7]

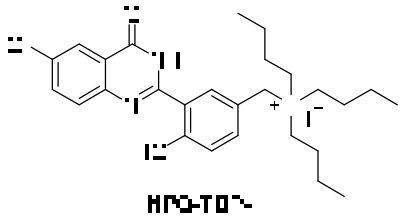


图 4. 探针 HPQ-TBP-I 的化学结构

Zhou 等人设计了含对位硼酸酯取代的苄醚结构的探针 HPQ-H，探针可以高效响应过氧化氢，释放出 HPQ 沉淀后产生 45 倍的荧光增强，具备高灵敏度和高特异性，在双光子激发下（720 nm）可以产生较大的组织穿透深度（70-170 μm），从而在活细胞和组织上对过氧化氢进行高分辨率可视化显像，为研究氧化应激与衰老相关疾病的内在机制提供了一种潜在的工具。[8]

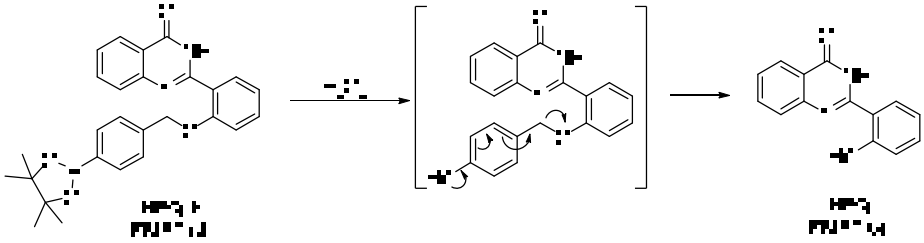


图 5. 探针 HPQ-H 对过氧化氢的响应

Li 等人通过自毁连接子将不溶性的固态荧光团 6-氯-2-（2-羟基苯基）喹唑啉-4（3H）-酮（Cl-HPQ）与弗林蛋白酶的特异性肽底物（RVRR）整合，开发了一种用于原位检测内源性弗林蛋白酶活性和对其进行长时成像的探针 HPQF，该探针对弗林蛋白酶具有高选择性和高灵敏度，弗林蛋白酶切割酶底物后，HPQF 释放出游离的 Cl-HPQ 可在酶活性位点附近沉淀，发出明亮的固态荧光，显示出细胞内弗林蛋白酶的具体位置，其结果与共定位和免疫荧光实验的结果一致。HPQF 还可进一步用于监测在低氧诱导因子（HIF）稳定下弗林蛋白酶的水平变化以及对 MDA-MB-468 肿瘤组织中的弗林蛋白酶进行可视化。[9]

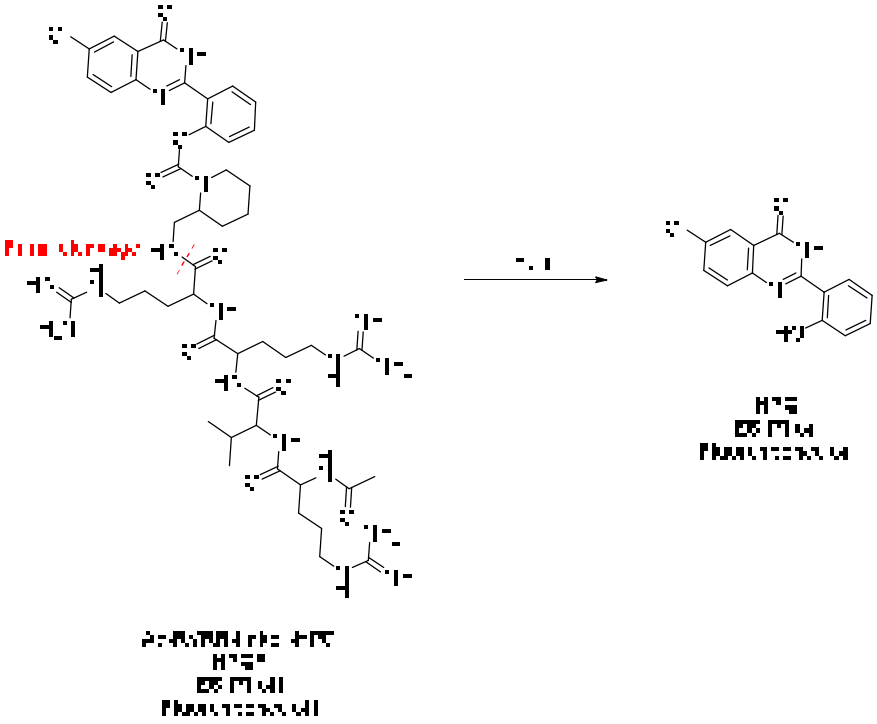


图 6. 探针 HPQF 对弗林蛋白酶的响应

Juan 等人设计合成了一种能够识别 γ-谷氨酰转肽酶（GGT）的新型荧光探针 HPQ-PDG，探针能够对 GGT 活性进行高灵敏度地检测和显像，从而对癌细胞和正常细胞进行有效区分，探针亦可应用于病理组织地成像，显示了其潜在的临床应用价值。[10]

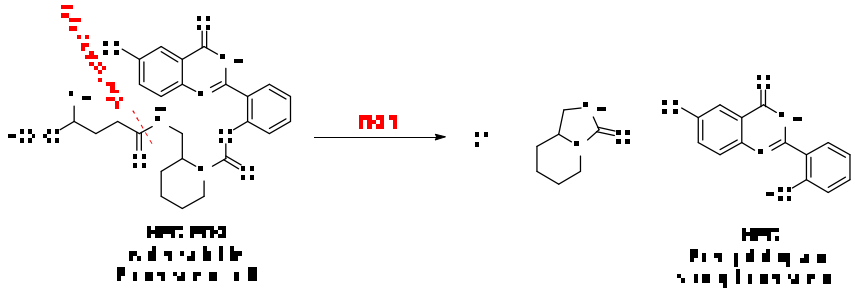


图 7. 探针 HPQ-PDG 对 γ-谷氨酰转肽酶的响应

Li 等人通过将传统上强疏水性固态荧光染料 6-氯-2-（2-羟基苯基）喹唑啉-4（3H）-酮（HPQ）与 2-（2-甲基-4H-色烯-4-亚基）丙二腈基团偶联，以期获得更紧密的堆叠以降低亲脂性并延伸发射波长到近红外区域，得到了沉淀荧光染料 HYPQ。之后膜相关酶 γ -谷氨酰转肽酶（GGT）被选作模型酶来设计抗扩散探针 HYPQG，探针 HYPQG 响应 GGT 后，释放出 HYPQ 在细胞膜上沉积和发出荧光，成功实现了 GGT 在膜上的原位成像，荧光信号可长时间保持不变，对于酶活性的原位监测具有重要意义，探针可对荷瘤小鼠进行长时原位成像和准

确定义肿瘤区域，有望成为术中导航的有效工具。[11]

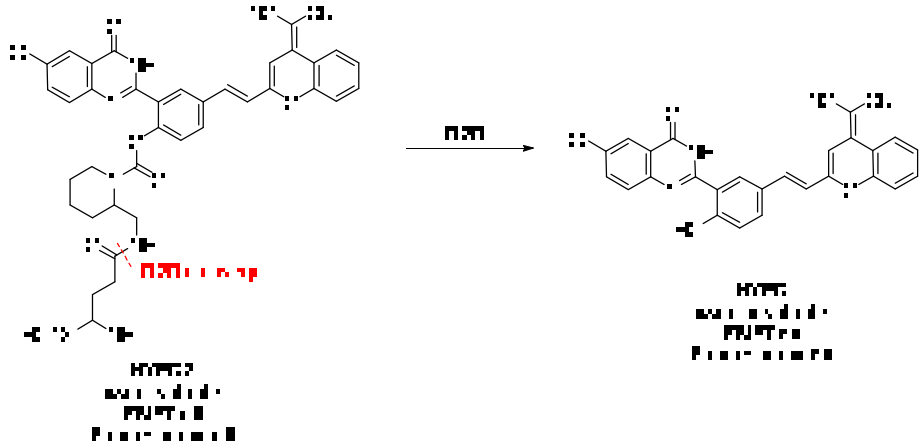


图 8. 探针 HYPQG 对 γ-谷氨酰转肽酶的响应

Nasim 等人通过在 CAM-B3LYP/TZVP 水平上通过 DFT 和 TDDFT 理论计算对 HPQ 和 HPQ-TD 的发光特性进行了模拟，结果表明：光致电子转移过程导致了烯醇型 HPQ 的荧光淬灭，而酮型 HPQ 的较大的斯托克斯位移的特征则与 ESIPT 机制有关。之后的前线分子轨道（FMO）分析、几何分析和势能曲线（PEC）扫描结果则进一步交叉验证了前述结果。此项工作为基于 ESIPT 的 HPQ（酮烯醇形式）对 GGT 活性的传感机制提供了有力证据。[12]

Liu 等人通过两步环加成反应合成得到了新型比率荧光探针 HPQRB，具有较大的发射位移（$\Delta\lambda = 116$ nm），亚硫酸盐可对探针的罗丹明样结构进行迈克尔加成，导致探针在 566 nm 处的发射峰随着亚硫酸盐浓度的增加而减小，而 HPQ 结构在整个反应过程中始终存在 ESIPT 效应，其发射峰保持在 450 nm 不变，可以作为自身参照。HPQRB 对亚硫酸盐具有高选择性，30 s 内即可完成响应，检测限低可低至 44 nM，可用于 HepG2 细胞中亚硫酸盐的荧光显像。[13]

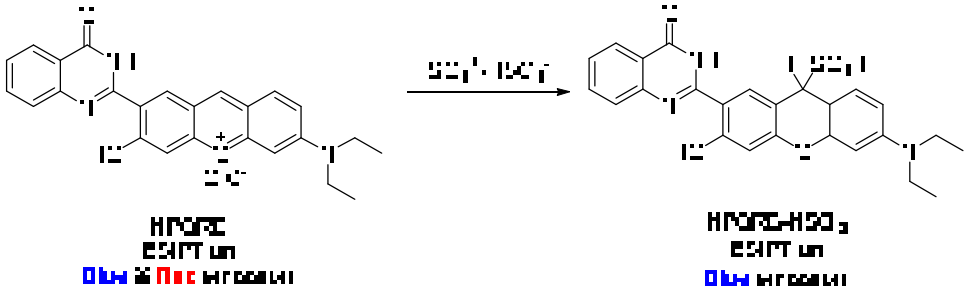


图 9. 探针 HPQRB 对亚硫酸盐的响应

Liu 等人制备了含有丙烯酰基的探针 MA-HPQ，通过半胱氨酸（Cys）对丙烯酰基的迈克尔加成以及分子内加成/消除反应从而导致丙烯酰基的离去，离去后形成的 MeO-HPQ 不溶于水，具有很强的固态荧光，最大发射波长为 510 nm，最大激发波长为 365 nm，斯托克斯位移为 145 nm。探针 MA-HPQ 的灵敏度高，背景荧光干扰少，成像对比度高，可用于 HeLa 细胞和组织中内源性 Cys 的实时成像。[14]

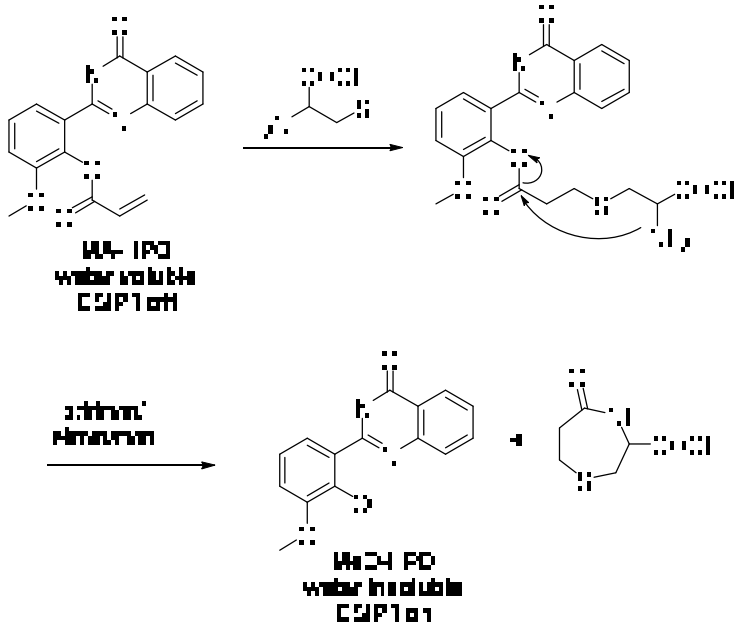


图 10. 探针 MA-HPQ 对半胱氨酸的响应

Zheng 等人基于吩噻嗪-HPQ 骨架，以 DNBS（2,4-二硝基苯磺酸酯）为响应基团开发了一种能够用于检测体外和体内的半胱氨酸（Cys），同型半胱氨酸（Hcy）和谷胱甘肽（GSH）等硫醇的高效荧光探针 PHPQ-SH，其对硫醇响应后表现出了快速响应、较高的选择性、较大的斯托克斯位移（138 nm），较高的灵敏度（对于 GSH，LOD = 18.3 nM）、显着的荧光增强（163 倍）以及较好的生物相容性，在 MCF-7 细胞和斑马鱼中能够对生物硫醇进行有效响应和可视化。[15]

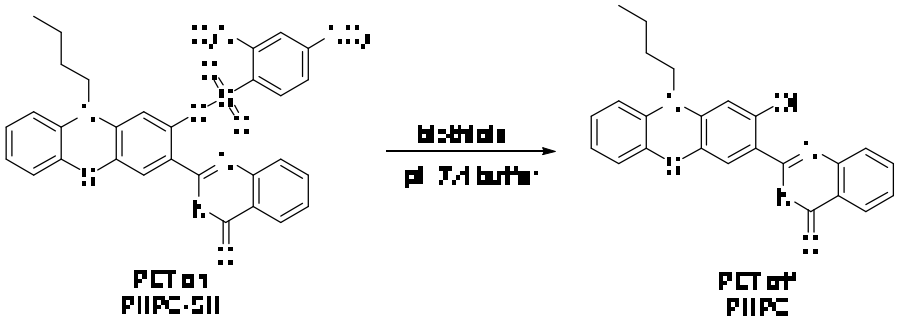


图 11. 探针 PHPQ-SH 对生物硫醇的响应

Zhang 等人将沉淀发光荧光团 HAPQ 与 NBD 模块通过亲核取代反应进行拼合得到了高效的诊疗一体化探针 HAPQ-NBD：该探针可以响应生物硫醇从而实现对肿瘤细胞和正常细胞的区分，探针响应后可释放出对肿瘤细胞存在毒性的沉淀荧光团 HAPQ，从而达到杀灭癌细胞的目的。[16]

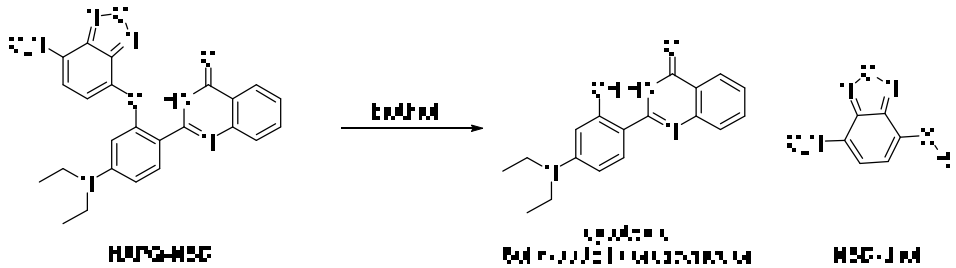


图 12. 探针 HAPQ-NBD 对生物硫醇的响应

Fu 等人将苯并假吲哚结构片段拼合到 HPQ 上，扩展了π共轭体系，开发了可用于生物系统粘度检测的探针 HPQ-BI-V，探针的最大发射波长红移至 610 nm 处，在低粘度环境下，苯基喹唑啉基和苯并吲哚基之间的分子内相对自由旋转造成了扭曲的分子内电荷转移状态，荧光较弱。当粘度增加时，在高粘度环境中，旋转受到限制，扭转的分子内电荷转移（TICT）状态的形成受到抑制，发出强烈的荧光，在生理 pH 范围内具有出色的光稳定性和出色的响应能力，可用于检测 HepG2 细胞和斑马鱼的粘度变化，能够成功地可视化 LPS 诱导的急性炎症小鼠的粘度变化和抗炎药物的疗效评估。[17]

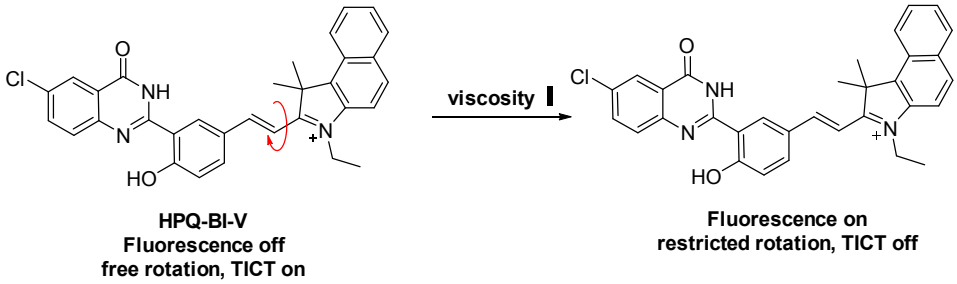


图 13. 探针 HPQ-BI-V 对粘度的响应

Fu 等人通过将 1-乙基-2-甲基喹啉基团引入 HPQ 获得了长发射波长和良好的抗扩散能力的新型水溶性荧光探针（HPQ-MQ-CO），可用于一氧化碳（CO）的精准检测，具备良好的水溶性甲酸烯丙酯作为 CO 的鉴定单元，可猝灭 HPQ-MQ-CO 的荧光，当探针与 CO 和 Pd^{2+}发生 Tsuji-Torst 反应时，可以观察到 650 nm 处的固态荧光发射信号，该探针对 CO 的选择性好，灵敏度高，可用于对 HepG2 细胞和斑马鱼中的一氧化碳进行原位长时显像，结果表明药物性肝损伤（DILI）期间 HepG2 细胞和斑马鱼中的 CO 是上调的。[18]

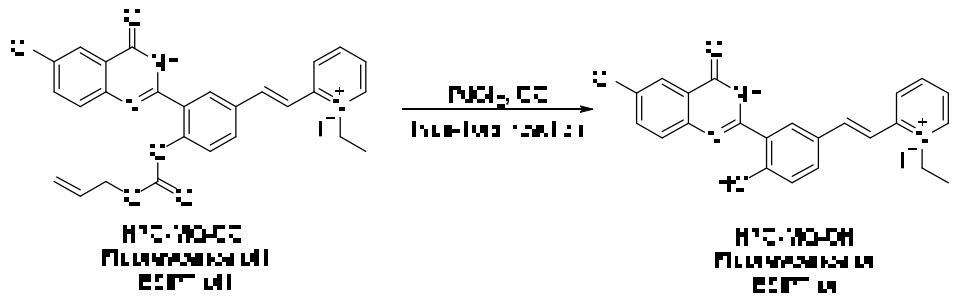


图 14. 探针 HPQ-MQ-CO 对一氧化碳的响应

Ji 等人通过将双氰基异佛尔酮与与羟基苯基喹唑啉酮（HPQ）偶联获得了一种新型比率型近红外荧光探针 HPQD。HPQD 不受环境粘度的影响，可在 40 s 内对过氧亚硝酸盐 $ONOO^-$进行快速响应，检测的线性范围为 0-35 μM。细胞水平上，HPQD 不与活性氧反应，能够敏感响应外源/内源 $ONOO^-$。在 LPS 诱导的炎症小鼠模型上，HPQD 能够通过对 $ONOO^-$的定量可视化监测来反映体内的炎症水平。[19]

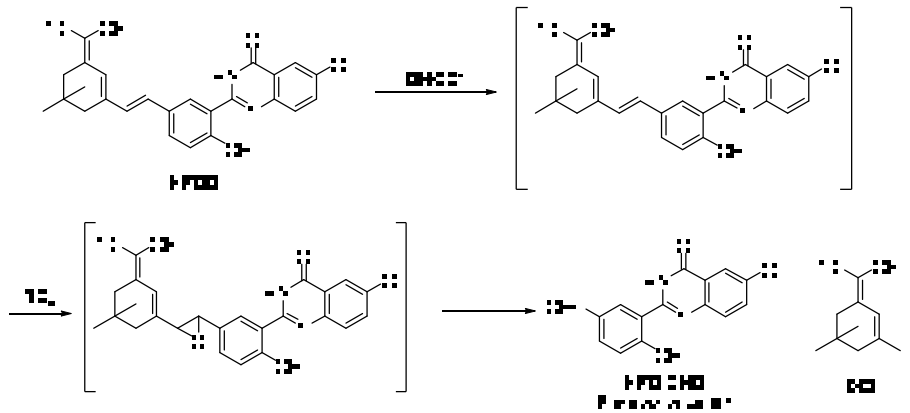


图 15. 探针 HPQD 对过氧亚硝酸盐的响应

Li 等人将 HPQ 融合到带正电荷的吸电子的半菁共轭体系中，构建了一系列稳定性高，可原位活化自组装的探针，探针在生理条件下溶解良好，几乎不显示荧光，当探针的羟基上的响应基团被 $ONOO^-$等分析对象去除时，释放的染料分子立即通过分子内和分子间氢键相互作用形成一个大的平面二聚体，该二聚体通过 π-π 堆积进一步有序地自组装，从而形成了抗扩散的近红外二区 J-聚集体（NIR-II-J-聚集体），其中探针 HPQ-Zzh-B λex/λem = 808/960 nm，可实现肿瘤的长时原位成像和成像导航的精确肿瘤切除从而减少肺部转移。[20]

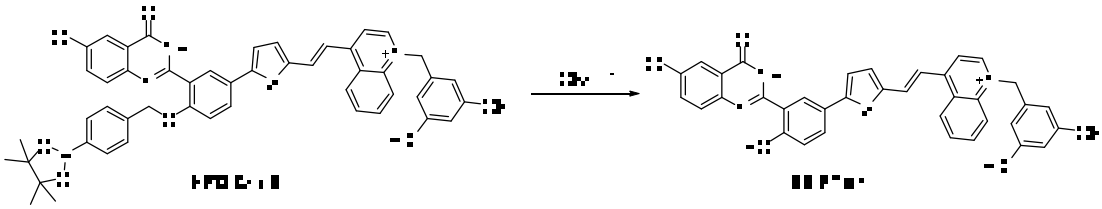


图 16. 探针 HPQ-Zzh-B 对过氧亚硝酸盐的响应

Chaudhuri 等人基于 HPQ 发色团构建了一种在单光子和双光子照射下能够耐受氧化应激并精确释放 H_2S 的荧光有机纳米体系，这种新的光触发剂的双光子吸收截面在 283nm 处计算为 720 GM，在过量 ROS 存在的情况下，MDA-MB-468 细胞系上的 H_2S 的光致释放也证明了此类荧光纳米体系的有效性，此类 H_2S 纳米前药有望在光治疗窗口中应用于激光照射下向生命系统释放 H_2S。[21]

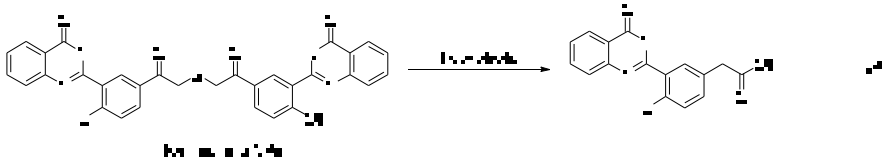


图 17. 双光子触发基于 HPQ 构建的荧光有机纳米体系释放硫化氢

总结与展望

2-（2-羟基苯基）-4（3H）-喹唑啉酮（HPQ）是因其同时具备聚集诱导发光（AIE）和激发态分子内质子转移（ESIPT）的双重特性，因而正在被广泛用于各种生物学事件的可视化，可以预见，未来基于 HPQ 的探针的开发会继续不断被推向深入并取得长足进展。本文对 HPQ 的发光机制及其在对金属离子和各种生物标志物的可视化检测方面进行了全面综述，旨在为新型 HPQ 衍生探针的开发提供一些有益参考。未来基于 HPQ 进行结构改造开发发射波长更长的近红外二区探针及双模态或者多模态探针可能是一个具备前景的研究方向。值得一提的是，HPQ 本身的低脂溶性和低水溶性的性质造成的生物活体的代谢困难是一个无法忽视的问题，这将阻碍 HPQ 衍生探针的临床转化，继续围绕 HPQ 进行结构修饰来改善其理化性质可能是一个有益的探索方向。

参考文献

(1) Anthony, S. P. Polymorph-Dependent Solid-State Fluorescence and Selective Metal-Ion-Sensor Properties of 2-(2-Hydroxyphenyl)-4(3H)-quinazolinone. *Chemistry – An Asian Journal* **2012**, *7* (2), 374-379.

(2) Liu, L.-Y.; Wu, S.-S.; Yu, J.; Chai, S.; Cong, S.-L. Theoretical insights into excited-state intramolecular and multiple intermolecular hydrogen bonds in 2-(2-Hydroxy-phenyl)-4(3H)-quinazolinone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2019**, *207*, 61-67.

(3) Zhang, X.-B.; Cheng, G.; Zhang, W.-J.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. A fluorescent chemical sensor for Fe3+ based on blocking of intramolecular proton transfer of a quinazolinone derivative. *Talanta* **2007**, *71* (1), 171-177.

(4) Huang, Z.; Terpetschnig, E.; You, W.; Haugland, R. P. 2-(2′-Phosphoryloxyphenyl)-4(3H)-quinazolinone derivatives as fluorogenic precipitating substrates of phosphatases. *Analytical Biochemistry* **1992**, *207* (1), 32-39.

(5) Zhou, L.; Zhang, X.; Lv, Y.; Yang, C.; Lu, D.; Wu, Y.; Chen, Z.; Liu, Q.; Tan, W. Localizable and Photoactivatable Fluorophore for Spatiotemporal Two-Photon Bioimaging. *Analytical Chemistry* **2015**, *87* (11), 5626-5631.

(6) Zhou, L.; Lu, D.-Q.; Wang, Q.; Hu, S.; Wang, H.; Sun, H.; Zhang, X. A high-resolution mitochondria-targeting ratiometric fluorescent probe for detection of the endogenous hypochlorous acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2016**, *166*, 129-134.

(7) Li, S.; Gao, M.; Wang, S.; Hu, R.; Zhao, Z.; Qin, A.; Tang, B. Z. Light up detection of heparin based on aggregation-induced emission and synergistic counter ion displacement. *Chemical Communications* **2017**, *53* (35), 4795-4798.

(8) Zhou, L.; Peng, Y.; Wang, Q.; Lin, Q. An ESIPT-based two-photon fluorescent probe detection of hydrogen peroxide in live cells and tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, *167*, 264-268.

(9) Li, K.; Hu, X.-X.; Liu, H.-W.; Xu, S.; Huan, S.-Y.; Li, J.-B.; Deng, T.-G.; Zhang, X.-B. In Situ Imaging of Furin Activity with a Highly Stable Probe by Releasing of Precipitating Fluorochrome. *Analytical Chemistry* **2018**, *90* (19), 11680-11687.

(10) Ou-Yang, J.; Li, Y.-F.; Wu, P.; Jiang, W.-L.; Liu, H.-W.; Li, C.-Y. Detecting and Imaging of γ-Glutamytranspeptidase Activity in Serum, Live Cells, and Pathological Tissues with a High Signal-Stability Probe by Releasing a Precipitating Fluorochrome. *ACS Sensors* **2018**, *3* (7), 1354-1361.

(11) Li, K.; Lyu, Y.; Huang, Y.; Xu, S.; Liu, H.-W.; Chen, L.; Ren, T.-B.; Xiong, M.; Huan, S.; Yuan, L.; et al. A de novo strategy to develop NIR precipitating fluorochrome for long-term in situ cell membrane bioimaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2021**, *118* (8), e2018033118.

(12) Zahid Nasim, S.; Sarfaraz, S.; Jan, F.; Yar, M.; Ur Rehaman, A. Computational insights of excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) based fluorescent detection and imaging of γ-glutamytranspeptidase activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2023**, *299*, 122814.

(13) Liu, Y.; Ren, T.-B.; Cheng, D.; Hou, J.; Su, D.; Yuan, L. An ESIPT-Based Ratiometric Fluorescent Probe for Highly Sensitive and Rapid Detection of Sulfite in Living Cells. *ChemistryOpen* **2019**, *8* (10), 1251-1257.

(14) Liu, Y.; Wu, Y.-X.; Zhang, D.; Zhong, H.; Li, D.; He, K.; Wei, W.-T.; Yu, S. Rational design of in situ localization solid-state fluorescence probe for bio-imaging of intracellular endogenous cysteine. *Talanta* **2020**, *220*, 121364.

(15) Zheng, Y.; Hou, P.; Li, Y.; Sun, J.; Cui, H.; Zhang, H.; Chen, S. A Phenothiazine-HPQ Based Fluorescent Probe with a Large Stokes Shift for Sensing Biothiols in Living Systems. In *Molecules*, 2021; Vol. 26.

(16) Zhang, Y.; Liu, C.; Sun, W.; Yu, Z.; Su, M.; Rong, X.; Wang, X.; Wang, K.; Li, X.; Zhu, H.; et al. Concise Biothiol-Activatable HPQ-NBD Conjugate as a Targeted Theranostic Probe for Tumor Cells. *Analytical Chemistry* **2022**, *94* (19), 7140-7147.

(17) Fu, G.-Q.; Liao, Q.-T.; Wang, Z.-Q.; Tan, Z.-K.; Mao, G.-J.; Yang, B.; Li, C.-Y. A HPQ-based far-red fluorescent probe for monitoring viscosity in mice model of acute inflammation. *Analytica Chimica Acta* **2022**, *1226*, 340192.

(18) Fu, G.-Q.; Xia, Y.-S.; Jiang, W.-L.; Wang, W.-X.; Tan, Z.-K.; Guo, K.-Y.; Mao, G.-J.; Li, C.-Y. A novel precipitating-fluorochrome-based fluorescent probe for monitoring carbon monoxide during drug-induced liver injury. *Talanta* **2022**, *243*,

123398. DOI: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123398.

(19) Ji, Y.; Liu, S.; Zhang, J.; Qu, L.; Wu, J.; Liu, H.; Cheng, Z. Construction of HPQ-based activatable fluorescent probe for peroxynitrite and its application in ferroptosis and mice model of LPS-induced inflammation. *Bioorganic Chemistry* **2023**, *138*, 106650.

(20) Li, Z.; Liang, P.-Z.; Xu, L.; Zhang, X.-X.; Li, K.; Wu, Q.; Lou, X.-F.; Ren, T.-B.; Yuan, L.; Zhang, X.-B. In situ orderly self-assembly strategy affording NIR-II-J-aggregates for in vivo imaging and surgical navigation. *Nature Communications* **2023**, *14* (1), 1843.

(21) Chaudhuri, A.; Singha, T.; Jena, B. C.; Shee, M.; Datta, P. K.; Mandal, M.; Singh, N. D. P. A two-photon responsive hydroxyphenylquinazolinone (HPQ)-based fluorescent organic nanoprodrug for H2S release against oxidative stress. *Chemical Communications* **2023**, *59* (9), 1177-1180.

武当山茱萸鞣质调控“LARA”型星形胶质细胞活化的抗脑衰老作用机制研究

陈　鹏[1]，陈富超[2]，雷洁昕[3]，周本宏[1*]

（1.武汉大学人民医院药学部，湖北 武汉 430060；2.湖北医药学院附属东风医院,湖北,十堰 442008；3.武汉大学人民医院内分泌科，湖北 武汉 430060）

【摘要】目的：探讨武当山茱萸鞣质调控“LARA”型星形胶质细胞活化的抗脑衰老作用机制研究。**方法**：60 只 C57 小鼠随机分为 5 组即正常对照组、衰老模型组、山茱萸鞣质高（200 mg/kg/d）、中（100 mg/kg/d）、低（50 mg/kg/d）剂量给药组。小鼠通过颈皮下注射 *D*-型半乳糖（100 mg/kg，0.1 mL/10 g）建立衰老模型，山茱萸鞣质治疗组每天接受药物灌胃进行干预。8 周后，利用旷场实验与 Y 迷宫等行为学实验检测其认知功能指标变化；高尔基染色检测其海马突触可塑性变化；透射电镜检测海马区星形胶质细胞胞内脂滴沉积情况；免疫荧光检测 GFAP 和 Perilipin 2 确定体内“脂质堆积的反应性星形胶质细胞”（Lipid-accumulated reactive astrocyte, LARA）表型相关 maker 表达变化情况；WB 检测 Perilipin 1、Perilipin 2 及 TIP47 的蛋白表达水平。检测海马组织及星形胶质细胞中 SIRT1、AMPKα（Th172）、p-AMPKα（Th172）、AMPK 靶蛋白 ACC（Ser-79）、p-ACC（Ser-79）、LKB1、p-LKB1 以及该通路相关蛋白 p-ULK1（ser-556）、ULK1 的 mRNA 水平和蛋白表达量。**结果**：山茱萸鞣质可以改善衰老小鼠空间记忆功能；缓解脑衰老小鼠的突触损伤；抑制脑衰老小鼠脑内 LARA 的活化；还可上调衰老小鼠海马区 AMPK 和 SIRT1 等相关通路蛋白表达水平。**结论**：山茱萸鞣质可激活 AMPK/SIRT1 正反馈环路促进星形胶质细胞自噬能够抑制 LARA 活化，进而改善脑衰老相关认知缺陷。

【关键词】山茱萸鞣质；脑衰老；脂质；星形胶质细胞；

第一作者：陈鹏；博士，药师；E-mail：2282968908@qq.com

通讯作者：周本宏；博士，教授；E-mail：benhongzh@whu.edu.cn

基金项目：国家自然科学基金（编号：31770381）；武当山武当特色中药研究湖北省重点实验室开放基金（编号：WDCM2022006）

c-Met 靶向近红外荧光分子探针在结肠癌成像中的应用

陈淑莹，王慧怡，涂远彪*

（江西中医药大学癌症研究中心，江西 南昌 330004）

【摘要】结肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一，也是全球癌症相关死亡的第二大原因。手术切除是局部结肠癌最常见的治疗方式。近红外(NIR)荧光成像凭借其较深组织穿透力、高成像分辨率和低自体荧光等特点在实时可视化手术导航中广泛应用。在此，我们基于结肠癌显著上调的 c-Met 蛋白受体设计了一种靶向多肽 V-1-GGGK 并合成了异硫氰酸荧光素（FITC）及花菁类近红外染料 MPA 标记的荧光分子探针 V-1-GGGK-FITC 和 V-1-GGGK-MPA，并在体内外评估了荧光分子探针用于结直肠癌靶向成像的潜力。体外细胞水平的流式、共聚焦成像及蛋白免疫印记实验证实了，探针 V-1-GGGK-FITC 对结肠癌细胞 SW480 的选择性及特异性。此外，我们通过 NIR 荧光活体成像实验评估了探针 V-1-GGGK-MPA 在结直肠癌 SW480 皮下及原位模型中的肿瘤靶向能力。活体成像结果验证了探针 V-1-GGGK-MPA 在体内的特异性且能以高信噪比靶向识别皮下及原位结肠癌 SW480。注射探针 10 小时后的主要器官离体荧光定量结果指出，皮下与原位 SW480 肿瘤模型中，肿瘤与正常结肠信噪比分别为 6.23 ± 0.53 和 4.23 ± 0.21，表明了探针 V-1-GGGK-MPA 具有体内高对比度识别 c-Met 高表达结肠癌的潜力。由此可见，新型 NIR 分子探针 V-1-GGGK-MPA 是 c-Met 阳性结直肠癌靶向成像和手术导航的潜在工具。

Efficacy of spirulina in treatment of oral submucous fibrosis: a meta-analysis of randomised controlled clinical trials

Xueru Chen[1,2,3], Hui Xie[1,2], Jincai Guo[1,2,3*]

（1. Department of Pharmacy, Changsha Stomatological Hospital, Changsha, 410006, China; 2. School of Stomatology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410006, China; 3. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208, China; ）

【**Abstract**】**Objectives:** This meta-analysis aims to systematically evaluate the efficacy of spirulina in improving mouth opening and other clinical symptoms in patients with oral submucous fibrosis (OSF). **Methods:** We conducted a comprehensive search on PubMed, Web of Science, Embase, and Cochrane Library from inception to 20 February 2023. Statistical analyses were performed using RevMan 5.4 software. Four randomized controlled trials fulfilled the inclusion criteria. The results of this meta-analysis showed that spirulina was no significant difference in improving maximum mouth opening (MMO) ([MD]: 0.61; 95% [CI]: -0.04–1.26, P = 0.07, I^2=84%), tongue protrusion (TP) ([MD]: -0.02; 95% [CI]: -0.08–0.04, P = 0.52, I^2=0%), and alleviation of the burning sensation (BS) ([MD]: 0.91; 95% [CI]: -0.32–2.15, P = 0.15, I^2=81%) in OSF patients compared with control group. **Conclusions:** The results of this meta-analysis showed that spirulina were no significant differences in improving symptoms of MMO, alleviation of the BS and TP in OSF patients compared with control group, which mean that spirulina is as effective as other drugs in improving OSF symptoms.

【**Keywords**】Oral submucous fibrosis, Spirulina, Meta-analysis

Instruction

Oral submucous fibrosis (OSF) is an insidious and chronic oral mucosal disease, which has been recognized as a precancerous lesion of the oral cavity, and the malignant transformation rate between 6% and 9%[1]. It is characterized by excessive fibrotic changes in the lamina propria and any associated connective tissue of the oral mucosa[2]. The pathogenesis of OSF has not yet been fully elucidated but may be related to betel nut chewing, capsaicin, autoimmunity, genetic predisposition, allergies, micronutrient deficiencies and chronic vitamin[1, 3-6]. At present, OSF treatment is predominantly focused on drug therapy, surgical treatment and physical therapy[7-9].

Drug therapy is the most common and important treatment for OSF, and available drug treatments include antioxidants, steroids, exogenous enzymes, multivitamins and micronutrients, peripheral vasodilators, human placental extracts, and other therapeutic agents[8, 10]. Although, numerous drugs have been applied for clinical treatment over the past few decades, satisfactory results have yet to be achieved.

Spirulina is a freshwater microalga which is considered as superfood by the WHO[11]. Spirulina is rich in protein, essential fatty acids, minerals and vitamins B12 and provitamin A (β-carotenes)[12]. In addition to its rich nutrient content, it has anti-inflammatory, anti-oxidative stress suppression, and immune-enhancing properties[13]. The high levels of phycocyanin, beta carotene, and superoxide dismutase have a potential preventive and therapeutic effects on oral diseases, several clinical

Corresponding author:

Jincai Guo, Changsha Stomatological Hospital, No. 389 Youyi road, Tianxin district Changsha, Hunan, China. Email:540009728@qq.com.

trials and animal studies have shown that spirulina has therapeutic effects on OSF, oral lichen planus and other oral diseases[14-19], however, no meta‐analysis has been conducted to evaluate the efficacy of spirulina. Hence, we conducted a comprehensive search to collect all relevant studies on the efficacy of spirulina in the treatment of OSF, and summarized the application of spirulina and provide reference for the clinical treatment of OSF.

Materials and Methods:

Research question

The present meta-analysis was designed to address the following PICO (Participants, Intervention, Control and Outcomes) question: "Is spirulina effective in management of OSF?". P=Patients with OSF, I= use spirulina treat OSF, C= conventional (curcumin, aloe vera gel, betamethasone, et al) or placebo treatment, O= improving symptoms of OSF, such as maximum mouth opening (MMO), burning sensation (BS), and tongue protrusion (TP).

Data sources and searches

We conducted a comprehensive search on PubMed, Web of Science, Embase, and Cochrane Library from inception to 20 February 2023. In addition, we performed a manual search for other references in published reviews. The detailed search strategy is shown in Figure 1. We carefully scanned the references and related reviews of the selected studies.

Eligibility criteria

Inclusion criteria: (1) Study design: Randomized control trials (RCTs); (2) Patients with OSF; (3) Intervention: spirulina; (4) Control: any medical interventions or placebo; (5) Outcomes: the subjective and objective changes after intervention such as maximum mouth opening, cheek flexibility, burning sensation. (6) Language: articles published in English language.

Exclusion criteria: (1) OSF combined with systemic diseases and the other oral mucosal diseases; (2) Studies with unclear evaluation criteria; (3) Cannot be obtained Bureau index data, literature with incomplete data and wrong data; (4) No full-text or abstract literature was available. (5) Both experimental and control groups were treated with spirulina.

Study selection

Prior to screening, a calibration exercise was conducted to ensure selection reliability. Two reviewers (Xueru Chen and Jincai Guo) independently screened the literature, extracted the data, and checked each other. If their opinions differed, a third reviewer (Hui Xie) assisted in the judgment. Studies meeting the inclusion criteria were selected for analysis and were then excluded if the studies met the exclusion criteria.

Quality Assessment

The risk of bias and the methodological quality of each included study were evaluated by two independent coauthors (Xueru Chen and Jincai Guo) using the Cochrane assessment tool.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using RevMan 5.4 software (Cochrane Collaboration, Copenhagen, Denmark). Mean difference (MD) and 95% confidence interval (CI) were used for continuous data and risk ratio (RR) and 95% CI were used for dichotomous data. Heterogeneity was evaluated by the chi-square test (a = 0.1) and the inconsistency index statistic (I^2). If no heterogeneity was observed ($P>0.1$, $I^2 \leq 50\%$), a fixed-effects model was chosen. If statistical heterogeneity was present ($P \leq 0.1$, $I^2 > 50\%$), a random-effects model was chosen.

RESULTS

Literature search and study selection

Figure 1 shows the process of the literature search. The database search yielded a total of 189 studies. After eliminating duplicate studies, 184 studies were selected for further title and abstract screening. After screening, 106 studies were excluded as they did not meet the inclusion criteria. The remaining 78 studies were selected for full-text screening, 4 RCTs were deemed eligible for qualitative and quantitative analyses[15, 17-19].

General characteristics of the included studies

General characteristics of the included studies are presented in Table 1. Four randomized controlled trials (RCT) published from 2013 to 2022 involving 162 patients were included. The average age of the participants ranged from 28.05 to 47.1 years. The reported duration of intervention was 3 months in three studies and 4 months in one study. Two studies used spirulina alone, aloe vera and pentoxifylline were used as control group, respectively[17, 18]. Two studies used spirulina in combination with sterols, control group were sterols plus omega-3 and placebo, respectively[15, 19].

Study quality evaluation

The risk of bias in the included studies was assessed by the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions,Version 5.1.0[20]. All included studies were clinical RCTs, all studies did not mention the randomization method used. No studies mentioned allocation concealment or double blinding. All the studies were data complete and not selectively reported. The details of the study quality evaluation were shown in figure 2.

Study outcomes and meta-analysis results

Tongue Protrusion

Two studies included the outcome of TP. As shown in the Figure2A, the results showed that there was no significant difference between spirulina group and control group ([MD]: -0.02; 95% [CI]: -0.08–0.04, P = 0.52, I^2=0%).

Maximum mouth opening

Four studies included the outcome of MMO. As shown in the Figure2B, studies reported the change of MMO ([MD]: 0.61; 95% [CI]: -0.04–1.26, P = 0.07, I^2=84%) between spirulina groups and control groups (pentoxifylline, aloe vera, omega-3 and placebo). This means that the effect of spirulina in improving MMO is the same as the drugs in the control group, which can improve the MMO of OSF patients effectively.

Burning sensation

Three studies included the outcome of BS. The visual analog scale (VAS) score was used in these three studies to assess BS. As shown in the Figure2C, the results showed that there was no significant difference between spirulina group and control group ([MD]: 0.91; 95% [CI]: -0.32–2.15, P = 0.15, I^2=81%).

Discussion

Spirulina is a blue-green alga that exert antioxidant properties, it is rich in high-value products, which contain β-carotene, γ-linolenic acid, phytocyanins, tocopherols and phenolic compounds[21]. Spirulina is a promising functional food and preventive medicine, it is considered safe by the US Food and Drug Administration[22]. Naif Abdullah's study showed that spirulina was evaluated for the concentration of six heavy metals/minerals, the results showed that the content of inorganic elements in spirulina did not exceed the standard, and spirulina could be used as a safe food[23]. Mahendra J et al. evaluated the clinical efficacy of spirulina gel in a clinical trial. The results showed that spirulina had strong antioxidant activity and

low toxicity[24]. Because spirulina contains a large amount of β-carotene and the antioxidant properties of superoxide dismutase, it can prevent or delay cardiovascular disease and have chemopreventive ability to reverse precancerous lesions[25, 26]. In addition, it also has a certain therapeutic effect on hypercholesterolemia, inflammatory chronic diseases, oral diseases (such as oral leukoplakia, oral lichen planus and other oral diseases)[13, 27]. Mathew et al. evaluated that spirulina has chemopreventive activity to reverse oral leukoplakia. Adding spirulina as an adjuvant therapy can improve the overall management[28]. A study by Chaitanya et al. demonstrated that spirulina may be useful in increasing the refractory period between remissions and may be useful in managing refractory lesions that do not respond to conventional therapy[14]. Mahendra J et al. evaluated that as a topical delivery system, the product exerts potent anti-inflammatory effects without any side effects in the non-surgical treatment of periodontitis[24]. A study from Kanjani et al. demonstrared that spirulina along with different physiotherapeutic modalities was well tolerated by the patients[16].

Oral submucosal fibrosis (OSF) is a common oral precancerous lesion in Asian countries, especially in areas with betel nut chewing culture[29, 30]. Abnormal collagen deposition in connective tissue causes OSF. The resulting symptoms, such as ulcers, dry mouth, BS and limited MMO, which can seriously affect the quality of life of patients[31]. In addition, OSF is a precancerous disease with the potential for malignant transformation[1, 32]. Therefore, there is an urgent need for early diagnosis and active therapeutic intervention of this disease. At present, the treatment methods of OSF can be divided into three categories: drug therapy, mouth opening exercise, and surgical treatment. Drug therapy includes sterols, hyaluronidase, vasodilators, antioxidants, etc. Among them, natural antioxidants such as aloe vera, curcumin and lycopene have shown their powerful effects in improving MMO and relieving BS[33, 34].

A meta-analysis by Jincai Guo et al. showed that compared with placebo, oral curcumin significantly improved the symptoms of MMO and burning sensation[35]. A meta-analysis conducted by Al-Maweri et al. showed that compared with other drugs, aloe vera was well tolerated, had few side effects, and was significantly better in reducing BS in the short-term treatment[34]. Spirulina is also a natural antioxidant, it has been reported for the treatment of OSF, and there is solid evidence to prove the efficacy of spirulina treatment, but there is a lack of evidence-based medical data. Therefore, a meta-analysis is necessary to investigate the efficacy of spirulina in the treatment of OSF[15, 17-19].

This meta-analysis was performed to answer the question, "Is spirulina more effective in treating OSF compared to other treatments?" The results of this meta-analysis confirmed that there were no significant differences in improving MMO, BS and TP. In other words, spirulina was similar to other treatments in improving symptoms of MMO, BS and TP. In addition, Patil et al. demonstrated that spirulina had a better effect on ulcers/vesicles/erosions and pain associated with lesion than aloe vera.

An important issue related to the management of OSF is the adverse effects after application. The main objective of this meta-analysis was to investigate the effectiveness of spirulina compared with other interventions, and the secondary objective was to investigate the safety of spirulina compared with other interventions. The results of the RCTs included in this meta-analysis showed that spirulina was well tolerated compared with other treatments, and no side effects were reported. Therefore, a safe and effective drug like spirulina is a promising and potential alternative treatment for OSF.

The current meta-analysis still has some limitations, the main limitations are as follows: first, the number of trials that can be included is relatively small, and the sample size of the included studies were small. Second, some of the included studies used a positive control rather than a placebo, and each control group had a different drug (pentoxyfilline, aloe vera, omega-3). Third, none of the studies specifically mentioned methods such as allocation concealment, randomization, and

double-blind, which may lead to implementation bias or measurement bias in outcome measures. Despite these limitations, our meta-analysis still made a lot of sense. To the best of our knowledge, this is the first comprehensive meta-analysis of the available evidence on the effectiveness of spirulina in the treatment of OSF, and shows that spirulina is equivalent to other drugs in the improvement of MMO, alleviating BS and TP. Such results can also give some reference for clinical medication.

Conclusion

In summary, the results based on the current study showed that spirulina and other drugs have the same effect on the treatment of OSF. However, the number of existing studies is small, the sample size is small, and the research still has some limitations. In the future, more high-quality large-sample multi-center RCTs are needed to further verify the conclusions of this study, so as to give clinicians a reference for medication.

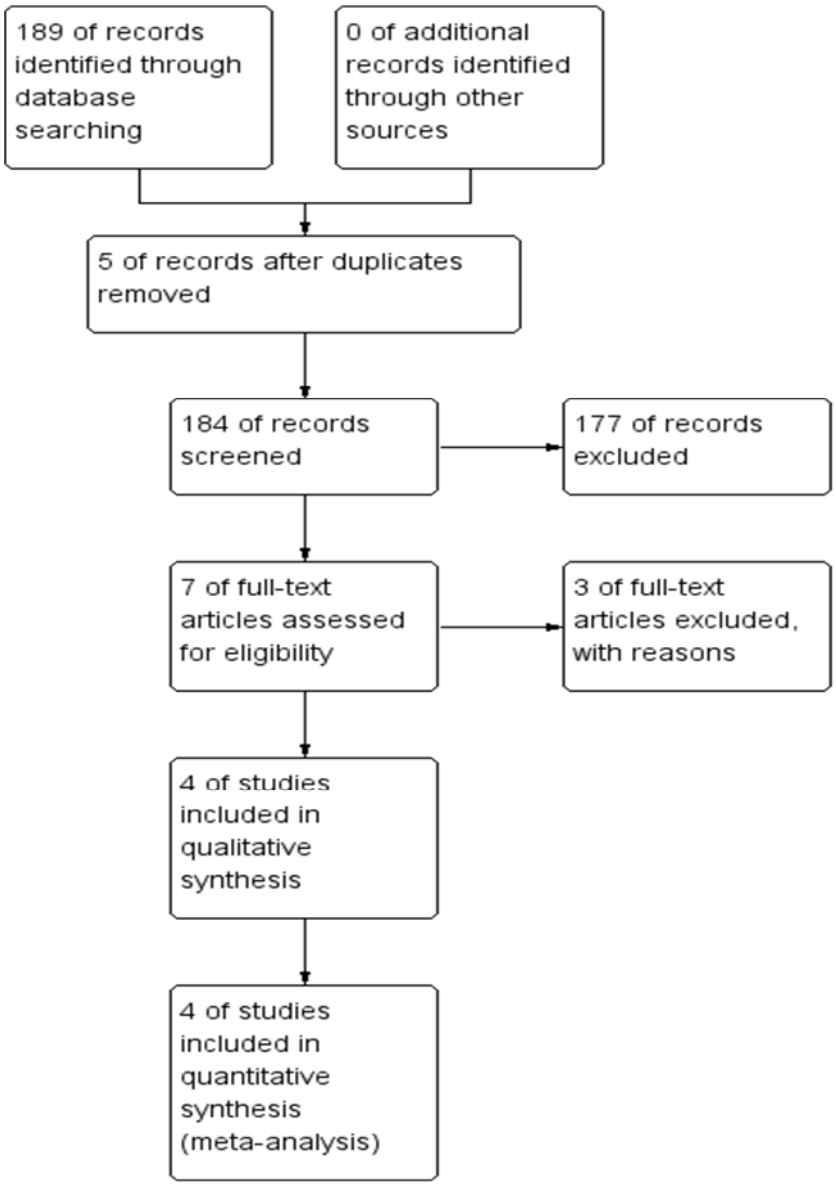


Figure 1. Flow chart of the study selection

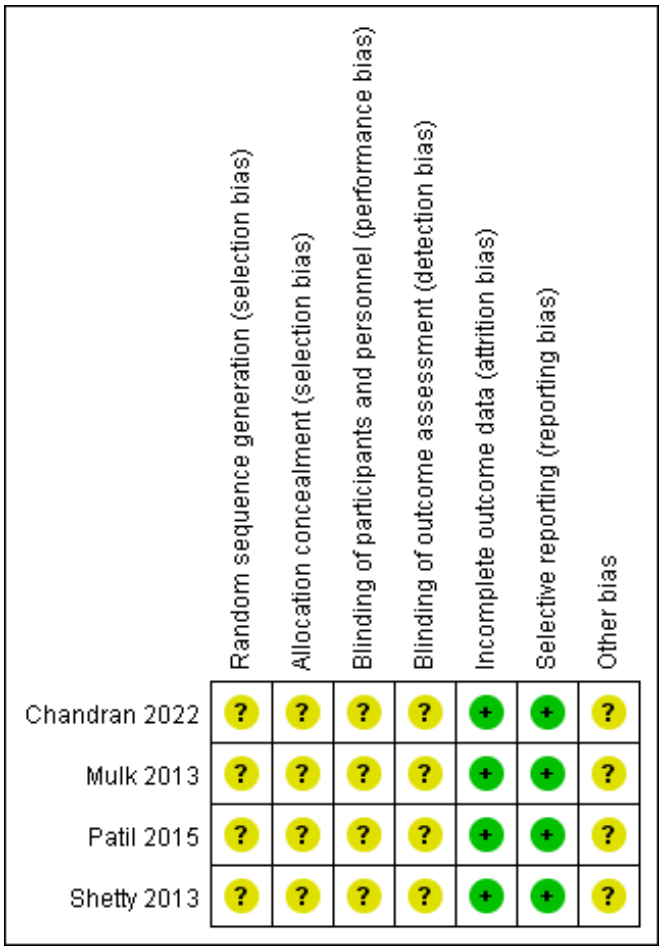


Figure 2. Risk-of-bias summary.

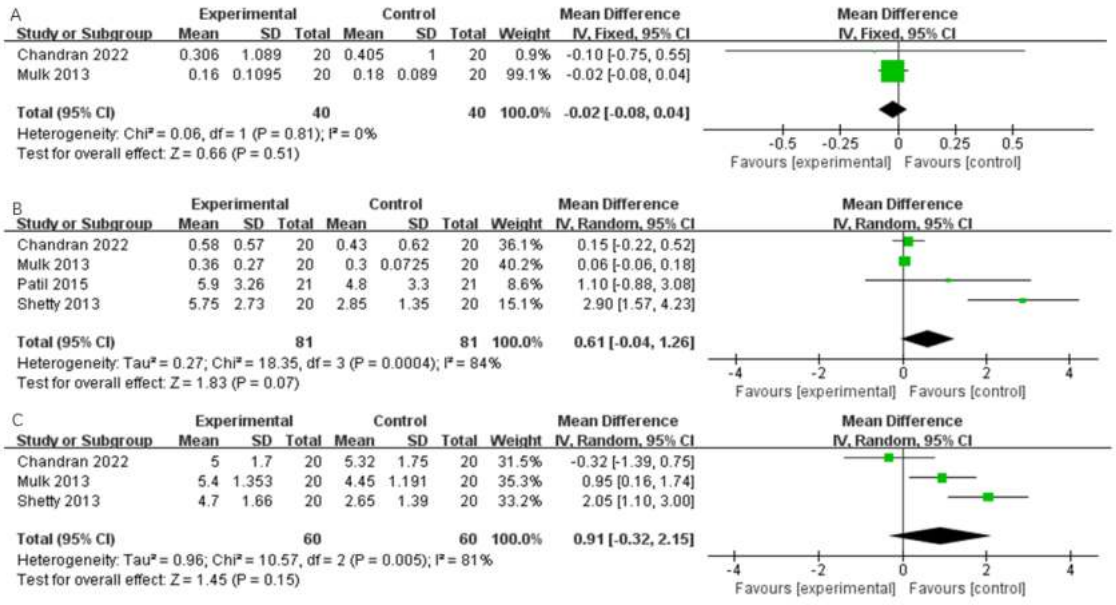


Figure 3. Meta-analysis for the treatment effects between spirulina and control group. (A) Forest plot of tongue protrusion. (B) Forest plot of MMO. (C) Forest plot of burning sensation.

Table 1. Characteristics of included studies.

Outcomes:①MMO②tongue protrusion③burning sensation

The first author, year	Participants		Gender (M/F)		Age (Yr)		Intervention		Duration	Outcomes
	T	C	T	C	T	C	T	C		
Chandran,2022	20	20	15/5	17/3	38.3 ± 6.8	37.6 ± 9.5	biweekly intralesional injections of 1.5 ml Dexamethasone in 4 mg/1 ml and Hyaluronidase 1500 IU mixed with Lignocaine 0.5 ml for six weeks and with omega-3 fatty acid capsules 1 gm three times daily	pentoxyfilline 400mg twice daily	3 months	①②③
Mulk 2013	20	20	19/1	20/0	31.6	31.95	spirulina capsules 0.5gm twice daily	5 mg aloe vera gel (Sheetal Lab, Surat) to be applied topically thrice daily	4 months	①②③
Patil 2015	21	21	/	/	31.2 ± 12.4	31.2 ± 12.4	500 mg spirulina in 2 divided doses	placebo capsules twice daily and biweekly intralesional steroid injection of Betamethasone 4 mg/ml	3 months	①
Shetty 2013	20	20	/	/	28.05	30.75	spirulina 500 mg twice daily and biweekly intralesional steroid injection of Betamethasone 4 mg/ml		3 months	③

References

1. Murthy, V.; Mylonas, P.; Carey, B.; Yogarajah, S.; Farnell, D.; Addison, O.; Cook, R.; Escudier, M.; Diniz-Freitas, M.; Limeres, J.; Monteiro, L.; Silva, L.; Fricain, J. C.; Catros, S.; Fenelon, M.; Lodi, G.; Lombardi, N.; Brailo, V.; Ariyaratnam, R.; Lopez-Lopez, J.; Albuquerque, R., Malignant Transformation Rate of Oral Submucous Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med* **2022,** *11* (7).

2. Canniff, J. P.; Harvey, W.; Harris, M., Oral submucous fibrosis: its pathogenesis and management. *Br Dent J* **1986,** *160* (12), 429-34.

3. Gupta, D. S.; Gupta, M.; Oswal, R. H., Estimation of major immunoglobulin profile in oral submucous fibrosis by radial immunodiffusion. *Int J Oral Surg* **1985,** *14* (6), 533-7.

4. Rajendran, R.; Vasudevan, D. M.; Vijayakumar, T., Serum levels of iron and proteins in oral submucous fibrosis (OSMF). *Ann Dent* **1990,** *49* (2), 23-5, 45.

5. Shiau, Y. Y.; Kwan, H. W., Submucous fibrosis in Taiwan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1979,** *47* (5), 453-7.

6. Yang, P. Y.; Chen, Y. T.; Wang, Y. H.; Su, N. Y.; Yu, H. C.; Chang, Y. C., Malignant transformation of oral submucous fibrosis in Taiwan: A nationwide population-based retrospective cohort study. *J Oral Pathol Med* **2017,** *46* (10), 1040-1045.

7. Arakeri, G.; Rai, K. K.; Boraks, G.; Patil, S. G.; Aljabab, A. S.; Merkx, M. A. W.; Carrozzo, M.; Brennan, P. A., Current protocols in the management of oral submucous fibrosis: An update. *J Oral Pathol Med* **2017,** *46* (6), 418-423.

8. Chole, R. H.; Gondivkar, S. M.; Gadbail, A. R.; Balsaraf, S.; Chaudhary, S.; Dhore, S. V.; Ghonmode, S.; Balwani, S.; Mankar, M.; Tiwari, M.; Parikh, R. V., Review of drug treatment of oral submucous fibrosis. *Oral Oncol* **2012,** *48* (5), 393-8.

9. Wollina, U.; Verma, S. B.; Ali, F. M.; Patil, K., Oral submucous fibrosis: an update. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **2015,** *8*, 193-204.

10. Jiang, X.; Hu, J., Drug treatment of oral submucous fibrosis: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* **2009,** *67* (7), 1510-5.

11. Sorrenti, V.; Castagna, D. A.; Fortinguerra, S.; Buriani, A.; Scapagnini, G.; Willcox, D. C., Spirulina Microalgae and Brain Health: A Scoping Review of Experimental and Clinical Evidence. *Mar Drugs* **2021,** *19* (6).

12. Hosseini, S. M.; Khosravi-Darani, K.; Mozafari, M. R., Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. *Mini Rev Med Chem* **2013,** *13* (8), 1231-7.

13. Deng, R.; Chow, T. J., Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovasc Ther* **2010,** *28* (4), e33-45.

14. Chaitanya, N. C.; Chikte, D.; Kumar, Y. P.; Komali, G.; Yellarthi, S. P.; Reddy, C. S.; Harika, D. P.; Haritha, S.; Taie, W. A. A.; Hatab, N. A.; et al., Efficacy of Spirulina 500 mg vs Triamcinolone Acetonide 0.1% for the Treatment of Oral Lichen Planus: a Randomized Clinical Trial. *Journal of contemporary dental practice* **2022,** *讨论 扁平苔藓* (5), 552 - 557.

15. Chandran, K. V. A.; Abhinethra, M. S.; Deepak, T. A.; Choudary, A. S.; Upasana, L., Effectiveness of Omega-3 Fatty Acids and Spirulina as an Adjuvant Antioxidant to Corticosteroid in the Treatment of Oral Submucous Fibrosis - A Comparative Study. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology* **2022,** *34* (2), 150-155.

16. Kanjani, V.; Annigeri, R. G.; Revanappa, M. M.; Rani, A., Efficacy of Spirulina along with Different Physiotherapeutic Modalities in the Management of Oral Submucous Fibrosis. *Annals of maxillofacial surgery* **2019,** *9* (1), 23-27.

17. Mulk, B. S.; Deshpande, P.; Velpula, N.; Chappidi, V.; Chintamaneni, R. L.; Goyal, S., Spirulina and pentoxyfilline - a novel approach for treatment of oral submucous fibrosis. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* **2013,** *7* (12), 3048-50.

18. Patil, S.; Al-Zarea, B. K.; Maheshwari, S.; Sahu, R., Comparative evaluation of natural antioxidants spirulina and aloe vera for the treatment of oral submucous fibrosis. *Journal of oral biology and craniofacial research* **2015,** *5* (1), 11-5.

19. Shetty, P.; Shenai, P.; Chatra, L.; Rao, P. K., Efficacy of spirulina as an antioxidant adjuvant to corticosteroid injection in

management of oral submucous fibrosis. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research* **2013,** *24* (3), 347-50.

20. Cumpston, M. S.; McKenzie, J. E.; Welch, V. A.; Brennan, S. E., Strengthening systematic reviews in public health: guidance in the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, 2nd edition. *J Public Health (Oxf)* **2022,** *44* (4), e588-e592.

21. Maranesi, M.; Barzanti, V.; Carenini, G.; Gentili, P., Nutritional studies on Spirulina maxima. *Acta Vitaminol Enzymol* **1984,** *6* (4), 295-304.

22. Gorban, E. N.; Kuprash, L. P.; Gorban, N. E., [Spirulina: perspectives of the application in medicine]. *Lik Sprava* **2003,** (7), 100-10.

23. Al-Dhabi, N. A., Heavy metal analysis in commercial Spirulina products for human consumption. *Saudi J Biol Sci* **2013,** *20* (4), 383-8.

24. Mahendra, J.; Mahendra, L.; Muthu, J.; John, L.; Romanos, G. E., Clinical effects of subgingivally delivered spirulina gel in chronic periodontitis cases: a placebo controlled clinical trial. *J Clin Diagn Res* **2013,** *7* (10), 2330-3.

25. Abouzed, T. K.; Althobaiti, F.; Omran, A. F.; Eldomany, E. B.; El-Shazly, S. A.; Alharthi, F.; Elkattawy, A. M.; Kahilo, K. A. A.; Dorghamm, D. A., The chemoprevention of spirulina platensis and garlic against diethylnitrosamine induced liver cancer in rats via amelioration of inflammatory cytokines expression and oxidative stress. *Toxicol Res (Camb)* **2022,** *11* (1), 22-31.

26. Martinez-Palma, N. Y.; Davila-Ortiz, G.; Jimenez-Martinez, C.; Madrigal-Bujaidar, E.; Alvarez-Gonzalez, I., Chemopreventive and Antioxidant Effect of Polyphenol Free Spirulina maxima and Its Hydrolyzed Protein Content: Investigation on Azoxymethane Treated Mice. *Pharmacogn Mag* **2017,** *13* (Suppl 2), S164-S169.

27. Calella, P.; Cerullo, G.; Di Dio, M.; Liguori, F.; Di Onofrio, V.; Galle, F.; Liguori, G., Antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory effects of spirulina in exercise and sport: A systematic review. *Front Nutr* **2022,** *9*, 1048258.

28. Mathew, B.; Sankaranarayanan, R.; Nair, P. P.; Varghese, C.; Somanathan, T.; Amma, B. P.; Amma, N. S.; Nair, M. K., Evaluation of chemoprevention of oral cancer with Spirulina fusiformis. *Nutr Cancer* **1995,** *24* (2), 197-202.

29. Gupta, S.; Jawanda, M. K., Oral submucous fibrosis: An overview of a challenging entity. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **2021,** *87* (6), 768-777.

30. Peng, Q.; Li, H.; Chen, J.; Wang, Y.; Tang, Z., Oral submucous fibrosis in Asian countries. *J Oral Pathol Med* **2020,** *49* (4), 294-304.

31. Warnakulasuriya, S., Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **2018,** *125* (6), 582-590.

32. Kujan, O.; Mello, F. W.; Warnakulasuriya, S., Malignant transformation of oral submucous fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Oral Dis* **2021,** *27* (8), 1936-1946.

33. Ahmad, T.; Khan, I.; Rizvi, M. M.; Saalim, M.; Manzoor, N.; Sultana, A., An overview of effect of lycopene and curcumin in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis. *Natl J Maxillofac Surg* **2021,** *12* (3), 316-323.

34. Al-Maweri, S. A.; Ashraf, S.; Lingam, A. S.; Alqutaibi, A.; Abdulrab, S.; Alaizari, N.; Halboub, E., Aloe vera in treatment of oral submucous fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med* **2019,** *48* (2), 99-107.

35. Guo, J. C.; Xie, H.; Wu, H.; Tong, T. J., [Efficacy of curcumin in the treatment of oral submucous fibrosis: a Meta-analysis]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **2021,** *39* (2), 195-202.

新型抗精神障碍药鲁拉西酮个体化用药研究进展

陈玉清，杨烨，戴丽静[1]，温预关

（广州医科大学附属脑科医院Ⅰ期临床研究室，广东 广州 510370）

【摘要】鲁拉西酮是一种新型抗精神障碍药(第二代抗精神病药SGA)，是多巴胺2型 D2 和血清素 5-HT2A 和 5-HT7 受体完全拮抗剂和部分 5HT1A 受体激动剂。鲁拉西酮对精神分裂症患者的精神病症状、感情症状、认知症状的治疗效果明显，同时对患者体重、代谢影响水平较小，具有良好的安全性及耐受性，广泛应用于临床治疗。基于此，本文综述了鲁拉西酮的作用机制和药代动力学研究、群体药代动力学、安全性、有效性及耐受性、治疗药物检测、基因多态性、药物相互作用研究现状，以期为后续研究及临床个体化用药提供参考。

【关键词】鲁拉西酮，药代动力学、治疗药物检测，群体药代动力学，基因多态性，个体化用药建议

Progress on individualized dosing of lurasidone, a new anti-psychotic drug

Chen Yuqing，Yang Ye，Dai Lijing，Wen Yuguan

(Phase I Clinical Laboratory of Brain Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou 510370）

【Abstract】 Lurasidone is a novel antipsychotic (second-generation antipsychotic SGA), which is a complete antagonist of dopamine type 2（D_2） and serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_7 receptors and a partial $5HT_{1A}$ receptor agonist. It is widely used in the clinical treatment of patients with schizophrenia because of its significant efficacy in psychotic, affective, and cognitive symptoms, and its low effect on body mass and metabolism, as well as its good safety and tolerability. Based on this, the review focus on the mechanism of action and pharmacokinetic studies, population pharmacokinetics, safety, efficacy and tolerability, therapeutic drug testing, gene polymorphism, and drug interaction studies of lurasidone, with the aim of providing reference for follow-up studies and individualized clinical treatment.

鲁拉西酮（Lurasidone）是新型第二代抗精神障碍药之一，由日本住友制药研制。鲁拉西酮属于苯并异噻唑类药物，是多巴胺2型 D_2、血清素 5-HT_{2A}、5-HT_7受体完全拮抗剂和 $5HT_{1A}$受体部分激动剂[1]。鲁拉西酮在2010年被美国食品药品监督管理局（FDA）批准用于治疗成年精神分裂症患者，2011 年在美国以及波多黎各自治邦首次上市，2013年被批准可作为单一疗法和辅助锂或丙戊酸盐治疗双相情感障碍的药物。2017年1月，美国 FDA 批准鲁拉西酮应用于青少年精神分裂症患者；2018 年 3 月，FDA 批准鲁拉西酮治疗与双相抑郁症相关的 10-17 岁青少年患者[2]。中国国家药品监督管理局（NMPA）于 2019 年 1 月批准鲁拉西酮上市并且用于成年精神分裂患者的治疗[3]。与先前的第二代抗精神障碍相比，鲁拉西酮提高对抑郁或阴性症状的疗效，减少代谢和心血管副作用，同时降低引起锥体外系不良反应的风险。但鲁拉西酮在我国的临床应用刚刚开始不久，临床使用经验不足，因此本综述将从以下方面：作用机制和药代动力学研究、群体药代动力学、安全性、有效性及耐受性、治

基金项目：广东省医院药学研究基金资助项目（澳美基金，2022A22）；广东省药学会临床治疗精准用药专项基金（基金编号：2023JZ14）；广东省卫生计生适宜推广基金资助项目(粤卫办函［2018］326号)

作者简介：陈玉清（2000-），女，2023级硕士研究生，研究方向：临床药学与药物评价。

通信作者：温预关（1972-），男，主任药师，研究方向：个体化用药研究，联系方式：18922165263，邮箱：wenyuguande@163.com。

疗药物检测、基因多态性、药物相互作用来介绍新型抗精神障碍药鲁拉西酮个体化用药研究进展，以期为后续研究及临床个体化用药提供参考。

1 作用机制和药代动力学研究

1.1 作用机制

鲁拉西酮的作用机制尚未完全明确，目前认为鲁拉西酮作用机制可能是拮抗多巴胺 D_2（Ki=1 nM）和 5-HT_{2A}（Ki=0.5 nM）受体发挥作用，对 5-HT_7 受体的高亲和力（Ki= 0.5 nM）并且部分激动 5-HT_{1A} 受体（Ki = 6.4 nM）[4]。在第二代抗精神病药当中，鲁拉西酮对 5-羟色胺受体活性最高，对 D_2 受体结合率也较高。对健康男性受试者给予鲁拉西酮后（10、20、40、60 或 80mg），D_2 受体占用率>60% ，其中 60mg 剂量 D_2 受体占用率最高[5]。此外鲁拉西酮对 α_2-肾上腺素能受体表现活性，此作用可增强认知[6]。鲁拉西酮对 α_1-肾上腺素能受体、5-HT $_{2C}$ 受体、组胺能 H_1 受体和毒蕈碱受体的活性较低，因此其引起体位性低血压，体重增加，镇静和反应迟钝的发生率较低[7]。鲁拉西酮较少引起锥体外系症状，可能是由于鲁拉西酮使 HTR $_{2A}$ 和 D_2 受体的阻断，促进 HTR $_{1A}$ 的激活来增加皮质和纹状体 DA 的释放[8]。

1.2 药代动力学研究

鲁拉西酮能够被人体快速吸收，但生物利用度较低（9%-19%）[9]。单次给药后 1.0 ~ 3.0 h 血药浓度达到最高 C_{max}（t_{max} 后浓度在给药后 2~8 h 内急剧下降后缓慢下降)，5d 后达到稳态。20~80 mg 范围内，平均 $t_{1/2}$ 为 18.1 ~ 25.5 h，CL/F 为 187 ~ 231 L/h，Vz/F 为 5523 ~ 6887 L。AUC 和 C_{max} 值与剂量成正比，但 C_{max} 和 AUC 的个体间变异性较高（30-60%）。给药间隔内 AUC 累积指数为 1.25，小于理论值 1.76。代谢产物（ID-14283、ID14326 和 ID-11614）也观察到了类似的结果[9-10]。研究认为中国健康人群在一次或多次服用鲁拉西酮后，其药物代谢特性与健康白人类似[10]。但另一项研究表明中国受试者的 AUC 比西方受试者高 37%[11]。

鲁拉西酮的吸收过程受食物影响较大。与食物一起服用时，鲁拉西酮及其代谢产物的血药浓度增加。在随机交叉临床试验当中，鲁拉西酮与 100、200、800~1000kcal 食物一起进食时，与空腹状态相比 T_{max} 均延长且 800~1000kcal 餐后服用鲁拉西酮的 AUC 和 C_{max} 增加 1-2 倍。进食 350~1000 kcal 后服用鲁拉西酮 C_{max} 的几何平均数升高 3 倍，平均 AUC_{0-tau} 增加 2 倍。卡路里一定的条件下，鲁拉西酮的吸收与脂肪量无关[12]。

鲁拉西酮与人血浆白蛋白和 α_1-糖蛋白的结合率较高（99%），与浓度无关[13]。在健康受试者体内，分布在红细胞中的鲁拉西酮平均分数约为 12%。鲁拉西酮主要分布于脑、肝、肾、心、脾、肺、肠、肌肉和脂肪，其中在脑的分布较缓慢，推测与其极高的血浆蛋白结合率和极低的未结合浓度有关[14]。

鲁拉西酮主要通过肝脏的 CYP3A4 进行代谢消除，主要产生 3 种无活性代谢产物（ID-20219、ID-20220、ID-11614）以及 2 种活性代谢产物（ID-14283、ID-14326）。ID-14283 和 ID-14326 对人 5-HT_{1A} 和 5-HT_7 受体也具与鲁拉西酮相似的高亲和力[7]。其中，ID-14283 活性约为鲁拉西酮的 1/4，药理学特征与鲁拉西酮相似，但存在时间较短（7.48~10 h）[9]。

鲁拉西酮通过尿液和粪便排泄，在这些排泄物中发现约 89%（粪便 80%，尿液 9%）。鲁拉西酮可通过胎盘屏障，也可通过乳汁排泄[6, 15]。

在特殊人群中，儿童和青少年人群多次给药后的鲁拉西酮暴露量与成人稳态时观察到的暴露量相似，且不良事件在性质上与成人报告的相似[16]。健康老年男性的鲁拉西酮的 C_{max} 比年轻男性低 31%，但 AUC 相似。老年精神病患者和年轻受试者同时服用盐酸鲁拉西酮 20mg/d，鲁拉西酮及其活性代谢物的暴露量相似[7]。

2 群体药代动力学

该方面的研究较少。目前在中国，Zhang H 等学者[11]结合两个中国 I 期研究的数据和之前模型开发中的 27 个临床研究的数据，并完善群体 PK 模型。结果表明中国受试者中鲁拉西酮的典型预测稳态 AUC 高 37%（中位数：264 ng × h/mL）于西方受试者（中位数：193 ng × h/mL），AUCss 比西方受试者高 13%。典型 Cmax,ss 略高于西方受试者，预测亚洲受试者的典型 Cmin,ss 比非亚洲人高约 1.7 倍[11]。与西方人群相比，中国个体的鲁拉西酮 Cps/DD 可能高出 30~ 40%[17]。

3 安全性、有效性及耐受性

3.1 精神分裂症

精神分裂症（SCZ）是一种常见的、遗传复杂的综合征，严重影响患者的生活质量和社会功能。鲁拉西酮治疗成人患者推荐初始剂量为 40 mg/d，推荐剂量 40-160 mg/d。研究表明，中国健康人群服用一次或两次以上鲁拉西酮的患者没有出现严重不良事件(Serious Adverse Events，SAE)。其中，最常见的不良反应是嗜睡，血液催乳素升高，以及烦躁不安（只在多次服用药物的受试者中出现），但所有的症状都评定为轻度，发生率随着服用剂量增加而增加。此外，没有发生明显的新陈代谢问题或心电图异常[10]。多项研究表明鲁拉西酮在批准剂量范围内，短期或长期治疗成人精神分裂症患者，与安慰剂相比其简易精神病学评定量表或阳性和阴性综合征量表(PANSS)总评分明显下降，同时患者的依从性高，发生不良反应概率及全因停药的风险较低，对代谢影响较其他抗精神病药小且疗效与奥氮平、利培酮相似[18-28]。然而鲁拉西酮停药率高于利培酮[23、25]。此外，精神分裂症患者使用鲁拉西酮治疗的复发率（23.7%）低于喹硫平（33.6%）[29]。

鲁拉西酮治疗青少年患者（13-17 岁）推荐初始剂量为 40 mg/d，推荐剂量 40-80 mg/d。多项研究表明，鲁拉西酮短期或长期治疗青少年患者，出现统计学意义和临床意义的症状缓解，PANSS 总评分持续改善，对体重和代谢参数影响较小（体重、脂质、血糖指数和催乳素），与成年患者的研究结果一致[21-24、26、30-32]。尚有两项网络荟萃分析认为，与其他口服非典型抗精神病药，鲁拉西酮单药治疗对 PANSS 和 CGI-S 评分的有效性显著高于安慰剂，同时体重增加与安慰剂相似；且与奥氮平、喹硫平、利培酮、阿塞那平和帕潘立酮相比，其导致的体重增加在统计学上明显更少；此外，鲁拉西酮全因停药风险较低[21、30]。但鲁拉西酮和其他非典型抗精神病药治疗青少年精神分裂症引起的 EPS 和静坐不能发生率相似[30]。

3.2 双相情感障碍

双相情感障碍是一种慢性和复杂的情绪障碍，以躁狂、轻躁狂和抑郁发作的混合为特征。鲁拉西酮治疗成人双相情感障碍推荐初始剂量 20mg/d，推荐剂量 20-120mg/d。Loebel A[33-37]等学者发现短期鲁拉西酮单药或者辅助锂或丙戊酸盐治疗双相 I 型抑郁症（与安慰剂联用锂或丙戊酸组相比），可明显降低了 MADRS 总分、CGI-BP 抑郁严重程度评分，改善患者病情，同时患者的体重、血脂和血糖只发生微小变化，因不良事件导致的停药率与安慰剂近似。日本研究表明鲁拉西酮(含或不含锂或丙戊酸钠)长期治疗同样具有良好的安全性和有效性。患者抑郁症状能有效缓解；有躁狂、轻躁狂或混合发作的患者其躁狂症状减轻。此外，不良事件发生率大体相似，研究期间没有发生新的安全性问题，代谢参数的平均变化不大[38]。

双相情感障碍在青少年中的患病率约为 1.8%，患有双相情感障碍的青少年自虐风险增加[39]。鲁拉西酮治疗儿童和青少年患者推荐初始剂量 20mg/d，推荐剂量 20-80mg/d。研究表明，鲁拉西酮短期或者长期治疗可有效减轻了 5-17 岁患者双相抑郁症的抑郁症状，CDRS-R 总分具有统计学意义改善，患者体重、催乳素等代谢参数变化不大，同时患者因 AE 导致的停药率相对较低[40-41]。

此外，鲁拉西酮治疗双相 I 型抑郁症老年患者同样显示出良好的临床价值。研究表明用鲁拉西酮作为单一疗法或辅助疗法治疗 6 个月，可观察到老年人平均 MADRS 得到改善，同时平均体重（分别为-1.0kg 和-0.4kg）、中位数总胆固醇（-2.0mg/dl 和+6.0mg/dl）、甘油三酯（+2.5mg/dl 和+6.0mg/dl）和 HbA1c（0.0%和-0.1%）变化微小[42]。

4 治疗药物检测

治疗药物监测（therapeutic drug monitoring, TDM）是通过测定药物及代谢物的血浆水平来优化和个体化治疗的有用工具，可减少因代谢的高度变异性导致的治疗不佳，从而提高治疗的有效性和安全性。根据治疗药物监测共识指南，鲁拉西酮治疗范围 15~40ng/ mL，实验室警戒 120 ng/mL，TDM 推荐级别为 3 级。 在给药间隔为 24h 时，鲁拉西酮 C/D 参考范围为 0.09~0.13[43]。有研究认为由于大多数患者的临床情况稳定，鲁拉西酮的处方剂量是合适的。该研究基于鲁拉西酮 $t_{1/2}$ 约为 18h，实验结果来自给药后约 15h，因此将平均稳态血药谷浓度应调整 85%至 13.0 ng/mL，中位数调整为 10.9 ng/mL。建议鲁拉西酮在维持期的稳态谷浓度治疗范围为 10~15 ng/mL[44]。

目前鲁拉西酮的临床 TDM 方面研究较少。在国外，Koo TS[45]等学者于 2011 年开发液相色谱-串联质谱（LC/MS/MS）法测定大鼠血浆的鲁拉西酮。采用乙腈蛋白沉淀法处理样品，齐拉西酮（内标物，IS）定量，使用 Gemini® C_{18} 柱色谱柱，采取用电喷雾离子源，多反应监测模式。鲁拉西酮和 IS 保留时间分别为 2.8、2.9 min。

线性范围为 0.002 ~ 1μg/mL。定量下限为 2.0 ng/mL。Chae[46]等学者开发并验证了用于定量测定大鼠血浆、胆汁和尿液中鲁拉西酮的 LC-MS 测定法。通过液-液萃取处理样品，用齐拉西酮（IS）定量，使用 Gemini C_6-Phenyl 色谱柱。鲁拉西酮和 IS 的保留时间分别约为 5.2~5.4 和 5.1~5.2 min。线性范围 5 ~5000 ng/ mL，绝对回收率大约 75%。上述两项研究方法[45-46]均用于大鼠，未与临床贴合，且使用非氘代内标，易导致色谱行为不一致，质谱基质影响不一致。同时研究[46]前处理较为复杂耗时。Patteet L[47]等学者通过 UHPLC-MS/MS 鉴定和定量人血清中鲁拉西酮。有机相萃取样本（氮气下蒸干），用鲁拉西酮-d_8（IS）定量。使用 Agilent SB C_{18} 反相柱，采用电喷雾电离技术，正离子模式。鲁拉西酮线性范围 5 ~1000 ng/ mL，与 IS 保留时间为 2.69、2.65min。Katteboina MY[48]等学者开发 LC-MS/MS 法测定用于人血浆中的鲁拉西酮及 ID-14283。有机相进行液-液萃取后，使用 C_{18} 柱色谱分离。鲁拉西酮和 ID-14283 的线性浓度分别为 0.25 ~100 和 0.10 ~14.1 ng/mL。色谱运行时间为 2.5min。较前两项研究[45-46]，研究[47-48]使用人血，与临床贴切，测样时间短，但前处理复杂耗时。

在国内，黄洪勇[49]等学者建立了 HPLC 法定量人血浆中鲁拉西酮。采用 Diamonsil B C_{18} 反相色谱柱，通过液-液萃取预处理样品。鲁拉西酮和内标保留时间分别为 6.38，11.26 min。定量下限 0.018ng/mL，线性范围为 0.018 ~2.304 ng/mL。该方法虽具有分析仪器普及率高、灵敏度高等优点，但其前处理复杂耗时，检测时间长，不适用于高通量需求的鲁拉西酮临床研究和不良反应监测。吴海根[50]等学者开发以蛋白沉淀法为基础的测定人血清中鲁拉西酮浓度的 HPLC-MS /MS 方法。使用 Shim-packVP-ODS 色谱柱，采用电喷雾离子源，多反应监测模式。鲁拉西酮与鲁拉西酮-D_8 的保留时间为 2.05 和 2.00 min，2 ~200 ng/mL 范围线性良好。该方法较研究[45-48]，其样品处理简便、检测时间短，适用于高通量的鲁拉西酮临床需求。此外，杨烨[51]等学者优化 HPLC-MS /MS 法，将检测时间缩至更短，更加迎合了临床精神障碍患者中鲁拉西酮的血药浓度监测的高通量需求。

5 基因多态性

5.1 CYP3A4 基因

人体内存在许多细胞色素 P450 亚型，但大多数药物代谢反应由 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 进行[52]。细胞色素 P450 家族的大多数成员具有遗传多态性，且等位基因变体会导致其相应酶的功能效率发生差异。这进而发展成群体内的不同表型，使得个体可被分类为“弱代谢者”（PM）、“中间代谢者”（IM）、“广泛代谢者”（EM）或“超快速代谢者”（UM）[53]。因此人群中药物代谢能力存在广泛差异，这可能导致临床疗效不足甚至引起毒性反应。

鲁拉西酮主要通过肝脏中的 CYP3A4 酶代谢。然而，CYP3A4 的酶活性在个体之间可以变化高达 20 倍且表现出种族差异，易导致治疗失败或毒副作用[54]。有研究通过 24 个重组人 CYP3A4 变体（与野生型 CYP3A4 相比）体外对鲁拉西酮代谢的影响，发现 10 个变体（CYP3A4*3、*14、*15、*19、*23、*24、*28、*29、*32、*33）的催化活性增加，K_m 显著小于野生型，可能属于鲁拉西酮强代谢基因。CYP3A4*12 和 CYP3A4*20 变体的活性较低，V_{max} 值显著低于野生型，可能为弱代谢基因。其余 CYP3A4 变体（CYP3A4*4、*5、*7、*9、*10、*13、*31、*34）显示出与野生型相似的催化活性。然而，CYP3A4*16、*17 和*18 对鲁拉西酮无催化活性，并且无法检测到 ID-14283 的浓度。其中 CYP3A4*17 是由于氨基酸取代：F189 S 位于外显子 7，可能导致其催化活性降低，而 CYP3A4*16 和 CYP3A4*18 酶活性低的原因有待于进一步研究[55]。

5.2 HTR1A 基因

5-羟色胺受体（HTR_{1A}）的刺激已被证明有助于一些非典型抗精神病药物（鲁拉西酮）的临床疗效例如减少锥体外系不良反应[8]。rs6295 是 HTR 1A 中研究最广泛的功能变体。有研究表明，rs6295 与接受非典型 APD 治疗的精神分裂症患者的临床反应相关[56]。一项荟萃分析显示，功能性 HTR_{1A} 多态性与鲁拉西酮治疗反应之间存在显著相关性的。在鲁拉西酮治疗后开始第 1 周发现与病情缓解具有显著相关性（β= 3.510；对于 PANSS 总计，$p = 0.035$）。rs6295 与阴性症状改善的相关性在第 1 周较为显著（β= 1.153； $p = 0.027$），在第 2 周时稳定（β= 1.726； $p = 0.004$），第 4 周（β= 2.303; $p = 0.003$）。rs6295 与阳性症状改善在第 2 周也观察到显著相关的趋势。而安慰剂组中未发现上述相关性（$p < 0.10$）[57]。

6 药物相互作用

CYP450 通路在多种药物的氧化代谢中起着重要作用，并与药物相互作用有关，CYP 酶影响的药物相互作

用是不良反应发生的主要原因。由于鲁拉西酮主要由于 CYP3A4 代谢，因此当鲁拉西酮与诱导或抑制 CYP3A4 的药物联用时，可能会发生药物-药物相互作用。研究表明鲁拉西酮与泊沙康唑（强效 CYP3A4 抑制剂）联合给药时，鲁拉西酮 AUC 在正常受试者中增加了 6.2 的算术平均因子，肥胖受试者中增加了 4.9。即使泊沙康唑停药后 2 周，鲁拉西酮 AUC 恢复缓慢，AUC 仍显著高于基线水平[58]。此外，酮康唑给药会导致鲁拉西酮 C_{max} 增加 6.8 倍，鲁拉西酮 AUC 增加 9.3 倍；同时地尔硫卓会导致鲁拉西酮 C_{max} 和 AUC 分别增加 2.1 倍和 2.2 倍。而利福平给药会降低鲁拉西酮的 C_{max} 和 AUC[59]。

鲁拉西酮本身也是 CYP3A4 的中度抑制剂，临床相关浓度的鲁拉西酮可中度抑制 CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 和 CYP2B6 介导的反应。鲁拉西酮在表达人 P-gp 的细胞中会对地高辛的体外转运产生抑制作用，鲁拉西酮稳态给药会使地高辛的 C_{max} 和 AUC_{0-24} 分别增加 9%和 13%。鲁拉西酮还会使咪达唑仑 C_{max} 和 AUC_{0-24} 分别增加 21%和 44%[7, 59]。但鲁拉西酮与锂、丙戊酸盐、乙炔雌二醇或诺孕曲明之间无显著相互作用[59]。

7 总结

鲁拉西酮作为新型非典型抗精神病药物，已被证实可有效治疗精神分裂症和双相Ⅰ型抑郁症。对于精神分裂症患者的精神病性症状、情感症状、认知症状疗效显著，并且对于体重、代谢影响水平较小，具有良好的安全性及耐受性。因此，鲁拉西酮适合于有情绪障碍、认知障碍症状、易发生体重增加及催乳激素升高等不良反应的病人。鲁拉西酮服药次数少（通常每晚一次），有助于提高患者的依从性。但因其特殊的吸收药代动力学过程，应建议患者进食至少 350 卡路里并且需进餐同时服用药物，患者坚持此建议的难度较大。此外，若存在有 CYP3A4 强诱导剂或强抑制剂联用的情况下，禁忌使用鲁拉西酮，防止鲁拉西酮的血药浓度过低或过高，导致药物毒副反应或造成患者疗效不佳。存在 CYP3A4 中度抑制剂联合应用的情况下，应该及时并合理地调整鲁拉西酮剂量。

鲁拉西酮的临床应用丰富了广大精神障碍患者临床用药选择。但鲁拉西酮作用机制尚未明确，且群体药代动力学，基因组学等研究有较大空白，对于 TDM 范围是否合适，关于儿童青少年、老人、孕妇等特殊人群的临床数据缺乏，未来需要更多相关临床研究来证实。

参考文献

[1] Orzelska-Górka J, Mikulska J, Wiszniewska A, *et al*. New Atypical Antipsychotics in the Treatment of Schizophrenia and Depression. Int J Mol Sci. 2022 Sep 13;23(18):10624.

[2] Azhar Y, Shaban K. Lurasidone. 2022 Nov 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 31082101.

[3] 陈俊，方贻儒.新型非典型抗精神病药：鲁拉西酮[J].临床精神医学杂志,2022,32(01):81-84.

[4] Loebel A, Citrome L. Lurasidone: a novel antipsychotic agent for the treatment of schizophrenia and bipolar depression. BJPsych Bull. 2015 Oct;39(5):237-41.

[5] Wong DF, Kuwabara H, Brašić JR, et al. Determination of dopamine D_2 receptor occupancy by lurasidone using positron emission tomography in healthy male subjects. Psychopharmacology (Berl). 2013 Sep;229(2):245-52.

[6] Jaeschke RR, Sowa-Kućma M, Pańczyszyn-Trzewik P, *et al*. Lurasidone: The 2016 update on the pharmacology, efficacy and safety profile. Pharmacol Rep. 2016 Aug;68(4):748-55.

[7] Caccia S, Pasina L, Nobili A. Critical appraisal of lurasidone in the management of schizophrenia. Neuropsychiatr Dis Treat. 2012;8:155-68.

[8] Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, *et al*. 5-HT(2A) and D(2) receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT(1A) receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. J Neurochem. 2001 Mar;76(5):1521-31.

[9] Mauri MC, Paletta S, Di Pace C, *et al*. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics: An Update. Clin Pharmacokinet. 2018 Dec;57(12):1493-1528.

[10] Hu C, Wang Y, Song R, *et al*. Single- and Multiple-Dose Pharmacokinetics, Safety and Tolerability of Lurasidone in

Healthy Chinese Subjects. Clin Drug Investig. 2017 Sep;37(9):861-871.

[11] Zhang H, Chiu Y Y, Lin S K. A Population Pharmacokinetic Analysis on Pharmacokinetic Characteristics Difference of Lurasidone between Chinese and Western Subjects[C]//Proceedings of the 33rd CINP Hybrid World Congress of Neuropsychopharmacology, Taipei, Taiwan. 2022: 9-13.

[12] Preskorn S, Ereshefsky L, Chiu YY, *et al*. Effect of food on the pharmacokinetics of lurasidone: results of two randomized, open-label, crossover studies. Hum Psychopharmacol. 2013 Sep;28(5):495-505.

[13] Citrome L. A review of the pharmacology, efficacy and tolerability of recently approved and upcoming oral antipsychotics: an evidence-based medicine approach. CNS Drugs. 2013 Nov;27(11):879-911.

[14] Lee KR, Chae YJ, Koo TS. Pharmacokinetics of lurasidone, a novel atypical anti-psychotic drug, in rats. Xenobiotica. 2011 Dec;41(12):1100-7.

[15] Meyer JM, Loebel AD, Schweizer E. Lurasidone: a new drug in development for schizophrenia. Expert Opin Investig Drugs. 2009 Nov;18(11):1715-26.

[16] Findling RL, Goldman R, Chiu YY, *et al*. Pharmacokinetics and Tolerability of Lurasidone in Children and Adolescents With Psychiatric Disorders. Clin Ther. 2015 Dec 1;37(12):2788-97.

[17] Lin SK. Racial/Ethnic Differences in the Pharmacokinetics of Antipsychotics: Focusing on East Asians. J Pers Med. 2022 Aug 24;12(9):1362.

[18] Loebel A, Cucchiaro J, Sarma K, *et al*. Efficacy and safety of lurasidone 80 mg/day and 160 mg/day in the treatment of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled trial. Schizophr Res. 2013 Apr;145(1-3):101-9.

[19] Nasrallah HA, Cucchiaro JB, Mao Y, . Lurasidone for the treatment of depressive symptoms in schizophrenia: analysis of 4 pooled, 6-week, placebo-controlled studies. CNS Spectr. 2015 Apr;20(2):140-7.

[20] Stahl SM, Cucchiaro J, Simonelli D, *et al*. Effectiveness of lurasidone for patients with schizophrenia following 6 weeks of acute treatment with lurasidone, olanzapine, or placebo: a 6-month, open-label, extension study. J Clin Psychiatry. 2013 May;74(5):507-15.

[21] Arango C, Ng-Mak D, Finn E, *et al*. Lurasidone compared to other atypical antipsychotic monotherapies for adolescent schizophrenia: a systematic literature review and network meta-analysis. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2020 Sep;29(9):1195-1205.

[22] Ogasa M, Kimura T, Nakamura M, *et al*. Lurasidone in the treatment of schizophrenia: a 6-week, placebo-controlled study. Psychopharmacology (Berl). 2013 Feb;225(3):519-30.

[23] Citrome L, Cucchiaro J, Sarma K, *et al*. Long-term safety and tolerability of lurasidone in schizophrenia: a 12-month, double-blind, active-controlled study. Int Clin Psychopharmacol. 2012 May;27(3):165-76.

[24] Correll CU, Cucchiaro J, Silva R,*et al*. Long-term safety and effectiveness of lurasidone in schizophrenia: a 22-month, open-label extension study. CNS Spectr. 2016 Oct;21(5):393-402.

[25] Rajagopalan K, Wade S, Meyer N, *et al*. Real-world adherence assessment of lurasidone and other oral atypical antipsychotics among patients with schizophrenia: an administrative claims analysis. Curr Med Res Opin. 2017 May;33(5):813-820.

[26] Costamagna I, Calisti F, Cattaneo A, *et al*. Efficacy and safety of lurasidone in adolescents and young adults with schizophrenia: A pooled post hoc analysis of double-blind, placebo-controlled 6-week studies. Eur Psychiatry. 2021 May 10;64(1):e35.

[27] Mattingly GW, Haddad PM, Tocco M, *et al*. Switching to Lurasidone following 12 months of treatment with Risperidone: results of a 6-month, open-label study. BMC Psychiatry. 2020 May 5;20(1):199.

[28] Feng Y, Shi J, Wang L, *et al*. Randomized, double-blind, 6-week non-inferiority study of lurasidone and risperidone for the treatment of schizophrenia. Psychiatry Clin Neurosci. 2020 Jun;74(6):336-343.

[29] Loebel A, Cucchiaro J, Xu J, Sarma K, Pikalov A, Kane JM. Effectiveness of lurasidone vs. quetiapine XR for relapse prevention in schizophrenia: a 12-month, double-blind, noninferiority study. Schizophr Res. 2013 Jun;147(1):95-102.

[30] Arango C, Ng-Mak D, Finn E, *et al*. Lurasidone compared to other atypical antipsychotic monotherapies for adolescent schizophrenia: a systematic literature review and network meta-analysis. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2020 Sep;29(9):1195-1205.

[31] Goldman R, Loebel A, Cucchiaro J, *et al*. Efficacy and Safety of Lurasidone in Adolescents with Schizophrenia: A 6-Week, Randomized Placebo-Controlled Study. J Child Adolesc Psychopharmacol. 2017 Aug;27(6):516-525.

[32] Correll CU, Cucchiaro J, Silva R,*et al*. Long-term safety and effectiveness of lurasidone in schizophrenia: a 22-month, open-label extension study. CNS Spectr. 2016 Oct;21(5):393-402.

[33] Loebel A, Cucchiaro J, Silva R, *et al*. Lurasidone as adjunctive therapy with lithium or valproate for the treatment of bipolar I depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Am J Psychiatry. 2014 Feb;171(2):169-77.

[34] Loebel A, Cucchiaro J, Silva R, *et al*. Lurasidone monotherapy in the treatment of bipolar I depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Am J Psychiatry. 2014 Feb;171(2):160-8.

[35] McIntyre RS, Cucchiaro J, Pikalov A, *et al*. Lurasidone in the treatment of bipolar depression with mixed (subsyndromal hypomanic) features: post hoc analysis of a randomized placebo-controlled trial. J Clin Psychiatry. 2015 Apr;76(4):398-405.

[36] Kato T, Ishigooka J, Miyajima M, *et al*. Double-blind, placebo-controlled study of lurasidone monotherapy for the treatment of bipolar I depression. Psychiatry Clin Neurosci. 2020 Dec;74(12):635-644.

[37] Alamo C, López-Muñoz F, García-García P. The effectiveness of lurasidone as an adjunct to lithium or divalproex in the treatment of bipolar disorder. Expert Rev Neurother. 2014 Jun;14(6):593-605.

[38] Higuchi T, Kato T, Miyajima M, *et al*. Lurasidone in the long-term treatment of Japanese patients with bipolar I disorder: a 52 week open label study. Int J Bipolar Disord. 2021 Aug 2;9(1):25.

[39] Goldstein TR, Birmaher B, Axelson D, *et al*. History of suicide attempts in pediatric bipolar disorder: factors associated with increased risk. Bipolar Disord. 2005 Dec;7(6):525-35.

[40] DelBello MP, Tocco M, Pikalov A, *et al*. Tolerability, Safety, and Effectiveness of Two Years of Treatment with Lurasidone in Children and Adolescents with Bipolar Depression. J Child Adolesc Psychopharmacol. 2021 Sep;31(7):494-503.

[41] DelBello MP, Goldman R, Phillips D, *et al*. Efficacy and Safety of Lurasidone in Children and Adolescents With Bipolar I Depression: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2017 Dec;56(12):1015-1025.

[42] Forester BP, Sajatovic M, Tsai J, *et al*. Safety and Effectiveness of Long-Term Treatment with Lurasidone in Older Adults with Bipolar Depression: Post-Hoc Analysis of a 6-Month, Open-Label Study. Am J Geriatr Psychiatry. 2018 Feb;26(2):150-159.

[43] Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, *et al.* Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: update 2017. Pharmacopsychiatry, 2018,51:9–62.

[44] Huang CY, Lin SK. Therapeutic Drug Monitoring of Lurasidone in Patients with Schizophrenia or Bipolar Disorder: A preliminary study. Psychiatry Clin Neurosci. 2022 Dec;76(12):674-675.

[45] Koo TS, Kim SJ, Lee J, *et al*. Quantification of lurasidone, an atypical antipsychotic drug, in rat plasma with high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2011 Dec;25(12):1389-94.

[46] Chae, YJ-Koo, TS. & Lee, *et al*. A Sensitive and Selective LC-MS Method for the Determination of Lurasidone in Rat Plasma, Bile, and Urine. Chromatographia 75, 1117–1128 (2012).

[47] Patteet L, Maudens KE, Sabbe B, *et al*. High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8

major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta. 2014 Feb 15;429:51-8.

[48] Katteboina MY, Pilli NR, Mullangi R, *et al*. LC-MS/MS assay for the determination of lurasidone and its active metabolite, ID-14283 in human plasma and its application to a clinical pharmacokinetic study. Biomed Chromatogr. 2016 Jul;30(7):1065-1074.

[49] 黄洪勇，职晓燕，张红星，等.高效液相色谱法测定人体血浆中鲁拉西酮的含量[J].中国医院药学杂志,2012,32(04):262-264.

[50] 吴海根，王珍姝，梁松新，等.HPLC-MS/MS 法测定人血清中鲁拉西酮的浓度[J].中国临床药理学杂志,2022,38(17):2075-2078.

[51] 杨烨，肖桃，倪晓佳，等.HPLC-MS/MS 快速测定精神障碍患者血清中鲁拉西酮的浓度[J].今日药学,2023,33(03):227-230.

[52] Waring RH. Cytochrome P450: genotype to phenotype. Xenobiotica. 2020 Jan;50(1):9-18.

[53] Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, *et al*. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. Genet Med. 2017 Jan;19(1):69-76.

[54] Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, *et al*. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. Drug Metab Dispos. 2001 Mar;29(3):268-73. PMID: 11181494.

[55] Li Q, Wang J, Zhou Q, *et al.* The Impacts of CYP3A4 Genetic Polymorphism and Drug Interactions on the Metabolism of Lurasidone[J]. Available at SSRN 4366153.

[56] Takekita Y, Fabbri C, Kato M, *et al*. HTR1A Polymorphisms and Clinical Efficacy of Antipsychotic Drug Treatment in Schizophrenia: A Meta-Analysis. Int J Neuropsychopharmacol. 2016 Apr 29;19(5):pyv125.

[57] Yoshikawa A, Li J, Meltzer HY. A functional HTR1A polymorphism, rs6295, predicts short-term response to lurasidone: confirmation with meta-analysis of other antipsychotic drugs. Pharmacogenomics J. 2020 Apr;20(2):260-270.

[58] Greenblatt DJ, Harmatz JS, Ryan MJ, *et al*. Sustained Impairment of Lurasidone Clearance After Discontinuation of Posaconazole: Impact of Obesity, and Implications for Patient Safety. J Clin Psychopharmacol. 2018 Aug;38(4):289-295.

[59] Chiu YY, Ereshefsky L, Preskorn SH, *et al*. Lurasidone drug-drug interaction studies: a comprehensive review. Drug Metabol Drug Interact. 2014;29(3):191-202.

Elabela-Apelin/APJ system promotes platelet aggregation and thrombosis via activating PANX1-P2X7 signalling pathway

Zhe Chen[1], Linxi Chen*[1]

1. Hunan Province Cooperative Innovation Center for Molecular Target New Drug Study, College of Basic Medical Science, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

【**Abstract**】**Background and Aim:** The human APJ receptor is an angiotensin receptor-like receptor which has some homology to angiotensin II receptor, and apelin is endogenous ligand of APJ. Elabela, a new endogenous ligand of APJ, and Elabela-apelin/APJ system is an important regulator in certain thrombosis-related diseases like atherosclerosis. Our previous reports revealed that APJ activation exacerbates atherosclerotic lesions, but little is known about the relationship of elabela-apelin/APJ system between platelet aggregation and athero-thrombosis. Here, we aim to investigate the effects of elabela-apelin/APJ system on platelet aggregation and thrombosis.**Method:** The platelet aggregation rates were detected using optical turbidimetry method. The thrombosis *in vitro* was detected using Chandler method. The aggregation rates of $APLNR^{+/-}$ mice and human platelet were used to revealed the effects of elabela-apelin/APJ system on platelet aggregation. Some potential APJ receptor-targeting inhibitors Schisandrin A from traditional Chinese medicine monomers and Cobicistat from FDA-approved drug library were screened out with high-throughput drug screening in silicon and bioinformatics methods. The effect of Schisandra A and Cobicistat on ischemic cerebral infarction with the middle cerebral artery occlusion (MCAO) modeld and thrombosis *in vivo* with zebrafish trunk thrombosis model. **Results:** Elabela and apelin-12, -17, -36 subtypes actually promote platelet aggregation and thrombosis via activating APJ receptor, and the EC50 value of apelin-17 is the lowest for inducing platelet aggregation, implying that apelin-17 has a strong effect on platelet aggregation than other subtypes. Besides, the maximum aggregation time to peak (Tmax) of apelin-12 is the longest than other subtypes. Interestingly, there is a phenomenon that elabela and apelin-12, -17, -36 show opposite effects with apelin-13 when activating APJ receptors. Moreover, Gi inhibitor PTX abolished the anti-thrombotic effects of apelin-13, while Gq inhibitor YM254890 abolished elabela and apelin-12, -17, -36-induced thrombosis, suggesting that APJ receptor can couple different G protein signals to mediate the multiple effects of elabela and apelin subtypes on thrombosis. More importantly, elabela and other endogenous ligands like apelin-12, -17, -36 all induces platelet aggregation and thrombosis by activating pannexin1(PANX1)-P2X7 signalling pathway. Interestingly, diuretic spironolactone, a novel PANX1 inhibitor, alleviated elabela and apelin subtypes-induced platelet aggregation and thrombosis. Notably, two anti-thrombotic potential drugs were screened out with targeting APJ receptors including Schisandrin A and Cobicistat. Schisandra A, a traditional Chinese medicine monomer which comes from 100 traditional Chinese medicine monomers by using cell membrane chromatography, reverses the promoting effects of elabela and apelin-12, -17, -36 on platelet aggregation and thrombosis in vitro. Schisandrin A also ameliorates the cerebral infarct size and increases the bleeding

*Corresponding author: Linxi Chen

Address: Institute of Pharmacy and Pharmacology, Learning Key Laboratory for Pharmacoproteomics, Hunan Province Cooperative Innovation Center for Molecular Target New Drug Study, College of Basic Medical Science, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China

Funding

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (81973326).

time and coagulation time in SD rat model of MCAO. Cobicistat, a selective inhibitor of human liver CYP3A enzymes for anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) treatment, was screened out by our team from the FDA-Approved drug library (include 1514 compounds) to target APJ receptor. Cobicistat abolishes the role of elabela and apelin-12, -17, -36 in promoting platelet aggregation and thrombosis by targeting APJ receptors. Besides, cobicistat significantly attenuated thrombosis in zebrafish and cerebral infarct in SD rat. **Conclusion:** Elabela and apelin-12, -17, -36 promote platelet aggregation and thrombosis by activating PANX1-P2X7 pathway, while apelin-13 inhibited the ADP-induced platelet aggregation and thrombosis. Spironolactone, a novel PANX1 inhibitor, shows an important anti-thrombotic effect through abolishing the promoting role of elabela and apelin subtypes in platelet aggregation and thrombosis. Both cobicistat and schisandrin A also have an anti-thrombotic effect by antagonizing APJ receptor. These findings might contribute to expand new approaches to anti-thrombotic therapy.

【**Key words**】Elabela-Apelin/APJ system; Cobicistat; Pannexin1; Schisandrin A; Thrombosis

雏菊叶龙胆酮抑制 SIRT1 诱导调节性 T 细胞干预过敏性鼻炎的研究

程保辉，胡田勇，刘志强，曾宪海

（深圳市龙岗区耳鼻咽喉医院耳鼻咽喉科 广东 深圳 518172）

【摘要】目的：探讨藏药印度獐牙菜活性成分雏菊叶龙胆酮（Bellidifolin）对 OVA 蛋白诱导的小鼠变应性鼻炎模型的治疗机制。**方法：**（1）SPF 级 BALB/c 小鼠（周龄为 6-8 周、雌性、体重为 25±2 g）随机分为正常组（NC）、过敏性鼻炎组（AR）、Bellidifolin 低剂量（B-L）、高剂量（B-H）组和地塞米松治疗组（Dex）。（2）BALB/c 小鼠腹腔注射卵清蛋白，构建 AR 小鼠模型；自第 14 天起，B-L、B-H 和 Dex 组鼻炎小鼠分别灌胃给药；NC 组和 AR 组灌胃等体积的生理盐水。最后一次用卵清蛋白激发小鼠后，记录小鼠的挠鼻和打喷嚏的次数。（3）在第 29 天，取小鼠眼球血液，免疫酶联检测法测定小鼠血清中 IFN-γ、IL-4、IL-13、IL-10 和 LTB_4、及卵清蛋白特异性 IgE（OVA-sIgE）含量。（4）收集小鼠的脾脏和鼻粘膜组织，鼻粘膜组织进行 HE 染色观察，运用流式细胞术检测小鼠脾脏中调节性 T 细胞的水平。（5）结合分子对接，体外 SIRT1 酶活抑制实验验证 Bellidifolin 对 SIRT1 的抑制活性。**结果：**同 NC 组比较，AR 组小鼠用卵清蛋白雾化激发后，打喷嚏和挠鼻次数显著升高，鼻粘膜炎症细胞浸润加重，血清中 OVA-sIgE、IL-4、IL-13、IL-17 水平显著上升，脾脏中 Treg 比例显著降低，提示 AR 小鼠模型造模成功。经高低剂量辛夷散治疗后，对小鼠 AR 相关症状、炎症、免疫细胞影响如下：（1）B-L 和 B-H 组小鼠打喷嚏次数和挠鼻次数比 AR 组明显减少。（2）HE 染色显示小鼠鼻粘膜充血及组织水肿程度均在 B-L 和 B-H 组明显改善，同时鼻粘膜炎性细胞浸润程度也较 AR 组明显减轻。（3）与 AR 组的小鼠对比，B-H 组小鼠的血清中 OVA-sIgE 的含量明显降低；B-L 和 B-H 组血清中 IL-4、IL-13 含量可见明显降低；B-H 组血清中 IL-10 较 AR 组显著增加；而 B-L 和 B-H 组血清中 IFN-γ 的水平与 AR 组相比差异无统计学意义。（4）流式细胞分析结果显示，B-L 和 B-H 治疗组及 Dex 治疗组的小鼠脾脏中 Treg 比例较 AR 组可见明显的上升。（5）体外酶活抑制结果表明，Bellidifolin 对 SIRT1 的 IC_{50}= 52.82±11.10 μM。**结论：**藏药印度獐牙菜活性成分雏菊叶龙胆酮可能通过抑制 SIRT1，逆转 AR 小鼠机体低表达的调节性 T 细胞，诱导机体对过敏原免疫耐受，减轻炎症反应，改善 AR 症状。

【关键字】过敏性鼻炎；雏菊叶龙胆酮；调节性 T 细胞

基于 GPCR 结构和功能的抗精神疾病药物发现

程建军*

（上海科技大学 iHuman 研究所，上海市浦东新区华夏中路 393 号，201210）

精神分裂症、抑郁症等精神类疾病发病率高，但现有药物存在缺陷，无法满足临床需求。精神类疾病主要与多巴胺受体、5-羟色胺受体等 G 蛋白偶联受体（GPCR）的功能异常相关。近年来，针对 GPCR 的结构生物学和信号通路偏向性研究取得了重要进展，为针对 GPCR 的药物设计提供了新的机遇，为高效低毒的药物发现提供了新的思路。然而，如何真正基于 GPCR 的结构和功能进行药物设计极具挑战。我们从药物化学的角度出发，以基于结构的药物设计为手段，以偏向性药理学为导向，实现对于 GPCR 靶标的精准调控，设计发现更有效、更安全的新型候选药物。（1）以 GPCR 晶体结构为指导，设计发现对于多巴胺 D2 受体具有高选择性的部分激动剂，优选化合物 IHCH-7041 对精神分裂症的阳性症状、阴性症状和认知障碍均有效，药效优于三代药物阿立哌唑(Nature Neuroscience 2022)；（2）从致幻剂类物质的作用机制出发，以结构为指导，设计发现首个具有 β-arrestin 偏向性的 5-HT2A 受体激动剂，具有显著的抗抑郁药效但不引起致幻作用(Science 2022)。这些工作表明，从 GPCR 的结构和功能出发，利用基于结构的药物设计手段，通过精准靶向 GPCR 靶标的不同受体亚型和激活状态，能够实现药效更强或者毒副作用更少的原创性候选药物发现。

【关键词】G 蛋白偶联受体；药物设计；激动剂；偏向性

参考文献

[1] Cao D#, Yu J#, Wang H#, Luo Z#, Liu X#, He L, Qi J, Fan L, Tang L, Chen Z, Li J, Cheng J*, Wang S*. Structure-based discovery of non-hallucinogenic psychedelic analogs. *Science*, 2022, 375, 403-411.

[2] Chen Z#, Fan L#, Wang H#, Yu J#, Lu D#, Qi J, Nie F, Luo Z, Liu Z, Cheng J*, Wang S*. Structure-based design of a novel third-generation antipsychotic drug lead with potential antidepressant properties. *Nature Neuroscience*, 2022, 25, 39–49.

突发公共卫生事件下国内外药品应急审批制度对比研究

崔俐俊、陈嫣婷、费永和、陈静

（海军军医大学药学系军队药材供应管理教研室，上海 200433）

【摘要】医药产品应急审批制度是应对突发公共卫生事件的一项重要制度，我国药品应急审批制度正处于不断发展之中，还存在很多不足之处。本文分析我国药品应急审批制度现状，并与美国、欧盟、日本的药品加快上市与应急审批制度对比，从制度建设、实施过程等方面为进一步完善我国药品应急审批制度提出建议，为推动我国药品应急审批工作提供参考。

【关键词】突发公共卫生事件；药品；应急审批；紧急授权

二十一世纪以来，各种传染病疫情频发并呈现规模化传播，严重危害公众生命健康。突发公共卫生事件不可预测性强、涉及人群范围广、公共危害性大，会对人民生命健康、社会经济发展与秩序稳定造成极大影响。特别是，2003 年非典型性肺炎（SARS）疫情、2020 年新型冠状病毒肺炎（COVID-19）疫情，传播迅速，对疫情防控急需医药产品的供应保障能力提出巨大考验，往往出现一药难求、无药可用的现象。

面对突发公共卫生事件，国家和省级药品监督管理部门紧急启动医药产品应急审批程序，开辟绿色通道，迅速扩大防疫物资产能，在抗击新型冠状病毒肺炎疫情过程中发挥了重要作用。为应对突发公共卫生事件实施的药品应急审批，在实施过程中取得了良好效果，同时也存在一些不足之处。本文通过总结我国突发公共卫生事件药品应急审批相关制度与实施情况，结合美国、欧盟、日本等国外药物应急审批特色制度，为进一步优化突发公共卫生事件下药品应急审批制度提供建议和思路。

1.我国应对突发公共卫生事件实施药品应急审批的相关制度

1.1 国家食品药品监督管理局药品特别审批程序

2005 年，国家食品药品监督管理局公布并实施了《国家食品药品监督管理局药品特别审批程序》[1]（以下简称“特别审批程序”）。该程序的核心在于发生突发公共卫生事件时，国家食品药品监督管理按照统一指挥、早期介入、快速高效、科学审批的原则，对突发公共卫生事件应急处理所需药品进行特别审批，使应急所需的防治药品能够快速通过批准上市。特别审批程序的审批流程包含了申请临床试验（IND）和上市许可（NDA）申请，审批过程中各环节均有明确的时间限制，注册申请受理后，国家药监局应当在 24 小时内组织对注册申报资料进行技审评，技术审评工作完成后，国家药监局应当在 3 日内完成行政审查，作出审批决定，并告知申请人，流程如图 1 所示。

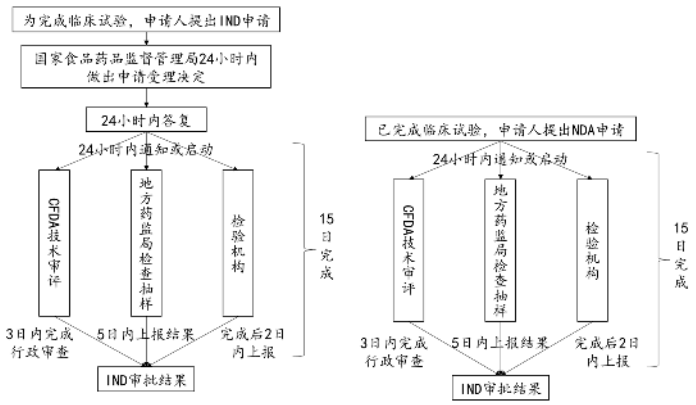


图 1 药品特别审批程序中 IND/NDA 申请流程

作者简介：崔俐俊，讲师，邮箱：cuilijun620@163.com

近年来，我国不断尝试摸索符合中国国情的药品加快上市注册程序。2020 年 1 月发布的《药品注册管理办法》[2]，仿照美国的应急审批制度，将我国药品加快上市注册程序划分为药品特别审批程序、突破性治疗、附条件批准和优先审评审批程序，2020 年 7 月 8 日国家药监局发布《突破性治疗药物审评工作程序（试行）》等三个文件的公告则对药品特别审批程序以外的三个审批程序的实施细节进行了具体规定。在特别审批程序中，注册申请的药物在申请受理、技术审评、抽样检验、行政审查等环节中得到第一时间处置，缩短了审批时间。2020 年新冠疫情形势严重，药审中心按程序将 59 件中药、化学药、生物制品注册申请纳入特别审批程序并完成技术审评[3]。2021 年，通过的抗疫用药品注册申请达到 81 件，初步满足了疫情期间抗疫防控的需求[4]。2023 年 3 月，药审中心总结抗疫应急审批宝贵经验，结合已有快速审批制度，制定了《药审中心加快创新药上市许可申请审评工作规范（试行）》[5]。

特别审批程序是一项制度性突破，但随着时间推移，该程序逐渐暴露出实施细节模糊、终止程序缺失等问题[6]，不能适应当今国家公共卫生形势的新变化。特殊审批已不完全适用于现行的药事管理法规政策。2020 年 7 月国家市场监督管理总局颁布了突破性疗法、附条件批准和优先审评审批的工作程序，未对特别审批程序作出新的要求，故特别审批程序执行的还是 2005 年颁发的局令第 21 号。基于新冠肺炎疫情下药品特别审批的审评经验，首先要建立特别审批的法规政策， 包括疫情期间发布的相关指导原则都略有滞后[7]。

1.2 药品附条件批准上市申请审评审批工作程序（试行）

2019 年 8 月，新修订的《中华人民共和国药品管理法》第二十六条规定，“对治疗严重危及生命且尚无有效治疗手段的疾病以及公共卫生方面急需的药品，药物临床试验已有数据显示疗效并能预测其临床价值的，可以附条件批准，并在药品注册证书中载明相关事项”[8]。2020 年 7 月，国家食品药品监督管理局发布《药品附条件批准上市申请审评审批工作程序（试行）》[9]。对于符合附条件批准的情形和条件的药品，申请人可以在药物临床试验期间向国家药品监督管理局药品审评中心提出附条件批准申请（图 2）。

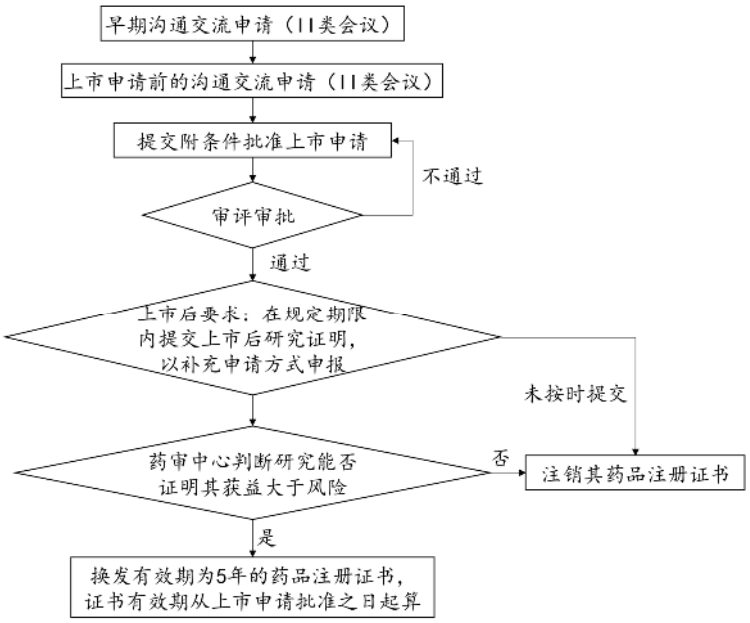


图 2　附条件批准药物审评流程

常规审批流程中，药物有效性评价的指标为临床终点，而符合附条件批准上市情形的药物则可使用替代终点、中间临床终点或早期临床试验数据来反映药物的有效性。2020 年药审中心审评通过的新药上市申请中，共有 15 件注册申请经附条件批准后上市。其中浙江海正药业股份有限公司用于抗流感相关适应证治疗的新药法维拉韦通过附条件批准上市，从注册正式受理到完成审批仅用了 10 d 左右的时间。2021 年的 323 件 NDA 申请中，共有 60 件（38 个品种）经附条件批准后上市，占比 18.58%。

药品附条件批准可以有效缩短临床研发所需的时间，但也存在一定的政策风险。“附条件批准上市”对药品上市时临床安全性等要求的降低，增加了疗效不确定的可能性[10]，存在安全有效性不足和资金浪费的风险，对于此类尚无充分证据的药品，平衡满足突发公共卫生事件药品需求和临床安全性可控，科学设计附条件批准方案，是监管部门面临的重要问题。

1.3 药品上市许可优先审评审批工作程序（试行）

2016 年发布的《总局关于解决药品注册申请积压实行优先审评审批的意见》[11]最先明确了优先审评审批的范围、程序和工作要求，2017 年 12 月修订的《总局关于鼓励药品创新实行优先审评审批的意见》[12]拓宽了优先审评审批的范围。2020 年优先审评审批程序再度进行了调整（图 3），对于临床急需的短缺药品、防治重大传染病、符合附条件批准的药品，疾病预防、控制急需的疫苗和创新疫苗等，申请人可以申请适用优先审评审批程序。

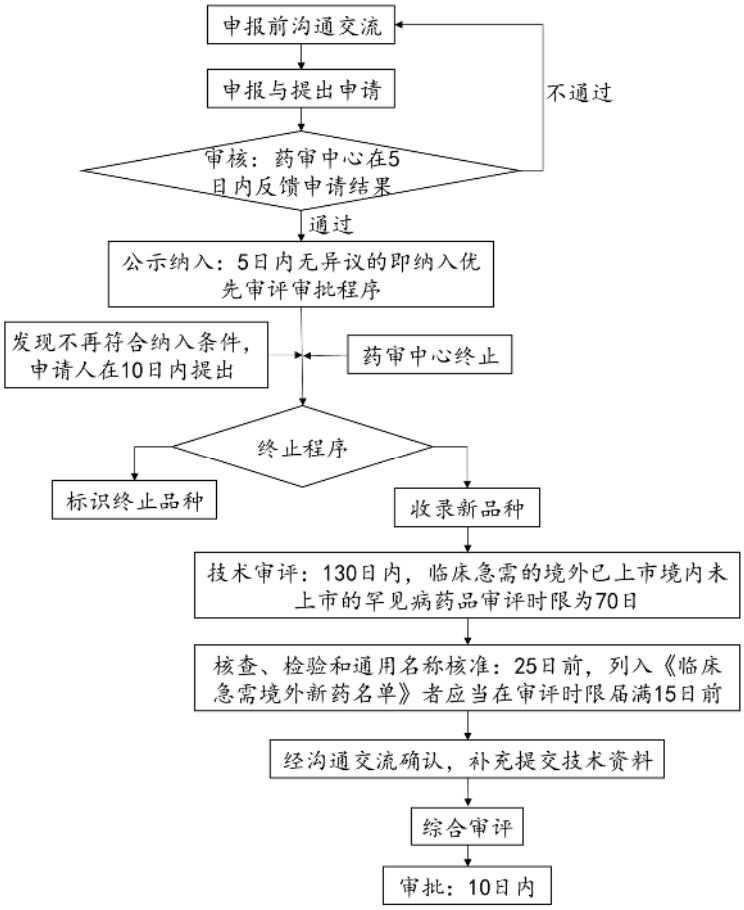


图 3 优先审评审批药物审评流程

一般药品上市许可申请的审评时限为 200 个工作日，而优先审评审批程序的审评时限缩短至 130 个工作日。2020年219件（127个品种），2021年115件注册申请（69个品种）被药审中心纳入优先审评审批程序。其中，符合附条件批准的药品 41 件，占比 35.65%。

药品监管部门已在积极推进药品优先审评审批制度的改革，形成初步稳定成熟的监管体制。2020 年 7 月 1 日实施药品注册管理办法以及药品上市许可优先审评审批工作程序（试行），规范了优先审评审批的适用范围、工作程序和工作要求等等，也取得了阶段性的成功。不过随着改革的推动，更深层次、更难解决的问题也会暴露出来。药品监管部门不但需要借鉴发达国家的加快审评审批政策，而且还要结合中国国情，构建一个中国特色的优先审评审批机制， 从根本上解决审评时限长、 效率低等问题[13]。

2.国外应对突发公共卫生事件实施药品应急审批的相关制度

2.1 美国

目前，美国食品药品监督管理局（FDA）建立了 4 种新药加快审批的途径，包括快速通道(fast track)、突破性治疗(Breakthrough therapy)、优先审查(priority review)及加速审批(Accelerate approval) [14]。其中加速审批可使用替代终点，中间临床终点作为许可基础，加速完成三期临床试验。药品可适用多种加快审批程序，2022 年 37 个批准的新药中有 24 个（65%）使用了一个或多个加快程序。

除此之外，美国还建立了紧急使用授权（EUA）制度。2004 年颁布的《生物恐怖防疫计划法》[15]中规定，在实际或潜在的公共卫生紧急事件中，在已批准的救治产品匮乏时，FDA 可以使用特定的医药产品用于紧急状态的诊断、治疗和预防。其后的《流行性和灾难预防再授权法案》、《21 世纪治愈法案》、《公共法 115-92》对 EUA 进行了完善。FDA 于 2017 年 1 月公布了《医药产品紧急使用授权指南》，建立了 EUA 操作程序[14]，即在实际或潜在的紧急状态下， FDA 可对未获批准的医药产品或已获批准医药产品的未获批准用途的授权[15]。自 2005 年以来，FDA 已发布了 60 多个 EUA。2012 年以来，已批准了 121 个公共卫生紧急状态下使用的医疗产品，包括药品、生物产品和医疗器械。EUA 发布、决定、终止的通知和更新均立刻以《联邦公告》的方式通告公众，同时在 FDA 与 CDC 官网上公告。

2.2 欧盟

欧洲药品审评管理局(EMA)承担欧洲的药品审评审批工作，注重专家审评，拥有来自欧盟各国的超过 4000 多名专家组成的技术资源。通过支持药品研究和开发、给予上市许可建议和进行药品安全性监测，欧盟采取了多种尽快获得新药的途径，包括附条件上市许可(Conditional Marketing Authorization)、加速审 批(Accelerated Assessment)、重点药物审批(PRIME)等[16-17]。

附条件上市许可旨在满足未被满足的医疗需求，是 EMA 为实现公共健康利益而实施的加速审批程序，以评估药品的安全性和有效性为基础，综合考虑药品带来的效益和风险的应急措施。可根据风险和收益，在数据不完整的情况下批准上市，上市后完成确证性临床试验[18]。加速审批旨在应对重大公共卫生问题等，从标准程序的 210 日缩短至 150 日。

欧盟药品审评法规体系全面、定位明确。以PRIME为例，该项计划旨在支持优化药物开发，将注意力集中在有潜力带来重大治疗成果的药物上，因此只有有限数量的申请（2021 年 40 份中的 13 份）被接受加入该计划。2022 年，EMA 收到了 45 项 PRIME 资格申请，比 2021 年减少 13%，并通过 40 项建议，比 2021 年少 31%，其中有新冠疫情影响下的药物资源倾斜的影响。

2.3 日本

日本药品与医疗器械管理局(PMDA)负责新药审批[19]。药品加速审批程序包括优先审评、例外审批、时间限制审批、先驱审查等。同时，PMDA 为了减少不同审查员之间可能存在的人为因素干扰，制定了细致的审查标准化手册，改善了不同机构之间可能存在的信息传递滞后、人员沟通困难等问题，将药品审批时间大幅缩短。例外审批制度专门针对紧急公共卫生事件，简化审批程序，实行滚动审批等。另外，日本在药事法（PAL）已明文规定：紧急批准程序(Emergency Approval，EA) 用于应对突发公共卫生事件，在没有其他应对措施，且确保安全性和有效性的情况下，可批准未批准或新适应症的药品和医疗器械上市[19]。拟申请紧急批准的产品，需符合以下两个标准:（1）在没有其他应对措施的紧急情况下必须使用，旨在预防致命或严重疾病扩散或其他健康危害事件扩大; （2）在具备相应确保质量、有效性和安全性的科学标准的其他国家（先进监管体系国家）批准用于相关适应证。

2.4 对我国的借鉴意义

美国、欧盟、日本药品优先审评目标定位明确，都是以临床需求为目的，加快临床急需药品的审评上市，形成覆盖全流程的多通道、多模式、多机制优先审评体系。制度中，不仅明确了适用范围、纳入标准、具体申请、受理、审核、审评流程，针对法规中涉及的具体事项，还制定了具体规定和细则。法规体系层次清晰、完整，可操作性强。各国药审部门都注重沟通指导，制定沟通方案和计划、提前沟通、主动指导，加快审评。同时，为保证上市药品安全有效，各国在针对通过优先审评上市的药品时，建立了更为严格的上市后监管制度，

明确职能定位、监管范围、监管方式、申请人责任和义务，确保监管的科学、规范、有效。美国、日本在推进药品监管领域加快上市注册程序同时，还设置紧急授权使用药品作为应对公共卫生或突发事件的措施。以上这些，都对我国有很好的借鉴意义。

3 我国突发公共卫生事件的药品审批思考及启示

3.1 完善药品应急审批制度建设

确定突发公共卫生事件药品需求导向，进一步缩减药品优先审评制度中药品纳入范围。针对不同阶段，明确和细化药品优先审评制度纳入标准。建立符合我国国情的药品优先审评上市后药品监管制度，对药品上市后研究、限制性适用、提交阶段性报告、信息公开、撤销上市和转为普通上市，以及相关的强制性手段、法律责任等都应予以明确细化的规定[20]。

建立我国药品紧急使用授权制度。我国《中华人民共和国突发事件应对法》对突发事件的预防和应急准备等作出了明确规定。但目前相关规定仍缺少关于药品紧急使用授权的法律依据。建议建立我国药品紧急使用授权管理制度，组建由国家卫生健康委员会、药品监管部门及相关部门组成的 EUA 专业领导工作组协调管理实施 EUA。突发公共卫生事件时间紧迫，应急情况下可考虑对未经药品监管部门批准上市的药品，在具有基础研发数据，可以证明其安全性和有效性的前提下，启动药品应急授权使用。药品应急授权使用是在公共健康利益收到严重威胁和药品安全有效评价之间寻找的平衡，遵循“边审批、边使用、边评估、边调整”的原则。可以与加快注册评审同步进行，及时补充调整新药的使用限制[21]。同时，出台 EUA 实施细则，明确规定实施 EUA 的条件、发布程序、审评流程和要求、终止或撤销、产品覆盖范围、信息公开、告知义务、责任保护等。

3.2 增强政府职能和人员配置优化

目前的药品应急审批程序主要从促进申请人与药审中心沟通、调整上市标准这两方面来提高新药注册的效率。我国虽设置了药品审评专家咨询委员会，但人员配置较欧盟、日本等数量较少，主要在药品审评过程中需要召开会议解决问题，或是申请过程中存在争议主动征询意见时提供相应的技术指导与决策建议，发挥作用有限。应积极推动审评审批人才培养和队伍建设，扩大药审专家职能，实现人员配置的优化和审评通过率的提升。

药品的上市审批过程中，申请方与监管部门、检验机构之间存在信息交流滞后的问题，应尽快推广和加强药审中心受理人员及项目管理人员的提前介入，争取受理问题在申报前得到解决，降低企业的创新风险，同时防止审评资源的浪费与人力物力的消耗。

3.3 加强快速审批药品上市后监管

美国、欧盟、日本药品优先审评制度中，药审部门侧重沟通指导，并重视上市后药品的安全性与有效性，建立了严格的上市后监管制度。现阶段，我国加快上市注册程序对新药的开发促进作用较为明显，通过快速审批程序注册上市的药品逐年增多，为避免出现相关药物上市后出现并无期望的临床疗效或安全性存在问题的现象，急需加强快速审批药品上市后的监管工作，保证审批药物的安全有效。新版《药品注册管理办法》引入药品“加快上市注册程序”的同时也明确设立了上市退出机制。为实现此类特殊审评通道药品上市前、后安全监管工作的顺利衔接，可借鉴 EMA 的经验，继续细化特殊审评药品准入条件，将上市前风险管理体系的建立作为关键审评因素，上市后设置额外监测、风险沟通等安全监管制度进行有效衔接，从而实现对用药风险的持续监测和动态管理。

4 结语

突发卫生公共制度下药品应急审批是在疫情等非常规状态下为降低突发事件给人们生命健康及社会经济秩序带来的风险所采取的应急措施，相关制度的制定以抗疫用药品需求为导向，以提高药品应急审批效率、加快药品应用为目标，在应对新冠疫情工作过程中，相关药品应急审批工作已取得了许多进展。然而对比国外药品加速审批程序，我国目前仍处于发展阶段，因此需要认真总结既往的工作经验，并在实践过程中不断完善。同时借鉴国外先进经验和管理方式，进一步改善药品应急审批制度和流程，为国家应对突发公共卫生事件做好药材保障，以更好地应对突发公共卫生事件。

参考文献

[1]国家食品药品监督管理总局.药品特别审批程序，https://gkml.samr.gov.cn/nsjg/bgt/202106/t20210630_331796.html

[2]国家药品监督管理局.药品注册管理办法 https://gkml.samr.gov.cn/nsjg/fgs/202003/t20200330_313670.html

[3]国家药品监督管理局药品审评中心.2020年度药品审评报告 https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/876bb5300cce2d3a5cf4f68c97c8a631

[4]国家药品监督管理局药品审评中心.2021年度药品审评报告 https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/f92b7bdf775bbf4c4dc3a762f343cdc8

[5]国家药品监督管理局药品审评中心.国家药监局药审中心关于发布《药审中心加快创新药上市许可申请审评工作规范（试行）》的通知 https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/ace377c025ad4f2bbf94790673b2646e

[6] 陈先红,王闻雅.新形势下我国药品特别审批制度的思考[J].中国食品药品监管,2020,No.200（09）:30-35.

[7]周菁菁,黄梦琴,孙志明.附条件批准上市药品纳入基本医疗保险药品目录的政策风险分析[J].医学与社会,2023,36（1）:99-104

[8]中华人民共和国中央人民政府. 中华人民共和国药品管理法 https://www.gov.cn/xinwen/2019-08/26/content_5424780.htm

[9]国家药品监督管理局.国家药监局关于发布《突破性治疗药物审评工作程序（试行）》等三个文件的公告（2020年第82号），https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/xzhgfxwj/20200708151701834.html

[10]吴忠虹，董丽.我国药品优先审评审批制度的现状分析[J].中国处方药.2022,20（10）：29-31

[11]国家药品监督管理局.总局关于解决药品注册申请积压实行优先审评审批的意见 https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20160226085101295.html

[12]国家药品监督管理局.总局关于鼓励药品创新实行优先审评审批的意见 https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20171228172301452.html

[13]白锦表.药物创新审评机制的分析与改进建议[J].中国药房，2013，24（21）：1930-1932

[14]FDA.GuidanceforIndustry:ExpeditedProgramsforSeriousConditions-DrugsandBiologicshttps://www.fda.gov/media/119748/download

[15]FDA.DesignatinganOrphanProduct:DrugsandBiologicalProductshttps://www.fda.gov/industry/medical-products-rare-diseases-and-conditions/designating-orphan-product-drugs-and-biological-products

[16]ELSANHOURYA，SANZENBACHERR，REINKEP，et,al. Acceleratingpatients’ accesstoadvancedtherapiesintheEU[J].Mol Ther Methods Clin Dev，2017，7（12）：15-19.

[17]冯媛媛,杨悦.我国药品优先审评制度的实施情况及建议[J].中国药房,2018,29（15）:6.DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2018.15.03.

[18]吴忠虹,董丽,顾玲玲.新冠肺炎疫情下关于我国药品特别审批程序的思考[J].中国处方药,2022,20（09）:47-48

[19]陈永法,王毓丰,伍琳.日本创新药物审批管理政策及其实施效果研究[J].中国医药工业杂志,2018,49(06):839-846.

[20]白锦表.药物创新审评机制的分析与改进建议[J].中国药房，2013，24（21）：1930-1932

[21]杨悦.新型冠状病毒肺炎疫情应对视角下建立药械紧急授权使用制度研究[J].中国药物评价,2020,37（1）:1-6.

Fabrication of soy protein isolate-glycyrrhizin composite complex for enhancing the bioavailability of resveratrol via its retarding characteristic

Cui Qingchen[1]，Wu Xianggen[1*]

（[1]College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong, 10426）

【**Abstract**】The polyphenolic compound resveratrol has received significant attention due to its many pharmacological actions such as anti-cancer, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities. However, poor solubility and first pass mechanism are major impediments for resveratrol's clinical effectiveness. Herein, the soy protein isolate-glycyrrhizin composite complex (SPI-DG) for encapsulating RES were prepared by the ultrasonic-assisted pH-driven method to overcome it. This novel RES@SPI-DG exhibited high encapsulation efficiency (97.60 ± 0.38%), loading capacity (8.74 ± 0.03%), and small nano size (68.39 ± 1.10 nm). Multispectral evaluations and molecular simulations revealed that the interaction of SPI and DG in SPI-DG involved the combination of a spontaneous exothermic reaction, and the mechanisms of interaction were dominated by a hydrogen bond and van der Waals forces. And the interaction mechanism of SPI-DG and RES was also simulated by molecular docking. Then, the physicochemical properties of RES@SPI-DG were investigated. RES@SPI-DG has demonstrated significant improvements in solubility and in vitro antioxidant activity. The enhanced in vitro release and digestion profiles of RES@SPI-DG were attributed to the solubility improvement of RES and the retarding characteristic of SPI-DG composite complex. Moreover, the pH-responsive hydrogel mechanism of SPI-DG could protect RES against gastric juices and retard release in gastric, and further targeted release rapidly in intestinal. These advantages further influenced the pharmacokinetic study and increased its AUC_{0-t} and C_{max} by 5.14 and 5.70 times, respectively. Additionally, it was worth mentioning that the RES@SPI-DG distributed significantly higher levels of RES in all tissues of rats, especially the liver and intestine, which possibly due to hepatoenteric circulation. Consequently, it is promising to use soy protein isolate-glycyrrhizin composite complex to design a promising nano-delivery system for hydrophobic polyphenolic compounds to improve their bioavailability and clinic efficacy.

【**Keywords**】resveratrol; soy protein isolate; glycyrrhizin; nanocomplex; efficacy; release retarding; bioavailability.

Simple but novel ICA-loaded pro-glycymicelles for hyperlipidemic prevention: Physicochemical characteristics and in vitro and in vivo animal evaluations

Cui Qingchen[1]，Wu Xianggen[1*]

（[1]College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong, 10426）

【**Abstract**】Hyperlipidemia, which involves an imbalance of cholesterol levels, is known as a silent killer because it can lead to severe cardiovascular events. As such, several patients require adjunct therapies to control hyperlipidemia properly. Thus, adjunct therapies, or even alternative therapeutic treatments, are highly desired in clinics. A novel nanomicelles for hyperlipidemia named icariin (ICA) pro-glycymicelles(ICA-PG) using glycyrrhizin as phytonanomaterials was easily fabricated with great storage, pH, and salt stabilities. The characteristics, safety, and stability evaluations were carried out firstly. Then the in vitro and in vivo antioxidant and antihyperlipidemic abilities were evaluated by tubes, cells, and animal experiments. The results showed that ICA-PG can easily dissolve in water to self-assemble a clear glycymicelle solution with high ICA encapsulation efficiency. The ICA in ICA-PG exhibits significantly increased aqueous solubility, faster in vitro release and higher bioaccessibility than bare ICA. ICA-PG exhibited improved in vitro activities including antioxidant activity, α-glucosidase inhibition, lipase and cholesterol esterase inhibition. ICA-PG also demonstrated improved antioxidant activity in cells. In vivo evaluation confirmed that ICA-PG demonstrated a significant protective effect against experimental hyperlipidemia in mice, exhibiting decreasing levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) in the serum and restoring the hepatic morphology to normal levels. These results showed that ICA-PG could improve in vitro/in vivo profiles of ICA, providing a new concept and a promising drug for hyperlipidemia.

【**Keywords**】icariin; glycyrrhizin; solubility; antioxidant; antihyperlipidemic

干血斑采样联合 LC-MS/MS 法同时测定早产儿体内咖啡因及其三种代谢产物的浓度

代浩然[1,2]，郭宏丽[1]，王玮珺[1,2]，沈仙[3]，程锐[3]，许静[1]，胡雅慧[1,*]，丁选胜[2,*]，陈峰[1,*]

（[1]南京医科大学附属儿童医院药学部药学研究中心，南京，210008；[2]中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京，211198；[3]南京医科大学附属儿童医院新生儿医学中心，南京，210008）

【摘要】目的：将传统的“湿基质”采样法更新为干血斑（Dried blood spot，DBS）采样法，利用液相色谱串联质谱（Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）技术开发一种可以同时测定咖啡因及其三种主要代谢物（可可碱、副黄嘌呤和茶碱）的新方法，以支持咖啡因在早产儿中的常规治疗药物监测（Therapeutic drug monitoring，TDM）。**方法：**采用“双定量”采样法用于制备 DBS 样品，即使用 10 μL 定量毛细采血管吸取固定体积的外周血，随后 8 mm 直径金属打孔器将干燥后的血斑全部冲切下来，使用含 125 mM 甲酸的甲醇/水混合溶液（80/20，v/v）用于样品的提取，采用四种配对的稳定同位素标记物作为内标，使用碰撞能量缺陷策略进行了待测物分析。根据国内外生物分析方法验证的指导原则和 DBS 分析的行业建议对该方法进行充分验证。并与前期开发的“湿基质”血浆检测方法进行了交叉验证。该方法经验证合格后应用到早产儿咖啡因 TDM 的临床实践中。**结果：**开发了一种新型的“双定量”采样策略，并优化了一种高回收率的提取方法。方法验证结果表明该方法的准确度、精密度、提取回收率、基质效应、残留、线性、定量下限、检测限、再进样重现性、稳定性均在可接受范围内。该方法可克服红细胞压积效应的影响。四种分析物的 DBS 和血浆测定浓度之间具有良好的平行性、一致性和相关性。应用该方法为 20 名早产儿提供了常规 TDM 服务。**结论：**本研究首次建立了基于干血斑采样的 LC-MS/MS 分析方法用于同时测定咖啡因及其三种主要代谢物。该方法经充分验证合格并成功应用于常规 TDM 的临床实践。将采样方法从“湿基质”转换为干血斑采样将为咖啡因在早产儿中的个体化精准用药提供助力和技术支持。

【关键词】干血斑，LC-MS/MS，治疗药物监测，咖啡因，早产儿

A versatile LC-MS/MS assay for simultaneous monitoring caffeine and its three primary metabolites in preterm infants through dried blood spot sampling strategy

Hao-Ran Dai[1,2,†], Hong-Li Guo[1], Wei-Jun Wang[1,2,†], Xian Shen[3], Rui Cheng[3], Jing Xu[1], Ya-Hui Hu[1,*], Xuan-Sheng Ding[2,*], Feng Chen[1,*]

（[1]Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Pharmacy, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, China. [2]School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing, China. [3]Neonatal Intensive Care Unit, Children’s Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, China.）

【Abstract】Purpose: To update traditional “wet matrices” to dried blood spot (DBS) sampling, based on the liquid

*通讯作者：胡雅慧 (huyahui324@163.com)；丁选胜 (dxs0162@sina.com)；陈峰 (cy.chen508@gmail.com)

*Corresponding authors: huyahui324@163.com (Ya-Hui Hu), dxs0162@sina.com (Xuan-Sheng Ding), and cy.chen508@gmail.com (Feng Chen).

chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique, and create a novel method for simultaneous analyzing caffeine and its three primary metabolites (theobromine, paraxanthine, and theophylline), supporting routine therapeutic drug monitoring (TDM) for preterm infants.**Methods:** DBS samples were prepared by a two-step quantitative sampling method, i.e., volumetric sampling of a quantitative 10 μL volume of peripheral blood and whole punch extraction by a methanol/water (80/20, v/v) mixture containing 125 mM formic acid. Four paired stable isotope labeled internal standards and a collision energy defect strategy were applied for the method optimization. The method was fully validated following international guidelines and industrial recommendations on DBS analysis. Cross validation with previously developed "wet" plasma method was also proceeded. The validated method was then implemented on the TDM for preterm infants.**Results:** The novel two-step quantitative sampling strategy and a high recovery extraction method were developed and optimized. The method validation results were all within the acceptable criteria. Satisfactory parallelism, concordance, and correlation were observed between DBS and plasma concentrations of the four analytes. The method was applied to provide routine TDM services to 20 preterm infants.**Conclusions:** A versatile LC-MS/MS platform for simultaneous monitoring caffeine and its three primary metabolites was developed, fully validated, and successfully applied into the routine clinical TDM practices. Sampling method switching from "wet" matrices to "dry" DBS will facilitate and support the precision dosing of caffeine for preterm infants.

【**Keywords**】Dried blood spot; LC-MS/MS; Therapeutic drug monitoring; Caffeine; Preterm infants

咖啡因用于早产儿的群体药动学模型：一项系统综述和外部评价

代浩然[1,2]，刘云[3]，卢刻羽[3]，何心[1]，郭宏丽[1]，胡雅慧[1]，许静[1]，丁选胜[2]，程锐[3]，陈峰[1,*]，焦正[4,*]

（[1]南京医科大学附属儿童医院药学部药学研究中心，南京，210008；[2]中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京，211198；[3]南京医科大学附属儿童医院新生儿医学中心，南京，210008；[4]上海交通大学附属胸科医院药剂科，上海，200030）

【摘要】目的：目前已有公开发表的几种咖啡因用于早产儿的群体药动学（Population pharmacokinetic，PopPK）模型，但能否将这些模型应用到模型引导的精准用药（Model-informed precision dosing，MIPD）临床实践中仍不清楚。本研究旨在对现有文献报道的这些模型进行系统综述，并使用一个独立的外部数据集对其预测性能进行全面的评价。**方法：**使用 Pubmed、Embase、Scopus、Web of Science、中国知网、万方和维普数据库进行文献检索。检索时间从建库开始至 2023 年 1 月。对检索到的相关文献进行筛选，并对纳入研究的质量进行评价。从已发表的文献中提取研究特征、建模策略和模型估算值，使用 NONMEM 软件重现模型。使用基于预测和模拟的评价来评估各个模型的预测性能。使用贝叶斯预测评估了先验观测值的纳入对模型估算结果的影响。**结果：**从 3887 篇检索到的文献中纳入了 11 项相关研究，从中提取了 12 个 PopPK 模型。所有研究都有不同程度的缺失报告项目。一房室模型最适合描述咖啡因在早产儿中的药动学过程。在不同的研究中模型估算的咖啡因的清除率和分布容积有明显的不同。早产儿的出生后日龄和当前体重被证明是最重要的协变量。其他纳入的协变量包括低胎龄，胃肠外营养，血清肌酐，合并使用红霉素以及芳基烃受体的一个基因型（rs2158041）。基于预测和模拟的评价结果表明，大多数模型的外部预测性能并不令人满意。贝叶斯预测法在即使仅纳入一个先验观测至时，也可明显改善模型的预测结果。**结论：**有两个 PopPK 模型在外部评价中显示出最佳的预测性能，但将这些模型应用到临床实践之前仍然需要进行严格的评价。贝叶斯预测法可能是将 MIPD 应用到咖啡因治疗早产儿呼吸暂停临床实践中的有效工具。

【关键词】咖啡因，早产儿，群体药动学，系统综述，外部评价

Population pharmacokinetics of caffeine in preterm infants: A systematic review and external evaluation

Hao-Ran Dai[1,2], Yun Liu[3], Ke-Yu Lu[3], Xin He[1], Hong-Li Guo[1], Ya-Hui Hu[1], Jing Xu[1], Xuan-Sheng Ding[2], Rui Cheng[3], Feng Chen[1,*], Zheng Jiao[4,*]

（[1]Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Pharmacy, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, China. [2]School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing, China. [3]Neonatal Intensive Care Unit, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, China. [4]Department of Pharmacy, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China.）

【Abstract】Purpose: Several population pharmacokinetic (PopPK) models of caffeine in preterm infants have been published, but the rationality of these models for model-informed precision dosing (MIPD) in clinical practice is unclear. This study aimed to systemically review these models and comprehensively evaluate their predictive performance using an external independent dataset.**Methods:** A literature search was conducted using PubMed, Embase, Scopus, Web of

*通讯作者：陈峰 (cy.chen508@gmail.com)；焦正 (jiaozhen@online.sh.cn)

*Corresponding authors: Feng Chen (cy.chen508@gmail.com), and Zheng Jiao (jiaozhen@online.sh.cn).

Science, CNKI, WANFANG, and CQVIP databases from inception to January 2023. Relevant publications were screened and the quality of included studies was assessed. Characteristics of included studies and modeling strategies were extracted. Prediction- and simulation-based diagnostics were used to evaluate model predictability. The influence of prior information was assessed using Bayesian forecasting.**Results:** Twelve PopPK models extracted from eleven studies were included. All studies had varying degrees of missing report items. One-compartment model was best suited to describe the pharmacokinetics of caffeine. The estimated clearance and volume of distribution were significantly varied among different studies. Postnatal age and current weight were proven as the most important covariates. Other covariates include the low gestational age, parenteral nutrition, serum creatinine, coadministered with erythromycin, and genotype of aryl hydrocarbon receptor (rs2158041). The external predictive performances of most included models were unsatisfactory in prediction- and simulation-based diagnostics. Bayesian forecasting substantially improved the prediction results even with one prior observation. **Conclusions:** Two PopPK models showed best predictive performance, but extensive evaluation is still needed before the adoption of these models in clinical practice. Bayesian forecasting could be a useful tool to implement MIPD.

【**Keywords**】 Caffeine, Preterm infants, Population pharmacokinetics, Systematic review, External evaluation

基于TOPSIS法建立注射用齐拉西酮药物利用评价标准及其应用结果分析

戴彪[1,2,3,4],夏清荣[1,2,3,4#],柏同健[5],曹银[1,2,3,4],张元元[1,2,3,4]

（1. 安徽医科大学附属心理医院，安徽 合肥 230022；2. 合肥市第四人民医院药剂科，安徽 合肥 230022；3 安徽省精神卫生中心精神药理研究室，安徽 合肥 230022.；4. 安徽省精神心理疾病临床医学研究中心，安徽 合肥 230022；5.安徽医科大学第一附属医院神经内科，安徽 合肥 230022）

【摘要】目的：基于 TOPSIS 法建立注射用齐拉西酮药物利用评价（DUE）标准，评价其临床使用的合理性。**方法：**以注射用齐拉西酮药品说明书为基础，参考相关指南，通过专家咨询法建立注射用齐拉西酮 DUE 标准，同时采用加权 TOPSIS 法回顾性分析安徽省某大型精神专科三甲医院 2022 年 1—12 月使用注射用齐拉西酮的归档病例进行合理性评价。**结果：**共纳入 269 份病例，完全符合评价标准仅 31 例（11.52%），注射用齐拉西酮不合理应用常见于超适应症（46.47%）、BPRC-EC 评分（69.53%）、禁忌症（0.37%）、用药疗程（9.29%）、辅助检查及实验室检查（32.71%）、药物相互作用（13.01%）、特殊人群（2.97%）和药物序贯（7.06%）。**结论：**建立的注射用齐拉西酮 DUE 标准具有较强的科学性、实用性和可行性，该院注射用齐拉西酮临床应用中尚存在一些问题，需加强管控，促进临床合理用药。

【关键词】注射用齐拉西酮；药物利用评价标准；合理用药；专家咨询法；加权 TOPSIS 法

Evaluation criteria of Ziprasidone for injection and analysis of its application results were established based on TOPSIS method

Biao Dai[1,2,3,4], QingRong Xia[1,2,3,4#],TongJian Bai[5],Yin Cao[1,2,3,4], YuanYuan Zhang[1,2,3,4]

(1.Affiliated psychological Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China; 2.Department of Mental Pharmacology, Anhui Mental Health Center, Hefei, Anhui 230022, China; 3. Department of Pharmacy, Hefei Fourth People's Hospital, Hefei, Anhui 230022, China; 4. Clinical Medical Research Center of Mental and psychological Diseases in Anhui Province, Hefei, Anhui 230022, China; 5.Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China;)

【Abstrast】OBJECTICE：The DUE criteria for ziprasidone for injection were established based on TOPSIS method to evaluate the rationality of its clinical use. **METHODS：**Based on the drug instructions of Ziprasidone for injection, the DUE standard for Ziprasidone for injection was established by referring to relevant guidelines through expert consultation. Meanwhile, the weighted TOPSIS method was used to retrospectively analyze the archived cases of Ziprasidone for injection used in a major Grade-III psychiatric hospital in Anhui Province from January to December 2022 for rationality evaluation. **RESULTS：**A total of 269 cases were included, of which only 31 (11.52%) fully met the evaluation criteria. Irrational use of ziprasidone for injection was common in off-label (46.47%), BPRC-EC score (69.53%), contraindications (0.37%), medication course (9.29%), auxiliary examination and laboratory examination (32.71%), drug interaction (13.01%), special population (2.97%) and drug sequence (7.06%). **CONCLUSION：**Established DUE criteria of Ziprasidone for injection has strong scientific, practical and feasible, and there are still some problems in the clinical

[作者简介]：戴彪，男，副主任药师，研究方向：临床药学，电话：13721095229，Email：370108952@qq.com

[通讯作者]：夏清荣，男，主任药师，研究方向：医院药学，电话：0551-63616022，Email：1356835730@qq.com

application of ziprasidone for injection in this hospital, so it is necessary to strengthen the control and promote clinical rational drug use.

【**Key words**】ziprasidone for injection; Evaluation criteria for drug utilization; Rational drug use; Expert consultation method; weighted TOPSIS method

药物利用评价（Drug Use Evaluation，DUE）是一种对药物使用的全过程进行医药学和管理等多个方面进行综合评价的方法[1]，通过 DUE 研究来提升药品合理使用率，已成为药学工作的重要组成部分[2]。注射用齐拉西酮是美国 FDA 批准上市的首个非典型抗精神病药速效注射剂，也是国内仅有上市的非典型抗精神病药速效注射剂，主要用于控制精神分裂症患者急性发作期的激越症状，在精神科临床应用较普遍[3]。随着临床的广泛应用，其不合理问题逐渐增加，给患者用药安全带来一定风险。逼近理想解排序法（Technique for Order Preference by Similarity to an Ideal Solution，TOPSIS）其基本原理是对原始数据矩阵进行归一化，并在其中找出最优方案和最劣方案之间距离，以此考察各方案优劣。加权 TOPSIS 法是属性层次模型（Attribute Hierarchical Model，AHM）与 TOPSIS 法的结合，来解决 TOPSIS 法对各项评价指标没有赋权的不足之处，使评价结果更客观、全面、准确、简明等[4]。加权 TOPSIS 法建立 DUE 标准已广泛应用于合理用药评价领域[5]。目前尚未见注射用齐拉西酮系统性 DUE 标准的相关报道，本研究拟采用加权 TOPSIS 法建立注射用齐拉西酮 DUE 标准，并以此评价注射用齐拉西酮在安徽省某大型精神专科三甲医院（以下简称“我院”）临床应用的合理性，分析不合理原因，以期为改进该药临床用药模式提供研究证据。

1 资料与方法

1.1 注射用齐拉西酮 DUE 标准的建立

以注射用甲磺酸齐拉西酮（规格 20mg，江苏恩华制药有限公司生产）药品说明书为基础，参考其他生产企业的药品说明书，以及激越患者精神科处置专家共识[6]、2019 年美国急诊室儿童青少年激越的评估和治疗共识[7]及 2018 年加拿大双相情感障碍患者管理指南[8]等相关指南和专家共识，通过 Micromedex 数据库 Thomson 分级的循证医学评价标准进行分级评价。运用 Lexicomp 数据库统计药物之间存在相互作用的目录，由高到低对药物间严重程度分级为 X 级、D 级、C 级、B 级和 A 级，本标准制定只纳入 D 级和 X 级。通过以上方式初步建立注射用齐拉西酮的 DUE 标准初稿，采用专家咨询法分析注射用齐拉西酮 DUE 标准初稿中相关条目内容。专家们结合临床实际情况，从科学性、实用性及可操作性方面进行修改和完善，形成最终标准，共 12 个条目，包括适应证、禁忌证、用法用量、用药疗程、辅助检查及实验室检查、配伍禁忌、特殊人群、用药监护、药物序贯、药物相互作用、临床疗效和不良反应等。如表 1 所示。

表 1 注射用齐拉西酮 DUE 标准

Tab1 DUE criteria for ziprasidone for injection

评价项目	评价指标	评价依据	评价结果
用药指征	适应证	（1）适应症：适用于治疗精神分裂症患者急性激越症状；符合条件①、②和③或符合条件④： ①BPRS-EC 总分≥14 分，且有 1 个条目≥4 分提示有激越表现（5 个条目，分别为兴奋、敌意、紧张、不合作及行为紊乱）； ②非药物控制激越效果不佳； ③口服制剂无效或口服疗法不能安全可靠地实施； ④激越躁动严重且拒绝口服药（BPRS-EC 总分≥20 分提示有严重激越）。 （2）超说明书用药：除精神分裂症外的其他精神障碍患者的急性激越。	0：符合（1） 1：符合（2）

	禁忌证	（1）对齐拉西酮或其他任何辅料（环糊精）过敏； （2）QT 间期延长病史的患者(包括先天性长 QT 间期综合征)； （3）近期出现急性心肌梗塞的患者； （4）非代偿性心衰的患者； （5）心律失常； （6）QTc 间期大于 500ms。	0：不符合（1）和（2）和（3）和（4）和（5）和（6）； 1：符合（1）或（2）或（3）或（4）或（5）或（6）；
用药过程	用法用量	（1）肌肉注射；每次在使用前加 2ml 注射用无菌水配制成注射液，每 1ml 药液含 10mg 齐拉西酮； （2）除注射用无菌水外，不应与其它药品或溶剂混合； （3）常规剂量每日 10-20mg，最大剂量为每日 40mg； （4）每次注射 10mg，可每隔 2 小时注射一次； （5）每次注射 20mg，可每隔 4 小时注射一次。	0：符合（1）和（2）和（3）和（4）和（5） 1：不符合（1）或（2）或（3）或（4）或（5）
	用药疗程	（1）连续肌注治疗时间不超过 3 天。	0：符合（1） 1：不符合（1）
	辅助检查及实验室检查	用药前和用药过程中需完成以下的所有检查： （1）用药前测定血常规、肝功能和肾功能； （2）用药前监测血钾和血镁水平，血钾＜3.5mmol/L 及血镁＜0.8mmol/L 时，需用药前纠正血钾及血镁浓度异常； （3）用药前监测心电图 QT 间期指标，男性 QTc<440ms 或女性 QTc<470ms，且无 T 波形态的异常情形；用药过程及用药后 3d 内酌情监测心电图； （4）用药前监测血压，用药过程及用药后 3d 内每日监测血压，注意体位性低血压； （5）用药前监测脑电图，用药过程及用药后 3d 内酌情监测脑电图，注意脑电图异常的癫痫发作。	0：符合（1）和（2）和（3）和（4）和（5） 1：不符合（1）或（2）或（3）或（4）或（5）
	配伍禁忌	（1）禁止与其他药物混合（即不能用于同一注射器）。	0：符合（1） 1：不符合（1）
	特殊人群	（1）孕妇：动物生殖研究表明对胎儿有不利影响，不推荐在怀孕期间使用； （2）哺乳妇女：用药后不可进行哺乳； （3）儿童青少年：不推荐儿童及 18 岁以下青少年应用； （4）老年人：无需调整剂量。	0：不符合（1）和（2）和（3）和（4） 1：符合（1）或（2）或（3）或（4）
	用药监护	（1）用药过程中每日监测血压、心率及其他生命体征的变化； （2）若出现心区不适时，及时监测心电图。若患者心电图检查提示 QT 间期异常：男性 QTc>440ms 或女性 QTc>470ms，但 QTc<500ms；考虑降低药物剂量或换用对 QT 间期影响较小的药物；用药过程中若患者心电图检查提示 QTc>500ms，应停用药物，换用另一种 QT 间期影响较小的药物； （3）若出现 EPS 的症状及其他不适症状，及时对症处理。	0：符合（1）和（2）和（3） 1：不符合（1）或（2）或（3）
	药物序贯	（1）不推荐与氟哌啶醇注射液及异丙嗪注射液联合应用或交叉使用； （2）不推荐与齐拉西酮口服制剂同时序贯使用。	0：符合（1）和（2） 1：不符合（1）或（2）

	药物相互作用	（1）禁止与下列引起 QT 间期延长或增强不良反应发生的药物合用（X 类）： ①抗心律失常药物：多非利特、索他洛尔、奎尼丁、利多卡因、美心律、普罗帕酮、胺碘酮、苄普地尔、决奈达隆； ②抗精神病药物：美索达嗪、硫利达嗪、氯丙嗪、氟哌利多、匹莫齐特、舒必利、氟哌噻吨、喹硫平； ③抗菌药物：司帕沙星、加替沙星、莫西沙星、克拉霉素； ④抗疟疾药物：卤泛群、甲氟喹、喷他脒、三氧化砷； ⑤麻醉药品：吗啡、左醋美沙朵； ⑥止吐药：多拉司琼； ⑦降酯药物：丙丁酚； ⑧免疫抑制剂：他克莫司； ⑨促胃肠道动力药：多潘立酮、甲氧氯普胺、溴必利； ⑩抗肿瘤药物：尼罗替尼； ⑪抗抑郁药物：西酞普兰。 （2）合用时应考虑药物治疗方案调整（D 类）： ①抗精神病药物：氯氮平、奥氮平、利培酮、氨磺必利、布南色林、氟哌啶醇； ②抗抑郁药物：艾司西酞普兰、氯米帕明、多塞平； ③镇静催眠药物：唑吡坦、佐匹克隆； ④抗菌药物：左氧氟沙星、阿奇霉素、红霉素； ⑤抗过敏药物：特非那定； ⑦促胃肠道动力药：西沙比利； ⑧麻醉药品：可待因、羟考酮、芬太尼。	0：符合（1）和（2） 1：不符合（1）或（2）
用药结果	临床疗效	（1）患者思维活动、情绪和行为从高的兴奋状态恢复平静； （2）简明精神病评定量表总分<14 分且任何 1 个条目不可大于 4 分； （3）配合病房医生和护士管理。	0：符合（1）和（2）和（3） 1：不符合（1）或（2）或（3）
	不良反应	（1）监测是否发生不良反应，特别关注是否发生 QT 间期延长、脑电图异常和 EPS 等不良反应发生；发现不良反应后采取有效处理手段，并收集上报药品不良反应。	0：符合（1） 1：不符合（1）

1.2 注射用齐拉西酮 DUE 标准的应用

采用回顾性分析方法，通过美康合理用药软件系统，统计全院使用注射用齐拉西酮的出院患者病例。纳入标准：2022 年 1 月 1 日至 2022 年 12 月 31 日期间使用注射用齐拉西酮的出院患者。排除标准：住院时间≤1 天和死亡病例。最终筛选出 269 份病例。查阅病历，参照表 1 标准中的 12 个评价条目内容对每一份病历进行合理性使用评价，对评价后的病历信息进行统计分析。

1.3 建立数据库并确立每项指标权重

根据注射用齐拉西酮 DUE 标准制作病历收集调查表，建立合理用药评价数据库，每份病历的 12 项指标评价结果赋予相应分值，结果 0（合理）赋予 10 分，结果 1（不合理）赋予 0 分，，逐份评价病例并将最终结果录入表格中，建立数据库。采用 AHM 赋权法对 12 项评价指标进行标记，分别为 x_1，x_2，x_3…x_{12}，两两进行相对重要性的对比。F_i 和 F_j 的重要性比例标度（a_{ij}）分为同等重要（a_{ij} =1）、稍微重要（a_{ij} =3）、重要一些（a_{ij} =5）、重要较多（a_{ij} =7）、极端重要（a_{ij} =9），两者之间评分为 2、4、6、8。各指标相对重要程度都经临床和药学专

家讨论确定并构建属性判断矩阵，。计算 12 个指标的归一化相对权重，第 j 个指标的权重为：[illegible]，j=1,2,3…，12。归一化后的指标权重为：$w_j'=\frac{w_j}{\sum_{j=1}^{12} w_j}$。

1.4 运用加权 TOPSIS 法评价用药合理性

建立注射用齐拉西酮 DUE 评价标准的数据矩阵，根据病历中每项指标进行评价合理或不合理，合理为最优方案 Z^+，不合理为最劣方案 Z^-。计算各项评价指标与 Z^+和 Z^-之间的加权欧式距离差值 D^+和 D^-，再计算各评价病例与最优方案的相对接近程度 C_i 值（范围 0~1），C_i 值越大说明该评价病例使用注射用齐拉西酮合理性越高。依据文献[9]，C_i≥90%、70%≤C_i＜90%和 C_i＜70%分别判断为合理、基本合理和不合理。Z^+=（a_{i1}^+，a_{i2}^+，a_{i3}^+……，a_{i12}^+），Z^-=（a_{i1}^-，a_{i2}^-，a_{i3}^-……，a_{i12}^-）$D_i^+=\sqrt{\sum_{j=1}^{12} w_j'(a_{ij}-a_{ij}^+)^2}$，$D_i^-=\sqrt{\sum_{j=1}^{12} w_j'(a_{ij}-a_{ij}^-)^2}$，$C_i=\frac{D_i^-}{D_i^+ + D_i^-}$。

2 结果

2.1 病例基本特征

共纳入 269 份病例，患者年龄范围 13~69 岁，平均年龄（33.87±12.55）岁。男性 145 例（53.90%），女性 124 例（46.10%）。患者使用注射用齐拉西酮所占比例最多为精神分裂症，其次为双相情感障碍、急性而短暂的精神障碍、抑郁障碍等。其中达到激越评分标准病例（简明精神评定量表—兴奋因子（BPRS-EC）≥14 分）的患者仅 82 例，占比 30.48%，平均评分（11.46±4.75）分。患者一般资料见表 2。

表 2 使用注射用齐拉西酮患者的基本资料

Tab 2 Basic information of patient used ziprasidone for injection

类别	项目	例数（n=269）	构成比/%	平均值
年龄	平均年龄			33.87±12.55
性别	男	145	53.90	
	女	124	46.10	
适应症	精神分裂症	144	53.53	
	双相情感障碍	66	24.54	
	急性而短暂的精神障碍	18	6.69	
	抑郁障碍	14	5.20	
	分离转换障碍	10	3.72	
	其他精神疾病	17	6.32	
激越（BPRS-EC 评分）	激越平均评分			11.46±4.75
	BPRS-EC≥14	82	30.48	
	BPRS-EC＜14	187	69.51	
禁忌症		1	0.37	

2.2 合理性评价

根据药品说明书和指南共识综合评定使用注射用齐拉西酮病例的合理性，患者诊断为精神分裂症并伴有急性激越症状的评判为用药合理。用药不合理主要集中在 BPRS-EC 评分不够激越标准、用法用量、用药疗程、辅助检查及实验室检查、药物序贯、用法用量、禁忌症、药物相互作用、特殊人群等。269 例病例中，完全符合评

价标准用药合理仅 31 例（11.52%），用药不合理体现在超适应症 144 例（53.53%），禁忌症 1 例（0.37%），用药疗程 25 例（9.29%），辅助检查及实验室检查 88 例（32.71%），药物相互作用 35 例（13.01%），特殊人群 8 例（2.97%），药物序贯 19 例（7.06%），临床疗效、用法用量、用药监护、配伍禁忌、不良反应未见不合理使用情况。 具体情况见表 3 和 4。

表 3　使用注射用齐拉西酮评价结果

Tab 3　Evaluation results of used ziprasidone for injection

指标名称	合理	不合理
完全符合 DUE 标准	31（11.52%）	238（88.48%）
超适应症	144（53.53%）	125（46.47%）
禁忌症	268（99.63%）	1（0.37%）
用药疗程	244（90.71%）	25（9.29%）
辅助检查及实验室检查	181（67.29%）	88（32.71%）
药物相互作用	234（86.99%）	35（13.01%）
特殊人群	261（97.03%）	8（2.97%）
药物序贯	250（92.94%）	19（7.06%）
临床疗效	269（100%）	0（0.00）
用法用量	269（100%）	0（0.00）
用药监护	269（100%）	0（0.00）
配伍禁忌	269（100%）	0（0.00）
不良反应	269（100%）	0（0.00）

表 4　使用齐拉西酮注射剂患者的联合用药情况汇总

Tab 4　Summary of combined use of ziprasidone injection

药物名称	作用结果（齐拉西酮）	风险等级（Lexicomp）	例数	占比/%
喹硫平	增加 QTc 延长和锥体外系反应风险	X	9	3.35
奥氮平	增加 QTc 延长和锥体外系反应风险	D	4	1.49
氨磺必利	增加 QTc 延长和锥体外系反应风险	D	2	0.74
利培酮	增加 QTc 延长和锥体外系反应风险	D	3	1.12
氯氮平	增加 QTc 延长风险	D	13	4.83
帕利哌酮	增加癫痫、镇静及 QTc 延长风险	C	1	0.37
阿立哌唑	增加癫痫及镇静风险	C	3	1.12
艾司西酞普兰	增加 QTc 延长风险	D	3	1.12
氯米帕明	增加 QTc 延长风险	D	1	0.37
度洛西汀	增加 5-HT 综合征和恶性综合征风险	C	1	0.37
氟西汀	增加 5-HT 综合征、恶性综合征及 QTc 延长风险	C	3	1.12
舍曲林	增加 5-HT 综合征、恶性综合征及 QTc 延长风险	C	3	1.12
丙戊酸	增加镇静风险	C	15	5.58
拉莫三嗪	增加镇静风险	C	2	0.74
碳酸锂	增加神经毒性及降低血清浓度风险	C	17	6.32
二甲双胍	增加低血糖风险	C	2	0.74

注（note）：X－避免联用（avoidcombination）;D－考虑治疗修改（consider treatment modification）；C－谨慎合用（caution in combination）；B－无临床意义的相互作用（non-clinically significat interactions）；A－没有任何已知的相互作用（without known interaction）

2.3 加权 TOPSIS 法评价结果

经 AHM 赋权法计算出适应证、禁忌证、用法用量、用药疗程、辅助检查及实验室检查、配伍禁忌、特殊人群、用药监护、药物序贯、药物相互作用、临床疗效和不良反应 12 个评价指标的相对权重系数，分别为 0.0851、0.1185、0.0902、0.0596、0.0867、0.1144、0.0803、0.0748、0.0795、0.0866、0.0621、0.0621。269 份病历 C_i 评价结果见表 5，相对接近度 $C_i \geq 90\%$的有 31 例（11.52%），判为合理用药；$70\% \leq C_i < 80\%$的有 137 例（50.93%），判为基本合理用药； $C_i < 70\%$的有 101 例（37.55%），判为不合理用药。

表 5　注射用齐拉西酮病历加权 TOPSIS 法评价结果 n=269

Tab5　Evaluation results of Ziprasidone for injection by weighted TOPSIS method n=269

相对接近范围/%	例数	所占比例/%
C_i=100.0	31	11.52
$80.0 \leq C_i < 100.0$	0	0
$70.0 \leq C_i < 80.0$	137	50.93
$60.0 \leq C_i < 70.0$	96	35.69
$50.0 \leq C_i < 60.0$	5	1.86

3 讨论

注射用齐拉西酮 2013 年在中国上市[10]，由于其是国内首个非典型的抗精神病药物速效注射制剂，较氟哌啶醇发生锥体外系反应少[11]，在临床广泛用于精神疾病的激越状态。国内一项研究显示[12]，精神专科医院齐拉西酮速效注射剂的超说明书用药的不合理率达到 86.85%，其中最主要的超说明书用药类型为超适应证，如躁狂症，双相情感障碍等，临床应用面临严重的风险挑战，迫切需要规范。此次对注射用齐拉西酮合理性评价中，临床药师通过查阅国内外相关的指南，依靠具有循证学依据的 Micromedex 和 Lexicomp 的数据库，采用加权 TOPSIS 法建立了注射用齐拉西酮 DUE 标准，具有一定的科学性、可行性和实用性。

加权 TOPSIS 法评价结果显示，完全合理使用的仅为 31 例（11.52%），$C_i \geq 70\%$的有 168 例（62.45%），提示不合理使用情况在我院临床使用中较为普遍，造成不合理使用的原因主要有以下几个方面：（1）超适应症用药：注射用齐拉西酮国内外药品说明书批准的唯一适应症是用于精神分裂症患者的急性激越症状。从批准的适应症中我们发现，该药物使用不仅需要满足精神分裂症的临床诊断，而且患者应伴有急性激越症状（BPRS-EC≥14 分）才有应用的指征。相关研究也指出应在口服药物干预效果不佳或拒绝口服药物治疗时，推荐使用注射用齐拉西酮控制激越[7]。除精神分裂症外，分裂情感性障碍、双相情感障碍及躁狂发作等都会伴有激越症状，临床上也常出现将注射用齐拉西酮用于以上急性激越患者的情形。随着齐注射用拉西酮在临床的大量使用，其超适应症使用的情况更加普遍[3]。虽然相关指南和共识都有推荐齐拉西酮在其他适应症的激越症状时使用，但超适应症用药给患者用药安全带来的风险，应引起足够的重视。另外，根据《医师法》的规定，医师若需超说明书用药，应经医院伦理和药事委员会审核并批准后，在患者签署知情同意书的情形下才能使用。否则不建议超适应症使用药物。（2）禁忌症用药：本研究发现 1 例房颤和房扑的心律失常患者使用注射用齐拉西酮。齐拉西酮是非典型抗精神病药物中对心脏 QT 间期影响最大的药物[13,14]，QT 间期延长有潜在的危险性，可能诱发严重心律失常如尖端扭转型室速，导致猝死的发生[15]。而相关的研究发现 QT 间期时限与房颤有关[16]，说明书中也指出具有心律失常病史的患者禁用齐拉西酮，故房颤的患者应避免使用齐拉西酮，以免出现尖端扭转型室速，造成严重后果。（3）药物相互作用：因齐拉西酮具有引起锥体外系反应、QT 间期延长、镇静和降低癫痫阈值的风险[17]，故与易致上述作用的药物合用时可能会增加不良反应的发生率。本研究共发现 35 例联合用药（D 级和 X 级），虽未发现两药联用导致的 QT 间期的延长，但有发现 1 例合用氯氮平出现心电图 T 波变化的改变，伴有心动过速的症状。另有 2 例分别合用喹硫平和氨磺必利出现锥体外系反应。虽联合用药出现不良反应的发生率较低，但其风险依然存在，不建议在注射用齐拉西酮应用期间同避免联用的药物合用。（4）特殊人群用药：本次研究中发现 8 例未成年人使用注射用齐拉西酮，其中有 2 例出现锥体外系反应。虽国内研究显示齐拉西酮口服制剂在治疗儿童青少年精神分裂症疗效确切，不良反应少[18]，但缺少注射剂型在控制急性激越症状的相关研究。国外共识指出，儿童青少年急性激越症状不应使用注射用齐拉西酮，因为其具有激活潜力、QT 延长风险以及当给

予口服时需要同时摄入食物的不便性[6]，并具有恶化病情和增加心律失常风险的可能，故不建议在儿童青少年中使用。（5）药物序贯：包括序贯疗法和转换疗法。前者是同一种药物剂型的转换，后者是作用相近的不同种药物之间的转换。本研究发现 19 例患者药物序贯不合理，分别是与氟哌啶醇注射液交叉使用控制激越以及注射用齐拉西酮应用期间同时服用齐拉西酮胶囊，其中 1 例与氟哌啶醇交叉使用造成锥体外系反应的发生。不合理的药物序贯会导致药物在体内蓄积过多造成中毒或多种药物存于体内造成不良反应发生的风险增加，故应规范药物序贯。

针对本研究中出现的问题，药师通过合理用药软件对其临床应用的规则进行优化设置，如儿童青少年禁止使用和超适应症提交药师在线审核。联合使用严重风险等级较高的药物时，给予弹框提示可能出现风险等，以此推进安全、有效和合理的临床用药。但本回顾性研究有一定的不足，一是本研究结果只是反映了我院的情况，不具有普遍适用性，今后应开展多中心研究，以确认是否具有推广价值；二是本研究结果尚未形成我院的评价标准，临床用药合理性的改善效果尚未体现。后续将申请将此评价标准纳入医院合理用药评价体系，观察对临床干预的实际效果，结合临床反馈意见进行更新和完善，达到逐步规范我院注射用齐拉西酮临床合理应用的目的。

参考文献：

[1] 李素琼,班立丽.国内外药物利用评价研究综述[J].中国医院用药评价与分析,2021,21(07):893-896.

[2] 余应嘉,叶淑芳,邓燕芳,等.基于加权 TOPSIS 法评价血必净注射液临床应用的合理性[J].中国医院药学杂志,2021,41(15):1546-1550.

[3] 杨欣湖,郑伟,张帆,等.精神专科医院齐拉西酮速效针剂的超说明书用药调查[J].临床精神医学杂志,2021,31(05):361-364.

[4] 武东,汪晓娟,马震,等.左西孟旦药物利用评价标准的建立与应用[J].中国新药与临床杂志,2022,41(08):483-489.

[5] 赵小丽,朱倩倩,赵佩,等.基于加权 TOPSIS 法评价重组人血小板生成素的合理使用[J].中国医院药学杂志,2022,42(04):431-434.

[6] 中华医学会精神医学分会精神分裂症协作组.激越患者精神科处置专家共识[J].中华精神科杂志,2017,12(50):401-410.

[7] Gerson R, Malas N, Feuer V,et,al. Best Practices for Evaluation and Treatment of Agitated Children and Adolescents (BETA) in the Emergency Department: Consensus Statement of the American Association for Emergency Psychiatry[J]. West J Emerg Med. 2019 ,20(2):409-418.

[8] Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV,et,al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) 2018 guidelines for the management of patients with bipolar disorder[J]. Bipolar Disord. 2018 ,20(2):97-170.

[9] 邵云,任艳丽,付强,等.基于加权 TOPSIS 法的头孢美唑药物利用评价[J].中国药物应用与监测,2022,19(06):402-404.

[10] 郭辉.齐拉西酮和奥氮平治疗老年精神分裂症患者的效果及对机体糖脂代谢的影响[J].当代医学,2022,28(3):53-55.

[11] 高帅,陈立勇,杨薇薇.齐拉西酮与氟哌啶醇治疗精神分裂症激越症状的效果及安全性比较[J].中国医药科学,2019,9(17):102-104.

[12] 杨欣湖,郑伟,张帆,等.精神专科医院齐拉西酮速效针剂的超说明书用药调查[J].临床精神医学杂志,2021,31(05):361-364.

[13] 杨建红,郑毅,姜长青,等.非典型抗精神病药物对首发儿童精神分裂症心电图 QT 间期的影响[J].中国健康心理学杂志,2012,20(08):1141-1143.

[14] 周华,戢秋明.关注齐拉西酮的安全性[J].环球中医药,2013,6(S2):24.

[15] 谭学瑞,禤婉玲.QT 间期与房颤[J].临床心电学杂志,2015,24(05):367-369.

[16] 陈统献,闫耀宇,鲍佑元.齐拉西酮和利培酮治疗精神分裂症的临床疗效及安全性评价[J].中国临床药理学杂志,2015,31(10):809-811.

[17] 殷莉,宋小珍,梁素改,等.齐拉西酮治疗儿童青少年精神分裂症的临床对照研究[J].中国临床药理学杂志,2012,28(07):493-495.

[18] 吴菊芳.序贯疗法的概念与应用现状[J].中国实用儿科志,2003,18(04):193-194.

铁死亡药物在膀胱癌中的治疗进展

单正达[1],*

中山大学，广东 深圳 518000

铁死亡是 2012 年 Stockwell 等人提出的一种可改变的复杂程序性细胞死亡[1]，是一种铁依赖性调节性细胞死亡，特征为活性氧(ROS)产生和分解的不平衡来诱导磷脂过氧化及其产物的积累。而膀胱癌（BC）是主要的泌尿系统恶性肿瘤之一，由于其多重耐药性，新型治疗方案一直是研究的重点。近几年，发现多种化合物可以诱导膀胱癌细胞发生铁死亡，将来或可用于前列腺癌的治疗。铁死亡诱导剂松香酸(AA)是一种松香烷二萜，在 AA 的影响下，癌细胞 GPX4 表达下调，HO-1 表达上调，导致无法抵御磷脂的过氧化，结果，越来越多的 BC 细胞会因为铁死亡而失活，从而抑制了膀胱癌的进展，且只对癌细胞有害，对正常细胞无害，这很有可能会有助于膀胱癌的治疗[2]。黄芩作为一种知名抗癌药物，黄芩苷是其功能的有效成分，黄芩苷可上调铁死亡过程中至关重要的启动子 FTH1，从而达到抗癌作用[3]。布比卡因是一种常见的麻醉剂，也可以抑制 PI3K、Akt 和 mTOR 的磷酸化[4]。换句话说，它通过下调 PI3K/AKT 信号通路的表达来诱导膀胱癌细胞的铁死亡进而抑制膀胱癌的发展。同时，有学者基于分子靶向药物 sorafenib 的结构修饰，合成了一系列喹唑啉基脲类衍生物[5]，在这其中，7j 可通过与相应受体 GPX4 的活性位点结合，诱导膀胱癌细胞内 ROS 产生，导致铁死亡。综上所述，随着铁死亡在膀胱癌细胞中的作用机制研究的逐渐深入，将会有更多新型化合物或与当前临床药物联合用于膀胱癌的治疗。

【关键字】铁死亡，铁死亡药物，膀胱癌

参考文献

1.Dixon, S. J., K. M. Lemberg, M. R. Lamprecht, R. Skouta, E. M. Zaitsev, C. E. Gleason, D. N. Patel, A. J. Bauer, A. M. Cantley, W. S. Yang, B. Morrison, 3rd, and B. R. Stockwell. "Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death." *Cell* 149, no. 5 (2012): 1060-72.

2.Liao, M. Y., T. C. Huang, Y. C. Chin, T. Y. Cheng, and G. M. Lin. "Surfactant-Free Green Synthesis of Au@Chlorophyll Nanorods for Nir Pdt-Elicited Cdt in Bladder Cancer Therapy." *ACS Appl Bio Mater* 5, no. 6 (2022): 2819-33.

3.Kong, N., X. Chen, J. Feng, T. Duan, S. Liu, X. Sun, P. Chen, T. Pan, L. Yan, T. Jin, Y. Xiang, Q. Gao, C. Wen, W. Ma, W. Liu, M. Zhang, Z. Yang, W. Wang, R. Zhang, B. Chen, T. Xie, X. Sui, and W. Tao. "Baicalin Induces Ferroptosis in Bladder Cancer Cells by Downregulating Fth1." *Acta Pharm Sin B* 11, no. 12 (2021): 4045-54.

4.Hao, J., W. Zhang, and Z. Huang. "Bupivacaine Modulates the Apoptosis and Ferroptosis in Bladder Cancer Via Phosphatidylinositol 3-Kinase (Pi3k)/Akt Pathway." *Bioengineered* 13, no. 3 (2022): 6794-806.

5.Chen, J. N., T. Li, L. Cheng, T. S. Qin, Y. X. Sun, C. T. Chen, Y. Z. He, G. Liu, D. Yao, Y. Wei, Q. Y. Li, and G. J. Zhang. "Synthesis and In vitro Anti-Bladder Cancer Activity Evaluation of Quinazolinyl-Arylurea Derivatives." *Eur J Med Chem* 205 (2020): 112661.

通讯作者：单正达， Email：Shanzhengda_Jerry@126.com

氨基葡萄糖类药物的来源、结构及其鉴别技术研究进展

但晓梦，谢育媛，郭江红*，姜红*

（湖北省药品监督检验研究院，国家药品监督管理局血液制品质量控制重点实验室，武汉 430073）

【摘要】目的：对氨基葡萄糖类药物的来源、结构及其鉴别技术相关研究进行梳理与归纳，为该类药物的开发与研究提供参考。**方法：**基于多年来的实验研究结果及文献资料，对市场常见的商品种类及规格进行总结，对氨基葡萄糖类药物的来源情况进行梳理，对氨基葡萄糖类药物的结构进行分析，采用方法对其来源和结构进行鉴别。**结果：**基葡萄糖类药物的种类主要有两种，即盐酸氨基葡萄糖和硫酸氨基葡萄糖，其产品种类主要有片剂、胶囊剂、颗粒剂等。通过稳定同位素比值检查法鉴别氨基葡萄糖类药物的来源，通过X射线粉末衍射技术鉴别氨基葡萄糖类药物的晶型结构。**结论：**该研究能准确鉴别氨基葡萄糖类药物的来源和结构，方法简便、准确，专属性强，为氨基葡萄糖类药物的监督管理提供了技术支撑。

【关键词】盐酸氨基葡萄糖；硫酸氨基葡萄糖；来源；结构；鉴别

Review on the Research Progress of identification technologies of sources and structures of Glucosamine drugs

DAN Xiao-meng，XIE Yuyuan, GUO Jiang-hong*, JIANG Hong*

(Hubei Institute for Drug Control；NMPA Key Laboratory for Quality Control of Blood Products，Wuhan 430073, China)

【Abstract】Objective: To sort out and summarize the Research Progress of types, identification technologies of sources and structures of glucosamine drugs, provide a reference for the resource development and research of this kind of drugs. **Methods:** Based on related references, especially ones in recent years, the common commodity specifications in the market were summarized, and the sources of glucosamine drugs were sorted out, the structures of glucosamine drugs were analyzed. The methods to identify sources and structures of glucosamine drugs. **Results：** There are two main categories of glucosamine drugs, glucosamine hydrochloride and glucosamine sulfate. The pharmaceutical dosage forms are tablets, capsules, granules and etc. The sources of glucosamine drugs was identified by Stable isotope ratio test, and the crystal structures of glucosamine drugs was identified by X-ray powder diffraction. **Conclusion:** The research can effectively identify the sources and structures of glucosamine drugs，which is simple, accurate and reliable. The research provides technical support for the supervision and management of glucosamine drugs.

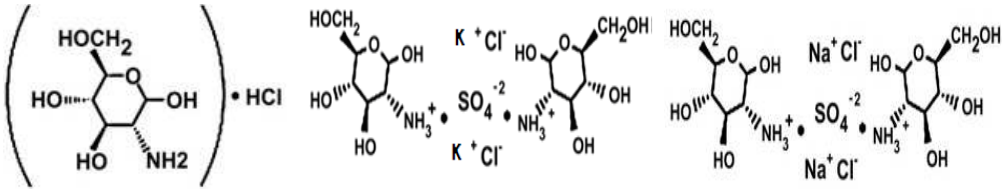
氨基葡萄糖是一种很特殊的药物，既属于药品又属于保健品，由于氨基葡萄糖属于副作用较小、安全性交给，在国外也作为保健品出售。中国是氨基葡萄糖在全球最大的生产及出口国，主要集中在山东、江苏、浙江等沿海城市，生产量巨大；随着人们对身体健康的重视程度逐年提高，氨基葡萄糖应用于治疗骨性关节炎的使用量也随之显著增长，提示该药物需求量较大，市场占有率较高[1、2]。

氨基葡萄糖是软骨基质中合成蛋白聚糖所必需的重要成分，蛋白聚糖可以通过抑制胶原纤维的拉伸力来使关节软骨具有吸收冲击力的功能。在关节退行性疾病的早期，软骨的弹性不断减弱并逐渐出现关节炎的诸多症状，氨基单糖可刺激软骨细胞产生具有正常多聚体结构的糖蛋白，抑制一些可损害关节软骨的酶，防止皮质激

素及某些非甾体抗炎药物对软骨细胞的损害及减少损伤细胞的内毒素因子的释放，从而改善关节软骨代谢。在关节炎的发展进程中，补充外源性的氨基葡萄糖可能起到有益的作用，氨基葡萄糖能为人体大量催生和补充关节滑液，从而不断润滑关节软骨面，减少磨损，使关节部位灵活自如，临床上主要用来治疗骨性关节炎，提高关节和机体的免疫力[3-5]。

1. 氨基葡萄糖的种类及商品规格

氨基葡萄糖是一种重要的氨基己糖，它由葡萄糖的一个羟基被氨基取代形成，氨基葡萄糖由于存在活性氨基基团，化学性质不稳定，在空气中易氧化，目前市场上的氨基葡萄糖主要以成盐形式存在，主要分为三种：盐酸氨基葡萄糖、硫酸氨基葡萄糖氯化钾和硫酸氨基葡萄糖氯化钠[6]，见图 1。



A　　B　　C

图 1 三种氨基葡萄糖类药物结构示意图

Fig.1 Structures of Three Kinds of GlcN

A.盐酸氨基葡萄糖，B.硫酸氨基葡萄糖氯化钾，C.硫酸氨基葡萄氯化钠

近年来，氨基葡萄糖类药物的上市剂型由经典的胶囊剂、普通片剂衍生出了更多的剂型，如颗粒剂、泡腾片剂。盐酸氨基葡萄糖类药物制剂的规格为 0.24g、0.48g、0.75g（以盐酸氨基葡萄糖计），硫酸氨基葡萄糖氯化钾和硫酸氨基葡萄糖氯化钠类药物制剂的规格均为 0.25g（以硫酸氨基葡萄糖计）[7]。

2.氨基葡萄糖类药物的来源鉴定

2.1 氨基葡萄糖类药物合成来源不明

目前，国内关于氨基葡萄糖原料的来源有 2 种：一种是动物性原料主要以甲壳类动物的外壳为主，通过酸解法、酶解法制得氨基葡萄糖；另一种是植物性原料主要以工业发酵柠檬酸的废弃玉米、大米、稻谷渣等，通过微生物发酵法生产氨基葡萄糖[8-15]。但国内氨基葡萄糖原料药的注册生产工艺仅批准了以甲壳素为来源的生产工艺，但市场上存在以微生物法生产氨基葡萄糖来掺杂或替代以甲壳类为原料生产氨基葡萄糖的情况。鉴于此，可以通过稳定同位素比值检查法鉴别不同来源生产的氨基葡萄糖原料。

2.2 仪器与方法

2.2.1 仪器

稳定性同位素质谱仪（型号：Detla Plus AD ，设备序列号：002508）

2.2.2 方法

稳定同位素比值检查法是使用碳氮分析仪，经还原炉与同位素质谱仪连接，推定分析氧化炉温度，还原炉温度，寻找适宜的内标物质，对样品组进行碳、氮同位素比值法测定。以 PDB（PeeDee Belemnie）皮狄箭石为碳同位素的国际标准和大气氮为同位素参比标准，计算样品中碳同位素比值、氮同位素比值和碳氮同位素比值之差的绝对值。

氨基葡萄糖分子中含碳、氮两个稳定同位素，由于同位素分馏过程使来源不同环境的甲壳素存在同位素比值差异，由此制得的氨基葡萄糖中碳氮同位素比值存在明显的不同。凭借碳氮，同位素比值差异，建立指标达到鉴别氨基葡萄糖原料药成品到底是来源于生物提取法还是微生物发酵法。依据《同位素地质样品分析方法总则及一般规定 DZ/T 0184.1-1997》[17]、《地质样品有机地球化学分析方法 GB/T 18340.2-2010》[18]，在线同位素分析法对不同来源的氨基葡萄糖类药物原料药进行 $\delta^{13}C$ 和 $\delta^{15}N$ 检测。

2.2.3 结果

由于生物发酵来源和动物来源的氨基葡萄糖类药物原料药的生物种群不一样，同位素分馏程度不同，动物

来源的分馏程度较高，生物发酵来源的分馏程度较低，一般来说 δ ^{13}C 同位素比值在-27~-18 说明氨基葡萄糖类药物原料药来源于动物提取。对市场上收集的 9 家企业 10 批样品进行测定，结果见表 1，图 1、2。通过下表明显看出企业 D、G、H、I 的 $\delta^{13}C$ 同位素比值在-11~-13 区间内，由此看出其生产的氨基葡萄糖原料药不属于动物来源；企业 A、B、C、E、F 的 $\delta^{13}C$ 同位素比值在-17~-24 区间内，由此看出其生产的氨基葡萄糖原料药属于动物来源，说明通过稳定同位素比值检查法能明显看出不同来源的氨基葡萄糖类药物原料药中碳氮同位素比值存在明显的不同。凭借碳氮同位素比值差异，可以鉴别氨基葡萄糖原料药成品到底是来源于甲壳素提取还是发酵法生产。

表 1　市场收集样品有机碳及氮同位素比值

序号	生产企业	批号	样品名称	$\delta^{13}C$ (‰PDB)	$\delta^{13}C$ (‰PDB)	$\delta^{15}N$ (‰)	$\delta^{15}N$ (‰)
1	A	201001	盐酸氨基葡萄糖	-20.53	-20.65	-3.66	-3.69
2	B	20161013	盐酸氨基葡萄糖	-17.25	-17.18	-1.62	-1.53
3	C	1803-2018-11021	盐酸氨基葡萄糖	-23.86	-23.83	-4.82	-4.94
4	D	190118	硫酸氨基葡萄糖氯化钠	-12.03	-11.83	-5.69	-5.87
5	D	150434	硫酸氨基葡萄糖氯化钠	-14.31	-14.28	-5.39	-5.33
6	E	210701	硫酸氨基葡萄糖氯化钾	-24.11	-24.18	-6.18	-6.04
7	F	/	硫酸氨基葡萄糖氯化钾	-21.12	-21.17	-3.47	-3.43
8	G	170726805	盐酸氨基葡萄糖	-11.25	-11.30	-6.07	-6.18
9	H	201708077	盐酸氨基葡萄糖	-11.98	-11.94	-7.19	-7.17
10	I	012170801-13	盐酸氨基葡萄糖	-12.01	-12.15	-7.61	-7.78

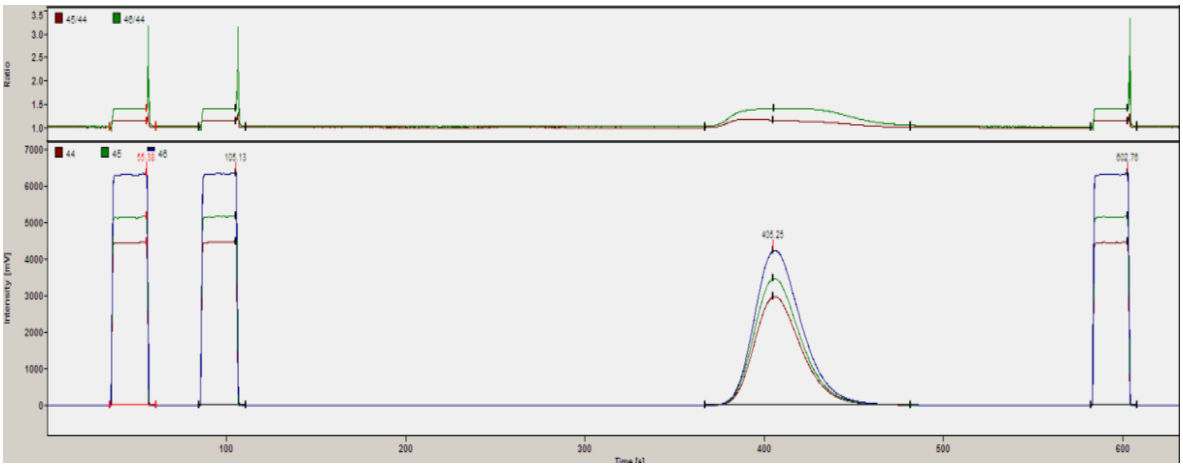


图 2 盐酸氨基葡萄糖（企业 C（批号：1803-2018-11021））$\delta^{13}C$ 稳定性同位素质谱图

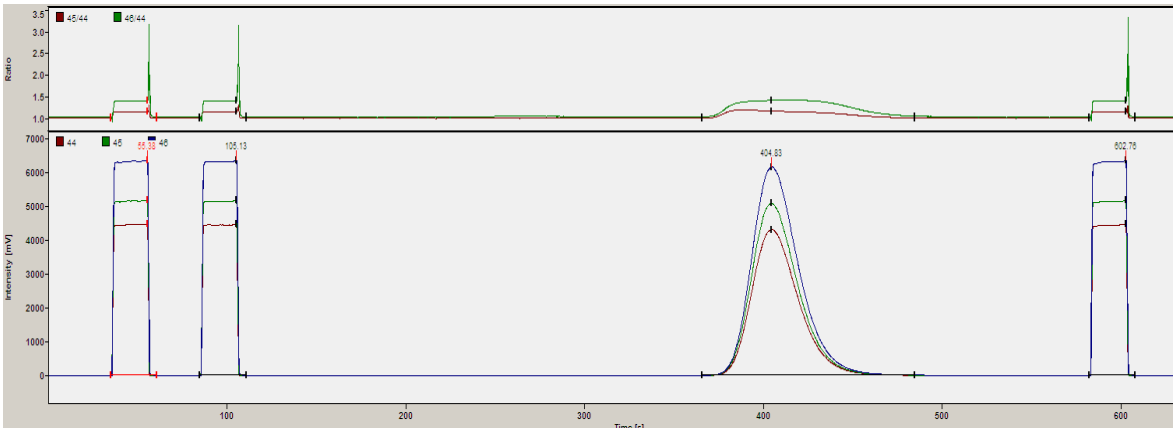


图 3 硫酸氨基葡萄糖氯化钠（企业 D（批号：150434）$\delta^{13}C$ 稳定性同位素质谱图

3.硫酸氨基葡萄糖类药物的结构鉴定

3.1 硫酸氨基葡萄糖类药物的结构晶型不明确

硫酸氨基葡萄糖类药物的结构应为硫酸氨基葡萄糖与氯化钾/氯化钠的共晶体复盐，但市场上采用盐酸氨基葡萄糖与无效的无机物硫酸钠/钾的混合物取而代之，而现行的药物质量控制要素无法区分药物结构[8]。

本文针对硫酸氨基葡萄糖氯化钾/氯化钠原料药是硫酸氨基葡萄糖氯化钾/钠共晶体复盐还是盐酸氨基葡萄糖与硫酸钾/钠的混合物的成盐问题，对企业生产的原料药、实验室自制的盐酸氨基葡萄糖+硫酸钠/钾混合物（2:1）进行 X-射线粉末衍射实验加以验证和鉴别。

3.2 仪器和方法

3.2.1 仪器

X 射线粉末衍射仪（型号：x'pert3 powder X 射线衍射仪，生产厂家：荷兰帕纳科公司 PANalytical B.V.）

3.2.2 方法

通过 X 射线粉末衍射技术对市场上收集的氨基葡萄糖类药物原料药进行 X 射线衍射，分析其衍射图谱，获得原料药的成分、材料内部原子或分子的结构或形态等信息的研究手段。当物质(晶体或非晶体)进行衍射分析时，该物质被 X 射线照射产生不同程度的衍射现象，物质组成、晶型、分子内成键方式、分子的构型、构象等决定该物质产生特有的衍射图谱，使用 X 射线粉末衍射技术物相鉴定功能，分析各结晶相的比例，以此判断企业生产的硫酸氨基葡萄糖氯化钾/钠原料药是否为晶体、是何种晶体物质以及其晶型结构。

3.3 结果

取市场上收集到的 7 批氨基葡萄糖类药物，取上述样品少量压制在光盘上以 17μm 的光斑扫描约 1mm^2 的式样 mapping 扫描，测定各个样品的最强衍射峰（2θ），测定结果见表 2。

表 2 XRD 被测样品信息表

被测样品名称	生产企业	批号	最强衍射峰（2θ）
盐酸氨基葡萄糖	A	201001	16.525
盐酸氨基葡萄糖	C	1803-2018-11021	16.525
硫酸氨基葡萄糖氯化钠	D	9051-A190118	27.036
硫酸氨基葡萄糖氯化钠	D	9051-150434	27.036
硫酸氨基葡萄糖氯化钾	E	210701	27.036
硫酸氨基葡萄糖氯化钾	F	/	27.036
盐酸氨基葡萄糖与硫酸钠混合物（2:1）	实验室自制	20220208	12.391

盐酸氨基葡萄糖与硫酸钾混合物（2:1）	实验室自制	20220208	12.391
硫酸氨基葡萄糖氯化钠	J	140846-201901	12.391

从盐酸氨基葡萄糖和硫酸钠的 XRD 标准图片看，盐酸氨基葡萄糖的最强衍射峰 2θ 位置在 16.525、12.360、17.330，硫酸钠的最强衍射峰 2θ 位置在 32.124、19.035（见图 3、4）。从测定结果可以看到，硫酸氨基葡萄糖氯化钠/钾原料药的最强衍射峰 2θ 位置在 27.036，盐酸氨基葡萄糖+硫酸钠/钾混合物（2:1）的最强衍射峰 2θ 位置在 12.391（见图 5），两种样品的最强衍射峰存在差异，说明通过 X-射线粉末衍射技术，一定程度上可以区分硫酸氨基葡萄糖氯化钠/钾共晶体复盐与盐酸氨基葡萄糖+硫酸钠/钾混合物。

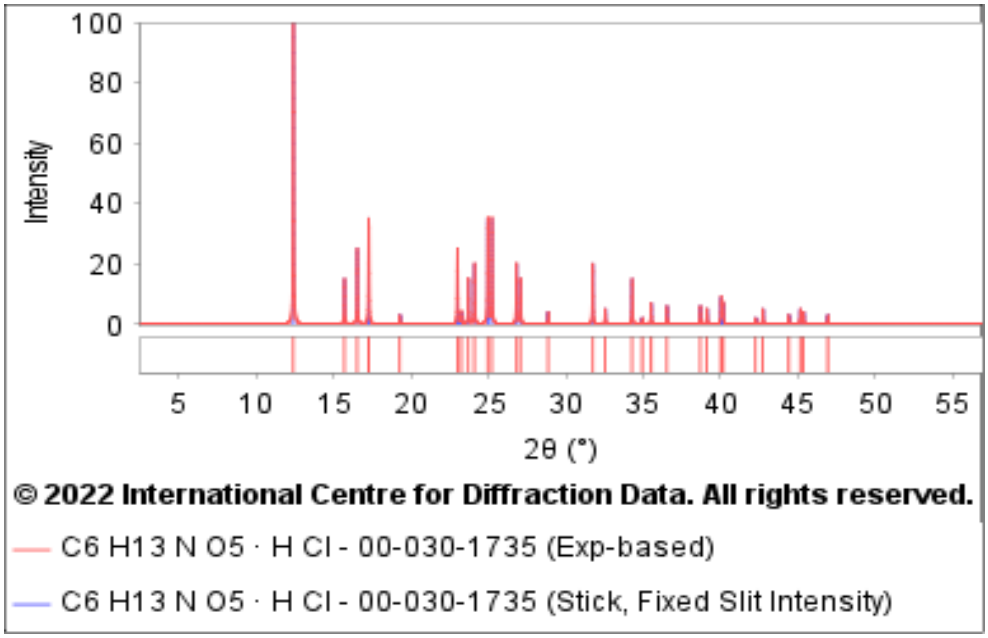


图 4 盐酸氨基葡萄糖 XRD 标准图片（卡片号：00-030-1735）

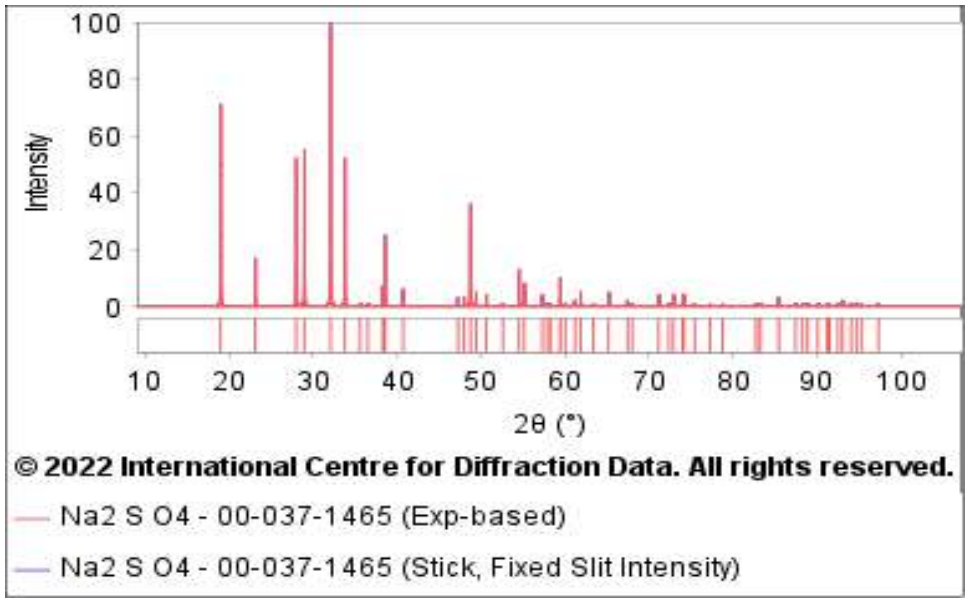


图 5 硫酸钠 XRD 标准图片（卡片号：00-037-0808）

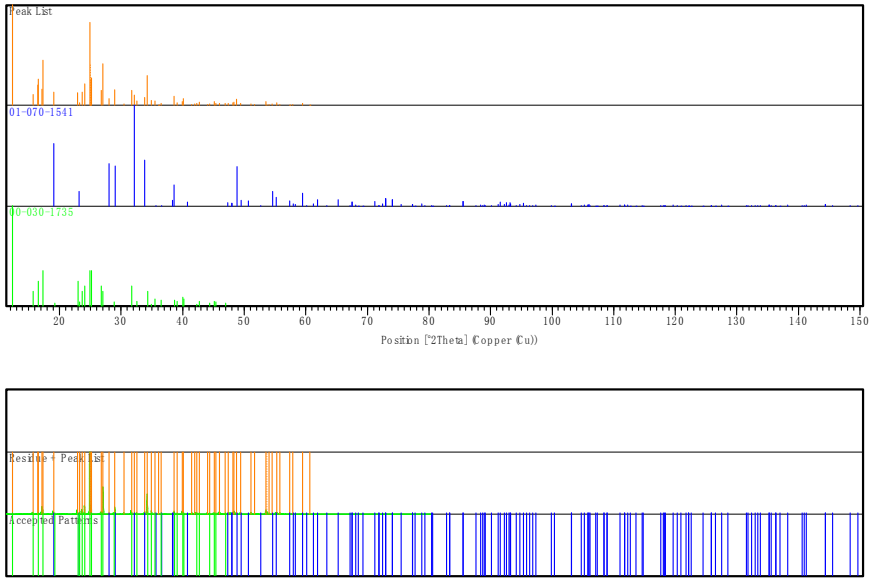


图 6　盐酸氨基葡萄糖+硫酸钠混合物（2:1）、盐酸氨基葡萄糖和硫酸钠 XRD 堆栈图

4.结论

本文通过稳定同位素-质谱测定法鉴别氨基葡萄糖类药物的来源问题，以鉴别市场上动物来源和植物来源生产的氨基葡萄糖原料。通过 X-射线粉末衍射法区分氨基葡萄糖类药物晶型结构，以鉴别市场上氨基葡萄糖类药物原料药晶型结构，防止采用盐酸氨基葡萄糖与无效的无机物硫酸钠或硫酸钾的混合物替代硫酸氨基葡萄糖与氯化钾或氯化钠的共晶体复盐的行为，为药品行政监管提高技术支撑作用。

【参考文献】

[1]纪立伟,傅得兴.氨基葡萄糖的药理作用及安全性[J],中国药学杂志，2007,42(19):1513-1516
[2]韩丽华.盐酸氨基葡萄糖胶囊治疗骨关节炎的现状及进展研究[J],中国现代药物应用,2020,14(8):232-233
[3]林灿彬.硫酸氨基葡萄糖联合抗骨质疏松药治疗老年膝骨性关节炎的临床效果[J],北方药学,2022,19(11):13-15
[4]European Food Safety Authority. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to glucosamine and maintenance of joints pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC)No 1924/2006[J]. EFSA Journal,2011,9(12):2476
[5]MCCARTY M F, O'KEEFE J H, DINICOLANTONIO J J. Glucosamine for the treatment of osteoarthritis: The time has come for higher-dose trials[J]. Journal of Dietary Supplements,2019,16(2)：179−192
[6]张淼.硫酸氨基葡萄糖制剂的质量研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.
[7]但晓梦. 氨基葡萄糖类药物质量控制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
[8]迟海林,李菲菲,张李伟,姜雨.氨基葡萄糖类物质在保健食品中的应用及研究进展[J],食品工业科技,2023,44(8):437-445
[9]孙丽.盐酸降解甲壳素制备氨基葡萄糖盐酸盐的机理研究[J],海峡药学,2018,30(4)14-16
[10]氨基葡萄糖微生物合成研究进展[J],齐鲁工业大学学报,2021,35(1):19-22
[11]孙丽. 虾头制备盐酸氨基葡萄糖的优化研究[J]. 福建分析测试,2018, 27(3):15−19.
[12]Zhang H. Lu Y., Wang Y., et al. D-Glucosamine production from chitosan hydrolyzation over a glucose-derived solid acid catalyst[J]. Rsc Advances, 2018, 8: 5608-5613.
[13]张健. 一种硫酸氨基葡萄糖氯化钠复盐的合成方法: 中国,110903330A[P]. 2020-03-24.
[14]王升,李丕武,刘佃磊,李以明,林晶晶.利用发酵法生产氨基葡萄糖的研究进展[J],生物技术通报，2014(1)：68-74
[15]刘佃磊,李丕武,李瑞瑞,王升,王瑞明.高产氨基葡萄糖基因工程菌的研究进展[J],生物技术通报，2014(3)：68-74
[16] Yeon J C，Eun J K，Zhe P，et al. Purification and Characterization of chitosanase from Bacillus sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides[J].Appl Envir Microbiol,2004,70(8):4522-4531.
[17]同位素地质样品分析方法总则及一般规定 DZ/T 0184.1-1997
[18]地质样品有机地球化学分析方法 GB/T 18340.2-2010

Developing an electronic medication adjustment tool and evaluating its effectiveness in detecting DRPs and creating medication schedules

Min Deng [1], Chang Yin [1], Mengyao Sun [1,2]and Zhuo Wang [1,2*]

[1] Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai, China, [2] Anhui University of Chinese Medicine, Anhui, China

【**Abstract**】The Electronic Medication Adjustment (EMA) tool was built from the results of a questionnaire on Drug-Related Problems (DRPs) in 720 people aged ≥60 years (1 August 2021 - 29 February 2022). We validated the tool's ability to identify DRPs and create a medication schedule that actually works, using medication data from 700 patients. At the same time, we asked medical staff to conduct a survey to assess their satisfaction with the medication schedule created by the tool (hereafter referred to as TMS) and to analyze their concerns about the tool and related factors.

Validation of the tool prompted that most (51.1%) older people had inappropriate administration times or intervals, as well as problems with duplicated medications and inappropriate dosages. In addition, TMS reduced the number of administrations per day for 38.1% of the elderly. The majority (55.3%) of responders felt that TMS was more reasonable and had a higher dominance score as superior ($p<0.001$) to the original medication schedule (hereafter referred to as OMS). More than 80% of responders agreed that TMS had appropriate administration times and reduced the number of administrations per day for patients. Nearly half of the responders agreed that TMS improves patient compliance. Requests for improvement included linking to the Hospital Information System (HIS) and simpler medication schedule. The tool usually takes less than five minutes to create a medication schedule.

This study shows that the EMA tool can initially assess the main DRPs in a patient's medication treatment and to create a simple and clear medication schedule for patients to use.

【**Keywords**】older people, medication adjustment tool, drug-related problems, administration time, medication schedule

Introduction

Older people often suffer from multiple diseases and require polypharmacy. [1,2] The phenomenon of polypharmacy is common in all countries and increases with age. [3,4] The WHO High5s medication reconciliation SOP is an effective measure to address this issue. [5] However, the SOP applies to the acute hospital setting and is primarily carried out at admission, at internal transfer, and on discharge from the hospital. [5] It is intended for inpatients and does not cover a wide range of patients at home.

As cognitive function and understanding decline in the elderly, there are often misconceptions about the use of medication, leading to errors in the method of administration and course of treatment. [6,7] In particular, elderly patients with chronic diseases have been self-medicating at home for a long time, lacking professional guidance on medication use and treatment management.[8] With the prolonged use of medication, problems such as self-adjustment and incorrect use may arise.[8] Many studies have reported that the implementation of electronic medication reconciliation tools has had a significant impact on improving medication adherence.[9-11] Electronic medication reconciliation tools help physicians to obtain the Best Possible Medication History (BPMH) and develop the best Possible Medication Discharge Plan (BPMDP).[12] The BPMDP is often difficult for patients to understand, limiting its usefulness. Many patients

benefit from being educated by clinical pharmacists on how to take their medication after discharge. Unfortunately, older people tend to forget, verbal explanations are not ideal and understanding the information on the medication list can be a challenge for older polypharmacy patients. They need a simple, clear and illustrated medication instruction [13, 14] to help them better understand what to take and how to take it. [15,16]

This study therefore began by investigating the main Drug-Related Problems (DRPs) of older people at home and developing an Electronic Medication Adjustment (EMA) tool to address the main problems of medication use in older people at home. The tool was designed to assist medical staff in the initial assessment of the main DRPs in a patient's medication treatment and to create a simple and clear medication schedule for use by the patient. We evaluated the effectiveness and usability of EMA in achieving these functions, as well as the reasonableness and acceptability of the medication schedule created by the tool (TMS).

Methods

An on-site study was conducted between 1 August 2021 and 29 February 2022 using a questionnaire survey of retired military veterans from 30 dry rest homes in Shanghai. The Pharmaceutical Care Network Europe Association (PCNE) classification tool (version 9.1) was used to analyze the presence of DRPs among older adults (≥60 years). The EMA tool was designed and developed based on the main DRPs present in older patients in the survey results. The study has received ethical review approval from Shanghai Changhai Hospital (approval number: CHEC2022-019).

The ease of use of the EMA tool was tested using the patient medication information from the above study questionnaires. The medication information from each questionnaire was entered into the EMA tool separately and the DRPs identified using the EMA tool were statistically analyzed.

The EMA tool is primarily intended for older patients with chronic illnesses and polypharmacy, so medical staff involved in the management of chronic illnesses or medication therapy management in older people were surveyed. Survey responders were asked to rate the medication schedule corresponding to 30 clinical prescriptions, each with two medication schedules (A and B), one being the patient's own medication schedule (the original medication schedule, OMS) and the other being the medication schedule given by the EMA tool (the tool’s medication schedule, TMS). To ensure objectivity in the evaluation, all prescriptions had both A and B treatments in disordered order and responders did not know which was the treatment given by the EMA tool. Survey responders were asked to select and justify a reasonable option, as well as to rate the strengths and weaknesses of the two options and the scope for optimisation and to list suggestions for improvement. Most of the survey questions either used a standard Likert scale or allowed for free entry of answers.

We analyzed survey responders' acceptance of three main improvements to the EMA tool: (1) a reduction in the number of administrations per day, (2) more appropriate administration times for each drug, and (3) an administration interval for drugs with potential interactions. Each of the above 3 dimensions included 10 clinical prescriptions as a predictor of medical staff's concerns about the EMA tool in terms of medication time optimisation.

Results

Main DRPs

DRPs was present in 41.67% of the elderly patients surveyed and consisted mainly of inappropriate administration times or intervals (258 cases, 35.8%), inappropriate drug combinations (119 cases, 16.5%) and inappropriate dose or

frequency of drugs (45 cases, 6.3%). Therefore, the EMA tool was designed to focus on addressing these issues.

Developing the EMA tool

A total of six rule bases were created to form a practically usable tool with the help of engineers. The EMA consists of an Information Input module, a DRPs Assessment module and a Generate Medication Schedule module (Appendix Figure 1-3). The information input module is used to enter basic patient information and medication information. The DRPs assessment module includes three rule bases for dosage, duplicated medications and drug interactions to assess the presence of DRPs in the patient's medication list. The medication schedule generation module includes three rule bases for drugs with administration time requirements, drugs without administration time requirements and intervals to create a medication schedule for the patient to use.

Drugs with administration time requirements are those for which the administration time is indicated in the drug instructions, clinical guidelines or the 《XINBIAN YAOWUXUE 17th edition》. The rule base with administration time requirements is further divided into a dosage form rule base, an adverse reaction rule base, a pharmacokinetic rule base, a chronopharmacological rule base and a pharmacodynamic rule base, depending on the factors affecting them. Drugs without administration time requirements are those that can be taken at any time of the day. Interval time refers to the need to take two or more drugs at intervals when they are combined.

Using the EMA tool

The EMA tool needs to be implemented "manually". Clinical pharmacists use the Information Input module to enter medication treatment and basic patient information into the tool website (Appendix Figure 1). The interface simplifies the input process by providing a drug search function and a default option to quickly retrieve the corresponding drug by entering the initials of the drug, while automatically populating with the drug's usual dosage. As a result, it takes less than 30 seconds to add a single drug and typically less than 5 minutes to enter a patient's complete medication information.

Once the medication information has been entered, click on "Medication Adjustment" and the EMA tool will immediately perform an initial assessment of this treatment through the DRPs Assessment module, flagging any potential DRPs as they arise (Appendix Figure 2). Finally, a description of the daily medication schedule is generated via the Generate Medication Schedule module (Appendix Figure 3). The process from assessing DRPs to creating a medication schedule typically takes less than 1 second. The tool tries to reduce the number of administrations per day by scheduling medications that do not have a specific dose time and those that need to be taken at a specific time in the same time frame. This is based on rules developed and reviewed by the clinical pharmacist to ensure that there are no interactions with concurrent doses. Based on the medication schedule created by the EMA tool, the clinical pharmacist can further optimise and provide life coaching to the patient and develop a more detailed medication list. In complex medication situations, the medication schedule created by the EMA tool can be used in a multidisciplinary discussion to create an individualised medication list.

Evaluation of EMA by Prescription Validation

20 questionnaires with no medication information were excluded and a total of 700 questionnaires were included for validation. Among the 700 patients' medication treatment, the EMA tool identified the following DRPs: (1) 15 cases (2.1%) of over- indicated dosage, (2) 9 cases (1.3%) of duplicated medications, and (3) 358 cases (51.1%) of inappropriate administration times or intervals. Of these, inappropriate administration times occurred 517 times, with an average of 1.47 ± 0.85 per case, with the largest number of occurring for 5 drugs in one case, and 58 drugs involved in

inappropriate administration times (Table 1). In addition, the EMA tool reduced the number of administrations per day in 267 patients (38.1%) by a mean of 1.63 ± 0.90 doses, with the majority of doses being reduced by 1 or 2 doses and the most being reduced by 6 doses.

Table 1 Prescriptions for inappropriate drugs at the time of administration

Drug name	Number of occurrences	The correct time to take your medication	Duration of patient's medication
Aspirin Enteric Tablets	123	Before the meal	At meals, after meals, before bedtime
Metformin hydrochloride tablets	46	Mealtime	Before, after and at bedtime
Tamsulosin hydrochloride extended release capsules	42	After the meal	Before meals, at meals and at bedtime
Acarbose tablets/capsule	33	Mealtime	Before and after meals
Metoprolol Succinate Extended Release Tablets	29	Morning wear	During and after meals
Lactulose Oral Liquid	27	Mealtime	Before, after and at bedtime
Compound alpha keto acid tablets	17	Mealtime	After the meal
Levothyroxine Sodium Tablets	15	Morning wear	At meals, after meals, before bedtime
Coenzyme Q10 Capsules	15	After the meal	Before meals, at meals and at bedtime
Donepezil Hydrochloride Tablets	13	Bedtime	After the meal
Butylphthalide Softgels	12	Fasting	After the meal
Isosorbide mononitrate extended release capsules	12	After the meal	Before meals, before bedtime
Metformin hydrochloride extended-release tablets	11	Mealtime	Before, after and at bedtime
Felodipine Extended Release Tablets	10	Morning wear	After the meal
Drugs with less than 10 occurrences			
Glucosamine Sulphate Capsules (8), Pantoprazole sodium enteric tablets/capsule (8), Rabeprazole sodium enteric tablets/capsule (8), Sitagliptin Metformin Tablets (7), Dagliflozin Tablets (6), Esomeprazole Magnesium Enteric Tablets/Capsules (5)			

Evaluation of EMA by Medical Staff

Invitations to the survey were sent to 102 medical staff working in areas related to the management of chronic diseases in the elderly. 67 medical staff (65.7%) completed the questionnaire, excluding 22 incompletely completed questionnaires, and a total of 45 valid questionnaires were included for analysis. Responders were mainly doctors, nurses and pharmacists with junior or middle-level titles.

The total percentage of responders choosing the TMS was 55.3%, with 54.0% of physicians, 49.1% of nurses and 62.7% of pharmacists choosing the TMS as more reasonable, respectively (Table 2). Responders rated the TMS as more advantageous than the OMS ($p < 0.001$), while the optimisation space scores were all lower (Table 3). Over 80% of responders agreed that the EMA tool gave medication schedule with reasonable administration times and reduced the number of administrations per day for patients. Almost half of the responders agreed that creating a TMS helped them to make medication adjustments and improved patient compliance.

Responders were surveyed on their agreement with the three main points of improvement of the EMA tool: 43.5% of responders agreed with the option to reduce the number of administrations per day, 40.7% agreed with the option to take each drug at a more appropriate time, and 11.3% agreed with the option to set an interval for drugs with possible interactions.

The most common improvements are the integration with the HIS and the design of the TMS, e.g. medical advice can be automatically converted into medication information, the medication schedule can be displayed at the doctor's workstation, the medication schedule should be designed to be as easy to understand as possible, with larger fonts and the addition of trade names to make it easier for older people to read.

Table 2 Selection of reasonable options

Group	Number of TMS (%)	Number of OMS (%)
Doctor	243 (54.0)	207 (46.0)
Nurse	221 (49.1)	229 (50.9)
Pharmacists	282 (62.7)	168 (37.3)
Total	746 (55.3)	604 (44.7)

Table 3 Strengths scores and optimisation space scores

	Strengths Rating		Optimised scoring	
Group	OMS	TMS	OMS	TMS
Doctor	2.60±0.908	2.74±0.960	2.43±0.797	2.33±0.828
Nurse	2.70±1.019	2.87±1.005	2.52±1.072	2.56±1.083
Pharmacists	2.96±0.990	3.26±0.998	2.40±0.911	2.14±0.881
p value	＜0.001			

Discussion

The finding from our study that DRPs in medication use in older people are more likely to be inappropriate timing of medication administration was unexpected. The EMA tool was developed to help healthcare professionals implement medication adjustments more efficiently and communicate medication instructions more clearly to patients. The medication schedule does not provide the full information of a conventional medication reconciliation list, but only conveys basic information to patients about each medication in their treatment: name, dose, frequency, time of administration and precautions, in order to reduce the patient's reading burden and facilitate memorisation. The dosing times are designed to take place at five specific times (before, during, after, on an empty stomach and at bedtime) according to meal times and lifestyle. For example, the EMA tool provides instructions for “Acarbose, 50mg, tid” as “Take 1 pill at breakfast, 1 pill at lunch and 1 pill at dinner” rather than “Take 1 pill three times a day” or “Take 1 pill in the morning and 1 pill in the evening”. [17] For polypharmacy patients, the former description may be unclear to the patient as to when to take the medication and the latter description, although clear, is inappropriate for medications that require a time to be taken, such as glucose-lowering medications that need to be adjusted for meal times. This is therefore designed to make it easier for patients to understand the dosing instructions and to adjust them to their own meal times.

Clinical pharmacists can use the EMA tool to assess medication treatments and obtain medication schedules for any

patient, but older polypharmacy patients may benefit more. The use of the EMA tool reduces the number of administrations per day for patient and although we did not directly assess patient adherence, it is known from medical staff comments that this improvement will increase patient adherence.

The results of our evaluation show that the EMA tool identifies and marks DRPs in prescriptions, correctly creates medication schedules and can be used in practice. Medical staff are satisfied with the current TMS and believe that it does not require much optimisation and that the TMS has some advantages. Several important recommendations for improvement can also be drawn from our evaluation:

1. There are still gaps in the EMA tool for assessing DRPs: we found a proportion of prescriptions containing multiple Chinese Medicines with the same pharmacological action, but the EMA tool did not indicate the presence of DRPs in them, so the number of duplicate medicines identified was low. This suggests that the EMA tool is designed to be lenient in its rules for repeated drug use, especially for proprietary Chinese Medicines.

2. Although responders considered the TMS to be superior to the original treatment, only the pharmacist group scored the TMS as superior by more than 3 points. The number of doctors and nurses who chose the TMS and their scores were lower than those of the pharmacist group, partly because they did not identify problems with the original treatment (for example, the treatment regarding the timing of glucose-lowering drugs should be taken at meals for acarbose and before meals for gliptone, but 10 doctors and nurses respectively chose the original treatment in which both drugs were taken after meals). This correlates with the knowledge base of different medical professionals and reflects the fact that the clinical pharmacist's service is not only patient-oriented, but also needs to educate medical staff on medication use.

3. Common suggestions from responders to improve the EMA tool were integration with the HIS and the design of the TMS. The main time spent using the EMA tool is in the manual entry process, which takes longer the more medications a patient has. In future implementations, this will be automated so that the EMA tool is connected to the HIS, the prescription information is automatically identified for evaluation, a patient medication schedule is created, reviewed on the pharmacist side and then transmitted to the clinician side. In this approach, rules can be set up accordingly, with level alerts at the pharmacy workstation based on the complexity of the patient's medication treatment, so that different staff can be notified when patients meeting different criteria arrive.

Our study has several limitations. Because the EMA tool was initially established, medical staff satisfaction was first surveyed, but patient satisfaction and adherence were not directly surveyed. The scope of our study evaluation and sample size was small, our findings may be more biased towards the perceptions of medical staff with less than mid-level titles.

Appendix



Basic patient and prescription information input



Fig 1 Information Input module



Fig 2 Drug-Related Problems (DRPs) Assessment module



Fig 3 Generate Medication Schedule module

References

[1] Fulop T, Larbi A, Witkowski J M, et al. Aging, frailty and age-related diseases[J]. Biogerontology, 2010, 11(5): 547-563.

[2] Leslie, Kevin O J, Medicine L. Idiopathic Pulmonary Fibrosis May Be a Disease of Recurrent, Tractional Injury to the Periphery of the Aging Lung: A Unifying Hypothesis Regarding Etiology and Pathogenesis [J]. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 2012, 136(6): 591-600.

[3] Marengoni A, Monaco A, Costa E, et al. Strategies to Improve Medication Adherence in Older Persons: Consensus Statement from the Senior Italia Federanziani Advisory Board [J]. Drugs and Aging, 2016, 33(9): 629-637.

[4] Lipska K J, Krumholz H, Soones T J. Polypharmacy in the Aging Patient: a Review of Glycemic Control in Older Adults With Type 2 Diabetes [J]. JAMA, 2016, 315(10): 1034-1045.

[5] World Health Organization. Action on patient safety - high 5s. https://www.who.int/publications/m/item/high5s-standard-operating-protocol- medication-reconciliation. pdf (accessed 6 Apr 2023).

[6] Botelho R J, Dudrak R 2nd. Home assessment of adherence to long-term medication in the elderly [J]. The Journal of family practice, 1992, 35(1): 61-65.

[7] Kar A, Ahamad N, Dewani M, et al. Wearable and implantable devices for drug delivery: Applications and challenges[J]. Biomaterials. 2022, 283. 121435. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121435

[8] Brown MT, Bussell JK. Medication Adherence: WHO Cares? [J]. Mayo Clin Proc. 2011, 86(4): 304-314.

[9] Ils D B, Clayton K, Roy K, et al. Implementing Online Medication Reconciliation at a Large Academic Medical Center [J]. The Joint Commission Journal on Quality Patient Safety, 2008, 34(9): 499-508.

[10] Sophie M, Bruno K, Anne S. Electronic tools to support medication reconciliation: a systematic review [J]. Journal of the American Medical Informatics Association: JAMIA, 2016, 24(1): 227-240.

[11] Wang H, Long M, Jie S, et al. Electronic medication reconciliation in hospitals: a systematic review and meta-analysis [J]. European journal of hospital pharmacy: science and practice, 2018, 25(5): 245-250.

[12] Hung P L, Lin P C, Chen J Y, et al. Developing an Integrated Electronic Medication Reconciliation Platform and Evaluating its Effects on Preventing Potential Duplicated Medications and Reducing 30-Day Medication-Related Hospital Revisits for Inpatients[J]. Journal of medical systems, 2021,45(4):47.

[13] Shrank W H, Agnew-Blais J, Choudhry N K, et al. The variability and quality of medication container labels [J]. Archives of internal medicine, 2007, 167(16): 1760- 1765.

[14] Wolf M S, Davis T C, Shrank W, et al. To err is human: patient misinterpretations of prescription drug label instructions [J]. Patient education and counseling, 2007, 67(3): 293-300.

[15] Katz M G, Kripalani S, Weiss B D. Use of pictorial aids in medication instructions: a review of the literature [J]. American journal of health-system pharmacy, 2006, 63(23): 2391-2397.

[16] Houts P S, Doak C C, Doak L G, et al. The role of pictures in improving health communication: a review of research on attention, comprehension, recall and adherence [J]. Patient Education Counseling, 2006, 61(2): 173-190.

[17] Mohan A, Riley M B, Boyington D, et al. PictureRx: Illustrated medication instructions for patients with limited health literacy [J]. Journal of the American Pharmacists Association: JAPhA, 2012, 52(5): e122-e129.

基于网络药理学大黄治疗急性胰腺炎的机制研究

丁伟超

（徐州医科大学附属医院急诊医学科，江苏徐州，221002）

【摘要】目的：使用网络药理学方法研究大黄在治疗急性胰腺炎（AP）中的潜在机制。**方法：**通过 TCMSP 数据库筛选大黄的活性成分，并进行药物靶点的预测。使用 Cytoscape 软件构建药物-成分-靶点网络图。在 DisGeNET、GeneCards、OMIM 数据库中筛选 AP 的靶点，然后删除重复靶点。通过 Venny 制作药物靶点和疾病靶点的韦恩图，并得到共同靶点。把从 Venn 图获得的共同靶点上传到 STRING 数据库，生成 PPI 网络，并将获得的 PPI 网络导入 Cytoscape 软件进行可视化分析。使用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析，随后进行可视化处理。然后，取 KEGG 富集分析的前 20 条信号通路，构建信号通路与靶点之间的关系网络图。最后，选择前 5 个活性成分和前 10 个靶点使用 CB-Dock 网站进行分子对接。**结果：**通过 TCMSP 数据库筛选出大黄 16 种活性成分，预测到 60 个疾病靶点。其中，β-谷甾醇、芦荟大黄素、泽兰黄醇、(-) 儿茶素、决明内酯等对应靶点较多，是大黄的核心活性成分。在 DisGeNET、GeneCards 和 OMIM 数据库中搜索到 2024 个 AP 的疾病靶点。使用 Venny 制作药物靶点和疾病靶点的韦恩图，得到共同靶点 31 个，为大黄治疗 AP 的潜在靶点。把这 31 共同靶点上传到 STRING 数据库生成 PPI 网络，PPI 网络显示 TP53、TNF、MYC、CASP3、ESR1、IL1β、PTGS2、PPARG、CASP8、CASP9 等靶点与其他靶点连接密切，是大黄治疗 AP 的核心靶点。GO 富集分析确定了 264 个与 AP 发生发展过程密切相关的条目，其中包括 200 个生物学过程相关条目、20 个细胞成分相关条目和 44 个分子功能相关条目。KEGG 富集分析共确定了 61 条通路，其中排在首位的是 P53 信号通路。最后，分子对接表明大黄的活性成分与其相应的靶点具有良好的结合亲和力。**结论：**大黄及其活性成分可能通过多靶点、多信号通路治疗 AP，为实验研究和临床应用提供了一定的科学依据。

【关键词】网络药理学，大黄，急性胰腺炎，机制

染料木苷通过降解 c-Myc 下调 PD-L1 和 CD47 发挥抗肿瘤免疫作用研究

董靖雯[1]，孙翠翠[1]，王犀锐[2]，邓伊扬[2]，王雨婷[1]，邓洪斌[1*]

（[1]中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所，北京 100050；[2]北京师范大学附属实验中学，北京，100032）

【背景】结肠癌（Colorectal cancer ，CRC）是世界第三大癌症，死亡率高，早期没有任何症状，中晚期常被误认为是消化不良而耽误诊治。寻找有效的 CRC 治疗手段是当前亟需解决的重要问题。研究表明，癌基因 c-Myc 在 CRC 癌组织中异常表达并参与了 CRC 的恶性转变过程。此外，c-Myc 与肿瘤细胞中免疫检查点 PD-L1 及 CD47 的表达也密切相关。虽然靶向 PD-L1 和 CD47 等的单克隆抗体能够显著提高病人的生存质量、延长生存期，但也存在治疗响应率低、价格昂贵、不能进入肿瘤内部等局限性。从天然产物中寻找具有免疫检查点阻断作用的小分子药物已成为肿瘤免疫治疗的新热点。我们前期研究发现染料木苷（Genistin）可显著降低 CRC 细胞中 c-Myc 的表达水平，本研究中进一步对其下调 PD-L1 和 CD47 水平发挥抗肿瘤免疫作用及机制进行研究。**方法：**以 CRC 细胞 SW480、HCT116 为实验对象，通过 Western Blot 检测染料木苷对 c-Myc、PD-L1 和 CD47 的蛋白表达的影响；流式细胞术检测染料木苷对膜表面 PD-L1 表达的影响；qRT-PCR 分析染料木苷对 c-Myc 下游靶基因的影响；细胞阻抗分析、结晶紫实验检测共培养细胞的 T 细胞和 PBMC 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性；在 C57BL/6J 小鼠 皮下 MC38 移植瘤模型中检测染料木苷体内抑瘤活性；同时利用多色流式细胞仪检测染料木苷对肿瘤浸润性 $CD4^+$、$CD8^+$T 细胞、调节性 T 细胞（Regulatory T-lymphocytes，Tregs）数量的影响和巨噬细胞（Macrophages） M2 型向 M1 型极化的比例，以及 γ-干扰素（Interferon-γ，IFN-γ）和颗粒酶 B（Granzyme B，GzmB）含量的变化；在 BALB/C 裸鼠体内探究染料木苷对皮下移植瘤的体内抑瘤效果；将染料木苷与鼠源 PD-1 单抗联用，探究其对 C57BL/6J 小鼠中 MC38 移植瘤的协同抑瘤效果。**结果：**染料木苷能够以时间和剂量依赖性方式诱导 CRC 细胞中 c-Myc 蛋白的降解并抑制其下游靶基因 *Pd-l1*、*Cd47*、*Cdk4* 和 *Glut1* 的表达。Western blot 和流式细胞分析结果表明，染料木苷可下调肿瘤细胞中和细胞表面 PD-L1 和 CD47 的蛋白水平。PD-1/PD-L1 结合实验结果证实，染料木苷可减少 CRC 细胞表面 PD-L1 与重组 PD-1 蛋白的结合并抑制 T 细胞中 TCR 信号的激活。细胞阻抗实验和结晶紫染色结果显示，染料木苷在增强共培养的 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性的同时，还可促进巨噬细胞对 CRC 细胞的吞噬活性。MC38 小鼠皮下荷瘤实验证实，染料木苷可显著抑制移植瘤的生长，同时增加 $CD8^+$T 细胞的浸润与激活（IFN-γ、GzmB 分泌增加），促进巨噬细胞发生 M1 极化和 NK 细胞的浸润，并减少 Treg 的数量，说明染料木苷通过重塑肿瘤免疫微环境发挥其抗肿瘤作用。最后，染料木苷与抗 PD-1 单抗联合用药后，可使 MC38 皮下移植瘤的瘤体积进一步减少，证实二者联用后可发挥协同抗肿瘤效果。**结论：**染料木苷能够诱导 CRC 细胞中 c-Myc 蛋白的降解并下调 PD-L1 和 CD47 的水平，阻断 PD-1/PD-L1 和 CD47/SIRPα 之间的相互作用，通过激活 $CD8^+$T 细胞和诱导巨噬细胞发生 M1 极化重塑肿瘤免疫微环境，达到抑制肿瘤生长的效果。本研究为将染料木苷发展成为新的肿瘤免疫治疗药物提供一定的数据基础与科学依据。

【关键词】c-Myc；PD-L1；CD47；染料木苷；抗肿瘤免疫治疗。

*通讯作者：Tel/Fax: 86-10-63169876, E-mail: hdeng@imb.pumc.edu.cn

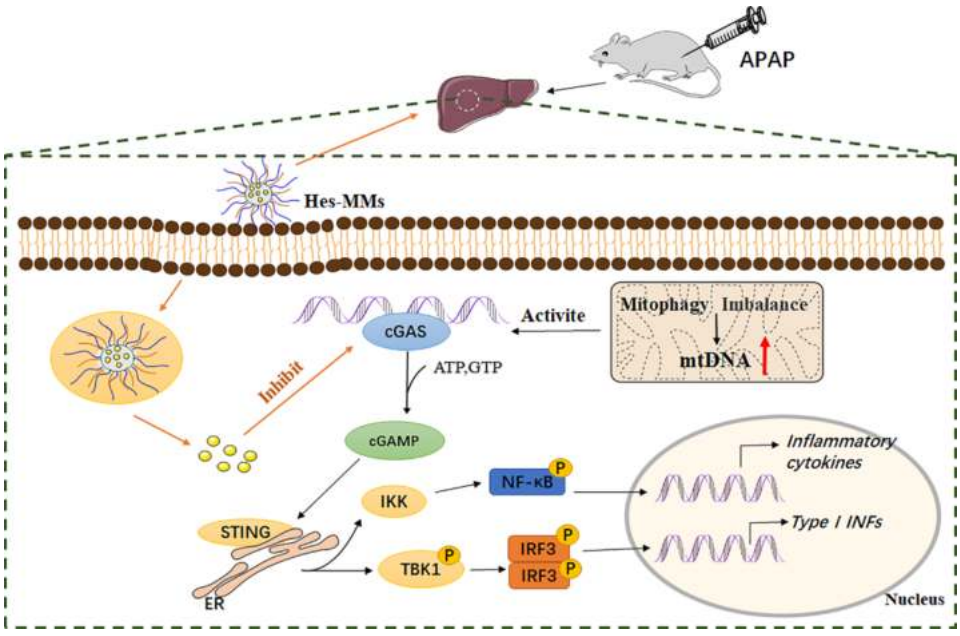
Mixed micelles loaded with hesperidin protect against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting the mtDNA-cGAS-STING pathway

Kehong Dong[1] and Chuanlong Guo[1,*]

[1] Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China

Excessive acetaminophen (APAP) is the main cause of drug-induced acute liver failure, and the pathogenesis has not been elucidated and there is a lack of effective drugs. Hesperidin (Hes), a rich flavanone in citrus peel with excellent biological activities, is a potential agent for treatment liver injury. Due to poor water solubility of Hes, this study prepared mixed micelles using polyvinyl pyrrolidone (PVP K17) and poloxamer 188, and encapsulated Hes (Hes-MMs). The results showed that Hes-MMs exhibited a uniform spherical shape with a particle size of 67.26 nm, and Hes-MMs significantly improved the dispersibility, antioxidant activity, and cellular uptake of Hes. *In vitro* results showed that Hes-MMs protected the proliferation inhibition of HepG2 cells induced by APAP, inhibited the production of reactive oxygen species (ROS) and the damage of mitochondrial membrane potential (MMP) induced by APAP. Furthermore, Hes-MMs exerted liver protective effects by inhibiting APAP induced mtDNA release and activating the cGAS-STING pathway. *In vivo* results demonstrated that Hes-MMs showed protective and therapeutic effects on APAP induced liver injury, and their mechanisms were related to the mtDNA-cGAS-STING signaling pathway. In summary, our study demonstrated that the mtDNA-cGAS-STING pathway was involved in APAP induced acute liver injury, and Hes-MMs might be a potential therapeutic agent for treating APAP induced acute liver injury.

【Keywords】 Acetaminophen, liver injury, hesperidin, mtDNA, cGAS-STING



胰岛素集中带量采购后我院胰岛素类药品的使用情况分析

董雅芬，王建#

（上海市浦东新区人民医院药剂科，上海 201200）

【摘要】目的：探讨胰岛素集中带量采购政策对我院胰岛素类药品使用及经济效应的影响，为政策制定和实施提供依据。**方法：**采用药物经济学方法对胰岛素集中带量采购实施前（2021 年 7 月 4 日-2022 年 1 月 3 日）与实施后（2022 年 7 月 4 日-2023 年 1 月 3 日）胰岛素类药品的单价、使用量、销售金额、用药频度（DDDs）、日均费用（DDC）等进行分析，计算各品种的集采完成进度及集采后的实际节省费用。**结果：**胰岛素集中带量采购后，我院胰岛素类药品品种数由 20 个增加至 29 个，除德谷门冬双胰岛素外，其余均被集采；中选品种的单价大幅下降，销售金额及 DDC 降低，实际节省费用共计 1438655.63 元，而德谷门冬双胰岛素因价格上调导致实际费用增加 50120 元；使用量最多的为门冬胰岛素 30 注射液和精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液(25R)；目录内原有品种集采完成进度较好，但新进品种集采完成度较低。**结论：**胰岛素集中带量采购节省了胰岛素治疗费用，但后续应制定相关政策保证新进品种集采任务完成。

【关键词】胰岛素；集中带量采购；用药频度；日均费用；实际节省费用

Analysis the impact of special centralized procurement policy on the utilization of insulin in a Tertiary hospital

DONG Yafen, QIU Yan, JIN Hui, LIU Yanping, WANG Jian

(Department of Pharmacy,Shanghai Pudong New Area People's Hospital, Shanghai 201200, China)

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To explore the impact of special centralized Procurement policy on the utilization of insulin and the economic effectiveness, and to provide a reference for the improvement of policy. **MEYHODS：**Pharmacoeconomic method was used to analyze the unit price, quantity used, sales amount, DDDs and DDC of insulin in our hospital before (July 4, 2021 to January 3, 2022) and after (July 4, 2022 to January 3, 2023) the special centralized procurement policy. The completion of the special centralized procurement task and the actual cost saving of insulin were calculated.. **RESULTS：**After the implementation of the special centralized procurement policy, the number of insulin products has increased from 20 to 29, and all of that were in the catalogue of special centralized procurement expect of insulin degludec/aspart The unit price, sales amount and DDC,of selected varieties has decreased significantly and the actual cost saving was 1438655.63 yuan, while the cost of insulin degludec/aspart increased 50120 because of the unit price; The dosage of insulin aspart 30 injection and lypro insulin mixed injection (25R) were most; The completion of the special centralized procurement task for the products in catalogue was relatively good, but same new products was still low. **CONCLUSION：**The implementation of special centralized procurement policy has saved the cost of insulin treatment,while relevant policies should be formulated to ensure the completion of task for new products.

【KEYWORDS】insulin; special centralized procurement; defined daily doses; defined daily cost ; actual cost saving

糖尿病是以持续高血糖为特征的代谢性疾病，是国际上公认的四大非传染性疾病之一，主要包括 1 型糖尿病和 2 型糖尿病。1 型糖尿病因胰岛素绝对缺乏，患者需要使用胰岛素维持治疗；2 型糖尿病起始治疗一般以口服降糖药为主，但是随着病程的进展，口服降糖药效果不佳或存在用药禁忌症时同样需要使用胰岛素治疗[1-2]。我国市场上的胰岛素主要为外资产品[3]，治疗费用较高，使得患者和医保的经济负担较重。药品集中带量采购工作的开展在减轻患者药物治疗经济负担方面取得了较好的成效[4-5]。国家医疗保障局在前 5 批化学药集中带量采购的基础上，于 2021 年 9 月启动第 6 批国家组织药品集中带量采购（胰岛素专项）（以下简称“集采”），以降低使用胰岛素治疗患者的经济负担[6]。为分析胰岛素带量采购政策在我院的实施情况及对临床上胰岛素类药品用药的影响，本研究对我院胰岛素在集采前后的使用情况进行分析，为集采政策的实施与监测提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

收集上海市浦东新区人民医院信息系统（Hospital Information System，HIS）第 6 批胰岛素专项集采后年（2022 年 7 月 4 日-2023 年 1 月 3 日）和集采同期前半年（2021 年 7 月 4 日-2022 年 1 月 3 日）的用药数据，具体包括药品规格、厂家、使用数量、销售金额及协议采购量等。

1.2 数据分析方法

采用限定日剂量（Defined daily dose，DDD）法计算每个胰岛素类药品的用药频度（DDDs）和限定日费用（defined daily cost，DDC）。DDD 值根据 WHO 官方网站提供的药物限定日剂量确定，并计算各品种的集采完成进度及实际节省费用。 用药频度（DDDs）=某药的消耗总剂量/该药 DDD 值，DDDs 反映药物的使用频率，值越大说明该药使用频率越高。日均费用（DDC）=某药的销售额/该药 DDDs 值，DDC 反映了应用该药物的平均日费用，值越小说明该药经济学越好。实际节省费用=(带量采购前 DDC-带量采购后 DDC)×带量采购后 DDDs[7]。

2 结果

2.1 集采实施后我院胰岛素类药品品种

第 6 批药品集采品种包括餐时人胰岛素、基础人胰岛素、预混人胰岛素、餐时胰岛素类似物、基础胰岛素类似物、预混胰岛素类似物等。集采实施前，我院胰岛素类药品包含了 4 个厂家的 20 个品种；集采实施后，除德谷门冬双胰岛素外，其余已有品种均被集采，另有 9 个不在我院目录内的胰岛素通过集采进入我院目录。详细情况见附件。

2.2 集采实施前后我院胰岛素类药品价格、使用量和销售金额的变化及集采完成度

在价格方面，除甘李药业股份有限公司的甘精胰岛素注射液为原价格中标带量外，实施集采后目录内所有胰岛素的价格均下降，其中降价幅度最大的为精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液(25R)（礼来苏州制药有限公司），降幅高达 72.35%，其余品种的降幅均在 33.13-59.96%；使用量方面，门冬胰岛素 30 注射液（诺和诺德）和精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液(25R)的使用量最大；基础和速效胰岛素类似物中用量较大的分别为德谷胰岛素和门冬胰岛素（诺和诺德）。德谷门冬双胰岛素注射液（诺和诺德）、甘精胰岛素注射液（通化东宝）及精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液(25R)（礼来）等品种的增幅较高，分别为 566.49%、102.69%和 98.71%，而人胰岛素各品种使用量均有不同程度的降低；在销售金额方面，除甘精胰岛素注射液（甘李/通化东宝）因使用量显著增加销售金额有所增长外，其余品种均下降；集采完成进度方面，目录内原有品种如德谷胰岛素、甘精胰岛素（通化东宝）、门冬胰岛素、精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)（诺和诺德/通化东宝）等超量完成了采购任务，完成度分别为 654.86%、610.63%、124.40%、1690%和 1685%，而新进品种如人胰岛素注射液（BIOTON S.A./合肥亿帆）仅完成 0.29%，其余新进品种的完成率低于 10%。详细情况见表 1。

2.3 集采实施前后我院胰岛素类药品 DDDs、DDC 变化及实际节省费用

集采实施前后，DDDs 排名前两位的均为门冬胰岛素 30 注射液（诺和诺德）和精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液(25R)（礼来）；精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)（诺和诺德/300U）的 DDDs 由集采前的第 3 名下降至集采后第 5 名；德谷门冬双胰岛素注射液（诺和诺德）虽未进入集采，但在集采实施的时间段其 DDDs 排名提升至第 3 名。德谷门冬双胰岛素注射液 DDC 由 10.4 元增至 11.73 元，实际费用增加 50120 元；除甘精胰岛素

注射液（甘李）DDC 未变外，所有中选品种 DDC 均下降，实际节省费用最多的为门冬胰岛素 30 注射液（诺和诺德）。我院所有中选胰岛素类药品共计节省费用 1438655.63 元。详细情况见表 1。

3 讨论

糖尿病是常见的慢性病，患者人群量较大，由于需要长期治疗，高额的药物治疗费用给患者及其家庭、国家等均带来了沉重的经济负担。2021 年调查统计显示，糖尿病的全球患病率高达 10.5%，卫生费用支出达 9 660 亿美元；我国糖尿病患者人数居世界第一位，糖尿病健康支出达 1 653 亿美元，排名全球第二[8]。因此我国糖尿病防控形势较为严峻。

胰岛素是治疗糖尿病的重要手段，其在临床具有使用量较大，采购金额高的特点。对于使用量大、价格高等的药品国际上通行的做法是实行带量采购[9]。2021 年 9 月启动第六批国家组织药品集中带量采购（胰岛素专项）。集采实施后，我院除德谷门冬双胰岛素注射液外原目录内品种均中选，另有 9 个中选品种新进入目录。目录结构涵盖了餐时、基础和预混胰岛素，能满足临床治疗需求。胰岛素类药品单价的降低带来了治疗费用的减少，半年来共计节省费用高达 1438655.63 元，从一定程度上减轻了患者、患者家庭及社会的经济负担。

在集采完成进度方面，德谷胰岛素、甘精胰岛素（通化东宝）、门冬胰岛素、精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)（诺和诺德、通化东宝）等原有品种超量完成了采购任务，而新进品种的完成进度大多低于 10%。究其原因可能：①胰岛素为生物制品，临床转换替代存在风险，②集采后原目录内品种价格大幅度下降，新中选品种在价格上无优势，③对于新进品种医师使用经验有限，使用时比较谨慎，④医师和患者对国产制剂接受程度不高等，⑤与化学药不同，胰岛素类药品无一致性评价结果，医师在选用时无循证医学证据作为参考。

在胰岛素选择方面，预混胰岛素是临床上常见的胰岛素制剂，因其能同时提供基础及餐时胰岛素，且方案简便易于被患者接受，为患者起始胰岛素治疗方案[2, 10]。研究结果显示门冬胰岛素 30 注射液（诺和诺德）在集采前后的 DDDs 均位于首位。门冬胰岛素 30 由含有 30%的可溶性门冬胰岛素和 70%的精蛋白门冬胰岛素混合而成。根据不同病程的糖尿病患者，门冬胰岛素 30 可以每日 1、2 或 3 次注射使用，以每日 2 次最常见，应用人群最广泛[11]。多项研究结果均证实，门冬胰岛素 30 每日 2 次注射方案在降低糖化血红蛋白的同时低血糖发生率低，显示出较好的有效性和安全性[12-13]。精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液在我院的使用量较门冬胰岛素 30 少，与往的调查结果相似[14]。但由于其集采后价格降幅较大，且有循证医学的证据，使用量增幅较高，任务进度完成较好。预混胰岛素类似物比预混人胰岛素能更好的模拟生理胰岛素分泌，减少低血糖风险，且注射方便有更好的患者依从性[2]。因此，我院预混人胰岛素使用量均低于预混胰岛素类似物，且有下降的趋势。对于使用低预混胰岛素方案并经充分优化调整后餐后血糖仍不能达标的患者，可以考虑调整为中预混胰岛素治疗[10]。故中预混胰岛素的使用量低于低预混胰岛素，集采后因厂家停止供应而未在我院使用。

人体正常的胰岛素分泌包括基础胰岛素分泌和餐时胰岛素分泌两部分，基础胰岛素主要用于控制空腹血糖和餐前血糖水平，而餐时胰岛素主要作用为降低餐后血糖[15]。短效人胰岛素和速效胰岛素类似物用于补充餐时胰岛素，临床上常与基础胰岛素联合作为强化降糖治疗方案。速效胰岛素类似物在起效、达峰及峰效时间等方面更合理，在控制好餐后血糖的同时发生低血糖的风险更低；同时注射时间灵活，可提高患者治疗依从性，目前为临床上常用的餐时胰岛素[15]；相较于基础人胰岛素，基础胰岛素类似物能更好地模拟生理性胰岛素分泌，低血糖风险低，是目前我国使用最广泛的基础胰岛素[2]。结果显示，餐时和基础胰岛素类似物的用量均多于餐时和基础人胰岛素。在具体品种的选择方面，德谷胰岛素的使用频率高于甘精胰岛素和地特胰岛素。甘精胰岛素注射液（通化东宝）在集采实施后的使用频率显著增加，其为院内原有品种，医师和患者有一定的用药经验与信心，且集采后价格降低，医师在保证集采任务量完成的基础上会选择使用。实施集采前，速效胰岛素类似物仅有门冬胰岛素注射液；实施集采后门冬胰岛素注射液的供应厂家增加至 3 家且增加了赖脯胰岛素注射液。虽然赖脯胰岛素和门冬胰岛素在药代动力学上存在一定差异，但其疗效和安全性无明显差异[15]。但门冬胰岛素注射液（诺和诺德）的使用量和使用频率明显高于门冬胰岛素注射液（甘李、浙江海正）和赖脯胰岛素注射液。原因可能为后三者是新进品种，我院就诊的糖尿病患者多为长病程患者，由于胰岛素临床转换替代存在较多问题（注射装置、有效性和安全性等），在血糖控制平稳情况下不建议转换胰岛素治疗方案[16-17]。为保证采购任务的完成，建议临床对需要使用静脉胰岛素的患者可以选择门冬胰岛素注射液（甘李、浙江海正）和赖脯胰岛

素注射液。

集采实施前，德谷门冬双胰岛素的使用量较低，集采实施后，其 DDDs 上升至第 3 位。德谷门冬双胰岛素含有 70%德谷胰岛素和 30%门冬胰岛素，制剂中的两种成分独立存在，并各自发挥作用：德谷胰岛素作为基础成分，在皮下注射后可形成稳定的可溶性多六聚体储库，单体逐渐从储库中分离后被持续、缓慢地吸收入循环系统，通过脂肪酸侧链与白蛋白可逆结合而获得超长、平稳的降糖作用；门冬胰岛素作为餐时成分在注射后以单体的形式迅速入血起效，提供餐时胰岛素的降糖作用[18]。研究显示，与基础胰岛素联合 1-3 针餐时胰岛素相比，每日 2 次德谷门冬双胰岛素注射在降低糖化血红蛋白方面效果相当，但后者仅使用一种胰岛素制剂可减少注射次数同时也可避免患者因混淆两种胰岛素而导致注射错误[19]。陶立波等[20]的研究评价了集采后德谷门冬双胰岛素和甘精胰岛素在治疗口服降糖药控制不佳 2 型糖尿病患者中的药物经济性，结果显示，德谷门冬双胰岛素在临床疗效和健康产出方面优于甘精胰岛素。虽然德谷门冬双胰岛素未被集采，但 2020 年经过谈判进入国家医疗保障目录，其单价明显下降，与被集采的基础胰岛素类似物相仿，加之制剂上的优势致使其使用量剧增。

4 结语

胰岛素集中带量采购在我院实施半年，取得了一定的成效，节省了胰岛素治疗费用，减轻了患者和社会的经济压力。但仍然存在一些问题，如新进品种集采完成进度低、因厂家停止供应目录中缺乏中预混胰岛素等。因此，今后将加强以下几方面工作：（1）增加带量采购政策宣传力度，增加患者和医师对集采中选国产药品的信心；（2）临床药师为患者做好药学服务，便于患者胰岛素安全转换替代；（3）定期监测胰岛素集采进度完成情况，在保证医疗质量的前提下鼓励医师使用同组内进度完成较差的品种；（4）制定考核目标，将集采完成进度情况纳入绩效考核；（5）加强对临床胰岛素类药品的动态监测与评估；（6）在保证医疗质量和安全的条件下，对于初次使用胰岛素治疗的患者选用新进品种；（7）增加中预混胰岛素品种，保证目录结构的完整性；(8)开展中选品种不良反应监测，将结果及时反馈给厂家便于质量改进；（9）由于胰岛素转换存在风险，建议下一个报量时只报院内已有品种；（10）从此次集采来看，进口胰岛素制剂体现出了价低质优的特点，国产胰岛素在价格上不再占有绝对优势，建议国产胰岛素增加相应的循证医学证据，提高医师的用药信心。此外，由于胰岛素类似物在降糖和提高患者依从性等方面的优势，人胰岛素类药品的使用量呈下降趋势，建议下一个周期报量时将人胰岛素类药品的一部分报量调整为胰岛素类似物；德谷门冬双胰岛素未进入集采，但在实施集采后的时间段其价格较前有所增加，致使治疗费用增加。由于在降糖方面的优势，其用量呈增加的趋势，建议政府可以进行“量价挂钩”的谈判来适当降低费用使患者有更多获益。

参考文献

[1] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2022[J]. Diabetes Care, 2022, 45: S1-S264.

[2] 中华糖尿病杂志, 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 37(4): 311-395.

[3] 姚倩, 胰岛素集采渐进，超 200 亿市场迎巨变. 北京商报, 2021.

[4] 国务院办公厅. 国务院办公厅关于推动药品集中带量采购工作常态化制度化开展的意见[EB/OL]. [2021-07-26]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2021-01/28/content_5583305.htm, 2021.

[5] 胡善联. 国家组织药品集中采购的卫生经济学理论基础及完善建议[J]. 中国卫生资源, 2021, 24(1):12-14,23.

[6] 国家医疗保障局. 陈金甫副局长主持召开胰岛素集中采购工作座谈会[EB/OL].(2021-07-28)[2020-07-29].http://www.nhsa.gov.cn/art/2021/7/28/art_98_5667.html.

[7] 董雅芬, 邱彦, 刘艳平, 李姝姝, 陈业, 王建. “4＋7”带量采购政策下上海市浦东新区人民医院口服降糖药的使用情况分析[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(5): 1113-1118.

[8] International-Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 2021[EB/OL].(2021-11-12)[2022-02-06].https: //www.diabetesatlas.org.

[9] 王东进. 协同推进“三医联动”构建融合发展新格局: 药品集中带量采购改革的主要成效和深刻启示[J]. 中国医疗保险, 2021(8): 19-21.

[10] 中华医学会内分泌学分会. 预混胰岛素临床应用专家共识(2016 年版)[J]. 药品评价, 2016, 13(9):5-11.

[11] 杨文英, 母义明, 许樟荣. 门冬胰岛素 30 每日 1 次起始方案的临床使用专家意见[J]. 药品评价, 2015, 12(11): 10-13.
[12] Raskin P, Matfin G, Schwartz SL, et al. Addition of biphasi c insulin aspart 30 to optimized metformin and pioglitazone treatment of type 2 diabetes mellitus: The ACTION Study (Achieving Control Through Insulin plus Oral ageNts)[J]. Diabetes Obes Metab, 2009, 11(1): 27-32.
[13] 杨文英, 李玉秀, 陈莉明,等, 双时相门冬胰岛素 30 在中国人群中的临床应用-A1chieve 观察性研究结果[J]. 中华糖尿病杂志, 2012, 4(10): 607-612.
[14] 胡惠子, 文小桐, 杨莹,等. 基于内分泌科医师问卷调查结果评价武汉市胰岛素类药品集中采购分组办法的合理性及可行性[J]. 中国药房, 2022, 33(6): 666-672.
[15] 母义明，朱大龙，李焱, 等. 速效胰岛素类似物临床应用专家指导意见[J]. 药品评价, 2016. 13(21): 13-17,53.
[16] 文小桐，杨莹，张维纯，等, 武汉市胰岛素带量议价对医疗机构采购使用的影响[J]. 中国卫生资源, 2022, 25(3): 296-302.
[17] 《落实国家组织胰岛素专项集中带量采购政策专家共识》专家组, 落实国家组织胰岛素专项集中带量采购政策专家共识[J]. 中国药业, 2022, 31(19): 1-7.
[18] 朱大龙,赵维纲,匡洪宇,等. 德谷门冬双胰岛素临床应用专家指导意见[J]. 中华糖尿病杂志, 2021. 13(7): 695-701.
[19] Philis-Tsimikas A, Astamirova K, Gupta Y, et al. Similar glycaemic control with less nocturnal hypoglycaemia in a 38‐week trial comparing the IDegAsp co‐formulation with insulin glargine U100 and insulin aspart in basal insulin‐treated subjects with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 147: 157‐165.
[20] 陶立波,王芳旭. 胰岛素专项集采后德谷门冬双胰岛素对比甘精胰岛素治疗口服降糖药控制不佳 2 型糖尿病患者的药物经济学评价[J]. 中国合理用药探索, 2022, 19(4): 12-19.

表 1　集采前后胰岛素类药品单价降幅、使用量、使用金额的变化、集采完成度、DDDs、DDC 的变化及实际节省费用

药品名称/厂家	价格降幅/%	使用量（支）			使用金额（元）			完成度/%	集采前				集采后				实际节省费用(元)
		带量前	带量后	浮动/%	带量前	带量后	浮动/%		DDDs	排序	DDC	排序	DDDs	排序	DDC	排序	
人胰岛素注射液（BIOTON S.A./合肥亿帆）		0	1	-	0	22.32	-	0.29	0	21	0	19	7.50	26	2.98	17	-22.32
人胰岛素注射液（珠海联邦）		0	11	-	0	316.47	-	3.38	0	21	0	19	82.50	23	3.84	10	-316.47
人胰岛素注射液（通化东宝）	35.36	1479.13	1401.76	-5.23	66265.02	40595	-38.74	83.44	591652	7	4.48	18	14017.60	7	2.90	18	22203.848
人胰岛素注射液（诺和诺德）	41.63	509	439	-13.75	26162.6	13170	-49.66	135.08	152700	15	6.85	12	3292.50	16	4	8	9394.6
人胰岛素注射液（礼来）	38.94	898	793	-11.69	44118.74	23790	-46.08	99.13	269400	11	6.55	14	5947.50	13	4	8	15170.09
精蛋白人胰岛素注射液（通化东宝）	33.13	544	517	-4.96	24371.2	15489.32	-36.44	82.85	217600	13	4.48	18	5170	14	3	16	7672.28
精蛋白人胰岛素注射液（诺和诺德）	41.82	539	425	-21.15	27790.84	12750	-54.12	42.50	161700	14	6.87	11	3187.50	17	4	8	9163
精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)（BIOTON S.A./合肥亿帆）	-	0	97	-	0	2252.34	-	2.97	0	21	0	19	727.50	21	3.10	15	-2252.34
精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)（合肥天麦）	-	0	7	-	0	163.66	-	4.12	0	21	0	19	52.50	24	3.12	14	-163.66
精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)（通化东宝/400U）	35.36	25	4	-84	1120	115.84	-89.66	0.08	10000	20	4.48	17	40	25	2.90	18	63.36
精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)（通化东宝/300U）	35.18	3248	2022	-37.75	145120.64	58557.12	-59.65	1685	974400	5	5.96	16	15165	6	3.86	9	31785.84
精蛋白人胰岛素混合注射液(30R) （礼来）	42.52	1419	956	-32.63	74057.61	28680	-61.27	28.12	425700	9	6.96	10	7170	10	4	8	21213.64
精蛋白人胰岛素混合注射液(30R) （诺和诺德/400U）	42.93	137	163	18.98	7202.09	4890	-32.10	171.58	54800	18	5.26	17	1630	19	3	16	3678.91

精蛋白人胰岛素混合注射液(30R) （诺和诺德/300U）	40.30	3866	3211	-16.94	194266.5	96330	-50.41	1690	1159800	3	6.70	13	24082.50	5	4	8	65022.75
精蛋白人胰岛素混合注射液(50R)（诺和诺德）	-	103	0	-100	5414.71	0	-100	-	30900	19	7.01	9	0	27	0	21	0
门冬胰岛素注射液（甘李）	-	0	24	-	0	479.52	-	4.80	0	21	0	19	180	22	2.66	19	-479.52
门冬胰岛素注射液(浙江海正）	-	0	130	-	0	3049.8	-	65	0	21	0	19	975	20	3.13	13	-3049.8
赖脯胰岛素注射液（礼来）	-	0	331	-	0	7801.67	-	30.09	0	21	0	19	2482.50	18	3.14	12	-7801.67
门冬胰岛素注射液(诺和诺德）	38.43	3666	3732	1.80	257243.22	161222.4	-37.33	124.40	1099800	4	9.36	6	27990	4	5.76	7	100652.04
甘精胰岛素注射液（甘李）	0	437	551	26.09	21286.27	26839.21	26.09	32.41	131100	17	6.49	15	4132.50	15	6.49	6	0
甘精胰岛素注射液(珠海联邦）	-	0	7	-	0	489.79	-	6.67	0	21	0	19	52.50	24	9.33	5	-489.79
地特胰岛素注射液(诺和诺德）	59.96	1060	861	-18.77	193460.6	62913.27	-67.48	46.79	318000	10	24.33	2	6457.5	11	9.74	4	94227.84
甘精胰岛素注射液(通化东宝）	44.30	482	977	102.69	67480	76186.46	12.90	610.63	144600	16	18.67	3	7327.50	9	10.40	3	60593.54
德谷胰岛素注射液(诺和诺德）	57.06	1484	1146	-22.77	284096.96	94201.2	-66.84	654.86	445200	8	25.53	1	8595	8	10.96	2	125189.04
精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液(25R)（礼来）	72.35	7952	8737	9.87	543360.16	165041.93	-69.63	40.08	2385600	2	9.11	8	65527.50	2	2.52	20	431957.28
门冬胰岛素 30 注射液（甘李）	-	0	853	-	0	20949.68	-	13.58	0	21	0	19	6397.5	12	3.27	11	-20949.68
门冬胰岛素 30 注射液(诺和诺德）	37.60	21359	18294	-14.34	1478683.57	790300.8	-46.55	91.47	6407700	1	9.23	7	1372050	1	5.76	7	476192.82
门冬胰岛素 50 注射液(诺和诺德）	-	2727	0	-100	194571.45	0	-100	-	818100	6	9.51	5	0	27	0	21	0
德谷门冬双胰岛素注射液（诺和诺德）	-12.82	752	5012	566.49	58656	441056	651.93	-	225600	12	10.4	4	37590	3	11.73	1	-50120

附件 1

表 1　我院所有胰岛素类药品协议采购量

是否原目录内	采购组名称	产品分类	药品名称	生产企业	规格	协议采购量（支）
否	餐时人胰岛素	A1	人胰岛素注射液	BIOTON S.A./合肥亿帆生物制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	350
否	餐时人胰岛素	A3	人胰岛素注射液	珠海联邦制药股份有限公司中山分公司	3ml:300 单位（笔芯）	325
是	餐时人胰岛素	B	人胰岛素注射液	通化东宝药业股份有限公司	10ml:400 单位	1680
是	餐时人胰岛素	C	人胰岛素注射液	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	325
是	餐时人胰岛素	C	人胰岛素注射液	礼来苏州制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/预填充）	800
是	基础人胰岛素	B	精蛋白人胰岛素注射液	通化东宝药业股份有限公司	10ml:400 单位	624
是	基础人胰岛素	B	精蛋白人胰岛素注射液	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/特充）	1000
否	预混人胰岛素	A2	精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)	BIOTON S.A./合肥亿帆生物制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	3261
否	预混人胰岛素	A3	精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)	合肥天麦生物科技发展有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	170
是	预混人胰岛素	B	精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)	通化东宝药业股份有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	5120
是	预混人胰岛素	B	精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)	通化东宝药业股份有限公司	10ml:400 单位	120
是	预混人胰岛素	C	精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/特充）	3400
是	预混人胰岛素	C	精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)	诺和诺德（中国）制药有限公司	10ml:400 单位	95
是	预混人胰岛素	C	精蛋白人胰岛素混合注射液(50R)	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	190
是	预混人胰岛素	C	精蛋白人胰岛素混合注射液(30R)	礼来苏州制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/预填充）	1750
否	餐时胰岛素类似物	A1	门冬胰岛素注射液	甘李药业股份有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	500
否	餐时胰岛素类似物	A2	门冬胰岛素注射液	浙江海正药业股份有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	200
否	餐时胰岛素类似物	A3	赖脯胰岛素注射液	礼来苏州制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/预填充）	1100
是	餐时胰岛素类似物	C	门冬胰岛素注射液	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/特充）	3000
是	基础胰岛素类似物	A1	甘精胰岛素注射液	甘李药业股份有限公司	3ml:300 单位（笔芯/预填充）	1700

否	基础胰岛素类似物	A2	甘精胰岛素注射液	珠海联邦制药股份有限公司	3ml:300 单位（笔芯/预填充）	105
是	基础胰岛素类似物	B	地特胰岛素注射液	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/特充）	1840
是	基础胰岛素类似物	B	甘精胰岛素注射液	通化东宝药业股份有限公司	3ml:300 单位（笔芯/预填充）	160
是	基础胰岛素类似物	C	德谷胰岛素注射液	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/畅充）	175
是	预混胰岛素类似物	A1	精蛋白锌重组赖脯胰岛素混合注射液(25R)	礼来苏州制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/预填充）	21800
否	预混胰岛素类似物	A2	门冬胰岛素 30 注射液	甘李药业股份有限公司	3ml:300 单位（笔芯）	6280
是	预混胰岛素类似物	C	门冬胰岛素 30 注射液	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/特充）	20000
是	预混胰岛素类似物	C	门冬胰岛素 50 注射液	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（笔芯/特充）	550
是	-	-	德谷门冬双胰岛素注射液	诺和诺德（中国）制药有限公司	3ml:300 单位（特充）	-

医疗机构急救药品规范管理在优化急救流程中的实践

杜汝琼

（安顺市妇幼保健院　贵州 安顺 561000）

【摘要】目的：探索急救流程中急救药品的管理问题，并在实践中发挥作用，结合本院实际，建立一套实用性较强的急救药品管理方法，在以后的急救流程中发挥作用。**方法：**查询相关文献并建立一套实用的管理方法，总结归纳其他医院的管理方法，取长补短应用到急救流程中。指导医院的管理工作。**结果：**初步建立了本院管理体系，提高其在急救流程中的实际应用，大大提高了急救药品的应用效率及医疗质量。给急救工作起到保障作用。在一定程度上缩小了急救工作中的安全隐患。**结论：**分析了急救药品管理在急救流程中的实践，对医院实际操作中出现的问题进行解决，优化完善管理措施，对以后的急救工作起到一定借鉴作用。

【关键词】急救药品；规范管理；实践应用；应对方法

近年来，随着“新型冠状病毒”的出现,各大医院系统应接不暇，如何利用有效时间抢救病人成了一个棘手的难题，在此过程中，优化急救流程的实际应用是一个可行的方案，它不仅可以有效应对急诊病症的抢救，还可以提高医院工作质量及服务质量，为广大人民群众提供放心、舒心、安心的医疗服务。

所谓“急救流程”是基于急救病人的抢救流程，建立的由制度保证、医务工作人员的素养、医疗水平支持等组成的体系，目的在于为病人赢得宝贵的抢救时间，其核心是以病人为中心，简化抢救程序，在最短时间内，为临床抢救病人全面提供”绿色抢救通道“的模式。

1 抢救药品的调剂系统建立及相关措施

一般以食物、药物、污染物中毒及危重症,超病急，病情复杂多变,发展快，凶险危急，如果不争分夺秒地抢救，会延误病情，使病人生命受到严重威胁。一般来说，医院药房工作模式以多剂量调剂系统和单剂量调剂系统，而且普通病人与危急重症病人的用药供给模式截然不同，因此药剂科需要根据医院具体情况进行制定。

1.1 分类协调　根据特殊病人不同程度的情况进行轻重缓急分类，通过学习先进技术来优化查找工作，使药品出入库简捷方便，利于在病人急救需求较多时，可以方便查找开药，为抢救流程提供药品供给，后续工作做好及时补充即可。

1.2 复核及交接工作　提高药剂科药师的工作水平，加强药师的工作经验积累，可缩短复核时间，构建抢救药品规范化管理流程，并对药房电脑系统有效管理，缩短其流程所需时间，发出时有必要进行双人核对，尽量避免差错发生，为药品入库管理保驾护航。多数药品存在别名，但年轻的药师未能对其别名进行掌握，只有部分老药师熟悉，因此易出现交接失误。

1.3 库存更新　据调查,有医院药房存在库存不能及时更新的不足,因此需要库存及时更新,对此过程实行追踪，交班等记录，做好紧急采购等相关工作，要求药师做好交班对接工作，避免产生纠纷问题。[1] 同时需要药库采购相关工作人员掌握准确的库存信息及药品有效期信息[2]，最低要储备三个月以内的各类急救药品，确保抢救药品的供应和采购安全，建议实施每月统计报表，以保证其流程平稳运行，有利于大大减轻工作人员的劳动强度，使其准确快速地进行发药抢救。医院药品的采购不仅要建立相关流程，需要遵守一定的规范，如制定采购计划、进行供应商选择和评估、签订采购合同等。且要尽力改正在实际采购时可能存在的流程不规范的情况，如采购计划未经合理审批、招标和比选程序不符合规定等。[3] 补药时需对其相关资料进行保存。

1.4 效期管理　药品有效期信息管理是决定抢救药品质量及使用的一个重要因素，需要建立整体的信息管理，得以保证其在临床工作中的使用，体现了本院的整体管理水平高低，因此必须重视其管理的特殊性，药物自生

作者简介：杜汝琼，药学本科，副主任药师，执业药师，研究方向：医院药学、药事管理，E-mail:　2722908635@qq.com

产以来需着重注意其使用期限，这一点在药品采购中需尤为注意，才可保证治疗质量，不浪费医疗公共资源和本院资金，达到理想疗效。我们可以采用贴标分类以便快速查找，同时在药物盘点时要着重检查药物有效期，在急救流程中尽可能使用有效期较近的药品，以避免药品浪费。进行效期检查，在采购环节里需要与配送公司保持密切联系。另外需设立相关检察组进行管理、指导、及在特殊情况下的紧急预备，来规范效期管理分类，与临床科室进行对口链接。

1.5 药品变质 大多数医护人员在进行取药时，药品的生产日期很少检查，造成严重后果，影响治疗质量。且平时使用的剂量较少或不常用的药品其更新时间较长，在雨季或潮湿地带容易出现潮解的情况，多数医护人员却很少注意到这个问题，未能对变质的药品进行及时的清理。[4]

2 急救药品规范化管理在急救流程中的实际应用

医院急救药品规范化管理是保障急救准时性的重要节点，如果要充分发挥其急救效能，那么其规范化管理是对急救工作的重要支援。

2.1 规范急救系统 急救系统关系到患者能否得到应急抢救，因此本院其急救单元应经常检查医用器械，规范其组成人员的应急抢救水平。建立专属急救药箱，使用后药箱回收并及时补给[5]，及时生成最新的急救药品清单，交代药剂科及时采购，确保下次急救时最快做好急救工作。

2.1.1 急救车及医疗器械规范 本院急救车应分为普通型急救车和监护型急救车，其内部医疗器械基本相同，但监护型急救车内应配备呼吸机，用于抢救急重症患者。急救车分类利于本院可准确调控医疗资源，使患者在合理医疗资源的配置下能最大化得到紧急救治效果。且急救车使用寿命很短，需定时检查急救车使用寿命及内部医疗器械的完备。

2.1.2 定期组织培训 根据急救工作需要，急救人员需开展急救工作培训。内容主要有：急救相关知识及技能培训，而且要进行不定期抽查，对急救人员的培训情况进行相应的检查工作，并进行统一考核，同时严格交接班制度。及时发现管理工作中存在的问题，并经过分析后解决。[6]



备注:临床医技科室每日交接班并核对药品数量，做到账物相符

2.1.3 急救单元人员配置　需训练急救人员专业水平和应对突发状况的能力，及对相关医疗器械使用的熟练程度。人员必须是中级职称及以上水平。由组长到小组成员，需要层层把控，对救护车急救药品管理中存在的问题进行总结，收集全员意见，对可行意见进行整合，制定对策后充分落实，定期开展效果评价，确保措施切实有效。[7]

2.1.4 急救联系方式畅通　网络应保持畅通，建议急诊科工作人员保持网络、联系电话 24 小时分分钟畅通，实行每人备案至少 2 个联系电话，开启急救车网络跟踪及其突发事件的紧急预案。

2.1.5 急救工作完成后的后续工作　需上报调派、指挥、决策、监控纪录相关信息。

2.2 药房管理和病区小药柜管理

2.2.1 急抢救等备用药品品种、基数的确定

由急抢救备用药品管理领导小组决定 15 个急抢救必备药品品种及数量，各科室可以根据科室诊疗需要增加配备专科用药品种及数量，由科室护士长及科室主任提交备药计划，双签字后报医教科、护理部、药剂科共同审核，报分管院长签字同意后，从药剂科领取。所领取药品费用如导致过期报损计入该病区成本进行核算。冷链药品需配备医用冰箱，麻醉精神药品、易制毒药品必须配备保险柜、摄像头等安全防盗设施。

临床医技科室调整备用药品品种或数量，必须由医教科、护理部、药剂科共同审核后方可执行。如因特殊情况需退回药剂科，药房工作人员必须详细检查退回药品的批号、有效期、外包装、外观等无异常并做好登记。冷链药品、麻醉精神药品、易制毒药品等特殊药品不允许退回。

2.2.2 急抢救等备用药品的储存

科室备用药品应严格控制药品存放条件，严格按药品说明书所列贮存条件存放，严防药品破损、变质、失效。每天进行温湿度监测登记，上午下午各监控一次，需避光、阴凉处、冷藏冷冻存放的药品，必须依照统一下发的需特殊保存药品目录按要求储存。

2.2.3 急抢救等备用药品的使用

急抢救备用药品使用遵循“近效期先用、先领先用、按批次使用”原则，以避免药品管理不当或更换不及时造成安全隐患或不良后果。急救车内物品私人严禁取用，病人使用后及时补充相应数量的药品。并严格执行全院急救车药品管理规定。

2.2.4 急抢救等备用药品的定位存放

药品分类定位放置，抢救车的第一层左侧放置 15 个固定目录药品，右侧放置专科用药。急救车内格子全院统一从左到右按目录序号依次放置抢救物品，并有警示标识，按 A 级高危药品到 C 级高危药品从上到下排序，不可混放。所有药品贮存盒/瓶应标识清楚、醒目，便于使用清点、检查。麻醉精神药品存放于保险柜里面及摄像头监控下。

2.2.5 急抢救等备用药品的督导检查

检查范围：全院有急抢救等备用药品的科室

检查内容：急抢救等备用药品使用、数量账卡、效期、储存及交接班、温室度监控等相关登记、管理情况

检查周期：药剂科每月 27 日之前下到各科室抽查药品管理情况，对于存在问题及时反馈给相关部门严格执行二级绩效考核并督促及时整改，做到层层把关。

医教科、护理部、药剂科三部门每季度联合对各临床医技科室急抢救等备用药品管理情况进行督查。药剂科每季度对督查科室出现的问题进行汇总分析，对其进行全院通报，并与科室绩效挂钩，让每个科室提高警惕，保持警醒，遵守管理规定，认真管理急抢救等备用药品，保障抢救小药柜药品安全、有效、数量相符，为患者争取抢救时间提供有利条件。

检查出的异常问题要报告护士长和药剂科进行及时有效的处理。建议使用法约尔跳板原则来管理急救药品，要想从根本上突破以往的工作模式，提高急救药品的管理质量和效率，药剂科和临床科室必须密切合作，对急救药品采用集中管理的方式。[8] 且药品使用后应该第一时间及时补充并规范放置。且病区小药柜管理的专管护士需具有中级及以上职称，还要认真迎接每一次检查，经检查后需及时整改。

2.2.6 特别急救通道的增设　因为本院的主要接诊人群是妇女和儿童，考虑以上实际情况，医院应优化及增设特别绿色通道，在急救危重症型病人的基础上增设妇女与儿童分类通道。

3 疫情防控药品保障在临床方面的使用调整

3.1 疫情下防控药品的售卖 去年因受“新冠”“流感”的双重影响，医院在药品采购、售卖方面发现明显问题，这使得疫情防控下药品供应不足，为加强整改，应进行使用调整。[9] 从而进行前瞻性管理模式。

3.2 加强药品保障 疫情下特殊救治药品应建立相应方案，加强对于新冠药品短缺的应急处理，我省应尽快为疫情防控药品持续生产开辟绿色通道，规范药品生产及调度，实行全过程监管。药剂科应做好药品采购保障工作，和生产厂家密切联系，同时应该治理不合理的囤药乱象，规范售卖和后台工作，加强监管和供应保障。

3.3 医务人员的自身防护 本院疫情防控相关工作医疗人员应严格进行自身防护，同时应对群众进行相关防护宣传。在临床方面，治疗期间应时时关注患者病情，多给予患者正面鼓励，治疗结束后应交待患者后期事项及收集患者相关反馈。实行精细化管理，缩短急救药品的取用时间。

4 讨论

综上所述，医务工作人员要尤为注意急救药品的科学管理，提高意识。药剂科应注重药品采购管理及药品保障，并进行急救药品科学管理在急救流程中的应用。切实提高药品的质量，保证药品的正确使用，发挥最大疗效，为广大群众提供高质量的医疗服务。同时，也要积极学习改进自身不足，结合当下法律政策，不断提高医院工作人员的科学素养和医院急救工作及整体水平。

构建急救药品规范管理主要是基于患者安全和提高医院的应急处理能力的表现。不可否认的是，在提高规范化管理水平后，抢救药品的管理质量明显提高，且药品应用效率也提高了。通过在急救流程中的应用，从多方面来提高医院的整体运行水平，提高管理质量，是一个动态化、持续化的过程，其含金量是很高的，不仅提高患者满意度，而且也有了自己的独立特色，实现了时间与质量的飞跃，确保质量，构建整体运行模式，实现人力、资源、成本、效率等统筹管理，节约对人员的培训力度，提高抢救效率，让患者在最短时间内得到及时抢救，间接提高了医院在人民群众中的信任度和满意度。所以加强急救药品的管理，不仅能确保急救药品的安全及使用效率，更能够提高药房及药库工作人员的综合素质从而减少医疗纠纷。

为加强医院急诊科、各病房（区）的急救室（车）、手术室及各诊疗科室急抢救等备用药品的有效管理和使用，规范各科室急抢救等备用药品领用、储存、使用、管理、补充、检查等流程，保证药品质量，确保患者用药安全有效，特别是近几年新型冠状病毒、甲型流感病毒等多起疫情爆发，既考验着医生的救治能力，也考验着药学人员的药品组织能力、管理能力、协调能力，愿我院的急抢救药品管理实践经验能对同行有所帮助，或为上级相关管理部门进一步细化管理规定提供决策参考。

参考文献

[1] 潘维,刘玉香,吴国明.医院药房亟待建立抢救药品调剂系统.药学服务与研究,2008,8(4):312-314

[2] 范碧梦,阎玉梅,王雯.药品有效期管理在医院临床科室药品管理中的应用.中医药管理杂志,2020,28(8):110-111

[3] 李柏胜.急救药品管理存在的问题与应对措施.岭南急诊医学杂志,2023,28(2):169-171

[4] 高在忠.研究急救药品管理中存在的问题及应对措施.世界最新医学信息文摘.2019,19(14):196-198

[5] 李杰,蒋志涛,韩怡,钱丽,等.基于云端协同管控的病区急救药品管理模式构建与成效.医药导报,2021,40(7):964-966

[6] 闵学,应晓庆.痕迹化管理在急救药品管理中的实施.中医药管理杂志,2019,27(16):116-117

[7] 崔丹桂.急救药品的细节管理在救护车物品管理中的应用效果观察.贵州医药,2021,45(11):1846-1847

[8] 眭文洁,王海芳,郑晓娴,等.法约尔跳板原则在急救药品安全管理中的作用.中国医院药学杂志,2015,35(18):1700-1703

[9] 徐婷.我市实现疫情防控药品销售实名登记电子化.池州日报/2021 年/1 月/4 日/第 001 版

医疗机构做好药品经营企业资质审核工作的探讨

杜兆松，彭静*

（华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院药学部，湖北 武汉 430016）

【摘要】目的：梳理医疗机构审核药品经营企业的资质材料，保障医疗机构药品来源合法、质量可靠，为其他医疗机构对药品经营企业资质审核提供参考。**方法：**以政府部门发布的相关政策法规为依据，建立药品经营企业资质审核目录。**结果：**药品经营企业的资质材料的审核内容与之前相比变化较大。**结论：**通过梳理政策法规可以建立药品经营企业资质审核目录，并通过建立药品经营企业资质档案能够保障医疗机构采购的药品来源合法、质量可靠。

【关键词】医疗机构；药品经营企业；资质档案

药品是指用于预防、治疗、诊断疾病，有目的地调节人的生理机能并规定有适应症或者功能与主治、用法和用量的物质。药品的质量关系到人民身体健康和生命安全，药品的生产、流通、销售、使用均可能影响到药品的质量，其中药品经营企业的资质水平、业务能力是保证药品质量的必要条件。特别是国家执行集中采购政策以来，对药品经营企业的配送能力、服务能力、财务能力提出了更高的要求[1]。然而，《医疗机构药事管理规定》中并没有明确医疗机构如何对药品经营企业资质进行审核以及具体审核哪些资质材料，同时，《中华人民共和国药品管理法》的修订、国家药监局开展配套规章规范性文件技术指南的修制订工作陆续开展，对经营企业资质审核的规范性和可操作性提出了更高的要求，因此本文通过我院的实际工作并结合相关文件要求，梳理了医疗机构审核配送企业资质的流程以及通过审核掌握配送企业的综合保障服务能力，以期为其他医疗机构提供参考。

1.药品经营企业资质材料的收集范围和审核要点

药品经营企业的资质材料主要包括企业合法性的资料和一般性资料，合法性资料包括《药品经营许可证》和《营业执照》，一般性资料包括法人授权委托书、药品经营企业被委托人员身份证复印件、两票制承诺书、经营过程中业务往来的所有印章、随货同行单票样式、质量保证协议书。

1.1 药品经营许可证

医疗机构的药品经营企业一般为药品批发企业，其《药品经营许可证》的发证机关为药品批发企业所在地省、自治区、直辖市药品监督管理部门[2]。《药品经营许可证》的发放，表明药品经营企业符合省、自治区、直辖市药品批发企业合理布局的要求并符合国家食品药品监督管理局的验收实施标准，反映了药品经营企业具备保证正常营业的人力资源和相关的软硬件设备。《药品经营许可证》是企业从事药品经营活动的法定凭证，在审核时要注意有效期是否过期、复印件上是否加盖企业公章、人员和地址的变更记录和营业执照是否一致。为医疗机构供应麻醉药品、精神药品的企业还应特别注意审核其经营范围是否包含麻醉药品和精神药品。

1.2 营业执照

营业执照是由药品经营企业所在地县级工商行政管理局登记审核后发放，表明企业能够依法开展经营活动[3]。在审核时，应注意其名称、住所、法人代表与《药品经营许可证》是否一致，经营范围与实际销售品种是否一致等。

1.3 法人授权委托书和身份证复印件

法人授权委托书是药品经营企业委托其单位工作人员代表法人进行有关业务活动的有效证明文件，其内容应包括被授权人姓名、身份证号、授权业务范围、公司印章和法人代表印章。在审核时还应该注意其授权期限的时间范围。身份证复印件应清晰真实，与授权委托书中的个人信息相一致。

1.4“两票制”承诺书

两票制是指药品生产企业到流通企业开一次发票，流通企业到医疗机构开一次发票。《国务院医改办等八部委印发关于在公立医药机构药品采购中推行“两票制”的实施意见（试行）的通知》中要求在公立医疗机构药品采购中逐步推行“两票制”，在参与药品集中采购的药品企业要在标书中作出执行“两票制”的承诺，否则投标无效；实行其他采购方式采购药品，也必须在采购合同中明确“两票制”的有关要求[4]。在审核时，主要核查承诺书中的

效期和是否加盖公司印章及法人印章。

1.5 印章和随货同行单票样式

印章备案表应包括药品经营企业的所有业务印章，且要清晰。随货同行单票样式应注明药品的相关信息并加盖公司印章。

1.6 质量保证协议书

质量保证协议书是医疗机构和药品经营企业签订的药品质量保证协议，其明确了双方的质量责任，协议书应至少包括以下内容：供货单位应当提供符合规定的资料且对其真实性、有效性负责；供货单位应当按规定开具发票；药品质量应符合相关标准的要求；药品储存、运输的质量保证及责任；药品的包装、标签、说明书等应符合有关规定；质量保证协议的有效期限。

2. 药品经营企业资质材料的归档和维护

药品经营企业资质材料的归档和维护既是医疗机构质量管理的具体要求，也是医疗机构药事管理水平的具体体现。在归档前应先制作归档信息表，以便后期工作人员随时查询和管理。我院在审核药品经营企业资质材料的同时要求企业在药品供应链管理平台上注册，药品经营企业在注册时必须上传资质材料，完成注册后形成药品经营企业的基础数据，待审核后将审核结果通报相关企业和质量管理部门。此外，在每年的药品配送企业资质评价中也将材料的规整度作为重要的考核内容。

3. 讨论

关于如何做好药品经营企业的资质材料审核，此前已有报道进行了总结[5-7]，然而近年来《药品管理法》的修订及相关配套条例、管理办法的发布，使之前的总结不能够符合新的规定（表 1）。如《国务院办公厅关于加快推进“三证合一”登记制度改革的意见》（ 国办发〔2015〕 50 号）中要求，原使用组织机构代码证、税务登记证办理相关事务的，一律改为使用“三证合一”后的营业执照，因此需要对审核时提供组织机构代码证、税务登记证的要求进行修改。国家药监局关于贯彻实施《中华人民共和国药品管理法》有关事项的公告（2019 年第 103 号）中要求，自 2019 年 12 月 1 日起，取消药品 GMP、GSP 认证，不再受理 GMP、GSP 认证申请，不再发放药品 GMP、GSP 证书，因此需要对审核时提供 GSP 证书的要求进行修改。而《印发关于在公立医疗机构药品采购中推行“两票制”的实施意见（试行）的通知》（国医改办发〔2016〕4 号）中要求药品企业作出执行“两票制”的承诺，因此审核时需要企业提供“两票制”承诺书。

表 1 对药品经营企业的资质审核内容变化

文件名称	发布时间	新增修订	对药品经营企业的审核变化
《国务院办公厅关于加快推进“三证合一”登记制度改革的意见》	2015.6	组织机构代码证、税务登记证办更改为三证合一的营业执照	只需要审核营业执照，不再审核组织机构代码证和税务登记证
国家药监局关于贯彻实施《中华人民共和国药品管理法》有关事项的公告	2019.12	取消 GMP/GSP 的认证，不再受理新的申请	不再审核 GSP 证书
印发关于在公立医疗机构药品采购中推行“两票制”的实施意见（试行）的通知	2016.12	要求企业作出执行“两票制”的承诺书	审核药品经营企业签署的“两票制”承诺书

通过对药品相关法律法规的梳理，本文明确了在新形势下对药品经营企业需要审核的资质材料，而通过对药品经营企业建立资料档案能够保证医疗机构采购的药品来源合法、质量可靠。

参考文献

1. 龙星颖, 葛名欢: 药品带量采购背景下配送企业评价管理体系的建立与评估[J] 中国医院药学杂志. 2021, 41(24):2586-2590.
2. 药品经营许可证管理办法 [J] 中华人民共和国国务院公报. 2018(06):32-38.
3. 个体工商户登记管理办法 [J] 中华人民共和国国务院公报. 2012(11):69-73.
4. 国家卫生计生委:在公立医疗机构药品采购中推行“两票制” [J] 中国数字医学. 2017, 12(01):99.
5. 徐德琴, 徐学君, 邹若飞: 医院药品采购中药品经营企业资质档案的建立 [J] 安徽医药. 2008(02):177-178.
6. 张晨曦, 王丹, 佟冬宁, 李侠: 某医院加强药品采购管理的做法 [J] 人民军医. 2016, 59(10):1085-1086.
7. 徐月林, 朱建国: 医院药品供应商分级管理模式的建立与应用 [J] 抗感染药学. 2015, 12(01):84-87.

新冠肺炎疫情下精神专科互联网医院的药学服务实践与处方分析

杜志强，蒋颖，陆荣荣，周勤，沈远，朱浩浩

（无锡市精神卫生中心 药学部 江苏 无锡 214151）

【摘要】目的：研究精神专科互联网医院的药学服务实践，调查分析2022年精神专科互联网医院处方，以保证互联网用药的安全和有效，为同行提供参考。**方法：**收集我院2022年互联网处方1259份，对患者的年龄、性别、互联网处方就诊病种，以及患者开具使用的药物、类型、剂型、用药合理性以及不合理原因等数据进行统计分析。**结果：**精神专科互联网医院电子处方中性别以女性为主（64.50%），女性与男性比例为1.82：1；年龄以中青年为主（57.50%）；其中涉及47个就诊病种；涉及药品品种89种，药品开具频次1938次，其中西药78种，开具频次1876次（96.80%），中成药11种，开具频次62次（3.20%）；主要以抗焦虑抑郁药物（44.94%）、精神药物（42.21%）为主；剂型均为口服剂型，其中占比前三位的是片剂（78.53%）、胶囊（17.54%）、溶液剂（2.17%）；根据处方点评结果统计，互联网系统初审核处方合格率为64.26%，后经互联网系统审核干预，审方药师人工审核后，最终互联网处方合格率达到99.76%。**结论：**精神专科互联网医院药学服务实践与处方分析一方面填补了国内外研究空白，为同行予以借鉴，另一方面，在新冠疫情特殊时期，将药学服务与互联网新技术充分融合，积极促进药学服务模式转型，为药学工作者在抗击疫情中提供新思路，贡献药师力量。

【关键词】新冠肺炎；精神专科；互联网医院；药学服务；处方分析

新型冠状病毒肺炎（Corona Virus Disease 2019，COVID-19，简称“新冠肺炎”）是指由新型冠状病毒所致的新型肺炎，具有传播性快速的特点，疫情期间医院既是防疫控疫工作的第一战场，也是疫情传播的高风险场所。对于精神科慢病患者，不仅存在感染的风险，还存在到医院开药困难，甚至面临停药的危险[1][2]。据我国疾病预防控制局发布关于加强新冠肺炎疫情期间严重精神障碍患者治疗管理工作的通知[3]显示，现共有323例严重精神障碍患者被确诊患新冠肺炎，43例为疑似患新冠肺炎，涉及全国范围17个省份。由于专科性强，大部分精神专科医院未配备内科、传染病科等，存在较高的风险，现阶段 COVID-19 的相关研究主要集中于综合医院，对于精神科疫情相关研究较少。

为了减少疫情期间医院人群聚集和交叉感染的风险，同时能满足患者安全、及时、便利地获得药品，国家卫生健康委员会印发通知，要求各地医疗机构充分发挥“互联网+医疗”的独特优势，完善互联网+药品供应保障服务，即对线上开具的常见病、慢性病处方，经药师审核后，医疗机构、药品经营企业可委托符合条件的第三方机构配送[4]，拓展线上医疗服务空间，缓解疫情传播。疫情期间，我院积极响应，于2021年10月10日开通试运行精神专科互联网医院线上门诊，并于2022年1月1日正式上线运行。本研究中开创性的对我院精神专科互联网医院的药学服务实践与门诊处方情况进行了深入分析，以提高精神专科互联网医院药学服务质量，规范新冠肺炎疫情期间互联网医院的运营，为临床和同行提供参考。

1 资料和方法

通过回顾性分析医院信息系统，调取2022年精神专科互联网医院的门诊电子处方1259份。根据处方内容将患者的年龄、性别、互联网线上就诊病种、处方药物名称、类型、剂型等信息录入Excel表中，并对处方情况，涉及病种分布情况，以及患者开具使用的药物、类型、剂型、用药合理性以及不合理原因等数据进行统计分析。处方用药合理性点评依据《处方管理办法》（原卫生部53号文件）、《医院处方点评管理规范（试行）》（卫医管发［2010］28号）、药品说明书、公开发表的国内外文献及公开出版的书籍等。

2 结果

2.1 精神专科互联网医院电子处方的基本情况

精神专科互联网医院1259张电子处方中，患者性别以女性为主812例（64.50%），男性447例（35.50%），

女性与男性比例为 1.82：1；年龄中以 18-39 岁的中青年为主，有 724 例（57.50%）。结合《医院处方点评管理规范》规定，单张处方药品品种数统计情况基本符合规定，处方以 1 种药品为主，有 702 张（55.76%）。见表 1。

表 1 精神专科互联网医院电子处方的基本情况

基本情况		互联网处方数（张）	占比（%）
性别	女	812	64.50
	男	447	35.50
年龄（岁）	7-17	209	16.60
	18-39	724	57.50
	40-59	231	18.35
	≥60	95	7.55
单张处方品种数（种）	1	702	55.76
	2	453	35.98
	3	89	7.07
	4	12	0.95
	5	3	0.24

2.2 精神专科互联网医院的病种分布情况

我院精神专科互联网医院开具的电子处方均为非初诊、非急诊的复诊用药。1259 张电子处方中共涉及 47 个病种，占比前三位的是焦虑性抑郁症 214 张（17.00%）、焦虑障碍 181 张（14.38%）、抑郁发作 137 张（10.88%）。见表 2。

表 2 处方数量排名前 10 位的病种分布情况

排名	病种	互联网处方数（张）	占比（%）
1	焦虑性抑郁症	214	17.00
2	焦虑障碍	181	14.38
3	抑郁发作	137	10.88
4	精神分裂症	136	10.80
5	复发性抑郁障碍	65	5.16
6	双相情感障碍	65	5.16
7	心境[情感]障碍	57	4.53
8	童年情绪障碍	53	4.21
9	强迫性障碍	52	4.13
10	精神衰弱	40	3.18

2.3 精神专科互联网医院的药品开具频次排名

本次调查的 1259 张精神专科互联网医院电子处方共涉及药品品种 89 种，药品开具频次 1938 次，未涉及国家特殊管理规定的麻醉、一类、二类精神药品，以及高危、高风险药品。互联网药品开具频次排名前 10 位的药品为富马酸喹硫平片（9.39%）、草酸艾司西酞普兰片（8.10%）、奥氮平片（7.59%）、盐酸度洛西汀肠溶胶囊（7.33%）、盐酸文拉法辛缓释胶囊（4.64%）、米氮平片（4.33%）、马来酸氟伏沙明片（4.23%）、阿立哌唑片（4.18%）、盐酸舍曲林片（4.08%）、阿戈美拉汀片（3.46%）。见表 3。

表 3 电子处方开具频次排名前 10 位的药物应用情况

排名	药品名称	开具频次（次）	占比（%）
1	富马酸喹硫平片	182	9.39
2	草酸艾司西酞普兰片	157	8.10
3	奥氮平片	147	7.59
4	盐酸度洛西汀肠溶胶囊	142	7.33
5	盐酸文拉法辛缓释胶囊	90	4.64
6	米氮平片	84	4.33
7	马来酸氟伏沙明片	82	4.23
8	阿立哌唑片	81	4.18
9	盐酸舍曲林片	79	4.08
10	阿戈美拉汀片	67	3.46

2.4 精神专科互联网医院药品类型分布情况

本次调查的精神专科互联网医院电子处方开具药品品种中，共涉及西药 78 种，开具频次 1876 次（96.80%）；中成药 11 种，开具频次 62 次（3.20%）。主要以抗焦虑抑郁药物 871（44.94%）、精神药物 818（42.21%）为主。见表 4。

表 4 精神专科互联网医院药品类型分布情况

类型	开具频次（次）	占比（%）
西药	1876	96.80
抗焦虑抑郁药物	871	44.94
精神药物	818	42.21
抗癫痫药物	104	5.37
抗痴呆药物	21	1.08
抗血小板药物	12	0.62
扩血管药物	9	0.46
抗胆碱能药物	9	0.46
通便药物	7	0.36
抗贫血药物	5	0.26
降糖药物	5	0.26
降压药物	4	0.21
维生素药物	3	0.15
保肝药物	3	0.15
心血管药物	2	0.10
抗菌药物	2	0.10
甲状腺激素类药物	1	0.05
中成药	62	3.20
安神助眠类	55	2.84
补血理气类	3	0.15
活血祛瘀类	3	0.15
清肝利胆类	1	0.05

2.5 精神专科互联网医院药品剂型分布情况

开具的精神专科互联网医院药品剂型均为口服剂型，其中占比前三位的是片剂 1522 次（78.53%），胶囊 340 次（17.54%），溶液剂 42 次（2.17%）。见表 5。

表 5 精神专科互联网医院药品剂型分布情况

药物剂型	开具频次（次）	占比（%）
片剂	1522	78.53
胶囊	340	17.54
溶液剂	42	2.17
颗粒	26	1.34
栓剂	7	0.36
丸剂	1	0.05
总计	1938	100.00

2.6 精神专科互联网医院处方不合理用药情况

根据处方点评结果统计，开具的 1259 张互联网电子处方中，互联网系统判定不合理有 450 张（35.74%），不合理用药类型有超适应证用药 254 张（20.17%）、特殊人群用药问题 130 张（10.33%）、存在相互作用 60 张（4.77%）、用法用量不当 6 张（0.48%）。经过互联网审方系统初审以及药师干预，经医生签字确认后，最经药师审核互联网处方不合理处方共 3 张，占总处方数的 0.24%，主要问题是：存在药物相互作用 2 张（0.16%），超适应症 1 张（0.08%）。见表 6。

表 6 精神专科互联网医院处方不合理用药情况

不合理用药类型	互联网判定不合理（张）	占比（%）	药师判定不合理（张）	占比（%）
超适应症	254	20.17	1	0.08
特殊人群用药问题	130	10.33	0	0.00
存在相互作用	60	4.77	2	0.16
用法用量不当	6	0.48	0	0.00
总计	450	35.74	3	0.24

3 讨论

3.1 精神专科互联网医院电子处方情况分析

本研究调查发现，疫情期间精神专科互联网医院电子处方中患者性别以女性为主（64.50%），女性与男性比例为 1.82：1；既往有研究显示，女性比男性负性情绪的发生率高[5][6]，并且女性在抑郁发作、复发性抑郁障碍、焦虑障碍等精神疾病的占比显著高于男性[7]。本研究发现患者年龄主要以 18-39 岁的中青年为主（57.50%），有研究证明，精神抑郁患者年龄分布中青年组病例数最多[8]，同时中青年相比于老年人进行互联网线上咨询频率更高，更方便。根据《医院处方点评管理规范》规定，本研究中精神专科互联网医院电子单张处方药品品种数统计情况基本符合规定，处方以 1 种药品为主（55.76%）。

我院精神专科互联网医院主要提供非初诊、非急诊的精神疾病复诊及慢病续方服务。本研究发现,我院互联网电子处方共涉及 47 个病种，占比前三位的是焦虑性抑郁症（17.00%）、焦虑障碍（14.38%）、抑郁发作（10.88%）。既往研究表明，突发公共卫生事件导致的社会经济状态和生活模式的改变，易导致民众出现抑郁、焦虑等不同程度的心理问题[9]。新冠疫情期间，为控制疫情发展，全国各地采取停工、停学和小区封闭式管理等限制活动的措施，由于医学隔离或者封闭在家，导致民众日常生活作息被打乱，担心在隔离或者患病期间影响工作或者家

庭，存在巨大心理压力，抑郁焦虑情绪明显[10]，而精神疾病患者往往会更容易发病，精神专科互联网能帮助其降低线下就诊交叉感染的风险，便于其咨询以及管理用药方案，进行用药指导。

3.2 精神专科互联网医院电子处方药品情况分析

药品目录应以满足精神专科互联网医院诊疗常见疾病、慢性病需求为原则，对于个别用药风险较高、需要进行个体化用药指导的药品，不得进入目录[11]。本研究调查的 1259 张精神专科互联网医院电子处方共涉及药品品种 89 种，药品开具频次 1938 次，其中西药 78 种，开具频次 1876 次（96.80%），中成药 11 种，开具频次 62 次（3.20%），未涉及国家特殊管理规定的麻醉、一类、二类精神药品，以及高危、高风险药品。

互联网药品开具频次排名前 10 位的药品有富马酸喹硫平片（9.39%）、草酸艾司西酞普兰片（8.10%）、奥氮平片（7.59%）、盐酸度洛西汀肠溶胶囊（7.33%）、盐酸文拉法辛缓释胶囊（4.64%）、米氮平片（4.33%）、马来酸氟伏沙明片（4.23%）、阿立哌唑片（4.18%）、盐酸舍曲林片（4.08%）、阿戈美拉汀片（3.46%）；主要以抗焦虑抑郁药物（44.94%）和精神药物（42.21%）为主。疫情期间，生活压力以及社会压力不断上升，人们的精神压力增大的同时，抑郁症、双相情感障碍等精神疾病的发病率不断上升，需要抗焦虑抑郁药物和抗精神病药物进行治疗[12][13]。

本研究发现，开具的精神专科互联网医院药品剂型均为口服剂型，其中占比前三位的是片剂（78.53%），胶囊（17.54%），溶液剂（2.17%）；由于我院为精神专科医院，门诊使用药物主要为口服的精神病类药物，注射剂使用率较低，另外，对于配送条件要求高的药品，如注射剂、冷链贮存药品尚未列入互联网线上配送药物目录，目前只可限患者去医院自取。

3.3 精神专科互联网医院电子处方药品点评结果分析

精神专科互联网医院电子处方开具后，互联网系统根据审方药师按相关法律、法规、技术规范等提前制定的审方规则，先初审，初审不合理处方互联网系统反馈提醒医生，医生修改或补充后，再提交给系统，审方药师进行实时在线审方。本研究发现，互联网系统初审核处方合格率为 64.26%，后经互联网系统审核干预，审方药师人工审核后，最终互联网处方合格率达到 99.76%。表明，一方面，精神科专科互联网医院药品使用基本合理，但仍存在不合理用药情况，用药管理有待加强；另一方面，互联网系统初审可以提醒医生不合理处方及原因，再审方药师干预让医生能完善处方或给出解释理由，干预后可以有效避免大多数不合理处方，大大提高处方合格率，促进患者安全合理用药，提高了医院互联网医疗系统的药学服务质量。

我院互联网系统初审判定不合理用药类型主要以超适应证用药（20.17 %）、特殊人群用药问题（10.33%）为主。对于精神专科互联网医院存在的超适应证用药、特殊人群用药、存在相互作用、用法用量不当等问题，可以采取相应措施，建立可行的互联网电子处方审查制度，严格遵循相关制度的规定，保证每一张电子处方的准确性和有效性[14]；在电子处方在开具过程中，持续更新维护互联网处方审核系统，在互联网进行初步处方审核筛选，医生开具处方时若出现超适应证、用药剂量、药品不对症、相互作用等，系统出现警报，以降低不合理处方的发生[15]。

4 结语

精神专科互联网医院改变了疫情期间患者的传统就医流程，实现了医疗服务人性化、个性化、高效化，带来医患共赢局面的同时，也开创了医疗信息化新局面。

针对新冠肺炎疫情下精神专科互联网医院的药学服务实践与电子处方情况分析，以及对使用的药品品种、类型、剂型，以及使用情况等应用特征分析，一方面填补了国内外研究空白，为同行予以借鉴。另一方面，能够提升精神专科互联网医院药学服务质量，与此同时后续还可以延伸药学服务，由临床药师对互联网就诊开药患者进行线上回访、监测其药品不良反应等药事服务工作。在全国上下众志成城、共克时艰的特殊时期，药学人员应在做好自身防护措施的同时，将药学服务与互联网新技术、新理念充分融合，积极促进药学服务模式转型，为药学工作者在抗击疫情中提供新思路，为取得疫情防控阻击战的全面胜利贡献力量。

参考文献

[1] 李琳,宋士卒.新型冠状病毒肺炎疫情期间互联网药学服务实践与研究[J].中国药业,2020,29(08):18-20.

[2] 高洋洋,徐珽,金朝辉,等.新冠肺炎疫情期间基于互联网医药模式的门诊药学服务实践与探讨[J].中国医院药学杂志,2020,40(06):606-611.DOI:10.13286/j.1001-5213.2020.06.02.

[3] 国家卫生健康委员会疾病预防控制局.关于加强新冠肺炎疫情期间严重精神障碍患者治疗管理工作的通知[EB/OL].[2020-02-18].http://www.nhc.gov.cn/kj/s3577/202002/f315a6bb2955474c8ca0b33b0c356a32.shtml.

[4] 国务院办公厅.国务院办公厅关于促进“互联网+医疗健康”发展的意见[EB/OL].(2018-04-28)[2020-11-18].http://www.gov.cn/zhengce/content/201804/28/content_5286645.htm.

[5] 罗芳,罗丹,王彬,等.新型冠状病毒肺炎疫情期间湖北非武汉地区居民焦虑和抑郁状况及其影响因素[J].中华疾病控制杂志,2020,24(06):643-648.DOI:10.16462/j.cnki.zhjbkz.2020.06.005.

[6] 王丽,张晓,高杰.我国成年居民心理健康状况及影响因素分析[J].中国公共卫生,2019,35(05):579-582.

[7] 王冰倩.北京市某精神专科医院住院患者特点与管理对策建议[J].医院管理论坛,2021,38(02):32-36.

[8] 刘真文,彭静,等.住院流浪精神病患者流行病学特征分析[J].内科,2018,13(03):417-418+433.DOI:10.16121/j.cnki.cn45-1347/r.2018.03.46.

[9] Kim HC,Yoo SY,Lee BH,et al.Psychiatric findings in suspected and confirmed middle east respiratory syndrome patients quarantined in hospital:a retrospective chart analysis[J].Psychiatry Investig,2018,15(4):355-360.

[10] 李伟,张彩迪,等.新型冠状病毒肺炎疫情期间不同人群心理状态的 Meta 分析[J].同济大学学报(医学版),2020,41(02):147-154.DOI:10.16118/j.1008-0392.2020.02.002.

[11] 广东省药学会.互联网医院处方流转平台规范化管理专家共识[J].今日药学,2020,30(11):721-727.

[12] 罗晓东,邵文良,盛巍,朱逸霞.精神科门诊不合理用药问题分析与管理对策[J].中医药管理杂志,2021,29(08):80-82.DOI:10.16690/j.cnki.1007-9203.2021.08.039.

[13] 程程,朱春燕.三级甲等精神病院门诊口服第二类精神药品现状分析[J].中国现代医生,2021,59(05):149-153.

[14] 易媛,黎佳瑜.某精神专科医院精神病药品门诊处方 100 张分析[J].系统医学,2021,6(24):187-189+198.DOI:10.19368/j.cnki.2096-1782.2021.24.187.

[15] 杨琪,果伟,刘珊珊.药品带量采购对某医院抗精神病药原研药和仿制药使用情况影响[J].中国医院药学杂志,2021,41(04):400-403+418.DOI:10.13286/j.1001-5213.2021.04.13.

精神专科医院药物滥用监测工作的探索与实践

杜志强，蒋颖，朱浩浩，周勤，沈远

（无锡市精神卫生中心，江苏无锡 214151）

【摘要】目的：构建精神专科医院药物滥用监测模式，并探讨其可行性。**方法：**成立药物滥用监测工作小组，制定药物滥用监测工作制度，建立医、药、护诊疗时主动实时监测模式、药师利用药物浓度检测技术主动实时监测模式、检验科进行滥用毒品筛查时异常结果主动实时监测模式，以及建立医院信息系统药物滥用回顾性分析监测模式，分析实施效果。**结果：**2021 年上报的有效药物滥用数量为 35 例，较去年被动监测模式下的 2 例，上报数量增加明显；其中，医、药、护诊疗时主动实时监测模式收集药物滥用 21 例，占 60.00%；药师利用药物浓度检测技术主动实时监测收集 3 例，占 8.57%；检验科进行滥用毒品筛查时异常结果主动实时监测收集 5 例，占 14.29%；医院信息系统药物滥用回顾性分析监测收集 6 例，占 17.14%；研究发现药物滥用中男性 14 例，占 40.00%，女性 21 例，占 60.00%，以≤18 岁青少年居多，为 12 例，占 34.29%；滥用二类精神药品居多，有 27 例，占 77.14%。**结论：**本研究所构建的四者相结合的药物滥用监测工作模式可有效改善药物滥用监测工作，为上级监管部门提供麻醉、精神药品等监管的依据。

【关键词】精神专科医院；药物滥用监测模式；药物浓度检测技术；滥用毒品筛查；医院信息系统；药物滥用回顾性分析

药物滥用是指与医疗目的无关，反复、大量地使用具有依赖性的药物，通过自身给药的方式，导致产生身体依赖性或精神依赖性，造成精神混乱以及产生异常行为，其后果除损害身体健康外，还带来严重的社会问题[1]。药物滥用监测作为疾病监测的一个组成部分，同其他公共卫生监测既有联系又有区别。其特点是对人群中麻醉药品和精神药品使用和滥用情况进行长期连续、系统地观察、调查并收集资料，及时发现麻醉药品、精神药品流弊和滥用问题，及时掌握药物滥用现状、动态分布、滥用者的人口学特征、滥用麻醉药品和精神药品的种类、滥用方式和可能的发展趋势，分析、确定各地区乃至全国药物滥用基本情况，为麻醉药品、精神药品的科学管理和禁毒工作提供科学依据[2]。

我国药物滥用监测方法主要有被动监测与主动监测两种，目前仍以被动监测为主，逐渐转向主动监测。根据“十三五”国家药品安全规划，2020 年底在全国范围内遴选了 100 家精神疾病专科医疗机构及综合医疗机构设立药物滥用监测哨点，开展药物滥用主动监测[3]。

有一项针对我国 12 个省 36 所监测机构的 37 名工作人员和 61 所医疗机构的 358 名医务人员的研究得出结论，超过 83.8%的被调查对象认为应在精神专科医院开展药物滥用监测工作[4]。精神专科医院作为精神药品使用的重要场所，同时也是精神活性物质滥用患者身心健康受到损害所致障碍后就诊的场所，在精神专科医院开展药物滥用监测工作可以更方便地收集特殊人群精神药品的滥用情况，通过对药品滥用数据及时、准确和有效的分析和评估，进行预报和预警，为精神专科医院、精神药物的科学管理工作提供服务。

目前在我国尚无精神专科医院药物滥用监测体系，因此，探讨与实践我国精神专科医院药物滥用监测工作模式，能提供建立我国精神药品监管所需要的技术体系，能更全面、准确地反映精神药物滥用的趋势和风险，便于国家药品监管政策的及时调整。

我院无锡市精神卫生中心自 2020 年起加入国家药物滥用监测哨点医院，2020 年采用被动监测模式。2021 年通过建立精神专科医院药物滥用监测工作小组，制定并完善药物滥用监测工作制度，梳理本院药物滥用监测重点品种，逐步探索与实践出以医、药、护诊疗时主动实时监测、药师利用药物浓度检测技术主动实时监测、检验科进行滥用毒品筛查时异常结果主动实时监测、以及医院信息系统药物滥用回顾性分析四者相结合的的药物滥用监测工作模式。该模式创新性的将人、信息系统与药学检验新技术三者联系在一起，可为全国精神专科医院药物滥用监测工作的开展提供新的思路。

1 成立药物滥用监测工作小组与制定药物滥用监测工作制度

我院自 2020 年起加入国家药物滥用监测哨点医院，医院领导高度重视药物滥用监测工作，经过对全院前期

的调查研究，于 2021 年成立了以药学分管院长为组长，由药学部、医务处、护理部、门诊部、检验科、信息科、临床科室科主任等组成的药物滥用监测工作小组；在各临床科室、门诊部、护理部、药学部设立专门的药物滥用监测联络员，并制订了联络员职责、药物滥用监测上报制度。由药学部临床药学室具体负责全院药物滥用监测工作的管理，指定 1 名临床药师负责报告的审核、上报和分析等工作，最后再反馈给定点科室的临床医师与药师，对该科室上报的药物滥用患者进行临床处理与监护，确保患者的用药安全。

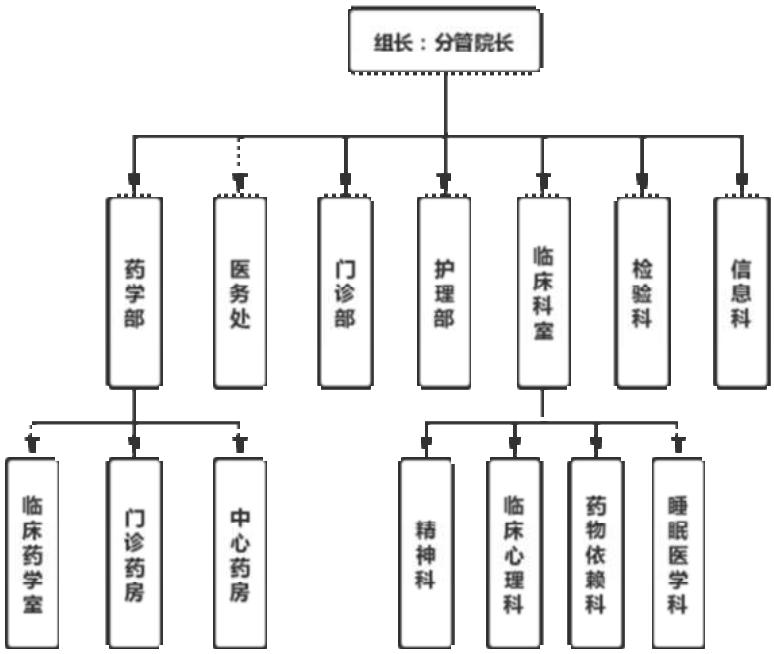


图 1 我院药物滥用监测工作小组组织架构

2 确定药物滥用诊断标准与监测品种

药物滥用的诊断标准参照世界卫生组织制定的标准[5]：持续或间断地过分使用药物，此用药行为与合理的医疗用途无关或相矛盾。

针对我院药物滥用监测工作前期的调研，并结合我院药品目录进行系统地梳理，列出了全部的监测品种，共 3 大类，16 种。包括二类精神药品如奥沙西泮、舒乐安定、佐匹克隆等；毒品如冰毒、海洛因等；含有精神活性物质的复方制剂如复方氨酚烷胺胶囊、复方对乙酰氨基酚片、氨麻美敏片等。

表 1 我院药物滥用监测品种

药物类别	具体药物
二类精神药品	奥沙西泮、佐匹克隆、佑佐匹克隆、唑吡坦、氯硝西泮、劳拉西泮、阿普唑仑、舒乐安定、地西泮
毒品	冰毒、海洛因、K 粉、摇头丸
含有精神活性物质的复方制剂	复方氨酚烷胺胶囊、复方对乙酰氨基酚片、氨麻美敏片

3 建立药物滥用监测工作模式

3.1 建立药物滥用主动实时监测工作模式

建立药物滥用主动实时监测工作模式。一是建立医、药、护诊疗时主动实时监测模式；在医生、护士、药师门诊与住院日常诊疗、咨询和处方审核中发现怀疑药物滥用的患者，及时通知药物滥用监测联络员，对患者进行详细询问，确认之后及时收集、整理患者药物滥用信息，并通过医院 OA 信息系统填写药物滥用调查表上报。二是建立药师利用药物浓度检测技术主动实时监测模式；一方面是在药师日常进行药物浓度监测时，发现我院药物滥用监测品种中所涉及的药物浓度异常偏高的患者；另一方面是对诊疗时有隐瞒情况的可疑患者，药师利用药物浓度检测技术对其可疑药物进行浓度检测，确定结果是否异常偏高；针对异常结果均及时通知药物滥用监测联络员，对患者进行详细调查询问，确认之后及时收集、整理患者药物滥用信息，并通过医院 OA 信息系统填写药物滥用调查表上报。三是建立检验科滥用毒品筛查时异常结果主动实时监测模式；在进行滥用毒品筛查发现阳性结果时，及时通知药物滥用监测联络员，对患者进行详细调查询问，确认之后及时收集、整理患者药物滥用信息，并通过医院 OA 信息系统填写药物滥用调查表上报。

最后由临床药师负责报告的审核，核实确认后上报国家药物不良反应监测中心，同时分析反馈给定点科室、部门的临床医师与药师，对该科室上报的药物滥用患者进行临床干预、处理与监护，确保患者的用药安全。

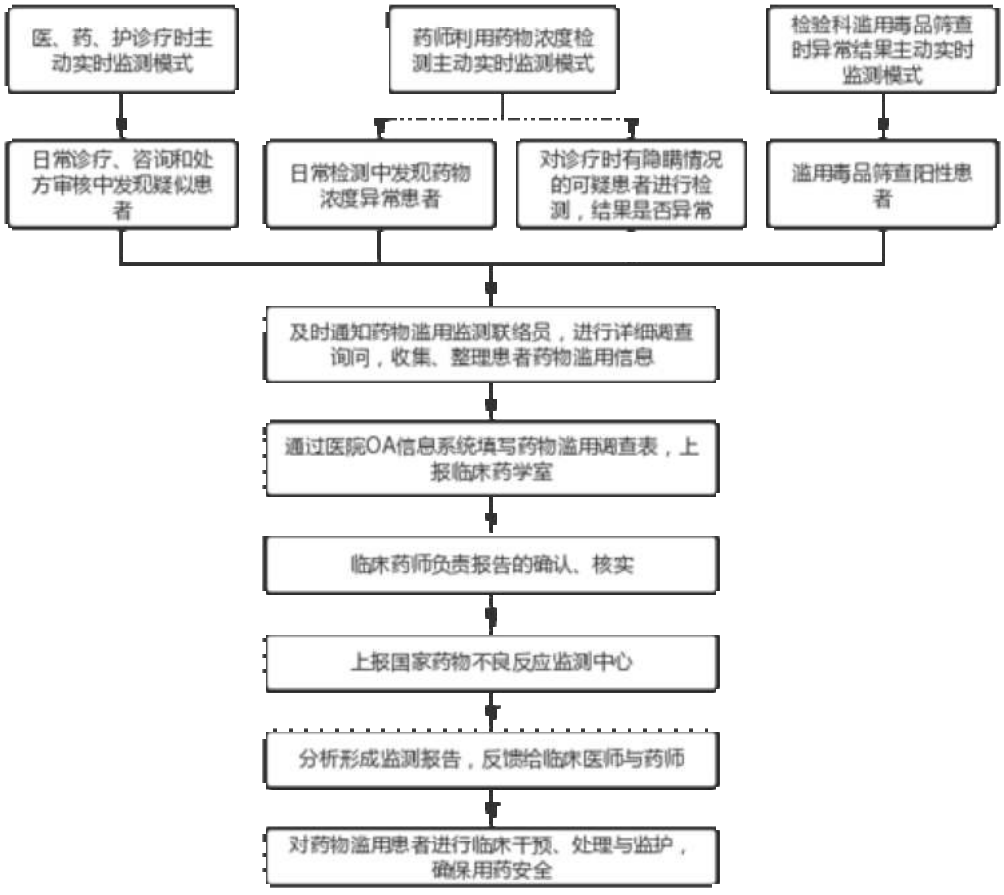


图 2 我院药物滥用主动实时监测工作模式上报流程

3.2 建立医院信息系统药物滥用回顾性分析监测工作模式

药师联合医院信息科建立医院信息系统药物滥用回顾性分析监测模式，是对主动实时监测模式的补充，补充了在实时监测中漏报的患者，能极大地覆盖医院医疗各个关键点，促进药物滥用监测工作的有效开展。

针对门诊患者，通过每季度导出医院信息系统数据，数据包括门诊患者性别、年龄、诊断等基本信息，以及门诊就诊处方次数、药品用法用量、用药天数、药品费用等，利用 EXCEL 筛除已主动实时监测上报的患者，

再以药物滥用监测目录内的药品为筛选项，对门诊就诊处方用药次数≥3 次、用量超说明书、用药周期异常的患者进行重点回访、跟踪调查，了解用药情况，确认患者是否存在药物依赖问题，对符合上报标准的，及时上报国家药品不良反应监测中心[6]，并进行干预，指导合理用药。

针对住院患者，以使用药物滥用监测目录内的药品较多的科室（精神科、临床心理科、药物依赖科、睡眠医学科）为重点监测科室，通过每季度导出医院信息系统数据，调取药物滥用监测目录内的药品使用情况、用药频次、用量，以及患者既往用药史、是否有吸毒史等，筛选药物滥用可疑患者，筛除已主动实时监测上报的患者，然后进行电话随访，跟踪调查，确认患者是否存在药物滥用问题，对符合上报标准的，及时上报国家药品不良反应监测中心，并进行干预，指导合理用药。而对于我院使用药物滥用监测目录内的药品较少的科室，目前设置为一般监测科室，每半年进行医院信息系统数据筛选监测。

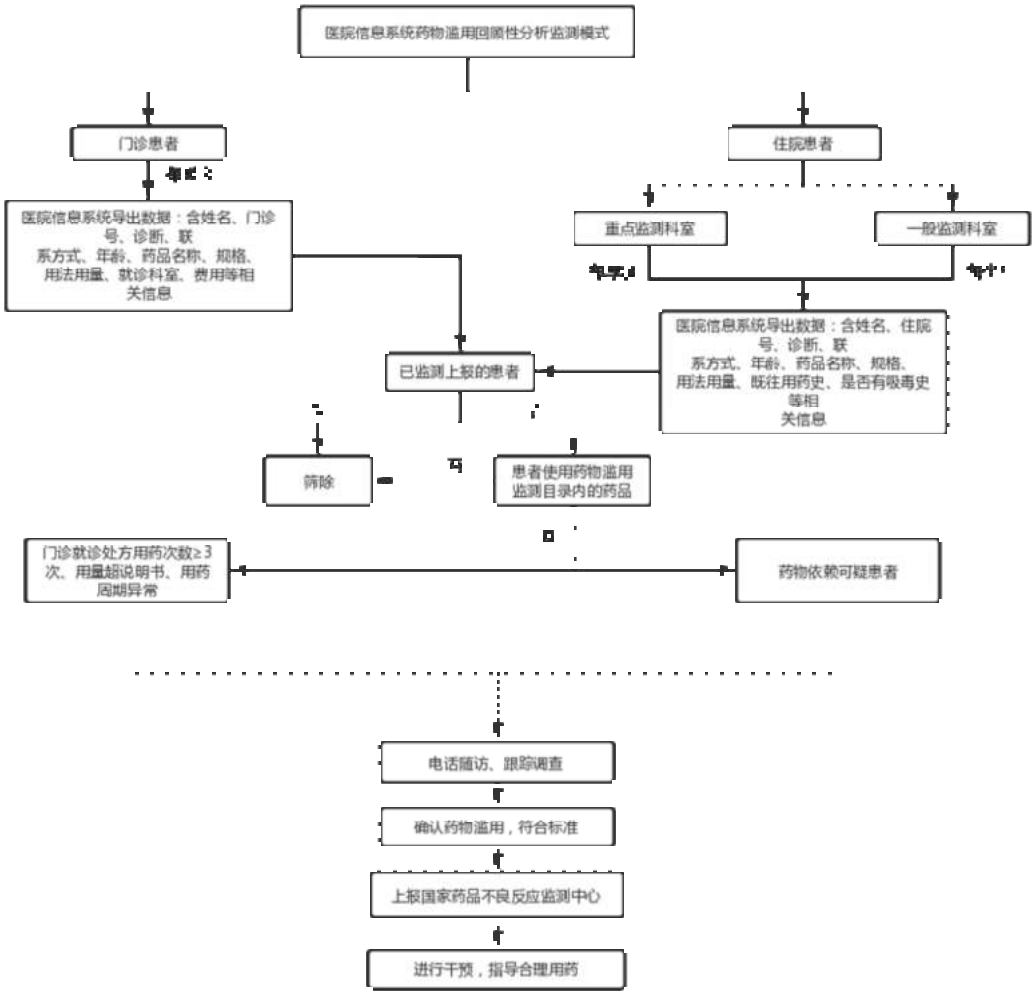


图 3 我院信息系统药物滥用回顾性分析监测模式上报流程

Descriptive statistics were used. Data was inputted to EpiData 3.1 software and statistical analyzed through SPSS 20.0. The counting data was described as the number of cases (composition ratio), and the measurement data was described by x±s.

4.分析我院药物滥用监测工作结果

4.1 新药物滥用监测模式上报数量提升明显

我院建立的新药物滥用监测工作模式，是通过医、药、护诊疗时主动实时监测、药师利用药物浓度检测技

术主动实时监测、检验科进行滥用毒品筛查时异常结果主动实时监测，三种主动实时监测模式与医院信息系统药物滥用回顾性分析监测模式相结合的工作模式。

我院新的药物滥用监测模式与去年被动监测模式对比，2021 年上报的有效药物滥用数量为 35 例，较去年被动监测模式下的 2 例，上报数量增加明显。其中，医、药、护诊疗时主动实时监测模式监测出药物滥用 21 例，占 60.00%；药师利用药物浓度检测主动实时监测出药物滥用 3 例，占 8.57%；检验科进行滥用毒品筛查时异常结果实时监测出药物滥用 5 例，占 14.29%；医院信息系统药物滥用回顾性分析监测出药物滥用 6 例，占 17.14%。

经实践证明，通过该监测模式不仅能发挥医、药、护、检验部门监测的主动性，还能通过药物浓度检测技术、毒品滥用筛查技术、信息系统回顾性分析来弥补可能因工作繁忙、患者隐瞒等原因导致的漏报问题，做到覆盖本院出现的全部药物滥用可疑患者；同时还能利用医、护、药、检验、信息等各自的专业特长与优势做到工作互补，共同促进医院各部门之间良好的沟通与协作。

表 2 2021 年我院新药物滥用监测模式上报情况

药物滥用监测模式	例数/n	构成比/%
医、药、护诊疗时主动实时监测模式监测	21	60.00%
药师利用药物浓度检测主动实时监测	3	8.57%
检验科进行滥用毒品筛查时异常结果实时监测	5	14.29%
医院信息系统药物滥用回顾性分析监测	6	17.14%

4.2 分析药物滥用监测患者信息，提前提高预警

通过我院开展的新药物滥用监测工作模式发现，药物滥用中男性 14 例，占 40.00%；女性 21 例，占 60.00%，女性高于男性。年龄分布在 13-82 岁，其中以≤18 岁青少年居多，为 12 例，占 34.29%，均为滥用二类精神药品，用于缓解烦恼、抑郁情绪。

随着社会发展以及青少年学业压力增加，越来越多的青少年患有焦虑、抑郁、失眠等问题，往往需要服用二类精神药品治疗；而来自青少年自身（如好奇心、追求刺激、缓解抑郁情绪、缓解压力）、朋辈（如亚文化）、家庭（如教养方式）、学校（如预防教育）和社会（如地理、文化及毒品可及性因素）等各方面因素的影响[7]，容易导致青少年对此类药物滥用。通过药物滥用监测工作，能够提前提高预警，及时关注、发现、解决、预防青少年潜在的用药问题。并且药师根据监测结果能够有选择性地重点关注青少年使用的二类精神药品，从适应证、用法用量、不良反应、成瘾性危害等方面提供药学服务，加强青少年对该类药物的认识，并督促其父母等监护人加强对药品的监管，更好地保障青少年患者用药安全、有效、合理。

表 3 2021 年我院药物滥用监测患者信息

项目	例数/n	构成比/%
性别		
男性	14	40.00%
女性	21	60.00%
年龄分布		
≤18	12	34.29%
19-25	6	17.14%
25-35	3	8.57%
35-45	3	8.57%
45-55	6	17.14%
55-65	4	11.43%
＞65	1	2.86%

4.3 分析药物滥用监测药物分布情况，及时干预，促进合理用药

通过药物滥用监测发现，35 例药物滥用患者主要以二类精神药品为主，有 27 例，占 77.14%；其次是毒品和含有精神活性物质的复方制剂，各有 4 例，占 11.43%。其中苯二氮䓬类药品最多，有奥沙西泮、氯硝西泮等。

苯二氮䓬类药品主要通过作用于苯二氮䓬类受体-$GABA_A$ 受体-Cl^-通道复合物上的 BZ 受体，引起 $GABA_A$ 受体构型改变，增加了 GABA 与 $GABA_A$ 受体的亲和力，从而增加氯离子通道开放的频率和数量，降低神经元的兴奋性[8]。但是在苯二氮䓬类药物的使用过程中，逐渐发现该类药物的使用限制，如用药后白天出现宿醉现象、记忆损害、对认知和精神运动功能的损害，大剂量使用可能出现戒断症状和反跳性失眠，长期使用出现药物耐受的风险[9]。对于已发现滥用苯二氮䓬类药品的患者，及时地进行用药指导与干预，根据患者情况逐渐减量并停用，或换用成瘾性小的替代药物。通过我院药物滥用监测工作，可重点监管滥用比例高的苯二氮䓬类药品，从而促进患者合理用药。

此外，对于发现的滥用毒品患者，确认后立即上报公安机关及政府监管部门，及时采取防范措施处理，规避风险。对于容易被忽视的含有精神活性物质的复方制剂滥用，通过监测患者用药情况和用药中的潜在安全因素，来解决患者药物用法不当、用量过大、随意用药等问题，并及时干预，指导临床合理用药。

表 4 2021 年我院药物滥用监测药物分布

药物	例数/n	构成比/%
二类精神药品	27	77.14%
奥沙西泮	7	20.00%
氯硝西泮	7	20.00%
舒乐安定	5	14.29%
佐匹克隆	3	8.57%
劳拉西泮	2	5.71%
唑吡坦	1	2.86%
地西泮	1	2.86%
硝西泮	1	2.86%
毒品	4	11.43%
冰毒	2	5.71%
海洛因	1	2.86%
K 粉	1	2.86%
含有精神活性物质的复方制剂	4	11.43%
复方氨酚烷胺胶囊	2	5.71%
复方对乙酰氨基酚片	1	2.86%
氨麻美敏片	1	2.86%

5 讨论与总结

目前我国缺少开展药物滥用监测工作完整的法律法规体系、明确的组织框架机构和职能职责及人员经费保障[10]。随着国家对药物滥用监测越来越重视，在全国范围内遴选了 100 家医疗机构设立药物滥用监测哨点，开始逐渐建立和完善药物滥用监测法规体系、组织框架机构和职能职责，建立相关工作制度、规范和技术标准等。

我院作为精神专科医院，是国内首家探索和开展精神专科医院药物滥用监测工作模式的医疗机构，目前尚属于起步阶段，国内外无固定的模式可参考。虽然目前成立了药物滥用监测机构小组，制定了药物滥用监测工作制度，建立了医、药、护诊疗时主动实时监测模式、药师利用药物浓度检测主动实时监测模式、检验科进行滥用毒品筛查时异常结果主动实时监测模式，以及医院信息系统药物滥用回顾性分析监测模式，四种监测模式相结合的药物滥用监测工作模式。但是还存在着许多挑战，一方面需要长期、连续和系统地开展和完善监测工

作模式与制度；另一方面，还需要通过追溯滥用药物的来源，发现监管的薄弱环节，加强对某些药品的生产、储存和流通环节的监管[11]。

除此之外，开展药物滥用监测工作需大量经费的投入，建立相应的奖励机制，提高相关人员参与的积极性，鼓励积极参与药物滥用监测工作信息收集和分析。还需要提高药物滥用监测报告上报质量，积极加大宣传药物滥用监测工作，开展培训，提高医师、护理人员、药学人员、检验人员、信息科工作人员等对此工作的知晓率，形成了人人参与监测和自觉报告的良好局面。同时积极宣传药物滥用监测相关知识，优化监测人员的知识结构，推动我院药物滥用监测工作的开展与业务水平的提高。

虽然有很多实际困难，但是我认为精神专科医院有必要开展药物滥用监测工作，其逐渐完善的药物滥用监测模式不仅能提高医院的监测和报告意识，显著降低漏报率，还能及时、有效地收集药物滥用相关资料、发现滥用问题及风险、掌握滥用毒品种类及现状特征，用来分析、确定地区乃至全国药物滥用的流行趋势，为上级监管部门提供麻醉、精神药品等监管的依据，并且对疾病控制具有重要意义。

现阶段药物滥用问题越来越引起全世界的重视，其不但对公共卫生造成很大危害，同时也是影响社会安全的重要因素［2］。药物滥用监测是国家了解药物滥用信息和维护公共安全不可缺少的重要工作［3-4］。目前我国缺少开展药物滥用监测工作完整的法律法规体系、明确的组织框架机构和职能职责及人员经费保障[10]。随着国家对药物滥用监测越来越重视，在全国范围内遴选了 100 家医疗机构设立药物滥用监测哨点，开始逐渐建立和完善药物滥用监测法规体系、组织框架机构和职能职责，建立相关工作制度、规范和技术标准等。

我院作为精神专科医院，是国内首家探索和开展精神专科医院药物滥用监测工作模式的医疗机构，目前尚属于起步阶段，国内外无固定的模式可参考。尽管如此，本研究所建立的药物滥用监测模式不仅能发挥医、药、护、检验部门监测的主动性，还能通过药物浓度检测技术、毒品滥用筛查技术、信息系统回顾性分析来弥补可能因工作繁忙、患者隐瞒等原因导致的漏报问题，做到覆盖本院出现的全部药物滥用可疑患者；同时还能利用医、护、药、检验、信息等各自的专业特长与优势做到工作互补，共同促进医院各部门之间良好的沟通与协作。但是还存在着许多挑战，一方面需要长期、连续和系统地开展和完善监测工作模式与制度；另一方面，还需要通过追溯滥用药物的来源，发现监管的薄弱环节，加强对某些药品的生产、储存和流通环节的监管[11]。

随着社会发展以及青少年学业压力增加，越来越多的青少年患有焦虑、抑郁、失眠等问题，往往需要服用二类精神药品治疗；而来自青少年自身（如好奇心、追求刺激、缓解抑郁情绪、缓解压力）、朋辈（如亚文化）、家庭（如教养方式）、学校（如预防教育）和社会（如地理、文化及毒品可及性因素）等各方面因素的影响[7]，容易导致青少年对此类药物滥用。通过药物滥用监测工作，能够提前提高预警，及时关注、发现、解决、预防青少年潜在的用药问题。并且药师根据监测结果能够有选择性地重点关注青少年使用的二类精神药品，从适应证、用法用量、不良反应、成瘾性危害等方面提供药学服务，加强青少年对该类药物的认识，并督促其父母等监护人加强对药品的监管，更好地保障青少年患者用药安全、有效、合理。

苯二氮䓬类药品主要通过作用于苯二氮䓬类受体-$GABA_A$ 受体-Cl^-通道复合物上的 BZ 受体，引起 $GABA_A$ 受体构型改变，增加了 GABA 与 $GABA_A$ 受体的亲和力，从而增加氯离子通道开放的频率和数量，降低神经元的兴奋性[8]。但是在苯二氮䓬类药物的使用过程中，逐渐发现该类药物的使用限制，如用药后白天出现宿醉现象、记忆损害、对认知和精神运动功能的损害，大剂量使用可能出现戒断症状和反跳性失眠，长期使用出现药物耐受的风险[9]。对于已发现滥用苯二氮䓬类药品的患者，及时地进行用药指导与干预，根据患者情况逐渐减量并停用，或换用成瘾性小的替代药物。通过我院药物滥用监测工作，可重点监管滥用比例高的苯二氮䓬类药品，从而促进患者合理用药。

尽管本研究所构建药物滥用监测模式可有效将人、信息系统与药学检验新技术三者联系在一起，提高药物滥用报告率，然而，本研究仍存在一定的缺陷：未建立相关奖励机制，人员参与积极性有待提高；药物滥用相关知识宣传不足，导致监测报告上报质量不一等。后续研究将进一步完善药物滥用监测模式并进行推广应用，以提高医院的监测和报告意识，降低漏报率，及时、有效地收集药物滥用相关资料、发现滥用问题及风险、掌握滥用毒品种类及现状特征，用来分析、确定地区乃至全国药物滥用的流行趋势，为上级监管部门提供麻醉、精神药品等监管的依据。

参考文献：

[1] 袁琳,张黎明.药物滥用与药物滥用监测[M].北京:军事医学科学出版社,2012:3.

[2] National Medical Products Administration.Annual National Drug Abuse Monitoring Report (China,2016) [EB/OL].(2017-08-11)[2020-01-07].http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2196/324182.html.

[3] 国务院.国务院关于印发“十三五”国家食品安全规划和“十三五”国家药品安全规划的通知 国发〔2017〕12 号[EB/OL].（2017-02-14）[2019-06-12].http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-02/21/content_5169755.htm.

[4] 黄元,王成岗,吴世福等.我国医疗机构药物滥用监测模式需求调查[J].中国药物警戒,2020,17(9):607-612.

[5] World Health Organization.Abuse(drug,alcohol,chemical,substance or psychoactive substance)[EB/OL].[2019-02-05]. http://www.who.int/substance_abuse/terminology/abuse/en.

[6] 徐洋洋,王玲,张树平等.医疗机构药物滥用监测工作的探索与实践[J].中国药房,2019,30(23):3181-3185.

[7] 吴世友,朱彬钰,祝玉红等.我国青少年药物滥用危害、原因和对策研究进展：基于 1996-2020 中文文献的系统综述[J].中国药物依赖性杂志,2021,30(02):97-105.

[8] Suo L,Wang J,Sun LL,etal.Benzodiazepines:benefits,risks and rational use[J].Chin J Drug Depend(中国药物依赖杂志),2019,28(3):163-171.

[9] Tang SJ,Zhao XW,Wang ZC,etal.Effects of zopiclone on neurotransmitters and EEG in elderly rats with chronic sleep deprivation[J].Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志),2017,37(15):1472-1474.

[10] 班炳坤,任鹏宇,韦敬土等.我国药物滥用监测工作发展历程及现状[J].中国药物警戒,2020,17(11):777-784.

[11] 吴建茹,肖霄,成斌等.美国药物滥用监测预警模式研究与启示[J].中国药物警戒,2019,16(1):32-36.

何首乌中中性和酸性多糖的结构表征及其抗衰老活性研究

范晶，王莹，金红宇，马双成

（中国食品药品检定研究院，北京 102629）

【摘要】目的：揭示何首乌中大分子物质多糖的结构与抗衰老活性，为何首乌延年益寿功效的表征奠定物质基础。**方法：**采用水提醇沉法得到何首乌粗多糖，进一步采用 Q-Sepharose Fast Flow 柱纯化分离得到中性（RPMP-N）及酸性多糖（RPMP-A）。对两组分的中性及酸性糖含量、分子量及其分布、官能团及形态进行分析，建立液质联用分析方法测定单糖组成，采用液质联用技术并结合甲基化实验对精细结构进行测定。以线虫为模式动物，研究了两组分对线虫自然状态下的寿命，以及氧化应激状态（百草枯）下存活率及氧化指标的影响。**结果：**RPMP-N 的中性及酸性糖含量分别为 87.80%、10.03%；RPMP-A 的中性及酸性糖含量分别为 34.38%，41.73%。两组分的相对分子质量分别为 245.30 kDa、28.45 kDa。官能团结果显示，RPMP-A 在 1743cm^{-1} 处有吸收峰，对应为酯化羧基的羰基伸缩振动，而 RPMP-N 中不含此峰。在扫描电镜的分析结果中，放大倍数为 2000 时，可见 RPMP-N 多呈条带状和层片状交错排列在一起，呈立体结构。RPMP-A 层片的表面显示高低不平的状态，略显皱痕。单糖组成结果表明，两组分都由 Rib, Ara, Xyl, Rha, Fuc, Man, Glc, Gal, GlcA 和 GalA 组成，但单糖含量存在一定差异，RPMP-N 的含量百分比为 0.04%，2.40%，0.51%，0.78%，0.05%，4.52%，89.82%，1.09%，0.10%，0.69%；RPMP-A 的含量百分比为 0.10%，5.61%，0.86%，2.75%，0.25%，5.53%，63.51%，3.98%，0.41%，17.01%。糖苷键分析结果表明，RPMP-N 主要由 1→4 连接的六碳糖组成；RPMP-A 主要由 1→4 连接的糖醛酸组成。药理结果表明，RPMP-N 和 RPMP-A 可显著延长自然状态下线虫的寿命；在氧化应激状态下，可显著延长存活率，提高抗氧化酶（CAT、SOD、GSH-PX）活性，并呈现剂量依赖性。**结论：**RPMP-N 和 RPMP-A 为何首乌抗衰老活性的多糖类药效物质基础，且 RPMP-A 的活性优于 RPMP-N，构效关系表明与 RPMP-A 具有更小的分子量和更高的糖醛酸含量有关。

【关键词】何首乌，多糖，结构表征，抗衰老，构效关系

心外科患者万古霉素高谷浓度发生率及影响因素研究

范淑盼，丁楠，王卓*

（海军军医大学第一附属医院（上海长海医院），上海市杨浦区长海路 168 号，上海 200433）

【摘要】目的：万古霉素治疗期间高血药谷浓度（Cmin>20ug/ml）与肾毒性增加有关，本研究旨在探索心血管外科患者万古霉素血药高谷浓度的发生率及相关影响因素。**方法：**回顾性分析 2018 年 2 月-2022 年 3 月期间上海某三甲医院心外科成人住院患者的血清万古霉素浓度。收集患者的基本信息、实验室数据以及给药方案信息，对高谷浓度的发生进行单因素分析、多因素 Logistic 回归分析，对万古霉素谷浓度相关的因素进行 Spearman 相关分析，并建立受试者工作曲线探究高谷浓度发生的临床预测界值。**结果：**100 例患者中达标组 29 例（29%），低谷浓度组 18 例（18%），高谷浓度组 53 例（53%）。在符合指南推荐剂量给药的情况下，也有接近一半的患者出现了高谷浓度。单因素分析显示，年龄、基线血清肌酐、肌酐清除率、接受透析治疗与万古霉素高血药谷浓度相关。多因素 logistic 回归分析得出年龄＞65 岁（P=0.046）、基线血清肌酐（P=0.001）、日剂量（P=0.041）是万古霉素血清高谷浓度发生的独立预测因素。超指南推荐剂量给药增加高谷浓度发生的风险（P＜0.05）。根据 Spearman 相关分析，肌酐清除率与万古霉素谷浓度呈负相关关系，基线血清肌酐与谷浓度呈正相关关系。基线血清肌酐是高谷浓度的有效预测因子，110μmol/L 是一个合适的阈值。**结论：**在心外科患者中，高谷浓度的发生是常见的。高龄（＞65 岁）、肾功能、每日给药剂量是引起万古霉素谷浓度过高的独立影响因素。按照专家共识推荐剂量给药能降低万古霉素高谷浓度的发生率，但并不适合所有患者。当基线血清肌酐浓度>110μmol/L 时，临床医生应提高警觉，结合患者的年龄、肾功能、是否透析等临床信息制定个体化的给药方案，并通过治疗药物监测方法随时调整给药方案。

【关键词】万古霉素；谷浓度；治疗药物监测；心外科

【Abstract】Aim：This study aimed to investigate the occurrence of high blood trough concentrations of vancomycin in cardiac surgery patients and the factors influencing them. High blood trough concentrations of vancomycin (Cmin>20ug/ml) during vancomycin therapy are linked with increased nephrotoxicity.**Methods：**Between February 2018 and March 2022, serum vancomycin concentrations in adult cardiothoracic surgery inpatients at a tertiary hospital in Shanghai were retrospectively examined. To investigate the clinical prediction threshold for the occurrence of high trough concentrations, basic patient data, laboratory results, and information about the dosing regimen were gathered. Univariate analysis, multifactorial logistic regression analysis of the occurrence of high trough concentrations, Spearman correlation analysis of factors related to vancomycin trough concentrations, and the establishment of a working curve of subjects were also performed.**Results：**The accomplishment group consisted of 29 (29%) patients, the low trough concentration group included 18, and the high trough concentration group consisted of 53 (53%) patients. When given at doses that complied with the recommendations of the guidelines, high trough concentrations were also seen in almost half of the patients. Age, baseline blood creatinine, creatinine clearance, and the use of dialysis were all linked to high vancomycin trough concentrations, according to a univariate analysis. Age >65 years (P=0.046), baseline serum creatinine (P=0.001), and daily dose (P=0.041) were identified by multifactorial logistic regression analysis as independent predictors of the occurrence of vancomycin serum high trough concentrations. The chance of experiencing high trough concentrations increased with dosage over the level advised by the guidelines (P 0.05). Creatinine clearance and vancomycin trough concentrations were found to be inversely correlated by Spearman's correlation analysis, while baseline serum creatinine

通讯作者：（王卓、上海长海医院、wangzhuo088@163.com）

and trough concentrations were found to be favorably correlated. A valid predictor of high trough concentrations was baseline serum creatinine, and a suitable threshold was 110 mol/L.**Conclusions：** High trough concentrations are frequently observed in heart surgery patients. High vancomycin trough concentrations are brought on by factors such as advanced age (>65 years), renal function, and daily dose provided. Although not appropriate for all patients, administering vancomycin at doses based on expert consensus minimizes the frequency of high trough concentrations of the drug. Clinicians should be cautious and create an individual dosing regimen for each patient when the baseline serum creatinine concentration is greater than 110 mol/L. This regimen should take into account the patient's age, renal function, and whether or not they are receiving dialysis. The dosing regimen can be modified at any time using therapeutic drug monitoring techniques.

【**Keywords**】vancomycin; trough concentration; therapeutic drug monitoring; cardiac surgery

万古霉素治疗药物监测的热点与进展

范淑盼，丁楠，王卓*

（海军军医大学第一附属医院（上海长海医院），上海市杨浦区 168 号长海医院，上海 200433）

【摘要】治疗药物监测（TDM）是维持万古霉素疗效和预防不良反应的重要手段。随着中国和美国指南关于 TDM 的监测指标的更新，以 24 小时药时曲线下面积（AUC_{24h}）引导的 TDM 逐渐成为热点。与谷浓度引导的 TDM 相比，AUC_{24h} 引导的 TDM 能够降低万古霉素引起的急性肾损伤（VA-AKI）的发生率。采用 TDM 有助于制定个体化的给药剂量方案。临床上可以通过贝叶斯法和线性药代动力学方法来实施 AUC_{24h} 引导的 TDM。两种方法均可以实现 AUC_{24h} 的预测，并达到早期干预的目的。贝叶斯方法通过监测单个或多个血清万古霉素浓度来进行贝叶斯模拟，制定给药计划和最佳采样策略。优点是不需要稳态下采样，并且可以在达到稳态之前提供 AUC 的预测值。其他益处还包括实现较低的万古霉素日剂量、较少的万古霉素浓度收集、较少的后续剂量调整以及较短的治疗持续时间。缺点是需要访问计算机软件、在建模过程中需要准确收集患者信息，并根据药理学知识选择合理先验参数，在医疗机构的实际使用中存在着一些准入门槛。线性药代动力学方法通过在单个给药间隔内收集两种血清万古霉素浓度，并使用几个药代动力学方程确定消除率常数和 AUC。与贝叶斯方法相比，一级药代动力学方程法对于常规临床实践使用来说足够简单。药师熟悉方程式后，可以很容易地在床边使用手持计算器计算 AUC，因此可以作为贝叶斯预测软件的合理替代方案。主要缺点是需要采集同一给药周期内的两个万古霉素水平(峰和谷)以计算 AUC_{24h}，给药和样本采集时间需要准确的记录，并且数据无法说明采集时间后可能发生的急性生理变化。各医疗机构有必要根据机构实际情况选择合适的监护方法。与此同时，合理的临床判断必须始终主导万古霉素的使用。

【关键词】万古霉素；治疗药物监测；药时曲线下面积；贝叶斯

【**Abstract**】Therapeutic drug monitoring (TDM) is crucial for preserving vancomycin's effectiveness and avoiding side effects. TDM, guided by the area under the 24-hour drug-time curve (AUC_{24h}), has gradually grown in popularity due to the update of Chinese and US recommendations on TDM monitoring indexes. Compared to trough concentration-guided TDM, AUC_{24h}-guided TDM decreased the frequency of vancomycin-induced acute kidney injury (VA-AKI). Individualized dosage regiment development is made more accessible by the use of TDM. Clinical implementation of AUC_{24h}-guided TDM is possible using Bayesian and linear pharmacokinetic techniques. Both approaches provide early intervention and AUC_{24h} prediction. The Bayesian method runs Bayesian simulations while observing one or more serum vancomycin concentrations to create dosage regimens and the best sampling tactics. Benefits include the ability to provide predictive values of AUC before a steady state is reached and the absence of the need for sampling at a steady state. Additional advantages include obtaining lower daily vancomycin dosages, collecting fewer vancomycin concentrations, making fewer subsequent dose modifications, and shortening treatment times. Constraints for practical use in healthcare settings include the requirement for access to computer software, the requirement to accurately gather patient data during the modeling process, and the requirement to choose reasonable a priori parameters based on knowledge of pharmacology. Two serum vancomycin concentrations were measured at a single dosage interval, and multiple pharmacokinetic equations were employed to establish the clearance rate constant and AUC. The linear pharmacokinetic technique is less complicated than the Bayesian approach and can be used in normal clinical practice. In place of Bayesian prediction software, pharmacists who are familiar with the formulae can quickly calculate AUCs at the patient's bedside using a handheld calculator. The main drawbacks are that the AUC24h must be calculated from two vancomycin levels (peak and trough) from the same dosing cycle, that the timing of dosing and sample collection must be accurately recorded, and that the data do not take into account any acute physiologic changes that may have taken place after the time of collection. Each healthcare organization must select the best monitoring technique based on the organization's current circumstances. At the same time, the use of vancomycin must always be guided by good clinical judgment.

【**Keywords**】Vancomycin; Therapeutic drug monitoring; Area under the drug-time curve; Bayesian

通讯作者：（王卓、上海长海医院、wangzhuo088@163.com）

应急状态下药品专利强制许可的几点思考

费永和，崔俐俊，陈静*

（海军军医大学药学系军队药材供应管理教研室，上海，200433）

【摘要】重大公共突发事件近年时有发生，在应急状态缺乏有效的预防或治药物时，为实现药品的及时保障首先解决的就是药品专利问题。本文对比国内外药品专利强制许可的法律法规，对我国关于药品专利强制许可的现状和问题进行分析，探讨我国药品专利强制许可的制度完善，明确其执行细则以及加强政策鼓励合作等方式，来完善我国在应急状态下药品专利强制许可的可行措施。

【关键词】专利强制许可、应急、药品

【**Abstract**】Public emergency have occurred from time to time in recent years, and the absence of effective preventive or curative medicines in the situations, the first solution to the problem is the issue of pharmaceutical patents. This paper compares the laws and regulations of compulsory licensing of pharmaceutical patents between internal and abroad, analyzes the status quo and problems of compulsory licensing of pharmaceutical patents in China, explores the improvement of the system of compulsory licensing of pharmaceutical patents in China, clarifies the implementation rules and strengthens the policy of encouragement of cooperation, etc. So as to improve the feasible measures of compulsory licensing of pharmaceutical patents in China in the state of emergencies.

【**Key Words**】Patent Compulsory Licensing, Emergency, Pharmacy

从 2003 年席卷全球的 SARS 疫情，到 2009 年爆发的 H1N1 甲型流感疫情，再到 2020 年持续至今的新冠肺炎疫情，可以发现重大公共突发事件普遍具有传播速度快、感染范围广、防控难度大的特点。[1,2]

1. 应急状态专利强制许可的必要性

国家近年来也非常重视突发公共事件的应急卫生物资保障。在 2007 年出台的《中华人民共和国突发事件应对法》中，明确规定突发事件需要采取应急处置措施，国家应建立健全应急物资储备保障制度，完善重要应急物资的生产、储备、调拨、紧急配送和监管体系。[3]药品作为应急物资中最重要的，也是最特殊的一部分，需快速准确配送到使用单位，以保障人民群众生命安全。我国作为仿制药大国，创新药品的专利技术仍长期被国外公司所拥有。因此当应急状态缺乏有效预防或治疗药物时，为快速获得药品以保障公众健康利益，首先需要解决的就是药品专利问题。

专利设置的初衷是保护专利所有人对其发明专利的专有权，保护专利权人的利益。创新药物研发具有资金投入大，研发周期长，成功率低的特点。药品专利是国家在一定时间内对专利权人的保护，通常专利权人与被许可人之间是以协商签订合同来许可实施该专利，专利权人获得相应报酬。作为私有财产权的专利与公共利益之间存在一定的冲突性，当应急情况下，为了国家或公共健康利益时，当前唯一有效的药品却由于受到专利保护而无法让公共获得，这显然不符合《专利法》的立法初衷。因此这样的背景下启动专利强制许可程序，符合专利法律制度的初衷。[4,5]

2. 专利强制许可的执行现状

新冠病毒疫情期间，美国辉瑞公司的 Paxlovid 作为口服新冠肺炎治疗新药，在临床研究中表现优秀，使新冠肺炎患者的住院或死亡风险降低 89%。[6]作为一款治疗新冠病毒的药物，Paxlovid 于 2022 年 2 月在国内获批上市，且被纳入我国第九版、第十版新冠诊疗方案抗病毒治疗的推荐药物。但在 2022 年的医保谈判中，Paxlovid 因企业报价过高未能通过谈判纳入医保范畴，我国依旧未对该药品实施专利强制许可。

作者简介：费永和，助　教，研究方向：药事管理, Email:nantongfyh@sina.com

通信作者：陈　静，副教授，研究方向：药事管理, Email:cjchen_02@163.com

现阶段我国专利相关的法律法规，与国际上关于对药品专利强制许可的约定条款大体一致。而发达国家的典型代表美国则没有明文规定专利强制许可，在美国法官拥有自由裁量权，可通过零散法条和司法判例实施专利强制许可。详见下方表 1。

作为发展中国家且同样是仿制药大国的印度，通过强制性的行政干预，减少对新药的保护，使得本国的仿制药行业蓬勃发展。在 2008 年印度专利局批准了印度首个药品专利强制许可申请：拜耳公司的“多吉美”（索拉非尼，Nexavar）。2008 年拜尔公司在印度取得索拉非尼的专利权，作为治疗晚期肾癌的新药，一位病人服用多吉美的费用大约需要 5700 美元，远超人均年收入仅 1316 美元的印度国民承受能力。[7] 过高的药物价格不是病人所能承受的。印度的仿制药公司 Natco 公司在与拜耳公司请求给予专利许可失败的情况下，以该药未在印度得到充分利用为由，向印度专利局提出该药的专利强制许可申请。2012 年印度专利局以公众健康的需求和该药的定价过高为理由，授予 Natco 公司该药的专利强制许可。[7,8]

表 1 国内外专利强制许可法律法规

国家/地区	法律法规	颁发年份	条款	部门	条件
中国[9-11]	中华人民共和国专利法（2020 年修订）	1985 年 4 月 1 日起施行	第 54 条	国务院专利行政部门	在国家出现紧急状态或者非常情况时，或者为了公共利益的目的
	专利实施强制许可办法（局令第 64 号）	2012 年 5 月 1 日起施行	第 6 条	国务院有关主管部门建议国家知识产权局给与其指定的具备实施条件的单位强制许可	在国家出现紧急状态或者非常情况时，或者为了公共利益的目的
	涉及公共健康问题的专利实施强制许可办法（局令第 37 号）	2006 年 1 月 1 日起施行	第 3 条 第 4 条	国务院有关主管部门请求国家知识产权局授予实施该专利的强制许可	为了公共利益目的，或国家紧急状态
国际[12]	关于与贸易有关的知识产权协议与公共健康多哈宣言	2001 年通过	-	世界贸易组织(WTO)	允许各国利用强制许可制度生产专利药品，明确没有制药能力的成员可以进口其他国家生产的被授予强制许可的专利药品
	与贸易有关的知识产权协议（TRIPS）	2005 年被纳入	-	世界贸易组织(WTO)	公共利益、公共健康、紧急状态或其他紧急情况、公共非商业性使用、被确认为限制竞争的行为、专利不实施、因合理要求被拒绝许可、从属专利

印度[7]	专利法（2005 年修订）	1970 年实施	第 84 条 第 92 条第 A 款第（1）项	印度专利的主管部门专利局以及对专利局实施的专利许可具有复核权的印度知识产权上诉委员会 印度专利的主管部门专利局以及对专利局实施的专利许可具有复核权的印度知识产权上诉委员会	在公众的合理要求未能得到满足，或者公众无法以合理价格获得此专利发明的情况下 国家突发事件、其他非常紧急情况以及专利产品的公众非商业化使用 扩大制造、出口已取得专利的药物产品强制许可范围，出口至无生产能力的地区、国家。
美国[13]	未有明文规定药品专利强制许可制度，通过其他零散法条规定和司法判例进行专利强制许可	-	-	法官具有自由裁量权	针对滥用专利权的反垄断诉讼中会采用专利强制许可 一般采用审批、政府采购专案、医保等市场准入政策，以谈判协商为主要手段

3. 应急状态实施专利强制许可存在的问题

3.1 制度不健全

3.1.1 缺乏专利强制许可专项规定和应急范例

我国对专利强制许可已呈现基本法律设置，《中华人民共和国专利法》已明确规定申请专利强制许可的条件，国家专利局部门规章《专利实施强制许可办法》、《涉及公共健康问题的专利实施强制许可办法》进一步明确了实施专利强制许可的执行要求，但启动药品专利强制许可的准入条件概念判定模糊，缺少可操作性。[7]若国家宣布进入应急状态后，何时启动专利强制许可以及具体执行步骤和责任机构均没有明确的专项规定。实际上我国至今从未实施药品专利强制许可，如遇应急情况，缺乏执行专利强制许可的范例参考。

3.1.2 医药卫生部门应急分工不明

现行专利相关的法律法规仅明确强制许可启动条件，未对应急状态下专利强制许可的执行步骤进行细化。当出现紧急情况，国家卫生和计划生育委员会和国家食品药品监督管理总局作为卫生医药管理部门，应当第一时间确定对治疗方案，有无替代药品，该药品是否需要申请强制许可、治疗效果等方面给出专业意见。这是他们的权利，也是其责任。

3.2 应急执行细则不明

3.2.1 应急批准专利强制许可条件模糊

批准药品专利强制许可条件如紧急状态、非常情况、公共利益的概念判定模糊。《中华人民共和国宪法》明确全国人大常委会有权宣布全国进入紧急状态，但我国从未动用过这一权力。[14]公共利益定义广泛，国务院有关主管部门对“公共利益”有很大的裁量权，同时对他们来说这也是一个挑战。因此我国对于药品专利强制许可的批准使用持谨慎态度，至今从未实施药品专利强制许可。

3.2.2 应急执行强制许可的期限不明

一般情况下，专利许可通过与专利权人协商的方式进行，但协商的期限是无法控制的。如果在专利强制许可的情况下，遇专利权人不服时申请行政复议，诉讼程序漫长，诉讼结束时间也是不确定的。

应急情况下，时间是最为重要的。但我国的《专利法》并未对专利强制许可的执行期限进行明确的规定，这将滞后公共利益的维护。此时这种“滞后”对相关利益人是致命的。未及时启动的专利强制许可，则不能在应急状态时实现其应有的价值；或在应急状态结束后，未及时终止强制许可也会影响正常的市场秩序。应急情况下，明确的强制许可执行期限决定其可行性和必要性。

3.2.3 缺乏应急使用授权

实施专利强制许可只是实现应急药品的第一步，按照国家药品上市的现行规定，后续流程包括样品检测、现场核查、技术评审等均需要一定的时间来完成。当国家处于应急状态时，后续的上市流程则限制了药品何时能上市使用，甚至可能导致专利强制许可“前功尽弃”。药品管理部门需要对药品应急使用授权做出明确规定。

3.3 存在风险隐患

药品专利强制许可的实施在一定程度抑制本国药企创新药物研发的积极性，同时可能造成国际纠纷，从而削弱本国对医药投资的吸引力。且药品专利涉及的巨大经济利益，国家之间的政治、外交博弈，各国对国际条约的理解差异，决定了执行专利强制许可必然是谨慎的、艰难的，可能导致实施专利强制许可国家与被实施专利权人及其所属国家产生纠纷甚至冲突。[7]在应急情况下，如何避免引发上述问题，同时实现药品快速准确配送是我们需要去探索解决的。

4. 应急状态专利强制许可的可行性措施

4.1 完善应急药品强制许可

国家政策明确指出药品保障的必要性，《中共中央关于制定国民经济和社会发展第十四个五年规划和二〇三五年远景目标的建议》指出，把保障人民健康放在优先发展的战略位置，健全物资保障体系，提高应对突发公共卫生事件能力，提高药品安全保障水平，完善国家应急管理体系。[15]

从应急管理体系的药品保障，到药品的专利强制许可制度，应急状态下药品的保障已形成基本框架。现行法律法规的操作流程较繁琐，并且仅局限在药品专利的范畴内，没有从药品管理方面进行细化。药品作为特殊的商品，建立药品专利强制许可的专属法规，以确保在应急情况下，专利强制许可的可执行是十分必要的。

对于国家卫生和计划生育委员会和国家食品药品监督管理总局给出的建议，应当规定其具有一定的法律效力，专利主管部门在没有充分理由的情况下不得拒绝该建议。两家单位需从专业角度，对该药品的治疗效果、有无替代治疗药物、相关指定企业的生产和运输能力、药品的公共可及性等进行全方面评估。研发环节的审批、申报企业生产前现场核查等均应给与“绿色”通道，提高审批效率。同时应加强仿制药的质量监管和一致性评价，仿制药的质量是应对应急情况的重要保障。考虑到应急情况下此类药品的紧缺，政府应该完善创新服务能力，该药品应由政府进行统筹后进行保障分配。

4.2 细化专利强制许可执行步骤

4.2.1 明确应急宣布条件

我国宪法规定全国人大常委会有权宣布全国进入紧急状态，但紧急状态的衡量标准并没有明文规定。以新型冠状病毒肺炎疫情为例，当出现疫情事件持续一定时间、受灾/患病人数达到一定数量、并且呈现增长趋势，对社会稳定和发展的影响已到严重程度时。[5]国家对当前情况进行研判，可以考虑宣布进入紧急状态。在应急情况下，必然是对医药产品供给的集中爆发。药品、医用耗材、医疗设备在第一时间完成筹并措配送到使用单位。当目标药品因专利限制而无法投入使用，其专利强制许可申请则是重点考虑的解决方案，以响应国家或公共健康需求。

4.2.2 细化执行期限

专利强制许可是因紧急事件或应急情况产生的，在事件被控制后，强制许可亦失去了启用的前提。因此快速有效的启动并完成专利强制许可，在事件结束后，及时终止专利强制许可也是极其重要的。

因时间上的紧迫性与应急性，要求强制许可需要简化专利审批程序。当强制许可决定做出后，要求立即生效，保证与后续的费用核定以及行政复议等分离，从程序上提高了专利强制许可的效率。在应急状态结束后，

申请人和专利权人应在限定的时间内完成专利授权的磋商，避免影响正常的市场秩序，亦可避免产能过剩。[14]

4.2.3 对专利权人进行经济补偿

通常优先考虑专利权人自愿向政府申请，同意第三人在支付相关费用后，可使用该专利。即避免了专利强制许可，又提高了专利的使用效率，解决了应急情况下的实际问题。

而专利涉及核心技术、经济利益、商业战略等多方面。因此应急情况的专利强制许可考虑对专利权人进行相应的经济补偿。《中华人民共和国专利法》第六十二条规定：“取得实施强制许可的单位或个人应当付给专利权人合理的使用费，其数额由双方协商，双方不能达成协议的，由国务院专利行政部门裁决”。[9]联合国开发计划署建议是以仿制药价格为基础，设置净销售额的 4%为基本率，药品专利强制许可的最终使用费可根据药品专利的创新性和接收政府补贴的情况上下浮动 2%。支付给专利权人以作为专利强制许可的经济补偿。[16]

4.2.4 探索应急使用授权

为保障在应急状态下，目标药品能及时投入使用，在实施专利强制许可的基础上，探索药品的应急使用授权是十分有必要的。例如美国国防部与美国食品药品监督管理局（FDA）进行了密切合作，为进一步提高紧急情况下获得相关医疗产品的可能，并签署了谅解备忘录，打破了百年来医疗产品必须经过 FDA 注册审批的程序。2004 年美国国会通过《联邦食品药品和化妆品法案》第 564 条的修订，建立了医药产品应急使用授权制度。该制度授权在美国公众面临严重或危及生命的应急状态下，FDA 使用应急使用授权（EUA）允许使用未经 FDA 批准上市的医疗产品，或已批准上市用于未批准的适应症的医疗产品。2005 年 FDA 发布了 6 项 EUA 应对炭疽恐怖袭击，2009 年、2010 年应对 H1N1 流感疫情发布了 22 项 EUA，2018 年，FDA 授予冻干血浆的 EUA。这对我们探索应急情况下药品应急使用授权具有很好的借鉴意义。[17]

该合作开创了应急状态药品使用的新局面，实现挽救生命的医疗用品的优先。确定应急状态后，在有充分数据保证药品的安全性和有效性，且能证明药品已知或潜在的受益大于风险时，且药品应急使用授权应适用在审批、制造、配送、发放、管理、使用等多个环节。

4.3 出台政策鼓励企业合作创新

企业研发的重点是创造经济效益。不同于企业，院校和科研单位的主要经费来自于政府拨款，研究方向注重创新性，往往从事某些利益创造低但极为重要的研究。将企业、院校、科研单位等多主体纳入政府牵头的科研攻关项目中，实现企业与院校、科研单位的对接，最大限度发挥各个主体的作用和特长。专利权人可以通过内部交叉许可协议，有效解决专利实施过程中的授权问题。在应急情况下可以迅速实现技术的推广与应用。[18]

创新药品专利的研发成本高，且研发成功风险极高，应急事件中药品专利应用场景和时间都有局限性，对于企业来说缺乏研发吸引力。政府应对于创新医药企业提供税收减免、补贴和融资支持等激励政策，激发企业自主创新的内在动力。在发展前景良好的生物药行业以及我国独具特色的中药行业，应从激励数量增长转向激励高质量专利的产出。

5 小结

应急情况下批准实施药品专利强制许可，是满足国家或公共健康利益的药品需求的首要步骤，对比国际上药品专利强制许可的执行现状，我们需要结合实际完善相关制度，明确部门分工，细化执行步骤，并出台政策施鼓励企业。为当遇到应急情况时，守护人民群众健康预先做好应急保障工作。

参考文献

[1] 王魁英，大规模人员伤亡事件中军队医院医学救援处置流程构建及救治策略研究[D]，第三军医大学, 2017.

[2] 魏晓瑜. 新冠肺炎疫情期间医疗物资市场乱象的成因与对策[J]. 社会科学前沿, 2021(1): 1-4.

[3] 中华人民共和国突发事件应对法[J]. 安全, 2007, 28(10): 60-63.

[4] 刘义胜, 田侃. 根据《专利法》第 49 条研究药品专利强制许可的可执行性[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(22): 2581-2586.

[5] 李宗辉. 论公共健康需求下的药品专利强制许可[J]. 中国发明与专利, 2021, 18(8)69-79

[6] 王欢, 口服新型冠状病毒肺炎治疗新药——Paxlovid[J], 临床药物治疗杂志, 2022,20(2):13-17.

[7] 印度药品专利强制许可制度及对我国的启示

[8] 张武军, 张博涵. 新冠肺炎疫情下药品专利强制许可研究: 以瑞德西韦为例[J]. 科技进步与对策, 2020, 37(20): 83-88.
[9] 中华人民共和国专利法（2020 年修订）
[10] 专利实施强制许可办法（局令第 64 号）
[11] 涉及公共健康问题的专利实施强制许可办法[J]. 司法业务文选, 2006(11): 22-23.
[12] 于良. 科技领域的强制实施实践与启示: 以各国强制专利许可、强制产能调配为例[J]. 科技中国, 2020(8): 69-71.
[13] 汪敏, 王洪友. 中美药品专利强制许可模式研究[J]. 中国卫生法制, 2023, 31(2): 66-71, 120.
[14] 袁勤玮. 公共卫生危机中医疗防护用品专利的强制许可研究[J]. 医学与法学, 2022, 14(3): 107-111.
[15] 中共中央关于制定国民经济和社会发展第十四个五年规划和二〇三五年远景目标的建议，http://www.gov.cn/zhengce/2020-11/03/content_5556991.htm.
[16] 竹苗嘉. 浅析药品专利强制许可使用费的计算标准[J]. 广西政法管理干部学院学报, 2021, 36(3):31-35.
[17] 仲宣惟, 中美应对突发公共卫生事件医药产品应急政策分析与思考[J], 中国药学杂志, 2020, 55(23):1979-1984.
[18] 杨锋. 抗新冠肺炎药物专利布局及对突发公共卫生事件的政策启示[D].西南政法大学, 2021.

唐古特大黄蒽醌类成分在线近红外光谱监测研究

冯丹[1, 2], 罗西[1, 2], 臧利艳[1, 2],孙菁[1, *]

（1.中国科学院西北高原生物研究所 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室，西宁 810008； 2.中国科学院大学, 北京 100049）

【摘要】为构建在线提取条件下唐古特大黄蒽醌类成分含量快速检测方法，并对提取终点进行快速判定，本研究利用实验室自行搭建的近红外在线提取检测平台，以唐古特大黄醇提液中多指标蒽醌类化学成分含量为评价指标，对其超声提取过程关键质量属性进行了在线近红外监测研究。共采集得到 13 个批次 403 个样品的 NIR 光谱，利用马氏距离（MD）与主成分分析（PCA）进行光谱异常值剔除，并以多元散射校正（MSC）、标准归一化（SNV）、一阶导数（1D）和二阶导数（2D）等方法对谱图预处理方法进行优化。在最佳预处理方法基础上，利用全波段、变量重要性投影（VIP）、相关系数法（CC）、水光谱分析法选择最佳建模波段，并优化了建模集中校正集与预测集的比例，分别建立了总蒽醌以及单个五种蒽醌类成分的定量检测模型。结果表明，总蒽醌、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚的 PLS 模型最佳预处理方法均为无散射校正+二阶导数谱图（D2）+Norris 平滑，大黄酸的 PLS 模型最佳预处理方法为多元散射校正（MSC）+二阶导数谱图（D2）+Norris 平滑。利用水光谱分析获得的 O-H 键变化最明显的区间（6000~7400 cm^{-1}、4500~5400 cm^{-1}）为最佳建模区间，总蒽醌、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚的最佳校正集与预测集的比例为 5∶1，芦荟大黄素为 2∶1，大黄酸为 4∶1。所建指标成分的定量模型校正集相关系数（Rc）与验证集相关系数（Rp） 均大于 0.9600，RPD 值均大于 4，表明模型效果较好，可以实现唐古特大黄药材提取过程重要关键质量属性的实时在线监测和提取终点的判定。

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.32270402）

作者简介：冯丹（2000—），女，在读硕士，研究方向为中药质量评价与控制(E-mail) fengdan@nwipb.cas.cn；

通讯作者：孙菁（1976—），女，博士，研究员 (E-mail) sunj@nwipb.cas.cn。

临床药师参与智能化前置审方系统的优化及实施效果评价

冯林林

1. 贵州省仁怀市人民医院，贵州 遵义 564500

【摘要】目的：通过对前置审方系统规则进行优化，提高智能化前置审方系统的敏感性和特异性；比较前置审方实施前后对处方合格率的影响，并评价其实施效果。**方法：**建立智能化前置审方平台，记录审方过程中遇到的“假阳性”“假阴性”的处方，通过询证医学查询、文献分析和梳理，并与医师沟通，达成共识，定期对审方系统的审方规则进行优化、删除，必要时增加警示内容。应用优化后的前置审方系统运行 6 个月后（试验组）与前置审方系统上线前 6 个月（对照组）进行比较，采用 SPSS22.0 统计分析软件中的 $\chi 2$ 检验，并调查分析医师对前置审方系统实施的满意度，对其实施效果进行评价。**结果：**实施智能化前置审方系统后，门诊处方审核率由原来人工审核抽取当月处方总量的 8% 升至所有处方都需经过前置审方软件的 100%，审核处方的合格率由 95.34% 提升至 99.71%，提升了约 4.37%，差异有统计学意义（$P<0.05$）。2021 年 10 月-2022 年 3 月对智能化前置审方系统进行优化并实施，2022 年 4 月前置审方系统正式上线，统计实施前置审方系统后的 4 月份- 9 月份前置审方系统审核的处方共 199987 张，系统审核出的问题处方数共 8602 张，占处方总量的 4.30%；返回后医师主动修改的处方共 7820 张，占处方总量的 3.91%；系统提交临床药师审核的处方（医师拒绝修改提交临床药师审核）共 786 张，占处方总量的 0.39%，临床药师复审合理处方共 599 张，占处方总量的 0.30%，临床药师干预处方共 187 张，占处方总量的 0.09%，临床药师干预后返回修改处方数共 165 张，占处方总量的 0.08%，医师采纳临床药师意见占比 88.24%。前置审方系统的规则优化后，医师对警示信息的接受度调查结果显示接受度由原来的 47.43%上升至 88.57%。**结论：**智能化前置审方系统优化后，显著提高了门诊处方合格率、处方合理率；临床药师对前置审方系统的优化提高了医生对该系统实施的接受度，促进临床合理用药水平，并且得到医师的认可，值得同行借鉴与参考。

【关键词】智能化；前置审方系统；优化；实施效果

基金项目：仁怀市科技计划项目（合同编号：仁科支撑〔2021〕10 号）

作者简介：冯林林，女，硕士，主管药师，研究方向：临床药学

HDAC6 非酶功能的研究进展：结构，作用机制，靶向策略

冯梦凯，刘宏民*，高雅*

（郑州大学药物研究院 河南 郑州 450001）

【摘要】引言：HDAC6 属于 IIb 类组蛋白去乙酰化酶，含有两个催化结构域和一个 ZnF-UBP 结构域。HDAC6 的去乙酰化功能已经在其常见底物，如 α 微管蛋白、皮质素和 HSP90 中进行了广泛的研究。值得注意的是， 除了 HDAC6 的去乙酰化酶活性外，HDAC6 ZnF-UBP 可以在泛素-蛋白酶体途径受损时结合特定序列的非锚定泛素将错误折叠的蛋白质运输到微管中心（MTOC）形成聚集体，通过自噬溶酶体途径将错误折叠的蛋白质降解；HDAC6 可以独立于其去乙酰化功能介导炎症小体的激活和组装，并且炎症小体的成功激活依赖于 HDAC6 ZnF-UBP 结构域的存在；虽然 HDAC6 可以在病毒感染中协助病毒脱壳以加速感染进程，但 HDAC6 ZnF-UBP 也可以通过其非酶功能阻止病毒的复制和入侵。综上，由于这些非酶功能，HDAC6 与多种疾病密切相关，包括神经退行性疾病、炎症相关疾病、癌症和病毒感染。**目的：**与其他 HDACs 不同，HDAC6 有两个功能性催化结构域（CD1、CD2）和一个锌指结构泛素结合区（ZnF-UBP）。目前，针对 HDAC6 抑制剂的研究主要是针对两个酶催化结构域，但 ZnF-UBP 通过其非酶功能与多种蛋白结合，使其与许多生理功能密不可分。因此开发拮抗 HDAC6 ZnF-UBP 的小分子抑制剂，并将其应用于癌症、病毒感染和炎症相关疾病具有重要意义。**结论：**在这篇综述中，我们重点讨论了 HDAC6 的非酶功能机制和通过抑制 HDAC6 泛素结合功能的疾病治疗策略的合理性和发展前景。针对 HDAC6 ZnF-UBP 结构域的抑制剂的设计有望成为治疗癌症、某些神经退行性疾病、炎症相关疾病和病毒感染的有效策略。设计和开发能够阻断 HDAC6 ZnF-UBP 与泛素结合过程的小分子化合物方面的工作取得了根本性的进展，为后续抑制剂的开发奠定了基础,但目前仍处于探索阶段，缺乏必要的生物活性验证，想在未来开发出更有效的小分子抑制剂需要更加努力的探索。

【关键词】HDAC6 ZnF-UBP；非酶功能；小分子抑制剂；治疗策略

替加环素致低纤维蛋白原血症相关风险预测模型的建立与内部验证

伏安[1,2,3]，郭代红[1,3]，朱曼[1]

1.中国人民解放军总医院医疗保障中心药剂科，北京 100853；2.解放军医学院，北京 100853；3.解放军 ADR 监测中心，北京 100853

【摘要】背景和目的：诸多研究表明，使用替加环素可能导致低纤维蛋白原血症，发生率高达 19-61%，并由此增加大出血甚至死亡的风险。及早识别高危患者并针对性预防，是临床用药风险管控的关键。本研究旨在开发和验证一个预测模型，以评估替加环素相关低纤维蛋白原血症的发生风险。**方法：**我们对某大型综合医院 2016-2022 年间 1284 名接受替加环素治疗的住院患者数据进行回顾性分析。利用本团队研发的临床药物不良事件主动监测与智能评估警示系统筛选可能发生低纤维蛋白原血症的病例并进行人工甄别，以确定病例组和对照组。采用双向逐步回归、最小绝对收缩和选择算子方法 (LASSO)以及全子集回归三种方法筛选变量并建模，通过比较受试者操作特征曲线下面积(AUROC)确定最佳变量组合。非限制性立方样条 (RCS)拟合连续变量与因变量的非线性关系并对其进行分类转换。最终模型通过列线图和基于网络的概率计算器呈现。1000 次重抽样的 Bootstrap 方法用于内部验证和校准，决策曲线和临床影响曲线用于分析模型的临床实用性。**结果：**替加环素相关低纤维蛋白原血症的发生率为 53.43% (686/1284)。最终模型包括 12 个参数：年龄 60-74 岁、年龄>75 岁、脓毒症、近期大出血、凝血功能障碍、用药疗程>9 天、平均日剂量>120mg、凝血酶原时间、肾小球滤过率、D 二聚体、纤维蛋白原以及脓毒症与纤维蛋白原的交互项。模型在原始开发队列 (AUC=0.806 (0.782-0.829)和 Bootstrap 队列 (AUC=0.806 (0.781-0.830)中，均显示出较好的辨别能力。Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验 p>0.05，Brier 分数为 0.179，说明校准度良好。决策曲线分析和临床影响曲线分析表明，在 0.08-0.98 的阈值概率范围内，模型实用性良好。模型辨别能力在特定人群亚组分析中趋于稳定 (AUC>0.75，Delong 检验 p>0.05)。模型还有效区分了低风险与高风险患者。以 0.50 为高风险阈值，两组的低纤维蛋白原血症发生率 (33%、79%)、严重低纤维蛋白原血症发生率 (3%、11%)、大出血率 (10%、22%)、输血率 (47%、63%)、干预率 (39%、68%)、中位住院日 (34 天、40 天)均有显著差异 (p<0.001)。比较两组 30、90、180 天生存率，低风险组 (86.5%、78.6%、72.5%)均显著高于高风险组 (73.0%、46.6%、22.4%) (Log rank 检验 p<0.001)。**结论：**我们基于目前最大的替加环素研究队列，首次创建了低纤维蛋白血症的联合预测模型，以 81%的区分度量化了不良反应发生风险。同时我们建立了风险分层标准，以辅助临床识别干预高风险患者。经过外部验证后，模型或可用于个体化用药风险评估，以减少低纤维蛋白原血症的发生。

【关键词】替加环素；低纤维蛋白原血症；凝血功能障碍；预测模型；主动监测；抗菌药物管理

中国住院患者中头孢哌酮/舒巴坦致凝血功能障碍相关风险 预测模型的建立与内部验证——单中心病例对照研究

伏安[1,2,3]，郭代红[1,3*]，朱曼[1]，李树[1]，高奥[1,3]，郭海丽[1,2,3]，李超[1,2,3]，卢京川[1,3,4]

（1.中国人民解放军总医院医疗保障中心药剂科，北京 100853；2.解放军医学院，北京 100853；3.解放军 ADR 监测中心，北京 100853；4.重庆医科大学药学院，重庆 400016）

【摘要】背景和目的：长期使用头孢哌酮/舒巴坦 （CPZ/SAM） 可能导致维生素 K 依赖性的凝血功能障碍，这与大出血和死亡风险增加有关，但目前缺少相关风险预测模型。本研究旨在建立并内部验证一个模型，用于预测使用 CPZ/SAM 的中国住院患者发生凝血功能障碍的风险。**方法：**对某综合医院 2020-2021 年 11092 名接受 CPZ/SAM 治疗的住院患者进行病例对照研究。利用本团队研发的临床药物不良事件主动监测与智能评估警示系统筛选发生凝血功能障碍的患者。使用最小绝对收缩和选择算子方法（LASSO）筛选预测变量，R 语言“rms”包拟合线性模型，并通过静态诺模图和基于网络的动态诺模图可视化模型。增强 bootstrap 方法用于内部验证，受试者工作特征曲线下面积（AUC） 用于评估模型区分度，Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验、Brier 分数用于评估模型校准度，决策曲线分析评估模型的临床效能。**结果：**4214 名接受 CPZ/SAM 治疗的患者中 215 例发生了凝血功能障碍 （5.1%）。208 例病例人群和 624 例对照人群用于模型的开发与验证。营养不良、肾功能不全、用药天数、合并肠外营养、联用替加环素、联用碳青霉烯类抗菌药物、红细胞计数被确定为最终预测变量。该模型在原始数据集中（AUC=0.763（0.724-0.803），Brier 分数=0.148）和 Bootstrap 验证集（AUC=0.755（0.714-0.797），Brier 分数=0.152）中，均显示出较好的辨别和校准能力。决策曲线分析显示，与对所有患者进行干预或不干预相比，该模型的净收益更高。**结论：**诺模图模型量化了接受 CPZ/SAM 治疗的住院患者凝血功能障碍的发生风险，可支持个体化评估和干预以降低用药风险。在考虑临床实施之前，需要对模型进行外部验证。

【关键词】头孢哌酮/舒巴坦；凝血功能障碍；预测模型；LASSO；主动监测；药品不良反应

Development and validation of a risk prediction model for cefoperazone/sulbactam-related coagulation disorders in Chinese inpatients – A case-control study

An Fu[1,2,3], Daihong Guo[1,3], Haili Guo[1,2,3], Man Zhu[1], Shu Li[1], Ao Gao[1,3], Chao Li[1,2,3], Jingchuan Lu[2,3,4]

（1. Department of Pharmacy, Medical Supplies Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; 3. Adverse Drug Reaction Monitoring Center of Chinese PLA, Beijing 100853, China; 4. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China.）

【Abstract】Background and aim: Long-term use of cefoperazone/sulbactam （CPZ/SAM） may lead to vitamin K-dependent coagulation dysfunction which is significantly associated with increased risks of major bleeding and death.

*通讯作者，邮箱 guodh301@163.com

However, there is a lack of prediction models estimating the risk for this adverse drug reaction. This study aimed at developing and internally validating a risk prediction model for coagulation-related adverse reactions in Chinese inpatients treated with CPZ/SAM. **Methods:** A case-control study was conducted in 11,092 adult inpatients admitted to our hospital from 2020 to 2021. We selected patients reporting coagulation-related adverse reactions through the Adverse Drug Events Active Surveillance and Assessment System-2 developed by our team. The final predictors were obtained by using the Least Absolute Shrinkage and Selection Operator （LASSO） algorithm. The prediction model was presented as a static nomogram and a web-based dynamic nomogram. Internal validation and calibration were performed using bootstrap enhanced procedure The decision curve analysis was used to assess the clinical practicability of the model. **Results:** We found 215 coagulation-related adverse reactions （5.1%） in 4214 patients treated with CPZ/SAM. A final population of 208 cases and 624 controls was considered for model development and validation. Malnutrition, renal insufficiency, red blood cell count, parenteral nutrition, treatment duration and concomitant use of tigecycline or carbapenems were identified as final predictors. The model showed good discrimination and calibration ability in the development cohort （AUC=0.763（0.724-0.803）, Brier score = 0.148） and validation cohort （AUC=0.755（0.714-0.797）, Brier score = 0.152）. The decision curve analysis revealed that the clear net benefit of the model was higher compared with intervening in all or none of the patients. **Conclusions:** The nomogram model quantified the risk for coagulation-related adverse reactions in Chinese inpatients treated with CPZ/SAM, supporting individual assessment and interventions to mitigate the risk. External validation of the model is needed before considering the clinical implementation.

【KEYWORDS】Cefoperazone/Sulbactam; coagulation disorder; prediction model; LASSO; active surveillance; adverse drug reaction

1 前言

头孢哌酮/舒巴坦 （Cefoperazone/Sulbactam, CPZ/SAM） 是第三代头孢菌素和 β-内酰胺酶抑制剂的联合制剂，对革兰氏阴性杆菌引起的中重度感染疗效显著，在中国、印度等众多亚太国家被广泛使用[1, 2]。一种已知的副作用是维生素 K 依赖性的凝血功能障碍，它会显着增加大出血甚至死亡的风险[3-5]。补充维生素 K 和新鲜冰冻血浆可能有助于预防这一不良反应[6-8]。然而对于低风险患者来说，这可能是不必要的，因其疗效不确切、安全性存疑，且会导致医疗成本增加[4-6]。因此，如何及早识别高风险患者并针对性预防，是使患者获益最大化的关键，然而既往研究只关注个体风险因素，包括营养不良、肝功能衰竭、肾功能衰竭和既往出血史等[3, 9, 10]，缺少可用于识别这一风险的预测工具。本研究的目的是开发并内部验证一个预测模型，用于量化接受 CPZ/SAM 治疗的中国住院患者凝血功能障碍的发生风险。

2 材料和方法

2.1 数据来源

这项单中心病例对照研究在一家大型综合医院 （中国北京） 进行。我们团队研发的临床药物不良事件主动监测与智能评估警示系统 （Adverse Drug Events Active Surveillance and Assessment System Ⅱ, ADE-ASAS-II） 与医院信息系统 （Hospital Information System, HIS） 对接，基于触发器原理和文本识别技术，可提取患者信息、采集药品安全信号并提供预警 [11, 12]。该研究得到了当地伦理委员会的批准，数据按照《赫尔辛基宣言》的原则匿名存储。

2.2 研究设计

我们根据个体化预后或诊断的多变量预测模型的透明报告 （TRIPOD） 指南进行了样本量测算[13]。我们为每个潜在预测因子收集了至少 10 个事件以获得稳定的系数估计[14]。事件定义为 CPZ/SAM 给药后发生的凝血障碍。我们估计事件发生率为 5%[5, 8, 10]。假设失访率为 15%，则至少需要 1647 个事件来开发具有七个潜在预测因子的模型。

我们筛选了 18 岁及以上接受 CPZ/SAM （Sulperazon, 1.5g, 大连辉瑞制药有限公司） 静滴治疗超过 48 小时

的患者。同一患者多次住院分别计算例次，而住院期间多次使用 CPZ/SAM 者仅考虑首次用药的结果。排除标准如下：①治疗前后缺乏凝血指标检测；②患有严重肝病（Child-Pugh 评分≥10 分）、血液系统恶性肿瘤、终末期实体瘤、多器官功能衰竭、大出血、血液透析或/和严重创伤；③连续口服抗凝药或静脉输注肝素。

ADE-ASAS-II 筛选出 CPZ/SAM 相关凝血障碍的疑似病例，两名临床药师通过 Naranjo 量表评估了其因果关系[15]。因果关系评估分为肯定（≥ 9 分）、很可能（5-8 分）、可能（1-4 分）或不可能（≤ 0）。评分 ≥1 的所有患者被纳入病例组，随机抽取其余患者中的一部分做为对照组，两者用于开发和验证预测模型。

2.3 数据收集

患者数据从电子病历中收集，我们结合多学科专家意见和文献审查结果，确定了 38 个候选预测因子：①人口统计数据，包括年龄、 性别、体重指数 （BMI） 和住院天数；②合并症，包括营养不良、低蛋白血症、肿瘤、肝功能不全、肾功能不全、手术史、近 7 天出血史和通过病历计算的经年龄调整后的查尔森合并症指数（ACCI）[16]；③治疗信息，包括 CPZ/SAM 的用药天数、平均日剂量、累积剂量，同时接受肠外营养治疗 3 天以上，或使用抗血小板聚集药物、非甾体类抗炎药、其他抗菌药物 （包括左氧氟沙星、奥硝唑、替加环素、碳青霉烯类抗菌药物）；④实验室检查基值，包括谷丙转氨酶、谷草转氨酶、白蛋白、总胆红素、血肌酐、红细胞计数、白细胞计数、中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比、血小板计数、中性粒细胞与淋巴细胞比值、血小板与淋巴细胞比值、C 反应蛋白、血浆纤维蛋白原、D 二聚体以及结局指标 （PT、APTT、TT），基值定义为用药前 15 天内最近一次实验室测量结果。

我们将凝血功能基值异常定义为 PT > 15 秒、aPTT > 45 秒和/或 TT > 21 秒，并将 PT、aPTT 或 TT 较基线增加 25% 定义为 CPZ/SAM 相关凝血障碍[10]。根据欧洲临床营养与代谢学会 （ESPEN） 的共识声明，我们通过使用 BMI 和营养风险指数来识别营养不良[17, 18]。使用 CKD-EPI 方程计算肾小球滤过率 （eGFR）[19]，并将 eGFR < 60 ml/min 定义为肾功能不全。大约 3% 的病例 （n = 7） 缺少一个或多个预测因子的数据，缺失数据被视为完全随机缺失，因此这些病例被排除在进一步分析之外[13]。

2.4 统计分析

所有统计分析工作均使用 R 4.2.2 和 spss 27.0 完成。P 值<0.05 时定义为差异有统计学意义。

仅病例组的红细胞计数为正态分布，以平均值±标准差表示，其他连续变量用中位数 （四分位数范围） 表示，分类变量用绝对数 （百分比） 表示。为了比较病例组和对照组之间的差异，对连续变量进行 Mann-Whitney U 检验，对分类变量进行卡方检验。为了建立 Logistic 回归模型，使用最小绝对收缩和选择算子（LASSO） 算法筛选候选预测因子。“rms”R 包 （https://cran.r-project.org/web/packages/rms/） 用于构建静态诺模图，而“dyNom”R 包 （https://cran.r-project.org/web/packages/DynNom/index.html） 用于构建基于 Web 的动态诺模图。使用增强 Bootstrap 方法对模型进行内部验证。模型的区分度评价指标为 AUC。绘制校准曲线以分析预测概率与实际观测值的一致性，并通过 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验以及计算 Brier 分数评估模型的校准度。决策曲线分析 （Decision Curve Analysis, DCA） 用于确定预测的净收益阈值，以评估模型的临床效用。

3 结果

3.1 病例基本特征

ADE-ASAS-II 监测了 231,705 例住院患者，其中 11092 例患者接受了 CPZ/SAM 治疗。约有 4214 例患者符合纳入标准，其中 668 例被系统识别为可疑病例。通过 Naranjo 评分确定 215 例阳性病例 （6 例肯定、37 例很可能、172 例可能）。CPZ/SAM 相关性凝血障碍的总发生率为 5.10% （215/4214），其中 PT 延长 1.61%（68/4214），aPTT 延长 3.70% （156/4214），TT 延长 0.40% （17/4214）。凝血功能障碍多发生在 CPZ/SAM 给药后 14 天内 （90.91%）。共 832 例患者被用于模型开发和验证 （图 1）。患者基线特征如表 1 所示。

3.2 模型的建立与呈现

初始模型共包括 38 个变量，随着惩罚系数（λ）的变化，部分变量的系数被压缩到 0 （图 2）。图 3 为五倍交叉验证误差图，左侧垂直虚线表示最小均方误差，表示预测模型的最佳性能。为了进一步简化模型，我们选择了与最小均方误差相差一个标准差的 λ （右侧垂直虚线）。简化模型包含 7 个预测因素，包括营养不良 （是=1，否=0）、肾功能不全 （是=1，否=0）、治疗时间、肠外营养 （≥3 天=1，<3 天=0）、联用替加环素 （是=1，

否=0） 或碳青霉烯类抗菌药物 （是=1，否=0） 以及红细胞计数 （表 2）。CPZ/SAM 相关凝血功能障碍的风险概率公式为：概率（P）=1/（1+EXP（-（-1.22+营养不良×0.82+肾功能不全×1.06+治疗时间×0.10+肠外营养×0.73+替格环素×0.99+碳青霉烯×1.46-红细胞计数×0.40））。

列线图 （图 4） 中各个预测指标所对应的分数 （顶部标尺） 相加得到总分 （底部标尺），总分对应的概率即为使用 CPZ/SAM 的患者发生凝血功能障碍的风险概率。我们还建立了网页版动态诺模图（图 5），以便更快捷地计算预测概率，网址如下：https://coagulopathypredict.shinyapps.io/dynnomapp/。

3.3 模型的评估与验证

模型在原始数据集中 AUC 为 0.763（0.724-0.803），Bootstrap 验证集为 0.755（0.714-0.797），平均高估值为 0.008，显示了较好的辨别能力。校准图表明观察概率和预测概率之间具有较好的一致性 （图 7），Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验结果 P=0.217，Brier 分数为 0.148（验证后 0.152）均说明模型校准良好。DCA 曲线如图 8 所示，y 轴表示潜在风险患者的净收益，x 轴表示风险阈值。当阈值概率为 0.10 到 0.95 时，应用该预测模型比干预所有患者 （灰色斜线） 或不干预任何患者 （黑色水平线） 提供更多净收益。

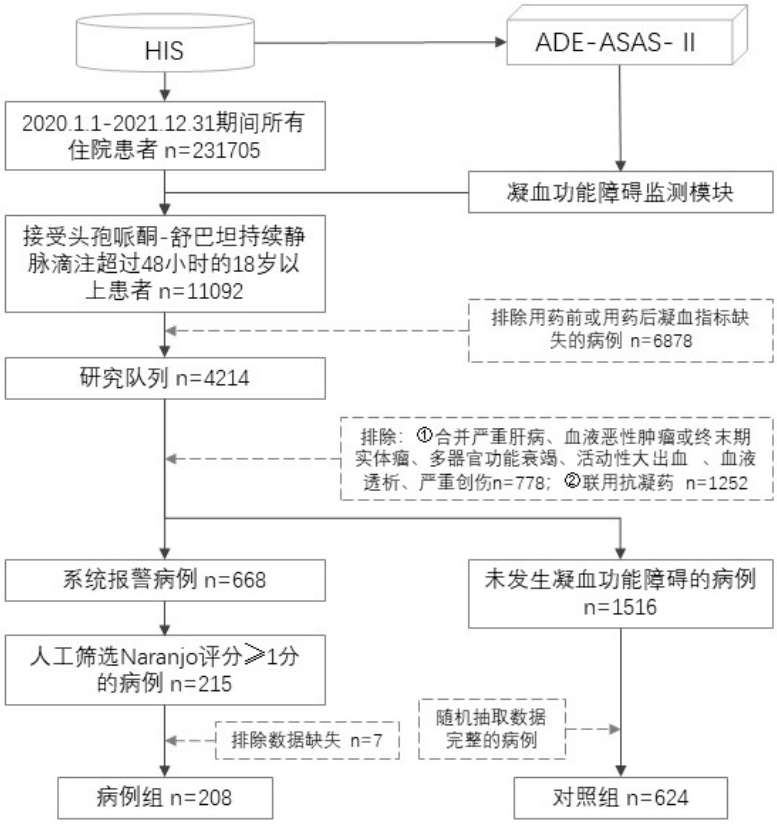


图 1 病例入选流程图

表 1 患者基线资料比较

指标	病例组 （n=208）	对照组 （n=624）	$t/U/c^2$ 值	P 值
人口学信息				
BMI , Median （IQR）	23.8 （21.5, 26.1）	23.9 （21.5, 26.0）	63198.500	0.572
年龄, Median （IQR）	67 （53, 84）	65 （51,76）	57690.000	0.016
性别 ,男, n （%）	129 （62.0）	378 （60.6）	0.136	0.712
住院天数, Median （IQR）	23 （16, 44）	18 （12, 30）	49615.500	<0.001
合并诊断, n （%）				

营养不良	86 （41.3）	88 （14.1）	63.600	<0.001
低蛋白血症	96 （46.2）	235 （37.7）	4.698	0.030
恶性肿瘤	55 （36.4）	178 （28.5）	0.336	0.562
肝功能不全 （Child-Pugh A/B）	23 （11.1）	56 （9.0）	0.788	0.375
肾功能不全	49 （23.6）	58 （9.3）	28.318	<0.001
近期外科手术	35 （16.8）	153 （24.5）	5.278	0.022
近期出血	79 （38.0）	232 （37.2）	0.043	0.836
ACCI, Median （IQR）	5 （3, 6）	5 （3, 6）	59470.000	0.068
治疗信息				
疗程 ,Median （IQR）	10 （6, 14）	6 （3, 9）	40244.000	<0.001
平均日剂量 （g）, Median （IQR）	6 （6, 6）	6 （6, 6）	61827.000	0.227
累积剂量 （g）, Median （IQR）	58 （30, 90）	34 （19, 55）	42954.000	<0.001
合并用药, n （%）				
肠外营养液	86 （41.3）	188 （30.1）	8.888	0.003
抗血小板聚集药物	29 （13.9）	76 （12.2）	0.440	0.507
非甾体类抗炎药	22 （10.6）	80 （12.8）	0.730	0.393
左氧氟沙星	32 （15.4）	58 （9.3）	5.997	0.014
奥硝唑	32 （15.4）	129 （20.7）	2.796	0.095
替加环素	24 （11.5）	12 （1.9）	34.841	<0.001
碳青霉烯类抗菌药物	21 （10.1）	17 （2.7）	19.450	<0.001
实验室参数, Mean±Std/Median （IQR）				
谷丙转氨酶 （U/L）	18.6 （11.2, 33.0）	16.9 （11.1, 33.8）	64350.500	0.856
谷草转氨酶 （U/L）	20.5 （15.5, 31.1）	18.6 （13.8, 29.6）	59033.500	0.051
白蛋白 （g/L）	36.6 （32.2, 39.8）	37.2 （33.4, 40.5）	58590.500	0.036
总胆红素 （umol/L）	10.5 （7.3, 17.3）	10.8 （7.5, 17.3）	64787.000	0.971
血肌酐 （umol/L）	65.4 （53.6, 96.7）	69.5 （56.3, 84.5）	64535.000	0.904
红细胞计数 （10^12/L）	3.58±0.75	4.03 （3.57, 4.46）	44598.000	<0.001
白细胞计数 （10^9/L）	8.10 （5.78, 11.06）	7.39 （5.47, 10.48）	60716.000	0.164
中性粒细胞占比	0.77 （0.68, 0.84）	0.73 （0.61, 0.84）	58419.000	0.031
淋巴细胞占比	0.14 （0.09, 0.19）	0.17 （0.09, 0.29）	56109.500	0.003
血小板 （10^9/L）	197 （157, 276）	200 （159, 253）	63849.500	0.727
C 反应蛋白 （mg/dL）	1.73 （0.48, 4.59）	1.00 （0.10, 4.14）	53687.000	<0.001
纤维蛋白原 （g/L）	3.72 （3.00, 4.80）	3.51 （2.80,4.60）	58654.500	0.038
D 二聚体 （mg/mL）	1.61 （0.70, 2.90）	1.07 （0.41, 2.37）	54510.500	<0.001
凝血指标基值异常, n （%）	53 （25.5）	118 （18.9）	4.125	0.042
中性粒细胞/淋巴细胞	5.35 （3.34, 8.91）	4.22 （2.16, 8.96）	56672.500	0.006
血小板/淋巴细胞	184.73 （131.67, 275.07）	162.76 （111.60, 238.63）	56816.500	0.007

注：ACCI, Age-adjusted Charlson Comorbidity Index, 经年龄调整后的查尔森指数。

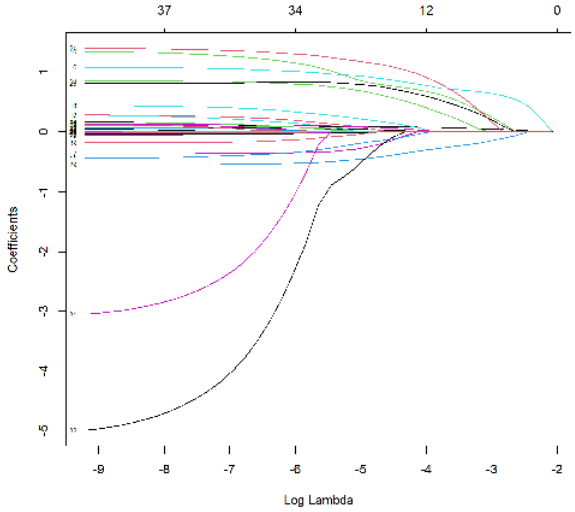


图 2 LASSO 回归模型的系数分布图

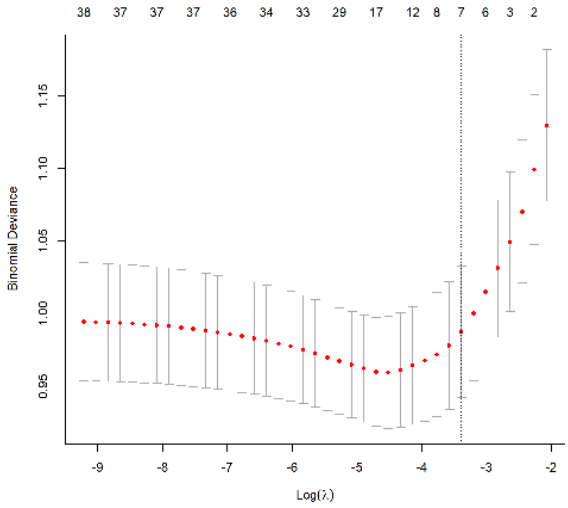


图 3 LASSO 回归模型的交叉验证误差图

注：1. Y 轴表示均方误差，λ 表示惩罚系数，X 轴表示λ的对数值；2. 左侧虚线表示模型均方误差最小时对应的 Log（λ），右侧虚线表示距离最小均方误差一个标准差时对应的 Log（λ）

表 2 最终预测模型

指标	系数	标准误	OR 值 （95%CI）	P 值
截距	-1.22	0.58		<0.05
营养不良	0.82	0.22	2.28 （1.49, 3.49）	<0.001
肾功能不全	1.06	0.25	2.89 （1.75, 4.74）	<0.001
用药天数	0.10	0.02	1.11 （1.07, 1.14）	<0.001
合并肠外营养	0.73	0.19	2.07 （1.42, 3.04）	<0.001
联用替加环素	0.99	0.44	2.69 （1.14, 6.51）	<0.05
联用碳青霉烯类抗菌药物	1.46	0.39	4.31 （2.01, 9.29）	<0.001
红细胞计数	-0.40	0.14	0.67 （0.51, 0.88）	<0.01

注：1. OR, Odds Ratio, 比值比; 2. CI, Confidence Interval, 置信区间。

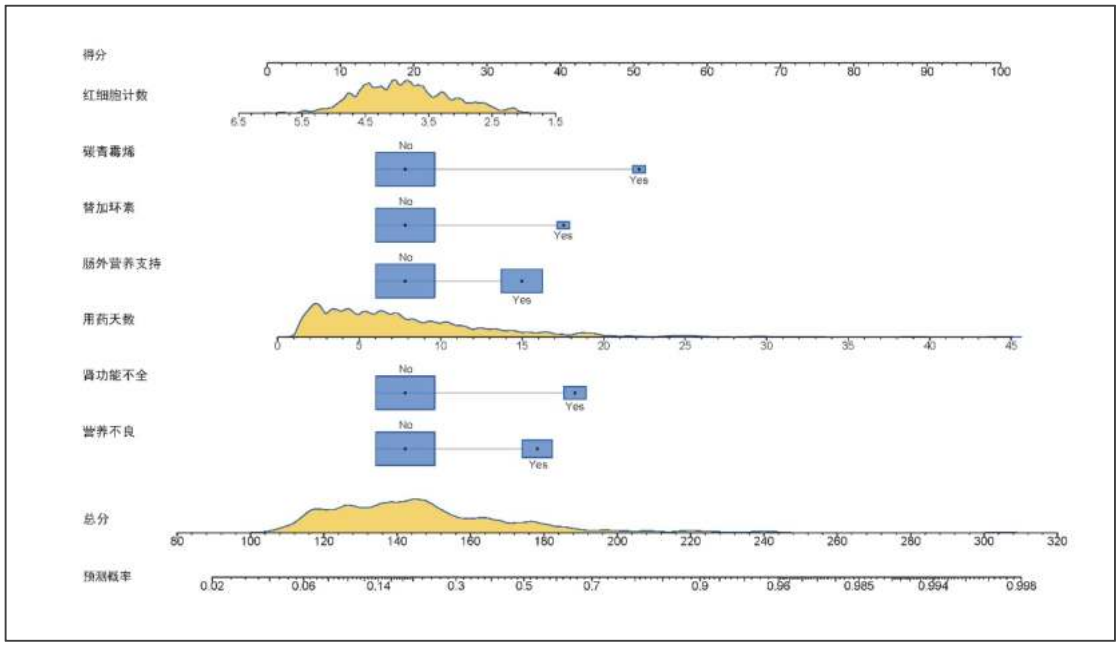


图 4 预测模型的列线图

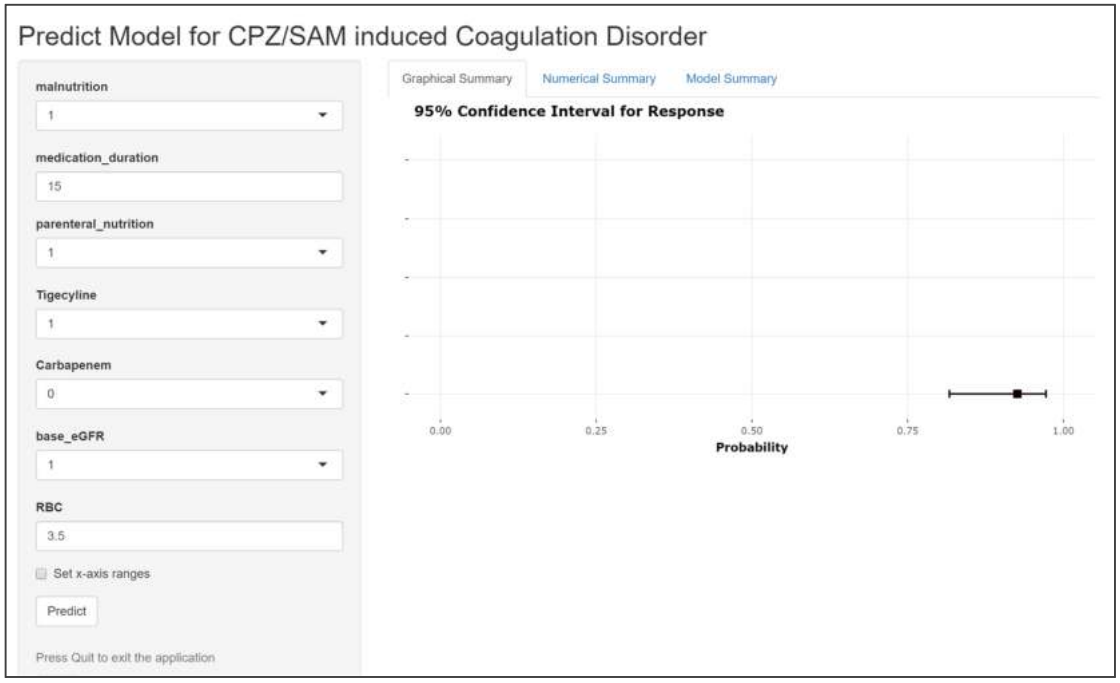


图 5 预测模型的网页版动态诺模图

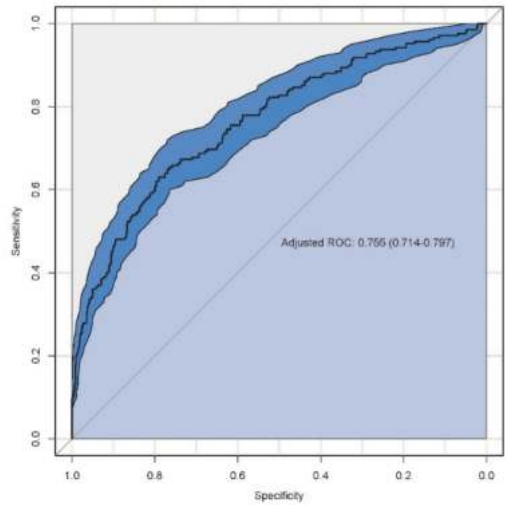


图 6 模型的受试者工作特征 （ROC） 曲线

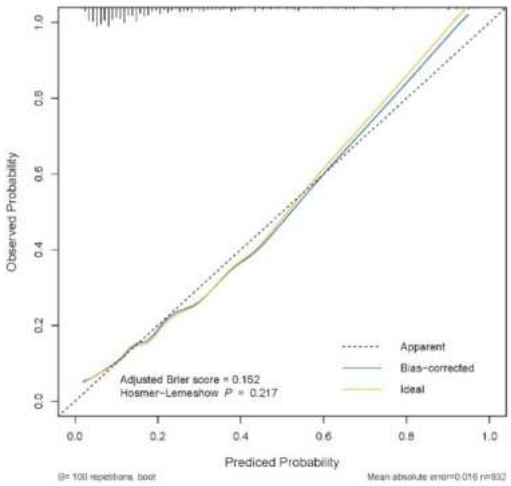


图 7 模型的校准曲线

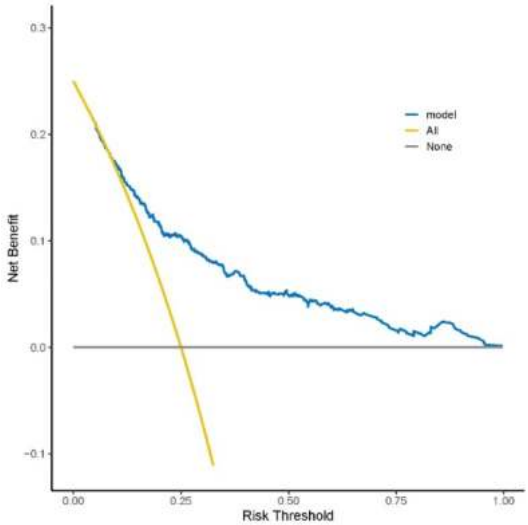


图 8 模型的决策曲线分析 （DCA） 曲线

4 讨论

4.1 ADR 发生率

本研究中 CPZ/SAM 相关凝血障碍的患病率 （5.1%） 低于既往研究 （9.2%）[10]。这一差异可能归因于我们严格的排除标准，包括严重肝病、恶性血液病、严重创伤、联合应用抗凝剂以及包括终末期恶性肿瘤和多器官功能衰竭在内的终末期疾病。这些情况往往与凝血障碍有关，有可能增加与 CPZ-SAM 相关凝血障碍的患病率[20-23]。

4.2 模型总结

诺模图是临床医生评估肿瘤患者预后的重要临床工具。本研究中，我们开发了一个静态诺模图和基于网络的动态诺模图的预测模型，用于预测中国住院患者中与 CPZ/SAM 相关的凝血障碍。我们采用增强 Bootstrap 方法进行内部验证，获得了模型的无偏估计[24]。该模型在 CPZ/SAM 治疗前识别高危患者方面显示出良好的区分度和校准度。临床医生可以在 0.10-0.95 的概率范围内确定风险阈值，以便在患者的风险高于该水平时进行早期干预 （例如，调整抗菌药物方案或补充维生素 K），相较于对所有患者进行干预或不干预，使用该模型可使患者获益更大。因此，基于预测模型而非医生的主观判断，可能更有助于实现个体化用药风险评估和管控，以预防 CPZ/SAM 相关的凝血障碍。

4.3 模型的预测变量

模型包含的七个预测因素中，营养不良和肾功能不全与凝血功能障碍显著相关[3, 9]。维生素 K 是血液凝固的关键，在营养不良的病人中可能缺乏[8]。此外，血清蛋白和其他微量营养素的缺乏也可干扰凝血机制[25, 26]。肾功能的下降会增加 CPZ/SAM 的血液浓度和胆汁排泄水平，增强对维生素 K 在胃肠道合成的抑制作用，从而增加凝血异常的风险[27]。由于一些肠外营养制剂中缺乏维生素 K，接受长期肠外营养的病人也可能发生维生素 K 缺乏[28]。长时间的治疗是 CPZ/SAM 相关凝血功能障碍的另一个预测因素，可能与药物在体内的蓄积有关。

我们的研究结果表明，部分抗菌药物与 CPZ/SAM 联用会增加凝血功能障碍的风险，其中联用替加环素或碳青霉烯类抗菌药物被纳入最终模型。CPZ/SAM 联合替加环素或碳青霉烯类药物被广泛用于治疗多重耐药鲍曼不动杆菌引起的血液感染[29, 30]。与单独使用替加环素相比，使用 CPZ/SAM 和替加环素联合治疗的患者 INR 和 aPTT 异常的风险增加[31]。已知替加环素可能通过多种途径干扰凝血机制[32]。暂无研究评估 CPZ/SAM 联合碳青霉烯类药物对凝血的影响，碳青霉烯类药物是一类广谱抗生素，与 CPZ/SAM 一样可能抑制维生素 K 的肠道合成[27, 33]。据此我们合理推测，头孢哌酮与这两种抗菌药物联用可能对凝血系统造成“双重打击”，加重不良反应的发生。然而，由于接受联合用药的病例数量不足，导致两个预测因子的系数估计不够稳定，可能使模型表现出现偏差。

本研究首次报告了红细胞计数是 CPZ/SAM 相关凝血功能障碍的预测因素。红细胞通过与血小板、Von Willebrand 因子和纤维蛋白原相互作用影响凝血级联反应[34, 35]。而输注红细胞有助于纠正贫血患者的难治性出血[36]。由于缺乏可用于确定凝血功能障碍风险的临床阈值，我们没有将红细胞计数作为二分变量进行评估[35]。

4.4 优势和局限性

本研究的优势之一在于 ADE-ASAS-Ⅱ可自动筛选疑似 CPZ/SAM 相关凝血功能障碍的病例。其二，我们首次使用预测模型来量化 CPZ/SAM 的用药风险，且列线图和网页计算器的呈现方式使得临床应用更加灵活、便捷。模型包含的七个预测因子在临床实践中广泛使用且易于获得，使该模型适用于各种医疗环境。我们的研究结果也受到局限性的影响。首先，这是一项单中心的病例对照研究，不可避免存在选择偏倚、数据缺失等固有缺陷。由于这些原因，我们没有进行外部验证。其次，使用严格的纳排标准可能造成病例丢失，从而低估了事件发生率。此外，一些预测因子的贡献较小，可能会使模型的估计出现偏差。需要设计样本量更大的前瞻性研究对我们的预测模型进行外部验证。

5 结论

本研究评估了中国住院病人中 CPZ/SAM 相关凝血功能障碍的患病率和风险因素。在同类型研究中首次创建并应用了诺模图预测模型来量化 CPZ/SAM 相关凝血功能障碍的风险。该模型显示出良好的辨别、校准能力和临床实用性，有助于支持个体化用药风险评估和管控，但需要进行外部验证以确定该模型的可重复性和通用性。

参考文献

[1] CHANG P-C, CHEN C-C, LU Y C, et al. The impact of inoculum size on the activity of cefoperazone-sulbactam against multidrug resistant organisms [J]. Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi, 2018, 51（2）: 207-213.

[2] JI X W, ZHU X, LI Y, et al. Model-Informed Drug Development of New Cefoperazone Sodium and Sulbactam Sodium Combination （3:1）: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis and Antibacterial Efficacy Against Enterobacteriaceae [J]. Frontiers in pharmacology 527, 2022, 13（856792）.

[3] GRASELA T H, JR., WALAWANDER C A, WELAGE L S, et al. Prospective surveillance of antibiotic-associated coagulopathy in 970 patients [J]. Pharmacotherapy, 1989, 9（3）: 158-164.

[4] ROCKOFF S D, BLUMENFRUCHT M J, IRWIN R J, JR., et al. Vitamin K supplementation during prophylactic use of cefoperazone in urologic surgery [J]. Infection, 1992, 20（3）: 146-148.

[5] STROM B L, SCHINNAR R, GIBSON G A, et al. Risk of bleeding and hypoprothrombinaemia associated with NMTT side chain antibiotics: using cefoperazone as a test case [J]. Pharmacoepidemiology and drug safety, 1999, 8（2）: 81-94.

[6] WALSH T S, STANWORTH S J, PRESCOTT R J, et al. Prevalence, management, and outcomes of critically ill patients with prothrombin time prolongation in United Kingdom intensive care units [J]. Critical care medicine, 2010, 38（10）: 1939-1946.

[7] CAI Z, YANG W, HE Y, et al. Cefoperazone/Sulbactam-Induced Abdominal Wall Hematoma and Upper Gastrointestinal Bleeding: A Case Report and Review of the Literature [J]. Drug safety - case reports, 2016, 3（1）: 2.

[8] WU S, WU G, WU H. A Comparison of Coagulation Function in Patients Receiving Aspirin and Cefoperazone-Sulbactam With and Without Vitamin K（1）: A Retrospective, Observational Study [J]. Clinical therapeutics, 2021, 43（12）: e335-e345.

[9] CHEN L J, HSIAO F Y, SHEN L J, et al. Use of Hypoprothrombinemia-Inducing Cephalosporins and the Risk of Hemorrhagic Events: A Nationwide Nested Case-Control Study [J]. PloS one, 2016, 11（7）: e0158407.

[10] WANG W, LIU Y, YU C, et al. Cefoperazone-sulbactam and risk of coagulation disorders or bleeding: a retrospective cohort study [J]. Expert opinion on drug safety, 2020, 19（3）: 339-347.

[11] CHEN C, JIA W P, GUO D H, et al. Development of a Computer-Assisted Adverse Drug Events Alarm and Assessment System for Hospital Inpatients in China [J]. Ther Innov Regul Sci, 2020, 54（1）: 32-41.

[12] YU C, GUO D, YAO C, et al. Clinical Characteristics of Hospitalized Patients with Drug-Induced Acute Kidney Injury and Associated Risk Factors: A Case-Control Study [J]. Biomed Research International, 2020, 2020.

[13] MOONS K G, ALTMAN D G, REITSMA J B, et al. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis （TRIPOD）: explanation and elaboration [J]. Annals of internal medicine, 2015, 162（1）: W1-73.

[14] PEDUZZI P, CONCATO J, KEMPER E, et al. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis [J]. Journal of clinical epidemiology, 1996, 49（12）: 1373-1379.

[15] NARANJO C A, BUSTO U, SELLERS E M, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clinical pharmacology and therapeutics, 1981, 30（2）: 239-245.

[16] GLASHEEN W P, CORDIER T, GUMPINA R, et al. Charlson Comorbidity Index: Update and Translation [J]. Am Health Drug Benefits, 2019, 12（4）: 188-197.

[17] YAMADA K, FURUYA R, TAKITA T, et al. Simplified nutritional screening tools for patients on maintenance hemodialysis [J]. The American journal of clinical nutrition, 2008, 87（1）: 106-113.

[18] CEDERHOLM T, BOSAEUS I, BARAZZONI R, et al. Diagnostic criteria for malnutrition - An ESPEN Consensus Statement [J]. Clinical nutrition （Edinburgh, Scotland）, 2015, 34（3）: 335-340.

[19] STEVENS P E, LEVIN A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease:

improving global outcomes 2012 clinical practice guideline [J]. Annals of internal medicine, 2013, 158（11）: 825-830.
[20] BARLETTA J F, COOPER B, OHLINGER M J. Adverse drug events associated with disorders of coagulation [J]. Critical care medicine, 2010, 38（6 Suppl）: S198-218.
[21] TRIPODI A, MANNUCCI P M. The coagulopathy of chronic liver disease [J]. The New England journal of medicine, 2011, 365（2）: 147-156.
[22] FALANGA A, RUSSO L, MILESI V. The coagulopathy of cancer [J]. Current opinion in hematology, 2014, 21（5）: 423-429.
[23] MAEGELE M. The Diagnosis and Treatment of Acute Traumatic Bleeding and Coagulopathy [J]. Deutsches Arzteblatt international, 2019, 116（47）: 799-806.
[24] ABRAM S V, HELWIG N E, MOODIE C A, et al. Bootstrap Enhanced Penalized Regression for Variable Selection with Neuroimaging Data [J]. Frontiers in neuroscience, 2016, 10（344）.
[25] ABDELHAFIZ A H, MYINT M P, TAYEK J A, et al. Anemia, hypoalbuminemia, and renal impairment as predictors of bleeding complications in patients receiving anticoagulation therapy for nonvalvular atrial fibrillation: a secondary analysis [J]. Clinical therapeutics, 2009, 31（7）: 1534-1539.
[26] MOUSTAFA F, DOPEUX L, MULLIEZ A, et al. Severe undernutrition increases bleeding risk on vitamin-K antagonists [J]. Clinical nutrition （Edinburgh, Scotland）, 2021, 40（4）: 2237-2243.
[27] HU H R. Fatal Vitamin K-Dependent Coagulopathy Associated with Cefoperazone/Sulbactam: A Case Report [J]. Drug safety - case reports, 2019, 6（1）: 6.
[28] SHEARER M J. Vitamin K in parenteral nutrition [J]. Gastroenterology, 2009, 137（5 Suppl）: S105-S118.
[29] NIU T, LUO Q, LI Y, et al. Comparison of Tigecycline or Cefoperazone/Sulbactam therapy for bloodstream infection due to Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii [J]. Antimicrobial resistance and infection control, 2019, 8（52）.
[30] YU K, ZENG W, XU Y, et al. Bloodstream infections caused by ST2 Acinetobacter baumannii: risk factors, antibiotic regimens, and virulence over 6 years period in China [J]. Antimicrobial resistance and infection control, 2021, 10（1）: 16.
[31] HU J, XIAO Y H, ZHENG Y, et al. Clinical characteristics and risk factors of tigecycline-associated hypofibrinogenaemia in critically ill patients [J]. European journal of clinical pharmacology, 2020, 76（7）: 913-922.
[32] LENG B, SHEN C, GAO T, et al. Incidence, characteristics and risk factors of hypofibrinogenemia associated with tigecycline: A multicenter retrospective study in China [J]. Frontiers in pharmacology 527, 2022, 13（943674）.
[33] HAKEAM H A, AL DUHAILIB Z, SALAHUDDIN N, et al. Impact of tigecycline versus imipenem-cilastatin on fibrinogen levels following cytoreductive surgery （CRS） and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy （HIPEC）: a randomized-controlled study [J]. J Chemother, 2018, 30（4）: 224-232.
[34] WEISEL J W, LITVINOV R I. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis [J]. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2019, 17（2）: 271-282.
[35] GILLESPIE A H, DOCTOR A. Red Blood Cell Contribution to Hemostasis [J]. Frontiers in pediatrics, 2021, 9（629824）.
[36] YAOI H, SHIDA Y, OGIWARA K, et al. Role of red blood cells in the anemia-associated bleeding under high shear conditions [J]. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia, 2017, 23（5）: 750-758.

SRSF6 影响 RNA 可变剪切作为耐 ADT 前列腺癌的一个潜在治疗靶点

付晨，陈秋晨

中国医科大学药理学 辽宁 110017

【简介】前列腺癌（PCa）的治疗主要基于对雄激素受体（AR）信号通路的阻断，即所谓的雄激素剥夺疗法（ADT）。不幸的是，一些患者对这种药物治疗方法产生了耐药性，形成了耐 ADT 的前列腺癌（CRPC），这是这种病理学中最具侵袭性的表型，如今仍然是致命的。因此，非常需要有新的分子靶点来制定更有效的治疗策略。某种程度上，RNA 剪切过程的改变已经成为癌症发生发展的的重要新标志。在此，我们研究了 SRSF6 的表达和病理生理作用和致癌潜力。**材料和方法：**首先利用公共数据库对临床上相关的 PCa 患者群进行亚型分类，并对各种亚型进行基因差异性和预后分析，并进行功能富集相关作用通路。通过 qPCR 和免疫组织化学方法对两个 AR 特征明显差异的队列中的 SRSF6 水平进行了检测，并对 SRSF6 的沉默（使用特定的 siRNA）进行了多种功能和机制的检测。此外，我们还使用异种移植小鼠模型测试了 SRSF6 沉默的体内效果。最后，我们分析了 SRSF6 的表达水平与 AR 信号和对 ADT 的抗性之间的关系。**结果和讨论：**作为推断表达差异与预后相关的生物途径的策略，我们对 5 个 PCa 亚型队列的临床和转录数据进行了 GSEA。这种计算方法指出，SRSF6 在 PCa 样本中上调，其水平与 PCa 侵袭性的关键临床和分子参数[如 Gleason 等级、AR 信号通路]直接相关。此外，SRSF6 降低明显降低了 PCa 细胞功能如增殖和迁移率，以及克隆形成。从机制上讲，SRSF6 降低改变了 AR 可变剪接，特别是减少了致癌剪接变体 AR-V7。动物体内显示，用 SRSF6 siRNA 治疗减少了 PCa 衍生肿瘤的大小，其机制可能影响了关键分子途径 AR 信号通路。**结论：**综上所述，抑制 AR 基因可变剪切可能是 PCa 晚期肿瘤的新的治疗策略。我们的策略可以通过抑制 SRSF6 来激活 AR 途径促进内在和外在的肿瘤抑制。从概念上讲，这些观点支持基于降低 SRSF6 表达作为 PCa 的精准医疗策略的实施，我们的研究结果表明，SRSF6 通过改变致癌性 AR-V7 变体的剪接来影响 AR 信号，所以，靶向 SRSF6 可以作为一种治疗晚期 PCa 和耐 ADT 的 PCa 的新型治疗策略。

【关键词】SRSF6，可变剪切，前列腺癌，治疗

甘露聚糖、叶酸双靶向物质修饰甲基澳瑞他汀 E 抗肿瘤机制的研究

高迪迪

（山东大学青岛校区 山东 青岛 266237）

海兔毒素 10 衍生物甲基澳瑞他汀 E (MMAE)其具有很强的杀伤作用，具有很高抑制活性，可以用于肿瘤细胞的抗增殖，抗转移，促凋亡等，是一种拥有广阔前景的细胞毒素分子。肝癌是一种死亡率高、严重威胁人类健康的重大疾病之一。在全世界的范围内其致死率为第 3 位。我国是肝癌的高发病地区，据报道，我国肝癌的发病率在恶性肿瘤中排第 4 位，在癌症死亡中排第 2 位，仅低于肺癌。目前，对肝癌最有效的治疗手段仍是手术切除，然而术后较高的复发与转移率严重影响着患者疗效，如何能够有效的对肝癌进行预防与治疗，是当前研究中的难点和热点。大量实验研究表明细胞在恶变过程中，其表面的糖蛋白会发生比较复杂的改变，甘露糖（Man）的改变是最常见的。一些恶性肿瘤如肝癌、肾癌及乳腺癌等在其细胞表面均有高表达的甘露糖受体。叶酸受体在肿瘤细胞表面相较于正常细胞处于高表达的状态，叶酸（FA）-药物共聚物与肿瘤细胞膜表面高表达的叶酸受体结合，并富集于靶细胞特定区域（包涵体有衣小凹处）。利用叶酸和甘露聚糖靶向作用于肝癌细胞表面，经细胞内吞作用，释放小毒素分子，抑制微管蛋白的聚合，起到抗肿瘤的作用。

CD36 靶向近红外荧光分子探针在肺癌成像诊断中的应用

高敏芳，周坤城，涂远彪*

（江西中医药大学癌症研究中心，江西 南昌 330004）

【摘要】肺癌的发病率和死亡率均居所有恶性肿瘤之首，肺癌的治疗手段因肺癌的类型、分期等因素而有所不同。对早期肺癌患者而言，手术治疗是最常用的治疗手段。特异性的近红外分子探针结合实时可视化的荧光成像技术对引导肺癌手术导航具有重要意义。因此，我们通过异硫氰酸荧光素（FITC）与花菁类近红外染料 MPA 分别标记了血小板反应蛋白-1（TSP-1）模拟肽 ABT-510，合成了荧光探针 FITC-PEG_4-ABT-510 和 MPA-PEG_4-ABT-510，用于肺癌 H1299 中高度上调的 CD36 蛋白的靶向成像。探针 FITC-PEG_4-Ang II 的体外细胞实验表明了其能与肺癌细胞 H1299 特异性结合。皮下异种移植肿瘤模型的活体成像结果指出，探针 MPA-PEG_4-ABT-510 可强选择性、高信噪比地靶向至 CD36 高表达的 HT29 肿瘤，并展现出肿瘤长时间成像窗。探针注射 12 小时后的离体器官的荧光定量结果表明，在皮下肺癌 H1299 肿瘤模型中，肿瘤与正常肺组织的信噪比分别 7.83 ± 0.82，体现出了探针 MPA-PEG_4-ABT-510 能在体内高对比度识别 CD36 高表达肺癌的潜力。综上所述，基于多肽 ABT-510 的近红外荧光探针 MPA-PEG_4-ABT-510 有望用于 CD36 阳性肺癌的靶向成像和手术导航。

三取代哌嗪类非共价 SARS-CoV-2 主蛋白酶抑制剂的设计、合成和生物学评价

高升华，宋乐天，刘新泳*，展鹏*

（山东大学药物化学研究所 山东 250001）

The continuously spreading of SARS-CoV-2 require additional effective antiviral agents to not only combat the highly infectious variants, but also emerging coronaviruses. Here, we report the discovery of potent non-covalent non-peptide main protease inhibitors featuring a novel scaffold with prominent antiviral activity and improved pharmacokinetic properties. After three-round focalized modifications, three series 1,2,4-trisubstituted piperazine derivatives were designed and synthesized. The optimal compound GC-78-HCl exhibited high potency enzyme inhibition (IC_{50} = 0.19 μM) and excellent antiviral activity (EC_{50} = 0.40 μM), displaying 3-fold improvement than that of lead compound GC-14 (EC_{50} = 1.28 μM) and reaching the same level that of nirmatrelvir (EC_{50} = 0.38 μM). Additionally, GC-78-HCl possessed potent antiviral activities towards the tested SARS-CoV-2 variants (EC_{50} = 0.21−0.25 μM) and human coronaviruses HCoV-OC43 and HCoV-229E, indicating its potential broad-spectrum property. Furthermore, GC-78-HCl displayed low cytotoxicity and high target selectivity for SARS-CoV-2 M^{pro}. Notably, the pharmacokinetic properties GC-78-HCl were significantly improved compared to the lead compound GC-14 and the oral bioavailability increased from 7% to 20% without ritonavir. This work discovers a novel non-peptidic non-covalent SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor with promising antiviral activity and enhanced pharmacokinetic profiles.

【Key wards】SARS-CoV-2; Main Protease; Non-covalent Inhibitor; Broad-spectrum; Pharmacokinetic Profiles.

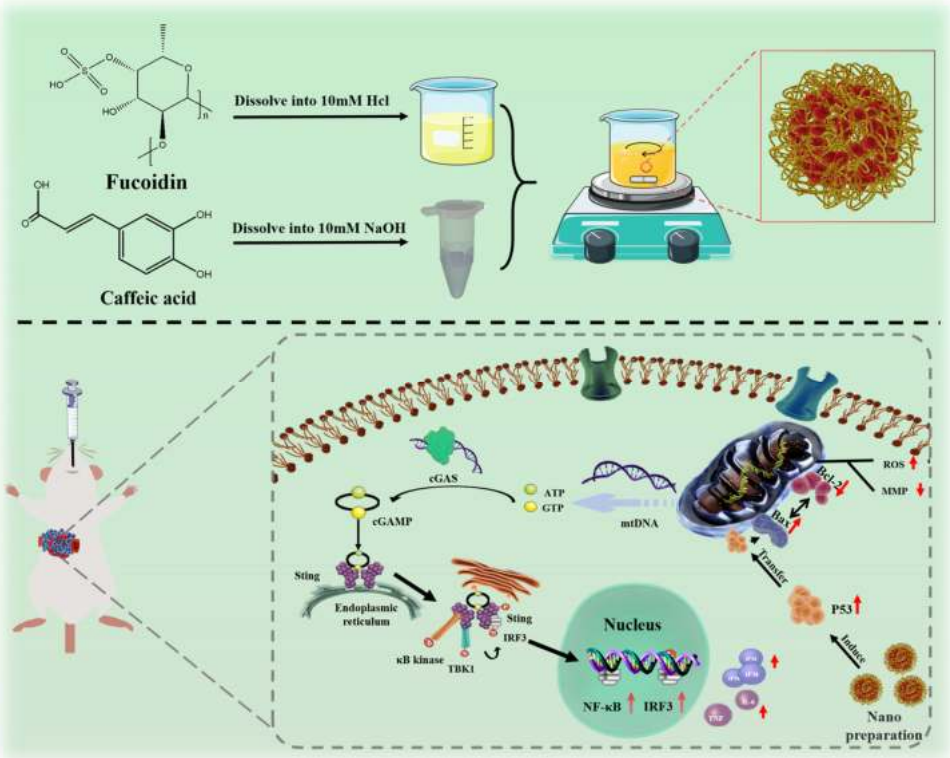
岩藻多糖/咖啡酸纳米颗粒调控 cGAS/STING 通路发挥抗肿瘤作用和缓解肾损伤机制研究

高新涛[1]，郭传龙[1]，*

（[1]青岛科技大学，山东省青岛市市北区郑州路 53 号，266042）

【摘要】岩藻多糖(FU)是褐藻中提取的天然多糖，具有多种生理活性，是一种优良的药物递送材料。本研究使用 pH 驱动法制备了负载咖啡酸（CA）的 FU 纳米颗粒（FU/CA NPs），并探讨了其抗肿瘤中的作用机制。FU/CA NPs 的粒径为 127.22 ± 2.6 nm，zeta 电位 38.57 ± 1.75 mV。体外研究证实，FU/CA NPs 具有显著的抗肿瘤活性，可以抑制 Hela 细胞的增殖和迁移能力。进一步的机制研究显示，FU/CA NPs 通过上调 p53 蛋白表达诱导凋亡。p53 激活后，Bax/Bcl-2 比值增加，导致线粒体膜电位丧失，触发凋亡程序；同时线粒体膜通透性增加致使 mtDNA 的易位激活了 cGAS/STING 通路，进一步强化凋亡程序。此外，体内结果还表明，FU/CA NPs 可以逆转化疗药物顺铂造成的急性肾损伤（AKI），包括抑制顺铂引起的血尿素氮（BUN）和血清肌酐（SCr）水平的增加。总而言之，本研究表明 FU/CA NPs 在肿瘤治疗中具有远大前景。

【关键词】岩藻多糖；咖啡酸；纳米颗粒；cGAS/STING；抗肿瘤



Plant spore shells & alginate nanocomplexes hydrogel enhances intestinal delivery of probiotics by resistance to gut pH and on-demand disintegration

shengchan Ge, shaochong Tan

School of Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Targeting Therapy and Diagnosis for Critical Diseases, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, E-mail: 1617851088@qq.com

【**Abstract**】In this study, we developed L. rhamnosus GG (LGG) -encapsulated plant spore shell & alginate nanocomplexes (PSA) to protect probiotics by delaying the penetration of gastric juice into the nanocomposite and release on-demand in the gut. The pore size of the spore shell & alginate nanocomposite hydrogel (PSA) is twice smaller than that of the spore shell alone. After pH challenge under gastrointestinal conditions, LGG survival in spore shell / alginate nanocomposite hydrogels decreased by only 1.5 log CFU / g compared to the 5.25 log CFU / g reduction in alginate. Furthermore, the internal pH of PSA decreased slower than the alginate. Following oral administration in mice, PSA maintains shape integrity during passage through the gastrointestinal tract and can enhance mucosal adhesion, followed by appropriate disintegration within the target intestinal region. Furthermore, mouse fecal recovery experiments showed that the number of LGG in PSA was sixfold higher than that in alginate. The results show that the plant spore shell & alginate nanocomplex (PSA) is a promising platform for the intestinal delivery of probiotics.

【**Keywords**】Plant spore shells&alginate nanocomposite hydrogels; LGG; probiotics; intestinal delivery

纳米颗粒的响应性释放用于治疗胶质母细胞瘤的研究

龚若涵

湖北理工学院 湖北 黄石 435003

【**Abstract**】**Introduction:** The use of triggered drug release involving nanoparticles plays a critical role in the treatment of glioblastoma. Nanoparticles possess unique size-dependent effects, the release of liposome drugs is usually triggered based on the principle of the instability of lipid bilayers. Both external and internal stimuli can cause the collapse or degradation of liposome lipid bilayers, thus releasing their contents. Currently, studies have found that there are two environmental mechanisms about triggered liposomes release, one is exogenous stimulation, and the other is endogenous stimulation. This review aims to provide an overview of the advancements in the triggered of nanoparticles for the treatment of glioblastoma. **Methods:** Literature search was performed on PubMed between 2015 and 2023. **Result:** Initially, the triggered drug release is achieved through stimulation such as heat, magnetic, acidic pH and enzyme activity. However, some stimuli mechanisms have extremely high requirements for the tumor microenvironment, and are still in the exploration stage. **Conclusions:** The current progress is that lipid nanoparticles are designed as responsive carriers to release their payload in response to various chemical activation methods(exogenous stimuli, endogenous stimuli), giving liposomes with triggered release characteristics to deliver drug. This requires us to explore together that not only preserves the performance of nanoparticles but also enhances the strategic release strategy. More importantly, the triggered drug release therapy involving nanoparticles has unlimited potential and is expected to achieve new breakthroughs in the field of glioblastoma treatment.

【**Keywords**】triggered release of nanoparticles; GBM therapy; drug release

酒石酸托特罗定片有关物质的超高效液相-质谱鉴定

顾霄，郑金琪*

（浙江省食品药品检验研究院国家药品监督管理局仿制药评价关键技术重点实验室，浙江杭州 310052）

【摘要】目的：采用超高效液相-质谱联用技术对酒石酸托特罗定片中有关物质进行结构鉴定。**方法：**采用 ZORBAX XDB-C18（100 mm×2.1 mm, 1.8μm）色谱柱，以乙腈-甲酸铵缓冲液为流动相梯度洗脱，对酒石酸托特罗定片中有关物质进行分离；采用电喷雾正离子化的方法，通过四极杆飞行时间质谱（Q-TOF/MS）测定母离子和子离子的准确质量，并进行结构解析。**结果：**对 4 家企业 5 种处方产品进行了分析，共鉴定了 11 个有关物质，其中 4 个尚未见文献报道。**结论：**该方法能有效地鉴定酒石酸托特罗定片中的有关物质，研究结果可对其质量控制和工艺优化提供参考依据。

【关键词】酒石酸托特罗定片；有关物质；超高效液相-质谱；结构鉴定

【中图分类号】R284.1；R917.101　　**【文献标志码】**A　　**【文章编号】**1007-7693

Identification of related substances in tolterodine tartrate tablets by UHPLC-MS

GU Xiao[1], WANG Yu[2], ZHENG Jingqi[1*]

（1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory for Core Technology of Generic Drug Evaluation National Medical Product Administration, Hangzhou 310052, China; 2. Hangzhou Simbos Pharmaceutical Co.,Ltd, Hangzhou 311121,China）

【ABSTRACT】OBJECTIVE: To use an UHPLC-MS method for the identification of related substances in tolterodine tartrate tablets. **METHODS:** The related substances of tolterodine tartrate tablets were separated by using a ZORBAX XDB-C18 （100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm）column with gradient elution by a mobile phase consisting of acetonitrile-ammonium formate buffer solution. Electrospray ionization source was operated in positive ion mode. Q-TOF/MS method is used to determine the accurate masses of the precursor and product ions, and the structures of the related substances are speculated. **RESULTS:** 11 related substance were identified in 5 batches from 4 companies, 4 of which have not been reported in the literature. **CONCLUSION:** This method is effective for identification of the related substance in tolterodine tartrate tablets, and the results are valuable for its quality control and manufacturing process improvement.

【KEY WORDS】tolterodine tartrate tablets; related substance; UHPLC-MS; structure identification

酒石酸托特罗定（图 1）是一类竞争性毒蕈碱受体拮抗剂，主要用于治疗尿频、尿急和紧迫性尿失禁等症状[1]。目前中国药典尚未收载酒石酸托特罗定原料药或制剂，USP43[2]和 EP10.0[3]中均收载有原料药。目前对酒石酸托特罗定及制剂杂质结构研究的报道较少。Yu 等采用 LC-TOF/MS 和 LC-MS/MS 方法对原料药中的 9 个有

基金项目： 2021 年度浙江省公益技术应用分析测试项目（LGC21H300001）

作者简介：顾霄，男，硕士，主管药师　　Tel: (0571)87180340　　E-mail:guxiao@zjyj.org.cn

*通信作者：郑金琪，男，硕士，主任药师　　Tel: (0571)87180340　　E-mail: zhengjinqi@zjyj.org.cn

关物质进行了检测和结构鉴定[4]。Prakash 等[5]和 Reddy 等[6]采用制备液相和 NMR 等方法，分别对制剂中两个和一个降解产物进行了分离制备和结构确证。目前尚未见针对酒石酸托特罗定片中有关物质进行系统结构研究的报道。

本研究采用了采用超高效液相-高分辨质谱（UHPLC-HRMS）方法对 4 家企业 5 种处方的酒石酸托特罗定片中的有关物质做了研究，共分离并鉴定了 11 个有关物质，其中 4 个尚未见文献报道。本研究可为本品的质量控制和工艺优化提供参考依据。

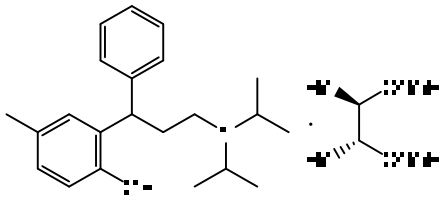


图 1　酒石酸托特罗定结构式

Fig. 1　The structure of tolterodine tartrate

1 仪器与试剂

Agilent1290 Infinity 液相色谱-Agilent 6538Q TOF 四级杆飞行时间质谱仪（美国 Agilent 公司），色谱柱为 Agilent XDB-C_{18} 键合硅胶柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）。

乙腈（色谱纯，MERCK），甲酸铵（色谱纯，Sigma）、甲酸（色谱纯，Sigma）；水为超纯水；5 批酒石酸托特罗定片（2 mg）分别由企业 A、B、C 和 D 生产，其中企业 A 包括两种处方工艺（A1 和 A2）。

2 实验条件

2.1 液相色谱条件　以乙腈-20 mM 甲酸铵溶液（用甲酸调节 pH 至 3.0）为流动相，梯度洗脱：0 min（乙腈 27%）→8 min（乙腈 45%）→15 min（乙腈 45%）→15.5 min（乙腈 27%）→21 min（乙腈 27%），流速 0.3 ml·min^{-1}；柱温 30 ℃；检测波长 220 nm；进样量 2 μL。

2.2 质谱条件　电喷雾正离子化（ESI+）检测，喷雾电压 4000 V，雾化气压力 35 psi，干燥气流量 10 L/min，去溶剂温度 350 ℃。

2.3 供试品溶液制备　取酒石酸托特罗定片 1 片，加水 1.0 ml，振摇 3 min，14500 rpm 离心 10 min，取上清液过滤，取续滤液即得。

3 结果

3.1 有关物质的色谱特征　对 4 个企业 5 批酒石酸托特罗定片进行 UHPLC 分析，相应的色谱图见图 2，除了辅料峰，共检测到 11 个有关物质峰（按保留时间编号为 1~11）。

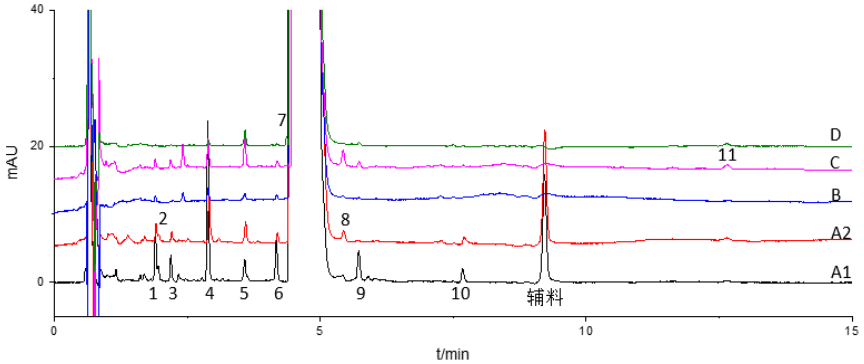


图 2　酒石酸托特罗定片色谱图

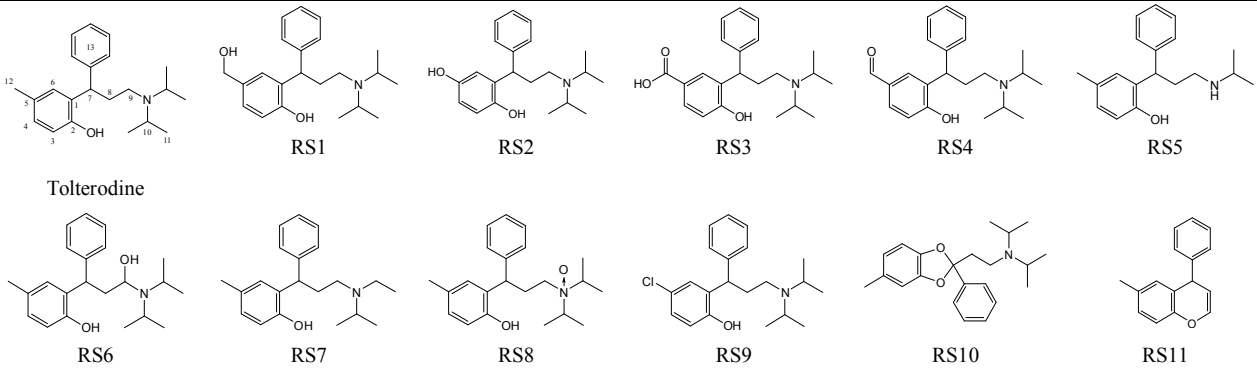
Fig. 2　Chromatograms of tolterodine tartrate tablets

3.2 有关物质的质谱特征　托特罗定与各有关物质的质谱信息和推断结构见表 1，托特罗定典型二级质谱见图 3，托特罗定与有关物质质谱裂解图见图 4~5。所有一二级离子测得质量与理论质量偏差均小于 5 ppm。

表 1 酒石酸托特罗定片有关物质 UHPLC-Q-TOF 鉴定结果

Tab 1 Related substances（RSs） in tolterodine tartrate tablets by UHPLC-Q-TOF

Compound NO.	t/min	$[M+H]^+$	Proposed ion formula	Ddviation/ppm	Characteristic product ion
Tolterodine	4.5	326.2478	$C_{22}H_{31}NO$	0.13	284.2011,197.0961,147.0803,121.0650
1	1.9	342.2424	$C_{22}H_{31}NO_2$	1.04	300.1960,213.0911, 163.0753
2	2.0	328.2283	$C_{21}H_{29}NO_2$	-3.65	199.0761, 123.0447
3	2.2	356.2221	$C_{22}H_{29}NO_3$	-0.22	227.0703, 151.0388
4	2.3	340.2279	$C_{22}H_{29}NO_2$	-2.34	211.0752,161.0598
5	2.9	284.2004	$C_{19}H_{24}NO$	1.73	197.0964,147.0805
6	4.2	342.2424	$C_{22}H_{31}NO_2$	1.04	324.2331,223.1120,145.0644,114.1279
7	4.4	312.2331	$C_{21}H_{29}NO$	-2.92	270.1847,197.0958,147.0800
8	5.4	342.2426	$C_{22}H_{30}NO_2$	0.46	300.1975,282.1867,197.0967,147.0810,114.1283
9	5.7	346.1940	$C_{21}H_{28}ClNO$	-2.26	217.0404,141.0097
10	7.7	340.2279	$C_{22}H_{29}NO_2$	-2.34	239.1076,211.0748,114.1279,105.0339
11	12.6	223.1117	$C_{16}H_{14}O$	0.19	195.1162,145.0643



3.2.1 托特罗定 $[M+H]^+$离子的准确质量为 326.2478，与离子式 $C_{22}H_{32}NO^+$相应。其二级质谱主要碎片包括 m/z 284、197、147 和 121。m/z 284 和 197 分别与母离子脱去丙烯和二异丙基乙胺对应。m/z 147 与母离子脱去二异丙胺和苯对应，之后进一步脱去乙炔产生 m/z 121。主成分的二级质谱分析对于解析其有关物质结构具有参考意义。

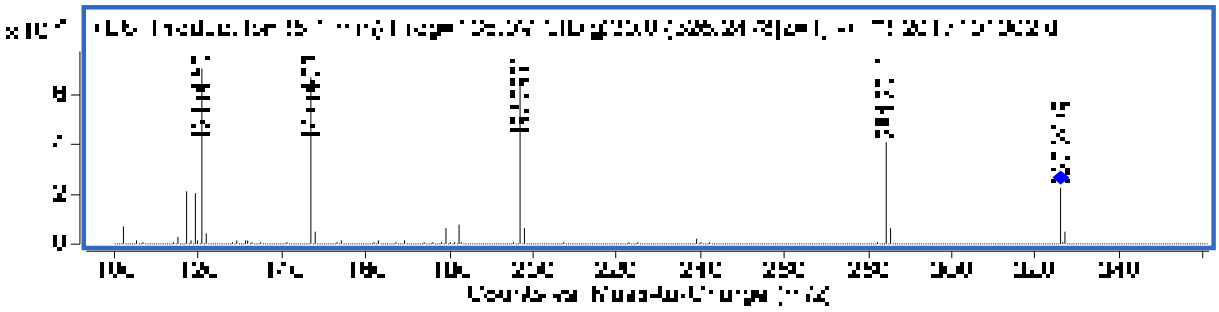


图 3 托特罗定二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of tolterodine

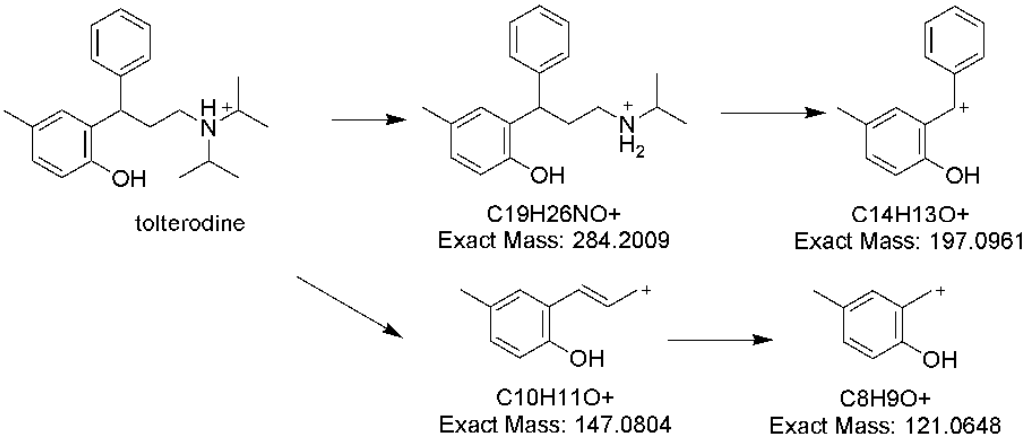


图 4　托特罗定质谱裂解图

Fig. 4　Plausible fragmentation of tolterodine

3.2.2　有关物质 1　与托特罗定相比，质量数多 16，元素组成多一个 O 原子，可能对应一个醚或醇结构。其主要碎片 m/z 300、213 和 163 分别比托特罗定对应碎片多 16，表明结构差异位于对甲苯酚基团位置，考虑到其保留最弱，推测其为 5-羟甲基托特罗定，可能为生产储存过程中 5 位甲基氧化后的产物。5-羟甲基托特罗定是托特罗定的一种代谢物。

3.2.3　有关物质 2　与托特罗定相比，质量数多 2，元素组成少一个 CH_2 且多一个 O 原子，可能对应一个甲基被羟基替换。其主要碎片 m/z 199 和 123 均比托特罗定对应碎片质量大 2，说明结构差异位于对甲苯酚基团位置，故推测有关物质 2 为 5 位甲基被羟基取代的产物，推测其为 12-羟基托特罗定。该杂质在文献[4]中也有报道。

3.2.4　有关物质 3　与托特罗定相比，质量数多 30，元素组成少两个 H 原子并多两个 O 原子，可能对应一个甲基被甲酸取代。其主要碎片 m/z 227 和 151 分别比托特罗定对应碎片多 30，表明结构差异位于对甲苯酚基团位置，推测其结构为 5-羧基托特罗定，可能同样为生产储存过程中的氧化产物，5-羧基托特罗定也是托特罗定的一种代谢物。

3.2.5　有关物质 4　与托特罗定相比，质量数多 14，元素组成少两个 H 原子且多一个 O 原子，推测有关物质 4 比托特罗定多一个羰基或醚环。其主要碎片中，m/z 211 和 161 分别比托特罗定对应碎片大 14，说明结构差异位于对甲苯酚基团位置，推测有关物质 4 为 5-醛基托特罗定，可能也是生产储存过程中的氧化产物。

3.2.6　有关物质 5　与托特罗定相比，质量数少 42，元素组成少一个丙烯。有关物质 5 的母离子 m/z 284 及碎片离子 m/z 197 和 147 在托特罗定的二级质谱图中也可以找到。因此推测有关物质 5 为去异丙基托特罗定，其在国外药典[2-3]中也有收载。

3.2.7　有关物质 6　元素组成比托特罗定多一个 O 原子，与有关物质 1 相同，但两者保留时间与二级质谱差异较大。其主要碎片中，m/z 324 与母离子脱去一分子水相应，表明增加的 O 原子可能对应羟基。m/z 324 脱去二异丙基胺基团产生 m/z 223，再脱去一分子苯产生 m/z 145。推测有关物质 6 为 7、8、9 位碳其中一位与羟基相连的产物。二级质谱图中基峰为 m/z 114，对应 8、9 位 C-C 键断裂且脱去一分子水的产物，因此推测 9 位碳连接羟基可能性最大，推测其结构为 9-羟基托特罗定。该杂质在文献[4]中有报道。

3.2.8　有关物质 7　元素组成比托特罗定少一个亚甲基。其主要碎片中，m/z 270 对应$[M+H]^+$离子脱去一分子丙烯，表明 N-异丙基结构未改变，m/z 197 和 147 在托特罗定质谱图中也存在，表明 N 原子靠苯基一侧结构也没有改变，因此推测有关物质 7 为托特罗定的一个异丙基被乙基取代的产物，该杂质可能为原料药合成过程中起始物料杂质造成。

3.2.9　有关物质 8　元素组成比托特罗定多一个 O 原子，与有关物质 1 和 6 相同。其主要碎片中，m/z 197 和 147 在托特罗定碎片中也存在，表明 N 原子靠苯基一侧的结构未发生改变，m/z 300 与$[M+H]^+$离子脱去丙烯对应，表明 N-异丙基结构未发生改变，m/z 282 为 m/z 300 的脱水产物，m/z 114 在有关物质 6 二级质谱中也存在。综

合以上信息，推测有关物质 8 为托特罗定的 N-氧化物。有关物质 8 在文献[4]中有报道。

3.2.10　有关物质 9　与托特罗定相比，质量数多 20，元素组成比托特罗定少一个甲基，多一个 Cl，推测为托特罗定结构中甲基被氯取代产物。其主要碎片中，m/z 217 和 141 分别比托特罗定对应碎片大 20，表明结构差异位于苯酚基团位置。推测结构为 5-氯托特罗定，该杂质可能为原料药合成过程中起始物料杂质造成。其在文献[4]中也有报道。

3.2.11　有关物质 10　元素组成比托特罗定少两个 H 原子，多一个 O 原子，与有关物质 4 相同，但二级质谱碎片差异较大。二级质谱中主要有 m/z 114 的碎片离子，其余离子强度均极弱。m/z 239 与 211 分别对应$[M+H]^+$ 离子脱去二异丙基胺与二异丙基乙胺，表明结构差异位于对甲苯酚基团位置，由于该基团除了 12 位碳，其他位置都不太可能形成碳氧双键，因此推测有关物质 10 的 1 位碳位置有醚环结构。碎片离子 m/z 105 比托特罗定对应碎片 m/z 121 少 16，元素组成少 CH_4，进一步表明有关物质 10 结构中 1 位碳并不与 7 位碳直接相连。根据以上信息，推测有关物质 10 存在二氧五环结构，可能也是原料药起始物料杂质造成。

3.2.12　有关物质 11　元素组成比托特罗定少 C_6H_7N。其母离子 m/z 223 在有关物质 6 的碎片离子中也存在。其主要碎片中，m/z 195 和 145 分别对应$[M+H]^+$离子脱去一个 CO 和一个苯。根据文献报道[6]，6-甲基-4-苯基-2-色满醇（分子式 $C_{16}H_{16}O_2$）为托特罗定制剂的降解产物，根据二级质谱，有关物质 12 可能为 6-甲基-4-苯基-2-色满醇进一步脱水产物。

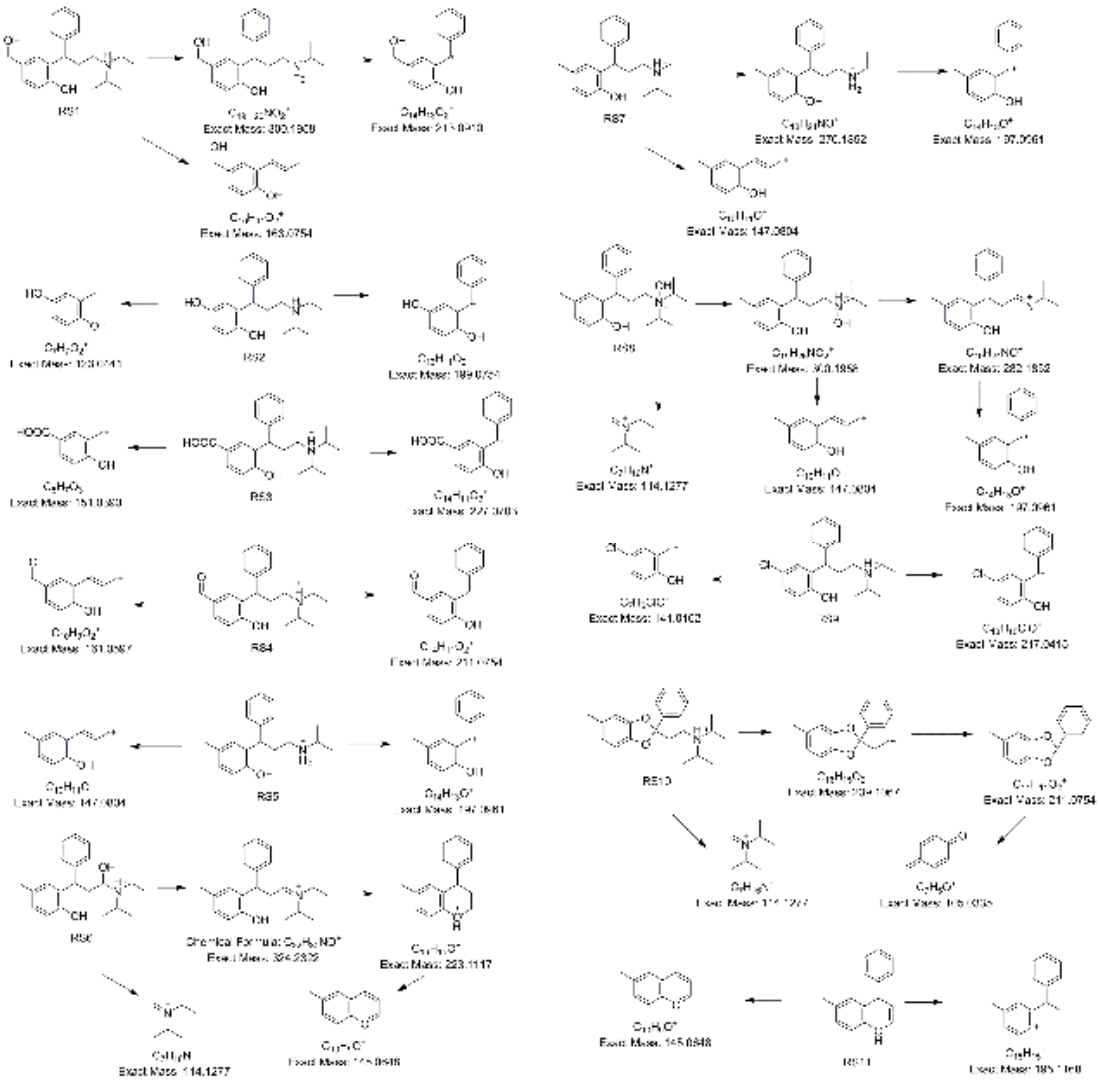


图 5　有关物质质谱裂解图

Fig. 5　Plausible fragmentation of related substances

4 讨论

本研究采用了 UHPLC-HRMS 方法，对 4 家企业 5 批酒石酸托特罗定片中的 11 个有关物质进行了分离和鉴定，其中有关物质 4、7、10 和 11 未见文献报道。不同企业不同处方之间有关物质种类和含量均有一定差异，表明本品的处方工艺对于有关物质的控制有直接影响。酒石酸托特罗定片有关物质的研究可为其质量控制和工艺优化提供参考依据。

REFERENCES

[1] ZENG M H，JIANG D F，JIANG H，et al. Tolterodine tartrate tablets combined with tamsulosin in the treatment of bladder excess the effect of active disease[J]. Guangdong Med J（广东医学），2012，33（9）：1329.

[2] USP 43-NF38[S].

[3] EP 10.0[S]

[4] YU L，SONG M，ZHOU X，et al. Identification of the related substances in tolterodine tartrate by LC-MS /MS[J]. Chin J New Drugs（中国新药杂志），2013，22（21）：2561.

[5] Prakash L , Himaja M , Subbaiah B V , et al. Isolation, identification and characterization of degradant impurities in Tolterodine tartrate formulation[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2014, 90:215-221.

[6] Reddy A S , Reddy R C , Venkateswarlu P . Identification, isolation and quantification of unknown impurity in tolterodine tartrate tablets by stability indicating HPLC method[J]. Journal of Chemical & Pharmaceutical Research, 2012, 4（7）:3659-3664.

Investigating the enhancement of human immunity by HuangQi Oral (HO) via 16S rRNA gene sequencing and UPLC/ MS-based metabolomics

桂婉玉

南京中医药大学附属医院（江苏省中医院） 江苏 210000

【**Abstract**】**Background**：Nowadays, more and more people are focusing on their health and strengthening their immune systems.HuangQi Oral (HO)is a commonly used preparation of the well-known Chinese herbal medicine Astragali radix with tonic, hepatoprotective, diuretic, and expectorant properties and has been proven to exhibit immunomodulating. **Purpose**：This study aimed to investigate the enhancing effect of HO on human immunity and potential mechanism. **Methods**：Twenty healthy subjects were selected to participate in the experiment and were given the HO for 14 days. Then UHPLC Q-TOF-MS/MS-based untargeted serum, urine, and fecal metabolomics approach combined with 16S rRNA-based microbiota analysis was used to explore the underlying biomarkers and mechanisms for the immune-enhancing effects of HO. **Results**：Metabolomics indicated HO could regulate the biosynthesis of Linoleic acid metabolism, alpha-Linolenic acid metabolism, arachidonic acid metabolism, purine metabolism, Glycerolipid metabolism, and fatty acid biosynthesis. In addition, 16S rRNA gene sequencing analysis showed that HO could regulate gut microbiota disorder, especially the inflammation-related bacteria (g_Prevotella, and g_Granulicatella, etc.), and the short-chain fatty acids (SCFAs)-producing bacteria (g_Alloprevotella, g_Enorma, and g_Flavonifractor). **Conclusions**：This study revealed the enhancement of human immunity to HO, and found that effect was related to the host microbiome and metabolome. These findings provided new insight into the health effect of dietary HO as a functional food for cisplatin-based chemotherapy.

【**Keywords**】HuangQi Oral (HO)；immunity；metabolomics；gut microbiota

具有竞争性抑制 eIF4E/eIF4G 相互作用的“双亲性”模拟肽分子的设计、合成及抗肿瘤机制研究

郭传龙 [1,*]

[1]青岛科技大学，山东省青岛市市北区郑州路 53 号，266042

真核细胞翻译起始因子 4E（eIF4E）处于肿瘤信号调控的中心节点，是极具潜力的抗肿瘤药物研究新靶点。已有的研究及申请人的前期探索发现小分子 eIF4E 抑制剂多存在靶点亲和力低和透膜性差等关键缺陷。为解决上述问题，申请人基于 4E-BP1 与 eIF4E 的“双亲性”结合模式，合成了一系列靶向 eIF4E 的模拟肽分子，研究发现其中模拟肽分子 4E-BF-3 与 eIF4E 亲和力高，K_D 为 85.3nM，显著低于小分子抑制剂 4EGI-1（23.1 μM），分子对接结果显示与小分子抑制剂 4EGI-1 的结合模式不同，4E-BF 模拟肽分子与 eIF4G 竞争 eIF4E 结合口袋，表现出竞争性 eIF4E/eIF4G 抑制作用。m^7-GTP pull down 结果显示，4E-BF-3 作用细胞后，eIF4G 和 4E-BP1 水平均下调，证明本研究设计的模拟肽分子 4E-BF-3 通过竞争机制抑制 eIF4E/eIF4G 相互作用。在此基础上，本研究采用模拟肽学、丙氨酸扫描、脂肪酸修饰等手段，进一步优化和改造模拟肽分子，阐明构效关系，以期获得结构新颖、活性优异的候选模拟肽分子，解决 eIF4E 抑制剂靶点亲和力低和透膜性差等关键缺陷；并体内外阐明候选模拟肽分子调控 eIF4E 发挥抗肿瘤作用的分子机制。本课题有望获得具有独立知识产权的新型 eIF4E 抑制剂，为基于靶点 eIF4E 的抗肿瘤药物开发提供新思路。

【关键词】eIF4E/eIF4G 相互作用；竞争性抑制剂；模拟肽；抗肿瘤

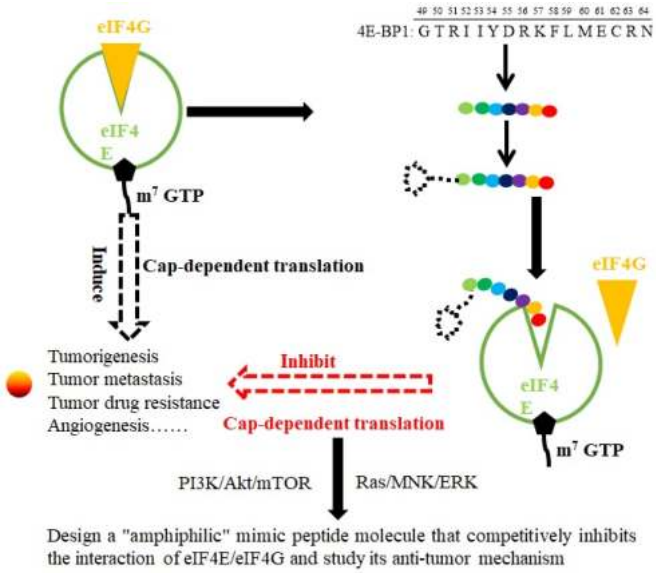


Fig. 1 Design a "amphiphilic" mimic peptide molecule that competitively inhibits the interaction of eIF4E/eIF4G and study its anti-tumor mechanism

参考文献

[1] Wang, L.; Guo, C.; Li, X.; Yu, X.; Li, X.; Xu, K.; Jiang, B.; Jia, X.; Li, C.; Shi, D. *European journal of medicinal chemistry 2019, 177, 153-170.*

[2] Qi, X. J.; Zhang, S. N.; Chen, Z. K.; Wang, L. J.; Zhu, W. Y.; Yin, C. J.; Fan, J. T.; Wu, X. C.; Wang, J.; Guo, C. L. *Chem-Biol Interact.* 2022, 352. 109773.

Study on the Mechanism of Crizotinib Inducing Ferroptosis via Stat1/Nrf2 Pathway Resulting in Hepatotoxicity

郭林[1],肖明漩[2],颜苗,于锋

（中南大学湘雅二医院 药剂科 湖南 长沙 410012；中国药科大学 江苏 南京 210000）

【**Abstract**】Background: Crizotinib, the world's first ATP-competitive multi-target PKI capable of simultaneously inhibiting ALK, MET, ROS1, is widely used for first-line treatment of locally advanced or metastatic ALK-positive non-small cell lung cancer. However, its severe hepatotoxicity limits its clinical application (it carries an FDA hepatotoxicity "precautionary warning" label). Current research on the mechanism of crizotinib hepatotoxicity is scarce, and these results have not yet provided satisfactory intervention targets or preventive measures to solve the dilemma of hepatotoxicity limiting its clinical use. **Objective:** The goal is to explore the molecular mechanism of crizotinib-induced hepatotoxicity, find effective prevention and treatment strategies to protect damaged liver cells to the greatest extent possible, and provide clues for how clinical cancer patients can benefit more. **Methods and Results:** Firstly, it was found through the FAERS database that the safety warning for hepatotoxicity after crizotinib's launch is very clear, with relatively higher ROR values for hepatocellular jaundice, fulminant/acute hepatitis or (acute) liver failure, suggesting that the current FDA hepatotoxicity precautionary warning label for crizotinib might be underestimated. Secondly, by combining various cell death inhibitors Z-VAD-FMK, Nec1, 3MA, CQ, DFO, it was found that the iron chelator DFO can further enhance the low cell survival rate induced by crizotinib, suggesting that ferroptosis is one of the important ways crizotinib causes hepatocyte death. Using L02 cells and AML12 cells, we combined the ferroptosis inhibitors Fer1 and DFO to measure cell survival rate, ferrous and total iron content, MDA, lipid ROS, and the expression of ferroptosis-related proteins (ACSL4, SLC7A11, and GPX4) and mRNA. At the animal level, we combined Fer1 and DFO to measure liver function indicators, lipid peroxidation levels (MDA, LPO, 4HNE), antioxidant capacity (GSH, rGSH/GSSG, cys), and changes in ferroptosis-related proteins. The results show that the ferroptosis inhibitors Fer1 and DFO can significantly alleviate crizotinib-induced hepatocyte ferroptosis and hepatotoxicity. Subsequently, at the cellular and animal levels, it was confirmed that crizotinib regulates ferroptosis via Nrf2 rather than P53. By combining the Nrf2 agonist tBHQ and constructing Nrf2 overexpressing plasmids at the cellular level, and constructing an adenoviral vector for Nrf2 overexpression at the animal level, changes in the Nrf2 pathway and ferroptosis-related indicators were detected, confirming that crizotinib regulates ferroptosis through Nrf2. Subsequently, through agarose gel electrophoresis and silencing c-Met, it was found that crizotinib cannot induce hepatotoxicity through the pharmacodynamic target. Finally, by combining Stat1 activation inhibitors, silencing Stat1, and mutating Stat1 at the S727 site, changes in the Nrf2 pathway and the ferroptosis pathway were observed, confirming that crizotinib induces hepatotoxicity by regulating ferroptosis via the Stat1/Nrf2 pathway. **Conclusion:** Crizotinib induces hepatotoxicity by activating the phosphorylation of Stat1 at the S727 site, inhibiting Nrf2 pathway expression, and thereby activating ferroptosis. This provides a basis for the development of drugs for the safe clinical use of crizotinib and the prevention and treatment of hepatotoxicity, and provides a direction for the development of PKIs with higher safety.

【**Keywords**】Crizotinib; hepatotoxicity; drug-induced liver injured; ferroptosis; Stat1; Nrf2.

Detection of Depression Marker ASS1 in Urine by Gold Nanoparticles Based Dual Epitope-peptides Imprinted Sensor

Min Guo[a,c], Yan Chen[a,c], Xiaohui Mo[a,c], Zixia Wang[a,c], Fangdi Hu[a,b,c,*]

（[a] School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China；[b] State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China；[c] Codonopsis Radix Industrial Technology Engineering Research Center, Gansu Province, Lanzhou, Gansu, 730000）

【**Abstract**】Trace detection of argininosuccinate synthetase 1 (ASS1), a depression marker, in urine samples is difficult to achieve. In this work, a dual-epitope-peptides imprinted sensor for ASS1 detection in urine was constructed based on the high selectivity and sensitivity of the "epitope imprinting approach". First, two cysteine-modified epitope-peptides were immobilized onto gold nanoparticles (AuNPs) deposited on a flexible electrode (ITO-PET) by gold-sulfur bonds (Au-S), then a controlled electropolymerization of dopamine was carried out to imprint the epitope peptides. After removing epitope-peptides, the dual-epitope-peptides imprinted sensor (MIP/AuNPs/ITO-PET) which with multiple binding sites for ASS1 was obtained. Compared with single epitope-peptide, dual-epitope-peptides imprinted sensor had higher sensitivity, which presented a linear range from 0.15~6000 pg ml^{-1} with a low limit of detection (LOD = 0.106 pg mL^{-1}, S/N=3). It had good reproducibility (RSD = 1.74%), repeatability (RSD = 3.60%), stability (RSD = 2.98%), and good selectivity, and the sensor had good recovery (92.4% - 99.0%) in urine samples. This is the first highly sensitive and selective electrochemical assay for the depression marker ASS1 in urine, which is expected to provide help for the non-invasive and objective diagnosis of depression.

【**Keywords**】Depression marker detection; ASS1; Dual-epitope imprinting; Electrochemical sensor; Gold nanoparticles

1. Introduction

Depression is a mental illness with high morbidity, easy recurrence, disability and high mortality [1], which imposes a heavy burden on families and society. The diagnosis of clinical depression mainly relies on the depression scale[2][3] and the subjective judgment of psychiatrists, and the missed diagnosis and misdiagnosis rate are high due to the lack of objective diagnostic indicators [4]. The objectivity of disease markers makes the monitoring of index values play a great role in assisting disease diagnosis and providing prospective disease-related information[5]. Therefore, it is of great significance for the early warning, objective diagnosis and prognostic treatment of depression to screen and sample non-invasive and easily available depression markers through construct sensitive and convenient analysis methods. Human arginine succinate synthase 1 (ASS1) is an arginine cycle enzyme[6], which affects many important physiological activities and is closely related to the occurrence of diabetes [7], pulmonary fibrosis [8] and various tumors[9]. Wu et al. [10] analyzed the urine proteomics of healthy subjects and patients with severe depression and found that the content of ASS1 protein in the urine of patients with depression was significantly decreased. Activation of plaques densities increases glomerular vasoconstriction, resulting in a decrease in glomerular filtration rate leading to a decrease in urinary ASS1, that is, ASS1 can be used as a marker of depression for analysis and study. Urine samples are non-invasive, stable and easy to store [11], which makes ASS1 more valuable and promising for clinical research. At present, the quantitative detection of ASS1 is mainly based on enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) [12] and Western blot (WB) [13]. These two methods have

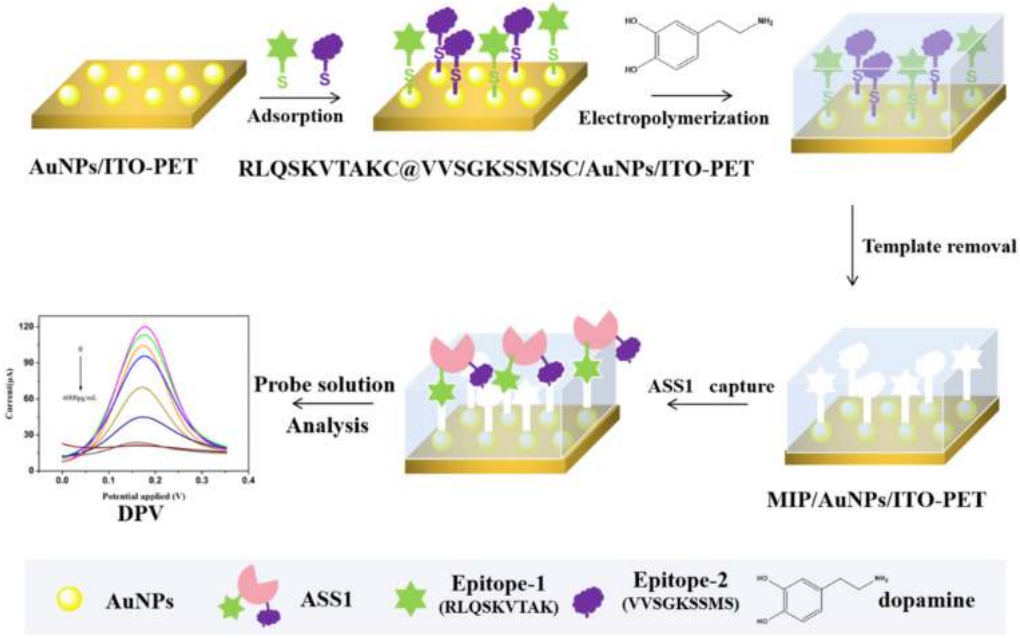
Corresponding authors. Tel./fax: +86 0931 8915686 * E-mail addresses: hufd@lzu.edu.cn (F. Hu)

high reliability, but high detection cost, slow detection speed, toxic reagents and other drawbacks make them difficult to be widely used in the detection of large samples of clinical markers. Therefore, it is necessary to develop a highly sensitive, highly selective and low-cost quantitative detection method for urinary depression marker ASS1.

Electrochemical immunosensors have been used for the detection of disease markers in complex body fluid samples due to their high selectivity and sensitivity [14]. In addition to the inactivation of biological macromolecules and the limited detection environment, conventional electrochemical immunoassay based on antigens and antibodies may also have the problem of non-target proteins adsorbed on the surface of biosensors, which is difficult to achieve clinical application [15]. Sensors using molecularly imprinted polymers (MIPs) have become a common tools for detecting different analytes, especially biomolecules, with significant advantages in terms of selectivity, durability, cost and storage conditions[16]. The development of noninvasive diagnostic point-of-care (PoC) detection tools has made molecularly imprinted electrochemical sensors the best candidates for the development of biosensors such as disease markers [17]. Epitope imprinting is a novel method to generate antibody-like specific recognition sites whose structural specificity ensures that it can represent the entire protein during the imprinting process [18]. Epitope imprinted has attracted extensive attention in the fields of bioanalysis, pharmacy, etc. Due to its easy availability of templates, flexible selection of monomers, tolerance to harsh environments and high specificity of targets[19]. Epitope-imprinted electrochemical sensing technology combines the sensitivity of electrochemical technology and the high selectivity of molecular imprinting technology. It has been reported that this technology can be used for the detection of disease markers. Palladino et al. [20] constructed an epitope-imprinted biosensor for the cardiac biomarker troponin T (TnT) for the first time, and they prepared a stable and inexpensive polydopamine membrane with TnT epitope, which can be passed through Its C-terminal region rapidly and specifically captures proteins, and this blot sensor exhibits good sensitivity to troponin in the nanomolar range. The dual epitope imprinting electrochemical sensing technology has more abundant recognition sites, which improves the recognition efficiency of the sensor and makes it more sensitive. Currently, there is relatively little research on dual epitope imprinting. Studies have found that epitope peptide chains consisting of at least 9 amino acids can specifically represent proteins. Therefore, an epitope imprinting sensor can be constructed by selecting a nonapeptide suitable for ASS1 (RLQSKVTAK, VVSGKSSMS) as a template to achieve high sensitivity, high selection, and low-cost detection of ASS1.

The selection of the working electrode is critical for the construction of the sensor. With the continuous development of life science and technology, research and development of new wearable flexible sensors, real-time assessment of health factor content, timely and accurate monitoring of human health, early warning of diseases and auxiliary prognosis treatment are one of the hotspots in future development [21] . Flexible electrodes are the core components of wearable electronic devices, which refers to one type of flexible electrodes that are formed by using flexible materials as a matrix to modify their surfaces or by doping them with conductors. Indium tin oxide (ITO), as an N-type semiconductor material[22], has the characteristics of high light transmittance and high electrical conductivity. Indium tin oxide composite polyethylene terephthalate (ITO-PET) [23] is a flexible conductive material obtained by sputtering transparent ITO coating on PET base material using magnetron sputtering technology and annealing at high temperature. It has good mechanical flexibility and can be arbitrarily cut into any desired shape. Using it as a flexible basic electrode can broaden the application scope of electrochemical detection and provide the possibility for the subsequent development of wearable devices for real-time monitoring of life factors[24]. At present, it has been reported to use this material as a basic electrode for electrochemical sensor construction research. Gold nanoparticles (AuNPs) are widely used as electrode modification materials due to their high electrical conductivity [25][26] . In addition, gold nanoparticles are widely used in biological It is very stable in the environment and is often used to label biomolecules [27]. Using it as a modification material can amplify electrical signals and improve sensor sensitivity.

This paper constructed a dual-epitope imprinted sensor for the determination of depression marker ASS1 in urine. First, AuNPs were electrodeposited on ITO-PET, which has both flexibility and excellent conductivity. AuNPs can not only amplify the signal and improve the sensitivity of the sensor, but also can interact with the end-modified cysteine epitope peptide chain forming gold-sulfur bonds. The Epitope-Cys-AuNPs/ITO-PET obtained by immobilizing the preferred epitope template of ASS1 (RLQSKVTAKC, VVSGKSSMSC) was placed in a dopamine polymer solution for electropolymerization. Dopamine is a neurotransmitter in human body. As a polymeric monomer, dopamine has high biological characteristics, compatibility and polymerization efficiency. The template was further removed by potentiostatic gold-sulfur bond breaking, and the imprinted sensor MIP/AuNPs/ITO-PET for detecting the target protein ASS1 was obtained. Scanning electron microscopy, atomic force microscopy and electrochemical methods were used to study the construction process of the imprinted sensor, and the experimental conditions affecting the performance of the sensor were investigated. The sensor was used to detect ASS1 in urine samples to verify its application value. The specific process is shown in the Scheme. This is the first time to achieve sensitive and high-selective electrochemical determination of ASS1, a marker of depression in urine, which is expected to help with the non-invasive and objective diagnosis of depression.



Scheme: Construction of an dual-epitope imprinted sensor for ASS1 detection

2. Experimental

2.1 Instruments and Reagents

The AUTOLAB PGSTAT302N electrochemical workstation (Mitsubishi China Co., Ltd.) adopts a three-electrode system: a modified flexible electrode (ITO-PET, total area = 1 cm × 2 cm, modified area = 1 cm × 1 cm) is used as the working electrode, and a Pt wire electrode was used as the auxiliary electrode and a saturated calomel electrode as the reference electrode; JSM-6701F cold field emission scanning electron microscope (Japan Electron Optical Co., Ltd.); Soniprep-150 ultrasonic instrument (Sanyo company, UK); Botai Biotechnology Co., Ltd., purity 98%); ELISA kit of human arginine succinate synthase 1 (Shanghai Zhenke Biotechnology Co., Ltd.); pH=7.4 phosphate buffer solution (PBS) (White Shark Biotechnology Co., Ltd.) All reagents used were of analytical grade. The experimental water was double distilled water. The probe solution was 1.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ solution containing 0.1M KCl.

2.2 Experimental method

2.2.1 Preparation of AuNPs/ITO-PET

The uniform ITO-PET flexible thin film electrode obtained by the magnetron sputtering technology was cut into a size of 1 cm × 2 cm, placed in an isopropanol solution for ultrasonic cleaning for 30 s, and dried naturally for use. In order to ensure that the area of the modified parts is equal, an insulating film is used to separate the fixed modified areas of 1×1 cm. The modified part of ITO-PET was placed in a 1% chloroauric acid aqueous solution, and deposited at -0.3 V for 400 s by the potentiostatic deposition method.

2.2.2 Immobilization of cysteine termination epitopes

(1) Immobilization of a single epitope

The cysteine-terminated peptide template (RLQSKVTAKC) was prepared into a 0.05mM incubation solution using ultrapure water, and the AuNPs/ITO-PET was incubated in the prepared template (Epitope-Cys) solution at 25°C for continuous incubate for 20min. The electrode sheet was carefully rinsed with distilled water, dried under mild N_2 flow, and stored at 4°C in the dark to obtain a single-template immobilized modified electrode.

(2) Immobilization of dual-epitopes

The cysteine-terminated peptide templates (RLQSKVTAKC, VVSGKSSMSC) were prepared into incubation solutions of 0.025 mM each using ultrapure water, the total template concentration was 0.05 mM, and the concentrations of two epitope peptides account for 50% of the total peptide concentration respectively. The AuNPs/ITO-PET were incubated in the prepared template solution, incubation was continued at 25°C for 20 min. The electrode sheet was carefully rinsed with water, gently dried under N_2 flow, and stored at 4°C in the dark to obtain a dual-template immobilized modified electrode RLQSKVTAKC@VVSGKSSMSC/AuNPs/ITO-PET. In this work, single-epitope imprinting was used only in the linear investigation, and dual-epitope imprinting sensors were used in sensor characterization, condition optimization, and methodological investigation.

2.2.3 Preparation of MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET electrochemical sensor

RLQSKVTAKC@VVSGKSSMSC/AuNPs/ITO-PET was placed in 0.1 M PBS (pH = 6.0) containing 1 mM dopamine, and the blotted membrane was electropolymerized by electropolymerization under potentiodynamic conditions: the potential range is 0~0.8V, the sweep rate is 50mV/s, and the number of cycles is 50. The resulting electrode was placed in a phosphate buffer solution (100 mM, pH = 7.4) to maintain a potential pulse of 1.0 V intermittently for 300s to remove the template, resulting in MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET. Non-molecularly imprinted electrodes (NIP/AuNPs/ITO-PET) were prepared by the same method except that the epitope peptide chain was not immobilized.

2.2.4 Pretreatment of actual samples

50 mL of morning urine was collected from healthy volunteers, and midstream urine was collected, and the urine samples were frozen at -20°C for future use. During the analysis, the urine was taken out of the refrigerator, thawed in a water bath at 35°C, and 5.0 mL of the urine sample was accurately transferred into a plastic centrifuge tube, centrifuged at 5000 rpm for 10 min, and the supernatant was taken to obtain a blank urine sample.

2.3 Electrochemical determination

2.3.1 Electrochemical Characterization of Prepared Electrodes

Modified electrodes were characterized by cyclic voltammetry (CV) electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and differential pulse voltammetry (DPV) using 1.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ solution of 0.1 M KCl. The measurement conditions of

CV are: potential range is -0.4~0.6V, sweep speed is 50mV/s; EIS measurement conditions are: amplitude is 0.005 V, potential is 0.2 V, frequency range is 10^{-1} ~ 10^{5} Hz; DPV measurement conditions are: the potential range is 0 ~ 0.6V, the pulse amplitude is 25mV, the pulse width is 50ms, the pulse period is 0.5s, and the potential increment is 5mV.

2.3.2 Determination of ASS1 samples

The MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET and NIP/AuNPs/ITO-PET were incubated in the sample solution containing ASS1 for 20 min, and the response of the electrode in the potassium ferricyanide probe solution before and after incubation was recorded by DPV. The DPV measurement conditions are: the potential range is 0~0.6V, the pulse amplitude is 25mV, the pulse width is 50ms, the pulse period is 0.5s, and the potential increment is 5mV.

3 Results and Discussion

3.1 Electrochemical Characterization

The electrochemical performance of the electrode and the construction process of the imprinted sensor were compared and analyzed by CV, DPV and EIS. The current value of the oxidation peak of the measuring electrode in the probe solution can be seen from the CV diagram. The larger the current value, the better the conductivity of the electrode. The larger the measured current value in the DPV diagram, the better the electrode conductivity; In the EIS diagram, the larger the semi-arc radius, the larger the resistance and the slower the reaction rate of the electrode surface[28][29]. As shown in Fig. 1A (curves a, b), the electrode conductivity was significantly improved after electrodeposition of AuNPs. The oxidation peak current value of AuNPs/ITO-PET is about twice that of the bare electrode. EIS characterization results (Fig. 1C) can also intuitively show that the semicircular arc radius of the Nyquist is significantly decreased, and the electron transfer resistance resistance (Rct) is significantly decreased[30][31][32]. The Rct of ITO-PET and AuNPs/ITO-PET are 0.622 kΩ and 0.102 kΩ, which is attributed to the excellent conductivity of AuNPs. Fig. 1A (curve c) is the CV curve of RLQSKVTAKC@VVSGKSSMSC/AuNPs/ITO-PET, the redox peaks are significantly decreased and the decrease in conductivity should be attributed to the insulating peptide chains that hinder the electron transfer on the electrode surface. At the same time, the oxidation peak potential moved positively to 0.447V vs. SCE, it was speculated that the template peptide chain was adsorbed on the electrode surface during the incubation, resulting in electrode blocking and generating high overpotential of the electrode surface. The results of the Nyquist in Fig. 1C also confirms the speculation that the Rct of RLQSKVTAKC@VVSGKSSMSC/AuNPs/ITO-PET is 2.41 kΩ. Fig. 1 (curve d) is the imprinted sensor(MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET), and the results show that its conductivity is lower than that of AuNPs/ITO-PET. This is because the surface of the electrode is still partially covered with insulating polydopamine after the template is removed, and its Rp is 0.306 kΩ, which has high conductivity, which lays the foundation for the high sensitivity of the sensor. The characterization of NIP/AuNPs/ITO-PET was shown in Fig. 1 (curve e). The results show that it has extremely poor conductivity and a huge Rp of 6.32 kΩ. This is because the insulating polymer almost completely covers electrode, and the electron transfer speed on the electrode surface is extremely low. The Randles equivalent circuit for the cell is shown in Fig. 1D, which consists of the Rct in series with the Warburg impedance (Zw), then in parallel with the double layer capacitor (C) and then in series with the electrolyte resistance (Rs).

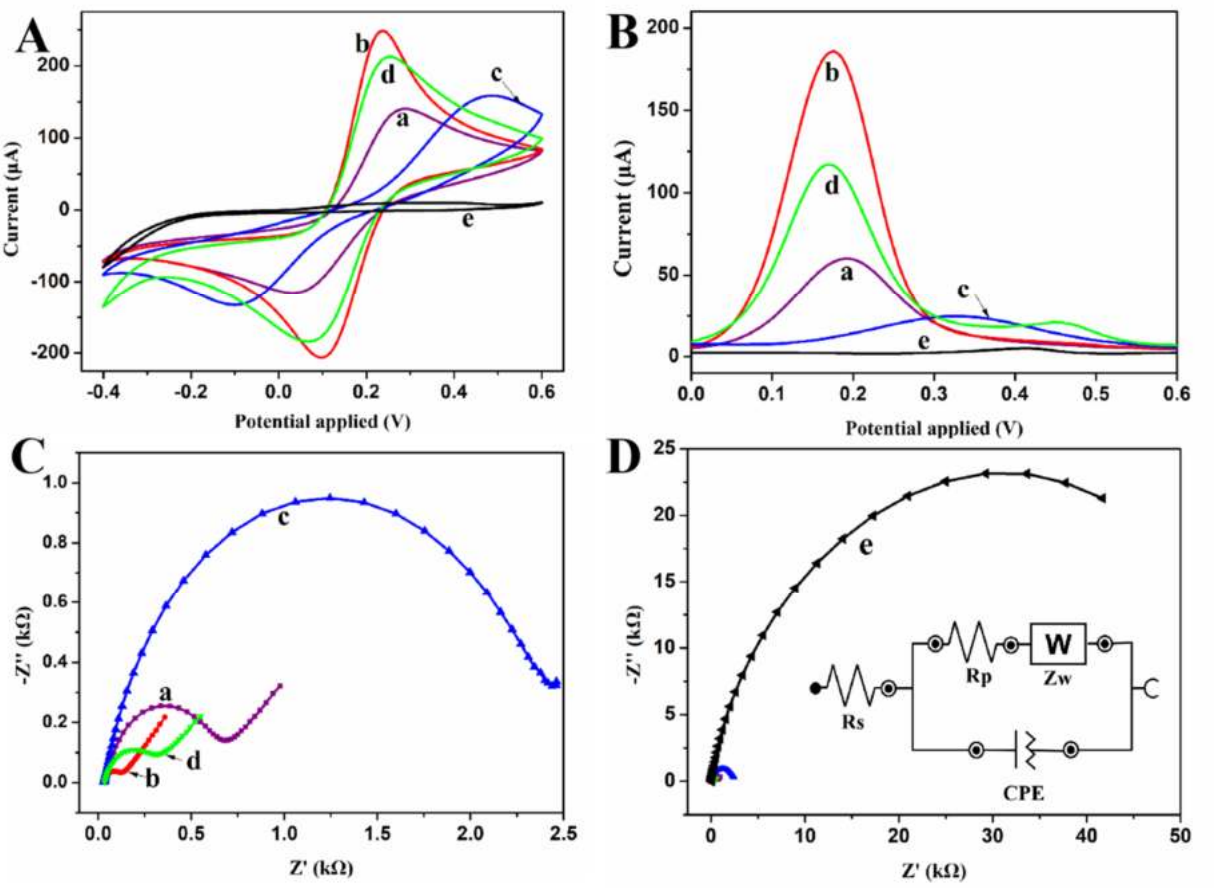


Fig. 1 CV (A) and DPV (B) curves of electrode in probe solution, EIS and sensor equivalent circuit curves (C, D) (a: ITO-PET, b: AuNPs/ITO-PET, c: RLQSKVTAKC@VVSGKSSMSC/AuNPs/ITO-PET, d: MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET, e: NIP/AuNPs/ITO-PET) in 1.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ solution of 0.1 M KCl.

3.2 Electrode physical characterization

A preliminary study of the sensor construction process was carried out using scanning electron microscopy (SEM). Samples include AuNPs/ITO-PET, RLQSKVTAKC@VVSGKSSMSC/AuNPs/ITO-PET, MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET and NIP/AuNPs/ITO-PET at magnifications of 10000 and 30000. Fig. 2A shows the morphology of ITO-PET after deposition of gold nanoparticles. It can be observed that AuNPs are uniformly distributed on the surface of ITO-PET. The morphologies of RLQSKVTAKC@VVSGKSSMSC-AuNPs/ITO-PET are shown in Fig. 2B. AuNPs showed irregular aggregation due to the chemisorption of AuNPs and peptide chains, indicating that the peptide template was successfully immobilized, which was also confirmed by electrochemical characterization. However, in the characterization diagram of the imprinted sensor, the agglomeration phenomenon is not obvious, which may be due to the change of the adsorption force caused by the change of the peptide chain charge in the acidic polymer solution. Fig. 2C show the imprinted electrode (MIP/AuNPs/ITO-PET). Compared with Fig. 2B, it can be seen that the conductivity of the electrode becomes poor after the imprinting layer is covered, and the electrode surface is wrapped by the MIP. It is necessary to further characterize the 3D structure of the removed template electrode surface. Fig. 2D shows the surface morphology of the non-imprinted sensor (NIP/AuNPs/ITO-PET). It can be seen that the NIP surface is smooth, with only some the larger-sized AuNPs were not completely covered by polydopamine.

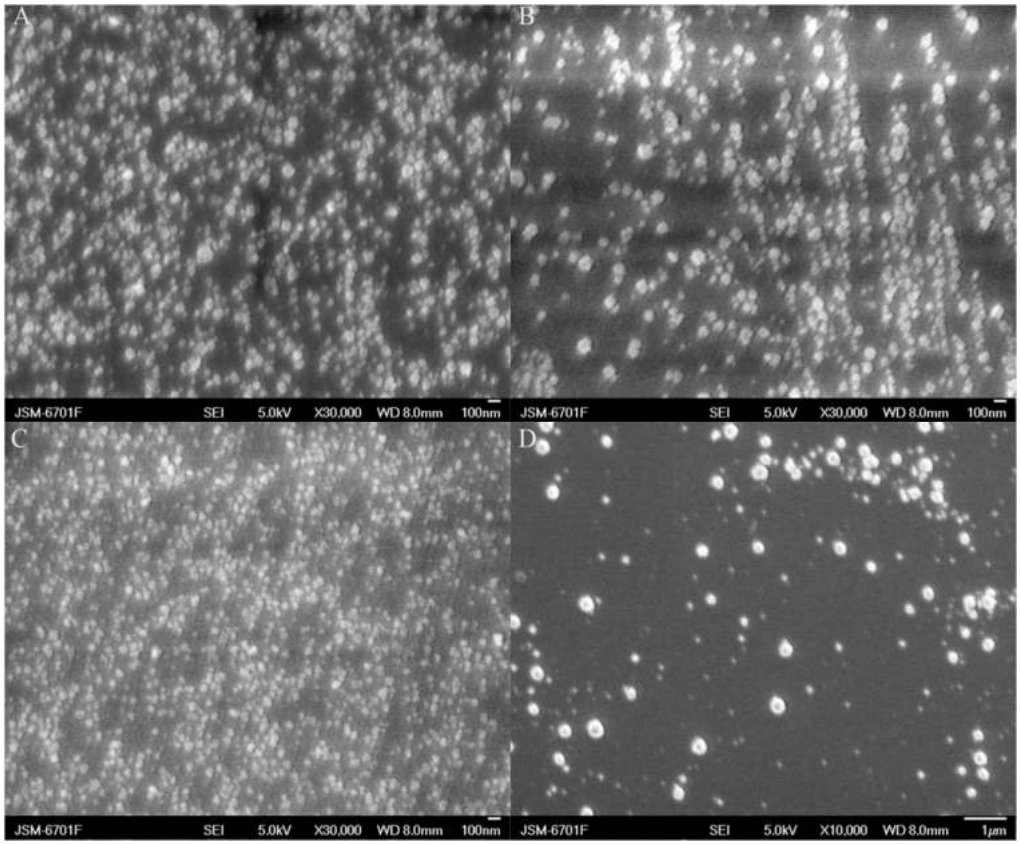


Fig.2 SEM of AuNPs / ITO-PET (A); Epitope-Cys-AuNPs / ITO-PET (B); MIP / AuNPs / ITO-PET (C); NIP / AuNPs / ITO-PET (D)

To confirm the existence of specific imprinted pores on the sensor, the surface morphologies of the imprinted electrodes before and after template removal were investigated by atomic force microscopy (AFM). Plane 2D images, pseudo-3D topography, root mean square roughness (RMS) and cross-sectional profiles of the samples were analyzed. Measurements were performed in a dry state at room temperature using a tap (intermittent contact) mode with a scan rate of 1 Hz and a scan area of 1 μm^2. Fig. 3B and 3E show the pseudo-3D topography. before and after elution. At the same scale, it is obvious that the electrode surface is rougher after removing the template. The cross-sectional profile was obtained by measuring the surface roughness from the upper right to the lower left of the two-dimensional image of each sample. As shown in Fig. 3C and 3F, the surface of the electrode after elution is more undulating, the height of the cross-section of the imprinted electrode before removing the template is 15.748 nm, and the RMS value of the surface roughness is 5.929 ± 0.048 nm. The cross-sectional height of the removed electrode was significantly increased to 30.139 nm, and the root mean square value was also greatly increased to 11.985 ± 0.224 nm. This height difference is very consistent with the small size (>1 nm) of the template molecule, which confirms the existence of imprinted sensor surface after removing the specific recognition sites of the template.

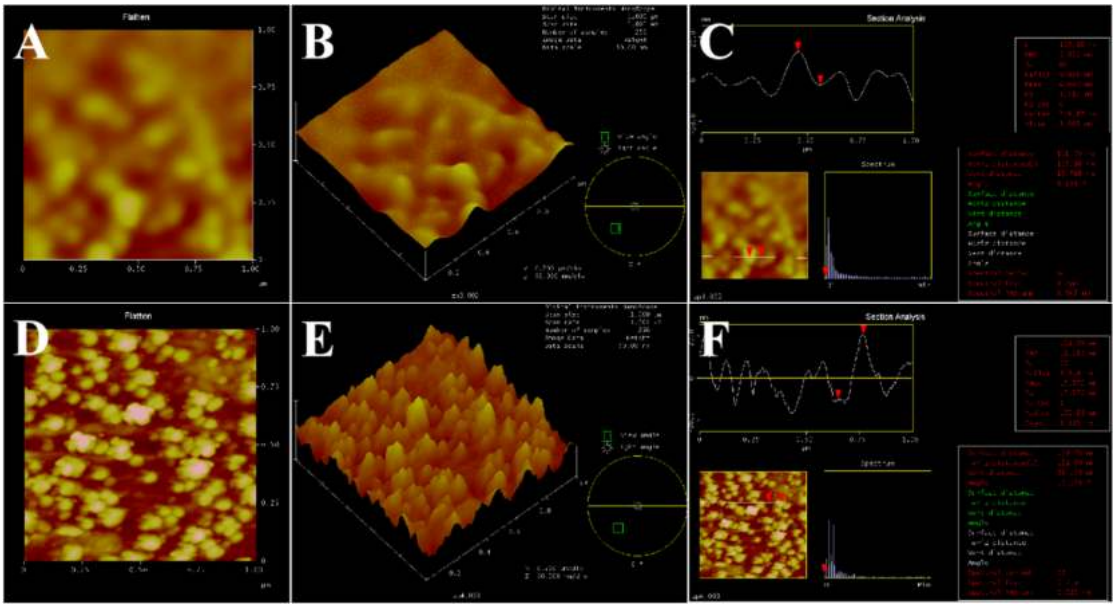


Fig. 3 AFM of MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET before template removal (A, B, C) and after template removal (D, E, F)

3.3 Linear dynamic concentration range and limit of detection

Under optimized experimental conditions, a highly sensitive DPV was selected to determine the current response of MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET after incubation in solutions containing different concentrations of ASS1 (Fig. 4). We investigated the effect of using a single epitope and two epitopes as imprinting templates on the detection performance of the sensor. It can be seen from Fig. 4 that the oxidation peak current and the logarithm of the ASS1 concentration have a good linear relationship for both single-epitope imprinted sensor and dual-epitope imprinted sensor. The sensitivity of analytical methods is often represented by the limit of detection, which is the lowest concentration of the tested substance in the sample that can be detected. Generally, when the signal-to-noise ratio is 3:1, the amount injected into the instrument is the limit of detection. The limit of detection is lower, the sensitivity of the method is higher. Compared with single-epitope imprinting, dual-epitope imprinting has higher sensitivity, with a half of LOD and twice of maximum detection concentration of single-epitope imprinting. The single-epitope imprinted sensor achieved accurate determination of ASS1 at 0.3~3000pg mL^{-1}, linear equation was expressed as I(μA)=-22.9LogCASS1+85.2, R^2=0.998, and the limit of detection was 0.232 pg mL^{-1} (S/N =3); the dual-epitope imprinted sensor also achieved trace detection of ASS1 in the range of 0.15~6000 pg mL^{-1}, linear equation was expressed as I(μA)=-21.9 LogCASS1+86.3, the correlation coefficient R^2 =0.998, limit of detection was 0.106 pg mL^{-1} (S/N=3). This is because dual-epitope imprinting provides more abundant recognition sites for the sensor, and the improvement of recognition efficiency leads to better sensitivity of the sensor. In addition, two different imprinting sites make the arrangement of ASS1 on the electrode surface more efficient. According to the investigation, this is the first time to construct a dual-epitope imprinted electrochemical sensor for the detection of depression marker ASS1.

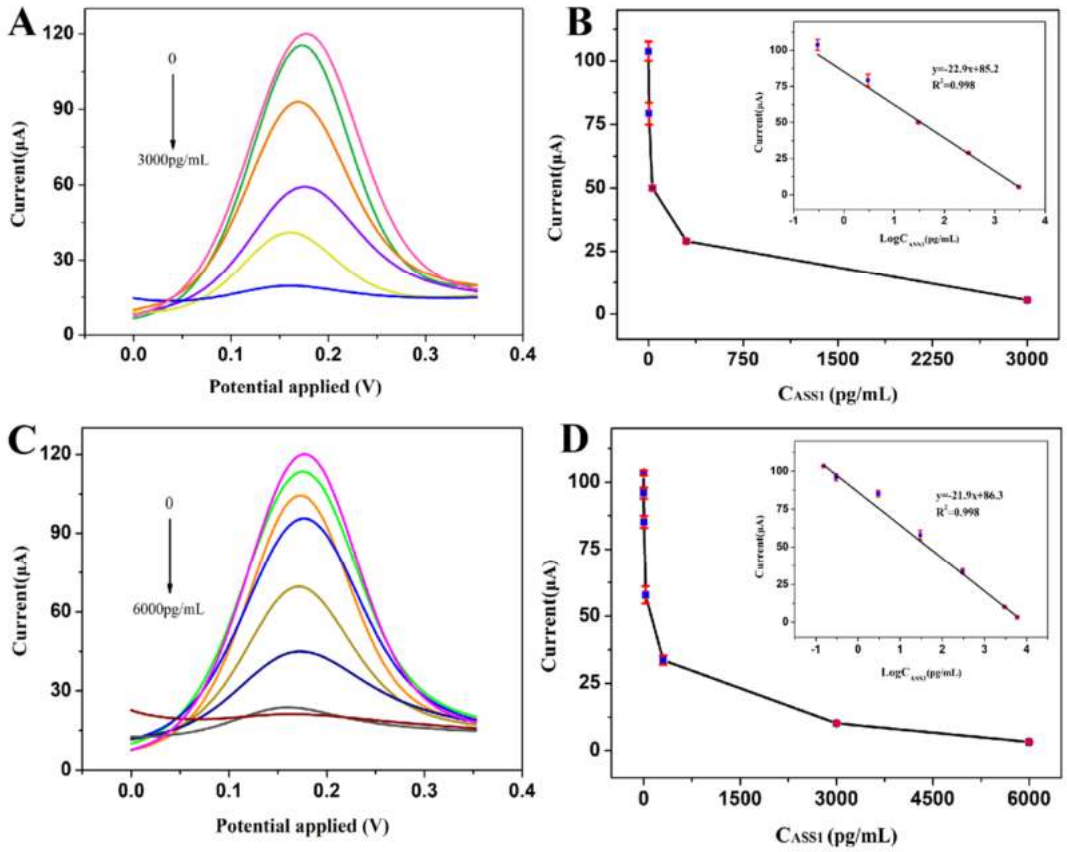


Fig. 4 The relationship between ASS1 concentration and DPV peak detected by single-epitope imprinting sensor (A) and the fitted linear diagram of the logarithm of ASS1 concentration and DPV peak (B); The relationship between ASS1 concentration and DPV peak detected by dual-epitope imprinting sensor (C) and the fitted linear diagram of the logarithm of ASS1 concentration and DPV peak (D);

3.4 Methodological investigation

3.4.1 Selectivity and cross-reactivity studies

The dual-epitope imprinted sensor (MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET) was incubated in non-target protein solutions (dendritic cell nuclear protein 1 (DCNP1), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), bovine serum albumin (BSA), Rheumatoid factor (CTGF)), lipoprotein A4 (Apo-A4), Cortisol) and detected to evaluate the specificity of the imprinted electrode. The target molecule (ASS1) was also detected at the same test concentration. All samples to be tested were prepared in PBS (pH = 7.4) at an analyte concentration of 300 pg mL^{-1}. The results are shown in Fig. 5 and it can be seen that the current response of the sensor in the probe solution after ASS1 incubation is significantly lower than that of interfering substances, indicating that the constructed imprinted sensor can selectively recognize ASS1 and has good anti-interference ability.

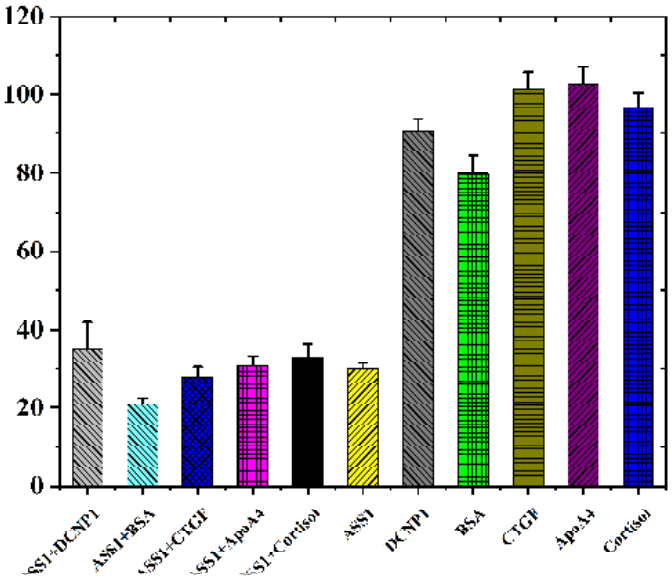


Fig. 5 Incubation in ASS1, DCPN1, BSA, CTGF, ApoA4, cortisol and binary mixtures solutions of the same concentrations.

3.4.2 Investigation of stability, repeatability and reproducibility

Five pieces of MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET were prepared in parallel, the relative standard deviation between the five measured values is 1.74% (RSD<5%), indicating that the constructed sensor has high reproducibility. Five consecutive cycles of detection and elution were performed on the same blotting electrode to examine the repeatability of the sensor. The relative standard deviation(RSD) of the five measurements was 3.60%, which means that the sensor can be used 5 times in a row, with the risk of polymer shedding after more elutions. After storing the blotted sensor at 4°C for 30 days, it retained 94.8% of its detection performance (RSD = 2.98%), indicating acceptable stability of the sensor.

3.5 ASS1 determination in real urea samples

The imprinted electrodes(MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET) were placed in 1 mL of urine samples from healthy subjects. DPV was used to record the response values of the imprinted sensors before and after 20 min incubation. Add a certain concentration of the substance to be tested to the real sample, and conduct the standard addition recovery experiment. The results were shown in Table 1. The sensor exhibited sensitive, simple and rapid detection, the average recovery of ASS1 in urine samples was between 92.4% and 99.0% (90%<recovery<110%), and the RSD values were between 2.90 and 4.30%, indicating that the method can be used to measure ASS1 in urine.

Table 1 MIP/peptides/AuNPs/ITO-PET for detection of ASS1 in urine samples

Biological sample	Added (pg mL-1)	Measured (pg mL-1)	RSD (%, n = 3)	Recovery (%)
1	0.00	24.82	4.13	-
2	50.00	73.97	2.90	98.9
3	500.00	485.49	3.44	92.4
4	5000.00	4972.29	4.30	99.0

4 Conclusion

In this work, molecularly imprinted polymer sensor based on a gold-sulfur bond-directed fixed epitope template was constructed to detect the depression marker ASS1 in urine. The difference in detection performance between single epitope and double epitope templates for imprinting indicates that multiple templates can improve the recognition efficiency and fault tolerance of target proteins. The sensor has detection repeatability, stability and anti-interference ability. The method has been applied to the recovery test of ASS1 in healthy human urine samples with good results. However, the sensor has not been used to detect urine samples from patients with depression, and there is no intuitive comparison between ASS1 in urine samples from healthy subjects and patients.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declaration of Interest Statement

The authors claim that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81972018), the major science and technology project of Gansu Province (21ZD4FA013), the People's Livelihood Special Project from Technical Innovation Guide Plan of Gansu Province (20CX4FK014), the Key Talent Project of Organization Department of Gansu Provincial Party Committee ([2022] Gan-71), the Central Government Guiding Local Science and Technology Development Fund Project (22ZY1QA012), the Special Project of Science and Technology Commissioner of Gansu Province (22CX8GA009), the Talent Innovation and Entrepreneurship Project of Lanzhou (2017-RC-115, 2020-RC-41).

References

[1] Cummins, N., Scherer, S., Krajewski, J., Schnieder, S., Epps, J., & Quatieri, T. F. (2015). A review of depression and suicide risk assessment using speech analysis. Speech communication, 71, 10-49. https://doi.org/10.1016/j.specom.2015.03.004

[2] Yang, Y., Sun, S., Hu, S., Tang, C., Zhang, Y., & Lin, H. (2021). Comparative effectiveness of multiple psychological interventions for psychological crisis in people affected by coronavirus disease 2019: a Bayesian network meta-analysis. Frontiers in psychology, 12, 577187. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.577187

[3] Wittkampf, K., van Ravesteijn, H., Baas, K., van de Hoogen, H., Schene, A., Bindels, P., ... & van Weert, H. (2009). The accuracy of Patient Health Questionnaire-9 in detecting depression and measuring depression severity in high-risk groups in primary care. General hospital psychiatry, 31(5), 451-459. https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2009.06.001

[4] Schlaepfer, T. (2013). 3035–The magnitude of the problem-what price is society paying for under diagnosis and sub optimal treatment of depression. European Psychiatry, 28, 1. https://doi.org/10.1016/S0924-9338(13)77529-1

[5] Rodland, K. D. (2010). Systems biology and biomarker discovery. Disease markers, 28(4), 195-197.

[6] Husson, A., Brasse‐Lagnel, C., Fairand, A., Renouf, S., & Lavoinne, A. (2003). Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline–NO cycle. European Journal of Biochemistry, 270(9), 1887-1899. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03559.x

[7] Oyadomari, S., Gotoh, T., Aoyagi, K., Araki, E., Shichiri, M., & Mori, M. (2001). Coinduction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in aorta of diabetic rats. Nitric Oxide, 5(3), 252-260. https://doi.org/10.1006/niox.2001.0344

[8] Li, J. M., Yang, D. C., Oldham, J., Linderholm, A., Zhang, J., Liu, J., ... & Chen, C. H. (2021). Therapeutic targeting of

argininosuccinate synthase 1 (ASS1)-deficient pulmonary fibrosis. Molecular Therapy, 29(4), 1487-1500. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.01.028

[9] Goodwin, B. L., Pendleton, L. C., Levy, M. M., Solomonson, L. P., & Eichler, D. C. (2007). Tumor necrosis factor-α reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. American journal of physiology-heart and circulatory physiology, 293(2), H1115-H1121. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01100.2006

[10] Dhir, A., & Kulkarni, S. K. (2011). Nitric oxide and major depression. Nitric oxide, 24(3), 125-131. https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.02.002

[11] Chang, C., Obeid, W., Thiessen-Philbrook, H., & Parikh, C. R. (2021). Sample processing and stability for urine biomarker studies. The journal of applied laboratory medicine, 6(6), 1628-1634. https://doi.org/10.1093/jalm/jfab082

[12] Ichiki, H., Imamura, Y., Saheki, T., Kobayashi, K., Yagi, Y., Noda, T., & Inoue, I. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay of serum argininosuccinate synthetase. Clinical chemistry, 33(10), 1941-1941. https://doi.org/10.1093/clinchem/33.10.1941

[13] Qin, S., Zhou, Y., Gray, L., Kusebauch, U., McEvoy, L., Antoine, D. J., ... & Hood, L. (2016). Identification of organ-enriched protein biomarkers of acute liver injury by targeted quantitative proteomics of blood in acetaminophen-and carbon-tetrachloride-treated mouse models and acetaminophen overdose patients. Journal of proteome research, 15(10), 3724-3740. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00547

[14] Cai, J., Gou, X., Sun, B., Li, W., Li, D., Liu, J., ... & Li, Y. (2019). Porous graphene-black phosphorus nanocomposite modified electrode for detection of leptin. Biosensors and Bioelectronics, 137, 88-95. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.045

[15] Aydin, M., Aydin, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2021). Advances in immunosensor technology. Advances in Clinical Chemistry, 102, 1-62. https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.08.001

[16] Bräuer, B., Unger, C., Werner, M., & Lieberzeit, P. A. (2021). Biomimetic sensors to detect bioanalytes in real-life samples using molecularly imprinted polymers: a review. Sensors, 21(16), 5550. https://doi.org/10.3390/s21165550

[17] Mooney, C. , Byrne, M. , Kapuya, P. , Pentony, L. , & on behalf of the British Society for Haematology Guideline. (2019). Point of care testing in general haematology. British Journal of Haematology. https://doi.org/10.1111/bjh.16208

[18] Yang, K., Li, S., Liu, L., Chen, Y., Zhou, W., Pei, J., ... & Zhang, Y. (2019). Epitope imprinting technology: progress, applications, and perspectives toward artificial antibodies. Advanced Materials, 31(50), 1902048. https://doi.org/10.1002/adma.201902048

[19] Dietl, S., Sobek, H., & Mizaikoff, B. (2021). Epitope-imprinted polymers for biomacromolecules: Recent strategies, future challenges and selected applications. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 143, 116414. https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116414

[20] Palladino, P., Minunni, M., & Scarano, S. (2018). Cardiac Troponin T capture and detection in real-time via epitope-imprinted polymer and optical biosensing. Biosensors and Bioelectronics, 106, 93-98. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.068

[21] Min, J., Sempionatto, J. R., Teymourian, H., Wang, J., & Gao, W. (2021). Wearable electrochemical biosensors in North America. Biosensors and Bioelectronics, 172, 112750. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112750

[22] Bi, Y. G., Liu, Y. F., Zhang, X. L., Yin, D., Wang, W. Q., Feng, J., & Sun, H. B. (2019). Ultrathin metal films as the transparent electrode in ITO‐free organic optoelectronic devices. Advanced Optical Materials, 7(6), 1800778. https://doi.org/10.1002/adom.201800778

[23] Silah, H., Erkmen, C., Demir, E., & Uslu, B. (2021). Modified indium tin oxide electrodes: Electrochemical applications in pharmaceutical, biological, environmental and food analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 141, 116289. https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116289

[24] Teymourian, H., Parrilla, M., Sempionatto, J. R., Montiel, N. F., Barfidokht, A., Van Echelpoel, R., ... & Wang, J. (2020).

Wearable electrochemical sensors for the monitoring and screening of drugs. ACS sensors, 5(9), 2679-2700. https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01318

[25] Chen, W. L., Dai, Y. M., Huang, B. S., Lai, G. H., & Tsai, M. H. (2021). Preparation and electrochemical sensor application of tetra aniline/graphene oxide/gold nanoparticle composites. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 627, 127110. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127110

[26] Atapour, A., Khajehzadeh, H., Shafie, M., Abbasi, M., Mosleh-Shirazi, S., Kasaee, S. R., & Amani, A. M. (2022). Gold nanoparticle-based aptasensors: a promising perspective for early-stage detection of cancer biomarkers. Materials Today Communications, 103181.

[27] Ngamdee, T., Yin, L. S., Vongpunsawad, S., Poovorawan, Y., Surareungchai, W., & Lertanantawong, B. (2020). Target Induced-DNA strand displacement reaction using gold nanoparticle labeling for hepatitis E virus detection. Analytica chimica acta, 1134, 10-17. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.018

[28] Er Zeybekler S, Odaci D. Carbon Nanotube-Incorporated Nanofibers for Immunosensor Preparation against CD36[J]. ACS omega, 2023, 8(6): 5776-5786. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07458

[29] Elgrishi N , Rountree K J , Mccarthy B D , et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry[J]. Journal of Chemical Education, 2017:págs. https://doi.org/197-206.10.1021/acs.jchemed.7b00361

[30] Khoshfetrat S M , Dorraji P S , Shayan M , et al. Smartphone-Based Electrochemiluminescence for Visual Simultaneous Detection of RASSF1A and SLC5A8 Tumor Suppressor Gene Methylation in Thyroid Cancer Patient Plasma[J]. Analytical chemistry, 2022(22):94. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01132

[31] Smk A , Ph B , Aa C , et al. Cascade Electrochemiluminescence-based integrated Graphitic Carbon Nitride-encapsulated metal-organic framework nanozyme for prostate-specific antigen biosensing[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021. https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130658

[32] Mousavi M F , Amiri M , Noori A , et al. A Prostate Specific Antigen Immunosensor Based on Biotinylated ǀǀ ntibody/Cyclodextrin Inclusion Complex: Fabrication and Electrochemical Studies[J]. Electroanalysis, 2017. https://doi.org/10.1002/elan.201700363

Pivotal role of Ubiquitin-Specific Protease 7 in protein homeostasis and cancers

Ningjie Guo[a], Huiqin Kang[a], Haiqian Nie[a], Mengkai Feng[a], Xiya Zhang[a], Hong-Min Liu[a], Yi-Chao Zheng[a,*], Wen Li[a,*], and Ya Gao[a,*]

[a] State Key Laboratory of Esophageal Cancer Prevention & Treatment; Key Laboratory of Advanced Drug Preparation Technologies, Ministry of Education of China; Key Laboratory of Henan Province for Drug Quality and Evaluation, Henan Province; Institute of Drug Discovery and Development; School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, 100 Kexue Avenue, Zhengzhou, Henan 450001, China

Ubiquitination and deubiquitination are important physiological processes for the in vivo homeostasis of proteins, especially catalyzed by deubiquitinases (DUBs), which specifically dissociate ubiquitin from ubiquitin-labelled substrate proteins and maintain free ubiquitin levels, while at the same time releasing substrate proteins from the ubiquitin degradation pathway and preventing them from being degraded. There are about 100 different deubiquitinating enzymes in the human body, and ubiquitin-specific protease 7(USP7) is the most well-studied in terms of structure and function, and the most reported small molecule inhibitor. Studies have shown that USP7 is widely involved in various physiological processes in cells, including transcription, apoptosis, autophagy, DNA repair, and immune response, etc. Its dysfunction induces cellular infiltration in patients with tumours such as chronic lymphocytic leukaemia, prostate cancer, glioma, non-small-cell lung cancer, epithelial ovarian cancer, etc., and is closely associated with poor prognosis of tumour patients. Overall, USP7 is not only an important post-translational modifier but also a key participant in the disease process. A more in-depth drilling of both its biological function and its inhibitors would be high of value.

【Key words】 Deubiquitination, USP7, Protein homeostasis, Cancer therapy.

时空定量观测 ADC 旁观者杀伤效应用于提高实体肿瘤渗透性

郭鹏 *, 韦青 , 杨腾 , 应杰儿 , 樊梦阳 , 程向东

中国科学院基础医学与肿瘤研究所 科研部 浙江 杭州 310000

【摘要】抗体偶联药物 (ADC) 是近年来迅速发展的一种新型大分子靶向药物，其独特的旁观者杀伤效应与实体肿瘤临床疗效密切相关。但是，目前 ADC 在肿瘤微环境中如何发挥旁观者杀伤效应的生物学机制尚不明确。针对上述问题，我们开发了一组新型双荧光标记探针（抗体和弹头），可以时空定量并且可视化观测三种 HER2 靶向 ADC（DS8201，RC48，T-DM1）的瘤内旁观者杀伤效应，同时对不同 ADC 的瘤内分布和药代动力学进行分析。 首先，我们发现肿瘤血管周围的结合位点屏障（BSB）显著限制了非可裂解型 ADC（T-DM1） 的肿瘤渗透性，而由组织蛋白酶 B 剪切连接子产生的旁观者杀伤效应可以帮助可裂解型 ADC（DS8201 和 RC48）的游离弹头突破 BSB。我们进一步在动物模型中发现将可裂解型 ADC（DS8201）与其亲本抗体（曲妥珠单抗）按不同比例（1：0，1：3，1：8）进行联合给药，可以通过瞬时竞争机制产生协同效应，帮助 ADC 完全突破 BSB，显著提高 ADC 对实体肿瘤的渗透深度和治疗效果。基于上述实验结果，我们启动了一项 RC48 和曲妥珠单抗联合给药治疗恶性胃癌患者的 I/II 期临床试验，用于评估该联合给药方式的临床效果。

【关键字】ADC，肿瘤渗透性，旁观者效应，抗体偶联药物

近红外光免疫疗法的细胞焦亡机制研究

郭鹏*，陈帆，田雪飞

（中国科学院基础医学与肿瘤研究所）

【摘要】近红外光免疫疗法(near-infrared photoimmunotherapy, NIR-PIT)是一种将抗体偶联药物（ADC）与免疫治疗结合的新型癌症治疗策略，目前已被临床获批治疗晚期头颈肿瘤。但是，NIR-PIT 疗法如何通过 ADC 光敏剂弹头调控肿瘤免疫微环境的生物学机制尚不明确。针对上述问题，我们构建一种靶向治疗未分化甲状腺癌(ATC)的新型 NIR-PIT ADC，在携带 ATC 肿瘤的动物模型中证明了该 NIR-PIT ADC 药物具有显著抑瘤效果，并通过转录组分析发现 NIR-PIT 治疗显著激活了细胞焦亡相关通路，进一步分析显示炎性小体 NLRP1 显著上调，下游 Caspase1 显著下调，焦亡的关键执行蛋白 GSDMD 显著下调，相关的炎症因子 IL-1β、IL-12A 和 TNF 显著上调，证实了焦亡发生的可能。我们进一步通过 Western blot 检测焦亡的关键执行蛋白 GSDMD 的剪切情况，发现 GSDMD 蛋白发生了明显的剪切，产生了 32 kD 大小的 N 端结构域。以上结果表明，不同于传统的物理作用打孔机制，NIR-PIT ADC 还能够通过细胞焦亡机制介导 GSDMD 进行选择性的肿瘤细胞膜打孔，通过释放多种炎症因子改善肿瘤免疫微环境和提高免疫检查点治疗效果。

【关键字】近红外光免疫，细胞焦亡，免疫治疗，靶向治疗，肿瘤微环境

靶向治疗基因组稳定型胃癌的核素偶联药物研究

郭鹏*, 杨乐, 易贺庆, 程向东

（中国科学院基础医学与肿瘤研究所 科研部 浙江 杭州 310000）

【摘要】胃癌是一种常见的恶性肿瘤，基因组稳定型（GS）胃癌因其分子特征在四种胃癌亚型中恶性程度最高，至今缺乏有效靶向药物进行治疗。放射性核素偶联药物（RDCs）因其辐射相关的 DNA 直接损伤和相对较长的辐射距离特点，正在成为下一代抗体偶联药物（ADC）技术的重要发展方向。针对上述未满足医学需求，首先，我们通过无偏见高通量筛选发现细胞间黏附分子-1（ICAM1）是一种 GS 亚型胃癌的新型分子靶点，并成功构建了 ICAM1 单克隆抗体与放射性核素 131I 的 RDC。在动物模型中，将 ICAM1-131I（RDC）与携带可裂解连接子和微管蛋白抑制剂的 ICAM1-MMAE（常规细胞毒性 ADC）进行了头碰头比较，发现 RDC 对 GS 胃癌展现了安全且优异地治疗效果，并且能与 PD1 免疫检查点抑制剂产生协同治疗效果，同时还可以进行 SPECT 成像，而且为致死率最高的 GS 亚型胃癌提供了一种新型靶向治疗候选药物。

【关键字】核素偶联药物，基因组稳定型胃癌，ICAM1，131I，靶向治疗

1 例新型冠状病毒感染合并常见慢病患者的药物治疗评价和药学监护

郭西芮[1]，刘春[1]，杨芳[1]，周燕[1]，颜世豪[1]，王洪菊[1]，叶永琴[1]，刘欢[2]，李刚[2]

（1. 成都市第二人民医院临床药学科，四川 成都 610017；2. 四川省交通医院，四川 成都 610097）

【摘要】 随着我国疫情防控的开放，非定点医院也陆续开始收治 COVID-19 的患者。由于抗新冠病毒药 Paxlovid 与多种药物之间存在相互作用，而伴有多种基础疾病的老年患者也同时合 并使用多重药物，故存在潜在的药物相互作用。因此，本文报道临床药师参与一例使用 Paxlovid 治疗 COVID-19 同时合并多种基础疾病的老年患者的治疗全过程，根据 Paxlovid 与治疗慢病的多种药物之间的相互作用，结合患者疾病变化情况协助临床医师优化调整用药方案，并提供全程化的药学监护，以期为临床药师参与 COVID-19 合并其他疾病的诊疗和监护提供参考，提高药物治疗水平。

【关键词】 新型冠状病毒；多重用药；临床药师；药物治疗评价；药学监护

2019 年末，2019 冠状病毒病（corona virus disease 19，COVID‐19）开始暴发，随后在全球范围内持续扩散流行。截止 2023 年 5 月 31 日，全球已累计报告超过 7.6 亿例 COVID‐19 的确诊病例和 693 万例死亡病例[1]。在 2022 年 12 月我国全面放松防疫限制后，感染基数不断扩大，在院新冠病毒感染者于 2023 年 1 月 5 日达到峰值 162.5 万人，随后持续下降，2 月 6 日下降至 6 万人，较峰值减少了 96.3%[2]，国内疫情防控放开后的首轮疫情高峰已基本结束。然而，根据《新型冠状病毒感染诊疗方案（试行第十版）》（以下简称《第十版），高龄、患有心血管疾病、慢性肺部疾病等基础疾病的患者属于重型/危重型高危人群，在高风险人群中占据着很大比例[3]，病毒对此类人群的健康仍产生较大威胁。针对 COVID-19 的抗病毒药物奈玛特韦/利托那韦（Paxlovid）适用于感染新型冠状病毒（SARS-CoV-2）后发病 5 天以内的轻、中型且伴有进展为重症高风险因素的成年患者[3,4]。然而，许多慢病常用药物与 Paxlovid 存在有临床意义的相互作用，可能导致严重不良反应的风险。因此，临床药师参与 1 例服用 Paxlovid 治疗新型冠状病毒感染且同时合并多种常见慢病患者的诊治过程，根据 Paxlovid 与慢病治疗的多重用药间的相互作用，结合患者疾病变化情况进行个体化药物重整并提供全程化药学监护，以期为 Paxlovid 的临床合理使用以及合并慢性疾病的新冠患者的药学监护提供参考。

1 病史摘要

患者，男性， 87 岁，身高 1．69 m，体重 60 kg。因“纳差、呕吐伴嗜睡 3 天”于 2022 年 12 月 25 日来院就诊。自患病以来精神食欲差，嗜睡。患者入院当天胸部 CT 示：双肺感染并累及肺间质（病毒感染可能），经我院行两次咽拭子新型冠状病毒核酸检测阳性。既往诊断为慢性支气管炎伴肺气肿、冠状动脉粥样硬化性心脏病、室壁瘤伴心尖部血栓形成、主动脉瓣、二、三尖瓣反流、前列腺增生。规律服用沙库巴曲缬沙坦 、曲美他嗪、阿托伐他汀、美托洛尔、氯吡格雷。入院诊断：新型冠状病毒肺炎、冠状动脉粥样硬化性心脏病。

2 诊疗经过

入院后，患者体温正常，双肺未闻及明显干湿啰音，BP：88/44mmHg↓，血氧饱和度：91%↓，血气分析 $PaCO_2$ 25mmHg↓。血常规：淋巴细胞 0.9×10^9/L%↓，血红蛋白 110g/L↓；炎症标志物：降钙素原 0.092ng/mL↑， 超敏 C 反应蛋白 59.92mg/L↑，铁蛋白 1184.75 pg/mL↑；心肌标志物：超敏肌钙蛋白 T 51.7 ng/L↑，B 型脑利钠肽前体 4338 pg/mL↑；凝血指标：凝血时间 13.5 sec↑ 。其余检验检查指标无明显异常。入院后诊疗方案：1. 使用 Paxlovid（奈玛特韦 300mg+利托那韦 100mg，q12h）抗病毒治疗；更换调脂药为普伐他汀 20mg qd；更换凝药为艾多沙班 30mg qd；加用甲泼尼龙 40 mg qd 抗炎。第 3 天患者加用哌拉西林他唑巴坦 4.5g q8h 抗感染治疗；丙种球蛋

【基金项目】国家重点研发计划课题（编号：2020YFC2005506）

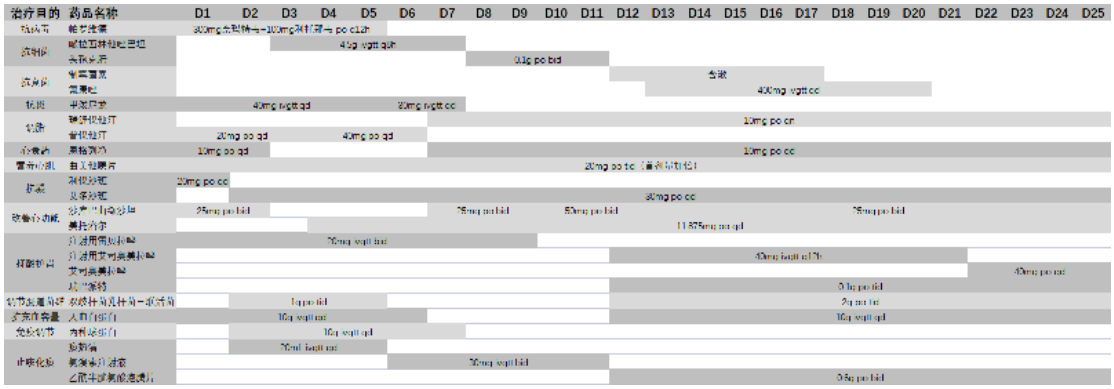
[作者简介] 郭西芮，女, 硕士，药师，研究方向：临床药学

[通讯作者] 李刚，男，硕士，主任药师，研究方向：临床药学

白 10g qd 调节免疫治疗。第 12 天，患者最高体温 37.4℃，出现口腔粘膜白斑，G 实验阳性，考虑鹅口疮及深部真菌感染可能，予以氟康唑 400mg qd 和制霉菌素局部抗真菌治疗，碳酸氢钠漱口；同时患者出现解黑便，加用艾司奥美拉唑 40mg q12h 和瑞巴派特 0.1mg tid。第 20 天，患者白细胞 2.66×109L↓，血红蛋白 77g/L↓，红细胞计数 2.39×10^{12}L↓，淋巴绝对数 0.6×10^{9}L↓，考虑氟康唑的不良反应所致，停用。第 25 天，患者经治疗后新冠核酸阴性，胸部 CT 与前比较肺部病灶有所吸收，精神食欲明显好转，办理出院。

2 主要治疗药物

该患者的主要治疗药物、治疗目的与治疗周期见表 1。



注：po 为口服，ivgtt 为静脉滴注，qd 为每日 1 次，bid 为每日 2 次，tid 为每日 3 次，qn 为每晚一次。

图 1 主要治疗药物、治疗目的与治疗周期

3 药物评价与药学监护

3.1 奈玛特韦/利托那韦与心血管系统药物

依据《第十版》，该患者临床分型标准为轻型，属于重型/危重型高危人群，入院后予以口服奈玛特韦 300mg（150mg×2 片）联合利托那韦 100mg（100mg×1 片），q12h，连续服用 5 天抗病毒治疗。奈玛特韦是一种 SARS-CoV-2 主要蛋白酶 Mpro 的拟肽类抑制剂，使病毒无法处理多蛋白前体，从而阻止病毒复制增殖。利托那韦抑制 CYP3A 介导的奈玛特韦代谢，从而升高奈玛特韦血药浓度，发挥协同作用。由于奈玛特韦和利托那韦均为 CYP3A 的底物，利托那韦是多种药物酶和 P-糖蛋白（P-gp）的抑制剂、诱导剂和底物，其对肝药酶 CYP3A 有强效抑制作用，因此所有经过 CYP3A 代谢的药物、抑制或诱导 CYP3A 酶的药物与其联合使用都可能发生相互作用，进而影响 Paxlovid 或联用药物的疗效或增加不良反应发生的风险[4]。同时，研究显示合并心血管疾病会显著增加新冠病毒感染者的死亡风险。因此，针对新冠病毒感染治疗的同时，正确及时处理患者本身的心血管疾病对于患者的预后有重要影响[5]。既往有心血管疾病的患者在新冠病毒感染之后，基本可以沿用原来的治疗方案，按原剂量服用，但是用 Paxlovid 等抗病毒药物期间，应注意通过 CYP3A 代谢通路的心血管药物的使用。故针对此患者临床药师建议[3-7]：1. 将依赖 CYP3A 代谢的阿托伐他汀换为不依赖 CYP3A 代谢的普伐他汀 20mg qd，可将 Paxlovid 与调脂药的药物相互作用相关不良事件风险降至最低。2. 将受 CYP3A 和 P-糖蛋白抑制的利伐沙班 20mg qd 更换为艾多沙班，由于艾多沙班是 P-gp 的底物，利托那韦对 P-gp 的抑制作用，合用会增加艾多沙班的浓度，对于静脉/动脉血栓栓塞（VTE/ATE）高危患者，建议将艾多沙班调整为 30 mg qd。

由于患者需长期服用冠心病二级预防及心衰治疗的药物，为提高患者药物治疗的依从性，在停用 Paxlovid 后药师协助医生对患者口服的药物进行了药物重组和用药教育：1. 他汀是用于降低低密度脂蛋白，无论血脂情况如何，稳定性冠心病患者均建议长期服用他汀类药物。根据 Paxlovid 药代动力学数据，奈玛特韦+利托那韦合用半衰期是 6.9 小时，一般认为代谢 5 个半衰期后药物在体内可基本消除，Paxlovid 停药后 35 小时左右可基本清除完全；利托那韦停用后 3 天内 CYP3A 酶活性可恢复 80%～90%[8]。因此，该药的相互作用管理时间窗在从起始用药持续至停药后的 3d 内，故临床药师建议在 Paxlovid 5 日疗程结束后 3 天后，重新给予停用的药物[9]，结合血脂情况恢复阿托伐他汀 20mg qd 治疗[5,7]。2. 美托洛尔用于控制心室率，降低心肌耗氧量，防止心肌缺血的

复发；在服药期间应密切观察心率，静息心率控制在 55-60 次/分，监测心率不要低于 50 次/分钟，过慢的心率可能造成乏力甚至脑缺血[10]。3.曲美他嗪可优化心肌能量代谢，改善心肌对缺血的耐受性及左心功能，缓解心绞痛[10]。4.艾多沙班抗凝期间注意监测黑便、皮下、牙龈等部位是否有出血情况。该患者从第 12 天起连续 8 天解黑便，考虑消化道出血；但由于患者长期卧床，Padua 评分：8 分，高危，故治疗期间一直存在出血和血栓的治疗矛盾。考虑停用艾多沙班风险较大，故一直最低剂量使用并对症处理消化道出血情况[11]。5.恩格列净和沙库巴曲缬沙坦两药都属于心衰“新四联”的药物，可以降低心血管死亡和因心力衰竭入院的发生风险，尽早使用可以改善患者总体预后，减少猝死风险[12]。

3.2 抗菌药物

入院后第 3 天患者有咳黄白粘痰表现，双下肺可闻及少许湿鸣音，PCT 无明显升高，白细胞、中性粒细胞百分比较前升高。由以上情况是否可判断患者合并细菌感染，是否能启用抗生素治疗值得思考和讨论。由于白细胞总数和中性粒细胞的分数均会受到甲泼尼龙的影响而升高，不宜用来判断是否存在细菌感染，所以 PCT 是更为客观的感染评价指标[13,14]。根据文献报告，COVID-19 初期合并细菌感染的概率约为 10%，而入住重症监护室的危重症患者约 31%继发细菌感染。新冠病毒感染后期可出现咯黄脓痰、脓涕等症状，早期肺部影像学可有实变、渗出成分。故脓痰、脓涕、血白细胞轻度升高和早期肺部影像学出现实变渗出不应作为使用抗菌药物的指征[15]，故该患者存在细菌感染的依据似乎不足。然而，患者存在高龄，慢性支气管炎病史，咳黄白痰，长期卧床等细菌感染的危险因素，同时全身使用糖皮质激素也会增加感染风险，且不排除耐药菌感染可能，故综合考虑后给予哌拉西林他唑巴坦治疗[16]。由于该药为广谱抗菌药物，患者入院后出现腹泻症状，药师提醒可能为 Paxlovid 的不良反应，也需要关注抗生素相关性腹泻，建议加用双歧杆菌乳杆菌三联活菌维持肠道微生物平衡。

治疗第 12 天，患者出现低热和口腔粘膜白斑，予以抗真菌治疗后白斑减少。根据《口腔念珠菌病诊疗指南（2022 年版）》，急性假膜型念珠菌病多见于婴幼儿及衰弱者、长期使用激素及免疫抑制剂者，又称鹅口疮或雪口。有轻度发热症状出现，全身反应一般较轻，少数病例会引起念珠菌食管炎或肺念珠菌病[17]。此外，文献报道 COVID-19 相关念珠菌病（CAC，COVID-19-associated candidiasis）在 12 个国家有爆发报道，其中白色念珠菌最常见，大多数来源为患者定植，感染部位多见于血流和腹部[18]。该患者出现鹅口疮伴有低热，且 G 试验阳性须考虑有深部真菌感染，故予以碳酸氢钠和制霉菌素漱口局部抗真菌治疗，同时静脉使用氟康唑全身治疗。但该患者出现上述情况也不排除一些特殊原因，首先 G 试验是早期诊断侵袭性真菌感染（IFI）的有效检测手段，但可能存在该患者使用白蛋白、丙种球蛋白后出现的假阳性情况[14]。其次，低热情况也不排除是输注白蛋白和丙种球蛋白引起不良反应[19,20]。

4 小结

COVID-19 患者常合并慢性基础疾病，不仅存在病毒感染与其他慢性疾病的相互影响，还要考虑抗病毒药物和慢病药物之间的相互作用，增加了治疗矛盾和用药风险。此类人群是药学监护的重点关注人群，重点应关注其基础疾病是否得到有效控制，药物之间是否存在相互作用、重复用药及不良反应风险等。因此，临床药师工作中对此类重点人群开展药学监护的工作至关重要，利用药学专业知识协助医生根据患者病情的变化及时地对治疗方案进行优化，实时地进行药学监护，可以更好地保障患者的用药安全，发挥疫情中临床药师的专业作用。

参考文献

[1] World Health Organization. Coronavirus Disease (Covid-19) Situation Dashboard. |.*2023*2023. p 19.

[2] 中国疾病预防控制中心. 全国新型冠状病毒感染疫情情况. |.*2023*2023.

[3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒感染诊疗方案（试行第十版）的通知. |.*2023*2023; 2023.

[4] 奈玛特韦片/利托那韦片组合包装说明书, 国药准字 HJ20220006. 核准日期：2022 年 02 月 11 日.

[5] 中国医师协会心血管内科医师分会.新型冠状病毒感染与心血管疾病诊疗中国专家共识（2023）[J].中华心血管病杂志（网络版）, 2023, 第 6 卷.

[6] Abraham S NANT.Cardiovascular Drug Interactions With Nirmatrelvir/Ritonavir in Patients With COVID-19: JACC

Review Topic of the Week[J].J AM COLL CARDIOL, 2022, 80(20): 1912～1924.
[7] 广东省药学会.广东省心血管患者使用奈玛特韦/利托那韦片（Paxlovid）临床药学指引[J]., 2023.
[8] Felix S, Saye K, Marcel S,et al.Stopping lopinavir/ritonavir in COVID-19 patients: duration of the drug interacting effect[J].J ANTIMICROB CHEMOTH, 2020(10): 10.
[9] Therapeutics and COVID-19: living guideline. |.*2023*2023. p 14～2022.
[10] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分会,et al.稳定性冠心病基层诊疗指南(2020 年)[J].中华全科医师杂志, 2021, 20(3): 9.
[11] 王乔宇, 武明芬, 柳鑫,et al.2021 中国静脉血栓栓塞症防治抗凝药物的选用与药学监护指南[J].中国临床药理学杂志, 2021, 37(21): 18.
[12] 中国老年医学学会心电及心功能分会, 中国医师协会心血管内科分会, 中国心衰中心联盟专家委员会.慢性心力衰竭加重患者的综合管理中国专家共识 2022[J].中国循环杂志, 2022, 37(3): 11.
[13] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会.降钙素原指导抗菌药物临床合理应用专家共识[J].中华医学杂志, 2020, 100(36): 2813～2821.
[14] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会.感染相关微生物标志物临床意义解读专家共识[J].中华结核和呼吸杂志, 2017, 20(4).
[15] 胡明, 李绪言, 邱海波,et al.新型冠状病毒肺炎患者继发细菌感染防治的体会与建议[J].中华重症医学电子杂志, 2020, 06(02): 230～232.
[16] 中华医学会呼吸病学分会感染学组.中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018 年版)[J]., 2018.
[17] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.口腔念珠菌病诊疗指南（2022 年版）[J]., 2022.
[18] Hoenigl M, Seidel D, Sprute R,et al.COVID-19-associated fungal infections[J].NAT MICROBIOL, 2022(8): 7.
[19] 静注人免疫球蛋白（pH4）注射液说明书，国药准字 S19993042. 核准日期：2012 年 06 月 29 日.
[20] 人血白蛋白注射液说明书，国药准字 S20170005. 核准日期：2008 年 07 月 28 日.

监管科学视角下美国 FDA 紧急使用授权制度研究及启示

韩丹[1]，高文，任磊，郭明明，舒丽芯*

（1.海军军医大学药学系军队药材保障论证中心，上海，200433）

【摘要】本研究以监管科学视角，对美国 FDA 在紧急使用授权方面的经验和做法进行批判性回顾。经文献研究发现，在 COVID-19 流行期间，美国 FDA 采用了一系列监管科学的方法，加速 COVID-19 相关药物和治疗方案的研发和审批。截止 2023 年 6 月，FDA 共授权了 15 个 COVID-19 治疗药物和 4 个 COVID-19 疫苗的 EUA，包括上市药品扩大适应症、试验药物 EUA、EUA 后撤销、EUA 后上市 4 种情形。美国 FDA 紧急使用授权产品快速获批的原因，主要包括使用已有的临床试验数据、省略动物药效试验、合并一期和二期临床试验、采用临床结局替代终点等监管科学方法。本研究提出了完善我国的药品紧急使用授权制度、将监管科学方法运用到我国药品紧急使用授权中、对紧急使用授权的药品应制定主动监测机制等建议，旨在为我国药品监管机构制定相应药品特别审批制度程序和指导性文件提供参考依据，提高突发公共卫生事件下药品的可及性。

【关键词】监管科学；美国 FDA；紧急使用授权；药品特别审批

Research on FDA Emergency Use Authorization System from the Perspective of Regulatory Science

【**Abstract**】During the COVID-19 epidemic, the FDA has adopted a series of regulatory science approaches to accelerate the development and approval process for COVID-19-related drugs and therapeutic regimens. As of April 2023, the FDA has authorized 15 EUAs for COVID-19 therapeutics and four EUAs for COVID-19 vaccines, including four scenarios: expanded indications for marketed drugs, experimental drug EUAs, post-EUA withdrawals, and post-EUA launches.The reasons for the rapid approval of emergency use authorisation products by the US FDA mainly include the use of existing clinical trial data, omission of animal efficacy tests, combining phase I and phase II clinical trials, applying for approval using the interim results of phase III clinical trials, and adopting regulatory science methods such as clinical outcome surrogate endpoints. This study proposes to improve China's drug emergency use authorization system, apply regulatory science methods to China's drug emergency use authorization, and develop an active monitoring mechanism for drugs authorized for emergency use, with the aim of providing a reference basis for China's drug regulatory agencies to develop procedures and guidance documents for the corresponding drug special approval system, and to improve the accessibility of drugs under public health emergencies.

【**KEYWORDS**】regulatory science; US FDA; emergency use authorization; Special approval for drugs

基金项目：军队生物安全专项（A3703022001）

作者简介：韩丹，讲师，硕士。研究方向：药材保障。电子邮箱：handanxuan@163.com

通讯作者：舒丽芯，副教授，博士。研究方向：军队药材政策研究。电子邮箱：lukyshu@sina.com

2020 年 3 月 11 日，世界卫生组织（World Health Organization, WHO）宣布由新型冠状病毒引起的肺炎为全球大流行病。由于在应对之初没有特效药物和疫苗，各国均出现了不同程度的无措和慌乱，面对疫情的紧急情况，迫切需要找到预防和治疗新冠肺炎的药物和疫苗，以应对疫情的发展。鉴于完全批准所需要的时间长且缺乏可用的替代品，因此，在紧急情况下批准使用有限证据支持的药物和疫苗已经成为国家监管机构以及疾病爆发控制过程中的重要一环。美国的药品紧急使用授权制度（Emergency Use Authorization，EUA）已经历了近二十年的修正与演化，相关法律依据已趋于完善，紧急使用授权程序的启动、终止和实施范围亦有相对细致的规定。在新冠肺炎疫情防控期间，美国 FDA 针对疫苗、药物和非疫苗生物制品、医疗器械三类医疗产品分别进行了紧急使用授权和信息公开，对疫情防控和疾病诊疗发挥了积极作用。

当前国内药品特别审批制度的研究主要集中在理论探讨和案例分析方面，缺乏实证研究和数据支持，也不具备相对完善的监管科学研究体系。常规的审评审批显然不适应突发公共卫生事件药品可及性迫切需求，而过分追求药品的可及性又会忽视药品安全性带来的深远隐患。药品特别审评以怎样的速度进行，取决于药品安全性和可及性的权衡。监管科学可以为药品的审批部门提供严格的临床试验设计和评估标准，确保特别审批药品符合质量、安全性和有效性要求。本研究以监管科学视角，批判性地借鉴美国紧急使用授权的经验做法，探索我国药品特别审批制度的优化研究，具有重要理论和现实意义，可为我国药品监管机构制定相应药品特别审批制度程序和指导性文件提供参考依据，提高突发公共卫生事件下药品的可及性。

1 研究资料与方法

本研究收集了 FDA 官方网站、FDA 发布的全球 COVID-19 药品开发要求、已公布的涉及 COVID-19 治疗药物的临床试验数据等来自公开的和具有公信力的资源和数据，在 2020 年至 2023 年 6 月之间，搜集已获得紧急使用授权的 COVID-19 治疗药物和疫苗信息，并在此基础上归纳总结其批准和审批情况，以及审批快的原因和启示。

2 美国 FDA 紧急使用授权制度审批药品情况

在 COVID-19 流行期间，美国 FDA 采用了一系列监管科学的方法，加速 COVID-19 相关药物和治疗方案的研发和审批流程，截止 2023 年 6 月，FDA 共授权了 15 个 COVID-19 治疗药物（见表 1）和 4 个疫苗（见表 2）的 EUA，包括已上市药品扩大适应症、试验药物 EUA、EUA 后撤销、EUA 后上市 4 种情形。

表 1 美国 FDA 在 COVID-19 流行期间授权 EUA 的治疗药物（数据来源于 FDA 官网）

序号	药物名称	公司名称	向 FDA 提交申请时间	FDA 获批时间	状态	类型
1	羟氯喹和氯喹	多家公司		2020 年 3 月 28 日	已撤销	上市药品扩大适应症
2	瑞德西韦	吉利德科学公司	2020 年 3 月 30 日	2020 年 5 月 1 日	已上市	试验药物 EUA
3	COVID-19 康复患者血浆			2020 年 8 月 23 日	已撤销	试验药物 EUA
4	巴尼韦单抗	美国礼来公司	2020 年 10 月 6 日	2020 年 11 月 9 日	已撤销	试验药物 EUA
5	巴瑞替尼	美国礼来公司	2020 年 10 月 15 日	2020 年 11 月 19 日	EUA	上市药品扩大适应症
6	索罗维单抗	瑞士罗氏制药公司/美国再生元制药公司	2020 年 10 月 8 日	2020 年 11 月 21 日	EUA	试验药物 EUA
7	巴尼韦单抗/埃特司韦单抗	美国礼来公司	2020 年 11 月 16 日	2021 年 2 月 9 日	EUA	试验药物 EUA
8	索曲韦单抗	英国葛兰素史克公司/Vir 公司	2021 年 3 月 24 日	2021 年 5 月 26 日	EUA	试验药物 EUA
9	托珠单抗	基因泰克公司	2021 年 4 月 20 日	2021 年 6 月 24 日	EUA	上市药品扩大适应症

序号	药物名称	公司名称	向 FDA 提交申请时间	FDA 获批时间	状态	类型
10	替沙格韦单抗/西加韦单抗	阿斯利康制药有限公司	2021 年 9 月 30 日	2021 年 12 月 8 日	EUA	试验药物 EUA
11	奈玛特韦/利托那韦	美国辉瑞公司	2021 年 11 月 5 日	2021 年 12 月 22 日	EUA	试验药物 EUA
12	莫诺拉韦	默沙东公司	2021 年 10 月 8 日	2021 年 12 月 23 日	EUA	试验药物 EUA
13	贝特洛韦单抗	美国礼来公司	2022 年 1 月 7 日	2022 年 2 月 11 日	EUA	试验药物 EUA
14	阿那白滞素	Swedish Orphan Biovitrum（Sobi）公司	2022 年 2 月 10 日	2022 年 11 月 8 日	EUA	上市药品扩大适应症
15	韦洛利单抗	InflaRx 公司	2022 年 9 月 29 日	2023 年 4 月 4 日	EUA	试验药物 EUA

表 2 美国 FDA 在 COVID-19 流行期间授权 EUA 的疫苗（数据来源于 FDA 官网）

序号	疫苗名称	公司名称	向 FDA 提交申请时间	FDA 获批时间	状态	类型
1	BNT162b2 疫苗	美国辉瑞公司	2020 年 11 月 20 日	2020 年 12 月 11 日	已上市	试验药物 EUA
2	mRNA-1273 疫苗	莫德纳公司	2020 年 11 月 30 日	2020 年 12 月 18 日	已上市	试验药物 EUA
3	Jcovden 疫苗	美国强生公司	2021 年 2 月 4 日	2021 年 2 月 27 日	EUA	试验药物 EUA
4	Nuvaxovid 疫苗	诺华公司	2022 年 1 月 31 日	2022 年 7 月 13 日	EUA	试验药物 EUA

2.1 上市药品扩大适应症

2.11 巴瑞替尼 Baricitinib

巴瑞替尼是一种口服 JAK 激酶抑制剂，用于治疗中度至重度活动性类风湿性关节炎。美国 FDA 于 2020 年 11 月 19 日紧急批准礼来公司的巴瑞替尼（baricitinib, CAS 登记号为 1187594-09-7）与吉利德科学公司的瑞德西韦（remdesivir, CAS 登记号为 1809249-37-3）联用，用于治疗患有严重 COVID-19 的住院成人和儿童（2 岁及以上），需要补充氧气、有创机械通气或体外膜氧合（ECMO）。随后于 2021 年 7 月 29 日扩大紧急使用授权范围，允许联用或不联用瑞德西韦进行治疗。在 ACTT-2 (NCT04401579) 试验中，首次评估了巴瑞替尼联合瑞德西韦与单独使用瑞德西韦治疗 COVID-19 住院患者的疗效，发现巴瑞替尼与瑞德西韦联用疗效更好尤其是在高流量吸氧或无创通气的患者中。

2.12 托珠单抗 Tocilizumab

托珠单抗是一种白细胞介素-6（IL-6）受体拮抗剂，用于治疗类风湿性关节炎、全身性幼年特发性关节炎和细胞因子释放综合征。美国 FDA 于 2021 年 6 月 24 日紧急批准基因泰克公司的单抗药物托珠单抗（tocilizumab, CAS 登记号为 375823-41-9），用于治疗成人及 2 岁以上儿童重症危重型（接受全身性皮质类固醇和补充氧气、无创或有创机械通气、或 ECMO）COVID-19 患者。FDA 信函引用了四项临床试验: RECOVERY (NCT04381936)、COVACTA (NCT04320615)、EMPACTA (NCT04372186) 和 REMDACTA (NCT04409262)。这些试验调查了托珠单抗单独或联合瑞德西韦在 COVID-19 或缺氧或全身炎症的各种住院人群中的作用。RECOVERY 发现，2,022 名接受托珠单抗治疗的患者在随机分组后 28 天内的全因死亡率为 31%，2,094 名接受安慰剂治疗的患者的全因死亡率为 35%（$p = 0.0028$）。

2.13 阿那白滞素 Anakinra

阿那白滞素是一种白细胞介素-1（IL-1）受体拮抗剂，可用于治疗对一种或多种调节剂治疗无反应的中重度活动性类风湿关节炎（RA）。美国 FDA 于 2022 年 11 月 8 日紧急批准瑞典 Orphan Biovitrum AB (Sobi) 北美分公司的抗炎药阿那白滞素（anakinra, CAS 登记号为 143090-92-0），用于治疗需要补充氧气（低氧或高氧）的住院成人 COVID-19 患者，这些患者有进展为严重呼吸衰竭的风险，且血浆可溶性尿激酶纤溶酶原激活剂受体（suPAR）可能升高。为支持 EUA 请求而提交的临床试验有 SAVE-MORE (NCT04680949) 和 SAVE (NCT04357366)（见附表）。在 SAVE 研究中，将使用 suPAR 生物标志物检测患有严重急性呼吸系统综合症冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 的下呼吸道感染且有进展为严重呼吸衰竭的高风险的患者，使用阿那白滞素进行早期治

疗，以防止进展为严重呼吸衰竭。

2.2 试验药物

2.21 索罗维单抗 REGEN-COV (Casirivimab and Imdevimab)

索罗维单抗是两种非竞争单克隆抗体 Casirivimab 和 Imdevimab 的组合，针对严重的急性 SARS-CoV-2 刺突蛋白。美国 FDA 于 2020 年 11 月 21 日紧急批准瑞士罗氏制药公司和美国再生元制药公司的这两种单抗 Casirivimab (CAS 登记号为 2415933-42-3) 与 Imdevimab (CAS 登记号为 2415933-40-1) 联合用药用于治疗成人及儿童（12 岁及以上、体重至少 40 公斤）轻中度 COVID-19 患者和通过静脉注射或皮下注射进行暴露后预防。FDA 的 EUA 信中引用了由再生赞助的一项临床试验 COV-2067 (NCT04425629)。这项有 799 名参与者的试验表明，与安慰剂组相比，使用索罗维单抗治疗的患者在第 7 天病毒载量有较大的减少（$p = 0.0003$ 在）。临床上，索罗维单抗组第 29 天减少了 57%的病毒相关医疗就诊次数（$p = 0.024$），特别是在有严重 COVID-19 危险因素的患者中。

2.22 巴尼韦单抗/埃特司韦单抗 Bamlanivimab/etesevimab

巴尼韦单抗-埃特司韦单抗是两种单克隆抗体的组合，与 SARS-CoV-2 穗蛋白上不同但重叠的表位结合。美国 FDA 于 2021 年 2 月 9 日紧急批准礼来公司的巴尼韦单抗（bamlanivimab, CAS 登记号为 2423943-37-5）与埃特司韦单抗（etesevimab, CAS 登记号为 2423948-94-9）联用，用于治疗成人及儿童（12 岁及以上、体重至少 40 公斤）轻或普通型 COVID-19 患者。随后，FDA 于 2021 年 12 年 3 日对此 EUA 进行修订，允许将这两种药物联合用药用于治疗所有儿童轻或普通型 COVID-19 患者以及在新冠病毒暴露后预防 COVID-19。FDA 引用了有 3,360 名参与者的临床试验 BLAZE-1 (NCT04427501) 和 1,755 名参与者的临床试验 BLAZE-4 (NCT04634409)，发现用巴尼韦单抗-埃特司韦单抗治疗的患者与安慰剂组相比，COVID-19 相关住院率（2.1%比 7.0%）和死亡率（0%比 1.7%）均有统计学显著下降（$p < 0.001$）。

2.23 索曲韦单抗 Sotrovimab

索曲韦单抗是一种针对 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 保守表位的单克隆抗体，其开发的目的是创造一种具有高抗性屏障以及跨不同冠状病毒活性的抗体[18]。美国 FDA 于 2021 年 5 月 26 日紧急批准葛兰素史克公司的索曲韦单抗（sotrovimab, CAS 登记号为 2423014-07-5）用于治疗成人及儿童（12 岁及以上、体重至少 40 公斤）轻症或中症（但有可能发展为重症）COVID-19 患者。向 FDA 提交的主要有效性和安全性数据来自对 COMET-ICE (NCT04545060)的中期分析。COMET-ICE 招募了 1,057 名被认为可发展为高风险 COVID-19 且有症状的成年患者。中期分析表明，与安慰剂组相比，索曲韦单抗治疗导致死亡或住院超过 24 小时的需求减少了 85%（$p = 0.002$）。

2.24 替沙格韦单抗/西加韦单抗 Evusheld (tixagevimab/cilgavimab)

Evushold 是替沙格韦单抗和西加韦单抗的组合，这是两种长效 IgG1 单抗，针对 SARSCoV-2 刺突蛋白的非重叠表位。美国 FDA 于 2021 年 12 年 8 日紧急批准阿斯利康公司的复方长效单抗药物 Evusheld (tixagevimab, CAS 号为 2420564-02-7；cilgavimab, CAS 号为 2420563-99-9) 用于成人和 12 岁及以上的儿童病毒暴露前预防 COVID-19，他们最近没有接触过 COVID-19，目前也没有感染。仅限于中度或重度免疫功能低下的个体，或有严重不良反应史、对 COVID-19 疫苗接种有不适当反应的人。Evushold 的 EUA 信件引用了 PROVENT (NCT04625725)，一项针对 5,254 名未接种疫苗的成年参与者的试验，在两份报告中显示，与安慰剂组相比，Evushold 组降低了发生 COVID-19 症状的风险（83%比 77%）（$p < 0.001$）。

2.25 奈玛特韦/利托那韦 Paxlovid (Nirmatrelvir/ritonavir)

Paxlovid 由奈玛特韦和利托那韦组成，奈玛特韦通过抑制 SARS-CoV-2 病毒中的某种蛋白酶从而阻止病毒复制，同时还可以减缓奈玛特韦的分解，使其在体内长时间保持较高浓度，从而延长药物的作用时间。美国 FDA 于 2021 年 12 月 22 日紧急批准辉瑞公司的复方口服抗病毒药物 Paxlovid (nirmatrelvir, CAS 登记号 2628280-40-8；ritonavir, CAS 登记号 155213-67-5) 用于治疗成人及儿童（12 岁及以上、体重至少 40 公斤）轻型或普通型 COVID-19 患者。EPIC-HR (NCT04960202) 试验是 FDA 引用的唯一临床试验，发现利托那韦联合奈玛特韦在 3 天内比安慰剂组降低了 89% 的住院或死亡风险，在 2,246 名非住院的高危 COVID-19 患者中，88% 在 5 天内出现症状。与安慰剂组相比，利托那韦联合奈玛特韦可使病毒载量降低近 10 倍。

2.26 莫诺拉韦 Molnupiravir

莫诺拉韦是一种非链终止核苷类似物，其机制是干扰 SARS-CoV-2 病毒的遗传编码，以阻止病毒复制。美国 FDA 于 2021 年 12 年 23 日紧急批准默克公司的莫诺拉韦（Molnupiravir, CAS 登记号为 2492423-29-5）用于治疗成人轻型和普通型 COVID-19 患者。莫诺拉韦不建议在怀孕期间使用，因为它有可能对胎儿造成伤害[22]。支持这一 EUA 请求的临床疗效数据主要来源于临床试验 MK- 4482-002 (NCT04575597)，中期分析结果表示，与安慰剂组相比，莫诺拉韦组的住院率下降了 48%（p = 0.001）。

2.27 贝特洛韦单抗 Bebtelovimab

贝特洛韦单抗是针对新冠病毒奥密克戎（Omicron）变体的新型单克隆抗体，通过与引起 COVID-19 的病毒的穗状蛋白结合而发挥作用。美国 FDA 于 2022 年 2 月 11 日紧急批准礼来公司的贝特洛韦单抗用于治疗成人和儿童（12 岁及以上、体重至少 40 公斤）轻中度 COVID-19 患者，有高风险发展为重症 COVID-19 的人群，以及 FDA 批准或授权的替代治疗方案不可用或在临床上不适用的人。贝特洛韦单抗的 EUA 得到了临床和非临床数据的支持。临床数据来自一项随机、单剂量的 II 期临床试验 BLAZE-4 (NCT04634409)，试验发现，与安慰剂组相比，使用贝特洛韦单抗可缩短症状持续缓解的时间，病毒载量也有所下降。到第 29 天，与接受其他单克隆抗体的高风险患者相比，单独接受贝特洛韦单抗或与其他单克隆抗体联合使用的患者的 COVID-19 相关的住院和死亡率都有所下降。

2.28 韦洛利单抗 vilobelimab

韦洛利单抗是一种抗人补体因子 C5a 的单克隆抗体，在人体血液中对其靶点具有高度选择性。美国 FDA 于 2023 年 4 月 4 日紧急批准 InflaRx 公司的韦洛利单抗（Vilobelimab, CAS 登记号为 2250440-41-4）用于在接受有创机械通气（IMV）或体外膜氧合（ECMO）后 48 小时内开始治疗住院成人的 COVID-19。支持 EUA 请求的临床疗效和安全性数据主要基于 PANAMO (NCT04333420) 试验。这是一项随机、双盲、安慰剂对照、多中心的 III期临床试验，比较了 Vilobelimab＋标准治疗（SOC，即地塞米松）与安慰剂＋SOC 对重症 COVID-19 患者的疗效。按预设的中心分层分析，与安慰剂组相比，使用韦洛利单抗治疗后 28 天全因死亡率降低了 23.9%（p=0.094 下），未显示统计学意义；而使用原始研究设计中定义的非分层 Cox 回归分析，使用韦洛利单抗治疗后 28 天全因死亡率明显降低，并具有统计学意义（p = 0.027）。

2.29 Jcovden 疫苗

Jcovden 疫苗由强生公司开发。2021 年 2 月 4 日，强生公司向 FDA 提交了紧急使用授权申请（EUA）。2021 年 2 月 26 日，FDA 召开首次会议，审查强生公司新冠疫苗的安全性和有效性数据，并发布相关文档。2021 年 2 月 27 日，根据 FDA 的建议，美国疾病控制与预防中心（CDC）将强生新冠疫苗列为推荐疫苗。2021 年 2 月 27 日，FDA 紧急使用授权批准了强生新冠疫苗的使用，用于预防 18 岁及以上人群的 COVID-19。研究 VAC31518COV3001 (NCT04505722) 是一个单剂量方案的III期疗效和安全性研究，是 EUA 评估的重点。第三阶段和第四阶段的试验规模为 44,325 人（大于 18 岁），纳入安全组的参与者为 21,895 人，疫苗的有效性记录为 66%。

2.210、Nuvaxovid 疫苗

Nuvaxovid 疫苗（NVX-CoV2373 疫苗）由诺华公司开发。2022 年 1 月 31 日，诺华公司向 FDA 提交了紧急使用授权申请（EUA）。2022 年 7 月 13 日，FDA 紧急使用授权批准了 NVX-CoV2373 疫苗的使用，用于预防 12 岁及以上人群感染 COVID-19。支持 NVX-CoV2373 疫苗安全性和有效性的主要临床证据来源是 2019nCoV-301 (NCT04611802) 研究。一项随机、观察者盲法、安慰剂对照III期研究，评估 NVX-CoV2373 疫苗的安全性、有效性和免疫原性。

2.3 EUA 后撤销

FDA 实施的紧急使用授权机制具有一定的风险性，一些紧急使用授权批准的药物在后续的临床试验中并没有得到充分验证或出现安全问题，因此需要及时撤销紧急使用授权。

2.31 羟氯喹和氯喹

2020 年 3 月 28 日，美国 FDA 紧急批准医院使用羟氯喹（hydroxychloroquine, HCQ）和氯喹（chloroquine, CQ）

治疗已入院的青少年及成年 COVID-19 患者。由于没有临床试验证实羟氯喹和氯喹治疗 COVID-19 的安全性和有效性，只能在紧急情况下使用，并且需要告知其已知风险和药物相互作用。2020 年 6 月 15 日，美国 FDA 撤销了羟氯喹和氯喹的紧急使用授权，原因是最新的临床试验显示，该药物疗效不佳并有很大的副反应（如严重不良心脏事件），已知和潜在风险已超过其已知和潜在益处。

以下是 2 项支持该决定的临床研究证据：NCT04420247：一项由 105 名入住 ICU 或急性护理的成年患者参与的开放标签、对照、随机、多中心III期研究。该研究显示，在标准治疗中加入氯喹/羟氯喹会导致临床状况显著恶化，肾功能不全的风险增加，以及对有创机械通气的需求增加。SOLIDARITY (NCT04315948)：一项由 11,330 名住院成年患者参与的双盲、安慰剂对照、随机、多中心III期研究。该研究显示，羟氯喹对住院的 COVID-19 患者的总体死亡率、开始通气或住院时间没有显著影响。

2.32 巴尼韦单抗 Bamlanivimab

2020 年 11 月 9 日，美国 FDA 紧急批准礼来公司的在研单抗药物巴尼韦单抗（Bamlanivimab, CAS 登记号为 2423943-37-5）用于治疗成人和儿童(12 岁及以上、体重至少 40 公斤)轻中度并且有高风险发展为重度或住院的 COVID-19 患者。

2021 年 4 月 20 日，美国 FDA 撤回了巴尼韦单抗单独使用的紧急使用授权（EUA）。此举是因为巴尼韦单抗不再能有效地对最流行的 COVID-19 变体进行单独治疗[34]。

以下是支持该决定的 2 项主要临床研究：BLAZE-1 (NCT04427501)：一项针对轻至中度 COVID-19 患者，对比使用巴尼韦单抗和安慰剂的试验。研究结果表明，在患者接触到传染源后的 3 天内，巴尼韦单抗组的病毒载量减少了 60%，并且可以减少住院或急诊就诊的次数。然而，在研究的后期，这种治疗方法并没有很好地缩短症状时间或降低住院率[35]。BLAZE-4 (NCT04634409)：一项针对重症 COVID-19 患者，并与其他治疗方式进行比较的试验。这项研究旨在确定巴尼韦单抗的最优治疗剂量，并评估巴尼韦单抗是否可以降低 COVID-19 相关的死亡率，但此项研究没有显示该药物可以减少重症治疗或死亡风险。

2.33 COVID-19 康复患者血浆

COVID-19 恢复期血浆是从已经康复的 COVID-19 患者里采集的血浆，其中含有抗体，可以用于治疗其他 COVID-19 患者。2020 年 8 月 23 日：FDA 授权紧急使用授权(EUA)程序，以在 COVID-19 住院患者中使用恢复期血浆。2020 年 10 月 22 日，美国 FDA 宣布暂停使用 COVID-19 恢复期血浆治疗 COVID-19 患者，因为没有足够的证据证明其安全性和有效性。。

COVID-19 恢复期血浆向美国 FDA 提交申请的时间和历程比较复杂，需要不断地进行研究和临床试验来证明其安全性和有效性，并且需要满足特定的条件和程序才能得到批准和使用。以下是支持撤销 EUA 的 1 项临床研究：NCT04383535：一项随机、双盲、多中心安慰剂对照的临床试验，比较 COVID-19 恢复期血浆与安慰剂，以评估两组在研究开始后第 30 天对六个相互排斥的临床状态类别的有序评分的影响，结果显示，在接受恢复期血浆和安慰剂治疗的患者之间，临床状态或总死亡率方面没有显著差异。

2.4 EUA 后上市

一些药物被紧急使用授权批准后，FDA 会进一步审查这些药物是否满足正式上市的要求。如果通过了复审流程，则可以正式上市。目前，有 2 款 mRNA 新冠疫苗获批上市，分别是辉瑞（Pfizer）/拜恩泰科（BioNTech）研发的 BNT162b2 和莫德纳（Moderna）研发的 mRNA-1273，这 2 款 mRNA 疫苗预防新冠病毒感染的有效性均超过 90%。

2.41 瑞德西韦 Remdesivir

2020 年 5 月 1 日，美国 FDA 紧急使用授权吉利德科学公司的抗病毒药物瑞德西韦（remdesivir，CAS 登记号韦 1809249-37-3）用于治疗 12 岁及以上严重 COVID-19 住院患者。2020 年 10 月 22 日，美国 FDA 正式批准瑞德西韦用于治疗 12 岁及以上且体重至少 40 公斤的 COVID-19 住院患者。

FDA 正式批准瑞德西韦主要基于以下 3 项临床试验：ACTT-1 (NCT04280705)：一项随机、双盲、安慰剂对照的 III 期临床试验，在标准护理的基础上，将 1,062 名轻度至重度 COVID-19 住院患者分成瑞德西韦治疗组（n = 541）和安慰剂（n = 521）治疗组。结果显示，瑞德西韦组与安慰剂组的临床恢复中位时间分别为 10 天和 15

天，具有统计学差异。与安慰剂组相比，瑞德西韦组在第 15 天临床症状有所改善的几率在统计学上显著升高。GS-US-540-5774 (NCT04292730)：一项多中心、开放标签、随机的临床试验，将中度 COVID-19 住院成人患者分成瑞德西韦治疗 5 天组（n = 191）、瑞德西韦治疗 10 天组（n = 193）和标准护理组（n = 200），比较治疗后第 11 天的临床状况。结果显示，与仅接受标准护理的受试者相比，瑞德西韦治疗 5 天组的临床状况改善几率在统计学上显著升高，瑞德西韦治疗 10 天组的临床状况改善几率没有统计学差异。GS-US-540-5773 (NCT04292899)：一项非盲法、随机（非分层）III 期临床试验，将重度 COVID-19 住院成人患者分成瑞德西韦治疗 5 天组（n = 200）和 10 天组（n = 197），比较治疗后第 14 天的临床状况。结果显示，5 天与 10 天的瑞德西韦疗程在疗效和安全性方面没有显著差异。

2.42 BNT162b2 疫苗

BNT162b2 疫苗是一种 mRNA 疫苗，由辉瑞公司和 BioNTech 联合开发。2020 年 12 月 11 日，美国 FDA 紧急使用授权批准辉瑞新冠疫苗，成为第一个被美国批准使用的新冠病毒疫苗。2021 年 8 月 23 日，美国 FDA 正式批准辉瑞新冠疫苗，用于 16 岁及以上人群预防 COVID-19。成为首个获得正式批准的 mRNA 新冠疫苗以及全球首个正式获批的拥有完整 3 期数据的新冠疫苗。

为支持辉瑞新冠疫苗的有效性和安全性而提交的主要临床试验是 C4591001 (NCT04368728)：一项安慰剂对照、随机、观察员盲法、剂量探索的Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ期试验，以评估辉瑞新冠疫苗在健康个体中针对 COVID-19 的安全性、耐受性、免疫原性和功效。该试验经三角肌肌肉注射两剂疫苗，间隔至少 21 天，第三阶段和第四阶段的试验规模为 43,998 人（12 岁及以上），纳入安全组的参与者为 22,752 人，疫苗的有效性记录为 95%。

2.43 mRNA-1273 疫苗

mRNA-1273 疫苗是一种 mRNA 疫苗，由莫德纳公司开发。2020 年 12 月 18 日，FDA 紧急使用授权批准莫德纳新冠疫苗，成为第二个被美国批准使用的新冠病毒疫苗。2022 年 1 月 31 日，美国 FDA 正式批准莫德纳新冠疫苗用于预防 18 岁以上人群的 COVID-19。

为支持莫德纳新冠疫苗的有效性和安全性而提交的主要临床试验是 NCT04283461：一项评估莫德纳新冠疫苗在健康成人中的安全性和免疫原性的开放标签、剂量探索、I 期试验。两次注射，间隔 28 天，第三阶段和第四阶段的试验规模分别为 3,000（12 至 18 岁）和 30,420（大于 18 岁），安全组中的参与者为 15,208 人，疫苗的有效性记录为 94.1%。

3 美国 FDA 紧急使用授权审批快速的原因

2020 年 1 月 22 日，我国国家基因科学数据中心发布了 2019 新型冠状病毒数据库。该数据库收录了全球范围内已公开发表的新型冠状病毒基因序列数据，旨在为科研人员提供便捷的数据资源，促进新型冠状病毒的研究和控制。该数据库的发布，将为全球范围内的新型冠状病毒研究提供有力支持，有助于科研人员更好地了解和控制该病毒的传播和感染。本研究以 2020 年 1 月 22 日我国国家基因科学数据中心发布 2019 新型冠状病毒数据库为时间戳，有 13 个抗病毒药物向美国 FDA 提交紧急使用授权（EUA）申请，获批 EUA 的审评时间中位数 80 天，最短 32 天，最长 271 天。向美国 FDA 提交 EUA 的疫苗有 4 个，获批 EUA 的审评时间中位数 56 天，最短 18 天，最长 163 天（详见表 5）。目前有 1 个药品通过完整的上市许可（瑞德西韦），注册审评耗时 76 天，2 个疫苗通过完整的上市许可，注册审评耗时 93-244 天不等，中位数 169 天。

疫苗从研发到使用主要分为五大阶段:研发阶段、注册阶段、生产阶段、流通阶段、使用阶段。为应对 COVID-19 疫情，全球多个国家启动了药品特别审批程序，仅 2 年左右就有多种 COVID-19 疫苗获批紧急使用或附条件批准上市，而以往疫苗从研发到上市大致需要 8 至 15 年，甚至更长时间，例如麻疹疫苗耗时 9 年，脊髓灰质炎疫苗耗时 20 年。下面对美国 FDA 紧急使用授权新冠药物快速获批的原因进行探讨。

3.1 使用已有的临床试验数据

临床试验富集方法是缩短审批时间的主要手段。通过优化招募人数、研究地点和病例选择等因素，可以大幅度缩短临床试验时间，从而快速获得 FDA 紧急使用授权。在紧急情况下，FDA 可以直接使用已有的临床试验数据。例如，氯喹和瑞德西韦的紧急使用授权审批过程中，FDA 可以使用之前的临床试验数据来快速评估。FDA 可以使用已有的与 COVID-19 相关的疾病临床试验数据来加快审批的时间。这种方法被称为“借鉴历史数据”，

通过利用先前进行的临床试验数据来填补现有数据缺失或增强分析结果。

在 COVID-19 流行期间，FDA 已经批准了一些针对其他病毒的药物和疫苗的紧急使用授权，其中许多是基于借鉴历史数据的结果。例如瑞德西韦是一种广谱抗病毒药物，最初是用于治疗埃博拉病毒感染，由于在治疗其他病毒感染方面已经进行了多项临床试验，FDA 可以将这些数据与新的 COVID-19 临床试验结果结合起来，以便更快地评估瑞德西韦在 COVID-19 治疗中的有效性和安全性。此外，一些新的临床试验也采用了这种方法，例如在早期使用重症 COVID-19 患者的血浆治疗，由于这种治疗方法是已有的方法，因此在新冠病毒爆发之前已经用于治疗其他病毒感染的临床试验结果可以被用于评估治疗 COVID-19 的效果和安全性。

然而，需要注意的是，借鉴历史数据仅适用于具有相似特征、风险因素和结果的疾病之间的转化。此外，FDA 仍然需要根据临床试验中的具体细节和数据质量来评估数据是否有效，并决定是否应该将其纳入其决策过程中。

3.2 省略临床前动物试验

常规药物开发必须进行动物试验后才能进入人体临床试验。但因为疫情紧急，时间紧迫，为了缩短研究进程，许多科技公司省略了动物试验并直接将药物应用于人体试验，这也大大减少了开发周期。

莫德纳公司开发的 mRNA-1273 疫苗是一种 mRNA 疫苗，与传统疫苗的研发、生产相比，有较大不同。在传统疫苗中，减毒或灭活的病原体或抗原被注入体内，被人体自身的免疫系统识别并通过免疫反应形成抗体。而 mRNA 疫苗是通过设计基因序列，指导细胞合成蛋白质，引发免疫反应。一旦被利用，mRNA 会分解、清除，不会对人体造成威胁。由于不需要进行繁琐的菌株筛选，且感染路径明确、设计工艺简单，mRNA-1273 疫苗省略了动物试验，从研发启动到进入人体试验，前后不到十周的时间。

3.3 合并一期和二期临床试验

目前的药物开发往往需要分阶段进行，比如先进行一期和二期临床试验，再进行三期临床试验。然而，在 COVID-19 流行时期，压力增大，FDA 通过把第一和第二期临床试验结合在一起来简化审批流程。例如，FDA 批准了巴瑞替尼的新冠药物，这是一种已经用于治疗风湿性关节炎和其他自身免疫疾病的药物。在 COVID-19 爆发期间，该药物被重新调查，以评估其在新冠病毒感染患者中使用的有效性和安全性，以及是否需要修改剂量或使用方式。为了加快审批，FDA 允许巴瑞替尼的开发商将第一和第二期临床试验结合在一起进行，从而在短时间内收集更多的临床试验数据，并且可以更快地决定是否需要进行更大规模的第三期临床试验。在紧急情况下，更快的审批流程可以使新的 COVID-19 药物更快地到达需要它们的患者的手中。此外也有少数将二期与三期临床试验合并进行或将一期、二期、三期合并的临床试验研究。

3.4 审批终点的替代

在临床试验中评估一种药物的获益和风险时，临床获益通常由终点指标来衡量。临床终点包括临床结局和替代终点。临床结局是临床试验中最可靠的终点指标，因为它们直接反映了药物的疗效。但是，使用临床结局存在一些问题，如漫长的开发周期、大量的参与者和高成本，这限制了药品获得许可的速度。替代终点通常是一种生物标志物，它不能直接测量临床获益，但可以预测临床获益。

疫苗主要通过在体内引发免疫反应来发挥其保护作用，免疫学替代终点可作为评价疫苗效力的替代终点，与临床终点（感染或发病）相关的可以预测疫苗效力的疾病中间指标也可以作为评价疫苗效力的替代终点。例如美国已上市 COVID-19 疫苗（辉瑞疫苗、莫德纳疫苗、强生疫苗）的关键Ⅲ期临床试验主要终点是新冠肺炎发生率，次要终点包括 COVID-19 疫苗的免疫原性。美国 FDA 发布的《预防新冠肺炎疫苗的紧急使用授权》行业指南也提出，应当确定评估临床试验免疫原性终点的检测方法。尽管到目前为止还没有发现预测 COVID-19 疫苗保护效力的免疫标志物，但根据疫苗结构，中和抗体可能是免疫原性的相关指标。因此，需要临床试验数据来证明改良的 COVID-19 疫苗能在体内诱导出中和抗体反应。

4 启示

4.1 完善我国紧急使用授权制度

虽然我国已有药品特别审批程序，但是还没有建立起一套完善的紧急使用授权制度，我国急需完善这种有效应对突发公共卫生事件的制度。目前，我国对紧急使用授权制度的规定还比较笼统和零散，多为原则性规定，

可以通过对美国紧急使用授权制度进行逐步分析、借鉴和总结，建立和完善我国的紧急使用授权制度。首先，完善药品紧急使用的上位法，目前只有疫苗被列入紧急使用授权药品清单中，建议扩大紧急使用授权药物类型，在《药品管理法》中纳入治疗性药品紧急使用授权条款。其次，在《传染病防治法》、《突发事件应对法》、《药品管理法》和《疫苗管理法》中明确规定紧急使用授权的启动程序。再次，在我国现行药品特别审批制度的基础上，制定药品紧急使用授权制度程序，并建议简化程序，放宽标准，以加快授权进程。最后，建议发布类似于行业指南的紧急使用授权指导文件，明确紧急使用授权的启动条件、产品范围、授权原则、评估程序、授权期限、终止条件、责任豁免机制等。

4.2 将监管科学工具运用到我国药品特别审批中

总的来说，美国 FDA 紧急使用授权产品能够快速获批的原因，来自于运用了美国药品监管科学的方法，例如使用已有的临床试验数据、省略动物药效试验、合并一期和二期临床试验、三期临床试验中期结果申请审批、临床结局指标的替代终点等都属于监管科学的范畴。为应对突发公共卫生事件所带来的药物研发模式及制药产业发展模式的变化，药品评价和监管的工具和标准也在不断创新。在安全性评价工具和标准方面，出现了新的生物标志物或替代终点、临床试验网络和主方案等证明疗效的工具和方法。采用替代终点加速疫苗研发上市本质上也属于监管科学的范畴，也是一种研发和审评策略。从药品特别审批的动物模型资格认定、临床实验设计、临床试验富集、临床结局指标认定、药品的安全性和有效性评价等多方面借鉴“新标准”“新方法”“新工具”，结合我国现有的药品特别审批制度和实际情况，作为监管科学框架中的“预制件”或者“创新部件”，组装进入我国的药品特别审批制度和程序中。

4.3 对紧急使用授权的药品应制定主动监测机制

美国 FDA 紧急使用授权制度，一方面满足突发公共卫生事件的药品可及性需求，另一方面也使公众可能暴露在安全性研究不充分造成的风险之中。例如 2021 年 3 月，欧洲多国暂停接种阿斯利康公司生产的 COVID-19 疫苗，因为有报道称少数人接种疫苗后出现了血栓事件。因此对于紧急使用授权产品，FDA 应发布面向医疗专业人员的产品说明，确保医务人员获知产品适应证、禁忌证、剂量和不良事件联系等信息，同时还应发布面向使用者的产品说明，确保使用者充分了解该产品的已知和潜在的风险和效益，自愿选择是否使用。FDA 还应定期公布 EUA 产品的安全性及有效性数据，以便让公众及时了解产品信息。目前我国药品监管部门并没有发布 EUA 产品的详细信息，包括禁忌证、不良反应、注意事项以及紧急授权之后的研究情况，风险交流是公众理性管理其对风险的恐惧的重要方式，上述相关信息对 EUA 产品的使用者非常重要。

参考文献

[1] Branswell, H., Joseph, A., 2020. WHO declares the coronavirus outbreak a pandemic. STAT. March 11. https://www.statnews.com/2020/03/11/who-declares-the-coronavirus-outbreak-a-pandemic

[2] 仲宣惟,韩若斯,李波.中美应对突发公共卫生事件医药产品应急政策分析与思考[J].中国药学杂志,2020,55(23):1979-1984.

[3] 杜方舟.《疫苗管理法》中的疫苗安全监管法律问题研究[D].华中师范大学,2022.

[4] FDA. Emergency Use Authorization［EB/OL］.［2023-05-10］. https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization

[5] FDA. Emergency Use Authorization-Archived Information［EB/OL］.[2023-05-10]. https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization-archived-information

[6] 中华人民共和国国务院. 国家食品药品监督管理局药品特别审批程序[EB/OL]. 2005[2023-05-10]. http://www.gov.cn/zhengce/2021-06/30/content_5723546.htm

[7] 赵一飞,耿欣,徐立华,欧婷,张宁.对我国附条件批准上市化药药学技术要求的思考[J].中国药科大学学报,2021,52(05):636-642.

[8] 中华人民共和国国务院. 中华人民共和国疫苗管理法[EB/OL]. 2019[2023-05-10]. http://www.gov.cn/xinwen/2019-06/30/content_5404540.htm

[9] 国家食品药品监督管理局对大流行流感疫苗启动特别审批程序[J].世界临床药物,2008(04):214.

[10] 中华人民共和国国务院. 国务院应对新型冠状病毒感染的肺炎疫情联防联控机制医疗物资保障组关于疫情期间执行《医用一次性防护服辐照灭菌应急规范（临时）》的通知[EB/OL]. 2020[2023-05-10]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-02/08/content_5476127.htm

[11] Kalil AC, Patterson TF, Mehta AK, et al. Baricitinib plus Remdesivir for hospitalized adults with Covid-19. N Engl J Med. 2021;384(9):795-807.

[12] FDA. Fact sheet for healthcare providers: emergency use authorization (EUA) of baricitinib[EB/OL]. [2023-05-10]. https://www.fda.gov/media/143823/download

[13] RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. Lancet. 2021 May 1;397(10285):1637-1645.

[14] Samaras C, Kyriazopoulou E, Poulakou G, et al. Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) for the early prognosis of the risk for severe respiratory failure and death in COVID-19 pneumonia. Cytokine. 2023 Feb;162:156111.

[15] Regeneron Pharmaceuticals Inc. Regeneron's REGN-COV2 antibody cocktail reduced viral levels and improved symptoms in non-hospitalized COVID-19 patients[EB/OL]. [2023-05-10]. https://investor.regeneron.com/news-releases/news-release-details/regenerons-regn-cov2-antibody-cocktail-reduced-viral-levels-and/

[16] Regeneron Pharmaceuticals Inc. Regeneron's COVID-19 outpatient trial prospectively demonstrates that REGN-COV2 antibody cocktail significantly reduced virus levels and need for further medical attention[EB/OL]. [2023-05-10]. https://investor.regeneron.com/news-releases/news-releasedetails/regenerons-covid-19-outpatient-trial-prospectivelydemonstrates/

[17] Nathan R, Shawa I, De La Torre I, et al. A Narrative Review of the Clinical Practicalities of Bamlanivimab and Etesevimab Antibody Therapies for SARS-CoV-2. Infect Dis Ther. 2021 Dec;10(4):1933-1947.

[18] Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, et al. Early treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab. N Engl J Med. 2021;385(21):1941-1950.

[19] Vir Biotechnology, Inc. A randomized, multi-center, doubleblind, placebo-controlled study to assess the safety and efficacy of monoclonal antibody VIR-7831 for the early treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in non-hospitalized patients[EB/OL]. [2023-05-10]. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04545060

[20] Levin MJ, Ustianowski A, De Wit S, et al. LB5. PROVENT: Phase 3 study of efficacy and safety of AZD7442 (Tixagevimab/Cilgavimab) for pre-exposure prophylaxis of COVID-19 in adults. Open Forum Infect Dis. 2021;8(Supplement_1):S810.

[21] Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, et al. Oral Nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with Covid-19. N Engl J Med. 2022;386:1397-1408.

[22] FDA. Coronavirus (COVID-19) update: FDA authorizes additional Oral antiviral for treatment of COVID-19 in certain adults[EB/OL]. 2021[2023-05-10]. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-oral-antiviral-treatment-covid-19-certain

[23] O'Shaughnessy JA. Emergency use authorization of molnupiravir for COVID-19[EB/OL]. 2021[2023-05-10]. https://www.fda.gov/media/155053/download

[24] FDA. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes New Monoclonal Antibody for Treatment of COVID-19 that Retains Activity Against Omicron Variant[EB/OL]. [2023-05-10]. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-new-monoclonal-an

tibody-treatment-covid-19-retains

[25] FDA. Emergency Use Authorization (EUA) for Vilobelimab (IFX-1) Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Review[EB/OL]. [2023-05-10]. https://www.fda.gov/media/167044/download

[26] Li Y, Tenchov R, Smoot J, et al. A Comprehensive Review of the Global Efforts on COVID-19 Vaccine Development. ACS Cent Sci. 2021 Apr 28;7(4):512-533.

[27] Wu Q, Dudley MZ, Chen X, et al. Evaluation of the safety profile of COVID‐19 vaccines: Arapid review. BMC Med 2021;19:1‐16.

[28] FDA. Emergency Use Authorization (EUA) for an Unapproved Product Review Memorandum[EB/OL]. 2022[2023-05-10]. https://www.fda.gov/media/160082/download

[29] Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. Cell Res. 2020;30(3):269-271.

[30] FDA. Letter of Authorization - chloroquine phosphate and hydroxychloroquine[EB/OL]. 2020[2023-05-10]. https://www.fda.gov/media/136534/download

[31] FDA. Letter revoking EUA for chloroquine phosphate and hydroxychloroquine[EB/OL]. 2020[2023-05-10]. https://www.fda.gov/media/138945/download

[32] Réa-Neto Á, Bernardelli RS, Câmara BMD, et al. An open-label randomized controlled trial evaluating the efficacy of chloroquine/hydroxychloroquine in severe COVID-19 patients. Sci Rep. 2021 Apr 27;11(1):9023.

[33] WHO Solidarity Trial Consortium. Remdesivir and three other drugs for hospitalised patients with COVID-19: final results of the WHO Solidarity randomised trial and updated meta-analyses. Lancet. 2022 May 21;399(10339):1941-1953.

[34] FDA. Revocation Letter Bamlanivimab[EB/OL]. 2021[2023-05-10]. https://www.fda.gov/media/147629/download

[35] Chen P, Behre G, Hebert C, et al. Bamlanivimab and Etesevimab Improve Symptoms and Associated Outcomes in Ambulatory Patients at Increased Risk for Severe Coronavirus Disease 2019: Results From the Placebo-Controlled Double-Blind Phase 3 BLAZE-1 Trial. Open Forum Infect Dis. 2022 Apr 7;9(5):ofac172.

[36] Simonovich VA, Burgos Pratx LD, Scibona P, et al. A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia. N Engl J Med. 2021 Feb 18;384(7):619-629.

[37] Grundeis F, Ansems K, Dahms K, et al. Remdesivir for the treatment of COVID-19. Cochrane Database Syst Rev. 2023 Jan 25;1(1):CD014962.

[38] Olender SA, Perez KK, Go AS, et al. Remdesivir for Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Versus a Cohort Receiving Standard of Care. Clin Infect Dis. 2021 Dec 6;73(11):e4166-e4174.

[39] 杨景舒,丁胜,杨悦.使用替代终点加速新型冠状病毒肺炎疫苗研发的监管考量[J].中国新药杂志,2022,31(02):119-124.

[40] 李峰,何辉.新形势下药品监管科学的内涵与发展[J].中国新药杂志,2019,28(16):1921-1925.

我院腹膜透析患者全程智慧化药学服务模式的建立

杭永付[1a]，戴小花[2#]，徐燕[3]，吴甜甜[4]，段银银[5]，徐德宇[1b]，胡坤[1b]，刘星星[6]，朱建国[1a]，李琳[1b*]

（1.苏州大学附属第一医院，a.药学部，b.肾内科 江苏 苏州 215006；2.肇庆市第一人民医院药学部 广东 肇庆 526000；3.郑州大学第五附属医院药学部 河南 郑州 450052；4.郑州市中心医院药学部 河南 郑州 450007；5.淮安市第一人民医院药学部 江苏 淮安 223300；6.贵阳市妇幼保健院药剂科，贵州 贵阳 550003）

【摘要】目的：探讨临床药师为腹膜透析患者提供全程智慧化药学服务的模式。**方法：**分析国内外 PD 患者的药学服务模式，结合我院实际情况，建立腹膜透析患者全程智慧化药学服务模式并通过具体案例阐述 PD 患者药学服务模式的具体流程。**结果：**我院以线上服务的药物治疗管理平台为依托，构建了 PD 患者住院药学监护建档-腹透门诊 MTM-居家线上 app 管理随访的闭环药学服务模式，优化了药物重整循环流程，改良了汉化版的 DRPs 分类工具，制定了相应的药学服务流程，形成了“双循环”的药学服务模式。**结论：**我院 PD 患者全程智慧化药学服务模式的建立使 PD 患者的药学服务更规范，减少了 DRPs。

【关键词】腹膜透析；药学服务；工作模式；临床药师；药物重整

Establishment of whole-process intelligent pharmaceutical care model for peritoneal dialysis patients in our hospital

HANG Yong-fu[1a]，DAI Xiao-hua[2#]，XU Yan[3]，WU Tian-tian[4]，DUAN Yin-yin[5]，XU De-yu[1b]，HU Kun[1b]，LIU Xing-xing[6]，ZHU Jian-guo[1a]，LI Lin[1b*]

（1a.Department of Pharmacy，1b.Department of Nephrology，The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000，China；2. Department of Pharmacy, Zhaoqing First People's Hospital, Zhaoqing 526000, China；3. Department of Pharmacy, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052，China；4. Department of Pharmacy, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China；5. Department of Pharmacy，the Affiliated Huaian NO.1 People's Hospital of NanJing Medical University，Huaian 223300，China；6. Department of Pharmacy，Guiyang Maternal and child health care hospital，Guiyang 550003，China）

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To develop the model of pharmaceutical care provided by clinical pharmacists for peritoneal dialysis patients. **MERHODS：**we analyzed some pharmaceutical care models of PD patients at home and abroad. The pharmaceutical care model of PD patients was established based on the actual situation of our hospital and the process of it was expounded through specific cases. **RESULTS：**Based on the online medication therapy management platform, The closed-loop pharmaceutical care model of PD patients' hospitalization pharmacy care document - peritoneal

第一作者：杭永付，男，硕士，副主任药师，研究方向：临床药学。电话：0512-67973021，E-mail：hangyongfu1986@163.com。
戴小花，女，本科，药师，研究方向：临床药学。电话：18826107368，E-mail：hua20186@126.com
（戴小花为共同第一作者）
通讯作者：李琳，女，本科，副主任护师，研究方向：腹膜透析专科护理。电话：13915575478，E-mail：1641323553@qq.com

dialysis clinic MTM - home online app management follow-up was constructed. The cycle process of medication reconciliation was optimized, the Chinese version of DRPs classification tool was improved, and the corresponding process of pharmaceutical care was developed, forming a "double cycle" mode of pharmaceutical care. C**ONCLUSION：** The whole-process intelligent pharmaceutical care model for PD patients in our hospital makes pharmaceutical care for PD patients more standardized and reduces DRPs.

【KEY WORDS】Peritoneal dialysis; Pharmaceutical care; Work model; Clinical pharmacist; Medication reconciliation

腹膜透析（peritoneal dialysis, PD）是终末期肾病（end-stage renal disease, ESRD）患者重要的肾脏替代治疗方法之一，因其操作简便、安全有效和适宜居家治疗等优点，已得到广泛应用[1]。据中国肾脏病网络（CK-NET）报告，2016 年我国接受 PD 患者的患病率为 34.99/百万人口，且合并心血管疾病患病率达 47.14%，糖尿病患病率达 39.61%，使用促红细胞生成素、磷结合剂和骨化三醇的百分比分别为 72.72%、54.15%和 58.96%[2]，有报道 PD 患者平均服用药物种类高达 11-12 种[3]，发生药物相关问题（drug related problems，DRPs）的风险显著升高，严重影响其临床结局[4]。

药学服务是为保障患者用药安全、优化患者治疗效果和节约治疗费用而进行的相关服务，旨在发现和解决患者用药相关问题[5]。有研究显示，74.5%的 PD 患者受年龄、透析时间、合并用药种类、腹膜炎发病情况、用药依从性、对药物认知情况等影响对药学服务整体需求比较强烈[6]。另外，PD 患者主要采取居家自助治疗，仅在医疗机构获取的药学服务时间及质量难以保证，迫切需要一种个体化、全程化和适宜居家管理的药学服务模式来完善 PD 患者的健康管理。

本文通过文献调研国内外 PD 患者药学服务模式，工作流程，再结合我院 PD 患者诊疗实际情况和实践经验，探索我院 PD 患者智慧化全程药学服务模式，为 PD 患者药学服务的规范开展提供参考。

1 PD 患者药学服务模式简介

1.1 国外

自 1990 年 Hepler 和 Strand 提出“药学监护”这一新的概念以来，药剂师一直致力于发展药学服务实践[7]。随后，美国首次引入药物治疗管理（medication therapy management, MTM）策略，并将标准化的药学服务体系命名为基于药学服务的 MTM 实践[8]。美国药师协会和美国连锁药店基金协会共同发布的 MTM 服务实践指南包含 5 个核心要素：药物治疗回顾、个人用药记录、药物治疗计划、干预或转诊、文档记录和随访。国外对于 PD 患者的 MTM 实践已较为成熟。Harold 等[9]对维持性透析患者出院后进行多学科 MTM 模式管理：诊所护士为患者制定用药清单，药剂师对清单进行审核评估、制定行动计划，最后由肾病医师审查确认更改医嘱。这种模式可以减少 74%的 30 天内再入院率。匹兹堡大学肾病药学服务指导小组[10]研究显示，药师参与透析患者的 MTM 实践主要发生在住院-随访门诊-透析室三个区域。van 等[11]的研究显示对透析前和透析患者，药师为主导的医嘱审核工作可以使 50%的患者医嘱出现改动。Pai 等[12]提出透析患者最优的药物重整和治疗管理模式：围绕透析机构以治疗为中心，由专业人员进行药物重整，专业的、训练有素的临床医师/药师进行高质量的全面药物审核和管理服务，需要和透析机构内外的其他医务人员进行协作。

由此可见，国外透析患者药学服务主要集中在诊疗地点（医疗机构、透析中心、门诊等）。提供药学服务内容包括规范的 MTM、药物重整、评估、干预、随访、记录、用药教育、药物咨询等服务。形式可以是多学科，也可以是药师主导的药学服务。

1.2 国内

国内药学服务起步较晚，2019 年中国医学协会药事专业委员会编写了《医疗机构药学服务规范》，提出药学服务涉及门诊、住院、居家三种场所，服务内容涵盖药学门诊、处方审核、药物重整、用药咨询、用药教育、药学查房、用药监护、居家药学服务等，服务流程包括收集信息、分析评估、制定计划、执行计划、跟踪随访[5]。国内 PD 患者的药学服务模式研究较少，王庆等[13]探索了 PD 患者的居家药学服务模式：半年 1 次居家药学服务+每月 1 次电话随访，魏娟娟[14]等研究了电子平台的构建对药师开展线上 MTM 的可行性。刘晶等[15]报道了 1 例住院 PD 患者的药学服务。由此可见，PD 患者的药学服务尚处于探索阶段，多偏重单个诊疗地点的药学服务，

缺少对 PD 患者全程药学服务的研究报道。

综上所述，目前国外透析患者药学服务开展较为系统规范，涉及到各就诊地点，形式多样；国内 PD 患者的药学服务处于探索阶段，开展较少，形式主要是药师为主导。

2 我院 PD 患者药学服务模式的构建

2.1 全程智慧化药学服务模式

结合国内外 PD 患者药学服务的开展情况，结合我院前期药物重整循环服务模式经验[16]以及 PD 患者诊疗的特殊性，以 PD 患者诊疗点“居家→腹透门诊→医院住院部”为主要节点，依托诺道医学开发的 MTM 平台和手机慢病用药管家系统，我们构建了 PD 患者全程智慧化药学服务模式（线上+线下）。包含住院药学监护建档-腹透门诊 MTM-居家线上 app 管理随访的闭环药学服务模式（图 1）。

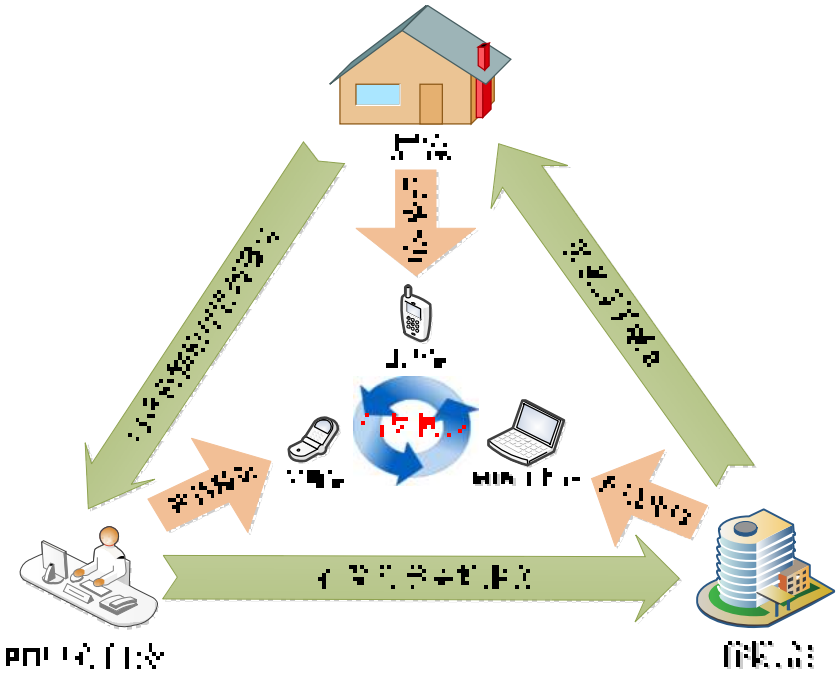


图 1　PD 患者诊疗路径和药学服务模式图

PD 患者的线上药学服务依托 MTM 平台（电脑端）和与之信息同步的慢病用药管家系统（手机端 APP）。MTM 平台主要使用患者管理功能，包括患者的基本信息登记、医疗记录、数据库知识等。MTM 平台功能基本涵盖《医疗机构药学服务规范》要求的药学服务流程：收集信息、分析评估、制定计划、执行计划、跟踪随访。电脑端建档并收集患者住院/门诊患者信息，制定干预计划，慢病用药管家系统需要患者签约药师后才能和药师在线远程居家互动管理（图 1）。慢病用药管家 APP 分为药师端和患者端，药师端 APP 具有信息查看、随访记录、依从性统计和在线咨询功能，患者端 APP 可实现随访反馈、用药提醒、在线咨询和居家监测等。

2.2 药物重整循环和 DRPs 评估

药物重整（medication reconciliation，MR）是药师通过与患者沟通，核对患者正在应用的所有药物方案与药物医嘱是否一致，并对发现的 DRPs 进行干预，并做全面的记录的过程，是预防和解决用药错误和药物不良事件的重要手段[16]。我们在前期实践的基础上优化了入院 MR、出院 MR 和门诊 MR 流程，并衔接形成 MR 循环（图 2），这对于加强患者出院后的药学服务、减少用药错误至关重要。

对 MR 循环中发现的 DRPs，我们基于欧洲药学监护网（pharmaceutical care network Europe，PCNE）V9.1 版分类系统[17]进行汉化改良，改良分类系统主要包含 6 个部分：①问题（P，3 个方面）；②原因（C，9 个方面）；③干预方案（I，4 个方面）；④干预方案的接受程度（A，3 个方面）；⑤DRP 状态（O，4 个方面），⑥潜在

危害性程度评估（ME，4 层 9 级分类）。该改良分类系统从临床发现的具体问题出发，分析该问题的具体原因，并实施干预方案，对干预结果进行记录，随访评价 DRPs 的状态，最后评估潜在危害性程度，可使每个 DPR 均能实现“发现-分析-干预-随访-记录-评估”的闭环途径。

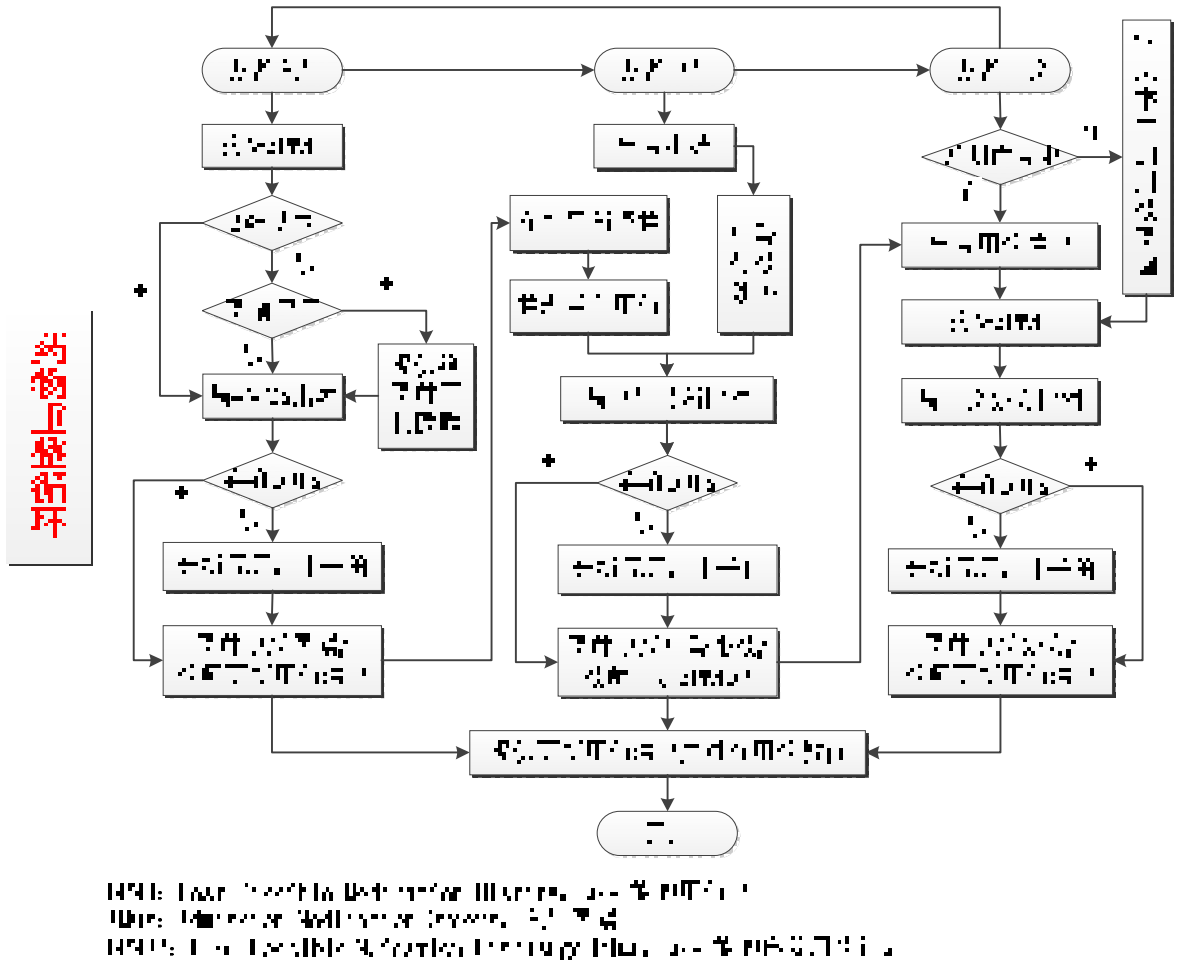


图 2 药物重整循环模式图

2.3 住院药学监护建档流程

在我院肾内科住院期间确诊的 ESRD 患者，一旦开始腹膜透析方案治疗，将被纳入 PD 患者药学服务管理系统。药师通过 MTM 平台登记患者基本信息和本次医疗记录，并对患者用药进行重整，对发现的 DRPs 进行分类并实施干预。另外，药师指导患者下载和使用慢病用药管家 APP 患者端，完成患者与药师签约，并开启患者端 APP 用药提醒功能。当患者出院时，药师进行出院药物重整，对患者进行用药教育，并告知腹透门诊随访时间（图 3）。

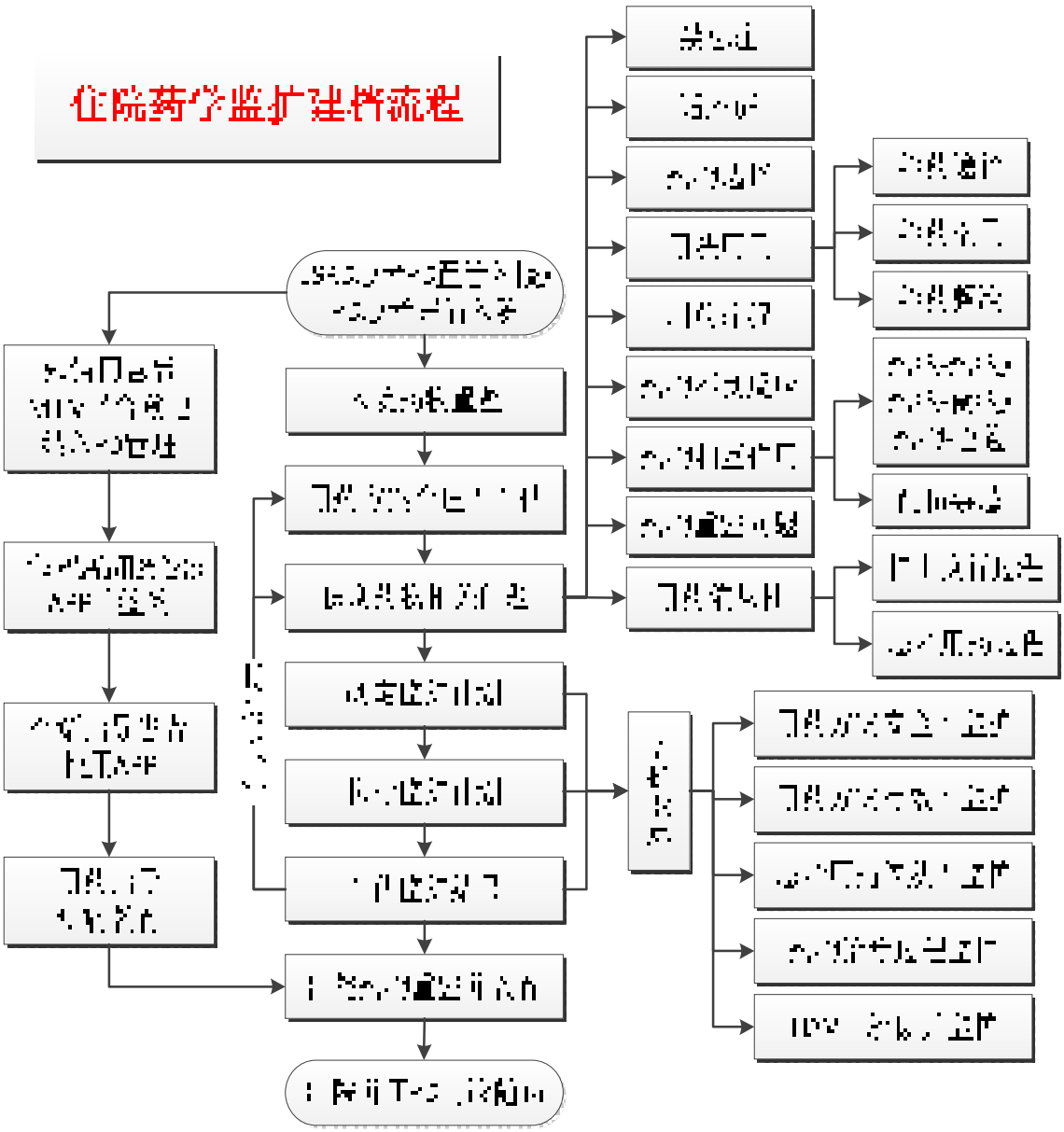


图 3 PD 患者住院药学监护建档流程

2.4 腹透门诊 MTM 服务流程

我院从 2022 年 4 月份开始开展 PD 患者药物治疗管理门诊工作。药师与 PD 医师、PD 专科护士组成团队，在获得患者同意情况下为 PD 患者门诊随访时提供 MTM 服务。医师根据患者病情制定用药方案并开具处方，护士进行腹透操作的强化培训以及出现问题的处理措施，饮食宣教，预约住院和一日病房腹透评估。药师结合患者病情对当前用药方案进行评估对处方进行审核，并建档（住院期间未纳入 MTM 平台管理的 PD 患者）、更新药物清单，发现 DRPs 实时反馈给医师，ADR 识别及处理，并对患者开展用药教育，APP 使用指导等服务。MTM 服务完成后，平台上的最新信息将会实时同步更新到 APP 患者端。多学科合作能够最大程度保障患者的安全合理用药，减少 DRPs（图 4）。

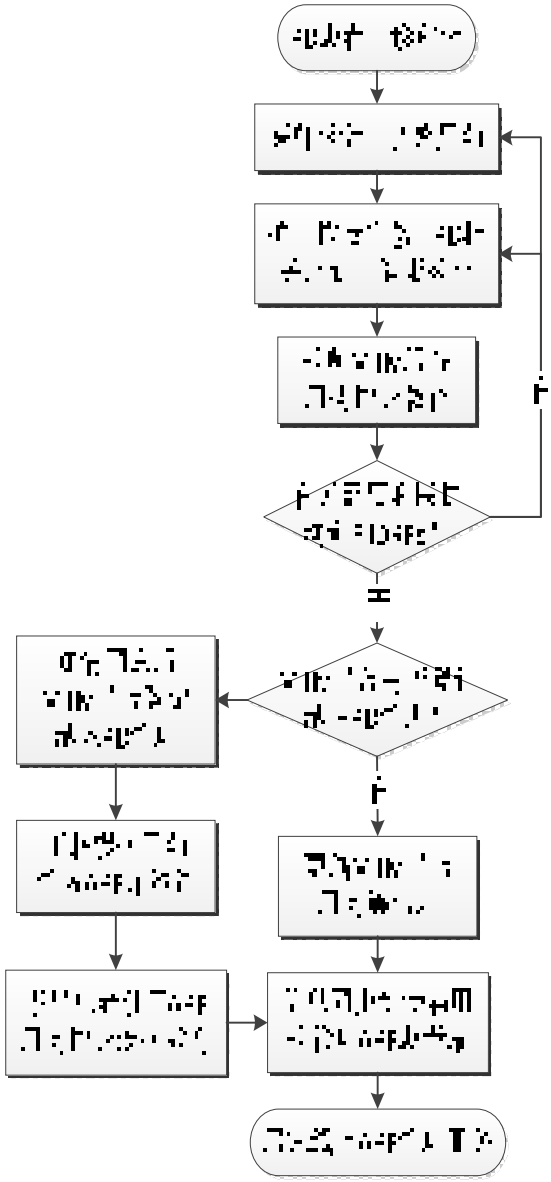


图 4 腹透门诊随访 PD 患者的药学服务流程

2.5 居家线上 APP 管理随访药学服务流程

患者端 APP 有以下功能：查看或编辑个人健康档案、按时接受提醒服药、记录日常血糖/血压值、在线咨询签约药师和接受随访反馈等。患者居家药物治疗的过程（如增减或漏服药物、化验检查结果等）从患者端 APP 同步至药师端 APP 和电脑端 MTM 平台，药师可同步查看患者实际药物治疗情况，评价患者用药依从性（morisky 服药依从性量表-8）和提供用药教育及制定随访内容，实现患者与药师的在线互动（图 4）。必要时可随医师、护士进行家访。

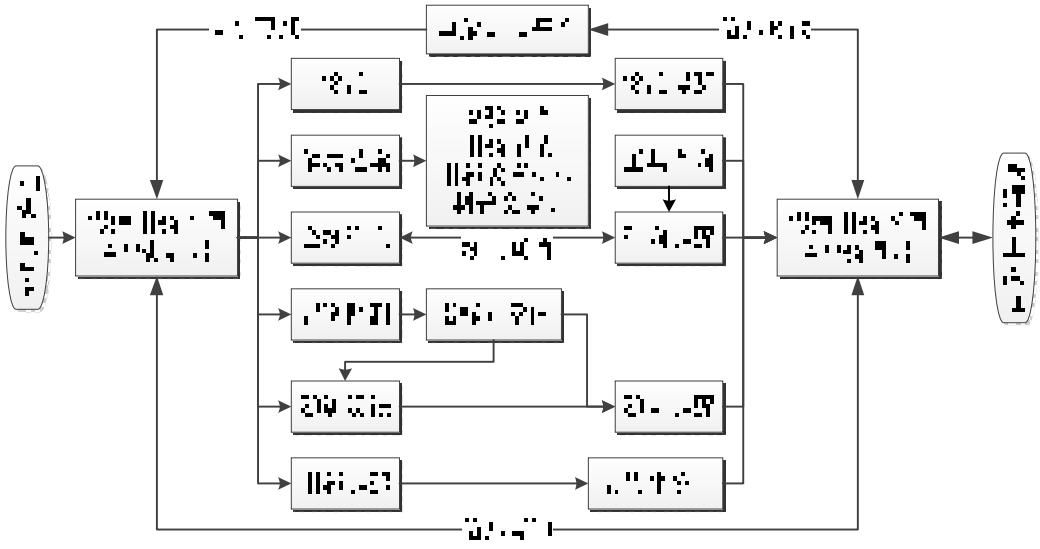


图 5 居家 PD 患者和签约药师互动流程

案例：患者，男，39 岁，诊断为“慢性肾脏病 5 期，高血压”，住院期间行“腹膜透析导丝法置管术”，术后第 8 天开始腹膜透析。临床药师将该患者纳入 PD 患者药学服务系统，进行 MTM 平台信息登记，指导患者下载使用患者端 APP，在对患者行 MR 时，发现患者不规律自行服用碳酸钙 D3 片，医嘱未显示，查患者血钙水平偏高（2.61mmol/L），和临床医师沟通后，告知患者停用碳酸钙 D3 片，患者接受并执行。该 DRP 用改良分类系统标为：①问题（P2.1 可能发生药物不良事件）；②原因（C7.4 患者自行服用了不必要的药物）；③介入方案（I3.5 停用药物）；④介入方案的接受（A1.1 接受介入方案并完全执行）；⑤DRP 状态（O1.1 问题已被解决）。随后患者出院，出院时进行 MR 并整理药物清单（表 1），嘱患者戒酒，避免高嘌呤饮食，坚持低盐，优质低蛋白饮食，适当有氧运动，服用非布司他注意复查肝功能，琥珀酸亚铁缓释片需和碳酸氢钠片、复方 α-酮酸片间隔 2h 服用，重组人促红素注射液需避光冰箱 2-8℃保存，注意监测每日腹透出入量及尿量，2 周后腹透门诊随访。患者出院后，通过患者端 APP 联系药师，诉昨日漏服琥珀酸亚铁缓释片，今日是否加量服用，药师回复无需加量，随后药师评估该患者服药依从性为 5.5（较差）。2 周后患者腹透门诊随访，药师对患者药物重整后，告知医师该患者存在漏服药物情况，医师知晓并嘱患者停用甲钴胺片，其余服用药物不变。药师更新用药医嘱单，嘱患者按 APP 提醒及时服药，若有不适及时就诊。

表 1 出院带药清单

出院带药清单								
	药名	目的	使用方案					
			早	中	晚	睡前	使用方法	注意事项
1	卡维地洛片	降压	1		1		1 天 2 次，1 次 1 片	早晚餐中
2	苯磺酸氨氯地平片	降压	1				1 天 1 次，1 次 1 粒	早餐前半小时
3	甲钴胺片	营养神经	1	1	1		1 天 3 次，1 次 1 片	三餐餐中
4	复方 α-酮酸片	营养	4	4	4		1 天 3 次，1 次 4 片	三餐餐中
5	叶酸片	纠贫	1	1	1		1 天 3 次，1 次 1 片	三餐餐中
6	非布司他片	降尿酸				1	1 天 1 次，1 次 1 片	睡前半小时
7	琥珀酸亚铁缓释片	纠贫		1			1 天 1 次，1 次 1 片	中餐后 2h
8	重组人促红素注射液	纠贫	1				1 周 1 次，1 次 1 支	定期皮下注射

3 PD 患者药学服务模式实践的体会

3.1 药物重整和 DRPs 分类是 PD 患者药学服务的

PD 患者因并发症多，服药种类多、用药周期长且常常发生治疗场所变更，相对其他患者更容易发生漏服、重复用药、用法用量错误等情况，药物重整能识别、解决药物治疗中的问题，防止潜在的用药错误和药物不良事件的核心方法。我院通过实践已探索出较为成熟的药物重整循环模式[14]，并应用在 PD 患者的药学服务模式中。有报道[15]药物重整药师干预成功率约 70%，即能够减少 70%的 DRPs。由此可见，药物重整可以促进用药安全。

我们对欧洲的 DRPs 分类工具进行本土汉化改良，以每个 DRPs 为目标导向，构建了“问题（P）-原因（C）-干预（I）-接受度（A）-状态（O）-潜在危害性程度评估（ME）”6 方面的 DRPs 分类系统，形成“发现问题-分析问题-解决问题-随访问题-记录问题-评估问题”这一工作循环流程。全程智慧化药学服务流程将传统的零散的药学服务进行有序衔接，形成整体。同时对局部的每一项药学服务如入院药物重整，进行全程跟踪记录，有始有终有数据，体现了药师药学服务的价值。同时，还可以对临床 DRPs 发生流行情况进行研究[18]，即告诉我们“为什么要做”，MR 循环告诉药师“做什么”，工作流程循环告诉药师“怎么做”。这种“双循环”工作模式对药学服务的切实有效开展有巨大的推动作用。

3.2 智慧化 MTM 平台是 PD 患者居家药学服务的保障

PD 患者因其诊疗的特殊性，居家治疗时间远远高于住院和门诊随访时间，仅靠医疗机构接内的药学服务时间非常有限，若患者能充分利用患者端 APP 功能，及时上传用药信息、检查检验信息和日常监测数据等，与药师线上沟通，将会及时获得个体化的药学服务内容。签约药师可通过药师端 APP 向患者提供用药教育、在线解答患者问题、发送随访单等，及时了解药物干预情况和患者实际用药情况，评估患者用药依从性，患者药物治疗效果，为患者后续随访治疗提供真实的居家药物治疗资料。此外，由于 PD 患者家庭药物种类多，对药物贮存不熟悉，常常发生因药物贮存不当致疗效不佳的情况，如促红细胞生成素应避光，2-8℃保存，常被患者常温或冰箱靠边冷藏致冷冻保存，签约药师通过查看患者药物清单指导患者贮存药品，可避免因药物贮存不当而致的 DRPs。通过患者与签约药师的及时互动沟通，药师可向患者提供更加个体化、全程的药学服务。

3.2 团队协作可使 PD 患者治疗效果最大化

临床药师开展的 PD 患者的药学服务是保障用药疗效和安全性不可或缺的一部分，只有与临床医师、护士等的相互配合，才能使患者治疗效果最大化，促进患者的用药安全。对于住院 PD 患者，临床药师除进行医嘱审核、用药监护、用药指导外，应做好 MTM 平台的病史登记、诊疗方案的记录以及指导患者端 APP 使用等，该阶段患者病历相对全面，时间充裕，且接受度较高，患者出院时，做好药物重整和用药教育，保证患者出院用药的安全性和有效性。患者出院后的居家药学服务，依靠患者与签约药师的互动，可使药师了解真实的药物治疗情况和患者服药的依从性，从而进行患者用药和依从性评估，并进行干预随访。腹透门诊是 PD 患者的重要诊疗场所，通过我院建立的多部门联合门诊，药师向医师提供患者居家真实的药物使用情况以及日常监测信息，医师结合检验检查指标可全面评估患者病情及药物治疗的有效性，从而制定更加适合患者的诊疗方案。

我院依托线上服务的 MTM 平台构建的 PD 患者住院建档-居家管理-腹透门诊随访的闭环药学服务模式，使 PD 患者的药学服务更加个体化，全程和连续，可减少 DRPs，提高药物治疗效果，保障患者用药安全。

REFERENCE

[1] PROJECT GROUP OF “WHITE PAPER ON THE STATUS OF PERITONEAL DIALYSIS MANAGEMENT IN CHINA”. White paper on the current status of peritoneal dialysis management in China[J]. *Chinese Journal of Nephrology*（中华肾脏病杂志），2022，38（12）：1076-1104.

[2] ZHANG L, ZHAO M H, ZUO L, et al. China Kidney Disease Network (CK-NET) 2016 Annual Data Report[J]. *Kidney Int Suppl*，2020，10（2）：e97-e186.

[3] ST PETER WL. Improving medication safety in chronic kidney disease patients on dialysis through medication reconciliation[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*，2010，17（5）：413-419

[4] DANIAL M, HASSALI MA, ONG LM, et al. Survivability of hospitalized chronic kidney disease (CKD) patients with

moderate to severe estimated glomerular filtration rate (eGFR) after experiencing adverse drug reactions (ADRs) in a public healthcare center: a retrospective 3 year study[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*，2018，19（1）：1-12.
[5] ZHEN J C，MEI D，DU G，et al. Medical Institution Pharmaceutical Service Practices(Part Ⅰ):General Rule[J]. *China Pharmacy*（中国药房），2019，30（23）：3169-3180.
[6] XU D，FEN X，CHEN L J，et al. Influencing factors of peritoneal dialysis patients' demand for pharmaceutical services[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacy*（中国临床药学杂志），2021，30（5）：355-360.
[7] MCGIVNEY MS, MEYER SM, DUNCAN-HEWITT W, et al. Medication therapy management: ITS relationship to patient counseling, disease management, and pharmaceutical care[J]. *Journal of the American Pharmacists Association*，2007，47（5）：620-628.
[8] DE OLIVEIRA DR，BRUMMEL AR，MILLER DB. Medication Therapy Management: 10 Years of Experience in a Large Integrated Health Care System[J]. *J Manag Care Spec Pharm*， 2020，26（9）：1057-1066.
[9] MANLEY HJ, AWEH G, WEINER DE, et al. Multidisciplinary Medication Therapy Management and Hospital Readmission in Patients Undergoing Maintenance Dialysis: A Retrospective Cohort Study[J]. *Am J Kidney Dis*，2020，76（1）：13-21.
[10] MATZKE GR, ST PETER WL, COMSTOCK TJ, et al. Nephrology pharmaceutical care preceptorship: a programmatic and clinical outcomes assessment[J]. *Ann Pharmacother*，2000，34（5）：593-599.
[11] VAN BERLO-VAN DE LAAR, I. R. F., SLUITER, H. E., RIET, E. V., et al. Pharmacist-led medication reviews in pre-dialysis and dialysis patients[J]. *Res Social Adm Pharm*，2020，16（12）：1718-1723.
[12] PAI, A. B., CARDONE, K. E., MANLEY, H. J., et al. Medication reconciliation and therapy management in dialysis-dependent patients: need for a systematic approach[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*，2013，8（11）：1988-1999.
[13] WANG Q，LIU D，ZHOU Y M，et al. Extended Pharmaceutical Care for Home Peritoneal Dialysis Patients[J]. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*（解放军药学学报），2022，35（2）：171-174.
[14] WEI J J，LI X X，ZHANG Y N，et al. Construction and effect analysis of online platform based on medication therapy management[J]. *Clinical Medication Journal*（临床药物治疗杂志），2022，20（7）：46-50.
[15] LIU J，YANG X J，HE S，et al. Pharmaceutical care for one peritoneal dialysis patient with antibiotic encephalopathy induced by cefminox sodium[J]. *Central South Pharmacy*（中南药学），2018，16（7）：1009-1011.
[16] ZHAO R，HANG Y F，LIU X X，et al. Development of medication reconciliation model for patients with chronic kidney disease in our hospital[J]. *Chin Pharm J*（中国药学杂志），2020，55（5）：408-412.
[17] WANG H X , ZHU X T , XIE C, et al. Primary Medication Reconciliation Service Provided by Clinical Pharmacist for Chronic Kidney Disease in Our Hospital [J]. *Chin Pharm J*（中国药学杂志），2018，53（24）：2148-2151.
[18] LIU X X, WANG H X, HU Y Y, et al. Drug-related problems identified by clinical pharmacists in nephrology department of a tertiary hospital in China-a single center study[J]. Ann Palliat Med，2021，10（8）：8701-8708.

新型核苷抗肿瘤药物的设计、合成及活性研究

郝二军*，王珂新，丁笑波，周红昊，渠桂荣，郭海明*

河南师范大学化学化工学院，抗病毒性传染病创新药物全国重点实验室，国家药监局创新药物研究与评价重点实验室，平原实验室，绿色化学介质与反应教育部重点实验室，精细化学品绿色制造河南省协同创新中心　新乡市建设东路 46 号，邮编：453007

癌症作为目前严重威胁人类健康和生命的主要病因之一。临床使用的抗肿瘤药物产生耐药性和毒副作用较大，急需研发新型高效低毒的抗肿瘤药物。无环核苷由于其独特的作用，在核苷类药物中具有非常重要的地位，越来越多的证据显示病毒性疾病与肿瘤的发生有密切关系。我们结合已知核苷类抗肿瘤药物的结构特点，进行结构优化，设计合成新型嘌呤核苷碱基 2 位、6 位、8 位和 1′位取代的无环核苷类化合物(包括手性核苷)，并建立了相应的核苷化合物库，研究其抗肿瘤活性、构效关系及作用机制。获得了一类具有显著抗肿瘤活性的无环核苷先导化合物 9b，研究表明在该类结构中侧链的羟基对活性至关重要。其中嘌呤的 C6 位被氯取代，嘌呤侧链的 1′位是 n-C_9H_{19} 基团取代时显示出了较强的抗肿瘤细胞增殖活性；通过获得活性较好的抗肿瘤优选药物分子，可为无环核苷类药物提供合理的合成策略和方法，为开发具有自主知识产权的抗肿瘤核苷药物奠定基础[1-3]。

【关键词】无环核苷，核苷类药物，抗肿瘤活性

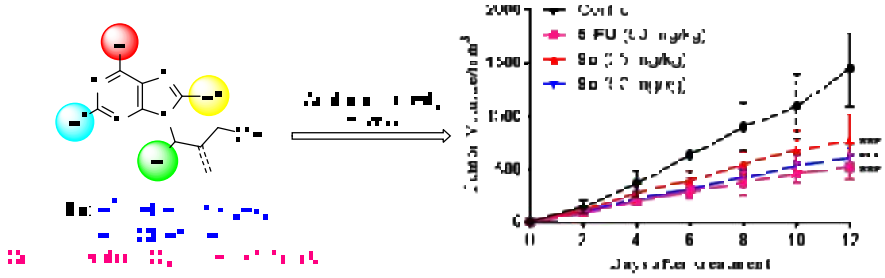


Fig. 1 Design, Synthesis, and Activity Evaluation of Novel Acyclic Nucleosides as Potential Anticancer Agents In Vitro and In Vivo

参考文献

[1] Hao E.-J., Li G.-X., Liang Y.-R., Xie M.-S., Wang D.-C., Jiang X.-H., Cheng J.-Y., Shi Z.-X., Wang Y.,* Guo H.-M.* *J. Med. Chem.* 2021, *64*（*4*）, 2077-2109.

[2] Sang J.-W., Xie M.-S.,* Wang M.-M., Qu G.-R., Guo H.-M.* *Chem. Commun.*, 2021, *57*, 4552-4555.

[3] Huang, K.-X.; Xie, M.-S.*; Sang, J.-W.; Qu, G.-R.; Guo, H.-M.* *Org. Lett.* 2021, 23, 81-86.

本研究得到国家自然科学基金(22071046 和 U22A20378)和河南省自然科学基金重点项目（232300421126）的支持。

药品品质安全以及药品短缺应对方法与措施

郝胜杰

（甘肃农业大学 甘肃 兰州 730070）

【摘要】随着全球范围内医疗保健水平的提高，药品的品质安全和供应稳定性日益成为重要关注的问题。本文旨在探讨药品品质安全和药品短缺应对方法与措施，以应对这些挑战，保障公众的用药安全和健康需求。

在药品品质安全方面，本文首先介绍了药品质量控制的重要性。国家和地区应建立完善的药品质量监管体系，加强对药品生产企业的质量监督和抽检，严格执行药品质量标准。此外，加强药品质量溯源，建立药品溯源系统，以确保药品的来源可追溯和质量可控。同时，加强对医疗机构和药店的药品质量管理，提高医护人员和药店从业人员的药品质量意识和技能，减少用药风险。

在药品短缺应对方面，本文介绍了多方合作的重要性。政府、药品生产企业、医疗机构和药店等各方应加强沟通合作，及时分享市场信息和供应情况，共同应对药品短缺。政府应建立健全药品供应预警机制，加强对药品供应的监测和预测，提前采取措施，避免药品短缺的发生。此外，推动药品生产企业提高产能，优化生产计划，保障药品供应的稳定性。医疗机构和药店应合理用药，避免浪费，确保药品的合理使用。

综上所述，药品品质安全和药品短缺应对方法与措施是保障公众用药安全和健康的重要保障。国家和地区应共同努力，建立完善的药品质量监管体系和供应预警机制，加强多方合作，共同维护药品市场秩序，确保药品的质量和供应稳定性，实现公众用药的安全和可持续发展。

【关键词】药品品质安全，药品短缺，应对方法，措施，公众用药安全

【**Abstract**】With the improvement of healthcare standards worldwide, drug quality safety and supply stability have become increasingly important concerns. This paper aims to explore the strategies and measures to address drug quality safety and drug shortages, ensuring the safety and health needs of the public.

Regarding drug quality safety, this paper first emphasizes the significance of drug quality control. Countries and regions should establish comprehensive drug quality supervision systems, strengthen quality supervision and random inspections of drug manufacturers, and strictly enforce drug quality standards. Additionally, enhancing drug quality traceability and establishing drug traceability systems are essential to ensure traceable origins and controlled quality of drugs. Furthermore, strengthening drug quality management in medical institutions and pharmacies, and improving the awareness and skills of healthcare professionals and pharmacy staff regarding drug quality, can reduce medication risks.

In response to drug shortages, this paper highlights the importance of multi-party cooperation. Governments, drug manufacturers, medical institutions, and pharmacies should enhance communication and cooperation, promptly share market information and supply conditions, and jointly address drug shortages. Governments should establish sound drug supply warning mechanisms, strengthen monitoring and forecasting of drug supply, and take proactive measures to prevent drug shortages. Moreover, promoting drug manufacturers to increase production capacity and optimize production plans can ensure stable drug supply. Medical institutions and pharmacies should rationalize drug use, avoid wastage, and ensure appropriate drug use.

In conclusion, strategies and measures for drug quality safety and drug shortages are crucial safeguards for ensuring the safety and health of the public in drug use. Nations and regions should work together to establish comprehensive drug quality supervision systems and supply warning mechanisms, strengthen multi-party cooperation, jointly maintain the order of the drug market, ensure drug quality and supply stability, and achieve the safety and sustainable development of public drug use.

【**Keywords**】drug quality safety, drug shortages, strategies, measures, public drug safety.

利格列汀治疗初诊 2 型糖尿病的临床疗效研究

何楚哲

（汕头市潮阳区关埠镇中心卫生院 广东 汕头 515164）

【摘要】目的：观察利格列汀治疗初诊 2 型糖尿病的临床疗效。**方法：**采用随机数字表法，对我院 2020 年 7 月至 2021 年 1 月收治的 76 例初诊 2 型糖尿病患者为受试勘验对象，按照研究需要等比例分为病例数相同的对照组和实验组两小组，分别予以达格列净和利格列汀治疗，就两组的临床疗效进行对比分析。**结果：**实验组降糖总有效率为 94.73%（36/38）和 65.79%（25/38），有统计学意义（P<0. 05）。有统计学意义。实验组在 FPG、2hPG、HbAlc 上明显低于对照组，有统计学意义（P<0.05）。炎性因子水平均低于对照组，有统计学意义（P<0.05）。生活质量评分高于对照组，有统计学意义（P<0.05）。**结论：**初诊 2 型糖尿病利格列汀治疗的效果突出，尤其表现在提升降糖总有效率，改善患者血糖指标总体控制水平上，值得在该类患者的临床治疗实践中大力推广实施。

【关键词】初诊 2 型糖尿病；治疗；利格列汀；二甲双胍

2 型糖尿病在中国形势十分严峻，其并发症危害极大，对居民的生存质量和生命安全影响较大。由于人们对糖尿病的认识和越来越多的循证研究，目前的糖尿病治疗观念已经从最初的“降糖为主”发展到了对多种风险因子的“综合管理”[1]。初诊 2 型糖尿病为首次诊断的、后天因素引发的病症，尽早规范用药，可收到良好的临床控制效果[2-3]。达格列净为常规治疗本病的方法，其降糖原理主要表现在通过用药后排除多余的葡萄糖，并通过排泄，来达到有效降糖效果。在初诊 2 型糖尿病患者的临床治疗中，对降低热量、减轻体重、保护心脏的起了一定的效果；但长期服用可对患者肾脏造成较大的伤害。故利格列汀的替代治疗，可对有效降低副作用提供治疗依据[4]。对于 2 型糖尿病患者，通过饮食、运动等方式进行调节，但是对于那些血糖不能有效的患者，一般都会选择服用利格列汀。但由于糖尿病为一种终生病，病人需要长期用药，随病情发展，单纯应用利格列汀已无法达到糖化血红蛋白（HbAlc）水平，并易引发上呼吸道感染、鼻咽炎等副作用，影响病人的治疗效果[5]。本病的一线治疗方案为双胍类降糖药，对提升胰岛素敏感性，较好地控制患者血糖说水平等提供了条件。然而，由于不同的降糖药其疗效也不相同。基于此，本文为观察利格列汀治疗初诊 2 型糖尿病的临床疗效，特对我院 2020 年 7 月至 2021 年 1 月收治的 76 例初诊 2 型糖尿病患者为受试勘验对象，相关细节汇总如下：

1.资料与方法

1.1 一般资料

采用随机数字表法，对我院 2020 年 7 月至 2021 年 1 月收治的 76 例初诊 2 型糖尿病患者为受试勘验对象，按照研究需要等比例分为病例数相同的对照组和实验组两小组。其中对照组，男 26 例，女 24 例年龄 46～68 岁，平均年龄（55.28±0.53）岁，病程范围（28-48）月，平均病程（37.98±6.49）月；实验组，男 27 例，女 23 例，年龄 47～67 岁，平均年龄（55.38±0.43）岁，病程范围（29-48）月，平均病程（37.86±6.27）月。两评定小组的一般资料在年龄、平均年龄、性别比、病程、平均病程上相差不大，本次研究具有可比性。

入选标准：（1）所有患者及家属对此次研究内容知情，且自愿参与研究；（2）此次研究经伦理委员审核后实施；（3）所有研究对象的临床资料完整；（4）此次研究经伦理委员审核后实施。

排除标准：（1）患者存在其他感染性疾病或是恶性肿瘤疾病；（2）患者对此次研究中所使用药物不耐受或是存在过敏现象；（3）患者存在认知功能障碍或是语言功能障碍；（4）由于患者个人原因退出研究或是转院治疗。

1.2 方法

分别予以达格列净和利格列汀治疗，就两组的临床疗效进行对比分析。

给予所有患者对症支持治疗，包括常规饮食调护、适度运动、规律进食的指导和健康宣教。

达格列净：达格列净片(安达唐)（10mg*14s）由 AstraZeneca AB 生产，批准文号：国药准字 J20170040，500-2000mg/d，日一次] ；起始剂量是 5mg 每天 1 次，早晨服用，不受进食限制；患者耐受情况下剂量加倍。

利格列汀：利格列汀片(欧唐宁)（5mg*7s）由 Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.生产；批准文号：国药准字 J20171087；推荐剂量为 5mg，每日 1 次。

1.3 观察指标

临床疗效：以降糖总有效率为临床疗效。划定为显著、尚可、无效三等级。显著：血糖控制较佳，患者的临床症状、体征得到显著的改善；尚可：FPG、2 hPG、HbAlc 水平起了明显的变化；无效：血糖降低幅度较小。降糖总有效率（临床疗效）=显著+尚可。期间观察两组患者炎性因子水平的变化程度。使用 SF-36 量表对患者治疗前后的生活质量进行评分对比。

1.4 统计方法

应用 SPSS23.0（Statistical Product and Service Solutions，统计产品与服务解决方案）对所有研究数据进行统计分析，样本率比较采用%表示，用 X^2 检验，计量资料以（ $\bar{x}\pm s$） 表示，用 t 检验；当 P<0.05 时，有统计学对比意义。

2.**结果**

2.1 两组降糖总有效率情况

实验组降糖总有效率为 94.73%（36/38）和 65.79%（25/38），有统计学意义（P<0. 05）。有统计学意义。如表 1 所示：

表 1 两组降糖总有效率情况比较（%）

组别	例数	显著	尚可	无效	降糖总有效率
对照组	38	10（26.32）	15（39.47）	13（34.21）	25（65.79）
实验组	38	19（50.00）	17（44.73）	2（5.27）	36（94.73）
X^2	/	11.741	8.410	9.621	8.145
P	/	0.001	0.021	0.012	0.036

2.2 两组治疗后血糖水平检测情况

实验组在 FPG、2hPG、HbAlc 上明显低于对照组，有统计学意义（P<0.05）。如表 2 所示：

表 2 两组治疗后血糖水平检测情况比较（ $\bar{x}\pm s$）

组别（例数）	FPG（ mmol /L）	2hPG（ mmol /L）	HbAlc（%）
对照组（n=38 例）	6.55±0.97	10.58±5.10	7.14±0.85
实验组（n=38 例）	5.73±1.98	7.41±2.16	6.23±0.78
t	2.292	3.528	4.862
P	0.024	0.000	0.000

2.3 对比两组患者炎性因子水平

实验组炎性因子水平均低于对照组，（P＜0.05）。如表 3 所示：

表 3 对比两组患者炎性因子水平（ $\bar{X}\pm s$）

组别	例数	IL-4（pg·ml/L^{-1}）		IL-6（pg·ml/L^{-1}）		TNF-α（U·ml^{-1}）	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
实验组	38	14.58±4.89	7.15±2.59	7.84±1.64	4.59±0.56	13.12±2.54	5.61±2.04
对照组	38	14.62±4.59	8.15±3.12	7.59±1.52	6.02±1.02	13.08±2.61	7.51±3.59

t	-	0.265	6.352	0.194	7.154	0.461	5.164
p	-	0.758	0.000	0.829	0.000	0.594	0.000

2.4 对比两组患者生活质量评分

实验组患者生活质量评分高于对照组，，（P＜0.05）。如表 4 所示：

表 4 两组患者生活质量评分比较（$\overline{x}$±s，分）

组别	例数	社会功能		躯体质量		角色功能		情绪功能	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
实验组	38	68.34±3.51	79.42±3.16	67.64±5.31	82.46±3.87	65.37±3.27	85.42±3.31	68.18±3.20	82.36±3.41
对照组	38	68.29±3.11	74.15±2.29	67.75±5.28	75.51±3.29	65.49±3.19	74.52±3.49	68.46±3.23	74.56±2.67
t	-	0.384	6.198	0.295	8.642	0.428	5.941	0.462	8.162
p	-	0.864	0.000	0.864	0.000	0.519	0.000	0.395	0.000

3.讨论

对于初次发生的 2 型糖尿病患者，长期建议采用生活习惯干预和二甲双胍作为基本药物。然而，最近的研究表明，DPP-4 的抑制剂为初次发病的 2 型糖尿病提供了新的思路[6]。它的效果机理是：抑制二肽基肽酶- IV，可以降低胰高血糖素样肽-1 （GLP-1）在体内的失活，提高 GLP-1 在体内的水平，而 GLP-1 可以以葡萄糖浓度依赖的方式对胰岛素分泌进行强化，抑制胰高血糖素分泌[+]，进而减缓胃排空及刺激下丘脑的饱食中枢，达到抑制食欲以及调节血糖的作用。利格列汀是一种具有较强选择性的、可逆的、具有较强的竞争型 DPP-4 抑制剂，具有明显的提高胰岛功能和缓解胰岛素抵抗的效果，它可以同时降低空腹和餐后的血糖，而且服用后可以被迅速和广泛的吸收，不会受到食物的干扰，也不需要调节用量，使用方便、安全。初诊 2 型糖尿病的治疗用药中，常规治疗基础上加用利格列汀，可更好地提升临床治疗效果，改善患者预后血糖控制水平。

本研究的结果和相关学者在本论题的研究成果进一步表明，利格列汀治疗对有效降低血糖水平，改善氧化应激水平；尤其表现在治疗后餐后两小时血糖（2hPG）、空腹血糖（FBG）、糖化血红蛋白(HbA1c)、超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-P）、丙二醛（MDA）上差异均显著（P<0.05）[7]。二甲双胍联合利格列汀能有效降低 2 型糖尿病合并肥胖患者的血糖、血脂、BMI，改善胰岛素抵抗；尤其在治疗 6 个月后空腹血糖、餐后 2 h 血糖、糖化血红蛋白、胰岛素抵抗指数、体质量指数、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇等各指标上对比均明显（P<0.05）[8]。应用二甲双胍疗效控制不佳的初诊 2 型糖尿病患者，联合达格列净或利格列汀治疗后的临床疗效更好；与利格列汀相比，达格列净对血糖、腰围、体质指数的改善更显著，安全性更高；尤其表现在治疗后对患者的 TG、LDL 水平及 BMI、WC、TG、LDL 水平；FPG、2 h PG、HbA1c、BMI、WC；餐后轻度低血糖、恶心、乏力、轻度肝损害等的发生率显著低于常规治疗药物[9-10]。糖尿病常伴有全身炎性反应，而调控炎性反应是糖尿病发生发展的关键环节。TNFa 是炎性介质，其高表达可导致血管内皮功能受损并加速 AS 进程，其浓度高低可直接反应血管内皮功能及视网膜病变严重程度。因此需要对患者炎性因子水平进行有效的调控[11]。此次研究实验组患者的炎性因子水平明显低于对照组，说明利格列汀在降低炎性反应上有积极作用。

综上所述，初诊 2 型糖尿病利格列汀治疗的效果突出，尤其表现在提升降糖总有效率，改善患者血糖指标总体控制水平上，值得在该类患者的临床治疗实践中大力推广实施。

参考文献

[1]马晓云.胰岛素泵联合利格列汀对 2 型糖尿病患者血糖及胰岛素抵抗的影响[J].黑龙江医药，2021，34(01):106-108.
[2]孙李永眷.利格列汀联合二甲双胍治疗初诊 2 型糖尿病的效果研究[J].中国现代药物应用，2021，15(01):102-104.
[3]张连菊.二甲双胍联合利格列汀在高 BMI2 型糖尿病患者中的应用效果分析[J].实用糖尿病杂志，2020，16(06):15-16.
[4]陈孟.利格列汀联合二甲双胍对 2 型糖尿病患者血糖控制及氧化应激的影响[J].实用糖尿病杂志，2020，16(06):8-9.
[5]卢婷.二甲双胍联合利格列汀治疗肥胖 2 型糖尿病患者的临床观察[J].临床医药实践，2020，29(12):915-917.
[6]冯畅，王艳军，杨梅，等.达格列净与利格列汀治疗初诊 2 型糖尿病的临床疗效比较[J].中国现代药物应用，2020，14(21):190-192.
[7] 郭春梅. 利格列汀联合二甲双胍治疗初诊 2 型糖尿病的疗效研究[J]. 糖尿病新世界,2019,22(10):73-74.
[8] 蔡柏奇. 利格列汀联合二甲双胍治疗初诊 2 型糖尿病的临床效果与用药不良反应观察[J]. 糖尿病天地,2022,19(1):85-86.
[9] 李睿, 孔燕茹. 利格列汀对初诊 2 型糖尿病患者炎症因子和动脉硬化的影响[J]. 中国药学（英文版）,2021,30(8):692-698.
[10] 庞毅,刘海燕,钟励文,等. 甘精胰岛素联合利格列汀对初诊2型糖尿病胰岛β细胞损伤保护作用的研究[J]. 中国医学创新,2020,17(1):23-26.
[11] 姚小利. 利格列汀联合阿卡波糖对初诊老年 2 型糖尿病患者胰岛 β 细胞功能及血糖控制的影响[J]. 实用糖尿病杂志,2020,16(2):31.

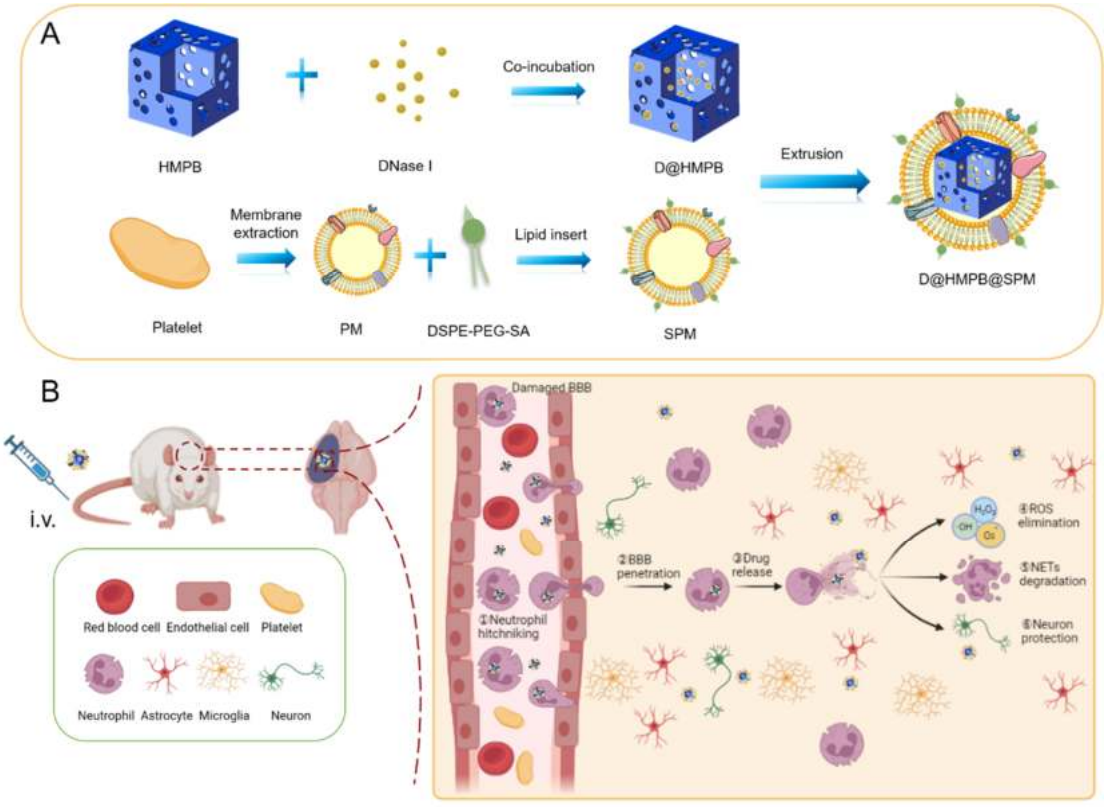
基于仿生及细胞搭便车的缺血性脑卒中药物递送系统研究

何文秀* 宋俊彦 栾玉霞

山东大学药学院，山东 济南，250012

【摘要】针对药物无法跨过血脑屏障，更难以入脑后精准递送至脑缺血区域的问题，利用中性粒细胞炎症部位归巢特性，设计了具有中性粒细胞搭便车功能的仿生纳米粒（D@HMPB@SPM），从而实现药物脑部高效精准递送。D@HMPB@SPM 由唾液酸修饰的血小板膜包裹装载 DNase I 的中空介孔普鲁士蓝纳米粒构成。该仿生纳米粒具有以下优点：（1）血小板膜的包裹赋予纳米粒脑部炎症趋向性；（2）唾液酸的修饰可使纳米粒通过中性粒细胞搭便车方式高效递送至脑损伤区域；（3）“过河拆桥”，中性粒细胞受到刺激通过产生 NETs 释放出纳米粒，纳米粒又可通过降解 NETs 缓解脑损伤；（4）D@HMPB@SPM 通过抗氧化和降解 NETs 的协同功能显著缓解缺血性脑卒中再灌注损伤。

【关键词】缺血性脑卒中；细胞搭便车；仿生递送系统



参考文献

1.Luo Z, Lu Y, Shi Y, Jiang M, Shan X, Li X, et al. Neutrophil Hitchhiking for Drug Delivery to the Bone Marrow. Nat Nanotechnol 2023, 18(6): 647-656.

2.Quan X, Han Y, Lu P, Ding Y, Wang Q, Li Y, et al. Annexin V-Modified Platelet-Biomimetic Nanomedicine for Targeted Therapy of Acute Ischemic Stroke. Adv Healthc Mater 2022, 11(16): 2200416-2200426.

涉药第三方检测机构加强能力建设的措施探讨

何英梅[1,2]，常琦[1,2]，王云[3]，康宁[1,2]，谢楠[1,2*]，马潇[1,2]，郭朝晖[1,2]，冯祥瑞[1,2]，张明童[1,2]，
高天鹏[1,2]，虎文茜[1,2]

（1. 甘肃省药品检验研究院；2. 国家药品监督管理局“中药材及饮片质量控制研究重点实验室”；3. 甘肃省药监局审评中心，兰州 730070 ）

随着社会经济发展，产品质量安全监管及产业发展对检验检测的需求日益旺盛，以中药材、中药饮片检验检测为例，企业需求很大，药检系统检验机构由于承担大量的药品化妆品国抽省抽等政府性任务，精力有限，很多企业只能向第三方检测机构委托。为大力推动中药质量提升和产业高质量发展，国家出台《关于促进中医药传承创新发展的意见》[1]等相关政策和措施，其中包括健全中药材第三方质量检测体系等。在产业发展需求和相关政策推动下，社会力量举办的药品（主要是中药材、中药饮片）检测机构（以下简称涉药第三方检测机构）申请资质认定（CMA）/实验室认可（CNAS）的需求不断增长，涉药第三方检测机构数量大幅增加。

为加强涉药第三方检测机构的考核评价及使用管理，甘肃省药品检验研究院承担了省监督管理局重点科研项目《药品第三方检测机构管理和评价体系建设》，课题组对各种类型的涉药第三方检测机构（社会力量举办、国企投资、药检系统以外其他行业部门所属）开展了调研。本文根据调研结果，结合涉药第三方检测机构资质认定（CMA/ CNAS）情况，就涉药第三方检测机构如何加强药品（尤其是中药材、中药饮片）检验检测能力开展了研究，以期为涉药第三方检测机构加强能力建设以及监管部门加强监管提供参考。

1.涉药第三方检测机构基本情况

目前涉药第三方检测机构多为综合性实验室，社会属性主要是社会力量举办、国企投资、药检系统以外其他行业部门所属，取得资质认定（CMA/ CNAS）的领域有食品、保健食品、农产品、环境、土壤、水质、工业品、医药、化妆品及建材等多种领域，非专业的药品检验机构。涉药第三方检测机构除少数大规模的上市公司或全国连锁检测机构设有专门的药品检测实验室，大部分涉药第三方检测机构是中小规模的综合性实验室，检验人员数量在数十人至十人以内，从事药品（中药材、中药饮片）检验检测的人员普遍是一人多岗，同时承担食品等其他领域的检验检测。

《中华人民共和国认证认可条例》[2]规定：向社会出具具有证明作用的数据和结果的检查机构、实验室，应当具备有关法律、行政法规规定的基本条件和能力，并依法经认定后，方可从事相应活动，认定结果由国务院认证认可监督管理部门公布。国家认证认可监督管理委员会在《检验检测机构资质认定评审准则》[3]基础上，针对不同行业和领域检验检测机构的特殊性，制定和发布评审补充要求，评审补充要求与评审准则一并作为评审依据。目前，食品检验机构、食品复检机构、医疗器械检验机构、机动车检验机构、刑事技术机构、司法鉴定机构的资质认定，均有其相应的评审补充要求[4-8]， 作为 RB/T 214《检验检测机构资质认定能力评价 检验检测机构通用要求》[9]的补充，用于上述特殊行业检验机构的资质认定评审依据。药品作为特殊商品，药品检验有其特有的专业性，既要遵守《药品管理法》[10]、《药品管理法实施条例》、《药品质量抽查检验管理办法》[11]等法律法规，又要严格按照《药品抽样指导原则及程序》、《药材和饮片取样方法》、《中国药典》[12]、《中国药品检验标准操作规范》[13]等标准和技术规范操作，在实验室质量管理及检验报告和原始记录的书写方面，也有其特定的专业要求和行业规范。药检系统的检验机构从事药品检验工作，在遵循《计量法》、《药品管理法》等法律法规及实验室认证认可准则的基础上，在中国食品药品检验研究院（以下简称中检院）的业务指导下，严格按照《药品检验所实验室质量管理规范（试行）》[14]、《药品质量控制实验室质量管理规范 (征求意见稿)》[15]开展药品检验和质量管理。由于《检验检测机构资质认定能力评价 药品检验机构要求》缺失，涉药第三方检测机构取得药品（中药材、中药饮片）CMA 资质认定，是按照 RB/T 214《检验检测机构资质认定能力评价 检验检测机构通用要求》评审，

作者简介：何英梅，主任药师；研究方向：药品化妆品检验研究及实验室管理；E-mail：3097552373@qq.com

通信作者：谢楠，正高级工程师；研究方向：药品化妆品监管及检验研究；E-mail：7488215@qq.com

导致部分检测机构对药品检验的质量管理、业务流程、检验技术操作要点、技术规范、检验报告和原始记录的要求理解不到位，影响检验结果和工作质量。涉药第三方检测机构在药品检验尤其是中药材/中药饮片检验方面，不论是检验业务管理、检验检测技术水平和能力、检验检测报告和原始记录的规范性，尤其是从事中药材/中药饮片检验的实践经验、处理复杂问题和疑难检品的能力方面，与药检系统专业药检机构相比，尚有差距。

2.涉药第三方检测机构在药品（尤其是中药材、中药饮片）检验检测方面存在的问题

2.1 质量管理体系未有效覆盖药品（中药材、中药饮片）检验检测

涉药第三方检测机构均为多领域综合性实验室，取得资质和承接的检验检测领域有食品、保健食品、农产品、环境、土壤、水质、医药、化妆品等多种领域，部分机构认为制定的一套体系文件在食品、保健食品、农产品、药品等各领域通用，质量管理体系未有效覆盖药品（中药材、中药饮片）检验检测：一是质量管理体系文件缺少药品（中药材、中药饮片）检验检测的具体规定，只是在质量手册中简单提及要遵守《药品管理法》，对药品（中药材、中药饮片）的样品受理、样品暂存、流转、检验、药品标准物质、数据完整性、报告和原始记录书写、异常结果（OOS）处置、留样管理等缺少相应的文件规定，未制定药品（中药材、中药饮片）检验检测报告和原始记录书写规程；二是内审/管审未有效覆盖药品（中药材、中药饮片）检验检测领域，部分机构的内审、管审活动未涉及药品（中药材、中药饮片）检验检测领域；三是质量控制未涉及药品（中药材、中药饮片）领域，部分机构的内部质控计划和外部质控计划均未涉及药品（中药材、中药饮片）领域，参加的能力验证通常为食品、环境检测等领域，未参加中检院等权威药检机构组织的药品领域能力验证。

2.2 人员培训不到位，对《中国药典》理解和掌握不够

部分机构的人员培训仅有《药品管理法》等法律法规培训，缺少《中国药典》凡例、附录和《中国药品检验标准操作规范》等药品（中药材、中药饮片）检验应知应会的基础知识培训；从事药品（中药材、中药饮片）检验检测及报告签发的人员对《中国药典》的体例格式、凡例、附录通则等不熟悉，尤其是对药典凡例中“精密称定”、“恒重”、“按干燥品（或无水物、或无溶剂）计算”、“空白实验”等药品检验基本概念理解不到位，部分实验室的中药检验原始记录中对照品称量仅有几毫克，未达到“精密称定”的要求；个别机构含量测定（例如 HPLC 法测定含量、GC 法测定含量）未按照《中国药典》和《中国药品检验标准操作规范》的规定操作（以外标法为例，供试品称取两份平行样制备供试液，每份供试液进样 2 针；对照品平行称取 2 份，制备相应的对照品溶液，一份进样 5 针计算 RSD 应符合规定，另一份进样 2 针，两份对照均参与计算，外标法定量），而是沿用其检验食品的方式（供试品称取两份平行样制备供试液，每份供试液进样 1 针，对照品称取 1 份，制备系列浓度的对照品溶液，每个浓度的对照品溶液进样 1 针，采用标准曲线法计算供试品含量）；含量测定结果未按照质量标准规定扣除水分以干燥品计。

2.3 药品质量标准管理方面

个别机构虽然从事药品（中药材、中药饮片）检验检测，为节省成本，未购买纸质版的《中国药典》，使用的是网上下载的《中国药典》电子版；部分机构《中国药典》配备不全，只配备了《中国药典》一部，未配备《中国药典》四部，或者虽然配备了《中国药典》一部及四部，但未对持有的《中国药典》及时勘误。

2.4 取样和样品前处理不规范

个别机构对《中国药典》的凡例、附录通则以及《中国药品检验标准操作规范》学习和培训不足，取样和样品前处理不规范。中药材、中药饮片检验的取样方面，对四分法取样不了解；中药材样品受理后，沿用其食品检验的样品制备和前处理方式，由制样室（前处理室）粉碎后交给检验科室（或检验人员）完成农残、重金属检测或含量测定等委托检验项目，制样室承担的食品、保健食品、农产品、药品等制样（前处理）工作均在同一个房间操作，食品/保健食品/农产品/药品等不同领域的样品前处理制样，没有采取分区或隔离措施，样品前处理过程存在交叉污染的风险。

2.5 检验操作不规范

个别第三方检测机构对《中国药品检验标准操作规范》不知悉，薄层色谱鉴别、挥发油测定、含量测定等检验操作不符合《中国药品检验标准操作规范》要求。薄层鉴别操作不规范，检验人员在薄层点样、展开、喷板显色等具体操作环节操作不规范，技术不过关，导致斑点之间分离效果不好、拖尾严重、斑点扩散、供试品溶液的

斑点位置与相应的对照品斑点位置不对应；挥发油测定过程中，供试品取样量不足，挥发油测定管中蒸出的挥发油太少，读数误差大，结果不准确；含量测定未按质量标准规的外标法操作，每份样品只进样 1 针且沿用其食品检验的方式，称取一份对照品配制系列浓度采用标准曲线法定量，标准曲线制备后多次或长期使用，后续该品种的含量测定没有配制相应的对照品溶液随行，含量测定结果的计算使用之前的标准曲线。

2.6 对照品（对照药材）配备不足或未使用国家药品标准物质

个别第三方检测机构为节省成本，含量测定用的对照品或薄层色谱鉴别用的对照品/对照药材未使用国家药品标准物质，使用的是用于食品、保健食品检验购买的其他有证标准物质（不是中国食品药品检定研究院研制标定的国家药品标准物质）。

2.7 检验报告和原始记录不规范

检验报告方面：对药品质量标准的体例格式不了解；原始记录方面：对照品/对照药材的信息不完整，未写对照品/对照药材的来源、批号、含量等信息，检测结果缺乏可追溯性，甚至计算方法有误（含量测定结果未根据对照品含量进行折算），影响了中药检验结果的准确性。农残检测等仪器参数（例如农药残留量测定：液相色谱-串联质谱法，液相色谱条件、质谱参数、定性及检测的离子对等关键信息填写不完整）。

2.8 检验管理不规范

一是仪器设备的计量确认不规范，药品检验检测所使用仪器设备的检定校准结果未按照相应的药品检验技术规范和要求开展计量确认。二是未建立超标结果处理程序，未对超标结果进行处置；或者超标结果处理程序缺乏可操作性，未规定人员要求、复核次数、复核过程注意事项、结果判断等。

3.涉药第三方检测机构加强能力建设的措施探讨

3.1 涉药第三方检测机构监管层面

3.1.1 建议资质认定管理部门研究制定《检验检测机构资质认定能力评价 药品检验机构要求》

国家药品监督管理局印发的《药品检验所实验室质量管理规范(试行)》以及中检院制定的《药品质量控制实验室质量管理规范 (征求意见稿)》，对药检系统检验机构规范药品检验质量管理、业务流程、检验报告和原始记录，奠定了基础，发挥了重要作用。2020 年 8 月，为加强和推进药品检验机构资质认定条件和检验规范制定工作，国家药品监督管理局组织起草了药品检验机构资质认定条件与检验工作规范系列文件，即：《药品检验机构资质认定条件与检验工作规范》《中药检验工作规范》《化学药品检验工作规范》《生物制品检验工作规范》《药用辅料与药品包装材料检验工作规范》和《药品安全性评价检验工作规范》，向社会公开征求意见。鉴于药品检验的重要性和特殊性，建议资质认定管理部门在此基础上，针对药品检验行业和领域的特殊性，研究制定和发布《检验检测机构资质认定能力评价 药品检验机构要求》，作为评审补充要求，用于涉药检验检测机构的资质认定和管理。

3. 1.2 建议研究建立药品第三方检测机构管理和考核评价体系

我国实验室资质认定管理部门的监管和服务对象是全社会各行各业的检验检测机构，仅仅依靠资质认定管理部门对取得资质的检验检测机构的实际技术能力和从业行为进行动态监管是不现实的。鉴于中药材/中药饮片检验检测的专业性、特殊性和复杂性，药品监督管理部门亟需研究建立药品第三方检测机构的监督管理和考核评价体系，对其从事的药品（中药材、中药饮片）检验检测的硬件水平、管理体系、技术能力进行动态监管和考核评价，督促其依法依规、科学准确地开展检验检测。例如甘肃省药监局委托省药检院开展相关研究，立足医药产业发展需求及药品监管实际，结合实验室认证认可的相关要求，按照药品检验尤其是中药材/中药饮片检验的专业特点和技术要求，研究制定甘肃省药品第三方检测机构管理办法、甘肃省药品第三方检测机构考核评价细则，用于全省涉药第三方检测机构的考核评价和使用管理，旨在健全和规范我省中药材第三方质量检测体系，为我省医药产业发展（尤其是中药材/中药饮片生产、流通和使用）和药品监管提供准确可靠的检测检测技术服务。

3.2 涉药第三方检测机构内部管理层面

3.2.1 充分认识药品检验检测的专业性、特殊性和复杂性，加强机构内部培训

中药材品种繁多、中药资源分布差异大，以及各地药用习惯不同，造成中药材/中药饮片的品种复杂多样，同物异名和同名异物现象经常出现，混淆混乱品种很多，加之中药材/中药饮片市场长期存在以次充好、以假充

真、真假混杂、非法添加、非法染色等现象，中药材/中药饮片的检验检测，需要很强的专业性和技术性。因此，涉药第三方检测机构首先要加强机构内部培训，培训范围要涉及中药检验的收检、检品流转、检验检测、结果报告、留样管理等各环节所有人员，培训内容包括涉药法律法规（如《药品管理法》、《药品管理法实施条例》等）、技术标准和规范（如：《中国药典》、《药材和饮片取样方法》、《药品抽样指导原则及程序》、《中国药品检验标准操作规范》等），此外，还要学习了解《药品检验所实验室质量管理规范(试行)》、《药品质量控制实验室质量管理规范 (征求意见稿)》等药品检验质量管理要求和行业规范。

3.2.2 建议到专业药检机构开展实操培训

药品检验检测和实验室管理的专业性、技术性和实践性很强，检验检测机构需要在具体工作和实践中不断更新知识、汲取经验、与时俱进。涉药第三方检测机构多为综合性实验室，非专业的药品检验机构，而且多数机构检验人员身兼数职，既要从事药品（中药材/中药饮片）检验检测、又要从事食品、农产品、土壤、环境等其他领域检验检测，建议涉药第三方检测机构加强人员培训，尤其是到专业药检机构开展实操培训，进一步规范检验操作。

3.2.3 积极参加药检系统组织的能力验证和实验室比对

为加强药品检验检测能力建设，中检院每年面向全社会检验检测机构组织开展药品检测领域能力验证活动，能力验证涉及的项目和参数涵盖中药材/中药饮片显微鉴别、薄层鉴别、PCR-RFLP 法（聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性方法）、农残检测、重金属检测、二氧化硫检测、药物含量测定（HPLC 法、GC 法、UV 法、滴定法等）、熔点测定、残留溶剂检测、微生物检测等，为社会各界检验检测机构搭建了检验检测能力验证的平台，此外，各省药品监督管理部门也组织开展实验室比对。建议涉药第三方检测根据自身的能力建设需求积极报名参加相应的能力验证和实验室比对，检验自身技术水平，持续加强能力建设。

3.2.4 积极参加药监药检部门组织的业务培训和技能比赛

建议涉药第三方检测机构积极关注和参加药监部门和药检机构组织的业务培训和技能比赛，进一步提升检验操作水平。例如：甘肃省药监局连续多年组织开展全省药品质控实验室规范化管理业务培训及全省药品检验技能大赛，为全省药检系统检验机构及药品生产企业药检人员搭建了学习培训和能力提升的平台。

参考文献

[1] 中共中央 国务院. 关于促进中医药传承创新发展的意见 [S]. 2019.

[2] 中华人民共和国国务院令. 第 666 号 中华人民共和国认证认可条例 [S]. 2016.

[3] 市场监管总局关于发布《检验检测机构资质认定评审准则》的公告. 2023 年第 21 号.

[4] 中国国家认证认可监督管理委员会.RB/T 215-2017 检验检测机构资质认定能力评价 食品检验机构要求 [S]. 2017.

[5] 中国国家认证认可监督管理委员会.RB/T 216-2017 检验检测机构资质认定能力评价 食品复检机构要求 [S]. 2017.

[6] 中国国家认证认可监督管理委员会.RB/T 217－2017 检验检测机构资质认定能力评价 医疗器械检验机构要求 [S]. 2017.

[7] 中国国家认证认可监督管理委员会.RB/T 218—2017 检验检测机构资质认定能力评价 机动车检验机构要求 [S]. 2017.

[8] 中国国家认证认可监督管理委员会.RB/T 219-2017 检验检测机构资质认定能力评价 司法鉴定机构要求 [S]. 2017.

[9] 中国国家认证认可监督管理委员会.RB/T 214-2017 检验检测机构资质认定能力评价 检验检测机构通用要求 [S]. 2017.

[10] 中华人民共和国主席令.第 31 号 中华人民共和国药品管理法 [S]. 2019.

[11] 国家药品监督管理局. 国药监药管 [2019]34 号 关于印发药品质量抽查检验管理办法的通知[S]. 2019.

[12] 中华人民共和国药典 [S]. 2020.

[13] 中国药品检验标准操作规范 [S]. 2019.

[14] 国家药品监督管理局. 国药管注[2000]403 号 关于印发《药品检验所实验室质量管理规范（试行）》的通知《药品检验所实验室质量管理规范（试行）》 [S]. 2000.

[15] 中国食品药品检定研究院. 药品质量控制实验室质量管理规范（征求意见稿）[S]. 2012

Dual-functional nanoparticles with anti-angiogenic and tumor cell-killing properties for the treatment of the malignant tumor

Huiwen Hou[a, b, c], Yan Li[a, b, c], Wen Tang[a, b, c], Jie Wang[a, b, c], Didi Gao[a, b, c], Lu Lu[a, b, c], Jiaai Fu[a, b, c], Zengmei Liu[a, b, c], Feiyan Zhao[a, b, c], XinQing Gao[a, b, c], Peixue Ling[a, b, c, d], Fengshan Wang[a, b, c, d], Feng Sun[*, a, b, c], Haining Tan[*, a, b, c, d]

（[a] National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China；[b] NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Carbohydrate-Based Medicine, Shandong University, Qingdao 266237, China；[c] Shandong Provincial Technology Innovation Center of Carbohydrate, Shandong University, Qingdao 266237, China；[d] School of Pharmaceutical sciences, Shandong University, Jinan, 250012, China）

【Abstract】 A crucial part of carcinoma development is angiogenesis. Therefore, antiangiogenic therapy is one of the effective ways to treat the malignant tumor. Due to the complexity of tumor pathogenesis, the combination of multiple cancer therapies can enhance the antitumor effect more than single therapies. In this study, based on tumor microenvironment, we designed a nanoparticle PTX-CS-CYS-ES2 (PCCE) which consisted of chondroitin sulfate (CS), antiangiogenic peptide ES2 and paclitaxel (PTX). It has been proved that PCCE could release ES2 in response to a high glutathione environment, and have good antiangiogenic and antitumor activities. A series of experiments have demonstrated that PCCE could effectively inhibit tumor cell proliferation, migration, and invasion. *In vivo* antitumor assay demonstrated that PCCE inhibited 1.70 times more than PTX and 1.79 times more than ES2, respectively. Hence, the nanoparticles carrying multiple therapeutic agents with intelligent response characteristics can be used in the treatment of cancer diseases with low toxic side effects.

【Keywords】 antitumor, antiangiogenic, paclitaxel, chondroitin sulfate, redox-sensitive

HPV 四价疫苗体外相对效力标准化检测方法的建立及初步验证

胡金盼，王萌，聂建辉，张青凤，黄维金*

（中国食品药品检定研究院 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室，北京 102629）

【摘要】目的：建立人乳头瘤病毒（human papilloma virus，HPV）四价疫苗（6、11、16 和 18 型）体外相对效力标准化检测方法。**方法：**利用单 B 细胞抗体筛选技术从接种 HPV 疫苗的志愿者全血样本中分离获得 HPV 全人源单克隆抗体盘，通过比较抗体的结合活性、中和活性、人血清中免疫优势以及构象敏感性，按照双抗体夹心 ELISA 法，从抗体盘中筛选获得一株广谱结合抗体作为捕获抗体，4 株型特异中和抗体分别作为 HPV6、11、16 和 18 型的检测抗体，形成“包被抗体-抗原-酶标抗体”复合物，加入显色剂，用酶标仪检测后采用四参数曲线法进行量效关系拟合。对建立的方法初步验证准确度、精密度、检测范围和稳定性。并用上述方法对国内 6 家 HPV 研发单位的三批单价抗原和三批疫苗成品的体外相对效力进行检测。**结果：**建立了 HPV 四型所用抗体盘，选定了包被抗体 F5-127，6 型检测抗体 F5-77，11 型检测抗体 F5-187，16 型检测抗体 F5-196，18 型检测抗体 F5-203，4 株检测抗体特异性强，识别构象、优势与中和表位。得到的四参数方程拟合的量效关系曲线 R^2 大于 0.99，信噪比高。初步验证结果显示 HPV6、11、16 和 18 型方法的 5 个效价水平的相对偏倚在 ± 12%范围内，回归方程的斜率在 0.80 ~ 1.25 范围内；每个效价水平相对效价测定值的几何变异系数均小于 20%；检测范围为 50%-200%。37℃加速三天半，四型试剂检测曲线 EC_{50} 偏倚均小于 30%，具有良好稳定性。6 家 HPV 研发单位的三批单价抗原和三批疫苗成品的体外相对效力检测结果均在 50%-200%之间，具有通用性。**结论：**建立的标准化 ELISA 方法可用于 HPV 四价疫苗体外相对效力的测定。

【关键词】人乳头瘤病毒(HPV)；结合抗体；中和抗体；体外相对效力；ELISA; 四参数曲线法

* 通信作者　黄维金　E-mail：huangweijin@nifdc.org.cn

第一作者　胡金盼　E-mail：hujinpan93@163.com

Identification of New Ergosterol Derivatives Associated with Anti-Neuroinflammation Activity in MPP+-Induced Parkinson's Disease Model

Zhou Tong,[a] Yuexing Zhang,[b] Rongrong Dai,[a] Yilan Wang,[a] Luqi Kong,[a] Tianhui Hu,[a] Juan Ji,[c] Zhiyong Huang,[*,d] and Linzhen Hu[*,a,c]

[a.] State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, National & Local Joint Engineering Research Centre of High-throughput Drug Screening Technology, College of Health Science and Engineering, Hubei University, Wuhan 430062, China. Email: linzhenhu@hubu.edu.cn (L.H.), huang_zy@tib.cas.cn (Z.H.)

[b.] College of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei University, Wuhan 430062, China

[c.] Jiangsu Key Laboratory of Neurodegeneration, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[d] Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

【**Abstract**】A new ergosterol derivative brassisterol A (**1**), along with brassisterols B and C (**2** and **3**) with absolute configurations confirmed for the first time by the TD-DFT ECD calculation or the single crystal XRD data analysis, were isolated from the co-cultivation of *Alternaria brassicicola* and *Penicillium granulatum*. Compound **1** exhibited potential anti-Parkinson's disease activity in both MPTP-induced zebrafish and MPP^+-induced SH-SY5Y cells. Extensive molecular mechanism studies *in vitro* showed that **1** attenuated the increase of α-synuclein, NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1β, IL-18, and GSDMD expression in the MPP^+ induced PD model, which manifested that **1** protected dopaminergic cell from neuroinflammation by suppressing α-syn/NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway activation.

Introduction

As the second largest neurodegenerative disorder after Alzheimer disease, Parkinson's disease (PD) is characterized by the progressive apoptosis of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra and the exhaustion of dopamine in the striatum, which consequently lead to a variety of motor symptoms including tremors, rigidity, and bradykinesia, as well as non-motor symptoms such as cognitive deficit and depression.[1] Although the exact pathogenic mechanisms of PD are still vague, accumulated studies have suggested that the chronic neuroinflammation might play a vital role during the progressive degeneration of dopaminergic neurons.[2] Neuroinflammation has been demonstrated to correlate with the filamentous aggregation of α-synuclein (α-Syn), subsequently resulting in the death of DA neurons in PD.[3] The accumulation of α-syn activates the formation of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasomes, which bind to apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), further recruit pro-caspase 1. Within NLRP3 inflammasomes, caspase 1 is activated, then active caspase 1 cleaves gasdermin D (GSDMD) into a *N*-terminal $GSDMD^{NT}$ fragment to generate GSDMD pores upon the plasma membrane, which allow the release of those cytokines cleaved by caspase 1, such as mature interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-18 (IL-18), leading to neuronal pyroptosis.[2, 4] Therefore, inhibiting activation of the α-syn/NLRP3/caspase-1/GSDMD neuroinflammatory signaling pathway might potentially provide a wide therapeutic approach toward treating PD.

Fungi have a complicated secondary metabolism and yield diverse chemical constituents. The approach of fungi co-culture has long been utilized to gain natural products with multifarious bioactivities.[5, 6] Belonging to fungisterol, ergosterol has been believed as a crucial constituent of the fungal cell membrane and has universally served as a marker to evaluate fungal biomass.[7] Ergosterol and its derivatives, as direct precursors of steroid drugs, exhibited versatile bioactivities including anti-inflammatory

effects,[8, 9] cytotoxic against tumor cells,[10, 11] and anti-obesity activity.[12] In our continuous pharmaceutical study on exploring lead compounds towards PD from fungi,[13-15] presently, three ergosterol derivatives named brassisterols A–C (1–3) (Figure 1), were obtained from the co-cultivation of *Alternaria brassicicola* and *Penicillium granulatum*, whose absolute configurations were determined via TD-DFT ECD calculation or single crystal XRD data analyses. Bioactivity screening revealed that compound 1 exhibited potential anti-PD activity, and further molecular biochemical research manifested that 1 ameliorated the expression of α-synuclein, NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1β, IL-18, and GSDMD in the MPP^+ induced PD model.

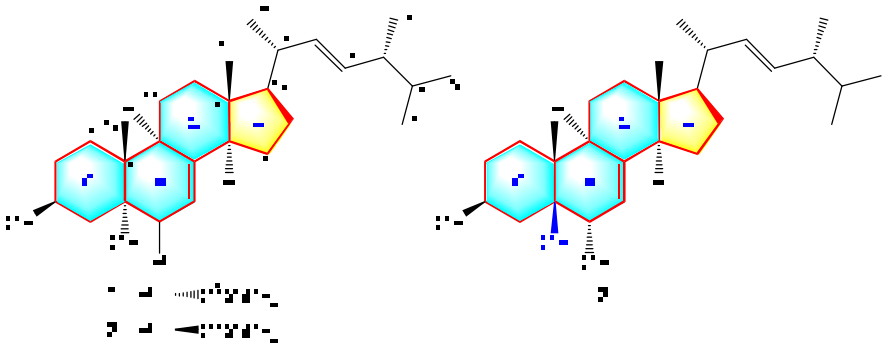


Fig. 1. Structures of compounds 1–3.

Results and discussion

Brassisterol A (1), a colorless block crystal, was obtained from the co-cultivation of *Alternaria brassicicola* and *Penicillium granulatum*, with the molecular formula of $C_{30}H_{48}O_4$ determined via the HRESIMS spectrum of $[M + Na]^+$ quasi-molecular ion peak at *m/z* 495.3447 (calcd for $C_{30}H_{48}O_4Na$, 495.3445), which means seven-unsaturated degrees. The IR absorption band (1709 cm^{-1}) implied the presence of an acetoxy group, which was further verified by the chemical shifts (δ_H 2.05, s; δ_C 21.4 and 170.9) in the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra. The data of ^1H and ^{13}C NMR of 1 (Table S1), together with the signals of HSQC spectrum, confirmed the presence of seven methyls [δ_H 0.54, s; 0.80 d (J = 6.9 Hz); 0.81, d (J = 6.6 Hz); 0.89, d (J = 6.8 Hz); 0.99, s; 1.00, s; and 2.10, s), three olefinic protons [δ_H 5.20, dd (J = 15.3, 7.5 Hz); 5.14, dd (J = 15.3, 8.2 Hz); and 4.88, s], two oxygenated methines [δ_H 3.99, m; 5.24, d (J = 2.2 Hz)],and methylene and methine protons with the resonances ranging from δ_H 1.27 to 2.07. The data of ^{13}C and DEPT 135 NMR showed thirty carbons which were designated to be seven methyls (δ_C 12.5, 17.8, 18.1, 19.9, 20.2, 21.3, and 22.3), seven methylenes (δ_C 21.5, 22.9, 28.3, 31.0, 31.6, 39.4, and 39.7), eleven methines including two oxygenated and three olefinic ones (δ_C 33.3, 40.6, 43.1, 43.6, 55.0, 56.1, 67.5, 74.2, 115.2, 132.4, and 135.6), and five non-protonated carbons containing an oxygenated one, an olefinic one, and a carbonyl one (δ_C 39.2, 44.0, 75.4, 144.6, and 170.9). These provided spectral data have a similarity to those of ergosterols,[16, 17] thus, 1 was suggested to be an ergosterol analogue.

Based on the ^1H–^1H COSY and HMBC spectra (Figure 2), the planar structure of 1 was illustrated as follows. ^1H–^1H COSY spin systems of H_2-1/H_2-2/H-3/H_2-4 and H-6/H-7, combining with the long-range HMBC correlations from H_2-4 to C-5, C-6, and C-10, from H_2-1 to C-5, C-9, and C-10, from H-7 to C-5 and C-9, from Me-19 to C-1, C-5, and C-10, from H-6 to C-29, and from Me-30 to C-29 constructed rings A and B with a methyl substituent at C-10 and an acetoxyl motif at C-6. Furthermore, spin systems in ^1H–^1H COSY of H-9/H_2-11/H_2-12 and H-14/H_2-15/H_2-16/H_2-17 as well as HMBC correlations from H-9 to C-14, from H-14 to C-7 and C-8, and from Me-18 to C-12, C-13, C-14, and C-17, contrived rings C and D. Additionally, the substituent from C-20 to C-28 located at C-17 was demonstrated by the ^1H–^1H COSY spin systems of H-17/H-20/H-22/H-23/H-24/H-25/Me-26 (Me-27), Me-21/H-20, and Me-28/H-24, along with the HMBC correlations from Me-21 to C-17 and C-22. Ultimately, compound 1 presented the same skeleton as (22*E*,24*R*)-6-acetoxy-ergosta-7,22-dien-3β,5α,6β-triol.[17]

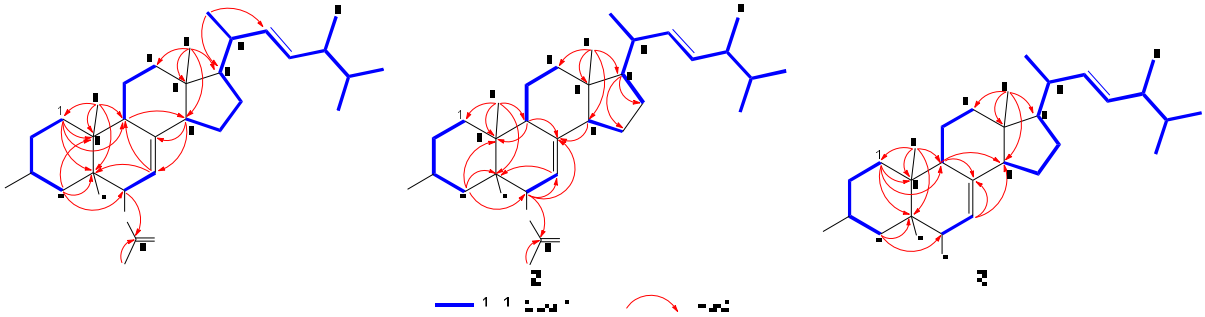


Fig. 2. $^{1}H-^{1}H$ COSY and key HMBC correlations of compounds 1−3.

The relative configuration of 1 was assigned through analyses of the NOESY spectrum (Figure 3). NOESY correlations between Me-19/H-1β, Me-19/H-6, and H-6/H-4β permitted these protons on an assumed β orientation, and NOESY cross-peak of H-3/H-4α placed them on the α orientation. Furthermore, the observed NOESY correlations of H-1α/H-9, H-9/H-14, H-14/H-15α, and H-15α/H-16α assigned these protons on the α-oriented, while H-16β and Me-18 protons ascribed the β-oriented for their NOESY correlation. Regarding the side motif, the large coupling constant (J = 15.3 Hz) between H-22 and H-23 implied a *E*- geometry of $\Delta^{22(23)}$ double bond. In addition, H-20 correlated with H-16β and H-23, whereas no NOE signal was observed between H-23 and H-24, which manifested the relative configurations of C-20 and C-24. The chirality of C-6 was determined as 6*S* via ECD calculations (Figure 4) based on the TD-DFT theory using the Gaussian 16 program at the CAM-B3LYP-SCRF/def2-TZVP//B3LYP/6-311G(d,p) level.

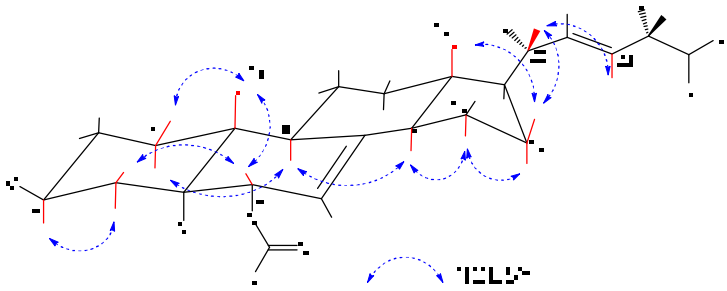


Fig. 3. Key NOESY correlations of 1.

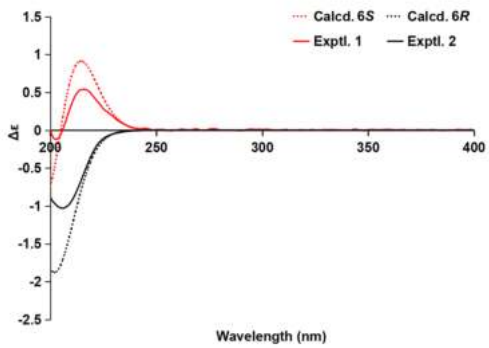


Fig. 4. Experimental and calculated ECD spectra of 1 and 2.

Successfully, the high-quality crystal of 1 was obtained from the solvent of CH_2Cl_2-MeOH (v/v = 20/1) at room temperature, which confirmed the proposed structure of 1 as 3*S*,5*R*,6*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*R*,17*R*,20*R*,24*R* through the single-crystal X-ray diffraction (XRD) analysis using Cu Kα radiation (Figure 5), with a Flack parameter of -0.03(18) (CCDC 2163265).

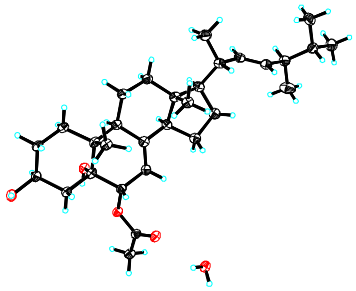


Fig. 5. The ORTEP drawing of 1.

Brassisterol B (2) was purified as a colorless oil, possesses the same formula as 1, in terms of its ion peak in HRESIMS spectrum (*m/z* 495.3457 [M + Na]$^+$, calcd as 495.3445). Firstly, we proposed 2 has the same skeleton as 1 for its similar data of ^{1}H and ^{13}C NMR to 1 (Table S1). Then, comprehensive analyses on the HSQC, ^{1}H–^{1}H COSY, and HMBC (Figure 2) demonstrated that 2 had the identical planar structure with 1. Whereas, chemical shifts deviation of C-6, C-7, and C-8 between 2 and 1 indicated that the vicinal chirality around those carbons should be different. Regarding the documented data, 2 seems to be (22*E*,24*R*)-6-acetoxy-ergosta-7,22-dien-3β,5α,6β-triol,[17] 3β,5α-dihydroxy-6β-acetoxy-ergosta-7,22-diene,[18] or 3β,5α-dihydroxy-10α-methyl-6β-acetoxy-ergosta-7,22-diene.[19] Nevertheless, the first one of the above compounds has not been determined an absolute configuration,[17] the second one has been oppugned for the validity of the structure or NMR data,[17, 18] and the third one has been proven to present a faulty configuration.[19, 20] Rigorously, it's necessary to establish an accurate spatial configuration of 2. Thus, the subtle NOESY experiment of 2 was performed and most NOESY correlations were similar to those of 1, while a strong NOESY effects of Me-19 /H-6 in 1 was disappeared in 2 (Figure 6). Moreover, the NOESY signal of H-6/H-9 was observed in 2, which did not appear in 1. Taken together, the disparity between 2 and 1 was deduced to be the contrast chirality of C-6. Unsurprisingly, the absolute configuration of C-6 was certified as 6*R* through ECD calculations (Figure 4) based on the forementioned method, and the stereochemistry of 2 was unambiguously established as 3*S*,5*R*,6*R*,9*S*,10*R*,13*R*,14*R*,17*R*,20*R*,24*R*.

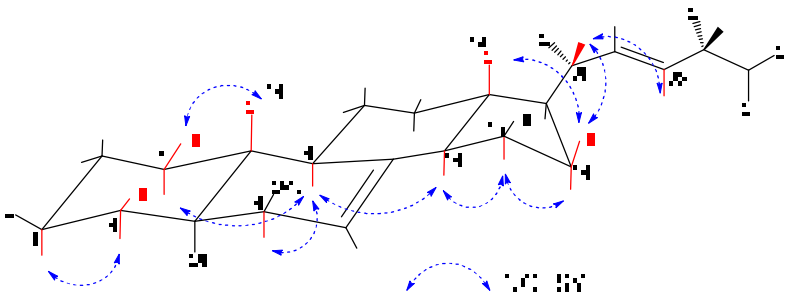


Fig. 6. Key NOESY correlations of 2.

Brassisterol C (3) was obtained as a colorless block crystal. HRESIMS spectrum analysis deduced its molecular formula C28H46O3 (m/z 453.3313 [M + Na]+, calcd as 453.3345). Cautious 1D NMR data (Table S1) comparison of 3 with those of previous reports manifested that 3 should resemble 22E,24R-ergosta-7,22-diene-3β,5β,6a-triol,21, 22 and the key 1H−1H COSY HMBC correlations (Figure 2) demonstrated its planar skeleton, although none of those documents depicted the absolute stereo-configuration. In the wake of exhaustive trials on crystal cultivation for 3, we successfully harvested its single crystals from a mixed solvent (MeOH-H2O, v:v = 20:1). Unequivocally, the spatial configuration of 3 was confirmed as 3S,5S,6S,9S,10R,13R,14R,17R,20R,24R along with a Flack parameter of 0.17(13) (CCDC 2169685) by means of XRD analysis with Cu Kα radiation (Figure7).

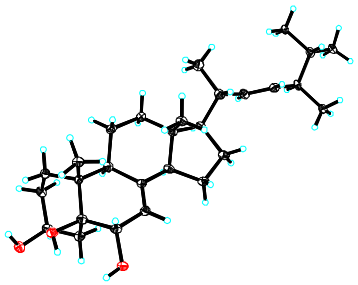


Fig. 7. The ORTEP drawing of 3.

Ergosterol and its derivatives presented anti-inflammation or anti-neuroinflammation effectiveness in those compelling reports.[8, 23] PD pathology is characterized by the loss of dopaminergic neurons in the brain and the accumulation of α-synuclein and substantial evidence have shown that neuroinflammation is a significant feature of PD.[24] The release of inflammatory factors has also been significantly observed in PD animal or cell models induced by neurotoxins such as MPP^+, MPTP, or 6-OHDA. Downregulation of NLRP3 could inhibit inflammation and alleviate MPTP-induced degeneration of DA neurons in MPTP-induced PD animal models.[25] Hence, studying ergosterol derivatives, Brassisterols A−C (1−3), whether alleviate PD by regulating NLRP3 might provide theoretical reference for the treatment of PD. The CCK-8 assay towards absent or present MPP^+ treated SH-SY5Y cells was carried out herein. All molecules showed no cytotoxic activity on SH-SY5Y cells at the concentration of 50 μM (Figure 8A). Amongst isolates, at the concentration of 50 μM, 1 exhibited the best protective effects for cells from MPP^+-induced injury (100 μM), nearly acquiring the cell viability restoration level with Levodopa (L-DOPA, positive control) treatment at 20 μM (Figure 8B), increasing the viabilities of SH-SY5Y cells treated with MPP^+ in a dose-dependent manner ranging from 6.25 to 50 μM (Figure 8C).

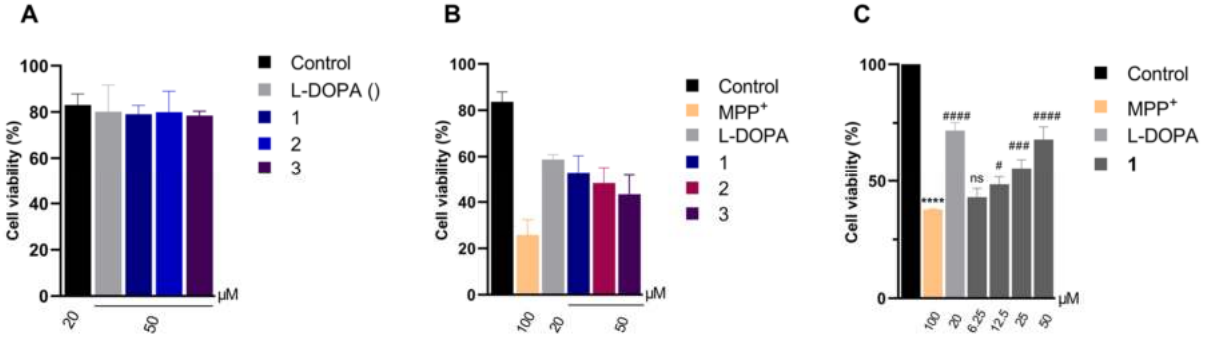


Fig. 8. (A) Cell viabilities of 1−3 on SH-SY5Y cells with the concentration at 50 μM. (B) Cytoprotective effects on MPP^+ insult SH-SY5Y cells of L-DOPA (20 μM) or 1−3 with the concentration of 50 μM. (C) Effects on MPP^+ insult SH-SY5Y cells of L-DOPA (20 μM) or 1 with concentrations ranging from 6.25−50 μM. $^{****}P < 0.0001$ vs control group; $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, and $^{\#}P < 0.05$ vs MPP^+ insult group; ns means no statistical significance. Statistical analyses were evaluated with two-way or one-way ANOVA; the values represent mean ± SD. All experiments were parallelly repeated three times in triplicate.

In order to confirm whether 1 mitigates the pyroptosis in MPP^+-activated SH-SY5Y cells, the ultrastructure of cells was evaluated using scanning electron microscope (SEM). The characteristic structure of pyrolytic cells, namely GSDMD-mediated pores on cell membrane, was observed. As shown in Figure 9A, cells in the control group showed round or elliptic small cellular body and no pit or pore on membrane. While MPP^+-stimulated cells exhibited soma enlargement

and expansion, with a large number of pits and pores on membrane. After 1 treatment, the cell bodies retracted and membrane pore decreased. Similar results were observed by the immunofluorescence staining assay. The number of GSDMD-positive cells was decreased in the 1 + MPP^+ group compared with the MPP+-induced group (Figure 9B). To validate the role of 1 in mediating the anti-pyroptotic action in PD, flow-cytometric analysis towards FAM-FLICA-caspase1 and propidium iodide (PI) double-positive cells were performed, and the increasing number of caspase-1-PI positive cells induced by MPP^+ was lessened after the administration of 1 with 50 μM (Figure 9C). Meanwhile, decreased TUNEL positive cells further confirmed the inhibitory effects of 1 on MPP^+-insulted cells pyroptosis (Figure 9D). Immunostaining showed increased α-synuclein accumulation in MPP^+-treated cells in comparison with untreated cells. Treatment with 1 decreased α-synuclein accumulation, which suggest that 1 can remove α-synuclein aggregates (Figure 9E).

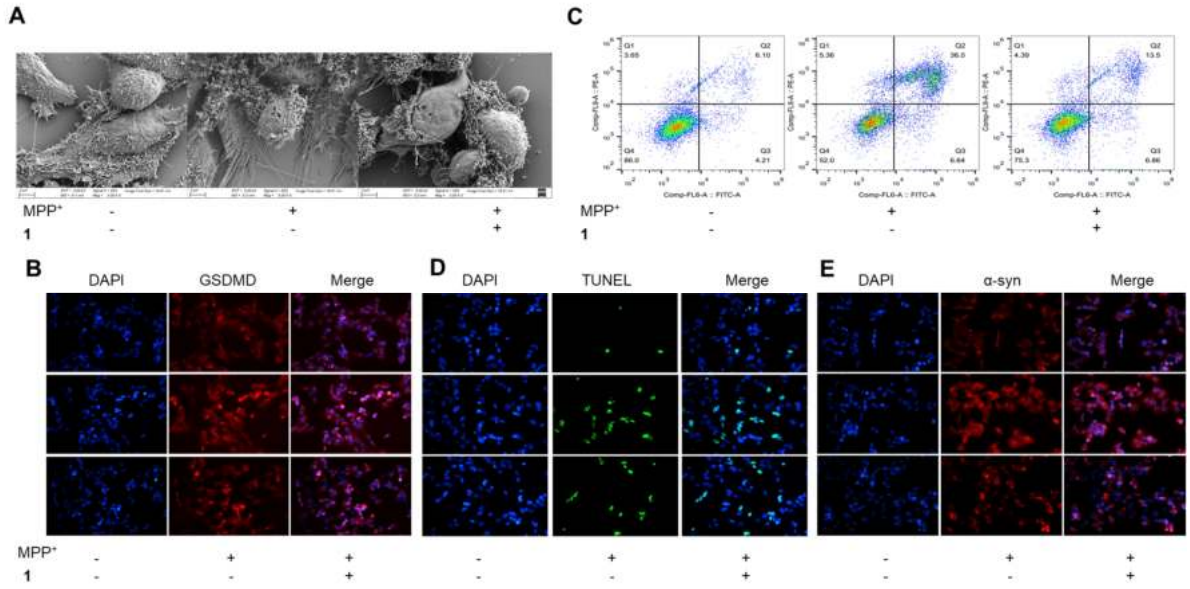


Fig. 9. (A) Scanning electron micrographs for SH-SY5Y cells after treatment with MPP+ at 100 μM and 1 at 50 μM. (B) (D), and (E): GSDMD, TUNEL, and α-syn immunofluorescence staining of cells, respectively. (C) Flow-cytometric analysis of caspase-1 + PI + cells. n=3/group.

To further explore the mechanism by which 1 inhibited MPP^+ induced inflammatory responses, the transcriptional expressions and the protein levels of α-syn, NLRP3 and related genes and proteins were respectively determined by RT-PCR and western blotting. As shown in Figure 10A and B, MPP^+ treatment significantly increased both the mRNA expression and the protein levels of α-syn, NLRP3, ASC, GSDMD, caspase-1, IL-1β, and IL-18 expression, and 1 pre-treatment reduced the over-expression of these genes and proteins. These results indicated that the anti-inflammatory effects exerted by 1 were achieved through inhibiting the α-syn/NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway. In addition, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for levels of inflammatory cytokines IL-1β and IL-18 were performed. Compared to the control group, the levels of inflammatory factors increased significantly in the MPP^+ group, and 1 pre-treatment significantly reduced the levels of inflammatory factors (Figure 10C and D).

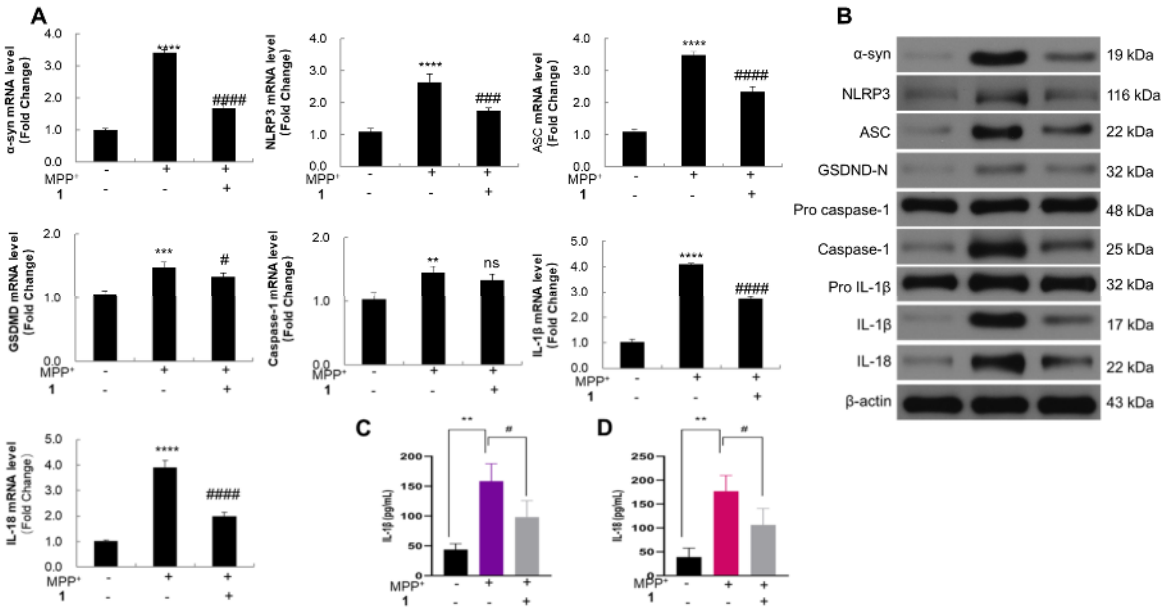


Fig. 10. (A) The statistical results of α-syn, NLRP3, ASC, GSDMD, caspase-1, IL-1β, and IL-18 mRNA relative expressions. (B) The protein expressions of α-syn, NLRP3, ASC, GSDMD-N, caspase-1, IL-1β, and IL-18 via Western blotting. (C) and (D) ELISA analysis of protein level of proinflammatory cytokines in the culture supernatants of cells. n=3/group. $^{****}P < 0.0001$, $^{***}P < 0.001$, and $^{**}P < 0.01$ vs control group; $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, and $^{\#}P < 0.05$ vs MPP^+ insult group; ns means no statistical significance. Statistical analyses were evaluated with two-way or one-way ANOVA; the values represent mean ± SD. n = 3/group.

In the field of developmental biology, zebrafish has emerged as an important model that rapidly become apparent and significant in the analysis of human neurodegenerative diseases,[26] especially in PD research. Hence, a PD-like model was established by exposing zebrafish larvae to MPTP with 10 μM. Locomotor activity is an important index of PD syndrome. In the present study, MPTP treatment dramatically decreased the swimming total distance of zebrafish larvae (Figure 11A and B), which was significantly improved by administration of 1 with the dose ranging from 40 to 80 μg/mL. Especially, MPTP-induced locomotor aberration can be rescued by a higher dose of 1 with 60 μg/mL in zebrafish larvae.

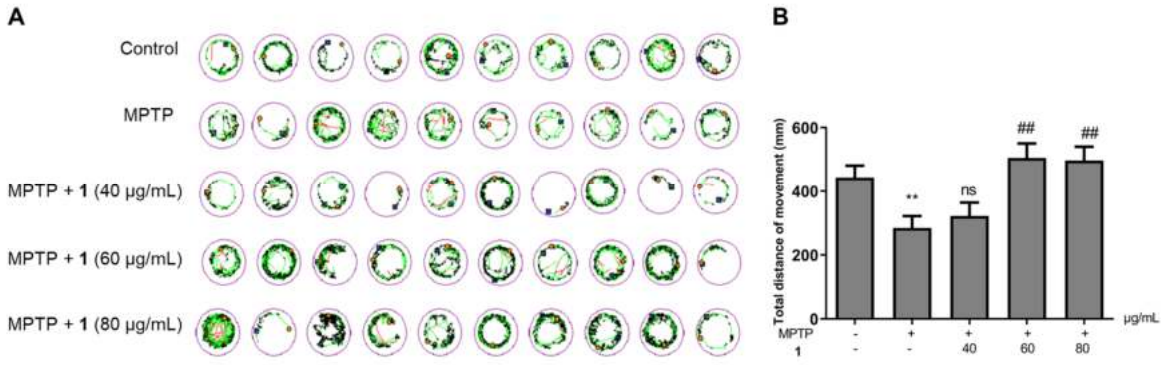


Fig. 11. (A) The digital track map. Red, green, and black lines represent fast, medium, and slow movement trajectories, respectively. n = 10/group. (B) The total distance moved in control, MPTP, and MPTP + 1 groups. n = 10 per group. $^{**}P < 0.01$ vs control group; $^{\#\#}P < 0.01$ vs MPTP insult group; ns means no statistical significance. Statistical analyses were evaluated with two-way or one-way ANOVA; the values represent mean ± SD. n = 10/group.

Conclusions

In conclusion, three ergosterol derivative brassisterols A–C (1–3) were discovered from the co-cultivation of *Alternaria brassicicola* and *Penicillium granulatum*. To the best of our knowledge, 1 belongs to a new ergosterol analogue, 2 and 3 were absolute configurations confirmed for the first time. More importantly, 1 displayed a remarkable anti-Parkinson's disease activity in both MPTP-induced zebrafish and MPP^+-induced SH-SY5Y cells. The molecular mechanism exploration demonstrated that 1 protected dopaminergic cell from neuroinflammation may be attributable to suppressed α-syn/NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway activation.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31700298), the Opening Foundation of Jiangsu Key Laboratory of Neurodegeneration, Nanjing Medical University (No. KF202203), and the Shuiyuntian (Tianjin) Biotechnology Development Co., Ltd.

Notes and references

1. Z. Fan, Z. Liang, H. Yang, Y. Pan, Y. Zheng and X. Wang, Tenuigenin protects dopaminergic neurons from inflammation via suppressing NLRP3 inflammasome activation in microglia, *J Neuroinflammation*, 2017, 14, 256.
2. J. H. Lee, H. J. Kim, J. U. Kim, T. H. Yook, K. H. Kim, J. Y. Lee and G. Yang, A Novel Treatment Strategy by Natural Products in NLRP3 Inflammasome-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's and Parkinson's Disease, *Int J Mol Sci*, 2021, 22.
3. Y. Q. Yan, Y. Fang, R. Zheng, J. L. Pu and B. R. Zhang, NLRP3 Inflammasomes in Parkinson's disease and their Regulation by Parkin, *Neuroscience*, 2020, 446, 323-334.
4. P. Broz, P. Pelegrin and F. Shao, The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation, *Nat Rev Immunol*, 2020, 20, 143-157.
5. M. Sanita Lima and R. Coutinho de Lucas, Co-cultivation, Co-culture, Mixed Culture, and Microbial Consortium of Fungi: An Understudied Strategy for Biomass Conversion, *Front Microbiol*, 2021, 12, 837685.
6. S. L. Knowles, H. A. Raja, C. D. Roberts and N. H. Oberlies, Fungal-fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity, *Nat Prod Rep*, 2022, 39, 1557-1573.
7. Z. Hu, B. He, L. Ma, Y. Sun, Y. Niu and B. Zeng, Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in Saccharomyces cerevisiae, *Indian J Microbiol*, 2017, 57, 270-277.
8. Q. Shi, Y. Huang, H. Su, Y. Gao, X. Peng, L. Zhou, X. Li and M. Qiu, C(28) steroids from the fruiting bodies of Ganoderma resinaceum with potential anti-inflammatory activity, *Phytochemistry*, 2019, 168, 112109.
9. M. Kobori, M. Yoshida, M. Ohnishi-Kameyama and H. Shinmoto, Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells, *Br J Pharmacol*, 2007, 150, 209-219.
10. H. Gao, K. Hong, X. Zhang, H.-W. Liu, N.-L. Wang, L. Zhuang and X.-S. Yao, New Steryl Esters of Fatty Acids from the Mangrove FungusAspergillus awamori, *Helvetica Chimica Acta*, 2007, 90, 1165-1178.
11. V. T. Nguyen, N. T. Tung, T. D. Cuong, T. M. Hung, J. A. Kim, M. H. Woo, J. S. Choi, J.-H. Lee and B. S. Min, Cytotoxic and anti-angiogenic effects of lanostane triterpenoids from Ganoderma lucidum, *Phytochemistry Letters*, 2015, 12, 69-74.
12. J. Noinart, S. Buttachon, T. Dethoup, L. Gales, J. A. Pereira, R. Urbatzka, S. Freitas, M. Lee, A. M. S. Silva, M. M. M. Pinto, V. Vasconcelos and A. Kijjoa, A New Ergosterol Analog, a New Bis-Anthraquinone and Anti-Obesity Activity of

Anthraquinones from the Marine Sponge-Associated Fungus Talaromyces stipitatus KUFA 0207, *Mar Drugs*, 2017, 15.

13. X. Xiao, Z. Tong, Y. Zhang, H. Zhou, M. Luo, T. Hu, P. Hu, L. Kong, Z. Liu, C. Yu, Z. Huang and L. Hu, Novel Prenylated Indole Alkaloids with Neuroprotection on SH-SY5Y Cells against Oxidative Stress Targeting Keap1-Nrf2, *Mar Drugs*, 2022, 20.

14. Z. Tong, X. Xiao, Y. Lu, Y. Zhang, P. Hu, W. Jiang, H. Zhou, S. Pan, Z. Huang and L. Hu, New Metabolites from Aspergillus ochraceus with Antioxidative Activity and Neuroprotective Potential on H2O2 Insult SH-SY5Y Cells, *Molecules*, 2021, 27.

15. L. Hu, S. Tian, R. Wu, Z. Tong, W. Jiang, P. Hu, X. Xiao, X. Zhang, H. Zhou, Q. Tong, Y. Lu, Z. Huang, Y. Chen and Y. Zhang, Identification of anti-Parkinson's Disease Lead Compounds from Aspergillus ochraceus Targeting Adenosin Receptors A2A, *ChemistryOpen*, 2021, 10, 630-638.

16. M. Kobayashi, M. M. Krishna and V. Anjaneyulu, Marine Sterols. XXIV.[1)] Isolation of 24-Methylenecholestane-1α,3β,5α,6β,16β-pentol from *Sinularia* sp. of Soft Coral, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1992, 40, 2845-2846.

17. W. Zhang, S. Draeger, B. Schulz and K. Krohn, Ring B Aromatic Steroids from an Endophytic Fungus, *Colletotrichum* sp., *Natural Product Communications*, 2009, 4, 1449-1454.

18. H. Lu, W. X. Zou, J. C. Meng, J. Hu, and R. X. Tan, New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*, *Plant Science*, 2000, 151, 67-73.

19. M. F. Qiao, Y. W. Yi and J. Deng, Steroids from an Endophytic Eurotium rubrum Strain, *Chemistry of Natural Compounds*, 2017, 53, 678-681.

20. Y. Yaoita and K. Machida, Misassigned Polyoxygenated Sterols and Reassignments of Their Structures, *Natural Product Communications*, 2020, 15.

21. T. Kikuchi, Y. Maekawa, A. Tomio, Y. Masumoto, T. Yamamoto, Y. In, T. Yamada and R. Tanaka, Six new ergostane-type steroids from king trumpet mushroom (Pleurotus eryngii) and their inhibitory effects on nitric oxide production, *Steroids*, 2016, 115, 9-17.

22. S. P. Yang, J. Xu and J.-M. Yue, Sterols from the fungus Catathelasma imperiale, *Chinese Journal of Chemistry*, 2010, 21, 1390-1394.

23. H. C. Wu, Y. F. Chen, M. J. Cheng, M. D. Wu, Y. L. Chen and H. S. Chang, Different types of components obtained from Monascus purpureus with neuroprotective and anti-inflammatory potentials, *Food Funct*, 2021, 12, 8694-8703.

24. Z. Wang, X. G. Luo and C. Gao, Utility of susceptibility-weighted imaging in Parkinson's disease and atypical Parkinsonian disorders, *Transl Neurodegener*, 2016, 5, 17.

25. Y. Lin, D. Xu, F. Gao and X. Zheng, Ulinastatin inhibits NLRP3-induced apoptosis in a PD cell model, *Ann Transl Med*, 2021, 9, 924.

26. Y. Sun, L. He, T. Wang, W. Hua, H. Qin, J. Wang, L. Wang, W. Gu, T. Li, N. Li, X. Liu, F. Chen and L. Tang, Activation of p62-Keap1-Nrf2 Pathway Protects 6-Hydroxydopamine-Induced Ferroptosis in Dopaminergic Cells, *Mol Neurobiol*, 2020, 57, 4628-4641.

基于美国 FAERS 数据的索磷布韦/维帕他韦与来迪派韦/索磷布韦不良事件安全警戒研究

黄李梧，朱泽凤，卢渭金，赵飞宇，刘志文，吴晓松

河源市深河人民医院/暨南大学附属第五医院　药学部 广东 河源 517000

【摘要】目的：挖掘直接抗丙型肝炎病毒复方制剂索磷布韦/维帕他韦 (SOF/VEL)、来迪派韦/索磷布韦 (LDV/SOF)上市后的不良事件信号，为其临床合理用药提供依据。**方法：**采用比值比法 (ROR)、比例报告比值比法 (PRR)和联合综合标准法 (MHRA) 对美国不良事件报告系统(FAERS) 中 SOF/VEL 及 LDV/SOF 自上市至 2023 年第一季度所有的药品不良事件报告进行数据挖掘分析。**结果：**通过二次筛选，共挖掘到 SOF/VEL 87 个有效信号，涉及 20 个系统器官，LDV/SOF 148 个有效信号，涉及 25 个系统器官，主要全身性疾病及给药部位各种反应、各类神经系统疾病以及肝胆系统疾病等方面。**结论：**治疗丙型肝炎时，优先考虑 SOF/VEL。应用抗丙型肝炎病毒药物时，应密切检测肝功能相关指标，预防不良反应的发生。

【关键词】丙型肝炎、FAERS、SOF/VEL、LDV/SOF、不良事件

Security alert of sofosbuvir/velpatasvir and ledipasvir/sofosbuvir adverse drug events based on FAERS

【 Abstract 】 Objective： To explore the adverse event signals of sofosbuvir/vipataivir (SOF/VEL) and ledivavir/sofosbuvir (LDV/SOF), which are directly anti-hepatitis C virus compound preparations, after marketing, and provide a reference for safe clinical medication. **Methods：** The Odds ratio method (ROR), Proportional Reporting Odds ratio method (PRR) and Joint Comprehensive Standard method (MHRA) were used to conduct data mining analysis on all adverse event reports of SOF/VEL and LDV/SOF in the US Adverse Event Reporting System (FAERS) from the launch to the first quarter of 2023. **Results：** Through secondary screening, 87 effective SOF/VEL signals involving 20 SOCs and 148 effective LDV/SOF signals involving 25 SOCs were found, mainly in systemic diseases, various reactions at the administration site, various neurological diseases and hepatobiliary diseases. **Conclusion:** SOF/VEL should be given priority in the treatment of hepatitis C.When using anti-hepatitis C virus drugs, the relevant indicators of liver function should be closely detected to prevent the occurrence of adverse reactions.

【Keywords】hepatitis C; FAERS; SOF/VEL; LDV/SOF; adverse drug events

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染所致，以肝脏病变为主的传染性疾病，临床变现可分为急性和慢性病毒性肝炎。其中慢性丙型肝炎易诱发乏力、食欲减退、恶心等症状，进一步可导致肝脂肪病变，甚至是肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌等，严重威胁公众健康。其传播途径主要是血液、母乳以及性接触[1-4]。据世界卫生组织预计，2015 年全球慢性 HCV 感染者约有 7100 万例，其中 39.9 万死于 HCV 感染所引起的肝硬化或肝细胞癌(HCC)[5]。2019 年全球有慢性 HCV 感染者 5800 万例，29 万例死于 HCV 感染引起的肝硬化或肝癌，2019 年全球新发感染者约 150 万例。

丙型肝炎的目标是清除 HCV，获得治愈，清除或减轻 HCV 相关肝损害，逆转肝纤维化，提高患者生存率，改善生命质量，预防 HCV 传播。近年来，丙型肝炎的治疗从以干扰素为基础的治疗发展为直接抗病毒药物(DAAs)

全口服治疗[6-11]。DAAs 具有疗效好、疗程短、用药方便、安全性高等优势，备受临床认可。根据作用的靶蛋白不同，DAAs 可分为 HCV 非结构蛋白 3/4A (non-structrual 3/4A, NS3/4A) 抑制剂、HCV 非结构蛋白 5B (non-structrual 5B, NS5B) 抑制剂和 HCV 非结构蛋白 5A(non-structrual 5A, NS5A)抑制剂。目前，用于治疗基因型 HCV-Ⅰ~Ⅵ 慢感染者的，并纳入国家医疗保险报销方案的药物——NS5B 聚合酶核苷类似物抑制剂/NS5A 抑制剂复方制剂：索磷布韦/维帕他韦(SOF/VEL, Epclusa)、来迪派韦/索磷布韦(LDV/SOF, Harvoni)。索磷布韦/维帕他韦(SOF/VEL, Epclusa)于 2016 年 06 月 28 日经美国 FDA 批准上市，2018 年 05 月 23 日在我国获批上市。来迪派韦/索磷布韦(LDV/SOF, Harvoni)于 2014 年 10 月 10 日经美国 FDA 批准上市，2018 年 11 月 21 日在我国获批上市。尽管上市时间较短，但是 SOF/VEL、LDV/SOF 均已被推荐为丙型肝炎的一线治疗药物[12]。随着两种药物被广泛应用于临床，其不良事件报告也逐渐增多。SOF/VEL、LDV/SOF 的不良反应均以Ⅱ/Ⅲ期的临床试验数据为主，缺乏上市后安全性调查，且关于两种药物的研究相对较少[13]。综上所述，研究分析 SOF/VEL、LDV/SOF 的不良事件对于临床合理用药具有重要的意义。

本研究基于美国 FDA 不良事件报告系统(FDA Adverse event reporting System, FAERS) 数据库对 SOF/VEL、LDV/SOF 的安全性进行比对分析，利用报告比值比法(reporting odds ratio, ROR)、比例报告比值比法(proportional reporting ratio, PRR)和 PRR 联合综合标准法(The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA)挖掘 SOF/VEL、LDV/SOF 安全警戒信号，用以优化患者治疗方案、预防和应对药物不良反应[14-16]。

1 数据与方法

1.1 数据来源

本文数据来源于 FAERS 数据库，利用药物警戒数据挖掘和分析的开放工具—Open Vigil 2.1 直接提取数据库中的不良事件(adverse drug event, ADE)报告信息，高效、准确提取数据。FAERS 数据库由 FDA 建立，支持上市后药物和治疗性生物制品的安全监测。FAERS 数据库数据量大、真实且免费，方便科研工作者挖掘药物上市后的安全信息。

1.2 数据提取与处理

通过 Open Vigil 2.1 数据平台，“索磷布韦维帕他韦”“来迪派韦索磷布韦”为目标药物，分别以“通用名称+商品名称”(“Sofosbuvir/Velpatasvir + Epclusa”，“Ledipasvir/Sofosbuvir+Harvoni”)为主题词，复合检索 FAERS 数据库，收集药物上市至 2023 年第一季度的 ADE 报告。剔除错误报告、重复以及不确定的 ADE 报告，收集和纳入 ADE 报告的呈报时间、患者性别以及年龄、呈报国家或地区等信息。采用国际医学用语词典(Medical Dictionary for Regulatory Activities, MedDRA)24.0 版本中首选术语(perferred terms, PT)和系统器官分类(system organ class, SOC)对 ADE 进行标准化和分类。

1.3 数据分析

表 1 比值失衡法四个表

项目	目标 ADE 数量	其他 ADE 数量	合计
目标药物	a	b	a+b
其他药物	c	d	c+d
合计	a+c	b+d	a+b+c+d

目前，国内外用于药品 ADE 信号检测的数据挖掘方法主要是比例失衡法，包括告比值比法(reporting odds ratio, ROR) 、比例报告比值比法(proportional reporting ratio, PRR)和 PRR 联合综合标准法(The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA)，具有容易理解、相对简单、灵敏度高、可信度高以及减少偏移等特点。该法的原理是比较目标药物-事件的出现频率与背景频率的差异，即在 1 个包含所有药物事件报告的数据库中，当目标药物-事件组合的出现频率明显高于整个数据库的背景频率，并且达到了设定的阀值，就认为产生了 1 个信号。本文采用 ROR，PRP 和 MHRA 分析法进行信号挖掘，均基于四格表(表 1)，通过比较目标药物和其他所有药物的 ADE 报告数(背景数据)来判断是否失衡，以此挖掘潜在的 ADE 信号；同时，3 种方法联用可以

降低假阳性和假阴性信号的数量，提高结果的可靠性。

基于标准化后的数据，筛选出报告数大于 3 例的数据。根据上述四表格，计算出对应的 ROR 值、PRR 值、χ2 值和相应的 95%置信区间(CI)下限并统计信号数，排除不满足阈值要求的报告。其中，ROR 值 95%CI 下限越大，信号越强，说明目标药物和目标 ADE 之间的联系就越强。ROR、PRR 和 MHRA 法的计算公式及阈值见表 2。

表 2 计算公式及信号检测阈值标准

检测方法	计算公式	阈值
ROR 法	ROR=(a/c)/(b/d)	a≧3,ROR 值的 95% CI 下限>1,则提示生成 1 个信号
	SE(ln ROR)= $\sqrt{\frac{1}{a}+\frac{1}{b}+\frac{1}{c}+\frac{1}{d}}$	
	95% CI=$e^{\ln ROR\pm 1.96\ SE*(\ln ROR)}$	
PRR 法	PRP=[a/(a+b)]/[c/(c+d)]	a≧3,PRR 值的 95% CI 下限>1,则提示生成 1 个信号
	SE(lnPRR)= $\sqrt{\frac{1}{a}-\frac{1}{a+b}-\frac{1}{c}+\frac{1}{c+d}}$	
	95%CI=$e^{\ln PRR\pm 1.96*SE(\ln PRR)}$	
MHRA 法	PRR=[a/(a+b)]/c/(c+d)]	a≧3,PRR>2, χ^2>4,则提示生成 1 个信号
	χ^2=[(ad-bc)2(a+b+c+d)]/[(a+b)(c+d)(b+d)(a+c)]	

2 结果

2.1 不良事件 ADE 报告基本特征

2.1.1 不良事件基本情况

从药物上市以来，剔除重复以及不确定的 ADE 报告，FAERS 数据库分别挖掘到应用 SOF/VEL 的 ADE 报告 8796 份，应用 LDV/SOF 的 ADE 报告 14049 份。排除未标明性别的报告后发现，药物使用者均以男性为主，在 SOF/VEL ADE 报告中，男性(4834 例)多于女性(3588 例)；在 LDV/SOF 的 ADE 报告中男性 (7766 例) 多余女性 (5822 例)。在不良事件 ADE 报告中，两种药物上报地区均主要来自于美国，年龄多集中于青壮年(18~65 岁)，占比均超过 50%，详见表 3。

表 3 慢性丙肝一线治疗药物 AE 报告的基本信息

类别		SOF/VEL		LDV/SOF	
		n=8796	占比%	n=14049	占比%
性别	男	4834	54.96	7766	55.28
	女	3588	40.79	5822	41.44
	未知	374	4.25	461	3.28
年龄	<18	18	0.20	49	0.35
	18~65	5074	57.69	8123	57.82
	>65	1366	15.53	2719	19.35
	未知	2338	26.58	3158	22.48
上报国家	美国	7624	86.68	10834	77.12

	日本	136	1.55	895	6.37
	法国	83	0.94	193	1.37
	中国	35	0.40	7	0.05
	其他	906	10.30	1878	13.37
	未知	12	0.14	242	1.72

2.1.2 年度分布情况

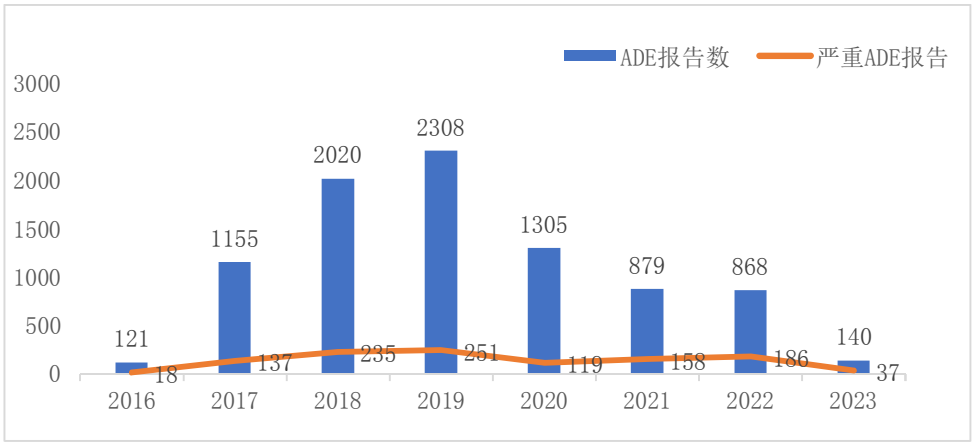


图 1 SOF/VEL - ADE 报告年度分布情况

SOF/VEL ADE 报告年度分布情况详见图 1。由图 1 可见，SOF/VEL 上市第一年(2016 年)的 ADE 报告仅有 121 份，但是，次年已达到 1155 份。随后逐年增加，2019 年达到峰值 2308 份，之后逐年减少。其中，SOF/VEL 严重不良事件(例如：死亡、危及生命、住院、致残、致畸等)报告共 1141 份，占 12.97%，变化趋势与 ADE 报告数成正相关。

LDV/SOF ADE 报告年度分布情况详见图 2。由图 2 可见，LDV/SOF 上市第一年(2014 年)的 ADE 报告仅有 97 份，但是次年已达到 3132 份。2016 年达到峰值 3712 份，随后逐年减少。LDV/SOF 严重不良事件共 2371 份，占 16.88%，变化趋势与 ADE 报告数成正相关。

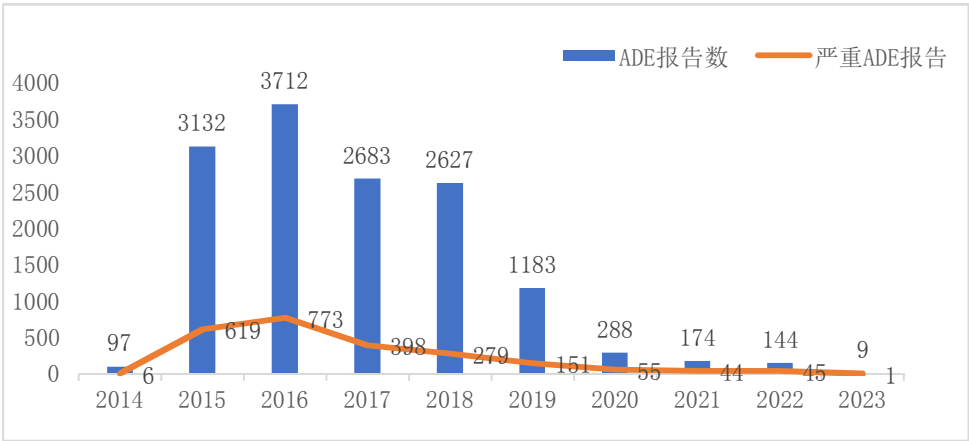


图 2 LDV/SOF - ADE 报告年度分布情况

2.2 风险信号分析

2.2.1ADE 信号频次检测结果

从纳入的 8796 例 SOF/VEL ADE 报告中，经 ROR、PRR 和 MHRA 法筛选后，获得不良反应信号数 106 个，涉及 7989 个独立 PT 事件。通过排除社会环境、产品问题、各种手术及医疗操作等与药物不良反应无关的信号后，最终筛出不良信号数 87 个，6682 个 PT。从纳入的 LDV/SOF ADE 报告中，经上述条件筛选后，获得不良反应信号 148 个，9397 个 PT。根据报告例数排序，展示前 30 PT，结果见表 4。其中重叠信号有 17 个，SOF/VEL 报告数前五为：疲乏、头痛、恶心、腹泻、失眠；LDV/SOF 报告数前五为：疲乏、头痛、丙型肝炎、失眠、治疗失败。

表 4　ADE 信号报告数前 30

序号	SOF/VEL				LDV/SOF			
	PT	例数	ROR	χ^2	PT	例数	ROR	χ2
1	疲乏	1901	8.42	9503	疲乏	2838	7.9	13337.23
2	头痛	1638	9.08	9344	头痛	2582	8.84	14274.23
3	恶心 [b]	844	3.42	1279	失眠	581	4.21	1333.54
4	腹泻 [b]	466	2.1	250.2	治疗失败 [b]	318	4.67	856.21
5	失眠	354	4.21	805.1	肝细胞癌	303	44.7	10588.76
6	腹部不适 b	188	2.88	215.5	药物相互作用 [b]	203	2.05	93.77
7	消化不良	158	5.29	525.7	消化不良	188	3.82	374.52
8	胃食管反流病 [b]	66	2.79	70.89	腹水	128	8.49	735.72
9	腹水	65	6.69	265.9	易激惹	108	3.19	158
10	肝细胞癌	60	12.64	555.1	肝硬化 [b]	96	9.58	652.95
11	易激惹	51	2.53	45.18	流感样疾病 [b]	94	2.31	67.87
12	基因型耐药性检测阳性	47	65.29	2560	基因型耐药性检测阳性	84	86.96	5808.95
13	肝衰竭	46	4.7	111.7	肝癌 [b]	78	2.35	56.94
14	肠胃气胀	37	2.25	24.18	血肌酐升高 [b]	75	2.35	53.25
15	耳鸣	31	2.08	15.64	肝衰竭	71	4.77	193.5
16	肝性脑病	30	9.88	219.3	肝性脑病	63	12	569.73
17	色素尿	28	4.05	56.19	耳鸣	61	2.6	57.75
18	血胆红素升高	26	3.7	46.32	肠胃气胀	60	2.24	39.62
19	肾小球滤过率降低	24	5.57	77.23	血胆红素升高	60	4.7	145.91
20	睡眠过度 [b]	24	2.6	21.98	肾小球滤过率降低	57	8.08	298.06
21	肝移植 [a]	22	19.94	349.4	脑病	48	3.69	78.96
22	盗汗 [b]	21	2.24	13.08	复发性肝癌 [b]	44	213.88	6644.96
23	食欲增加 [a]	20	3.93	40.42	病毒突变鉴定阳性 [b]	43	13.39	445.9
24	粪便变色	19	2.87	20.01	食管静脉曲张出血 [a]	38	33.03	1054.64
25	口渴 [a]	18	2.78	18.62	异常做梦	37	3.11	50.44
26	脑病	18	2.52	14.93	粪便变色	36	3.28	52.91
27	肝痛 [a]	17	10.75	112.5	乙型肝炎再激活	35	10.13	225.12
28	异常做梦	16	2.6	14.08	色素尿	33	3.02	42.35
29	精力增加 [a]	13	6.39	53.29	黄疸 [b]	31	2.44	22.26
30	乙型肝炎再激活	12	4.69	25.30	乙型肝炎 [b]	31	7.75	138.15

注：a 代表比较的药物存在该不良事件的信号，但未进入前 30；b 代表比较的药物未检出到该信号

2.2.2 不良事件安全警戒信号系统器官分类情况分布

使用 MedDRA 24.0 对筛选后的 AE 信号进行 SOC 分类，其中 SOF/VEL 累计的 SOC 数为 20，LDV/SOF 累计的 SOC 数为 25，详见图 3。通过分类统计可知，SOF/VEL 累计 SOC 占比最高的前三位为：各类神经系统疾病(28.08%)、全身性疾病及给药部位各种反应(27.19%)、胃肠系统疾病(25.14%)、精神病类(6.10%)、肝胆系统疾病(3.93%)。LDV/SOF 累计 SOC 占比最高的前五位为：全身性疾病及给药部位各种反应(31.68%)、各类神经系统疾病(29.77%)、肝胆系统疾病(9.40%)、精神病类(6.38%)、胃肠系统疾病(4.86%)。

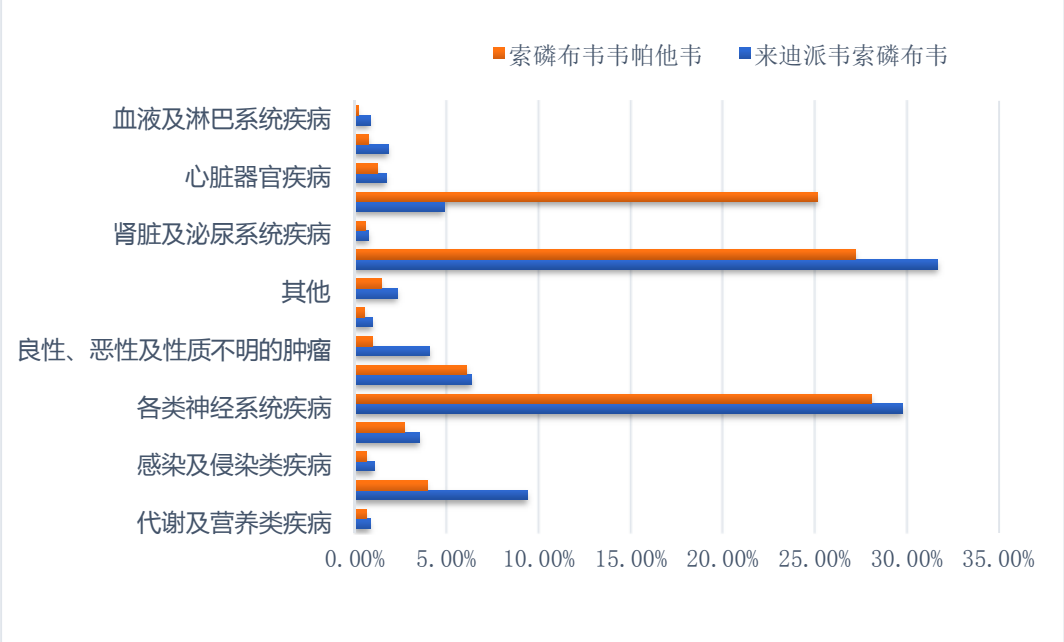


图 3 丙型肝炎治疗药物累计 SOC 占比图

3 讨论

索磷布韦维帕他韦(SOF/VEL)、来迪派韦索磷布韦(LDV/SOF)均是 NS5A 抑制剂及 NS5B 聚合酶核苷类似物抑制剂组成的复方制剂，所以两者不良事件的异同主要与其主要成分密切相关。

本文通过挖掘 FAERS 数据库获取的 SOF/VEL、LDV/SOF ADE 信号与说明书中信息基本一致。其中，SOF/VEL 说明书中常见的不良反应，如：头痛、恶心、疲劳等，以及说明书警告的乙肝病毒再激活，均被检测到。LDV/SOF 说明书中提到的头痛、失眠、疲劳等常见的 ADE 信号均被检测到[17]。因此，本研究是真实可靠的，具有一定的参考价值。

3.1 主要 ADE 信号分析

与 SOF/VEL 相比，LDV/SOF 涉及的 ADE 信号种类、涉及系统更为广泛。目前，文献显示两种药物的 ADR 多为轻、中度，且应答率较高[17-21]。在本次研究结果中，LDV/SOF 的“治疗失败”ADE 信号排序在前列，而 SOF/VEL 未检出该信号。故在无禁忌症时，临床用药应优先考虑使用 SOF/VEL。

3.2 肝功能安全性分析

HCV 感染会加重肝肾功能发的损害，故肝肾功能不全时，选择合适的药物治疗是难点也是重点。据相关临床指南，SOF/VEL 以及 LDV/SOF 均作为失代偿期肝硬化患者的一线用药[22-24]。本次研究 LDV/SOF 在肝胆系统疾病中检测的不良 ADE 信号，如：肝癌、肝硬化等，远远高于 SOF/VEL。在肝功能不全时，可优先使用 SOF/VEL，但是不能简单地认为 SOF/VEL 绝对安全，临床使用时仍需要检测相关指标。

3.3 耐药性

耐药性一直是抗病毒药物治疗面临的常见问题。HCV NS5A 基因的替换突变及 NS5A 抑制剂(PIB)的低耐药

屏障性，可导致 PIB 治疗过程中耐药发生[25]。此次研究 SOF/VEL 以及 LDV/SOF 均检测到基因型耐药性检测阳性 ADE 信号，但仅 LDV/SOF 检测到病毒突变鉴定阳性信号。因此，LDV/SOF 可能更容易诱导病毒耐药性的发生。

3.4 研究局限性

基于 FAERS 数据库对 ADE 信号的探索有待提高与改进：1)FAERS 数据库属于自发呈报系统，必然存在漏报、误报以及重复上报等情况。2)上报人员未经过统一培训，来自不同领域，如：医生、患者以及医药公司工作人员，难以按照规范要求上报。3)报告地区主要集中于美、法等欧美国家，缺少亚洲人群相关的安全性数据。4)无法明确区分 ADE 信号是疾病进展或是药品所致。SOF/VEL 以及 LDV/SOF 的安全性分析结果在我国有待进一步确认。

4 结论

本研究通过对 FAERS 数据库对慢性丙肝治疗药物的不良反应信号进行挖掘、分析，为 SOF/VEL 以及 LDV/SOF 安全应用提供了客观证据。本文结果验证了说明书常见中的不良反应，如：疲乏、头痛，还进一步挖掘了新的潜在的不良反应信号，为后续的研究提供了新的方向和初步证据。

参考文献

[1] Di Marco L, La Mantia C, Di Marco V. Hepatitis C: Standard of Treatment and What to Do for Global Elimination[J]. Viruses, 2022, 14(3).

[2] Davis G L, Alter M J, El-Serag H, et al. Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression[J]. Gastroenterology, 2010, 138(2): 513-21, 521.e1-6.

[3] Kouroumalis E, Voumvouraki A. Hepatitis C virus: A critical approach to who really needs treatment[J]. World J Hepatol, 2022, 14(1): 1-44.

[4] 李健, 庞琳, 王晓春, et al. 中国丙型肝炎防治进展与展望[J]. 中国艾滋病性病, 2022, 28(07): 761-765.

[5] WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee, Guidelines for the Care and Treatment of Persons Diagnosed with Chronic Hepatitis C Virus Infection, Geneva: World Health Organization© World Health Organization 2018., 2018.

[6] 陈若蝉, 刘振国, 范学工. DAA 与 HCC——丙肝治疗新时代的挑战[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(05): 369-372.

[7] Barenie R E, Avorn J, Tessema F A, et al. Public funding for transformative drugs: the case of sofosbuvir[J]. Drug Discov Today, 2021, 26(1): 273-281.

[8] 金敏, 陈平钰, 李洪超, et al. 5 种直接抗病毒药物治疗慢性丙型病毒性肝炎有效性与安全性比较的 Meta 分析[J]. 中国药房, 2021, 32(10): 1262-1271.

[9] 张宁, 罗生强. 《世界卫生组织指南:慢性丙型肝炎感染者的筛查、护理和治疗(2016 年更新版)》推荐意见[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(07): 1248-1249.

[10] 尚佳, 何佳. 直接抗丙肝病毒药物研究进展[J]. 河南预防医学杂志, 2017, 28(02): 107-109.

[11] 张莹, 侯凌欣, 鞠翰, et al. 以聚合酶为靶标的抗病毒药物研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2021, 31(09): 657-679.

[12] 梅长林, 张文宏, 戴兵. 慢性肾脏病合并丙型肝炎病毒感染诊断、治疗和预防的临床实践指南(2023 年版)[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(04): 369-382.

[13] Li C, Li X, Zhu X, et al. Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Ledipasvir/Sofosbuvir and Sofosbuvir/Velpatasvir in Healthy Chinese Subjects[J]. Clin Ther, 2020, 42(3): 448-457.

[14] 田晓江, 贾运涛, 王柯静, et al. 基于美国 FAERS 的新型口服抗凝药物致女性生殖系统异常出血风险的数据分析[J]. 中国药房, 2020, 31(14): 1751-1755.

[15] 唐平秀, 张询研, 杨强. 基于美国 FAERS 的 5-氟尿嘧啶和卡培他滨致心脏毒性的风险分析[J]. 实用药物与临床, 2023, 26(06): 499-503.

[16] 芦小燕, 陈维, 戴幼琴, et al. 基于 FDA 不良事件报告系统的头孢他啶阿维巴坦不良事件信号挖掘研究[J]. 中国临

床药学杂志, 2022, 31(09): 641-646.
[17] Buggisch P, Wursthorn K, Stoehr A, et al. Real-world effectiveness and safety of sofosbuvir/velpatasvir and ledipasvir/sofosbuvir hepatitis C treatment in a single centre in Germany[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0214795.
[18] Xie J, Xu B, Wei L, et al. Effectiveness and Safety of Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir as a Hepatitis C Virus Infection Salvage Therapy in the Real World: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. Infect Dis Ther, 2022, 11(4): 1661-1682.
[19] Yang X, Tang Y, Xu D, et al. Efficacy and safety of ledipasvir/sofosbuvir for hepatitis C among drug users: a systematic review and meta-analysis[J]. Virol J, 2021, 18(1): 156.
[20] EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series(☆)[J]. J Hepatol, 2020, 73(5): 1170-1218.
[21] Zignego A L, Monti M, Gragnani L. Sofosbuvir/Velpatasvir for the treatment of Hepatitis C Virus infection[J]. Acta Biomed, 2018, 89(3): 321-331.
[22] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2022 年版)[J]. 中华传染病杂志, 2023, 41(1): 29-46.
[23] Zhang W, Zhang J, Tang S, et al. Efficacy and Safety of Sofosbuvir-based Regimens in Hepatitis C Patients With Decompensated Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. J Clin Transl Hepatol, 2023, 11(1): 144-155.
[24] 董菁, 高沿航, 刘嵘, et al. HBV/HCV 相关肝细胞癌抗病毒治疗专家共识(2021 年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(10): 2292-2302+2499-2506.
[25] Feld J J, Jacobson I M, Hézode C, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection[J]. N Engl J Med, 2015, 373(27): 2599-607.

核磁共振技术用于盐酸阿芬太尼注射液质量分析

黄滔[1]，吕振兴[2]，赵亚萍[2]，张许[1]，曾丹云[1**]，杜天鹏[2**]

（1.中国科学院精密测量科学与技术创新研究院，武汉 430071；2.湖北省药品监督检验研究院/湖北省药品检测与控制工程技术研究中心，武汉 430075）

摘要目的：建立核磁共振技术评价盐酸阿芬太尼注射液质量的新方法。**方法：**采集不同厂家盐酸阿芬太尼注射液的水峰压制 ^{1}H-NMR 和一维非去耦 HSQC，快速确定杂质信号，通过 2D NMR 鉴定其化学结构，进一步通过定量核磁氢谱对杂质进行定量分析。**结果：**采集并分析抽检样品的水峰压制 ^{1}H-NMR 和一维非去耦 HQSC 谱图，发现其中一个厂家产品在 2.2ppm 处有一明显杂峰，通过二维 HSQC 和 HMBC 确定杂质为丙酮，定量核磁测定其含量为 0.15%，进一步通过溯源分析确定该丙酮来源于原料药。**结论：**对于没有统一国家标准的高风险注射剂品种，利用核磁共振技术无差别响应的优点，可以迅速全面了解注射液中的化学成分和含量，用于注射液质量分析。该方法具有样品制备简单、检测化学成分全面、可同时进行定性和定量的优点。

关键词：核磁共振；盐酸阿芬太尼注射液；质量分析；定量分析；一致性评价

Quality analysis of alfentanil hydrochloride injection by nuclear magnetic resonance techniques

HUNG Tao[1], LU ZHEN-xing [2], ZHAO Ya-ping[2], ZHANG Xu[1], ZENG Dan-yun[1**], DU Tian-peng[2**]

（1. Innovation Academy for Precision Measurement Science and Technology, CAS, Wuhan 430071；2. Hubei Institute for Drug Control / Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control, Wuhan 430075）

Abstract Objective: To establish a new method for the quality analysis of alfentanil hydrochloride injection by nuclear magnetic resonance (NMR) techniques. **Methods:** Alfentanil hydrochloride injections were detected by water suppression ^{1}H-NMR, ^{1}H quantitative NMR, heteronuclear single-quantum correlation (HSQC) and

heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC). **Results:** A tiny sharp peak at 2.2ppm was shown on the NMR spectra acquired on the alfentanil hydrochloride injection from one manufacturer. 2D NMR analysis was further performed and the sharp peak was irrefutably identified as acetone. The concentration of acetone was determined as 0.15% of the injection through quantitative NMR analysis. At last, the origin of acetone was traced and confirmed that it was from the drug substance. **Conclusion:** As one of the high safety risk injection species, at present, there is no national quality standard for alfentanil hydrochloride injection in the pharmacopoeia. NMR technique can provide abundant chemical information about the molecular composition of alfentanil hydrochloride injection with the merit of unbiased signal response. NMR spectroscopy-based method has advantages of simple pretreatment of samples, fast analysis, rich chemical information and simultaneous qualification and quantification, which can be recruited as a regular tool for quality monitoring of injections.

Keywords： nuclear magnetic resonance(NMR); alfentanil hydrochloride injection; quality analysis; quantitative analysis; consistency evaluation

*湖北省药品监督管理局药品安全监管科研项目（No.20220123）

**通讯作者：杜天鹏 Tel:15102783953；E-mail：dtpwhale2019@163.com
曾丹云 Tel:19947650913；E-mail：zengdanyun@apm.ac.cn
第一作者：黄滔 Tel:18798092195；E-mail：huangtao@apm.com
吕振兴 Tel:15071145310；E-mail：150056467@qq.com

阿芬太尼为短效强镇痛药，属于阿片类药物。阿芬太尼作用于阿片 μ 受体而产生镇痛作用，是阿片类药物中起效最快，消除半衰期最短的强效药，呼吸抑制和恶心呕吐等副作用小，是目前外科临床上使用最广泛的麻醉药之一，适用于短时手术的麻醉和全身麻醉的诱导和维持[1]。

阿芬太尼只有注射剂一种剂型，1983 年在欧洲上市，1985 年在美国上市，我国于 2019 年由宜昌人福药业进行首仿，属于特殊管制药品中的麻醉药品。国内现有两家企业生产盐酸阿芬太尼注射液，另一家是江苏恩华药业。两个厂家执行的质量标准分别为各自企业拟定的标准，暂无统一的国家标准。

盐酸阿芬太尼注射液虽然已经使用 30 多年，但是进入国内时间比较晚，对其质量数据积累不足，注射剂又是国家重点监控的高风险剂型，引入新技术对注射剂进行质量分析，从新的角度可能会看到法检遗漏的信息。核磁共振技术与液相色谱相比，可以全面无损检测样品，且样品信号具有无差别响应的特点，可以更直观、更全面反映注射剂质量水平和批间差异。

^{1}H-NMR 用于原料药含量测定和杂质含量分析已经很常见，但鲜用于注射剂分析，原因如下：1.注射剂是水溶液，如果不进行水峰压制，观测不到有效成分信号，常用压水序列如 zgpr 或 noesygppr1d 往往会出现水峰压制不住或压制效果不理想，影响结果分析；2.注射剂中经常会添加辅料，辅料的信号会遮盖住目标信号，且辅料的卫星峰也会干扰分析。如果辅料用量很大，核磁增益都给了辅料，有效信号强度很低，如果对辅料采取多峰压制，会损失很多信号区域且基线可能有畸变。

近年来，已出现 NMR 应用于中药注射剂质量控制研究的报道[2, 3]。盐酸阿芬太尼注射液辅料只有氯化钠和调节 pH 的盐酸，非常适合核磁分析。本研究通

过简单的样品制备，采用高效水峰压制技术采集了国内不同厂家盐酸阿芬太尼注射液的 ^{1}H-NMR，直观地分析了注射液中的化学成分。结果显示该方法可以迅速直观地比较不同厂商产品的质量一致性，以及发现新杂质成分。

1.仪器与试药

1.1 仪器

所有 NMR 实验均在配备有超低温液氦 TCI-^{1}H/^{13}C/^{15}N 探头的 600MHz 液体核磁共振波谱仪（Bruker）上采集，操控软件为 TopSpin 3.5pl7；XP205 型万分之一天平（Mettler Toedo 公司）；超声波清洗机（长沙明杰仪器有限公司）。

1.2 试药

D_2O（99.9%）购自 Sigma； TSP（trimethylsilylpropionic）（氘代度：98%）购自 Sigma；盐酸阿芬太尼注射液购自宜昌人福药业和江苏恩华药业；盐酸阿芬太尼原料药由宜昌人福药业和江苏恩华药业提供。

2.方法

2.1 溶液制备

盐酸阿芬太尼注射液供试品溶液：450μl 盐酸阿芬太尼注射液加入 50μl D_2O 和 1μl 20mM TSP，涡旋混匀后转移到 5mm 核磁管。盐酸阿芬太尼原料药溶液：5mg 盐酸阿芬太尼用 500μl D_2O 溶解，超声 5 秒。两个厂家的样品均平行制备 2 份。两个厂家的盐酸阿芬太尼注射液浓度都是 0.5mg/ml，A 企业有 2ml 和 5ml 两个规格，B 企业是 2ml 规格。

2.2 NMR 分析条件

注射液的 ^{1}H-NMR 谱采用 Watergate-W5 序列[4, 5]，并引入“perfect echo”方法消除 J 调制引起的色散项[6, 7]。谱宽 16ppm，采样点数 64k，谱中心设置在水峰

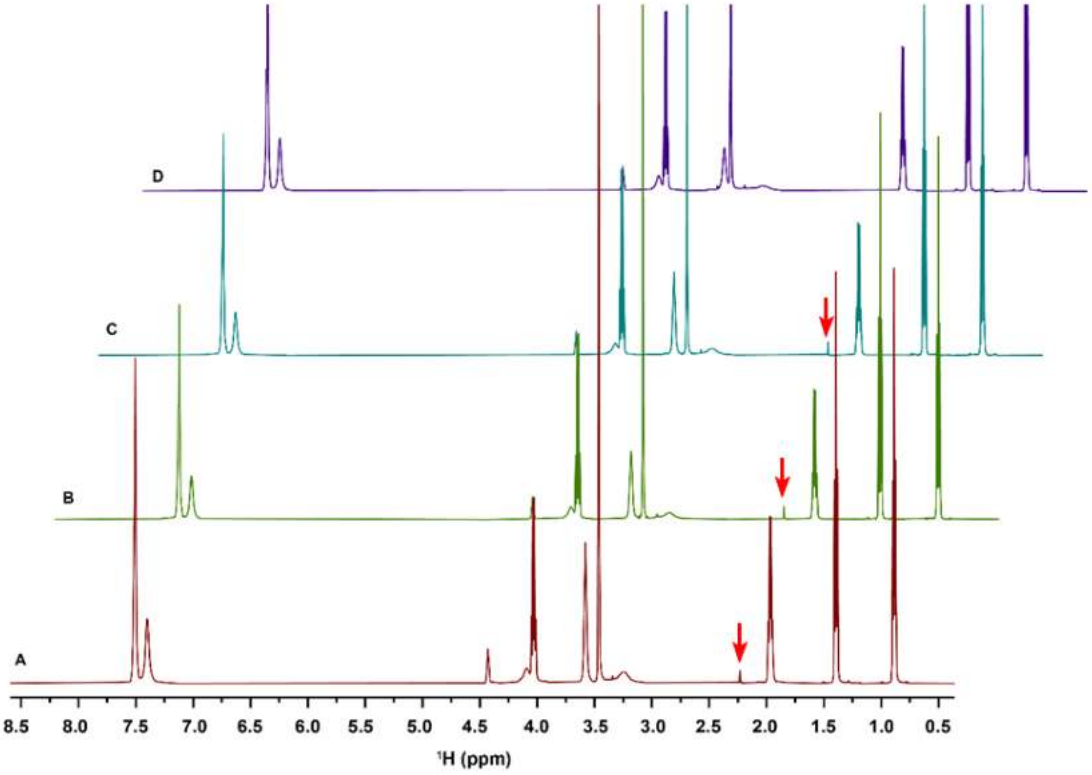
位置。循环延迟时间设置为 2s，空扫 4 次，累加 32 次。一维非去耦 HSQC 采用 CLIP-HSQC 脉冲序列[8]，谱宽 20ppm，采样点数 64k，谱中心设置在水峰位置，循环延迟时间设置为 2s，空扫 4 次，累加 128 次。^{1}H-^{13}C HSQC 实验使用 TopSpin 中的 hsqcetgpsp.2 序列，在采样阶段使用双水平 ^{13}C 绝热宽带去耦。HMBC 实验采用 J 过滤压制一键相关信号的 hmbcgplpndqf 序列，CNST13=8Hz，循环延迟时间设置为 1.5s。阿芬太尼各信号的 T1 值使用反转恢复法测试。定量核磁氢谱使用 zg 序列，循环延迟时间为 55s (>5T_1max)，累加 16 次。

谱图解卷积操作利用 Mestrenova(14.2.1)的线性拟合工具进行，选择的拟合峰型为“Genealized Lorentzian”。

3.结果

3.1 样品测定

两个厂家的盐酸阿芬太尼注射液的 ^{1}H NMR 叠加谱图见图 1，A 和 B 企业产品均在 3.3ppm 有一个小峰，距甲氧基 70Hz，推测 3.3ppm 处的峰可能为甲氧基的卫星峰或杂质信号。 A 企业三个批次产品在 2.2ppm 处有一尖锐的小杂峰，积分面积基本相同。而 B 企业在此处无峰，2.2ppm 化学位移一般为与氮或羰基相连的甲基。采集 HSQC 确认 2.2ppm 峰的碳化学位移为 30ppm（图 3A），氢谱其它位置没有与 2.2ppm 小杂峰强度相似的峰，表明没有氢氢耦合体系存在。将样品用氮气吹干，用 D_2O 重新溶解，采集 ^{1}H NMR，2.2ppm 处的小峰消失，表明该杂质是易挥发成分，结合文献报道的 NMR 数据推测该杂质峰是丙酮[9]。在 1.2ppm 和 3.7ppm 处可以认识出乙醇的甲基和亚甲基信号峰，但信号很弱。除上述杂峰外，^{1}H NMR 很干净，只能观测到几个毛刺杂峰，与法检数据中有关物质在万分之一水平一致。



A.A 企业批次 1 产品　B. A 企业批次 2 产品　C. A 企业批次 3 产品　D. B 企业产品

图 1. 盐酸阿芬太尼注射液 ^{1}H-NMR 叠加图.

Fig.1　Alfentanil hydrochloride injection ^{1}H-NMR overlap

3.2 卫星峰的快速识别

卫星峰对预估杂质含量很重要，左右对称的卫星峰面积之和占主峰的 1.07%，一个卫星峰的面积大概是 0.5%，可以用卫星峰估算杂质含量水平。虽然卫星峰可以提供含量估算的辅助，但是卫星峰信号往往与杂质峰强度相当，因此卫星峰识别至关重要。

采集样品的一维非去耦超高分辨率的 HSQC，与 ^{1}H NMR 谱图对比（图 2），可以明确指认出 3.3ppm 处的小峰是甲氧基的卫星峰，通过两张一维谱对比可以清晰明确高效地区别活性成分的卫星峰和杂质信号。

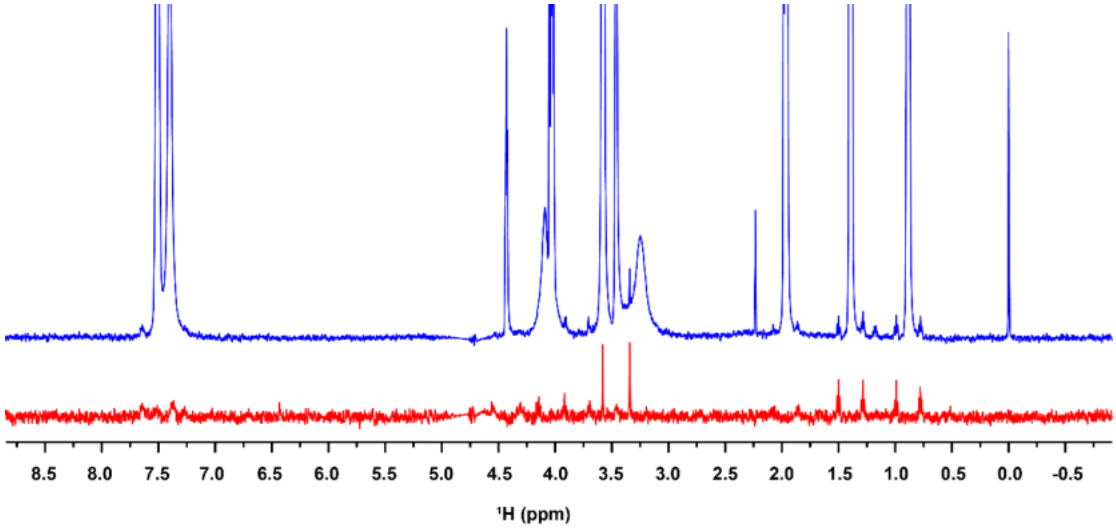


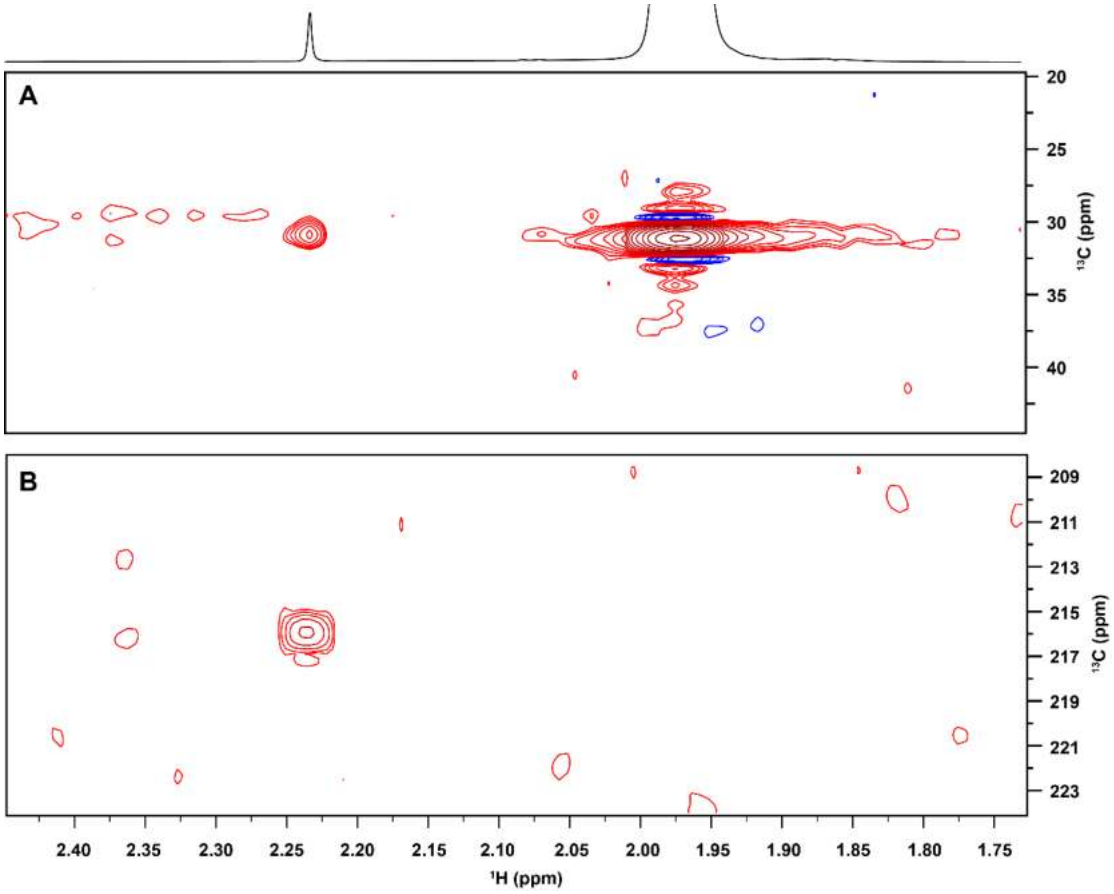
图 2. 盐酸阿芬太尼注射液 ^{1}H-NMR 和一维非去耦 HSQC 比对图

Fig.2 Alfentanil hydrochloride injection ^{1}H-NMR compare with 1D HSQC

3.3 杂质鉴别

为了确认 A 企业样品 2.2ppm 处杂峰的结构，采集了样品的 HMBC，215ppm 处的羰基碳与 2.2ppm 的氢有耦合，确证杂质是丙酮。

进一步追溯了注射液中丙酮的来源。丙酮是原料药产生过程中常用的有机试剂（在残留溶剂中属于低毒的第三类有机溶剂），将两个厂家盐酸阿芬太尼原料药溶液采集 ^{1}H-NMR，A 企业在 2.2ppm 处出了相同化学位移和强度的小杂峰，A 企业盐酸阿芬太尼原料药和盐酸阿芬太尼注射液小杂峰可以完美重叠在一起，而 B 企业原料药中无此信号。随后采集了 A 企业盐酸阿芬太尼原料药 HSQC 和 HMBC，与 2.2ppm 处氢相连的碳在 30ppm，HMBC 中 215ppm 处的羰基碳与 2.2ppm 的氢有耦合，与盐酸阿芬太尼注射液谱图完全吻合。表明盐酸阿芬太尼注射液中的丙酮来自原料药，而非制剂过程。



A.盐酸阿芬太尼注射液 ^{1}H-^{13}C HSQC　　B. 盐酸阿芬太尼注射液 ^{1}H-^{13}C HMBC

图 3. 丙酮信号指认

Fig.3　Acetone structure elucidation

3.4 定量

对盐酸阿芬太尼原料药采集了定量核磁。丙酮峰下面有一个小鼓包，是哌啶环上的亚甲基旋转受阻峰展宽所致，旋转受阻可以通过采集升温核磁消除，但是在升温核磁的温度条件下，丙酮会挥发，因此采用解卷积（deconvolution）的方法提取峰面积，根据定量公式[10]计算丙酮含量为 0.15%。盐酸阿芬太尼原料药和盐酸阿芬太尼注射液水峰压制 ^{1}H-NMR 中丙酮信号峰强度和面积基本相同，盐酸阿芬太尼注射液中丙酮含量也在 0.15%附近。

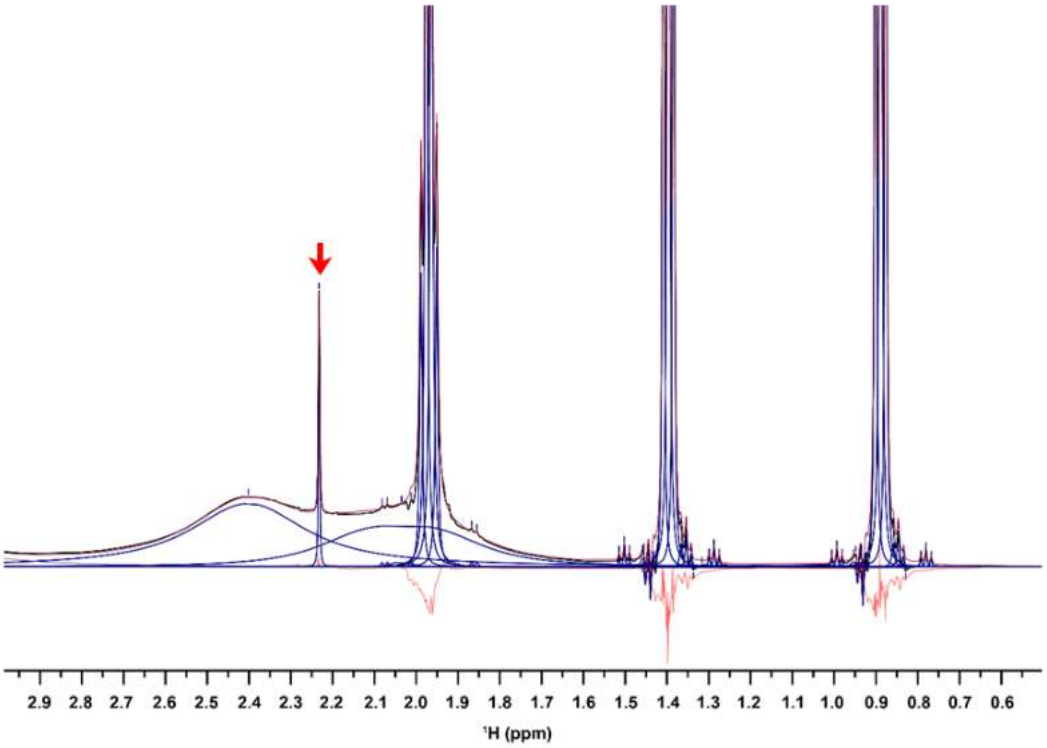


图 4. 原料中丙酮峰解卷积

Fig.4　Deconvolution of acetone peak from drug substance

4.讨论

用核磁采集注射液氢谱，最大的挑战是水峰压制，常用的序列是 zgpr 和 noesyppr1d, 对于含量在 0.5mg/ml 的盐酸阿芬太尼注射液, zgpr 水峰压制效果差，基本观测不到阿芬太尼信号，noesyppr1d 水峰压制效果比 zgpr 好，但阿芬太尼信号信噪比差，谱图无法用于质量分析。本研究采用的 Watergate-W5 序列，并引入“perfect echo”方法消除 J 调制引起的色散项序列, 水峰压制效果, 基线平整，信号信噪比高，使核磁方法可以用于盐酸阿芬太尼注射液质量分析。

核磁谱图中由于 ^{13}C 耦合出现的卫星峰（0.5%）会给辨识杂质峰带来干扰，一般的做法是采集 HSQC 和非去耦 HSQC，两张谱图和 ^{1}H NMR 对比，识别主峰的卫星峰，但二维谱非去耦 HSQC 分辨率低，对于卫星峰附近有几个小杂峰的情况，依然会遇到无法精确识别卫星峰的问题。本研究采用一维超高分辨率

HSQC 可以精确识别卫星峰，不会出现模棱两可无法裁断的情况，且采样时间明显短于二维非去耦 HSQC。

定量核磁的信噪比在 100 或 150 以上定量结果才会准确，这一点和液相定量对信噪比的要求不同。本研究采用 zg 序列对盐酸阿芬太尼原料药定量。对注射液进行严格定量需要用 zg 或 zgpr，但 zg 无法压水，zgpr 压水效果不好，无法使用。文献中有使用 noesyppr1d 定量，但严格来说 noesyppr1d 不是定量脉冲，计算结果会有一定误差。本研究中使用的氢谱脉冲和 noesyppr1d 类似，也不是定量序列，无法用于绝对定量，可以做相对定量。我们使用采集了注射液的定量核磁谱图（循环延迟时间为 55s），丙酮计算的结果也约为 0.15%。

传统的液相方法是一个分离手段，样品中的杂质可能在色谱柱上没有保留，或信号响应弱，无法全面监控样品的全貌。国家抽检品种经常会遇到没有统一的国家标准，企业各自执行国家局批准的自拟标准。和药品安全密切相关的有关物质，企业自拟的实验条件往往相差较大，无法比较全国同类品种的质量。核磁共振技术使用最广泛的是氢谱，药物分子（除金属药物外）基本都含有氢原子，氢谱中的峰面积在无旋转受阻和化学交换的情况下，只与氢原子数目有关，且所有信号具有无差别响应的优点。西药的化学成分单一，谱图简单，^{1}H 谱检测灵敏较高，可以快速检测微克级以上的成分，因此可用于快速监测杂质和污染物成分，尤其适合作为比较同类药品质量高低优劣的一把客观尺子，作为现有检测标准中的补充。

核磁共振技术与质谱、紫外等检测手段相比，具有灵敏度低的缺点。但是 NMR 检测具有非样品破坏性，检测信号可以通过多次累加实现增强。随着高场谱仪和液氦超低温探头的普及、高灵敏度和快速采样序列的出现，核磁检测灵敏

度大大增强，数分钟时间内即可以采集微克级样品的信号并定量[11, 12]。

本研究检测出盐酸阿芬太尼注射液中有微量丙酮。有机溶剂对人体具有刺激、麻醉和中毒等危害，根据 2020 年版《中国药典》四部规定，原料药和制剂均应严格限制有机溶剂的残留量以保证用药安全。本研究用核磁共振技术检测出盐酸阿芬太尼注射液中丙酮含量为 0.15%，静脉注射剂直接入血，应该有比口服药更严格的有机溶剂残留量要求，这一点应该引起关注，进一步研究注射剂中残留溶剂的毒理效应。

参考文献

1. 王金伙，郭建荣, 阿芬太尼的临床药理特性及其麻醉应用进展. 中国临床药理学与治疗学, 2021. **26** (7): p. 824-829
2. Li, W., et al., Quantitative profiling of comprehensive composition in compound herbal injections: An NMR approach applied on Shenmai injection. Phytochemical Analysis, 2022. **33**(7): p. 1045-1057.
3. Li, W., et al., Development of a comprehensive method based on quantitative 1H NMR for quality evaluation of Traditional Chinese Medicine injection: a case study of Danshen Injection. Journal of Pharmacy Pharmacology, 2022. **74**(7): p. 1006-1016.
4. Liu, M., et al., Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. Journal of Magnetic Resonance, 1998. **132**(1): p. 125-129.
5. Wang, J., et al., The impact of pulse duration on composite WATERGATE pulse. Journal of Magnetic Resonance, 2010. **206**(2): p. 205-209.
6. Aguilar, J.A., et al., Spin echo NMR spectra without J modulation. Chemical Communications, 2012. **48**(6): p. 811-813.
7. Adams, R.W., et al., “Perfecting” WATERGATE: clean proton NMR spectra from aqueous solution. Chemical Communications, 2013. **49**(4): p. 358-360.
8. Enthart, A., et al., The CLIP/CLAP-HSQC: Pure absorptive spectra for the measurement of one-bond couplings. Journal of Magnetic Resonance, 2008. **192**(2): p. 314-322.
9. Fulmer, G.R., et al., NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. Organometallics, 2010. **29**(9): p. 2176-2179.
10. Bharti, S.K. and R. Roy, Quantitative 1H NMR spectroscopy. TrAC Trends in

Analytical Chemistry, 2012. **35**: p. 5-26.
11. Krunić, A. and J. Orjala, Application of high-field NMR spectroscopy for characterization and quantitation of submilligram quantities of isolated natural products. 2015. **53**(12): p. 1043-1050.
12. Molinski, T.F., NMR of natural products at the ‘nanomole-scale’. Natural Product Reports, 2010. **27**(3): p. 321-329.

畲药小香勾治疗痛风性关节炎有效部位筛选及作用机制研究

黄玉龙[1]，林小惠[1]，林敏华[1]，艾克拜尔·热合曼[2]，汪余嘉[1]，钟弟[1]，肖冰颖[1]，张江源[1]，张玲玲[1]，陈子春[1*]，聂雪坤[1*]

（1. 宁德师范学院附属宁德市医院药学部，福建 宁德 352100；2. 宁德师范学院医学院药物化学系，福建 宁德 352100）

【摘要】目的：筛选小香勾治疗痛风性关节炎（Gouty arthritis，GA）活性部位并进行疗效验证，初步探索其对 GA 的作用机制。**方法：**MTS 法筛选小香勾抗炎的药物浓度；酶联免疫吸附法（ELISA）法检测巨噬细胞模型及 GA 大鼠踝关节滑膜组织中 IL-1β、TNF-α 表达量；根据大鼠关节肿胀程度及步态行为学评分评价小香勾乙酸乙酯有效部位对 GA 大鼠的治疗效果；苏木素-伊红（HE）染色观察 GA 大鼠踝关节的组织病理学变化；HPLC-MS/MS 技术检测小香勾乙酸乙酯有效部位中主要化学成分；网络药理学筛选小香勾乙酸乙酯有效部位相关成分治疗 GA 的可能信号通路；实时荧光定量 PCR 法检测小香勾乙酸乙酯有效部位对 RAW264.7 细胞炎症模型 TLR4/MYD88 通路相关基因的 mRNA 表达。**结果：**小香勾乙酸乙酯有效部位可降低 RAW264.7 细胞 TNF-α 的表达量；小香勾乙酸乙酯有效部位可降低 GA 大鼠关节组织 TNF-α 和 IL-1β 表达量，改善关节滑膜组织的病理组织结构学变化；小香勾乙酸乙酯有效部位可降低 RAW264.7 炎性细胞模型 TLR4/MYD88 信号通路相关基因的 mRNA 表达。**结论：**小香勾乙酸乙酯有效部位对 GA 有防治作用，其作用机制与 TLR4/MYD88 信号通路相关。

【关键词】畲药，小香勾，RAW264.7 炎性细胞，TLR4/MYD88 信号通路，痛风性关节炎

Screening of effective parts of She Medicine Xiaoxianggou and studying its mechanism in the treatment of gouty arthritis

【Abstract】Objective: To evaluate the effectiveness of Xiaoxianggou in treating gouty arthritis and investigate its mechanism of action on GA. **Method:** MTS method was used to screen the anti-inflammatory drug concentration of Xiaoxianggou；ELISA was used to detect the levels of IL-1β, and TNF-α in macrophage inflammation model and synovial tissue in rats；Evaluate the therapeutic effect of Xiaoxianggou ethyl acetate effective part on GA rats according to the degree of joint swelling and gait behavior score of rats.；The pathological changes of the joint tissue of GA rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining；HPLC-MS/MS technology was used to detect the main chemical components in Xiaoxianggou ethyl acetate effective part；The network pharmacology method was used to screening the possible signal pathway of the related components of Xiaoxianggou ethyl acetate effective part in the treatment of GA；Real-time fluorescence quantitative PCR method was used to detect expression of *TLR4/MYD88* pathway related mRNA in RAW264.7 cell inflammatory model of Xiaoxianggou ethyl acetate effective part. **Result:**

基金项目：2022 年宁德师范学院附属医院科研项目专项（2022Y1003）
2022 年宁德师范学院附属医院科研项目专项（2022Y1002）
2022 年福建省自然科学基金面上项目（2022J011220）

作者简介：黄玉龙，男，硕士在读，研究方向为中药药理学。Email：huangyl1118@163.com。
*通讯作者：陈子春，男，教授，硕士研究生导师，研究方向为临床药理学。Email：516602528@qq.com。

Xiaoxianggou ethyl acetate effective part can reduce the expression of TNF-α in RAW264.7 cells. Xiaoxianggou ethyl acetate effective part can reduce the expression of TNF-α and IL-1β in rats with gouty arthritis and improve the histopathological structural changes of joint synovium. Xiaoxianggou ethyl acetate effective parts can reduce the mRNA expression of TLR4/MYD88 pathway-related genes in RAW264.7 inflammatory cell models. **Conclusion:** Xiaoxianggou effective part of ethyl acetate has an certain therapeutic effect on GA，and its mechanism is correlated with TLR4/MYD88 signal pathway.

【**Keywords**】Traditional She medicine, Xiaoxianggou, RAW264.7 inflammatory cells, TLR4/MYD88 signaling pathway, gouty arthritis.

畲药小香勾，又名小康补，为桑科榕属植物条叶榕或琴叶榕的干燥根及茎，主要分布于福建、浙江等地[1]。因其具有祛风除湿，健脾止泻的功效，民间广泛用于关节疼痛、痛风等治疗[2]。痛风性关节炎（gouty arthritis）是机体尿酸长期过高导致尿酸钠（sodium urate，MSU）结晶沉积于关节组织的炎性代谢性疾病，严重者产生痛风性肾炎、肾结石、尿毒症等多种并发症，严重影响患者的生活质量[3]。目前治疗 GA 的主要药物有秋水仙碱、非甾体类抗炎药、糖皮质激素，但因副作用多、肝肾功能损害及停药后易复发等因素使用受限。中医认为痛风属“痹症”范畴，我国使用中医药治疗痛风有着悠久的历史。有研究表明，小香勾在治疗 GA 方面具有较好的临床疗效及安全性[4]，但对其药效物质基础及潜在药理机制研究鲜见报道[5]。因此，明确小香勾治疗 GA 的有效部位及药理作用机制可望为防治 GA 提供新的选择和策略。本研究选用 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型筛选小香勾抗炎有效部位，并建立 GA 大鼠模型验证其抗炎效果；此外，进一步使用液质联用和网络药理学技术进一步分析小香勾抗 GA 的药效活性成分及潜在作用机制，并进行初步的实验验证，以期为促进民族药物小香勾的开发应用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 实验细胞

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 实验动物

SD 大鼠，SPF 级，雌性，6 周龄，150~200 g，购自中国医学科学院医学实验动物研究所，许可证号 SCXK（京）2019-0008。所有大鼠适应性喂养一周后开始实验。本实验经宁德师范学院附属宁德市医院伦理委员会审批批准。

1.3 实验药材

畲药小香勾购自宁德市蕉城区北山村畲药种植示范基地，经闽东畲族中草药协会副会长兰福禄鉴定。药材经充分干燥、粉碎后，过 80 目筛备用。

1.4 实验试剂

没食子酸对照品（批号：G823638）、Folin-Ciocalteu 试剂（批号：P824172）无水碳酸钠（分析纯）、尿酸钠（U886060-5 g）、氢氧化钠（分析纯），均购自上海麦克林生化科技有限公司；无水乙醇（分析纯）、乙酸乙酯、氯仿、异丙醇（170802），均购自西陇科学股份有限公司；浓盐酸（T622-1989），成海化学工业，上海；DMEM 培养基（D6419-500 mL）Sigma；胎牛血清（PS-FB5-SA），Hyclone，美国； 0.25%胰蛋白酶（25200-056），Gibco，美国；PBS 缓冲液（PB180327），Procell，武汉；Mouse TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit（E-EL-M3063），Elabscience；MTS 试剂盒（G3581）、GoScript Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)（A2791）、Eastep qPCR Master Mix（LS2062）均购自 Promega，美国；DMSO（219605580），MP Biomedicals，美国；Rat TNF-α ELISA Kit（EK0526）、Rat IL-1 beta ELISA Kit（EK0393）均购自武汉博士德生物工程有限公司；乙腈（ACN）、甲酸（FA）、甲醇均购自 Fisher Chemical；TRNzol 总 RNA 提取试剂（DP424），TIANGEN，北京；小鼠 GAPDH 内参引物，10μM（B661304），生工，上海。

2 实验方法

2.1 小香勾有效部位制备

取小香勾粉末，使用正交实验法优化其提取工艺，对优化结果进行极差和方差分析，得到最佳提取条件为超声时间 30 min，提取次数两次，提取温度 70 ℃、乙醇体积分数 60 %、料液比 1:30。取所得小香勾醇提液，挥干乙醇后依次用乙酸乙酯、正丁醇、水萃取，萃取液旋转蒸发冷冻干燥得小香勾乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物冻干粉。冻干粉均用 DMSO 溶解后配置成不同浓度母液备用。

2.2 MTS 法检测细胞活力

RAW264.7 细胞用含 10 %胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。细胞按每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板，培养 24 h 后，将细胞分为空白对照组、DMSO 溶剂对照组、小香勾乙酸乙酯相组、小香勾正丁醇相组、小香勾水相组。空白对照组及 DMSO 溶剂对照组仅加入无血清 DMEM 高糖培养基，药物处理组加入对应浓度的含药培养基；37 ℃下继续孵育 6 h；吸弃上清，对照组处理同前，余下各组均更换为含 MSU 400 μg/mL 的 DMEM 高糖培养基继续培养 24 h；吸弃上清，按 MTS 试剂盒检测细胞活力。

2.3 ELISA 法检测细胞炎症因子表达水平

细胞培养同 2.3，培养 24 h 后，将细胞分为空白对照组、模型组、小香勾乙酸乙酯相组，小香勾正丁醇相组、小香勾水相组。收集各组细胞上清液，按照试剂盒说明书检测炎症因子 TNF-α 表达量。

2.4 qRT-PCR 检测 TLR4、MYD88、NF-κB、TNF-α、IL-1β mRNA 基因表达

按“2.3”项下给药干预细胞，采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA，检测总 RNA 浓度和纯度；取 5 μg RNA 按试剂盒逆转录为 cDNA；以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应，反应体系与反应条件均按照试剂盒说明书进行操作。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。PCR 引物由上海生工公司合成，引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

Genes		Primer sequence (5’→3’)
TLR-4	Forward	AATGAGGACTGGGTGAGAAATG
	Reverse	GCAATGGCTACACCAGGAATA
MYD88	Forward	AGCAGAACCAGGAGTCCGAGAAG
	Reverse	GGGCAGTAGCAGATAAAGGCATCG
NF-κB	Forward	GGGGATGTGAAGATGTTGC
	Reverse	GGATGATGGCTAAGTGTAAGA
IL-1β	Forward	CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC
	Reverse	TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGTAC
TNF-α	Forward	
	Reverse	ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA

2.5 动物实验

2.5.1 实验分组与造模

SPF 级 6 周龄雌性 SD 大鼠 48 只适应性饲养一周后，随机数字表法分为正常组、模型组、秋水仙碱组（0.3 mg/kg）、小香勾乙酸乙酯有效部位给药组[3.125、6.25、12.5 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$]，每组 8 只，灌胃给药每组 8 只，连续 7 天。第五天给药后，于大鼠右后踝关节外侧后方注射 100 μL MSU 溶液（25 mg/mL）入关节腔造模，空白组和模型组注射等量生理盐水。

2.5.2 关节肿胀程度的评分

对大鼠右后踝关节周围上下 3 mm 进行剃毛，减少对测量值的干扰。用记号笔在大鼠右后踝关节下 1 mm 处进行标记。分别于踝关节注射尿酸钠溶液造模前和造模后的 1、12、24 和 48 h 用缚线法来测量标记处的周径，重复测量 3 次。

2.5.3 步态行为学评分

在注射尿酸钠晶体 24 h 后进行步态行为学评分检测，评分标准为：0 分为正常步态；1 分为正常跛行，给

药部位肢体略微弯曲；2 分为中度跛行，受试肢体刚触及地面；3 分为重度跛行，受试肢体离开地面，三足着地行走。

2.5.4 ELISA 法检测大鼠关节滑膜组织中 IL-1β、TNF-α 含量

大鼠第 7 天灌胃 3 h 后断颈处死，在右后踝关节上方 0.5 cm 左右处剪断，于冰浴上去除毛皮等，加入适量液氮研磨，再加入生理盐水在冰上用组织匀浆器研磨充分，以 4 ℃、3000 rpm 条件下离心 10 min，吸取上清液，-80 ℃保存。两种炎性因子 IL-1β、TNF-α 的含量按照对应的 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

2.5.5 大鼠踝关节病理组织学检查

将踝关节组织固定好后放入包埋盒中，用 4 %福尔马林溶液中固定 24 h；将固定完成的组织进行修片处理，然后用清水冲洗固定剂后放入脱水机过夜脱水；将脱水好的组织进行石蜡包埋，石蜡切片；后进行 HE 染色，显微镜观察拍照。

2.6 LC-MS/MS 分析

2.6.1 样品处理

精密称取小香勾乙酸乙酯有效部位冻干粉 50 mg，溶于 400μL 冷甲醇（含内标），涡旋振荡 2 min；4 ℃条件下研磨 4 min，并使用超声探头萃取 30 min，使其提取充分；离心取上清液于新的 EP 管中，进行正、负离子模式分析。

2.6.2 色谱条件

正离子模式:色谱柱采用美国 Waters 公司 BEH C8 柱（1.7 μm，2.1×100 mm）；流动相：A 相为水，B 相为乙腈；柱温 50 ℃；流速 0.35 mL/min；洗脱条件：0~1min，5 % B；1~27.5min，100 % B；27.5~30min，5% B。

负离子模式:色谱柱采用美国 Waters 公司 HSS T3 柱（1.8 μm，2.1×100 mm）；流动相：A 相为水，B 相为 95 %甲醇；柱温 50 ℃；流速 0.35 mL/min；洗脱条件：0~1min，5 % B；1~22min，100 % B；22~25min，5% B。

2.6.3 质谱条件

正离子模式：采用加热电喷雾离子源正/负离子模式。Spray Voltage (kV): -3.0; Aux gas heater temperature (℃): 350; Sheath gas flow rate (Arb): 35; Aux gas flow rate (Arb): 8; S-lens RF level: 50; Mass range (m/z): 70-1050, Full ms resolution: 70000; MS/MS resolution:17500; TopN: 5; NCE/stepped NCE:20,40.

2.6.4 活性成分及靶点筛选

通过对小香勾乙酸乙酯有效部位质谱数据进行分析，结合 TCMSP 数据库（https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）平台，鉴定其主要化学成分。以药物相似性（drug-like properties，DL）＞0.18 和口服生物利用度（oral bioavailability，OB）＞30 %为评分标准，筛选主要潜在活性成分。将各潜在活性成分输入到化合物数据库 PubChem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）中进行检索，获得各成分的 2D 结构；将各成分的 2D 结构导入到 Swiss Target Prediction 数据库（http://swisstargetprediction.ch/）中，选择“pecies”为“homo sapiens”，获得潜在药物作用靶点。

2.6.5 痛风靶点的获取

将以“gout arthritis”作为检索关键词，分别从 OMIM 数据（https://omim.org/）、GeneCards 数据库（https://www.genecards.org/）、DisGeNet 数据库（https://www.disgenet.org/）、CTD 数据库（https://ctdbase.org/）等获得疾病靶点。筛选 GeneCards 数据库中相关性得分＞1 的靶点，以及 DisGeNet 数据库评分大于 0.2 的靶点。合并所有获得的靶点，并去除重复的靶点。

2.6.6 PPI 网络的构建及关键靶点的获取

通过仙桃学术在线工具（https://www.xiantao.love/products）取交集，获得小香勾乙酸乙酯有效部位治疗 GA 的潜在靶点。通过 String 数据库（https://string-db.org/）构建共同靶基因蛋白互作网络。将蛋白互作数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件，利用 Cytoscape 软件中 cytoHubba 插件，根据最大团中心性（maximal clique centrality，MCC）分数筛选核心靶点。最大团中心性数值越大，说明这个基因在网络中的作用越重要。

2.6.6 GO 功能及 KEGG 分析

用 R 4.1.3 对 PPI 网络中的靶点基因进行基因本体（Gene ontology, GO）分析和京都基因与基因组百科全书

（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）分析。以 P<0.05 和 Q<0.05 为显著性标准，筛选排名前 10 生物过程（Biological Process，BP）、细胞组成（Cell Component，CC）、分子功能（Molecular Function，MF）和信号通路进行可视化分析，结果以柱形图表示。

2.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 绘制统计图表，SPSS 26.0 统计软件分析数据，计量资料采用均数（Mean）±标准差（SD）表示。所有数据正态性检验采用 Shapiro-Wilk 评估，方差齐性检验采用 F 检验评估，数据组间差异比较采用单因素方差分析（ANOVA），通过 LSD 检验（方差齐）或 Games-Howell 检验（方差不齐）进行两两比较，P＜0.05 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小香勾各萃取物对 RAW264.7 细胞活力的影响

小香勾不同浓度的不同萃取部位干预细胞 24 h，MTS 法检测细胞活力。与对照组相比，小香勾乙酸乙酯相和正丁醇相在 0~40 μg/mL、水相在 100-400μg/mL 范围内对 RAW264.7 巨噬细胞存活率无明显影响，差异无统计学意义（P＜0.05），可用于后续实验（图 1）。

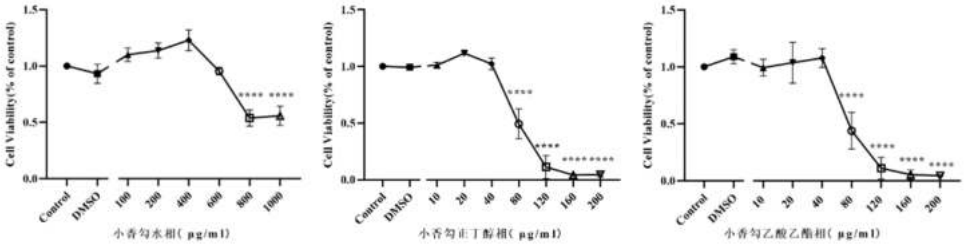


图 1 小香勾各萃取物对 RAW264.7 细胞活力的影响

Figure 3 Xiaoxianggou different extraction sites on viability of RAW264.7 macrophages.

$^{*}P$<0.05, $^{****}P$<0.0001 compared to control group.

3.2 小香勾各萃取物对炎症模型 RAW264.7 细胞 TNF-α 表达的影响

不同浓度 MSU 晶体干预细胞 24 h，ELISA 测定 TNF-α 表达水平。结果显示，与对照组相比，100-600 μg/mL MSU 处理细胞 24 h 后各组 TNF-α 表达水平均明显升高，差异有统计学意义（P<0.001)。其中 400-600 μg/mL MSU 组上升趋势减缓，可能与高浓度 MSU 对细胞活力产生影响有关，故选用 400 mg/L MSU 晶体干预巨噬细胞 24 h 构建炎症模型（图 2）。

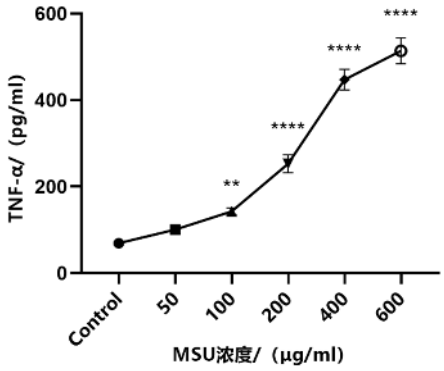


图 2 MSU 晶体促进 RAW264.7 细胞 TNF-α 表达

Fig 2 MSU crystal stimulating the expression level of TNF-α in RAW264.7 cells.

$^{**}P$<0.001, $^{***}P$<0.0001.

小香勾不同浓度的各萃取部位干预细胞 6 h，ELISA 测定 TNF-α 表达水平。结果发现，与 Model 组相比，小香勾乙酸乙酯相降低 MSU 诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生的 TNF-α 水平，其中 40 μg/mL 降低最为显著（P<0.01）。相反，小香勾水相和正丁醇相各浓度则促进巨噬细胞 TNF-α 的表达（P<0.0001）。因此，鉴于小香勾乙酸乙酯相对 MSU 诱导的炎症因子水平升高具有抑制作用,后述拟定此部位进行重点研究（图 5）。

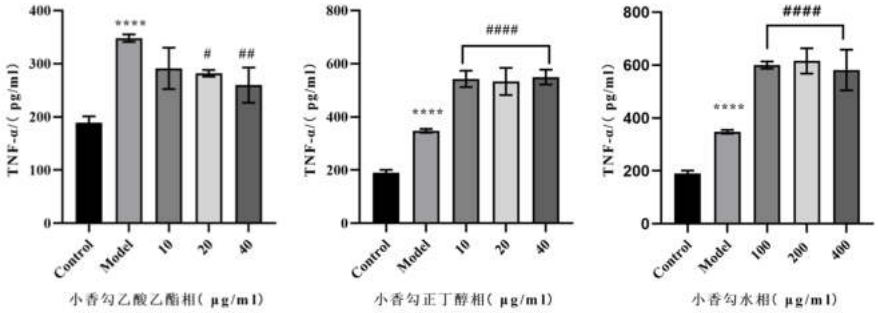


图 3 小香勾萃取部位对 RAW264.7 TNF-α 表达的影响

Figure 3 Effects of Xiaoxianggou extraction sites of TNF-α produced by RAW264.7 macrophages. $^{****}P$<0.0001 compared to control group. $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01, $^{\#\#\#\#}P$<0.0001 compared with model group.

3.3 小香勾乙酸乙酯有效部位降低 GA 大鼠足肿胀和步态评分

除空白对照组外，其余大鼠踝关节均注射 MSU 晶体，测定大鼠踝关节肿胀程度及步态行为学。结果证明，与空白组大鼠比较，Model 组大鼠在注射尿酸钠晶体 6 h 后大鼠出现明显的足肿胀（P＜0.05），12 h 后足肿胀达到高峰（P＜0.05），并持续至注射后 48 h（P＜0.05）。与 Model 组比较，12.5 g/（kg·d）小香勾乙酸乙酯有效部位干预可减轻尿酸钠晶体诱导 24 h 后的足肿胀程度（P＜0.05），且可明显降低注射尿酸钠晶体 24 h 后大鼠步态评分。秋水仙碱及小香勾乙酸乙酯有效部位不同浓度组均可降低痛风性关节炎大鼠的步态评分，其中高剂量组效果较为显著（P＜0.05）（表 2，表 3）。

表 2 小香勾乙酸乙酯有效部位降低痛风性关节炎大鼠足肿胀

Tab 2 Xiaoxianggou ethyl acetate effective part reduced paw swelling in rats with gouty arthritis

组别	剂量（g/kg·d）	大鼠踝关节周径（cm）				
		0h	6h	12h	24h	48h
空白	—	2.08±0.12	2.21±0.10	2.24±0.07	2.14±0.11	2.08±0.15
Model	—	2.06±0.05	2.73±0.12*	2.98±0.19*	2.83±0.14*	2.56±0.13*
秋水仙碱	0.0003	2.08±0.07	2.86±0.21	2.95±0.11	2.76±0.17	2.48±0.16
低剂量组	3.125	2.08±0.05	2.80±0.16	2.96±0.21	2.75±0.16	2.43±0.18
中剂量组	6.25	2.04±0.05	2.71±0.18	2.91±0.15	2.71±0.15	2.54±0.23
高剂量组	12.5	2.05±0.08	2.85±0.12	2.81±0.11$^{\#}$	2.64±0.12$^{\#}$	2.48±0.24

Compared to control group,* P<0.05. Compared with model group, $^{\#}P$<0.05.（$\bar{X}$±s，n= 8）

表 3 小香勾乙酸乙酯有效部位降低痛风性关节炎大鼠步态行为学评分

Tab 3 Xiaoxianggou ethyl acetate effective part reduced gait score in rats with gouty arthritis

组别	剂量（g/（kg·d））	步态评分（分）
空白	—	0.00±0.00
Model	—	2.50±0.53
秋水仙碱	0.0003	2.38±0.52

低剂量组	3.125	2.25±0.46
中剂量组	6.25	2.25±0.46
高剂量组	12.5	1.88±0.64*

Compared with model group, *P<0.05.（$\bar{X}$±s，n=8)

3.4 小香勾乙酸乙酯有效部位降低 GA 大鼠踝关节 TNF-α、IL-1β 表达

各药物治疗组分别给予不同剂量小香勾乙酸乙酯有效部位后，ELISA 检测踝关节组织 TNF-α，IL-1β 的表达量。结果发现，与空白组大鼠相比较，Model 组大鼠注射尿酸钠 48 h 后关节炎组织中 IL-1β、TNF-α，表达均显著升高（P＜0.0001)。与 Model 组相比，6.25 g/（kg·d）小香勾乙酸乙酯有效部位可显著降低大鼠关节炎组织中 IL-1β 的表达（P＜0.001)；3.125、6.25、12.5 g·/（kg·d）小香勾乙酸乙酯有效部位治疗可显著降低大鼠关节炎组织中 TNF-α 的表达（P＜0.01）（图 4)。

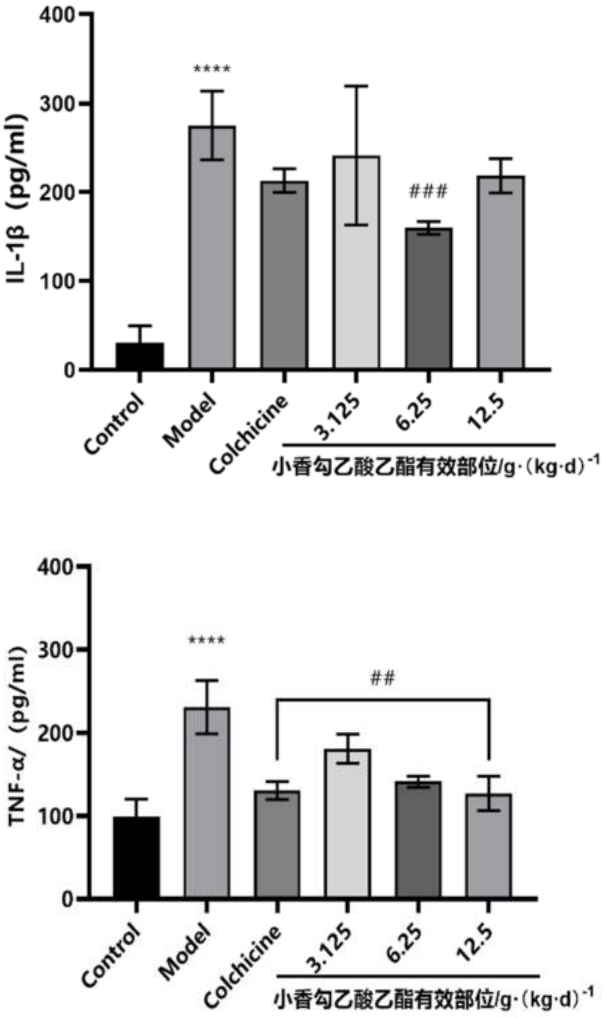


图 4 小香勾乙酸乙酯有效部位降低大鼠踝关节 IL-1β、TNF-α 的表达

Figure 4 Xiaoxianggou ethyl acetate effective part reduced IL-1β、TNF-α producted by Rat ankle.$^{****}P$<0.0001 compared to control group. $^{##}P$<0.01, $^{###}P$<0.001, compared with model group.

3.5 小香勾乙酸乙酯有效部位改善 GA 大鼠踝关节组织炎性病变

各药物治疗组分别给予不同剂量小香勾乙酸乙酯有效部位后，HE 染色观察大鼠踝关节病理组织变化情况。结果表明，正常组大鼠踝关节组织表面光滑，滑膜组织细胞分布均匀，无炎症细胞浸润；模型组大鼠关节炎性

反应明显，滑膜组织结构紊乱，有大量炎性细胞浸润；小香勾乙酸乙酯有效部位低剂量组大鼠关节周围组织增生较多，炎性细胞浸润较其余药物组明显。秋水仙碱组和小香勾乙酸乙酯有效部位中高剂量组的炎性细胞浸润较模型组减轻，周围软组织充血水肿好转；提示，小香勾乙酸乙酯有效部位与秋水仙碱均具有改善 GA 大鼠关节滑膜增生及炎症细胞浸润等作用（图 5）。

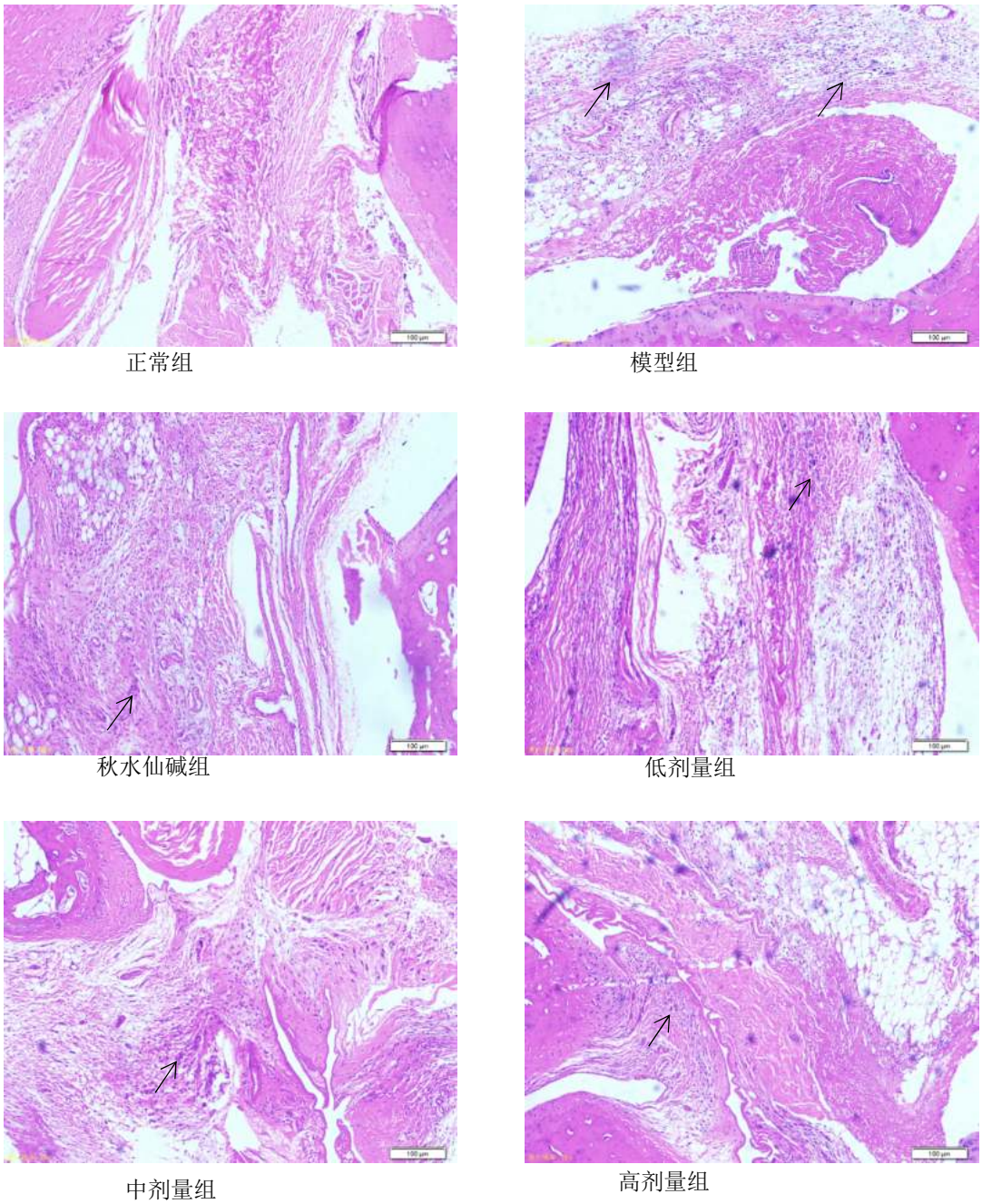


图 5 小香勾乙酸乙酯有效部位（不同剂量）降低大鼠踝关节组织炎性病变

Fig 5 Xiaoxianggou ethyl acetate effective part（different dosages）reduced histopathology of ankle joint in gouty arthritis rats.

3.6 LC-MS/MS 鉴定小香勾乙酸乙酯有效部位潜在活性成分

通过 LC-MS/MS 可得小香勾乙酸乙酯有效部位总离子流图（图 6），与文献及对照品比对及去重后取相对

含量前 25 %作为候选标志物[29]后共鉴定出 95 个化学成分，其中包括黄酮及其苷类、黄烷醇类、双黄酮、萜内酯类、有机酸类等。基于 TCMSP 数据库对候选化学物进行筛选共得到 14 个化合物（表 4）。

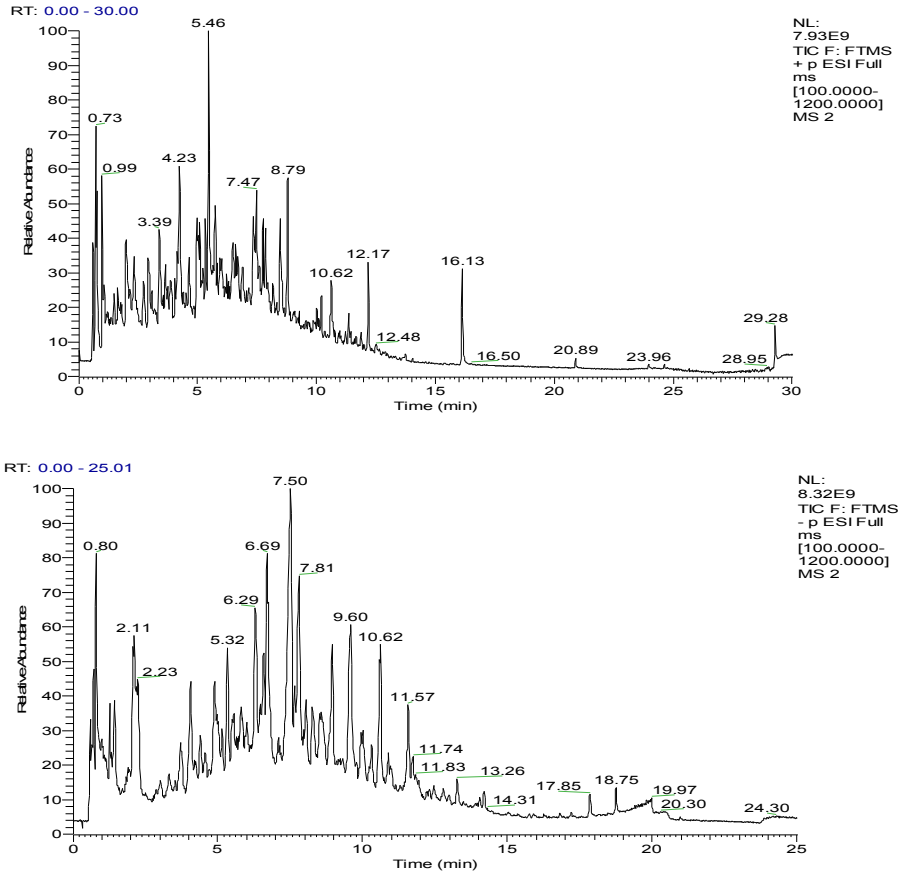


图 6 小香勾乙酸乙酯有效部位冻干粉的 LC-MS/MS 图谱

Figure 6 LC-MS/MS map of lyophilized powder at the Xiaoxianggou ethyl acetate effective part

表 4 小香勾乙酸乙酯有效部位冻干粉潜在成分鉴定

Tab 4 Identification of the potential components of lyophilized powder at the Xiaoxianggou ethyl acetate effective part

编号	保留时间/min	质量数	化合物	CAS 号	监测模式
1	4.25	290.29	儿茶素	-	正、负离子
2	3.00	290.29	表儿茶素	35323-91-2	正离子
3	8.78	271.26	花葵素	-	正离子
4	6.50	286.25	金鱼草素	5281220	正离子
5	3.21	302.25	槲皮素	-	正离子
6	6.48	304.27	五羟基二氢黄酮	78708-33-5	正离子
7	7.76	288.27	圣草酚	552-58-9	负离子
8	4.98	304.27	花旗松素	480-18-2	负离子
9	9.54	286.25	木樨草素	491-70-3	负离子
10	9.85	286.25	山柰酚	520-18-3	负离子
11	6.02	270.25	芦西定	-	正离子
12	14.04	246.28	紫花前胡内酯	-	负离子
13	5.10	302.3	橙皮素	-	正离子
14	2.78	302.25	6－羟基木犀草苷	-	负离子

3.7 小香勾乙酸乙酯有效部位治疗 GA 潜在靶点获取

通过 PubChem 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库共得到 198 个小香勾乙酸乙酯活性成分药物作用靶点。将药物作用靶点与 417 个 GA 靶点通过 Venny 图取交集，共得到 47 个交集靶点（图 7），即小香勾乙酸乙酯有效部位各活性成分治疗 GA 潜在靶点。

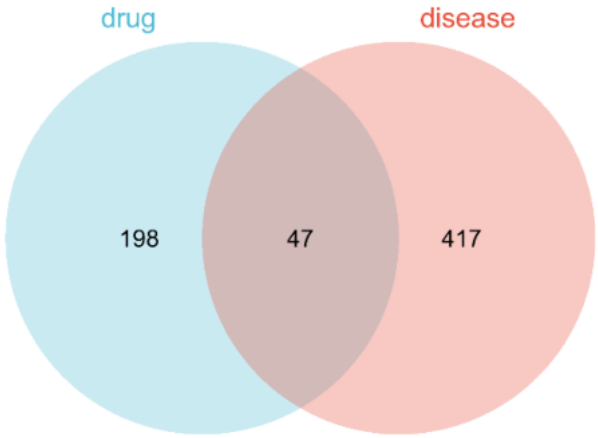


图 7 小香勾乙酸乙酯有效部位各活性成分与GA基因交集的Venn图

Figure 7 Venn diagram of the intersection of each active ingredient of Xiaoxianggou ethyl acetate effective part with GA gene

3.8 小香勾乙酸乙酯有效部位治疗 GA 核心靶点蛋白筛选

通过 String 数据库探索小香勾乙酸乙酯有效部位活性成分治疗 GA 的潜在作用靶点间的相互作用，共个 47 节点，期望边线值 46，实际 182 个边线，平均节点度 7.74，PPI 富集 *P*<1.0e-16。删除其中与网络无连接的节点后将靶点关系导入 cytoscape 软件，以度值为指标进行排序，结果显示 VEGF-α、MMP9、TLR-4、PTGS2、SRC、PPARG 等在网络中的度值较高（图 8）。

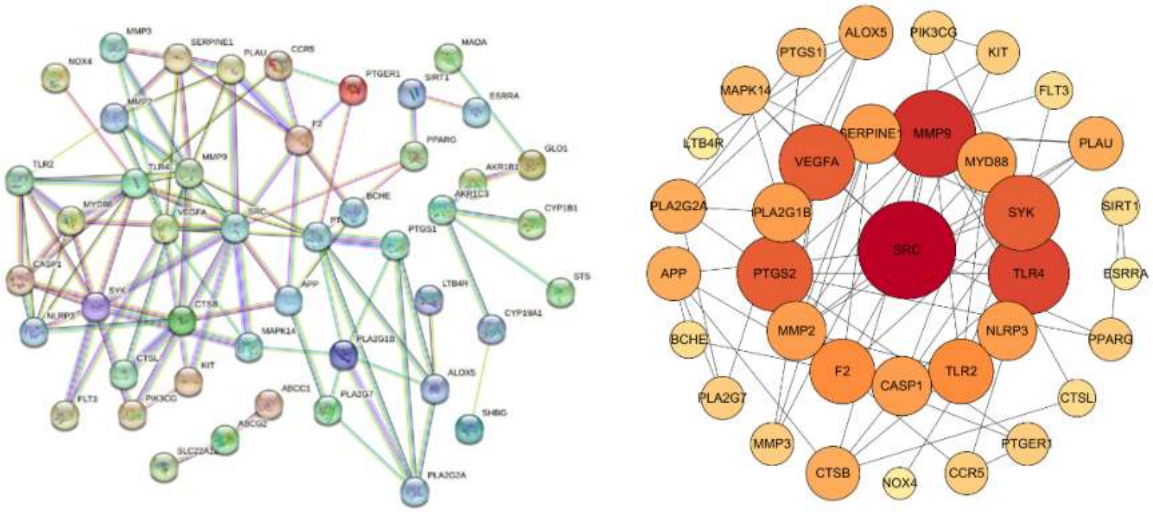


图 8 蛋白互作网络分析图

Figure 8 The PPI-protein interaction network was constructed for the screened 47 targets.

3.9 小香勾乙酸乙酯有效部位治疗 GA 作用靶点的 GO 和 KEGG 分析

采用 *p*adj<0.05 作为显著性富集的阈值，GO 功能富集分析结果涉及 2255 个生物过程，主要涉及炎症反应的调节、免疫应答细胞因子的产生、活性氧的代谢、免疫反应的淋巴细胞活化等；得到细胞组成相关的条目 79 个，主要涉及分子功能如炎症小体复合体、核内膜、细胞质囊泡、膜筏、膜微区等。分子功能相关的条目 149 个，主要涉及细胞因子受体结合、生长因子受体结合、DNA 结合转录因子、细胞因子活性、核激素受体结合、信号受体激活剂活性等（图 9）。KEGG 通路富集分析共得到 152 条信号通路，排名前 10 位的信号转导通路主要包括 TH17 细胞分化、NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路、磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B（PI3K/Akt）信号通路、FoxO 信号通路、类风湿性关节炎、NF-κB 信号通路等（图 9），结合文献及通路富集相关结果，选择 TLR-4/MyD88 信号通路进行后续研究。

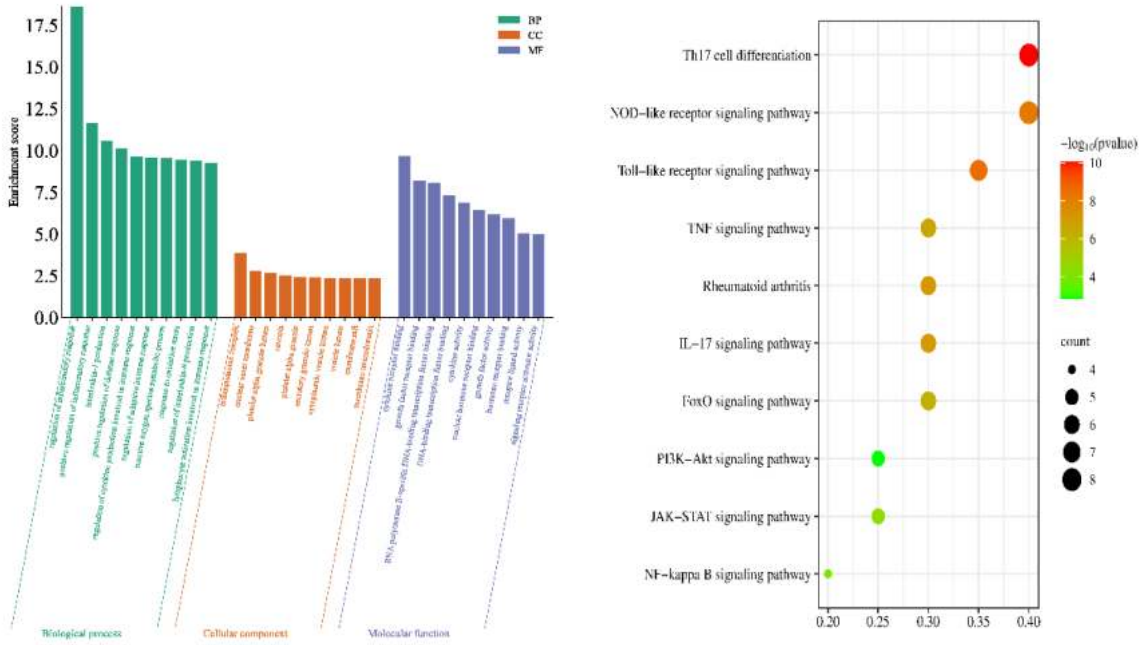


图 9 GO 富集分析和 KEGG 富集分析

Figure 9 GO functional enrichment analysis and KEGG enrichment analysis.

3.10 小香勾乙酸乙酯有效部位降低 TLR4/MYD88 通路相关基因 mRNA 表达

RAW264.7 巨噬细胞经不同浓度小香勾乙酸乙酯有效部位（10、20、40 μg/mL）干预 6 h 后，加入 400 μg/mL MSU 孵育 24 h，qRT-PCR 检测 *TLR4*、*MYD88*、*NF-κB*、*TNF-α*、*IL-1β* mRNA 表达。结果发现，与对照组相比，Model 组 *TLR4* 表达水平升高不明显，*MYD88*、*NF-κB*、*TNF-α*、*IL-1β* 的 mRNA 表达均显著上升（*P*<0.0001）。与 Model 组相比，20 μg/mL 中剂量组 *TLR4*、*MYD88*、*NF-κB*、*TNF-α*、*IL-1β* 表达水平均降低（*P*<0.05，*P*<0.0001，*P*<0.01，*P*<0.01，*P*<0.05）；与中剂量组相比，40 μg/mL 高剂量组的各基因 mRNA 表达显著降低（图 10）。说明小香勾乙酸乙酯有效部位治疗 GA 可能通过 TLR4/MYD88 通路发挥作用。

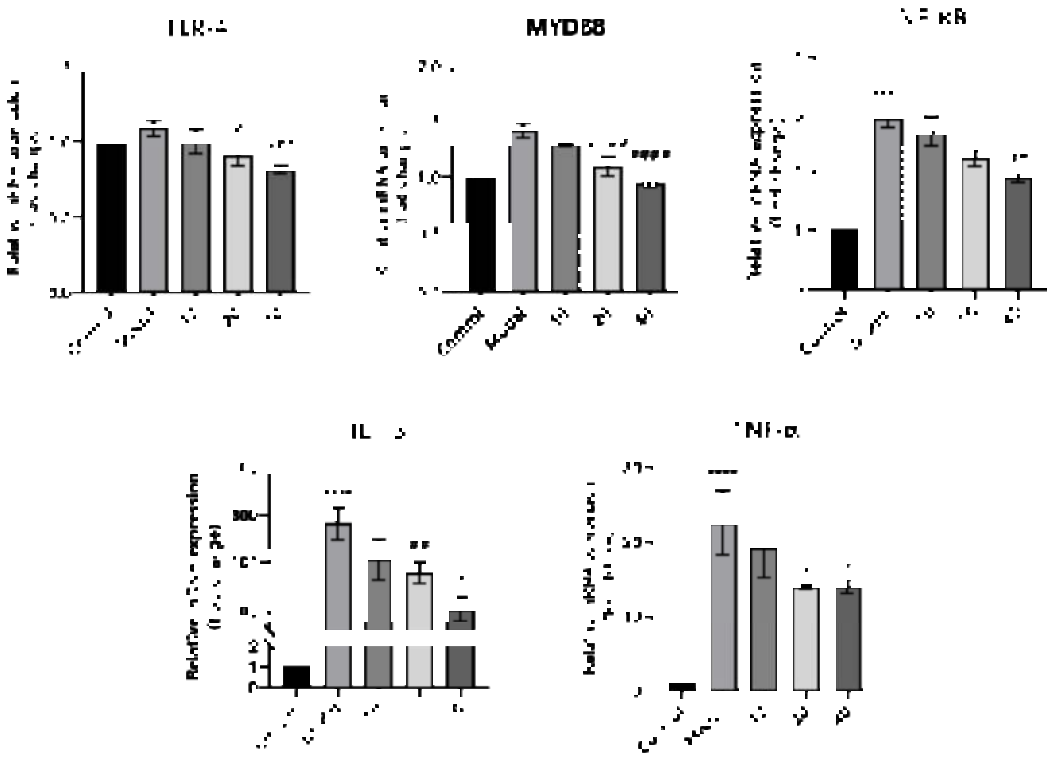


图 10 小香勾乙酸乙酯有效部位降低 RAW264.7 细胞 *TLR4*、*MYD88*、*NF-κB*、*TNF-α*、*IL-1β* mRNA 表达.

Figure 10 Xiaoxianggou ethyl acetate effective part reduced the level of *TLR4*、*MYD88*、*NF-κB*、*TNF-α*、*IL-1β* produced by RAW264.7 cell. $^{****}P$<0.0001 compared to control group. $^{\#}P$<0.01, $^{\#\#}P$<0.01, $^{\#\#\#}P$<0.001, $^{\#\#\#\#}P$<0.0001compared with model group.

4 讨论

痛风性关节炎（gouty arthritis，GA）发病机制不明，现有治疗药物不良反应较大。传统中医药、特别是民族医药在痛风的治疗领域尝试颇多，并被证实在治疗 GA 中优势显著[6, 7]。研究表明畲药小香勾在治疗 GA 方面有较好的疗效，但潜在的药理作用机制及有效部位鲜有报道[4]。

GA 的发病机制复杂，其中关节及周围软组织中沉积的 MSU 晶体被普遍认为是诱发 GA 的关键诱导因子[8]。当 MSU 晶体被病变部位巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞识别后，会释放以 TNF-α 为代表的炎症因子诱发炎症级联反应和关节损伤[9]。中药有效部位指中药中具有相似化学性质的一大类化合物集团。多个组分或多个中药有效部位协同作用则是构成中药发挥药效的关键[10]。不同极性溶剂萃取中药提取物是制备有效部位的常用方法。本研究在前期预实验的基础上，选用乙酸乙酯、正丁醇及水作为萃取剂制备各个可能有效部位进行后续研究。结果显示，经过药物细胞毒性筛选浓度后的小香勾乙酸乙酯萃取物（10、20、40 μg/mL）对 MSU 诱导的炎症因子水平升高有不同程度的抑制作用，且呈剂量依赖性。相反，小香勾正丁醇萃取物和水萃取物则可促进 TNF-α 表达升高，可能与正丁醇的极性较大导致提取物有溶剂残留造成溶剂假阳性效应、提取非有效成分及相关制备工艺不完善等各方面因素相关。

传统的 GA 动物模型是 Coderre 穿刺法，即向大鼠关节腔注射 MSU 混悬液诱导关节炎症的产生[11]。有、研究发现，由于大鼠关节间隙狭窄，传统 Coderre 穿刺法极易造成大鼠关节的机械损伤和液体渗漏，而沿大鼠踝后跟腱边缘与小腿轴线成 30-40 °深入注射不超过 100 μL 的药量可有效改善传统 Coderre 穿刺法的弊端[12, 13]。因此，本研究采用大鼠踝后跟腱内侧 30°-40°向下刺入关节腔注射 100 μL MSU 溶液（25 mg/mL），制备急性 GA 模型。结果表明，小香勾乙酸乙酯有效部位干预后，大鼠痛风性关节炎的踝部肿胀、关节病理损伤均明显减轻，关节组织中 TNF-α、IL-1β 表达量降低（P＜0.001），说明小香勾乙酸乙酯有效部位具有抑制 GA 的药理作用。

中药的组成成分复杂，即使是同一种药材在不同产地、气候、温湿度、采摘时间等条件下含有的成分及含量也不尽相同，因此对中药的组成成分进行鉴定和分析尤为重要。液质联用技术可应用于中药成分的定性定量分析，实现全组分鉴定，适合探索中药未知组分，广泛应用于中药代谢组学等领域。本研究应用 LC-MS/MS 技术测得 14 种小香勾乙酸乙酯有效部位可能的潜在活性成分，包括儿茶素、槲皮素、山奈酚等，其中以多酚类物质为甚。相关活性成分利用 PubChem 等在线数据库进行网络药理学分析，发现 TH17 细胞分化、Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路等和小香勾乙酸乙酯有效部位与抗痛风性关节炎密切相关。

Toll 样受体作为免疫系统重要的模式识别受体（pattern recognition receptors，PRR），其中 TLR4、TLR2 及下游衔接蛋白 MYD88 对炎症的发生发展起到重要作用。TLR4/MYD88 是目前针对 GA 发病机制研究较多的一条信号通路。TLR4 是机体免疫固有系统中识别病原相关分子（pathogen-associated molecular patterns，PAMP）非常重要的模式识别受体，在 MSU 的刺激下结合下游 MYD88 激活转录因子 NF-κB，启动炎性因子 IL-1*β* 的转录和表达，诱导炎症级联反应的发生[14]。本研究通过 qRT-PCR 检测 *TLR4/MYD88* 信号通路相关分子 *TLR4*、*MYD88*、*NF-κB*、*TNF-α*、*IL-1β* 的表达水平，证明小香勾乙酸乙酯有效部位可能通过调节 *TLR4/MYD88* 通路减少炎症因子的产生和释放发挥抗炎作用。

综上，本研究证实小香勾乙酸乙酯有效部位可抑制 MSU 晶体诱导的巨噬细胞炎症和大鼠痛风性关节炎，其机制可能与抑制 TLR4/MYD88 信号通路密切相关。

参考文献

[1] 王伟影, 毛菊华, 余华丽, 等. 畲药小香勾的质量标准研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(08): 1979-81+2075.

[2] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范 [J]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:13-14. .

[3] DALBETH N, GOSLING A L, GAFFO A, et al. Gout [J]. Lancet, 2021, 397(10287): 1843-55.

[4] 朱慧梅, 马睿杰, 俞坤强, 等. 浮针结合畲药小香勾治疗急性痛风性关节炎疗效观察 [J]. 新中医, 2018, 50(07): 211-4.

[5] 张王宁, 李爱平, 李科, 等. 中药药效物质基础研究方法进展 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(10): 761-4.

[6] ZHU X, SUN Y, ZHANG C, et al. Effects of berberine on a rat model of chronic stress and depression via gastrointestinal tract pathology and gastrointestinal flora profile assays [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(5): 3161-71.

[7] MARTINS DE Sá MüLLER C, COELHO G B, CAROLINA DE PAULA MICHEL ARAúJO M, et al. Lychnophora pinaster ethanolic extract and its chemical constituents ameliorate hyperuricemia and related inflammation [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 242: 112040.

[8] 宋霁翔, 褚福浩, 王鹏龙, 等. 中药药效物质基础的研究究现状与展望; proceedings of the 中华中医药学会中药化学分会第八届学术年会, 中国北京, F, 2013 [C].

[9] ZHOU F, MEI J, HAN X, et al. Kinsenoside attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating NF-κB/MAPK signaling and protecting chondrocytes [J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9(5): 973-85.

[10] LI S, LI L, YAN H, et al. Anti‐gouty arthritis and anti‐hyperuricemia properties of celery seed extracts in rodent models [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(5): 4623-33.

[11] CODERRE T J, WALL P D. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1988, 29(3): 461-6.

[12] 吕军, 方和金, 吴涛. 一种改进的痛风性关节炎大鼠模型制备方法 [J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(18): 17-21.

[13] 宋娟, 李清漪, 张奇, 等. 改良法制备大鼠痛风性关节炎模型 [J]. 中国当代医药, 2018, 25(31): 4-6.

[14] JOOSTEN L A, ABDOLLAHI-ROODSAZ S, DINARELLO C A, et al. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(6): 344-57.

橙皮素对 mRNA 疫苗的免疫增强作用及其机制研究

季阿芳

苏州大学附属传染病医院，江苏 苏州 215131

【摘要】目的：探究橙皮素作为 mRNA 疫苗的佐剂对其肿瘤预防作用产生的影响及其相关免疫机制。**方法：**利用微流控技术制备脂质纳米颗粒（lipid nanoparticles，LNPs），使其单独或同时负载 mRNA 和橙皮素；测定 mRNA-LNPs 负载橙皮素前后的粒径、包封率；利用流式细胞术等方法考察 DC 细胞对复合物的摄取与表达情况；将 C57BL/6 小鼠随机分为 PBS 对照组（NC 组）、橙皮素单药组（Hes 组）、OVA mRNA 单药组（mRNA 组）和橙皮素-mRNA 组（Hes-mRNA 组），分别于第 0 天和第 7 天皮下注射相应药物进行免疫，于第 1 次接种 28 天后，给小鼠皮下接种 E.G7 OVA 细胞造瘤并监测肿瘤生长趋势和小鼠生存情况；流式细胞术检测小鼠淋巴结中 CD4+、CD8+ T 细胞表达 IFN-γ 的水平，ELISA 检测小鼠血清中 OVA 特异性抗原 IgG（OVA-sIgG）的水平。**结果：**橙皮素-脂质纳米颗粒系统稳定，能实现 mRNA 的胞内递送。与 NC 组相比，Hes 组小鼠的生存期延长，差异具有统计学意义（$P<0.05$），mRNA 组和 Hes mRNA 组小鼠生存期延长，差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.0001$）；与 NC 组相比，mRNA 组和 Hes mRNA 组小鼠的肿瘤生长缓慢，差异具有统计学意义（P 均 <0.05）；与 mRNA 组相比，Hes mRNA 组小鼠肿瘤生长速度和生存期均有显著改善，差异具有统计学意义（P 均 <0.05）。与 NC 组相比，Hes 组小鼠的血清中 OVA-sIgG 的含量显著增高（$P<0.0001$）。**结论：**橙皮素作为中药佐剂可以通过静电吸附作用稳定地加入 mRNA-LNPs 系统，并且其自身具有肿瘤预防和诱导小鼠体液免疫作用，能显著延长荷瘤小鼠的生存时间，与 mRNA 联合使用还能有效减缓肿瘤生长，增强肿瘤预防作用。

【关键词】橙皮素；mRNA；预防；肿瘤；免疫

Study on the prevention of tumor by mRNA-LNPs loaded hesperetin

JI A-fang

Infectious Disease Hospital Affiliated to Soochow University, Jiangsu Suzhou 215131, China

【Abstract】Objective: To investigate the tumor prevention effect of hesperetin combined with mRNA-LNPs. **Methods:** Lipid nanoparticles loaded with mRNA or hesperetin were prepared via microfuidics by mixing the aqueous phase and ethanol phase. Particle size and encapsulation efficiency of complexes were determined once prepared. The uptake and expression of the complexes by dendritic cells were investigated by flow cytometry. C57BL/6 mice were randomly divided into PBS control group (NC group), hesperetin-LNPs group(Hes group)、OVA mRNA-LNPs group(mRNA group) and hesperetin OVA mRNA-LNPs group(Hes-mRNA group), then given drugs on day 0 and day 7, respectively. E.G7 OVA cells were inoculated 4 weeks after the first injection. Tumor volume of the mice were measured twice a week and stopped when it exceeded 2 000 mm^3. The levels of IFN-γ in $CD4^+$、$CD8^+$ T cells were detected by flow cytometry. The concentration of OVA-sIgG was detected by ELISA. **Results:** The delivery system is stable and capable of delivering mRNA into cells. Compared with NC group, Hes group prolonged the survival time($P<0.05$), mRNA group and Hes-mRNA group showed a significant delay of tumor growth($P<0.05$) and a modest prolongation of survival($P<0.05$, $P<0.001$). Compared with mRNA group, tumor growth rate and survival of Hes-mRNA group were significantly improved($P<0.05$). Compared with NC group, concentration of OVA-sIgG in Hes group mice was significantly increased($P<0.001$). **Conclusion:** Hesperetin can be stably added into the mRNA-LNPs system by electrostatic adsorption. Hesperetin may

enhance the immune effect of mRNA vaccines and be a promising adjuvant.
【**Keywords**】hesperetin; mRNA; prevention; tumor; immune

信使 RNA（messenger RNA，mRNA）是携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸，因其安全性、高效性正被开发为预防各类癌症及传染病的疫苗[1-4]。mRNA 经皮内、肌内或皮下注射后，主要通过转染（1）注射部位的体细胞，如肌肉细胞和表皮细胞；（2）注射部位附件的组织驻留抗原提呈细胞（Antigen presenting cells，APCs）；（3）进入淋巴结或脾脏，转染其中的驻留细胞发挥免疫效应[4]。然而，mRNA 的胞内递送较寡核苷酸困难，因为 mRNA 分子量较大且极其不稳定，容易被 RNase 降解，因此合适的递送载体有利于 mRNA 成功进入胞内发挥作用[1,5]。

脂质纳米颗粒（lipid nanoparticles，LNPs）是目前应用最成熟的 mRNA 递送载体，其通过静电吸附作用将呈电负性的核酸类药物负载于内[5-6]。LNPs 常见的脂质组成为可电离脂质、中性磷脂、胆固醇以及聚乙二醇连接的脂质（PEG-脂质）[7]。阳离子脂质具有带永久正电荷的头部基团，已应用于多种细胞类型中的 mRNA 递送[1,8]。有研究显示，阳离子脂质不仅可以与 mRNA 形成复合物，还可以刺激先天免疫反应，从而作为 mRNA 疫苗的免疫佐剂[9-10]。然而，阳离子脂质的正电荷会不可避免的增加机体的免疫原性和毒性。

橙皮苷和橙皮素是芸香科柑橘属植物果实的主要药效成分，其生物活性包括抗癌及基因毒性、抗氧化和消除自由基、抗细菌及微生物等[11]。有研究发现，橙皮素能成功负载于纳米脂质体中，且能够充当中药佐剂发挥抗肿瘤作用并增强机体免疫应答[12-13]。此外，橙皮素可在多种癌症类型中发挥作用，其能抑制乳腺癌细胞增殖，可诱导骨肉瘤细胞停滞于 G2 期，可有效抑制人肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移，并诱导细胞发生凋亡[14-15]。课题组前期研究发现，制备阳离子脂质体时加入橙皮素，可中和复合物表面负电荷，降低其表面电势[16]。基于此，本研究旨在探究橙皮素加入 mRNA-LNPs 中的肿瘤预防效果及其免疫机制，以期为临床开发高效、安全的中药佐剂提供依据。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物　雌性 C57BL/6 小鼠（6~8 周龄），购自常州卡文斯实验动物有限公司，饲养于苏州大学药学院动物中心 SPF 屏障。动物质量合格证编号：NO.202139490。出售单位许可证号：SCXK（苏）2016-0010。饲养单位许可证号：SYXK（苏）2017-0043。

1.1.2 细胞　E.G7-OVA 细胞，购自中国北纳细胞库；DC2.4 细胞，苏州大学药学院馈赠

1.1.3 试剂　橙皮素，购自中国源叶公司；DOTAP，DOPE，DMG-PEG2000，胆固醇，购自美国 Sigma 公司；eGFP mRNA，OVA mRNA，均购自美国 TriLink 公司；细胞培养试剂（PBS、DMEM 高糖培养基、胎牛血清等）均购自武汉普诺赛生命科技有限公司；流式抗体均购自 Biolegend 公司；Quanti-iT RiboGreen RNA reagent and Kit 试剂盒购自 Invitrogen 公司；抗原肽（OVA27-35、OVA208-216、OVA257-264、OVA323-339）均购自上海楚肽生物科技有限公司；小鼠卵清蛋白特异性 IgG 抗体试剂盒，购自上海酶联生物科技有限公司。

1.1.4 仪器　微流控仪器，苏州安拓思公司产品；Nicomp 激光粒度仪，倒置荧光显微镜，TEM 透射电镜，苏州大学药学院提供；全波长酶标仪，美国 TECAN 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 微流控技术制备 mRNA 疫苗　按照阳离子脂质:中性磷脂:胆固醇:PEG 脂质的摩尔比为 35:16:46.5:2.5 称取各脂质成分（含或不含橙皮素各 1 份）溶于乙醇，形成乙醇相；再将 mRNA（与阳离子质量比为 1:20）加入含有柠檬酸钠缓冲盐的溶液中，形成水相；将乙醇相和水相以 1:3 流速比通过微流控制备 mRNA-LNPs。制备完成后，4℃下使用分子量为 1000 的透析膜针对 PBS 透析 2 h 除去乙醇相，收集样品。

1.2.2 mRNA 疫苗的粒径表征　将收集的样品用纯水稀释 10 倍后，使用激光纳米粒度仪分别检测粒径，各样本重复检测 3 次；将稀释后的样品滴至铜网上，经过烘干、磷钨酸染色、洗涤、再烘干后，置于透射电镜下观察并拍摄图片验证粒径结果。

1.2.3 mRNA 包封率的检测　参照 Quanti-iT RiboGreen RNA reagent and Kit 厂家说明书检测 mRNA 的包封率。将

样品用 1×TE buffer 稀释至 5 μg/mL；取 50 μL 稀释后的样品加入 96 孔板的两孔中；向上述两孔中分别加入 50 μL 1×TE buffer、50 μL 2% Triton-X100，空白孔中加入 100 μL 1X TE buffer；96 孔板放入 37 ℃培养箱中孵育 15 min；取 10 μL RiboGreen RNA reagent 用 1×TE buffer 稀释 100 倍至 1 mL；分别向 96 孔板各孔中加入 100 μL 稀释后的 RiboGreen RNA reagent；设置酶标仪激发波长 480 nm，发射波长 520 nm 读取各孔荧光值；包封率=1－[（TE 样品孔荧光值-空白孔荧光值）/（Triton-X100 样品孔荧光值-空白孔荧光值）]×100%。

1.2.4 流式细胞术检测 DC2.4 细胞的摄取与转染效率 加入 FITC-DSPE-PEG2000 脂质制备复合物（FITC-LNPs、Hes FITC-LNPs），DC2.4 细胞适应性培养 24 h 后，分别与 2 种复合物孵育 4 h，流式细胞术检测细胞对 2 种复合物的摄取率；制备 eGFP mRNA-LNPs 和橙皮素 eGFP mRNA-LNPs，分别与 DC2.4 细胞孵育 48 h 后，于倒置荧光显微镜下观察荧光蛋白表达情况，并上流式细胞仪检测其转染效率。

1.2.5 T 淋巴细胞瘤小鼠预防模型构建 32 只 C57BL/6 小鼠适应性饲养一周后，随机分为 4 组，依次标记为 NC 组（皮下注射 PBS），Hes 组（皮下注射只负载橙皮素的 LNPs），mRNA 组（皮下注射 OVA mRNA-LNPs），Hes-mRNA 组（皮下注射橙皮素 OVA mRNA-LNPs），每组 8 只小鼠；分别于第 0 天和第 7 天给小鼠皮下接种相应药物（每只小鼠单次接种含 mRNA 10 μg，橙皮素 125 μg/mL）；第 28 天，给小鼠皮下注射 3.0×10^6 E.G7-OVA 细胞，肿瘤生长至可测量时，每 3 天测量小鼠肿瘤体积，观察小鼠生存状况，肿瘤体积超过 2 000 mm^3 则停止记录。肿瘤体积计算公式：$V=0.52*a*b^2$（a 为肿瘤长径尺寸，b 为肿瘤短径尺寸）。

1.2.6 流式细胞术检测特异性 T 细胞表达 取小鼠脾脏处理成单细胞悬液，细胞以 2.0×10^5/孔接种于 12 孔板，适应性培养 12 h；每孔加入肽段 OVA323-339，OVA257-264，OVA208-216 和 OVA27-35 (各 10 μg/mL)刺激处理 1 h 后，加入封闭剂 Brefeldin A，参照厂家说明封闭 11 h，孵育结束后，离心弃上清，加入 1 mL PBS 重悬；按照说明书分别标记活死细胞染料、Fc-block 以及膜抗体 CD3、CD4 和 CD8a 抗体；固定破膜后加入 IFN-γ 抗体孵育结束后，上流式细胞仪检测分泌 IFN-γ 的 $CD4^+$和 $CD8^+$ T 细胞情况，Flowjo 软件分析数据。

1.2.7 ELISA 检测血清中特异性 IgG 抗体含量 取血约 200 μL 于 EP 管中，在 37 ℃培养箱中静置 2 h 后，4 ℃，1 200 g，离心 10 min 收集血清；将标准品和 20 倍稀释的血清加入已包被抗原的 96 孔板中，37℃培养箱中孵育 1 h，加入 wash buffer 洗涤 5 次后，加入底物孵育 15 min，加入终止液终止反应，酶标仪设置吸收光 450 nm 处读板。

1.2.8 统计学处理 用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。数据间差异用 Student's t-test，two-way ANOVA 以及 Log-rank 进行分析。

2. 结果

2.1 橙皮素在不影响包封率的基础上使 mRNA 疫苗吸附更紧密

2.1.1 mRNA 疫苗的粒径表征 mRNA-LNPs 由 mRNA、胆固醇、DOTAP、DOPE 和 DMG-PEG2000 组成，其大致结构如图 1 所示。粒径仪测得 mRNA-LNPs 的粒径在 200~300 nm，Hes mRNA-LNPs 的粒径在 100~200 nm；透射电镜下可见，Hes mRNA-LNPs 略小于 mRNA-LNPs，详见图 2。

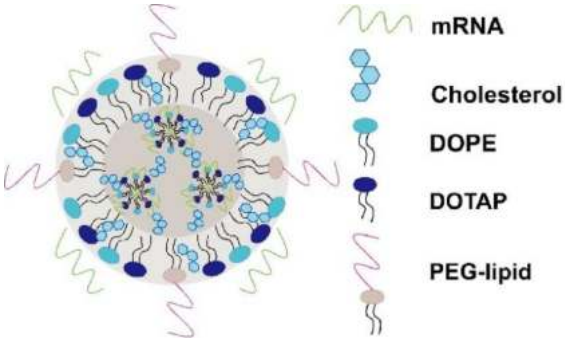


图 1 mRNA-LNPs 示意图

Fig 1 Schematic representation of mRNA-LNPs

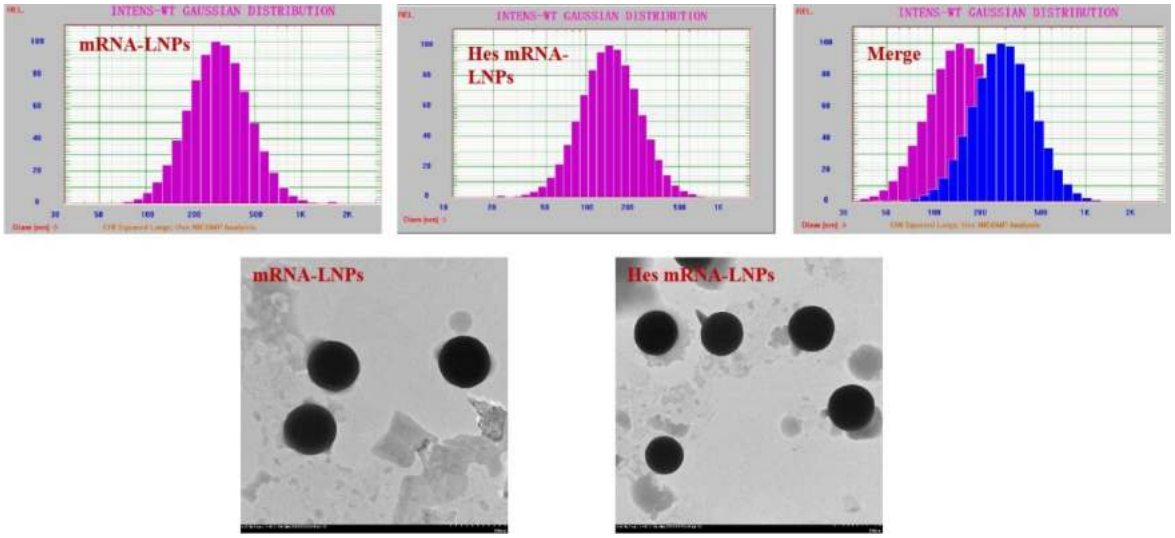


图 2 粒径表征图

Fig 2 Characterization of particle size

2.1.2 Hes LNPs 高水平负载 mRNA 为明确橙皮素的加入是否影响脂质纳米颗粒对 mRNA 的包载，我们对涉及的 2 种 mRNA 疫苗进行包封率检测，重复 3 次实验测得 mRNA-LNPs 的包封率平均为 90.0%，Hes mRNA-LNPs 的包封率平均为 89.6%，差异无统计学意义，详见表 1。

表 1 脂质纳米颗粒的包封率

TAB 1 ENCAPSULATION EFFICIENCIES (EES) OF LIPID NANOPARTICLES

样品	包封率（%）			t 值	P 值
	test 1	test 2	test 3		
MRNA-LNPS	89.7	92.0	88.3	0.2284	0.8306
HES MRNA-LNPS	91.2	90.4	87.3		

2.2 橙皮素不影响 mRNA 疫苗在细胞水平的摄取与转染效率

2.2.1 Hes LNPs 几乎完全被 DC 细胞摄取 用 FITC 染料标记 LNPs 和 Hes LNPs，分别与细胞共孵育 4 h 后上流式检测，结果如图 3 所示，细胞对 FITC-LNPs 和 Hes FITC-LNPs 的摄取率均＞95%，且组间无显著性差异（P＞0.05）。这表明橙皮素对细胞摄取脂质纳米颗粒未产生显著影响。

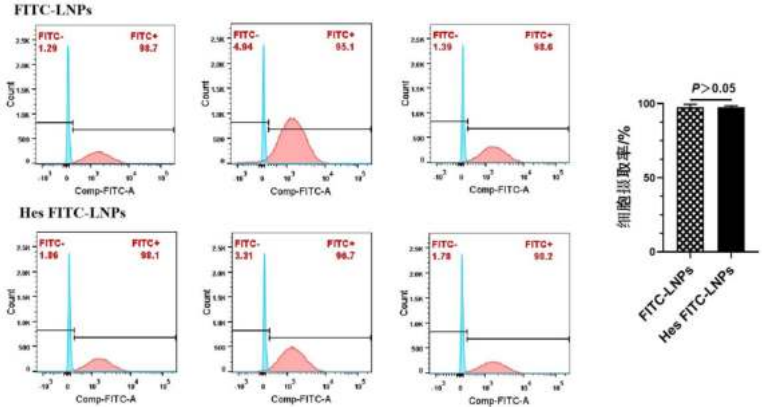


图 3 细胞摄取实验

Fig 3 Cellular uptake FITC-lipid complexes

2.2.2 Hes mRNA-LNPs 成功转染 DC2.4 细胞 摄取实验显示 DC2.4 细胞对 2 种脂质纳米颗粒相近的摄取率，因此我们进一步使其负载 eGFP mRNA，探究体外表达水平。实验使用倒置荧光显微镜拍摄 2 种 eGFP mRNA-LNPs 复合物转染 DC2.4 细胞 48 h 后的图像，结果如图 4a 所示；流式实验结果显示 mRNA-LNPs 和 Hes mRNA-LNPs 对细胞的转染率无显著性差异（$P>0.05$）。这表明橙皮素加入载体系统不影响 mRNA 在细胞水平的表达。

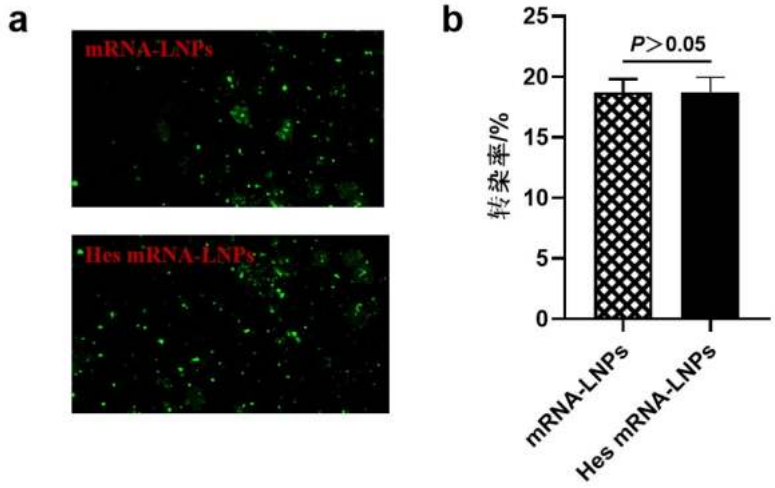


图 4 eGFP mRNA 在 DC 细胞中的表达

Fig 4 The expression of eGFP mRNA in DC2.4

2.3 橙皮素显著增强 OVA mRNA-LNPs 对小鼠 T 淋巴细胞瘤的预防作用

为探究橙皮素-mRNA 疫苗的预防效果，我们进一步构建了小鼠 T 淋巴细胞瘤模型并进行预防实验。结果显示，相较于 NC 组，mRNA 组和 Hes mRNA 组的小鼠肿瘤体积生长显著延缓（$P<0.05$）；与 mRNA 组比较，Hes mRNA 组的肿瘤体积仍具有统计学差异（$P<0.05$），结果如图 5a。生存期曲线显示，单独使用橙皮素或 mRNA-LNPs 均可以增加小鼠生存天数（$P<0.05$），Hes mRNA-LNPs 效果优于单独使用 mRNA-LNPs（$P<0.05$），结果如图 5b。这说明橙皮素自身具有肿瘤预防作用，作为佐剂可提升 mRNA 疫苗的预防效应。

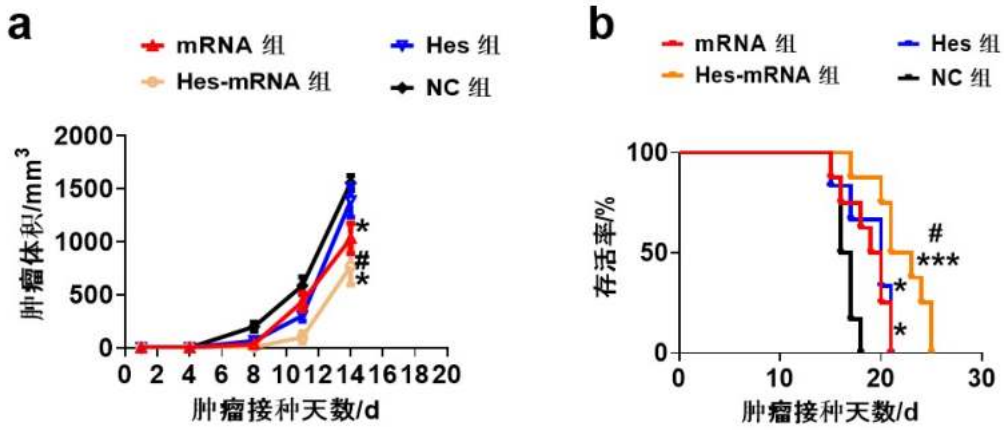


图 5 各组小鼠的体重和肿瘤体积变化情况以及生存期情况

Fig 5 Curves of mice tumor volume, survival and body weight change

注（note）：$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$，与 NC 组比较；$^{\#}P<0.05$，与 mRNA 组比较。

2.4 Hes mRNA-LNPs 通过激活细胞免疫和体液免疫发挥肿瘤预防作用

小鼠预防试验证实橙皮素具有一定的肿瘤预防作用，为明确这一机制，我们从细胞免疫和体液免疫水平进行了研究，结果如图 6、7 所示。mRNA 组和 Hes mRNA 组小鼠活化的 $CD4^{+}$、$CD8^{+}$ T 细胞水平无显著性差异（$P>$

0.05），均优于 NC 组（$P<0.05$），证明其均能诱导抗原特异性 T 细胞免疫；Hes 组、mRNA 组和 Hes mRNA 组的 OVA-sIgG 血清浓度均高于 NC 组（$P<0.001$，$P<0.01$，$P<0.01$），这说明橙皮素单药即可诱导小鼠体液免疫应答，作为佐剂同时递送入体内可改善免疫应答，增强 mRNA 疫苗的免疫效应。

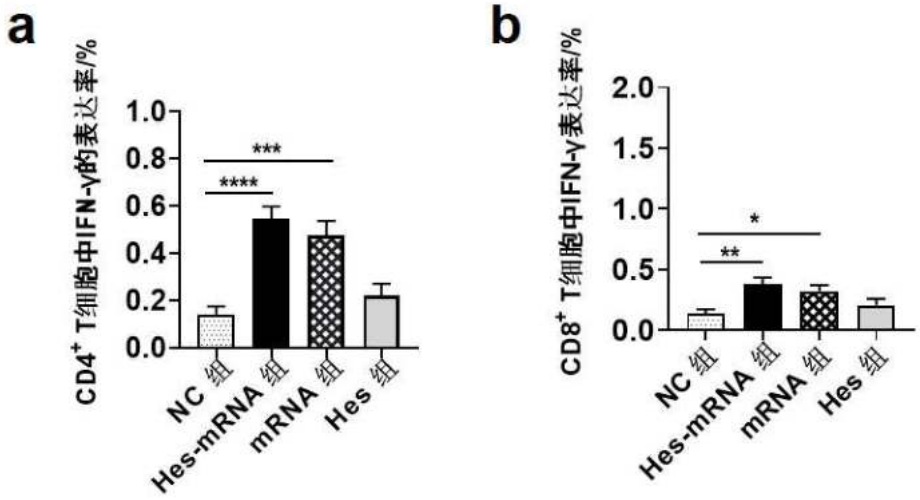


图 6 复合物诱导的细胞免疫应答

Fig 6 Cellular immune responses induced by complexes

注（note）：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.0001$ 与 NC 组比较。

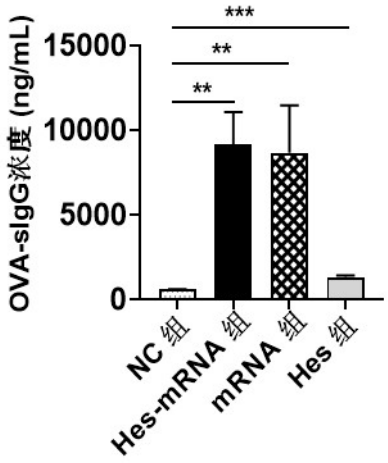


图 7 复合物诱导的体液免疫应答

Fig 7 Humoral immune responses induced by complexes

注（note）：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，与 NC 组比较。

3.讨论

橙皮素是柑桔属植物中普遍存在的一种类黄酮物质，有研究发现橙皮素具有抗氧化、抗癌、抗肿瘤、保护神经系统以及调节机体免疫等多种作用[11-14]。毛晨梅等[18]研究发现橙皮素能够抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移及黏附。王超等[19]发现橙皮素能抑制口腔鳞癌 BcaCD885 细胞迁移、侵袭。基于此，橙皮素作为中药单体或疫苗佐剂的抗肿瘤活性有待开发利用。mRNA 疫苗因其安全高效、易于生产的的特点被广泛应用于肿瘤免疫治疗等领域，其常见组成为体外转录合成的 mRNA 和脂质纳米颗粒[1,16]。本研究将橙皮素溶于乙醇，通过静电吸附作用加入 mRNA-LNPs 中，结果发现，橙皮素可以使复合物整体吸附更紧密，粒径减小且不影响纳米粒对 mRNA 的包封率。

最近的研究发现，mRNA-LNPs 经皮下或肌肉注射后，即被注射部位的抗原提呈细胞摄取，转运至引流淋巴结[18-19]。DC 细胞是其中最关键的抗原提呈细胞，能高度特异性的摄取并提呈抗原，其摄取效率以及 mRNA 转染表达抗原的能力是疫苗发挥免疫作用的关键[20-21]。在本研究中，我们通过制备 Hes FITC-LNPs 和 FITC-LNPs 进行 DC 细胞摄取实验，制备 Hes eGFP mRNA-LNPs 和 eGFP mRNA-LNPs 进行 DC 细胞转染实验，结果表明 mRNA-LNPs 递送系统中加入橙皮素不影响细胞摄取与抗原提呈这一环节。

近年来的研究发现，mRNA 疫苗主要通过刺激机体，诱导细胞免疫和体液免疫发挥预防治疗作用，而橙皮素被证实能够调节机体免疫应答[12,14,15,20]。小鼠 T 淋巴细胞瘤预防实验结果显示，橙皮素单药可延长小鼠生存期，橙皮素-mRNA 疫苗较单用 mRNA 疫苗能显著抑制肿瘤生长并提高同时期小鼠生存率。流式细胞术检测结果显示，疫苗组分泌 IFN-γ 的 $CD4^+$和 $CD8^+$ T 细胞数量显著增高，说明疫苗组小鼠体内发生了特异性 T 细胞免疫。ELISA 实验结果显示，橙皮素单药组与疫苗组的特异性抗体水平均有显著提升，这可能是橙皮素单药发挥免疫调节的作用机制。

综上所述，橙皮素作为免疫佐剂能稳定 mRNA 疫苗递送体系，不影响其递送效率与 mRNA 的表达能力。此外，橙皮素-mRNA 疫苗同时激活机体特异性 T 细胞发挥免疫效应以及诱导抗原特异性体液免疫，显著延缓肿瘤生长与生存期，这可能是其发挥肿瘤预防作用的机制。

参考文献：

[1] Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, *et al*. Developing mRNA-vaccine technologies. RNA Biol [J]. 2012, 9(11): 1319-1330.

[2] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs [J]. Nat Rev Drug Discov. 2014, 13(10): 759-780.

[3] Islam MA, Reesor EK, Xu Y, *et al*. Biomaterials for mRNA delivery [J]. Biomater Sci. 2015, 3(12): 1519-1533.

[4] Geall AJ, Verma A, Otten GR, *et al*. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2012, 109: 14604-14609.

[5] Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, *et al*. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes [J]. J Control Release. 2015, 217: 345-351.

[6] Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery [J]. Nat. Biotechnol. 2015, 33: 941-951.

[7] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, *et al*. Non-viral vectors for gene-based therapy [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(8): 541-555.

[8] Ke X, Howard GP, Tang H, *et al*. Physical and chemical profiles of nanoparticles for lymphatic targeting [J]. Adv Drug Deliv Rev. 2019, 151-152: 72-93.

[9] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, *et al*. Discher Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery [J]. Nat Nanotechnol. 2007, 2(4): 249-255.

[10] Kumar S, Anselmo AC, Banerjee A, *et al*. Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles [J]. J Control Release. 2015, 220(Pt A): 141-148.

[11] 刘学仁，张莹，林志群. 橙皮苷和橙皮素生物活性的研究进展[J]. 中国新药杂志，2011. 20（4）：329-333，381.

[12] 江莎莎. 中药单体作为疫苗佐剂的筛选及橙皮素增强机体抗肿瘤免疫应答的研究[D]. 青岛大学，2020.

[13] 江基根，吴奋飞，田伟强. 包载橙皮素纳米脂质体对于血管性痴呆小鼠学习记忆能力改善作用的实验研究[J]. 中国药师，2021，24（9）：1641-1646.

[14] Chandrika BB, Steephan M, Kumar TRS, *et al*. Hesperetin and Naringenin sensitize HER2 positive cancer cells to death by serving as HER2 Tyrosine Kinase inhibitors [J]. Life Sci. 2016, 160: 47-56.

[15] Coutinho L, Oliveira H, Pacheco AR, *et al*. Hesperetin-etoposide combinations induce cytotoxicity in U2OS cells: Implications on therapeutic developments for osteosarcoma [J]. DNA Repair (Amst). 2017, 50: 36-42.

[16] Ji A, Xu M, Pan Y, *et al*. Lipid Microparticles Show Similar Efficacy With Lipid Nanoparticles in Delivering mRNA and Preventing Cancer [J]. Pharm Res. 2023, 40(1): 265-279.

[17] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, *et al*. mRNA vaccines-a new era in vaccinology [J]. Nat Rev Drug Discov. 2018, 17(4): 261-279.

[18] 毛晨梅，郁丹红，桂环. 橙皮素抑制 P-选择素诱导的乳腺癌转移作用机制研究[J]. 中草药，2017，48（4）：714-721.

[19] 王超，马旭亮，程瑞卿，等. 橙皮素调控 miR-182-5p 对口腔鳞癌 BcaCD885 细胞迁移和分泌 IL-6、IL-8 的影响[J]. 中国免疫学杂志，2021，37（4）：463-468.

[20] Kowalczyk A, Doener F, Zanzinger K, *et al*. Self-adjuvanted mRNA vaccines induce local innate immune responses that lead to a potent and boostable adaptive immunity [J]. Vaccine. 2016, 34(33):3882-3893.

[21] R.C. Mundargi, V.R. Babu, V. Rangaswamy, *et al*. Aminabhavi Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives [J]. J Control Release. 2008, 125: 193-209.

Utilization Patterns and Costs of BTK Inhibitors in B-cell Lymphoma: A Retrospective Analysis from Real-Word Data

Dan Jiang[1,2†], Zaiwei Song[1,2†], Yang Hu[1,2], Fei Dong[3*], Rongsheng Zhao[1,2*]

（1 Department of Pharmacy, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China；2 Institute for Drug Evaluation, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China；3 Department of Hematology, Lymphoma Research Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China）

【**ABSTRACT**】**Background:** To promote the utilization and accessibility of innovative medicines and relieve the patients' financial burden, the Chinese government designed a national drug price negotiation (NDPN) policy in 2016. However, Bruton's tyrosine kinase inhibitor (BTKi)-related data in the real clinical practice remain sparse, and particularly the impact of the NDPN policy still remains ambiguous. This retrospective study aims to elucidate utilization patterns, cost and safety of BTKi in the real world. **Methods:** A retrospective cohort was designed and constructed using real-world BTKi data from a single lymphoma center. Descriptive analysis was performed to describe the demographic and clinical characteristics of the population. Medicine utilization and cost were quantified by defined daily doses (DDDs) and defined daily dose cost (DDDc), respectively. A generalized estimating equation (GEE) was used to explore the potential influencing factors of platelet aggregation rate (PAR). **Results:** The study cohort included 193 patients [median age, 65 years; 77 (39.90%) women]. Most patients received ibrutinib (n = 109, 56%) therapy, followed by zanubrutinib (n = 69, 36%) and switching from ibrutinib to zanubrutinib (n = 15, 8%). Most patients (77.20%) were treated by BTKi in combination with chemotherapy or targeted therapy. The implementation of NDPN had a large impact on medicine utilization and cost. The DDDs difference between the two BTKis was reduced from 18.55 to 1.41 times. The DDDc for ibrutinib decreased from US$251 to US$88, and that for zanubrutinib from US$109 to US$53 was already significantly lower than ibrutinib. Interruptions were more readily observed in patients treated with ibrutinib, and hematological toxicity was the main adverse drug event (ADE) leading to treatment interruption. Besides, GEE model showed that antiplatelet medication significantly decreased the PAR (β=28.724%, 95% CI 7.063-50.385, P=0.009) and ibrutinib tended to decrease the PAR (β=-8.483%, 95% CI -20.823-3.856, P=0.178). **Conclusion:** With the implementation of NDPN policy, the gap of medicine utilization between zanubrutinib and ibrutinib has narrowed. Additionally, compared with ibrutinib, zanubrutinib showed an advantage in terms of economic profile, treatment interruptions caused by ADE, and the effect on PAR.

【**KEYWORDS**】BTK inhibitor, ibrutinib, zanubrutinib, national drug price negotiation, utilization pattern

† These authors have contributed equally to this work.

Corresponding author:

Prof. Fei Dong

Department of Hematology, Lymphoma Research Center, Peking University Third Hospital, Beijing, China.

Email address: knowflying7979@163.com

Prof. Rongsheng Zhao

Department of Pharmacy, Peking University Third Hospital, Beijing, China.

Email address: zhaorongsheng@bjmu.edu.cn

Statement of funding sources

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (NSFC) (72074005).

基于网络药理学和实验验证瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 改善高糖诱导的内皮功能障碍

蒋诗情[1]，汪余嘉[1]，聂雪坤[1]，雷永芳[1]，林小惠[1]，陈子春[1,2*]

（1：宁德师范学院附属宁德市医院，福建 宁德 352000；2：宁德师范学院闽东畲药有效成分研究协同创新中心 2020Z03）

【摘要】目的：本研究旨在探讨糖尿病性内皮损伤和他汀类药物改善糖尿病相关内皮功能障碍的作用机制。**方法：**通过在线数据库筛选他汀类药物-内皮功能障碍-高血糖共有靶点，利用蛋白互作网络、基因本体、京都基因与基因组百科全书及分子对接技术挖掘他汀类药物抗糖尿病性内皮功能障碍的潜在靶点和信号通路。将人脐静脉内皮细胞于 30.5 mM 的高糖培养基和 5 μM 的瑞舒伐他汀分别干预，通过检测细胞活力、增殖凋亡、NO 水平评估他汀类药物的功效，RT-qPCR 和 WB 检测 eNOS、CLDN-1、OCLN、ZO-1、HIF-1α、VEGF 和 Bax 的表达。**结果：**筛选出 76 个他汀类药物-血管内皮功能障碍-高血糖的共同靶点，得到由 76 个靶点，202 个边缘组成的蛋白互作网络图，拓扑分析后集中于 TNF、HIF-1A 等 10 个核心靶点，分子对接提示瑞舒伐他汀、阿托伐他汀和氟伐他汀与核心靶点均有良好结合力。体外实验发现高糖诱导 HUVECs 细胞凋亡、NO 释放减少、紧密连接相关蛋白表达降低、HIF-1α 表达和活性被抑制，而瑞舒伐他汀可修复高糖对内皮细胞的损伤作用。YC-1，一种 HIF-1 抑制剂，可以逆转瑞舒伐他汀改善高糖诱导血管内皮功能障碍的作用。**结论：**本研究表明瑞舒伐他汀作用于 HIF-1α 分子，提高高糖环境下 HUVECs 的细胞活力并降低细胞凋亡，促进 NO 的合成与释放，诱导紧密连接蛋白的表达，改善高糖引起的内皮屏障功能和内皮依赖性血管舒张功能障碍。

【关键词】网络药理学，瑞舒伐他汀，高血糖，HIF-1α，HUVECs

Network-based Pharmacology and Experimental Validation of Rosuvastatin to Improve High Glucose-Induced Endothelial Dysfunction via Activation of HIF-1

JIANG Shi-Qing[1]，Wang Yu-Jia[1]，Nie Xue-Kun[1]，Lin Xiao-Hui[1]，Lei Yong-Fang[1]，Chen Zi-Chun[1,2*]

（1：Ningde Municipal Hospital Affiliated to Ningde Normal University，Fujian Ningde 352000，China；2：Collaborative Innovation Center of Active Ingredient research of She Medicine(2020Z03), Ningde Normal University，Fujian Ningde 352100，China）

【Abstract】Objective: The aim of this study was to investigate the mechanism by which statins improving diabetes-related endothelial dysfunction. **Methods:** Statins-endothelial dysfunction-hyperglycemia shared targets were screened by online database, the protein interaction network, gene ontology, Kyoto gene and genome encyclopedia and molecular docking techniques were used to mine potential targets and signaling pathways of statins against diabetic endothelial dysfunction. Human umbilical vein endothelial cells were intervened respectively in 30.5 mM high glucose medium and

项目基金：福建省自然科学基金面上项目（2022J011217）；福建省卫生健康青年科研课题（2022QNA106）；福建医科大学启航基金一般项目（2020QH1335）

作者简介：蒋诗情，女，汉，全日制在读研究生，研究方向为临床药学，e-mail：1171501287@qq.com

通讯作者：陈子春，男，汉，主任药师，硕士生导师，研究方向为临床药学，e-mail：ndczc@ndnu.edu.cn

5 μM rosuvastatin, and the efficacy of statins was assessed by detecting cell viability, proliferation apoptosis, NO levels, and RT-qPCR and WB to detect the expression of eNOS, CLDN-1, OCLN, ZO-1, HIF-1α, VEGF and Bax. **Results:** Seventy-six statin-vascular endothelial dysfunction-hyperglycemia common targets were screened, and a protein interaction network map consisting of 76 targets and 202 edges was obtained. Topological analysis focused on 10 core targets such as TNF and HIF-1A, and molecular docking suggested that rosuvastatin, atorvastatin and fluvastatin all had good binding to the core targets. In vitro experiments revealed that high glucose induced apoptosis, decreased NO release, reduced expression of tight junction-related proteins, and suppressed HIF-1α expression and activity in HUVECs, while rosuvastatin could repair the damaging effects of high glucose on endothelial cells. YC-1, a HIF-1 inhibitor, reversed the effect of rosuvastatin in ameliorating high glucose-induced vascular endothelial dysfunction. **Conclusion:** This study shows that rosuvastatin acts on HIF-1α molecules, improves cell viability and reduces apoptosis in HUVECs under high glucose environment, promotes NO synthesis and release, induces tight junction protein expression, and improves endothelial barrier function and endothelium-dependent vasodilatory dysfunction induced by high glucose.

【**Keywords**】network pharmacology, rosuvastatin, hyperglycemia, HIF-1α, HUVECs

1 前言

糖尿病是因胰岛素绝对或相对分泌不足及靶组织细胞对胰岛素敏感性降低，引起蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱的综合征，高血糖为其主要标志。在糖尿病的病理条件下，高血糖可导致心、脑、肾、眼、血管在内的多器官慢性损害和功能障碍[1]，其中糖尿病血管并发症是糖尿病患者发病和死亡的重要原因[2]。研究证实，糖尿病血管病变与内皮功能障碍息息相关[3]，内皮功能障碍是诱发并加重糖尿病血管疾病的重要危险因素[4-9]，但其病理生理学机制尚未完全阐明。

血管内皮是由形态似鹅卵状、边缘呈锯齿状，相互嵌合的内皮细胞组成，主要参与血液和组织液间的选择性体液渗透交换、物质转运和信息交换过程[10]。研究表明，内皮细胞可通过合成并释放多种血管活性因子，发挥调节血管通透性、抑制单核细胞趋化和迁移、调节血管收缩和舒张、抑制血小板聚集和抗粘附等功效[11-12]。其中内皮型一氧化氮合酶（endothelial Nitric Oxide Synthase，eNOS）合成的一氧化氮（Nitric Oxide，NO）是内皮依赖性血管舒张的关键介质，参与调节血管内皮的多种功能[13-14]。另有研究发现内皮细胞紧密连接蛋白在动脉粥样硬化、肺动脉高压等多种疾病中表现出其表达水平和功能异常，提示紧密连接蛋白对维持血管内皮功能具有重要意义[15]，其中封闭蛋白（Claudin，CLDN）、闭锁蛋白（Occludin，OCLN）和闭锁带蛋白（Zonula Occludens，ZO）在内皮细胞中广泛表达。因此，恢复 NO 信号、改善紧密连接蛋白的表达和分布异常是减轻内皮功能障碍和预防血管病变的重要策略。

他汀类药物（Statins）是临床上首选的调脂药物，通过抑制内源性胆固醇合成限速酶 3-羟基 3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶，发挥降低血清低密度脂蛋白、稳定动脉粥样硬化斑块的作用。研究表明，他汀类药物具有独立于经典调脂作用外的多效性功能，如减轻炎症及氧化应激反应、抑制神经体液系统活性、提高动脉血管的顺应性等，在糖尿病、阿尔兹海默症、肿瘤等疾病治疗方面均有一定获益[16]。研究发现辛伐他汀通过抗凋亡作用保护高糖对人脐静脉内皮细胞的损伤[17]；阿托伐他汀可激活磷脂酰肌醇-3-激酶（Phosphatidylinositol-3-Kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（Protein Kinase B，AKT）/核因子 E2 相关因子 2（Nuclear Factor Erythroid-2 related factor 2，Nrf2）通路发挥抗炎、抗氧化功效保护损伤的血管内皮细胞[18]。上述研究均证实他汀类药物对损伤血管内皮具有保护作用，但具体作用机制尚未完全阐明，亟待对分子间信号转导及相关作用靶点开展深入研究。

网络药理学是基于复杂网络模型，整合生物分子网络与药物作用网络，分析网络中关键节点与模块的关系，研究机体生理、病理发展规律以及和药物相互作用机制的一门学科[19]。临床上用于治疗疾病的药物通常是多靶点化合物，其现有的治疗功能仅发挥其治疗作用之一，利用网络药理学对数据库挖掘及关联分析的特点，有利于加速药物靶点的确认以及发现新的生物标志物，优化药物设计，寻找老药新的靶点和新的作用，从而产生新的治疗疾病的方法和策略[20]。

本研究旨在通过网络药理学方法探讨他汀类药物改善高糖诱导血管内皮功能障碍的潜在靶点和途径。而后，

采用高糖处理的人脐静脉内皮细胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells，HUVECs）作为体外糖尿病细胞模型，验证他汀类药物在调节细胞增殖凋亡、NO 释放、紧密连接相关蛋白表达中的功能和机制。本研究结果表明，他汀类药物可以通过激活缺氧诱导因子-1（Hypoxia Inducible Factor-1，HIF-1）信号通路改善内皮屏障和血管舒张功能，缓解高糖对 HUVECs 的损伤。

2 材料和方法

2.1 候选靶点筛选

他汀类药物作用靶点以“Rosuvastatin”、“Atorvastatin”、“Fluvastatin”为检索词，PubChem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）转换成化学结构，导入 Swiss TargetPrediction（http://www.swisstargetprediction.ch/）数据库，得到三份药物靶点数据，整合并删去重复基因，得到药物的靶点。通过 Genegcard（http://www.genecards.org/）、OMIM（https://www.omim.org/）、DisGeNET（https://www.disgenet.org/）数据库，以“Hyperglycemia”为检索词获取疾病靶点，以“Vascular Endothelial Injury”、“Vascular Endothelial Dysfunction”为检索词获取表型靶点，而后将疾病靶点与表型靶点上传至韦恩图在线绘制网站（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html）取二者交集得到高糖诱导血管内皮功能障碍的作用靶点。该交集进一步与药物靶点取交集，获得他汀类药物改善高血糖致血管内皮功能障碍的潜在作用靶点。

2.2 蛋白质互作网络的构建和核心靶点的筛选

将所得交集靶点上传至 STRING（https://www.string db.org/）数据库，限定物种 Homo sapiens，构建他汀类药物改善高血糖致血管内皮功能障碍相关作用靶点的蛋白质互作网络（Protein-Protein Interaction Networks，PPI）。利用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 CytoNCA 插件对网络相互作用关系进行拓扑参数分析，并应用 Cytohubba 插件，按 Degree 参数大小对核心基因靶点进行排序。

2.3 交集基因的功能及通路富集分析

采用微生信在线平台对交集基因进行基因本体（Gene Ontology，GO）富集分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析，限定物种为 Homo sapiens。GO 富集结果分别输出生物过程（Biological Process，BP）、细胞组分（Cellular Component，CC）、分子功能（Molecular Function，MF）3 个方面各前 10 位结果；KEGG 富集结果按照 pvalue 值分别输出新陈代谢（Metabolism）、遗传信息处理（Genetic Information Processing）、环境信息处理（Environmental Information Processing）、细胞过程（Cellular Processes）、生物系统（Organismal Systems）、人类疾病（Human Diseases）、药物开发（Drug Development）7 个方面的前 10 位结果。

2.4 分子对接验证

从 PubChem 数据库下载药物对应小分子配体的 2D 结构，通过 ChemBioOffice 14.0 软件将其转化为 3D 结构；从 RCSB PDB（https://www.pdbus.org/）数据库下载核心靶点对应大分子受体蛋白的 3D 结构，通过 PyMOL 2.3.0 软件移除溶媒和配体分子，并导入 AutoDockTools 1.5.6 进行加氢等预处理。使用 AutoDockTools 确定受体蛋白对接区域（活性口袋），最后运行 AutoDuckVina 对受体和配体进行分子对接并计算结合能，利用 PyMOL 对模型进行可视化。

2.5 细胞培养和实验分组

HUVECs 从某医院健康足月计划性剖腹产所剥离的胎盘脐带上提取，于 10%胎牛血清（Hyclone，USA）、1%青霉素-链霉素(Beyotime，China)、1%生长因子（ScienCell，USA）的 M199 培养基（Procell，China）中培养，置于 37℃、5% CO_2 培养箱（ThermoFisher Scientific，USA）中。30.5 mM 高糖培养基培养 HUVECs 72 h 建立体外糖尿病细胞模型，5 μM 瑞舒伐他汀（Sigma，USA）培养 24 h 为药物组，HIF-1 抑制剂 YC-1（Sigma，USA）用来干扰 HIF-1 信号。

2.6 细胞活力测定

HUVECs 于上述分组分别干预后，弃旧培养基，加入 100 μL M199 培养基与 20 μL MTS（Promega，USA），于培养箱中避光孵育 2~3 h。测定 490 nm 处的光密度以计算细胞存活率。

2.7 细胞凋亡测定

使用 Hoechst 33258 试剂盒（Beyotime，China）评估细胞凋亡能力。将 HUVECs 接种到 24 孔板中，按照上述分组分别干预后，以多聚甲醇固定细胞，于 Hoechst 33258 染色后放置荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

2.8 细胞 NO 测定

根据制造商的说明，使用 NO 检测试剂盒（Beyotime，China）测量培养上清中 NO 含量。

2.9 RNA 提取、逆转录和 qPCR

使用 TRIzol（Ambion，USA）提取细胞中的总 RNA。紫外可见分光光度法测定 RNA 浓度后，使用逆转录试剂盒（Promega，USA）依照试剂盒的说明进行逆转录。按照 RT-qPCR 试剂盒（Promega，USA）说明书要求在荧光定量 PCR 仪（Applied Biosystems，USA）上进行 RT-qPCR，并将测量结果归一化为内参基因 β-Actin 的表达。相关引物见表 1。表达式数据表示为 $2^{-\Delta\Delta CT}$。

2.10 蛋白质印迹

使用 RIPA 强效裂解液（Beyotime，China）进行总蛋白提取。在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离后，将蛋白质印迹到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜中。然后用以下抗体：Bax（1:1000；5023S）、eNOS（1:1000，5880S）、HIF-1α（1:1000，ab179483）VEGFA（1:1000，ab214424）、ZO-1（1:1000，ab276131）、Occludin（1:1000，ab216327）和 β-actin（1:1000，100166-MM10），在 4℃ 下孵育过夜。通过 ECL 检测试剂（Advansta，USA）观察免疫活性印迹。以 β-Actin 的灰度值作为内参对照。计算目的蛋白的相对表达量=目的蛋白的灰度值/β-Actin 的灰度值。

2.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0.2 绘制统计图表。采用 SPSS 21.0 统计分析数据，组间数据比较选用单因素方差分析（ANOVA）。数据分布正态性检验采用 Shapiro-Wilk 评估。方差齐性检验采用 *F* 检验评估。当方差齐时，LSD 检验比较组间差异；方差不齐时，Games-Howell 检验比较组间差异。结果采用均值±标准误（Mean±SEM）表示，$P<0.05$ 说明差异具有统计学意义。

表 1 引物基因序列

Genes		Primer sequence (5'→3')
CLDN1	Forward	TCTTGCAGGTCTGGCTATTTTA
	Reverse	TTGGGTAAGAGGTTGTTTTTCG
eNOS	Forward	TGATGGCGAAGCGAGTGAAG
	Reverse	ACTCATCCATACACAGGACCC
HIF-1α	Forward	CCATTAGAAAGCAGTTCCGCAAGC
	Reverse	GTGGTAGTGGTGGCATTAGCAGTAG
OCLN	Forward	AACTTCGCCTGTGGATGACTTCAG
	Reverse	TTTGACCTTCCTGCTCTTCCCTTTG
VEGF	Forward	AGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCAC
	Reverse	GGGCACACAGGATGGCTTGAAG
ZO-1	Forward	AAAGAGAAAGGTGAAACACTGC
	Reverse	TTTTAGAGCAAAAGACCAACCG

3 结果

3.1 他汀-内皮功能障碍-高血糖靶点的筛选

共得到 202 个他汀类药物的数据靶点，血管内皮功能障碍靶点 9632 个，高血糖相关靶点 1413 个。疾病和表型经韦恩取交集后得到 1225 个高血糖诱导血管内皮功能障碍的作用靶点。将该交集与药物靶点进一步交集，发现他汀类药物改善高血糖诱导血管内皮功能障碍的潜在靶点有 76 个，占整体 0.8%（图 1A）。

3.2 PPI 网络的构建及核心靶点的筛选

利用 STRING 数据库得到他汀类药物改善高血糖致血管内皮功能障碍的蛋白互作网络图（图 1B），图中蛋

白质用节点表示，蛋白质之间的关联采用边表示，涉及 76 个节点，共 202 个边缘组成，平均节点度为 5.32，平均局部聚类系数是 0.462。将上述结果进行拓扑分析，得到他汀类药物改善高血糖导致内皮功能障碍的靶点同心圆，其颜色越红，圆圈直径越大，越靠近同心圆中心位置，degree 值越大，靶点越重要（图 1C）。由图可知，他汀类药物主要作用于 TNF、CASP3、EGFR、SRC、PPARG、PPARA、SIRT1、MAPK3、HIF1A、MAPK8 发挥改善高血糖诱导的血管内皮功能障碍的作用。

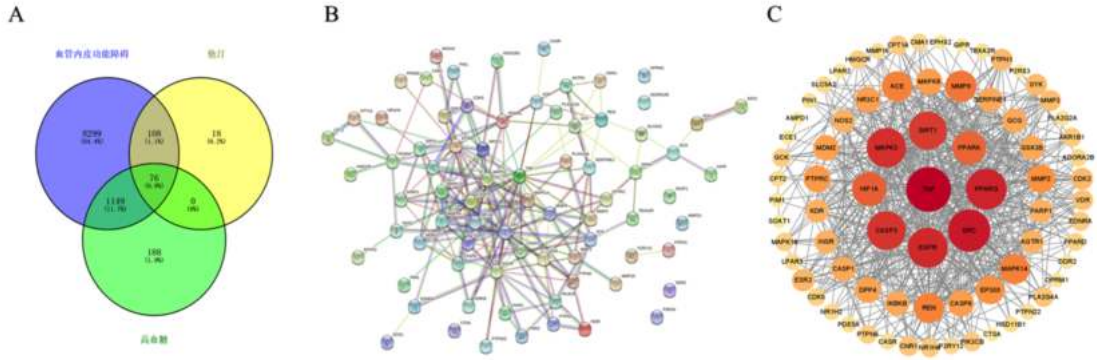
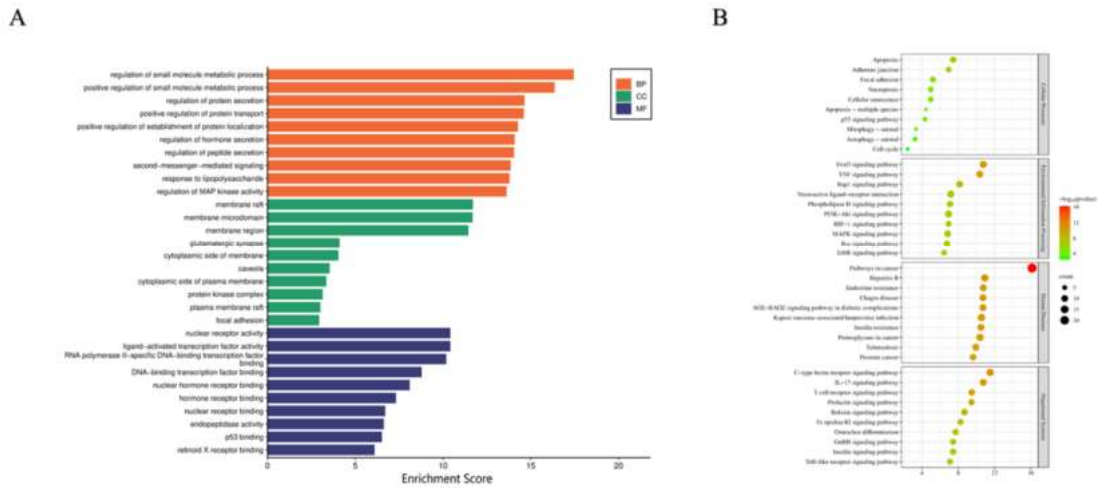


图 1 他汀、内皮功能障碍、高血糖相关靶点的筛选。（A：韦恩显示三者有 76 个重复基因；B：交集靶点的 PPI 图；C：核心靶点同心圆图）

3.3 GO 和 KEGG 富集分析

将他汀类药物改善高血糖诱导内皮功能障碍的 76 个潜在靶点进行 GO 功能富集（图 2A），共得到 3369 个 BP 条目，192 个 CC 条目，364 个 MF 条目，分别取 BP、CC、MF 3 个方面各前 10 位结果做聚类分析。结果可知，他汀类药物改善高血糖导致血管内皮功能障碍的生物过程主要是小分子代谢过程的调节、蛋白质分泌、转运、定位建立的调控等。所在的细胞组分集中于膜筏、膜微区、膜区等。涉及的分子功能有核受体活性、配体激活转录因子活性、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合等。KEGG 富集出 236 条通路。按照 pvalue 做分类气泡图（图 2B），结果表明他汀类药物改善高血糖诱导血管内皮功能障碍主要涉及人类疾病、生物系统、环境信息处理、细胞过程这四个过程，他汀类药物改善高血糖诱导血管内皮功能障碍与 C 型凝集素受体信号通路、IL-17 信号通路、HIF-1 信号通路等相关。



他汀类药物改善高糖诱导血管内皮功能障碍潜在靶点的 GO 富集和 KEOO 富集分析。（A：GO 富集结果气泡图；B：KEGG 富集结果气泡图）

3.4 分子对接

基于 PPI、GO 和 KEGG 富集结果，选择 CASP3、EGFR、HIF1A、MAPK3、MAPK8、MMP9、PPARG、SIRT1、SRC、TNF 为分子对接的蛋白受体，以瑞舒伐他汀（图 3A-F）、阿托伐他汀（图 4A-F）和氟伐他汀（图 5A-F）为分子对接的小分子配体。表 2 结果表明：所选的蛋白受体与瑞舒伐他汀、阿托伐他汀和氟伐他汀均具有良好的结合活性，其结合能均< -5 kJ/mol，表明该研究预测的科学性与可靠性。

表 2 他汀类药物与核心靶点基因分子对接

靶点	结合能（kj/mol）		
	Rosuvastatin	Atorvastatin	Fluvastatin
CASP3	-5.8	-6.6	-7.1
TNF	-6.0	-5.8	-6.5
MAPK8	-6.8	-6.2	-8.2
HIF1A	-7.0	-6.7	-7.0
SRC	-7.0	-8.1	-7.6
SIRT1	-7.8	-7.7	-7.8
EGFR	-7.8	-6.6	-7.5
PPARG	-8.7	-8.8	-9.0
MMP9	-9.0	-8.6	-8.5
MAPK3	-9.1	-8.3	-7.5

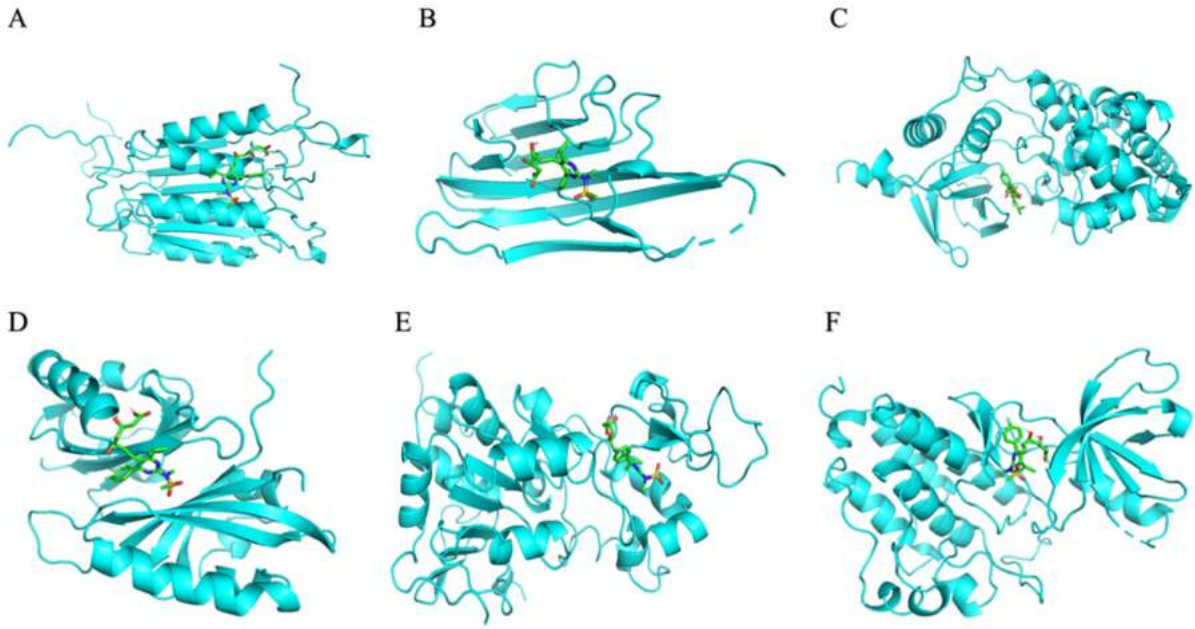


图 3 瑞舒伐他汀与核心靶点分子对接结果（A：CASP3、B：TNF、C：MAPK8、D：HIF1A、E：SIRT1、F：EGFR）

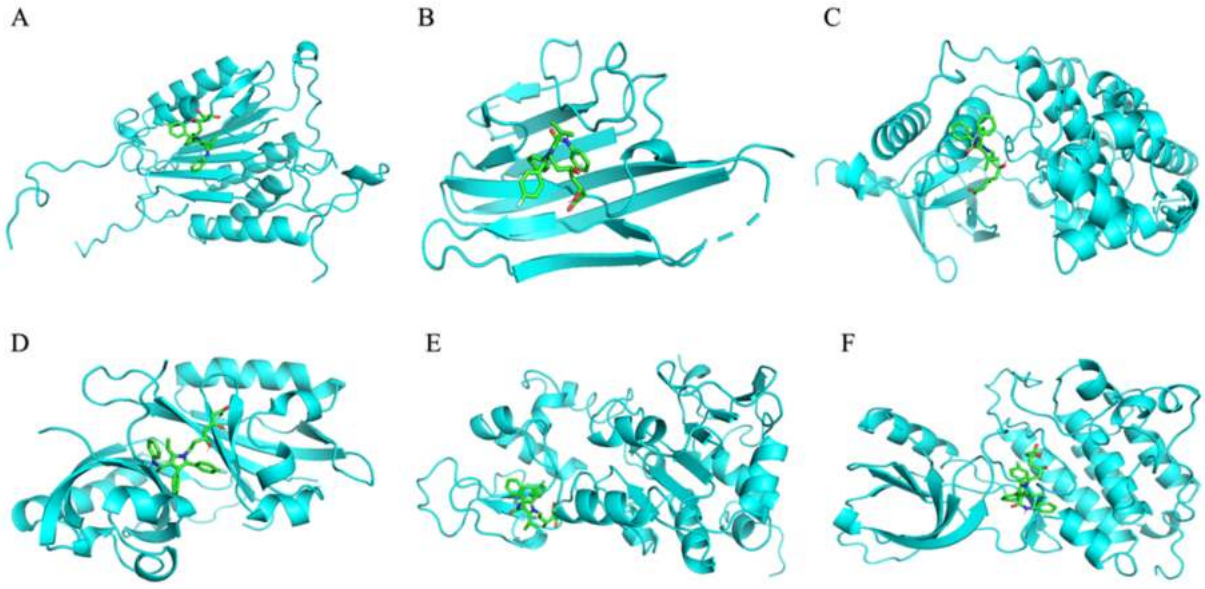


图 4 阿托伐他汀与核心靶点分子对接结果（A：CASP3、B：TNF、C：MAPK8、D：HIF1A、E：SIRT1、F：EGFR）

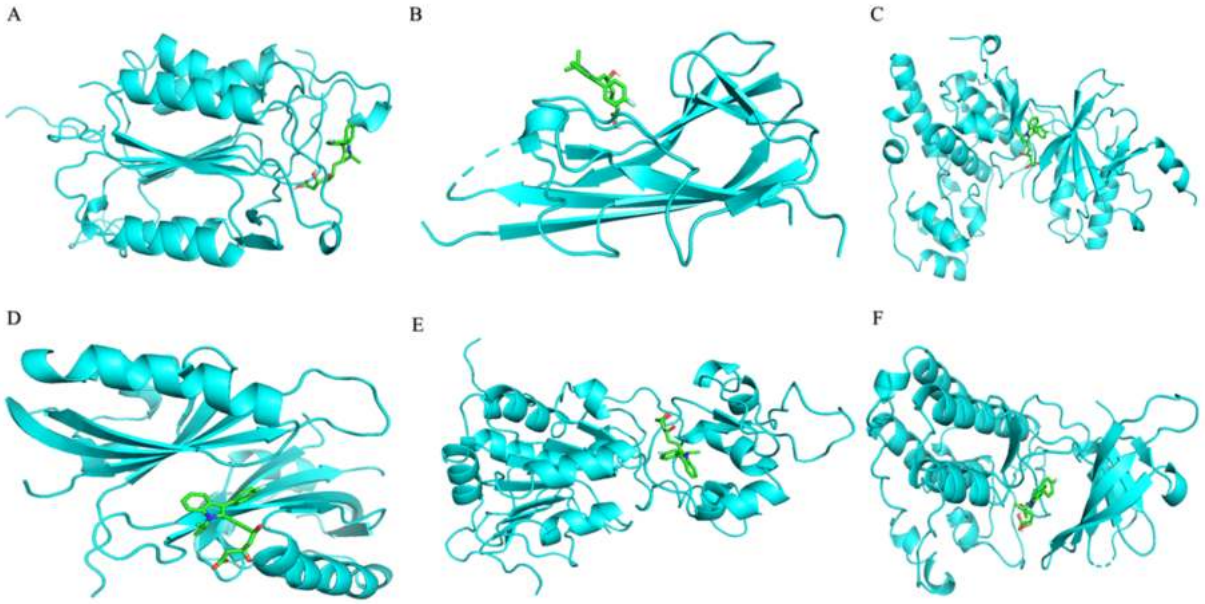


图 5 氟伐他汀与核心靶点分子对接结果（A：CASP3、B：TNF、C：MAPK8、D：HIF1A、E：SIRT1、F：EGFR）

3.5 瑞舒伐他汀激活 HIF-1 信号通路

HIF-1 具有治疗心血管疾病的潜力，PPI 网络分析表明 HIF-1α 是他汀类药物改善糖尿病性血管功能障碍的前 10 个关键基因之一，KEGG 富集表明 HIF-1 信号通路可能是他汀类药物抗糖尿病血管病变的作用途径。将 HUVECs 分为对照组、高糖模型组、瑞舒伐他汀干预组及 YC-1 组干预后，采用 RT-qPCR 和 WB 检测 HIF-1 的表达。结果表明，与对照组相比，高糖组中 HIF-1α 的基因和蛋白表达水平均显著降低（P<0.001）；而与高糖组相比，瑞舒伐他汀干预组中 HIF-1α 表达升高，且呈浓度依赖性（P<0.001），YC-1 组则抑制瑞舒伐他汀对 HIF-1α 的促进作用（P<0.001）。HIF-1 下游调节因子血管内皮生长因子（Vascular Endothelial Growth Factor，VEGF）的 mRNA 和蛋白表达水平与 HIF-1α 一致（P<0.05），表明瑞舒伐他汀可促进高糖环境下 HIF-1α/VEGF 的表达（图 6A-E）。

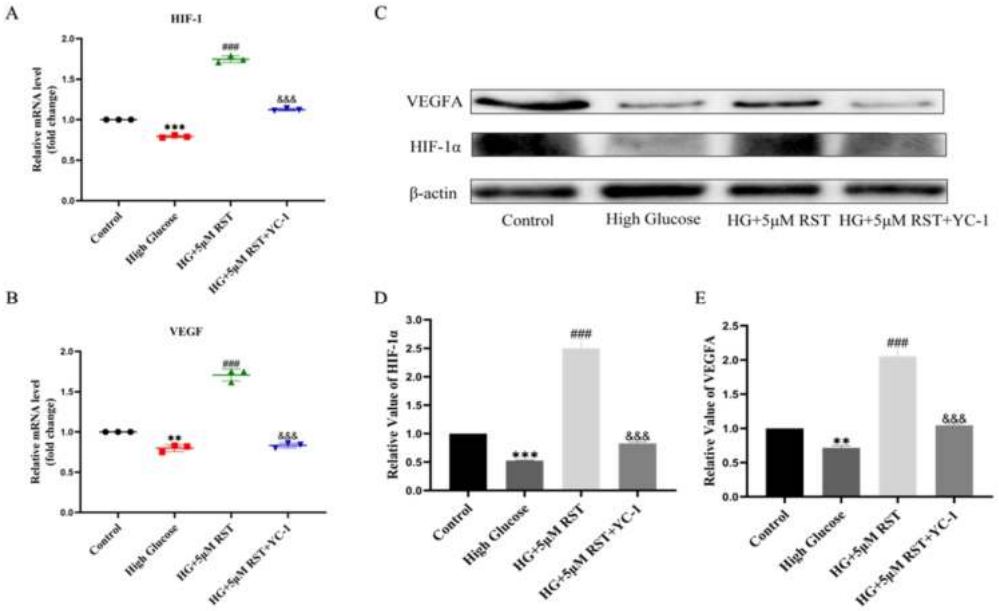


图 6 瑞舒伐他汀促进高糖环境下 HUVECs HIF-1α 及 VEGF 的表达。A：*HIF-1* mRNA 水平；B：*VEGF* mRNA 水平；C-E：HIF-1α 和 VEGFA 蛋白水平

3.6 瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 信号通路减轻高糖对 HUVECs 细胞活力和 NO 的抑制作用

采用 MTS 检测各组 HUVECs 的细胞活力。与对照组相比，高糖明显抑制 HUVECs 的细胞活力（$P<0.001$），而瑞舒伐他汀可逆转高糖对 HUVECs 的影响（$P<0.001$）。经 HIF-1α 抑制剂（YC-1）干预后，瑞舒伐他汀对高糖环境下 HUVECs 细胞活力的改善作用被显著抑制（$P<0.001$）（图 7A）。NO 检测结果显示高糖明显抑制 NO 的合成和释放（$P<0.001$），瑞舒伐他汀可显著提高高糖环境下 NO 的表达水平（$P<0.001$），而 YC-1 则逆转了瑞舒伐他汀的作用（$P<0.001$）（图 7B）。提示瑞舒伐他汀通过调控 HIF-1α 减轻高糖损伤 HUVECs 增殖及 NO 合成的作用。

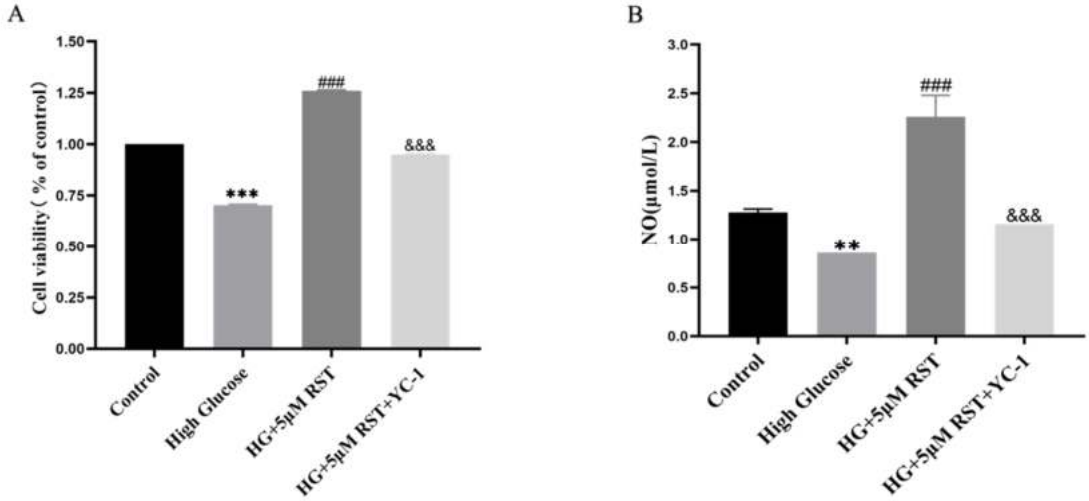


图 7：瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 信号通路改善高糖诱导的细胞活力降低和 NO 合成下降。A：细胞活力；B：NO 释放

3.7 瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 信号通路减轻高糖诱导的 HUVECs 细胞凋亡

于荧光倒置显微镜下观察 Hoechst 染色后的各组细胞，结果显示，与对照组相比，高糖组蓝色荧光的细胞数量减少，且细胞核多呈灰白色、碎块状。与高糖组相比，5 μM 的瑞舒伐他汀干预下蓝色荧光的细胞数量变多，

细胞核多蓝色，少见灰白色；而 YC-1 处理后，蓝色细胞数量明显减少（图 8A-D）。WB 检测凋亡相关蛋白（Bcl-2 Associated X Protein，Bax）表达，结果亦表明高糖可促进 HUVECs Bax 表达（P<0.001），瑞舒伐他汀则抑制高糖环境下 Bax 表达（P<0.001），而 HIF-1α 抑制剂（YC-1）可逆转瑞舒伐他汀对高糖环境下 HUVECs 的 Bax 表达（P＜0.001）（图 8E-F），表明 HIF-1α 参与高糖诱导细胞凋亡的过程。

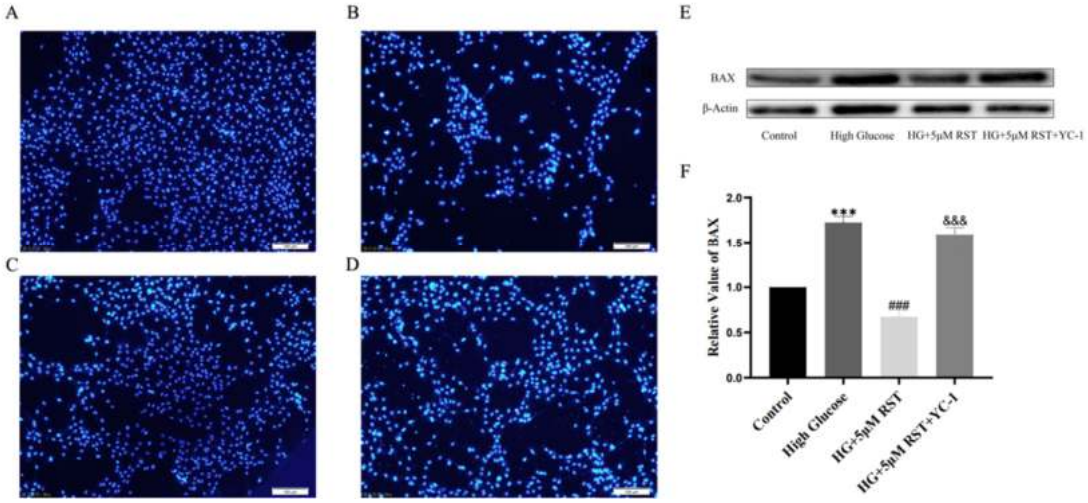


图 8：瑞舒伐他汀通过 HIF-1 信号通路减轻高糖对 HUVECs 的凋亡。A-D：细胞凋亡 Hoechst 染色观察；E-F：Bax 蛋白水平

3.8 瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 信号通路改善高糖对 HUVECs eNOS、CLDN1、OCLN、ZO-1 mRNA 的表达

RT-qPCR 检测各组细胞中 *eNOS*、紧密连接相关蛋白 *CLDN-1*、*OCLN*、*ZO-1* 的 mRNA 水平变化。结果发现，与对照组相比，高糖可降低 HUVECs 的 *eNOS*、*CLDN-1*、*OCLN*、*ZO-1* mRNA 水平（P<0.05），瑞舒伐他汀则逆转高糖作用（P<0.001），而加入 YC-1 后，瑞舒伐他汀对上述基因 *mRNA* 水平的改善作用被消除（P<0.001）（图 9A-D）。这提示 eNOS 和紧密连接相关蛋白的表达在高糖环境下受到抑制，而瑞舒伐他汀可通过介导 HIF-1 来改善其表达水平。

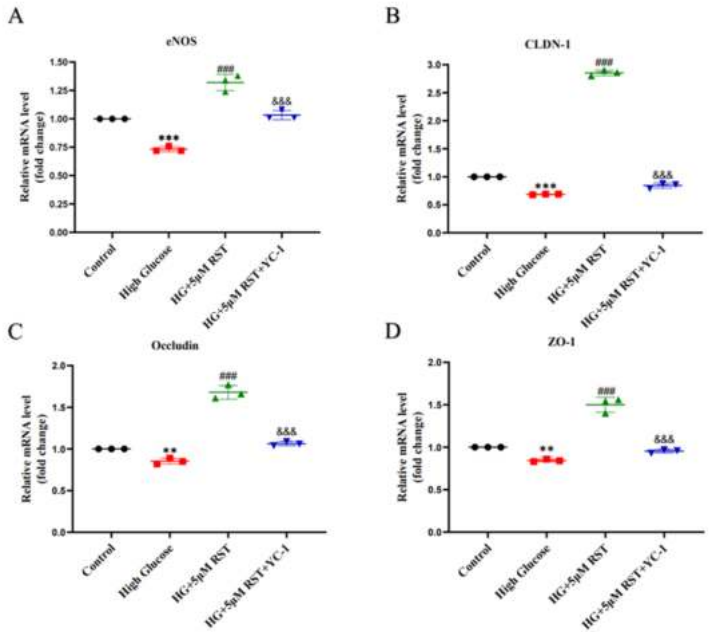


图 9：瑞舒伐他汀通过 HIF-1 信号改善高糖对 *eNOS*、*CLDN-1*、*OCLN*、*ZO-1* mRNA 表达的抑制。A：*eNOS*；B：*CLDN-1*；C：*OCLN*；D：*ZO-1*

3.9 瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 信号通路改善高糖对 HUVECs eNOS、CLDN1、OCLN、ZO-1 的蛋白表达

WB 检测 eNOS、OCLN、ZO-1 的蛋白水平表达。结果发现上述分子的翻译水平与 mRNA 表达趋势一致（P<0.05）（图 10A-E），表明瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 信号通路，促进 eNOS、CLDN-1、OCLN、ZO-1 的转录和翻译，改善高糖诱导的血管内皮功能障碍。

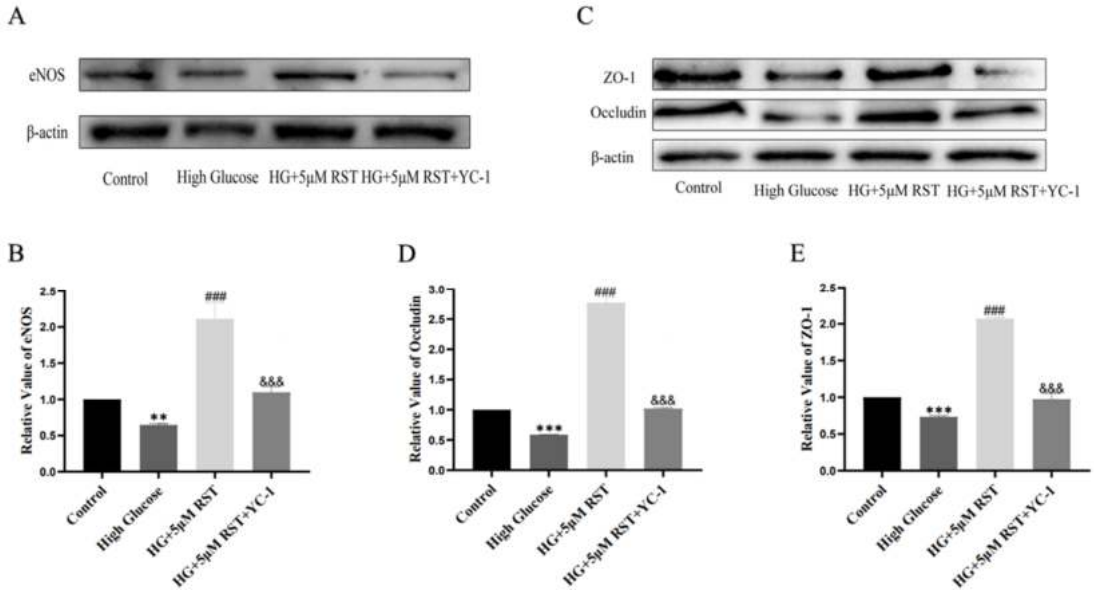


图 9：瑞舒伐他汀通过 HIF-1 信号改善高糖对 eNOS、OCLN、ZO-1 蛋白表达的抑制。A-B：eNOS；C-E：OCLN、ZO-1

4 讨论

人类生活方式和饮食结构的巨大改变，使糖尿病患病人群攀升。据统计，到 2045 年，全球糖尿病患者将增加至 7 亿[21]。糖尿病性大血管病变所致的动脉粥样硬化是糖尿病患者致死的主要原因之一。高糖诱导的血管内皮功能障碍，被认为是糖尿病动脉粥样硬化和其他糖尿病血管并发症的关键因素[22]。为此，本研究结合网络药理学和体外细胞实验，表明瑞舒伐他汀可通过 HIF-1α 及其下游 VEGF，改善高糖环境下 HUVECs 的细胞活力和细胞凋亡，促进 NO 的合成和 eNOS 的表达，恢复紧密连接相关蛋白表达，减轻糖尿病所致的内皮功能障碍，以期延缓糖尿病血管病变的发生和发展。

他汀类药物因其可显著减少动脉粥样硬化性心血管疾病事件而成为临床冠状动脉粥样硬化性心脏病二级预防的基石药物之一。现有研究表明他汀可通过对抗活性氧降低氧化应激来保护内皮细胞[23]。Kim 等发现瑞舒伐他汀能降低内皮细胞间黏附分子、白介素、单核细胞趋化蛋白的表达，发挥抗炎作用[24]。本课题早期研究表明小剂量的氟伐他汀使得 HUVECs 存活率升高，逆转受损细胞的活性，而大剂量则显著诱导 HUVECs 的程序性死亡[25]。这些研究提示他汀类药物对糖尿病所致血管内皮损伤具有保护作用，但具体机制存在争议。因此本研究利用网络药理学，整合生物分子网络与药物作用网络，分析其关键节点与模块的关系[26]，挖掘他汀类药物保护糖尿病性血管损伤的潜在靶点。通过对筛选出的他汀、血管内皮功能障碍和高血糖的作用靶点取交集并拓扑分析，发现他汀类药物改善高血糖性血管功能障碍与 CASP3、EGFR、HIF1A、MAPK3、MAPK8、MMP9、PPARG、SIRT1、SRC、TNF 等核心靶点密切相关。KEGG 和 GO 富集分析显示他汀类药物可发挥抗凋亡、抑制细胞炎症的作用，通过 MAPK、HIF-1 等信号通路，改善高血糖对血管内皮的损伤。为进一步验证他汀类药物与核心靶点的结合能力，利用分子对接技术的锁匙原理[27]，证实瑞舒伐他汀、阿托伐他汀和氟伐他汀与核心靶点均有较好的结合能力，验证网络药理学结果的可靠和严谨。

与 PPI 核心靶点中其他分子相比，HIF-1 在糖尿病性血管内皮损伤的研究较少。Li 等[28]研究提出高糖能增加大鼠肾小球系膜细胞中 HIF-1α 的表达；Katavetin 等[29]则发现高糖下调了大鼠近端小管细胞中的 HIF-1α 水平，

而 Takiyama 等[30]却认为高糖不能激活人肾近端小管细胞中的 HIF-1α，这提示高糖对 HIF-1α 的调节作用结论存异。为此本课题采用 RT-qPCR 和 WB 检测 HIF-1α 的表达，发现高糖可显著降低内皮细胞中 HIF-1α 的表达，与 Bento CF 及 Isoe T 等的结论一致[31-32]。HIF-1α 是 HIF-1 分子的活性调节亚基，可与内皮细胞中的 HIF-1β 亚基结合，增加转录并与 VEGF 启动因子的结合，提高 VEGF 的表达水平[33-34]。在高糖环境下，VEGF 的表达水平随着 HIF-1α 的下降而显著降低，而加入瑞舒伐他汀后，HIF-1α 及 VEGF 的表达均显著增加，提示瑞舒伐他汀可逆转高糖对内皮细胞中 HIF-1α/VEGF 通路的抑制作用。

研究发现，VEGF 可下调凋亡蛋白 Bax 表达，降低 Bax/Bcl-2 比率，进而抑制含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3（cysteinyl aspartate specific proteinase-3，Caspase-3）活性，改善高糖诱导的细胞凋亡[35]，本研究使用 YC-1 联合瑞舒伐他汀干预细胞，发现 YC-1 通过抑制 HIF-1α 蛋白表达，下调 VEGF 水平，从而促进 Bax 的表达而诱导细胞凋亡，表明瑞舒伐他汀可上调 HIF-1，调节 VEGF，改善细胞凋亡。Mesquita-Britto 等[36]人研究表明 VEGF 可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路，促进紧密连接蛋白的表达和组装，从而增强血管壁的稳定性；早期的研究证实 VEGF 可减少 Occludin 的表达、破坏 ZO-1 的结构[37]。不同的研究呈现出不同的结果，但均表明 VEGF 对紧密连接相关蛋白具有一定的调节作用。Claudin、Occludin、ZO-1 的表达下降可导致旁细胞途径的通透性增高、血管通透性增加、炎症反应增加等，进而诱导血管功能紊乱[38-40]。本研究发现，经 YC-1 干预后，被瑞舒伐他汀上调的紧密连接相关蛋白表达出现显著下降，提示瑞舒伐他汀通过激活 HIF-1 上调 VEGF 的表达，刺激细胞间紧密连接蛋白的形成和表达，发挥保护血管内皮屏障的作用[41]。此外，YC-1 抑制 HIF-1α 表达后，瑞舒伐他汀促进 eNOS 释放 NO 的功效亦被逆转，提示瑞舒伐他汀可通过调控 HIF-1α/VEGF/eNOS/NO 信号通路，促进 NO 释放，改善血管内皮功能[42]，与 Ho V C 等[43]研究结果相符。

综上所述，本研究结合网络药理学和体外细胞实验对糖尿病血管内皮功能障碍的可能机制及他汀类药物保护作用进行验证。研究发现高糖通过抑制内皮细胞的活力、促进内皮细胞凋亡、降低 NO 合成和释放、阻遏紧密连接相关蛋白表达等多个途径加剧血管内皮结构和功能的障碍。瑞舒伐他汀作用于 HIF-1 及其下游 VEGF 分子，促进 eNOS、CLDN1、OCLN、ZO-1 等基因的转录和翻译表达，抑制 Bax 蛋白，逆转了高糖诱导的内皮依赖性血管舒张功能和内皮屏障功能的损伤，发挥改善血管内皮功能障碍的作用。

本研究猜测瑞舒伐他汀这类降脂药物可能通过抑制胆固醇的合成，降低细胞膜的刚度，增加细胞膜的可变性，进而促进 HIF 分子的转录活性。胆固醇水平的下降可使细胞内乳酸水平增加，大量乳酸能促进 HIF 分子的稳定性，从而上调 HIF 分子的表达，但这需后续更多实验验证。本研究基于糖尿病大血管损伤的细胞模型，发现他汀类药物可以促进 HIF-1 的表达和转录激活活性，调控下游分子的转录，发挥逆转和修复高糖对血管内皮的损伤作用，为糖尿病血管病变的防治及药物研发提供了新的理论基础和实验依据，为动物及人体水平深入研究他汀类药物作用机制提供依据。

5 结论

本研究通过网络药理学和分子对接方法确定了他汀类降脂药物抗糖尿病血管内皮功能障碍的关键靶点和可能通路。利用高糖培养 HUVECs 构建糖尿病体外实验，证实高糖可通过抑制 HUVECs 的细胞活力，促进 HUVECs 的细胞膜破损和裂解从而导致细胞的坏死和凋亡。瑞舒伐他汀通过上调 HIF-1 的活性，提高下游 VEGF 的转录和翻译，进而抑制凋亡蛋白表达来减轻高糖诱导的细胞凋亡。高表达量的 VEGF 与其受体结合调节生理性及病理性的血管新生，刺激细胞间紧密连接蛋白的形成和表达，促进 NO 释放，修复高糖对血管内皮功能的损伤（图 11）。

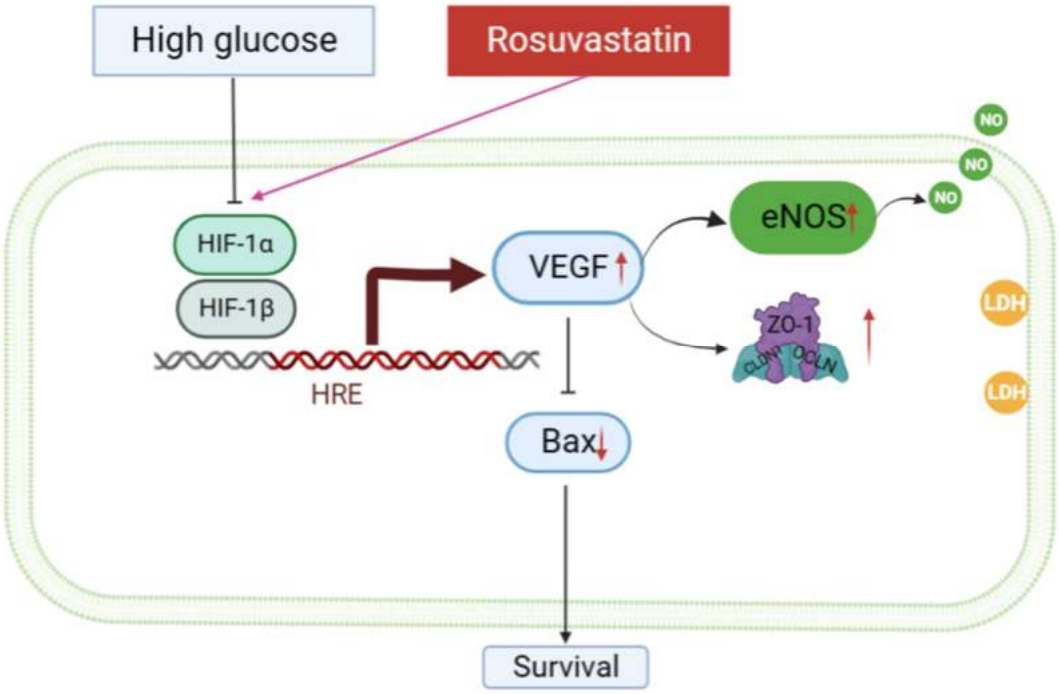


图 11：瑞舒伐他汀通过调控 HIF-1 改善高糖诱导血管内皮功能障碍的机制图

参考文献

[1] Carpenter R, DiChiacchio T, Barker K. Interventions for self-management of type 2 diabetes: An integrative review[J]. Int J Nurs Sci, 2019,6(1):70-91.

[2] Sora N D, Shashpal F, Bond E A, et al. Insulin Pumps: Review of Technological Advancement in Diabetes Management[J]. Am J Med Sci, 2019,358(5):326-331.

[3] Yun J S, Ko S H, Kim J H, et al. Diabetic retinopathy and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab J, 2013,37(4):262-269.

[4] Haspula D, Vallejos A K, Moore T M, et al. Influence of a Hyperglycemic Microenvironment on a Diabetic Versus Healthy Rat Vascular Endothelium Reveals Distinguishable Mechanistic and Phenotypic Responses[J]. Front Physiol, 2019,10:558.

[5] Xu F, Liu Y, Zhu X, et al. Protective Effects and Mechanisms of Vaccarin on Vascular Endothelial Dysfunction in Diabetic Angiopathy[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(18).

[6] Goto K, Kitazono T. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Diabetes: Mechanistic Insights and Therapeutic Implications[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(15).

[7] Widlansky M E, Hill R B. Mitochondrial regulation of diabetic vascular disease: an emerging opportunity[J]. Transl Res, 2018,202:83-98.

[8] Shi Y, Vanhoutte P M. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes[J]. J Diabetes, 2017,9(5):434-449.

[9] Engelen S E, van der Graaf Y, Stam-Slob M C, et al. Incidence of cardiovascular events and vascular interventions in patients with type 2 diabetes[J]. Int J Cardiol, 2017,248:301-307.

[10] Minami T, Muramatsu M, Kume T. Organ/Tissue-Specific Vascular Endothelial Cell Heterogeneity in Health and Disease[J]. Biol Pharm Bull, 2019,42(10):1609-1619.

[11] Gordon E, Schimmel L, Frye M. The Importance of Mechanical Forces for in vitro Endothelial Cell Biology[J]. Front Physiol, 2020,11:684.

[12] Wong B W, Marsch E, Treps L, et al. Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia[J]. EMBO J,

2017,36(15):2187-2203.
[13] Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation[J]. Aging Cell, 2009,8(3):226-238.
[14] Paniagua O A, Bryant M B, Panza J A. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients[J]. Circulation, 2001,103(13):1752-1758.
[15] Li X, Wu T T, Chen J, et al. Elevated expression levels of serum insulin-like growth factor-1, tumor necrosis factor-α and vascular endothelial growth factor 165 might exacerbate type 2 diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Investig, 2017,8(1):108-114.
[16] Satoh M, Takahashi Y, Tabuchi T, et al. Cellular and molecular mechanisms of statins: an update on pleiotropic effects[J]. Clin Sci (Lond), 2015,129(2):93-105.
[17] 董干. 辛伐他汀对高糖诱导血管内皮细胞炎症反应损伤的保护作用[D]. 苏州:苏州大学, 2011.
[18] Ma Y, Chen Z, Zou Y, et al. Atorvastatin represses the angiotensin 2-induced oxidative stress and inflammatory response in dendritic cells via the PI3K/Akt/Nrf 2 pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014,2014:148798.
[19] 王娟, 李学军. 网络药理学与药物发现研究进展[J]. 生理科学进展, 2011,42(04):241-245.
[20] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008,4(11):682-690.
[21] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019,157:107843.
[22] Bavuma C, Sahabandu D, Musafiri S, et al. Atypical forms of diabetes mellitus in Africans and other non-European ethnic populations in low- and middle-income countries: a systematic literature review[J]. J Glob Health, 2019,9(2):20401.
[23] Ali F, Hamdulay S S, Kinderlerer A R, et al. Statin-mediated cytoprotection of human vascular endothelial cells: a role for Kruppel-like factor 2-dependent induction of heme oxygenase-1[J]. J Thromb Haemost, 2007,5(12):2537-2546.
[24] Kim Y S, Ahn Y, Hong M H, et al. Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-Jun N-terminal kinase and Nuclear Factor-kappaB in endothelial cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007,49(6):376-383.
[25] 林敏华，陈子春，富显果，等. 不同降压药和他汀类药物对波动高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡及增殖的影响[J]. 中华高血压杂志, 2014, 22(10):952-957.
[26] 王娟，李学军. 网络药理学与药物发现研究进展[J]. 生理科学进展, 2011, 42(04):241-245.
[27] 宋向岗. 基于分子对接技术探讨中药川芎治疗脑缺血的物质基础及分子作用机制[D]. 广州:广东药学院, 2015.
[28] Li R, Uttarwar L, Gao B, et al. High Glucose Up-regulates ADAM17 through HIF-1α in Mesangial Cells[J]. J Biol Chem, 2015,290(35):21603-21614.
[29] Katavetin P, Miyata T, Inagi R, et al. High glucose blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia via the oxidative stress-regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia-responsible element pathway[J]. J Am Soc Nephrol, 2006,17(5):1405-1413.
[30] Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, et al. Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin: a possible role of HIF-1α expression and oxygen metabolism[J]. Diabetes, 2011,60(3):981-992.
[31] Bento C F, Pereira P. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes[J]. Diabetologia, 2011,54(8):1946-1956.
[32] Isoe T, Makino Y, Mizumoto K, et al. High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein[J]. Kidney Int, 2010,78(1):48-59.
[33] Jeon O, Song S J, Bhang S H, et al. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs[J]. J Biomed Sci, 2007,14(3):323-330.
[34] Galasso G, Schiekofer S, Sato K, et al. Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with

endothelial progenitor cell dysfunction[J]. Circ Res, 2006,98(2):254-261.

[35] Yang Z, Mo X, Gong Q, et al. Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose[J]. Apoptosis, 2008,13(11):1331-1343.

[36] Mesquita-Britto M, Mendonça M, Soares E S, et al. VEGF/VEGFR-2 system exerts neuroprotection against Phoneutria nigriventer spider envenomation through PI3K-AKT-dependent pathway[J]. Toxicon, 2020,185:76-90.

[37] Wang W, Dentler W L, Borchardt R T. VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001,280(1):H434-H440.

[38] Chen W, Ju X Z, Lu Y, et al. Propofol improved hypoxia-impaired integrity of blood-brain barrier via modulating the expression and phosphorylation of zonula occludens-1[J]. CNS Neurosci Ther, 2019,25(6):704-713.

[39] Rochfort K D, Cummins P M. Cytokine-mediated dysregulation of zonula occludens-1 properties in human brain microvascular endothelium[J]. Microvasc Res, 2015,100:48-53.

[40] Chen Y H, Xu X, Sheng M J, et al. Effects of asymmetric dimethylarginine on bovine retinal capillary endothelial cell proliferation, reactive oxygen species production, permeability, intercellular adhesion molecule-1, and occludin expression[J]. Mol Vis, 2011,17:332-340.

[41] Ho V C, Duan L J, Cronin C, et al. Elevated vascular endothelial growth factor receptor-2 abundance contributes to increased angiogenesis in vascular endothelial growth factor receptor-1-deficient mice[J]. Circulation, 2012,126(6):741-752.

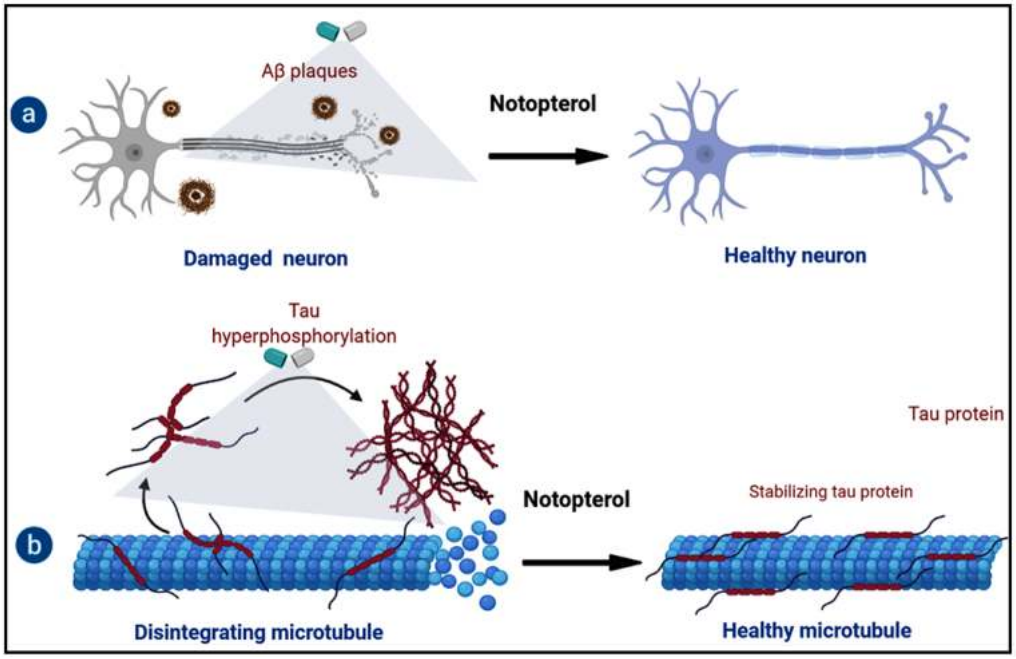
[42] Roberts A C, Porter K E. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes[J]. Diab Vasc Dis Res, 2013,10(6):472-482.

[43] Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer[J]. Int J Cancer, 2016,138(5):1058-1066.

A nature molecule Notopterol alleviate the amyloid-β, tau and neuroinflammation pathophysiology in Alzheimer's disease mice A BACE1 and GSK3β dual inhibitor Notopterol

Xiaowen Jiang[1, 2], Nan Wang[3, 4], Xinming Jiao[3], Lijun Zhou[1], Xin Liu[3], Xiang Li[1, 3], Qingchun Zhao[4*], Huiyuan Gao[1, 2*]

([1]School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, People's Republic of China;[2]Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery, Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, People's Republic of China;[3]School of Life Science, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, People's Republic of China;[4]Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110840, People's Republic of China.)



【**Abstract**】**Aims:** Alzheimer's disease (AD) is characterized by amyloid plaque deposition and neurofibrillary tangles formed by hyperphosphorylated tau. The concurrent inhibition of the validated AD targets β-secretase (BACE1) and glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) by attacking both β-amyloid and tau protein cascades have been identified as a promising strategy for AD treatment.

*Correspondence authors:

Prof. H.-Y. Gao,

School of Chinese Medicine Chemistry, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, People's Republic of China, Tel.: +86-24-23986481, Fax: +86-24-23986460, E-mail address: sypugaohy@163.com

Prof. Q.-C. Zhao,

Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110840, People's Republic of China, Tel.: +86-24-28856262, E-mail address: zhaoqingchun1967@163.com

Methods: The ADMET and pharmacokinetic profile of Notopterol following oral dosing in mice were evaluated. *In vivo* calcium ion microscopy was performed on the cortex to monitor the inhibitory effect of Notopterol on cortical excitability. Finally, behavioral tests were conduct to analyze.**Results:** In this study, we demonstrated that Notopterol exhibits excellent safety. Due to its outstanding brain permeability, reasonable oral dose was sufficient to prevent cognitive impairment in AD mice. Furthermore, the inhibition of BACE1 and GSK3β can silence cortical neuronal hyperactivity. Notopterol can suppress Aβ plaque deposition, neurofilament aggregation and neuroinflammation in APP/PS1 mice. In addition, Notopterol reverse the overexpression of phosphorylated tau in GSK3β-overexpression APP/PS1 mice, which provided direct evidence of the inhibition potency of Notopterol on GSK3β inhibition. **Conclusions:** Our data highlighted the potential benefits of Notopterol as a dual inhibitor of BACE1 and GSK3β in the treatment of AD.
【**Key words**】Alzheimer's disease; BACE1 and GSK3β; dual inhibitor; neuronal hyperactivity; neuroinflammation

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common dementia in the elderly which is responsible for about 60–70% of all dementia cases [1]. It is a highly complex, rapidly progressing neurodegenerative disease characterized by dense amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the brain, as well as a large number of neuron loss [2,3]. AD is first described by Dr. Alzheimer in 1907, but until now there is no effective treatment to slow down or stop its underlying pathology. At present, FDA approved several AD drugs to relieve symptoms, including Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) and non-competitive N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist [4]. These drugs can only provide temporary and incomplete symptom relief, and can only benefit patients with moderate and severe AD [5,6]. In recent years, there are drugs for treating AD in China and the United States, such as Sodium oligomannate and aducanumab, but their anti-AD efficacy has yet to be verified [7]. Hence, it is urgent to seek novel pharmacological treatments for AD.

β-secretase (BACE1) is a membrane-bound aspartyl protease, which is necessary for the processing of the amyloid precursor protein (APP) to form the N-terminal of Aβ peptide and protein-soluble APPβ (sAPPβ) [8]. Subsequently, protein hydrolysis in the membrane catalyzed by γ-secretase complex releases 38-43 amino acids of Aβ peptide, forming pathogenic oligomeric and fibrous Aβ [9]. Glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) is the most implicated in the development of tau pathology in AD [10]. GSK3β can phosphorylate most serine and threonine residues of tau to form protein paired helix filaments which is considered to be the major tau kinase involved in the formation of NFTs, making it a potential target for AD therapy [11]. Furthermore, activating GSK3β contributes to Aβ production and Aβ-mediated neuronal death [12,13]. Surprisingly, GSK3β inhibitors have impressive effects in various cell cultures and preclinical studies, but lack efficacy in AD patients [14,15]. It is likely that treatment in patients may need to be started early in the disease process. Alternatively, the complex mechanisms of the pathogenesis of human AD will need to target multiple molecules at the same time, including but not limited to GSK3β [16]. Given the crosstalk between Aβ and tau pathology [17], a multi-target approach based on simultaneously inhibiting BACE1 and GSK3β is expected a promising therapy to achieve effective treatment [18,19].

Notopterygium incisum Ting ex H.T. Chang (N. incisum) is the dried rhizome of *Notopterygium incisum*, which has been used for the treatment of rheumatoid arthritis, headaches and colds since ancient times in China [20]. Our previous research demonstrated that *Notopterygium incisum* extract (NRE) can improve cognitive impairment of APP/PS1 mice via inhibiting Aβ cascade, tau pathology, and neuroinflammation [21]. Benefiting from virtual screening and bioinformatics *in silico*, we identified Notopterol with simultaneously inhibitory activity on BACE1 and GSK3β from *Notopterygium incisum* [22]. As the pharmacological intervention of AD is expected to take a long time, it is very important to have compounds with appropriate efficacy and safety, which is the reason why many compounds fail to enter long-term clinical trials [23-25]. Hence, this study mainly focused on two aspects: (1) The brain exposure and safety of Notopterol. (2) BACE1 and GSK3β dual inhibitor dependent repair of Alzheimer's pathophysiology.

Methods

Animal

APP/PS1 mice and wild-type mice were purchased from GemPharmatech (stock no. 005625, Nanjing, China). All mice were fed at room temperature under 12 hours light/dark cycle standard conditions and provided with food and water ad libitum. This study was approved by the Ethics Committee of the Institutional Animal Care and Use Committee of Shenyang Pharmaceutical University.

Six-month-old male APP/PS1 mice were randomly separated into two groups (n=10) The Notopterol-treated mice group was given an oral administration with 20 and 40 mg/kg/d Notopterol with 5% DMSO in 5% CMC-Na for 2 months. Age matched wild type C57BL/6 mice as a control group were given vehicle solvent.

For epilepsy assay, two-month-old male C57BL/6J mice were purchased from HFK bioscience (Beijing, China) and habituated for 7 days. C57BL/6 mice were divided into three groups (n=6 per group): control group, epilepsy group and Notopterol treated group. The Notopterol group was given an oral administration with 40 mg/kg/d for 7 days. On the 8th day, mice received i.p. injection of Pentaerythrazole (PTZ) at a single dose of 55 mg/kg. Mice in the control group were injected with equivalent volume of saline.

Pharmacokinetic study

Notopterol (40 mg/kg) was orally administered to C57BL/6J mice. Eyeball blood were collected at 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 12 h (n=5). The mice were killed, and the heart, liver, spleen, lung, kidney and brain were collected, respectively. Homogenate tissue samples with 3/5-fold 1 mM PBS and acetonitrile (1:1, v/v). Intrinsic standard (terfenadine) was added to blood or tissue homogenate samples, and Notopterol was extracted by 3-fold acetonitrile quenching. The plasma was isolated from the blood samples by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min at 4℃. The supernatant was directly injected into the LC/MS/MS system (MD3200, Applied Biosystems). Das 3.0 software was used for analyzing data. See the supplementary materials for details.

Magnetic resonance imaging (MRI) scanning

MRI assay was performed using a Siemens Verio 3.0T MRI scanner. A volume coil of 4 cm diameter is used for radio frequency (RF) transmission and an orthogonal surface coil is used for signal detection. The mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of 3% chloral hydrate (Aladdin, Shanghai, China). When the mice were completely anaesthetized, they were fixed in the prone position on the scanning bed. Fast Spin Echo (FSE) sequence T2 weighted imaging (T2 weighted imaging, T2 WI) was performed successively after receiving the coil with the following parameters: TR of 2500 ms, effective TE of 66 ms, FOV of 0.96 cm×0.96 cm, Thk/Gap=0.8 mm/1 mm, average=4.

In vivo calcium imaging

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 3% chloral hydrate during surgery and imaging. Clean and dry the surface of the skull, use a cranial drill to open a circular hole with a diameter of 0.5 cm on the surface of the skull, apply a thin layer of cyanoacrylate glue around it, and stick a special chamber. Ca^{2+} probe Cal Green™1 AM (AAT Bioquest, USA) was loaded on the surface of cerebral cortex, incubated for 30 min, then the chamber was perfused with artificial cerebral spinal fluid (ACSF). Imaging was performed on a dual scanner confocal microscope Olympus Fluoview 1000, with 20 (air, NA=0.75) objectives. Microscope settings were adjusted to generate images displaying background fluorescence values slightly larger than zero in order to capture the complete signal stemming from the respective fluorescent dyes. For imaging, fluorescence emission was filtered with a DM 405/488 and split through a dichroic filter.

coumarin dyes were excited with 488 nm laser light and emitted light was collected between 500 and 600 nm.

Morris water maze (MWM) test

The MWM assay was performed as previously described [21]. Briefly, mice were placed in a circular pool (120 cm in diameter and 50 cm in depth) and sprinkled with titanium dioxide. In each experiment, each mice had 60s to find a hidden platform. If the mouse find the platform during 60s, the animal was placed and stayed on the platform for 10s. If the mouse cannot find the platform, place the animal on the platform by hand and let it stay on the platform for 10s. On the day 6, the platform was taken away and the space exploration experiment of the mice was carried out.

Western blotting

Brain sample were isolated from each group and homogenized in RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma, USA) using a hand-held motor, maintaining at 4 ℃. Protein concentration was determined by BCA. Cell Lysates SDS- buffer was added to dish and the lysate was collected then boiled for 10 min at 100 ℃. Cell lysates were separated on 12 % SDS polyacrylamide gel transferred onto PVDF membranes (Millipore, NK, USA). Primary antibodies: APP (CST, NAB228, 1:1000), COX2 (Wanleibio, WL01750, 1:1000), IL-1β (Wanleibio, WL02257, 1:1000). After overnight incubation at 4 ℃, the membrane was washed three times with TBST and then incubated with secondary antibody for 1 hour at room temperature. The results were visualized by chemiluminescence using an ECL plus reagent (Beyotime, Shanghai, China). GAPDH (Wanleibio, 1:15000) were used as internal controls in Western blot analysis. The gray value of the western blot results was analyzed using image analysis software (Image J).

Immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) staining

Tissue preparation was performed as described protocol previously [26]. For immunohistochemical analysis, 10 mM citrate buffer (pH 6.0) was used for antigen retrieval to effectively expose the epitope of the antibody. Treat with 0.3% H_2O_2 to quench endogenous peroxidase, and use blocking buffer (10% goat serum in PBS containing 0.3% Triton-X) to eliminate non-specific binding of antibodies at room temperature for 1 hour. The primary antibody prepared in blocking buffer is left overnight at 4°C and then incubated with the secondary antibody at room temperature for 30 min. After that, the sample was incubated with the first antibody overnight at 4 °C, and then incubated with HRP linked or fluorescent probe labeled secondary antibody or fluorescent probe for 1h. The antibodies used include: mAb p-tau (S396) (Wanlei bio, Shenyang, China), mAb GFAP (Servicebio, Wuhan, China) and mAb Iba1 (Servicebio, Wuhan, China). Astrocytes and microglia were detected by anti GFAP antibody (1:500) and anti Iba1 antibody (1:500). The number of patches in each ROI was counted and quantified. For immunofluorescence, the nuclei were stained with 4, 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in 1:5000 diluent. The positive microscope (Nikon, Eclipse Ni-E, Japan) was used to take pictures.

Thioflavine T (ThT) staining

ThT (Yuanye bio, Shanghai, China) was dissolved in 50% ethanol at 500 mM and brain sections were stained for 10 min. In order to remove the non-specific binding of dyes, the slides were immersed in PBS for 10 min, then dried and observed by a positive microscope.

Bielschowsky nerve fiber staining (silver staining)

Ethanol silver ammonia staining solution formula: 5 g silver nitrate, was dissolved in 60 mL distilled water, added 40 mL absolute ethanol, dissolved and mixed, and added concentrated ammonia water dropwise until the precipitate was completely dissolved. After preparation, store in the dark at 4℃. Formaldehyde reducing solution formula: 40 mL of formaldehyde solution, 120 mL of distilled water, 5 mL of absolute ethanol, and 5 mL of glacial acetic acid. The sections

were dewaxed to hydrated, and stained with a 2% silver nitrate aqueous solution for 30 min at 37°C in the dark. Then placed the sections in a formaldehyde reducing solution for a few seconds, dripped with ammonia silver solution for 20-40 s, poured out the dye solution, and used directly reduce the formalin solution again for 1 to 2 min, soaked in 0.2% gold chloride solution for 5 min, fixed with 5% sodium thiosulfate aqueous solution for 1-3 min, and stained with 0.1% nuclear fast red for 3 min. Sections were dehydrated and mounted.

Tunel assay

Apoptosis in the hippocampus was detected by TUNEL method (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling). The mice were sacrificed by cervical dislocation. The brains were removed immediately and placed into containing 4% paraformaldehyde in PBS, and then processed for paraffin embedding. TUNEL staining was carried out as previously described [27]. For TUNEL positive cells, the positive apoptotic nuclei are green, and the average number of positive cells in the sample are calculated.

ELISA assay

The mice brain was homogenized in PBS using a hand-held homogenizer, and then the homogenate was centrifuged at 2.0×10^4 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was collected and tested for IL-1β and TNF-α according to kit instructions (Lvye Life Sciences, Shanghai, China).

Plasmid Construction

To construct an expression plasmid encoding *GSK3B*, we first synthesized the mice *GSK3B* gene according to the *GSK3B* (NM_019827.7) CDS region of the NCBI database. The expression plasmid (GL120 pSLenti-SFH-EGFP-P2A-Puro-CMV-MCS-3×FLAG-WPRE) is regulated by the CMVIE promoter. In order to generate the full length *GSK3B* sequence, we amplified *GSK3B* with high fidelity Primestar enzyme and designed primers (5' -> 3') F: TGGCAGCAAGGTAACCACAG, R: CGGTTCTTAAATCGTTGTCCTG. PCR products were amplified by agarose gel electrophoresis, and the target gene bands were cut from agarose gel electrophoresis.

The target gene fragment and the linearized vector were added to a centrifuge tube at a molar ratio of 2:1 for recombination reaction. After mixing, incubate at 37°C for 30 min, and then transfer to ice for 5 min to transform into DH5α competent cells. The transformants grown on the plate were picked and resuspended in 10 μL LB medium, and 1 μL was used as a template for colony PCR identification, and the positive clones obtained were verified by sequencing.

Transfection and Clonal Selection

When the cell fusion rate reached 60%, 293T cells were infected with packaged lentivirus. The recombinant plasmid was effectively transfected and green fluorescence be observed under fluorescence microscopy in 293T cells from the supernatant of lentivirus effectively infected. Stable transfectants were selected in medium containing 1 μg/mL Puromycin (Life Technologies, Inc.). Steady-state expression of mice GSK3b was assayed by Western blot analysis using mAb FLAG (Sigma, USA).

Brain stereotactic injection

Stereotactic brain injection was performed according to the previous literature. GSK3β-overexpression lentivirus (3.62E+08 TU/mL) or vehicle lentivirus were injected with a speed of 2 μL/10 min at the following coordinates (from bregma): mediolateral=±1.1mm, anteroposterior=-0.5mm, dorsoventral=-3.0 mm (the depth of needle insertion takes the dura as the starting point). After injection, stay for 3 min and then pull out the needle. The skin incision was sutured,

intramuscular injection of penicillin was used to prevent infection, and the mice were returned to the cage for feeding recovery. After 3 days of recovery, the mice were given oral Notopterol at 40 mg/kg or vehicle solvent for 2 months.

Statistical analysis

Graphs were obtained with GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Unpaired Student's t test was used to analyze two groups. Two-way ANOVA followed by Bonferonni post hoc analyses for was used to analyze MWM data. One-way ANOVA analysis followed by Tukey post hoc analyses performed in three or more groups statistical analyses. The statistical method for each quantitated data was described in the Figure legend. Levels of significance are as follows: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. $P < 0.05$ was considered as statically significant. Data were expressed as mean ± SD.

Results

Oral delivery of Notopterol exhibits excellent brain exposure and safety

Before conducting the *in vivo* pharmacodynamic study, we investigated the ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion) profiles of Notopterol. We found that the metabolism of Notopterol in human plasma was stable within 90 min **(Figure 1A)**. Furthermore, Notopterol was relatively stable in human and rat liver microsomes for 30 min **(Figure 1B-C)**. Metabolic half-life ($T_{1/2}$) of Notopterol in human liver microsomes was 215 min and the intrinsic clearance (CL) was 0.322 mL/min/mg*protein, indicating that Notopterol is metabolized slowly in liver microsomes (**Table 1**). In addition, Notopterol showed low inhibitory activity against CYP450 ($IC_{50} > 10$ μM for four isotypes), except for the human liver microsomal CYP3A4 subtype with IC_{50} of 8.071 μM (**Table 2**).

To further address the functional role of Notopterol in AD mice model, we firstly we performed Notopterol acute toxicity and chronic toxicity experiments on C57BL/6 wild-type mice. Toxicities were estimated by the weight gain and hair loss of mice exposed to Notopterol, as well as by histopathological changes in organs. No general behavioral changes and signs of toxicity were observed in mice exposed to Notopterol at 1,000 mg/kg for single dose and 20 or 40 mg/kg per daily for 60 days, as well as the histopathological changes (**Figure S1 and Table 2**).

As illustrated in **Figure1D** and **Table S2**, it was found that Notopterol pharmacokinetics were characterized by rapid plasma clearance and a low elimination rate, suggesting extensive tissue distribution. It was found that Notopterol was rapidly absorbed and distributed to the brain reaching its peak concentrations at 0.5h after oral administration, with 5 times higher than that in blood (**Figure 1E**). In other words, Notopterol is less distributed in the blood and more distribution in the tissues, especially in the brain (**Figure 1F**), which is also consistent with our prediction *in silico*[22]. Based on these results, we decided to set orally administer 20 and 40 mg/kg per day Notopterol dosages to mice for pharmacological research.

Notopterol can rescue neuronal hyperactivity in APP/PS1 mice

The APP/PS1 mice showed behavioral changes at the age of 4 months, and Aβ plaques began to appear at the age of 6 months [28]. Therefore, we analyzed the Notopterol pre-administered mice with T2WI magnetic resonance imaging (MRI) at 6 months old. **Figure 2A** showed that the brain tissue of AD transgenic mice had obvious low signal area on T2WI imaging. There were a lot of low signal spots in the parietal cortex and hippocampus of APP/PS1 mice. And, there was no obvious point like low signal in the brain of WT mice. These results indicated that Aβ plaque in the brain of APP/PS1 transgenic mice at early stage could be detected by T2WI imaging.

Neuronal hyperactivity is a key pathophysiological feature of AD mouse models and AD patient [29,30]. To explore the effects of BACE1 and GSK3β dual inhibitor on neuronal function, we examined Ca^{2+} imaging of cortical neurons. Our results showed that most of the neurons in wild-type mice cortex were silent. The neuronal hyperactivity phenotype of APP/PS1 mice was partially corrected after gavage of 40 mg/kg Notopterol for 2 months (**Figure 2B**).

Chronic treatment of Notopterol has therapeutic effect on the cognition of AD mice

To assess whether Notopterol treatment had any beneficial effects on the cognition of AD mice, we performed Morris water maze assay. Our previous studies have confirmed that Notopterol can reverse the cognitive impairment of APP/PS1 mice [31]. Next, we explored the effect of Notopterol on the cognitive function of non-familial dementia mice.

Pentylenetetrazol (PTZ) induce excitatory seizure and cause cognitive impairment in mice, which is a well-known method used to study the excitotoxicity of AD mice model [32]. There was no significant difference in swimming ability between the groups in the training, while the escape latency of PTZ-treated mice was significantly longer than that of the control group. However, the escape latency of Notopterol-treated mice was significantly decreased compared with that of PTZ-treated mice **(Figure 3A-C)**. In addition, n can also reduce the number of apoptotic cells in the hippocampus of PTZ exposed mice **(Figure 3D-E)**. These results indicated that Notopterol not only prevents memory impairment in Aβ-induced familial AD mice, but also reverses the memory impairment in non-familial AD mice.

Notopterol ameliorates Aβ plaques and NFT in APP/PS1 transgenic mice

Given Notopterol is a BACE1 and GSK3β dual inhibitor, we first investigated the deposition of amyloid plaques and NFT in APP/PS1 mice. As illustrated in **Figure 4A-B**, the thioflavine T (ThT)-stained plaque burdens in hippocampus and cortex of 40 mg/kg Notopterol-treated APP/PS1 transgenic mice were significantly decreased compared to those of vehicle group mice. Next, we investigated the effects of Notopterol on the C-and N-terminal APP fragments. C99 and sAPPβ are the metabolites produced by APP by BACE1 cleavage [33]. The C99 fragment and the Aβ oligomer in the brain of APP/PS1 mice were markedly reduced after treated with the Notopterol (**Figure 4C-D**). At last, we determined neurofibrillary tangles (NFT) in APP/PS1 mice after treated with Notopterol. Gallyas-Braak staining showed that Notopterol reduced NFT the in the cortex (**Figure 4E**).

Notopterol suppressed phosphorylation of tau induced by overexpression of GSK3β

Activation of GSK3β, also known as tau protein kinase I, is closely linked to tau phosphorylation [34]. We used gain-of-function assays to investigate the effect of Notopterol as an inhibitor of GSK3β on tau phosphorylation. We first constructed a plasmid expressing full-length GSK3β, as shown in **Figure 5A**. Then, this plasmid was packaged by lentivirus and transfected into 293T cells for expression. Western blot results showed that the expression of GSK3β in GSK3β-transfected cells was significantly increased compared with the vehicle group (**Figure 5B**), stabilized the cell line after optimizing the conditions. In order to improve the infection efficiency of the virus, we concentrated the virus solution to 3.62E+08 TU/mL. GSK3β-expressing lentivirus was then injected into the lateral ventricle of APP/PS1 mice via a stereotaxic apparatus (**Figure 5C**). IHC results showed that GSK3β and phosphorylated tau were significantly increased in APP/PS1 mice injected with GSK3β-expressing lentivirus compared with untreated APP/PS1 mice (**Figure 5D**). In contrast, the expression of phosphorylated tau was suppressed in GSK3β-overexpressing APP/PS1 mice chronically exposed to Notopterol compared with GSK3β-overexpressing APP/PS1 mice (**Figure 5E-F**). These results provide direct evidence of the inhibition potency of Noteprol on GSK3β activation.

Notopterol attenuates neuroinflammation in APP/PS1 transgenic mice

A large amount of amyloid plaque deposits in the brain are usually accompanied by the accumulation of many immune cells such as known microglia which usually reflect the degree of damage and toxicity of AD [35]. Iba1 and GFAP are the markers of microglia and astrocytes, respectively [36]. We explored immunofluorescence of Iba1 and GFAP to examine the expression and distribution of microglia and astrocytes in hippocampus and cortex. After oral administration of Notopterol, abnormal elevations of Iba1 and GFAP in the cortex of APP/PS1 mice were relieved, as well as those in CA1 and dentate gyrus in hippocampus (**Figure 6A-B**). Furthermore, we performed Sholl analysis to identify the morphology of Iba1 positive cells. As shown in **Figure 6C-D**, the branching of microglia in APP/PS1 mice was significantly reduced, indicating that it was activated. The branching of microglia increased significantly after Notopterol treatment, which indicated that the activation of microglia was inhibited. In addition, the expressions of COX-2 and IL-1β were also decreased in whole brain from APP/PS1 mice after treated with Notopterol compared with those of vehicle mice (**Figure 6E-F**). Finally, we used ELISA to detect TNF- α and IL-1β levels in mice brain. **Figure 6 G** showed that the level of TNF-α and IL-1β in APP/PS1 mice was significantly higher than that in WT mice (P=0.0015 for TNF-α, P=0.0153 for IL-1β), and Notopterol could inhibit these increase (P=0.0045 for TNF-α, P=0.043 for IL-1β). This suggests that Notopterol can reduce the number of M1 microglia and inhibit the activation of microglia in the brain of APP/PS1 mice.

Discussion

In this study, we report that (1) Notopterol, a furocoumarin from *Notopterygium incisum*, exhibits excellent brain exposure and safety. (2) orally administered Notopterol produces behavioural deficits in the excitotoxicity of AD mice model and a dose-dependent reduction of Ab plaque deposits and a reduction of Aβ plaques and NFT in APP/PS1 transgenic mice. (3) Notopterol suppressed the phosphorylation of tau and neuroinflammation in APP/PS1 mice.

Recently, the research on the safety of traditional Chinese medicine (TCM) has attracted the attention of Asians who are accustomed to using TCM [37]. As a natural product, coumarin is known for its hepatotoxicity and species specificity. Notopterol is a furocoumarin isolated from *Notopterygium incisum*, a traditional Chinese medicine that is widely used in East Asian countries. It has been reported that herbs containing furocoumarin can cause hepatitis, and these findings suggest that furocoumarin may be the cause of the toxicity of certain foods and herbs [38,39]. Therefore, it is necessary to evaluate the toxicological properties of furanocoumarin, especially liver toxicity. FU et al. found that Notopterol can affect seven human liver CYP enzymes within 30 min at 37°C, of which CYP2D6 has the strongest inhibitory effect [40]. We incubated Notopterol with liver microsomes for 90 min, and found that its IC_{50} for human CYP3A4 was 8 μM, and the IC_{50} for rats was 10 μM. In addition, we also found that it is more stable than liver microsomes in the plasma of human, rat and mouse. Notably, Wang et al reported that the level of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase in serum increased significantly after oral administration of 40 mg/kg furocoumarin for one month, which indicated that hepatotoxicity existed[41]. In our study, we found that there was no obvious toxic effect in mice after chronic oral administration of 20 mg/kg and 40 mg/kg Notopterol for two months, which meant that Notopterol was safe for mice at the oral dose of 40 mg/kg.

The physicochemical properties of Notopterol, such as molecular weight and lipophilicity, are in the known range for brain-penetrating compounds. Consistent with its physicochemical and membrane transport characteristics, Notopterol demonstrated excellent PK and pharmaceutical properties, including the ability to cross the blood brain barrier (BBB).
BACE1 and GSK3β involved in AD have a significant opposite effect on the activity of the neural circuits in the body. Aβ can causes excessive excitability, while tau inhibit and silence the activity of many neurons [42]. We found that the amplitude signal of calcium ion in the cortex of APP/PS1 mice was significantly higher than that of wild-type mice, which was consistent with the previous studies [42-44]. This is because a large number of amyloid deposits occurred in APP/PS1 mice

at 8 months, whereas phosphorylated tau was not sufficient to silence the activity of excitatory neurons. Previous research reports that BACE1 inhibitor (NB-360) could silence the excitatory activity of the cortex [45]. However, BACE1 and GSK3β dual inhibitor confers not only a reduce the amyloid plaques advantage, but also inhibit the formation of NFT in AD mice. In the subsequent study, we found that Notopterol significantly silenced the hyperactivity of cortical neurons in APP/PS1 mice, and the pharmacologic inhibition of BACE1 and GSK3β activity could effectively attenuated the pathophysiological and cognitive consequences of abnormal Aβ accumulation and tau hyperphosphorylation.

The activation of microglia and neuroinflammation are the third key determinant of the pathogenesis and progress of Alzheimer's disease, which are independent or synergistic with tau protein and amyloid protein [46]. Amyloid-induced pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species and other inflammatory mediators play a key role in neurodegeneration [47-49]. Coexisting with amyloid-β, neuroinflammation can induce tau protein to spread from medial temporal lobe to other cortical areas, which may be related to the downstream neurodegenerative process and cognitive decline [50]. The number of Iba1-positive activated microglia and GFAP-positive astrocyte in the Notopterol treatment mice was significantly reduced compared with the APP/PS1 group. Moreover, the inflammatory factors (TNF-α and IL-1β) in the entire brain region were also significantly reduced after exposure to Notopterol. These results suggested that Notopterol could reduce the number of M1 microglia transformed from resting M2 microglia in the brain of AD mice.

Conclusions

In this study, we demonstrated that AD-related learning and memory deficits in an excitotoxicity mice model of AD were ameliorated by Notopterol, a dual inhibitor of BACE1 and GSK3β. Currently available data suggest that Notopterol effectively stops further amyloid-β deposition and NTFs and can also have marked effects on the downstream neuroinflammation at least in an APP/PS1 mice model. Our results provided direct evidence that BACE1 and GSK3β dual inhibitor may have the desired beneficial downstream effects on AD pathology. In light of its safety and brain bioavailability, Notopterol appears to be a promising therapeutic strategy for AD in the future research.

Author contributions

Xiaowen Jiang, project design, experimental verification, data analysis and writing. Nan Wang, experimental verification. Xinming Jiao, experimental verification and data analysis. Lijun Zhou, experimental verification and data analysis, Xin Liu, experimental verification. Xiang Li, experimental verification and discussion. Qingchun Zhao, supervision and research grants. Huiyuan Gao, supervision and research grants.

Acknowledgment

This project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (grant numbers: 81973209 and 82104154), Natural Science Foundation of Liaoning Province (2022-BS-156) and Basic Scientific Research Project of Liaoning Provincial Department of Education (LJKQZ20222347).

Competing financial interests:

None.

Supplementary Materials

The supplementary data can be found online.

References

1. Xu Q-Q, Su Z-R, Hu Z, Yang W, Xian Y-F, Lin Z-X. Patchouli alcohol ameliorates the learning and memory impairments in an animal model of Alzheimer's disease via modulating SIRT1. *Phytomedicine.* 2022;106:154441.

2. Frisoni GB, Altomare D, Thal DR, et al. The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. *Nat Rev Neurosci.* 2022;23(1):53-66.

3. James BD, Bennett DA. Causes and Patterns of Dementia: An Update in the Era of Redefining Alzheimer's Disease. *Annu Rev Public Health.* 2019;40:65-84.

4. Liu W, Wu L, Liu W, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin derivatives as multifunctional ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2022;242:114689.

5. Atri A. Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. *Semin Neurol.* 2019;39(2):227-240.

6. Huang LK, Chao SP, Hu CJ. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):18.

7. Jeremic D, Jiménez-Díaz L, Navarro-López JD. Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid-β peptides in Alzheimer's disease: a systematic review. *Ageing Res Rev.* 2021;72:101496.

8. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999;286(5440):735-741.

9. Masters CL, Selkoe DJ. Biochemistry of amyloid β-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(6):a006262.

10. Ye J, Yin Y, Yin Y, et al. Tau-induced upregulation of C/EBPβ-TRPC1-SOCE signaling aggravates tauopathies: A vicious cycle in Alzheimer neurodegeneration. *Aging Cell.* 2020;19(9):e13209.

11. Llorach-Pares L, Rodriguez-Urgelles E, Nonell-Canals A, et al. Meridianins and Lignarenone B as Potential GSK3β Inhibitors and Inductors of Structural Neuronal Plasticity. *Biomolecules.* 2020;10(4).

12. Billingsley ML, Kincaid RL. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J.* 1997;323 (Pt 3):577-591.

13.Hernandez F, Lucas JJ, Avila J. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 2013;33 Suppl 1:S141-S144.

14. Bhat RV, Andersson U, Andersson S, Knerr L, Bauer U, Sundgren-Andersson AK. The Conundrum of GSK3 Inhibitors: Is it the Dawn of a New Beginning? *J Alzheimers Dis.* 2018;64(s1):S547-s554.

15. Lovestone S, Boada M, Dubois B, et al. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;45(1):75-88.

16. D'Mello SR. When Good Kinases Go Rogue: GSK3, p38 MAPK and CDKs as Therapeutic Targets for Alzheimer's and Huntington's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).

17. Polanco JC, Li C, Bodea L-G, Martinez-Marmol R, Meunier FA, Götz J. Amyloid-β and tau complexity - towards improved biomarkers and targeted therapies. *Nature reviews Neurology.* 2018;14(1):22-39.

18. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329-344.

19. Prati F, De Simone A, Bisignano P, et al. Multitarget drug discovery for Alzheimer's disease: triazinones as BACE-1 and GSK-3β inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015;54(5):1578-1582.

20. Azietaku JT, Ma H, Yu XA, et al. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of Notopterygium incisum. *Journal of ethnopharmacology.* 2017;202:241-255.

21. Jiang X-W, Liu W-W, Wu Y-T, et al. Notopterygium incisum extract (NRE) rescues cognitive deficits in APP/PS1 Alzhneimer's disease mice by attenuating amyloid-beta, tau, and neuroinflammation pathology. *Journal of ethnopharmacology.* 2019:112433-112433.

22. Jiang X, Lu H, Li J, et al. A natural BACE1 and GSK3β dual inhibitor Notopterol effectively ameliorates the cognitive deficits in APP/PS1 Alzheimer's mice by attenuating amyloid-β and tau pathology. *Clinical and translational medicine.* 2020;10(3):e50.

23. Swahn BM, Kolmodin K, Karlström S, et al. Design and synthesis of β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE1) inhibitors with in vivo brain reduction of β-amyloid peptides. *J Med Chem.* 2012;55(21):9346-9361.

24. May PC, Willis BA, Lowe SL, et al. The potent BACE1 inhibitor LY2886721 elicits robust central Aβ pharmacodynamic responses in mice, dogs, and humans. *J Neurosci.* 2015;35(3):1199-1210.
25. Fielden MR, Werner J, Jamison JA, et al. Retinal Toxicity Induced by a Novel β-secretase Inhibitor in the Sprague-Dawley Rat. *Toxicol Pathol.* 2015;43(4):581-592.
26. Hu X, Song Q, Li X, et al. Neuroprotective effects of Kukoamine A on neurotoxin-induced Parkinson's model through apoptosis inhibition and autophagy enhancement. *Neuropharmacology.* 2017;117:352-363.
27. Dixit S, Dhar P, Mehra RD. Alpha lipoic acid (ALA) modulates expression of apoptosis associated proteins in hippocampus of rats exposed during postnatal period to sodium arsenite (NaAsO(2)). *Toxicol Rep.* 2015;2:78-87.
28. Cao D, Lu H, Lewis TL, Li L. Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2007;282(50):36275-36282.
29. Keskin AD, Kekuš M, Adelsberger H, et al. BACE inhibition-dependent repair of Alzheimer's pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(32):8631-8636.
30. Esposito Z, Belli L, Toniolo S, Sancesario G, Bianconi C, Martorana A. Amyloid β, glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track? *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(8):549-555.
31. Jiang X, Lu H, Li J, et al. A natural BACE1 and GSK3β dual inhibitor Notopterol effectively ameliorates the cognitive deficits in APP/PS1 Alzheimer's mice by attenuating amyloid-β and tau pathology. *Clin Transl Med.* 2020.
32.Ittner A, Chua SW, Bertz J, et al. Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid-β toxicity in Alzheimer's mice. *Science.* 2016;354(6314):904-908.
33. Neumann U, Rueeger H, Machauer R, et al. A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile and robust reduction of amyloid-β and neuroinflammation in APP transgenic mice. *Mol Neurodegener.* 2015;10:44.
34. Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 1993;325(3):167-172.
35. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(6):358-372.
36. Sabogal-Guaqueta AM, Carrillo-Hormaza L, Osorio E, Cardona-Gomez GP. Effects of biflavonoids from Garcinia madruno on a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacol Res.* 2018;129:128-138.
37. Brendel M, Focke C, Blume T, et al. Time Courses of Cortical Glucose Metabolism and Microglial Activity Across the Life Span of Wild-Type Mice: A PET Study. *J Nucl Med.* 2017;58(12):1984-1990.
38. Cheung WI, Tse ML, Ngan T, et al. Liver injury associated with the use of Fructus Psoraleae (Bol-gol-zhee or Bu-gu-zhi) and its related proprietary medicine. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa).* 2009;47(7):683-685.
39. Nam SW, Baek JT, Lee DS, Kang SB, Ahn BM, Chung KW. A case of acute cholestatic hepatitis associated with the seeds of Psoralea corylifolia (Boh-Gol-Zhee). *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa).* 2005;43(6):589-591.
40. Fu Y, Tian X, Han L, Li Y, Peng Y, Zheng J. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2D6 by Notopterol. *Chemico-biological interactions.* 2020;322:109053.
41. Wang X, Lou Y-J, Wang M-X, Shi Y-W, Xu H-X, Kong L-D. Furocoumarins affect hepatic cytochrome P450 and renal organic ion transporters in mice. *Toxicology letters.* 2012;209(1):67-77.
42. Busche MA, Wegmann S, Dujardin S, et al. Tau impairs neural circuits, dominating amyloid-beta effects, in Alzheimer models in vivo. *Nat Neurosci.* 2019;22(1):57-64.
43. Harris SS, Wolf F, De Strooper B, Busche MA. Tipping the Scales: Peptide-Dependent Dysregulation of Neural Circuit Dynamics in Alzheimer's Disease. *Neuron.* 2020;107(3):417-435.
44. Toniolo S, Sen A, Husain M. Modulation of Brain Hyperexcitability: Potential New Therapeutic Approaches in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23).
45. Keskin AD, Kekus M, Adelsberger H, et al. BACE inhibition-dependent repair of Alzheimer's pathophysiology. *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 2017;114(32):8631-8636.

46. Malpetti M, Kievit RA, Passamonti L, et al. Microglial activation and tau burden predict cognitive decline in Alzheimer's disease. *Brain*. 2020;143(5):1588-1602.

47. Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience*. 2015;302:103-111.

48. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010;68(10):930-941.

49. Motta C, Finardi A, Toniolo S, et al. Protective Role of Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokines in Patients with Amnestic Mild Cognitive Impairment and Early Alzheimer's Disease Carrying Apolipoprotein E4 Genotype. *J Alzheimers Dis*. 2020;76(2):681-689.

50. Perea JR, Llorens-Martín M, Ávila J, Bolós M. The Role of Microglia in the Spread of Tau: Relevance for Tauopathies. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:172.

Table 1 Metabolic half-life and intrinsic clearance of Notopterol in rat and human liver microsomes *in vitro*.

Species	$T_{1/2}$ (min)	CL (ml/min/mg*protein)
Rat liver microsomes	130 ± 1.2	0.329 ± 0.12
Human liver microsomes	215 ± 2.4	0.322 ± 0.15

Table 2 The ADMET profile of Notopterol *in vivo* and *in vitro*.

In vivo Toxicity (Mice)		Stability (% remaining)[b]			CYP (IC_{50})[c]		
Dosing (p.o.)	NOPR[a]	Species	Microsomes	Plasma	Subtype	Human	Rat
Single	1000	Human	49.96	83.61	CYP1A2	>40	>40
Repeated (8 weeks)	40	Rat	39.93	80.26	CYP2A6	>40	10.2
		Mice	54.82	69.16	CYP3A4	8.071	>40
					CYP2E1	>40	>40

[a]NOAEL: No observed poisoning reaction, the highest tested dose at which no such poisoning reaction is found in exposed test organisms. (mg/kg)

[b]Parent Notopterol remaining was determined after 90 min incubation. (%)

[c]IC_{50} value was calculated with nonlinear regression fit with four parameters. (μM)

Figure legends

Figure 1. Metabolic stability and pharmacokinetics profiles of oral administration Notopterol in C57BL/6J mice. (A) Time curve of Notopterol in plasma. (B) Time curve of the concentration of Notopterol in brain tissue. (C) The concentration of Notopterol in heart, liver, spleen, lung, kidney and brain. Mean values ± SD are shown, n=5. (*P < 0.05, other comparisons were not significant; One-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc multiple-comparisons test, n=5).

Figure 2. Notopterol can suppress the neuronal hyperactivity in APP/PS1 mice. (A) Longitudinal T2-weighted MRI image in 6-month APP/PS1 mice. (B) Representative *in vivo* Ca^{2+} fluorescence images of Cal GreenTM1 AM in the cortex and corresponding activity maps obtained from WT, APP/PS1 mice and Notopterol treated APP/PS1 mice; scale bars, 50 μm; n=5.

Figure 3. Notpterol can improve the cognitive impairment in AD mice. (A) Representative water maze traces of WT mice (left), PTZ mice (middle) and Notopterol treated PTZ mice (right) on day 5. The swimming speed (B) and escape latency (C) of WT mice, PTZ mice and Notopterol treated PTZ mice, n=6. (D) Representative micrographs demonstrate TUNEL-positive cells in the CA1 area; scale bars, 20 μm. (E) Numbers of TUNEL-positive cells in CA1 area. Mean values ± SD are shown. *P < 0.05, **P < 0.01 and ****P < 0.0001, other comparisons were not significant; Two-way ANOVA analysis for MWM assay. One-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's post-hoc multiple-comparisons test for TUNEL assay.

Figure 4. Notopterol reduced amyloid plaque and neurofilament tangle in APP/PS1 mice. Representative images of amyloid plaques in cortex (A) and hippocampus (B) stained with ThT; scale bars, 50 μm. (C) Western blot of metabolites (full APP and C99) of APP in whole brain from APP/PS1 mice. Full version of Western blots and statistics see in Figure S2. (D) Statistical histogram. (E) Gallyas-Braak silver staining of neurofilament tangle; scale bars, 50 μm. Mean values ±

SD are shown. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001, other comparisons were not significant.

Figure 5. Notopterol increased tau phosphorylation in GSK3β overexpressed APP/PS1 mice. (A) Construction of plasmids for full-length GSK3β. (B) The expression of GSK3β in 293T cells was verified by Western blotting. (C) Optimization of 293T cells stably expressing GSK3β, scale bars: 50 μm. (D) Schematic illustration of lateral ventricle injection of GSK3β-loaded lentivirus. (E) IHC analysis of GSK3β and phosphorylated tau in cortex of APP/PS1 mice; scale bars: 50 μm (n=3). Mean values ± SD are shown. *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001, other comparisons were not significant.

Figure 6. Notopterol relieved neuroinflammation in APP/PS1 mice. Representative images of IF for Iba1 (green) (A) and GFAP (red) (B) positive glial cells in cortex and hippocampus; scale bars, 100 μm. Statistical histogram seen in Figure S4. (C) Sholl analysis of Iba1 positive cells; scale bars, 50 μm. (D) Sholl statistical results. (E) Western blot of COX2 and IL-1β in whole brain of APP/PS1 mice. Full version of Western blots see in Figure S3. (F) Statistical results of Western blot. (G) ELISA results of TNF-α and IL-1β. The error bars represent the SD. (*P < 0.05 and **P < 0.01; One-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc multiple-comparisons test).

Figure 1

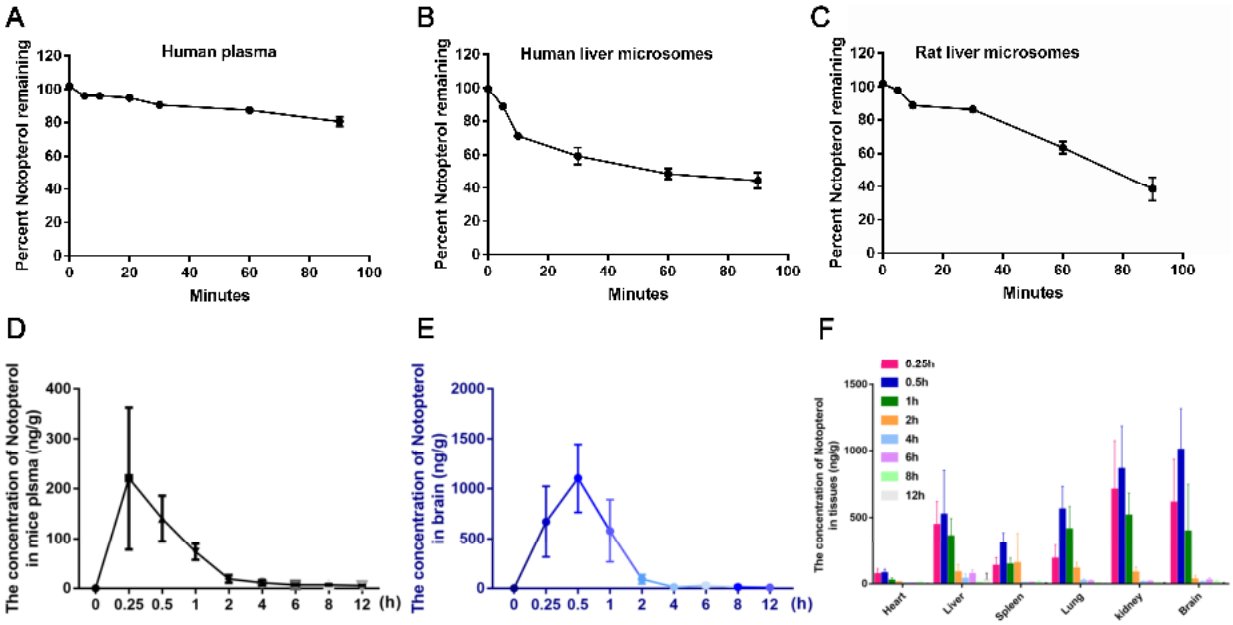


Figure 2

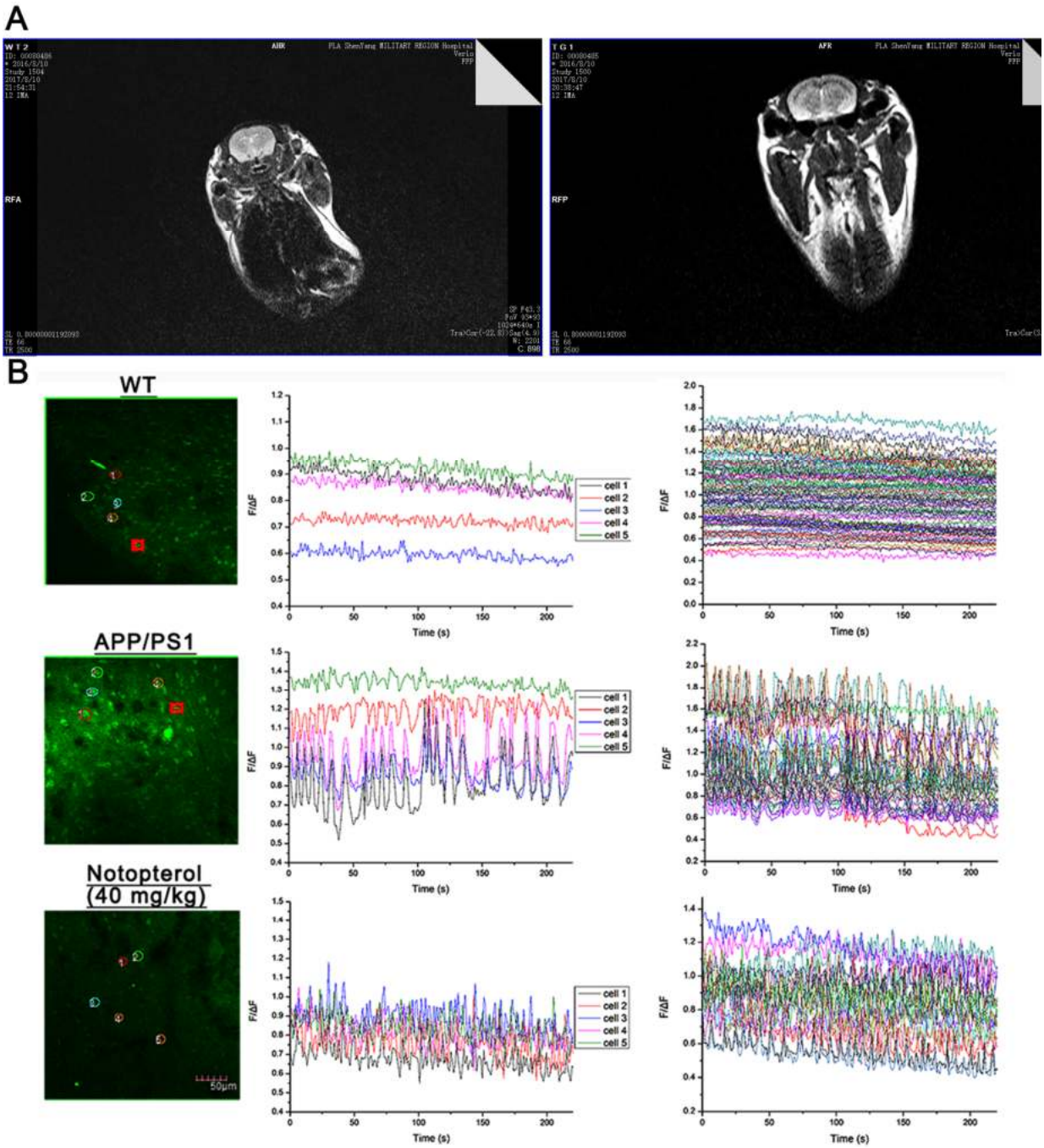

A
RFA
RFP
B
WT
APP/PS1
Notopterol
(40 mg/kg)
50μm
F/ΔF
Time (s)
cell 1
cell 2
cell 3
cell 4
cell 5

Figure 3

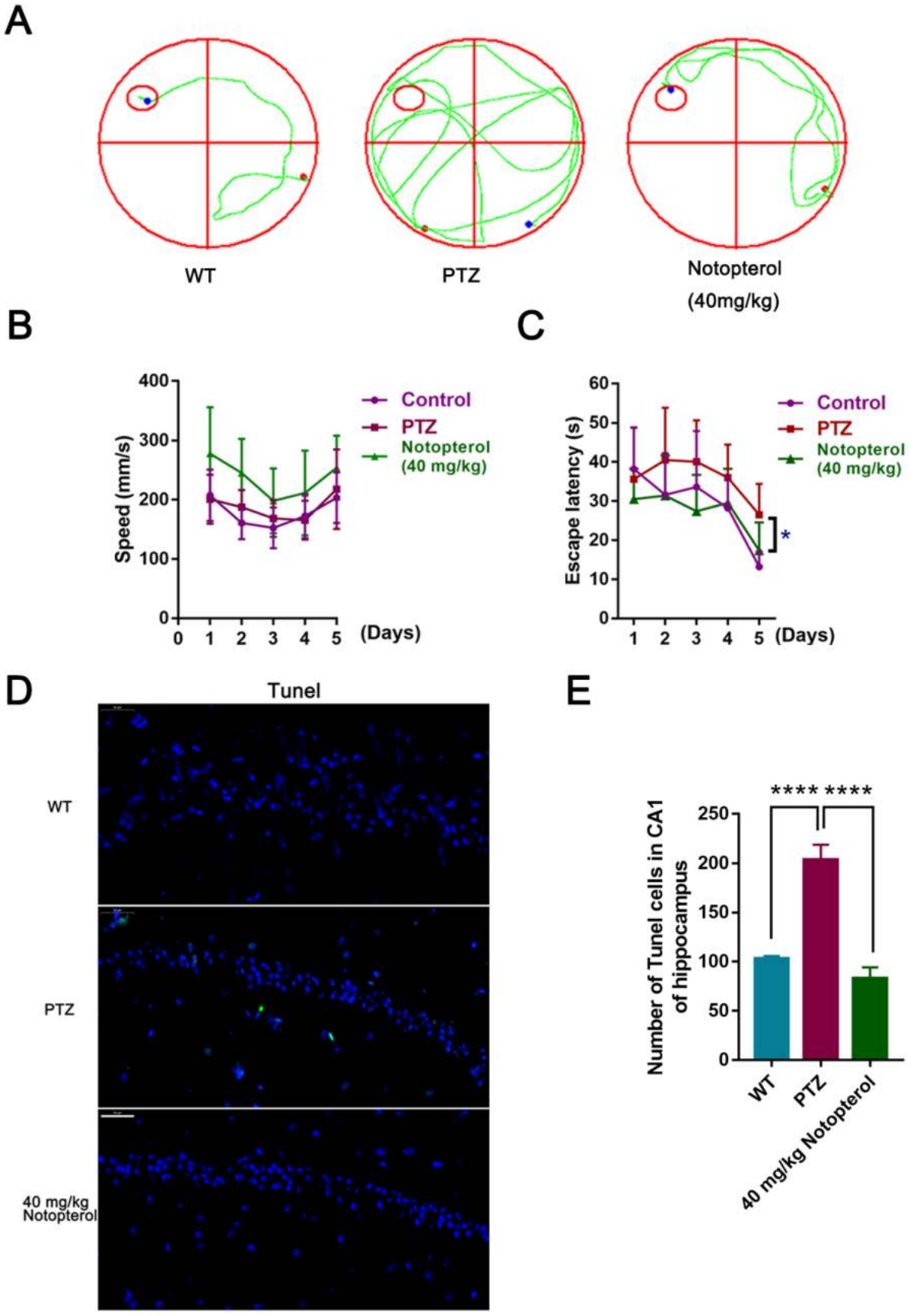

A
WT
PTZ
Notopterol
(40mg/kg)
B
Speed (mm/s)
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5
(Days)
Control
PTZ
Notopterol
(40 mg/kg)
C
Escape latency (s)
60
50
40
30
20
10
0
1 2 3 4 5
(Days)
*
Control
PTZ
Notopterol
(40 mg/kg)
D
Tunel
WT
PTZ
40 mg/kg
Notopterol
E
Number of Tunel cells in CA1
of hippocampus
250
200
150
100
50
0
**** ****
WT
PTZ
40 mg/kg Notopterol

Figure 4

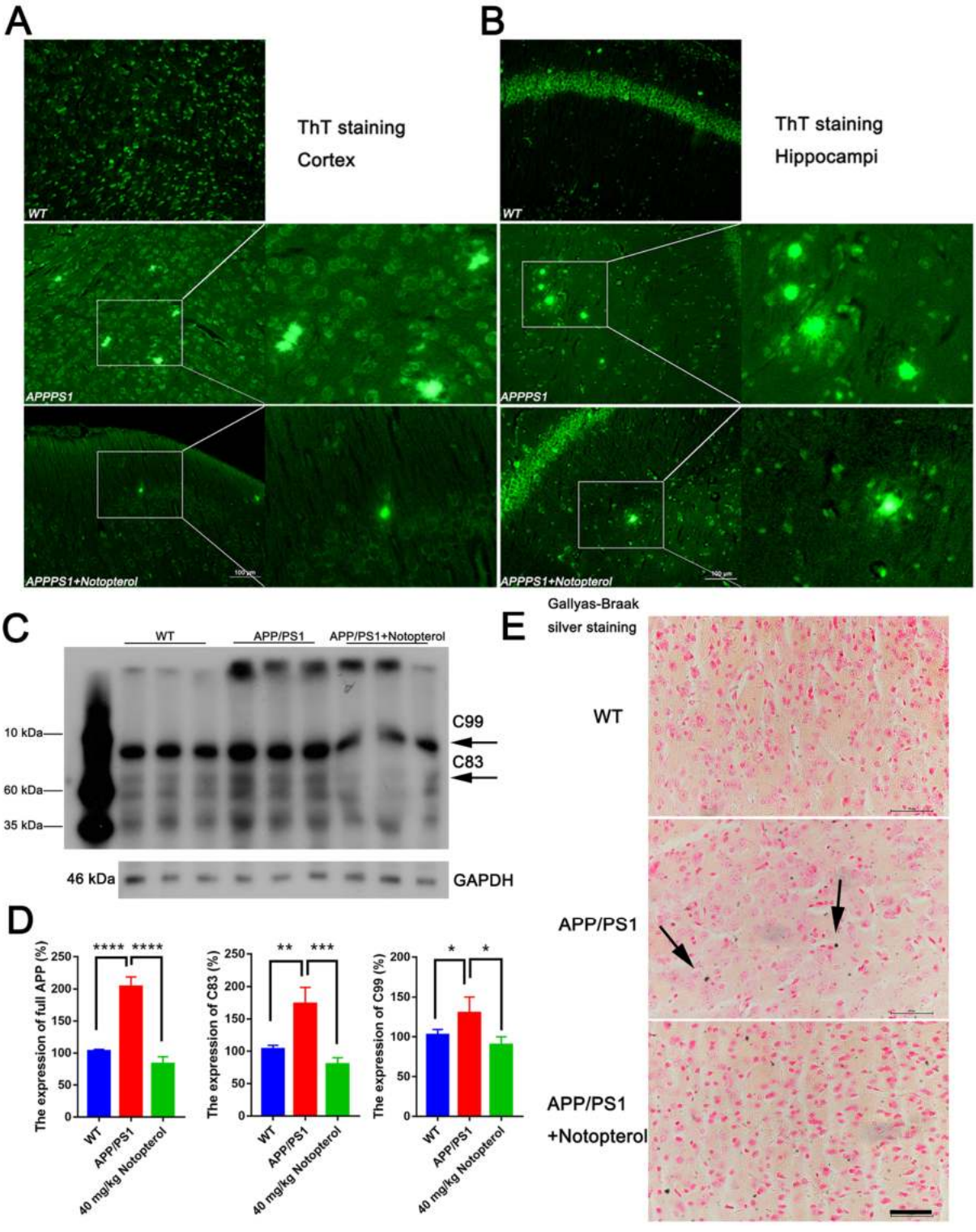

A
ThT staining
Cortex
WT
APPPS1
APPPS1+Notopterol
B
ThT staining
Hippocampi
WT
APPPS1
APPPS1+Notopterol
C
WT
APP/PS1
APP/PS1+Notopterol
10 kDa
60 kDa
35 kDa
C99
C83
46 kDa
GAPDH
D
The expression of full APP (%)
The expression of C83 (%)
The expression of C99 (%)
WT
APP/PS1
40 mg/kg Notopterol
E
Gallyas-Braak
silver staining
WT
APP/PS1
APP/PS1
+Notopterol

Figure 5

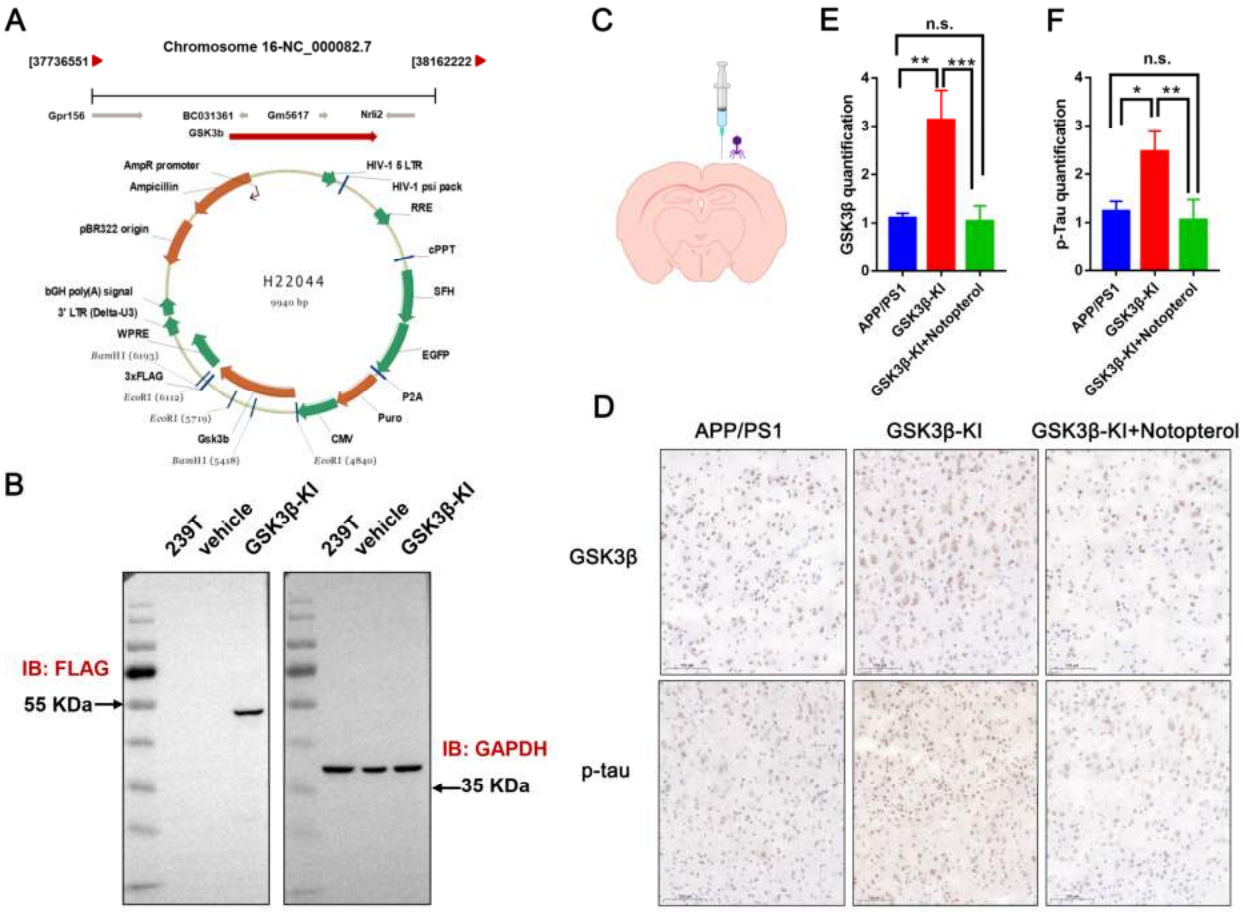
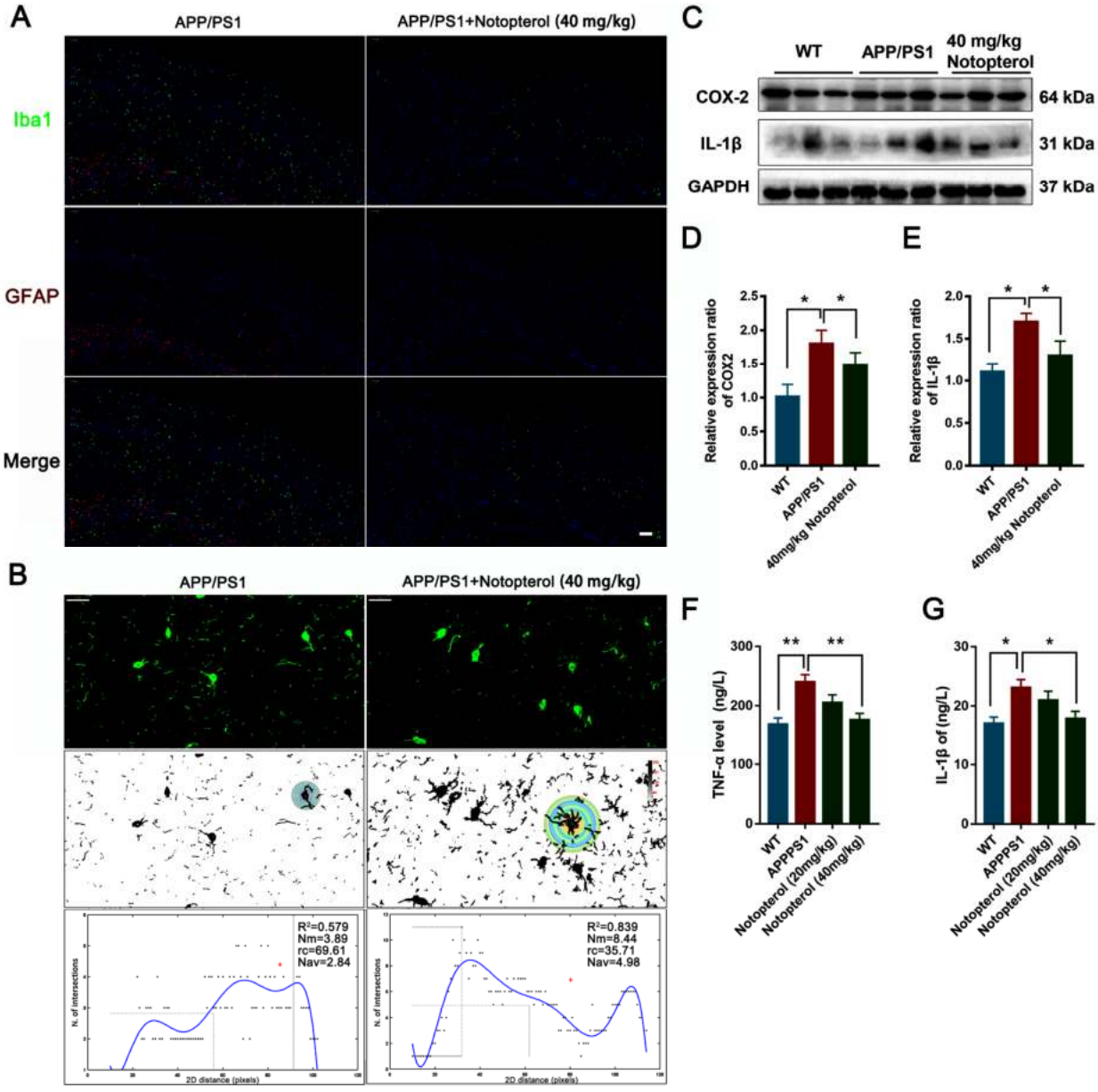

A
Chromosome 16-NC_000082.7
[37736551
[38162222
Gpr156
BC031361
Gm5617
Nrli2
GSK3b
AmpR promoter
Ampicillin
pBR322 origin
bGH poly(A) signal
3' LTR (Delta-U3)
WPRE
BamHI (6193)
3xFLAG
EcoRI (6112)
EcoRI (5719)
Gsk3b
BamHI (5418)
HIV-1 5 LTR
HIV-1 psi pack
RRE
cPPT
SFH
EGFP
P2A
Puro
CMV
EcoRI (4840)
H22044
9940 bp
B
239T
vehicle
GSK3β-KI
239T
vehicle
GSK3β-KI
IB: FLAG
55 KDa
IB: GAPDH
35 KDa
C
E
n.s.
**
***
GSK3β quantification
APP/PS1
GSK3β-KI
GSK3β-KI+Notopterol
F
n.s.
*
**
p-Tau quantification
APP/PS1
GSK3β-KI
GSK3β-KI+Notopterol
D
APP/PS1
GSK3β-KI
GSK3β-KI+Notopterol
GSK3β
p-tau

Figure 6


A
APP/PS1
APP/PS1+Notopterol (40 mg/kg)
Iba1
GFAP
Merge
B
APP/PS1
APP/PS1+Notopterol (40 mg/kg)
R²=0.579
Nm=3.89
rc=69.61
Nav=2.84
R²=0.839
Nm=8.44
rc=35.71
Nav=4.98
N. of intersections
2D distance (pixels)
C
WT
APP/PS1
40 mg/kg Notopterol
COX-2
IL-1β
GAPDH
64 kDa
31 kDa
37 kDa
D
Relative expression ratio of COX2
WT
APP/PS1
40mg/kg Notopterol
E
Relative expression ratio of IL-1β
F
TNF-α level (ng/L)
WT
APPPS1
Notopterol (20mg/kg)
Notopterol (40mg/kg)
G
IL-1β of (ng/L)

基于网络药理学联合实验验证探讨除烦益神合剂改善抗氧化应激反应和调节 VEGFA 水平治疗抑郁症的作用机制

蒋颖，杜志强，陆荣荣，周勤，沈远，朱浩浩

Mental Health Center of Jiangnan University, Wuxi Central Rehabilitation Hospital, Wuxi, Jiangsu, 214151, China

【摘要】目的：通过网络药理学、分子对接及实验验证探讨除烦益神合剂（CFYS）抗抑郁作用及潜在机制。**方法：**通过 TCMSP 和 TCM-ID，识别了 CFYS 的活性成分及其靶基因，从利 GEO 数据库中获得抑郁症患者中差异表达的基因，并筛选出与 CFYS 靶基因交叉的基因。通过 Cytoscape v3.9.1 软件构建 PPI 网络，通过 STRING 及 KEGG 筛选关键作用通路，利用 AutoDock vina 进行分子对接验证，并分析药物作用潜在通路靶基因对抑郁症的诊断效能。随后构建动物模型通过实验验证 CFYS 抗抑郁的作用机制。**结果：**化合物和靶基因筛选共得到 113 种有效成分和 195 个靶基因。靶基因和抑郁症患者差异基因取交集后得到 37 个差异靶基因，其中基因 HMOX1、VEGFA 等是差异靶基因中的关键基因。差异靶基因 KEGG 富集后发现 Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species 途径是 CFYS 抗抑郁的关键通路，同时发现 VEGFA 可能是抑郁症的关键 marker。实验验证发现 CFYS 能够显著改善抑郁模型大鼠的行为学指标，其中包括改善大鼠的抗氧化酶活性，降低 MDA 水平，提高 VEGFA 水平等，结果与网络药理学结果一致，提示烦益神合剂可能通过改善神经元的抗氧化应激反应和调节 VEGFA 水平发挥抗抑郁作用。**结论：**CFYS 治疗抑郁症是多成分-多靶点-多途径的复杂过程，其可能主要通过改善神经元的抗氧化应激反应和调节 VEGFA 水平发挥抗抑郁作用。

【关键词】除烦益神合剂；抑郁症；网络药理学；reactive oxygen species；　VEGFA

1. Introduction

抑郁症是以持续性情绪低落和认知功能障碍为主要特征的精神类疾病，包括无快感体验、注意缺失、睡眠障碍、食欲减退、反复自杀念头等临床症状。我国的抑郁症患病人数超过 9500 万，抑郁症已经成为国民疾病负担第二的疾病，具有极强的致残性和致死性，对国民健康造成严重危害[1,2]。目前，虽然抗抑郁药物治疗和电休克治疗在临床上发挥着不可替代的作用，但其临床疗效有限，近三分之二的抑郁症患者对此反应不敏感[3-5]。并且，临床研究表明，即使取得疗效的患者，抑郁症的复发率仍高达 70%[6]。因此，急需研究抑郁症的发病机制，寻找更有效的抗抑郁药物或治疗方法，提高临床治疗效果。

中医药抗抑郁的临床疗效明显，且与常用抗抑郁西药相比，有一定的优势与应用前景。中药复方与西药合用，不仅增强了药物抗抑郁作用，还可以减少西药的某些副作用，且中药是治疗重度抑郁症发作的有效和相对安全的手段[7-9]。除烦益神合剂（CFYS）为我院院内制剂（批准文号：苏药制字 Z04001408），具有和解表里，重镇安神等功效，其临床治疗抑郁症疗效确切，但是 CFYS 的药效物质基础和抗抑郁信号通路作用机制并不明确，有待进一步研究。

网络药理学作为运用网络方法分析药物与疾病和靶点之间“多成分、多靶点、多途径”协同作用关系的药理学分支学科与中药复方多成分、多作用靶点和作用途径复杂的特点十分契合，因此运用网络药理学方法有利于研究中医药对疾病本质的认识，为研究中药药效物质基础及作用机制，阐明其疗效好、安全性高、多组分、多靶点的作用特点带来了新的思路和策略[10-12]。故本研究从现代医学的角度，运用网络药理学探讨 CFYS 治疗抑郁症的作用机制，为进一步推广 CFYS 的临床应用提供参考依据。

*Correspondence: Haohao Zhu: zhuhh@jiangnan.edu.cn

The work is supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82104244), Wuxi Municipal Health Commission (No. Q202101 and ZH202110), Wuxi Taihu Talent Project (No. WXTTP2020008 and WXTTP2021), Wuxi Medical Development Discipline Project (No. FZXK2021012) and Jiangsu Research Hospital Association for Precision Medication (JY202105).

2 材料和方法

2.1 数据收集及预处理

GEO 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）下载 GSE76826 抑郁症患者血液转录组数据集进行分析。并下载 GSE54570 抑郁症数据集进行诊断效能验证。GEO 数据集的数据处理标准：根据各平台的探针对应关系将探针转换成 symbol，一个探针对应多个基因则去掉该探针，多个探针对应同一个 symbol 则取均值。GSE76826 数据集中包含 20 个抑郁症患者和 12 个正常人的转录组数据。GSE54570 数据集中包含 13 个抑郁症患者和 13 个正常人的转录组数据

2.2 CFYS 活性成分鉴定

利用中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP，https://tcmsp-e.com/tcmsp.php），分别检索 CFYS 中九味中药（柴胡、白芍、生地黄、川芎、当归、龙骨、牡蛎、泽泻和甘草），获得 CFYS 的化学成分和靶点。TCMSP 数据库中无龙骨、牡蛎信息。从中医药信息数据库 TCM-ID（https://www.bidd.group/TCMID/）获得牡蛎 5 种成分，其中 4 种成分在 TCMSP 中 OB 值均小于 30%；另一种成分（TCM-ID：TCMC2018）经过 SwissADME（http://www.swissadme.ch/）预测，五种药物特性（Lipinski，Ghose，Veber，Egan 和 Muegge）中只有一个 yes，GI absorption 值为 low，认为不是活性物质。从 TCM-ID 获得龙骨 1 种成分，与牡蛎中的一种成分（TCM-ID：TCMC2018）相同，认为不是活性物质。所以我们只分析了 CFYS 中的七味中药（柴胡、白芍、生地黄、川芎、当归、泽泻和甘草）。利用 uniprot 数据库中蛋白质基因对应关系将靶点转化为对应靶基因。

2.3 构建活性成分与对应目标基因关联网络

使用从 TCMSP 数据库得到的有效成分和靶基因对应关系数据，利用 Cytoscape v3.9.1 软件对关联网络进行可视化构建

2.4 疾病相关差异表达基因和富集分析

利用 R 包 limma 来确定抑郁症患者中差异表达的基因。根据显著性阈值 pvalue < 0.05 筛选在患病组和正常组间差异表达的基因。GO 分析是基因及其产物注释的主要生物信息学工具，包括三大类：细胞成分（CC）、分子功能（MF）和生物通路（BP），KEGG 是多个数据库的集合，其中包含有关基因组、生物途径、疾病和化学物质的信息。使用 clusterProfiler 包对差异表达的基因进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析，来预测它们的潜在分子功能。$p<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2.4 CFYS 作用的差异靶基因

将 CFYS 靶基因和抑郁症差异基因取交集，得到 CFYS 作用的差异靶基因。PPI 网络分析使用 STRING (https://string-db.org/)进行，STRING 是一个已知和预测蛋白质相互作用的在线数据库。这些交互包括物理和功能关联，数据主要来自高通量实验、自动文本挖掘、共表达网络和计算预测。我们将 CFYS 作用的差异靶基因映射到 PPI 网络上，利用 Cytoscape v3.9.1 软件对 PPI 网络进行可视化，并使用 MCODE 识别显著模块。

2.5 筛选药物作用的潜在关键通路

KEGG 是多个数据库的集合，其中包含有关基因组、生物途径、疾病和化学物质的信息。基于 CFYS 作用的差异靶基因使用 clusterProfiler 包进行 KEGG 通路分析，筛选药物作用的潜在关键通路。$p<0.05$ 被认为是统计学显著。

2.6 分子对接展示 CFYS 活性成分与靶基因亲和力

从 TCMSP 数据库获得活性成分的结构，利用 AutoDocktools 调整电荷、检测扭转键，保存为 pdbqt 文件；RCSB（https://www.rcsb.org/）获得蛋白质三维结构，优先选择 X 射线方法、分辨率高且有配体的结构，利用 PyMol 将原配体小分子去除，便于后面进行其他分子的对接，再利用 AutoDocktools 对此蛋白进行去水加氢，计算电荷，添加原子类型，保存为 pdbqt 文件，使用 AutoDock vina 进行分子对接，并使用 PyMol 展示活性成分和蛋白结合作用图。

2.7 关键 marker 对疾病的诊断效能

药物作用潜在通路靶基因对疾病的诊断效能分析。利用 R 包 pROC 分析靶基因对抑郁症诊断效能。并使用同样的方法在验证集 GSE54570 中进行验证。

2.8 Experimental verification of network analysis results

2.8.1 动物分组、给药及 CUMS 模型建立

适应性喂养 1 周后，将大鼠按随机数字表法分为对照组（Control）、模型组（DP）和高（DP+CFYS-5g/kg）、中（DP+CFYS-2.5g/kg）、低剂量组（DP+CFYS-1.25g/kg），每组 6 只。参照文献进行 CUMS 造模[13,14]。刺激方式包括：禁食 12 h，禁水 12 h，昼夜颠倒，垫料潮湿 8 h，60 Hz 噪声刺激 1 h，夹尾 2 min，摇晃鼠笼 15 min，4℃冰水游泳 5~10 min，束缚 2 h。每天从 9 种刺激方式中随机选择 2 种，3 d 内不重复，持续刺激 11 周。CUMS 干预第 7 周开始给药干预，连续给药 5 周。给药 5 周后，进行行为学检测。行为学检测结束后所有大鼠禁食过夜，采用吸入 CO2 安乐死处理，断头后取出完整脑组织，右侧脑组织经液氮快速冷冻后保存于-80℃冰箱备用，左侧脑组织于 4%多聚甲醛固定并进行石蜡包埋。

2.8.2 行为学评价

旷场实验：给药干预后，记录 5min 旷场实验大鼠影响，并分析后 3min 内大鼠的静止时间、总运动距离及中央区域穿越格数；

强迫游泳实验：实验前 12h 禁食不禁水，将大鼠放入游泳水箱，记录大鼠 5min 内的不动时间，即大鼠在水中停止挣扎、呈漂浮状态，或仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面的时间。

2.8.3 氧化应激指标检测

取适量脑组织，并用冷盐水冲洗。通过在冷盐水（pH 7.0）中均化=组织来制备组织匀浆（10％w / v）。使用检测试剂盒检测 Cu/Zn-超氧化物歧化酶（SOD）、Mn-SOD、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽（GSH）及丙二醛（MDA）的含量，于荧光分光光度计下检测。

2.8.4 ELISA 检测 VEGFA 含量

取适量脑组织，按质量体积比 1∶9 加入 PBS，使用手持匀浆仪于冰上研磨后，低温 14 000 r/min 离心 15 min，取上清液。先使用 BCA 试剂盒定量上清液中的总蛋白，然后严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行标准品的稀释，加样，并依次完成温育、洗涤、加酶、温育、洗涤、显色、终止反应等过程后，使用酶标仪在 450nm 波长处依序测量各组大鼠脑组织中 VEGFA 的光密度（OD）值。

2.8.5 统计学分析

采用 SPSS 24.0 进行数据分析，采用均数±标准差（x±s）表示。组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD-t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Compound-target network and analysis

从 TCMSP 数据库获得 CFYS 中柴胡、白芍、生地黄、川芎、当归、泽泻和甘草七味中药的有效成分，通过 OB≥30%和 DL≥0.18 筛选有效成分，共得到 113 种有效成分，195 个靶基因，基于 CFYS 中 7 种中药、113 种有效成分和 195 个潜在靶基因相互关系，构建中药-有效成分-靶点网络（图 1）。结果表明有效成分 quercetin（MOL000098）和 kaempferol（MOL000422）有最多的靶基因，可能发挥更重要的作用。

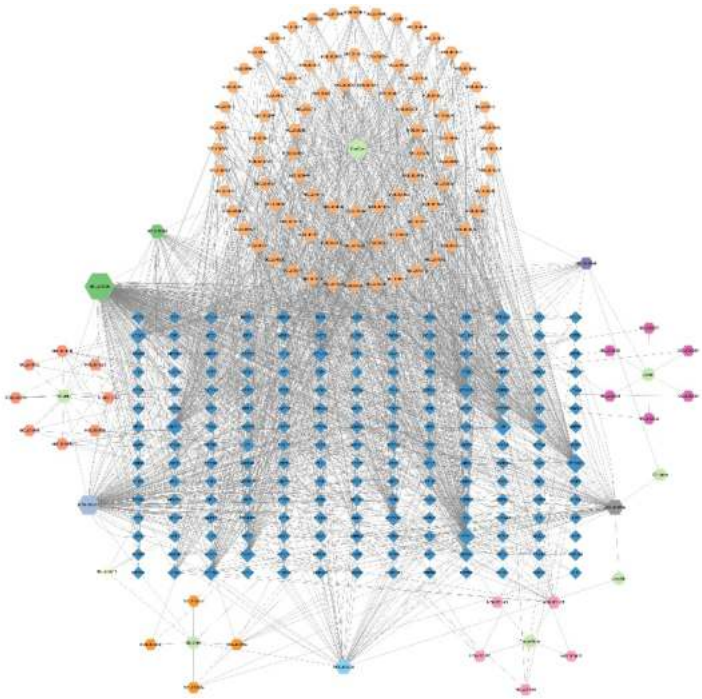


图 1 中药-有效成分-靶点网络。图中圆形表示中药材，围绕中药材的六边形表示该种中药材特有的有效成分，单独的六边形（A1、A2、B1、C1、D1、E1、F1）表示两种或两种以上中药材共有的有效成分，中间的菱形表示靶点基因，图形的大小表示度值。

3.2 差异表达分析和功能富集

为了研究抑郁症患者与正常人基因表达的不同，我们使用 “limma” 包对不同样本间进行差异表达分析，差异基因筛选条件 pvalue < 0.05，共得到 5031 个基因在抑郁症患者中差异表达，其中 3039 个上调基因，2042 个下调基因（图 2）。随后使用 clusterProfiler 进行富集分析。结果表明，这些差异表达基因主要富集在液泡膜、转录组调节复合物，通过与转录辅助调节因子活性、泛素样蛋白连接酶结合，参与蛋白酶体蛋白分解代谢过程、前体代谢产物和能量的产生等生物学过程（图 3A-C），KEGG 分析结果显示差异表达基因主要富集在多种神经系统相关疾病，如神经退化、阿尔茨海默病等（图 3D）。

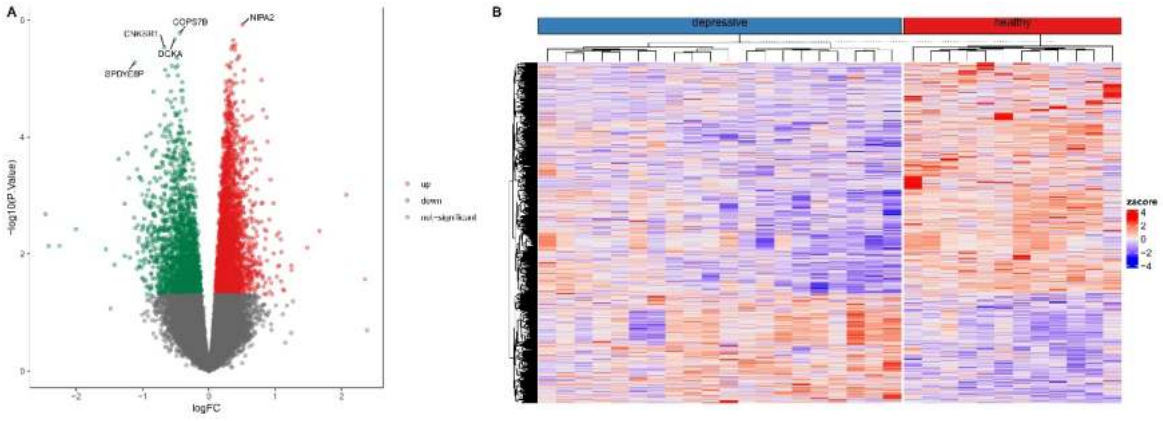


图 2 差异表达分析。A：差异表达分析火山图，绿色是下调基因，红色是上调基因，灰色是表达不显著基因；B：差异基因聚类热图

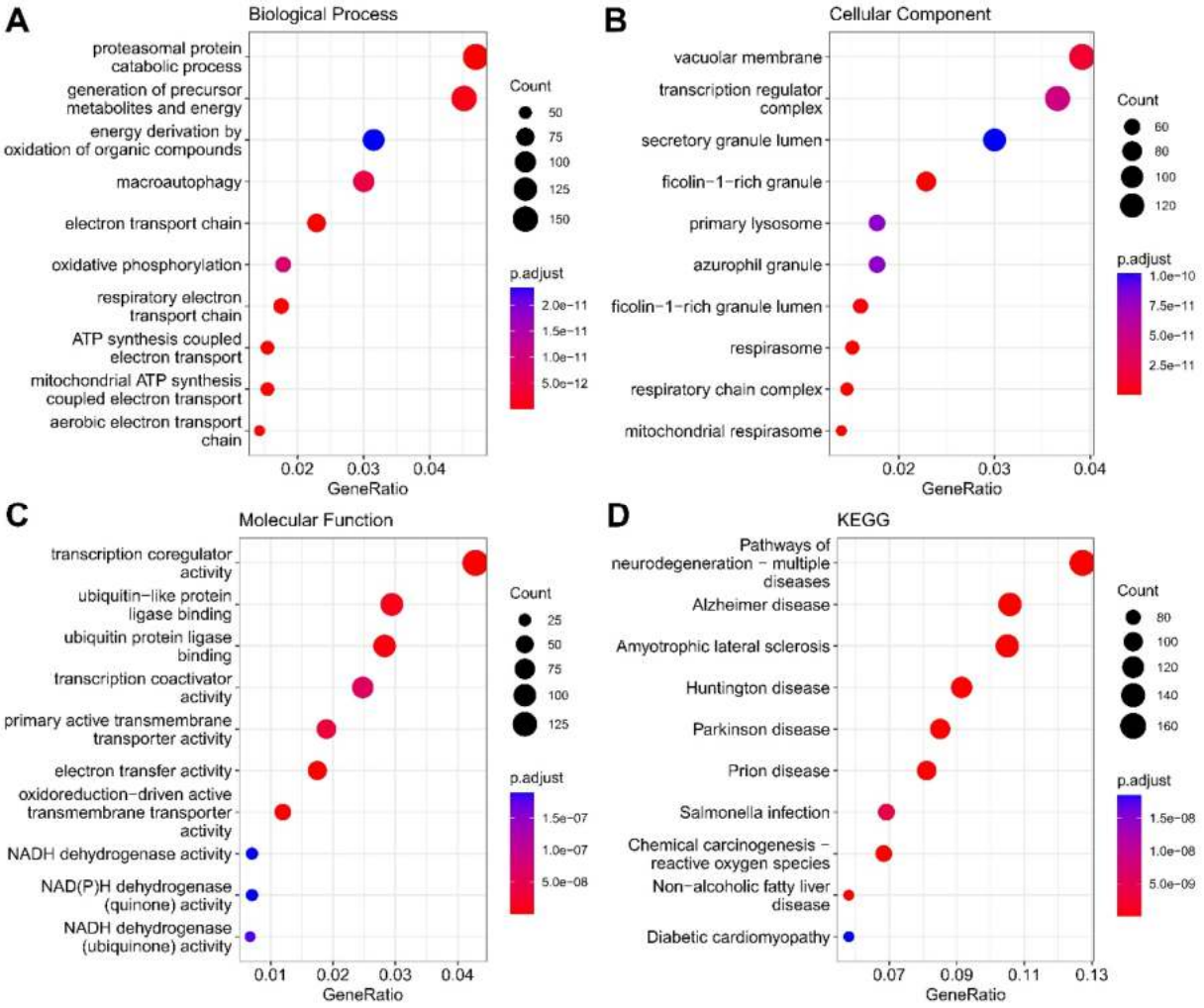


图 3 富集分析。A：生物学过程（BP）富集，B：细胞成分（CC）富集，C：分子功能（MF）富集，D：KEGG 通路分析

3.3 CFYS 作用的差异靶基因

差异基因（DEGs）和 CFYS 靶基因（X-TGs）取交集，共得到 37 个 CFYS 作用的差异靶基因（图 4）。为了探究差异靶基因的相互作用，我们使用 String 数据库基于差异靶基因构建了 PPI 网络（图 5A）。利用 Cytoscape v3.9.1 软件对 PPI 网络进行可视化，因为基因 GABRA1 和 ABAT 与其他基因无相互作用，所以 PPI 网络中只有 35 个基因的相互作用关系。并使用 MCODE 识别关键模块，根据子模块（图 5B-C）可知，基因 HMOX1、VEGFA 等是差异靶基因中的关键基因。

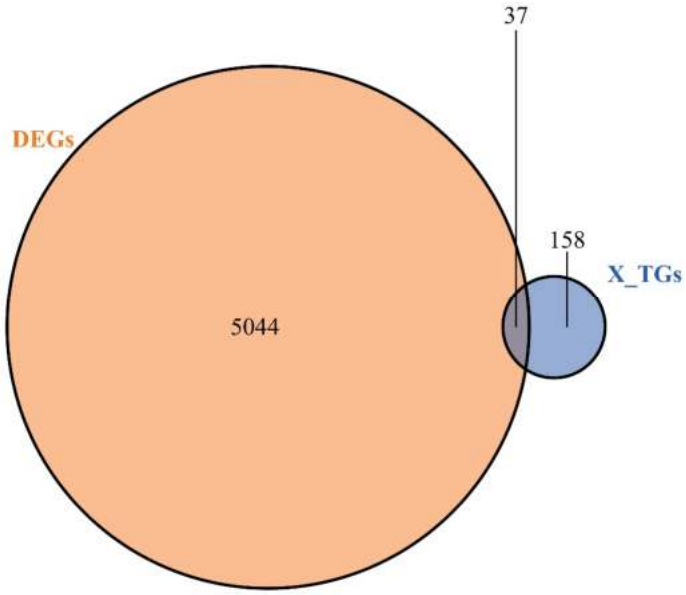


图 4 CFYS 作用的差异靶基因

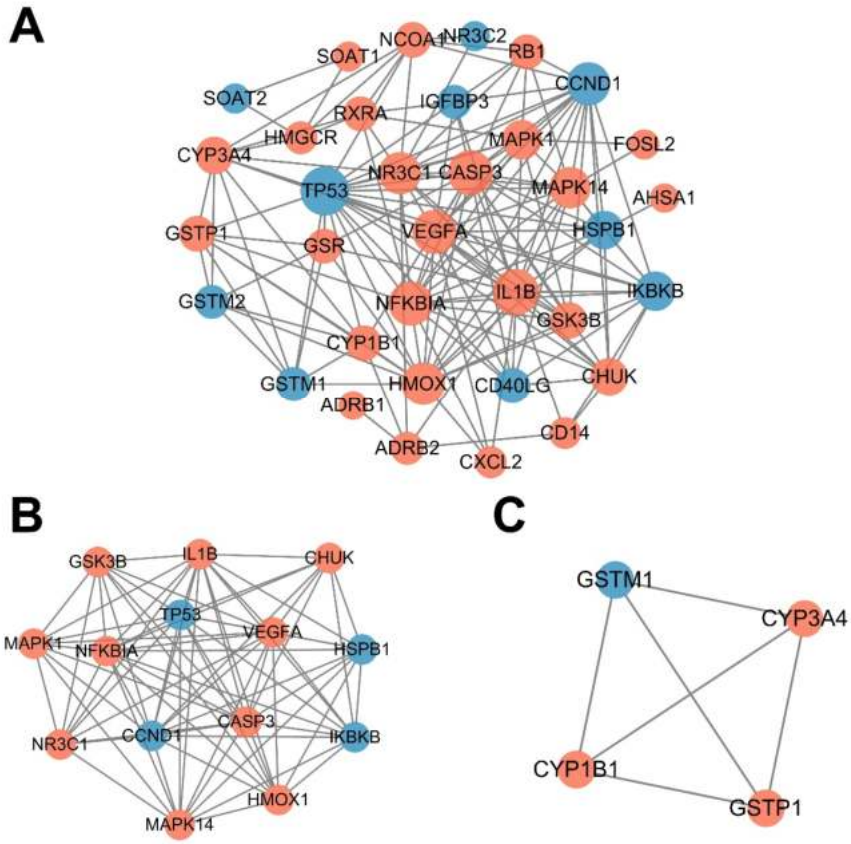


图 5 PPI 网络。A：CFYS 作用的差异靶基因互作网络，B-C：由 Cytoscape 软件中 MCODE 识别到的两个关键子模块；红色表示差异上调基因，蓝色表示差异下调基因，节点的面积表示度值的大小。

3.4 药物作用关键通路

为了探究 CFYS 作用的关键通路，使用 clusterProfiler 对 37 个差异靶基因进行 KEGG 通路分析。共富集到 120 个通路（p<0.05），按 P 值大小进行排序，选取前 15 个通路进行展示（图 6）。此外与抑郁症有关的 Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species 通路是前 15 条通路之一[15]。

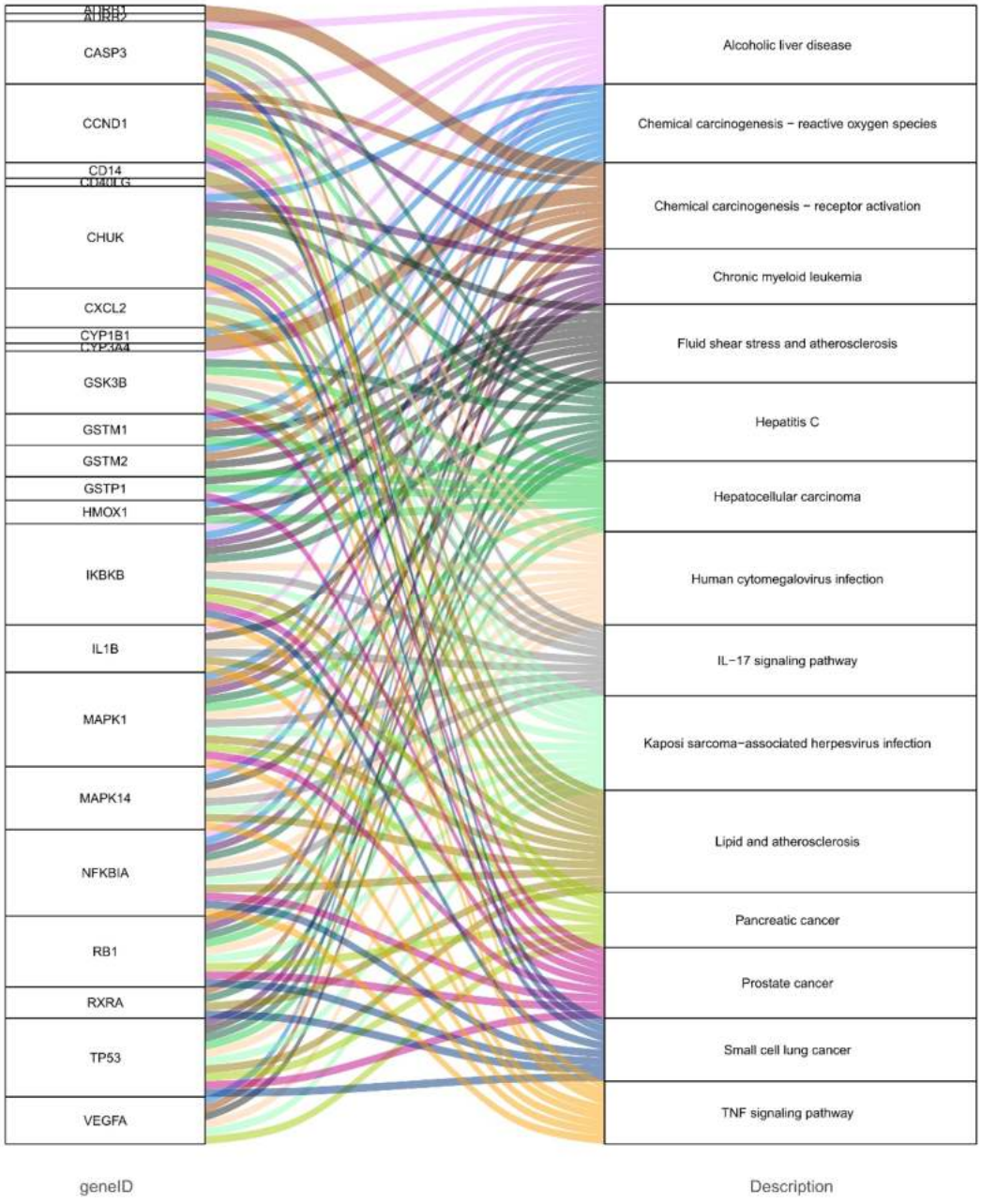


图 6 KEGG 通路分析

3.5 活性成分和靶基因亲和力

通过图 3D 和图 6 可以确定"Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species"通路是抑郁症的关键通路。因此，我们进一步研究了 10 个"Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species"途径富集基因和其对应的 52 个 CFYS 有效成分的组合活性，包括 GSTM2、CHUK 、GSTM1、HMOX1、NFKBIA、VEGFA、MAPK1、CYP1B1、MAPK14 和 IKBKB。我们进行了 64 个对接组合。Autodock vina 结果中打分最小的说明结合性最佳。选取每个基因中结合能最小的构象进行展示（图 7）。

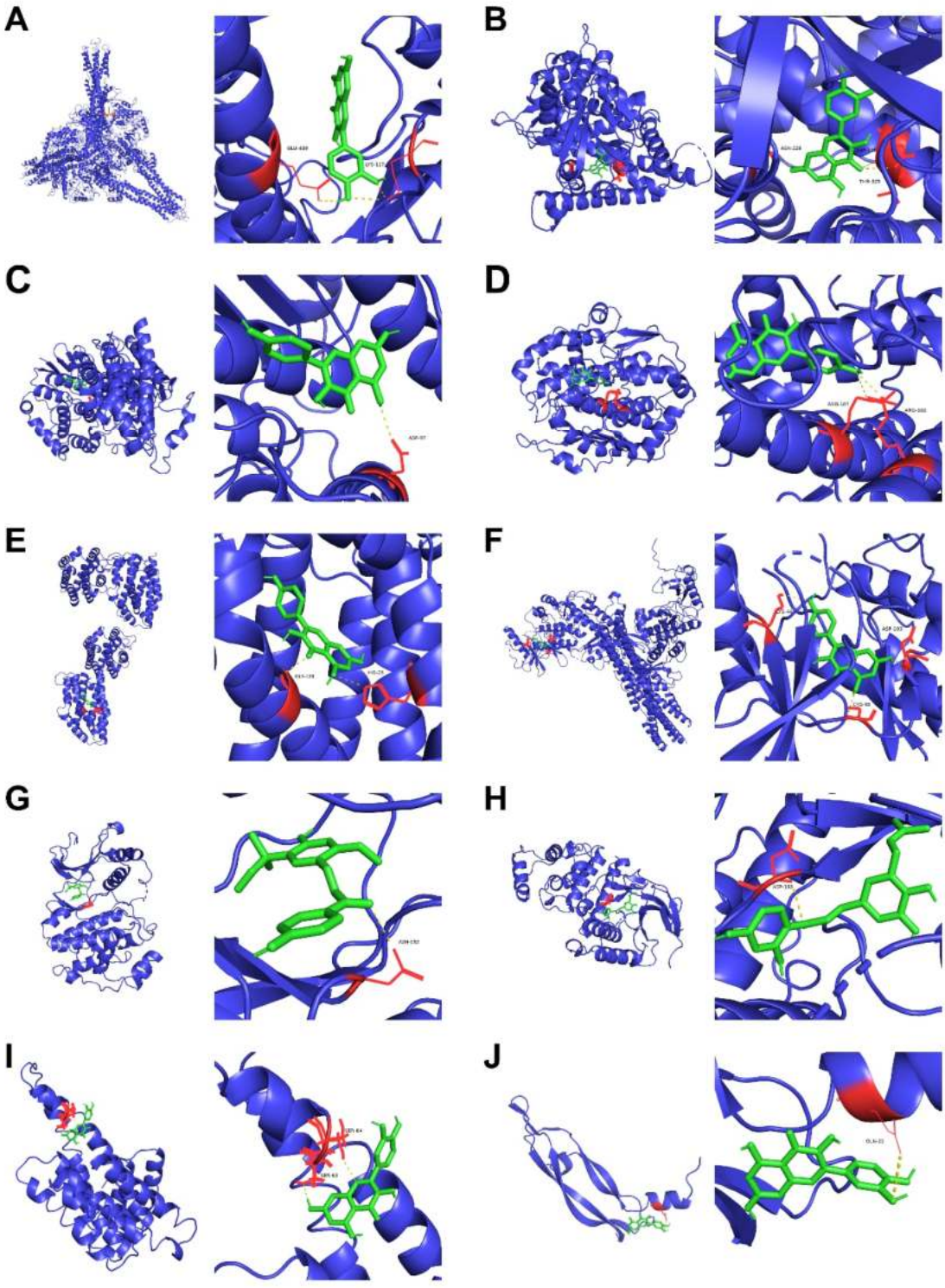


图 7 典型分子对接图。A：CHUK 与 quercetin 结合能最小（-7.6）的构象，B：CYP1B1 与 quercetin 结合能最小（-10.0）的构象，C：GSTM1 与 kaempferol 结合能最小（-6.0）的构象，D：GSTM2 与 kaempferol 结合能最小（-6.9）的构象，E：HMOX1 与 kaempferol 结合能最小（-7.2）的构象，F：IKBKB 与 kaempferol 结合能最小（-9.4）的构象，G：MAPK1 与 licochalcone a 结合能最小（-8.4）的构象，H：MAPK14 与(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one 结合能最小（-9.2）的构象，I：NFKBIA 与 quercetin 结合能最小（-6.6）的构象，J：VEGFA 与 quercetin 结合能最小（-5.0）的构象。

3.6 关键 marker 对疾病的诊断效能

基于 CFYS 作用的 37 个差异靶基因，使用 pROC 包计算 marker 对抑郁症的诊断效果，并绘制 ROC 曲线。并用同样的方法在验证集 GSE54570 中对 marker 的诊断进行验证。ROC 是真阳性率与假阳性率组成的曲线，AUC 值代表了真阳性大于假阳性的概率。结果显示 VEGFA 对抑郁症具有良好的预测能力（图 8）。

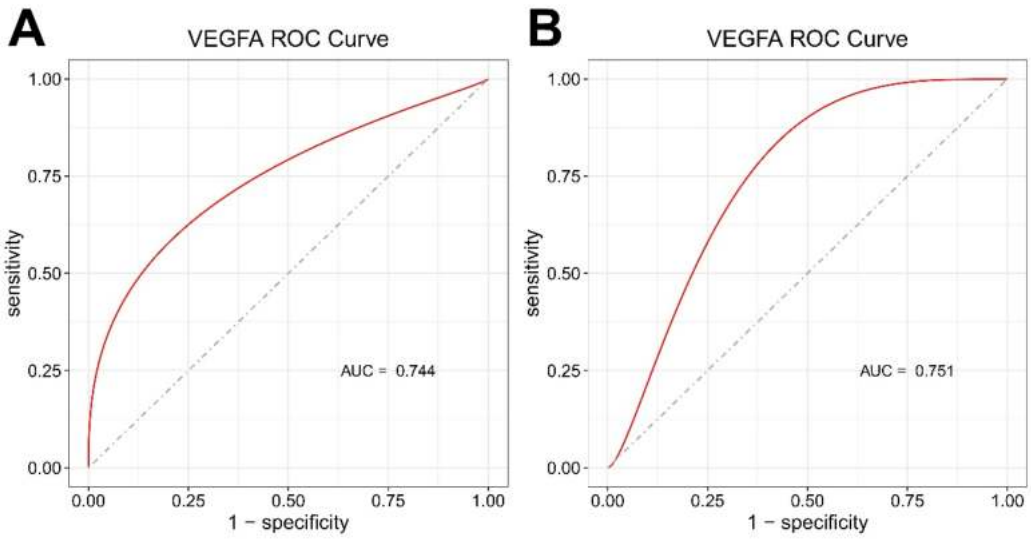


图 8 VEGFA 对抑郁症的诊断效能。A：训练集 GSE76826 中 VEGFA 基因诊断抑郁症 ROC 曲线，B：验证集 GSE54570 中 VEGFA 基因诊断抑郁症 ROC 曲线。

3.7 CFYS 对 CUMS 大鼠的影响

结果见表 1，可见抑郁模型大鼠旷场实验静止时间显著延长，而总运动距离缩短、中央区域穿越格数减少，表明造模成功，经 CFYS 干预后，上述抑郁大鼠行为学指标显著改善。

表 1 CFYS 对抑郁模型大鼠行为学的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量（g/kg）	静止时间	总运动距离	中央区域穿越格数	不动时间
对照组	-	56.28±8.23	802.33±37.21	21.42±4.36	26.06±9.55
模型组	-	132.33±11.47[a]	416.91±24.07[a]	11.82±3.85[a]	71.12±6.73[a]
低剂量组	1.25	117.23±9.38[ab]	519.92±22.25[ab]	14.83±3.44[ab]	53.92±6.37[ab]
中剂量组	2.5	93.06±8.30[ab]	565.84±24.12[ab]	17.39±4.06[ab]	43.72±7.46[ab]
高剂量组	5	82.58±7.26[ab]	662.40±25.38[ab]	18.93±4.17[ab]	35.13±5.057[ab]
西药组	-	87.74±7.54[ab]	573.59±28.56[ab]	16.92±3.63[ab]	42.94±7.83[ab]

与对照组比较，[a]P<0.05；与模型组相比，[b]P<0.05

如图 9 所示，结果表明，在模型组中，大鼠的抗氧化酶活性显著降低，包括 SOD、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、GSH、GSH-PX 及 CAT 水平降低（图 9A-F），而 MDA 水平升高（图 1G）。CFYS 干预后可显著逆转上述变化，同时呈剂量依赖关系。同时，研究发现模型组中铁离子水平显著升高（图 9H），CFYS 可呈剂量依赖型改善 VEGFA 水平。上述结果提示 CFYS 可能通过拮抗氧化应激反应治疗抑郁症。

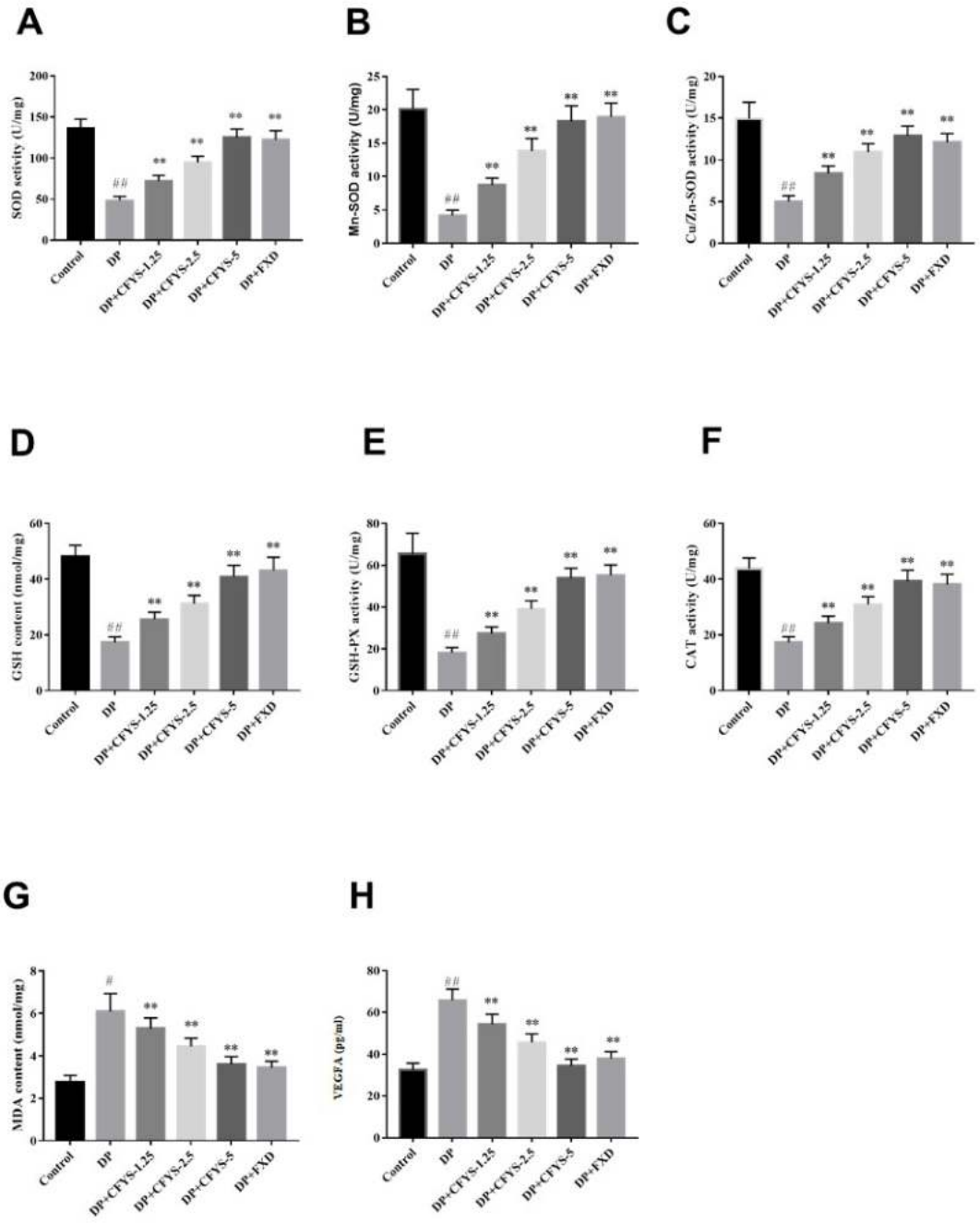


图 9 CFYS 对抑郁大鼠海马氧化应激指标及铁离子水平的影响。A：SOD，B：Mn-SOD，C：Cu/Zn-SOD，D：GSH，E：GSH-PX，F：CAT，G：MDA，H：VEGFA。**P VS DP<0.001，$^{\#}$P<0.05，$^{\#\#}$P<0.001

4. 讨论

本研究通过网络药理学和实验验证的方式，对 CFYS 治疗抑郁症的作用机制进行了探索。首先，我们利用网络药理学的方法从 TCMSP 数据库中获得了 CFYS 的有效成分以及其靶基因，分析结果显示，其中两种有效成分 quercetin（MOL000098）和 kaempferol（MOL000422）具有最多的靶基因。已有研究证实 Quercetin 可通过抗氧化、抗炎、抗细胞凋亡特性和抗钙超载发挥神经保护作用[16-18]，其可通过多种机制发挥抗抑郁作用，包括调节 triggering receptors expressed on myeloid cells 1/2 (TREM1/2)失衡[19]及核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）相关信号通路等[20]。Kaempferol 可通过调节多种促炎相关信号通路发挥神经保护作用，如核因子 κ B（NF-kB）、p38 丝

裂原活化蛋白激酶（p38MAPK）[21]。Kaempferol 可通过 AKT/β-catenin 通路介导神经炎症及氧化应激反应发挥抗抑郁作用[22]。由此可见，CFYS 中的有效成分，包括 quercetin 和 kaempferol 等，可能使其抗抑郁作用的主要物质基础。

进一步分析了这些靶基因在抑郁症中的表达差异，以及他们所参与的生物学过程和通路。富集分析揭示了差异基因所参与的生物学过程，如液泡膜、转录组调节复合物、蛋白酶体蛋白分解代谢过程等，上述通路均在抑郁症进展中发挥一定的作用[23-25]，这些可能是 CFYS 治疗抑郁症的作用机制之一。此外，研究成功构建了 PPI 网络，潜在作用靶点中 HMOX1 和 VEGFA 显示出较高的关联度，是该网络中的关键节点，提示 CFYS 活性成分抗抑郁作用与上述靶点有关。HMOX1 是铁代谢和抗氧化应激的重要代谢酶[26,27]，HMOX1 在 NADPH 及细胞色素 P450 还原酶的辅助下消耗 O2 催化血红素的降解反应，多项研究发现中医药其在中医药抗抑郁作用中发挥重要作用[28,29]。根据神经营养抑郁症假说，VEGF 可能参与抑郁症的进展[30]，VEGFA 是人体最有效的血管生成生长因子之一,其基本作用机制是促进血管生成和增加血液供应[31]。越来越多的研究表明 VEGFA 可以以多种方式影响神经发生, VEGFA 可通过与其受体 VEGFR2 结合, 介导其下游的效应基因表达, 促进海马神经元的存活、 迁移和增殖[32,33]。VEGFA 还广泛参与了海马神经细胞的信号转导,对海马神经细胞的增殖、存活以及功能维持等方面起着重要作用[34]。通过 ROC 曲线分析差异靶基因对抑郁症的诊断效果同样发现，VEGFA 对抑郁症具有良好的预测能力。由此提示，CFYS 抗抑郁作用机制研究可能与氧化应激及神经元功能调控机制相关

使用 clusterProfiler 对 37 个差异靶基因进行 KEGG 通路分析发现"Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species"通路可能是 CFYS 治疗抑郁症的关键通路，ROS 及其介导的神经元功能调控作用均在抑郁症进展中发挥重要作用[35-37]，此结果与上述靶基因分析结果相吻合。进一步通过分子对接研究 10 个"Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species"途径富集基因和其对应的 52 个 CFYS 有效成分的组合活性结果表明，CFYS 有效成分可与"Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species"通路中关键调节基因结合性均较佳。通过实验验证，我们发现 CFYS 能够显著改善抑郁模型大鼠的行为学指标，其中包括改善大鼠的抗氧化酶活性，降低 MDA 水平，提高 VEGFA 水平等，这些结果与网络药理学的分析结果是一致的，进一步支持了我们的假设，即 CFYS 可能通过改善神经元的抗氧化应激反应和调节 VEGFA 水平，从而达到治疗抑郁症的效果。

尽管本研究结合了网络药理学和实验验证的方法，从多角度揭示了 CFYS 治疗抑郁症的可能作用机制，为进一步理解中药治疗抑郁症的科学依据，以及开发新的抑郁症治疗策略提供了重要的线索。然而，我们的研究还存在一些局限性，如机制研究仍有待进一步深入。此外，我们的研究主要关注了中药有效成分及其潜在靶标与抑郁症的关联，但如何将这些有效成分及其潜在靶标有效地用于临床治疗，仍需要更深入的探讨。

5. 结论

综上，本研究从 TCMSP 数据库检索 CFYS 成分和靶点，经过筛选后，得到 113 种有效成分和 195 个靶基因。靶基因和抑郁症患者差异基因取交集后得到 37 个差异靶基因。差异靶基因 KEGG 富集及动物实验验证后发现 CFYS 可能通过改善神经元的抗氧化应激反应和调节 VEGFA 水平，从而达到治疗抑郁症的效果，同时 VEGFA 具有应用于早期预测抑郁症的潜力。

参考文献

[1] Lu J, Xu X, Huang Y, et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study[J]. The Lancet Psychiatry, 2021, 8(11): 981-990.

[2] Li F, Cui Y, Li Y, et al. Prevalence of mental disorders in school children and adolescents in China: diagnostic data from detailed clinical assessments of 17,524 individuals[J]. Journal of Child Psychology and Psychiatry, 2022, 63(1): 34-46.

[3] Heerlein K, Perugi G, Otte C, et al. Real-world evidence from a European cohort study of patients with treatment resistant depression: Treatment patterns and clinical outcomes[J]. Journal of Affective Disorders, 2021, 290: 334-344.

[4] Krystal J H, Abdallah C G, Sanacora G, et al. Ketamine: a paradigm shift for depression research and treatment[J]. Neuron, 2019, 101(5): 774-778.

[5] Espinoza R T, Kellner C H. Electroconvulsive therapy[J]. New England Journal of Medicine, 2022, 386(7): 667-672.

[6] de Zwart P L, Jeronimus B F, de Jonge P. Empirical evidence for definitions of episode, remission, recovery, relapse and recurrence in depression: a systematic review[J]. Epidemiology and psychiatric sciences, 2019, 28(5): 544-562.

[7] Chi X, Wang S, Baloch Z, et al. Research progress on classical traditional Chinese medicine formula Lily Bulb and Rehmannia Decoction in the treatment of depression[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 112: 108616.

[8] Shao R, He P, Ling B, et al. Prevalence of depression and anxiety and correlations between depression, anxiety, family functioning, social support and coping styles among Chinese medical students[J]. BMC psychology, 2020, 8(1): 1-19.

[9] Lu J, Xu X, Huang Y, et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study[J]. The Lancet Psychiatry, 2021, 8(11): 981-990.

[10] Niu W, Wu F, Cao W, et al. Network pharmacology for the identification of phytochemicals in traditional Chinese medicine for COVID-19 that may regulate interleukin-6[J]. Bioscience reports, 2021, 41(1).

[11] Pan L, Li Z, Wang Y, et al. Network pharmacology and metabolomics study on the intervention of traditional Chinese medicine Huanglian Decoction in rats with type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of ethnopharmacology, 2020, 258: 112842.

[12] Xin W, Zi-Yi W, Zheng J H, et al. TCM network pharmacology: a new trend towards combining computational, experimental and clinical approaches[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2021, 19(1): 1-11.

[13] Ruilian L, Honglin Q, Jun X, et al. H2S-mediated aerobic exercise antagonizes the hippocampal inflammatory response in CUMS-depressed mice[J]. Journal of Affective Disorders, 2021, 283: 410-419.

[14] Liu X, Zheng X, Du G, et al. Brain metabonomics study of the antidepressant-like effect of Xiaoyaosan on the CUMS-depression rats by 1H NMR analysis[J]. Journal of ethnopharmacology, 2019, 235: 141-154.

[15] Bhatt S, Nagappa A N, Patil C R. Role of oxidative stress in depression[J]. Drug discovery today, 2020, 25(7): 1270-1276.

[16] Grewal A K, Singh T G, Sharma D, et al. Mechanistic insights and perspectives involved in neuroprotective action of quercetin[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 140: 111729.

[17] Khan H, Ullah H, Aschner M, et al. Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease[J]. Biomolecules, 2019, 10(1): 59.

[18] Fideles S O M, de Cássia Ortiz A, Buchaim D V, et al. Influence of the Neuroprotective Properties of Quercetin on Regeneration and Functional Recovery of the Nervous System[J]. Antioxidants, 2023, 12(1): 149.

[19] Fang K, Li H R, Chen X X, et al. Quercetin alleviates LPS-induced depression-like behavior in rats via regulating BDNF-related imbalance of Copine 6 and TREM1/2 in the hippocampus and PFC[J]. Frontiers in pharmacology, 2020, 10: 1544.

[20] Guan Y, Wang J, Wu X, et al. Quercetin reverses chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior in vivo by involving nuclear factor-E2-related factor 2[J]. Brain Research, 2021, 1772: 147661.

[21] Silva dos Santos J, Goncalves Cirino J P, de Oliveira Carvalho P, et al. The pharmacological action of kaempferol in central nervous system diseases: a review[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 11: 565700.

[22] Gao W, Wang W, Peng Y, et al. Antidepressive effects of kaempferol mediated by reduction of oxidative stress, proinflammatory cytokines and up-regulation of AKT/β-catenin cascade[J]. Metabolic Brain Disease, 2019, 34: 485-494.

[23] Li X, Su X, Liu J, et al. Transcriptome-wide association study identifies new susceptibility genes and pathways for depression[J]. Translational psychiatry, 2021, 11(1): 306.

[24] Zhao B, Shan Y, Yang Y, et al. Transcriptome-wide association analysis of brain structures yields insights into pleiotropy with complex neuropsychiatric traits[J]. Nature communications, 2021, 12(1): 2878.

[25] Perić I, Costina V, Findeisen P, et al. Tianeptine enhances energy-related processes in the hippocampal non-synaptic mitochondria in a rat model of depression[J]. Neuroscience, 2020, 451: 111-125.

[26] Meng Z, Liang H, Zhao J, et al. HMOX1 upregulation promotes ferroptosis in diabetic atherosclerosis[J]. Life Sciences, 2021, 284: 119935.

[27] Yang X, Chen A, Liang Q, et al. Up-regulation of heme oxygenase-1 by celastrol alleviates oxidative stress and vascular calcification in chronic kidney disease[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2021, 172: 530-540.

[28] Ji Y, Luo J, Zeng J, et al. Xiaoyao pills ameliorate depression-like behaviors and oxidative stress induced by olfactory bulbectomy in rats via the activation of the PIK3CA-AKT1-NFE2L2/BDNF signaling pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 643456.

[29] Chen Y, Miao Z, Sheng X, et al. Sesquiterpene lactones-rich fraction from Aucklandia lappa Decne. alleviates dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis through co-regulating MAPK and Nrf2/Hmox-1 signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 295: 115401.

[30] Nunes F D D, Ferezin L P, Pereira S C, et al. The Association of Biochemical and Genetic Biomarkers in VEGF Pathway with Depression[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(12): 2757.

[31] Wang R, Ma Y, Zhan S, et al. B7-H3 promotes colorectal cancer angiogenesis through activating the NF-κB pathway to induce VEGFA expression[J]. Cell death & disease, 2020, 11(1): 55.

[32] Di Marco B, Crouch E E, Shah B, et al. Reciprocal interaction between vascular filopodia and neural stem cells shapes neurogenesis in the ventral telencephalon[J]. Cell reports, 2020, 33(2): 108256.

[33] Cheng C Y, Huang H C, Kao S T, et al. Angelica sinensis extract promotes neuronal survival by enhancing p38 MAPK–mediated hippocampal neurogenesis and dendritic growth in the chronic phase of transient global cerebral ischemia in rats[J]. Journal of ethnopharmacology, 2021, 278: 114301.

[34] Wang D P, Jin K Y, Zhao P, et al. Neuroprotective effects of VEGF-A nanofiber membrane and FAAH inhibitor URB597 against oxygen–glucose deprivation-induced ischemic neuronal injury[J]. International Journal of Nanomedicine, 2021, 16: 3661.

[35] Jiang L, Ma D, Grubb B D, et al. ROS/TRPA1/CGRP signaling mediates cortical spreading depression[J]. The journal of headache and pain, 2019, 20(1): 1-12.

[36] Correia A S, Cardoso A, Vale N. Oxidative stress in depression: the link with the stress response, neuroinflammation, serotonin, neurogenesis and synaptic plasticity[J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 470.

[37] Lim D W, Park J, Jung J, et al. Dicaffeoylquinic acids alleviate memory loss via reduction of oxidative stress in stress-hormone-induced depressive mice[J]. Pharmacological Research, 2020, 161: 105252.

疫情期间精神专科医院独立药学门诊服务的探讨与实践

蒋颖，蒋颖，周勤，曲衍衍，陆荣荣，朱浩浩，沈远

无锡市精神卫生中心　江苏　无锡 214000

【摘要】目的：新冠肺炎疫情期间通过精神专科医院独立药学门诊服务的实践，探讨并分析精神患者的用药情况与药物相关咨询问题，促进精神专科医院药学发展。**方法：**回顾性的收集并分析本院 2020 年 1 月-2022 年 12 月疫情期间独立药师门诊接诊患者的所有资料和具体咨询问题，并进行统计分析。**结果：**疫情 3 年间精神专科独立药学门诊共接诊患者 40 例，其中男性 21 例、女性 19 例，患者平均年龄（38.33 ± 15.30）岁。疾病诊断主要是抑郁症（22.50%）、双相情感障碍（22.50%）、精神分裂症（22.50%）。患者咨询使用药物数量平均是（1.90 ± 1.08）种。患者就诊咨询问题平均（1.80 ± 0.82）种。主要咨询问题有不良反应与处理方法（38.89%）、药物用法用量及疗程咨询（22.22 %）、药物治疗方案咨询与评估（20.83%）。咨询药物主要涉及抗精神药物（38.16%）、抗焦虑抑郁药物（27.63%）。药师给予的建议主要是用药宣教（47.54%），咨询体验满意度达到 100%。**结论：**建立精神专科医院独立药学门诊，不仅为药学工作者在抗击疫情中提供了新思路，另外还为药学服务的转型提供实践参考。尽管在药学门诊服务实践中还存在一些问题，我们将继续致力于解决和克服药学门诊建设中的困难，同时研究结合线上线下模式，进一步践行和探索后疫情时代独立药学门诊建设，推动药学学科建设的发展，打下可持续发展的基础。

【关键词】新冠疫情；精神专科；独立药学门诊；互联网+

精神专科疾病的病理机制复杂，一般病程长，容易反复发作，目前对于各种精神疾病大多数都是依靠药物控制病情且需长期用药，有些患者甚至需要终生接受药物治疗；而精神科药物药理作用复杂，毒副作用较明显，有些精神病患者还伴随其他躯体疾病需要用药[1]。

药学门诊是指医疗机构具有药学专业技术优势的药师对患者提供用药评估、用药调整、用药计划、用药教育、随访指导等一系列专业化服务，是药师为门诊患者提供的一种新型药学服务[2]。国外类似药学门诊的药学服务开展较早且较为成熟，如美国自 20 世纪 90 年代开展药物治疗管理(medication treatment management，MTM) ，已经形成标准的服务流程、服务内容、收费制度等，通过法案并纳入保险[3][4]。药学门诊在我国起步较晚，并且发展较为缓慢，我国药学门诊开设主要为各级公立医院，以三级甲等（简称三甲）医院为主，其药学门诊开设率约为 12.97%，远低于美国的各级医疗机构药学门诊开设率 46.2%[5][6]。

2020 年新冠疫情暴发，1 月 21 日国家卫健委将 COVID- 19 纳入法定乙类传染病管理，实行甲类传染病防控措施[7]。在疫情期间，我院作为三级甲等精神专科医院，及时调整药学服务策略，开设精神专科医院独立药学门诊，为患者提供专业化、个体化的精神科合理用药指导，防范疫情期间患者用药的不良反应，提升患者服药依从性，提高生活质量。本文针对疫情期间精神专科医院独立药学门诊服务的实践情况做回顾性分析，进一步完善本院药学门诊的工作模式，为规范精神专科独立药学门诊管理提供参考依据。

1 精神专科独立药学门诊工作模式

本院开设的精神专科独立药学门诊由 4 名副主任药师和 3 名临床药师独立出诊，门诊开放时间为每周 2 个半天（周二、周五下午）。患者可通过手机在线预约，也可直接到医院通过挂号窗口或导诊台咨询就诊，疫情期间提供免费就诊。药师接诊后对患者进行药学问诊，了解患者基本信息，根据患者具体情况及其咨询诉求提供个体化的药学服务（比如进行全面的用药干预与重整、合理用药教育与指导，包括药品适应证、用法用量及服药疗程，不良反应及应对处理办法，药物/食物相互作用，服药期间注意事项，药物选择及调整，特殊人群用药等），并对患者进行药学随访。药学门诊不提供疾病诊断，无开具药品和检验、检查项目的权限。我院精神专科独立药学门诊工作流程详见图 1。

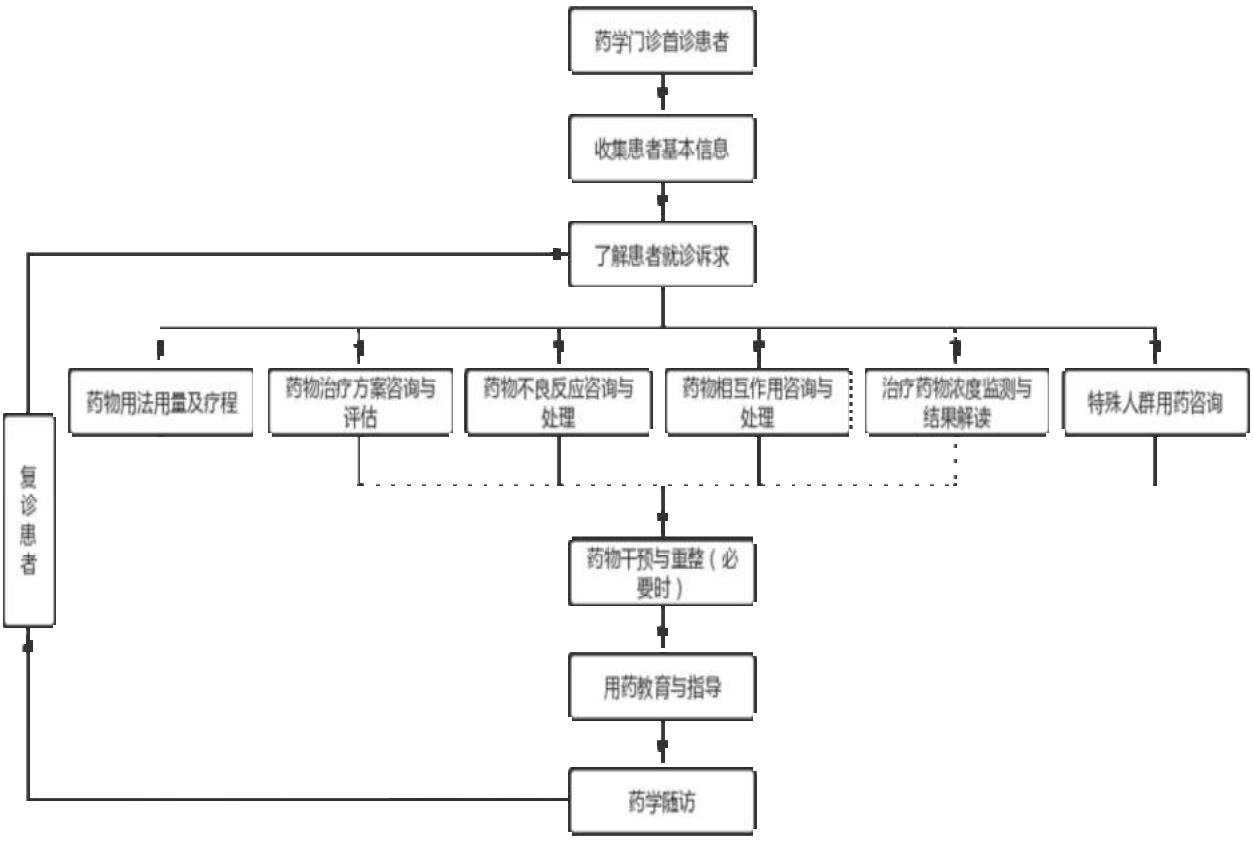


图 1 我院精神专科独立药学门诊工作流程

2 精神专科独立药学门诊情况分析

2.1 资料与方法

收集 2020 年 1 月-2022 年 12 月疫情 3 年在我院精神专科独立药学门诊就诊的患者资料和具体咨询问题进行统计分析。患者服药依从性采用 Morisky 用药依从性问卷(MMAS-8)评分，满分为 8 分得分<6 分为依从性差，得分 6-8 分为依从性中，等得分 8 分为依从性好。数据采用描述性统计，输入 EpiData 3.1 软件，采用 SPSS 20.0 进行统计分析。计数数据用 n（%）描述，计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 描述。

2.2 结果

2.2.1 患者的基本信息

疫情 3 年间精神专科独立药学门诊共接诊患者 40 例，其中男性 21 例（52.50%）、女性 19 例（47.50%），患者年龄 17-78 岁，平均（38.33±15.30）岁。患者中最常见的疾病诊断类型是抑郁症（22.50%）、双相情感障碍（22.50%）、精神分裂症（22.50%）。患者使用药物数量主要涉及 1 种（47.50%）、2 种（25.00%）、3 种（22.50%），平均使用（1.90±1.08）种。患者就诊咨询 1 种问题（占 47.50%）、2 种（占 30.00%）、3 种（占 25.00%），平均有（1.80±0.82）种。服药依从性 8 分（40.00%）、依从性差（37.50%），平均（6.31±2.16）分。详见表 1。

表 1 精神专科独立药学门诊患者的基本信息

基本信息	人数/例	构成比/%	$\bar{x}$±s
性别			
男	21	52.50	
女	19	47.50	
年龄/岁			
＜18	1	2.50	
18-35	19	47.50	38.33±15.30
36-59	17	42.50	
＞60	3	7.50	
疾病诊断			
抑郁症	9	22.50	
双相情感障碍	9	22.50	
精神分裂症	9	22.50	
焦虑症	4	10.00	
失眠症	3	7.50	
睡眠障碍	2	5.00	
童年期情绪障碍	1	2.50	
精神发育迟滞	1	2.50	
焦虑抑郁症	1	2.50	
急性短暂性精神障碍	1	2.50	
合并用药数量/种			
1	19	47.50	
2	10	25.00	1.90±1.08
3	9	22.50	
5	2	5.00	
就诊咨询问题数量/种			
1	18	45.00	
2	12	30.00	1.80±0.82
3	10	25.00	
服药依从性评分/分			
＜6	15	37.50	
6-8	9	22.50	6.31±2.16
8	16	40.00	

2.2.2 咨询问题分类

40 例就诊患者共有 72 条咨询问题，根据咨询问题内容分为 6 种类型。38.89%的患者主要咨询药物治疗过程中出现的不良反应与处理方法，包括疫情期间焦虑失眠，服用安眠药物成瘾性咨询。其次是药物用法用量及疗程咨询（22.22 %）、药物治疗方案咨询与评估（20.83%）、药物相互作用咨询与处理（9.72%）、特殊人群用药咨询（6.94 %）、治疗药物浓度监测与结果解读（1.39 %）。详见表 2。

表 2 精神专科独立药学门诊患者咨询问题分类

咨询问题	次数/条	构成比/%
药物不良反应咨询与处理	28	38.89
药物用法用量及疗程	16	22.22
药物治疗方案咨询与评估	15	20.83
药物相互作用咨询与处理	7	9.72
特殊人群用药咨询	5	6.94
治疗药物浓度监测与结果解读	1	1.39
合计	72	100.00

2.2.3 咨询药物分类

40 例就诊患者涉及咨询药物有 76 条，主要分为 6 大类，主要涉及抗精神药物（38.16%）、抗焦虑抑郁药物（27.63%）、镇静催眠类药物（19.74%）。具体详见表 3。

表 3 精神专科独立药学门诊咨询药物分类

药物分类	次数/条	构成比%	药物名称	次数/条	构成比%
抗精神药物	29	38.16	奥氮平	9	11.84
			喹硫平	7	9.21
			碳酸锂	5	6.58
			氯氮平	3	3.95
			利培酮	2	2.63
			阿立哌唑	2	2.63
			氨磺必利	1	1.32
抗焦虑抑郁药物	21	27.63	艾司西酞普兰	6	7.89
			度洛西汀	3	3.95
			氟西汀	3	3.95
			阿戈美拉汀	2	2.63
			米氮平	2	2.63
			舍曲林	1	1.32
			伏硫西汀	1	1.32
			西酞普兰	1	1.32
镇静催眠类药物	15	19.74	氟伏沙明	1	1.32
			文拉法辛	1	1.32
			阿普唑仑	3	3.95
			奥沙西泮	3	3.95
			右佐匹克隆	2	2.63
			氯硝西泮	3	3.95
			劳拉西泮	2	2.63
			艾司唑仑	1	1.32
			佐匹克隆	1	1.32
抗癫痫药物	7	9.21	丙戊酸钠	7	9.21
中成药物	3	3.95	甜梦胶囊	2	2.63
			七叶安神片	1	1.32
抗胆碱能药物	1	1.32	盐酸苯海索片	1	1.32
合计	76	100.00		76	100.00

2.2.4 药师用药建议与满意度

40 人次有效就诊患者中，药师给予的建议主要分为 7 类，有 61 条；主要有用药宣教（47.54%）、药物剂量调整（14.75%）、推荐主治医生就诊（14.75%）等。40 人次咨询患者中均表示认可药师解决咨询问题的工作，采纳药师提供的用药建议，咨询体验满意度达到 100%。详见表 4。

表 4 精神专科独立药学门诊药师用药建议

用药建议类型	次数/条	构成比/%
用药宣教	29	47.54
药物剂量调整	9	14.75
推荐主治医生就诊	9	14.75
饮食运动干预	7	11.48
调整用药种类	4	6.56
停用药物	2	3.28
调整用药时间	1	1.64
合计	61	100.00

3 讨论

3.1 精神专科独立药学门诊现状

从患者基本信息数据分析可知，疫情 3 年间精神专科独立药学门诊共接诊 40 位患者，就诊率较低，主要考虑受以下几个方面的影响：一是新冠疫情期间，医院进入常态化防控管理状态，患者就医后很快离开医院，未能有很多机会了解药学门诊的具体情况，导致患者对药师门诊的知晓率较低。二是本院为精神专科医院，就诊患者具有一定的特殊性，对医生以外的用药建议信任度较低；且患者在药学门诊进行诊疗时，药学门诊药师无协议处方权[8]，又缺乏相关技术手段使得患者与药学门诊的联系更加紧密，使得药学门诊在患者诊疗过程中无法占据主动地，导致就诊率低[9]。

本研究发现，精神专科独立药学门诊以 18-59 岁的中青年居多，常见疾病以抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症为主。主要咨询药物有抗精神药物、抗焦虑抑郁药物。咨询使用药物主要以 1 种为主，一方面可能与本院精神专科医院有关，病种较综合医院少，故医嘱用药单一简单；另外当前精神科药物用药趋势至臻至简，王传跃[10]教授认为，精神科应加强用药规范化，识别患者个体差异，追求用药的精准化，至高境界少即是多，合理用药需极简化，药物治疗中，贯彻用药品种、用药剂量、用药频率的“少即是多”，可以减少药物带来的可塑性损伤，有利于顺利调整治疗方案，实现少数患者的有效时限治疗[11]。

本研究发现多数患者咨询的问题是服药期间出现的药物不良反应与处理方法、药物用法用量及疗程，咨询过程中发现当患者出现药物不良反应，或者自我感觉病情好转时，会自行减量甚至停药，患者对疾病和药物不良反应的认识不足影响了用药依从性和治疗效果，故本研究发现患者服药依从性较差。针对上述情况，本研究中药师主动为患者提供全方位的用药知识，给予药学建议服务，主要集中于用药宣教、药物剂量调整等。越来越多的研究表明药学建议服务可显著提高患者的用药依从性[12][13]，药学门诊对提高患者治疗依从性和治疗效果起到一定的积极作用。本研究发现药师主动提高服务意识，使药学门诊咨询的患者均认可药师解决咨询问题的工作，采纳了药师提供的用药建议，咨询体验满意度达到 100%。

3.2 精神专科独立药学门诊改进措施

一方面需要药学门诊坐诊药师提高自身素养，提升服务能力，进行专业、专科、专病种的学习，大幅度提高自身临床药学和医学等专业知识水平，学习并利用药物浓度监测与药物基因检测等药学新技术，来使得患者与药学门诊的联系更加紧密，药师通过全面的学习减少药学教育体制缺陷带来的限制[14]。同时医院需要对药学人员进行更贴合临床实际的专业培训，提升药学人员的专业水平，才能更好的做好用药宣教与咨询服务工作。

另一方面需要加强药学门诊宣传，可以通过微信公众号宣传、药师科普文章宣传等多种途径宣传。药学门

诊可以结合出院患者、社区义诊，提供连续性的药学服务，比如针对患者出院后通过药学门诊进行药物重整与管理、疗效评估、用药教育等[15]。针对研究中发现的特殊人群需求，比如老年、儿童、妊娠期和哺乳期妇女、新冠感染者等特殊患者，药学门诊可以重点关注，并主动追踪病情，进行药学门诊服务，提高特殊患者对药学门诊重要性的认识，提升药学门诊就诊率。另外药学门诊可以联动医师门诊，医师为患者评估病情，拟定治疗方案，之后药师再给患者提供用药宣教、药物干预与重整等服务，发挥各自专业特长[16]。不仅可以保障患者药物治疗的有效性与安全性，减少不良反应的发生[17][18]，还可以为合理用药保驾护航，提高患者就诊体验感和满意度，进一步提升药学门诊就诊率。

3.3 开展互联网+精神专科药学门诊

随着互联网+药学服务的推广，药师在互联网+新型模式下，可以利用信息化手段为患者的药物治疗方案提供合理用药宣教、用药指导、药物警戒等全方位、全周期的高质量药学服务，也是互联网诊疗对药师新的要求[19]。

在新型冠状病毒疾病集中爆发期间，各大医院为了减少聚集性感染的风险，均采取了一系列减少就医次数的相关措施，本院药学门诊就诊量也因此受到了一定的影响。随着疫情常态化，推进药学门诊线上服务，为患者在特殊时期实行无接触式药学服务，是对抗这一流行病的有益补充。与传统的面对面药学门诊咨询相比，互联网+药学门诊服务更有利于对患者在疫情期间开展合理用药，同时有效避免面对面沟通造成交叉感染风险，让患者足不出户就可以体验到药学服务。增加患者对药学门诊的认可度和知晓率，为后疫情时代药学门诊线上线下相结合模式的可持续发展打下基础。

4 结论

药学服务体系建设是健康中国必不可少的支撑部分，推进药学服务体系建设和医疗保障协调发展是我们共同努力的方向[20]。而独立药学门诊作为医师门诊的有益补充，可在提高患者用药安全性、有效性、经济性、依从性方面发挥重要作用。

本院在疫情期间开展精神专科药学独立门诊，肩负患者药物咨询和药物治疗管理的重任，不仅为药学工作者在抗击疫情中提供了新思路，为取得疫情防控阻击战的全面胜利贡献了力量，另外还为药学服务的转型提供实践参考。尽管在药学门诊服务实践中还存在一些问题，我们将继续致力于解决和克服药学门诊建设中的困难，同时研究结合线上线下模式，进一步践行和探索后疫情时代独立药学门诊建设，推动药学学科建设的发展，打下可持续发展的基础。

参考文献

[1] 廖丹,罗骞,占海燕.临床药师在精神病院开展药学服务的实践与体会[J].宜春学院学报,2022,44(06):68-70+125.

[2] 甄健存,陆进,梅丹,等.医疗机构药学服务规范[J].医药导报,2019,38(12):1535-1556.

[3] 毛静怡,柳丽丽,潘永卉.美国药物治疗管理对我国药学服务的启示[J].现代药物与临床,2017,32(10):2031-2035.

[4] 李达,闫素英.药物治疗管理教学与实践手册[M].北京:人民卫生出版社,2018: 6.

[5] 张昕怡,万青,唐宁佳,等.全国三甲医院药学门诊开设情况网上调查[J].中国药学杂志,2021,56(10):849-853.

[6] Pedersen Craig A,Schneider Philip J,Ganio Michael C,et al. ASHP national survey of pharmacy practice in hospital settings:Dispensing and administration-2020[J].AMERICAN JOURNAL OF HEALTHSYSTEM PHARMACY,2021,78(12):1074-1093.

[7] 疾病预防控制局.中华人民共和国国家卫生委员会公告(2020年第1号)[EB/OL].(2020-01-20)[2020-01-16].http://www.nhc.gov.cn/jki/s7916/202001/44a3b8245e8049d2837a4f27529cd386.shtml.

[8] 李国锋,张仕畅.当前中国医院药学发展面临的问题及对策[J].现代医院,2020,20(09):1308-1311.

[9] 罗美霞,邱畅,尚德为,等.某三甲精神专科医院药学门诊药学服务分析[J].今日药学,2022,32(06):477-480.

[10] 王传跃.精神分裂症药物治疗的“物稀为贵”（英文）[J].上海精神医学,2015,27(06):368-370.

[11] 谭红阳,赵旭东,戴常诠,等.精神科药学服务现状[J].广西医学,2019,41(22):2918-2920.

[12] 张玉艳.药学服务对精神分裂症患者服药依从性及疗效的影响[J].中国药业,2017,26(24):93-95.

[13] 张德伦,陈林,沈宁平,何益梅,辛霁霏.药学服务对精神分裂症患者服药依从性的影响[J].中国药业,2017,26(06):91-93.
[14] 沈亚岚. 南京市三级医院门诊药学服务调查研究[D].南京医科大学,2011.
[15] 梁松新,于志军.临床药师对精神分裂症伴躯体疾病患者的药学监护[J].中国民康医学,2013,25(07):41-43.
[16] 何杏仪,欧阳燕婷,李正平,等.中药药学门诊案例分析与服务模式探讨[J].临床合理用药杂志,2021,14(25):12-14+17.DOI:10.15887/j.cnki.13-1389/r.2021.25.004.
[17] 苏昊凡,张青霞,李晓玲.医师-药师协作模式在门诊慢性病管理中的研究进展[J].实用药物与临床,2021,24(08):757-761.DOI:10.14053/j.cnki.ppcr.202108020.
[18] 张耀峰,黄静娥,符红波.医师-药师协作的华法林抗凝门诊管理模式的应用及其效果评价[J].今日药学,2021,31(08):623-626.
[19] Ying Jiang, Rongrong Lu, Mengmeng Ou,et al.Application of “Internet +” pharmaceutical consultation services in psychiatric hospital during the epidemic[J].Asian Journal of Psychiatry,82 (2023) 103532.www.elsevier.com/locate/ajp.
[20] 中国健康促进基金会,中国药学会,中国药师协会.推进药学服务体系建设和医疗保障协同发展专家共识[J].医药导报,2022,41(6):755-761.

选择性 HDAC6 抑制剂通过上调食管癌 MHC-Ⅱ型复合物的表达增强抗肿瘤免疫反应

康慧琴[1]，聂海倩[1]，冯梦凯[1]，高雅[1*]，刘宏民[1*]

[1]郑州大学，河南省郑州市中原区科学大道 100 号，450000

食管癌是消化道常见恶性肿瘤之一。目前手术是早期食管癌治疗的首选方案，但长期效果不理想，术后局部复发和转移常导致手术失败，化疗一线药物的有效率仅为 40%左右，且一线药物不敏感[1]。目前，靶向表观遗传的小分子药物在疾病治疗的研究中有重要临床应用价值。鉴于组蛋白去乙酰化酶 6（HDAC6）在肿瘤、免疫中的重要作用，HDAC6 抑制剂对肿瘤免疫效应的调节将是未来抗肿瘤药物研发新的方向和热点[2]。

首先，本课题组发现 HDAC6 抑制剂抑制食管癌细胞的增殖和迁移；为了探索具体作用机制，通过 RNA-seq 及 RT-qPCR 我们发现 HDAC6 抑制剂促进 MHC-Ⅱ型复合物（HLA-DR/DP）的表达（图 1，A&B）。除此之外，流式实验也证明 MHC-Ⅱ型复合物的表达也随着化合物作用浓度的增加而增加（图 1，C)。接下来，我们着重探索 HDAC6 促进 MHC-Ⅱ型复合物表达的作用机制以及小分子抑制剂调控肿瘤微环境，逆转免疫抑制状态的作用机制。

【关键词】HDAC6；抑制剂；MHC-Ⅱ型复合物；免疫微环境

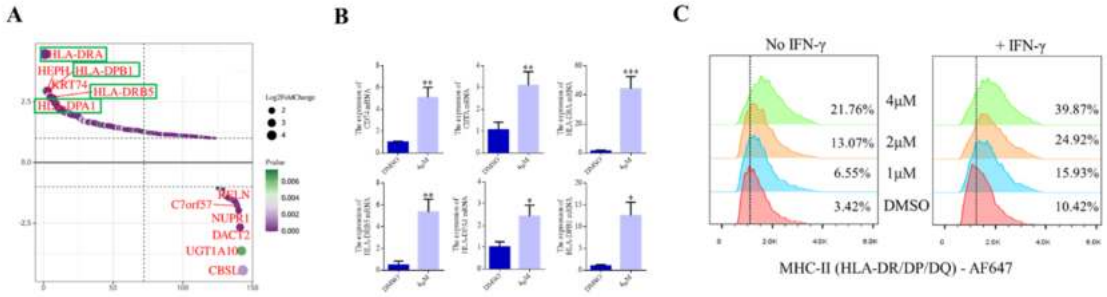


图 1　MHC-Ⅱ型复合物相关因子的表达（A and B）；流式实验表明 MHC-Ⅱ型复合物的表达（C）。

参考文献

1. Shimada, H., et al., Clinical TNM staging for esophageal, gastric, and colorectal cancers in the era of neoadjuvant therapy: A systematic review of the literature. Ann Gastroenterol Surg, 2021. 5(4): p. 404-418.

2. Zheng, Y.C., et al., Curriculum vitae of HDAC6 in solid tumors. Int J Biol Macromol, 2023. 230: p. 123219.

美国化生放核及新发传染病医学对策产品及监管进展

蒯丽萍

（北京智勤启航咨询服务有限公司 北京 100000）

美国《公共健康服务法案》(Public Health Service Act，PHS Act)中提出了医学对策产品（Medical Countermeasure，MCM）的概念，是保护美国国人免受化生放核（CBRN）和新兴传染病威胁的医疗产品，包括药品、治疗性生物制品、疫苗和器械（包括诊断及检测方法）。2010 年，根据美国人类健康服务部（HHS）要求美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）启动医学对策产品行动计划（Medical Countermeasures Initiative， MCMi），不仅对所有拟上市投入使用的医学对策产品进行审评审批，履行相关监管责任，还要与美国其他政府机构合作，促进 MCM 的研发和可获得性。可以说 FDA 是美国化生放核及新发传染病医学对策产品从研发、生产到使用与供应等多个环节的协调及促进机构。本文以 2018-2019 年 FDA 医学对策行动计划年度总结报告及 FDA MCMi 网页信息为基础，系统梳理美国近年来批准上市或紧急授权使用的医学对策产品，并对其监管科学进展及其他相关活动进行总结分析，以便了解目前美国应对化生放核及新发传染病医疗产品及保障能力的整体情况。本研究范围仅限于药品与个别敷料，不包括诊断设备、试剂及其他医疗器械产品。

1.概念与范畴

医学对策（Medical Countermeasure，MCM），是指经美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）审批未来可以用于应对潜在的公共卫生应急事件（包括核化生恐怖袭击或自然发生的新兴传染病）的医学产品，包括生物制品（疫苗、血液制品及抗体）、化学药品（抗菌药物、抗病毒药物）及医疗设备（诊断试剂、个人防护装备，包括口罩、手套及呼吸机等）等[1]。医学对策产品可以用于诊断、预防、防护或治疗上述公共卫生应急事件引发的疾病或伤害。

医学对策产品行动计划（Medical Countermeasures Initiative，MCMi）是由 FDA 发起的一项协调并促进 MCM 研发、准备与响应的项目，由 FDA 首席科学家办公室下设的反恐及应急威胁处置办公室领导实施。FDA 是美国食品及其他医疗产品的监管机构，所有医疗产品包括仅限军队使用的军队特需药品也要经过 FDA 的审评审批方可使用。对于确保医学对策产品的安全、有效，FDA 可以说是责无旁贷。除了对 MCM 进行审评审批外，FDA 还负责确定 MCM 研发需求及研发的优先级别，通过协调研发、供应保障及使用战略，提高 MCM 的可获得性及使用效能。

2.相关机构及管理情况

参与 MCMi 的其他美国政府机构还有美国疾病预防控制中心（Center of Disease Control， CDC）、美国国立卫生研究院（National Institute of Health， NIH），这两个机构与 FDA 一起在美国健康与公共服务部（United States Department of Health and Human Services，HHS）负责备灾与响应的助理部长（Assistant Secretary for Preparedness and Response ，ASPR）办公室领导下，组织实施名为 公共健康应急医学对策专项(Public Health Emergency Medical Countermeasures Enterprise，PHEMCE) 的相关工作，该专项的合作机构还包括：国防部（Department of Defense，DoD），美国退伍军人事务部（Department of Veterans Affairs，VA）， 国土安全部（Department of Homeland Securit，DHS） 和美国农业部（United States Department of Agriculture，USDA）。

3.近年来上市的医学对策产品情况

根据 2018、2019 两个年度 FDA 发布的 MCMi 年度总结报告及 FDA 网站公告，对近年来美国批准上市的核

[1] https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/about-mcmi/what-are-medical-countermeasures

化生放及新兴传染病医学对策产品药品部分进行汇总梳理。[2]目前在 FDA 网站上，MCMi 药品部分主要分为 5 个专项，分别是应对炭疽事件、应对其他生物恐怖事件、应对核与辐射应急事件、应对化学应急事件以及与军方合作项目，详见表 1，共有针对 16 种不同适应证 50 种防治药品。

3.1 炭疽感染防治药品

主要包括 6 种抗菌药物、1 种疫苗及 3 种治疗用生物制品（包括两种单克隆抗体）。包括环丙沙星、多西环素、青霉素在内的 6 种抗菌药物均用于预防及治疗吸入性炭疽，其中仅有多西环素通过应急使用授权（EUA）进行使用。两种单克隆抗体分别于 2012 年 12 月，2016 年 3 月通过“动物有效性原则”获批。2012 年获批的瑞西巴库（Raxibacumab）同时享有 FDA 快速审评、优先审评的政策，且被认定为孤儿药。

3.2 其他病原体防治药品

目前确定的其他可能造成生物恐怖事件的病原微生物包括肉毒梭菌、埃博拉病毒、马鼻疽、类鼻疽、鼠疫、天花、土拉热杆菌、寨卡病毒、流感病毒等 9 种。针对马鼻疽、类鼻疽和寨卡病毒，尚未有获批的防治药品。在治疗肉毒梭菌方面，有一种免疫球蛋白和一种抗毒素；在埃博拉病毒防治方面，FDA 分别于 2019-2020 年度批准了一种疫苗和两种抗体制剂，其中 Inmazeb 是三种单克隆抗体的混合物；在鼠疫和土拉热杆菌治疗方面，主要是四环素和链霉素类的抗菌药物，相较炭疽杆菌治疗，以及同样可以治疗炭疽感染的喹诺酮类抗菌药物；在天花防治方面，有 3 种不同来源及制备技术的疫苗，一种免疫球蛋白及两种治疗药物，分别为 2018 年获批的特考韦瑞及目前尚在 IND 阶段的西多福韦；在流感防治方面，包括 2016 年获批的四价流感疫苗及 2019 年获批的巴洛沙韦酯。Afluria 四价流感疫苗于 2016 年 8 月首次在美国获得批准上市，适用于 18 岁以上的成年人，并可有助于预防两种甲型流感病毒株和两种乙型流感病毒株。FDA 还批准了扩大年龄的适应症，使 6 个月至<36 个月的儿童可使用 0.5 毫升（mL） 剂量的 Fluzone 四价流感疫苗。

3.3 急性放射病防治药品

共有 6 种急性放射病防治药品，其中两种促排药，分别为普鲁士蓝胶囊，Ca-DTPA 和 Zn-DTPA。2015 年根据动物有效性原则批准了两款生物制品非格司亭、培非格司亭，用于帮助因放射事故造成骨髓抑制后的白细胞及中性粒细胞恢复。2018 年，FDA 依据动物有效性原则批准了 Leukine（沙格司亭）的新适应人群，用于提高受到骨髓抑制剂量辐射的患者的存活率，本次适应人群由原来的 17 岁以上成人拓展至刚出生的婴儿及青少年以提高暴露于骨髓抑制剂量辐射的成年人和刚出生至 17 岁儿科患者的存活率（急性辐射综合征造血综合征，又称 H-ARS）。

3.4 化学损伤防治药品与敷料

主要分为氰化物解毒、神经毒剂解毒及化学毒剂引起的皮肤损伤防治三类。在氰化物中毒方面，共有 4 种产品，分别为亚硝酸钠注射液，硫代硫酸钠注射液及前二者混合注射液，强考拉明注射液；神经毒剂解毒方面共有 7 种，其中 6 种为自动注射针，均为阿托品、氯解磷定、地西泮三种成分的单品或组合产品。2018 年，FDA 批准一款 2 毫克（mg）阿托品自动注射器，用于治疗可疑有机磷神经性毒剂以及有机磷或氨基甲酸酯杀虫剂中毒的成年人和体重超过 90 磅（通常 10 岁以上）儿科患者。 另外，FDA 批准 Seizalam（咪达唑仑肌内注射液）用于治疗成年人神经毒剂中毒后的癫痫持续状态。在化学神经毒剂造成的皮肤损伤方面，2019 年 FDA 批准了 Silverlon 的新适应症，这是一种首创的伤口接触敷料，包括对因暴露于硫芥气体（通常被称为芥子气）造成的某些损伤的救治，适用于因暴露硫芥子气导致的一级和二级皮肤烧伤。此外，FDA 在 2003 年批准了反应性皮肤去污乳液（RSDL），用于接触化学战剂导致的皮肤烧伤。

3.5 军方应用的产品

自 2018 年起，FDA 与国防部建立了合作关系，将适用于军队及军事作战环境的产品也纳入 MCMi 进行管理。2018 年以来，经由 FDA 与 DoD 合作机制获批的药品包括：

---

[2] 1. MCMi Program Update FY 2019

2. MCMi Program Update FY 2018

3. https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/medical-countermeasures-initiative-mcmi/mcm-issues

一是在镇痛方面。2019 年度，批准 Dsuvia，舒芬太尼舌下片，通过一次性、预填充、单剂量给药器给药，用于对严重到需要阿片类镇痛药的急性疼痛的处理以及替代疗法不足的情况。满足作战环境下无法通过静脉给药来治疗与战伤相关的急性疼痛时的治疗需求。

二是在疟疾治疗方面。分别于 2018 年、2020 年批准了用于预防疟疾的他非诺奎，及治疗严重疟疾的首选药物，注射用青蒿琥乙酯，解决了美军海外驻军疟疾防治的问题。注射用青蒿琥乙酯获得了 FDA 优先审评的地位。

三是在止血与复苏方面。2018 年 7 月，FDA 签发一项 EUA，允许在涉及军事行动遭遇（如火器、炮弹和爆炸装置）紧急情况期间，在血浆不可使用或血浆使用不可实际使用时，使用减少病原体、去白血球冻干血浆（FPD），治疗出血或凝血障碍的美国伤病员。批准在战区使用冷藏 14 天的血小板，救治在战场上遭受创伤性出血的重伤战士。这种差异性使用条件的批准为战区提高了战区血小板使用的可行性，血小板是一种关键的血液成分，在常规血小板产品无法获得或无法实际使用的情况下，在治疗出血患者时可以使用冷藏并保存长达 14 天的血小板

4.促进 MMCM 研发的相关举措

4.1 为研发者提供审评指导与建议

一是发布指南及提供监管指导。FDA 为 MCM 发起人和申请人以及资助 MCM 研发的联邦合作伙伴提供监管建议和指南，以帮助促进各种 MCM 的研发和可获得性。FDA 通过向众多机制提供监管建议和指南，包括直接与发起人和申请人沟通、发布指导文件，举行咨询委员会会议和公众座谈会。

二是与研发者保持充分的交流与沟通。FAD 制定了与产品发起人或申请人举行正式会面的政策和规程，在整个产品寿命周期内与 MCM 发起人和申请人交流沟通。FDA 医疗产品审评中心举行广泛的交流，讨论检测、数据要求和非临床研发计划，以便促使候选 MCM 进入临床研发和评估阶段，便于这些专业候选产品顺利通过临床研发，进入至上市申请阶段。FDA 亦继续与发起人和申请人交流，以解决监管审评期间及这些 MCM 上市后出现的任何问题。

4.2 推动 MCM 监管科学（regulatory science）研究与发展

许多高优先级威胁的 MCM 正处于研发之中，但自然发生的程度并不足以支持进行人体内有效性研究，而且鉴于相关威胁可能会给参加研究的志愿者带来不可接受的风险，所以进行人体临床研究并不符合伦理学。针对 MCM 研发的特点与困难，FDA 设立了 MCMi 监管科学行动计划，其目标是研发各种工具、标准和方法，用于评估 MCM 安全性、功效、质量和性能，帮助将先进科技转化成创新、安全、有效的 MCM，包括适合特定人群，动物有效性原则就是 FDA 开展 MCM 监管科学研究的重要成果之一。FDA 成立了一个推进 MCMi 监管科学指导委员会，其中有来自 NIH、CDC、BARDA 和国防部的代表，该委员会评估 MCMi 监管科学计划研究方案的科学/技术优点和可行性以及是否与公共卫生紧急医学对策机构优先等级一致。由 FDA 资助（或部分资助）的 MCM 相关监管科学研究工具可免费获得，以帮助 MCM 研究人员改进其产品，并帮助 FDA 审评人员评估 MCM 产品是否可获得批准。2019 年度 FDA 监管科学行动计划相关内容详见表 2。

4.3 加强国内外相关部门间合作

在国家政府层面，FDA 为多个政府常设内部机构、PHEMCE 及 DoD 内部委员会、工作组等提供技术援助，涉及制定 MCM 需求、计划、优先事项和政策，并开展计划整体评估与促进合作。通过定期举行会议，讨论威胁评估、需求设定、产品研发、采购、储备、利用和 MCM 在分发或使用之后的监测和评估。

在地方政府层面，FDA 与州、地方、民族和区域公共卫生管理部门及其他非政府组织合作，以支持州和地方层面的 MCM 准备和应对能力，包括答复与 EUA 和其他紧急使用权限、MCM 储备、有效期、分发和配药有关的大量法律和监管询问。

在国际合作层面，FDA 积极参与 WHO 发起的全球性的战略与防范计划，旨在在疫情期间快速启动研发活动。其目的是追踪可用于挽救生命和避免大规模危机的有效检测、疫苗和药物的可得性。同时，与流行病应对准备创新联盟（Coalition for Epidemic Preparedness and Innovation ，CEPI）、全球传染病防治研究合作组织（Global Research Collaboration for Infectious Disease Preparedness ，GloPID-R）等机构开展合作。

5.小结

在 PHS Act 的支持下，美国已形成了完备的 MCM 产品研发及监管体系，目前可用于核化生放及新兴传染

病威胁防治的药品已达 50 个。除了传统的化学药品以外，近年来又新增了基于新技术、新平台研发的疫苗及单克隆抗体，特别是在埃博拉病毒防治方面，近两年来有多款生物药获批使用，显示了生物药极大的应用前景（在新型冠状病毒感染治疗方面目前也有多款单克隆抗体获得 EUA 或在积极开展临床研究中）。虽然仍有部分新兴传染性疾病尚未有明确的防治药品，但作为 MCMi 的牵头机构，FDA 从加强审评指导、促进监管科学研究及积极组织相关机构间合作等多个维度，为 MCM 的研发上市提供了良好的监管环境，并对协调和利用各方资源开展 MCM 研发起到了积极作用。特别是与 DoD 的合作，不仅统筹了军地核化生放的研发需求与研发力量，还可充分运用优先审评、快速通道等特殊审评政策，吸引更多的研发资源持续投入 MCM 的研发工作，助力打通研发与上市的关键限速环节。在 FDA 内设立 MCMi 对于提升美国核化生放及新发传染病医学对策产品的保障能力起到了至关重要的作用。

免疫检查点抑制剂致大疱性类天疱疮：基于真实世界的药物警戒研究

郎晓琴，郑明昱，马欢，谷文睿*

陆军军医大学第一附属医院药剂科，重庆 400038

【摘要】目的：基于美国食品和药物管理局不良事件报告系统（FAERS），探讨免疫检查点抑制剂（ICIs）相关大疱性类天疱疮（BP）的临床特征，分析两者关联性，为临床安全用药提供参考。**方法：**提取 2004 年 1 月至 2022 年 6 月 FAERS 数据库中 ICIs 相关的 BP 病例报告，采用报告比值比（ROR）、比例报告比（PRR）评价两者关联性，并分析其发病规律及临床特征。**结果：**共筛选出 437 例以 ICIs 作为可疑药物的 BP 相关的报告。在关联性评价中，除伊匹木单抗及阿维鲁单抗外，其余 ICIs 及联用方案与 BP 均存在统计学相关性，其中以伊匹木单抗+帕博利珠单抗联用方案（ROR 18.44（95%CI: 8.24～41.28）,PRR18.21）信号最强。报告中年龄≥70 岁的老年人（38.90%）和男性（59.96%）比例较高。ICIs 导致 BP 发病时间的中位数为 131.50（0～1185）d。**结论：**通过对 FAERS 数据库药物警戒研究，揭示了不同 ICIs 导致 BP 的发病风险及临床特征，并对 ICIs 治疗过程的药学监护和 BP 治疗提出相应建议，以期提高临床治疗安全性。

【关键词】免疫检查点抑制剂；大疱性类天疱疮；美国食品和药物管理局不良事件报告系统

Immune checkpoint inhibitor-induced bullous pemphigoid: a real-world pharmacovigilance study

Lang Xiaoqin, Zheng Mingyu, Ma Huan, GU Wenrui*

Department of Pharmacy,The First Hospital Affiliated to AMU, Chongqing 400038,China

【ABSTRACT】Objective: To investigate the clinical characteristics of bullous pemphigoid （BP） associated with immune checkpoint inhibitors （ICIs） based on the Adverse Event Reporting System （FAERS） of the United States Food and Drug Administration （FDA）, and to analyze the association between the two, so as to provide reference for clinical safe drug use. **Methods:** BP case reports related to ICIs were extracted from FAERS database from January 2014 to June 2022, and the correlation between the two cases was evaluated by reporting odds ratio （ROR） and proportional reporting ratio （PRR）, and the pathogenesis and clinical characteristics were analyzed. **Results:** A total of 437 BP-related reports with ICIs as suspected drugs were screened out. The main drugs were navulizumab （248/437,56.75%）, followed by parbolizumab （95/437,21.74%） and ipimimumab + navulizumab （40/437,9.15%）. In correlation evaluation, except for ipilimumab and averumab, other ICIs and combination regiments were statistically correlated with BP, among which ipilimumab plus parbolizumab regiments （ROR 18.44 （95%CI: 8.24-41.28）,PRR18.21） had the strongest signal. Older adults （38.90%） and males （59.96%） aged ≥70 years were more common in the report. The median duration of BP onset due to ICIs was 131.50（0～1185） days. **Conclusions:** Through the pharmacovigilance study of FAERS database, the risk and clinical characteristics of BP caused by different ICIs were revealed, and the safety of clinical treatment was improved.

【KEY WORDS】immune checkpoint inhibitors; bullous pemphigoid; US Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System

---

[基金项目] 重庆市临床重点专科

[作者简介] 郎晓琴，女，学士，副主任药师；研究方向：临床药学；Tel:（023）68766803；E-mail：350073189@qq.com

[通信作者] 谷文睿，女，硕士，主管药师；研究方向：临床药学；Tel：（023）68766803；E-mail:guwr49@163.com

基于苦豆子衍生的新骨架化合物在非小细胞肺癌中的功能及机制研究

雷颖，王永莲，刘晓珊，陈倩，李瑞芝，于桐，蒋淑侠，单宏丽

上海工程技术大学医药前沿技术研究院　上海　201620

【摘要】非小细胞肺癌是一种高度恶性、异质性的肺癌，其病因和发病机制复杂。CNI3 是本课题组从中药苦豆子中提取并进行结构设计改良的小分子化合物，具有较好的抑癌作用。本文旨在研究小分子化合物 CNI3 对非小细胞肺癌的抑制作用及其调节机制。通过使用不同浓度的 CNI3 处理 A549 细胞发现，150 μM 以上浓度的 CNI3 处理 A549 细胞 24 h 和 48 h 后，均能显著降低细胞活力，且具有剂量依赖性。与此同时，150 μM 的 CNI3 在处理 A549 细胞 48 h 后达到半数致死量，因此选用此剂量用于后续研究。结果显示，CNI3 显著降低 A549 细胞的侵袭和迁徙能力，导致上皮-间充质转化（EMT）标志 E-钙黏蛋白（E-cadherin）的表达显著降低，N-钙黏蛋白（N-cadherin）和波形蛋白（Vimentin）的表达显著增加。结合网络药理学筛选和分子对接发现 AKT1、CTNNB1、EGFR、ALB、TNF、CASP3、HSP90AA1、SRC、ESR1、MTOR 等 10 个核心靶点均与 CNI3 存在结合位点，表明该靶点可能是 CNI3 抗非小细胞肺癌的潜在作用靶点。以上研究结果表明，中药苦豆子提取物 CNI3 对非小细胞肺癌的进展具有抑制作用，其中作用机制有待进一步研究。

【关键词】苦豆子；非小细胞肺癌；CNI3;

基于“互联网+”的龙泉地区门诊儿童分剂量用药安全管理模式初步构建及效果评价

李丹妮[1]，艾伟[1]，彭小书[1]，张茜莎[1]，刘美娜[1]，张琴*[1]

（1.成都市龙泉驿区妇幼保健院药剂科，成都 610100）

【摘要】**目的：**对我院儿科门诊需要分剂量服药的儿童患者采用“互联网+”的管理模式进行干预和随访以提高门诊儿童分剂量给药方式准确度、提高分剂量用药正确性认知及行为，保障儿童分剂量给药安全性。**方法：**纳入我院 2022 年 9-12 月至儿科门急诊的分剂量用药患者 542 例随机分为对照组和实验组，实验组进行“互联网+”分剂量管理模式实施干预，对照组进行常规干预，干预后比较两组分剂量给药方式准确度改变趋势，分剂量准确性认知及行为改变趋势，从而评价“互联网+”分剂量安全管理模式的效果。**结果：**实验组在干预后分剂量给药方式准确度人数及占比较干预前提高，且增长人数较对照组趋势明显；实验组分剂量给药准确性认知及行为各指标人数及占比较干预前提高，且增长人数较对照组趋势明显，实验组五项准确性认知及行为指标均达标人数占比较干预前提高，差异有统计学意义（$P<0.05$）,而对照组干预前后五项准确性认知及行为指标均达标人数占比无统计学意义。**结论：**我院分剂量服药的儿童采用“互联网+”的管理模式进行干预和随访能提高家长分剂量给药方式正确度，提高家长分剂量给药正确性认知及行为，减少分剂量不良事件发生，“互联网+”儿童分剂量用药安全管理模式取得初步成效。

【关键词】儿童分剂量用药；“互联网+”药学

Preliminary construction and effect evaluation of the safety management model of drug dosage for out-patient children in Longquan area based on "Internet +"

【**Abstract**】**Objective：** The "Internet +" management mode was used to intervene and follow up children in the pediatric outpatient department of our hospital who needed to take medicine in different doses, so as to improve the accuracy of dosing in outpatient children, improve the cognition and behavior of the correctness of dosing, and ensure the safety of dosing in children. **Methods：** A total of 542 dose-divided patients in our hospital from September to December 2022 to the outpatient and emergency department of pediatrics were randomly divided into the control group and the experimental group. The experimental group was subjected to the "Internet +" dose-divided management mode for intervention, while the control group was subjected to routine intervention. After intervention, the change trend of the accuracy of the two-component dose-administration mode, the change trend of dose-divided accuracy cognition and behavior were compared.Thus, the effect of "Internet +" fractional dose safety management model is evaluated. **Results：** In the experimental group, the number and proportion of accuracy of divided dose administration after intervention were improved compared with that before intervention, and the increasing number was more obvious than that in the control group. The number and proportion of patients with accuracy cognition and behavior indexes of experimental component

通讯地址：成都市龙泉驿区妇幼保健院药剂科，成都 610100

dose administration increased compared with before intervention, and the increasing trend was obvious compared with the control group. The number of patients with five accuracy cognition and behavior indexes reaching the standard increased in the experimental group compared with before intervention. The difference was statistically significant (P<0.05), while the proportion of people in the control group who met the five accuracy cognition and behavior indicators before and after intervention was not statistically significant. **Conclusion：** The use of "Internet +" management mode for intervention and follow-up of children taking dose-divided medication in our hospital can improve the accuracy of parents' dose-divided medication mode, improve parents' cognition and behavior of the correctness of dose-divided medication, and reduce the occurrence of dose-divided adverse events. The "Internet +" safety management mode for children taking dose-divided medication has achieved initial results.
【Keywords】Divided dosage for children; "Internet +" pharmacy

WHO 在《促进儿童药物安全性》的报告中指出，儿童用药安全是全球性问题[1]，有九成药品无儿童适用剂型[2]，由于儿童剂型的缺乏，分剂量成为儿童用药中的常用手段，通常会根据患儿的体重、年龄或体表面积与成年人的比例折算出给药剂量，特别是新生儿婴幼儿剂量甚至为成人剂量的百分之一[3]。分剂量给药剂量问题常常给家长造成困扰，分剂量不准确会影响药物在儿童体内的吸收、分布、代谢、排泄，特别是儿童对于药物剂量更敏感，所能允许的药物剂量误差较小[4]，并且分剂量极大降低了儿童用药的依从性。面对儿童用药分剂量安全的严峻挑战，国家鼓励提供保障儿童安全用药措施，建立儿童服用剂量评价，需要为儿童提供安全服用分剂量的教育和培训，提高用药的安全性。“互联网+”的药学服务模式一直是近年来的研究热点，包括电子药讯发行、药学问卷调查、医院药事管理、患者电子药历和药学监护等特色药学服务功能已在多家医院开展，但“互联网+”药学应用在儿童分剂量用药干预中的研究较少。

本研究为了降低儿童分剂量用药不准确不规范，提高儿童分剂量用药安全性，以在我院儿科门诊就诊且服用片剂分剂量药物的儿童为研究对象，通过“互联网+”的管理模式进行儿童分剂量给药干预和随访，并探讨干预效果及对该干预模式进行初步评价。

1 资料与方法

1.1 研究资料

纳入我院 2022 年 9-12 月至儿科门急诊的分剂量用药患者，纳入标准：签署知情同意书自愿入组，需要分剂量给药的门诊儿科患者，合理处方患者，问卷填写完整者，接受所有干预方式且良好执行者；排除标准：不需要分剂量给药的门诊儿科患者，排除不合理处方患者，无效问卷者，未接受且未执行干预者，随访失联者。

1.2 研究方法

1.2.1 构建“互联网+”分剂量管理干预模式

制作专业药师分剂量标准操作视频、宣传折页，利用微信缴费信息平台和医院 HIS 系统构建信息关联为“互联网+”干预管理模式做准备。

1.2.2 实施干预

对纳入研究患者进行简单随机（实验组：对照组=1；1）分组，入组患者在干预前进行问卷调查，实验组采用“互联网+”分剂量管理模式进行干预：分发分剂量科普漫画折页进行用药宣传指导，再将原创专业药师分剂量标准操作视频（展示了药师标准分剂量操作方式包括：分药器分药，研磨，溶解三种分药方式）通过信息技术关联到入组分剂量给药患者的取药导诊单，并通过微信缴费信息平台提醒患者家长观看。对照组患者采用常规干预模式：在患者到药房取药时进行常规用药指导。

1.2.3 分剂量干预模式效果评价方法

统计我院 2022 年 9-12 月儿科门诊分剂量片剂使用量占比；干预措施实施后，两组同时追踪患者用药情况，入组患者需再次填写同一份调查问卷，收集有效纸质问卷，评价分剂量给药方式正确性：通过评价干预后两组无工具徒手分药减少人数及减少占比，减少趋势程度，剪刀分药及分药器分药增加人数及增加占比，增加趋势程度进行比较；评价分剂量给药正确性认知及行为：为了评价干预前后的患者家长在分剂量准确性认知上的改

变，本研究在设计调查问卷前进行了一次投票统计，投票内容为用药不准确认知及行为，以专家共识，指南，文献中提到的儿童用药不准确认知和行为为主共计 12 项，以来我院儿科门诊就诊儿童患者家长为投票对象，统计在给孩子喂药中常常出现的喂药不准确认知及行为情况，统计结果排名前五的如表 6 所示，最终将这五项作为评价分剂量准确性的指标。将分剂量准确性评价五项指标进行程度分级按照执行的准确性指标执行的优良情况分为“优秀，良好，差”，统计干预前后两组各指标程度选择人数及占比，将实验组与对照组进行比较。

1.3 统计方法

本研究采用调查问卷方法，本次研究利用软件 Excel2019 录入数据、双人进行核对，以保证数据真实有效，SPSS25．0 进行统计分析，计数资料以百分比(%)表示，组间采用 χ2 检验分析。P＜0.05 为差异具有统计学意义。

2.结果

2.1 调查问卷回收情况

本研究调查问卷的 Cronbach’s α 系数为 0．72，信度较高可以接受，回收有效问卷共 542 份（实验组 n=271，对照组 n=271）。

2.2 我院分剂量给药频率最多的五种片剂

我院儿科用分剂量片剂共有十种品类，2022 年 9-12 月儿科门诊分剂量片剂使用量占比前五如表 1 所示，其中用量最多的是富马酸酮替芬片（48.96%）。

表 1 儿科门诊分剂量片剂使用量前五位

排序	药品名称	占比（%）	分剂量	我院药品规格
1	富马酸酮替酚片	48.96	1/2,1/3,2/3	1mg
2	盐酸丙卡特罗片	20.84	1/2,1/3	4mg
3	孟鲁司特钠咀嚼片	12.60	4/5	25ug
4	马来酸氯苯那敏片	11.00	1/2,1/3,2/3	5mg
5	氯雷他定片	5.19	1/2	10mg

说明：占比=单个药品处方量/十种分剂量片剂处方量总和（截至 2022 年 9-12 月之间）。

2.3 研究对象基本信息

纳入研究对象基本信息见表 3，纳入研究者年龄分布占比最多为 1-4 岁（288 人，53.14 %），儿童患者的喂药人以父母为主，30-40 岁占比最多，受教育程度以中专大专及以上占比最多，职业以农民自有职业占比最多，符合龙泉地区经济及发展水平特征。实验组与对照组研究对象年龄人数分布无统计学差异（P>0.05），见表 2，排除年龄分布差异，两组具有可比性。

表 2 两组患者年龄分布特征

分组	实验组人数及占比（n,%）	对照组人数及占比(n,%)	P
小于等于 1 岁	32，11.81%	31，11.44%	
1-4 岁	133，49.08%	155，57.20%	0.9985
大于等于四岁	106，39.11%	85，31.37%	

表 3 纳入研究对象基本信息（n=542 人）

项目	人数	构成比
研究对象年龄		
≤1 岁	63	11.62%
1-4 岁	288	53.14%
≥4 岁	191	35.24%
研究对象与喂药人关系		
父母	458	84.2%
外公外婆、爷爷奶奶	80	14.76%
其他	4	0.74%
研究对象的喂药人年龄		
≤30 岁	140	25.83%
30-40 岁	286	52.77%
40-50 岁	46	8.49%
≥50 岁	68	12.55%
研究对象的喂药人文化程度		
初中及以下	92	16.97%
高中	83	15.31%
中专或大专	203	37.45%
大学本科及以上	162	29.89%
研究对象的喂药人职业		
职员、公务员、干部	68	12.55%
教师、工程师及技术人员	84	15.50%
医务人员	14	1.29%
工人	100	18.45%
农民及自由职业者	276	50.92%

2.4 分剂量干预模式效果评价

2.4.1 分剂量方式干预前后评估

我们统计了干预前后患者分剂量方式，患者家长以无工具徒手分药，剪刀分药，分药器分药为主，并以我院用量最多的分剂量片剂富马酸酮替酚为例，依据《欧洲药典》7.0 版[5]药片分剂量准确性测试方法分析三种分药方式的准确度，其中徒手分药较剪刀分药差异有统计学意义（$P<0.05$），剪刀分药较分药器分药差异无统计学意义见表 4，而分药器分药为推荐的较准确分药方式[6]，因此较正确的分剂量方式为剪刀和分药器分药。根据干预前后统计的分剂量方式比较见表 5，实验组通过干预后无工具徒手分药人数下降趋势明显，剪刀分药的人数上升明显，而对照组干预前后徒手分药及剪刀分药人数变化趋势不大，如图 1 所示，通过干预后部分患者家长分剂量用药方式准确度有提高，表明干预方式特别是原创药师分剂量操作标准视频在干预中的效果显著。

表 4 富马酸酮替芬片三种分量方式准确度评价

分劈比（片）	分剂量方式	是否合格（片）		片重合格率
		合格	不合格	P 值
1/2	无工具徒手分药	23	7	<0.05
	剪刀分药	29	1	1
	分药器分药	30	0	

附：随机抽取酮替芬片 30 片，进行分剂量，选取某一个等份片，将每一个等份片质量与等份片平均质量进行对比，高于或低于平均质量的 15%的等份片有两片，或高于或低于平均质量的 25%的等份片有 1 片及以上，均判别为不合格。分剂量合格率＝（未超出重量限度 15%药片的数量/分劈药品的数量）×100%。

表 5 干预前后分剂量方式比较（n 人,%）

分剂量方式	实验组(n,%)		对照组（n,%）	
	干预前	干预后	干预前	干预后
无工具徒手分药	161，59.40%	114，42.07%	21，7.75%	21，7.75%
剪刀分药	63，23.25%	105，38.76%	67，24.72%	69，25.47%
分药器分药	22，8.12%	29，10.70%	155，57.20%	152，56.09%

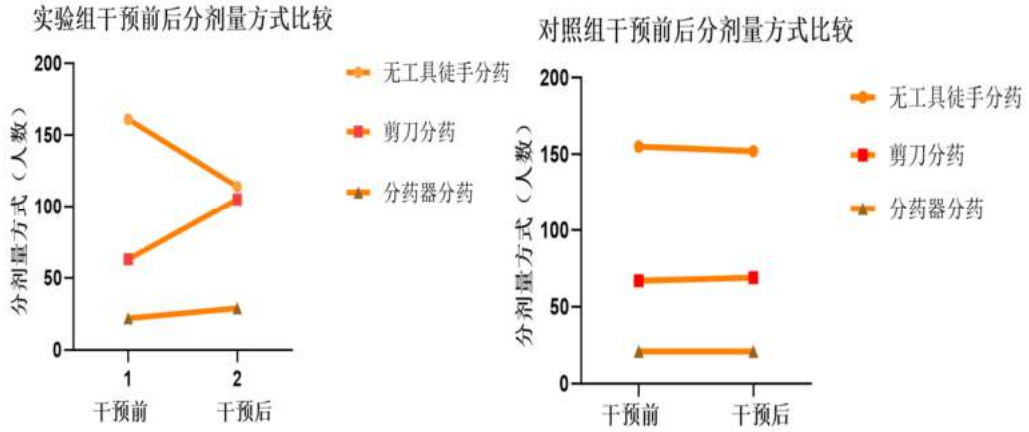


图 1：两组干预前后分剂量方式改变趋势图

2.4.2 分剂量准确性认知及行为干预前后评估

将分剂量准确性认知及行为评价指标执行情况进行程度分级为“优秀，良好，差”（达标程度由优秀到差），统计干预前后两组各指标程度选择人数及占比，所得结果如表 7，表 8 所示，将两组五项指标干预前后选择程度为“优秀”的人数进行图像可视化见图 2 所示，两组在干预前后分剂量准确性指标五项均能完全达标（五项指标均选择“优秀”）的人数及其占比见表 9 所示。实验组各项指标选择“优秀”的人数及占比均有提升，选择偶尔的人数及占比有一定程度的下降，而对照组各项指标选择“优秀”的人数及占比干预前后变化不明显，特别是指标一按时服药情况出现 6 例患者家长在干预后随访发现有时未能按时服药，指标三，指标四，指标五在干预前后选择“优秀”的人数及占比无任何改变。五项评价指标完全达标（五项指标均选择“优秀”）的人数占比两组都不理想，实验组干预前后五项指标均完全达标的人数占比差异显著（$p<0.05$），对照组干预前后五项指标均完全达标的人数占比差异无统计学意义，见表 9。对比两组实验结果，“互联网+”干预模式对患者家

长“按时服药”，“无漏服药的情况”，“服药剂量准确的情况（剪刀或分药器分药分劈比差异小）”，“无药物分剂量困难而擅自增减药物的情况”，“无药物分剂量困难而擅自停用药物的情况”五项分剂量认知及行为方式的改善有一定成效。

表 6 分剂量准确性认知及行为评价指标

序号	指标
1	按时服药[7-11]
2	无漏服药物的情况[9-11]
3	服药剂量准确的情况（剪刀或分药器分药分劈比差异小）[12-13]
4	无药物分剂量困难而擅自增减药物的情况[8,14-16]
5	无药物分剂量困难而擅自停用药物的情况[7,15]

表 7 实验组准确性认知及行为评价程度人数及占比 n(%)

准确性评价程度	干预前			干预后		
	优秀	良好	差	优秀	良好	差
能按时服药	169 62.36%	89 37.27%	13 0.48%	210 71.49%	48 17.71%	13 0.48%
无漏服药物的情况	147 54.24%	122 45.01%	165 0.74%	165 60.89%	105 38.75%	1 0.36%
服药剂量准确的情况(剪刀或分药器分药分劈比差异小)	153 56.46%	111 40.96%	4 1.46%	202 74.54%	65 24.00%	4 1.46%
无药物分剂量困难而擅自增减药物的情况	191 70.50%	78 28.78%	2 0.74%	215 79.34%	55 20.30%	1 0.36%
无药物分剂量困难而擅自停用药物的情况	226 83.39%	44 16.24%	1 0.36%	233 85.98%	37 13.65%	0 0

表 8 对照组准确性认知及行为评价程度人数及占比 n(%)

准确性评价程度	干预前			干预后		
	优秀	良好	差	优秀	良好	差
能按时服药	206 76.01%	50 18.45%	14 5.17%	197 72.69%	56 20.66%	17 6.65%
无漏服药物的情况	141 42.03%	128 47.23%	2 0.74%	143 52.77%	126 46.50%	1 0.36%

服药剂量准确的情况(剪刀或分药器分药分劈比差异小)	193 71.22%	74 27.31%	4 1.48%	193 71.22%	73 26.94%	5 1.85%
无药物分剂量困难而擅自增减药物的情况	173 63.84%	93 34.32%	4 1.48%	173 63.84%	95 34.32%	2 0.74%
无药物分剂量困难而擅自停用药物的情况	222 81.92%	44 34.32%	1 0.36%	226 83.39%	48 17.71%	1 0.36%

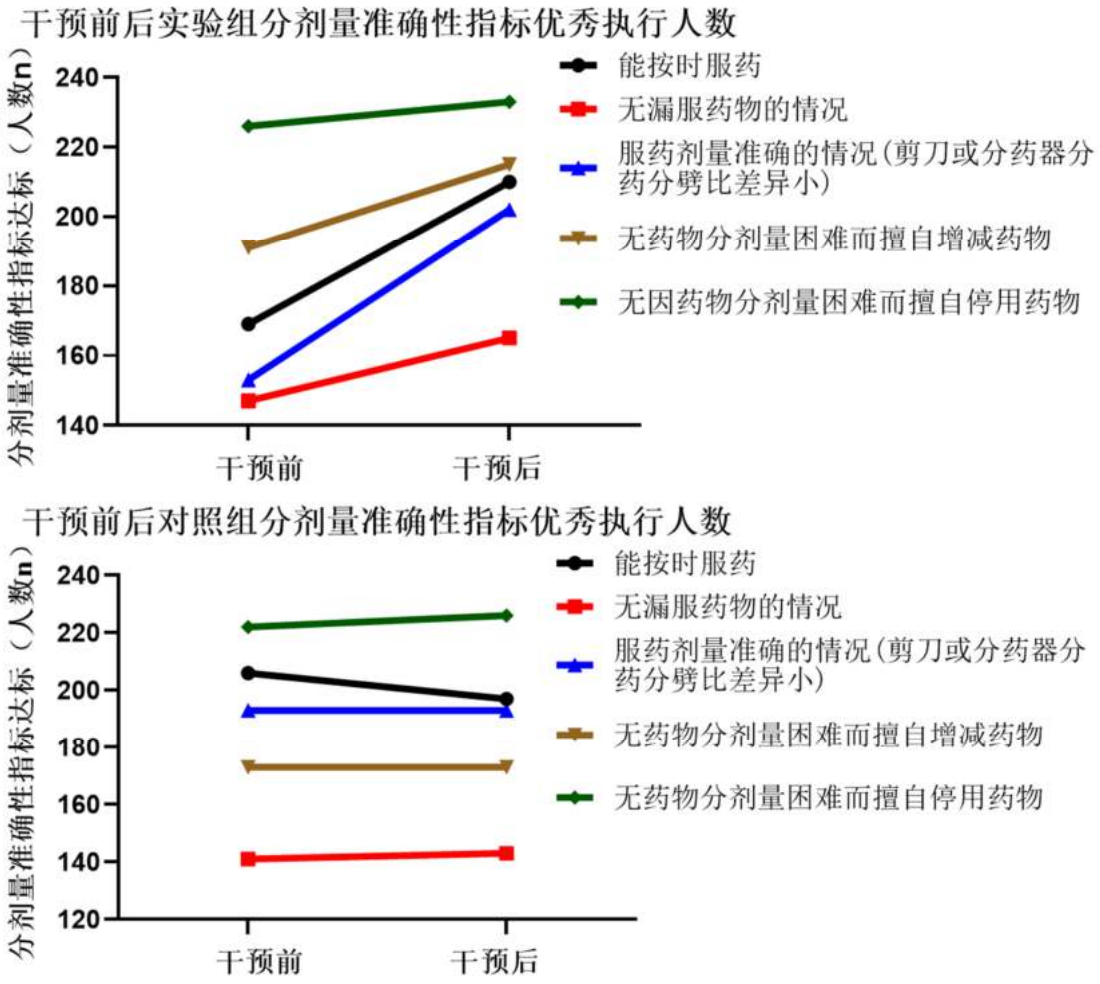


图 2:干预前后两组分剂量准确性指标优秀执行人数趋势图。

表 9 干预方式对两组五项准确性指标均达标的影响（n 人,%）

分组	干预前	干预后	X^2	P*
实验组	78，28.78%	108，39.85%	7.3668	<0.05
对照组	50，18.45%	56，20.66%	0.42219	p>0.05

注：采用定性资料卡方检验，p*<0.05 为差异有统计学意义。

2.5 其他分剂量行为统计

比较实验组与对照组干预前后患者家长对“不清楚分剂量用药”的咨询情况，实验组干预后主动咨询医院工作人员的人数及占比提升较大；口服分剂量片剂送服溶剂选择两组占比最多的都是温开水送服，干预后实验组牛奶或果汁以及茶送服的比例均清零，而对照组干预前后无明显变化；实验组在“不会分剂量的方法而发生不良事件中”从未发生不良事件比例干预前后均为 100%，而对照组在随访中发现两例分剂量不良事件，见表10。对比两组实验结果，“互联网+”干预模式对提高患者家长主动咨询医院工作人员的行为、正确选择服药溶剂的行为，减少药物不良事件发生有一定成效。

表 10 干预实施后其他分剂量行为统计(n,%)

项目	实验组		对照组	
	干预前	干预后	干预前	干预后
不清楚分剂量用药咨询情况				
咨询医院工作人员	153 56.46%	266 98.15%	158 58.3%	166 61.25%
看用药说明书	105 38.75%	5 1.85%	98 36.16%	97 35.79%
自己定				
用大人用量的一半	7 2.58%	0	7 2.58%	3 1.11%
根据用药效果自行加减	6 2.21%	0	8 2.95%	5 1.85%
口服分剂量片剂送服溶剂选择				
温开水	263 97.05%	270 99.63%	263 97.05%	263 97.05%
牛奶或果汁	4 1.48%	0	2 0.74%	2 0.74%
糖水	2 0.74%	1 0.37%	2 0.74%	2 0.74%
茶	2 0.74%	0	4 1.48%	4 1.48%
不会分剂量的方法而发生不良事件				
从未	271 100%	271 100%	271 100%	269 99.26%

3.讨论

3.1 结论

通过“互联网+”将本研究的干预内容，包括药师分剂量标准操作视频、引导患者家长正确的分剂量用药认知及行为的科普投送到患者手机端，线下干预不正确的分剂量用药认知及行为，均起到了正向的干预效果，改变了部分患者家长的无工具徒手分剂量方式，这部分患者家长在我们干预后开始使用剪刀或分药器分药，部分患者家长对“按时服药”，“无漏服药的情况”，“服药剂量准确的情况（剪刀或分药器分药分劈比差异小）”，“无药物分剂量困难而擅自增减药物的情况”，“无药物分剂量困难而擅自停用药物的情况”的分剂量认知及行为有了改善，减少了分剂量药品不良事件的发生。

3.2 局限性

本文样本量局限在龙泉地区及来我院就诊患者，样本量及样本多样性不足，未来可能扩大样本量及纳入更多区域医院儿科患者进行研究；此外干预随访时间较短，应延长干预随访时间，同时在线下也应该加强儿童分剂量用药的干预，比如增加儿科类药学门诊，加强线下随访。

3.3 讨论

儿童分剂量用药是目前临床的用药难题，也是焦点问题，本研究创新尝试设计“互联网+”儿童分剂量用药安全管理模式，将“互联网+”应用到儿童片剂分剂量给药中，更科学的参与儿童分剂量安全用药，实现了对儿童分剂量难点的精细化管理，减少了我院患儿家长在给孩子喂药过程中遇到的剂量不准问题，参与研究的患者家长对该种干预模式的满意度较高，加强了药师队伍参与我院儿科患者治疗过程，用药过程，未来该模式不仅将继续用于儿童分剂量的干预，还将用于其他特殊人群的用药安全管理，并继续发展个体化用药及全民药学科普等药学服务模式。

参考文献:

[1] 虞燕霞,尚尔宁,翁小红等. 儿童安全用药多元化药学服务模式的实践与探索[C]中国药学会. 2015 年中国药学大会暨第十五届中国药师周论文集.[出版者不详],2015:1087-1092.

[2] 菁菁. 九成药品无儿童剂型儿童服用减量成人药存隐患[J]. 广西质量监督导报, 2015(03): 24-25.

[3] 林艳. 药片分剂量准确性考察及对儿童用药安全的影响[D].浙江大学,2014.

[4] 鲁湘鄂,杜占伟,吕洁琼等.某妇幼保健院夏冬季儿童用药情况及片剂药物的分剂量情况分析[J].广东药科大学学报,2020,36(04):558-562.

[5] European Pharmacopoeia7.0[S].2010: 736.

[6] Verrue C et al, Tablet splitting a common yet not so innocent practice[J]. Journal of advanced Nursing 2011 67(1): 26-32.

[7] 用药五忌[J].黑龙江医药,2001(05):402.

[8] 霍记平,杨兴华,王兴河等.中国家庭中儿童主要照护者的用药健康素养:一项全国性调查研究[J].医药导报,2021,40(09):1287-1295.

[9] 合理用药国际网络中国中心组临床安全用药组，中国药理学会药源性疾病学专业委员会，中国药学会医院药学专业委员会，等.儿科人群用药错误防范指导原则［J］.药物不良反应杂志，2018，20（5）：324-328.

[10] 合理用药国际网络（INRUD）中国中心组临床安全用药组，中国药理学会药源性疾病学专业委员会，中国药学会医院药学专业委员会，等.中国用药错误管理专家共识［J］.药物不良反应杂志，2014，16（6）：321-326.

[11] Walshke Roblindw, Weingartsn, et al. Medication errors in the home: a multisite study of children with cancer［J］. Pediatrics，2013，131(5) : e1405.

[12] 曹爽,张琳,李英等.儿童用药错误案例分析及药师在错误防范中的作用[J].安徽医药,2019,23(11):2308-2312.

[13] Yin H S，Dreyer B P，Ugboaja D C，et al． Unit of measurement used and parent medication dosing errors［J］. Pediatrics，2014，134(2) : 354-361.

[14] 石双姣,沈志莹,段应龙等.儿童居家用药安全的研究进展[J].护理学杂志,2019,34(01):95-99.

[15] 张梦娟,孙一帆,金美兰等.儿童家庭用药安全现状及影响因素[J].科技视界,2017(11): 192-200.

[16] Chang M C，Chen Y C，Chang S C，et al. Knowledge of using acetaminophen syrup and comprehension of written medication instruction among caregivers with febrile children［J］. J Clin Nurs，2012，21(1-2) : 42-51.

气相色谱法测定八角茴香中反式茴香脑不确定度的评定与表示

李飞飞[1,2]

（1. 河南省科学院，2. 河南省纳普生物技术有限公司河南郑州 450002）

【摘要】为了评定 GC 测定八角茴香中反式茴香脑含量的测量不确定度。建立 GC 测定八角茴香中反式茴香脑含量的数学模型，分析测量不确定度的来源并对各分量进行量化分析和评估，合成标准测量不确定度，给出扩展测量不确定度报告。GC 测定八角茴香中反式茴香脑含量的扩展测量不确定度为 0.4%，测量结果表示为(4.5 ± 0.4)%，k=2。分析产生不确定度的主要来源，为有效地控制该含量测定方法的准确性提供可靠的理论依据。

【关键词】气相色谱；八角茴香；测量不确定度；反式茴香脑

Evaluation and expression of measurement uncertainty in determination of trans-anethole in Illicium verum Hookf by gas chromatograph

LI Feifei[1, 2]

（1. Natural product innovation research center of Henan Academy of Sciences, Zhengzhou, Henan 450002）

【**Abstract**】To evaluate the measurement uncertainty for the determination of trans-anethole in *Illicium verum Hookf* by GC. The mathematical model of determination by GC was established. The uncertainty sources had been analyzed. Each active component of uncertainty was calculated, and the expanded uncertainty was obtained. The expanded uncertainty for the GC determination of trans-anethole in *Illicium verum Hookf* was 0.4%, and the result of determination was (4.5±0.4)%, k=2. The main sources of uncertainty are analyzed, which provide the reliable theoretical basis for effectively controlling of this method.

【**Keywords**】gas chromatograph; *Illicium verum Hookf ;* measurement uncertainty; trans-anethole;

八角茴香（Illicium verum Hookf），属木兰科植物[1]，广泛分布于我国云南、四川和贵州等省，其果实在产地多年来被做食用香科，也有用来做配方颗粒剂进行使用。其中主要成分为反式茴香脑、茴香醛、草蒿脑和茴香醚等[2-5]。动物实验表明，茴香提取物有升高白细胞和祛痰作用。醇提物对离体气管有抗组织胺作用；体外试验对枯草杆菌、大肠杆菌等多种细菌有抑制作用，同时对长角扁谷盗有触杀和驱避活性[6-13]。目前，测定八角茴香中反式茴香脑主要有气相色谱法，气相色谱质谱联用方法。气相色谱法具有灵敏度高、检出限低、线性范围宽、精密度和准确度高检测等优点，被广泛用于易挥发性物质分析。测量不确定度是表征合理的赋予被测量之值的分散性与测量结果相联系的参数，早在 20 世纪 70 年代初，国际上已有越来越多的学者认为使用“不确定度”代替“误差”更为科学，测量的不确定度是测量可靠性的重要标志，也是国际通用的最基本、最重要的特性指标之一，通过对测量不确定度的合理评定可以定量评价测量结果的质量，并表示出测量的可信程度。本研究根据《测量不确定度评定与表示》及有关规定[13-16]，对 GC 测定八角茴香中反式茴香脑含量的测量不确定度进行评定，分析影响不确定度的因素，为客观评价八角茴香中反式茴香脑的含量测定结果提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

GC-2010plus 气相色谱仪配制自动进样器，FID 检测器（日本岛津）；HP-FFAP 毛细管色谱柱（30 m×0.32 mm×0.25 μm，Angilent）；超声波提取仪 KQ-500E（昆山）；ME204 电子天平（万分之一，梅特勒）；AUW220D 电子天平（十万分之一，日本岛津）。

1.2 试药

八角茴香药材分别购自不同地区，经鉴定为木兰科植物八角茴香 Illicium verum Hookf.的干燥成熟果实；反式茴香脑（批号 11835-201503，含量≧98.7%）、无水乙醇，分析纯（北京北化精细化学品有限责任公司）。

2 方法

2.1 色谱分析条件

检测器：FID 检测器；色谱柱：HP-FFAP 毛细管色谱柱（30 m×0.32 mm×0.25 μm，Angilent）；程序升温：初始温度 80 ℃，保持 1 min，以 2 ℃/min 升温至 100 ℃，保持 1 min，然后以 5 ℃/min 升温至 200 ℃，保持 15 min；分流比：5:1；进样口温度：200 ℃；检测器温度：230 ℃；进样量：1.0 μl；尾吹气流量：30 mL/min，空气流量：400 mL/min，氢气流量：40 mL/min。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备

取反式茴香脑对照品适量，精密称定，加无水乙醇制成每 1 mL 含 0.40 mg 的溶液，即得。

2.2.2 溶液制备

分别取不同地区样品粉末（过三号筛）约 0.5 g，精密称定，置具塞三角瓶中，加入无水乙醇 25 mL，称定重量，超声处理（功率 600 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用乙醇补足失重，摇匀，滤过，取续滤液，过 0.45 μm 滤膜即得。

2.2.3 含量测定

分别取对照品溶液和供试品溶液各 1 μL，注入液相色谱仪，测定，按单点法以峰面积计算，即得。

2.3 建立数学模型

根据测定原理和过程，样品的标示百分含量计算公式为：

$$含量\ w(\%) = \frac{C_1 \times A_1 \times V_1}{A_2 \times m \times 10000} \times f$$

式中：w---样品中被测成分的含量（%）；C_1---标准溶液浓度(μg/mL)；A_1---标准溶液峰面积；A_2--样品溶液峰面积；V_1---样品溶液定容体积(mL)；m---样品的质量（g）；f---稀释倍数。

3 识别不确定度来源

根据分析过程的描述及对计算模型分析，测量不确定度来源主要有：（1）测量重复性引入的不确定度 u_1，（2）样品溶液配制引入的不确定度 u_2，包括天平的计量性能引入的不确定度 $u_{2.1}$、单标线移液管引入的不确定度 $u_{2.2}$，（3）标准品溶液配制引入的不确定度 u_3，包括称量标准品带来的不确定度 $u_{3.1}$、标准品定容带来的不确定度 $u_{3.2}$。

4 各标准不确定度分量的评定

4.1 测量重复性引入的不确定度 u_1

检测方法重复性误差的不确定度属于 A 类不确定度评定，可用多次独立重复测量来进行评定。考虑到人员的操作，安排 4 个人平均每个人测定 4 次，按照上述分析过程同时进行处理，制备好待测溶液，在相同的气相色谱仪的条件下，测定已制备好的 16 份待测溶液中反式茴香脑的浓度，实验数据和分析结果见表 1。

表 1 实验重复性八角茴香样品检测结果

序号	测定值 w/%			
	人员 A	人员 B	人员 C	人员 D
1	4.1	4.0	4.0	4.1

2	4.2	4.1	4.2	4.2
3	4.0	4.1	4.1	4.1
4	4.1	4.1	4.0	4.1
平均值	4.10	4.08	4.08	4.13
标准偏差	0.08	0.05	0.10	0.05
合并样本标准偏差	0.0722			

本次共测量 2 个样品，样品含量平均值为 4.5%，利用预评估的标准偏差，按照下式计算本次测量平均值的标准偏差带来的不确定度：

$$u_1 = S/\sqrt{n} = 0.0722\%/\sqrt{2} = 0.0510\%$$

本次重复性实验引入的相对标准不确定度为：

$$u_{rel1} = 0.0510\%/4.5\% = 0.0113$$

4.2 样品溶液配制引入的不确定度 u_2

4.2.1 天平计量性能引入的不确定度 $u_{2.1}$

4.2.1.1 天平检定时产生的偏载误差引入的标准不确定度

根据天平检定证书，天平偏载误差为 0.3 mg，按均匀分布 B 类评定，$k=\sqrt{3}$则天平偏载误差引入的不确定度为：

$$u(m1) = 0.3\text{mg}/\sqrt{3} = 0.1732\ \text{mg}$$

4.2.1.2 天平重复性误差产生的误差引人的标准不确定度 u(m2)

根据天平检定证书，天平重复性误差为 0.1 mg，按均匀分布 B 类评定，$k=\sqrt{3}$，则天平重复性误差引入的不确定度为：

$$u(m2) = 0.1\text{mg}/\sqrt{3} = 0.0577\ \text{mg}$$

4.2.1.3 天平示值误差产生的误差引人的标准不确定度 u(m3)

方法中样品称取 0.5 g，精确至 0.0001 g，根据天平检定证书，当称样量不大于 5×10^4 mg 时，天平示值误差为 0.6 mg，按均匀分布 B 类评定，$k=\sqrt{3}$，则天平示值误差引入的不确定度为：

$$u(m3) = 0.6\ \text{mg}/\sqrt{3} = 0.3464\ \text{mg}$$

样品称量时每次都需要清零，实际上是一次称样，因此，试样称量引入的合成标准不确定度 $u_{2.1}$ 为：

$$u_{2.1} = \sqrt{u(m1)^2 + u(m2)^2 + u(m3)^2} = 0.3916\ \text{mg}$$

称取样品 16 次，其平均质量为 0.5025 g，则相对标准不确定度 $u_{rel2.1}$：

$$u_{rel2.1} = u_{2.1}/m = 0.3916\ \text{mg}/502.5\ \text{mg} = 0.000779$$

4.2.1.4 单标线移液管引入的不确定度 $u_{2.2}$。

室温情况下，样品溶液配制，量取 25 mL 溶剂，检定证书上给出移液管检定级别为 A 级，容量允差为±0.030 mL，该分布为均匀分布，$k=\sqrt{3}$，

$$u_{2.2} = 0.030\ \text{mL}/\sqrt{3} = 0.0173\ \text{mL}$$

单刻度吸量管所引入的相对不确定度：

$$u_{rel2.2} = 0.0173\ \text{mL}/25\ \text{mL} = 0.000693$$

样品溶液配制引入的相对不确定度 u_{rel2}：

$$u_{rel2} = \sqrt{u_{rel2.1}^2 + u_{rel2.2}^2} = 0.001$$

4.3 配制标准品溶液引入的不确定度 u_3

4.3.1 称量标准品带来的不确定度 $u_{3.1}$

4.3.1.1 天平检定时产生的偏载误差引入的标准不确定度 u(m1)

标准品称量用十万分之一天平，根据天平检定证书，天平偏载误差为 0.3 mg，按均匀分布 B 类评定，$k=\sqrt{3}$则天平偏载误差引入的不确定度为：

$$u(m1)=0.3mg/\sqrt{3}=0.1732\ mg$$

4.3.1.2 天平重复性误差产生的误差引人的标准不确定度 u(m2)

根据天平检定证书，天平重复性误差为 0.2 mg，按均匀分布 B 类评定，$k=\sqrt{3}$，则天平重复性误差引入的不确定度为：

$$u(m2)=0.2mg/\sqrt{3}=0.1155\ mg$$

4.3.1.3 天平示值误差产生的误差引人的标准不确定度 u(m3)

方法中标准品称取 4.0 mg，精确至 0.00001 g，根据天平检定证书，当称样量不大于 5×10^3 mg 时，天平示值误差为 0.1mg，按均匀分布 B 类评定，$k=\sqrt{3}$，则天平示值误差引入的不确定度为：

$$u(m3)=0.1\ mg/\sqrt{3}=0.0577\ mg$$

样品称量时每次都需要清零，实际上是一次称样，因此，试样称量引入的合成标准不确定度 $u_{3.1}$ 为：

$$u_{3.1}=\sqrt{u(m1)^2+u(m2)^2+u(m3)^2}=0.2160\ mg$$

称取标准样品 3 次，其平均质量为 0.00402 g，则相对标准不确定度 $u_{rel3.1}$：

$$u_{rel3.1}=u_{3.1}/m=0.2160\ mg/4.02\ mg=0.0537$$

4.3.2 标准品定容带来的不确定度 $u_{3.2}$

标准品溶液配制使用的是 10 mL 容量瓶，检定证书上给出容量瓶检定级别为 A 级，容量允差为±0.02 mL，该分布为均匀分布，$k=\sqrt{3}$，则容量瓶误差引入的不确定度为：

$$u_{3.2}=0.02\ mL/\sqrt{3}=0.0115\ mL$$

容量瓶所引入的相对不确定度 ：

$$u_{rel3.2}=0.0115\ mL/10\ mL=0.00115$$

根据上述数据，所以配制标准溶液引入的相对不确定度 u_{rel3} 按照下式计算：

$$u_{rel3}=\sqrt{u_{rel3.1}^2+u_{rel3.2}^2}=0.0538$$

5 合成标准不确定度

通过分析八角茴香中反式茴香脑含量测定结果的相对不确定度分量结果，发现其中标准溶液配制引入的不确定度最大，而影响反式茴香脑含量测定结果的合成相对标准不确定度为：

表 2 八角茴香中反式茴香脑含量的测定不确定度分量表

分量类别	来源	数值
u_{rel1}	重复性	0.0113
u_{rel2}	样品溶液配制	0.0010
u_{rel3}	标准溶液配制	0.0538

合成相对标准不确定度按照下面公式计算：

$$u_{rel}(w)=\sqrt{u_{rel1}^2+u_{rel2}^2+u_{rel3}^2}=0.0550$$

当采用气相色谱法法测定八角茴香药材及饮片中反式茴香脑含量为 4.5%时，合成标准不确定度为：

$$u(w)= u_{rel}(w) \times 0.0550=4.5\% \times 0.0550=0.2\%$$

6 扩展不确定度

当该测量误差的分布类型属于正态分布，置信水平为 95%，扩展因子 k=2 时，则扩展不确定度为：

$$U=u(w) \times k=0.2\% \times 2=0.4\%$$

7 结论

本文评定了气相色谱法测定八角茴香中反式茴香脑含量的测量不确定度，利用可得到的信息，讨论了测量不确定度的来源，如对样品测量重复性、样品溶液制备及标准溶液配制等产生的不确定度分量进行量化，得到八角茴香中反式茴香脑 4.5%的测量扩展不确定度是 0.4%，发现当采用多次重复测量数据平均值作为最后结果时，标准溶液配制引人的不确定度最大，但若以单次结果作为测量结果时，方法重复性引人的不确定度更大。因此，在采用气相色谱法测定八角茴香中反式茴香脑含量时，标准溶液配制应给予足够的重视，且建议报出数据时尽量做两个以上的实验重复，以减小八角茴香中反式茴香脑测量结果的分散性，使测量结果的表达更加客观和真实。

参考文献

[1] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典: 2015 年版第一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 4-5.

[2] 谢滟, 黄丽贞, 廖敏君, 等. 八角茴香配方颗粒的制备工艺[J]. 中成药, 2016, 38(3): 695-698.

[3] 尚小雅, 郭妙茹, 赵琮玮, 等. 野八角化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(21): 2490-2492.

[4] 商艳丽, 史荣军. 八角茴香果实中酚苷类成分的研究[J]. 中成药, 2016, 38(1): 107-110.

[5] 李飞飞, 魏悦, 宋梦娇等. 一测多评法测定八角茴香中 3 种成分及药材指纹图谱研究[J]. 2020.29:1419-1421..

[6] 袁经权, 汪洋, 周雅琴, 等. 八角茴香药材质量标准研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(1): 196-198.

[7] 袁经权, 周小雷, 王硕, 等. 八角茴香化学成分的研究[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2123-2126.

[8] 张赟彬, 郭媛, 江娟, 等. 八角茴香精油及其主要单体成分抑菌机理的研究[J]. 中国调味品, 2011, 36(2): 28-33.

[9] 林霄, 刘元, 柴玲, 等. 毛细管气相色谱法测定八角茴香油中草蒿脑的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 89~91.

[10] 赵俊丽, 骆志成, 武三卯, 等. 八角茴香挥发油抗念珠菌活性的体外研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2004, 37(8): 475-477.

[11] 何玉杰, 花日茂, 李世广, 等. 八角茴香提取物对长角扁谷盗的触杀和驱避活性[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(8):63-67.

[12] 黄丽贞, 谢滟, 姜露, 等. 八角茴香化学与药理研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(2): 83-85.

[13] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL0I-G003 测量不确定度的要求[M]. 北京: 中国计量出版社，2019.

[14] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL006 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2018.

[15] GB/T 27418-2017, 测量不确定度评定和表示[s].

[16] GB/T 27025-2008, 检测和校准实验室能力的通用要求[s].

介孔型纳米光敏剂的构建及其光诱导肿瘤高效治疗

李红宇[1], 崔国庆[2], 施江南[1], 何慧[2*], 郭正清[1*]

（[1] School of Radiation Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou, 215123；[2] College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou, 215123）

光动力治疗作为新兴的肿瘤治疗手段，因其治疗周期短、创伤性小、靶向性好、不易复发和无耐药性等优点备受关注[1,2]。然而，常规光敏剂存在稳定性差、酶降解、非特异性靶向以及肿瘤滞留性差等缺点，极大限制了其临床应用。虽然纳米载体的快速发展为解决上述问题带来希望，但仍存在以下问题亟待解决：1）光敏剂易聚集，常导致光动力活性显著降低；2）光敏剂在纳米粒内部产生的活性氧物质难以扩散，限制了治疗效果。近年来，金属有机框架纳米光敏剂（MOF-NPs）在光动力治疗领域表现出极大潜力。理论上，光敏剂可作为有机配体与多金属氧化簇构建多孔结构，从而有效避免聚集产生[3]。然而，目前绝大多数 MOF-NPs 为晶态结构，制备条件苛刻，种类有限。此外，经典 MOF-NPs 的孔径较小（小于 2.0 nm），活性氧物质扩散仍较为缓慢[4]。因此，如何设计合成具有较大孔径的高性能 MOF-NPs 对于发挥光敏剂潜力，促进光动力治疗临床转化具有重要意义。

近期，我们以 C_3 对称性氟硼二吡咯光敏剂为有机配体，与金属锆离子（Zr^{4+}）通过溶剂诱导自组装策略，以温和的合成方式构建得到非晶态金属有机框架纳米光敏剂 *a*MOF-NPs。此纳米光敏剂具有较大孔径（10 ~ 20 nm），并表现出优越的化学稳定性、热稳定性和光稳定性。在低功率 LED 灯的照射下（660 nm，50 mW cm^{-2}），*a*MOF-NPs 能高效产生活性氧物质，表现出显著增强的光动力活性。更为重要的是，*a*MOF-NPs 可在肿瘤组织中长效滞留，有利于高效光动力治疗的实施，从而实现光诱导肿瘤完全消融。

【关键词】纳米光敏剂；光动力治疗；介孔材料；非晶态有机金属框架

参考文献

[1] Zhao, X.; Liu, J.; Fan, J.; Chao, H.; Peng, X. Chem. Soc. Rev. 2021, 50, 4185-4219.

[2] Guo, Z.; He, H.; Zhang, Y.; Rao, J.; Yang, T.; Li, T.; Wang, L.; Shi, M.; Wang, M.; Qiu, S.; Song, X.; Ke, H.; Chen, H. Adv. Mater. 2021, 33, 2004225.

[3] Chen, J.; Zhu, Y.; Kaskel, S. Angew. Chem. Int. Ed. 2021, 60, 5010-5035.

[4] Luo, T.; Nash, G. T.; Xu, Z.; Jiang, X.; Liu, J.; Lin, W. J. Am. Chem. Soc. 2021, 143, 13519-13524.

二芳基酰胺衍生物的合成、抗新型冠状病毒生物学评价和多靶点作用研究

李佳玉#, 钟秀丽#, 于智慧, 李健蕊, 段琼璐, 李迎红, 陈芬倍, 汪燕翔, 刘永华*, 彭宗根*, 宋丹青*

(中国医学科学院，北京协和医学院医药生物技术研究所，北京市抗菌药物重点实验室，北京 100050)

【摘要】新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的流行引起了严重的公共卫生安全问题。尽管全球已经有多种有效的疫苗和药物，但由于病毒在不断变异，因此仍然迫切需要研发更有效的抗冠状病毒药物。本研究设计并合成了 33 种具有抗冠状病毒活性的新型二芳基酰胺衍生物，基于抗冠状病毒的活性结果，我们选择了最有前景的化合物 8h (EC_{50} = 2.13 μM; SI = 31.5 μM) 作为代表性化合物进行机制研究。实验结果表明，8h 具有广谱抗冠状病毒活性，对 α 型 HCoV-229E 和 β 型 HCoV-OC43 都表现出广泛的抗病毒活性。时间加药实验结果显示，8h 在单个感染周期的早期阶段抑制病毒 dsRNA 的合成。病毒附着和进入实验也证实了这一结果。在随后的靶点确证中，我们发现 8h 与跨膜丝氨酸蛋白酶 (Transmembrane protease serine 2，TMPRSS2) 有较弱的结合。酶活性抑制和联合用药实验的结果显示，化合物 8h 主要结合于病毒 3C 样蛋白酶 (3C-like protease, 3CLpro)。以上结果表明，二芳基酰胺衍生物具有广谱抗冠状病毒的活性，其作用靶点主要是病毒的 TMPRSS2 和 3CL 蛋白。

【关键词】新型冠状病毒；二芳基酰胺衍生物；抗冠状病毒；TMPRSS2；3CLpro

Synthesis, biological evaluation and multi-target action of biaryl amide derivatives against SARS-CoV-2

LI Jia-yu#, ZHONG Xiu-li#, YU Zhi-hui, LI Jian-rui, DUAN Qiong-lu, LI Ying-hong, CHEN Fen-bei, WANG Yan-xiang, LIU Yong-hua*, PENG Zong-gen*, SONG Dan-qing*

(Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

【**Abstract**】The epidemic of SARS-CoV-2 has raised serious public health and safety concerns. Although several effective vaccines and drugs are available worldwide, there is still an urgent need to develop more effective anti-coronaviral drugs because the virus is constantly mutating. In this study, we designed, synthesized and evaluated 33 new biaryl amide derivatives for antiviral activity against coronavirus. Based on the results of anti-coronaviral activity, we chose the most promising compound, 8h (EC_{50} = 2.13 μM; SI = 31.5 μM), as a representative compound for mechanistic studies. The experimental results showed that 8h possessed broad-spectrum anti-coronaviral activity and exhibited broad antiviral activity against both α-coronavirus (HCoV-229E) and β-coronavirus (HCoV-OC43). The result of time-of-addition assay showed that 8h inhibited viral dsRNA synthesis during the early stage of a single infection cycle. Virus attachment and entry assays also confirmed this result. In subsequent target corroboration, we found that 8h binds weakly to Transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2). The results of enzymatic and drug combination experiments showed that compound 8h mainly binds to viral 3C-like protease (3CLpro). The above results indicated that the biaryl amide derivatives possessed broad-spectrum anti-coronavirus activity, and their targets were mainly the viral TMPRSS2 and 3CLpro.

【**Keywords**】SARS-CoV-2; biaryl amide derivatives; anti-coronavirus; TMPRSS2; 3Clpro

资金项目：CAMS 医学科学创新基金 (2021-12M-1-030).

四逆散调控脂代谢稳态改善肥胖症与“透邪”、“疏肝”传统功效相关性研究

李建超[1,2]，吴恺怿[3]，钟颖[1]，黄娜娜[1]，刘闰平[4]，孙蓉[1*,5]

（1. 山东大学第二医院，山东 济南 250033；2. 山东中医药大学，山东 济南 250355；3. 天津中医药大学，天津 301617；4. 北京中医药大学中药学院，北京 100029；5. 山东大学高等医学研究院，山东 济南 250012）

【摘要】目的：四逆散始载于汉代张仲景《伤寒论》，具有疏肝和脾，解郁透热之功效，临床用于治疗脂质代谢紊乱引起的多种疾病，但四逆散对肥胖的改善作用及其机制尚不清楚。本研究旨在对四逆散调控脂代谢稳态改善肥胖症与“透邪“、”疏肝”传统功效相关性进行多角度探讨，以期为肥胖症的临床治疗策略提供新的思路，并为四逆散精准化用药提供基础数据支持。**方法：**通过给予高脂饲料诱导建立肥胖小鼠模型，检测小鼠体重及体脂率，分析血清中 ALT、AST、甘油三酯（triglyceride，TG）、游离脂肪酸（non-esterified fatty acid，NEFA）、酮体含量变化，苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色检测脂肪组织及肝组织脂肪变性程度，明确四逆散改善肥胖症的药效作用；并通过免疫印迹试验（western blot，WB）检测附睾周围白色脂肪组织及肝组织中蛋白表达量，对潜在生物学机制进行验证。诱导培养原代小鼠胚胎成纤维细胞（primary mouse embryonic fibroblast，MEF）使其分化为脂肪细胞；对四逆散体外药效作用机制进行验证。 **结果：**本研究运用体内、外模型结合网络药理学技术从脂肪组织与肝组织两方面开展四逆散的药效作用及机制研究，明确四逆散“透邪”、“疏肝”传统功效的作用表征。四逆散可显著降低小鼠血清中 ALT、AST 活力，显著改善肝组织脂肪变性；四逆散可减轻小鼠体重，降低体脂率，降低血清中 TG、NEFA 含量，改善脂肪组织细胞大小；WB 结果显示四逆散通过升高小鼠脂肪组织中 AKT、HSL 和 ATGL 的蛋白磷酸化水平，降低 AMPK 活性增强脂肪分解，改善肥胖症。四逆散水提物可显著增加脂肪细胞培养基中 NEFA 含量，降低脂质积累，增加脂肪细胞中 AKT 的磷酸化，负向调控 AMPK 激活，增加 HSL 和 ATGL 的磷酸化；四逆散组小鼠血清中酮体含量显著增加，通过增加 ATGL、Plin5 的表达，促进 SIRT1 的活性，增加 PGC1α 和 CPT1α 的表达，激活 PPARα 信号通路。**结论：**本研究发现四逆散可降低体脂率，减少脂肪细胞肥大，减轻肝脏脂质堆积，改善血脂循环。四逆散在体内、外减少脂肪组织中脂质积累；显著提高肝组织脂肪酸氧化相关蛋白的表达，调节线粒体氧化能力与脂肪酸通量相匹配，维持脂代谢稳态，发挥改善肥胖症的作用。

【关键词】四逆散；肥胖症；脂肪分解；脂肪酸氧化

基金项目：国家重点研发计划项目（2022YFC3502100）；国家自然科学基金面上项目(82274197、81773997)

作者简介：李建超，博士研究生，研究方向为中药药理学与毒理学。E-mail： lijianchao0117@163.com

*通信作者：孙蓉，博士生导师，教授，从事中药药理学与毒理学研究。E-mail: sunrong107@163.com

桂枝葛根汤结合温针灸对颈性眩晕患者IL-6、hs-CRP和ET-1、NO的影响

李明[1]，姚文平[1]，黄谦[1]，祁红艳[1]，侍昊[2]

连云港市中医院 药学部 江苏 连云港 222000

【摘要】目的：观察桂枝葛根汤结合温针灸治疗颈性眩晕的临床疗效及对炎性因子 IL-6、hs-CRP、ET-1、NO的影响。**方法：**选取2019年1月至2022年4月南京中医药大学连云港附属医院收治的90例颈性眩晕患者，用随机数字表法分为对照组和观察组各45例。对照组给予甲磺酸倍他司汀片治疗，每次6mg，每日3次。观察组在对照组基础上增加温针灸及桂枝加葛根汤治疗，温针灸隔日1次，中药汤剂每日1剂。疗程均为4周。观察2组患者治疗前后颈性眩晕与功能评分、前基底动脉及双侧椎动脉的收缩期峰流速（Vs）和平均血流速度（Vm）水平、hs-CRP、IL-6、ET-1、NO的水平。**结果：**观察组痊愈16例，显效18例，有效7例，无效2例，总有效率95.35%（41/43）；对照组痊愈12例，显效9例，有效15例，无效8例，总有效率81.81%（36/44），观察组治疗总有效率明显高于对照组（χ^2=3.914，P<0.05）。与治疗前比较，观察组和对照组治疗后，观察组眩晕、头痛、颈肩痛、日常生活及工作评分均明显升高（t=-12.612，-16.809，-12.545，-15.902,P均<0.05；对照组t= -10.658，-8.691，-8.174，-11.681，P均<0.05）；与对照组比较，观察组治疗后眩晕、头痛、颈肩痛评分均明显降升高（t= -2.499，-4.279，-2.198，P均<0.05）。与治疗前比较，观察组治疗后基底动脉及双侧椎动脉的Vs和Vm均明显增快（前基底动脉：t=-11.875，-63.50，P均<0.05；双侧椎动脉：t=-37.346，-25.800，-25.699，-24.576，P均<0.05）；与治疗前比较，对照组治疗后基底动脉Vs、Vm均明显增快（t=-2.815，-10.823，P均<0.05）；与对照组比较，观察组治疗后基底动脉及双侧椎动脉的Vs、Vm均明显增快（基底动脉：t=-3.022，-6.970，P均<0.05；双侧椎动脉：t=-8.073，-10.417，-6.356，-5.958，P均<0.05）。与治疗前比较，2组治疗后血清hs-CRP、IL-6、ET-1水平均明显降降低，NO水平均明显升高（观察组：t=15.549，11.862，18.102，-11.276，P均<0.05；对照组：t= -8.767，-6.051，-9.565，-8.645，P均<0.05）；[b]与对照组比较，观察组治疗后血清hs-CRP、IL-6、ET-1水平均明显降降低，NO水平均明显升高（t=4.177，3.925，6.110，-4.051，P均<0.05）。**结论：**桂枝葛根汤结合温针灸可有效改善颈性眩晕患者的临床症状，作用机制可能与抑制血清炎症因子hs-CRP、IL-6以缓解肌肉紧张，增加NO合成及降低ET释放改善血管内皮血供有关。

【关键词】桂枝加葛根汤；温针疗法；眩晕；白细胞介素6；C反应蛋白质；内皮缩血管肽1；一氧化氮

Effects of Gui Zhi Jia Ge Gen Tang combined with Needle warming therapy on IL-6, hs-CRP, ET-1 and NO in patients with cervical vertigo

Li Ming[1],Yao Wen-ping[1],Huang Qian[1],Qi Hong-yan[1],Shi Hao[2].[1]

Lianyungang Pharmacy Department of Lianyungang Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine，, Lianyungang 222004, China;[2]Clinical Medicine Department, Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China

【Abstract】Objective：To observe the clinical effect of Gui Zhi Jia Ge Gen Tang combined with warm acupuncture

Corresponding author:Yao Wenping,Email:3ywp@163.com

and moxibustion on cervical vertigo and its influence on inflammatory factors IL-6, hs-CRP, ET-1 and NO. **Methods**: 90 patients with cervical vertigo admitted to Lianyungang Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine from January 2019 to April 2022 were selected and randomly divided into the control group and the observation group with 45 cases each. The control group was treated with betahistine mesylate tablets, 6mg each time, three times a day. On the basis of the control group, the observation group added warm acupuncture and moxibustion and Guizhi plus Kakkonto, warm acupuncture and moxibustion once every other day, and traditional Chinese medicine decoction once a day. The course of treatment is all 4 weeks. Observe the cervical vertigo and functional score, systolic peak flow velocity (Vs) and mean blood flow velocity (Vm) levels of the anterior basilar artery and bilateral vertebral arteries, as well as the levels of hs-CRP, IL-6, ET-1, and NO in two groups of patients before and after treatment. **Results**: In the observation group, 16 cases were cured, 18 cases were significantly improved, 7 cases were effective, and 2 cases were ineffective, with a total effective rate of 95.35% (41/43); In the control group, 12 cases were cured, 9 cases were significantly improved, 15 cases were effective, and 8 cases were ineffective, with a total effective rate of 81.81% (36/44). The total effective rate of the observation group was significantly higher than that of the control group (χ^2=3.914, P<0.05). Compared with before treatment, the observation group and control group showed a significant increase in dizziness, headache, neck and shoulder pain, daily life and work scores after treatment (t=-12.612, -16.809, -12.545, -15.902, P<0.05; control group t=-10.658, -8.691, -8.174, -11.681, P<0.05); Compared with the control group, the observation group showed a significant decrease and increase in dizziness, headache, and neck and shoulder pain scores after treatment (t=-2.499, -4.279, -2.198, all P<0.05). Compared with before treatment, the Vs and Vm of the basilar and bilateral vertebral arteries in the observation group increased significantly after treatment (anterior basilar artery: t=-11.875, -63.50, P<0.05; bilateral vertebral artery: t=-37.346, -25.800, -25.699, -24.576, P<0.05); Compared with before treatment, the basal artery Vs and Vm in the control group increased significantly after treatment (t=-2.815, -10.823, P<0.05); Compared with the control group, the Vs and Vm of the basilar and bilateral vertebral arteries in the observation group increased significantly after treatment (basilar artery: t=-3.022, -6.970, P<0.05; bilateral vertebral artery: t=-8.073, -10.417, -6.356, -5.958, P<0.05). Compared with before treatment, the levels of serum hs-CRP, IL-6, and ET-1 in both groups decreased significantly after treatment, while the levels of NO increased significantly (observation group: t=15.549, 11.862, 18.102, -11.276, P<0.05; control group: t=-8.767, -6.051, -9.565, -8.645, P<0.05); Compared with the control group, the serum levels of hs-CRP, IL-6, and ET-1 in the observation group decreased significantly after treatment, while the levels of NO increased significantly (t=4.177, 3.925, 6.110, -4.051, P<0.05). **Conclusion**: Gui Zhi Jia Ge Gen Tang combined with warm acupuncture and moxibustion can effectively improve the clinical symptoms of patients with cervical vertigo. The mechanism may be related to inhibiting serum inflammatory factors hs-CRP and IL-6 to relieve muscle tension, increasing NO synthesis and reducing ET release to improve vascular endothelial blood supply..

【**Key words**】Gui Zhi Jia Ge Gen Tang; Needle warming therapy; Vertigo; Interleukin-6;C-reactive protein; Endothelin-1; Nitric oxide

颈性眩晕是由颈源性等因素引发的继发性眩晕，其常见临床症状主要为眩晕伴颈部的僵硬不适感，同时伴有耳鸣、恶心、头痛等症状，眩晕程度与头部位置有关，这对患者的生活质量有严重的影响[1]。目前，消炎镇痛及血管扩张剂为常规治疗方法，虽然在一定程度上缓解部分症状，但是症状极易反复。以往研究表明传统针刺疗法和中药能够明显缓解颈性眩晕患者临床症状，提高患者生活质量，特别是温针灸可以通过针刺特定穴位并进行艾灸，可以明显改善颈部血流动力学，改善患者眩晕、头痛等症状[2]。近来研究证明颈性眩晕的发生、发展除与颈部血流动力学异常外，还与超敏 C-反应蛋白（hs-CRP）、IL-6 有密切联系，同时血管内皮功能拮抗因子血清内皮素-1（endothelin-1，ET-1）和 NO 的变化与颈性眩晕患者的症状密切相关[3]。本研究通过桂枝葛根汤结合温针灸治疗颈性眩晕患者临床症状，及对 IL-6 和 IL-1β 和血管内皮功能拮抗因子 ET-1 和 NO 的

观察，探讨针药结合治疗颈性眩晕的临床效果及相关作用机制，为临床治疗提供理论与实践依据。

资料与方法

一、对象

选取 2019 年 1 月至 2022 年 4 月南京中医药大学连云港附属医院收治的 90 例颈性眩晕患者，根据 SAS9.4 软件编写程序，生成随机序列表，依据随机表制作不透光密封随机信封。根据患者就诊顺序随机分为观察组和对照组，每组 45 例。对照组 45 例中男 23 例，女 22 例；年龄 30～74 岁，平均（51.59±12.24）岁；病程 1～10 年，平均（5．27±2.15）年。观察组 45 例，其中男 22 例，女 23 例；年龄 33～75 岁，平均（53.25±10.71）岁；病程 2～9 年，平均（5.65±1.74）年。2 组患者一般资料差异无统计学意义（P＞0.05）。2 组颈性眩晕患者治疗前眩晕、头痛、颈肩痛、日常生活及工作评分比较，差异无统计学意义（P 均＞0.05），具有可比性。本研究经伦理委员会批准实施（伦理批号：2019-伦理审查 KY-04）。

诊断、纳入及排除标准

1.诊断标准。西医诊断标准符合中华医学会神经病学分会《眩晕诊治专家共识》[4]：（1）临床表现为发作性的眩晕、症见呕吐、视力下降，旋转或水平眼震颤征阳性，转头眩晕会加重。（2）颈椎片显示颈椎骨质增生或椎间孔狭窄。（3）椎基底动脉供血不足者（经颅多普勒）。中医诊断和辨证标准按照《中医病证诊断疗效标准》[5]中眩晕-气虚血瘀证。主证：头晕目眩，视物旋转，头重昏蒙，可伴有颈部僵硬，头痛，恶心呕吐，肢体麻木，舌质暗红，苔薄白，脉滑或涩。

2.纳入标准。符合上述中医和西医诊断标准；年龄 30～75 周岁；签署知情同意书，自愿为受试对象；头颅 CT 或是 MRI 无明显异常。

3.排除标准。（1）合并肿瘤、结核及感染性疾病的患者；（2）心、肝、肾、肺等功能严重异常及合并精神疾病。（3）妊娠或哺乳期患者。（4）对药物过敏及及针灸不耐受者。

二、治疗方法

常规治疗在两组中均使用。

1.对照组。予常规治疗加服甲磺酸倍他司汀片。常规治疗为卧床、减少不良声光和体位变化等。甲磺酸倍他司汀片（卫材中国药业有限公司，批准文号：国药准字 H20040130），规格为 6 mg X 30 片，每次 6mg，每日 3 次，饭后口服，共服用 4 周，若患者治疗过程中症状完全缓解超过一周可停药。

2.治疗组。在对照组治疗基础上加温针灸及桂枝加葛根汤治疗。（1）温针灸：取穴：风池、天柱、百会、大椎、颈夹脊穴。操作：体位选取俯卧位或坐位，选用的华佗牌一次性针灸针（0.30 mm x 40 mm）。穴位常规消毒，风池穴向鼻尖方向进针约 30mm 左右，天柱穴略向脊柱斜刺，进针 30 mm 左右，采用轻柔的提插捻转平补平泻法，以患者自觉麻胀感为度，不宜针刺过深；百会穴针刺时针体与头皮呈 15°向后快速刺入，针刺深度入帽状腱膜下 20 mm 左右，行快速捻转平补平泻手法；大椎穴针尖略朝上快速进针 30 mm 左右，颈夹脊穴针尖向脊柱方向呈 75°刺入，行提插捻转捻转平补平泻法，局部酸胀感为度。在双侧风池、天柱和大椎穴行温针灸，将清艾条剪成直径约为 1.5 cm、高约 2 cm 的艾段，插于针尾，下垫硬纸片，点燃使其燃烧，每穴艾灸 3 壮。隔日 1 次，治疗 4 周后进行评价。

（2）桂枝加葛根汤：葛根 30 g，天麻 15 g，白芍 10 g，桂枝 10 g，甘草 6 g，生姜 10 g，川芎 10 g。亳州市永刚饮片厂有限公司提供所用饮片，煎制 400 mL，晨起睡前两次温服，每日 1 剂，治疗 4 周后进行评价。

三、观察指标及疗效评价标准

1.颈性眩晕症状与功能评估量表（evaluation scale for cervical vertigo ，ESCV）评分。按照《颈性眩晕症状与功能评估量表（ESCV）》[6]，分别对治疗前后患者眩晕、头痛、颈肩痛、日常工作生活能力等方面进行评分，得分越低示病情越重。

2.血流动力学指标变化。采用美国 GE 公司生产的 LOGIQE9 型彩色多普勒超声诊断仪进行常规颈动脉参数测量，采用 9MHz 的高频灰阶探头及 4MHz 低频凸阵探头联合检查。分别检查治疗前后患者的基底动脉（basal artery，BA）和双侧椎动脉（vertebral artery，VA）的血流动力学指标，包括收缩期峰流速（Velocity systole，Vs）和平均血流速度（Velocity systole mean，Vm）。

3.观察 2 组患者静脉血血清 hs-CRP、IL-6 和 ET-1、NO 的变化。治疗前后分别于晨起空腹抽取静脉血 3 mL，注于乙二胺四乙酸抗凝管中。离心半径为 13.5cm，离心 15 min（转速为 3 000r/min）后收集上清液在-80℃保存待测，应用酶联免疫法测定血清中 IL-6 含量，采用化学发光法测定 hs-CRP 的血清水平；抽取 3 mL 静脉血，注入乙二胺四乙酸抗凝管中，摇匀血液，置 4℃离心，离心半径为 13.5cm，（转速为 3 000r/min）10 min，取上清液放入-80℃冰箱保存待测，采用放射免疫法检测 ET-1 水平，采用硝酸还原酶法测定 NO 水平。

4.疗效评价标准。参照《中医病证诊断疗效标准》[5]拟定。治愈：头痛、眩晕等症状和体征消失，能正常生活。显效：头痛、眩晕等症状和体征基本消失，日常生活基本恢复正常。有效： 头痛、眩晕等症状和体征明显减轻，日常生活明显恢复。无效：症状和体征无改善，甚至加重。总有效率=（痊愈+显效+有效）例数/总例数×100%。

四、统计学方法

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析，首先进行方差齐性检验，确定数据符合正态分布。若不满足正态分布，采用非参数检验。计量资料以 $x\pm s$ 表示，组内治疗前后比较采用配对 t 检验，2 组间比较采用独立样本 t 检验，计数资料比较采用 X^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一、2 组患者临床疗效比较

研究结果示，观察组 45 例患者中脱落 2 例，对照组 45 例患者中脱落 1 例。观察组痊愈 16 例，显效 18 例，有效 7 例，无效 2 例，总有效率 95.35%（41/43）；对照组痊愈 12 例，显效 9 例，有效 15 例，无效 8 例，总有效率 81.81%（36/44），观察组治疗总有效率明显高于对照组（$\chi^2=3.914$，$P<0.05$）。

二、治疗前后 ESCV 评分比较

观察组与对照组患者治疗后眩晕、头痛、颈肩痛、日常生活及工作评分均较治疗前均明显升高（$P<0.05$），且观察组治疗后头痛、眩晕、颈肩痛评分较对照组明显升高（$P<0.05$），日常生活及工作虽有改善，但差异无统计学意义（$P>0.05$）（表 1）。

表 1 2 组颈性眩晕患者治疗前后症状评分比较（x±s，分）

组别		例数	眩晕	头痛	颈肩痛	日常生活及工作
观察组		43				
	治疗前		7.05±0.95	0.91±0.25	1.16±0.48	1.12±0.43
	治疗后		11.09±2.09[ab]	1.89±0.40[ab]	3.19±0.96[ab]	2.84±0.67[a]
对照组		44				
	治疗前		7.02±1.07	0.89±0.30	1.36±0.72	1.20±0.46
	治疗后		10.09±1.62[a]	1.50±0.46[a]	2.75±0.89[a]	2.76±0.64[a]

注：[a] 与治疗前比较，观察组和对照组治疗后眩晕、头痛、颈肩痛、日常生活及工作评分均明显降升高（t=-12.612，-16.809，-12.545，-15.902，P 均＜0.05；对照组 t=-10.658 ，-8.691，-8.174，-11.681，P 均＜0.05）；[b] 与对照组比较，观察组治疗后眩晕、头痛、颈肩痛评分均明显降升高（t=-2.499，-4.279，-2.198，P均＜0.05）

三、治疗前后血流动力学指标的比较

2 组颈性眩晕患者治疗前基底动脉及双侧椎动脉的 Vs、Vm 比较，差异无统计学意义（P均＞0.05），具有可比性。观察组与对照组患者治疗后前基底动脉的 Vs、Vm 均较治疗前均明显增快（P 均＜0.05）；观察组治疗后双侧椎动脉的 Vm、Vs 均较治疗前增快（P 均＜0.05）；对照组治疗后双侧椎动脉的 Vm、Vs 与治疗前比较，差异无统计学意义（P 均＞0.05）。与对照组比较，观察组治疗后前基底动脉及双侧椎动脉的 Vs、Vm 均明显增快（P均＜0.05）（表 2）。

表 2 2 组颈性眩晕患者治疗前后血流动力学指标比较（$\bar{x}$±s，cm/s）

组别		例数	基底动脉		左侧椎动脉		右侧椎动脉	
			Vs	Vm	Vs	Vm	Vs	Vm
观察组		43						
	治疗前		39.72±1.65	22.12±1.78	31.30±2.04	15.67±1.63	31.00±2.03	16.35±1.66
	治疗后		45.67±4.55[ab]	36.88±3.09[ab]	37.32±2.77[ab]	23.58±3.44[ab]	37.16±3.41[ab]	22.05±3.01[ab]
对照组		44						
	治疗前		39.52±2.07	22.86±2.40	30.61±2.53	15.86±2.17	31.68±1.90	17.23±2.54
	治疗后		42.07±6.40[a]	29.47±6.26[a]	31.57±3.79	16.54±2.83	32.34±3.66	17.86±3.51

注：[a]与治疗前比较，观察组治疗后前基底动脉及双侧椎动脉的 Vs、Vm 均明显增快（基底动脉：*t*=-11.875，-63.50，*P* 均＜0.05；双侧椎动脉：*t*=-37.346，-25.800，-25.699，-24.576，*P* 均＜0.05）；[a]与治疗前比较，对照组治疗后基底动脉 Vs、Vm 均明显增快（*t*= -2.815，-10.823，*P* 均＜0.05）；[b]与对照组比较，观察组治疗后基底动脉及双侧椎动脉的 Vs、Vm 均明显增快（基底动脉：*t*=-3.022，-6.970，*P* 均＜0.05；双侧椎动脉：*t*=-8.073，-10.417，-6.356，-5.958，*P* 均＜0.05）。Vs：收缩期峰流速；Vm：平均血流速度

四、2 组患者血清 hs-CRP 及 IL-6 含量比较

2 组颈性眩晕患者治疗前血清 hs-CRP、IL-6、ET-1、NO 水平比较，差异无统计学意义（*P* 均＞0.05），具有可比性。观察组与对照组患者治疗后血清 hs-CRP、IL-6、ET-1、水平均较治疗前明显降低（*P* 均＜0.05），NO 水平均较治疗前明显升高（*P* 均＜0.05），且观察组治疗后血清 hs-CRP、IL-6、ET-1、水平较对照组明显降低（*P* 均＜0.05），NO 水平均较对照组明显升高（*P* 均＜0.05）（表 3）。

表 3 2 组颈性眩晕患者治疗前后血清 hs-CRP、IL-6 水平比较（$\bar{x}$±s）

组别	n	时间	Hs-CPR（mg/L）	IL-6（pg/L）
观察组	43	治疗前	3.86±0.47	143.51±10.52
		治疗后	2.21±0.73[ab]	125.44±9.83[ab]
对照组	44	治疗前	3.76±0.52	145.18±9.36
		治疗后	2.84±0.67[a]	134.95±12.57[a]

注：[a]与治疗前比较，2 组治疗后血清 hs-CRP、IL-6、ET-1 水平均明显降降低，NO 水平均明显升高（观察组：*t*=15.549，11.862，18.102，-11.276，*P* 均＜0.05；对照组：*t*= -8.767，-6.051，-9.565，-8.645，*P* 均＜0.05）；[b]与对照组比较，观察组治疗后血清 hs-CRP、IL-6、ET-1 水平均明显降降低，NO 水平均明显升高（*t*=4.177，3.925，6.110，-4.051，*P* 均＜0.05）

五、比较 2 组治疗前后 ET-1 和 NO 变化

治疗后，对照组和观察组 ET 水平均有下降，NO 水平上升（*P*＜0.05），且治疗组 ET 水平幅度和 NO 水平上升幅度均大于对照组，差异具有统计学意义（*P*＜0.05）。见表 4.

表 4 2 组颈性眩晕患者治疗前后血清 ET-1、NO 水平比较（$\bar{x}$±s）

组别	n	时间	ET-1（ng/L）	NO（umol/L）
观察组	43	治疗前	139.53±9.64	18.09±1.32
		治疗后	108.74±10.64[ab]	21.81±2.60[ab]
对照组	44	治疗前	141.73±10.17	17.86±1.42
		治疗后	125.39±14.43[a]	19.84±1.89[a]

注：治疗前比较 aP＜0.05，和对照组比较 bP＜0.05。

六、安全性评价

治疗期间观察组出现 2 例患者针刺后局部肿胀，按压五分钟后消失，不影响后续治疗。对照组首次口服药物后 2 例患者出现轻微胃部不适症状，后自行缓解，未影响后续治疗。

讨论

本病属中医学“眩晕”“项痹”等范畴，多由劳倦外伤或是寒邪外侵导致少阳经、太阳经经络痹阻、清窍被蒙而发。《素问》云：“诸风掉眩，皆属于肝。”本病病性为本虚标实，气虚、阳虚为本，血瘀为标，治疗以疏风定眩、温经活血为主。目前对于颈性眩晕治疗尚无统一的标准方案，治疗策略主要以扩血管药物改善脑部血液循环，非甾体消炎药解除颈肩部肌肉紧张痉挛，手法复位及物理疗法纠正小关节紊乱，提升颈椎稳定性[7-8]。但因为椎动脉狭窄多由物理刺激所致，所以在没有有效解除刺激的情况下，单纯药物治疗效果有限，手法治疗限于医师水平差异，疗效不稳定[7]。

既往研究发现，基于传统经络理论的针灸疗法和中药经典方剂桂枝加葛根汤可有效缓解颈部肌肉紧张，减轻对椎动脉和颈部交感神经的刺激，改善椎基底动脉系统的血液循环，减轻临床眩晕症状。通过针刺百会、风池、大椎穴及颈夹脊穴可升举阳气、熄风定眩、潜阳益髓，在一定程度上缓解椎基底动脉供血不足，改善眩晕症状。温针灸充分发挥针刺和艾灸的双重功效，温经散寒，活血通络，加快椎基底动脉血流速度，同时温热刺激又能够明显缓解颈部肌肉紧张，缓解疼痛[8]。桂枝加葛根汤根据《伤寒论》经典名方加减化裁而成，方中以葛根、桂枝、川芎、白芍、甘草、天麻、生姜等中药组成，具有解肌发表、疏风定眩之功效，临床主用于太阳经枢不利所致的颈项强痛、头痛、头晕、目眩等。方中葛根除痹止痛，有效成分异黄酮能使血管平滑肌舒张，降低外周阻力，改善局部血流[9]；桂枝温阳通脉，疏达太阳之表，具有增加局部血流和解热止痉等作用。川芎是血中之气药，能够缓解头风头痛、风湿痹痛，具有活血行气、祛风止痛的功效。甘草、芍药具有柔筋缓急、益阴敛营功效，有效成分有镇静、镇痛、通经活络及活血化瘀的功效[10]，芍药甘草配伍柔肝缓急，可明显缓解颈部肌肉紧张，如果颈部疼痛明显可增加芍药用量。天麻可熄风止痉、祛风通络，对眩晕，头痛等显著功效[11]。总览全方，共奏疏风通络、熄风定眩之功。

本研究中采用的针药结合组总有效率高于单用甲磺酸倍他司汀片治疗，患者的眩晕症状缓解天数更短，头痛、眩晕障碍及颈肩痛程度更低，治疗后日常生活及工作能力评分更高，明显改善患者生活质量。分析原因颈性眩晕的发病多由颈椎退行性改变引起，颈椎退变过程引起颈椎形态学改变，特别是颈椎曲度的变化使穿过颈椎横突孔的椎动脉受到刺激或是直接压迫导致痉挛狭窄，同时退变椎间盘细胞产生 IL-6 和 hs-CRP 等炎性因子所致的生物化学平衡的破坏导致颈部肌肉软组织持续紧张，进而刺激颈部交感神经引起椎动脉痉挛狭窄，痉挛的椎动脉血管壁压力上升导致血管内皮缺血缺氧，而 ET-1 和 NO 是反应血管内皮功能拮抗因子，椎动脉的持续收缩使得血管内皮释放 NO 降低和释放 ET-1 上升[12]。甲磺酸倍他司汀作为治疗眩晕常用的组胺类循环改善药，可以有效扩张椎基底动脉，抑制前庭神经元异常放电，促进前庭血液循环，改善耳蜗及脑组织血容量，减轻眩晕、耳鸣等症状，桂枝加葛根汤能更好抑制血清炎症因子 IL-6 和 IL-1β 的表达，缓解颈部肌肉紧张。相较单纯对照组，中药有效成分能更好的作用于血管内皮，纠正血管内皮功能紊乱，改善血管内皮血供，增加 NO 合成及降低 ET 释放，从而缓解患者临床症状[13]。

综上所述，颈性眩晕的发病过程中血清 IL-6 和 hs-CRP 等炎性因子发挥重要作用，血管内皮释放 NO 降低和释放 ET-1 上升是椎动脉痉挛的重要影响因素，而椎动脉血流减少是导致眩晕的直接原因。针刺结合葛根桂枝汤治疗，通过调节相关影响因子增加椎动脉血流量改善患者临床症状，同时相关炎性指标的降低又可以减少颈椎病疼痛症状，缓解肌肉软组织紧张进而减少对神经血管的刺激，发挥良性调节作用。本研究发现对照组治疗前后症状改善明显，但是椎动脉血流速度无明显差别，分析原因可能与治疗后血管痉挛程度减轻导致管径增加，在血流速度不变甚至部分患者血流速度减缓的情况下仍然可以提高供血量，提示之后的研究在关注血流速度的同时也要关注血管管径的变化。

参考文献

[1] 杨雨薇,陈小波,祝郑飞,等．颈性眩晕发病机制的最新研究进展[J].中医临床研究,2022,14(30):26-29．

[2] 周艳朋,李长聪,焦雪蕾．针刺颈夹脊配合风池、后溪及束骨穴治疗颈性眩晕的疗效及对血流动力学的影响［J］．中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(4):664-667.
[3] 李明,姚文平.不同剂型桂枝葛根汤治疗颈性眩晕的疗效比较[J].药物流行病学杂志,2018,27(6):357-360.
[4] 中华医学会神经病学分会,中华神经科杂志编辑委员会.眩晕诊治专家共识[J].中华神经科杂志,2010,43(5): 369-374.
[5] 国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准[M].南京:南京大学出版社,1994.
[6] 王楚怀,卓大宏.颈性眩晕患者症状与功能评估的初步研究[J].中国康复医学杂志,1998,13(6):245-247.
[7] 苏先喆,吴东生.桂枝加葛根汤联合项三针治疗神经根型颈椎病的疗效及安全性观察[J].中医临床研究,2021,13(1):45-47.
[8] 张德亮,袁海兰.中医针灸结合推拿手法治疗对椎动脉型颈椎病患者 疗效、血流动力学各项指标的影响研究［J］.中医临床研究,2021,13(24):55-56,61.
[9] 史晨旭，杜佳蓉，吴威，葛根化学成分及药理作用研究进展，中国现代中药，2021,23（12）:2177-2195.
[10] 蒲香蓉，胡菲菲，郭昕，芍药甘草汤在 肌肉骨骼疼痛康复中的运用及研究探析，河北 中医药学报，2023，38（2）:39-42.
[11] 任桂香．不同剂型桂枝葛根汤对颈性眩晕患者椎基底动脉血流速度的影响[J]．内蒙古中医药,2019,38(7):44-45.
[12] 冯桂芳,张凯滢,李洁毅.中药熏蒸结合桂枝加葛根汤加减治疗颈型颈椎病的临床研究及对患者治疗依从性的影响[J].中医临床研究,2022,14(24):131-134.
[13] 唐仲.针灸联合桂枝葛根汤治疗神经根型颈椎病临床评价［J］.中医临床研究,2020,12(6):93-95.

基于网络药理学和实验验证的清肺排毒汤抗新冠肺炎和急性肺损伤机制研究

李明会*，洪雪莲，方瑞，陈滢，张菊，许林燕

（安徽师范大学 生命科学学院，安徽 芜湖 241000）

【摘要】目的：利用网络药理学结合实验验证阐明清肺排毒汤（QPD）治疗新冠肺炎（COVID-19）的物质基础和作用机制。**方法：**通过 TCMSP 数据库获得药物有效成分及靶点，挖掘 GEO 数据库中 COVID-19 转录组数据集获得疾病相关靶点，运用 Cytoscape 构建药物活性成分-潜在靶点-相关疾病的网络药理学模型，对重要靶点进行分子对接验证与化合物结合情况，并进行 GO 和 KEGG 分析挖掘作用通路。同时利用体内外实验结合代谢组学分析了 QPD 中多糖类和乙醇提取物的抗肺损伤效果。**结果：**经筛选从 QPD 中得到 247 个化合物及 320 个 QPD 调控的靶点蛋白。根据 $P<0.05$ 值得到 1810 个 COVID-19 相关的差异表达基因。根据度值得到与 COVID-19 相关的核心靶点为 MDM2、CDK2 和 APP，同时利用 AutoDock 对化合物-靶点结合力进行了验证。根据 KEGG 分析得到 QPD 最重要的作用通路为 PI3K-Akt 信号通路。此外，细胞动物水平实验表明，QPD 显著降低 LPS 诱导的巨噬细胞炎症模型中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 炎症因子表达水平，且显著缓解 LPS 诱导的小鼠肺损伤及肺组织水肿，同时发现 QPD 多糖比醇提物显示出了更显著的抗炎及抗急性肺损伤效果。代谢组数据得出 QPD 通过调节机体酪氨酸代谢、柠檬酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢以及糖酵解等多个途径，使急性肺损伤小鼠紊乱的代谢恢复正常。**结论：**本研究表明 QPD 抗 COVID-19 具有多靶点、多途径调节作用，其中多糖类物质比醇提物展示了更好的药理活性，研究结果为 QPD 抗肺损伤的临床应用提供了理论依据。

【关键词】清肺排毒汤；新冠肺炎；网络药理学；急性肺损伤；多糖；乙醇提取物

*通讯作者：李明会（liminghui@ahnu.edu.cn）；电话：15952052370。

基金资助：安徽省自然科学基金青年项目（1908085QH342）。

住院患者格拉司琼相关心律失常的临床特征分析及预测模型的构建

李鹏[1,2]，郭代红[2]，朱曼[2]，高奥[2]，郭海丽[1,2]，伏安[1,2]，赵安琪[1,2]

（1.解放军医学院，北京 100853；2.解放军总医院医疗保障中心药剂科，北京 100853）

【摘要】目的：通过真实世界数据分析止吐药格拉司琼相关心律失常的发生率、临床特征和危险因素，构建列线图预测模型，为临床安全用药提供参考。**方法**：依托临床 ADE 主动监测与智能评估警示系统-Ⅱ对 2017 年至 2021 年某院使用该药的住院患者开展回顾性自动监测，获取心律失常发生率。采用倾向性评分匹配平衡混杂因素，分析临床特征。基于 Logistic 回归分析确定的危险因素建立并运用 Bootstrap 方法内部验证预测模型。**结果**：在 72 508 例次用药病例中，有 178 例次发生心律失常，发生率 0.25%。使用该药住院患者发生心律失常的独立危险因素有用药时间（OR 1.127, 95%CI 1.063-1.195）、合并心血管疾病（OR 1.546, 95%CI 1.079-2.216）、联用其他 5-羟色胺 3 受体拮抗剂（5-HT3RA）（OR 2.871, 95%CI 1.779-4.632）、丙氨酸氨基转移酶＞40 U•L^{-1}（OR 2.375, 95%CI 1.197-4.711）、血尿素氮＞7.5 mmol•L^{-1}（OR 2.012, 95%CI 1.181-3.426）。预测模型区分度和校准度较好，当风险阈值为 0.1-0.82 时净收益更高。**结论**：格拉司琼相关心律失常发生率属偶见范围。基于 5 个独立危险因素构建的预测模型可以协助预测相关用药风险，具有一定的临床应用价值。

【关键词】 5-HT3RA；格拉司琼；心律失常；自动监测；发生率；危险因素；列线图预测模型

药源性心律失常是指药物非治疗目的导致或加重的各类心律失常[1]，是药物安全性评价的重要指标。其中，心电图 QT 间期延长（QT interval prolongation, QTIP）和尖端扭转型室性心动过速（torsades de pointes, TdP）等药品不良反应（adverse drug reaction, ADR）可能发展为室颤，造成患者血流动力学障碍，甚至心源性猝死[2]。国际人用药品注册技术协调会建议各国在新药开发阶段评价药物对心脏安全性的影响[3]，而美国食品药品监督管理局则要求药物上市前必须进行全面 QT 研究[4]。格拉司琼是一种高选择性 5-羟色胺 3 受体拮抗剂（5-hydroxytryptamine 3 receptor antagonists，5-HT3RA），可以预防化疗引起的恶心、呕吐（chemotherapy-induced nausea and vomiting，CINV）和术后恶心、呕吐（postoperative nausea and vomiting，PONV）。尽管有分析认为该药导致心律失常的风险较低[5]，但仍有发生 QTIP 的报道[6]，其心脏安全性问题日益受到关注。本研究借助团队自主研发的临床 ADE 主动监测与智能评估警示系统-Ⅱ（adverse drug event active surveillance and assessment system-Ⅱ，ADE-ASAS-Ⅱ），开展了上市后药物再评价研究，分析了格拉司琼相关心律失常的发生率、临床特征和危险因素，并基于研究结果构建了列线图预测模型，旨在帮助临床便捷掌握用药患者发生心律失常的风险概率，为临床安全用药决策提供更多参考。

1 材料与方法

1.1 研究设计与数据来源

本研究采用病例对照研究方法，通过团队前期研发的 ADE-ASAS-Ⅱ心律失常模块对接医院信息系统（hospital information system, HIS），提取某三甲医院 2017 年 1 月 1 日-2021 年 12 月 31 日所有使用盐酸格拉司琼注射液（3 ml:3 mg）的住院患者电子病历（electronic medical record, EMR）进行回顾性自动监测。若患者的 EMR 满足该模块包含的 28 个心律失常关键词之一，系统则可以利用文本分类技术初步判断其是否发生心律失常，并发出报警信号[7]。研究者人工甄别报警病例，结合专家意见，评价出发生心律失常的阳性病例，得到 ADR

基金项目：本研究受编号 17CXZ010 基金项目和中国研究型医院学会临床重点药品的使用监测和评价研究专项（编号 Y2022FH-YWPJ01）资助。

发生率。采用倾向性评分匹配（propensity score matching，PSM）按适应症不同为使用该药预防 CINV 和 PONV 的阳性病例分别匹配对照组。结合文献调研结果，匹配因素包括年龄、性别及身体质量指数（body mass index，BMI），卡钳值设为 0.05，比例为 1:4[8]。之后，分析相关临床特征和危险因素，构建并验证列线图预测模型。

1.2 患者选择

纳入标准：（1）住院期间用药前后分别接受至少 1 次心电图（electrocardiogram，ECG）检查，（2）后次 ECG 有心律失常记录，且结果不同于前次的病例。

排除标准：（1）ECG 记录前后无明显变化，（2）存在可能诱发心律失常的非药源性因素（如原患心律失常、先天性心脏病等基础疾病，接受过心脏手术等）的病例。

参考 Naranjo 评估量表[9]对该药与心律失常 ADR 进行关联性评价，判定分数≥1 的为阳性病例。

PSM 对照组的匹配标准为：（1）在研究目标时段使用该药，（2）住院期间接受 ECG 检查，（3）未新发或加重原有心律失常的住院病例。

1.3 数据收集

本研究收集的数据包括：（1）住院管理数据（年龄、性别、BMI、科别）；（2）病史信息[ECG 记录，吸烟史，饮酒史，过敏史，合并心血管疾病（cardiovascular disease, CVD）、糖尿病、传染病情况]；（3）实验室检验指标[丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、血尿素氮（BUN）、肌酐（Cr）、血清尿酸（UA）、肌酸激酶（CK）、肌酸激酶同工酶（CK-MB）、血糖（GLU）、钙（Ca^{2+}）、镁（Mg^{2+}）、钾（K^{+}）、钠（Na^{+}）、肌钙蛋白 T（cTnT）、氨基末端脑钠肽前体（NT-proBNP）、血红蛋白（HGB）、红细胞计数（RBC）、白细胞计数（WBC）、中性粒细胞（N）、淋巴细胞（L）、单核细胞（M）、血小板计数（PLT）]；（4）用药情况[用药时间，联用地塞米松、神经激肽-1 受体拮抗剂（NK-1RA）、其他 5-HT3RA、心肌保护药物（左卡尼汀、右雷佐生、磷酸肌酸钠）情况]。实验室指标采用用药前最近一次检验数据。依据 MedDRA 26.0 首选术语规范 ADR 名称。

1.4 统计学分析

使用 SPSS Statistics 26.0、Excel 2021 和 R 4.3.0 进行统计分析与预测模型的开发、验证。对于基线特征分析，符合正态分布的连续变量以均值±标准差表示，非正态分布的以中位数和四分位数区间表示，组间比较分别使用 t 检验和 Mann-Whitney U 检验；分类变量以频数和百分比表示，组间比较使用 χ^2 检验。运用 Logistic 回归分析确定危险因素，将单因素分析结果 $P<0.05$ 的变量纳入多因素分析。利用 Bootstrap 方法对模型进行内部验证，计算受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线下面积（area under the curve, AUC）判断其区分度，依据校准曲线及相关参数评估校准度，采用临床决策曲线（decision curve analysis, DCA）评估临床应用价值。

2 结果

2.1 临床特征

使用格拉司琼的住院患者共计 49 727 例，用药 72 508 例次。经数据清洗，778 例次因住院管理数据、ECG 检查记录等信息缺失被系统排除。纳入研究的 71 730 例次中有 13 004 例次发出报警信号，即系统自动筛除了 82.07%的无关病例，用时约 2.5 h。根据前述患者选择标准，人工评价得到该药致心律失常的阳性病例 178 例次，ADR 发生率 0.25%，其中关联性评价为很可能和可能的分别有 117 例次（65.73%）和 61 例次（34.27%），使用该药预防 CINV 和 PONV 的分别有 26 例次（14.61%）和 152 例次（85.39%）。按适应症不同分别进行 PSM，所有阳性病例均成功匹配到了对照病例。

阳性病例涉及 16 种类型心律失常 ADR，详见图 1。146 例次（82.02%）因出现相关症状或体征（包括心悸、心前区或胸背部疼痛、胸闷、心动过速、憋喘、呼吸困难、血压异常、晕厥、房颤等）后进行 ECG 检查发现了 ADR。结局为死亡的有 5 例次（2.81%）。有 36 例次出现 QTIP，发生率 0.050%；未发现 TdP 或心源性猝死病例。经 PSM，病例组和对照组各项匹配因素无显著差异，详见表 1。PSM 后临床基线特征详见表 2。

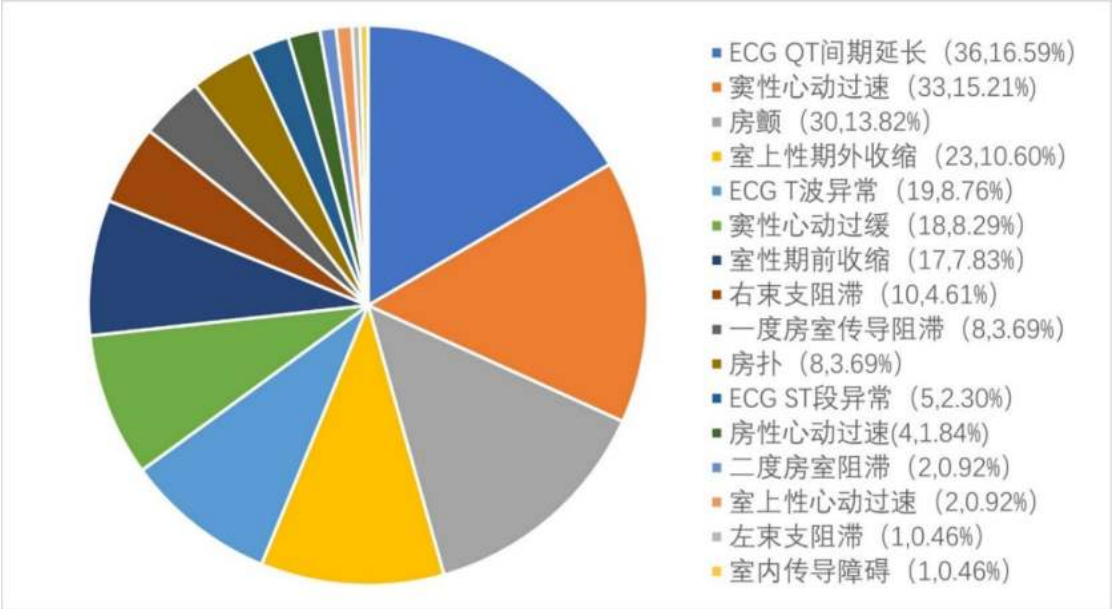


图 1 阳性病例涉及心律失常类型及分布（n=217*）

*1 例病例若涉及多种心律失常，记为多个例次。

Fig 1 Types and distribution of arrhythmias associated with positive cases(n=217*)

*A case involving multiple arrhythmias is counted as plural cases.

表 1 PSM 前后患者的匹配因素特征

Tab 1 Characteristics of matching factors in patients before and after PSM

变量	PSM 前			PSM 后					
				预防 CINV 病例			预防 PONV 病例		
	病例组（n=178）	对照组（n=71552）	*P*	病例组（n=26）	对照组（n=104）	*P*	病例组（n=152）	对照组（n=608）	*P*
年龄/岁 [M(IQR)]	63(54,70)	60(51,68)	0.004	58(53,70)	56(52,68)	0.658	66(58,72)	64(56,70)	0.118
性别			0.985			0.724			0.971
男/例(%)	96(53.93)	38638(54.00)		14(53.85)	60(57.69)		82(53.95)	327(53.78)	
女/例(%)	82(46.07)	32914(46.00)		12(46.15)	44(42.31)		70(46.05)	281(46.22)	
BMI/(kg•m^{-2}) [M(IQR) 或 ($\bar{x}$±S)]	24.42 (22.02,26.69)	23.95 (21.72,26.30)	0.089	23.38±3.49	23.47±3.21	0.182	24.80 (22.17,27.31)	24.78 (22.42,27.21)	0.938

表 2 匹配后病例组与对照组基线特征

Tab 2 Baseline characteristics of case and control groups after PSM

变量	预防 CINV 病例			预防 PONV 病例		
	病例组(n=26)	对照组(n=104)	*P*	病例组(n=152)	对照组(n=608)	*P*
吸烟史/例	4(15.38)	16(15.38)	＞0.999	23(15.13)	96(15.79)	0.842
饮酒史/例	2(7.69)	23(22.12)	0.096	33(21.71)	148(24.34)	0.496
过敏史/例	2(7.69)	7(6.73)	0.863	21(13.82)	64(10.53)	0.250

合并 CVD/例	12(46.15)	25(24.04)	0.026	76(50.00)	246(40.46)	0.033
合并糖尿病/例	2(7.69)	19(18.27)	0.192	32(21.05)	107(17.60)	0.325
合并传染病/例	2(7.69)	7(6.73)	0.863	15(9.87)	35(5.76)	0.068
ALT/(U•L^{-1})	14.9(11.2,29.9)	16.9(11.8,24.8)	0.537	18.1(11.5,33.6)	15.1(11.4,22.3)	0.001
AST/(U•L^{-1})	18.9(15.1,23.7)	17.0(14.2,22.8)	0.349	18.6(14.4,26.7)	16.6(13.6,20.3)	＜0.001
BUN/(mmol•L^{-1})	4.79(4.03,5.94)	4.57(3.69,5.61)	0.574	5.40(4.32,6.73)	5.05(4.05,6.11)	0.026
Cr/(μmol•L^{-1})	67.8(54.6,80.9)	64.0(55.5,79.8)	0.637	70.7(61.0,82.6)	70.5(59.0,82.7)	0.669
UA/(μmol•L^{-1})	309.0(237.3,364.1)	302.0±85.8	0.537	313.1±96.4	307.8(253.2,364.6)	0.583
CK/(U•L^{-1})	44.5(32.6,52.8)	47.9(34.6,63.4)	0.352	64.7(43.4,109.9)	75.5(50.4,102.5)	0.230
CK-MB/(ng•ml^{-1})	1.00(0.59,1.69)	0.90(0.60,1.86)	0.823	1.72(0.90,2.94)	1.35(0.92,2.16)	0.008
GLU/(mmol•L^{-1})	5.31(4.79,6.15)	(4.74,5.63)	0.584	5.34(4.79,6.82)	5.21(4.75,6.24)	0.049
Ca^{2+}/(mmol•L^{-1})	2.27±0.12	2.27±0.11	0.869	2.24(2.16,2.32)	2.27(2.20,2.35)	0.007
Mg^{2+}/(mmol•L^{-1})	0.88(0.82,0.93)	0.87(0.83,0.91)	0.896	0.88(0.79,0.93)	0.88(0.82,0.92)	0.280
K^{+}/(mmol•L^{-1})	4.10±0.51	4.00±0.41	0.196	3.89(3.64,4.15)	3.85(3.62,4.09)	0.476
Na^{+}/(mmol•L^{-1})	138.2±4.0	141.3(139.1,142.4)	0.002	140.8(139.4,142.7)	141.1(139.5,142.6)	0.516
cTnT/(μg•ml^{-1})	0.012(0.006,0.019)	0.007(0.004,0.008)	＜0.001	0.008(0.005,0.015)	0.007(0.005,0.010)	0.002
NT-proBNP/(pg•ml^{-1})	198.6(66.0,687.2)	124.5(40.4,189.3)	0.018	173.1(64.3,394.9)	98.3(41.9,211.9)	＜0.001
HGB/(g•L^{-1})	109±25	120±17	0.020	126±23	132(121,143)	0.016
RBC/(×10^{12}•L^{-1})	3.61±0.94	3.93±0.58	0.002	4.16±0.71	4.34(3.99,4.67)	0.021
WBC/(×10^{9}•L^{-1})	6.39(5.24,7.15)	4.70(3.55,6.59)	0.003	6.12(4.78,8.31)	6.04(4.98,7.39)	0.491
N/%	66.8(55.0,73.6)	62.3(57.0,68.0)	0.220	60.6(54.4,73.2)	58.5(51.3,66.5)	0.007
L/%	21.2±9.2	25.8±8.6	0.471	28.5(17.0,35.4)	21.0(13.0,29.0)	0.002
M/%	8.7±2.9	8.7±3.1	0.473	7.0±2.6	6.8(5.6,8.3)	0.838
PLT/(×10^{9}•L^{-1})	227±100	224(170,287)	0.665	199(169,251)	211(174,252)	0.163
用药时间/d	3(2,5)	2(1,3)	0.002	3(0,6)	2(0,4)	0.003
联用地塞米松/例	13(50.00)	64(61.54)	0.286	23(15.13)	55(9.05)	0.027
联用 NK-1RA/例	7(26.92)	45(43.27)	0.130	0(0.00)	1(0.16)	0.617
联用其他 5-HT3RA/例	10(38.46)	29(27.88)	0.294	30(19.74)	29(4.77)	＜0.001
联用心肌保护药/例	1(3.85)	9(8.65)	0.412	10(6.58)	3(0.49)	＜0.001

注：符合正态分布的连续变量以均值±标准差表示，非正态分布的以中位数和四分位数区间表示,分类变量以频数和百分比表示。

2.2 危险因素分析

为保证结果稳健，个别阳性例次偏少的分类变量未被纳入 Logistic 回归多因素分析。最终进入分析模型的自变量数量和阳性病例数量满足 Logistic 回归分析对样本量的要求[10]。假设检验结果显示，连续的自变量与因变量的 logit 转换值之间存在线性关系，自变量之间无多重共线性。Hosmer-Lemeshow 检验结果为 P=0.684，表示拟合程度良好。经分析，用药时间[比值比（odds ratio, OR） 1.127, 95%置信区间（confidence interval, CI） 1.063-1.195]、合并 CVD（OR 1.546, 95%CI 1.079-2.216）、联用其他 5-HT3RA（OR 2.871, 95%CI 1.779-4.632）、ALT＞40 U•L^{-1} （OR 2.375, 95%CI 1.197-4.711）、BUN＞7.5 mmol•L^{-1}（OR 2.012, 95%CI 1.181-3.426）可能是格拉司琼相关心律失常的独立危险因素，详见表 3。

表 3 格拉司琼相关心律失常危险因素的 Logistic 回归分析结果

Tab.3 Logistic regression analysis results of risk factors for granisetron-related arrhythmias

	单因素分析		多因素分析	
变量	OR(95%CI)	*P*	OR(95%CI)	*P*
用药时间	1.141(1.081-1.203)	＜0.001	1.127(1.063-1.195)	＜0.001
合并 CVD	1.591(1.143-2.214)	0.006	1.546(1.079-2.216)	0.018
联用其他 5-HT3RA	3.268(2.099-5.089)	＜0.001	2.871(1.779-4.632)	＜0.001
ALT＞40 $U•L^{-1}$	4.567(2.756-7.568)	＜0.001	2.375(1.197-4.711)	0.013
AST＞40 $U•L^{-1}$	4.938(2.840-8.587)	＜0.001		
GLU＞6.1 $mmol•L^{-1}$	1.643(1.157-2.334)	0.006		
BUN＞7.5 $mmol•L^{-1}$	1.842(1.117-3.040)	0.017	2.012(1.181-3.426)	0.010
Ca^{2+}＜2.09 $mmol•L^{-1}$	1.923(1.141-3.243)	0.014		
HGB 异常降低	2.297(1.579-3.343)	＜0.001		
RBC 异常降低	2.129(1.453-3.119)	＜0.001		
L＜20%	1.983(1.370-2.872)	＜0.001		

2.3 列线图预测模型的建立与评估

基于危险因素分析的结果，我们构建了预测格拉司琼用药患者发生心律失常 ADR 的列线图模型（图 2）以及网页版动态列线图（ https://druginducedarrhythmias.shinyapps.io/granisetron/），以方便临床应用。图 3 展示了某患者使用模型进行预测的示例。对预测模型区分度和校准度进行评估。ROC 曲线（图 4）分析显示，该模型的 AUC 为 0.706（95%CI 0.661-0.750），而经 Bootstrap 方法重复抽样 1000 次进行内部验证后得到的 AUC 为 0.700，表明模型区分度良好。校准曲线（图 5）在内部验证过程中显示出较好的拟合性，平均绝对误差为 0.018；Hosmer-Lemeshow 检验结果为 P=0.153，Brier 分数为 0.142，说明模型校准度良好。DCA（图 6）显示，当该药导致心律失常 ADR 的风险阈值为 0.1-0.82 时，使用该模型的收益更大。

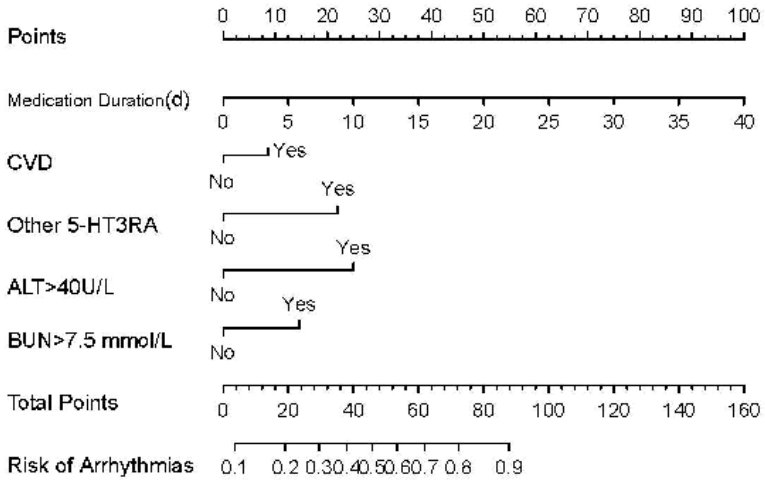


图 2 预测格拉司琼用药患者发生心律失常的列线图

Fig 2 Nomogram to predict the occurrence of arrhythmias in patients administered granisetron

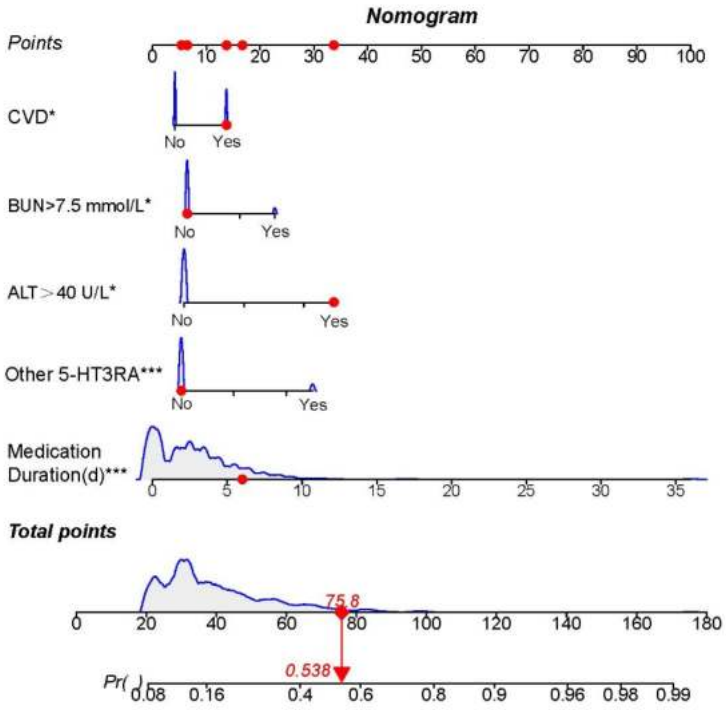


图 3 列线图应用示例（患者合并 CVD，ALT 130 U•L^{-1}，BUN 3.5 mmol•L^{-1}，使用格拉司琼 6 d，未联用其他 5-HT3RA。将每个预测变量对应的分数相加得到总分，总分对应的预测概率即为患者发生心律失常的概率。*：*P*<0.05；***：*P*<0.001。）

Fig 3 An example of the nomogram application (The patient has CVD in combination, with ALT 130 U•L^{-1}and BUN 3.5 mmol•L^{-1}. No other 5-HT3RA was co-administered within the 6 days of granisetron use. The scores corresponding to each prediction variable are summed to obtain a total score, and the predicted probability corresponding to the total score is the probability that the patient will develop arrhythmias. *: *P*<0.05; ***:*P*< 0.001.)

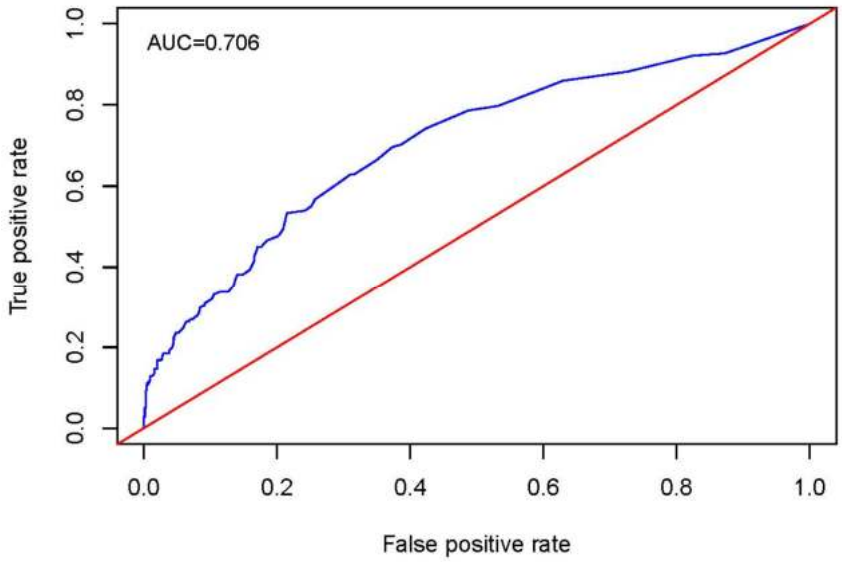


图 4 列线图模型的 ROC 曲线分析

Fig 4 Analysis of ROC curve for the nomogram

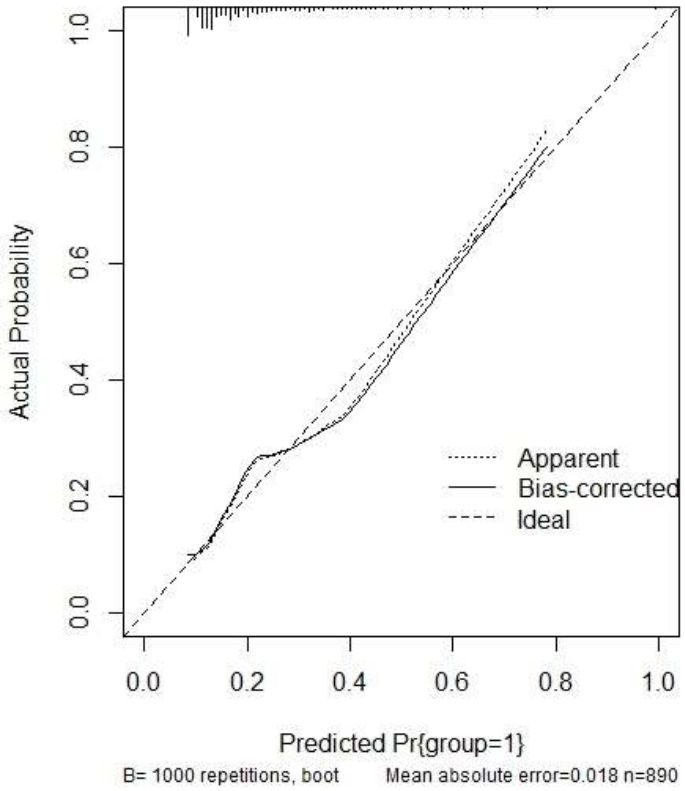


图 5 Bootstrap 方法验证预测模型的校准曲线

Fig 5 Calibration curves for validating the nomogram with Bootstrap method

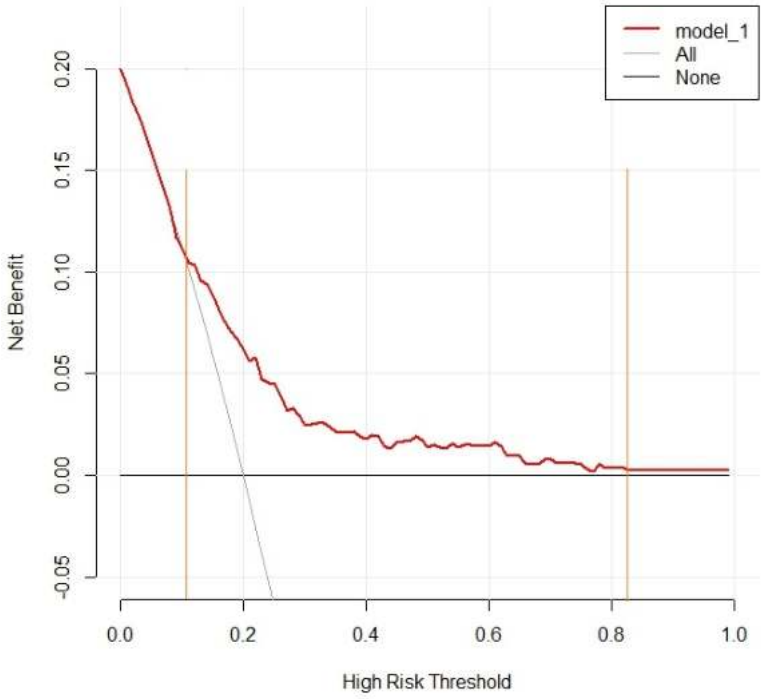


图 6 列线图模型的 DCA 分析

Fig 6 DCA for the nomogram

3 讨论

3.1 ADR 发生率及临床特征分析

据该药说明书记载，在临床试验阶段可观察不同类型心律失常 ADR，但较为罕见，且因果关系存疑；来源于自发报告的上市后经验认为该药可导致 QTIP，但无法确定发生率及因果关系。既往相关研究结论存在矛盾之处[11, 12]，这可能与研究设计不一致或 ADR 发生率较低有关。另外，较少有研究关注到 QTIP 等研究热点以外的心律失常 ADR[5]。本研究发现该药致心律失常 ADR 的发生率为 0.25%，属偶见范围，与以往研究结果基本一致[13]；监测到包括 QTIP 在内的 16 种 ADR，其中 QTIP 发生率为 0.050%，属罕见范围。尽管未发现 TdP 或心源性猝死等严重威胁患者生命的 ADR，但 82.02%阳性病例出现了可能影响其正常治疗或病程的身心不适，提示临床对风险患者仍需给予特别关注。

3.2 超适应症用药情况

该药在获得 FDA 批准上市之初标注的适应症为预防 CINV，后注射剂获批用于预防 PONV。一些随机对照研究认为，格拉司琼安全性和耐受性良好，受体特异性高，其作为预防 PONV 的常规止吐药效果明显优于昂丹司琼[14]。本研究中该适应症阳性病例占 85.39%，来自普通外科、肝胆胰外科、泌尿外科等 12 个科室，同样说明临床实际广泛应用该药预防 PONV。但是，我国厂家生产的盐酸格拉司琼注射液说明书并未将预防 PONV 纳入适应症范畴，因此属于超适应症用药，这在带来某些益处的同时也存在一定用药风险，有必要根据循证医学证据谨慎评估，以促进安全合理用药。

3.3 危险因素分析

有研究发现，年龄＞68 岁和女性是发生 QTIP 的独立预测因素[15]，而 BMI 的增加与房颤等心律失常的发病风险呈正相关性[16]。为了更有针对性地探究除上述已知风险外的危险因素，并且尽可能减少上述混杂因素和不同适应症病例基线特征的差异可能造成的偏倚，本研究运用 PSM 分别为两类适应症的阳性病例匹配对照组，以改善组间的均衡性，达到“事后随机化”效果[17]。匹配后相比匹配前，病例组与对照组各项匹配因素无显著差异，说明匹配结果可以接受。

本研究发现用药时间延长、合并 CVD、联用其他 5-HT3RA、ALT＞40 $U \cdot L^{-1}$ 和 BUN＞7.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 可能是格拉司琼患者发生心律失常的独立危险因素。需要说明的是，考虑到若将连续的自变量直接纳入 Logistic 回归模型，其 OR 值所代表的发生结局事件的风险变化在临床上意义不大，因此将其转换为分类变量后进行分析。研究结果显示，患者使用该药时间每延长 1d，发生心律失常 ADR 的风险增加 12.7%，其可能的原因在于连续用药易导致药物蓄积，从而诱发 ADR。既往研究表明，合并冠心病、心肌疾病等 CVD 的患者发生心律失常的风险更高，甚至有出现 TdP 的可能[18]。本研究的发现与之相符，提示临床应密切关注合并 CVD 的格拉司琼用药患者 ECG 表现。联合用药方面，昂丹司琼、多拉司琼等致心律失常作用广受关注，个别剂型甚至因此撤市[19, 20]。同时，尽管有分析认为帕洛诺司琼比第一代 5-HT3RAs 更加安全，但仍有发生严重心律失常的报道[21]。因此，格拉司琼与同类药物联用可能增加心律失常的发生概率，需要临床合理把控，针对风险患者制定个性化用药方案。另外两项发现则提示临床亦需关注某些实验室检验指标异常的用药患者。药代动力学研究表明，格拉司琼主要通过细胞色素 P450-3A 亚型经肝脏代谢[22]。患者 ALT 异常升高可能意味着肝功能受损，因而导致血药浓度升高，更易发生心律失常。而最近一项研究表明，肾功能损害与房颤等心律失常 ADR 之间存在双向因果关系，其机制在于激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统[23]。BUN 是器质性肾功能损害以及神经激素激活的指标[24]，结合本研究结果，其水平异常升高可能对格拉司琼用药患者发生心律失常有一定预测作用。

3.4 预测模型的建立与验证

目前尚无关于住院患者使用格拉司琼发生心律失常的预测模型。为填补空白，帮助临床更准确识别潜在风险患者，做好针对性监测与管理，本研究以前述 5 个独立危险因素为基础设计开发了列线图预测模型。另外，精准可视化的网页版动态列线图的建立使模型应用更加便捷、准确。以往研究表明，AUC 值大于 0.7 表明模型的预测性能良好[25]。经评估，模型在原始数据集和 Bootstrap 内部验证集中均具备较好的区分度和校准度，体现了良好的临床预测准确性。DCA 结果显示该模型在相应决策区间内临床净收益率较高，说明其具有一定的应用价值和推广意义。

3.5 自动监测情况

ADE-ASAS-Ⅱ是开展真实世界临床用药风险评价研究的高效实用工具，目前已完成涉及数百万例次用药人群的自动监测研究[26,27]。该系统基于触发器原理和文本分类技术研发，能够对接 HIS，跨科室高效提取、监测原始 EMR，兼具便捷性、稳定性和准确性[28]。本研究借助 ADE-ASAS-Ⅱ，自动筛除掉 82.07%不符合心律失常模块报警规则的无关病例，且耗时仅需 2.5h，显著降低了人工评估的工作量，体现了大样本信息化自动监测的优势。研究所得结果精准可溯源，具备较好的参考价值。

3.6 局限性

首先，作为单中心、回顾性研究，本研究在病例代表性方面可能存在偏倚。由于同样的原因，我们只对预测模型进行了内部验证，仍需多中心研究验证期普适性与一致性。再者，本研究评价得到的使用格拉司琼预防 CINV 的阳性病例偏少，因此无法更进一步对两类适应症用药患者分别进行危险因素分析。同样出于对 Logistic 回归分析样本量要求的考虑，本研究没有将更多潜在的预测变量纳入分析，深入探索和验证有待于开展更大规模的研究，以及未来自动监测技术的进一步发展。

4 结论

本研究基于真实世界数据，开展了大样本信息化临床用药风险自动监测评价，分析了格拉司琼相关心律失常发生率、临床特征和危险因素，首次构建并验证了列线图预测模型，丰富了相关循证依据，为临床安全用药提供了参考。

参考文献

[1] Frommeyer G, Eckardt L. Drug-induced proarrhythmia: risk factors and electrophysiological mechanisms [J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(1): 36-47.

[2] Tisdale JE, Chung MK, Campbell KB, et al. Drug-Induced Arrhythmias: A Scientific Statement From the American Heart Association [J]. Circulation, 2020, 142(15): e214-e33.

[3] Shah RR. Drugs, QTc interval prolongation and final ICH E14 guideline : an important milestone with challenges ahead [J]. Drug Saf, 2005, 28(11): 1009-28.

[4] Shah RR. If a drug deemed 'safe' in nonclinical tests subsequently prolongs QT in phase 1 studies, how can its sponsor convince regulators to allow development to proceed? [J]. Pharmacol Ther, 2008, 119(2): 215-21.

[5] Brygger L, Herrstedt J. 5-Hydroxytryptamine3 receptor antagonists and cardiac side effects [J]. Expert Opin Drug Saf, 2014, 13(10): 1407-22.

[6] Buyukavci M, Olgun H, Ceviz N. The effects of ondansetron and granisetron on electrocardiography in children receiving chemotherapy for acute leukemia [J]. Am J Clin Oncol, 2005, 28(2): 201-4.

[7] 郭海丽, 郭代红, 高奥, et al. 基于 HIS 数据的药源性心律失常自动监测模块规则建立与验证 [J]. 中国药物应用与监测, 2022, 19(03): 176-81.

[8] Huang L, Wang Y, Wang S, et al. Statistical consensus on propensity score methods and its normative application [J]. Chinese Journal of Health Statistics, 2020, 37(6): 952-8.

[9] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther, 1981, 30(2): 239-45.

[10] Peduzzi P, Concato J, Kemper E, et al. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis [J]. J Clin Epidemiol, 1996, 49(12): 1373-9.

[11] Tricco AC, Soobiah C, Blondal E, et al. Comparative safety of serotonin (5-HT3) receptor antagonists in patients undergoing surgery: a systematic review and network meta-analysis [J]. BMC Med, 2015, 13: 142.

[12] Mason JW, Selness DS, Moon TE, et al. Pharmacokinetics and repolarization effects of intravenous and transdermal granisetron [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(10): 2913-21.

[13] Guo H, Li P, Guo D, et al. Analysis of clinical characteristics and automatic monitoring of drug-induced arrhythmias in

167,546 inpatients [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2023.
[14] Savant K, Khandeparker RV, Berwal V, et al. Comparison of ondansetron and granisetron for antiemetic prophylaxis in maxillofacial surgery patients receiving general anesthesia: a prospective, randomised, and double blind study [J]. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2016, 42(2): 84-9.
[15] Tisdale JE, Jaynes HA, Kingery JR, et al. Development and validation of a risk score to predict QT interval prolongation in hospitalized patients [J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2013, 6(4): 479-87.
[16] Ma M, Zhi H, Yang S, et al. Body Mass Index and the Risk of Atrial Fibrillation: A Mendelian Randomization Study [J]. Nutrients, 2022, 14(9).
[17] Jupiter DC. Propensity Score Matching: Retrospective Randomization? [J]. J Foot Ankle Surg, 2017, 56(2): 417-20.
[18] Zeltser D, Justo D, Halkin A, et al. Torsade de pointes due to noncardiac drugs: most patients have easily identifiable risk factors [J]. Medicine (Baltimore), 2003, 82(4): 282-90.
[19] FDA Drug Safety Communication: Updated information on 32 mg intravenous ondansetron (Zofran) dose and pre-mixed ondansetron products[EB/OL].(2012-06-29)[2023-03-21].https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-updated-information-32-mg-intravenous-ondansetron-zofran-dose-and-pre.
[20] FDA Drug Safety Communication: Abnormal heart rhythms associated with use of Anzemet (dolasetron mesylate)[EB/OL].(2010-12-17)[2022-10-26].https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-abnormal-heart-rhythms-associated-use-anzemet-dolasetron-mesylate.
[21] M P, V KS, Chakraborty A. Palonosetron-Induced Ventricular Tachycardia in a Patient Receiving Cancer Chemotherapy [J]. Cureus, 2017, 9(7): e1480.
[22] Wolf H. Preclinical and clinical pharmacology of the 5-HT3 receptor antagonists [J]. Scand J Rheumatol Suppl, 2000, 113: 37-45.
[23] Geurts S, van der Burgh AC, Bos MM, et al. Disentangling the association between kidney function and atrial fibrillation: a bidirectional Mendelian randomization study [J]. Int J Cardiol, 2022, 355: 15-22.
[24] Liu EQ, Zeng CL. Blood Urea Nitrogen and In-Hospital Mortality in Critically Ill Patients with Cardiogenic Shock: Analysis of the MIMIC-III Database [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 5948636.
[25] Yu C, Guo D, Yao C, et al. Development and Validation of a Nomogram for Predicting Drug-Induced Acute Kidney Injury in Hospitalized Patients: A Case-Control Study Based on Propensity-Score Matching [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 657853.
[26] 郭代红, 朱曼, 徐元杰, et al. 信息化军队药物警戒系统的构建与应用 [J]. 解放军药学学报, 2023, 36(2): 95-9.
[27] 郭代红, 于承暄. 基于医院信息系统数据的临床用药风险自动监测评价专家共识 [J]. 中国药物应用与监测, 2021, 18(05): 277-87.
[28] Chen C, Jia W, Guo D, et al. Development of a Computer-Assisted Adverse Drug Events Alarm and Assessment System for Hospital Inpatients in China [J]. Ther Innov Regul Sci, 2020, 54(1): 32-41.

基于人群特征的心律失常自动监测模块功能拓展与优化

李鹏[1,2]，郭代红[2]，朱曼[2]，高奥[2]，郭海丽[1,2]，伏安[1,2]，赵安琪[1,2]，石廷永[3]

（1.解放军医学院，北京 100853；2.解放军总医院医疗保障中心药剂科，北京 100853；3.北京康联达软件有限公司，北京 100028）

【摘要】目的：对临床 ADE 主动监测与智能评估警示系统-Ⅱ心律失常自动监测模块进行功能开发与优化，持续完善性能，提升效率，探索模块优化方式。**方法：**开发“强制医嘱关键字”功能，增加模块自定义配置内容；根据监测人群特征，确定最佳优化设置条件，对比优化测试数据与前期应用研究结果，获取模块优化程度和准确性参数。**结果：**新开发功能具有普适性和灵活性，满足各类自动监测模式需求。优化后利用该模块在全药和单药条件下开展自动监测，报警病例相较优化前分别下降 30.75%和 80.13%-90.82%，阳性预测值得到了不同幅度的提升，真阳性病例全部保留。**结论：**经功能拓展与优化完善，该模块监测准确，运行稳定，进一步显著降低了人工病例评价的工作量，为基于人群特征的自动监测复合模块的发展提供了新途径。

【关键词】心律失常；自动监测；模块优化；人群特征；药品不良反应；真实世界研究

近年来，基于真实世界数据的临床用药风险自动监测评价迅速发展，其凭借精准、高效、灵活、经济的特点，显著提升了药品不良反应（adverse drug reaction，ADR）监测水平，为保障公众用药安全提供了科学助力[1]。依托团队自主研发的临床 ADE 主动监测与智能评估警示系统-Ⅱ（adverse drug event active surveillance and assessment system-Ⅱ，ADE-ASAS-Ⅱ）[2, 3]，我们前期设计开发了 20 个基于医院信息系统（hospital information system, HIS）数据的住院患者 ADR 大样本信息化智能监测模块，包括量化模块 12 个、文本模块 6 个、量化文本共模块 2 个，实现了自动监测评价模式由“模块确定研究”到“研究确定模块”的突破性转变[4]。其中，利用文本分类技术构建的心律失常模块通过反复测试确定了 28 个关键词，报警准确性良好，稳定性可靠，为识别、防范与管控药源性心律失常风险提供了实用工具[5]。本研究基于后续应用研究结果，根据监测人群特征，对该模块进行功能拓展和优化，进一步降本增效，探索模块发展与完善的新思路。

1 资料与方法

1.1 模块优化设计思路

心律失常自动监测模块能够高效识别 HIS 数据，若住院患者电子病历（electronic medical record, EMR）中存在符合关键词集的记录，系统则会初步判定该患者可能发生了心律失常并发出报警信号。在利用该模块开展的应用研究中，我们将药源性心律失常阳性病例的纳入标准之一设定为用药患者住院期间至少接受 2 次心电图（electrocardiogram，ECG）检查，通过对比报警病例的 ECG 检查记录，研究者最终判定心律失常的发生与否。实际操作时，我们发现报警病例中存在大量只接受了 1 次 ECG 检查，因而无法进行对比评价的病例，需要人工甄别进行排除。基于上述自动监测人群特征，结合但不限于此类研究的需要，我们开发了具有普适性的“强制医嘱关键字”功能，旨在通过设置滤过条件，减少无关报警病例，进一步降低人工评价的工作量，更加高效获取目标病例，达到模块优化完善的目的。

1.2 模块功能开发拓展

在 ADE-ASAS-Ⅱ事件配置-自定义事件设置-排除标准-其他选项卡中，新增“强制医嘱关键字”功能，详见图 1。研究者可以通过该功能，自定义设置需要保留的医嘱关键字以及次数，从而在监测过程中排除不符合设置条件的病例。尽管系基于心律失常模块优化需要而开发，但该功能适用于依托 ADE-ASAS-Ⅱ构建的全部自动监测模块，满足回顾监测与实时监测模式需求，支持多个关键字以“或”的关系输入，同时允许模糊输入。

利用 2019 年 1 月 1 日-1 月 31 日某三甲医院（以下简称“某院”）使用盐酸帕洛诺司琼注射液（5 ml:0.25 mg）的 1874 例次住院病例数据，对该功能准确性和稳定性进行小样本验证实验，同时探索心律失常模块优化所需的医嘱关键字。由于 ECG 检查与医嘱信息存在对应关系，因此利用该功能进行合理设置，即可排除 ECG 检查次数不满足研究需要的无关病例。输入医嘱“心电图检查（多导）”，设定至少出现 2 次，结果显示优化前经评价得到的 10 例真阳性病例中仅有 7 例发出报警。查询某院 HIS 构建的医嘱信息库，将医嘱关键字扩展为所有与 ECG 检查相对应的 6 条医嘱，即“心电图检查（多导）”、“床旁心电图检查（多导）”、“动态心电图检查（含电极和心率变异）”、“心电监护+氧饱和度监测”、“持续心电、血压、呼吸、血氧饱和度监测”、“请心血管内科会诊（新版）”，至少出现次数仍设定为 2 次。经运行，报警病例为 29 例次，较优化前发出报警的 356 例次减少了 91.85%，且真阳性病例得到全部保留，同时功能运行稳定性满足监测要求。



图 1 ADE-ASAS-Ⅱ强制医嘱关键字功能

Fig 1 Compulsory medical order keyword function of ADE-ASAS-II

1.3 模块优化方法与评价指标

借助 ADE-ASAS-Ⅱ心律失常模块，我们前期已对某院 2019 年 1 月 1 日至 2019 年 12 月 31 日所有住院患者，以及 2017 年 1 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日使用盐酸帕洛诺司琼注射液（5 ml:0.25 mg）和盐酸格拉司琼注射液（3 ml:3 mg）的住院患者分别进行了全药[6]和单药（待发表）条件下的回顾性自动监测研究。在“强制医嘱关键字”功能中输入前述 6 条与 ECG 检查相对应的医嘱关键字，次数设定为至少出现 2 次，在不改变其他设置条件的情况下，对前期研究相同时段内相同目标研究人群再次进行回顾性自动监测，通过计算阳性预测值（positive predictive value, PPV），即报警病例中真阳性病例数所占的百分比，以及优化后相较优化前报警病例中真阳性病例保留的百分比，分析模块优化的程度和准确性。

1.4 数据收集

本研究收集的数据包括患者住院管理信息（ID、住院号、年龄、性别、入住科室）、病史信息（医嘱信息、病程记录、诊断记录、ECG 检查记录）、用药情况等。

1.5 数据处理

依据《国际疾病分类》第十一次修订本（ICD-11）和 MedDRA 26.0 的首选术语，分别对诊断记录和 ADR 名称进行归类与规范。使用 Excel 2021 和 SPSS Statistics 26.0 进行数据描述与统计分析。计数资料用频数和百分比描述。

2 结果

应用优化完善的心律失常自动监测模块，在全药条件下再次监测该院 2019 年 1 月 1 日至 2019 年 12 月 31

日全部 201 299 例住院患者。经数据清洗，研究同样纳入了 167 546 例次病例，其中 22 141 例次发出报警信号，较前期研究得到的 31 972 例次报警病例下降了 30.75%。同时，报警病例涵盖了前期经评价得到的全部 2 097 例次阳性病例，即 PPV 提高了 44.36%，而报警病例中真阳性病例全部保留。

再次监测 2017 年 1 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日 78 232 例次使用盐酸帕洛诺司琼注射液（5 ml:0.25 mg）和 72 508 例次盐酸格拉司琼注射液（3 ml:3 mg）的用药病例，分别得到报警病例 1 377 例次和 2 583 例次，较前期研究得到的 15 006 例次和 13 004 例次报警病例下降了 90.82%和 80.13%，前者 PPV 由 1.10%提高至 11.98%，后者由 1.37%提高至 6.89%，且前期经评价得到的真阳性病例全部包含于报警病例中。

上述测试结果详见表 1。

表 1 心律失常自动监测模块优化测试结果

Tab 1 Optimization test results of arrhythmia automated monitoring module

监测药品	监测病例数量（例次）	优化前/优化后报警病例数量（例次）	优化前/优化后阳性病例数量（例次）	优化前/优化后 PPV（%）	真阳性病例保留比例（%）
全部用药	167 546	31 972/22 141	2 097/2 097	6.56/9.47	100
帕洛诺司琼	78 232	15 006/1 377	165/165	1.10/11.98	100
格拉司琼	72 508	13 004/2 583	178/178	1.37/6.89	100

3 讨论

3.1 药源性心律失常自动监测的进展

药源性心律失常是药物临床试验和上市后安全性评价的重要指标[7]，包含多种类型，其中心电图 QT 间期延长（QT interval prolongation, QTIP）和尖端扭转型室性心动过速等 ADR 因可能造成血流动力学障碍，甚至威胁患者生命而备受关注[8]。目前，国内外相关研究多通过持续监测 ECG、评估 QTIP 量化指标、监测血药浓度或采用评分量表等方式获取数据[9-11]，研究结果为药源性心律失常的防治提供了科学依据，但存在数据采集耗时耗力，或 QTIP 判断标准不统一等问题[12]。为更加高效、灵活、全面挖掘 EMR 数据，便于开展大样本信息化药源性心律失常真实世界研究，我们团队王啸宇等前期对非结构文本数据的提取处理技术进行了研究[13]，通过设置含有 13 个关键词的报警规则监测罗沙替丁导致心律失常的情况[14]。之后，郭海丽等根据自发报告分析[15]及相关指南共识描述，将关键词扩展至 28 个，并利用小样本数据构建了心律失常自动监测模块，PPV 为 10.82%，阳性病例召回率（recall rate, R）达 99.18%，实际监测中 80.92%-82.07%的无关病例可其被自动筛除[6]，且用时较少、报警准确、运行稳定，为快速、精准、高效地获取目标病例相关信息提供了实用工具。

3.2 心律失常自动监测模块的优化完善

尽管该模块为后续应用研究节省了大量人力和时间成本，我们仍基于前述设计思路，通过开发系统功能的方式，持续对其效率和性能进行提升与改进，保证了团队研发成果的稳定性与延续性。研究结果表明，在全药条件下，优化后的模块相比优化前减少了 30.75%的无关报警病例；而在单药条件下，下降幅度可达 80.13%-90.82%，进一步显著降低了人工评估的工作量。在报警病例大幅降低、PPV 明显提升的情况下，报警病例中的真阳性病例全部得以保留，既说明设置保留的医嘱关键字及次数满足本研究要求，也表示模块优化达到了预期效果。需要说明的是，各项测试的报警病例下降程度与 PPV 提升程度不同可能与心律失常全药发生率以及不同品种单药发生率存在差异有关[16]，重复测试后本研究各项数据及监测用时保持稳定，深入验证有待于开展多品种、多中心研究以提供数据支持。另外，其他中心可根据自身 HIS 医嘱信息库和研究方法的异同，自定义设置强制医嘱关键字及次数，体现了优化方案的灵活性。未来，可以将智能提取、比对 EMR 中 ECG 各波形振幅和间期的测量数值，作为心律失常自动监测技术的发展优化方向。

3.3 探索自动监测模块的优化方式

经过团队多年努力，ADR 自动监测模块类型已由最初的量化模块、文本模块，发展为量化文本共模块。在实际研发过程中，我们在坚持开发针对更多 ADR 类型模块的基础上，以问题为导向，洞察个性化研究需求，持

续聚焦功能创新性改进与优化，推动现有模块向兼顾监测人群特征的复合模块类型方向发展。具体来讲，我们探索了拓展模块功能和采用决策树设置等优化方式，以提升模块的灵活性与适应性。本研究通过开发“强制医嘱关键字”功能，达到了根据检查记录进一步保留目标研究人群的优化目的。并且，由于医嘱关键字除 ECG 等检查医嘱外，还包括用药、检验、操作医嘱等，因此研究者也可根据人群特征需要，使用该功能从患者联合用药、治疗操作等方面确定最佳优化设置条件。而借助决策树预测模型的迭代监测模式[17]，前期开发的住院人群癫痫发作自动监测模块得以逐层挖掘目标人群数据，降低了开展监测的计算量[18]。另外，综合考虑计算效率和研究所依据的临床诊疗逻辑，赵安琪等通过合理设置决策树节点，将药物相关肌肉不良反应自动监测模块的 PPV 由 15.31%提升至 55.65%，同时 R 值保持为 100%，实现了对 48h 内接受过手术病例的精准排除。

本研究根据监测人群特征，对 ADE-ASAS-Ⅱ心律失常自动监测模块进行了功能开发与优化完善，探索了模块发展优化的新方式。优化后的该模块无关报警病例大幅下降，保留了优化前报警的全部真阳性病例，且运行稳定，为更加高效开展相关领域真实世界研究提供了技术支持。

参考文献

[1] 郭代红, 于承暄. 基于医院信息系统数据的临床用药风险自动监测评价专家共识 [J]. 中国药物应用与监测, 2021, 18(05): 277-87.

[2] 姚翀, 刘东杰, 郭代红, et al. 临床药物不良事件主动监测与智能评估警示系统Ⅱ的研发 [J]. 中国药物应用与监测, 2020, 17(06): 387-91.

[3] Chen C, Jia W, Guo D, et al. Development of a Computer-Assisted Adverse Drug Events Alarm and Assessment System for Hospital Inpatients in China [J]. Ther Innov Regul Sci, 2020, 54(1): 32-41.

[4] 郭代红, 朱曼, 徐元杰, et al. 信息化军队药物警戒系统的构建与应用 [J]. 解放军药学学报, 2023, 36(2): 95-9.

[5] 郭海丽, 郭代红, 高奥, et al. 基于 HIS 数据的药源性心律失常自动监测模块规则建立与验证 [J]. 中国药物应用与监测, 2022, 19(03): 176-81.

[6] Guo H, Li P, Guo D, et al. Analysis of clinical characteristics and automatic monitoring of drug-induced arrhythmias in 167,546 inpatients [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2023.

[7] Turner JR, Rodriguez I, Mantovani E, et al. Drug-induced Proarrhythmia and Torsade de Pointes: A Primer for Students and Practitioners of Medicine and Pharmacy [J]. J Clin Pharmacol, 2018, 58(8): 997-1012.

[8] Tisdale JE, Chung MK, Campbell KB, et al. Drug-Induced Arrhythmias: A Scientific Statement From the American Heart Association [J]. Circulation, 2020, 142(15): e214-e33.

[9] Weeke PE, Kellemann JS, Jespersen CB, et al. Long-term proarrhythmic pharmacotherapy among patients with congenital long QT syndrome and risk of arrhythmia and mortality [J]. Eur Heart J, 2019, 40(37): 3110-7.

[10] Chernoby K, Lucey MF, Hartner CL, et al. Impact of a clinical decision support tool targeting QT-prolonging medications [J]. Am J Health Syst Pharm, 2020, 77(Supplement_4): S111-s7.

[11] Tisdale JE, Jaynes HA, Kingery JR, et al. Development and validation of a risk score to predict QT interval prolongation in hospitalized patients [J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2013, 6(4): 479-87.

[12] Brygger L, Herrstedt J. 5-Hydroxytryptamine3 receptor antagonists and cardiac side effects [J]. Expert Opin Drug Saf, 2014, 13(10): 1407-22.

[13] 王啸宇, 郭代红, 陈超, et al. 基于电子医疗档案的 ADR 自动监测规范化操作流程 [J]. 中国药物应用与监测, 2016, 13(05): 302-5.

[14] 王啸宇. 基于文本信息的变态反应 ADE 主动监测关键技术研究及模块开发 [D]; 中国人民解放军医学院, 2017.

[15] 郭海丽, 郭代红, 刘思源, et al. 1439 例药源性心律失常自发报告分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2021, 30(03): 181-6.

[16] Barnes BJ, Hollands JM. Drug-induced arrhythmias [J]. Crit Care Med, 2010, 38(6 Suppl): S188-97.

[17] Mcsherry D. Strategic induction of decision trees [J]. Knowl Based Syst, 1999, 12(5-6): 269-75.

[18] 卢京川, 郭代红, 高奥, et al. 基于 HIS 数据的住院人群癫痫发作自动监测模块的建立与优化 [J]. 中国药物应用与监测, 2022, 19(04): 248-53.

Impact of clinical pharmacist intervention on proper inhaler use among Chinese chronic obstructive pulmonary disease patients

Sha-Sha Li[1*], Kun-Yu Huang[1], Xiu-Lan Deng[2], Xiao-Song Wu[1], Qing Zhang[3],Min- Juan Lin[2], Ming-Hao Chen[1], Yi Wu[2], Sheng-Ming Liu[2*].

[1] Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, 510632, PR China.

[2] Pulmonary and Critical Care Medicine (PCCM), the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, 510632, PR China.

[3] School of Pharmacy, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510515, PR China.

【**Abstract**】Background Improper use of inhalers is very common and leads to poor control of COPD. Among health care providers, clinical pharmacists play a very important role in the management of COPD. Objective The purpose of this study is to assess the impact of clinical pharmacists on the management of Chinese patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Patients and Methods The subject population in the pre- and post-intervention study included 98 COPD patients aged 18 years or older who were hospitalized during the pre-determined 6-month period. The inhalation techniques were assessed by a standardized checklist for the proper use of metered-dose inhalers and dry powder inhalers. The Morinsky Green test (MGT) was used to assess patients' medication adherence. The CAT was used to assess the symptom scale and the mMRC was used to assess dyspnea. Follow-up interviews were conducted one month, three months, and six months after the first interview. Results Before the intervention, a high rate of errors was observed. The intervention improved the average scores of patients' operation of inhalation devices (T0=8.62, T3=8.85, T6=4.38; $P < 0.001$). The CAT score decreased significantly with the intervention of the clinical pharmacist (T0=17.16, T3=15.07, T6=15.18; $P<0.05$). Although the mMRC score decreased after the intervention, the difference was not statistically significant (T0=2.35, T3=2.25, T6=2.32; $P>0.05$). After the intervention, the patients' medication adherence improved, with a significant difference. (T0=2.96, T3=3.40, T6=3.46; $P<0.05$). Conclusions Clinical pharmacist-led interventions can improve the inhalation techniques and medication adherence of the hospitalized patients.

【**Key Words**】COPD; inhalers; clinical pharmacist; medication adherence;

Abbreviations

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; MDI, metered-dose inhaler; DPI, dry powder inhalers; SMI, soft mist inhalers; MGT, Morinsky Green test; CAT, COPD Assessment Test; mMRC, modified Medical Research Council;

Impacts on practice

Clinical pharmacist intervention can significantly improve the inhalation technique, medication adherence and clinical symptoms of Chinese patients with COPD.

It is recommended that pharmaceutical care for COPD management should be improved in the future.

* Address for Correspondence:

1. Sha-Sha Li, Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, 510632, PR China. Email: s19861020@jnu.edu.cn

2. Sheng-Ming Liu, Pulmonary and Critical Care Medicine (PCCM), the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, 510632, PR China. Email: tlsm@jnu.edu.cn

Introduction

COPD is one of the leading causes of chronic disability and death globally and has become one of the three most common causes of death in the world[1], with an increasing rate of 18.0% from 1990 to 2017[2]. By 2060, more than 5.4 million people may die each year from COPD and COPD-related complications[3]. In addition, according to the study of the World Bank/WHO, COPD has become the fifth economic burden of diseases in the world, bringing a huge economic burden to patients, families, and society. The average hospitalization cost can reach ¥11,598 per patient, accounting for 33-40% of the average household income in China，reported in 2008[4].

Inhalation preparation is the first line of basic treatment of COPD. Improper inhalation operation will reduce the effective dose of the drug, thereby leading to poor disease control, causing acute exacerbation of the disease, and reducing the quality of life of the patient[5,6]. In addition, the improper use of inhalation devices can increase patients' additional medical costs and risk of death[7]. However, the improper use of inhalation devices in COPD patients is common[8]. According to previous studies, more than 50% of patients failed to use their inhaler devices correctly[9].

In recent years, more studies have been performed in other countries. Doctors, nurses, and pharmacists are all involved in the education of inhaled preparations, in which pharmacists play an important role in the education and management of inhaled preparation. The involvement of community pharmacists in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) management improves inhalation techniques and medication adherence in patients with COPD[10,11]. Clinical pharmacists with systematic pharmaceutical knowledge are a new force in the medical team in China. Clinical pharmacists role in COPD treatment includes giving educations on diseases and medication, implementation of pharmaceutical care in the treatment process, providing interventions, improving patients' medication adherence, examining medical orders and so on. Pharmaceutical care aims to provide knowledge about the disease in COPD and improve drug therapy compliance on COPD patients to ensure the safe and effective for treating patients.

Aim of the study

The aim of this study is to assess the impact of clinical pharmacists on the management of patients with COPD in China.

Study design

This is a prospective study and has obtained approval from the Institutional Review Board (IRB) at the First Affiliated Hospital of Jinan University (number KY-2021-086). All eligible patients must provide a consent form before the study.

Patients and Methods

Study participants

COPD patients who were hospitalized in Pulmonary and Critical Care Medicine (PCCM) at the First Affiliated Hospital of Jinan University, a teaching hospital in Guangzhou, from December 2019 to December 2020 were selected. The inclusion criteria for the patients in this study are listed as follows: The patients should be diagnosed with COPD by a physician according to Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines, and treated with at least one inhaler medication. The patients were excluded from the study if they had severe visual, hearing, and communication problems, were mentally incompetent, were at the advanced stage of a serious illness (e.g., cancer), or refused to provide written informed consent. In addition, we could not include in the study those patients who could not be contacted at 3, and 6 months after the first intervention. All eligible patients must provide a consent form before the study.

Interventions

In this study, the clinical pharmacist adopts a "one-to-one" method to educate the patient at the bedside. In the educational session provided by the clinical pharmacist, first, the patient demonstrates the learned inhalation techniques on the placebo inhaler, and then the pharmacist points out and corrects any mistakes made by the patient and explains the importance of the missed steps. Then, the pharmacist shows the patient each step of using the placebo inhaler, and at the same time distributes the inhalation preparation instructions and instructional videos to the patient until they are able to demonstrate all the steps correctly. In addition, the pharmacist evaluates whether each patient's current inhalation device is suitable. If not, based on each doctor's situation, a more suitable inhalation device will be selected for the patient and individualized treatment will be provided to the patient. During the interventions, clinical pharmacists provided educations on diseases and medication, implemented pharmaceutical care in the treatment process to improving patients' medication adherence.

Follow up

Two follow-up telephone calls about patients' mMRC, CAT and MGT was conducted at 3-month and 6-month after the first intervention.

Statistical analysis

SPSS (Version 22.0) statistical software was used to process and analyze the data. Descriptive statistics were used to analyze the patient's social activities, demographic information, and disease-related characteristics. Quantitative data were expressed as mean ± standard deviation ($\chi \pm S$), while qualitative data were expressed as the number of cases (percentage) [n (%)]. In the case that difference between two related samples was normally distributed, the paired t-test was used in the analysis; otherwise, Wilcoxon signed rank test was used in the analysis. $P<0.05$ was used to indicate a statistical difference. GraphPad Prism8.0 was used for mapping.

Outcome measures

Baseline assessment

During the pharmacist's counseling, a custom-designed and validated record form was used to collect the baseline of each patient, including demographic measures, disease characteristics, and respiratory medications.

Evaluation of patients' operation of inhalation devices

The evaluation of patients' operation of inhalation devices was self-designed with reference to the literature. A literature search was conducted to develop specific checklists and to identify key steps for each inhalation device according to A Duarte-de-Araújo[8]. A key step can have a significant impact on dose delivery if not done properly. In the absence of references, a checklist for similar inhalation devices was adapted from a critical review of the manufacturers' product information sheet. When patients used the inhalation device correctly at each step, they can obtain a maximum score of 10. The score of patients' operation of inhalation devices was assessed before and after education, as well as before the discharge.

Dyspnea assessment

The modified Medical Research Council dyspnea score (mMRC) was used to assess dyspnea. The scale of mMRC is 0 to 4, where 0 means no trouble breathing except for strenuous exercise, and 4 means trouble breathing to the point of being unable to leave the house or trouble breathing while dressing or undressing.

Clinical symptoms assessment

The COPD Assessment Test (CAT) consisting of 8 unit dimension measures of health status impairment was used to assess the clinical symptoms of the patients with COPD. Patients were evaluated from the following aspects: cough, sputum, chest tightness, climbing hills or stairs, limited activity at home, confidence in going out, sleep, and mental state. The score for each item is in a scale of 0 to 5, and the overall score ranges from 0 to 40. The grade was determined by the score.

Medication adherence

The Morinsky Green test (MGT) was used to assess patients' medication adherence at the first visit. The four-item MGT includes the following questions: "Do you ever forget to take your inhaled medication? Are you careless at times about taking your inhaled medication? When you feel better, do you sometimes stop taking your inhaled medication? Sometimes, if you feel worse when you take the inhaled medication, do you stop taking it? Each question is rated 0 for 'yes' and 1 for 'no'. The range of the total score is 0 to 4 , where 4 means 'adherence', 0-3 means 'non-adherence'.

Statistics

SPSS (Version 22.0) statistical software was used to process and analyze the data. Descriptive statistics were used to analyze the patient's social activities, demographic information, and disease-related characteristics. Quantitative data were expressed as mean ± standard deviation (mean ± SD), while qualitative data were expressed as the number of cases (percentage) [n (%)]. In the case that difference between two related samples was normally distributed, the paired t-test was used in the analysis; otherwise, Wilcoxon signed rank test was used in the analysis. $p<0.05$ was used to indicate a statistical difference. GraphPad Prism8.3 was used for mapping.

Results

Baseline assessment

A total of 621 hospitalized COPD patients were initially enrolled into the study, as shown in Table 1. Eventually, 98 patients completed the data collection, and only 78 patients completed the 6-month follow-up. The mean age of the patients was 71.7±9.8 years, and 88.8% of the patients were males. Most of the patients had been diagnosed with COPD for ＞1 year. Approximately 89.8% of patients have medical insurance. About 22.4% of patients is still smoking currently, as shown in Table 1.

Table 1 Sociodemographic and disease-related characteristics of patients enrolled in the study

Characteristics		Total（N=98）
Age (Mean±SD, years)		71.7 ± 9.8
Gender, n（%）	Male	87（88.78%）
	Female	11（11.22%）
BMI (kg/m^2) （Mean±SD）		20.6 ± 3.7
Years suffering from COPD, n(%)	First diagnosed	17（17.35%）
	≤1 year	13（13.27%）
	1-5 years	28（28.57%）
	5-10 years	34（34.69%）
	＞10 years	6（6.12%）
Complication, n（%）	Yes, more than one complication	60（61.22%）
	One complication at most	37（37.76%）

Education level, n（%）	No formal education	10（10.20%）
	Primary education	38（38.78%）
	Secondary education	28（28.57%）
	Technical secondary school education	4（4.08%）
	College degree or above	18（18.37%）
Daily care（N,%）	self	67（68.37%）
	others	31（31.63%）
Medical insurance（N,%）	Yes	88（89.79%）
	No	10（10.20%）
Normal terminology for smokers（N,%）	Current	22（22.45%）
	Ever smoker	55（56.12%）
	Never	21（21.43%）
Number of exacerbations last year（N,%）	≤1	63（64.29%）
	＞1	35（35.71%）
GOLD group（N,%）	A	6（6.12%）
	B	30（30.61%）
	C	4（4.08%）
	D	58（59.18%）
mMRC score （N,%）	0-1	23（23.47%）
	＞2	75（76.53%）
CAT score （N,%）	＜10	14（14.29%）
	≥10	84（85.71%）
MGT score（N,%）	0-3	35（43.21%）
	4	46（56.79%）

Patients were assessed for dyspnea after admission, and more than 50% of the patients were grades 2-3. The patients' clinical symptoms were assessed using a CAT scale, and the results showed that about 80% of patients scored above 10, and about 60% of patients in the GOLD D group scored above 10. The compliance assessment showed that only 59.1% of patients had good compliance, and 40.9% of patients had medication compliance problems, as shown in Table 1.

Use of the long-acting inhaled drug in study subjects

The results of the study showed that about 43.88% of patients chose LABA + ICS combination therapy, 20.41% of patients received triple-drug therapy, 27.55% of patients received a single bronchodilator, and only 8.16% of patients received dual bronchodilator therapy, as shown in Figure 1. Furthermore, long-acting inhaled drug use in GOLD staging (A, B, C, D) of COPD were shown in Table 2.

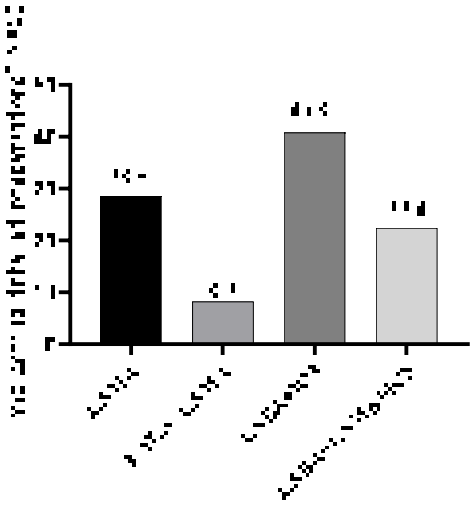


Figure 1 Use of the long-acting inhaled drug in study subjects

Table 2 Long-acting inhaled drug use in GOLD staging (A, B, C, D) of COPD

	LAMA	ICS+LABA	ICS+LAMA+LABA	LAMA+LABA
GOLD A（6，6.12%）	1	3	0	2
GOLD B（30，30.61%）	12	14	4	0
GOLD C（4，4.08%）	1	3	0	0
GOLD D（58，59.18%）	13	23	16	6
Total	27（27.55%）	43（43.88%）	20（20.41%）	8（8.16%）

Types of inhalation devices used by study subjects

The results showed that 64.3% of patients used dry powder inhalers (DPI), and only 20.4% of patients used soft mist inhaler (SMI), as shown in Figure 2a. In DPI, the majority of patients used the Turbuhaler® device (43.9%), followed by the Handihaler® (19.4%) and the Diskus® (17.3%), and only 7.1% of the patients received the Ellipta® therapy, as shown in Figure 2b.

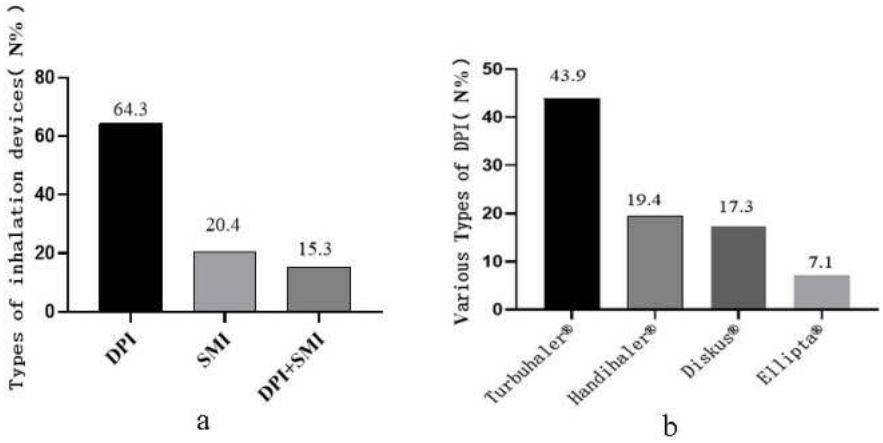


Figure2 Types of inhalation devices used by study subjects. (a) Types of inhalation devices used by study subjects. (b) Usage of various types of DPI in study subjects. DPI: dry powder inhaler; SMI: soft mist inhaler.

Operation problems of inhalation devices for the patients hospitalized with COPD

A total of 121 inhalation devices were evaluated, and Table 3 shows the problems found during the patients' operation of inhalation devices. The most common operation errors of all inhalation devices were not exhaling before inhalation (n=81), not holding the breath after inhalation, or not holding the breath for long enough (n=54). In DPI, other operation errors were found in Turbuhaler® and Diskus®, including medication errors, insufficient inspiratory power, and failure to rinse mouth after the medication, while no other operation errors were found in Handihaler® and Ellipta®. Operation problems such as the accidental release of drugs, activation before inhalation, and rapid inhalation were also found in SMI.

Table 3 Frequent operation problems of inhalation devices

Inhalation device	Frequent operation problems
Common operation error	Not exhaling before inhalation (n=81,82.65%)
	Not fully contained or inhaled through the mouthpiece (n=8,8.16%)
	Not holding breath or holding breath for an insufficient time after inhalation (n=54,55.12%)
DPI (n=86,87.76%)	
Turbuhaler® (n=43,43.88%)	No vertical application (n=9,9.18%)
	Not reversely rotated the base when applying the medicine (n=4,4.08%)
	Insufficient strength when inhaling (n=11,11.22%)
	Not rinsing after taking medicine (n=12,12.24%)
	Rotate the base again after use (n=3,3.06%)
Diskus® (n=19,19.39%)	The slider can not push all the way out (n=2,2.04%)
	Push the slider back and forth (n=1,1.02%)
	Insufficient strength when inhaling (n=7,7.14%)
	No rinsing after taking medicine (n=3,3.06%)
Handihaler® (n=17，17.35%)	None
Ellipta® (n=7, 7.14%)	None
SMI (n=35，35.71%)	Open the green dust cap before applying the medicine to release the medicine accidentally (n=12,12.24%)
	Not enough strength to rotate the base (n=1,1.02%)
	Inconsistent activation and compression: activation precedes inhalation (n=13,13.27%)
	Inhaling too fast (n=13,13.27%)

Improvement in the average score of patients' operation of inhalation devices

The average scores of patients' operation of inhalation devices at three assessment time points were evaluated with DPI and SMI. The average scores were 4.38, 8.62, and 8.85 at T0 (baseline), T1 (after 1 month), T2 (after 3 months), respectively, as shown in Table 4. Overall, there was a significant difference in the scores of patients' operation of inhalation devices after the intervention ($p<0.001$).

Table 4 Comparison of average scores of patients' operation of inhalation devices before and after the intervention

Assessment time points	T0	T1	T2
Operation score of the inhalation device	4.38 ± 3.73	8.62 ± 1.48	8.85 ± 1.29
t	-	13.48	12.33
p	-	＜0.001	＜0.001

T0: Before and after the intervention, T1: After the intervention, T2: Reassessment at discharge

Comparison of correct operation rate of key steps of inhalation devices before and after the intervention

The results of the study showed that after education, most patients were able to use the inhalation device correctly. For SMI (Figure 3-1), very few patients were able to correctly complete the key steps before education. However, after education, the proportion of patients who took the medicine correctly increased from 25.7% to 80% and even reached 91.4%. The proportion of patients exhaling fully before inhalation increased from 8.6% to 54.3%, and the highest proportion was 57.1%. About 80% of patients inhaled slowly and deeply, and over 80% of patients held their breath for 5-10 s. For DPI (Figure 3-2), Ellipta® had the highest proportion of correct drug application, followed by Handihaler® and Diskus®, and Turbuhaler® had the lowest proportion of correct drug application (37.2%). After education, most patients were able to inhale the drug correctly, hold their breath for 5-10 s, and rinse their mouth after inhalation, but the proportion of patients who can fully exhale before inhalation remained small.

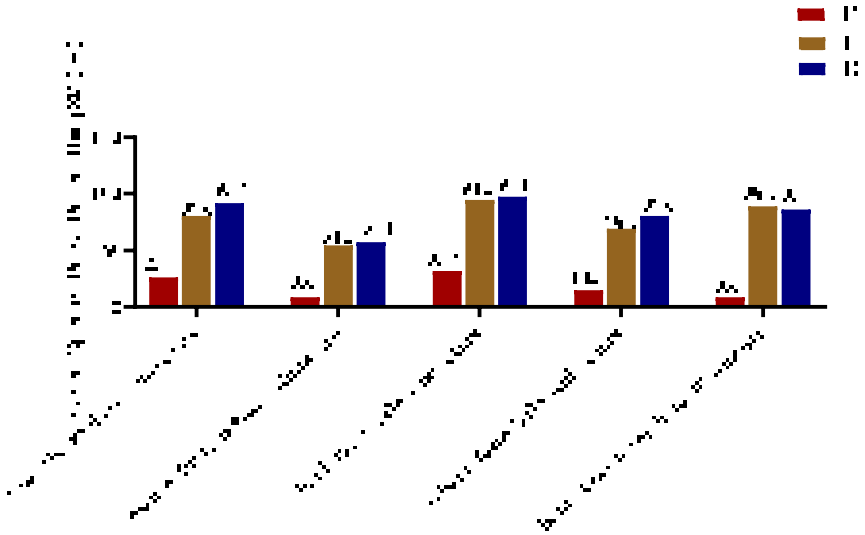
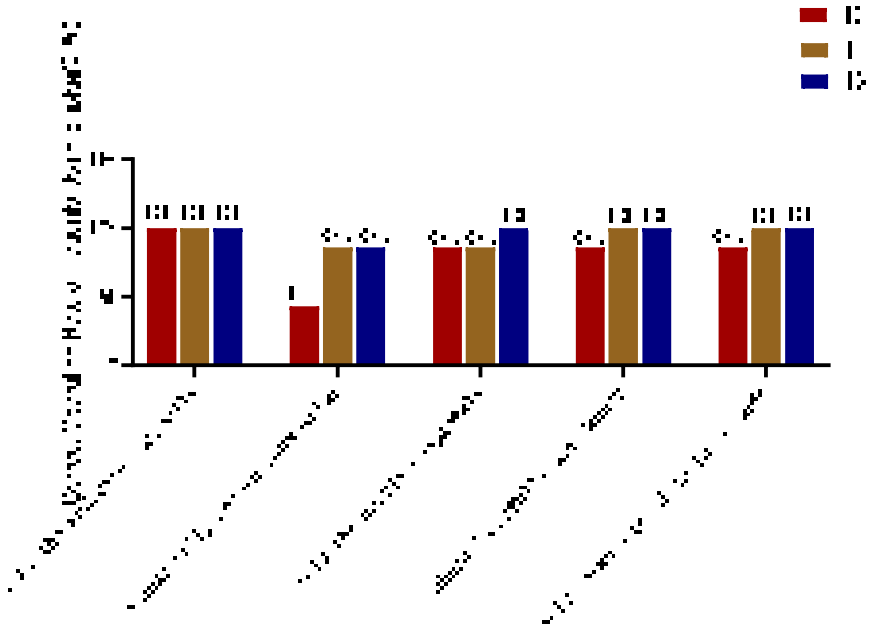
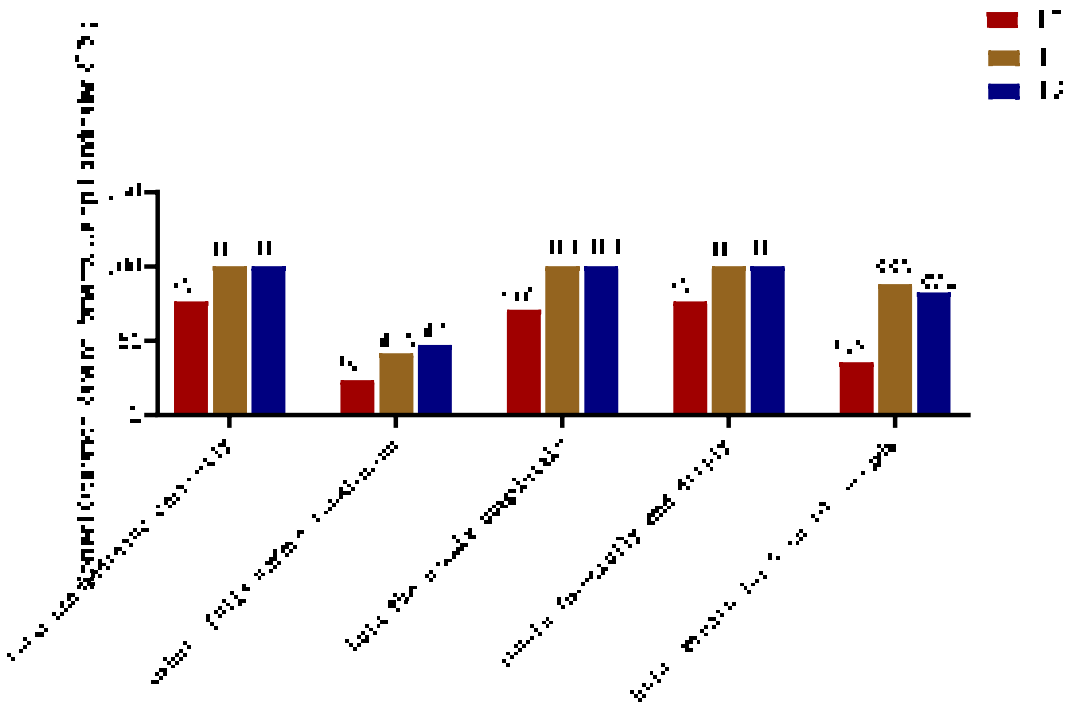


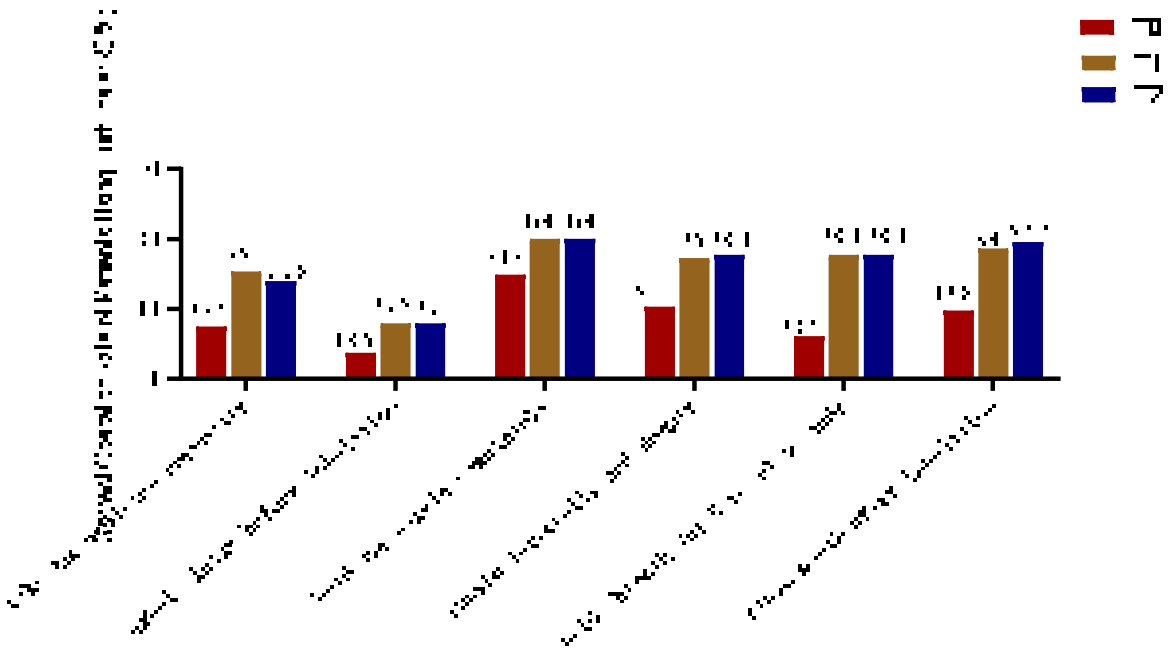
Figure 3-1 Comparison of correct operation rate of SMI in patients before and after the intervention. T0:Pre-intervention assessment; T1:Post-intervention assessment;T2: Assessment at discharge.



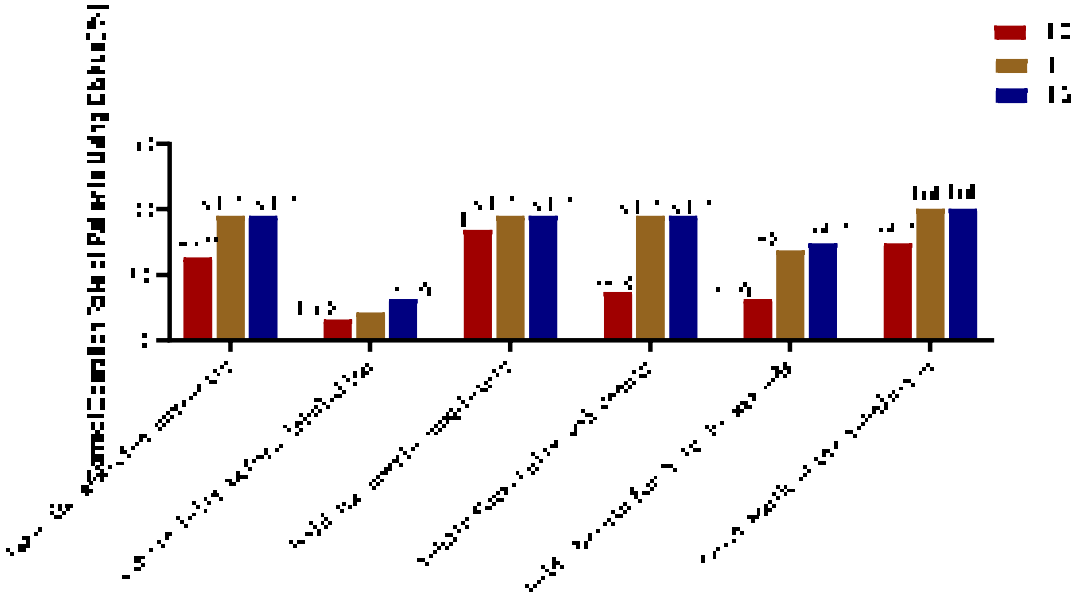
a



b



c



d

Figure 3-2 Comparison of correct operation rate of DPI in patients before and after the intervention. T0: Pre-intervention assessment; T1: Post-intervention assessment; T2: Assessment at discharge. (a) Comparison of the correct operation rate of Ellipta® before and after the intervention; (b) Comparison of the correct operation rate of operation of Handihaler® before and after the intervention; (c) Comparison of the correct operation rate of Turbuhaler® before and after the intervention; (d) Comparison of the correct operation rate of Diskus® before and after the intervention.

Improvement of COPD management of hospitalized patients

Before the intervention, the average score on the CAT scale was 17.16, and after 3 and 6 months, the average score dropped to 15.07 and 15.18 (P=0.001; P=0.003), respectively. The mMRC scale was used to assess the degree of dyspnea in patients, and the results are shown in Figure 4a. From Figure 4a, the average score before and after the intervention fluctuates slightly, from 2.35 before the intervention to 2.25 and 2.32 at 3 months and 6 months after the discharge, respectively. However, the difference was not statistically significant. Figure 4c shows the results of patients' medication compliance. The average score of MGT increased from 2.96 at T0 to 3.40 and 3.46 at T3 and T6 after the discharge, respectively, which had an statistically significant.

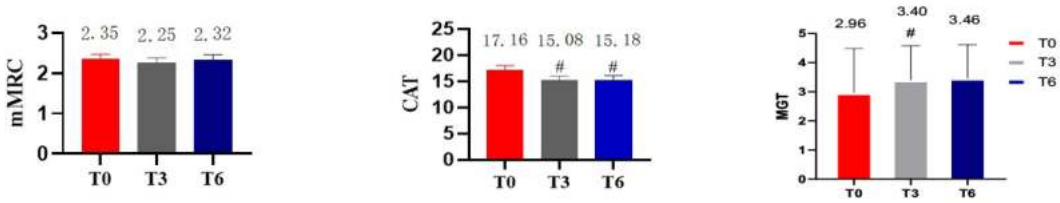


Figure 4 Comparison of scores before and after the intervention. T0: Pre-intervention assessment; T3: 3 months after the discharge; T6: 6 months after the discharge; (a) Comparison of mean mMRC scores before and after the intervention; (b) Comparison of mean CAT scores before and after the intervention; (c) Comparison of mean MGT scores before and after the intervention. All data are expressed as Mean±SD, #p＜0.05.

Analysis of factors associated with patients' medication compliance

Multivariate logistic regression analysis indicated that the education level and comorbidities were significantly correlated with patients' medication compliance. The details are summarized in Table 5.

Table 5 Analysis of factors related to patients' medication compliance before the intervention（n=81）

	Poor compliance (n)	Good compliance (n)	*p*
Age (year)			*0.140*
＜75	24（29.63%）	24（29.63%）	
≥75	11（13.58%）	22（27.16%）	
Years suffering from COPD			*0.926*
≤1	5（6.17%）	8（9.88%）	
1-5 years	13（16.05%）	15（18.52%）	
5-10 years	15（18.52%）	19（23.46%）	
＞10 years	2（2.47%）	4（4.94%）	
Complication			*0.045*
≤1	2（2.47%）	10（12.35%）	
＞1	33（40.74%）	36（44.44%）	
Education level			*0.006*
Low (Primary school or below)	22（27.16%）	15（18.52%）	
High (Junior high school and above)	13（16.05%）	31（38.27%）	
Number of exacerbations in the past year			*0.111*
≤1	23（28.40%）	22（24.69%）	
＞1	12（14.81%）	24（29.63%）	
CAT scores			*0.532*
＜10	3（3.70%）	6（7.41%）	
≥10	32（39.51%）	40（49.38%）	
GOLD group			0.289
GALD A	0	2（2.47%）	
GOLD B	10（12.35%）	7（8.64%）	
GOLD C	1（1.23%）	3（3.70%）	
GOLD D	24（29.63%）	34（41.98%）	

Discussion

In China, patients with COPD have insufficient awareness of the disease, the rate of drug therapy is low, especially inhaled drug therapy, and the drug compliance is poor[12]. Previously studies showed that many physicians often simply prescribe inhaler therapy, and in China，physicians and nurses were too busy to give patients sufficient education about the inhaler technique. Clinical pharmacists with systematic pharmaceutical knowledge, and their care aims to provide knowledge about the disease in COPD and improve drug therapy compliance on COPD patients to ensure the safe and effective for treating patients[13]. Therefore, in this study, clinical pharmacists were involved in the management of inhaled medications for COPD patients, and the impact of inhaled medications on patients before and after clinical pharmacists' management

was evaluated by accuracy, medication compliance, clinical symptoms and drug compliance. The results indicated that the inhalation technique and patient's clinical symptoms were significantly improved after pharmaceutical care.

Inhaled medications is the cornerstone in the treatment of for COPD[14]. Among the 98 patients included in this study, more than 60% of them used DPI. This may be related to the clinical symptoms of our included patients. SMI is mainly used for patients with low inspiratory flow rates. The proportion of patients in the GOLD D group (59.2%) included in the study was relatively large (59.2%), and the patients had obvious clinical symptoms and a history of moderate to severe exacerbation within a year. In addition, due to the high cost of SMI, the proportion of SMI use was reduced.

The correct inhalation of drugs is the basis to ensure the therapy efficacy for patients. Incorrect inhalation can lead to poor treatment effects and poor disease control[15]. This study showed that before the intervention, more than 80% of patients did not operate inhaled SMI or DPI properly, which was consistent with the results in other published literature[16]. In all the studied inhalation devices, common mistakes included insufficient exhalation before inhalation, inability to force fast or deep and slow inhalation, and failure to hold the breath for 5-10 s after inhalation. One of the most common mistakes is not fully exhaling before inhalation. However, this step is a critical one. This is because if there is not enough exhalation before inhalation, the patient may not be able to inhale strongly and deeply through the device to ensure that the drug enters the lungs[17]. Secondly, the results of this study showed that not holding the breath after inhalation is also the most common error. Similarly, a study by Lavorini et al.[17] also showed that failure to hold the breath after inhalation is the second most common error in DPI. Typically, patients holding their breath for 5-10 s after inhaling can help the drug settle in the small airways and reduce the loss of the drug.

There are many types of devices for DPI. Currently, the commonly used devices include Turbuhaler®, Ellipta®, Diskus®, and Handihaler. This study found that Turbuhaler® had the lowest rate of correct drug application (37.2%), and literature studies have shown that common application errors when using the Turbuhaler® device include the inability to fully rotate the base in both directions and the inability to keep the device upright before applying the drug[7,18]. In addition, the study found that 51.2% and 36.8% of patients using Turbuhaler® and Diskus® devices, respectively, failed to inhale quickly and forcibly. However, in order to dissociate the drug powder in DPI into more fine particles, not only the internal resistance of the device but also the turbulence generated by the patient's active inspiratory is required. Therefore, DPI has high requirements on the patient's inspiratory flow rate. In general, Turbuhaler® and Ellipta® have the best suction flow rate of 60L/min, Diskus® receiver is greater than 60L/min, and Handihaler® only requires 30L/min. Therefore, only patients with large inspiratory volume and fast speed can improve the drug output of DPI, thereby improving the efficacy.

At the same time, we found that compared with the pre-intervention, after the intervention of the clinical pharmacist, the steps of correctly applying the medicine and completely covering the mouthpiece were significantly improved, more patients (at least 80% of the patients) achieved rapid and forceful inhalation of the medicine, and the inhalation techniques of the patients were significantly improved. However, many patients still did not fully exhale before inhalation. On the one hand, it may be related to the fact that the patients do not pay attention to this step and consider it irrelevant for the effectiveness of the medication. On the other hand, as patients have been using medications for a long time, they have formed deep-rooted ideas that are difficult to correct in a short period. Therefore, in the future, clinical pharmacists need to repeatedly guide and use easy-to-understand methods to inform patients of the importance of this step.

For SMI, this study showed that the rate of correct medication administration was only 25.7%. This finding is similar to the conclusion obtained by Zhang et al.[19]. Since SMI is an inhalant that actively releases aerosols, a large number of drug

particles will be deposited in the throat and tracheal branches if the inhalation speed is too fast. Therefore, SMI requires patients to take deep breaths and then inhale the drug slowly and deeply to improve the lung deposition of the drug in the lungs. However, we found that only 14.8% of patients achieved slow and deep inhalation initially, and after clinical pharmacist intervention, about 80% of patients achieved slow and deep inhalation. In addition, after the clinical pharmacist's education, the rate of correct operation of other steps, including correct medicine administration, full exhalation before inhalation, full cover of the mouthpiece, and breath-holding after inhalation, have also been significantly improved.

Although many studies have shown that education can improve patients' inhalation techniques[14,20], it is difficult for COPD patients to adhere to correct operation of the device over time because they are mostly elderly and have poor memory. There are no guidelines on how often to repeat the education, and studies have shown that three months is the optimal interval for re-education[11]. In addition, it has been indicated that education every two or four weeks can help maintain proper inhalation techniques[21]. In this study, we conducted a 6-month follow up, the short duration of follow-up (6 month) had conform the positive impact of inhaler training on adherence, however the positive impact of inhaler education on mMRC and GOLD stage may be need a longer period of observation.

Due to the limitation of telephone follow-up, we did not assess inhaler technique over time in this study. Therefore, clinical pharmacists still need to explore new educational models to improve patients' operation of inhalation devices and ensure that patients follow the correct steps in a long term. The effective improvement of inhalation techniques can control patients' symptoms of patients and improve their quality of life[22]. In this study, the CAT score and mMRC score were used to evaluate patients' clinical symptoms and dyspnea after medication education by clinical pharmacists. The results showed that after the intervention, the CAT score of patients decreased compared to pre-intervention, while the mMRC score decreased, but the decrease was not significant. Therefore, medication education to COPD patients by clinical pharmacists can improve their clinical symptoms. At the same time, in the 3-month follow-up, the patients' clinical symptoms were improved than before the intervention; while in the 6-month follow-up, the clinical symptoms began to worse, but there was no significant difference. Furthermore, five patients changed their Gold staging after discharge, four of these patients changed their stage from GOLD D to GOLD C, and one patient changed his stage from Group B to Group A.

Patients with COPD often have low adherence with inhaled medications, which can lead to poor disease control, increased hospitalization, and increased mortality rates[23]. Literature studies have shown that drug adherence is related to many factors including the patient's age, education level, correct use and selection of inhalation devices, knowledge of diseases, and complications[1,24,25]. This study assessed patients' compliance with inhalation formulations, and only 59.1% of patients had high compliance before the intervention. After the intervention of clinical pharmacists, the compliance score of patients was improved, which was consistent with the conclusions from other studies[26,27].

In view of these results, we analyzed the related factors affecting the compliance of inhaled medications in COPD patients. The results showed that the patients' compliance was related to their education level regardless of the clinical pharmacist intervention. Patients with high education levels had good compliance, otherwise, the compliance was poor. The patients in this study had a low level of education (49%), and the differences in education levels were not stratified during the intervention. As a result, patients with a low level of education failed to understand or accept the intervention. This may be one of the reasons for the lack of significant improvement in patients' compliance after the intervention by clinical pharmacists in this study. In addition, the severity of COPD increases with age, patient's condition aggravation with smoking and the appropriateness of an inhaler drug, so the medication is not as effective, causing patients to lose

confidence in inhalation preparations. In this study, about 59% of patients were in the GOLD D group according to the GOLD guidelines, indicating that patients had severe clinical symptoms, high risk of acute exacerbation, recurrent attacks of acute exacerbation, and low confidence in inhalation preparation. There was no significant improvement in the compliance. Therefore, in the future, there is a need to explore educational methods for the patients with low education levels and poor compliance.

Our study had some limitations. First, the patients included in this study was single-center study with small samples. Second, diagnosis of COPD was lack of pulmonary function test when they included in our study, it was diagnosed by a physician according to Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines.

Conclusion

Our study found that clinical pharmacist intervention can significantly improve the inhalation technique, drug safety, and patient's clinical symptoms. However, the clinical pharmacist intervention did not improve patients' medication adherence, which was influenced by patients' education level, age, and the severity of COPD. Therefore, it is recommended that pharmaceutical care for COPD management should be improved in the future.

Author contributions

Kun-Yu Huang and Xiu-Lan Deng conducted the experiments and contributed equally to this paper. Ming-Hao Chen analyzed the data. Min-Juan Lin and Yi Wu identified the study participants. Sha-Sha Li was mainly responsible for writing the manuscript. Xiao-Song Wu, Qing Zhang, and Sheng-Ming Liu designed the experiments. All authors participated in the manuscript editing and approved the final version.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

We thank the COPD patients for their participation. The authors would like to thank the reviewers and also the authors of the references. The reviewer's comments have improved this paper considerably. This work was supported by the Guangdong Provincial Hospital Association Pharmaceutical Research Special Fund (No.2021YSQN03) and the Guangdong Pharmaceutical Society Hospital Pharmacy Research Fund (2019A10).

References

1. Halpin D, Celli BR, Criner GJ, et al. The GOLD Summit on chronic obstructive pulmonary disease in low- and middle-income countries. Int J Tuberc Lung Dis. 2019. 23(11): 1131-1141.
2. Li X, Cao X, Guo M, Xie M, Liu X. Trends and risk factors of mortality and disability adjusted life years for chronic respiratory diseases from 1990 to 2017: systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. BMJ. 2020. 368: m234.
3. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. Eur Respir J. 2006. 27(2): 397-412.
4. Chen YH, Yao WZ, Cai BQ, et al. Economic analysis in admitted patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. Chin Med J (Engl). 2008. 121(7): 587-91.
5. Bystrak T, Eisenhower C. Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Older Adults: Part II: Considerations for Inhaler Selection. J Gerontol Nurs. 2018. 44(10): 10-15.
6. Padmanabhan M, Tamilarasu K, Rajaram M, Batmanabane G. Inadequate inhaler technique, an everlasting problem, is

associated with poor disease control - A cross sectional study. Adv Respir Med. 2019. 87(4): 217-225.
7. Molimard M, Raherison C, Lignot S, Depont F, Abouelfath A, Moore N. Assessment of handling of inhaler devices in real life: an observational study in 3811 patients in primary care. J Aerosol Med. 2003. 16(3): 249-54.
8. Duarte-de-Araújo A, Teixeira P, Hespanhol V, Correia-de-Sousa J. COPD: misuse of inhaler devices in clinical practice. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2019. 14: 1209-1217.
9. Apikoglu-Rabus S, Yesilyaprak G, Izzettin FV. Drug-related problems and pharmacist interventions in a cohort of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Respir Med. 2016;120:109-115.
10. Hesso I, Gebara SN, Kayyali R. Impact of community pharmacists in COPD management: Inhalation technique and medication adherence. Respir Med. 2016. 118: 22-30.
11. Nguyen TS,Nguyen TLH,Van Pham TT, et al.Pharmacists' training to improve inhaler technique of patients with COPD in Vietnam[J].Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2018,13:1863-1872.
12. Bourbeau J, Bartlett SJ. Patient adherence in COPD. Thorax. 2008. 63(9): 831-8.
13. Plaza V, Giner J, Rodrigo GJ, Dolovich MB, Sanchis J. Errors in the Use of Inhalers by Health Care Professionals: A Systematic Review. J Allergy Clin Immunol Pract. 2018;6(3):987-995.
14. Wang W, Xu T, Qin Q, Miao L, Bao J, Chen R. Effect of a Multidimensional Pharmaceutical Care Intervention on Inhalation Technique in Patients with Asthma and COPD. Can Respir J. 2020. 2020: 8572636.
15. Melani AS, Bonavia M, Cilenti V, et al. Inhaler mishandling remains common in real life and is associated with reduced disease control. Respir Med. 2011. 105(6): 930-8.
16. Price D, Keininger DL, Viswanad B, Gasser M, Walda S, Gutzwiller FS. Factors associated with appropriate inhaler use in patients with COPD - lessons from the REAL survey. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2018. 13: 695-702.
17. Lavorini F, Magnan A, Dubus JC, et al. Effect of incorrect use of dry powder inhalers on management of patients with asthma and COPD. Respir Med. 2008. 102(4): 593-604.
18. Hesselink AE, Penninx BW, Wijnhoven HA, Kriegsman DM, van Eijk JT. Determinants of an incorrect inhalation technique in patients with asthma or COPD. Scand J Prim Health Care. 2001. 19(4): 255-60.
19. Zhang W, Xu L, Gao S, et al. Technical Evaluation of Soft Mist Inhaler Use in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Cross-Sectional Study. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2020. 15: 1471-1479.
20. Pothirat C, Chaiwong W, Phetsuk N, Pisalthanapuna S, Chetsadaphan N, Choomuang W. Evaluating inhaler use technique in COPD patients. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2015. 10: 1291-8.
21. Baba R, Nakachi I, Masaki K, et al. Repetitive instructions at short intervals contribute to the improvement of inhalation technique. Asia Pac Allergy. 2020. 10(2): e19.
22. Göriş S, Taşci S, Elmali F. The effects of training on inhaler technique and quality of life in patients with COPD. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. 2013. 26(6): 336-44.
23. Rogliani P, Ora J, Puxeddu E, Matera MG, Cazzola M. Adherence to COPD treatment: Myth and reality. Respir Med. 2017. 129: 117-123.
24. Ágh T, Inotai A, Mészáros Á. Factors associated with medication adherence in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respiration. 2011. 82(4): 328-34.
25. Khdour MR, Hawwa AF, Kidney JC, Smyth BM, McElnay JC. Potential risk factors for medication non-adherence in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Eur J Clin Pharmacol. 2012. 68(10): 1365-73.
26. Nguyen TS, Nguyen T, Pham T, Hua S, Ngo QC, Li SC. Impact of pharmaceutical care in the improvement of medication adherence and quality of life for COPD patients in Vietnam. Respir Med. 2019. 153: 31-37.
27. Abdulsalim S, Unnikrishnan MK, Manu MK, Alrasheedy AA, Godman B, Morisky DE. Structured pharmacist-led intervention programme to improve medication adherence in COPD patients: A randomized controlled study. Res Social Adm Pharm. 2018. 14(10): 909-914.

靶向 c-Met 的近红外荧光探针用于胃癌分子成像

李舒欣，陈淑莹，涂远彪*

（江西中医药大学癌症研究中心，江西南昌 330004）

【摘要】胃癌是最常见的恶性肿瘤之一，是全球癌症相关死亡的第四大原因。胃癌预后较差，治疗选择较少，易发生转移、复发和耐药，因此早期胃癌的手术治疗成功与否对患者的预后至关重要。特异性的近红外荧光分子探针引导的手术导航可实时可视化胃癌边界，是胃癌阴性切缘的关键。研究表明，c-Met 蛋白与胃癌的发生、发展及不良预后等有着千丝万缕的联系。因此，我们设计了一种 c-Met 靶向多肽 V-1-GGGK 并对其分别标记了异硫氰酸荧光素（FITC）及花菁类近红外染料 MPA，构建了荧光分子探针 V-1-GGGK-FITC 和 V-1-GGGK-MPA。此外，我们在体内外评估了基于多肽 V-1-GGGK 的荧光分子探针用于胃癌 SGC-7901 的靶向成像的能力。体外细胞水平的实验表明了探针 V-1-GGGK-FITC 可特异性结合胃癌 SGC-7901。活体水平的皮下、原位异种移植肿瘤模型的活体成像结果表明，探针 V-1-GGGK-MPA 能以高信噪比特异性靶向识别 c-Met 高表达的胃癌 SGC-7901，且在强的肿瘤内滞留能力。8 小时后的离体组织器官的荧光定量结果指出，皮下和原位胃癌 SGC-7901 肿瘤模型中，肿瘤与正常胃组织的信噪比分别为 7.56 ± 0.86 和 4.89 ± 0.52，表明了探针 V-1-GGGK-MPA 具有用于体内高信噪比检测 c-Met 高表达胃癌的潜力。综上所述，基于 V-1-GGGK 的近红外荧光探针 V-1-GGGK-MPA 是 c-Met 阳性胃癌成像诊断和手术导航的潜在工具。

相变材料在医药冷链中的应用

李双梅[1]，章雅冲[2]，张得志[3]，梁家玮[3]

（1.湖南昊东林中药饮片有限公司 质量部保证科，湖南省长沙市 410006；2.中南林业科技大学物流与交通学院，湖南省长沙市 410004；3.中南大学交通运输工程学院，湖南省 长沙市 410075；3.湖南昊东林中药饮片有限公司 总经办，湖南省长沙市 410006）

【摘要】PCM（相变材料）作为低能耗、零排放的冷源能够让疫苗、血液制品等温度敏感医药冷链运作更为环保安全，在现代医药冷链中得到广泛的应用。本文根据材料特性的差异将 PCM 进行分类并总结它们的特点，以适配其应用场合，并针对不同冷链运输存储要求的医疗物品给出相应 PCM 选择，同时对 PCM 在冷链载运工具中的应用进行分析，提出 PCM 在冷链应用中的发展对策。

【关键字】相变材料、冷链物流、医药冷链

在医疗行业中诸如疫苗、血液制品、重组蛋白等都需要在特定的温度下存储运输和处理，并且其市场需求也在不断上升，2021 年我国的医疗冷链物流费用支出为 215.74 亿，较 2020 年的 173.17 亿上涨 24.58%。由此可见医药冷链有着广阔的市场前景。冷链中运输、仓储等环节需要恒温制冷，冷链制冷方式上分为冷藏车电制冷、干冰低温制冷、相变蓄冷[1]。由于电制冷运输车辆相较非冷链运输车辆每百公里油耗要多出 25%到 50%，这对于医疗企业来说是增加了成本开支。除了运输成本增加，电制冷与干冰冷链在运行过程中会排放大量二氧化碳污染环境，而相变材料(PCM - Phase Change Material)这种材料仅通过相变材料的物质状态改变的相变过程中吸收或释放潜热，让温度保持稳定且可以进行近万次的使用，具有储冷密度大、原料廉价、制备简单、低耗环保的优点。

由此可见 PCM 的使用不仅可以降低冷链的成本，还能同时实现绿色物流。但 PCM 材料种类繁多，为了明确不同 PCM 的应用场合，本文对 PCM 进行了分类，理清常用医疗品匹配的 PCM 类型。并分析 PCM 相较于其它制冷方式的优势，给出在医药冷链中 PCM 要的改进方向。

1 相变材料（PCM）的介绍及分类

PCM 是通过材料在物质形态发生转变时提供潜热的材料，一般有气液互化、固液互化、固气互化，因为除了固液互化其余材料在形态转变时体积变化过大，所以在冷链中通常使用固液互化的材料。当外界温度上升时，PCM 吸收多余的热量，从固体变为液体。当外界温度下降时，PCM 释放出之前吸收的热量，由液转固。由此来保证冷链温度在运输时的稳定。

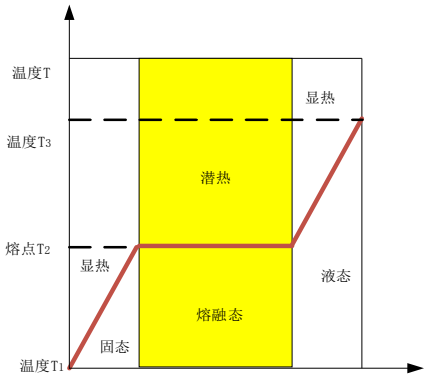


图 1 相变过程示意图

通讯作者：李双梅，女，湖南长沙人，中医学本科，研究方向为医药仓储，药品流通，邮箱：3549532632@qq.com

章雅冲，男，江苏淮安人，管理学硕士生，中南林业科技大学物流与交通学院在读，研究方向为供应链优化，医药物流，邮箱：20221100306@csuft.edu.cn

张得志，男，湖南祁东人，工学博士，教授，中南大学交通学院物流工程教研室主任，研究方向为供应链优化，医药物流，邮箱：dzzhang@csu.edu.cn

按照相变材料的不同划分如图 2，可分为有机相变材料、无机相变材料、复合共晶相变材料。相变材料最重要的就是潜热的大小，材料的潜热值决定了它的储能大小。

1.1 有机相变材料

有机相变材料通常包括了脂肪酸、石蜡、酯、醇等[2]，这类化学性质稳定，过冷度低，不易相分离的优点，缺点为导热率低、相变潜热会随着冷热循环次数上升而下降，潜热值降低后，材料得到导热系数会直线降低。

1.2 无机相变材料

无机相变材料有水合盐、金属及合金、盐类等，水合盐材料属于低温相变材料所以通常用于冷链物流。常见的水合盐来源广、成本低、商用化前景好。相较于有机材料，无机材料的成本更低廉，导热性高，相变潜热稳定，缺点是过冷度高，相分离情况严重，且有一定的腐蚀性。

1.3 共晶复合相变材料

单一的有机或无机 PCM 总是有无法弥补的短板，因此研究人员进行了大量的研究发现了复合 PCM 可以通过添加纳米材料、高分子材料、改变原料配比等方式完美综合两者的优点形成复合相变材料。按照复合材料的不同大体可分为有机-有机共晶、无机-无机共晶和有机-无机共晶相变材料。分析复合相变材料的优势可发现，有机-无机共晶相变材料兼具有机、无机材料的优势，具有相变潜热比较高、过冷度低且无明显相分离等优势。

2 PCM 在医药冷链中的应用与优势

2.1 冷链医药品适配的 PCM

医药冷链物品包括了药品、疫苗、血液制品、医疗器械、体外诊断试剂（IVD—In vitro diagnostic）等。由于医药产品的特殊性与高附加值，相比较食品行业，医药冷链运输对温度变化和蓄冷材料选取要求更高。而 PCM 相变温度各不相同，不同的医药冷链运输温度要求也各不相同。因此不同医药冷链要求适配的 PCM 材料也不相同如表 1。例如胰岛素最适宜的温度为 2℃-8℃，器官则需要放在 0℃-4℃冷藏，血小板应在 22℃-28℃运输，国产新冠疫苗冷藏温度为-2℃左右，这些医疗品对于仓储与运输的环境和温度有极高的要求。

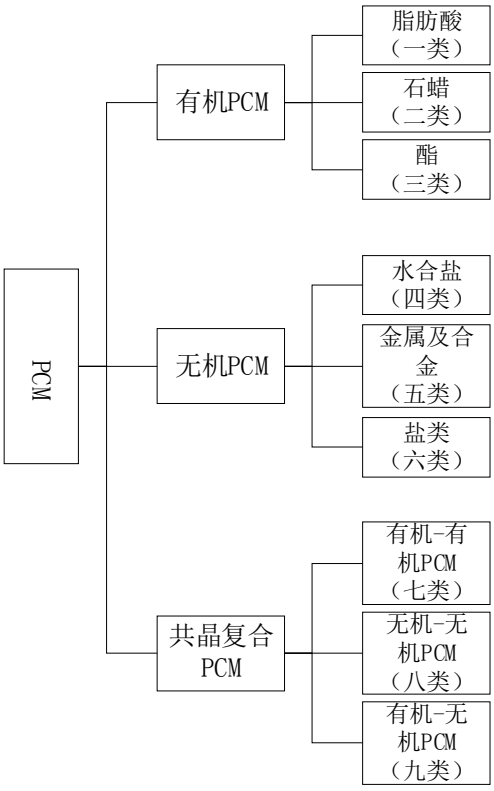


图 2 相变材料分类

表 1 典型医药物品冷链温度要求

医疗用品分类	小类	适宜存储温度区间	适宜 PCM 材料
药品	胰岛素等	2-8℃	Na2SO4·10H2O（一类）、月桂酸（一类）、十二烷醇+辛酸（七类）
	卡前列甲酯栓等	-5℃以下	十二烷+十三烷（七类）、氯化钾+水（四类）、
	巴曲酶注射液等	5℃	辛酸+月桂酸（七类）
	甲泼尼龙片等	15-25℃	癸酸+棕榈酸酯（七类）、六水氯化钙+六水氯化镁（八类）
疫苗	国产新冠疫苗等	2℃	十二烷醇+辛酸（七类）
	辉瑞新冠疫苗等	-70℃	氯化氢+水（八类）
	HPV 九价疫苗等	2-8℃	Na2SO4·10H2O（四类）、月桂酸（一类）、十二烷醇+辛酸（七类）
血液制品	冷冻血浆等	0℃以下	山梨酸钾+氯化钾（八类）
	血小板等	22-24℃	癸酸+棕榈酸酯（七类）
	全血及红细胞等	2℃	十二烷醇+辛酸（七类）
医疗器械	体内肿瘤低温治疗仪、肝脏冷冻治疗仪、直肠癌低温治疗仪、眼用凝胶等	2-8℃	Na2SO4·10H2O（四类）、月桂酸（一类）、十二烷醇+辛酸（七类）
IVD	肿瘤标志物检测试剂等	2-8℃	Na2SO4·10H2O（四类）、月桂酸（一类）、十二烷醇+辛酸（七类）
	酶类检测试剂等	-25℃	乙二醇+氯化铵+水（九类）
	溶血剂等	15-30℃	癸酸+棕榈酸酯（七类）、六水氯化钙+六水氯化镁（八类）、六水硝酸钙+六水硝酸锌（八类）
其他生物制品	移植器官等	0-4℃	十二烷醇+辛酸（七类）、硼砂（四类）

2.2 冷藏车中的 PCM

用于医疗的冷链物流一般按照货量的大小选择相应的运输方案，运送大批量医疗药物采取冷藏车，小批量则采取冷藏箱运输。也有对温控要求高的医药品采用冷藏车和冷藏箱组合运输，如移植器官这种温度敏感性高的医药产品，以确保器官不受温度变化影响。

冷藏车是医疗冷链物流中最常使用的工具，一般是由隔热保温厢体(一般由聚氨酯材料，玻璃钢组成、彩钢板、不锈钢等)，制冷机组，车厢内温度记录仪等部件组成，到 2021 年底我国拥有医药冷藏车近 13 万辆。在使用冷藏车时，由于车辆移动、频繁的开门以及尾门隔热不足，保持冷藏车维持固定温度是一大难题。为了控制车内冷藏环境温度，人们创新出在传统制冷材料中加入相变材料的混合技术，提高了运输的质量和经济性。Sonnenrein[3]等人就在不在冷藏箱中使用相变材料做过一次实验，发现使用了相变材料的冷藏箱比没使用的温度更加稳定。还有研究人员发现相变材料不仅是很好的蓄冷材料，还是很好的隔热材料，能够很好的减少热负荷，从而降低冷却能量需求以降低制冷能耗。Tinti[4]等人进行了一项实验研究，探索将相变材料纳入硬质聚氨酯泡沫层（绝缘）的可能性。其使用的是含有 85-90wt%的石蜡基相变材料和 10-15wt%的惰性聚合物外壳的微型胶囊（熔点为 6℃），平均颗粒大小为 17-20 微米。对不同含量的微型相变材料进行测试。与对照情况（仅聚氨酯）相比，集成微型相变材料的泡沫更慢。特别是在微型相变材料含量最低的情况下（4.5%），最大温差约为 3℃，而在最高的情况下（13.5%），温差约为 7℃。

2.3 冷藏箱中的 PCM

冷藏箱通常体积在 10-200L 不等，适用温度区间为冷藏 2℃—8℃、冷冻-22℃—-12℃、超低温-55%—-36℃。郭浩[5]等人利用十氟戊烷（HFC-4310mee）作为无源型血液冷藏箱的蓄冷剂，最低温度可以达到-128℃，有力的证明了相变材料可以在没有任何能源的情况下依旧能够完成血液的超低温运输。但是冷藏箱内相变材料的摆放也会对运输物品产生影响。豆孟柯[6]在测量用于疫苗运输的蓄冷箱不同位置温度时发现蓄冷箱不同的位置，温度不一样，靠近蓄冷剂的疫苗易发生凝固现象。翟纪强[7]也发现了类似的情况，蓄冷剂放在蓄

冷箱四周蓄冷时间更长，放在顶部会让温度分布更加均匀。

针对一些温度敏感度高的医疗产品通常还会预先套上一层蓄冷包装，这是一种利用复合纤维素相变材料填充的新型包装材料，以确保运输的医疗用品有效性。结合微型胶囊技术做出比单一相变材料更加稳定的新型蓄冷包装。王文娟[8]将不同剂量的微胶囊化的石蜡通过负过滤技术分散在纸盒上，剂量越高纸盒的保温性能越好。

除了冷链运输需要用到相变材料，将相变材料利用到低温仓储中也是未来冷链物流的方向，不仅能够稳定冷库温度达到冷藏作用，还能够降低冷库电力消耗。例如将乙二醇作为冷库蓄冷液，冷库温差稳定在 0.8℃以内，且比传统冷库用电量少 75%，总费用下降 25%。

2.4 PCM 的优势与问题

综上所述，PCM 相比较于传统医药冷链运输有着明显的优势：绿色节能、经济适用、没有能源依赖、温度更加稳定、对温度的检测更加直观。要发挥 PCM 相变材料在医疗冷链应用的优势，还应注意几个问题：

（1）现在衡量一个低温相变材料合格与否的标准仍然是相变温度、相分离情况、潜热以及导热系数。对于医疗冷链最重要的是材料是否对运输物品有腐蚀，在有固转液的相变过程中由于体积的变化是否会造成泄露腐蚀运输物品的问题。

（2）长久来看相变材料应该追求更高的潜热、更低的过冷度、更多次的冷热相变循坏以及更低的热损失。在蓄冷设备上做到更加智能化，通过内置芯片自动控制与调节设备温度，推动行业朝着零排放的绿色发展。

（3）相变蓄冷材料作为新型技术，在医疗领域中尚未形成成熟的行业标准，消费者对此认知度更低。所以要完善医药冷链物流中关于 PCM 使用的相关标准为行业发展提供重要的保障，政府应鼓励相关企业的交流与合作，制定医药冷链物流交接验收等环节的标准，为监管工作提供依据。

3 结论与展望

本文针对相变材料在医疗冷链的应用展开总结和分析，进行用于低温冷链的相变蓄冷材料的分类，明确不同冷链医药品适配的相变材料，最后指出相变材料在当今医疗行业的应用与优势和注意问题。

（1）PCM 相比较于传统医药冷链运输有着明显的优势：绿色节能、经济适用、没有能源依赖、温度更加稳定。但依旧存在以下问题，医用冷藏车中，车辆的运行和频繁的开门会导致仓内保温不足；相变材料在蓄冷箱的布局也会导致箱内的温度分布差异。

（2）在材料开发上未来应重视复合 PCM 的研究，寻找出使用寿命长、性能更稳定的材料。在蓄冷设备上要更加重视设备的智能性、实时性与可视性，以便操作人员能够及时发现使用寿命即将到期的 PCM，保障运输物品的医疗效果。在冷链物流对于 PCM 使用的规章制度建设上，在行业内要形成行之有效的行业规范，加强对运输全流程的监管。

参考文献

[1] 张红雨, 万贤, 陈妍等. 相变蓄冷材料在冷链物流中的研究进展[J]. 中国塑料, 2021, 35(4): 106-115.

[2] 黄雪, 崔英德, 尹国强等. 相变蓄冷材料研究进展[J]. 化工新型材料, 2020, 48(1): 19-22, 30.

[3] Chandel, S. S., & Agarwal, T. Review of current state of research on energy storage, toxicity, health hazards and commercialization of phase changing materials[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017（67）:581–596.

[4] Tinti, A., Tarzia, A., Passaro, A et al Thermographic analysis of polyurethane foams integrated with phase change materials designed for dynamic thermal insulation in refrigerated transport[J]. Applied Thermal Engineering, 2014(70):201–210.

[5] 郭浩,刘敏霞,阎少多等.无源型低温血液运输箱的研制[J].军事医学,2018,42(07):489-493.

[6] 豆孟柯,刘宝林,宋晓燕等.蓄冷箱在疫苗冷链中的研究进展[J].制冷学报,2019,40(02):135-141.

[7] 翟纪强,宋海燕,肖婕.EPP 多温区保温箱温控效果的特性研究[J].包装工程,2019,40(01):93-99.

[8] 王文娟.相变储能在冷链物流中的应用与研究[J].中国航务周刊,2022(46):67-69

微针阵列贴片耐热疫苗的使用分析

李双梅[1]，章晓彤[2]，章雅冲[3]，张得志[3]

（1.湖南昊东林中药饮片有限公司 质量部保证科，湖南省长沙市 410006；2.中南林业科技大学物流与交通学院，湖南省长沙市 410004； 3.中南大学交通运输工程学院，湖南省 长沙市 410075）

【摘要】目的：探讨微针阵列贴片（MAP）疫苗的应用价值。**方法：**分析 MAP 疫苗与传统疫苗的成本构成和特点，并从接种者感受，疫苗免疫效果、包装、回收，运输等方面进行对比分析。进一步讨论 MAP 疫苗取代传统针剂疫苗的效益和限制。**结果：**微针阵列贴片（Microneedle array patch，MAP）的出现提供了耐热疫苗，降低了疫苗流通过程中对低温控制的要求，从而使得冷链温控这一焦点问题可以缓解。MAP 耐热疫苗预计可以降低疫苗的制造、运输、储存与回收成本。**结论：**未来应用微针阵列贴片耐热疫苗技术可以实现更为高效和安全的疫苗接种，使用 MAP 时应关注精确剂量，疫苗供应链重新设计等问题。

【关键词】微针阵列贴片 耐热疫苗 对比分析

Analysis of the use of microneedle array patch heat-resistant accines

Li Shuangmei[1], Zhang Xiaotong[2], Zhang Yachong[2], Zhang Dezhi[3]

（1.Deputy General Manager Section, General Manager Office of Yueyang Zhenghai Pharmaceutical Co., Ltd., Yueyang Changsha Hunan, China 414418; 2. Forestry Engineering Doctoral Research Center, Central South University of Forestry and Technology, Changsha Hunan, China 410004; 3. School of Traffic and Transportation Engineering, Central South University, Changsha Hunan, China 410075)

【Abstract】Objective：To investigate the value of micro-needle array patch (MAP) vaccine application. **Methods：**To analyze the cost components and characteristics of MAP vaccines versus conventional vaccines, and to conduct a comparative analysis in terms of vaccine recipient perception, vaccine immune efficacy, packaging, recall, and transportation. The benefits and limitations of MAP vaccines to replace conventional needle vaccines are further discussed. **Results：**The advent of Microneedle array patch (MAP) provides heat-resistant vaccines that reduce the requirement for low-temperature control during vaccine distribution, thus allowing the focal issue of cold chain temperature control to be alleviated. MAP heat-resistant vaccines are expected to reduce the cost of vaccine manufacturing, transportation, storage, and retrieval. **Conclusion：**Future applications of Microneedle array patch heat-resistant vaccine technology could enable more efficient and safe vaccination, and the use of MAP should be concerned with precise dosing, vaccine supply chain redesign, and other issues.

【Keywords】Microneedle array patch, heat-resistant vaccine, Comparative Analysis

通讯作者：李双梅，女，湖南长沙人，中医学本科，研究方向为医药仓储，药品流通，邮箱：3549532632@qq.com

章雅冲，男，江苏淮安人，管理学硕士生，中南林业科技大学物流与交通学院在读，研究方向为医药供应链优化，邮箱：20221100306@csuft.edu.cn

章晓彤，女，湖南长沙人，中南林业科技大学物流与交通学院本科生，研究方向为医药物流与供应链管理，邮箱：2876381354@qq.com

张得志，男，湖南祁东人，工学博士，教授，中南大学交通学院物流工程教研室主任，研究方向为供应链优化，医药物流，邮箱：dzzhang@csu.edu.cn

前言

据国家疾病预防控制局统计，2021 年我国共报告传染病 6233537 例，其中甲类、乙类以及丙类传染病分别报告发病 6 例、2727282 例、3506249 例，死亡人数共计达 22198 人，报告发病率为 442.16/10 万，报告死亡率为 1.57/10 万。疫苗接种使得大多数传染病得以预防并降低其伤害和死亡率。疫苗能使接种者体内出现相应的抗体，控制传染病的传播。接种疫苗是世界公认的预防控制或消除与疫苗针对性疾病的最简便、经济、有效的手段[1]。

疫苗接种减小流行病死亡风险及其传播范围，降低国家公共卫生事件的发生率。但使用传统针剂注射接种的疫苗必须在受控的低温下储存和运输，其温度范围大多为 2℃-8℃。疫苗在储存、运输全过程中应当处于规定的温度环境，疫苗的冷链储存、运输环节必须符合要求，同时要进行记录温度和实时监测[2]。这是因为疫苗一旦出现失温或脱链，带来的损失和危害将是巨大的。对疫苗进行有效、规范化贮存管理是保证疫苗安全有效的首要条件[3]。疫苗因为缺乏完善的温控运作后会受变性受损，导致预防和抵御作用丧失。如减毒活疫苗在 37 度的环境中会在 12 小时之后失效，而狂犬病疫苗和甲肝疫苗在 37 度的环境下会在 1-3 周失效。

可见温度控制对疫苗的安全有着决定性的意义，而微针阵列贴片（Microneedle array patch，MAP）的出现提供了耐热疫苗，降低了疫苗流通过程中对低温控制的要求，从而使得冷链温控这一焦点问题可以缓解。MAP 耐热疫苗预计可以降低疫苗的制造、运输、储存甚至回收成本。本文旨在通过传统注射器疫苗接种和微针阵列贴片成本与效益分析以及可能存在的限制与挑战，为我国使用 MAP 疫苗技术提供参考。

1 微针阵列贴片介绍

微针阵列贴片（MAP）是一种疫苗接种设备，由以阵列布置的微小针状突起组成，能够以无痛且易于使用的方式将药物输送到皮肤中。其中大于 550 微米的长型微针在手动应用时可以有效刺穿皮肤，而 300 微米或更短的微针通常需要冲击器的辅助。MAP 与透皮贴剂不同，透皮贴剂通过皮肤的最外层输送药物，而 MAP 的微型针头具有一定的长度和机械强度，能够打破角质层屏障对药物的阻滞作用，并将药物输送到表皮或真皮的上部，大大提高了药物的递送效率[4]。在传统针剂注射过程中，患者的痛感主要来源于皮肤，其他原因包括注射针与皮肤间的摩擦阻力以及针头刺入和拔出时会对皮肤周围细胞产生较大拉力等[5]。相比与传统针头，MAP 微针刺入的深度较浅，不会刺激真皮层中的感知神经而产生痛觉，但是也足以让疫苗刺激免疫细胞，或让皮肤层中的血液和淋巴系统循环输送其他药物。MAP 通过皮肤给药，药物的药代动力学可以改变，加速其吸收到血液中，能够实现更快的起效。

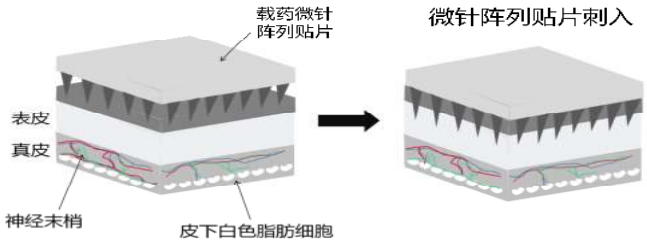


图 2 微针阵列贴片刺入过程

MAP 可以有效地解决疫苗配送和储存面临的温控和包装等问题。一方面，大多中低收入国家通常没有良好的冷链设施设备配置，难以形成安全的疫苗冷链体系，而 MAP 技术在疫苗配方中去除了水分，可以部分或完全降低对低温控制的要求。如可耐热的 MAP 流感疫苗可在 25℃温度下储存 6 个月，甚至有的 MAP 流感疫苗可在 40℃下储存 1 年。另一方面，部分人对于传统针剂注射感到恐惧，MAP 可提高厌恶针头的接种者的可接受度。再者，MAP 可以在没有医护人员的情况下，由经过培训的人员来实现接种。对于缺乏熟练医护人员的发展中国家来说，该优势显著。

微针高分子贴片的许多优势通过动物和人体研究得到验证。2015 年 5 月，由美国疾病与预防控制中心与佐治亚理工学院合作开发的微针贴片覆盖着 100 个由疫苗、糖和聚合物制成的微型针头，单个贴片面积约为 1 平方厘米。使用时用手指按一下贴片，便可将微型针头刺入表层皮肤，并在几分钟内溶解进入人体；2020 年 4 月

匹兹堡大学医学团队研发的冠状病毒贴片型疫苗使用“微针阵列”接种药物，并在动物实验中产生了疗效；2021年11月，澳大利亚昆士兰大学的研究人员通过动物实验证实微针贴片可以用来接种新冠疫苗。

2 MAP 疫苗与传统针剂疫苗的成本比较

MAP 耐热疫苗正被广泛研究应用在各类传染病，包括狂犬疫苗、灭活轮状病毒疫苗、灭活脊髓灰质炎疫苗以及新冠疫苗等。而其成本与经济效益是 MAP 推广使用的关键。在发达国家如澳大利亚，MAP 疫苗装置已被证明比传统针剂注射技术更具成本效益。

由于缺乏完善的冷链物流设施配置和冷链温度控制管理，根据世卫组织的研究发现每年全球有多达 50%的疫苗被浪费。而 MAP 耐热疫苗，对温控的要求降低，因而对冷链设施设备的要求也可降低，疫苗的浪费也将大大减小。此外，国际标准要求盛装疫苗的玻璃容器必须是“一类中硼硅玻璃瓶”。据统计，截至到 2021 年此类玻璃瓶的国产率不到 10%。中硼硅玻璃与高硼硅玻璃相比，抗冲击强度比较差、易碎。即疫苗瓶的运输条件较为严格，若瓶身也易震碎，造成疫苗破坏和损毁 MAP 的药物包装为聚合物材料，韧性远高于针剂玻璃瓶，其包装材料不易破碎，也可减少疫苗浪费。

表 1 传统针剂疫苗和 MAP 疫苗成本比较

不同种类疫苗	制造成本	物流成本			管理成本
		包装成本	储运成本	交付/配送成本	
传统针剂疫苗	不同种类的疫苗要求的技术不同，制作成本也不同	国内生产盛装疫苗的玻璃容器材料的企业刚刚起步，在进行中硼硅玻璃管的自主研发过程中，依然没有完全解决气泡线、结瘤等问题，因此，还未能实现中硼硅管制瓶的量产[9]。但是中硼硅玻璃管的需求量大，价格昂贵	为疫苗存储所开支的保管费、运杂费，包括用于疫苗的出入库装卸搬运、包装、配送、保管、相关信息及物流管理等费用和装运的冷藏包、冰箱、冷库、冷藏车等的运行费用[10]	在传统配送模式中，在不考虑通货膨胀的情况下，因疫苗对温度环境的要求，各级机构要求配备有适合辖区疫苗储运需求的冷链设备和相关配套设备，产生较高的软硬件费用，且疫苗的配送的人工成本较高[11]	全程温控的要求，产生相应的管理费用。在接种单位接种非免疫规划疫苗，除收取疫苗费用外，还可以收取接种服务费。接种服务费的收费标准由省、自治区、直辖市人民政府价格主管部门会同财政部门制定
MAP 疫苗	对模具、材料和机械要求高，相应的生产成本较高，但目前有更为经济简单的技术被开发出来，如光刻技术[7]、转写技术[8]等	尺寸更小，所需包装材料也更少，但可能对包装材料的性质有一定的要求，使得在储运过程中保持完好无损	降低了对温度的要求，大都不需要制冷装置，可在常温环境下储存和运输；另外，因尺寸更小，单位储运空间可供给给更多数量的 MAP 疫苗		可以采用自行管理或半自行管理，极大降低管理成本

疗效试验发现虽然 MAP 上的疫苗剂量相对肌肉注射较低，却能达成后者相同层度的免疫反应。疫苗接种专家表示，MAP 最终可能大幅降低疫苗副作用以及费用，同样数量的疫苗可以为更多人接种，节省下的成本也是巨大的。同时，微针由于针体短小其强度大大增强，甚至可以反复应用多次而不会发生针体断裂[6]。

可见 MAP 耐热疫苗降低对温控要求是主要成本节约因素，且因为 MAP 耐热疫苗对物流环境要求降低，也可以节约疫苗管理费用。因管理成本是整个疫苗供应链成本的重要组成部分，减少管理负担将相当可观，可采用自行管理或半自行管理管理以极大地降低整个疫苗接种成本如表 1。

3 优势与机会

在运输方面，一方面，运输 MAP 耐热疫苗不需要制冷装置，因此更为便宜、灵活，甚至可以通过安全便宜的国家邮政或包裹服务来运输，也可更为容易地通过地面或空中运输向农村和偏远地区供货，提高供应链的有效性和稳健性；另一方面，实际上，10 个 MAP 的大小与使用注射器的疫苗几乎相同，即 MAP 疫苗在尺寸上比注射器和针头疫苗小得多，所以，包装也更小，这意味着更为高效的储存和材料运输，减少对人力资源和专业知识的需求。同时，大量的存储和运输空间将被释放出来，可用于存储其他物品。

在环境可持续性和安全方面，由于降低了对温控的要求，运输和储存过程中消耗的能源更少，因此污染更少；所需的二次包装更少，材料浪费和回收操作也更少。使用 MAP 将消除与针刺伤害有关的风险和尖锐废物处理的负担。此外，微针很容易使用，短的微针通常不需要由专家来应用，长的微针需要由受过训练的专业人员施用，相比与传统针剂注射疫苗，也更为安全。而传统针剂疫苗因包装材料直接接触疫苗成分，可能会发生玻璃与药物成分相互迁移，直接影响药品质量和用药安全。对于药店或卫生机构，因 MAP 耐热疫苗可以保存在常温储存空间中，加上大宗采购的折扣以及牛鞭效应的减小，药店或卫生机构可以以更低的单位成本下达更大的订单，确定更多的安全库存，最大限度地降低库存短缺的概率，提高客户的服务水平和服务提供者的声誉。同时，因 MAP 耐热疫苗可被视为普通的医疗物品，不再产生冷链费用，无需遵守冷链协议，药店或卫生机构不必担心冷链破坏和转运认证要求，也可以通过数字化机会和使用先进的信息共享平台使转运更加有效。同时，因为冷藏空间的重新利用以及运输成本和能源消耗的减少，可能提高其他冷藏物品的服务水平。

4 限制和挑战

尽管微针阵列贴片的耐热疫苗能够提供极大便利，其使用也有其局限性和挑战。

（1）研究表明，MAP 储运的非特定温度范围为 0-40℃。因此 MAP 的引入虽然能取消 2-8℃的温度要求，但在零下的超

低温或 40℃及以上的超高温时可能仍需对其进行保护。这意味着 MAP 在运往极寒或酷热的目的地时，仍将被视作“温控”产品。

（2）由于微针接种深度多样、接种部位不同会产生微针疫苗药物给量的差异，这就要求使用 MAP 时能根据接种情形精确控制给药剂量。

（3）在开发 MAP 等新技术时，还应考虑其可接受性。对微针的研究大多集中在其输送效果上，很少关注医疗保健专业人员和公众的看法，以及其在医疗领域的可接受性。尽管微针具有较高的可接受性和适用性，但业界若看不到改变现有做法的好处，便可能对采用微针犹豫不决，这可能会成为采用 MAP 的潜在障碍。医护人员的认可以及与与患者、家长和医疗机构共享 MAP 信息方面的合作，有助于加快 MAP 疫苗的快速采用并提供其可接受性。

（4）供应链转型并非一蹴而就。在 MAP 疫苗完全取代现有疫苗之前，将有一个过渡期。在此期间，政府、医院、药店、诊所、第三方物流公司、制造商和新的利益相关者将重新设计现有的供应链，并可能实施冷链运输和常温运输的混合模式。

5 总结

随着我国民众健康及防护意识不断增强且在新冠病毒肺炎这一全球大流行病带来的挑战下，各类传染病疫苗需求急剧增加，而微针阵列贴片疫苗可以极大程度地克服传统针剂注射疫苗的缺点并具有诸多的优势。在未来，应用微针阵列贴片耐热疫苗技术可以实现更为高效和安全的疫苗接种。

参考文献

[1] 虞海燕,杨劼.中国人体免疫预防存在的问题及立法建议[J].中国公共卫生管理,2017,33(02):156-159.

[2] 国务院关于修改《疫苗流通和预防接种管理条例》的决定[J].首都公共卫生,2016,10(03):97-99.

[3] 李旭山,刘丛海.疾控中心疫苗冷链管理存在的问题及对策[J].中国医药指南,2019,17(31):295-296.

[4] 黄颖聪,马凤森,占浩慧等.微针阵列用于生物大分子药物的递送[J].生物化学与生物物理进展,2017,44(09):757-768.

[5] 潘盼,王立新,闫征.仿生无痛注射针头研究进展[J].河北科技大学学报,2021,42(02):101-110.

[6] 刘怡,缪宁,崔健等.2020 年中国疫苗冷链储存和运输设备现况调查[J].中国疫苗和免疫,2022,28(02):238-241+247.

[7] 李伟泽,闫菁华,赵宁等.盐酸青藤碱在微针阵列作用下的透皮给药研究[J].第二军医大学学报,2011,32(07):767

[8] 李以贵,谢长生,廖哲勋等.基于转写技术的微针阵列制备与强度特性测试[J].纳米技术与精密工程,2014,12(03):194-201.

[9] 王明瑞.中硼硅玻璃与药用玻璃瓶生产[J].新材料产业,2021,No.323(04):54-57.

[10] 王云川.基层疾控机构疫苗储运和接种的成本核算及管理[J].行政事业资产与财务,2021(22):48-49.

[11] 陈俊磊,潘伟毅,兰星等.2019 年福建省疫苗配送成本调查[J].中国疫苗和免疫,2023,29(01):82-85.

苦鬼臼毒素靶向 HSP90 抑制胃癌生长的作用机制研究

李晓莉，赵慧洁，周晓琳，王国丽，叶蕾*，李德芳*，洪盼*

滨州医学院　山东 滨州 256603

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一，迫切需要开发用于胃癌治疗的安全有效的化合物。本研究旨在探究从八角莲的根茎中提取的化合物——苦鬼臼毒素对胃癌细胞增殖的作用。研究结果表明，苦鬼臼毒素通过诱导细胞凋亡来抑制胃癌细胞的增殖，并表现为剂量依赖性。此外，研究结果显示，苦鬼臼毒素可以抑制裸鼠体内移植瘤的生长，而且没有明显的毒副作用。在机制上，苦鬼臼毒素通过阻断 AKT/mTOR 信号通路发挥其作用，组成型活性 AKT 的过表达显著消除了这些作用。此外，药物亲和响应靶标稳定性实验和液相色谱-串联质谱结果显示，热休克蛋白 90（HSP90）可能是苦鬼臼毒素的潜在靶点。表面等离子体共振和免疫沉淀实验表明苦鬼臼毒素可以直接靶向 HSP90 并破坏 HSP90 与 AKT 的结合，从而抑制胃癌细胞增殖。因此，苦鬼臼毒素可能是一种很有前景的用于治疗胃癌的化合物。

【关键词】苦鬼臼毒素；胃癌；HSP90；AKT/mTOR

Study of the effect and Mechanism of picropodophyllin in targeting HSP90 to suppresses gastric cancer proliferation

Xiaoli Li, Huijie Zhao, Xiaolin Zhou, Guoli Wang, Lei Ye *, Defang Li *, Pan Hong *

Binzhou Medical University　Shandong binzhou 256603

Gastric cancer (GC) is one of the most common malignant tumors worldwide. Thus, the development of safe and effective therapeutic compounds for GC treatment is urgently required. Here, we aimed to examine the role of picropodophyllin (*PPP*), a compound extracted from the rhizome of *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying, on the proliferation of GC cells. Our study revealed that *PPP* inhibits the proliferation of GC cells in a dose-dependent manner by inducing apoptosis. Moreover, our study elucidated that *PPP* suppresses the growth of GC tumor xenografts with no side effects of observable toxicity. Mechanistically, *PPP* exerts its effects by blocking the AKT/ mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway; these effects are markedly abrogated by the overexpression of constitutively active AKT. Furthermore, drug affinity responsive target stability (DARTS) and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) revealed that heat shock protein 90 (HSP90) may be a potential target of *PPP*. Surface plasmon resonance and immunoprecipitation assay validated that *PPP* directly targets HSP90 and disrupts the binding of HSP90 to AKT, thereby suppressing GC cell proliferation. Thus, *PPP* may be a promising therapeutic compound for GC treatment.

【Key words】Picropodophyllin, Gastric cancer, HSP90, AKT/mTOR

糖尿病患者冠脉造影或经皮介入治疗发生造影剂发生肾损危险因素

李晓烨，李晓宇，吕迁洲

（复旦大学附属中山医院 药剂科，上海，200032）

【摘要】目的：分析糖尿病患者冠脉造影或经皮介入术后发生造影剂肾病的危险因素。**方法：**本试验为单中心、回顾性研究。纳入 2016 年 1 月~2016 年 12 月期间于本院心血管内科住院并行冠脉介入治疗的糖尿病患者。记录并收集所有患者的基线特征，生化指标，术前用药情况，记录服药期间患者发生的不良反应及处理情况以及 8 个月内再住院率。主要评价终点为 CIN 的发生率，次要评价终点为 8 个月内患者的再住院率。**结果：**53 例（9.50%）患者最终发展为造影剂肾病，全部病人肌酐均升高基础值的 25%以上，但如果将 CIN 定义为肌酐值增加 44.2umol/ L，发生率则为 0.90%（5/558）。两组之间在年龄、糖尿病时长，手术类型，不同造影剂类型和用量，LVEF，及合并疾病如高血压、心肌梗死、心律失常等未发现显著差异。然而，CIN 患者往往具有更轻的体重，并且女性居多（OR= 2.8, 95% CI 1.597, 5.039）。此外，患有 ACS 的病人更容易发生 CIN （OR= 5.4, 95% CI 2.535, 11.469）。与大多数研究相反，在我们的研究，CIN 组患者术前肌酐低于非 CIN 组（69.57±25.03 VS 81.50±20.98, P＜0.05）。至于术前用药，他汀类药物似乎可以降低 CIN 发病率 （OR= 0.26, 95% CI 0.12, 0.55），利尿剂的使用可能会增加 CIN 发生风险 （OR= 2.62, 95% CI 1.49, 5.24）。此外，PPI 和硝化甘油可能会增加 CIN 的风险。随访的结果显示 CIN 组患者的住院天数和费用较非 CIN 组延长或增加，但 8 个月内的再住院率两组间并无显著差异。**结论：**虽然 CIN 的确切发病机制仍不清楚，但 CIN 的发生已被证实会增加患者住院天数和费用以及导致更坏的健康状况。由于没有有效措施治疗 CIN，因此术前预防就更为重要，如水化疗法或术前药物。CIN 的危险因素有很多，有必要区分高危患者，进行相应的预防措施。

【关键词】造影剂肾病，危险因素，冠脉造影，经皮介入治疗，糖尿病

Risk Factors for Contrast-Induced Nephropathy after coronary angiography（CAG）or percutaneous coronary intervention（PCI）in Diabetes Patients

【ABSTRACT】AIM: The purpose of this retrospective, single-center study was to investigate the pre-procedural laboratory investigations and drug effects to the incidence of CIN in diabetes patients who underwent coronary angiography （CAG） or percutaneous coronary intervention（PCI）. **Methods:** We retrospectively studied a total of 558 diabetes patients who underwent CAG or PCI during 2016 in our hospital, and compared the baseline clinical characteristics, especially the laboratory investigations and pre-procedural drugs of those two groups （with CIN Group and without CIN Group）. CIN was defined as an increase of either 25% or 0.5 mg/dl （44.2umol/L） in serum creatinine （Scr） within 72 hours after contrast exposure. **Results:** Overall, 53 （9.50%） patients were developed into CIN according to the definition of an increase of 25% of pre-Scr, supposing that on the basis of an increase of 44.2mmol/L, the incidence would be 0.90% （5/558）. No significant differences were found between the two groups with respect to age, DM during, operation type, contrast type and volume, LVEF, and combined diseases including hypertension, MI, Arrhythmia etc. However, patients with CIN tended to be lighter in bodyweight, and were more often female （OR=2.8, 95% CI 1.597, 5.039）, as well as had a higher prevalence with ACS （OR= 5.4, 95% CI 2.535, 11.469）. On the contrary to most studies, the pre-Scr in with CIN group in our study was lower than without CIN group （69.57±25.03 VS

81.50±20.98, P < 0.05）. As for the pre-procedural drugs, significant differences existed in statins, which seemed could decrease the incidence of CIN （OR= 0.26, 95% CI 0.12, 0.55）, and the use of diuretics might increase the occurrence of CIN （OR= 2.79, 95% CI 1.49, 5.24）. Furthermore, PPI and nitroglycerin added the risk of CIN. As regard to the follow-up results in eight months, the hospitalization days and expense of with CIN group were significantly longer and higher than the without CIN group. **Conclusions:** Though the exact pathogenesis of CIN is still unclear, it has been identified that the occurrence of CIN would add the hospitalization days and expense. Since there is no effective treatment for CIN, pre-procedural preventions are very important, such as oral hydration therapy or drugs. There are many risk factors for CIN, it is necessary to distinguish the high risk patients so as to carry out corresponding protection actions.
【Keywords】contrast-induced nephropathy, risk factor, coronary angiography, percutaneous coronary intervention, diabetes mellitus

造影剂肾病（CIN）是冠状动脉造影（CAG）以及经皮冠状动脉介入（PCI）后一种常见的潜在的致命并发症，在医院急性肾损伤占有很大比重[1-2]]。CIN 有很多风险因素，根据现有的研究，肾功能不全、糖尿病、充血性心力衰竭、造影剂用量及类型、糖尿病肾毒性药物[3-4]等。对于糖尿病患者，在未出现显著地临床症状之前，就已经有证据表明它对血管系统的功能有影响，损伤到终末器官，特别是心脏和肾脏[5]。CIN 在糖尿病患者的发病率不同，6 - 30%不等[6-8]。尽管一些研究未能证明糖尿病是 CIN 一个独立危险因素[9-10]，但基于减少 CIN 发生率以及住院费用，筛查出高危糖尿病患者并采取适当的预防方案仍是必要的。另一方面，CIN 根据不同的定义发病率也是不同的。本研究的目的是在糖尿病患者中行 CAG 或 PCI 术后 CIN 的发病率及风险因素（包括实验室指标和术前药物的影响）。

研究设计与方法

1. 研究对象

应用复旦大学附属中山医院电子病例管理系统，收集于 2016 年 1 月~2016 年 12 月间于我院心血管内科并行冠脉介入治疗的糖尿病住院患者资料。

1.1 入选标准

1) 具有冠脉造影适应症并接受冠状动脉介入检查；
2) 年龄>35 岁；
3) 术前及术后 72h 有完整肾功能记录；
4) 糖尿病；

1.2 排除标准

1) 严重肝功能不全（尿毒症）
2) 重度心力衰竭（左心室射血分数<30%）
3) 既往行肾脏切除手术
4) PCI 前 2 周内使用对比剂、PCI 前行透析治疗
5) 造影剂过敏者
6) 资料不全患者

2. 研究设计

本研究是一个单中心，回顾性研究，旨在探索糖尿病患者行冠脉造影或经皮介入术后发生造影剂肾病的危险因素。

3. 研究方法

收集符合入选标准的患者临床资料，根据需要纳入研究的信息，填入数据提取表 1 中，并建立 Excel 数据库以便后续分析。

3.1 基本信息

包括患者年龄，性别，体重，入院日期，出院日期，合并疾病包括高血压，肾功能不全，心肌梗死，心律失

常，高尿酸血症，高脂血症等，详见数据提取表 1。造影剂肾病诊断标准：使用对比剂后 24~72h 内，Scr 水平较原有基础升高>25%或者绝对值升高>44.2umol/L 以上，并排除其它影响肾功能原因。

3.2 生化指标

包括血糖（糖化血红蛋白，空腹血糖，餐后血糖），肾功能（肌酐值，尿酸值，血中尿素氮等），肝功能（胆红素，结合胆红素，白蛋白，球蛋白，白球比等），心功能指标如肌酸激酶，肌酸激酶 MK 以及肌酸激酶 MB 及其他相关指标，详见数据提取表 1.

3.3 术前用药

将患者术前 3 天内所用药物记录下来，包括降糖药物（二甲双胍，磺脲类，格列奈类，胰岛素等等），降脂药物如他汀类，抗凝药物，高血压药物如钙通道阻滞剂，利尿剂等等，详见数据提取表 1，忽略不能纳入统计分析的药物类别。

3.4 临床结局

由电子病历对研究所纳入患者进行 8 个月的随访，研究的主要终点是造影剂肾病的发生情况，次要终点是 8 个月内患者的再住院率。

4. 统计学分析

将患者信息输入 Excel 数据库，采用 IBM SPSS19.0 统计分析软件对数据进行处理。计量资料数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm S$）表示，计数资料以频数和百分率表示；连续性的变量资料两组间比较采用独立样本 t 检验，方差不齐时采用近似 t 检验（如不符合正态分布则采用 Wilcoxon 秩和检验）。定性资料组间比较采用 χ^2 检验，两组等级资料的比较采用非参数 Mann-Whitney 秩和检验，两组以上等级资料地比较采用非参数 Kruskal-Walls H 秩和检验。以 $P<0.05$ 为有统计学意义，$P<0.01$ 为有显著统计学意义。

结果

研究共纳入 558 糖尿病患者（404 名男性，72.40%），其中有 53 例（9.50%）发展成 CIN，我们把病人分成两组，一个是与 CIN 组，另一个是非 CIN 组。两组的基线特征如表 1 所示。所有病人术前均进行生理盐水水化，具体水化量由临床医生视患者具体情况而定。两组之间在年龄、DM 期间，手术类型，造影剂类型和用量，LVEF，和合并疾病包括高血压、心肌梗死、心律失常没有显著差异。然而，CIN 患者往往倾向体重更轻，更多女性（OR= 2.8, 95% CI 1.597, 5.039），ACS 患者更容易发生 CIN （OR= 5.4, 95% CI 2.535, 11.469）。与大多数研究相比，在我们的研究中有一个与多数研究相反的现象，即术前肌酐 CIN 组低于非 CIN 组（69.57±25.03 VS 81.50±20.98, P < 0.05）。此外，术前肌酐< 45umol/ L 两组之间具有统计学差异（OR= 12.8, 95% CI 3.754,43.410）。造影剂类型和用量之间没有差异，但是，用量超过最大造影剂剂量是 CIN 一个重要的危险因素（OR = 4.5, 95% CI 1.336, 15.144）。我们在表中列出，CIN 组的所有病人的比术前肌酐均增长了 25%，然而，只有 5 例患者术后肌酐值增加超过 44.2 umol / L。

表一：患者基线特征

	With CIN	N	Without CIN	N	P/OR
Age（years）	65.64±9.29	53	64.85±9.77	505	0.571
Female/Male	26/27	53	128/377	505	2.836（1.597,5.039）*
Weight（Kg）	66.68±9.88	53	69.87±9.75	505	0.024*
Pre-Scr（mmol/L）	69.57±25.03	53	81.50±20.98	505	0.000*
Scr≤45（umol/L）	7	53	5	505	12.766（3.754,43.410）
Scr≥115（umol/L）	5	53	32	505	1.540（0.573,4.136）
Post-Scr（mmol/L）	96.49±41.49	53	78.63±19.72	505	0.000*
CIN[a] （>25%）	53	/	505	/	/

CIN[b] （44.2umol/L）	5	/	553	/	/
Pre-Ccr（mmol/L）	89.28±32.25	53	81.07±25.86	505	0.033*
Pre-eGFR（umol/L/1.73m²）	101.94±31.80	53	87.55±23.05	505	0.000*
eGFR>90	33	53	223	505	2.087（1.165,3.736）
60≤eGFR≤90	14	53	228	505	0.436（0.231,0.823）
eGFR<60	6	53	54	505	1.066（0.436,2.610）
LVEF （%）	59.25±9.80	51	61.86±9.24	492	0.058
LVEF≤40（%）	4	52	21	492	1.873（0.617,5.682）
LVEF≤50（%）	9	52	60	492	1.517（0.705,3.263）
LVEF≤60（%）	28	52	161	492	2.393（1.352,4.235）
Hypertension	42	53	371	505	1.379（0.690,2.757）
ACS	12	53	26	505	5.392（2.535,11.469）*
MI	14	53	118	505	1.274（0.668,2.431）
Angina	6	53	124	505	0.403（0.168,0.964）
Arrhythmia	5	53	43	505	1.119（0.423,2.960）
DM During（years）	8.98±8.70	48	8.07±6.37	449	0.366
CAG/PCI History	13	53	160	505	0.701（0.365,1.347）
Operation Type（CAG/PCI）	7/46	53	48/457	505	0.690（0.295,1.613）
Contrast Type（a/b/c[δ]）	21/28/4	53	232/234/39	505	P>0.05δ
Contrast Volume（ml）	149.25±92.01	53	151.81±72.59	505	0.812
Over MRCDζ	4	53	9	505	4.499（1.336,15.144）*

表 1. CIN 组与非 CIN 组的基线特征，计量资料以 mean ± SD 呈现，计数资料以例数或比值比呈现，缩写见中英文缩略词索引，*表示有统计学意义（p<0.05） δ 造影剂类型: a 是碘比醇，b 是碘帕醇，c 是碘普罗胺，三种造影剂类型对 CIN 发生率无统计学差异。 ζ 最大造影剂剂量公式 maximum radiographic contrast dose MRCD= 5ml×kg/Scr（mg/dl）.

记录所有患者实验室指标，如表 2 所示，数值型变量都以平均数±标准差和总数呈现。两组之间在血糖指标（HbA1c、FPG、PPG）、Hcy、肾功能（UA、BUN），总胆汁酸，前白蛋白，糖化白蛋白，总胆红素，结合胆红素、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白，脂蛋白 A，氯离子，钾离子没有显著差异（P＞0.05）。然而，我们发现在乳酸脱氢酶、ALB、GLB、A/G（P＜0.05）有统计学意义。在脂质指标中，我们发现 TC、TG、Non-HDL-C、APO-B、APO-E 与 CIN 的发病率相关。此外，钠和二氧化碳的浓度也是有统计学意义的。心脏功能指标显示，两组之间在 CK、CK-MB、CK-MM 具有统计学差异。此外，hs-CRP 炎症因子在两组之间有统计学意义，CIN 组显著高于非 CIN 组。

表二：实验室指标与 CIN

	With CIN	N	Without CIN	N	P
HbA1c	7.84±1.46	41	7.81±3.96	444	0.952
FPG	9.08±4.33	51	8.12±3.41	504	0.062
PPG	13.20±3.10	25	13.43±4.32	325	0.793

Hcy	11.20±2.32	5	12.03±3.46	77	0.599
UA	316.89±121.51	53	328.52±89.13	505	0.385
BUN	7.19±8.95	53	6.43±6.01	505	0.405
TBA	5.62±5.50	28	4.43±3.75	275	0.127
PA	0.24±0.07	28	0.27±0.18	275	0.389
GA（%）	19.59±5.09	42	19.39±5.47	445	0.820
LDH	275.58±185.15	50	199.46±116.73	476	0.000*
TBIL	8.94±3.28	52	9.22±4.30	502	0.650
DBIL	3.23±1.43	52	3.48±1.75	502	0.323
TP	65.15±4.96	52	65.22±5.98	502	0.938
ALB	38.85±4.03	52	40.33±3.90	502	0.009*
GLB	26.38±4.40	52	24.90±3.91	502	0.010*
A/G	1.52±0.29	52	1.66±0.29	502	0.001*
TC	4.31±1.57	52	3.86±1.02	491	0.004*
TG	2.23±3.13	52	1.84±1.15	491	0.022*
HDL-C	1.10±0.34	52	1.07±0.28	491	0.493
LDL-C	2.22±0.90	52	2.01±0.90	491	0.104
Non-HDL-C	3.19±1.48	52	2.79±1.00	491	0.009*
APO-A	1.15±0.27	52	1.14±0.22	491	0.747
APO-B	0.78±0.23	52	0.71±0.22	491	0.029*
APO-E	43.27±39.00	52	35.44±16.55	491	0.007*
LP（a）	434.60±582.60	52	423.46±553.83	491	0.891
Na	140.26±4.50	53	141.54±2.87	505	0.004*
K	4.00±0.44	53	4.10±0.38	504	0.077
Cl	103.34±4.06	53	104.64±20.02	505	0.636
CO2	24.72±2.85	53	25.85±2.36	505	0.001*
CK	330.88±614.25	52	113.52±199.69	495	0.000*
CK-MB	36.73±58.21	52	14.79±14.91	482	0.000*
CK-MM	294.15±560.24	52	96.29±185.23	482	0.000*
D-Dimer	0.73±1.21	45	0.74±5.38	415	0.986
FBG	325.21±83.25	52	309.28±81.68	497	0.182
hs-CRP	17.99±49.09	28	6.26±13.69	313	0.002*

表 2. 两组患者的实验室指标，计量资料以 mean ± SD 呈现，计数资料以例数或比值比呈现，缩写见中英文缩略词索引

1. 术前用药与 CIN

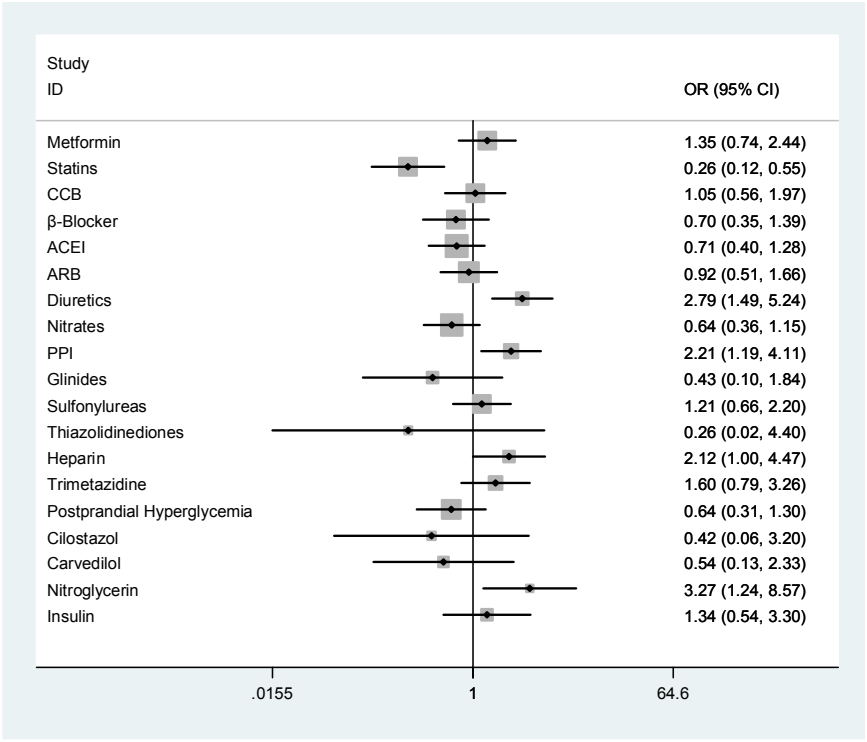


图 1. 术前用药对 CIN 发生率的影响，用比值比 OR 表示危险程度

记录全部患者的药物记录。我们列出了最常用的药物类别，如图 1 所示，忽略了相对较少的药物以方便统计分析过程。其中常见的药物如二甲双胍，钙通道阻滞剂，β-阻滞剂，ACEI，ARB，硝酸盐类，格列奈类，磺脲类，曲美他嗪，餐后降糖药，西洛他唑和胰岛素等两组均无差异。然而，他汀类药物中存在显著差异，术前他汀类药物可能降低 CIN 发生率 （OR= 0.26, 95% CI 0.12, 0.55），此外，利尿剂的使用可能会增加发生 CIN（OR= 2.79, 95% CI 1.49, 5.24）。同时，单因素分析中 PPI 和硝化甘油可能会增加 CIN 的风险。

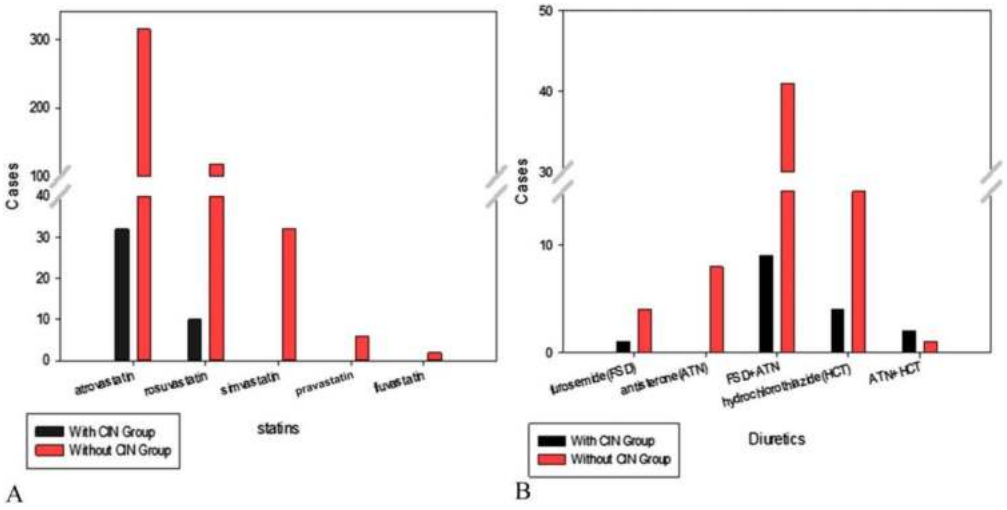


图 2. 术前他汀的用药情况，5 种类型他汀分别为：阿托伐他汀，瑞舒伐他汀，辛伐他汀，普伐他汀和氟伐他汀

图 3. 术前利尿剂的用药情况，5 种类型利尿剂分别为：呋塞米 （FSD），醛固酮 （ATN）， 呋塞米加醛固酮（FSD +ANT），氢氯噻嗪 （HCT），醛固酮加氢氯噻嗪（ANT+HCT）

在五种他汀类药物中，阿托伐他汀（347/558）最为常用，氟伐他汀 （2/558）是最少使用的。术前他汀类药物的情况下两组如图 2 所示。在 CIN 组中药物仅有阿托伐他汀和瑞舒伐他汀。然而，相比之下，两种他汀之间并无差别（OR= 1.20, 95% CI 0.571, 2.515）。

在五种利尿剂中，最常用的一种利尿剂是呋塞米+醛固酮（51/558），最少使用的是醛固酮+氢氯噻嗪（3/558），如图 3 所示。醛固酮+氢氯噻嗪可能增加 CIN 的风险（CIN 发生率为 2/3）相比于其他类型的利尿剂，最安全的利尿剂为醛固酮（0/8）。利尿剂的联合应用比单用及不使用利尿剂明显增加 CIN 的发生风险（OR=3.226, 95% CI 1.576, 6.606）。由于醛固酮+氢氯噻嗪病例不是很多，以至于得不到一个可靠的分析，得出的结论可能不足以令人信服，还需要进一步的临床试验进行验证。

2. 住院与随访

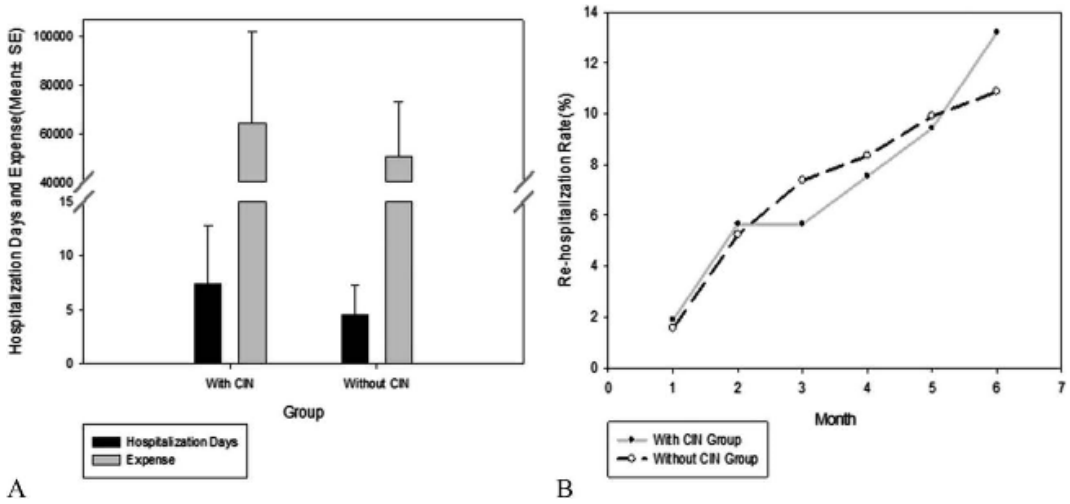


图 4. 两组患者的住院时间及用药费用情况，P<0.05 均具有统计学差异

图 5. 两组患者的 8 个月再住院率，P>0.05，不具有统计学差异

记录所有研究对象住院天数及费用，如图 4 所示，在两组中，住院天数（D）和费用（元）（7.37±5.33 VS 4.549±2.76, P < 0.001;64420±37386 VS 50499±22889, P < 0.001）存在差异。CIN 组住院天数和费用明显高于非 CIN 组。

所有的研究对象都从病人出院的那一天被随访 8 个月时间。CIN 组有 8 例患者再住院，非 CIN 组 67 例，两组随访结果无显著差异（OR=1.162 95% CI 0.525, 2.573），然而，随访曲线显示 CIN 组可能在长远来说会出现更不利的健康状况，如图 5 所示。

讨论

1. CIN 的定义

我们的研究中 CIN 的发病率是 9.50%（53/558），而与一些其他类似研究[6-8]中 6 - 30%的发病率相比较低，这可能与对术前患者进行充分水化降低了 CIN 发生率相关。然而，在过去的 30 年里，随着造影剂越来越多的在诊断和介入过程中使用，造影剂肾病已成为医院获得急性肾功能衰竭的一个重要来源。越来越多的临床医生认为，造影剂诱发的肾病在临床实践中是一个重要但低估了问题。根据 CIN 的不同定义，即术后血清肌酐增加 44.2 umol/L（0.5 mg/dl），或基线值 25%以上，即反映了不同的肾功能的变化。前者对肾功能不全患者较为敏感，而后者对肾功能正常的患者更为敏感[11]。在我们的研究中，我们纳入的患者大部分为肾功能正常的患者，在所有 53 例 CIN 患者中，肌酐值均升高 25%，而只有 5 例肌酐增加超过 44.2 umol/L，这也与 Allaqaband 研究的结果一致[11]。

2. 性别与 CIN

此外，在本研究中，我们发现女性是发生 CIN 的一个危险因素，比值比为 2.8，并且有越来越多的研究证实这一结果[12-15]，即使在一些较老的研究中，风险更高的是男性[16-17]。Lucreziotti[13]研究表明，女性是一个独立的

预测患者 PCI 术后发生的 CIN 危险因素。此外，在穆勒[14]研究中，PCI 术后女性 CIN 的高发病率似乎很大程度上是由于她们比较不利的基线特征，如肾小球滤过率（GFR） 降低及动脉高血压发生率升高，而不是女性本身。

3. 他汀与 CIN

术前药物中，我们发现他汀类药物和利尿剂对 CIN 的发生率有明显影响，他汀类药物已被证明具有内皮保护特性，可能能够预防 CIN 的发生[18-19]，研究显示他汀类药物可以降低细胞间粘附分子 1，hs-CRP 和 P 选择素[20]。过去的几十年中大量的研究在评估他汀类药物预防接受冠状动脉造影或经皮介入患者发生 CIN 的作用[21-25]相互冲突的结果。相反，一些研究没有显示他汀具有降低 CIN 的发生率[26-27]。我们的研究中显示术前使用他汀类药物可能降低 CIN 的风险，且与种类无关。

4. 利尿剂与 CIN

利尿剂影响细胞外液平衡，这样就可能减少血管舒张肾前列腺素[28-29]，在某些小样本研究呋喃苯胺酸添加到术前水化能增加负平衡从而增加 CIN 的风险[30]。我们的研究中显示，利尿剂可以增加 CIN 的发生风险，尤其是当他们的联合使用。在五种利尿剂中，氢氯噻嗪加醛固酮是最危险的组合，应该避免手术前使用。多数学者建议在术前 24 小时内停用利尿剂。

5. 其他

二甲双胍对于糖尿病患者来说是一线选择，正如最近的数据显示，二甲双胍导致糖尿病乳酸酸中毒的风险很低[31]，我们并没有发现二甲双胍与 CIN 的发生率有关。表中的实验室指标显示，血脂异常可能与 CIN 有关，这与他汀类药物可以降低 CIN 的风险一致。最终，在多因素 logistic 回归分析时，女性，ACS，超剂量使用造影剂，他汀类药物和利尿剂仍具有显著意义，而 PPI 和硝化甘油则无显著统计学意义。

6. 研究的局限性

首先，我们只收集了一年的数据，鉴于糖尿病病人的 CIN 发病率不是很高，结果还有待大型临床研究验证。其次，术后肌酐数据几乎都是从术后 24 小时取得，没有取得术后 48 h 和 72 h 内的肌酐值，从而导致 CIN 的发病率降低。最后，患者随访 8 个月时间，有些患者失访（包括转移到其他医院），我们可能没有获得完整的信息。

结论

我们的研究发现了糖尿病患者行冠脉造影或经皮介入术后发生 CIN 危险因素有女性，脂质和心脏指标，肝功能指标，他汀类药物，利尿剂等都可能影响 CIN 的发生率。由于没有有效手段治疗 CIN，因此识别 CIN 高危人群对于预防及减少 CIN 的发生是很有必要的。除了标准的水化治疗，可以合理使用他汀类药物以及谨慎使用利尿剂。以上结论，仍然需要进一步的研究探索其中的可能性。

参考文献

1. Nash K, Hafeez A, Hou S （2002） Hospital-acquired renal insufficiency. Am J Kidney Dis 39: 930-936.

2. Pannu N, Wiebe N, Tonelli M （2006） Prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy. JAMA 295: 2765-2779.

3. Pucelikova T, Dangas G, Mehran R （2008） Contrast-induced nephropathy. Catheter Cardiovasc Interv 71: 62-72.

4. Marenzi G, Cabiati A, Milazzo V, Rubino M （2012） Contrast-induced nephropathy. Intern Emerg Med 7 Suppl 3: S181-S183.

5. Economides PA, Caselli A, Zuo CS, Sparks C, Khaodhiar L, et al. （2004） Kidney oxygenation during water diuresis and endothelial function in patients with type 2 diabetes and subjects at risk to develop diabetes. Metabolism 53: 222-227.

6. Parfrey PS, Griffiths SM, Barrett BJ, Paul MD, Genge M, et al. （1989） Contrast material-induced renal failure in patients with diabetes mellitus, renal insufficiency, or both. A prospective controlled study. N Engl J Med 320: 143-149.

7. Kurnik BR, Allgren RL, Genter FC, Solomon RJ, Bates ER, et al. （1998） Prospective study of atrial natriuretic peptide for the prevention of radiocontrast-induced nephropathy. Am J Kidney Dis 31: 674-680.

8. Bagshaw SM, Culleton BF （2006） Contrast-induced nephropathy: epidemiology and prevention. Minerva Cardioangiol 54: 109-129.

9. Rudnick MR, Goldfarb S, Wexler L, Ludbrook PA, Murphy MJ, et al. （1995） Nephrotoxicity of ionic and nonionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial. The Iohexol Cooperative Study. Kidney Int 47: 254-261.

10. Allaqaband S, Tumuluri R, Malik AM, Gupta A, Volkert P, et al. （2002） Prospective randomized study of N-acetylcysteine, fenoldopam, and saline for prevention of radiocontrast-induced nephropathy. Catheter Cardiovasc Interv 57: 279-283.
11. Thomsen HS, Morcos SK （2009） Risk of contrast-medium-induced nephropathy in high-risk patients undergoing MDCT--a pooled analysis of two randomized trials. Eur Radiol 19: 891-897.
12. Madershahian N, Scherner M, Rudolph T, Slottosch I, Grundmann F, et al. （2014） Impact of sex on the risk to develop contrast-induced nephropathy after transcatheter aortic valve implantation. Innovations （Phila） 9: 87-92, 92.
13. Lucreziotti S, Centola M, Salerno-Uriarte D, Ponticelli G, Battezzati PM, et al. （2014） Female gender and contrast-induced nephropathy in primary percutaneous intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. Int J Cardiol 174: 37-42.
14. Mueller C, Buerkle G, Perruchoud AP, Buettner HJ （2004） Female sex and risk of contrast nephropathy after percutaneous coronary intervention. Can J Cardiol 20: 505-509.
15. Iakovou I, Dangas G, Mehran R, Lansky AJ, Ashby DT, et al. （2003） Impact of gender on the incidence and outcome of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention. J Invasive Cardiol 15: 18-22.
16. Rudnick MR, Goldfarb S, Wexler L, Ludbrook PA, Murphy MJ, et al. （1995） Nephrotoxicity of ionic and nonionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial. The Iohexol Cooperative Study. Kidney Int 47: 254-261.
17. Scherberich JE, Fischer A, Rautschka E, Kollath J, Riemann H （1989） Nephrotoxicity of high and low osmolar contrast media: case control studies following digital subtraction angiography in potential risk patients. Fortschr Geb Rontgenstrahlen Nuklearmed Erganzungsbd 128: 91-94.
18. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, et al. （2001） Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. N Engl J Med 344: 1959-1965.
19. Chang YH, Hsieh MC, Wang CY, Lin KC, Lee YJ （2013） Reassessing the benefits of statins in the prevention of cardiovascular disease in diabetic patients - a systematic review and meta-analysis. Rev Diabet Stud 10: 157-170.
20. Waybill MM, Waybill PN （2001） Contrast media-induced nephrotoxicity: identification of patients at risk and algorithms for prevention. J Vasc Interv Radiol 12: 3-9.
21. Khanal S, Attallah N, Smith DE, Kline-Rogers E, Share D, et al. （2005） Statin therapy reduces contrast-induced nephropathy: an analysis of contemporary percutaneous interventions. Am J Med 118: 843-849.
22. Yoshida S, Kamihata H, Nakamura S, Senoo T, Manabe K, et al. （2009） Prevention of contrast-induced nephropathy by chronic pravastatin treatment in patients with cardiovascular disease and renal insufficiency. J Cardiol 54: 192-198.
23. Kandula P, Shah R, Singh N, Markwell SJ, Bhensdadia N, et al. （2010） Statins for prevention of contrast-induced nephropathy in patients undergoing non-emergent percutaneous coronary intervention. Nephrology （Carlton） 15: 165-170.
24. Zhao JL, Yang YJ, Zhang YH, You SJ, Wu YJ, et al. （2008） Effect of statins on contrast-induced nephropathy in patients with acute myocardial infarction treated with primary angioplasty. Int J Cardiol 126: 435-436.
25. Attallah N, Yassine L, Musial J, Yee J, Fisher K （2004） The potential role of statins in contrast nephropathy. Clin Nephrol 62: 273-278.
26. Kandula P, Shah R, Singh N, Markwell SJ, Bhensdadia N, et al. （2010） Statins for prevention of contrast-induced nephropathy in patients undergoing non-emergent percutaneous coronary intervention. Nephrology （Carlton） 15: 165-170.
27. Toso A, Maioli M, Leoncini M, Gallopin M, Tedeschi D, et al. （2010） Usefulness of atorvastatin （80 mg） in prevention of contrast-induced nephropathy in patients with chronic renal disease. Am J Cardiol 105: 288-292.
28. Weinstein JM, Heyman S, Brezis M （1992） Potential deleterious effect of furosemide in radiocontrast nephropathy. Nephron 62: 413-415.
29. Solomon R, Werner C, Mann D, D'Elia J, Silva P （1994） Effects of saline, mannitol, and furosemide to prevent acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents. N Engl J Med 331: 1416-1420.
30. Cryer DR, Nicholas SP, Henry DH, Mills DJ, Stadel BV （2005） Comparative outcomes study of metformin intervention versus conventional approach the COSMIC Approach Study. Diabetes Care 28: 539-543.
31. Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, Salpeter PE （2010） Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev: D2967.

应用单中心的病例验证Mehran积分预测冠心病合并糖尿病患者造影剂肾病发生的风险

李晓烨，李晓宇，吕迁洲

（复旦大学附属中山医院药剂科,上海 200032）

【摘要】目的: 探讨是否可以应用 Mehran 积分预测冠心病合并糖尿病患者造影剂肾病发生的风险。**方法：**分析 558 名冠心病合并糖尿病患者临床资料，依据 Mehran 积分分为低危（≤5 分，n=118），中危（6-10 分，n=358），高危（11-15 分，n=74）以及极高危组（≥16 分，n=74），主要分析指标为造影剂肾病发生率，通过 Logistic 回归分析高危和极高危组发生造影剂肾病的危险因素。**结果：**共有 63 例发生造影剂肾病，其中高危组和极高危组造影剂肾病的发生相对于低危组其比值比分别为 4.54（95% CI: 1.02-20.17, P=0.032）和 6.06（95% CI: 2.63-13.92, P<0.001），而中危组与低危组发生率无统计学差异。Logistic 回归分析显示女性、年龄＞75 岁、肾功能不全、心功能不全、造影剂量>300ml 为引起造影剂肾病的主要危险因素。**结论：**Mehran 积分可预测糖尿病患者行冠脉造影或经皮介入术后发生 CIN 的风险。

【关键词】冠心病合并糖尿病　造影剂肾病　Mehran 积分

Application of Single Center Case for Verification Contrast Induced Nephropathy in Patients With Coronary Heart Disease Combined With Diabetes Using the Mehran Score

LI Xiaoye, WEN Jingyan, LV Qianzhou

(Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital Fudan University, Shanghai 200032,China)

【ABSTRACT】AIM：The aim of this study was to investigate whether Mehran risk score could predict contrast induced nephropathy in patients with coronary heart disease combined with diabetes. **METHODS：**We analyzed the clinical data of 558 patients diagnosed as coronary heart disease combined with diabetes. Patients were categorized into 4 groups according to Mehran risk scores: low(≤5, n=118); moderate(6-10, n=358); high (11-15, n=74) and very high(≥16, n=8). The primary end point was defined as contrast induced nephropathy. Logistic regression analysis was performed to screen the related risk factors from the clinical data in high and very high risk groups. **RESULTS：**63 patients developed contrast induced nephropathy. The occurrence of high risk group and very high risk group of contrast induced nephropathy relative to the low risk group with the odds ratio were 4.54(95%CI:1.02-20.17, P=0.032)and 6.06(95%CI:2.63-13.92, P<0.001) and there was no difference in the moderate risk group and the low risk group. Stepwise logistic regression analysis revealed that female, age>75, kidney dysfunction, cardiac dysfunction, and contrast volume>300ml were the risk factors of contrast induced nephropathy. **COCLUSION：**Mehran risk score could predict contrast induced nephropathy in patients with coronary heart disease combined with diabetes.

【KEY WORDS】coronary heart disease combined with diabetes　contrast induced nephropathy　Mehran score

造影剂肾病(Contrast Induced Nephropathy, CIN)是冠脉造影过程中应用碘造影剂的严重并发症，由于接受造影检查和介入手术的患者不断增加，因此会有更多的患者应用碘造影剂。CIN 的临床症状一般比较轻微或无明显不适感,易被临床医生忽略。通常造影剂所造成的肾损伤大部分可逆。然而，CIN 一旦发生不仅延长患者的住

院时间、增加住院费用，而且增加心脏不良事件发生率以及近期和远期死亡率，部分患者需要临时甚至永久性透析治疗，严重影响患者的生存预后[1]。目前，CIN 公认的主要危险因素有：高龄>75 岁、行主动脉球囊反博术（Intra-aortic Balloon Pump, IABP）、肾功能不全、糖尿病、心力衰竭、贫血、应用大剂量造影剂[2]。对于糖尿病患者，在未出现显著的临床症状之前，就已经有证据表明它对血管系统的功能有影响，损伤到终末器官，特别是心脏和肾脏，文献报道 CIN 在糖尿病患者的发病率为 6-30%[3]，因此对于糖尿病患者预测 CIN 发生风险是必要的。目前有研究[4]发现应用 Mehran 积分可有效预测冠脉造影术后 CIN 的发生风险。本研究拟通过临床病史资料回顾性分析应用 Mehran 积分是否可预测冠心病合并糖尿病发生 CIN 风险。

研究对象与方法：

1.1 研究对象：

本研究是一个单中心、回顾性研究，旨在探索 Mehran 积分是否可预测糖尿病患者行冠脉造影或经皮介入术后发生 CIN 的风险。应用复旦大学附属中山医院电子病例管理系统，收集于 2013 年 1 月-2013 年 12 月间于我院心血管内科并行冠脉介入治疗的糖尿病住院患者资料。包括患者年龄，性别，体重，入院日期，出院日期，左心室射血分数、造影剂用量、治疗药物、造影术前与术后的肌酐、肾小球滤过率(estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR)，合并疾病包括高血压，中重度肾功能不全，心力衰竭，心肌梗死，高尿酸血症，高脂血症等。排除术前 2 周内使用对比剂、术前行透析治疗的患者。入院后即进行抗栓、降低心肌耗氧、抑制心室重构以及稳定斑块等药物治疗，其中阿司匹林在经皮冠状动脉介入治疗（Percutaneous Coronary Intervention, PCI）术前给予 300mg 负荷剂量，次日 100mg/d；氯吡格雷在 PCI 术前给予 300mg 负荷剂量，次日 75mg/d；低分子肝素（依诺肝素）在 PCI 围术期给予 4000IU q12h（2-8d）；PCI 术中给予普通肝素为 5000IU-10000IU。本项研究通过了我院伦理委员会的批准。

1.2 研究方法：

CIN 是指在应用造影剂后 24-72h 血清肌酐(serum creatinine, Scr)值较基础水平升高超过 25%或绝对值升高大于 44.2umol/L 以上[3]，同时在排除其他肾脏损害因素后使用对比剂后发生的急性肾功能损害。Mehran 积分主要有 CIN 的八个危险因素积分累加构成，其中低血压（5 分）、IABP（5 分）、心功能不全（5 分）、年龄>75 岁（4 分）、贫血（3 分）、糖尿病（3 分）、造影剂用量（其中每使用 100ml 积 1 分）、原有肾功能不全（其中 eGFR＜20mL/min·1.73m^2 积 6 分，eGFR 20-40mL/min·1.73m^2 积 4 分，eGFR 40-60 mL/min·1.73m^2 积 2 分），患者依据 Mehran 积分分为 4 个不同风险组，其中低危组（≤5 分）、中危组（6-10 分）、高危组（11-15 分）以及极高危组（≥16 分）。通过电子病历记录患者住院时间，对研究所纳入患者进行 1 个月的随访，研究的主要终点为造影剂肾病的发生率，次要观察指标为 1 个月内患者的再住院率（包括因心脑血管疾病、心衰、再血管化的住院率）。其中心功能不全按照美国心脏病协会（New York Heart Association, NYHA）根据患者临床表现分为 I-IV 级。心脏功能Ⅰ级：体力活动不受限制，一般体力活动不引起过度疲乏，心悸、呼吸困难或心绞痛；心功能Ⅱ级：体力活动稍受限制，休息时无症状，感觉舒适，但一般体力活动会引起疲乏、心悸、呼吸困难或心绞痛；心功能Ⅲ级：体力活动大受限制，休息时无症状，但一般轻微体力活动会引起疲乏，心悸，呼吸困难或心绞痛；心功能Ⅳ级：体力能力完全丧失，呼吸困难和疲乏，进行任何体力活动都会使症状加重。患者入院后给予常规的治疗方案，其中肌酐术前 24h 内以及术后 48h 内均为常规检测并在住院期间进行心超检查。术中使用的造影剂为等渗非离子型造影剂，最大造影剂剂量依据公式（maximum radiographic contrast dose，MRCD）= 5ml×kg/Scr(mg/dl)计算，术前术后均进行生理盐水水化，具体水化量为 PCI 术前 12 小时至术后 24 小时均应用生理盐水溶液(1ml/kg/h)进行水化治疗。

1.3 统计方法：

将患者信息输入 Excel 数据库，采用 IBM SPSS 19.0 统计分析软件对数据进行处理。计量资料数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm S$）表示，计数资料以频数和百分率表示；连续性的变量资料两组间比较采用独立样本 t 检验，方差不齐时采用近似 t 检验（如不符合正态分布则采用 Wilcoxon 秩和检验）。定性资料组间比较采用 χ^2 检验，两组等级资料的比较采用非参数 Mann-Whitney 秩和检验，两组以上等级资料的比较采用非参数 Kruskal-Walls H 秩和检验。以 P<0.05 为有统计学意义。

2、结果：

2.1 Mehran 积分与各组临床资料的比较

本回顾性研究共纳入 558 名冠心病合并糖尿病患者(142 名女性，25.5%)，平均年龄为 64.9+9.7 岁，其中年龄＞75 岁为 101 例（18.1%）。合并存在中重度肾功能不全为 99 例（17.7%），左室心功能不全为 25 例（4.5%）。

表一：依据 Mehran 造影剂肾病风险评估积分法分组后各组临床资料的比较

Table 1．Comparison of baseline clinical characteristics among Mehran CIN-Risk groups

临床资料	所有患者（n=558）	低危组（n=118）	中危组（n=358）	高危组（n=74）	极高危组（n=8）	P 值
Mehran CIN 积分	7.8±2.8	4.3±0.6	7.7±1.4	12.6±1.3	16.3±0.5	<0.001*
性别（女）	142 (25.5%)	52（44.1%）	77（21.5%）	11（14.9%）	2（25.0%）	<0.001*
年龄（岁）	64.9±9.7	61.8±7.6	64.0±9.1	74.2±9.6	68.5±12.6	<0.001*
年龄>75 岁	101(18.1%)	4(3.4%)	48(13.4%)	46(62.2)	3(37.5%)	<0.001*
体重（kg）	69.6±9.8	66.0±10.9	70.7±9.2	69.9±9.2	67.75±11.6	<0.001*
肌酐(umol/L)	80. 4±21.7	59.7±9.3	82.5±18.4	100.9±23.2	100.7±23.0	<0.001*
eGFR<60 mL/min	99(17.7%)	0	51(14.2%)	43(58.1%)	5(62.5%)	<0.001*
LVEF(%)	61.6±9.3	64.3±7.4	62.6±7.5	55.4±12.6	41.1±12.0	<0.001*
左室功能不全（LVEF<40%）	25(4.5%)	1(0.8%)	5(1%)	12(16.2%)	7(87.5%)	<0.001*
ACS	38(6.8%)	7(5.9%)	32(8.9%)	7(9.4%)	2(25%)	0.148
高血压	413(74.0%)	80(67.8%)	264(73.7%)	62(83.8%)	7(87.5%)	0.078
高脂血症	49(8.8%)	9(7.6%)	32(8.9%)	8(10.8%)	0	0.717
卒中史	41(7.3%)	9(7.6%)	22(6.1%)	9(12.2%)	1(12.5%)	0.312
心绞痛史	79(14.1%)	18(15.3%)	44(12.3%)	16(21.6%)	1(12.5%)	0.148
行 PCI 史	173(31.0%)	28(23.7%)	112(31.3%)	29(39.2%)	4(50%)	0.086
行 CABG 史	15(2.7%)	2(1.7%)	8(2.23%)	5(6.8%)	0	0.132
治疗药物						
阿司匹林	556(99.6%)	118(100%)	356(99.4%)	74(100%)	8(100%)	0.906
氯吡格雷	555(99.4%)	117(99.1%)	356(99.4%)	74(100%)	8(100%)	0.372
他汀	516(92.4%)	104(88.1%)	331(92.4%)	73(98.6%)	8(100%)	0.095
ACEI/ARB	450(80.6%)	90(76.3%)	284(29.3%)	68(91.9%)	8(100%)	0.350
β 阻滞剂	455(81.5%)	96(81.3%)	296(82.7%)	57(77.0%)	6(75%)	0.711
造影剂量（ml）	151.8±74.5	120.3±50.5	155.1±69.3	169.0±89.9	308.1±144.8	<0.001*
造影剂量>300ml	65(11.6%)	0	17(4.7%)	44(59.4%)	4(50%)	<0.001*
住院时间（天）	4.7±3.2	4.8±3.8	4.5±2.8	5.3±3.5	5.4±2.4	<0.001*
再住院率	16.4%	15.2%	17.6%	12.1%	25.0%	<0.001*

注：eGFR 为肾小球滤过率（estimated glomerular filtration rate）应用 MDRD 公式计算；LVEF 为左心室射血分数（Left ventricular ejection fraction）计算公式为(舒张末容积-收缩末容积)/舒张末容积，通过心脏超声结果获得；ACS 为急性冠脉综合症（acute coronary syndromes）；PCI 为经皮冠状动脉介入治疗（Percutaneous Coronary Intervention）；CABG 为冠状动脉旁路移植术（Coronary artery bypass grafting）；ACEI 为血管紧张素转化酶抑制剂（angiotension converting enzyme inhibitors）；ARB 为血管紧张素受体拮抗剂（angiotension receptor blocker）

所有患者依据 Mehran 造影剂肾病风险评估积分法进行分组，分为低危组、中危组、高危组、极高危组。通过 Mehran 造影剂肾病风险评估积分发现随着年龄、体重的增加以及在女性患者中发生 CIN 的风险较高。当合并存在中重度肾功能不全（eGFR<60 mL/min）、左室心功能不全（LVEF<40%）时 CIN 发生的风险较高，肌酐基线水平较高以及造影剂量应用过大发生 CIN 的风险较高（表一）。

2.2 CIN 各组发生率的比较

在 558 例冠心病合并糖尿病行冠脉造影术的患者中，发生 CIN 为 63 例（11.3%），其中低危组为 9 例（7.6%），中危组为 27 例（7.5%），高危组为 24 例（32.4%），极高危组为 3 例（37.5%）。通过多因素统计分析后，极高危组和高危组 CIN 的发生相对于低危组其比值比（odds ratio，OR）分别为 6.06（95% CI: 2.63-13.92, P<0.001）和 4.54（95% CI: 1.02-20.17, P=0.032），而中危组 CIN 的发生与低危组 CIN 发生无统计学差异其 OR 为 0.99（95% CI: 0.45-2.16, P=0.976）（表二）。

表二：Mehran 造影剂肾病风险评估各组肾功能变化以及 CIN 发生率

Table 2. Changes in Renal Function and Incidence of CIN in Mehran CIN Risk Groups

变量	所有患者（n=558）	低危组（n=118）	中危组（n=358）	高危组（n=74）	极高危组（n=8）	P 值
Pre-PCI SCr, umol/L	80.3±21.6	59.6±9.3	82.5±18.4	100.8±23.2	100.7±23.0	<0.001
Post-PCI SCr, umol/L	79.5±21.2	62.9±10.8	81.1±19.5	95.5±23.3	104.1±17.9	<0.001
Δ SCr，umol/L	1.2±13.3	3.2±9.0	1.6±12.1	5.4±17.2	3.4±14.0	<0.001
CIN	63（11.3%）	9（7.6%）	27（7.5%）	24（32.4%）	3（37.5%）	<0.001

注：Pre-PCI SCr 为 PCI 术前 24h 内血清肌酐值；Post-PCI SCr 为 PCI 术后 48h 内血清肌酐值；Δ SCr 为 PCI 术后 48h 内血清肌酐值与 PCI 术前 24h 内血清肌酐值的差值；CIN 为造影剂肾病发生率

2.3 CIN 危险因素逐步 Logistic 回归分析

对引起 CIN 的危险因素进行 Logistic 回归分析高危和极高危组相对于低危组其发生 CIN 的风险，在女性患者中 OR 分别为 2.5（95%CI: 0.07-0.29,P<0.001）和 3.7（95%CI:0.05-1.40, P<0.001）；当年龄＞75 岁其 OR 分别为 17.10（95%CI: 2.98-97.85,P=0.005）和 46.82（95%CI: 15.55-140.96,P<0.001）；当 eGFR<60 mL/min 其 OR 分别为 1.6（95%CI: 0.93-2.73,P<0.001）和 2.38（95%CI: 1.82-3.12,P<0.001）；当 LVEF<40%其 OR 分别为 24.93（95%CI: 3.19-195.21,P<0.001）和 81.9（95%CI: 41.61-205.71,P<0.001）；当造影剂量>300ml 其 OR 分别为 1.12（95%CI: 1.03-1.21,P<0.001）和 2.00（95%CI: 1.00-3.99,P<0.001）（表三）。

表三：高危组和极高危组 CIN 危险因素逐步 Logistic 回归分析

Table 3　Risk factors of CIN by stepwise Logistic regression analysis in high and very high group

危险因素（高危组）	OR	95%CI	P	危险因素（极高危组）	OR	95%CI	P
性别（女）	2.5	0.07-0.29	<0.001*	性别（男）	3.7	0.05-1.40	<0.001*
年龄>75 岁	17.10	2.98-97.85	0.005*	年龄>75 岁	46.82	15.55-140.96	<0.001*
eGFR<60 mL/min	1.60	0.93-2.73	<0.001*	eGFR<60 mL/min	2.38	1.82-3.12	<0.001*
LVEF<40%	24.93	3.19-195.21	<0.001*	LVEF<40%	81.9	41.61-205.71	<0.001*
造影剂量>300ml	1.12	1.03-1.21	<0.001*	造影剂量>300ml	2.00	1.00-3.99	<0.001*

讨论：

在我们的研究中 CIN 的发生率是 11.3%（62/558），而与一些其他类似研究[3]中 6-30%的发病率相比较低，

这可能与 PCI 术前患者进行充分水化降低了 CIN 发生率相关。然而，在过去的 30 年里，随着造影剂越来越多的在诊断和介入过程中使用，造影剂肾病已成为医院获得急性肾功能衰竭的一个重要来源。越来越多的临床医生认为造影剂诱发的肾病在临床实践中是一个重要但低估了问题。根据 CIN 的不同定义，即术后血清肌酐增加 44.2 umol/L(0.5 mg/dl)，或基线值 25%以上，即反映了不同的肾功能的变化。前者对肾功能不全患者较为敏感，而后者对肾功能正常的患者更为敏感[5]。

目前肾功能不全和造影剂的用量是 PCI 术后发生 CIN 的主要相关因素[6]，其他 CIN 主要的相关因素包括年龄＞75 岁、糖尿病、心功能不全、贫血以及合并应用肾毒性药物（例如非甾体抗炎药等）[7]。CIN 的发生机制是多因素的，因而对于预测 CIN 的高危患者是非常重要的。其中糖尿病是 CIN 一个独立危险因素，对于 Mehran 造影剂肾病评估积分（＞11）为高风险患者，因此该项评分系统可有效预测对于该类患者行 PCI 术发生 CIN 的风险。

Brown 等[8]曾报道应用该评分系统可有效预测 CIN 发生风险。在 Mehran 等[2]研究中发现低危患者（≤5 分）发生 CIN 以及需要血液透析的比例分别为 7.5%和 0.04%，中危患者（6-10 分）比例分别为 14%和 0.12%，高危患者（11-15 分）比例分别为 26.1%和 1.09%，极高危患者（≥16 分）比例分别为 57.3%和 12.6%。本研究共纳入了 558 名冠心病合并糖尿病行冠脉造影术的患者，结果发现 PCI 术后 CIN 的发生率：低危组（7.6%）与中危组（7.5%）无统计学差异（P=0.976）；而高危组（32.4%）和极高危组（37.5%）相对于低危组 OR 分别为 4.54（P=0.032）和 6.06（P<0.001），住院时间和再住院率随着 Mehran 积分的增高而增加，其中在高危组中其再住院率为 25.0%。由于该评分方法未进行前瞻性研究，因此该评分目前未广泛应用于临床[7]，同时对于 PCI 术后应用 Mehran 积分与长期的心血管不良事件以及肾功能不全的关系还不清楚。Sgura[9]等报道 Mehran 积分可有效预测 ACS 患者短期以及长期 CIN 的发生风险，然而对于 ACS 患者不可忽略的是其血流动力学不稳定对于 CIN 发生的影响，其可能机制为由于心排量减少，全身血流量减少最终导致了肾血流量的下降，同时对于 ACS 患者行急诊 PCI，未及时水化，增加了造影剂在肾血管的浓度，因此目前没有研究表明 Mehran 积分是否适用于 ACS 患者 [10]。

Mehran 积分可预测行 PCI 术 CIN 发生风险、术后心血管事件，首先主要是由于高积分患者有多种并发症例如糖尿病、高血压以及肾功能不全等以及存在冠状动脉严重弥漫性病变；其次这类患者在手术过程中需要植入多枚支架以及使用更多的造影剂。本研究通过 Logistic 回归分析发现造影剂的用量为 CIN 的独立危险因素，当用量超过 300ml 时高危组和极高危组相对于低危组 OR 分别为 1.12 和 2.00，造影剂的使用剂量直接影响其在肾血管的浓度[11]。目前推荐造影剂用量[12]的计算公式：5ml×体重（Kg）/Cr(mg/dl)，最大用量不宜不超过 300 ml，本项研究显示用量超过 300ml 为 65(11.6%)，其中在高危组和极高危组中的比例分别为 59.4%和 50.0%。

目前对于 CIN 的预防主要采用术前水化的方式，但是有研究显示[13]，在应用造影剂前应用大剂量他汀类药物可以对 CIN 的预防起到作用。其对肾脏具有保护作用，可降低 CIN 的发生率，并且这种作用与其剂量及给药时间有相关性。

我们的研究仍然存在许多局限性，首先该研究为一回顾性研究，样本量较小。其次，术后肌酐数据几乎都是从术后 48h 内取得，没有取得术后 72 h 内的肌酐值，从而导致 CIN 的发病率降低。最后，在患者随访的时间，有些患者失访（包括转移到其他医院），我们可能没有获得完整的信息。由于没有有效手段治疗 CIN，因此识别 CIN 高危人群对于预防及减少 CIN 的发生是很有必要的，而 Mehran 积分可有效预测糖尿病患者行冠脉造影或经皮介入术后发生 CIN 危险因素。除了标准的水化治疗外，对于高危患者可通过减少造影剂的用量以降低 CIN 的发生率。

参考文献

[1]Nash K, Hafeez A, Hou S,et al. Hospital-acquired renal insufficiency[J]. Am J Kidney Dis, 2002,39(5):930-936.

[2]Mehran R, Aymong ED, Nikolsky E, et al. A simple risk score for prediction of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation[J]. J Am Coll Cardiol. 2004;44(7):1393–1399.

[3]Bagshaw SM, Culleton BF. Contrast-induced nephropathy: epidemiology and prevention[J]. Minerva Cardioangiol.2006; 54(1): 109-129.

[4]Sgura FA, Bertelli L, Monopoli D, et al. Mehran contrast-induced nephropathy risk score predicts short- and long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. Circ Cardiovasc Interv. 2010;3(5):491–498.
[5]Thomsen HS, Morcos SK. Risk of contrast-medium-induced nephropathy in high-risk patients undergoing MDCT--a pooled analysis of two randomized trials[J]. Eur Radiol.2009;19(4): 891-897.
[6] Stacul F, van der Molen AJ, Reimer P, et al. Contrast Media Safety Committee of European Society of Urogenital Radiology (ESUR). Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guide-lines[J]. Eur Radiol 2011;21(12):2527–2541.
[7]McCullough PA. Contrast-induced acute kidney injury[J]. J Am Coll Cardiol 2008; 51(15):1419–1428.
[8] Brown JR, DeVries JT, Piper WD, et al. Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. Serious renal dysfunction after percutaneous coronary interventions can be predicted[J]. Am Heart J 2008;155(2):260–266.
[9] Sgura FA, Bertelli L, Monopoli D, et al. Mehran contrast-induced nephropathy risk score predicts short- and long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation-myocardial infarction[J]. Circ Cardiovasc Interv 2010;3(5): 491–498.
[10] James MT, Samuel SM, Manning MA, et al. Contrast-induced acute kidney injury and risk of adverse clinical outcomes after coronary angiography a systematic review and meta-analysis[J]. Circ Cardiovasc Interv 2013;6(1):37–43.
[11]Marenzi G, Assanelli E, Campodonico J, et al. Contrast volume during primary percutaneous coronary intervention and subsequent contrast-induced nephropathy and mortality[J]. Ann Intern Med. 2009;150(3):170–177.
[12]Cigarroa RG, Lange RA, Williams RH, et al. Dosing of contrast material to prevent contrast nephropathy in patients with renal disease[J]. Am J Med. 1989;86(6):649-52.
[13]Bonnet J, McPherson R, Tedgui A, et al. Comparative effects of 10-mg versus 80-mg Atorvastatin on high-sensitivity C-reactive protein in patients with stable coronary artery disease: results of the CAP (Comparative Atorvastatin Pleiotropic effects) study[J]. Clin Ther, 2008,30(12):2298-2313

大黄-甘草治疗溃疡性结肠炎作用机制的网络药理学研究

李秀[1]，刘洪孛[1]，王启晓[1]，杨晨[1]，顾晨露[1]，童珊珊[1]

（1.江苏大学药学院，江苏 镇江 212001）

【摘要】目的：基于网络药理学的理论和分析方法及生物信息数据库探究大黄-甘草药对治疗溃疡性结肠炎（Ulcerative Colitis, UC）的药理作用机制和特点。**方法：**运用生物信息数据库、分析软件、R 语言等分析方法，将大黄-甘草药对的 99 个潜在有效成分及其对应的 253 个潜在靶点与 UC 的 910 个差异基因构建调控网络，通过得到的相应预测靶点进行蛋白-蛋白相互作用分析、GO 功能富集分析、 KEGG 通路富集分析。**结果：**IL-6、MMP9、IL-1B、CCL2、ICAM1、VCAM1、SPP1、MMP1、SELE 和 MMP3 靶点之间相互作用更为紧密，这些靶点主要参与主要涉及脂多糖反应等生物过程及细胞因子活性等分子功能，主要富集于肿瘤坏死因子、糖尿病并发症中的糖基化终末产物及其受体等信号通路。**结论：**大黄的芦荟大黄素、(-)-儿茶素和甘草的槲皮素、山奈酚可能是大黄-甘草药对发挥药理作用的关键性成分，它们通过下调 IL-1B、NOS2、IL-6、CCL2、ICAM1、VCAM1 和 MMP9 基因的表达，上调 PPARG 的表达，主要参与调控 IL-17、Toll 样受体、细胞因子相互作用信号通路而发挥“多成分-多靶点-多功能-多通路”的整体性药理作用。

【关键词】大黄-甘草药对;溃疡性结肠炎;网络药理学;药理机制

Mechanism of Rhubarb-Licorice in the treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology

LI Xiu[1]，LIU Hong-bei[1]，WANG Qi-xiao[1]，YANG Chen[1]，GU Chen-lu[1]，TONG Shan-shan[1]

(1.College of Pharmacy, Jiangsu University, Jiangsu, Zhenjiang 212001, China)

【ABSTRACT】Objective: To explore the pharmacological mechanism of Rhubarb-Licorice on ulcerative colitis based on the theory and analysis method of network pharmacology and biological information databases. **Method:** Biological information databases, analysis software and R language were used to build the regulatory network between the 99 effective potential components in Rhubarb-Licorice, 253 corresponding potential targets and 910 differential genes of ulcerative colitis. PPI, GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment analyses were performed on the predicted targets. **Result:** IL-6, MMP9, IL-1B, CCL2, ICAM1, VCAM1, SPP1, MMP1, SELE and MMP3 targets had closer interaction. These targets mainly involved in response to lipopolysaccharide reaction and other biological processes and molecular functions such as cytokine activity, which are mainly concentrated in tumor glycosylation terminal and their receptor in diabetic complications. **Conclusion:** Aloe emodin, (-)-catechin of Rhubarb and quercetin, kaempferol of Licorice may be the key components of Rhubarb - Licorice on the pharmacological action. The "components-targets-multifunction-multipath" holistic pharmacological effect is primarily acted via down-regulating the expression of IL-1B, NOS2, IL-6, CCL2, ICAM1, VCAM1 and up-regulating the expression of MMP9, regulating IL-17, Toll-like receptor signaling and cytokine receptor interaction pathways.

【KEY WORDS】Rhubarb-Licorice; Ulcerative colitis; Network pharmacology; Pharmacological mechanism

[基金项目] 国家自然科学基金（NO.81673574）

[作者简介] 李秀（1995—），女，硕士研究生；童珊珊（通讯作者），教授，硕士生导师，Email：tongss@126.com

溃疡性结肠炎（Ulcerative Colitis, UC）是一种结肠和直肠慢性非特异性炎症性疾病[1]，其病因尚不明确、病程漫长且反复发作，属于胃肠病的疑难杂症之一。在中医理论中将该病分为大肠湿热证、热毒炽盛证、肝郁脾虚证、脾肾阳虚证等 7 个症型[2,3]。大黄-甘草汤出自于《金匮要略》卷中，具有通腑泄热、和胃止呕之功效。何春芳等[4]将大黄-甘草汤灌肠治疗脓毒症，结果显示大黄甘草汤作用显著，可明显改善肠功能障碍。网络药理学作为一种立足于“多成分-多靶点-多通路”研究思路的新的方法论，在寻找潜在的作用靶点或可能干预的疾病、探讨药理作用机制等方面的研究日益增多[5-7]。但目前对于大黄-甘草治疗 UC 的药理机制研究较少，因此本研究基于网络药理学从 TCMSP、GEO 等生物信息数据库筛选大黄-甘草药对有效成分，查找溃疡性结肠炎等疾病的差异基因并进行数据统计和处理，运用 GO、KEGG 富集分析等方法建立中药成分-靶点-疾病的调控网络、功能网络和通路网络，进而研究该药对中两者在药理作用方面的交互及机制。

1 实验方法

1.1 大黄、甘草有效成分靶点的获取

从 TCMSP 数据库中以 OB（口服生物利用度）≥30%、DL（药物相似性）≥0.18 为标准筛选大黄和甘草中具有良好药物相似性和 ADME（吸收、分布、代谢、排泄）特性的有效成分，同时获取所有化学成分的靶点信息。整理得到一个包含中药名、有效成分 ID、有效成分名及靶点的有效成分靶点文件；基于从各数据库平台下载的靶点与其 ID 的对应关系编写 Perl 脚本，将有效成分靶点文件中的靶点名转换为基因 Symbol。

1.2 疾病相关基因的获取

1.2. 1 疾病基因样本平台文件及探针举证文件的下载

在 GEO 数据库下的 GEO DataSets 数据库中检索“ulcerative colitis”，输出其中条目类型（Entry Type）为 Series、研究类型（Study Type）为 Expression Profiling by Array、研究对象为人类（Homo Sapiens）的结果，一共获得了 87 条结果。其中 Noble CL 等[3]关于健康和溃疡性结肠炎患者的研究样本大于 20 且同时存在正常样本和患者样本，满足本实验研究所需的所有条件。下载其平台文件 GPL1078 和探针举证文件 GSE11223_series_matrix。

1.2. 2 基因注释

根据平台文件中探针“ID”列与“Gene Symbol”列之间的对应关系编写 Perl 脚本，将探针举证文件中的探针 ID 改为基因 symbol 并输出基因举证文件，该文件中基因的表示方式与 1.1 中相同，以便于进行后续操作。

1.2. 3 数据分组

从探针举证文件的样本描述中可知该数据共 27 个正常样本和 87 个 UC 患者样本，分别建立文本文档，编写 Perl 脚本并将 1.2.2 的基因举证文件输出为完成分组的样本表达文件，以便差异分析。

1.2.4 根据 Adj.*P*.Val 值进行差异分析获取差异基因

编写 R 脚本，设置 $\log_2$FC 的绝对值“|$\log_2$FC|” ＞1、校正后的 *P* 值“adj.*P*.Val”＜0.05 阈值等参数，输入 1.2.3 的样本表达文件，载入“limma”和“pheatmap”程序包，实现差异分析，获得热图、火山图、满足阈值的差异基因及上调、下调的差异基因文件。

1. 3“药对有效成分-靶点”调控网络的构建

编写 Prel 脚本，由 1.1 所获得的有效成分靶点文件和 1.2.4 所获得的差异基因文件，将两者的基因取交集，获取大黄、甘草参与 UC 调控的预测靶点的基因列表，及 network 文件（有效成分与基因的对应关系）、type 文件（结点属性）、有效成分列表；将 network 文件导入 Cytoscape3.5.0-RC2，再导入 type 文件后调整网络图的“style”；根据“degree”值对网络进行拓扑分析。

1. 4 预测靶点蛋白互作分析（PPI）

将 1.3 的基因列表输入 STRING 中，限定为“Homo sapiens”，得出蛋白-蛋白相互作用网络（*P*≥0.04）；下载该网络的 TSV 文件用 cytoscape 打开，用“NetworkAnalyzer”工具进行网络分析，并根据数据设置风格的可视化参数。

1. 5 GO 功能富集分析

编写 R 脚本，载入“org.Hs.eg.db”程序包，将 1.3 的基因列表中的基因 symbol 对应为基因 ID（ENTREZID），

输出为基因 ID 文件，用于 GO 和 KEGG 分析；编写 R 脚本，输入基因 ID 文件，设置 $P<0.05$ 等，载入“colorspace”、“stringi”、“ggolot2”、“DOSE”、“clusterProfiler”、“enrichplot”程序包，输出生物过程（BP）、分子功能（CC）和细胞组成（MF）的柱状图、气泡图等。

1. 6 KEGG 信号通路富集分析及 KEGG 网络的构建

编写 R 脚本，输入 1.5 的基因 ID 文件，设置 $P<0.05$，载入 1.5 所用的的程序包，将基因 ID 转换为基因 symbol，输出柱状图、气泡图和 KEGG 数据文件；根据 KEGG 数据文件编写 Perl 脚本，构建通路和基因 symbol 的 network 关系文件和 node 属性文件，以及网络的通路和基因列表文件；将两个文件导入 cytoscape，以“degree”修改结点的大小等其他风格，得到 KEGG 网络。

2 结果

2.1 药对有效成分及其靶点筛选结果

借助 TCMSP 数据分别得到了 16 个大黄的有效成分及 93 个甘草的有效成分，获取了 654 个大黄化学成分的靶点和 2506 个甘草化学成分的靶点。在删除 11 个无靶点成分之后，筛选出 10 个大黄的有效成分和 89 个甘草的有效成分。删除无效和重复靶点得到 53 个大黄有效成分靶点和 200 个甘草有效成分靶点，即大黄-甘草药对经筛选后存在 99 个潜在有效成分及 253 个潜在靶点。

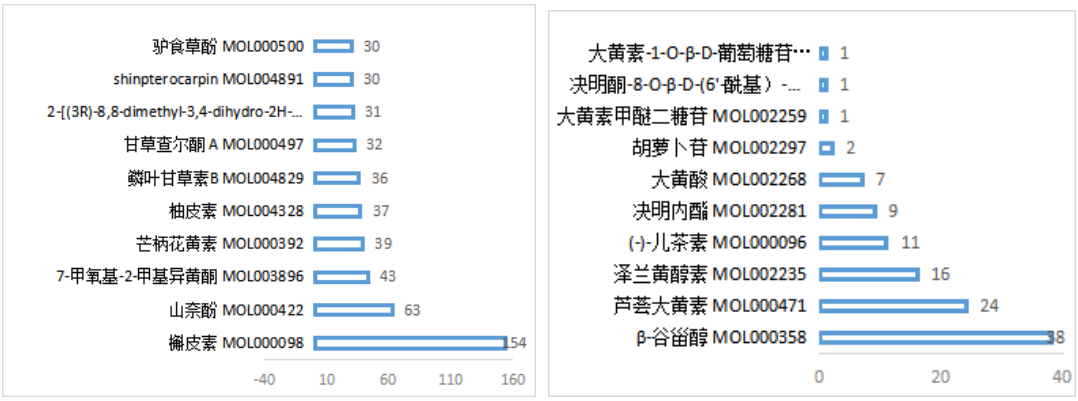


图 1 靶点数降序前 10 个有效成分及其靶点数（左：甘草；右：大黄）

2.2 UC 疾病相关基因数据

由 GEO 得到的 UC 相关样本数据经差异分析，从所测定的 19919 个基因中得到 910 个差异基因，其中 575 个基因为上调基因、335 个基因为下调基因。从热图可直观观察到正常样本（左蓝）和 UC 患者样本（右红）基因表达的差异及表达情况，根据火山图亦可大致判断基因的总体数量情况。

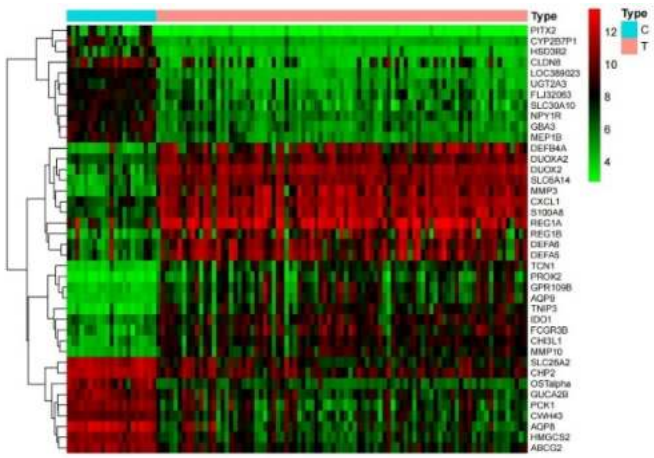
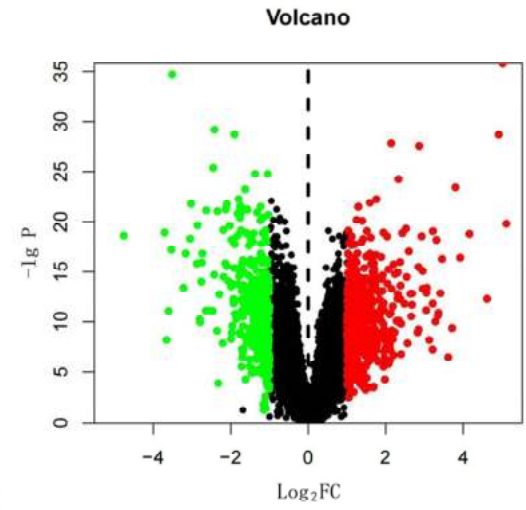


图 2 UC 相关的差异基因热图



横坐标代表差异倍数，纵坐标代表 *P* 值

图 3　UC 相关的差异基因火山图

表 1　UC 差异显著性前 5 的上调（左）、下调（右）基因

ID	Log_2FC	adj.*P*.Val	ID	Log_2FC	adj.*P*.Val
SLC6A14	5.020323026	1.55E-36	LOC389023	-3.51440476	1.92E-35
DUOX2	4.918552893	2.02E-29	SLC23A1	-2.42091334	6.57E-30
TIMP1	2.142125648	1.43E-28	DPP10	-1.902833	2.02E-29
LCN2	2.864257608	2.62E-28	AQP7	-2.45286847	4.10E-26
PI3	2.330014208	5.54E-25	SLC19A3	-1.04804087	1.68E-25

2.3 大黄-甘草药对治疗 UC 的预测靶点及调控网络的构建

将这些 UC 疾病相关基因与大黄和甘草的潜在靶点建立交集并绘制韦恩图，结果显示，三者交叉的靶点 NOS2、PPARG、KDR 和 IL-1B 即为大黄和甘草共同调控 UC 的核心预测靶点，同时两者有 46 个交集靶点，甘草还另有 22 个单独调控 UC 的靶点。

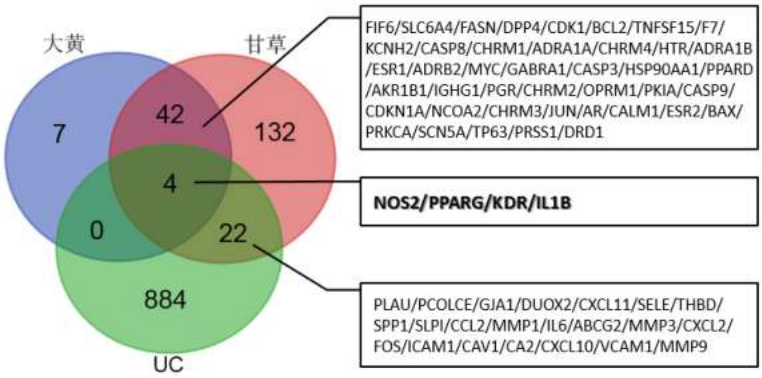


图 4　大黄-甘草的有效成分靶点与 UC 疾病相关基因的韦恩图

在 Cytoscape 上构建“有效成分-靶点”网络，形成了 106 个结点和 180 个关系对，其平均自由度为 3.396。由此获得 26 个该药对参与 UC 调控的预测靶点，4 个大黄潜在有效成分和 76 个甘草潜在有效成分以“多成分-多靶点”的形式参与该调控网络。

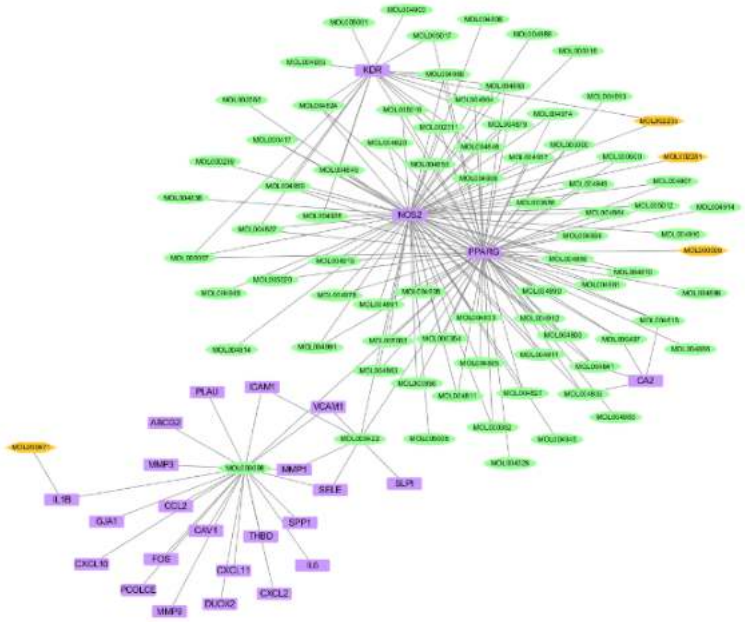


图 5 “有效成分-靶点” 调控网络图

2. 4 蛋白-蛋白相互作用网络 PPI 结果

在 STRING 上对 26 个预测靶点进行 PPI 分析，共形成 159 个蛋白互作关系对，在图中可看到有 1 个独立的结点，该网络的平均节点度值为 12.2，平均局部聚类系数为 0.773，PPI 富集 *P* 值小于 1.0-16，具有统计学意义。对网络中的 25 个结点运用 Cytoscape 的“Centiscape”计算节点度，平均值为 12.72，最大值为 22.0、最小值为 1.0，其中度值前 10 位的靶点为 IL-6、MMP9、IL-1B、CCL2、ICAM1、VCAM1、SPP1、MMP1、SELE、MMP3，这些靶点很可能是参与 UC 治疗的关键靶点



图 6 预测靶点的蛋白相互作用网络图（左）及其拓扑网络图（右）

2. 5 GO 富集分析结果

经 GO 富集分析共得到具有统计学意义的 608 个生物过程条目、12 个细胞组成条目和 26 个分子功能条目，其中生物过程主要涉及脂多糖反应、细菌来源分子反应、白细胞游走、脂多糖的细胞反应等、细菌来源分子的细胞反应等，细胞组成方面影响涉及脂筏、膜微区、膜区、初期内体、细胞顶端等，分子功能主要包括细胞因

子活性、趋化因子活性、整合素结合、趋化因子受体结合、细胞因子受体结合等。BP、CC 和 MF 柱状图中长度越长表示富集的基因越多，颜色越红表示富集的显著性越高。

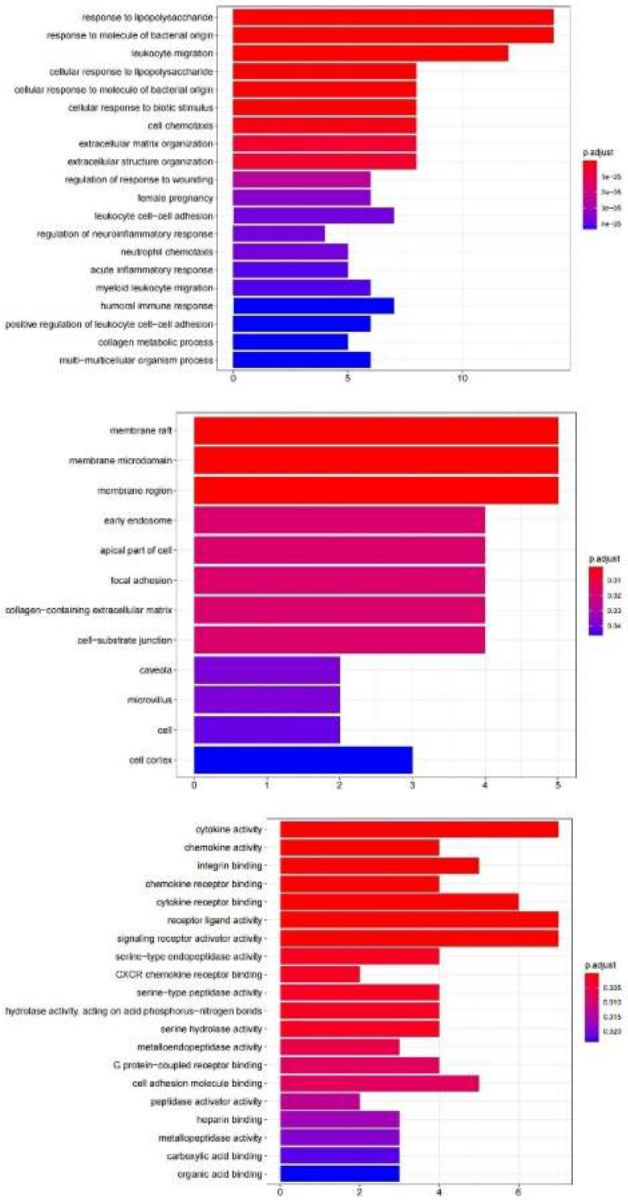


图 7　BP、CC 和 MF 的富集柱状图

表 2　GO 富集分析前 3 的 BP、CC 和 MF

类别	ID	条目	基因 ID	基因数/个	*P* 值
生物过程(BP)	GO:0032496	脂多糖反应	NOS2/IL-1B/ICAM1/SELE/VCAM1/SLPI/FOS/IL-6/GJA1/CCL2/THBD/CXCL11/CXCL2/CXCL10	14	1.76E-18
	GO:0002237	对细菌来源分子的反应	NOS2/IL-1B/ICAM1/SELE/VCAM1/SLPI/FOS/IL-6/GJA1/CCL2/THBD/CXCL11/CXCL2/CXCL10	14	3.03E-18
	GO:0050900	白细胞游走	IL-1B/MMP1/ICAM1/SELE/VCAM1/IL-6/CAV1/CCL2/THBD/CXCL11/CXCL2/CXCL10	12	8.01E-13

细胞组成(CC)	GO:0045121	脂筏	KDR/ICAM1/SELE/CAV1/GJA1	5	5.03E-05
	GO:0098857	膜微区	KDR/ICAM1/SELE/CAV1/GJA1	5	5.11E-05
	GO:0098589	膜区	KDR/ICAM1/SELE/CAV1/GJA1	5	6.10E-05
分子功能(MF)	GO:0005125	细胞因子活性	IL-1B/IL-6/CCL2/CXCL11/CXCL2/CXCL10/SPP1	7	2.25E-08
	GO:0008009	趋化因子活性	CCL2/CXCL11/CXCL2/CXCL10	4	7.42E-07
	GO:0005178	整合素结合	KDR/IL-1B/ICAM1/VCAM1/SPP1	5	1.24E-06

2.6 KEGG 信号通路富集分析结果

对预测靶点进行 KEGG 分析，结果显示（图 8），降序 *P* 值前 20 位的信号通路为肿瘤坏死因子信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、IL−17 信号通路、类风湿性关节炎信号通路、糖尿病并发症中的糖基化终末产物及其受体信号通路、疟疾信号通路、Toll 样受体信号通路、细胞因子相互作用信号通路、非洲锥虫病信号通路、病毒蛋白与细胞因子及其受体相互作用信号通路、南美锥虫病信号通路、NF-kB 信号通路、甲型流感信号通路、肿瘤转录失控信号通路、百日咳信号通路、阿米巴病、耶尔森菌感染、松弛素信号通路、抗叶酸途径信号通路及军团杆菌病信号通路，这些信号通路可能是大黄-甘草药对调控 UC 的重要通路。

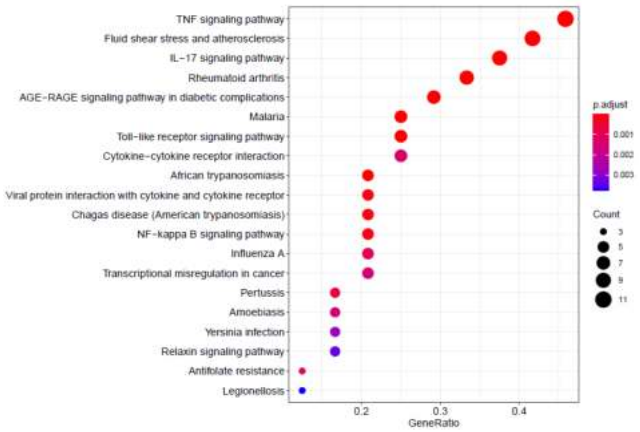


图 8　KEGG 富集气泡图

表 3　KEGG 富集分析前 5 的通路

ID	通路描述	基因ID	基因数/个	*P*值
hsa04668	肿瘤坏死因子	IL-1B/ICAM1/SELE/VCAM1/MMP3/FOS/MMP9/IL-6/CCL2/CXCL2/CXCL10	11	4.99E-15
hsa05418	流体剪切应力与动脉粥样硬化	KDR/IL-1B/ICAM1/SELE/VCAM1/FOS/MMP9/CAV1/CCL2/THBD	10	2.75E-12
hsa04657	IL−17	IL-1B/MMP1/MMP3/FOS/MMP9/IL-6/CCL2/CXCL2/CXCL10	9	3.13E-12

hsa05323	类风湿性关节炎	IL-1B/MMP1/ICAM1/MMP3/FOS/IL-6/CCL2/CXCL2	8	1.49E-10
hsa04933	糖尿病并发症中的糖基化终末产物及其受体	IL-1B/ICAM1/SELE/VCAM1/IL-6/CCL2/THBD	7	1.08E-08

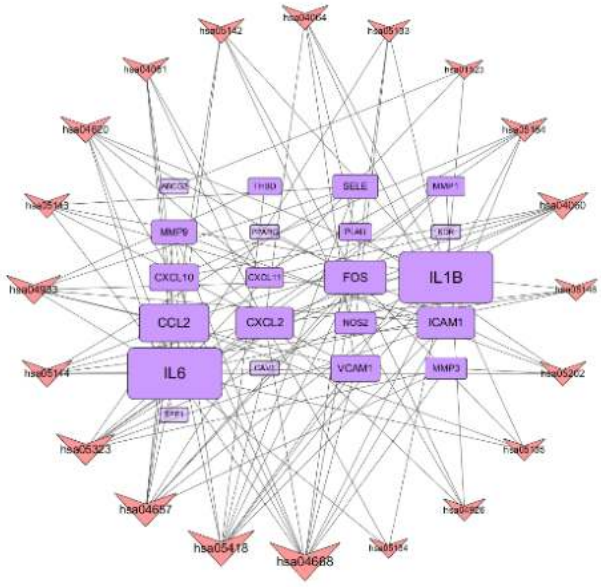


图 9　KEGG 拓扑分析图

3 讨论

本文创新性地将差异基因的上调与下调融入靶点的分析与筛选中，通过考察有效成分与预测靶点的调控网络、预测靶点的蛋白互作分析、预测靶点的功能和通路富集分析，实现了对大黄-甘草治疗 UC 的药理机制的预测。由大黄-甘草的有效成分靶点与 UC 疾病相关基因的韦恩图得到了大黄和甘草共同参与 UC 调控的核心预测靶点 NOS2、PPARG、KDR 和 IL-1B。通过 Cytoscape 分析得到了大黄-甘草潜在有效成分与靶点之间的调控网络图，该网络拓扑分析结果显示，Degree 序前 2 位的有效成分为甘草中的 MOL000098（槲皮素）、MOL000422（山奈酚），之后的有效成分度值相差较小；自由度值前 4 位的靶点为 NOS2、PPARG、KDR 和 CA2，与网络图中直观表示相一致。

GO 功能富集分析显示，大黄-甘草参与 UC 调控的预测靶点基因 IL-1B、NOS2、KDR、PPARG 主要富集于脂多糖反应、对细菌来源分子的反应、白细胞游走等生物学过程，发挥细胞因子活性、整合素结合等分子功能。近年对 IL-1β 和溃疡性结肠炎的相关研究比较充分，张海峰等[8]对比了 42 例 UC 患者和 20 例健康志愿者的结肠组织中 IL-1β 的表达差异，且得出其阳性表达率与病情严重程度成正相关的结论，在 UC 中具有重要的临床意义。Kaminsky 等[9]研究抑制 IL-1β 对小鼠结肠炎模型的影响，结果表示抑制其表达可对 UC 起到一定的治疗作用。由“有效成分-靶点” 调控网络图可以推测，大黄-甘草药对的 2 个有效成分 MOL000471（芦荟大黄素）、MOL000098（槲皮素）对 UC 的调控作用可能是通过下调 IL-1B 基因的表达实现的。Qiu 等[10]研究了芦荟大黄素对小鼠溃疡性结肠炎模型的作用机制，发现其可以降低 IL-1B、TNF-α、PEG2 的水平，同时还能抑制 *NF-kB* 通路的激活。黄瑞雪[11]以槲皮素配伍姜黄素对小鼠溃疡性结肠炎进行药效评价，结果显示两者可改善小鼠脓血便等其他症状。NOS2 为 UC 的上调基因，调控该基因的大黄-甘草有效成分较多，如大黄的 MOL002235（泽兰黄醇素）和 MOL002281（决明内酯）及甘草的 MOL000422（山奈酚）、MOL002311（甘草酚）、MOL004908（光甘草定）等。KDR 基因在 UC 中上调，受大黄 MOL002235（泽兰黄醇素）和 18 种甘草有效成分的调控。PPARG 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的编码基因，主要负责脂类的分解代谢等，还与肥胖症、糖尿病、动脉硬化[12]

和癌症等多种疾病相关，PPARG 则是脂肪细胞分化和葡萄糖稳态的关键调节因子。研究表明，PPARγ 下在维持肠道正常的免疫功能方面发挥着重要作用[13]，在 UC 患者中该基因下调，PPARγ 表达减少，细胞因子表达增加，将会导致肠粘膜受损，引起肠道炎症[14, 15]。因此运用 PPARγ 激活剂可对 UC 起到治疗作用[16]。推测大黄中 MOL000096[-(-)儿茶素]和甘草的多种成分可能通过激活 PPARγ 而发挥作用。

KEGG 拓扑分析图结果显示，预测靶点 IL-6、IL-1B、MMP9、ICAM1、VCAM1 等基因主要参与肿瘤坏死因子、流体剪切应力与动脉粥样硬化、IL-17 等信号通路。在本文所得的数据中，IL-6 基因的差异显著性 *P* 值为 4.63E-05，小于 IL-1B 的显著性，亦有以两者的指标作为考察某个药物对溃疡性结肠炎的疗效，使 IL-6 水平升高并降低 IL-1B 的水平以扭转失衡状态[17-19]。ICAM1 和 VCAM1 基因与炎症相关，在促进炎症部位的黏连性、控制肿瘤恶化和转移以及调节机体免疫反应中起重要作用；VCAM-1 是一种重要的细胞粘附分子，可在 IL-1，TNF-α 等细胞因子作用后表达，内皮细胞表面的 VCAM-1 能在细胞因子的诱导下高水平的表达。MMP9 编码基质金属蛋白酶 9，能水解细胞外基质并破坏内皮连接，使基底膜丧失屏障保护功能，则肠黏膜损伤加剧，同时血管通透性也增加[20]。

通过上述对基因功能的分析和其对应的 GO 分析及 KEGG 分析结果可以看出，在抗炎功能上具有相关性的基因，共同参与了与其功能相关的多个与抗炎有关的信号通路，因此，这些靶点、通路与功能形成了闭环，形成了合理的调控机制。可预测 UC 与这些疾病如类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、糖尿病、肿瘤存在一定的联系。

目前，很大一部分实验研究以脂多糖诱导建立的 UC 疾病为模型，本实验数据显示，预测靶点所富集度最高的的分子生物过程为 GO:0032496(脂多糖反应)，因此进行大黄-甘草药对治疗 UC 的动物实验时，通过脂多糖诱导建立模型是合理的。但是基于目前的研究结果尚不能准确描述其具体的作用机制及特点，需在后续实验中进行更深一步探究。

参考文献

[1] Hiroshi Nakase, Noriko Sato, Naomi Mizuno, et al. The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis[J].Autoimmun Rev, 2022,21(3):103017.

[2] 张声生,沈洪,郑凯,等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见[J]. 中华中医药杂志. 2017,32(08):3585-3589.

[3] Noble CL, Abbas AR, Cornelius J, et al. Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis[J]. Gut. 2008,57(10):1398-1405.

[4] 何春芳. 俞立超, 谢海芳. 大黄甘草汤灌肠治疗脓毒症并发肠功能障碍临床研究[J].新中医, 2021,53(01):1-3.

[5] Su Youn Baek, Eun Hye Lee, Tae Woo Oh, et al. Network Pharmacology-Based Approaches of Rheum undulatum Linne and Glycyrriza uralensis Fischer Imply their Regulation of Liver Failure with Hepatic Encephalopathy in Mice[J].Biomolecules, 2020,10(3):437-453.

[6] 毛银枫, 崔松香, 华臻, 等. 基于网络药理学探究黄芪-白术药对治疗骨质疏松性骨折的作用机制[J].江苏大学学报(医学版), 2022,32(01):13-17.

[7] 王福燕, 江丰, 范小龙, 等. 基于化学成分药理作用及网络药理学的菝葜质量标志物预测分析[J]. 时珍国医国药,20223,33(11):2805-2809.

[8] 张海峰, 周国雄, 张彬. IL-1β 在溃疡性结肠炎中的表达及意义[J]. 南通大学学报(医学版),2016,36(05):417-420.

[9] Lauren W Kaminsky, Rana AL-Sadi, Thomas Y Ma. IL-1β and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier[J].Front Immunol, 2021,12:767456.

[10] Xiang Qiu, Heying Pei, Hengfan Ni, et al. Design, synthesis and anti-inflammatory study of novel N-heterocyclic substituted Aloe-emodin derivatives[J]. Chem Biol Drug Des, 2021,97(2):358-371.

[11] 黄瑞雪. 姜黄素—槲皮素复方自微乳制备与药效学评价 [D]. 北京中医药大学, 2017.

[12] Stephanie A Cevallos, Jee-You Lee, Eric M Velazquez, et al. 5-Aminosalicylic Acid Ameliorates Colitis and Checks Dysbiotic Escherichia coli Expansion by Activating PPAR-g Signaling in the Intestinal Epithelium[J].

mBio,2021,12(1):227-237.
[13] Shuang Luo, Jinrong He, Shaowei Huang, et al. Emodin targeting the colonic metabolism via PPARγ alleviates UC by inhibiting facultative anaerobe[J].Phytomedicine, 2022,104:154106.
[14] Ping Li, Yuqing Wang, Jun Luo, et al. Downregulation of OCTN2 by cytokines plays an important role in the progression of inflammatory bowel disease[J].Biochem Pharmacol,2020,178:114115.
[15] Atug O, Tahan V, Eren F, et al. Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) gene in inflammatory bowel disease[J].J Gastrointestin Liver Dis, 2008,17(4):433-437.
[16] Lewis JD, Lichtenstein GR, Deren JJ, et al. Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial[J]. Gastroenterology, 2008,134(3):688-695.
[17] 刘凯, 熊晶晶, 刘梅, 等. 酪酸梭菌、美沙拉嗪、蒙脱石散对溃疡性结肠炎大鼠血 IL-6、IL-8、IL-10 及 TNF-α 水平的影响[J]. 免疫学杂志, 2015,31(11):931-936.
[18] 曹燕飞. 疏肝健脾法对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-6、IL-10 水平及结肠组织 Mek1/2 基因表达影响的研究 [D]. 甘肃中医学院, 2014.
[19] 李彦龙, 伍春, 廖志峰, 等. 薏苡仁水提液对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-6、IL-10 的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013,15(09):42-45.
[20] Sanam Soomro, Suresh Venkateswaran, Kamala Vanarsa, et al. Predicting disease course in ulcerative colitis using stool proteins identified through an aptamer-based screen[J].Nat Commun,2021,12(1):224-235.

中医药牵头紧密型医疗集团中药数据共享机制研究：基于扎根理论创新视角

李雪燕[1]、洪日[2]

（[1]安徽中医药大学 安徽省合肥市瑶海区磨店街道龙子湖路350号 230012；[2]合肥综合性国家科学中心数据空间研究院）

【摘要】针对中医药牵头紧密型医疗集团和分级诊疗制度建设背景下，中医药数据要素价值潜力尚未激活，“数据壁垒”依然存在，无法满足数据驱动的中医药创新健康发展问题，对中药数据要素资源提出现实需求，聚焦适用于中医药牵头紧密型医疗集团以提升数据质量为基础、以保障数据共享安全为依托的数据共享模式，以扎根理论创新研究方法视角出发，通过安徽省中医药大学附属医院紧密型医疗集团数据共享进行案例实践。创新点其一是构建中医药牵头紧密型医疗集团中医药数据质量提升机制，探讨优化中医药数据的收集、存储、分析和管理路径；其二是挖掘中医药牵头紧密型医疗集团中医药数据共享和隐私安全的关键影响因素，探讨将中药数据与现代医学数据进行有效整合和共享过程中如何保障中药数据的安全和隐私。通过本研究，为中医药牵头紧密型医疗集团实现区域内线上线下、院内院外中药数据的质量提升、共享和隐私安全平衡提供理论模式借鉴，同时为促进中药数据资源管理提供有益的实践思路。

溶瘤纳米药物的设计与抗肿瘤应用

李亚超*，徐翔晖

湖南大学，湖南省长沙市岳麓区天马路 27 号，410011

溶瘤治疗是一种极具发展潜力的生物治疗手段，通过直接裂解肿瘤细胞，并激活肿瘤特异性免疫反应发挥抗肿瘤作用。然而，溶瘤病毒药物的生物安全性和给药方式阻碍了溶瘤治疗药物的发展。利用现代生物技术和纳米技术，通过调控多肽序列与结构，有望模拟病毒的生物学功能与活性。我们利用树状多肽纳米组装体在仿病毒构筑、生物活性放大、靶向递送功能构建中具有的天然优势，模拟病毒的基本结构和功能，通过纳米技术构筑溶瘤纳米药物。本研究中，我们设计并合成了手性仿溶瘤病毒纳米药物，成功模拟了溶瘤病毒的药效学活性（图 1）。通过手性所介导的肿瘤识别和抗蛋白酶降解等，手性溶瘤纳米药物展现出了高效的溶瘤活性和接近 100%的肿瘤抑制率，同时可有效激活系统性抗肿瘤免疫，包括细胞因子释放和淋巴细胞激活。本研究有望为溶瘤药物的设计提供一种新的策略。

【关键词】溶瘤治疗；肿瘤免疫；手性识别；溶瘤纳米药物

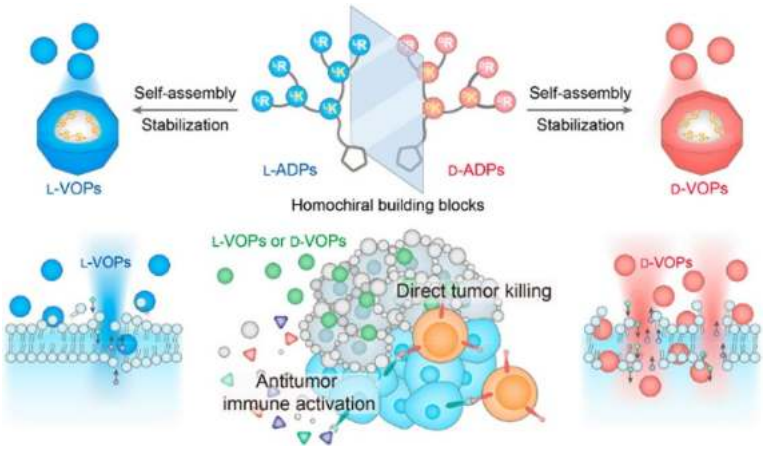


图 1. 手性溶瘤纳米药物结构和作用机制示意图

参考文献

[1] Yachao Li, and Xianghui Xu*, *et al*. "Enantiomeric Virus-Inspired Oncolytic Particles for Efficient Antitumor Immunotherapy" *ACS Nano* 2023, DOI: 10.1021/acsnano.3c05288.

[2] Yachao Li, and Xianghui Xu*, *et al*. "Bio-Responsive Macromolecular Drug and Small‐Molecular Drug Conjugates: Nanoparticulate Prodrugs for Tumor Microenvironment Heterogeneity Management and Therapeutic Response Enhancement. " *Small* 2023, DOI: 10.1002/smll.202301656

[3] Yachao Li, and Xianghui Xu*, *et al*. "Nanomedicine solutions to intricate physiological-pathological barriers and molecular mechanisms of tumor multidrug resistance." *Journal of Controlled Release* 2020, 323, 483.

CD44 targeting nanodrug based on chondroitin sulfate for melanoma therapy by inducing mitochondrial apoptosis pathways

Yan Li[a, b, c], Huiwen Hou[a, b, c], Zengmei Liu[a, b, c], Wen Tang[a, b, c], Jie Wang[a, b, c], Lu Lu[a, b, c], Jiaai Fu[a, b, c], Didi Gao[a, b, c], Feiyan Zhao[a, b, c], XinQing Gao[a, b, c], Peixue Ling[a, b, c, d], Fengshan Wang[a, b,d], Feng Sun*[, a, b, c], Haining Tan*[, a, b, c, d]

（[a] National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Qingdao 266237, China；[b]NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Carbohydrate-Based Medicine, Shandong University, Qingdao 266237, China；[c]Shandong Provincial Technology Innovation Center of Carbohydrate, Shandong University, Qingdao 266237, China；[d] School of Pharmaceutical sciences, Shandong University, Jinan, 250012, China）

【**Abstract**】Neovascularization is crucial to the occurrence and progression of tumors, and the development of antiangiogenic drugs has essential theoretical value and clinical significance. However, antiangiogenesis therapy alone cannot meet the needs of tumor therapy. Meanwhile, polysaccharides are ideal drug carriers with promising applications in drug modification and delivery. In this research, we developed a novel redox and acid sensitive nanodrug (CDDP-CS-Cys-EA, CCEA) composed of chondroitin sulfate (CS), antiangiogenic peptide (endostatin2-alft1, EA) and chemotherapeutic drug (cisplatin, CDDP). CCEA exhibited redox and acid responsiveness, better blood hemocompatibility (hemolysis rate < 5%), the ability to target tumors (CD44-mediated endocytosis), and strong anti-angiogenesis and anti-tumor characteristics in vitro. Moreover, CCEA showed excellent antitumor activity and low toxicity in B16 xenograft mice. It also has been confirmed that CCEA induced tumor cell apoptosis through promoting the expression of Bax, suppressing the expression of Bcl-2, decreasing mitochondrial membrane potential, releasing cytochrome C (Cyto C), and enhancing the activities of Caspase 9 and Caspase 3. The results of this paper provided a theoretical basis and insight for the development of antitumor drugs.

【**Key words**】chondroitin sulfate, antiangiogenic peptide, cisplatin, antitumor, tumor microenvironment

中药及复方药效物质基础研究新技术与新方法

李耀磊，王莹，程显隆，金红宇，魏锋，马双成

（中国食品药品检定研究院，北京 102629）

【摘要】目的：浅析中药及复方中药效物质基础研究新技术与新方法，以期为中药有效性与质量可控性研究提供科学支撑。**方法：**基于理论认知、突出成果及临床应用角度，分析中药及复方药效物质基础研究的一般思路；从化学成分分析到体内移行成分识别，概述中药药效物质基础研究的新技术与新方法，涵盖了关键药效成分的揭示与效用机制的阐释；对现阶段存在的问题进行分析，并对未来技术方法的发展进行展望。**结果：**现有的中药及复方药效物质基础研究的一般思路主要包括：基于“化学成分-活性成分”的体外研究思路；基于“体内成分-药效作用”的分子效用特征体内研究思路。关键药效成分的发现技术涵盖了生物色谱、配体垂钓、分子印迹、超滤亲和、器官芯片、人工智能、生物信息等；有效成分的药效评价及机制阐释技术主要包括三维细胞、类器官、生物 3D 打印等。目前存在的问题主要聚焦在忽略成分协同关系、高内涵物质被忽略、大分子物质研究薄弱等。**结论：**药效物质基础研究技术方法的发展是中药及复方效用表征的关键，应关注临床用药为基准的创新思路开拓、单一技术创新和集成方法创新的开发与应用、“源于中药，创新中药”的方向拓展。

【关键词】中药，复方，药效物质基础，新技术，新方法

NPHP3 基因突变致婴幼儿肝肾损害伴贫血的铁治疗

李紫薇，李智平

Ziwei Li[1], Yidie Huang [1], Qian Shen [2], HongXu [2], Zhiping Li [1]

国家儿童医学中心/复旦大学附属儿科医院临床药学部，上海 201102

[1] Department of Pharmacy, Children's Hospital of Fudan University, National Children's Medical Center, Shanghai 201102, China

[2] Department of Nephrology, Children's Hospital of Fudan University, National Children's Medical Center, Shanghai 201102, China

【摘要】肝脏是铁储存的主要场所，铁过载可诱导铁死亡导致肝损伤。虽然 ESA 和铁被认为是治疗肾性贫血的标准，但没有足够的证据阐明长期铁治疗的潜在的铁超载的风险。该文以 2 例 NPHP3 基因突变致肾单位肾痨伴肝损害的婴幼儿为例，探究肝疾病状态下，是否可以长期使用铁剂。NPHP3 基因突变致肝肾损伤在不同年龄段有差异，肝铁过载不一定导致肝损伤，铁指标不能很好地指示铁过载，应综合考虑体内铁状态、肝疾病状况以及贫血治疗反应。

【关键词】NPHP3，肾单位肾痨，肾性贫血，肝损伤，铁剂

病例 1，女，1 月 22 天，主诉"发现皮肤黄染 1 月余"。患儿出生后 3 天发现皮肤巩膜黄染，未就诊。后皮肤黄染较前明显，伴有尿黄，大便呈淡黄色，无发热、呕吐，无排陶土样粪便，外院就诊期间持续性代谢性酸中毒、低蛋白血症和高钾血症，予以碳酸氢钠、胰岛素等对症治疗。肝功能指标进行性升高，查生化 γ-谷氨酰转肽酶 (GGT) 186.8 IU/L↑，总胆红素 (TBIL) 103.445 μmol/L↑，直接胆红素 (DBIL) 94.59 μmol/L↑。查 ECT 提示胆道闭锁可能。基因检测 NPHP3 复合杂合基因突变，c.1817G>A (p.W606*)，杂合，来源母亲，c.3402_3403de1TG (p.A1135Sfs*5)，来源父亲。考虑黄疸（胆道闭锁?）收治入院。

入院查体：体温 36.8 ℃，心率 120 次/min，呼吸 24 次/min，血压 86/56 mmHg。神志清，发育正常。全身皮肤巩膜中度黄染，皮肤粘膜未见苍白及出血点。全身浅表淋巴结未及肿大。心音有力，律齐，无杂音。双肺呼吸音清，未及啰音。腹平软，无压痛，肝肋下 4cm，质硬，脾肋下 1cm，肝、肾区无叩痛。双下肢无水肿。余无明显阳性体征。

入院后辅助检查、诊断及治疗经过：入院后查生化：血肌酐 (Serum creatinine，Scr)和尿素氮 (Blood urea nitrogen，BUN) 持续升高，Scr 最高 277 umol/L (eGFR=7.3ml/m^2)，BUN 20.18 mmol/L，考虑慢性肾脏病 (Chronic kidney disease，CKD) 5 期。外院基因提示 NPHP3 基因突变，考虑肾消耗性疾病 (Nephronophthisis，NPHP)。尿沉渣：胆红素 2+；蛋白少量；红细胞 3.65 个/HP↑，尿蛋白/肌酐 5.87↑，尿 α1-微球蛋白 (A1MU)/CR 1785.2 mg/g↑，尿白蛋白 (ALBU)/CR 568.2 mg/g↑，尿免疫球蛋白 G (IgGU)/CR 57.7 mg/g↑，NAG/CR 7.77 U/mmol↑。肾脏超声：双肾损害，左肾囊性占位。查电解质、血气：钙 1.36 mmol/L↑，氯 121.0 mmol/L↑，钾 7.3 mmol/L↑，pH 7.324↓，标准碱剩余 (SBE) -9.8 mmol/L↓，考虑代谢性酸中毒和高钾血症。期间反复高血钾 (4.9~7.4 mmol/L)，予葡萄糖酸钙、碳酸氢钠和胰岛素对症治疗后血钾仍不能降至正常范围，行腹膜透析治疗后血钾降至正常。查血常规：血红蛋白 (Hemoglobin，Hb) 74 g/L↓，考虑肾性贫血。予输血 7 次，予蛋白琥珀酸铁口服液 3 ml，重组人促红素注射液 (Erythropoietin，EPO) 400iu biw 皮下注射，Hb 恢复正常。患儿皮肤黄染明显，查生化：γ-GGT 164.10 IU/L↑，AST 109.30 IU/L↑，ALT 77.40 IU/L↑，TBIL 150.60 μmol/L↑，DBIL 122.90 μmol/L↑，肝胆酸 95.17 mg/L↑。腹部超声：肝质地欠佳。肝胆显像：肝/心比值 0.84，肝脏摄取清除功能差，肝胆排泄受阻。外院基因检测 NPHP3 基因突变。肝穿病理：考虑胆汁淤积性肝损害伴部分微泡性脂质变性，肝细胞病变以中央静脉周围更为显著，汇管区胆小管数量减少，可见中间型胆管细胞，G2S1-2。腹腔镜下胆道探查术，腹腔镜下肝组织病

基金项目：上海市科学技术委员会科研项目（19DZ1910703）

Corresponding author: Zhiping Li, E-mail: zpli@fudan.edu.cn

理：考虑胆汁淤积性肝损害伴部分肝细胞微泡性脂质变性，汇管区纤维组织及胆小管组织及胆小管增生、部分胆管损伤，G3S2-3，排除胆道闭锁可能。考虑胆汁淤积症，予苯巴比妥、熊去氧胆酸和消胆安。5 月 25 日起胆红素进行性升高，TBIL 从 227.20（危急值）上升至 425.90 μmol/L，DBIL 从 201.90 上升至 367.50 μmol/L。肝病科会诊：患儿 NPHP3 基因突变，胆汁淤积症，建议熊去氧胆酸加量，停用铁剂。考虑患儿 Hb 已正常，故停用铁剂，EPO 减量。复诊查肝功能 TBIL 218.90 umol/L，DBIL 204.40 umol/L，较前下降。Hb 92~109 g/L，加用铁剂。

病例 2，男，7 岁，主诉“面色苍黄半年，肾功能不全半月余”。半年前出现面色苍黄，身高、体重增加较同龄儿慢，未予处理。半月前外院检查：Scr 218 umol/L ↑，BUN 24.02 mmol/L ↑，尿蛋白 (-)，24 小时尿蛋白 0.1 g，β2 微球蛋白 6.97 mg/L↑，血气 pH 7.335 ↑，BE -10.6 ↓，25-羟维生素 D 53.57 nmol/L↓，PTH 31.69 pmol/L↑，Hb 87g/L↓，腹部超声：双肾回声增强，皮髓质分界不清 (左肾 7.6*3.4cm，右肾 6.6*2.8cm)，肝胆胰脾未见明显异常，纠正代谢性酸中毒后出院。拟“CKD 4 期”收治入院。

入院查体：体温 36.9 ℃，心率 90 次/min，呼吸 20 次/min，血压 118/80mmHg，神清，反应可，肤色苍黄，未见皮疹及皮下出血点，口唇稍苍白。双肺呼吸音清，无啰音。心律齐，心音无力，未闻及杂音。无明显压痛，脾肝肋下未及，双肾区无叩击痛。四肢肌张力可，双下肢无水肿。余无明显阳性体征。

入院后辅助检查、诊断及治疗经过：入院后查生化：Scr 255.3 umol/L (eGFR=16.7 ml/m^2) ，BUN 20.83 mmol/L ↑，考虑 CKD4 期，尿量 1130~1300 ml/d，查尿沉渣：尿蛋白极微，尿蛋白/肌酐 0.81 ↑，24h 尿蛋白 0.02g，A1MU/CR 173.4 mg/g ↑，ALBU/CR 45.3 mg/g ↑，IgGU/CR 19.3 mg/g ↑，NAG/CR 1.54 U/mmol ↑。B 超：双肾小伴损害 (左肾 76.2*29.0*30.1 mm)，右肾 74.7*28.0*28.0 mm)。肾脏 MRI：双肾皮髓质分界不清，DTPA：双肾灌注差，功能重度受损，GFR=22.7ml/min。肾外表现：听力检查示左耳听力减弱，余正常。外院基因 NPHP3 复合杂合突变，c.2694-2_2694.1del，杂合，来源于母亲，c.2653T>C(p.Cys885Arg)，杂合，来源于父亲，考虑肾消耗性疾病。查血常规：Hb 84g/L，考虑肾性贫血，予 EPO 1800iu biw 皮下注射，铁剂 0.1g tid 口服。查血气 pH 7.18，BE -15.6mmol/L ↓，考虑代谢性酸中毒，予枸橼酸钠和碳酸氢钠对症治疗。查钙 2.26 mmol/L，PTH 33.2 pmol/L ↑，磷 1.7 mmol/L ↓，25 羟基维生素 D 28.57 ng/ml, 考虑继发性甲状旁腺功能亢进，予骨化三醇胶丸口服。心电图、胸部 CT 及病毒筛查未见异常。2022 年 8 月 5 日患儿因肌酐升高 (411~515 umol/L)入院评估。查生化：Scr 409.9 umol/L (eGFR=10.7 ml/m^2/1.73m^2)，BUN 23.80 mmol/L，双肾 B 超：萎缩，考虑 CKD5 期。肝功能异常 (γ-GGT 144 IU/L)，存在胆汁淤积症，肝弹力纤维超声剪切波 1.14m/s 尚可，予熊去氧胆酸治疗。伴有肾性贫血 (Hb 87g/L) 等 CKD 并发症，继续 EPO 和铁剂等维持治疗。2022 年 11 月 9 日患儿再次因肌酐升高 (Scr 1155.1 umol/L) 入院评估。查生化：Scr 1185.6 umol/L，BUN 39.88 mmol/L，开始腹膜透析。肝功能 ALT 96.18 IU/L，γ-GGT 55.98 IU/L，加用复方甘草酸苷片。铁蛋白 (Serum ferritin，SF) 45.15 ng/ml ↓，转铁蛋白饱和度 (Transferrin saturation，TAST) 16% ↓，血清铁 8.5 μmol/L (绝对性缺铁)。查血常规：Hb 150 g/L ↑，EPO 减量为 1800iu qw, 继续铁剂 0.1g tid。2023 年 3 月 6 日患儿因出量及超滤量减少入院。查肝功能 AST 63.25 IU/L，γ-GGT 165.88 IU/L，B 超：肝质地欠佳，维持目前治疗。SF 520.4↑，TS 53 % ↑，血清铁 23.8 (铁过载)；患儿 Hb 波动于 96~100g/L， EPO 加量至 2000iu biw，继续铁剂 0.1g tid。调整腹膜透析后出院。

讨论 NPHP，又称肾单位肾痨，是一种常染色体隐性遗传肾病，是儿童 ESRD 的主要原因 [1]。NPHP1 和 NPHP3 突变是最常见的遗传缺陷。在 NPHP3 突变患者中，74.4%的患儿快速进展为 ESRD，80%的患儿存在肝脏异常 [2]。早期 (＜5 岁) 发生 ESRD 的 NPHP3 突变者以肝脏受累为主要表现，如黄疸、肝功能异常，肝纤维化和胆管发育异常等肾外表。5 岁以后发生 ESRD 的 NPHP3 突变者以贫血、肾功能异常、高血压等肾脏表现为主 [3]。本文 2 例 NPHP3 突变患儿分别在婴儿期和少年期进展为 ESRD，发病初期，患儿 1 (1 月余) 表现为严重的肝脏受损，患儿 2 (7 岁) 则以肾脏受累为主，肝脏无异常。因此，对不明原因出现黄疸和肝功能异常的 ESRD 患儿，应考虑 NPHP3 突变可能。

贫血在 CKD 患者很常见。CKD 患者的缺铁可表现为绝对性缺铁（血液透析失血）和功能性缺铁（接受 ESA 治疗或炎症状态）。后者是因为在 ESA 的驱动下或受网状内皮阻塞，铁的供应不足，即使铁正常或升高 [4, 5]。ESA 联合铁剂是治疗 ESRD 贫血的标准 [6]。指南建议当 SF≤100 ng/mL，TAST≤20%开始补铁 [4, 7]。当 SF>800ng/mL 或 TAST>50%存在铁过载，这是基于意见，而不是证据 [8]。该文以 2 例 NPHP3 基因突变致 ESRD

伴肝损害的婴幼儿为例，探究肝疾病状态下，长期使用铁剂的安全性。患儿 1 NPHP3 基因突变导致肝脏疾病进展，胆红素进行性上升，此时 Hb 恢复正常，在急性期停用铁剂。复诊时，肝功能较前好转，但 Hb 偏低，在恢复期重新启用铁剂。患儿 2 在服用铁剂治疗贫血期间，肝功能出现轻度异常，Hb 过高，存在绝对性缺铁，铁状态和贫血状况不一致，因此，根据患儿贫血情况减量 EPO，继续铁剂。再次随访肝功能中度异常，Hb 仍然偏低，存在铁过载，铁状态和贫血状况不一致，因此，增加 EPO 提高铁的利用度。

目前用于确定铁补充的生物标志物存在局限性，包括生物标志物水平的日变化，实验室间缺乏标准化以及炎症存在造成混淆 [5]。尽管输血依赖性贫血患者的 SF 很高 (1000~2000 ng/mL)，几乎没有证据表明组织铁过载 [4]。即使在 SF<500 ng/mL 的透析患者中，也可见肝铁过载 [9]。因此，SF 和 TAST 不能很好地指示透析依赖性 CKD 患者 [10]或输血依赖性恶性贫血患者的肝脏铁负荷 [11]。纳入 108 项研究的 Cochrane Reviews 表明 SF 作为铁缺乏和铁过载的指标具有较低的确证性 [12]。KDOQI 表示，并非超过 SF 上限就不需要铁，而是建议在 SF 高的人群中权衡使用铁的利弊 [13]。如果益处大于风险，患者大剂量促红细胞生产刺激剂 (Erythropoiesis-stimulating agent，ESA) 仍未达到目标 Hb，TSAT 较低且无感染，则尽管 SF 高，仍可使用铁剂 [4]。相较于 NPHP3 突变导致的肝脏进展是一个不可逆的过程，贫血带来的长期不良预后更值得关注，它不仅影响 CKD 患者的生活质量，还增加 CKD 进展、心血管事件及死亡的风险 [14]。

铁死亡最近被用来描述由于应激介导的细胞内游离铁增加而发生的细胞死亡 [15]，其特征是过度地脂质过氧化，具有铁离子依赖性，并在肝脏疾病进展中发挥多重作用 [16]。铁过载可以通过诱导铁死亡导致肝损伤和肝纤维化 [17]，但这似乎与铁的剂量和暴露时间有关。机体存在铁过载的代偿机制，在组织囊泡中可以隔离多达 300 倍的过量铁，以应对细胞外的铁过载，防止铁中毒 [18, 19]。不同血液疾病患者在高非转铁蛋白结合铁状况下，出现铁损伤大约需要 10 年 [20]。因此，只有当非转铁蛋白结合铁急性非常高或长期高时，铁过载才会出现临床问题。动物实验表明，长服用铁会导致组织铁沉积，但不会或很少出现肝损害，而急性铁过载会出现组织损伤 [20]。然而，短时间给予大剂量铁，反应的是毒理学效应，而不是病理生理学效应 [21]。这给人一种错误倾向，即铁有如此高的毒性，它可以轻易地破坏细胞代谢过程，促进疾病发展 [22]。在接受 ESA 和铁剂治疗的血液透析 (hemodialysis，HD) 患者中，肝脏和其他组织存在严重铁过载 [9, 10, 23-26]。Rostoker 等人研究中 57.4%（39/68）HD 患者肝铁过载，23.5%患者中至重度肝铁过载且与肝脂肪分数异常有关 [25]。而 Carrilho 等人研究中 57%（11/21）HD 患者轻至中度肝铁过载，尽管在 6 例严重铁过载的患者的网状内皮细胞充满铁颗粒，但未见肝纤维化 [26]。虽然 HD 患者存在组织铁超载的临床证据无可争议，但铁超载对全因死亡率和心血管死亡率的影响尚未明确 [6]。在 2141 例 HD 患者的前瞻性 RCT 试验中，与低剂量相比，高剂量静脉铁与死亡、心梗或心衰等复合终点风险降低有关 [16]。也有人提出了膳食铁超载可消除大鼠化学诱导的肝损伤或肝硬化，认为亚致死量的铁预处理可以阻止多种应激导致的细胞凋亡 [17, 18]。因此，肝内铁超载的存在并不意味着一定会导致肝损伤或疾病，但需要关注不必要的铁过载。

综上，在 NPHP3 突变导致肝肾损害的儿童中，肾性贫血的铁治疗，应该综合考虑体内铁状态、肝疾病状况以及贫血的治疗反应。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

[1] König J, Kranz B, König S, et al. Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (GPN). Phenotypic Spectrum of Children with Nephronophthisis and Related Ciliopathies [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017,12(12): 1974-1983. DOI: 10.2215/CJN.01280217.

[2] Tang X, Liu C, Liu X, et al. Chinese Children Genetic Kidney Disease Database (CCGKDD). “Internet Plus” Nephrology Alliance of the National Center for Children’s Care. Phenotype and genotype spectra of a Chinese cohort with nephronophthisis-related ciliopathy [J]. J Med Genet, 2022, 59(2): 147-154. DOI:

[3] 李国民, 刘海梅, 陈径等. NPHP3 基因突变致婴幼儿期进展为终末期肾病的肾单位肾痨 2 例并文献复习[J]. 中国循证儿科杂志, 2017, 12(05): 362-367. DOI:

[4] Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. Clin J Am Soc Nephrol. 2006;1 Suppl 1:S4-8.

[5] Agarwal AK. Iron metabolism and management: focus on chronic kidney disease. Kidney Int Suppl (2011). 2021;11(1):46-58.
[6] Ribeiro S, Belo L, Reis F, Santos-Silva A. Iron therapy in chronic kidney disease: Recent changes, benefits and risks. Blood Rev. 2016;30(1):65-72.
[7] Ratcliffe LE, Thomas W, Glen J, et al. Diagnosis and Management of Iron Deficiency in CKD: A Summary of the NICE Guideline Recommendations and Their Rationale. Am J Kidney Dis. 2016;67(4):548-58.
[8] IV. NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Anemia of Chronic Kidney Disease: update 2000. Am J Kidney Dis. 2001;37(1 Suppl 1):S182-238.
[9] Canavese C, Bergamo D, Ciccone G et al. Validation of serum ferritin values by magnetic susceptometry in predicting iron overload in dialysis patients. Kidney Int 2004; 65: 1091-1098
[10] Ferrari P, Kulkarni H, Dheda S et al. Serum iron markers are inadequate for guiding iron repletion in chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol 2011; 6: 77-83
[11] Puliyel M, Sposto R, Berdoukas VA, et al. Ferritin trends do not predict changes in total body iron in patients with transfusional iron overload. Am J Hematol. 2014;89(4):391-4.
[12] Garcia-Casal MN, Pasricha SR, Martinez RX, et al. Serum or plasma ferritin concentration as an index of iron deficiency and overload. Cochrane Database Syst Rev. 2021;5(5):CD011817.
[13] Kliger AS, Foley RN, Goldfarb DS, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for anemia in CKD. Am J Kidney Dis. 2013;62(5):849-859.
[14] 中国医师协会肾脏内科医师分会肾性贫血指南工作组. 中国肾性贫血诊治临床实践指南 [J] . 中华医学杂志, 2021, 101(20) : 1463-1502.
[15] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012;149(5):1060-72
[16] Chen J, Li X, Ge C, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease. Cell Death Differ. 2022;29(3):467-480.
[17] Wu A, Feng B, Yu J, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates iron overload-induced liver injury and fibrosis by inhibiting ferroptosis. Redox Biol. 2021;46:102131.
[18] Iancu TC. Iron overload. Mol Aspects Med. 1983;6(1):1-100.
[19] Golberg L, Smith JP. Iron overloading and hepatic vulnerability. Am J Pathol. 1960;36(2):125-49.
[20] Eid R, Arab NT, Greenwood MT. Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2017;1864(2):399-430.
[21] Tenenbein M. Toxicokinetics and toxicodynamics of iron poisoning. Toxicol Lett. 1998;102-103:653-6.
[22] Gozzelino R, Arosio P. Iron Homeostasis in Health and Disease. Int J Mol Sci. 2016;17(1):130.
[23] Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C et al. Hemodialysis-associated hemosiderosis in the era of erythropoiesis-stimulating agents: a MRI study. Am J Med 2012; 125: 991-999 e991
[24] Ghoti H, Rachmilewitz EA, Simon-Lopez R et al. Evidence for tissue iron overload in long-term hemodialysis patients and the impact of withdrawing parenteral iron. Eur J Haematol 2012; 89: 87-93
[25] Rostoker G, Loridon C, Griuncelli M, et al. Liver Iron Load Influences Hepatic Fat Fraction in End-Stage Renal Disease Patients on Dialysis: A Proof of Concept Study. EBioMedicine. 2019;39:461-471.
[26] Carrilho P, Fidalgo P, Lima A, Bastos L, et al. Post-mortem liver and bone marrow iron quantification in haemodialysis patients: A prospective cohort study. EBioMedicine. 2022;77:103921.
[27] Macdougall IC, White C, Anker SD, et al. Intravenous iron in patients undergoing maintenance hemodialysis. N Engl J Med. 2019;380:447–458.
[28] Atarashi M, Izawa T, Mori M, et al. Dietary Iron Overload Abrogates Chemically-Induced Liver Cirrhosis in Rats. Nutrients. 2018;10(10):1400.
[29] Mori M, Izawa T, Inai Y, et al. Dietary Iron Overload Differentially Modulates Chemically-Induced Liver Injury in Rats. Nutrients. 2020;12(9):2784.

基因多态性对药物代谢的影响

练勇,冯振

（温州医科大学 第一临床医学院（信息与工程学院） 浙江 温州）

引言

药物治疗的效果和安全性往往受到个体差异的影响。其中，基因多态性是个体差异的一种重要来源，它能够影响药物的代谢和药效。在药物研发和临床应用中，了解基因多态性对药物代谢的影响，可以帮助设计更加个体化的治疗方案，提高治疗效果和安全性。

基因多态性与药物代谢

药物代谢是指药物在体内的转化、分解和排泄过程。其中，药物在体内转化的主要途径是肝脏中的细胞色素 P450 酶（CYP450 酶）系统。CYP450 酶系统包括多种同工酶，它们能够代谢各种药物和代谢产物。不同的药物可被不同的 CYP450 同工酶代谢，而 CYP450 同工酶的活性和表达水平则受基因多态性的影响。

基因多态性是指同一基因在不同个体中存在着不同的等位基因，导致同一基因产物的表达量和活性存在差异。在 CYP450 酶系统中，一些重要的 CYP450 同工酶的基因存在多态性，如 CYP2C9、CYP2D6 和 CYP3A4 等。这些基因的多态性可以影响药物代谢的速率和药物在体内的浓度，从而影响药物的药效和毒性。

基因多态性对药物代谢的影响

基因多态性对药物代谢的影响具有多样性和复杂性。以下是一些常见的基因多态性对药物代谢的影响：

CYP2C9 基因多态性与华法林代谢

华法林是一种广泛用于血栓症治疗的抗凝药物。CYP2C9 是华法林的主要代谢酶之一。CYP2C9 基因存在多态性，其中 CYP2C9*1 是正常等位基因，而 CYP2C9*2 和 CYP2C9*3 则是常见的突变等位基因，导致 CYP2C9 酶的活性降低。因此，携带 CYP2C9*2 或 CYP2C9*3 等位基因的患者在华法林治疗中需要更低的剂量，以避免出现不良反应。

CYP2D6 基因多态性与氯丙嗪代谢

氯丙嗪是一种广泛用于治疗精神疾病和恶心呕吐的药物。CYP2D6 是氯丙嗪的主要代谢酶之一。CYP2D6 基因存在多态性，其中 CYP2D6*1 是正常等位基因，而 CYP2D6*4 是常见的突变等位基因，导致 CYP2D6 酶的活性降低。因此，携带 CYP2D6*4 等位基因的患者在氯丙嗪治疗中需要更低的剂量，以避免出现不良反应。

CYP3A4 基因多态性与西咪替丁代谢

西咪替丁是一种广泛用于治疗胃酸反流和胃溃疡的药物。CYP3A4 是西咪替丁的主要代谢酶之一。CYP3A4 基因存在多态性，其中 CYP3A4*1 是正常等位基因，而 CYP3A4*22 是常见的突变等位基因，导致 CYP3A4 酶的活性降低。因此，携带 CYP3A4*22 等位基因的患者在西咪替丁治疗中需要更低的剂量，以避免出现不良反应。

结论

基因多态性对药物代谢的影响是复杂和多样的。在个体化药物治疗中，了解患者的基因多态性，可以帮助选择更加个体化的治疗方案，提高治疗效果和安全性。然而，基因多态性的检测和解读仍然存在挑战和困难，需要更多的研究和技术进展来解决这些问题。

药物基因组学在全球医疗健康中的应用和前景

练勇

温州医科大学 第一临床医学院（信息与工程学院） 浙江 温州 325000

药物基因组学是一门研究基因组如何影响药物反应的科学。它的目标是促进个体化药物治疗，使我们能够根据个人的基因组来预测药物剂量，药物反应，以及药物相关的副作用。随着全球医疗健康领域对个体化治疗的需求日益增强，药物基因组学的应用和前景十分广阔。

一、药物基因组学的应用

1.个体化药物治疗

药物基因组学的最大应用之一就是在个体化药物治疗中。每个人的基因组构成都不同，这会影响他们对药物的反应。通过理解这些差异，我们可以预测哪些药物对特定的个体最有效，同时避免可能的副作用。

以抗癌药物为例。某些癌症类型，如肺癌、乳腺癌和结肠癌，已经被发现与特定的基因突变有关。这些突变可能会影响癌细胞对特定药物的反应。通过基因检测，我们可以确定患者的癌症类型和基因突变，然后选择最有效的药物进行治疗。

2.药物研发

药物基因组学也在药物研发过程中发挥着重要作用。通过研究基因与药物反应之间的关系，科学家可以更有效地设计和开发新药。

例如，基因组学可以帮助我们理解为什么某些药物在临床试验阶段失败，或者为什么某些药物会产生严重的副作用。有了这些信息，我们就可以更早地识别出有问题的药物，减少研发过程中的失败风险，同时提高药物的安全性和有效性。

二、药物基因组学的前景

面向未来，药物基因组学有着巨大的发展潜力。随着基因测序技术的进步和价格的下降，个体化药物治疗将变得越来越可行。预计在未来几年内，我们将能够为每个人提供基于其个人基因组的详细药物反应预测。

此外，人工智能和机器学习的进步也将对药物基因组学产生深远影响。通过使用这些先进的计算工具，我们可以更快地分析大量的基因组数据，从而更准确地预测药物反应。

药物基因组学也有可能改变我们的公共卫生策略。例如，通过分析人口基因组数据，我们可以预测哪些人群可能对某种药物产生副作用，然后针对这些人群制定特殊的药物使用指南。

结论

药物基因组学在全球医疗健康领域的应用和前景十分广泛。它为个体化药物治疗提供了新的可能，也为药物研发带来了新的思路。随着科技的不断进步，我们有理由相信，药物基因组学将在未来的医疗健康领域中发挥越来越重要的作用。

然而，尽管药物基因组学的潜力巨大，我们也必须面对其带来的挑战。比如，如何解读和应用复杂的基因组数据，如何保护患者的基因信息隐私，以及如何确保所有人都能公平地享受到药物基因组学的益处。

总的来说，药物基因组学为我们提供了一个全新的视角来理解和应用药物，有望在未来的全球医疗健康领域中发挥重要作用。在这个领域的研究者和从业者需要积极面对挑战，不断创新，以便更好地利用药物基因组学的潜力，提高我们的医疗服务质量，从而推动全球健康事业的发展。

这篇文章仅概述了药物基因组学在全球医疗健康中的应用和前景，还有很多相关的具体细节和深入的研究需要进一步探索和理解。但是，不可否认的是，药物基因组学已经成为现代医学的重要组成部分，将对我们的健康和生活产生深远影响。

靶向制剂治疗婴幼儿血管瘤的研究进展

梁恬恬，刘显彬，杨敏，宁红

（电子科技大学医学院附属绵阳医院·绵阳市中心医院，绵阳 621000）

【摘要】目的：了解靶向制剂治疗婴幼儿血管瘤的研究进展，以期为其进一步研究和应用提供参考。**方法：**查阅国内外相关文献，对已有的治疗婴幼儿血管瘤的靶向制剂进行整理归纳。**结果：**对婴幼儿血管瘤为靶部位的不同类型靶向制剂从发展历程、优点以及临床应用潜能进行了总结。血管瘤靶向制剂使药物定位浓集，增加药物疗效，减少药物剂量；延长药物释放时间，增加药物稳定性，减少给药次数，提高患者依从性；生物相容性材料的载体降低了药物免疫原性，减少不良反应。但目前靶向制剂尚存在载体材料不是绝对安全；如何进一步提高载药量；动物血管瘤模型不能完全反映出人类婴儿血管瘤完全相同的生物学性质；高发病率的深部血管瘤模型的建立；更多特异性靶头或靶标需开发等问题。**结论：**随着人类对其病理机制的深入研究以及靶向药物制剂的迅速发展，上诉问题在将来都有望解决，婴幼儿血管瘤靶向制剂将会展现出更广阔的前景。

【关键词】靶向治疗；靶向制剂；婴幼儿血管瘤

白芍总苷经活性氧-线粒体途径改善骨关节炎软骨细胞自噬性死亡

廖太阳，李晓辰，杨楠，茆军，邢润麟，王培民

（南京中医药大学附属医院（江苏省中医院）骨伤科，江苏 南京 210029）

【摘要】目的：关于白芍总苷（TGP）与骨关节炎（OA）的研究报道少见。文章旨在探讨 TGP 对白介素-1β（IL-1β）诱导小鼠关节软骨细胞（MACs）的保护作用及可能机制。**方法：**体外培养 MACs 细胞并通过甲苯胺蓝染色和Ⅱ型胶原免疫荧光染色鉴定；CCK-8 检测 TGP 对 MACs 细胞活性的影响，根据检测结果确定后续实验的 TGP 剂量范围；采用白介素-1β（IL-1β）构建 MACs 细胞 OA 模型，予以不同剂量 TGP 干预（10、20 及 50 μmol/L），分组为：空白组，模型组，低、中、高剂量 TGP 干预组，DCFH-DA 荧光探针检测 MACs 细胞中 ROS 荧光强度；JC-1 荧光探针观察 MACs 细胞线粒体电位变化；流式检测 MACs 细胞死亡率；RT-PCR 检测 Beclin 1、LC3、MMP-3 和 MMP-13 基因表达水平。**结果：**模型组 ROS 含量高于空白组，应用 TGP 后 ROS 含量显著降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；线粒体膜电位检测：与空白组比较，模型组线粒体膜电位下降，而 TGP 组线粒体膜电位较模型组上升，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；细胞死亡率检测：与空白组比较，模型组细胞死亡率显著上升，TGP 干预后，细胞死亡率显著下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；此外，模型组 Beclin 1 及 LC3 mRNA 表达水平较空白组降低，而 TGP 组较模型组升高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；模型组 MMP-3 及 MMP-13 mRNA 表达水平较空白组升高，而 TGP 组较模型组降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。**结论：**白芍总苷可通过活性氧-线粒体途径改善骨关节炎软骨细胞自噬性死亡，发挥软骨保护功效。

【关键词】白芍总苷；活性氧；线粒体；小鼠关节软骨细胞；骨关节炎

Total glucosides of paeony ameliorated autophagic death of osteoarthritis chondrocytes by reactive oxygen species-mitochondria pathway

LIAO Tai-yang, LI Xiao-chen, YANG Nan, MAO Jun, XING Run-lin, WANG Pei-min

(Department of Orthopaedics and Traumatology, Affilliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine & Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

【Abstract】Objective：Few studies have been reported on total peony glycosides (TGP) and osteoarthritis (OA). The aim of this study was to investigate the protective effect of TGP on murine articular chondrocytes (MACs) induced by interleukin-1β (IL-1β) and its possible mechanism. **Methods：**MACs were cultured in vitro and identified by toluidine blue staining and type II collagen immunofluorescence staining. CCK-8 was used to detect the effect of TGP on the

基金项目: 国家自然科学基金项目（81804123）；江苏省医学重点学科/实验室建设单位（js2252）；江苏省中医院高峰学术人才项目（y2021rc39）；江苏省第六期“333 人才”工程（第三层次人才项目）；

作者单位: 210029 南京，南京中医药大学附属医院（江苏省中医院）骨伤科［廖太阳（医学博士研究生）、李晓辰、杨楠、茆军、邢润麟、王培民］

通信作者: 王培民，教授，博士生导师，主任医师，E－mail: wangpeimin@njucm.edu.cn

activity of MACs. And the concentrations of TGP in subsequent experiments were determined according to the detection results．MACs cell OA model was established by IL-1β，and different concentrations of TGP intervention (10，20 and 50 μmol/L) were administered． Cell experiment group: blank group，model group，TGP low，medium and high concentration group．The content of ROS in MACs were detected by DCFH-DA. Mitochondrial potential changes in MACs observed by JC-1 fluorescent probe. Mortality of MACs was detected by flow cytometry. The mRNA expression of Beclin 1, LC3, MMP-3 and MMP-13 were detected by RT-PCR. **Results：**The ROS content in the model group was higher than that of the blank group, and the ROS content in the TGP group was reduced, and the difference was statistically significant (P<0.05); mitochondrial membrane potential detection showed that the mitochondrial membrane potential of the model group decreased significantly compared with the blank group. After the intervention of TGP, the mitochondrial membrane potential increased significantly, and the difference was statistically significant (P<0.05); Mortality rate detection found that the mortality of the model group was higher than that of the blank group, and the TGP group was lower than the model group, and the difference was statistically significant (P<0.05); The mRNA expression levels of Beclin 1 and LC3 in the model group was lower than that of the blank group, while the TGP group was higher than the model group, and the difference was statistically significant (P<0.05); The mRNA expression levels of MMP-3 and MMP-13 increased compared with the blank group, while the TGP group was lower than the model group, and the difference was statistically significant (P<0.05). **Conclusion：**TGP can improve the autophagic death of osteoarthritic chondrocytes through the ROS-mitochondrial pathway and exert chondroprotective effects.

【Key words】total glucosides of Paeony; reactive oxygen species; mitochondrion; murine articular chondrocytes; osteoarthritis

引言

骨关节炎（osteoarthritis，OA）是临床常见的一种骨关节退行性疾病，已成为影响中老年人群健康生活质量中亟待解决的重要问题，改善和治疗 OA 刻不容缓[1]。OA 病理特征主要包括软骨破坏、滑膜炎症、骨赘生成、关节内环境紊乱等[2]。在 OA 好发部位中，膝关节最易受累，故膝骨关节炎（KOA）发病率最高。最新流行病学研究显示，我国中老年人群 KOA 发病率达 8.1%，且随着深度老龄化社会的到来，该病有不断升高趋势[3]。

主流研究认为以基质金属蛋白酶 3（matrix metalloproteinase3，MMP-3）、MMP-13 为代表的软骨基质降解酶增加，加剧细胞外基质（extracellular matrix，ECM）丢失导致软骨细胞凋亡，这通常被认为是 OA 发生持续性软骨破坏的重要病理环节[4]。另一方面，活性氧（reactive oxygen species，ROS）诱发线粒体损伤，导致软骨细胞自噬性死亡成为 OA 发病的关键机制[5]。研究证实，激活小鼠关节软骨细胞（Mouse articular chondrocytes，MACs）自噬可恢复受损线粒体功能，减少细胞死亡，延缓 OA 关节软骨退变[6]。因此，抑制 ROS 生成、促进线粒体自噬以减少软骨细胞死亡，维持线粒体稳态以发挥软骨细胞正常功能，对于 OA 软骨治疗具有重要意义。

中医药的多途径、多靶点干预能力对 OA 软骨治疗极具优势，能有效缓解 OA 症状，且无明显副作用。中药白芍为毛茛科植物芍药 Paeonia lactiflora Pall.的干燥根，具有养血调经，敛阴止汗，柔肝止痛，平抑肝阳之功效[7]。白芍总苷（total glucosides of Paeony，TGP）是中药白芍提取的有效成分，其中芍药苷含量占总成分的 90%以上，具有免疫调节、减少炎症损伤、提高细胞存活率、保肝等药理作用[8]。现有的研究揭示了 TGP 在各种慢性关节炎治疗方面具有显著疗效，能抑制软骨细胞死亡、刺激细胞增殖、减缓 ECM 丢失，从而延缓关节软骨退变[9-10]。课题组前期也在体外细胞实验中验证了经白芍干预的肝细胞外泌体抑制软骨 ECM 降解，发挥软骨保护的功效[11]。然而，TGP 在白介素-1β（IL-1β）中的软骨保护机制，尚不十分清楚。本实验以小鼠软骨细胞作为研究对象，探讨 TGP 改善 OA 软骨细胞自噬性死亡以及细胞外基质丢失的可能作用机制，以期为中药白芍改善软骨破坏的机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

IL-1β（C042，中国近岸生物公司）；白芍总苷胶囊（国药准字 H20055058，宁波立华制药有限公司）；II 型

胶原酶（17101015，美国 Thermo 公司）；甲苯胺蓝染液（DA0053，中国雷根公司）；Collagen II 抗体（AF0135，美国 Affinity 公司）；CCK-8（K1018，美国 Apexbio 公司）；ROS 检测试剂盒（S0033S，上海 Beyotime 公司）；JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒（C2003S，上海 Beyotime 公司）；Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒（556547，美国 BD 公司）；RT-PCR 试剂盒（Q331-02，中国诺唯赞公司）。

1.2 MACs 细胞培养

取小鼠膝关节胫骨平台、股骨髁软骨并采用 II 型胶原酶消化法提取 MACs 细胞，培养于 10%胎牛血清和 1%青-链霉素（100x）的 DMEM 培养液中，培养箱常规培养条件设置为 37℃、5% CO_2，24 h 细胞贴壁，取对数生长期 MACs 细胞进行实验。

1.3 MACs 细胞鉴定

甲苯胺蓝染色：MACs 细胞计数后以 2.5×10^5/孔接种于 6 孔板，培养 48 h 后，PBS 洗涤 2 次，使用 4%多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗涤 2 次并覆盖甲苯胺蓝工作液，在无 CO_2 的情况下于室温染色 5 min，PBS 洗涤 2 次后荧光显微镜下拍照。II 型胶原免疫荧光染色：MACs 细胞计数后以 1×10^5/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 后，PBS 洗涤 2 次，使用 4%多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗涤 2 次并覆盖 0.2%曲拉通工作液透膜 20 min，5%牛血清蛋白孵育 1 h，PBS 洗涤 2 次并添加一抗工作液（Collagen II，1:200）4℃孵育过夜。PBS 洗涤并添加二抗工作液（Alexa Fluor 594，1:1000）覆盖细胞，避光室温孵育 30 min，PBS 洗涤 2 次后每孔添加 1 mL DAPI 孵育 10 min，荧光显微镜下拍照。

1.4 MACs 细胞存活率

通过 CCK-8 法测定 MACs 细胞存活率，MACs 细胞计数后以 2×10^4/孔接种到 96 孔板中培养 24 h，每孔加入 200 μL 不同剂量 TGP（10、20、50、100 和 200 μmol/L），干预 12 h、24 h 和 48 h 后，弃去细胞培养液，PBS 洗涤 2 次，每孔加入 200 μL 含 CCK-8 试剂的 DMEM 培养液（CCK-8 试剂：DMEM= 1:10），室温下孵育 2 h，酶标仪测定吸光度 A_{450} 值。

1.5 MACs 细胞 ROS 含量检测

MACs 细胞计数后以 2.5×10^5/孔接种于 6 孔板，培养 48 h 后，分为空白组、模型组以及不同剂量 TGP 干预组（10、20、50 μmol/L），处理细胞 48 h，吸弃培养液，DMEM 培养液清洗 2 次后，每孔加入 1 mL 经 DMEM 培养液稀释的 DCFH-DA 工作液（10 μmol/L）无 CO_2 的情况下于室温孵育 20 min，PBS 洗涤 2 次，荧光显微镜下观察 MACs 细胞 ROS 荧光强度。

1.6 JC-1 检测 MACs 细胞线粒体膜电位变化

按 1.5 实验分组给药处理 48 h 后，吸弃培养液，PBS 洗涤 2 次，按照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒的使用说明操作。简单来说，每孔加入 JC-1 染色工作液 1 mL，常温孵育 15 min，吸弃染色工作液，JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次，每孔加入 1 mL DAPI 核染 10 min，正常情况下，JC-1 形成聚合物呈红色荧光，表明线粒体膜电位水平较高；异常情况下，JC-1 形成单体呈绿色荧光，表明线粒体膜电位水平较低，荧光显微镜下观察 JC-1 单体/聚合物荧光强度，绿色/红色荧光比值越大，表示线粒体膜电位下降越明显。

1.7 流式检测 MACs 细胞死亡率

按 1.5 实验分组给药处理 48 h 后，吸弃培养液，PBS 洗涤 2 次，用 0.25%胰酶（无 EDTA）消化并低速离心收集各组细胞沉淀，加入 1×Binding Buffer（1 mL）重悬细胞后转移至流式管内，检测方式参照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书。简单来说，每管加入 Annxeni V-FITC/PI 染液 5 μL，置于 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 30 min，流式细胞仪检测。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 MMP-3、MMP-13 的 mRNA 水平

按 1.5 实验分组给药处理 48 h 后，吸弃培养液，PBS 洗涤 2 次，TRIzol 法提取细胞总 RNA，测定浓度和纯度后，进行逆转录，按照 real-time PCR 试剂盒说明加入引物进行荧光定量。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法并以 GAPDH 为内参标准计算细胞 mRNA 表达量。引物：Beclin 1 基因上游：ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC，下游：TGGGCTGTGGTAAGTAATGGA；LC3 基因上游：GACCGCTGTAAGGAGGTGC，下游：CTTGACCAACTCGCTCATGTTA；MMP-3 基因上游：TTAAAGACAGGCACTTTTGGCG，下游：

CCCTCGTATAGCCCAGAACT；MMP-13 基因上游：TGTTTGCAGAGCACTACTTGAA，下游：CAGTCACCTCTAAGCCAAAGAAA。

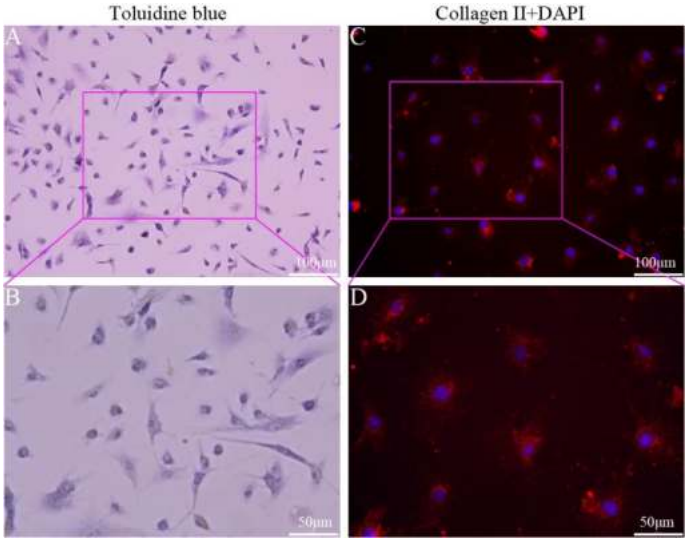
1.9 统计学分析

用 GraphPad Prism 9.0 绘制柱状图及统计分析。各实验独立重复 3 次，定量资料以均数±标准差表示，2.2 实验部分各浓度白芍总苷与对照组之间的比较若符合正态分布采用两样本 t 检验，不符合正态分布采用秩和检验，其余实验方差齐时组间比较采用单因素方差分析并使用 Tukey 检验方法。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 MACs 细胞鉴定结果

MACs 细胞初期呈不规则多角形或短梭形，继续培养则可见部分细胞呈长梭形，细胞核呈椭圆形或者圆形，细胞间有伪足相连，形态似成纤维细胞。甲苯胺蓝染色结果显示，MACs 细胞胞核呈深蓝色，胞浆呈浅蓝色。Ⅱ型胶原免疫荧光染色可见 MACs 细胞胞质呈现清晰的淡红色荧光，细胞核被 DAPI 复染呈蓝色，表明 MACs 细胞表达特征性 II 型胶原。见图 1。



AB：甲苯胺蓝染色（A：200x，B：400x）; CD：Ⅱ型胶原免疫荧光染色（C：200x，D：400x）

图 1 MACs 细胞的染色鉴定

Figure 1 Staining identification of MACs cells

2.2 TGP 对 MACs 细胞活性的影响

12 h、24 h 和 48 h 的 CCK-8 实验结果均显示，10，20，50 μM 的 TGP 对 MACs 细胞有显著的促增殖作用（P<0.05），而 100，200 μM 的 TGP 对 MACs 细胞则呈抑制增殖作用（P<0.05）。因此，10，20，50 μmol/L 的 TGP 应用于本文后续实验。见表 1。

表 1 TGP 对 MACs 细胞活性的影响（ $\bar{x}\pm s$，%）

Table 1 Effect of TGP on the cell activity of MACs（ $\bar{x}\pm s$，%）

组别	组别	样本量/孔	软骨细胞存活率（ $\bar{x}\pm s$）				
			10 μM	20 μM	50 μM	100 μM	200 μM
	对照组	3	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
12 h	白芍总苷组	3	109.75±3.07*	119.83±3.97*	132.39±7.37*	79.62±4.14*	70.69±3.53*
24 h	白芍总苷组	3	117.92±9.26*	139.02±2.38*	151.97±2.64*	73.13±3.62*	61.40±4.18*
48 h	白芍总苷组	3	136.71±2.07*	160.21±2.53*	174.63±1.77*	62.83±2.01*	53.28±2.74*

与对照组比较，*P<0.05

2.3 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞死亡的影响

MACs 细胞死亡包括坏死/早期/晚期凋亡细胞，与空白组相比，模型组 MACs 细胞死亡率显著增加（$P<0.05$），提示 IL-1β 能诱导 MACs 细胞死亡；给予不同剂量 TGP 干预后，与模型相比，低、中、高剂量干预组 MACs 细胞死亡率显著减少（$P<0.05$），提示 TGP 能通过抑制 IL-1β 诱导的细胞死亡保护 MACs 细胞。见图 2、表 2。

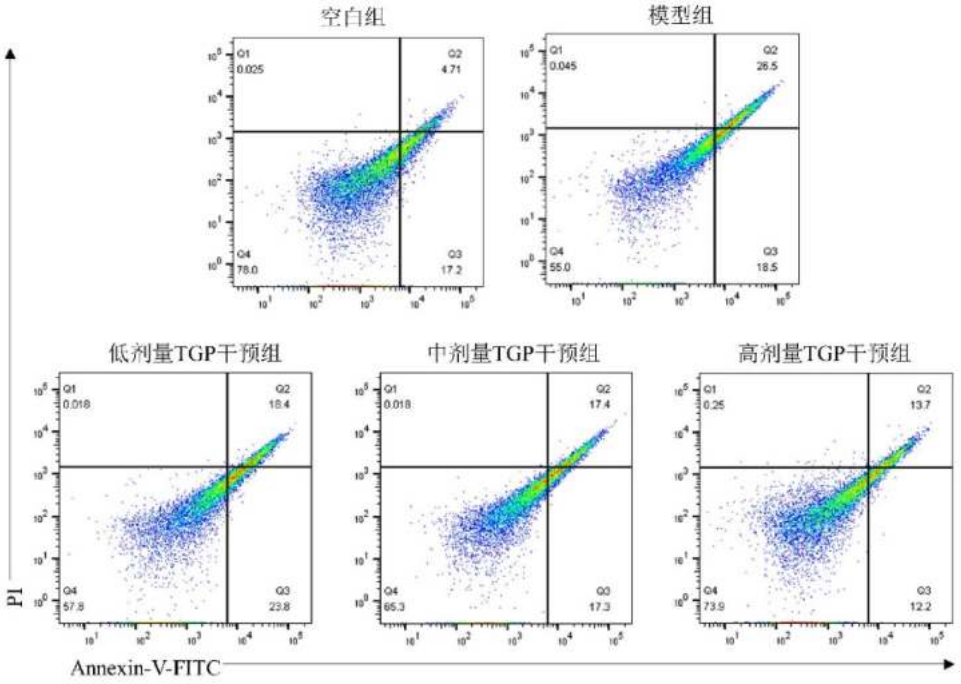


图 2 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞凋亡的影响

Figure 2 Effect of TGP on IL-1β-induced apoptosis in MACs cells

表 2 TGP 对 MACs 细胞凋亡率、ROS 荧光强度和线粒体膜电位水平的影响（ $\bar{x}\pm s$）

Table 2 Effect of TGP on apoptosis rate, ROS fluorescence intensity and mitochondrial membrane potential level in MACs cells（ $\bar{x}\pm s$）

组别	凋亡率	线粒体膜电位水平	ROS 荧光强度
空白组	6.58±1.65	1.54±0.66	1.90±0.56
模型组	26.77±0.93*	41.18±1.36*	39.10±0.36*
白芍总苷低浓度组	21.50±2.70$^{\#}$	26.32±0.75$^{\#}$	26.53±0.75$^{\#}$
白芍总苷中浓度组	19.03±1.89$^{\#}$	12.86±0.46$^{\#}$	17.57±0.75$^{\#}$
白芍总苷高浓度组	13.33±1.29$^{\#}$	6.04±0.60$^{\#}$	9.00±0.26$^{\#}$

与空白组相比，*$P<0.05$;与模型组相比，$^{\#}P<0.05$

2.4 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞 ROS 含量的影响

与空白组相比，模型组 MACs 细胞内 ROS 荧光强度显著增强（$P<0.05$），提示 IL-1β 促进 MACs 细胞内 ROS 的生成；给予不同剂量 TGP 干预后，与模型组相比，低、中、高剂量 TGP 干预组 ROS 荧光强度均显著减弱（$P<0.05$），提示 TGP 能部分恢复 IL-1β 所致的 ROS 含量的下降，保护 MACs 细胞。见图 3、表 2。

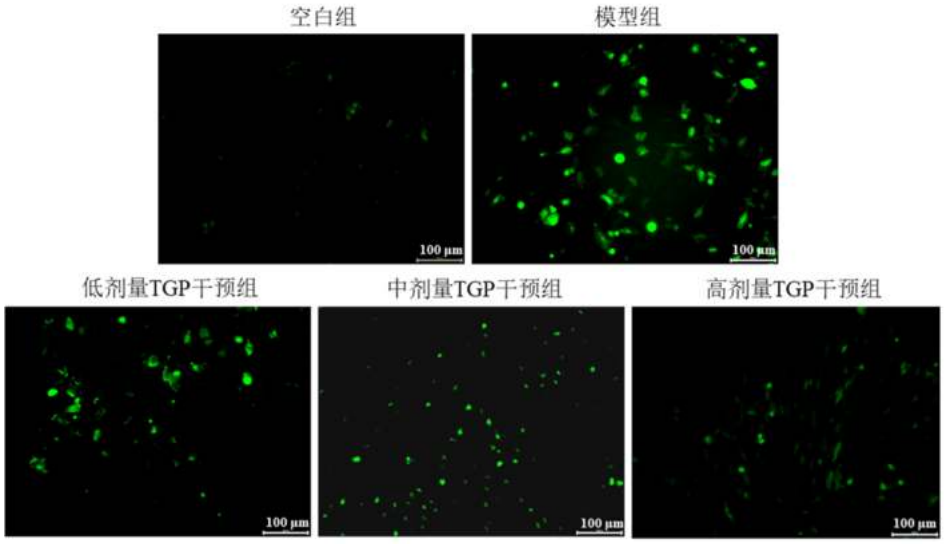


图 3 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞 ROS 含量的影响

Figure 3 Effect of TGP on ROS content in IL-1β-induced MACs cells

2.5 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞线粒体膜电位的影响

与空白组相比，模型组 MACs 细胞 JC-1 聚合物的红色荧光强度显著减弱（$P<0.05$），JC-1 单体的绿色荧光强度显著增强（$P<0.05$），提示 IL-1β 对线粒体功能有不利影响，导致 MACs 细胞线粒体膜电位下降；给予不同剂量 TGP 干预后，与模型组相比，低、中、高剂量 TGP 干预组 MACs 细胞 JC-1 聚合物的红色荧光强度显著增强（$P<0.05$），JC-1 单体的绿色荧光强度显著减弱（$P<0.05$），提示 TGP 处理能部分恢复 IL-1β 所致的线粒体膜电位的下降，具有线粒体保护功能。见图 4、表 2。

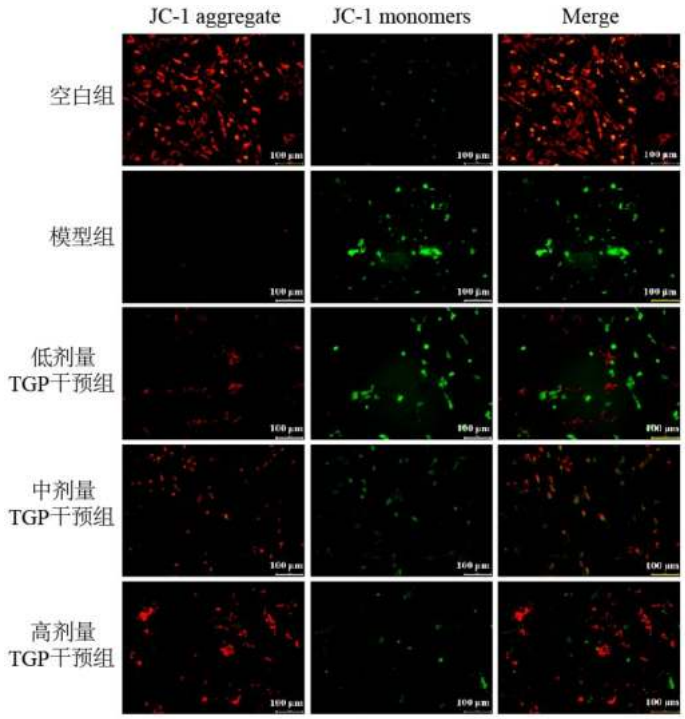


图 4 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞线粒体膜电位的影响

Figure 4 Effect of TGP on IL-1β-induced mitochondrial membrane potential in MACs cells

2.6 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞自噬的影响

与空白组相比，模型组 Beclin 1 和 LC3 mRNA 表达水平显著减少（$P<0.05$），提示 IL-1β 导致 MACs 细胞自噬受损；给予不同剂量 TGP 干预后，与模型相比，低、中、高剂量干预组 Beclin 1 和 LC3 mRNA 表达水平显著增加（$P<0.05$），提示 TGP 通过促进 IL-1β 诱导的细胞自噬保护 MACs 细胞。见表 3。

表 3 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞自噬的影响（ $\bar{x}\pm s$）

Table 3 Effect of TGP on IL-1β-induced autophagy in MACs cells（ $\bar{x}\pm s$）

组别	Beclin 1/GAPDH	LC3/GAPDH
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.28±0.05*	0.21±0.95*
白芍总苷低浓度组	0.48±0.08#	0.39±0.05#
白芍总苷中浓度组	0.58±0.11#	0.50±0.08#
白芍总苷高浓度组	0.79±0.08#	0.67±0.06#

与空白组相比，*$P<0.05$;与模型组相比，#$P<0.05$

2.7 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞基质降解的影响

与空白组相比，模型组 MMP-3 和 MMP-13 mRNA 表达水平显著增加（$P<0.05$），提示 IL-1β 导致 MACs 细胞基质降解增加；给予不同剂量 TGP 干预后，与模型相比，低、中、高剂量干预组 MMP-3 和 MMP-13 mRNA 表达水平显著减少（$P<0.05$），提示 TGP 通过抑制 IL-1β 诱导的细胞基质降解保护 MACs 细胞。见表 4。

表 4 TGP 对 IL-1β 诱导 MACs 细胞基质降解的影响（ $\bar{x}\pm s$）

Table 4 Effect of TGP on IL-1β-induced matrix degradation in MACs cells（ $\bar{x}\pm s$）

组别	MMP-3/GAPDH	MMP-13/GAPDH
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	6.42±0.39*	5.37±0.22*
白芍总苷低浓度组	4.71±0.53#	4.03±0.17#
白芍总苷中浓度组	3.49±0.47#	2.97±0.23#
白芍总苷高浓度组	2.32±0.61#	1.96±0.19#

与空白组相比，*$P<0.05$;与模型组相比，#$P<0.05$

3 讨论

白芍是养血柔肝、妇科调理月经之要药，也是治疗四肢挛急疼痛的必用之药，常以“柔肝养筋”之功效治疗 OA[12]。现代研究发现，白芍含有的萜类化合物（主要是白芍总苷）在治疗 OA 方面具有显著疗效。陈谱等[9]运用白芍总苷对体外培养的人膝关节软骨细胞进行干预，发现其能刺激细胞增殖、改善软骨细胞炎症和延缓 ECM 丢失。此外，白芍总苷还能抑制人 OA 软骨细胞核因子 κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）、凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达、炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-8 表达，降低 MMP-13/TIMP-1 比值，发挥 OA 软骨保护效应，延缓 OA 进程[13]。本课题组前期研究发现，经白芍干预的肝细胞外泌体能抑制软骨分解标志物 ADAMTS-5、SOX9、MMP-3、MMP-13 表达，延缓 LPS 所致的软骨细胞退变[11]。本研究发现，10，20，50 μM 剂量的 TGP 对软骨细胞有显著的促增殖作用，因此，选择 10，20，50 μmol/L 作为 TGP 干预的低、中、高剂量组。本研究使用 IL-1β 来模拟 OA 细胞病理模型，是因为大量的研究已证实 IL-1β 是一种促炎细胞因子，在 OA 中可由活化的滑膜细胞、软骨细胞和巨噬细胞分泌及释放，造成关节软骨细胞损伤，诱导软骨细胞凋亡，已成为促进 OA 发展的主要炎症因子[14]。IL-1β 联合不同剂量 TGP 处理后，发现软骨分解标志物 MMP-3、MMP-13 基因表达下调，提示 TGP 可抑制体外培养的 OA 软骨细胞分解反应维持软骨 ECM 稳态。

线粒体是人体能量代谢和自由基生成的关键细胞器，与各种信号通路紧密联系，其功能障碍更可导致细胞外基质代谢异常、细胞衰老、细胞死亡等一系列病理结局[15]。软骨细胞线粒体功能障碍广泛直接参与了 OA 发病机制，包括软骨细胞的氧化应激、软骨细胞凋亡、软骨基质钙化、软骨细胞自噬、软骨 ECM 合成代谢受损以及软骨细胞炎症反应等[16-17]。与线粒体功能障碍相伴随的是 ROS 的生成，当过量的 ROS 无法代谢时，导致线粒体膜电位降低和软骨细胞死亡。另一方面，过量的 ROS 也会损害线粒体，导致软骨细胞线粒体功能障碍[18]。由于维持正常的 ROS 水平对于 OA 软骨细胞线粒体稳态至关重要，故本研究使用 DCFH-DA 荧光探针法检测各组软骨细胞中 ROS 含量，结果表明 IL-1β 促进软骨细胞内 ROS 的生成，而 TGP 能部分恢复 IL-1β 所致的 ROS 含量的下降，保护软骨细胞。线粒体膜电位检测也显示，IL-1β 导致 MACs 细胞线粒体膜电位下降，而 TGP 能部分恢复 IL-1β 所致的线粒体膜电位的下降，具有线粒体保护功能。

促进细胞自噬是修复受损软骨细胞线粒体功能，减少软骨细胞死亡，延缓 OA 进程的重要途径[19]。课题组前期研究显示，IL-1β 诱导软骨细胞自噬相关蛋白 LC3、Parkin、PINK1、P62 表达升高[20]，文献研究表明，TGP 可以升高自噬相关因子 Beclin1、LC3 蛋白表达水平[21]，对 OA 关节软骨退变具有显著的保护作用[9,13]。Beclin 1 是调控软骨细胞自噬的关键因子，参与自噬小体的形成，而 LC3 作为自噬标志物，是位于自噬膜上的一种蛋白，通常由 LC3-I 和 LC3-II 构成，研究显示，LC3-II 参与自噬体双层膜的形成，并且 LC3-I 向 LC3-II 的转化是细胞自噬活性检测的关键环节[22]。故本研究选择自噬标志物 Beclin 1 和 LC3 进行 PCR 检测，结果显示，IL-1β 导致软骨细胞自噬受损，表现为上调自噬标志物 Beclin 1 和 LC3 基因表达，而 TGP 低、中、高剂量干预组可以上调上述自噬相关基因表达，表明 TGP 能促进激活软骨细胞自噬。结合流式检测细胞凋亡率，结果说明 IL-1β 诱导的细胞凋亡与自噬水平呈负相关，而 TGP 可以激活自噬，降低细胞死亡。

综上所述，TGP 可减少由 IL-1β 诱导的小鼠软骨细胞内 ROS 含量，改善线粒体功能，并通过促进自噬发生，抑制细胞凋亡，延缓软骨细胞基质降解。上述研究结果为 TGP 的软骨保护作用提供了新的理论与实验依据。

参考文献

[1]中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心, 等. 中国骨关节炎诊疗指南（2021 年版）[J]. 中华骨科杂志, 2021,41(18):1291-1314.

[2]Sharma L. Osteoarthritis of the Knee[J]. N Engl J Med, 2021,384(1):51-59.

[3]Tang X, Wang S, Zhan S, et al. The Prevalence of Symptomatic Knee Osteoarthritis in China: Results From the China Health and Retirement Longitudinal Study[J]. Arthritis Rheumatol, 2016,68(3):648-653.

[4]廖太阳, 张力, 杨楠, 等. 基于 AMPK/mTOR 信号通路研究膝痹宁方对膝骨关节炎模型大鼠的改善作用机制[J]. 中国药房, 2023,34(01):23-28.

[5]Jiang N, Xing B, Peng R, et al. Inhibition of Cpt1a alleviates oxidative stress-induced chondrocyte senescence via regulating mitochondrial dysfunction and activating mitophagy[J]. Mech Ageing Dev, 2022,205:111688.

[6]Li Y, Shen B, Lv C, et al. Methyl gallate prevents oxidative stress induced apoptosis and ECM degradation in chondrocytes via restoring Sirt3 mediated autophagy and ameliorates osteoarthritis progression[J]. Int Immunopharmacol, 2023,114:109489.

[7]国家药典委员会. 中华人民共和国药典-一部[M]. 中国医药科技出版社, 2010.

[8]杨山景, 封安杰, 孙越, 等. 白芍总苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021,38(13):1627-1633.

[9]陈谱, 阮安民, 周俊, 等. 白芍总苷对骨关节炎软骨细胞炎症及退变的影响[J]. 中国组织工程研究, 2021,25(29):4614-4618.

[10] 黄皆和, 郑文标, 管军辉, 等. 白芍总苷对类风湿性关节炎的治疗作用及 Wnt/β-catenin 通路的影响[J]. 中国药师, 2020,23(02):218-223.

[11] 张力, 李晓辰, 廖太阳, 等. 衰老表型肝细胞外泌体对脂多糖致炎软骨细胞的影响及白芍的干预效应[J]. 南京中医药大学学报, 2021,37(05):702-708.

[12] 张燕丽, 田园, 付起凤, 等. 白芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2021,49(02):104-109.

[13] 杜旭召, 杨豪, 邓素玲, 等. 白芍总苷对骨关节炎软骨细胞增殖及分泌表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,

2016,22(11):1375-1379.
[14] Wan Y, Shen K, Yu H, et al. Baicalein limits osteoarthritis development by inhibiting chondrocyte ferroptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2023,196:108-120.
[15] Videla L A, Mariman A, Ramos B, et al. Standpoints in mitochondrial dysfunction: Underlying mechanisms in search of therapeutic strategies[J]. Mitochondrion, 2022,63:9-22.
[16] Zhang J, Hao X, Chi R, et al. Moderate mechanical stress suppresses the IL-1beta-induced chondrocyte apoptosis by regulating mitochondrial dynamics[J]. J Cell Physiol, 2021,236(11):7504-7515.
[17] He Y, Wu Z, Xu L, et al. The role of SIRT3-mediated mitochondrial homeostasis in osteoarthritis[J]. Cell Mol Life Sci, 2020,77(19):3729-3743.
[18] Wang X, Liu Z, Peng P, et al. Astaxanthin attenuates osteoarthritis progression via inhibiting ferroptosis and regulating mitochondrial function in chondrocytes[J]. Chem Biol Interact, 2022,366:110148.
[19] Hu S L, Mamun A A, Shaw J, et al. TBK1-medicated DRP1 phosphorylation orchestrates mitochondrial dynamics and autophagy activation in osteoarthritis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023,44(3):610-621.
[20] 揭立士, 时孝晴, 殷松江, 等. 原儿茶醛调控线粒体自噬延缓软骨细胞衰老的作用机制[J]. 医学研究生学报, 2022,35(11):1126-1131.
[21] 林劲, 欧阳辉, 梁春玲, 等. 白芍总苷对膜性肾病大鼠肾脏保护作用及自噬的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019,30(09):1025-1031.
[22] Gu Y, Yan R, Wang Y, et al. High TRB3 expression induces chondrocyte autophagy and senescence in osteoarthritis cartilage[J]. Aging (Albany NY), 2022,14(13):5366-5375.

乳香-没药通过抑制 TLR4/MyD88/TRPV1 通路介导的神经胶质细胞活化治疗神经病理性疼痛

廖禹程

空军军医大学西京医院 陕西 710032

【摘要】可调节神经元功能的神经胶质细胞是治疗神经病理性疼痛（NP）的关键。乳香-没药有“活血化瘀”的功效。以两者为核心的方剂广泛用于治疗 NP，但其具体作用机制尚不清楚。因此，我们研究了乳香没药对 NP 的预防作用，并进一步探索了其潜在机制。采用慢性坐骨神经压迫性损伤（CCI）建立 NP 模型。乳香、没药、乳香-没药和阳性药普瑞巴林灌胃给药 14 天。网络药理学用于预测乳香-没药对 NP 发生中的潜在靶点和通路，进一步研究证实了相关靶点。TLR4 拮抗剂 (LRU) 和 MyD88 同源二聚化抑制肽 (MIP) 被鞘内给药以评估阻断 TLR4 信号传导对 NP 的行为影响。结果证实，乳香和没药的组合显著减轻了 CCI 小鼠的机械和热刺激，并抑制了 NP 的发生。网络药理学提示 TLR4/MyD88 介导的神经炎症可能与 NP 相关。进一步研究证实，乳香没药可降低脊髓背角神经胶质细胞中 TLR4、MyD88 和 p-P65 的表达，抑制神经元中 TRPV1 和炎症因子的表达。LRU 和 MIP 的鞘内应用减轻了 CCI 小鼠的机械性疼痛和热痛觉过敏，降低了神经元中 TRPV1 的表达，减少了脊髓背角的神经胶质细胞活化。这些发现表明，用乳香-没药治疗可减轻 NP，这可能与 TLR4/MyD88/TRPV1 信号通路的抑制有关。阻断 TLR4 和 MyD88 可能作为 NP 的潜在治疗方法。

【关键词】乳香-没药；神经病理性疼痛；网络药理学；神经胶质细胞；TLR4/MyD88/TRPV1 信号通路

1 前言

神经病理性疼痛（neuropathic pain，NP）是由躯体感觉神经系统损伤或疾病引起的常见慢性顽固性疼痛。主要临床表现是刺激依赖性痛觉过敏和异常性疼痛，或非刺激依赖性疼痛，如刺痛或灼痛，严重影响患者的健康和生活质量。据统计，普通人群中 NP 的患病率约为 6.9-10%，占慢性疼痛人群的 20-25%。NP 目前采用以抗惊厥药、抗抑郁药、抗心律失常药、大麻二酚和阿片类药物等为中心的跨学科策略进行治疗。然而，由于现有药物的镇痛作用有限和剂量相关的副作用，如吗啡耐受等。NP 的治疗仍然是一个未解决的临床问题。

以“神经元”为中心的学术体系并不能完全解释疼痛的复杂机制，需要对神经元处于疼痛状态的环境进行全面的研究。近年来，对神经元功能具有调节作用的神经胶质细胞（小胶质细胞和星形胶质细胞）越来越受到疼痛研究人员的关注。周围神经损伤、炎症、肿瘤等可导致脊髓背角神经胶质细胞活化，参与 NP 的维持。神经胶质细胞靶向镇痛策略为 NP 的治疗提供了新思路。神经胶质细胞不仅为神经元之间正常的信号传递提供稳定的微环境，而且在被激活时还能产生大量的促炎因子和趋化因子等信号分子作为免疫反应细胞，提高神经元的兴奋性，促进疼痛的维持。以往的研究表明，炎症反应是参与 NP 形成的重要部分，而神经胶质细胞是参与免疫炎症反应的关键因素，其细胞表面表达的 Toll 样受体是介导炎症反应的主体。主要的信号通路之一是 TLR4/MyD88。TLR4/MyD88 是一种不依赖 Ca^{2+}的通路，可激活神经胶质细胞并增强疼痛信号。在周围神经损伤期间，伤害感受递质与 Toll 样受体 4 (TLR4) 结合以激活髓样分化因子 88 (MyD88)，从而激活神经胶质细胞。激活核因子 Kappa B (NF-κB) 和下游相关因子促进 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 等炎症介质的合成和释放，并通过激活瞬时受体电位香草素 1 (TRPV1)使脊髓背角神经元敏感。神经元上的 TRPV1 被认为与疼痛关系特别密切，作为炎症和疼痛通路的门控分子，在 NP 的发生和发展中起重要作用，诱导疼痛的产生和增强。因此，通过脊髓神经胶质细胞中的 TLR4/MyD88 信号通路调节 TRPV1 表达对于 NP 的治疗至关重要。

乳香与没药的配伍应用最早见于《辨证论治》中的“乳香止痛散”。临床上常将乳香与没药联合用于治疗 NP，如小活络丸、根痛平片、活络效灵丹等。药对研究的开展，不仅降低了方剂研究的复杂性和难度，而且不偏离方剂整体疗效和中医药理论，可为方剂配伍理论研究提供理论基础和方法参考。Hu 研究表明，乳香和没药水提物对正常小鼠和 CCI 小鼠均表现出良好的镇痛作用，其作用机制主要是通过调节 TRPV1 的表达和活性发挥镇痛作用。课题组发现，调节神经胶质细胞中的 TLR4/MyD88 信号通路对于 NP 的治疗至关重要。虽然乳香和没药

作为药对广泛用于临床镇痛，但乳香和没药作为一组药物的镇痛机制尚不完全清楚。

基于此，如何运用现代科学技术，在中医理论指导下，阐明乳香没药治疗 NP 的有效成分及作用信号网络，是一个亟待解决的科学问题。因此，本研究采用坐骨神经慢性压迫性损伤模型评价乳香-没药对 NP 的保护作用。采用网络药理学预测与 NP 发生相关的潜在靶点和通路，并通过实验进一步验证乳香-没药治疗 NP 的作用机制。详细的工作流程如图 3A 所示。

2 材料与方法

2.1 药物和试剂

山羊抗兔 IgG (98164S)、兔抗 Iba-1 (17198S)、兔抗 NeuN (24307S)、兔抗 TLR4 (14358S)、兔抗 MyD88 (4283S)、兔抗 P65 (8242S) , 兔抗磷酸化 P65 (3033S), 兔抗 c-Fos (2250S), 兔抗 ERK (4695S), 兔抗磷酸化 ERK (4370S), 兔抗 CREB (9197S), 兔抗磷酸化 CREB (9198S)和兔抗 GAPDH (2118S)获自 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, United States)。兔抗 IL-10（ab9969）、兔抗 TGF-β（ab259360）、兔抗 BDNF（ab108319）、兔抗 IL-6（ab259341）、兔抗 IL-1β（ab254360）和兔抗 TNF-α（ab205587）购自 Abcam（Cambridge, MA, United States）。AST（ab263882）和 ALT（ab282882）ELISA 试剂盒购自 Abcam（Cambridge, MA, United States）。S-Cr 试剂盒购自泛柯生物科技（中国上海）。2,3,5-三苯基四唑氯化物（TTC，纯度>98.0%）购自 SigmaAldrich（美国密苏里州圣路易斯）。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和二辛可宁酸 (BCA) 蛋白检测试剂盒购自鼎国昌盛生物科技（中国北京）。Tris 缓冲盐水 (TBS)、转移缓冲液 (pH 8.4) 和电泳缓冲液 (pH 8.4-8.6) 购自 Servicebio（中国武汉）。其他试剂由其他供应商提供。

2.2 乳香和没药提取物的制备

乳香（批号 171010）和没药（批号 171108）均产自广西，购自苏州天灵中药饮片有限公司，经第四军医大学第一附属医院文爱东教授鉴定为正品。乳香是橄榄树 Boswellia carterii Birdw 的干燥树脂，没药是橄榄树 Commiphoramyrrha Engl 的干燥树脂。符合中国药典 2020 年版要求，现保存于第四军医大学。取 50g 乳香、没药和乳香-没药混合物 (1:1) 研磨成粉末(1mm, 16 目)，溶于 100mL 75%乙醇中，80°C 萃取 120min 连续回流 3 次。然后过滤乙醇提取物，3200r/min 离心 10min，取上清液，用 0.45μm 微孔膜过滤，真空干燥得粉末状样品（10g，1g 含 5g API）。

2.3 LC-MS/MS 条件

LC-MS/MS 分析在配备 Waters UPLC BEH C18 色谱柱 (1.7 μm 2.1*100 mm) 的安捷伦超高效液相色谱 1290 UPLC 系统上进行。流速设置为 0.4 mL/min，进样量设置为 5 μL。流动相由 0.1%甲酸水溶液（A）和 0.1%甲酸乙腈溶液（B）组成。多步线性洗脱梯度程序如下：0 - 3.5 min，95 - 85% A；3.5 - 6min，85 - 70% A；6 - 6.5min，70 - 70% A；6.5 - 12min，70 - 30% A；12 - 12.5min，30 - 30% A；12.5 - 18min，30 - 0% A；18 - 25min，0 - 0 % A；25 - 26min，0 - 95% A；26 - 30min，95 - 95% A。

采用 Q Exactive Focus 质谱仪与 Xcalibur 软件相结合，根据 IDA 采集模式获取 MS 和 MS/MS 数据。在每个采集周期内，质量范围为 100~1500，筛选出每个周期的前三名，进一步获取相应的 MS/MS 数据。鞘气流速：45 Arb，辅助气流速：15 Arb，毛细管温度：400 ℃，全毫秒分辨率：70000，MS/MS 分辨率：17500，碰撞能量：NCE 模式下为 15/30/45，喷雾电压：4.0 kV（正）或 -3.6 kV（负）。

2.4 网络药理学分析

乳香和没药中的化学成分信息来自 BATMAN-TCM 数据库(http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/), 这是一种生物信息学评估工具，用于在线预测中医药使用的药物分子机制。通过在 Herb or Herb list 中使用“乳香”和“没药”两个词进行关键词搜索，然后选择具有高可靠性的蛋白质作为靶点（分数截止 ＝20 , 调整后的 p 值 ＝0.05）进行进一步研究。将由此获得的所有靶标导入 UniProt 数据库，去除非人类靶标以分离相关基因名称，并记录所有与活性成分相关的靶标信息。

通过 GeneCards 数据库（https://www.genecards.org/）、DrugBank 数据库（https://go.drugbank.com/）、OMIM 数据库（https://omim.org/）、TTD 数据库（http://db.idrblab.net/ttd/）和 CTD 数据库（http://ctdbase.org/）进行检索，通过输入检索词“Neuropathic pain”，选择数据得分≥20 和 FDA 批准以获得 NP 相关的靶标基因。

将药物与疾病的相互作用靶基因导入 STRING（https://string-db.org/）网站进行蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）分析，其度数、介数中心性和亲近中心性大于他们各自的中位数被选为核心靶基因。DAVID 在线分析工具用于进行基因肿瘤学（GO）富集分析以及京都基因和基因组百科全书（KEGG）通路富集分析。

2.5 动物与实验设计

雄性 C57BL/6 小鼠（20.0±2.0g）获自第四军医大学实验动物中心。将小鼠维持在 12/12 小时的光照/黑暗循环和稳定的环境条件下（室内湿度：45–75%；温度：22±2°C），自由饮水和饮食。在行为研究之前，让小鼠适应实验室条件一周。所有实验均遵循美国国立卫生研究院出版的《保护和使用实验动物》（NIH 出版物第 85-23 号，1996 年修订）的指导，并经空军军医大学实验动物伦理委员会批准（许可证号：ZJU20220096）。尽一切努力减少使用的动物数量和它们的痛苦。

为研究乳香-没药对 NP 的镇痛作用，将动物随机分为 6 组（每组 n=12）：假手术组（Sham）、模型组（CCI）、CCI+乳香（200mg/kg BW/天）、CCI +没药（200 mg/kg BW/天）、CCI +乳香-没药（200 mg/kg BW/天，乳香-没药的比例是 1:1）和 CCI+普瑞巴林（10mg/kg BW/天），溶解在 0.9%盐水中。于术后（POD）第 0 天至第 14 天灌胃给药。假手术组和 CCI 组给予相同剂量的生理盐水。

根据我们之前在一个类似的动物模型中的报告，我们发现 200 mg/kg BW/天，乳香-没药的比例是 1:1 是最佳的。同时，在初步实验中，进行了剂量-肝肾毒性反应研究(100 mg/kg、200 mg/kg 和 400 mg/kg 乳香-没药) (数据如图 3D-F 所示)。通过对 AST、ALT 和 S-Cr 的测定，我们证明了乳香-没药在 200 mg/kg 剂量下的安全性，因此我们重点研究了乳香-没药在 200 mg/kg 剂量下的生化和分子分析。

2.6 CCI 模型建立

小鼠建立 CCI 模型，术前通过 von Frey 仪器测量小鼠的基础痛阈值。CCI 模型的建立如下：将实验动物用 1%戊巴比妥钠麻醉，并固定在手术台。将小鼠的左后肢皮肤脱毛并消毒。然后，在坐骨结节处切开皮肤，并且将每一层的肌肉分开以暴露坐骨神经。使用 4-0 肠线结扎小鼠的坐骨神经，打结三个相距约 1 mm 的合适的弹性结。当结扎时小鼠神经受压出现左爪轻微抖动，证明结扎强度是适当的。手术后，将肌肉和皮肤层层缝合，并用碘伏消毒。Sham 组只暴露小鼠左后肢的坐骨神经，不使用结扎后将切口逐层缝合。

2.7 行为学评估

在 POD 0、1、3、5、7、10 和 14 天分别采用机械性痛觉异常和热痛觉过敏进行疼痛行为评估。机械刺激缩足反射阈值（paw withdrawal mechanical threshold，PWMT）测定采用 von Frey 纤维机械测痛仪（Ugo Basile, Varese, Italy）。实验小鼠前一日晚上禁水禁食，测试前置于透明塑料箱中适应 30 min，von Frey 纤维丝的刺激强度由小至大穿过铁丝网格垂直刺激大鼠右足底中心部位，每个刺激强度连续使用 10 次，每次时间间隔 3 ~5 s，出现缩足反射（PWT）5 次以上的纤维丝强度为小鼠对机械刺激的反应阈值，重复测定 6 次，取平均值。

热刺激缩足反应潜伏期（paw withdrawal thermal lantency，PWTL）测定采用热刺痛仪（IITC360, Woodland Hills, CA）。实验小鼠前一日晚上禁水禁食，测试前置于实验箱中适应 30 min，卤素投射灯选择 100 W，电压调节至 10 mV，调节灯源与玻璃板之间的距离，使投射至足底光圈的直径为 5 mm。从开始照射计时，直至出现缩足逃避反射，该时间即为 PWL。在同侧爪上进行 6 次试验，间隔至少 5 分钟。为防止组织损伤，辐射热的使用时间最长为 30 s。

2.8 鞘内注射

在 CCI 造模后第 3-5 天，将小鼠置于异氟醚麻醉下，并牢牢固定腰椎区域。在 L5-L6 之间插入带有 29 号针头的 25μl Hamilton 注射器，直到如尾部抽动所示达到鞘内空间，然后注射 10μl（治疗或媒介物对照）。鞘内注射 TLR4 特异性拮抗剂（LRU，InvivoGen，San Diego，CA，USA，10ug 溶解于 10ul PBS）；MyD88 同源二聚化抑制肽（MIP，Novus Biologicals，CO，USA，10ug 溶解于 10ul PBS）；LRU 缓冲液和 MIP 对照肽（Novus Biologicals，CO，USA）。

2.9 酶联免疫稀释法

取实验小鼠，1%戊巴比妥纳腹腔注射麻醉，摘眼球取血，放入 1.5mL 离心管中。高速离心机 3000 r/min 于 4 ℃离心 15 min，将上清液移入另一 1.5 mL 离心管。ELISA 试剂盒检测小鼠血清中 AST、ALT 和 S-Cr 的表达。

用布拉德福法测定血清中总蛋白浓度，样品浓度与颜色测定强度成正比，在建立标准曲线的同时读取样品浓度值。

2.10 免疫荧光

取实验小鼠，1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。打开胸腔，经心尖依次用生理盐水、4%多聚甲醛灌注固定动物。取出小鼠脊髓腰膨大段（L4 ~L5），多聚甲醛中固定 2 h，含 30%蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸盐缓液（PBS）中 4 ℃保存过夜。染色前将切片置于室温 4~6 h 自然晾干，画圈后，置于染缸中 4%多聚甲醛固定 30 min，0.1mol/L PBS 漂洗 5min，用含 3%牛血清白蛋白和 0.3%聚乙二醇辛基苯基醚（Triton）的 0.1 mol/L PBS 室温孵育 1h 封闭。一抗（1：200 稀释）4 ℃孵育过夜后，0.1 mol/L PBS 液漂洗 3×10 min，二抗（1：1000 稀释）室温孵育 2~4 h，0.1 mol/L PBS 液漂洗 3×10 min，抗荧光猝灭封片剂封片，-20 ℃保存或激光共聚焦显微镜观察。

2.11 蛋白印迹

取实验小鼠，1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，断头处死小鼠。快速取出脊髓 L4~L5 段，冷冻并保存在-80℃直到需要。置于含 500μL 蛋白裂解缓冲液的离心管中，匀浆器匀浆，高速离心机 12000 r/min 于 4 ℃离心 15 分钟，将上清液移入另一 1.5 mL 离心管，用 BCA 蛋白检测试剂盒测定总蛋白含量。琼脂糖凝胶电泳，转膜，5%脱脂奶粉封闭 30 min，一抗（1 ：1000 稀释）4 ℃孵育过夜，TBST 漂洗 3×10 min，二抗（1 ：5000 稀释）室温孵育 1h，TBST 漂洗 3×10 min，化学发光显色，ECL 试剂盒显示蛋白条带，凝胶成像仪成像，拍照，Image ProPlus 6.0 图像处理软件分析条带密度。

2.12 统计学分析

GraphPad Prism 7.00 软件用于统计分析。结果表示为平均值±SEM。使用未配对的学生 t 检验进行两组之间的统计分析。对于两个以上的组，使用单因素方差分析和 Bonferroni 的多重比较事后检验进行统计分析。$P < 0.05$ 被认为具有统计学意义，$p < 0.01$ 或 $p < 0.001$ 被认为具有显著统计学意义。

3 结果

3.1 乳香-没药的 UPLC-MS 成分分析

使用 UPLC-MS 对乳香，没药配伍前后的活性成分进行分析，将保留时间、UV 和 MS 光谱与参比样品进行比较，总共鉴定出 25 种显著增加的成分，如图 1 和表 1 所示。25 种显著增加的成分中的 10 种单体具有抗 NP 作用：Nicotinamide, Adenine, Guanine, alpha-Boswellic acid, Cinnamic acid, Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid, Pyrocatechol, Kaempferol, 18-Beta-glycyrrhetinic acid, Pyrogallol。这些发现为深入了解乳香-没药治疗 NP 作用的因素提供了依据。

3.2 乳香-没药治疗 NP 的网络药理学分析

为探讨乳香没药对 NP 的保护作用机制，采用网络药理学分析了乳香没药在 NP 中的潜在作用靶点。结果表明，乳香-没药和 NP 之间有 71 个相交靶标（图 2A）。共同靶标被上传到 STRING 数据库以获得 PPI 网络。前 15 个基因被确定为 PPI 网络的关键基因。在这个网络中，更相关的蛋白质以较深的颜色描述（图 2B）。从 PPI 分析可以看出 IL6、TNF、IL1β、BDNE、IL10、TLR4 和 TRPV1 与 NP 高度相关。在 Cytoscape 中建立了具有 96 个节点（包括 22 个生物活性成分和 71 个靶标）以及 314 个边缘的可视化网络图（图 2C）。DAVID 数据库用于 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析的结果分为生物过程（BPs）、细胞成分（CCs）和分子功能（MFs）。BP、CC 和 MF 的前五个富集条件如图 2D 所示。KEGG 的前 15 个信号通路以直方图的形式呈现，如图 2E 所示。根据分析结果，炎症相关（HIF-1、TNF、Toll 样受体和 NF-kappa B）信号通路与 NP 密切相关。

3.3 乳香没药抑制神经性疼痛小鼠的机械和热痛觉过敏

CCI 诱导的疼痛模型用于探索乳香-没药对 NP 的影响，并评估小鼠在 POD 0、1、3、5、7、10 和 14 的行为学。行为分析表明，与假手术组（Sham）相比，CCI 模型组的 PWT 和 PWTL 值显著降低（$P < 0.01$），如图 3B-C 所示。降低后，PWT 和 PWTL 值被证明小于 50％正常阈值，表明我们生成的模型是成功的。然而，在假手术组的任何给定时间点，同侧后爪的 PWT 和 PWTL 值均未观察到差异。与 CCI 模型组相比，乳香和没药组的 PWT 和 PWTL 均显著增加（$P < 0.01$）。更具体地说，我们注意到乳香和没药可减轻 CCI 诱导的 NP 小鼠的机械性异常性疼痛和热痛觉过敏，并且联合效果更好。

3.4 阻断 TLR4/MyD88 信号通路缓解 NP 诱发的疼痛

为了评估 TLR4 信号传导对 NP 相关疼痛的行为影响，我们在药理学上阻断了 TLR4 信号传导并观察了行为学变化。我们使用特异性 TLR4 拮抗剂 (LRU) 和 MyD88 同源二聚化抑制肽 (MIP) 分别抑制 TLR4 和 MyD88。进行鞘内注射以将 LRU (10 μL) 或 MIP (10 μL) 输送到腰池。从 POD3 开始连续三天每天鞘内给药。我们发现 LRU 和 MIP 给药都缓解了 NP，从 POD7 到 POD14 具有持久的缓解作用。LRU 缓冲液和 MIP 的对照肽，以相同方式给药，显示没有效果（图 8）。

3.5 阻断 TLR4/MyD88 信号通路抑制 TRPV1 的激活

为了研究 LRU 和 MIP 缓解疼痛的机制，我们检测了 TRPV1 在感觉神经元中的表达。 蛋白质印迹显示，从 POD3 到 POD5 的 LRU 降低了 POD14 上脊髓背角的 TRPV1。同时，从 POD3 到 POD5 的 MIP 治疗也降低了 POD14 上脊髓背角中的 TRPV1（图 8A）。进行免疫荧光染色以确定在 NP 小鼠中阻断 TLR4 信号传导后 TRPV1 表达的变化。我们的结果表明，从 POD3 到 POD5 的 LRU 和 MIP 处理都降低 POD14 上 TRPV1 的表达，表明阻断 TLR4/MyD88 信号通路抑制了 TRPV1 的激活（图 8B）。

3.6 阻断 TLR4/MyD88 信号通路抑制 NP 下神经胶质细胞的活化

为了确定在 NP 小鼠中阻断 TLR4 信号传导后神经胶质细胞活化的变化，我们检测了小胶质细胞标志物 Iba-1 和星形胶质细胞标志物 GFAP 的表达。蛋白质印迹显示，从 POD3 到 POD5 的 LRU 和 MIP 处理均降低了 POD14 上 Iba-1 和 GFAP 的表达变化（图 8A）。同时，免疫荧光染色结果显示，NP 诱导（Iba-1 和 GFAP）的上调和 POD14 上的神经胶质细胞活化，这可以通过从 POD3 到 POD5 鞘内注射 LRU 或 MIP 来抑制（图 8B）。这表明阻断 TLR4/MyD88 信号通路抑制了 NP 下神经胶质细胞的活化。

3.7 乳香-没药调节炎症因子的表达

为了评估炎症因子与 NP 发病机制的关系，我们在 POD 14 上收获了用乳香和没药治疗的小鼠脊髓。使用 Western blotting 检测了脊髓背角炎症因子的蛋白表达。结果显示，促炎表型标志物（IL-6、IL-1β 和 TNF-α）和抗炎表型标志物（IL-10、TGF-β 和 BDNF）在 CCI 后均显著增加。然而，促炎标志物比抗炎标志物增加得多。乳香和没药治疗在 CCI 后 14 天抑制了脊髓组织中促炎标志物的表达（图 4A-C），同时增强了上述抗炎标志物的表达（图 4D-F），并且联合作用更好。

3.8 乳香-没药抑制神经胶质细胞中 TLR4、MyD88 和 p-P65 的激活

我们在 POD 14 上收获了用乳香和没药治疗的小鼠脊髓。免疫染色分析显示，乳香和没药降低了小胶质细胞标志物 Iba-1、星形胶质细胞标志物 GFAP、TLR4 和 MyD88 的免疫反应性。特别是，我们注意到用乳香-没药处理的小鼠的 Iba-1、TLR4 和 MyD88 的免疫反应性与假手术组中观察到的相似（图 5A，图 6A）。此外，蛋白质印迹分析显示，乳香和没药降低了 CCI 小鼠中神经胶质细胞标志物 Iba-1、GFAP、TLR4、MyD88 和 p-P65 的表达（图 5B，图 6B）。这些结果表明神经胶质细胞参与了 CCI 诱发疼痛的过程，而乳香-没药能减弱神经胶质细胞标志物 Iba-1、GFAP、TLR4、MyD88 和 p-P65 表达的上调，联合作用更好。

3.9 乳香-没药抑制脊髓神经元 TRPV1、p-ERK、p-CREB 和 c-Fos 的增加

我们在 POD 14 上收获了用乳香和没药治疗的小鼠脊髓。免疫染色分析显示乳香和没药降低了 TRPV1 的免疫反应性。特别是，用乳香-没药处理的小鼠中 TRPV1 的免疫反应性与假手术组中观察到的相似（图 7A）。此外，蛋白质印迹分析显示乳香和没药降低了 CCI 小鼠中 TRPV1、p-ERK、p-CREB 和疼痛相关因子 c-Fos 的表达（图 7B）。我们的研究结果表明，TRPV1、p-ERK、p-CREB 和疼痛相关因子 c-Fos 参与了 CCI 引起的疼痛，乳香和没药减弱了 TRPV1、p-ERK、p-CREB 和疼痛相关因子 c-Fos 的激活，联合作用更好。

4 讨论

NP 严重危害人类身心健康和生活质量，其迁延难治的特性使很多患者长期倍受折磨，“痛”不欲生。由于疼痛信息的传递和调节所依赖的神经网络的复杂性，仍然缺乏有效的治疗方法和药物。有必要寻找治疗 NP 的新药。近些年，各种具有神经保护的传统中药化合物，已被证明可以减轻 NP。中药多靶点干预疾病的特点使其可通过多种途径干预 NP。在本研究中，我们的研究结果表明，乳香和没药的组合可以减少 CCI 小鼠的机械和热刺激，降低脊髓背角 TLR4、MyD88 和 p-P65 的表达，抑制神经元中 TRPV1 的表达，因此发挥镇痛作用。同时，

我们发现阻断 TLR4/MyD88 信号通路可减轻 NP 引起的疼痛，并减少 CCI 小鼠脊髓背角中 TRPV1 和神经胶质细胞的活化。乳香没药的作用机制可能与抑制 TLR4/MyD88/TRPV1 介导的神经炎症有关，从而起到治疗 NP 的作用。

乳香-没药是经典的活血化瘀、消肿止痛药对。我们最近的研究发现，乳香没药通过调节神经营养因子和炎症因子、降低神经胶质细胞的表达和促进神经元的表达来改善脑缺血，但乳香没药对 NP 的作用仍不清楚。网络药理学在揭示潜在靶点和阐明机制方面具有明显优势，广泛应用于中医药（TCM）研究。中药网络药理学研究侧重于成分、靶点和疾病之间的相互关系，有助于阐明中药的作用机制和靶点。本研究采用网络药理学预测乳香-没药治疗 NP 的活性成分、靶点和通路。结果表明，乳香没药的成分和作用靶点复杂，与 NP 的多种炎症信号通路相关，如 HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路和 NF-kappa B 信号通路。同时，网络药理学分析表明，乳香中的 β-乳香酸、α-乳香酸和 D-柠檬烯和没药中的肉桂酸、丁香酚和姜黄酮可能是治疗 NP 的潜在活性成分。一些研究发现 β-乳香酸、α-乳香酸和 D-柠檬烯可以预防 NP。此外，据报道，其他一些成分，如肉桂酸、丁香酚和姜黄酮也对 NP 有治疗作用。因此，这些成分可能是乳香没药缓解 NP 的潜在活性成分。

在网络药理学预测的这些信号通路中，一些研究表明，TLR4 是一种与炎症和先天免疫密切相关的模式识别受体。TLR4 是一种单一的跨膜受体，在先天性和获得性免疫反应中起重要作用。在中枢神经系统 (CNS) 中，TLR4 主要在神经胶质细胞上表达，它是炎症激活的关键触发因素。因此，TLR4 是调节 CNS 神经炎症的良好靶点。当相应的病原体模式识别受体 TLR4 上调时，会产生促炎因子，如 TNF-α、IL-6 和 IL-1β，并通过 NF-κB 信号通路释放，引发炎症反应。炎症和神经损伤可诱导 TRPV1 转录上调，调节 TRPV1 活性被认为是治疗炎症和神经性疼痛的有效方法。TRPV1 的激活可启动下游一系列信号转导，包括细胞外调节蛋白激酶（ERK）、环磷腺苷效应元件结合蛋白（CREB）、c-Fos 等，这些下游信号分子与痛敏密切相关。因此，TRPV1 已成为通过阻断受体功能或用高剂量激动剂耗尽伤害感受器来筛选镇痛药的有希望的靶标。由于 TRPV1 不是 TLR4 的唯一受体，TLR4 信号通路同时由 MyD88 依赖和 MyD88 非依赖通路传导，分别阻断 TLR4 和 MyD88，观察 TLR4/MyD88 通路对 NP 的影响。我们通过鞘内注射进行药物干预，以在 NP 病理构建后特异性干扰 TLR4/MyD88 通路。先发制人地，LRU 或 MIP 的鞘内应用可以延缓机械异常性疼痛和热痛觉过敏的发生。在最初的多痛形成后进行 LRU 或 MIP 的治疗逆转了疼痛症状并显示出持久的效果。与疼痛相关行为的改变一致，通过阻断 NP 小鼠的 TLR4/MyD88 信号通路，TRPV1 的表达和脊髓背角神经胶质细胞的激活发生了逆转。我们的数据表明脊髓背角中激活的 TLR4/MyD88 信号通路导致 NP 小鼠的机械性疼痛和热痛觉过敏。

由于神经胶质细胞具有大量受体和细胞表面分子，它们能够与中枢神经系统中的神经元和其他类型的细胞进行双向相互作用。神经元和神经胶质细胞之间存在大量信息交换。目前，细胞间的相互作用和影响越来越受到关注。大量先前的研究揭示了它们的各种功能。本研究发现 CCI 小鼠脊髓组织中神经胶质细胞向神经元的浸润增强。乳香没药抑制炎症因子的释放和神经胶质细胞浸润，表现为促炎因子（IL-6、IL-1β、TNF-α）分泌减少，抗炎因子（IL-10、TGF-β、BDNF）分泌增加，这可能与其神经保护作用有关。有趣的是，乳香和没药联合治疗 NP 比仅使用其中一种的单一疗法取得了更好的效果。这表明它对 NP 具有协同保护作用。然而，这项研究有一些局限性。神经胶质细胞和神经元之间的相互作用极其复杂，涉及多个信号分子，需要对其进行更多研究；乳香和没药的显著协同作用也值得进一步研究。因此，需要更多的体外、体内和临床研究来验证乳香和没药在治疗 NP 中的协同作用和安全性。NP 的治疗靶点和作用机制也有待进一步验证。可以使用 qRT-PCR 技术来检测 NP 相关的 mRNA 表达水平以支持这项研究。

综上所述，本研究采用系统药理学和实验评价相结合的方法，探索乳香没药治疗 NP 的生物活性成分、治疗靶点和药理机制。我们的研究结果表明，乳香-没药改善了 CCI 小鼠的机械和热刺激，并通过抑制 TLR4/MyD88/TRPV1 信号通路调节“神经胶质细胞-神经元”在 NP 治疗中发挥作用（图 9）。研究成果不仅为 NP 提供了创新的药物治疗思路，也为乳香-没药配伍的科学内涵提供了理论和实验依据。

肉苁蓉通过 HMGB1/TLR4/NLRP3 调节小胶质细胞介导的神经炎症减轻缺血性脑卒中引起的血脑屏障损伤

廖禹程

（空军军医大学西京医院 药剂科 陕西省 710032）

【ABSTRACT】脑血管疾病是世界范围内主要的死亡原因之一。缺血性脑卒中（IS）是最常见的严重并发症，预后不良。我们以往的实验证明肉苁蓉（CD）是由有效成分组成的传统药食两用植物，在治疗神经系统疾病方面具有多种药理作用。然而，CD 对 IS 后血脑屏障（BBB）的影响尚不清楚。因此，我们研究了 CD 对 IS 的治疗作用，并进一步探讨了其机制。采用大鼠中脑动脉栓塞模型建立 IS 损伤。CD（50、100、200mg kg^{-1} day^{-1}）灌胃给药，连续 7 天。网络药理学用于预测 CD 在 IS 发生中的潜在靶点和途径，进一步的研究证实了相关靶点。结果表明，MCAO 加重了神经功能障碍和 BBB 的破坏。CD 可改善神经功能和 BBB 完整性，抑制脑缺血的发生。网络药理学显示，小胶质细胞介导的神经炎症可能与 IS 有关。进一步的研究证实，MCAO 诱导炎症因子的释放和小胶质细胞的浸润，从而导致 IS 的发生。CD 可调节小胶质细胞 M1-M2 极化介导的神经炎症。这些结果表明，CD 可减轻 MCAO 诱导的 IS，这可能与 HMGB1/TLR4/NLRP3 调节小胶质细胞介导的神经炎症有关。

1. Introduction

缺血性脑卒中（IS）是严重危害人类健康的重大疾病，具有致残率、病死率和复发率高，治愈率低的特点。目前临床标准治疗策略是使用溶栓药进行血管再通，但受最佳药物治疗时间窗窄和给药后易并发多部位出血的制约，临床受益率不足 3%。IS 发病机制复杂，目前临床尚无理想的治疗药物或措施。因此，寻找新型高效安全、作用机制清晰的 IS 防治药物是治疗该疾病的迫切需求。

传统中药及民族药在治疗 IS 方面显示良好的疗效，近年来成为医药领域研究的热点课题。传统中药（如丹参、三七、川芎和黄芪等）具有益气活血、祛痰化瘀、醒神开窍等功效。现代药理学研究证明此类药材能够扩张血管、改善微循环、改善 BBB 的通透性及减轻脑缺血再灌注损伤。因此，从活血化瘀药材中寻找高效、低毒的脑卒中防治天然活性成分具有重要的社会和经济效益。

肉苁蓉（CD）作为最具特色的优势药用资源之一，主要分布于荒漠、盐碱地等干燥地域，新疆是其主要产区，占中国总产量的六成以上。作为著名的补益类中草药和功能性食品被《神农本草经》列为上品，具有补肾阳、益精血、润肠通便等功效。CD 是治疗健忘、抗老防衰、改善学习记忆功能的经典中药，能补益精血、填精益髓，在历代补肾阳方剂中出现频率最高。现代研究资料显示，CD 对于中枢神经系统疾病的防治具有一定治疗优势，可明显改善阿尔茨海默症、帕金森症等的临床症状，减缓患者认知功能障碍、提高学习记忆能力。然而，CD 对 IS 的保护作用尚不清楚。

因此，在目前的研究中，大鼠中脑动脉栓塞模型（MCAO）被用来评价 CD 对 IS 的保护作用。采用网络药理学方法预测 IS 的潜在靶点和途径，并进一步实验验证 CD 对 IS 的作用机制。

2. Materials and methods

2.1 药物和试剂

山羊抗兔 IgG（98164S）、兔抗 Iba-1（17198S）、兔抗 Occludin（91131S）和兔抗 GAPDH（2118S）购自 Cell Signaling Technology（Danvers, MA, United States）。兔抗 ZO-1（ab221547）、兔抗 MMP-9（ab76003）、兔抗 IL-10（ab9969）、兔抗 TGF-β（ab259360）、兔抗 BDNF（ab108319）、兔抗 I-L6（ab259341）、兔抗 IL-1β（ab254360）和兔抗 TNF-α（ab205587）购自 Abcam（Cambridge, MA, United States）。兔抗 CD31（GB12063）、兔抗 CD86（GB13585）和兔抗 CD206（GB13438）购自 Servicebio（中国武汉）。2,3,5-三苯基四唑氯化物

（TTC，纯度>98.0%）购自 SigmaAldrich（美国密苏里州圣路易斯）。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）和二辛可宁酸（BCA）蛋白检测试剂盒购自鼎国昌盛生物科技（中国北京）。Tris 缓冲盐水（TBS）、转移缓冲液（pH 8.4）和电泳缓冲液（pH 8.4-8.6）购自 Servicebio（中国武汉）。其他试剂由其他供应商提供。

2.2 肉苁蓉提取物的制备

肉苁蓉提取物购自和田帝辰生物科技有限公司，CD 的定量分析是通过高效液相色谱（HPLC）进行的，其色谱图如图 1 所示。其中苯乙醇苷（CPhGs）含量 > 80%，其中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量分别为 44.5%和 16.1%。CD 的茎于 2016 年 10 月从中国新疆采集。该植物由胡君萍博士鉴定。这些凭证标本（编号：201610）均存放于新疆医科大学药学院植物标本馆。取原料药 50 g 研成粉末（1 mm，16 目），溶于 100 mL 75%乙醇中，80 ℃连续回流 3 次提取 120 min。然后过滤所得乙醇提取物，以 3200 rpm 离心 10 分钟，使上清液通过 0.45 μm 微孔膜。然后合并过滤的提取物并在减压下蒸发以产生干燥的提取物，CD 提取物的产率约为 5.8％。

2.3 网络药理学分析

CD 的化学成分信息来自 BATMAN-TCM 数据库（http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/）, 这是一种生物信息学评估工具，用于在线预测中医药使用的药物分子机制。通过在 Herb or Herb list 中使用“rou cong rong”进行关键词搜索，然后选择具有高可靠性的蛋白质作为靶点（分数截止 = 20, 调整后的 p 值 = 0.05）进行进一步研究。将由此获得的所有靶标导入 UniProt 数据库，去除非人类靶标以分离相关基因名称，并记录所有与活性成分相关的靶标信息。

通过 NCBI Gene 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/）、GeneCards 数据库（https://www.genecards.org/）、DrugBank 数据库（ https://go.drugbank.com/ ）、 OMIM 数据库（ https://omim.org/ ）、 TTD 数据库（http://db.idrblab.net/ttd/）和 CTD 数据库（http://ctdbase.org/）进行检索。通过输入检索词“cerebrovascular diseases”，选择数据得分 ≥ 20 和 FDA 批准以获得 IS 相关的靶标基因。

将药物与疾病的相互作用靶基因导入 STRING（https://string-db.org/）网站进行蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）分析。其度数、介数中心性和亲近中心性大于他们各自的中位数被选为核心靶基因。DAVID 在线分析工具用于进行基因肿瘤学（GO）富集分析以及京都基因和基因组百科全书（KEGG）通路富集分析。

2.4 动物与实验设计

雄性 SD 大鼠体重 240-260g，购自第四军医大学实验动物中心（中国西安，动物生产许可证号：SCXK-2019-001）。所有实验均按照美国国立卫生研究院 (NIH Publication No.85-23, 1996 年修订版) 出版的《实验动物护理和使用》的指导进行，实验方案经第四军医大学 2019 年 1 月 2 日实验动物伦理委员会批准（注册号：FE15611-07）。

SD 大鼠随机分为六组（每组 n = 12）：假手术组（Sham）、模型组（MCAO）、MCAO+CD 组（50，100，200 mg kg^{-1} day^{-1}）、MCAO+尼莫地平组（10 mg kg^{-1} day^{-1}）。给药浓度梯度根据前期相关研究确定。在 MCAO 开始前 30 min 进行灌胃给药，造模后继续给药 7 天。收集血液和脑组织进行相关检测，详细的工作流程如图 2A 所示。

2.5 MCAO 模型建立

本研究采用经典的大脑中动脉阻闭法模拟 IS：取颈正中切口，暴露右侧颈总动脉，结扎颈总动脉和颈内外动脉，于颈总动脉分叉下方剪开，置入线栓，深度 18 mm。采用激光多普勒血流仪监测脑血流，探头固定于前囟后 2 mm，中线旁开 2 mm，以大脑中动脉后脑血流量减少超过 80%为 MCAO 模型制备成功的标志。Sham 组只暴露血管，不放入线栓。整个手术过程中，大鼠的体温维持在 37 ℃。

2.6 神经功能评分

给药结束后，进行单盲法评分。根据 Longa 评分方法，神经功能共分为 5 个等级：0 分，无神经功能损伤；1 分，左前肢不能完全伸展，轻度神经功能损伤；2 分，行走时大鼠向左侧转圈，中度神经功能损伤；3 分，行走时大鼠向左侧倾倒，重度神经功能损伤；4 分，无自发活动，有意识障碍。

2.7 脑梗死体积测定

大鼠处死后，取出大脑放入预冷的脑槽中，从人字缝分叉处开始，切成 2 mm 厚冠状切片。脑片在 37 ℃下浸泡于 2% TTC 溶液中约 15 min，待脑片染成粉红色后，用 10%多聚甲醛固定 24 h。染色后梗死区颜色为白色，非缺血区为红色。测量并计算总梗死体积。梗死体积的水肿校正通过以下公式计算：梗死体积比=（左侧正常组织－右侧正常组织）/左侧正常组织。

2.8 脑水肿测定

采用常规干湿重法。分别称量梗死侧大脑半球在烘烤前后的湿重（WW）和干重（DW）。然后按 Eliot 公式计算脑组织含水量：脑含水量（BWC）=（WW-DW）/WW×100％。

2.9 H&E、Nissl 和 TUNEL 染色

大鼠麻醉后，分别用生理盐水和 4%多聚甲醛灌注，取出脑组织后放入 4%多聚甲醛中继续固定 24 h。石蜡包埋，冠状面切片，厚度约 5 μm。按照常规 H&E 染色和 Nissl 染色操作进行处理，显微镜下观察病理学变化。凋亡水平用 TUNEL 试剂盒按照操作说明检测。

2.10 蛋白印迹

大鼠脑皮层组织加入 RIPA 裂解液中，在冰上用超声波匀浆，离心后收集上清液，加入 5×loading buffer 沸水煮 8 min 变性。用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。蛋白样本用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，随后转至 PVDF 膜上，用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h，加入相应的一抗：anti-ZO-1、anti-Occludin、anti-MMP-9、anti-IL-6、anti-IL-1β、anti-TNF-α、anti-IL-10、anti-TGF-β、anti-BDNF、anti-Iba-1、anti-CD86、anti-CD206，4 ℃条件下过夜孵育。回收一抗，条带用 TBST 漂洗后加入二抗，室温孵育 2 h，TBST 漂洗后用 ECL 发光液发光。以 GAPDH 为内参分析蛋白表达水平。

2.11 免疫荧光

大鼠脑组织处理后冰冻切片。放入 1%胎牛血清中室温封闭 1 h，用相应的一抗 4 ℃孵育过夜。一抗分别为：anti-CD31、anti-ZO-1、anti-Occludin、anti-MMP-9、anti-Iba-1、anti-CD86、anti-CD206。PBS 冲洗后，用相应的二抗室温孵育 1 h。细胞核用 DAPI 进行染色。染色后的脑片用共聚焦显微镜进行拍照，平均荧光光密度用 Image-Pro Plus 6.0（IPP 6.0）软件单盲条件下进行分析。

2.12 统计学分析

GraphPad Prism 7.00 软件用于统计分析。结果表示为平均值 ± SEM。使用未配对的学生 t 检验进行两组之间的统计分析。对于两个以上的组，使用单因素方差分析和 Bonferroni 的多重比较事后检验进行统计分析。$P < 0.05$ 被认为具有统计学意义，$p < 0.01$ 或 $p < 0.001$ 被认为具有显著统计学意义。

3. Results

3.1 CD 治疗 IS 的网络药理学研究

为探讨 CD 对 IS 的保护作用机制，采用网络药理学分析了 CD 在 IS 中的潜在作用靶点。结果表明，CD 和 IS 之间有 85 个相交靶标（图 1A）。共同靶标被上传到 STRING 数据库以获得 PPI 网络。前 20 个基因被确定为 PPI 网络的关键基因。在这个网络中，更相关的蛋白质以较深的颜色描述（图 1B）。从 PPI 分析可以看出 BDNF、IL-6、IL-1β、TNF、MMP-9 和 IL-10 与 IS 高度相关。DAVID 数据库用于 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析的结果分为生物过程（BPs）、细胞成分（CCs）和分子功能（MFs）。BP、CC 和 MF 的前五个富集条件如图 1C 所示。KEGG 的前 15 个信号通路以直方图的形式呈现，如图 1D 所示。根据分析结果，炎症相关（HIF-1、TNF、Toll 样受体和 MAPK）信号通路与 IS 密切相关。

3.2 CD 改善了 MCAO 引起的脑损伤

每天记录大鼠的体重。结果表明：Sham 组体重稳定增加，缺血后体重明显下降。200mg/kg CD 的治疗显著减缓了下降趋势（图 2B）。在处死大鼠之前对神经功能缺损进行评分。结果显示，MCAO 引起严重的神经功能损伤，100mg/kg 和 200mg/kg CD 治疗组的评分显著下降（图 2C）。缺血后脑组织含水量增加，给药 7 天后脑组织含水量降低（图 2D）。TTC 染色显示，Sham 组和对侧大脑半球均未发现损伤区。相比之下，手术组的同侧大脑半球则出现广泛的病变（图 2E）。脑梗死体积的定量分析表明，CD 治疗显著减少了脑梗死体积（图 2F）。上述结果表明，CD 可减轻脑缺血后的脑损伤，促进脑功能恢复，且随着 CD 浓度的增加，其神经保护作用增强。

3.3 CD 改善了缺血半暗带损伤

H&E 染色观察组织病理学改变。图像显示 Sham 组细胞排列整齐，无缺失和形态学改变。缺血后神经元排列紊乱，细胞体萎缩，细胞核固缩。CD 治疗显著改善了这些组织病理损伤，较高剂量的 CD 表现出较少的病理改变（图 3A）。Nissl 染色显示，Sham 组细胞具有完整的细胞体。MCAO 组神经元细胞排列松散或缺失，Nissl 小体轻度染色甚至溶解，提示脑缺血引起的神经元损伤，较高计量的 CD 表现出较少的病理改变（图 3B）。TUNEL 染色也显示 MCAO 组和 CD 组之间梗死体积神经元凋亡相似减少（图 3C）。上述结果表明，CD 可改善缺血半暗带损伤，保护脑缺血诱导的神经元损伤。且随着 CD 浓度的增加，其神经保护作用增强。

3.4 CD 减轻 MCAO 引起的 BBB 损伤

紧密连接蛋白（TJs）是 BBB 的重要组成部分，维持 BBB 的完整性，并受基质金属蛋白酶（MMPs）调节。因此，采用免疫荧光和 Western blotting 测定 TJs 和 MMPs 的表达量。结果表明，IS 后，Zonula Occludens-1（ZO-1）（图 4A, C）和 Occludin（图 4B, D）的表达明显降低，MMP-9（图 5A, B）的表达增加，提示 BBB 的完整性受到破坏。然而，CD 抑制了 TJs 和 MMP-9 表达的降解，并保护了 BBB 结构。

3.5 CD 治疗调节炎症细胞因子的分泌

极化的小胶质细胞通常通过其特征基因的表达来区分。我们在 MCAO 后 7 天使用 Western blotting 检测了小胶质细胞表型标志物 Iba-1 的蛋白表达。Western blotting 结果显示，小胶质细胞标志物 Iba-1 在假手术组很少表达，而在缺血后表达明显增加。然而，CD 显著抑制小胶质细胞的表达（图 5C）。同时，我们的数据显示，MCAO 后促炎细胞因子（IL-6、IL-1β 和 TNF-α）和抗炎细胞因子（IL-10、TGF-β 和 BDNF）均显著增加。 然而，促炎因子的上调程度高于抗炎因子。CD 治疗在 MCAO 后 7 天抑制缺血性脑组织中促炎细胞因子的表达（图 6A-C），同时增强上述抗炎细胞因子的表达（图 6D-F）。

3.6 CD 促进小胶质细胞 M1-M2 极化

为了证实 CD 是否能够影响 MCAO 大鼠半暗带区域的小胶质细胞极化，在 MCAO 后 7 天对小胶质细胞 M1 表型标志物（CD86）和小胶质细胞 M2 表型标志物（CD206）进行免疫荧光染色和 Western blotting 测定。如图 7 所示，使用这些表型标志物来评估 MCAO 大鼠梗塞皮层半暗带中 CD86/Iba-1 细胞和 CD206/Iba-1 细胞的表达。在 MCAO 组中，我们观察到 CD86 和 Iba-1 的共定位计数高于 Sham 组，而给予 CD 后显示 CD86/Iba-1 细胞与 MCAO 相比显著减少（图 7A, C）。同样，与 Sham 组相比，MCAO 组中 CD206/Iba-1 细胞的 CD206 和 Iba-1 的共定位计数高，但是与 MCAO 组相比给予 CD 后进一步增加了 CD206/Iba-1 细胞计数（图 7B, D）。总之，这些结果表明小胶质细胞在 MCAO 后被激活为 M1 经典表型。然而，CD 处理促进小胶质细胞向 M2 表型极化过程。

4.Discussion

缺血性脑卒中是一种严重危害人类健康的疾病，是世界上第二大死亡原因和慢性致残的主要原因，引起了人们越来越多的关注。由于复杂的病理机制，临床治疗药物仍然缺乏。有必要寻找新的治疗药物来改善脑卒中的预后。在这项研究中，我们的结果表明，CD 治疗能显著改善 IS 后引起的神经缺损和脑内缺血。其影响可能与小胶质细胞 M1-M2 极化引起的神经炎症有关，从而保护 BBB 的完整性（图 8）。

BBB 对维持正常脑功能至关重要，BBB 破裂是脑病的主要病理机制。因此，保护 BBB 的完整性是预防和治疗 IS 的重要策略。TJs 是 BBB 的基本组成部分，并保持 BBB 的完整性。TJs 的结构和功能可以通过在 IS 时 BBB 上的表达或分布的变化来调节。中风引起的 TJs 降解增加 BBB 通透性。MMPs 是一类锌依赖性酶，被认为在缺血性中风时调节 BBB 的通透性和功能。MMPs 通过降解 TJs 和基底膜蛋白破坏 BBB，导致白细胞浸润，脑水肿和出血。在 MMPs 中，MMP-9 是急性 IS 研究最广泛的酶。在中风后的人脑组织和血清中，MMP-9 活性明显升高。在所有卒中亚型中，卒中急性期 MMP-9 水平被认为是 IS 的独立预测因子。因此，本研究测定了 TJs 和 MMP-9 的表达。结果表明，CD 和尼莫地平均能抑制 MMP-9 的表达和 TJs 的降解，这可能与保护 BBB 有关。

BBB 由 TJs 连接的连续内皮细胞层组成，这有助于形成选择性物理屏障并维持脑内平衡。已有研究显示，脑缺血和再灌注期间 BBB 受到高度破坏，其中神经血管炎症，拥有属性炎症介质和来自内皮细胞和免疫细胞的蛋白酶的上调起着重要作用。BBB 的破坏也可能与小胶质细胞的活化状态密切相关。已有研究表明，中风后，

炎性小胶质细胞调节促炎细胞因子（包括 IL-6、IL-1β 和 TNF-α）大大降低了 BBB 的完整性。BBB 完整性的破坏也与细胞旁通透性增加有关，可能通过改变细胞骨架组织，TJs 表达和 MMPs 产生。相反，促血管生成小胶质细胞可增强缺血性卒中后神经增殖和分化，推测可能通过上调细胞因子（包括 IL-10，TGF-β 和 BDNF）刺激 TJs 表达增加 BBB 的完整性。因此，本研究说明给予 CD 后 IS 部位小胶质细胞 M1 向 M2 表型极化，并发挥抑制炎症作用。表现为促炎因子（IL-6、IL-1β、TNF-α）分泌减少，抗炎因子（IL-10、TGF-β、BDNF）分泌增加。

网络药理学在发现潜在靶点和阐明作用机制方面具有明显的优势，在中医药研究中得到了广泛的应用。中医药网络药理学研究着眼于成分、靶点和疾病之间的相互关系，有助于阐明中医药的作用机制和作用靶点。本研究采用网络药理学方法预测 CD 的活性成分、作用靶点和治疗 IS 的途径。结果表明，CD 治疗 IS 的成分和靶点是复杂的，与 HIF-1 通路、TNF 通路和 Rap1 通路等多种信号通路有关，而这些信号通路被认为是治疗 IS 的关键因素。同时，网络药理学分析表明，Phenylalanine、Dauricine 和 6-Methyl Indole 可能是缓解 IS 的潜在活性成分。一些研究发现，Phenylalanine、Dauricine 和 6-Methyl Indole 可以有效防治 IS。因此，这些成分可能是 CD 的潜在活性成分，可以减轻 IS。

小胶质细胞是脑的主要免疫细胞，是对 IS 引起的病理生理变化最早作出反应的细胞。传统观点认为小胶质细胞活化对 IS 有害，而抑制小胶质细胞活化的治疗方法已被广泛研究。然而，越来越多的证据表明，小胶质细胞激活对于神经发生、血管生成和突触重塑也是至关重要的，从而促进脑缺血后的功能恢复。本研究发现 CD 给药后小胶质细胞 M1 向 M2 表型极化，抑制炎症因子的释放和增强神经保护因子，这可能与其改善 BBB 作用有关。然而，我们的研究还存在一些局限性。首先，没有使用体外实验来验证小胶质细胞极化与其改善 BBB 作用的关系。此外，结合网络药理学的结果，CD 对 IS 的保护作用也可能与血管功能和氧化应激有关。因此，我们有必要进一步探讨其作用机制。

5. Conclusion

我们的结果表明，IS 通过激活小胶质细胞介导的神经炎症，加重了 BBB 功能紊乱。 CD 治疗可以预防 IS 并且保护 BBB 的完整性，这可能与小胶质细胞 M1-M2 极化介导的神经炎症有关。因此，CD 可以作为治疗与神经炎症相关的脑血管疾病（如 IS）的潜在候选者。 此外，我们为 CD 作为功能性食品保护神经系统提供了科学依据。

一例华法林致急性肾损伤的病例分析

林晓霞

茂名市人民医院　广东 茂名 525000

【前言】华法林是目前临床最常用的抗凝药物之一，华法林相关肾病(warfarin related nephropathy，WRN)是指使用华法林时国际标准化比值(international normalized ratio，INR)>3.0时发生不明原因的血肌酐升高(1周内Scr升高≥0.3mg/dl或高于基础水平的50%)[1]。WRN的发病率为20.5%，在慢性肾脏病患者中发病率为33%，非慢性肾脏病患者发病率为16.5%，老年人、慢性肾脏病、糖尿病肾病、高血压、心脏病患者是WRN的高危因素，WRN可加速肾脏病进展，增加病死率[1]。临床药师在参与查房时发现一例“瓣膜性房颤”患者在使用华法林治疗过程中出现了急性肾功能损害，通过分析怀疑由华法林引起，建议医生停药后肾功能好转，现分析如下:

1 病例资料

患者，女，62岁，身高151cm，体重51.5 kg，因反复活动后气促3年,加重1周于2019年4月15日收入院。患者3年前无明显诱因开始出现活动后气促，之后反复在外院住院及门诊治疗，最近1次在2019年3月31日，予口服“华法林2.25mg qd，地高辛0.125mg qd，立普妥20mg qd，速尿20mg bid，螺内酯20mg qd，盐酸左氧氟沙星0.2g bid，立加利仙50mg qd，雷贝拉唑20mg qd。”4月8日患者再次出现气促不适，步行数十米即可出现，夜间不能平卧，伴有双下肢水肿、胸骨处点状疼痛、胸闷，咳嗽，不剧烈，咳少许白痰。既往史：10余年前有脑梗死病史，遗留有左侧肢体乏力，能步行，生活自理。

查体T：36.3 ℃ P：104 次/分 R：19 次/分 BP：104 /61 mmHg。心前区无隆起，心尖搏动向左下移位，心尖搏动位于第5肋间左腋前线，心尖部未触及震颤，叩诊心界向左下扩大，听诊心率：110 次/分，律绝对不齐，心音强弱不等未闻及异常附加音，心尖部可闻及5/6级双期杂音，可触及震颤，向左腋下传导，呼吸时无明显差异，未闻及心包摩擦音。实验室检查CRP:64.8mg/l，WBC:7.67*10^9/L，NE:0.688、NT-proBNP:3159pg/ml，PCT0.13ng/ml，HBA1c8.1%，尿酸782umol/l，凝血：INR:4.9，肌酐127umol/l（入院前肌酐90umol/l，INR:4.39）。2019年3月26日：广东省水电医院心脏彩超：风湿性心脏病 中度二尖瓣狭窄并中度返流 中度主动脉瓣返流 左室收缩舒张功能减低。我院急诊查心电图：房颤心律，心室率78次/分。初步诊断 1.慢性心力衰竭急性加重 1)风湿性心脏病中度二尖瓣狭窄并中度返流 中度主动脉瓣返流、心房颤动、心功能4级 2.痛风性关节炎 3.左肾多发结石并肾积水 4.脑梗死后遗症。

患者初始治疗方案为予阿托伐他汀钙降脂、螺内酯改善心肌重构、曲美他嗪营养心肌、苯溴马隆降尿酸。入院第二天患者心衰发作心室率104次/分偏快，给予地高辛0.125mg，qd控制心率，并拟呋塞米20mg，bid加强利尿。患者新诊断糖尿病，加阿卡波糖100mg Tid控制血糖；痛风发作，予依托考昔片60mg，qd对症治疗。4.18患者心率110次/分，加用美托洛尔缓释片23.75mg，qd治疗。经过治疗，患者的心衰症状好转。双输尿管膀胱超声显示：左肾结石，左肾积液。4.15查尿常规：尿比重1.008，患者尿隐血（2+），尿蛋白弱阳性，尿红细胞6个/UL,4.19复查尿常规：尿比重1.007，患者尿隐血（2+），尿蛋白弱阳性，尿红细胞1个/UL。

患者因瓣膜性房颤予华法林3mg，qn抗凝治疗，病情中患者INR及肌酐变化如图1。入院时，患者INR:4.39，肌酐90umol/L，立即停用华法林，复查INR:4.9，肌酐127umol/L。当INR从4.9降至1.4时重启华法林3mg，qd治疗；肌酐持续上升至245umol/l,较入院前基础值升高2倍，符合急性肾损伤的诊断标准。由于患者肾功能恶化，暂停依托考昔、螺内酯、苯溴马隆等，目前肌酐清除率为17.05ml/min，不适宜使用阿卡波糖降糖治疗，改用瑞格列奈2mg tid降糖。4.21复查INR 4.5，立即停用华法林。出院时查INR4.7，肌酐较前明显降低。不排除华法林引起的相关性肾功能损害，出院诊断为：1.慢性心力衰竭急性加重 1)风湿性心脏病 2)中度二尖瓣狭窄并中度返流 中度主动脉瓣返流3)心房颤动4)心功能4级,2.抗凝相关性肾病,3.2型糖尿病,4.痛风性关节炎,5.左肾多发结石并肾积水,6.脑梗死后遗症。

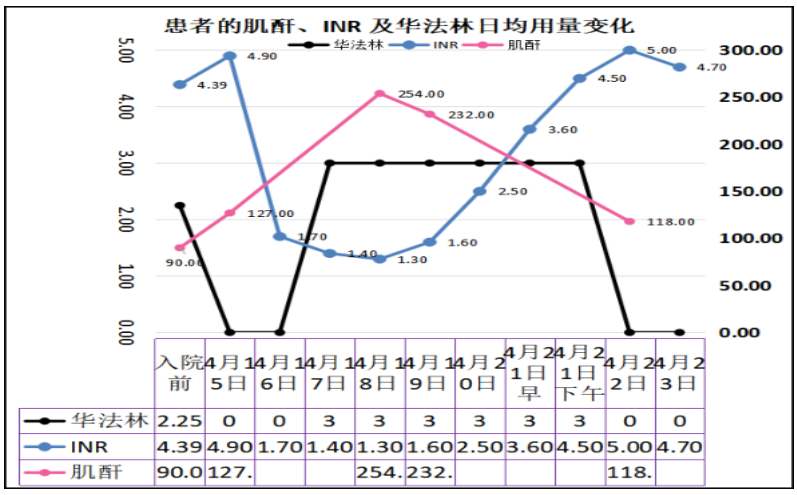


图 1.患者的肌酐、INR 及华法林日均用量变化

2 病例分析

该患者为老年女性，风湿性心脏病，瓣膜性心房颤动，反复发生心力衰竭，存在心功能不全、有效血容量不足所致的急性肾功能不全，但该患者 BUN / Scr<20，考虑肾前性因素为非 AKI 主要原因，但也不能排除；本患者存在心房颤动，应警惕有无房颤所致血栓，进而脱落导致肾动脉栓塞的可能。肾动脉栓塞起病急骤，可出现血尿、AKI，多伴有腰痛、血压升高，乳酸脱氢酶升高等表现。但患者长期使用华法林抗凝，且无典型临床表现，故可基本除外。需排除泌尿道结石，本例患者为老年女性，B 超提示左肾结石，左肾积液，出现 AKI，应警惕此病导致的梗阻性肾病。但患者尿量正常，且无临床症状，予排除。该患者尿比重 1.008，患者尿隐血（2+），尿蛋白弱阳性，尿红细胞 6 个/UL，患者长期口服华法林抗凝，近期查 INR4 左右，临床医生考虑患者的肌酐、INR 及华法林日均用量变化有一定的相关性，肌酐逐渐升高较入院前基础值升高 2 倍以上，符合华法林相关肾病的诊断。治疗方面，该患者入院后停用华法林，凝血功能恢复后重新启动华法林抗凝，但肌酐持续上升，于是再次停止抗凝，并停用可能引起肌酐升高的药物安康信、螺内酯、立加力仙等。临床药师根据国家药品不良反应监测中心所采用的药品不良反应关联性评价方法评判：①华法林使用时间上与肾功能损害有合理的关联性；②查阅中、英文数据库，也有华法林引起肾功能损害的报道。该患者肌酐升高可能为华法林引起急性肾功能损害的不良反应。

	肯定	很可能	可能	可能无关
1.用药与不良反应/事件的出现有无合理的时间关系	+	+	+	-
2.反应是否符合该药已知的不良反应类型	+	+	+	-
3.停药或减量后，反应是否消失或减轻	+	+	±?	±?
4.再次使用可疑药品是否再次出现同样反应/事件	+	?	?	?
5.反应/事件是否可用并用药的作用、患者病情的进展、其他治疗的影响来解释	-	-	±?	±?
评价：在不良反应分析的 5 个原则选项中，前四个选项都选择“是”，则关联性评价应选“肯定”；前四个选项中有 3 个选择“是”，则关联性评价应选“很可能”；前四个选项中有 2 个选择“是”，则关联性评价应选“可能”。				

3 分析与讨论

华法林是双香豆素类中效抗凝剂，其作用机制为竞争性对抗维生素 K，抑制肝细胞中维生素 K 依赖性凝血

因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ的合成，适用于治疗血栓栓塞性疾病。但老年人应慎用华法林，其原因如下：（1）华法林由肝脏代谢，老年患者肝功能下降致其对华法林清除率下降。（2）受多种因素的影响，华法林安全范围窄，药效学及药动学个体差异较大，易发生不良反应，最常见的不良反应为出血。在对患者 AKI 病因的探寻中，通过查阅文献了解到 WRN 的概念，但临床对 WRN 认识不足，本文对 WRN 目前的研究进展总结如下。

2011 年 Brodsky 等[1]回顾性分析了 4006 例服用华法林且国际标准化比值（INR）维持在 3 .0 以上的非 CKD 患者，首次提出了华法林相关性肾病（WRN）的概念，发现 WRN 除了发生于 CKD 患者，也发生于非 CKD 患者，且发生后会增加其病死率。临床上 WRN 缺乏特异性表现，且无有效评估手段，故华法林导致的肾损伤很容易被忽视[2,3-4]。

3.1 危险因素:华法林或其他抗凝药导致的中度或重度凝血障碍是 ARN 的主要危险因素，研究发现 INR 通常大于 3[1,5,6]。然 ，除了凝血病程度，还有其他因素与 AKI 的发生相关。CKD 也是 ARN 的主要危险因素之一，在慢性肾脏病患者中发病率为 33%，非慢性肾脏病患者发病率为 16.5%[1,5]，除此之外，其他独立危险因素包括老年人、糖尿病、心力衰竭、高血压病、肾小球肾炎以及肾病综合征也是 WRN 的高危因素，WRN 可加速肾脏病进展，增加病死率[1,5,6]。

3.2 华法林相关肾病的发病机制：目前华法林相关肾病的发病机制尚不清楚，目前目前研究局限于肾活组织和动物模型[2,7,8]。对 WRN 患者进行肾活检发现在患者的 Bowman 囊、肾小管中存在许多红细胞管型，推测华法林过度抗凝导致肾小球出血,继而造成肾小管广泛被红细胞管型阻塞有关（主要是远端小管）[2]；另外，研究发现抗氧化剂(如 N-乙酰半胱氨酸)不能改善肾小球出血，但可减轻肾损伤；推测 AKI 的发生可能与红细胞的分解产物血红蛋白及亚铁血红素对肾小管的氧化性损伤有关[9]。

3.3 临床表现：WRN 缺乏特异的临床表现，没有发生临床上明显的出血事件[1]。Brodsky 等首次对发生不明原因 AKI 的华法林凝血病患者进行肾活检研究发现 9 例活检证实的 WRN 患者，所有的患者都有血尿，仅 1 例出现肉眼血尿，肉眼血尿的发生少于镜下血尿[2]。但其随后的报告却报道，血尿与 ARN 无关，近一半患者可不出现血尿，因此无血尿并不能排除 ARN。部分患者的血尿可能是一过性的，由于红细胞管型可阻止肾小球继续出血或小管损伤出现在临床症状之前，使得出现 AKI 时未检测到血尿。在 ARN 动物模型中也能观察到无血尿的情况[7,8]。肉眼血尿较镜下血尿少见[1,2]。 在上述研究中, 9 例中仅 1 例有肉眼血尿。尿沉渣分析显示为变形红细胞，偶尔有红细胞管型，白细胞尿不常见。ARN 的其他临床表现取决于 AKI 的严重程度，重度 AKI 患者可出现高血压、容量负荷及尿量减少。

3.4 预后：WRN 患者预后不良，积极治疗后多数患者 Scr 可保持在某一水平，但无法完全恢复至初始水平，部分患者肾功能永久丧失。9 例患者存在活检证实的华法林相关肾病的研究中，有 5 例患者没有恢复到之前的肾功能水平[2]。WRN 组的实际死亡率为 42.8%，非 WRN 组为 26.3%。华法林肾病显著提高了死亡率[10]。

4 小结

ARN 是一种常见但被低估了的抗凝药相关并发症，是一种由过量使用华法林或其他抗凝药所致的 AKI，其增加肾损伤发病率和全因病死率。其主要病因是由华法林或其他抗凝药过量所致的中度或重度凝血障碍。当 INR ＞ 3 时，ARN 发病风险加大，其他高危因素包括 CKD、糖尿病、心力衰竭、高血压病、肾小球肾炎等。目前对其发病机制、预防和有效治疗方法尚不明确。

在药物治疗过程中，临床药师与临床医师密切合作，利用丰富的药学知识，尽早识别药品不良反应，尤其像本文报道的华法林引起的 AKI，其临床上无特异性表现，容易被忽视，WRN 在 CKD 患者中更易发生，因此临床药师应密切监测使用华法林进行系统抗凝治疗的高危人群的肾功能及 INR。做到尽早识别，尽早诊断，尽早采取有效治疗措施，有利于患者病情恢复及预后。另外临床药师对患者进行用药教育，减轻患者心理负担，增加患者依从性，减低药物对患者的危害。

文献参考

[1] Brodsky SV, Nadasdy T, Rovin BH, et al.Warfarin-related nephropathy occurs in patients with and without chronic kidney disease and is associated with an increased mortality rate. Kidney Int 2011; 80:181.

[2]BRODSKY S V，SATOSKAR A，CHEN J，et a1．Acute kid— ney injury during wafarin therapy associated with obstructive tubular red blood cell casts：a report of 9 cases [J]．Am J Kidney Dis，2009，54(6)：1121-1126．
[3]ARPPARISUTH N，CHEUNSUCHON B，CHAWANASU． NTORAPO J R．et a1．Warfarin related nephropathy：the first case report in Thailand[J]．J Med Assoc Thai，2015，98(2)：212-214．
MOECHEL G W，LUCIANO R L，BREWESTER U C．Warfarin related nephropathy in a patient with mild IgA nephropathy on dabigatran and aspirin[J]．Clin Kidney J，2013，6(5)：507-509．
[5]Brodsky SV, Collins M, Park E, et al. Warfarin therapy that results in an International Normalization Ratio above the therapeutic range is associated with accelerated progression of chronic kidney disease. Nephron Clin Pract 2010; 115:c142.
[6]An JN, Ahn SY, Yoon CH, et al. The occurrence of warfarin-related nephropathy and effects on renal and patient outcomes in korean patients. PLoS One 2013; 8:e57661.
[7]Ware K, Brodsky P, Satoskar AA, et al. Warfarin-related nephropathy modeled by nephron reduction and excessive anticoagulation. J Am Soc Nephrol 2011; 22:1856.
[8] Ozcan A, Ware K, Calomeni E, et al. 5/6 nephrectomy as a validated rat model mimicking human warfarin-related nephropathy. Am J Nephrol 2012; 35（4）356-364
[9] Ware K , Qamri Z , Ozcan A , et al. N-acetylcysteine ameliorates acute kidney injury but not glomerular hemorrhage in an animal model of warfarin-related nephropathy[J]. AJP: Renal Physiology, 2013, 304(12):F1421-F1427.
[10] Nam A J , Young A S , Chang-Hwan Y , et al. The Occurrence of Warfarin-Related Nephropathy and Effects on Renal and Patient Outcomes in Korean Patients[J]. PLoS ONE, 2013, 8(4):e57661

临床药师参与主动脉瓣置换术后华法林致消化道出血的病例分析

林晓霞

茂名市人民医院 药学部 广东 茂名 525000

【摘要】临床药师参与 1 例主动脉机械瓣置换术后服用华法林致消化道大出血的病例，结合患者的饮食、疾病状态、药物相互作用等多方面因素，与医生共同讨论患者的药物治疗方案，密切留意患者用药期间的消化道出血情况，并对患者进行华法林的用药教育，减少不良反应的发生。临床药师在临床工作中发挥专业特长，协助医生优化治疗方案，促进临床合理用药。

心脏瓣膜置换术是治疗严重瓣膜疾病的有效手段，心脏人工机械瓣膜置换术后的患者需长期口服华法林，以防止因机械瓣膜植入产生血栓引起栓塞[1]。华法林则为机械瓣膜置换术后临床一线口服抗凝药物，但华法林的治疗窗窄，个体差异较大，影响患者术后抗凝疗效的因素很多，包括种族、性别、年龄、左心房大小、心功能分级、有无心房颤动及其持续时间、原发疾病、心脏瓣膜置换种类及部位、华法林剂量及用药规律、抗凝治疗持续时间、并发疾病及合并用药、饮食习惯，以及华法林药动学差异等[2]。临床药师通过 1 例主动脉机械瓣置换术后服用华法林致消化道大出血的病例，分析引起华法林过度抗凝的原因，为医生提供合理用药建议，对患者进行药学监护及用药教育。

1 病例资料

患者，男，50 岁，身高 171cm,体重 74kg。患者 2 月余前劳累后出现咳嗽,咳少量白痰,夜间突感胸闷、气促、心悸，半小时后可缓解。4-20 因咳嗽加剧就诊于我院急诊，予阿斯美、切诺等药物治疗，咳嗽较前好转，仍有夜间心悸、气促。4 天患者上述症状较前加重，伴大汗，持续 2-3 小时，端坐位可缓解。1 天前就诊于外院行胸片示“心胸比 0.67，心影中高度增大，左、右心室增大”。遂就诊于我院门诊，查 WBC 9.71x10^9/L，Hb 156g/L，PLT 281x10^9/L，pro-BNP 6339 pg/ml，TG1.83mmol/L，LDL-c 3.43 mmol/L，AST 61 U/L，LDH 590 U/L，肌酐 95umol/L，尿酸 674umol/L，心电图示窦性心律，频发室早，左房大。现为进一步诊治于 2019 年 6 月 10 日入院。既往史儿时瓣膜关闭不全，5 年余前体检发现心脏增大和高血压；高尿酸血症 6 年余。入院诊断：慢性心力衰竭急性加重；频发室性早搏；高血压 2 级高危组；高尿酸血症。

2 主要治疗经过与监护

入院后给予速尿+螺内酯利尿、胺碘酮片降心室率、美托洛尔改善心肌重塑、沙库巴曲缬沙坦钠片改善心衰、苯溴马隆降尿酸、泮托拉唑护胃等治疗。完善心脏冠状动脉 CT：1.左冠脉前降支近段、右侧冠状动脉中段钙化斑块，管腔轻度狭窄。 2.左心增大。 心脏彩超：EF45%，主动脉瓣关闭不全（重度），主动脉增宽 左右房左室明显增大，二尖瓣关闭不全（轻度），心包积液（微量），左心室收缩及舒张功能均降低，有行主动脉瓣置换指征，于 6.25 全麻行体外循环辅助开放性心脏手术+主动脉瓣机械瓣膜置换术，术中予头孢呋辛预防感染、泮托拉唑针预防消化性溃疡、甲泼尼龙保护心肌和抗炎。术后第一天，治疗原则为抗凝,INR 目标值为 1.8-2.5，控制心室率，改善心功能，抑酸，预防感染。华法林的起始剂量是 3mg，Qn。术后第 2 天，患者出现发热，体温最高 38.3℃，白细胞 16.97x10^9/L，中性分叶粒细胞% 0.868，升级为头孢哌酮他唑巴坦钠抗感染。使用华法林的第 3 天，查 INR 为 1.37，未达标，上调华法林的剂量为 3.75mg,qn,用药 5 天后复查 INR 为 2.62，7 月 3 日下调华法林剂量为 3mg，qn，当天患者出现房颤心率，脉率波动在 60-120 次/分，加用泼尼松片进行治疗。7 月 12 日凌晨患者出现柏油样变，血压降低，面色苍白，意识淡漠，血压 63/40mmHg，心率 150 次/分，考虑消化道出血，给予停用华法林，跟医生沟通后把泼尼松片也停用，头孢哌酮他唑巴坦改为头孢呋辛。辅助检查：大便血红蛋白（++），转铁蛋白（++）；尿潜血（3+）；凝血示：INR3.93，血红蛋白 46g/L,血小板 152。即停用华法林，予患者质子泵抑制剂抑酸、纤维蛋白原 3g，qd、凝血酶原复合物 600iu，qd 止血，维生素 K_1 分别为 10 mg 和 5mg，ivdrip，qd 拮抗华法林等治疗等，积极治疗后患者血压回升不明显，转 ICU。转入后予高病危、开放静

脉通道、联系床边急诊胃镜、积极止血、改善凝血功能、纠正贫血、升压、维持内环境稳定等处理。经以上处理，于 2019-7-12 13:45 患者血压有所回升，心电监护示：心率 120 次/分，血压 100/60mmHg。

3 分析与讨论

华法林是一种双香豆素衍生物，通过抑制维生素 K 及其 2，3-环氧化物(维生素 K 环氧化物)的相互转化而发挥抗凝作用。华法林的量效关系受遗传和环境因素影响，有效性和安全性同其抗凝效应密切相关，而剂量-效应关系在不同个体有很大差异，因此必须密切监测防止过量或剂量不足[3]。心瓣膜病的抗栓治疗对减少血栓形成具有重要意义，但同时出血的并发症也是目前棘手的问题，因此，将临床出血及血栓栓塞事件发生率降到最低是临床抗凝治疗的主要目标[4]。研究表明，与西方人比较，亚洲人华法林肝脏代谢酶存在较大的差异，中国人的平均剂量低于西方人[3]。患者消化道出血时 INR 升高，临床药师参与患者的治疗全过程，从饮食、疾病状态及药物相互作用分析导致华法林过度抗凝的可能原因，为临床医生提供合理用药建议。

3.1 消化道出血的原因分析

3.1.1 遗传因素

2007 年 8 月 16 日，美国 FDA 批准更新抗凝药物华法林的产品说明书，要求在警示信息中标明人的遗传差异可能影响其对该药物的反应，建议通过基因多态性检测来帮助初始剂量的选择，基因多态性只能解释 30%-60%华法林的个体差异，其他的还要考虑患者的体表面积、肝肾功能和合并用药[3]。患者华法林用药基因监测提 CYP2C9 为*1/*1，属于正常代谢型，VKORCl AA 突变纯合型，与 GG、GA 基因型相比，对华法林最敏感，应降低给药剂量。根据基因型预测起始剂量 3-4mg，国际华法林药物基因组学联合会（The International Warfarin Pharmaeogenetics Consortium）通过大量数据，制订了华法林的剂量运算法，它明显优于传统的固定剂量方案，在药物基因组学检测结果的基础上，计算得出华法林的给药剂量为 3.5mg/天。本患者华法林 3mg qN，消化道出血当天 INR3.94，故患者的剂量选择是合理的，应综合考虑患者 INR 升高导致消化道出血还有其他因素的影响。

3.1.2 饮食因素

食物中维生素 K 主要源于绿色蔬菜，如菠菜、生菜、花菜、胡萝卜等。华法林的抗凝作用能被维生素 K 拮抗。长期接受华法林治疗的患者对饮食中维生素 K 的变化非常敏感。当患者突然改变饮食习惯，就有可能使得体内维生素 K 发生较大变化，从而改变华法林的抗凝作用。经临床药师询问，患者住院期间饮食规律且较固定，蔬菜食用较多，因术后胸痛后食欲明显减退，食物中的维生素 K 摄入减少，可能增强华法林抗凝作用，导致消化道出血。

3.1.3 疾病因素

可能影响华法林抗凝作用的疾病包括：术后应激、心衰、发热、甲状腺功能亢进、乏氧状态、慢性肝脏疾病、长期腹泻或呕吐、营养不良等。该患者 15 天前行心脏直视手术后，可能由于体外循环的全身炎症反应和手术创伤作用于机体，引起全身主要脏器和消化道黏膜缺血-再灌注损伤，导致应激性溃疡的发生。手术过程中和完成后的机械通气、体外循环和主动脉阻断时间的延长明显增加上消化道出血的发生率，术中肝素的使用等因素可导致体外循环术后并发应激性溃疡的发生[5-6]。

3.2 药物治疗的监护

3.2.1 华法林用药监护

患者 7 月 12 日 INR 值 3.93，并出现上消化道出血症状，不能排除患者的病理状态对华法林抗凝药效的增强。另外，由于华法林半衰期较长(T2/1 约 37h)，代谢较慢，且该患者合并用药较多,故患者该次上消化道出血与患者病理状态和服用药物因素均有密切相关性。故给予患者质子泵抑制剂抑酸、纤维蛋白原 3g，qd、凝血酶原复合物 600iu，qd 止血，维生素 K_1 分别为 10 mg 和 5mg，ivdrip，qd 拮抗华法林等治疗后，7 月 12 日患者 INR 可降至 1.26，此时患者的出血情况控制欠佳，转入 ICU 后予高病危、开放静脉通道、联系床边急诊胃镜、积极止血、改善凝血功能、纠正贫血、升压、维持内环境稳定等处理。经以上处理，于 2019-7-12 13:45 患者血压有所回升。在消化道出血事件后 90 天内不恢复华法林治疗的决定与血栓形成和死亡风险增加有关。对于许多经历过华法林相关消化道出血的患者来说，恢复抗凝治疗的益处将超过风险[7]。美国的回顾性研究分析了 2005-2010 年因心房颤动抗凝治疗发生消化道出血的 1329 例患者，其中 49.1%的患者重启华法林治疗，与出血稳定后 30d 比较，7d

后重启抗凝治疗明显降低死亡率且未增加出血[8]。抗栓治疗消化道损伤防治中国专家建议(2016・北京)也建议：抗栓治疗患者消化道出血稳定后，应该尽快恢复抗栓治疗，治疗时机应个体化处理，充分治疗下1周可能是合理的选择[9]。但由于患者为换瓣术后伴房颤，且 INR 值已降至 1.26，有发生血栓的危险，且华法林起效缓慢，2-7天后出现抗凝作用。综合考虑后于 7.14 日重启华法林 1.5mg 抗凝治疗。

3.2.2 头孢哌酮他唑巴坦钠药学监护

患者因术后第 2 天出现发热，体温最高 38.3℃，白细胞 16.97x10^9/L，中性分叶粒细胞% 0.868，升级为头孢哌酮他唑巴坦钠抗感染。头孢哌酮致维生素 K 相关性凝血功能异常：1）头孢哌酮为三代头孢菌素，其侧链上的 N- 甲基四唑基(MTT)一方面与体内维生素 K 作用，使维生素 K 消耗增加。2）直接抑制肝微粒体羧化酶或维生素 K 氧化还原酶，减少维生素 K 生成，从而导致维生素 K 依耐性凝血因子缺乏而出血。3)肠道菌群分解代谢产生维生素 K，头孢哌酮主要经胆汁排泄，进入小肠后大量杀死正常菌群，使维生素 K 生成减少，导致维生素 K 依耐性凝血酶源和凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ合成减少。头孢哌酮致血小板数量减少：1)头孢哌酮 7 位碳- C OOH 取代，可与 ADP 竞争结合血小板受体而减少 ADP 诱导激活的血小板聚集，导致出血倾向或出血；2)头孢哌酮钠舒巴坦钠可作为半抗原先吸附于血小板膜表面，构成全抗原，然后刺激机体免疫细胞产生抗血小板抗体，后者与靶细胞作用，引起血小板大量凝集与破坏。头孢菌素类药物可能影响黏膜上皮的前列腺素合成，导致黏膜屏障功能减弱、黏膜功能损害引起出血[10-13]。患者 INR 的升高可能与华法林剂量增加有关，但也不能排除头孢哌酮他唑巴坦钠对华法林的抗凝作用增强因素，增加用药者的出血风险，且患者无发热、无咳嗽咳痰症状，感染指标也正常，故药师建议临床医师停用头孢哌酮他唑巴坦钠，可停用抗菌药物或选用头孢呋辛继续抗感染，临床医师接受建议，降级为头孢呋辛后停用抗菌药物。

3.2.3 泼尼松的药学监护

患者术后心率 110 次/分，房颤率，予泼尼松抑制炎症介质对传导系统的刺激。泼尼松是糖皮质激素类药物，可通过以下机制致消化道不良反应：①会增加胃酸、胃蛋白酶分泌，减少胃黏液分泌，使胃肠黏膜的抵抗力下降，在胃部的侵蚀因素作用下可诱发或加剧胃、十二指肠溃疡，进一步造成消化道出血或穿孔。②还可以抑制上皮细胞再生和肉芽组织形成，使溃疡修复减慢，从而抑制溃疡的恢复，减少胃肠道保护的机制同非甾体抗炎药相似，都是通过抑制磷脂酶 A2，减少花生四烯酸合成，进而减少体内前列腺素[14-15]。单用糖皮质激素的胃肠道不良反应估计相对危险度从 1.1(无统计学意义)至 1.5(有统计学意义，P 值在临界值附近)不等。国外荟萃分析显示，糖皮质激素所致的消化道出血发生率约在 0.2%～0.8%之间。患者术中使用甲泼尼龙 40mg，qd，术后因房颤使用泼尼松片 10mg，qd 共七天，结合患者的用药史及出血的时间来看，糖皮质激素增强华法林抗凝效果导致患者出血的可能性也不能排除，建议医生停用泼尼松片，医生予采用。

3.2.4 参芪扶正注射液的药学监护

有研究报道某些中药也能增强华法林的抗凝作用。患者入院后给予参芪扶正注射液 250 mL iv drip qd，其包含有效成分党参、黄芪等，有益气扶正的功效。与华法林合用是否增强其抗凝作用效果，尚需进一步研究。但其上市后监测数据显示涉及出血报告，有出血倾向的患者应谨慎使用。在患者严重消化道出血的情况下，临床药师建议停用，医生予以采纳。

3.2.5 用药教育

临床药师在患者的治疗过程中密切关注患者的出血倾向，观察是否有易出血的倾向（每天注意监测是否有出血的表现，如牙龈出血、鼻子出血、皮肤淤斑、粉红尿、黑便等情况），动态监测 INR，与医生讨论重启抗凝的时机及药物剂量。停用华法林后第 2 天复查凝血功能 INR 1.26 且患者已无出血情况，临床药师建议重新服用华法林，从小剂量开始 1.5 mg po qn。患者出院后嘱患者每日晚上同一时间服药，切勿自服退烧药、消炎药及中药，保持相对稳定的膳食结构，密切观察是否出现牙龈出血、皮下瘀斑等情况，定期检测 INR 值。

4 小结

由于华法林的量效关系受遗传和环境因素的影响，临床药师结合患者的饮食、疾病状态、药物相互作用等多方面因素，与医生共同讨论患者的药物治疗方案，密切留意患者用药期间的消化道出血情况，并对患者进行华法林的用药教育，减少不良反应的发生，提高华法林临床应用的安全性和有效性。

文献参考

[1]中华医学会心血管学分会，中国老年学学会心脑血管病专业委员会.华法林抗凝治疗的中国专家共识[J].中华内科杂志，2013，52(1)：76-82.

[2］付博，董力，石应康．中国人心脏瓣膜置换术后抗凝治疗数据库建设［J］．中国胸心血管外科临床杂志，2013，20(1) : 3

[3］中华医学会心血管病学分会, 中国老年学学会心脑血管病专业委员会. 华法林抗凝治疗的中国专家共识[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(1):76-82.

胡文娟, 王欢, 黄瑾. 心脏瓣膜置换术后抗凝治疗出血的药学监护[J]. 中国临床药学杂志, 2014(5):325-328.

[5]丁静丽, 周建良, 朱志刚, et al. 体外循环心内直视术后应激性溃疡的个体化防治[J]. 中国医学创新, 2014, 11(33):154-156.

[6]张艳玲. 心脏直视手术患者术后应激性溃疡的防治概述[J]. 中国药业, 2014, 23(8):89-91.

[7]Witt D M , Delate T , Garcia D A , et al. Risk of Thromboembolism, Recurrent Hemorrhage, and Death After Warfarin Therapy Interruption for Gastrointestinal Tract Bleeding[J]. Archives of Internal Medicine, 2012, 172(19):1484.

[8]Qureshi W , Mittal C , Patsias I , et al. Restarting Anticoagulation and Outcomes After Major Gastrointestinal Bleeding in Atrial Fibrillation[J]. The American Journal of Cardiology, 2014, 113(4):662-668.

[9]抗栓治疗消化道损伤防治专家组. 抗栓治疗消化道损伤防治中国专家建议(2016·北京)[J]. 中华内科杂志, 2016, 55(7):564-567.

[10]陈明月.1 例头孢哌酮钠舒巴坦钠致消化道出血的病例分析[J]. 心理医生,2018,24(16):99-100

[11]王艳宁, 钟慧. 头孢哌酮舒巴坦钠致凝血功能障碍临床分析[J]. 中国药物应用与监测, 2005, 2(5):54-55.

[12]付新霞. 头孢哌酮钠舒巴坦钠对凝血功能的影响分析[J]. 医药前沿, 2017(7):64.

[13]乔莉, 刘先华. 头孢哌酮钠-舒巴坦钠致凝血功能异常一例分析并文献复习[J]. 临床误诊误治, 2016, 29(3):90-92.

[14]赵籥陶, 黄慈波, ZHAOYue-tao, et al. 类固醇性溃疡的发病机制及临床特点[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2008, 2(4):307-311.

[15]王玫, 董利森. 甲泼尼龙琥珀酸钠致消化道出血 1 例[J]. 北方药学, 2016(11):188-189.

中国医务人员头孢菌素类药物皮试知信行的调查研究

刘佳明，褚燕琦，张兰*

（首都医科大学宣武医院药学部，国家老年疾病临床医学研究中心，北京 100053）

【摘要】目的：分析中国医疗机构医务人员对头孢菌素类药物的知信行现状及其影响因素，为医疗机构规范皮试相关医疗行为提供参考依据。**方法：**采用自制的医务人员头孢菌素类药物皮试知信行问卷对国内医务人员进行调查。统计分析知识、态度、行为得分及影响因素。**结果：**32 个省份 205 家医疗机构的 873 名医务人员参与调查。对头孢菌素类药物皮试知识、态度、行为得分分别为（9.95±2.87）分、（13.56±2.63）分和（12.17±3.54）分。药师相关知识水平较医师、护士好。文化程度、工作岗位和职称是知识、态度得分的影响因素（$p<0.05$）；性别、工作岗位、职称和工作年限是行为得分的影响因素（$p<0.05$）。**结论：**中国医务人员头孢菌素类药物皮试知信行情况有待加强，应重点关注文化程度、职称较低的医务人员，发挥药师知识水平开展教育培训，规范医疗机构皮试相关医疗行为。

【关键词】医务人员；头孢菌素；皮肤过敏试验；知信行

Investigation on knowledge, attitude and practice of cephalosporins skin test in medical staff across China

LIU Jia-ming[1,2]，CHU Yan-qi[1,2]，Zhang Lan[1,2]

（1.Department of Pharmacy，Xuanwu Hospital，Capital Medical University，Beijing 100053；2.National Clinical Research Center for Geriatric Disease，Beijing 100053, China）

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To analyze the current situation and influencing factors of knowledge, attitude and practice of cephalosporins skin test among medical staff, provide evidence for medical institutions to standardize skin test-related medical behavior. **METHODS：**A self-made questionnaire on the knowledge, attitude and practice of cephalosporins skin test was used to investigate medical staff across China. Knowledge, attitude, behavior scores and influencing factors were analyzed statistically. **RESULTS:** 873 medical staff from 205 medical institutions in 32 provinces participated in this survey. The scores of knowledge, attitude and practice of cephalosporins skin test were (9.95±2.87), (13.56±2.63) and (12.17±3.54), respectively. Pharmacists have better knowledge levels than physicians and nurses. Education level, job position, and professional title were the influencing factors of knowledge and attitude scores($p<0.05$). Gender, job position, professional title, and years of service were the influencing factors of behavior scores($p<0.05$). **CONCLUSION：**The knowledge, attitude and practice of cephalosporin skin test among medical staff across China need to be strengthened. Attention should be paid to medical staff with lower education and professional titles. And utilize the knowledge level of pharmacists to carry out education and training for standardizing medical behaviors related to skin test in medical institutions.

【KEY WORDS】medical staff; cephalosporins; skin test; knowledge, attitude and practice

【基金项目】北京市医院管理中心“登峰”计划专项（DFL20190803）

[作者简介] 刘佳明，女，硕士，主管药师，研究方向：合理用药。

[通信作者] 张兰，女，主任药师，博士生导师，研究方向：临床药学、神经药理和临床药理学。

2021 年，国家卫生健康委发布《β 内酰胺类抗菌药物皮肤试验指导原则（2021 年版）》（以下简称《指导原则》），明确说明不推荐头孢菌素类药物常规皮试并提供了相关的循证证据[1]。《指导原则》发布后，最新研究指出， 34.7%的医疗机构及时取消了原有的头孢菌素常规皮试要求，但有较大比例的医疗机构仍在常规皮试[2]。医务人员常规皮试理念根深蒂固，而且担心取消常规皮试后发生医疗纠纷，是目前医疗机构仍继续常规皮试的主要原因[3-4]。知信行理论模式(knowledge attitude/belief practice，KAP)是用来阐述个人知识和信念如何影响行为改变最常用的模式，“知”是对相关知识的认识和理解，“信”是正确的信念和积极的态度，“行”是行动[5]。目前鲜有研究分析医疗机构内部医务人员头孢菌素类药物皮试的知识水平、态度、行为情况。本研究旨在分析中国医疗机构医务人员对头孢菌素类药物的知信行现状及其影响因素，以期为医疗机构规范皮试相关医疗行为提供参考依据。

1. 资料与方法

1.1 一般资料

2022 年 6 月开展此项调查，以中国医疗机构医务人员为研究对象，在医务人员相关微信群中发放问卷二维码。应用问卷星制作问卷，采用统一指导语向受调查者解释本次调查的目的及意义。受调查者采用匿名方式自愿参加，独立填写提交问卷。纳入标准：（1）明确岗位为医疗机构医务人员；（2）所答问卷完整，无漏项。

1.2 方法

1.2.1 调查问卷

以《指导原则》及头孢菌素类药物皮试相关的指南、共识和文献为材料，编制调查问卷。问卷内容包括一般情况调查和 KAP 调查。一般情况包括性别、年龄、文化程度、岗位、职称、工作年限，医疗机构名称。KAP 调查内容分为知识、态度、行为 3 方面。知识共 16 项，为单项选择题，包括皮试与过敏反应的关系、头孢菌素类药物抗原决定簇、与青霉素交叉过敏情况等，答错或不清楚计 0 分，答对计 1 分，总分为 0-16 分，分值越高表明知识掌握程度越好；态度包括不能使用头孢菌素类药物对疾病治疗的影响等共 4 项。行为包括参与相关培训、实践操作及解答咨询等共 4 项。态度及行为均以 5 级评分法计分，每项 1-5 分，态度/行为总分 4-20 分，分值越高表明态度/行为越好。将实际分值转化为百分制标准分，标准分 80 分及以上为良好，60 分及以上为及格。

1.2.2 统计学方法

通过 SPSS22.0 统计软件处理数据，计量资料以均数±标准差表示，采用 t 检验，计数资料以频数和率（%）表示，多因素分析采用 χ^2 检验和方差分析，多因素分析采用多元线性回归，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。考虑年龄和工作年限存在共线性问题。在多因素分析时排除年龄，纳入余 5 项因素进行多重线性回归。

2 结果

2.1 调查对象一般情况

全国 32 省份 205 家医疗机构 873 名医务人员参与调查。其中，女性 686 名（686/873，78.58%），男性 187 名（187/873，21.42%）；年龄＜30 岁 159 名（159/873，18.21%），30-39 岁 405 名（405/873，46.39%），40-49 岁 205 名（205/873，23.48%），50-60 岁 104 名（104/873，11.91%）。文化程度情况：专科 87 名（87/873，9.97%），本科 548 名（548/873，62.77%），硕士 214 名（214/873，24.51%），博士 24 名（24/873，2.75%），岗位情况：医生 165 名（165/873，18.90%），药师 385 名（385/873，44.10%），护士 298 名（298/873，34.14%），医院管理部门工作者 12 名（12/873，1.37%），其他岗位（技师、康复治疗师）13 名（13/873，1.49%）。职称情况：初级及以下 262 名（262/873，30.01%），中级 373 名（373/873，42.73%），高级 238 名（238/873，27.26%）。工作年限情况：＜5 年 105 名（105/873，12.03%），5-9 年 218 名（218/873，24.97%），10-20 年 316 名（316/873，36.20%），21-30 年 160 名（160/873，18.33%），30 年以上 74 名（74/873，8.48%）。

2.2 医务人员头孢菌素类药物皮试 KAP 情况

医务人员对头孢菌素类抗菌药物皮试知识方面实际评分为（9.95±2.87）分，标准评分为（62.18±17.93）分；态度方面实际评分为（13.56±2.63）分，标准评分为（67.82±13.14）分；行为方面实际评分为（12.17±3.54）分，标准评分为（60.80±17.81）分。目前医务人员对头孢菌素抗菌药物皮试在知识、态度及行为方面均为及格。

2.3 医务人员头孢菌素类药物皮试知识得分情况

16 道知识相关问题回答情况见表 1。第 3 题认知度最高（793/873，90.8%）。第 6、8、9、13 和 14 题的认知度较低，均＜50%。医生、药师和护士是皮试相关医疗工作的直接参与者，也是问卷调查的主要群体，分析这三类医务人员对头孢菌素类药物皮试知识掌握情况，除第 12、15 题外，医生、护士和药师对头孢菌素类药物知识的掌握情况有显著差异。

医务人员对头孢菌素类药物皮试知识得分情况的单因素和多因素分析结果见表 2。单因素分析结果显示，不同年龄层、文化程度、岗位和职称的医务人员知识得分差异有统计学意义（p＜0.05）。多因素分析结果显示（F=17.913，R^2=0.226，调整 R^2=0.214 P＜0.001），文化程度、工作岗位和职称是影响知识得分的影响因素（P＜0.05）。

表 1 医务人员头孢菌素类药物皮试知识掌握情况

序号	头孢菌素类抗菌药物皮试知识	正确选项	回答正确总人数（%）	医生（165,%）	药师（385,%）	护士（298,%）	P
1	皮试可以预测各种类型过敏反应。	否	524（60.0）	79（47.9）	311（80.8）	122（40.9）	＜0.001
2	皮试阳性说明患者如果用药一定会发生过敏反应。	否	553（63.3）	97（58.8）	313（81.3）	132（44.3）	＜0.001
3	皮试阴性说明患者用药后一定不会发生过敏反应。	否	793（90.8）	145（87.9）	370（96.1）	258（86.6）	＜0.001
4	头孢菌素类的抗原决定簇主要由其侧链结构所构成。	是	701（80.3）	124（75.2）	344（89.4）	218（73.2）	＜0.001
5	《指导原则》不推荐在使用头孢菌素前常规进行皮试。	是	676（77.4）	123（74.6）	337（87.5）	204（68.5）	＜0.001
6	规定皮试的头孢菌素的药品说明书更加专业。	否	258（29.6）	43（26.1）	191（49.6）	20（6.7）	＜0.001
7	患者既往明确对某种头孢过敏（速发型过敏反应），如临床确有必要使用头孢菌素，在有抢救条件下可以使用 C7 位的 R1 侧链不同的其他头孢菌素进行皮试。	是	644（73.8）	111（67.3）	321（83.4）	198（66.4）	＜0.001
8	有过敏性哮喘病史的患者比正常患者容易发生头孢菌素过敏。	否	204（23.4）	37（22.4）	119（30.9）	44（14.8）	＜0.001
9	青霉素与第三、四代头孢菌素之间的交叉过敏性较第一、二代头孢菌素多见。	否	354（40.6）	57（34.6）	220（57.1）	69（23.2）	＜0.001
10	患者既往有青霉素过敏史（速发型过敏），使用头孢菌素前应进行皮试。	是	713（81.7）	138（83.6）	299（77.7）	258（86.6）	0.009
11	若需进行头孢菌素皮试，《指导原则》推荐使用拟用的头孢菌素进行皮试。	是	760（87.1）	147（89.1）	325（84.4）	271（90.9）	0.03
12	《指导原则》推荐头孢菌素皮试浓度为 2mg/ml，注射量为 0.02～0.03ml。	是	659（75.5）	118（71.5）	296（76.9）	227（76.2）	0.389
13	《指导原则》推荐头孢菌素皮试浓度为与注射量与以往共识推荐的相同。	否	214（24.5）	18（10.9）	134（34.8）	55（18.5）	＜0.001

14	皮试时用 75%乙醇消毒前臂掌侧下段皮肤，之后皮下注射皮试液。	否	335（38.4）	58（35.2）	118（30.7）	152（51.0）	＜0.001
15	头孢皮试若出现过敏性休克应该立即肌肉注射肾上腺素。	是	736（84.3）	137（83.0）	332（86.2）	253（84.9）	0.619
16	头孢皮试若出现过敏性休克使用糖皮质激素比肾上腺素重要。	否	561（64.3）	100（60.6）	286（74.3）	167（56.0）	＜0.001

表 2 医务人员对头孢菌素类药物皮试知识得分情况单因素和多因素分析结果

影响因素	得分	单因素分析		多因素分析			
		t/F	*P*	回归系数	标准误	t	*P*
性别							
男	10.25±2.728	1.600	0.110	1.000			
女	9.87±2.906			0.101	0.238	0.423	0.672
年龄				/			
＜30 岁	8.97±3.261						
30~39 岁	10.16±2.754	7.754	＜0.001				
40~49 岁	10.25±2.810						
50~60 岁	10.04±2.504						
文化程度							
专科	9.03±2.670			0.174	0.318	0.547	0.585
本科	9.55±2.775	22.925	＜0.001	1.000			
硕士	11.19±2.700			0.955	0.235	4.063	＜0.001
博士	11.21±3.514			0.717	0.550	1.304	0193
岗位							
医生	9.28±2.424			-2.169	0.254	-8.529	＜0.001
药师	11.21±2.655			1.000			
护士	8.89±2.517	46.087	＜0.001	-1.579	0.237	-6.661	＜0.001
医院管理部门工作者	9.58±2.746			-2.142	0.761	-2.816	0.005
其他	5.69±4.956			-4.588	0.737	-6.228	＜0.001
职称							
初级及以下	8.92±2.861			1.000			
中级	10.20±2.819	27.923	＜0.001	0.823	0.260	3.164	0.002
高级	10.69±2.649			1.710	0.371	4.602	＜0.001
工作年限							
＜5 年	9.59±3.254			1.000			
5-9 年	9.73±2.883			-0.240	0.323	-0.743	0.458
10-20 年	10.14±2.839	1.338	0.254	-0.218	0.351	-0.622	-0.534
21-30 年	9.95±2.770			-0.716	0.421	-1.702	0.089
30 年以上	10.30±2.568			-0.328	0.498	-0.658	0.511

2.4 医务人员头孢菌素类药物皮试态度影响因素分析情况

医务人员头孢菌素类药物皮试态度得分单因素分析及多因素分析见表 3。单因素分析结果显示，不同性别、年龄层、文化程度、岗位、职称和工作年限的医务人员态度得分差异有统计学意义（$P<0.05$）。多因素分析结果

显示（F=27.051，R^2=0.306，调整 R^2=0.295　P＜0.001），文化程度、工作岗位和职称是态度得分的影响因素（P＜0.05）。

表 3 医务人员对头孢菌素类药物皮试态度得分单因素和多因素分析

影响因素	得分	单因素分析		多因素分析			
		t/F	*P*	回归系数	标准误	t	*p*
性别							
男	13.95±2.960	2.252	0.025	1.000			
女	13.46±2.524			-0.103	0.207	-0.501	0.617
年龄							
＜30 岁	12.53±2.354	11.034	＜0.001	1.000			
30-39 岁	13.92±2.549						
40-49 岁	13.66±2.776						
50-60 岁	13.57±2.672						
文化程度							
专科	12.11±1.932	41.389	＜0.001	-0.375	0.275	-1.363	0.173
本科	13.18±2.367			1.000			
硕士	14.92±2.886			1.146	0.204	5.624	＜0.001
博士	15.58±2.244			1.616	0.477	3.391	0.001
岗位							
医生	12.65±2.408	67.488	＜0.001	-2.497	0.221	-11.320	＜0.001
药师	14.97±2.572			1.000			
护士	12.30±1.797			-1.828	0.206	-8.892	＜0.001
医院管理部门工作者	14.33±2.871			-0.871	0.660	-1.320	0.187
其他	11.62±2.181			-2.410	0.639	-3.773	＜0.001
职称							
初级及以下	12.59±2.133	28.340	＜0.001	1.000			
中级	13.87±2.555			0.544	0.226	2.412	0.016
高级	14.16±2.937			1.086	0.322	3.370	0.001
工作年限							
＜5 年	12.90±2.523	2.849	0.023	1.000			
5-9 年	13.64±2.687			0.467	0.280	1.668	0.096
10-20 年	13.79±2.544			0.417	0.304	1.371	0.171
21-30 年	13.33±2.801			-0.141	0.365	-0.387	0.699
30 年以上	13.82±2.446			0.410	0.432	0.949	0.343

2.5 医务人员头孢菌素类药物皮试行为得分影响因素分析情况

医务人员头孢菌素类药物皮试行为得分单因素分析及多因素分析见表 4。单因素分析结果显示，不同性别、岗位、职称和工作年限的医务人员头孢菌素类抗菌药物皮试行为得分差异有统计学意义（P＜0.05）。多因素分析结果显示（F=4.372，R^2=0.067，调整 R^2=0.051 P＜0.001），性别、工作岗位、职称和工作年限是头孢菌素类抗菌药物皮试行为得分的影响因素（P＜0.05）。

表 4 医务人员对头孢菌素类药物皮试行为得分情况单因素和多因素分析结果

影响因素	得分	单因素分析		多因素分析			
		t/F	*P*	回归系数	标准误	t	*p*
性别							
男	12.60±3.897	1.883	0.060	1.000			
女	12.06±3.429			-0.700	0.323	-2.170	0.030
年龄							
＜30 岁	11.94±3.688						
30-39 岁	12.02±3.583	1.523	0.207				
40-49 岁	12.39±3.371						
50-60 岁	12.70±3.430						
文化程度							
专科	12.01±3.153			-0.192	0.430	-0.447	0.655
本科	12.11±3.523	0.499	0.683	1.000			
硕士	12.43±3.653			0.353	0.318	1.109	0.268
博士	12.04±4.268			-0.463	0.744	-0.622	0.534
岗位							
医生	11.72±3.469			-1.253	0.344	-3.640	＜0.001
药师	12.31±3.543			1.000			
护士	12.38±3.482	3.627	0.006	0.832	0.321	2.591	0.010
医院管理部门工作者	12.17±3.298			-1.067	1.030	-1.036	0.300
其他	9.08±4.368			-2.541	0.997	-2.547	0.011
职称							
初级及以下	11.74±3.713			1.000			
中级	12.02±3.424	7.144	0.001	0.459	0.352	1.303	0193
高级	12.88±3.429			1.986	0.503	3.950	＜0.001
工作年限							
＜5 年	12.16±3.614			1.000			
5-9 年	11.54±3.623			-0.982	0.437	-2.245	0.025
10-20 年	12.55±3.568	3.583	0.007	-0.512	0.475	-1.077	0.282
21-30 年	11.96±3.252			-1.492	0.569	-2.620	0.009
30 年以上	12.89±3.407			-0.645	0.674	-0.956	0.339

3 讨论

本研究发现医务人员头孢菌素类药物皮试知识、态度、行为均处于及格水平。知识和态度是行为的重要影响因素，掌握的知识越全面、树立的态度越积极，越有利于正性行为的输出[6]。然而本研究显示医务人员对头孢菌素类药物过敏相关知识较薄弱，应加强医疗机构对头孢菌素类药物皮试的学习，提升医务人员知识水平，从而在医疗行为上落实相关皮试规定。

医务人员头孢菌素类药物过敏知识薄弱主要表现在青霉素和头孢菌素类药物交叉反应、过敏性疾病病史患者应用头孢菌素类药物过敏情况、皮试液浓度情况等。文献报道青霉素和头孢菌素类药物交叉反应约 2%[7]。头孢菌素的免疫原性和交叉反应性主要由 R1 侧链决定，而非与青霉素共同拥有的 β 内酰胺环[8-9]。青霉素和 1、2 代头孢菌素类药物的侧链较 3、4 代相似，所以青霉素和 1、2 代头孢菌素类药物的交叉过敏较 3、4 代常见[10]。

有青霉素或头孢菌素过敏史的患者可安全使用 R1 侧链不同的其他头孢菌素类药物[11]。目前无证据显示有过敏性疾病病史，如过敏性鼻炎、过敏性哮喘等的患者发生头孢菌素过敏的几率高于普通人群[1]，故不能认为有过敏性哮喘病史的患者比正常患者容易发生头孢菌素过敏。既往地方共识建议头孢菌素类药物皮试浓度为 300μg/ml-500μg/ml，皮内注射 0.1ml，而《指导原则》推荐皮试浓度为 2mg/ml，皮内注射 0.02～0.03ml[1，12-13]。浓度有所增加，但注射量减少，总量一致。事实上，头孢菌素皮试的理想浓度尚未明确，目前认为使用较高的无刺激性皮试浓度评估头孢菌素速发反应，可在保证特异性的同时提高敏感性[8,14]。此外，本次调查还发现大部分医务人员认为规定皮试的头孢菌素的药品说明书更加专业。反映出医务人员信赖说明书，认为说明书对临床用药具有指导性作用。但研究发现，某些头孢菌素类药物品种说明书要求皮试但缺少具体的皮试液配制、皮试操作及皮试结果判读，科学性与规范性有待提高[3,15]。

多因素分析显示，工作岗位是影响知识、态度及行为得分的因素。医疗机构医生、药师和护士是皮试处方/医嘱开具、审核、调剂、操作的主要医务人员。进一步分析这三类医务人员的知识掌握情况发现药师的知识掌握程度较医师、护士好。应充分发挥药师专业知识上的优势，在医疗机构开展教育培训，尤其针对开具处方/医嘱的医师加强培训，促进头孢菌素类药物合理应用[16]。职称也是影响知识、态度及行为得分的因素。职称越高，知识、态度及行为得分越高。考虑是由于职称高的医务人员工作时间长，经验丰富，同时会从事相关培训及管理工作，重视皮试要求从而规范自身医疗行为[17]。值得关注的是，本研究还发现性别是影响头孢菌素类药物皮试行为得分的因素。男性较女性行为得分高。究其原因可能与女性应对和适应压力能力较差，若取消常规皮试可能会导致医疗纠纷，使得女性倾向于采取防御性医疗行为，即为患者提供不必要的医疗服务来保护自己[18]。也从另外一方面说明医疗机构仍存在常规皮试的医疗行为可能与非医务人员知识、态度相关的其他原因有关[4]。

综上所述，医务人员头孢菌素类药物皮试知识、态度、行为现状处于及格水平。工作岗位和职称是头孢菌素类药物皮试知识、态度、行为的影响因素。应发挥药师知识方专业优势，对其他岗位，尤其是职称较低的医务人员开展针对性教育培训。从医疗机构内部加强医务人员对头孢菌素类药物皮试相关知识的正确认识和学习，规范医疗机构皮试相关医疗行为，促进临床合理使用头孢菌素类药物。

参考文献

[1] 国家卫生健康委办公厅. 关于印发《β内酰胺类抗菌药物皮肤试验指导原则（2021年版）》的通知.国卫办医函〔2021〕188号，2021年4月.

[2] 邹鹤娟,李颖,吕娟丽,等.全国医疗机构头孢菌素皮试现状分析[J].中国感染与化疗杂志,2023,23(01):14-19.

[3] 邓为上,杨森森,陈吉生.基于3938份药品说明书探讨头孢菌素类药品皮肤过敏试验的规范[J].医药导报,2023,42(01):97-103.

[4] 霍婷,王岳.从头孢类抗生素过敏案件探究诊疗注意义务内容[J].中国司法鉴定,2022,121(02):88-93.

[5] Alqahtani N, Oh KM, Kitsantas P, *et al*. Nurses' evidence-based practice knowledge, attitudes and implementation: A cross-sectional study[J]. J Clin Nurs, 2020, 29(1-2):274-283.

[6] 何丽芳,甘香,郑玉仁,等.中青年脑力工作者预防腰椎间盘突出症知信行的调查研究[J].中华护理杂志,2018,53(8):996-1000.

[7] Shenoy ES, Macy E, Rowe T, *et al*. Evaluation and Management of Penicillin Allergy: A Review[J]. JAMA. 2019, 321(2):188-199.

[8] Khan DA, Banerji A, Bernstein JA, *et al*. Cephalosporin Allergy: Current Understanding and Future Challenges[J]. J Allergy Clin Immunol Pract. 2019, 7(7):2105-2114.

[9] Romano A, Gaeta F, Arribas Poves MF, *et al*. Cross-Reactivity among Beta-Lactams[J]. Curr Allergy Asthma Rep. 2016, 16(3):24.

[10] Pichichero M.E., Casey J.R. Safe use of selected cephalosporins in penicillin-allergic patients: A meta-analysis[J]. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2007, 36:340–347.

[11] Chaudhry SB, Veve MP, Wagner JL. Cephalosporins: A Focus on Side Chains and β-Lactam Cross-Reactivity. Pharmacy

(Basel)[J]. 2019, 7(3):103.
[12] 浙江质控. 浙江省头孢菌素类抗生素皮肤过敏试验指导意见. 浙江省医院药事管理质控中心官网, 2018.
[13] 重庆市药事管理质量控制中心.2018 年关于印发重庆市头孢菌素类抗菌药物皮肤过敏试验共识的通知. 2018.
[14] Brockow K, Garvey LH, Aberer W, *et al*. Skin test concentrations for systemically administered drugs -- an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper[J]. Allergy. 2013, 68(6):702-12.
[15] 赵磊,何晓静,李晓冰,等.临床常用头孢菌素类抗菌药物药品说明书评价[J].中国现代应用药学,2020,37(15):1872-1876.
[16] 闫琴琴,吴雪. 某院头孢菌素类药物皮试管理规定实施前后皮试情况对比[J]. 中国抗生素杂志,2022,47(11):1216-1219.
[17] 张凤莲,姜丽丽,刘宝珠. 手术室护理人员医院感染防控"知信行"水平及影响因素[J]. 国际护理学杂志,2023,42(4):613-617.
[18] 黄果,董来东. 山东省某三甲医院医疗纠纷对临床医务人员心理和行为的影响[J]. 医学与社会,2022,35(6):111-115.

妇产专业药学门诊线上咨询的实践与探索

刘静[1]，于红[1]，邵华[1]

（[1]东南大学附属中大医院 南京 210009）

【摘要】目的：探讨妇产专业方向开展药学门诊线上咨询的方法和前景。**方法：**收集我院线上药学门诊 2021 年 5 月 31 日至 2022 年 8 月 25 日的 83 例患者用药咨询服务数据，对咨询患者、咨询问题、咨询药物类型等进行分类统计，分析在线药学服务的获益和局限，以及移动互联网药学服务模式的发展前景。**结果：**83 例线上咨询中以非妊娠期非哺乳期成年女性为主；咨询药物以西药为主；按照药物的作用分类，抗感染类药物咨询最多，其他依次为性激素类药物、活血化瘀抗凝类药物、其他类药物；咨询问题中包含与用药直接相关的问题和诊疗问题，前者中以咨询药物用法用量、用药疗程和时机为主，其次为药物安全问题；妊娠期和哺乳期用药安全问题咨询量较少；大部分患者在线上咨询前先进行了线下咨询；线上咨询患者对药师的应答率为中等水平。**结论：**妇产专业线上药学门诊为广大女性患者用药咨询提供了快捷的途径；药师需要积极提升自身业务能力、责任心、沟通技巧等综合素质，以促进移动互联网药学服务模式的规范、良性发展。

【关键词】妇产专业；药学门诊；线上咨询；药学服务

Practice and Exploration of Online Consultation in Pharmacy Outpatient Department of Obstetrics and Gynecology

Liu Jing[1], Shao Hua[1]

（1.Department of Pharmacy, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing China, 210009）

【Abstract】Objective：To explore the methods and prospects of online pharmacy consultation in obstetrics and gynecology. **Methods：**Collect the data of medication consultation service of 83 patients from May 31, 2021 to August 25, 2022 in the online pharmacy clinic of "Medicine Cube", classify and count the consultation patients, consultation questions, consultation drug types, etc., and analyze the online pharmacy services The benefits and limitations of pharmacy, as well as the devel. **Results：**In 83 cases of online consultation, non-pregnancy and non-lactation adult women were the main; Western drugs were the main consultation drugs. According to the role of drugs, anti-infection drugs were consulted the most, followed by sex hormone drugs, anticoagulant drugs that activated blood stasis, and other drugs. The consultation questions were directly related to drug use. Among the problems and diagnosis and treatment problems, the former is mainly the dosage, course and timing of drug treatment, followed by drug safety; the amount of consultation on drug safety during pregnancy and lactation is relatively low; most patients have offline consultation before online consultation; and the response rate of online consultation patients to pharmacists is medium. **Conclusion：**The online pharmacy clinic specialising in obstetrics and gynaecology provides a fast way for female patients to consult medicine. Pharmacists need to actively improve their comprehensive qualities such as their business ability, sense of responsibility and communication skills to promote the standardised and benign development of the mobile Internet pharmacy service model.

【Key words】obstetrics and gynecology; Pharmaceutical clinic; Online consultation; Pharmaceutical care

自 2019 年 12 月各地新型冠状病毒肺炎疫情爆发以来，因疫情防控压力陡增，多地患者实体医院就诊困难

重重，线上药学服务门诊得到了众多患者的青睐。妇女、儿童和老人是社会关怀的特殊群体，为方便妇产科患者进行线上用药咨询，减少线下就诊带来的交叉感染风险，我院于 2021 年 5 月 31 日起开展了妇产专业用药咨询互联网药师门诊服务，为患者提供线上用药咨询。现以用药咨询案例为样本，分析患者在线药学服务的获益和局限，探讨妇产专业方向开展药学门诊线上咨询的发展前景，为药师开展线上药学服务提供经验参考。

1 资料与方法

收集我院互联网用药咨询服务版块 2021 年 5 月 31 日至 2022 年 8 月 25 日在线咨询的案例 83 例，内容包括患者的问诊时间、个人信息、病情描述、线下就诊情况、本次线上问诊目的等，分别按用药人员类别、问题属性、药物类型、问题类别、诊疗问题类别等分类，统计不同人群及各类问题咨询分布情况。

2 结果

83 例线上咨询中，妊娠期妇女 13 例（15.7%），哺乳期妇女 5 例（6.0%），儿童 1 例（1.2%），非妊娠期非哺乳期成年女性 64 例（77.1%）；涉及最多的药物为内服药（30/44，68.2%），其次为外用药（13/44，29.5%）；咨询药物中西药为主（31/44，70.5%），其余为中成药（13/44，29.5%）；按照药物的作用分类，抗感染类药物咨询最多（18/44，40.9%），其他依次为性激素相关药物（13/44，29.5%）、活血化瘀抗凝类药物（7/44，15.9%）、其他类药物（6/44，13.6%）；咨询问题中包含与用药直接相关的问题（47/83，56.6%）和诊疗问题（36/83，43.4%），前者中以咨询药物用法用量、用药疗程和时机为主（30/49，61.2%），其次为用药安全性问题（19/49，38.8%），诊疗问题主要包含描述症状、提供检查结果后咨询用何种药物治疗（18/36，50%），其他有描述症状、提供检查结果后咨询下一步诊疗措施（14/36，38.9%），咨询疾病病因和进展（4/36，11.1%）；妊娠期和哺乳期用药安全问题咨询量较少（3/83，3.6%；3/83，3.6%）；83 例咨询者中，大部分患者在线上咨询前先进行了线下咨询（49/83，59%）；线上咨询患者对服务药师的应答率为中等水平（63/83，75.9%）。

表 1 咨询药物类型分类（n=44）

Tab.1 Classification of drug types consulted(n = 44)

药物类型	例数	构成比（%）
抗感染药物	18	40.9
性激素相关药物	13	29.5
活血化瘀药物	5	11.5
抗凝药物	2	4.5
消炎消肿	2	4.5
抗过敏药物	2	4.5
非甾体类抗炎药	1	2.3
滋阴补肾	1	2.3

表 2 咨询用药人群类别（n=83）

Tab.2 Classification of consulting people types

人群类别	例数	构成比（%）
非妊娠期非哺乳期成年女性	64	77.1
妊娠期女性	13	15.7
哺乳期女性	5	6.0
儿童	1	1.2

3 讨论

3.1 妇产专业线上用药咨询门诊的发展优势

药学门诊是指由药师为患者提供综合、可获得的药学服务[1]，其方式包括面对面咨询、电话咨询和互联网咨询[2]。随着互联网药学服务的发展，人们看病就医必须到医院的传统观念被打破，线上就医用药咨询为广大患者

提供了极为便利的就诊途径，节约了时间、误工费和交通费等[3]。有学者调查研究发现[4]，患者对网上药师咨询、网上用药教育及药学知识的科普接受程度分别达到 78.2%、64.3%、70.4%，尤其是年轻人，对互联网用药咨询需求度较高。本研究的 83 例咨询案例中，有 49 例（59%）先进性了线下咨询，后再一次进行了线上咨询。线上药学门诊的设立对于特殊人群的用药咨询具有重要意义，例如对于有妇科疾病的非妊娠哺乳期女性，线上打字的用药咨询方式通常可以让患者更自然地描述自身的病情状况，从而更及时地得到救治或治疗建议；对于妊娠期和哺乳期妇女，线上咨询既能更加便捷地咨询用药问题，又不会耽误婴儿喂养，减少孕产妇外出对身体可能带来的潜在伤害。如某妊娠 5 周的孕妇，因排卵日同房后 1 周内服用过喹诺酮类药物左氧氟沙星片和抗过敏药物地氯雷他定片，询问胎儿是否会受到影响。药师回复在卵子受精后 2 周，孕卵着床前后，药物及周围环境毒物对胎儿的影响表现为“全”或“无”现象，“全”是表示胚胎受损严重而死亡, 最终流产，“无”是指无影响或影响很小，可以经其他早期的胚胎细胞的完全分裂代偿受损细胞, 胚胎继续发育，不出现异常[5]，该孕妇目前已经过了“全”或“无”的时期处于正常宫内妊娠状态，药师建议妊娠 12 周时按时建卡做好后期体检，不必过度担忧。

线上药学门诊可以为妊娠期、哺乳期等女性患者提供更加全面、专业的用药咨询信息。有大量研究表明，药师通过在药学门诊提供专业的药学服务，可以增加患者对疾病的认知程度，提高患者用药依从性，减少药物相关不良事件发生，进而促进药物治疗更安全、更有效、更经济[6-8]。线上咨询方式药师可以 24h 在线，能做到随时回复患者的问题，不像线下咨询需要当场回复患者，因此药师能利用工作、生活中的碎片时间，在详细沟通病情和用药情况后，有时间查阅更多、更详细的相关资料，从而给出科学、专业的用药建议。如某妊娠中期女性，因病情需要咨询是否可以使用利伐沙班，这是一个关于妊娠期用药安全性的问题，因关系到母体和胎儿双方的安危，药师给予患者专业的指导极为关键。药师不能武断地给出能用或不能用的建议，经过全面地查阅药品说明书、相关书籍和文献后发现，利伐沙班可穿过体外足月人类灌注胎盘[9]，尽管没有该药物人类孕期用药资料，但是产品说明书上提示孕期使用可能会导致异常出血；欧洲强调利伐沙班的胎盘毒性，将其列为孕期禁止服用药物类[10]。2016 年一份病例报告报道一名孕妇在妊娠前 25 周服用利伐沙班后，导致阴道严重出血[11]。在一项利伐沙班暴露和前瞻性随访的 37 例妊娠患者研究中[12]，大部分女性在妊娠早期停用该药，结果有 6 名女性自然流产，1 名女性产下心脏畸形婴儿。综合以上查阅到的资料考虑，建议该孕妇妊娠期尽量避免服用利伐沙班。

3.2 妇产专业线上用药咨询门诊的不足之处

与线下面对面交流或电话交流相比，线上用药咨询时常有患者不能提供完整的病情信息，这就容易造成药师无法准确获取患者的就诊信息，对进一步全面提供用药意见带来困难。在本研究中，非妊娠期非哺乳期成年女性咨询者有 64 例，其中仅有 35 例患者具体描述了疾病情况、用药原因及用药品种，许多咨询者信息交代不明，这就需要药师掌握好沟通技巧，充分挖掘有用的信息；此外本研究中患者咨询时对药师的回应率仅有 75.9%，24.1%的患者 未时回复药师的提问，导致咨询活动进展不顺利。如某妇科女性患者，咨询长期服用雌二醇片雌二醇地屈孕酮片复合包装的副作用，因用药方法、用药原因、已用药疗程等关键信息并未给出，药师只能根据药品说明书、文献等报道告知患者用药期间可能会出现头痛、皮疹等反应，有少数病人有胃肠道不适，副作用较少[13-14]。

药师在提供用药咨询服务过程中不具有诊疗权，不能根据患者的病情描述为其推荐药物[15]，然而本项研究发现线上门诊中有 43.4%的患者咨询诊疗问题（36/83），其中多数患者在描述病情症状、提供检查结果后咨询药师病因和进一步诊疗方案。分析原因，一方面是患者分不清医师和药师的职责范围，认为药师也可以给予诊疗服务；另一方面是药师在线为患者提供用药咨询服务时，为了能对患者进行更科学、更安全的用药指导，也必须要询问病情，但部分患者并未前往医院就诊，病情尚未明确诊断，药师在提供药学服务前必须对病情有初步判断，无形中参与了疾病的诊疗，这样可能会造成错误诊疗而延误病情，导致相关纠纷。如某妇科女性患者，咨询近期阴道瘙痒且有黄色分泌物，腥臭味，能用什么药物治疗。药师无权利给予用药品种建议，只能告知患者首先去医院就诊，根据相关检查的结果，听取线下医生的用药建议；为患者讲解了不同病因用药不同，如对于细菌性阴道病，主要有硝基咪唑类药物、克林霉素[16]，而外阴阴道假丝酵母菌病则需要用抗真菌药物等[17]，具体用药仍需患者去医院进一步诊治明确诊断遵医嘱用药。

3.3 小结

从本次咨询统计数据来看，妇产科线上用药咨询门诊中大部分咨询者为非妊娠期非哺乳期的成年女性，这可能的原因是妊娠期女性和哺乳期女性用药咨询更倾向于去医院进行线下药师门诊当面咨询；患者咨询的药物相关问题中，居于前三位的是抗感染药物、性激素相关药物以及活血化瘀药物，这与患者的病情有关，观察后不难发现，较多女性因阴道感染、调节月经周期、药物流产、痛经等疾病需要用药。本研究也有一定的局限性，如研究的样本量较少，为得出更准确的妇产科线上药学门诊咨询数据，仍需更大样本量的研究。

线上与线下药学门诊各有特点，有 59%的妇产科患者在进行线上咨询前进行了线下咨询，由此可见患者对线上咨询门诊的需求较大，迫切需要妇产专业的药师提供专业的用药指导，因此药师应当充分利用线上药学门诊服务平台，积极提升自身业务水平和专业能力，注重提高与患者的沟通能力，做到用责任心和耐心去关怀病人，以更好地为患者提供药学服务，促进广大妇产科患者的安全、合理、经济用药。

参考文献

[1].Buxton JA, Babbitt R, Clegg CA, Durley SF, Epplen KT, Marsden LM, Thomas BA, Thompson NS. ASHP guidelines: Minimum standard for ambulatory care pharmacy practice. Am J Health Syst Pharm. 2015 Jul 15;72(14):1221-36.

[2].王海莲,何晓静,李燕菊,张杜枭.医疗机构药学服务规范 第 4 部分 用药咨询[J].中国药房,2019,30(24):3313-3314+3323.

[3].李秦川,刘春,韩潇,谢方晴,王洪菊,郭西芮.基于综合药学服务的重特大疾病互联网药学门诊实践[J].药学服务与研究,2021,21(05):398-400.

[4].段晓红,陈设,汪小惠,赖潇潇,王颖彦,罗懿妮,吴俊标,林华.基于“互联网+”探索药事服务模式的问卷调查研究[J].中国现代应用药学,2017,34(09):1343-1346.

[5].戴钟英.妊娠期用药的基本原则[J].实用妇产科杂志,2007(10):581-582.

[6].Chen CM, Kuo LN, Cheng KJ, Shen WC, Bai KJ, Wang CC, Chiang YC, Chen HY. The effect of medication therapy management service combined with a national PharmaCloud system for polypharmacy patients. Comput Methods Programs Biomed. 2016 Oct;134:109-19.

[7].Manzoor BS, Cheng WH, Lee JC, Uppuluri EM, Nutescu EA. Quality of Pharmacist-Managed Anticoagulation Therapy in Long-Term Ambulatory Settings: A Systematic Review. Ann Pharmacother. 2017 Dec;51(12):1122-1137.

[8].Entezari-Maleki T, Dousti S, Hamishehkar H, Gholami K. A systematic review on comparing 2 common models for management of warfarin therapy; pharmacist-led service versus usual medical care. J Clin Pharmacol. 2016 Jan;56(1):24-38.

[9].Bapat P, Pinto LS, Lubetsky A, Berger H, Koren G. Rivaroxaban transfer across the dually perfused isolated human placental cotyledon. Am J Obstet Gynecol. 2015 Nov;213(5):710.e1-6.

[10].Cutts BA, Dasgupta D, Hunt BJ. New directions in the diagnosis and treatment of pulmonary embolism in pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2013 Feb;208(2):102-8.

[11].Myers B, Neal R, Myers O, Ruparelia M. Unplanned pregnancy on a direct oral anticoagulant (Rivaroxaban): A warning. Obstet Med. 2016 Mar;9(1):40-2.

[12].Hoeltzenbein M, Beck E, Meixner K, Schaefer C, Kreutz R. Pregnancy outcome after exposure to the novel oral anticoagulant rivaroxaban in women at suspected risk for thromboembolic events: a case series from the German Embryotox Pharmacovigilance Centre. Clin Res Cardiol. 2016 Feb;105(2):117-26.

[13].强素凤,付菲,支云清,等.芬吗通治疗异常子宫出血的临床观察[J].生殖医学杂志,2015,24(05):377-380.

[14].邝翠琼,詹惠因,詹彩娟,等.芬吗通片治疗月经失调的疗效观察[J].实用妇科内分泌杂志(电子版),2018,5(34):76-77.

[15].邵明鸣,李静静,陈久艳,薛苏冬,虞燕霞.妊娠哺乳期药学门诊线上咨询的实践与探索[J].中国药业,2021,30(20):27-30.

[16].细菌性阴道病诊治指南(2021 修订版)[J].中华妇产科杂志,2021,56(01):3-6.

[17].混合性阴道炎诊治专家共识(2021 版)[J].中华妇产科杂志,2021,56(01):15-18.

Reporting of Tumor Lysis Syndrome with targeted therapy for hepatic cancer in the FAERS database

刘灵，郭林，曹蓉，马嘉婷，肖明漩，颜苗，江志超

（湖南中医药大学 研究生院 湖南 长沙 410208）

【**Abstract**】**Background:** Tumor lysis syndrome is one of the most serious complications of cancer treatment. In many case reports, both tumor lysis syndrome and targeted therapies for hepatic cancer have occurred concurrently, but their clinical features are still unclear. The aim of this study was to investigate the association between tumor lysis syndrome and targeted therapies for hepatic cancer, as well as to elucidate their clinical features. **Method:** The preferred term "tumor lysis syndrome" was used to identify documented reports of TLS in FAERS (January 2006 to December 2022). As a comparison, chemotherapy and immune checkpoint therapy were used to examine disproportionality signals. Signals were then adjusted for by eliminating preexisting illness. To examine the disease latency time for various treatments, we did time-to-onset analysis. Using the Bradford-Hill standards, the evidence was thoroughly evaluated as well. **Result:** We obtained a total of 191 TLS reports related to targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the FAERS database. Sorafenib, lenvatinib, cabozantinib, bevacizumab, ramucirumab had significant signals compared with other drugs in the FAERS database. The signals for sorafenib, lenvatinib, cabozantinib, bevacizumab remained robust after exclusion of prior illness and confounding factors. Among them lenvatinib and sorafenib demonstrated significant correlation with TLS in the report. In the reported time-to-onset analysis, the median number of days for TLS to occur after sorafenib, lenvatinib, and bevacizumab administration was 5.5, 6.5, and 6.5 days, respectively. **Conclusion:** According to FAERS, sorafenib, lenvatinib, cabozantinib, and bevacizumab showed a strong signal of TLS in the disproportionate analysis. Of these, lenvatinib showed the strongest correlation with TLS, and most TLS cases (approximately 60%) occurred later in bevacizumab than in sorafenib and lenvatinib. Further research is warranted to validate our findings.

成人实体器官移植患者基因多态性对他克莫司浓度影响的研究

刘若琳[1]，王卓[1*]

（海军军医大学第一附属医院，药剂科，上海，200433）

【摘要】目的：他克莫司是实体器官移植术后常用的免疫抑制剂，其治疗窗窄，药代动力学及药效学（PK/PD)个体差异大，其中遗传因素是引起他克莫司个体差异大的主要原因之一。目前 CYP3A5 对他克莫司浓度有明确影响，但其他基因型对他克莫司的影响，各报道之间差异较大。因此，本研究旨在全面系统探讨实体器官移植术后基因多态性与他克莫司浓度之间的相关性，以期为他克莫司个体化给药提供依据。**方法：**通过检索 Pubmed、Medline 和 Web of science 等数据库，以确定从数据库建立之初到 2023 年 2 月 21 日发表的心脏、肾以及肝移植术后，基因多态性对他克莫司浓度的影响的文献。**结果：**最终纳入 62 篇研究中，52%来自肾移植患者，29%来自心脏移植患者，19%来自肝移植患者。CYP3A4*18B（rs2242480）、 CYP3A5*3（rs776746）的基因多态性对心脏移植患者应用他克莫司的血药浓度有影响。LINC01121 与心脏移植一年后肾功能不全风险相关，而 STAT3 和 MPO 基因多态性以及 ADRB2 rs1042713 G 等位基因与心脏移植后急性肾损伤风险相关。ABCB1 rs2032582 和 rs1128503 联合构成的 T-T 单倍型及纯合子的肾和肝移植患者需要更高剂量的他克莫司。CYP3A5（rs776746、rs15524 和 rs4646450）、CYP3A7（rs10211 AA）、CYP3A4（rs4646437 CC）、CYP3A4*1G（rs2242480 CC）、CYP3A5*3（rs776746 GG）、PPARα（rs5767743）、IL-6（rs1800796）、SLCO1B1（rs2291075）以及 C6（rs9200）与肝移植患者他克莫司谷浓度/剂量比相关。而 MAP3K1（rs62355944）和 MAP3K9（rs8006424）可能成为预测肝移植患者术后肝功能的生物标志物。CYP3A4*22、CYP3A4（rs2242480）、CYP3A5（rs15524 和 rs776746）、CYP3A5*1/ABCB1 3435TT、CYP3A7（rs2257401）、CYP3A5*3/*3/ POR（rs1057868-rs2868177 GC-GT）双倍型携带者与肾移植他克莫司浓度有关。SLCO1B1 rs2306283 CC 携带者的他克莫司剂量调整浓度明显高于 CT 和 TT 携带者，SUMO4 rs237024A-rs237025A (GA-GA+AA-AA)携带者的他克莫司剂量调整浓度显著高于 GG-GG 携带者。CYP24A1（rs2296241 A）、ABCB1 CC/CT、POR*28/*28、KCNJ11（rs5219 AA+AG）、PPARα（rs4823613）和 POR（rs1057868）与肾移植后糖尿病风险显著相关。**结论：**成人实体器官移植受者的他克莫司浓度与多种基因多态性具有相关性，本研究能够为后续应用他克莫司的患者提供的个体化用药建议。

【关键词】他克莫司；实体器官移植；基因多态性；血液药物浓度检测

参考文献

[1] Cheng Y, Chen J, Lin X, Qiu H, Zhang J. Population Pharmacokinetic Analysis for Model-Based Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus in Chinese Han Heart Transplant Patients. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2023;48(1):89-100.

[2] Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. Clin Pharmacokinet. 2010;49(3):141-175.

[3] Aghakhani Chegeni S, Rahimzadeh M, Montazerghaem H, Khayatian M, Dasturian F, Naderi N. Preliminary Report on the Association Between STAT3 Polymorphisms and Susceptibility to Acute Kidney Injury After Cardiopulmonary Bypass. Biochem Genet. 2018;56(6):627-638.

[4] Dai S, Ma W, Qin G, Wang L, Wang E. Influence of ADRB1, ADRB2, and COMT Genetic Polymorphisms on Postoperative Outcomes of Patients Undergoing Cardiac Valve Surgery. Clin Ther. 2021;43(2):349-359.e2.

[5] Liu J, Ouyang Y, Chen D, et al. Donor and recipient P450 gene polymorphisms influence individual pharmacological effects of tacrolimus in Chinese liver transplantation patients. Int Immunopharmacol. 2018;57:18-24.

[6] Dong Y, Xu Q, Li R, et al. CYP3A7, CYP3A4, and CYP3A5 genetic polymorphisms in recipients rather than donors influence tacrolimus concentrations in the early stages after liver transplantation. Gene. 2022;809:146007.

[7] Liu MZ, He HY, Zhang YL, et al. IL-3 and CTLA4 gene polymorphisms may influence the tacrolimus dose requirement in Chinese kidney transplant recipients. Acta Pharmacol Sin. 2017;38(3):415-423.

[8] Genvigir FD, Salgado PC, Felipe CR, et al. Influence of the CYP3A4/5 genetic score and ABCB1 polymorphisms on tacrolimus exposure and renal function in Brazilian kidney transplant patients. Pharmacogenet Genomics. 2016;26(10):462-472.

[9] Liao JH, Li CC, Wu SH, Fan JW, Gu HT, Wang ZW. Gene Variations of Sixth Complement Component Affecting Tacrolimus Metabolism in Patients with Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. Chin Med J (Engl). 2017;130(14):1670-1676.

[10] Wu Y, Fang F, Wang Z, Wen P, Fan J. The influence of recipient SLCO1B1 rs2291075 polymorphism on tacrolimus dose-corrected trough concentration in the early period after liver transplantation. Eur J Clin Pharmacol. 2021;77(6):859-867.

[11] Liu XM, Li JL, Wang HY, et al. Yao Xue Xue Bao. 2015;50(2):180-184.

[12] Liu S, Chen RX, Li J, et al. The POR rs1057868-rs2868177 GC-GT diplotype is associated with high tacrolimus concentrations in early post-renal transplant recipients. Acta Pharmacol Sin. 2016;37(9):1251-1258.

[13] Elens L, Sombogaard F, Hesselink DA, van Schaik RH, van Gelder T. Single-nucleotide polymorphisms in P450 oxidoreductase and peroxisome proliferator-activated receptor-α are associated with the development of new-onset diabetes after transplantation in kidney transplant recipients treated with tacrolimus. Pharmacogenet Genomics. 2013;23(12):649-657.

[14] Zhang X, Men T, Liu H, Li X, Wang J, Lv J. Genetic risk factors for post-transplantation diabetes mellitus in Chinese Han renal allograft recipients treated with tacrolimus. Transpl Immunol. 2018;49:39-42.

[15] Tavira B, Coto E, Torres A, et al. Association between a common KCNJ11 polymorphism (rs5219) and new-onset posttransplant diabetes in patients treated with Tacrolimus. Mol Genet Metab. 2012;105(3):525-527.

[16] Lancia P, Adam de Beaumais T, Elie V, et al. Pharmacogenetics of post-transplant diabetes mellitus in children with renal transplantation treated with tacrolimus. Pediatr Nephrol. 2018;33(6):1045-1055.

致谢：

感谢综述写作过程中王卓老师的悉心指导，以及杨云云老师在专业与论文写作上的帮助。

基于单细胞转录组测序揭示乳香-没药协同配伍抗缺血性脑卒中的新机制

刘天龙，白敏，柳敏娜，王靖雯，文爱东，丁一

（陕西省空军军医大学西京医院　药剂科 710032）

【摘要】背景：尽管已经取得了长足的进步，但预防和治疗缺血性中风的挑战仍在全球范围内持续存在。中医药博大精深，在脑卒中的防治上有独特优势。乳香-没药是经典的活血化瘀中药药对，临床用于缺血性脑卒中的治疗已有上千年历史，但是两药协同配伍的机制仍有待阐明。我们前期已经明确，11-酮-β-乳香酸（KBA）和 Z-没药甾酮（Z-GS）分别是乳香和没药的核心药效物质。本研究拟利用单细胞转录组测序（scRNA-seq）技术，揭示 KBA 和 Z-GS 协同抗缺血性脑卒中的机制。**方法：**C57BL/6 小鼠分为对照组、模型组、KBA 给药组、Z-GS 给药组、KBA+Z-GS 联合给药组、阳性对照药组。模型和给药组进行 MCAO 造模处理。给药结束后进行神经功能评价，并行 TTC 染色分析脑梗死体积。另取小鼠脑梗死半暗带组织，作单细胞悬液后上机行 10×Genomics 单细胞测序及深度分析。此外，分离小鼠脑皮层小胶质细胞和星形胶质细胞，氧糖剥夺（OGD）造模并给予相应药物。免疫荧光、Western blotting、siRNA 转染等用于相关验证。**结果：**KBA 与 Z-GS 给药对 MCAO 小鼠神经功能和脑梗死体积有显著改善作用，且两药联用效果更佳，证实了 KBA+Z-GS 的协同药效。scRNA-seq 结果共得到 31,872 个细胞，经鉴定包括 14 个细胞类型，其中小胶质细胞和星形胶质细胞占比最大，分别占 33%和 24%。对小胶质细胞进一步分析发现，其可分为 Csmd3hi、H2-Q7hi、Isg15hi、Ptprz1hi、Rab7bhi、Ttrhi 六个新的亚型。GSVA 分析发现，KBA+Z-GS 通过调控这些亚型细胞的代谢和凋亡发挥作用。拟时序分析发现，KBA+Z-GS 配伍通过调控 Slc1a2 等基因影响小胶质细胞的演化。通过组间差异基因的对比发现，KBA 与 Z-GS 主要是通过调控小胶质细胞炎症反应发挥协同作用。同样地，对星形胶质细胞的分析发现，KBA 与 Z-GS 主要是通过调控星形胶质细胞铁死亡发挥协同作用。此外，本研究中我们创新性地构建了一种药物-基因协同调控模式，将所有差异基因按照减毒增效功能分为四类，并以此模式进行了筛选研究。最后，将小胶质细胞和星形胶质细胞分析结果进行合并，最终确定 Spp1 为 KBA 和 Z-GS 协同配伍的核心靶点。以上结果在体内外水平均进行了验证。**结论：**本研究揭示了乳香、没药协同配伍抗缺血性脑卒中的脑图谱变化，阐明了 KBA+Z-GS 对脑缺血后细胞的演化调控规律，并明确了以 Spp1 为代表的协同配伍药效靶点。本研究进一步丰富了乳香-没药协同配伍的现代科学内涵，并为该药物配伍减毒增效提供了实验基础，研究结果对缺血性脑卒中的防治药物研究提供了新的思路。

鸭跖草及混淆品饭包草的鉴定

刘祥

盐城市中药饮片有限公司　江苏 盐城 224000

近期，中药材市场出现了一定批量的饭包草在销售，并以此冒充鸭跖草，鉴于这种混乱状况，为了厘清鸭跖草和饭包草的区别，本文从两者的性状及叶的显微特征两方面进行阐述。

一、《中国植物志》中关于鸭跖草和饭包草性状的描述。

1.佛焰苞边缘分离，基部心形或浑圆。

2.萌果 3 室：佛焰苞披针形。基部心形或浑圆：花远伸出佛焰苞……1、竹节草 C.diffuse Butm.f.

2.萌果 2 室：佛焰苞心形。

3.叶片长 8－13 厘米，宽 3－5 厘米；萌果每室仅有种子一枚；焰苞顶端钝……3.大叶鸭拓草 C.suffnultcosa BI.

中　国　植　物　志

3.叶片长 3 — 9 厘米，宽不过 2 厘米；萌果每室有种子 2 粒；佛焰苞顶端急尖……2.鸭拓草 C.communls Linn

1.佛焰苞因下缘连合而成漏头状或风帽状。

4.萌果 3 片裂，每室 2 籽。叶有明显的柄，叶片卵形至宽卵形，长不超过 7 厘米……4.

饭包草 C.bengalensis Linn.

4.萌果 3 片裂或 2 片裂，每室 1 籽，叶无柄，如有柄，则佛焰苞很小。叶片披针形至卵状披针形，长可达 15 厘米。

5.佛焰苞小，长仅 1 厘米，植株被毛；叶片长 6 厘米以上。

6.植株粗壮，高达 1 米，叶片长 12－15 厘米，宽 3－5 厘米，叶鞘口部密被棕色褶长硬睫毛。佛焰苞多个（4－10）在茎顶集成头状……5.大苞鸭拓草 C.paludase BI.

6.植株比较细弱而矮小，近直立或铺散；叶片长不超过 12 厘米，宽不过 2.5 厘米，叶鞘口部无毛或疏被黄贝硬睫毛，佛焰苞 1 至多个集成头状。

7.植株常匍匐分枝：　叶片卵状披针叶形；佛焰苞长 2 厘米，顶端短急尖，2－3 个集成头状，萌果 3 片裂……6.地地藕 C.macuiata Edgew.

7.植株直立或上升，少匍匐分枝；叶片披针形，顶端长渐尖，宽不超过 2 厘米；佛焰苞长 2.5 厘米，顶端镰刀状短渐尖，1 至多个集成头状；萌果 3 片裂，其后面 1 室包着种子脱落……7 波缘鸭拓草 C.undulata R.Br.

二、从茎、叶、佛焰苞、花果、种子的性状特征分别对鸭跖草和饭包草进行细述其区别。

1.鸭趾草：为鸭跖草科植物鸭跖草 Commelina communis L.的干燥地上部分。

茎：下部无毛、上部短毛。

叶：披针形、卵状披针形，无叶柄。

佛焰苞：与叶对生、一般单个、下部不连和、心形、顶端短急尖、（植物志：边缘常有硬毛）实际没看见。

花果：聚伞花序，下面不孕花 1 朵，上面 3-4 朵（不伸出苞片）。蒴果 2 室、种子 4，种子 2-3 毫米。

2.饭包草：本品为鸭跖草科饭包草 Commelina bengalensis L.，以全草入药。

茎：大部分匍匐，有不定根，被疏柔毛

叶：有叶柄、卵形、，近无毛，叶鞘口有长睫毛

佛焰苞：漏斗状，下部边缘连和，数个集于枝顶与叶对生，被疏毛，（植物志：顶端短急尖或钝）实际顶端微凹或尖，

花果：下面长花梗，伸出佛焰苞，上面花数朵，果 3 室、腹面 2 室，每室 2 种子，后面 1 室无种子或 1 种子。种子近 2 毫米（比鸭跖草小、形状也不同）。

由此判断：

根据检索表：佛焰苞下边缘是否分离；

分离的三种：竹节草、大叶鸭跖草、鸭跖草；

连和的 5 种：饭包草、耳包鸭跖草、大苞鸭跖草、地地藕、波缘鸭跖草。

3.针对鸭跖草和饭包草样品分别细述其区别点。

样品（2021.8 月浙江结果）：鸭跖草分离、饭包草不分离

分离的三种：蒴果 3 室：竹节草（排除）

蒴果 2 室：大叶鸭跖草、鸭跖草

大叶鸭跖草：叶大、每室 1 种子佛焰苞顶端钝（排除）

鸭跖草：每室 2 种子、佛焰苞顶端短尖（确定）

连和的 5 种：两类：1、每室 2 种子（只有饭包草）另外，叶片卵形、长度等

2、每室 1 种子，叶披针形 9（排除）

三、鸭跖草与饭包草的茎、叶、佛焰苞、花果、种子图片，从中也能看出不同之处。



鸭跖草：全植株基本无毛，茎上部有毛


饭包草浙


鸭跖草茎上部有短毛


鸭跖草果实，腹缝线裂开，
下面花不孕
不孕花梗


鸭跖草果实


鸭跖草佛焰苞


鸭跖草果实



佛焰苞顶端尖、饭包草有尖和凹




鸭跖草果实2室，每室2种子


饭包草不孕花梗伸出佛焰苞，
佛焰苞数个


鸭跖草叶


饭包草茎有疏柔毛
叶鞘口有长睫毛


鸭跖草叶背面


鸭跖草叶正面


饭包草茎匍匐生根


鸭跖草叶与佛焰苞对生


饭包草茎有疏柔毛
叶鞘口有睫毛


饭包草鸭跖草叶比较


饭包草佛焰苞漏斗状，被柔毛


饭包草叶正面，近无毛，有叶柄

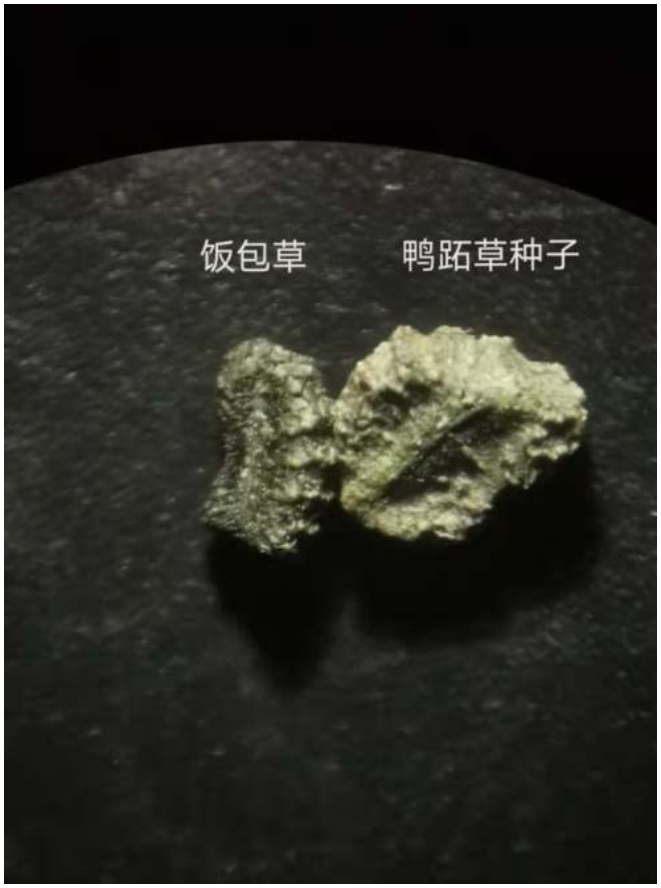

饭包草果实，3室


饭包草果实


饭包草果实，三室，两室分别有种
子两枚，另一室通常无


饭包草佛焰苞有疏柔毛，


叶柄，叶鞘长睫毛


饭包草
鸭跖草种子


饭包草
鸭跖草种子


饭包草鸭跖草叶比较





也有顶端尖的



下面是广西购买的饭包草：特征相同，茎比较粗、紫红色较多







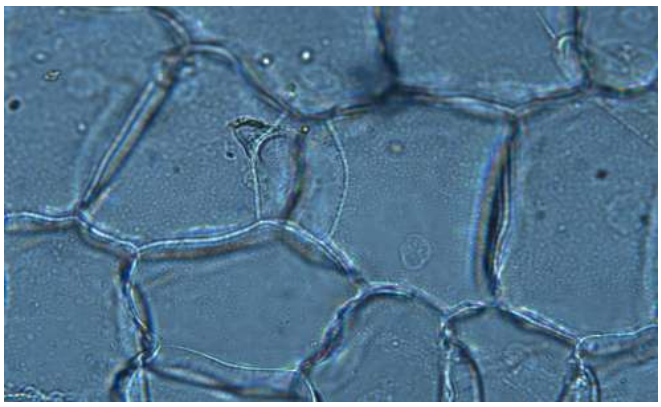
部分有，不明确。唐海发认为鸭跖草和竹节草的区别在此。

四、《中国药典》2020 年版关于鸭跖草叶的显微特征描述。

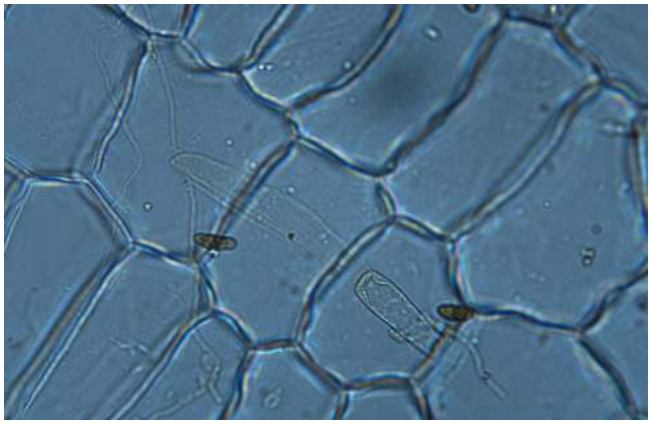
【鉴别】（1）本品叶表面观：非腺毛有两种，均为 2 细胞，一种短锥形，长 45～60 μm，壁较厚，基部细胞直径约 45 μm，顶端细胞短尖；另一种棒形，基部细胞长 45～60 μm，壁稍厚，顶端细胞较长，先端钝圆，壁薄，常脱落。草酸钙针晶较多，长至 74 μm。

1-3 在上表皮、4 上下都有、5 在下表皮

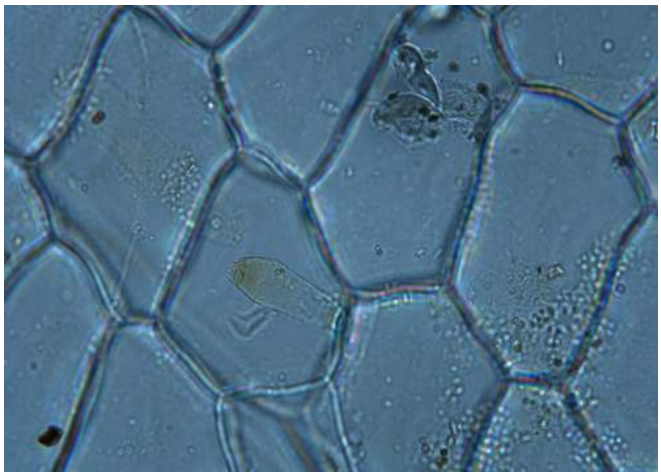
1、短锥形非腺毛（很少、看起来像是单细胞，基部细胞应该是细胞腔，药典图也一样，有疑问药典错误）



2、棒形非腺毛较多（顶端细胞长）

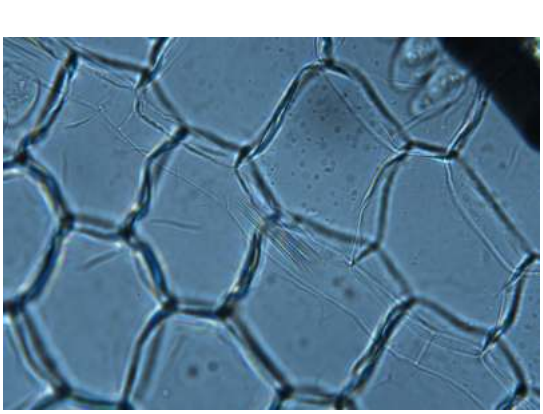
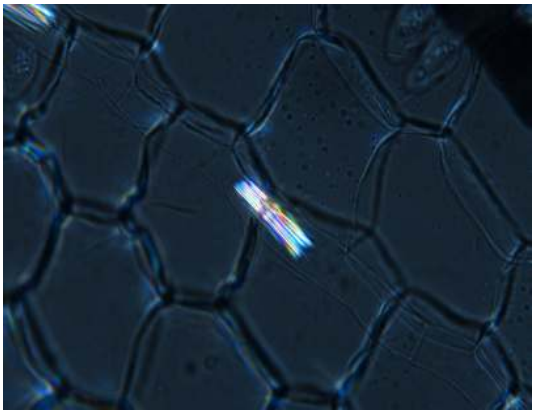


完整

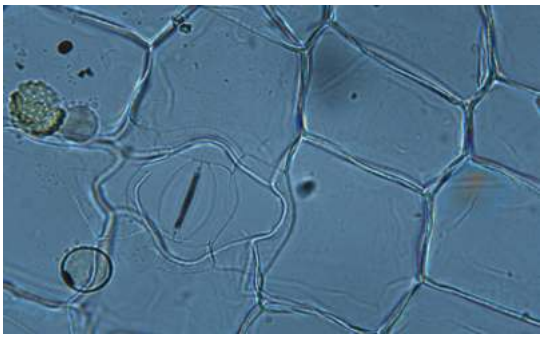
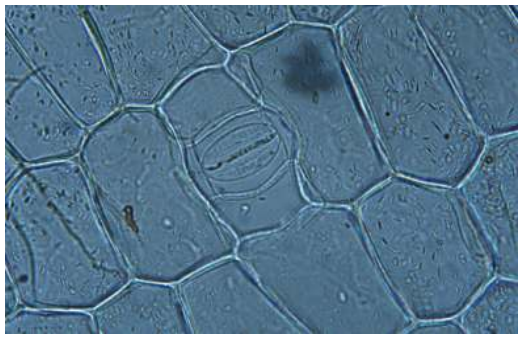


头部脱落

3、针晶

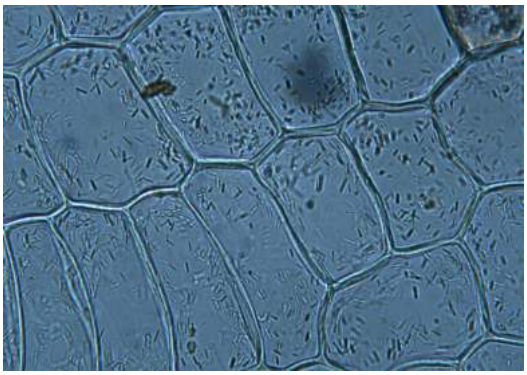
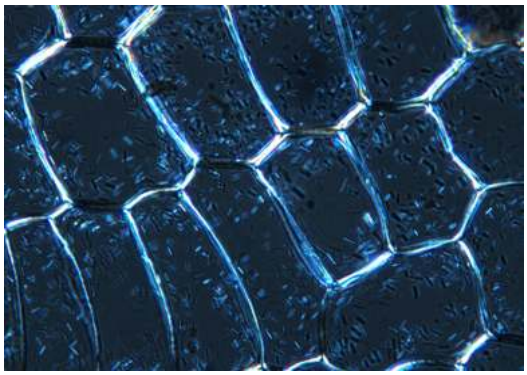



4、气孔平轴式

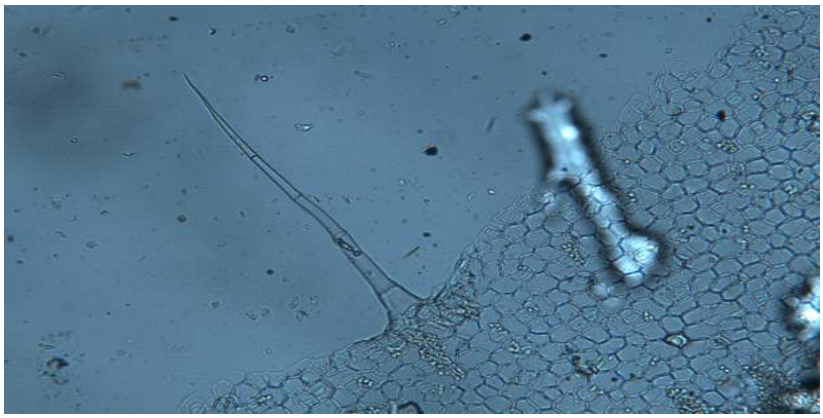
上表皮　　下表皮（副卫细胞方一点）

5、下表皮可见柱晶（药典没有描述，但是彩图有）

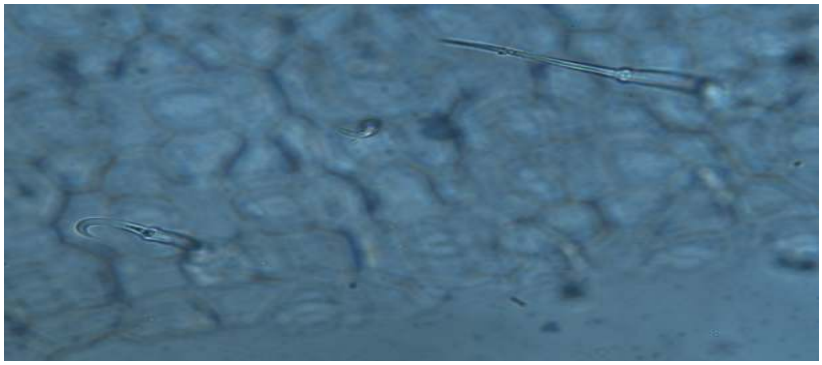



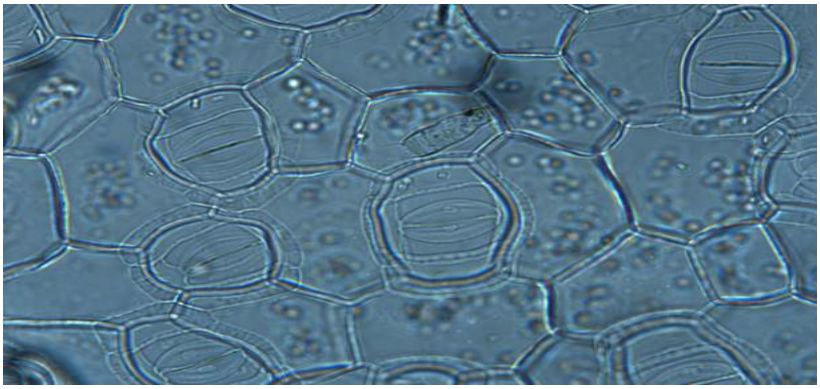
下面是饭包草

饭包草叶上可见有毛，应该可见长的非腺毛，微信安同学没有提到



非腺毛顶端勾状（2-3 细胞）是饭包草特有；另外偶见棒状非腺毛（极少）；感觉饭包草气孔副卫细胞更方一点。





上述内容重点从鸭跖草和饭包草两者的性状及叶的显微特征两方面阐述了它们的区别，尤其是显特征，区别更为明显。

参考文献：

1.《中国植物志》，中国科学院《中国植物志》编委会；2.《中国药典》2020 年版一部，中国药典委员会。

2D-LC-QTOF-MS 鉴定酒石酸托特罗定片辅料中未知杂质及来源分析[1]

刘晓佳[1,2]，潘芳芳[2,3]，徐东海[2,3]，柳文媛[1,4]，邵鹏[2,4,5]△

（1.中国药科大学，南京 210009；2.浙江省食品药品检验研究院，杭州 310052；3.国家药品监督管理局仿制药评价关键技术重点实验室，杭州 310052；4.浙江省原料药安全研究中心，杭州 310051；5.浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室，杭州 310051）

【摘要】目的：通过中心切割在线二维液相色谱四级杆飞行时间质谱法对酒石酸托特罗定片辅料中未知杂质进行结构鉴定，同时归属杂质来源。**方法：**一维液相色谱采用 Waters XBridge-C_{18} 色谱柱，以乙腈-水-高氯酸（200:800:1.5）为流动相 A，以乙腈为流动相 B，梯度洗脱，柱温为 65℃，检测波长为 220nm；二维液相色谱采用 Agilent Poroshell 120 EC-C_{18} 色谱柱，以甲酸铵缓冲液(20mmol/L 甲酸铵溶液，用甲酸调节 pH 值至 3.0)-乙腈（55：45）为流动相，流速为 0.3mL/min；质谱采用电喷雾离子源(ESI)，正离子模式检测。**结果：**鉴定了未知杂质的可能结构，确认该杂质由酒石酸托特罗定片中预混包衣剂辅料羟丙甲纤维素引入；检测了 8 家羟丙甲纤维素生产企业的产品，发现 1 家企业检测出该杂质。**结论：**建立的中心切割二维高效液相色谱四极杆飞行时间质谱法对酒石酸托特罗定片中未知杂质进行在线定性鉴别；为酒石酸托特罗定片质量控制研究提供参考；同时也为制剂中辅料质量控制和标准的进一步完善阐述了一定的必要性。

【关键词】酒石酸托特罗定片；二维液相色谱-四极杆-飞行时间质谱；中心切割；辅料；羟丙甲纤维素

Structure identification and source analysis of unknown impurity in excipients of Tolterodine Tartrate Tablets by 2D-LC-QTOF-MS

LIU Xiaojia[1,2], PAN Fangfang[2,3], XU Donghai [2,3],LIU Wenyuan[1,4], SHAO Peng[2,4,5]△

（China Pharmaceutical University, Nanjing 210009，China；Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China；NMPA Key Laboratory for Core Technology of Generic Drug Evaluation, Hangzhou 310052, China；Zhejiang Research Center for API Security, Hangzhou 310051, China；Key Laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Provincial, Hangzhou 310051, China）

【Abstract】Objective: To identify the structure of unknown impurities in Tolterodine Tartrate Tablets by a method of heart-cutting two-dimensional liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry , and trace the source of the impurity. **Methods**: One-dimensional chromatographic conditions were as listed. A Waters XBridge-C_{18} column was used, and acetonitrile-water-perchloric acid (200:800:1.5) as the mobile phase A, and acetonitrile as the mobile phase B, in gradient mode. The detection wavelength was set at 220 nm. The column temperature was 65°C.Two-dimensional chromatographic conditions were as listed. A Agilent Poroshell-120 EC-C_{18} column was used, and 20mmol/L ammonium formate (adjust pH to 3.0 with formic acid) –acetonitrile(55:45) as the mobile phase, at a flow rate of 0.3 mL/min. The mass spectrometry used an electro spray ionization source(ESI) for positive ion mode detection.**Results:** The possible

基金项目：浙江省药品监管系统科技计划项目[202201]

第一作者：刘晓佳，男，硕士研究生，（电子信箱）1697536929@qq.com

△通讯作者：邵鹏，男，副主任药师，主要从事药物分析与标准起草工作，（电子信箱）shaopeng@zjyj.org.cn

structure of the unknown impurity in Tolterodine Tartrate Tablets was infered. It was confirmed that the unknown impurity was introduced by hypromellose, a film-coated premix in Tolterodine Tartrate Tablet. The products of 8 hypromellose manufacturers were tested, and 1 enterprise was found to detect the impurity **Conclusion**： The 2D-LC-QTOF-MS method can be used to identify unknown impurities in Tolterodine Tartrate Tablets, which provides reference for the quality control study of Tolterodine Tartrate Tablet. At the same time, it also explains the necessity for the quality control and further improvement of excipients in preparations.

【KEY WORDS】 Tolterodine Tartrate Tablet; 2D-LC-QTOF-MS; heart cutting; excipient; hydroxypropyl methyl cellulose(HPMC);

酒石酸托特罗定(Tolterodine Tartrate)为(*R*)-N，N-二异丙基-3-(2-羟基-5-甲基苯基) -3-苯丙胺 L(+)-酒石酸盐（见图 1），临床主要广泛被用于治疗膀胱过度活动症所引起的尿急、尿频和尿失禁等症状[1-4]。酒石酸托特罗定片在生产过程中使用了薄膜包衣预混剂、填充剂、黏合剂、崩解剂等多种辅料，原辅料按处方比例混合后，经一系列工艺处理后最后制成薄膜衣片[5]。药用辅料为药物制剂的重要组成部分，辅料质量也直接影响制剂的质量及临床疗效，进而对进一步开展仿制药一致性评价研究也可能产生一定影响[6]。

酒石酸托特罗定片收载于《卫生部药品标准》（第 39 册），但标准中未控制有关物质[7]，中国、美国、欧洲、日本等各国药典未收载该品种。本文在对国内酒石酸托特罗定片进行质量标准研究过程中，参考《美国药典》酒石酸托特罗定原料药的色谱方法对酒石酸托特罗定片有关物质进行检验，发现在 A 制药企业生产的酒石酸托特罗定片中保留时间约为 10min（RRT: 0.5）处有一未知杂质特征峰，其中该企业 7 批次产品中该未知杂质含量为 0.05%~0.16%，超出杂质的鉴定限度要求(0.10%)[8]，经检索酒石酸托特罗定片文献未见相关报道[9-10]，因此有必要对该杂质进一步进行结构确认与来源分析，同时为酒石酸托特罗定片质量安全控制和标准提高研究提供一定参考。

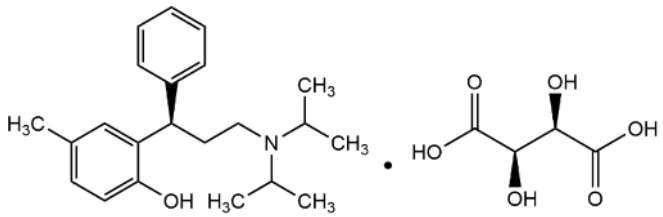


图 1. 酒石酸托特罗定结构式

Fig.1 The structure of Tolterodine Tartrate

1 仪器与试药

Mettler-XPE205 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）； Agilent 1290- 6538 Q/TOF (美国安捷伦公司)、 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)；水为超纯水(美国 Millipore 公司)；

甲酸铵、甲酸、高氯酸、甲醇和乙腈均为色谱纯(美国默克公司)；酒石酸托特罗定对照品（中国食品药品检定研究院，批号：100723-201802）；羟丙基甲基纤维素(1 号~8 号企业,其中 8 号企业为 A 制药企业辅料供应商)；酒石酸托特罗定片（批号：202301~202307，规格：2mg）及其他药用辅料(辅料 a~i)均由 A 制药企业提供。

2 方法与结果

2.1 有关物质色谱条件

色谱条件参考《美国药典》酒石酸托特罗定中有关物质项下条件[11]。采用 Waters XBridge-C_{18}（4.6 × 250 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈-水-高氯酸（100：900：1.5）为流动相 A，以乙腈-水-高氯酸（500：500：1.5）为流动相 B，以乙腈为流动相 C 梯度运行，流速为 1 mL/min，检测波长为 220 nm，柱温 65 ℃，进样量 20 μL，梯度洗脱：见表 1。

2.2 2D-LC-QTOF-MS 分析条件

2.2.1 第一维液相

色谱柱为 Waters XBridge C_{18} 柱（4.6 × 250 mm，5 μm）；流动相 A：乙腈-水-高氯酸(200:800:1.5)，流动相 B：乙腈；流速：1.0 mL/min;柱温：65℃；进样体积：10 μL；检测波长：220 nm；梯度洗脱：见表 2。

2.2.2 第二维液相

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C_{18} 柱（2.1 × 100 mm，2.7 μm）；流动相：甲酸铵缓冲液（20mmol/L 甲酸铵溶液，用甲酸调节 pH 值至 3.0）-乙腈（55：45）；流速：0.3 mL/min；柱温：25℃；检测波长：220 nm；

2.2.3 质谱条件

电喷雾电离(ESI 源)，正离子模式，喷雾电压 4000V，雾化气压力 35psi，干燥气流量 10 L/min，去溶剂温度 350℃。质量扫描范围 m/z 50～1000。

表 1.液相洗脱梯度

Tab .1 Liquid phase elution gradient

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）	流动相 C（%）
0~5	75	25	0
5~22	0	100	0
22~47	0	0	100
47~57	0	0	100
57~70	75	25	0

表 2.第一维液相洗脱梯度

Table 2. First-dimensional liquid phase elution gradients

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~5	100	0
5~22	62.5	37.5
22~47	0	100
47~57	0	100
57~70	100	0

2.3 供试品和辅料溶液配制

2.3.1 供试品溶液

精密称取酒石酸托特罗定片剂粉末约 10mg，用 50%的乙腈溶解并定容至 20.0mL，过滤，取续滤液即得。

2.3.2 辅料溶液

分别精密称取 7 种辅料、薄膜包衣预混剂中的 4 种辅料和不同厂家生产的羟丙甲纤维素 10.0mg，分别用 50%的乙腈溶解并分别定容至 10.0mL，过滤，取续滤液即得。

2.4 色谱分析

采用 2.1 色谱条件对 A 制药企业的酒石酸托特罗定片进行有关物质测定，除已鉴定的 5 个工艺和降解杂质外，发现该企业产品中保留时间约为 10min（RRT：0.5）处存在一未知杂质峰；按面积归一化法计算，其中 7 批次未知杂质含量为 0.05%~0.16%。超过了产品的鉴定限，需严格控制。典型图谱见图 2~图 3。

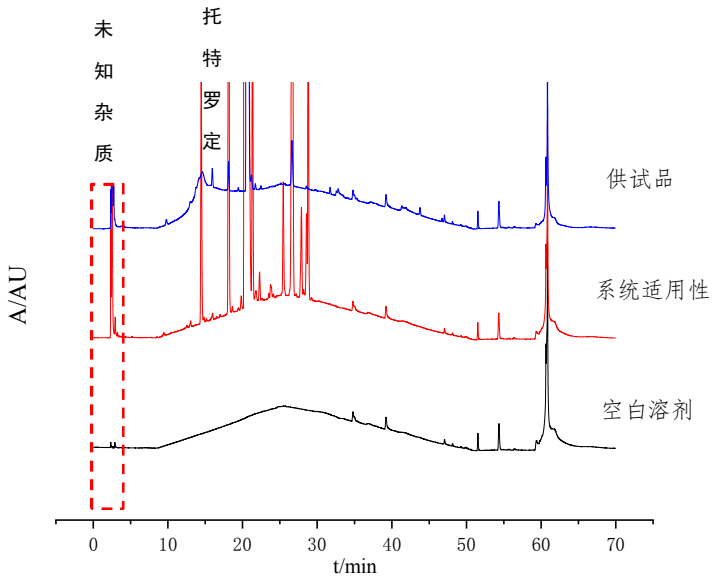


图 2.酒石酸托特罗定片有关物质液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of related substances of Tolterodine Tartrate Tablet

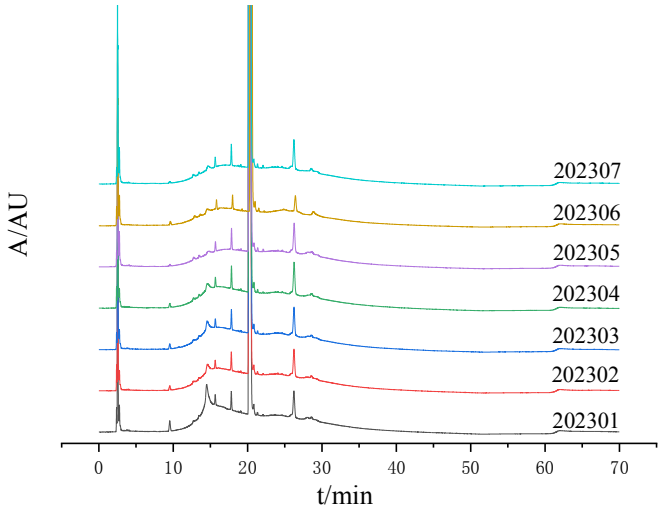


图 3. 7 批酒石酸托特罗定片有关物质液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of related substances of 7 batches of Tolterodine Tartrate Table

2.5 未知杂质结构确证

采用 2.2 项下分析条件，利用二维液相色谱中心切割法，将一维色谱图中保留时间为 14min 的未知杂质通过阀切换技术富集于 80μL 的定量环中，然后切入二维色谱柱，质谱分别扫描一级质谱图和二级质谱图，对未知杂质进行结构推测鉴定，发现与 m/z 236.1129 结构单元的碎片一致,与离子式 $C_9H_{18}NO_6^+$相吻合。其中$[M+H]^+$离子主要碎片包括 *m/z* 159、117、99 和 57，其中碎片 *m/z* 159 为$[M+H]^+$脱去两分子水和乙腈。碎片 *m/z* 117 可由$[M+H]^+$脱去侧链以及水分子和羟基得到，再脱去一分子水得到碎片 *m/z* 99。因此鉴定该杂质为 6-（2-亚氨基丙氧基）甲基四氢吡喃-2，3，4，5-四醇（命名为杂质 I），结构式见图 10。相关质谱图与裂解途径见图 6~图 9。

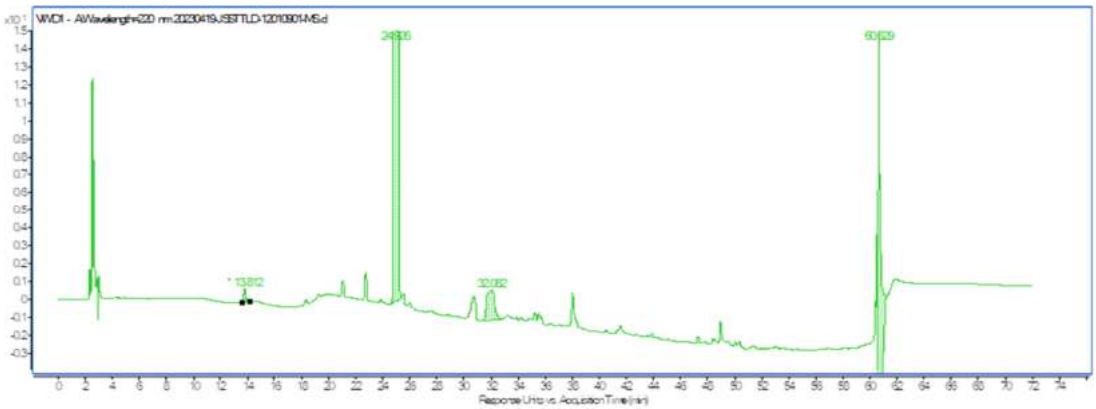


图 4. 托特罗定一维液相色谱图

Fig. 4 The flrst dimensional UPLC-UV chromatogram of Tolterodine

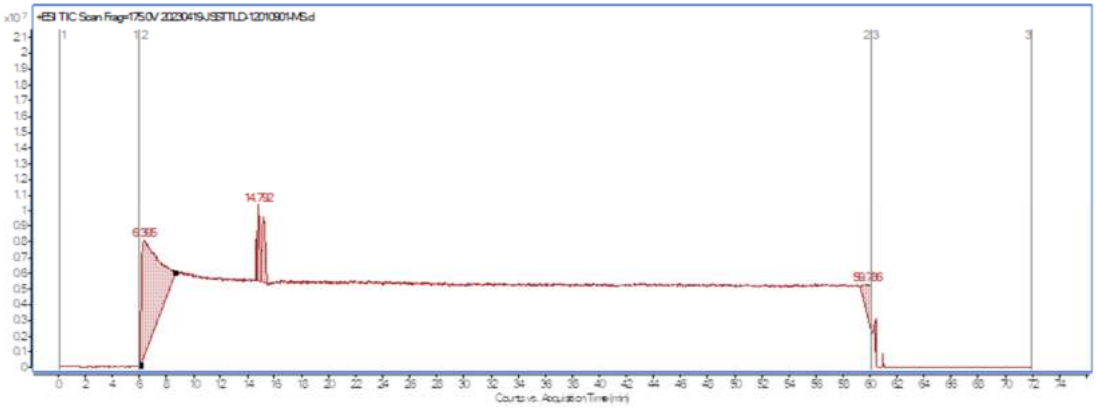


图 5. 未知杂质二维系统总离子流色谱图

Fig.5 Total ion chromatogram of unknown impurity in 2D system

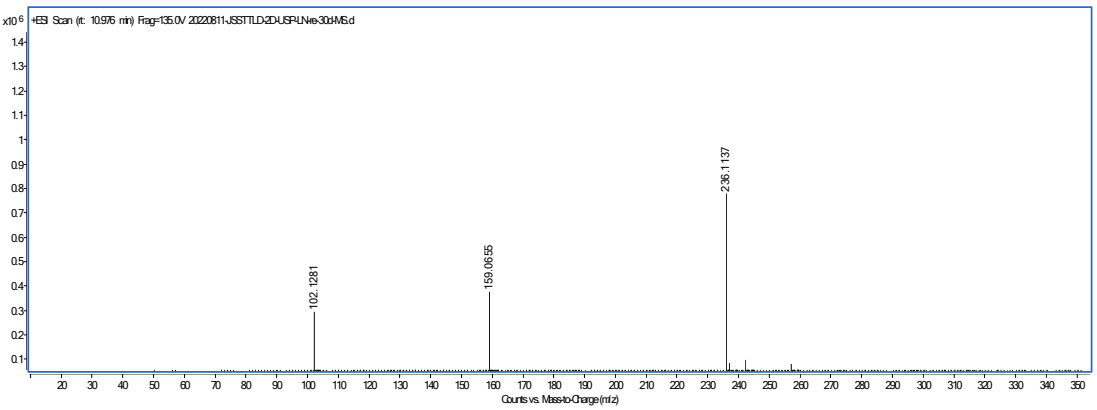


图 6.未知杂质一级质谱图

Fig .6 Primary mass spectra of unknown impurities

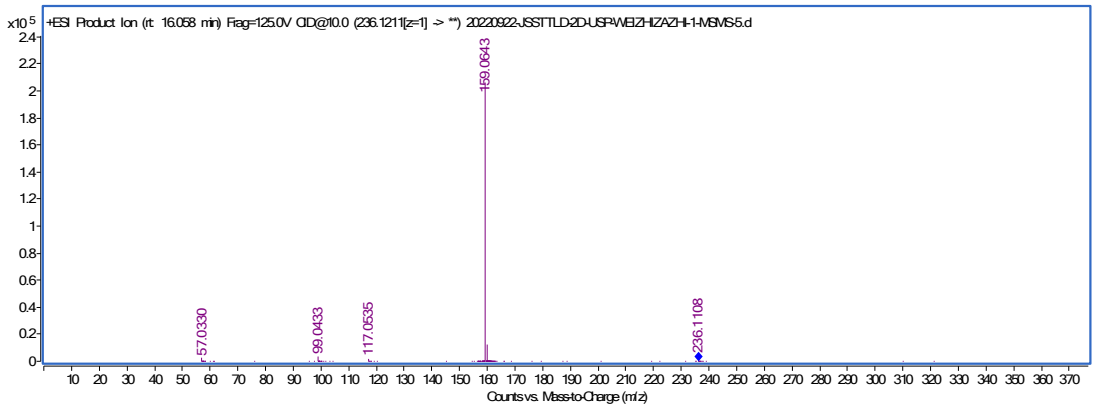


图 7.未知杂质二级质谱图

Fig .7 Secondary mass spectra of unknown impurities

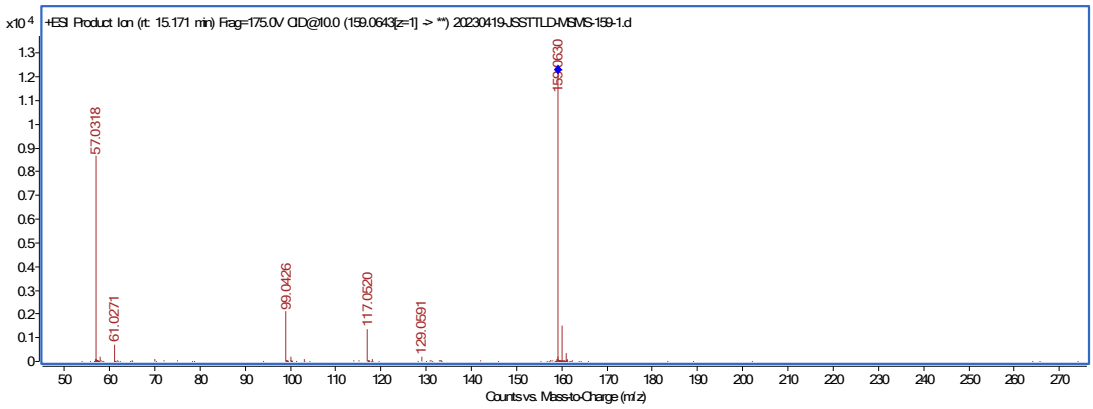


图 8.未知杂质 m/z159 碎片二级质谱图

Fig .8 Secondary mass spectra of unknown impurity m/z159 fragments

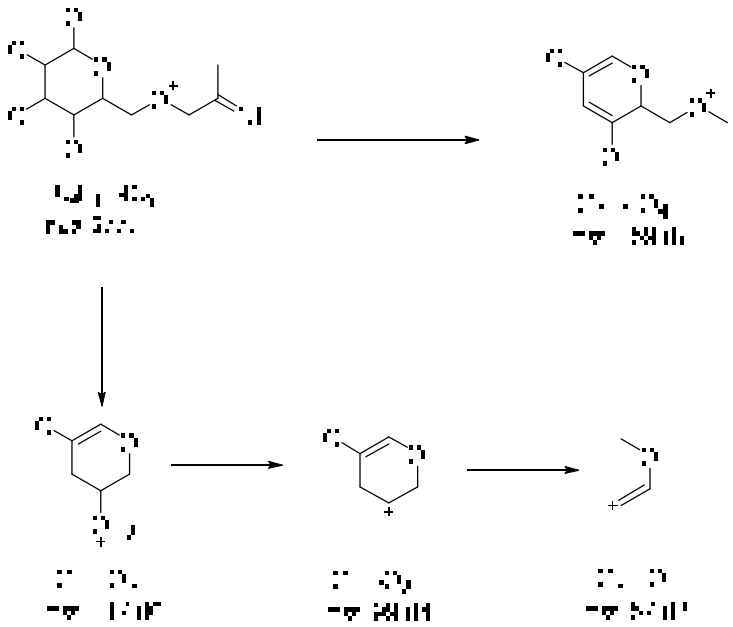


图 9.未知杂质裂解途径

Fig .9 Mass spectral fragmentation of unknown impurity

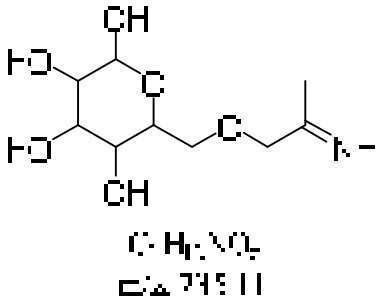


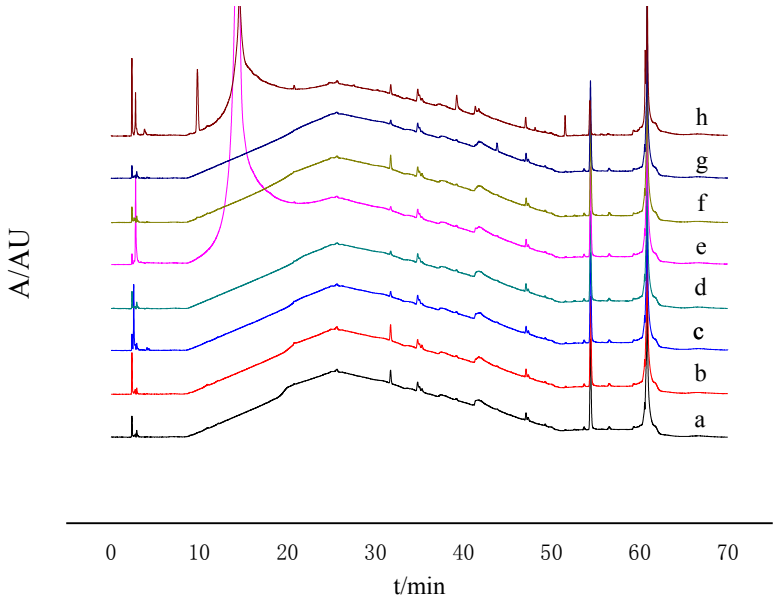
图 10. 杂质 I 结构式

Fig.10 The structure of Impurity I

2.6 杂质 I 来源分析

结合制剂中主成分托特罗定结构与工艺处方，发现杂质 I 与主成分结构式差异较大，推测可能由生产过程中或贮存过程中外源性物料引入；故对生产过程中所使用的相关辅料进行高效液相色谱分析，进一步确定杂质 I 来源。

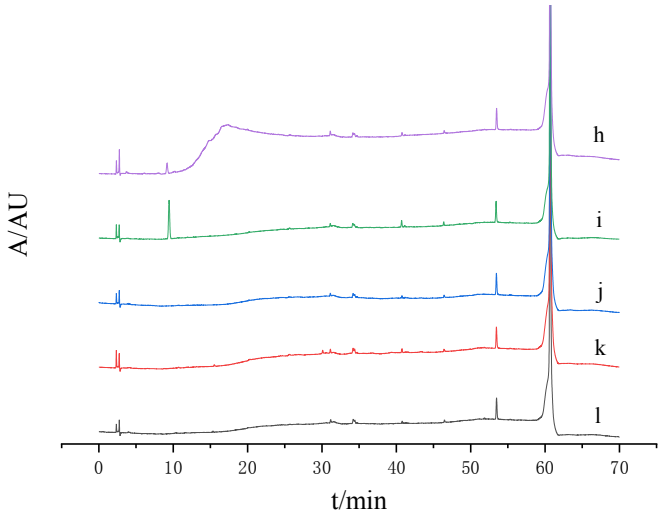
经与生产企业沟通，酒石酸托特罗定片在生产过程中共使用 7 种辅料和 1 种薄膜衣预混剂，其中薄膜衣预混剂中又包含 4 种药用辅料成分。对上述 11 种药用辅料初筛，经分析高效液相色谱图结果，在辅料羟丙甲纤维素色谱图中发现与杂质 I 保留时间一致的色谱峰，其他辅料均未见此色谱峰，结合羟丙甲纤维素结构特征(图 13)，初步推断杂质 I 是来源于羟丙甲纤维素中。色谱图见图 11~图 12。



a~g:7 种药用辅料[7 kinds of excipients]　h:薄膜衣预混剂[film-coated premix]

图 11. A 制药企业酒石酸托特罗定片辅料液相色谱图

Fig. 11 HPLC chromatogram of Tolterodine Tartrate Tablets excipients of A pharmaceutical enterprise



h:薄膜衣预混剂[film-coated premix]　i:羟丙甲纤维素[hydroxypropyl methyl cellulose]

图 12.薄膜衣预混剂四种成分液相色谱图

Fig. 12 HPLC chromatogram of the four components of the film-coated premix

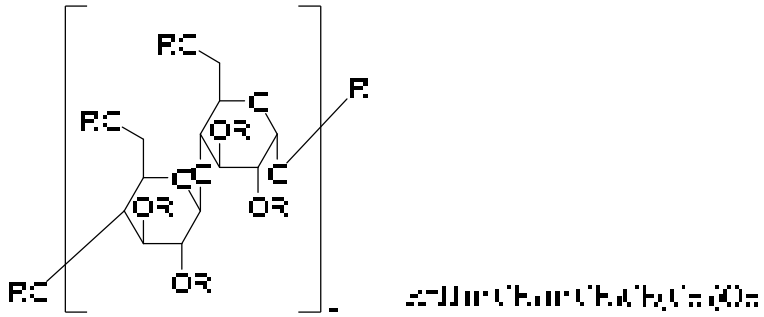


图 13. 羟丙甲纤维素结构式

Fig. 13 The structure of hydroxypropyl methyl cellulose

羟丙甲纤维素属于非离子型纤维素混合醚，是一种半合成的、不活跃的黏弹性聚合物[6]，所以照 2.2 项下分析条件对辅料羟丙甲纤维素中发现的未知杂质进行了质谱分析，显示该未知杂质与酒石酸托特罗定片中杂质 I 分子量及裂解规律基本匹配一致，进一步证明杂质 I 来源于辅料羟丙甲纤维素。

2.7 羟丙甲纤维素生产企业中杂质 I 研究评价

为明确杂质 I 与羟丙甲纤维素辅料生产企业产品的相关性，对征集到的国内外 8 家辅料企业生产的羟丙甲纤维素进行液相色谱分析与评价，仅 8 号辅料企业产品中检出杂质 I（图 14）；经 A 制药企业反馈，该企业生产的酒石酸托特罗定片中所使用的羟丙甲纤维素也来源于 8 号企业。

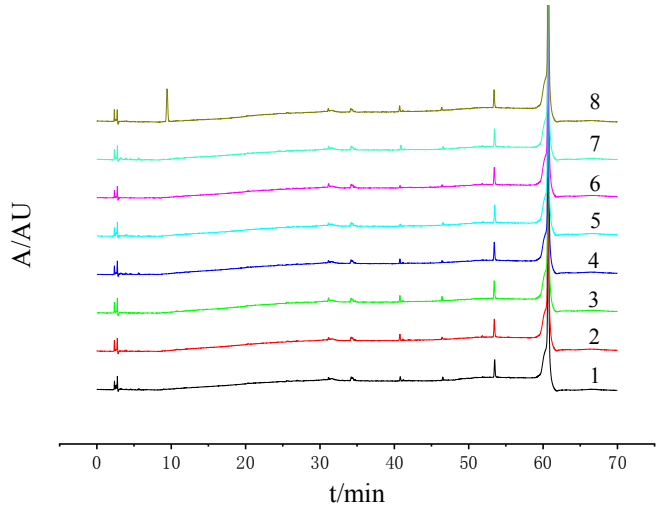


图 14. 8 家企业生产的羟丙甲纤维素色谱图

Fig. 14 HPLC chromatogram of eight manufacturers hypromellose methyl cellulose

3 讨论

1.基于中心切割二维液相色谱四极杆飞行时间质谱联用技术通过在线自动化操作，可以实现在线除盐、提高峰容量和多组分序列分析等效果。通过两种不同的互补分离系统一定程度上解决了复杂样品特别是高分子辅料样品的鉴定与分析。且与传统单一的 LC-MS 相比， 2D-LC-MS 有着更强的分离能力[12-13]。由于酒石酸托特罗定片有关物质较为复杂，不同杂质可能来源于原料药的合成、制剂降解、辅料杂质引入，本研究故而采取中心切割二维液相色谱四极杆飞行时间质谱联用技术对酒石酸托特罗定片中来源于辅料中的杂质进行鉴别，既保证了分离效果，同时避免流动相中非挥发性物质的影响，得到较好的质谱响应，进而通过结构鉴定尽可能从多角度对杂质控制进行分析与研究。

2. 近年来辅料质量影响在药品质量控制中起到越来越重要的作用，对于有关物质检测过程中出现的未知杂质，未来杂质谱研究可能不仅要考虑杂质来源于主要活性成分外，同时还需进一步关注其来源于辅料的可能，从而对杂质做出有效地判定和控制[14-15]。在本研究中推断出杂质 I 来源于薄膜衣预混剂中羟丙甲纤维素，并鉴定出其结构。目前各国药典收载的辅料羟丙甲纤维素质量标准中，尚未收录有关物质控制项目。故提示生产企业为更好的保证产品质量，应加强药物辅料质量控制与供应商审计，进一步提高制剂产品质量水平；而且建议后续应对辅料中杂质进行相关毒理学研究。

4 小结

本文建立的中心切割在线二维高效液相色谱四极杆飞行时间质谱法可以应用于酒石酸托特罗定片中可能出现的其他杂质鉴别；同时为相关企业或监管部门对辅料质量标准健全完善上提供了一定的必要性参考。

参考文献

[1] 刘娜.托特罗定 PLGA 微球的制备及治疗膀胱过度活动症的研究[D].吉林:吉林大学,2018.

[2] 于艚,宋敏,周霞 等.酒石酸托特罗定有关物质的液质联用鉴定研究[J].中国新药杂志,2013,22(21):2561-2568.

[3] Crandall C. Tolterodine: a clinical review[J]. J Womens Health Gend Based Med,2001, 10(8):735-743.

[4] Clemett D, Jarvis B. Tolterodine: a review of its use in the treatment of overactive bladder[J]. Drugs Aging, 2001,18(4):277-304.

[5] 鲁南制药集团股份有限公司.一种酒石酸托特罗定片及其制备工艺:中华人民共和国,CN 114652694 A[P].2022.06.24.

[6] 宫艳畅,杨白雪,孙瑞濛 等.羟丙甲纤维素的来源差异对其性质及功能性的影响[J].中国医药工业杂志,2020,51(09):1178-1183.
[7] 国家药品标准(新药转正标准)第 39 册[S].2004:111-112
[8] EP9.0[S].2019:3727
[9] Lakkireddy Prakash, M. Himaja , Venkata Subbaiah et al. Isolation, identification and characterization of degradant impurities in Tolterodine tartrate formulation[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2014,90:215-221.
[10] Prakash L, Himaja M, Vasudev R. Identification, and Characterisation of Degradation Products and the Development and Validation of a Stability-Indicating Method for the Estimation of Impurities in the Tolterodine Tartrate Formulation[J]. Scientia Pharmaceutica, 2014 ,83(1):65-83.
[11] USP43-NF38[S].2020:2021.
[12] 林丽琴,彭彦,金朦娜 等.2D-LC-QTOF MS 鉴定门冬氨酸钾镁注射液中的未知杂质[J/OL].中国现代应用药学. https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222087
[13] 赵敬丹,秦峰,刘浩.中心切割二维液相色谱-质谱法定性鉴别盐酸特比萘芬乳膏中的未知杂质及其校正因子的测定[J]. 中国现代应用药学, 2021,38(14): 1717-1722.
[14] 崇小萌,田冶,王立新 等.克拉霉素分散片有关物质分析中辅料干扰的研究[J].中国新药杂志,2022,31(19):1936-1942.
[15] 刘朝霞,程奇蕾,何兰.辅料聚维酮 K30 对缬沙坦胶囊质量控制的影响[J].药物分析杂志,2014,34(06):1091-1099.

Enantioselective Effect of Chiral Small Molecules in SARS-CoV-2 Vaccine-Induced Immune Response

Ye Liu*

（Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming, Yunnan 650000, China）

【**Abstract**】Although numerous chiral small molecules have been discovered and synthesized, the investigation on their enantioselective immunological effects remains limited. In the study, we designed and synthesized a pair of small molecule enantiomers (*R/S*-ResP) by covalently bonding two immunostimulators (resiquimod/Res) onto a planar chiral framework (paracyclophane/P). Notably, we found that *S*-ResP exhibits a 4.05-fold higher affinity for toll-like receptor 7 (TLR7) than *R*-ResP, thereby more effectively enhancing the functions of dendritic cells and macrophages in cytokine secretion and antigen internalization. Furthermore, we observed that *S*-ResP significantly enhances RBD antigen-induced cross-neutralization against various SARS-CoV-2 strains compared to *R*-ResP. These findings demonstrate the enantioselective effects of small molecules on regulating vaccine-induced immune responses and emphasize the significance of chirality in designing small molecular adjuvants.

【**Keywords**】Adjuvant · Chirality · Immunology · Small Molecule

参考文献

[1] Zhou Z, et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2023, e202301085.

脱水穿心莲内酯对 Poly(I:C) 引起的小鼠急性肺损伤的改善作用及体内药代动力学特性研究

刘永广，靳苏维，张姗姗，夏天吉，王智，闫明珠*，常琪**

（中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所，北京 100094，中国）

【摘要】目的：急性肺损伤（Acute lung injury，ALI）是临床上常见的由病毒或细菌等感染等因素引起的肺部危重症。脱水穿心莲内酯（Dehydroandrographolide，DAP）是清热解毒中药穿心莲中所含的一个二萜内酯类成分，具有抗菌、消炎、抗病毒感染、抗肿瘤、调节免疫和抗肝纤维化等生物活性。然而，有关 DAP 对病毒性肺损伤的改善作用及其在 ALI 情况下的药代动力学特征研究至今确鲜有报道。本研究采用 Poly(I:C)（PIC）引起的 ALI 小鼠模型探究了 DAP 对 ALI 的改善作用，并比较了 DAP 在正常小鼠和 ALI 小鼠体内的药代动力学特征。**方法：**雄性 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周后随机分为 7 组，空白对照组、模型组、和 5 个 DAP（5、10、20、40 和 60 mg/kg）干预组，每组 6 只。动物在麻醉状态下气管滴注 40 μL 的 3 mg/mL PIC 溶液或等体积生理盐水（空白对照组），滴注后的 2 h 和 12 h 时分别灌胃给予 DAP 一次，空白组和模型组给予随行溶剂。动物在造模后 24 h 时处死，收集肺泡灌洗液（BALF）和肺组织，分别用于肺湿/干重比、BALF 中炎症因子和总细胞数测定。另取二批雄性 C57BL/6J 小鼠各 50 只，适应性喂养 1 周后各自随机分为 10 组，每组 5 只，其中一批为正常动物，灌胃给予 DAP（20 mg/kg）后分别于 0、0.083、0.05、0.5、1、2、4、6、8 和 12 h 时处死动物，收集血浆和肺组织；另一批为模型动物，PIC 致炎 24 h 时同上给予 DAP 并收集生物样品；使用 LC-MS/MS 检测血浆和肺组织中的 DAP 浓度，根据平均血药浓度-时间曲线以 Winnolin 软件计算药代动力学参数。**结果：**与空白组相比，PIC 组动物肺湿/干重比明显增大 BALF 中 TNF-α、IL-1β、IL-6 显著升高，表明 PIC 造成了小鼠的 ALI。与模型组相比，DAP 可剂量依赖性地使小鼠 BALF 中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 以及总细胞数明显降低，表明 DAP 可显著改善肺部炎症。比较正常小鼠和 ALI 小鼠的血浆和肺组织中的 DAP 药物浓度及药代动力学特征发现，DAP 在 ALI 小鼠中的肺暴露量显著高于正常小鼠，Cmax 和 AUC 分别是在正常小鼠的近 2.7 和 2.5 倍，这可能与 ALI 造成的肺毛细血管通透性增大有关；DAP 在 ALI 小鼠血浆和肺组织中的消除半衰期明显长于在正常小鼠中。**结论：**小鼠气管滴注 PIC 后可引起严重的 ALI，DAP 可显著降低 PIC 引起的小鼠肺部炎症，对 ALI 具有很好的改善作用。在肺部发生炎症时，DAP 易于在肺组织中分布，并具有较长的体内消除半衰期和滞留时间，尤其是在肺组织中。研究结果为 DAP 在抗肺部炎症方面的药物研发提供基础数据支持。

【关键词】脱水穿心莲内酯；急性肺损伤；炎症因子；药代动力学

基金资助：中国医学科学院医学与健康科技创新工程（2021-I2M-1-048）

*E-mail: mzyan@implad.ac.cn；**E-mail: qchang@implad.ac.cn

肿瘤微环境敏感的透明质酸化促凋亡肽 KLA 构建及抗肿瘤作用研究

刘增美

山东大学 山东 济南 250100

【摘要】本研究设计并合成了一种新的生物偶联纳米粒 HCTK(HA-Cys-TAT-KLA)，它具有肿瘤靶向性和细胞内药物选择性释放的双重特性。其中，促凋亡肽 KLA 本身不穿透细胞膜，可通过破坏线粒体膜而诱导癌细胞凋亡。TAT 是携带正电荷的细胞穿膜肽(CPPs)，通过将两个短肽连接来改善稳定性及半衰期。同时，将透明质酸(HA)结合到多肽中增强纳米粒的细胞内吞和靶向肿瘤的能力。已经证实，我们的 HCTK 纳米粒可靶向肿瘤细胞，破坏线粒体而诱导癌细胞快速凋亡，具有良好的的肿瘤靶向性，进一步的体外和体内实验表明，HCTK 纳米粒具有较强的抗肿瘤作用，为多肽药物的特异性靶向和细胞内控制释放提供了平台。

PF4 与 VWF 诱导和加速免疫相关血栓的形成

刘志艳[1,2]，牛镜[3]，李龙图[4]，向倩[1,2]，崔一民[1,2,4]

（1. 北京大学第一医院，药学部，北京，中国；2. 北京大学第一医院，临床药理研究所，北京，中国；3. 徐州医科大学，药学院，江苏，中国；4. 北京大学医学部，药学院，北京，中国）

【摘要】目的：肝素诱导性血小板减少（HIT）、自发性 HIT 等常伴严重免疫性血栓形成，其预防和免疫逆转仍是临床诊疗的难点。血小板因子 4（PF4）介导的免疫反应是该类疾病的共同特征，但作用机制尚未完全阐明，本研究旨在探索 PF4 与血管性血友病因子（VWF）在诱导和加速免疫性血栓形成中的潜在作用，进一步加深对免疫性血栓形成机制的理解，为临床检测方法和新药研发新靶点的筛选提供依据。**方法：**课题组通过基因重组技术构建并制备重组 PF4 蛋白，为系统开展 PF4 介导的作用机制研究奠定基础；通过系统综述、表面等离子共振技术、流式细胞术、共聚焦成像、比浊法、血栓弹力图等进行 PF4 与 VWF 相互作用研究、介导血小板激活作用及途径、血栓形成的影响检测，以阐明 PF4 与 VWF 在诱导和加速免疫性血栓形成中的作用机制。**结果：**基于重组 PF4 技术完成了首个国产化 HIT 体外诊断试剂盒的研发，为肝素诱导的 HIT 早期临床诊断提供了简单、快速的诊疗方法。体内外评价发现，PF4-VWF 可刺激单核细胞 CD86 和 CD25 表达、增加血小板活化，在 HIT 患者和小鼠肺栓塞模型中初步证实血浆 PF4-VWF 表达增加。**结论：**当前，PF4-肝素复合物的形成被认为是 HIT 免疫性血栓形成的核心机制。然而，非肝素暴露情况下的自发性 HIT、新冠疫苗引起的血小板减少和血栓形成(VITT)和 COVID-19 重症感染患者中，仍可见高频率的血栓形成、高致病性抗 PF4 抗体产生，提示仍有 PF4 介导的重要免疫反应机制尚未阐明。本研究基于已有研究成果，推测 PF4-VWF 表达水平升高可诱导抗体形成和血小板消耗，是免疫性血栓形成的关键诱因，但需进一步研究证实。

【关键词】血小板因子 4，血管性血友病因子，免疫反应，血栓形成

肝素诱导性血小板减少症临床危险因素分析与4T评分系统预测效能评价

刘志艳[1,2]，孙敏雪[3]，向倩[1,2]，崔一民[1,2,4]

（1. 北京大学第一医院，药学部，北京，中国；2. 北京大学第一医院，临床药理研究所，北京，中国；3. 中国药科大学，药学院，南京，中国；4. 北京大学医学部，药学院，北京，中国. ）

【摘要】目的：肝素诱导性血小板减少症（HIT）是肝素类药物最严重的一种免疫介导的药物不良反应，起病隐匿，易引起严重的动静脉血栓。本研究旨在通过收集分析疑似HIT患者临床基本特征、诊断及血小板变化情况，筛查与HIT发生相关的高危影响因素与4T评分系统预测效能评价，为临床预防和诊断HIT提供参考依据。**方法：**收集自2019年5月至今于北京大学第一医院就诊的疑似HIT或存在血小板减少症状患者。详细记录患者性别、年龄、血型、诊断、既往病史、既往肝素应用史（普通肝素或低分子肝素等）、并记录此次入院使用肝素的剂量、类型、暴露途径、用药疗程等，分析发现可能对HIT患者存在影响的危险因素；入组患者进行4T评分并开展抗PF4/肝素抗体检测。根据抗体检测结果将患者分为两组，其中抗体检测为阳性的患者即为HIT阳性组，同理可得另一组为HIT阴性组。按人次计算HIT检测结果，若同一患者进行两次检测，则记为2人次。研究对象的人口学资料和临床特征使用描述性统计分析方法，对于连续变量以平均±标准差表示，采用Mann-Whitney U检验进行组间比较。分类变量采用计数（频率）表示，并使用$\chi 2$检验或Fisher's精确检测进行分析。**结果：**本研究共收集82名患者信息，经纳入和排除标准筛选后（图1-1），最终共有62名患者（66人次）纳入研究。患者平均年龄为59.5岁，HIT阳性患者平均年龄偏高，为66.1岁；所有患者中男性有38人，占比57.6%，HIT阴性患者中男性患者比例稍高为68.4%。HIT阳性组与阴性组在BMI组存在显著性差异（BMI<24kg/m^2，P=0.03），阳性组患者BMI均值偏高，提示高BMI可能是HIT的独立危险因素。本研究中4T评分阴性预测率仅有80.6%，存在部分患者漏诊可能；也说明4T评分的预测效力有限，亟需开发新的评分体系或快速检测方法与其配合，从而提高对HIT的诊断水平。**结论：**BMI偏高（BMI>24kg/m^2）是发生HIT的可疑危险因素，与HIT的发生具有相关性，但具体相关联程度还有待更大样本量的研究发现。4T评分预测效能不高，临床需结合抗体检测系统进行诊断。

【关键词】肝素诱导性血小板减少症，血小板因子4，危险因素，4T评分

肾透明细胞癌 E2F 家族的生物信息学综合分析

刘治国，杨雪，苏静，刘豪，杨雪健，赵先诚，郁全胜

南京医科大学附属宿迁第一人民医院（宿迁市第一人民医院），江苏 宿迁 223800

【摘要】背景：肾透明细胞癌（ccRCC）起源于肾小管上皮细胞，是最常见的病理性肾细胞癌类型，预后最差。本研究的目的是研究 ccRCC 的表达、预后和机制与 E2F 家族之间的关系。**方法：**本研究利用 TCGA 中 ccRCC 的 RNA 测序和临床数据以及基因表达总表中的两个数据集 GSE36895 和 GSE53757 来确定 E2F 家族在 ccRCC 中的作用。通过 qPCR 对 10 名 ccRCC 患者的肿瘤组织和相应正常组织进行了验证。分析了 E2F 家族在 ccRCC 中的表达、肿瘤分级和分期、预后及调控机制。**结果：**发现 E2F1-4 和 6-8 在 ccRCC 组织中的表达水平高于正常组织，而 E2F5 在前者中的表达低于后者。E2F1-8 的表达水平与肿瘤的分期和分级有关。E2F1-5 和 7-8 的低表达与较长的总生存期、疾病特异性生存期和无进展生存时间显著相关。结果显示，E2F 家族很少有基因突变。E2F1、E2F2、E2F5、E2F7 和 E2F8 的表达与 DNA 甲基化显著相关，E2F1-E2F7 与拷贝数显著相关，E2Fs 的表达与细胞周期显著相关。**结论：**E2F 家族成员在 ccRCC 组织中的表达与 ccRCC 患者的病理状态和生存预后密切相关，但不同家族成员在不同组织样本中存在差异。目前的研究结果表明，E2F 家族基因可能是 ccRCC 分子诊断和靶向治疗的潜在靶点，转录 E2F1-5、7 和 8 是提高 ccRCC 生存率和预后准确性的潜在预后标志物。

【关键词】肾透明细胞癌，E2F 家族，表达，预后，细胞周期

Tenovin-3 抑制肺癌血管新生的作用和机制研究

卢渭金，朱泽凤，黄李梧，吴晓松

暨南大学附属第五医院（深河人民医院）药学部，河源，517000

【摘要】肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一，具有高发病率和高死亡率的特点，严重影响人类的生活质量。肿瘤生长依赖于血管生成，而血管是恶性肿瘤生存的土壤。生长停滞特异性蛋白 6（Gas6）诱导 Axl 受体酪氨酸激酶（Axl receptor tyrosine kinase, Axl）的活化，在血管生成过程中起着至关重要的作用。因此，抑制 Gas6/Axl 通路可能是抗肺癌血管生成的有效策略。Tenovin-3 是 SirT2 的小分子抑制剂，Tenovin-3 能够增加肿瘤细胞中的 p53 表达水平，与肿瘤的发生发展密切相关。迄今为止，tenovin-3 抗肺癌血管生成的作用机制尚未有报道。在本研究中，我们首先通过 MTT 实验确定 tenovin-3 对 HUVECs 的非毒剂量，后续用 tenovin-3 的非毒剂量进行相关的药效学实验；Transwell 实验结果显示 tenovin-3 抑制内皮细胞的迁移和侵袭；另外 tenovin-3 还减少了内皮细胞的管腔形成以及抑制大鼠动脉环出芽；在体内实验中，tenovin-3 显著抑制 A549 移植瘤的血管生成和肿瘤生长；最后，在蛋白印迹实验中，我们发现 tenovin-3 能够显著降低 Axl 磷酸化水平，这提示其抗血管生成作用可能与 Gas6/Axl 通路有关。本研究旨在阐明 tenovin-3 的抗肺癌血管新生的作用与分子机制，为 tenovin-3 发展为抗血管生成药物治疗肺癌提供科学依据。

【关键词】Tenovin-3，血管新生，肺癌，Gas6/Axl 信号通路

Tenovin-3 inhibits angiogenesis of lung cancer

Weijin Lu, Zefeng Zhu, Liwu Huang, Xiaosong Wu*

Department of pharmacy, the Fifth Affiliated Hospital of Jinan University (Shenhe People's Hospital), Heyuan Guangdong 517000, China

【**Abstract**】Lung cancer is one of the most common malignant tumors in the world, with high incidence and high mortality, which seriously affects the quality of human life. Tumor growth depends on angiogenesis, and blood vessels are the soil for the survival of malignant tumors. Growth arrest-specific protein 6 (Gas6) induces the activation of Axl receptor tyrosine kinase (Axl), which plays a vital role in the angiogenic processes. Inhibition of Gas6/Axl pathway could be an effective strategy for lung cancer. Tenovin-3, a small molecule inhibitor of Sirtuin 2 (SirT2), has been reported to show anticancer effects. However, the underlying mechanisms of tenovin-3 in anti-angiogenesis of lung cancer is not clear. Herein, we report that tenovin-3 significantly inhibited the migration, invasion and tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro*. Tenovin-3 also suppressed microvessel sprouting in the aorta ring assay. *In vivo*, tenovin-3 significantly inhibited tumor angiogenesis and tumor growth in A549 xenografts. The anti-angiogenic effect of tenovin-3 may be associated with the inhibition of the Gas6/Axl pathway since its downstream phosphorylation level of Axl. Taken together, the present study reveals a role of tenovin-3 in inhibiting tumor angiogenesis through blocked of Gas6/Axl pathway and suggests that tenovin-3 might serve as a promising antiangiogenic agent for cancer therapy.

【**Keywords**】Tenovin-3, angiogenesis, lung cancer, Gas6/Axl pathway

Introduction

Lung cancer, one of the most common malignant tumors all around the world, has high incidence and high mortality, and seriously affects the quality of human life [1]. In recent decades, the prognosis of lung cancer patients has improved due to

通讯作者：吴晓松，twxs2010@126.com

* Corresponding author: Xiaosong Wu, twxs2010@126.com

advances in risk factor prevention, early screening, targeted therapy and immunotherapy [2]. However, there are both ongoing challenges and opportunities for further progression in the treatment of lung cancer. Therefore, it is urgent to develop effective and prosing strategies for the treatment of lung cancer from new perspectives.

Angiogenesis is essential for solid tumor growth [3]. Tumor vessels are formed by sprouting or interposition from pre-existing vessels. Circulating endothelial precursor cells derived from the bone marrow can also be conducive to tumor angiogenesis [4]. Without blood vessels, tumors cannot develop beyond a critical size or transfer to other organs [5]. Blocking angiogenesis is considered an attractive strategy to arrest tumor growth.

The tumor angiogenesis process is regulated by a variety of proangiogenic factors in the tumor microenvironment [6, 7], such as epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) [8, 9]. Growth arrest-specific protein 6 (Gas6) is a vital proangiogenic factor that mediates the activation of Axl signaling pathway [10]. The Gas6/Axl axis is mainly expressed in endothelial cells (ECs), smooth muscle cells (SMC) and pericytes [11-13]. It has been demonstrated that Gas6/Axl involve in multiple angiogenic processes including endothelial cells proliferation, migration, invasion and aggregation, which makes Gas6/Axl signaling pathway a potential target in angiogenesis and cancer treatment [14-16].

Tenovins are small molecule inhibitors of sirtuins, a member of the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)-dependent family of protein deacetylases [17]. Sirtuin1/2, two important members of the sirtuin family, are associated with tumorigenesis and are highly expressed in many type of solid tumors such as prostate cancer, liver cancer, colorectal cancer, and lung cancer [18, 19]. Studies have reported that tenovins inhibit tumor growth through reducing the activities of sirtuin 1 and sirtuin 2 [20, 21]. Tenovin-3, a selective inhibitor of sirtuin2, can up-regulate the expression of cell-cycle regulator and p53 [22]. However, the anti-angiogenesis effect of tenovin-3 remains poorly understood. In the present study, we reveal that tenovin-3 suppresses angiogenesis in vitro and ex vivo. The results show that tenovin-3 decreases A549 xenograft tumor growth. Western blot assay suggests that tenovin-3 significantly down-regulated the phosphorylation level of Axl, a key protein in Gas6/Axl axis, indicating that tenovin-3 may play a role in inhibiting lung tumor angiogenesis through Gas6/Axl signaling pathway.

Materials and methods

Materials

Tenovin-3 (≥98% pure) was purchased from Aladdin (Shanghai, China), dissolved in DMSO and stored at -20˚C. Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Life Technology (Carlsbad, CA, USA). Endothelial cell medium (ECM) was obtained from ScienCell Research Laboratories (San Diego, CA). Antibodies against Axl, GADPH and a secondary antibody were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). p-Axl^{Y779} antibody and recombinant human Gas6 growth arrest-specific protein 6 (Gas6) were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). Other reagents were obtained from Sigma-Aldrich.

Cell lines and cell culture

The human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the human non-small cell lung cancer cell line A549 were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), and were respectively cultured in ECM and DMEM with 10%FBS. All cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C.

Animals

Adult male Sprague Dawley rats (weighing 200-240 g) were obtained from the Guangdong Medical Experimental Animal Center (Guangzhou, China). BALB/c （nu/nu) were obtained from GemPharmatech Co, Ltd (Nanjing, China). All animal experiments were approved by the Experimental Animal Ethics Committee of the fifth affiliated hospital of Jinan University (Heyuan, China).

Cell viability assay

The effect of tenovin-3 on the viability of HUVECs was assessed by the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. HUVECs ($1x10^4$ cells per well) were seeded in 96-well plates and cultured for 24 h. Then, the cells were treated with different concentrations of tenovin-3. After incubating another 24 h, the cell viability was tested using MTT assay.

Cell migration and invasion assay

The effect of tenovin-3 on cell migration and invasion were evaluated by Transwell assay as previously described [23]. Briefly, $2x10^4$ HUVECs suspended in 100 μl of the serum-free ECM with or without various concentrations of tenovin-3 added to the upper chamber insert, the bottom chamber was filled with 0.6 ml of fresh ECM. After incubation for 24 h, the cells of upper chamber were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. Then the cells were stained with 0.1% crystal violet for 15 min. The non-migrated HUVECs which remained on the inner side of upper chamber were removed gently with a cotton swab. The migrated HUVECs on the bottom of upper chamber surface were photographed by Olympus BX53 microscope. For cell invasion assay, the upper chamber was pre-coated with 30 μl of diluted Matrigel (Matrigel: PBS =3:1) for 1 h at 37˚C, subsequent procedures were consistent with described above.

Tube formation assay

HUVECs ($2.5x10^4$ cells per well) were seeded in Matrigel-coated 96-well plates with or without the presence of various concentrations of tenovin-3. After 8 h incubation, endothelial tubes were observed and photographed under an Olympus inverted microscope.

Aortic ring assay

The dorsal aortas were separated from Sprague-Dawley rats in a sterile environment. Then, the dorsal aortas were cut into rings with 1-2 mm-long. Next, the rinsed aortic rings were put in Matrigel-coated 96-well plates and sealed with 80 μl Matrigel. After incubation for 2 h, fresh ECM was added. The rings were incubated for another 96 h, various concentrations of tenovin-3 were performed for 7 days. The microvessel sprouting of aortic rings were photographed by Olympus inverted microscope.

Tumor xenograft model

A549 cells mixed with diluted Matrigel (Matrigel: PBS =1:1, v/v) were inoculated subcutaneously into the backs of 4- to 6-week-old BABL/c (nu/nu) male mice. When the tumor volume reach to approximately 100 mm^3, Tumor burden mice were randomized into three groups with 8 mice per group. The mice were intravenously injected every two days with saline, tenovin-3 (20 mg/kg or 30 mg/kg) for a total of 10 administrations. Tumor size was measured by vernier caliper and calculated according to following formula: $a \times b^2 \times 0.5$, where “a” represents to the longest diameter and “b” refers to the shortest diameter. After the mice were sacrificed, tumor was removed and weighed. Next, the tumors were fixed with 4% paraformaldehyde for histological and immunohistochemical assay.

Histology and immunohistochemistry

The tumors in each group were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h and then imbedded in paraffin. Tumor tissue sections (about 5 μm thick) were placed on glass slides. For histological assay, the sections were stained with hematoxylins-eosin (H&E). In immunohistochemistry assay, the sections were incubated with anti-Ki67 or anti-CD31. Images were acquired with Olympus microscope.

Western blot analysis

HUVECs were seeded in 6‐well plates for culture 24 h, then treated with various concentrations of tenovin-3 for another 48 h. Proteins were extracted by RIPA lysis buffer in accordance with the manufacturer's protocol. Protein quantification was determined using BCA Protein Assay Kit. Equal concentrations of proteins (50 μg) were subjected to 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)‐polyacrylamide gel electrophoresis. Then, it was transferred to the PVDF membrane. Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. After incubated with second antibodies for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were treated with ECL solution and detected by GE Amersham Imager 600 System.

Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate. The data are presented as the mean ± SEM. GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was applied to analyze the statistical date. Significant differences were assessed with one-way ANOVA followed by Tukey's test. $P<0.05$ indicates statistically significant.

Results

1.Tenovin-3 inhibited the viability of HUVECs.

The cytotoxic effect of tenovin-3 on HUVECs was determined by MTT assay. Our results showed that tenovin-3 had a negligible influence on the viability of HUVECs at a dose range of 0.25 to 1.0 μM (Fig. 1). Therefore, the concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0 μM were considered as non-toxic doses of tenovin-3 in HUVECs, and tenovin-3 at the concentrations (0.25, 0.5 and 1.0 μM) was used for the subsequent antiangiogenic experiments *in vitro* and *ex vivo*.

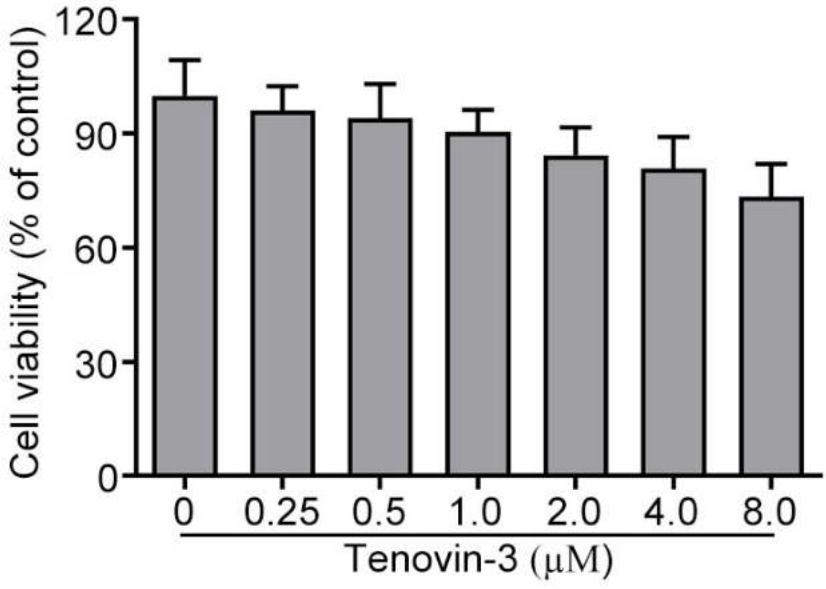


Figure 1 Tenovin-3 inhibits the proliferation of HUVECs in a dose-dependent manner. HUVECs were treated with various concentrations of tenovin-3 for 24 h. Then, cell viability was detected by the MTT assay.

2.Tenovin-3 inhibited the migration and invasion of HUVECs.

The effect of tenovin-3 on the migration and invasion of HUVECs was conducted by the Transwell assay. The results of the migration chamber assay showed that tenovin-3 significantly inhibited the migration of HUVECs in a dose-dependent manner (Fig. 2A). A similar effect of tenovin-3 on the invasion of HUVECs was observed in an invasion chamber assay (Fig. 2B). Taken together, tenovin-3 significantly suppressed the motility of HUVECs.

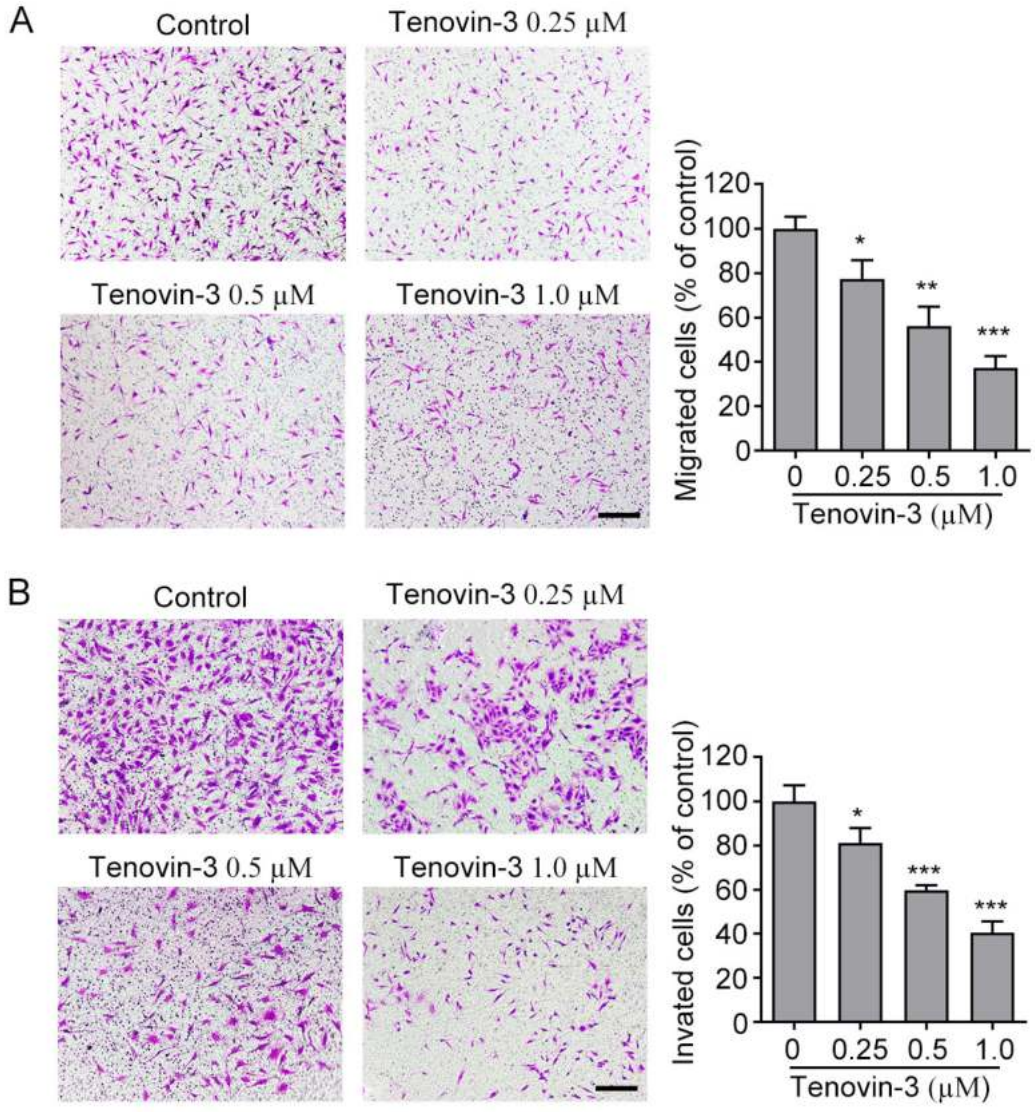


Figure 2 Tenovin-3 inhibits the migration and invasion of HUVECs. (A) Tenovin-3 suppressed the migration of HUVECs in Transwell assay. HUVECs (2×10^4) were suspended in 100 μl serum-free ECM with or without tenovin-3 added to the upper chamber of Transwell and the bottomed chamber were decanted with 600 μl fresh ECM. After culture for 24 h, the cells of upper chamber were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, and the cells were then stained with crystal violet for 15 min. The cells that did not move to the inner side were removed lightly with a cotton swab. The images of migrated cells were acquired by Olympus BX53 microscope and the number of migrated cells were quantified by Image-Pro Plus 6.0. (B) Tenovin-3 significantly inhibited HUVECs invasion. The upper chamber of Transwell was pre-coated with Matrigel and the subsequent procedures were conducted in line with the migration Transwell assay. Scale bar, 200 μm. The data are presented as mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ compared with the control group.

3.Tenovin-3 inhibited endothelial angiogenesis and vessel sprouting *ex vivo.*

The tube formation assay and aortic ring assay were performed to investigate the anti-angiogenic effects of tenovin-3 *ex vivo*. The results of endothelial tube formation suggested that the number of the tube-like structures were significantly decreased after exposure to tenovin-3 at concentrations of 0.25, 0.5 or 1.0 μM (Fig. 3A). In a mouse aortic ring assay, we found that the outgrowth of microvessels were remarkably suppressed by tenovin-3 in a dose-dependent manner (Fig. 3B). These results demonstrated that tenovin-3 effectively inhibited angiogenesis.

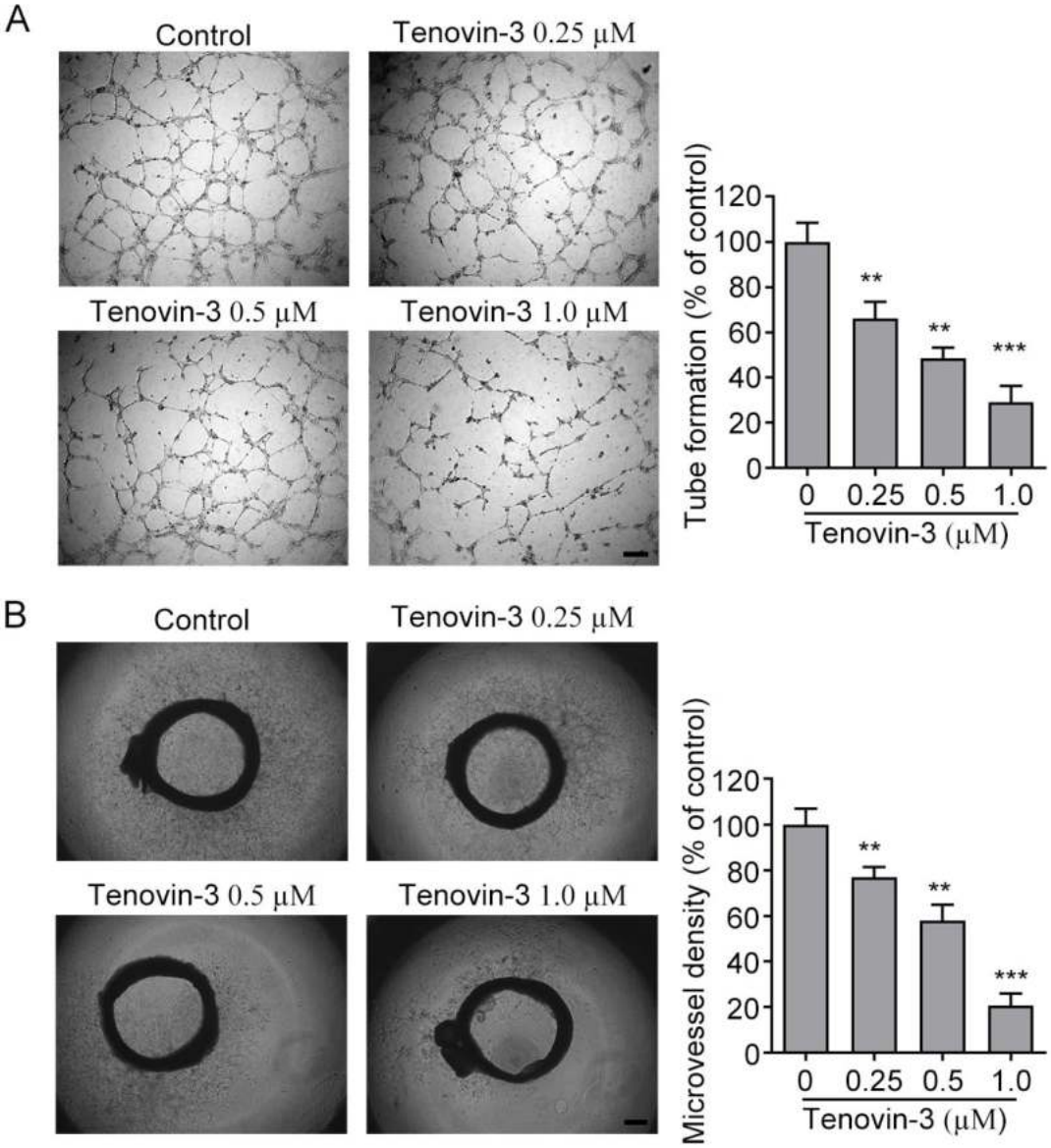


Figure 3 Tenovin-3 suppresses the angiogenic activity of HUVECs and vessel sprouting in rat aorta rings. (A) Tenovin-3 reduced the tube formation of HUVECs. HUVECs (2.5 × 104) treated with indicated concentrations of tenovin-3 were planted in Matrigel-coated 96-well plates. After incubation for 8 h, the capillary-like tubes were observed and photographed by an Olympus inverted microscope. The number of tubes was quantified by Image-Pro Plus 6.0. Scale bar, 100 μm. (B) Tenovin-3 decreased microvessel sprouting in aorta ring assay. The aortic rings of rat were treated with various concentrations of tenovin-3 for 96h, the microvessel outgrowth was viewed and pictured under an Olympus inverted microscope. Scale bar, 100 μM. The data are presented as the mean ± SEM. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ compared with the control group.

4.Tenovin-3 inhibits tumor angiogenesis and tumor growth in A549 xenografts.

To explore the effect of tenovin-3 on angiogenesis and tumor growth *in vivo*, A549 xenograft tumor-bearing mouse models were established. Our results showed that tenovin-3 obviously inhibited the growth of A549 xenograft tumors, and then there were no significant effects on the body weight of mice (Fig. 4A-B). As shown in Fig. 4C, the tumors weight in mice treated with tenovin-3 (20 mg/kg or 40 mg/kg) was significantly lower than that in mice of the vehicle group. H&E staining results suggested that the area of necrosis in tumors was remarkably increased in mice treated with tenovin-3 compared with the vehicle group. In addition, immunohistochemical assay results revealed that tenovin-3 suppressed tumor cell proliferation and obviously reduced microvessel density of CD31 (Fig. 4D). These results indicated that tenovin-3 significantly inhibited tumor angiogenesis and tumor growth *in vivo*.

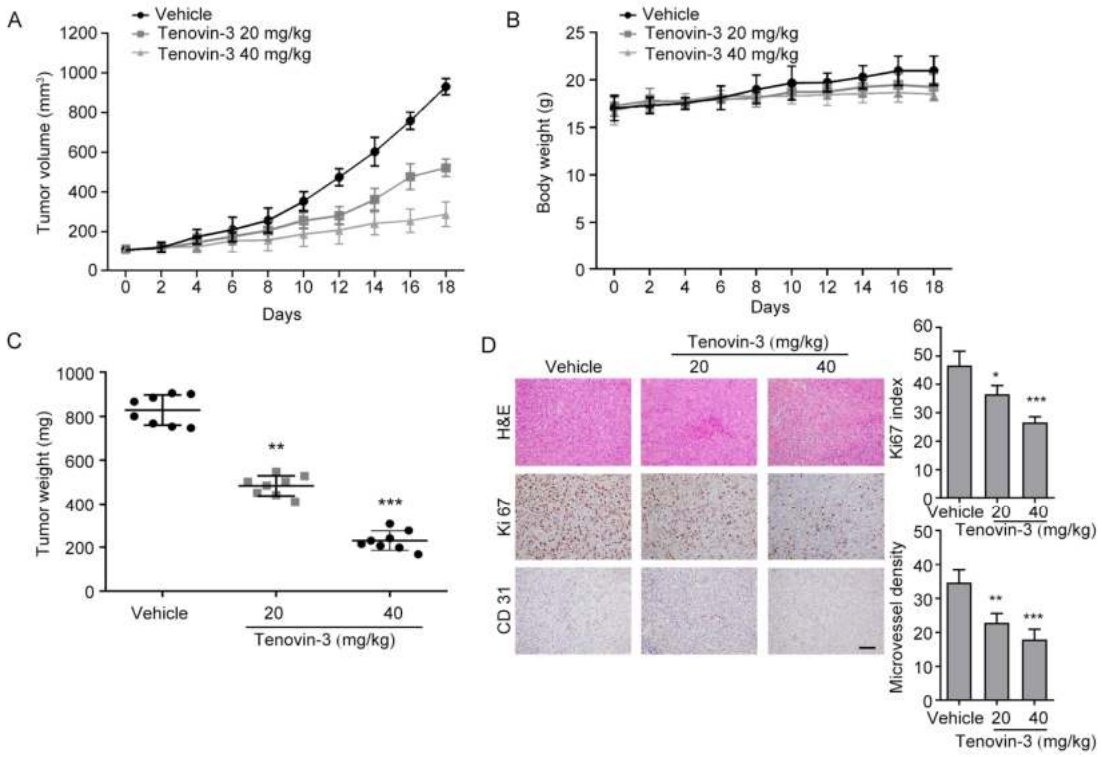


Figure 4 Tenovin-3 inhibits tumor growth and tumor angiogenesis in a A549 xenograft mouse model. A549 cells (1×10^7) were injected subcutaneously into 4- to 6-week-old BABL/c (nu/nu) male mice. When the tumors grew to approximately 100 mm^3, mice were divided into three groups with 8 mice per group. The mice bearing tumor were injected intravenously with saline, tenovin-3 (20mg/kg or 30mg/kg) every two days for a total of 9 injections. (A) Tenovin-3 suppressed A549 xenograft tumor growth, as measured by tumor volume. (B) The body weight curves of tumor-bearing mice were shown. No obvious difference in body weights between the vehicle group and the tenovin-3-treated groups. (C) Tumors were removed from the mice at the end of the experiment, and tumor weight was measured. (D) Histological and immunohistochemical assay of tumor tissues from sacrificed mice. In the histological assay, sections were stained with H&E (the first line). In immunohistochemical assay, sections were incubated with anti-Ki67 and anti-CD31. The Ki67 proliferation index was presented as the percentage of Ki67-positive cells in total cells. The microvessel density (MVD) was assessed by calculating the number of vessels in the fields by Image-Pro Plus 6.0 software. Scale bar, 100 μm. The data are presented as the mean ± SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ compared with the vehicle group.

5.Tenovin-3 play an important role on the expression of Axl.

Accumulative evidence has demonstrated that Gas6/Axl signaling pathway critically regulates the angiogenesis processes [14-16]. For further studies on the mechanisms of tenovin-3 in inhibiting angiogenesis, we preliminarily investigated whether this effect was associated with the Gas6/Axl signaling pathway. Western blot results showed that tenovin-3 significantly down-regulated the phosphorylation level of Axl, indicating that blockade of the Gas6/Axl axis may contribute to tenovin-3-mediated angiogenesis inhibition.

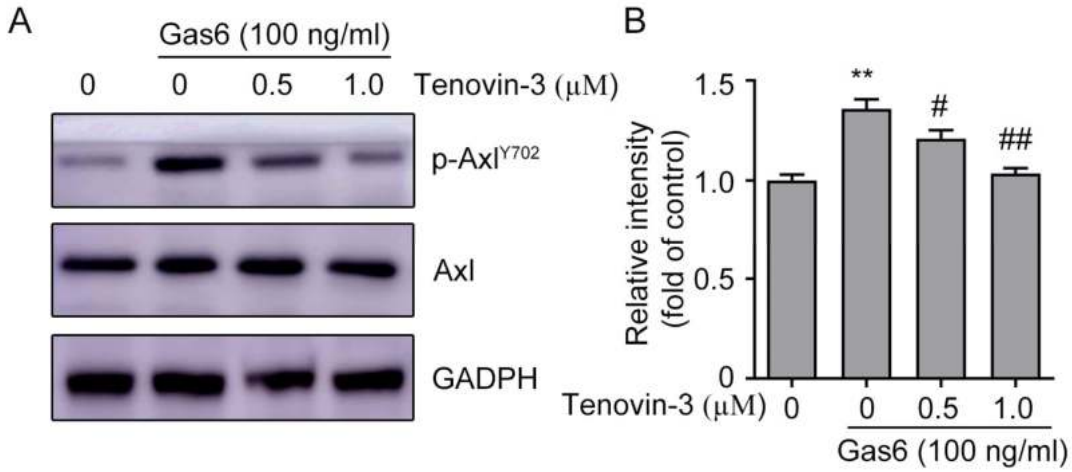


Figure 5 Tenovin-3 suppresses the activation of Gas6/Axl signaling pathway. (A) Tenovin-3 inhibited the Gas6-induced phosphorylation of Axl in HUVECs. The HUVECs were pre-stimulated with Gas6 (100 ng/mL) for 1 h, and were then treated with tenovin-3 for another 24 h. (B) The quantitative analysis of western blotting was exhibited. $^{**}P < 0.01$ compared with the control group; $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#}P < 0.01$compared with the Gas6‐treated group.

Discussion

Tenovins known as inhibitor of sirtuins, contribute to the treatment of cancer [24]. Tenovin‐1 and tenovin‐6 have been demonstrated that can inhibit cell growth in various cancer types, including non-small cell lung cancer, colon cancer and Ewing's sarcoma [25-27]. Tenovin-3, an analogue of tenovin‐1 and tenovin‐6, that the N-acetyl group present modified [26]. Until now, there are little research have reported the role of tenovin-3 on angiogenesis and tumor growth. In the present study, we found that tenovin-3 inhibited angiogenesis *in vitro, ex vivo* and *in vivo*. *In vitro,* tenovin-3 suppressed HUVECs proliferation, migration, invasion and tube formation. In addition, tenovin-3 reduced microvessel sprouting in aorta ring assay. In A549 xenografts, we observed that tenovin-3 inhibited tumor growth and decreased the microvessel density (MVD). Our study provides new evidence for further exploring the potent anti-angiogenesis and anti-tumor effects of tenovin-3 and contributes to an understanding of its molecular mechanism.

Axl is a receptor tyrosine kinase (RTK) belonging to the Tyro3, Axl and MerTK (TAM) subfamily. Axl binds high-affinity ligand Gas6 which is a member of the vitamin K-dependent family of proteins [28]. Gas6/Axl signaling functions as a key pathway driving cancer cell proliferation, migration and invasion, angiogenesis and metastasis [15, 29]. Gas6/Axl is overexpressed not only in neoplastic cells but also in endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells [16]. The paracrine and autocrine loops of Axl and its ligand Gas6 may improve the activity of ECs, promote the survival and migration of ECs and tumor cells through Akt signaling [30]. In addition, Gas6/Axl induces HUVECs growth, migration and tube formation [31]. Whether Axl or Gas6 is knocked down, the tube formation and functional circulation of ECs will impair [32]. Gas6/Axl signaling pathway play a vital role in tumor angiogenesis, which contributes to tumor progression.

Therefore, it is necessary to develop an inhibitor that targets Gas6-induced angiogenesis.

In the current study, we found that tenovin-3 obviously down-regulated the level of phosphorylation Axl. To further understand the mechanism of tenovin-3 in Gas6-induced angiogenesis, there are some experiments need to perform. First, the anti-angiogenic effect of tenovin-3 should be confirmed to be dependent on Gas6/Axl signaling *in vitro* and *ex vivo*. Next, we should conduct a mice xenograft model to investigate the role of tenovin-3 on the expression and activation of Gas6/Axl axis *in vivo*. Last but not least, tenovin-3 whether inhibit the activation of Gas6/Axl downstream pathways, such as Akt, FAK and ERK are supposed to verify.

Currently, anti-angiogenesis is one of the promising therapy strategies for multiple solid cancers. The inhibitors of angiogenesis have been widely applied to therapy cancer in clinic, mainly including small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and monoclonal antibody [33, 34]. TKIs, such as sorafenib, sunitinib, and pazopanib, had been approved for treatment of patients with advanced cancer (hepatocellular cancer, renal cell cancer and gastro-intestinal stromal tumors). There are many other TKIs of anti-angiogenic are going studied on phase I-III clinical trials. In addition to their advantageous anti-tumor activity, toxicities and clinical resistance have also been found with these agents [35]. Bevacizumab and Ramucirumab are the representative monoclonal antibody, have been licensed by the Food and Drug Administration (FDA) in several tumor types, however only in cancer patients appearing metastasis and without curative potential [36, 37]. Moreover, monoclonal antibodies are too expensive for patients in poorer areas to afford. Tenovin-3 is a small molecule inhibitor of sirtuin, which can be obtained by chemical synthesis. Our results demonstrated that tenovin-3 may be developed into a potential angiogenesis inhibitor and inhibited lung cancer growth.

In conclusion, we found that tenovin-3 significantly suppresses A549 xenograft tumor growth that angiogenesis mediated without causing mouse body weight loss. Its antiangiogenic activity may be associated with the inhibition of the Gas6/Axl signal pathways. This study provides evidence for the development of tenovin-3 into an anti-angiogenic agent for the treatment of lung cancer.

Acknowledgements

This work was supported by Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province, China (No. A2022549).

Authors' contributions

Xiaosong Wu supervised the overall project. Weijin Lu and Zefeng Zhu designed the study, performed the experiments, and wrote the manuscript. Liwu Huang contributed to reviewing the study.

Disclosure of conflict of interest

None

References

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA: a cancer journal for clinicians. 2023 Jan;73(1):17-48.

2. Chen P, Liu Y, Wen Y, Zhou C. Non-small cell lung cancer in China. Cancer communications (London, England). 2022 Oct;42(10):937-70.

3. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. The New England journal of medicine. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.

4. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. The Journal of clinical investigation. 2000 Jan;105(1):17-9.
5. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
6. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature. 2011 May 19;473(7347):298-307.
7. Teleanu RI, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu DM. Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment. Journal of clinical medicine. 2019 Dec 29;9(1).
8. Bamias A, Pignata S, Pujade-Lauraine E. Angiogenesis: a promising therapeutic target for ovarian cancer. Critical reviews in oncology/hematology. 2012 Dec;84(3):314-26.
9. Dong R, Yang GD, Luo NA, Qu YQ. HuR: a promising therapeutic target for angiogenesis. Gland surgery. 2014 Aug;3(3):203-6.
10. Kariolis MS, Miao YR, Jones DS, 2nd, Kapur S, Mathews, II, Giaccia AJ, et al. An engineered Axl 'decoy receptor' effectively silences the Gas6-Axl signaling axis. Nature chemical biology. 2014 Nov;10(11):977-83.
11. Avanzi GC, Gallicchio M, Bottarel F, Gammaitoni L, Cavalloni G, Buonfiglio D, et al. GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. Blood. 1998 Apr 1;91(7):2334-40.
12. Collett G, Wood A, Alexander MY, Varnum BC, Boot-Handford RP, Ohanian V, et al. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. Circulation research. 2003 May 30;92(10):1123-9.
13. Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Lu R, Yokoyama S. Involvement of protein kinase D in phosphorylation and increase of DNA binding of activator protein 2 alpha to downregulate ATP-binding cassette transporter A1. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2008 Dec;28(12):2282-7.
14. Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, et al. Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. Oncogene. 2009 Oct 1;28(39):3442-55.
15. Zhu C, Wei Y, Wei X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. Molecular cancer. 2019 Nov 4;18(1):153.
16. Tanaka M, Siemann DW. Gas6/Axl Signaling Pathway in the Tumor Immune Microenvironment. Cancers. 2020 Jul 9;12(7).
17. McCarthy AR, Pirrie L, Hollick JJ, Ronseaux S, Campbell J, Higgins M, et al. Synthesis and biological characterisation of sirtuin inhibitors based on the tenovins. Bioorganic & medicinal chemistry. 2012 Mar 1;20(5):1779-93.
18. Choi G, Lee J, Ji JY, Woo J, Kang NS, Cho SY, et al. Discovery of a potent small molecule SIRT1/2 inhibitor with anticancer effects. International journal of oncology. 2013 Oct;43(4):1205-11.
19. Spiegelman NA, Price IR, Jing H, Wang M, Yang M, Cao J, et al. Direct Comparison of SIRT2 Inhibitors: Potency, Specificity, Activity-Dependent Inhibition, and On-Target Anticancer Activities. ChemMedChem. 2018 Sep 19;13(18):1890-94.
20. Sonnemann J, Marx C, Becker S, Wittig S, Palani CD, Krämer OH, et al. p53-dependent and p53-independent anticancer effects of different histone deacetylase inhibitors. British journal of cancer. 2014 Feb 4;110(3):656-67.
21. Wang Y, Xie Q, Tan H, Liao M, Zhu S, Zheng LL, et al. Targeting cancer epigenetic pathways with small-molecule compounds: Therapeutic efficacy and combination therapies. Pharmacological research. 2021 Nov;173:105702.
22. Lain S, Hollick JJ, Campbell J, Staples OD, Higgins M, Aoubala M, et al. Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. Cancer cell. 2008 May;13(5):454-63.
23. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. Angiogenesis. 2018 Aug;21(3):425-532.
24. Villalba JM, Alcaín FJ. Sirtuin activators and inhibitors. BioFactors (Oxford, England). 2012 Sep-Oct;38(5):349-59.
25. Ueno T, Endo S, Saito R, Hirose M, Hirai S, Suzuki H, et al. The sirtuin inhibitor tenovin-6 upregulates death receptor 5 and enhances cytotoxic effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. Oncology research. 2013;21(3):155-64.
26. Marx C, Marx-Blümel L, Lindig N, Thierbach R, Hoelzer D, Becker S, et al. The sirtuin 1/2 inhibitor tenovin-1 induces a

nonlinear apoptosis-inducing factor-dependent cell death in a p53 null Ewing's sarcoma cell line. Investigational new drugs. 2018 Jun;36(3):396-406.

27. Lee BB, Kim Y, Kim D, Cho EY, Han J, Kim HK, et al. Metformin and tenovin-6 synergistically induces apoptosis through LKB1-independent SIRT1 down-regulation in non-small cell lung cancer cells. Journal of cellular and molecular medicine. 2019 Apr;23(4):2872-89.

28. Tanaka M, Siemann DW. Therapeutic Targeting of the Gas6/Axl Signaling Pathway in Cancer. International journal of molecular sciences. 2021 Sep 15;22(18).

29. Zdżalik-Bielecka D, Poświata A, Kozik K, Jastrzębski K, Schink KO, Brewińska-Olchowik M, et al. The GAS6-AXL signaling pathway triggers actin remodeling that drives membrane ruffling, macropinocytosis, and cancer-cell invasion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2021 Jul 13;118(28).

30. Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. Nature reviews Cancer. 2014 Dec;14(12):769-85.

31. Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2004 Sep;287(3):H1207-13.

32. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. Taking aim at Mer and Axl receptor tyrosine kinases as novel therapeutic targets in solid tumors. Expert opinion on therapeutic targets. 2010 Oct;14(10):1073-90.

33. Lopes-Coelho F, Martins F, Pereira SA, Serpa J. Anti-Angiogenic Therapy: Current Challenges and Future Perspectives. International journal of molecular sciences. 2021 Apr 5;22(7).

34. Liu ZL, Chen HH, Zheng LL, Sun LP, Shi L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. Signal transduction and targeted therapy. 2023 May 11;8(1):198.

35. Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? Angiogenesis. 2010 Mar;13(1):1-14.

36. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. Nature clinical practice Oncology. 2006 Jan;3(1):24-40.

37. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nature reviews Drug discovery. 2007 Apr;6(4):273-86.

磺胺嘧啶锌软膏质量评价

卢玉凤，李洁，李少杰，李茜，梅芊，林红军，刘英*

（河南省药品医疗器械检验院，河南省化学药品质量评价与控制工程技术研究中心，郑州 450018）

【摘要】目的：对磺胺嘧啶锌软膏的质量现状进行综合评价。**方法：**基于质量源于设计（quality by design, QbD）理念，建立 HPLC 法测定磺胺嘧啶锌软膏的含量、有关物质与抑菌剂含量，并开展水活度、抑菌效力、酸碱度、体外释放等相关探索性研究项目。采用法定标准检验与探索性研究相结合，对国家药品抽检的 29 批次样品与调研企业收集的样品进行检验，并对测定结果统计分析与汇总，进而科学公正地评价其质量。**结果：**法定标准检验结果显示，29 批次磺胺嘧啶锌软膏的合格率为 100%。探索性研究提示磺胺嘧啶锌软膏的处方仍有进一步优化的空间，可通过优化处方设计提高释放率和降低黏稠度，并选择合适的抑菌剂种类，增强对真菌的抑菌效力等改善产品疗效。同时，提示原料质量与软膏生产过程控制对软膏质量起着不容忽视的作用。现行标准中鉴别项有待优化，含量测定方法为永停滴定法，受基质干扰，新建专属性更强的 HPLC 法。**结论：**目前磺胺嘧啶锌软膏整体质量一般，软膏和原料质量标准有待提高，建议企业优化处方设计，同时关注原料质量与软膏生产过程控制，从而全面提高产品质量。

【关键词】磺胺嘧啶锌软膏；质量分析；质量源于设计；抑菌剂；包材

【中图分类号】R917，R978.1　　**【文献标志码】**A

Quality evaluation of Sulfadiazine Zinc Ointment

Lu Yu-feng, Li Jie, Li Shao-jie, Li Qian, Mei Qian, Lin Hong-jun and Liu Ying *

（Henan Institute For Drug and Medical Device Inspection, Henan Chemical Quality Evaluation and Control Engineering Technology Research Center, Zhengzhou 450018）

【Abstract】Objective：To evaluate the quality status of sulfadiazine zinc ointment. **Methods：**Based on the concept of quality by design (QbD), HPLC method for determine the content，related substances and bacteriostatic agents of sulfadiazine zinc ointment was established, and exploratory research projects related to water activity, bacteriostatic efficacy, pH, invitro release, etc was carried out . The 29 batches of sulfadiazine zinc oinment from national drug market were sampled by national assessment program and the quality of the 29 batches of samples were analyzed according to the combination of general requirements of national assessment program and exploratory research. The results were summaried, so as to evaluate their quality scientifically and fairly. **Results：**The legal test results showed that the qualified rate was 100%. But exploratory research showed that the prescription of sulfadiazine zinc oinment could be further optimization. The therapeutic effect can be improved by optimizing the prescription design to reduce the viscosity and improve the release rate, selecting the appropriate type of bacteriostatic agent to enhance the antibacterial effect of fungi. At the same time, raw material quality and preparation process control play an important role in preparation quality. The identification items in the current standard need to be optimized. The content determination method is the permanent titration method. Due to matrix interference, a new HPLC method with stronger specificity is established. **Conclusion：**The quality of sulfadiazine zinc oinment at present is generally good. The current statutory standard needs to be improved . It is suggested that enterprises optimize prescription design, pay attention to the quality of raw materials and preparation production process control, so as to comprehensively improve product quality.

【Key words】Sulfadiazine zinc ointment; Quality analysis; Quality by design; Preservatives; Packaging material

---

作者简介：卢玉凤，女，1982 年生，硕士，主管药师，主要从事抗生素药品质量分析与质量控制，E-mail：654202924@qq.com

*通讯作者：刘英，女，中国卫生部-盖茨基金会项目，E-mail：ying_leaf@263.net

磺胺嘧啶锌软膏为局部外用磺胺类抗生素，具有磺胺嘧啶和锌两者的作用，对多数革兰阳性菌、革兰阴性菌和酵母菌等有良好的抗菌作用，并且不为氨基苯甲酸所拮抗，其中锌因能破坏细菌的 DNA 结构，亦具有抑菌作用。同时，本品可补充烧伤患者体内锌损失，增强机体抵抗干扰和创面愈合能力。临床适用于预防及治疗Ⅱ、Ⅲ度烧伤继发创面感染[1-2]。

1975 年，美国 FOX 公司合成磺胺嘧啶锌[3]。1981 年，河南师范大学化学系研发磺胺嘧啶锌原料及软膏[4]。1989 年，磺胺嘧啶锌软膏投产并用于临床[5]。目前，国外无该品种原料与软膏上市，国内共有磺胺嘧啶锌软膏生产企业 3 家，批准文号 3 个，但在产企业仅 1 家。2022 年国家药品抽检从 14 个省（直辖市、自治区）抽取到 29 批次磺胺嘧啶锌软膏，涉及 1 家生产企业，1 个批准文号，全面覆盖在产企业。本文按《中国药典》2015 年版（以下简称 ChP2015）年版[6]或 2020 年版（以下简称 ChP2020）[7]二部磺胺嘧啶锌软膏质量标准进行检验，并结合探索性研究结果对其质量现状进行客观评价，为助力企业全面提高产品质量与完善质量标准提供数据支持。因本品无原研，选择同类型、同疗效的美国辉瑞磺胺嘧啶银乳膏为对照样品。

1 仪器与试药

1.1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)；Dionex Ultimate 3000 双三元液相色谱仪(美国戴安公司)；Thermo QE plus 离子轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司）；ZYT-1 型自动永停滴定仪(上海安亭）；ZHR-2 型锥入度测定仪(天津天大天发）；Aqualab-4TE 型水分活度仪(美国 decagon 公司）；Olympus BX51 光学显微镜(日本 Olympus 公司）；Malvern Mastersizer 2000 激光粒度测定仪和 Hydro 2000MU(A)湿法进样器(英国 Malvern 公司）；TK-12D 型透皮仪(上海锴凯科技）；W3/230 型水蒸气透过率测试系统(济南兰光机电）；OX2/230 型氧气透过率测试系统 (济南兰光机电）；BRUKER MPA 型傅立叶变换近红外光谱仪(德国 BRUKER 公司）；XRD-7000 型 X 射线衍射仪(日本岛津公司）；IRPrestige-21 型傅立叶变换红外分光光度计(日本岛津公司）等仪器。

乙腈为色谱纯，购自美国 Sigma 公司，超纯水由 Millipore 纯水仪制备，其余试剂均为分析纯。

1.2 试药

标准物质：磺胺嘧啶（批号 100026-201404，99.7%）、羟苯甲酯（批号 100278-201906，99.9%）、羟苯乙酯（批号 100847-202105，100.0%）、羟苯丙酯（批号 100444-202005，99.9%）磺胺（批号 100024-201103，99.8%）、磺胺脒（批号 100412-201302，92.0%）均购自中国食品药品检定研究院；对羟基苯甲酸（批号 LRAC5151，100.0%）购自 SIGMA-ALDRICH 公司；N-乙酰磺胺嘧啶（批号 2-JGC-61-2，97%）购自 Toronto Research Chemicals 公司；水活度标准溶液：0.500aw（批号 21161034）、0.760aw（批号 21720818）、0.920aw（批号 21645394）、0.984aw（批号 21643391）、1.000aw（批号 20964482），均购自美国 METER Group 公司。

试验菌种：金黄色葡萄球菌[CMCC(B) 26 003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B) 10 104]、白色念珠菌[CMCC(F)98 001]、黑曲霉[CMCC(F) 98 003]，均购自中国食品药品检定研究院。

样品：2022 年磺胺嘧啶锌软膏国家药品抽检样品（以下简称国抽样品）29 批次，涉及 A 企业。调研收集 A 企业的辅料（空白基质和羟苯乙酯）、1 批次聚乙烯/铝/聚乙烯复合药用软膏管、3 批次磺胺嘧啶锌原料与 3 批次磺胺嘧啶锌软膏。1 批次国外对照样品：磺胺嘧啶银乳膏（批号 EL2544，规格 1%），购自美国辉瑞公司。1 批次近红外建模验证样品：克霉唑乳膏（批号 170901，规格 1%），购自 B 企业。

2 试验方法

2.1 法定标准检验

按 ChP2015 或 ChP2020 二部磺胺嘧啶锌软膏质量标准进行检验，主要项目包括性状、鉴别、粒度、无菌、装量和含量测定。

2.2 探索性研究

根据质量源于设计（quality by design, QbD）的理念[8]，针对本品为多剂量外用无菌软膏的特点，基于药品全生命周期质量控制，围绕产品安全性、有效性、稳定性与质量可控性开展以下探索性研究。

2.2.1 安全性

磺胺嘧啶锌软膏为多剂量无菌外用软膏，开启后易受微生物污染，而微生物生长与水活度密切相关，考察水活度；处方中添加抑菌剂为羟苯乙酯，考察抑菌剂含量的同时，以抑菌效力为指标考察抑菌剂的种类是否合适；外用软膏对皮肤的刺激性与酸碱度相关；本品基质复杂，原料及软膏现行质量标准缺失有关物质，考察有关物质，同时进行杂质谱分析，查清杂质来源及产生原因，分析杂质结构有无遗传毒性警示结构，从源头控制杂质。结合水活度、抑菌剂含量、抑菌效力、酸碱度、有关物质及杂质谱分析测定结果与分析，对处方设计的合理性进行评价。

水活度 采用 Aqualab-4TE 型水分活度仪，测定条件：25℃。样品前测定，首先取水活度的标准溶液 0.500aw、0.760aw、0.920aw、0.984aw、1.000aw 对仪器的准确性进行验证，每个标准溶液的水活度读数均需要在标准值的±0.003aw 范围。然后测定 29 批次国抽样品水活度，每批平行测定 3 次，取平均值。

抑菌剂含量 建立 HPLC 法同时测定羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯 3 种常用尼泊金酯类抑菌剂含量。采用 Kromasil 100-5 C18 色谱柱（5μm，4.6×250mm）；流动相 A 为冰乙酸-水（1∶87），流动相 B 为乙腈，梯度洗脱，见表 1；流速 1.0ml· min^{-1}；柱温 30℃；进样量 20μl；检测波长 260nm。

表 1 抑菌剂流动相梯度洗脱表

Tab.1 The gradient elution table of preservatives' mobile phase

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	88	12
8	88	12
9	40	60
15	40	60
16	88	12
20	88	12

（1）*抑菌效力* 参考 ChP2020 四部通则 1121 抑菌效力检查法[9]，以 2 种细菌：金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌，2 种真菌：白色念珠菌、黑曲霉作为试验菌种，分别设置 2d、7d、14d 和 28d 这 4 个时间点进行试验。选取有代表性的 5 批次国抽样品和对照样品进行抑菌效力研究，并对处方量的抑菌剂羟苯乙酯和羟苯甲酯的抑菌效力进行比较。

（2）*酸碱度* 取样品，采用 pH 计直接测定其 pH 值。

（3）*有关物质* 参考 USP 现行版磺胺嘧啶含量测定色谱条件[10]及相关文献[11]，建立 HPLC 法同时测定磺胺嘧啶锌软膏及原料有关物质。采用 Kromasil 100-5 C18 色谱柱（5μm，4.6×250mm）；流动相 A 为冰乙酸-水（1∶87），流动相 B 为乙腈，梯度洗脱，见表 2；流速 1.0ml·min^{-1}；柱温 35℃；进样量 20μl；检测波长 260nm。

表 2 有关物质流动相梯度洗脱表

Tab.1 The gradient elution table of related substances' mobile phase

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	95	5
10	95	5
22	60	40
30	60	40
35	95	5
40	95	5

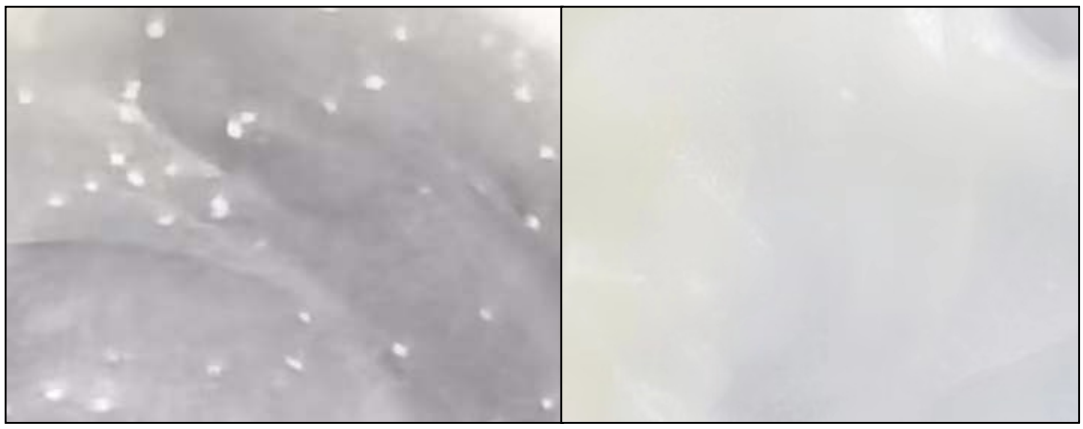
（4）*杂质谱分析* 结合磺胺嘧啶锌原料的合成路线、降解途径、磺胺嘧啶锌软膏的生产工艺对杂质谱进行分析；对比磺胺嘧啶锌软膏、原料、原料的起始物料磺胺嘧啶、辅料羟苯乙酯、及空白基质色谱图，分析杂质

来源；采用双三元二维液相色谱--Q Exactive Plus 高分辨质谱对软膏和原料中检出的杂质进行确证与结构推断。

2.2.2 有效性

磺胺嘧啶锌软膏标准检验发现 29 批次国抽样品中，5 批次有团聚物，为考察团聚物是否影响药效，分析团聚物成分；本品为混悬型软膏，原料的晶型和粒度会影响其在基质内的分布状态和药效发挥，考察原料晶型与粒度分布；根据原料晶型与粒度分布测定结果，结合软膏生产工艺分析团聚物形成原因；同时为考察药物释放程度，进行体外释放试验；软膏的黏稠度影响涂布延展性，间接影响疗效，考察锥入度。

（1）团聚物成分分析 分别取有团聚物的样品与无团聚物样品进行比较，目视团聚物为白色点状物，见图 1 。采用显微镜法、HPLC 法对团聚物成分进行分析。



有团聚物样品　　无团聚物样

图 1 磺胺嘧啶锌软膏样品目视照片

Fig.1 Visual photo of sulfadiazine zinc ointment sample

（2）原料粒度分布 采用显微镜法测定原料粒度，光散射法（激光粒度仪）测定原料粒度分布。

（3）原料晶型 分别采用红外分光光度法（IR）与粉末 X 射线衍射法（PXRD）测定原料红外光谱图与 X 射线衍射图，分析其晶型。

（4）团聚物形成原因 根据原料晶型与粒度分布测定结果，同时模拟软膏生产工艺，考察原料在软膏水相（甘油和水混合）中分散情况，并结合企业调研情况分析团聚物形成原因。

（5）体外释放试验 从 29 批次国抽样品中选取不同剩余有效期，且有代表性的 14 批次样品与 1 批次对照样品，采用 Franz 扩散池法，体外释放试验条件：扩散池为带有标准开帽式毛玻璃样表面的扩散池系统，注入孔直径为 15 mm；人工膜为 MCE 膜（直径 25mm，0.45μm），膜面积 1.77cm^2；接受液介质为 0.1mol·L^{-1} 盐酸溶液；接收液介质温度为 32℃；接收液介质体积为 7ml；搅拌速率为 250rpm。分别在 0.5、1、2、4、5 和 6h 取出全部接收液，采用新建磺胺嘧啶锌软膏含量测定 HPLC 方法测定接收液中磺胺嘧啶含量，并分别换算为磺胺嘧啶锌或磺胺嘧啶银含量，每批样品测定 3 次，取平均值计算不同取样时间药物累积释放量，考察磺胺嘧啶锌软膏批间释放差异，重点关注团聚物是否影响磺胺嘧啶锌释放，比较磺胺嘧啶锌软膏与对照样品释放差异，并分析导致释放差异的因素。

（6）锥入度 采用 ChP2020 年版四部通则 0983 锥入度测定法[12]，取样品适量小心装满样品杯，采用震动法除去可能混入的气泡，在 25℃±0.5℃环境下放置 24h 后，用Ⅲ号椎体进行测定，每批次样品平行测定 3 份，取平均值，并根据计算公式换算为Ⅰ号椎体锥入度推测值。

2.2.3 稳定性

磺胺嘧啶锌软膏为油/水两相的热力学不稳定体系，基于药品全生命周期质量控制，根据 ChP2020 四部 9001 原料药物与软膏稳定性试验指导原则[13]，进行影响因素试验和 3 个月加速试验，考察其稳定性。同时本品有效期 3 年，包材为聚乙烯/铝/聚乙烯复合药用软膏管，处方中水分占比 52%，贮藏期间，水分挥发影响产品稳定性

和质量，考察包材阻隔性。

（1）影响因素试验 取国抽样品与调研收集样品各 1 批次，除去外包装，分别在高温（40℃）、高湿（饱和硝酸钾溶液，相对湿度 92.5%，25℃）与光照（4500lx±500lx）下放置相应天数，考察高温、高湿与强光照射条件对样品的性状、粒度、酸碱度、水活度、有关物质、羟苯乙酯和磺胺嘧啶锌含量等指标的影响。

（2）加速试验 取调研收集样品 1 批次，除去外包装，在温度 30℃、相对湿度 65%条件下放置 3 个月，分别在 0、1、2、3 月 4 个时间点取样，以样品的性状、粒度、酸碱度、水活度有关物质、锥入度、羟苯乙酯和磺胺嘧啶锌含量与含量均匀性为指标，考察样品稳定性，为其处方设计、工艺改进、质量研究、包装改进、运输、贮存提供必要资料。

（3）包材阻隔性 参考国家药包材标准（2015）YBB00252005-2015 聚乙烯/铝/聚乙烯复合药用软膏管[14]，采用 GB/T31355-2014 包装件和容器水蒸气透过性测试方法红外传感器法[15]测定软膏管水蒸气透过率；采用 GB/T31354-2014 包装件和容器氧气透过性测试方法库仑计检测法[16]测定软膏管氧气透过率；采用《中国药典》2020 年版四部通则 4010 水蒸气透过量测定法第一法重量法 2

减重法[17]测定软膏管水蒸气透过量；对调研收集 1 批次包材的阻隔性能进行考察。

2.2.4 质量可控性

从软膏和原料质量标准，以及近红外建模 3 方面进行研究。目前，国外药典均未收载该品种原料和制剂。

（1）软膏质量标准

① 鉴别 现行标准鉴别试验样品前处理产生的沉淀量少，无法按标准规定的沉淀取样量进行化学鉴别试验，通过优化样品前处理方式进行修订。

② 含量测定 现行标准为永停滴定法，因基质易粘附于铂片电极，使电极灵敏度降低，试验中需经常清洗电极。同时空白基质消耗滴定液，干扰测定。参考 USP 现行版磺胺嘧啶含量测定方法[10]和相关文献[18]，建立专属性强的 HPLC 法，并进行方法学验证，色谱条件见“2.2.1（2）”项下。

（2）原料质量标准

① 有关物质 现行标准缺失与安全性相关的有关物质，建立专属性强、灵敏度高的 HPLC 法，色谱条件见“2.2.1（5）”项下。测定调研收集 3 批次原料有关物质，有效控制杂质量。

② 锌含量 现行标准缺失与有效性相关的锌含量测定，磺胺嘧啶锌中锌作为主药的组成部分，对药物的疗效起着至关重要的作用，烧伤患者体内会大量丧失锌，磺胺嘧啶锌可补偿锌损失[19]，从而增强机体抵抗感染能力，使其具有控制感染与促进愈合的双重功能。参照《中国药典》2000 年版（ChP2000）二部磺胺嘧啶锌含量测定“锌”项下方法[20]，建立络合滴定法测定原料中锌含量，该法与上述 ChP2000 中测定方法一致，但滴定度不同，该法滴定度为每 1ml 乙二胺四醋酸二钠定液（0.05mol/L）相当于 3.27mg 的 Zn，计算锌含量。

（3）近红外建模 采用 MPA 型傅立叶变换近红外光谱仪，积分球模式，将样品置入近红外专用 22mm 玻璃管采集 NIR 光谱。

① 近红外一致性检验模型 采集 29 批次国抽样品和 3 批次调研收集样品共 192 张原始光谱，采用一阶导数+矢量归一化进行预处理，平滑点：13 个，谱段为 9087.6～7760.7 cm^{-1}、6356.7～4165.8 cm^{-1}。参考光谱数量不少于 20 张，CI（一致性指数）限度设置为 5，建立一致性检验模型。同时采集 1 批次调研收集样品、1 批次对照样品和 1 批次克霉唑乳膏对所建一致性检验模型进行验证。

⑤ 近红外定量模型 取全部 29 批次国抽样品建立定量模型，使用 OPUS 软件进行自动优化并结合手动修改得到谱段范围及预处理方法。再用所建模型对 29 批次国抽样品进行测定，对预测结果与所建 HPLC 法样品含量测定结果进行比较，并采用交叉验证方法来判断模型的准确度和稳健性，计算得到 R^2、RMSECV、最小偏差和最大偏差。

3 结果与讨论

3.1 法定标准检验

按法定标准检验，29 批次国家药品抽检样品均符合规定，合格率 100%。对与产品质量密切相关的主要检验项目如粒度、装量和含量测定结果进行统计分析。

3.1.1 粒度 29 批次国抽样品粒度测定结果为均小于 180μm。

3.1.2 装量 29 批次国抽样品装量批内 5 支 RSD 为 0.25%～4.64%，其中标示装量为 15g 与 20g 的样品各有 2 批次装量批内 5 支 RSD 大于 3.0%，表明 A 企业需关注样品灌装工艺稳定性，见图 1。

3.1.3 含量测定 29 批次国抽样品含量结果为 4.98%～5.39%，均值为 5.26%，（标准规定：含量应为 4.50%～5.50%），均无低限投料情况，含量测定箱式图表明从 2020 年至 2022 年，样品含量有逐年提高的趋势，见图 2。

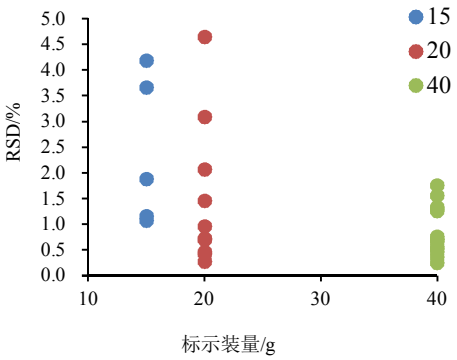


图 2 磺胺嘧啶锌软膏装量批内 RSD 分布图

Fig.2 RSD of Weight deviation of sulfadiazine zinc ointment

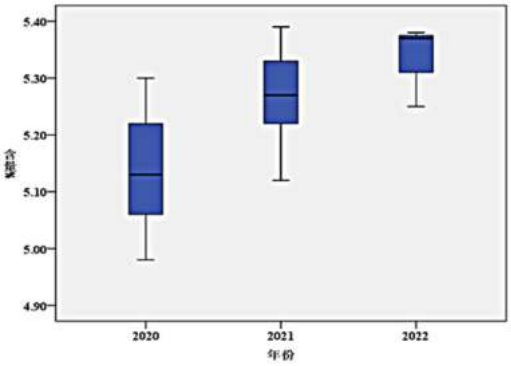


图 3 磺胺嘧啶锌软膏含量测定箱式图

Fig.3 Boxplots of assay of sulfadiazine zinc ointment

3.2 探索性研究

3.2.1 安全性

（1）水活度 采用“2.2.1（1）”方法测定 29 批次国抽样品水活度，测定结果为 0.9581～0.9632，平均值为 0.961，RSD 为 0.2%，表明磺胺嘧啶锌软膏水活度适宜大部分微生物生长，需加合适的抑菌剂阻止自身及环境微生物的生长繁殖。

（2）抑菌剂含量 采用“2.2.1（2）”方法测定 29 批次国抽样品和 3 批次调研收集样品中抑菌剂含量。新建 HPLC 方法经方法学验证可准确测定软膏中抑菌剂含量，测定结果为：32 批次均未检出羟苯甲酯和羟苯丙酯，表明 A 企业未添加处方外的抑菌剂羟苯甲酯和羟苯丙酯；32 批次羟苯乙酯含量为 95.4%~131.8%，平均值为 102.9%，RSD 为 11.3%，频数分布图显示其含量呈左偏分布，表明其含量多数小于 100%，见图 4；29 批次国抽样品羟苯乙酯含量箱式图显示有 5 批羟苯乙酯含量在 124～131%之间，超过拟定限度 80%~120%上限，合格率为 82.8%，提示 A 企业应关注羟苯乙酯投料量准确性，见图 5；由 SPSS 25.0 软件进行相关性分析，Sig.双尾为 0.266>0.05，表明羟苯乙酯含量与样品剩余有效期不相关，表明贮存期间羟苯乙酯较稳定，不易降解；参考欧盟委员会第 1004/2014 号委员会条例[21]化妆品中羟苯酯类抑菌剂单酯限量为 0.4%，建议 A 企业关注羟苯乙酯添加量的合理性。

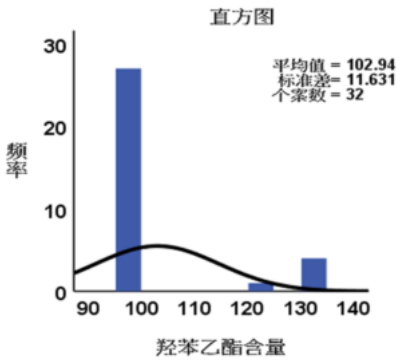


图 4 羟苯乙酯含量频数分布图

Fig.4 Frequent distribution of hydroxyphenyl ester content

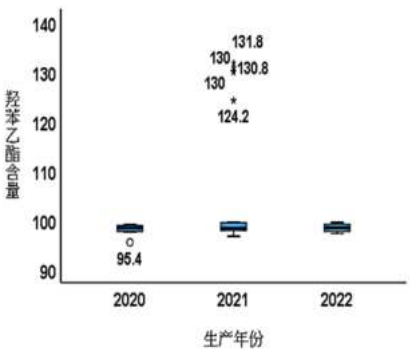


图 5 羟苯乙酯含量箱式图

Fig.5 Boxplots of hydroxyphenyl ester content

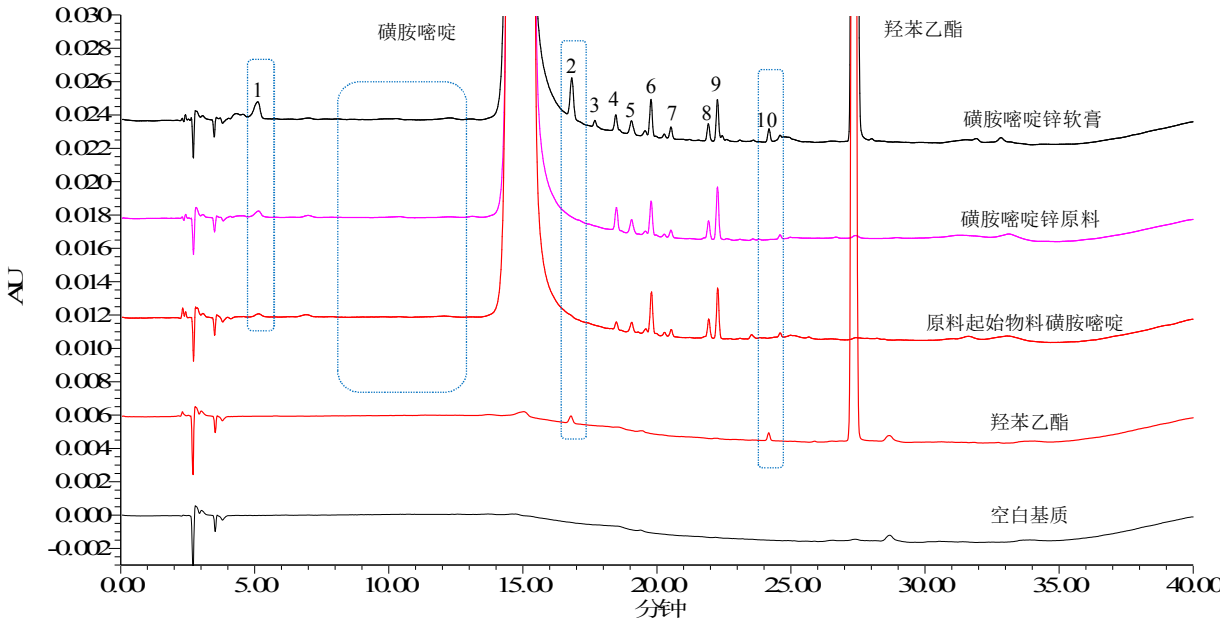
（3）抑菌效力 采用“2.2.1（3）”方法测定有代表性的 5 批次国抽样品和 1 批次对照样品抑菌效力。结果参照 ChP2020 四部通则 1121 抑菌效力检查法[9]，5 批次国抽样品抑菌效力对细菌达到 A 级标准，对真菌未达到 B 级标准，所用抑菌剂 0.5%羟苯乙酯的抑菌效力对细菌仅达到 B 级标准，对真菌未达到 B 级标准，表明羟苯乙酯未与磺胺嘧啶锌起到协同抑制作用。然而对照样品对细菌和真菌抑菌效力均达到 A 级标准，其所用抑菌剂为 0.3%羟苯甲酯，按磺胺嘧啶锌软膏处方和生产工艺，取磺胺嘧啶锌原料、空白基质与 0.3%羟苯甲酯制成混合物，其抑菌效力对细菌达到 A 级标准，对真菌达到 B 级标准。提示 A 企业应关注抑菌剂种类，并根据 ChP2020 四部通则 1121，软膏中抑菌剂的量应为最低有效量的原则，对抑菌效力做进一步研究，选择对真菌抑菌效力强的抑菌剂。

（4）酸碱度 采用“2.2.1（4）”方法测定 29 批次国抽样品和 3 批次调研收集样品 pH 值，结果为 32 批次样品 pH 值为 6.5~6.9，均值 6.7，RSD 为 1.5%，酸碱度接近中性，对皮肤刺激性较小，表明磺胺嘧啶锌软膏酸碱度适宜；同时此中性条件下，处方中的抑菌剂羟苯乙酯不易降解，有利于样品贮藏期间羟苯乙酯稳定；参考 USP 现行版磺胺嘧啶银乳膏[22]，拟定磺胺嘧啶锌软膏 pH 值限度为 4.0～7.0，29 批次国抽样品 pH 值均在拟定限度范围内，合格率 100.0%。

（5）有关物质 采用“2.2.1（5）”方法测定 29 批次国抽样品、3 批次调研收集样品及 3 批次原料有关物质。结果磺胺嘧啶锌软膏共检出 10 个杂质，单杂%小于 0.08%，总杂%小于 0.3%；原料检出 7 个杂质，单杂%小于 0.04%，总杂%小于 0.2%；磺胺嘧啶锌软膏和原料中杂质含量均较低。

（6）杂质谱分析

① 杂质来源分析 通过对比磺胺嘧啶锌软膏、原料、原料起始物料磺胺嘧啶、辅料羟苯乙酯、空白基质色谱图，见图 6，分析磺胺嘧啶锌软膏中检出的 10 个杂质来源，其中 7 个杂质，即杂质 1、杂质 4～杂质 9 与磺胺嘧啶锌原料及原料起始物料磺胺嘧啶杂质种类相同；2 个杂质，即杂质 2 和杂质 10 与辅料羟苯乙酯杂质种类相同。



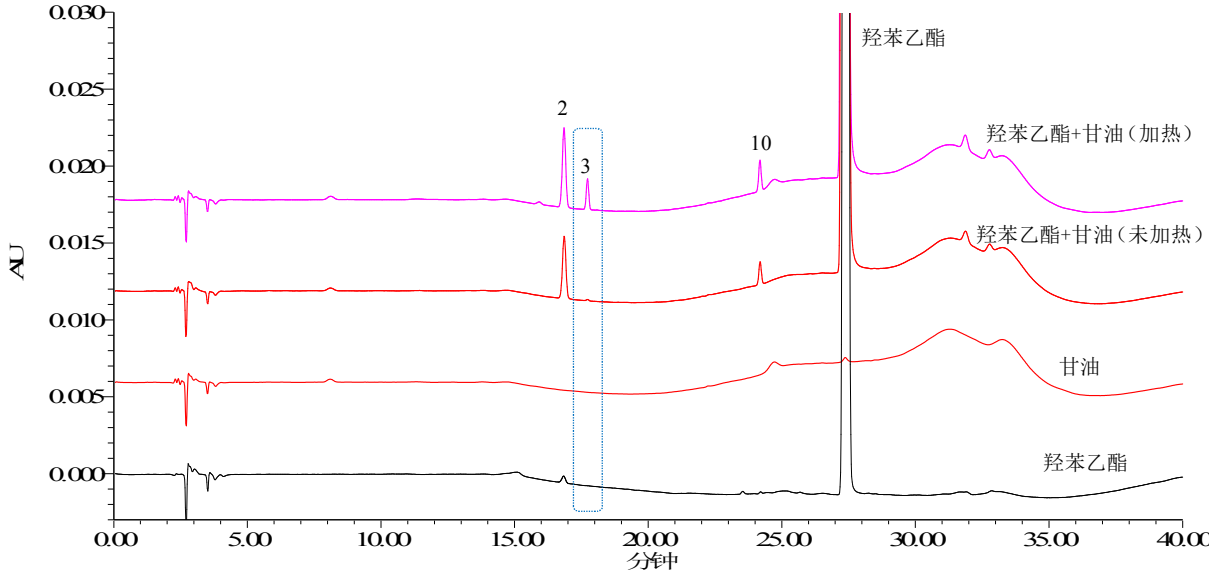
注：1-杂质 1；2-杂质 2；3-杂质 3；4-杂质 4；5-杂质 5；6-杂质 6；7-杂质 7；8-杂质 8；9-杂质 9；10-杂质 10

图 6 磺胺嘧啶锌软膏、原料、起始物料、羟苯乙酯与空白基质色谱图比较

Fig.6 Comparison of chromatographic of sulfadiazine zinc ointment, raw materials, starting materials, hydroxyphenyl ester and blank matrix

取处方量的羟苯乙酯与甘油充分混匀后按软膏生产工艺加热，比较辅料羟苯乙酯、甘油、羟苯乙酯和甘油

混合溶液加热前与加热后色谱图，见图 7 ，结果羟苯乙酯与甘油混合后经加热产生杂质 3，同时杂质 2 和杂质 10 加热后峰面积较加热前略有增大。



注：2-杂质 2；3-杂质 3；10-杂质 10

图 7 羟苯乙酯、甘油、羟苯乙酯和甘油混合溶液加热前与加热后色谱图比较

Fig.7 Comparison of chromatograms of hydroxyphenylate, glycerol, mixed solutions of hydroxyphenylate and glycerol before and after heating

通过对比色谱图，分析杂质来源，并对杂质进行归属，见表 3，软膏中 7 个杂质来源于原料，有必要严格控制原料中杂质；总杂含量软膏比原料高 0.1%，分析为软膏比原料多检出杂质 2、杂质 3 和杂质 10，表明在软膏生产过程中产生此 3 个杂质，有必要加强软膏生产过程控制，减少杂质产生。

表 3 杂质来源分析

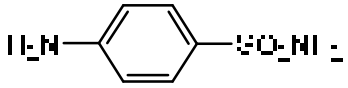
Tab.3 Impurity source analysis of Sulfadiazine Zinc Ointment

杂质名称	来源	归属
杂质 1	原料	工艺杂质
杂质 2	羟苯乙酯	工艺杂质、降解杂质
杂质 3	羟苯乙酯与甘油灭菌	降解杂质
杂质 4	原料	工艺杂质
杂质 5	原料	工艺杂质
杂质 6	原料	工艺杂质
杂质 7	原料	工艺杂质
杂质 8	原料	工艺杂质
杂质 9	原料	工艺杂质
杂质 10	羟苯乙酯	工艺杂质、降解杂质

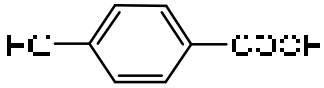
② 杂质确证与结构推断 查阅文献资料 [23-25]，并结合磺胺嘧啶锌原料的合成路线、降解途径、磺胺嘧啶锌软膏的软膏生产工艺及杂质来源分析；采用双三元二维液相色谱--Q Exactive Plus 高分辨质谱对检出的 10 个杂

质进行确证与结构推断，确证杂质 1 为磺胺，杂质 2 为对羟基苯甲酸，杂质 4 为 N-乙酰磺胺嘧啶；推断杂质 3 为羟苯乙酯和甘油混合加热后反应产生的对羟基苯甲酸单甘油酯，同时推断杂质 5～杂质 10 结构，结构式见图 8，经查阅相关文献 [26-28]，与常见的遗传毒性警示结构进行比较，本品中检出 10 种杂质均不含遗传毒性警示结构。

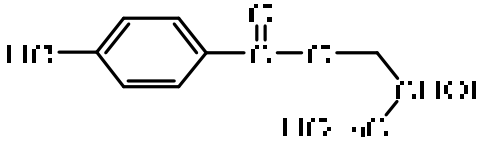
杂质 1（磺胺）



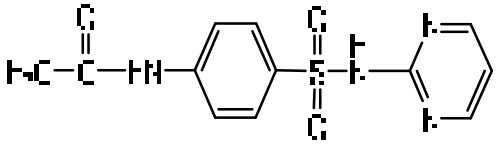
杂质 2（对羟基苯甲酸）



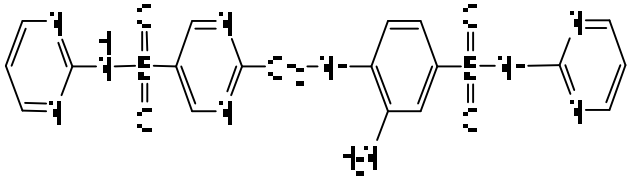
杂质 3（对羟基苯甲酸单甘油酯）



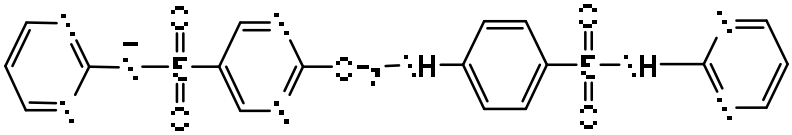
杂质 4（N-乙酰磺胺嘧啶）



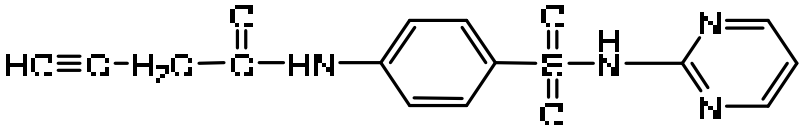
杂质 5



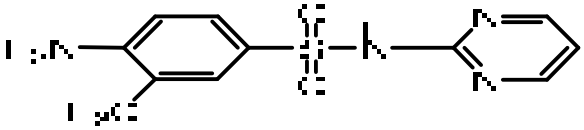
杂质 6



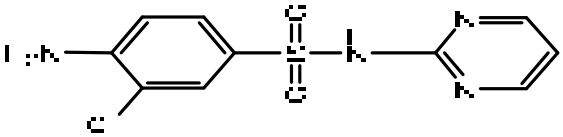
杂质 7



杂质 8



杂质 9



杂质 10

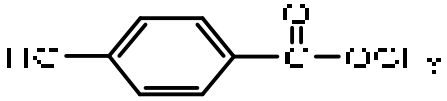
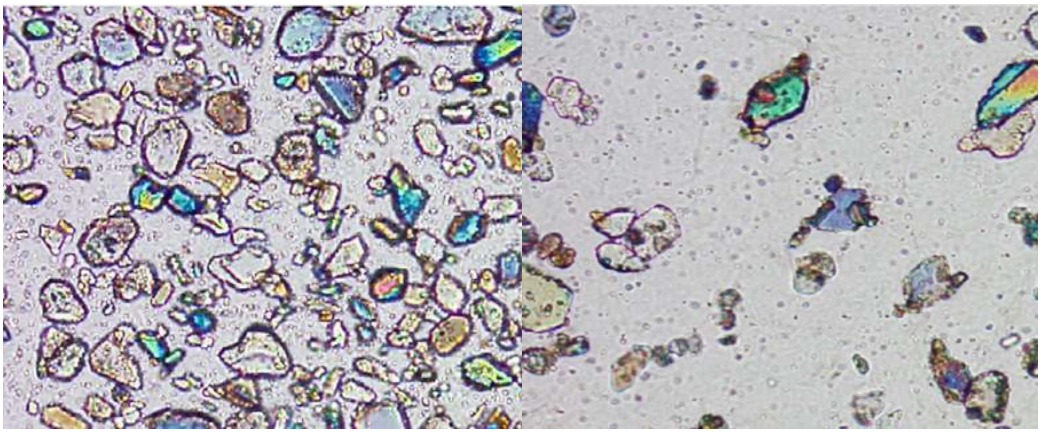


图 8 杂质结构式图

Fig.8 The Impurity structure formula of Sulfadiazine Zinc Ointment

3.2.2 有效性

（1）*团聚物成分分析* 分别挑取同1批次国抽样品中团聚物和无团聚物部分涂布于载玻片上，覆以盖玻片，立即在400倍显微镜下检视，见图9。结果团聚物中布满磺胺嘧啶锌晶体，结合企业调研情况，初步认为团聚物为磺胺嘧啶锌。另采用新建的软膏含量测定 HPLC 方法，分别取相同称样量的团聚物和无团聚物制备成溶液，比较两种溶液色谱图中磺胺嘧啶峰面积，结果团聚物中磺胺嘧啶峰面积大于无团聚物部分，进一步证明团聚物为磺胺嘧啶锌。

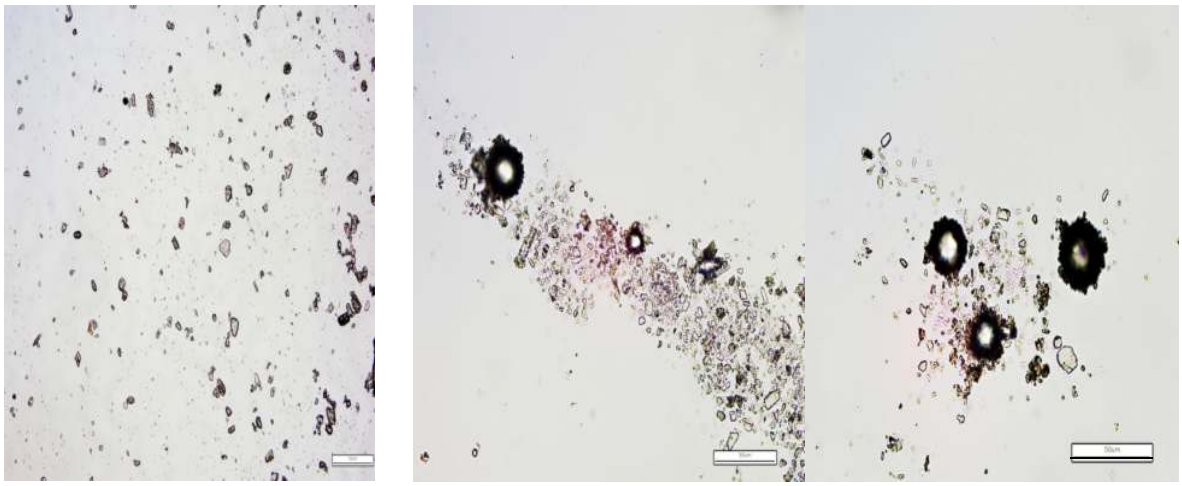


团聚物　　无团聚物

图 9 磺胺嘧啶锌软膏显微镜视野图（偏光）

Fig.9 The Microscope view (polarized light) of Sulfadiazine Zinc Ointment

（2）*原料粒度分布* 采用光散射法测定原料粒度分布，激光粒度仪测定 3 批次调研收集原料，d（0.9）为28μm～37μm，利于药物吸收；D[3,2]1 批为11μm，2 批为7μm，表明原料批次间粒径有差异。采用显微镜法观察该3批次原料粒度，结果3批次中，1批次粒径大的原料粒子分布均匀，2批次粒径小的原料粒子有团聚现象，见图10，提示企业关注原料粒径。



1 批原料易分散　　2 批原料易聚集

图 10 磺胺嘧啶锌原料显微镜视野图

Fig.10 The Microscope view of Sulfadiazine Zinc

（3）原料晶型 采用红外光谱法测定 3 批次调研收集原料红外光谱图均与磺胺嘧啶锌对照图谱（光谱集 573 图）[29]一致，表明为同一晶型。采用粉末 X 射线衍射（PXRD）法测定该 3 批次原料，结果原料衍射峰均为锐峰，表明为结晶型粉末；衍射峰数量和位置均一致，表明为同一晶型。但 3 批次原料衍射峰强度有差异，其中 1 批次粒径大的原料衍射峰强度高，2 批次粒径小的原料衍射峰强度低，表明原料批次间有差异。

（4）团聚物形成原因 根据原料粒度分布与晶型测定结果，结合企业调研和软膏生产工艺，分析软膏中团聚物形成原因为粒径小的原料投入水相溶解罐后不易分散，打入乳化罐又未充分搅匀，被基质包裹形成团聚物。提示企业关注原料粒径和软膏生产过程控制。目前，企业已通过改善软膏生产过程控制，避免软膏中团聚现象发生。

（5）体外释放试验 采用“2.2.2（5）”中方法对有代表性的 14 批次国抽样品和 1 批次对照样品进行体外释放试验，并以取样时间为横坐标，单位面积药物累积释放百分率为纵坐标绘制释放曲线，见图 11，结果为 6h 累积释放百分率：有团聚物 5 批次为 2.26%/cm^2～3.34%/cm^2，无团聚物 9 批次为 3.62%/cm^2～5.62%/cm^2，表明团聚物对药物释放有影响，提示企业关注软膏生产过程控制。对照样品 6h 累积释放百分率为 14.17%/cm^2，高于磺胺嘧啶锌软膏，提示企业优化处方设计，提高释放率，改善有效性。

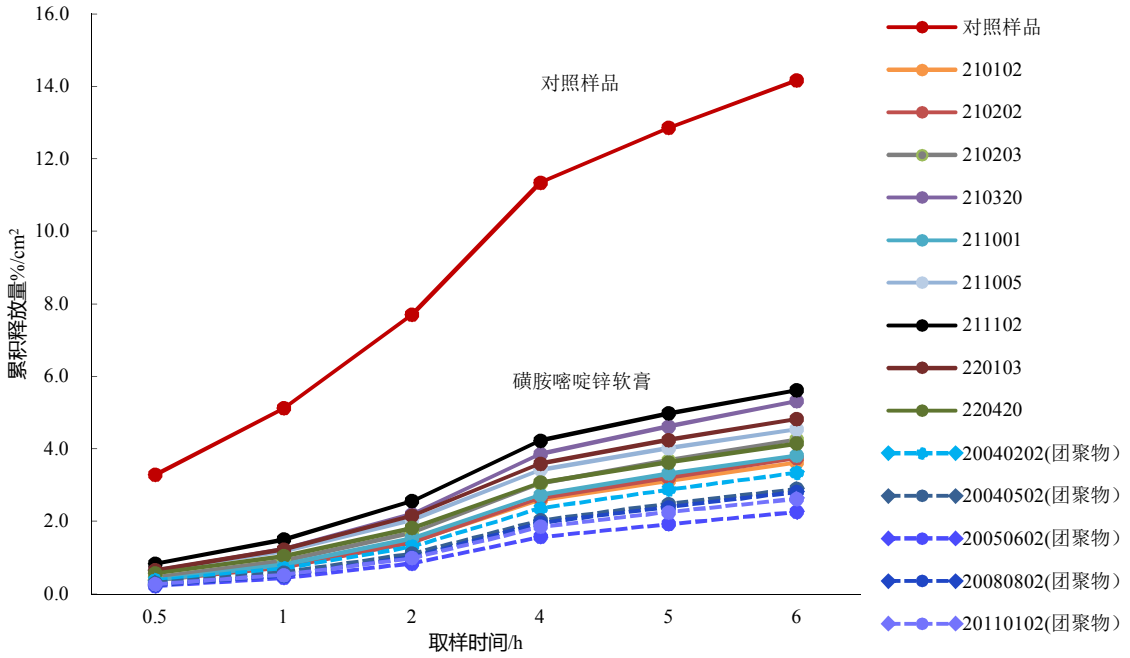


图 11 体外释放曲线

Fig.11 the releasing curve

（6）锥入度 采用“2.2.2（6）”中方法测定 29 批次国抽样品、3 批次调研收集样品及 1 批次对照样品锥入度，结果 32 批次样品锥入度值为 178~212，对照样品为 351，表明磺胺嘧啶锌软膏黏稠度高于对照样品，涂布延展性较差，提示企业优化处方设计，降低产品黏稠度。

3.2.3 稳定性

（1）影响因素试验 在高温、高湿及强光照射条件下，软膏的性状无变化，未发现油水分离现象，其粒度、酸碱度、水活度、有关物质、羟苯乙酯和磺胺嘧啶锌含量均无显著变化。

（2）加速试验 在温度 30℃、相对湿度 65%条件下放置 3 个月，软膏的性状无变化，未发现油水分离现象，其粒度、酸碱度、水活度、有关物质、均匀性、羟苯乙酯和磺胺嘧啶锌含量、锥入度等均无显著变化。

上述影响因素和 3 个月加速试验结果均表明磺胺嘧啶锌软膏稳定，在阴凉（20℃以下）贮藏条件下可以保证药品有效期内质量稳定。

（3）包材阻隔性　国标方法测定软膏管水蒸气透过率为 0.00011g/d，氧气透过率为 0.013cm^3/d，推算磺胺嘧啶锌软膏 3 年有效期内水蒸气透过量为 0.12g；药典方法测定软膏管水蒸气透过量为 0.006%；表明 A 企业所使用的包材（聚乙烯/铝/聚乙烯复合药用软膏管）阻隔性能良好，可防止有效期内样品水分挥发，以保证药品质量稳定。

3.2.4 质量可控性

（1）磺胺嘧啶锌软膏质量标准

① 鉴别 现行软膏质量标准鉴别试验，样品前处理方法为加入稀盐酸 200ml 使磺胺嘧啶锌溶解，磺胺嘧啶锌浓度约为 2.5mg/ml，再取 15ml（相当于磺胺嘧啶锌 37.5mg）进行后续处理生成磺胺嘧啶沉淀，理论上沉淀物量为 33mg，无法按标准规定的沉淀取样量 0.05g 和 0.1g 进行化学鉴别反应，探索性研究发现将稀盐酸加入量减至 20ml，沉淀量显著增加，可满足化学鉴别反应沉淀取样量，现行质量标准鉴别项需修订。

② 含量测定 采用“2.2.4（1）”软膏含量测定中新建 HPLC 法，经方法学验证，方法学各项指标均符合要求，可准确测定磺胺嘧啶锌软膏及原料中磺胺嘧啶锌含量。HPLC 法测定 29 批次国抽样品、3 批次调研收集样品含量为 4.88%~5.24%（按标示量计算为 97.6%~104.8%），现行软膏质量标准为永停滴定法，32 批次样品含量为 4.98%~5.39%（按标示量计算为 99.6%~107.8%）。对 2 种方法含量测定结果进行比较，永停滴定法由于基质消耗滴定液，比 HPLC 法平均偏高 3%（按标示量计算）。采用 SPSS 25.0 软件对 2 种方法含量测定结果进行配对样本 t 检验，Sig.双尾为 0.000<0.05，表明 HPLC 法与永停滴定法含量测定结果有显著性差异。经企业调研，A 企业按 100%投料，新建 HPLC 法,低中高三个浓度水平的平均回收率为 99.94%，其含量测定结果更接近实际投料量，更能准确反应磺胺嘧啶锌软膏真实含量，现行质量标准方法需修订。

（2）磺胺嘧啶锌质量标准

① 有关物质 采用“2.2.4（2）”原料有关物质中新建 HPLC 法测定 3 批次调研收集原料有关物质，结果原料检出杂质 7 个，单杂%小于 0.04%，总杂%小于 0.2%，杂质含量较低。

② 锌含量 采用“2.2.4（2）　”锌含量中方法，经方法学验证，该方法准确度高，专属性强，可有效控制锌含量，结果测定 3 批次调研收集原料中锌含量为 11.3%～11.8%。根据测定结果及磺胺嘧啶锌分子式（$C_{20}H_{18}N_8O_4S_2Zn•2H_2O$），分子量为 599.94，Zn 分子量为 65.38，按磺胺嘧啶锌无水物计算，Zn 占比为 11.59%，拟定限度为 11.0%~12.2%（相当于理论量的 95%~105%）。3 批次原料锌含量均在拟定限度范围内，表明原料合成时锌完全与磺胺嘧啶结合。

③ 含量测定 采用原料现行质量标准永停滴定法与新建软膏含量 HPLC 法同时测定 3 批次调研收集原料含量，结果 2 种方法测定 3 批次原料含量结果基本一致。采用 SPSS25.0 软件对 2 种方法含量测定结果进行配对样本 t 检验，Sig.双尾为 0.35>0.05，表明 2 种方法含量测定结果无显著性差异。分析现行质量标准永停滴定法因不受基质影响，方法专属性好，滴定终点明显，准确度高，无需修订。

（3）近红外建模

① 近红外一致性检验模型 采用“2.2.4（3）”中近红外一致性检验模型方法，结果验证用 1 批次调研收集磺胺嘧啶锌软膏的 6 张光谱的 CI 值在 5 以内，表明为同一品种；1 批次对照样品的 3 张光谱的 CI 值在 45～50 之间，表明为不同品种；1 批次克霉唑乳膏的 3 张光谱的 CI 值在 55～60 之间，远大于 5，亦表明为不同品种。以上验证结果均表明所建近红外一致性检验模型可有效区分磺胺嘧啶锌软膏和非磺胺嘧啶锌软膏。

② 近红外定量模型 采用“2.2.4（3）”中近红外定量模型方法，经交叉验证计算得到 R^2 为 81.09，RMSECV 为 0.05，所建立近红外定量模型预测结果与 HPLC 含量测定结果接近，最小偏差为 0.0007，最大偏差为 0.12，可用于本品生产过程质量控制。

（4）剂型名称

根据磺胺嘧啶锌软膏处方，基质为 O/W 乳剂型基质，乳化剂为聚山梨酯 80；其生产工艺为水相、油相分别经加热灭菌后再混合乳化、灌封制得，按照中国药典 2020 年版四部通则 0109 软膏剂与乳膏剂表述，建议剂型名称修订为乳膏剂。

（5）说明书问题

磺胺嘧啶锌软膏说明书“包装”表述为“铝塑复合管”，实际为“聚乙烯/铝/聚乙烯复合药用软膏管”，包装材质不符合国家食品药品监督管理局第 24 号令《药品说明书和标签管理规定》[30]，建议对说明书中包装材质进行规范化表述。

4 总结

采取法定标准检验结合探索性研究对磺胺嘧啶锌软膏的质量现状进行综合评价。按法定标准检验，29 批次国抽样品法定检验合格率 100%，探索性研究合格率 82.8%，因此产品总体质量为一般。探索性研究提示磺胺嘧啶锌软膏和原料质量标准有待提高；建议企业优化处方设计，关注原料质量与软膏生产过程控制，从而全面提高产品质量；同时建议将剂型名称修订为乳膏剂，并对说明书中包装材质进行规范化表述。

参考文献

[1] 马忠敏,常东明,岳苏华,等.磺胺嘧啶锌对实验性烧伤的作用[J].新乡医学院学报,1989(02):79-82.

[2] 杨美华.磺胺嘧啶锌软膏治疗 518 例烧伤创面的应用体会[J].现代医药卫生,2006(14):2183-2184.1

[3] 河南师范大学化学系：愈合灵一磺胺嘧啶锌及其在治疗创伤上的应用（内部资料),1984:1-7.

[4] 常东明,马忠敏,王素琴,等.愈合灵(磺胺嘧啶锌)的毒理研究[J].新乡医学院学报,1986(03):13-16+24.

[5] 中华人民共和国卫生部药典委员会.卫生部标准[S]（1993 年版）.北京:中华人民共和国卫生部药典委员会,1993:X2-51

[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S]（2015 年版二部）.北京:中国医药科技出版社,2015:1559.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S]（2020 年版二部）.北京:中国医药科技出版社,2020:1843.

[8] International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH) .pharmaceutical development . Q8 [S].2005, 1-19.

[9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S]（2020 年版四部）.北京:中国医药科技出版社,2020:176-177.

[10] USP-NF Online[EB/OL].[2022-11-29].https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M78900_05_01.html.

[11] 李少杰,杨淑先,王立萍.HPLC 测定磺胺嘧啶锌软膏中的有关物质[J].华西药学杂志,2015,30(05):615-616.

[12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S]（2020 年版四部）.北京:中国医药科技出版社,2020:147-148.

[13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S]（2020 年版四部）.北京:中国医药科技出版社,2020:457-460.

[14] 中国食品药品检定研究院.国家药包材标准[S].北京:中国医药科技出版社,2015:263-265.

[15] 国家标准化管理委会.国家标准[S] GB/T 31355-2014.https://std.samr.gov.cn/search/std?q=GB%2FT31355-2014.

[16] 国家标准化管理委会.国家标准[S] GB/T 31354-2014.https://std.samr.gov.cn/search/std?q=GB%2FT31354-2014.

[17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S]（2020 年版四部）.北京:中国医药科技出版社,2020:381-383.

[18] 徐桂清,于刚,李伟,等.磺胺嘧啶锌的 HPLC 测定[J].中国医药工业杂志,2003(12):41-42.

[19] 郭振荣,李利根,李烽.重视烧伤后补锌,促进创面愈合[J].中华烧伤杂志,2001(04):202-203.

[20] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S]（2000 年版二部）.北京:中国医药科技出版社,2000:1051.

[21] COMMISSION REGULATION (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products.pp.L282/5:L282/8.

[22] USP-NF Online[EB/OL].[2022-11-29]. https://doi.org/10.31003/USPNF_M78970_01_01.

[23] 陈国亮,李剑,杨丽娜.卤代水解法合成对羟基苯甲酸单甘油酯[J].应用化工,2016,45(06):1092-1095+1099.

[24] 李璐,廖乃英.UPLC-QTOF-MS 鉴定磺胺嘧啶原料药的有关物质[J].药物分析杂志,2019,39(12):2148-2156.

[25] 汪茂田,李伟,戴新志.磺胺嘧啶锌的结构[J].中国药学杂志,1988(09):551.

[26] 万君玥,陈华,尹婕.化学药品中杂质的基因毒性评估策略以及相关分析方法研究进展[J].药物分析杂志,2022,42(04):557-571.DOI:10.16155/j.0254-1793.2022.04.02.

[27] 马磊,马玉楠,陈震等.遗传毒性杂质的警示结构[J].中国新药杂志,2014,23(18):2106-2111.

[28] ICH 办公室.ICH 指导原则：M7 Genotoxic Impurities 遗传毒性杂质[EB/OL]. [2014-06-23]. https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/4/1

[29] 国家药典委员会.药品红外光谱集[S]（第一卷 1995）.北京:化学工业出版社,1995:光谱号 573.

国家药品监督管理局.法规文件：药品说明书和标签管理规定（局令第 24 号）[EB/OL]. [2006-03-15]. https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypfgwj/ypfgbmgzh/20060315010101975.html.

精神专科医院互联网+药学咨询服务实践和探索

陆荣荣，蒋颖，周勤，杜志强，朱浩浩，沈远

（无锡市精神卫生中心药学部 江苏 无锡 214000）

【摘要】目的：通过新冠肺炎疫情期间精神专科院互联网+药学咨询服务的实践与探索，探索互联网+药学咨询服务的新模式。**方法：**建立和完善我院互联网+药学咨询服务流程规范、管理体系、资质准入和质量控制评价。提取2019年4月20日至2020年12月31日疫情暴发前后的互联网+药学咨询服务记录，统计类型、内容、药品品种及病例、患者评价等相关信息。**结果：**建立了药师咨询相关制度和规范化流程，自2019年4月20日药学部互联网+药学咨询服务正式上线后，截至2020年12月31日完成有效咨询180例次。在新冠肺炎疫情前，截至2019年12月31日，药师完成线上有效咨询31例次（17.22%）；在2020年新冠肺炎疫情期间，截止至2020年12月31日，线上药师咨询量增至149例次（82.78%），较疫情前上涨了377.42%，可见疫情期间患者对线上用药咨询的需求量增加明显。**结论：**在新冠肺炎疫情期间，实施互联网+药学咨询服务，不仅帮助患者解答疑问，开展合理用药指导，提高患者用药依从性，减少或避免药物不良反应，还有效规避了面对面交流造成的交叉感染风险。药师借助互联网+药学咨询服务，持续提供方便、快捷、以患者为中心的药学服务，为药师抗击疫情构建全新的药学服务模式。

【关键词】新型冠状病毒肺炎;精神专科医院;互联网+;药学咨询服务

国家卫生健康委员会制定出台了《关于加强信息化支撑新型冠状病毒感染的肺炎疫情防控工作的通知》，要求强化数据采集分析应用，积极开展远程医疗服务，规范互联网诊疗咨询服务等[1]。

本院前期通过微信公众号板块，试运行提供了线上药学咨询服务，得到了一致好评，后经持续发展完善，申请取得了互联网执业许可，互联网医院正式上线运行。上线后充分运用线上就诊、线上咨询等方式为患者答疑解惑，医、药、护从不同专业方向为患者提供线上守护。

2018年11月，国家卫生健康委发布的《关于加快药学服务高质量发展的意见》[3]提出“积极推进“互联网+药学服务””，探索提供互联网和远程药学服务；2020年2月卫健委发布《关于加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见》指出[4]，药师在互联网+新型模式下，可以利用信息化手段为患者的药物治疗方案提供合理用药建议、用药指导、药物警戒等全方位、全周期的高质量药学服务，也是互联网诊疗对药师的新的要求。

新冠肺炎疫情期间，疫情的控制和患者的治疗都离不开药学服务[6]。在政策支持和疫情的需要下，本院药学部药师依托互联网医院新模式，积极响应并探索互联网医院药学服务新模式,开展了线上互联网药师咨询服务，已实现线上一对一实时咨询，后续逐步开展线上处方审核、用药指导、药品线上配送到家等服务，实现药学专业服务的延伸。

1 互联网+药学咨询服务管理制度及流程

我院根据《处方管理办法》、《中华人民共和国药品管理法》、《互联网诊疗管理办法(试行》、《互联网医院管理办法(试行)》等法律法规，同时参照《药师提供互联网科普与咨询服务的专家共识》，初步制定出互联网+药学咨询服务管理制度。

制度要求由药学部主任安排临床药学组长负责统筹互联网+药学咨询服务工作，定期汇总分析药学咨询问题，就共性问题进行总结反馈，并纳入后续培训。最终由实践反馈逐步设定质量控制目标，促进专业能力和服务水平的持续提升。

流程上互联网+药学咨询服务经过前期试运行后逐步优化，目前操作简单方便，只需要患者通过关注无锡市精神卫生中心微信公众号，进行注册认证，点击互联网医院“免费咨询”模块，添加就诊人信息、描述药物咨询内容，并可上传图片资料，提交上传即可（如图1）。可以做到与药师实时在线互动交流，提高问诊效率的同时，还可以满足疫情期间患者无需接触的防疫需求。

我院药学部每日安排药师上岗完成互联网+药学咨询服务，上岗药师按制度要求，必须是临床药师或取得主管药师以上职称，同时具有门诊咨询或医药联合门诊经验，需接受互联网咨询相应岗位的专业知识培训，保证

药学服务的专业性和均质性[7]。药师接受咨询后在规定时间 24 小时内完成咨询并给予意见和建议。同时药师可根据咨询情况判断患者是否需转线下诊疗或者药学门诊。



图 1 互联网+药学咨询服务流程图

2 互联网+药学咨询服务情况

2019 年 4 月 20 日药学部互联网+药学咨询服务正式上线，截至 2020 年 12 月 31 日完成有效咨询 180 例次。在新冠肺炎疫情前，截至 2019 年 12 月 31 日，药师完成线上有效咨询 31 例次，占 17.22%；在 2020 年新冠肺炎疫情期间，截止至 2020 年 12 月 31 日，线上药师咨询量增至 149 例次，占 82.78%（详见表 1），较疫情前上涨了 377.42%，可见疫情期间患者对线上用药咨询的需求量增加明显。

表 1 互联网+药学咨询服务情况

时间	药师有效咨询数/例	比例/%
疫情前（2019 年）	31	17.22
疫情期间（2020 年）	149	82.78
合计	180	100.00

2.1 互联网+药学咨询服务问题类型及其效果

疫情前（2019 年）互联网+咨询问题类型涉及药物不良反应咨询评估 12 例（占 38.71%）、用药教育 10 例（占 32.26%）、合理用药选择 8 例（占 25.81%）、儿童用药注意事项 1 例（占 3.22%）。（详见表 2）

疫情期间（2020 年）咨询问题类型主要包括药物不良反应咨询评估 37 例（占 24.83%）、用药教育 33 例（占 22.15%）、合理用药选择 21 例（占 14.09%），除此之外还增加了疫情期间药品配送咨询 21 例（占 14.09%）、药物用法用量 16 例（10.74%）、诊断相关 9 例（6.04%）、药物相互作用 5 例（3.36%）、药品有无 3 例（2.02）、价格咨询 2 例（1.34%）、对备孕影响咨询 2 例（1.34%）等咨询内容。

互联网+药学咨询基本覆盖了患者整个用药周期，在疫情前后 49 例（27.22%）药物不良反应的咨询中，药师详细告知药品服用的长期益处和客观存在的药物不良反应，并针对已经出现的药物不良反应进行干预，协助患者缓解药物不良反应，增强药物治疗的依从性；43 例(23.89%)对患者用药教育咨询中，针对不同患者的不同

情况，选择不同的方法进行用药教育，对患者居家治疗起到积极作用，提高患者合理用药，避免不良反应的发生。29 例（16.11%）药物选择涉及合理用药相关咨询中，药师的专业咨询意见，帮助患者了解熟悉药物，正确的选择合适药物，促进了医患双方的信任。

除此之外，在疫情期间新增了 21 例(11.67%)处方开药和药品配送相关咨询，药师合理解释在疫情期间保证患者用药持续性，同时体现了在疫情期间实现互联网诊疗和药品配送上门的迫切性；疫情期间还增加了药物用法用量咨询 16 例（8.89%）、药物相互作用 5 例（2.78%）、特殊人群药物咨询 2 例（1.11%）、药物价格咨询 2 例（1.11%）等，药师疫情期间对患者的咨询过程不仅仅是提供了专业的药学建议，解决患者的问题，同时还能为因疫情隔离在家的患者构建沟通倾诉的桥梁，能够有效地安抚患者焦虑苦闷情绪，稳定病情，体现了在特殊时期对特殊患者的人文关怀。

表 2 互联网+药学咨询问题类型和例次

咨询问题类型	**疫情前（2019 年）**		**疫情期间（2020 年）**		**疫情前后合计**	
	例次/例	比例/%	例次/例	比例/%	例次/例	比例/%
药物不良反应	12	38.71	37	24.83	49	27.22
用药教育	10	32.26	33	22.15	43	23.89
药物选择	8	25.81	21	14.09	29	16.11
疫情期间药品配送			21	14.09	21	11.67
药物用法用量			16	10.74	16	8.89
诊断相关			9	6.04	9	5.00
药物相互作用			5	3.36	5	2.78
药品有无			3	2.02	3	1.67
药物价格咨询			2	1.34	2	1.11
药物对备孕影响咨询			2	1.34	2	1.11
儿童用药咨询	1	3.22			1	0.55
合计	31	100.00	149	100.00	180	100.00

2.2 互联网+药学咨询服务药物分类

疫情期间，本院互联网+药学咨询服务主要集中在神经系统的药物咨询共 255 例（96.59%），涉及抗焦虑抑郁药物 115 例（43.56%）、镇静催眠药物 91 例（34.47%）、精神药物 41 例（15.53%）、中成药 5 例（1.89%）、抗癫痫药物 3 例（1.14%）（详见表 3）。

除此之外还涉及呼吸系统药物 4 例（1.52%）、心血管系统 4 例（1.52%）、内分泌系统 1 例（0.37%）。

其中抗焦虑抑郁药物主要涉及舍曲林 24 例（9.09%）、米氮平 17 例（6.44%）、艾司西酞普兰 15 例（5.68%）等；镇静催眠类药物主要涉及劳拉西泮 27 例（10.23%）、奥沙西泮 22 例（8.33）等；精神药物主要涉及奥氮平 16 例（6.06%）、喹硫平 7 例（2.65%）等；这些药物咨询数量较多，与本院属于精神专科医院，患者为精神、抑郁、失眠患者为主有关，其中有 52 例（19.70%）是由于疫情期间患者情绪焦虑、失眠，自我感觉药效下降的药物咨询，34 例（12.88%）是疫情期间无法来医院就诊、购药不便的药物咨询。

疫情期间，互联网+药学咨询主要涉及药物不良反应、药物的选择、用法用量、长期用药的持续性、药物配送等。患者服用神经系统药物需长期服用，不良反应较多，在疫情期间无法及时来医院就诊、配药，导致患者服药依从性降低，出现自行停药等情况。在对互联网+药学咨询服务的问题分类分析凸显出患者尤需知晓长期药物治疗中断后风险较大的药品及严重后果，如有患者自觉情绪、睡眠平稳，医院购药不便利，拟自行停用精神类、抗抑郁焦虑、镇静催眠类药物，咨询药师后解答告知患者可能会因停药致反跳现象，致患者情绪、睡眠控制不佳，病情反复或恶化；帮助患者提高服药依从性，解决问题。

表 3 互联网+药学咨询问题药物分类及例次

药理系统	例次/例	比例%	药物分类	例次/例	比例%	药物名称	例次/例	比例%
神经系统						舍曲林	24	9.09
						米氮平	17	6.44
						艾司西酞普兰	15	5.68
						文拉法辛	11	4.17
						阿戈美拉汀	10	3.79
						度洛西汀	9	3.41
						氟哌噻吨美利曲辛	9	3.41
			抗焦虑抑郁药物	115	43.56			
						氟伏沙明	5	1.89
						帕罗西汀	5	1.89
						曲唑酮	4	1.52
						西酞普兰	3	1.14
						丁螺环酮	1	0.38
						米安色林	1	0.38
						坦度螺酮	1	0.38
						劳拉西泮	27	10.23
						奥沙西泮	22	8.33
						佐匹克隆	9	3.41
	255	96.59				艾司唑仑	7	2.65
			镇静催眠药物	91	34.47	阿普唑仑	6	2.27
						氯硝西泮	6	2.27
						唑吡坦	6	2.27
						硝西泮	4	1.52
						右佐匹克隆	4	1.52
						奥氮平	16	6.06
						喹硫平	7	2.65
						碳酸锂	4	1.52
						阿立哌唑	3	1.14
						氟西汀	3	1.14
			精神药物	41	15.53	盐酸哌甲酯	3	1.14
						盐酸托莫西丁	2	0.76
						齐拉西酮	1	0.38
						艾地苯醌	1	0.38
						氨磺必利	1	0.38
			中成药	5	1.89	乌灵胶囊	5	1.89
			抗癫痫药物	3	1.14	丙戊酸钠	3	1.14
呼吸系统						复方氨酚那敏	1	0.38
			感冒药	2	0.76	复方氨酚烷胺	1	0.38
	4	1.52						
			祛痰药物	1	0.38	氨溴索	1	0.38
			抗菌药物	1	0.38	罗红霉素	1	0.38
心血管系统	4	1.52	高血压药物	4	1.52	倍他乐克	4	1.52
内分泌系统	1	0.37	抗痤疮药物	1	0.38	异维 A 酸软胶囊	1	0.38
总计	264	100.00		264	100.00		264	100.00

3 讨论

3.1 互联网+药学咨询服务的前景

中国互联网络信息中心（CNNIC）发布的第 45 次《中国互联网络发展状况统计报告》显示，截止至 2020 年 3 月，我国网民规模为 9.04 亿，较 2018 年底增长 7508 万，互联网普及率达 64.5%。当前，以互联网为代表的新信息技术正迅速发展，互联网与传统医疗行业深度融合必然成为医疗信息化发展的趋势[8]。我国居民对互联网医疗服务的态度积极，需求迫切[9]，因此互联网+药学咨询服务模式必然在后疫情时代得到高速发展。

2020 年 4 月 8 日，美国卫生及公共服务部（Health and Human Services，HHS，简称卫生部）授权执业药师可开具新冠肺炎检测的处方，并可执行检测[10]。意味着药师在为公众提供公共卫生服务和信息方面发挥着至关重要的作用。4 月 16 日，美国临床药学学会（American College of Clinical Pharmacy，ACCP）等 5 部门联合发布声明[11]，再次提到美国药师在新冠肺炎期间提供一线服务方面的重要作用，并呼吁药师作为医疗团队成员积极参与应急响应工作，努力支持进行最佳的临床实践。

新冠疫情特殊时期精神专科药师参与互联网+药学咨询服务可认为是拓展药师的服务范围，在特殊时期，契合国家政府管控措施，降低交叉感染风险，保障患者用药安全且节约患者诊疗时间。同时促进中国药学服务模式的转型，和国际药师服务接轨，为药学人在抗击疫情中提供新模式。也为中国医院探索互联网+药学咨询服务模式提供参考和借鉴。

3.2 风险规避

互联网+药学咨询服务对药学的专业基础、沟通能力、职业操守、人文素养、医疗风险意识等都提出要求，务必确保专业水准、信息安全。药师在实际操作时须遵守原则，为患者答疑解惑，同时遵守国家管理规定，不逾越咨询范围。对于常规用药咨询，如果患者前期已有明确诊断，药师应坚持在临床诊断的基础上，给予患者正确的用药指导。对于药学问诊中发现的急重症情况，应建议患者及时前往医院就诊，这样既符合临床诊疗规范，又能有效规避药师执业风险。

多项研究[12]均强调使用社交媒体进行咨询时对隐私性和机密性、数据安全性以及对个人数据建立索引时可能产生危害的担忧。患者个人健康信息属于隐私，尤其对于特殊人群（精神抑郁患者）的隐私更需重点关注。医疗机构具有保护患者个人健康信息的义务，线上咨询不可泄，注意保护用户隐私。

2018 年 9 月《药师提供互联网科普与咨询服务的专家共识》[13]由中国药师协会等发布，明确了药师在互联网平台上的专业相关活动须遵循的基本原则、风险控制和伦理及职业责任等标准规范，支持药师用严谨科学的态度积极探索互联网药学服务新模式。

本院互联网+药学咨询服务范围的限定是药物治疗咨询，不涉及诊疗。药学部根据前期线上实践，并逐步根据实践工作建立完善培训制度和质控机制，首先由科室成立项目组，制定互联网+药学咨询服务准入资质制度，先由科室评估互联网咨询药师的执业能力，考核合格由医务处和门诊部审核确认资质；其次，定期审核咨询问题类型和内容，反馈和培训共性问题，持续开展培训和分享；并按我院“互联网医院网络与信息安全管理制度(试行)”，药师须遵守互联网的隐私保护规定等。最后，医院对互联网咨询建立准出管理规定，一旦违反立即暂停或终止咨询服务。

后期拟逐步由实践反馈设定质量控制目标，对搭建互联网咨询质量控制体系提出要求；关注精神专科服务能力与服务水平提升，科学和严谨评估药物服务质量和干预结果；重视服务质量评估和社会效应。

3.3 互联网+药学咨询服务中的价值

随着我国的医药格局不断变化，药师的地位也在不断提升。药师提供的药学服务在临床安全用药方面发挥了重要作用，长期以来用药咨询模式主要局限于面对面或电话咨询，互联网+药学咨询服务为用药咨询提供了新的路径，开辟了新的药学服务模式[14]。

药师参与互联网+药学咨询服务能实现药学服务的优质化、个体化、多元化，满足患者医疗卫生健康需求，实现以患者为中心的药学服务转型，体现创新服务模式的理念。

一方面，药师的专业咨询不仅有利于优质药学服务的供给，更是为药师创造提升临床药学实践技能的真实平台，使药师可以在互联网平台上直接面向患者服务，做到真正解决患者用药相关疑问，并为患者建立互联网+

药学咨询数据库，定期追踪随访；同时推进线下诊疗和药学门诊等工作，提升便捷性和扩大患者覆盖面；同时为患者所提供的药学服务承担责任[15][16]。

另一方面，在新型冠状病毒肺炎疫情特殊时期，实施互联网+药学咨询服务模式的实施，不仅可以补充优质医疗资源的匮乏，缓解线下压力，避免了患者线下交叉感染的潜在风险，为疫情的防控起到积极作用[17]。同时还可以为患者提供药师“一对一”的服务，解决医疗信息不对称，打破信息壁垒，获得精神科药师专业的药物治疗意见。

在互联网+药学咨询服务中，上岗药师应指导患者用药，普及相关知识，帮助患者正确选择和使用药物，提高患者用药依从性，减少或避免药物不良反应。同时注意向患者交待药物使用的注意事项、禁忌症、服药时间、用药疗程、潜在药品不良反应、特殊药品的储存方法等[18]。

4 小结

在新型冠状病毒疾病集中爆发以及一线医生和护士全力治疗患者的背景下，药师的用药咨询是对抗这一流行病的有益补充。与传统的面对面咨询相比，互联网+药学咨询服务更有利于对患者在疫情期间开展合理用药，同时有效避免面对面沟通造成交叉感染的风险。

“互联网+”平台的发展为推动药学服务模式的转变提供了新思路。在新冠肺炎疫情特殊时期和后疫情时代，药师应充分利用互联网信息系统，拓展互联网+药学服务，努力转变药学服务模式，深化互联网医疗服务。

参考文献

[1] National Health Commission of the People's Republic of China.Notice of strengthening information Support the coronavirus disease 2019 epidemic prevention and control[EB/OL].(2020-02-03)[2020-04-15].

[2] http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02 /O5/content_5474692.htm.

[3] 牟岚,何艺,周文庆,等.新型冠状病毒肺炎时期住院病案的签名.中国病案,2020,21(3).

[4] National Health Commission of the People's Republic of China.Notice of strengthening drug administration in medical Institutions to Promote rational Drug use[EB/OL].(2020-02-21)[2020-04-15].http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/202002

[5] /ea3b96d1ac094c47a1fc39cf00f3960e.shtml.

[6] 关于印发新型冠状病毒感染相关 ICD 代码的通知》国卫医函(2020)58 号(20200213).

[7] 胡杨,闫雪莲,等.新冠肺炎疫情期间基于互联网医药模式的药学咨询服务实践和探讨[J].中国药学杂志,2020,55(23):1974-1978.

[??] 丁胜,申刚磊,杨庆有,等.“互联网+”与医疗深度融合在改善医疗服务中的实践[J].中国医院管理,2019,39(3):78-80.

[9] 江虹,丁福,朱跃平,等.1788 名居民对互联网医疗认知、态度及行为的调查分析[J].中国数字医学,2019,14(7);46-48,77.

[10] HHS Statements on Authorizing Licensed Pharmacists to Order and AdministerCOVID-19 Tests.Accessed on April 17,2020.[EB/OL].(2020-04-17)[2020-04-20].https://www.hhs.gov/about/news/2020/04/08/hhs-statements-on-authorizing-licensed-pharmacists-to-order-and-administer-covid-19.

[11] Response to HHS Statements on Authorizing Licensed Pharmacists to Order and Administer COVID-19 Tests.[EB/OL}.(2020-04-17)[2020-04-20].https://www.accp.com/docs/HHS_COV-ID-19_TESTSAFETY.pdf ? utm_source=accp&utm_medium=email&utm_campaign=ACCP%20Test&_zs=QM6Qa&_z1=T8 G42.pdf.

[12] MOORHEAD S A,DIANE E H,LAURA H,et al.A new dimension of health care:systematic review of the uses,benefits,and limitations of social media for health communication[J].J Med Internet Res,2013,15(4):e85.

[13] CHINESE PHARMACEUTICAL ASSOCIATION.Expert consensus for pharmacists providing on Internet consulting services[EB/OL].(2019-03-05)[2020-04].http://www.clponline.cn/info_show.asp? infoid=573.

[14] 李丽丽，裘方剑，王建群.“互联网+”背景下药师用药咨询服务创新模式研究[J].中医药管理杂志,2020,28(2):108-110.

[15] 金澄滔,方红梅,吴圣洁,等.“互联网+”药事服务助力新型冠状病毒肺炎疫情防控实践[J].中华医院管理杂志,2020,36(4):328-330.

[16] 夏铮铮,冀连梅,孟裙.基于移动互联网社交软件的专科药学咨询服务实践[J].中国药师,2019,22(9):1679-1681.

[17] 李琳,宋士卒.新型冠状病毒肺炎疫情期间互联网药学服务实践与研究[J].中国药业,2020,29(8):18-20.

[18] 许书慧,陈玲.基于“问药师”平台的用药咨询服务实践[J].中国药房.2019,30(3):421-427.

“4+7”带量采购政策下精神药物不良反应回顾性分析

陆荣荣，沈远，周勤，杜志强，朱浩浩

（江南大学附属市精神卫生中心药学部，无锡 214151）

【摘要】目的：分析国家“4+7”带量采购模式下精神科药物不良反应的发生特点及相关影响因素，为临床用药提供参考。**方法：**回顾性地统计2020年我院实行“4+7”模式下上报的130例精神药物不良反应，分别从性别与年龄、引起不良反应的“4+7”药物及临床表现、药物不良反应涉及器官/系统及临床表现、新的/严重不良反应分布及临床表现、转归情况等进行分析。**结果：**130例不良反应报告患者中，61-70岁区间的患者药物不良反应发生率最高，为25.38%。主要涉及4种“4+7”精神类药物，其中奥氮平片引起的不良反应最多，为54例（39.24％）。主要累及消化系统、神经系统、心血管系统、血液与淋巴系统等系统，其中消化系统不良反应例数最多（61，44.53%)。共有8例（6.16%）新的及26例严重不良反应报道，均导致患者病程延长。除过性不良反应外，绝大多数不良反应通过停用或减少剂量、对症治疗等方法后，不良反应症状均好转或痊愈，且无致死致残致畸。**结论：**随着越来越多“4+7”国家带量采购药物的临床使用，临床药师应加强“4+7”药物知识的宣传与培训，加强药物不良反应的监测工作，及时反馈于临床，做到早期预防、早期识别、及时诊断和合理干预，有助于提高用药安全。

【关键词】“4+7”；精神药物；药物不良反应；合理用药

“4+7”带量采购是国家政府主导的“大型团购”，起到以量换价的作用，从而降低药品价格。而进入“4+7”带量采购的药品均通过国家一致性评价，使人民群众以低廉的价格用上保障质量的药物。

近年来，精神卫生问题已经成为了我国重要的公共卫生问题，而临床上精神药物的用量不断增长，临床使用的种类不断增多，患者用药的持续时间也随之增长。精神药物的药理作用广泛，药物间相互作用非常复杂，且因为患者大多存在合并用药、长期服药，由此产生药物不良反应的概率也大大增加。而随着今年国家“4+7”带量采购的施行，越来越多通过国家一致性评价的国产精神药物进入医院，其临床使用也不断增多，药物不良反应呈现出新的特点。本文对我院2020年上报的“4+7”精神药物不良反应进行了回顾性的汇总分析，以期在治疗中发现该类药物不良反应发生的内在特点及规律，为精神科临床能更加安全、合理地使用国家“4+7”精神药物提供临床依据与参考。

1 资料与方法

收集2020年全年我院上报至国家不良反应监测中心的130例“4+7”精神药物不良反应有效报告。回顾性统计分析患者的性别、年龄、引起不良反应的“4+7”药品及临床表现、药物不良反应涉及器官/系统及临床表现、新的/严重不良反应分布及临床表现、转归情况等，考察并分析之间的相关性问题。通过Excel表格进行统计分析。

2 结果

2.1 患者的性别与年龄分布

130例不良反应报告患者中，男性63例，占48.46％；女性67例，占51.54％。年龄最小为14岁，最大为97岁，平均年龄59岁，61-70岁区间的患者药物不良反应发生率最高为25.38%，见表1

表1 发生药物不良反应患者性别与年龄分布

	年龄（岁）									
性别	≤17	18-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	≥81	总计	构成比(%)
男	2	5	2	8	10	19	11	6	63	48.46

女	2	7	3	10	10	14	9	12	67	51.54
总计	4	12	5	18	20	33	20	18	130	
构成比(%)	3.08	9.23	3.85	13.85	15.38	25.38	15.38	13.85		100. 00

2.2 引起不良反应的“4+7”药物及临床表现

本研究不良反应报告中共涉及了 4 种“4+7”精神药物。其中奥氮平引起的不良反应最多，为 54 例（39.24%），其次是氯氮平 38 例（27.73%），利培酮 23 例（16.79%），喹硫平 22 例（16.06%）。某些药物可能涉及多个不良反应临床表现，因此具体不良反应例数大于报告总例数，详见表 2。

表 2 引起不良反应的“4+7”药物及临床表现

药品	例数	构成比(%)	临床表现（例数）
奥氮平片	54	39.42	便秘（18）过度镇静（6）锥体外系反应（4）下肢水肿（4）肝功能异常（3）血压降低（3）血脂异常（2）窦性心动过缓（2）癫痫样发作（1）视物模糊（1）眼睛干涩（1）坐立不安（1）Q-T 间期延长（1）口干（1）流涎（1）绝经两年后出现例假（1）白蛋白减少（1）血糖升高（1）过敏性皮炎（1）皮疹（1)
氯氮平片	38	27.73	便秘（17）流涎（6）窦性心动过速（3）肝功能异常（2）心慌（1）癫痫样发作（1）静坐不能（1）嗜睡（1）不全性肠梗阻（1）甲状腺功能减退（1）白细胞减少（1）血小板减少（1）血药浓度升高显著（1）尿频（1）
利培酮片	23	16.79	锥体外系反应（4）高催乳素血症（3）头晕（2）白细胞减少（2）静坐不能（1）视物模糊（1）嗜睡（1）过度镇静（1）窦性心动过缓（1）窦性心动过速（1）便秘（1）肝功能异常（1）流涎（1）血小板减少（1）小便困难（1）恶性综合症（1）
喹硫平片	22	16.06	便秘（4）白细胞减少（3）肝功能异常（3）过度镇静（3）嗜睡（2）头晕（1）吞咽困难（1）口干（1）高催乳素血症（1）泌乳（1）乏力（1）下肢水肿（1）
总计	137	100	

注：某些药物可能涉及多个不良反应临床表现，因此具体不良反应例数大于报告总例数

2.3 药物不良反应涉及的器官/系统及临床表现

本研究不良反应报告中主要累及消化系统、神经系统、心血管系统、血液与淋巴系统等多个系统，消化系统不良反应例数最多 61 例(44.53%)，其中便秘报告数量最多为 40 例(29.20%)。某些药物可能累及多个器官/系统，因此具体不良反应例数大于报告总例数，详见表 3。

表 3 药物不良反应涉及的器官/系统及临床表现

涉及系统/器官	例数	构成比(%)	临床表现（例数）
消化系统	61	44.53	便秘（40）肝功能异常（9）流涎（8）口干（2）不完全性肠梗阻（1）吞咽困难（1）
神经系统	33	24.09	过度镇静（10）锥体外系反应（8）嗜睡（4）头晕（3）癫痫样发作（2）静坐不能（2）视物模糊（2）眼睛干涩（1）坐立不安（1）
心血管系统	12	8.75	窦性心动过速（4）窦性心动过缓（3）血压降低（3）Q-T 间期延长（1）心慌（1）
血液与淋巴系统	10	7.30	白细胞减少（6）血小板减少（2）白蛋白减少（1）血药浓度升高显著（1）

内分泌系统	7	5.11	高催乳素血症（4）甲状腺功能减退（1）绝经两年后出现例假（1）泌乳（1）
全身反应	7	5.11	下肢水肿（5）恶性综合症（1）乏力（1）
代谢与营养障碍	3	2.19	血脂异常（2）血糖升高（1）
泌尿与生殖系统	2	1.46	小便困难（1）尿频（1）
皮肤及附属器官	2	1.46	过敏性皮炎（1）皮疹（1）
总计	137	100	

注：因某些不良反应涉及多个器官/系统，故具体不良反应例数多于不良反应报告的例数

2.4 新的/严重不良反应分布及临床表现

本研究上报的 130 例“4+7”精神药物不良反应中，新的 8 例（占 6.16%），严重的 26 例（20.00%），其中新的/严重药物不良反应涉及奥氮平最多，有 12 例（9.22%），其次是利培酮片、氯氮平片 8 例（6.16%），喹硫平最少 6 例（4.62%）。详见表 4。

表 4 新的/严重药品不良反应分布及临床表现

药品	新的			严重		
	例数	构成比(%)	临床表现（例数）	例数	构成比(%)	临床表现（例数）
奥氮平	3	2.31	过敏性皮炎（1）绝经两年后出现例假（1）视物模糊（1）	9	6.91	肝功能异常（2）过度镇静（1）皮疹（1）体位性低血压（1）心动过缓（1）过敏性皮炎（1）血脂异常（1）锥体外系反应（1）
利培酮片	3	2.31	头晕（2）窦性心动过速（1）	5	3.85	白细胞减少（1）窦性心动过缓（1）恶性综合症（1）视物模糊（1）小便困难（1）
氯氮平片	2	1.54	甲状腺功能减退（1）血药浓度升高显著（1）	6	4.62	不完全性肠梗阻（1）癫痫样发作（1）窦性心动过速（1）肝功能异常（1）血小板减少(1)血药浓度升高显著(1)
喹硫平片	0	0		6	4.62	肝功能异常（2）白细胞减少（1）过度镇静（1）口干（1）泌乳（1）
总计	8	6.16		26	20.00	

2.5 “4+7”药物不良反应转归情况

130 例不良反应除了一过性的不良反应之外，绝大多数不良反应通过停用或减少剂量、对症治疗等方法好转或痊愈。好转的 115 例（88.46%），未好转 13 例（10.00%），痊愈 2 例（1.54%），无致死致残致畸。见表 5。

表 5 “4+7”药品不良反应转归情况（例数（%））

药品	痊愈	好转	未好转	总计
奥氮平片	1（0.77）	45（34.62）	5（3.85）	51（39.24）
氯氮平片	0（0）	33（25.38）	4（3.08）	37（28.46）
利培酮片	1（0.77）	17（13.08）	3（2.30）	21（16.15）
喹硫平片	0（0）	20（15.38）	1（0.77）	21（16.15）
总计	2（1.54）	115（88.46）	13（10.00）	130（100）

3 讨论

3.1 药物不良反应与个体因素

通过表 1 可以发现，130 例不良反应报告患者中，女性略高于男性，与“4+7”带量采购之前精神药物不良反应的文献报道中女性比男性多的结果一致[1]。在年龄方面，不良反应发生最小为 14 岁，最大为 97 岁，平均年龄 59 岁，“4+7”带量采购的精神药物不良反应发生主体以 40 岁以上人群为主,109 例（83.84%），其中 61-70 岁区间的患者药物不良反应发生率最高 33 例（25.38%）。表明“4+7”国家带量采购的精神药物不良反应高发人群主要集中在中老年人。此外，18 岁以下儿童、青少年报告 4 例（3.08%）,18-30 岁报告 12 例（9.23%）,31-40 岁报告 5 例（3.85%），与总体相比较少。推测可能是中老年人较儿童、青壮年病程发展周期长、合并疾病多，对“4+7”国家带量采购精神药物的反应性不同、存在个体差异所致。

3.2 引起不良反应的“4+7”精神药物

本研究涉及的 4 种“4+7”精神药物中，奥氮平引起的不良反应最多，为 54 例（占 39.24％），其次是氯氮平 38 例（占 27.73％），利培酮 23 例（占 16.79%），喹硫平 22 例（占 16.06％）。考虑是因为奥氮平使用广泛，引起的不良反应报告增多。而国外有 1 项前瞻性研究分析了某精神科医院使用精神药物门诊患者的药物不良反应发生情况，怀疑多数药物不良反应与奥氮平和利培酮有关[2]。本研究提示随着“4+7”国家带量采购药物的深入推广，其安全性及耐受性方面还需进一步验证，故临床使用过程中仍需要注意监测药物的不良反应，及时的对不良反应报告进行收集分析，方便临床对不良反应进行把控，更安全与合理地制定药物治疗方案。

3.3 药物不良反应涉及的器官/系统

由表 3 可知，“4+7”国家带量采购精神药物不良反应累及器官较为广泛，其中以消化系统（44.53%）、神经系统（24.09%）、心血管系统（8.75%）、血液与淋巴系统（7.30%）为主。常见不良反应有便秘（29.20%）、过度镇静（7.30%）、肝功能异常（6.57%）、锥体外系反应（5.84%）等。与“4+7”前的精神药物不良反应报道相比累及的主要器官/系统相似，但是发生率有所差别；“4+7”药物不良反应以消化系统（便秘）最多，而“4+7”前不良反应以神经系统（锥体外系不良反应）为最主要的一般不良反应[3-6]。这可能与“4+7”药物的制剂工艺，临床医生的用药习惯等多种因素有关。也提示了精神科医生临床用药时应注意从最低剂量开始缓慢加量或密切监测血药浓度，使药物在有效剂量水平内的同时，观察患者对药物的敏感度，减少不良反应的发生。

3.4 新的/严重的药物不良反应分析

新的/严重的药物不良反应是影响用药安全最重要的信息，对保障安全用药具有重要意义[7]。本研究中的 130 例“4+7”精神药物不良反应中，新的 8 例（6.16%），严重的 26 例（20.00%）。新的/严重药品不良反应涉及奥氮平最多，有 12 例（9.22%），其次是利培酮片、氯氮平 8 例（6.16%），喹硫平 6 例（4.62%）。其中新的不良反应中一般的 6 例（4.62%）；严重的 2 例（1.54%），分别是过敏性皮炎 1 例（怀疑是奥氮平引起）、血药浓度升高显著 1 例（怀疑是氯氮平引起）。考虑“4+7”精神药物作用机制复杂，导致其发生的不良反应广泛多样，难以预测。因此临床用药时应密切监测患者用药情况，及时控制和缓解患者已有的一般的不良反应，预防严重不良发应的发生，针对新的不良反应及时收集分析，反馈于临床。

3.5 “4+7”药物不良反应转归情况

本研究中 130 例不良反应除了一过性的不良反应之外，绝大多数不良反应通过停用或减少剂量、对症治疗等方法好转或痊愈。好转的 115 例（88.46%），未好转 13 例（10.00%），痊愈 2 例（1.54%），无致死致残致畸。由此可见，临床应严格监测患者用药，及时的对症治疗，有助于改善药物不良反应。

综上所述，精神疾病的病因大多数还不明确，在治疗过程中，精神药物在对症治疗靶症状的同时，也影响了与精神症状无关的大脑及躯体，产生了不良反应[8-9]。此次研究涉及了“4+7”国家带量采购的 4 种精神药物（奥氮平、氯氮平、喹硫平、利培酮），其不良反应呈现出了与之前精神药物有所不同的特点。研究发现不良反应与患者的性别、年龄有关，其中女性中老年人群高发。以消化系统、神经系统、心血管系统、血液与淋巴系统为主，可累及全身各个器官。

随着越来越多“4+7”国家带量采购药物的临床使用，其临床使用时的安全性与有效性还有待进一步验证，临床药师应加强“4+7”药物知识的宣传与培训，加强药物不良反应的监测工作，及时反馈于临床，做到早期预防、早期识别、及时诊断和合理干预，有助于提高用药安全。并且在用药的过程中，应该详细了解患者的药物不良反应史，严密监测特殊人群以及合并躯体疾病多的精神科患者，按照说明书给予合适的剂量，避免合并用药时药物相互作用，减少不良反应的发生[10-11]。

参考文献

[1] 庄红艳,刘珊珊,郝红兵.327 例精神科药物不良反应回顾性分析[J].西北药学杂志,2017,32(3):378-381.

[2] Piparva KG,Buch JG,Chandrani KV.Analysis of adverse drug reactions of atypical antipsychotic drugs in psychiatry OPD[J].Indian J Psy Med,2011,33(2):153-157.

[3] 盛鑫,叶明全,童九翠等.精神科 1916 例药品不良反应/事件分析[J].中国药物评价,2017,34(4):305-306.

[4] 宋环霞.我院精神科住院患者药品不良反应报告分析[J].中国药物评价,2016,33(3):168-171.

[5] 陈寅,施薇华.精神病专科医院 509 例药物不良反应分析[J].中国执业药师,2016,13(10)):49-53.

[6] 庄红艳,刘珊珊,郝红兵等.我院 114 例严重的药品不良反应分析[J].中国药房,2016,27(35):4933-4936.

[7] 杨悦．近年我国药品不良反应报告与监测总体情况分析[J]．西北药学杂志,2016,31(3):323-326.

[8] 付春凤.精神疾病的药物治疗史[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2014:16-17.

[9] 贾竑晓,康玉春.中医论治精神药物不良反应[M].北京:人民卫生出版社.2014:1-28.

[10] 黄迪.精神专科医院老年住院患者的用药调查[J].中国医药指南,2013,11(10):88-89.

[11] 任志强,刘英.121 例严重的药品不良反应报告分析[J].中国医院药学杂志,2015,35(14:)1314-1317.

难溶性肾上腺素原料药细菌内毒素检查方法学研究

吕晓君　杨雅婷　张菊　徐小玲　何开勇　沈佳特

（湖北省药品监督检验研究院，武汉 430075）

第一作者 吕晓君(1983-)，女，湖北钟祥人，副主任药师，硕士，主要研究方向：药理毒理。电话：027-87705360，13476118549，E-mail: lvxiaojunwhu@foxmail.com。

摘要　目的：建立难溶性肾上腺素原料药细菌内毒素检查方法。**方法：**依照 2020 年版《中国药典（四部）》通则 1143 细菌内毒素检查法，用盐酸溶解肾上腺素，再用细菌内毒素检查用水（BET水）稀释，用凝胶法和动态浊度法进行干扰试验和内毒素回收干扰试验。**结果：**肾上腺素原料药用0.1mol/L盐酸溶解制成浓度为10mg/mL的溶液，再用BET水稀释200倍及以上时对细菌内毒素检查法无干扰作用。**结论：**本研究所建立的细菌内毒素检查方法可用于肾上腺素原料药的细菌内毒素检查，控制其产品质量。

关键词：细菌内毒素；难溶性；原料药；肾上腺素

Study on Bacterial Endotoxins Test Method of Insoluble Adrenaline Active Pharmaceutical Ingredients

Lv Xiao-jun[1,2],Yang Ya-ting[1,2], Zhang Ju[1,2], Xu Xiao-ling[1,2], He Kai-yong[1,2], Shen Jia-te[1,2]

([1]Hubei Institute for Drug Control, [2]Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control,Wuhan 430075, China)

ABSTRACT Objective　To establish a method for bacterial endotoxin test of insoluble adrenaline active pharmaceutical ingredients (API). **Methods**　According to bacterial endotoxin test (BET) method in the general rule 1143 in the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition, Volume Ⅳ), adrenaline API was dissolved with hydrochloric acid, diluted with BET water, the gel method and kinetic turbidimetric assay were used to carry out interference test and endotoxin recovery interference verification test. **Results**　Adrenaline API was dissolved with 0.1mol/L

hydrochloric acid to 10 mg/ml, and then diluted 200 times or more by BET water, which was no interference effects to bacterial endotoxin test. **Conclusion** The BET method established in this study can be used for bacterial endotoxin test of adrenaline API to control the quality in the production.

Key words：bacterial endotoxin；insolubility；API；adrenaline

肾上腺素是一种肾上腺素受体激动剂，可以直接作用于肾上腺素 α、β 受体[1]，具有重要的生理及药理功能，临床上常作为急救用药物，用于支气管哮喘、过敏性休克或心脏骤停的抢救，也可用于荨麻疹、花粉症等过敏性疾病的治疗[2-4]。目前临床应用的肾上腺素剂型主要是注射剂，细菌内毒素检查为注射剂安全性检查的重要项目，建立肾上腺素原料药的细菌内毒素检查方法，从源头上减少内毒素污染风险，也是控制药品质量的重要一环，对于肾上腺素注射剂成品的质量控制及临床用药安全具有重要意义。《中华人民共和国药典》2020 年版[5]、《欧洲药典》(EP11.0)[6]《美国药典》(USP43-NF38)[7]及《日本药局方》(JP18)[8]中均收录了肾上腺素及肾上腺素注射液（含盐酸肾上腺素注射液），但没有对肾上腺素的细菌内毒素含量进行控制，目前亦未见肾上腺素原料药细菌内毒素检查方法学研究的相关文献报道。肾上腺素原料药为白色或类白色结晶性粉末且在水中不溶，建立细菌内毒素检查方法的前提是样品应溶于水或合适的溶剂中，使其溶解至澄清溶液后再进行细菌内毒素检验[9]，否则不溶性微粒中可能包裹细菌内毒素导致假阴性结果[10]，故采用合适的溶剂并进行方法适用性考察是本研究的重点。本研究采用凝胶法和动态浊度法对溶剂盐酸和肾上腺素进行干扰试验及内毒素回收试验，排除盐酸对细菌内毒素检查法的干扰，建立了肾上腺素的细菌内毒素质量控制方法，将为肾上腺素原料药质量标准中制定细菌内毒素检查项提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

PKF96 细菌内毒素定量检测仪（美国科德角公司），TAL-96G 试管恒温仪（湛江安度斯生物有限公司），XP205 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）。

1.2 试药

肾上腺素原料药（湖北美林药业有限公司，批号 20201101、20201102、20201103）；细菌内毒素国家标准品（中国食品药品检定研究院，批号 150800-201601，规格 9000EU/支）；动态浊度法鲎试剂（湛江安度斯生物有限公司，批号 2111302，检测范围 0.005～10EU/mL）；凝胶法鲎试剂（湛江安度斯生物有限公司，批号 2102193，规格 0.1mL/支，灵敏度 0.5EU/mL）；凝胶法鲎试剂（湛江博康海洋生物制品有限公司，批号 2103051，规格 0.1mL/支，灵敏度 0.5EU/mL）；BET 水（湛江安度斯生物有限公司，批号 2201110，规格 100mL/瓶），盐酸（湖南汇虹有限试剂有限公司，批号 20220311）。

2 方法和结果

2.1 内毒素限值（L）的确定

根据企业提供数据设定本品细菌内毒素的限值为：每 1 mg 肾上腺素中含细菌内毒素的量应小于 10 EU。

2.2 凝胶法

2.2.1 鲎试剂灵敏度复核

取细菌内毒素国家标准品，加 BET 水分别制成 2λ、λ、0. 5λ、0. 25λ（1.0、0.5、0.25、0.125 EU/mL）的溶液，以 BET 水为阴性对照（NC），按照 2020 年版《中国药典（四部）》[11]通则 1143 细菌内毒素检查法中“鲎试剂灵敏度复核试验”项下进行操作。结果表明，两个厂家的鲎试剂灵敏度测定值 λ_c 均在 0. 5λ~2 .0λ，灵敏度检查均符合规定，可用于细菌内毒素检查。 结果见表 1。

表 1 鲎试剂灵敏度复核结果

鲎试剂批号	细菌内毒素浓度（EU/mL）				NC	λ	λ_c
	1.0	0.5	0.25	0.125		（EU/mL）	（EU/mL）
2102193	＋＋＋＋	＋＋＋＋	————	————	——	0.5	0.5
2103051	＋＋＋＋	＋＋＋＋	————	————	——	0.5	0.5

注：NC，阴性对照管。

2.2.2 溶剂盐酸的干扰试验

将盐酸用 BET 水配制成 1 mol/L 储备液，用于后续试验。

盐酸干扰预试验：将 1 mol/L 盐酸用 BET 水制成 0.02、0.01、0.005、0.002、

0.001mol/L 的盐酸系列溶液；取 0.01、0.005、0.001mol/L 的盐酸系列溶液作为 A 液；取 0.02、0.01、0.002 的盐酸溶液与 4λ 浓度（2.0EU/mL）的细菌内毒素标准品溶液等体积混合，使成为含有 2λ 浓度内毒素（1.0 EU/mL）的 0.01、0.005、0.001mol/L 的盐酸系列 PPC 溶液，作为 B 液。各取 0.1mL 加入到已复溶的两个厂家的鲎试剂(λ 为 0.5EU/mL)反应管内，每个浓度平行 2 管；另取 2 管加入 BET 水作为阴性对照（NC），2 管加入 2λ 浓度的内毒素标准品溶液作为阳性对照（PC）。 用 λ 为 0.5EU/mL 的两个厂家的鲎试剂与上述系列溶液进行反应，结果见表 2。预试验结果表明，0.001mol/L 盐酸对鲎试剂与内毒素的凝集反应无干扰。

盐酸正式干扰试验：将 1 mol/L 盐酸用 BET 水制成 0.002mol/L、0.001mol/L 溶液，细菌内毒素标准品用 BET 水制成 4λ、2λ、λ、0.5λ、0.25λ 浓度（2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 EU/mL）的溶液。取 0.001mol/L 盐酸溶液作为 A 液；取 0.002mol/L 盐酸溶液与 4λ、2λ、λ、0.5λ 浓度的内毒素标准品溶液等体积混合，使成为含有 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 浓度内毒素的 0.001mol/L 盐酸溶液，作为 B 液；取 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 浓度的内毒素标准品溶液作为 C 液。各取 0.1mL 加入到已复溶的两个不同厂家生产的鲎试剂(λ 为 0.5EU/mL)反应管内，A 液平行做 2 管，B 液、C 液每个浓度平行做 4 管；另取细菌内毒素检查用水做 2 支阴性对照管（NC）。计算 B 液和 C 液实测鲎试剂灵敏度，结果见表 3。结果表明，0.001mol/L 盐酸对鲎试剂与内毒素的凝集反应无干扰。

表 2　盐酸干扰预试验结果

鲎试剂批号	系列	盐酸浓度（mol/L）			NC	PC
		0.01	0.005	0.001		
2102193	A 液	——	——	——	——	++
	B 液	——	——	++		
2103051	A 液	——	——	——	——	++
	B 液	——	——	++		

注：A，盐酸系列溶液；B，含 2λ 的盐酸系列溶液；NC，阴性对照管；PC，阳性对照管。

表 3　盐酸干扰试验结果

鲎试剂批号	系列	细菌内毒素浓度（EU/mL）				NC	A 液	实测灵敏度（EU/mL）
		1.0	0.5	0.25	0.125			
2102193	B 液	++++	++++	----	----	--		0.5
	C 液	++++	++++	----	----		--	0.5
2103051	B 液	++++	++++	----	----	--		0.5
	C 液	++++	++++	----	----		--	0.5

注：A，0.001mol/L 盐酸；B，为干扰试验系列；C 为鲎试剂标示灵敏度的对照系列；NC，阴性对照管。

2.2.3 溶剂盐酸回收干扰试验

盐酸回收干扰试验：将 1 mol/L 盐酸用 BET 水制成 0.2mol/L 溶液，细菌内毒素标准品用 BET 水制成 200、100、50、25 EU/mL 的溶液，分别与 0.2mol/L 盐酸对倍混匀，得含有 100、50、25、12.5EU/mL 的 0.1mol/L 盐酸溶液，再用 BET 水稀释 100 倍，得含有 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 浓度内毒素的 0.001mol/L 盐酸溶液。细菌内毒素标准品用 BET 水制成 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 浓度的内毒素标准品溶液，作为鲎试剂标示灵敏度的对照系列。取上述系列溶液参照 2.2.2 进行干扰试验。因干扰试验系列溶液的盐酸终浓度为 0.001mol/L，在 2.2.2 中已验证其无干扰作用，未设 0.001mol/L 盐酸对照组。结果见表 4。盐酸回收干扰试验结果表明，将内毒素加入 0.1mol/L 盐酸中，反应终点浓度的几何平均值均在 0. 5λ~2.0λ，无干扰作用。

表 4　0.1mol/L 盐酸预添加细菌内毒素的回收干扰试验结果

鲎试剂批号	组别	细菌内毒素浓度（EU/mL）				NC	实测灵敏度（EU/mL）
		1.0	0.5	0.25	0.125		
2102193	0.1mol/L 盐酸	++++	----	----	----	--	1.0
	BET 水	++++	++++	----	----		0.5
2103051	0.1mol/L 盐酸	++++	++++	----	----	--	0.5
	BET 水	++++	++++	----	----		0.5

注：NC，阴性对照管。

2.2.4 肾上腺素原料药的干扰试验

本品细菌内毒素的限值为：每 1 mg 肾上腺素中含细菌内毒素的量应小于 10EU，鲎试剂灵敏度 λ 为 0. 5EU/mL，计算 MVC = λ/L=0.05 mg/mL。3 批次肾上腺素原料药用 0.1mol/L 盐酸溶解配制为 10 mg/mL 溶液，再用 BET 水稀释至 0.1mg/mL、0.05 mg/mL。取 0.05 mg/mL 溶液作为供试品溶液，取 0.1mg/mL 溶液与 4λ、2λ、λ、0.5λ 浓度的内毒素标准品溶液等体积混合，使成为含有 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 浓度内毒素的 0.05 mg/mL 供试品 PPC 溶液；取 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 浓度的内毒素标准品溶液作为鲎试剂标示灵敏度的对照系列，进行干扰试验。结果见表 5。肾上腺素原料药干扰试验结果表明，反应终点浓度的几何平均值均在 0.5λ~2.0λ，认为肾上腺素对细菌内毒素检查无干扰作用。

表 5　肾上腺素原料药细菌内毒素干扰试验结果

鲎试剂批号	供试品批号	细菌内毒素浓度（EU/mL）				供试品溶液	NC	实测灵敏度（EU/mL）
		1.0	0.5	0.25	0.125			
2102193	20201101	++++	++++	----	----	----	--	0.5
	20201102	++++	++++	----	----	----		0.5
	20201103	++++	++++	----	----	----		0.5
	BET 水	++++	++++	----	----	/		0.5
2103051	20201101	++++	++++	----	----	----	--	0.5
	20201102	++++	++++	----	----	----		0.5
	20201103	++++	++++	----	----	----		0.5
	BET 水	++++	++++	----	----	/		0.5

注：NC，阴性对照管。

2.2.5 肾上腺素原料药回收干扰试验

细菌内毒素标准品用 BET 水制成 200、100、50、25 EU/mL 的溶液，与 3 批次肾上腺素 10 mg/mL 的供试品溶液对倍混匀，得含有 100、50、25、12.5EU/mL 内毒素的 5 mg/mL 供试品溶液（盐酸的浓度为 0.05mol/L），再用 BET 水稀释 100 倍，得含有 2λ、λ、0.5λ、0.25λ 浓度内毒素的 0.05 mg/mL 供试品 PPC 溶液（盐酸的浓度为 0.0005mol/L）。供试品溶液、鲎试剂标示灵敏度的对照系列溶液同 2.2.4，进行干扰试验。结果见表 6。肾上腺素原料药回收干扰确证试验结果表明，反应终点浓度的几何平均值均在 0.5λ~2.0λ，认为盐酸溶解肾上腺素的过程对细菌内毒素检查无干扰作用。

表 6　肾上腺素原料药细菌内毒素回收干扰试验结果

鲎试剂批号	供试品批号	细菌内毒素浓度（EU/mL）				供试品溶液	NC	实测灵敏度（EU/mL）
		1.0	0.5	0.25	0.125			
2102193	20201101	++++	----	----	----	----	--	1.0
	20201102	++++	----	----	----	----		1.0
	20201103	++++	----	----	----	----		1.0
	BET 水	++++	++++	----	----	/		0.5
2103051	20201101	++++	++++	----	----	----	--	0.5
	20201102	++++	+++-	----	----	----		0.59
	20201103	++++	+++-	----	----	----		0.59
	BET 水	++++	++++	----	----	/		0.5

注：NC，阴性对照管。

2.3 动态浊度法

2.3.1 标准曲线的可靠性试验

动态浊度法鲎试剂灵敏度为0.005～10EU/mL，细菌内毒素标准品用BET水制成3.125、0.625、0.125、0.025、0.005 EU/mL的溶液。各取 0.1 mL分别加到预先加有 0.1 mL鲎试剂的反应管内，混合均匀，插入细菌内毒素检测仪内进行检测，每浓度平行3管；同时用BET水与鲎试剂反应作为阴性对照，平行 3管，反应温度为（37±1）℃，工作波长为660nm，预设吸光度为0.02。结果见表7，计算得标准曲线回归方程为LgT=2.8-0.3LgC（T为反应时间，C为溶液中细菌内毒素浓度），其相关系数r的绝对值为0.999，反应时间在447～3070s，而阴性对照管反应时间＞3570 s，因此标准曲线成立，可用于细菌内毒素定量检查。

表7　标准曲线的可靠性试验结果（n=3）

外加内毒素（EU/mL）	平均反应时间（s）	变异系数（%）
阴性对照	＞3570	/
0.005	3070	3.24
0.025	1739	1.07
0.125	1096	6.12
0.625	682	6.47
3.125	447	3.10

2.3.2 溶剂盐酸的干扰试验

将1 mol/L盐酸用 BET 水制成0.02、0.01、0.005、0.002、0.001mol/L的盐酸系列溶液；取0.01、0.005、0.001mol/L的盐酸系列溶液作为A液；取0.02、0.01、0.002mol/L的盐酸溶液与2λm浓度（0.25EU/mL）的细菌内毒素标准品溶液等体积混合，使成为含有λm浓度内毒素（0.125 EU/mL）的0.01、0.005、0.001mol/L的盐酸系列PPC溶液，作为B液。进行干扰试验：分别取上述各液 0.1 mL加到预先加有0.1 mL鲎试剂反应管内，混合均匀，插入细菌内毒素定量检测仪内进行检测，每浓度重复2管，检测条件同“2.3.1”项下。测定结束后，按标准曲线回归方程分别计算出盐酸溶液和含标准细菌内毒素λm的盐酸溶液中的细菌内毒素含量，计算回收率(B-A)/0.125×100％。结果见表 8。干扰试验结果表明，0.01、0.005mol/L盐

酸加入内毒素后未测出，0.001mol/L 盐酸加入内毒素后回收率为 51%，因此认为 0.01、0.005mol/L 盐酸对鲎试剂与内毒素的凝集反应有干扰，0.001mol/L 盐酸对鲎试剂与内毒素的凝集反应无干扰。

表 8　盐酸干扰试验结果（n=2）

稀盐酸浓度 (mol/L)	稀释倍数	外加内毒素（EU/mL）	实测内毒素（EU/mL）	变异系数（%）	回收率（%）
0.01	100	0	<0.005	/	
		0.125	<0.005	/	/
0.005	200	0	<0.005	/	
		0.125	<0.005	/	/
0.001	1000	0	<0.005	/	
		0.125	0.063	0.45	51

2.2.3 肾上腺素原料药回收干扰试验

本品细菌内毒素的限值为：每 1 mg 肾上腺素中含细菌内毒素的量应小于 10 EU，鲎试剂灵敏度 λ_1 为 0. 005EU/mL，计算 MVC = λ_1/L=0.0005 mg/mL。3 批次肾上腺素原料药用 0.1mol/L 盐酸溶解配制为 10 mg/mL 溶液，用 BET 水稀释 200 倍得 0.05mg/mL 供试品溶液；细菌内毒素标准品用 BET 水稀释至 25 EU/mL，与 10 mg/mL 肾上腺素溶液对倍混匀，得含有 12.5 EU/mL 内毒素的 5 mg/mL 供试品溶液（盐酸的浓度为 0.05mol/L），再用 BET 水稀释 100 倍，得含有 λm 浓度内毒素（0.125 EU/mL）的 0.05 mg/mL 供试品 PPC 溶液（盐酸的浓度为 0.0005mol/L），进行回收干扰试验。供试品溶液终浓度大于 MVC，盐酸终浓度小于最大无干扰浓度 0.001mol/L。结果见表 9。回收干扰试验结果表明，肾上腺素原料药用 0.1mol/L 盐酸溶解后加入内毒素的回收率为 74～80%，进一步确证肾上腺素用 0.1mol/L 盐酸制备成供试品溶液的过程对细菌内毒素检查无干扰作用，可用 0.1mol/L 盐酸溶解进行细菌内毒素检查。

表 9　肾上腺素原料药回收干扰试验结果（n=2）

供试品批号	稀释倍数	外加内毒素（EU/mL）	实测内毒素（EU/mL）	变异系数（%）	回收率（%）
20201101	200	0	<0.005	/	
		0.125	0.095	0.29	76
20201102	200	0	<0.005	/	
		0.125	0.010	4.99	80
20201103	200	0	<0.005	/	
		0.125	0.093	0.44	74

3 讨论

鲎试剂与内毒素的反应需在水溶液环境中进行，难溶于水的原料药品则需要完全溶解才能确保内毒素不被样品包裹，从而在稀释过程释放到 BET水中，否则会产生假阴性的结果。肾上腺素原料药不溶于水，因此寻找合适的溶剂是本研究的关键。据溶解性考察结果，采用盐酸作为溶剂溶解肾上腺素，再用BET水稀释后得到均一的供试品溶液。为排除溶剂对细菌内毒素活性的影响，本研究通过凝胶法和动态浊度法考察了盐酸的最大无干扰浓度，并将细菌内毒素预加入盐酸中进行回收干扰试验。凝胶法和动态浊度法结果表明盐酸最大无干扰浓度为0.001mol/L，预加入细菌内毒素的盐酸溶液浓度为0.1mol/L时，细菌内毒素检查试验（凝胶法）无干扰。

目前用于细菌内毒素检查凝胶法的市售鲎试剂灵敏度范围多在 0.5~0.03 EU/ml之间，本研究选择0.5EU/ml灵敏度的鲎试剂，肾上腺素用0.1mol/L盐酸配制成浓度的10mg/ml再用BET水进一步稀释至MVC进行细菌内毒素干扰试验，能覆盖目前市售鲎试剂灵敏度范围。结果表明肾上腺素用0.1mol/L盐酸溶解后制备成供试品溶液，对细菌内毒素检查无干扰作用。为了确保盐酸溶解样品的方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性，本研究将内毒素预先添加至含0.1mol/L盐酸的供试品溶液中再用BET水稀释至MVC进行细菌内毒素回收干扰试验，结果表明肾上腺素用0.1mol/L盐酸制备成供试品溶液的过程对细菌内毒素检查无干扰作用，回收率为74～80%。因此，拟定其细菌内毒素检查方法为：取供试品适量，加入适量0.1mol/L盐酸，旋混至完全溶解，制成浓度为10mg/ml的溶液，再用细菌内毒素检查用水稀释，依法检查（中国药典2020版通则1143），每 1 mg 肾上腺素中含细菌内毒素的量应小于10 EU。

综上所述，本研究对肾上腺素原料药细菌内毒素检查进行了方法学研究，建立的细菌内毒素检查方法可行，可选择市售任意灵敏度的鲎试剂对本品进行细菌内毒素检查，控制其质量。本文探索了一种新的思路，即将不溶于水的肾上腺素原料药用盐酸溶解，再用BET水稀释建立了细菌内毒素检查进行方法学研究，以完善其质量标准，本文同时考察了用溶剂盐酸对细菌内毒素检查的影响，为该产品采用凝胶法进行细菌内毒素检查提供了更多科学依据，并为难溶性药物建立细菌内毒素检查法提供更多

的参考。

参 考 文 献

[1] Guan HY, Long J, Hu DQ. et al. Study on influence of irradiation on content of adrenaline hydrochloride injection [J]. China Pharm, 2013, 22: 35-37.

[2] 周楚楚，杜鹏，孟雅，等. 肾上腺素注射液中肾上腺素磺化物的 HPLC 检测方法研究[J]. 药学学报, 2022, 57(9):2805-2810.

[3] Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? [J]. Nature, 1979, 280: 235-236.

[4] 李爱莲.肾上腺素临床应用研究进展[J]. 山西医药杂志, 2011, 40(2):129-130.

[5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People'sRepublicof China（中华人民共和国药典）[S].2020 Ed. Vol II. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 793-795.

[6] European Pharmacopoeia Commision. European Pharmacopoeia (欧洲药典) [S].11.0Ed. Strasbourg: European Directorate for Quality Medicines, 2023: 1886-1887.

[7] U.S. Pharmacopeial Convention. U. S. Pharmacopeia/National Formulary (美国药典/国家处方集)[S], USP43-NF38. Rochville MD the United States Pharmacopeial Convention, 2020: 9155-9158.

[8] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan. The Japanese Pharmacopoeia (日本药局方)[S].18th Ed. Tokyo: the Ministry of Health, Labor and Welfare, 2021: 417-418.

[9] 郝敏, 矫建, 刘进朋. 度骨化醇细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药品标准, 2020, 21(6): 526-530.

[10] 晏成倩, 黄梅梅, 王红平, 等. 一种难溶性原料药细菌内毒素检查方法的建立[J]. 中国药师, 2018, 21(2): 365-368.

[11] 国家药典委员会．中华人民共和国药典（四部）［M］．北京：中国医药科技出版社，2020.

基于 FARES 数据库对可乐定治疗注意力缺陷多动障碍的安全警戒信号分析

马欢，马攀*

（陆军军医大学第一附属医院 药学部，重庆 40038）

【摘要】目的：挖掘和分析美国不良反应报告系统（FARES）数据库中可乐定缓释片治疗注意力缺陷多动障碍的安全警戒信号，为临床安全用药提供借鉴。**方法：**以“clonidine”或“clonidine hydrochloride”为首要怀疑对象，提取 2004 年 Q1-2022 年 Q2，FARES 数据库中适应症为“attention deficit hyperactivity disorder（ADHD）”的相关不良事件报告，采用报告比值比法（ROR）、比例报告比值比法（PRR）及贝叶斯置信度递进神经网络法（BCPNN）进行信号挖掘及检测分析。**结果：**检索到以可乐定或盐酸可乐定为主要怀疑对象且适应症为 ADHD 对应的 AE 报告有 134 例，累及 9 个系统，45 个安全警戒信号，其中以神经系统、心血管系统及呼吸系统不良反应为主，常见镇静、嗜睡、窦性心动过缓、低血压、戒断性高血压、呼吸抑制、呼吸暂停等，另检测出说明书未提及的 QT 间期延长、全身强直性痉挛发作、自杀行为、超重等不良反应信号。**结论：**临床使用可乐定缓释片时需做好用药监测，尤其心率和血压。当患儿出现精神系统症状或生长发育异常的也需积极排除是否与此药相关，做好安全合理用药。

【关键词】注意力缺陷多动障碍；可乐定缓释片；信号分析；FDA 不良事件报告系统

Detection and evaluation of Adverse Drug events of clonidine based on FDA adverse event database

Ma Huan and Ma Pan

（Department of Pharmacy, The First Hospital Affiliated Army Medical University, Chongqing 400038, China）

【Abstract】Objective：To mine and analyze the safety warning signals of Clonidine Sustained-release Tablets in the treatment of ADHD in the American Adverse Reaction Reporting System （FAERS） database, and provide reference for clinical safety medication. **Methods**："Clonidine" or "clonidine hydrochloride" is targeted as the primary suspect, and extracted adverse event reports related to "attention deficit hyperactivity disorder （ADHD）" in the FAERS database from Q1 of 2004 to Q2 of 2022, using the report odds ratio method （ROR）, Proportional Reporting Odds Ratio （PRR）, while Bayesian Confidence Progressive Neural Network （BCPNN） were used for signal detection analysis. **Results**：There were 134 AE reports with clonidine or clonidine hydrochloride as the main suspected object and the indication corresponding to ADHD, involving 9 systems and 45 safety warning signals, including the nervous system, cardiovascular system and respiratory system. The main adverse reactions are common sedation, drowsiness, sinus bradycardia, hypotension, withdrawal hypertension, respiratory depression, apnea, etc. In addition, prolongation of QT interval and generalized tonic convulsions not mentioned in the instruction manual were detected, including suicidal behavior, overweight and other adverse reaction signals. **Conclusion**：When using clonidine sustained-release tablets clinically, it

资助项目：重庆市临床药学重点专科建设项目

作者简介：马欢，女，硕士研究生，主管药师，研究方向：临床药学，email：makunta@163.com

通讯作者：马攀，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学、体内药物分析、医疗大数据方面的研究，email：472447635@qq.com

is necessary to monitor the medication, especially the heart rate and blood pressure. In children with behavioral disorders or brain development, it is also necessary to consider the relationship with this drug, and make a safe and rational use of the drug.
【**KEYWORDS**】Attention deficit and hyperactivity disorder; clonidine hydrochloride; signal detection; FDA adverse event reporting system

注意力缺陷多动障碍（Attention deficit and hyperactivity disorder，ADHD）是一种复杂的神经发育障碍，其特征是多动、注意力不集中、冲动以及社交和学习成绩方面的问题[1]。多动症的病因仍不清楚，可能受遗传[2]和环境因素[3]的影响。它最常见于 6 至 17 岁的儿童[4]，患病率在 3.4% 到 7.2% 之间[5, 6]，大约 60% 到 80% 的患儿会持续到成年期，且与女性相比，男性受到的影响更大[7]。该病严重影响了儿童的学业成绩、幸福感和社会交往，给个人和社会都带来了高昂的成本[8, 9]。

药物治疗是 ADHD 治疗策略的一个重要内容。尽管 ADHD 的治疗指南建议将兴奋剂（即哌醋甲酯）作为一线治疗[10]，但多达 15% 的患者对这些药物没有反应[11]，且因一些不良反应，如食欲下降[12]、生长速度下降[13]、短期和长期心血管不良反应[14, 15]而被迫停药。可乐定能有效控制抽动症状，特别是对抽动障碍合并注意缺陷多动障碍（ADHD） 患者的有效性和安全性俱佳，研究证据较充足，指南均推荐使用[16, 17]。尽管普遍认为可乐定不如抗精神病药物有效，但包括可乐定和胍法辛在内的 α2 受体激动剂因其安全性更佳而常被用作抽动症的一线药物治疗[18]。

盐酸可乐定缓释片于 2022 年 6 月 30 日获国家药监局注册批准，用于 6～17 岁儿童和青少年 ADHD 的治疗，此为广大患儿和临床医生提供了新选择。尽管可乐定的临床研究显示该药具有较好的安全性，但缺少真实临床应用的数据。不良事件（Adverse events，AEs）自发呈报系统是目前世界上最主要的药物不良事件监测方法，可以获取药物在真实世界中的安全性数据；通过美国 FDA 不良事件报告系统（adverse events reporting system，FARES）数据库的信号检测也是发现上市后不良反应的重要数据来源。本研究采用数据挖掘方法，对 FAERS 中盐酸可乐定的不良事件进行信号检测，以发现和评价该药在真实世界中的安全性特征，为患有 ADHD 的儿童群体的治疗和监护提供参考。

1.方法

1.1 数据来源和处理

本研究数据来源于 FDA 公众健康项目 open-FDA 数据库，其中不良事件数据来源于 FAERS。FAERS 是 FDA 用于药物上市后安全性监测及评价的首要信息来源，收集了来自各个国家的医师、药师、制药企业、消费者等的不良事件报告，每季度更新，其累计报告数据已超过一千万份。FAERS 中所有不良事件数据采用国际医学用语词典（Medical Dictionary for Drug Regulatory Activities，MedDRA）的首选语（preferred terms，PT）编码。MedDRA 共 5 个层级，包括系统器官分类（system organ class，SOC）编码、PT、高位语（high level term，HLT）、高位组语（high level group term，HLGT）及相关中文术语，使用 MedDRA 可使数据的输入更特异、更全面，数据检索更方便。

本研究通过应用程序编程接口提取 open-FDA 数据库中结构化的不良事件报告数据。为保证数据的完整性，限定时间为 2004Q1-2022Q2，限定目标药物通用名为“clonidine”或“clonidine hydrochloride”，提取目标药物为 AE 发生的首要怀疑对象的原始数据并筛选适应症为 ADHD 对应的 AE 报告，删除疾病本身的临床表现和药物适应症相关的 AE 信号，并评价其余信号的相关性。

1.2 信号检测方法

比例失衡测量法是国际上常用的药物不良事件定量信号检测方法。本研究采用报告比值比法（Reporting Odds Ratio，ROR）、比例报告比值比法（Proportional Reporting Ratio ，PRR）及贝叶斯置信度递进神经网络法（bayesian confidence propagation neural network，BCPNN）3 种方法进行信号检测，当 2 种算法均呈阳性，则判断为可疑信号。算法的具体计算公式及信号检测标准见表 1、表 2，其中 a、b、c、d 的意义见表 1。

表 1 比例失衡测量法

Tab1 Ratio imbalance measurement algorithm

	目标不良事件	其他不良事件	合计
目标药物	a	b	a+b
其他药物	c	d	c+d
合计	a+c	b+d	a+b+c+d

表 2 信号检测标准及计算公式

Tab2 Standard of signal detection and calculation formula

Algorithms	Calculation formula	Criteria
ROR	$ROR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{ad}{bc}$ $95\%CI = e^{\ln(ROR) \pm 1.96\sqrt{\frac{1}{a}+\frac{1}{b}+\frac{1}{c}+\frac{1}{d}}}$	（1） a ≥ 3 （2） ROR ≥ 2 （3） 95%CI > 1
PRR	$PRR = \frac{a/(a+b)}{c/(c+d)} = \frac{a(c+d)}{c(a+b)}$ $\chi^2 = \frac{\left(\lvert ad-bc\rvert - \frac{n}{2}\right)^2 n}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)}$ n= a + b + c + d	（1） a ≥ 3 （2） PRR ≥ 2 （3）$\chi^2 \geq 4$
BCPNN	$E(IC) = \log_2 \frac{(C_{xy}+\gamma_{11})(C+\alpha)(C+\beta)}{(C+\gamma)(C_x+\alpha_1)(C_y+\beta_1)}$ $V(IC) = \frac{1}{(\ln 2)^2}\left\{\left(\frac{C-C_{xy}+\gamma-\gamma_{11}}{(C_{xy}+\gamma_{11})(1+C+\gamma)}\right)+\left(\frac{C-C_x+\alpha-\alpha_1}{(C_x+\alpha_1)(1+C+\alpha)}\right)+\left(\frac{C-C_y+\beta-\beta_1}{(C_y+\beta_1)(1+C+\beta)}\right)\right\}$ $\gamma = \gamma_{11}\frac{(C+\alpha)(C+\beta)}{(C_x+\alpha_1)(C_y+\beta_1)}$ $IC-2SD = E(IC)-2\sqrt{V(IC)}$ $\alpha_1=\beta_1=1;\alpha=\beta=2;\gamma_{11}=1;$ $C=a+b+c+d;C_x=a+b;C_y=a+c;C_{xy}=a$	（1） a ≥ 3 （2） IC-2SD > 0

2 结果

2.1 AE 上报基本情况

以盐酸可乐定或可乐定为首要怀疑药物且适应症为 ADHD 对应的 AE 报告共 134 例。可乐定 134 份 AE 报

告的人口学特征及严重不良事件构成情况见表 3。部份报告存在信息缺失，男性（61.19%）多于女性（28.36%）。上报年龄主要集中在 6-17 岁（68 例，50.75%），这与美国 FDA 批准适应症中年龄段一致；可乐定缓释片先于 2010 年在美国上市，临床应用广泛，故上报数量最多的是美国（97 例，72.39%）。

表 3 人口学特征及严重不良事件构成情况

Tab 3 Demographic characteristics and composition of serious adverse events

类别	数量	占比 （%）
性别		
男	82	61.19
女	38	28.36
未知	14	10.45
年龄/岁		
＜6	10	7.46
6-17	68	50.75
＞17	7	5.22
未知	49	36.57
严重不良事件		
死亡	4	2.99
残疾	2	1.49
危及生命	5	3.73
住院或住院时间延长	24	17.91
未知	99	73.88
报告来源		
美国	97	72.39
印度	2	1.49
其它已知国家	7	5.22
未知	28	20.90

2.2 不良事件信号分析结果

本次 AEs 报告中经 ROR、PRR、BCPNN 三种方法共检测出 45 个安全信号，使用 MedDRA 系统器官分类（SOC）对所有信号的 PT 进行分类，可乐定的安全信号累及 9 个 SOC，包括心脏器官疾病，呼吸系统、胸及纵隔疾病，各类神经系统疾病，精神类疾病，血管与淋巴管类疾病，胃肠系统疾病，代谢及营养类疾病，免疫系统疾病，眼器官疾病。具有临床参考意义的高风险信号包括：戒断性高血压（ROR 下限=836.56，IC-2SD=4.68）、低血压（ROR 下限=7.69，IC-2SD=2.82）、嗜睡（ROR 下限=5.84，IC-2SD=2.44）、镇静（ROR 下限=10.73，IC-2SD=3.19）、心动过缓（ROR 下限=23.22，IC-2SD=4.33）、窦性心动过缓（ROR 下限=27.96，IC-2SD=4.26）、呼吸抑制（ROR 下限=12.04，IC-2SD=3.18）、呼吸暂停（ROR 下限=12.64，IC-2SD=3.08）。说明书未提及的信号，包括心电图 QT 间期延长（ROR 下限=2.43，IC-2SD=1.21）、张力减退（ROR 下限=8.02，IC-2SD=2.61、困倦（ROR 下限=6.82，IC-2SD=2.64）、瞳孔缩小（ROR 下限=37.84，IC-2SD=4.55）、精神状态变化（ROR 下限=9.14，IC-2SD=2.98）、实施自杀行为（ROR 下限=3.72，IC-2SD=1.81）、 超重（ROR 下限=5.28，IC-2SD=1.64），全身性强直阵挛发作（ROR 下限=2.09，IC-2SD=0.92），详见表 4。

表 4　重点系统器官信号检测结果

Tab 4 Results of key system organ signal detection

SOC/PT	ROR（95%CI 下限）	IC（IC－2SD）	PRR（χ2）	是否收录说明书
心脏器官疾病				
急性心肌梗塞	3.57 （2.43）	1.70 （1.14）	3.56（45.23）	否
冠状动脉痉挛	26.20 （17.20）	3.63 （3.03）	26.09（500.78）	否
早搏/期外收缩	4.13 （1.97）	1.57 （0.55）	4.13（13.6）	否
左心室功能障碍	3.60 （1.50）	1.33 （0.15）	3.6（6.95）	否
左心室衰竭	31.45 （20.83）	3.78 （3.19）	31.31（636.75）	否
左心室肥大	12.21 （6.92）	2.71 （1.90）	12.19（111.75）	否
窦性心动过缓	34.97 （27.96）	4.59 （4.26）	34.43（2496.59）	是
心动过缓	26.11 （23.22）	4.50 （4.33）	24.6（6695.86）	是
心动过速	3.44 （2.69）	1.72 （1.36）	3.41（108.43）	否
心室功能障碍	5.59 （2.09）	1.54 （0.25）	5.59（10.8）	否
一级房室传导阻滞	18.31 （11.91）	3.35 （2.73）	18.23（322.65）	是
心电图 QT 间期延长	3.16 （2.43）	1.60 （1.21）	3.14（79.76）	否
心率增加	2.24 （1.68）	1.12 （0.70）	2.23（30.72）	否
呼吸系统、胸及纵隔疾病				
呼吸暂停	17.73 （12.64）	3.57 （3.08）	17.62（512.83）	否
呼吸不全	7.71 （3.20）	1.86 （0.68）	7.7（22.77）	否
呼吸抑制	16.01 （12.04）	3.60 （3.18）	15.87（650.03）	是
呼吸频率降低	19.70 （11.63）	3.13 （2.38）	19.64（227.61）	否
各类神经系统疾病				
意识水平低下	9.18 （7.39）	3.04 （2.72）	9.04（584.74）	否
昏迷程度异常	18.71 （11.43）	3.19 （2.48）	18.66（248.14）	否
张力减退	11.31 （8.02）	3.11 （2.61）	11.24（296.41）	否
困倦	8.26 （6.82）	2.92 （2.64）	8.11（658.99）	否
意识丧失	2.56 （2.04）	1.31 （0.98）	2.53（69.39）	否
镇静	13.41 （10.73）	3.51 （3.19）	13.21（875.62）	是
嗜睡	6.59 （5.84）	2.62 （2.44）	6.27（1256.45）	是
晕厥	2.73 （2.13）	1.40 （1.04）	2.71（67.39）	是
刺激反应消失	7.23 （5.29）	2.64 （2.18）	7.18（206.16）	否
全身性强直阵挛发作	3.22 （2.09）	1.54 （0.92）	3.21（29.71）	否
精神类疾病				
好斗情绪	3.91 （2.99）	1.88 （1.49）	3.88（112.56）	否
幻觉	2.55 （2.00）	1.30 （0.95）	2.53（59.68）	否
故意自我伤害	3.52 （2.33）	1.67 （1.07）	3.51（38.73）	否
睡眠质量差	2.40 （1.29）	1.09 （0.21）	2.39（6.78）	否
睡惊症	9.46 （4.72）	2.28 （1.32）	9.44（52.04）	否
药物滥用（成瘾）	4.30 （2.23）	1.69 （0.78）	4.29（19.53）	否
实施自杀行为	4.64 （3.72）	2.13 （1.81）	4.58（220.76）	否
血管与淋巴管类疾病				
高血压	7.37 （6.58）	2.77 （2.60）	6.95（1665.33）	是

血压升高	11.86 （10.66）	3.42 （3.27）	11.07（3322.42）	是
低血压	8.59 （7.69）	2.98 （2.82）	8.08（2099.79）	是
恶性高血压	42.30 （22.62）	3.15 （2.27）	42.21（356.02）	是
戒断性高血压	1237.16 （836.56）	5.22 （4.68）	1227.72（30105.26）	是
胃肠系统疾病				
肠梗阻	3.44 （1.79）	1.46 （0.55）	3.43（13.17）	否
代谢及营养类疾病				
超重	9.56 （5.28）	2.48 （1.64）	9.54（75.45）	否
免疫系统疾病				
超敏反应	2.02 （1.61）	0.98 （0.66）	2（38.4）	是
眼器官疾病				
干眼症	2.07 （1.29）	0.96 （0.28）	2.07（8.35）	否
瞳孔缩小	47.36 （37.84）	4.87 （4.55）	46.62（3416.75）	否
畏光	3.47 （2.01）	1.56 （0.78）	3.46（20.32）	否

3.讨论

可乐定是一种 α2-肾上腺素能受体激动剂，其速释片剂作为抗高血压药已有 40 多年的历史，多年来超说明书用于治疗 ADHD[19, 20]。2010 年，几个大规模的随机对照试验增加了可乐定在 ADHD 患儿中的应用[21, 22]。同年，盐酸可乐定缓释片（Kapvay® 或 CLON XR）获得 FDA 批准，在美国上市，2022 年 6 月盐酸可乐定缓释片于国内上市。可乐定说明书中最常见的不良反应为低血压/心动过缓、镇静和嗜睡、反跳性高血压、过敏反应、心脏传导异常、疲劳、易怒、失眠、头晕、噩梦、便秘、食欲下降、口干。如果 AE 被忽视，这可能会导致 ADHD 患者受到伤害。

在多药治疗和/或先天性心脏畸形的儿童中使用可乐定有出现儿童猝死的病例报告后，人们特别关注可乐定的安全性。一项相对较大的为期 16 周的多中心双盲试验[23]，122 名患有 ADHD（无基线心血管问题）的儿童被随机分配到可乐定（n＝31）、醋哌甲酯（n＝29）、可乐定和醋哌甲酯 （n＝32） 或安慰剂 （n＝30） 组，与单独使用安慰剂或醋哌甲酯相比，在接受可乐定（含或不含哌醋甲酯）治疗的 ADHD 儿童中未发现重大心血管事件或脑电图变化。但接受可乐定治疗儿童的心动过缓和嗜睡更常见，可乐定（单独或与醋哌甲酯联合）对比安慰剂组有明显更多的嗜睡相关。在 2002 年图雷特综合症研究组[24]中，48%接受可乐定治疗的儿童出现镇静，而接受醋哌甲酯治疗的这一比例为 14%，接受安慰剂治疗的这一比例为 6%。Rakesh[25]展开的一项临床研究中显示盐酸可乐定缓释片具有良好的耐受性，最常见的不良事件是轻度至中度嗜睡，心电图变化很小。本次可乐定缓释片的安全信号中检测到嗜睡、镇静的强信号，不难看出，可乐定的药理机制导致了相关的不良反应。可乐定是一种合成的咪唑衍生物，对中枢和外周的肾上腺素能受体均具有激动剂活性，髓质心血管中心突触后肾上腺素能受体的激活导致交感神经流出减少，并降低心率、心输出量、外周阻力和血压。可乐定还能兴奋蓝斑区 α2 肾上腺素能受体，增强 γ-氨基丁酸的释放及与阿片受体和 5-羟色胺能受体的相互作用，带来进一步镇静效果。可乐定最常见心血管系统的不良反应为心动过缓，窦性心动过缓，窦性心律不齐和房室传导阻滞已有报道[26]，本研究也挖掘出心动过缓、窦性心动过缓的强信号。尽管可乐定作为一种抗高血压药物，中枢 α 肾上腺素能活动通常占主导地位，但脉管系统中外周 α 肾上腺素能受体的激活可降低血压，所以可乐定也会有低血压的表现[27]。

结合临床研究，虽然可乐定在没有基线心血管风险的 ADHD 儿童中似乎安全且耐受性良好，但有必要定期监测脉搏和血压变化，不建议进行常规心电图检查。伴有低血压、心动过缓和心脏传导阻滞风险的患儿应谨慎使用可乐定缓释片。应在治疗开始前、剂量增加后定期测量心率和血压。还建议患者不要脱水或过热。应密切监测患有血管疾病、心脏传导疾病或慢性肾功能衰竭的患者，并应缓慢增加可乐定缓释片的剂量[28]。还需注意的是，在停用 α2 肾上腺素受体激动剂时，必须逐渐减量以避免戒断性高血压。

文献报道，可乐定最常见的神经系统影响包括感觉下降，嗜睡，昏迷，共济失调，瞳孔缩小，沮丧，反射和肌张力减退[29]。本次数据挖掘检测到张力减退、困倦、瞳孔缩小、呼吸抑制和呼吸暂停的强信号。从药理作用方面分析，α2 肾上腺素能受体对脊髓中间神经元谷氨酸释放的损害及抑制作用促进蓝斑核脊髓束通路产生张力减退和骨骼肌松弛。可乐定还可激活蓝斑中 α-肾上腺素能受体使瞳孔缩小，在中枢神经系统显着抑制的情况下，有时会出现苍白，呼吸抑制和呼吸暂停[30]，类似阿片类药物中毒。

本次数据挖掘显示 QT 间期延长中强信号，说明书中并未提及，但文献有报道。在一项对儿童和青少年 ADHD 药物治疗的系统评价[31]中，胍法辛可出现了 QT 间期延长的不良反应，可乐定和胍法辛同为 α2 肾上腺素能受体激动剂，药理作用相似，在临床使用过程中，需密切关注可乐定对心血管系统的潜在风险。在病例报道中，可乐定可能与新发癫痫发作有关[32]，本次也研究检测出说明书未提及的全身性强直阵挛发作的信号。有学者考虑癫痫发作可能是由低血糖继发的[33]，这提示在临床用药中，需关注患儿的血糖情况。在极少数情况下，在可乐定服药过量和给药后进行诊断性检测（例如生长激素缺乏症检测）时，可发现低血糖，这是所有精神状态改变的患儿应排除低血糖的原因之一[33, 34]。但 ADHD 疾病本身可能导致癫痫发作，ADHD 患者的无端癫痫发作和癫痫发病率已被证明是非 ADHD 儿童的两到三倍[35]。另外，ADHD 通常共患精神和/或行为障碍，如抽动障碍，焦虑障碍、抑郁障碍等，这些合并症的存在增加了 ADHD 儿童和青少年管理的复杂性。此次可乐定的安全信号中检测到说明书中未提及的精神系统信号，如实施自杀行为等，从疾病本身方面分析，自杀未遂或死亡的青少年大多有精神障碍[36]，ADHD 共患病可能会对自杀行为产生一定的影响。目前可乐定缓释片对精神类疾病的影响报道较少，也尚未充分研究可乐定对自杀的影响。现有的回顾性研究无明确证据表明自杀与可乐定有关[37]，但可乐定具亲脂性，易透过血脑屏障，儿童血脑屏障发育不完全，相比成人更易发生神经系统抑制作用。这也提示临床，使用可乐定时需注意这一风险。

超重和肥胖儿童及青少年与心血管、内分泌系统疾病等的发生显著相关，肥胖极大的增相关疾病的负担[38]，本次信号挖掘提示可乐定超重的强信号，目前虽然短期研究中没有发现可乐定对体重有显著的影响[31]，但在临床实践中，医师也需警惕可乐定是否影响了患儿的体重增长。

本研究基于 AEs 自发呈报系统，采用数据挖掘信号检测方法，对国外多年来儿童使用可乐定治疗 ADHD 的真实数据进行分析，有效解决临床试验样本量不足，观察时间短等问题，为我国刚上市的可乐定缓释片在儿童中安全的应用提出参考和警示。但本研究仍存在一定的局限性。首先，本次真实数据主要来源于美国、日本，基于种族、环境等差异，本研究的数据不能完全反应中国儿童的用药后不良反应的发生情况，为正确评估我国可乐定缓释片上市后的不良反应，做好药物安全警戒，需尽快规范化的建立基于我国儿童的不良反应数据库。其次，自发呈报的方式不可避免的会出现漏报、少报、报告不准确的情况，可能会导致研究结果的偏差。最后本研究中的 ADE 信号表示目标药物与目标 ADE 在统计学上有关联，而非生物学关联，并不能证明目标药物与目标 ADE 有必然的因果关系，其关联性还需进一步的临床研究评估加以证实。尽管如此，使用自发呈报系统数据库进行药物安全信号的挖掘和分析，仍可对临床安全用药提供一定的参考。

参考文献

1. Ozgen, H., et al., International Consensus Statement for the Screening, Diagnosis, and Treatment of Adolescents with Concurrent Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Substance Use Disorder. Eur Addict Res, 2020. 26（4-5）: p. 223-232.
2. Pan, C., et al., Development and Validation of a Risk Prediction Model of Vancomycin-Associated Nephrotoxicity in Elderly Patients: A Pilot Study. Clin Transl Sci, 2020. 13（3）: p. 491-497.
3. Burgess, L.D. and R.H. Drew, Comparison of the incidence of vancomycin-induced nephrotoxicity in hospitalized patients with and without concomitant piperacillin-tazobactam. Pharmacotherapy, 2014. 34（7）: p. 670-6.
4. <20032.pdf>.
5. Thomas, R., et al., Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. Pediatrics, 2015. 135（4）: p. e994-1001.
6. Polanczyk, G.V., et al., Annual research review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. J Child Psychol Psychiatry, 2015. 56（3）: p. 345-65.

7. <childress2012.pdf>.
8. Groman, C.M. and D.H. Barzman, The impact of ADHD on morality development. Atten Defic Hyperact Disord, 2014. 6（2）: p. 67-71.
9. Klein, R.G., et al., Clinical and functional outcome of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder 33 years later. Arch Gen Psychiatry, 2012. 69（12）: p. 1295-303.
10. Findling, R.L., Evolution of the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children: a review. Clin Ther, 2008. 30（5）: p. 942-57.
11. <barbaresi2006.pdf>.
12. <charach2004.pdf>.
13. Swanson, J.M., et al., Effects of Stimulant Medication on Growth Rates Across 3 Years in the MTA Follow-up. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 2007. 46（8）: p. 1015-1027.
14. Childress, A., The safety of extended-release drug formulations for the treatment of ADHD. Expert Opin Drug Saf, 2017. 16（5）: p. 603-615.
15. Liang, E.F., et al., The Effect of Methylphenidate and Atomoxetine on Heart Rate and Systolic Blood Pressure in Young People and Adults with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder （ADHD）: Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression. Int J Environ Res Public Health, 2018. 15（8）.
16. <20-pringsheim2012 重要.pdf>.
17. <中国抽动障碍诊断和治疗专家共识解读.pdf>.
18. Jain, R., et al., Clonidine extended-release tablets for pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2011. 50（2）: p. 171-9.
19. Palumbo, D.R., et al., Clonidine for attention-deficit/hyperactivity disorder: I. Efficacy and tolerability outcomes. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2008. 47（2）: p. 180-188.
20. <23-28-16-27-胍法辛治疗抽动障碍和注意力缺陷多动障碍儿童的安慰剂对照研究.pdf>.
21. Biederman, J., et al., A randomized, double-blind, placebo-controlled study of guanfacine extended release in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. Pediatrics, 2008. 121（1）: p. e73-84.
22. <23-28-16-29-P21241954_11128508.pdf>.
23. Daviss, W.B., et al., Clonidine for attention-deficit/hyperactivity disorder: II. ECG changes and adverse events analysis. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2008. 47（2）: p. 189-198.
24. <06-treatment-of-adhd-in-children-with-tics-a-randomized-controlled--2002.pdf>.
25. <08-jain2011 重要.pdf>.
26. Spiller, H.A., H.L. Hays, and A. Aleguas, Jr., Overdose of drugs for attention-deficit hyperactivity disorder: clinical presentation, mechanisms of toxicity, and management. CNS Drugs, 2013. 27（7）: p. 531-43.
27. Spiller, H.A., et al., Toxic clonidine ingestion in children. The Journal of Pediatrics, 2005. 146（2）: p. 263-266.
28. <28-可乐定缓释：用于注意力缺陷多动障碍.pdf>.
29. <klein-schwartz2002.pdf>.
30. <knapp1995.pdf>.
31. Hirota, T., S. Schwartz, and C.U. Correll, Alpha-2 agonists for attention-deficit/hyperactivity disorder in youth: a systematic review and meta-analysis of monotherapy and add-on trials to stimulant therapy. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2014. 53（2）: p. 153-73.
32. Feron, F.J., et al., New-onset seizures: a possible association with clonidine? Pediatr Neurol, 2008. 38（2）: p. 147-9.
33. <forum-and-correspondence-book-reviews-calendar-2000.pdf>.
34. Huang, C., et al., Hypoglycemia associated with clonidine testing for growth hormone deficiency. The Journal of Pediatrics, 2001. 139（2）: p. 323-324.
35. <hesdorffer2004.pdf>.
36. Nock, M.K., et al., Prevalence, correlates, and treatment of lifetime suicidal behavior among adolescents: results from the National Comorbidity Survey Replication Adolescent Supplement. JAMA Psychiatry, 2013. 70（3）: p. 300-10.
37. <long1993.pdf>.
38. Collaborators, G.B.D.O., et al., Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. N Engl J Med, 2017. 377（1）: p. 13-27.

药师助力高龄住院患者多学科评估与管理

马志会 姬丽刚 李雪琴

晋城大医院药学部 山西晋城 048006

【摘要】目的：为了促进对高龄患者的精细化管理，增加对高龄患者的人文关怀，降低高龄患者用药风险，改善高龄患者的营养、精神等状况。以整合医学的理念全程、全方位对高龄患者进行管理，切实保障高龄患者住院期间的医疗安全。**方法：**通过成立高龄患者多学科评估与管理小组，由老年病科、全科医学、中医科、营养科、护理部以及药学部医疗专业技术人员共同对入院 72h 内的高龄患者进行综合评估与管理。药师利用 Beers 标准（2019）等工具对高龄患者进行用药风险评估，根据用药风险级别进行个体化干预；营养师利用营养风险评估工具对高龄患者进行营养状况评估；其它科室分别进行衰弱评估、家庭与社会、智能精神状态、老年抑郁、尿失禁等进行综合评估，实现多学科诊疗的就医模式。**结果：**2023 年 3~5 月我院住院患者中年龄≥75 周岁的合计 1071 人，高龄患者多学科评估小组共完成 285 例患者的评估工作，评估占比 26.6%，其中男性 151 例，女性 134 例，年龄最大为 95 岁，有效评估人数 243 例，有效评估率 85.3%，评估阳性病例中主要为用药风险、营养状况及衰弱居多，阳性率分别为 40.7%、74.1%、65.4%。**结论：**通过对高龄住院患者多学科评估与管理，提高了高龄患者的就医满意度，降低了患者用药风险，改善了患者营养、精神等状况，药师在本项工作中发挥着不可或缺的作用。

【关键词】药师；高龄患者；多学科评估；整合医学；精细化管理

背景

人口老龄化已成为一种全球现象，中国是老年人口最多的国家，我国人口老龄化的程度持续加深，截至 2020 年末，中国 60 岁及以上的人口为 2.64 亿，占总人口的 18.7%，其中，65 岁及以上人口为 1.91 亿，占总人口的 13.5%。预计至 2050 年，65 岁及以上老年人口占总人口的比例将达到 30%[1]。高龄患者具有其特殊性，器官和生理严重衰退，普遍存在多种合并症，且常伴随多重用药，也会对机体造成潜在损害，但随着医疗水平和慢性病管理的进步，合并慢病的高龄患者预期寿命显著延长，就医需求也在不断增加。老年综合评估技术在我国推荐 60 岁及以上的人群开展，欧美国家推荐 65 岁及以上的人群开展。完整的老年综合评估包括 17 方面的内容，但对于某些失能、轻度失智老年人，由于其日常活动能力下降、认知功能问题，可开展部分老年功能评估[2]。

我院近 3 年年龄≥75 岁高龄住院患者占比约 10%，为了切实保障高龄患者院内医疗安全，对高龄患者进行多学科评估也是我院精细化管理的重要环节之一。为此，我院特成立“高龄患者多学科评估与管理”小组，并制定了《高龄患者多学科评估规范与管理流程》，以整合医学的理念全程、全方位对高龄患者进行管理，切实保障高龄患者住院期间的医疗安全。现将本项工作开展情况介绍如下。

1 研究内容

1.1 多学科团队搭建

本项工作由我院医疗质量控制部牵头，从医院层面下发开展《高龄患者多学科评估与管理》工作的文件。成立“高龄患者多学科评估与管理小组”，由分管院长担任组长，组员由老年科、中医科、全科医疗、营养科、护理部、医疗质量控制部、信息科相关医护工作者以及药学部全体临床药师，每个科室设定 1 名联络员。

1.2 职责与分工

整个评估小组职责与分工明确，有执行，有监督，有考核。

组长：统筹管理，制定高龄患者多学科评估规范及相关制度，协调和处理方案实施过程中的各种问题，监督方案有效开展；

作者/通讯作者信息：

马志会 副主任药师 硕士研究生 临床药师

研究方向：临床药学、药事管理与医院药学、药物治疗管理

副组长：协助组长制定高龄患者多学科评估规范及相关制度，负责方案的具体落实，及时向组长反馈方案实施的进展情况；

秘书：协助组长、副组长制定高龄患者多学科评估规范及相关制度，组织召开相关工作会议，与各科室联系员沟通，安排日常评估工作；

组员：老年科、中医科、全科医疗科、营养科以及药学部全体临床药师按照高龄患者多学科评估流程图对高龄患者进行评估工作；医疗质量控制部人员负责协调与监督评估工作的开展；信息科工作人员负责提供信息系统统计等技术支持。

1.3 评估与管理目标人群

本项目以年龄≥75 周岁，入院 72 小时内的高龄患者为评估与管理目标人群，每周小组组织 2 次评估工作，分为外科评估日与内科评估日。重点评估合并有 2 种及以上基础疾病，有多种（≥5 种）联合用药，营养情况及精神状态不佳等高龄患者。

1.4 具体评估项目

（1）**用药风险评估** 药师利用 Beers 标准（2019）、药物治疗管理（MTM）的药物治疗相关问题（MRP）与权重量表，从用药的适应证、有效性、安全性和依从性 4 个维度对患者进行用药风险评估，同时制定干预与跟踪随访计划。

（2）**营养风险评估** 营养师利用《简易营养状态评估表（MNA）》，了解患者过去 3 个月内食欲及进食量，营养是否均衡，体重变化情况，活动量以及精神心理问题，进而进行简易评估高龄患者的营养状态。

（3）**衰弱情况** 参照《老年人衰弱预防中国专家共识（2022 年）》，利用衰弱评估量表（FRAIL 量表）评估患者过去 4 周内有无疲乏，有无自由活动下降，疾病情况等，标准规范地识别与预防高龄患者的衰弱情况。

（4）**尿失禁、压疮** 护理部人员对高龄患者有无尿失禁、压疮以及是否存在尿失禁、压疮的风险进行评估。

（5）**精神和心理状态** 利用《老年抑郁评估表》评估患者精神和心理状态。

（6）**家庭与社会支持** 利用《家庭与社会评估量表》了解患者对家人及社会的满意度及幸福感。

1.5 多学科评估流程

为规范整个评估工作，特制定高龄患者多学科评估与管理工作流程图，见图 1.

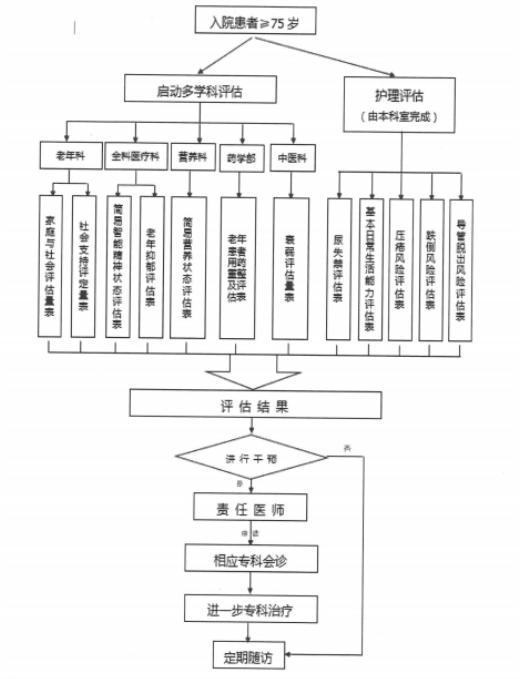


图 1.高龄患者多学科评估流程图

1.6 培训与管理

由于参与本项目评估工作的人员较多，且同一专业人员进行轮班制，在开始评估工作之前，医疗质量控制部组织所有参与评估工作的人员进行统一培训，包括《高龄患者多学科评估与管理规范》《高龄患者多学科评估与管理评估流程》以及各专业评估量表解读，保证整个评估工作同质化。同时对参与评估的人员进行考勤及工作量效考核，每月对评估工作进行总结与分析，尤其是评估阳性率的统计与分析，以便及时调整对高龄患者住院期间的管理，使管理更加精细化。



图 2 高龄患者多学科评估培训与实施

2 主要成果及转化

2.1 评估基本情况

自 2023 年 3 月启动本项工作以来，我院 2023 年 3~5 月住院患者中年龄≥75 周岁的合计 1071 人，共完成 285 例高龄住院患者的评估工作，评估占比 26.6%，其中男性 151 例，女性 134 例，年龄最大为 95 岁，有效评估人数 243 例，有效评估率 85.3%。有效评估指患者及家属配合，评估信息完整，具体信息如表 1.

表 1 参与评估患者基本信息

基本信息	患者数（例）	有效评估人数（例）
男	151	137
女	134	106
75~80 岁	136	133
81~85 岁	94	76
＞85 岁	55	34
合计	285	243

2.2 评估患者阳性率

开展高龄患者多学科评估与管理工作，目的就是为了识别与预防高龄患者住院期间的各种医疗风险，切实保障高龄患者住院期间的医疗安全。本评估工作通过多学科的合作，发现高龄患者存在多种医疗风险，其中以用药风险、营养状况及衰弱居多，分别为 40.7%、74.1%、65.4%，详见表 2.

表 2　高龄患者多学科评估风险阳性量表

评估项目	衰弱评估	家庭与社会	社会支持	智能精神状态	老年抑郁	尿失禁	营养状态	用药风险
阳性（例）	159	1	3	12	1	24	180	99
阳性率（%）	65.4	0.4	1.2	4.9	0.4	9.9	74.1	40.7

备注：评估结果“阳性”指评估项目存在风险，需要相关科室干预

2.3 存在用药风险情况

从评估结果中提示，存在用药风险的占比较高，根据药物治疗相关问题权重高低，将用药风险分为低，中，高 3 个等级，如表 3.

表 3 存在不同用药风险等级患者的情况

风险等级	患者数（例）	主要问题
低风险	60	服药品种数≥5 种 用法不适宜，如应该空腹服用而餐后服用
中风险	21	用药依从性差，如血压不高就不服用降压药； 缺乏疾病指标监测意识，如高血压，糖尿病服药不监测血压、血糖情况 存在药物治疗不足，如长期服用双联抗血小板药物未给予预防胃粘膜损伤的药物 存在低风险情况
高风险	19	存在用药禁忌 存在重复用药，如同时服用 2 种不同厂家不同剂型的二甲双胍 c) 存在药物相互作用，如氯吡格雷与奥美拉唑联用 d) 存在药物不良反应未干预 e) 存在中风险情况
合计	99	

备注：低，中，高风险均需要给予药学干预

3 社会效益

3.1 **增加医疗服务收入**。存在用药风险的患者，药师给予用药指导及干预，提高了用药依从性，为高龄患者居家用药提供了安全保障。同时为药师开展居家药学服务以及药学门诊奠定了基础。

3.2 **降低医疗费用支出**。通过多学科评估，降低老年抑郁风险，提高了高龄患者社会满意度，增加幸福感，提升对医护的认可度。减少高龄患者致残率及病死率，降低了家庭照护等人员成本支出。

3.3 **避免不必要的医疗纠纷**。通过多学科评估，及早识别和预测高龄患者发生各种不良风险，同时采用了及时的预防和干预措施，避免了医疗不良事件的发生，改善了医疗安全压力，营造了良好的就医环境。

4 存在问题与优化

4.1 存在问题

（1）患者方面，对评估小组接受意愿较低

主要表现在：①对评估小组缺乏信任，身份存疑，难以建立有效的沟通基础；②患者及家属对评估之后产生的治疗费用，是否可以医保报销问题较为关注。

（2）科室方面，与评估小组缺乏衔接机制

主要表现在：①医务人员对高龄评估工作了解不深，科室配合度不强；②评估小组直接和患者进行沟通，评估后的结果主要依靠患者和主治医师进行沟通，易被患者忽视，成果转化存在沟通断层，影响成果转化效率。

（3）成果转化方面，转化率较低

主要表现在：评估小组评估后工作成果，仅有部分科室主治医师发送会诊，成果转化率较低。

（4）评估小组方面，部分评估量表指标针对性不强

主要表现在：评估结果依赖问卷调查的支持，部分指标可优化。

4.2 工作优化

（1）加强宣贯工作　各临床科室护士，对入院的≥75 岁高龄患者，入院宣贯项目增加高龄患者评估小组工作内容，为高龄评估小组与患者交流时提供沟通基础。护理部协调各护理站增加入院宣贯项目。

（2）贯通衔接流程

①建立评估反馈卡　评估小组根据患者的评估结果，出具评估报告，针对阳性患者填写评估反馈卡。

②反馈卡工作跟进　将反馈卡存放护理站，由本科室护士和阳性患者主管医师对接，确认是否发起会诊；同时评估小组成员主动与阳性患者的主管医师沟通，增强阳性患者评估成果转化的即时性，实现患者→评估小组→主管医师→患者之间的有效衔接。

（3）优化评估量表　针对患者认可度较低的情况，进一步优化评估的形式及评估内容，减少冗余评估，对于评估指标的确定加强目标导向。

5 工作展望

老年综合评估技术涉及 17 项内容，从一般情况、视力、听力、口腔问题、躯体功能、营养状态、精神和心理状态、衰弱[3-6]、老年肌少症、疼痛、睡眠状态、尿失禁、压疮、社会支持、居家环境、共病和多重用药等内容。内容涉及面广泛，因此只能就某些单项做简单概述，不能详细展开，高龄患者综合评估工作无论从人员及技术上都存在一定的难度。

根据国际规范结合我国国情，为规范开展老年综合评估工作，建议老年医学从业人员在连续性医院-社区-中长期照料机构-居家一体化的医养服务体系中，全面实施老年综合评估。为此高龄患者多学科评估与管理可为此项工作提出一条新的工作手段。

目前，国际上并没有通用的老年人不适当用药的评价标准，及减少老年人多重用药的方案和流程。真正解决多重用药应注意以下原则[7]：①抓住疾病的主要矛盾；②充分考虑药物相互作用及药物对疾病的影响；③避免重复用药。药师作为评估团队的一员，有扎实的药理学、药效/药代动力学等专业知识，相较于临床医师及护士有充足的时间专职开展高龄患者的评估工作，对老年患者存在的潜在用药风险，如药物相互作用、用药依从性差，重复用药、用药错误及早识别与干预，避免不必要的用药错误，提高药物治疗效果。随着未来《药师法》的颁布，也为药师拓展药学服务提供了一个方向，如高龄患者的居家药学服务，药物治疗管理、药学门诊的开设等等。

参考文献

[1] 中华医学会来年医学分会.老年人衰弱预防中国专家共识（2022）[J].2022,41（5）：503-511.

[2] 陈旭娇，严静.中国老年综合评估技术应用专家共识[J].中华老年医学杂，2018，37(2):123-124.

[3] Shen S，He T，Chu J，et a1. Uncontrolled hypertension and orthostatic hypotension in relation tO standing balance in elderly hypertensive patients[J]. Clin Interv Aging，2015，10(5)：897-906.

[4] 于普林，王建业．加强老年人衰弱综合征的防治研究[J].中华老年医学杂志，2015，34(12)：1281.

[5] Chen X，Mao G，Leng SX．Frailty syndrome：anoverview[J]．Clin Interv Aging，2014，19(9)：433-441.

[6] Kenneth R，Song XW，Arnold M，et a1．老年医学与衰弱老年人的医疗服务[J].中华老年医学杂志，2009，28(5)：353 365.

[7] 中国老年保健医学研究会老龄健康服务与标准化分会，《中国老年保健医学》杂志编辑委员会.中国老年人用药管理评估技术应用共识(草案)[J].中国老年保健医学，2019，17（4）：16-19.

我院围术期气道管理药物临床路径的建立与分享

马志会，姬丽刚，赵敏敏

（晋城大医院药学部 山西 晋城 048006）

【摘要】目的：促进围术期雾化吸入药物的合理使用。**方法：**以循证医学为基础建立围术期气道管理药物治疗临床路径，采用戴明环（PDCA）循环法进行行政干预，完善围术期气道管理雾化吸入药物用药路径管理模式。**结果：**建立了围术期气道管理药物治疗临床路径，规范气道管理药物的使用。**结论：**提供围术期气道管理药物治疗临床路径管理新模式及临床合理用药新理念。

【关键词】临床药师；围术期气道管理；雾化吸入；药物路径；合理用药；

近年来加速康复外科（enhanced recovery after surgery，ERAS）理念普遍应用于临床，气道管理作为加速康复外科（ERAS）的重要环节之一，应用于临床可减少肺部并发症、降低死亡风险、再入院率和住院费用[1]。常见消化道、胆道和阑尾等腹部手术主要采用全身麻醉插管，术后多出现呼吸道症状。相关研究显示[2, 3]，术后肺部并发症 （postoerative pulmonary complications, PPCs） 在普通外科人群中发生率在 2.0%~6.5%，在上腹部和胸部手术中约为 20% ~ 70%，是腹部外科手术中导致预后不佳的一个重要因素。为此做好围手术期气道管理有利于实现 ERAS。吸入性药物如吸入性糖皮质及激素、支气管扩张剂以及黏液溶解剂是目前围术期气道管理的主要药物。尽管相关指南对围术期患者使用上述气道管理药物有相应推荐，但是多数医院缺乏实施细则而执行力不够，临床常有不合理使用现象。临床药师在医嘱审核及点评中发现围术期气道管理药物使用欠规范[4]。为此以普通外科为试点，提出围术期气道管理药物治疗临床路径（以下简称“临床药径”），采用计划（plan）-执行（do）-检查（check）和处理（action）的戴明环（PDCA）循环法分步骤有序实施，为用药精细化管理提供新思路，逐步规范我院围术期气道管理药物的合理使用。具体实施如下：

1. 围术期气道管理药物临床路径的建立

1.1 成立围术期气道管理药物小组

为保证建立的围术期气道管理药物临床路径适用于临床，也为了使临床药径顺利实施，需成立由医务部、药学部、临床科室以及质量控制部组成的临床药径管理小组。临床药径的建立以药学部临床药师为主，每个环节需与临床科室医师进行有效沟通，医务部的职责为临床药径运行时给予行政干预，质量控制部对临床药径实施的全程进行质量控制，保证临床药径安全实施。

1.2 建立临床药径管理模式

临床药径管理模式采取 PDCA 循环法与行政干预相结合的管理模式[5]，主要步骤：①建立医务部和科室两级质控体系，科主任为第一责任人，形成“医师执行-护士监督-药师反馈”品管圈。②召开临床药径启动会，药师进行讲解、培训，确保医师对药径可接受、能操作。③药径实施后，药师每月病例点评，形成分析报告上报医务部；药径实施情况与科室及个人绩效挂钩。④实施过程中出现问题，由质控医师和药师沟通，如需修订药径则在医务部、药学部、临床科室共同协商下完成，逐步实现药径优化、提高质控效果。

2. 围术期气道管理药物临床路径标准流程

2.1 适用对象

有消化道、胆道和阑尾等疾病诊断，需要采用全身麻醉插管进行腹部手术的普通外科患者。

作者：马志会，硕士，副主任药师，临床药师 Email:mazhihui1984@126.com

2.2 药物治疗方案依据

（1）《加速康复外科中国专家共识及路径管理指南》（2018 版）（《中国实用外科杂志》2018（1）：1-20. ）

（2）《多学科围手术期气道管理专家共识》（2018 版）（《中国胸心血管外科临床杂志》2018（7）：545-549.）

（3）雾化吸入疗法合理用药专家共识（2019 年版）（《医药导报》2019（2）：135-146.）

（4）《胸外科围手术期气道管理专家共识》（2019 版）（《 中国胸心血管外科临床杂志》2019（9）：835-842.）

（5）《肺部手术加速康复围手术期路径管理指南》（2019 版）（《T ransl Lung Cancer Res 》2019，8（6）：1174-1187.）

2.3 监护要点

（1）药物选择：按照《雾化吸入疗法合理用药专家共识》（2019 年版）执行。建议使用吸入用糖皮质激素（如：布地奈德混悬液）、支气管扩张剂（如：特布他林或异丙托溴铵）以及痰液溶解剂（如：吸入用乙酰半胱氨酸溶液）。

（2）给药时机：对于合并危险因素的手术患者推荐在术前 3~7d 和术后 3~7d 雾化吸入布地奈德，每次 2.0mg，每天 2 或 3 次[6]；对于存在高危因素的患者，建议术前 3~7d 开始使用异丙托溴铵，每次 0.5mg，每隔 6h 雾化吸入一次，手术当天进入手术室之前雾化吸入，术后 24h 内建议及早雾化吸入，24h 后建议每隔 6h 雾化吸入一次，建议连续用药 7d[7]. 围手术期连续使用吸入用乙酰半胱氨酸溶液 3ml/次，2 次/每天 。

（3）用药使用剂量：如下表

表 1 雾化吸入药物使用剂量

药品	用法用量
布地奈德	常规单次剂量 2.0mg，每天 2~3 次
异丙托溴铵	常规单次剂量 0.5mg，每 6h 一次
特布他林	常规单次剂量 5.0mg，每天 2 次
乙酰半胱氨酸溶液	常规单次剂量 3.0ml，每天 2 次
便携吸入布地奈德+福莫特罗	常规单次剂量 9ug，1 吸/次，每天 2 次

（4）疗程：围术期气道管理药物建议术后雾化吸入 3~7d。

（5）不良反应：常用雾化吸入药物的不良反应及处理 ①ICS 与全身用糖皮质激素比较 ICS 的不良反应发生率低，安全性较好。但由于给药方式的特殊性 ICS 吸入后沉积在口咽部、喉部可造成局部不良反应，使用后立即漱口和漱喉，可有效减少局部不良反应。对于需要长期吸入大剂量 ICS 的患者，应定期检查患者的皮肤、骨骼、代谢等情况[8,9]。②支气管舒张剂选择性 β2 受体激动剂（SABA）和短效胆碱受体拮抗剂（SAMA）过量或不恰当使用 SABA 可导致严重不良反应，对于合并青光眼、前列腺肥大的患者使用 SAMA 过程中可能导致原患疾病的加重，注意识别并更换药物。③乙酰半胱氨酸，对鼻咽和胃肠道有刺激，可出现鼻液溢、胃肠道刺激，如：口腔炎、恶心和呕吐的情况[10]，对于胃溃疡或有胃溃疡病史的患者，尤其是当与其他对胃黏膜有刺激作用的药物合用时慎用 [10] 。患有支气管哮喘的患者，在治疗期间应密切观察病情，如有支气管痉挛发生，应立即终止治疗。

2.4 围术期气道管理药物治疗临床路径流程图

将符合纳入本临床药径的患者进行围术期气道管理危险因素评估[1]。

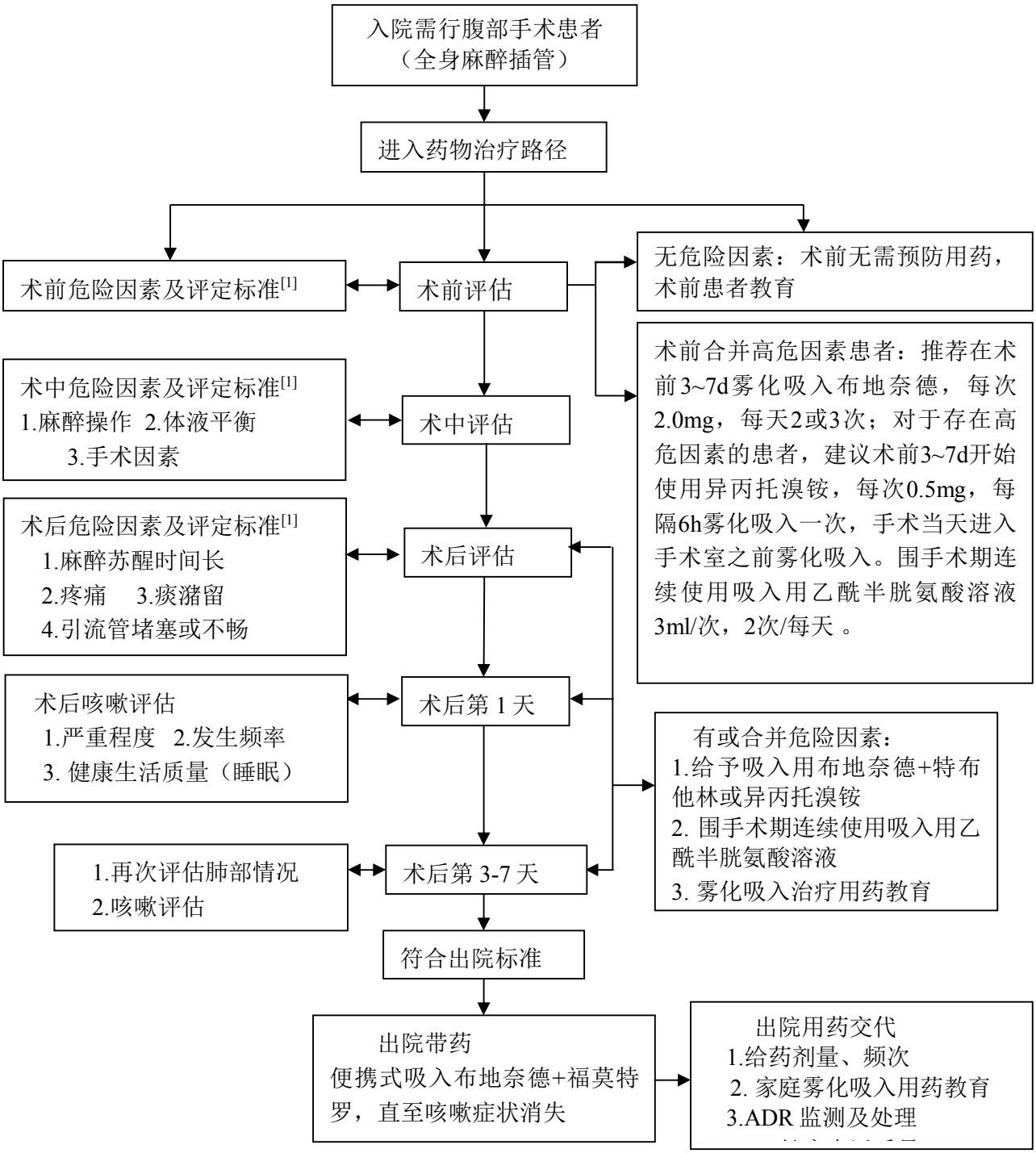


图 1　围术期气道管理药物治疗临床路径流程图

注：（1）术前危险因素及评估：1.年龄≥ 75 岁；2.吸烟史；3.致病性气管定植菌；4.哮喘或气道高反应性；5.肺功能临界状态或低肺功能；6.呼气峰值流量 PEF<320 L/min。7.肥胖 体重指数（BMI）≥ 28 kg/m2 或体表面积（body surface area，BSA）≥ 1.68 m2；8.基础疾病及合并疾病 COPD、结核及其合并肺部其它疾病，如肺间质纤维化等；9.既往史与手术史，如术前曾行放射治疗和/或化学治疗。二次手术或外伤治疗史；10.其它 心、肝、肾等功能不全和代谢性疾病（如糖尿病）及各种原因所致营不良或贫血等；（2）术中危险因素评估：1.麻醉操作；2.体液平衡；3.手术因素；（3）术后危险因素：1.麻醉苏醒时间长；2.疼痛；3.痰潴留；4.引流管堵塞或不畅。

3. 讨论

围术期气道管理在 ERAS 中不可或缺，做好围术期气道管理，可以减少肺部并发症、降低死亡风险、再入院率和住院费用。这种理念的推广使得临床围术期气道管理药物广泛使用，尤其是雾化吸入类药物。但存在一些手术围术期未进行危险因素评估，对于术前有危险因素的患者未进行预防性气道管理，增加术后肺部并发症的发生；同时也存在术后雾化吸入疗程不足或过度使用的问题。

在循证医学基础上，围术期气道管理药物临床路径初步建立，在临床药径建立的过程中得到了医务部、临床科室及质量控制部的大力支持。国内尚无有关围术期气道管理药物治疗临床路径建立的相关资料，本临床药径的建立可以提供一种管理新思路。运用 PDCA 管理模式联合行政干预，临床药师在这其中也起了关键作用，同时也承担着气道管理药物的点评工作，通过点评发现问题及时反馈给临床，促进临床药径正常运行，围术期气道管理药物的使用也会逐渐规范。

目前本临床药径以普通外科为试点，纳入临床药径的手术以中上腹部手术为主。如临床药径运行良好，可将试点扩大到其它临床科室，如胸外科、骨科等以全麻手术为主的科室，但路径中的一些细节还需要在扩围中不断完善。

总之，围手术期气道管理药物临床治疗路径需要在临床实践中不断完善，以便更好地服务于患者。

参考文献

[1] 多学科围手术期气道管理中国专家共识专家组.多学科围手术期气道管理中国专家共识 （2018 年版 ）.中国胸心血管外科临床杂志，2018，25（7）：545-549.

[2] Chandler D, Mosieri C, Kallurkar A, et al. Perioperative strategies for the reduction of postoperative pulmonary complications. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2020, 34（2）:153-166.

[3] 陈龙 . 预防应用布地奈德雾化吸入对全麻甲状腺良性肿物切除术后患者咽喉部并发症的影响.中国处方药 ，2020，18（9）：73-74.

[4] 杨智，易燕桃，车凤莲，等. 普外科围手术期气道管理药物的应用分析[J].中国现代药物应用，2021，15（12）：235-238.

[5] 梁瑜，孟真，王 越，等. 止吐药物和质子泵抑制剂临床路径管理的探索与实践[J].医药导报，2022，41（2）：248-251.

[6] 蔡映云，吕迁洲.临床药物治疗学呼吸系统疾病[M].北京：人民卫生出版社，2016.

[7] 王天佑.吸入型抗胆碱能药物在围手术期肺保护中的应用专家共识[J].中华胸心血管外科杂志，2011，27（9）：513-515.

[8] ROLAND NJ, BHALLA RK, EARIS J. The local side effects of inhaled corticosteroids: current understanding and review of the literature[J]. Chest, 2004, 126（1）:213-219.

[9] LIPWORTH BJ. Systematic adverse effects of inhaled and corticosteroid therapy: a systematic review and meta-analysis[J].Arch Intern Med, 1999,159（9）:941-955.

[10] Zambon S.p.A.富露施（吸入用乙酰半胱氨酸溶液）说明书[Z].2012-01-05.

附表：

围术期气道管理药物治疗临床路径表单

患者姓名：_____性别：____年龄：____住院号：_____床号：

住院日期：___年__月__日　出院日期：___年__月__日

时间	手术前		手术日
药学监护要点	询问病史 询问药物过敏史 评估术后肺部并发症风险 收集检查检验结果	向医生交待围手术期用药注意事项 术前用雾化吸入药物 （给药频次、剂量、吸入装置使用患教、ADR） 抗生素（酌情）	雾化吸入药物（给药时机、药物选择、用法用量） 抗生素（酌情）
药师签名			

时间	术后第 1 天	术后第 3-7 天	出院
药学监护要点	术后咳嗽评估 严重程度 发生频率 健康生活质量（睡眠） 持续雾化吸入药物（给药频次、剂量、吸入装置使用患教、ADR）	术后咳嗽评估 持续雾化吸入药物 （给药频次、剂量、吸入装置使用患教、ADR）	肺部等呼吸道相关症状评估 出院带药交代（给药频次、剂量、吸入装置使用患教、ADR）
药师签名			

某三甲医院5年间临床常见细菌分布及耐药性分析

莫双铭[1]，唐钰书[2,3]，伍建中[1]，符露丹[1]，郑治宝[1]，游海涛[1]

1.岳池县人民医院药剂科，四川 广安 638300；2. 川北医学院第二临床学院肾内科，四川 南充 637001；3.岳池县人民医院肾内科，四川 广安 638300

【摘要】目的：基于某医院抗菌药物耐药监测，确定常见致病菌分离株及其抗菌药物敏感性特征。**方法：**使用来自广安某三甲医院5年间抗菌药物药敏试验记录进行横断面回顾性研究，对纳入统计的9135株细菌药敏结果进行分析。**结果：**革兰阳性菌占31.2%，革兰阴性菌占68.8%，分别以金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌为主；血流感染病原菌分析：革兰阳性菌占55.1%，革兰阴性菌占44.9%，革兰阴性菌以大肠埃希菌和克雷伯菌为主，革兰阳性菌以葡萄球菌为主。整体药敏结果显示，MRSA和MRCNS检出率为41.9%和77.4%，甲氧西林耐药株对绝大多数抗菌药物耐药率远高于甲氧西林敏感菌株；肠杆菌属中产ESBLs的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌检出率为21.6%和57.9%，肠杆菌目细菌对碳青霉烯类耐药率均低于8.5%。血流感染监测显示：产酶株大肠埃希菌对部分抗菌药物耐药呈增加趋势，头孢吡肟敏感率下降26.2%，氨曲南敏感率下降12.9%，环丙沙星敏感率下降28.3%；凝固酶阴性葡萄球菌对克林霉素敏感率上升10.5%。连续监测显示：MRSA对左氧氟沙星敏感率从2018年的90.1%下降至73.6%；流感嗜血杆菌对阿莫西林/克拉维酸敏感率上涨至92.3%。**结论：**临床分离菌株对常见抗菌药物的耐药率呈水平趋势，但如MRSA对左氧氟沙星耐药呈直线上升趋势，提示该院需要加强广谱抗菌药物管理；血流感染产酶株大肠埃希菌对头孢吡肟、环丙沙星及氨曲南等抗菌药物敏感率下降，提示需要规范临床合理使用抗菌药物，加强预防感染措施，减缓细菌耐药。

【关键词】细菌耐药监测；血流感染；抗菌药物；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

Distribution and drug resistance of common bacteria in a tertiary hospital during 5 years

Mo Shuangming[1], Tang Yushu[2,3], Wu Jianzhong[1], Fu ludan[1], Zheng Zhibao[1], You Haitao[1]

（[1]Department of Pharmacy, The People's Hospital of Yuechi , Guang'an Sichuan；[2]Department of Nephrology, Second Clinical College of North Sichuan Medical University, Nanchong, Sichuan；[3]Department of Nephrology, The People's Hospital of Yuechi, Guang'an Sichuan）

【Abstract】Objective：Based on a hospital antibiotic resistance surveillance, identify Bloodstream infectionpathogenic strains and their antibiotic sensitivity characteristics. **Methods：**A cross-sectional retrospective study was conducted using the records of antimicrobial susceptibility testing of a tertiary hospital in Guang'an for 5 years, and the antimicrobial susceptibility results of 9135 bacterial strains included in the statistics were analyzed. **Results：**Gram-negative bacteria: 68.8%, gram-positive bacterium: 31.2%, mainly *S. aureus* and *E. coli*. Analysis of bloodstream infection: Gram-positive bacterium: 55.1%, mainly *E. coli* and Klebsiella; Gram-negative bacterium: 44.9%, mainly staphylococcus. The overall results showed that MRSA 41.9%,MRCNS 77.4%, methicillin-resistant strains were much more resistant to most

[作者简介] 莫双铭，男，1994-12，硕士，临床药师，17685125015，738350768@qq.com，研究方向：临床药学和药理学

[通信作者] 游海涛，女，1978-04，本科，副主任药师，15282604960，1436443003@qq.com，研究方向：临床药学

[作者详注] 莫双铭，游海涛。四川省广安市岳池县建设路东段22号，岳池县人民医院，药剂科，638300，738350768@qq.com

唐钰书。四川省南充市顺庆区涪江路234号，川北医学院第二临床学院，肾内科，637001，1181165697@qq.com

[基金项目] 川北医学院2021年度四川省基层卫生事业发展研究中心资助项目（项目编号：SWFZ21-C-86）

antibiotics than methicillin-sensitive strains.ESBLs-producing *E. coli* had 21.6%, ESBLs-producing *K. pneumoniae* had 57.9%, and the resistance rate of enterobacteriaceae to carbapenems was lower than 8.5%.Blood flow infection monitoring showed that the resistance of *E. coli* to cefepime, amtronam and ciprofloxacin was increasing.Monitoring showed that MRSA sensitivity to levofloxacin decreased by 16.5%;The susceptibility of *H. influenzae* to amoxicillin/clavulanic acid increased to 92.3%. **Conclusion：** There was no significant change in the resistance rate of clinical isolates to common antibiotics.Some drug resistance changes suggest that the hospital needs to strengthen the management of broad-spectrum antibiotics, standardize the rational use of antibiotics in clinical practice,Strengthen infection prevention measures to slow down bacterial resistance.

【**Keywords**】Bacterial monitoring; Bloodstream infection; Antimicrobial drugs; Methicillin-resistant *S. aureus*

从 1928 年发现青霉素至今，抗菌药物挽救无数生命，但是近年来细菌耐药阻碍有效治疗，抗菌药物耐药现在被认为是一个世界性问题[1-2]。血流感染病死率高，与非血流感染耐药谱差异大，血流感染会导致住院时间延长、治疗费用增加、使用毒副作用更大的抗菌药物[3-6]。本研究旨在描述 2018 年—2022 年某综合性医院门诊及住院患者抗菌药物暴露与细菌耐药性的变化趋势及相关性，加强对临床抗菌药物的合理选用工作并建立抗菌药物临床预警机制。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2018 年—2022 年该三级综合医院门诊及住院患者送检的临床标本（血液、引流液、痰液、尿液、分泌物、咽拭子等），排除同一患者重复样本，排除了来自社区样本，共计 9135 株非重复样本分离株。

1.2 方法

法国生物梅里埃公司的 VITEK 2 Compect 全自动微生物分析系统进行菌株鉴定，以及配套的培养瓶、革兰阴性细鉴定卡（GN）、革兰阳性细菌鉴定卡（GP）、革兰阴性菌药敏卡(AST GN14)、革兰阳性菌药敏卡（AST GP67）等。细菌分离鉴定严格按 2016 年《全国临床检验操作规程》的规范进行，根据美国临床实验室标准化协会（CLSI）标准进行 K-B 法药敏试验。

1.3 质量控制

质控菌株为金黄色葡萄球菌（ATCC25923）、大肠埃希菌（ATCC25922）、铜绿假单胞菌（ATCC27853）、肺炎克雷伯菌（ATCC700603）等均来源于国家卫生健康委临床检验中心。

1.4 统计学处理

使用 WHONET 5.6 软件和 SPSS 17.0 软件进行数据分析，计数采用百分比或者例数表示。

2 结果

2.1 分离细菌分布

2018 年—2022 年共检出菌株 9135 株，其中革兰阴性菌 69 种，6285 株(68.8%)，革兰阳性菌 23 种，2850 株（31.2%），以大肠埃希菌（*E. coli*）1 795 株（19.6%）、金黄色葡萄球菌*(S. aureus*)1156 株（12.7%）及流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)1144 株（12.5%）（图 1）；血流感染检出病原菌 1031 株(11.3%)，其中革兰阴性菌 31 种，568 株(55.1%)，革兰阳性菌 29 种，463 株（44.9%），以大肠埃希菌(*E. coli*）358 株（34.7%）、凝固酶阴性葡萄球菌(Coagulase negative staphyloco)249 株（24.2%）及金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)152 株（14.7%）、肺炎克雷伯菌(*K. pneumonia*)106 株（10.3%）等，见图 2。大肠埃希菌是过去 5 年中最常见的菌株，监测显示分离占比呈上涨趋势。

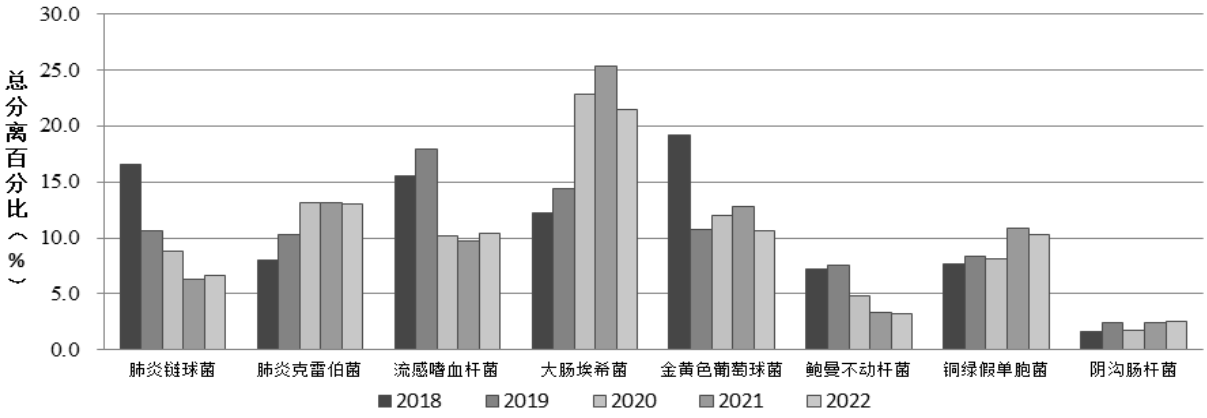


图 1 排名前八分离的菌种占比

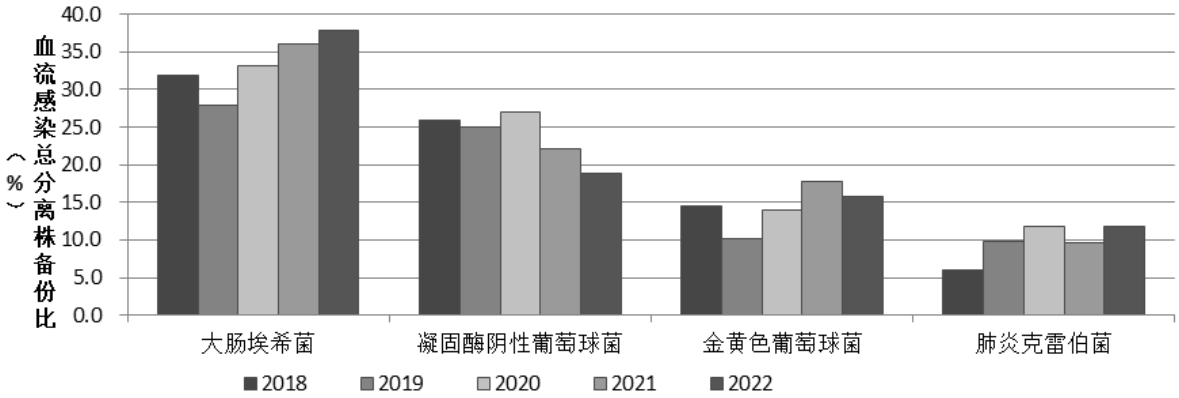


图 2 血流感染病原菌排名前十分离的菌种占比（%）

2.2 革兰阳性菌对抗菌药物的抗菌谱

2.2.1 肺炎链球菌

851 株肺炎链球菌中，尚未发现万古霉素耐药株，极少菌株对莫西沙星或利奈唑胺耐药，对青霉素 G、红霉素、四环素和复方新诺明耐药率较高，分别为 66.2%、98.1%、82.4%和 63.7%（表 1）。

2.2.2 金黄色葡萄球菌

MRSA 和 MRCNS 的检出率为 41.9%和 77.4%， MRSA 和 MRCNS 对万古霉素耐药率为 1.2%和 4.7%。甲氧西林耐药株（MRSA 和 MRCNS）对克林霉素、红霉素及喹诺酮类等抗菌药物耐药率远高于甲氧西林敏感株（MSSA 和 MSCNS），但 MRSA 对复方新诺明的耐药率低于 MSSA；MRCNS 对喹诺酮类、万古霉素及庆大霉素等抗菌药物耐药率显著高于 MRSA。葡萄球菌属尚未发现利奈唑胺耐药株，MSSA 中发现极少数替加环素耐药株（表 1）。

2.2.3 肠球菌属

肠球菌属菌株中粪肠球菌和屎肠球菌占 33.4%和 28.6%。粪肠球菌对绝大多数受试抗菌药物的耐药率显著低于屎肠球菌，其对呋喃妥因的耐药率较低，为 4.1%，但屎肠球菌对呋喃妥因耐药率较高，为 39.5%。粪肠球菌及屎肠球菌菌株对克林霉素完全耐药，两者对万古霉素耐药率分别为 2.1%和 3.7%，尚未发现利奈唑胺或替加环素耐药株（表 1）。

表 1 革兰阳性球菌耐药率(%)

抗菌药物	肺炎链球菌（n=851）	金黄色葡萄球菌（n=1156）		凝固酶阴性葡萄球菌（n=359）		肠球菌（n=290）	
		MRSA（n=484）	MSSA（n=672）	MRCNS（n=278）	MSCNS（n=81）	粪肠球菌（n=97）	屎肠球菌（n=83）
青霉素 G	66.2	—	—	—	—	—	—
阿莫西林	32.7	—	—	—	—	—	—
头孢噻肟	13.3	—	—	—	—	—	—
头孢曲松	12.8	—	—	—	—	—	—
左氧氟沙星	0.4	5.0	0.7	35.6	1.2	20.6	71.6
环丙沙星	—	9.1	7.1	48.9	7.4	22.7	74.1
莫西沙星	0.2	2.7	0.0	10.1	1.2	20.6	71.6
克林霉素	—	82.0	44.9	57.9	28.4	100.	100.
红霉素	98.1	73.1	51.3	78.8	38.3	—	—
四环素	82.4	26.0	21.3	38.1	16.0	—	—
复方新诺明	63.7	5.0	13.1	45.0	12.3		
美罗培南	14.7	—	—	—	—	—	—
厄他培南	0.8	—	—	—	—	—	—
万古霉素	0.0	1.2	0.4	4.7	0.0	2.1	3.7
利奈唑胺	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
呋喃妥因	—	0.2	0.1	0.4	1.2	4.1	39.5
庆大霉素	—	5.6	8.2	19.8	0.0	29.9	40.7
替加环素	—	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

注：— ：表示无此耐药数据，未经统计学分析

2.3 革兰阴性杆菌对抗菌药物抗菌谱

2.3.1 肠杆菌目细菌

大肠埃希菌和克雷伯菌中产 ESBLs 株分别占 21.6%和 57.9%。大肠埃希菌和克雷伯菌非产酶菌株对绝大多数受试抗菌药物耐药率远低于产酶菌株，大肠埃希菌产酶株在酶复合制剂中，除了氨苄西林/舒巴坦耐药率 64.1%，其余酶复合制剂耐药率均低于 9.5%，而肺炎克雷伯菌产酶株在酶复合制剂中，氨苄西林/舒巴坦耐药率 72.8%，其余酶复合制剂耐药率均低于 27.5%。肠杆菌目细菌对替加环素、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦及碳青霉烯的敏感度较高，耐药率均低于 6.7%（表 2）。

表 2 肠杆菌目细菌对抗菌药物耐药率(%)

抗菌药物	克雷伯菌(n=1074)			大肠埃希菌(n=1795)			肠杆菌(n=280)	变形杆菌(n=169)
	ESBLs 阳性(n=232)	ESBLs 阴性(n=842)	合计	ESBLs 阳性(n=1039)	ESBLs 阴性(n=756)	合计		
阿莫西林/克拉维酸	27.2	7.7	11.9	9.0	11.6	10.1	96.9	0.0
氨苄西林	100	98.9	99.1	100	66.0	85.7	—	66.1
氨苄西林/舒巴坦	72.8	14.1	26.8	64.1	27.2	48.6	—	23.2
哌拉西林/他唑巴坦	13.4	1.1	3.7	4.0	0.7	2.6	6.6	1.1
头孢曲松	95.3	0.1	20.7	95.1	4.4	56.9	32.4	26.0

头孢他啶	44.0	4.0	12.7	34.5	5.8	22.4	24.3	3.4
头孢哌酮/舒巴坦	20.7	1.4	5.6	9.2	0.0	5.3	13.1	0.6
头孢吡肟	37.9	2.3	10.0	30.1	1.6	18.1	11.2	2.8
左氧氟沙星	36.2	3.6	10.6	60.0	22.5	44.2	10.8	19.2
环丙沙星	49.6	4.4	14.2	62.8	27.2	47.8	8.9	32.2
四环素	80.6	13.8	28.2	75.7	58.6	68.5	13.9	95.5
复方新诺明	55.6	11.2	20.8	60.0	39.2	51.2	18.9	42.4
氨曲南	64.2	3.3	16.5	63.9	3.3	38.4	22.8	3.4
美罗培南	6.0	2.6	3.4	1.2	0.8	1.0	3.9	1.7
亚胺培南	6.0	2.3	3.1	1.0	0.7	0.8	0.8	2.3
厄他培南	1.7	0.0	0.4	0.1	0.1	0.1	2.3	0.0
呋喃妥因	39.7	11.0	17.2	2.3	1.5	1.9	14.7	95.5
阿米卡星	7.3	1.3	2.6	2.6	0.4	1.7	0.8	2.8
妥布霉素	12.1	0.8	3.3	22.3	5.4	15.2	7.7	10.7
庆大霉素	52.6	2.6	13.4	40.1	30.8	36.2	5.4	24.3
替加环素	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—

注：— ：表示无此耐药数据，未经统计学分析

2.3.2 非发酵糖革兰阴性杆菌

铜绿假单胞菌对常用抗菌药物仍高度敏感，对美罗培南和亚胺培南的耐药率为 5.8%和 8.4%；对阿米卡星、妥布霉素及庆大霉素的耐药率分别为 1.0%、2.3%和 3.5%；对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、环丙沙星、氨曲南及氨基糖苷类抗菌药物耐药率均低于 10.0%；5 年间铜绿假单胞菌对头孢他啶以及碳青霉烯抗菌药物耐药率趋势平稳无明显波动。不动杆菌属细菌对美罗培南和亚胺培南耐药率分别为 75.4%和 62.7%，头孢哌酮/舒巴坦耐药率为 83.4%，对阿米卡星和复方新诺明耐药率分别为 19.0%和 34.2%，替加环素耐药率为 2.6%，对其他受试抗菌药物耐药率则在 50.0%以上（表 3）。

表 3 非发酵糖革兰阴性杆菌以及其他革兰阴性杆菌对抗菌药物耐药率(%)

抗菌药物	流感嗜血杆菌(n=1144)	铜绿假单胞菌(n=838)	鲍曼不动杆菌(n=459)
阿莫西林/克拉维酸	17.7	96.4	91.1
氨苄西林	92.0		100
哌拉西林	—	9.9	100
氨苄西林/舒巴坦	—	93.3	—
哌拉西林/他唑巴坦	—	8.9	—
头孢噻肟	1.3	—	—
头孢曲松	—	95.3	65.6
头孢他啶	—	9.9	64.5
头孢哌酮/舒巴坦	—	7.9	83.4
头孢吡肟	—	5.7	64.7
左氧氟沙星	2.19	11.6	53.2
环丙沙星		9.1	65.4
四环素	3.1	97.5	60.6
复方新诺明	63.8	91.2	34.2

氨曲南	—	7.3	98.9
美罗培南	—	5.8	75.4
亚胺培南	—	8.4	62.7
呋喃妥因	—	98.1	100.0
阿米卡星	—	1.0	19.0
妥布霉素	—	2.3	65.1
庆大霉素	—	3.5	60.6
替加环素	—	—	2.6

注： — ：表示无此耐药数据，未经统计学分析

2.3.3 其他

流感嗜血杆菌分离株数量在 2020 年之前占比最大，1144 株流感嗜血杆菌中，儿童株和老年人分离株分别占 88.1%和 11.1%；β 内酰胺酶的检出率分别占各检出株 58.6%和 48.1%。流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药率均超过 90.0%，对阿莫西林/克拉维酸耐药率为 17.7%。流感嗜血杆菌对头孢噻肟、左氧氟沙星及四环素高度敏感，耐药率均低于 3.5%（表 1）。

2.4 部分细菌耐药率变迁

监测显示，MRSA 对左氧氟沙星敏感率从 2018 年的 90.1%下降至 73.6%；流感嗜血杆菌对阿莫西林/克拉维酸敏感率由 2018 年的 64.2%上升至 92.3%；肺炎链球菌对美罗培南敏感率由 2018 年的 30.6%上升至 100%，相应中介率由 68.6%下降至 0%。（表 4）。

表 4 部分细菌对抗菌药物耐药率变迁

时间	美罗培南-肺炎链球菌			左氧氟沙星-耐甲氧西林葡萄球菌			阿莫西林/克拉维酸-流感嗜血杆菌		
(年)	例数(例)	敏感(%)	中介(%)	例数(例)	敏感(%)	中介(%)	菌株数（株）	敏感(%)	耐药(%)
2018	232	30.6	56.9	269	90.1	6.1	218	64.2	35.3
2019	195	36.6	46.4	197	84.8	5.0	330	70.6	27.6
2020	155	61.9	12.9	212	75.8	12.9	180	95.6	4.4
2021	118	69.4	10.2	76	73.7	5.3	182	95.1	4.9
2022	150	100	0.0	133	73.6	4.5	234	92.3	7.7

3 血流感染病原菌结果

3.1 葡萄球菌属对抗菌药物的抗菌谱

MRSCNS 的检出率为 73.4%，耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌对克林霉素、复方新诺明、红霉素及喹诺酮类等抗菌药物耐药率高于甲氧西林敏感株，尚未发现替加环素和利奈唑胺耐药株，呼吸喹诺酮中，MSCNS 耐药率为 1.5%， MRSCNS 对莫西沙星对的耐药率为 13.3%，较左氧氟沙星低 22.5%；发现万古霉素耐药株 2 株，该菌株对万古霉素、利福平、奎奴普丁/达福普汀、左氧氟沙星呈耐药，对莫西沙星呈中介状态，仅对替加环素及利奈唑胺敏感，见表 5。

金黄色葡萄球菌中 MRSA 株的检出率为 33.6%。MRSA 对克林霉素和环丙沙星的耐药率均显著高于 MSSA，但 MRSA 对复方新诺明和红霉素耐药率低于 MSSA。金黄色葡萄球菌中尚未发现利奈唑胺、万古霉素及替加环素耐药株，极少数莫西沙星耐药株，见表 5。

表 5 葡萄球菌耐药率(%)

抗菌药物	凝固酶阴性葡萄球菌(n=249)			金黄色葡萄球菌(n=152)		
	MRSCNS(n=183)	MSCNS(n=66)	总(n=249)	MRSA(n=51)	MSSA(n=101)	总(n=152)
万古霉素	1.1	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0
克林霉素	63.4	28.8	54.2	90.2	46.5	61.2
利奈唑胺	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
利福平	11.0	0.0	8.0	3.9	2.0	2.6
呋喃妥因	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.7
四环素	36.4	21.2	32.6	21.6	25.7	24.3
复方新诺明	45.7	18.2	38.5	9.8	17.8	15.1
奎奴普丁/达福普汀	0.6	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
左氧氟沙星	35.8	1.5	27.0	9.8	9.9	9.9
庆大霉素	14.5	0.0	10.8	2.0	2.0	2.0
替加环素	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
环丙沙星	41.0	7.6	32.0	17.7	9.9	12.5
红霉素	83.8	53.0	75.7	47.1	48.5	48.0
莫西沙星	13.3	1.5	10.1	1.9	0.0	0.7

3.2 肠杆菌目细菌对抗菌药物抗菌谱

克雷伯菌和大肠埃希菌分别检出 116 株和 358 株，大肠埃希菌和克雷伯菌中产 ESBLs 株分别占 50.3%和 25.9%。大肠埃希菌和克雷伯菌非产酶株对绝大多数受试抗菌药物耐药率低于产酶株，大肠埃希菌产酶株在酶复合制剂中，除了氨苄西林/舒巴坦耐药率为 25.6%，其余酶复合制剂均低于 6.5%；而克雷伯菌产酶株在酶复合制剂中，耐药率整体明显高于大肠埃希菌，氨苄西林/舒巴坦耐药率为 73.3%，仅有头孢哌酮/舒巴坦耐药率低于 15.0%；耐碳青霉烯类大肠埃希菌的检出率仅 0.6%，耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌为 3.4%，见表 6。

表 6 肠杆菌目细菌对抗菌药物耐药率(%)

抗菌药物	大肠埃希菌(n=358)			克雷伯菌(n=116)		
	ESBLs 阳性(n=180)	ESBLs 阴性(n=178)	总(n=358)	ESBLs 阳性(n=30)	ESBLs 阴性(n=86)	总(n=116)
亚胺培南	0.6	0.6	0.6	0.0	2.3	1.7
美洛培南	0.0	0.0	0.0	6.7	2.3	3.4
厄他培南	0.6	0.0	0.3	0.0	2.3	1.7
呋喃妥因	3.3	1.1	2.5	40.0	5.8	12.9
四环素	66.7	59.0	63.1	90.0	15.1	41.4
复方新诺明	56.7	41.0	48.9	76.7	15.1	27.6
头孢唑啉	100	70.8	84.4	100.	34.9	57.8
头孢呋辛	100	4.5	50.3	100.	16.3	35.3
头孢西丁	10.0	7.3	8.7	13.3	17.4	16.4
头孢他啶	30.6	5.6	17.9	26.7	9.3	12.9
头孢曲松	98.3	3.9	51.4	100	4.7	23.3
头孢吡肟	35.6	1.1	18.4	50.0	2.3	11.2
哌拉西林/他唑巴坦	2.2	3.4	2.8	43.3	4.7	12.9
头孢哌酮/舒巴坦	5.6	1.1	3.1	13.3	7.0	8.6

阿莫西林/克拉维酸	6.1%	12.4	9.2	33.3	9.3	13.8
氨苄西林/舒巴坦	25.6	14.0	18.4	73.3	15.1	71.6
左氧氟沙星	52.2	19.1	35.8	40.0	1.2	8.6
环丙沙星	49.4	24.2	36.9	50.0	3.5	8.6
氨曲南	55.6	6.7	31.3	60.0	3.5	14.7
妥布霉素	35.6	10.1	20.4	16.7	79.1	67.2
氨苄西林	91.7	65.7	76.0	—	—	—
哌拉西林	92.8	30.3	62.3	—	—	—
阿米卡星	0.6	0.0	0.3	6.7	1.2	1.7
庆大霉素	28.9	24.7	31.3	—	—	—
替加环素	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
米诺环素	18.9	6.7	10.9	—	—	—

注：— ：表示无此耐药数据，未经统计学分析

3.3 部分细菌耐药率变迁

过去 5 年监测显示，凝固酶阴性葡萄球菌对克林霉素敏感率从 2018 年的 39.5%上涨至 2022 年的 50.0%，相应耐药率下降 12.6%；大肠埃希菌对阿莫西林/克拉维酸敏感率由 2018 年的 61.4%上升至 79.2%，相应中介率由 24.6%下降至 9.4%；而产酶株大肠埃希菌在头孢吡肟、环丙沙星及氨曲南中敏感率呈现不同耐药下降，其中头孢吡肟敏感率下降 26.2%，其中介率上涨 32.4%，氨曲南敏感率下降 12.9%，中介率增加 26.5%，环丙沙星敏感率下降 28.3%，耐药率上涨 18.3%，见表 7。

表 7 部分细菌对抗菌药物耐药率变迁

时间	头孢吡肟-产酶株大肠埃希菌			环丙沙星-产酶株大肠埃希菌			氨曲南-产酶株大肠埃希菌		
(年)	菌株数 (株)	敏感 (%)	中介 (%)	菌株数 (株)	敏感 (%)	耐药 (%)	菌株数 (株)	敏感 (%)	中介 (%)
2018	26	61.5	0.0	26	57.7	34.6	26	42.3	0.0
2019	41	58.5	0.0	41	46.3	48.8	41	39.0	0.0
2020	31	67.7	3.2	31	61.3	35.5	31	35.5	0.0
2021	48	41.7	22.9	48	31.3	64.6	48	33.3	14.6
2022	34	35.3	32.4	34	29.4	52.9	34	29.4	26.5

4 讨论

研究显示，该院整体耐药监测具有以下特点：(1)检出菌株总数呈直线上升趋势，2022 年较前一年增加 11%，2020 年儿科搬迁后前五位细菌变化较大，大肠埃希菌取代流感嗜血杆菌成为检出数最多的细菌，占比前三中已无肺炎链球菌或流感嗜血杆菌。(2)MRSA 对左氧氟沙星敏感率逐年下降，已降至 73.6%。(3)流感嗜血杆菌对阿莫西林/克拉维酸敏感率上升至 92.3%，处于低耐药水平；美罗培南对肺炎链球菌完全没敏感。(4)大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产酶株在酶复合制剂中，氨苄西林/舒巴坦耐药率显著高于阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦及头孢哌酮/舒巴坦等酶复合制剂。

血流感染监测特点如下：(1)检出菌株总数呈直线上升趋势，5 年间大肠埃希菌持续为检出数最多的细菌，且呈增加趋势，凝固酶阴性葡萄球菌占比呈下降趋势。(2)克林霉素对凝固酶阴性葡萄球菌耐药率逐年下降。(3)大肠埃希菌对阿莫西林/克拉维酸钾敏感率上升。(4)产酶株大肠埃希菌对多种抗菌药物呈现不同耐药增加。(5)产酶株克雷伯菌和大肠埃希菌在酶复合制剂中，氨苄西林/舒巴坦耐药率显著高于头孢哌酮/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸及头孢哌酮/舒巴坦等酶复合制剂。(6)ICU 病区鉴定出 2 株万古霉素耐药葡萄球菌，虽对万古霉素耐药，

但对利奈唑胺和替加环素敏感。(7)该院血流感染鉴定肠杆菌目细菌耐药追踪发现，无论是克雷伯菌属还是大肠埃希菌，在此 5 年间，碳青霉烯耐药率低于四川及全国平均水平[7,8]，且无明显耐药增加趋势。

肺炎链球菌和流感嗜血杆菌敏感率大幅上升，血流感染凝固酶阴性葡萄球菌和大肠埃希菌的敏感率呈上涨趋势，应该是该院采取合理使用抗菌药物遏制耐药发展的一系列措施取得的成效，应在不断完善的前提下继续执行。流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药主要与产 β-内酰胺酶对抗菌药物水解有关，产酶为其耐药主要机制，产酶可导致细菌与 β-内酰胺类抗菌药物的亲和力下降[9]，依据药敏监测头孢噻肟、阿莫西林/克拉维酸及喹诺酮类为优选。非发酵菌中鲍曼不动杆菌耐药率基本大于 60.0%，且基本对四种抗菌药物耐药，对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌，基本上对 β-内酰胺类抗菌药物完全耐药，对妥布霉素大部分耐药，环丙沙星几乎完全耐药，可选择品种较少，目前鲍曼不动杆菌和耐碳青霉烯革兰阴性菌对于临床来说是一个重大挑战[10-12]。血流感染产酶株克雷伯菌和大肠埃希菌对氨苄西林/舒巴坦耐药主要与产 β-内酰胺酶对抗菌药物水解有关，水解为其耐药主要机制，水解可导致细菌与酶复合制剂抗菌药物的亲和力下降[9-11]，依据耐药监测，碳青霉烯类、头孢西丁及头孢哌酮/舒巴坦为优选。

肺炎链球菌对青霉素 G 和阿莫西林耐药率高于全国平均水平[13]，且 MRSA 菌株中出现少许万古霉素耐药株，该地区肺炎链球菌对青霉素耐药情况严重可能由于该地区抗菌药物的使用频次及强度有关，也可能是由于患者在细菌鉴定前在门诊或诊所就诊，病情加重后才到大医院治疗，且耐青霉素肺炎链球菌菌株中出现少数莫西沙星耐药株；肺炎链球菌耐药较为严重，红霉素和四环素均保持较高耐药，肺炎链球菌的耐药机制复杂[14]。

血流感染产酶株大肠埃希菌和克雷伯菌属检出率 50.3%和 25.9%，略高于全国平均水平[3]，产酶株大肠埃希菌和克雷伯菌属对碳青霉烯类抗菌药物敏感率高且平稳，但大肠埃希菌对头孢吡肟、环丙沙星及氨曲南等抗菌药物敏感率呈下降趋势，提示大肠埃希菌耐药情况不容乐观，可从医院环境消毒、侵入性操作及合理用药等方面采取措施，遏制耐药。

这项研究有几个局限性，首先，尽管监测年度连续入选，回顾性分析耐药变迁，但血流感染病原菌可供研究仅 1000 余株，可能导致血流感染耐药结果偏差，其次，由于该研究仅对样本量大病原菌分析，并未对阴沟肠杆菌（248 株）、沙雷菌（90 株）及血流感染肠球菌（37 株）等分析，因此在应用时应仔细检查结论。最后，受限于血流感染样本量及病原菌来源，且未分析有关危险因素的临床信息，无法对该院血流感染做出全貌研究。

综上所述，该院临床分离株的分布特征和耐药监测，显示该院临床分离株仅鲍曼不动杆菌仍以较高耐药率高于全国及四川平均水平[13]。监测资料同时也显示，部分抗菌药物的耐药正得以改善，提示加强细菌耐药监测[14,15]、加强预防感染防控措施以及加强抗菌药物管理[16-20]，对控制细菌感染传播和耐药是行之有效的。

参考文献

[1] Nolivos S, Cayron J, Dedieu A, *et al.* Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer[J]. Science, 2019, 364(6442): 778-782.

[2] 李昕, 曾洁, 王岱, 等. 细菌耐药耐受性机制的最新研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(2): 113-121.

[3] 龙姗姗, 黄湘宁, 张杰, 等. 四川省细菌耐药监测网 2016—2020 年血流感染病原菌分布及耐药分析[J]. 医药导报, 2021, 40(8): 1053-1059.

[4] Butters C, Phuong LK, Cole T, *et al.* Prevalence of immunodeficiency in children with invasive pneumococcal disease in the pneumococcal vaccine era: A systematic review[J]. JAMA Pediatrics, 2019, 173(11): 1084-1094.

[5] Lekshmi M, Ammini P, Adjei J, *et al.* Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in Staphylococcus aureus[J]. AIMS Microbiol, 2018, 4(1): 1-18.

[6] Patini R, Mangino G, Martellacci L, *et al.* The effect of different antibiotic regimens on bacterial resistance: A systematic review[J]. Antibiotics, 2020, 9(1): 22-37.

[7] Butler DF, Myers AL. Changing epidemiology of haemophilus influenzae in children[J]. Infect Dis Clin North Am, 2018, 32(1): 119-128.

[8] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4): 377-387.

[9] Li XX, Xiao SZ, Gu FF, *et al*. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of haemophilus influenzae in adult patients in Shanghai, China[J]. FRONT PUBLIC KEALTH, 2020, 8(15): 95-102.
[10] Lin W, Fu J, Liang Z, *et al.* Prevalence and serotype distribution of nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae in China: a meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 765-778.
[11] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网2014—2019年门诊患者临床分离细菌耐药监测报告[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1): 31-42.
[12] 沈芳, 全晶晶, 刘炉香, 等. 碳青霉烯耐药肠杆菌目细菌耐药性及耐药传播机制研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2021, 41(9): 679-686.
[13] 国家卫生健康委合理用药专家委员会, 全国细菌耐药监测网. 2019 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国合理用药探索, 2021, 18(3): 1-11.
[14] 刘彩林, 明亮. 异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的流行性及 mgrA 基因对万古霉素耐药性影响的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(2): 175-180.
[15] Sato T, Kawamura M, Fujimu R. Analysis of the mechanisms of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. J Infect Public Health, 2020, 13(2): 320.
[16] 杨莉, 陈茜, 陈明洁, 等. 某医院重症监护病房物体表面耐甲氧西林金黄色葡萄球菌污染状况分析[J]. 中国消毒学杂志, 2021, 38(1): 25-27.
[17] 何多姣, 荆菁华, 安淑霞, 等. 医院内多重耐药菌的监测报告与分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(17): 2147-2149.
[18] 杨启文, 吴安华, 胡必杰, 等. 临床重要耐药菌感染传播防控策略专家共识[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(01): 1-14.
[19] Xu S, Li Y,Xu X G, Su *et al*. A Case-Control Study: Clinical Characteristics of Nosocomial Bloodstream Infections Versus Non-bloodstream Infections of Acinetobacter spp.[J]. Clin infect dis , 2018, 67(suppl_2): S189-S195.
[20] 陈招虹, 尤晓萍, 蔡媛媛, 等. 血流感染中多重耐药菌的耐药性及感染危险因素分析[J]. 中国热带医学: 1-9.

围产期居家药学服务模式的构建和实践

沐宇[1]，丁逸卿[2]，王达成[3]，石祥奎[1*]

1. 徐州市妇幼保健院药事科，江苏徐州 221000；2. 徐州市卫生健康委员会药物政策和基本药物制度处，江苏徐州 221000；3. 徐州市云龙区云龙社区卫生服务中心，江苏徐州 221000

【摘要】目的：探索居家药学用于围产期人群的服务模式。**方法：**徐州市卫生健康委启动首批居家药学服务示范站点，本项目以围产期人群为服务对象，采用多种方式下开展居家药学服务。**结果：**构建了徐州地区围产期居家药学服务模式，服务人群包括妊娠期、哺乳期女性、儿童等围产期人群。截至2023年4月共签约患者570例，并广泛开展了线下、线上的居家药学服务工作。所有全程药学监护患者妊娠结局良好。签约患者居家治疗效果明显，患者合理用药认知情况和用有依从性明显提升（p<0.05），患者满意度100%。**结论：**围产期居家药学服务有利于提高围产期人群用药合理率，提高区域优生优育水平，具有较强的可操作性和推广性，但仍需在人才培养、乡镇药学服务、全生命周期服务、医保支付等方面加强探索。

【关键词】居家药学服务；围产期；用药咨询；微信群

Construction and Practice of Home - based Pharmaceutical Care Model during peri - pregnancy period

MU Yu[1], DING Yiqing[2], WANG Dacheng[3], SHI Xiangkui[1*]

[1]Department of Pharmacy, Xuzhou Maternity and Child Health Hospital, Xuzhou Jiangsu 221000, China; [2]Drug Policy and Essential Drug System Division of Xuzhou Municipal Health Commission, Xuzhou Jiangsu 221000, China; [3]Xuzhou Yunlong Community Health Service Center, Xuzhou Jiangsu 221000, China

【ABSTRACT】Objective: To explore the mode of home - based pharmaceutical care during peri - pregnancy period. **Methods:** Xuzhou Municipal Health Commission launched the first batch of home-based pharmaceutical service demonstration sites. The project takes the people in the peri -pregnancy population as the service object, and carries out home - based pharmaceutical services in a variety of ways. **Results:** Established a home - pharmacy service model during the perinatal period in Xuzhou area. The service population includes pregnant women, lactating women, children and other perinatal populations. As of April 2023, a total of 570 patients were contracted, and offline and online home pharmacy services were widely carried out. All patients under full pharmaceutical monitoring had good pregnancy outcomes. The home treatment effect of contracted patients is significant, and their awareness of rational medication and compliance with medication have significantly improved (p<0.05). Patient satisfaction is 100%. **Conclusion:** Perinatal home - pharmacy services are beneficial for improving the rational use of medication among the perinatal population and improving the level of regional eugenics and fertility, and have strong operability and promotion. However, there is

基金支持　徐州市卫生健康委2022年度药学科研立项项目（XWYXKY202201）；徐州市卫生健康委2021年度青年医学科技创新项目（XWKYHT20210548）

作者简介　沐宇，男，江苏徐州人，主管药师，硕士，主要研究方向：居家药学和临床药学，E-mail：15162240142@163.com

*通信作者　石祥奎，男，江苏徐州人，主任药师，学士，主要研究方向：医院药学和药事管理，E-mail：jsxzsxk@126.com

still a need to strengthen exploration in areas such as talent cultivation, rural pharmaceutical services, full life cycle services, and medical insurance payments.
【KEY WORDS】Home - based Pharmaceutical Services; Peri - pregnancy period; Medication consultation; WeChat group

改革开放以来我国经历了几十年的飞速发展，人民生活水平日益提高，公众的平均寿命逐渐提升。然而社会经济的发展也带了一些隐形的健康威胁，比如环境污染、生态危机、食品安全问题、饮食习惯改变等。据统计，2022 年医疗卫生机构总诊疗人次数达 84 亿人次，出院人数 2.5 亿人。除此之外，还有相当数量的患者自己购买药品进行居家治疗，2022 年全国药店数量达到 62 万家，药店购药自我药疗 60 亿人次。习总书记指出：没有全民健康，就没有全面小康。新时期卫生与健康方针指出以基层为重点。其中重点人群如慢病患者、老年群体、孕产妇、婴幼儿更是关注的重点。《“健康中国”2030 规划纲要》明确指出加强重点人群健康服务，推动医疗卫生服务延伸至社区、家庭[1]。孕产妇、婴幼儿群体几乎关乎每一个家庭，围产期一个长期的生理状态，孕期用药安全是保障安全妊娠、顺利分娩的重要环节。

据统计，美国每年 600 万孕妇中，60%的孕妇会在妊娠期哺乳期服用 3-5 种药物，64%的孕妇至少服用一种处方药物，而这一比例在中国人群中更高[2-3]。一旦出现用药错误，可能引起流产、胎儿畸形，带来的后果及其严重，用药错误的风险是巨大的。孕产妇对于合理用药的知识欠缺：目前一些药品说明书在“妊娠及哺乳期妇女用药”一栏标注为“禁用”、“慎用”或“尚不明确”等。有研究显示，研究显示对于说明书标注“慎用”的药物，51%孕妇选择直接放弃用药[4]。其带来的风险是不可估量的。除了药品之外，孕产妇对于保健食品甚至一些食品的认知情况仍然堪忧。一项苏北调查显示仅有 34%的孕产妇认识保健食品标志，甚至低于一般人群的认知水平，尤其是经济欠发达和文化程度不高的孕产妇[5]。研究显示，围产期女性对安全用药态度较积极[6]。愿意主动了解妊娠期安全用药知识，但普遍反映获得的解答专业性不足。尤其是基层医院对于妊娠期哺乳期用药风险评估的能力欠缺，无法为患者提供充足的证据支撑患者做出相对合理的决策。

随着医保制度的改革，特别是过去几年的抗疫工作，医保基金压力与日俱增。2022 年全国居民医疗保健费用总支出 29934 亿元，人均医疗保健费用支出 2120 元，2022 年医保基金总支出 24431.72 亿元，相当于全国医疗保健费用 81.62%由医保资金承担。居家药学服务直接参与对患者的用药指导，尤其是对于每年 60 亿人次的药店购药自我药疗的患者来说，通过用药教育、家庭药箱管理、药物重整、处方精简等，能够有效避免重复购药和用药，减少不必要的二次住院，有效避免药物浪费，节约医保基金。由此可见，居家药学在医保控费方面大有可为。

居家药学是近 20 年发展起来的一个药学分支，2004 年美国率先提出药物治疗管理（MTM）的概念，2006 年世界卫生组织和国际药学联合会进一步强调药师对病人的直接照顾[7]。我国的家庭药师制度起步较晚，2017 年广东省佛山市南海区开始实施的家庭药师制度，填补了国内此领域的空白[8]。2018 年我国出台了家庭药师服务标准与路径专家共识，为居家药学服务提供了技术指引[9]。2020 年徐州市卫生健康委员会印发了《徐州市家庭药师签约服务实施方案》，2022 年启动了首批居家药学服务示范站点建设，包括建立 2 家市级示范站点和 5 家县（市）区级示范站点。我院于 2022 年 9 月开始居家药学筹备工作，同年 12 月份正式启动。

1　资料与方法

1.1　组建围产期居家药学服务团队

1.1.1　岗位设置：

总药师 1 名，负责居家药学服务的统筹协调和考核指导工作。

管理员 1 名，负责患者签约工作，药学服务微信群的日常维护，家庭药师工作室的日常运行，以及各项工作总结。

家庭药师 7 名，所有家庭药师均从我院临床药师中选拔，需完成临床医师规范化培训并获得《临床药师规范化培训》证书，专业要求为妇产专业、小儿用药专业、抗感染专业且从事药学服务工作≥3 年，热爱药学服务工作。

监督员 1 名，由卫健委药政处指派，负责居家药学服务工作的日常监督。

社区药师 2 名：在家庭药师的指导下开展药物咨询工作。

医生、护士各 1 名，要求为长期从事产科一线工作，医生具备副高级职称以上，护士由产科护士长担任。

1.1.2　专业组

设置 5 个专业组，包括门诊组、入户服务组、线上咨询组、讲座培训组和监督考核组。

1.2　签约制度

在产科门诊、用药咨询窗口以及社区医院建卡处等地点放置居家药学服务介绍及管理员微信二维码的宣传摆台，患者可自行扫码添加管理员入群，在院、科微信公众平台公布管理员微信二维码，供有用药需求的孕产妇及儿童添加，完成后续的签约工作。为患者建立用药档案，详细收集基本资料、月经婚育史、妊娠状态、诊断、相关检查、妊娠相关药物治疗史、药事服务需求/拟解决的用药相关问题等，填写《围产期妇女用药档案登记表》。

妊娠期患者划分一般和高危孕产妇，制定不同的随访监护计划。签约时对患者合理用药认知情情况和用药依从性评价。用药依从性评价量表和合理用药认知评价量表均为选择或判断题，满分均为 10 分。

1.3　服务内容

孕前、孕期意外用药风险评估，孕期合并症的治疗药物选择，孕早期指标解读（如血清学指标、影像学指标），保胎药的选择，铁剂、钙剂、叶酸个性化增补等，妊娠期糖尿病、妊娠期高血压等的管理，以及产后哺乳、产后康复、新生儿和儿童常见病的药物治疗等。

1.4　服务模式

1.4.1　线下模式

1.4.1.1　家庭药师工作室

目前已与 1 家社区卫生服务中心联合建立居家药学服务点。家庭药师工作室设在社区卫生服务中心内部，配备独立诊室和诊疗、办公设备。出诊药师为妇产专业临床药师，出诊时间为每周一、三下午。服务对象包括该中心建卡的孕妇，由围产建卡窗口工作人员引导前来，以及签约患者前来咨询，一般提前微信预约。接诊时参照药学门诊诊疗流程，给出明确的药学建议和提示，填写《家庭药师工作室咨询登记表》并打印，一式两份，一份交给患者，一份药师留存。

1.4.1.2　入户服务

制定入户计划，每月在签约患者中选择一些用药较为复杂、药物调整较多的患者，以及行动不便者和高危孕产妇。也可在患者提出申请后，药师可提供上门药学咨询服务。每次上门前需要与患者约定上门时间，服务要求至少 2 名药师同行，且其中至少包含 1 名女性药师。提供“六个一”服务：即药箱整理（含效期管理）、用药评估、用药档案、用药教育、药学调研、药学科普。并详细解答患者提问。每次入户须填写《家庭药师入户服务记录》，由患者和药师签字确认。

1.4.1.3　药学门诊

药学门诊满足一些孕期意外用药风险评估、妊娠合并其他系统疾病药物选择、妊娠合并症的剂量调整等。药学门诊出诊药师为总药师和两名工作 5 年以上的妇产专业临床药师，出诊时间为每周五全天，诊室设在我院门诊产科诊区。按照药学门诊的规范诊疗流程，填写《药物治疗管理门诊记录表》，一式两份。

1.4.1.4　讲座和义诊

居家药学服务示范站点已配备医患宣教室和相关硬件设施，定期邀请我院药学、产科、儿科等专家参与授课，服务辖区及周边孕产妇。选择一些育龄女性占比较高且平时接受妇幼科普较少的高校等企事业单位。以“三八国际妇女节”等节日为契机，或以支部共建、党日活动等形式开展用药专题授课，提高企事业单位职工的围产保健和儿童合理用药意识。组织义诊活动，深入周边乡镇和农村地区，提高广大农村孕产妇、留守儿童的保健意识和居家治疗水平，同时建立药患联络渠道，以便提供持续性药学服务。在讲座和义诊活动现场，同时开展患者签约活动。

1.4.2　线上模式

1.4.2.1　居家药学服务微信群

建立居家药学服务微信群，建立值班员制度。家庭药师轮值，每班 24h 制，工作日每日 1 名药师值班，休息日每日 2 名药师值班，二线药师 2 名。节假日正常值班，全年无休。患者可在随时提问咨询，由值班药师解答，如遇难题由二线药师解答，二线药师由总药师和管理员担任。家庭药师同时入驻我院产科、儿科病区微信群和社区建卡孕妇交流群，承担线上用药咨询工作。

1.4.2.2　网络直播

《“健康中国 2030”规划纲要》提出促进健康与互联网的融合，在院党委统领、宣传科的监督下，根据医院组织的直播计划开展直播，目前通过妇幼大讲堂、妇幼云学堂、幸运宝典等平台直播。

1.4.2.3　科普

结合当前的热点问题，充分利用院、科微信公众平台，每周发布科普文章不少于 1 篇、每月发布科普视频不少于 1 条。精选内容制作传统科普彩页，在接诊、入户、讲座、义诊活动中发放。

1.5　随访制度

1.5.1　常规随访

所有签约孕妇均进行随访，一般孕妇按照常规产检孕周节点随访，高危孕妇（高危因素包括既往 10 周以后胚停史，宫颈环扎术后，人类辅助生殖等）每周随访一次。随访方式包括电话随访、微信随访、入户随访等。每次随访填写《围产期妇女随访登记表》。

1.5.2　即时随访

居家治疗的患者在根据药师建议用药后，在解答咨询的 24-48h 完成首次随访，并根据需根据具体药物和疾病特点进行后续随访，随访由首诊家庭药师负责，视情予药物调整。

1.6　调查与调研

每月随机抽取 10 例签约患者进行满意度调查，每位孕产妇分娩后进行满意度调查。签约居家药学服务满 3 个月的患者进行用药依从性和合理用药认知情情况的再评价。

2 结果

2.1　签约情况

自 2022 年 12 月正式启动围产期居家药学服务工作，目前已建立“市卫健委全面统筹-三级医院指导-社区医院设点”的围产期居家药学服务体系，自居家药学服务工作开展以来，每日均有新签约患者，截至 2023 年 4 月，共签约患者 570 例。根据签约时的生理状态，包含备孕期 18 例（3.16%），妊娠期 208 例（36.49%），哺乳期 180 例（38.30%），儿童（家属）164 例（28.77%），妊娠期和儿童（家属）人群有部分重叠；服务患者区域以徐州为中心辐射整个淮海经济区，以及部分外省包括陕西、云南、内蒙、江西等地。

2.2　服务内容

2.2.1　线下工作

截至 2023 年 4 月，家庭药师工作室共开诊 39 次，药学门诊共开诊 22 次，累计接诊 120 余人次。入户药学服务 10 户。开展高校等企事业单位妇幼合理用药讲座 3 场，参加义诊 3 次。制作并发放纸质科普材料 4000 余份。

2.2.2　线上工作

截至 2023 年 4 月，已建立 2 个居家药学微信服务群（药师主导）：服务人群，共 600 余人。药师参与产科病区、社区建卡等 13 个群的药学咨询服务，共计 3000 余人。微信群共解答用药咨询 5200 余人次，日均 32.8 人次。新冠、甲流期间、春节假期期间 24 小时服务，指导患者居家治疗，缓解患者焦虑情绪，帮助患者平稳度过特殊时期。

通过微信公众平台等发布科普作品 10 则，网络直播 8 次。2023 年初新冠疫情期间帮助徐州周边孕产妇紧急联系购药 20 余次。

2.3　服务成效

2.3.1　妊娠结局

截至 2023 年 4 月，在全程药学监护下共 54 例妊娠期女性顺利完成分娩，34 例在我院分娩，20 例在属地医院分娩。其中 23 例（42.59%）合并双胎妊娠、胎膜早破、宫颈环扎术后、人工辅助生殖等高危因素，不良妊娠结局 0 例。

2.3.2　居家治疗转归

患者在根据家庭药师的用药建议处理后，均获得好转，无一例无效或加重。规避和纠正患者错误用药 200 余次，有效规避了不良反应的出现。在新冠疫情和甲流流行期间，尤其在居家隔离和一些药物无法获得的情况下，家庭药师充分运用中医药理论，提供了广泛的中医药指导，保证患者保证患者用对药治好病。

2.3.3　合理用药评价量表及满意度调查

对居家药学服务签约对象进行合理用药认知水平和用药依从性评价，较签约时明显改善，对比服务前后，差异有统计学意义（p<0.05），具体见表 1。每月抽取的患者满意度和分娩后的满意度调查中，签约患者对居家药学服务非常满意，满意度均为 100%。

表 1　药学服务前后合理用药认知评分和用药依从性评分对比

项目	签约时	药学服务后	t	p
合理用药认知评分	6.150±1.393	7.700±1.457	5.146	0.024
用药依从性评分	5.950±1.504	8.050±1.326	4.664	0.032

3 讨论

国际药学联合会中国总代表陈征宇院士表示，中国开创性的设立了家庭药师，江苏走在全国前列。家庭药师在治未病、慢病管理、自我保健、药学科普等方面将发挥积极作用。围产期用药安全是保障出生人口质量的重要环节。围产期药学服务能够将药物对于妊娠和哺乳的风险有效量化，为患者决策提供关键的证据支持，有效减少不必要的终止妊娠和暂停哺乳，尤其对于反复流产、高龄、人类辅助生殖等人群具有重要的意义，因此围产期女性亟需专业的药学服务。由于受到伦理的限制，很多药物的人类妊娠期、哺乳期资料匮乏，迫切需要更多的前瞻性研究，开展妊娠暴露药物登记[10]。同时，居家药学服务通过随访孕期药物暴露者的妊娠结局和新生儿发育，不断累积更多的妊娠期哺乳期用药安全性的真实世界证据，不断充实我国妊娠期哺乳期用药安全性数据。

研究发现，家庭药师直面患者，需要具备临床、药学、心理学、护理学、健康管理等知识[11]。围产期居家药学服务属于专科药学服务，服务对象特殊，对专业能力要求极强。我院选拔的家庭药师均为经过规范化培训临床药师，而二级和社区医院符合要求的药师较少。国家卫健委已经批准 16 家医院为家庭药师培训基地，笔者建议可适当参照临床药师培训模式，增设围产期药学方向。此外，本项目开展过程中广泛运用中药和中成药指导患者居家治疗。我国的一项调查研究显示，妊娠期中成药和中药占使用药物的首位[12]。可适当增加家庭药师中医药理论和实践技能的培养。

本项目目前签约患者 570 名，从徐州地区来讲仍然仅占很小一部分围产期人群，下一步将继续增加服务站点，逐步实现孕妇从建卡、甚至备孕开始便能获得药学服务。国内药学服务多在发达的一线城市开展，存在区域发展不平衡的现状[13]。本项目运行期间发现，更多的是一些县区的孕产妇和哺乳期女性更需要药学服务。可依托医联体总药师制度，将居家药学服务延伸至县级妇幼保健院。支持县级妇幼保健院建立线上咨询平台和县乡级家庭药师工作室。协助基层织密妇幼保健网络，识别孕产妇急危重症，及时帮助联系转诊至上级医院治疗。在我院分娩的 34 为孕妇中，约 1/3 孕妇的孕妇居住在基层乡镇，突然出现胎膜早破、先兆早产，在家庭药师指导下从乡镇转诊至我院，开辟绿色通道，顺利分娩。

签约患者经过药学服务后合理用药认知情况和用药依从性均显著提升，随着时间的推移，签约时的生理状态会发生改变（妊娠期→哺乳期），服务对象会增加（妊娠期女性→宝妈+儿童），在服务实践中，服务对象获得持续性药学服务的意愿非常强烈，服务对象咨询的问题也不仅仅局限于围产期药物治疗，逐渐扩大到其他女

性特有疾病，包括月经相关疾病、围绝经期相关疾病等。因此，在围产期居家药学服务成熟后的可尝试开展全生命周期居家药学服务。下一步有望提供持续性药学服务，覆盖女性从新生儿到老年期的全生命周期。

综上所述，徐本研究探索了围产期居家药学服务模式，助力孕产妇、哺乳期女性及儿童的安全合理用药。目前已经取得阶段性成果，具有较强的可操作性和推广性，有望为其他地区药学服务和妇幼保健工作提供参考，实现全女性生命周期的药学服务。

参考文献

[1] 中国共产党中央委员会, 中华人民共和国国务院. "健康中国 2030"规划纲要[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2017, 24(7): 1-12.

[2] Elibiary SY, Raney EC, Moos MK. The pharmacist's role in promoting preconception health [J]. J Am Pharm Assoc (2003), 2014, 54(5): e288-e301.

[3] Feibus KB. FDA's proposed rule for pregnancy and lactation labeling: improving maternal child health through well-informed medicine use[J]. J Med Toxicol, 2008, 4(4): 284-288.

[4] 李薇, 徐剑. 妊娠期妇女安全用药现状及药物咨询服务需求调查分析[J]. 北方药学, 2020, 17(10): 145-147.

[5] 鲍萌, 孙雪莲, 刘苏熠, 等. 苏北地区妊娠期妇女对保健食品认知的现况研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(3): 510-512.

[6] 肖溢, 李艳钰. 孕妇用药安全认知现状及妊娠期药物使用情况调查[J]. 中国计划生育学杂志, 2022, 30(4): 734-737.

[7] Robert J. Cipolle, Linda M. Strand, Peter C. Morley. Pharmaceutical Care Practice: The Patient-Centered Approach to Medication Management, Third Edition[M]. McGraw-Hill Medical Publishing, 2012, 001-005.

[8] 吴晓玲, 谢奕丹, 邱宇翔, 等. 家庭药师制度的构建与实践探索[J]. 今日药学, 2018, 28(5): 340-343.

[9] 吴晓玲, 赵志刚, 于国超. 家庭药师服务标准与路径专家共识[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(7): 1-6.

[10] 叶淑雅, 郑彩虹. 妊娠期用药咨询门诊的焦点问题与思考[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(11): 1171-1176.

[11] 刘慧, 夏伟, 陈文杰, 等. 居家药学服务质量提升思考与建议[J]. 中国药业, 2022, 31(4): 32-36.

[12] 张川, 张伶俐, 王晓东, 等. 全球妊娠期用药危险性分级系统的比较分析[J].中国药学杂志, 2016, 51(3): 234-238.

[13] 田塬, 唐贵菊, 王继婷, 等. 药学服务发展历程及价值体现[J]. 中国药房, 2021, 32(23): 2924-2929.

IL4I1 在癌症免疫逃逸中的作用机制及其抑制剂的研究进展

聂海倩[1]，康慧琴[1]，冯梦凯[1]，熊宇涵[1]，何昂[1]，高雅[1]*

[1]郑州大学，河南省郑州市中原区科学大道 100 号，450000

色氨酸（Trp）在癌症代谢中起着重要作用。色氨酸降解途径涉及的代谢酶主要包括吲哚胺 2,3-双加氧酶 1（IDO1）、色氨酸-2,3-双加氧酶（TDO2）和最新发现的白细胞介素 4 诱导蛋白 1（IL4I1）。多种色氨酸代谢产物均是芳香烃受体 AHR 的配体，进一步激活 AHR，通过多种机制促进免疫抑制效应。晚期黑色素瘤患者中，IDO1 抑制剂 epacadostat 联合 PD-1 抑制剂帕博利珠单抗的 III 期临床研究宣告失败。对晚期黑色素瘤患者的转录组数据进行分析发现，PD-1 抑制剂纳武利尤单抗治疗可以增强 IL4I1 活性，促进 IL4I1 表达，进而上调 AHR 的活性，诱发免疫抑制，提示 IL4I1 驱动的色氨酸分解代谢及芳香烃受体的激活可能是免疫检查点阻断（ICB）和 IDO1 抑制剂临床试验失败的重要原因。IL4I1 属于 L-氨基酸氧化酶，主要由树突状细胞、巨噬细胞和 B 细胞等免疫细胞表达，是一种近年来被发现的新型调节因子，其在免疫调控中起着重要作用。IL4I1 通过调节细胞外环境中的氧化还原平衡、调节 T 细胞极化和抑制 T 细胞激活等多种机制参与免疫调控过程。已有报道指出 IL4I1 在多种肿瘤细胞中表达，能够抑制抗肿瘤性 T 细胞反应等，促进巨噬细胞向 M2 型分化，促进肿瘤的进展和免疫逃逸。IL4I1 在黑色素瘤患者体内通过抑制 CD8+T 细胞功能，促进恶性黑色素瘤生长。因此，深入研究 IL4I1 在免疫调控中的作用机制对于揭示免疫疾病的发病机理以及开发相关治疗策略具有重要意义。然而，迄今还没有 IL4I1 抑制剂上市，仅有极少 IL4I1 抑制剂被报道，并且活性不高，如 Cp2-SO4，对 IL4I1 酶半数抑制浓度为 21.2 ± 5.9 μM，这使得深入研究 IL4I1 的作用机制以及开发相关治疗策略变得至关重要。进一步深入研究 IL4I1 在免疫调控中的机制，并基于此开发高水平高活性的 IL4I1 抑制剂，有望为抗肿瘤治疗提供新策略。

【关键词】色氨酸代谢；IL4I1；免疫检查点阻断；IL4I1 抑制剂

参考文献：

[1] Sadik A, Somarribas Patterson LF, Öztürk S, et al. IL4I1 Is a Metabolic Immune Checkpoint that Activates the AHR and Promotes Tumor Progression. *Cell*. 2020;182(5):1252-1270.e34. doi:10.1016/j.cell.2020.07.038.

[2] Wang Z, Li T, Mao C, Liu W, Tao Y. IL4I1-driven AHR signature: a new avenue for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):118. doi:10.1038/s41392-021-00529-z.

[3] Mulder K, Patel AA, Kong WT, et al. Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity*. 2021;54(8):1883-1900.e5. doi:10.1016/j.immuni.2021.07.007.

高场核磁波谱仪在生命及化学科学研究中的应用

牛晓刚

（北京大学北京核磁中心 北京）

北京核磁共振中心是由国家科技部、教育部、中国科学院和总后卫生部共同投资，依托于北京大学建立的国家公用大型仪器设备开放实验室。目前负责管理北京核磁中心和国家蛋白质科学基础设施北京基地（凤凰工程）核磁平台两个平台，拥有从 400MHz 到国内最高磁场的 950MHz 的 10 台核磁共振波谱仪。是国内 600MHz 及以上高场核磁谱仪最多的单位。本文根据作者十多年管理使用高场核磁谱仪的经验，总结了高场核磁谱仪在生命科学及化学科学等科学研究中的主要优势。并结合自身和用户的科研实例，展示了利用高场核磁谱仪高灵敏度，高分辨率和弛豫速率大的优势，在生物大分子结构解析，蛋白质动力学研究，多肽结构分析，有机分子结构表征和药物筛选等方面的研究成果。

Quantitative acetylproteomic analysis reveals the effect of metformin hyperacetylated H3K9 and H3K56 on cervical cancer growth

Running title: Metformin hyperacetylates H3K9 and H3K56

Botao Pan [1], Can Liu [1, 2], Jiyan Su [1], Chenglai Xia [1, 2 *]

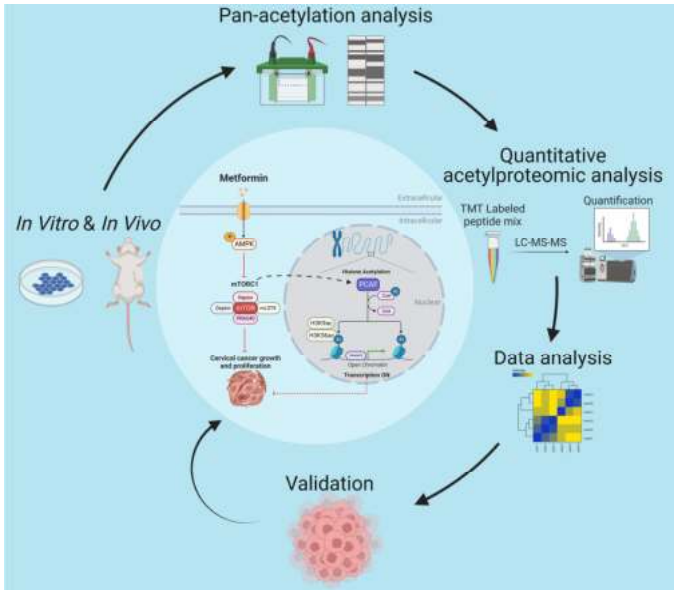
[1] Affiliated Foshan Maternity and Child Healthcare Hospital, Southern Medical University, Foshan 528000, China;

[2] School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, 515150, China

【**Abstract**】Metformin, as a first-line drug for the treatment of type 2 diabetes, has attracted considerable interest as a potential anti-cancer agent. Accumulating evidence suggests that the inhibition of tumor growth by metformin was linked to the activation of AMP-activated protein kinase （AMPK） signal pathway. Recently, attractive studies have shown that metformin could induce the acetylation of lysine sites in proteins. But their regulations in detail remain elusive. Here, we found that metformin could inhibit cervical cancer growth in vitro and in xenograft in the nude mouse in vivo. Furthermore, the acetylation of 728 lysine sites of 494 proteins was significantly downregulated, while the acetylation of 21 lysine sites of 15 proteins was significantly upregulated by global quantitative acetylproteomic analysis after cervical cancer SiHa cells treated with metformin. Particularly, the acetylation levels of histone H3（K9, K56）were significantly increased via the activation of AMPK/mTOR axis in the presence of metformin, which conferred to the inhibition of cervical cancer growth. These results demonstrate the lysine new sites of acetylation of histone H3 （K9, K56） induced by metformin maybe play a key role in the inhibition of cervical cancer growth.

【**Keywords**】Metformin, Quantitative acetylproteomic analysis, H3K9, H3K56

Graphical Abstract Image



* Corresponding author: Chenglai Xia, TEL: +86-0757-82969723, E-mail: xiachenglai@smu.edu.cn;

1. Background

Cervical cancer is considered one of the most common types of cancer in women, recording approximately 300,000 deaths and 600,000 new cases a year worldwide[1]. Following the discovery of the causative infectious agent high-risk human papillomavirus （hrHPV）, persistent hrHPV infection was found to be a major cause of cervical cancer[2]. Most cases are predominantly caused by HPV types 16 and 18, with the remaining cases are associated with a dozen other hrHPVs[3]. Although HPV infection is found in the majority of cases, progression of cervical cancer requires additional epigenetic and genetic changes[4]. Recent studies have shown that abnormal changes in epigenetics are involved in all processes of cervical cancer initiation and progression[5]. This change not only activates viral oncogenes after HPV infection, but also plays an essential role in regulating cell differentiation and progression[6, 7].

Histone acetylation is an essential epigenetic mechanism that regulates transcriptional activity by controlling histone acetylation through the state of two enzymes with opposing activities, HDAC and HAT[7]. Thus, the balance of histone deacetylation and acetylation is pivotal in the transcription and expression of various oncogenes; however, aberrant expression of HDAC and HAT disrupts this balance and affects tumor progression. For example, overexpression of HDAC10 leads to inhibition of matrix metalloproteinase 2 and 9 expression, which in turn inhibits cervical cancer metastasis[8]. Overexpression of SIRT1 in HPV-infected cervical cancer cells allows continued cell growth by repressing the transcription of AIM2[9]. In another study, the expression of the HPV 16 gene correlated with the histone acetylation level on the HPV 16 genome[10]. Furthermore, acetyltransferase PCAF played a key role in tumor progression as a co-activator of p53, which is a tumor suppressor[11]. As a result, the development of inhibitors based on HAT and HDAC as drug targets to alter the acetylation level of histones has been regarded as a promising anti-cancer therapy in recent years[12, 13]. Additionally, mechanisms based on the histone acetylation contribute to the understanding of cervical cancer occurrence and progression.

As a drug for type II diabetes, metformin is currently attracting attention as a promising anti-cervical cancer drug[14, 15]. Several previous studies have shown that the anti-tumor mechanism of metformin involves epigenetic modification[16-18]. Metformin has been shown to modulate many epigenetic-related enzyme activities by activating AMPK, thereby altering the level of lysine acetylation, which in turn affects disease progression[18-20]. However, it remains to be determined whether metformin can inhibit cervical cancer progression by modulating histone acetylation modifications and which specific histone acetylation sites are specifically altered.

Quantitative acetylproteomics is an effective technique to quantitatively analyze differentially acetylated lysine sites by comparing the level of lysine acetylation modification between experimental and control groups. Therefore, we employed a TMT-based proteomic strategy to identify proteins and modification sites that undergo aberrant acetylation in metformin-treated cervical cancer cells in this study. Six differentially acetylated lysine sites on histones H2B and H3, including H3K9, H3K56, H3K122, H2BK12, H2BK20, and H2BK23, were identified in metformin-treated group compared to the control. Although the functional significance of each histone acetylation modification is not fully understood, patterns of histone acetylation alterations have been broadly implicated in cancer, both at the overall level across the genome and at particular genetic loci[21, 22]. Aberrant changes in H3K9 and H3K56 acetylation modifications have been reported in various human cancers[23-27]. However, its functional role in cervical cancer has not yet been elucidated, and the signaling pathway through which metformin alters the acetylation of H3K9 and H3K56 remains to be determined.

Here, we demonstrate that the acetylation levels of histone H3 （K9, K56） were dramatically elevated in the presence

of metformin via activating AMPK, which conferred to the inhibition of cervical cancer growth. These results demonstrate the lysine new sites of acetylation of H3 （K122, K56, K9） and H2B （K23, K20, K12） induced by metformin maybe critical in the suppression of cervical cancer growth.

2. Materials and methods

2.1 Cell culture, treatment, and transfection

HeLa （Cat. NO. CL-0101） and SiHa （Cat. NO. CL-0210） obtained from Procell （Wuhan, China） were cultured in DMEM complemented with 1% PS（Sigma, MO, USA）and 10% FBS（Gibco, NY, USA）under standard conditions （37℃, 5% CO_2）.

DMSO and metformin hydrochloride were supplied by Sigma-Aldrich （MO, USA）. Dorsomorphin and MHY1485 were obtained from MedChemExpress （Shanghai, China）. Dorsomorphin and MHY1485 were prepared as DMSO solutions, while metformin was prepared as aqueous solutions for *in vitro* studies. Cell samples were collected after 48 hours of treatment of various drugs（0–20 mM metformin, 10 μM dorsomorphin, 10 μM MHY1485, 10 μM dorsomorphin + 10 mM metformin, or 10 μM MHY1485 + 10 mM metformin） for subsequent Western blotting analysis.

The small interfering RNA PCAF （si-PCAF） were bought from Sangon Biotech （Shanghai, China）. And the sequences of si-PCAF were as following: si-PCAF#1, 5`-CCU AAA CCG CAU CAA CUA UUG TT-3`, and si-PCAF#2, 5`-GCU GGG ACA AUU UCA UAC AAU TT-3`. si-PCAF was transiently transfected into cervical cancer cells for 48 hours using Lipofectamine 3000 （Invitrogen, NY, USA）, followed by drug administration for another 48 hours, after which cell samples were collected for further Western blotting analysis.

2.2 Cell proliferation assays

Logarithmic growth SiHa or HeLa were planted in 96-well plates at the optimum density. After 24 hours, various concentrations of metformin were added and cultured for another 72 hours. Metformin's anti-proliferative effect was assessed by adding CCK-8 reagent, followed by analysis through microplate reader （BioTek, USA）.

2.3 Tumor xenografts

All protocols for the study of animals involved were reviewed and approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Guangdong Pharmaceutical University （Guangdong Province, China）. Twenty-four nude mice （female, BALB/c, and 4-week-old） were housed and bred in SPF grade animal facility and maintained at temperatures between 22 – 25℃, humidity between 40–60%, and a 12 hours/12 hours dark/light cycle. A xenograft was established by injecting SiHa cells （around 5×10^6 cells/0.1 mL） suspended in serum-free media into the mice's right forelimb near the axilla. When the tumor diameter met certain criteria （0.3 – 0.5 cm）, mouse were numbered and randomly classified into 4 groups （6/group）: Control, Cisplatin （CIS, 2.5 mg/kg）, Metformin （MET, 5 mg/kg）, and Metformin （MET, 50 mg/kg）. The volume （V） of tumor was derived from V=0.5×A×B×B, where A and B denote the longest and shortest diameters of the mice's subcutaneous tumors, respectively. Therefore, the above data need to be measured and recorded before every three days of treatment to determine the tumor volume. After the administration was completed, these sacrificed mice were dissected in time to collect tumor xenografts for further studies.

2.4 Western blot analysis

Briefly, whole protein and histone samples from cells or mice tissues were obtained using RIPA buffer （Beyotime; Shanghai, China） and histone extraction kit （EpiGentek, NY, USA）, respectively. Western blot procedures refer to

the previous protocol[28]. The concentration of the samples was quantified by BCA assay （Beyotime; Shanghai, China）, and then the 8-15% SDS-PAGE separated proteins were transferred to PVDF （0.2 μm） （Millipore, MA, USA） and subsequently incubated with the primary antibody （0°C, overnight） and secondary antibody （room temperature, 2 hours）. Protein bands on membranes were photographed using ChampChemi chemiluminescence instrument （Sagacreation, Beijing, China）and an enhanced chemiluminescence solution（Thermo, MA, USA）. ImageJ software was applied to analyzed the immunoblot band intensities.

The antibodies used below and their corresponding secondary antibodies were bought from CST （Danvers, MA, USA）, including anti-AMPKα（Cat#5832）, anti-mTOR（Cat#2983）, anti-phosphorylation-AMPKα（Thr172）（Cat#2535）, anti-phosphorylation-mTOR （Ser2448） （Cat#5536）, anti-PCAF （Cat#3378）, anti-SIRT2 （Cat#12650）, anti-PCNA （Cat#13110）, anti-β-actin （Cat#4970）, and anti-GAPDH （Cat#5174）. Other antibodies used in this study, anti-H3 （Cat#PTM-6613）, anti-acetyllysine （Cat#PTM-105RM）, anti-acetyl-H3K9 （Cat#PTM-112RM）, and anti-acetyl-H3K56 （Cat#PTM-162） were obtained from the PTM Biolabs Inc. （Hangzhou, China）.

2.5 Protein extraction and digestion, TMT labeling, and acetyl peptide enrichment

Three pairs of independent replicate cell samples （10 mM metformin-treated SiHa cells and solvent-treated control SiHa cells） were collected. The experimental procedure was carried out according to the protocol of the previously study[29]. After sonicating （3 times, 0°C） the samples with a Scientz sonicator in lysis buffer and collecting the supernatant by centrifugation （10 minutes, 12,000 g, 4°C）, the protein samples were finally quantified with a BCA kit. Protein samples were reduced with 5 mM DTT （30 minutes, 56°C） and alkylated with 11 mM IAA （15 minutes, room temperature） in the dark before being diluted with 100 mM TEAB to a urea concentration < 2M. Next, trypsin was added to the samples for digestion （37°C） for 18 hours.

Subsequently, the trypsin-digested peptide samples were processed based on the TMT kit protocol after completing the following series of operations, including desalting using a Phenomenex Strata X C18 SPE column, drying in vacuo, and reconstituted in 0.5 M TEAB. Then sample dissolved in NETN buffer were mixed with pre-washed antibody beads at 4°C with moderate shaking overnight to enrich for the modified peptides. After that, the beads were washed with NETN buffer and H_2O, respectively. Bound peptides from the beads were eluted with TFA （0.1%）, and the eluted fractions were mixed and vacuum-dried.

2.6 LC-MS/MS analysis

The experimental procedure was carried out according to the protocol of the previously study[29]. The resultant peptides were first desalted using the C18 ZipTips （Millipore） before being analyzed by LC-MS using EASY-nLC 1000 UPLC system equipped with a home-made reversed-phase analytical column （15 cm length × 75 μm inner diameter） at a constant flow rate of 400 nL/min. Mobile phase A was an aqueous solution containing 0.1% formic acid and 2% acetonitrile, whereas mobile phase B included 0.1% formic acid and 90% acetonitrile. Settings for the liquid phase gradient: 10%-25% solvent B, 0-24 min; 25%-35% solvent B, 24-32 min; 35%-80% solvent B, 32-36 min; 80% solvent B, 36-40 min. After separated by the UPLC system, the peptides were ionized with an NSI ion source and then analyzed by Q ExactiveTM Plus （Thermo） for mass spectrometry.

2.7 Bioinformatic analysis

The MaxQuant search engine （v.1.5.2.8） was performed to evaluate the raw MS/MS data and compared it with the human UniProt database. Acetylated peptides having a fold-change of less than 1/1.5 or greater than 1.5 were regarded

to have substantially differentially expression in this study （$P < 0.05$）. The UniProt-GOA database （http://www.ebi.ac.uk/GOA/） and InterProScan software were employed to obtain GO annotated proteomes. The InterProScan in combination with the InterPro domain database （http://www.ebi.ac.uk/interpro/） also allows annotation of the functional descriptions of the identified protein domain. KEGG online software KAAS （http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main） and the KEGG Mapper （http://www.kegg.jp/kegg/mapper.html） were used for KEGG enrichment analysis. The soft MoMo （http://meme-suite.org/tools/momo）, motif-x algorithm was applied to analyze the motif characteristics of the modification sites.

The limma package in R software was utilized to identify the DEGs between the 24 normal cervical epithelial tissues and 33 primary tumors from the datasets GSE9750 in GEO （https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo）. Subsequently, DEG volcano plots and scatter plots were obtained by the ggplot2 package in R language and the GraphPad 7.0 software.

2.8 Statistical analysis

In this study, data was analyzed using the GraphPad Prism 7.0 software. Data are presented as mean with SD. Statistical significance of differences between two- and multiple-group comparisons was assessed by independent t-test and multivariate ANOVA, respectively. Unless otherwise noted, differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Metformin considerably impeded cervical cancer tumor growth *in vitro* and *in vivo*

We first used the CCK-8 assay to identify whether metformin induced anti-proliferative activities in different cervical cancer cells. Metformin dramatically inhibited cell proliferation in a concentration-dependent way, with IC_{50} results of 24.28 ± 0.78 mM and 10.35 ± 0.88 mM for SiHa and HeLa cells, respectively（**Figure 1a**）. PCNA[15], a cell proliferation molecular marker, was used it to assess the growth status of HeLa and SiHa cells. **Figure 1b** showed that the level PCNA expression dropped markedly in a concentration-dependent way after treating with metformin for 48 hours. These outcomes indicated that metformin significantly suppressed the proliferation of cervical cancer cells, suggesting a favorable anti-tumor effect *in vivo*.

To verify whether metformin inhibited tumor growth *in vivo*, we established SiHa cell xenograft models in BALB/c nude mice. The average tumor volume in the metformin and cisplatin groups was remarkably lower than the tumor volume in the saline group （**Figure 1c-d**）. Notably, no deaths or significant body weight change were observed in the metformin-intervention group throughout the entire experiment, indicating that metformin was well-tolerated in mice with limited side effects and minimal toxicity（**Figure 1e**）. These findings elucidate the potential antitumor efficacy of metformin *in vitro* and *in vivo*.

3.2 Pan-acetylation regulation of metformin in the treatment of cervical cancer

Lysine acetylation abnormalities have been implicated in cervical cancer tumorigenesis and could be a prospective novel target for cancer treatment, especially epigenetic alterations of histones, which can modulate chromatin architecture at promoter regions[13, 30]. However, there have been few published studies on the acetylation capacity of metformin on histone lysine residues in cervical cancer. Therefore, we measured the acetylating capacity of metformin on lysine residues of whole proteins and histones. Cervical cancer cells treated with metformin were examined for the acetylation level of lysine residues by a pan anti-acetylation immunoblot. Metformin efficiently altered the acetylation of lysine residues in whole protein extracts from SiHa and HeLa cells（**Figure 2a**）. Interestingly, metformin also upregulated the acetylation

levels of histone lysine residues （15 kD） in cervical cancer cells （**Figure 2b**）. These results indicated that the inhibition of cervical cancer proliferation by metformin may be related to the regulation of acetylation of histone lysine residues.

3.3 Global lysine acetylation profiling of protein

To further understand the comprehensive alteration of protein lysine acetylation in cervical cancer by metformin intervention, we performed MS-based quantitative acetylproteomic analysis. The general flow chart of the quantitative proteomics research of acetylation modification in this study is shown in **Figure 2c**. Our results identified that more than 1000 proteins had only one lysine acetylation （Kac） site, around 400 proteins had two Kac sites, while more than 200 proteins had three Kac sites （**Figure 2d**）. Additionally, 5235 acetylation modification sites on 2069 proteins were discovered, with 4804 sites on 1940 proteins containing quantitative information （**Figure 2e**, **Additional file 1**）. Furthermore, 749 acetylated lysine sites corresponding to 509 proteins were significantly altered （fold change < 1/1.5 or > 1.5, and $P < 0.05$） after metformin treatment compared to the control, of which 21 were upregulated （acetylated） sites corresponding to 15 proteins, and 728 were downregulated （nonacetylated） sites corresponding to 494 proteins （**Figure 2f**）.

3.4 Conserved motifs flanking the acetylation sites

Motifs of amino acid in the identified lysine-acetylated proteins （10 amino acids downstream and upstream of the acetylation site） were explored using motif-X to clarify the characteristics of the amino acids around the identified acetylation sites in metformin-treated protein samples. **Figure 2g** shows the top 18 over-represented motifs. These motifs results revealed the presence of two groups of residues in the area around the acetylated lysine. The first was alanine （A）, cysteine （C）, lysine （K）, and threonine （T） upstream of the Kac sites. The second was serine （S）, histidine （H）, tyrosine （Y）, asparagine （N）, proline （P）, and tryptophan （W） downstream of the Kac sites, indicating that the protein lysine acetylation preferred residues K, Y, and T. The majority of the conserved residues were positioned at ± 1 or ± 2 positions away from the Kac sites, based on the location of the residues in proximity to the acetylated lysine（**Figure 2h**）. These motif models and residue preferences provide helpful insights for predicting the acetyl sites of unidentified acetyl proteins.

3.5 Functional annotation and subcellular localization of differentially acetylated proteins

Functional enrichment and subcellular localization studies were carried out to better comprehend the functions and characteristics of the identified differentially modified proteins. First, GO analysis and GO functional classification revealed that the identified Kac proteins were mainly participated in single-organism processes, metabolic processes, cellular processes, developmental processes, and signaling （**Figure 3a-c**）. Membrane, organelle, membrane-enclosed lumen, and extracellular regions were the main areas where the Kac proteins were distributed in cells, while catalytic activity and binding were the dominant functions of the identified Kac proteins （**Figure 3d**）.

Next, the KEGG results reveled that Kac proteins were participated in “antigen processing and presentation（hsa04612）”, “cholesterol metabolism （hsa04979）”, “non-homologous end-joining （hsa03450）”, and “one carbon pool by folate （hsa00670）”, based on statistically significant pathways （$P < 0.05$） （**Figure 3e**）. Upregulated Kac proteins were notably enriched in pathways such as “systemic lupus erythematosus （hsa05322）”, “alcoholism （hsa05034）”, and “carbon metabolism （hsa01200）” （**Figure 3f**）, while downregulated Kac proteins were significantly enriched in “cholesterol metabolism （hsa04979）”, “antigen processing and presentation （hsa04612）”, “non-homologous end-joining （hsa03450）”, and “protein processing in endoplasmic reticulum （hsa04141）” （**Figure 3g**）.

In the subcellular localization classification, 41.09% of downregulated Kac proteins were localized in the cytoplasm, 30.16% in the nucleus, 10.53% in the mitochondria, 5.87% in extracellular areas, 4.05% in the plasma membrane, and 2.63% in other cellular regions （**Figure 3h**）. For the upregulated Kac protein localization, 73.33% were in the nucleus, 20% were in the cytoplasm, and 6.67% were in the mitochondria （**Figure 3i**）. These findings imply that lysine acetylation of proteins is present in various cellular processes and may be one of the pivotal regulatory mechanisms by which metformin inhibits cervical cancer proliferation.

3.6 Metformin-induced H3K9 and H3K56 hyperacetylation in vitro

Hyperacetylation may be attributed to the expression of proto-oncogenes, whereas hypoacetylation is implicated in the silencing of tumor suppressor genes[22]. Acetylproteomic results demonstrated that histones were acetylated in SiHa cells following metformin therapy, including three lysine residues in both H3 （P84243） and H2B （Q99879）. The acetylation-modified sites of H2B were K12, K20, and K23 residues, and the acetylation-modified sites of H3 were K9, K56, and K122 residues, as identified by LC-MS/MS （**Figure 4a**）. Recent studies have shown that histone acetylation marks on K9 （H3K9ac） and K56 （H3K56ac） of H3 are related to the activation of gene expression and tumor progression; however, much remains unknown about their role in cervical cancer [25, 31]. In view of this, we next explored the role of acetylation of these two sites in cervical cancer after metformin treatment. The MS/MS spectra results identified K9ac and K56ac in H3 （**Figure 4b-c**）. To further confirm the mass spectrometric results, we performed Western blotting. Following metformin treatment of SiHa and HeLa cells, we observed that metformin strongly induced histone H3 hyperacetylation at Lys9 and Lys56 residues（**Figure 4d-g**）. Two additional differentially acetylated proteins of our interest were selected for Western blot validation, and the results were confirmed in agreement with the mass spectrometry results, suggesting that the acetylproteomic results were reliable.

3.7 H3K9 and H3K56 are hyperacetylated through metformin-induced acetyltransferase PCAF upregulation

It is well known that acetylation and deacetylation on specific lysine residues of histones can be catalyzed by HATs and HDACs, respectively, thereby epigenetically regulating global gene transcription and metabolism in tumors[32]. It was shown recently that SIRT2 mediates acetylation of H3K9 and H3K56[33]. The histone acetyltransferase KAT2B, also referred to as PCAF, was shown to be the key enzyme responsible for H3K9ac deposition[34], whereas studies on H3K56ac were rarely reported. Therefore, to further investigate whether metformin potentially acetylated histone H3K9 and H3K56 through the acetyltransferase PCAF and the deacetylase SIRT2, we first validated by Western blot analysis whether metformin mediated PCAF and SIRT expression in cervical cancer cells. Notably, we found decreasing levels of SIRT2 yet increasing levels of PCAF after metformin treatment, both in HeLa and SiHa cells（**Figure 5a-d**）. The differential expression patterns of PCAF and SIRT2 in metformin-treated cervical cancer cells suggest that acetylation of H3K9 and H3K56 in cervical cancer may be dynamically regulated by acetyltransferases and deacetylases.

To further assess roles for PCAF and SIRT2 in cervical cancer, we applied the GEO database to mine their transcriptional expression patterns in 33 primary tumors and 24 normal cervical epithelial tissues. The results showed that, compared with normal cervical epithelial tissue, both PCAF and SIRT2 transcript levels were downregulated in tumor tissue, especially PCAF, which showed significant differences （**Figure 5e-f**）. Furthermore, former studies have shown that a higher prognosis of patients with high expression of PCAF, suggesting that PCAF is a novel cervical tumor suppressor gene[35]. Given this, we next focused on whether metformin mediated the hyperacetylation of H3K9 and H3K56 by altering the activity of PCAF. To identify the acetyltransferases involved in increasing H3K9ac and H3K56ac in metformin-treated cervical cancer cells, we silenced the expression of PCAF with siRNA. Suppression of PCAF significantly reduced the global level of H3K9ac and H3K56ac, while supplementation of metformin significantly rescued

the acetylation of H3K9 and H3K56 in cervical cancer cells after si-PCAF treatment, indicating that PCAF is essential for metformin-mediated H3K9 and H3K56 hyperacetylation （**Figure 5g-j**）.

3.8 Metformin-induced H3K9 and H3K56 hyperacetylation in vitro is mediated through the AMPK/mTOR/PCAF axis

Growing evidence underlies the importance of AMPK in the anti-cancer effects of metformin[36]. As a potent AMPK activator, metformin has been demonstrated in recent years to induce histone and non-histone acetylation by activating AMPK[37]. Additionally, regulation of mTOR by AMPK may represent the most critical antitumor effect of metformin-activated AMPK, as mTOR inhibition leads to downregulation of protein synthesis and cell proliferation. Therefore, there is a need to explore whether the AMPK/mTOR pathway and the acetyltransferase PCAF are responsible for the role of metformin-induced histone acetylation in anti-cervical cancer activity. Analysis showed that the intervention of metformin on SiHa and HeLa remarkably increased AMPK phosphorylation while decreasing mTOR phosphorylation （**Figure 6a-d**）. We observed that metformin treatment increased histone acetylation, presumably by inhibiting mTOR following AMPK activation.

Next, we performed gene knockdown experiments for PCAF using siRNA in HeLa and SiHa to explore whether the expression of PCAF influences AMPK and mTOR phosphorylation. The finding revealed that the phosphorylation of AMPK and mTOR was not significantly altered after si-PCAF intervention, whereas it did shift dramatically following metformin supplementation（**Figure 6e-h**）. Furthermore, the PCAF expression level was also significantly upregulated after metformin supplementation. These data suggested that PCAF is likely to be a downstream protein of the AMPK/mTOR pathway, and its activity may be regulated by this pathway.

Further *in vitro* experiments were conducted to explore whether blocking the AMPK/mTOR pathway affects the regulation of H3K9ac and H3K56ac levels by metformin. Dorsomorphin and MHY1485, an AMPK inhibitor and mTOR activator, respectively, were used to interfere with metformin-regulated histone acetylation. As shown in the Western blot analysis, the acetylation of H3K9 and H3K56 in the drug interference group was increased under metformin treatment and decreased under treatment with the AMPK inhibitor dorsomorphin or the mTOR activator MHY1485. Furthermore, the hypoacetylation levels of H3K9 and H3K56 in the dorsomorphin and MHY1485 treatment groups were reversed by metformin （**Figure 7a-d**）. This result was explained by additional Western blot results that showed supplemental treatment with metformin reversed the acetylation levels of H3K9 and H3K56 by activating the AMPK/mTOR signaling pathway, which was disrupted by AMPK inhibitors or mTOR activators （**Figure 7e-h**）. Likewise, metformin restored PCAF protein expression levels under dorsomorphin and MHY1485 treatments. These data indicated that engagement of the AMPK/mTOR/PCAF axis is critical in the beneficial effects of metformin-induced hyperacetylation of H3K9 and H3K56 in cervical cancer treatment.

3.9 Metformin-induced H3K9 and H3K56 hyperacetylation in vivo is mediated through the AMPK/mTOR/PCAF axis

To further explore whether the metformin *in vitro* results are in accordance with the *in vivo* results, we examined the expression patterns of AMPK, mTOR, p-AMPK, p-mTOR, PCAF, SIRT2, H3K9ac, and H3K56ac in tumor tissues collected from the cervical cancer xenograft nude mouse model. Metformin treatment significantly upregulated p-AMPK, PCAF, H3K9ac, and H3K56ac levels in xenografts, and significantly downregulated the p-mTOR and SIRT2 levels, compared to the saline group （**Figure 8a-b**）. These data are in line with those at the cellular level, suggesting that metformin hyperacetylates H3K9 and H3K56 by mediating the AMPK/mTOR/PCAF axis *in vivo*.

4. Discussion

Clinical investigations have demonstrated that metformin use is related with a statistically significant lower incidence of cancer in diabetic individuals, raising awareness of metformin's role cancer prevention and treatment[38]. Data from clinical trials registered on ClinicalTrials.gov show that there are multiple studies using metformin in the treatment of a wide range of cancer types, and in particular, some clinical trials of metformin in non-diabetic cancer patients have yielded promising results[39, 40]. Although recent studies by us and others have found that metformin has significant anti-cervical cancer activity, there remains an urgent need to investigate its anti-cancer molecular mechanism for subsequent clinical trials and combination therapy applications in cervical cancer treatment[41-44].

Previous studies have found that the low-priced and wide-used drug metformin has a previously unrecognized role of enhancing histone acetylation, yet this effect has been unexplored in cervical cancer [18, 19]. It was demonstrated that histone acetylation is involved in chromatin remodeling and transcriptional activation[45]. Global alterations in histone acetylation levels are relevant to a wide range of cancer phenotypes and have even been found to have underlying prognostic value[22]. However, to our knowledge, no large-scale analyses of the effects of metformin in regulating lysine acetylation in cervical cancer development has been reported. Given the complexity of global acetylation regulation and inspired by the study of Zhang et al.[30], we employed label-free quantitative proteomics to identify the role of metformin on histone and non-histone acetylation in cervical cancer.

Quantitative acetylproteomic results showed that 749 lysine acetylation sites from 509 proteins were differentially acetylated in the metformin-treated group in comparison to the control group. Following metformin treatment, most non-histone acetylation levels were downregulated, whereas histone acetylation levels were upregulated relative to controls. Among them, the acetylation sites of some proteins have been confirmed to be engaged in the regulation of tumor progression. Our study showed that metformin intervention resulted in a downregulation of acetylation PGK1 （an essential enzyme in the metabolic glycolytic pathway） lysine residues K139, K48, K275, K97, K323, and K220 relative to the control group. Hu et al.[46] discovered that PGK1 acted as an oncogenic factor in the progression of liver cancer progression, and that acetylation of PGK1 at the K323 site was a key regulatory mechanism that enhanced its enzymatic activity and metabolism in cancer cells. Additionally, NPM1, a multifunctional histone chaperone, is frequently overexpressed in some human cancers. Shandilya et al.[47] found that NPM1 acetylation was positively correlated with tumorigenesis. Furthermore, the acetylation status of NPM1 could be developed as a diagnostic marker or even as a possible therapeutic target for malignant transformation. Interestingly, our quantitative acetylproteomic results indicated that metformin treatment of cervical cancer cells significantly downregulated the acetylation levels of five lysine sites of NPM1, including K248, K202, K154, K229, and K141. In addition, the functions of the acetylation sites of some proteins uncovered in this investigation have not been reported in the literature, but the acetylation of these proteins has been confirmed to be engaged in the regulation of tumor development, including SDHA[48], IDH1[49], and HMGB1[50]. It can be seen that the regulation of metformin on cervical cancer progression involves a large and complex regulatory process of protein acetylation, most of which remains to be elucidated.

Disruption of the balance of histone acetylation causes unregulated activation of numerous genes, resulting in occurrences related to malignant transformation. Numerous investigation have linked changes in histone acetylation as promising diagnostic or prognostic indicators in cancer. Notably, our quantitative acetylproteomic data identified that metformin dramatically increased acetylation at six lysine sites in histones H2B （K20, K23, K12） and H3 （K122, K56, K9） in cervical cancer cells. However, the function of each of these histone acetylation modifications in cancer progression has not been fully elucidated; for example, current studies suggest that the role of H3 acetylation at K9 in tumors is

controversial. Liana et al.[25] demonstrated that hypoacetylation of H3K9ac can be a poor prognosis marker in oral cancer; whereas hyperacetylated H3K9ac acted as a transcriptional activator and enhanced various signaling pathways to promote tumorigenesis[51]. Additionally, elevated H3K9ac was related with a poor prognosis in cervical cancer [52], whereas it was associated with a better prognosis in glioma[53]. Yoichi et al.[54] demonstrated that metformin markedly suppressed the p300-induced hypertrophic responses and H3K9 acetylation in cardiomyocytes. However, the effect of metformin on H3K9ac in cervical cancer has been unknown. In the current study, the results of Western blot were in agreement with the quantitative acetylproteomic data, showing that metformin hyperacetylated H3K9 in cervical cancer cells. The implications of H3K56 acetylation in cervical cancer, as well as how metformin modulates H3K56 acetylation, remain to be elucidated. Metformin hyperacetylated H3K56 in cervical cancer cell lines, as seen by Western blotting analysis, which was in accordance with the quantitative acetylproteomic data. Moreover, the cervical cancer xenografts experiment reveled that metformin dramatically suppressed tumor development. These findings suggest that metformin-mediated cervical cancer suppression is dependent on H3K9 and H3K56 hyperacetylation.

Histone acetylation is a dynamic and reversible procedure that is mediated by lysine deacetylases and lysine acetyltransferases. PCAF belongs to the GNAT family of lysine acetyltransferase, which acetylate histone H3K9[55]. Yamauchi et al.[56] showed that PCAF and its homologue GCN5/KAT2A serve unique but overlapping functions in mouse embryonic development. Jorrit et al.[57] demonstrated that GCN5/KAT2A acetylated H3K56 *in vitro* and *in vivo*. However, the relationship between PCAF and H3K56ac has been unclear. In our study, we demonstrate that metformin upregulated PCAF expression in cervical cancer *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, silencing PCAF in cervical cancer cells not only blocked the acetylation of H3K9, but also blocked acetylation of H3K56, indicating that PCAF is also involved in acetylating H3K56. Supplementation with metformin reversed this result, suggesting that the hyperacetylation of H3K9 and H3K56 by metformin may be mediated through the upregulation of PCAF. Moreover, using the GEO database, we described the expression pattern of PCAF in cervical cancer and normal cervical epithelial tissues, and the results agreed with the findings of Li et al.[35], who discovered that the expression of PCAF in cervical cancer tissues was lower than that in control group. Taken together, we found that PCAF, as a transcriptional co-activator with multiple biological functions, is required for metformin-mediated hyperacetylation of H3K9 and H3K56, and may play a prominent role in metformin-regulated cervical cancer development.

AMPK is a metformin target that is critical in the control of bioenergy metabolism[58]. Recent studies suggested that metformin works as an AMPK agonist to aid in cancer prevention and treatment[59], but the underlying processes are uncertain. Other studies have shown that metformin-induced histone modification via AMPK activation may be one of these mechanisms. Galdieri et al.[19] demonstrated that metformin hyperacetylated histones in ovarian and ovarian cancer cells through activating AMPK. Our results suggested that metformin may inhibit cervical cancer growth by activating AMPK, and that this mechanism likely occurs through an AMPK-dependent mechanism mediated by metformin's inhibition of mTORC1 signaling. However, whether metformin regulates the acetylation of H3K9 and H3K56 by activating an AMPK-dependent mechanism has been unclear and rarely reported. To investigate the upstream mechanism, we applied siRNA and small molecule compounds （dorsomorphin and MHY1485） to demonstrate that metformin promoted H3K9 and H3K56 acetylation through the AMPK/mTOR axis. Our findings showed that suppressing PCAF had not effect on AMPK/mTOR signaling, whereas metformin supplementation stimulated the AMPK/mTOR pathway. Furthermore, metformin supplementation restored PCAF expression even in the presence of si-PCAF, indicating that PCAF may be a downstream protein of and possibly regulated by the AMPK/mTOR axis.

Furthermore, treatment of cervical cancer cells with dorsomorphin （AMPK inhibitor） or MHY1485 （mTOR agonist）

hypoacetylated H3K9 and H3K56, whereas metformin supplementation restored H3K9ac and H3K56ac levels. Dorsomorphin and MHY1485 are frequently used as small-molecule interference tools to study the role of AMPK/mTOR signaling[60], and dorsomorphin in particular has been shown to block AMPK/mTOR signaling[61]. In addition, studies have shown that major molecular targets of metformin included AMPK and mTORC1[59].

Taken together, our findings indicate that metformin acts as an AMPK agonist to hyperacetylate H3K9 and H3K56 by activating the AMPK/mTOR pathway and increasing the expression of the acetyltransferase PCAF; however, the underlying mechanisms remain unknown. Metformin's modulation of histone acetylation may be one of the potential mechanisms for cervical cancer prevention and therapy, providing a foundation for the development of novel metformin-based cancer combination therapies. As shown in **Figure 8c**, we propose a hypothesis for the mechanism of action of metformin against cervical cancer proliferation.

5. Conclusions

Overall, this work highlights essential underlying molecular pathways involved in reducing cervical cancer growth by providing a comprehensive acetylome profile of metformin-mediated regulation of cervical cancer by a quantitative acetylproteomic analysis. Metformin slows the growth of cervical cancer *in vitro* and *in vivo* by triggering the AMPK/mTOR pathway and promoting H3K9 and H3K56 acetylation. Furthermore, PCAF was discovered as a potential acetyltransferase of H3K9ac and H3K56ac in this work, however the functions of H3K9ac and H3K56ac in cervical cancer remain to be elucidated.

Abbreviations

AMPK: AMP-activated protein kinase; TMT: Tandem mass tag; hrHPV: High-risk human papillomavirus; HAT: Histone acetyltransferase; HDAC: Histone deacetylase; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; PS: Penicillin-streptomycin; DMSO: Dimethyl sulfoxide; CST: Cell Signaling Technology; MET: Metformin; CIS: Cisplatin; CCK-8: Cell counting kit-8; SPF: Specific pathogen-free; PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; PVDF: Polyvinylidene fluoride; DTT: Dithiothreitol; IAA: Iodoacetamide; TEAB: Triethylammonium bicarbonate; NETN: buffer comprising 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, and 0.5% NP-40; TFA: Trifluoroacetic acid; LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; UPLC: Ultra-performance liquid chromatography; NSI: Nanospray ionization; GO: Gene ontology; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; GEO: Gene Expression Omnibus; FDR: False discovery rate; SD: Standard deviation; Kac: Lysine acetylation; PCAF: P300/CBP-associated factor; PGK1: Phosphoglycerate kinase 1; NPM1: Nucleophosmin; GNAT: GCN5-related N-acetyltransferase;

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All protocols for the study of animals involved were reviewed and approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Guangdong Pharmaceutical University （Guangdong Province, China）, Reference Number: gdpulac2021243.

Consent for publication

Consent for publication was obtained from the participants.

Availability of data and material

Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found in GEO.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was supported by grants from the Science and Technology Bureau of Foshan （NO. FS0AA-KJ218-1301-0008 and NO. FS0AA-KJ819-4901-0082）.

Authors' Contributions

CX supervised the entire work. BP performed the cell cultures, proliferation assays, transfection, western blot assays, and animal experiments. CL and JS performed the cell cultures and western blot assay. BP, JS, and CX analyzed the data. CX and BP designed the experiments. BP contributed to the manuscript writing, and CX critically revised the manuscript. All authors discussed the results. And all authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We especially thank PTM Biolab LLC for their assistance with label-free quantitative acetylproteomics techniques in this study.

References:

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2021, 71（3）:209-249.

2. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC: Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet （London, England）* 2013, 382（9895）:889-899.

3. Brianti P, De Flammineis E, Mercuri SR: Review of HPV-related diseases and cancers. *The new microbiologica* 2017, 40（2）:80-85.

4. Saavedra KP, Brebi PM, Roa JC: Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clinical epigenetics* 2012, 4（1）:13.

5. Laengsri V, Kerdpin U, Plabplueng C, Treeratanapiboon L, Nuchnoi P: Cervical Cancer Markers: Epigenetics and microRNAs. *Laboratory medicine* 2018, 49（2）:97-111.

6. Xu W, Xu M, Wang L, Zhou W, Xiang R, Shi Y, Zhang Y, Piao Y: Integrative analysis of DNA methylation and gene expression identified cervical cancer-specific diagnostic biomarkers. *Signal transduction and targeted therapy* 2019, 4:55.

7. Fang J, Zhang H, Jin S: Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014, 35（6）:5083-5093.

8. Song C, Zhu S, Wu C, Kang J: Histone deacetylase （HDAC） 10 suppresses cervical cancer metastasis through inhibition of matrix metalloproteinase （MMP） 2 and 9 expression. *The Journal of biological chemistry* 2013, 288（39）:28021-28033.

9. So D, Shin HW, Kim J, Lee M, Myeong J, Chun YS, Park JW: Cervical cancer is addicted to SIRT1 disarming the AIM2 antiviral defense. *Oncogene* 2018, 37（38）:5191-5204.

10. Johansson C, Jamal Fattah T, Yu H, Nygren J, Mossberg AK, Schwartz S: Acetylation of intragenic histones on HPV16 correlates with enhanced HPV16 gene expression. *Virology* 2015, 482:244-259.

11. Watts GS, Oshiro MM, Junk DJ, Wozniak RJ, Watterson S, Domann FE, Futscher BW: The acetyltransferase p300/CBP-associated factor is a p53 target gene in breast tumor cells. *Neoplasia （New York, NY）* 2004, 6（3）:187-194.

12. Dekker FJ, Haisma HJ: Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug discovery today* 2009, 14（19-20）:942-948.

13. Lourenço de Freitas N, Deberaldini MG, Gomes D, Pavan AR, Sousa Â, Dos Santos JL, Soares CP: Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Interventions on Cervical Cancer Induced by Human Papillomavirus. *Frontiers in cell and developmental biology* 2020, 8:592868.

14. Hoppe-Seyler K, Herrmann AL, Däschle A, Kuhn BJ, Strobel TD, Lohrey C, Bulkescher J, Krijgsveld J, Hoppe-Seyler F: Effects of Metformin on the virus/host cell crosstalk in human papillomavirus-positive cancer cells. *International journal of cancer* 2021, 149（5）:1137-1149.

15. Xia C, Liu C, He Z, Cai Y, Chen J: Metformin inhibits cervical cancer cell proliferation by modulating PI3K/Akt-induced major histocompatibility complex class I-related chain A gene expression. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2020, 39（1）:127.

16. Cuyàs E, Verdura S, Martin-Castillo B, Menendez JA: Metformin: Targeting the Metabolo-Epigenetic Link in Cancer Biology. *Frontiers in oncology* 2020, 10:620641.

17. Yu X, Mao W, Zhai Y, Tong C, Liu M, Ma L, Yu X, Li S: Anti-tumor activity of metformin: from metabolic and epigenetic perspectives. *Oncotarget* 2017, 8（3）:5619-5628.

18. Bridgeman SC, Ellison GC, Melton PE, Newsholme P, Mamotte CDS: Epigenetic effects of metformin: From molecular mechanisms to clinical implications. *Diabetes, obesity & metabolism* 2018, 20（7）:1553-1562.

19. Galdieri L, Gatla H, Vancurova I, Vancura A: Activation of AMP-activated Protein Kinase by Metformin Induces Protein Acetylation in Prostate and Ovarian Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry* 2016, 291（48）:25154-25166.

20. Fang W, Zhang J, Hong L, Huang W, Dai X, Ye Q, Chen X: Metformin ameliorates stress-induced depression-like behaviors via enhancing the expression of BDNF by activating AMPK/CREB-mediated histone acetylation. *Journal of affective disorders* 2020, 260:302-313.

21. Bannister AJ, Kouzarides T: Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011, 21（3）:381-395.

22. Audia JE, Campbell RM: Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2016, 8（4）:a019521.

23. Berger L, Kolben T, Meister S, Kolben TM, Schmoeckel E, Mayr D, Mahner S, Jeschke U, Ditsch N, Beyer S: Expression of H3K4me3 and H3K9ac in breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2020, 146（8）:2017-2027.

24. Li YH, Li YX, Li M, Song SW, Ge Y, Jin JY, Li XY, Tan XD, Ye J: The Ras-ERK1/2 signaling pathway regulates H3K9ac through PCAF to promote the development of pancreatic cancer. *Life sciences* 2020, 256:117936.

25. Webber LP, Wagner VP, Curra M, Vargas PA, Meurer L, Carrard VC, Squarize CH, Castilho RM, Martins MD: Hypoacetylation of acetyl-histone H3 （H3K9ac） as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology* 2017, 71（2）:278-286.

26. Wu HT, Kuo YC, Hung JJ, Huang CH, Chen WY, Chou TY, Chen Y, Chen YJ, Chen YJ, Cheng WC *et al*: K63-polyubiquitinated HAUSP deubiquitinates HIF-1α and dictates H3K56 acetylation promoting hypoxia-induced tumour progression. *Nature communications* 2016, 7:13644.

27. Vadla R, Haldar D: Mammalian target of rapamycin complex 2 （mTORC2） controls glycolytic gene expression by regulating Histone H3 Lysine 56 acetylation. *Cell cycle （Georgetown, Tex）* 2018, 17（1）:110-123.

28. Pan B, Yin S, Peng F, Liu C, Liang H, Su J, Hsiao WLW, Cai Y, Luo D, Xia C: Vorinostat targets UBE2C to reverse epithelial-mesenchymal transition and control cervical cancer growth through the ubiquitination pathway. *European journal of pharmacology* 2021, 908:174399.

29. Yang H, Sha W, Liu Z, Tang T, Liu H, Qin L, Cui Z, Chen J, Liu F, Zheng R *et al*: Lysine acetylation of DosR regulates the hypoxia response of Mycobacterium tuberculosis. *Emerging microbes & infections* 2018, 7（1）:34.

30. Zhang L, Wang W, Zhang S, Wang Y, Guo W, Liu Y, Wang Y, Zhang Y: Identification of lysine acetylome in cervical cancer

by label-free quantitative proteomics. *Cancer cell international* 2020, 20:182.

31. Liu Y, Wang DL, Chen S, Zhao L, Sun FL: Oncogene Ras/phosphatidylinositol 3-kinase signaling targets histone H3 acetylation at lysine 56. *The Journal of biological chemistry* 2012, 287（49）:41469-41480.

32. Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, Zhao K: Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 2009, 138（5）:1019-1031.

33. Qu ZA, Ma XJ, Huang SB, Hao XR, Li DM, Feng KY, Wang WM: SIRT2 inhibits oxidative stress and inflammatory response in diabetic osteoarthritis. *European review for medical and pharmacological sciences* 2020, 24（6）:2855-2864.

34. Jin Q, Zhuang L, Lai B, Wang C, Li W, Dolan B, Lu Y, Wang Z, Zhao K, Peng W *et al*: Gcn5 and PCAF negatively regulate interferon-β production through HAT-independent inhibition of TBK1. *EMBO reports* 2014, 15（11）:1192-1201.

35. Li L, Zhang J, Cao S: Lysine Acetyltransferase 2B predicts favorable prognosis and functions as anti-oncogene in cervical carcinoma. *Bioengineered* 2021, 12（1）:2563-2575.

36. Faria J, Negalha G, Azevedo A, Martel F: Metformin and Breast Cancer: Molecular Targets. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2019, 24（2）:111-123.

37. Vancura A, Vancurova I: Metformin induces protein acetylation in cancer cells. *Oncotarget* 2017, 8（25）:39939-39940.

38. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD: Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ （Clinical research ed）* 2005, 330（7503）:1304-1305.

39. Hosono K, Endo H, Takahashi H, Sugiyama M, Sakai E, Uchiyama T, Suzuki K, Iida H, Sakamoto Y, Yoneda K *et al*: Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer prevention research （Philadelphia, Pa）* 2010, 3（9）:1077-1083.

40. Higurashi T, Hosono K, Takahashi H, Komiya Y, Umezawa S, Sakai E, Uchiyama T, Taniguchi L, Hata Y, Uchiyama S *et al*: Metformin for chemoprevention of metachronous colorectal adenoma or polyps in post-polypectomy patients without diabetes: a multicentre double-blind, placebo-controlled, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2016, 17（4）:475-483.

41. Xia C, Yang F, He Z, Cai Y: iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the inhibition of cervical cancer cell invasion and migration by metformin. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2020, 123:109762.

42. Xia C, He Z, Liang S, Chen R, Xu W, Yang J, Xiao G, Jiang S: Metformin combined with nelfinavir induces SIRT3/mROS-dependent autophagy in human cervical cancer cells and xenograft in nude mice. *European journal of pharmacology* 2019, 848:62-69.

43. Chen YH, Wu JX, Yang SF, Chen ML, Chen TH, Hsiao YH: Metformin Potentiates the Anticancer Effect of Everolimus on Cervical Cancer In Vitro and In Vivo. *Cancers* 2021, 13（18）.

44. Chen J, Zhou C, Yi J, Sun J, Xie B, Zhang Z, Wang Q, Chen G, Jin S, Hou J *et al*: Metformin and arsenic trioxide synergize to trigger Parkin/pink1-dependent mitophagic cell death in human cervical cancer HeLa cells. *Journal of Cancer* 2021, 12（21）:6310-6319.

45. Shvedunova M, Akhtar A: Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. *Nature reviews Molecular cell biology* 2022, 23（5）:329-349.

46. Hu H, Zhu W, Qin J, Chen M, Gong L, Li L, Liu X, Tao Y, Yin H, Zhou H *et al*: Acetylation of PGK1 promotes liver cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Hepatology （Baltimore, Md）* 2017, 65（2）:515-528.

47. Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS, Kundu TK: Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. *Molecular and cellular biology* 2009, 29（18）:5115-5127.

48. Li ST, Huang D, Shen S, Cai Y, Xing S, Wu G, Jiang Z, Hao Y, Yuan M, Wang N *et al*: Myc-mediated SDHA acetylation triggers epigenetic regulation of gene expression and tumorigenesis. *Nature metabolism* 2020, 2（3）:256-269.

49. Wang B, Ye Y, Yang X, Liu B, Wang Z, Chen S, Jiang K, Zhang W, Jiang H, Mustonen H *et al*: SIRT2-dependent IDH1 deacetylation inhibits colorectal cancer and liver metastases. *EMBO reports* 2020, 21（4）:e48183.

50. Kong Q, Li Y, Liang Q, Xie J, Li X, Fang J: SIRT6-PARP1 is involved in HMGB1 polyADP-ribosylation and acetylation and promotes chemotherapy-induced autophagy in leukemia. *Cancer biology & therapy* 2020, 21（4）:320-331.

51. Ji H, Zhou Y, Zhuang X, Zhu Y, Wu Z, Lu Y, Li S, Zeng Y, Lu QR, Huo Y *et al*: HDAC3 Deficiency Promotes Liver Cancer through a Defect in H3K9ac/H3K9me3 Transition. *Cancer research* 2019, 79（14）:3676-3688.

52. Beyer S, Zhu J, Mayr D, Kuhn C, Schulze S, Hofmann S, Dannecker C, Jeschke U, Kost BP: Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, 18（3）:477.

53. Liu B-l, Cheng J-x, Zhang X, Wang R, Zhang W, Lin H, Xiao X, Cai S, Chen X-y, Cheng H: Global Histone Modification Patterns as Prognostic Markers to Classify Glioma Patients. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2010, 19（11）:2888-2896.

54. Sunagawa Y, Shimizu K, Katayama A, Funamoto M, Shimizu K, Nurmila S, Shimizu S, Miyazaki Y, Katanasaka Y, Hasegawa K *et al*: Metformin suppresses phenylephrine-induced hypertrophic responses by inhibiting p300-HAT activity in cardiomyocytes. *Journal of pharmacological sciences* 2021, 147（2）:169-175.

55. Jin Q, Yu LR, Wang L, Zhang Z, Kasper LH, Lee JE, Wang C, Brindle PK, Dent SY, Ge K: Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *The EMBO journal* 2011, 30（2）:249-262.

56. Yamauchi T, Yamauchi J, Kuwata T, Tamura T, Yamashita T, Bae N, Westphal H, Ozato K, Nakatani Y: Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97（21）:11303-11306.

57. Tjeertes JV, Miller KM, Jackson SP: Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *The EMBO journal* 2009, 28（13）:1878-1889.

58. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B: Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metabolism* 2014, 20（6）:953-966.

59. Vancura A, Bu P, Bhagwat M, Zeng J, Vancurova I: Metformin as an Anticancer Agent. *Trends in pharmacological sciences* 2018, 39（10）:867-878.

60. Chen WR, Yang JQ, Liu F, Shen XQ, Zhou YJ: Melatonin attenuates vascular calcification by activating autophagy via an AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway. *Experimental cell research* 2020, 389（1）:111883.

61. Jiang L, Liu T, Xie L, Ouyang C, Ji J, Huang T: AICAR prolongs corneal allograft survival via the AMPK-mTOR signaling pathway in mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2019, 113:108558.

Figure and legends:

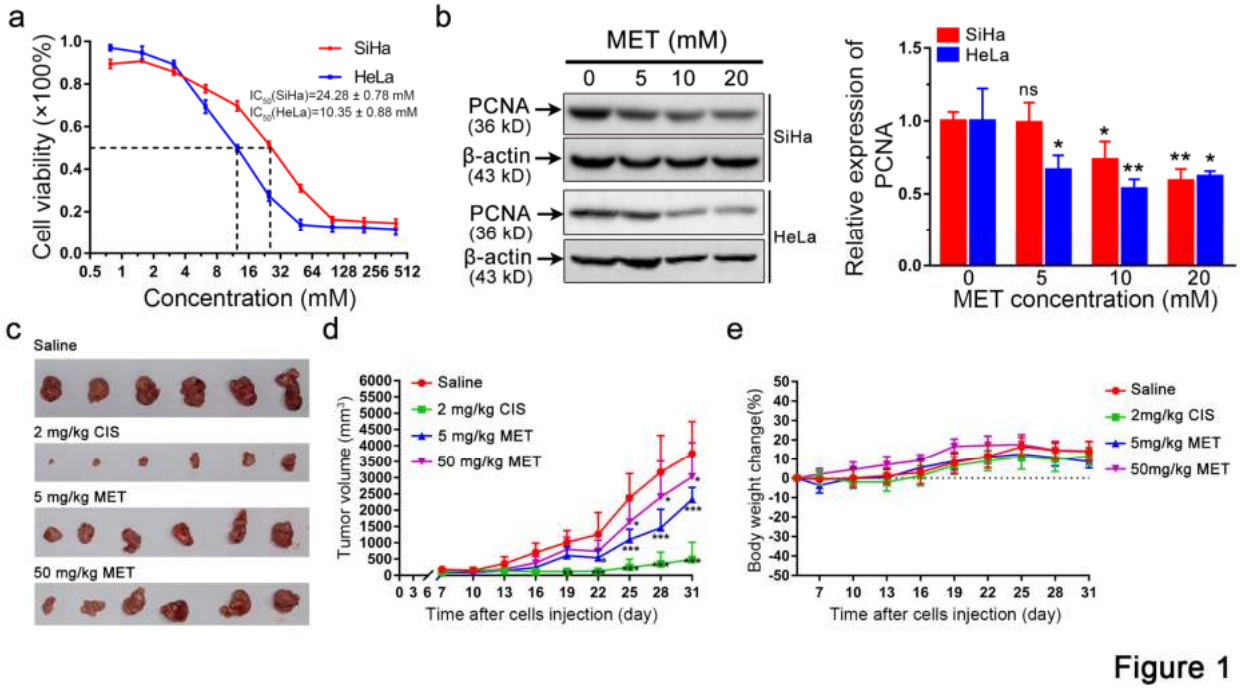


Figure 1

Figure 1: Metformin's cytotoxicity and anti-tumor effects in cervical cancer. **（a）** Cell viability of HeLa and SiHa after metformin treatment was determined by CCK-8 assay. **（b）** PCNA expression levels in HeLa and SiHa for 48 hours with varied doses of metformin （representative Western blots and bar chart）. **（c）** SiHa cell xenograft tumors from various groups. **（d）** Tumor growth curves were depicted after implantation using tumor volume data collected every 3 days （n = 6）. **（e）** After implantation, the curve of the body weight change （%） was displayed using mice weight data collected every 3 days （n = 6）. Data shown were mean ± SD for each group. $^{*}P < 0.05$, and $^{**}P < 0.01$, when compared to the control group.

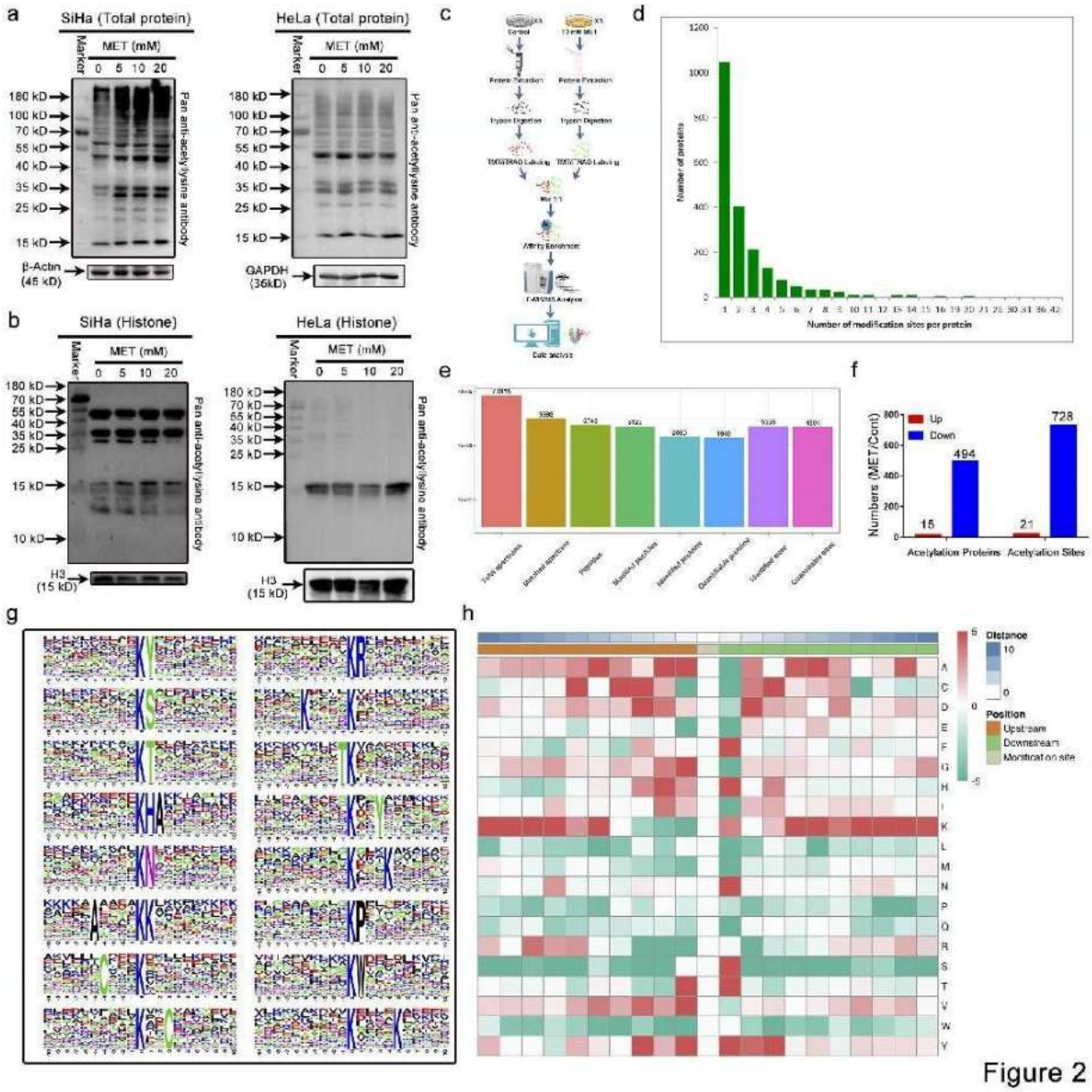


Figure 2: Global profiling of protein lysine acetylation in metformin-treated cervical cancer. **（a）** Pan-acetylation analysis by Western blotting of the total protein extracts from SiHa （left） and HeLa （right） cells treated with various doses of metformin for 48 hours. **（b）** Pan-acetylation analysis by Western blotting of histone extracts from SiHa （left） and HeLa （right） cells treated with various doses of metformin for 48 hours. **（c）** Flowchart of quantitative acetylproteomic analysis. **（d）** Histogram analysis of protein corresponding to modification sites. **（e）** Basic statistics of mass spectrum data results. **（f）** Histograms illustrate the number of significantly differential modifications of proteins and modification sites in various comparison groups （$P < 0.05$）. **（g）** Motif-X analysis of over-represented motifs around the acetylation sites of the identified acetyl proteins. **（h）** Motif enrichment heatmap for all identified downstream and upstream amino acids acetylation modification sites. Amino acid that are significantly enriched near the modification site are shown in red, while amino acid that are significantly reduced near the modification site are show in green.

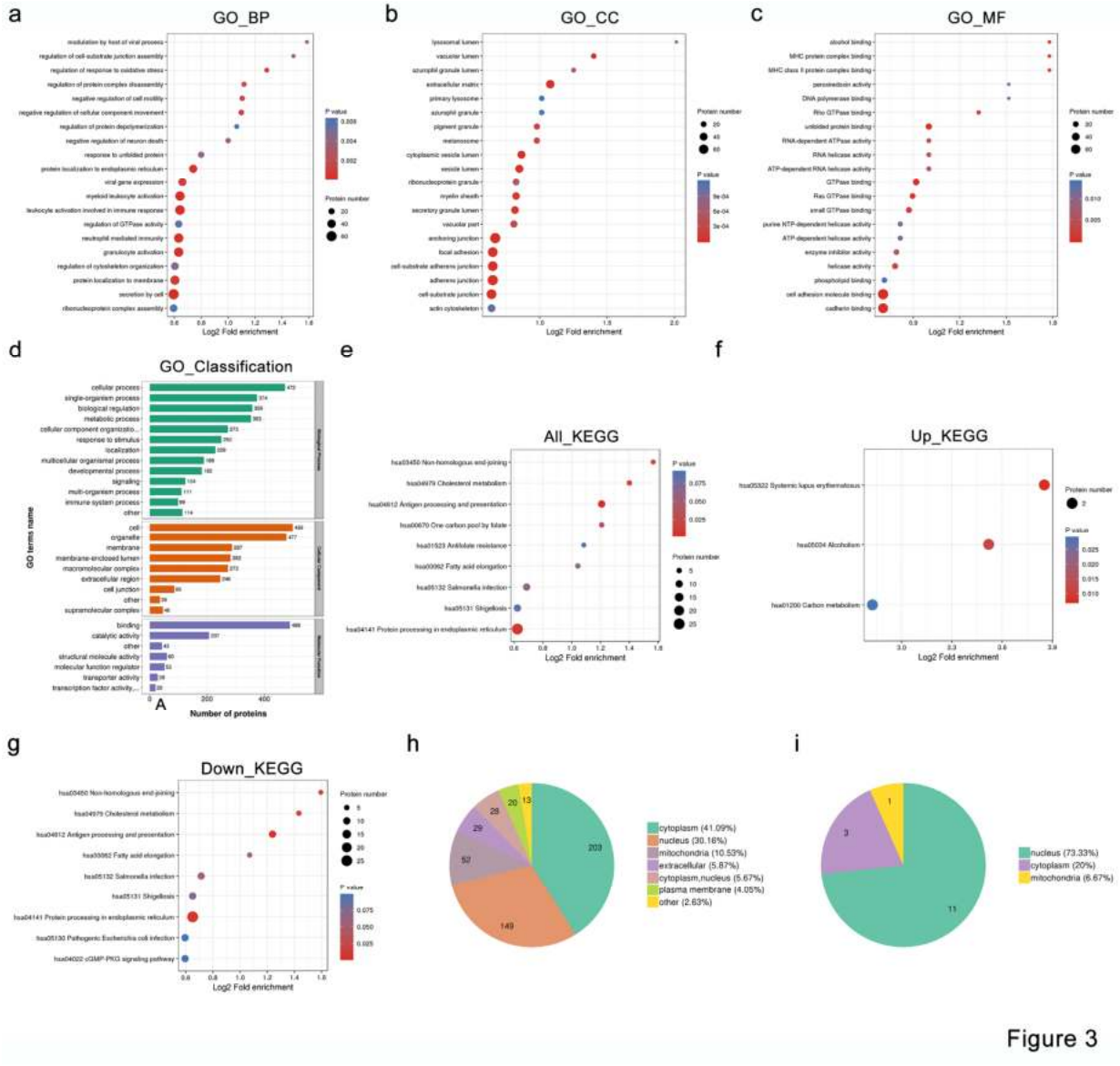


Figure 3: Enrichement analysis, GO classification, and subcellular structure distribution of the identified proteins with modified sites by TMT labeled quantitative acetylproteomics. （**a**） Biological processes. （**b**） Cellular components. （**c**） Molecular functions. （**d**） GO classification. Bubble map of enrichment distribution in KEGG pathways, divided into all （**e**）, upregulated （**f**）, and downregulated （**g**） proteins corresponding to differentially acetylated modification sites. Subcellular structure distribution of proteins corresponding to upregulated （**h**） and downregulated （**i**） differentially acetylated sites.

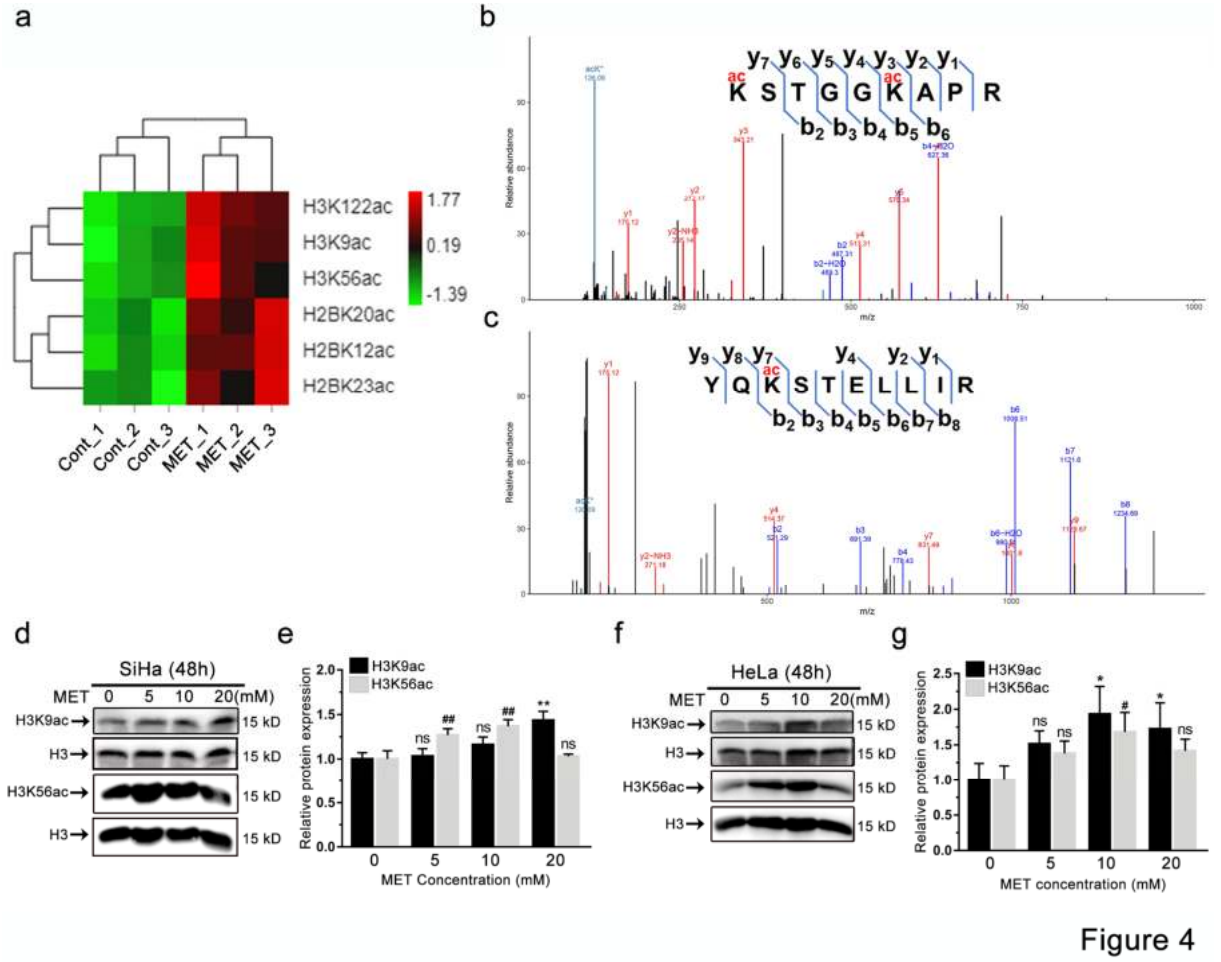


Figure 4

Figure 4: Metformin hyperacetylated histones H3K9 and H3K56 in cervical cancer cell lines. **（a）** Heatmap analysis of metformin-altered acetylation levels at different lysine sites on histone H3 and H2B in cervical cancer cells based on quantitative acetylproteomic results. Identification by LC-MS/MS of H3 4-12 peptides carrying acetylation （ac） at K9 **（b）** and H3 54-63 peptides carrying acetylation （ac） at K56 **（c）**. Western blotting analysis of different concentrations of metformin treatment of cervical cancer cells SiHa **（d-e）** and HeLa **（f-g）** for 48 h upregulated the acetylation levels of H3 at K9 and K56. Data shown were mean ± SD for each group, n = 3. ns, not significant. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, compared to the 0 mM metformin control group. $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#}P < 0.01$, compared to the 0 mM metformin control group.

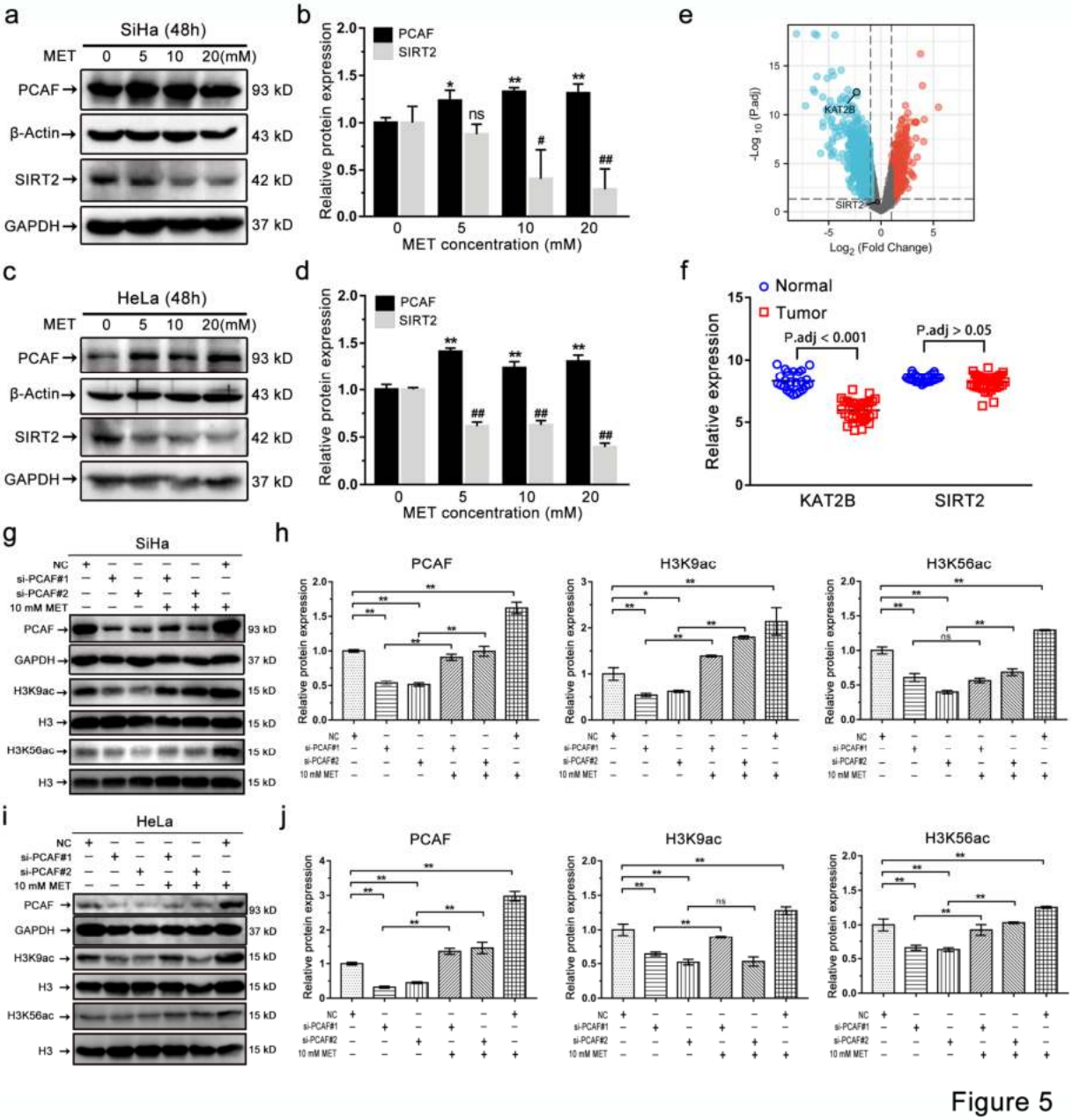


Figure 5

Figure 5: Metformin upregulated the acetyltransferase PCAF to hyperacetylate histones H3K9 and H3K56 in cervical cancer. Metformin increased the expression level of the acetyltransferase PCAF while decreasing the expression level of the deacetylase SIRT2 in SiHa （**a-b**） and HeLa （**c-d**）. Significantly differentially expressed genes between 33 primary cervical cancer tissues and 24 normal cervical epithelial tissues were mined through the GEO database, with volcano plots （**e**） and scatter plots （**f**） showing the relative transcript levels of KAT2B and SIRT2. Silencing of PCAF in cervical cancer cells SiHa （**g-h**） and HeLa （**i-j**） resulted in hypoacetylation of H3K9 and H3K56, which was reversed by metformin supplementation. Data shown were mean ± SD for each group, n = 3. ns, not significant. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, compared to the control group. $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#}P < 0.01$, compared to the control group.

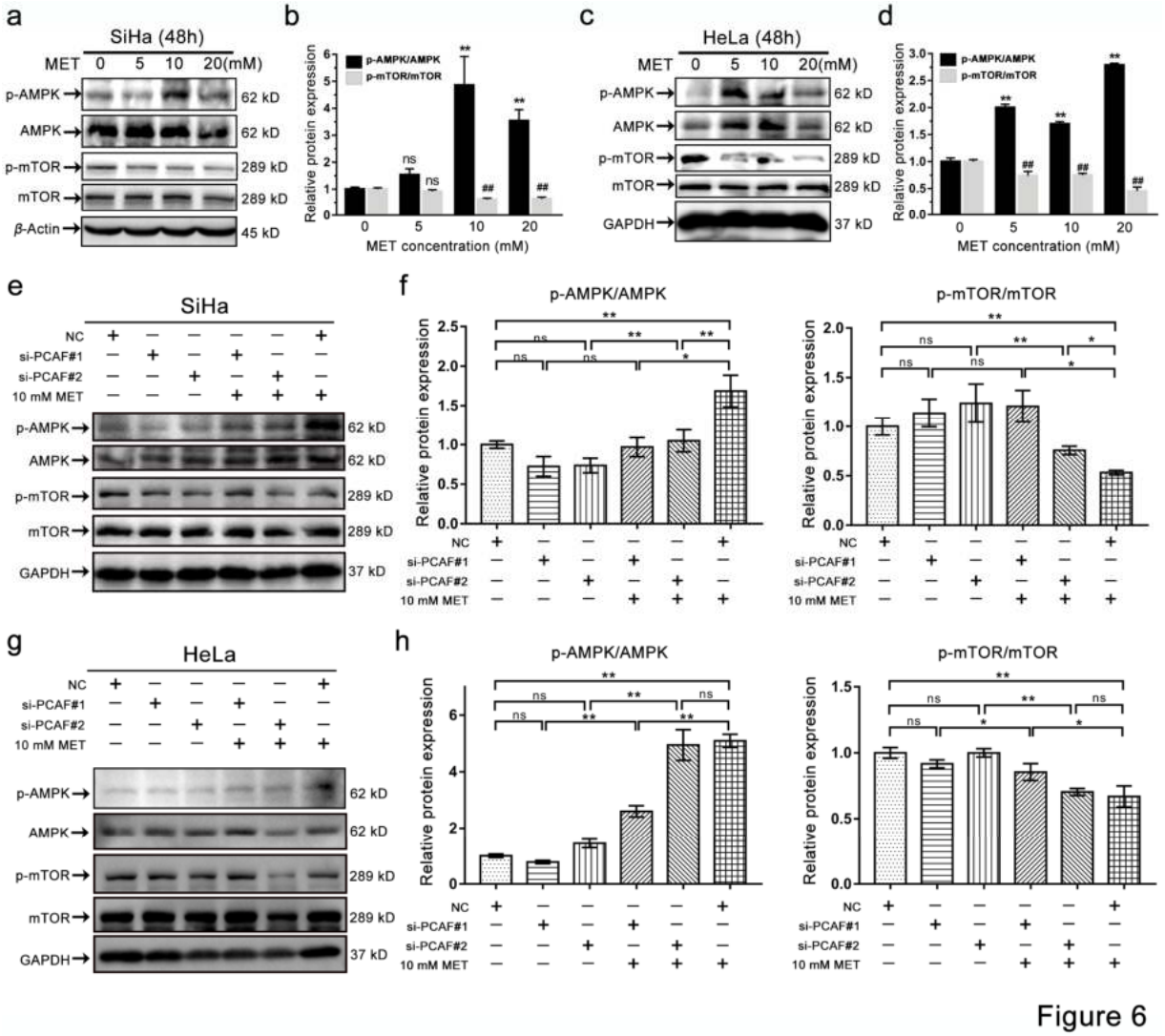


Figure 6

Figure 6: Effect of metformin on the AMPK/mTOR pathway. Metformin upregulated the phosphorylation level of AMPK, while it inhibited the phosphorylation level of mTOR in SiHa （**a-b**） and HeLa （**c-d**）. Silencing of PCAF in cervical cancer cells SiHa （**e-f**） and HeLa （**g-h**） did not interfere with the AMPK/mTOR pathway, which was activated by metformin supplementation. Data shown were mean ± SD for each group, n = 3. ns, not significant. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, compared to the control group. $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#}P < 0.01$, compared to the control group.

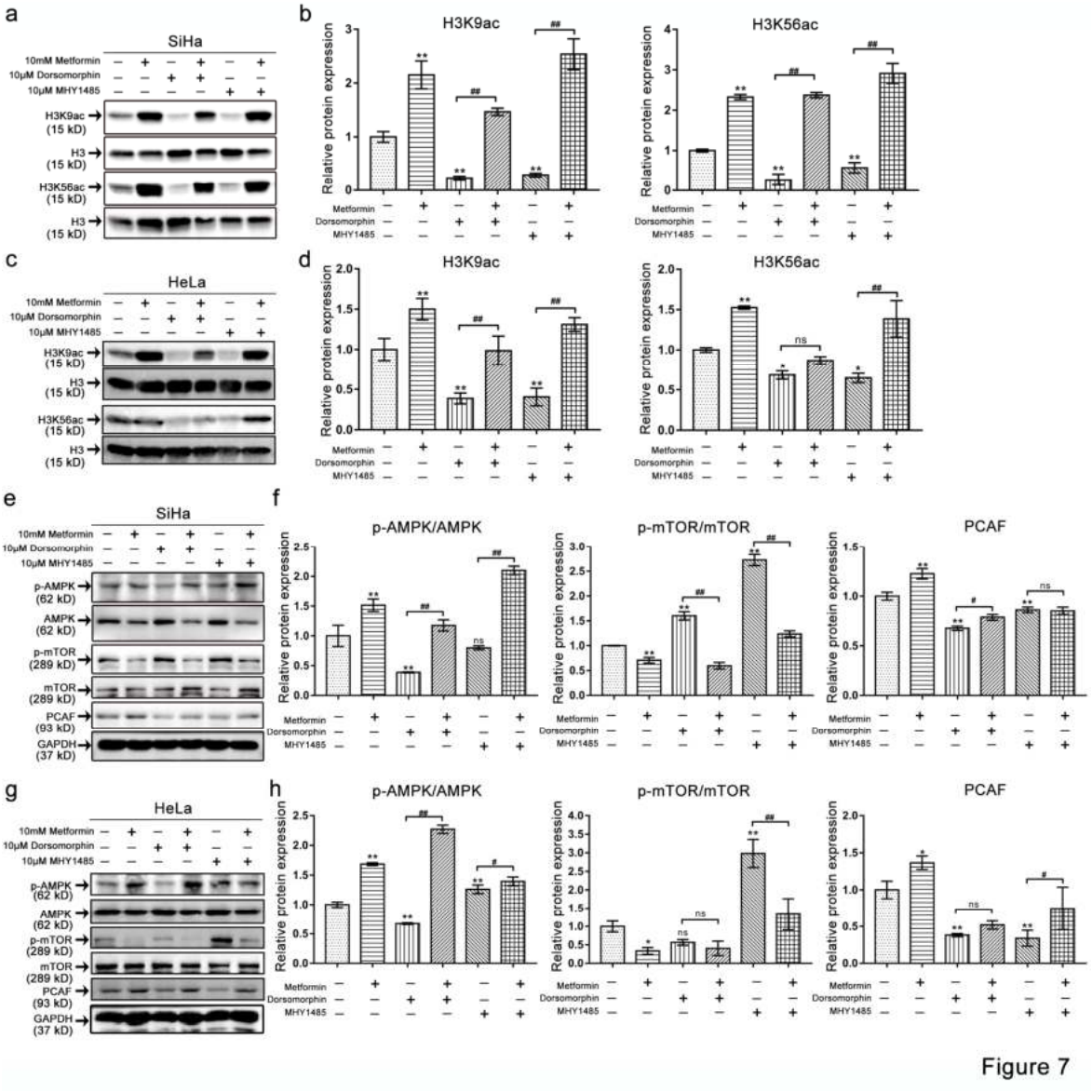


Figure 7: Metformin reverses the effects of an AMPK inhibitor （dorsomorphin） and mTOR activator （MHY1485） on the AMPK/mTOR pathway, PCAF protein, H3K9ac, and H3K56ac. Metformin reversed the acetylation levels of H3K9 and H3K56 in SiHa （**a-b**） and HeLa （**c-d**） cells under dorsomorphin or MHY1485 treatment. Metformin activated the AMPK/mTOR signaling and upregulated the protein level of PCAF in SiHa （**e-f**） and HeLa cells （**g-h**） under dorsomorphin or MHY1485 treatment. Data shown were mean ± SD for each group, n = 3. ns, not significant. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, compared to the control group. $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#}P < 0.01$, compared to the control group.

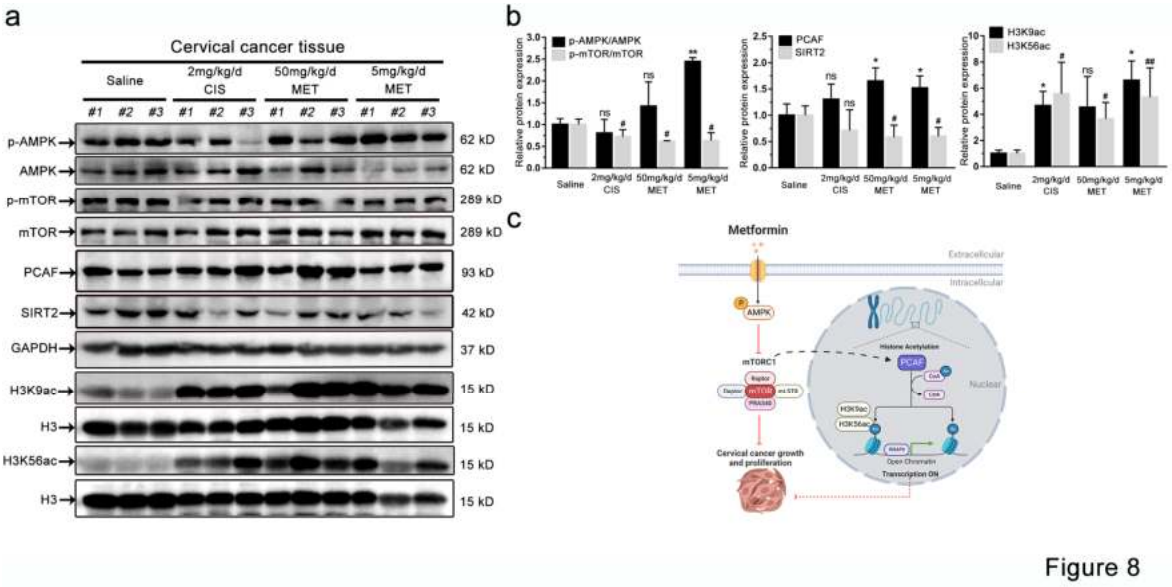


Figure 8

Figure 8: Western blot analysis of the effects of metformin on the AMPK/mTOR pathway, protein expression levels of PCAF and SIRT2, and acetylation levels of H3K9 and H3K56 in SiHa cell-derived cervical cancer xenografts. Western blots （**a**） and bar charts （**b**） showed that metformin activated the AMPK/mTOR pathway, upregulated PCAF protein levels, inhibited SIRT2 protein levels, and hyperacetylated H3K9 and H3K56 in xenograft tissues. （**c**） Schematic diagram of the hypothesized molecular mechanism of metformin. Metformin increases the expression of the acetyltransferase PCAF through the AMPK/mTOR pathway, hyperaccetylates H3K9 and H3K56, thereby opening chromatin and increasing the level of transcription, suppressing cervical cancer growth. Data shown were mean ± SD for each group, n = 3. ns, not significant. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$, compared to the control group.

感染性心内膜炎患者万古霉素相关急性肾损伤：一项大型回顾性队列研究

潘坤明，李艳丽，陈璋璋，李晓宇*，吕迁洲*

复旦大学附属中山医院 药剂科，徐汇区枫林路 180 号，上海，20032，中国

【摘要】目的：揭示感染性心内膜炎（IE）患者万古霉素相关急性肾损伤（VA-AKI）的发病率、危险因素和预后，为预防和减少 IE 患者 VA-AKI 提供临床参考。**方法：**纳入 2016 年 1 月至 2019 年 6 月诊断为 IE 并接受万古霉素的成人住院患者。主要结局指标为 VA-AKI 发生率，定义为患者在万古霉素治疗期间或停药后 48 小时内发生 AKI。**结果：**600 例患者中共有 435 例被纳入。73.6%为男性，中位年龄为 52 岁。VA-AKI 的发生率为 32.2%（74/435），37.2%的患者接受了万古霉素的治疗药物浓度监测，其中 18.5%患者的谷浓度在 15-20 μ mol/L 之间，达到目标谷浓度。多元 logistic 回归分析显示，BMI (OR 1.09, 95%Cl. 1.01-1.18, *p*=0.046)，万古霉素疗程（OR 1.03, 95%Cl. 1.01-1.06, *p*=0.032），入住 ICU（OR 2.12, 95%Cl. 1.21-3.71, *p*=0.009）以及同时使用造影剂（OR 2.05, 95%Cl. 1.08-3.90，*p*=0.029）是 VA-AKI 的独立风险因素。ROC 及单因素分析显示，万古霉素疗程超过 10.8 天与 AKI 风险显著增加有关（HR 1.93，*p*=0.011）。73.0% (54/7)VA-AKI 患者肾功能完全或部分恢复。多元 logistic 回归分析显示，支付方式（自费 vs. 国家基本医疗保险）是 VA-AKI 患者肾功能不恢复的独立风险因素（OR 4.78, 95%Cl. 1.59-14.38, *p*=0.005）。**结论：**IE 患者 VA-AKI 发生率高于普通成人患者。万古霉素药物浓度监测存在一些不足，包括监测率低，初始监测时间不准确，谷浓度达到率低。同时使用造影剂是 IE 患者最令人担忧的风险因素。万古霉素疗程超过 10.8 天时，肾损伤发生风险显著增加。

【关键词】万古霉素，急性肾损伤，感染性心内膜炎，危险因素

Vancomycin associated acute kidney injury in patients with infectious endocarditis: a large retrospective cohort study

Pan Kunming[1], Li Yanli[1], Chen Zhangzhang[1], Li Xiaoyu[1]*, Lv Qianzhou[1]*

1. Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital Fudan University, 180 Fenglin Road, Shanghai, 200032, China.

【Abstract】Aim: We conducted this large retrospective cohort study to reveal the incidence, risk factors, and prognosis of vancomycin-associated acute kidney injury (VA-AKI) in patients with infectious endocarditis (IE). **Methods:** Adult patients admitted between January 2016 and June 2019 with a diagnosis of IE and received vancomycin were included. The primary outcome was VA-AKI.**Results:** In total, 435 of the 600 patients were enrolled. Of these, 73.6% were male, and median age was 52 years. The incidence of VA-AKI was 32.2% (74/435). Only 37.2% of the patients received therapeutic monitoring of vancomycin. Multiple logistic regression analysis revealed that duration of vancomycin therapy [odds ratio (OR) 1.030, 95%Cl. 1.003, 1.058, p=0.032] and concomitant radiocontrast agents (OR 2.051, 95%Cl. 1.078,

第一作者：潘坤明，职称：主管药师；单位、科室：复旦大学附属中山医院药剂科；联系电话：15026629516；Email: panxso@163.com。

Corresponding Author:

Qianzhou Lv, Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital Fudan University, 180 Fenglin Road, Shanghai, 200032, China. Email: lv.qianzhou@zs-hospital.sh.cn.

Xiaoyu Li, Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital Fudan University, 180 Fenglin Road, Shanghai, 200032, China. Email: li.xiaoyu@zs-hospital.sh.cn.

3.904, p=0.029) were independent risk factors for VA-AKI. Duration of therapy longer than 10.75 days was associated with a significantly increased risk of VA-AKI (HR 1.927, p=0.011). Renal function was fully or partially recovered in 73.0% (54/74) of patients with VA-AKI. Multiple logistic regression analysis showed payment mode (at one's own expense vs. national basic medical insurance) was the independent risk factor for non-recovery of renal function in patients with VA-AKI (OR 4.78, 95%Cl. 1.59, 14.38, p=0.005).**Conclusions:** The incidence of VA-AKI was higher in patients with IE than in general adult patients. Concomitant contrast agents were the most alarming nephrotoxic in patients with IE. The risk of VA-AKI significantly increased when the duration of therapy exceeded 10.75 days.
【**Keywords**】Vancomycin, acute kidney injury, infectious endocarditis, risk factors

1 Introduction

Vancomycin is a glycopeptide antibiotic that is active against Gram-positive bacteria since its approval in 1958[1]. Vancomycin remains the cornerstone antibiotic for the treatment of infective endocarditis (IE) and is the drug of first choice for *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) infection[2-4]. The recommended duration of vancomycin therapy for IE is 4-6 weeks, with a target trough concentration of 15-20 mg/L, according to clinical guidelines for IE and guidelines for therapeutic monitoring of vancomycin[2-6]. However, vancomycin has been associated with significant nephrotoxicity[1]. The incidence of vancomycin-associated acute kidney injury (VA-AKI) ranges from as low as 0% in the absence of concurrent risk factors to 43%[1, 7]. Vancomycin is the second most common drug causing drug-induced hospital-acquired acute kidney injury (AKI) in China[8]. Numerous risk factors have been defined for developing VA-AKI in patients receiving vancomycin, including maximal dose, duration of therapy, concomitant diseases, the severity of illness, etc[1, 9, 10]. A small sample size retrospective study showed that infective endocarditis (IE) was significantly associated with an elevated incidence of VA-AKI[11].

Infective endocarditis (IE) is a rare infectious disease, but with high mortality and poor prognosis. The annual incidence ranges from 3 to 7 per 100000 person-years in the most contemporary population surveys[2, 3]. The incidence in the Chinese population shows an increasing trend, but no definitive epidemiological data are available[2]. AKI is a common complication of IE and occurs in about 6-30% of patients[4]. Effective antimicrobial therapy such as vancomycin may reduce the complications of IE and the risk of progression to the need for surgery[12]. Vancomycin exposure in patients with IE may further increase the risk of AKI. Gagneux-Brunon A. et al. described the frequency and risk factors for AKI during the course of IE in 112 patients and showed that vancomycin exposure was independently associated with AKI[13]. Similar results were obtained by Legrand M. et al. in their analysis of post-operative AKI following cardiac surgery for active IE[14]. However, vancomycin was not always a significant risk factor for AKI in patients with IE[15, 16]. Ritchie, B. M. et al. evaluated AKI in 211 patients with IE, and multivariate analysis showed that vancomycin combined with aminoglycosides was significantly associated with an increased risk of renal failure in patients with bacterial endocarditis, whereas vancomycin alone did not significantly increase the risk[16]. Whether vancomycin increases the risk of AKI in patients with IE remains a minor controversy.

Vancomycin is associated with significant nephrotoxicity, and the risk will be further increased by the long course of treatment and high trough concentrations. Meanwhile, AKI is one of the common complications of IE. Therefore, the risk of AKI in patients with IE who are treated with vancomycin would be of great concern. VA-AKI is associated with increased length of stay, need for dialysis, increased mortality, and increased costs[17]. Based on a comprehensive literature search, there are no published studies assessing the characteristics of VA-AKI in this specific group of patients with IE. We conducted this large retrospective cohort study to reveal the incidence, risk factors, and prognosis of VA-AKI in patients with IE, in order to provide a clinical reference for the prevention and reduction of VA-AKI in patients with IE.

2 Methods

2.1 Study design and Patients

This was a retrospective observational cohort study conducted at Zhongshan Hospital of Fudan University, a 2005-bed top-tier general teaching hospital in China. All consecutive adult (≥18 years) patients admitted between January 2016 and June 2019 with a diagnosis of IE according to the modified Duke criteria[2, 12] and received vancomycin anti-infective therapy were included. Patients were excluded if: (1) they had stage 5 chronic kidney disease or were on regular dialysis. (2) their baseline serum creatinine (SCr) was ≥4 mg/dL (353.6 μmol/L). (3) they had AKI at admission. (4) they had a history of nephrectomy, renal transplantation, or sole kidney. (5) their vancomycin administration was not intravenous. (6) they received less than 4 doses of vancomycin. (7) their SCr measurement was insufficient to determine whether AKI had developed.

2.2 Data collection

Data were collected from the hospital's electronic database using a standardized case report form. Patient information was anonymized by a researcher not involved in the study. The following variables were collected: demographic information, concomitant underlying diseases, severity of disease, vancomycin exposure, vancomycin variety (Laikexin vs.Wenkexin; trade name: Laikexin, generic name: Vancomycin Hydrochloride for Injection, manufacturers: Zhejiang Medicine Co., Ltd. Xinchang Pharmaceutical Factory, China, specification: 500 mg/bottle; trade name: Wenkexin, generic name: Vancomycin Hydrochloride for Injection, manufacturer: VIANEX S.A. (PLANT C), Greece, specification: 500 mg/bottle), therapeutic drug monitoring (TDM), and concomitant nephrotoxic drugs. The detailed items of data collection are presented in table 1 and 2.

2.3 Outcome measure

The primary outcome measure was VA-AKI, defined as patients developed AKI during vancomycin therapy or within 48 hours of vancomycin discontinuation. We used the 2012 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical practice guideline for AKI to define and stage AKI, e.g., an increase in SCr by ≥0.3 mg/dL (≥26.5 μmol/L) within 48 hours or an increase in SCr to ≥1.5 times baseline, which was known or presumed to have occurred within the prior 7 days[18].

For patients who developed AKI, we further evaluated the 30-day morbidity and recovery of renal function. Renal recovery was categorized into three levels: full recovery, partial recovery, and failure to recover. We defined full recovery as a decrease in SCr to baseline at discharge. We defined partial recovery as a decrease in SCr of 25% or more from the peak concentration, but still above baseline. We defined failure to recover as the patient remaining dependent on dialysis or SCr decreasing by less than 25% from peak concentration until discharge.

2.4 Data analysis

We used the Kolmogorov-Smirnov test to assess the normality of the variables. Continuous variables were presented as means with standard deviations or medians with interquartile ranges (IQR), and we used independent t-tests or rank-sum tests to compare variables between groups. Qualitative variables are presented as frequencies with corresponding percentages, and we used chi-squared or Fisher's exact tests to compare variables between groups.

We used multivariate logistic regression analysis to assess independent risk factors for the development of VA-AKI, as well as non-recovery of renal function. We included all covariates with a p-value ≤0.05 in univariate analysis and forced other relevant variables in multivariable models. A backward stepwise regression was used to construct the final model.

The following covariates were included in the model to explore the risk factors for the occurrence of VA-AKI: gender (male vs. female), age (years), body mass index (BMI), baseline SCr, cardiac surgery (yes or no), admission to the ICU (yes or no), vancomycin variety (Lai Kexin vs.Wen Kexin), length of vancomycin therapy (days), vancomycin daily dose (≤2 g/d vs. ≥ 2 g/d), concomitant nephrotoxic drugs (yes or no), concomitant radiocontrast agents (yes or no). The results of the univariate analysis of factors affecting the recovery of renal function in patients with VA-AKI were shown in Supplementary Table 1. The following covariates were included in the model to explore the risk factors for non-recovery of renal function in patients with VA-AKI: age (years), payment mode (At one's own expense vs. National basic medical insurance), concomitant vasopressors (yes or no), and concomitant carbapenems (yes or no). The good of fit was evaluated by the analysis of Hosmer and Lemeshow. All *p*-values were two-sided, and a *p*-value ≤0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS statistics version 26.0 (IBM Inc., Armonk, NY, USA).

3 Results

3.1 Patients' characteristics

There were 600 patients evaluated for study inclusion. After applying the exclusion criteria, 165 (47.3%) patients were omitted from the study. Of those excluded, 55 patients lacked SCr measurements, typically within 7 days after stopping vancomycin therapy (Figure 1). In total, 435 patients were included for analysis. Of these, 73.6% were male, and the median age was 52 (IQR=22) years.

Seventy-four patients developed AKI. The incidence of VA-AKI was 32.2% (74/435), and the time of diagnosis was day 5.9 (IQR=7.4) after receiving vancomycin therapy. Table 1 displayed patient demographic information, concomitant underlying diseases, and severity of illness. There were no statistical differences between patients with and without VA-AKI in terms of concomitant underlying diseases, admission to the ICU (*p*=0.053), and receipt of mechanical ventilation (*p*=0.358). Patients with AKI tend to be older (58.0 vs. 51.0yrs, p=0.028) and were more likely to have a higher baseline SCr (76.0±29.9 u mol/L vs. 86.3±41.0 u mol/L, *p*=0.014) and to undergo cardiac surgery (91.9% vs. 82.3%, *p*=0.040), compared to patients without AKI. Table 2 listed patient vancomycin exposure and concomitant nephrotoxic drugs. There were two varieties of vancomycin from different companies. Patients with VA-AKI were more likely to receive Lai Kexin (Lai Kexin vs. Wen Kexin 83.8% vs. 65.9%, *p*=0.002), compared with patients without VA-AKI. Patients with AKI underwent a longer duration of vancomycin treatment (12.0±10.6 days vs. 9.5±8.5 days, *p*=0.038) and were more likely to concomitant radiocontrast agents (23.0% vs. 12.5%, *p*=0.019). There were no statistical differences between patients with and without AKI in terms of vancomycin daily dose (*p*=0.112) and concomitant nephrotoxic drugs (*p*=0.146).

3.2 Therapeutic Drug Monitoring of Patients

One hundred and sixty-two (37.2%, 162/435) patients received TDM during vancomycin therapy. Of the patients who received TDM, 8% (13/162) had their initial vancomycin TDM on day 3, in accordance with the guideline recommendations. 88.3% (143/162) of patients had delayed first vancomycin trough concentration monitoring. Only 30 (18.5%, 30/162) patients had vancomycin trough concentrations between 15-20 μmol/L and reached the target trough concentration. Besides, 69 (42.6%) patients had vancomycin trough concentrations <15 μmol/L and 63 (38.9%) patients had vancomycin trough concentrations >20 μmol/L.

3.3 Comparison of Medical Costs and Outcomes for Patients with and Without VA-AKI

Patients who developed AKI had longer hospital stays (18.0 vs. 15.1 days, *p*=0.005) and a higher 30-day mortality rate (4.4% vs. 0.6%, *p*=0.037) than those who did not develop AKI. Patients with VA-AKI were more likely to have higher

total costs (119.8 vs. 98.4 thousand US dollars, p=0.001), medical costs (p<0.001), treatment costs (p<0.001), and consumables costs (p=0.011), compared with patients without VA-AKI (see Table 3).

3.4 Risk factors for VI-AKI

Multiple logistic regression analysis revealed that BMI [odds ratio (OR) 1.085, 95%Cl. 1.001, 1.175, p=0.046), duration of vancomycin therapy (OR 1.030, 95%Cl. 1.003, 1.058, p=0.032), admission to the ICU (OR 2.117, 95%Cl. 1.209, 3.707, p=0.009) and concomitant radiocontrast agents (OR 2.051, 95%Cl. 1.078, 3.904, p=0.029) were independent risk factors for VA-AKI; vancomycin variety (Lai Kexin vs. Wen Kexin, OR 0.512, 95%Cl. 0.288, 0.909, p=0.022) were determined to be an independent protective factor for VI-AKI (see Table 4). ROC analysis revealed a cut-off value of 10.75 days for the duration of vancomycin therapy that contributed to the development of VA-AKI. Univariate analysis revealed a significantly higher risk of VA- AKI in patients with a long duration of therapy (longer than 10.75 days) compared to those with a short duration of therapy (shorter than 10.75 days) (HR 1.927, 95% Cl. 1.159 3.205, p=0.011).

3.5 Treatment and outcome of patients with vancomycin-associated acute kidney injury

The 30-day mortality rate in patients with VA-AKI was 4.1% (3/74). 5.4% (4/74) of patients were treated with dialysis. Renal function was fully recovered or partially recovered in 73.0% (54/74) of patients, and 27.0% (20/74) failed to recover renal function until discharge. There was no statistical difference in the recovery of renal function among patients with different highest AKI stages (see Table 5). Multiple logistic regression analysis showed payment mode (at one's own expense vs. national basic medical insurance) was the only independent risk factor for non-recovery of renal function in patients with VA-AKI (OR 4.78, 95%Cl. 1.59, 14.38, p=0.005).

4 Discussion

This study demonstrated the incidence of VA-AKI in patients with IE, which was 32.2%, and further revealed the clinical characteristics, risk factors, and outcomes of VA-AKI. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate VA-AKI in patients with IE, and we believe that the results will provide an important reference for the rational use of vancomycin in this special population.

Several studies have focused on the nephrotoxicity of antimicrobial agents used to treat IE, the majority focusing on aminoglycosides such as gentamicin-associated nephrotoxicity[1, 19, 20]. However, physicians still did not pay enough attention to VA-AKI in patients with IE. The incidence of IE is low, and the sample sizes of published studies are relatively small, in the range of 100-200 cases[11, 13-16]. This study included 435 patients with IE who were treated with vancomycin, which, to our knowledge, is the largest sample size of any study investigating antibiotic-associated AKI in patients with IE. In previous studies involving vancomycin-associated kidney injury, vancomycin is generally used as conventional therapy or as a control, compared with daptomycin[11]. Studies showed vancomycin to be less nephrotoxic than daptomycin, but greater than or closer to other antibiotics such as beta-lactam antibiotics[21-23]. However, no studies have evaluated the incidence, clinical characteristics, risk factors, and outcomes of VA-AKI in patients with IE.

This study showed that the incidence of VA-AKI in patients with IE was 32.2%, which is higher than the incidence in general adult patients[23-29]. Data from studies in the United States[24], China[25-27], Taiwan in China[23], South Korea[28], France[29], and other countries or regions indicated that the incidence of VA-AKI in adult patients was generally greater than 10% and less than 15%. The incidence of VA-AKI in critically ill patients was higher than that in general adult patients but still lower than or close to the incidence in patients with IE[30-32]. We speculate that there are four causes for the higher incidence of VA-AKI in patients with IE than in the general adult population. First, pathogenic bacteria that

infect the endocardium may also invade the kidney and induce AKI through mechanisms such as immune complexes and vasculitis glomerulonephritis[4, 13, 16]. Second, there is a relatively high rate of patients with IE undergoing cardiac surgery, especially valve surgery[3, 12-14]. Third, the course of vancomycin for IE is long, usually 4-6 weeks[2, 3]. Fourth, a high percentage of patients with IE received vancomycin concomitant contrast agents[4]. These possible contributing factors will also provide an indication for reducing the risk of VA-AKI in patients with IE.

The study showed that 37.2% of patients with IE received vancomycin TDM, 8% of patients were initially monitored on day 3 of vancomycin therapy, and 18.5% of patients achieved target trough concentrations. According to the vancomycin TDM guidelines published by the American Society of Health-System Pharmacists in 2009 and the Chinese Pharmacology Society in 2016[5, 6], there were 3 deficiencies in vancomycin TDM: low vancomycin TDM rate, inaccurate timing of initial TDM, and low attainment of target trough concentrations. Our further analysis showed that 64.6% (281/435) of the patients were given vancomycin at 1g q12h, which was a conventional dose. Patients with IE may have complex pathophysiological profiles and vancomycin pharmacokinetics; therefore, more precise dosing regimens, more frequent concentration monitoring, and dose adjustments are necessary[1, 10, 33]. We also found that the hospitalization units for patients with IE were predominantly surgical. Surgeons may be more focused on surgical treatment and pay less attention to drug therapy. The 2020 update of the vancomycin TDM guidelines further recommended Area Under the Curve-guided dosing and monitoring regimens, which raised the difficulty of vancomycin TDM[33, 34]. We believe that this study reveals the deficiencies in vancomycin prescribing and TDM and suggests that clinicians should pay attention to these issues. In addition, we suggest clinical care teams should increase the involvement of clinical pharmacists. Our previously published study showed that pharmacist intervention in vancomycin treatment significantly decreased the rate of VA-AKI while improving efficacy and reducing mortality[35]. Clinical pharmacists are experts in medication therapy management, and many hospitals, mainly in the United States, have established the model of pharmacist managing vancomycin dosing and monitoring, which are worthy of emulation by hospitals in other countries[35].

Concomitant nephrotoxic drugs were risk factors for VA-AKI, especially aminoglycosides and piperacillin-tazobactam[1, 9, 19, 20, 36]. According to this study, concomitant contrast media was the most alarming nephrotoxic agent in patients with IE. Concomitant contrast resulted in a 2.051-fold increased risk of VA-AKI. Contrast-associated AKI was one of the leading causes of iatrogenic renal insufficiency[37]. Direct mechanisms of contrast-associated AKI were due to nephrotoxic effects on the tubular epithelium, leading to loss of function, apoptosis, and eventually, necrosis. In addition, contrast can induce ischemic injury through an indirect mechanism of regional or global perfusion reduction[38]. The mechanism of vancomycin-associated AKI was suggested to be associated with the oxidative stress effect on proximal renal tubular[10, 17]. Contrast and vancomycin have a synergistic effect on the mechanism of renal injury; therefore, patients with IE require special attention to the synergistic risk of vancomycin concurrent with contrast. We recommend to postpone tests requiring contrast, such as coronary angiograms and coronary artery imaging, during vancomycin therapy, if conditions permit; or to replace vancomycin with teicoplanin.

The duration of vancomycin therapy was a factor that we focused on. The recommended course of vancomycin for the medical treatment of patients with IE was 4-6 weeks, which was longer than the course of most infections[2-4]. This study suggested that duration of therapy was an independent risk factor for VA-AKI in patients with IE, consistent with previous studies[17]. However, the HR for duration of vancomycin therapy was only 1.030, showing a weak increased risk of AKI, which was lower than we expected. The risk of developing vancomycin nephrotoxicity significantly increased with a duration $\geq$ 7 days, and 14 days[13, 33, 38]. The course of vancomycin in this study was 12 and 9.5 days for patients who developed and did not develop AKI, both greater than 7 and less than 14 days, which may account for the low HR for the

vancomycin course. Univariate analysis showed a significantly higher risk of AKI in patients with a long duration of treatment (longer than 10.75 days) compared to those with a short duration of treatment (shorter than 10.75 days) (HR 1.927, p=0.011). In patients with IE, we suggested that the course of vancomycin longer than 10.75 days was associated with a significantly increased risk of AKI and required more frequent monitoring of renal function and vancomycin trough concentrations.

This study showed that BMI and residence in the ICU were risk factors for VA-AKI in patients with IE, which was consistent with the findings in the general adult patients[8]. Several studies have shown that obesity or increasing BMI was significantly associated with the development of VA-AKI[39]. Obese patients have a significantly higher incidence of trough levels >20 mg/L due to complex vancomycin pharmacokinetics (e.g., increased volume of distribution and clearance) and demanding dose adjustment regimens[10]. In addition, a study by Maha S. Assadoon et al. found that obese patients may experience vancomycin accumulation within the first 10 days of treatment[40]. Measures such as actual weight-based dosing, frequent monitoring of vancomycin, and AUC-guided therapy may contribute to the reduction of VA-AKI in obese patients[33, 39, 40]. Severity of illness impacted development of AKI in patients receiving vancomycin. Admission to the ICU indicated that patients were critically ill and more likely to have a combination of multiple risk factors for AKI, thus increasing the nephrotoxicity of vancomycin[1, 30, 31].

VA-AKI was associated with increased length of hospital stay, need for dialysis, increased mortality, and increased costs, which is consistent with previous studies[17]. More than 70% of the patient's renal function can be recovered, which suggests the importance of early intervention and aggressive salvage of VA-AKI. Payment method (at one's own expense vs. national basic medical insurance) was the only risk factor for renal function recovery. Patients without medical insurance may limit the choice of measures for improving renal function due to their weak payment willingness.

This study has several strengths. First, AKI is a major complication of IE, and the recommended course of vancomycin for the treatment of IE is up to 4-6 weeks, with a target trough concentration of 15-20 mg/L. Therefore, patients with IE are at an elevated risk of VA-AKI. Based on a literature search, vancomycin nephrotoxicity in patients with IE has not been evaluated, including incidence, risk factors, outcomes, etc. Second, the sample size of this study was relatively large and was the largest sample size studying antibiotic-associated kidney injury in patients with IE. Third, we counted the consequences of VA-AKI, including economic consequences, mortality, and recovery of renal function. We further analyzed the risk factors affecting the recovery of renal function in patients with AKI. The economic consequences of VA-AKI are rarely addressed in previous studies. However, the study has several limitations. First, this was a single-center retrospective study, and we could only demonstrate a correlation between vancomycin and AKI, not a causal relationship. Second, vancomycin trough concentrations were not included as a risk factor due to the low percentage of TDM and the small amount of concentration data available for analysis.

5 Conclusions

The incidence of VA-AKI was higher in patients with IE than in general adult patients. Management of therapeutic monitoring of vancomycin had some deficiencies, including low vancomycin TDM rate, inaccurate timing of initial TDM, and low attainment of target trough concentrations. Concomitant contrast agents were the most alarming nephrotoxic in patients with IE, and we speculate that this may be due to a synergistic mechanism of nephrotoxicity between contrast agents and vancomycin.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethical Approval Statement

This study was reviewed and approved by the Ethics Committee of Zhongshan Hospital, Fudan University (Shanghai, China, approval number: B2019-194(2)) and no consent was needed.

References

1. Filippone EJ, Kraft WK, Farber JL. The Nephrotoxicity of Vancomycin. *Clin Pharmacol Ther* 2017, 102(3):459-469.

2. Chinese Society of Cardiology. Expert consensus on prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis in adults. *Chinese Journal of Cardiovascular Disease* 2014, 42(10):806-816.

3. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Jr Tleyjeh IM, Rybak MJ, et al. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation* 2015, 132(15):1435-1486.

4. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta JP, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J* 2015, 36(44):3075-3128.

5. Rybak M, Lomaestro B, Rotschafer JC, Moellering R, Jr. Craig W, Billeter M, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm* 2009, 66(1):82-98.

6. Ye ZK, Chen YL, Chen K, Zhang XL, Du GH, He B, et al. Therapeutic drug monitoring of vancomycin: a guideline of the Division of Therapeutic Drug Monitoring, Chinese Pharmacological Society. *J Antimicrob Chemother* 2016, 71(11):3020-3025.

7. van Hal SJ, Paterson DL, Lodise TP. Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, 57(2):734-744.

8. Liu C, Yan S, Wang Y, Wang J, Fu X, Song H, et al. Drug-Induced Hospital-Acquired Acute Kidney Injury in China: A Multicenter Cross-Sectional Survey. *Kidney Dis (Basel)* 2021, 7(2):143-155.

9. Kim JY, Yee J, Yoon HY, Han JM, Gwak HS. Risk factors for vancomycin-associated acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2022, 88(9):3977-3989.

10. Elyasi S, Khalili H, Dashti-Khavidaki S, Mohammadpour A. Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review. *Eur J Clin Pharmacol* 2012, 68(9):1243-1255.

11. Barberan J, Mensa J, Artero A, Epelde F, Rodriguez JC, Ruiz-Morales J, et al. Factors associated with development of nephrotoxicity in patients treated with vancomycin versus daptomycin for severe Gram-positive infections: A practice-based study. *Revista espanola de quimioterapia* 2019, 32(1):22-30.

12. Valvular Surgery Group SoTaCS, Chinese Medical Association: Chinese expert consensus on surgical treatment of infective endocarditis. *Chin J Thorac Cardiovasc Surg* 2022, 38(3):146-155.

13. Gagneux-Brunon A, Pouvaret A, Maillard N, Berthelot P, Lutz MF, Cazorla C, et al. Acute kidney injury in infective endocarditis: A retrospective analysis. *Med Mal Infect* 2019, 49(7):527-533.

14. Legrand M, Pirracchio R, Rosa A, Petersen ML, Van der Laan M, Fabiani JN, et al. Incidence, risk factors and prediction of post-operative acute kidney injury following cardiac surgery for active infective endocarditis: an observational study. *Critical care* 2013, 17(5): R220.

15. V Von Tokarski F, Lemaignen A, Portais A, Fauchier L, Hennekinne F, Sautenet B, et al. Risk factors and outcomes of early

acute kidney injury in infective endocarditis: A retrospective cohort study. *Int J Infect Dis* 2020, 99:421-427.

16. Ritchie BM, Hirning BA, Stevens CA, Cohen SA, DeGrado JR. Risk factors for acute kidney injury associated with the treatment of bacterial endocarditis at a tertiary academic medical center. *J Chemother* 2017, 29(5):292-298.

17. Jeffres MN. The Whole Price of Vancomycin: Toxicities, Troughs, and Time. *Drugs* 2017, 77(11):1143-1154.

18. KDIGO Clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney International Supplements* 2012, 2(1).

19. Goenaga Sanchez MA, Kortajarena Urkola X, Bouza Santiago E, Munoz Garcia P, Verde Moreno E, Farinas Alvarez MC, et al. Aetiology of renal failure in patients with infective endocarditis. The role of antibiotics. *Med Clin (Barc)* 2017, 149(8):331-338.

20. Cosgrove SE, Vigliani GA, Fowler VG, Jr Abrutyn E, Corey GR, Levine DP, et al. Initial low-dose gentamicin for Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis is nephrotoxic. *Clin Infect Dis* 2009, 48(6):713-721.

21. Gaudard P, Saour M, Morquin D, David H, Eliet J, Villiet M, et al. Acute kidney injury during daptomycin versus vancomycin treatment in cardiovascular critically ill patients: a propensity score matched analysis. *BMC Infect Dis* 2019, 19(1):438.

22. Moise PA, Culshaw DL, Wong-Beringer A, Bensman J, Lamp KC, Smith WJ, et al. Comparative Effectiveness of Vancomycin Versus Daptomycin for MRSA Bacteremia With Vancomycin MIC >1 mg/L: A Multicenter Evaluation. *Clin Ther* 2016, 38(1):16-30.

23. Kiley PS PA, Hodge LA, Kaplan MC, Baczek SM, Stanley JS, Wilson TJ, et al. Retrospective Cohort Study of the Incidence of Acute Kidney Injury with Vancomycin Area under the Curve-Based Dosing with Concomitant Piperacillin-Tazobactam Compared to Meropenem or Cefepime. *Antimicrob Agents Chemother* 2022, 66(8):e0004022.

24. Muklewicz JD, Steuber TD, Edwards JD. Evaluation of area under the concentration-time curve-guided vancomycin dosing with or without piperacillin-tazobactam on the incidence of acute kidney injury. *Int J Antimicrob Agents* 2021, 57(1):106234.

25. Pan K, Ma L, Xiang Q, Li X, Li H, Zhou Y, et al. Vancomycin-associated acute kidney injury: A cross-sectional study from a single center in China. *PLoS One* 2017, 12(4):e0175688.

26. Pan KM, Wu Y, Chen C, Chen ZZ, Xu JA, Cao L, et al. Vancomycin-induced acute kidney injury in elderly Chinese patients: a single-centre cross-sectional study. *Br J Clin Pharmacol* 2018, 84(8):1706-1718.

27. Kunming P, Can C, Zhangzhang C, Wei W, Qing X, Xiaoqiang D, et al. A Longitudinal Study in China. *Front Pharmacol* 2021, 12:632107.

28. Chun JY, Song KH, Lee DE, Hwang JH, Jung HG, Heo E, et al. Impact of a computerised clinical decision support system on vancomycin loading and the risk of nephrotoxicity. *Int J Med Inform* 2021, 149:104403.

29. Contejean A, Tisseyre M, Canoui E, Treluyer JM, Kerneis S, Chouchana L. Combination of vancomycin plus piperacillin and risk of acute kidney injury: a worldwide pharmacovigilance database analysis. *J Antimicrob Chemother* 2021, 76(5):1311-1314.

30. Blevins AM, Lashinsky JN, McCammon C, Kollef M, Micek S, Juang P. Incidence of Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients Receiving Vancomycin with Concomitant Piperacillin-Tazobactam, Cefepime, or Meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2019, 63(5):e02658-02618.

31. O'Callaghan K, Hay K, Lavana J, McNamara JF. Acute kidney injury with combination vancomycin and piperacillin-tazobactam therapy in the ICU: A retrospective cohort study. *Int J Antimicrob Agents* 2020, 56(1):106010.

32. Hodiamont CJ, Juffermans NP, Berends SE, van Vessem DJ, Hakkens N, Mathot RAA, et al. Impact of a vancomycin loading dose on the achievement of target vancomycin exposure in the first 24 h and on the accompanying risk of nephrotoxicity in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2021, 76(11):2941-2949.

33. Rybak MJ, Le J, Lodise TP, Levine DP, Bradley JS, Liu C, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of

Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm* 2020, 77(11):835-864.

34. He N, Su S, Ye Z, Du G, He B, Li D, et al. Evidence-based Guideline for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin: 2020 Update by the Division of Therapeutic Drug Monitoring, Chinese Pharmacological Society. *Clin Infect Dis* 2020, 71(Suppl 4):S363-S371.

35. Kunming P, Xiaotian J, Qing X, Chenqi X, Xiaoqiang D, Qian Zhou L. Impact of pharmacist intervention in reducing vancomycin-associated acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2023, 89(2):526-535

36. Luther MK, Timbrook TT, Caffrey AR, Dosa D, Lodise TP, LaPlante KL. Vancomycin Plus Piperacillin-Tazobactam and Acute Kidney Injury in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med* 2018, 46(1):12-20.

37. Huang WC, Wang MT, Lai TS, Lee KH, Shao SC, Chen CH, et al. Nephrotoxins and acute kidney injury - The consensus of the Taiwan acute kidney injury Task Force. *J Formos Med Assoc* 2022, 121(5):886-895.

38. Mehran R, Dangas GD, Weisbord SD. Contrast-Associated Acute Kidney Injury. *N Engl J Med* 2019, 380(22):2146-2155.

39. Choi YC SS, Soliman D, Bingham AL, Pontiggia L, Hunter K, Chuang L, et al. Intravenous Vancomycin Associated With the Development of Nephrotoxicity in Patients With Class III Obesity. *Ann Pharmacother* 2017, 51(11):937-944.

40. Assadoon MS, Pearson JC, Kubiak DW, Kovacevic MP, Dionne BW. Evaluation of Vancomycin Accumulation in Patients With Obesity. *Open Forum Infectious Diseases* 2022, 9(10):ofac491.

Table 1 Demographic information and clinical characteristics of patients with and without VA-AKI

Factors	Patients included N = 435	Patients without VA-AKI N=361	Patients with VA-AKI N=74	*P* Value
		Demographic information		
Gender (male)	320 (73.6)	267 (74.0)	54 (71.6)	0.678
Age (years)	52.0 (22)	51.0 (22.0)	58.0 (22.0)	0.028
Body Mass Index (Kg/m^2)*	21.8 (4.2)	21.48 (4.6)	22.17 (4.13)	0.176
Payment mode				0.131
At one's own expense	272 (62.5)	220 (60.9)	52 (70.3)	
National basic medical insurance	163 (37.5)	141 (39.1)	22 (29.7)	
		Concomitant underlying diseases		
Coronary heart disease	23 (5.3)	20 (5.5)	3 (4.1)	0.814[b]
Hypertension	66 (15.2)	53 (14.7)	13 (17.6)	0.528
Diabetes	28 (6.4)	21 (5.8)	7 (9.5)	0.366[b]
Heart failure	51 (11.7)	40 (11.1)	11 (14.9)	0.357
Sepsis	144 (33.1)	119 (33)	25 (33.8)	0.891
Cancer	43 (9.9)	36 (10)	7 (9.5)	0.893
valvular heart disease	378 (86.9)	311 (86.1)	67 (90.5)	0.308
		Severity of illness		
Baseline serum creatinine	77 (30.0)	76.0 (29.9)	86.3 (41.0)	0.014
Cardiac surgery	365 (83.9)	297 (82.3)	68 (91.9)	0.040
Admission to the ICU	220 (50.6)	175 (48.5)	45 (60.8)	0.053
Mechanical ventilation	67 (15.4)	53 (14.7)	14 (18.9)	0.358

Data are described as mean (SD), n (%), or median (IQR). b refers to the calibration of the chi-square test. ICU=intensive care unit. VA-AKI= vancomycin-associated kidney injury.

*There were missing values in the BMI data. The percentage of missing values for patients included was 8.8% (8.9%for patients without VA-AKI; 8.1% for patients with VA-AKI). Missing values were filled using the median.

Table 4 Risk factors for vancomycin-associated acute kidney injury

	B	S.E.	OR	95% CI. for OR		*P* Value
				Lower	Upper	
Body Mass Index (Kg/m^2)	0.081	0.041	1.085	1.001	1.175	0.046
Vancomycin varieties (Lai Kexin vs. Wen Kexin)	-0.67	0.293	0.512	0.288	0.909	0.022
Daily dose (≥ 2 g/d vs. ≤2 g/d)	-0.931	0.553	0.394	0.133	1.166	0.093
Length of vancomycin therapy	0.029	0.014	1.030	1.003	1.058	0.032
Baseline serum creatinine	0.005	0.003	1.005	0.9996	1.011	0.071
Admission to the ICU	0.75	0.286	2.117	1.209	3.707	0.009
Radiocontrast agents	0.719	0.328	2.051	1.078	3.904	0.029
Constant	-4.426	1.029	0.012			<0.001

Figure Legends

Figure 1 Study Design

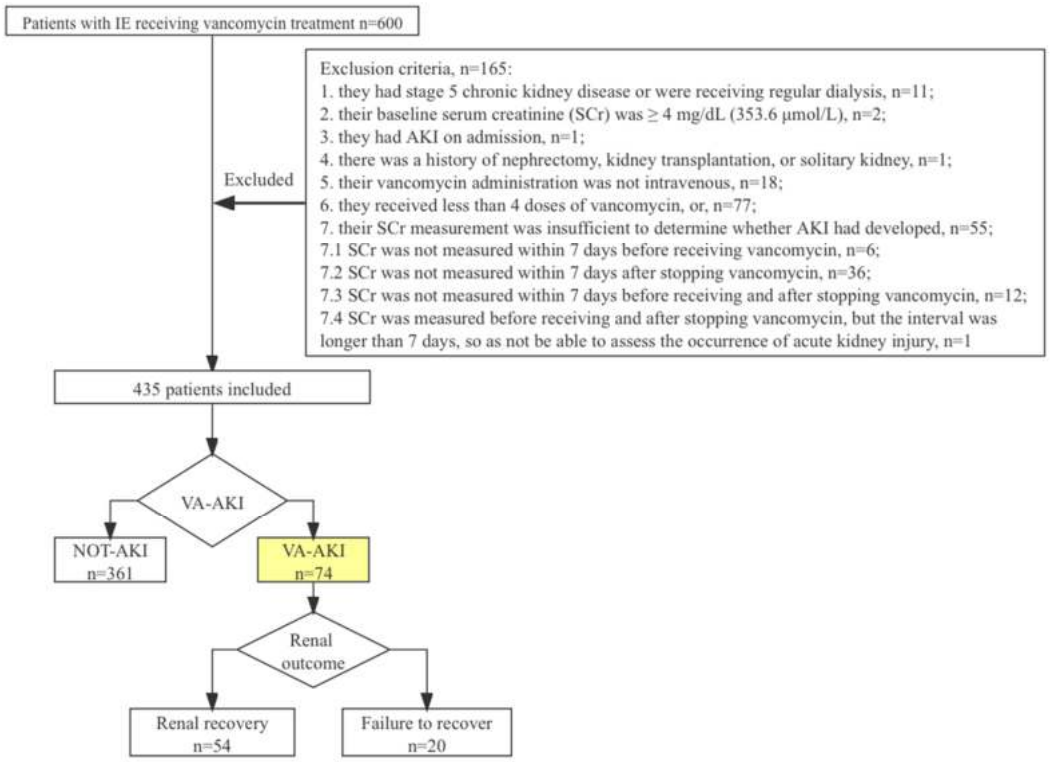


Figure 1 Study Design

VA-AKI= vancomycin-associated kidney injury.

摄影技术在中药标本数字化信息采集的应用

潘银蕉[1]，唐理立[2*]，杨志业[1*]，刘潇潇[1]

（1. 广东省药品检验所，广东广州 510663；2. 自由摄影师，广东广州）

【摘要】近年来，随着我国中医药事业的不断重视以及网络技术的快速提升，我国中药标本数字化也得到了迅速发展，全国各省市地方都在建设中药标本数字化平台，为了建设高质量的数字化平台，需对中药的药用植物及实物标本进行数字化信息采集，也就是图像拍摄，因此在中药数字化建设中，运用好摄影技巧可有效提高图像质量，加快数字化平台的建设。本文从摄影的角度讨论如何利用合理的摄影技术拍摄中药标本图像，获得高质量的数字化信息，以供中药标本数字化平台建设作参考。

【关键词】摄影；中药标本；数字化信息；

Application of photography technology in digital information collection of traditional Chinese medicine specimens

PAN Yin-jiao[1], TANG Li-li[2], YANG Zhi-ye[1],LIU Xiao-xiao[1]

(1. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou510180,China;2.Freelance photographer,Guangzhou,China）

【**Abstract**】In recent years, with the continuous attention paid to the traditional Chinese medicine industry and the rapid improvement of network technology in China, the digitization of traditional Chinese medicine specimens has also developed rapidly. Various provinces, cities, and regions across the country are building digital platforms for traditional Chinese medicine specimens. In order to build high-quality digital platforms, it is necessary to collect digital information, i.e. image capture, on medicinal plants and physical specimens of traditional Chinese medicine. Therefore, in the digitization construction of traditional Chinese medicine, Applying photography techniques effectively improves image quality and accelerates the construction of digital platforms. This article discusses from the perspective of photography how to use reasonable photography techniques to capture images of medicinal plants and traditional Chinese medicine specimens, in order to obtain high-quality digital information for reference in the construction of traditional Chinese medicine digital platforms.

【**Keywords**】Photography; Traditional Chinese medicine specimens; Digital information;

2021 年发布的《“十四五”国家药品安全及促进高质量发展规划》提出建立国家中药标本数字化平台。”岳秉飞委员建议，进一步做好顶层设计，发挥各地区优势，整合资源，研究建立一个以中药标本实物为基础，具有一定专业价值和社会价值的国家中药民族药数字化标本平台，为生产、质量控制、标准制定、科学研究、教育科普等提供实物和信息支撑。中药数字化标本馆是时代的需要，发展的必然，加强中药标本数字化建设是振兴中药事业的关键。

基金项目：广东省中医药局科研项目（项目编号：20221056）

作者简介：潘银蕉，女，副主任中药师 研究方向：中药鉴定与质量分析

*通讯作者: 唐理立，男，自由摄影师

*通讯作者: 杨志业，女，副主任中药师 研究方向：中药鉴定与中药质量评价。

中药标本数字化建设中，信息采集与数字转化是关键的环节，而图像信息包括中药材标本的基原动、植物及其生境，中药材标本的外观、鉴别点及其标签容器等原始信息，这些信息的采集均需要进行图像拍摄，而所采用的摄影技术与一般摄影技术有所区别，被称为“科学摄影技术。科学摄影技术是将摄影作为一种科学研究的手段或工具，用来记录、测量或分析研究对象，具有真实性，科学性，艺术性等特点[1]。中药标本数字化借助“科学摄影”技术，通过数字化图像信息，真实、客观、详细地反映中药基原及中药材鉴别要点，有效宣传和弘扬中医药传统文化，增进公众对中药知识的了解，更进一步提高公众对中药材、饮片真伪的辨别能力。

为了更好地应用科学摄影技术实现中药数字化标本馆建设的高质量发展，本文从中药材标本的科学摄影应用进行举例，将技术应用的关键要点进行阐述，以期加快对科学摄影技术的掌握。

1 拍摄的设备

为获得清晰度高且鉴别点细节丰富的图片，对相机的像素和镜头的解析力要求均比较高。在拍摄设备的选择上，优先考虑全画幅的单反相机或全画幅的无反相机，因为全画幅相机具有高像素，高分辨率，高动态范围以及低噪点等诸多优点。参考配置清单如下：尼康 Z7 全画幅无反相机；尼康 24-70mm F2.8 标准变焦镜头；尼康 60mm F2.8 微距镜头；尼康 105mm F2.8 微距镜头；尼康 SB8000 外置闪光灯；维卓仕环形微距闪光灯；CPL 偏振滤镜；百诺横置杆三脚架；尼康专用遥控器/快门线；黑色吸光绒布背景架；白色 PVC 背景板；静物拍摄台；金贝摄影灯柔光箱及引闪器。

2 拍摄的方法

2.1 拍摄前的准备

拍摄药材标本前，先要布置好拍摄台、背景和摄影灯具，拍摄台应选用专业的水平拍摄台，在拍摄台上覆盖白色 PVC 背景布，或者放置无影背景底灯板，为了避免出现近大远小的光学透视现象，相机应安装在横置杆三脚架上，相机镜头的光轴应和摄影台垂直呈 90 度角，把拍摄标本有规律地摆放在拍摄台上，同类型多样本的可以把样本摆放成不同的角度，方便展示更全面的特征鉴别。标本拍摄需要用到专业的摄影灯具，包括相机外置闪光灯，微距环形闪光灯，无线引闪器，棚拍摄影灯组，大型柔光箱等，根据拍摄样本的不同使用不同的灯光组合。

2.2 相机的设置

药材标本拍摄和野外药用植物拍摄有所不同，由于拍摄环境相对稳定，只需要针对不同主体的体积和形状进行细微的调整。

2.2.1 拍摄模式和参数设置

中药标本的拍摄多采用白色背景，部分浅色的标本可能使用黑色背景，有时候需要配合摄影灯具拍摄，所以拍摄模式应选择手动档（M 档）。感光度设置为 ISO100，光圈大小根据实际拍摄主体的厚度来设置，通常设置为 F8 至 F16 之间，最后通过快门速度调节来正常曝光。无需使用闪光灯拍摄的标本，可以根据选用的背景颜色和相机测光结果调整合适的快门速度，依据白加黑减的曝光法则，如果使用白色背景，快门速度应该调节到比测光结果更低，相反如果使用黑色背景，快门速度就应该调节到比测光结果更高。使用闪光灯拍摄的标本，快门速度需要根据所配备摄影灯的同步速度来设置，通常为 1/100 秒左右，最后通过闪光灯的输出功率调节来正常曝光。

2.2.2 焦距选择

为了拍摄出尽可能清晰的药材标本照片，首选是 100mm 左右的微距定焦镜头，因为各品牌的百微镜头都是分辨率的标杆，能最大限度地还原出主体的轮廓和细节，故此适合拍摄大部分的药材。对于体积较小的药材标本，需要使用高倍率放大才能体现鉴别特征的，为避免景深过浅不能覆盖其整体，可以选用 50mm 左右焦距较短的标准微距镜头进行拍摄。体积大而厚但不需要过于注重微小细节的草药标本或者拍摄标本罐，可使用标准变焦镜头的短焦段进行拍摄以保证画面和景深的覆盖。

2.2.3 白平衡

由于黑白背景和摄影灯色温的共同影响，使用自动白平衡可能无法还原标本的真实色彩，所以需要手动设置白平衡，避免出现偏色的情况。将相机的白平衡调到手动模式，色温调成和摄影灯色温相同（通常闪光灯和

摄影灯的色温都是 5500K+/-200K），然后进行试拍，在显示器中观察拍出来的照片，和肉眼所见真实的标本进行对比，再进一步微调白平衡，每次可调+/-100K 进行试拍，重复对比直到获得准确的色彩还原为止。记录下调整好的色温，以后再处于相同的拍摄环境就不需要每次都进行调整了。

2.2.4 对焦

使用拍摄棚架等道具进行平面摆拍时，由于标本基本处于一个比较薄的平面中，只要利用光圈调节到合适的景深，就可以使用相机的单次自动对焦功能进行拍摄。如果景深明显大于拍摄主体的厚度，自动对焦到最接近相机的表面即可，基本无需调整，如图 1。但如果景深接近覆盖主体的厚度，在自动对焦后，需要再手动调节焦点到主体前三分之一处，以保证景深的覆盖，如图 2。

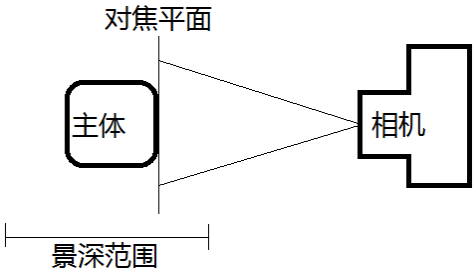


图 1 景深示意图

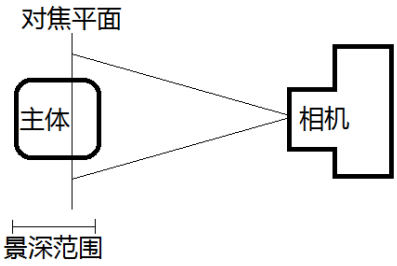


图 2 景深示意图

3 实例分析

3.1 标本罐的拍摄

中药标本的数字化，为了与传统实物标本相对应，会先以标本罐的形式进行拍摄。和普通标本拍摄有所不同，拍摄时要把标本罐直立放置在摄影台上，相机以水平竖拍角度安装在三脚架上进行拍摄，根据标本罐的体积来选择镜头焦段，一般使用标准变焦镜头的 35mm 至 50mm 焦段比较合适，能同时能兼顾画面覆盖，景深覆盖和防止畸变。大部分标本罐都是玻璃或者透明亚克力材质，在静物摄影中，拍摄玻璃制品技术难度较高，既要展示其通透的质地，并拍出清晰的线条轮廓，同时还得控制表面的反光。要达到上述要求，必须做到两点，一是选择合适的光源，二是选择合适的背景。相机所使用的闪光灯，不论是外置还是内置，都属于面积比较小的点光源，更容易导致玻璃表面高亮度的反光，影响标本的观察，所以应该使用大型柔光箱，根据标本罐摆放的位置来调整柔光箱的位置和角度，将反光的亮度和面积尽可能降低。此外可以在镜头前装上 CPL 滤镜，进一步降低反光，先利用摄影灯的造型灯来观察反光的情况，再旋转 CPL 滤镜到合适的角度可使反光降到最低。在拍摄背景的选择上，可使用白色 PVC 背景布，将背景布夹在静物台上，使背景布形成一个弧度，这样拍摄出来的标本罐就比较立体且背景中不会出现背景布的折痕。（如图 3、图 4）



图 3 标本罐正面（f/8 1/2 秒 ISO1OO ）



图 4 标本罐反面（f/8 1/2 秒 ISO1OO ）

3.2 药材标本的拍摄

将药材标本从标本罐中取出进行拍摄，可以根据药材的色泽、质地选择合适的拍摄背景，一般使用白色的背景较多，可以让画面显得干净和简洁。但有些药材色泽比较浅，如果使用白色背景会使得标本边缘的轮廓不明显，这时候只有采用黑色背景，才能更好突出药材特性及鉴别点。数量较多或者体积较大的标本为保证画面能覆盖样本全貌，可以使用 24-70mm 变焦镜头的短焦段拍摄，如果标本数量少或者标本体积较小，则优先使用微距镜头拍摄，因为微距镜头拥有高放大倍率和更高分辨率等优势。体积较小的标本可以在微距镜头前加装环形微距闪光灯，可以使画面亮度更均匀，画质更通透。

3.2.1 白色背景拍摄

白色背景可以选择纯白色 PVC 背景布或者无影背景底灯板，纯白色 PVC 背景布品质细腻，拍摄效果好，且容易操作。而无影背景底灯板，可以通过底部无极调节的光源减淡或消除标本边缘的阴影，可以简化电脑后期扣图的工作，但是无影背景底灯板的亮度需要多次微调试拍才能达到最佳效果。某些形状复杂的样品可能需要配合大型柔光箱，从两侧互补打光才能完全消除阴影。无影背景底灯板只适合不透光的标本拍摄，如果比较薄的会透光的叶子或全草类标本不适用。（如图 5～图 8）



图 5 五指毛桃药材（f/8 2s ISO2OO ）



图 6 黑血藤药材（f/8 1s ISO1OO ）



图 7 金樱子（f/16 3/5s ISO1OO ）



图 8 红豆蔻（f/8 1/13s ISO2OO ）

3.2.2 黑色背景拍摄

黑色背景拍摄，可选择使用黑色 PVC 背景板或者黑色吸光绒布。黑色 PVC 背景板有轻微反光，尤其在纵深较小的静物台上，拍摄时需要调整柔光箱角度以及配合 CPL 滤镜来减淡或消除反光，具体操作与拍摄标本罐时类似。黑色吸光绒布不会反光，这样可以拍出幽静的黑色背景从而突出药材标本，但对于体积较小或者厚度较小的标本，不能直接把样品放在黑色吸光绒布上拍摄，否则绒布的质地纹理也会显现，应该在黑色吸光绒布

上架设有机玻璃板[2]，玻璃板和黑色吸光绒布背景大约保持 30cm 距离，这样绒布的纹理会在焦外被虚化，才能获得干净的纯黑色背景。（如图 9、图 10）



图 9 石仙桃（f/8 3/5s ISO1OO）



图 10 沙参（f/8 1.6s ISO125）

3.2.3 细小标本的拍摄

前面讲到的是普通样品的拍摄方法，对于细小样品，比如细小种子[3]，花蕾等标本，如果采用数码相机加摄影台的拍摄方案很难直接拍出满意的图像，主要问题是光圈设置得太大景深难以覆盖，光圈设置得太小会因为衍射现象严重降低分辨率率。所以拍摄时需要不断微调对焦，拍摄多张焦点不同的照片，再利用电脑后期叠加合成才能获得景深完全覆盖，轮廓分明细节丰富的照片。除了使用数码相机加后期合成的方案之外，也可以使用超景深三维数码显微镜（ZEISS SteREOS Discovery.V20）来拍摄[4]。超景深三维数码显微镜简称数码体视显微镜，其工作原理其实和数码相机加后期合成是一样的，可以通过内置的程序设置焦点步长，然后自动扫描并进行景深合成，拍摄出具有全景深并且细节丰富的标本照片，使用方便，简单快捷，大幅地节省了后期的工作量。（如图 11、图 12）



图 11 红豆蔻（体视显微镜）



图 12 槐米（体视显微镜）

4 讨论

关于图像的后期处理，一张构图良好，曝光正常的图像一般不需要后期，但是难免会有拍得不理想的时候。所以懂得一些简单的后期技术是很有必要的。后期的软件有很多，笔者建议使用专业的图像处理软件 PhotoShop，正常情况下不会影响图像的画质。一些简单的后期，比如构图不合理，可以通过简单的裁剪使得画面更严谨，

主体更突出；比如曝光不合理，曝光过度、阴影较多、图像偏灰等，根据直方图来观察图像的整体曝光情况，通过调整图像的直方图对图像的亮度进行控制，从而使照片处于一个较好的曝光状态[5]；还有其他的一些简单的后期技术，比如曲线命令[6]，对模糊照片的锐化处理技术[7]，抠图技术[9]等可以提升中药标本数字化信息图像的质量和美感。

5 结语

中药标本是中药检验与科研的基础资料，传统的检索和查阅方法已不能满足科研机构和社会公众不断增长的获取中药民族药标本信息资源的需要，专业的摄影技术，能够很好地提高中药标本数字化信息的质量，为数字化平台的建设奠定基础，使其能够更好地服务药品监管，促进产业发展，传承中药文化，加强科普宣传[9]。

参考文献

[1] 周良云,咸庆飞,纪瑞锋等.科学摄影在中药研究中的应用与展望[J].中草药,2018,49(23）:5683-5690.

[2] 葛斌杰.放大细节之美——植物精细解剖摄影（下）[J].中学科技，2021（01）：40-43.

[3] 刘爱朋,张树旺,王世信等 10 种细小果实种子类药材的微性状鉴别[J].中 成药,2022,44（6）:1869-1874

[4] 林锦锋,葛蓉,康帅等.3 种药用菟丝子的生药学鉴别研究与数字化表征[J]药物分析杂志,2021,41(8）:1326-1334

[5] 张泰松.PhotoShop 直方图快速实现照片处理的探讨[J].电脑编程技巧与维护,2016（22）:80-82

[6] 庞国斌.PhotoShop 曲线工具在数码照片后期处理中的运用[J].科技,2020（05）:16-17

[7] 马强明.浅谈 PhotoShop 在数码照片后期处理的使用[J].中国培训，2016（14）：252-255

[8] 王银辉.基于 Photoshop 的抠图技术应用[J].电子技术,2023,52(05）:58-60

[9] 康帅,王淑红,连超杰等.服务监管科学的中药民族药数字标本平台建设思路[J],智慧监管视界,2021,(9）:32-39

医防协同，击破疫苗犹豫促进老年人群疫苗接种

潘志强

长春医学高等专科学校　吉林 长春 130000

【摘要】人口老龄化已是我国基本国情，健康需求是老年人群迫切需求。但我国约有 1.8 亿老年人患有慢性病[1]，60 岁以上老年人中高血压、血脂异常、糖尿病、COPD、脑卒中等慢性疾病发病率较高。常见感染性疾病的发生也集中于老年患者人群，如肺炎、流感、带状疱疹等疾病。当老年人群发生慢性病合并常见感染性疾病时，会影响慢病管理，加重基层防病的负担[2]。大量研究也证实慢性病与许多传染性疾病有着共同的病因，相互之间存在重要关联[3]。通过疫苗预防感染或可成为有效预防和控制慢性病的重要手段，常见的老年人群接种的疫苗如流感疫苗、肺炎疫苗、带状疱疹疫苗等[4]。但据《中老年常见感染性疾病预防认知调研报告》显示：年龄越大，疫苗犹豫比例越高；50 岁以上的受访者没有接种过肺炎疫苗、流感疫苗、带状疱疹疫苗中的任意一种占比 33%；50 岁以上受访者，带状疱疹和肺炎疫苗接种率不足 35%[5]。在促进老年预防接种行动方面，通过医院全科医生、社区慢病医生、公卫医生与计划免疫医生，携手并进做好健康科普和健康教育，增强老年人群对疫苗有效性和安全性的信心，提高老年人疫苗接种积极性，通过预防感染减缓老年人慢性病的进展，降低慢性病并发症导致不良结局的风险，改善患者生活质量[6]。该文通过对国家相关部门有关医防融合、公共卫生体系建设相关政策及慢病防治痛点问题等方面的要求，引入笔者对深入医防协同、促进老年人群疫苗接种的思考，旨在为后续医疗机构开展医防协同工作提供思路和参考。

【关键词】医防协同 疫苗接种 疫苗犹豫

前言

由于人口老龄化、经济发展和生活方式改变等因素，慢性病已成为主要的疾病负担。对于常见感染性疾病包括流感、肺炎和带状疱疹等，同样是老年人需要重点关注的问题。应对当前慢性病的病因和病程发展特征，医学需要改变以疾病和治疗为中心的模式，转化为以健康为中心，并从整个健康到疾病发展全过程来提供预防、治疗和健康管理的整合连续服务[7]。2016 年，中共中央、国务院就曾印发了《“健康中国 2030”规划纲要》，明确提出实施老年健康促进行动；坚持预防为主、防治结合，全方位、全周期维护和保障人民健康。2019 年国家卫生健康委办公厅关于印发老年失能预防核心信息的通知，其中明确建议老年人定期注射肺炎球菌疫苗和带状疱疹疫苗，流感流行季前在医生的指导下接种流感疫苗。然而迄今为止老年人对接种疫苗的认知还存在诸多误区，疫苗犹豫（vaccine hesitancy）已然成为构筑 “免疫屏障” 的重大阻碍，在几乎所有感染性疾病中不可忽视[8]。如何解决老年人群“疫苗犹豫”显然已成为控制感染性疾病发病的首要话题。

1.医防协同的概念

所谓医防协同，即基层医疗卫生机构通过预防保健、疾病治疗和健康管理的相互促进，达到基层医疗卫生服务质量提升的工作机制，“医”是指临床工作，“防”是指公共卫生，医防融合则从服务技术层面和责任分担层面去理解[9]。

2.老年人群常见感染性疾病流行病学数据

我国每年流感、肺炎、带状疱疹感染性疾病的新发病人数突破百万。流感：2019 年中国流感新发病例数约 349 万 1，2017-2018 年统计数据显示，中国 60 岁以上流感报告病例占总发病人数的 9.08%，大多数患者流感体征和症状一般在 3-7 天后消退，但咳嗽和不适可持续大于 2 周，尤其是在老年人和慢性肺病患者中[10]。据统计每年平均每次流感发作，门诊就诊次数为 2.1 次；平均住院治疗次数为 1.2 次；平均住院时间为 9 天[11]。肺炎：2016 年我国 60 岁以上人群新发社区获得性肺炎(CAP)病例数约为 177 万 4 肺炎链球菌导致的 CAP 比例约为 11.68-32.6%。老年肺炎病程迁延，病灶吸收缓慢，多数需 4-6 周才能完全吸收，平均住院时间 12.73-15.21 天[12]。中国 50 岁及以上人群每年新发带状疱疹病例约为 156 万，病程一般 2-3 周，老年人为 3-4 周，带状疱疹后神经痛的患者 30-50%疼痛持续超过 1 年，部分病程可达 10 年或更长[13]，50 岁及以上人群每次新发带状疹平均门诊就诊次数为 3.6 次，平均住院治疗次数为 2.1 次，平均住院时间为 21.6 天[14]。上述三种感染性疾病在中老年

人群中发病率高、病死率高，严重影响了老年人群的生命质量并引发沉重的经济负担。

3.我国老年人常见感染性疾病疫苗接种现状

2018-2019 年度全国流感疫苗接种率统计显示，60 岁老年人流感疫苗接种率是 1.10%(自愿自费)[15]。部分地区数据显示，我国老年人肺炎球菌疫苗接种率是 1.9%-5.8%。2020 年上海市一项问卷调查显示 50-69 岁成人带状疹疫苗接种意愿率是 16.57%[15]。2023 年 4 月 24 日，由中国老年保健协会等联合发起的《中国中老年常见感染性疾病预防行动倡议暨认知调研结果》结果显示，我国 50 岁及以上中老年人群低估了自己患常见感染性疾病如流感、肺炎、带状疱疹等的风险和危害，疾病预防意识有待提升。

4.老年人常见感染性疾病疫苗接种获益

据国外的监测和调查数据显示，接种流感疫苗可减少 260 岁老年人接种后一年内 75.7%的流感就诊，可减少呼吸系统疾病所致入院死亡风险 30%。接种 23 价肺炎球菌多糖疫苗(PPV23)可减少 260 岁老年人肺炎发病率 72%和呼吸道感染率 29%,在 50 岁成人中进行的模型分析显示，带状疱疹疫苗接种率为 5%时，接种带状疱疹疫苗可避免 43568 例带状疱疹病例，避免 103139 次门诊和 1425 次住院[18]。

5.疫苗犹豫--感染性疾病防控中不可忽视的阻力

自疫苗被发明以来至今 200 余年，可以发现“疫苗犹豫” 在不同的历史阶段因其复杂成因呈现出不同的影响力，早在 2019 年世界卫生组织已将 “疫苗犹豫” 列为 “2019 年十大全球健康威胁”。疫苗犹豫存在其老年人群的原因需引发思考，中国一项于 2019 年 8-10 月开展的全国性横断面调查，在老年人中探讨流感疫苗接种犹豫的流行率和决定因素。研究在中国大陆 10 个省市 3849 名 260 岁老年人中开展，在研究人员的协助下完成一份满查问卷，对于流感疫苗接种的犹豫状态通过两个问题评估，(1)您拒绝接种流感疫苗吗?(2)您对接种流感疫苗有任何担忧或疑虑吗?研究采用多项式逻辑回归分析来探讨流感疫苗犹豫的决定因素。其研究结论：疫苗安全性、对疫苗接种必要性的认识和疫苗有效性是影响中国居民接种流感疫苗犹豫的主要因素[15]。

6.医防协同，多点击破老年人群疫苗犹豫

疫苗是人类历史上抵御传染病最成功的发明，接种疫苗是预防和控制传染病最经济、有效的公共卫生干预措施之一[17]。谈及疫苗接种更多考虑应为疾控专家及社区计划免疫相关医护工作，其实若要提高老年人群感染性疾病疫苗接种率，防止疾病发生，应为社区基层医护、综合医院全科医护、疾病治疗专科医生、社区新闻媒体等多方力量与疾控专家共同携手，相互协同从而击破老年人群疫苗犹豫，提高老年人对疫苗的正确认知，树立积极主动的预防观念。笔者结合大量文献与专家指导，总结出下列七条可行性较高的意见。

（1）充分发挥新闻媒体的作用

老年人接种疫苗意愿低的首要原因，即是常见感染性疾病知识和信息的传播力度不够，老年人群获取疾病科普知识渠道较为狭窄，这就需要让更多的中老年人通过较多的新闻媒体多渠道地获得疾病危害信息，不论是电视媒体、报纸还是新媒体，都应该积极宣传中老年接种疫苗预防感染性疾病的必要性、可行性、有效性和安全性。

（2）与基层社区公共卫生服务过程充分结合

国家基本公共卫生服务项目包括 12 类内容。其中 4 类内容：健康教育、预防接种、老年人健康管理与慢性病患者健康管理均与老年人群疾病防控相关。在健康教育实施过程中，疾病预防是其中主要的科普内容，预防接种是预防感染性疾病最有效的手段，在此过程中由公卫医生推荐辖区老年人群接种感染性疾病疫苗。同时在老年人群健康体检时，由体检预约医生进行科普或可在体检后由体检报告解读医生，在与老年体检者一对一解读报告时进行科普告知，通过权威专家指南共识推荐，老年人群应接种的预防感染性疾病的疫苗。这均是提高中老年人接种意愿击破老年人疫苗犹豫的有效方法[16]。

（3）综合医院医护充分识别老年易感人群

综合医院的特点是科系多而全，收治范围广泛，临床专家技术水平较高，可以提供医疗保健全方位的服务。老年人因常患有多种疾病尤其是常见慢性疾病需要频繁到医院就诊，接触医生的机会较多，患者来综合医院就医时，临床医生如若能够通过老年患者疾病控制情况，识别出老年患者中的感染性疾病易感人群，并对这部分人群给出接种预防感染性疾病疫苗的建议，会达到事半功倍的作用。临床医生的建议相对社区医生更有权威性

和说服力，会对老年人提升疫苗接种意愿产生非常积极的影响，这也是一种很重要的传播和影响方式。

（4）建立社区疾病防治立体化

击破老年人群“疫苗犹豫”，提高老年人群免疫接种，建立社区卫生服务中心防治一体化，单纯通过社区中计免医生是不足以实现的，需要由社区卫生服务中心负责人领导自上而下的建立老年人群疾病防治“立体化”才可能实现。定期开展社区诊断工作，摸清辖区居民慢性病及感染性疾病流行特点和影响因素，定期举办院内会议召集社区医生学习，设立奖惩机制，将老年人群健康管理与科普责任落实到人。社区医生包括了全科医生、公共卫生人员、家庭医生、计免医生、护士等，基层医务工作者有责任深入社区，走进百姓家中普及中老年感染性疾病预防知识，一方面击破老年人群疫苗犹豫，一方面建立了社区疾病防治立体化，便于对老年患者的健康管理。

（5）感染性疾病专科医生积极推荐

我国每年流感、肺炎、带状疱疹感染性疾病的新发病人数突破百万。感染流感、肺炎、带状疱疹疾病的老年患者大多数会选择呼吸内科、老年病科、皮肤科、疼痛科等相关科室进行一段时的入院治疗，这部分的老年患者罹患感染性疾病后的个人情感、睡眠质量、慢病控制、经济负担及其患者家属均会造成不同程度的影响。且这部分老年患者康复后仍要防止感染性疾病的复发及多次感染，但相对而言他们对于疫苗接种意愿便会提高很多。感染性疾病专科医生可以在出院交代时建议待康复后及时接种预防感染性疾病的疫苗，以避免疾病复发及多次感染。

（6）老年患者子女的科普告知

老年人群的家庭成员特别是子女的意见会影响老年人群的接种意愿，很多老年人都是在子女的督促和劝告之下选择接种疫苗或者选择不接种，因此同时要做好老年人子女的科普工作，鼓励子女为老年人传递预防接种常识，让预防感染性疾病成为保护老年人健康的一种家庭行动。

（7）充分与行政社区融合，科普宣传

把网格触角延伸到每一户居民，让群众健康更有“医”靠。不断探索社区医生融入“微网实格”新路径，提高老年人群对感染性疾病的知晓率和老年人群感染性疾病接种疫苗的覆盖率。社区卫生服务中心依托行政社区“微网实格”，充分发挥家庭医生“健康守门人”的作用，积极探索家庭医生团队融入“微网实格”治理新路径，促进“家庭医生+社区网格员”服务合力形成，为居民提供更高质量的健康管理服务。

7.结论

综上所述，中国人口老龄化进程不断加剧，老年患者感染性疾病也随之增高。感染性疾病可通过接种疫苗从而有效预防，提高提高中老年人接种意愿、击破老年人疫苗犹豫，需在社区基层医护、综合医院全科医护、疾病治疗专科医生、社区新闻媒体等多方深化医防协同。通过提高老年患者感染性疾病疫苗接种率，以减少感染性疾病的发生率，从而提高老年人的生活质量。相信我国在不断优化和完善医防协同的体系下，能够给老年人群提供更加优质、高效的医疗保健服务。

参考文献：

[1] 健康中国行动推进委员会健康中国行动(2019-2030 年)，2019 年 7 月 9 日

[2] Weiskopf D, et al. The aging of the immune system. Transpl Int. 2009 Nov;22(11):1041-50.

[3] LalH, et al. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunitvaccineinolderadults[J].NEnglJMed,2015,372(22):2087‐2096.

[4] 杨瑛莹. 免疫功能低下人群带状疱疹及其并发症的发病及经济负担研究[D].浙江中医药大学,2022.

[5] 《中国中老年常见感染性疾病预防行动倡议暨认知调研结果》2022

[6] 冯录召，等中华医学杂志 2020:100(00):E032-E032

[7] https://www.washingtonpost.com/dc-md-va/2022/01/23/dc-anti-vaccine-rally-mandates-protest/

[8] Hou Zet alVaccine202240(33):4806-4815

[9] 中华儿科杂志.医防融合推进儿童轮状病毒胃肠炎的免疫预防 2020,58(08):621-623DOI

[10] CDC.InfluenzaFlu).Clinical Signs and Symptoms of Influenza.https://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/clinical.htm
[11] Yana Jet alInfect Dis Poverty.2015:4:44.
[12] 中国医师协会皮肤科医师分会带状疱疹专家共识工作组中华皮肤科杂志，2018:51(6):403-408
[13] 带状疯疹后神经痛诊疗共识编写专家组，中国疼痛医学杂志 2016:22(3):161-167
[14] 湖南省预防医学会中华预防医学杂志 202054(12):1364-1377
[15] 王雯，等中国疫苗和免疫 202228(4):486-490.
[16] 刘翰谕，等中国预防医学杂志 202122(3):233-237
[17] de Fiqueiredo Aet alLancet2020:396(10255):898-908
[18] MARRA F, PARHAR K, HUANG B, et al. Risk Factors for Herpes Zoster Infection: A Meta-Analysis [J].Open Forum Infect Dis, 2020, 7(1): ofaa005.

医药类高校参与社区居民药学服务初探

潘志强

长春医学高等专科学校 吉林 长春 130000

【摘要】安全合理用药不仅关系到公众的质量和生命安全，也关系到家庭幸福与社会和谐。对公众开展安全合理用药知识的教育与宣传，是降低不合理用药风险的有效手段之一。为了更好的服务社区居民,创建良好的药学服务氛围,本文结合了高校和社会中诸多痛点问题：医药类相关教育高校学生参与社会实践机会较少，不能满足学生对未来就业的需求；社区居民参与科普活动机会较少，合理用药知识匮乏；医疗机构合理用药指导药师工作繁忙，开展药学科普讲座形式单一等。而医学类高校学生本身具有相关药学知识且课余时间较多的优势，结合我校的实际情况与笔者的自身实践经验总结出了一些可行性较高的向社区居民开展合理用药指导的建议。基于此组建医药类高校药学科普团队，医药类高校与各大医疗机构协作在社区开展有特色的用药科普活动，确保能够为公众者提供更加全面且优质的药学服务。使公众、相关医疗组织机构、医药类高校等多方受益，共同推进我国医疗卫生事业的发展。与此同时为其他同类医药类高校参与社区药学服务提供经验和借鉴。

【关键词】医药类高校　合理用药指导　医疗机构

前言

随着我国医药卫生事业的发展和人们对用药安全需求的增加，药学服务已在我国各级医院、社区、社会药房开展，药学服务已成为公共卫生服务体系的重要组成部分。《国家药品安全＂十三五＂规划》提出“保障药品安全是建设健康中国、增进人民福祉的重要内容，是以人民为中心发展思想的具体体现”，可见，保障安全公众用药已成为保障民生问题。同时，国民文化素质普遍提高，对生命和健康质量高度关注，自我保健意识逐渐增强[1]，大病上医院、小病到药店、没病多保健已蔚然成风。同时医疗制度的不断深化，患者和普通民众更需要合理用药指导。无论是高层次国家文件要求，再到公众对合理用药指导需求增加，都需要更好的药学服务。基于此组建医药类高校药学科普团队，医药类高校与各大医疗机构协作在社区开展有特色的用药科普活动，确保能够为公众者提供更加全面且优质的药学服务[2]。本文 “医药类高校参与社区居民药学服务” 所指的是医药类相关教育高校在校大学生通过与专业的医疗组织单位合作在社区开展的药学服务。

1.药学服务的概念

我国的医疗体制的不断改革，从而对于患者的服务模式也在与时俱进。但用药相关事故、药源性疾病及不合理用药等现象仍然存在。故合理用药指导，是药师的职责所在。而药学服务（Pharmaceutical care）就是指药学人员利用药学专业知识和工具，向社会公众（包括医药护人员、病人及其家属、其他关心用药的群体等）提供与药物使用相关的各类服务。即合理用药指导同样是药学服务中十分重要的一部分[3]。

2.医药类高校参与药学服务活动前抽样调查

2.1 医药类高校教学现状

了解医药类高校在校大学生在校学习情况与就社会实践活动现状并分析，为制定针对其现状提供科学依据及解决办法。方法:采用方便抽样的方法,在吉林省选取五所医药类相关教育高校个地区每所学校选取 1 个调查点，以 5 个调查点的 2500 名不同年级的在校大学生为调查对象,调查员操作平板电脑对其进行问卷调查.结果医药类高校在校大学生在校学习相关药学知识与就社会实践活动现状问题较为突出的是:课堂教学较为单一不能满足知识需求的 (89.1%)、参与社会实践较少 (70.9%)及参与相关医药类学术会议及科普讲座的机会较少”(88.7%)[4]。结论: 课堂单一的教学活动不能满足多数在校大学生的知识需求，在校学生的社会实践机会相对较少且社会实践活动项目中缺少与专业结合的内容。

2.2 社区居民用药及相关参与相关药学科普活动现状

了解社区居民用药及相关参加相关药学科普活动现状并分析，为药科普活动策略提供科学依据.方法:采用方便抽样的方法,在吉林省选取五个社区每个社区选取 1 个调查点，以 5 个调查点的 1000 名 18 周岁及以上居民为

调查对象,调查员操作平板电脑对其进行问卷调查.结果: 居民用药及相关参加相关药学科普问题较为突出的是:"不清楚'OTC 标志含义"(76.9%)、“自行服用抗生素(78.5%)及参加相关药学科普活动较少”(66.3%)参加相关要学科普活动但因讲座过于学术化记忆不深刻(89.3%)结论: 社区居民对于合理用药观念较差，生病乱用药的情况始终存在，合理用药素养有待进一步的提高，因此理用药的宣传教育且开展合理用药科普工作势在必行。

2.3 我省各大医疗机构开展合理用药科普活动现状

了解各大医疗机构开展合理用药科普活动现状并分析，方法:采用访问查法，在吉林省走访五所大医疗机构，针对社区居民合理用药科普活动的频率，科普的内容，参与科普活动社区居民的人数等作出调查。结论：因医疗机构日常工作较为繁忙，故开展药学科普次数相对较少且活动流程单一只限于传统讲座导致参与者感到乏味不易理解，因科普活动前宣传力度不够导致参与人数不多，覆盖面不广。

3.医药类高校参与药学服务初探的建议。

基于医疗机构开展药学科普，次数相对较少且活动流程单一，只限于传统讲座导致参与者感到乏味不易理解，因科普活动前宣传力度不够导致参与人数不多，覆盖面不广。而医药类高校在校学生的社会实践机会相对较少且社会实践活动项目中缺少与专业结合的内容。基于此提出以下具体建议：

3.1 组建医药类高校药学科普团队。

由医药类高校学生发起倡议，药学系学生群体中选拔优秀先进学生、组建临时药学科普志愿服务队组委会。由临时组委会编写药学科普志愿服务协会的章程、制定志愿者奖惩办法，启建药学科普志愿服务协会线上平台。召集在大学生，加入协会，推广药学科普志愿服务协会线上公众平台。在校大学生自愿在平台上报名注册。线上开展网络培训课程，培训结束后参与线上考试。线上考试通过者参与线下面试，面试通过者准予加入志愿者协会。召开大会，在会议通过《协会章程》及《奖惩办法》等、选举出药学科普志愿服务协会干部。可以使医药类相关教育高校在校大学生在学习理论知识的过程中，将理论知识融于实践、用于实践、指导实践、从而培养出综合型药学人才、为我国储备了“未来药师”资源。

3.2 确立药学服务受益群体及目标。

高校医药类专业的学生参与药学服务的群体可初步定为辖区的社区居民们，随之可将范围扩大，形成以点带面的体系，逐步使更多公众受益。组织参与药学服务科普活动的目标是为公众提供便捷的、合理的用药知识，能够满足公众的用药需求，让每一位公众都能享受到细致、称心的服务。

3.3“线上线下联合”对药学科普团队成员进行培养。

我校药学教师在药学科普团队成员培训中采取线上和线下结合方式。线下为主，线上为辅。课余时间线上预习复习，线下授课学习。除我校现有的药学教师以外还定期邀请各大医疗组织机构的专家药师对高校学生志愿者进行上岗培训及指导，主要内容涉及的课程有临床用药指导、用药常识、礼仪学、心理学等[3]。

3.4 开展有特色的用药科普活动

（1）开展“寓教于乐”的合理用药科普活动。我校为药学科普团队组织建立了活动室，定期邀请艺术院校表演教师，指导高校志愿者们撰写药学科普话剧剧本和舞台表演等。高校药学科普团队成员可充分利用课余时间排练。通过“科普+文艺”的形式，向公众宣传安全用药知识，以公众喜闻乐见的形式带入社区中，使科学与艺术、科普与文化有效结合起来。

（2）医药类高校与各大医疗机构协作完成药学科普活动。

医药类高校药学科普团队与医疗机构建立协作机制，及时沟通，设定相应时间，相应地点。由医疗机构设定科普内容主题，医药类高校科普团队参与设计活动方案，发起活动通知，联络参加科普活动公众，布置会场，绘制展板，引领公众，维持秩序等相关工作。双方协作开展用药科普活动，使科普活动更加专业化且更具有影响力。

3.5 对社区居民中的慢病用药患者进行定期随访

为弥补合理用药宣传的不足，使科普内容对更具有针对性，尤其是慢病患者，我校科普团队通常采取两种方式，定期进行电话随访和家访。电话随访的人群通常是用药的依从性相对较好的慢病患者，家访通常是身体不便的慢病用药患者，而对于用药的依从性较差的慢病患者，通常采用“双管齐下”，既做家访又做电话随访。

团队通过访问了解患者用药信息及用药情况，给患者建立用药档案，第一时间将信息传递给各大医疗组织机构药师，再由临床药师做出判断，及时给予解答和反馈，使用合理用药指导更具有精准性和及时性。

4.结果：

吉林省长春医学高等专科学校于 2016 年 10 月组建了省内第一支大学生药学科普服务队，即为药盾之光志愿者协会，该协会从组建以来共计招募志愿者 1068 人，现有在校志愿者 342 人。(截至 2023.6)曾与吉林省药学会、吉林大学第一临床医院药学部、长春市中心医院、长春东方广场社区卫生服务中心、等多家医疗单位共同合作完成药学科普活动百余场，展演药学科普话剧 49 场，覆盖公众人数千余人，长期服务固定慢病用药患者 216 人。协会成立以来影响深远，得到了吉林省内各级医疗组织及社会公众的极高赞誉，曾多次受到吉林电视台、长春电视台、吉林日报等多家媒体采访报道。由协会成员自导自演的药学科普话剧在吉林省药学会举办的第二届及第三届“演说展板大赛文艺作品组”中分别获得一等奖和二等奖。长春医学高等专科学校被吉林省药学会评为“药盾之光科普大讲堂示范基地”。同时在 2016 年参与了由中国药师协会举办的“小手拉大手智爱妈妈用药科普”活动。

5.结论：

综上所述，我们利用有效资源在医药类高校中组建药学科普团队，协助各大医疗组织机构完成社区药学科普工作，在社区开展有特色的用药科普活动，确保能够为公众者提供更加全面且优质的药学服务。使公众、相关医疗组织机构、医药类相关教育高校等多方受益。欲取提供更优质的服务，我们还应将上述这一过程与互联网充分结合，应用在药学科普活动中，利用微信公众平台完成药学科普志愿者招募，志愿者服务组织宣传，志愿者注册，志愿服务宣传，线上合理用药相关内容咨询等;利用蓝墨云 APP 完成志愿者线上培训，定期测试等;利用 WPS 建立社区慢病患者信息库等等。当取得一定成果时，将开发推广集所有功能于一体的小程序或 APP。还可以通过联动形成社区药学服务网络体系,由高校学生科普志愿者和药剂师等共同组建药学服务团队,分管辖区内居民的用药服务。同时还组建社区药学服务宣传团队,深入每一户家庭,面对面向群众宣传安全用药知识，提高公众生活质量，促进家庭幸福与社会和谐，共同推进我国医疗卫生事业的发展。

参考文献

［1］马丽媛．我国药学服务研究的内容与发展趋势（J）．中国药物临床，2016，16（6）:908-909.

［2］秦红兵，熊存全，蒋立英，等.高职高专药学专业教育培养社区药学服务人才的探索（J）．中国药房，2016，27（15）：2156-2157.

［3］汤贵松．浅谈药学服务与临床用药指导（J）．医院管理论坛，2015，32 （9）:43-46.

［4］蒋立英 ，秦红兵 ，于广华 ，等.基于社区药学服务人才培养的实践教学改革研究与探索[J].中国职业技术教育，2016（25）：67-69.

［5］范秀荣，李海燕 ，李振全 ，等.药师科普宣教进社区活动及效果评价分析[J].中国医院用 药 评 价 与 分析,2016,16(5):713-716.

齐墩果酸治疗缺血性心力衰竭的作用研究

钱铭，杨慧

（南京鼓楼医院药学部　江苏 南京 210008）

【摘要】目的：天然产物齐墩果酸（Oleanolic acid，OA）是临床应用的一种保肝药，具有抗癌、抗骨质疏松、抗肥胖、抗糖尿病、抗炎、免疫调节、抗氧化等多种生物活性，近年来研究发现 OA 能够缓解压力诱导的心肌重构，但其在缺血导致的心力衰竭中的作用尚不清楚，本研究旨在探究 OA 对缺血性心力衰竭（Ischemic heart failure，IHF）的治疗作用及其作用机制。**方法：**在动物水平上通过结扎小鼠冠状动脉左前降支构建心肌梗死模型，灌胃给予小鼠 OA（20 mg/kg/d）或 Metoprolol（40 mg/kg/d），连续给药 28 天。超声检测小鼠心脏功能，通过 HE 和天狼猩红检测小鼠心脏组织炎症浸润和纤维化，通过 TUNEL 染色检测小鼠心肌细胞的凋亡。在细胞水平上，预先加入不同浓度的 OA 处理细胞，构建心肌细胞缺氧模型，通过流式细胞术检测心肌细胞的凋亡。通过 Western blot 和 RT-PCR 检测心肌组织和细胞中 AMPK、ESRRA、凋亡基因和炎症因子的蛋白和 mRNA 表达变化。**结果：**OA 显著改善了 IHF 小鼠的心脏功能。与模型组相比，OA 能够降低心力衰竭小鼠心脏组织纤维化面积和胶原蛋白的表达，OA 组小鼠心脏中心肌细胞凋亡减少，心脏组织炎症浸润和炎症因子的表达减少。同时，OA 能够减少缺氧导致的心肌细胞凋亡以及心肌细胞炎症因子的表达。OA 增加了 IHF 小鼠心脏和缺氧诱导的心肌细胞中 AMPK 和 ESRRA 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结论：**OA 可能通过 AMPK-ESRRA 信号通路发挥抗炎、抗凋亡和抗纤维化作用，进而改善缺血性心力衰竭小鼠的心脏功能，为缺血性心力衰竭的治疗提供候选药物。

【关键词】OA；缺血性心力衰竭；凋亡；炎症；纤维化；心脏功能

The activation of PPARγ by natural flavonoids protects myocardial ischemia-reperfusion injury

Xingkai Qian[1,2,*], Yadi Zhu[3], Min Xu[1], Siyuan Yang[2], Guiyou, Liang[1,2]

（1. Center for Translational Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China. 2. Department of Cardiac Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou, China. 3. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China. ）

【**Abstract**】Reperfusion surgery is a treatment for ischemic cardiovascular diseases in clinical practice. Although many lives have been saved, myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) has become a major cause affecting the treatment of these diseases. Peroxidase proliferator-activated receptor-γ (PPARγ) agonists rosiglitazone and pioglitazone had a protective effect on MIRI in rats, and promote the expression of myocardial glucose transporter 4 after MIRI, increase myocardial glucose transport, uptake and utilization, and thus increase the possibility of myocardial cells to obtain energy. Objective: To screen the natural flavonoid PPARγ agonists and investigate the effect of PPARγ agonists on myocardial ischemia-reperfusion injury. Methods: Hek293 cell line transfected with luciferin plasmid was used as PPARγ agonist screening method, and 48 flavonoids were screened. The experiment was divided into control group, hypoxic reoxygenation group, positive drug group and experimental group. The positive drug group was pretreated with rosiglitazone and pioglitazone, which have been listed as PPARγ agonists. The experimental group used this experiment to screen natural flavonoids that had been verified to have an active effect on PPARγ. After hypoxia and reoxygenation, the expression levels of lactate dehydrogenase (LDH), creatine phosphokinase (CPK) and troponin (Tn) and the survival rate of cells were used to explore the influence of drugs on cell hypoxia and reoxygenation injury and whether they had a protective effect. Results: The results showed that oroxylin A, acacetin, diosmetin and hispidulin had strong excitatory effects on PPARγ. After pretreatment of H9C2 cells, the survival rate of H9C2 cells was higher than that of hypoxia group. The results of myocardial injury markers LDH, CPK and Tn showed that the expression level of the experimental group was lower than that of the hypoxia group, and the expression level of glucose transferase 4 was increased. Conclusion: oroxylin A, acacetin, diosmetin and hispidulin could improve myocardial ischemia-reperfusion injury by activating PPARγ.

【**Key Words**】Peroxisome proliferator-activated receptors γ; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Agonists; Flavonoids

药学监护对2型糖尿病患者治疗效果及并发症发生率的影响

乔熙雯，柏蓉，沈倩，张学会*

南京医科大学附属江苏盛泽医院药学部，江苏 苏州 215228

【摘要】**目的：**探讨药学监护对2型糖尿病患者治疗效果及并发症发生率的影响。**方法：**选择2019年7月-2019年12月收治的2型糖尿病患者100例，按照随机数字分为药学监护组（n=50）与对照组（n=50），对照组患者接受常规用药指导，药学监护组患者接受全程化药学监护，比较两组患者的用药依从性、治疗效果及并发症发生率。**结果：**药学监护组患者干预后的用药依从性得分显著高于对照组（P＜0.05），空腹血糖、餐后2小时血糖、糖化血红蛋白、血压的指标显著优于对照组（P＜0.05）；并发症的发生率低于对照组（P＜0.05）。**结论：**有效的药学监护可提高2型糖尿病患者对自身疾病的认知度，从而提高用药依从性，有效改善患者的血糖控制情况，减少相关并发症的发生。

【关键词】2型糖尿病；药学监护；血糖控制；并发症

Effect of pharmaceutical care on the treatment effect and complication rate of type 2 diabetes patients

QIAO Xi-wen,BAI Rong,SHEN Qian,ZHANG Xue-hui*

（Department of Pharmacy, Jiangsu Shengze Hospital, Nanjing Medical University, Suzhou 215228, China）

【**Abstract**】**Objective**：To explore the effect of pharmaceutical care on the treatment effect and complication rate of type 2 diabetes patients. **Methods**：100 patients with type 2 diabetes admitted from July 2019 to December 2019 were randomly divided into a pharmaceutical care group (n=50) and a control group (n=50). The patients in the control group received routine medication guidance, while the patients in the pharmaceutical care group received full course chemical pharmaceutical care. The drug compliance, treatment effect and complication rate of the patients in the two groups were compared. **Results**：The score of medication compliance in the pharmaceutical care group after intervention was significantly higher than that in the control group(P<0.05) .The indexes of fasting blood glucose, 2-hour postprandial blood glucose, glycosylated hemoglobin and blood pressure were significantly better than those of the control group(P<0.05).The incidence of complications was lower than that of the control group (P<0.05). **Conclusion**：Effective pharmaceutical care can improve the awareness of type 2 diabetes patients on their own diseases, thereby improving drug compliance, effectively improving patients' blood sugar control, and reducing the occurrence of related complications.

【**Key words**】Type 2 diabetes; Pharmaceutical care; Blood glucose control; Complications

糖尿病作为慢性病的一种，通常是由多种病因引起的以慢性高血糖为特征的终身性代谢性疾病[1]。由于血糖长期的升高，组织细胞耐受高血糖达阈值后，引发氧化应激、炎性反应、凝血机制等导致神经损伤、微血管病

第一作者：乔熙雯（1987-），女，本科，副主任药师，研究方向：临床药学，E-mail：123944299@qq.com。

通信作者：张学会（1981-），女，研究生，副主任药师，研究方向：医院药学，药事管理，药理学，E-mail：zhangxuehui111@163.com

基金项目：吴江区“科教兴卫”项目（wwk201814）；苏州市科技发展计划（医疗卫生科技创新-医学创新应用研究[第二批]）指导性项目（SKYXD2022011）

变，随病情进展，各器官受损程度加剧，最终导致产生多个并发症。临床数据显示，糖尿病发病 10 年左右，30%～40%的患者会发生一种或一种以上并发症，且并发症一旦产生，药物治疗很难逆转，因此对糖尿病患者应尽早预防，延缓糖尿病并发症的发生[2-4]。

我国糖尿病以 2 型糖尿病（T2DM）为主。该疾病因病程较长，患者需长期服用降糖药，部分患者因自我管理水平不高，导致其用药依从性较差，血糖未能得到有效控制，致使糖尿病相关并发症的发生。因此，需要为患者提供有效的药学监护。本研究探讨了药学监护对 2 型糖尿病患者的治疗效果以及并发症发生率的影响，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取我院内分泌科 2019 年 07 月至 2019 年 12 月收治的 2 型糖尿病患者 100 例为对象，纳入标准：①符合 WHO 的 T2DM 诊断标准；②参与研究者对研究实施的方法、目的等均知情并同意；③临床资料完整。排除标准：①已出现糖尿病相关并发症者；②合并严重脏器功能不全者；③合并自身免疫性疾病者；④自身存在明显营养不良者；⑤有重大疾病或威胁生命的疾病（器官功能衰竭，严重血液系统疾病，恶性肿瘤等)；⑥既往或现存精神疾病史者。

100 例患者照随机数字表法分为药学监护组（n=50）和对照组（n=50），其中药学监护组男 28 例，女 22 例，平均年龄（59.22±11.72）岁；对照组男 27 例，女 23 例，平均年龄（58.30±12.92）岁。两组患者的性别、年龄均无显著差异，P＞0.05。

1.2 方法

对照组患者只接受常规用药指导，包括药物的用法用量、注意事项等。监护组参照国外药学管理模式，对患者进行基本情况评估及建立患者个人用药档案表。以药师主导式和患者及家属共同参与式相结合的方式。包括：①用药教育：定期开展健康宣教，发放宣传手册。药师进行用药指导、开展用药咨询：包括口服降糖药、胰岛素用药指导；特殊人群药物治疗（如老年人、肝、肾功能不全者等）；特殊情况用药指导（如漏服、错服等情况）；同时每两周进行一次随访教育。不定期下社区开展健康教育咨询及讲座，提高患者及家属对糖尿病的相关知识和所用药物的了解以及糖尿病并发症相关知识介绍。②针对性心理指导，让患者明白疾病的理论知识以及治疗的配合度的重要性，使其主动提高自身依从性。③营养干预：根据患者具体情况为其推荐合理的饮食计划，禁烟禁酒，建立良好饮食习惯。④运动干预：鼓励患者每日多实施体育锻炼，控制体重，养成健康的生活作息，保证每日充足的睡眠。⑤与临床合作建立“病友俱乐部”，鼓励患者主动实施管理，每日对自身血糖及血压等指标记录，并定期汇总，组内成员定期举行会议进行交流，增加治疗积极性。

1.3 观察指标

记录患者相关指标：①患者各项临床指标：空腹血糖（FPG）、餐后 2 小时血糖（2hPG）、糖化血红蛋白（HbA1c）、血压等。②治疗依从性：患者的用药依从性判断参考 Morisky 推荐的评价服药依从性的有关问题[5]，自制问卷。1-4、6-7 题答“是”记 0 分“否”记 1 分；其中第 5 题，答“是”记 1 分“否”记 0 分；第 8 题备选答案为“从不”、“偶尔”、“有时”、“经常”、“所有时间”，相应记 1 分、0.75 分、0.50 分、0.25 分和 0 分。依从性程度：<6 分，依从性差，≥6 分且<8 分，依从性一般，得分 8 分为依从性好。③并发症：主要包括糖尿病相关并发症发生情况。详细见表 1。

表 1 用药依从性及并发症发生情况随访表

基本情况	姓名　　性别　　年龄 地址　　联系方式　　诊断		
指标监测			
用药情况			
用药依从	1.你是否有时会忘记服药？	□是□否	

<table>
<tr><td rowspan="8">性评价</td><td>2.在过去的 2 周内，是否有一天或几天您忘记服药？</td><td>□是□否</td><td rowspan="8">用药依从性
□好
□一般
□差</td></tr>
<tr><td>3.治疗期间，当您觉得症状加重或出现其他症状时，您是否未告知医生而自行减少药量或停止服药？</td><td>□是□否</td></tr>
<tr><td>4.当您外出旅行或长时间离家时，您是否有时忘记携带药物？</td><td>□是□否</td></tr>
<tr><td>5.昨天您服药了吗？</td><td>□是□否</td></tr>
<tr><td>6.当您自己觉得症状改善时，是否会自行停药？</td><td>□是□否</td></tr>
<tr><td>7.您是否觉得要坚持治疗计划有困难？</td><td>□是□否</td></tr>
<tr><td>8.您觉得要记住按时按量服药很困难吗？</td><td>□从不
□偶尔
□有时
□经常
□所有时间</td></tr>
<tr><td rowspan="2">糖尿病患者并发症发生情况</td><td colspan="2">急性并发症：□无 □糖尿病酮症酸中毒 □高血糖高渗透压综合征 □糖尿病乳酸性酸中毒 □其他</td></tr>
<tr><td colspan="2">慢性并发症：□无 □糖尿病肾病变 □糖尿病视网膜病变和失明 □糖尿病神经病变 □糖尿病下肢血管病变 □糖尿病足 □其他</td></tr>
<tr><td>不良反应</td><td colspan="2">□无 □有（详述）</td></tr>
</table>

根据患者的个人档案表进行随访,随访后对患者情况进行记录分析，与医师讨论后对患者进行个体化用药指导并进行监督执行。本研究为期 18 个月的随访，以最后一次随访时患者最近的复查结果为干预后的指标，对患者各项指标进行对比分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理分析，其中计数资料用[例(%)]表示，采用 x^2检验；计量资料用均数±标准差(x±s)表示，采用 t 检验。以 P＜0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者药学监护前后用药依从性

两组患者药学监护前根据随访表，用药依从性均较差，得分水平无显著差异（P＞0.05）；监护后，药学监护组患者的用药依从性得分明显高于对照组，两组差异有统计学意义（P＜0.05）。具体依从性得分见表 2。

表 2 两组患者干预前后用药依从性比较（$\bar{x} \pm S$）

组别	例数	用药依从性得分	
		干预前	干预后
药学监护组	50	5.195±1.388	7.185±0.740
对照组	50	5.270±1.431	5.765±1.071
t	-	0.265	7.174
P	-	0.791	0.000

2.2 两组患者药学监护前后临床的相关指标

两组患者在药学监护前，相关临床指标无显著差异（P＞0.05）；监护后，两组的 HbA1c、FPG、2hPG、DBP、SBP 水平均低于干预前，且两组监护前后的差异均有统计学意义（P＜0.05）。具体指标变化见表 3。

表 3 两组患者干预前后临床相关指标比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	糖化血红蛋白 HbAlc		空腹血糖 FBG		餐后 2h 血糖 2hPG		收缩压 SBP		舒张压 DBP	
		干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
药学监护组	50	8.50±1.67	7.55±1.30	8.38±2.47	6.35±1.35	11.57±2.19	9.39±1.63	133.08±1 5.55	120.96±1 3.27	81.50±8.85	74.34±6.72
对照组	50	8.56±1.85	8.31±1.53	8.52±2.40	7.59±1.79	11.34±2.21	10.74±1. 86	133.86±1 7.04	126.50±1 2.52	81.54±8.48	78.24±6.95
t	-	0.170	2.677	0.287	3.911	0.523	3.860	0.239	2.147	0.023	2.853
P	-	0.865	0.009	0.774	0.000	0.602	0.000	0.812	0.034	0.982	0.005

2.3 两组患者药学监护前后并发症发生率

比较药学监护组在监护后，患者并发症的发生率。药学监护组的并发症发生率为 4.00%（2/50），对照组的发生率为 18.00%（9/50），差异具有统计学意义(P<0.05)。具体见表 4。

表 4 并发症发生情况比较[例（%）]

组别	例数	2 型糖尿病性肾病	2 型糖尿病性视网膜病变	2 型糖尿病伴神经并发症	2 型糖尿病性周围血管病变	糖尿病足病	并发生发生例数合计
药学监护组	50	1（2.00）	0（0.00）	1（2.00）	0（0.00）	0（0.00）	2（4.00）
对照组	50	2（4.00）	1（2.00）	2（4.00）	3（6.00）	1（2.00）	9（18.00）
χ^2	-	-	-	-	-	-	5.005
P	-	-	-	-	-	-	0.025

3 讨论

2 型糖尿病是一种终身性疾病，患者需长期服药控制血糖。糖尿病患者随着病程的延长和血糖水平的控制不佳，可导致心脑血管、肾脏、眼及神经等多器官和组织的损伤，引发多种并发症[6]。研究指出，慢病管理模式可有效预防糖尿病并发症的发生，而传统的慢病管理模式暴露出“医药分离”的缺陷，其不利于患者疾病的长期治疗[7]。因此药师参与慢病管理已成为一种趋势。本次研究，旨在为 2 型尿病患者提供必要的药学服务，指导其合理用药，提高糖尿病患者的生活质量、降低糖尿病患者的并发症发生。本次调查结果表明，全程化药学监护可提高 2 型糖尿病患者对自身疾病的认知度，提高用药的依从性，从而减少不合理用药的发生，从而更好地控制血糖、血压等相关临床指标，提高患者的治疗效果。具体如下：

3.1 药学监护对用药依从性的影响

经多项研究显示[8]，在糖尿病患者长期用药的过程中易出现烦躁、焦虑等不良情绪，从而抗拒规律用药，同时，也有部分患者因担心长期服用降糖药物，引起相关不良反应而不按医嘱用药，或者自我感觉疾病稳定而自行减少用药剂量或频次、甚至自行停药。而较差的将严重影响患者血糖控制效果，增加并发症发生风险。本研究监护组干预后患者用药依从性显著提高，说明本研究所建立的药学监护模式，可通过个体化的药学监护，在与患者的沟通中，根据患者不同的情况，提供健康教育及药物知识，指导患者合理用药等，使患者对自身疾病、规律用药的重要性、依从性差的危害性有全面了解，可促进患者自我管理行为的提高，促进合理用药，提高用药依从性，降低不合理用药的发生率。患者规律用药，才能保证治疗效果及对疾病的控制程度。

3.2 药学监护对血糖控制的影响

FBG、2hPG 以及 HbA1c 是评估血糖控制的几个重要指标，其中 FBG 的异常主要反映了胰岛 β 细胞分泌胰岛素的功能发生障碍，而餐后血糖升高则引起日间血糖的波动，也是导致 HbA1c 升高的主要原因之一[9]。HbA1c 则可以反映近 2～3 个月的血糖变化，是长期血糖控制的重要监测指标，已被证明能直接预测糖尿病并发症的风险。这几个指标的控制在糖尿病代谢管理中具有重要的意义[10]，是延缓糖尿病进展及降低并发症发生率的关键。糖尿病的慢性并发症包括：糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变、糖尿病下肢动脉病、糖尿病足病等。有多项大型临床随机试验证明，强化血糖控制对慢性并发症有显著影响，可以降低糖尿病慢性并发症的发生率与死亡率[11]。代喆等[12]研究了 712 例 2 型糖尿病患者的并发症，通过对血糖监测获得数据，计算血糖波动指数。其结果表明：血糖波动可能与 2 型糖尿病视网膜病变和大血管病变相关，并且血管并发症发生的风险与血糖波动幅度呈正相关。Cardoso[13]等对 654 例 2 型糖尿病患者平均随访 9.3 年发现，HbA1c 变异度在血糖控制良好的患者（平均 HbA1c≤7.5%）中可以作为 2 年内糖尿病视网膜病变进展的显著风险预测因子。因此，良好的血糖控制，可预防或减少慢性并发症的发生。

本研究结果显示，药学监护组在干预后患者的 HbA1c、FPG、2hPG 均低于对照组，这说明，全程化的药学监护，为患者提供用药指导、药物不良反应监测、特殊情况（漏服、错服等）的处理、药物副作用的应对等，可以较大程度地提改善血糖控制的情况。

3.3 药学监护对血压控制的影响

UKPDS[14]研究结果显示，在新诊断的糖尿病患者中，严格控制血压能显著降低大血管病变以及微血管病变的发生风险。严格的血压控制可使糖尿病的相关并发症发生率下降 20%左右[15]。降糖治疗的同时，控制血压，可降低心血管疾病的风险[16]。因此，对于 2 型糖尿病患者，药学监护的重点在关注患者血糖水平的同时，还要关注患者的血压，对于血压>120/80 mmHg 的患者，应进行生活方式干预，以预防高血压的发生，生活方式干预包括：合理膳食、控制钠盐摄入、增加钾钙镁、膳食纤维的摄入、控制体重，保持运动、戒烟限酒等。当糖尿病患者的血压≥140/90 mmHg 时给予抗高血压药治疗，密切关注患者的血压变化，用药依从性及不良反应等方面。药学监护应结合病人的疾病情况，制定个体化的目标，将血压控制在合理范围内，从而最大限度地帮助病人降低发生不良事件的风险。在监护期间，准确、综合评估 T2DM 患者各项指标,包括血糖控制情况、血压状况、是否合并其他疾病等，同时结合其用药方案，与临床医师积极探讨，综合分析病人情况，制定合理且安全的血压控制目标并定期随访。本研究结果显示，药学监护组在干预后血压指标水平较研究前均显著降低，说明合理有效的药学监护，对于患者血压的改善及控制具有重要作用，从而延缓并发症发生。

3.4 药学监护对并发症发生率的影响

对 T2DM 患者而言，疾病早期单纯的血糖升高以及对糖尿病相关并发症知识的容易引起患者忽视。有研究指出，提高 T2DM 患者对疾病的认知水平，可减少导致其发生糖尿病并发症的危险因素，降低糖尿病并发症的发生率[17]。因此，对糖尿病患者开展药学监护，提高患者对糖尿病的知识掌握，让患者了解糖尿病并发症包括哪些，引起并发症的机制，并发症发生的危害，让患者充分认识到发生糖尿病并发症风险性，促使患者从主观认知方面发生转变，激发患者产生改变自我管理行为的意向，从而主动学习糖尿病自我管理知识，改善自我管理行为，以期减少并发症的发生。本次研究通过为期 18 个月的药学监护，药学监护组共发生糖尿病相关并发症 2 例，对照组 9 例，并发症发生率有显著差异，这种命，有效的药学监护，能够提高患者的治疗效果，改善患者的糖代谢状况，从而控制患者的疾病进展，并从一定程度上预防相关并发症的发生，提高生活质量。

综上所述，对 2 型糖尿病患者进行药学监护，有助于控制患者血糖情况，促进合理用药，提高用药依从性及自我管理行为，降低不良事件的发生率，同时增加对药学服务的满意度以及信任度，有较好的临床应用价值，也可为临床药师参与慢病管理提供新的思路。

参考文献

[1] 迟家敏主编.实用糖尿病学[M].北京:人民卫生出版社,2008.

[2] 中华医学会糖尿病学分会.中国血糖监测临床应用指南(2011 年版)[J]. 中华医学杂志, 2011,91(10):656-664.

[3] 吕登智,白荣莉,王玮,等.综合管理对 2 型糖尿病患者血糖控制及减少并发症的效果分析[J].检验医学与临床,2017,14(17):2578-2580.DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.17.031.
[4] 武淑俊.糖尿病并发症的发病机制及治疗研究进展[J]. 中国处方药,2021,19(11):69-70.
[5] 翁艳君,赵豫梅,刘伟军,等.中文版 8 条目 Morisky 服药依从性量表在 2 型糖尿病患者中的信效度评价及应用研究[J].中华临床医师杂志（电子版）,2018,12(8):445-450.
[6] 李炼.老年 2 型糖尿病慢性并发症的临床研究[J].中国老年学杂志,2019,39(18):4619-4622.
[7] 何粤红,杨春霞,于海燕,等. 浅析慢病管理的药学服务新模式[J].世界最新医学信息文摘,2017(89):231.
[8] Lee, HyunjaeChoi, Tae KyuLee, Young Bum, et al. A graphene-based electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy[J]. Nature nanotechnology, 2016,11(6):566-572.
[9] 张岩岩.空腹血糖、餐后 2h 血糖、糖化血红蛋白检测在糖尿病诊断中的临床价值[J].糖尿病新世界,2022,25(8):37-39,43.
[10] 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南（2020 年版）[J].中华糖尿病杂志, 2021,13(4):315-409.
[11] 母义明,纪立农,杨文英,等. 中国 2 型糖尿病患者餐后高血糖管理专家共识[J]. 中国糖尿病杂志,2016,24(5):385-392.
[12] 代喆,季振中,王桦,等. 2 型糖尿病患者血糖波动与血管并发症的关系及其相关因素分析[J].中华糖尿病杂志,2012,4(10):618-624.
[13] Cardoso C. R. L.,Leite N. C.,Moram C. B. M.,等.Long-term visit-to-visit glycemic variability as predictor of micro- and macrovascular complications in patients with type 2 diabetes: The Rio de Janeiro Type 2 Diabetes Cohort Study[J].Cardiovascular Diabetology.2018,17(1).
[14] Turner R.Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). Lancet.1998 Sep 12;352(9131):854-65.
[15] Cooper DeHoff RMGong YHandberg EM, et al. Tight blood pressure control and cardiovascular outcomes among hypertensive patients with diabetes and coronary artery disease.[J]. JAMA: the Journal of the American Medical Association,2010,304(1):61-68.
[16] Ilkun OL,Greene T,Cheung AK,et al. The Influence of Baseline Diastolic Blood Pressure on the Effects of Intensive Blood Pressure Lowering on Cardiovascular Outcomes and All-Cause Mortality in Type 2 Diabetes[J]. Diabetes care,2020,43(8):1878-1884.
[17] 孙秋英,金小龙,金琳.规范化糖尿病自我管理教育的有效性分析[J].中国实用护理杂志,2017,33(25):1930-1933.

基于“单胺假说”研发快速起效抗抑郁新靶标 SERT-nNOS 及其干预药物

秦亚娟

（南京医科大学药学院　江苏 南京 210000）

【摘要】中缝背核脑区 5-HT1A 自身受体脱敏是 5-HT 再摄取抑制剂类抗抑郁药物延迟起效等副作用的根源。我们发现 DRN 区的 SERT-nNOS 蛋白互作是快速抗抑郁新靶标，促偶联化合物 Sakura-6 和 Sakura-8，DRN 区注射 Sakura-6 (2 h 后)诱发抑郁样行为，干预化合物 ZZL-7 给药 2 小时后快速起效抗抑郁，不依赖于 5-HT1A 自身受体脱敏。由于 ZZL-7 是肽类化合物，在生物体内可能存在易酶解、生物利用度不高的缺点。我们又开发了基于吲哚的非肽的 SERT-nNOS 偶联抑制剂。

目前临床上抗抑郁药物主要是基于“单胺假说”研发，该假说认为抑郁患者神经突触间隙可有效利用的单胺类神经递质浓度明显下降，升高突触间隙单胺递质浓度（主要是 5-羟色胺）能发挥抗抑郁作用。基于该理论开发了 5-羟色胺和去甲肾上腺素双重再摄取抑制剂，选择性 5-HT 再摄取抑制剂（Selective Serotonin Reuptake Inhibitors，SSRIs，氟西汀、西酞普兰、帕罗西汀、舍曲林等）。然而，5-羟色胺再摄取抑制剂类药物存在严重缺陷：①延迟起效，服药 2-3 周甚至更长的时间才开始起效，无法挽救急性自杀抑郁症患者；②有效率低、仅对部分患者有效；③疗效不稳定，甚至会加重症状导致自杀。

位于脑干的中缝背核（DRN）是脑内 5-HT 主要来源，DRN 内的 5-HT 能神经元投射到前额皮层（PFC）、海马、下丘脑等部位，释放 5-HT 激活前额皮层、海马等部位突触后膜上的 5-HT_{1A} 受体（5-HT_{1A}R）发挥情绪调节作用。SSRIs 阻断 5-HT 神经元投射到海马和皮层等突触前 SERT，抑制 5-HT 再摄取，升高突触间隙 5-HT 浓度，激活突触后膜 5-HT_{1A}R，发挥抗抑郁作用；但 SSRIs 同时阻断 DRN 区 5-HT 能神经元体树突的 SERT，升高 DRN 区的 5-HT，激活 5-HT_{1A} 自身受体（5-HT_{1A} Auto Receptor）5-HT_{1A} 自身受体是抑制性受体，它的激活抑制 5-HT 能神经元放电，导致释放到突触间隙的 5-HT 减少，发生负反馈作用，诱导甚至加重抑郁。

选择性 5-HT 再摄取抑制剂无选择性地阻断了海马和皮层等突触后部位和 DRN 突触前 SERT，其发挥疗效依赖 DRN 区 5-HT_{1A} 自身受体脱敏-负反馈消失过程。这就导致了氟西汀等 SSRIs 代表性药物早期没有效果，需要等到 DRN 脑区 5-HT_{1A} 自身受体脱敏后，才能显现抗抑郁效果；5-HT_{1A} 自身受体脱敏的不稳定，也导致了部分患者无效、疗效不稳定等其它缺陷；甚至一旦 5-HT_{1A} 自身受体脱敏受阻会导致 DRN 区负反馈作用进一步加强，皮层、海马等突触后组织 5-HT 急剧减少，甚至会加重抑郁症状导致患者自杀。

我们发现并确证了 DRN 的 SERT-nNOS 蛋白-蛋白相互作用是快速抗抑郁新靶标，促偶联化合物 Sakura-6 和 Sakura-8，DRN 区注射 Sakura-6 (2 h 后)诱发抑郁样行为，而在 mPFC 和 vHPC 脑区定点给药，却不能诱发抑郁样行为。该发现，也证实了 DRN 脑区 SERT-nNOS 偶联与抑郁症相关联。干预化合物 ZZL-7 给药 2 小时后快速起效抗抑郁，不依赖于 5-HT_{1A} 自身受体脱敏。

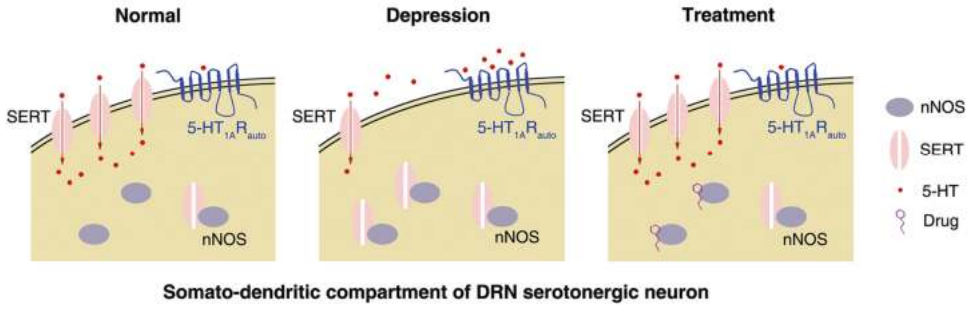


图 1 DRN 脑区 SERT-nNOS 解偶联剂可以快速起效抗抑郁，不依赖于 5-HT1A 自身受体脱敏

由于 ZZL-7 是肽类化合物，在生物体内可能存在易酶解、生物利用度不高的缺点。我们又开发了基于吲哚的非肽的 SERT-nNOS 偶联抑制剂。其中，苯环的邻甲基羧基可有效模拟 SERT 羧基末端 0 位的 Val，吲哚环氮原子的侧链模拟 SERT -1 位氨基酸，吲哚环的 3 位模拟-2 位氨基酸，吲哚环的 2 位模拟-3 位氨基酸。SERT 的羧基末端四肽是 LNAV，基于吲哚骨架，我们合成了系列的吲哚衍生物，其代表性化合物 SW-9 显示出具有良好的体内外解偶联活性，并在动物模型中体现快速抗抑郁作用。

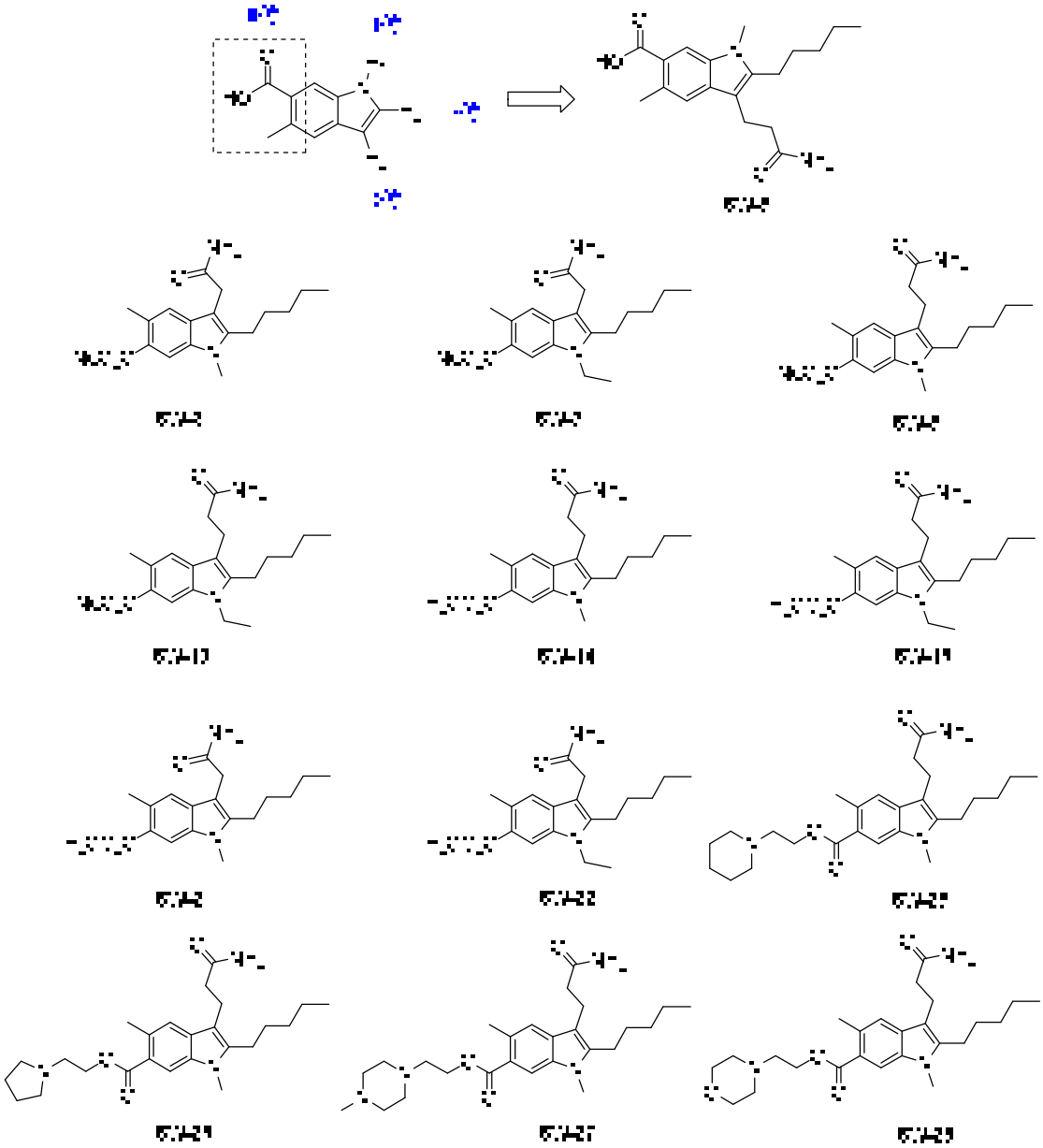


图 2 SERT-nNOS 解偶联剂 SW-9 系列小分子化合物

参考文献：

1. Sun N, Qin YJ, Xu C, Xia T, Du ZW, Zheng LP, Li AA, Meng F, Zhang Y, Zhang J, Liu X, Li TY, Zhu DY, Zhou QG. Design of fast-onset antidepressant by dissociating SERT from nNOS in the DRN. Science. 2022, 378(6618):390-398.

2. 周其冈,厉廷有,秦亚娟,朱东亚. 一种发挥快速抗抑郁效应的二肽类化合物及其应用[P]. 江苏省：CN113831391A, 2021-12-24.

3. 朱东亚,厉廷有,周其冈,秦亚娟. 一类吲哚衍生物及其制备方法和应用[P]. 江苏省：CN113717091B, 2023-03-10.

基于 ECRSI 法的口服药品单剂量配方制自动核对模式的建立与优化

邱婷婷，闫盈盈，张毓宸，张晨辰，程吟楚，孔宪伟，杨毅恒*

(北京大学第三医院药剂科，北京 100191)

【摘要】**目的：**构建某三甲医院口服药品单剂量配方制自动核对模式并优化。**方法：**通过成立小组、现状分析、流程再造构建自动核对模式，其中流程再造环节采用 ECRSI 法，通过取消、合并、调整、简化、增加五个原则梳理构建模式。对硬件串联问题和软件假阳性报错率过高问题进行优化，比较两种模式的效率和外部差错率。**结果：**构建了口服药品单剂量配方制自动核对模式。优化后假阳性报错率从 9.03%下降到 5.28%，显著降低(P<0.05)。优化后自动核对模式可显著提高工作效率(P<0.05)。外部差错率从 0.039‰下降到 0.015‰，自动核对模式显著降低出门差错(P<0.05)。**结论：**基于 ECRSI 法的单剂量配方制自动核对模式的建立与优化可以有效降低外部差错并提高工作效率，保证患者用药安全。

【关键词】单剂量配方制；ECRSI；自动核对

Construction and optimization of automatic checking mode for Unit Dose Dispensing System of oral drugs based on ECRSI method

Qiu Tingting, Yan Yingying, Zhang Yuchen, Zhang Chenchen, Cheng Yinchu, Kong Xianwei, Yang Yiheng*

(Department of Pharmacy, Peking University Third Hospital, Beijing 100191)

【**Abstract**】**Objective：** To construct and optimize the automatic checking mode of the unit dose dispensing system in a Grade A tertiary hospital. **Methods：** The automatic checking mode was constructed through group formation, current situation analysis, and process reengineering. ECRSI method was adopted in process reengineering, and the construction mode was organized through five principles of Eliminate, Combine, Rearrange, Simplify, and Increase. The hardware series problem and the high false positive error rate of the software were optimized, and the efficiency and external error rates of the two modes were compared. **Results：** An automatic checking mode for unit dose dispensing system of oral drugs was established. After optimization, the false positive error rate decreased from 9.03% to 5.28%, and the false positive error rate decreased significantly (P<0.05). The optimized automatic check mode significantly improved work efficiency (P<0.05). The external error rate decreased from 0.039‰ to 0.015‰, and the automatic checking mode significantly reduced the external error rate (P<0.05). **Conclusion：** The establishment and optimization of the automatic checking mode of the unit dose dispensing system based on ECRSI method can effectively reduce external error and improve work efficiency, ensuring the medication safety of patients.

【**Key words**】Unit Dose Dispensing System；ECRSI；Automatic check

邱婷婷（1981 年），女，北京，主管药师，硕士学位，临床药学，E-mail: 13661350431@163.com，https：//orcid.org/ 0000-0001-7192-4778.

杨毅恒（1968 年），女，主任药师，硕士学位，药事管理，13661350431@ qq.com

单剂量配方制(Unit Dose Dispensing System，UDDS)，又称为单元调剂或单剂量配发药品，即调剂人员把患者所服用的各种固体制剂按照一次服用剂量，借助全自动单剂量药品分包机(Automatic medicine machine, ATC)单独包装，能做到准确配发、表示清晰以及药品卫生安全，对保证药品使用的正确性、安全性以及提高住院药房的工作效率具有重要的意义[1,2, 3]。目前，对于 UDDS 的核对环节，大多数医疗机构采用人工核对模式，需要药师肉眼核对药袋中药品品种是否正确，数量是否与实际医嘱数量相符（多药、少药、无药、串袋、碎片现象）等[4-6]。然而，许多口服药品在去除原包装后，片形、颜色和厚度都很相似，尤其是白色片剂，且在没有任何标识的情况下难以辨认。人工核对存在品种不易识别隐患和视觉疲劳漏检隐患，且人工核对效率有待提高。

自动核对机(Automatic medicine detection machine, MDM) 可以辅助药师更快更准确地检测分包药袋。用自动核对模式替代人工核对模式将是未来发展的方向。我院于 2020 年底引进一台品牌为 Global Factories BV 的荷兰产型号为 MDM 2 series 的片剂自动核对机，由于 MDM 在国内刚刚起步，缺乏可借鉴的应用经验[7]，本文将比较人工核对模式与自动核对模式的外部差错率、效率，并对硬件串联问题和软件假阳性过高的问题进行解决与优化，以期为同行提供参考。

1 方法

ECRSI 分析法是在 ECRS 分析法的基础上增加了另一原则“增加(Increase)”，是工业工程学中程序分析的基本方法。通过过程价值分析，可以发现过度、不合理、不经济、非必要的工序。通过取消 (Eliminate)、合并(Combine)、调整(Rearrange)、简化 (Simplify)、增加(Increase)，优化流程，提高工作效率、工作质量和操作效果[8]。

1.1 成立流程再造小组 由药剂科主任、住院药房组长、组员、核对机工程师组成。药剂科主任负责总体流程规划；组长负责分析观察组流程存在的问题，并且对流程进行制定、修改、再造；组员对流程执行情况做到监督检查和质量分析；工程师负责系统流程再造的技术支持。

1.2 现状分析 我院在项目实施前采用人工核对的模式，即住院药房药师登陆 HIS 系统审核患者用药的合理性，确认后发送至 ATC 进行分包，由两位药师根据药袋信息人工核核对患者病区、姓名、品种、数量与药袋打印信息的一致性。由于 ATC 包药时会存在碎片、多出少漏、串袋等问题[6,9]，药师进行校正错误后再发放临床。人工核对模式的流程如图 1。

1.3 流程再造

1.3.1 建立自动核对模式 使用 ECRSI 法结合口服药品人工核对模式的流程图，对住院药房口服药品调剂、核对的全流程各环节步骤进行重新整合重组。ECRSI 分析法思路如图 2 所示。针对原因对象（人工核对的弊端）消除人工核对的操作；针对方法对象，增加 MDM 自动核对，同时将两位药师人工核对简化为一台 MDM 自动核对；针对程序对象，将片剂调配核对流程进行合并和重排，减少一名药师配备。

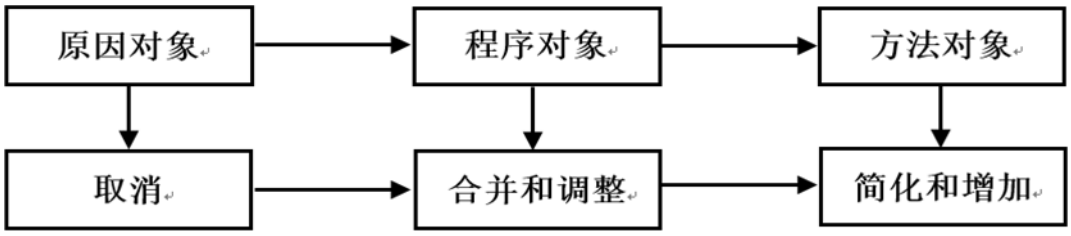


图 1 人工核对模式的流程

Figure 1 The process of manually checking patterns

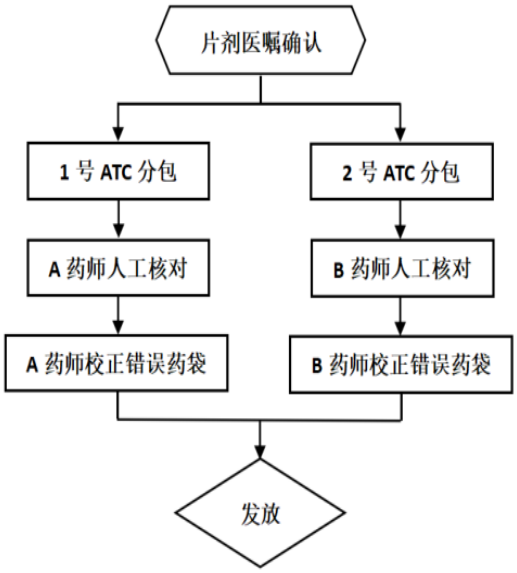


图 2 ECRSI 分析法思路图

Figure 2 ECRSI analytical method diagram

1.3.2 两种模式的特点比较

单剂量配方制人工核对模式存在隐患，体现在品种不易识别隐患和视觉疲劳漏检隐患，且人工核对效率有待提高，核对速度存在个体差异，偶发延误药品及时送达临床的情况。自动核对优点是准确识别检测、方便追溯信息、提高核对效率。但是自动核对存在设备串联问题，以及假阳性报错率过高问题。

1.4 自动核对模式优化

1.4.1 硬件串联优化 ATC 产出的药袋进入 MDM 时，需要增设一名药师，由药师手工导入 MDM。同时，为了保证药袋在 MDM 内不会翻拧和出现卡顿，药师需要手工在进口处捋顺药袋，不仅耗费人力资源，而且还不利于提高效率。为此我药房发明了一种住院药房用防药袋翻拧的连接装置 [10]，解决上述硬件串联问题。

1.4.2 软件性能优化 统计自动核对模式下的 10 个病房，每个病房统计 10 次，报错总数与真阳性和假阳性的数据，进行假阳性类别分析，针对分析结果进行软件性能的优化。

1.5 观察指标

1.5.1 比较核对机优化前后假阳性的报错率 比较优化前（2021 年 7-12 月）和优化后（2022 年 4-9 月），每种核对模式下的 10 个病房，每个病房统计 10 次，不同类别导致的假阳性报错率。

1.5.2 比较人工核对模式与优化前自动核对模式的工作效率 选取 10 个病房（内科系统 6 个病房，外科系统 4 个病房），每个病房各统计 10 次，统计 2020 年 7-12 月人工核对模式与 2021 年 7-12 月自动核对模式平均每袋的核对用时。

1.5.3 比较人工核对模式与优化后自动核对模式的工作效率 测算 2022 年 4 月-9 月优化后 10 个病房，每个病房 10 次的平均每袋的核对用时，与 2020 年 7-12 月人工核对模式的核对用时进行比较。

1.5.4 比较人工核对模式与自动核对模式的外部差错 对 2020 年 7-12 月人工核对模式与 2021 年 7-12 月优化前自动核对模式及 2022 年 4-9 月优化后自动核对模式的外部差错进行对比。

1.6 统计方法 对于连续变量，符合正态分布的计算均值、标准差，组间比较采用 t 检验；非正态的计算中位数、四分位数，组间比较采用秩和检验。对于分类变量，计算频数和构成比，组间比较采用卡方检验，统计处理分析软件采用 SPSS 25，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自动核对模式的建立 2021 年 1 月通过 ECRSI 分析法确定自动核对模式的流程，药品经过 ATC 分包后可

用第一作者发明授权的连接装置[10]输送入 MDM。预先通过 MDM Pill Programmer 软件多光谱拍摄每种药品可能会出现的各种状态的照片并保存，作为参照标准。自动核对系统直接从 ATC 数据库中接收医嘱信息，作为药品核对时的信息依据。通过扫描单剂量药袋上的条形码来检索与该袋药品对应的医嘱信息，根据医嘱信息确定该袋药品的种类和数量信息，然后与接收到的医嘱信息进行比对，如果发现不正确的药包，系统报警提示。药师鉴别核对结果真假阳性，改正错误药包，形成了完整的自动核对链条。实施 ECRSI 分析法重整后的流程见图 3。

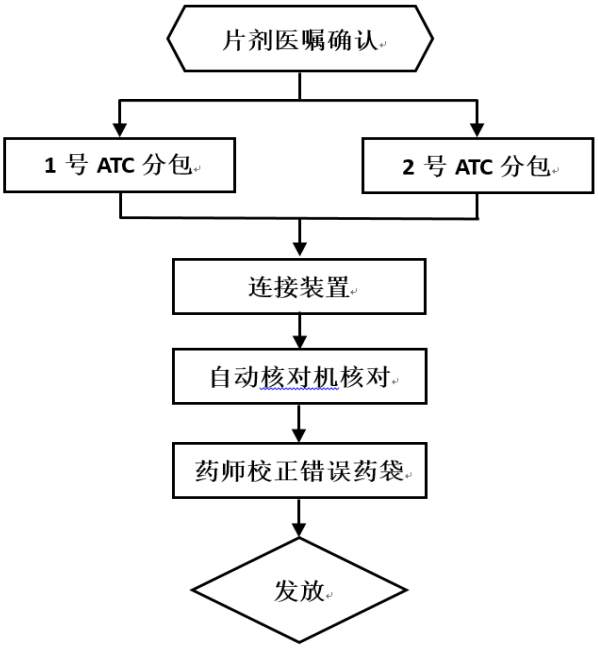


图 3 自动核对模式流程图

Figure 3 Automatic check pattern flow chart

2.2 软件性能优化内容及效果 通过人工核对与自动核对模式的工作效率比较发现，核对机假阳性报错偏多，核对机总耗时既包括过机耗时也包括药师辨别真假阳性耗时，假阳性报错会影响工作效率。因此分析假阳性报错类型，并且针对性地加以解决，可优化核对机性能。假阳性报错类型及解决方案见表 1。此外通过软件调整，实现过滤掉正确的图片显示，只显示报警图片信息，使得对报警图片的显示更加明显。

表 1 核对机假阳性报错类型及解决方案

Table 1 Automatic medicine detection machine false positive error types and solutions

假阳性类型	解决方案	关键技术环节
阴影	调整照相机光圈，同步闪光灯曝光时间，调整背景光亮度。对照片的颗粒调整，改变阴影边界。色差和透明度调整，改变药品的识别精度。对部分药品模型宽容度调整，实现对部分不规则药品的模型通过率提高（如边缘切角虚化）。经测试该调整不会改变因模型数量变化导致的错误报警。	光圈、曝光时间、亮度、色差、透明度、宽容度
半片	升级软件，处理处方信息为整片加半片的错误报警问题。如药品用量 1.5 片，修改前会报错。现版本软件会做数据拆分，拆成一片和 0.5 片，解决报错问题。部分照片重录，并添加颜色识别功能。	软件进行数据拆分

重叠、竖立、并行	通过调整皮带张紧度，增加均衡器抖动幅度，调整设备分离器高度（均衡器由于部分药品质地松散，抖动幅度加大时易出现抖碎情况；设备分离器高度由于药片大小形状差异较大不能充分分离）。	皮带紧张度，均衡器抖动幅度，分离器高度
条形码/二维码误报	条码，二维码在药包的打印浓度、密度较大，设备会误认为是药品，所以出现报错。调整药袋模板，将条形码宽度和二维码图片面积扩大，降低密度，提高设备识别。	药袋模板，扩大图片面积
信息传输错误	清理数据库内容，并设置定期清理时间点，减少数据积压完成的错误，通过降低药包过机速度，即一个科室药品完全通过设备后再放下一科室。	数据库清理，过机速度

优化前测试 12190 袋，核对机总报错 1136 袋中真阳性 35 袋，假阳性 1101 袋，优化后测试 13100 袋，核对机总报错 746 袋中真阳性 54 袋，假阳性 692 袋。不同类别假阳性报错对比见表 2。优化前优化后假阳性报错率从优化前的 9.03%下降到 5.28%，经过卡方检验，$P<0.05$，有显著性差异。假阳性类型中，除了半片假阳性报错优化前后没有显著性差异外，其他类型优化后比优化前均有显著性改善。

表 2 核对机优化前后不同类别假阳性报错比较

Table 2 Comparison of different types of false positive errors before and after the optimization of the Automatic medicine detection machine

项目	核对机假阳性							假阳性报错率
	阴影	半片	重叠	竖立	并行	条形码/二维码误报	信息传输错误	
优化前（n=12190）	302	201	34	344	23	135	61	9.03%
优化后 (n=13100)	143	194	19	242	6	70	18	5.28%
卡方检验 *P* 值	<0.001	0.062	0.005	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 工作效率比较

2.3.1 人工核对与优化前自动核对模式的工作效率比较

比较两种模式下 10 个病房每个病房 10 次的平均用时，自动核对用时比人工核对用时的提升率在 12.99%~26.22%之间，除 2 个病房外（心血管内科、肾脏内科），其余 8 个病房有显著性差异（$P<0.05$），见表 3。

表 3 人工核对与优化前自动核对耗时（秒）的比较

Table 3 Comparison of manual check time (seconds) with automatic check time before optimization

科室	人工核对		优化前自动核对				提升率（%）	t 检验	
	总耗时	每袋平均耗时	过机耗时	辨别真假阳性耗时	总耗时	每袋平均耗时		t 值	p 值
心血管内科	1905	1.75±0.26	1074	584	1658	1.54±0.22	12.99	2.050	0.065
肾脏内科	2323	2.09±0.52	1148	775	1923	1.71±0.20	16.99	2.209	0.051
神经内科	2903	1.65±0.26	1657	689	2346	1.33±0.16	19.39	3.537	0.005
风湿免疫科	2442	1.64±0.31	1442	669	2111	1.42±0.14	13.41	1.837	0.049

心内监护	2556	1.58±0.24	1550	649	2199	1.35±0.21	14.10	3.070	0.033
内分泌科	1594	1.49±0.25	1006	333	1339	1.27±0.13	16.00	2.610	0.018
心脏外科	2551	1.69±0.10	1436	654	2090	1.39±0.06	18.24	6.584	0.045
介入科	1742	1.88±0.39	921	366	1287	1.41±0.18	26.22	3.593	0.005
胸外科	1332	1.56±0.16	841	251	1092	1.30±0.18	17.83	3.047	0.003
骨科	1550	1.66±0.41	928	221	1149	1.25±0.09	26.19	3.034	0.012

2.3.2 人工核对与优化后自动核对模式的工作效率比较

优化后自动核对模式与人工核对模式每袋单剂量配方的平均耗时相比，经过 t 检验，*P* 均小于 0.05，效率有显著性提高，见表 4。

表 4 人工核对与优化后自动核对耗时（秒）的比较

Table 4 Comparison of manual and automatic checking time (seconds) after optimization

科室	人工核对 每袋平均耗时	优化后自动核对 每袋平均耗时	优化后与人工核对 t 检验 P 值
心血管内科	1.75±0.26	1.43±0.35	0.032
肾脏内科	2.09±0.52	1.44±0.07	0.001
神经内科	1.65±0.26	1.31±0.17	0.003
风湿免疫科	1.64±0.31	1.21±0.08	<0.001
心内监护	1.58±0.24	1.29±0.03	0.004
内分泌科	1.49±0.25	1.22±0.11	0.007
心脏外科	1.69±0.10	1.30±0.11	<0.001
介入科	1.88±0.39	1.16±0.12	<0.001
胸外科	1.56±0.16	1.23±0.12	<0.001
骨科	1.66±0.41	1.12±0.15	0.009

2.4 人工核对与自动核对模式的外部差错率比较

比较 2020 年 7-12 月人工核对模式，2020 年 7-12 月优化前自动核对模式与 2022 年 4-9 月优化后自动核对模式的单剂量配方袋数，出门差错件数，以及外部差错率，见表 5。优化前自动核对模式与人工核对模式相比，经过卡方检验，*P*=0.018。优化后自动核对模式与人工核对模式相比，经过卡方检验，*P*=0.003，有显著性差异，自动核对模式可以显著降低外部差错率。

表 5 人工核对模式与优化前后自动核对模式的外部差错比较

Table 5 Comparison of external errors between manual check mode and automatic check mode before and after optimization

	人工核对模式	优化前自动核对模式	优化后自动核对模式
单剂量配方袋数	718746	850813	971801
出门差错件数	28	16	15
出门出错率	0.039‰	0.019‰	0.015‰

3 讨论

《关于加快药学服务高质量发展的意见》提出 “两个转变”，核心就是让药学服务贴近患者、贴近临床、贴近社会[11]。然而，摆在国内广大药师面前的最大问题是如何从药品调剂的繁重劳动中解放出来，以便有时间和精力参与更高层次的药学服务工作[12]。目前绝大多数医疗机构单剂量配方制的核对仍然是采用人工核对，效率欠佳的同时，存在药师不易识别裸片品种和漏检的安全隐患。自动核对模式的建立，不仅可以提高工作效率，更有利于降低 UDDS 外部差错，保障患者用药安全。但是因为进口自动核对机存在与全自动单剂量药品分包机的串联问题，以及软件假阳性报错率过高问题，阻碍了医疗机构全面使用自动模式对单剂量配方制进行核对。

针对设备之间串联问题，我们发明并得到国家知识产权局授权的实用新型专利一项。该专利为一种住院药房用防药袋翻拧的连接装置，入口与 ATC 的输出口联通，连接本体的侧壁上设有可拆卸连接的稳定件。连接本体侧壁向中心倾斜，形成倒置的截头四棱锥形。通过设置与 ATC 的输出口相匹配的入口和斜坡可以使药袋顺畅平整地滑落，并且保证药袋平整的进入 MDM，以避免药袋在 MDM 中卷曲和翻拧。

软件假阳性报错率过高，会影响工作效率，优化前自动核对模式与人工核对模式相比，10 个测试科室中有 2 个科室的每袋耗时并没有显著性差异(P>0.05)。因为自动核对模式总耗时既包括过机耗时也包括药师辨别真假阳性耗时，因此针对关键技术环节上进行优化，优化后测试均有显著性差异(P<0.05)，自动核对模式显著提高工作效率。

通过我院住院药房的实践，构建了单剂量配方制的自动核对模式，并针对硬件串联问题发明专利，优化软件假阳性报错率，有效降低外部差错并提高工作效率，保证患者用药安全。该项目具有普适性和推广性，经验可供同行借鉴。

参考文献

[1]朱爱江,刘艳.全自动药品单剂量分包机在本院我院药房的应用体会[J].天津药学，2017, 29(6):72-74.

[2]胡锋,胡子燕,邵丽晓.全自动药品单剂量分包机在我院药房的应用情况与差错分析[J].海峡药学,2016,28(1):223-224.

[3]闫冬良,高平.浅谈在药学教育中传递正能量[J]卫生职业教育,2015,33(07):7-9.

[4]吴丽嫦,林桂锋,林颖,等.住院药房自动包药机的应用体会[J].中国处方药，2016，14(2):34-35.

[5]蔡卓倩,宋惠珠,杨华,等.品管圈在提高全自动摆药机分包前流程效率中的应用[J].中国药房,2017,28(13):1801-1804.

[6]林璇.全自动单剂量药品分包机在住院药房的应用[J].中国处方药,2020,18(4):62-63.

[7]徐萍蓉,邓小红,苏兰,等.我院自动包药机单剂量调剂模式实施情况及体会[J].中国药房,2011,22(41):3920-3921.

[8]Liu X b, Bo H G, Ma Y, et al. An improved fuzzy approach to planning and scheduling problems in hybrid distributed MES. Proceedings of the 3rd International Conference, 2006, Springer2Verlag, Vol.(2006):929-932.

[9]谢群莉.全自动单剂量药品分包机应用的利弊与建议[J]中国乡村医药.2018, 25(09):65-66.

[10]邱婷婷,赵荣生,杨毅恒,孔宪伟.一种住院药房用防药袋翻拧的连接装置：CN215689893 U[P].2022-02-01.

[11]卫生健康委员会,中医药管理局.关于加快药学服务高质量发展的意见(国卫医发[2018]45 号)[EB/OL]. (2018-11-23)[2023-1-20].http://www.gov.cn/xinwen/2018-11/28/content_5344128.htm.

[12]寿张轩,金雪.自动化建设给我院门诊药房带来的改变[J]中国药房.2012, 23(01):45-47.

基于 MBO 的住院药房岗位胜任力分级分类培养教学体系的构建和实施

邱婷婷，孔宪伟，董淑杰，王海滢，韩艳颖，杨丽

北京大学第三医院药剂科，北京 100191

【摘要】目的：基于目标管理法，构建住院药房岗位胜任力分级分类培养教学体系，并评估其实施效果。**方法：**运用目标管理法，根据学员类型、学时、掌握程度、带教老师级别和考核形式构建分级分类培养的教学大纲模型。设置实习目标，应用客观结构化临床考核作为五站式出组考核方式，结合迷你临床演练来评估日常调剂基本技能，形成住院药房岗位胜任力分级分类培养的教学体系。**结果：**对体系实施前后的规范化培训学员和药剂科员工出组考试成绩进行比较，教学体系实施后学员的理论和技能考核成绩显著优于体系实施前（P<0.05）。**结论：**基于目标管理法的住院药房岗位胜任力分级分类培养结合多元化评估方法的教学体系，经实践已初步显示出理论与技能并重的优势，可提高学员综合能力，有利于带教质量的提升。

【关键词】目标管理法；岗位胜任力；分级;分类；客观结构化临床考试；迷你临床演练评估

Construction and implementation of the teaching system of hierarchical and classified training of post-competency in inpatient pharmacy based on management by objective

Qiu Ting-ting, Kong Xian-wei, Dong Shu-jie, Wang Hai-ying, Han Yan-ying, Yang Li

Department of Pharmacy, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】Objective：Based on management by objective, the teaching system of hierarchical and classified training of post-competence in inpatient pharmacy is constructed, and its implementation effect is evaluated. **Methods：**Objective management method was used to construct the teaching syllabus model of hierarchical and classified training according to the types of students, class hours, mastery level, teacher level, and assessment form. Practice objectives were set, the objective structured clinical examination was used as the five-station out-of-group assessment method, and basic skills of daily dispensing were evaluated with a Mini-clinical evaluation exercise, so as to form a teaching system of hierarchical and classified training of inpatient pharmacy post-competency. Results The results of standardized training of students and pharmacy staff before and after the implementation of the system were compared. After the implementation of the teaching system, the students' theory and skill examination results were significantly better than those before the implementation of the system (p<0.05). **Conclusion：**The teaching system of hierarchical and classification training of post-competency in inpatient pharmacy based on management by objective combined with diversified evaluation methods has preliminarily shown the advantages of paying equal attention to theory and skills, which can improve the comprehensive ability of students and is conducive to the improvement of teaching quality.

通信作者：杨丽，Email：lilianyangli@163.com

Corresponding author: Yang Li, Email: lilianyangli@163.com

【**Key words**】management by objective; post competence; hierarchical; classification; objective structured clinical examination; Mini-clinical evaluation exercise

岗位胜任力是指胜任某个特定岗位工作应具备的知识、技能、态度、特质及动机等的总和[1]。第三次医（药）学教育改革倡导以岗位胜任力为导向，强调学生不仅需要具备专业知识和技能，更应具有良好的综合素质[2]。医院住院药房作为药学专业培训的重要基地，对药学服务及临床药学经验要求比较高，研究如何提高学员的岗位胜任力，有效强化学员的综合素质是带教工作的重点。

传统轮转手册加笔试考评的评价方法对于药师岗位胜任力考核过于简单，已经不能适应新医改形势下对医院药师能力培养的要求。为此我院住院药房将目标管理法（management by objective, MBO）应用于学员岗位胜任力实习带教过程中，根据学员类型、学时、对技能和理论要求掌握的程度、带教老师级别以及考核形式分类不同的特点，构建住院药房岗位胜任力分级分类培养的教学大纲模型。目标的实施与过程管理中，应用客观结构化临床考核（Objective Structured Clinical Examination，OSCE）作为五站式出组考核方式，结合迷你临床演练评估（Mini-clinical evaluation exercise，Mini-CEX）作为日常调剂基本技能的考核，取得良好的实施效果。本文旨在对住院药房岗位胜任力分级分类培养教学体系进行总结分析，并评价实施效果，为进一步探讨医院药剂科住院药房岗位胜任力理论与实践能力的培养和考核方案提供经验。

1. 分级分类培养教学体系

1.1 岗位分类

我院住院药房主要岗位分为注射剂调剂岗、口服药品调剂岗和药品管理岗。在进行岗位胜任力带教时，每个岗位细分为不同的带教模块，见表 1。

表 1 住院药房岗位胜任力带教模块

模块	岗位学习内容		
	注射剂调剂岗	口服药品调剂岗	药品管理岗
第一模块	规章制度、工作流程	规章制度、工作流程	药品请领、验收
第二模块	注射剂医嘱审核	口服药品医嘱审核	药品储存、有效期管理、盘点
第三模块	药品调剂	单剂量调剂	病区药品管理
第四模块	麻醉药品调剂与管理	全自动摆药机使用	用药错误
第五模块	不良反应	出院带药、患者用药教育	用药咨询与信息检索

1.2 学员分类

我院带教学员种类繁多，有七种类型，分别为博士/硕士研究生、临床 8 年制本科生、进修生、药学专/本科生、临床药师学员、规范化培训学员和药剂科员工。学员在院总时长和住院药房实习时长各不相同，见表 2。

表 2 住院药房学员分类

	教育类型						
	研究生学位教育	学生授课教育	进修生教育	实习生教育	临床药师学员培训	规范化培训教育	药学技术人员教育
学员类型	博士/硕士研究生	临床 8 年制医学生	进修生	药学专/本科生	临床药师学员	规范化培训学员	药剂科员工
在院学习总时长	3-5 年	每年 26 学时	半年~1 年	8 个月	1 年	3 年	每年
住院药房实习时长	6 天	1 学时	2 周	1 个月	2~3 天	6~7 个月	3 个月

1.3 带教师资分级

住院药房参与教学的师资力量也呈现出分级的特点。第一级为班组长，负责教学的整体把控。第二级为教学干事，辅助教学管理。第三级为拥有带教师资的老师，通过医院教学考核，被授予实践带教资格和理论带教资格。第四级为班组青年骨干，培养他们积极参与实践带教的辅助工作。

1.4 考核形式分类

住院药房根据学院类型不同、实习时长不同的特点，将考核形式进行了分类，带教师资也相应进行了合理安排，见表 3。

表 3 住院药房考核评价分类

学员类型	住院药房实习时长	考核方式	带教师资
博士/硕士研究生	6 天	笔试	实践带教师资
临床 8 年制医学生	1 课时	无	理论带教师资
进修生	2 周	无	班组长
药学专/本科生	1 个月	笔试	实践带教师资
临床药师学员	2~3 天	无	教学干事
规范化培训学员	6~7 个月	五站式：笔试 + OSCE+ min-CEX	实践带教师资+青年骨干
药剂科员工	3 个月	五站式：笔试 + OSCE+ min-CEX	实践带教师资+青年骨干

结合住院药房的特点，在原有住院医师五站式的基础上进行了改良，Mini-CEX 考核用于第二站调剂基本技能，OSCE 考核用于第三、四、五站考核，五个考核站点及内容、要点和形式见表 4。

表 4 住院药房五站式考核内容及形式

站点模块	站点名称	考核内容	考核要点	考核形式
第一站	药学服务综合能力	1 道药物不良事件分析上报管理题和 1 道计算机信息检索处理题	不良反应关联性评价、报告及咨询与信息检索	笔试（可借助笔记本电脑和网络）
第二站	医嘱审核与调配	3 道医嘱审核题，及 1 道调配注射剂或口服单剂量或出院带药或毒麻药处方，4 道裸片（拆除外包装的片剂）识别题	不规范处方、不适宜处方、超长处方及调配流程与规范性，裸片识别能力	医嘱审核口试+调剂 Min-CEX
第三站	发药与患者教育	2 道出院带药发药与患者教育题，其中包含一道英文的出院带药培养学员英文交流能力。	发药患者教育知识要点，沟通能力，英语交流能力	OSCE
第四站	药物治疗管理	1 道多重用药的处方或医嘱（考核 3 种以上合并疾病）	药物治疗学相关的药物重整的思路，药物知识点及疾病相关指标	OSCE
第五站	人文沟通	1 个案例，涉及与患者或者医生、护士的沟通	日常药学服务态度、药事管理、沟通能力或应急与投诉处理能力	OSCE

住院药房于 2022 年初引入 Mini-CEX 考核，用于日常调剂基本技能考核。Mini-CEX 作为美国内科医学会（American Board of Internal Medicine，ABIM）1995 年发起并推荐使用的一种评价住院医师临床能力的测评工具[3-6]，正越来越广泛地应用于临床、护理、检验、药学等专业，成效显著[7-11]。住院药房考察学员日常调剂时通过 Mini-CEX 在九个方面进行多维度评估，考核内容全面，与实际工作同步进行，直接观察，及时反馈，费时少，

可行性高。

OSCE 由英国 Dundee 大学 Harden 教授于 1975 年提出，通过模拟临床场景测试医学生的临床能力，是一种知识、技能和态度并重的临床能力评价方法[12,13]，提供的是一组客观的、有组织的考核框架。住院药房应用 OSCE 考核形式于第三、四、五站考核，根据教学考试大纲和考点制定相应的考核内容和方法，最终通过模拟各类临床场景和对话，对考核对象的理论知识、临床技能、沟通技巧等方面的能力进行全方位考核，避免学员将药学实践停留在理论学习层面。对培训标准化病人（Standardized Patient，SP）[14]和考官进行遴选和培训，让其熟知各种考场设备操作、考试时间限制、考试站点切换以及考核成绩收集等内容。

1.5 创新分级分类培养的教学体系

因为学员类型不同，学时不同，对技能和理论要求掌握的程度不同，带教老师的级别以及考核形式也有所不同，为此我们住院药房构建出分级分类的教学大纲模型，体现出层次化、差异化设计。针对学员类型，制定相应的学习内容、学时、掌握程度和分别的带教老师，形成分级分类培养的教学体系。其中学习内容又分为技能点和理论点，掌握程度分为四级，分别是熟练掌握（D）、掌握（C）、熟悉（B）、了解（A）。教学大纲模型以表格形式列出，见图 1。

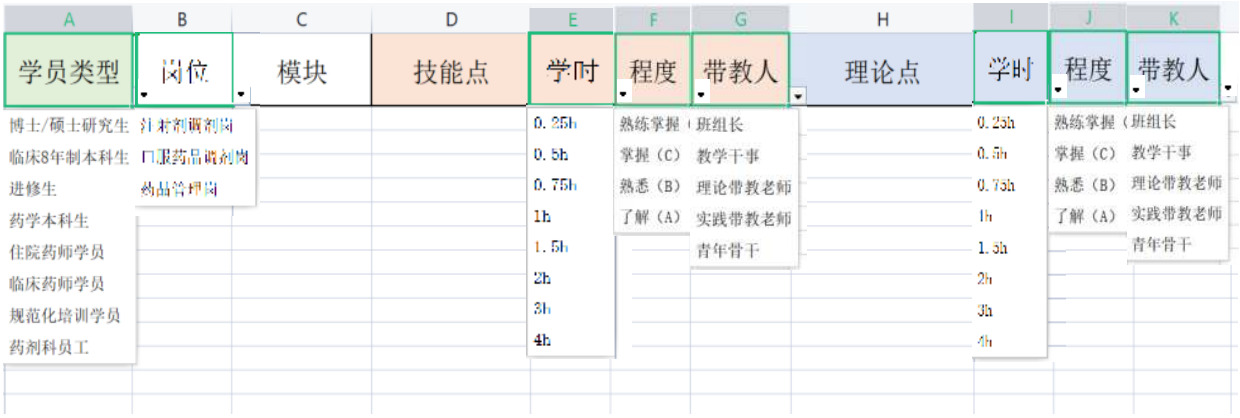


图 1 岗位胜任力分级分类培养教学大纲模型

2. 目标管理法应用于住院药房岗位胜任力教学

目标管理法是美国著名管理学家彼得•德鲁克（Peter Druckel）创立的新的管理方法，是一种以目标为中心、围绕临床问题进行讨论的教学形式[15]。我院将目标管理法应用于住院药房带教过程中，以教学目标为主线实施带教，通过分级分类分模块地制定规范、合理、细化的实习目标，不断引导学生接近实习目标，帮助学生对所学知识进行巩固提高[16-18]。具体分为三个阶段，第一阶段：实习目标的设置；第二阶段：实习目标的实施与过程管理；第三阶段：测定评价成果。这三个阶段构成一个循环周期。

2.1 实习目标的设置

结合中国药师协会 2017 年发布的《药师药学服务胜任力评价标准（试行）》[1]，分模块按照学员分类设置目标及目标的掌握程度。实习目标分技能和理论两部分。将每个模块的技能点目标细化分解，包括处方审核和调剂技能、药学咨询技能、采集与分析信息技能、系统操作技能、药品管理技能、解决问题技巧、沟通协调技巧等；理论点目标细化既包括国家层面相关法律法规知识，也包括院级、药房内部的 SOP 等，此外还要掌握药学专业知识、药物治疗学知识、药学计算知识（掌握药物使用所需的给药剂量、浓度、单位转换、疗程等的计算，尤其针对特殊人群）等。

2.2 实习目标的实施与过程管理

不同类型的学员分别由带教老师按照岗位胜任力分级分类培养教学大纲模型安排技能和理论的带教。以月为单位，进行月考，分为笔试理论部分和现场考核技能，以便了解学员掌握程度，查漏补缺。

2.3 测定评价成果

2.3.1 考核评价：

（1）客观结构化临床考核评价

OSCE 针对不同的案例有不同的考核评价表，案例框架主要由 12 部分组成，分别为 OSCE 题目、助考角色、适用考试对象、情景、参考答案、替代答案、评分标准、考试时间、不及格原因、解析、知识考点和技能考点。OSCE 不仅考核药师的专业知识，也考核个人素质等软实力，因此，在评分部分，除案例相关的考点评分外（权重占 70%），每题均设有主管技能评分项（权重占 30%），包含 10 个方面的内容，即口齿清晰度、自信度、互动性、表述的优先顺序、恰当的语言、自我介绍、为对方提供精准的信息、解决问题能力、确认对方是否理解和结束语。为保证这 10 项评分的客观公正，考官按照主观技能评分表中各项具体评分标准进行打分，以减少不同考官打分时的主观给分差异。

（2）迷你临床演练评估

我院住院药房，通过前期调研，对 Mini-CEX 量表进行设计、试用和修改，形成适用于住院药房对学员日常考核环节的改良式 Mini-CEX 量表。量表结构分为三部分，分别是考核基本元素信息（教师学员基本情况和考核环境）、评估与反馈、对考核的评价。评量采用 9 级评分法：优良 7~9 分，合格 4~6 分 ，有待改进 1~3 分。满意度采用 9 级评分法，1~3 分为不满意，4~6 分 为基本满意,7~9 分为非常满意。评量要点为注射剂和口服单剂量调剂从 9 个方面分别进行评量，即工作准备、His 系统操作能力、医嘱审核、调剂操作技能、药品核对、退药操作技能、应急能力、沟通能力和整体表现。

2.3.2 反馈：

考核环节的反馈按照 Mini-CEX 量表执行，“五站式”客观结构化临床考核使用具体评分细则打分。反馈给学员时常用的反馈模型为 SBI 模型：情境（Situation）→行为（Behavior）→影响（Impact）。SBI 模型可以给考生提供激励型反馈及建设型反馈。反馈技巧包括分析现状、以结果和目的为导向、准确定位反馈对象、建立信任的环境、使用中性语言及基于行为的反馈。考核完成后将每位学员的考核成绩和具体评分细则反馈给带教教师和培训学员。一方面有利于带教教师发现教学过程中的薄弱环节，进行改进和提升；另一方面有利于培训学员及时发现自己的理论或技能缺陷，进行针对性训练[19]。

3. 效果评价

3.1 评价方法

3.1.1 研究对象 住院药房对规范化培训学员（6~7 个月）、药剂科员工（3 个月）实行五站式出组考核。住院药房自 2020 年引入 OSCE 与“五站式”相结合的形式进行岗位胜任力考核，2021 年实施 MBO 并引入 Mini-CEX 进行日常考核环节，建立起基于 MBO 的住院药房岗位胜任力分级分类培养教学体系。以 2020 年以前规范化培训学员和药剂科员工的教学成绩为教学体系实施前的数据，2021 年以后的教学成绩为教学体系实施后的数据。

3.1.2 主观评价 对住院药房培训学员的医德医风（工作态度、服务态度、学习态度）、劳动纪律（尊师守规）及团结协作精神等指标进行主观评估，并将有无上班迟到、早退或脱岗现象，发生次数计入主观评价，总分 100 分。

3.1.3 客观评价 带教老师对住院药房规范化培训学员、药剂科员工实行五站式出组考核，考核形式为笔试 + OSCE+ min-CEX，总分为 100 分。理论考核通过笔试实现，技能考核通过 OSCE+ min-CEX 的形式进行。

3.1.4 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析，计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）描述，组间比较采用 t 检验，检验水准为 0.05，$P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

3.2 评价结果

3.2.1 主观评价 实施教学体系前后无显著性差异（$P>0.05$）。

3.2.1 客观评价 结果显示（表 5），教学体系实施后规范化培训学员、药剂科员工的各项成绩显著优于体系实施前（$P<0.05$）。

表 5 教学体系实施前后规培学员成绩比较（ x ±s,分）

考试种类	体系实施前（n=10）	体系实施后（n=10）	*t* 值	*p* 值
理论考核	86.00±5.56	93.50±4.35	-3.69	0.005
技能考核	84.50±6.00	89.20±5.34	-3.32	0.009

4. 讨论

住院药房因为学员类型繁多、学时不等、对技能和理论要求掌握的程度不同以及带教老师级别不同，传统的教学计划及大纲较为宽泛,针对性不强，缺乏系统、全面的培训计划，实习效果不理想。为此住院药房构建基于 MBO 的岗位胜任力分级分类培养的教学体系，具有以下优势：①分级分类培养针对性强，因材施教，更加科学、系统。② MBO 实习目标的设置能激励带教老师与学员朝共同的方向努力，起导向作用。③目标的实施与过程管理中促进各环节的把握与落实，实时跟进带教任务完成情况，加强过程控制管理。④教学成果以多种形式进行不同教学环节的测评，增加 “五站式”OSCE 考核的形式，并结合 Mini-CEX 考核用于日常调剂基本技能考核。改变过于注重知识传授的倾向，强调激发和推动学员的认知活动、实践活动以及情感活动，使学员主动参与教学过程，形成积极主动的学习态度，使获得理论知识与实践技能的过程成为学员的内在需求而不是一种外部的驱动。

目前我院住院药房的教学体系尚存一些局限性：1.虽然 OSCE 的实施流程实现了标准化，但考官和 SP 仍会存在个体间差异，考核结果的人为因素仍存在,进而影响学员的考试效果。因此我院计划除了考核评分表应尽可能细化，考官和 SP 的考前培训应进一步强化外，拟将 SP 角色采用录制标准化情景视频形式，能够保障培训及考核标准的一致性和重复性，既符合日常工作沟通情景，又能够依托网络平台和信息化技术建立相应题库，降低考试的时间成本和人力成本。2.Mini-CEX 目前存在的问题主要是带教老师考评存在个体化差别，主观性比较强。目前我院住院药房仅有 10 例学员应用 Mini-CEX，但是随着考评次数增加、增强带教老师的培训、细化统一评分细则等，可减小带教老师间的差异。

综上，我院建立起基于 MBO 的住院药房岗位胜任力分级分类培养教学体系，OSCE 和 Mini-CEX 多元化评估方法的结合，已经初步显示出理论与技能并重、考核与培训互促的优势，为进一步完善药剂科住院药房岗位胜任力理论与实践能力的教学培养模式提供经验。

参考文献

[1]中国药师协会.药师药学服务胜任力评价标准（试行）[J]中国合理用药探索,2017,14(9):1-2

[2] 高巍，梁丽娜，刘佳，等.以岗位胜任力为导向的临床技能模拟教学体系的建立与实践[J].重庆医学，2020，49（6）：1018-1021

[3] Norcini JJ, Blank LL, Arnold GK, et al. The MINI-CEX(clinical evaluation exercise)：a preliminary investigation[J]. Ann intern med,1995,123(10):795-799.

[4]张晶，王蕾，涂明利，等.迷你临床演练评估在内科住院医师规范化培训临床能力测评中的应用[J].中华医学教育杂，2013，33（5）：765.

[5]Tokode OM，Dennick R. A qualitative study of foundation doctors’ experiences with mini-CEX in the UK[J]. International Journal of Medical Education，2013，3（4）：83.

[6]Weller JM，Jolly B，Misur MP，et al. Mini-clinical evaluation exercise in anaesthesia training[J]. Br J Anaesth，2009，102（5）：633.

[7] Yoyo Suhoyo ,Johanna Schönrock-Adema, Ova Emilia，et al. How students and specialists appreciate the mini-clinical evaluation exercise (mini-CEX) in Indonesian clerkships [J] . BMC Med Educ，2020，20(1) : 144.

[8]Andrea C Lörwald , Felicitas-Maria Lahner , Bettina Mooser L, et al. Influences on the implementation of Mini-CEX and DOPS for postgraduate medical trainees' learning: A grounded theory study [J]. Med Teach，2019，41(4) : 448－456.

[9]付明倜，徐海莉，徐宏蕊，等 ．多站式 Mini － CEX 在骨科护理实习生带教中的应用[J]．中华现代护理杂志，2020，26(28) : 3982 － 3985．
[10]Victor Lee , Keira Brain, Jenepher Martin．Factors Influencing Mini-CEX Rater Judgments and Their Practical Implications: A Systematic Literature Review [J]．Acad Med，2017，92(6) : 880－887．
[11]高晨，田德蔷. Mini-CEX 应用于医院药师技能培训考核的方案设计[J] 中国药房, 2014, 25(41):3924-3927.
[12]Harden ＲM，Stevenson M，Downie WW，et al． Assessment of clinical competence using objective structured examination［J］． Br Med J，1975，1(5955):447-451.
[13]涂文记，杨萍，潘慧，等． 临床医学毕业考试之客观结构化临床考试的实施效果调查［J］． 基础医学与临床，2015，35: 1004-1007．
[14] 樊瑛，杨树森，于江波.OSCE 在住院医师培训和技能考核中的应用[J].当代医学，2009，15（1）：8-9.
[15] 祝晓明.论目标管理法在高校教学中的运用[J].市场周刊(理论研究),2015(12):154-155.
[16]施玲玲，周丽娜.目标管理教学法在产科临床护理带教中的应用[J].中国高等医学教育，2015（11）：119-120.
[17]陶娟，杨丽黎，金学勤，等.目标管理法在护理实习生带教中的应用[J].中华护理教育，2015，12（5）：383-385
[18]Amin Y, Grewcock D, Andrews S, et al. Why patients need leaders: introducing a ward safety checklist[J] J R Soc Med, 2012,105(9):377-383
[19] 赖雁，陈登榜，任佳.临床专业毕业生客观结构化临床考试的设计与实践[J].中华医学教育探索杂志，2011，10（2）：163-165

顶空气相色谱法同时测定氢溴酸伏硫西汀原料药中 6 种溶剂残留量

邱妍川[1]，刘阳[2]

（重庆医药高等专科学校，重庆 401331）

【摘要】目的：建立同时测定氢溴酸伏硫西汀原料药中 6 种溶剂的方法。**方法：**采用顶空气相色谱法。色谱柱为 DB-624 毛细管柱，采用程序升温，进样口温度为 250 ℃，检测器为氢火焰离子化检测器，检测器温度为 300 ℃，载气为氮气，流速为 1.0 mL/min，分流比为 50:1，顶空平衡温度为 80℃，顶空平衡时间为 25 min，顶空进样量为 1 mL。**结果：**六种溶剂能得到很好的分离；乙醇、丙酮、溴乙烷、叔丁醇、乙酸乙酯和四氢呋喃检测质量浓度线性范围分别为 10.04~200.83 mg/mL（r=1.000 0）、10.10~202.03 mg/mL（r=0.999 9）、2.59~51.74 mg/mL（r=0.999 9）、5.03~100.57 mg/mL（r=1.000 0）、9.96~199.12 mg/mL（r=0.999 9）、1.46~29.11 mg/mL（r=1.000 0）；定量限分别为 10.04、10.10、2.59、5.03、9.96、1.46 mg/mL；检测限分别为 3.01、3.03、0.78、1.51、2.99、0.44 mg/mL；平均回收率分别为 100.91%、98.78%、93.19%、100.59%、100.41%、100.87%、RSD 均小于 5%；3 批样品中 6 种溶剂残留量测定结果均符合规定。**结论：**该方法简便、灵敏、可靠，可用于氢溴酸伏硫西汀原料药中 6 种溶剂的残留量测定。

【关键词】氢溴酸伏硫西汀；顶空气相色谱法；乙醇；丙酮；溴乙烷；叔丁醇；乙酸乙酯；四氢呋喃；残留量

Simultaneous Determination of Six Residual Solvents in Vortioxetine hydrobromide by Head-space GC

Qiu Yanchuan, Liu Yang

(Chongqing Medicine Junior College, Chongqing 401331)

【ABSTRACT】OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of residual solvents in. Vortioxetine hydrobromide.**METHODS:** Head-space GC was adopted. The determination was performed on Agilent DB-624 capillary column by temperature programming. The inlet temperature was 250 ℃, and detector was flame ionization detector with temperature of 300 ℃. carrier gas was nitrogen, at the flow rate of 1.0 mL/min. The split ratio was 50∶1. Headspace equilibrium temperature was 80 ℃， and equilibration time was 25 min. The sample size was 1 mL. **RESULT:** Six Residual Solvents were well-separated, and the linear ranges were 10.04~200.83 mg/mL for ethanol（r=1.000 0）、10.10~202.03 mg/mL for ethanol（r=0.999 9）、2.59~51.74 mg/mL for ethanol（r=0.999 9）、5.03~100.57 mg/mL for ethanol（r=1.000 0）、9.96~199.12 mg/mL for ethanol（r=0.999 9）、1.46~29.11 mg/mL for ethanol（r=1.000 0），respectively. The limits of quantification (LOQ) were 10.04、10.10、2.59、5.03、9.96 and 1.46 mg/mL. The average spike recoveries were 100.91%、98.78%、93.19%、100.59%、100.41%、100.87% and RSD were less than 5%. Test results for 3 batches of Vortioxetine hydrobromide were met the specification. **CONCLUSIONS:** The established method is simple, accurate and reliable. Therefore it is suitable for control of the contents of Six Residual Solvents in Vortioxetine hydrobromide.

【Key words】Vortioxetine hydrobromide；Head-space GC；Ethanol；Acetone；Bromine ethane；Tertiary butyl alcohol；Ethyl acetate；Tetrahydrofuran；Residual Solvent

1 第一作者：邱妍川，副教授，重庆医药高等专科学校，重庆市沙坪坝区大学城中路 82 号，401331，32444271@qq.com

2 通讯作者：刘阳，讲师，重庆医药高等专科学校，重庆市沙坪坝区大学城中路 82 号，401331，17229715@qq.com

伏硫西汀（vortioxetine）于 2013 年通过美国 FDA 批准上市, 并于 2017 年 11 月通过国家药品监督管理局批准在中国上市, 用于治疗成人抑郁症。该药通过抑制 5-HT 转运体介导的 5-HT 再摄取，同时调节多种 5-HT 受体活性而发挥抗抑郁作用。体外和动物研究表明，伏硫西汀除增加脑内 5-HT 浓度外，还可增强大脑某些区域的多巴胺、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、组胺和谷氨酸神经传递，并降低 γ-氨基丁酸神经传递。临床研究显示，伏硫西汀可同时改善抑郁症患者症状及认知功能, 促进其社会功能恢复[1-3]。在氢溴酸伏硫西汀原料药的合成工艺中，要用到乙醇、丙酮、乙酸乙酯和四氢呋喃 4 种溶剂。溴乙烷是最后一步反应过程中使用的氢溴酸和溶剂乙醇反应生成的副产物、叔丁醇是起始物料反应过程的副产物，我们经方法开发和确认，溴乙烷和叔丁醇可与前 4 种溶剂合并起来在同一方法中进行研究。根据《中国药典》2020 年版第四部通则 0861 残留溶剂测定法及人用药品注册技术规定国际协调会议（ICH）指导原则[4-5]要求，6 种溶剂残留量限度分别定为乙醇不得过 0.5%、丙酮不得过 0.5%、溴乙烷不得过 0.128%、叔丁醇不得过 0.25%、乙酸乙酯不得过 0.5%、四氢呋喃不得过 0.072%。通过文献调研[6-8]，目前国内还未见氢溴酸伏硫西汀原料药中相关残留溶剂检测方法的报道。本研究根据 6 种溶剂的性质，采用顶空气相色谱法，建立了测定氢溴酸伏硫西汀原料药中 6 种溶剂残留量的方法，并进行了方法学验证。现将结果报道如下。

1 材料

1.1 仪器

7980A 气相色谱仪，配有氢火焰离子化检测器（FID）（美国安捷伦公司）；XS205 电子分析天平（精度：0.000 01 g，瑞士 Mettler-Toledo 公司）

1.2 药品与试剂

氢溴酸伏硫西汀原料药（重庆药友制药有限公司自制样品，批号：21090801、21091701、21092801，纯度：均大于 99.0%）；无水乙醇（诺尔施有限公司，批号：021090301）；丙酮（重庆川东化工有限公司，批号：20201201）；溴乙烷（北京百灵威科技有限公司，批号：LO70O26）；叔丁醇（成都市科隆化学有限公司，批号：2019022101）；乙酸乙酯（重庆川东化工有限公司，批号：20190801）；四氢呋喃（诺尔施有限公司，批号：2021052501）；N，N-二甲基甲酰胺（DMF）为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：DB-624 毛细管柱（30 m × 0.32 mm，1.8 μm）；升温程序：起始温度 40 ℃，保持 5 min，以 10 ℃/min 速率升至 140 ℃，再以 20 ℃/min 升温至 200℃，保持 2 min；进样口温度：250 ℃；检测器：FID；检测器温度：300 ℃；载气：氮气（高纯氮）；流速：1.0 mL/min；分流比：50:1。空平衡温度为 80 ℃，顶空平衡时间为 25 min，顶空进样量为 1 mL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品储备溶液

分别取无水乙醇约 200 mg、乙酸乙酯约 200 mg、丙酮约 200 mg，叔丁醇约 100 mg，溴乙烷约 51.2 mg，四氢呋喃约 28.8 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，加入 DMF 溶解并稀释至刻度，摇匀。

2.2.2 混合对照品溶液

精密称取混合对照品储备液 1 mL，置于 100 mL 量瓶中，用 DMF 稀释至刻度，摇匀，精密移取 5 mL 置 20 mL 顶空瓶中，密封。

2.2.3 供试品溶液

称取样品约 100 mg，精密称定，置于 20 mL 顶空瓶中，精密加入 DMF 5 mL，密封。

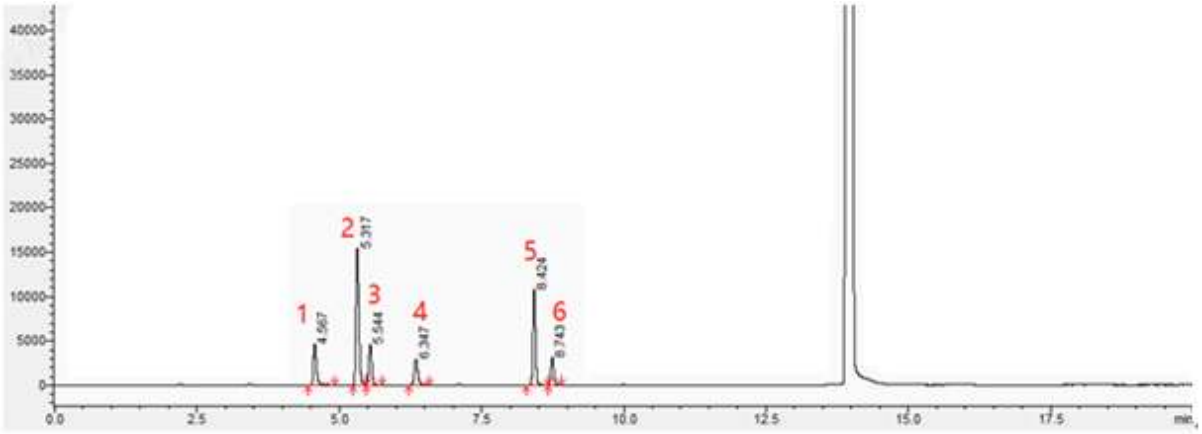
2.2.4 空白对照溶液

取 DMF 作为空白对照溶液。

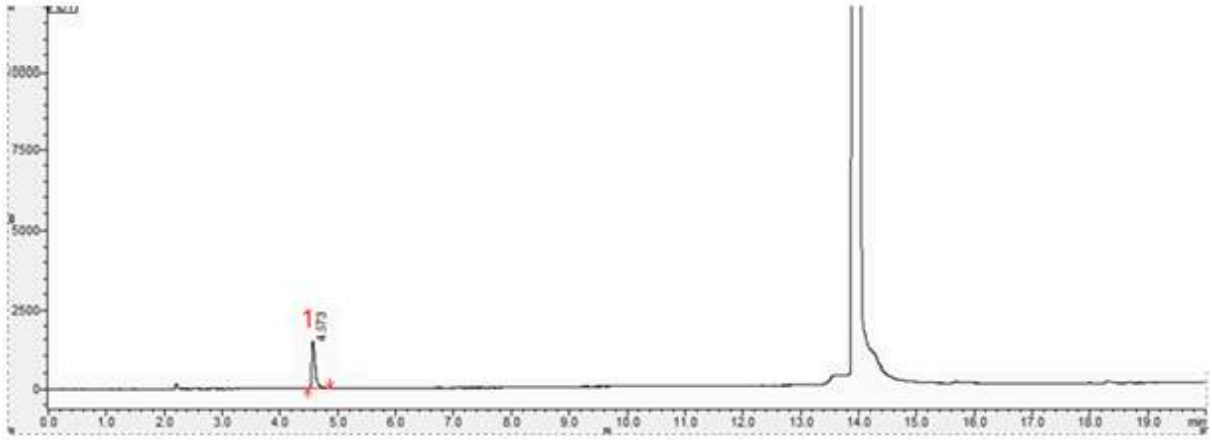
2.3 专属性试验

精密吸取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液各 1 mL，分别注入气相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱，详见图 1。结果显示，样品中乙醇、丙酮、溴乙烷、叔丁醇、乙酸乙酯和四氢呋

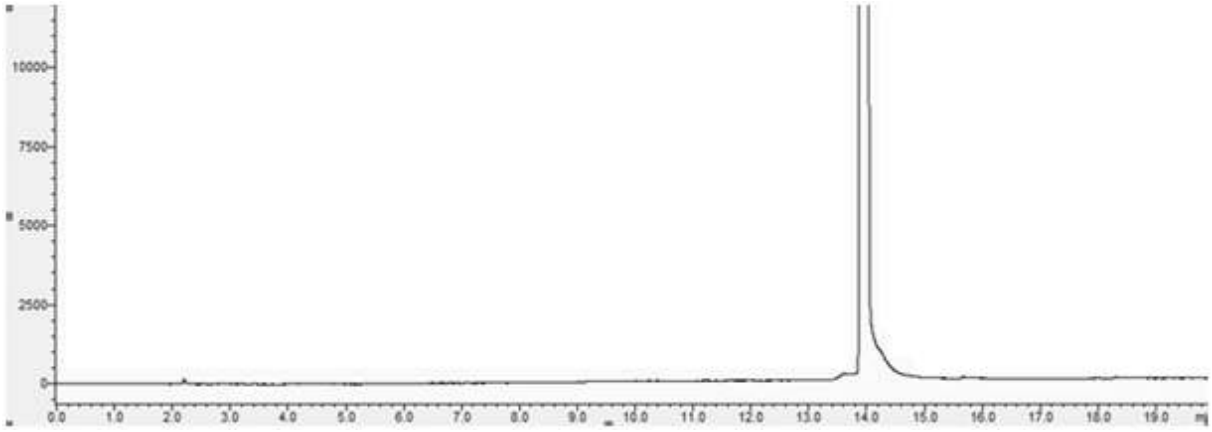
喃的保留时间分别为 4.558 min、5.310 min、5.538 min、6.340 min、8.417 min、8.736 min；分离度分别为 8.0、2.4、2.4、7.6、、3.7、3.7，各待测成分间均能达到基线分离，分离度大于 1.5，详见图 1。



A．混合对照品溶液



B．供试品溶液



C．空白对照溶液

图 1 气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms

注：1．乙醇；2．丙酮；3．溴乙烷；4．叔丁醇；5．乙酸乙酯；6．四氢呋喃

Note：1. Ethanol；2. Acetone；3. Bromine ethane；4. Tertiary butyl alcohol；5. Ethyl acetate；6. Tetrahydrofuran

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下的对照品贮备液 0.5、1、1.5、2 mL，置于 100 mL 量瓶中，加 DMF 至刻度，稀释制成不同质量浓度的线性溶液 2#～5#，取线性溶液 5# 2.5 mL，置于 50 mL 量瓶中，加 DMF 至刻度，作为线性溶液 1#。按“2.1”项下色谱条件分别进样测定，记录峰面积。以各待测成分峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x，mg/mL)为横坐标进行线性回归，回归方程与线性范围见表 1。

表 1 线性关系考察结果

Tab 1 Result of linear range investigation

待测成分	回归方程	r	线性范围，mg/mL	检测限，mg/mL	定量限，mg/mL
乙醇	Y=-340.07+179.52×X	1.000 0	10.04~200.83	3.01	10.04
丙酮	Y=-1224.85+573.97×X	0.999 9	10.10~202.03	3.03	10.10
溴乙烷	Y=-0.86+627.57×X	0.999 9	2.59~51.74	0.78	2.59
叔丁醇	Y=-134.19+250.72×X	1.000 0	5.03~100.57	1.51	5.03
乙酸乙酯	Y=-598.30+352.81×X	0.999 9	9.96~199.12	2.99	9.96
四氢呋喃	Y=1.66+707.16×X	1.000 0	1.46~29.11	0.44	1.46

2.5 检测限和定量限考察

取“2.2.2”项下对照品溶液逐级稀释，然后分别进样，记录色谱。直至各组分的信噪比分别为 3:1 和 10:1，分别得到检测限和定量限，结果见表 1。

2.6 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液 1 mL，按“2.1”项下色谱条件进样，连续测定 6 次，记录峰面积。结果，乙醇、丙酮、溴乙烷、叔丁醇、乙酸乙酯和四氢呋喃峰面积的 RSD 分别为 1.49%、2.56%、2.56%、2.56%、2.56%、2.56%（n=6），仪器进样精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下对照品溶液，分别于室温下放置 0、17、28、37 h 时，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，乙醇、丙酮、溴乙烷、叔丁醇、乙酸乙酯、四氢呋喃含量的相对变化率均小于 10%。

2.8 重复性试验

精密称取样品（批号：FA5-201412001V）约 100 mg，共 6 份，置 20 mL 顶空瓶中，精密移取“2.2.2”项下混合对照品溶液 5 mL，密封。再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算 6 种溶剂的残留量。结果，6 种溶剂的残留量的 RSD 均＜10%。

2.9 回收率试验

精密称取样品（批号：21090801）100 mg，共 9 份，分别置于 20 mL 顶空瓶中，分别加入“2.4”项下线性溶液 1#、3#、5#各 5 mL，各平行操作 3 份，作为供试品溶液。以“2.2.2”项下的对照品溶液作为对照，分别按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率，结果见表 2。

表 2 回收率试验结果（n=9）

Tab 2 Recovery determination result （n=9）

溶剂	样品中含量 mg	加入量 mg	测得量 mg	回收率（%）	平均回收率%）	RSD（%）
乙醇	170.99	50.21	219.63	96.87	100.91	2.59
	169.45	50.21	218.74	98.17		
	170.77	50.21	220.72	99.48		

	170.74	502.08	670.23	99.48		
	169.93	502.08	679.94	101.58		
	171.01	502.08	678.70	101.12		
	170.62	1004.15	1219.08	104.41		
	170.60	1004.15	1210.54	103.56		
	170.47	1004.15	1209.80	103.50		
丙酮	0.00	50.51	47.73	94.50	98.78	3.94
	0.00	50.51	47.25	93.55		
	0.00	50.51	47.58	94.20		
	0.00	505.08	498.53	98.70		
	0.00	505.08	504.27	99.84		
	0.00	505.08	501.82	99.35		
	0.00	1010.15	1040.93	103.05		
	0.00	1010.15	1036.73	102.63		
	0.00	1010.15	1042.61	103.21		
溴乙烷	0.00	12.94	12.07	93.28	93.19	1.03
	0.00	12.94	11.87	91.73		
	0.00	12.94	11.90	91.96		
	0.00	129.35	121.10	93.62		
	0.00	129.35	122.41	94.63		
	0.00	129.35	121.82	94.18		
	0.00	258.70	241.72	93.44		
	0.00	258.70	239.54	92.59		
	0.00	258.70	241.39	93.31		
叔丁醇	0.00	25.14	25.11	99.88	100.59	2.52
	0.00	25.14	25.50	101.43		
	0.00	25.14	23.83	94.79		
	0.00	251.43	249.13	99.09		
	0.00	251.43	254.26	101.13		
	0.00	251.43	253.92	100.99		
	0.00	502.85	515.08	102.43		
	0.00	502.85	514.86	102.39		
	0.00	502.85	519.02	103.22		
乙酸乙酯	0.00	49.78	47.91	96.24	100.41	3.46
	0.00	49.78	47.47	95.36		
	0.00	49.78	48.65	97.73		
	0.00	497.80	496.37	99.71		
	0.00	497.80	503.94	101.23		
	0.00	497.80	500.77	100.60		
	0.00	995.60	1038.30	104.29		
	0.00	995.60	1035.41	104.00		

	0.00	995.60	1040.60	104.52		
四氢呋喃	0.00	7.28	7.53	103.43	100.87	1.43
	0.00	7.28	7.38	101.37		
	0.00	7.28	7.43	102.06		
	0.00	72.78	71.99	98.91		
	0.00	72.78	72.62	99.78		
	0.00	72.78	72.15	99.13		
	0.00	145.55	147.46	101.31		
	0.00	145.55	147.03	101.02		
	0.00	145.55	146.71	100.80		

2.10 耐用性试验

2.10.1 色谱柱考察 精密称取样品（批号：21090801）100 mg，置于 20 mL 顶空瓶中，分别加入“2.4”项下线性溶液 3# 5 mL，作为供试品溶液。将 DB-624 毛细管柱（30 m × 0.32 mm，1.8 μm）更换为 AT-624 毛细管柱（30 m × 0.32 mm，1.8 μm）；按“2.1”项下色谱条件进样测定。

2.10.2 流速考察 精密称取样品（批号：21090801）100 mg，置于 20 mL 顶空瓶中，分别加入“2.4”项下线性溶液 3# 5 mL，作为供试品溶液。分别设置流速为 0.9 mL/min、1.1 mL/min；再按“2.1”项下色谱条件进样测定。

2.10.3 柱温（初始温度）考察 精密称取样品（批号：21090801）100 mg，置于 20 mL 顶空瓶中，分别加入“2.4”项下线性溶液 3# 5 mL，作为供试品溶液。分别设置柱温为 38 ℃、42 ℃；再按“2.1”项下色谱条件进样测定。

2.10.4 进样口温度考察 精密称取样品（批号：21090801）100 mg，置于 20 mL 顶空瓶中，分别加入“2.4”项下线性溶液 3# 5 mL，作为供试品溶液。分别设置进样口温度为 245 ℃、255 ℃；再按“2.1”项下色谱条件进样测定。

耐用性考察结果详见表 3。结果表明，以上各条件发生一定程度变化，本方法能满足试验要求，耐用性良好。

表 3 耐用性试验结果

Tab 3 Results of durability tests

色谱条件	设置	含量（%）					
		乙醇	丙酮	溴乙烷	叔丁醇	乙酸乙酯	四氢呋喃
改变载气流速（ml/min）	0.9	0.67	0.5	0.12	0.25	0.5	0.072
	1.1	0.7	0.51	0.12	0.26	0.51	0.073
改变起始柱温（℃）	38	0.67	0.51	0.12	0.25	0.5	0.073
	42	0.67	0.51	0.12	0.25	0.51	0.073
改变进样口温度（℃）	245	0.68	0.5	0.12	0.25	0.5	0.074
	255	0.69	0.5	0.12	0.25	0.5	0.073
改变色谱柱	AT-624	0.66	0.49	0.12	0.26	0.5	0.07
	DB-624	0.67	0.5	0.12	0.25	0.5	0.072
平均含量（%）		0.68	0.5	0.12	0.25	0.5	0.07
RSD（%）		1.92	1.42	0	1.86	0.93	1.71

2.11 样品中残留溶剂测定

按照“2.1”项下方法，取 3 批原料药样品制成 3 批供试品溶液，进样测定，记录色谱图并计算有机溶剂残留量。结果，3 批原料药中除乙醇外，其余目标溶剂均未检出，详见表 4。

表 4 样品中残留溶剂测定结果（n=3，%）

Tab 4 Results of content determination of sample（%，n=3）

样品批号	乙醇	丙酮	溴乙烷	叔丁醇	乙酸乙酯	四氢呋喃
21090801	0.16	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
21091701	0.19	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
21092801	0.18	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

3 讨论

根据研究策略，我们需将本品工艺过程使用到的 4 种溶剂（乙醇、丙酮、乙酸乙酯和四氢呋喃 4）及 2 种工艺过程产生的副产物（溴乙烷和叔丁醇），共计 6 种溶剂根据 ICH 相应的法规限度要求，在终产品—原料药中进行分别研究和控制。因此，我们根据原料药的溶解性和待测组分的物理化学性质，开发了本方法。本实验室对比了不同极性的毛细管柱 DB-624、DB-WAX 和 HP-1，结果发现采用 DB-624 毛细管柱分离效果最好，6 种目标成分在该色谱柱条件下可以达到良好的分离效果。故本研究最终选择了 DB-624 色谱柱。

稀释剂的选择：氢溴酸伏硫西汀原料药在甲醇中溶解，在乙醇中略溶，在水中极微溶解。但研究发现，这 3 种溶剂做稀释剂存在专属性和对目标成分的溶解性问题，均不适合作为本方法的稀释剂。由于本品和目标成分均易溶于 DMF，且 DMF 不干扰 6 种残留溶剂的分离，因此本研究选用 DMF 作为对照品和供试品的稀释剂。

本文所建立的氢溴酸伏硫西汀原料药中 6 种溶剂的残留量测定方法简便、灵敏度高、可靠，且暂未见氢溴酸伏硫西汀中残留溶剂测定方法的相关文献报道。该方法已用于本品原料药质量研究过程中残留溶剂的控制。

参考文献

[1] 宗小芬，胡茂林，王高华. 新型多模式作用抗抑郁药伏硫西汀的研究进展[J]. 中华精神科杂志.2021,54(06): 480-484.

[2] 何俊，乔蓉，王泽民等. 新型抗抑郁药物氢溴酸伏硫西汀研究进展[J]. 医药导报.2021,40(10): 1 351-1 355.

[3] 刘孟嘉，陈文. 伏硫西汀治疗抑郁症的药物经济学评价[J]. 卫生经济研究.2019,36(12):53-58.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部[S]. 2020 年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：通则 0861 105-109.

[5] 周海钧. 药品注册的国际技术要求：质量部分[M]. 北京：人民卫生出版社，2000：82-89.

[6] 于生，单鸣秋，邵霞等. 气相色谱法同时测定尼尔雌醇原料药中 7 种有机溶剂的残留量[J]. 中国药房， 2019,30(10): 1357-1360.

[7] 张西如，孙婷，王琛等. 顶空气相色谱法同时测定保泰松原料药中 6 种溶剂残留量 [J]. 中国药房， 2019,30(10): 780-784.

[8] 刘英，刘葵葵，邓玉晓等. 顶空气相色谱法同时测定硫酸沃拉帕沙原料药中 7 种有机溶剂的残留量 [J]. 中国药房，2018,29(16): 2224-2227.

参麦注射液临床研究进展*

邱粤，陈秋芳**，赵敏**

厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361003

【摘要】参麦注射液益气固脱，养阴生津，生脉，是临床广泛使用的中药注射液品种，可辅助用于多种疾病的治疗。本文介绍了参麦注射液的最新临床研究进展，包括主要活性成分、药代动力学特点、临床应用及不良反应等，以期进一步探索参麦注射液的作用靶点及机制，全面把握其适应症及不良反应，提高参麦注射液的临床价值。

【关键词】参麦注射液；活性成分；药代动力学；临床应用；不良反应

Clinical Research Progress of Shenmai Injection

QIU Yue, CHEN Qiu-fang, ZHAO Min

The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China

【**ABSTRACT**】Shenmai injection is a kind of traditional Chinese medicine injection widely used in clinic. It can tonifying qi and preventing exhaustion, nourish yin, generate body fluid and generate pulse. It can be used in the treatment of various diseases. This paper introduces the latest research progress of Shenmai injection, including the main active components, pharmacokinetic characteristics, clinical application and adverse reactions, in order to explore the action target and mechanism of Shenmai injection, better understand its application and improve its clinical value.

【**KEY WORDS**】Shenmai injection；active components；pharmacokinetic； clinical application；adverse reactions

引言

参麦注射液是由等量红参和麦冬提取精制而成的中药注射液品种，其辅助常规疗法对多种疾病有更好的防治效果，包括病毒性心肌炎、休克、肺心病、冠心病和恶性肿瘤等。对参麦注射液防治疾病的系统评价再评价显示，多项研究之间相关的结果指标基本类似，研究结论的一致性较好，说明参麦注射液在辅助疾病防治方面有确切的疗效，具有较高的临床应用价值[1]。本文从主要活性成分、药代动力学特点、临床应用及不良反应等方面切入，介绍参麦注射液的最新研究进展，重点讨论参麦注射液的作用机制和临床应用，以期更全面把握其适应症，提高参麦注射液的临床价值。

1 参麦注射液主要活性成分研究

参麦注射液的主要活性成分是人参皂苷、麦冬皂苷、糖类和黄酮等化合物等，《中国药典》规定，红参中人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 的总含有量不得少于 0.25%，人参皂苷 Rb_1 不得少于 0.20%；麦冬中麦冬总皂苷含有量以鲁斯可皂苷元计，不得少于 0.12%[2]。文献已报道多种方法可以鉴定参麦注射液超百种化学成分，对参麦注射液的质量标准及其控制至关重要：基于 LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MS 的参麦注射液化学分析共推测了其

* 基金项目：福建省自然科学基金（编号：2021J05285）、厦门市医疗卫生指导性项目（编号：3502Z20209270）和厦门市妇幼院林巧稚科研课题（编号：FYLQZ2020005）。

作者简介：邱粤（2000- ），女（土家族），研究生在读，研究方向：中药药理，联系信息（电话：15377069205，邮箱：qiuyue@stu.xmu.edu.cn）

**通讯作者：陈秋芳（1989- ），女（汉族），主管药师，理学博士，研究方向：临床药理学，联系信息（电话：18205902593，邮箱：chenqiufang@xmu.edu.cn）

**通讯作者：赵敏（1990- ），男（汉族），主管药师，理学博士，研究方向：临床药理学，联系信息（电话：13606071924，邮箱：zhaomincpupk@xmu.edu.cn）

中 64 个成分的结构，包括来源于红参的 56 个化合物（其中 34 个属于原人参二醇型皂苷，19 个属于原人参三醇型皂苷，1 个齐墩果烷型三萜皂苷和 2 个其他苷类成分）和来源于麦冬的 8 个化合物（7 个甾体皂苷类化合物和 1 个单萜苷类化合物），该研究结果可为参麦注射液质量标准的提升和药效物质发现提供重要的理论依据[3]；基于 HPLC-ESI-MS 的麦冬化学成分鉴定共鉴定出 15 种麦冬化学成分，可为参麦注射液质量标准的提高提供依据[4]。参麦注射液中具体化学成分、所属类别及来源见表 1。基于 HPLC-MS/MS 的参麦注射液成分分析鉴定了其中多种人参皂苷类成分，其中人参皂苷 Rb_1，Rb_2，Rc，Rd，Re，Rf 和 Rg_1 等的含量较高，可作为参麦注射液质量控制指标[5]；高效液相指纹图谱与模式识别技术相结合技术可分析鉴别 7 种人参皂苷成分，可鉴定分辨正品和混合品，也可以根据制造商进行鉴定区分，可用于参麦注射液的原料药鉴别和质量控制[6]。

表 1 参麦注射液的主要化学成分

化学成分	所属类别	来源
人参皂苷 Ra1、Ra2 、Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Rg3 及其异构体等 34 个人参皂苷	原人参二醇型皂苷	红参
人参皂苷 Re、Rf、Rg1、 Rg2、Rg6、Rh4、Rk1、Rg5 及其异构体等 19 个人参皂苷	原人参三醇型皂苷	红参
人参皂苷 Ro	齐墩果烷型三萜皂苷	红参
异庚醇 2(S)-O-β-D-木糖苷-(1→6)-O-β-D-葡萄糖苷、姜糖酯 B	其他苷类	红参
parisaponin Ⅰ、麦冬皂苷 D 和麦冬皂苷 D'、OJV-VI 等 12 个化合物	甾体皂苷	麦冬
龙脑基 7-O-α-L-阿拉伯糖苷-(1→6)-β-D-葡萄糖苷 龙脑-2-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→6) -β-D-吡喃葡萄糖苷	单萜苷类	麦冬
甲基麦冬黄烷酮 A、甲基麦冬黄烷酮 B	高异黄酮类	麦冬

2 参麦注射液药物代谢动力学研究

参麦注射液的组成成分复杂，因此研究者们对其药代动力学的研究主要着眼于主要活性成分。多项研究表明，参麦注射液主要的皂苷成分（包括人参皂苷和麦冬皂苷）在肾脏和肝脏中分布量最大，Re、Rg_1 和 Rf 等 10 种人参皂苷可以透过血脑屏障；原人参三醇型、齐墩果烷型和甾体皂苷属于快消除，原人参二醇型皂苷属于慢消除型；原人参二醇型皂苷 Rb_1、Rb_2、Rb_3、Rc 和 Rd 在某些组织器官中存在蓄积现象，其中 Rd 在肾脏中的蓄积最为明显[7]。稳定性心绞痛患者体内人参皂苷 Rg_1 半衰期最短，Rc 最长，Re 到达最大血药浓度时间最短，Rd 则最长，Re 峰值血药浓度最小，Rb_1 最大，Re 表观分布容积最小，Rb_1 最大；人参皂苷 Rg_1、Rb_1、Re、Rd 和 Rc 清除率均较快[8]。稳定性心绞痛患者连续滴注参麦注射液后，原人参二醇型皂苷类成分(人参皂苷 Rb_1、Rc 和 Rd) 体内存在明显蓄积[9]。同时有研究结果表明，参麦注射液在长期给药情况下，能调控大鼠 P450 酶系的表达，对 CYP3A1/2 和 CYP2C6 酶活性有潜在的抑制作用，对 CYP1A2 和 CYP2E1 无显著影响[10]；另有研究表明参麦注射液的活性成分甲基麦冬皂苷 B 和人参皂苷 F2 可能是 CYP 诱导剂[11]。因此，在与其他药物合并用药时，应关注受这些酶特异代谢药物的治疗效果，及时调整剂量。参麦注射液中多种人参皂苷成分对有机阴离子转运多肽（OATPs）也有显著抑制作用，可能与多种药物存在潜在的相互作用，值得临床关注[12, 13]。毒代动力学研究显示，长期使用参麦注射液，20(S)-原人参二醇型人参皂苷的暴露水平会不断增加，可能产生免疫负调节毒性和引发药物相互作用的风险，应给予关注和监测[14, 15]。

3 参麦注射液的临床应用

3.1 心血管系统保护作用

参麦注射液临床主要用于治疗心血管系统疾病，对多种心血管系统疾病有辅助治疗作用。在常规治疗的基础上，给予参麦注射液治疗气阴两虚型缓慢性心律失常合并期前收缩，可有效提高临床治疗疗效，改善患者心悸、气短、胸闷、乏力和头晕等多个临床症状，肌酸激酶同工酶、高敏肌钙蛋白 T 和 N 末端 B 型钠尿肽前体水平等检验指标显著低于对照组，且未增加不良反应的发生率[16]。在控制感染、改善通气、给予强心剂和利尿剂等常规治疗的基础上，对患者加用参麦注射液治疗慢性心力衰竭既可以增强心肌收缩力，又不会增加心肌耗氧量，可明显提高疗效，改善慢性心力衰竭和冠心病患者的心脏功能分级，与其改善患者能量代谢和抑制心肌纤维化密切相关，已被写入临床应用指南在临床推广[17-21]。在对照组基础上加用参麦注射液可显著改善冠心病心绞痛患者的心绞痛发作频率、心功能、血脂及炎症指标均得到良好改善，可有效提高舒血宁注射液临床治疗效果，多项研究表明参麦注射液可显著改善心绞痛或心肌梗死患者症状，提高临床有效率和冠脉再通率，提示合用参麦注射液可能更有利，机制可能与参麦注射液减轻氧化应激、炎症反应和细胞凋亡，进而改善血管内皮功能和微血管结构相关[22-24]，也可能与其靶向 Nrf2/Gpx4 信号转导的铁下垂以及调控心肌细胞线粒体动力学和自噬相关[25, 26]。在对心肌梗死病人的研究中，对照组采用常规内科治疗，观察组在对照组基础上采用参麦注射液辅助治疗，观察组血清 hs-CRP、PCT 、BNP 、乳酸、全血黏度、还原黏度、血浆黏度和血细胞比容显著低于对照组，观察组 CI、SV、EF 和 CO 显著高于对照组，即参麦注射液可显著改善病人心脏功能和血流动力学指标，机制可能与参麦注射液激活 Nrf2/GPX4 信号介导的铁凋亡相关[27, 28]。参麦注射液辅助治疗病毒性心肌炎能显著提高总有效率，同时改善患者心电图，是补益类中药注射液辅助治疗病毒性心肌炎中的佼佼者[29]。30 项随机对照试验的 Meta 分析结果也表明，与单独使用常规药物相比，参麦注射液和常规药物联合使用在管理休克方面更有效，多项指标也有所改善，显示参麦注射液治疗休克具有潜在的疗效[30]。参麦注射液联合新活素可使左心室舒张末期内径、左心室收缩末期内径、血肌酐和血纳变低，左心室射血分数、每搏输出量和内生肌酐清除率变高 ，表明参麦注射液联合新活素治疗 ADHF 患者可改善其心功能和肾功能，提高临床疗效[31]。参麦注射液的有效成分之一人参皂苷 Rb_1 能通过调节代谢组学和 AMP 活化蛋白激酶依赖性有丝分裂发挥心脏保护作用，有效缓解急性心肌缺血和氧葡萄糖剥夺诱导的心肌细胞损伤[32]。参麦注射液可降低辐射诱导心脏损伤大鼠血清心脏损伤生物标志物水平，改善心功能障碍，主要可能是通过减轻了心脏结构损伤、纤维化、巨噬细胞浸润和减少过量 ROS 的产生[33]；

不同厂家的参麦注射液对心肌细胞的保护作用以以浙麦冬为原料的参麦注射液较好，说明地道药材对参麦注射液的心血管保护作用影响较大，临床治疗上可优先选择以浙麦冬为原料的参麦注射液[34, 35]。综上，参麦注射液的心血管系统保护作用药效显著，与其改善心肌细胞能量代谢、减轻氧化应激及炎症反应、缓解心肌纤维化和细胞凋亡、增强心肌收缩力和改善血流动力学指标等密切相关。

3.2 肺部疾病的作用研究

参麦注射液益气固脱，养阴生津，对多种肺部疾病有显著的药效。参麦注射液能显著提高肺心病患者的总有效率，同时增加患者动脉氧分压、降低动脉二氧化碳分压、全血黏度、纤维蛋白原水平和平均肺动脉压，显示参麦注射液联合西药常规治疗组具有一定优势[36]。在对肺结核的治疗研究中，研究者对比了患者的临床疗效、免疫功能及炎症因子水平，结果发现，参麦注射液辅助治疗组治疗后 $CD3^+$、$CD4^+$和 $CD4^+/CD8^+$的值较给予常规抗结核药物组明显升高，而 $CD8^+$值显著降低，这些结果表明参麦注射液辅助治疗肺结核能提高患者的免疫功能，降低炎症因子的水平，提高临床疗效[37]；在对照治疗的基础上，参麦注射液能显著缓解患者的咳嗽、咯痰及喘息，表明参麦注射液能有效改善 COPD 患者肺功能, 缓解临床症状，值得临床推广应用[38]。加用参麦注射液患者 FEV_1、PEF 和 GR 蛋白表达显著增加，JNK 蛋白表达、CRP、IL-2、IL-4 和其它炎症因子水平均显著降低，表明参麦注射液治疗激素抵抗型支气管哮喘患者，可以增加患者糖皮质激素受体蛋白表达，对免疫功能具有很好的调控作用，显著改善患者肺功能状况[39]。综上，参麦注射液对多种肺部疾病有显著治疗作用，与其免疫调控和肺功能改善作用密切相关。

大鼠灌胃给予参麦注射液(10ml/kg)，2 次/d，连续 45d，可显著降低高脂血症大鼠体重、血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、丙二醛水平，升高高密度脂蛋白胆固醇、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、脂蛋白脂酶、高密度脂蛋白水平，提示参麦注射液对高脂血症大鼠有明显的调脂和

抗氧化作用[40]。

3.3 抗肿瘤药效研究

参麦注射液作为临床肿瘤患者的常用辅助药，能显著增强化疗药物的药效，提高疾病治疗的总有效率和控制率，有效改善患者生活质量，多个有效性评价表明参麦注射液联合化疗组药效优于化疗组[41, 42]。参麦注射液可联合铂类、紫杉醇、EGFR-TKI 和拓扑异构酶抑制剂等用于肺癌的辅助化疗，均具有明显改善患者免疫功能和增效减毒作用[43-46]。静脉滴注参麦注射液联合化疗能有效降低多种化疗药物的毒副作用，缓解恶性肿瘤患者患者精神状态，修复机体组织，增强机体免疫力[47]。参麦注射液联合多西他赛加环磷酰胺化疗有明显的增效减毒作用，可改善癌症患者全身症状，提高骨髓造血功能，改善细胞免疫功能，最重要的是可减少化疗药物对人体所引起的不良反应[48]。有研究者重点考察了参麦注射液改善恶性肿瘤化疗毒副反应的效果，治疗组在对照组的基础上给予参麦注射液，结果显示，化疗 4 个周期后，观察组血浆黏度、血沉、纤维蛋白原水平、红细胞压积及形态、管周状态、流态和综合积分均低于对照组，而 ORR 明显高于对照组，表明参麦注射液可改善恶性肿瘤化疗患者微循环状态，降低血液黏稠度，提高化疗效果[49]。参麦注射液可通过抑制 miR-103/GPER1 轴向 Treg 细胞分化，改善乳头状甲状腺癌患者术后免疫功能[50]。参麦注射液不仅能显著改善阿霉素的细胞药代动力学行为，增强阿霉素的抗肿瘤药效并逆转乳腺癌细胞对阿霉素的耐药，对阿霉素所导致的心肌毒性也有显著保护作用，机制可能与其抑制 JNK 通路、上调 miR-30a/Beclin 1 的表达、激活 AMPK and PI3K/Akt/GSK-3β 等通路调控阿霉素导致的心肌细胞凋亡和自噬、抑制 MAPK/NF-κB 激活，降低 P-糖蛋白（P-gp）的表达相关[51-56]。参麦注射液还可以重塑促血管生成因子和抗血管因子之间的动态平衡，使肿瘤血管正常化，从而提高药学的转运和抗肿瘤作用，多维药代动力学研究了参麦注射液主要活性成分在血浆、皮下肿瘤和肿瘤内皮细胞内的分布，结果发现，原人参二醇型（PPD）人参皂苷（Rb1、Rb2/Rb3、Rc 和 Rd）的浓度高于原人参三醇型（Rg1 和 Re）和油酸烷型（Ro）人参皂苷，其中 Rd 在皮下肿瘤和肿瘤内皮细胞中的浓度最高，能抑制肿瘤血管新生，正常化肿瘤血管结构，提高 5-氟尿嘧啶的抗肿瘤作用，可能是参麦注射液抗肿瘤血管生成的主要活性成分[57, 58]。综上，参麦注射液辅助化疗具有显著的增效减毒作用，与其改善微循环、提高骨髓造血功能、增强免疫和抗肿瘤血管生成作用密切相关。

3.4 参麦注射液的其他应用

除了上述主要的临床应用，参麦注射液的二次开发一直是一个临床研究热点。有研究者考察了参麦注射液联合肌电生物反馈训练治疗脑卒中后吞咽障碍的临床疗效，使用参麦注射液治疗后的患者洼田饮水试验、吞咽功能评分均低于未使用的患者，表明参麦注射液联合肌电生物反馈训练治疗脑卒中后吞咽障碍，有助于改善患者的吞咽功能，提高治疗效果[59]。参麦注射液治疗膝关节骨关节炎具有多成分、多途径和多靶点协同干预作用特点，能明显改善患者临床症状，提高生活质量并延缓疾病进展[60]。参麦注射液预处理可通过减少炎症因子的产生，促进腹腔镜子宫切除术后患者骨骼肌功能的恢复，且不增加患者不良反应发生率[61]。参麦注射液治疗糖尿病酮症酸中毒临床疗效的 Meta 分析结果显示，参麦注射液干预的治疗组总有效率高于对照组，改善多个临床检验指标，可有效控制糖尿病酮症酸中毒，值得临床推广[62]。参麦注射液联合抗感染治疗老年阿尔茨海默症合并医院获得性肺炎的研究结果表明，加用参麦注射液可显著降低患者炎症因子水平，提高临床疗效，同时能明显改善机体免疫功能[63]。脓毒血症患者给与参麦注射液联合扶正解毒汤治疗后，患者免疫球蛋白 A、E 和 G 水平均显著升高，血乳酸、血清降钙素原和 C 反应蛋白水平均显著降低，序贯器官衰竭评分、急性生理与慢性健康评分均显著降低，生活质量评分显著升高[64]。参麦注射液联合三七粉治疗肝硬化食管胃静脉曲张出血患者的研究结果显示，实验组 PT、APTT 均明显短于对照组、$CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$均明显高于对照组，同时实验组治疗总有效率显著高于对照组，表明参麦注射液和三七粉联合治疗可显著改善肝硬化食管胃静脉曲张出血患者凝血及免疫功能[65]。除此之外，参麦注射液在急诊方面也有一定的临床应用：参麦注射液治疗急性草铵膦中毒致休克研究结果显示，加用参麦注射液组去甲肾上腺素用量、休克持续时间、窦性心动过缓例数均较对照组减少，表明参麦注射液可改善急性草铵膦中毒致休克患者的血流动力学状态，减少血管活性药物使用量，缩短休克持续时间，对心脏有一定的保护作用[66]；通过网络药理学和实验验证，参麦注射液辅助治疗急性胰腺炎的机制被初步揭示，可能与其抑制 IL6/STAT3 激活有关，解释了临床上在血液净化治疗基础上联合参麦注射

液治疗急性重症胰腺炎可显著增强疗效，减少炎症反应，加速病情恢复[67, 68]；在西医对症治疗的基础上，加用参麦注射液辅助治疗慢性胰腺炎急性发作有确切疗效，可显著改善血、尿淀粉酶水平和患者临床症状[69]。综上，参麦注射液其他作用的主要靶点和机制在于其减轻炎症反应、改善机体免疫功能和血流动力学改善作用。

4 参麦注射液不良反应研究

真实世界中 30012 例参麦注射液用药患者的总不良反应发生率 0.15%, 57.78%的不良反应发生在输液后 24 小时内，不良反应最常表现为心血管系统的损害，其次分别是血液系统和呼吸系统，不良反应的出现多与超说明书使用有关[70]。另有参麦注射液不良反应分析显示，不良反应较多发生于 60 岁以上年龄患者, 且女性多于男性，累及器官主要有呼吸系统、中枢神经系统、皮肤及附件和全身性损害等，其药物不良反应出现时间多在用药过程中 30 min 内发生，临床医师和药师应重视参麦注射液的不良反应，加强其应用过程中的监测，合理用药[71]；参麦注射液主要是用于治疗气阴两虚证，患者存在虚实夹杂和实证情况下，不宜进行使用；同时也有研究表明，参麦注射液静脉滴注的过程中，特别是较大的剂量应用时，对于一些内毒素敏感的患者将会出现各种不良反应；参麦注射液的临床应用中，要结合患者的过敏史，并做好症状的合理分析，对溶剂类型和用量进行合理的选择，对合理用药意识进行强化，避免不良反应事件的发生[72]。

总结与展望

参麦注射液作为应用广泛的中药注射液大品种，具有确切的药效及较低的不良反应率，在临床上用于多种疾病的辅助治疗。随着中药现代化脚步的加速迈进，人们对参麦注射液的活性成分、药理机制和临床研究越来越细致深入，三者之间的联系也一步步地被清楚地揭示，主要包括心肌细胞能量代谢调控、炎症免疫调控、肺功能和血流动力学改善、提高骨髓造血功能、抗肿瘤血管生成作用、凝血和微循环改善等。这些研究的进展深化了人们对参麦注射液的认识，为参麦注射液的临床药物治疗提供了科学依据和有益的启示。由于中药重在温和调理的特点，参麦注射液还很难作为某种疾病的首选和单一用药，联合用药可能是其发挥药效的最佳手段。虽然联合用药方案很难界定参麦注射液的药效贡献，但是至少能表明在常规治疗方案的基础上给予参麦注射液可以提高治疗效果，有助于患者的快速康复。现代药学理论研究表明，参麦注射液的活性成分主要包括人参皂苷、人参多糖、麦冬黄酮和麦冬皂苷等成分，具有广泛的药理活性，并且有助于调节患者机体免疫功能来发挥药效。虽然目前参麦注射液的临床应用范围比较广泛，但是不难发现其治疗的特异性不强，而且一般都用作疾病的辅助治疗，这就迫使我们更深层次地揭示参麦注射液的药理机制和临床应用的科学依据，明确药物作用的靶点，为我们合理应用该经典名方提供解释和依据，提高参麦注射液的临床应用价值。

参考文献

[1] SHI S, LIU M, GAO Y, et al. Overview of systematic reviews on Shenmai Injection in prevention and treatment of diseases [J]. Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica, 2021, 46(15): 3998-4007.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版第一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 153-6.

[3] 王若柳, 王海强, 范骁辉, 等. LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MS 分析参麦注射液中化学成分[J]. 中国中药杂志, 2020, 45: 555-64.

[4] 李宁, 黄星, 王冰, 等. 参麦注射液中麦冬化学成分的鉴定[J]. 中成药, 2017, 39: 2340-4.

[5] 王若柳, 范骁辉, 袁玮, 等. HPLC 法同时测定参麦注射液中 9 种人参皂苷[J]. 中成药, 2019, 41: 987-90.

[6] LU X F, BI K S, ZHAO X, et al. Authentication and distinction of Shenmai injection with HPLC fingerprint analysis assisted by pattern recognition techniques [J]. J Pharm Anal, 2012, 2(5): 327-33.

[7] 李雅珍. 参麦注射液主要药效成分的体内过程研究 [D]; 浙江大学, 2020.

[8] 丰晶. 112 例稳定性心绞痛患者参麦注射液静滴后药代动力学分析[J]. 中国处方药, 2022, 20: 49-50.

[9] 于珊珊, 唐思, 张世良, 等. 连续滴注参麦注射液在心绞痛患者体内的药动学研究[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36: 29-31.

[10] 杨林, 张升, 徐晓珍, 等. 参麦注射液药代动力学研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30: 27-30.

[11] YU Z W, LOU G D, GE L L. Rapid identification of cytochrome P450 inductive constituents of Shenmai injection by combined pregnane X receptor reporter gene assay and LC-TOF-MS analysis [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113588.
[12] OLALEYE O E, NIU W, DU F F, et al. Multiple circulating saponins from intravenous ShenMai inhibit OATP1Bs in vitro: potential joint precipitants of drug interactions [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(6): 833-49.
[13] LIU X, CHEN L, LIU M, et al. Ginsenoside Rb1 and Rd Remarkably Inhibited the Hepatic Uptake of Ophiopogonin D in Shenmai Injection Mediated by OATPs/oatps [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 957.
[14] YU J, XIN Y F, GU L Q, et al. One-month toxicokinetic study of SHENMAI injection in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(2): 391-9.
[15] YU J, GU L Q, XIN Y F, et al. Potential accumulation of protopanaxadiol-type ginsenosides in six-months toxicokinetic study of SHENMAI injection in dogs [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2017, 83: 5-12.
[16] 何明, 刘金涛, 胡艳艳, 等. 参麦注射液治疗气阴两虚型缓慢性心律失常合并期前收缩的临床研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022, 24: 987-9.
[17] 郭蕾, 李国境. 参麦注射液治疗慢性心力衰竭的临床观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8: 40.
[18] XIAN S, YANG Z, LEE J, et al. A randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled clinical study on the efficacy and safety of Shenmai injection in patients with chronic heart failure [J]. Journal of ethnopharmacology, 2016, 186: 136-42.
[19] WANG S M, YE L F, WANG L H. Shenmai Injection Improves Energy Metabolism in Patients With Heart Failure: A Randomized Controlled Trial [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 459.
[20] 毛静远, 张健, 朱明军. 中成药治疗心力衰竭临床应用指南（2021 年） [J]. 中国中西医结合杂志: 1-15.
[21] HU S Y, ZHOU Y, ZHONG S J, et al. Shenmai Injection Improves Hypertensive Heart Failure by Inhibiting Myocardial Fibrosis via TGF- β 1/Smad Pathway Regulation [J]. Chin J Integr Med, 2022.
[22] 王连辉. 参麦注射液联合舒血宁注射液治疗冠心病心绞痛疗效观察 [J]. 中外女性健康研究, 2020, (03): 38+62.
[23] ZHANG X, SUN Y, YANG X, et al. Effect of Chinese Medicine on No or Slow Reflow after Percutaneous Coronary Intervention in Myocardial Infarction Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Chinese journal of integrative medicine, 2020, 26(3): 227-34.
[24] ZHENG Z, YU Z, XU B, et al. Pretreatment with Shenmai Injection Protects against Coronary Microvascular Dysfunction [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 8630480.
[25] MEI S L, XIA Z Y, QIU Z, et al. Shenmai Injection Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Targeting Nrf2/GPX4 Signalling-Mediated Ferroptosis [J]. Chin J Integr Med, 2022, 28(11): 983-91.
[26] YU J, LI Y, LIU X, et al. Mitochondrial dynamics modulation as a critical contribution for Shenmai injection in attenuating hypoxia/reoxygenation injury [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 237: 9-19.
[27] 张丹, 贾小凤. 参麦注射液辅助治疗急性心肌梗死的临床研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(12): 1890-4.
[28] MEI S, XIA Z, QIU Z, et al. Shenmai Injection Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Targeting Nrf2/GPX4 Signalling-Mediated Ferroptosis [J]. Chinese journal of integrative medicine, 2022, 28(11): 983-91.
[29] 李跃文, 刘志强, 王博龙. 补益类中药注射液辅助治疗病毒性心肌炎的网状 Meta 分析 [J]. 中成药, 2018, 40(11): 2414-20.
[30] LI X, SHEN Y, HE F, et al. Effectiveness and safety of Shenmai injection in treatment of shock: A Meta-analysis [J]. Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan, 2018, 38(2): 155-66.
[31] 尤翠兰. 参麦注射液联合新活素治疗 ADHF 患者的效果及对其心肾功能的影响 [J]. 当代临床医刊, 2022, 35(03): 71-3.
[32] HU J, ZHANG L, FU F, et al. Cardioprotective effect of ginsenoside Rb1 via regulating metabolomics profiling and AMP-activated protein kinase-dependent mitophagy [J]. Journal of ginseng research, 2022, 46(2): 255-65.
[33] XU M, TANG Q, YIN X, et al. Protective Role of Shenmai Injection on Radiation-Induced Heart Injury [J]. Radiat Res, 2023.

[34] ZHAO M, CHEN Q, WANG H, et al. Comparison of Protective Effects of Shenmai Injections Produced by Medicinal Materials from Different Origins on Cardiomyocytes [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 7205476.
[35] ZHAO M, XU W F, SHEN H Y, et al. Comparison of bioactive components and pharmacological activities of ophiopogon japonicas extracts from different geographical origins [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 138: 134-41.
[36] WANG K, WU J, WANG H, et al. Comparative Efficacy of Chinese Herbal Injections for Pulmonary Heart Disease: A Bayesian Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials [J]. Frontiers in pharmacology, 2020, 11: 634.
[37] 张绿浪, 胡清亮, 邓长刚, 等. 参麦注射液联合常规抗结核药物对肺结核患者的临床疗效、免疫功能及炎症因子水平的影响[J]. 现代医学, 2018, 46: 1266-70.
[38] 尹祥. 参麦注射液联合氨茶碱治疗慢性阻塞性肺疾病的临床观察 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(26): 20-3.
[39] 胡纪旋. 参麦注射液对激素抵抗型支气管哮喘患者糖皮质激素受体和免疫功能调节的作用分析 [J]. 海峡药学, 2020, 32(05): 102-3.
[40] ZHU T L, GUO Y S, YANG B, et al. [Modulating effects of shenmai injection on serum lipids in rats with hyperlipemia] [J]. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2016, 32(3): 230-3.
[41] ZHANG D, WANG K, ZHENG J, et al. Comparative efficacy and safety of Chinese herbal injections combined with transcatheter hepatic arterial chemoembolization in treatment of liver cancer: a bayesian network Meta-analysis [J]. Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan, 2020, 40(2): 167-87.
[42] 彭婉, 王建, 马骁, 等. 参麦注射液联合化疗治疗非小细胞肺癌的 Meta 分析[J]. 中药与临床, 2018, 7.
[43] 张健, 毛卫军, 刘世腾. 参麦注射液联合含卡铂双药治疗晚期非小细胞肺癌的疗效观察 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2021, 28(09): 1075-8.
[44] 陈律, 柴枫, 傅思喆, 等. 参麦注射液辅助紫杉醇联合卡铂化疗治疗非小细胞肺癌的疗效观察[J]. 基层医学论坛, 2021, 25: 4017-9.
[45] 汪海锋, 张学德, 刘朝辉, 等. 参麦注射液联合埃克替尼治疗晚期非小细胞肺癌效果观察[J]. 中国乡村医药, 2022, 29: 29-30.
[46] 张伟杰, 张钟月, 娄世同. 参麦注射液联合安罗替尼及伊立替康二线以上治疗小细胞肺癌有效性和安全性临床观察 [J]. 中医研究, 2022, 35(08): 10-5.
[47] 王凤歧. 参麦注射液联合化疗治疗恶性肿瘤的临床体会 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(A1): 187.
[48] 施丽, 刘璐, 宋锐. 参麦注射液联合多西他赛+环磷酰胺化疗方案对中晚期卵巢癌临床疗效、免疫功能的影响以及不良反应 [J]. 中国药物经济学, 2021, 16(01): 85-8.
[49] 郝晶, 孙岸弢, 赵伟, 等. 参麦注射液对恶性肿瘤化疗患者微循环及白细胞水平的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15: 3295-8+303.
[50] FANG T, LI J, WU X. Shenmai injection improves the postoperative immune function of papillary thyroid carcinoma patients by inhibiting differentiation into Treg cells via miR-103/GPER1 axis [J]. Drug Dev Res, 2018, 79(7): 324-31.
[51] LIU W Y, ZHANG J W, YAO X Q, et al. Shenmai injection enhances the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs against colorectal cancers via improving their subcellular distribution [J]. Acta pharmacologica Sinica, 2017, 38(2): 264-76.
[52] LIU L, LIU C, DUAN L, et al. Shengmai injection combined with conventional therapy in treating Adriamycin-related cardiotoxicity: A protocol for systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Medicine, 2020, 99(45): e23084.
[53] WU Y P, ZHANG S, XIN Y F, et al. Evidences for the mechanism of Shenmai injection antagonizing doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Phytomedicine, 2021, 88: 153597.
[54] ZHANG X, LV S, ZHANG W, et al. Shenmai injection improves doxorubicin cardiotoxicity via miR-30a/Beclin 1 [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139: 111582.
[55] LI L, LI J, WANG Q, et al. Shenmai Injection Protects Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via Maintaining Mitochondrial Homeostasis [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 815.

[56] YANG L, ZHANG C, CHEN J, et al. Shenmai injection suppresses multidrug resistance in MCF-7/ADR cells through the MAPK/NF-κB signalling pathway [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 276-85.
[57] CHENG L, LIU W, ZHONG C, et al. Remodeling the homeostasis of pro- and anti-angiogenic factors by Shenmai injection to normalize tumor vasculature for enhanced cancer chemotherapy [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113770.
[58] ZHONG C, JIANG C, NI S, et al. Identification of bioactive anti-angiogenic components targeting tumor endothelial cells in Shenmai injection using multidimensional pharmacokinetics [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(9): 1694-708.
[59] 吴春红, 朱小云. 参麦注射液联合肌电生物反馈训练治疗脑卒中后吞咽障碍临床研究 [J]. 新中医, 2022, 54(06): 88-91.
[60] 程中午, 王大玉, 张本结, 等. 参麦注射液治疗膝关节骨关节炎的网络药理学分析及临床对照验证[J]. 中国骨与关节杂志, 2021, 10: 546-53.
[61] 朱梅桢, 潘亚飞, 陈磊, 等. 参麦注射液促进子宫切除术后骨骼肌功能恢复[J]. 温州医科大学学报, 2021, 51: 315-8.
[62] 杨芸艺, 雷涛, 沙雯君, 等. 参麦注射液治疗糖尿病酮症酸中毒临床疗效的 Meta 分析[J]. 中国中医急症, 2022, 31: 1138-42.
[63] 詹惠娟. 参麦注射液联合抗感染治疗老年阿尔茨海默症合并医院获得性肺炎的效果观察 [J]. 现代养生, 2022, 22(17): 1442-4.
[64] 刘海林, 霍娟勇, 燕垚旬. 扶正解毒汤联合参麦注射液对脓毒血症患者体液免疫功能的影响[J]. 中国药业, 2021, 30: 74-6.
[65] 刘晓东, 郭晓会, 任海霞, 等. 参麦注射液联合三七粉治疗肝硬化食管胃静脉曲张出血疗效及对凝血和免疫功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30: 3688-91+730.
[66] 称宏森, 孙超男, 陈晨松, 等. 参麦注射液对急性草铵膦中毒致休克患者的疗效观察[J]. 中国急救医学, 2021, 41: 316-8.
[67] HE Y, HU C, LIU S, et al. Anti-Inflammatory Effects and Molecular Mechanisms of Shenmai Injection in Treating Acute Pancreatitis: Network Pharmacology Analysis and Experimental Verification [J]. Drug design, development and therapy, 2022, 16: 2479-95.
[68] 杨明, 杨琳, 樊哲, 等. 杂合式血液净化序贯联合参麦注射液治疗急性重症胰腺炎患者临床观察[J]. 中国实用医药, 2021, 16: 140-2.
[69] 陈卫阳, 张兴龙, 丁文元. 参麦注射液辅助治疗慢性胰腺炎急性发作临床研究[J]. 新中医, 2020, 52: 72-4.
[70] 王明霞, 王淑梅, 刘明, 等. 真实世界中 30 012 例参麦注射液使用情况与安全性评价[J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21: 133-8.
[71] 姜芳媛. 参麦注射液不良反应分析 [J]. 中国社区医师, 2021, 37(33): 9-10.
[72] 闫正博. 浅析参麦注射液联合应用及不良反应 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(91): 132-3.

某院肠外营养多腔袋临床应用现状调查：单中心回顾性研究

屈伟

（1.江阴市人民医院药学部，江苏 江阴 214400）

【摘要】目的：单中心评价脂肪乳氨基酸（17）葡萄糖（11％）注射液（以下简称肠外营养多腔袋）临床应用合理性。**方法：**回顾性通过医院 HIS 系统，抽取 2022 年 10 月-2022 年 12 月所有使用肠外营养多腔袋的患者病历信息，评价营养风险筛查 2002（NRS 2002）和使用疗程是否合理；禁忌症：包括高度高脂血症、严重肝功能不全；微量营养素缺失；代谢性并发症：包括甘油三酯（TG）值≥3mmol/L、肝功能指标异常、血糖升高。**结果：**共纳入 256 例患者，排名前三的科室分别是普外科占 63.40%，肿瘤内科占 12.45%，妇科占 11.32%； NRS 2002 评分<3 分占 16.80%，≥3 分占 83.20%；患者平均使用疗程（7.01±6.42）d，其中 NRS 2002 评分<3 分的患者中，≥7d 的占 1.56%，NRS 2002 评分≥3 分的患者中，≥7d 占 32.03%；存在重度高脂血症 1 例（0.38%），严重肝功能不全患者 12 例（4.53%）；多种微量元素和多种维生素均添加占 18.87%，均未添加占 63.77%；营养支持后，TG≥3mmol/L 患者 3 例（10.00%），肝功能指标异常患者 15 例（7.35%），血糖升高 7 例（4.93%）。**结论：**肠外营养多腔袋临床应用仍存在无适应症、疗程较长、禁忌症患者使用及部分微量营养素缺失等问题，同时代谢性并发症也时常发生，临床药师需加强用药监测，提高其使用合理性。

【关键词】脂肪乳氨基酸（17）葡萄糖（11％）注射液；合理性；禁忌症；代谢性并发症

Investigation of multi-chamber bag for parenteral nutrition in a hospital: A retrospective cross-sectional study

QU WEI, ZHANG YING

（1. Department of Pharmacy, Jiangyin People's Hospital, Jiangsu Jiangyin 214400, China）

【Abstract】Objective: Evaluation the clinical rationality of fat emulsion amino acids (17) and glucose (11%) Injection (hereinafter referred to as multi-chamber bag for parenteral nutrition) in a single center hospital. **Methods:** The medical records of all patients using multi-chamber bag for parenteral nutrition were selected through HIS system from October 2022 to December 2022 retrospectively. Evaluating whether the Nutritional Risk Screening 2002 (NRS 2002) and treatment course were reasonable. Contraindications: including high hyperlipidemia, severe liver insufficiency; Micronutrient deficiency; Metabolic complications: including triglyceride (TG) value ≥3mmol/L, abnormal liver function indicators, elevated blood sugar; electrolyte levels (Na, sodium; K, potassium; Ca, calcium; Mg, magnesium; P, phosphorus) change degree. **Results:** A total of 256 patients were included. The top three departments were general surgery (63.40%), oncology (12.45%) and gynecology (11.32%). NRS 2002 scores <3 score accounted for 16.80%, ≥3

基金项目：中国药学会科技开发中心科普项目(CMEI2021KPYJ00707)；江苏省药学会—天晴医院药学基金科研课题（Q202136）

作者简介：屈伟，男，硕士研究生，主要从事临床药学工作，Email: 2417150652@qq.com

score accounted for 83.20%; The average treatment course of patients was (7.01±6.42) d. Among the patients with NRS 2002 score <3, 1.56% were ≥7d; Among the patients with NRS 2002 score ≥3, 32.03% were ≥7d; There were 1 (0.38%) patient with high hyperlipidemia and 12 (4.53%) patients with severe liver insufficiency. 18.87% of all trace elements and multivitamins were added, 63.77% were not added; After nutritional support, there were 3 patients (10.00%) with TG≥3mmol/L, 15 patients (7.35%) with abnormal liver function index, and 7 patients (4.93%) with elevated blood glucose. **Conclusion：** The clinical application of multi-chamber bag for parenteral nutrition still has some problems, such as no indications, long course of treatment, contraindicated patients and partial micronutrient deficiency. Meanwhile, metabolic complications also occur frequently. Clinical pharmacists need to strengthen drug monitoring and improve the rationality of its use.

【Key words】 Fat Emulsion amino Acids (17) and glucose (11%) Injection; Rationality; Contraindications; Metabolic complications

肠外营养多腔袋也称商业预混多腔袋（multi-chamber bag, MCB）,是工业化的“全合一”肠外营养混合液，采用标准化肠外营养配方，包含人体代谢所需要的宏量营养素和部分微量营养素。由于多腔袋具有明显的临床使用优势，比如处方较为合理，减少静脉药物配置环节，节省人力成本，降低处方和配置差错，减少血流感染，即开即用，满足大多数临床营养需求等[1]，因此在临床使用较为广泛，但也存在不规范现象[2,3]。我国已发表《肠外营养多腔袋临床应用专家共识（2022）》[4]，为规范肠外营养多腔袋的临床应用提供参考，但证据多来源于国外研究数据，本文就我院单中心临床实际应用情况进行分析，为进一步规范肠外营养多腔袋的合理使用提供数据基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

脂肪乳氨基酸（17）葡萄糖（11％）注射液（四川科伦药业股份有限公司，批准文号：H20173381），剂量1440ml，氨基酸 34g,脂肪 51g，葡萄糖（无水）97g，以下简称肠外营养多腔袋。回顾性通过医院 HIS 系统，抽取 2022 年 10 月-2022 年 12 月所有使用肠外营养多腔袋的患者病历信息，共 256 例。采用 EXCEL 表格记录患者诊疗科室，临床诊断，营养风险筛查 2002（NRS 2002）评分，使用疗程，使用前后肝功能指标、营养指标、血糖等，是否添加微量营养素及代谢性并发症等。

1.2 点评方法与依据

主要参考肠外营养多腔袋药品说明书，肠外营养多腔袋临床应用专家共识（2022）》[4]，中国成人患者肠外肠内营养临床应用指南(2023 版)[1]，肠外营养安全性管理中国专家共识[5]，肠外肠内营养临床药学实践共识(2022 年版）等对多腔袋临床应用合理性进行评价。

1.3 评价指标与标准

①NRS 2002 评分：NRS 2002 评分＜3 分，不合理；≥3 分合理。②使用疗程：疗程＜7d，不合理；≥7d，合理。③禁忌症：根据《高甘油三酯血症及其心血管风险管理专家共识》[6]，当甘油三酯（TG）值≥5.6mmol/L 时，为高度高脂血症；参照美国卫生与公众服务部 2017 年 11 月发布的《不良事件通用术语标准》5.0 版相关内容及国际通用的采用生化指标进行肝功能不全严重程度分级[7,8]，当丙氨酸氨基转移酶(ALT) 、天冬氨酸氨基转移酶(AST) 中任一指标 ≥正常值的 5 倍，或总胆红素(TBIL) 、直接胆红素(DBIL) 中任一指标≥正常值的 3 倍为严重肝功能不全。④微量营养素缺失：未添加多种微量元素或多种维生素中任一种或两种；⑤代谢性并发症：使用肠外营养多腔袋后，TG 值≥3mmol/L（排除使用前 TG 值>3mmol/L 及未检测 TG 患者）；肝功能指标异常，ALT、AST、TBIL、DBIL 中任一指标≥正常值的 1 倍（排除使用前肝功能异常及未检测肝功能指标患者）；血糖升高，Glu 值≥10mmol/L（排除使用前糖尿病及未检测血糖患者）。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析，符合正态分布计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，采用 t 检验。计数资料采用 n（%）表示。P＜0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 科室分布

共纳入 256 例患者，排名前三的科室分别是普外科 168 例（63.40%），肿瘤内科 33 例（12.45%），妇科 30 例（11.32%）等。见表 1。

表 1　科室分布 n（%）

科室	n（例）	百分比（%）
普外科	168	63.40
肿瘤内科	33	12.45
妇科	30	11.32
胸心外科	13	4.91
重症医学科	8	3.02
介入科	7	2.64
产科	1	0.38
放疗科	1	0.38
骨科	1	0.38
呼吸内科	1	0.38%
全科医学科	1	0.38%
心血管内科	1	0.38%

2.2 NRS 2002 和疗程

NRS 2002 评分<3 分的患者共 43 例（16.80%），NRS 2002 评分≥3 分的患者共 222 例（83.20%）；患者平均使用疗程（7.01±6.42）d，其中 NRS 2002 评分<3 分的患者中，使用多腔袋≥7d 的患者共 4 例（1.56%），NRS 2002 评分≥3 分的患者中，使用多腔袋≥7d 的患者共 82 例（32.03%）。见表 2。

表 2　适应症和疗程

NRS 2002 评分（分）	发生数（%）	疗程（d）	发生数（%）
＜3	43(16.80)	＜7d	39(15.23)
		≥7d	4(1.56)
≥3	222(83.20)	＜7d	140(54.68)
		≥7d	82(32.03)

2.3 禁忌症

忌症患者包括重度高脂血症 1 例（0.38%），严重肝功能不全患者 12 例（4.53%）。见表 3。

表 3　禁忌症　n（%）

项目	发生数（例）	百分比（%）
高度高脂血症	1	0.38
严重肝功能不全	12	4.53

2.4 微量营养素

肠外营养多腔袋中多种微量元素和多种维生素均添加共 50 例（18.87%），均未添加共 169 例（63.77%）。

见表 4。

表 4　微量营养素　n（%）

项目	发生数（例）	百分比（%）
2 种都缺少	169	63.77
仅缺少多种微量元素	43	16.23
仅缺少多种维生素	3	1.13
2 种都添加	50	18.87

2.5 代谢并发症

使用肠外营养多腔袋营养支持后，根据使用前后生化指标结果，甘油三酯（≥3mmol/L）患者 3 例（10.00%），肝功能指标异常（≥正常值 1 倍）患者 15 例（7.35%），血糖升高（≥10mmol/L）7 例（4.93%）。见表 5。

表 5　代谢性并发症　n（%）

项目	总患者数（例）	发生数（例）	百分比（%）
甘油三酯（≥3mmol/L）	30	3	10.00
肝功能指标异常（≥正常值 1 倍）	204	15	7.35
血糖升高（≥10mmol/L）	142	7	4.93

3.讨论

肠外营养是通过静脉途径为机体提供营养素的营养治疗方式。指南均一致推荐肠外营养采用“全合一”模式，优先推荐使用工业化多腔袋，也可使用医院配置。规范应用肠外营养可改善患者临床结局，并减少并发症，使用不当则可能造成患者伤忘。因此，美国医疗安全协会和中国药学会均将其列入高警示药品名单[9,10]。研究结果显示，使用量排名前三的科室分别是普外科，肿瘤内科，妇科，与临床需求一致。普外科和妇科患者术后常存在胃肠道功能障碍，因此需要选择肠外营养；肿瘤患者放化疗期间或恶液质期口服或肠内营养常不能满足患者需求，而我院肠外营养多腔袋总能量 1000Kcal，可作为补充性肠外营养补足能量缺失部分，且部分肠内联合部分肠外应该是肿瘤患者住院期间最常见、最现实的营养治疗方式[11]。

规范启动肠外营养是保障患者安全肠外营养的基础。因此患者使用肠外营养多腔袋前，应先进行三级营养诊断，即营养筛查、营养评估、综合评价。NRS 2002 具有循证医学基础，对识别营养风险的敏感性和特异性较高，多个指南推荐对于住院患者营养筛查首选 NRS 2002[1,12]。对于≥3 分的患者，给予营养支持后能更有效的改善患者临床结局，而<3 分的患者，给予营养支持后疗效不明显[13]。国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录（2021 年）凡例中要求，“胃肠外营养液”需经营养风险筛查，明确具有营养风险，且不能经饮食或使用“肠内营养剂”补充足够营养的住院患者方予支付[14]。本研究结果显示，有 16.80%的患者 NRS 2002 评分<3 分使用肠外营养多腔袋，说明无适应症使用现象较为严重，与杨阳等[2]研究结果一致。83.20%的患者 NRS 2002 评分≥3 分，但并不是都有使用肠外营养多腔袋的适应症。从上可知，患者除具有营养风险外，还应不能通过饮食或肠内途径补充足够营养，才具有使用肠外营养的适应症，本研究部分患者 NRS 2002 评分≥3 分，但其可能通过建立肠内营养途径补充足够营养，且由于本研究为回顾性研究，依赖于电子病历系统数据，因此可能存在一定误差。

肠外营养多腔袋平均使用疗程（7.01±6.42）d，其中疗程≥7d 的患者占 32.03%。多腔袋制剂通常采用标准化肠外营养配方，适合病情稳定和需要短期肠外营养支持的患者；对于严格限制液体、电解质紊乱、有特殊营养素需求等患者需给予个体化肠外营养处方，宜采用院内配制。因此多腔袋更适合病情稳定特别是仅需短期（<7d）肠外营养的患者[4]。我院肠外营养多腔袋总能量仅 1000kcal，对于≥50g 的患者，每日需要总能量大约 1500kcal，

若患者持续使用肠外营养多腔袋，则累积能量缺口较大，第 7 天重新采用 NRS 2002 评分，则患者营养受损部分得 1 分，体质量较大患者，甚至评分 2 分，因此需要及时调整营养支持方案，才能更好得改善临床结局。

对于重度高脂血症和严重肝功能不全患者属于禁忌症范畴。本研究显示使用肠外营养多腔袋前，1 例患者重度高脂血症，12 例患者严重肝功能不全。TG 重度升高，即使无动脉粥样硬化性心血管疾病风险，急性胰腺炎风险也明显增高[6]。我院肠外营养多腔袋中脂肪乳剂由长链脂肪酸构成，虽然能为机体提供能量和生物膜的活性成分及必须不饱和脂肪酸，但其氧化速度慢，还需要肝脏线粒体肉毒碱的转运，患者疾病状态下，易在患者体内堆积，增加蛋白质内耗。存在肝功能障碍患者，不宜过多使用长链脂肪酸，否则可能加重患者机体的氧化分解代谢负担[15]。因此使用肠外营养多腔袋前，需检测患者血脂和肝功能，严禁具有禁忌症的患者使用。

微量营养素是肠外营养的重要组成部分，对维持机体水、电解质、酸碱平衡及内环境具有十分重要的作用。研究结果显示，63.77%的患者未添加多种微量元素和多种维生素制剂，17.36 的患者只添加其中一种微量营养素，与祁献芳等[16]研究结果比较，未添加率比例较高。可能与医生未意识到微量营养素在营养支持中的重要性，或者认为使用肠外营养多腔袋疗程较短，不需要补充微量营养素有关。

肠外营养多腔袋作为标准化的肠外营养处方，其糖脂比较低，非蛋白热氮比较高，电解质较少，缺失微量元素和维生素等，长期使用可能会导致糖脂代谢紊乱和电解质紊乱等。研究发现使用肠外营养多腔袋营养支持后，10.00%的患者 TG 浓度≥3mmol/L，7.35%的肝功能指标异常，4.93%的患者血糖升高。可能与脂肪乳、葡萄糖输注速度过快，机体的脂肪廓清能力降低，原发疾病等因素有关[5]，但长期使用也会带来代谢性并发症发生，与本研究结果显示部分患者使用疗程≥7d 也有一定的相关性。

综上，肠外营养多腔袋的使用不合理问题较多，主要包括无适应症、疗程较长、禁忌症患者使用及部分微量营养素缺失等，同时代谢性并发症也时常发生，临床药师需加强用药监护，提高临床疗效。本研究也具有一定的局限性：本研究为单中心回顾性研究，部分临床结局难以获得，也是下一步工作方向。

参考文献

[1]中华医学会肠外肠内营养学分会.中国成人患者肠外肠内营养临床应用指南（2023 版）[J].中华医学杂志,2023,103(13):946-74.

[2]杨阳,顾海娟,陆海敏,等.肿瘤专科医院脂肪乳氨基酸(17)葡萄糖(11％)注射液临床使用分析[J].海峡药学,2019,31(10):126-28.

[3]王秀花,何泽然,李志蕨,等.脂肪乳氨基酸(17)葡萄糖(11％)注射液临床应用点评与规范、合理使用[J].昆明医科大学学报,2023,44(3):138-42.

[4]中华医学会肠外肠内营养学分会.肠外营养多腔袋临床应用专家共识（2022）[J].中华外科杂志,2022,60(4):321-28.

[5]中国抗癌协会肿瘤营养专业委员会,中华医学会肠外肠内营养学分会.肠外营养安全性管理中国专家共识[J].肿瘤代谢与营养电子杂志,2021,8(5):495-502.

[6]中国胆固醇教育计划委员会.高甘油三酯血症及其心血管风险管理专家共识[J].中华心血管病杂志,2017,45(2):108-15.

[7] Freites-Martinez A,Santana N,Arias-Santiago S,et al. Using the Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE-Version 5.0）to evaluate the severity of adverse events of anticancer therapies [J]. Actas Dermosifiliogr（Engl Ed）,2021,112(1):90-92.

[8]朱珠,曹运莉,孙钢,杜小莉.肝功能不全分级方法概述[J].中国药师,2012,15(03):418-21.

[9] Institute for Safe Medication Practices. ISMP list of high-alert medications in acute care settings [EB/OL]. [2017-05-21]. Available at https://www.ismp.org/recommendations/high_alert_medications_acute_list.

[10]中国药学会医院药学专业委员会.高警示药品推荐目录(2019 版)[EB/OL]. [2019-07-08]. Available at https://www.cpa.org.cn/index.php?do=info&cid=75011.

[11]王林,丛明华,崔久嵬,等.肿瘤营养治疗的基本原则[J].肿瘤代谢与营养电子杂志,2022,9(6):727-34.

[12]许静涌,杨剑,康维明,等.营养风险及营养风险筛查工具营养风险筛查2002临床应用专家共识(2018版)[J].中华临床营养杂志,2018,26(3):131-35.

[13] Zhu MW, Wei JM, Chen W, et al. Nutritional Risk and Nutritional Status at Admission and Discharge among Chinese Hospitalized Patients: A Prospective, Nationwide, Multicenter Study[J]. J Am Coll Nutr,2017,36(5):357-63.
[14]国家医疗保障局. 国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录（2021 年）[EB/OL]. [2021-12-03]. Available at http://www.nhsa.gov.cn/art/2021/12/3/art_37_7429.html.
[15] Calder PC, Jensen GL, Koletzko BV, et al. Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions[J]. Intensive Care Med,2010,36(5):735-49.
[16]祁献芳,王志,何丹丹,等.郑州某三甲医院成人住院患者肠外营养治疗的现状调查：一项回顾性横断面研究[J/OL].中国医院药学志:1-6[2023-05-18]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1204.R.20230417.1311.006.html.

超高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时检测滋肾健脑颗粒中的龟甲和鹿角※

曲范娜[†1,2,3]，刘丽[1,2,3]，田辉[1,2,3]，笔雪艳[*1 1,2,3]

（1、黑龙江省药品检验研究院（黑龙江 哈尔滨 150088）；2、国家药品监督管理局中药质量研究与评价重点实验室（黑龙江 哈尔滨 150088）；3、黑龙江省中药质量研究与评价重点实验室（黑龙江 哈尔滨 150088））

【摘要】目的：通过液质联用鉴别滋肾健脑颗粒中龟甲和鹿角两味药材的真伪。**方法**：采用 Waters ACQUITY UPLC BEH-C_{18}（2.1mm X 100mm,1.7μm）；流动相：乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0~25min，5%→20%A；25~40min，20%~50%A）；流速：0.3 mL • min^{-1};柱温：20℃；进样量：5μL；质谱采用电喷雾正离子模式（ESI+），进行多反应监测（MRM）。毛细管电压为 3.5kV，离子源温度为 150℃，脱溶剂温度为 350℃，脱溶剂气体流速 600L • h^{-1}，碰撞气体为氩气。**结果**：在相同的保留时间下，供试品与对照品出现了相同离子对的峰。**结论**：本方法可以用于滋肾健脑颗粒中龟甲和鹿角的真伪鉴别。

【关键词】滋肾健脑颗粒；龟甲；鹿角；液质联用

UPLC/QQQ-MS analysis of Tortoise shell and Antler in Zishenjiannao grains

QU Fan-na[†1,2,3]，LIU Li[1,2,3]，Tian Hui[1,2,3]， Bi Xue-yan[*2 1,2,3]

1. Heilongjiang Institute of Drug Control （Harbin 150088, China）; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine （Harbin 150088, China）; 3. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine （Harbin 150088, China）

【Abstract】Objective：To establish a LC-MS method to discriminate the tortoise shell and antler in Zishenjiannao grains. **Methods:** The chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH-C_{18} column（2.1mm X 100mm,1.7μm） by gradient elution（0~25min，5%→20%A；25~40min，20%~50%A）using acetonitrile（A）-formic acid soluton （each 1000mL of water containing 1 mL formic acid）（B）. The mobile phase at the flow rate of 0.3 mL • min^{-1}, the column temperature was maintained at 20℃, the injection volume was 5μL; the mass spectrometer was operated in the positive ion mode and multi-reaction mode, the capillary voltage was 3.5kV, the ion source temperature was set at 150℃, the desolvation temperature was set at 350℃，the desolvation of source gas flow was set at 600L • h^{-1}，the collision gas is argon. **Results:** The sample have the same ion-pair peaks to the reference standards at the same retention time. **Conclusion:** The method could be used in the discrimination of tortoise shell and antler in Zishenjiannao grains.

【Key words】Zishenjiannao grains; Tortoise shell; Antler;UPLC/QQQ-MS

滋肾健脑颗粒是复方中药颗粒制剂。其主要功效为补气养血，填精益髓。用于健忘症，精神衰弱腰膝酸软，神疲乏力。[1]随着现代人生活节奏加快，压力增大及人口老龄化进程的加剧，医药市场对滋补保健类中药复方制

※ 2015 年国家药品标准提高项目

[†]作者简介：曲范娜，女，硕士研究生，电话：0451-87537011，Email: qfnqfn@163.com

[*]通讯作者：笔雪艳，女，博士研究生，电话：0451-87301293，Email: 65554629@qq.com；

剂的需求逐年增加。[2]

滋肾健脑颗粒的处方由龟甲、鹿角、楮实子、枸杞子、人参和茯苓六味药材组成。龟甲和鹿角用量较大，占整个处方量的 65%。自古以来，龟甲和鹿角就是两味常见的补品。龟甲的功效主要为滋阴潜阳，益肾强骨，养血补心，固经止崩。[3,4]。鹿角的功效主要为温肾阳，强筋骨和行血止痛。[5,6]但在原标准中，仅用茚三酮的化学反应法对其进行检测。[1]无论在准确性还是可靠性上，都存在明显的不足。同时，由于近年来胶类药材市场的用料混乱，有关胶类药材的专属性研究也有报导，多采用 LC-MS 与胰蛋白酶测序相合的方法，通过对各种胶类药材的特征肽段进行检测从而进行专属性鉴别。[7-9]2015 版《中国药典》的龟甲胶和鹿角胶项下，均增加了相应的质谱鉴别方法。[10,11]但是，迄今为止并 没有发现对处方药中龟甲和鹿角的专属性研究的报导。为了准确鉴别滋肾健脑颗粒中龟甲和鹿角的真伪。本文借鉴 2015 版《中国药典》的龟甲胶和鹿角胶项下的检测模式，对滋肾健脑颗粒中龟甲和鹿角的专属性鉴别进行了一系列的探索性研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Acquity UPLC Xevo TQD 液质联用仪，MassLynx V4.1 质谱工作站（美国 Waters 公司），METTLER TOLEDO XS205DU 电子天平（美国梅特勒公司），SK2510LHC 型超声波仪（KUDOS 公司）。

1.2 试药

对照品龟甲胶对照药材（批号 121693-201301）和鹿角胶对照药材（批号 121694-201301）均购于中国食品药品检定研究院。序列级胰蛋白酶（美国 Promega 公司），乙腈（美国 Sigma 公司）为色谱纯，甲酸（美国 Sigma 公司）为色谱纯，水为 Milli-Q 制备的超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Waters ACQUITY UPLC BEH-C_{18}（2.1mm X 100mm,1.7μm）；流动相：乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0~25min，5%→20%A；25~40min，20%~50%A）；流速：0.3 mL•min^{-1};柱温：20℃；进样量：5μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾正离子模式（ESI+），进行多反应监测（MRM），选择质荷比（m/z）631.3（双电荷）→546.4 和 631.3（双电荷）→921.4 作为龟甲的检测离子对。选择质荷比（m/z）765.4（双电荷）→554.0 和 765.4（双电荷）→733.0 作为鹿角的检测离子对，毛细管电压为 3.5kV，离子源温度为 150℃，脱溶剂温度为 350℃，脱溶剂气体流速 600L•h^{-1}，碰撞气体为氩气。锥孔电压与碰撞能量对龟甲和鹿角分别设置，见表 1。

	锥孔电压（kV）	碰撞能量（eV）
龟	40	30
鹿	40	20

2.3 对照品溶液制备

2.3.1 龟甲对照品溶液制备

取龟甲胶对照品 0.1g，加 1%碳酸氢铵溶液 50ml，超声处理 30 分钟，用微孔滤膜滤过，取续滤液 100μl，置微量进样瓶中，加胰蛋白酶 10μl（取序列分析用胰蛋白酶，加 1%碳酸氢铵溶液制成每 1ml 中含 1mg 的溶液，临用时配制），摇匀，37℃恒温酶解 12 小时，作为龟甲对照品溶液。

2.3.2 鹿角对照品溶液制备

取鹿角胶对照品 0.1g，同 2.3.1 项下制备方法，制成鹿角对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取本品 10g，同 2.3.1 项下的方法，制成供试品溶液。

2.5 阴性样品溶液的制备

按滋肾健脑颗粒处方取不含龟甲和鹿角的药材，制备滋肾健脑颗粒阴性样品，再按 2.3.1 项下的方法进行处理，即得。

2.6 专属性实验

根据上述实验条件，将对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液分别进样。以质荷比（m/z）631.3（双电荷）→546.4 和 631.3（双电荷）→921.4 离子对提取的供试品离子流图中，检测到与龟甲胶对照品色谱保留时间一致的色谱峰。以质荷比（m/z）765.4（双电荷）→554.0 和 765.4（双电荷）→733.0 离子对提取的供试品离子流图中，检测到与鹿角胶对照品色谱保留时间一致的色谱峰。同时，在阴性样品溶液中，未检出相同的色谱峰。见图 1-2。

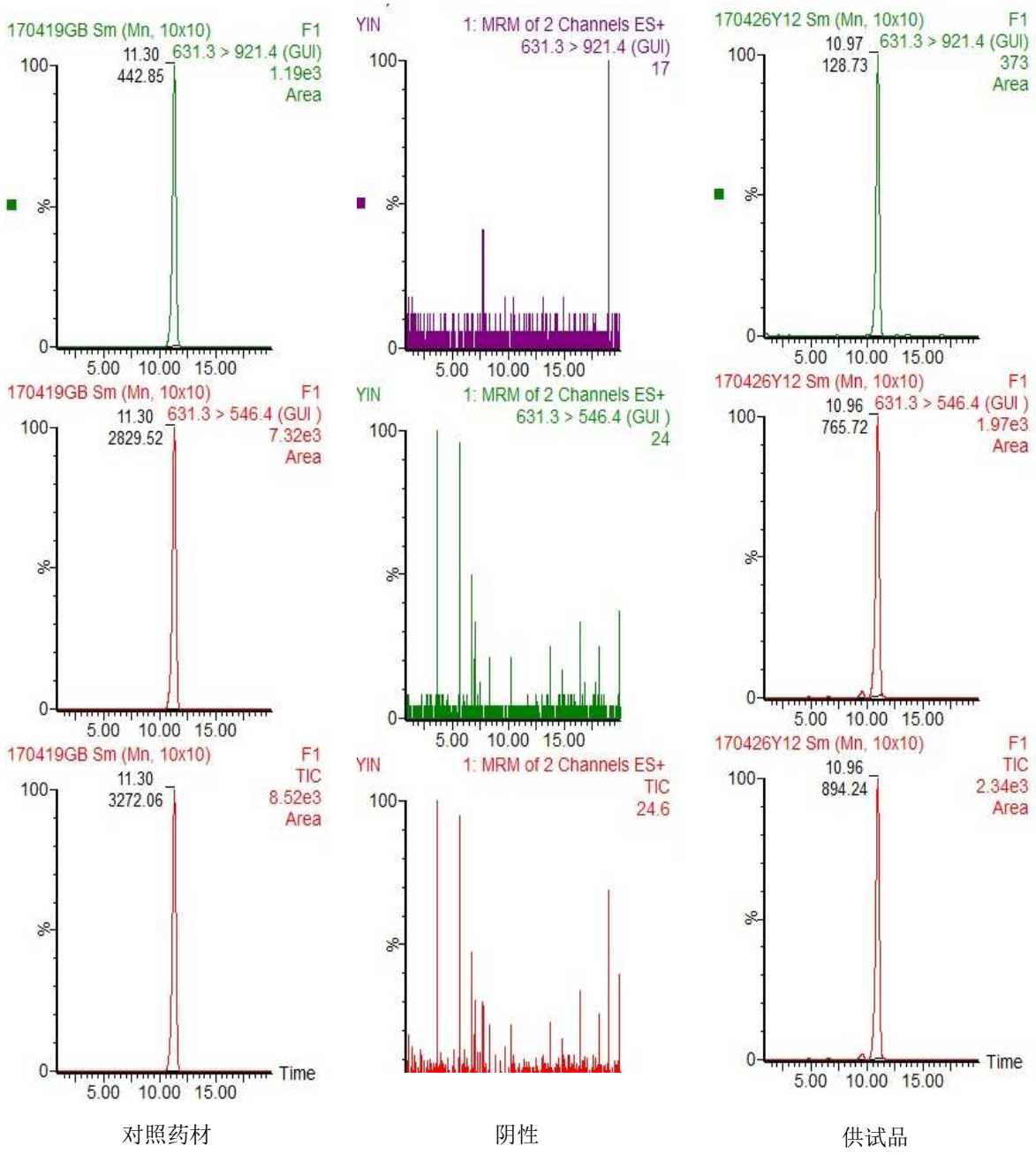


图 1 龟甲质谱鉴别

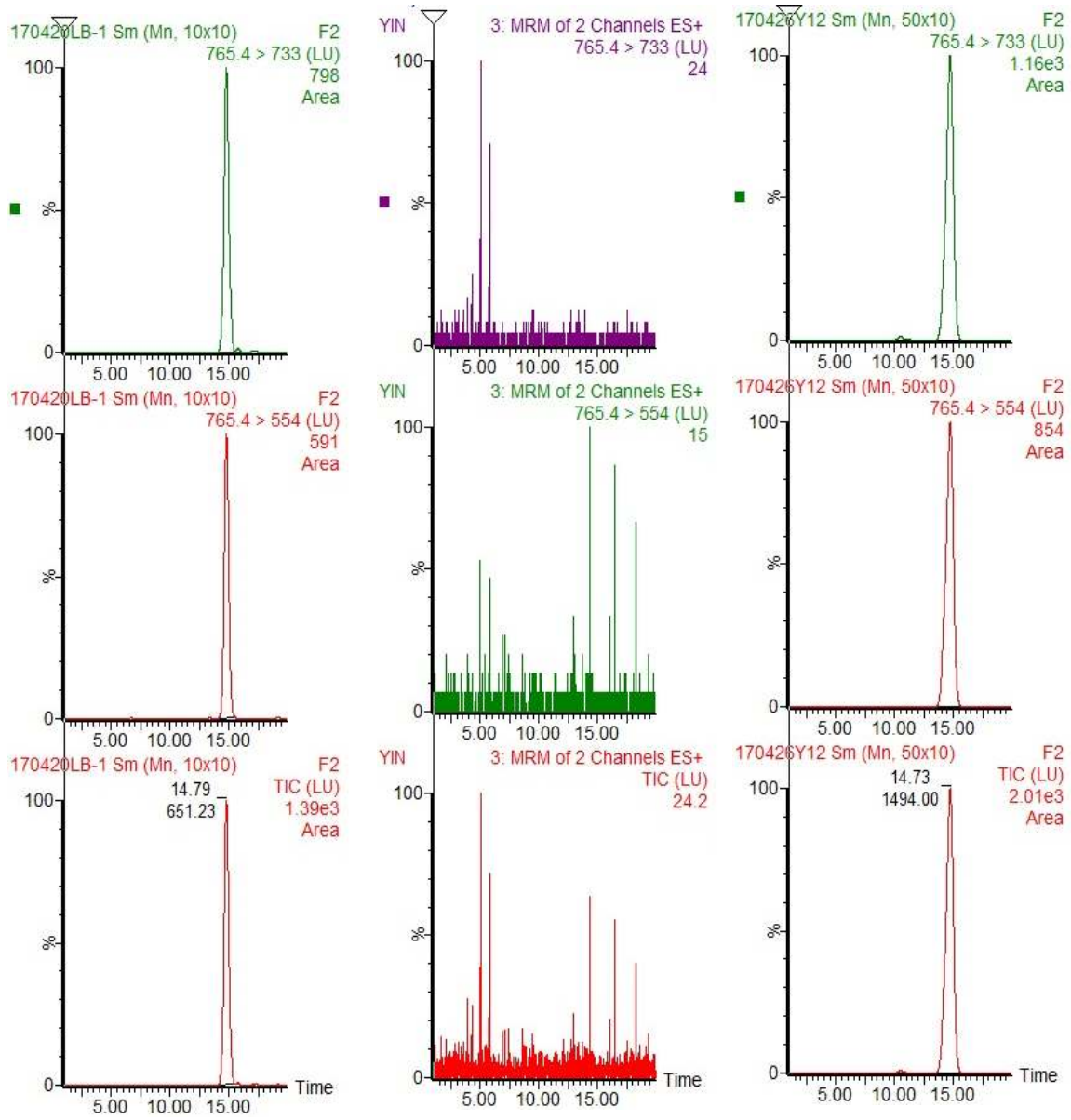


图 2 鹿角的质谱鉴别

2.7 重复性实验

取同一批次滋肾健脑颗粒，按 2.3.1 项下方法平行制备 6 份供试品溶液，以龟甲胶特征离子峰 m/z 631.3（双电荷）→546.4 和 631.3（双电荷）→921.4 和鹿角胶特征离子峰 m/z 765.4（双电荷）→554.0 和 765.4（双电荷）→733.0 作为检测离子对，进行测定。结果 6 份滋肾健脑颗粒供试品中均检出相应的特征离子峰。

2.8 样品测定

以所建立的方法对 3 批滋肾健脑颗粒进行检验，均检出特征离子峰。三批样品信息见下表。

编号	生产单位	批号
1	葵花药业集团（佳木斯）有限公司	201611001
2	葵花药业集团（佳木斯）有限公司	201611002
3	葵花药业集团（佳木斯）有限公司	201611003

3 讨论

3.1 供试品取样量的考察

分别选取 1g、2g、5g、8g 和 10g 供试品。结果在 8g 和 10g 的样品是，检测到了与对照品保留时间与离子对相同的色谱峰。对比 8g 样品和 10g 样品的信号强度，10g 样品信号较强，响应明显。最终将供试品的取样量定为 10g。

3.2 质谱条件的优化

根据《中国药典》2015 版龟甲胶和鹿角胶下的鉴别方法，选定特征离子。[10,11]以多反应检测（MRM）方式对质谱条件进行优化，最终确定，毛细管电压为 3.5kV，锥孔电压为 40V，离子源温度为 150℃，脱溶剂温度为 350℃，脱溶剂气体流速 600L•h^{-1}。同时，对碰撞能量进行优化。最终确定龟甲的碰撞能量为 30V，鹿角的碰撞能量为 20V。

3.3 结论

本研究采用 LC-MS 与胰蛋白酶水解相结合的方式，对滋肾健脑颗粒中的龟甲和鹿角两味药材的真伪进行了鉴别。该方法简便可行，结果准确可靠，为滋肾健脑颗粒的质量优劣检测提供了新的思路。

参考文献

[1] 卫生部药品标准.中药成方制剂第二十册[S].1998:356 Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health.P R China.Vol20.1998:356

[2] 任光会.走向集中化的补肾药市场.中国药店, 2010（01）: 66 REN GH. The market of concentrated medicine of tonifying kidney[J].China Drug Store, 2010（01）: 66

[3] 余新建, 陈素红, 吕圭源.龟甲“滋阴补肾”药效相关研究概况.当代医学, 2009, 15（10）: 15 YU XJ, CHEN SH, LV GY. Research overview of tortoise shell in the function of nourishing yin and tonifying kidney[J].Contemporary Med.2009,15（10）:15

[4] 宋述财, 许华, 周健洪,等.龟甲提取物对骨髓间充质干细胞增殖过程中核受体的影响.广州中医药大学学报, 2006,23（02）: 95 SONG SC, XU H, ZHOU J, et al. Effect of extract of carapax et plastrum testudinis on nuclear receptor in the proliferation of rat mesenchymal stem cell in vitro[J]. J GuangZhou University of tra Chin med, 2006,23（02）: 95

[5] 张婧卓, 林喆, 律广富,等.鹿角胶的抗炎镇痛作用研究.吉林中医药, 2014,34（10）: 975 ZHANG JZ, LIN Z, LV GF, et al. Effects of colla corni cervi on anti-inflammation and analgesia[J].Jilin J Tra Chin Med, 2014,34（10）: 975

[6] 林贺, 律广富, 田文婷,等.鹿角胶抗乳腺增生的作用研究.吉林中医药, 2013,33（02）: 169 LIN H, LV GF, TIAN WT, et al. Effects of antler glue on anti-mammary hyperplasia[J]. Jilin J Tra Chin Med, 2013,33（02）: 169

[7] 程显隆, 李文杰, 张小龙,等.UPLC-QTOF-MS 结合主成分分析法用于龟甲胶、鹿角胶中添加牛皮源成分的检测研究.药物分析杂志, 2012, 32（06）: 931 CHENG XL, LI WJ, ZHANG XL, et al. Identification of bovine-hide gelatin from gule of tortoise shell and deer-horn gelatin by UPLC-QTOF-MS and principal component analysis[J].Chin J Pharm Anal, 2012, 32（06）: 931

[8] 陈鸿玉, 李文莉, 李劲平,等.超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测补血益母丸中阿胶.中南药学, 2016, 14（05）: 540 CHEN HY, LI WL, LI JP, et al.Qualitative UPLC-QQQ/MS analysis of donkey-hide gelatin in Buxue Yimu pills.Central South Pharm, 2016, 14（05）: 540

[9] 龙国友，李明华，刘薇等.超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测阿胶补血颗粒中的阿胶.药物分析杂志, 2016，36（05）:823 LONG GY, LI MH, LIU W, et al.RRLC/QQQ-MS analysis of donkey-hide gelatin in E jiao buxue granula[J].Chin J Pharm Anal, 2016，36（05）:823

[10] 中国药典 2015 年版.一部[S].2015:181 ChP 2015.Vol I[S].2015:181

[11] 中国药典 2015 年版.一部[S].2015:322 ChP 2015.Vol I[S].2015:322

ANG-1 诱导骨髓间充质干细胞成脂分化促进 CML 对 TKIs 抵抗的机制研究

冉允盛，万峻钊，谢泰，朱仁光，王义娟，胡楚娇，马丹*

（贵州医科大学 药学院　贵州　550025）

【摘要】目的：探索预后不良因子血管生成素 1（ANG-1）通过诱导骨髓微环境成脂分化，从而促进慢性粒性白血病（CML）对酪氨酸激酶抑制剂（TKIs）耐药的分子机制，为临床治疗对 TKIs 抵抗的 CML 提供新的靶点与策略。**方法：**肿瘤来源 ANG-1 孵育正常人的骨髓间充质干细胞（BMSCs），再与 CML 细胞共培养：EdU 检测 CML 细胞的增殖力、流式细胞术检测其对 TKIs 的敏感性变化、从而评估 ANG-1 调控 BMSCs 对 CML 耐药的影响；RNA-seq 联合代谢组学检测分析 ANG-1 对 BMSCs 的影响及相关信号通路；油红染色与流式细胞术验证 BMSCs 成脂分化；蛋白质互作网络分析探寻成脂分化关键基因或者通路；Bodipy493/503 荧光素验证 CML 细胞对 BMSCs 分泌的脂质产物的摄取水平；脂质释放抑制剂 Acipimox 处理共培养体系，检测肿瘤细胞增殖及对 TKIs 敏感性的变化；以脂肪酸氧化磷酸化（FAO）的小分子抑制剂 Etomoxir 处理共培养体系，验证 FAO 在 CML 耐药中的作用；western blot 检测 FAO 相关信号通路关键因子的表达；ANG-1 孵育的 BMSCs 与人源亲本 CML 细胞混合种植于 NSG 小鼠皮下验证 ANG-1 诱导 BMSCs 成脂分化并介导 CML 耐药的作用；收集临床样本，ELISA 分析骨髓上清液中 ANG-1 含量与骨髓脂肪化、CML 耐药的相关性。**结果：**本研究中证实了 ANG-1 诱导 BMSCs 成脂分化，CML 细胞通过摄取脂化的 BMSCs 分泌的游离脂肪酸类产物，实现能量代谢途径的改变以促进对 TKIs 的抵抗的机制。肿瘤来源 ANG-1 孵育正常 BMSCs 后与 CML 共培养，显著增强 CML 细胞增殖能力并且降低了 CML 细胞对达沙替尼的敏感性；RNA-seq 检测发现 ANG-1 具有启动 BMSCs 脂质代谢重编程，促进其向脂肪细胞分化的趋势，脂质代谢组学分析也发现 6 种促进脂肪形成的脂质显著增加。流式细胞术检测发现 ANG-1 促进 BMSCs 脂肪转化相关抗原 CD10 的表达，镜下观察到大量脂滴状并且油红染色阳性。PPI 网络分析发现 ANG-1 抑制 SIRT1 的表达，同时上调 ChREBP 及其下游脂肪生成相关因子 ACC1、FASN、PKLR 的水平；上调 BMSCs 中 SIRT1 的表达可以有效逆转 ANG-1 促进 BMSCs 成脂分化的诱导作用。Bodipy493/503 标记脂化 BMSCs 的荧光实验发现：共培养的 CML 细胞可以摄取大量来源于脂化 BMSCs 中的游离脂肪酸，并且脂滴面积减小，上清中脂解产物甘油含量显著上升。采用脂质释放的小分子抑制剂 Acipimox 处理的共培养体系中，发现 CML 细胞摄取的 FAs 量显著降低，增殖水平也被明显削弱，同时对达沙替尼的敏感性显著增强。对共培养的 CML 细胞进行 RNA-seq 检测发现差异基因显著富集于 FAO 相关信号途径，为了进一步验证 FAO 在脂化 BMSCs 介导 CML 耐药中的作用，采用 FAO 抑制剂 Etomoxir 对共培养体系进行处理，发现抑制 FAO，显著降低了对 CML 细胞的增殖水平，升高了达沙替尼对 CML 细胞的凋亡率，FAO 途径相关蛋白表达也显著增加。体内动物模型显示 ANG-1 刺激的 BMSCs 组的肿瘤增殖活力旺盛，生存期最短，达沙替尼治疗后肿瘤体积减小的程度最低，脂肪分布比例最高。Elisa 检测的正常人和患者骨髓上清中 ANG-1 的含量，发现 TKIs 耐药组显著高于敏感组和正常组，而 TKIs 敏感组与正常组无显著差异，IHC 染色检测了骨髓组织切片中细胞间质的 ANG-1 表达水平，同时以 Bodipy 493/503 对切片进行染色并检测脂质，过表达 ANG-1 的患者，骨髓中脂质含量更高。**结论：**本研究发现 ANG-1 可以诱导 BMSCs 成脂分化并且显著增强了 CML 对 TKIs 的化学抗性，分别深入探讨了 ANG-1 诱导 BMSCs 成脂分化以及脂化 BMSCs 促进耐药的机制，为 CML 临床 TKIs 抵抗的治疗提供了新的见解。

飞行人员救生急救药品配置现状及展望

任磊，雍伟，高革，宋青，戴博，周海亮，李法林，袁海龙

（中国人民解放军空军特色医学中心　北京 100089）

【摘要】通过分析美军和我军各军兵种急救包配置情况及其最新研究进展，分析了飞行人员救生急救包药品特殊需求，提出改善止血药品种类和相关敷料，更换止痛药片和抗生素药片种类，选择性增配抗高原病药，海上防晒霜和促觉醒药物莫达非尼。通过合理优化配置，提高飞行作战和空降作战中的飞行人员自救互救能力。

【关键词】飞行人员，救生急救，止血，止痛，促觉醒

【**Abstract**】Through analyzing the configuration of first aid kits of various services of the US military and Chinese military and their latest research progress, the special requirements of lifesaving first aid kits for flight personnel were analyzed, and the types of hemostatic drugs and related dressings were proposed, the types of pain pills and antibiotics were changed, and anti-altitude sickness drugs, maritime sunscreen and awakening drug modafinil were selectively added. Through rational optimization of configuration, the self-rescue and mutual rescue ability of pilots in flight operations and airborne operations should be improved.

【**Keywords**】Flight personnel, Lifesaving first aid, Hemostasis, Pain relief，Promote awakening

未来作战是高技术条件下诸军兵种联合战役，空战和空降作战是空军争夺制空权、出奇制胜的重要手段。随着航空武器装备的发展，飞机的远距离机动性能日益增强，甚至跨多个时区飞行，战场环境无法预测，给飞行人员和空降兵的卫勤保障带来了新的挑战。

军事航空救生物品是供被迫跳伞或迫降的飞行人员用于各种恶劣环境下求救联络和生存的用品。它是军事航空救生系统的重要组成部分，是飞行人员生命保障系统的最后一道保障，对鼓舞士气和提高部队战斗力具有十分重要的作用。飞行人员救生物品大致可分为求救联络用品、医疗卫生用品、生存辅助用品等，功能种类繁多[1]。飞行人员救生药品的及时配置更新和伴随保障对于弹射跳伞后遇险飞行人员的外伤疼痛和各种急性感染性疾病的治疗，保障战斗力有重要意义。

本文结合国内外各军兵种急救包现状及任务要求，针对飞行人员作战任务救生急救药品配置方案进行分析讨论，旨在未来空战和空降作战中提升参战飞行人员紧急自救互救的能力。

1.美军单兵急救包的发展历程

美军最早在 1920 年就在军营中使用了战场急救包，被称为“卡莱尔急救盒”。近一百年来，美军急救包不断升级改型，在二战和美军对外发动等多次局部侵略战争实战中得到广泛的实际应用，在战场急救中发挥了重要作用。1967 年越战期间，美军正式提出了单兵急救包概念， 2003 年研发了美国海军陆战队单兵急救包 2725 型，首次提出了模块化装配的概念，组件数量大幅压缩，功能主要集中在止血、抗感染、净水和消毒方面，特别是研制出止血带，具备划时代意义。伊拉克战争后期推广使用的 2732 型单兵急救包中，用加固带代替弹性绷带止血，增加了压迫止血功效。2011 年在 6545 型单兵急救包中，将止血带升级为 C-A-T 止血带和高岭土止血绷带，止血效果明显，并推广普及至今。美军后勤装备研究人员也对暴露出的各种问题进行了研究和解决，美军在急救物品配置理念和新材料及药品的应用值得借鉴学习[2]。

1.1 美军各军兵种现役急救包介绍

美海军陆战队目前主要装备为 2732 型急救包，在阿富汗战争后升级配置，其主要组件分为创伤模块与迷你急救模块，主要配备有 C-A-T 止血带、银氯净水片、杆菌肽软膏以及最新的高岭土止血绷带，具有包扎、止血、消毒、净水和抗感染的功能 [3]。该急救包是美国海军陆战队大量配发的制式装备，美国发动局部战争主要依靠海空军和海军陆战队，该救生包经历数次战争的验证，具有较强的急救效能。

美特种作战部队目前装备 5661 型急救包，重点放在止血、通气、包扎上，除具有类似于海军陆战队急救包的常用功能组件外，还包括烧伤使用的凡士林纱布及消毒纸巾，鼻咽导气管、气胸使用的封胸贴和引流导管以及

心肺复苏使用的呼吸面膜，呈现符合特种作战需求的急救理念[4]。

美空军单兵急救包主要包括单兵急救包 0779 型、特种兵单兵急救包 9451 型和首次打击单兵急救包 6546 型三种，其功能侧重于止血、包扎、止痛和抗感染。单兵急救包 0779 型包含创伤模块与迷你急救模块，创伤模块包括最新的 C-A-T 止血带、高岭土止血绷带、鼻咽导气管、吗啡皮下注射针、急救剪刀，迷你急救模块包括口服补液盐、邦迪绷带、皮肤标记笔等。特种兵单兵急救包 9451 型和单兵急救包 0779 型装配方式与外观不同，配置基本相同。首次打击单兵急救包 6546 型与海军陆战队急救包配置相似，但是增加了无菌手套及剪刀[5]。 表 1 对美军各军兵种现役救生包的组件进行了对比分析。

1.2 美军急救包研究进展

目前，美军通用单兵急救包为 0929 型，其主要侧重于重伤急救，其设计思路基本为仅强化战场重伤急救的功能，避免冗余单元增加士兵负荷。其他各兵种针对各自任务特点，基于该创伤模块进行改良优化，重组了止血、通气单元模块，并且均弱化了轻伤所需非急救用品的配备 [6]。

高岭土止血材料被评为美军创伤研究“十大顶尖陆军装备”，该止血材料在新一代单兵急救包中均有广泛配置。高岭土（$Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$）属于惰性矿物质，主要由小于 2μm 的微小片状、管状、叠片状等高岭石簇矿物组成。其止血机理为直接激活凝血因子Ⅻ，启动内源性凝血机制，继而激发凝血因子Ⅺ，使纤维蛋白原形成纤维蛋白单体，纤维蛋白单体进一步聚合为纤维蛋白多聚体，从而形成血凝块堵塞血管，达到止血目的[7-9]。在凝血因子Ⅻ缺乏的情况下，高岭土也可以直接激活凝血因子Ⅺ，启动凝血机制。高岭土也具有物理止血机制，其中的 SiO_2 具有很强的吸附作用，当高岭土接触到血液时，会大量吸收血液中的水分，使得红细胞、血小板及凝血因子浓缩，聚集血小板与凝血因子，更快激发凝血机制，达到止血目的。目前，美军开发出高岭土战伤纱布及其加大型、高岭土止血敷料、 高岭土 Z 字战伤折叠纱布和高岭土止血绷带。经过实验室和实战检验，高岭土纱布和敷料的止血率可达 100%，与传统沸石止血敷料相比，不产热、不会造成组织热损失；与蒙脱石止血材料相比，不产生血管栓塞，更加安全。其单纯吸血效果是普通纱布的 2.7 倍，属于美军一线战救器材。

目前，英国、德国等北约组织成员国研究急救包也依据模块化设计，根据任务地点、烈度、类型进行合理化配置，均由基础型+功能模块组成，其中，英军将 Celox 止血粉及相关敷料作为主要止血材料使用。俄军通过 2 次车臣战争及多场局部低烈度战斗、战役的经验总结，也将止血及早期抗休克治疗作为单兵急救包的重要组成部分，强化了作战实用性及稳定性，但在止血材料、敷料及医疗装具配置上还与美军有着不小的差距[10]。

表 1 美军各军兵种急救包主要配置对比

序号	急救包	美陆军急救包	美空军急救包	美海军陆战队急救包	美特种作战急救包
1	模块设计	√	√	√	√
2	CAT 止血带	√	√	√	√
3	旋压式止血带	×	×	×	×
4	鼻咽导管	√	√	×	×
5	吗啡皮下注射针	√	√	√	√
6	封胸贴及导管	√	√	√	√
7	呼吸面膜	×	×	×	√
8	高岭土绷带及纱布	√	√	√	√
9	Celox 止血粉	×	×	×	√
10	凡士林纱布	√	×	×	√
11	净水片	×	√	√	×

2.我军各军种单兵急救包的发展

目前，我军所使用的单兵急救包以 82 型三角巾急救包和 03 型单兵急救盒为主。82 型三角巾急救包主要由三角巾和辅料垫组成，材料和工艺较陈旧，其止血效果不够理想，03 型单兵急救盒主要以药品为主，包含清

凉油、黄连素、镇痛片、饮水消毒丸、创口贴、别针和刀片，用于战伤急救急需的通气、止血器械较少，不能完全满足现代战争的需要。我军一直重视战场单兵急救包的研究和配置，最近我军逐步推广应用的 A 型单兵急救包，设计理念先进，物品配置理念得到革新，着重将救治重点放在止血、通气、包扎上。该急救包配有旋压式止血带、Celox 止血粉、急救止血绷带、 急救创伤绷带、压缩曲线纱布、一次性鼻咽通气道、 胸腔穿刺针、胸部密封贴、碘伏消毒棉片、消炎止痛药盒（吗啡片、美洛昔康片、左氧氟沙星片）、急救剪、 记号笔、无菌手套、使用手册，从装备用品（共 14 种） 来说，是我军历史上最贴近于战场急救、重伤急救的单兵卫生装备，基本与美军通用急救包 0929 型功能相近，凸显重伤急救的功能。

该急救包首次置入代表现代急救包的一次性鼻咽通气道，关注战地急救中的通气环节；不同于我军目前装备使用的三角巾敷料，该急救包中的急救止血绷带、急救创伤绷带具有自加压功能， 通过螺旋缠绕或反向缠绕的包扎，能够更加有效地止血与固定；旋压式止血带原理与 CAT 止血带近似，通过旋臂的旋转在止血带上均匀施压，更好地实施压迫，从而闭合大动脉，并且解决了卡式止血带易松脱、易滑落的缺点；配备记号笔能够帮助施救或自救人员标记止血时间，对于防止肢体坏死起到重要的作用；装备碘伏消毒片和无菌手套，能够建立战场急救时相对的无菌环境，减少了后期伤员感染风险。

海战条件下的战伤特点与陆战条件的相比有其不可忽视的差异性。我军现有的 A 型海军单兵急救包的设计理念较为先进，但是仍存在救治面窄、范围小，与陆军单兵急救包的内容物完全相同(表 2) ，对海战伤特点的针对性不足等特点。

3.我军装备的飞行人员救生急救药品现状

随着航空武器装备的发展，飞机的远距离机动性能日益增强，飞行人员常深入敌后，远离后方基地，战场环境无法预测，可能面对海上、高原等缺水的复杂恶劣环境，给航空兵部队的伴随卫勤保障带来了困难。目前，我军单兵携带的急救药物仍以普通制剂为主，在缺水的特殊环境条件下，伤员使用不便，无法快速发挥作用，影响伤员急救。

飞行人员救生物品多是固定在弹射座椅靠背或者座椅内部，空间受限，所以我军现有装备的为某型空勤救生急救盒，其相应标准制定沿用已近 20 年，急救盒包装和急救物品配置都急需更新升级。

该型急救盒内装物品不仅与美军救生包差距较大，与我陆军和海军最新配备的救生包也有一定差距。其中弹力止血带需要更新为旋压式止血带，云南白药需要更换为 Celox 止血粉，三角巾急救包需要更换为急救止血绷带和创伤绷带，阿司匹林可以更换为美洛昔康片或者布洛芬片，复方新诺明片需要更换为左氧氟沙星片。

阿司匹林片，可用于普通感冒或流行性感冒引起的发热，也用于缓解轻至中度疼痛如头痛、关节痛、偏头痛、牙痛、肌肉痛、神经痛、痛经。但是恶心、呕吐、上腹部不适或疼痛等胃肠道反应较为常见。布洛芬片作为解热镇痛类非处方药品，适应症范围更广，对各种肌肉疼痛，头疼，关节炎，非关节性的各种软组织风湿性疼痛都有很好的止疼效果，并且能够预防治疗高原性头痛。布洛芬不良反应较少，可以替换阿司匹林片。

复方新诺明片为磺胺类抗菌药，但是由于许多临床常见病原菌对该品常呈现耐药，不易清除细菌。磺胺类药物过敏反应较为常见，比如说皮肤黏膜的反应，如红斑、疱疹、紫癜、光敏性皮炎，临床已很少使用。左氧氟沙星片是喹诺酮类药物中的一种，具有广谱抗菌作用，抗菌作用强，不良反应发生率低，临床使用较多。

并且需要根据飞行作战的高原航空救生，海上航空救生等特殊环境，考虑增加抗高原病药，海上防晒霜，和促觉醒药物等。

4.特殊战场环境对飞行人员急救药品保障的新需求

飞行和空降作战具有突然、快速、机动性强，全纵深、高强度、高消耗、高伤亡、快节奏、全天候连续作战等诸多特点。空降兵常深入敌后，后方无依托，空降地点、时间及作战方法均具有很大的不确定性，伴随保障短时难以达到，战场快速止血、镇痛等医疗急救只能以单兵自救、互救为主。

我国幅员辽阔，地理状况复杂，在航空救生过程中，飞行员可能面对 热带丛林、沙漠寒区、海上、高原等复杂恶劣环境，必须靠携带药品自救，维持基本生命体征，等待救援。对执行长途跨时区飞行、空中加油等长航时飞行任务的飞行员，易发生生物节律紊乱、睡眠不足，产生急性或累积性飞行疲劳，空间定向等飞行作业能力下降，需要通过快速催眠和兴奋药物制剂，调节睡眠，保持战斗力。

4.1. 高原航空救生药品保障研究进展

我国高原地区人烟稀少，地域广阔，海拔高，条件恶劣，使生存者的体能和个人生存活动能力大大降低，给航空救生提出了严峻的挑战。高原地区对航空救生的影响主要是缺氧、寒冷、气候干燥、紫外线辐射和高山积雪对人眼的强光反射。其中对人体影响最为严重的是高原缺氧。在海拔 6000m 以上时会严重缺氧，呼吸显著加快、头痛、眩晕、紫绀、意识和判断力低下，直至意识丧失，或发展为肺水肿、脑水肿而致死亡[11,12]。我空军高原警巡航线紧邻边境地区，沿途多为雪山、峡谷和荒原等地形，飞行员一旦遇险离机后，将面临高冲击过载、严重缺氧、高寒和恶劣地形等极端生存环境，搜索、生存和营救非常困难。早期轻型急性高原病（acute high altitude sickness）也称急性高山病（acute mountain sickness，AMS），常见症状有头痛、失眠、耳鸣、眩晕、恶心呕吐、心慌气短、尿量减少等，是一种影响部队战斗力的自限性疾病，通常需要 1～2 周自愈。若救治不及时可导致非战斗性减员。高原地区突出的问题主要是缺氧和寒冷，这就对航空救生药物的种类选择和服用便利性提出了新的要求。在高原空勤急救药品中配备急性高原病和冻伤防治药物显得尤为必要。

目前 AMS 的药物治疗在很大程度上依赖于使用碳酸酐酶抑制剂和皮质类固醇。《美国荒野医学协会预防和治疗急性高原病 2019 版临床实践指南》指出[13]，进入中度或高度 AMS 风险及以上高海拔地区时，乙酰唑胺是 FDA 认可的防治 AMS 的首选药品。乙酰唑胺不足之处在于：一是磺胺过敏反应，尽管常用剂量下反应轻微、风险极低[14]，但由于口服给药难以较快穿透血脑屏障，治疗急性高原反应时往往会加大剂量，导致不良反应的发生概率增大。二是近几年在服用乙酰唑胺后是否影响作业人员体能方面产生了一定的争议。与国外对比，乙酰唑胺是美国 FDA 首推的急性高原病预防药品，但在我国乙酰唑胺的急性高原病预防作用至今未得到国家药监局的认可。

皮质类固醇代表药物地塞米松，在中度或高度 AMS 风险时可替代乙酰唑胺治疗 AMS 或保留用于治疗更严重的高原疾病。预防剂量为 2mg/6h 或 4mg/12h，对必须迅速上升 3500m 以上的人员，预防或治疗剂量可达到 4mg/6h。地塞米松可与乙酰唑胺联用，加小剂量地塞米松比单用乙酰唑胺能更好地缓解急性高原反应症状[15,16]。地塞米松会造成肾上腺抑制，不宜长时间使用，但从国外使用情况看，已从最初的不超过 7d，到 2014 版急性高原病临床实践指南不超过 10d，2019 版 14d 以内，但 24h 内快速停药可能造成 AMS 的复发和加重，当使用时间达到 10d，需要 1 周缓慢停药。《指南》中同时推荐对于不愿使用乙酰唑胺或地塞米松，或对这 2 种药物过敏、不耐受者，可使用布洛芬预防 AMS，推荐剂量为 600mg/次，每 8 小时 1 次。同时布洛芬可以缓解高海拔引起的头痛，但是不能改善 AMS 的症状。

地塞米松是目前 国内 AMS 急救的主要治疗方法，具有稳定毛细血管通透性、抗细菌感染、抗炎、抗过敏、抗休克等功能，能减少肺部、脑部毛细血管渗漏，还可纠正人体水与电解质紊乱，从而降低水肿的风险和减轻病情[17,18]。

高原地区通常气温较低，并且干燥多风，因而冻伤是高原高寒地区常见病之一，严重影响部队战斗力，是目前高原军事医学 研究的重点问题之一。我军研究人员发现呋喃西林霜剂可以对冻伤具有很好的防治效果[19]。用 1%呋喃西林霜剂和它的中药复方霜剂能使冻伤组织的血管通透性明显降低，有利用冻伤组织的存活[20]。

4.2.海上航空救生药品保障研究进展

我国海岸线长达约 18000km，远离大陆的岛屿也很多，海域上空，既是我空、海军航空兵部队平时飞行训练的练兵场，也是我军未来反侵略战争的主战场。随着军队实战化训练的加强和转型发展的需要，海上军事行动也越来越多样化，海上救生与搜寻救助任务的执行关系到部队战斗力的提高、人命与财产安全以及社会的发展稳定。

经调查，舰载机飞行员中，晕船发生率达 81.7%～90%，严重晕船不能坚持飞行者达 7.7%～18.2%[21]。海上飞行气象条件复杂，飞行人员遇险后开展生存营救的难度增大：其次，海上起降平台狭小，船体六自由度运动和舰尾流干扰是影响着舰安全的主要因素，飞行起降风险较陆基飞行显著加大。飞行起降风险较陆基飞行显著加大：第三，美国海军相关统计资料显示，舰载机着舰事故率是陆机着陆事故率的 1.5 倍，而在夜间或在环境恶劣、能见度差的情况下，事故率更高达白天的 4 倍[22]。飞行人员对野外生存知识、救生物品的组成和使用方法等处于“了解”水平（分别占 73.9%和 70.2%）；飞行人员对海上生存所面临的威胁识别不足，有 46.9%不能完全识别或不知道海上生存的主要威胁[23]。

另外，海上晒伤、湿疹高发易发，装备新型外用制剂防晒霜、黄连氧化锌霜用于防晒、抗湿疹意义很大。海上航空救生急救药品包装不能防水，药品容易浸湿散失，由于缺水导致药品服用不便，研究新的便于携带服用的药品新剂型具有重要意义。

4.3 促觉醒药莫达非尼在军事航空救生中的应用研究

被迫应急弹射跳伞的飞行员，有可能在空战负伤、弹射损伤及着陆损伤并存的情况下着陆在海上、沙漠、寒区、热带丛林等恶劣环境中。遇险生存自救的主要影响因素包括环境的恶劣程度、个人生存能力大小、救生装备的优劣以及营救的速度等。当然，逃生装置的各项性能再强大，也只能加强飞行人员在各种环境下的个人生存能力，以及经过一连串脱出作业后依然冷静、清晰的反应和判断能力，才能利用和创造一切条件，应付迫切需要，改善自身状况，合理使用救生物品，伤后自救，以待营救。通过促觉醒药物提高飞行员在空难应激情况下保持觉醒状态，提高反应和判断能力的研究非常有必要。

新型的中枢促醒剂莫达非尼主要作用是治疗发作性嗜睡症和自发性嗜睡症，以及阻塞型睡眠呼吸暂停综合征和倒班工作所致的睡眠紊乱等症状，与传统中枢兴奋剂比较，能有效调节睡眠、促进觉醒，且不良反应较小。目前有研究表明，莫达非尼还对许多原因引起的认知功能障碍有明显改善作用[24]，因此莫达非尼也在适应证外被广泛使用，作为一种认知增强剂。因为莫达非尼尚没有关于药物肝脏安全性的证据，不建议长期使用，并且由于其属于精神类药物，所以在国内外均被严格管制，在绝大多数的国家属于处方药。在跨时区及远程长航飞行时，飞行员因睡眠剥夺导致过度疲劳，进而警觉度和认知功能明显下降，飞行操作能力也随之下降。莫达非尼对于飞行员因睡眠剥夺引起的一系列问题具有显著的改善作用，是较为理想的对抗睡眠剥夺药物。

在模拟器飞行实验的基础上，美军进一步的研究表明，莫达非尼可替代右旋苯丙胺作为军事飞行人员的促醒抗疲劳药物。 将 18 名直升机飞行员（其中男性 17 人、女性 1 人）随机分为以下 6 组（n=3），并在 2 次持续 40h 觉醒状态下自身交叉用药：①分别服用莫达非尼和安慰剂；②分别服用安慰剂和莫达非尼； ③分别服用右旋苯丙胺和安慰剂；④分别服用安慰剂和右旋苯丙胺；⑤分别服用莫达非尼和右旋苯丙胺；⑥分别服用右旋苯丙胺和莫达非尼。用药剂量为莫达非尼 100mg/次，右旋苯丙胺 5mg/次，首次用药在夜间 23:00（SD 16h 后），间隔 4 h 重复给药，共 3 次。对实际飞行操作成绩、一般认知功能、基本生命体征及情绪情感状态等主客观指标的检测结果表明，莫达非尼与右旋苯丙胺的作用相似，可有效维持 SD 条件下飞行员的警觉性、认知判断能力和情景意识，而且无明显航空医学关注的不良反应[25]。 基于大量试验研究和应用验证，美军准予飞行人员在飞行任务中使用莫达非尼，并做出以下相关规定以确保飞行安全：①让飞行人员知情同意并密切关注用药的正性作用和不良反应，在非飞行期间开展地面试药观察；②授权飞行联队指挥官和航医主任决定兴奋药物的使用并严格监控； ③用药剂量每隔 8h 服用 200 mg， 24h 不超过 400mg；④原则上，战斗机飞行任务超过 8h、轰炸机飞行任务超过 12h 再用药[26]。

国内的相关研究亦证实飞行人员服用莫达非尼的作业安全性和有效性。将 21 名男性飞行学员分两组：安慰剂组（n=10） 和莫达非尼组（n=11）。在飞行前 2h 分别服用莫达非尼 200mg 和安慰剂。对飞行活动中的心电进行连续监测，完成飞行任务后由飞行教员对飞行操作成绩进行评价。此外，比较 2 组飞行前后的基本生命体征、视反应时、CFF 和主观嗜睡感、 疲劳感以及情绪情感状态的变化。结果表明，与安慰剂相比，服用莫达非尼对飞行操作成绩、基本生命体征、视反应时、CFF 等指标均无明显影响， 但使飞行中心率明显增加（平均增加 15.7%）、飞行后的疲劳感明显降低、情绪情感状态自评量表（POMS 量表） 的“有力好动” 感积分明显升高[27]。

总之，国内外的大量研究和应用表明，莫达非尼针对不同作业群体均有良好的促醒和认知增强效果，单次用药剂量多为 200mg， 间隔 6～8h 重复用药，亦可每次服用 100mg，间隔 4h 重复用药；在优化用药方案时应注意不同性别、任务类别及疲劳程度的差异。联系到军事卫勤保障，美军的有关规定为我军促觉醒药莫达非尼用药方案的制订提供了重要参考依据。

5.结语

本研究根据可能进行的飞行和空降作战任务特点，有针对性地根据作战任务需求对目前最新单兵急救包进行调整配置：学习外军先进经验，模块化设计急救包，并将止血、镇痛、通气、烧伤等模块单元化组合；根据可能的飞行作战任务特点和作战区域特殊环境进行模块组合，减少冗余物品的携带，目的在于更加快速、高效、便

捷地完成任务，提升参战人员紧急救治的能力。在完善飞行人员救生急救盒的配置同时，还需要加强飞行人员正确使用急救包的能力：熟练掌握使用方法、固定装配位置，优化流程预案、模拟实际操作，发挥出人装结合的最大功效。

参考文献：

[1]陈立雄,费伊,李法林,邓略,王颖,周海亮.飞行人员救生物品现状与展望[J].医疗卫生装备,2008(01):26-27.

[2]张宜，张梦，刘学会，等. 美军高岭土止血材料的研究进 展[J]. 华南国防医学杂志，2014，28（12）：1 275-1 277.

[3] POLITI L，APRILE A，PAGANELLI C，et al. Randomized clinical trial on short-time compression with kaolin-filled pad：a new strategy to avoid early bleeding and subacute radial artery occlusion after percutaneous coronary intervention[J]. J Interv Cardiol，2011，24（1）：65-72.

[4] IFAK（Individual First Aid Kit）[EB/OL]. [2018-04-20]. http:// www.instructables.com/id/IFAK-Individual-First-Aid-Kit/.

[5]李加宁，程凌燕，张玲. 便携式急救箱（包）及其物品配备的发展状况[J].医疗卫生装备，2004，25(2):22-23.

[6] GEERS D. Special operations individual medical equipment： part I—the major trauma kit[J]. J Spec Oper Med，2009，9（4）：43-52.

[7] GOOLSBY C，BRANTING A，CHEN E，et al. Just-in-time to save lives：a pilot study of layperson tourniquet application[J]. Acad Emerg Med，2015，22（9）：1 113-1 117.

[8] ORMAN J A，EASTRIDGE B J，BAER D G，et al. The impact of 10 years of war on combat casualty care research：a citation analysis[J]. J Trauma Acute Care Surg，2012，73（6 Suppl 5）： S403-S408.

[9]王正国，杨志焕，华积德，等． 野战外科学[M]． 北京：人卫生出版社，2010：9

[10]樊光辉，张宜，何光学，等. 单兵急救包的体系构建[J]. 华 南国防医学杂志，2013，27（2）：98-102.

[11]费伊,聂金玺.青藏高原航空救生初探[J].中华航空航天医学杂志,1999(02):54.

[12]张晓丽,王兴伟,罗永昌.高原航空救生体系建设对策措施[J].中华航空航天医学杂志,2013,24(04):283-286.

[13]Luks AM，Auerbach PS，Freer L，et al. Wilderness Medical Society Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Acute Altitude Illness：2019 Update［J］. Wilderness Environ Med，2019，30（4S）：S3-S18

[14]Ritchie ND，Baggott AV，Andrew Todd WT. Acetazolamide for the prevention of acute mountain sickness—a systematic review and meta‐analysis［J］. J Travel Med，2012，19（5）：298-307

[15]罗勇,李俊峡,李国凯,等. 急性高原病 98 例临床分析［J］.华北国防医药，2007，19（3）：47-48.

[16]Aksel G，ÇorbacıoğluŞK，Özen C. High‐altitude illness：management approach［J］. Turk J Emerg Med，2019，19（4）：121-126.

[17] Davis C，Hackett P. Advances in the prevention and treatment of high altitude illness［J］. Emerg Med Clin North Am，2017，35（2）：241-260.

[18]Gudbjartsson T，Sigurdsson E，Gottfredsson M，et al. High altitude illness and related diseases‐a review[J]. Laeknabladid，2019，105（11）：499-507

[19]王梅松,王津平,劳卫华,等.呋喃西林复方霜剂治疗重度冻伤[J].中华外科杂志,1993(11):669-670.

[20]王梅松,王津平,劳卫华,等.呋喃西林霜剂降低冻伤组织血管通透性和减少组织坏死作用的观察[J].中华病理生理杂志,1994,10(1):429-433.

[21]宗玉国,陈赛铮,吴岩印,等.驻舰环境对舰载直升机飞行员身心健康影响的因素分析[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2006(01):49-50.

[22]黄宾,王嘉琪,张舒.舰载机飞行员执行海上任务时航卫保障的挑战与对策[J].西南国防医药,2020,30(10):945-947.

[23]郭华,陈立雄,李晅,等.军事飞行人员海上航空救生能力情况分析[J].空军医学杂志,2016,32(06):422.

[24] Kelley AM， Webb CM， Athy JR， et al．Cognition enhancement by modafinil: a meta-analysis[J]．Aviat Space Environ Med，2012，83（7）：685-690．

[25] Estrada A，Kelley AM，Webb CM，et al．Modafinil as a replacement for dextroamphetamine for sustaining alertness in military helicopter pilots[J]．Aviat Space Environ Med，2012，83（6）：556-564．

[26] Caldwell JA，Mallis MM，Caldwell J L，et al．Fatigue countermeasures in aviation[J]．Aviat Space Environ Med，2009，80（1）：29-59．

[27] 詹 皓，陈勇胜．飞行疲劳研究[M]．北京：国防工业出版社，2011： 202-224．

端粒与端粒酶在结肠癌发生发展中的最新研究进展

任凝慧，关秋彤，魏敏杰，李振华*

（1.中国医科大学药学院药理教研室，辽宁 沈阳 110000）

【摘要】端粒是染色体末端维持基因组稳定性的保护性区域。端粒障碍引发的基因组不稳定性是结肠癌诱因之一。端粒功能障碍可诱发炎症性肠病，同时炎性环境会进一步加剧端粒的侵蚀，形成正反馈作用，增加患者癌变风险。端粒酶表达活性可调节端粒长度及功能，正常细胞的端粒会随着分裂逐渐缩短，而在肿瘤细胞中，端粒酶异常激活介导端粒延长，从而诱发端粒功能障碍，促使肿瘤细胞永生化。因此，调节端粒酶的异常激活状态可抑制癌细胞无限增殖的能力。包括免疫疗法、端粒酶抑制剂、TERT 基因靶向治疗等针对端粒酶的抗癌策略也成为了癌症治疗中富有前景的治疗思路。本文回顾了端粒及端粒酶诱导结肠癌相关研究的新进展，并对目前靶向端粒酶疗法的开发提供建议。

【关键字】端粒；端粒酶；结肠癌；炎症性肠病

The Recent Progress of Telomere and Telomerase in the Development of Colon Cancer

Ren Ninghui, Guan Qiutong, Wei Minjie, Li Zhenhua*

（Department of Pharmacology, School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110000, Liaoning, China）

【ABSTRACT】Telomeres are protective regions at the end of a chromosome that maintain genomic stability. Genomic instability caused by telomere disorder is one of the inducements of colon cancer. Telomere dysfunction can induce inflammatory bowel disease. At the same time, the inflammatory environment further aggravates the erosion of telomeres, forms a positive feedback effect, and increases the risk of cancer in patients. Telomerase expression activity can regulate telomere length and function. Telomeres in normal cells will gradually shorten with division. In tumor cells, abnormal telomerase activation mediates telomere elongation, which induces telomere dysfunction and promotes tumor cell immortalization. Therefore, regulating the abnormal activation of telomerase can inhibit the unlimited proliferation of cancer cells. Anticancer strategies targeting telomerase, including immunotherapy, telomerase inhibitors, and TERT gene targeting therapy, have also become promising therapeutic ideas in cancer treatment. This article reviews the new progress of telomere and telomerase-induced colon cancer and provides suggestions for developing targeted telomerase therapy.

【KEY WORDS】telomere; Telomerase; Colon cancer; Inflammatory bowel disease

结肠癌（colon cancer，COC）是全世界最常见的消化道癌症。目前全球 COC 的发病率居于第四位，但却是仅次于肺癌之后的第二大癌症相关死亡的原因[1]。在中国，COC 是五大确诊癌症和癌症相关死亡的原因之一[2]，由于中国癌症谱正处于从发展中国家向发达国家转变的过渡期，COC 的发病率和癌症负担在逐年迅速增加[3,4]。广泛的结肠镜检查降低了 COC 的发病率，且由于包括结肠切除术、化疗和免疫治疗在内的治疗方法的改进，COC 患者的总体 5 年相对生存率约为 64%，但 IV 期患者生存率仍然较低，仅为 15%[5]。

端粒是位于染色体末端的保护性蛋白复合物组成的区域，通过防止被识别为 DNA 损伤位点，维持染色体的稳定性[6]。基因组的染色体不稳定性（chromosomal instability，CIN）是肿瘤发展的一个重要特征。而端粒酶的激活可通过维持端粒长度，促使癌细胞绕过危机并变得永生[7]。研究表明，由于端粒稳定性、染色体分离和 DNA 损伤反应等方面造成的 CIN 是 COC 的主要发病机制之一[8]。因此，针对端粒及端粒酶的药物和疗法引起了研究

者的注意，并逐渐成为 COC 以及其他肿瘤的诊治新思路[9,10]。本文就端粒及端粒酶在 COC 中的研究新进展进行综述，为针对端粒及端粒酶的疗法开发提供建议。

1.端粒与端粒酶的结构与功能

端粒是由重复串联的 TTAGGG DNA 序列和位于染色体末端的保护性蛋白复合物组成的区域（图 1），保护性蛋白复合物由六个核心蛋白成员组成，分别为端粒重复结合因子（telomeric repeat binding factor，TRF）1，TRF2， 抑制/激活蛋白 1（repressor/activator protein1，RAP1），TRF1 相互作用核蛋白 2（TRF1-interacting nuclear protein 2，TIN2），端粒保护 1（protection of telomers 1，POT1）及 POT1 和 TIN2 组织蛋白（the POT1 and TIN2 organizing protein，TPP1）。在 3'单链的端粒末端会形成一种类似套索状的 t 环构型[11]，该环状构型由端粒末端折叠形成，可通过将 DNA 末端掩盖在其中从而保护染色体末端。在细胞周期的 S 期，TRF2 中的磷酸化开关会协调 t 环的解环和缠绕，进而保护端粒免受复制应激和 DNA 损伤反应的影响[12]。由于 DNA 聚合酶无法完全合成线性染色体的 3'端，在每一轮细胞分裂后，一部分端粒 DNA 都会丢失，因此在健康生理状态下，细胞中的端粒会随着每次分裂而逐渐缩短。当其变得非常短时，未加帽的端粒会引发 DNA 损伤信号，最终导致细胞生长停滞。这种由端粒变短引发的生长停滞是生物机体清除衰老细胞的保护机制，也是肿瘤形成过程中阻碍癌细胞初始增殖的保护屏障[13,14]。如果这种保护机制受损，细胞将持续增殖，端粒被进一步侵蚀缩短，降低对染色体末端的保护作用，并造成额外的积累 DNA 损伤，加剧基因组的不稳定程度和细胞死亡或衰老，最终导致 CIN 并造成肿瘤进展[15]。

一方面，肿瘤发展需要端粒缩短段引发基因组不稳定性，另一方面，肿瘤细胞需要维持较长的端粒从而实现无限增殖。大多数癌细胞通过增强端粒酶的表达活性来突破细胞增殖极限。端粒酶是一种核糖核蛋白复合物，由催化作用的酶亚单位，即端粒酶逆转录酶（telomerase reverse trancriptase，TERT）和作为复制模板的 RNA 亚单位，即端粒酶 RNA 成分（telomerase RNA component，TERC）组成（图 2）。TERT 是端粒酶复合物的限速成分，在正常体细胞中其表达会受到抑制。而在肿瘤细胞中，端粒酶可通过 TERT 对 TERC 逆转录从而直接延长端粒，或者通过同源重组使端粒选择性延长，躲避 DNA 损伤信号并维持自身永生化，这种使端粒延长的能力称为端粒维持机制[16-18]。有研究表明，约 75%的肿瘤中存在 TERT 表达。其中，31%的样本发生了 TERT 启动子突变（TERT promoter mutations，TPM），53%的样本中 TERT 的启动子甲基化[19]。

除了在端粒维持中的典型作用外，端粒酶的非典型促癌作用也已有报道。这些非典型功能包括染色质状态的调节、DNA 损伤反应、氧化应激保护和增殖基因活性[20-22]。例如，端粒酶可以独立于其逆转录酶活性促进 MYC 驱动的肿瘤发生[22]。内源性 TERT 的短期耗竭可通过破坏含有核酸酶 Snm1B/Apollo 和 TRF2 的端粒保护复合物的稳定性，独立于端粒侵蚀介导端粒功能障碍[22]等。

总之，端粒可以通过两种不同的方式影响癌症的发展过程：一方面，端粒的缩短也可能导致广泛的基因组不稳定，从而促进癌症进展；另一方面，癌细胞通过激活端粒维持机制延长端粒长度，从而实现持续的无限增殖。通过将端粒维持机制与端粒侵蚀造成的异常 DNA 损伤反应相结合，癌症细胞可以突破细胞分裂限制，并且通过复制应激积累不可修复的基因组突变。

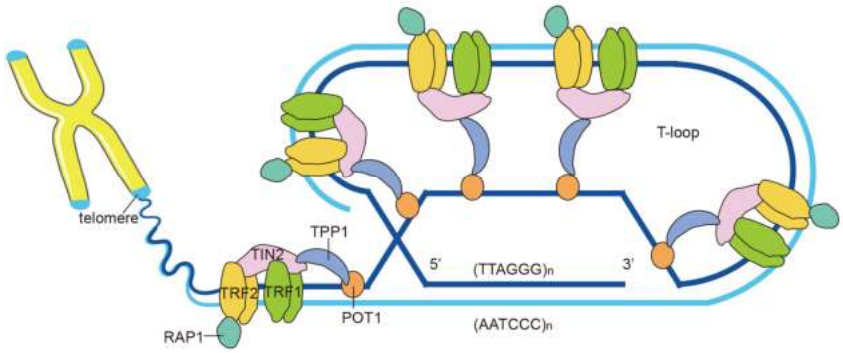


图 1 端粒结构

Fig. 1 Telomere structure

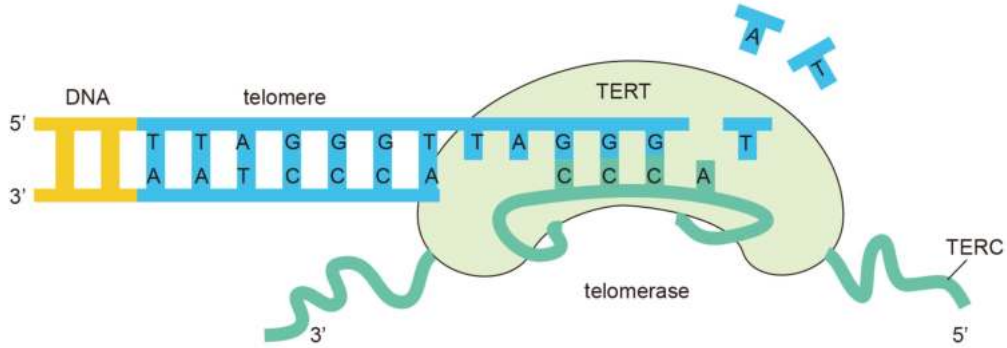


图 2 端粒酶结构

Fig. 2 Telomerase structure

2.端粒与结肠癌发生发展机制

2.1 端粒功能障碍引起的基因组不稳定诱导结肠癌

CIN 现象存在于约 65%–70%的结直肠癌患者组织中[8]，是多数 COC 的发病基础，其他 COC 组织则具有微卫星不稳定性（microsatellite instability，MSI）表型。具有 CIN 特征的肿瘤细胞中，染色体结构和数量畸变率高，通过不断制造非整倍体基因组导致肿瘤细胞异质性[23]。CIN 由染色体位点等位基因失衡、染色体扩增和易位引发，其特征为如 APC、p53 等抑癌基因的失活，如 KRAS、BRAF 等致癌基因的激活以及 18 号染色体长臂杂合性的丧失，进而促进 COC 的发生[24]。基因组中被称为微卫星的串联核苷酸重复序列在复制过程中易滑动出现错误。DNA 错配修复（DNA mismatch repair ，MMR）蛋白可识别并修复 DNA 复制过程中的错配错误。因此 MMR 基因缺陷会影响微卫星的修复，进而产生 MSI 表型。MMR 基因启动子特别是 MLH1 的甲基化，是偶发性 COC 中沉默 MMR 基因的最常见机制[25]。

有研究表明，在 COC 组织中，端粒缩短与线粒体 MSI 相关[26]。同时在携带野生型 p53 的 COC 中，MSI 表型患者的端粒长度明显短于微卫星稳定患者的端粒长度[27]。但目前端粒功能改变在 MSI 中的意义仍尚不明确。然而端粒功能障碍被认为是 CIN 产生的主要驱动力。当端粒末端保护机制受损时，染色体末端进入断裂-融合-桥（breakage-fusion-bridge，BFB）循环，这种循环可致显著的基因组重组。同时，端粒功能障碍与 BFB 循环会促进肿瘤中基因组的大量扩增和缺失，导致更高水平的 CIN[28]。体细胞中的端粒长度主要反映细胞增殖，但在肿瘤细胞中，它反映了细胞增殖导致的端粒缩短与端粒酶激活导致的端粒序列从头合成之间的平衡。在缺乏 TERC 的小鼠中，端粒缩短会导致胃肠道肿瘤的形成和微腺瘤发病率上升[29]。相较于正常细胞，COC 细胞中的端粒长度较短，而在高拷贝数变异和高体细胞突变数的 COC 细胞中，此趋势会更加明显[30]；而与肿瘤邻近健康组织中的端粒相比，远离癌性病变部位的健康组织中的端粒更短[31]。此外，COC 组织中端粒长度的减少与诊断时疾病状态的恶化、疾病进展的加快、生存率的降低相关[32]，而端粒长度变化最大的患者死亡风险最高[33]。然而，在 COC 中也有端粒酶活性增加的报道[34]。这是由于虽然端粒缩短促进了染色体不稳定性导致早期癌变，但端粒酶在后期的激活使肿瘤细胞永生话，即端粒长度和端粒酶表达的增加与肿瘤侵袭深度的增加相关[35]。这些结果有力地支持了端粒侵蚀导致 CIN 是 COC 发生的关键。

2.2 端粒功能障碍、炎症性肠病及结肠炎相关癌变

炎症是部分癌症发生和进展的原因，特别是 COC。炎症过程始于受损组织中生物分子的分泌，随后白细胞迁移到受伤组织以重建组织并帮助修复损伤，它是受伤组织愈合的生理反应。而慢性炎症则是由于没有受到损伤的刺激，但相关信号通路却发生了激活造成的，在 COC 肿瘤细胞转化、存活、增殖、侵袭、血管生成和转移等各个过程中发挥作用[36]。患有炎症性肠病（inflammatory bowel disease，IBD）包括溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）和克罗恩病（Crohn's disease，CD）的患者，COC 的发病风险也会增加[37]。有研究显示，长期患有 UC 的患者在 10 年、20 年和 30 年后，结肠炎相关癌症（colitis-associated cancer ，CAC）的累积发病率分别为 0.1%、2.9%和 6.7%[38]。CD 患者发生 CAC 的风险尚不完全清楚。但 Canavan 等人进行的一项荟萃分析显示，CD

发病 10 年、20 年和 30 年后 COC 发展的累积率分别为 2.9%、5.6%和 8.3%[39]。同时最近一项队列研究显示 CD 患者 COC 的预后较差，与诊断为 COC 的健康个体相比，CD 患者（根据肿瘤分期调整）COC 导致死亡的风险增加[40]。

端粒功能障碍能诱导 IBD 的发生，而形成的炎症微环境会进一步增加癌症患病风险。有研究报道，经过端粒功能障碍改造的小鼠的肠上皮细胞白介素 18 前体（pro-IL-18）会发生表达上调，表现出 IBD 样炎症状态，这证明了端粒功能障碍可以驱动炎症过程[41]。pro-IL-18 是 IBD 的主要驱动因素[42,43]，具有与端粒维持受损相关的生殖系变异的个体表现出这一途径的激活[41]。其中 TERC 或 TERT 的种系突变与纤维化和炎症疾病以及癌症的风险增加相关[44]。在病理层面上，端粒酶成分中存在种系突变的个体表现为进行性绒毛萎缩、小肠结肠炎和上皮内淋巴细胞增多[45]。同时 UC 肠上皮中较短的端粒可能导致基因组不稳定，并加剧这些患者癌症发病率的增加[46]。

此外，也有研究表明端粒侵蚀或功能障碍不仅可以成为 IBD 炎症过程的关键诱因，同时其也是是慢性炎症的结果。炎症会增加上皮损伤，肠上皮细胞、中性粒细胞和巨噬细胞产生高局部活性氧[47]，引起的氧化应激会加速端粒缩短[48]。即使是低程度的慢性炎症也足以诱导端粒侵蚀[49]。TERT 可以调节包括 Wnt/β-catenin 在内的通路，并可以通过与 NF-kB 启动子结合来调节炎症信号，该启动子可导致 IL-6 或 TNFα 等基因的转录[50]。NF-kB 是炎症信号的主要驱动因素，这一途径反过来也可调节端粒酶的活性[51]。有报道称，许多包括 IL-7、IL-8 和 IL-10 在内的免疫细胞因子的表达上调了端粒酶的活性，并与癌症的端粒长度呈现相关性[52]。这表明这些细胞因子在肿瘤微环境中的积累可能会对肿瘤细胞的端粒产生影响。

3.端粒酶作为治疗靶点的机遇与挑战

3.1 靶向端粒酶的抗癌策略研究进展

癌症细胞通过端粒酶的重新激活介导端粒延伸，从而实现癌细胞永生化。此外端粒酶还是癌变细胞的高度特异性靶点，端粒酶上调几乎是各种癌症类型的普遍特征，因此针对端粒酶的策略可能对各种癌症均具有广泛的治疗适用性。

3.1.1 免疫疗法

癌症细胞产生的内源性 TERT 肽可被主要组织相容性复合体 I 或 II 类分子识别并触发适应性免疫反应，许多 TERT 肽疫苗已进入早期临床试验。基于 TERT 的治疗性疫苗能够在高比例的癌症患者中调节特异性 T 细胞反应。在一项临床试验中，TERT 肽疫苗 UV1 激发了 86%的转移性激素性前列腺癌患者体内的免疫应答[53]。然而对 TERT 疫苗的免疫反应不足以控制疾病进展[54]。因此，TERT 疫苗与免疫检查点阻断相结合的疗法走进人们视野。研究表明，一种合成的 TERT DNA 疫苗与抗 CTLA-4 疗法协同作用，在对单一免疫检查点抑制剂反应较弱的小鼠模型中取得了抑制肿瘤生长并延长生存期的效果，这为 TERT 疫苗与免疫检查点抑制物相结合的免疫疗法的可行性提供了强有力的理论依据[55]。

3.1.2 端粒酶抑制剂

端粒酶抑制剂能够阻碍细胞端粒维持机制，使端粒逐渐变短，从而触发 DNA 损伤反应和随后的凋亡。伊美司他（imetelstat）是一种端粒酶的直接抑制剂，竞争性抑制端粒酶活性，从而抑制癌症细胞活性和肿瘤生长[56]。其在临床试验中引发了较高的应答率[57]，而在晚期非小细胞肺癌癌症患者进行的 II 期试验中，虽然端粒最短者生存率有提高的趋势，但患者整体的生存率并有明显改善[58]。这可能是由于微量的残余端粒酶活性仍可以延长和保护最短的端粒，维持肿瘤细胞增殖。因此这意味着需要高效的端粒酶抑制剂来完全耗尽端粒酶活性。BIBR1532 是一种非竞争性的端粒酶小分子抑制剂。尽管较差的药代动力学限制了其临床应用，但有证据表明高剂量 BIBR1532 可导致不依赖于端粒缩短的急性诱导端粒功能障碍，从而快速引发细胞毒性[59]。这种迅速触发抗癌反应的能力暗示了其潜在开发价值。

3.1.3 TERT 基因靶向治疗

绝大多数癌症通过端粒酶的重新表达获得复制永生，而端粒酶会通过 TPM 而重新激活[60]。这些突变招募了多聚体 ETS 因子 GABP，最近的研究者开始聚焦于这些发生 TPM 的癌症细胞。GABPβ1L（β1L）是一种四聚体形成的 GABP 亚型，对正常细胞而言，敲除该基因不会影响其发育，但会导致 TPM 依赖的 TERT 沉默，因此可

以通过抑制 β1L 驱动的 ETS 结合位点的转录，靶向治疗 TPM 的癌症细胞[61]。靶向 TPM 疗法的关键点在于区分正常和转化的端粒酶表达细胞。然而，TPM 的发生率和性质在不同的癌症类型之间差异很大。这一现象的潜在原因仍然是该领域的一个重要问题，因为了解其发生模式可能会揭示具有 TPM 的癌症细胞与没有这些突变的细胞中 TERT 的重要调节动力学。

3.2 挑战与阻碍

尽管端粒酶作为癌症靶点具有许多理想的优势，但其临床治疗应用的发展面临诸多重大挑战。由于依赖于随着每个细胞分裂端粒的逐渐磨损，基于抑制端粒酶逆转录酶活性的治疗需要一段较长的治疗时间才能发挥抗癌作用，这可能使其不适合用作一线治疗方案，因此不依赖于端粒缩短的急性诱导端粒功能障碍的药物开发显得尤为重要。同时由于端粒酶在干细胞和前体细胞中均有表达，端粒酶靶向疗法可能会产生一定的副作用。此外，由于肿瘤细胞中的端粒维持机制和维持肿瘤细胞增殖能力的限制，端粒酶活性可能处于较低水平，从而端粒酶抑制剂的效力也可能会被限制，这表明需要更高效的抑制剂才能确保治疗效果。同时，由于端粒酶的细胞丰度低导致了活性端粒酶难以纯化和结晶，因此人类端粒酶全酶的结构和组成尚不清楚，这也阻碍了药物设计和机理分析[10]。

4.小结

端粒障碍引发的基因组不稳定性是诱发 COC 的关键。此外，端粒功能障碍会诱发 IBD，同时炎性环境会进一步加剧端粒的侵蚀，增加癌变风险。由于癌症细胞通过端粒酶的重新激活介导端粒延伸实现永生化，因此端粒酶一直是癌症治疗中富有有吸引力的靶点。尽管面临重大挑战，但包括免疫疗法、端粒酶抑制剂、TERT 基因靶向治疗等针对端粒酶的抗癌策略仍然是癌症治疗中富有前景的策略。为了实现更好的临床疗效，进一步研究急性诱导端粒功能障碍的方法，并确定 TERT 疫苗和免疫检查点阻断之间的潜在协同作用至关重要。

REFERENCES

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E*, et al.*Cancer statistics, 2022[J].*CA: a Cancer Journal For Clinicians*,2022, 72 (1).

[2] WU C, LI M, MENG H*, et al.*Analysis of status and countermeasures of cancer incidence and mortality in China[J].*Science China. Life Sciences*,2019, 62 (5): 640-647.

[3] FENG R-M, ZONG Y-N, CAO S-M*, et al.*Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J].*Cancer Communications (London, England)*,2019, 39 (1): 22.

[4] XIA C, DONG X, LI H*, et al.*Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J].*Chinese Medical Journal*,2022, 135 (5): 584-590.

[5] MILLER K D, NOGUEIRA L, DEVASIA T*, et al.*Cancer treatment and survivorship statistics, 2022[J].*CA: a Cancer Journal For Clinicians*,2022, 72 (5): 409-436.

[6] VICTORELLI S, PASSOS J F.Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not[J].*EBioMedicine*,2017, 21: 14-20.

[7] NEIDLE S, PARKINSON G.Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery[J].*Nature Reviews. Drug Discovery*,2002, 1 (5): 383-393.

[8] LENGAUER C, KINZLER K W, VOGELSTEIN B.Genetic instabilities in human cancers[J].*Nature*,1998, 396 (6712): 643-649.

[9] MIZUKOSHI E, KANEKO S.Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy[J].*International Journal of Molecular Sciences*,2019, 20 (8).

[10] GUTERRES A N, VILLANUEVA J.Targeting telomerase for cancer therapy[J].*Oncogene*,2020, 39 (36): 5811-5824.

[11] DOKSANI Y, WU J Y, DE LANGE T*, et al.*Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation[J].*Cell*,2013, 155 (2): 345-356.

[12] SAREK G, KOTSANTIS P, RUIS P*, et al.*CDK phosphorylation of TRF2 controls t-loop dynamics during the cell cycle[J].*Nature*,2019, 575 (7783): 523-527.

[13] MACIEJOWSKI J, DE LANGE T.Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability[J].*Nature Reviews.*

Molecular Cell Biology,2017, 18 (3): 175-186.
[14] SHAY J W.Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer[J].*Cancer Discovery*,2016, 6 (6): 584-593.
[15] HACKETT J A, GREIDER C W.Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis[J].*Oncogene*,2002, 21 (4): 619-626.
[16] EBATA H, LOO T M, TAKAHASHI A.Telomere Maintenance and the cGAS-STING Pathway in Cancer[J].*Cells*,2022, 11 (12).
[17] BORGES G, CRIQUI M, HARRINGTON L.Tieing together loose ends: telomere instability in cancer and aging[J].*Molecular Oncology*,2022, 16 (18): 3380-3396.
[18] GAO J, PICKETT H A.Targeting telomeres: advances in telomere maintenance mechanism-specific cancer therapies[J].*Nature Reviews. Cancer*,2022, 22 (9): 515-532.
[19] BARTHEL F P, WEI W, TANG M, *et al.*Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types[J].*Nature Genetics*,2017, 49 (3): 349-357.
[20] MASUTOMI K, POSSEMATO R, WONG J M Y, *et al.*The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2005, 102 (23): 8222-8227.
[21] NITTA E, YAMASHITA M, HOSOKAWA K, *et al.*Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere-independent mechanism[J].*Blood*,2011, 117 (16): 4169-4180.
[22] KOH C M, KHATTAR E, LEOW S C, *et al.*Telomerase regulates MYC-driven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity[J].*The Journal of Clinical Investigation*,2015, 125 (5): 2109-2122.
[23] GRONROOS E, LóPEZ-GARCíA C.Tolerance of Chromosomal Instability in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Opportunities[J].*Cancer Research*,2018, 78 (23): 6529-6535.
[24] MALKI A, ELRUZ R A, GUPTA I, *et al.*Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements[J].*International Journal of Molecular Sciences*,2020, 22 (1).
[25] DE' ANGELIS G L, BOTTARELLI L, AZZONI C, *et al.*Microsatellite instability in colorectal cancer[J].*Acta Bio-medica : Atenei Parmensis*,2018, 89 (9-S).
[26] PARK W-J, BAE S U, HEO Y-R, *et al.*Telomere shortening in non-tumorous and tumor mucosa is independently related to colorectal carcinogenesis in precancerous lesions[J].*International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*,2017, 8 (5): 53-58.
[27] RAMPAZZO E, BERTORELLE R, SERRA L, *et al.*Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers[J].*British Journal of Cancer*,2010, 102 (8): 1300-1305.
[28] O'HAGAN R C, CHANG S, MASER R S, *et al.*Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes[J].*Cancer Cell*,2002, 2 (2): 149-155.
[29] RUDOLPH K L, MILLARD M, BOSENBERG M W, *et al.*Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans[J].*Nature Genetics*,2001, 28 (2): 155-159.
[30] LOPEZ-DORIGA A, VALLE L, ALONSO M H, *et al.*Telomere length alterations in microsatellite stable colorectal cancer and association with the immune response[J].*Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*,2018, 1864 (9 Pt B): 2992-3000.
[31] HEAPHY C M, GAONKAR G, PESKOE S B, *et al.*Prostate stromal cell telomere shortening is associated with risk of prostate cancer in the placebo arm of the Prostate Cancer Prevention Trial[J].*The Prostate*,2015, 75 (11): 1160-1166.
[32] VALLS C, PIñOL C, REñé J M, *et al.*Telomere length is a prognostic factor for overall survival in colorectal cancer[J].*Colorectal Disease : the Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*,2011, 13 (11): 1265-1272.
[33] HERRMANN M, PUSCEDDU I, MäRZ W, *et al.*Telomere biology and age-related diseases[J].*Clinical Chemistry and*

Laboratory Medicine,2018, 56 (8): 1210-1222.
[34] GERTLER R, ROSENBERG R, STRICKER D, *et al.*Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma[J].*Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*,2004, 22 (10): 1807-1814.
[35] PINO M S, CHUNG D C.The chromosomal instability pathway in colon cancer[J].*Gastroenterology*,2010, 138 (6): 2059-2072.
[36] HIRANO T, HIRAYAMA D, WAGATSUMA K, *et al.*Immunological Mechanisms in Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis[J].*International Journal of Molecular Sciences*,2020, 21 (9).
[37] WIJNANDS A M, DE JONG M E, LUTGENS M W M D, *et al.*Prognostic Factors for Advanced Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review and Meta-analysis[J].*Gastroenterology*,2021, 160 (5): 1584-1598.
[38] CHOI C-H R, RUTTER M D, ASKARI A, *et al.*Forty-Year Analysis of Colonoscopic Surveillance Program for Neoplasia in Ulcerative Colitis: An Updated Overview[J].*The American Journal of Gastroenterology*,2015, 110 (7): 1022-1034.
[39] CANAVAN C, ABRAMS K R, MAYBERRY J.Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease[J].*Alimentary Pharmacology & Therapeutics*,2006, 23 (8): 1097-1104.
[40] OLéN O, ERICHSEN R, SACHS M C, *et al.*Colorectal cancer in Crohn's disease: a Scandinavian population-based cohort study[J].*The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*,2020, 5 (5): 475-484.
[41] CHAKRAVARTI D, HU B, MAO X, *et al.*Telomere dysfunction activates YAP1 to drive tissue inflammation[J].*Nature Communications*,2020, 11 (1): 4766.
[42] MOKRY L E, ZHOU S, GUO C, *et al.*Interleukin-18 as a drug repositioning opportunity for inflammatory bowel disease: A Mendelian randomization study[J].*Scientific Reports*,2019, 9 (1): 9386.
[43] WILLIAMS M A, O'CALLAGHAN A, CORR S C.IL-33 and IL-18 in Inflammatory Bowel Disease Etiology and Microbial Interactions[J].*Frontiers In Immunology*,2019, 10: 1091.
[44] WATANABE S, HIBIYA S, KATSUKURA N, *et al.*Importance of Telomere Shortening in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis: A New Treatment From the Aspect of Telomeres in Intestinal Epithelial Cells[J].*Journal of Crohn's & Colitis*,2022, 16 (1): 109-121.
[45] JONASSAINT N L, GUO N, CALIFANO J A, *et al.*The gastrointestinal manifestations of telomere-mediated disease[J].*Aging Cell*,2013, 12 (2): 319-323.
[46] O'SULLIVAN J N, BRONNER M P, BRENTNALL T A, *et al.*Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening[J].*Nature Genetics*,2002, 32 (2): 280-284.
[47] AVIELLO G, KNAUS U G.ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage?[J].*British Journal of Pharmacology*,2017, 174 (12): 1704-1718.
[48] BARNES R P, FOUQUEREL E, OPRESKO P L.The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis[J].*Mechanisms of Ageing and Development*,2019, 177: 37-45.
[49] GRAHAM M K, MEEKER A.Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy[J].*Nature Reviews. Urology*,2017, 14 (10): 607-619.
[50] GHOSH A, SAGINC G, LEOW S C, *et al.*Telomerase directly regulates NF-κB-dependent transcription[J].*Nature Cell Biology*,2012, 14 (12): 1270-1281.
[51] JURK D, WILSON C, PASSOS J F, *et al.*Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice[J].*Nature Communications*,2014, 2: 4172.
[52] SVENSON U, GRöNLUND E, SöDERSTRöM I, *et al.*Telomere length in relation to immunological parameters in patients with renal cell carcinoma[J].*PloS One*,2013, 8 (2): e55543.
[53] LILLEBY W, GAUDERNACK G, BRUNSVIG P F, *et al.*Phase I/IIa clinical trial of a novel hTERT peptide vaccine in men with metastatic hormone-naive prostate cancer[J].*Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*,2017, 66 (7): 891-901.

[54] ZANETTI M.A second chance for telomerase reverse transcriptase in anticancer immunotherapy[J].*Nature Reviews. Clinical Oncology*,2017, 14 (2): 115-128.

[55] DUPERRET E K, WISE M C, TRAUTZ A*, et al.*Synergy of Immune Checkpoint Blockade with a Novel Synthetic Consensus DNA Vaccine Targeting TERT[J].*Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy*,2018, 26 (2): 435-445.

[56] ASAI A, OSHIMA Y, YAMAMOTO Y*, et al.*A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent[J].*Cancer Research*,2003, 63 (14): 3931-3939.

[57] BAERLOCHER G M, OPPLIGER LEIBUNDGUT E, OTTMANN O G*, et al.*Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia[J].*The New England Journal of Medicine*,2015, 373 (10): 920-928.

[58] CHIAPPORI A A, KOLEVSKA T, SPIGEL D R*, et al.*A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer[J].*Annals of Oncology : Official Journal of the European Society For Medical Oncology*,2015, 26 (2): 354-362.

[59] EL-DALY H, KULL M, ZIMMERMANN S*, et al.*Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532[J].*Blood*,2005, 105 (4): 1742-1749.

[60] PILSWORTH J A, COCHRANE D R, XIA Z*, et al.*TERT promoter mutation in adult granulosa cell tumor of the ovary[J].*Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*,2018, 31 (7): 1107-1115.

[61] MANCINI A, XAVIER-MAGALHãES A, WOODS W S*, et al.*Disruption of the β1L Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a TERT Promoter Mutation-Dependent Manner[J].*Cancer Cell*,2018, 34 (3).

Dangshen Huangjiu exerts prevention of gastric mucosal injury and inhibits Akt/NF-κB pathway

Yazhou Shao[a,b], Qiaohong Xu[a,b], Yanping Wang[a,b], Pengpeng Li[a,b], Han Shen[a,b], Fangdi Hu[*a,b,c]

（a. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China ； b. State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China； c. Codonopsis Radix Industrial Technology Engineering Research Center, Gansu Province, Lanzhou, Gansu, 730000）

【**Abstract**】One of the top ten tonic herbs, Dangshen is frequently found in Chinese functional foods. With the inclusion of Dangshen in the list of food and medicine substances in 2020, the Dangshen Huangjiu (DHJ) emerged. In the Bencao, it is written that Huangjiu can "open up the curved veins and thicken the stomach and intestines". Furthermore, increasing investigations have verified the protective effect of Dangshen on the gastric mucosa. Therefore, we propose the hypothesis that the stomach mucosa might be protected by the DHJ. To demonstrate that the effect of solids in Dangshen Huangjiu (DHJG) on damaged human gastric mucosal epithelial cells (GES-1) was reversed, the study used ethanol to injury GES-1 and then used protein immunoblotting (western blot) to determine the expression levels of p-Akt, p-NF-κBp65, and NF-κBp65 proteins in the cells; MNNG mixed with eating disorders were used to further establish the chronic non-atrophic gastritis (CNAG) model in Wistar rats, DHJ and DHJG were administered by gavage concurrently with molding. Cellular assays confirmed that DHJG (25-100 μg/mL) dose-dependently increased the viability of ethanol-injured GES-1, and lowered p-Akt and p-NFκB-p65/NFκB-p65 protein expression. Animal experiments revealed that 10 mL/kg and 20 mL/kg DHJ had no significant effect on the basic activity and gastric tissues and related biochemical indices of healthy rats; DHJ (10 mL/kg, 20 mL/kg) and DHJG (2.8 g/kg, 11.4 g/kg) resulted in some improvement in weight loss and significant improvement in gastric mucosal pathology in CNAG rats damage. Particularly, DHJ and DHJG significantly decreased the expression of p-Akt, p-NFκB-p65/NFκB-p65, Bcl-2/Bax protein and Akt, IKKβ, IκBα, NF-κB mRNA in the gastric tissues of CNAG rats. These results showed that DHJG ameliorates ethanol-induced GES-1 cell injury; both DHJ and DHJG alleviate CNAG, and the mechanisms by which they do so may be related to DHJ and DHJG increasing antioxidant capacity (elevating SOD, decreasing MDA), attenuating inflammatory responses (decreasing IL-1β, IL-6, and TNF-α), reversing apoptosis (reducing Bcl-2/Bax ratio) and down-regulating gastric tissue p-Akt, p-NFκB-p65/NFκB-p65 protein expression as well as Akt, IKKβ, IκBα, NF-κB mRNA expression. This study indicates that the interventional effects of DHJ and DHJG in CNAG may act through the Akt/NF-κB pathway.

【**Keywords**】Dangshen Huangjiu, Solids of Dangshen Huangjiu, Chronic non-atrophic gastritis, Akt/NF-κB pathway

1.Introduction

Chronic gastritis is a chronic inflammatory lesion of the gastric mucosa and is one of the most prevalent, severe and insidious diseases in humans[1]. Based on gastroscopy and pathology, chronic gastritis can be divided into non-atrophic gastritis (CNAG) and atrophic (CAG)[2]. Smoking, a poor diet, and *Helicobacter pylori* infection can all contribute to the development of CNAG, which is frequently disregarded due to its asymptomatic or mildly symptomatic beginnings. Proton pump inhibitors (PPI), antihistamines, and antacids are the main chemically synthesized medications used in clinical practice today for CNAG. These medications have several side effects and are challenging to treat[3]. Therefore, finding a natural product that can prevent the occurrence of gastritis is important.

*Corresponding authors:

Fangdi Hu, 199 Dong-gang Road West, Lanzhou, 730000, China. Tel.: +86 0931 8911865/8911895; Fax: +86 0931 8915686. E-mail address: hufd@lzu.edu.cn.

Huangjiu has a lengthy history in China and is well-received by consumers. Dangshen Huangjiu (DHJ) (Gansu Wushanchi Huangjiu Co., Ltd.) came into being, with Dangshen added to the list of food and medicine substances in 2020, but what health advantages DHJ has is still unknown. Huangjiu can "open up the curved veins and thicken the stomach and intestines," according to the Compendium of Materia Medica. Furthermore, amounts of studies in recent years have confirmed the protective effect of Dangshen on the gastric mucosa of animals. The superfine powder of Dangshen can reduce the level of gastric ulcer index and gastrin, and increase the level of 6-keto-PGF1α and EGF in rats with gastric injury caused by acetic acid, exerting its protective effect on gastric mucosa[4]; Lobetyolin can increase the content of prostaglandins, counteract the acid-producing effect of gastrin and stimulate the synthesis and release of epidermal growth factor in the gastric mucosa, thereby alleviating ethanol-induced gastric mucosal damage and accelerating ulcer healing in rats[5]; Inulin-type fructan CP-A, methanolic extract and ethanolic extract of Dangshen significantly reduced gastric damage and gastric mucosal ulcer index in rats with acute gastric ulcer caused by ethanol, and improved gastric ulcer caused by ethanol by increasing the antioxidant capacity of gastric tissues of rats[6, 7]; In addition, it was found that the water-soluble fraction (equivalent to 10 g of raw herb/kg) of Dangshen had a significant protective effect against gastric mucosal damage induced by anhydrous ethanol, acidic (0.6 N HCl) and alkaline (0.2 N NaOH) stimuli, the pharmacological mechanism of which may be related to the synthesis and/or release of prostaglandins in the gastric mucosa[8, 9]. To date, studies have shown that Dangshen can also inhibit the proliferation of gastric cancer cells. Quantitative proteomic and metabolomic results showed that aqueous extract of Dangshen inhibited the proliferation of gastric cancer cells by regulating energy metabolism, and that serum containing Dangshen inhibited the proliferation of gastric cancer AGS cells without significant effect on normal gastric mucosal epithelial cells[10]. Further study revealed that polysaccharide of Dangshen could effectively inhibit the proliferation of gastric cancer AGS cells, induce apoptosis and inhibit the secretion of pro-inflammatory factors, the mechanism of which may be related to the regulation of miR-361-5p/TLR4/NF-κB pathway[11]. Based on the above study we propose the hypothesis that DHJ may have a protective effect on the gastric mucosa.

A substantial part of the development of gastritis is due to inflammatory mediators like the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-α (TNF-α), which are linked to damage to the gastric mucosa as a result of the inflammatory response[12]. NF-κB contributes to the emergence of inflammation as a pro-inflammatory regulator[13]. These cytokines amplify the inflammatory cascade response by triggering the release of other pro-inflammatory mediators. It was shown that in RAW264.7 cells, Huangjiu polysaccharide effectively inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines[14]. NF-κB is also a redox-sensitive transcription factor[15]. Moreover, redox reactions and redox signaling are involved in maintaining homeostasis in the gastric mucosa[16]. Reactive oxygen species (ROS) are important redox signals and when the redox state is imbalanced or when antioxidants are insufficient, gastric tissue undergoes oxidative stress, which in turn causes damage to the gastric mucosa. Excessive ROS production also leads to an increase in lipid peroxides like malondialdehyde (MDA). Superoxide dismutase (SOD), which directly removes oxygen-derived free radicals from the environment, and other antioxidant defense molecules have been evolved by mammalian cells to inhibit ROS generation.[17]. In addition, ROS production has been reported to activate caspases and upregulate the ratio of Bcl-2 and Bax, thereby inhibiting the apoptosis of inflammatory cells and aggravating the damage of gastric mucosa[18]. 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG) is a commonly used modeling drug for gastric mucosal injury in animals, and it can mimic nitrite damage to gastric mucosa[19]. Long-term and repeated damage to the gastric mucosa's epithelial tissue can lead to many gastric-related diseases[20]. In this study, ethanol-induced damage to human gastric mucosal epithelial cells (GES-1) was firstly used to verify the reversal of the effect of DHJG on damaged GES-1 cells, and the expression levels of p-Akt, p-NF-κBp65 and NF-κBp65 proteins in the cells were determined by Western blot; further, To analyze the possible mechanism of DHJ and DHJG in improving CNAG, the serum levels of G-17, PG

Ⅰ, IL-6, IL-1β, TNF-α, SOD, MDA was measured in Wistar rats by biochemical methods. The levels of p-Akt, p-NFκB-p65, NFκB-p65, Bax, Bcl-2 protein expression and Akt, IKKβ, IκBα, NF-κB mRNA expression in Wistar rats were measured by Western blot and quantitative real-time fluorescence PCR (QRT-PCR). It is promising to provide experimental support for developing and utilizing DHJ.

2. Materials and methods

2.1 Samples and reagents

DHJ is provided by Gansu Wushanchi Huangjiu Co. Ltd (Gansu, China), which is made of Dangshen and millet rice as raw materials through soaking, steaming, saccharification, fermentation, pressing, filtration and sterilization and other processes; DHJG is produced from DHJ by spin-drying under reduced pressure, concentrating to a non-alcoholic taste and then freeze-drying; Hydrotalcite Chewable Tablets was purchased from Deshengtang Pharmacy (Gansu, China); MNNG was purchased from Toshii Ai Chemical Development Co Ltd (Shanghai, China); SOD and MDA kits were purchased from Nanjing Jiancheng Institute of Biological Engineering (Jiangsu, China);IL-6, IL-1β, TNF-α,G-17, PG Ⅰ Elisa kits were purchased from Jiangsu Meimian Industrial Co. Ltd (Jiangsu, China); PVDF membrane, Tris, glycine, SDS, RIPA buffer(high) (tissue/cell), protein phosphatase inhibitor mixture, ECL luminescent solution, BCA protein concentration assay kit purchased from Beijing Solarbio Science & Technology Co. Ltd (Beijing, China); NF-κB p65, p-NF-κB p65, p-Akt, Bax, Bcl-2 and GAPDH primary antibody, horseradish peroxidase were purchased from Immunoway Biotechnology Co. Ltd (Beijing, China); TRIzol® extraction solution, Hifair™ II First Stand cDNA Synthesis SuperMix, Hieffff™ qPCR SYBR® Green Master Mix were purchased from Yeasen Biotechnology Co. Ltd(Shanghai, China). All other chemicals are of analytical grade.

2.2 Cell experiments

2.2.1 Cell culture and viability assays

Servicebio Biotechnology Co. Ltd (Wuhan, China) supplied the gastric epithelial cell line (GES-1), which was cultivated in DMEM with 10% FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin. The cell supernatant was changed every 48 h, and GES-1 was incubated at 5% CO_2, 37°C. In this experiment, cell viability and cytotoxicity were determined by the MTT method. Briefly, GES-1 cells were inoculated into 96-well microplates (Corning, Costar®, USA) at a density of 5×10^3 cells/well until the cells adhered and treated with DHJG at concentrations of 10, 20, 40, 80, 100, 200, 400, 600 μg/mL for 24 h. Then, 10 μL of MTT was injected into each well to make a final MTT concentration of 5 mg/mL and the microtiter plate was incubated for 4 hours. Finally, the supernatant was discarded and formazan was allowed to dissolve in 100 μL DMSO. The optical density values were read at 490 nm using a microplate reader (Infinite F50, Dicken (Shanghai) Trading Co.). The results of the study were repeated three times. Cell viability was calculated from the absorbance of treated cells (A) and control cells (B) using the following equation:

$$\text{Cell viability}(\%) = A/B\times100\%$$

2.2.2 Protective effect of DHJG on ethanol-damaged GES-1 cells

GES-1 cells in the logarithmic growth phase were plated (density 5×10^3 cells) and incubated for 12 hours until the cells adhered. Cells were treated with ethanol at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 2, 3, 5, and 10% to induce damage, and ethanol concentrations were screened for cell survival of approximately 60% for further experiments[21]. To test the effect of DHJG on ethanol-induced damage in GES-1 cells, GES-1 cells were pretreated with 25, 50, 75, and 100 μg/mL of DHJG for 24 h and then treated in ethanol at a concentration of 2% for 24 h. Cell modeling aimed to screen for the most effective treatment concentration of DHJG for the construction of an in vitro prevention model for GES-1 cells.

2.2.3 DHJG prevents ethanol-induced GES-1 cell injury via the Akt/NF-κB signaling pathway

The protein expression levels of p-Akt, p-NF-κBp65, and NF-κBp65 were measured in GES-1 cells. Cells were lysed on ice for 20 min using RIPA buffer (high) and centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4℃, and cellular protein concentrations were determined using the BCA kits. Proteins were separated by electrophoresis in 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and the separated proteins were then transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. PVDF membranes were incubated overnight at 4°C in combination with anti-p-Akt antibody, anti-p-NF-κBp65 antibody, anti-NF-κBp65 antibody, or anti-NADPH antibody, and then shaken with secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Exposure in a TANON gel imager.

2.3.1 Animal experimental

A total of 72 male Wistar rats aged 2.5 months, 240±20 g in weight were purchased from the Lanzhou University Experimental Animal Centre (license number SCXK (Gan) 2021-0002). Eight animals were kept in one cage with free access to food and water in a controlled environment with a 12-hour light/dark cycle (25±3℃ at 50 %-60% relative humidity). The experimental design of the animal is shown in Fig.1. After one week of acclimatization feeding, rats were randomized into nine groups(n=8): normal control group (NC), normal plus DHJ low and high dose group (10 mL/kg,20 mL/kg) (NC+DHJ10/20), model control group (MC), model plus Hydrotalcite group (0.36 g/kg) (MC+LTSM), model plus DHJ low and high dose group (10 mL/kg,20 mL/kg) (MC+DHJ10/20), model plus DHJG low and high dose group (2.8 g/kg,11.4 g/kg) (MC+DHJG2.8/11.4). The NC group was given free access to water for regular feeding; the NC+DHJ10/20 group and MC+DHJ10/20 group were gavaged with 10 mL/kg and 20 mL/kg body weight of DHJ per day respectively; MC+DHJG2.8/11.4 group were gavaged with DHJG 2.8 g/kg and 11.4g/kg body weight per day respectively, equivalent to DHJG in 20 mL and 80 mL DHJ. The MC+LTSM group was gavaged 0.36 g/kg body weight of Hydrotalcite per day. Except for the NC group and NC+DHJ10/20 group, The rest of the rats were molded at the same time as the drug was administered. Gavage with 0.04 mol/L MNNG solution at 5 mL/kg every three days and Irregular diets (2 d satiety, 1 d starvation, so repeatedly) were used to develop the CNAG rat model[10]. CNAG is characterized by an infiltration of inflammatory cells (e.g. neutrophils and monocytes) in the mucosal layer and the degree of inflammation is graded according to the intensity and depth of the infiltration[2, 22]. At weeks 6 and 8, gastric tissue from two rats from the model group was stained with HE to see if the CNAG rat model had been effectively duplicated and to measure the levels of gastrin 17 (G-17) and pepsinogen I (PG I) to rule out the possibility of CAG. All the experimental procedures followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, eighth edition (ISBN-10: 0-309-15396-4) and were approved by the Ethics Committee of Lanzhou University.

The dose of DHJ was set with reference to the recommendations of the Chinese Nutrition Society in the Dietary Guidelines for Chinese Residents (2016 edition): ≤25 g/d of pure alcohol for adult males and ≤15 g/d for adult females, so we set the appropriate alcohol dose at 20 g/d, which is equivalent to 3.6 mL/kg/d DHJ for adults (70 kg). According to the dose per body weight, the equivalent dose for rats is 6 times that of humans, resulting in a calculated dose of 21.6 mL/kg/d for rats. Considering the maximum daily gavage dose for rats, we set the high dose for rats at 20 mL/kg/d DHJ and the low dose at 10 mL/kg/d DHJ, corresponding to 1.6 g/kg and 0.8 g/kg of pure alcohol per rat per day, respectively.

2.3.2 Hematoxylin & eosin (H&E) staining for pathological histology

All rats were executed, the stomach tissue was cut along the greater curvature of the stomach and half of the stomach tissue was placed in paraformaldehyde (4%) (Solarbio, Beijing, China) for 12 hours and then dehydrated in alcohol and xylene, respectively. After dehydration, paraffin was used to embed the samples. To visualize histological changes in the gastric mucosa, serial sections (4-5 μm thick) of the stomach were stained with hematoxylin and eosin (H&E) using

standard techniques.

2.3.3 Biochemical method to determine serum SOD, MDA, IL-1β, IL-6, TNF-α, G-17, PG Ⅰ levels

The serum levels of SOD and MDA were measured using commercial kits (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Jiangsu, China). The serum concentrations of G-17, PGI, IL-1β, IL-6, and TNF-α were determined using commercially available Elisa kits (Jiangsu Meimian Industrial Co. Ltd, Jiangsu, China) according to the manufacturer's instructions.

2.3.4 Determination of protein levels of p-Akt, NF-κBp65, p-NF-κBp65, Bax and Bcl-2 in gastric mucosal tissues by western blot

The protein expression levels of stomach p-Akt, NF-κBp65, p-NF-κBp65, Bax, and Bcl-2 were determined. The stomach samples were lysed and homogenized in tissue lysis buffer containing phenylmethylsulfonyl fluoroprotease and phosphatase inhibitors. After 20 minutes on ice, the lysates were centrifuged at 12,000 rmp for 5 minutes. The supernatant was collected, and the extracted protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit. The obtained proteins were subjected to subsequent immunoblotting analysis.

2.3.5 Determination of Akt, IKKβ, IκBα, and NF-κB mRNA at the transcriptional level in gastric mucosal tissues by QRT-PCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) and RNA expression levels were analyzed using NanoDrop One (Thermo Fisher, USA). The cDNA was obtained by reverse transcription of RNA using Hifair™II First Strand cDNA Synthesis Super Mix (Yeasen, Shanghai, China). The resultant cDNA (1 μL) was utilized as a template and combined with 2 μL of target primers, 10 μL Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix and 5 μL of water: initial preincubation at 95°C for 5 min; 40 PCR cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 20 s and 72°C for 20 s; followed was a melting curve cycle. Table.1 lists the used primers. Data analysis using QuantStudio™ 5 software (ABI, USA). The comparative $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to obtain relative quantification. Expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The mean RNA expression level in the NC group of rats was set to 1.

Table.1 Primer sequences for real-time PCR analysis of mRNA expression

Genes	Forward	Reverse
Akt	TCATTGAGCGCACCTTCCAT	GACCTGTGGCCTTCTCCTTC
IKKβ	AGGAAGACTGTAACCGGCTG	CCGTTCTACCAGGACCTTCAC
IκBα	TGGAAGTGATTGGTCAGG	ACGGAGTGGAGATGCTG
NF-κB	CGCATCCAGACCAACAATAACC	GCCAGGTCCCGTGAAATACA
GAPDH	GGGTGATGCTGGTGCTGAGTATGT	AAGAATGGGAGTTGCTGTTGAAGTC

2.4 Statistical analysis

Experimental values are expressed as means ± standard deviation (S.D). Data were analyzed using SPSS 26.0 and one-way analysis of variance (ANOVA) was used to analyze differences in biochemical parameter data between groups, followed by a two-way comparison using Dunnett's post hoc test for significance. The S-N-K test was used for chi-square and the rank sum test for non-uniformity of variance. $P < 0.05$ was considered a statistically significant difference.

3. Results

3.1 Protective effect of DHJG on damaged GES-1 cells

3.1.1 DHJG inhibits ethanol-induced decrease in cell viability

Ethanol can induce cell dehydration, degeneration, and necrosis[23]. Ethanol-induced gastric mucosal damage is a common method for establishing models[21]. As shown in Fig. 2A, the viability of ethanol-treated GES-1 cells decreased with increasing ethanol concentration. After incubating the GES-1 cells with 2% ethanol for 24 h, the cell viability was about 60% of that of the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$), which was in accordance with the requirements of this experiment.

The damaging effects of ethanol on cells are well known, and DHJ contains 10% ethanol, but what we wanted to know was whether other components of DHJ besides alcohol had a protective effect on ethanol-damaged GES-1 cells, so we used DHJG for cellular experiments. The preparation of DHJG is mentioned in the part of Materials and Methods, and although DHJG does not represent DHJ, it is an important component of DHJ. As shown in Fig. 2B, when the DHJG concentration was less than or equal to 100 μg/mL, there was no significant difference in cell viability compared to the control group ($P > 0.05$). Next, to determine whether DHJG protected against ethanol-induced loss of cell viability, we pretreated GES-1 cells with DHJG (25, 50, 75, 100 μg/mL) for 24 h and then co-incubated them with 2% ethanol for 24 h. The results showed that ethanol significantly reduced the viability of GES-1 cells by approximately 60% of the control; compared to the ethanol group, DHJG (25, 50, 75, and 100 μg/mL) dose-dependently increased the viability of ethanol-damaged GES-1 cells by 13.17%, 33.11%, 46.83%, and 51.69%, respectively (Fig. 2C).

3.1.2 Effect of DHJG on the expression of p-Akt, NF-κBp65 and p-NF-κBp65 in GES-1 cells

To determine whether ethanol activated the NF-κB pathway, GES-1 was treated with 2% ethanol for 24 h, followed by western blot analysis of NF-κB related proteins.as shown in Fig.2D, p-Akt, NF-κBp65, and p-NF-κBp65 expression levels were significantly up-regulated in the ethanol group. In contrast, compared to the ethanol group, 100 μg/mL DHJG reduced the relative levels of p-Akt and p-NFκB-p65/NFκB-p65 protein expression in ethanol-damaged GES-1 cells by 82.72% and 54.72%, respectively.

3.2 Prevention of CNAG by DHJ through inhibition of the Akt/NF-κB pathway

3.2.1 Establishment of the CNAG rat model

The successful establishment of the model is the basis of the efficacy study. The CNAG model in this experiment was established over a period of 8 weeks. From the general condition, the rats showed a loss of appetite, loose hair, reduced activity and slow growth in body weight compared with the blank group at week 6, and unformed feces, unresponsive and huddled at week 8 (Fig.S1A). From the gastric histopathology, the superficial epithelium of the gastric mucosa of rats appeared partially destroyed at week 6, the interstitium appeared congested and a small number of lymphocytes infiltrated. At week 8, the gastric mucosa border of rats was incomplete, the superficial epithelium was necrotic and detached, it was mildly eroded, the interstitium appeared congestive edema and neutrophils infiltrated (Fig. S1C). In addition, the serum G-17 and PG Ⅰ levels of rats at week 8 showed no significant changes compared with the blank group (Fig. S1B), indicating that the gastric mucosal glandular secretion function of rats in the CNAG stage was still normal, which was consistent with the literature reports[24], and the possibility of CAG was excluded. The above results indicate that the CNAG rats model was successfully established.

3.2.2 Effect of DHJ on macrofaunal characteristics and body weight of CNAG rats

Firstly, we recorded the body weight and general status of the rats. Compared with the NC group, the healthy rats pretreated with DHJ (10, 20 mL/kg) were in better general condition, with lustrous coats, agile movements, no abnormal stools, and no significant differences in body weight and dietary intake (Fig. 3A-B). The gastric wall of the rats in the MC group was less elastic, with low creases and a reddish or dark red gastric mucosa, with visible congestion and edema (Fig. 3C, d).

Compared with the MC control group, different concentrations of DHJ (10, 20 mL/kg), DHJG (2.84, 11.36 g/kg) and hydrotalcite intervention had different degrees of repairing effects on the gastric mucosa (Fig. 3C, e-i), indicating that DHJ and DHJG had therapeutic effects on the MNNG-induced CNAG rats. However, we did not find a major difference in body weight and gastric histomorphology between DHJ and DHJG in CNAG rats.

3.2.3 DHJ attenuates gastric histopathological damage in CNAG rats

H&E staining showed that the gastric mucosa of the rats in the NC group was intact, with normal thickness, normal glandular morphology and structure, tightly arranged, no obvious inflammatory cell infiltration in the field of view, the cells were monolayer columnar, cytoplasm transparent or vacuolated, no congestion and edema in the intrinsic glands and mucosa, and no hyperplasia in the mucosal muscle layer (Fig.3 D, a). Compared with the NC group, the morphology, cell arrangement and glandular structure of the gastric mucosa of healthy rats treated with DHJ (10, 20 mL/kg) showed no obvious pathological damage (Fig. 3D, b-c); compared with the model control group, the model group treated with hydrotalcite and different doses of DHJ (10, 20 mL/kg) and DHJG (2.84, 11.4 g/kg) which gastric mucosal borders of the rats tended to be intact, superficial epithelial necrosis was reduced, interstitial edema was improved, the order of glandular arrangement was generally regular and limited disorder was seen, and the high-dose group was better than the low-dose group (Fig. 3D, e-i).

3.2.4 DHJ enhances the antioxidant capacity of CNAG rats

Oxidative stress is a key pathogenic factor in the process of gastric mucosal injury. The levels of SOD activity and MDA expression, which are closely related to oxidative stress, were measured. The results showed that there was no significant difference in the serum SOD and MDA levels in healthy rats gavaged with DHJ (10, 20 mL/kg) compared with the NC group ($P > 0.05$). In the MC group, serum SOD levels were significantly lower and MDA levels were significantly higher, all differences were statistically significant ($P < 0.01$); serum SOD was 49.69% lower and MDA was 1.39 times higher in the MC group compared to the NC group; serum SOD activity was significantly higher and MDA levels were significantly lower in the rats treated with hydrotalcite, DHJ and DHJG compared to the MC group. The treatment with DHJ (10, 20 mL/kg) and DHJG (2.84, 11.4 g/kg) increased the SOD level by 59.46%, 91.05%, 124.89% and 157.99%, respectively, and reduced the MDA level by 53.95%, 56.41%, 41.48% and 42.71%, compared with the MC group. It can be seen that in raising serum SOD of CNAG rats, the MC+DHJ20 group is better than the MC+DHJ10 group, the MC+DHJG11.4 group is better than the MC+DHJG2.8 group, and MC+DHJG2.8 is better than MC+DHJ20 group at the same dose; while MC+DHJ10/20 group is better than MC+DHJG2.8/11.4 group in lowering serum MDA in the CNAG rats (Fig. 4 A-B).

3.2.5 Effect of DHJ and DHJG on gastrointestinal hormones in CNAG rats DHJ had no significant effect on gastrointestinal hormones in both healthy rats and CNAG rats

With the continuous development of molecular diagnosis, serum pepsinogen (PG) and gastrin (G) have become the main serological markers to determine the atrophy of gastric mucosa and the site of atrophy[25]. From Fig.5C-D, we can find no significant changes in serum G-17 and PG Ⅰ levels in healthy rats and CNAG rats, indicating that the gastric mucosa of CNAG rats is still in the non-atrophic stage, and no significant changes in serum G-17 and PG Ⅰ levels in CNAG rats after DHJ and DHJG treatment ($P > 0.05$) (Fig. 4C-D).

3.2.6 Effect of DHJ and DHJG on inflammatory indicators in CNAG rats

The inflammatory molecule-mediated inflammatory response is the main pathological manifestation of chronic non-atrophic gastritis and one of the main factors that damage the gastric mucosa. The results showed that DHJ (10, 20 mL/kg) treatment had no significant difference in serum IL-6, IL-1β and TNF-α levels in healthy rats compared with the NC group

($P > 0.05$). Serum IL-1β, IL-6 and TNF-α levels were significantly higher ($P < 0.01$) in the MC group. In the DHJ (10, 20 mL/kg) and DHJG (2.84, 11.36 g/kg) treated groups serum IL-1β, IL-6 and TNF-α levels were 29.58%, 9.93%, 19.26%, 26.54% and 32.39%, 28.79%, 32.30%, 31.64% and 21.44%, 10.32%, 28.35%, 43.16% lower than those in the MC group (Fig. 4E-G).

3.2.7 DHJ inhibits apoptosis of gastric mucosal cells

Bcl-2 and Bax are a pair of key proteins that regulate apoptosis. Compared with the NC group, the expression levels of the pro-apoptotic protein Bax and the anti-apoptotic protein Bcl-2 in the gastric tissues of the MC group rats were significantly reduced; however, DHJ (10, 20 mL/kg) and DHJG (2.84, 11.36 g/kg) pretreatment significantly attenuated the changes, and the relative expression content of Bcl-2/Bax protein decreased by 60.78%, 68.97%, 50.86% and 59.48% compared with the MC group (Fig. 5A-D). It can be seen that the pro-apoptotic effect of DHJ on abnormal cells was superior to that of DHJG.

3.2.8 DHJ inhibits inflammatory pathway activation through Akt/NF-κB signaling pathway in CNAG

To verify whether DHJ inhibits the process of CNAG through the Akt/NF-κB signaling pathway, we measured several important target proteins by the Western Blot method and QRT-PCR. Compared with the NC group, the levels of p-Akt and p-p65/p65 proteins were significantly upregulated in the gastric tissues of rats in the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In contrast, DHJ and DHJG could inhibit the Akt/NF-κB signaling pathway. Continuous gavage administration of 10 mL/kg, 20 mL/kg of DHJ and 2.8 g/kg, 11.4 g/kg of DHJG caused a significant down-regulation of p-Akt and p-NFκB-p65/NF-κB-p65 protein levels in gastric tissues of rats with chronic non-atrophic gastritis induced by MNNG combined with eating disorders. p-Akt and p-NFκB-p65/NF-κB-p65 protein relative expression decreased by 81.45%, 75.00%, 50.00%, 54.03% and 25.60%, 73.43%, 15.46%, 70.05%, respectively (Fig. 6A-C). It decreased Akt, IKKβ, IκBα and NF-κB mRNA expression by 55.65%, 59.41%, 26.36%, 29.29% and 59.32%, 72.03%, 78.81%, 79.66% and 43.01%, 59.59%, 32.64%, 58.03% and 33.06%, 59.09%, 59.09%, 43.80%, respectively (Fig.6D-G). It can be seen that the MC+DHJ10/20 group had a better effect on the regulation of Akt/NF-κB-related protein and gene expression in the gastric tissue of CNAG rats than the MC+DHJG2.8/11.4 group.

4. Discussion

In the present study, we analyzed the protective effect of DHJ on gastric mucosal injury induced by MNNG combined with hunger and satiety disorders in Wistar rats. Firstly, the in vitro results showed that 25-100 μg/mL DHJG could inhibit ethanol-induced GES-1 cell damage via the Akt/NF-κB pathway. DHJG is an important component of DHJ, and in vivo animal experiments were conducted based on the validity of the cellular experiments. DHJ (10, 20 mL/kg) and DHJG (2.8, 11.4 g/kg) treated for 8 weeks significantly improved gastric mucosal damage in CNAG rats, and acted by affecting oxidative stress, inflammatory factor production and transport, and regulating the levels of apoptotic proteins, the molecular mechanism of which may be related to the inhibition of the Akt/NF-κB signaling pathway. These results suggest that DHJ may have the potential to protect the gastric mucosa and its effects are closely related to the inhibition of inflammation, and studies have demonstrated the significant anti-inflammatory activity of Huangjiu polysaccharides and Huangjiu polyphenols[14, 26].

According to the Correa model, the progression of gastric disease is as follows: normal gastric mucosa - chronic non-atrophic gastritis - chronic atrophic gastritis - intestinal epithelial metaplasia - gastric cancer, with chronic atrophic gastritis and intestinal epithelial metaplasia collectively referred to as gastric precancerous lesions[27]. MNNG is often used as an animal model for the establishment of gastric precancerous lesions. In this study, a CNAG rat model was prepared using

a combination of gavage with 0.04 mol/L MNNG solution at 5 mL/kg every 3 days and hunger and satiety disorder (2 d satiety, l d starvation). The criteria for successful modelling were referred to the Consensus Opinion on Integrated Chinese and Western Medicine Treatment of Chronic Non-Atrophic Gastritis (2017). As there are few studies on the induction of chronic non-atrophic gastritis using MNNG, the gastric histopathological changes of the model rats were closely monitored during the modelling process in this study.

The levels of pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and IL-6 were determined, which is similar to the report that HJ polysaccharide has anti-inflammatory effects by reducing the expression levels of TNF-α, IL-1β and IL-6[14]. As an inflammatory cytokine, TNF-α can promote the production and secretion of IL-1 and IL-6, and induce inflammation. TNF-α is a key downstream inflammatory factor of NF-κB, during stress, due to the increase of oxygen free radicals and vascular ischemia in gastric mucosa, the NF-κB signaling pathway is activated and the expression of a variety of pro-inflammatory factors is induced[28]. IL-1β may also increase inflammation by inducing the expression of other cytokines such as IL-6[29]. Previous studies have shown that NF-κB is a molecular switch of inflammatory signaling pathway, and both IL-1β and TNF-α can activate NF-κB inflammatory signaling pathway, thus participating in the development of inflammation[30]. According to our results, MNNG combined with dietary disorders induces gastritis, along with activation of the NF-κB pathway and up-regulation of downstream signals, such as TNF-a, IL-1β, and IL-6. These findings are consistent with previous studies[31]. DHJ inhibited the expression levels of pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and IL-6, thereby alleviating the progression of CNAG. This is undoubtedly an effective strategy for DHJ to improve these inflammatory pathological factors.

Except for inflammation, excessive production of oxidative stress can damage the gastric mucosa, leading to alterations in endogenous antioxidant defence systems, including SOD and MDA[32]. The ROS response to cell membranes results in lipid peroxidation, which generates high levels of MDA and causes oxidative damage to the stomach[33]. The results of this study showed that the application of MNNG significantly elevated MDA levels and inhibited the activity of SOD. These observations are in agreement with the findings of earlier studies[34]. In fact, our findings showed that DHJ significantly reversed MNNG-induced redox. A large body of evidence demonstrated that antioxidants play a central role in the development of gastric mucosal damage[35]. Our data validate the replenishment of the key antioxidant component SOD and the reduction of MDA following DHJ treatment. These suggests the potential of DHJ as an antioxidant to prevent CNAG.

A number of studies have shown that apoptosis is also closely related to the development of gastric mucosal damage, and that sustained excessive apoptosis production can disrupt the integrity of the gastric mucosa, ultimately leading to gastric mucosal dysfunction[35]. The Bcl-2 family of proteins is an important regulator of apoptosis, with two main categories of functions: inhibition and promotion. Twenty-five Bcl-2 family homologous proteins have been identified, some of whose members promote apoptosis, such as Bax, and others prevent apoptosis, such as Bcl-2[36], with Bcl-2/Bax directly determining the permeability of various mitochondrial channels and thus whether the cell can survive[37, 38]. Interestingly, our data showed that MNNG significantly upregulated the anti-apoptotic protein Bcl-2, downregulated the pro-apoptotic protein Bax and significantly upregulated Bcl-2/Bax. After DHJ treatment, CNAG gastric mucosal apoptotic protein levels showed a feedback trend, as evidenced by a down-regulation of Bcl-2 levels, an up-regulation of Bax levels and a decrease in the Bcl-2/Bax ratio. It is suggested that DHJ can promote apoptosis of abnormal gastric mucosa cells in CNAG rats.

Western blotting and real-time fluorescence quantitative PCR studies revealed changes in protein and gene expression levels both upstream and downstream of the Akt/NF-κB pathway. These findings support the hypothesis that DHJ may

regulate this signaling pathway. Phosphorylated Akt protein is involved in the development of gastritis, and NF-κB is involved in an Akt signaling cascade; phosphorylated Akt promotes the phosphorylation of IκB kinase (IKK), which leads to IκBα ubiquitination and subsequent activation of NF-κB[39]. Akt also activates NF-κB by phosphorylating Ser 536 residues directly during inflammation[29]. DHJ inhibited Akt phosphorylation. In addition, activation of the Akt pathway is critical for cellular resistance to oxidation and apoptosis, in contrast, reactive oxygen species can activate NF-κB through the Akt pathway[40]. Our data confirm these relationships. NF-κB is expressed in almost all cells and plays an important role in the pathogenesis of gastric mucosal injury[41]. Four transcriptional variants encoding different isoforms have been identified, including NF-κB p65/p105/p50/p52[42]. In this study, we detected NF-κB p65 because of its greater contribution to inflammation. Many pro-inflammatory stimuli and ROS can also lead to activation of NF-κB by phosphorylation of IκBα by IKK complex; later, free NF-κB is translocated into the nucleus, leading to transcriptional activation of a variety of pro-inflammatory mediators[29]. After DHJ and DHJG treatment, phosphorylation of Akt and NF-κB and expression of IKKβ and IκBα were inhibited. Therefore, our in vivo western blotting and QRT-PCR results further support the hypothesis that DHJ may regulate the Akt/NF-κB pathway. The results were consistent in vitro and in vivo.

When people think of alcohol, the first thing that comes to mind is its harmful effects, but a Lancet study showed that alcoholic beverages have beneficial effects on human health when consumed at certain levels[43]. In this experiment, a high dose of 20 mL/kg/day of DHJ was administered to rats, which was converted to 18.9 g/day of pure alcohol for adults, a dosage that is within the recommended drinking standard. The results showed that the rats of the MC+DHJ20 group showed better effects on antioxidant, pro-apoptotic and inhibition of Akt/NF-kB signaling pathway than the MC+DHJG2.8 group, and inferior in terms of anti-inflammation. In general, this suggests that the components of DHJ, in addition to DHJG, also contain volatile components that are beneficial to the gastric mucosa.

To sum up, inflammation, oxidative stress and apoptosis are closely associated with the development of gastric mucosal injury. excessive expression of ROS releases inflammatory and apoptotic signals, inhibits antioxidant elements and promotes the ongoing oxidative stress creation. Our results reveal that DHJ enhances the anti-inflammatory, antioxidant and pro-apoptotic defenses of cells, thereby protecting them from MNNG damage. The suppression of the Akt/NF-kB signaling pathway and inflammatory signaling may be connected to the underlying mechanism. Fig.7 shows their complex relationships.

5. Conclusions

To conclude, this study revealed that 10 mL/kg and 20 mL/kg DHJ had little effect on gastric mucosa and serum biochemical parameters in healthy rats, while DHJ and DHJG could play a key role in the inflammatory response of CNAG rats and gastric mucosal epithelial cells by inhibiting the Akt/NF-κB pathway. And DHJ has a better protective effect on gastric mucosal damage in CNAG rats compared to DHJG. This study provides new insights into the molecular mechanisms by which DHJ regulates oxidative stress, inflammatory factor expression and apoptosis to prevent gastric mucosal injury. The findings provide a new basis for the healthcare function of DHJ. However, more clinical trials are needed to further confirm this conclusion.

Abbreviations

DHJ	Dangshen Huangjiu
DHJG	Solids of Dangshen Huangjiu
CNAG	Chronic non-atrophic gastritis
CAG	Chronic atrophic gastritis

IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
SOD	Superoxide dismutase
MDA	Malondialdehyde
NF-κBp65	Nuclear Factor-κB(p65)
p- NF-κBp65	Phosphorylated Nuclear Factor-κB (p65)
IκBα	Inhibitor of nuclear factor-κB
IKKβ	Inhibitor of nuclear factor κB kinase subunit beta
Akt	Serine/threonine kinase

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81972018), the Key Research and Development Project of Gansu Province (21ZD4FA013), the People's Livelihood Special Project from Technical Innovation Guide Plan of Gansu Province (20CX4FK014), the Key Talent Project of Organization Department of Gansu Provincial Party Committee ([2022] Gan-71), the Central Government Guiding Local Science and Technology Development Fund Project (22ZY1QA012), the Talent Innovation and Entrepreneurship Project of Lanzhou (2017-RC-115, 2020-RC-41).

References

1. P. Sipponen and H.-I. Maaroos, Chronic gastritis, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2015, **50**, 657-667.

2. J.-Y. Fang, Y. Q. Du, W. Z. Liu, J. L. Ren, Y. Q. Li, X. Y. Chen, N. H. Lv, Y. X. Chen and B. Lv, Chinese consensus on chronic gastritis (2017, Shanghai), *Journal of Digestive Diseases*, 2018, **19**, 182-203.

3. P. Yue, J. Zhong, J. Huang, Z. Lan and S. Zhong, The efficacy and safety of Xiangsha Liujunzi decoction in the treatment of chronic non-atrophic gastritis: A protocol for a systematic review and meta-analysis, *Medicine (Baltimore)*, 2021, **100**, e24504.

4. Z. Jin, Z. Song and X. Dou, Study on the protective effect of Dang Ginseng ultramicro powder on gastric mucosa in rats with gastric ulcer model, *China Modern Applied Pharmacology*, 2017, **34**.

5. D. Song, Z. Wang, L. Li and G. Zhong, Protective Effect of Lobetyolin on Gastric Mucosa of Experimental Gastric Ulcer in Rats, *Emergency Chinese Medicine*, 2008, **17**.

6. J. Li, T. Wang, Z. Zhu, F. Yang, L. Cao and J. Gao, Structure Features and Anti-Gastric Ulcer Effects of Inulin-Type Fructan CP-A from the Roots of Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf, *Molecules*, 2017, **22**, 2258.

7. T. Wang, R. Ge, F. Yang and J. Gao, Protective effect of Codonopsis pilosula extract on gastric mucosal injury in rats, *Chinese Pharmacology and Clinical*, 2015, **31**, 138-141.

8. L. Liu, J. Wang, N. Hou, Y. Hu and J. Chen, Study on the anti-gastric mucosal damage effect and mechanism of Radix et Rhizoma Ginseng and its active ingredients - V. Effect of Radix et Rhizoma Ginseng part extract VII-II on prostaglandin content in gastric tissues, *Chinese Pharmacology and Clinical*, 1990, 9-11.

9. L. Liu, J. Wang, N. Hou, Y. Hu and J. Chen, Study on the anti-gastric mucosal damage effect and mechanism of Radix et Rhizoma Ginseng and its active ingredients Ⅱ, The anti-gastric mucosal damage effect of Radix et Rhizoma Ginseng parts extract, *Chinese Pharmacology and Clinical*, 1989, 11-14.

10. R. He, R. Ma, Z. Jin, Y. Zhu, F. Yang, F. Hu and J. Dai, Proteomics and Metabolomics Unveil Codonopsis pilosula (Franch.)

Nannf. Ameliorates Gastric Precancerous Lesions via Regulating Energy Metabolism, *Frontiers in Pharmacology*, 2022, **13**, 933096.

11. Z. Yang and H. Zhou, Effect of modulation of miR-361-5p/TLR4/NF-κB pathway by Codonopsis polysaccharide on proliferation, apoptosis and inflammatory factor expression in AGS of gastric cancer cells, *Journal of Immunology*, 2022, **38**, 347-353.

12. H. H. Nam and B. K. Choo, Geranium koreanum, a medicinal plant Geranii Herba, ameliorate the gastric mucosal injury in gastritis-induced mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, **265**.

13. J.-l. Lai, Y.-h. Liu, C. Liu, M.-p. Qi, R.-n. Liu, X.-f. Zhu, Q.-g. Zhou, Y.-y. Chen, A.-z. Guo and C.-m. Hu, Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF-kB and MAPK Signaling Pathways, *Inflammation*, 2017, **40**, 1-12.

14. L. Peng, S. Liu, Z. Ji, S. Chen and J. Mao, Structure characterisation of polysaccharide isolated from huangjiu and its anti-inflammatory activity through MAPK signalling, *International Journal of Food Science and Technology*, 2019, **54**, 1874-1883.

15. F. Biasi, G. Leonarduzzi, P. I. Oteiza and G. Poli, Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Targets, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, **19**, 1711-1747.

16. E. L. Campbell and S. P. Colgan, Control and dysregulation of redox signalling in the gastrointestinal tract, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019, **16**, 106-120.

17. Y. Yang, B. Yin, L. Lv, Z. Wang, J. He, Z. Chen, X. Wen, Y. Zhang, W. Sun, Y. Li and Y. Zhao, Gastroprotective effect of aucubin against ethanol-induced gastric mucosal injury in mice, *Life Sciences*, 2017, **189**, 44-51.

18. X. Wang, X. Lu, R. Zhu, K. Zhang, S. Li, Z. Chen and L. Li, Betulinic Acid Induces Apoptosis in Differentiated PC12 Cells Via ROS-Mediated Mitochondrial Pathway, *Neurochemical Research*, 2017, **42**, 1130-1140.

19. Y. Ke, L. Zhan, T. Lu, C. Zhou, X. Chen, Y. Dong, G. Lv and S. Chen, Polysaccharides of Dendrobium officinale Kimura & Migo Leaves Protect Against Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury via the AMPK/mTOR Signaling Pathway in Vitro and vivo, *Frontiers in Pharmacology*, 2020, **11**.

20. M. El-Zaatari, A. J. Bass, R. Bowlby, M. Zhang, L.-J. Syu, Y. Yang, H. Grasberger, A. Shreiner, B. Tan, S. Bishu, W. K. Leung, A. Todisco, N. Kamada, M. Cascalho, A. A. Dlugosz and J. Y. Kao, Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1, Increased in Human Gastric Pre-Neoplasia, Promotes Inflammation and Metaplasia in Mice and Is Associated With Type II Hypersensitivity/Autoimmunity, *Gastroenterology*, 2018, **154**, 140-+.

21. Y. Zhang, J. Liang, H. Jiang, M. Qian, W. Zhao and W. Bai, Protective effect of sterols extracted from Lotus plumule on ethanol-induced injury in GES-1 cells in vitro, *Food Funct*, 2021, **12**, 12659-12670.

22. C. Yu, Z. Su, Y. Li, Y. Li, K. Liu, F. Chu, T. Liu, R. Chen and X. Ding, Dysbiosis of gut microbiota is associated with gastric carcinogenesis in rats, *Biomed Pharmacother*, 2020, **126**, 110036.

23. M.-C. Kang, K.-N. Kin, W. A. J. P. Wijesinghe, X. Yang, G. Ahn and Y. J. Jeon, Protective effect of polyphenol extracted from Ecklonia cava against ethanol induced oxidative damage in vitro and in zebrafish model, *Journal of Functional Foods*, 2014, **6**, 339-347.

24. S.-Y. Lee, Endoscopic gastritis, serum pepsinogen assay, and Helicobacter pylori infection, *Korean Journal of Internal Medicine*, 2016, **31**, 835-844.

25. Q. Cai, C. Zhu, Y. Yuan, Q. Feng, Y. Feng, Y. Hao, J. Li, K. Zhang, G. Ye, L. Ye, N. Lv, S. Zhang, C. Liu, M. Li, Q. Liu, R. Li, J. Pan, X. Yang, X. Zhu, Y. Li, B. Lao, A. Ling, H. Chen, X. Li, P. Xu, J. Zhou, B. Liu, Z. Du, Y. Du, Z. Li, P. Gastrointestinal Early Cancer and C. Treatment Alliance of, Development and validation of a prediction rule for estimating gastric cancer risk in the Chinese high-risk population: a nationwide multicentre study, *Gut*, 2019, **68**, 1576-1587.

26. L. Peng, A. Ai-lati, Z. Ji, S. Chen and J. Mao, Polyphenols extracted from huangjiu have anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 cells, *Rsc Advances*, 2019, **9**, 5295-5301.

27. P. Correa, W. Haenszel, C. Cuello, S. Tannenbaum and M. Archer, A MODEL FOR GASTRIC CANCER

EPIDEMIOLOGY, *The Lancet*, 1975, **306**, 58-60.

28. A. Borghi, L. Verstrepen and R. Beyaert, TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-κB, MAP kinases and cell death, *Biochemical pharmacology*, 2016, **116**, 1-10.

29. A. Oeckinghaus, M. S. Hayden and S. Ghosh, Crosstalk in NF-κB signaling pathways, *Nature Immunology*, 2011, **12**, 695-708.

30. T. Lawrence, The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, **1**, a001651.

31. T. Cai, C. Zhang, Z. Zhao, S. Li, H. Cai, X. Chen, D. Cai, W. Liu, Y. Yan, K. Xie, H. Pan and X. Zeng, The gastric mucosal protective effects of astragaloside IV in mnng-induced GPL rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, **104**, 291-299.

32. Y.-S. Kim, J. H. Lee, J. Song and H. Kim, Gastroprotective Effects of Inulae Flos on HCl/Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Rats, *Molecules*, 2020, **25**, 5623.

33. G. Cui, F. Wei, M. Wei, L. Xie, Z. Lin and X. Feng, Modulatory effect of Tagetes erecta flowers essential oils via Nrf2/HO-1/NF-κB/p65 axis mediated suppression of N-methyl-N′nitro-N-nitroguanidine (MNNG) induced gastric cancer in rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2021, **476**, 1541-1554.

34. S. Mohan, Y. H. Hobani, E. Shaheen, A. S. Abou-Elhamd, A. Abdelhaleem, H. A. Alhazmi and S. I. Abdelwahab, Ameliorative effect of Boesenbergin A, a chalcone isolated from Boesenbergia rotunda (Fingerroot) on oxidative stress and inflammation in ethanol-induced gastric ulcer in vivo, *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, **261**.

35. H. H. Arab, S. A. Salama, A. H. Eid, A. M. Kabel and N. N. Shahin, Targeting MAPKs, NF-kappaB, and PI3K/AKT pathways by methyl palmitate ameliorates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats, *J Cell Physiol*, 2019, **234**, 22424-22438.

36. B. R. International, Retracted: Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer, *Biomed Res Int*, 2020, **2020**, 2451249.

37. S. J. Korsmeyer, J. R. Shutter, D. J. Veis, D. E. Merry and Z. N. Oltvai, Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death, *Seminars in cancer biology*, 1993, **4**, 327-332.

38. O. Yoon and J. Roh, Downregulation of KLF4 and the Bcl-2/Bax ratio in advanced epithelial ovarian cancer, *Oncol Lett*, 2012, **4**, 1033-1036.

39. M. G. Netea, F. Balkwill, M. Chonchol, F. Cominelli, M. Y. Donath, E. J. Giamarellos-Bourboulis, D. Golenbock, M. S. Gresnigt, M. T. Heneka, H. M. Hoffman, R. Hotchkiss, L. A. B. Joosten, D. L. Kastner, M. Korte, E. Latz, P. Libby, T. Mandrup-Poulsen, A. Mantovani, K. H. G. Mills, K. L. Nowak, L. A. O'Neill, P. Pickkers, T. van der Poll, P. M. Ridker, J. Schalkwijk, D. A. Schwartz, B. Siegmund, C. J. Steer, H. Tilg, J. W. M. van der Meer, F. L. van de Veerdonk and C. A. Dinarello, A guiding map for inflammation, *Nature Immunology*, 2017, **18**, 826-831.

40. A. Kim, Y. J. Nam and C. S. Lee, Taxifolin reduces the cholesterol oxidation product-induced neuronal apoptosis by suppressing the Akt and NF-κB activation-mediated cell death, *Brain Research Bulletin*, 2017, **134**, 63-71.

41. M. J. Hossen, J. Y. Chou, S. M. Li, X. Q. Fu, C. Yin, H. Guo, A. Amin, G. X. Chou and Z. L. Yu, An ethanol extract of the rhizome of Atractylodes chinensis exerts anti-gastritis activities and inhibits Akt/NF-kappaB signaling, *J Ethnopharmacol*, 2019, **228**, 18-25.

42. T. D. Gilmore, Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives, *Oncogene*, 2006, **25**, 6680-6684.

43. D. Bryazka, M. B. Reitsma, M. G. Griswold, K. H. Abate, C. Abbafati, M. A. Kangevari, Z. A. Kangevari, A. Abdoli, M. Abdollahi, A. Y. M. Abdullah, E. S. Abhilash, E. Abu Gharbieh, J. M. Acuna, G. Addolorato, O. M. Adebayo, V. Adekanmbi, K. Adhikari, S. Adhikari, Q. E. S. Adnani, S. Afzal, W. Y. Agegnehu, M. Aggarwal, B. O. Ahinkorah, A. R. Ahmad, S. Ahmad, T. Ahmad, A. Ahmadi, S. Ahmadi, H. Ahmed, T. A. Rashid, C. J. Akunna, H. Al Hamad, M. Z. Alam, D. T. Alem, K. A. Alene, Y. Alimohamadi, A. Alizadeh, K. Allel, J. Alonso, S. Alvand, N. A. Guzman, F. Amare, E. K. Ameyaw, S. Amiri, R. Ancuceanu, J. A. Anderson, C. L. Andrei, T. Andrei, J. Arabloo, M. Arshad, A. A. Artamonov, Z. Aryan, M. Asaad, M. A. Asemahagn, T. A. Burt, S. S. Athari, D. D. Atnafu, P. Atorkey, A. Atreya, F. Ausloos, M. Ausloos, G. Ayano, M. A. Ayanore, O. O. Ayinde, J. L. A. Mateos, S. Azadnajafabad, M. M. Azanaw, M. A. Khyavy, A. A. Jafari, A. Y. Azzam, A. D. Badiye, N. Bagheri, S. Bagherieh, M.

Bairwa, S. M. Bakkannavar, R. K. Bakshi, A. H. Balchut, T. Null, F. Barra, A. Barrow, P. Baskaran, L. Belo, D. A. Bennett, I. M. Bensenor, A. S. Bhagavathula, N. Bhala, A. Bhalla, N. Bhardwaj, P. Bhardwaj, S. Bhaskar, K. Bhattacharyya, V. S. Bhojaraja, B. S. Bintoro, E. A. E. Blokhina, B. B. A. Bodicha, A. Boloor, C. Bosetti, D. Braithwaite, H. Brenner, N. I. Briko, A. R. Brunoni, Z. A. Butt, C. Cao, Y. Cao, R. Cardenas, A. F. Carvalho, M. Carvalho, J. M. C. Maia, G. Castelpietra, L. F. S. C. de Araujo, M. S. Cattaruzza, P. A. Chakraborty, J. Charan, V. K. Chattu, A. Chaurasia, N. Cherbuin, C. Dinh Toi, N. Chudal, S. C. Chung, C. Churko, L. G. Ciobanu, M. Cirillo, R. M. Claro, S. Costanzo, R. G. Cowden, M. H. Criqui, N. C. Martins, G. T. Culbreth, B. A. Dachew, O. Dadras, X. Dai, G. Damiani, L. Dandona, R. Dandona, B. D. Daniel, A. Danielewicz, J. D. Gela, K. Davletov, J. A. P. de Araujo, A. R. de Sa Junior, S. A. Debela, A. Dehghan, A. K. Demetriades, M. D. Molla, R. Desai, A. A. Desta, D. D. da Silva, D. Diaz, L. E. Digesa, M. Diress, M. Dodangeh, D. Dongarwar, F. Dorostkar, H. L. Dsouza, B. Duko, B. B. Duncan, K. Edvardsson, M. Ekholuenetale, F. J. Elgar, M. Elhadi, M. A. Elmonem, A. Y. Endries, S. Eskandarieh, A. Etemadimanesh, A. F. Fagbamigbe, I. R. Fakhradiyev, F. Farahmand, C. S. E. Sa Farinha, A. Faro, F. Farzadfar, A. Fatehizadeh, N. K. Fauk, V. L. Feigin, R. Feldman, X. Feng, Z. Fentaw, S. Ferrero, L. F. Desideri, I. Filip, F. Fischer, J. M. Francis, R. C. Franklin, P. A. Gaal, M. M. Gad, S. Gallus, F. Galvano, B. Ganesan, T. Garg, M. G. D. Gebrehiwot, T. G. Gebremeskel, M. A. Gebremichael, T. R. Gemechu, L. Getacher, M. E. Getachew, A. G. Obsa, A. Getie, A. Ghaderi, M. Ghafourifard, A. Ghajar, S. H. Ghamari, L. A. Ghandour, M. G. Nour, A. Ghashghaee, S. Ghozy, F. N. Glozah, E. V. Glushkova, J. Godos, A. Goel, S. Goharinezhad, M. Golechha, P. Goleij, M. Golitaleb, F. Greaves, M. Grivna, G. Grosso, T. W. Gudayu, B. Gupta, R. Gupta, S. Gupta, V. B. Gupta, V. K. Gupta, N. H. Nejad, A. H. Mirzaian, B. J. Hall, R. Halwani, T. B. Handiso, G. J. Hankey, S. Hariri, J. M. Haro, A. I. Hasaballah, H. H. Moghaddam, S. I. Hay, K. Hayat, G. Heidari, M. Heidari, D. Hendrie, C. Herteliu, D. Z. Heyi, K. Hezam, M. M. Hlongwa, R. Holla, M. M. Hossain, S. Hossain, S. K. Hosseini, M. Hosseinzadeh, M. Hostiuc, S. Hostiuc, G. Hu, J. Huang, S. Hussain, S. E. Ibitoye, I. M. Ilic, M. D. Ilic, M. Immurana, L. M. Irham, M. M. Islam, R. M. Islam, S. M. S. Islam, H. Iso, R. Itumalla, M. Iwagami, R. Jabbarinejad, L. Jacob, M. Jakovljevic, Z. Jamalpoor, E. Jamshidi, S. K. Jayapal, U. U. Jayarajah, R. Jayawardena, R. Jebai, S. A. Jeddi, A. T. Jema, R. P. Jha, H. A. Jindal, J. B. Jonas, T. Joo, N. Joseph, F. Joukar, J. J. Jozwiak, M. Jurisson, A. Kabir, R. H. Kabthymer, B. D. Kamble, H. Kandel, G. G. Kanno, N. Kapoor, I. M. Karaye, S. E. Karimi, B. G. Kassa, R. J. Kaur, G. A. Kayode, M. Keykhaei, H. Khajuria, R. Khalilov, I. A. Khan, M. Ab Khan, H. Kim, J. Kim, M. S. Kim, R. W. Kimokoti, M. Kivimaki, V. Klymchuk, A. K. S. Knudsen, A. A. Kolahi, V. A. Korshunov, A. Koyanagi, K. Krishan, Y. Krishnamoorthy, G. A. Kumar, N. Kumar, L. Ben, T. Lallukka, S. Lasrado, J. Lau, S. W. Lee, W. C. Lee, Y. H. Lee, L. L. Lim, S. S. Lim, S. W. Lobo, P. D. Lopukhov, S. Lorkowski, R. Lozano, G. Lucchetti, F. Madadizadeh, S. Mahjoub, A. Mahmoodpoor, R. A. Mahumud, A. Makki, M. R. Malekpour, N. Manjunatha, B. Mansouri, M. A. Mansournia, J. M. Raga, F. A. M. Villa, R. Matzopoulos, P. K. Maulik, M. Mayeli, J. J. McGrath, J. K. Meena, E. M. Nasab, R. G. Menezes, G. B. M. Mensink, A. F. A. Mentis, A. Meretoja, B. T. Merga, T. Mestrovic, J. M. Jonasson, B. Miazgowski, A. C. M. G. N. de Sa, T. R. Miller, G. Mini, A. Mirica, A. Mirijello, S. Mirmoeeni, E. M. Mirrakhimov, S. Misra, B. Moazen, M. Mobarakabadi, M. Moccia, Y. Mohammad, E. Mohammadi, A. M. Hafshejani, T. A. Mohammed, N. Moka, A. H. Mokdad, S. Momtazmanesh, Y. Moradi, E. Mostafavi, S. Mubarik, E. C. Mullany, B. T. Mulugeta, E. M. Zamora, C. J. L. Murray, J. C. Mwita, M. Naghavi, M. D. Naimzada, V. Nangia, B. P. Nayak, I. Negoi, R. I. Negoi, S. A. Nejadghaderi, S. Nepal, S. P. P. Neupane, S. N. Kandel, Y. T. Nigatu, A. Nowroozi, K. M. Nuruzzaman, C. I. Nzoputam, K. O. Obamiro, F. A. Ogbo, A. S. Oguntade, H. O. Aliabad, B. O. Olakunde, G. M. M. Oliveira, A. O. Bali, E. Omer, D. V. O. Altamirano, A. Otoiu, S. S. Otstavnov, B. Oumer, P. A. Mahesh, A. P. Monedero, R. Palladino, A. Pana, S. P. Jonas, A. Pandey, S. Pardhan, T. Parekh, E. K. Park, C. D. H. Parry, F. P. Kan, J. Patel, S. Pati, G. C. Patton, U. Paudel, S. Pawar, A. E. Peden, I. R. Petcu, M. R. Phillips, M. Pinheiro, E. Plotnikov, P. M. S. Pradhan, A. Prashant, J. Quan, A. Radfar, A. Rafiei, P. R. Raghav, V. R. Movaghar, A. Rahman, M. M. Rahman, M. Rahman, A. M. Rahmani, S. Rahmani, C. L. Ranabhat, P. Ranasinghe, C. R. Rao, D. P. Rasali, M. M. Rashidi, Z. A. Ratan, D. L. Rawaf, S. Rawaf, L. Rawal, A. M. N. Renzaho, N. Rezaei, S. Rezaei, M. Rezaeian, S. M. Riahi, E. R. Rodriguez, G. A. Roth, G. M. Rwegerera, B. Saddik, E. Sadeghi, R. Sadeghian, U. Saeed, F. Saeedi, R. Sagar, A. Sahebkar, H. Sahoo, M. A. Sahraian, K. S. U. Rahman, S. Salahi, H. Salimzadeh, A. M. Samy, F. Sanmarchi, M. M. S. Milicevic, Y. Sarikhani, B. Sathian, G. K. Saya, M. Sayyah, M. I. Schmidt, A. E. Schutte, M. Schwarzinger, D. C.

Schwebel, A. A. Seidu, N. S. Kumar, S. SeyedAlinaghi, A. Seylani, F. Sha, S. Shahin, F. S. Sanavi, S. Shahrokhi, M. A. Shaikh, E. Shaker, M. Z. Shakhmardanov, M. S. Beyranvand, S. Sheikhbahaei, R. A. Sheikhi, A. Shetty, J. K. Shetty, D. S. Shiferaw, M. Shigematsu, R. Shiri, R. Shirkoohi, K. M. Shivakumar, V. Shivarov, P. Shobeiri, R. Shrestha, N. B. Sidemo, I. D. Sigfusdottir, D. A. S. Silva, N. T. da Silva, J. A. Singh, S. Singh, V. Y. Skryabin, A. A. Skryabina, D. A. Sleet, M. Solmi, Y. Solomon, S. Song, Y. Song, R. J. D. Sorensen, S. Soshnikov, I. N. Soyiri, D. J. Stein, S. H. Subba, M. Szocska, R. T. Seisdedos, T. Tabuchi, M. Taheri, K. K. Tan, M. Tareke, E. E. Tarkang, G. Temesgen, W. A. Temesgen, M. H. Temsah, K. R. Thankappan, R. Thapar, N. K. Thomas, C. Tiruneh, J. Todorovic, M. Torrado, M. Touvier, M. R. T. Palone, T. Mai Thi Ngoc, S. T. Llimos, J. P. Tripathy, A. Vakilian, R. Valizadeh, M. Varmaghani, S. B. Varthya, T. J. Vasankari, T. Vos, B. Wagaye, Y. Waheed, M. T. Walde, C. Wang, Y. Wang, Y. P. Wang, R. Westerman, N. D. Wickramasinghe, A. D. Wubetu, S. Xu, K. Yamagishi, L. Yang, G. E. E. Yesera, A. Yigit, A. E. Yimaw, D. K. Yon, N. Yonemoto, C. Yu, S. Zadey, M. Zahir, I. Zare, M. S. Zastrozhin, A. Zastrozhina, Z. J. Zhang, C. Zhong, M. Zmaili, Y. M. H. Zuniga, E. Gakidou, A. M. Madureira-Carvalho and G. B. D. A. Collaborators, Population-level risks of alcohol consumption by amount, geography, age, sex, and year: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2020, *Lancet*, 2022, **400**, 185-235.

Figure Legends:

Figures：

Fig.1

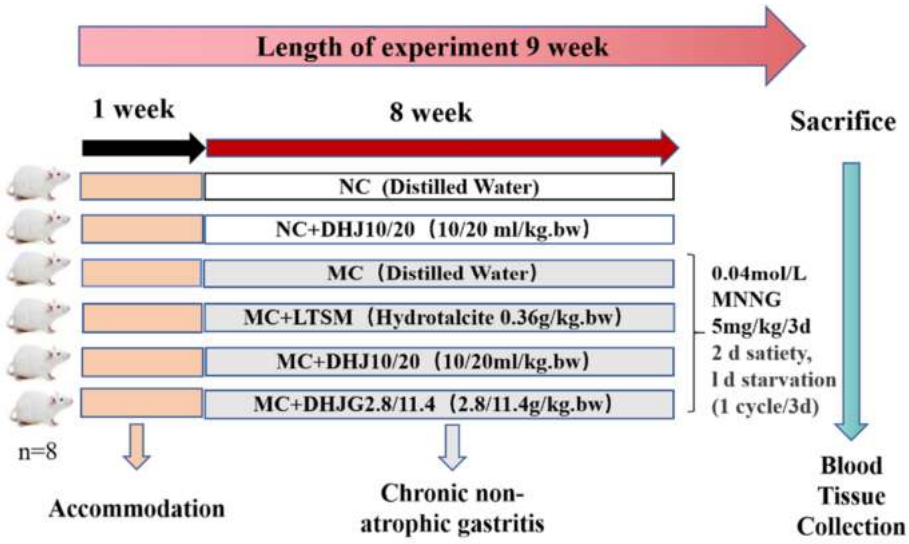


Fig.1 Scheme of the experimental design (n=8 rats per group). Rats were divided into nine groups: NC, normal group; NC+DHJ10/20, only 10, 20 mL/kg/day DHJ treatment; MC: MNNG plus eating disorders. MC+LTSM: MNNG plus eating disorders plus 0.36 g/kg hydrotalcite; MC+DHJ10/20: MNNG plus eating disorders plus 10, 20 mL/kg/day DHJ treatment; MC+DHJG2.8/11.4: MNNG plus eating disorders plus 2.8, 11.4 g/kg/day DHJG treatment.

Fig.2

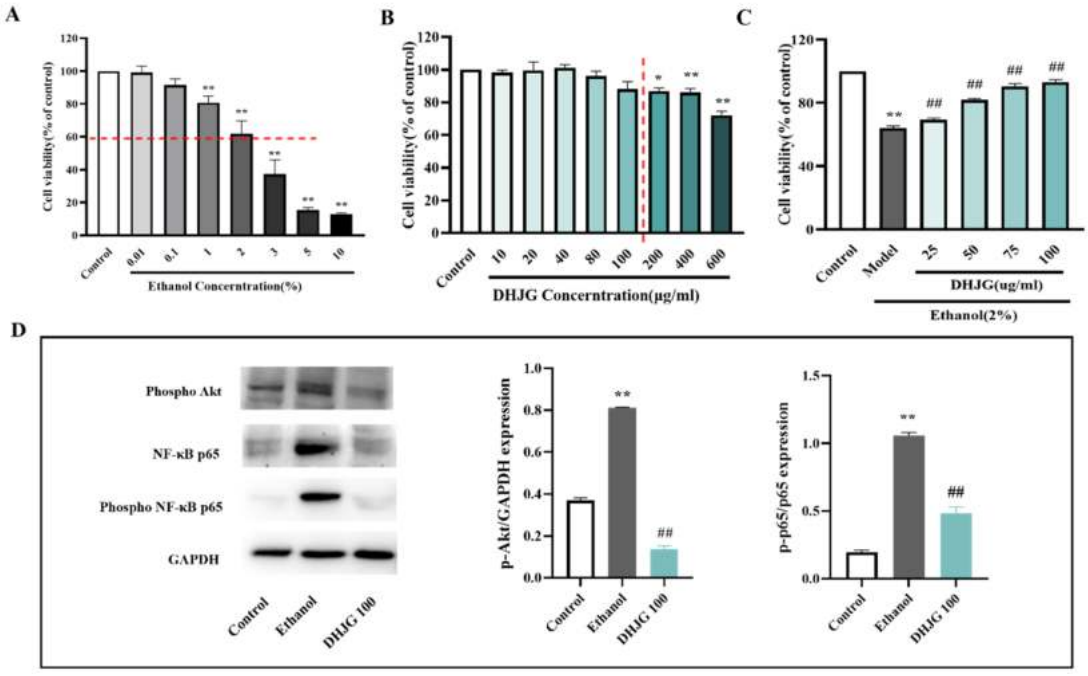


Fig.2 (A) Cell viabilities under ethanol treatment conditions. (B) Cell viabilities of DHJG treatment. (C) Effect of DHJG treatment on ethanol injury of GES-1cells in prevention models. (D) Effect of DHJG on inflammation-related proteins involved in the Akt/NF-κB pathway. Data is expressed as means ± SD (n=3-5). Significance is determined by Student's t-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group. ## $P < 0.01$ vs. ethanol group.

Fig.3

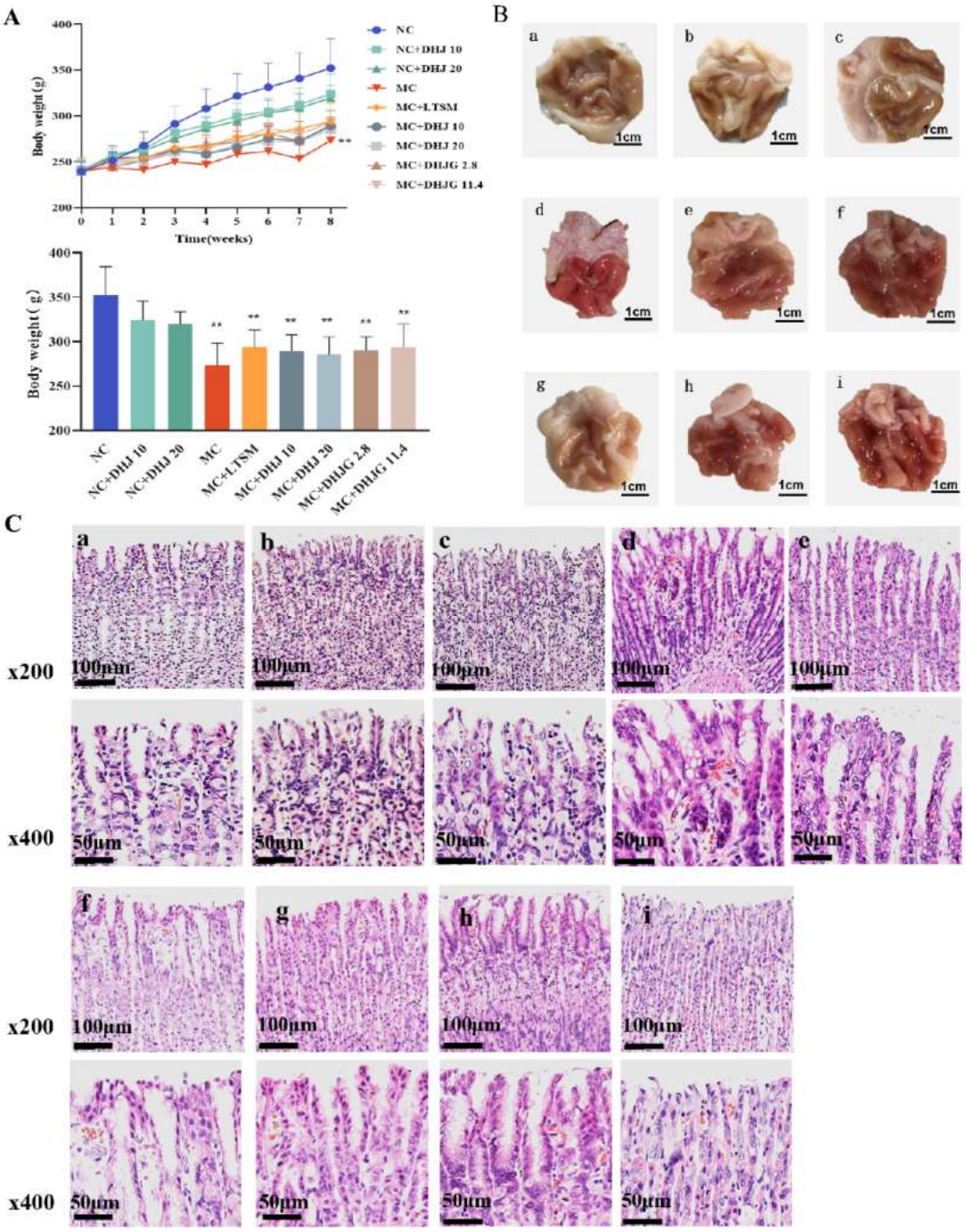


Fig.3 Effects of DHJ and DHJG on body weight and macroscopic images of gastric mucosal damage in model group rats. (A) and (B) Body weight change in rats. (C) gastric tissue morphology of rats. (D) Pathological changes of the stomach (hematoxylin & eosin staining, 200× and 400×). (a) NC; (b) NC+DHJ10; (c) NC+DHJ20; (d) MC; (e) MC+LTSM; (f) MC+DHJ10; (g) MC+DHJ20; (h) MC+DHJG2.8; (i) MC+DHJG11.4. Data are expressed as means ± SD (n=8). ** $P <$ 0.01 vs. NC group.

Fig.4

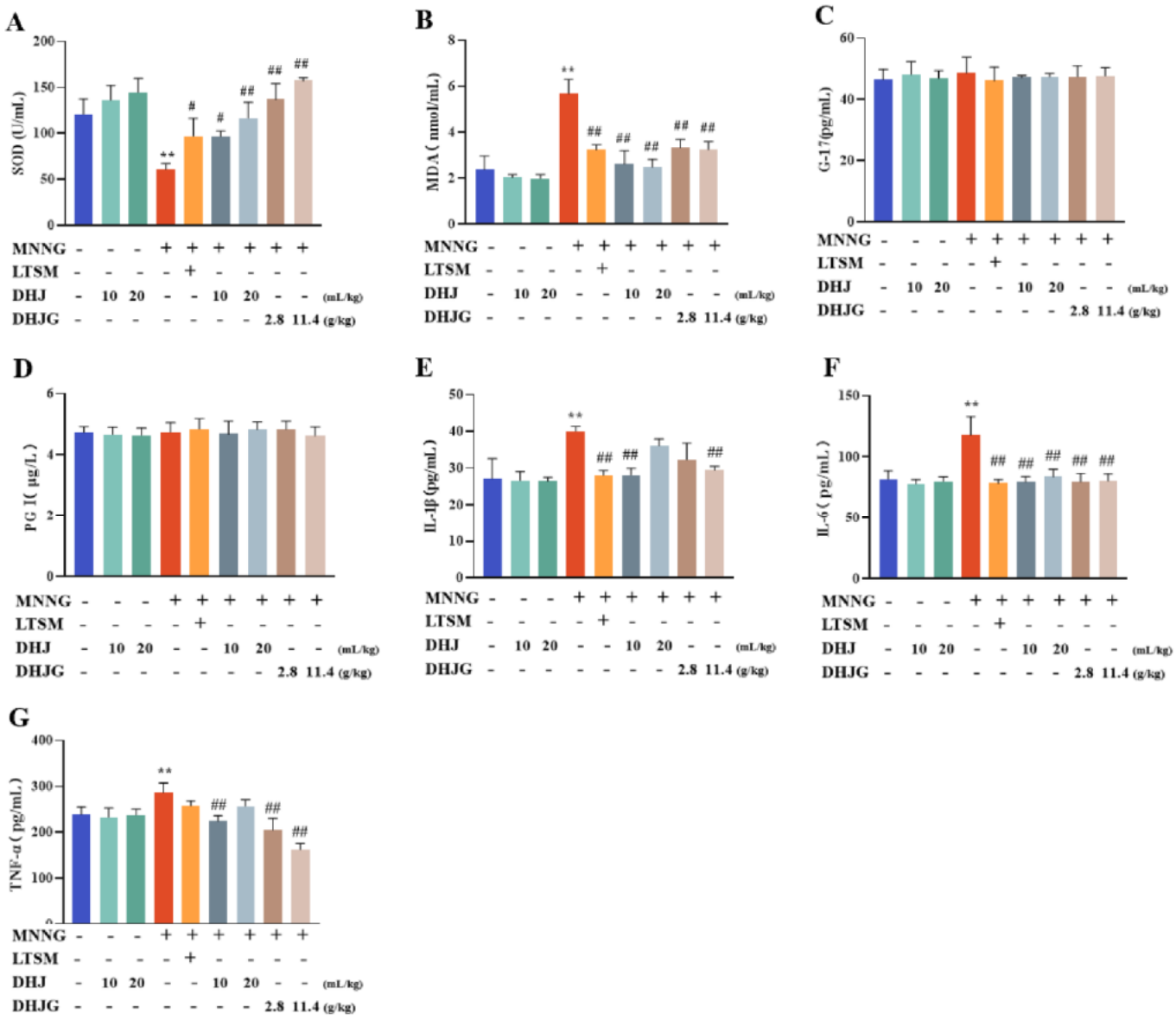


Fig.4 Effect of DHJ and DHJG on serum biochemical indexes of CNAG rats. (A) Levels of SOD in serum; (B) levels of MDA in serum; (C) levels of G-17 in serum; (D) levels of PG I in serum; (E) levels of IL-1β in serum; (F) levels of IL-6 in serum; (G) levels of TNF-α in serum. Data are expressed as means ± SD (n=8). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. MC group.

Fig.5

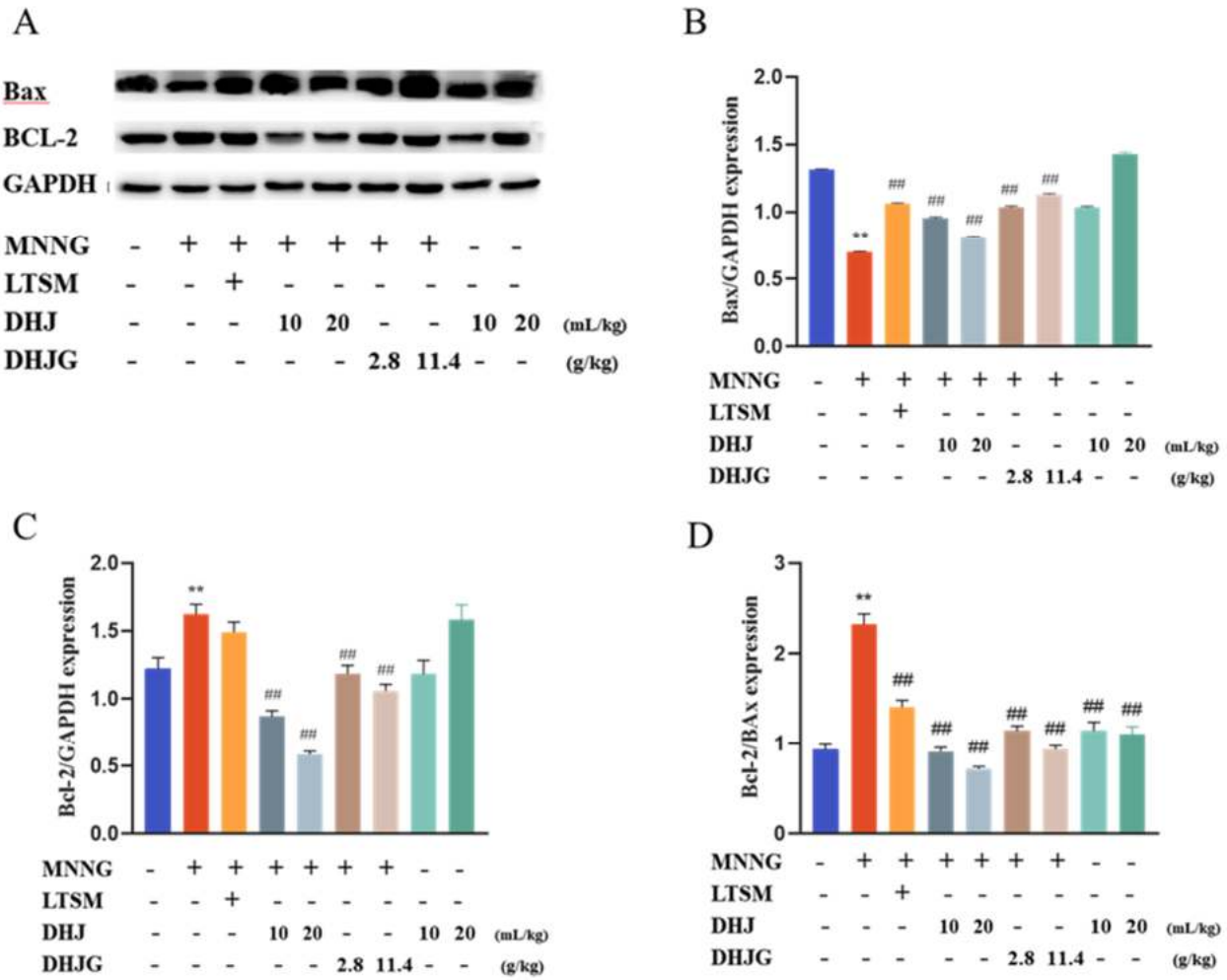


Fig.5 Effects of DHJ and DHJG on apoptosis-related proteins in the CNAG rats. The levels of Bax and Bcl-2 in the CNAG rats were analyzed using western blot analysis. Data are expressed as means ± SD (n=3). ***P* < 0.01 vs. NC group, ## *P* < 0.01 vs. MC group.

Fig.6

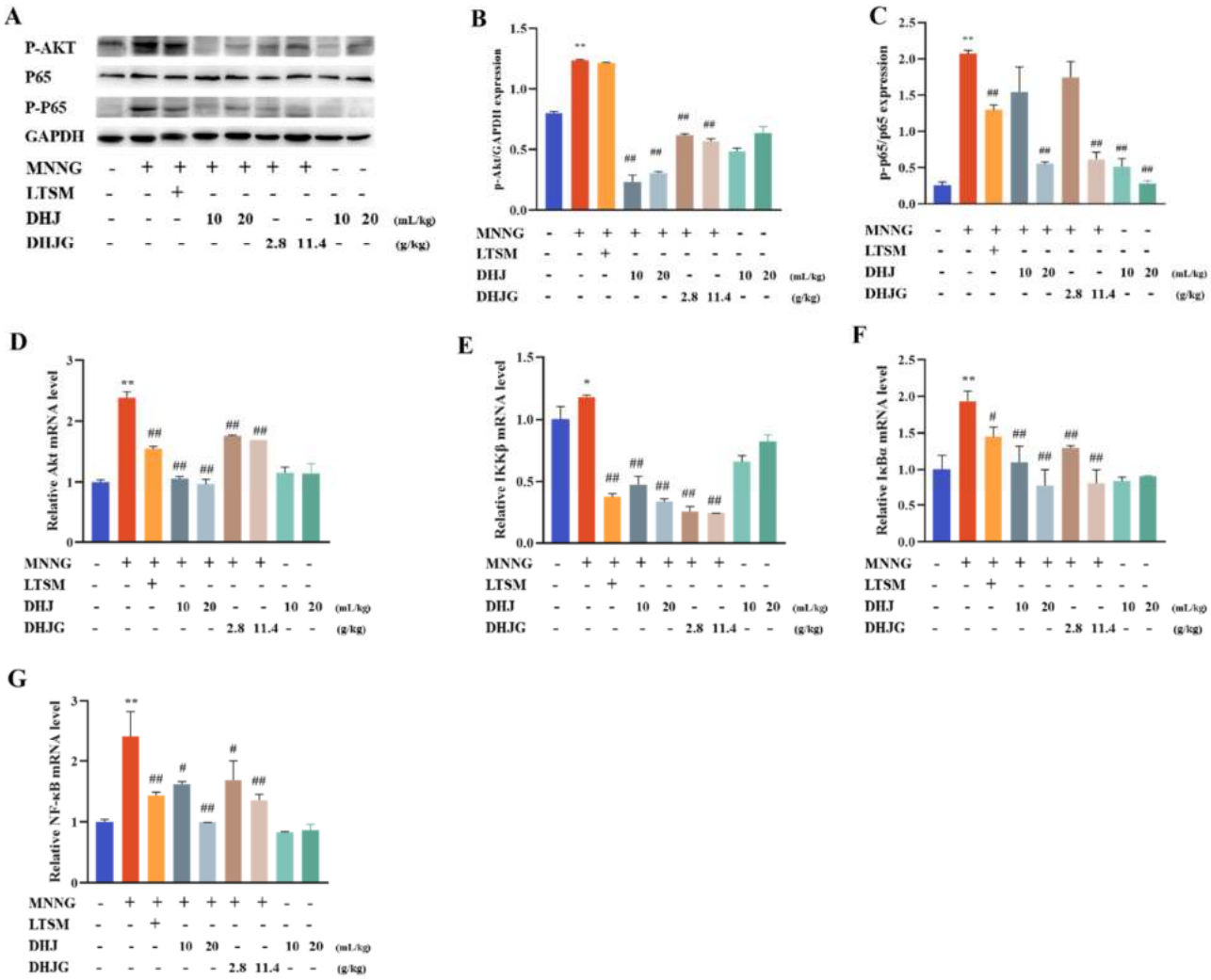


Fig.6 Effects of DHJ and DHJG on related-inflammation protein and mRNA expression involved in the Akt/NF-κB in the CNAG rats. (A) Representative images of western blotting analysis of p-AKt, p-NF-κBp65 and NF-κBp65 in the stomach. (B) Relative protein expressions of p-Akt. (C) Relative protein expressions of p-NF-κBp65/NF-κBp65. (D) The mRNA expression of Akt in the stomach was detected by QRT-PCR. (E) The mRNA expression of IKKβ in the stomach was detected by QRT-PCR. (F) The mRNA expression of IκBα in the stomach were detected by QRT-PCR. (G) The mRNA expression of NF-κB in the stomach was detected by QRT-PCR. GAPDH served as a loading control. Data is expressed as means ± SD (n=3). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. NC group; # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01 vs. MC group.

Fig.7

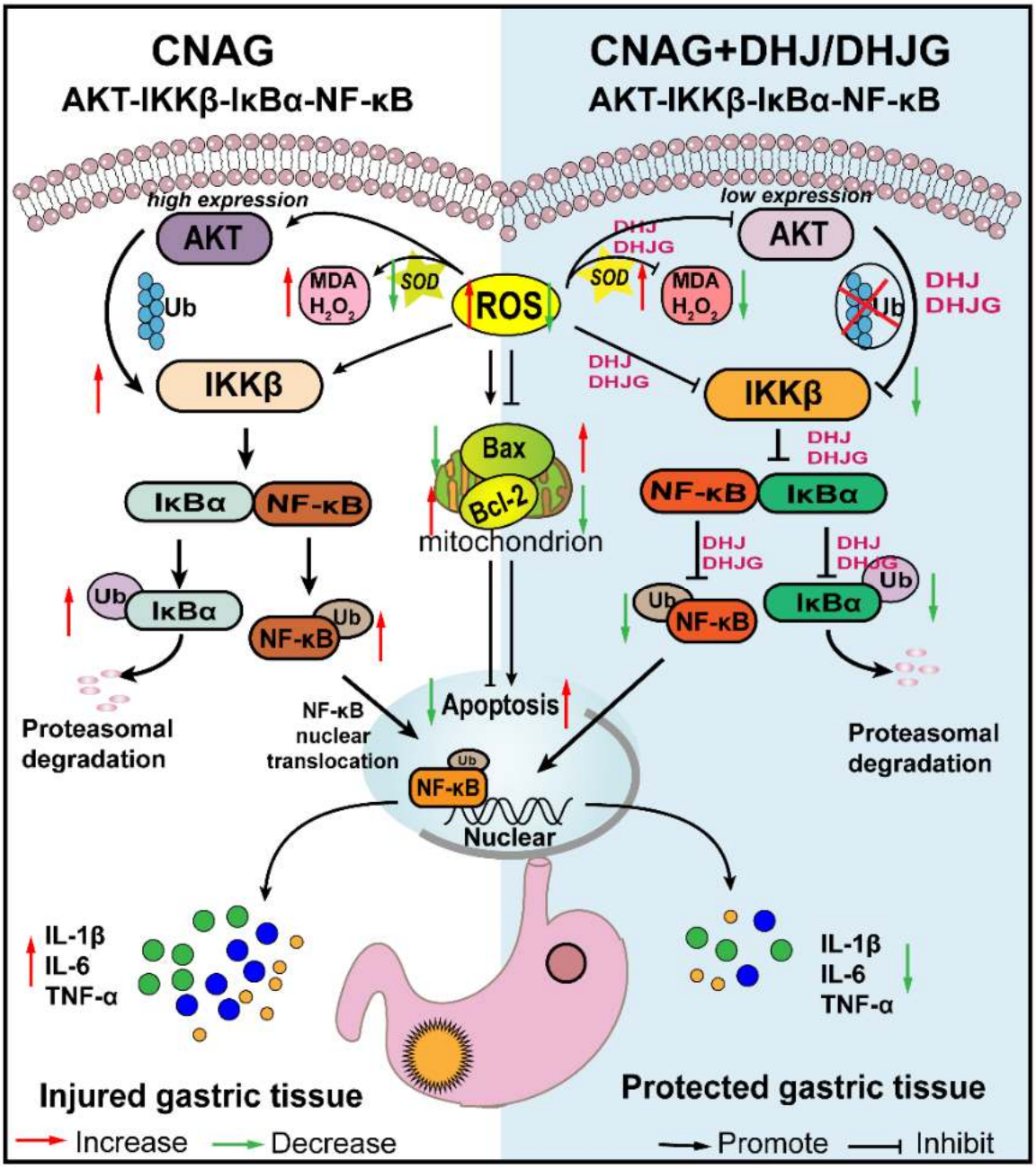


Fig.7 Proposed mechanism for the gastric protective effects of DHJ and DHJG in ingury gastric mucosa. The red arrows indicate that the CNAG rat modeling activates the relevant pathway and upregulates the corresponding target proteins and genes' levels; the green arrows indicate that DHJ and DHJG inhibit the signaling pathway and downregulate the levels of the corresponding target proteins and target genes.

Supplementary information

Fig.S1

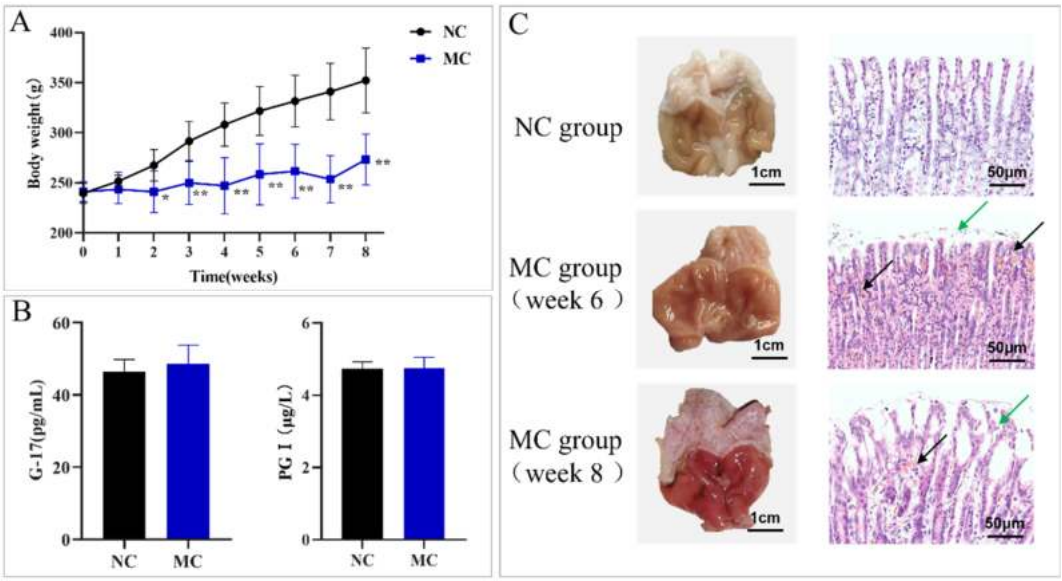
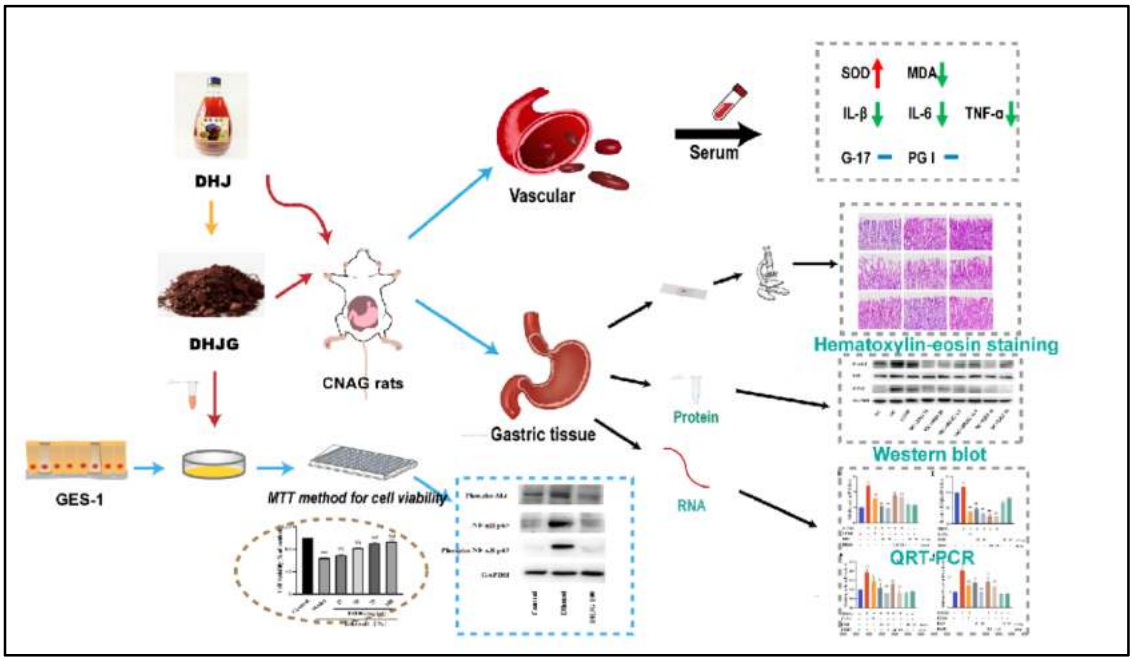


Fig.S1 Evaluation of the indicators in rats during CNAG modeling. (A) Body weight change in rats. (B) Serum G-17 and PG Ⅰ levels of rats in the model group at week 8. (C) Morphological and histopathological changes of rat gastric tissue during modeling (green arrows indicate gastric mucosa exudation and detachment, black arrows indicate congestion and edema). Data is expressed as means ± SD (n=8). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. NC group.

Graphic Abstract



他扎罗汀凝胶处方及微观结构特性评价的比较研究

沈丹丹[1]，吴群[1]，沈川[2]，许娟[3]，姜学美[1*]

（1. 重庆市食品药品检验检测研究院，国家药品监督管理局麻醉精神药品质量监测重点实验室，重庆 401121；2. 重庆綦江区人民医院，重庆 401420；3. 重庆仁泽医药科技有限公司，重庆 400021）

【摘要】目的：为他扎罗汀凝胶一致性评价处方工艺设计及关键质量属性评价提供指导。**方法：**逆向解析原研产品ZORAC®和国产仿制药产品乐为®处方，比较处方（Q_1）和关键辅料的处方用量（Q_2）差异；并采用光学显微镜和流变仪考察粒度、流变特性等微观结构特性（Q_3）差异。**结果：**国产仿制药产品乐为®与原研产品ZORAC®均为“非牛顿流体”，均属于弱性凝胶，但在稳定剂种类及用量、活性成分粒度、流变特性、pH值等5个关键质量属性方面差异显著，说明两者产品Q_1、Q_2及Q_3均不一致，推测Q_1、Q_2和工艺设计不同引起Q_3差异。**结论：**本研究可用于指导国内生产企业优化处方工艺设计，为皮肤外用半固体制剂一致性评价提供研究思路。

【关键词】他扎罗汀凝胶；处方（Q_1）；处方用量（Q_2）；微观结构特性（Q_3）；流变特性

Comparative Study on the Ingredients and Microstructure Arrangement of Tazarotene Gel

SHEN Dan-dan[1],WU Qun[1] , SHEN Chuan[2],XU Juan[3], JIANG Xue-mei[1*]

（1..Chongqing Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Monitoring of Anaesthetic and Psychotropic Substances, Chongqing 401121 ,China; 2. Chongqing Qijiang District Hospital, Chongqing 401420，China;3. Chongqing Renze Pharmaceutical Technology Co., Ltd , Chongqing 400021）

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To provide guidance for the formulation process design and the evaluation of Critical quality attributes of tazarotene gel consistency evaluation. **METHODS:** The ingredients of the original product ZORAC® and domestic generic drug 乐为®are analysised by reverse engineering,and the difference between qualitative (Q_1) and quantitative (Q_2) composition of inactive ingredients are compared ; and the difference of microstructure arrangement(Q_3) are investigated by optical microscope and rheometer, such as particle size and rheological properties. **RESULTS：** Both of ZORAC® and 乐为® are "Non-Newtonian fluid" and belong to weak gel, However, there are significant differences in five Critical quality attributes, such as the type and amount of stabilizer, particle size of active ingredient, rheological properties and pH value, which indicates that the Q1, Q2, and Q3 of the two products are inconsistent. It is indicated that the wide variations in Q3 are caused by the differences in Q1, Q2, and process design. **CONCLUTION：** It is significant for this study to optimize formulation development, and provide research ideas for consistency evaluation of Semisolid Preparations for Topical Skin Use.

【KEY WORDS】Tazarotene Gel; Qualitative (Q_1); Quantitative (Q_2); Microstructure Arrangement(Q_3); Rheological Properties

作者简介：沈丹丹，女，生于1986年，硕士，高级工程师，研究方向：药物分析与药物制剂，E-mail: shendandan@cqifdc.org.cn

*通讯作者，姜学美，女，本科，工程师，研究方向：药物分析，E-mail: jiangxuemei@cqifdc.org.cn

他扎罗汀凝胶（Tazarotene Gel）是由 Allergan Inc 公司开发的半透明水性凝胶剂，商品名为 TAZORAC®（美国）/ZORAC®（欧洲），于 1997 年 6 月 13 日在美国上市，主要用于治疗斑状牛皮癣和寻常性痤疮。本品具有 2 个浓度规格，分别为 0.05%和 0.1%原研未进口销售。国内有 1 家生产企业，商品名为炔维®（0.1%规格）和乐为®（0.05%规格）。对于皮肤局部外用仿制药，目前各国监管机构均倾向于与 FDA 保持一致，即保持最大程度的处方组成（Q_1）、处方用量（Q_2）及微观结构特性（Q_3）等同，可提出临床豁免申请[3-5]。根据 ZORAC®说明书[1-2]，本品含有炔基稳定性较差，同时本品的水溶性极差，在处方中使用了多种助溶剂和稳定剂，处方设计较为复杂，因此该产品不同处方及工艺可能导致具有不同的表观和功能特性，进而影响药物的安全性和有效性。

本研究以 ZORAC®（0.05%规格）为参比制剂，逆向解析 Q_1 及关键功能性辅料稳定剂苯甲醇、丁羟茴醚、丁羟甲苯的 Q_2，考察 Q_3 的质量属性包括活性成分粒度、流变特性等，并与国产仿制药产品乐为®比较差异。根据国内外最新的外用半固体制剂技术指导原则，项目组完成了曲安奈德益康唑乳膏剂处方生产工艺解析、关键质量属性评价，取得了一定研究成果[6]。开展他扎罗汀凝胶剂 Q_1、Q_2 及 Q_3 评价研究，有助于指导生产企业优化本品种处方工艺设计，实现豁免复杂的生物等效性研究；同时，本项目组建立了皮肤局部外用半固体制剂乳膏、凝胶剂等不同剂型评价的研究基础，也为国内皮肤局部外用仿制药开展一致性评价研究提供思路和方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

U3000 型 高效液相色谱仪（Thermo）；K51502653 型电子天平（Sartorius AG）；光学显微镜（Olympus Corporation）；HAAKE MARS 流变仪（Thermo）；S220-K 酸度计（METTLER TOLEDO）。

1.2 药物与试剂

苯甲醇对照品（中国食品药品检定研究院，批号：190019-201903，含量 99.9%）；丁羟甲苯对照品（中国食品药品检验检测研究院，批号：510142-201701，含量 100.0%）；丁羟基茴醚对照品（默克公司，批号：K52622823，含量 100.0%）；他扎罗汀凝胶（厂家 A，商品名乐为®，规格 0.05%，批号：016210020）；他扎罗汀凝胶（Allergan Inc 公司，商品名 ZORAC®，规格 0.05%，批号：T1323）；乙酸铵为分析纯，乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 Q1 分析

根据 ZORAC®说明书[1-2]以及乐为®处方工艺调研结果，由表可见（表 1），国内仿制药乐为® Q_1 与 ZORAC® 均不一致，在抗氧剂、抑菌剂及助溶剂种类等方面差异显著。

表 1. Q_1 比较

Table 1. Comparison of Q_1

生产/销售企业		Allergan USA, Inc.	Allergan Pharmaceuticals Ireland	厂家 A	在处方中的作用
商品名		TAZORAC®（美国）	ZORAC®（欧洲）	乐为（0.05%规格） 炔维（0.1%规格）	
活性成分	他扎罗汀	√	√	√	药用活性成分
辅料	苯甲醇	√	√	×	抑菌剂、助溶剂
	抗坏血酸	√	√	×	抗氧剂
	丁羟茴醚	√	√	×	抗氧剂
	丁羟甲苯	√	√	×	抗氧剂
	卡波姆	√	√	√	增稠剂
	依地酸钠	√	√	√	金属离子螯合剂

	己二醇	√	√	×	助溶剂
	泊洛沙姆 407	√	√	×	表面活性剂
	聚乙二醇	√	√	√	助溶剂
	聚山梨酯 40	√	√	×	表面活性剂
	纯化水	√	√	√	基质成分
	氨丁三醇	√	√	√	pH 调节剂
	香精	×	×	√	香精
	羟苯甲酯	×	×	√	抑菌剂
	亚硫酸氢钠	×	×	√	抗氧剂
贮藏		20~25℃，短期允许波动范围 15~30℃	30℃以下保存。	密封，在阴凉处（不超过 20℃）保存。	—
有效期		未说明	3 年，开封后 6 个月	2 年	—

注：“√”表示有，“×”表示无。

2.2 Q_2 分析

2.2.1 苯甲醇、丁羟基茴醚及丁羟甲苯的含量测定　色谱条件：十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（ACE C18，250 mm×4.6 mm，5 μm），以 0.02 mol/L 乙酸铵为流动相 A，以乙腈为流动相 B，按下表梯度洗脱；检测波长 218 nm；柱温 35 ℃；流速 1.0 mL·min^{-1}；进样量 20 μL。

表 2. 洗脱梯度

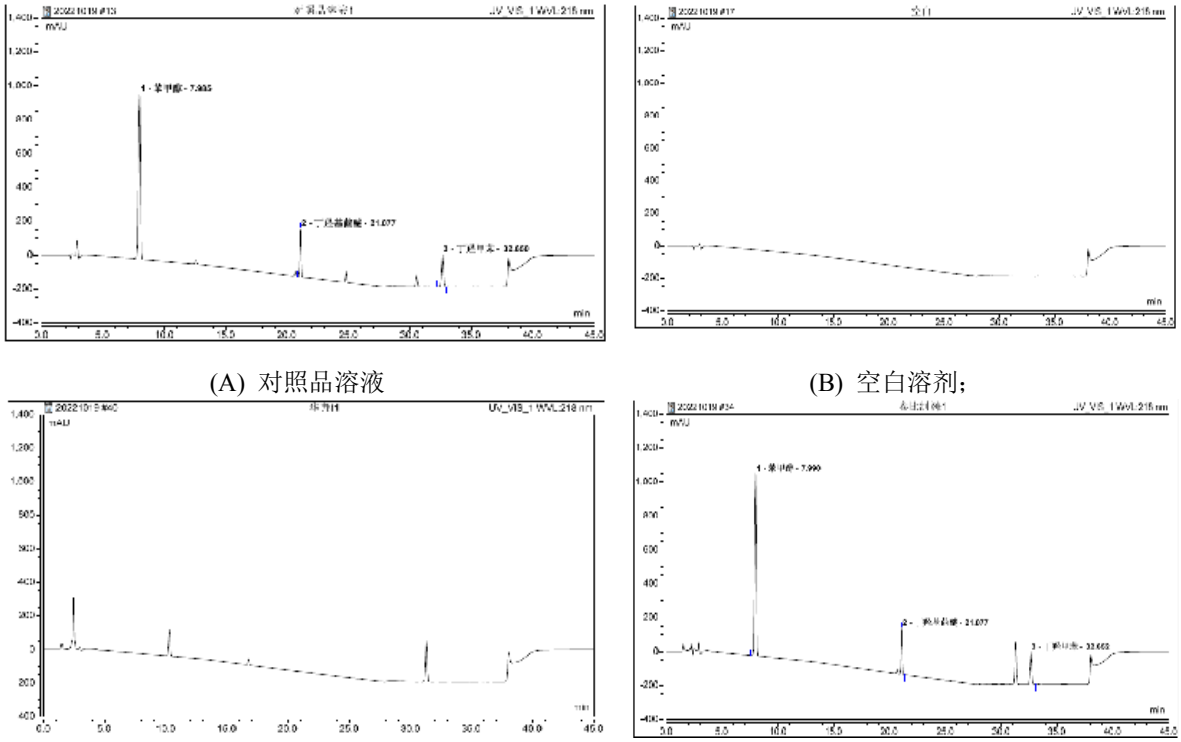
Table 2. Gradient elution

Time（min）	Mobile phase A%	Mobile phase B%
0	80	20
10	60	40
25	20	80
35	20	80
36	80	20
45	80	20

供试品溶液的配制：取本品 0.5 g，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加 80%乙腈适量，充分振摇使溶解，用 80%乙腈稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

对照品混合溶液的配制：取苯甲醇对照品约 250 mg，置 25 mL 量瓶中，用 80%乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品贮备溶液（1）；取丁羟基茴醚及丁羟甲苯对照品各约 10 mg，置同一 10 mL 量瓶中，用 80%乙腈溶解并稀释至刻度，作为对照品贮备溶液（2）；精密量取对照品贮备溶液（1）1 mL 与对照品贮备溶液（2）0.5 mL，置同一 20 mL 量瓶中，用 80%乙腈稀释至刻度，摇匀，作为对照品混合溶液。

结果表明（典型色谱图见图 1）：ZORAC®中苯甲醇、丁羟基茴醚与丁羟甲苯的含量分别为 1.03%（g·g^{-1}）、0.049%（g·g^{-1}）、0.049%（g·g^{-1}）。乐为®未检出苯甲醇、丁羟基茴醚和丁羟甲苯。



(A) 对照品溶液　　(B) 空白溶剂；

（C）乐为®供试品溶液　　（D）ZORAC®供试品溶液

图 1. 典型色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms (A) the reference solution ；(B) blank solution;（C）the test solution of 乐为®; (D) the test solution of ZORAC®

2.3 Q3 分析

2.3.1 药用活性成分的晶型及粒度测定　取本品适量，置于载玻片上涂成薄层，覆以盖玻片，注意防止气泡进入，立即采用光学显微镜在 10×40 倍下观察活性成分的晶型与粒度，见图 2 与图 3。结果表明，ZORAC®中活性成分为柱状晶体，粒度为 71.29 μm×12.86 μm（D_{90}），而邦力®中活性成分为不规则晶体，粒度 66.48 μm×39.12 μm（D_{90}）。研究表明，虽然两种产品处方中均含有助溶剂，但均存在未完全溶解的活性成分混悬于凝胶基质中，粒度差异较大。



图 2. ZORAC®活性成分粒度分布（10×40 倍）

Fig.2 Particle size distribution of active ingredients in ZORAC® (10×40)

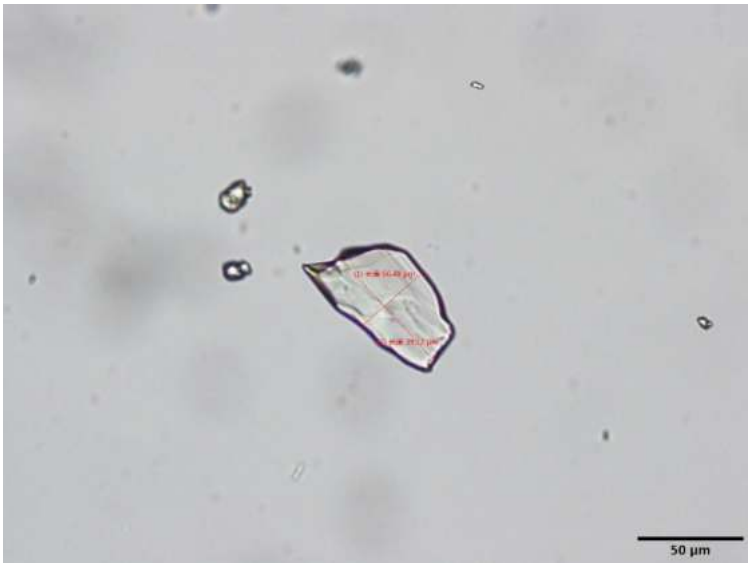


图 3. 乐为®活性成分粒度分布（10×40 倍）

Fig.3 Particle size distribution of active ingredients in 乐为® (10×40)

2.3.2　流变特性研究

2.3.2.1　稳态流动曲线　流动曲线能够反映体系黏度随剪切速率、剪切力随剪切速率的变化规律，属于静态流变学。黏度不受剪切速率影响的理想液体称作“牛顿流体”；反之，不具备这种“理想”流动特性的其他液体称作“非牛顿流体”[7-8]。剪切速率（$1 \cdot s^{-1}$），扫描范围为 0.01～100，温度 25℃±1℃。ZORAC®及乐为®的黏度（η，Pas）、剪切力（τ，Pa）随剪切速率（γ，$1 \cdot s^{-1}$）变化的关系曲线分别见图 4、图 5，流动曲线对比图见图 6。结果表明，2 种产品的表观黏度均随剪切速率的增加而减小，剪切力均随剪切速率的增加而增大，说明两者均为“非牛顿流体”。

采用 OrginPro 9.1.0 软件，对两条 η=f(γ)曲线采用非线性最小二乘算法（列文伯格-马夸尔特法，levenberg marquardt 算法）分别进行进行非线性拟合，P 值（Prob > F）=0 < 0.01，即在 0.05 显著性水平上，两条曲线具有显著性差异，ZORAC®与乐为®静态流变学不一致。

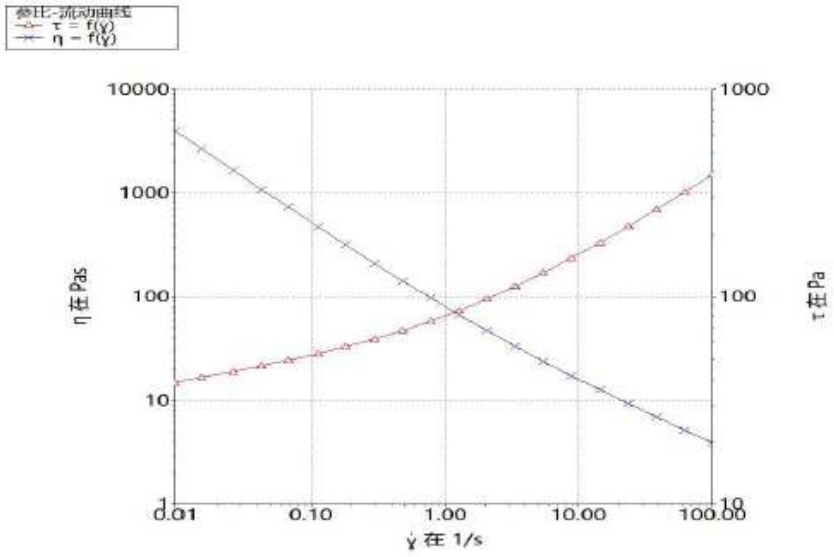


图 4. ZORAC®流变曲线

Fig.4 Rheological curve of ZORAC®

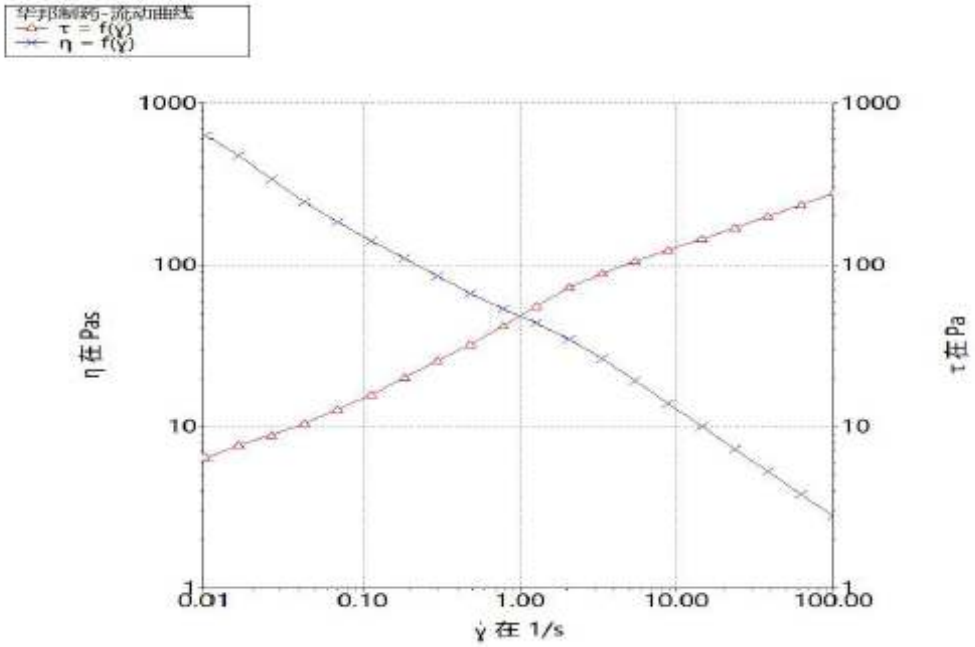


图 5. 乐为®流变曲线

Fig.5 Rheological curve of 乐为®

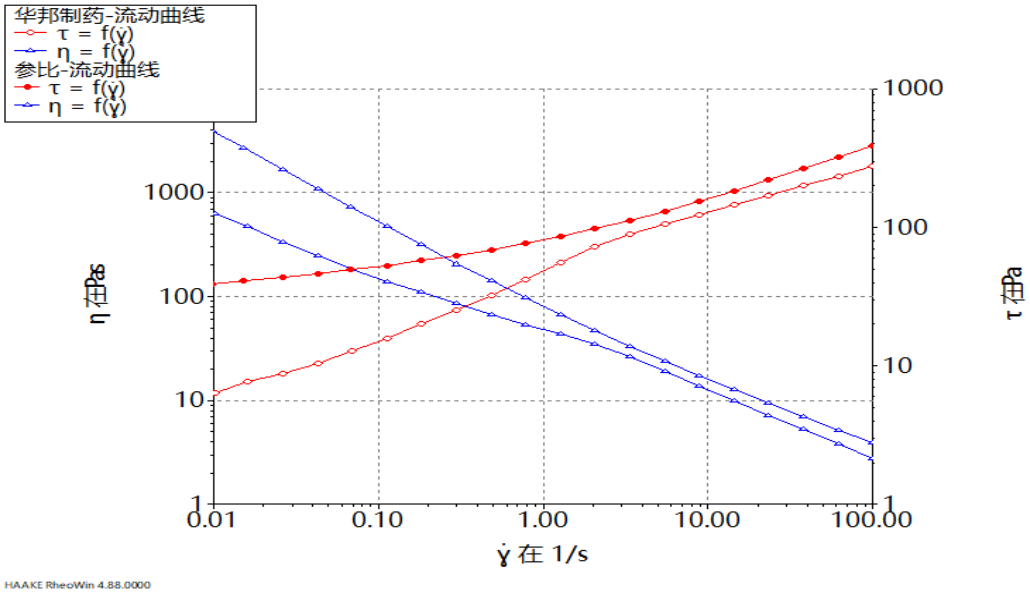


图 6. 流变曲线对比图

Fig.6 Comparison of rheological curve

2.3.2.2 振幅扫描　固定扫描速率，观察弹性模量或黏性模量在不同应变条件下的变化情况，以确定样品的线性粘弹区范围，因为在线性粘弹区范围内的测量才能获得样品的特性流变学常数[7-8]。扫描范围为 0.10 Pa～200 Pa，温度 25 ℃±1 ℃，采用 P35/Ti 型转子，扫描频率 1 Hz，见图 7 和图 8。结果表明，ZORAC®在 0-15.84 Pa 范围内，弹性模量和粘性模量均不随剪切应变的改变而显著变化，提示该区域为本品的线性粘弹区；乐为®在 0-11.25 Pa 范围内，弹性模量（G′）和粘性模量（G″）均不随剪切应变的改变而显著变化，提示该区域为本品的线性粘弹区。

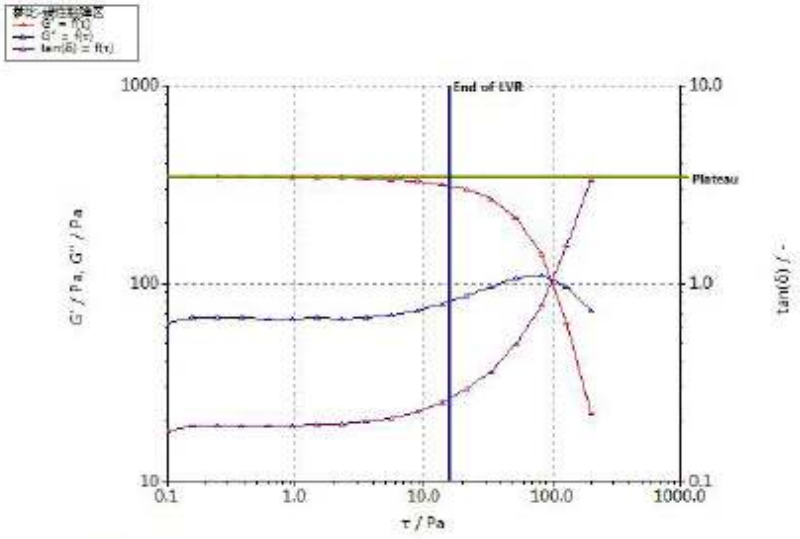


图 7. ZORAC®振幅扫描

Fig.7 Rheological curve of ZORAC®

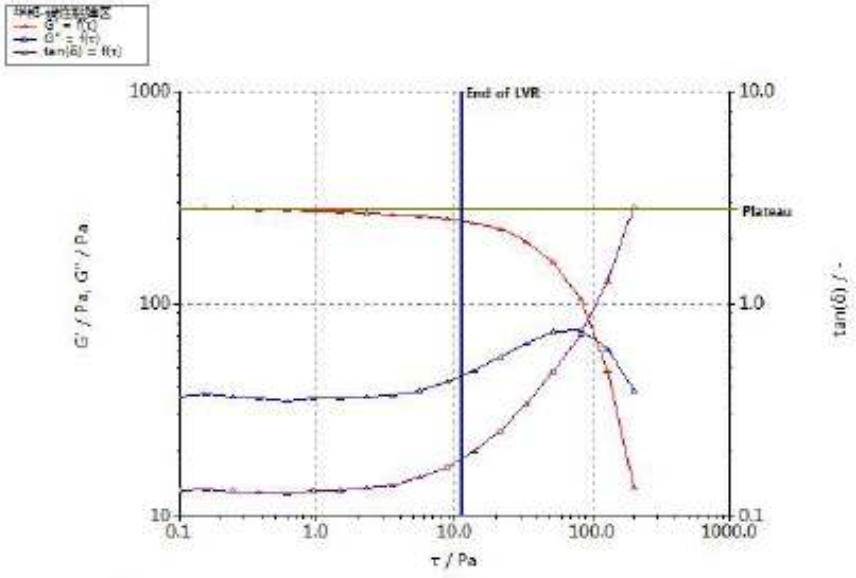


图 8. 乐为®振幅扫描

Fig.8 Rheological curve of 乐为®

2.3.2.3 频率扫描　选择在线性黏弹区范围内的某个应变条件下，用不同的振荡频率扫描，观察线性黏弹区内 G′、G " 及损耗角正切值（tan（δ））随着振荡频率变化的情况，反应体系黏弹性的变化规律，属于动态流变学[4-5]。振荡频率扫描范围为 0.1000Hz～10.00Hz，温度 25℃±1℃，采用 P35/Ti 型转子，剪切力为 3Pa，结果见图 9、图 10。结果表明，随着频率增大，ZORAC®与乐为® G′ 、G " 及 tan（δ）均呈增大趋势，两种产品 G′ 均大于 G " ，表明形成的凝胶为均弱凝胶，均以弹性为主，tan（δ）值越小，表明样品弹性越高，黏性越低[9]。

采用 OrginPro 9.1.0 软件，对两条 G”=f(f)曲线采用非线性最小二乘算法（列文伯格-马夸尔特法，levenberg marquardt 算法）分别进行进行非线性拟合，结果为 P 值（Prob > F）=0 < 0.01，即在 0.05 显著性水平上，两条曲线具有显著性差异，说明 ZORAC®与®乐为动态流变学不一致。

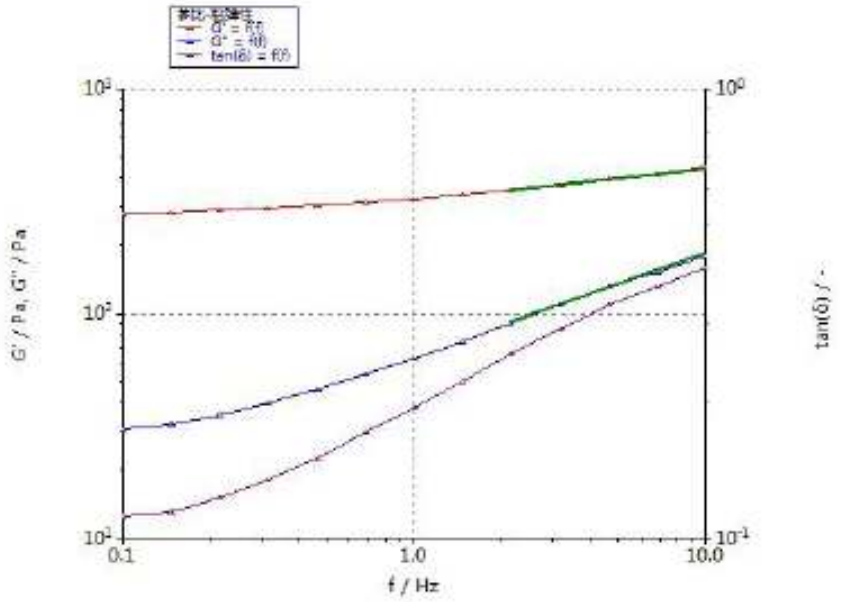


图 9. ZORAC®频率扫描

Fig.9 Rheological curve of ZORAC®

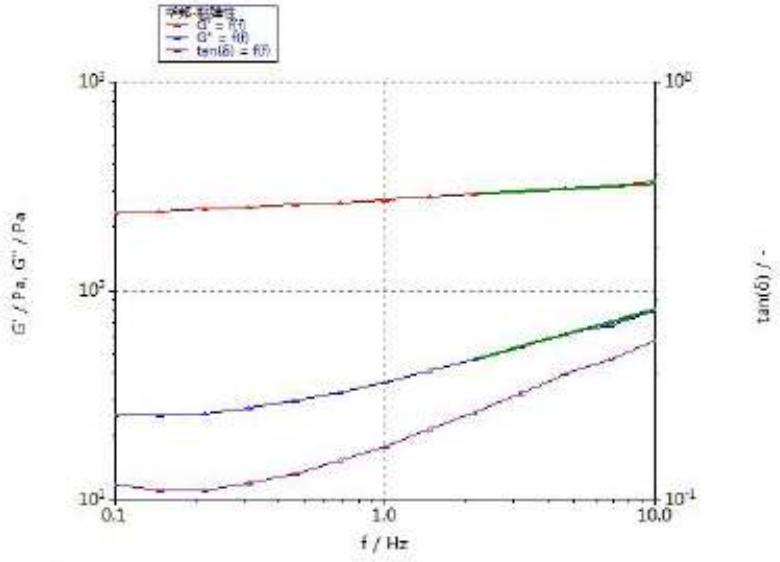


图 10. 乐为®频率扫描

Fig.10 Rheological curve of 乐为®

2.3.3 pH 值　取本品各约 2 g，分别加水 30 mL 溶解后，依法操作。ZORAC®与乐为®pH 值分别为 6.2 和 7.5，乐为®pH 值更高，差异显著。

3 讨论

3.1 Q_1 与 Q_2 的差异　根据国家药监局药审中心 2021 年 3 月 16 日发布的《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则（试行）》的通告（2021 年第 23 号）[10]，其中指出仿制药与参比制剂的辅料在定性（Q1）和定量（Q2）上应相同，辅料的浓度差异不应超过±5%，会有助于保证仿制药与参比制剂质量的一致性。根据 ZORAC®说明书[11]公开的结果，ZORAC®中苯甲醇、丁羟基茴醚、丁羟甲苯的处方用量分别为 1.0%（$g \cdot g^{-1}$）、0.05%（$g \cdot g^{-1}$）、0.05%（$g \cdot g^{-1}$），处方设计中苯甲醇既为抑菌剂又为助溶剂，丁羟基茴醚和丁羟甲苯作为抗氧剂，用于保护产品受辅

料中残留过氧化物的影响，本研究测得结果分别为 1.03%（$g \cdot g^{-1}$）、0.049%（$g \cdot g^{-1}$）、0.049%（$g \cdot g^{-1}$），与说明书一致；国产仿制药乐为®均未检出苯甲醇、丁羟基茴醚和丁羟甲苯，与调研结果一致，进一步说明乐为®与参比制剂抑菌剂及抗氧剂种类不一致，可能导致产品质量的稳定性不一致。

3.2 Q_3 的差异 虽然乐为®与参比制剂 ZORAC®处方中均使用了助溶剂，但根据显微镜观察结果，两者基质中均存在未溶解的活性成分，ZORAC®基质内药用活性成分的晶体为细长柱状晶体，而国内仿制药乐为®中为粗大不规则形状的晶体，说明二者的微观结构不同，提示可能影响体外释放行为，进而影响药物的生物等效性；流变学研究结果表明，乐为®与参比制剂 ZORAC®均为“非牛顿流体”，均属弱凝胶，但两者体系在静态流变学和动态流变学均存在显著差异，进一步说明两者辅料属性、处方工艺设计不同引起流变特性差异；pH 测定结果表明，乐为®产品中 pH 值明显高于 ZORAC®，ZORAC®说明书[1-2]中指出在最后一步用氨丁三醇调节 pH 值，而乐为®产品是在第一步用氨丁三醇调节 pH 值。综上表明，两者产品 Q_3 的差异可能是由于 Q_1、Q_2 以及工艺不同引起的。

3.3 小结 国产仿制药乐为®与参比制剂 ZORAC®Q_1 和 Q_2 明显不一致，因而 Q_3 也存在显著性差异，但本品 Q_1、Q_2、Q_3 与体外释放行为的关联性，特别是 ZORAC®处方中使用的 3 种关键辅料聚山梨酯 40、泊洛沙姆 407 与己二醇，已有专利报道该 3 种辅料会影响药物的溶解度和释放[12]，故乐为®与原研产品 ZORAC®体外释放性能有待进一步研究。另外，虽然已有相关文献报道了流变学评价在皮肤外用半固体制剂的应用[8,13]，但仍缺乏标准化开发方法，本研究建立的凝胶剂流变特性测定方法，可为表征同类型制剂的流变学研究提供参考。

REFERENCES

[1] Allergan Pharmaceuticals Ireland. Summary of product characteristics for ZORAC 0.05%, gel. [OL]. http://www.mhra.gov.uk, 2018-08-31.

[2] Allergan Pharmaceuticals Ireland. Summary of product characteristics for ZORAC 0.1%, gel. [OL]. http://www.mhra.gov.uk, 2018-08-31.

[3] Vinod P. Shah et al. A science based approach to topical drug classification system (TCS). [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 491(1-2): 21-25.

[4] 郭涤亮，徐萍蔚，王亚敏. 皮肤局部外用仿制药质量等同性评价的一般考虑 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(18): 2116-2120.

[5] 国家药品监督管理局药品审评中心. 新注册分类的皮肤外用仿制药的技术评价要求(征求意见稿)[EB/OL]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/bec4520b9d49718ce022c1e96fb6a450.2018-07-11.

[6] 沈丹丹，吴群，沈川等.曲安奈德益康唑乳膏处方及微观结构特性评价的比较研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(7): 691-696.

[7] 郭佳欣，张慧君，刘鑫宇等. 玉米淀粉和马铃薯淀粉糊化后的流变性及热力学性质比较[J]. 中国果菜, 2022, 42(3): 1-5.

[8] 黄乐乐，马晋隆，王嘉明等. 流变学评价在皮肤局部外用半固体制剂处方开发中的应用进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53(5): 611-620.

[9] SOUTO E B,WISSING S A,BARBOSA C M,et al.Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after in corporation into hydrogel formulations [J].Eur J Pharm Biopharm，2004,58(1):83-90.

[10] 国家药品监督管理局药品审评中心.《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则（试行）》的通告（2021 年第 23 号）[EB/OL].https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/4e790f4ad1cb21091e5a8bf4a107c535.2021-03-03.

[11] Allergan USA, Inc. Full prescribing information for TAZORAC®. [EB/OL]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/020600s010lbl.pdf, 2018-04-16.

[12] Allergan Inc. Stable gel formulation for topical treatment of skin conditions. [P]. US5914334, 1996-03-28.

[13] 武余波，黄乐乐，卢望丁等. 皮肤局部外用制剂 Q3 等同性研究技术要点解析 [J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53(5): 601-610.

GSTO1 aggravates EGFR inhibitors resistance and tumor metastasis in lung adenocarcinoma

Ning-xiang Shen, Ming-yu Luo, Miaomiao Gong, Ying Shen*

Department of Pharmacology and Chemical Biology, Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of Chinese Ministry of Education, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China.

【**Abstract**】Despite significantly improved clinical outcomes in EGFR-mutant lung adenocarcinoma, all patients develop acquired resistance and malignancy on the treatment of EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs). Understanding the resistance mechanisms is crucial to uncover novel therapeutic targets to improve the efficacy of EGFR-TKIs treatment. Here, integrated analysis using RNA-Seq and shRNAs metabolic screening reveals glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1) as one of the key metabolic enzymes that is required for EGFR-TKIs resistance in lung adenocarcinoma cells. Aberrant upregulation of GSTO1 confers EGFR-TKIs resistance and tumor metastasis *in vitro* and *in vivo*. Importantly, pharmaceutical intervention or knockdown of GSTO1 restores sensitivity to EGFR-TKIs and synergistically enhanced tumoricidal effects. Mechanistically, mass spectrometry-based screening indicates the interaction between GSTO1 and nucleophosmin 1 (NPM1) that leads to the deglutathionylation of NPM1 and the subsequent activation of the AKT/NF-κB signaling pathway, which is dependent on GSTO1 active-site cysteine (C32). In addition, clinical data illustrates that GSTO1 level is positively correlated with NPM1 level, NF-κB-mediated transcriptions and progression of human lung adenocarcinoma. Overall, our study highlights a novel mechanism of GSTO1 mediating EGFR-TKIs resistance and malignant progression via protein deglutathionylation, and GSTO1/NPM1/AKT/NF-κB axis as a potential therapeutic vulnerability in lung adenocarcinoma.

【**Keywords**】tumor metabolism; protein-protein interaction; EGFR-TKIs resistance; tumor metastasis; lung cancer

*Corresponding author. yshen0510@sjtu.edu.cn

ICP-MS 法测定玉屏风制剂中元素组成及玉屏风丸中 20 种元素含量

施贝[1]，岳超[1]，王芸[1]，王展华[1]

（1.浙江省食品药品检验研究院，浙江 杭州 310052）

【摘要】目的：结合 ICP-MS 半定量和全定量联合筛查不同玉屏风类制剂（口服液、丸剂）中元素组成及含量。**方法：**样品经消解，采用 ICP-MS 半定量法对玉屏风口服液、玉屏风丸进行全元素扫描及浓度估测，再使用全定量法对丸剂样品中贡献率较高的元素和药典重点关注重金属、有害元素等进行定量测定。**结果：**经半定量全元素扫描预估确定 20 种元素 Be、Li、Sr、B、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、As、Se、Mo、Cd、Sb、Ba、Pb、Hg，并进行定量测定。20 种元素全定量分析线性关系良好，相关系数（r）≥0.9999；重复性实验 RSD 为 1.3%～7.1%；加样回收率为 84.8%～119.2%，RSD 为 1.1%～8.3%。**结论：**本次研究所使用方法操作简便，结合 ICP-MS 的两种检测功能，提高分析效率，节约时间，为进一步制定不同剂型的玉屏风类制剂质量控制标准提供参考依据。

【关键词】ICP-MS；玉屏风类制剂；元素分析；半定量；全定量

Determination of Element Composition in Yupingfeng Preparation and Content of 20 elements in Yupingfeng Pills by ICP-MS

Shi Bei[1]，Yue Chao[1]，Wang Yun[1]，WangZhanhua[1]

（1.Zhe jiang Institute for Food and Drug Control，Zhejiang Hangzhou 310052，China）

【Abstract:】Objectives: The present study aimed to screen the composition and content of elements in different Yupingfeng preparations (oral liquid and pills) by ICP-MS semi-quantitative and full-quantitative methods. **Methods:** After the samples were digested, the total elements of Yupingfeng oral liquid and Yupingfeng pills were scanned and the concentration was estimated by ICP-MS semi-quantitative method, and then the heavy metals and harmful elements with high contribution rate in the pill samples were quantitatively determined by the full-quantitative method. **Results:** Twenty elements, such As Be, Li, Sr, B, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, As, Se, Mo, Cd, Sb, Ba, Pb and Hg, were determined by semi-quantitative total element scanning. The linear relationship of the total quantitative analysis of 20 elements is good, and the correlation coefficient (r) is ≥ 0.9999. The RSD of repetitive experiments is 1.3% ~ 7.1%; The recovery rate was 84.8% ~ 119.2% and RSD was 1.1% ~ 8.3%. **Conclusions:** The method used in this study is simple and easy to operate. Combining the two detection functions of ICP-MS improves analysis efficiency and saves time, providing some reference for further formulating the quality control standards of Yupingfeng preparations of different types.

【Keywords】ICP-MS; Yupingfeng preparations; Elemental analysis; Semi-quantitative; Full quantification

前 言

玉屏风是中医药扶正固本经典古方，由防风、黄芪、白术组成，该方具有益气，固表，止汗功效，药简效宏。适用于表虚不固，自汗恶风，面色㿠白，或体虚易感风邪者[1]。现代研究表明，玉屏风系列的各种剂型不仅针对上呼吸道感染等疾病，还对多种皮肤病、消化系统疾病、自身免疫疾病、儿科疾病等具有治疗作用[2,3]。

新冠肺炎疫情盛行时期，玉屏风散是全国大部分地区采用最多的中药防治方案，特别强调以补虚、清热、化湿为主，在此次新冠肺炎的预防中有较大的应用价值[4]。据相关文献研究报道，结合网络药理学方法与分子对接技术对玉屏风制剂组方药材相关功效成分及靶点进行分析，表明玉屏风散对于防治 COVID-19 具有较好的疗效[5]。

现代药学研究发现，中药材中的有机成分与微量元素形成配合物从而成为药效成分[6]，无机元素的种类和含量都会影响中药的性味功效。例如，铁（Fe）、锰（Mn）元素含量比值可作为区分中药寒热药性的特征元素；锂（Li）、锰（Mn）含量可作为区分辛味药物的特征元素，可根据药“味”初步推断药材中所含元素[7]。扶正固本类中药中含有大量 Fe、Mn、Zn、Cu 元素，可能与增强机体免疫力、补虚健气功效相关[8]。说明无机元素与中药药效的发挥具有一定的协同作用，共同维护人体健康。明确无机元素的种类和含量，可以从元素角度对药物的疗效和质量控制研究提供一定参考。

电感耦合等离子体质谱（以下称 ICP-MS）具有灵敏度高、检出限低、可同时分析多元素、线性动态范围宽、基质耐受性强等特点[9]，广泛应用于食品、药品、生物、环境等样品中多元素的测定[10–12]。目前采用 ICP-MS 方法测定玉屏风丸剂中无机元素的研究开展较少，本研究使用 ICP-MS 半定量功能对玉屏风口服液、丸剂进行全元素的扫描，推断相关元素的含量范围，比较不同剂型的检出效果；再利用全定量方法对玉屏风丸剂中无机元素进行定量测定，并开展方法学考察，为下一步研究提供物质基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器设备

XPE205 电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo）、Multiwave 3000 微波消解仪（奥地利 Anton Paar）、NexION 350D 电感耦合等离子体质谱仪（美国 PerkinElmer）、Purelab Chorus 2+(RO/EDI/UV) 超纯水仪（英国 ELGA）、加热板。

1.2 试剂与药物

多元素标准溶液（Ba、V、Cr、Cd、Co、K、Fe 等 27 种元素，浓度均为 100 mg/L，北京坛墨质检科技有限公司，批号：批次号 B1911029）、混合内标溶液（Bi、Ge、In、Li、Sc、Tb、Y 浓度均为 10 μg/mL，美国 PerkinElmer，批号：N9303832）、汞元素标准溶液（1000 μg/mL，国家有色金属及电子材料分析测试中心，批号：211002-4）、金元素标准溶液（1000 mg/L，上海安谱实验科技股份有限公司，批号：CFGG-060079-04-01）、67-70%硝酸（优级纯，美国 Fisher Chemical）。

玉屏风口服液、玉屏风丸来源及批号见表 1-1、1-2。

表 1-1　玉屏风口服液信息

样品编号	厂家	批号
YP-1	湖北东信药业有限公司	191008
YP-2	广州小奇灵制药有限公司	191101
YP-3	仲景宛西制药股份有限公司	200201
YP-4	江西南昌桑海制药有限责任公司	191220
YP-5	河南金鸿堂制药有限公司	20180906
YP-6	湖北济安堂药业股份有限公司-双龙出海	200406
YP-7	湖北济安堂药业股份有限公司-仁悦	200503
YP-8	浙江新光药业股份有限公司	20200401
YP-9	江西盛翔制药有限公司	200802
YP-10	江西盛翔制药有限公司	20200401
YP-11	广州小奇灵制药有限公司	200802

YP-12	湖北东信药业有限公司	200621
YP-13	恩威(江西)制药有限公司	201003
YP-14	仲景宛西制药股份有限公司	200802
YP-15	湖北济安堂药业股份有限公司	200801
YP-16	江西南昌济生制药有限责任公司	200438
YP-17	江苏聚荣制药集团有限公司	20080701

表 1-2 玉屏风丸样品信息

样品编号	厂家	批号
YP-18	山西华康药业股份有限公司	20200601
YP-27	山西华康药业股份有限公司	20200902
YP-29	山西华康药业股份有限公司	20200901
YP-40	山西华康药业股份有限公司	20220801
YP-41	山西华康药业股份有限公司	20220803
YP-42	山西华康药业股份有限公司	20220802
YP-43	山西华康药业股份有限公司	20211006
YP-44	山西华康药业股份有限公司	20211008
YP-45	山西华康药业股份有限公司	20211201

2 实验和方法

2.1 样品预处理

取不同厂家、不同批次共 17 批玉屏风口服液摇匀待用，9 批玉屏风丸经高速粉碎机粉碎均匀。使用重量法精密称取 1 mL 液体样品、0.2 g 固体样品，置入聚四氟乙烯消解管中，每管加入浓硝酸 5 mL，加盖放置 1 h，置于加热板上 100℃预消解 30 min，放冷，加盖放入微波消解仪中进行消解，微波消解程序见表 2-1。消解完成后，冷却至室温，缓慢开盖排气，用少量超纯水冲洗内盖，洗入消解管中，将消解管放置于加热板 100℃赶酸至 2~3 mL 取下，放冷后，用超纯水定容至 50 mL，混匀备用，同时做空白试验。

表 2-1 微波消解条件

消解步骤	时间（min）	温度（℃）	功率（W）	%
1	0 → 25	室温 → 185	1800	100
2	25 → 45	185	1800	100
3	45 →	185 → 室温	0	0

2.2 标准溶液的制备

2.2.1 汞标准稳定剂

取 0.5 mL 金元素标准溶液，用 5%溶液（5 + 95）稀释至 250 mL，作为汞标准稳定剂。

2.2.2 混合标准工作曲线

准确量取 27 种元素混合标准母液（含 Ba、Bi、V、Ca、Cd、Cr、Co、K、Li、Al、Mg、Mn、Mo、Na、Ni、B、Be、Pb、As、Si、TI、Ti、Sb、Fe、Cu、Se、Zn），用 5%硝酸作空白试剂，将母液稀释成 1、5、10、20、50、100 ng/mL 浓度的标准工作曲线系列。

2.2.3 汞标准工作曲线

移取适量汞元素标准溶液，用汞标准稳定剂逐级稀释配成标准工作溶液系列，分别为 0.2、0.5、1、2、5 ng/mL。

2.2.4 内标使用液

移取适量混合内标多元素溶液（含 Bi、Ge、In、Li、Sc、Tb、Y），用 5%硝酸配制成 25 μg/L 的内标使用液。

2.3 无机元素半定量分析

2.3.1 测定条件

氦反应模式；RF 发射功率 1550W；载气（氩气）流量：0.84 L/min；等离子体气流速 16 L/min；辅助气流速：1.2 L/min；雾化器泵速：20 r/min；重复次数：3 次；分析模式：半定量。

2.3.2 半定量测定方法

检测包括 *m/z* 为 9 至 208 的所有质量数，依次采集空白对照溶液、17 批玉屏风口服液样品溶液（编号 YP1～YP17）、9 批玉屏风丸样品溶液（编号 YP18、27、29、40～45）数据，预估不同剂型样品中所含元素种类及浓度测定。

2.4 无机元素全定量分析

2.4.1 测定条件

氦反应模式；RF 发射功率 1550W；载气（氩气）流量：0.84 L/min；等离子体气流速 16 L/min；辅助气流速：1.2 L/min；雾化器泵速：20 r/min；重复次数：3 次；分析模式：全定量。

2.4.2 全定量分析方法

根据半定量分析中所得各元素浓度范围，比对两种剂型的玉屏风类制剂，我们发现玉屏风丸剂中元素响应情况更稳定，因此只对玉屏风丸开展全定量分析。将样品溶液用于 Be、K、Na、Al、Li、Sr、B、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Mo、Cd、Sb、Ba、Pb、Tl 及 Hg 的测定，依次采集系列浓度混合标准品溶液、空白对照液、9 批样品溶液（编号 YP18、27、29、40～45）、系列浓度汞元素标准品溶液数据。

2.5 方法学考察

2.5.1 重复性试验

取编号 YP41（批号 20220803）的样品，按“2.1”项中方法平行制备 6 份样品溶液，测定 Be、Li、Sr、B、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、As、Se、Mo、Cd、Sb、Ba、Pb 以及 Hg 元素。

2.5.2 加样回收率试验

将已知各元素含量的编号 YP41 样品取 6 份，分高、中、低三组，分别加入 100 ng/mL 混合标准溶液 40 μL、10 μL、5 μL，200 ng/mL 汞元素标准溶液 1 mL、0.25 mL、0.1 mL，按“2.1”项中方法制备样品溶液，计算相应 20 种元素平均回收率。

3 结果与分析

3.1 多元素半定量分析

WHO 组织于 1996 年公布了 21 种构成人体组织、参与机体代谢、维持生理功能所必需的无机元素，其中分为必需微量元素（Fe、Cu、Se、Cr、Co、Mo）、可能必需微量元素（Mn、Ni、B、V、Si）、具有潜在毒性微量元素（Pb、Cd、Hg、As、Li 等）[13]。分析玉屏风类制剂中多元素组成及含量，可以进一步了解元素与药物疗效的关系，并能为不同剂型产品制定质量控制标准提供一定参考。

样品（玉屏风口服液、玉屏风丸）经半定量分析，显示 Li～U 中的 75 种元素的每秒计数（CPS）及浓度，通过与空白对照试剂的 CPS、浓度比较，判断各个元素是否存在定量必要。同时需排除内标元素、部分非金属元素（C、N、O、S、P、F 等），并考虑药典中所要求重金属元素及有害元素（Hg、Pb、As、Cd、Cr、Cu）检测的必要性，综合以上考虑，选择多元素混合标准溶液中的 Be、Li、Sr、B、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、As、Se、Mo、Cd、Sb、Ba、Pb 以及单元素 Hg 进行定量测定。部分元素半定量结果见表 3-1、3-2。

表 3-1 玉屏风口服液部分元素半定量测定结果（mg/kg）

元素	浓度范围		元素	浓度范围
Li	0 ~ 0.008		Mn	/
Be	/		Fe	0 ~ 0.023
B	0 ~ 0.002		Cr	0 ~ 0.0001
Na	0.016 ~ 0.563		Co	0 ~ 0.0002
Mg	0.003 ~ 0.030		Ni	0 ~ 0.003
Al	/		Cu	/
K	0.041 ~ 1.634		Zn	0 ~ 0.010
Ca	/		As	/
V	/		Se	/
Ti	/		Mo	0.001 ~ 0.005
Sb	/		Ba	0 ~ 0.002

表 3-2 玉屏风丸部分元素半定量测定结果（mg/kg）

元素	浓度范围		元素	浓度范围
Li	0 ~ 0.001		Mn	0 ~ 0.001
Be	0 ~ 0.001		Fe	0.023 ~ 0.061
B	0 ~ 0.001		Cr	0 ~ 0.004
Na	0.053 ~ 0.158		Co	0 ~ 0.001
Mg	0.040 ~ 0.185		Ni	0.001 ~ 0.014
Al	0 ~ 0.005		Cu	0.002 ~ 0.107
K	0.041 ~ 1.634		Zn	0.002 ~ 0.039
Ca	/		As	/
V	0 ~ 0.001		Se	/
Ti	0 ~ 0.003		Mo	0.001 ~ 0.027
Sb	/		Ba	0.029

3.2 多元素全定量分析

3.2.1 线性关系和检出限

以标准溶液质量浓度为横坐标（X）、各元素 CPS 值为纵坐标（Y），进行回归处理，得到 20 种元素线性良好。连续采集样品空白溶液 8 次，作出相应元素检出限，结果见表 3-3。

3.2.2 重复性试验

重复测定 YP41 样品的 6 份平行溶液，各元素 RSD 为 1.3%~7.1%，在可接受范围内，表明该方法重复性良好。

表 3-3 20 种元素线性关系及检出限

元素	回归方程	r	检出限/(mg·L^{-1})
Be	Y=0.0100X+0.00041	0.999883	0.001280
Li	Y=0.0178X+0.0001351	0.999961	0.205738
Sr	Y=0.0023X+0.00821	0.999902	0.044422
B	Y=0.0006X+0.00052	0.999872	0.882684

Ti	Y=0.0008X-0.00029	0.999905	0.346550
V	Y=0.0218X-0.021668	0.999829	0.187632
Cr	Y=0.02515X+0.000122	0.999976	0.002068
Mn	Y=0.018117X+0.003543	0.999961	0.003996
Fe	Y=0.000574X-0.00011	0.999785	0.412423
Co	Y=0.042347X+0.002091	0.999965	0.001015
Ni	Y=0.011126X+0.002163	0.999940	0.011993
Cu	Y=0.029884X+0.002416	0.999975	0.000920
As	Y=0.002602X+0.000803	0.999921	0.025506
Se	Y=0.000324X-0.0035342	0.999944	0.067831
Mo	Y=0.016416X-0.01634	0.999840	0.231763
Cd	Y=0.012389X-0.00021	0.999968	0.004337
Sb	Y=0.010136X+0.00153	0.999962	0.004855
Ba	Y=0.039508X+0.007113	0.999968	0.007752
Pb	Y=0.0141X+0.0013	0.999895	0.005117
Hg	Y=0.217172X-0.17677	0.999941	0.001285

3.2.3 加样回收率试验

根据 YP41 样品高、中、低加标浓度计算 20 种元素回收率，高浓度组回收率为 85.7% ~ 119.2%；中浓度组回收率为 89.7% ~ 110.1%；低浓度组回收率为 84.8% ~ 104.7%。综上，各元素回收率为 84.8%～119.2%，RSD 为 1.1%～8.3%。

3.2.4 全定量分析结果

20 种元素全定量测定结果见表 3-4。编号 YP18、YP27、YP29、YP40～45 玉屏风丸样品中除 Na、Mg、K、Zn、Fe 元素以外，其余元素半定量检测所得结果的 RSD 均在±15%范围内，且与全定量测量模式下的浓度范围大致一致，具有可参考性。根据药典所规定必须检测的重金属与有害元素参考，我们重点关注 Hg、Pb、As、Cd、Cr、Cu 元素，均符合 2020 年版《中国药典》中相关限定标准，在安全限度内。其中，相较于其他元素含量水平，Cr、Cu 元素略有升高，可以重点关注相应元素对丸剂剂型的质量控制展开进一步研究。

在所有样品中，YP42（批号：20220802）中 Cr、Fe、Ni 元素含有量显著高于其他批次；YP43 ~ 44（批号：20211006、20211008）中 Ba、Cu 元素含量明显偏高，表明该药厂不同生产年份、不同批次在生产工艺上存在一定变化，需要加强金属元素的把控。

表 3-4 玉屏风丸样品中 20 种元素测定结果（mg/kg）

编号	Li	Be	Sr	B	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co
YP18	0.651	0.019	27.442	13.130	11.149	1.231	3.784	20.834	504.248	0.291
YP27	0.893	0.023	23.203	12.552	15.718	1.504	3.727	26.396	665.263	0.364
YP29	0.916	0.023	23.288	12.954	15.741	1.424	3.825	26.316	631.720	0.364
YP40	0.816	0.022	22.081	12.446	21.301	1.451	3.527	25.752	665.179	0.341
YP41	0.783	0.020	23.082	13.045	13.867	1.260	3.112	25.364	565.493	0.325
YP42	0.879	0.023	24.260	13.068	25.172	1.670	7.991	26.956	741.219	0.375
YP43	0.866	0.024	26.574	14.947	9.821	1.408	3.403	31.237	552.691	0.395
YP44	0.744	0.019	47.758	15.966	20.244	1.288	4.277	27.872	602.622	0.342
YP45	0.864	0.023	24.409	13.276	21.019	1.581	3.896	27.483	713.585	0.374

表 3-4 玉屏风丸样品中 20 种元素测定结果（mg/kg）（续表）

编号	Ni	Cu	As	Se	Mo	Cd	Sb	Ba	Pb	Hg
YP18	2.554	8.697	0.253	0.049	3.229	0.058	0.013	15.989	0.441	0.009
YP27	2.604	7.350	0.334	0.045	2.320	0.073	0.019	17.354	0.559	0.012
YP29	2.725	8.291	0.349	0.029	2.322	0.075	0.020	16.305	0.568	0.006
YP40	2.607	7.346	0.356	0.040	3.283	0.087	0.027	19.040	0.537	0.013
YP41	2.550	7.740	0.337	0.030	2.996	0.091	0.022	19.229	0.518	0.010
YP42	4.901	7.617	0.363	0.031	3.301	0.086	0.029	21.277	0.554	0.013
YP43	3.303	11.28	0.346	0.043	3.094	0.151	0.015	26.817	0.722	0.039
YP44	3.341	8.010	0.275	0.044	2.021	0.129	0.023	27.339	0.689	0.013
YP45	2.993	7.790	0.352	0.040	3.154	0.111	0.024	21.993	0.622	0.013

4 结论与展望

本研究结合 ICP-MS 半定量分析与全定量分析模式，对不同剂型的玉屏风制剂（口服液、丸剂）中的多元素开展检测。根据半定量元素扫描结果，为全定量检测中元素的选择提供了参考，并通过对玉屏风口服液投药量进行折算，估算出了每种元素较准确的元素浓度范围。比较不同剂型玉屏风制剂样品的元素响应情况，可知丸剂相较于其他剂型结果更准确、稳定，因此研究后续对玉屏风丸样品开展了全定量测定，且各批次样品中相关元素含量均在安全限度以内，总体来看丸剂剂型的重金属安全性较好。

本试验比较口服液、丸剂剂型，对于玉屏风类制剂中 20 种无机元素组成与含量进行研究，为玉屏风类制剂其他不同剂型（颗粒、胶囊、滴丸、袋泡茶）的质量情况标准制定提供一定参考，为玉屏风丸剂类质量控制及重金属、有害元素的检测提供依据。为下一步元素的量效关系和与活性成分相互作用等方面的研究打下物质基础。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 胡海乐. 玉屏风颗粒防治小儿反复呼吸道感染的疗效及其对免疫物质、微量元素的影响[J]. 中医临床研究, 2020, 12(13): 13–16.

[3] 汪青楠, 吕文良, 李娟梅, 等. 玉屏风散实验研究及临床应用进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9): 165–168.

[4] 吴嫣然, 齐海军, 姜淑君, 等. 玉屏风散预防新型冠状病毒肺炎的可行性[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(8): 1769–1772.

[5] 黄浪浪, 徐驯, 刘言薇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的玉屏风散防治新型冠状病毒肺炎活性化合物研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 116–121.

[6] 奚群华. 基于 ICP-MS 的三种中药中无机元素的分析[D/OL]. 上海交通大学, 2019.

[7] 魏小成, 李成义, 周瑞娟, 等. 无机元素与中药关系研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(7): 140–144.

[8] 张柯瑶, 郭惠, 王媚, 等. 扶正固本类中药中微量元素含量测定及药效关系研究[J]. 陕西中医, 2017, 38(3): 398–400.

[9] Thabit, Tamer M A M, Elgeddawy, *et al*. Determination of some common heavy metals and radionuclides in some medicinal herbs using ICP-MS/MS[J]. Journal of AOAC International, 2020, 103(5): 1282–1287.

[10] Tokalioğlu, Şerife. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis[J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2504–2508.

[11]曾涛, 沈倩. 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)应用进展及展望[J]. 广东化工, 2018, 45(18): 116-119.

[12] Wysocka, Irena. Determination of rare earth elements concentrations in natural waters – a review of ICP-MS measurement approaches[J]. Talanta, 2021, 221: 121636.

[13] Antoniadis, Shaheen, Levizou, *et al*. A critical prospective analysis of the potential toxicity of trace element regulation limits in soils worldwide: are they protective concerning health risk assessment? - a review[J]. Environment International, 2019, 127: 819–847.

全新 10, 12-双取代苦豆碱衍生物的合成及抗人类β冠状病毒活性研究

施宇龙[1,†]，陈芬倍[1,†]，吴梦媛[1]，张欣[2]，孟润泽[1]，王坤[1]，王艳[1]，梅钰恒[1]，段琼璐[1]，李迎红[1]，高荣梅[1]，李玉环[1]，邓洪斌[1]，蒋建东[1]，汪燕翔[1,*]，宋丹青[1,*]

（[1]中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所，北京 100050；[2]济宁医学院附属医院药剂科，济宁 272000）

【摘要】本研究首次设计并合成了 31 个全新的 10, 12-双取代苦豆碱衍生物。化合物通过磺酰基诱导的 10-α-C-H 键选择性氧化和亲核取代得到，该法具有立体选择性和可扩展性。其中，化合物 6b 抗人类β冠状病毒活性最优，IC50 值为 5.14 μmol · L−1，SI 值为 9.0。时间添加实验和病毒进入实验表明 6b 通过宿主机制阻断了病毒的进入阶段。利用基于活性的化学蛋白组学技术 （ABPP），我们成功捕获并确证了跨膜丝氨酸蛋白酶 2（TMPRSS2）和 B 类清道夫受体 1（SR-B1） 蛋白是 6b 抗人类β冠状病毒的直接靶标，这两种蛋白是病毒吸附与进入阶段的宿主辅助因子。此外，6b 可能通过结合活性中心附近的疏水口袋，诱导蛋白质构象的改变而非与其催化中心结合，使 TMPRSS2 失活。我们的研究开发了一类新结构的苦豆碱衍生物，并证明了苦豆碱作为 TMPRSS2 和 SR-B1 双重抑制剂可阻断 HCoV-OC43 的进入过程，为开发针对包括 SARS-CoV-2 在内的人类β-冠状病毒的抗病毒候选药物提供了关键的科学数据。

【关键词】苦豆碱；合成；SARS-CoV-2；TMPRSS2；SR-B1

Synthesis and anti-human β-coronavirus evaluation of novel 10, 12-disubstituted aloperine derivatives

SHI yu-long[1,†], CHEN fen-bei[1,†], WU meng-yuan, Zhang xin, MENG run-ze, WANG kun, WANG yan, MEI yu-heng, DUAN qiong-lu, LI ying-hong, GAO rong-mei, Li yu-huan, DENG hong-bin, JIANG jian-dong, WANG Yan-xiang*, SONG Dan-qing*

（Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Medical University, Jining 272000, China）

【Abstract】Thirty-one novel 10,12-disubstituted aloperine derivatives were synthesized through selective oxidation on the 10-α-C–H induced by sulfonyl and nucleophilic substitution with stereoselectivity and scalability. Among them, compound 6b showed the most potent activity against human β-coronavirus with IC_{50} value of 5.14 μmol·L^{-1} and selection index of 9.0. Time addition assay and viral entry assay demonstrated that 6b blocked the viral entry stage via a host mechanism of action. Using activity-hased protein profiling （ABPP）, transmembrane serine protease 2 （TMPRSS2） and scavenger receptor class B type 1 （SR-B1） proteins were identified as the direct host targets of 6b against human β-coronavirus, which both act as host factors of viral entry. Furthermore, 6b may deactivate the TMPRSS2 by directly binding to the hydrophobic pocket adjacent to the active center rather than catalytic center and inducing a change in protein conformation. Our study developed a new class of aloperine scaffold and demonstrated that aloperines act as TMPRSS2 and SR-B1 dual inhibitors to block the human β-coronavirus entry, providing key scientific data for the development of antiviral candidates against human β-coronavirus including SARS-CoV-2.

【Key words】aloperine; synthesis; SARS-CoV-2; TMPRSS2; SR-B1

基金项目：国家自然科学基金 （No. 81974494） 和中国医学科学院医学与健康科技创新工程 （No. 2021-I2M-1-070）。

*通讯作者 Tel: 86-10-63033012, E-mail: wangyanxiang@imb.pumc.edu.cn

快速变异的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 （SARS-CoV-2） 变种（包括 BF.7、BQ.1 和 XBB 等）的出现和传播对全球人类健康和经济造成了巨大影响[1-3]。作用于宿主成分的抗病毒药物具有广谱性和减少产生耐药性的优势，因此不易受到病毒变异的影响[4-7]。此外，该类药物具有与现有抗 SARS-CoV-2 药物联合使用的潜力，从而共同对抗 SARS-CoV-2 的变异[8]。

天然喹唑嗪类生物碱具有独特的化学骨架和类药性，如苦豆碱 （aloperine）、黄花棘豆碱 B （ochrocephalamines B） 和苦参碱 （matrine） （图 1），通过多靶点机制表现出多种药理活性[9-12]，特别是多种抗病毒活性。我们已经证明桥环化合物通过宿主作用机制对丙型肝炎病毒 （HCV）、埃博拉病毒 （EBOV） 和马尔堡病毒 （MARV） 具有多种抑制作用[13-15]。此外，单取代苦豆碱衍生物通过靶向病毒核蛋白，表现出抗流感病毒和抗艾滋病毒活性[16]。最近，研究发现 12N-p-对氯苯乙基苦豆碱通过阻断病毒进入过程，表现出广谱抗冠状病毒作用，包括 SARS-CoV-2、SARS-CoV 和中东呼吸综合征冠状病毒 （MERS-CoV）[17]，且具有良好安全性。然而，苦豆碱衍生物抗冠状病毒的直接靶标仍然未知。此外，化学修饰只集中在苦豆碱的 12N 取代基上，这极大限制了此类化合物的结构多样化。因此，构建新的合成方法从而丰富喹唑嗪类生物碱的结构多样性和生物活性具有重要意义。

黄花棘豆碱 B 的结构表明，苦豆碱可能通过在 12N 原子上引入氢键受体来活化 α-C-H 键，从而在 C-10 上形成新的碳碳键[18]。基于这一策略，如图 1 所示，在苦豆碱中引入 12N 取代的磺酰基会导致邻近叔胺的 10-α-C-H 键高度活化，从而通过选择性氧化作用巧妙地形成了关键中间体 10-亚胺离子苦豆碱衍生物[19]。正如预期那样，通过亲核取代和氨解反应，我们成功地构建了具有七元环的新型骨架 10,12-环苦豆碱 3。同时，关键的亚胺离子中间体分别与格氏试剂或锌试剂反应，获得了各种 10,12-双取代苦豆碱衍生物。本研究合成了 31 个新型 10,12-双取代苦豆碱衍生物，评价了其对人类冠状病毒 OC43（HCoV-OC43）的抗病毒活性[20]，并分析得到它们的构效关系 （SAR）。此外，我们利用化学蛋白组学技术对代表性化合物进行了安全性分析和直接靶蛋白鉴定。

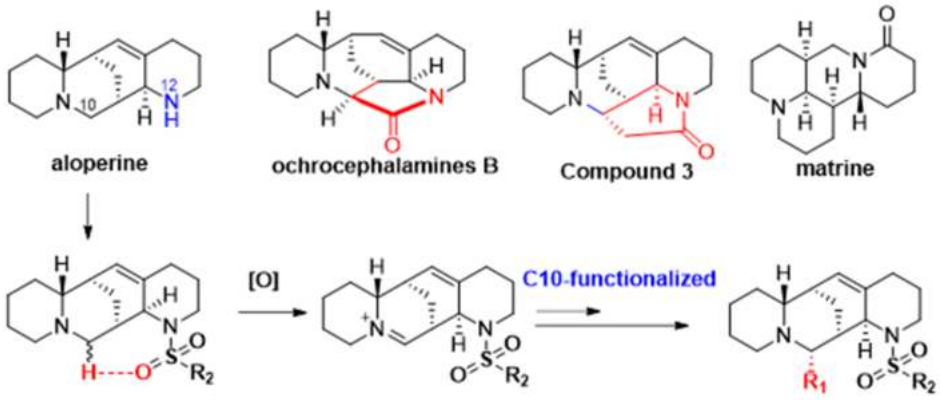
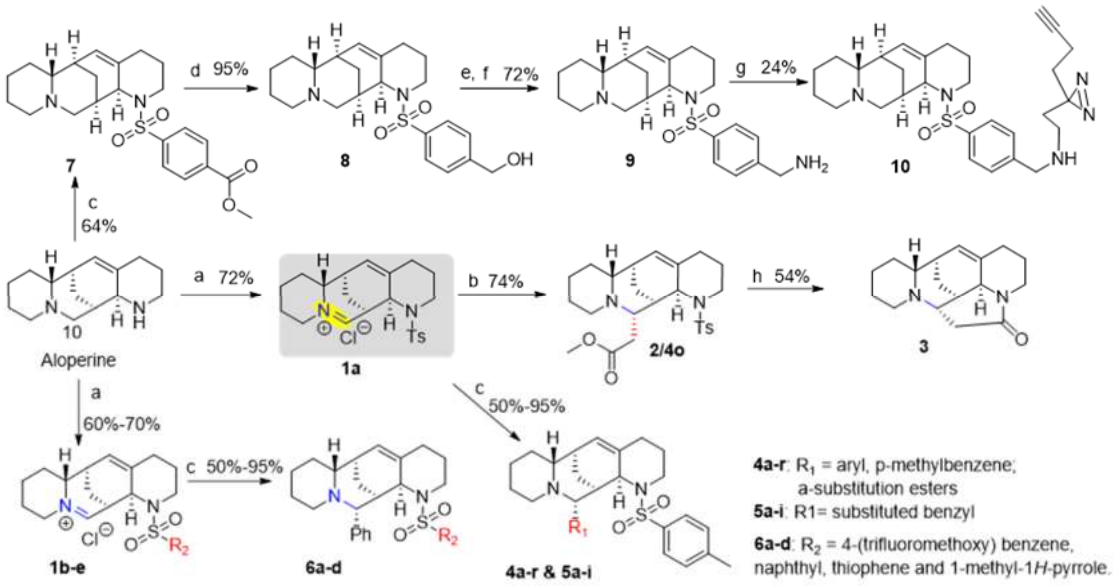


Figure 1 Structures of the representative alkaloids and construction of target compounds

结果与讨论

1 化学合成

如路线 1 所示，将甲苯磺酰基和氧化试剂 I_2 与市售的起始原料苦豆碱反应，环状叔胺可转化为带有可分离亚胺离子的关键中间体 1a。亚胺中间体经锌和溴乙酸甲酯反应后引入乙酸甲酯基团 （2）。然后，通过萘基钠氨解反应去除磺酰基，得到 10,12-环苦豆碱 3。关键中间体 1a-e 苦豆碱衍生物与不同的格氏试剂或锌试剂反应，通过亲核加成得到系列目标化合物 4-6。该方法反应条件温和，具有立体选择性和可扩展性，可以有效拓宽喹唑嗪类生物碱的结构多样性。此外，通过四步反应，包括 12N 磺酰基取代、酯还原、羟基胺化和官能团偶联反应，我们设计并制备了活性光亲和苦豆碱探针 10。通过比较计算出来的和实验获得的 ECD 光谱，我们进一步确认了目标化合物的绝对构型，证实在 C10 位新构建的手性中心具有 S 构型。

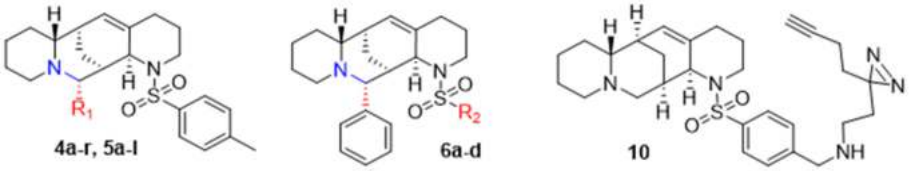


Scheme 1 The synthesis scheme for the aloperine derivatives. Reaction conditions: （a） K2CO3, N-protecting-reagent, I2, DCM, r.t.; Ag2O, HCl. （b） Zinc powder, methyl bromoacetate （1.2 eq）, THF, 100 oC. （c） Grignard reagents, THF. Or Zinc powder, THF, 100 oC. （d） LiAlH4, THF, 0 oC. （e） PPh3, DEAD, phthalimide, THF, 0oC–r.t. （f） N2H4.H2O, EtOH, reflux. （g） K2CO3, 3-（But-3-yn-1-yl）-3-（2-iodoethyl）-3H-diazirine, CH3CN, 80 oC. （h） Sodium naphthalene, THF, –20 oC.

2 抗病毒活性评价和构效关系分析

鉴于人 β 冠状病毒和 SARS-CoV-2 之间的相似性，我们采用基于 H460 细胞的 HCoV-OC43 模型来筛选和评价目标化合物抗病毒活性。表 1 列出了所有目标化合物的结构和对 HCoV-OC43 的抗病毒活性，利巴韦林（RBV） 为阳性对照。首先，与 RBV 相比，化合物 3 没有抗病毒活性。随后，我们保留了 12N 位上的甲苯磺酰基，并分别在 10-C 位上引入了不同的基团，从而得到 18 个新的 10,12-双取代的苦豆碱衍生物 4a-r。其中，较小的烷基有助于提高活性，化合物 4a-j 均显示出中等的抗病毒活性，半数最大抑制浓度 （IC_{50}） 在 10.7 至 38.5 μmol·L^{-1} 之间。含有 10-环丙基的化合物 4h 具有较理想的抗病毒活性，其 IC_{50} 值为 12.84 μmol·L^{-1}，选择指数 （SI） 为 6.2，与 RBV 相当。在具有苯基、对甲氧苯基、4-氯苯基和萘基的其他四种化合物 4k-n 中，只有 4l 的活性与 RBV 相当，IC_{50} 值为 12.84 μmol·L^{-1}。带有其他官能团 （如 α-取代酯和 1,3-二氧杂环己烷-5-乙基） 的衍生物 4o-r 的活性都有所下降。然后，我们合成了 10-C 上不同取代的苄基化合物 5a-i。只有化合物 5c 的 IC_{50} 值为 12.84 μmol·L^{-1}，SI 值为 6.2，与 RBV 活性相似。

Table 1 Anti-HCoV-OC43 activity and cytotoxicity of all the target aloperine derivatives



No	R_1/R_2	TC_{50} （μmol/L）[a]	IC_{50} （μmol/L）[b]	SI[c]	No	R_1/R_2	TC_{50} （μmol/L）[a]	IC_{50} （μmol/L）[b]	SI[c]
1a	-	115.6	>55.56	-	4q		80.12	>18.52	-
3	-	32.08	>18.52	-	4r		288.7	>55.56	-
4a	Methyl	240.4	38.52	6.2	5a	*p*-Chloro benzyl	240.4	>55.56	-

4b	Ethyl	96.23	23.86	4.0	5b	*m*-Chloro benzyl	240.4	38.52	6.2
4c	Vinyl	80.12	18.52	4.3	5c	*o*-Cyano benzyl	80.12	12.84	6.2
4d	Allyl	80.12	18.52	4.3	5d	*p*-Fluoro benzyl	115.6	18.52	6.2
4e	Butenyl	38.52	12.84	3.0	5e	*m,p*-Dichloro benzyl	96.23	>18.52	-
4f	Isobutyl	32.08	10.69	3.0	5f	*o*-Methyl benzyl	80.12	18.52	4.3
4g	Hexyl	32.08	10.69	3.0	5g	*p*-Methyl benzyl	96.23	18.52	5.2
4h	Cyclopropyl	80.12	12.84	6.2	5h	*p*-Acetyl benzyl	115.6	55.56	2.1
4i	Cyclopentyl	115.6	26.71	4.3	5i	*p*-Carbomethoxy benzyl	288.7	55.56	5.2
4j	CH_2CN	288.7	38.52	7.5	6a	*p*-CF_3OPhSO_2	80.12	>18.52	-
4k	Phenyl	346.7	96.23	3.6	6b		46.22	5.14	9.0
4l	*p*-Methoxyphenyl	55.56	12.84	4.3	6c		115.6	>55.56	-
4m	*p*-Chlorophenyl	38.52	>18.52	-	6d	-	288.7	>166. 7	-
4n	1-Naphthyl	214.8	>55.56	-	10	-	31.87	5.14	6.2
4o		288.7	38.52	7.5	RBV	-	96.23	11.11	7.0
4p		80.12	>18.52	-					

[a] Cytotoxic concentration required to inhibit H460 cell growth by 50%.

[b] Concentration required to inhibit HCoV-OC43 virus growth by 50%.

[c] Selectivity Index values equaled to CC_{50}/IC_{50}.

考虑到双取代修饰的可行性和反应产率，我们在 C-10 位保留了苯基，以探讨不同取代基对 C-12 位的影响。我们分别引入了不同的苯磺酰基，包括 4-（三氟甲氧基） 苯磺酰基、萘磺酰基、噻吩-2-磺酰基和 1-甲基-1H-吡咯-3-磺酰基，生成了化合物 6a-d。化合物 6b 活性最佳，其 IC_{50}值为 5.14 μmol·L^{-1}，SI 值为 9.0，远远优于 RBV。因此，抗病毒活性最好的化合物 6b 被选为代表性化合物用于进一步研究。

3 代表性化合物 6b 的安全性评价

为了评估代表性化合物 6b 的安全性，我们在昆明小鼠中进行了急性毒性实验。小鼠单次口服化合物 6b，剂量为 100、200、400 或 800 mg·kg^{-1}。所有动物实验方案均经中国北京 NIFDC 动物养护和使用委员会批准，动物实验由中国医学科学院药物生物技术研究所和中国协和医科大学伦理委员会批准（批准号：IBM20221030D1）。对小鼠进行 7 天的监测后，未观察到存活状况和体重发生显著变化。如图 2 所示，在所有剂量下，小鼠的肝肾功能 （天门冬氨酸转氨酶 （AST）、丙氨酸转氨酶 （ALT）、尿素和血清肌酐 （Cre）） 均无明显损害。6b 的中位致死剂量超过 800 mg·kg^{-1}，表明其安全性良好。

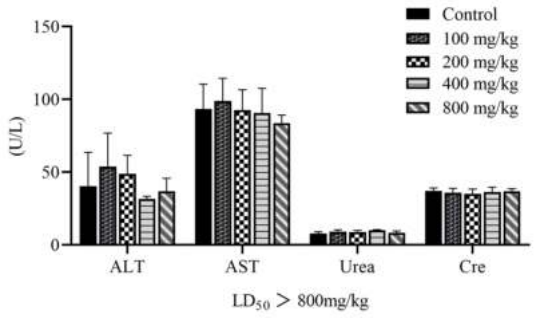


Figure 2 The acute toxicity experiment of compound 6b. The serum biochemistrical indices of each group after 6b treatment, including AST, ALT, urea and Cre were measured. Methanol was used to dissolve the crystal violet dyed crystal and its absorbance was measured at 562 nm. The data presented is the mean ± standard deviation.

4 代表性化合物 6b 的作用阶段确定

为了确定 6b 阻断的病毒生命周期的具体阶段，我们在病毒感染前或感染后的不同时间点对 H460 细胞进行了单周期添加时间实验。如图 3A 所示，化合物 6b 在病毒感染后 2 小时对 HCoV-OC43 产生了强烈的抑制作用，表明它可能通过靶向宿主细胞成分干扰了病毒的进入阶段，这与化合物 12N-对氯苯乙基苦豆碱衍生物观察到的效果基本一致[17]。为了进一步确定化合物 6b 在病毒进入阶段的确切抗病毒效果，我们进行了病毒附着试验和进入试验。如图 3B 所示，化合物 6b 对病毒的进入具有强效的抗病毒活性，其半数最大有效浓度（EC_{50}）为 3.7±1.3 μmol·L^{-1}。6b 对病毒附着也具有抑制作用，EC_{50} 值为 14.0±3.7 μmol·L^{-1}（图 3C）。这些结果进一步表明，6b 主要作用于病毒进入和附着阶段，这与单周期添加时间实验测定的结果一致。因此，可以在宿主细胞中捕获苦豆碱衍生物抗 HCoV-OC43 的直接靶蛋白。

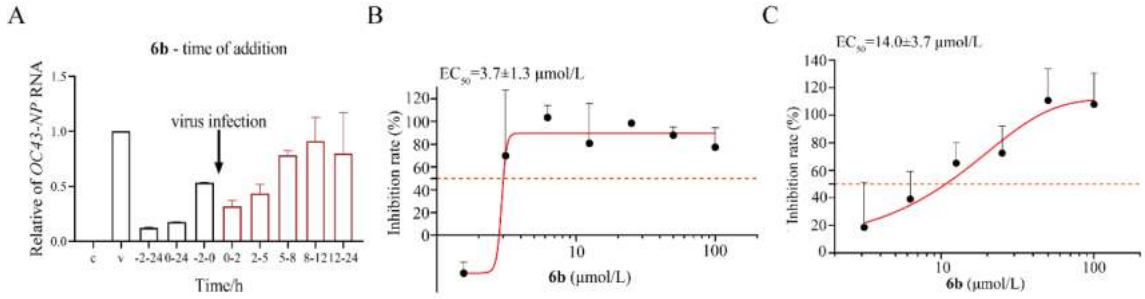


Figure 3 The Time of addition assays of 6b. （A） The time-of-addition experiment. Compound 6b was added at different time points, before or after virus infection. （B）. The viral entry assays. Compound 6b solutions of different concentrations were added 2h after virus infection. （C） The viral attachment assays. Compound 6b solutions of different concentrations and HCoV-OC43 were added at the same time.

5 苦豆碱衍生物抗病毒的直接靶标捕获

鉴于单或双取代的苦豆碱衍生物具有相同的作用机理，我们选择了简单的 12N-单取代苦豆碱作为构建活性苦豆碱探针的药效团。此外，由于苦豆碱结构中没有共价弹头，因此我们根据构效关系分析设计并合成了带有重氮烷基和炔基官能团的光亲和探针 10。正如预期，光亲和探针 10 与 代表性化合物 6b 活性相似，IC_{50} 值为 5.14 μmol·L^{-1}，SI 值 为 6.2，因此被用作活性光亲和探针，利用基于活性的蛋白质分析 （ABPP） 技术捕获此类化合物的直接靶标 （图 4A）。

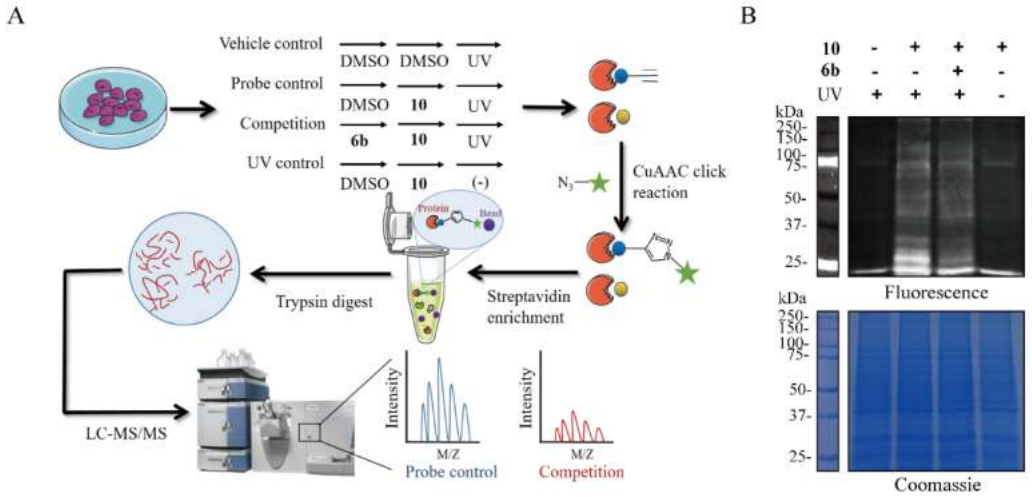


Figure 4 Target fishing of 6b by ABPP. （A） Overall workflow of the ABPP experiment to identify the direct target proteins of 6b. （B） Labeling of proteins under different conditions

基于化合物 6b 可能靶向宿主成分发挥抗病毒活性，我们利用 ABPP 技术将宿主 H460 细胞用于捕获直接靶标蛋白的对象。如图 4D 所示，一共设置了四组实验，包括竞争组和三个对照组 （空白对照组、探针对照组和紫外照射对照组）。探针标记的蛋白质组通过点击化学反应与 Cy3-叠氮化物或生物素-叠氮化物连接，进一步用于后续荧光成像或生物素/链霉亲和素富集蛋白。荧光成像显示，经 6b 预处理后，竞争组 （25-37 和 50-100 kDa 之间的条带） 的荧光强度与探针 10 对照组相比明显减弱，表明探针具有良好的特异性 （图 4B）。通过液相色谱串联质谱 （LC-MS/MS） 分析链霉亲和素磁珠富集的蛋白质组，首先筛选出差异倍数 （fold change） ≥1.5 的蛋白质（探针/竞争组和探针/空白对照组）。根据苦豆碱化合物的作用机制，我们选择了与病毒-宿主相互作用相关的蛋白质，包括跨膜丝氨酸蛋白酶 2 （TMPRSS2）、B 类清道夫受体 1 （SR-B1）、 组织蛋白酶 B （Cat B） 和跨膜蛋白 106B （TMEM106B），作为进一步验证的候选靶标。

Table 2 Related information of the 4 proteins identified by pull-down/LC-MS/MS

Protein names	Gene names	Probe/Vehicle control	Probe/Competition
		Fold change	Fold change
Scavenger receptor class B member 1	SCARB1	192.00413	1.95586
Transmembrane protein 106B	TMEM106B	32.85159	2.32938
Transmembrane protease serine 2	TMPRSS2	2.94104	1.57069
Cathepsin B	CTSB	1.64124	1.73084

6 靶蛋白验证

四个候选靶蛋白分别通过下拉实验 （pull down assay） 进行进一步验证。如图 5A 所示，TMPRSS2 和 SR-B1 都被其特异性抗体成功验证，表明 6b 与这两个蛋白之间存在直接相互作用。随后，在 H460 细胞中进行了细胞热稳定实验 （CESTA），进一步验证了它们的直接相互作用。在温度 40-70℃的条件下， 6b （50 μmol·L^{-1}） 预处理后，TMPRSS2 和 SR-B1 的热稳定性显著增加，这也证明了 6b 与这两种蛋白之间可能存在直接相互作用 （图 5B 和 C ）。此外，我们还利用重组表达蛋白进行了表面等离子共振 （SPR） 测定，以分析 6b 与这两个蛋白之间的亲和力以及每个潜在靶标的贡献。化合物 6b 与 TMPRSS2 和 SR-B1 表现出类似的剂量依赖性相互作用（图 5D 和 E），并且具有一定的结合亲和力，Kd 值分别为 9.17 和 11.54 μmol·L^{-1}。然后利用 Discovery Studio 4.5 软件对 TMPRSS2 和 SR-B1 与 6b 进行了分子对接，对接得分分别为 107 和 108，与实验得到的亲和力数据基本一致。如图 5F 和 5G 所示，相互作用模式表明 6b 不与 TMPRSS2 的催化中心结合，而是与活性中心外的疏水口袋结合。Tyr 431 与 SR-B1 形成萘基的 Pi-Pi 键的 T 形相互作用，苯基与 Val 440 通过 Pi-烷基相互作用。

TMPRSS2 在 SARS-CoV-2 的病毒膜融合过程中起着关键作用[21]，因此我们测定了 6b 对 TMPRSS2 的抑制活性。如图 5H 所示，6b 能显著抑制 TMPRSS2 的活性，IC_{50}值为 1.79 μmol·L^{-1}，从而阻止了病毒的融合和进入。这些结果表明，化合物 6b 可能通过与活性中心邻近的疏水口袋结合，改变蛋白质的构象，而不是直接与催化中心结合，使 TMPRSS2 的功能失活，从而抑制病毒的进入和感染。

同时，SR-B1 是一种高密度脂蛋白 （HDL） 受体，介导细胞与结合的 HDL 颗粒之间的脂质交换[22]，也是丙肝病毒和登革热病毒等多种病毒的细胞受体[23, 24]。最近有报道称，在高密度脂蛋白存在的情况下，SR-B1 可通过血管紧张素转换酶 2 （ACE2） 促进 SARS-CoV-2 的进入，SR-B1 抑制剂可强烈抑制该过程，这表明 SR-B1 作为一种病毒进入阶段的辅助因子，可能是抗击 SARS-CoV-2 的潜在治疗靶点[25, 26]。我们的研究结果表明，6b 可能直接与 SR-B1 结合，协助阻止病毒刺突 S 蛋白与宿主 ACE2 受体结合，从而影响病毒的附着和感染。由于 SR-B1 与高密度脂蛋白的转运密切相关，6b 在抑制病毒进入的同时对脂质代谢的影响正在积极研究中。

为了进一步验证各靶蛋白的贡献，我们通过 siRNA 干扰技术建立了 TMPRSS2 和 SR-B1 基因敲除模型。如图 5I 所示，当 TMPRSS2 或 SR-B1 被敲除时，DMSO 和 6b 处理组之间的 OC43-RdRp RNA 相对水平没有显著差异。这一结果进一步验证了 6b 与 TMPRSS2/SR-B1 之间的相互作用。

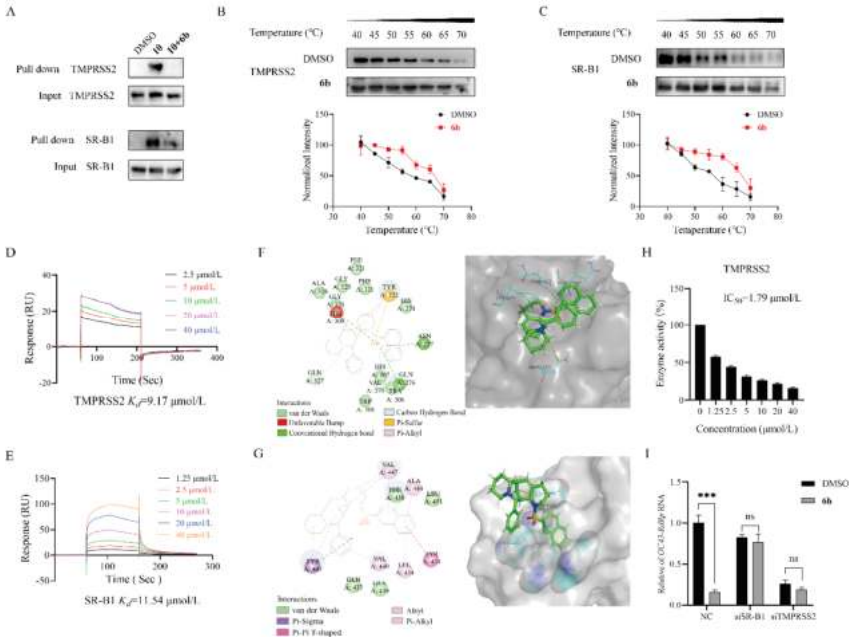


Figure 5 Validation of the candidate proteins. （A） Pull down assays of TMPRSS2 and SR-B1. （B, C） CETSA assays of TMPRSS2 and SR-B1. （D, E） SPR assays performed on TMRPSS2 （PDB ID: 7MEQ） and SR-B1 （PDB ID: 5KTF）. （F, G） 2D modes and solid surface map of TMPRSS2 and SR-B1 interaction pockets with compound 6b. Ligand is colored by element type （N, blue; O, red; C, green; S, yellow）, key bonds are indicated by dashed lines between the atoms involved, and the colors of key bonds and residues are shown according to the interaction mode. （H） Inhibitory activity of 6b on TMPRSS2. （I） Constructions of TMPRSS2 and SR-B1 knock-down model, and relative OC43-RdRp RNA level determination.

小结

我们开发了一种实用有效的合成方法，拓宽了喹唑嗪类生物碱的结构多样性，该方法具有立体选择性和可扩展性。通过磺酰基诱导的 10-α-C-H 键选择性氧化和随后的亲核取代，我们合成了 31 个全新的 10,12-双取代苦豆碱衍生物，并评价了它们对 HCoV-OC43 的抗病毒效果。化合物 6b 的活性最强，通过宿主作用机制阻断了病毒的进入阶段。化学蛋白组学技术表明化合物 6b 直接靶向 TMPRSS2 和 SR-B1 蛋白，抑制病毒的进入和感染。这两种靶蛋白是病毒与宿主 ACE2 受体结合及膜融合的宿主辅助因子。有趣的是，6b 可直接与活性中心而非催化中心邻近的疏水口袋结合，使 TMPRSS2 失活，从而阻止病毒膜融合。我们的研究开发了一类新结构的苦豆碱衍生物，并证明了苦豆碱作为 TMPRSS2 和 SR-B1 双重抑制剂可阻断 HCoV-OC43 的进入过程，为开发针对人类 β-冠状病毒（包括 SARS-CoV-2）的抗病毒候选药物提供了关键的科学数据。

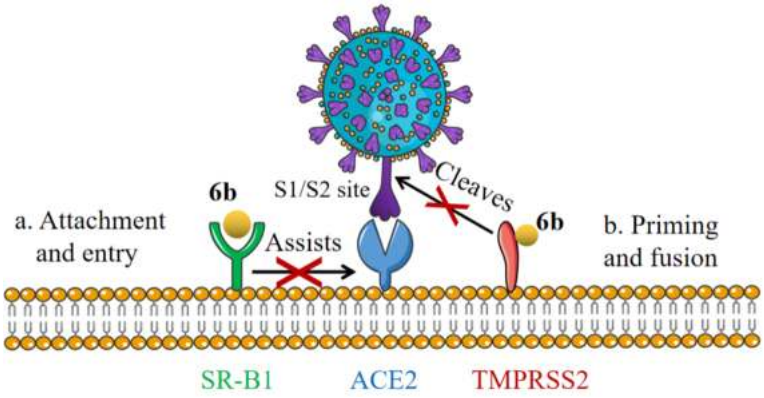


Figure 6 Cartoon diagram of compound 6b as a dual-target inhibitor against human β-coronavirus.

实验方法

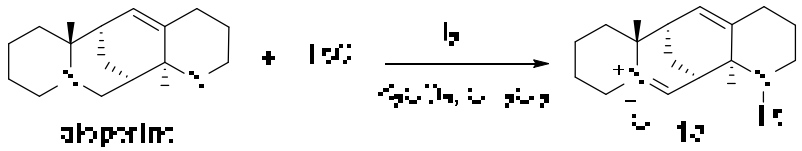
1 化学合成

1.1 仪器与试剂

熔点用 CXM-300 型精密熔点仪测定, 温度未校正; 核磁共振氢谱和碳谱分别采用 Varian Mercury Plus 400（600 MHz）和 Bruker Avance Ⅲ 500（151 MHz）核磁共振仪测定，溶剂均为 DMSO-d_6，TMS 为内标；HR-MS 用 Autospec Ultima-TOF 质谱测定仪测定；Flash 柱分离纯化，用 Combiflash Rf200 快速制备液相；荧光检测用 ZF-20D 暗箱式紫外分析仪；薄层色谱 （TLC） 采用 E-Merck 公司预铺硅胶铝箔卷。所用试剂为 Acros 公司和国产分析纯或化学纯的试剂。

1.2 化学合成

1.2.1 目标化合物 1a 的合成



在 CH_2Cl_2 （100 mL） 中加入苦豆碱（aloperine, 1.16 g, 5.0 mmol·L^{-1}），再加入 K_2CO_3 （2.07 g, 15 mmol·L^{-1}）、I_2 （0.76 g, 3.0 mmol·L^{-1}） 和 TsCl （1.90 g, 10 mmol·L^{-1}），反应混合物在恒温条件下搅拌，并通过 TLC 进行监测。反应结束后，过滤混合物，蒸发滤液，残留物经闪蒸柱层析 （CH_2Cl_2/CH_3OH = 25:1） 纯化，得到粗产物亚胺离子中间体。然后，在 3 N HCl （40 mL） 中加入 Ag_2O （1.2 g，5.17 mmol·L^{-1}），搅拌至无白色沉淀。将粗产物溶于甲醇 （20 mL） 并搅拌 2 小时，过滤混合物，蒸发溶剂，得到黄色固体 **1a** （1.51 g，产率：72%）。

1.2.2 目标化合物 4a-i, 4k-n 和 4r 的合成

将化合物 1a （210 mg，0.5 mmol·L^{-1}） 与 THF （4.0 ml） 混合，在 N_2 下加入格氏试剂 （2.0 mmol·L^{-1}）。混合物在恒温条件下搅拌，并通过 TLC 进行监测。反应完成后，用水淬灭。蒸发混合物，用 CH_2Cl_2 重新溶解，用水和盐水洗涤，用无水 Na_2SO_4 干燥，真空浓缩。残留物经柱层析 （CH_2Cl2/$CH3OH$ = 50:1） 纯化，得到所需的产物，其中一些用 2 N HCl/Et_2O 酸化，得到标题化合物。

1.2.3 目标化合物 4j, 4o-q 和 5a-i 的合成

将化合物 1a （210 mg，0.5 mmol·L^{-1}） 放入装有 THF （3.0 ml） 的密封管中，加入 α-溴酸酯 （0.60 mmol·L^{-1}） 和锌粉 （130 mg，2.0 mmol·L^{-1}）。混合物在 100 ℃下搅拌 6 小时后，过滤混合物，蒸发残留物，然后用 CH_2Cl_2 溶解，用水和盐水洗涤，用无水 Na_2SO_4 干燥，真空浓缩。残留物经柱层析 （CH_2Cl_2/CH_3OH = 50:1） 纯化，得到产物，其中一些用 2 N HCl/Et_2O 酸化，得到标题化合物。

1.2.4 10,12-环苦豆碱 3 的合成

向 THF （20 mL） 中的萘化物 （640 mg，5.0 mmol·L^{-1}） 中加入 Na （100 mg，4.34 mmol·L^{-1}），然后将所得混合物在恒温条件下搅拌 30 分钟，直至溶液变成深绿色。在 -20 ℃的 N_2 下，向上述萘化钠溶液中滴加在 THF（5.0 mL）中的化合物 4o （152 mg，0.5 mmol·L^{-1}）。混合物在 -20 ℃下搅拌 2 小时。反应完成后，将反应物转至恒温，然后用 EtOH （5.0 mL） 淬灭。蒸发混合物，用 CH_2Cl_2 重新溶解，用水和盐水洗涤，用无水 Na_2SO_4 干燥，真空浓缩。残留物经闪蒸色谱纯化，得到 化合物 3 （73.0 mg，产率：54%），为微黄色油状物。

1.2.4 目标化合物 6a-d 的合成

在 CH_2Cl_2（30 mL） 中加入苦豆碱 （464 mg，2 mmol·L^{-1}）、K_2CO_3（828 mg，6.0 mmol·L^{-1}）、I_2（304 mg，1.2 mmol·L^{-1}） 和磺酰氯 （4.0 mmol·L^{-1}）。搅拌反应混合物，并通过 TLC 进行监测。反应结束后，过滤混合物，蒸发滤液，用水和盐水洗涤残留物，用无水 Na_2SO_4 干燥，真空浓缩，得到粗产物，在 N_2 下加入格氏试剂 （5.0 mmol·L^{-1}） 在 THF （15 mL） 中。混合物在恒温条件下搅拌，并通过 TLC 进行监测。反应完成后，用水淬灭。蒸发混合物，用 CH_2Cl_2 重新溶解，用水和盐水洗涤，用无水 Na_2SO_4 干燥，真空浓缩。残留物经柱

层析（CH_2Cl_2/CH_3OH = 50:1）纯化，得到产物，然后用 2 N HCl/Et_2O 酸化，得到标题化合物。

1.2.5 目标化合物 7 的合成

向苦豆碱 （500 mg，2 mmol·L^{-1}） 在无水 CH_2Cl_2 （30ml） 中的溶液中，分别加入 K_2CO_3 （1.8 g，6mmol·L^{-1}） 和取代的苯磺酰氯 （2 mmol·L^{-1}），并在恒温条件下搅拌，直到 TLC 分析显示反应完成。然后过滤混合物，滤液用水 （20 mL） 和盐水 （20 mL） 洗涤，用无水 Na_2SO_4 干燥，过滤并浓缩，得到残留物。以 CH_2Cl_2/CH_3OH 为洗脱剂，在硅胶上进行柱层析纯化，得到白色固体 7（553 mg，产率：64%）。

1.2.6 目标化合物 8 的合成

向化合物 7 （430 mg，1 mmol·L^{-1}） 在无水 THF （10ml） 中的溶液中缓慢加入 $LiAlH_4$ （40 mg，1mmol·L^{-1}），并在 0℃下搅拌，直到 TLC 分析显示反应完成。然后用水 （0.5 mL） 淬灭混合物。蒸发混合物，用 CH_2Cl_2 重新溶解，用水和盐水洗涤，用无水 Na_2SO_4 干燥，真空浓缩。残留物在硅胶上以 CH_2Cl_2/CH_3OH 为洗脱剂进行色谱纯化，得到黄色油状的化合物 8（380 mg，产率：95%）。

1.2.7 目标化合物 9 的合成

向化合物 8 （403 mg，1 mmol·L^{-1}） 、PPh3 和邻苯二甲酰亚胺在无水 THF （10 ml） 中的溶液中缓慢加入 DEAD （40 mg，1 mmol·L^{-1}），并在 0℃的 N_2 下搅拌，直到 TLC 分析显示反应完成。然后用甲醇 （0.5 mL）淬灭混合物，蒸发混合物，得到粗产物。然后向粗产物在 EtOH 中的溶液中加入 4 mL 水合肼，并在 80 ℃下搅拌 3 小时。蒸发混合物，用 CH_2Cl_2 重新溶解，用水和盐水洗涤，用无水 Na_2SO_4 干燥，真空浓缩。残留物在硅胶上以 CH_2Cl_2/CH_3OH 为洗脱剂进行色谱纯化，得到黄色固体化合物 9（289 mg，产率：72%）。

1.2.8 目标化合物 10 的合成

向化合物 9 （401 mg，1 mmol·L^{-1}） 、K_2CO_3（276 mg，2 mmol·L^{-1}） 在 CH_3CN （10 ml）中的溶液中缓慢加入 3-（丁-3-炔-1-基）-3-（2-碘乙基）-3H-噻嗪 （248 mg，1 mmol·L^{-1}），在密封管中于 80℃下搅拌至 48 小时。残留物在硅胶上以 CH_2Cl_2/CH_3OH 为洗脱剂进行色谱纯化，得到微黄色油状物 10 （126.0 mg，产率：24%）。

2 生物实验

2.1 细胞培养

NCI-H460 人肺上皮细胞来自中国医学科学院基础医学研究所（中国北京），培养基为 RPMI 1640（Hyclone），添加 10% FBS （PAN-Seratech） 和 1%青霉素-链霉素 （Hyclone），37 ℃，5% CO_2，湿润环境。

2.2 抗 HCoV-OC43 活性评估

将 H460 细胞接种到 96 孔培养板中，在 5% CO_2、37 ℃ 条件下培养。感染 HCoV-OC43 24 h 后，同时加入含有不同稀释度样品和阳性药物的维持液，同时设置细胞对照孔和病毒对照孔，在 5% CO_2、37 ℃条件下培养。当病毒对照组病变程度 （CPE） 达到 4+ 时，观察各组细胞病变程度，并用 Reed-Muench 法分别计算半数样品对细胞的毒性浓度 （TC_{50}） 和对病毒的半数抑制浓度 （IC_{50}）。

2.3 时间添加实验

在 H460 细胞中对 HCov-OC43 株进行了时间添加实验。加入化合物 6b （25 μmol·L^{-1}），并在感染前 （-1 h）、感染期间 （0 h）和感染后 （+1 h） 各放置 1 h。培养 23 小时后，通过 RT-qPCR 检测病毒感染的抑制作用。实验重复 3 次。

2.4 病毒附着试验

将 H460 细胞接种于 96 孔培养板，在 5% CO_2、37 ℃ 条件下培养。24 小时后，除去培养基，加入含有 HCoV-OC43 （MOI=1） 的维持液和不同浓度的化合物 6b 溶液。在 4 ℃ 下培养 2 小时后，移去培养基，用冷 PBS 冲洗细胞一次。72 小时后用 CCK-8 法测定 OD_{450} 值。

2.5 病毒进入试验

将 H460 细胞接种到 96 孔培养板中，在 5% CO_2、37 ℃ 条件下培养。24 小时后，移去培养基，加入含有 HCoV-OC43 （MOI=1） 的维持液。4 ℃培养 2 小时后，移去培养基，用冷 PBS 冲洗细胞一次，然后加入不同浓度的化合物 6b 溶液。37 ℃孵育 2 小时后，移去溶液，用冷 PBS 冲洗细胞一次。96 小时后用 CCK-8 法测定

OD_{450} 值。

2.6 H460 细胞中的蛋白质标记和下拉试验

用 100 μmol·L^{-1} 的 DMSO 或 6b 处理 660 细胞 （80-90% 融合） 1 小时，然后用 10 μmol·L^{-1} 的探针 10 培养 3 小时。在 365 nm 紫外光下照射 30 分钟后，用 PBS 缓冲液洗涤细胞三次，然后在含有 1% NP-40 和不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂 （Bimake） 的 HEPES 缓冲液 （25 mmol·L^{-1} 1 × HEPES，pH 7.5，150 mmol·L^{-1} NaCl，2 mmol·L^{-1} $MgCl_2$） 中裂解细胞。蛋白定量采用 Bradford 法（Bio-Rad），并通过 Cu（I）-catalyzed click reaction （CuAAC） 用 Cy3-azide 或生物素-azide 标记等量蛋白。标记的蛋白质在 -20 ℃ 下用丙酮沉淀过夜。凝胶电泳后，用 Cy3-azide 标记蛋白质制备的样品进行荧光成像检测。生物素-叠氮标记的蛋白质与链霉亲和素磁珠 （赛默飞科技公司） 孵育以进行富集。用 TBS-T 冲洗五次，再用双蒸水 （ddH_2O） 冲洗三次，然后将磁珠分成两半，用于进一步检测。

进行下拉实验检测时，将磁珠在 1 × SDS 加载缓冲液中加热至 95 ℃10 分钟，以洗脱下拉蛋白，然后对样品进行免疫印迹分析。

2.7 免疫印记分析

收集 H460 细胞，用含有 1% NP-40 和不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂鸡尾酒的 HEPES 缓冲液在冰上裂解 30 分钟。然后将样品离心 （15000 g，15 分钟，4 ℃ ）并收集上清液。用 Bradford 分析法 （Bio-Rad） 测定蛋白质浓度，并调整至相同水平。向样品中加入 5 × 加载缓冲液并煮沸 10 分钟。然后将样品上载到 SDS-PAGE 上，再用 Bio-Rad Turbo 转移系统转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶阻断膜 1 小时，然后用一抗在 4 ° C 孵育过夜，再用 TBST 冲洗 3 次。TMPRSS2 和 Cathepsin B 一抗购自 Abcam，SRB1 购自 Cell Signaling Technology，TMEM106B 购自 Immunoway，β-actin 和 GAPDH 购自 ZSGB-BIO。兔和小鼠二抗购自 ZSGB-BIO。化学发光检测采用 Tanon-5200 化学发光成像系统。

2.8 LC-MS/MS 分析

链霉亲和素磁珠富集的蛋白质组经 LC-MS/MS 鉴定 （北京青莲百奥生物技术有限公司）。数据由 Proteome Discoverer 2.4 处理，蛋白质数据库来自 Uniprot 人类数据库。

2.9 分子建模分析

使用 Discovery Studio 4.5 软件 （BIOVIA, San Diego, California, USA） 进行分子对接研究。TMPRSS2 （PDB ID：7meq） 和 SR-B1 （PDB ID：5KTF） 的三维结构来自 PDB 数据库。蛋白质按默认设置准备，并应用 LibDock 分析分子与配体的相互作用，确定预测结合口袋中的重要氨基酸。

2.10 细胞热稳定试验

在 37 ℃ 下用 50 μmol·L^{-1} 6b 或 DMSO 处理 H460 细胞 6 h，然后用冷 PBS 冲洗三次。将样品分成等量。在 PCR 仪 （Bio-Rad）中设置加热程序，温度递增 5 ℃，每个温度加热 3 分钟。加热后，细胞经冻融循环裂解，离心收集沉淀蛋白。将蛋白质样品溶解在 1 × SDS 上样缓冲液中，然后在 95 ° C 下煮沸 10 分钟，并进行免疫印迹检测。

2.11 表面离子共振检测

SPR 分析是在 Biacore™ T200 生物传感器系统 （GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA） 上进行的。使用胺偶联试剂盒 （GE Healthcare, Uppsala, Sweden） 在 pH 4.0 的条件下将 TMPRSS2 和 SRB1 重组蛋白（华美生物科技有限公司，中国武汉） 固定到 CM5 传感器芯片上。苦豆碱衍生物 6b 溶于含 5% DMSO 的 1 × PBS-P，以 30 μL·min^{-1} 的流速与固定的蛋白质相互作用，接触时间为 120 s，解离时间为 120 s。数据由 Biacore™ T200 评估软件 2.0 （美国 GE Healthcare） 分析。

2.12 TMPRSS2 酶活抑制实验

用荧光底物 BOC-Gln-Ala- Arg-AMC 检测 TMPRSS2 的酶活性。将 TMPRSS2 （320 ng/孔） 用反应缓冲液（50 mmol·L^{-1} Tris-HCL，0.154 mmol·L^{-1} NaCl，pH 8.0） 稀释后放入 96 孔板中，用 6b 或 DMSO 的系列稀释液在 37 ℃ 下处理 30 分钟。然后加入蛋白酶底物 BOC-Gln-Ala-Arg-AMC （最终浓度 10 μmol·L^{-1}），37 ℃ 孵育 1 小时。在 360 nm 的激发波长和 465 nm 的发射波长下测量荧光强度。

2.13 基因敲低实验

使用 Trans-Mate 转染试剂，按照生产商提供的方案用 siRNA 转染 H460 细胞。靶向 TMPRSS2 和 SRB1 的 siRNA 由 JTSBIO Co 提供：

siSR-B1: 5'-GCCUCUACAUGAAAUCUGUTT-3'

siTMRPSS2: 5'-GCCAAGGAAUAGUGGAUGAUU-3'

NC 对照： 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'

转染 48 小时后，用 HCoV-OC43 感染 H460 细胞 （MOI=1），并用 6b （5 μmol·L^{-1}） 或 DMSO 培养 10 小时。

References

[1] WANG P, NAIR M S, LIU L, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7 [J]. Nature, 2021, 593（7857）: 130-5.

[2] FEIKIN D R, HIGDON M M, ABU-RADDAD L J, et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression [J]. Lancet, 2022, 399（10328）: 924-44.

[3] KWONG C H T, MU J, LI S, et al. Reviving chloroquine for anti-SARS-CoV-2 treatment with cucurbit[7]uril-based supramolecular formulation [J]. Chin Chem Lett, 2021, 32（10）: 3019-22.

[4] LIU X, HUUSKONEN S, LAITINEN T, et al. SARS-CoV-2-host proteome interactions for antiviral drug discovery [J]. Mol Syst Biol, 2021, 17（11）: e10396-e.

[5] HEATON S M. Harnessing host-virus evolution in antiviral therapy and immunotherapy [J]. Clin Transl Immunology, 2019, 8（7）: e1067.

[6] GORDON D E, JANG G M, BOUHADDOU M, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing [J]. Nature, 2020, 583（7816）: 459-68.

[7] HUANG T, SUN L, KANG D, et al. Search, Identification, and Design of Effective Antiviral Drugs Against Pandemic Human Coronaviruses [J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1322: 219-60.

[8] XIU S, DICK A, JU H, et al. Inhibitors of SARS-CoV-2 Entry: Current and Future Opportunities [J]. J Med Chem, 2020, 63（21）: 12256-74.

[9] YUAN X, JIANG J S, YANG Y A, et al. Three quinolizidine dimers from the seeds of Sophora alopecuroides and their hepatoprotective activities [J]. Chin Chem Lett, 2022, 33（6）: 2923-7.

[10] WANG R, DENG X, GAO Q, et al. Sophora alopecuroides L.: An ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological review [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 248: 112172.

[11] LI Y, WANG G, LIU J, et al. Quinolizidine alkaloids derivatives from Sophora alopecuroides Linn: Bioactivities, structure-activity relationships and preliminary molecular mechanisms [J]. Eur J Med Chem, 2020, 188: 111972.

[12] YUAN X, LI Z Y, FENG Z M, et al. Alopecuroidines A-C, three matrine-derived alkaloids from the seeds of Sophora alopecuroides [J]. Chin Chem Lett, 2021, 32（12）: 4058-62.

[13] ZHANG X, SHI Y, GUO Z, et al. Clofazimine derivatives as potent broad-spectrum antiviral agents with dual-target mechanism [J]. Eur J Med Chem, 2022, 234: 114209.

[14] ZHANG X, LV X Q, TANG S, et al. Discovery and evolution of aloperine derivatives as a new family of HCV inhibitors with novel mechanism [J]. Eur J Med Chem, 2018, 143: 1053-65.

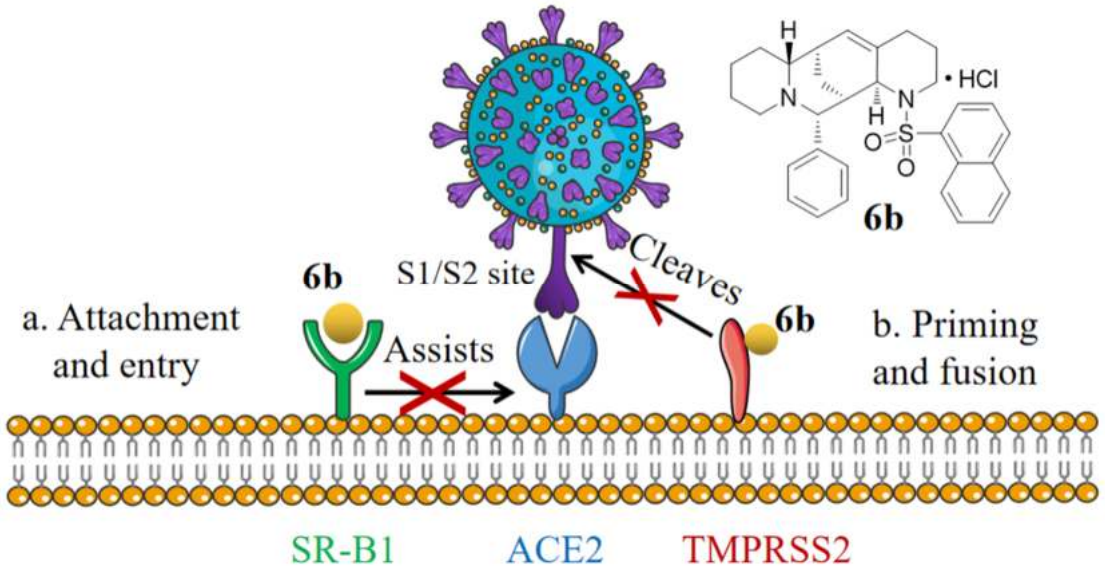
[15] ZHANG X, LIU Q, LI Q, et al. Synthesis and biological evaluation of novel tricyclic matrinic derivatives as potential anti-filovirus agents [J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8（4）: 629-38.

[16] DANG Z, ZHU L, XIE L, et al. Design and Synthesis of Quinolizidine Derivatives as Influenza Virus and HIV-1 Inhibitors [J]. Curr Med Chem, 2021, 28（24）: 4995-5003.

[17] WANG K, WU J-J, XIN Z, et al. Discovery and evolution of 12N-substituted aloperine derivatives as anti-SARS-CoV-2

agents through targeting late entry stage [J]. Bioorg Chem, 2021, 115: 105196-.
[18] ZHOU K S, YI P, YANG T, et al. Ochrocephalamines B-D, Three Alkaloids from Oxytropis ochrocephala Bunge [J]. Org Lett, 2019, 21（13）: 5051-4.
[19] MARUYAMA T, SUGA S, YOSHIDA J I. Distannane mediated reaction of N-acyliminium ion pools with alkyl halides. A chain mechanism involving radical addition followed by electron transfer [J]. Tetrahedron, 2006, 62（27）: 6519-25.
[20] KESHAVARZ VALIAN N, POURAKBARI B, ASNA ASHARI K, et al. Evaluation of human coronavirus OC43 and SARS-COV-2 in children with respiratory tract infection during the COVID-19 pandemic [J]. J Med Virol, 2022, 94（4）: 1450-6.
[21] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor [J]. Cell, 2020, 181（2）: 271-80.e8.
[22] SHEN W J, AZHAR S, KRAEMER F B. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux [J]. Annu Rev Physiol, 2018, 80: 95-116.
[23] LAVIE M, SARRAZIN S, MONTSERRET R, et al. Identification of conserved residues in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 that modulate virus dependence on CD81 and SRB1 entry factors [J]. J Virol, 2014, 88（18）: 10584-97.
[24] ALCALá A C, MARAVILLAS J L, MEZA D, et al. Dengue Virus NS1 Uses Scavenger Receptor B1 as a Cell Receptor in Cultured Cells [J]. J Virol, 2022, 96（5）: e0166421.
[25] WEI C, WAN L, YAN Q, et al. HDL-scavenger receptor B type 1 facilitates SARS-CoV-2 entry [J]. Nat Metab, 2020, 2（12）: 1391-400.
[26] KLUCK G E G, YOO J-A, SAKARYA E H, et al. Good Cholesterol Gone Bad? HDL and COVID-19 [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22（19）: 10182.

图形摘要



.

药用辅料聚乙二醇 6000 中醛类测定方法的比较研究

石蓉[1]，谢莹莹[2*]，郑金凤[1]，张悦[1]，尹林高[1]，刘雁鸣[1]

（1.湖南省药品检验检测研究院，国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙 410001；2.湖南省药品审核查验中心,长沙 410001）

【摘要】目的：探寻药用辅料聚乙二醇 6000 最有效的醛类控制方法，为其质量标准制修订提供参考和依据。**方法**：采用法定标准变色酸法测定聚乙二醇 6000 中甲醛含量，建立 DNPH 柱前衍生-高效液相色谱法测定聚乙二醇 6000 中甲醛、乙醛含量，采用酚试剂法测定聚乙二醇 6000 中总醛含量，并对样品测定结果进行比较。**结果**:法定标准变色酸法易受样品干扰，影响显色，造成甲醛测定结果低于实际含量；建立的 DNPH 柱前衍生-高效液相色谱法检出限低，方法准确度和重复性均良好；酚试剂法操作简便，可用于聚乙二醇 6000 中总醛含量测定。**结论**：DNPH 柱前衍生-HPLC 法不受样品干扰，测定结果更为准确，可以用于聚乙二醇 6000 的甲醛、乙醛定量分析，结合酚试剂测定总醛含量，可以从总体上控制聚乙二醇 6000 的醛类物质。

【关键词】聚乙二醇 6000；变色酸法；DNPH 柱前衍生-高效液相色谱法；酚试剂法；甲醛；乙醛；总醛

The Comparative Study of Methods for Determination of Aldehydes in Pharmaceutical Excipient Polyethylene Glycol 6000

SHI Rong[1], XIE Yingying[2*],ZHENG Jinfeng[1], ZHANG Yue[1],YIN Lingao[1],LIU Yanming[1]

(1.Hunan Institute for Drug Control， NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha ,410001,China；2.Hunan Drug Inspection Center ,Changsha ,410001,China)

【Abstract】Objective: To explore the most effective aldehydes control method for pharmaceutical excipients polyethylene glycol 6000, and provide reference and basis for the revision of its quality standard. **Methods:**The content of formaldehyde in polyethylene glycol 6000 was determined by the chromotropic acid method listed in the statutory standard, the content of formaldehyde and acetaldehyde in polyethylene glycol 6000 were determined by high performance liquid chromatography with DNPH pre-column derivatization,and the content of total aldehyde in polyethylene glycol 6000 was determined by phenol reagent method,all results of sample determination by three methods were compared.**Results:**The discoloration acid method listed in the statutory standard was easy to be interfered by the sample , which affects the color development, resulting in the formaldehyde determination results lower than the actual content；The established method with DNPH pre-column derivation by HPLC had low detection limit、good accuracy and repeatability;The phenol reagent method is simple and can be used for the determination of total aldehyde content in polyethylene glycol 6000. **Conclusion:**The HPLC method with DNPH pre-column derivation was free from sample interference, and the results of content determination were more accurate, it can be used for quantitative analysis of formaldehyde and acetaldehyde of polyethylene glycol 6000, by which the aldehydes of polyethylene glycol 6000 can be controlled on the whole combined with phenol reagent method to determine the total aldehyde content.

基金项目：湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目（2021JJ80044）

作者简介：石蓉，硕士研究生，主管药师。研究方向：药品和药用辅料。E-mail：343314868@qq.com。

通讯作者：谢莹莹，本科，工程师。主要从事药用辅料检验检测，E-mail：276468687@qq.com。

【Key words】Polyethylene glycol 6000; Chromic acid method; HPLC method with DNPH pre-column derivation; Phenol reagent method; Formaldehyde; Acetaldehyde; Total aldehyde

聚乙二醇 6000 是一种无毒、无刺激性的水溶性高分子聚合物，广泛应用于各种药物制剂中[1]。聚乙二醇 6000 作为药用辅料主要应用于口服和外用制剂，可作为软膏、栓剂的基质，片剂、胶囊剂的润滑剂，增塑剂等[2]。聚乙二醇 6000 现收载于《中华人民共和国药典》（简称《中国药典》）2020 年版四部[3]。目前国内生产企业基本采用乙二醇或二甘醇为起始原料，在碱土金属催化剂的作用下与环氧乙烷聚合生产聚乙二醇 6000[4-5]。由于该聚合物由多个氧乙烯基组成线性链状结构，两端各有 1 个羟基，其自氧化过程会发生不同程度的断裂，产生醛类小分子物质，主要为甲醛和乙醛[6-7]。甲醛、乙醛化学性质活泼，可与核酸、蛋白质等发生交联，促进蛋白质羰基化，导致机体应激反应和损伤，从而诱发多种疾病产生，目前已分别被国际癌症研究组织认定为Ⅰ类、2B 类致癌物[8]。《中国药典》2020 版四部标准采用变色酸法对聚乙二醇 6000 的甲醛含量进行控制。GB /T 14571.3-2008《工业用乙二醇中醛含量的测定-分光光度法》中采用酚试剂法测定乙二醇中总醛含量[9]。现有文献中对低分子醛测定有多种方法，其中 2，4 二硝基苯肼（以下称 DNPH）柱前衍生-高效液相色谱法应用广泛[10-17]。故本研究通过采用变色酸法测定聚乙二醇 6000 中甲醛含量，建立 DNPH 柱前衍生-高效液相色谱法测定聚乙二醇 6000 中甲醛、乙醛含量，参考 GB14571.3-2008 采用酚试剂法测定聚乙二醇 6000 中总醛含量这三种方法的比较研究，对药用辅料聚乙二醇 6000 醛类测定的标准制修订提供参考和依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪、PDA 检测器、LC-Slution 数据工作站；AUW220D 型电子天平，UV-2550 型紫外分光光度计（均来自岛津有限公司）。

1.2 试药

盐酸、硫酸和氨基磺酸，分析纯，购自国药试剂有限公司；3-甲基-2-苯并噻唑啉酮腙盐酸盐水合物（MBTH）、六水合三氯化铁，分析纯，购自阿拉丁；乙腈，色谱纯，购自默克公司；变色酸钠，分析纯，2，4-二硝基苯肼，HPLC 级（批号为 C10563969、纯度为 98 %），购自上海麦克林生化科技有限公司；水中甲醛溶液标准物质批号为 20211208、浓度为 10 mg/mL；乙醛对照品（批号为 22040034 、纯度为 99.7 %），均购自坛墨质检-标准物质中心。

2 方法与结果

2.1 变色酸法

参照《中国药典》2020 版四部聚乙二醇 6000 各论下甲醛项[3]测定方法进行试验，在 567 nm 波长下测定供试品溶液和对照溶液吸光度，用同法操作的空白溶液进行校正。根据吸光度以外标法计算样品中甲醛含量。

2.1.1 专属性

分别制备甲醛对照溶液、乙醛对照溶液进行实验。用空白溶液校正后，结果甲醛对照溶液吸光度为 0.468，乙醛对照溶液吸光度为 0.002，说明该方法只能测定甲醛，专属性好。

2.2 DNPH 柱前衍生-高效液相色谱法

2.2.1 色谱条件　采用 Waters XBridge C18 色谱柱(5μm, 4.6 mm×250 mm)，以乙腈-水（60:40）为流动相等度洗脱 20 min，检测波长为 360 nm，流速 1.0 mL/min，进样体积 10 μL，柱温 35℃。

2.2.2 溶液的制备　衍生化溶液：取经重结晶纯化后的 2,4-二硝基苯肼 0.25 g，精密称定，置 50 ml 棕色量瓶中，加入 20 mL 乙腈涡旋使部分溶解，再加入 3 mL 盐酸迅速涡旋混匀，超声使溶解，用乙腈稀释至刻度，临用新制。

供试品溶液：取样品 0.5 g，精密称定，置 10 mL 棕色量瓶中，加入 1 mL 乙腈，涡旋使样品溶解后，加入 2 mL 衍生化溶液，涡旋混匀，30℃静置 15 min，用乙腈稀释至刻度，摇匀，用 0.22 μm 有机滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液。空白溶液：不加样品，按供试品溶液同法操作。

对照溶液：精密称取乙醛对照品 0.05 g，置 10 mL 量瓶，加乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，即得乙醛贮备液。分别精密量取甲醛标准溶液 0.1 mL，乙醛贮备液 1 mL，置同一 100 mL 量瓶，加乙腈稀释至刻度，摇匀，即得对照混标贮备溶液。精密量取对照混标溶液 1 mL，置 10 mL 棕色量瓶中，自“加入 2 mL 衍生化溶液…”按供试品溶液同法操作。

线性系列标准溶液：分别精密量取甲醛标准溶液 0.4 mL，乙醛贮备液 4 mL，置同一 100 mL 量瓶，加乙腈稀释至刻度，摇匀，即得标准曲线贮备溶液。精密量取标准曲线贮备溶液适量，自“加入 2 mL 衍生化溶液…”，按供试品溶液同法操作，得到线性系列标准工作溶液，详见表 1。

表 1 线性系列标准工作溶液（μg/mL）

组分	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8
甲醛	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0	4.0
乙醛	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	10.0	20.0

2.2.3 专属性试验　精密量取空白、供试品和对照品溶液各 10 μL 进样，记录色谱图，详见图 1。结果空白溶液对测定无干扰，供试品色谱图中甲醛-DNPH、乙醛-DNPH 峰保留时间与对照品主峰保留时间一致。

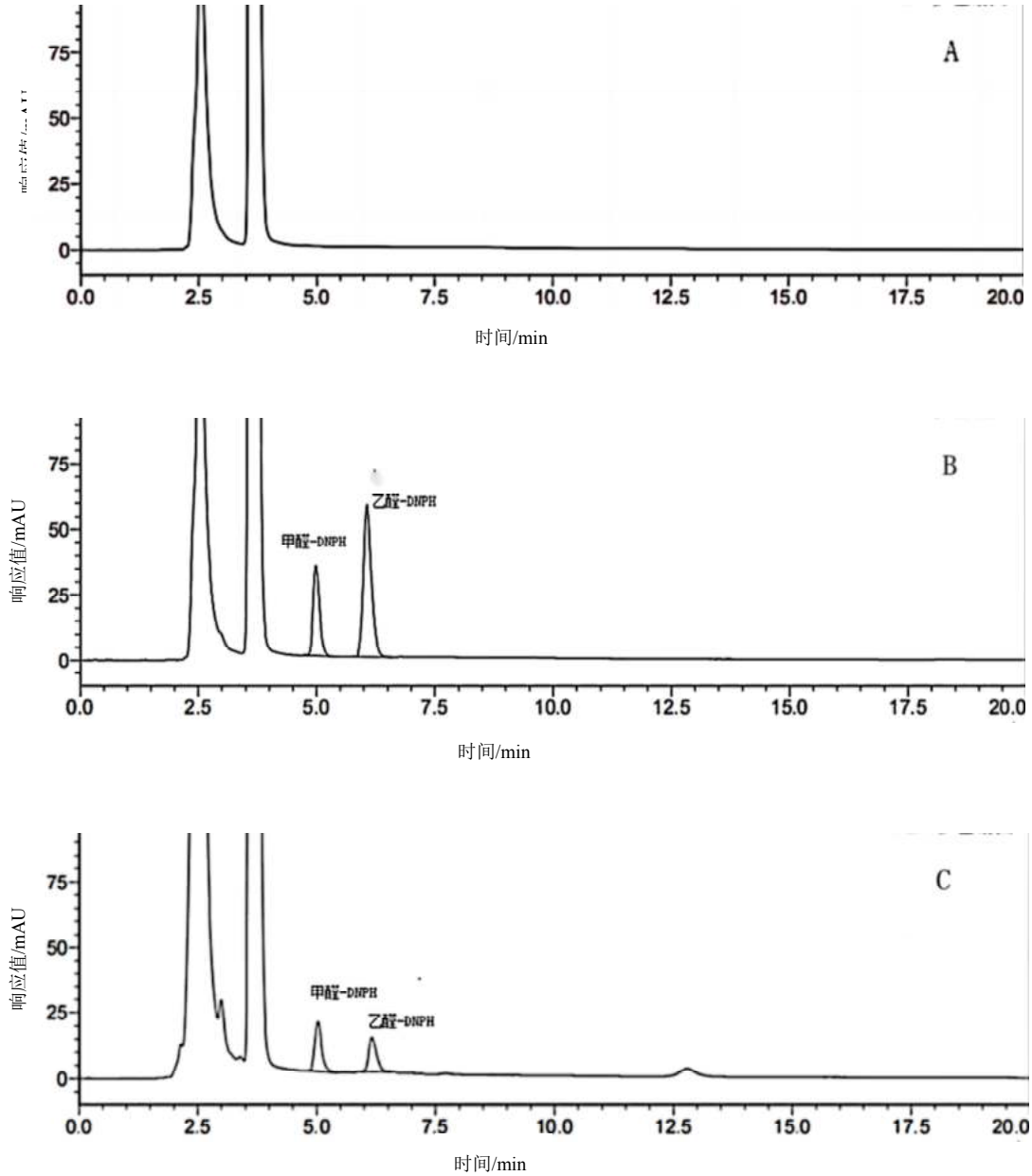


图 1 空白溶剂(A)、对照品(B)、供试品(C)溶液色谱图

2.2.4 线性关系、检出限、定量限、精密度与重复性试验　精密量取线性系列标准工作溶液各 10 μL 进样，以浓度为 X 轴，峰面积为 Y 轴，绘制线性标准曲线。精密量取 STD1 溶液 1 mL 置 10mL 量瓶，加乙腈稀释至刻度，摇匀，即得检出限溶液。取上述溶液 10 μL 进样，分别按 S/N=3、，S/N=10 计算检测限和定量限。取 STD 6 溶液，重复进样 6 次，计算峰面积 RSD。取同一批样品按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，进行重复性试验，结果详见表 2。

表 2 标准曲线、检出限、定量限、重复性与精密度试验结果

组分	线性范围/（μg/mL)	标准曲线方程	r	检出限/%	定量限/%	重复性 RSD/%	精密度 RSD/%
甲醛	0.1～4.0	Y=350 500X-2 745.2	1.000	0.000 005	0.000 02	0.94	0.28
乙醛	0.5～20.0	Y = 244 691X - 4 691	1.000	0.000 008	0.000 02	0.69	0.04
总醛	0.1~1.0	Y=1.503X-0.002	1.000	0.000 03	0.000 1	3.93	/

2.2.5 稳定性试验　取样品（自编号：J6）和对照贮备溶液适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液和对照溶液，于室温放置 0、2、4、8 h，分别取样 10 μL 测定，以峰面积为考察指标，结果供试品溶液中甲醛-DNPH、乙醛-DNPH 峰面积的 RSD 分别为 0.86 %、0.62 %，对照溶液中甲醛-DNPH、乙醛-DNPH 峰面积的 RSD 分别为 1.55 %、0.31 %，说明供试品溶液和对照溶液在 8 h 内稳定。

2.2.6 回收率试验　分别精密量取甲醛标准溶液 1 mL，乙醛贮备液 2 mL，置同一 100 mL 量瓶，加乙腈稀释至刻度，摇匀，精密量取上述溶液 1 mL，置 20 mL 量瓶，加乙腈稀释至刻度，摇匀，即得回收标准溶液。取样品（自编号：J6）0.5 g，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加入 1 mL 回收标准溶液，按“2.2”项下方法，自“加入 2 mL 衍生化溶液…”同供试品操作，平行制备 6 份溶液。分别取样 10 μL 测定并计算回收率，结果甲醛、乙醛平均回收率依次为：98.16 %、95.54 %，RSD 依次为 2.0 %、1.2 %。说明方法的准确度良好。

2.3 酚试剂法

2.3.1 测定方法　参照 GB/T 14571.3-2008《工业用乙二醇中醛含量的测定-分光光度法》中酚试剂法[9]测定聚乙二醇 6000 中总醛。在 620 nm 处测定供试品溶液和标准曲线溶液吸光度，用同法操作的空白溶液进行校正，根据吸光度以标准曲线法计算样品中总醛含量。

2.3.2 线性关系、检出限、定量限和重复性试验　取标准曲线系列溶液（0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.4 μg/mL、0.6 μg/mL、0.8 μg/mL、1.0 μg/mL），依法测定吸光度，以浓度为 X 轴，吸光度为 Y 轴，绘制线性标准曲线。取空白溶液，依法重复测定 7 次，计算 SD 值，以 3SD/标曲斜率，计算检出限，以 10 SD/标曲斜率，计算定量限。取样品（自编号：J15）按供试品溶液同法操作，平行制备 6 份供试品溶液，依法测定，结果详见表 2。

2.3.3 加标回收试验　取样品（自编号：J15）0.2 g，精密称定，置 9 个不同 50 ml 量瓶中，9 份样品分为三组，分别加入 0.8mL、1.0mL、1.2mL 对照贮备溶液，按“2.3.1”供试品溶液同法操作，即得加标回收溶液。取回收溶液 9 份，依法测定，结果低、中、高浓度水平的平均回收率分别为 95.09 %、99.18 %、96.01 %，RSD 分别为 0.66 %、0.78 %、0.85 %，方法准确度良好。

2.4 样品测定

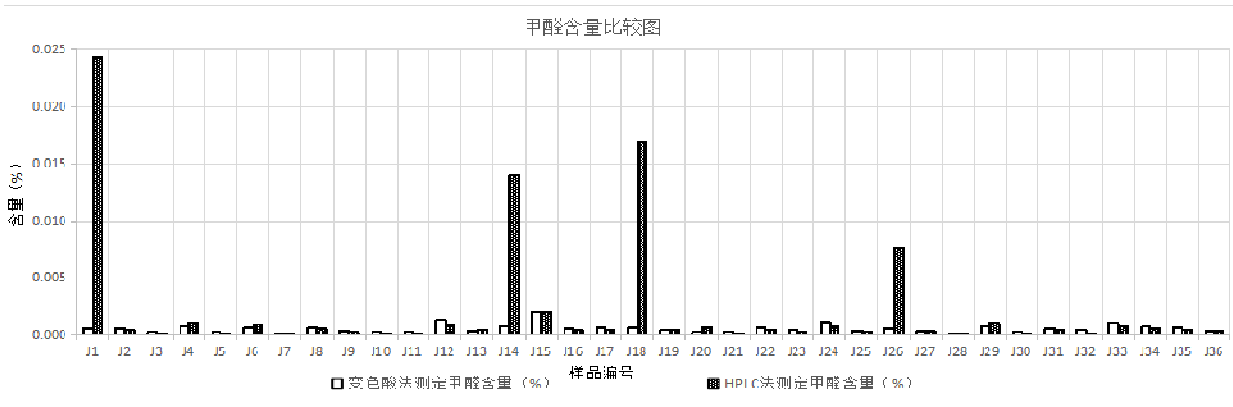
2.4.1 样品来源　共收集到 36 批样品（为国家药品计划抽验品种聚乙二醇 6000 样品，均为药用辅料级），来自 7 家生产企业，详细信息见表 3。

2.4.2 样品测定结果比较　分别采用以上三种方法，对 36 批聚乙二醇 6000 样品进行测定，结果详见表 3 聚乙二醇 6000 中醛含量测定结果比较表、图 2 变色酸法和高效液相色谱法测定甲醛含量比较图和图 3 酚试剂法测定总醛含量和高效液相色谱法测定甲醛、乙醛总量比较图。从以上图表可知，按变色酸法测定，36 批样品中甲醛含量为 0.00013 %～0.00205 %，均小于法定检验限度（0.003 %）,符合规定。按高效液相色谱法测定，36 批样品中甲醛含量为 0.00005 %～0.02427 %，乙醛含量为 0.00044 %～0.02321 %，有 4 批样品（编号：J1、J14、J18 和 J26）的甲醛测定结果远超法定限度。按酚试剂法测定，36 批样品中总醛含量为 0.00107 %～0.05275 %。

表 3 聚乙二醇 6000 醛含量测定结果比较表

编号（NO.）	批号	变色酸法	高效液相色谱法（HPLC）			酚试剂法(MBTH)
		甲醛含量/%	甲醛含量/%	乙醛含量/%	甲醛、乙醛总量/%	总醛含量/%
J1	20210104	0.000 56	0.024 27	0.000 69	0.024 96	0.052 28
J2	20211003	0.000 54	0.000 42	0.004 05	0.004 47	0.004 85

J3	20210703	0.000 22	0.000 08	0.000 44	0.000 52	0.001 07
J4	20210201	0.000 79	0.001 07	0.000 58	0.001 65	0.002 64
J5	103320211106	0.000 22	0.000 20	0.001 80	0.002 00	0.002 05
J6	20210801	0.000 66	0.000 97	0.000 95	0.001 92	0.003 05
J7	103320210305	0.000 16	0.000 05	0.001 66	0.001 71	0.001 13
J8	20210904	0.000 62	0.000 53	0.000 77	0.001 30	0.003 21
J9	FS211009174	0.000 33	0.000 22	0.020 02	0.020 24	0.021 77
J10	FS210322067	0.000 29	0.000 08	0.021 54	0.021 62	0.021 23
J11	103320211104	0.000 24	0.000 16	0.001 50	0.001 66	0.001 56
J12	20201106B-2	0.001 30	0.000 84	0.001 11	0.001 95	0.002 80
J13	FS210802127	0.000 36	0.000 47	0.015 87	0.016 34	0.015 54
J14	20210701B-1	0.000 79	0.014 10	0.000 48	0.014 58	0.031 07
J15	20201205B-2	0.002 05	0.002 08	0.000 50	0.002 58	0.005 34
J16	20210903	0.000 57	0.000 42	0.003 96	0.004 38	0.004 49
J17	20201205A-1	0.000 64	0.000 49	0.000 50	0.000 99	0.001 35
J18	20210802B-1	0.000 62	0.016 91	0.000 63	0.017 54	0.052 75
J19	HTFP2021102	0.000 44	0.000 46	0.003 51	0.003 97	0.003 45
J20	FS210802127	0.000 24	0.000 67	0.014 88	0.015 55	0.011 65
J21	103320211104	0.000 31	0.000 16	0.001 54	0.001 70	0.001 82
J22	PL20211003	0.000 65	0.000 50	0.004 83	0.005 33	0.004 45
J23	20210901B-1	0.000 46	0.000 31	0.000 83	0.001 14	0.001 47
J24	20210402B-1	0.001 12	0.000 76	0.000 71	0.001 47	0.002 54
J25	FS211207224	0.000 40	0.000 27	0.018 61	0.018 88	0.015 96
J26	HTFF2021122	0.000 56	0.007 69	0.013 51	0.021 20	0.038 80
J27	FS211101195	0.000 32	0.000 33	0.019 00	0.019 33	0.015 02
J28	103320211104	0.000 13	0.000 18	0.001 55	0.001 73	0.001 99
J29	20210801	0.000 74	0.001 06	0.000 94	0.002 00	0.004 25
J30	103320211202	0.000 22	0.000 18	0.001 68	0.001 86	0.001 47
J31	20201106B-1	0.000 57	0.000 51	0.001 64	0.002 15	0.002 75
J32	20211201	0.000 45	0.000 20	0.004 34	0.004 54	0.003 90
J33	FS211101195	0.001 06	0.000 79	0.023 21	0.024 00	0.019 55
J34	20201103	0.000 72	0.000 60	0.002 28	0.002 88	0.003 43
J35	20211101	0.000 70	0.000 49	0.004 13	0.004 62	0.005 14
J36	FS211101188	0.000 33	0.000 34	0.019 32	0.019 66	0.014 71



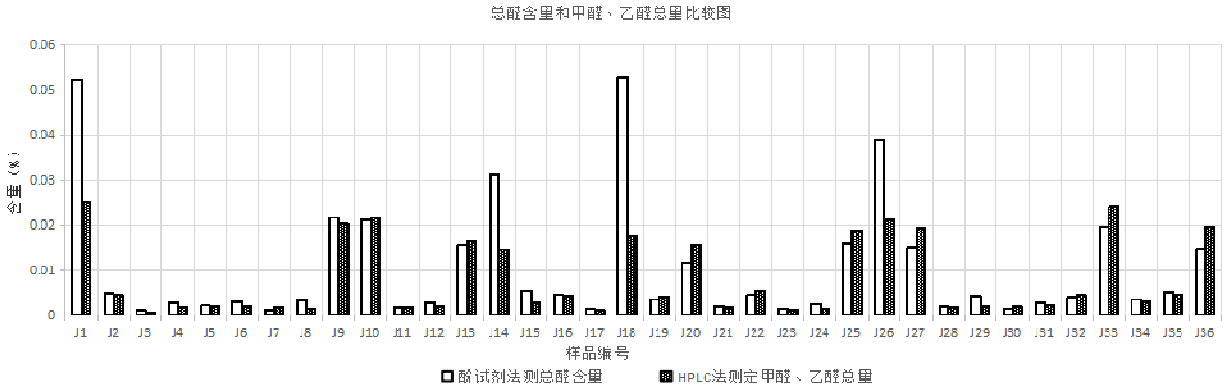


图 2 变色酸法和 HPLC 法测定甲醛含量比较图

图 3 酚试剂法测定总醛含量和高效液相色谱法测定甲醛、乙醛总量比较图

为分析 J1、J14、J18（来自 A 企业）和 J26（来自 B 企业）这 4 批样品两种方法甲醛测定结果不一致的原因，取样品 J1、J26 和 J5（来自 C 企业，含量小于 0.003 %）各 1 g，精密称定，分别加入 1 mL 甲醛溶液（30 μg/mL），按变色酸法制备样品加标回收溶液，在 400～700 nm 紫外波长范围进行扫描。结果显示，样品 J1、J26 均对标准溶液的显色有干扰，样品加标溶液在 567 nm 处无最大吸收，而来自 C 企业的 J5 样品对标准溶液的显色无干扰，样品加标溶液在 567 nm 处有有最大吸收。

3 讨论

3.1 三种醛类测定方法比较

本文对聚乙二醇 6000 中醛类测定方法进行了比较，结果表明除 J1、J14、J18 和 J26 这 4 批样品外，变色酸法与高效液相色谱法测定的甲醛含量，高效液相色谱法法测定的甲醛、乙醛总量和酚试剂法测定的总醛含量基本一致。

变色酸法是法定标准，该方法中变色酸和甲醛以浓硫酸为介质，生成紫色络合物，专属性好，但是该方法易受样品基质干扰，当样品中含有干扰显色物质时，比如其他醛类或杂质，样品在目的波长无最大吸收，造成甲醛含量测定结果远低于其实际含量。本文建立的 DNPH 柱前衍生 HPLC 法简便易操作，方法学验证结果表明本方法可行，可用于聚乙二醇 6000 中甲醛、乙醛含量测定。酚试剂法测定总醛含量的方法学验证结果符合要求，J1、J14、J18 和 J26 这 4 批样品总醛测定结果均高于与 HPLC 法测定甲醛、乙醛总量。推测可能是该 4 批样品中含有其他醛类，导致测定结果偏高。故三种醛类测定方法中，通过 HPLC 测定聚乙二醇 6000 中甲醛、乙醛含量不受样品干扰，测定结果更为准确，可以作为甲醛、乙醛定量分析，结合酚试剂测定总醛含量，可以从总体上控制药用辅料聚乙二醇 6000 的醛类物质。

3.2 衍生化条件考察

采用 DNPH 柱前衍生法进行样品处理，关键在于衍生液和衍生化过程。有文献报道 2，4-二硝基苯肼本身会带来甲醛、乙醛干扰，本文购买 HPLC 级 2，4-二硝基苯肼，通过重结晶纯化(称取 2，4-二硝基苯肼 5 g，置圆底烧瓶中，加入 100 mL 乙腈，90℃水浴加热 60 min 使溶解，60℃水浴中结晶，直到得到较大结晶，弃去上清液，用乙腈清洗结晶 3 次，105℃干燥即得)，经过空白试验验证，可排除干扰。同时，衍生液应临用新制，比较配制后 1 个小时内和 8 小时后的衍生液处理样品和对照溶液。样品中的甲醛、乙醛含量分别下降 12.20 %和 11.14 %，对照溶液中的甲醛、乙醛含量分别下降 7.05 %和 8.21 %。衍生温度和时间对衍生结果也有一定影响，分别考察 30℃、40℃和 50℃三个温度梯度，结果显示同一反应时长下，随着温度增高，对照溶液中甲醛、乙醛含量呈下降趋势。

参考文献

[1] 朱英.聚乙二醇的应用概况[J].浙江中医学院学报,2004(02):75-76

[2] 汪多仁.聚乙二醇的应用与合成进展[J].化学工业与工程技术,2000(05):21-23.
[3] 中华人民共和国药典.四部[S]. 2020 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020：802-803.
[4] 谢富春,朱长春,张玉清.聚乙二醇合成工艺[J].化学推进剂与高分子材料，2005(04):6-9.
[5] 绪国梅,郭振,李晓光,等.聚乙二醇 6000 的精制方法研究[J].化工时刊，2019,33(2)：56
[6] SHARMA A . Effect of Residual Reactive Impurities in Excipients on the Stability of Pharmaceutical Products[M]. John Wiley & Sons, Ltd, 2019.
[7] PAYNE M,KAREEM O,WILLIAMS-PAVLANTOS K , et al. Mass spectrometry investigation into the oxidative degradation of poly(ethylene glycol)[J]. Polymer Degradation and Stability, 2021(183-):183.
[8] 冯秒. 基于新型衍生化方法的小分子醛类检测[D].武汉理工大学,2020.
[9] GB14571.3-2008,《工业用乙二醇中醛含量的测定-分光光度法》[S]. 2008 年：1-3.
[10] 叶坚,王娴,余涛.二硝基苯肼柱前衍生-HPLC 法测定水中微量甲醛和乙醛[J].环境卫生学杂志,2013,3(04):361-363.
[11] 马贺伟.低分子醛酮类物质的 GC-MS 测定[J].皮革科学与工程,2015,25(06):58-61.
[12] 张朝阳,汤清娟,许凯,等.柱前衍生化 HPLC 法测定聚乙二醇 400 中的甲醛[J].中国药品标准,2017,18(6):465
[13] 马庆国,徐锦宏,贺伟,等.2,4 二硝基苯肼衍生化甲醛条件探讨[J].山东化工,2018,47(21):15-17
[14] 李颖,赵浩军,刘飞,等..2,4-二硝基苯肼柱前衍生-高效液相色谱法测定水中的微量乙醛[J].食品安全质量检测学报,2019,10(16):5523-5527.
[15] 王晓锋,王珏,宋晓松,等...HPLC 柱前衍生化法测定聚山梨酯类辅料中醛类物质及其与过氧化值的相关性研究[J].中国药学杂志,2018,53(14):1222-1229.
[16] 江颖,王珏,许凯,等.HPLC 柱前衍生化法测定药用辅料中甲醛、乙醛时空白干扰的探索及方法优化[J].药物分析杂志,2020,40(11):2062-2069.
[17] 顾晓风,杨袁,郝刚,等.柱前衍生高效液相色谱法测定尼莫地平注射液中的甲醛和乙醛[J].化学分析计量,2022,31(01):41-44.

在药学监护和咨询中发现的重症监护病房肝移植受者的药物相关问题：以提高医疗保健质量

石晓萍[1]，老东辉[1]，王菁[2]，吕迁洲[1]，李晓宇[1]，许青[1]

（1. 复旦大学附属中山医院药剂科　上海 200032；2. 上海交通大学医学院附属同仁医院药学部）

【摘要】目的：在重症监护室（intensive care unit, ICU）的肝移植受者（liver transplant recipients, LTRs）可能因为接受多种药物治疗以及复杂的医疗护理存在药物相关问题（drug-related problems, DRPs）。本研究旨在识别 ICU 中 LTRs 的 DRPs，确定药师干预的潜在影响，评估医生和药师在管理 LTRs 药物治疗方面的经验。**方法：**从 2020 年 1 月至 2021 年 12 月，对在药学监护和咨询过程中确定的 DRPs 进行调查，比较和分析 DRPs 的类型和原因。两名药师根据解决 DRPs 对 LTRs 治疗的潜在影响，以六分制标准独立评审药师的干预措施。**结果：**药师在药学监护期间共检测到 97 个 DRPs，常见类型是“（可能）发生药物不良事件”（51.5%）和“有未治疗的症状或适应症”（24.7%）。分析 DRPs 原因，显示“药物选择”所占比例最高。然而，原因最多样化的问题是“药物不良事件”以及“治疗效果不佳”，分别有 10 个和 8 个原因。对于药学咨询，药师共确定 114 个 DRPs，64.0%与抗感染药物有关。医生更关注“治疗有效性和安全性”，需要药师提供“额外的药物信息”或倾向咨询药师有关“药物组合”或“肾或肝功能不全时药物剂量调整”的问题。在药学监护和咨询过程中，分别有 64.0%和 52.6%的干预措施被评为“重要”，1.0%和 1.0%被评为“极为重要”。**结论：**药师能够识别并解决 ICU 中 LTRs 的 DRPs，干预措施对 LTRs 的药学护理具有积极影响。在肝移植护理团队中，医生和药师知识体系的互补，有利于保证用药的安全、可靠。

【关键词】药物相关问题；肝移植；重症监护；药学监护；药物咨询

Drug-related problems in liver transplant recipients in the intensive care unit identified during pharmaceutical care and drug consultation: to improve the quality of healthcare

Xiaoping Shi[1], Donghui Lao[1], Jing Wang[2], Qianzhou Lv[1], Xiaoyu Li[1*], Qing Xu[1]

1 Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital, Fudan University

2 Department of Pharmacy, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

【Abstract】 Objectives: Liver transplant recipients （LTRs） in the intensive care unit （ICU） may have drug-related problems （DRPs） by receiving multiple medications and complex medical care. To identify DRPs in LTRs, determine the potential impact of pharmacist interventions, and follow up on the experiences of physicians and pharmacists in managing drug therapy in LTRs. **Methods:** From January 2020 to December 2021, DRPs identified during pharmaceutical care and drug consultation were investigated to compare and analyze the types and causes of DRPs. Two pharmacists independently reviewed the pharmacist interventions on a six-point scale based on the potential impact of

第一作者：石晓萍，shi.xiaoping@zs-hospital.sh.cn，13651887033

通信作者：许青，xu.qing@zs-hospital.sh.cn，13916708028

resolving DRPs on treating LTRs. **Results:** Pharmacists identified 97 DRPs during pharmaceutical care with common "adverse drug event occurring" （51.5%） and "untreated symptoms or indication" （24.7%）. The analysis of the causes of DRPs showed that "drug selection" accounted for the highest proportion. However, the problems with the most diverse causes were "adverse drug event" and "effect of drug treatment not optimal," with 10 and 8 reasons, respectively. For drug consultation, pharmacists identified 114 DRPs, 64.0% related to an-infectives drugs. Physicians were more concerned about "treatment effectiveness and safety," requiring supplementary drug information from pharmacists, or were inclined to consult pharmacists about "appropriate combination of drugs" or "dose adjustment of renal or liver insufficiency." During pharmaceutical care and drug consultation, 64.0% and 52.6% of interventions were rated as "significant," 1.0% and 1.0% as "extremely significant," respectively. **Conclusion:** Pharmacists can identify and resolve DRPs in LTRs in the ICU, and the interventions positively impact LTRs. In the liver transplant care team, the complementary knowledge systems of physicians and pharmacists are conducive to ensuring the safety and reliability of medication.

【**Key words**】drug-related problems, liver transplant, critical care, pharmaceutical care, drug consultation

1 介绍

肝移植是终末期肝病及肝脏肿瘤的有效治疗方法。围手术期肝移植受者（liver transplant recipients, LTRs）和再入院的危重 LTRs 在重症监护室（intensive care unit, ICU）接受治疗，需要密切监测药物治疗方案。LTRs 不仅使用免疫抑制剂，还接受复杂的医疗护理和多种其他药物。这些因素可能导致药物相关问题（drug-related problems, DRPs），如药物相互作用、不良反应甚至重复用药[1,2]。又由于患者的危重疾病状态和治疗方案的复杂性，入住 ICU 预示患者具有更高的 DRPs 风险[1,3]。DRPs 可导致包括用药错误、药物不良反应、用药过量等在内的药物不良事件，造成巨大的健康和经济负担[4]。

研究显示，临床药师可以凭借其所具备的专业知识和能力发现并解决 DRPs，对药物治疗产生积极影响[5-7]。然而，由于器官移植人数相对较少，移植药学服务发展较晚等缘故，很少有研究描述器官移植受者的 DRPs。器官移植受者药物治疗的复杂程度与移植器官、治疗环境、移植时长都有很大的关系[8,9]。探讨 ICU 中 LTRs 的 DRPs 特征，有助于指导移植药师的日常实践。此外，不同于药师主导的用药审查所发现的 DRPs[5-7]，接受医生咨询所确定的 DRPs[10,11]，更能了解医生的需求、处方行为和能力，便于药师进行多层次、多学科的综合药物治疗管理，有利于设计和开发药物预警系统或药学监护模型。然而，很少有研究提及这一点。因此，本研究旨在识别 ICU 中 LTRs 的 DRPs，确定药师干预的潜在影响，评估医生和药师在管理 LTRs 药物治疗方面的经验。

2 方法

2.1 环境

在一家大型医院的专科 ICU 进行了这项研究。ICU 拥有 28 张床位，围手术期 LTRs 均在 ICU 度过早期恢复阶段。再入院的危重 LTRs 也会转入 ICU 接受治疗。一名拥有 5 年肝移植重症监护经验的临床药师加入到治疗团队，从周三至周五，每天花费约 5 小时，参与查房、医嘱审核、药学咨询、治疗方案优化、用药教育等工作。对在药学监护和咨询过程中确定的 DRPs，药师执行旨在优化患者药物治疗的干预措施。医生最终决定是否接受该干预措施。最后，药师在标准化的表格中记录 DRPs、干预措施和接受情况。

2.2 研究设计和数据采集

这项单中心、回顾性研究分析了 2020 年 1 月至 2021 年 12 月药师记录的 DRPs、干预措施和接受情况。未纳入院内其他药学部门（如静脉配置中心、住院药房）执行的干预措施。

通过审查电子病历系统和药师的记录，构建了包含 LTRs 资料、DRPs、干预措施和接受情况的数据库。患者资料包括性别、年龄、急性生理学和慢性健康状况评价Ⅱ （acute physiology and chronic health evaluation Ⅱ, APACHE Ⅱ）、入 ICU 后使用药物的数量、接受机械通气以及血液净化治疗。使用欧洲医药保健网分类系统 V9.1（pharmaceutical care network Europe, PCNE）[12]对 DRPs 进行分类。为更好地阐明和解释 LTRs 的 DRPs 特征，在本研究所有参与者达成共识后，适当修改了 PCNE V9.1（见附表 1）。DRPs 分类的准确性由 2 名药师根据事件

的描述进行审查。

2.3 评估解决 DRPs 的潜在影响

审查委员会由 3 名药师组成。2 名药师根据解决 DRPs 对 LTRs 治疗的潜在影响，使用 Hatoum 等人[13]提出的六分制标准独立评审干预措施（见附表 2）。如果结果存在差异，将由第 3 名药师做出最终决定。

2.4 统计分析

使用 Gephi 0.9.2 网络分析软件分析 DRPs 和原因之间的关系。应用 SPSS 19.0 软件处理数据。正态分布和非正态分布的连续变量以均数±标准差表示（$\bar{x} \pm s$）或中位数（四分位数）[*M* （P_{25}, P_{75}）]表示。分类变量使用频数表示 n （%）。

3 结果

共纳入 75 名 LTRs，男性 56 例，女性 19 例。平均年龄（57±11）岁，44.0%为 60 岁以上患者，平均 APACHE Ⅱ评分（20 ± 7）分。超过 50%的 LTRs 是围手术期患者，其余是有严重并发症的再入院患者。分别有 20.0%和 21.3%的 LTR 接受机械通气和血液净化治疗。入 ICU 后的用药数量中位数及四分位数是 21（12, 24）个。药物数量≤10 个、11~15 个、16~20 个、21~25 个以及≥26 个的比例分别为 8.0%、25.3%、14.7%、34.7%和 17.3%。LTR 每日需要调整的药物个数约为 3~8 个。

3.1 药学监护

3.1.1 药学监护过程中确定的 DRPs、原因和两者之间的关系

药师在药学监护期间共检测到 97 个 DRPs（1.29 个 DRP/LTR）。最常见的 DRPs 是“P2.1（可能）发生药物不良事件”（n=50，51.5%）和“P1.3 有未治疗的症状或适应症”（n=24，24.7%）（见表 1）。

表 1. 药学监护期间确定的药物相关问题、干预措施和结果

描述	肝移植受者 （n=97）	比例 （%）
问题		
P1 治疗有效性	**44**	**45.4**
P1.1 药物治疗无效	2	2.1
P1.2 治疗效果不佳	18	18.6
P1.3 有未治疗的症状或适应症	24	24.7
P2 治疗安全性	**50**	**51.5**
P2.1（可能）发生药物不良事件	50	51.5
P3 其他	**3**	**3.1**
P3.2 抗菌药物降阶梯*	3	3.1
原因		
C1 药物选择	**60**	**61.9**
C1.1 选药不适宜（因未依据指南或处方集）	8	8.2
C1.2 无指征用药	4	4.1
C1.3 不适当的组合（药物与药物或药物与草药或药物与保健品）	10	10.3
C1.4 药物重复使用（药理作用相同或活性成分相同）	15	15.5
C1.5 尽管存在适应症，未给予药物治疗或没有给予完整的药物治疗	21	21.6
C1.6 同一疾病使用太多种药物/活性成分	2	2.1
C3 剂量选择	**16**	**16.5**
C3.1 药物剂量过低	3	3.1
C3.2 单一成分的药物剂量过高	5	5.2
C3.4 给药频次过多	1	1.0
C3.6 剂量未在肾或肝功能不全时调整*	7	7.2

C6 药物使用过程	**4**	**4.1**
C6.1 不恰当的给药时间或给药间隔	3	3.1
C6.6 药物经过错误的途径给药	1	1.0
C8 患者治疗地点转换相关	**2**	**2.1**
C8.1 药物重整问题	2	2.1
C9 其他	**15**	**15.5**
C9.1 没有进行或没有适当的疗效监测（如 TDM）	2	2.1
C9.5 没有根据或没有适当的根据 TDM 调整方案*	13	13.4
介入方案		
I1 医生层面	**122**	**125.8**
I1.1 仅告知医生	3	3.1
I1.3 提供介入方案给医生	94	96.9
I1.4 与医生讨论介入方案	25	25.8
I3 药物层面	**98**	**101.0**
I3.1 药物调整为…	14	14.4
I3.2 剂量调整为…	26	26.8
I3.4 使用方法调整为…	9	9.3
I3.5 停用药物	27	27.8
I3.6 启用新药物	22	22.7
介入方案的接受		
A1 介入被接受	**92**	**94.8**
A1.1 接受介入方案并完全执行	85	87.6
A1.2 接受介入方案，部分执行	6	6.2
A1.3 接受介入方案，但并未执行	1	1.0
A2 介入未被接受	**2**	**2.1**
A2.4 未接受介入方案：不清楚原因	2	2.1
A3 其他	**3**	**3.1**
A3.2 未提出介入方案	3	3.1
药物相关问题状态		
O1 已被解决	**86**	**88.7**
O2 已部分解决	**9**	**9.3**
O3 没有解决	**2**	**2.1**

注：*修正项；TDM, therapeutic drug monitoring，治疗药物监测

对 DRPs 原因的分析显示，“C1 药物选择”的比例最高（61.9%），其次是“C3 剂量选择”和“C9 其他”。主要的原因子类别是“C1.5 尽管存在适应症，未给予药物治疗或没有给与完整的药物治疗”、“C1.4 药物重复使用”和“C9.5 没有根据或没有适当的根据 TDM 调整方案*”。

DRPs 与原因的关系分析如图 1 （A）所示。尽管 P2.1 和 P1.3 的发生频率较高，但原因最多的问题是 P2.1 和“P1.2 治疗效果不佳”，分别有 10 个和 8 个。在药物不良事件方面，需关注药物重复使用（C1.4，n=15）、没有根据或没有适当的根据 TDM 调整方案*（C9.5，n=9）和不适当的组合（C1.3，n=6）。对于治疗效果不佳，需注意没有根据或没有适当的根据 TDM 调整方案*（C9.5，n=4）、不适当的组合（C1.3，n=3）以及药物剂量过低（C3.1，n=3）。

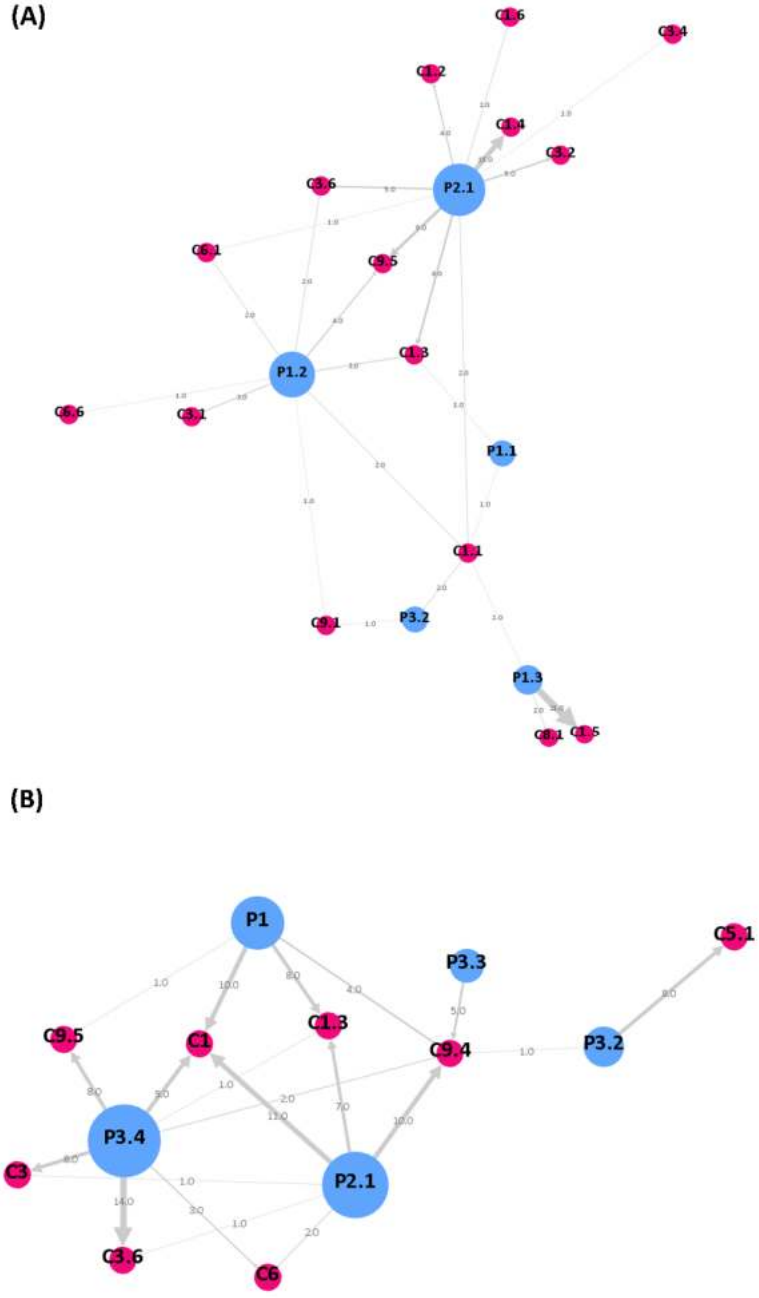


图 1. 在药学监护（A）和咨询（B）中发现的药物相关问题和原因的网络关系分析图。蓝色和红色节点分别代表药物相关问题和原因。蓝色节点的大小反映导致相同问题的原因的数量。边的粗细和边上的数字反映具有相同因果关系的数量。

3.1.2 药学干预和潜在影响

药师对 DRPs 共提出 220 条干预措施（2.27 条/LTR）。医生层面 122 条，药物层面 98 条。“I1.3 提供介入方案给医生”在医生层面的干预措施中比例最高（96.9%）。药物层面的干预措施比例从高到低依次为：“停用药物”、

“剂量调整为”、“启用新药物”、“药物调整为”和“使用方法调整为”。

绝大多数干预措施被评为“非常重要”（10.3%）、“重要”（64.0%）和“有些重要”（24.7%）。1 个干预措施（1.0%）被评为“极为重要”，与一位出现肢体抽搐的 LTR 有关。他同时使用了利奈唑胺和舍曲林，怀疑发生 5-羟色胺综合征。没有“没有意义”和“不利影响”的干预措施。对因“药物选择”、“没有根据或没有适当的根据 TDM 调整方案*”以及“剂量选择”导致的 DRPs，药师执行的干预措施具有重要影响，见图 2 （A）。

93.8%的介入方案被医生接受，并且部分或完全执行。仅有 1 条关于“伏立康唑药物浓度过低”的干预措施，在排除其他影响浓度的因素后，药师提出“输注伏立康唑需避开强电解质浓缩液或血制品”的建议，但医生已经换用其他药物，未予执行。经过药师干预，88.7%（n=86）DRPs 得到全部解决。

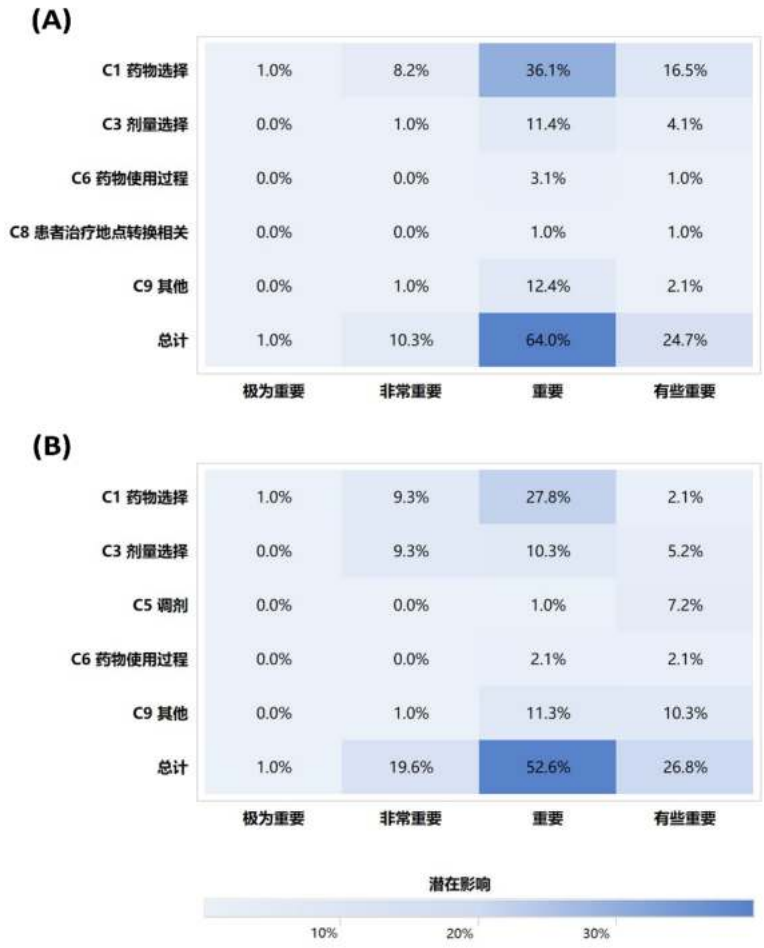


图 2. 药师干预对肝移植受者治疗的潜在影响。药学监护（A），药学咨询（B）。

3.2 药学咨询

研究期间共收集了 118 份咨询记录，剔除 4 条与药物无关的咨询，最终纳入分析 114 条。根据 ATC（Anatomical Therapeutic Chemical）药物分类，编码 DRPs 所涉及的药物（见附表 3）。64.0%是系统用抗感染药，其余主要是抗肿瘤药和免疫机能调节药、心血管系统药、神经系统药。

3.2.1 药学咨询所确定的 DRPs、原因和两者之间的关系

根据咨询的内容，药师共确定 114 个 DRPs（见表 2）。医生更关注“P3.4 治疗有效性和安全性*”。分析 DRPs 的原因，“C1 药物选择”所占比例最高（38.4%）。主要的原因子类别是“C9.4 需要额外的药物信息*”、“C1.3 药物组合*”和“C3.6 肾或肝功能不全时药物剂量调整*”。

表 2. 药学咨询期间确定的药物相关问题、干预措施和结果

描述	全部药品		系统用抗感染药	
	数量 （n=114）	比例 （%）	数量 （n=73）	比例 （%）
问题				
P1 治疗有效性	23	20.2	18	24.7
P2 治疗安全性	32	28.1	15	20.5
P3 其他	59	51.8	40	54.8
P3.2 药物可用性*	9	7.9	3	4.1
P3.3 药物敏感性试验解读*	5	4.4	5	6.8
P3.4 治疗有效性和安全性*	45	39.5	32	43.8
原因				
C1 药物选择	46	40.4	28	38.4
C1.3 适当的药物组合*	16	14.0	9	12.3
C3 剂量选择	24	21.1	17	23.3
C3.6 在肾或肝功能不全时药物剂量调整，包括肾脏替代治疗*	15	13.2	9	12.3
C5 调剂	8	7.0	3	4.1
C5.1 处方药物无法获得	8	7.0	3	4.1
C6 药物使用过程	5	4.4	4	5.5
C9 其他	31	27.2	21	28.8
C9.4 需要额外的药物信息*	22	19.3	15	20.5
C9.5 TDM 相关信息或解读*	9	7.9	6	8.2
介入方案				
I1 医生层面	202	177.2	130	178.1
I1.2 医生请药师提供资讯	114	100.0	73	100.0
I1.3 提供介入方案给医生	66	57.9	45	61.6
I1.4 与医生讨论介入方案	22	19.3	12	16.4
I3 药物层面	83	72.8	61	83.6
I3.1 药物调整为…	14	12.3	8	11.0
I3.2 剂量调整为…	42	36.8	31	42.5
I3.4 使用方法调整为…	12	10.5	11	15.1
I3.5 停用药物	4	3.5	2	2.7
I3.6 启用新药物	11	9.6	9	12.3
I4 **其他**	10	8.8	5	6.8
介入方案的接受				
A1 介入被接受	64	56.1	44	60.3
A1.1 接受介入方案并完全执行	49	43.0	32	43.8
A1.2 接受介入方案，部分执行	14	12.3	12	16.4
A1.3 接受介入方案，但并未执行	1	0.9		
A2 介入未被接受	2	1.8	1	1.4
A2.4 未接受介入方案：不清楚原因	2	1.8	1	1.4
A3 其他	48	42.1	28	38.4
A3.2 未提出介入方案	48	42.1	28	38.4

药物相关问题状态				
O0 状态不明	1	0.9		
O1 已被解决	102	89.5	66	90.4
O2 已部分解决	9	7.9	6	8.2
O3 没有解决	2	1.8	1	1.4

注：*修正项；TDM, therapeutic drug monitoring，治疗药物监测

DRPs 与原因的关系分析如图 2 （B）所示。导致“治疗有效性和安全性*”问题的原因最多（n=7），包括“肾或肝功能不全时药物剂量调整*”（C3.6，n=14）、“药物选择”（C1，n=9）、“剂量选择”（C3，n=8）和“TDM 相关信息或解读*”（C9.5，n=8）。

3.2.2 药学干预和潜在影响

对咨询过程中所确定的 DRPs 执行的干预措施，不仅有医生层面（n=202）和药物层面（n=83），还有一些其他介入或行为（n=10）。例如，1 位 LTR 感染了一种少见曲霉——迟缓曲霉。由于迟缓曲霉对抗真菌药物的敏感性不确定，医生咨询药师治疗药物和给药剂量。药师联系微生物实验室，解释了缘由，请其进行了药物敏感性试验。根据药敏结果和抗真菌药物的特性，药师协助医生制定了治疗方案。

因部分咨询没有目标患者，17 个 DRPs 的干预措施无法直接评估。对其余 97 个 DRPs 药师执行的干预措施，分别具有“非常重要”（19.6%）、“重要”（52.6%）和“有些重要”（26.8%）的潜在影响。1 个干预措施被评为“极为重要”（1.0%），与一位感染侵袭性肺曲霉病又亟需肝移植的慢加急性肝衰竭患者有关。因患者死亡风险高，抗真菌药又可能加重肝损伤，并且缺少重度肝功能不全患者的剂量指导，使治疗充满挑战。药师提供的干预措施均被医生采纳，最终取得抗感染治疗的成功，争取到肝移植的机会。此外，对于一些咨询，虽然药师并未提供介入方案，但提供的资讯对医生的决策具有帮助，使得 DRPs 得到全部解决或部分解决。

3.3 药学监护和咨询过程中 DRPs 和原因的比较

比较在药学监护和咨询中发现的 DRPs 和原因（图 3），可见医生和药师都比较关注包括药物相互作用在内的药物组合问题。医生在遇到“肾或肝功能不全时药物剂量调整*”、需要“额外的药物信息”或“无法获得药物”时，容易寻求药师的帮助。药师对“重复用药”、“存在适应症未给予药物治疗或没有给与完整的药物治疗”以及“没有根据或没有适当的根据 TDM 调整方案*”等问题有更敏锐的洞察力。

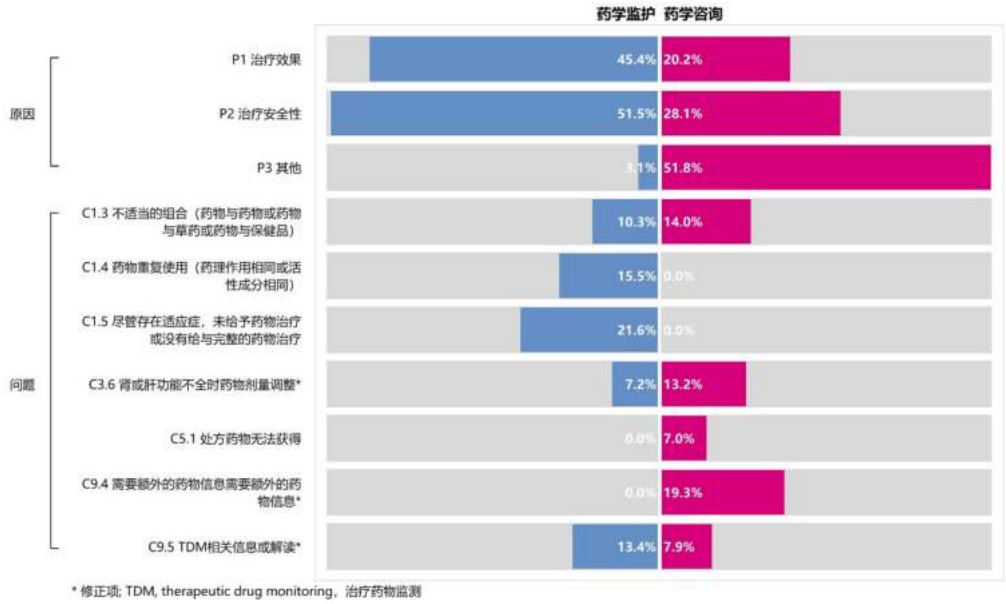


图 3. 比较在药学监护和药学咨询中发现的药物相关问题和原因

4 讨论

据我们所知，这是第一个调查 ICU 中肝移植受者 DRPs 类型和原因的研究。“发生药物不良事件”是最常检测到的 DRP，这与已发表的研究结果一致。然而，不同于门诊肝移植受者[14]以及其他 ICU 患者[11,15]，经药师主导的用药审查发现“未治疗的症状或适应症”是 ICU 中 LTRs 较为主要的 DRP。这可能和药师跟随医生查房，熟悉患者病情，更容易检测到此类 DRP 有关。此外，DRPs 的分布也受到医院规模、临床环境、处方习惯等因素的影响[7]。“未治疗的症状或适应症”可归因于：（1）病情改变后原治疗方案无效；（2）检验报告延迟所致信息未及时查看或漏看；（3）治疗地点转换导致原有药物漏开；（4）医嘱自动停止后未重新开具。Moyen 等人对 ICU 中的用药错误进行了评价，认为错误的发生与 ICU 患者疾病的严重程度、所用药物的数量和类型，以及 ICU 环境的动态、复杂有关[16]。本研究对象不仅是 ICU 患者，还是肝移植受者。移植后需接受抗排斥、控制感染、处理并发症、加强脏器功能支持以及营养支持等护理。Kamila 使用药物治疗方案复杂性评分量表比较不同类型患者的治疗方案，肝移植受者的得分远高于其他患者[17]。在我们的研究中，LTRs 中位用药数高达 21 个，每日需调整的药物个数也有 3~8 个，增加了 DRPs 风险。值得注意的是，除客观原因外，“瑞士奶酪模型”的开发者 James Reason 教授指出，“疏忽”和“失误”是系统发生错误不可忽视的人为因素[18]。一项有趣的研究，在医生不知情前提下，调查了查房期间医生查看医嘱的频率。结果发现，医生只有三分之二的时间查看药物医嘱，并且频率随着患者数量的增加而降低[19]。由于肝移植受者对不良事件的防御能力远低于其他患者，且缺乏承受额外伤害的生理储备，越来越多的医疗中心在肝移植团队中配备了临床药师[20,21]。

与一些描述 DRPs 类型和原因的研究相比[22-24]，我们的研究更多地强调了药学干预结果和潜在影响。90%以上的介入方案被医生接受并执行，接受度与其他 ICU 研究类似[11,15]。这表明，将临床药师纳入肝移植护理团队，在医生开具医嘱的时间和地点审查医嘱，可以预防许多用药错误和药物不良事件，提高医疗保健质量。已有研究显示了药师在器官移植药物治疗管理中的作用，具有显著的成本效益，但研究对象大多是门诊或是普通病房的移植受者[14,20,25]。我们的研究首次揭示了药师对接受重症监护的 LTRs 的附加价值，因为超过 95%的病例，药师干预的潜在影响介于“有些重要”和“非常重要”之间。此外，在治疗药物的选择、剂量调整以及药物浓度监测方面，药师具有明显优势。

通过比较药学监护和咨询中发现的 DRPs 和原因，我们还强调了医生对临床药学的理解和需求。一个重要的发现是，ICU 医生更易向药师咨询抗感染药物。这可能和 ICU 多重耐药菌普遍流行以及重症患者严重感染的高发病率和死亡率有关[26]。医生已经认识到，严重感染性疾病治疗成功需要基于适当的抗菌药物管理。这包括选择合适的抗菌药物并确保充分的体内暴露，需考虑 ICU 患者的病理生理变化和所用抗菌药物的特性，以便达到最佳的药代动力学/药效学目标[27]。另一个重要发现是，当医生遇到肝肾功能不全时的药物剂量调整、需要额外的药物信息或无法获得药物时，容易寻求药师的帮助。美国临床药学学会要求临床药师必须具备的核心技能之一是药物治疗知识，而医生的培训体系要求他们掌握和应用的是医学知识[28]。除了对药理学、药物治疗学、病理生理学等有深入了解外，药师还具备从生物医学、临床、流行病学和社会行为学文献中查找、评价、解释和利用临床证据以及其他重要信息的能力。这对临床决策至关重要。在多学科治疗团队中，医生和药师知识体系的互补，有利于保证用药的安全、可靠。

本研究有几个局限性。首先，有限的人力资源使得药师无法提供全时间段的药学监护，可能会低估 DRPs。其次，一位药师将 DRPs 作为记录指标在标准化的表格中记录，这可能导致信息偏差和书写遗漏。

5 结论

这是第一个使用成熟的分类系统评估 ICU 中肝移植受者 DRPs 和原因的研究，揭示了药师干预的价值。同时，我们的研究还强调，医生在临床实践中对肝移植受者药物治疗管理的关注与药师有所不同，这有助于了解医生的需求、处方行为和能力。药师通过药学监护可以识别并解决 ICU 中肝移植受者 DRPs，执行的干预措施对肝移植受者的药学护理具有积极影响。在肝移植护理团队中，医生和药师知识体系的互补，有利于保证用药的安全、可靠。

参考文献

[1]Kane-Gill S. L., Kirisci L., Verrico M. M., Rothschild J. M. Analysis of risk factors for adverse drug events in critically ill patients[J]. Crit Care Med, 2012, 40（3）: 823-828. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318236f473.

[2]Mair A., Wilson M., Dreischulte T. Addressing the Challenge of Polypharmacy[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2020, 60: 661-681. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010919-023508.

[3]Garrouste-Orgeas M., Flaatten H., Moreno R. Understanding medical errors and adverse events in ICU patients[J]. Intensive Care Med, 2016, 42（1）: 107-109. DOI: 10.1007/s00134-015-3968-x.

[4]Elliott R. A., Camacho E., Jankovic D., Sculpher M. J., Faria R. Economic analysis of the prevalence and clinical and economic burden of medication error in England[J]. BMJ Qual Saf, 2021, 30（2）: 96-105. DOI: 10.1136/bmjqs-2019-010206.

[5]Richter A., Bates I., Thacker M., Jani Y., O'farrell B., Edwards C., Taylor H., Shulman R. Impact of the introduction of a specialist critical care pharmacist on the level of pharmaceutical care provided to the critical care unit[J]. Int J Pharm Pract, 2016, 24（4）: 253-261. DOI: 10.1111/ijpp.12243.

[6]Leache L., Aquerreta I., Aldaz A., Monedero P., Idoate A., Ortega A. Clinical and economic impact of clinical pharmacist interventions regarding antimicrobials on critically ill patients[J]. Res Social Adm Pharm, 2020, 16（9）: 1285-1289. DOI: 10.1016/j.sapharm.2019.07.006.

[7]Oki T., Ishii S., Furukawa K., Shono A., Akazawa M. Assessment of the potential impact of resolving drug-related problems by clinical pharmacists in Japan: a retrospective observational study[J]. J Pharm Health Care Sci, 2021, 7（1）: 47. DOI: 10.1186/s40780-021-00232-9.

[8]Bryant B. M., Libby A. M., Metz K. R., Page R. L., 2nd, Ambardekar A. V., Lindenfeld J., Aquilante C. L. Evaluating Patient-Level Medication Regimen Complexity Over Time in Heart Transplant Recipients[J]. Ann Pharmacother, 2016, 50（11）: 926-934. DOI: 10.1177/1060028016657552.

[9]Marienne J., Laville S. M., Caillard P., Batteux B., Gras-Champel V., Masmoudi K., Choukroun G., Liabeuf S. Evaluation of Changes Over Time in the Drug Burden and Medication Regimen Complexity in ESRD Patients Before and After Renal Transplantation[J]. Kidney Int Rep, 2021, 6（1）: 128-137. DOI: 10.1016/j.ekir.2020.10.011.

[10]Amkreutz J., Lenssen R., Marx G., Deisz R., Eisert A. Medication safety in a German telemedicine centre: Implementation of a telepharmaceutical expert consultation in addition to existing tele-intensive care unit services[J]. J Telemed Telecare, 2020, 26（1-2）: 105-112. DOI: 10.1177/1357633x18799796.

[11]Li X. X., Zheng S. Q., Gu J. H., Huang T., Liu F., Ge Q. G., Liu B., Li C., Yi M., Qin Y. F., Zhao R. S., Shi L. W. Drug-Related Problems Identified During Pharmacy Intervention and Consultation: Implementation of an Intensive Care Unit Pharmaceutical Care Model[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 571906. DOI: 10.3389/fphar.2020.571906.

[12]Association Pharmaceutical Care Network Europe. Classification for Drug related problems V9.1[EB/OL]. （2022-07）[2022-07]. https://www.pcne.org/upload/files/417_PCNE_classification_V9-1_final.pdf.

[13]Hatoum Hind T., Hutchinson Richard A., Witte Kenneth W., Newby George P. Evaluation of the Contribution of Clinical Pharmacists: Inpatient Care and Cost Reduction[J], 1988, 22（3）: 252-259. DOI: 10.1177/106002808802200318.

[14]Mulder M. B., Borgsteede S. D., Darwish Murad S., Landman C. S., Metselaar H. J., Hunfeld N. G. M. Medication-Related Problems in Liver Transplant Recipients in the Outpatient Setting: A Dutch Cohort Study[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 637090. DOI: 10.3389/fphar.2021.637090.

[15]Albayrak A., Başgut B., Bıkmaz G. A., Karahalil B. Clinical pharmacist assessment of drug-related problems among intensive care unit patients in a Turkish university hospital[J]. BMC Health Serv Res, 2022, 22（1）: 79. DOI: 10.1186/s12913-022-07494-5.

[16]Moyen E., Camiré E., Stelfox H. T. Clinical review: medication errors in critical care[J]. Crit Care, 2008, 12（2）: 208. DOI: 10.1186/cc6813.

[17]Kamila P., Smith S. G., Patzer R., Wolf M. S., Marina S. Medication regimen complexity in kidney and liver transplant

recipients[J]. Transplantation, 2014, 98（7）: e73-4. DOI: 10.1097/tp.0000000000000403.
[18]Reason J. James Reason: patient safety, human error, and Swiss cheese. Interview by Karolina Peltomaa and Duncan Neuhauser[J]. Qual Manag Health Care, 2012, 21（1）: 59-63. DOI: 10.1097/QMH.0b013e3182418294.
[19]Li Looi Khang, Black Peter N. How often do physicians review medication charts on ward rounds?[J]. BMC Clinical Pharmacology, 2008, 8（1）: 9. DOI: 10.1186/1472-6904-8-9.
[20]Young-Mi Ah, Lee Ju-Yeun, Mi-Ra Moon, Yoon-Sook Cho, Kim Hyang-Sook, Nam-Joon Yi, Kwang-Woong Lee, Kyung-Suk Suh. Clinical and economic evaluation of pharmacists' contribution to patient care on a multi-disciplinary liver transplant team[J]. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2016, 54（2）: 102. DOI: https://doi.org/10.5414/CP202501.
[21]Schmid S., Schlosser S., Gülow K., Pavel V., Müller M., Kratzer A. Interprofessional Collaboration between ICU Physicians, Staff Nurses, and Hospital Pharmacists Optimizes Antimicrobial Treatment and Improves Quality of Care and Economic Outcome[J]. Antibiotics （Basel）, 2022, 11（3）. DOI: 10.3390/antibiotics11030381.
[22]Qu Can, Meng Long, Wang Ning, Chen Yong, Yang Xiao, Wang Jun, Sun Shusen, Qiu Feng. Identify and categorize drug-related problems in hospitalized surgical patients in China[J]. International Journal of Clinical Pharmacy, 2019, 41（1）: 13-17. DOI: 10.1007/s11096-018-0777-7.
[23]Nguyen T. H., Le V. T. T., Quach D. N., Diep H. G., Nguyen N. K., Lam A. N., Pham S. T., Taxis K., Nguyen T., Nguyen P. M. Drug-Related Problems in Prescribing for Pediatric Outpatients in Vietnam[J]. Healthcare （Basel）, 2021, 9（3）. DOI: 10.3390/healthcare9030327.
[24]Kusumawardani L. A., Andrajati R., Nusaibah A. Drug-related Problems in Hypertensive Patients: A Cross-sectional Study from Indonesia[J]. J Res Pharm Pract, 2020, 9（3）: 140-145. DOI: 10.4103/jrpp.JRPP_20_16.
[25]Wang H. Y., Chan A. L. F., Chen M. T., Liao C. H., Tian Y. F. Effects of Pharmaceutical Care Intervention by Clinical Pharmacists in Renal Transplant Clinics[J]. Transplantation Proceedings, 2008, 40（7）: 2319-2323. DOI: https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.06.050.
[26]Kollef M. H., Torres A., Shorr A. F., Martin-Loeches I., Micek S. T. Nosocomial Infection[J]. Crit Care Med, 2021, 49（2）: 169-187. DOI: 10.1097/ccm.0000000000004783.
[27]Roberts J. A., Abdul-Aziz M. H., Lipman J., Mouton J. W., Vinks A. A., Felton T. W., Hope W. W., Farkas A., Neely M. N., Schentag J. J., Drusano G., Frey O. R., Theuretzbacher U., Kuti J. L. Individualised antibiotic dosing for patients who are critically ill: challenges and potential solutions[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14（6）: 498-509. DOI: 10.1016/s1473-3099（14）70036-2.
[28]Saseen J. J., Ripley T. L., Bondi D., Burke J. M., Cohen L. J., Mcbane S., Mcconnell K. J., Sackey B., Sanoski C., Simonyan A., Taylor J., Vande Griend J. P. ACCP Clinical Pharmacist Competencies[J]. Pharmacotherapy, 2017, 37（5）: 630-636. DOI: 10.1002/phar.1923.

艾沙康唑、泊沙康唑和伏立康唑治疗侵袭性真菌感染的药物经济学评价：在中国鉴别诊断病原体前的发热驱动或诊断驱动治疗

石晓萍[1]，韩广信[1,2]，吕迁洲[1]，李晓宇[1]，许青[1]

1. 复旦大学附属中山医院药剂科 上海； 200032 2. 广东药科大学附属第一医院药剂科

【摘要】**目的：**侵袭性真菌感染 (invasive fungal infection, IFI) 与较高的死亡率和巨大的经济负担有关。对于高危患者，通常在鉴别诊断病原体前启动发热驱动或诊断驱动治疗。本研究从我国医疗卫生体系角度评估艾沙康唑、泊沙康唑对比伏立康唑治疗侵袭性真菌感染的成本效益，为临床治疗决策提供参考。**方法：**使用 TreeAge Pro 2011 软件构建一个决策树模型用以评估整个病程的成本效益。假设进入模型的患者毛霉菌病的患病率是 7.8%。模型所包含的疗效、成本、不良事件等数据，主要来自临床研究、发表的文献和公开可用的数据库。模型输出的主要结果是总成本、质量调整生命年 (QALYs)、生命年 (Lys) 和增量-成本效益比 (ICER)。以 1~3 倍 2022 年我国人均国内生产总值（GDP）作为意愿支付（WTP）阈值。使用单因素敏感性分析和概率敏感性分析确定模型的稳定性。同时探讨 3 个药物在不同的毛霉菌病患病率、伏立康唑可能纳入医疗保险报销时以及泊沙康唑降价后等情境下的经济性。**结果：**基础案例分析显示，相比伏立康唑，艾沙康唑预期寿命更长（+0.38 LYs 和 +0.31 QALYs），ICER 为 15,702.46 美元/QALY，远低于以 3 倍 2022 年我国人均国内生产总值（GDP）作为的意愿支付（WTP）阈值（38223 美元/QALY）；然而，泊沙康唑对比伏立康唑并未显示出经济优势（ICER 为 64,466.57 美元/QALY）。单因素敏感性分析表明，治疗侵袭性曲霉感染时艾沙康唑的全因死亡率是对 ICER 结果影响最大的参数。在概率敏感性分析中，当 WTP 阈值为 38223 美元/QALY 时，艾沙康唑具有经济性的概率为 72.9%。情境分析结果显示，上述情境下艾沙康唑对比伏立康唑依旧具有经济性；但当泊沙康唑降价 15%以及毛霉菌病患病率为 14%时，泊沙康唑将具有经济性。**结论：**艾沙康唑可作为高危患者在鉴别诊断病原体前接受发热驱动或诊断驱动治疗的一种具有成本效益的选择；当泊沙康唑降价 15%后同样也将具有经济性。

【关键词】艾沙康唑；泊沙康唑；伏立康唑；侵袭性真菌感染；成本效益

Pharmacoeconomic evaluation of isavuconazole, posaconazole and voriconazole in the treatment of invasive fungal infection: initial therapy prior to pathogen differential diagnosis in China

Xiaoping Shi [1], Guangxin Han [1, 2], Qianzhou Lv [1], Xiaoyu Li [1*], Qing Xu [1*]

1 Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2 Department of Clinical Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China

【**Abstract**】**Background:** Invasive fungal infections (IFIs) is associated with high mortality and a substantial economic burden. For high-risk patients, fever drive or diagnostic drive therapy is usually initiated prior to the differential diagnosis of the pathogen. This study evaluated the cost-effectiveness of isavuconazole, posaconazole, versus voriconazole in the treatment of invasive fungal infections from the perspective of the Chinese healthcare system, informing healthcare decision-making and resource allocation.**Methods:** A decision analytic model was constructed using TreeAge Pro 2011

software to evaluate the cost-effectiveness of the entire disease course. We assumed that the prevalence of mucormycosis in the patients entering the model was 7.8%. Efficacy, cost, adverse events, and other data included in the model were mainly derived from clinical studies, published literature, and publicly available databases. The primary outcomes of the model output were total cost, quality-adjusted life years (QALYs), life years (Lys), and incremental cost-effectiveness ratio (ICER). The willing-to-pay (WTP) threshold was defined as one to three times China's GDP per capita in 2022. One-way sensitivity analysis and probability sensitivity analysis were used to determine the robustness of the model. At the same time, the cost-effectiveness of three triazole antifungal agents under a broader range of mucormycosis prevalence, when voriconazole was covered by medical insurance reimbursement, and after the price reduction of posaconazole was discussed.**Results:** Base-case analysis showed that isavuconazole had greater efficacy (+0.38 LYs and +0.31 QALYs) than voriconazole; ICER was $15,702.46 /QALY, well below the WTP threshold ($38,223 /QALY). However, posaconazole did not provide a significant economic advantage over voriconazole (ICER $64,466.57 /QALY). One-way sensitivity analysis found that ICER was highly sensitive to the mortality of patients with invasive aspergillus infection. In the probabilistic sensitivity analysis, when the WTP threshold was $38223 /QALY, the probability of isavuconazole being cost-effective was 72.9%. The scenario analysis results indicated that posaconazole would become cost-effective when the price was reduced by 15% or the prevalence of mucormycosis was 14%.**Conclusions:** Isavuconazole represents a cost-effective initial option for treating IFIs in high-risk patients prior to the differential diagnosis of pathogens. It will also be economical when a 15% reduction in posaconazole cost is achieved.

【**Key words**】isavuconazole, posaconazole, voriconazole, invasive fungal infection, cost-effectiveness

Introduction

Invasive fungal infections (IFIs) are opportunistic fungal infections that frequently occur in immunocompromised patients, such as those with hematological malignancies, hematopoietic stem cell transplantation, and solid organ transplantation. The most common fungal pathogens are *Candida*, *Aspergillus*, and *Mucorales* species [1]. Although advancements in modern medical technology have vastly improved such patients' survival rates and survival time, it has also increased the incidence of IFI [2]. The prevalence of invasive *aspergillus* (IA) varies between 0.94% and 14% among China's immunocompromised individuals [3]. In Europe, approximately 60,000 cases of IA occur annually, whereas estimates suggest that over 160,000 cases of IA arise each year in China [4]. IFI imposes a heavy burden on patients and healthcare systems. A retrospective study of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) found higher rates of mechanical ventilation (43.3% vs. 5%), longer hospital stays (45.8 days vs. 18.4 days), and increased mortality rates (43.3% vs. 11.4%) in IPA cases relative to non-IPA patients [5]. Mucormycosis, another IFI, also has s significant economic impact on society and individuals due to its lengthy treatment duration, high cost, and limited safe and effective drug options. According to a Chinese study, the mortality rate of mucormycosis exceeds 40%, and the economic burden is 3 to 10 times the country's annual disposable income per capita [6].

Identification of IA and mucormycosis on time is challenging due to their similar clinical and radiological manifestations, with co-infections further complicating the differential diagnosis [7, 8]. Treatment of IFIs is typically initiated based on patient risk factors and clinical and radiological signs before the identification of the causative agent. As a result, a significant proportion of mucormycosis cases are initially misdiagnosed as IA.

Voriconazole is the recommended primary treatment agent for IA by the Infectious Diseases Society of America (IDSA), the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) guidelines [9, 10]. However, liver dysfunction is a common adverse event. And clinical use is limited due to its inhibition of cytochrome P450 isoenzymes and the presence of sulfobutylether-beta-cyclodextrin in the

intravenous formulation. Recently, a phase 3, randomized, controlled, non-inferiority trial evaluated the efficacy and safety of posaconazole for treating IA [11]. Given its effectiveness, it was approved by the United States Food and Drug Administration in June 2021 for treating IA. Isavuconazole is another antifungal drug used as a primary or alternative treatment agent for IA [9, 10]. Compared to voriconazole, isavuconazole has similar efficacy but significantly lower rates of drug-related adverse events such as hepatotoxicity and visual impairment (42% vs. 60%) [12]. The rate of permanent discontinuation due to drug-related adverse events is also lower for isavuconazole than for voriconazole (8% vs. 14%) [12]. Notably, in addition to their anti-aspergillus activity, both posaconazole and isavuconazole have shown activity against mucorales, whereas voriconazole has not. Consequently, posaconazole and isavuconazole are recommended as first-line treatments for mucormycosis by the global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis published by the ECMM [13].

Voriconazole has been the standard treatment for IA for a considerable period. Nonetheless, with the advent of isavuconazole and posaconazole, more options are now available for the clinical treatment of IA. Hence, it is imperative to determine the most cost-effective treatment options to conserve medical resources and reduce the financial burden on patients. Several studies have shown that isavuconazole is a cost-effective treatment for IA or suspected IA compared to voriconazole in the United States and some European countries [14-17]. However, there has yet to be a report on the cost-effectiveness of isavuconazole and posaconazole versus voriconazole in China. Therefore, an economic model was developed to explore the cost-effectiveness of using voriconazole, isavuconazole, and posaconazole to treat adults with suspected IFIs when the differential diagnosis between IA and mucormycosis is uncertain at the start of treatment.

Methods

Model structure

A decision analytic model (Figure 1) was adopted from a healthcare system perspective to evaluate the cost-effectiveness of isavuconazole, posaconazole, and voriconazole for treating IFIs. The model was based on the published literature [14, 15, 17] and used TreeAge Pro 2011 (TreeAge Software Inc., Williamstown, MA, USA), incorporating China-specific costs and resource utilization.

Assuming 1,000 patients with a suspected IFI entered the model, antifungal therapy was initiated before obtaining pathogen information. Patients were assigned to the following treatment sequences: isavuconazole, posaconazole, and voriconazole. Only 50% of patients had their pathogens identified, with *aspergillus* accounting for 92.2% of the cases and *mucorales* accounting for 7.8%. Given the absence of domestic data, the pathogen detection rate was referenced from previous studies [14, 17]. Depending on clinical responsiveness, drug tolerance, and other factors, patients could switch to second-line treatment with liposomal amphotericin B (L-AmB). As voriconazole had no activity against *mucorales*, patients initially treated with voriconazole switched to L-AmB therapy if *mucorales* were identified during treatment. Otherwise, voriconazole therapy was maintained until the patient's demise. The sequential regimen consisted of oral triazoles. Two additional triazoles, other than the initial one, were administrated orally at a 50%/50% ratio. However, for isavuconazole (posaconazole) -treated patients with mucormycosis, only oral posaconazole (isavuconazole) sequential L-AmB was allowed.

Model inputs and data sources

Clinical data

The proportion of switching to second-line treatment and all-cause mortality were derived from several large clinical studies [11, 12, 18] and literature [19, 20]. Since there were no head-to-head clinical studies between posaconazole and

isavuconazole, in vitro drug sensitivity tests showed that both drugs had similar good activity against *mucorales* [21], it was assumed that the data of isavuconazole were also applicable to posaconazole for mucormycosis.

Treatment regimen and duration

Patients entering the model were assumed to have normal liver and kidney function or not require dose adjustment. Of all patients, 75% received intravenous therapy initially and then switched to oral treatment, while 25% received oral medicine at the outset [14, 15, 17]. The daily loading and maintenance doses of isavuconazole, posaconazole, and voriconazole were 600 mg/200 mg, 600 mg/300 mg, and 800 mg/400 mg, respectively, whether administrated orally or intravenously. The dose of L-AmB was administrated at 5 mg/kg, and the mean body weight (60 kg) of Chinese patients with hematologic malignancies or hematopoietic stem cell transplantation was used to calculate the total daily dose of L-AmB [22, 23].

The treatment duration in the model was 67 days (intravenous 9 days) for invasive *aspergillus* (IA) [11] and 149 days (intravenous 15.5 days) for mucormycosis [18]. Referring to the published literature, isavuconazole, posaconazole, and voriconazole were thought to have the same course of treatment [14, 15, 17]. On average, patients who did not respond to first-line therapy changed their regimen on day 21 because most no-responders switched treatment between day 1 to 42 [12, 18]. However, patients treated with voriconazole who were later diagnosed with mucormycosis changed their regimen on day 11 [24]; those who did not receive a diagnosis of mucormycosis continued to be treated as IA for 67 days (intravenous 9 days). After the failure of first-line treatment, L-AmB took 14.5 days to treat IA [25] and 27.2 days to treat mucormycosis based on previous literature [18].

The average length of hospital stay (LOS) for first-line treatment of IA and mucormycosis was 19.7 days [12] and 19.3 days [18], respectively. Due to a lack of data for second-line treatment, we hypothesized an extended LOS to (19.7+21) and (27.2+21) days for treatment of IA and mucormycosis, respectively, to meet the required course of treatment and the necessary LOS. Clinical experts also endorsed this hypothesis.

Costs

The unit costs of isavuconazole (Cresemba®), posaconazole (Noxafil®), and voriconazole (Vfend®) were available from a tertiary care general hospital with 2,000 beds. Furthermore, Fengkesong® was the commonly used L-AmB in Chinese hospitals, so we adopted its price. The model also incorporated additional resources utilized beyond the cost of antifungal drugs, such as the costs of laboratory testing, microbiological detection, galactomannan antigen determination, imaging examination, hospitalization cost (cost for bed utilization, nursing fees, etc.), and outpatient follow-up cost. Considering the pharmacokinetics advantages of isavuconazole, the actual situation of Chinese hospitals, and the recommendations of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline [10], therapeutic drug monitoring was only conducted for posaconazole and voriconazole. Severe hepatotoxicity was considered the only adverse event that required intensive therapy and affected the cost. The incidence of severe hepatotoxicity was obtained from phase 3 clinical trials [11, 12] and publicly available databases. An artificial liver support molecular adsorbent recirculating system will be used to treat liver failure, and the cost was a one-time fee obtained from a study in China [26].

Utility and life expectancy

Since the key clinical outcomes of the model were derived from several clinical studies mainly targeting acute myeloid leukemia patients [12, 18], and the underlying disease will impact the quality of life and life expectancy for survivors of IFI, a lifetime horizon was chosen to capture the long-term effects and costs of the three compared drugs. A quality of life utility value of 0.82 [27], a life expectancy of 17 years [28], and a discount rate of 3% were applied to discount the costs and

health impacts. All input data for the decision-tree model were shown in Table 1.

Cost-effectiveness outcomes and model analysis

The model calculated quality-adjusted life years (QALYs), life years (LYs), and costs in each sequence. The incremental cost-effectiveness ratios (ICER) were represented by the ratio of cost to QALY. ICERs were compared to the willingness-to-pay (WTP) threshold of 3 times China's GDP per capita in 2022 (3×$12741) to assess cost-effectiveness.

In order to evaluate the robustness of the model, one-way sensitivity analysis was performed to examine the impact of varying the parameter on ICER. The following parameters were modified within a certain range: cost parameters, utility parameters, and duration of treatment were varied by ± 25% of the base-case values; probability parameters were varied by ± 10% of the base-case values. The upper and lower bounds of parameters within the range of 0 to 1 were restricted within their respective boundaries. The tornado diagrams displayed which parameters were the key drivers of the results.

Probabilistic sensitivity analysis (PSA) using 10,000 Monte Carlo iterations were performed to account for uncertainty in the model inputs and estimate the likelihood of different outcomes. Probability and utility parameters (bounded by 0 and 1) were assigned a beta distribution, while costs and treatment duration (due to positive values and bounded at 0) were assigned a gamma distribution. The standard error for some parameters was assumed to equal 10–25% of the mean because of lacking information on their variability. The results of PSA were presented by the cost-effectiveness acceptability curve, which showed the probability of compared drugs being cost-effective over a range of WTP threshold.

Scenario analysis were used to examine the results of the model under different scenarios or hypothetical situations. Given the absence of domestic data of *mucorales*, the impact of this parameter on ICER was tested by using a higher (14%) and a lower (2%) pathogen detection rate, respectively. As a classic old drug, the cost of voriconazole has been covered by health insurance payment in China, but the other two drugs are not. Eligible patients pay only a minimal account for voriconazole. Therefore, the cost-effectiveness of the three drugs in this patient population was evaluated. Finally, considering the situation of price decreases after the loss of exclusivity, we assessed the influence of the dynamics of drug price on results.

Results

Base-case analysis

The outcomes and costs over a lifetime horizon with isavuconazole, posaconazole, and voriconazole were shown in Table 2. The ICERs were calculated to voriconazole, which was regarded as the standard antifungal therapy. Isavuconazole demonstrated greater efficacy (+0.38 LYs and +0.31 QALYs) than voriconazole, albeit at a higher cost (+$4,857.71). An ICER of $15,702.46 for each extra QALY obtained was just only 23% higher than China's GDP per capita in 2022.

In contrast, posaconazole did not provide a significant cost-effectiveness advantage over voriconazole. The treatment cost of posaconazole was higher (+$2,111.92), but it only had a slight therapeutic advantage (+0.04 LYs and +0.03 QALYs). It resulted in an ICER of $64,466.57 per additional QALY gained, which was well over 3 times GDP per capita.

One-way sensitivity analysis

In the one-way sensitivity analysis, a total of 35 parameters were tested, and the 12 parameters that greatly impacted the model results were presented in Figure 2. It was found that ICER was most sensitive to the change of mortality in voriconazole-treated and isavuconazole-treated patients with IA in the model of isavuconazole. In addition, changes in

other parameters (parameters of the unit price of oral or intravenous isavuconazole, LY, QALY, etc.) did not result in an ICER above the $21,000 threshold. In the model of posaconazole, negative ICERs on the graph indicated a dominance of posaconazole over voriconazole. The reversal of results occurred when mortality decreased by 5% for posaconazole-treated with IA or increased by 5% for voriconazole-treated with IA.

Probabilistic sensitivity analysis

The PSA results revealed that the probability of voriconazole being cost-effective at a lower WTP threshold was higher than isavuconazole (Figure 3). Nevertheless, beyond the WTP threshold of $15,289 per QALY, the probability of isavuconazole was more cost-effective than voriconazole. Especially, isavuconazole was the optimal antifungal regimen in 61.6%, 72.9% and 80.3% of simulations at the $22,934, $38,223 and $76,446 threshold, respectively.

Scenario analysis

The results of scenario analysis were outlined in Table 3. If the health insurance paid the voriconazole cost, ICER might increase to $27,705.55, but isavuconazole still had an advantage. The higher (14%) or lower (2%) detection rate of *mucorales* also did not affect the results of the base-case model. Scenario analysis considering price decreases after the loss of exclusivity revealed that posaconazole began to show a cost-effectiveness advantage when the unit price decreased by 15%. Once it fell to 30%, it would become a dominant strategy.

Discussion

This study was the first investigation into the cost-effectiveness of three triazole antifungal agents for treating IFIs. It informed healthcare decision-making and resource allocation to improve patients' outcomes and medical efficiency.

Early definitive diagnosis and early initiation of antifungal therapy are essential for effectively managing IFIs. Immunocompromised patients, particularly those with hematologic malignancies after chemotherapy, are at significantly increased risk of developing IFIs, even when no microbiological culture results are available [29]. Initial antifungal therapy is paramount due to several factors, including the difficulty in clinically distinguishing between invasive aspergillosis (IA) and mucormycosis, which present with similar clinical presentations; the rapid and aggressive disease progression with a high mortality rate [20, 30] ; and the lack of antifungal activity of voriconazole against *mucorales*. Delayed antifungal treatment significantly increases the mortality rate [31, 32]. Therefore, choosing a cost-effective treatment option is crucial for optimal patient management.

Our base-case analysis indicates that compared to voriconazole, isavuconazole is a cost-effective option for suspected IFIs, while posaconazole is not. This finding is attributable to the favorable outcomes of isavuconazole not only against *aspergillus*, but also *mucorales* [18]. Although isavuconazole carries a high drug cost, its lower expenses in laboratory analysis (TDM), adverse events, and other treatment-related costs offset the high drug cost. On the other hand, posaconazole is effective against mucormycosis [33], but its drug cost is higher than that of voriconazole. Additionally, the costs associated with disease treatment do not differ significantly between posaconazole and voriconazole, further contributing to the disadvantage of posaconazole in terms of the total cost.

The one-way sensitivity analysis revealed the robustness of our findings. Consistent with previous studies in European countries, the model was highly sensitive to the mortality rate of patients with IA. [14, 15, 17]. The model also demonstrated that the prices of isavuconazole and posaconazole impacted its sensitivity, which was unsurprising. These brand drugs have not been on the Chinese market for long and are expensive under patent protection. However, once their patents

expire, the entry of generic drugs into the market will likely lower their cost. Subsequent price reductions could affect the cost-effectiveness of these drugs differently. To explore this possibility, we performed a scenario analysis, and the result showed that a mere 15% decrease in the price of posaconazole could lead to a pharmacoeconomic advantage.

There were several advantages of our model. For example, the model was constructed based on the complete process of treating IFIs in high-risk patients, which included empirical therapy prior to pathogen differential diagnosis and targeted therapy after identification, thereby highly replicating the real-world diagnostic and therapeutic processes. The model also allowed for transitions between different treatment regimens by capturing the impact of various treatment choices through detailed data, including the proportion of oral and intravenous medications selected, various oral sequential therapy plans, and the cost of outpatient follow-up for antifungal treatment. This abundance of information could help healthcare professionals consider a comprehensive range of factors when making treatment decisions.

Despite these strengths, our study has several limitations. Firstly, as with many modeling studies, the quality of available data limited the model inputs. The mortality in the model came from patients with hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation, which restricted the generalization of our results to other patient cohorts at different IFIs risks. Additionally, due to the lack of epidemiological data on mucormycosis in high-risk patients with IFIs in China, we relied on European data [14, 17]. To address this issue, we simulated a broader range (2%-14%) of mucormycosis prevalence in the scenario analysis. The results showed that when the incidence was 14%, the ICER decreased to $17734.73 /QALY, below the WTP threshold ($38223 /QALY). Compared with voriconazole, posaconazole became more cost-effective. Secondly, since the absence of relevant studies exploring the impact of IFIs on quality of life, our research did not set utility parameters based on this aspect. Finally, our study did not consider the drug-drug interactions and the direct or indirect costs associated with such interactions. It may underestimate the superiority of isavuconazole because of its lower frequency of drug-drug interactions [34].

Conclusion

Patients with a high risk of suspected IFIs should be treated with antifungal therapy as soon as possible. When making treatment decisions, healthcare professionals should take into account the possibility and incidence of mucormycosis, as well as the effectiveness and safety of triazole antifungal drugs. Our results suggested that isavuconazole represented a cost-effective initial option for treating IFIs in high-risk patients prior to the differential diagnosis of pathogens. It would also be economical when a 15% reduction in posaconazole cost was achieved.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

All authors contributed to the study's conception and design. XS and QX developed the model and analyzed the data. GH and XL performed the literature search and interpreted the results. XS and GH wrote the initial draft. QL critically reviewed and revised the manuscript.

Funding

This study was supported by the Shanghai key clinical specialist construction projects (shslczdzk06504).

Availability of data and materials

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

[1] Wilson DT, Dimondi VP, Johnson SW, Jones TM, Drew RH. Role of isavuconazole in the treatment of invasive fungal infections. Ther Clin Risk Manag. 2016; 12:1197-206.

[2] Silva JT, Ruiz-Camps I, Aguado JM. Invasive fungal infection over the last 30 years. Rev Iberoam Micol. 2021; 38:47-51.

[3] Liao Y, Chen M, Hartmann T, Yang R-y, Liao W-q. Epidemiology of opportunistic invasive fungal infections in China: review of literature. Chinese Medical Journal. 2013; 126:361-8.

[4] Chen M, Xu Y, Hong N, Yang Y, Lei W, Du L, et al. Epidemiology of fungal infections in China. Front Med. 2018; 12:58-75.

[5] Xu H, Li L, Huang WJ, Wang LX, Li WF, Yuan WF. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a case control study from China. Clin Microbiol Infect. 2012; 18:403-8.

[6] Jian Y, Wang M, Yu Y, Zhuo Y, Xiao D, Lin S, et al. Treatment and economic burden of mucormycosis in China: Case report review and burden estimation. J Clin Pharm Ther. 2022; 47:905-14.

[7] Skiada A, Lanternier F, Groll AH, Pagano L, Zimmerli S, Herbrecht R, et al. Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). Haematologica. 2013; 98:492-504.

[8] Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. Indian J Med Res. 2014; 139:195-204.

[9] Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2016; 63:e1-e60.

[10] Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clin Microbiol Infect. 2018; 24 Suppl 1:e1-e38.

[11] Maertens JA, Rahav G, Lee DG, Ponce-de-Leon A, Ramirez Sanchez IC, Klimko N, et al. Posaconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive aspergillosis: a phase 3, randomised, controlled, non-inferiority trial. Lancet. 2021; 397:499-509.

[12] Maertens JA, Raad, II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by Aspergillus and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. Lancet. 2016; 387:760-9.

[13] Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the

diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. Lancet Infect Dis. 2019; 19:e405-e21.

[14] Floros L, Pagliuca A, Taie AA, Weidlich D, Rita Capparella M, Georgallis M, et al. The cost-effectiveness of isavuconazole compared to the standard of care in the treatment of patients with invasive fungal infection prior to differential pathogen diagnosis in the United Kingdom. J Med Econ. 2020; 23:86-97.

[15] Floros L, Kuessner D, Posthumus J, Bagshaw E, Sjolin J. Cost-effectiveness analysis of isavuconazole versus voriconazole for the treatment of patients with possible invasive aspergillosis in Sweden. BMC Infect Dis. 2019; 19:134.

[16] Harrington R, Lee E, Yang H, Wei J, Messali A, Azie N, et al. Cost-Effectiveness Analysis of Isavuconazole vs. Voriconazole as First-Line Treatment for Invasive Aspergillosis. Adv Ther. 2017; 34:207-20.

[17] Azanza JR, Grau S, Vazquez L, Rebollo P, Peral C, Lopez-Ibanez de Aldecoa A, et al. The cost-effectiveness of isavuconazole compared to voriconazole, the standard of care in the treatment of patients with invasive mould diseases, prior to differential pathogen diagnosis in Spain. Mycoses. 2021; 64:66-77.

[18] Marty FM, Ostrosky-Zeichner L, Cornely OA, Mullane KM, Perfect JR, Thompson GR, 3rd, et al. Isavuconazole treatment for mucormycosis: a single-arm open-label trial and case-control analysis. Lancet Infect Dis. 2016; 16:828-37.

[19] Raad II, Hanna HA, Boktour M, Jiang Y, Torres HA, Afif C, et al. Novel antifungal agents as salvage therapy for invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: posaconazole compared with high-dose lipid formulations of amphotericin B alone or in combination with caspofungin. Leukemia. 2008; 22:496-503.

[20] Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Delaying Amphotericin B–Based Frontline Therapy Significantly Increases Mortality among Patients with Hematologic Malignancy Who Have Zygomycosis. Clinical Infectious Diseases. 2008; 47:503-9.

[21] Chowdhary A, Singh PK, Kathuria S, Hagen F, Meis JF. Comparison of the EUCAST and CLSI Broth Microdilution Methods for Testing Isavuconazole, Posaconazole, and Amphotericin B against Molecularly Identified Mucorales Species. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59:7882-7.

[22] Huang H, Liu Q, Zhang X, Xie H, Liu M, Chaphekar N, et al. External Evaluation of Population Pharmacokinetic Models of Busulfan in Chinese Adult Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. Front Pharmacol. 2022; 13:835037.

[23] Huang W, Zheng Y, Huang H, Cheng Y, Liu M, Chaphekar N, et al. External evaluation of population pharmacokinetic models for voriconazole in Chinese adult patients with hematological malignancy. Eur J Clin Pharmacol. 2022; 78:1447-57.

[24] Xhaard A, Lanternier F, Porcher R, Dannaoui E, Bergeron A, Clement L, et al. Mucormycosis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: a French Multicentre Cohort Study (2003-2008). Clin Microbiol Infect. 2012; 18:E396-400.

[25] Leenders AC, Daenen S, Jansen RL, Hop WC, Lowenberg B, Wijermans PW, et al. Liposomal amphotericin B compared with amphotericin B deoxycholate in the treatment of documented and suspected neutropenia-associated invasive fungal infections. Br J Haematol. 1998; 103:205-12.

[26] Xie. Q, Yu. Z. Comparison of short-term efficacy and cost-effectiveness ratio of artificial liver in treatment of acute (subacute)-on-chronic liver failure. Journal of Modern Medicine & Health. 2020; 36:2720-5.

[27] Leunis A, Redekop WK, Uyl-de Groot CA, Lowenberg B. Impaired health-related quality of life in acute myeloid leukemia survivors: a single-center study. Eur J Haematol. 2014; 93:198-206.

[28] Bower H, Andersson TM, Björkholm M, Dickman PW, Lambert PC, Derolf Å R. Continued improvement in survival of acute myeloid leukemia patients: an application of the loss in expectation of life. Blood cancer journal. 2016; 6:e390.

[29] Bergamasco MD, Pereira CAP, Arrais-Rodrigues C, Ferreira DB, Baiocchi O, Kerbauy F, et al. Epidemiology of Invasive Fungal Diseases in Patients with Hematologic Malignancies and Hematopoietic Cell Transplantation Recipients Managed with an Antifungal Diagnostic Driven Approach. Journal of fungi (Basel, Switzerland). 2021; 7.

[30] Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis. 2001; 32:358-66.

[31] Jeong SJ, Lee JU, Song YG, Lee KH, Lee MJ. Delaying diagnostic procedure significantly increases mortality in patients with invasive mucormycosis. Mycoses. 2015; 58:746-52.

[32] von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. Respiration. 1995; 62:341-7.

[33] Brunet K, Rammaert B. Mucormycosis treatment: Recommendations, latest advances, and perspectives. J Mycol Med. 2020; 30:101007.

[34] Groll AH, Townsend R, Desai A, Azie N, Jones M, Engelhardt M, et al. Drug-drug interactions between triazole antifungal agents used to treat invasive aspergillosis and immunosuppressants metabolized by cytochrome P450 3A4. Transpl Infect Dis. 2017; 19.

生理药动学模型预测国产左羟丙哌嗪胶囊体外溶出特性及对体内药动学影响

石笑弋[1,2,3]，刘轶[1,2,3*]，兰文[1,2,3]，李昌亮[1,2,3]，李琦[1,2,3]，刘雁鸣[1,2,3]，李帅[1,2,3]，陈涛[4]

（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙 410001；2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙 410001；3. 湖南省药品质量评价工程技术研究中心，长沙 410001；4. 上海凡默谷信息技术有限公司，上海 200127）

【摘要】目的：预测国产不同左羟丙哌嗪胶囊体外溶出特性及对体内药动学的影响。**方法：**根据不同厂家产品的体外溶出结果拟合体内溶出释放曲线；采用 Gastroplus 软件建立生理药动学模型；虚拟群体模拟预测制剂体外溶出特性以及对体内药动学的影响。**结果：**目前国产左羟丙哌嗪胶囊在 40 min 内溶出量（Q）达 85 %以上（T85 % = 40 min），达峰浓度（*Cmax*）、药时曲线（$AUC_{0\to\infty}$）等主要动力学参数在偏差范围内；不同厂家胶囊的体外溶出差异未影响体内药动学特征。**结论：**国产左羟丙哌嗪胶囊体外呈快速溶出的特性；快速溶出有利于其在体内迅速吸收，是发挥药效的有利因素。

【关键词】生理药动学模型；左羟丙哌嗪胶囊；体外溶出；影响；预测

Study on the dissolution characteristics of domestic levodropropizine capsule in vitro and its influence on pharmacokinetics in vivo using physiologically based pharmacokinetics model prediction

SHI Xiao-yi[1,2,3], LIU Yi[1,2,3,*], LAN Wen[1,2,3], LI Chang-liang[1,2,3], LI Qi[1,2,3], LIU Yan-ming[1,2,3], LI Shuai[1,2,3], Chen Tao[4]

(1. Hunan Institute for Drug Control,Changsha 410001：2.NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research ,Changsha 410001,3. Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation,Changsha 410001,4. PharmoGo Co.,Ltd.,Shanghai 200127)

【Abstract】Objective：To predict dissolution characteristics of different domestic levodropropizine capsule in vitro and their effects on pharmacokinetics in vivo. **Methods：**Fit the release rate curve in vivo according to the dissolution results of product from different manufacturers in vitro.Physiological pharmacokinetic model was established by Gastroplus software，the dissolution characteristics of the preparation in vitro and the effects on pharmacokinetics in vivo were predicted by virtual population simulation. **Results：**At present，the dissolution rate (Q) ofdomestic levodropropizine capsule in 40 min is predicted to be over 85 % (T 85% = 40 min)，the main pharmacokinetic parameters (*Cmax*，$AUC_{0\to\infty}$ and so on) were still within the deviation range .It does not affect the pharmacokinetic characteristics in vivo when the dissolution of granules from different manufacturers is different in vitro. **Conclusion：**The domestic levodropropizine capsule are rapid dissolution in vitro，which is beneficial for its rapid absorption in vivo and is an advantageous factor to exert the efficacy of drugs.

基金项目：2022 年国家药品抽验计划（No. 国药监药管 [2022]1 号）。

作者简介：石笑弋，女，主要从事药物分析与质量标准研究，email：40623099@qq.com *通信作者：刘轶，女，副主任药师，主要从事药物分析与质量标准研究，email：1124655@qq.com

【Key words】physiological based pharmacokinetic model; levodropropizine capsule; dissolution in vitro; influence; prediction

左羟丙哌嗪（levodroproplzine）为外周性镇咳祛痰药，通过对气管、支气管 C-纤维外周选择性抑制作用而发挥镇咳作用。它的作用部位在外周结后与感觉性神经肽相关的位点。它镇咳作用强，维持时间长。由于与 β 肾上腺素受体、M 胆碱受体和阿片受体均无作用，因此它的中枢抑制的不良反应较少，是一种高效安全的镇咳药物。临床上主要治疗急性上呼吸道感染和急性支气管炎引起的干咳和持续性咳嗽。不良反应表现在肠胃方面有恶心、胃灼烧、消化不良、腹泻等[1-4]。1988 年 10 月意大利的 Dompe 和 Mediolanum 公司共同开发了左羟丙哌嗪口服溶液并上市。国内无左羟丙哌嗪进口制剂，我国左羟丙哌嗪目前在售的剂型为胶囊剂[5]。由于原研左羟丙哌嗪片剂无进口，缺少参比制剂，无法采用生物等效性试验评价疗效，而按照新药模式开展大样本临床试验，又受临床资源和资金所限，短时间内难以实现。针对上述问题，本研究借鉴国外新发展的计算机模拟预测技术，以生理药动学模型（physiologically based pharmacokinetic model，*PBPK*）[6-8]为主要研究方法，以 2022 年国家药品抽检左羟丙哌嗪胶囊为对象，通过文献数据搭建 *PBPK* 模型。通过参考文献以及药代 / 药效（pharmacokinetic / pharmaco- dynamic，*PK* / *PD*）分析预测国产不同左羟丙哌嗪胶囊体外溶出特性以及其差异对体内药动学的影响。本研究为左羟丙哌嗪胶囊的质量与疗效评价提供了一种基于模拟预测的非临床评价方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

Ultuimate 3000 高效液相色谱仪（戴安，PDA 紫外检测器）；FADT-801RC 溶出度仪（上海富科思分析仪器有限公司）；XP205 电子分析天平（梅特勒·托利多公司，精度：十万分之一）。左羟丙哌嗪对照品（纯度：99.9%，批号：100678-201502，中国食品药品检定研究院）；左羟丙哌嗪胶囊（60 mg 及 30 mg），3 个厂家共 55 批均为 2022 年国家药品抽检样品；水为纯化水。

1.2 体外溶出实验

按照《中国药典》2020 年版二部方法[9]，开展常规溶出度检查。根据 FDA 对快速溶出的定义（30 min 内溶出量大于 85%）[10]，对 55 批次样品溶出实验结果拟合溶出释放率曲线，结合 *PBPK* 模型探讨左羟丙哌嗪胶囊的体外溶出特性。

1.3 PBPK 模型

采用 GastroPlus（version 9.0.0003,Simulations Plus,Inc.USA），利用文献[11-12]搭建 *PBPK* 模型。采用高级房室吸收与转运模型（advanced compartmental absorp- tion ＆ transit model，*ACAT*）作为吸收模型以及采用 *PBPK* 模型作为处置模型[13-14]。根据人体的相关生理性质，药物及制剂的理化性质和生理模型的结构，采用机制性卷积分和去卷积分函数模拟预测药物及制剂的体内药代特征。结合体外拟合溶出释放曲线，预测不同释放速率对体内药代特征的影响程度。

1.3.1 模型搭建主要参数

药学性质类参数有：相对分子质量（236.32）、脂水分配系数（0.44）、溶解度（1.0 mg • mL^{-1} at pH 7.2）、等电点（Base,7.35）、人体渗透性（3.08×10^{-4} cm^2 • s^{-1}）、扩散系数（0.83×10^5 cm^2 • s^{-1}）、人体口服左羟丙哌嗪胶囊、左羟丙哌嗪含片、左羟丙哌嗪片 60mg 和 30mg 后的血药浓度 - 时间曲线，均来源于文献[15-18]。药物粒子密度（1.2g • mL^{-1}）、剂量体积（250 mL）和沉淀时间（900 s）为软件默认值、药物粒径（25 μm）为软件优化值。人体生理性质参数有：总体清除率（0.362 mL/（min • kg））、分布体积（1.125 L • kg^{-1}）、胆酸盐增溶因子（0）、全血/血浆药物浓度比（0.96）、血浆游离药物分数（83.92%）。人体处置参数（CL：23.195 L • h^{-1}，V_2：0.42 L • kg^{-1}，$t_{1/2}$：2.49 h，K_{12}：0.529 h^{-1}，K_{21}：0.805 h^{-1}），为拟合口服左羟丙哌嗪胶囊、左羟丙哌嗪含片、左羟丙哌嗪片 60 mg 和 30 mg 后的血药浓度-时间曲线。

1.3.2 模型验证　采用和方差（ the sum of squares due to error，*SSE* ）、均方差（ mean squared error，*MES* ）、均方根误差（ root mean squared error，*RMSE* ）、确定系数（ R - square，*Rsq* ）以及预测误差（ prediction error，*PE* ）等参数进行模型准确性验证[13]。

1.3.3 模型评估 我们用不同文献[1-4]报道的药代动力学曲线，在 GastroPlus 的吸收和处置模型中进行相应的临床参数设置，并进行 *PK* 曲线的模拟。并对比预测结果与实测数值间的差异，评估模型预测的准确性。

2 结果

2.1 常规溶出度检查

按照《中国药典》2020 年版二部方法[9]，统一对 55 批次样品进行溶出度实验，样品均在 30 min 内溶出量（Q）达 85%以上，符合快溶出的特点[11]。

2.2 PBPK 模型预测左羟丙哌嗪胶囊的体内药动学特性

2.2.1 PBPK 模型的搭建与验证

按照“1.3.1”参数，采用 GastroPlus 的 PKPlus 模块计算资料及口服给药后的血药浓度-时间数据[19-20]获得经典房室模型的参数搭建 *PBPK* 模型，结果表明采用二房室拟合的结果最为准确。由此计算的 *V*ss / F 为 331.4 L，此时可结合 *PBPK* 模型推算的 *Vss*（75 L），反推得到该药物的口服生物利用度为约为 23%，可知相应的清除和分布参数。

进一步采用口服数据[12,15-17]建模，模拟预测达峰浓度(*Cmax*) 、药时曲线面积（ $AUC_{0\to\infty}$ ）按照文献报道的临床给药方式、受试者信息进行剂型、给药剂量和人群参数等模型参数的设置，并开展 *PK* 曲线的模拟；并对比预测值（*Cmax* 167 ng • mL^{-1} 和 *AUC* 646.2 ng • h • mL^{-1}）与实测数值间的差异，预测偏差都在 ± 25%的范围内，可以认为构建的模型校准确，也同时证明了预测模型的准确性[21]。从拟合曲线来看，预测曲线与实测数据点的每个点也基本重合在一起；表明初步搭建及优化的 PK 模型能够较好地反映左羟丙哌嗪制剂口服给药后在人体内的吸收，分布，代谢，排泄过程（ absorption,distribution,metabolism,excretion，*ADME* ）。绘制 PK 曲线模拟与实测结果图 1。

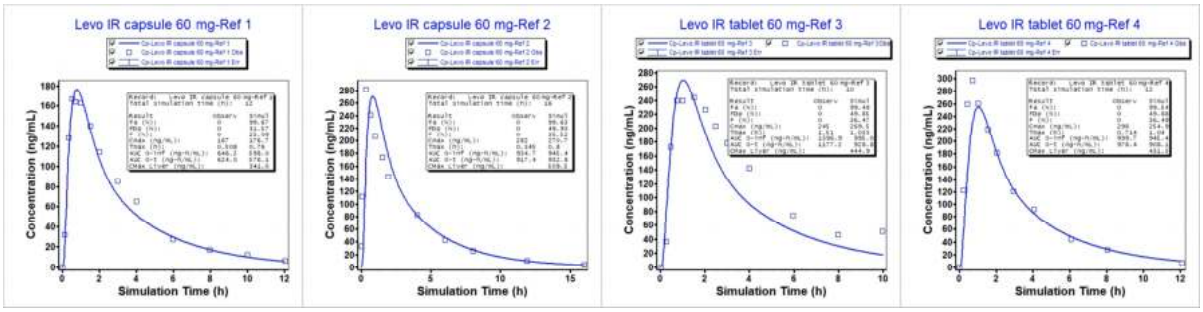


图 1　*PK* 曲线模拟（曲线）与实测结果（方格）

Fig 1　Simulative PK model（line）and clinlcal data（squaues）

2.2.2 体内释放与吸收分布 *PBPK*

左羟丙哌嗪属于高溶解、高渗透的 BCS Ⅰ类药物[22]。根据左羟丙哌嗪的理化性质及动力学参数，采用验证后左羟丙哌嗪 *PK* 模型，借助机制性口服吸收模型（ GastroPlus 的 *ACAT* 模型 ）反推得到左羟丙哌嗪在胃肠道中的释放与吸收曲线，以及胃肠道的局部吸收特征。根据图 2（红色 AmtDiss 为溶出曲线，蓝色 AmtAbs 为渗透曲线 ），根据图 3，可知左羟丙哌嗪主要吸收部位在十二指肠（duodenum）和小肠（jejunm）；可知体外溶出曲线明显快速体内的释放过程，药物在体外释放快于体内，且药物会在 0.5 h 后到达该部位，与文献[16]中记载的 t_{max} 结果基本相符合。

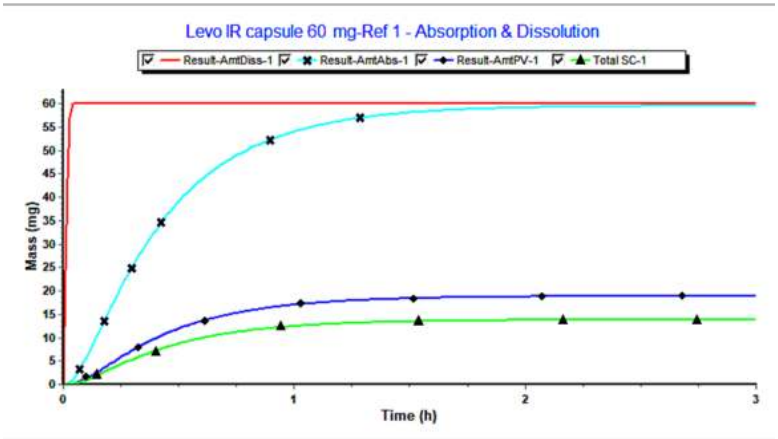


图 2 左羟丙哌嗪胶囊在体内的释放与吸收曲线

Fig 2 Release and absorption curve of levodropropizine capsule in vivo

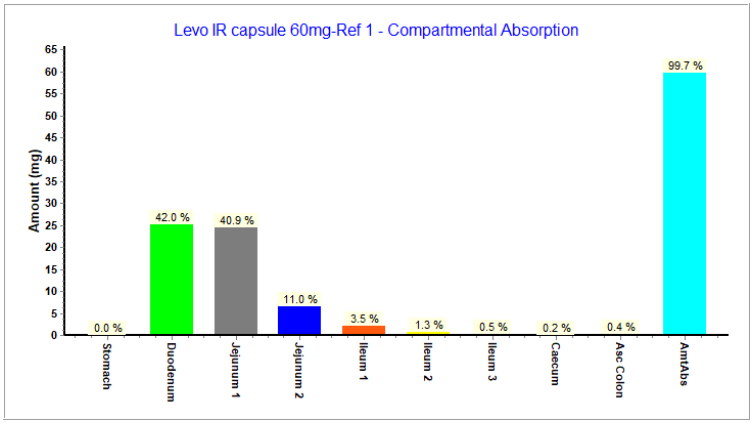


图 3 *PBPK* 模型预测吸收分布图

Fig 3 Plot of the absorption distribution predicted by the *PBPK* model

2.2.3 体外溶出与体内的相关性

在左羟丙哌嗪胶囊的质量评估中，筛选和评估了一些溶出条件并用于考察各制剂的体外溶出行为差异，根据拟合结果（图 4）显示，预测的 *Cmax* 和 *AUC* 与实测数值基本接近，偏差在 ± 10%的范围内。实测数据与参比体内的释放曲线相比，发现该药溶出条件可以很好的预测体内释放。

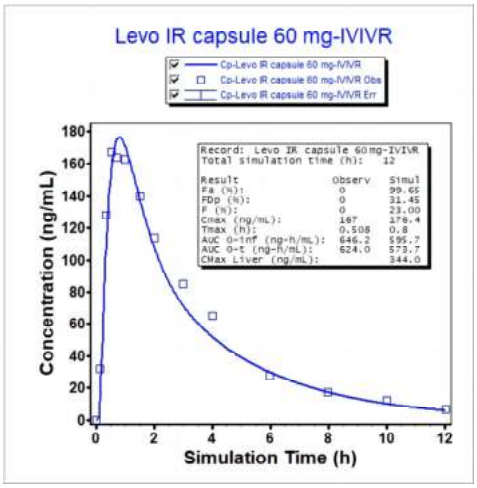


图 4 体外溶出与体内 *PBPK* 模型预测对比图

Fig 4 Comparison plot of in vitro dissolution and in vivo PBPK model predictions

2.2.4 体外溶出释放特性以及体内药代的影响

采用不同取样时间以及释放量拟合左羟丙哌嗪胶囊在 1 h 内的不同释放速率曲线，分别采用 15 min、30 min、40 min 和 45 min 内释放 85%，带入 *PK* 模型中进一步预测不同释放速率对体内左羟丙哌嗪胶囊药代的影响。以取样时间以及释放量拟合左羟丙哌嗪胶囊在 1 h 内的不同释放速率曲线，详见图 5。

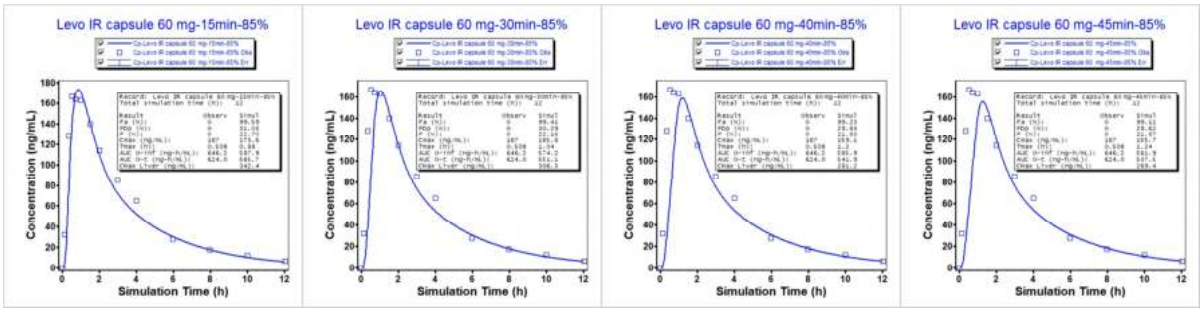


图 5　利用所构建的模型预测不同释放速率下左羟丙哌嗪胶囊的吸收分布图

Fig 5　The constructed model was used to predict the absorption distribution map of levodropropizine capsules at different release rates

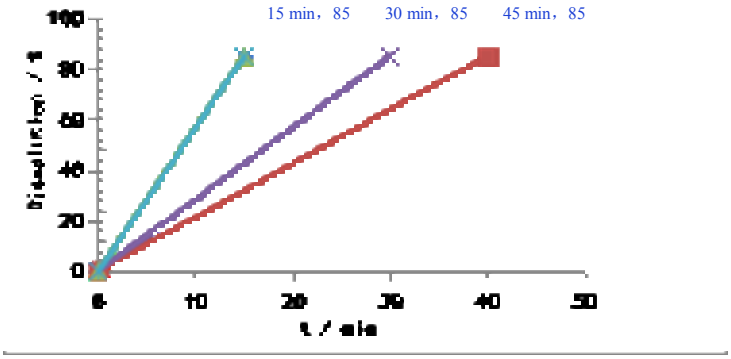


图 6　药物在胃肠道中不同的释放速率

Fig 6　Different release rate in the gastrointestinal tract of the drug

（图中直线分别代表药物在 15 min 、30 min 和 40 min 内释放 85%）

（Lines represents the release versus time of a release pattern corresponding to 85% release in 15 min 、30 min and 40 min）

分别采用 15 min 、30 min 和 40 min 内释放 85%，Cmax 偏差都在 ± 5%的范围内；45 min 内释放 85%，Cmax 偏差超出 ± 5%的范围（图 6）。将释放速率曲线加入模型预测，假设给药人群、生理条件等变异变化情况下，T85% = 40 min，*Cmax*、*AUC* 等动力学参数在偏差范围内。现行质量标准选择水作为溶出介质，采用 20 min 内释放 80%的限度作为制剂体外溶出考察的要求，能满足体内动力学参数要求。根据生物药剂处置分类系统左羟丙哌嗪为易溶解，高渗透药物。经评估，当药物在体内表现较慢地释放行为时，可能会增加峰浓度而导致的风险[22]。

2.2.5 上市仿制药 PK 曲线模拟及探讨

采用溶出度测定法第一法，以水 1000mL 为溶出介质，转速每分钟 50 转，取样点为 3 分钟、5 分钟、8 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、45 分钟、60 分钟。对 3 个厂家的 3 批胶囊制剂（ 厂家 A，Test 1，批号：220101，规格：60 mg； 厂家 B，Test 2，批号：20210404，规格：60 mg；厂家 C，Test 3，批号：

D2111231，规格：30 mg）开展体外溶出检查。经 *Weibull* 方程转化后的释放曲线，带入到已经验证的左羟丙哌嗪胶囊基础 PK 模型中，做体内 PK 曲线的预测。分别预测仿制制剂对应的人体 PK 曲线，并得到相应的 PK 参数，各个制剂的 PK 曲线和主要 PK 参数见下图（图 7）。三个仿制药的 PK 参数大体相近，*Cmax* 和 *AUC* 的比值表现出 ±5%左右差异，提示不同厂家的左羟丙哌嗪胶囊体外溶出差异未影响体内药动学特征，各个制剂间可能保持生物等效。

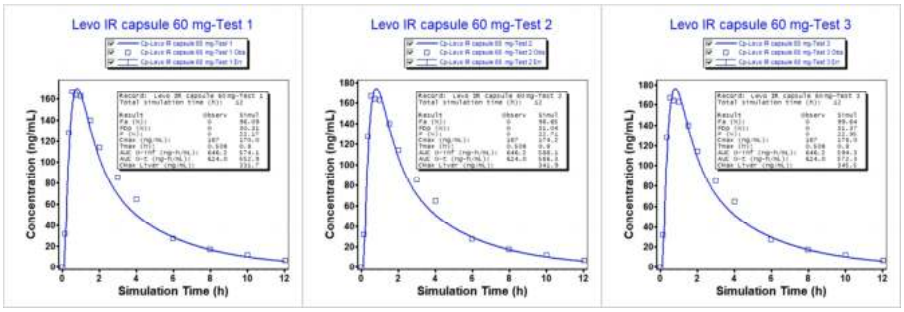


图 7　3 个厂家的平均 PK 曲线

Fig 7　Average PK curves of the 3 manufacturers

3 讨论

人体生理性质中对于分布体积，一般以静脉给药后的 PK 曲线经非房室模型计算处理后，得到的分布体积较为合理。但由于该药物没有上市的静脉给药制剂，因此无法获得准确地分布和清除数据。本工作为采用 GastroPlus 软件的 *PBPK* 模型可以结合药物的理化性质参数，机体的生理学参数，通过内建的公式进行计算得到药物在体内的分布特征。组织/血浆分配系数的计算公式（软件默认的 Lukacova（Rodgers-Single））并结合相关的建模参数，计算得到人体内的分布体积。

该软件在建立药物的体内外相关性、进行虚拟生物等效性等实验判断生物豁免性等方面均得到了较为广泛的应用[23]。由于国产左羟丙哌嗪胶囊体外溶出呈快速溶出以及口服模型预测其吸收量低于释放量的特点，结合分析预测，现有国产左羟丙哌嗪胶囊口服吸收基本不受体外溶出差异的影响，PK/PD 显示左羟丙哌嗪胶囊的快速溶解有利于其在体内迅速释放吸收，是发挥药效的有利因素。该研究为没有参比制剂的其他类似品种开展质量-疗效一致性评价工作提供了参考与借鉴，减少了 BE 试验带来的经济负担，亦可缩短药物的研发周期，减低制剂生物不等效的风险，同时为患者安全用药提供了质量保证。

参考文献

[1] Malandrino S, Melillo G, Bestetti A, et al. Antitussive properties of levodropropizine[J]. Arzneim. Forsch., 1988, 38(8): 1141-1143.

[2] Munt P L, Clavenna G, Algate D R, et al. Antitussive effects of levodropropizine in the dog[J]. Arzneim. Forsch., 1994, 44(2): 153-155.

[3] Lavezzo A, Melillo G, Clavenna G, et al. Peripheral site of action of levodropropizine in experimentally-induced cough: role of sensory neuropeptides[J]. Pulm. Pharmacol., 1992, 5(2): 143-147.

[4] Shams H, Daffonchio L, Scheid P. Effects of levodropropizine on vagal afferent C‐fibres in the cat[J]. Br. J. Pharmacol., 1996, 117(5): 853-858.

[5] Melillo G, Lavezzo A, Bestetti A, et al. Levodropropizine (DF 526), a new antitussive compound with antiallergic property[J]. Pharmacol. Res. Commun., 1988, 20: 238.

[6] Chow EC，Talattof A，Tsakalozou E， et al. Using physi-ologically based pharmacokinetic（pbpk） modeling to evaluate the impact of pharmaceutical excipients on oral drug absorption: sensitivity analyses [J]. AAPS J.,2016, 8(6): 1-12.

[7] Jones H M. Industry perspective of FDA PBPK guidance and EMA PBPK guideline: Report from IQC[J]. Drug Metab.

Pharmacokinet., 2018, 33(1): S8.

[8] Kesisoglou F. The role of physiologically based oral absorption modelling in formulation development under a quality by design paradigm[J]. J. Pharm. Sci., 2017, 106(4): 944-949.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 第二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 190-191.

[10] FDA. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on abiophar-maceutics classification system guidance for industry [EB / OL]. [2015-05-04].[2017-12-22]. www. Fda. gov / downloads /drugs / guidancecomplianceregulatoryinformation / guidances / UCM070246. pdf.

[11] Jeon S, Lee J, Hong T, et al. Pharmacokinetics and Safety of Levodropropizine Controlled Release Tablet after Repeated Dosing in Healthy Male Volunteers[J]. Journal of Korean Society for Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2013, 21(2): 113-119.

[12] 朱运贵, 肖轶雯, 雷志强. 左羟丙哌嗪的人体药动学研究[J]. 医学临床研究, 2005, 22(11): 1578-1581.

[13] Villiger A, Stillhart C, Parrott N, et al. Using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling to gain insights into the effect of physiological factors on oral absorption in paediatric populations[J]. The AAPS journal, 2016, 18(4): 933-947.

[14] Huang S M, Abernethy D R, Wang Y, et al. The utility of modeling and simulation in drug development and regulatory review[J]. J. Pharm. Sci., 2013, 102(9): 2912-2923.

[15] 高洪志, 梁宇光, 郝光涛, 等. 左羟丙哌嗪含片人体药动学研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(16): 1443-1447.

[16] 张相林, 李凯鹏, 丁庆明. 左羟丙哌嗪片剂人体生物等效性研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(11): 916-919.

[17] 毕津莲, 李湘斌. HPLC 法测定左羟丙哌嗪片血药浓度[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(12): 1888-1890.

[18] 肇丽梅, 赵立, 孙亚欣, 等. LC/MS/MS 法测定血浆中左羟丙哌嗪浓度及其药代动力学[J]. 药学学报, 2004, 39(12): 993-996.

[19] 王健康. 左羟丙哌嗪胶囊临床研究报告[P]. 中国人民解放军空军总医院, 2003-2004.

[20] Benet L Z, Broccatelli F, Oprea T I. BDDCS applied to over 900 drugs[J]. The AAPS journal, 2011, 13: 519-547.

[21] Heimbach T, Xia B, Lin T, et al. Case studies for practical food effect assessments across BCS/BDDCS class compounds using in silico, in vitro, and preclinical in vivo data[J]. The AAPS journal, 2013, 15(1): 143-158.

[22] 丁强, 金波, 管志美, 等. 塞来昔布胶囊体内外相关性的研究[J]. 中南药学, 2022, 20(08): 1810-1815.

[23] 潘瑞雪, 高源, 陈万里, 等. 溶出度实验结合计算机模拟技术评价国产阿莫西林胶囊的生物等效性[J]. 药学学报, 2014, 49(8): 1155-1161.

机器学习与 REIMS 技术在不同形态浙贝母与湖北贝母的鉴别分析中的应用研究

石岩，姚令文*，魏锋*，马双成

（中国食品药品检定研究院，北京 102629）

【摘要】目的：使用 REIMS 指纹图谱与机器学习相关技术对不同形态的浙贝母和湖北贝母进行预测和判别。**方法：**通过干法灼烧测定样品的 REIMS 指纹图谱数据，并将数据进行聚类分析、相关性分析、相似度分析、主成分分析，并建立逻辑回归模型。**结果：**测得的样品的 REIMS 指纹图谱具有品种差异的特征性，逻辑回归模型可以准确预测和判别样品的品种。**结论：**REIMS 技术结合机器学习在中药领域的应用前景十分广阔。

【关键词】浙贝母；湖北贝母；快速蒸发离子化质谱；机器学习；真伪鉴别

Research of machine learning and REIMS in the application of authenticity discrimination of Fritillariae Thunbergii Bulbus and Fritillariae Hupehensis Bulbus in different form

SHI Yan, YAO Ling-wen*, WEI Feng*, MA Shuang-cheng

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】Objective: Rapid evaporative ionization mass spectrometry (REIMS) fingerprints of samples of Fritillariae Thunbergii Bulbus and Fritillariae Hupehensis Bulbus in different forms were analyzed based on machine learning for authenticity discrimination. **Methods:** The samples were determined by REIMS with dry burning method. Then the REIMS data were studied and analyzed with the methods of cluster analysis, correlation analysis, similarity analysis, principal component analysis and logistic regression. **Results:** The REIMS fingerprints of the samples showed the characteristics of variety differences, and the logistic regression model can accurately predict and distinguish the varieties of the samples. **Conclusion:** The application prospect of REIMS technique combined with machine learning in the field of traditional Chinese medicine is very broad.

【Keyword】Fritillariae Thunbergii Bulbus; Fritillariae Hupehensis Bulbus; REIMS; machine learning; authenticity discrimination

百合科贝母属植物有上百种之多，其中有众多的以鳞茎入药的重要药用植物，大多具有清热润肺和止咳祛痰的功效[1]。贝母属的药用植物在我国有着悠久的药用历史，其药用始载于《神农本草经》；在我国最早的一部诗歌文学总集《诗经》中收载的《鄘风·载驰》，其中就有“陟彼阿丘，言采其蝱”的诗句，其中“蝱”即为贝母，可见贝母属药用植物自古就与我国劳动人民有着紧密的联系[2]。历代本草专著所记载的贝母品种来源虽较为混乱，

*通信作者　姚令文 E-mail: yaolingwen@nifdc.org.cn

魏　锋 E-mail: weifeng@nifdc.org.cn

第一作者　E-mail: shiyan@nifdc.org.cn

但都是以贝母属植物为主流，在清代《本草纲目拾遗》一书中将贝母按照功效分为了 2 个大类，即川贝母和浙贝母，这正与临床用药中将贝母分为“川贝”和“浙贝”2 个类群的实际情况相契合[1-4]。其中的“川贝”类群是以川贝母为主，而“浙贝”类群则以浙贝母为主，其中包括了产自长江流域的湖北贝母和东阳贝母等[1]。浙贝母药材是指浙贝母植物的干燥鳞茎，与川贝母功效类似，具有清热化痰止咳和解毒散结消痈的功效[5]。由于价格因素，一些与浙贝母性状相似的贝母类药材在市场上有混作正品浙贝母销售和使用的情况，其中混伪品多见湖北贝母[6,7]。

为规范中药临床用药，保障人民群众用药的安全有效，有必要对浙贝母与湖北贝母的特征进行鉴别研究。由于浙贝母与湖北贝母化学成分相近，目前对于两者的鉴别研究并不多，其理化特征鉴别的实验过程多经过色谱分离或较复杂的样品处理，且数据处理和分析方法识别准确度欠缺[8,9]。快速蒸发离子化质谱（rapid evaporative ionization mass spectrometry，REIMS）是一种手持式的，实时原位质谱分析技术，依靠将生物组织快速蒸发所产生的气溶胶引入质谱仪进行样品的检测[10-14]。目前 REIMS 的应用领域基本集中在手术医疗以及肉类食品检验等范围[15-19]，在中药，尤其是中药材及中药饮片的分析领域中几乎为空白，这与其手持式离子化设备 iknife 通过样品导电产热的原理有关。本研究在前期[20]创新地使用可调恒温电烙铁解决了干燥白头翁及其伪品药材表面缺乏导电性的问题的基础上，开展了浙贝母及其伪品湖北贝母的 REIMS 指纹图谱的测定，并且根据所获得的数据采用机器学习的相关算法进行了数据的处理和机器识别研究。考虑到实际应用情景，为了增加本研究及其所建立模型的泛化能力，在样品数据采集时，兼顾了浙贝母和湖北贝母的较完整鳞茎和粉末状两种常见的形态（见图 1），在机器识别模型时，训练集和测试集的数据也都包括了较完整鳞茎和粉末状的测定数据。最终所建立的模型对浙贝母和湖北贝母可以达到完全准确地识别，对浙贝母和湖北贝母的鉴别提供了一个可靠的方法，对于贝母类药材的真伪鉴别研究也有一定的参考意义。



图 1 样品形态

Fig1 Sample form

1 材料

1.1 仪器

SYNAPT G2-S 四极杆飞行时间质谱仪（美国 Waters 公司）；REIMS 离子源（美国 Waters 公司）；Pump 11 Elite 注射泵（美国 Harvard Apparatus 公司）；WSD71 可调温恒温数显焊台（德国 Weller 公司）。

1.2 试药

亮氨酸脑啡肽（美国 Sigma-Aldrich 公司）。

研究样品共 144 批，浙贝母为 74 批（编号为 ZBM_01~ZBM_74），其中浙贝母较完整鳞茎样品 35 批（ZBM_01~ZBM_35），浙贝母粉末样品 39 批（ZBM_36~ZBM_74）；湖北贝母为 70 批（编号为 HBBM_01~HBBM_70），其中湖北贝母较完整鳞茎样品 38 批（HBBM_01~HBBM_38），湖北贝母粉末样品 32 批（HBBM_39~HBBM_70）。样品详细信息见表 1。

表 1 样品信息表

Table 1 Information of samples

编号（code）	收集地（collection place）	外观形态（form）	品种（variety）
ZBM_01~ ZBM_16	河北（Hebei）	较完整鳞茎（complete	浙贝母（Fritillariae
ZBM_17~ ZBM_22	安徽（Anhui）	bulb）	Thunbergii Bulbus）
ZBM_23~ ZBM_35	浙江（Zhejiang）		
ZBM_36~ ZBM_45	河北（Hebei）	粉末（powder）	
ZBM_46~ ZBM_47	安徽（Anhui）		
ZBM_48~ ZBM_52	-		
ZBM_53~ ZBM_74	浙江（Zhejiang）		
HBBM_01~HBBM_11	湖北（Hubei）	较完整鳞茎（complete	湖北贝母（Fritillariae
HBBM_12~HBBM_18	河北（Hebei）	bulb）	Hupehensis Bulbus）
HBBM_19~HBBM_38	安徽（Anhui）		
HBBM_39~HBBM_44	湖北（Hubei）	粉末（powder）	
HBBM_45~HBBM_52	河北（Hebei）		
HBBM_53~HBBM_70	安徽（Anhui）		

1.3 编程语言

Python 计算机编程语言（美国 Python Software Foundation，version:3.8.8）。

2 方法与结果

2.1 质谱数据采集

2.1.1 质谱条件

100 ng·mL^{-1}亮氨酸脑啡肽溶液流速 100 μL·min^{-1}。焊台烙铁头温度 450 ℃；质谱扫描范围 50 ~1200 m/z；扫描模式为灵敏模式；扫描时间为 0.2 s。正离子模式采集，数据记录为 continuum 模式。

2.1.2 样品处理及测定

对于较完整鳞茎的供试样品，使用焊台烙铁头在供试样品表面进行干法烧灼；对于粉末形态的供试样品，取适量供试样品粉末于铝箔上，使用焊台烙铁头干法烧灼。干法烧灼生成的气溶胶使用聚四氟乙烯管引入 REIMS 离子源，进行质谱扫描检测，每批样品测定 10 次，烧灼时间约为 2 s。样品的 REIMS 质谱图见图 2。

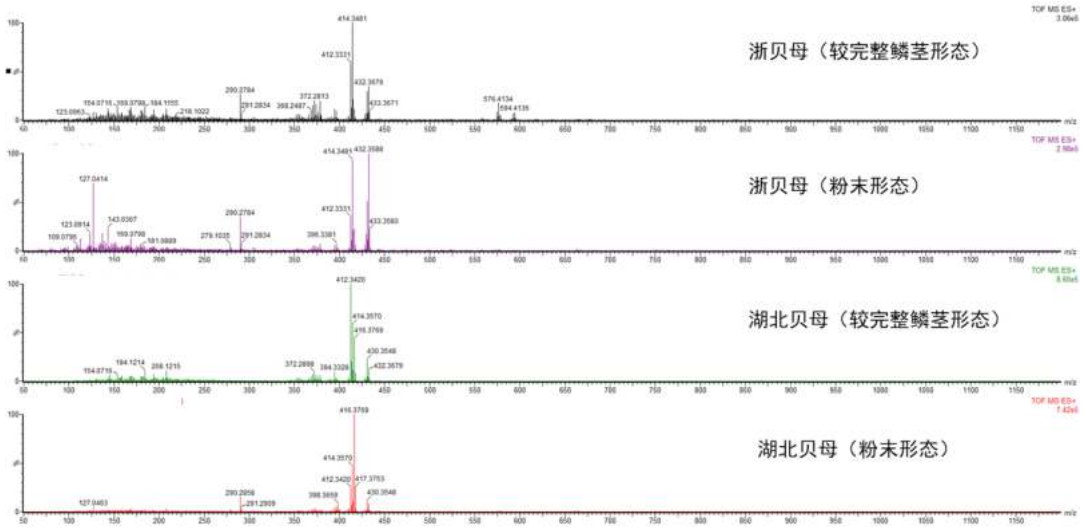


图 2 样品的 REIMS 质谱图

Fig.2 REIMS spectrums of samples

2.2 数据处理与分析

2.2.1 数据处理

质谱扫描范围 m/z 50 ~1200，样品总批数为 144 批，数据最终构成 144×334 的向量矩阵，经过标准化处理后导出 csv 格式备用。

2.2.2 聚类分析

使用 Ward 法根据各样品 REIMS 指纹图谱间的欧氏距离进行系统聚类分析，聚类分析树状图结果见图 3。

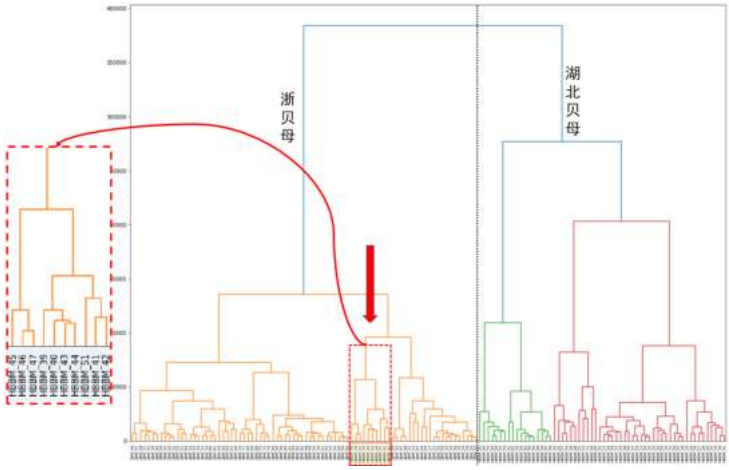


图 3 聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis dendrogram

2.2.3 Pearson 相关性分析

对样品的 REIMS 指纹图谱数据按照样品之间的关系进行基于 Pearson 法的相关性分析，按照样品之间 REIMS 指纹图谱相关性强弱绘制矩阵图，颜色越深代表相关性越强，见图 4。

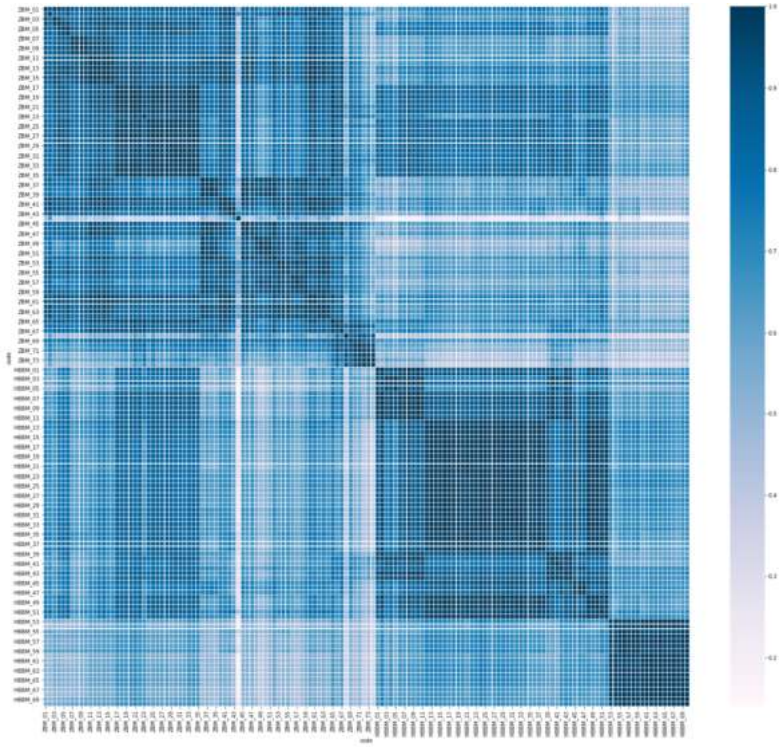


图 4 Pearson 相关性

Fig 4 Pearson Correlation

2.2.4 相似度分析

将浙贝母和湖北贝母的 REIMS 指纹图谱数据分别按照样品形态各分为 2 类，可得到样品 4 个分类，即编号为 ZBM_01~ZBM_35 浙贝母较完整鳞茎样品；编号为 ZBM_36~ZBM_74 浙贝母粉末样品；编号为 HBBM_01~HBBM_38 湖北贝母较完整鳞茎样品；编号为 HBBM_39~HBBM_70 湖北贝母粉末样品。将这 4 个分类样品的 REIMS 指纹图谱数据分别取平均值，可得到代表 4 个类别样品的 REIMS 平均指纹图谱数据，按照夹角余弦法分别计算所有样品与上述 4 个 REIMS 平均指纹图谱的相似度，然后按照样品品种的不同绘制相似度散点分布图及核密度图，即图 5。图 5 中，A 为样品分别对于浙贝母样品的相似度散点分布图，其中横坐标为样品对于浙贝母较完整鳞茎样品平均指纹图谱的相似度，纵坐标为样品对于浙贝母粉末样品平均指纹图谱的相似度；B 为 A 散点分布图的核密度图；C 为样品分别对于湖北贝母样品的相似度散点分布图，其中横坐标为样品对于湖北贝母较完整鳞茎样品平均指纹图谱的相似度，纵坐标为样品对于湖北贝母粉末样品平均指纹图谱的相似度；D 为 C 散点分布图的核密度图。

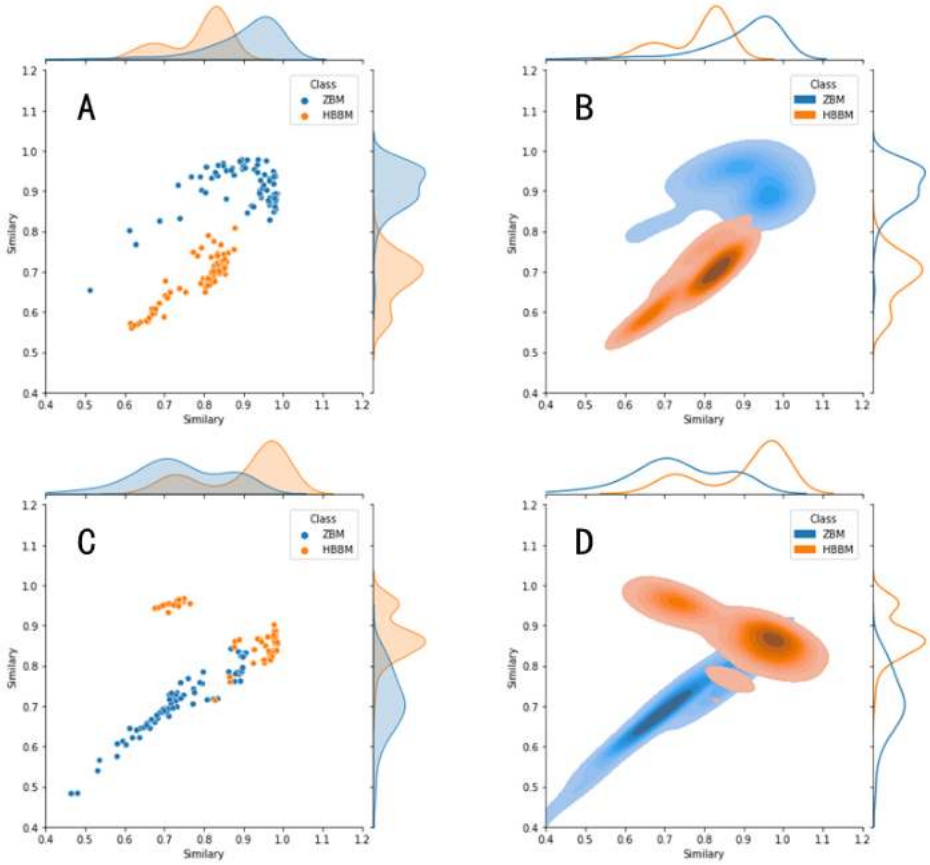


图 5 样品相似度分布

Fig 5 Similarity of samples

2.2.5 主成分分析

将各批样品的 REIMS 指纹图谱数据按照 95%累计方差水平进行主成分降维解构，结果得到 5 个主成分（分别为 PC1、PC2、PC3、PC4、PC5），各批样品在这 5 个主成分对应的二维空间的得分分布情况见图 6。

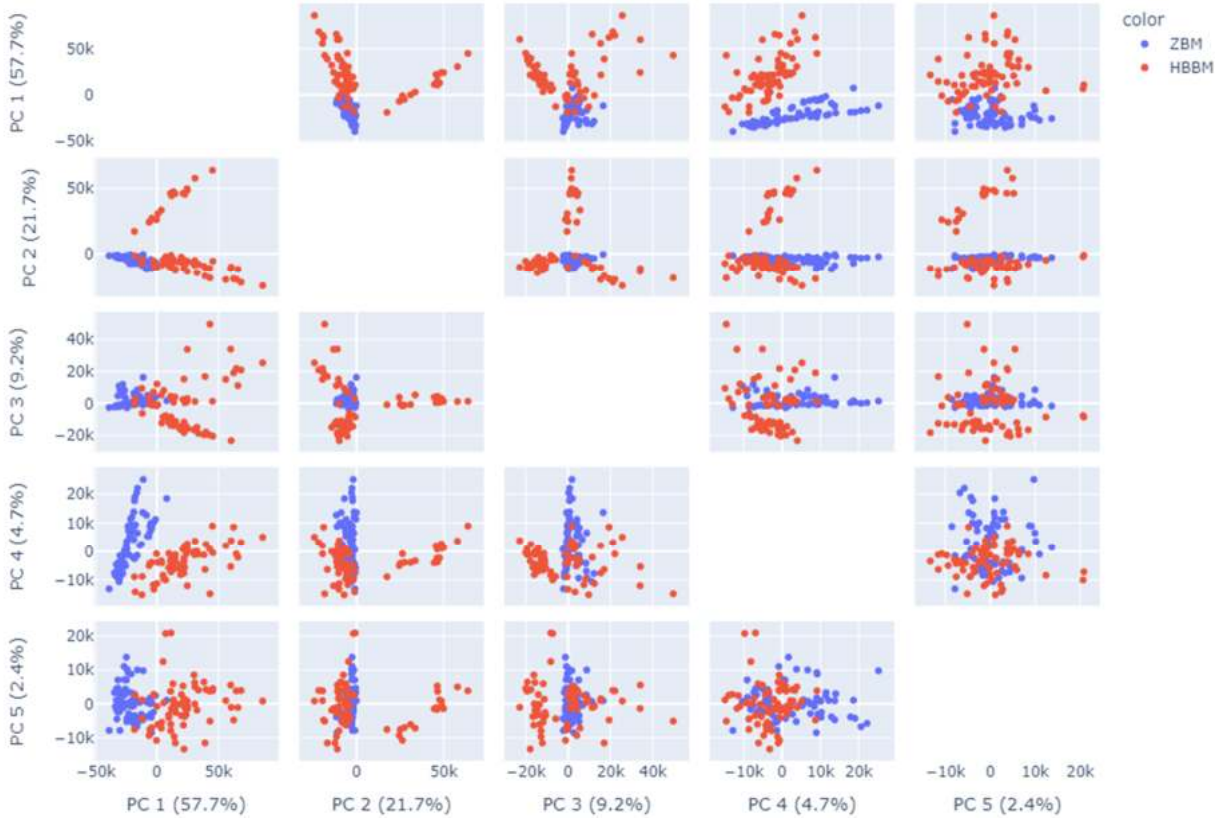


图 6 样品主成分得分分布图

Fig 6 Principal component score plots of samples

2.2.6 逻辑回归

将各批样品 REIMS 指纹图谱数据按照浙贝母和湖北贝母 2 种类别建立逻辑回归的分类模型，惩罚项参数选择岭回归（l2），优化算法选择拟牛顿法（lbfgs），结果所有样品的预测精确率、召回率以及 F1 分数均为 1.00，初步表明逻辑回归模型表现良好。

为了进一步客观准确地验证模型的预测能力，将 144 批样品按照浙贝母和湖北贝母 2 种类别根据约 8 比 2 的比例将样品随机划分为训练集和测试集，即训练集样品为 115 批，其中浙贝母样品 59 批，湖北贝母样品 56 批；测试集样品为 29 批，其中浙贝母样品 15 批，湖北贝母样品 14 批。以训练集按上述参数建立逻辑回归分类模型，并选择 5 折法进行交叉验证，然后以所建立的模型对 29 批测试集样品进行预测，预测精确度、召回率以及 F1 分数均为 1.00。训练集内部交叉验证和测试集外部验证的特异性、召回率、精确率、准确率结果见表 2。

表 2 逻辑回归分类模型预测评价

Table 2 Evaluation of classification prediction of Logistic Regression

样品类别（Class）	特异性（Specificity）	召回率（Sensitivity）	精确率（Precision）	准确率（Accurancy）	验证类型（Validation Type）
浙贝母（Fritillariae Thunbergii Bulbus）	1.00	1.00	1.00	1.00	交叉验证（cross validation）
湖北贝母（Fritillariae Hupehensis Bulbus）	1.00	0.99	1.00		
浙贝母（Fritillariae	1.00	1.00	1.00	1.00	测试集（test set）

Thunbergii Bulbus）			
湖北贝母（Fritillariae Hupehensis Bulbus）	1.00	1.00	1.00

为了考察训练集样品个数对所建立的逻辑回归模型预测能力的影响以及模型的过拟合情况，按照 8 比 2 比例将样品随机划分训练集和测试集，然后按照训练集样品的个数由 2 至满训练集样品逐个训练并建立模型，并逐个分别计算模型的均方误差（Mean Square Error，MSE），绘制 MSE 与训练集样品数关系图，见图 7。

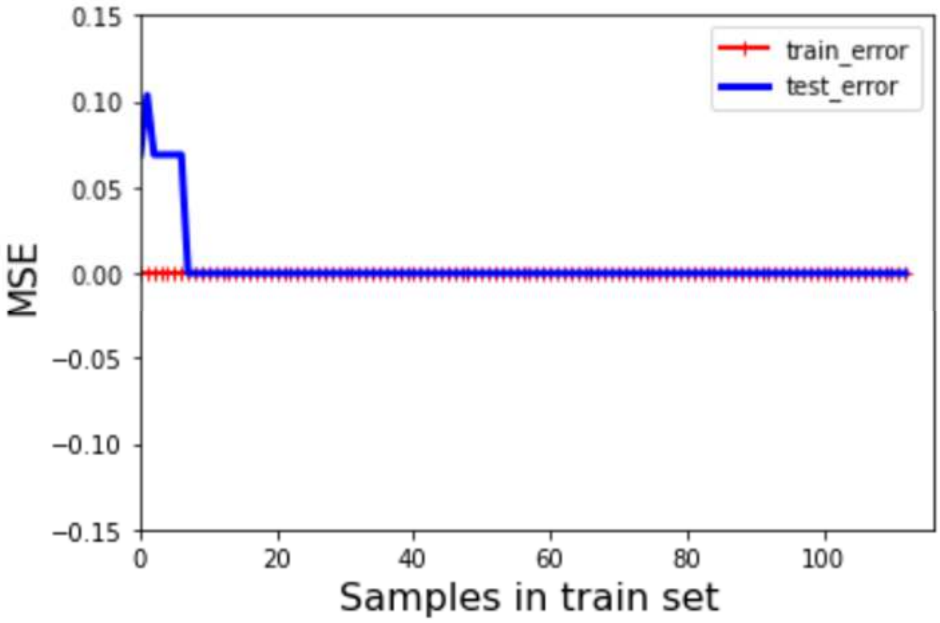


图 7 MSE 与训练集样品数关系

Fig 7 Relation of MSE and samples in train set

3 讨论

3.1 样品形态的选择

目前市场上的贝母类样品基本以较完整的鳞茎和粉末这 2 种形态存在，为了扩大研究的实际使用意义，增加机器学习模型的泛化能力，同时考察不同形态下的样品对 REIMS 测定的影响，在对浙贝母和湖北贝母进行 REIMS 测定时，同时测定了较完整鳞茎样品和粉末状样品，而在进行数据分析及训练模型时按照样品的品种进行研究和模型效果的验证。结果表明，尽管不同形态样品的数据对于简单的聚类分析或是相似度分析影响较大，但对于属于监督学习的逻辑回归而言则毫无影响，在不同形态的浙贝母和湖北贝母样品的预测方面表现出极佳的鲁棒性。

3.2 REIMS 测定方法

本研究在采集样品中的 REIMS 数据时，考虑到贝母类样品中主要活性成分是生物碱类物质，因此选择以正离子模式采集数据。在对较完整鳞茎样品进行干法烧灼测定时，为了数据具有更好的代表性，采用了前期研究[20]的采样策略,兼顾了样品表面不同部位，烧灼点分布在大瓣或小瓣鳞叶的上部或下部。REIMS 检测对象基本都是具有导电性的肉类或者湿润的样品，继前期研究[20]之后，本研究继续采用直接使用烙铁头对干燥中药材进行烧灼采集数据的方式，获得了令人十分满意的结果，进一步确证了创新的干法 REIMS 的方法的可行性，对 REIMS 在中药材检测领域的应用具有开创意义。

3.3 数据的预处理

由于采集 REIMS 数据时，人为操作或样品自身形态不同，会造成产生的气溶胶浓度具有差异，进而会造成

离子信号强弱有别，因此须对数据进行标准化预处理。

3.4 无监督学习

3.4.1 聚类分析

由聚类分析结果的树状图（图 3）明显可见所有样品首先是分为了 2 大类，即浙贝母和湖北贝母，该处分类明确清晰，大部分的样品聚类准确，但是有 10 批湖北贝母粉末状样品（HBBM39~HBBM47，HBBM51）聚类错误，可见尽管 REIMS 指纹图谱具有一定的品种特征性，但不同形态样品的数据仍然存在一些影响品种聚类的差异之处。

3.4.2 Pearson 相关性分析

Pearson 相关性系数（P_{corr}）可以衡量向量间（X，Y）相关程度及相似度关系，其计算方法为 2 个向量的协方差除以向量的标准差，取值范围为-1~1。

$$P_{corr} = \frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}\sqrt{\sum_i^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Pearson 相关性分析多用于变量间相关程度的研究[21-23]，本次研究将其用作表征不同样品间的相关或相似程度，结果如图 4 所示，蓝色颜色越深代表相关系数数值越大，相关性越强。图 4 显示所有样品均呈现正相关的关系，相同品种的样品 Pearson 相关系数一般较高，但是相同品种和不同品种间相关系数的数据分布有重叠情况，界限不够清晰，无法明确划分。

3.4.3 相似度分析

一般来讲，相似度的计算多采用夹角余弦法、欧氏距离法、Minkowsky 距离法、相关系数法等，一般以夹角余弦法最为常用，因此本研究采用夹角余弦法对样品进行相似度分析。从 Pearson 相关系数与夹角余弦相似度的数学定义可以推导出，在一定条件基础上，二者互为等价，因此在结果数据的分布趋势来看，二者基本保持了一致。在进行相似度分析时，本研究将不同品种且不同形态的样品数据分别进行了相似度分析，即按照各批样品分别对同品种下不同形态样品的平均指纹图谱的相似度分布情况进行了考察，分别以同品种不同形态样品的相似度绘制了分布核密度图，见图 5。

3.4.4 主成分分析

本研究所进行的主成分分析，旨在通过不同主成分的样品分布散点图对浙贝母与湖北贝母的数据特征性差异进行初步的研判。由图 6 可知，样品的 REIMS 指纹图谱数据经过主成分降维处理后，前 5 个主成分累计方差可达 95%以上，基本可以代表样品数据主要信息。根据各批样品的 5 个主成分得分，可绘制成 10 个二维的样品得分分布图。如图 6 所示，样品的 REIMS 指纹图谱数据的第 1 主成分和第 4 主成分得分分布图中，浙贝母与湖北贝母的样品具有一定的特征性差异。因此，由从本研究的数据来看主成分降维后的样品数据基本可用作不同类别样品的鉴别，但是必须至少以第 1 主成分和第 4 主成分组合，单独以某 1 个主成分作为数据是无法进行准确鉴别的。

3.5 基于逻辑回归的有监督学习及相关评估指标

逻辑回归虽然名为回归，实则是一种分类算法，在机器学习领域内被广泛使用。逻辑回归的分类属性，或者说预测事件发生概率的属性是依托于 sigmoid 函数而实现的。sigmoid 函数可以用公式$g(z) = \frac{1}{1+e^{-z}}$表示，绘制 sigmoid 函数曲线可得到“S”型的曲线，见图 8。当 z 大于 0 时，g(z)大于 0.5，且随着 z 数值的增大而接近 1，当 z 小于 0 时，g(z)小于 0.5，且随着 z 数值的减小而接近 0。

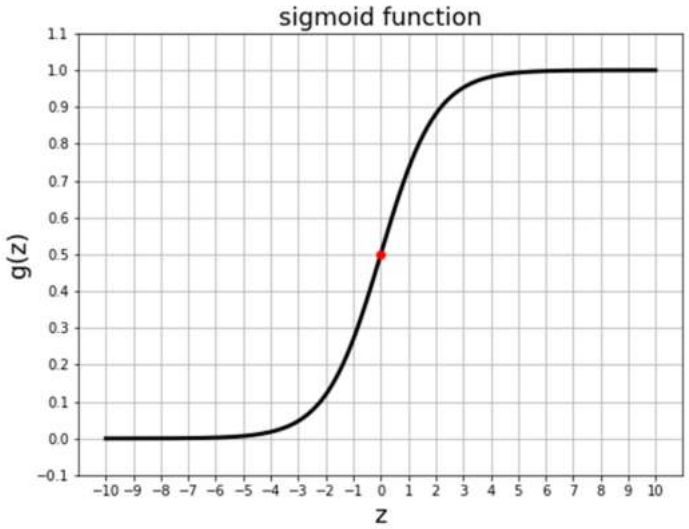


图 8 sigmoid 函数曲线

Fig8 Sigmoid function curve

回到机器学习的研究中，对于常见的二分类问题（y=0 还是 y=1），逻辑回归计算的概率即为 y 为 1 的概率，当逻辑回归计算概率大于 0.5，则认为 y 为 1，若概率小于 0.5，则认为 y 为 0[24]。由于是二分类问题的缘故，因此 y=0 和 y=1 的概率和为 1，即$P(y=0)+P(y=1)=1$。下式即为逻辑回归的方程，其中 θ 和 X 分别表示参数矩阵和特征矩阵。

$$h_\theta(x)=g(\theta^T\mathrm{X})=\frac{1}{1+\mathrm{e}^{-\theta^T\mathrm{X}}}$$

逻辑回归机器学习模型的训练和优化，是基于代价函数（COST）对参数矩阵 θ 进行的最优化学习。逻辑回归的代价函数公式如下式表示，其中根据样品目标矩阵 y 取值为 0 或 1。当 y=0 时，代价函数为$-log\big(1-h_\theta(x)\big)$，当 y=1 时，代价函数为$-log\big(h_\theta(x)\big)$。

$$COST\big(h_\theta(x),y\big)=-ylog\big(h_\theta(x)\big)-(1-y)log\big(1-h_\theta(x)\big)$$

为了解决模型的过拟合问题，需要对代价函数进行正则化处理，即代价函数最小化过程中加入惩罚项。一般来讲，正则化有两种方式，lasso 回归和 ridge 回归，即 l1 和 l2。

逻辑回归中常用的优化算法有 lbfgs、liblinear、newton-cg、newton-cholesky、sag 和 saga，这些算法一般是基于牛顿法、拟牛顿法以及梯度下降法等经典算法原理。在选择使用优化算法时，须根据算法自身特点，结合模型是二分类还是多分类问题，惩罚项的不同等进行选择。lbfgs 法是一种基于拟牛顿算法的经典而流行的优化算法，所谓拟牛顿法，是指不直接计算海森矩阵，而是通过一定方式构建近似海森矩阵或海森矩阵的逆，来迭代优化代价函数或损失函数，这样既能保证较为高效的收敛，又能保证模型的鲁棒性。lbfgs 法是通过构建近似海森矩阵的方式，在 bfgs 法基础上采用优先内存空间的方式实现的，其在各个领域都表现出了强大的生命力，目前已成为无约束优化领域的核心算法。本研究为二分类问题，采用的惩罚项为 l2，最终选择使用 lbfgs 法，取得令人满意的分类结果。

特异性、召回率、精确率、准确率是评估机器学习模型学习和预测分类效果的常用经典指标。样品经过机器学习模型学习和预测分类之后，可以根据样品的真实类别情况以及模型分类结果分为 4 类，即真阳性（TP）、假阴性（FN）、真阴性（TN）和假阳性（FP）。那么特异性可以用公式$\frac{\mathrm{TN}}{\mathrm{TN+FP}}$表示，召回率可以用公式$\frac{\mathrm{TP}}{\mathrm{TP+FN}}$表示，精确率可以用公式 $\frac{\mathrm{TP}}{\mathrm{TP+FP}}$表示，准确率可以用公式$\frac{\mathrm{TP+TN}}{\mathrm{TP+FN+TN+FP}}$表示。根据以上公式可知，特异性、召回率、精确率、准确率的数值范围为 0~1，数值越大越代表模型的学习和预测分类效果优秀。如表 2 所示，本研究所建立的

逻辑回归模型在样品训练集内部 5 折法交叉验证和测试集外部验证的特异性、召回率、精确率、准确率，除对湖北贝母的召回率为 0.99 外，其它指标数值均为 1，可见逻辑回归模型应用于浙贝母与湖北贝母干法 REIMS 指纹图谱数据预测分类的效果非常准确，尤其是更为重要的针对测试集样品的 4 项判别指标都为 1，判别完全准确。

机器学习不仅依赖于单纯的算法，样品的数量也直接关系到机器学习的效果。在目前的大数据时代，人类活动会产生海量的各种数据，对于药品分析而言，其样品数据的获得则依赖于样品的收集情况和实验测定活动。在一定的阶段中，样品批数可能会有所受限，那么在现有的样品批数情况下，数据数量对所建立的机器学习模型影响程度就应该需要纳入考量。本研究所绘制的图 7 表示了在训练集样品数量逐渐增加的情况下，逻辑回归模型的内部交叉验证和测试集的 MSE 的变化趋势。由该图可以得知，最初内部交叉验证的 MSE 为 0，而测试集则有较大 MSE，表示模型在训练集样品批数较少时预测分类效果一般，而随着训练集中样品批数的增加，测试集 MSE 迅速为 0，并且随着训练集样品批数的持续增加，测试集 MSE 始终保持为 0，表示模型并未出现过拟合情况。

在本研究中，通过对 115 批训练集样品的 REIMS 指纹图谱数据进行学习训练而优化得到的逻辑回归模型在内部交叉验证和测试集样品验证中，都获得了准确的结果，尤其是对于 29 批测试集样品的准确预测分类，充分表明了该模型的有效性。此外，考虑到具体应用情况，在采集得到 REIMS 指纹图谱数据时混合采集了较完整鳞茎和粉末状两种常见的形态的浙贝母和湖北贝母，逻辑回归验证结果也充分说明了模型预测能力对于样品形态变化的良好的鲁棒性。

3.6 展望

本研究是在前期开创性采用干法 REIMS 对中药材及饮片进行研究[20]基础之上，对不同形态浙贝母和湖北贝母进行的一次有益尝试。使用首创的电烙铁直接对干燥中药材取样测定法，对贝母类药材两种常见的形态，即较完整鳞茎和粉末状，分别进行质谱数据的采集，并使用机器学习领域的多种经典算法对所获得的 REIMS 数据进行分析与研究，其中建立的逻辑回归监督学习模型对两类样品的分类可以达到极高的正确率。本研究不仅表明 REIMS 对贝母类药材分类预测的强大能力，同时也再一次验证了 REIMS 结合机器学习在中药材及饮片研究领域的良好适用性。

参考文献

[1]王书军，高文远，于琳，等.百合科贝母属药用植物分类研究进展[J].中国中药杂志，2007，32（16）:1609-1614

WANG SJ, GAO WY, YU L, *et al*. Progress of taxonomic study on Fritillaria (Liliaceae) medicinal plant [J]. China J Chin Mater Med, 2007, 32(16):1609-1614

[2]肖培根.湖北贝母的研究进展[J].中国中药杂志，2002，27，（10）：726-728

XIAO PG. A Review on the Study of Hubei bei mu [J]. China J Chin Mater Med, 2002, 27(10):726-728

[3]YU M, WANG S, CAI R, *et al*. Discrimination and Content Analysis of Fritillaria Using Near Infrared Spectroscopy [J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2015:752162

[4]ZHOU M, MA X, DING G, et al. Comparison and evaluation of antimuscarinic and anti-inflammatory effects of five *Bulbus fritillariae* species based on UPLC-Q/TOF integrated dual-luciferase reporter assay, PCA and ANN analysis [J]. Journal of Chromatography B,2017,1041-1042:60-69

[5]中华人民共和国药典 2020 年版. 一部 [S].2020:304-305

ChP 2020. Vol I [S].2020: 304-305

[6]马秀芹，秦伟华，李学斌，等.浙贝母与其混淆品湖北贝母的鉴别[J].时珍国药研究，1997，8（1）：37

MA XQ, QIN WH, LI XB, et al. Identification of Fritillaria thunbergii and its adulterant Fritillaria hupehensis [J]. Liishizhen Med Mater Med Res,1997,8(1):37

[7]周建良，刘伟，郭增喜，等. 基于快速液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱的浙贝母特征图谱研究[J].中国中药杂志，2013，38（17）：2832-2837

ZHOU JL, LIU W, GUO ZX, *et al*. Fingerprint analysis of *Fritillaria thunbergii* using rapid resolution liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. China J Chin Mater Med, 2013,

38(17):2832-2837
[8] ZHANG ZF, LU LY, LIU Y. Comparing major alkaloids of Fritillariae Hupehensis Bulbs (FHB) and congeneric plants by HPLC-ELSD and HPLC-ESI-MSn [J]. Natural Product Research, 2014,28(15):1171-1175
[9] WANG Z, XIE H, REN J, *et al*. Metabolomic approach for rapid differentiation of Fritillaria bulbs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and multivariate statistical analysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020,185:113177
[10] SCHÄFER fer K C, DÉNES J, ALBRECHT K, *et al*. In Vivo, In Situ Tissue Analysis Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry[J]. Angew Chem Int Ed , 2009, 48, 8240-8242.
[11]BALOG J, SZANISZLO T, SCHAEFER K C, *et al*. Identification of Biological Tissues by Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry[J]. Anal Chem, 2010, 82:7343-7350.
[12]STRITTMATTER N, REBEC M, JONES E A, *et al*. Characterization and Identification of Clinically Relevant Microorganisms Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry[J]. Anal Chem, 2014, 86:6555-6562.
[13] BALOG J, SACHEEN K, ALEXANDER J, *et al*. In Vivo Endoscopic Tissue Identification by Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry (REIMS)[J]. Angew Chem Int Ed, 2015, 54:11059-11062.
[14]高海燕,孟宪双,付珺珺,等.快速蒸发电离质谱技术及其应用研究进展[J].分析测试学报,2021,40(2):159-170.
GAO HY, MENG XS, FU JJ, *et al*. Research progress on rapid evaporative ionization mass spectrometry and its applications [J]. J Instrm Anal, 2021,40(2):159-170
[15] SONG G, CHEN K, WANG H, *et al*. In situ and real-time authentication of Thunnus species by iKnife rapid evaporative ionization mass spectrometry based lipidomics without sample pretreatment[J]. Food Chemistry,2020,318:126504
[16] Cui Y, Wang H, Zhao Q, *et al*. Real-time detection of authenticity and adulteration of krill phospholipids with soybean phospholipids using rapid evaporative ionization mass spectrometry: Application on commercial samples[J]. Food Control,2021,121:107680
[17] MANOLI E, MASON S, FORD L, *et al*. Validation of Ultrasonic Harmonic Scalpel for Real-Time Tissue Identification Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry[J]. Anal. Chem.,2021,93:5906-5916
[18]刘鸣畅,林继红,刘哲硕,等.快速蒸发电离质谱技术（REIMS）鉴别肉品[J].质谱学报,2020,41(5):470-479
LIU MC, LIN JH, LIU ZS, *et al*. Identification of meat by rapid evaporation ionization mass spectrometry (REIMS) [J]. J Chin Msaa Spectrom Soc, 2020,41(5):470-479
[19] 张燕平,王海星,陈康,等.实时质谱新技术分析南极磷虾油的脂质组学轮廓[J].中国食品学报,2020,20(9):226-231
ZHANG YP, WANG HX, CHEN K, *et al*. Novel real-time mass spectrometry for detecting the lipidomics profile of antarctic krill oil [J]. J Chin Inst Food Sci Technol,2020,20(9):226-231
[20] 石岩, 姚令文, 魏锋, 等. 基于干法快速蒸发离子化质谱(REIMS)指纹图谱与机器学习算法联用的白头翁真伪判别研究[J]. 中国中药杂志,2023,48(4):921.
SHI Y, YAO LW, WEI F, et al. Authenticity discrimination of Pulsatillae Radix based on dry-process REIMS fingerprinting combined with machine learning[J]. China J Chin Mater Med, ,2023,48(4):921
[21] SANDUSKY P, RAFTERY D. Use of Semiselective TOCSY and the pearson correlation for the metabonomic analysis of biofluid mixtures: Application to urine [J]. Anal. Chem.,2005,77:7717-7723
[22]WANG Z, LUO P, CHENG L, *et al*. Hapten–antibody recognition studies in competitive immunoassay of a-zearalanol analogs by computational chemistry and Pearson Correlation analysis [J]. J Mol Recognit, 2011, 24: 815-823
[23] LUNSFORD R, GILLIS D, GRUN J. Automated identification of components in a chemical mixture utilizing multi-wavelength resonant-Raman spectroscopy and a Pearson correlation algorithm[J]. J. Raman Spectrosc. 2012, 43: 1472-1476
[24]GÉRON A. Hands-on machine learning with Sciket-Learn, Keras & Tensorflow: concepts, tools, and techniques to build intelligent systems[M]. 2nd ed. Sebastopol, CA: Reilly Media, 2019

基于 CiteSpace 的炭疽病文献计量学分析

宋凯[1]，舒飞[1]，张元林[1]，孙蕊[1]，闫家铭[1]，郭明明[1]，韩丹[1]，任磊[1]，舒丽芯[1]

（1.海军军医大学药学系军队药材保障论证中心，上海 200433）

【摘要】目的：通过对炭疽病相关文献进行分析，识别炭疽病相关研究热点与前沿，为公共卫生管理者制定针对性措施提供参考。**方法：**检索 Web of Science 核心合集中建库至 2022 年 10 月收录的炭疽病领域相关的文献，运用 CiteSpace 软件从发文量、发文作者/机构、国家/地区分布、关键词及突现词等方面进行可视化分析。**结果：**Web of Science 核心合集上 2005 年至 2022 年共发表炭疽病相关文献 2139 篇，发文量前三的机构美国国家过敏症和传染病研究所(NIAID)、美国疾病与防控中心（Ctr Dis Control & Prevent）和美国国家机构（USA），载文量前三的期刊为 INFECTION AND IMMUNITY、PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA、NATURE，关键词聚类代表主要为炭疽的脱酰胺作用（deamidation）、热带芽孢杆菌（bacillus tropicus）、蜡样芽孢杆菌炭疽（ bacillus cereus biovar anthracis）、炭疽疾病（disease）和部分迁徙（partial migration）。**结论：**研究后可得出，研究热点已经由炭疽基础的研究到生态学、治疗的演变，当前研究热点集中于炭疽的快速检验和探测，这既是生物威胁的迫切需要也是生物标志物研究的推进成果；贵金属纳米颗粒技术的进步对改良炭疽疫苗有重要的推进作用，下一步针对疫苗改进的研究强持续成为新的研究热点。

【关键词】炭疽病；文献计量学；Web of Science

Bibliometric Analysis of Anthrax Literature Based on CiteSpace

Song Kai[1],Shu Fei[1],Zhang Yuanlin[1],Sun Rui[1],Yan Jiaming[1],Guo Mingming[1],Han Dan[1],Ren Lei[1],Shu Lixin[1]

(1.Demonstration Center of Military Logistics，School of Pharmacy，Naval Medical University, Shanghai 200433，China)

【Abstract】Objective: This study aims to analyze anthrax-related literature to identify hotspots and frontiers of anthrax research, providing reference for public health managers to develop targeted measures. **Methods**: Anthrax-related literature indexed in the Web of Science Core Collection until October 2022 was retrieved and visualized using CiteSpace software. The analysis focused on publication patterns, author/institution profiles, country/region distribution, keywords, and burst terms. **Results**: A total of 2139 anthrax-related articles published between 2005 and 2022 were identified in the Web of Science Core Collection. The top three contributing institutions were the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), and the United States Institute. The most cited journals were INFECTION AND IMMUNITY, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, and NATURE. The keyword clustering analysis revealed key topics such as deamidation, Bacillus tropicus, Bacillus cereus biovar anthracis, disease, and partial migration. **Conclusion**: The analysis suggests that research in the field of anthrax has evolved from basic research to include ecological and therapeutic aspects. Current research focuses on rapid testing and detection of anthrax, driven by the urgent need for bioterrorism preparedness and advancements in biomarker research. The progress in noble metal nanoparticle technology has significantly improved anthrax vaccines and will continue to be a new research hotspot in vaccine development.

【Key words】Anthrax; Bibliometrics; Web of Science

炭疽病（Anthrax）是由炭疽杆菌（Bacillus anthracis）引起的一种人畜共患自然疫源性疾病,其病原孢子体能够在土壤中保持传染性长达数十年之久[1]。由于环境的污染，炭疽主要流传于食草动物之间，而人类往往是偶然宿主。全球每年约有 2 万至 10 万起炭疽病例发生，主要集中在较为贫困的发展中国家[2]。据估计约有 18.3 亿人生活在炭疽风险地区，但大多数人几乎没有职业接触，人类和牲畜高风险地区集中在亚欧大陆、非洲、北美干旱和温带的雨林地区[3]。然而，最近在美国和欧洲爆发的疫情以及这种细菌可能被用于生物恐怖活动，引起了人们的格外关注[4]。

炭疽作为生物武器对各国产生了威胁，引发了全球性的关注。经过各国家、机构及科研团队的研究，针对炭疽的防控、监测、预防及治疗等方面硕果累累。这些成果客观的反应了炭疽研究的发展趋势，并以知识结构、文献回顾等为载体在研究中体现。但是有限的文献回顾性研究不足以揭露各个研究热点、机构、领域等之间的复杂关系和交叉区域，而这些复杂关系更能迸发新的研究热点和孕育新的知识，并能为后续的研究提供支持和帮助。本文旨在利用可视化文献计量学工具对炭疽的研究发展进行分析，以求为该领域的研究者提供参考借鉴。

1 数据采集与研究方法

1.1 文献检索策略

登录 Web of Science（WOS）核心合集数据库，以检索式“主题 ＝anthrax OR 主题 ＝bacillus anthracis”进行检索，时间跨度设置为 2005 年 1 月 1 日至 2022 年 10 月 18 日，共检索 2139 篇文献。

1.2 研究样本

将检索得到的 2139 篇文献下载为全记录纯文本格式，以此作为研究样本。

1.3 CiteSpace

将研究样本导入 CiteSpace 6.1R3。CiteSpace 应用软件是美国 Dexrel 大学陈超美教授研发的文献计量学可视化软件，该软件能够通过不同参数设置实现对作者合作、国家和合作机构情况、关键词聚类等进行可视化网络分析。本次文献计量学研究参数设计如下：时间切片为 2005 年～2021 年，单个时间切片为 1 年；阈值为 TOP 50；算法为 Pathfinder。

2 结果与分析

2.1 基本情况

通过该领域的每年的发文量（图 1）可以看出，自 2006 年后炭疽相关内容的发文数均超过 60 篇，仅 3 年未达到 100 篇。科研人员对炭疽的关注度居高不下。

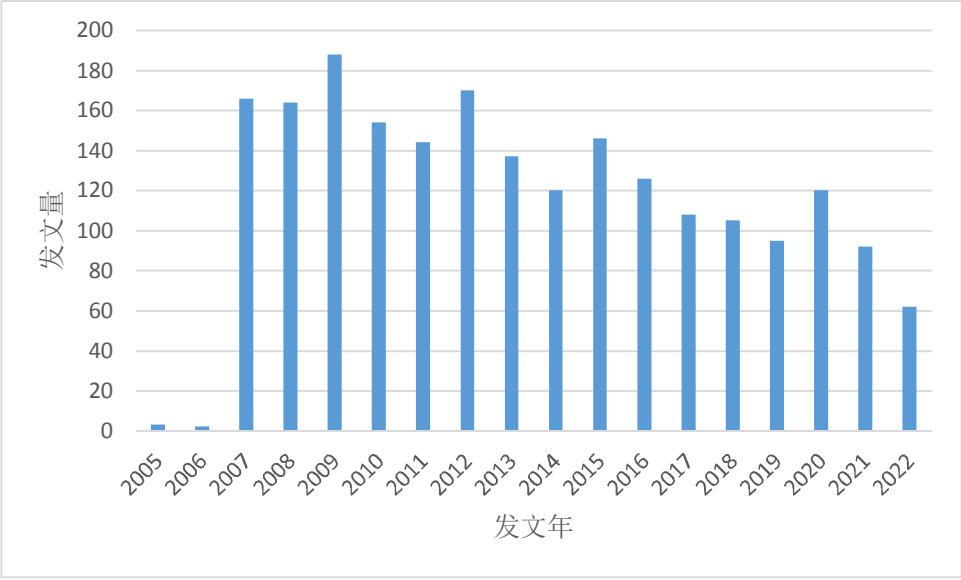


图 1 每年度炭疽领域发文数量（2005--2022）

2.2 国家、机构、作者合作关系及期刊分布分析

在 CiteSpace 中对国家、机构、作者逐一分析，可得出（图 2-4），共有 96 个国家、483 个机构和 665 名作者参与了该领域的研究。从国家角度来看，美国发文量最多（1217 篇），其次是德国（132 篇）、中国（127 篇）。在 Citespace 生成的知识图谱中，一个节点的中心性是节点在整体网络中连接作用大小的度量[x]，一个节点的中心度越高，说明其影响力和重要程度越大，美国中心性最高（0.8），其实是法国（0.22），中国的中心性仅为 0.03，以上说明美国是领域研究的核心国家且研究成果较多，中国在该领域的研究与其他国家交流较少。从研究机构上来看，美国国家过敏症和传染病研究所(NIAID)、美国疾病与防控中心（Ctr Dis Control & Prevent）和美国国家机构（USA）、弗洛里达大学（Univ Florida）和巴斯德研究所（Inst Pasteur）是全球较为核心的研究机构，中国的研究机构比较分散，中国科学院是我国研究机构中比较大的一个。

在作者团队方面看，发文量较多作者是 Leppla Stephen H（79 篇）、Moayeri Mahtab（47 篇）、Blackburn Jason K（36 篇）、Quinn Conrad P（34 篇）、Bhatnagar Rakesh（23 篇），其中 Quinn Conrad P 研究的中心较高（0.28）。根据普赖斯公式计算，核心作者最小发文量 $M\approx0.749\times N1/2max$ ，M=6.657。发文量≥7 篇的作者有 50 位，其中美国国家疾病控制和预防中心的康拉德·奎因（Quinn Conrad P）团队在炭疽疫苗的作用机制和免疫学研究方面有较为突出的成就，近几年一直都有持续性的研究成果产生。斯蒂芬·莱普拉（Leppla Stephen H）和马赫塔布·莫阿耶里（Moayeri Mahtab）是发文量最大的和第二的研究团体，其同属于 NIAID 这一机构，该学术团体以 Leppla Stephen H 为核心，自 2007 年以来一直深耕炭疽致病机制方面并取得丰富的研究成果。该团体代表作《Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin》发表在《MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE》上被引用高达 179 次。

在期刊分布方面来看，大部分文献分布在影响力较强的期刊，说明炭疽的研究越来越受到关注且突破性的进展越来越多（表 1）。

表 1 发文量排名前十的期刊

期刊名称	发文量	影响因子（2021）	JCR 分区
INFECTION AND IMMUNITY	1262	3.616	Q2
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	1203	12.779	Q1
NATURE	909	69.504	Q1
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY	884	5.485	Q2
JOURNAL OF BACTERIOLOGY	864	3.476	Q3
PLOS ONE	844	3.752	Q2
SCIENCE	796	63.832	Q1
EMERGING INFECTIOUS DISEASES	735	16.126	Q1
JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES	661	7.759	Q1
MOLECULAR MICROBIOLOGY	626	3.979	Q3

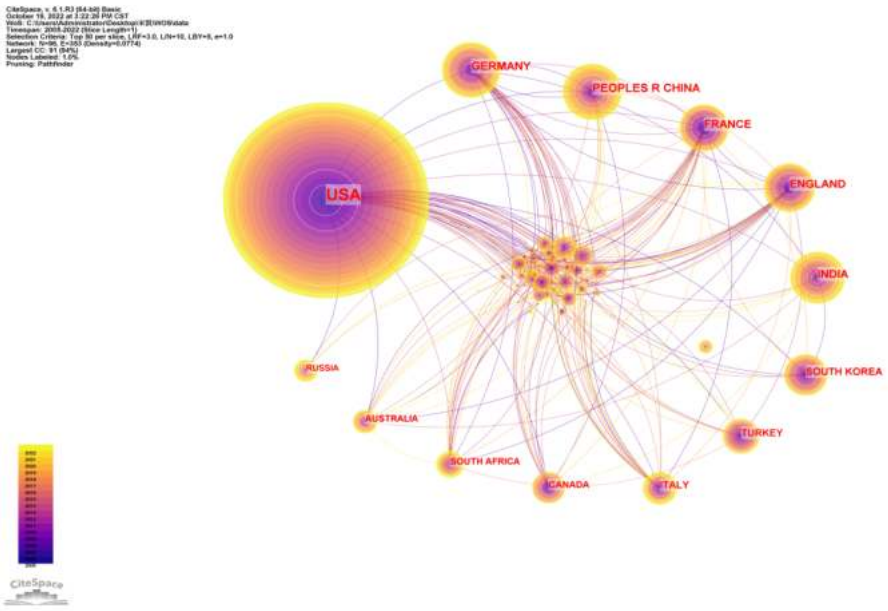


图 2 国家共现图

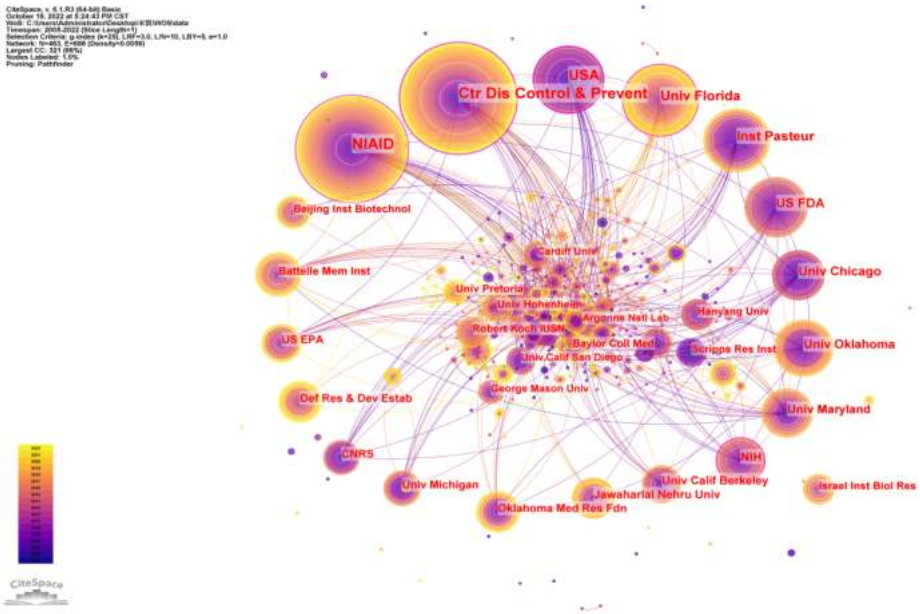


图 3 机构共现图

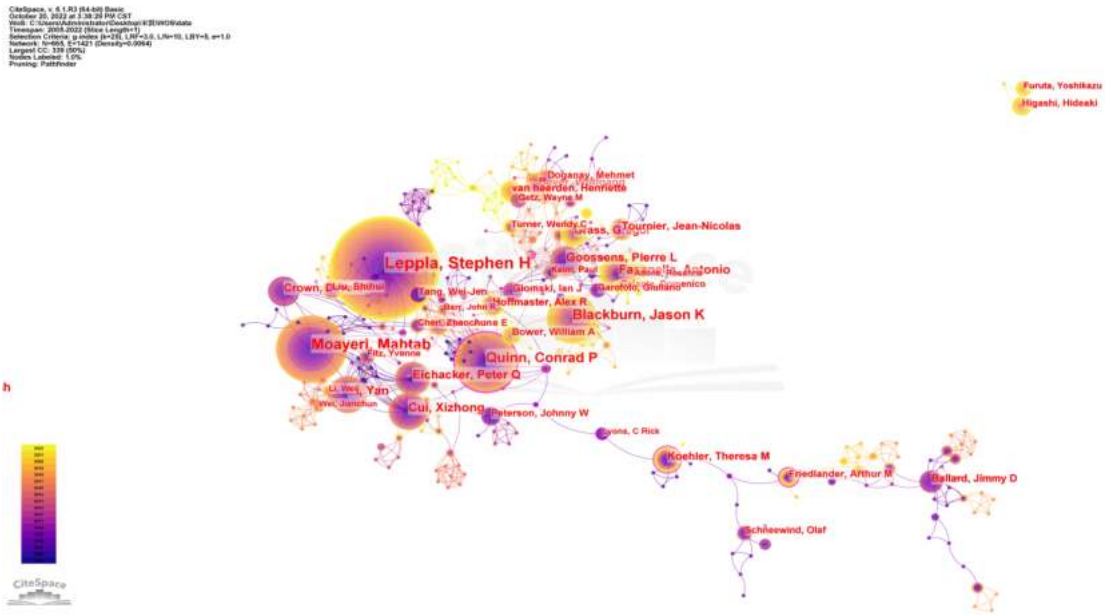


图 4 作者共现图

2.3 共被引文献分析

共被引文献（cited reference）的聚类词可以反映研究领域的基础知识框架[5]。运用 CiteSpace 软件中 g-index 算法（K=20）对 892 篇共被引文献进行分析，图 5 中形成编号 0-16 共 17 个聚类特征（详见表 2），共有 892 个节点，1957 条连线，节点代表不同的参考文献，连线代表节点间的共被引关系。不同的聚类形状的区域代表不同的聚类，不同的颜色代表聚类的发生时间，紫色区域发生时间最早，黄色区域距离现在最近。红色的节点代表突现性较大的参考文献（详见表 3），节点间越粗的连线代表有参考文献间影响强度越大，白色连线代表跨聚类间的联系。表 3 中的参考文献按引用量和突现值分离，引用量的文献可以代表炭疽研究领域的基础知识结构，而突现值较高的文献可作为研究热点的参考性知识。

在图 5 中随时间演变和聚类间的连线交互可把研究领域的基础大致分为 3 个阶段，由第一阶段以#0 致死毒素（lethal toxin）、#1 疫苗（vaccine）5#抑制剂（inhibitor）的研究为主，主要是以炭疽作为生物恐怖袭击武器引发高度关注[6]。聚类 0 中，Mahtab Moayeri 和 Stephen H Leppla 团队 2009 年发表在 Molecular Aspects of Medicine 上的综述对炭疽致死毒素是炭疽的主要毒力因子及炭疽致病力和症状的机制进行了简要回顾[7]；第二阶段以#2 水肿性毒素（edema toxin）、#3 全基因测序（whole genome sequencing）、#4 炭疽吸附疫苗(biothrax)的研究为主，主要对保护性抗原、人类保护性抗体、比较基因组学等领域进行研究。聚类 3 中，Kym S Antonation 团队在 PLOS Neglected Tropical Diseases 上发表的文献揭示了四个蜡样芽胞杆菌生物变种炭疽的全基因组分析，发现该型具有较强的潜在威胁[8]；第三阶段以#8 西非（west africa）、#7 分类学（taxonomy）的研究为主，主要对全球炭疽流行病学、菌群分类等领域进行研究。聚类 8 中，Colin J. Carlson 等人在 2019 年发表在 Nature Microbiology 上文献绘制了全球炭疽风险地图并预测了动物源性的风险[9]。

表 2 Top5 文献共被引聚类概况

ClusterID	Size	Silhouette	Mean Year	Label (LSI)	Label (LLR)	Label (MI)
0	107	0.801	2006	lethal toxin	lethal toxin	interleukin-8
1	98	0.888	2005	protective antigen	vaccine	antigen-antibody complex
2	91	0.861	2011	bacillus anthracis	edema toxin	lung dysfunction

3	87	0.871	2013	bacillus anthracis	whole genome sequencing	virulence plasmid
4	47	0.919	2014	bacillus anthracis	biothrax	mouse lethal challenge

表 3 参考文献引用量和突现值排名

排名	引用量	参考文献	突现值	参考文献
1	91	Anthrax Toxin: Receptor Binding, Internalization, Pore Formation, and Translocation	31.46	Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin
2	84	Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin	27.35	Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis
3	56	Anthrax toxins: a paradigm of bacterial immune suppression	25.23	Anthrax Pathogenesis
4	53	Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis	21.08	Anthrax:A disease of biowarfare and public health importance
5	49	Anthrax Pathogenesis	20.40	Anthrax Toxin: Receptor Binding, Internalization, Pore Formation, and Translocation

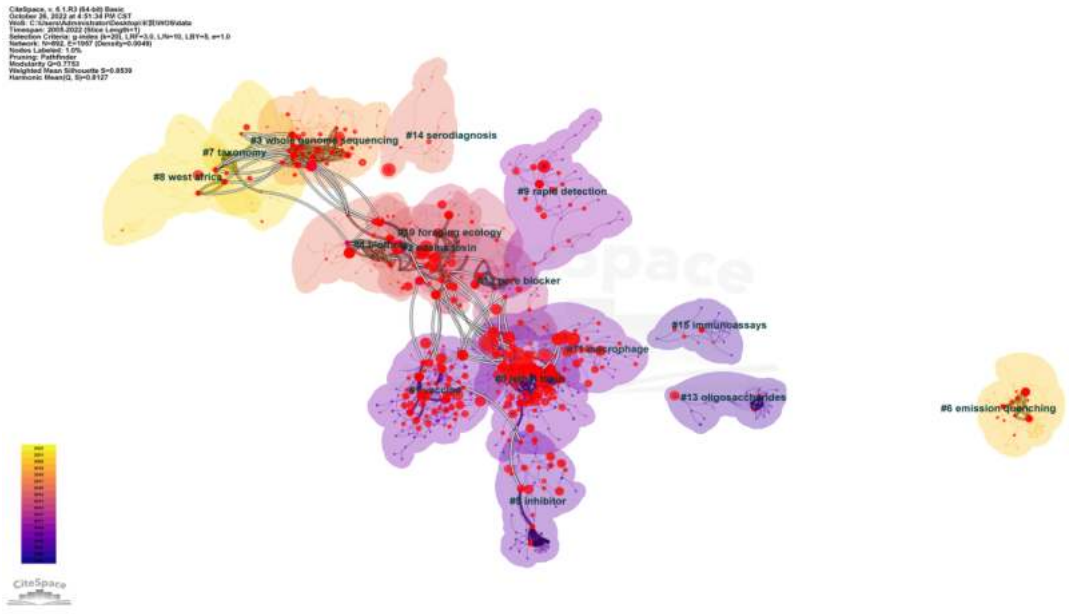


图 5 共被引文献聚类图

2.4 关键词分析

文献中关键词的分析可反应该领域的研究前沿、热点和趋势[10]。利用 CiteSpace 对关键词进行分析,提取到 458 个节点、2141 条连线，频次大于 3 次的有 270 个关键词，排名前 10 的关键词可见图 6。从图信息可发现，排名靠前的关键词集中在炭疽致病机制、保护性抗原、疫苗研制等方面的研究。

根据关键词聚类功能形成图 7，该图谱共产生了 458 个网络节点、2141 条连接线和 8 个关键聚类，轮廓值达到 0.7484，整体结果稳健。由图 7 可见，基于 LLR 算法形成的主要关键聚类包括致死毒素（lethal toxin）、保护性抗原（protective antigen）、识别（identification），它们呈现了全球炭疽研究领域的热点主体。由关键词时间线图中（图 8），可以看出聚类#1、#2 中的关于炭疽的脱酰胺作用（deamidation）、热带芽孢杆菌（bacillus tropicus）、蜡样芽孢杆菌炭疽（ bacillus cereus biovar anthracis）在近期较为活跃，体现了研究者当前关注的热点方向。

由关键词聚类的进一步分析（表 4），得出 0~8 号共 9 个聚类，聚类 0 是最大聚类、聚类 8 是最小聚类。按照 LSI、LLR、MI 三种不同算法对聚类提取名称，其中 LLR 算法更加符合研究的实际情况。从关键词出现的平均年份（mean year）来看，炭疽疾病（disease）和部分迁徙（partial migration）组成的关于炭疽疾病的生态学分布问题正在成为近 5 年的前沿热点。从轮廓值上来看，炭疽外生孢子（exosporium）和皮肤炭疽（cutaneous anthrax）分别为 0.936 和 0.883，说明研究者正集中关注这两个方向的研究。

表 4 关键词共现聚类概况

ClusterID	Size	Silhouette	Mean Year	Label (LSI)	Label (LLR)	Label (MI)
0	89	0.681	2008	lethal toxin	lethal toxin	cardiomyocyte
1	77	0.789	2010	bacillus anthracis	protective antigen	advisory committee
2	70	0.655	2011	bacillus anthracis	identification	conjugation
3	66	0.682	2011	bacillus anthracis	protein	confers resistance
4	51	0.82	2013	bacillus anthracis	dipicolinic acid	immunoassay
5	39	0.826	2015	transmission	disease	partial migration
6	23	0.883	2011	bacillus anthracis	cutaneous anthrax	information technology
7	23	0.779	2010	protective antigen;	crystal structure	multivalency
8	18	0.936	2006	bacillus anthracis	exosporium	exosporium glycoprotein

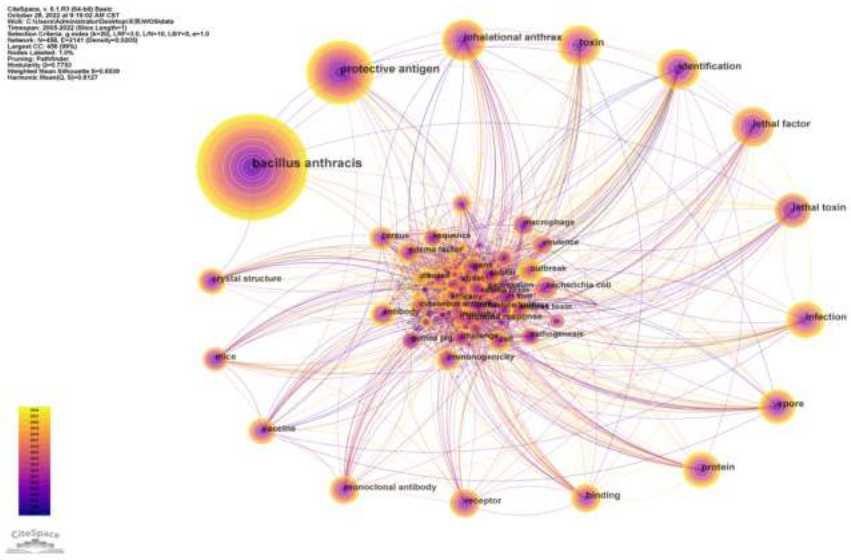


图 6 关键词共现图

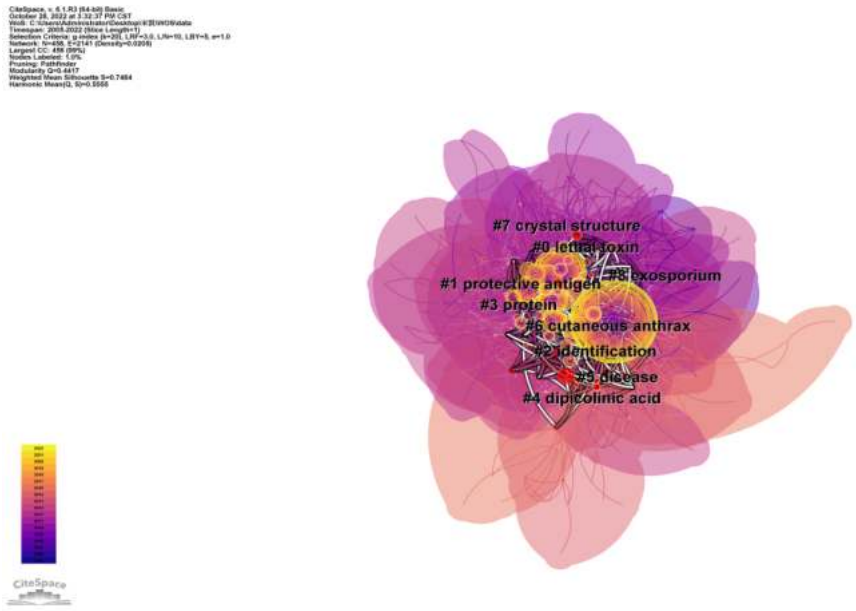


图 7 关键词聚类图

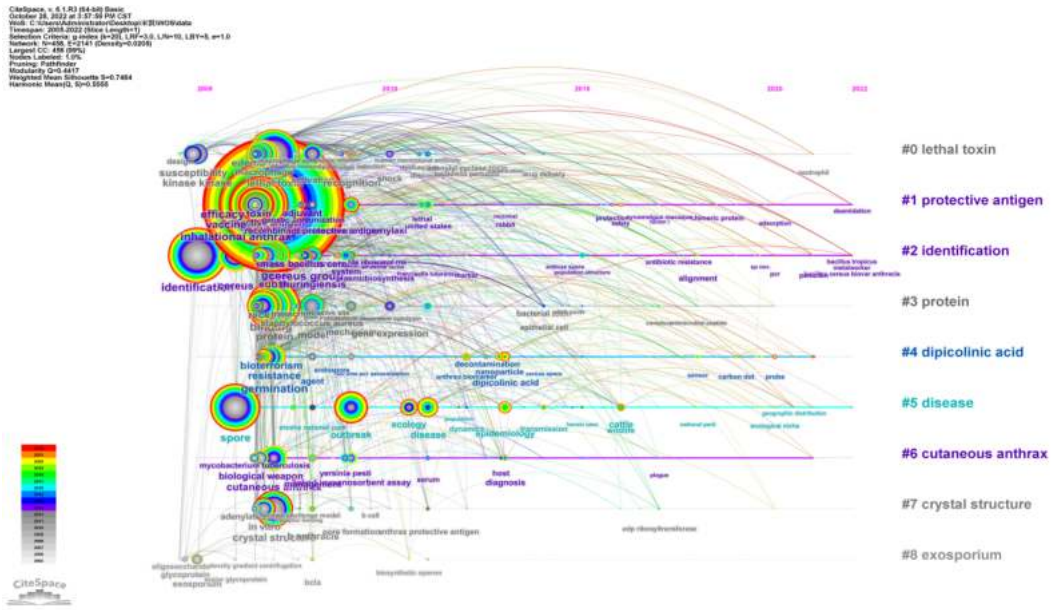


图 8 关键图时间线图

3 讨论

炭疽是 1849 年由德国医生 Pollender 首先发现的，1874 年 Wagner 对炭疽病及炭疽脑膜炎做了详细的记录。1876 年 Koch 研究了炭疽芽孢的形成条件，从而阐明了炭疽病的发生和传播方式。1881 年 Pasteur 制备了炭疽菌苗，首次成功的用于家畜的预防接种[11]。炭疽作为人畜共患病，研究热度不高，主要被视为次要的兽医问题，大多数病例归因于职业暴露。

自 2001 年美国遭到炭疽杆菌生物武器威胁后，引起了全球的关注。炭疽按临床分型，可分为皮肤炭疽、肺炭疽和肠炭疽[12]。炭疽发病率和死亡率高、感染剂量低、缺乏快速可用的诊断测试、缺乏普遍可用的有效疫苗、可能引起焦虑和恐惧、病原体的广泛可用性、生产的可行性、环境稳定性和被武器化的潜力使其成为绝佳的生物武器[13]。

通过对 WOS 数据的计量学与可视化分析（图 9），关于炭疽 2005-2022 年的研究热点可大致分为以下几个

阶段：

（1）2005 年至 2010 年，关于炭疽的基础研究。①主要是针对炭疽杆菌的致病毒素进行研究，揭露了肿瘤内皮标志物-8（TEM8）和毛细血管形态发生蛋白-2（CMG2)在炭疽传染中的重要性[14]。②通过对炭疽孢子的基因学和生态学研究，纠正了炭疽芽孢杆菌在哺乳动物宿主外生存不佳，必须孢子化才能在环境中生存的问题。发现通过与细菌病毒或噬菌体的相互作用，引发炭疽杆菌的表型改变，并出现具有显著改变生存能力的感染衍生物或溶菌原。研究表明噬菌体为炭疽芽孢杆菌提供了孢子形成的替代品，涉及土壤存活和内共生能力的激活[15]。③在炭疽免疫学方面的研究探明了炭疽毒素以协调的方式发挥作用，并能躲避免疫反应，从而确保感染成功。对于炭疽的治疗不能仅限于经典治疗，抑制剂或重组抗体可能被证明是有效的[16]。④在疫苗研究方面，正在逐步改良疫苗的剂型和机制以达到减少副作用和安全高效的作用[17]。

（2）2010 年至 2015 年，主要集中在生态学方面的研究。①炭疽在非洲流行，形成了“季节性”流行的特点。利用来自野生和家畜的空间和时间病例检测和血清阳性率数据，我们调查了暴露和疾病的空间、环境、气候和物种特异性关联。研究表明土壤碱度和长期干旱或降雨是疾病发生的有用预测因子，可以指导基于风险的监测，为管理炭疽的策略提供信息，包括预防性牲畜疫苗接种、公共卫生警告的时机和高风险地区的抗生素供应[18]。②炭疽作为生物恐怖主义的武器更加引起关注。2001 年美国的生物恐怖袭击以及 2009 年和 2010 年欧洲注射吸毒者中炭疽感染的爆发表明，炭疽的临床相关性大大增加。炭疽根据主要感染部位分为三种综合征之一：皮肤、胃肠道或吸入性。第四种综合征已经出现，其特征是注射吸毒者严重软组织感染。由于发达地区炭疽发病率低，早期症状不明确，这些暴发中的许多患者表现为晚期感染，并迅速进展为休克且死亡率高。

（3）2015 年至今，主要集中在炭疽疾病的治疗、流行病学及侦检探测研究。①对炭疽全球的发病地区分布、高危因素及各国防控现状进行了总结分析[3]。②在快速侦检技术上形成了较为密集的研究热点。其中利用表面增强拉曼散射（SERS）技术和纳米金离子对炭疽芽孢杆菌孢子的生物标志物双吡啶羧酸(DPA)的研究提高侦检的高灵敏度[18]。③在改进炭疽疫苗的多重加强剂量要求、副作用和稳定性问题上，纳米颗粒可以解决与炭疽疫苗相关的问题[19]。

随着研究热点由炭疽基础的研究到生态学、治疗的演变，当前研究热点集中于炭疽的快速检验和探测，这既是生物威胁的迫切需要也是生物标志物研究的推进成果；贵金属纳米颗粒技术的进步对改良炭疽疫苗有重要的推进作用，下一步针对疫苗改进的研究强持续成为新的研究热点。

因为 CiteSpace 软件的局限性，且对数据的分析仅限于 WOS 数据库，本文的分析同样具有局限性。

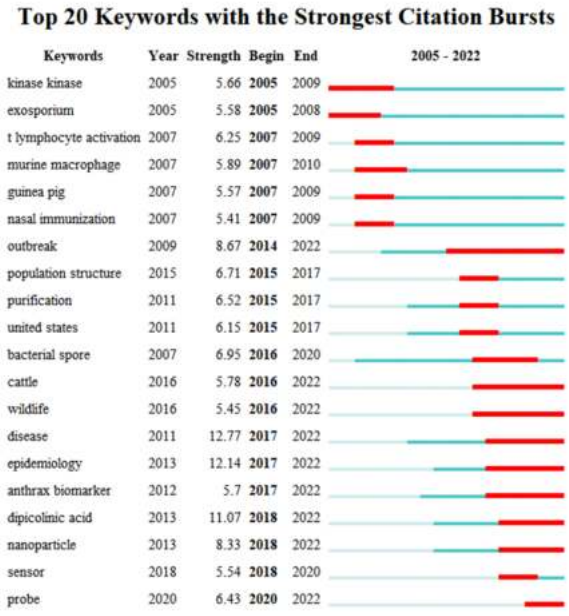


图 9 关键词突现词图

参考文献

[1]Carlson CJ, Getz WM, Kausrud KL, Cizauskas CA, Blackburn JK, Bustos Carrillo FA, Colwell R, Easterday WR, Ganz HH, Kamath PL, Økstad OA, Turner WC, Kolstø AB, Stenseth NC. Spores and soil from six sides: interdisciplinarity and the environmental biology of anthrax (Bacillus anthracis). Biol Rev Camb Philos Soc. 2018 Nov;93(4):1813-1831. doi: 10.1111/brv.12420. Epub 2018 May 6. PMID: 29732670.

[2]Swartz MN. Recognition and management of anthrax--an update. N Engl J Med. 2001 Nov 29;345(22):1621-6. doi: 10.1056/NEJMra012892. Epub 2001 Nov 6. Erratum in: N Engl J Med 2002 Feb 21;346(8):634. PMID: 11704686.

[3]Carlson CJ, Kracalik IT, Ross N, Alexander KA, Hugh-Jones ME, Fegan M, Elkin BT, Epp T, Shury TK, Zhang W, Bagirova M, Getz WM, Blackburn JK. The global distribution of Bacillus anthracis and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. Nat Microbiol. 2019 Aug;4(8):1337-1343. doi: 10.1038/s41564-019-0435-4. Epub 2019 May 13. PMID: 31086311.

[4]Sweeney DA, Hicks CW, Cui X, Li Y, Eichacker PQ. Anthrax infection. Am J Respir Crit Care Med. 2011 Dec 15;184(12):1333-41. doi: 10.1164/rccm.201102-0209CI. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21852539; PMCID: PMC3361358.

[5]Chen C.Science Mapping：A Systematic Review of the Literature[J].Journal of data and information science (Warsaw, Poland), 2017, 2(2): 1.

[6]任毓骏. 炭疽热恐慌在美蔓延[N]. 人民日报,2001-10-15(003).

[7]Moayeri M, Leppla SH. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. Mol Aspects Med. 2009 Dec;30(6):439-55. doi: 10.1016/j.mam.2009.07.003. Epub 2009 Jul 26. PMID: 19638283; PMCID: PMC2784088.

[8]Antonation KS, Grützmacher K, Dupke S, Mabon P, Zimmermann F, Lankester F, Peller T, Feistner A, Todd A, Herbinger I, de Nys HM, Muyembe-Tamfun JJ, Karhemere S, Wittig RM, Couacy-Hymann E, Grunow R, Calvignac-Spencer S, Corbett CR, Klee SR, Leendertz FH. Bacillus cereus Biovar Anthracis Causing Anthrax in Sub-Saharan Africa-Chromosomal Monophyly and Broad Geographic Distribution. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Sep 8;10(9):e0004923. doi: 10.1371/journal.pntd.0004923. PMID: 27607836; PMCID: PMC5015827.

[9]Carlson CJ, Kracalik IT, Ross N, Alexander KA, Hugh-Jones ME, Fegan M, Elkin BT, Epp T, Shury TK, Zhang W, Bagirova M, Getz WM, Blackburn JK. The global distribution of Bacillus anthracis and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. Nat Microbiol. 2019 Aug;4(8):1337-1343. doi: 10.1038/s41564-019-0435-4. Epub 2019 May 13. PMID: 31086311.

[10]Chen, C. (2020) A Glimpse of the First Eight Months of the COVID-19 Literature on Microsoft Academic Graph: Themes, Citation Contexts, and Uncertainties. Frontiers in Research Metrics and Analytics, 5:607286. 10.3389/frma.2020.607286 citation contexts; uncertainties

[11]Kamal SM, Rashid AK, Bakar MA, Ahad MA. Anthrax: an update. Asian Pac J Trop Biomed. 2011 Dec;1(6):496-501. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60109-3. PMID: 23569822; PMCID: PMC3614207.

[12]Kalamas AG. Anthrax. Anesthesiol Clin North Am. 2004 Sep;22(3):533-40, vii. doi: 10.1016/j.atc.2004.05.009. PMID: 15325717.

[13]Chambers J, Yarrarapu SNS, Mathai JK. Anthrax Infection. 2022 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan –. PMID: 30571000.

[14]Liu S, Crown D, Miller-Randolph S, Moayeri M, Wang H, Hu H, Morley T, Leppla SH. Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 28;106(30):12424-9. doi: 10.1073/pnas.0905409106. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19617532; PMCID: PMC2718377.

[15]Schuch R, Fischetti VA. The secret life of the anthrax agent Bacillus anthracis: bacteriophage-mediated ecological adaptations. PLoS One. 2009 Aug 12;4(8):e6532. doi: 10.1371/journal.pone.0006532. PMID: 19672290; PMCID: PMC2716549.

[16]Tournier JN, Quesnel-Hellmann A, Cleret A, Vidal DR. Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax.

Cell Microbiol. 2007 Mar;9(3):555-65. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00866.x. Epub 2007 Jan 11. PMID: 17223930.
[17]Bielinska AU, Janczak KW, Landers JJ, Makidon P, Sower LE, Peterson JW, Baker JR Jr. Mucosal immunization with a novel nanoemulsion-based recombinant anthrax protective antigen vaccine protects against Bacillus anthracis spore challenge. Infect Immun. 2007 Aug;75(8):4020-9. doi: 10.1128/IAI.00070-07. Epub 2007 May 14. PMID: 17502384; PMCID: PMC1952013.
[18]Hampson K, Lembo T, Bessell P, Auty H, Packer C, Halliday J, Beesley CA, Fyumagwa R, Hoare R, Ernest E, Mentzel C, Metzger KL, Mlengeya T, Stamey K, Roberts K, Wilkins PP, Cleaveland S. Predictability of anthrax infection in the Serengeti, Tanzania. J Appl Ecol. 2011 Jun 10;48(6):1333-1344. doi: 10.1111/j.1365-2664.2011.02030.x. PMID: 22318563; PMCID: PMC3272456.
[18]Naqvi TK, Bajpai A, Bharati MSS, Kulkarni MM, Siddiqui AM, Soma VR, Dwivedi PK. Ultra-sensitive reusable SERS sensor for multiple hazardous materials detection on single platform. J Hazard Mater. 2021 Apr 5;407:124353. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124353. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33144017.
[19]Manish M, Rahi A, Kaur M, Bhatnagar R, Singh S. A single-dose PLGA encapsulated protective antigen domain 4 nanoformulation protects mice against Bacillus anthracis spore challenge. PLoS One. 2013 Apr 29;8(4):e61885. doi: 10.1371/journal.pone.0061885. PMID: 23637922; PMCID: PMC3639271.

生防药物的储备与应急保障

宋亚彬，赵瑾

（军事科学院军事医学研究院微生物流行病研究所，北京 100071）

【摘要】近年来，重大传染病疫情引发的公共卫生事件给全球人类健康与经济社会发展带来深远影响。做好生防药物的储备与应急保障，对提升应对公共卫生事件的能力具有重大意义和作用。本文通过调研和比较国内外生防药物储备发展状况，并结合国内实际情况，对我国生防药物的储备及应急保障提出建议，以期为提高我国的生防药物储备与保障水平提供理论支持。

【关键词】生防药物；储备；公共卫生事件；生物安全；应急保障

进入 21 世纪以来，人类相继经历了 2003 年严重急性呼吸综合征（SARS）、2009 年甲型 H1N1 流感、2012 年中东呼吸综合征（MERS）、2014 年西非埃博拉病毒病等重大传染病疫情引发的公共卫生事件，特别是 2019 年新型冠状病毒肺炎（COVID-19）疫情，给人类健康与经济社会发展带来深远影响。在此背景下，全球对公共卫生安全的重视程度不断提升。由于突发公共卫生事件往往导致相关药物短缺，因此做好生防药物的储备与应急保障，对提升应对公共卫生事件的能力具有重大意义和作用。生防药物是指生物防御药物[1]，是针对高度威胁的生物病原体进行有效预防和治疗的药物，主要包括抗病毒药物、抗生素、激素和疫苗等。本文通过调研和比较国内外生防药物储备发展状况，并结合国内实际情况，对我国生防药物的储备及应急保障提出建议。

1 国外现状

美国最早由卫生和人类服务部（HHS）和国家疾病控制预防中心（CDC）建立“国家药品储备”(NPS)，用于储备应对核生化（CBRN）威胁的药品和疫苗[2]。“9・11”事件后，美国联邦进一步立法加强公共卫生应急准备。2003 年 3 月 1 日 NPS 变更为美国“国家战略储备”（SNS），由国土安全部与卫生和人类服务部联合管理，成为美国重要的生防战略措施之一[3]。

美国法规规定，SNS 的目的是在发生生物恐怖袭击或其他公共卫生紧急情况下，为美国提供紧急卫生安全[4]。其主要任务是储备大量的药品、疫苗、医疗产品等基本医疗物资，在联邦政府决定使用储备的 12 小时内运送到美国各地。自创立以来，该储备已对多个紧急事件作出响应，包括洪水、飓风、流感和新冠大流行等[4]。

针对美制定的高优先级生物威胁（如肉毒、炭疽、天花、鼠疫等），美国战略储备中生防药物品种主要包括抗生素、抗病毒药物及一些治疗性抗体药物、疫苗等。其中抗生素主要包括环丙沙星（Ciprofloxacin）和强力霉素（Doxycycline）等，用于治疗鼠疫等细菌感染[5]。抗病毒药物主要包括西多福韦（Cidofovir）、特考韦瑞（Tecovirimat）、奥司他韦（Tamiflu）、扎那米韦（Zanamivir）等，用于治疗天花、流感等病毒感染，储备数量合计达数千万人份[6,7]。此外，SNS 还储备了数千万剂天花疫苗[7]。历史上，SNS 的大部分资源被用于应对天花和炭疽这两种威胁。

美国政府每年组织威胁评估，对列储的品种进行优化。例如对抗生素抗药性的发展或人口的迁移进行评估，从而对存储药物类型、配比或数量进行改变[8]。此外，为了解决存储药品的过期问题，美国 FDA 与国防部于 1986 年合作制定了一个“保质期延期计划”，准许根据实际检测的结果来延长药品的有效期[8]。据此计划，多种储备药品有效期被延长，从而节省了大量资金。

除美国外，其它西方国家也十分重视生防药物储备。加拿大政府认为使用抗病毒药物是目前对病毒性传染病流行初期的有效干预措施，因此储备了大量抗病毒药物[9]。其药物储备主要包括“国家应急库存系统”（NESS）和“国家抗病毒库存系统”（NAS）。NESS 由加拿大联邦政府拥有和资助，由公共卫生署（PHAC）管理[10]。该储备系统由 11 个仓库和 1300 个预先安置物资的场所组成。NESS 包含约 1400 万剂抗病毒药物储备（奥司他韦和扎那米韦）。在出现公共卫生紧急情况时，地方政府可以申请获取 NESS 中的物资。NAS 成立于 2004 年，是一种省级/地区管理的抗病毒药物供应体系，旨在确保加拿大各地公平获得抗病毒药物供应。其储备约 5570 万剂奥司他韦，能够提供足够多的抗病毒药物保障全国人口。

日本政府长期对公共卫生安全极为关注[11]。为应对流感、天花等潜在生物威胁，日本厚生劳动省根据相关法律储备了天花疫苗（LC16m8）、禽流感疫苗、奥司他韦、扎那米韦和法匹拉韦等生防药物，其中禽流感疫苗1000 万人份，法匹拉韦 200 万人份，奥司他韦和扎那米韦合计数千万人份（覆盖 45%日本人口）,为日本政府应对公共卫生事件提供了保障[12]。

2 国内现状

我国生防药物储备主要包含在国家医药储备中的专项储备中。早期的药物储备是主要是为了满足战备需求[13]。1997 年国务院印发《关于改革和加强医药储备管理工作的通知》，对国家医药储备体制进行改革。1999 年原国家经贸委印发《国家医药储备管理办法》，规定国家医药储备实行中央和地方分级储备、动态储备、有偿调用的体制[14]。2021 年 7 月 8 日，工信部等六单位发布《国家医药储备管理办法（修订稿）》[15]。依照本办法，国家医药储备包括政府储备和企业储备。政府储备仍由中央与地方两级医药储备组成，实行分级负责的管理体制。中央医药储备主要储备应对特别重大和重大突发公共事件、重大活动安全保障以及存在较高供应短缺风险的医药产品，分为常规储备和专项储备[15]。其中中央专项医药储备主要包括公共卫生专项。地方医药储备主要储备应对较大和一般突发公共事件、重大活动区域性保障以及本辖区供应短缺的医药产品[15]。企业储备是医药企业依据法律法规并结合生产经营状况建立的企业库存。根据已有报道，目前我国生防药物储备的品种还相对较少，主要包括抗病毒药物奥司他韦等[16]。

3 国内外对比

我国虽然已初步建立了生防药物储备，但相比美国等国家依然存在较多短板。一是储备药品种类不足。2022 年全球出现猴痘疫情，美国 SNS 中储备有多种治疗药物和疫苗[17]，而我国却未存储相关药物，不利于疫情防控工作的开展。二是储备药品数量不足。例如长期以来我国抗流感药物“奥司他韦”的储备量仅为人口的 2%，远低于美国等西方国家的储备水平。2017 年流感疫情期间，我国出现抗流感药物供应严重短缺的窘境[18]。三是应急药品供应保障体系不健全。美国建立了一整套成熟的 SNS 药品申请与供应体系，能够在 12 小时内运送到所需地方[19]，且提供了个人申请使用库中药品的通道，而我国原有应急药品供应与调配机制不够完善，导致在公共卫生事件发生时相关药品在品种、数量和投放及时性及持续性上难以满足应急需求。四是我国应急药品轮储机制还不成熟。美国很早就通过立法建立了药品延期计划与质量检测体系，提高了效率，而我国现有存储机制需要进一步优化完善。

当然，我国生防药物储备也具有独特的优势。例如我国具有雄厚的医药工业生产能力，能够在较短时间内完成批量药品的生产与储备。此外，我国的传统中医药也曾在公共卫生事件中发挥了重要作用，一定程度上弥补了我国储备品种不足的缺陷。

4 建议

我国人口基数较大、人员流动十分频繁，且当前正面临“百年未有之大变局”，生物安全风险形势极为严峻。生防药物作为生物安全防御的重要一环，是应对公共卫生事件的重要手段，担负着压舱石的作用。因此，我们要从保护人民健康、保障国家安全的高度，提升生防药物的储备水平，做好未来突发公共卫生事件的应急保障。

一是科学论证储备品种。生防药物是应对公共卫生事件的重要战略物资，倘若储备不足，就会错失最佳干预时机；而过度储备又会造成浪费。因此精确预测需求是提高储备管理水平的重要前提。应以科学为准绳，组织多学科、多部门的专家共同对储备种类、品种等进行论证，并结合实地情况和威胁情况科学合理地调整需求。应尽可能涵盖更多的高致病性病原体，且采用更少的药物品种[19]。为了解决药品过期的问题，除通过立法来延长有效期外，还可以储备一些采用新技术的具有较长有效期的疫苗或药品。此外，开发和储备广谱药物和通用疫苗也将减少储备压力，并提高储备效率和可持续性。在预测未来需求及储备品种等方面也可以引入人工智能来提高经济性与准确性。

二是科学制定公共卫生事件应急预案。储备的生防药物如何在公共卫生事件中发挥最大作用十分关键，应科学制定能够应对更多场景的应急预案[20]。在预案制定过程中，需要重点考虑目标病原体的时空传播特点、可能影响范围、已有疫苗和救治药物的储备数量、疫情发展不同阶段所需采取的措施、各种可能情况下的药品等疫情防控所需物资的分发与配送预案等。在药品配送方案上，应对物流运输加以保障，从而保证应急药物能够及时

送达急需地区发挥作用。

三是加强各部门之间协同合作。一直以来我国对药品存储、公共卫生应急等多采用分部门管理的模式，难以形成高效协调的统一指挥系统[21]。2020 年，我国为应对新冠肺炎疫情建立了由国家卫生健康委员会牵头的联防联控工作机制，取得了疫情防控重大胜利[22]。生防药物的储备论证、存储、验收与使用等也应建立联席机制，引入各个相关部门的专业力量，从而全方位进行沟通、协调与统筹，使整个药物储备体系更高效。此外，应充分发挥军队在生防药物研发及应急保障方面的优势，通过军民融合、军民共享等方式，进一步优化我国生防药物的储备模式。

四是加强生防药物研发储备。由于公卫事件发生的偶然性大，所涉及药物市场极度不稳定，因此商业制药企业往往不愿投入自有资金开展这类药物研发。美国等西方国家长期由政府出资支持大型制药企业针对天花等公卫重大传染病开展药物研发，并将其研发成果列入本国药物储备[23,24]。我国也应建立国家层面的中长期战略布局，对一些市场较小的生防药物研发进行统筹规划和持续投入，最终形成药物储备。

5 总结

综上所述，生防药物储备是生物安全保障能力建设的重要内容。本文旨在分析国内外生防药物储备现状，为今后我国储备提供参考和建议。随着新的国家医药储备管理办法施行，我国药物储备将进一步走向正规化、高效化。生防药物储备水平的提高，将有效提升我国应对突发公共卫生事件的能力，维护国家生物安全。

参考文献

[1] 王伯阳, 高锦, 王子东等. 美国 FDA“动物(效应)法规”在生物防御药物开发中的应用及启示[J]. 中国药事, 2020, 34(6): 636-643.

[2] 刘芳, 赵建, 赵瑾等. 美国国家应急药物战略储备的发展历史及其运行管理[J]. 军事医学, 2014, 38(11): 904-907.

[3] Gerstein D. The Strategic National Stockpile and COVID-19: Rethinking the Stockpile[M]. Santa Monica, CA: RAND Corporation, 2020 [2023-07-13]. https://www.rand.org/pubs/testimonies/CTA530-1.html.

[4] The Nation’s Medical Countermeasure Stockpile: opportunities to improve the efficiency, effectiveness, and sustainability of the CDC Strategic National Stockpile: workshop summary. Washington (DC): National Academies Press, 2016 [2023-07-13]. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK396378.

[5] Nelson CA, Meaney-Delman D, Fleck-Derderian S, et al. Antimicrobial Treatment and Prophylaxis of Plague: Recommendations for Naturally Acquired Infections and Bioterrorism Response[J]. MMWR. Recommendations and Reports, 2021, 70(3): 1-27.

[6] Dimitrov NB, Goll S, Hupert N, et al. Optimizing Tactics for Use of the U.S. Antiviral Strategic National Stockpile for Pandemic Influenza[J]. PLoS ONE, 2011, 6(1): e16094.

[7] Neumeister SM, Gray JP. The Strategic National Stockpile: identification, support, and acquisition of medical countermeasures for CBRN incidents[J]. Toxicol Mech Methods, 2021, 31(4):308-321.

[8] Frank G， Taylor RW. The Strategic National Stockpile: Overview and Issues for Congress. 2023 [2023-07-13]. https://crsreports.congress.gov/product/pdf/R/R47400.

[9] Laing S, Westervelt E. Canada’s National Emergency Stockpile System: time for a new long-term strategy[J]. Canadian Medical Association Journal, 2020, 192(28): E810-E811.

[10] Canadian Pandemic Influenza Preparedness Task Group, Henry B. Canadian Pandemic Influenza Preparedness: Antiviral strategy[J]. Canada Communicable Disease Report, 2019, 45(1): 38-43.

[11] 高梓菁. 日本地方公共卫生应急管理体系及新冠肺炎疫情的应对_以北海道疫情应对为例[J]. 东北亚学刊, 2020，3: 131-146.

[12] Saito T, Kinoshita M. Bio-preparedness in Japan[D]. [2023-07-13]. https://aseanregionalforum.asean.org/wp-content/uploads/2019/10/Annex-C.2-Bio-Preparedness-in-Japan.pdf

[13] 徐德铎, 金晓玲, 温燕等. 我国应急药品储备与使用管理的现状与思考[J]. 世界临床药物, 2022, 43(8): 993-997.

[14] 徐娟, 余鸣人. 我国医药应急物资储备政策溯源[J]. 中国卫生, 2020, 5: 26-27.
[15] 工业和信息化部. 国家医药储备管理办法(2021 年修订)[EB/OL]. (2021-11-17)[2023-07-13]. https://www.miit.gov.cn/jgsj/xfpgys/wjfb/art/2021/art_d03e03715d4b45debed4702f956eac57.html.
[16] 王蔚佳. 加快甲型 H1N1 疫苗和药物生产收储[N]. 中国医药报, 2009-09-12(1).
[17] HHS, Administration for Strategic Preparedness and Response (ASPR). SNS Products: Vaccines and Treatment Available for Use in the Mpox Response[EB/OL]. [2023-07-13]. https://aspr.hhs.gov/SNS/Pages/Mpox.aspx.
[18] 张炜健, 施先亮, 黄安强等. 重大公共卫生事件下应急药品储备方式优化分配策略[J]. 系统工程理论与实践, 2022, 42(1): 110-122.
[19] Greer AL, Schanzer D. Using a Dynamic Model to Consider Optimal Antiviral Stockpile Size in the Face of Pandemic Influenza Uncertainty[J]. PLoS ONE, 2013, 8(6): e67253.
[21] 田菁, 邢花. 我国药品应急管理体系现状、问题及对策探讨[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(6): 477-482.
[22] 钟开斌.国家应急指挥体制的“变”与“不变”——基于“非典”、甲流感、新冠肺炎疫情的案例比较研究[J].行政法学研究, 2020, 121(03): 11-23.
[23] Larsen JC, Disbrow GL. Project BioShield and the Biomedical Advanced Research Development Authority: A 10-Year Progress Report on Meeting US Preparedness Objectives for Threat Agents[J]. Clinical Infectious Diseases, 2017, 64(10): 1430-1434.
[24] 徐婧含, 侯利华, 朱联辉. 美国生物防御特需药物研发现状分析及启示[J]. 军事医学, 2023, 47(2): 97-103.

2022 西医临床药师在职规范化培训的线上实践调查：一项混合式研究

苏成新

海军军医大学第一附属医院（上海长海医院） 上海 200000

【摘要】目的：本文旨在描述上海市临床药师在职规范培训西医部分转至线上的课程框架，并研究线上学习中的学员成绩影响因素，培训中的学习收获情况以及学员对培训评价。**方法：**在培训过程中，对学员问卷调查与半结构化访谈，通过定性与定量两种方法描述培训效果。**结果：**共培训学员 77 名，培训结束均达到毕业标准。其中定量数据显示：对学员总成绩有影响的因素包括医院等级、学员学历、工作年限；在培训前后的学员自我能力评估中有显著性差异的包括：药学问诊能力、文献查询能力、医疗文书阅读能力、发现并解决药物相关问题能力、处方审查能力、不良反应甄别与上报能力；满意度评分显示学员对培训总体评价、课程设计、作业模式、培训模式持有积极态度。半结构化访谈定性数据表明学员认可该次培训，肯定培训的实用性与便利性。**结论：**上海市临床药师在职规范化培训在 2022 年度转至线上，在保质保量完成培训的同时，大大增加培训工作开展的便利性同时也刺激了派出单位、学员的积极性。培训结果得到了学员的肯定。并通过学员反馈为以后在职临床药师规范化培训西医部分的开展提供了新思路。

【关键词】在线学习 临床药师规范化培训 在职培训 半结构化访谈

免疫治疗后晚期胃癌人群生存预后模型研究

孙明敏，赵俊

（江苏省人民医院（南京医科大学第一附属医院） 江苏 210000）

【摘要】目的：目前对接受免疫治疗的胃癌患者进行风险因子预测的评估工具不多。本研究的目的是使用诺模图预测生存结果和评估风险因子，以开发和验证适用于免疫治疗人群的预后模型，并通过持续随访进行模型的更新。**材料与方法：**2018 年到 2022 年 6 月诊断为胃癌，并符合方案纳入排除标准的患者进入队列。纳入多因素 Cox 比例风险回归模型，进入模型的是适合该结局事件的风险预测指标。采用 Kaplan-meier 方法结合对数秩检验进行生存分析并绘制生存曲线。使用列线图将预测因子和风险评分以标尺的形式呈现，个体可以通过各独立危险因素的得分计算出风险总分，进而得出结局时间发生的概率。使用区分度和校准度对模型进行内部和外部验证，最后采用决策曲线评估模型的临床应用价值。**结果：**共计 1014 名患者，开发队列（N=501）以及验证队列（N=513)。两个队列的患者平均年龄（SD）分别为 62.23(10.85)VS61.99(12.47)。四分位间距分别为（56，70）和（55，69）。训练集 365 名男性（72.85%）和验证组 365 名男性 (71.15%)。男性：女性约等于 2.5:1。患者使用免疫治疗时的初次诊断肿瘤分期主要为 III-IV 期，III 期的患者两组分别为 109 例(23.75%)和 138 例(30.40%); Ⅳ期的患者两组，两组分别为 307 例(66.88%)和 250 例(55.07%)。在观察期内，分别有 214 例（42.71%）和 258 例（50.29%）死亡。采用 Kaplan-Meier 方法，训练集的中位总生存期为 25.3 个月（95%CI: 20.96-40.20），训练集总生存期的 Mean(SD)为 25.5 个月(0.89)，验证集的中位总生存期是 23.73 个月（95%CI: 20.76-26.9）; 总生存期的 Mean(SD)为 33.37 个月（1.76）。按照国产免疫治疗药物和进口免疫治疗药物进行分层，国产组的患者中位生存期为 23.6 个月（95%CI: 19.9-30.63）; 而进口组的患者中位生存期为未达到（95%CI: 23.47-）（ P=0.03<0.05），而男女分层,男性的中位总生存期为 23.6 个月（95%CI: 19.9-26.63）; 女性的中位总生存期为 30.43 个月（P=0.2326>0.05)。进入模型的预测因素有以下四个是组织学分化（HR=1.56，95%CI: 1.11-2.24， P=0.01），免疫治疗的线数（HR=1.82, 95% CI: 1.39-2.4，P<0.00），肿瘤远端转移（HR=1.62, 95% CI: 1.09-2.47，P=0.02），免疫治疗周期（HR=0.94, 95% CI: 0.89-0.99，P=0.02）。模型经过内部验证和外部验证，C 指数在训练队列中为 0.64，在验证队列中为 0.77，Uno AUC 为 0.72，（95%[CI]: 0.55，0.88）,内部验证后，曲线下面积为 0.70，外部验证的曲线下面积为 0.68，（95%置信区间[CI]: 0.55,0.80）。总体外部平均校准为 0.95。**结论：**根据多因素回归建立的列线图，肿瘤远端转移，肿瘤组织低分化，三线以后应用免疫治疗的患者其生存的预后较其他患者差；无论 T 与 N，M，均可从免疫治疗中获益；肿瘤患者越早介入免疫治疗，采用的免疫治疗周期越多，生存预后情况更好。该模型可以通过对处于各种治疗阶段的患者打分来评估免疫治疗的获益。

【关键词】预测模型、生存分析、晚期癌症、免疫治疗、诺模图

Survival Analysis and Prediction Model for Advanced Gastric Cancer Patients after Immunotherapy

Sun Mingmin，Zhao Jun

【Abstract】Background .Few current risk assessments tools provide predictors for gastric cancer received immunotherapy. The purpose of this study was to develop and validate a nomogram that uses data to predict survival and risk assessments. **Methods：** Patients diagnosed with gastric cancer between 2018 and 2022 and who met the exclusion criteria for inclusion in the protocol were enrolled in the cohort. The multivariate Cox proportional hazards regression model was conducted to select the risk predictor suitable for the survival outcome of the model. Kaplan-meier method combined with log-rank test was used to analyze survival and plot survival curves. Using nomograms to demostrate

predictors and risk scores in the form of sacle plate, individuals can calculate the total score of independent risk factors, and then the probability of the occurrence of the outcome time. The internal and external validation of the model was performed with discrimination and calibration, and the clinical application value of the model was evaluated using decision curve.Analysis consisted of nomogram model's discrimination index, calibration plots, and decision curve. **Results**：1014 patients with development cohort (n=501) and validation cohort (n=513) during 2018Y to 2022Y were included. The mean age (SD) of patients in both cohorts was 62.23 (10.85) vs 61.99 (12.47). The interquartile is (56,70) and (55,69), respectively. The training set included 365 males (72.85%) and the validation group included 365 males (71.15%). Male: Female equals approximately 2.5:1. The primary diagnostic tumor stage for patients undergoing immunotherapy was mainly stage III-IV, with 109 patients (23.75%) and 138 patients (30.40%) in stage III, respectively; with 307 patients (66.88%) and 250 patients (55.07%) in stage IV. A total of 214（42.71%） and 258（50.29%）patients died during the observation period.After Kaplan Meier analysis the median OS of the training set was 25.3 months (95% CI: 20.96-40.20), the OS mean (SD) was 25.5 months (0.89), and the median OS of the validation set was 23.73 months (95% CI: 20.76-26.9); The OS mean (SD) overall survival period was 33.37 months (1.76). To compare imunotherapy manufatures,The median OS of patients in the domestic group was 23.6 months (95% CI: 19.9-30.63), and median OS of patients in the import group was not reached (95% CI: 23.47 -) (P=0.03<0.05).To compare male and female,while the median OS of male was 23.6 months (95% CI: 19.9-26.63); while the median OS of women was 30.43 months (P=0.2326>0.05).Four independent predictors histological grade, line of first immunotherapy ,tumor distant metastasis and immunotherapy cycle were identified[（HR=1.56，95%CI：1.11-2.24， P=0.01）;（HR=1.82, 95% CI：1.39-2.4，P<0.00）;（HR=1.62, 95% CI：1.09-2.47，P=0.02）;（HR=0.94, 95% CI：0.89-0.99，P=0.02)]. The C-index was 0.64 in development cohort and 0.67 in external validation cohort.Uno AUC was 0.72（95%[CI]：0.55，0.88）with internal validation AUC 0.70，external validation AUC 0.68（95%[CI]：0.55,0.80）.The external mean calibration in the large is 0.95. **Conclusions**：It appears that patients received more cycles immunotherapy as the first-line treatment with highly differentiated tumor showed positive effect on survival.The tool can also be used to determine the benefit of immunotherapy by comparing scores with patients at various stages of treatment

【**Keywords**】Prediction model , survival analysis, advanced gastric cancer, immunotherapy, nomogram

胃癌在全球新诊断的癌症病例中排名第六。它是癌症相关死亡的第三大主要原因，每年约有 769000 人因胃癌死亡，是癌症死亡的第三大原因[1][2]。在中国,胃癌是发病率居第五位和死亡率居第四位[5]。我国是胃癌的高发地区之一，我国胃癌新发病例数和死亡例数均约占世界的 50%，其发病率和病死率均高于全球水平，为全球平均水平的近 3 倍[28]。免疫治疗作为一种全新的治疗方法引入并通过了多国国家药品监督管理部门的批准上市，是胃癌治疗中一个发展迅速的研究领域。多个临床试验表明[15，16,18]，免疫治疗联合化疗在进展期胃和胃食管结合部腺癌中，患者的总生存期优于单纯化疗。3 项研究[41,44-45]报道，免疫检查点抑制剂治疗未提高患者 12 月的无疾病进展率（RR=1.75, 95%CI: 055-5.56），P>0.05）。无论 CHECKMATE-649 还是 KEYNOTE-061/062，ATTRACTION-02/04，单纯亚洲患者免疫治疗预后的分析不足，缺乏对免疫治疗前的胃癌患者进行个体生存结局预测的系统工具。

1.材料与方法

训练队列或建模队列是 2018 年至 2022 年 6 月在南京医科大学附属第一医院接受免疫治疗的癌症患者，验证队列的患者选自鼓楼医院，是南京大学附属的教学与临床医院。

入选标准如下：

（1）患有临床确诊的胃或胃食管交界部 AGC 腺癌（病理学/细胞学和影像学诊断）的患者；且

（2）在 2018 年至 2022 年 6 月期间接受过免疫治疗。免疫治疗为抗 PD-1、PD-L1 单克隆抗体，包括注射纳武利尤单抗（Nivolumab）、注射用帕博利珠单抗（Pembrolizumab）、注射用替雷利珠单抗（Tislelizumab）、注射

用信迪利单抗(Sintilimab)、注射用卡瑞利珠单抗（Camrelizumab）、注射用特瑞普利单抗（Toripalimab）、注射用派安普利单抗(Penpulimab)和注射用恩沃利单抗（Envafolimab）、注射用阿替利珠单抗（Atezolizumab）

排除标准：

（1）原发肿瘤非胃癌，即肿瘤细胞来源非胃部的患者；

（2）严重器官功能障碍的患者，如心力衰竭、呼吸衰竭、肝衰竭和肾衰竭；

（3）无本人或家属联系方式，无法进行门诊或电话随访的患者。

结局指标

根据 RECIST1.1, 实体肿瘤的疗效评价标准 1.1 版（New Response Evaluation Criteria in Solid Tumors: Revised RECIST Version 1.1）总生存期：（Overall Survival，OS）； 完全缓解（Complete Response, CR）；部分缓解（Partially Response, PR）；疾病进展（Progressive disease,PD）；疾病稳定（Stable disease）；客观应答率（Objective Response Rate，ORR）常见于癌症化疗患者评估疗效。生存随访：随访截止点为 2022 年 9 月。进行了电话随访，进一步确认出院后的治疗、基因检测结果和总体生存状况。无法联系的患者的数据将被删除。

预测指标

（1）人口统计学指标，包括年龄、婚姻状况、性别；

（2）疾病特征：

组织学分级；lauren 分级； Borrmann 分型；病理分型，根据第五版 WHO（2019）胃肿瘤病理分类：管状腺癌、黏液腺癌、低黏附性腺癌(印戒细胞癌)、腺鳞癌、神经内分泌瘤、乳头状腺癌。美国癌症联合委员会（AJCC）第 8 版首次诊断的肿瘤初级阶段 TNM；肿瘤标志物：

（3）干预措施。收集患者接受的既往的和现在的治疗方案：手术、放疗、化疗、免疫治疗。

2.统计方法

（1）建模队列/训练集按性别和免疫治疗进口或国产分为进行分层。采用 Kaplan-meier 方法结合对数秩检验进行生存分析并绘制生存曲线，根据分层因素，进行组间生存曲线的对比，探索两组中位生存期的差异。（2）对训练集进行单因素分析免疫治疗影响患者总生存期的独立预后因素，同时计算风险比（HR）和 95%置信区间（95% CI），基于多因素 Cox 等比例风险模型的结果，筛选独立的预后因素并建立预测然后纳入多因素 Cox 比例风险回归模型（proportional hazards model, 简称 Cox 模型），进入模型的是适合该结局事件的风险预测指标。（3）生存预测模型采用基于多因素 COX 回归分析结果的列线图法。评价预测模型的临床应用价值的指标一般有区分度（discrimination）、校准度（calibration）和决策曲线分析(Decision Curve Analysis, DCA)。模型的评估分为内部验证，验证训练集的效能，以及外部验证，利用验证集检验预测模型效能。预测模型的效能最常用的是校准度和区分度[53]。所有分析均使用 SAS 和 R 软件 4.1.1 版进行。

3.结果

研究采用整群抽样，样本量大小取决于可以在中心收集到的符合方案的患者信息。通过训练集所在中心信息中心统计数据可知，截止 2022 年 6 月 1 日患有人口统计学信息，共计收集南京医科大学第一附属医院 2018 年-2022 年 6 月因免疫治疗入院的胃癌患者 501 例，作为建模队列/训练集；鼓楼医院 2018 年-2022 年 6 月，符合纳入排除标准的患者 513 例，作为验证队列/验证集。表 1 显示了训练集（n=501）和验证集（n=513）的统计数据。患者基线特征使用分类变量进行描述，其中，如表 1 所示两个队列的患者平均年龄（SD）分别为 62.23(10.85)VS 61.99(12.47)。四分位间距分别为（56，70）和（55，69）。训练集 365 名男性（72.85%）和验证组 365 名男性 (71.15%)。男性：女性约等于 2.5:1。提示男性较女性胃癌发病率高。既往有慢性病史的患者比例两组分别为 254 例(50.70%)VS 204 例（42.06%)。患有高血压的患者两组比例分别是 142 例（28.34%）和 128 例（24.95%）。

表 1.训练集与验证集的人口统计学、预测指标以及结局指标

项目	指标	训练集	验证集	合计	统计量
年龄（岁）	N(Missing)	485(16)	502(11)	987(27)	0.057
	Mean(SD)	62.23(10.85)	61.99(12.47)	62.11(11.70)	Wilcoxon 秩和检验
	Median	63.75	64.60	64.16	
	Q1,Q3	56.09,70.29	55.94,69.52	56.04,69.93	
	Min,Max	24.74,85.36	43.90,90.25	43.90,90.25	
婚姻	未婚 n(%)	3(0.60%)	195(38.01%)	198(19.53%)	-
	已婚 n(%)	484(96.61%)	313(61.01%)	797(78.60%)	(Fisher 精确概率法)
	离婚 n(%)	10(2.00%)	2(0.39%)	12(1.18%)	
	丧偶 n(%)	4(0.80%)	3(0.58%)	7(0.69%)	
	合计	501	513	1014	
性别	男 n(%)	365(72.85%)	365(71.15%)	730(71.99%)	0.365
	女 n(%)	136(27.15%)	148(28.85%)	284(28.01%)	卡方检验
	合计	501	513	1014	
国产进口	国产 n(%)	365(73.44%)	307(60.08%)	672(66.67%)	20.244
	进口 n(%)	132(26.56%)	204(39.92%)	336(33.33%)	卡方检验
	合计	497	511	1008	
接受免疫治疗周期	N(Missing)	499(2)	503(10)	1002(12)	-1.969
	Mean(SD)	4.46(4.15)	4.90(4.28)	4.68(4.22)	Wilcoxon 秩和检验
	Median	3.00	4.00	4.00	
	Q1,Q3	2.00,6.00	2.00,6.00	2.00,6.00	
	Min,Max	1.00,32.00	1.00,36.00	1.00,36.00	
民族	汉族 n(%)	501(100.00%)	512(100.00%)	1013(100.00%)	-
	其他 n(%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	
	合计	501	512	1013	
疾病史	0n(%)	254(50.70%)	204(42.06%)	458(46.45%)	7.390
	1n(%)	247(49.30%)	281(57.94%)	528(53.55%)	卡方检验
	合计	501	485	986	
高血压	无 n(%)	359(71.66%)	385(75.05%)	744(73.37%)	1.493
	有 n(%)	142(28.34%)	128(24.95%)	270(26.63%)	卡方检验
	2n(%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	
	合计	501	513	1014	
组织学分化	1n(%)	20(5.08%)	4(0.88%)	24(2.82%)	20.203
	2n(%)	133(33.76%)	201(43.98%)	334(39.25%)	卡方检验
	3n(%)	241(61.17%)	252(55.14%)	493(57.93%)	
	合计	394	457	851	
Bormann 分型	1n(%)	11(2.27%)	9(2.24%)	20(2.26%)	112.802
	2n(%)	60(12.40%)	30(7.46%)	90(10.16%)	卡方检验
	3n(%)	138(28.51%)	256(63.68%)	394(44.47%)	
	4n(%)	275(56.82%)	107(26.62%)	382(43.12%)	
	合计	484	402	886	

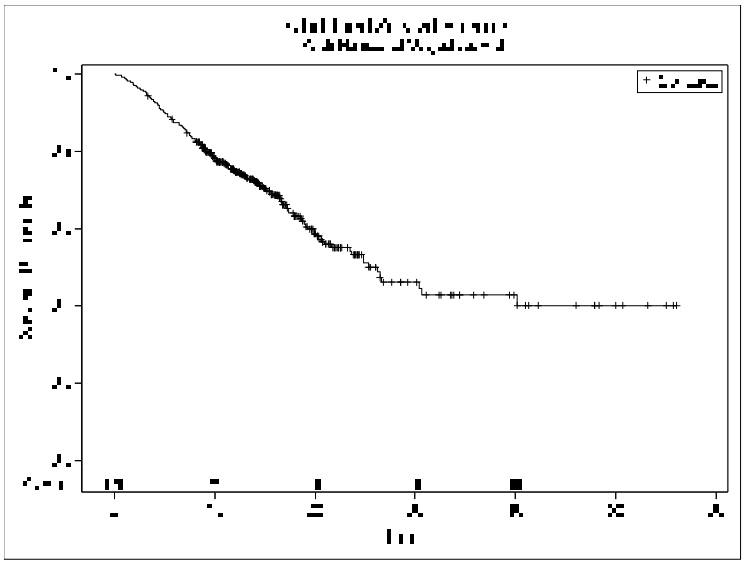
项目	指标	训练集	验证集	合计	统计量
LAUREN 分型	1n(%)	92(35.25%)	119(40.48%)	211(38.02%)	1.608
	2n(%)	102(39.08%)	105(35.71%)	207(37.30%)	卡方检验
	3n(%)	67(25.67%)	70(23.81%)	137(24.68%)	
	合计	261	294	555	
HER2	0n(%)	127(54.51%)	182(50.14%)	309(51.85%)	5.609
	1n(%)	51(21.89%)	77(21.21%)	128(21.48%)	卡方检验
	2n(%)	37(15.88%)	53(14.60%)	90(15.10%)	
	3n(%)	18(7.73%)	51(14.05%)	69(11.58%)	
	合计	233	363	596	
原发肿瘤	T1n(%)	15(4.44%)	24(7.48%)	39(5.92%)	8.629
	T2n(%)	22(6.51%)	24(7.48%)	46(6.98%)	卡方检验
	T3n(%)	94(27.81%)	111(34.58%)	205(31.11%)	
	T4n(%)	207(61.24%)	162(50.47%)	369(55.99%)	
	Txn(%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	
	合计	338	321	659	
区域淋巴结	N0n(%)	34(11.22%)	50(19.53%)	84(15.03%)	-
	N1n(%)	49(16.17%)	33(12.89%)	82(14.67%)	(Fisher 精确概率法)
	N2n(%)	75(24.75%)	55(21.48%)	130(23.26%)	
	N3n(%)	145(47.85%)	117(45.70%)	262(46.87%)	
	Nxn(%)	0(0.00%)	1(0.39%)	1(0.18%)	
	合计	303	256	559	
研究开始时肿瘤分期	1n(%)	9(1.96%)	18(3.96%)	27(2.96%)	14.601
	2n(%)	34(7.41%)	48(10.57%)	82(8.98%)	卡方检验
	3n(%)	109(23.75%)	138(30.40%)	247(27.05%)	
	4n(%)	307(66.88%)	250(55.07%)	557(61.01%)	
	5n(%)	0(0.00%)	0(0.00%)	0(0.00%)	
	合计	459	454	913	
首次接受免疫治疗的线数	0n(%)	9(1.79%)		9(0.90%)	-
	1n(%)	208(41.52%)	298(59.13%)	506(50.35%)	(Fisher 精确概率法)
	2n(%)	242(48.30%)	149(29.56%)	391(38.91%)	
	3n(%)	208(41.52%)	298(59.13%)	85(8.46%)	
	4n(%)	1(0.20%)	13(2.58%)	14(1.39%)	
	合计	501	504	1005	
远处转移	M0n(%)	154(34.45%)	209(41.72%)	363(38.29%)	50.827
	M1n(%)	293(65.55%)	250(49.90%)	543(57.28%)	卡方检验
	Mxn(%)	0(0.00%)	42(8.38%)	42(4.43%)	
	合计	447	501	948	
任何与肿瘤相关的手术	否 n(%)	245(50.83%)	218(42.75%)	463(46.67%)	6.508
	是 n(%)	237(49.17%)	292(57.25%)	529(53.33%)	卡方检验
	合计	482	510	992	
任何与肿瘤相关的化疗	否 n(%)	217(44.93%)	205(40.59%)	422(42.71%)	-
	是 n(%)	266(55.07%)	299(59.21%)	565(57.19%)	(Fisher 精确概率法)

项目	指标	训练集	验证集	合计	统计量
	2n(%)	1(0.20%)		1(0.10%)	
	合计	483	505	988	
任何与肿瘤相关的放疗	否 n(%)	433(89.83%)	342(66.67%)	775(77.89%)	77.449
	是 n(%)	49(10.17%)	171(33.33%)	220(22.11%)	卡方检验
	合计	482	513	995	
既往治疗方式	手术+化疗+免疫治疗 n(%)	148(38.44%)	175(45.69%)	323(42.06%)	9.233
	化疗+免疫治疗 n(%)	109(28.31%)	118(30.81%)	227(29.56%)	卡方检验
	免疫治疗 n(%)	128(33.25%)	90(23.50%)	218(28.39%)	
	合计	385	383	768	
PFS	CR	3（1.00%）	2（0.00%）	5(0.56%)	
	PR	47（11.00%）	98（22.00%）	145(16.26%)	
	SD	351（80.00%）	302(67.00%)	653(73.21%)	
	PD	39（9.00%）	50(67.00%)	89(9.98%)	
	合计	440	452	892	

3.2 模型的规范

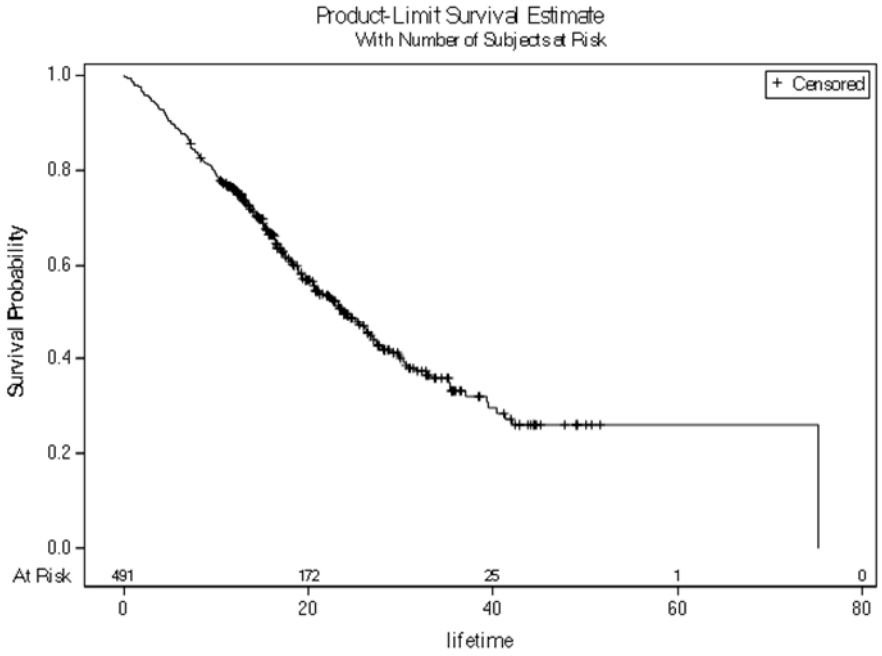
生存分析结果

训练集和验证集两组死亡人数分别 214 例（42.71%）和 258 例（50.29%）。Cox 比例风险回归用于选择独立的生存危险因素。为了估计两个队列的生存状态，采用 Kaplan-Meier 方法，训练集的中位总生存期为 25.3 个月（95%CI：20.96-40.20），总生存期的 Mean(SD)为 25.5 个月(0.89)，OS 的生存曲线如图 1 所示。验证集的中位总生存期是 23.73 个月（95%CI：20.76-26.9）；总生存期的 Mean(SD)为 33.37 个月（1.76），验证集的 OS 生存曲线如图 2 所示。可见国内进展期的胃癌目前经过免疫治疗后的情况中位总生存期超过 2 年。



Number at risk(censored)	474(0)	322(50)	94(228)	29(281)	14(296)	5(302)

图 1.训练集的总生存曲线（Overall Survival Curve）

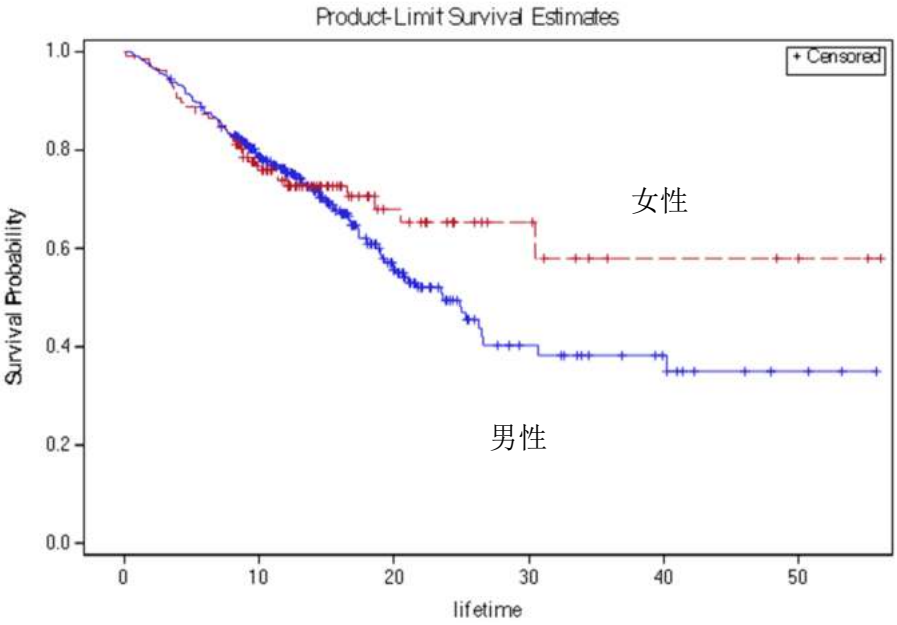


Number at risk(censored)	491(0)	385(2)	170(133)	61（203）	24（228）	3(247)	0

图 2.验证集的总生存曲线（Overall Survival Curve）

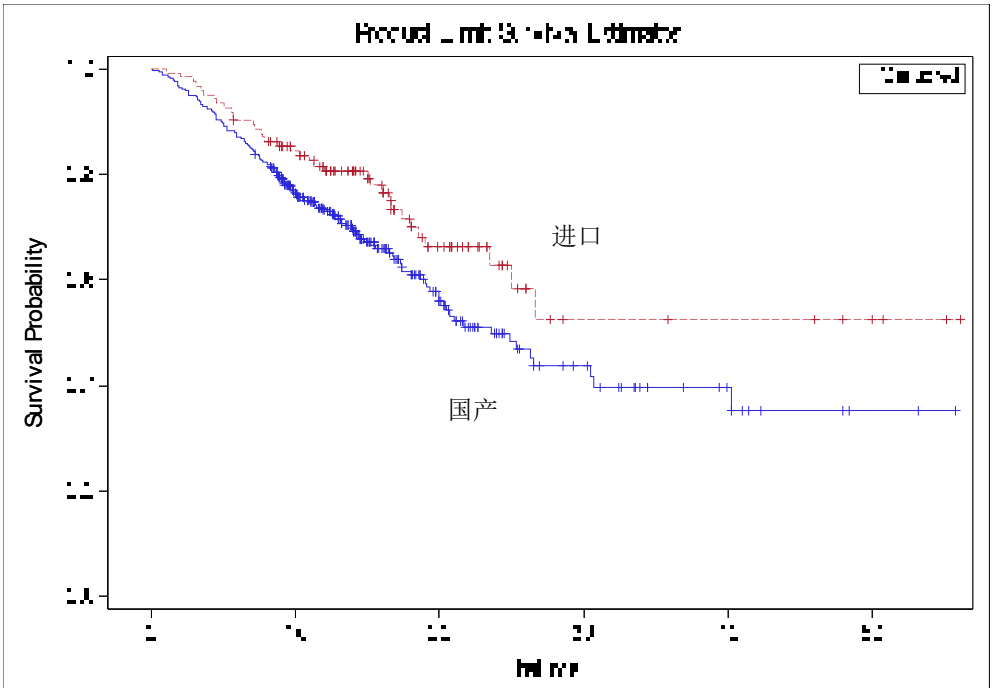
风险分层

按照男女进行风险分层，男性的中位总生存期为 23.6 个月（95%CI：19.9-26.63），生存期的 Mean（SD）24.5（1.02）；女性的中位总生存期为 30.43 个月，生存期的 Mean（SD）为 22.98（1.07）月。Log-rank 检验（P=0.2326>0.05）



Number at risk(censored)						
男性	347（0）	241（33）	70(161)	19(199)	10(207)	2(215)
女性	127(0)	80(17)	23(68)	9(82)	4(86)	2(88)

图 3.男女分组生存曲线



Number at risk(censored)

国产	347（0）	227（39）	62（168）	22（198）	8(209)	1(216)
进口	123（0）	93（10）	31（88）	7（81）	5（83）	2（86）

图 4.国产和进口免疫治疗药物分组生存曲线。1=国产；2=进口

按照国产免疫治疗药物和进口免疫治疗药物进行分层，国产组的患者中位生存期为 23.6 个月（95%CI：19.9-30.63），生存期的 Mean（SD）24.57（1.04）；而进口组的患者中位生存期未达到（95%CI：23.47-），生存期的 Mean（SD）21.19（0.8）；Log-rank 检验得出 P=0.03<0.05

单因素和多因素 COX 回归

对所有预测因子进行单因素和多因素 COX 回归分析，表 2 呈现了所有针对 OS 的单因素预测因子的风险比(HR)及其 95%的可信区间。单因素分析后进入模型的因素有以下 7 个：组织学分化(HR=1.41,P=0.03),肿瘤远端转移(HR=1.46,P=0.03)，pStage(HR=1.32,P=0.03)，化疗（HR=1.32，P=0.04），免疫治疗的周期（HR=0.95，P=0.01）；首次应用免疫治疗的线数（HR=1.53，P=0.00）；免疫治疗药物生产商（HR=0.66，P = 0.03），显示统计学显着性(P < 0.05)，其他还有年龄（HR=1.01，95%CI：1-1.02，P=0.03）但单因素亦没有进入模型。性别（P=0.23），LAUREN 分型（P=0.07），Borrmann（P=0.53），肿瘤浸润深度（P=0.5），淋巴结转移数量（P=0.42），HER-2 (P=0.99)，手术（P=0.11），既往接受过的治疗（P=0.18）单因素分析未能进入模型。

将所有因素进行多因素 COX 分析，逐步回归，纳入排除标准水平 0.1，结果如表 3 所示，第一个进入模型的是组织学分化（HR=1.56，95%CI：1.11-2.24，P=0.01）和免疫治疗的线数（HR=1.82, 95% CI：1.39-2.4，P<0.00），第三个进入模型的是肿瘤远端转移（HR=1.62, 95% CI：1.09-2.47，P=0.02），最后进入模型的是免疫治疗周期（HR=0.94, 95% CI：0.89-0.99，P=0.02），故而只有组织学分级，免疫治疗周期，首次免疫治疗线数和肿瘤远端转移四个因素在多因素分析后进入模型，这四个可能是免疫治疗胃癌患者的生存预后预测因子。

据此，使用 R 软件制作了如图 5 所示的列线图。

表 2.单因素 COX 回归结果

因素	卡方	风险比	自由度	95%可信区间		P 值
年龄	1.44	1.01	1	1.00	1.02	0.03
性别	1.42					0.23
男	1.42	1.25		0.88	1.82	0.23
女				Reference		
慢性病史						0.49
是	0.47	0.90		0.66	1.22	0.49
否				Reference		
婚姻						
未婚	0.00	0.99		.	.	1.00
已婚	0.00	454429.9		0.638	.	0.98
离婚	0.00	397206.8		0.401	.	0.98
丧偶						
组织学分级	4.54	1.41	2			0.03
高分化	0.91	0.67		0.26	0.41	0.34
中分化	4.99	0.64		0.43	0.94	0.03
低分化				Reference		
LAUREN 分级	5.23		2			0.07
肠型	0.01	0.90		0.97	0.55	1.74
弥漫型	2.91	0.09		1.59	0.95	2.78
混合型				Reference		
Borrmann 分级	2.22		3			0.53
I 型（息肉肿块型）	0.16	1.20		0.42	2.66	0.69
II 型（无浸润溃疡性）	0.59	0.84		0.52	1.30	0.44
III 型（有浸润溃疡型）	1.63	0.79		0.54	1.13	0.20
IV 型（弥漫浸润型）				Reference		
T 分级	2.39		3			0.50
T1	1.32	0.51		0.12	1.37	0.25
T2	0.00	0.98		0.43	1.92	0.96
T3	1.29	0.77		0.49	1.19	0.26
T4				Reference		

因素	卡方	风险比	自由度	95%可信区间		P 值
淋巴结转移	2.83		4			0.42
N0（无转移）	0.86	0.71		0.32	1.40	0.35
N1（3-6 个转移）	1.31	1.39		0.78	2.38	0.25
N2（7-15 个转移）	0.00	1.01		0.59	1.69	0.97
N3（16 个以上）				Reference		
远端转移	4.53	1.45	1			0.03
M0（无）	4.53	0.69		0.49	0.96	0.03
M1（有）				Reference		
P-stage	4.95	1.32	3			0.03
I	0.06	0.87		0.21	2.30	0.81
II	4.02	0.48		0.22	0.92	0.04
III	2.96	0.70		0.46	1.04	0.09
IV				Reference		
高血压			1			
0	0.17	0.93		0.68	1.31	0.68
1				Reference		
HER2 表达	0.02		3			0.99
0	0.00	1.00		0.48	2.44	0.99
1+	0.00	0.99		0.43	2.53	0.98
2+	0.01	1.04		0.42	2.81	0.93
3+				Reference		
手术	2.59		1			0.11
0	2.59	1.29		0.95	1.75	0.11
1				Reference		
手术和化疗顺序	0.08		1			0.78
术前化疗	0.08	1.05		0.73	1.49	0.78
术后化疗				Reference		

因素	卡方	风险比	自由度	95%可信区间		P 值
化疗	3.90	1.39				0.04
0	3.90	0.72	1	0.51	0.99	0.04
1				Reference		
既往治疗	3.48		2			0.18
手术联合化疗	0.13	1.08		0.71	1.66	0.72
化疗	2.90	1.46		0.95	2.26	0.09
无				Reference		
免疫治疗线数	13.74	1.53				0.00
一线	15.77	0.41		0.27	0.64	<.0. 00
二线	8.49	0.55		0.37	0.83	0.00
三线	.	.	.	.	.	.
四线				Reference		
免疫药物生产方	4.63	0.66				0.03
国产	4.63	1.51	1	1.05	2.22	0.03
进口				Reference		
免疫治疗的周期	6.25	0.95		0.91	0.99	0.01

表 3.OS 多因素 COX 回归结果

因素	卡方	风险比	95%可信区间		P 值
组织学分级	6.11	1.56	1.11	2.24	0.01
肿瘤远端转移	5.33	1.62	1.09	2.47	0.02
免疫治疗线数	18.44	1.82	1.39	2.40	<.00
免疫治疗周期	5.05	0.94	0.89	0.99	0.02

列线图如图 5 根据 COX 风险回归模型，筛选出：组织学分级，免疫治疗周期，首次免疫治疗线数和肿瘤远端转移四个独立危险因素。根据患者的状况，临床医生可使用以下列线图加出总分，以及找到对应的 1 年-5 年的生存预期。列线图第一列横轴是各因素得分，临床可以根据患者实际情况选择对应的分数。Total points 是指所有因素得分的总和。首先组织学分级是一个独立危险因素风险，在很多研究中均被证实，高分化的肿瘤组织恶性程度较低，患者具有较高的生存率，低分化的肿瘤组织分化程度低，恶性程度高，其生存的预后较其他两种差。本研究亦证明了这点。此外，肿瘤是否有远端转移，远端转移的患者得分更高，肿瘤的转移对免疫治疗的预后是危险因素。根据图 5，免疫治疗患者接受的周期越多，得分越低，患者的生存率越高。根据列线图，从一线治疗开始使用免疫治疗，免疫治疗干预越早，改善肿瘤微环境，患者生存获益更佳。通常一个完整的化疗疗程是 6-8 周，21 天一个周期。免疫治疗周期大于 6 周期以上的患者获益更多，且免疫治疗坚持周期越长，生存预后状态越好，显示免疫治疗对于肿瘤微环境的调整做出了很大的贡献。诸如，远端转移的患者得分为 10，组织学低分化得分 10，若可以一线即开始与细胞毒性化疗共同应用，并坚持 12 个周期，得分 60，共计 80 分，

2 年生存率可以达到 70%，5 年生存率可以达到 40%。若三线以上才使用免疫治疗，同样存在远端转移的，组织学低分化的患者，得分 110，2 年生存率下降到 35%，5 年生存率为不足 10%。因此，免疫治疗应作为 III-IV 期进展期胃癌患者的一线治疗方法提前应用。

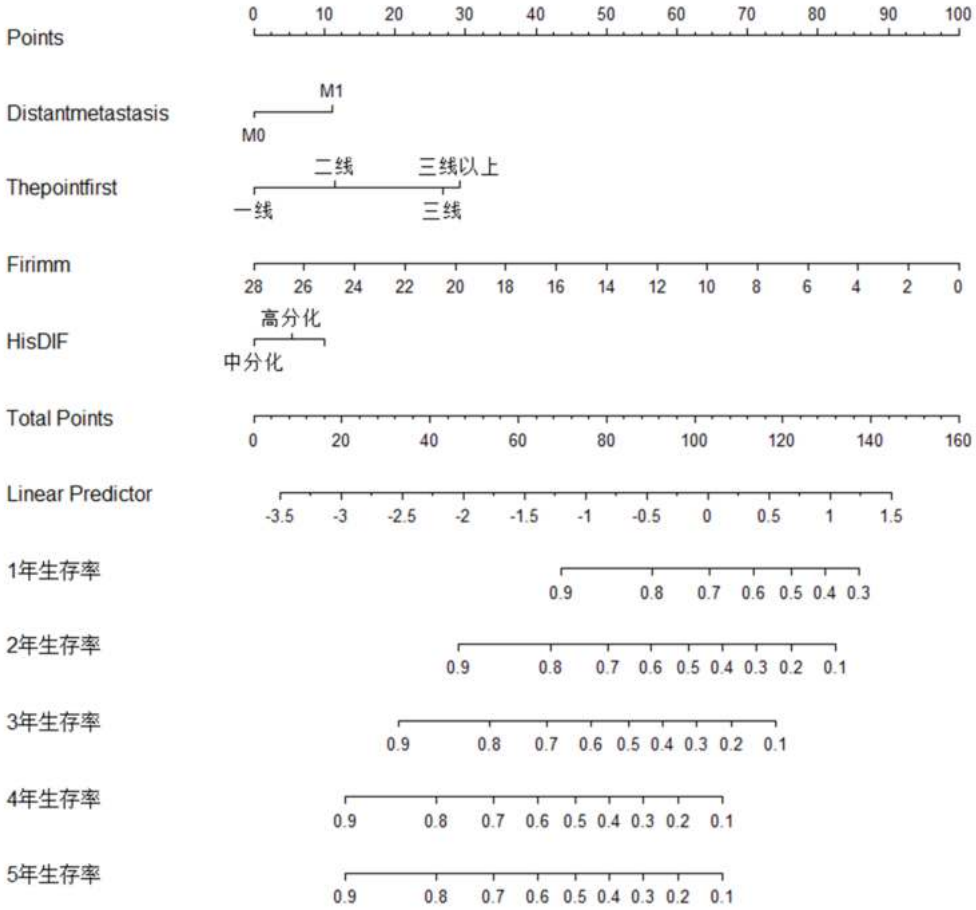


图 5.胃癌患者使用免疫治疗的列线图

3.3 模型的表现：列线图的区分度和校准度

建模以后，内部验证采用 bootstrap 法。经过 R 软件的分析，列线图的 Harrel C 指数为 0.64（95%置信区间[CI]：0.58,0.7）。内部验证后，经偏差校正的 Harrell C 指数为 0.62，Uno C 为 0.61。使用验证集进行外部验证后，训练集的外部验证偏差校正的 Harrell C 指数为 0.67（95%可信区间[CI] 0.63-0.72）。曲线下面积，Uno AUC 为 0.72，（95%置信区间[CI]：0.55，0.88）；内部校正后，曲线下面积为 0.70，外部验证的曲线下面积为 0.68，（95%置信区间[CI]：0.55,0.80），如图 6A/B。经过决策分析，三年内的决策分析曲线如图 7A/B/C。如图 7C 所示，1 年生存率的平均校准值为（OE=0.95，95%可信区间[CI]0.77，1.16）。三年的年平均校准生存率为（OE=0.86，95%置信区间 [CI] 0.72，1.02）。结合所有时间线，总体平均校准斜率为 0.95，四分位间距为（0.798-1.12）。我们的组合在建模/训练集和验证集中的广泛阈值概率范围内始终显示出良好的净收益（Net Benefit）。8A 和 8B 分别对训练集和验证集进行决策曲线分析，显示有一定临床应用价值。

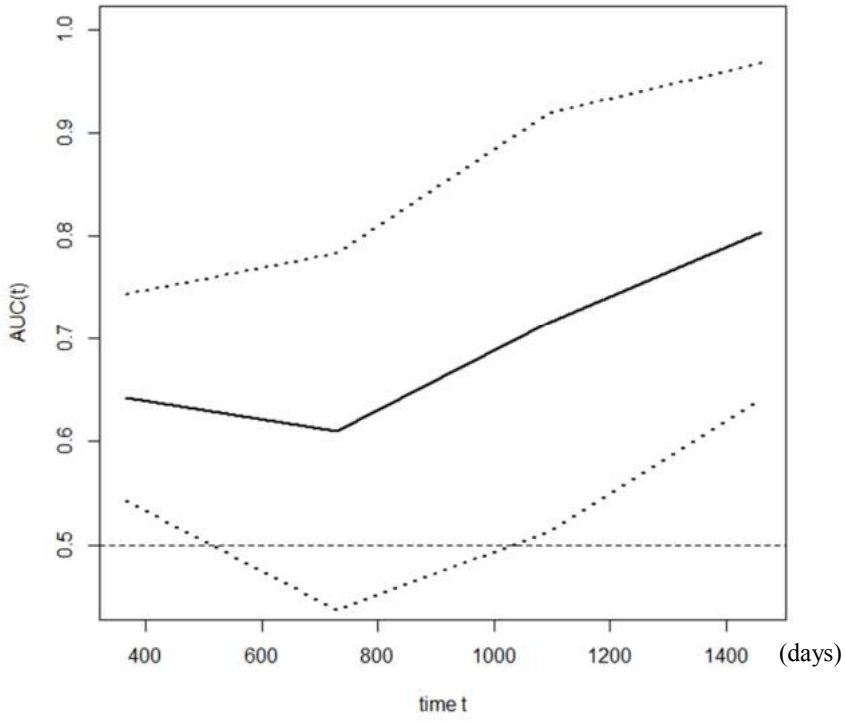


图 6A 训练集曲线下面积 AUC

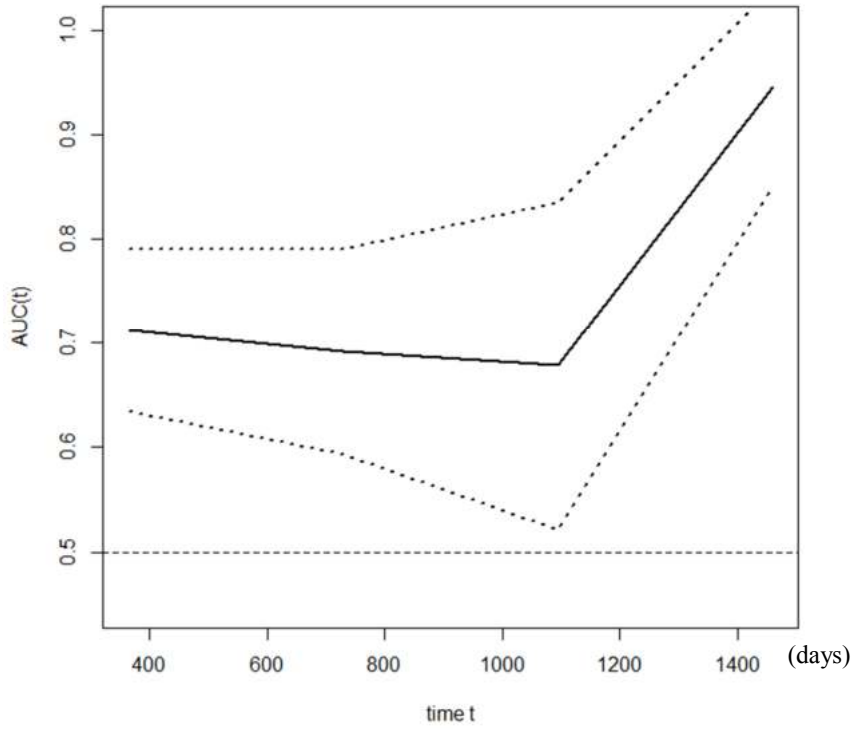
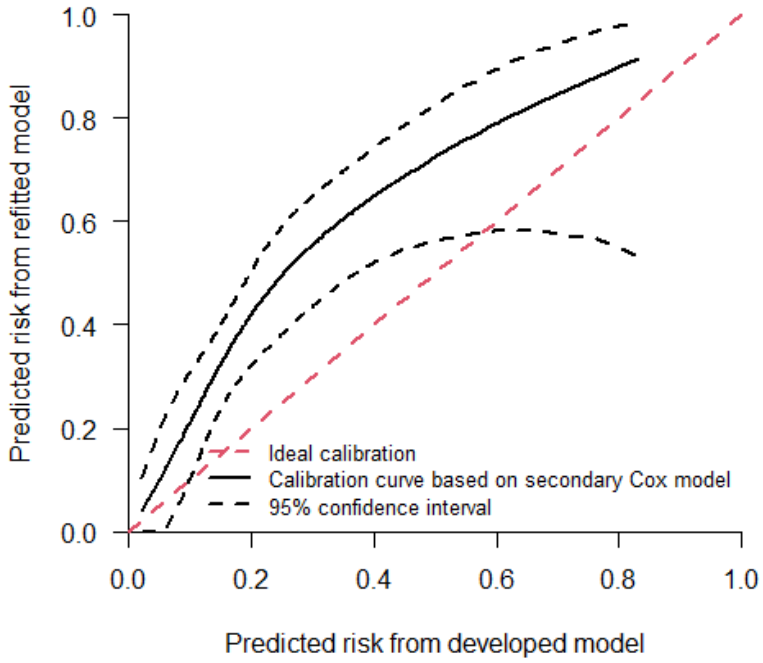
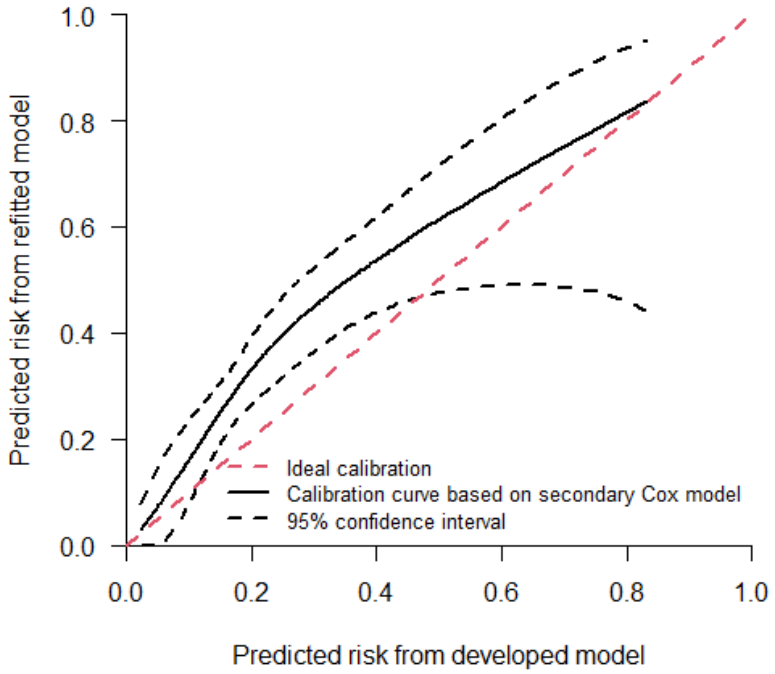


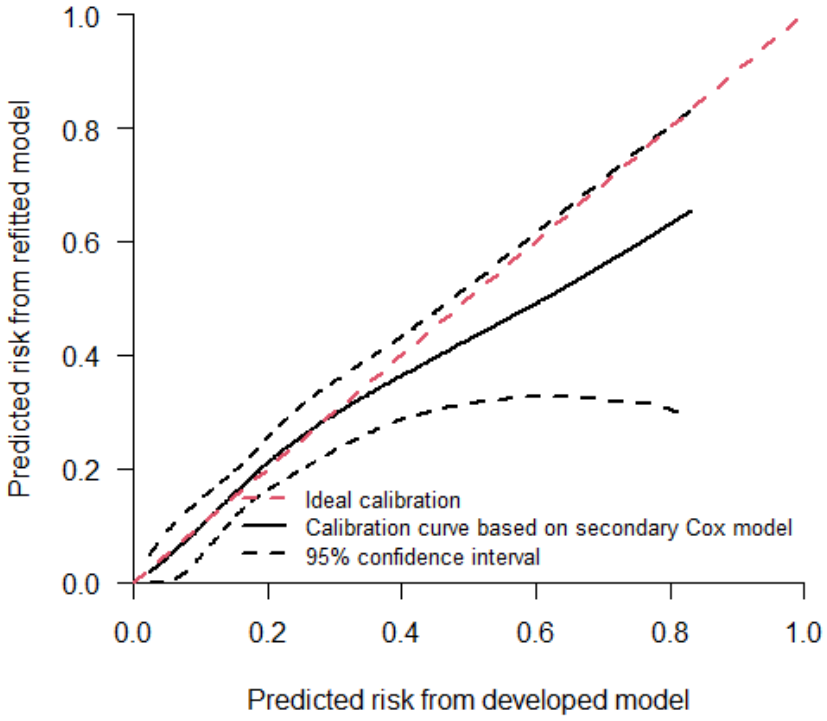
图 6B 训练集的曲线下面积 AUC



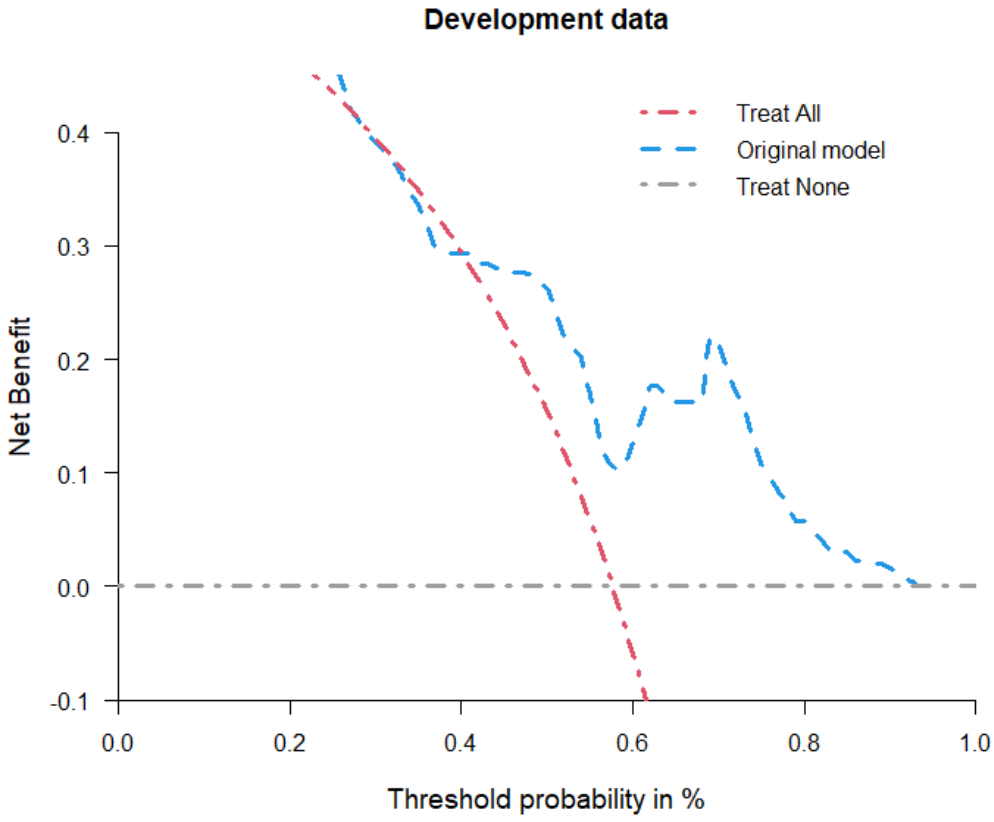
7A.预后三年疾病相关死亡的列线图校准度(slope=0.86 ,interquartile range,0.72-1.02)



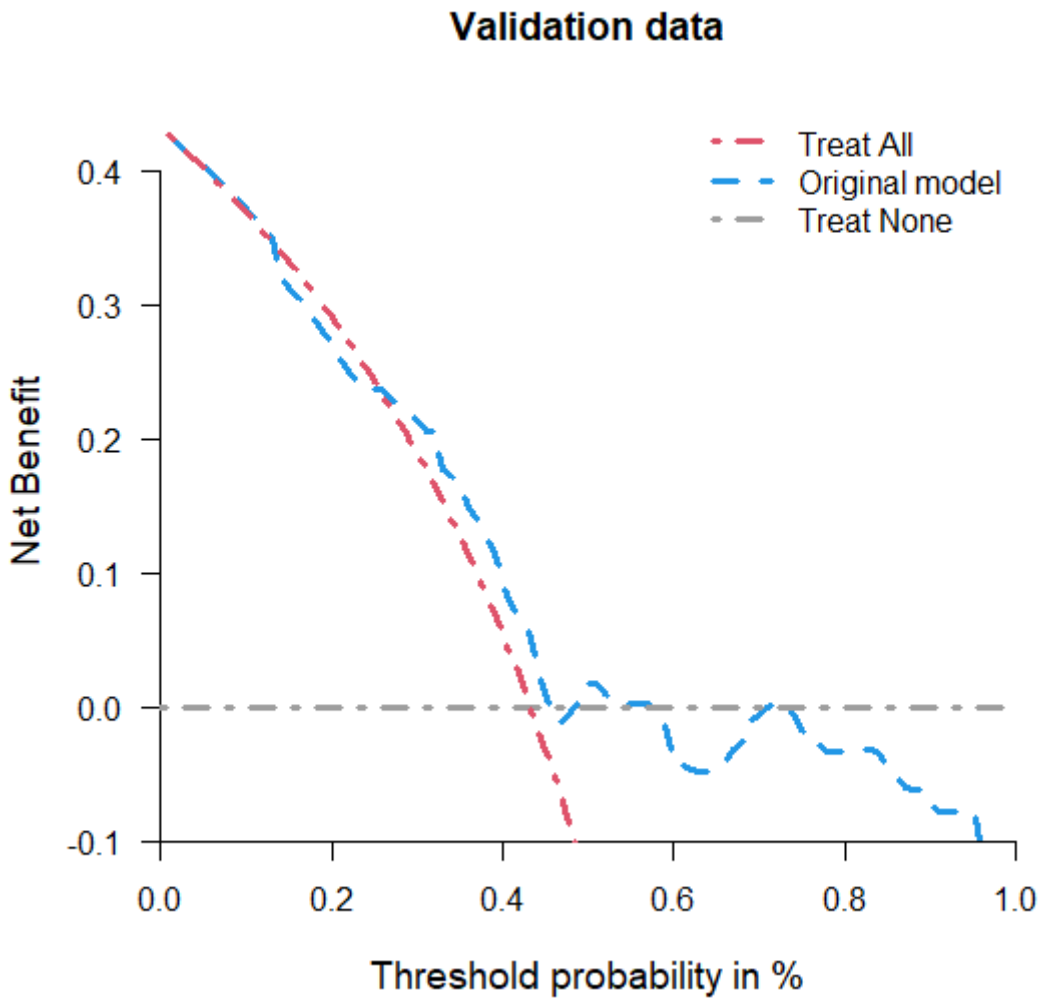
7B. 预后 2 年疾病相关死亡的列线图线校准度(slope=0.86 ,interquartile range,0.72-1.03)



7C.预后 1 年疾病相关死亡的列线图校准度(slope=0.947,interquartile range,0.77-1.16)



8A. 训练集的决策曲线



8B. 验证集的决策曲线

讨论

在这项研究中，我们开发了一个新的有关胃癌患者免疫治疗的列线图，并使用多中心研究的数据集对其进行了内部和外部验证。目前已经有许多评估胃癌患者术前、术后、化疗、放化疗结合等干预的后结局的生存预测模型，但它们不能应用于接受免疫治疗的晚期 GC 患者[34,35,39,40]。在本研究中，我们用真实世界的数据，经过一定时间的随访，实践了用生存曲线、COX 回归筛选独立危险因素，再使用列线图对患者个体使用免疫治疗的生存预后风险进行预测的方法，模型进行了区分度和校准度的内外部验证，对模型的效能进行了基本的评估，再使用决策分析曲线，对于模型的临床价值进行了评估，并根据针对个体的预后或诊断多因素模型报告规范（Transparent Reporting of a Multivariable Prediction Model for Individual Prognosis or diagnosis,TRIPOD ）[58]进行了研究的报告工作。

通过考虑上述最常见和最重要的参数，本研究针对免疫治疗的胃癌患者开发了一个新的列线图，这些参数有助于在免疫治疗之前识别影响治疗效果的高风险患者，并以患者生存预后为结局事件，帮助临床医生为患者做出适当的决定。根据在世界范围内，胃癌的发病率与年龄的增长呈正相关，年龄小于 45 岁的人群，无论男女，胃癌都相对罕见[59]。本研究中初次诊断时 55 岁以下胃癌患者的占比约为 25%，这与全球胃癌发病年龄的分布基本吻合。随着年龄的增长[42]，患者的生存期下降，反之亦然。上述研究表明，随着患者年龄的增长，总生存期也会下降。有研究发现，男性胃癌的发病率大约是女性的 2 倍[11]，这与本研究中使用免疫治疗的患者，男女比

例一致。在众多免疫治疗和其他抗肿瘤治疗中，已经观察到在男女性别方面可比较的治疗效应的差别[21]。虽然在肿瘤的临床试验未将男女分开分析治疗效应（Klein et al., Nature Review Immunology, 6; 626, 2016），这些差异可能反映的是生物学的差异在治疗效应方面的表现。而男女不应当被视为亚组,而应当是生物性差异组[21]。CHECKMATE649，在总样本量男性组和女性组（HR 0.77;95%CI：0.67-0.88 versus 0.84，95%CI：0.69-1.04）。在亚组分析中，CPS≥5 的患者中男性(HR 0.67, 95%CI：0.56-0.80)，女性（HR 0.78, 95%CI：0.59-1.03），男性在 nivolumab 中的获益优于女性。但是，该项研究中仅 30%的患者为女性，与流行病学分布状况一致[8]。故而，不能下明确的关于男女不同性别在免疫治疗中获益差异的结论。

组织学分级也是一个独立危险因素风险，在很多研究中均被证实，高分化的肿瘤组织恶性程度较低，患者具有较高的生存率，低分化的肿瘤组织分化程度低，恶性程度高，其生存的预后较其他两种差。本研究亦证明了这点。此外，根据图 4，免疫治疗患者接受的周期越多，免疫治疗干预越早，生存率越高。根据列线图，从一线治疗开始使用免疫治疗，改善肿瘤微环境，患者生存获益更佳。通常一个完整的化疗疗程是 6-8 周，21 天一个周期。免疫治疗周期大于 6 周期以上的患者获益更多，且免疫治疗坚持周期越长，生存预后状态越好，显示免疫治疗对于肿瘤微环境的调整做出了很大的贡献。同时，在我们的研究中，浸润深度（称为 T 期）和转移淋巴结（也称为 N 期）以及是否远端转移（M）均没有进入模型，可以推断，无论肿瘤浸润程度与淋巴结转移数量，是否存在远端转移，患者均可以从免疫治疗中获益。由于数据缺失值较多，肿瘤标志物未进入模型，部分原因是检测率较低或数据登记率较低（部分患者的基因检测在第三方检测公司进行，病案资料中未进行登记）。从收集的数据可以看出，在实际诊疗过程中，HER-2 作为免疫治疗和靶向治疗方案选择的重要肿瘤标志物，通常会进行免疫组化检测。两家医院对于胃癌肿瘤突变中 TMB 和 PD-L1、dMMR、EBER 的重视程度不同,故而检测率不同。所以两个数据集的肿瘤突变发生率与文献中不尽一致，亦可能由于人群选择方面的偏倚。在将来的研究中，应当做到前瞻性，做好肿瘤突变数据的病案登记。综上，免疫治疗应作为Ⅲ-Ⅳ期进展期胃癌患者的一线治疗方法应用。

目前的研究有几个优点。首先，列线图中使用的所有因素都为临床常用指标并且均为客观指标；因此，它可以在临床医生的临床实践中广泛应用。此外，基于系统的统计分析，我们在训练集和验证集中均确定了一个新的、重要的指标，即首次免疫治疗介入的时间，这表明了免疫治疗联合化疗可以作为一线治疗方案的更早的使用在进展期转移性胃癌患者中。无论涉及哪种免疫治疗药物及联合化疗药物，患者接受的周期越多，生存预后越好。印戒细胞癌目前属于低黏附性腺癌通常被认为是胃癌症预后不良的病理分型，但未进入我们的预测模型，是否病理分型为低黏附性腺癌，对应用免疫治疗的预后非独立危险因素。最后，中国人胃癌病理亚型分布有其独特特征，肠型腺癌与弥漫型腺癌的比率低于亚洲平均水平；EB 病毒阳性型胃癌占比低于国内外平均水平；HER2 免疫组化检测结果为阳性及以上病例数训练集和验证集两组分别为（106 例，45.49%和 181 例，49.86%）所占比例也低于国外报道。目前无论是 CheckMate 649，还是 KEYNOTE-059、KEYNOTE-060，其纳入的受试者主要为西方人群，对于中国人群的免疫检查点抑制剂的数据均有限，本研究患者全部来自国内，不考虑肿瘤突变分层，输出了出特定人群的预后数据，对我国研究者在胃癌中应用免疫治疗提供了一定的价值。

4 局限性

目前的研究表明，根据 C 指数可见，模型的区分度一般，但校准能力很好，在局限性方面，主要表现在以下方面。首先，我们的诺模图仅在接受免疫治疗的亚洲患者中开发和验证；因此，我们的诺模图在西方患者中的应用需要进一步验证。其次，我们试图尽可能多地搜索初次诊断以及患者既往史，保证收集的是原位为胃癌的患者数据，了解患者发病的初始状态；同时收集患者所有既往接受的干预、治疗和评估；然而，有一些不可避免的缺失值，没有进行插补，例如患者的肿瘤标志物检测结果；未经手术的患者缺乏 Borrmann 和 Lauren 评分数据；第三，对于 LAUREN 分型为弥漫型的胃癌，Borrmann IV 型，对应于 GS 亚型，需要根据其他信息综合考量如何选择治疗方案。最后，从社会学角度，我们的预测模型未收集患者虚弱、焦虑、抑郁等患者心理相关变量，如焦虑自评量表（SAS）。相关文献表明，情绪和焦虑状况对消化道癌症的发病和预后存在正相关关系，故而虚弱和心理状况是一个重要的临床因素，这可能是一个潜在的研究方向。

参考文献

[1]Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CAA Cancer J. Clin. 2021, 71, 209–249.

[2]Bray F,Ferlay J,Soerjomataram I,et al.Global cancer statistics 2018:GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin,2018,68(6):394-424.

[3]Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Dyba, T.; Randi, G.; Bettio, M.; Gavin, A.; Visser, O.; Bray, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. Eur. J. Cancer 2018, 103, 356–387.

[4]StomachCancer—Statistics.Availableonline:https://www.cancer.net/cancer-types/stomach-cancer/statistics (accessed on 27 December 2021).

[5]Li Y, Wei Y, He Q, Wang X, Fan C, Li G. Clinicopathological and prognostic significance of high circulating lymphocyte ratio in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer.Sci Rep. 2018 ,8(1):6223.

[6]De Manzoni G, Marrelli D, Baiocchi GL, et al. The Italian Research Group for Gastric Cancer (GIRCG) guidelines for gastric cancer staging and treatment: 2015. Gastric Cancer.2017,20(1):20–30.

[7] Ju MR, Karalis JD, Blackwell J-M, et al. Inaccurate Clinical Stage Is Common for Gastric Adenocarcinoma and Is Associated with Undertreatment and Worse Outcomes. Ann Surg Oncol. 2021.

[8]Guideline Committee of the Korean Gastric Cancer Association DWG, Review P. Korean Practice Guideline for Gastric Cancer 2018: an evidence-based, multi-disciplinary approach. J Gastric Cancer. 2019,19(1):1-48.

[9] Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. N Engl J Med 2006,355:11-20. [10] Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. N Engl J Med 2007,357:1810-1820.

[11]Stephen R Smalley 1, Jacqueline K Benedetti, Daniel G Haller, Scott A Hundahl, Norman C Estes, Jaffer A Ajani, Leonard L Gunderson, Bryan Goldman, James A Martenson, J Milburn Jessup, Grant N Stemmermann, Charles D Blanke, John S Macdonald. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. J Clin Oncol. 2012,30(19):2327-33.

[12] Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CC, Fritz A, Greene F. AJCC Cancer Staging Manual.Springer New York.2010:649.

[13] Ho-Jung Shin, MD, Yong-Ok Choi, PhD, Chul-kyu Roh, MD,Sang-Yong Son, MD,Hoon Hur, MD, and Sang-Uk Han.Prediction of Survival Outcomes Based on Preoperative Clinical Parameters in Gastric CancerMD. Ann Surg Oncol.2021, 28:7027–7037.

[14] Anica Högner;Markus Moehler.Immunotherapy in Gastric Cancer.Curr. Oncol. 2022, 29(3): 1559-1574

[15]Kang YK, Boku N, Satoh T, Ryu MH, Chao Y, Kato K, Chung HC, Chen JS, Muro K, Kang WK, et al: Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO 4538-12, ATTRACTION-2): A randomised, double blind, placebo controlled, phase 3 trial. Lancet 2017,390,2461-2471.

[16] Shitara K, O¨ zgu¨rog˘lu M, Bang YJ, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. Lancet. 2018,392:123-33.

[17]Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma（CheckMate-649）: A randomised, open-label, phase 3 trial [J]. Lancet, 2021, 398（10294）: 27-40.

[18] Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, Sun W, Jalal SI, Shah MA, Metges JP, et al: Safety and

efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: Phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. JAMA Oncol 4 , 2018:180013.

[19]Shitara K, van Cutsem E, Bang YJ, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab or pembrolizumab plus chemotherapy vs chemotherapy alone for patients with first-line, advanced gastric cancer: The KEYNOTE-062 phase 3 randomized clinical trial. JAMA Oncol. 2020,6:1571–80.

[20] Chen J, Li S, Yao Q, et al. The efficacy and safety of combined immune checkpoint inhibitors (nivolumab plus ipilimumab): a systematic review and meta-analysis. World J Surg Oncol.2020,18:150.

[21] Markus Moehler a1, Anica Högner b1, Anna D. Wagner c, Radka Obermannova d, Maria Alsina e, Peter Thuss-Patience b, Hanneke van Laarhoven f, Elizabeth Smyth g.Recent progress and current challenges of immunotherapy in advanced/metastatic esophagogastric adenocarcinoma. European Journal of Cancer .2022,176:13-29.

[22] Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature.2014,513(202):209.

[23] Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. Nat Med. 2015,21(449):456.

[24] Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition inmetastatic gastric cancer. Nat Med. 2018,24:1449–58.

[25] Satake H, Lee KW, Chung HC, Lee J, Yamaguchi K, Chen J-S,et al. Pembrolizumab (Pembro) versus standard of care chemotherapy (chemo) in patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: Asian subgroup analysis of KEYNOTE-062. J Clin Orthod 2020,38:4523-4523.

[26] Kawazoe A,Shitara K. Trifluridine/tipiracil for the treatment of metastatic gastric cancer[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2020, 14(2):65-70.

[27] Tabernero J, Alsina M, Shitara K, et al. Health-related quality of life associated with trifluridine/tipiracil in heavily pretreated metastatic gastric cancer: results from TAGS[J].Gastric Cancer. 2020.

[28]王静雷,杨一兵,耿云霞,等.1990-2017 年中国胃癌发病、患病及死亡状况趋势分析[J].中国慢性病预防与控制,2020,28(5):321-325.

Wang JL,Yang YB,Geng YX,et al.Trend analysis of the morbidity,prevalence and mortality of stomach can cer in China from 1990 to 2017[J].Chin J Prev Control Chronic Dis,2020,28(5):321-325.

[29]齐长松,程思远,沈琳.中国胃癌患者三线治疗的现状及研究进展[J].中华肿瘤杂志,2020,42(12):983-988. Qi CS,Cheng SY,Shen L.Current status and research progress of third-line treatment for patients with gastric cancer in China[J].Chin J Oncol,2020,42(12):983-988.

[30] Zheng Y, Zhu XQ, Ren XG. Third-line chemotherapy in advanced gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2017 Jun;96(24):e6884

[31] Ferlay J,Colombet M,Soerjomataram I,et al.Cancer statistics for the year 2020:An overview[J].Int J Cancer, 2021,149(4):778-789.

[32] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2018 (5th edition). Gastric Cancer 2020,24: 1–21 .

Jun Lu , Bin-bin Xu , Chao-hui Zheng , Ping Li, Jian-wei Xie , Jia-bin Wang, Jian-xian Lin, Qi-yue Chen , Mark J. Truty 5 * and Chang-ming Huang 1,2, Development and External Validation of a Nomogram to Predict Recurrence-Free Survival After R0 Resection for Stage II/III Gastric Cancer: An International Multicenter Stud. Front Oncol.2020(10):1-11.

[34]Eom BW, Ryu KW, Nam BH, et al. Survival nomogram for curatively resected Korean gastric cancer patients: multicenter retrospective analysis with external validation. PLoS One. 2015.10(2):0119671.

[35] Han DS, Suh YS, Kong SH, et al. Nomogram predicting longterm survival after d2 gastrectomy for gastric cancer. J Clin Oncol. 2012,30(31):3834–40.

[36] Kattan MW, Karpeh MS, Mazumdar M, Brennan MF. Postoperative nomogram for disease-specific survival after an R0 resection for gastric carcinoma. J Clin Oncol. 2003,21(19): 3647–50.

[37] Song KY, Park YG, Jeon HM, Park CH. A nomogram for predicting individual survival of patients with gastric cancer who underwent radical surgery with extended lymph node dissection. Gastric Cancer. 2014,17(2): 287–93.

[38]Nicholls RJ,Zinicola R,Haboubi N. Extramural Spread ofrectal cancer and the AJCC Cancer Staging Manual 8thedition,2017.JAnnOncol, 2019,30(8):1394-1395

[39] Hou songlin, et al, Prognostic factor analysis and prognostic model of liver metastasis of gastric cancer based on SEER database.J Chinese Journal of General Surgery,2020, 29 (10):1212-1223.

[40] Huling Li [1,] Dandan Lin [1,] Zhen Yu [2], Hui Li [3], Shi Zhao [4], Tuersun Hainisayimu [5], Lin Liu [2], Kai Wang [6] .A nomogram model based on the number of examined lymph nodes-related signature to predict prognosis and guide clinical therapy in gastric cancer. Front Immunol. 2022,13:947802.

[41] Kang YK, Boku N, Satoh T, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12,ATTRACTION-2):a randomised,double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2017, 390(10111): 2461-2471.

[42] Shitara K, Özgüroğlu M, Bang YJ, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061):a randomised,open-label,controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2018, 392(10142): 123-133.

[43] Bang YJ, Ruiz EY, Van Cutsem E, et al. Phase 3, randomised trial of avelumab versus physician's choice of chemotherapy as third-line treatment for patients with advanced gastric or gastrooesophageal junction cancer: primary analysis of JAVELIN Gastric 300[J]. Ann Oncol, 2018, 29(10): 2052-2060.

[44] Bang YJ, Cho JY, Kim YH, et al. Efficacy of sequential ipilimumab monotherapy versus best supportive care for unresectable locally advanced/metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(19): 5671-5678.

[45] Janjigian YY, Bendell J, Calvo E, et al. CheckMate-032 study: efficacy and safety of nivolumab and nivolumab plus ipilimumab in patients with metastatic esophagogastric cancer[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(28): 2836-2844.

[46] Pietrantonio F, Randon G, Bartolomeo MD, Luciani A, Chao J, Smyth EC, Petrelli F. Predictive role of microsatellite instability for PD-1 blockade in patients with advanced gastric cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. ESMO Open 2021;6.

[47] Yoon HH, Jin Z, Kour O, Shitara K, Gibson MK, Prokop L, Kang Y-K, Shi Q, Ajani JA. Association of magnitude and consistency of PD-L1 expression and other variables associated with benefit from immune checkpoint inhibition (ICI): systematic review and meta-analysis of 14 phase 3 trials in advanced gastroesophageal cancer (GEC). J Clin Orthod 2022;.

[48]RüschoffJ, DietelM, BarettonG, Arbogast S, WalchA, MongesG, Chenard M, Penault,Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, et al: HER2 diagnostics in gastric cancer guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing.Virchows Arch 2010.457: 299-307.

[49]Palle, J.; Rochand, A.; Pernot, S.; Gallois, C.; Taïeb, J.; Zaanan, A. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in advanced gastric cancer: Current knowledge and future perspectives. Drugs 2020, 80, 401–415.

[50] ReVD, Brisotto G, Repetto O, De Zorzi M, Caggiari L,Zanussi S, et al.Overview of Epstein-Barr-virus-associated gastric cancer correlated with prognostic classification and development of therapeutic options. Int J Mol Sci 2020,21:E9400.

[51] Panda A, Mehnert JM, Hirshfield KM, Riedlinger G, Damare S,Saunders T, et al. Immune activation and benefit from avelumabin EBV-positive gastric cancer. J Natl Cancer Inst 2017;110:316e20.

[52] Wang D, Wang N, Li X, Chen X, Shen B, Zhu D, Zhu L, Xu Y, Yu Y, Shu Y. Tumor mutation burden as a biomarker in resected gastric cancer via its association with immune infiltration and hypoxia. Gastric Cancer 2021;24:823e34.

王俊峰，章仲恒，周支瑞，谷鸿秋.临床预测模型：模型的验证[J]中国循证心血管医学杂志.2019(11):141-144.

FuchCS,Tomasa J ,Yong CJ.et al.Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma（REGARD)：an international, randomised ,multicentre, placebo-controlled,phase 3 trial.Lancet, 2014, 383(9911) :31-39

Ullman TA and Itzkowitz SH.Intestinal inflammation and cancer. Gastroenterology, 2011,140 (6): 1807 - 1816 .

WangK, KimMK, DicaroG, et al.Inter leukin-17 receptor a signaling in trmsformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. Immunity. 2014,41 (6) :1052-1063.

Atefeh Talebi 1, Nasrin Borumandnia 2, Hassan Doosti 3, Somayeh Abbasi 4, Mohamad Amin Pourhoseingholi 5, Shahram Agah 6, Seidamir Pasha Tabaeian .Development of web-based dynamic nomogram to predict survival in patients with gastric cancer: a population-based study. Sci Rep.2022 Mar 17,12(1):4580.

陶立元，刘珏，曾琳，李楠，张华，赵一鸣.针对个体的预后或诊断多因素预测模型报告规范（TRIPOD）解读.中华医学杂志[J]:98(44):3556-3560.

Ferlay J. Colombet M, Soerjomataram I,et al.Cancer statistics for the year 2020:An overview[J].Int J Cancer, 2021,149(4):778-789.

Shitara K, Ajani JA, Moehler M, et al. Nivolumab plus chemotherapy or ipilimumab in gastro-oesophageal cancer. Nature. 2022;603:942-8.

[61]国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心.关于公开征求《真实世界数据用 于医疗器械临床评价技术指导原则（征求意见稿）》意见的通知[EB/OL]. (2019-12-13).https://www.cmde.org.cn/CL0066/20139.html.

[62]国家药品监督管理局.国家药监局关于发布真实世界证据支持药物研发与审评 的 指 导 原 则（试 行）的 通 告[EB/OL].(2020-01-07).https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggtg/ypqtgg/20200107151901190.html.

[63]FDA.Use of real-world evidence to support regulatory decision-making form edical devices[EB/OL].(2017-08-31).https://www.fda.gov/media/99447/ download.

[64]FDA .Framework for FDA's realworld evidence program [EB/OL].(2018-12). https://www.fda.gov/media/120060/download.

[65] FDA. Submitting documents using real-world data and real-world evidence to FDA for drugs and biologics[EB/OL].(2013-05).https://www.fda.gov/media/124795/down load.

[66]赖俊凯，王斌，姚晨，任元凯，晋菲斐，王锴.从真实世界数据到临床研究数据的标准转化研究. [J]临床研究方法学 2021,11:39-46 .

[67]YOO S, CHOI J.On the query reformulation technique for effective MEDLINE document retrieval[J].J Biomed Informatics,2010,43(5):686-693.

[68]Elastic.Elastic Stack 的核心 [EB/OL].[2021-09-17].https://www.elastic.co/cn/ elasticsearch.

[69]. Bang YJ, Cho JY, Kim YH, Kim JW, Di Bartolomeo M, AjaniJA, Yamaguchi K, Balogh A, Sanchez T and Moehler M: Efficacy of sequential ipilimumab monotherapy vs best supportive care for unresectable locally advanced/metastatic gastric or gastroesoph ageal junction cancer. Clin Cancer Res 2017,23,5671-5678.

[70] VacchellieE, Aranda F, Eggermont A, Galon J, Sautes FridmanC, Cremer I, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L, Kroemer G and Galluzzi L: Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. Oncoimmunology 3, 2014, e27878.

[71] Wang Q, Liu F and Liu L: Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: An updated meta-analysis. Medicine (Baltimore) 2017; 96: 63-69.

[72] Smyth E and Thuss Patience PC: Immune checkpoint inhibition in gastro-oesophageal cancer. Oncol Res Treat 41, 2018,272-280.

[73] Wei SC, Duffy CR and Allison JP: Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. Cancer Discov 8, 2018, 1069-1086.

[74] Ott PA, Hodi FS and Buchbinder EI: Inhibition of immune checkpoints and vascular endothelial growth factor as combination therapy for metastatic melanoma: An overview of rationale, preclinical evidence, and initial clinical data. Front

Oncol 2015,5, 202 .
[75]. Shrimali RK, Yu Z, Theoret MR, Chinnasamy D, Restifo NP and Rosenberg SA: Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. Cancer Res,2010,70, 6171-6180.
[76] Kamath SD, Kalyan A and Benson AB: Pembrolizumab for the treatment of gastric cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2018,18,1177-1187
[77] Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, Safran H, Dos Santos LV, Aprile G, Ferry DR, et al: Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): An international, randomised, multicentre, placebo controlled, phase 3 trial. Lancet 2014,383, 31-39.
[78] Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh SC, Bodoky G, Shimada Y, Hironaka S, Sugimoto N, Lipatov O, Kim TY, et al: Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro oesophageal junc¬tion adenocarcinoma(RAINBOW): A double-blind, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2014,15, 12240-1235.
[79] Kamath SD, Kalyan A and Benson AB: Pembrolizumab for the treatment of gastric cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2018,18,1177-1187.
[80]National Cancer Institute: Gastric Cancer Treatment (PDQ), http://www.Cancer.gov/cancertopicspdq/treatment/gastric/HealthProfessi onal/page1#Reference1.
[81] Shikata K, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Shirota T, et al.Aprospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population:The Hisayama Study.Int J Cancer .2006,1 (19), 196-201.
[82]A Phase 1/2 Study of Ramucirumab Plus Nivolumab in Participants with Gastric or GEJ Cancer [EB/OL]. (2018-05-04) [2020-05-08]. https://clinicaltrials.gov.
[83]Bang YJ, Golan T, Lin CC, Kang YK, Wainberg ZA, Wasserstrom H, Jin J, Mi G, McNeely S, Laing N, et al: Interim safety and clinical activity in patients (pts) with locally advanced and unresectable or metastatic gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) adenocarcinoma from a multicohort phase I study of ramucirumab (R) plus durvalumab (D). J Clin Oncol 2018,36: 92.
[84]Pavlakis N, Sjoquist KM, Martin AJ, Tsobanis E, Yip S, Kang YK, Bang YJ, Alcindor T, O'Callaghan CJ, Burnell MJ, et al: Regorafenib for the treatment of advanced gastric cancer (INTEGRATE): A multinational placebo-controlled phase II trial. J Clin Oncol 34, 2016,2728-2735
[85]Fukuoka S, Hara H, Takahashi N, Kojima T, Kawazoe A, Asayama M, Yoshii T, Kotani D, Tamura H, Mikamoto Y, et al: Regorafenib plus Nivolumab in patients with advanced gastric (GC) or colorectal cancer (CRC): An open-label, dose-finding, and dose-expansion phase 1b trial (REGONIVO, EPOC1603). J Clin Oncol 37 2019,(15): S2522 .
[86] Ladan Goshayeshi, Benyamin Hoseini, Zahra Yousefli, Alireza Khooie, Kobra Etminani, Abbas Esmaeilzadeh, Amin Golabpour: Predictive model for survival in patients with gastric cancer. Electronic Physician.2017, 9, 12: 6035-6042.
[87] Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. N Engl J Med 2001，345:725-730.
[88]Ajani JA, Barthel JS, Bekaii-Saab T, et al. Gastric cancer. J Natl Compr Canc Netw 2010;8:378-409. 6. Okines A, Verheij M, Allum W, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2010;21(Suppl. 5):v50-v54
[89]Foundation for Promotion of Cancer Research. Cancer Statistics in Japan 2014.
[90]Japanese gastric cancer treatment guidelines 2014 (ver. 4). Gastric Cancer. 201720(1),1–19.
[9] Lordick F , Mariette C , Haustermans K , et al.. Oesophageal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2016,27(5),50–57
[91] Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M,et al.Helicobacter pylori infection and

the development of gastric cancer. N Engl JMed. 2001,345,784-9.
[92]. Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Bee-Choo T, Ho JS and Unverzagt S: Chemotherapy for advanced gastric cancer. Cochrane Database.Syst Rev 8,2017. CD004064.
[93]. Song Z, Wu Y, Yang J, Yang D and Fang X: Progress in the treatment of advanced gastric cancer. Tumour Biol ,2017,(39) 1010428317714626.
[94]. ShahMA, XuRH, Bang YJ, Hoff PM, LiuT, Herraez，BarandaLA, Xia
F, Garg A, Shing M and Tabernero J: HELOISE: Phase ⅢIb Randomized
multicenter study comparing standard of care and higher-dose trastuzumab regimens combined with chemotherapy as first-line therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. J Clin Oncol 2017,(35) 2558-2567 .
[95]. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, Safran H, Dos Santos LV, Aprile G, Ferry DR, et al: Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): An international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet 2014,383, 31-39
[96]. Yazici O, Sendur MA, Ozdemir N and Aksoy S: Targeted therapies in gastric cancer and future perspectives. World J Gastroenterol 2016(22):471-489.
[97]. Ribas A and Wolchok JD: Cancer immunotherapy using check-point blockade. Science.2018, 359: 1350-1355.
[98]. Myint ZW and Goel G: Role of modern immunotherapy in gastrointestinal malignancies: A review of current clinical progress. J Hematol Oncol 2017(10) 86
[99] Muro K, Chung HC, Shankaran V, Geva R, Catenacci D, Gupta S, Eder JP, Golan T, Le DT, Burtness B, et al: Pembrolizumab for patients with PD-L1 positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): A multicenter, open-label, phase 1b trial. Lancet Oncology2016(17),717-726 .

超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中23种非甾体抗炎成分

孙树妍[1,2]，乔亚森[1]，王海燕[1]，董亚蕾[*1]，孙磊[*1]

（[1]中国食品药品检定研究院，国家药品监督管理局化妆品研究与评价重点实验室，北京 100050）

（[2]中国药科大学中药学院，国家药品监督管理局化妆品研究和评价重点实验室，南京 210098）

【摘要】建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中非法添加的氟芬那酸等23种非甾体抗炎药的方法。以膏霜、面膜、凝胶、液体水基类样品为代表性基质，化妆品采用甲醇或0.3%甲酸-甲醇进行超声辅助液液萃取。使用ACQUITY UPLC BEH C18（1.7 μm，2.1 × 150 mm）色谱柱进行分离，以0.1%甲酸-水和乙腈分别作为水相和有机相进行梯度洗脱，在多反应监测模式下，通过串联质谱检测器进行检测。对样品前处理条件和色谱、质谱条件进行了系统性考察。结果表明，萘普生、罗非昔布和其余21种化合物的线性范围分别为40~150 μg/L、10~150 μg/L、5~50 μg/L，线性相关系数良好（$r^2 > 0.99$）。低、中、高三个浓度水平的加标回收率范围为71.8%~118.1%，RSD范围为0.5%~9.3%。该方法操作简便、准确性高、灵敏度好，适用于化妆品中非甾体抗炎药的检测，能够为化妆品中非法添加行为的监管提供技术支撑。

【关键词】超高效液相色谱-串联质谱；化妆品；非甾体抗炎药；非法添加

Determination of 23 Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Cosmetics by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

SUN Shu-yan[1,2], QIAO Ya-sen[1], WANG Hai-yan[1], DONG Ya-lei[*1], SUN Lei[*1]

([1]National Medical Products Administration Key Laboratory for Research and Evaluation of Cosmetics, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China；[2]National Medical Products Administration Key Laboratory for Research and Evaluation of Cosmetics, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210098, China)

【Abstract】A method was developed for the determination of 23 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as flufenamic, phenylbutazone, phenacetin and so on in cosmetics by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Four kinds of cosmetics such as cream, facial mask, gel and toner were selected as representative matrix. The sample pretreatment conditions, chromatography and mass spectrometry conditions were systematically investigated. At first, the cosmetic samples were extracted by methanol for cream, gel, toner matrix, and methanol containing 0.3% formic acid for facial mask matrix by ultrasonic-assisted liquid-liquid extraction. Then they were separated on an ACQUITY UPLC BEH C18 column（1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm）by gradient elution. Acetonitrile and water containing 0.1% formic acid were used as mobile phases. The flow rate was 0.3 mL/min and injection volume was 5 μL. Finally, samples were detected by tandem mass spectrometry under multiple reaction monitoring（MRM）scanning mode. The results showed a good linearity in the concentration range of 40~150 μg/L for naproxen, 10~150 μg/L for rofecoxib and 5~50 μg/L for other NSAIDs. The spiked recoveries at the low, medium, and high levels ranged from 71.8% to 118.1%, with RSD ranging from 0.5% to 9.3%. This method has the characteristics of simple operation, high accuracy, and good sensitivity. It is suitable for the detection of NSAIDs in cosmetics, and provides a technical support for the supervision in cosmetics.

【**Key words**】ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); cosmetics; nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs); illegal addition

依托于经济的快速发展，国民生活水平不断提高，我国化妆品行业近些年来迅速发展。2021 年，我国化妆品市场规模达 811 亿美元，位列全球第二[1]。化妆品产业在飞速发展的同时，一些不良商家擅自向化妆品中非法添加化学药物[2]，以在短期内达到所宣称效果的目的。非甾体抗炎药（NSAIDs）通过抑制前列腺素环氧化酶 COX，阻止花生四烯酸转换为前列腺素而发挥解热、抗炎、止痛的作用[3]，也可能非法添加于化妆品中，以实现祛痘、镇痛等作用。保泰松属于吡唑烷酮类非甾体抗炎药，具有一定的祛痘、抗粉刺等功效，作为药物用于临床中，但将这些非甾体抗炎药添加在化妆品中，消费者在不知情的情况下长期接触使用，会对机体造成慢性损伤[4]；非那西丁为非甾体抗炎药，但具有持续性肾毒性，其单方制剂已被各国弃用。为避免含有此类药物的化妆品对消费者健康造成威胁，我国已将保泰松和非那西丁列入《化妆品禁用原料目录（2021 年版）》。除保泰松、非那西丁外，非甾体抗炎药种类较多，因此，本研究将保泰松、非那西丁、氟芬那酸、吲哚美辛等 23 种常见的非甾体抗炎药物作为研究对象。

目前，非甾体抗炎药的检测方法有高效液相色谱法[5]、液相色谱-串联质谱法[6]、化学发光法[7]、近红外高光谱成像技术[8]、酶联免疫法[9]、免疫层析法[10]等。这些研究多集中在药品、食品与保健食品领域，化妆品中非甾体抗炎药的检测方法还只涉及保泰松、非那西丁、氨基比林等几种化合物[11-13]。本研究中，使用高效液相色谱-串联质谱法，建立了膏霜、面膜、凝胶、液体水基等基质的化妆品中 23 种常见非甾体抗炎药的检测方法。本方法的前处理步骤简单，能够用于化妆品中抗炎药含量的快速测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1290II-6495 型液质联用仪（美国 Agilent 公司），AL 204 型电子天平（美国 Sartorius 公司），KQ-700DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），VORTEX-5 涡旋混合器（江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司），GTR21-1B 离心机（北京新时代北利医疗器械有限公司）。

氨基比林（99.7%）、双氯芬酸钠（100%）、芬布芬（99.4%）、吲哚美辛（99.0%）、酮洛芬（99.0%）、甲芬那酸（99.9%）、美洛昔康（99.9%）、萘普生（100%）、尼美舒利（99.9%）、奥沙普秦（100%）、吡罗昔康（99.5%）、舒林酸（100%）、托芬那酸（100%）、保泰松（99.8%）、氯诺昔康（99.6%）、安替比林（100%）购自中国食品药品检定研究院；氟芬那酸（97.0%）购自赛默飞世尔科技有限公司；塞来昔布（99.8%）、依托考昔（99.7%）、伐地考昔（99.9%）、帕瑞考昔（99.9%）购自广州佳途科技股份有限公司；罗非昔布（99.6%）购自德国 WITEGA 实验室；非那西丁（98.7%）购自德国 DrE 公司。甲醇、乙腈、甲酸均为质谱级，购自美国 Fisher 公司。实验用水为超纯水（电阻率≥18 MΩ·cm）。

1.2 标准溶液配制

称取氟芬那酸、氨基比林、双氯芬酸钠、芬布芬、吲哚美辛、酮洛芬、甲芬那酸、萘普生、尼美舒利、奥沙普秦、吡罗昔康、舒林酸、托芬那酸、塞来昔布、依托考昔、伐地考昔、帕瑞考昔、保泰松、非那西丁、安替比林标准品各 10 mg 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，摇匀；称取美洛昔康、罗非昔布、氯诺昔康标准品各 1 mg 于 10 mL 容量瓶中，用乙腈溶解并定容至刻度，摇匀，作为氟芬那酸等 23 种单标标准品储备溶液。标准储备溶液置于 4 ℃冰箱中避光保存。

准确移取美洛昔康、氯诺昔康、罗非昔布标准品溶液各 1 mL，氟芬那酸等 23 种单标标准品溶液各 0.1 mL 置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释并定容至刻度，得到 23 种化合物的混合标准溶液。混合标准溶液置于 4 ℃冰箱中避光保存。

1.3 样品前处理

取样品 1 g 于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 提取溶剂（膏霜、凝胶、液体水基使用甲醇溶液提取，面膜使用 0.3%甲酸的甲醇溶液提取），涡旋 30 s 使分散均匀，定容至 25 mL，超声 5 min，冷却至室温后，以 10 000 r/min 的转速离心 5 min，取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后，注入 UHPLC-MS/MS 测定。

1.4 液相色谱-串联质谱条件

1.4.1 液相色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C18（1.7 μm，2.1×150 mm）；柱温：25 ℃；进样体积：5 μL；流动相 A：0.1%甲酸-水溶液，流动相 B：乙腈；流速：0.3 mL/min。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 23 种化合物梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedures for 23 compounds

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0.00	70	30
3.00	70	30
12.00	25	75
14.00	25	75
14.01	70	30
18.00	70	30

1.4.2 质谱条件

离子化模式：ESI^+/ ESI^-；扫描模式：多反应监测（MRM）模式；雾化器温度：225 ℃，14 L/min；雾化器压力：20 psi；鞘气温度：250 ℃；毛细管电压：3000 V；喷嘴电压：1500 V。23 种非甾体抗炎药的详细质谱参数及当前条件下的保留时间见表 2。

表 2 23 种化合物的保留时间及质谱参数

Table 2 Retention time and Mass parameters of 23 compounds

No.	Compound	Precursor ion（*m/z*）	Product ion（*m/z*）	CE（V）	Detect Mode	RT/min
1	Aminophenazone	232.2	97.1*	41	ESI+	1.6
			56.0	41		
2	Antipyrine	189.1	77.1	37	ESI+	1.9
			56.1*	41		
3	Etoricoxib	359.1	280.1*	37	ESI+	2.9
			244.1	61		
4	Phenacetin	180.1	110.0	25	ESI+	3.6
			138.1*	17		
5	Piroxicam	332.1	95.1*	17	ESI+	6.5
			121.2	37		
6	Lornoxicam	372.0	121.1*	37	ESI+	6.5
			95.1	37		
7	Sulindac	357.1	248.1	41	ESI+	7.4
			233.2*	53		
8	Vardicoxil	315.1	132.0*	25	ESI+	8.3
			165.1	61		
9	Ketoprofen	255.1	209.2*	17	ESI+	8.7
			105.0	25		
10	Meloxicam	352.0	114.9*	25	ESI+	8.7
			140.9	21		

11	Fenbufen	237.1	181.0* 152.1	21 49	ESI+	9.3
12	Oxaprozin	294.1	276.1* 103.0	17 45	ESI+	10.1
13	Indomethacin	358.1	139.1* 111.1	17 57	ESI+	11. 0
14	Celecoxib	382.1	362.0* 230.9	33 65	ESI+	11.5
15	Phenylbutazone	309.2	160.1* 77.1	17 69	ESI+	11.5
16	Mefenamic	242.1	224.1* 209.0	25 37	ESI+	12.2
17	Rofecoxib	313.1	285.1* 257.0	13 21	ESI-	7.5

续表

No.	Compound	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	CE (V)	Detect Mode	RT/min
18	Naproxen	229.1	185.0* 169.1	1 29	ESI-	8.8
19	Parecoxib	369.1	119.0* 234.0	33 29	ESI-	9.7
20	Nimesulide	307.0	229.0* 64.0	13 69	ESI-	9.8
21	Diclofenac	294.0	250.2* 214.2	5 21	ESI-	10.9
22	Flufenamic	280.1	236.1* 176.2	17 37	ESI-	12.0
23	Tolfenamic	260.1	216.2* 35.1	13 45	ESI-	12.7

*：定量子离子：Quantitative product ion。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 提取溶剂的选择

本研究首先对提取溶剂进行了考察。分别向空白膏霜、面膜、凝胶、液体水基四种化妆品基质中加入 23 种待测化合物混合标准溶液（萘普生和罗非昔布的加标浓度为 50 μg/L，其余化合物的加标浓度为 20 μg/L），以该加标样品为研究对象，考察甲醇、乙腈和乙醇作为提取溶剂的效果。以凝胶基质为例，结果如图 1 所示。采用甲醇、乙腈、乙醇作提取溶剂时，酮洛芬的回收率分别为 94.9%、78.5%、80.7%。，其他大部分化合物也是在采用甲醇作为提取溶剂时的回收率较高。采用上述三种有机溶剂对另外三种基质中的化合物进行提取时，所得结果与凝胶基质大体相似。因此，最终采用甲醇作为提取溶剂。

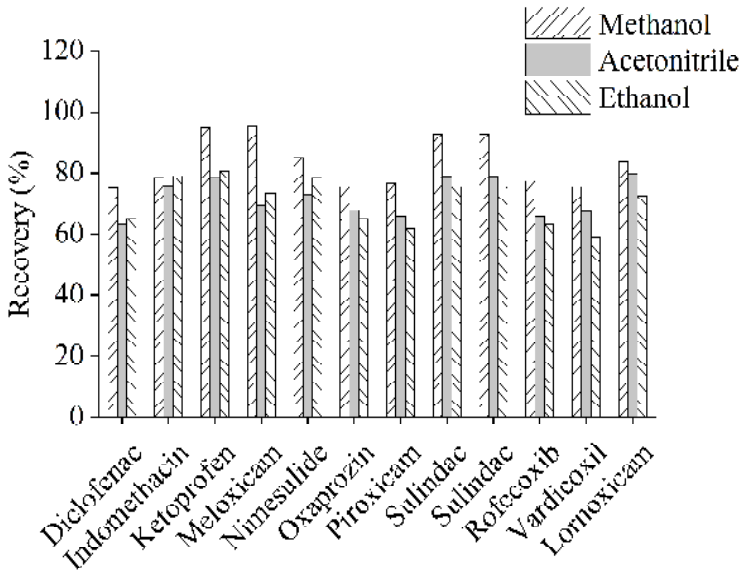


图 1 提取溶剂对凝胶基质中代表性化合物提取效率的影响

Figure 1 Effect of types of extraction solvent on extraction efficiency for representative compounds in gel matrix

2.1.2 提取溶剂中甲酸含量的影响

由于目标化合物种类较多，性质差异较大，为提高各化合物的回收率，对提取溶剂中甲酸含量进行了考察。分别向空白膏霜、面膜、凝胶、液体水基四种化妆品基质中加入一定量的 23 种待测化合物混合标准溶液，以该加标样品为研究对象，考察了含有不同含量甲酸（0、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%）的甲醇作为提取溶剂的提取效果，结果见图 2。在液体水基、凝胶和膏霜基质中，随着甲酸含量的增加，大部分化合物的回收率下降；而在面膜基质中，采用 0.3%甲酸-甲醇作为提取溶剂时，大部分化合物的回收率最高。为进一步验证面膜基质的最优提取试剂，本研究对其他空白面膜进行了相同的实验，得到了相似的结果。最终，选择甲醇作为液体水基、凝胶和膏霜基质的提取溶剂；选择 0.3%甲酸-甲醇作为面膜基质的提取溶剂。

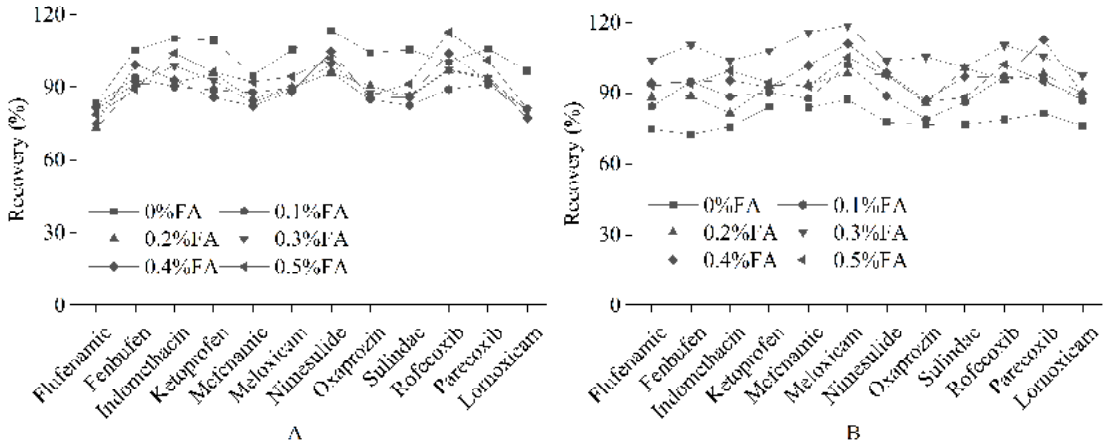


图 2 提取溶剂中甲酸含量对液体水基（A）和面膜基质（B）中代表性化合物提取效果的影响

Figure 2 Effect of content of formic acid in extraction solvent on extraction efficiency for representative compounds in toner and facial mask matrix

2.1.3 超声提取时间的影响

最后，以空白加标样品为研究对象，考察了超声提取时间分别为 0、5、10、15、20 min 时膏霜、面膜、凝胶、液体水基四种基质中 23 种化合物的提取效果。以凝胶基质为例，图 3 中的结果表明，超声时间为 5 min 时，各化合物的回收率最高，随着超声时间的增加，各化合物回收率有所下降。如塞来昔布的回收率从 96.9%降至 73.2%，依托考昔的回收率从 97.4%降至 76.6%。在其他三种基质中，23 种化合物受超声时间的影响与在凝胶基质中的趋势相同。因此，选择超声 5 min 作为最佳提取时间。

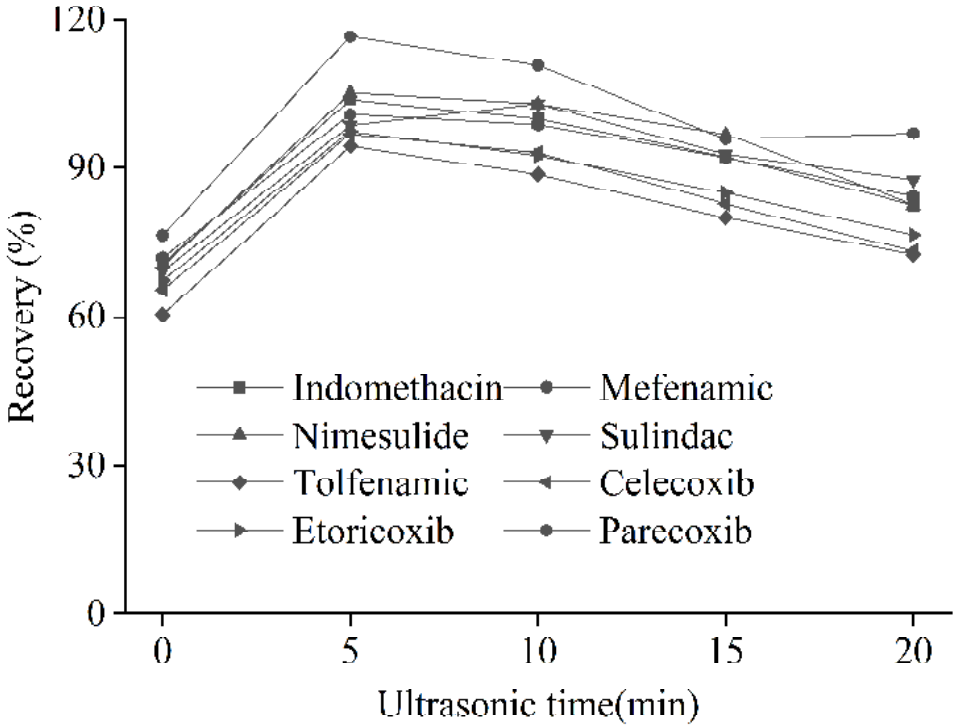


图 3 超声时间对凝胶基质中代表性化合物提取效果的影响

Figure 3 Effect of ultrasound time on extraction efficiency for representative compounds in gel matrix

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

根据化合物的性质，考察了 ACQUITY UPLC BEH C18（1.7 μm，2.1×150 mm）、Agilent Eclipse XDB-C18（3.5 μm，4.6×150 mm）、Shim-pack XR-ODS Ⅲ（2.2 μm，2.0 mm×150 mm）三种类型色谱柱对 23 种化合物的分离效果，并对保留时间和灵敏度进行比较，三种色谱柱对化合物的分离效果见图 4。结果表明，采用 XD8-C18 色谱柱时 23 种化合物的保留时间普遍延后，增加了分析时间；采用 XR-ODS 色谱柱时，部分化合物的灵敏度较低；采用 BEH-C18 色谱柱时，23 种化合物峰形较好，有利于获得更高的灵敏度。所以，本实验最终选用 BEH-C18 色谱柱。

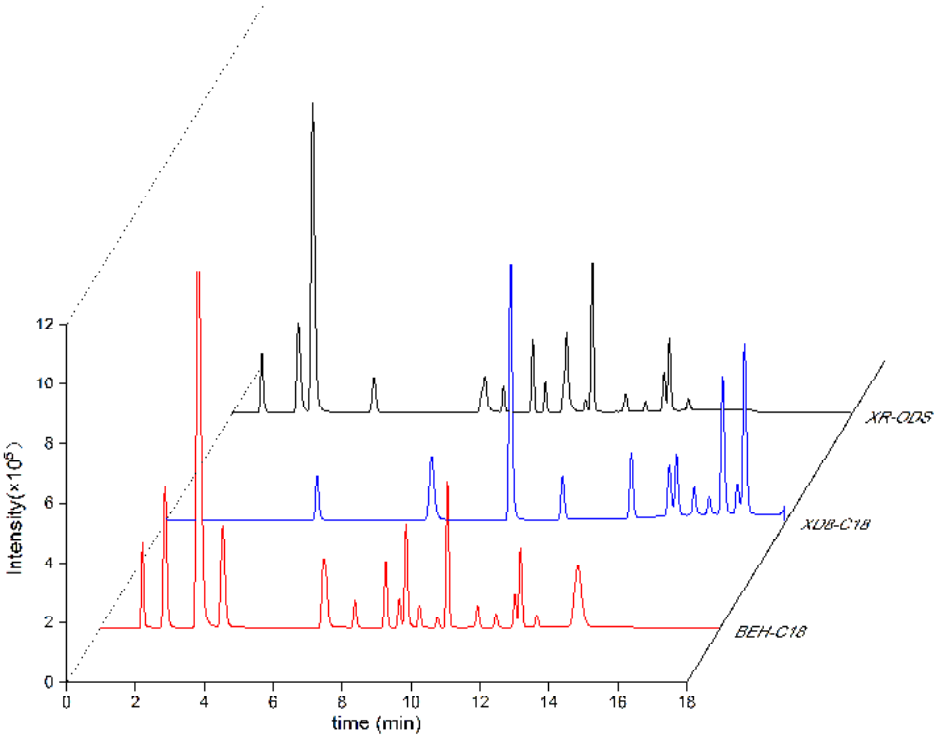


图 4 色谱柱对 23 种化合物分离的影响

Figure 4 Effect of chromatographic columns on separation for 23 compounds

2.2.2 流动相的选择

本实验对甲醇-水和乙腈-水两种流动相体系进行考察，由于甲醇的洗脱能力较弱，以甲醇作为流动相时，各化合物的保留时间增大，峰形较差且灵敏度较低。采用以乙腈作为流动相时，各化合物的灵敏度较高，故本研究选用乙腈-水作为流动相体系。

之后，考察了甲酸和甲酸铵两种添加剂对色谱分离和灵敏度的影响。在相同的梯度条件下，向水相中分别加入 0、0.1%、0.2%的甲酸，部分化合物的灵敏度受甲酸的影响较大。如图 5 所示， 当水相中甲酸浓度从 0 增加到 0.1%时，氟芬那酸和甲芬那酸的灵敏度显著提高，但进一步增加甲酸浓度，两种化合物的灵敏度反而下降，因此，最终选择含有 0.1%甲酸-水溶液作为水相。考虑到罗非昔布等部分化合物采用负离子模式检测，为有利于提高这些化合物的灵敏度，考察了甲酸铵作为添加剂对分离和灵敏度的影响。结果表明，甲酸铵的添加并没有提高罗非昔布等几种负离子的灵敏度，反而造成部分化合物如酮洛芬、美洛昔康、芬布芬的灵敏度下降，如图 6 所示。故最终本研究将 0.1%甲酸-水作为水相，乙腈作为有机相。

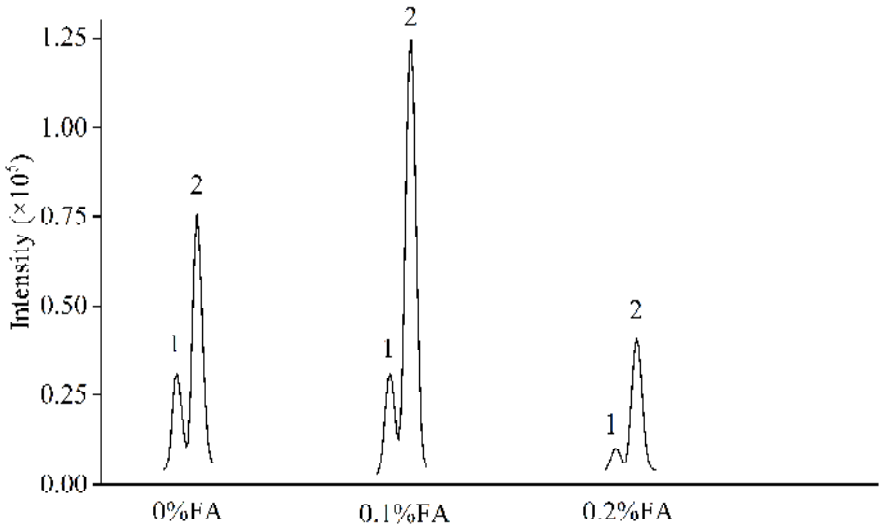


图 5 不同浓度甲酸添加对氟芬那酸（1）和甲芬那酸（2）分离的影响

Figure 5 Effects of different concentrations of formic acid on separation for flufenamic (1) and mefenamic (2)

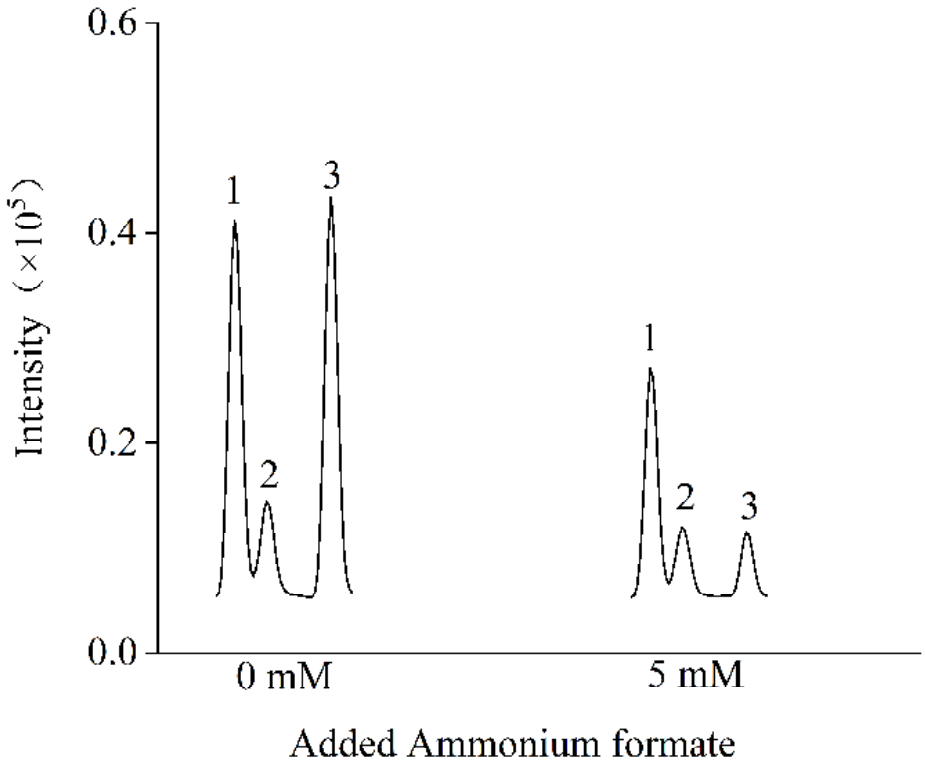


图 6 甲酸铵添加前后对酮洛芬（1）、美洛昔康（2）、芬布芬（3）灵敏度的影响

Figure 6 Effect of ammonium formate addition on the sensitivity for ketoprofen (1), meloxicam (2) and fenbufen (3)

2.2.3 进样量的考察

本实验分别考察了进样量为 2 μL、5 μL、10 μL 时各化合物的响应情况。结果表明，随着进样量的增大，灵敏度增大，进样量增加到 10 μL 时，溶剂效应较为显著，部分化合物的色谱峰出现展宽的现象。如图 7 所示，当进样量增加到 10 μL 时，氟芬那酸和甲芬那酸的峰展宽，分离度变差。从分离度和灵敏度两方面考虑，最终

确定进样量为 5 μL。

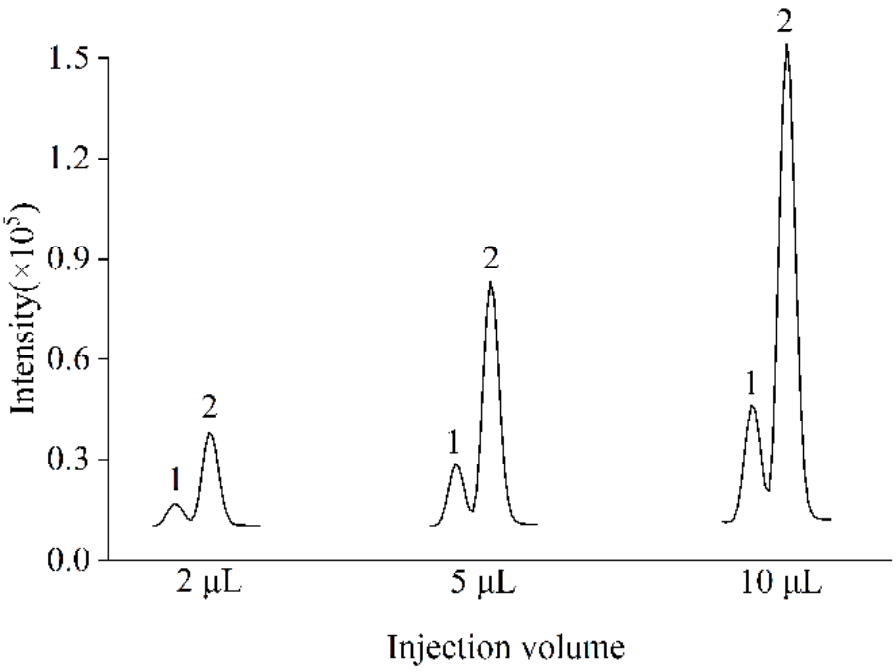


图 7 进样量对氟芬那酸（1）和甲芬那酸（2）分离的影响

Figure 7 Effect of injection volume on the separation for flufenamic (1) and mefenamic (2)

2.2.4 质谱条件的优化

选用合适质量浓度的标准品溶液，使用 Optimizer 软件，在 MRM 模式下分别进行正负离子扫描，对 23 种化合物的母离子、子离子、碰撞能进行自动优化，优化结果见表 2。

2.3 方法学评价

2.3.1 线性关系与检出限

分别采用膏霜、面膜、凝胶和液体水基样品作为空白基质，配制基质匹配标准曲线。由于萘普生和罗非昔布灵敏度较低，在配制基质匹配标准曲线时，增大了加入混标的浓度，以期获得合理的结果。萘普生的线性范围为 40~150 μg/L，罗非昔布的线性范围为 10~150 μg/L，其余化合物的线性范围为 5~50 μg/L。23 种化合物在四种基质中线性相关系数均大于 0.99，线性关系良好。向空白基质中加入混合标准溶液并检测，分别以 S/N=3 和 10 时的含量为检出限（LOD）和定量限（LOQ），23 种化合物的基质标准曲线范围、线性相关系数、LOD 和定 LOQ 见表 3。

表 3 23 种化合物的线性范围、相关系数、LOD 和 LOQ

Table 3 Linear range, correlation coefficient, LOD and LOQ of 23 compounds

Compound	Linear range (μg/L)	Correlation coefficient (r^2)	LOD (μg/g)	LOQ (μg/g)
Aminophenazone	5~50	0.9925~0.9991	0.025	0.05
Antipyrine	5~50	0.9988~0.9997	0.0125	0.05
Etoricoxib	5~50	0.9974~0.9991	0.0125	0.025
Phenacetin	5~50	0.9988~0.9999	0.0125	0.05
Piroxicam	5~50	0.999~0.9995	0.0125	0.025

Lornoxicam	5~50	0.9979~0.9994	0.0125	0.05
Sulindac	5~50	0.9987~0.9996	0.0125	0.025
Vardicoxil	5~50	0.9981~0.9996	0.0125	0.05
Ketoprofen	5~50	0.9984~0.9995	0.0125	0.025
Meloxicam	5~50	0.9962~0.9993	0.0125	0.025
Fenbufen	5~50	0.9991~0.9999	0.0125	0.025
Oxaprozin	5~50	0.9982~0.9996	0.0125	0.025
Indomethacin	5~50	0.9995~0.9996	0.0125	0.025
Celecoxib	5~50	0.9985~0.9999	0.0125	0.05
Phenylbutazone	5~50	0.9981~0.9995	0.025	0.05
Mefenamic	5~50	0.9972~0.9998	0.0125	0.025
Rofecoxib	10~150	0.9965~0.9988	0.0625	0.125
Naproxen	40~150	0.9929~0.9995	0.125	0.25
Parecoxib	5~50	0.9974~0.9996	0.0125	0.05
Nimesulide	5~50	0.9987~0.9992	0.0125	0.05
Diclofenac	5~50	0.9993~0.9996	0.025	0.05
Flufenamic	5~50	0.9913~0.9991	0.0125	0.025
Tolfenamic	5~50	0.9952~0.9997	0.025	0.05

2.3.2 精密度

采用四种基质的空白加标样品，在相同条件下平行处理 6 份进行测定，以测定结果的相对标准偏差（RSD）计算日内精密度。在相同条件下连续 3 天处理样品并测定，所得结果计算方法的日间精密度。结果见表 4，各化合物在四种化妆品基质中的日内精密度均小于 6.22%（n=6），日间精密度均小于 9.9%（n=3）。表明该方法的精密度良好。

表 4 不同基质中 23 种化合物峰面积的日内精密度和日间精密度（%）

Table 4 The inter-day and inner-day RSDs of peak area for 23 compounds in different matrix（%）

Compound	Toner		Facial mask		Gel		Cream	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Aminophenazone	3.5	6.5	4.0	8.2	2.3	7.4	2.4	7.6
Antipyrine	6.2	9.5	2.2	8.4	2.7	7.8	3.5	6.0
Etoricoxib	2.6	7.8	2.7	4.0	0.9	1.1	0.9	1.9
Phenacetin	3.3	5.7	1.2	1.8	0.5	0.6	2.6	4.1
Piroxicam	2.1	6.9	5.3	9.1	2.8	3.8	4.4	7.8
Lornoxicam	4.1	7.1	1.4	7.6	2.7	5.1	3.8	4.6
Sulindac	1.7	6.7	4.8	9.7	3.0	7.2	4.4	7.0
Vardicoxil	3.5	7.9	4.1	6.8	4.2	6.6	3.6	5.7
Ketoprofen	3.3	5.1	5.2	5.9	2.0	5.3	2.2	6.0
Meloxicam	4.4	8.6	4.7	8.8	5.5	7.8	5.3	8.0
Fenbufen	4.6	7.3	5.7	8.8	3.2	8.8	2.0	5.4
Oxaprozin	5.8	6.5	3.8	5.8	3.7	5.4	3.4	5.4

Indomethacin	2.2	6.0	4.2	8.0	2.4	5.9	2.0	4.6
Celecoxib	4.0	6.5	3.0	6.9	4.4	8.7	1.9	8.9
Phenylbutazone	5.3	9.9	3.5	9.2	4.7	6.0	4.6	7.5
Mefenamic	2.6	8.1	1.9	5.2	3.1	5.1	4.6	7.0
Rofecoxib	3.0	3.7	2.5	8.4	3.2	5.0	2.1	3.2
Naproxen	5.3	9.8	4.9	9.2	5.8	6.8	5.9	7.1
Parecoxib	3.0	5.1	4.2	9.2	4.3	8.6	4.3	7.7
Nimesulide	3.1	3.8	2.6	7.7	2.0	5.6	3.2	6.4
Diclofenac	1.3	4.7	3.6	9.2	4.4	7.0	4.2	5.0
Flufenamic	1.5	6.4	3.8	9.5	3.7	6.5	4.8	9.5
Tolfenamic	3.6	7.4	1.8	6.8	1.1	2.9	1.3	2.2

2.3.3 回收率

为验证方法的准确性，对四种基质进行低、中、高三个浓度水平的空白加标实验，每个浓度水平平行 6 份，计算平均回收率和 RSD，见表 5。23 种化合物的回收率范围在 71.8%~118.1%之间，RSD 范围为 0.5%~9.3%。说明该方法准确、有效，能够用于 23 种化合物的测定。

表 5 不同基质中 23 种化合物的平均回收率和相对标准偏差（%）

Table 5 Average recoveries and RSDs of the 23 compounds in different matrix（%）

Compound	Added	Toner		Facial mask		Gel		Cream	
	（μg/L）	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD
	10.4	97.1	5.6	104.6	4.4	101.8	3.6	113.4	6.3
Aminophenazone	15.6	105.9	4.8	105.7	4.4	103.0	1.5	107.6	7.2
	20.7	100.2	5.8	97.5	2.5	102.1	5.4	107.5	4.1
	10.4	102.5	6.9	100.2	2.5	102.4	2.8	96.3	6.3
Antipyrine	15.6	113.1	2.0	115.0	1.8	106.0	1.6	96.2	5.7
	20.8	114.7	2.0	104.0	1.2	100.0	7.0	82.4	2.7
	10.0	94.6	6.9	112.3	2.5	107.6	4.1	100.0	6.3
Etoricoxib	15.0	110.1	4.9	115.8	0.8	108.2	2.3	99.9	5.7
	20.0	113.1	3.2	110.9	3.1	104.5	4.8	85.6	2.7
	10.1	106.6	6.3	113.8	3.0	109.7	1.4	111.0	7.1
Phenacetin	15.1	116.6	1.5	115.9	1.8	112.1	2.0	107.2	6.0
	20.1	115.7	2.0	114.1	2.7	106.1	5.2	80.4	6.0
	10.0	111.8	5.2	113.8	1.5	116.1	1.3	115.5	3.1
Piroxicam	15.0	110.8	2.5	115.7	1.3	117.3	0.8	112.1	5.6
	20.0	109.4	1.9	109.9	4.5	109.0	6.3	83.6	3.3
	11.8	106.5	4.7	99.9	1.7	103.6	4.2	108.3	5.0
Lornoxicam	17.6	109.9	2.1	100.6	3.8	104.3	1.4	92.6	8.0
	23.5	110.3	2.7	99.3	4.4	101.8	2.8	71.8	1.1

续表

Compound	Added (μg/L)	Toner		Facial mask		Gel		Cream	
		Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD
Sulindac	10.1	102.9	8.2	112.6	2.7	102.6	1.3	111.9	8.4
	15.2	115.8	1.5	116.8	1.4	111.4	3.7	111.2	3.9
	20.2	114.9	2.3	117.3	1.7	106.6	8.1	89.5	4.7
Vardicoxil	10.3	104.9	7.8	110.9	2.6	105.6	4.2	109.7	5.9
	15.4	116.5	1.1	106.1	4.4	111.7	3.7	104.9	6.1
	20.5	115.5	2.1	106.4	1.9	104.7	5.7	104.2	6.3
Ketoprofen	9.9	105.3	6.2	111.3	2.7	112.7	3.1	112.4	6.4
	14.9	109.4	2.0	110.7	1.4	109.6	1.9	107.2	5.1
	19.8	109.6	1.9	114.8	1.9	101.7	4.7	96.2	5.0
Meloxicam	14.0	103.8	5.4	108.1	3.1	109.1	4.9	113.2	5.7
	21.0	106.8	1.1	109.2	2.2	104.6	4.4	106.2	5.9
	28.0	108.5	2.1	109.3	3.3	98.0	9.3	104.3	5.2
Fenbufen	10.3	109.5	7.7	115.9	2.0	111.2	3.6	111.3	6.3
	15.5	117.3	1.3	117.0	2.3	112.0	3.5	104.9	7.2
	20.7	118.1	1.6	116.2	2.8	106.9	5.7	102.1	4.6
Oxaprozin	10.2	103.1	6.7	109.2	2.2	111.5	2.1	109.2	6.8
	15.3	106.9	2.4	109.1	3.8	107.4	3.3	110.3	7.7
	20.4	107.1	2.6	110.2	4.8	105.1	9.0	113.1	3.3

续表

Compound	Added (μg/L)	Toner		Facial mask		Gel		Cream	
		Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD
Indomethacin	10.1	108.1	6.9	94.5	2.3	88.3	5.4	94.7	8.6
	15.1	109.4	3.1	96.7	4.5	89.6	5.7	104.3	5.0
	20.2	115.0	2.7	92.6	4.8	83.8	6.5	100.2	6.2
Celecoxib	10.0	87.7	6.6	82.6	4.6	79.2	7.8	106.3	7.3
	15.1	93.5	6.6	88.4	4.1	87.9	4.7	94.9	6.5
	20.1	94.5	5.3	89.8	5.0	85.9	8.8	73.2	3.6
Phenylbutazone	10.0	92.2	4.1	82.1	2.2	108.5	5.3	109.6	8.7
	15.0	88.1	7.7	82.2	2.5	107.8	5.1	114.2	3.5
	20.0	95.9	1.8	80.8	5.0	100.1	4.2	109.9	7.3
Mefenamic	10.1	81.9	1.9	72.7	3.0	75.0	3.8	83.8	3.7
	15.1	79.6	3.1	73.8	3.6	73.7	5.6	77.5	6.8
	20.2	78.7	4.1	79.6	2.7	74.7	2.7	82.0	4.1
Rofecoxib	19.9	101.8	6.8	104.2	2.3	100.3	4.2	94.1	3.3
	39.8	107.0	2.8	104.4	4.9	106.1	3.0	88.1	5.6
	79.7	112.0	4.4	102.6	2.2	109.8	5.2	74.7	4.5
Naproxen	62.4	92.5	7.3	91.6	6.4	77.6	1.6	107.7	8.2
	83.2	99.0	5.3	100.2	6.2	82.5	5.3	100.3	4.6
	104.0	99.3	6.6	101.7	4.2	91.5	3.8	112.9	1.6

续表

Compound	Added	Toner		Facial mask		Gel		Cream	
	（μg/L）	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD
Parecoxib	10.3	93.4	4.4	107.0	2.5	100.8	5.8	107.6	5.2
	15.4	104.1	2.4	107.3	7.1	102.2	3.6	111.0	4.6
	20.6	98.7	6.5	109.3	2.8	97.3	7.3	72.2	7.4
Nimesulide	10.0	95.1	7.6	91.7	4.6	95.9	4.6	99.9	6.3
	15.0	98.7	4.2	90.7	4.5	97.2	4.2	105.2	7.2
	20.0	102.2	3.8	90.8	6.9	90.5	6.4	86.0	6.0
Diclofenac	9.9	100.8	6.6	108.4	3.4	105.4	2.4	97.9	8.8
	14.9	104.0	3.4	110.2	3.2	112.2	3.3	104.4	7.2
	19.8	101.8	4.1	114.1	4.4	103.6	6.6	97.2	6.8
Flufenamic	10.1	91.6	7.2	116.6	1.8	118.1	0.5	112.1	6.4
	15.1	100.0	2.8	116.8	1.1	117.7	1.3	116.8	1.7
	20.2	104.3	3.5	116.8	0.8	117.1	0.7	111.4	7.5
Tolfenamic	10.4	92.5	6.8	116.2	2.6	117.6	0.7	108.0	8.7
	15.6	93.6	6.2	117.6	0.9	116.9	0.7	113.6	3.8
	20.8	88.3	6.9	115.9	2.2	117.8	1.3	113.3	2.6

2.4 实际样品的分析

利用上述方法对 63 批化妆品进行检测，一批次样品（抑菌膏）中检出双氯芬酸钠，含量低于定量限；一批次烫发剂样品中检出非那西丁，含量为 131.46 μg/g。烫发剂样品中非那西丁的提取离子色谱图如图 8 所示。

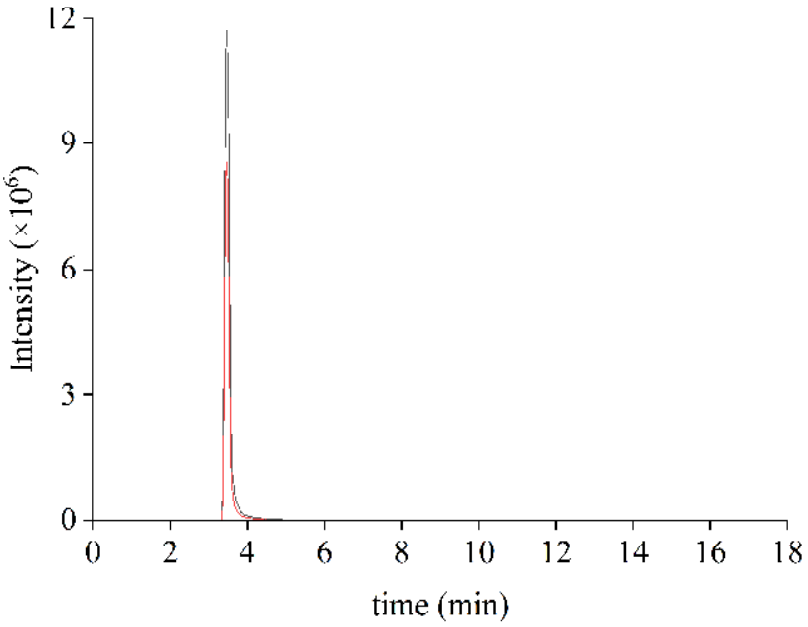


图 8 某烫发剂样品中非那西丁的提取离子色谱图

Figure 8 Extraction chromatogram of phenacetin in a perm agent

3 结论

建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中氟芬那酸等 23 种非甾体抗炎药含量的方法。利用所建立的方法对 63 批次样品进行分析，在 2 批样品中分别检出双氯芬酸钠和非那西丁，说明化妆品中存在非法添加非甾体抗炎药的行为。该方法操作简便、准确性高、灵敏度好，适用于化妆品中非甾体抗炎药的检测，为化妆品中非法添加行为的监管提供了技术支撑。

Reference

[1] 张程. 化妆品市场新趋势[J]. 检察风云, 2022(15): 74-75.

[2] 陈桂琴, 肖树雄, 黄佳颖等. 化妆品非法添加特点及检测研究[J]. 中国食品药品监管, 2022(10): 72-75.

[3] 刘雁, 李志军. 非甾体抗炎药物的药理及临床应用进展[J]. 中国医院药学杂志, 2000(12): 44-46.

[4] 穆同娜, 王浩, 刘艳琴等. 高效液相色谱法测定化妆品中的保泰松[J]. 日用化学工业, 2011, 41(06): 459-461.

[5] 李静, 周智明, 黄佳颖等. 高效液相色谱法同时测定牙膏中 4 种非甾体抗炎药[J]. 广东化工, 2022, 49(05): 164-166.

[6] 倪香艳, 孙念霞, 孙志文. 高效液相色谱-串联质谱法检测牛组织中双氯芬酸钠残留的研究[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(03): 48-54.

[7] Zhang Y, Zhang Z, Qi G, Sun Y, Wei Y, Ma H. Detection of indomethacin by high-performance liquid chromatography with in situ electrogenerated Mn(III) chemiluminescence detection. Anal Chim Acta. 2007 Jan 23; 582(2): 229-34.

[8] 王成, 于航, 姚卫蓉等. 近红外高光谱成像技术在筛查保健食品中违禁添加抗炎药物双氯芬酸钠的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(02): 592-598.

[9] 刘凤银, 陆曼芝, 梁水源等. 酶联免疫法快速检测保健食品中吲哚美辛和阿西美辛[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(13): 266-271.

[10] Lin L, Xu L, Kuang H, Xiao J, Xu C. Ultrasensitive and simultaneous detection of 6 nonsteroidal anti-inflammatory drugs by colloidal gold strip sensor. J Dairy Sci. 2021 Mar; 104(3): 2529-2538.

[11] 熊爽, 刘成雁, 王志嘉等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定祛痘类化妆品中保泰松与氨基比林的研究[J]. 分析测试学报, 2017, 36(08): 980-985.

[12] 董亚蕾, 袁莹莹, 乔亚森等. UHPLC-MS/MS 法检测化妆品中禁用原料非那西丁[J]. 香料香精化妆品, 2023(03): 43-47.

[13] 董亚蕾, 乔亚森, 黄传峰等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中的 6 种镇痛类化学成分[J]. 分析测试学报, 2022, 41(02): 220-226.

用于治疗多形性胶质母细胞瘤的纳米结构脂质载体

谭建美

（湖北理工学院　湖北 435000）

【**Abstract**】**Introduction:**Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive type of primary brain tumor with poor prognosis and easy recurrence. Surgery and radiotherapy are the only available treatment options at present. Surgical resection can effectively treat gliomas, and postoperative radiotherapy and chemotherapy are necessary. The high toxicity of postoperative chemotherapy, lack of specificity for cancer cells, and acquired drug resistance hinder the treatment of GBM, leading to disease recurrence. The emergence of nano drug delivery systems has helped traditional chemotherapy overcome its shortcomings. Lipid nanoparticles are widely used in nanodrug delivery systems due to their good biocompatibility and biosafety, and are a common carrier for targeted GBM therapy. This article reviews the research results of lipid nanoparticles in the treatment of GBM in the past five years, and elaborates in detail on the lipid nanoparticles used in various treatment methods, the drugs delivered, and the drug targets on GBM. **Methods:** A systematic search was performed with the phrase “Liposomes and glioblastoma” as a search term in PubMed to identify all articles published up between 2018 and 2023 that included this phrase in the title and/or abstract. **Result:** A total of 31 articles were included in this review. In the past five years, nano liposome technology has been constantly innovating in the treatment of Glioblastoma, developing from single function to multi-function, from encapsulating a single drug to encapsulating multiple drugs, from using the Internal environment of cells to magnetic release. **Conclusions:**Many reports have reported that SLN is an effective nano drug delivery system for the treatment of GBM, and they have been proved many times to be a promising method to improve the Therapeutic index. Despite this, recurrent Glioblastoma is still difficult to treat, and molecular Targeted therapy and the addition of anti-cancer drugs have only made some improvements. At present, a variety of LNP based preparations have been proposed for different GBM targeted therapies, such as chemotherapy drugs and Genetic material, as well as delivery of immune regulators. In addition to therapeutic applications, LNP can also serve as a diagnostic tool with great potential.

【**Keywords**】Glioblastoma; Lipid nanoparticles; Drug targets；

搭载中性粒细胞递送药物减少中性粒细胞外陷阱用于脑损伤的治疗

Drug delivery via hitchhiking on neutrophils to reduce neutrophils extracellular traps for enhanced brain injury therapy

Longguang Tang (唐龙光), Zhejiang University

（浙江大学医学研究中心　浙江 310000）

Brain damage refers to an injury that can cause deterioration of the brain cells. Both traumatic brain injury (TBI) and the acquired brain injury (ABI) are major public health issues annually affecting millions of people worldwide. It imposes a significant burden on society, the economy, and the healthcare system. The complex and heterogenous pathophysiology of TBI, in addition to the blood-brain barrier (BBB) resistance, is a major barrier to advancing diagnostics and therapeutics, including targeted drug delivery. The compromised BBB after TBI and resulting leukocytes infiltration creates an opportunity to use neutrophils as drug delivery vehicles. Moreover, biomaterials can be designed to cross these physiological barriers (such as BBB), allowing for the controlled drug delivery to the target site. In this study we designed and synthesized a new, neutrophils targeting, nano-carrier drug-delivery system for the targeted drug delivery to the injury site. The synthesized nanoparticles were loaded with PAD4 inhibitors to inhibit the formation of neutrophils extracellular traps (NETs), which reportedly exacerbate the TBI outcomes. Subsequent intravenous injection of these nanoparticles successfully reduced the NETs formation, alleviated the deteriorating TBI outcomes, and improved post-TBI recovery. This strategy offers a framework for further research and will serve as a foundation for the development of targeted nanodrug-delivery systems for TBI therapeutics and diagnostics.

临床药师参与 1 例肾功能不全患者抗感染治疗的个体化方案制定

唐文娟[1]，刘燚[1]，程星[1]，徐美霞[1]，李攀桐[1]，冯林林[1]，张廷廷[1]，魏坤[1]

仁怀市人民医院 贵州 仁怀 564500

【摘要】目的：通过对 1 例肾功能不全伴多部位感染患者病例的讨论和分析，分享肾功能不全患者抗感染治疗的经验，以及临床药师在抗感染治疗中的作用。**方法：**临床药师参与 1 例肾功能不全伴感染患者的抗感染药物治疗过程，结合病原学、耐药情况、实验室检查、影像学检查、血药浓度监测以及患者病情变化，协助医师制定并调整个体化用药方案。**结果：**临床药师对该患者抗感染药物更改及用法用量调整被医师完全采纳，且经过优化给药方案治疗后患者感染得到了控制。**结论：**在肾功能不全特殊患者抗感染治疗中，需要临床药师发挥自身专业特点，对于特殊药物需要借助血药浓度监测，然而从药学角度给予临床支持，协助医师优化治疗方案，促进临床合理用药。

【关键字】肾功能不全;抗感染治疗;个体化方案制定;血药浓度检测

肾功能不全尤其血液透析滤过患者属于特殊人群[1]，这类人群药物在体内代谢动力学是一个非常复杂的过程，涉及药物的分子量、水/脂溶性、蛋白结合率等，常规透析器能透过分子量小、水溶性、蛋白结合小的药物，高流量和高通量透析器可增加药物的透过。因此，对于血液透析滤过的患者考虑的因素较复杂，不能按照常规的肾功能进行剂量调整，需要从患者、药物及透析模式这三个方面来考虑，往往要求更多的医疗团队共同合作，否则很容易造成临床疗效的不足或者不良反应的发生。

本文通过临床药师参与 1 例血液透析滤过伴感染患者抗感染治疗过程及用药监护，阐述临床药师根据患者情况、结合药物的理化特点，再借助药物血药浓度监测，从药学角度给予临床支持，协助医师优化治疗方案，促进临床合理用药。

1 病历

1.1 病历资料 患者男，49 岁，因“发现肾功能异常 10 年，心悸、气促 3 天”于 2022 年 7 月 14 日入院，10 年前患者于院外体检时发现肾功能异常，具体肌酐数值不详，伴泡沫尿，未予特殊处理；2022 年 6 月因痛风结石伴局部皮肤破溃、坏死性筋膜炎，于外院行右下肢皮下脓肿切开引流术，并行下肢植皮术+创面封闭式负压引流术+皮肤缝合术+皮肤和皮下坏死组织切除清创术；3 天前患者出现心悸、气促，伴纳差、乏力，尿量减少，约 300-600ml/日，并感上腹部隐痛，感恶心、呕吐，进食后明显，呈非喷射性呕吐，伴发热，未监测体温，无畏寒、寒战等。

入院体检：T 36.9℃、P 115 次/分、R 31 次/分、BP 150/80 mmHg、SPO_2 89%，全身散在痛风石形成，双侧耳廓见散在痛风石；双肺呼吸音减低，双下肺可闻及少许细湿性啰音，未闻及哮鸣音；腹软，上腹部压痛，无反跳痛及肌紧张，双肾区无叩痛；双手见散在痛风石形成，双手掌指畸形；双足散在痛风石形成，见皮肤破溃，部分已结痂；双侧臀部见痛风石形成并破溃，见脓性渗出；双下肢重度凹陷性水肿，右下肢敷料覆盖，揭开敷料见少许脓性分泌物，左大腿供皮区敷料覆盖，无渗血及渗液。实验室检查：WBC 6.67 *10^9/L，NEUT 4.85*10^9/L，CRP 13.12 mg/L，肌酐 928 umol/L，估算肾小球滤过率 5.6 ml/min/1.73m^2，尿素 22.2 mmol/L，尿酸 826 umol/L。

作者单位: 1 仁怀市人民医院　贵州 仁怀 564500；

作者简介: 主管药师、仁怀市人民医院、硕士研究生，研究方向:临床药学，贵州省仁怀市鲁班街道仁怀市人民医院、1564500

通讯作者：魏坤、副主任药师、本科、仁怀市人民医院、贵州省仁怀市鲁班街道仁怀市人民医院、564500

入院诊断：1、慢性肾衰竭（肾功能不全）合并感染-重症感染；2、慢性肾衰竭急性加重病因：痛风性肾病？并发症：1）充血性心力衰竭、2）高钾血症、3）低钠血、4）低钙血症、5）代谢性酸中毒；3、社区获得性肺炎？4、痛风性关节炎；5、皮肤感染；6、坏死性筋膜炎术后感染-重症感染；7、消化性溃疡。

1.2 主要治疗经过及结果 入院第 1 天，下病危，心电监护、指脉氧监测及间断吸氧，查血凝四项：INR 12.27，PT 110.70 S，APTT 67.30 S，TT 22.30 S，FBG 1.65 g/L，D-D 1.78 mg/L，FDP 10.60 μg/mL，输注血浆纠正凝血功能障碍，给予头孢哌酮钠舒巴坦钠 2g ivgtt q12h 经验性抗感染治疗，同时给予护肾排毒、纠正酸碱电解质、利尿、护胃、补充血糖等处理。

第 2 天，患者精神萎靡，感心悸、气促，四肢乏力，纳差，进食困难，伴恶心、欲吐，昨日夜间解肉眼血尿 2 次，量约 700ml，查胸部 CT：左肺上叶感染，双肺下叶节段性肺不张、双侧大量胸腔积液，由于患者凝血功能障碍，且胸腔大量积液，今日选择血液透析滤过治疗（透析/滤器：B-18H）。

第 4 天，患者咳少许黄色痰，易咳出，右下肢有脓性分泌物附着，复查 WBC 1.85 *10^9/L，NEUT 0.75*10^9/L，CRP 88.63 mg/L，经头孢哌酮舒巴坦抗感染治疗后，效果不佳，医生加用万古霉素 1g q12h，并请临床药师会诊。临床药师会诊建议调整抗感染方案：1、哌拉西林他唑巴坦 2.25g ivgtt q12h，透析后追加 0.75g；2、万古霉素 15mg/kg 1 组，监测血药浓度，根据血药浓度调整剂量，由于今日日已用了两组，建议暂停，并监测万古霉素血药浓度；3、口服利可君升白细胞、中性粒细胞治疗；4、送痰、坏死性筋膜炎分泌物做细菌培养，根据药敏结果调整治疗方案，医生完全采纳。

第 7 天，复查 WBC 2.36 *10^9/L，NEUT 0.89*10^9/L，CRP 86.78 mg/L，右下肢敷料覆盖，少许渗液，复查胸部 CT 与入院第 2 天相比：双肺感染、双侧胸腔积液稍减少。痰培养见肺炎克雷伯杆菌，药敏结果：头孢他啶、左氧氟沙星耐药，哌拉西林舒巴坦/他唑巴坦、美罗培南敏感，万古霉素血药浓度：谷浓度 59.94 μg/mL(停药后第 1 天)、46.48 μg/m(停药后第 2 天)。临床药师会诊建议：继续当前治疗，暂停万古霉素，监测耳毒性等，医生采纳。

第 9 天，患者诉恶心、呕吐、咳嗽、咳痰较前好转，复查 WBC 3.51 *10^9/L，NEUT 1.46*10^9/L，CRP 41.03 mg/L，万古霉素血药浓度：谷浓度 26.42 μg/mL(停药后第 5 天)。临床药师会诊建议：继续当前治疗，暂停万古霉素，医生采纳。

第 15 天，复查万古霉素血药浓度降到正常值，感染指标下降，右小腿见皮肤缺损，局部少许渗液，无渗血，无脓性分泌物，临床症状好转，病情明显好转，办理出院。

2 用药分析及监测

2.1 抗感染治疗方案 感染诊断：1、社区获得性肺炎？2、皮肤感染，3、坏死性筋膜炎术后感染-重症感染，结合近期住院史及临床症状，医生经验性给予头孢哌酮钠舒巴坦钠（1:1）2g ivgtt q12h 抗感染治疗。头孢哌酮钠舒巴坦钠为广谱抗菌药可覆盖革兰阳性菌、革兰阴性菌和部分厌氧菌，对部分耐药的革兰阴性杆菌抗菌效果也好，它的抗菌谱基本可以覆盖该患者多部位感染常见致病菌。入院后查患者血凝四项，检查结果回报凝血时间延长，凝血功能障碍，而头孢哌酮与其他第三代头孢菌素相比，其所引发的凝血功能障碍或出血等不良反应的报道逐年增加[2-4]。由此可以看出，该患者选用头孢哌酮钠舒巴坦钠，虽然其抗菌谱可以覆盖该患者多部位感染常见致病菌，但是没考虑到自身凝血功能异常，所以选用头孢哌酮钠舒巴坦钠欠合理。

治疗后第 4 天，复查 CRP 升高，白细胞、中性粒细胞计数低至正常值以下，医生考虑抗感染治疗效果不好，加用万古霉素 1g q12h，并请临床药师会诊。临床药师会诊考虑：1）患者入院时白细胞、中性粒细胞计数正常，入院第 4 天复查其数值低至正常值以下，临床药师查阅文献和相关资料[5]，头孢哌酮钠舒巴坦钠导致白细胞、中性粒细胞降低很常见，考虑可能是使用头孢哌酮钠舒巴坦钠导致的药物不良反应，再加上患者入院时查凝血功能异常，而头孢哌酮钠舒巴坦钠不良反应中导致凝血障碍常见，根据药物不良反应及患者病情，临床药师建议停用头孢哌酮钠舒巴坦钠；2）患者有肺部感染、皮肤感染、坏死性筋膜炎术后感染等多部位感染，根据 ABX 指南[6]这些部位感染常见的致病菌有革兰阳性菌、革兰阴性菌和厌氧菌等，再结合患者近期多次住院及使用广谱抗生素史，不排除耐药菌可能，建议用广谱抗菌药哌拉西林他唑巴坦联合万古霉素抗感染治疗方案。哌拉西林他唑巴坦与头孢哌酮钠舒巴坦钠抗菌谱基本相似，是广谱抗菌药可覆盖革兰阳性菌、革兰阴性菌和部分厌氧菌，

它的抗菌谱基本可以覆盖该患者多部位感染常见致病菌，但是对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌（MRSA）无效，该患者入院后用了几天头孢哌酮钠舒巴坦钠，出现了咳嗽、咳痰，复查 CRP 升高，近期又有多次住院及使用广谱抗生素史，不排除 MRSA 感染可能，建议哌拉西林他唑巴坦联合万古霉素抗感染，并积极寻找病原学证据。

这是一个血液透析滤过特殊患者,血液透析滤过清除体液、溶质的同时，同样也会清除体内的药物，对药物的药代学 /药效造成影响,因此了解药物分子量、蛋白结合率等特征，可以大概推测药物在液透析滤过是滤过情况。哌拉西林和他唑巴坦的分子质量分别为 517.6 和 300.3，属小分子物质，血浆蛋白结合约 30%，在体内以 68%和 80%原形通过肾脏排泄，理论上均是易于被透析滤过清除的[7]，由于我院目前没有开展哌拉西林他唑巴坦血药浓度监测项目，不能精确知道它在体内的浓度，但可以参照根据指南推荐[6]，给予哌拉西林他唑巴坦（2.25g ivgtt q12h，透析后追加 0.75g）。万古霉素 ABX 推荐(15mg/kg 1 组 ivgtt，监测血药浓度，根据血药浓度调整剂量)，但在临床药师会诊前已经给了 2 组 1g q12h，建议暂停万古霉素，并抽血测血药浓度。

更换方案治疗 2 天后，患者白细胞、中性粒细胞上升，复查胸部 CT 与入院第 2 天相比：双肺感染、双侧胸腔积液稍减少，痰培养见肺炎克雷伯杆菌，对哌拉西林/他唑巴坦敏感，临床药师结合实验室检查、影像学检查、药敏试验及患者病情病患，考虑当前治疗有效，继续当前治疗。万古霉素血药浓度回报谷浓度(停药后第 1、2、5 天)均高于正常范围，建议暂停万古霉素，继续监测血药浓度。沿当前抗感染方案治疗 1 周后，患者症状、炎性指标、影像学均好转，患者办理出院。

2.2 万古霉素剂量分析及血药浓度检测

万古霉素是一种糖肽类抗菌药，在临床治疗中治疗窗比较窄，容易出现药物不足或药物过量等情况，且万古霉素在体内主要经过肾小球滤过排出，尤其对肾功能不全需要通过血液净化手段治疗的患者，在治疗期间个体化差异比较大，目前该药说明书中没有具体剂量推荐，在临床治疗中借助血药浓度监测，可提高药物治疗效果，降低药物不良反应。万古霉素分子量 1485，属中分子亲水性药物，血浆蛋白结合率为 18%-55%[8]，在体内主要经肾消除，肌酐清除率是影响万古霉素清除的主要因素。该患者估算肾小球滤过率 5.6ml/min/1.73m^2，药物和毒素在体内排泄比正常人要慢很多，为了防止体内毒素蓄积患者使用 B-18H 高通量透析器滤过 3 小时左右。虽然目前国内外暂无万古霉素在间歇血液透析滤过中药物代谢动力学的研究，但参照其他相关资料[9]万古霉素在低通量血液透析中基本不被清除，而连续 4h 高通量透析可清除 10%-60%。该患者使用高通量 B-18H 透析器，可以参照 4h 高通量透析，可以看出万古霉素在高通量血液透析中透过率个体差异比较大。根据 ABX 指南，血液透析患者给予 15mg/kg 1 组，后续给药剂量应根据万古霉素的血药浓度来调整，通常每周 2 次。结合患者已经给了两组 1g 万古霉素，给药频次过大，需警惕万古霉素浓度过大，临床药师建议停用万古霉素，由于万古霉素血药浓度在透析 3-6 h 后会反弹 16%-36%[10]，故万古霉素谷浓度监测取样时间应在血透后 6 h。

《中国万古霉素治疗药物监测指南》（2020 更新版）[1]推荐重症监护病房患者、肥胖患者、烧伤患者、应用肾损害药物的患者及肾功能不全的患者进行万古霉素血药浓度监测。万古霉素个体差异比较大，药物不足导致达不到有效的抗菌浓度，治疗无效加重感染，甚至导致细菌耐药，药物过量可能导致耳毒性、肾毒性或红人综合征等不良反应，所以万古霉素进行血药浓度监测十分必要，根据监测结果可以做到精准化治疗。该指南同时推荐了两个监测指标：①万古霉素血清谷浓度：对于普通感染的成人患者，目标谷浓度应维持在 10-15 mg/L ；对于严重 MRSA 感染的成人患者，建议目标谷浓度维持在 10-20 mg/L；且提示目标谷浓度＜25-20 mg/L ，可降低万古霉素的肾毒性风险；②$AUC_{0\text{-}24\ h}$：目标范围 400-650 mg.h.L^{-1}。由于计算 $AUC_{0\text{-}24\ h}$ 需要的采样点较多，病人的配合度较差，国内大部分医院选择监测万古霉素的血清谷浓度。该患者入院时，全身感染症状不重，低烧、无寒战，炎性指标不是很高，无需采用严重感染时的血药浓度目标值，再加上患者肌酐清除率非常低，已进入尿毒症期，为避免进一步的肾脏损害，应将治疗目标血药浓度控制在 10-15 mg/L。该患者万古霉素血药浓度回报：谷浓度 59.94 μg/mL(停药后第 1 天)、46.48 μg/mL (停药后第 2 天)、26.42 μg/mL(停药后第 5 天)，均高于目标浓度范围 10-15 mg/L，继续暂停万古霉素。

3 讨论

本案例中患者肾功能不全，维持血液透析滤过状态，因多部位感染给与头孢哌酮钠舒巴坦钠，因抗感染效果不佳，请临床药师会诊，会诊后建议哌拉西林他唑巴坦联合万古霉素，更改治疗方案后患者临床症状逐渐好

转、炎性指标降低。临床药师通过会诊参与抗菌药物选择、血药浓度检测、个体化给药方案调整等过程。

从该案例中得出万古霉素体内代谢个体差异大，尤其对于肾功能不全行血液净化手段的患者，不能单用肌酐清除率定剂量[12]，建议初始剂量可以查阅高质量文献或指南制定，后续根据血药浓度监测结果及时调整方案，从而实现个体化给药。临床药师在临床治疗团队中，可以发挥自身专业特点，从药学角度给予临床支持，协助医师制定个体化治疗方案，促进合理用药。

参考文献

[1]国家卫生健康委员会.血液净化标准操作规程(2021 版)[M],北京:人民卫生出版社, 2021:150-153.

[2] 韦玲云,韦铁猛,覃艳芬,等.头孢哌酮/舒巴坦致凝血功能障碍的相关因素研究进展[J].吉林医药学院学报, 2022, 43(2): 124-6.

[3] Wang W, Liu Y, Yu C, et al. Cefoperazone-sulbactam and risk of coagulation disorders or bleeding: A retrospective cohort study[J]. Expert Opin Drug Saf, 2020, 19 (3):339-347.

[4] 梁河,光义,钟丽球,等.头孢哌酮钠舒巴坦钠致凝血功能障碍研究进展[J].中国药业,2020，29(1) :95-96.

[5] 闫成.头孢哌酮钠舒巴坦钠致白细胞减少 1 例[J].西南军医, 2021,23(4):518-520.

[6] THE JOHNS HOPKINS.ABX 指南感染性疾病的诊断与治疗第二版[M],马小军,徐英春,刘正印(译).北京:科学技术文献出版社,2012:685-726.

[7] 蔡云,徐锦龙,张茂.脓毒症患者在接受持续血液透析滤过时哌拉西林他唑巴坦的药代动力学研究[J].中国临床药理学与治疗学,2018,23(8):905-911.

[8] 何志超,伍俊妍,邱凯峰.万古霉素个体化给药临床药师指引[J].今日药学,2015(2):78-82

[9] 万古霉素临床应用剂量专家组.万古霉素临床应用剂量中国专家共识(2011 版)[J].. 中华传染病杂志,2011,30(8):561-572.

[10] Vandecasteele S J , Vriese A S D .Vancomycin dosing in patients on intermittent hemodialysis.[J].Seminars in Dialysis, 2015, 24(1):50-55.

[11] HE N,SU S,YE ZK,et al.Evidence-based Guideline for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin:2020 Update by the Division of Therapeutic Drug Monitoring[J].Clin Infect Dis,2020,71(Suppl 4):S363-S371.

[12] Baddour.Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association[J].Circulation,2015,132(15) :1435-1486.

Methotrexate-loaded chitosan oligosaccharide-ES2 for targeted cancer therapy

Wen Tang, Shengli Ji, Yan Li, Huiwen Hou, Jie Wang, Lu Lu, Jiaai Fu , Zengmei Liu, Didi Gao, Xinqing Gao, Feiyan Zhao, Peixue Ling, Fengshan Wang, Feng Sun*, and Haining Tan *

山东大学国家糖工程技术研究中心 山东 青岛 266000

【**Abstract**】Cancer poses a great threat to human health. In order to treat cancer more accurately, efficiently and with less damage, in this study, under the EDC/NHS catalytic system, quaternized chitosan oligosaccharide (HTCOSC) was used as a drug carrier to constructed a nanoparticle delivery system HTCOSC-cRGD-ES2-MTX(CREM), which can target integrin αVβ3 on the surface of tumor cells and load with both the anti-angiogenic agent ES2 (IVRRADRAAVP) and chemotherapy drug methotrexate (MTX) simultaneously. Due to its amphiphilic nature, CREM could self-assemble into nanoparticles in water with an average diameter of 179.47 nm. In vitro studies showed that CREM possessed excellent anti-angiogenic activity and anti-tumor activity, and had good tumor targeting properties mediated by cRGD. Further in vivo studies showed that CREM could induce apoptosis of tumor cells through the mitochondrial apoptotic pathway and reduce the expression of angiogenic factors such as VEGF to inhibit tumor angiogenesis, thus exerting a potent anti-tumor effect in vivo with a tumor suppression rate of 80.19%. Importantly, CREM had no significant toxic side effects on various organs of mice. In conclusion, CREM nano drug delivery system could synergize the therapeutic effects of chemotherapeutic agents and anti-angiogenic drugs, providing a new approach and strategy for targeted cancer treatment.

【**Keywords**】Quaternized chitosan oligosaccharide; ES2; Integrin; Anti-tumor; Anti-angiogenesis

水痘疫苗研究进展

田辉† [1,2,3]，白福良† [4]，笔雪艳 [1,2,3]，赵超越 [1,2,3]，杨一荻 [1,2,3]，马驰 [1,2,3]，刘丽 [1,2,3]，曲范娜* [1,2,3]

1、黑龙江省药品检验研究院（黑龙江 哈尔滨 150088）；2、国家药品监督管理局中药质量研究与评价重点实验室（黑龙江 哈尔滨 150088）；3、黑龙江省中药质量研究与评价重点实验室（黑龙江 哈尔滨 150088）；4、哈尔滨师范大学（黑龙江 哈尔滨 150500）

【摘要】水痘是由水痘-带状疱疹病毒（Varicella-zoster virus, VZV）引起的，在儿童时期高发、高度传染的疾病。儿童时期初次感染 VZV 可引发水痘，病情恢复后，残余病毒可潜伏在机体脑神经、背脊神经和植物性神经内，在适宜的条件下会再次复发，引起带状疱疹（Herpes Zoster, HZ），可导致慢性带状疱疹后神经痛（postherpetic neuralgia, PHN）和中枢神经系统的并发症，目前接种减毒水痘疫苗是预防和控制水痘流行的最有效方法。近年来，水痘疫苗在我国应用越来越广泛，本文主要就水痘疫苗的使用现状和研究进展进行综述，以期能更全面地认识水痘减毒疫苗在防制水痘传播方面所起的作用。

【关键词】水痘-带状疱疹病毒；水痘；带状疱疹；带状疱疹后神经痛；水痘疫苗

Research Progress in Varicella Vaccine

TIAN Hui† [1,2,3], BAI Fu-liang† [4], BI Xue-yan[1,2,3], ZHAO Chao-yue[1,2,3], YANG Yi-di[1,2,3], MA Chi[1,2,3], LIU Li[1,2,3], QU Fan-na*[1,2,3]

1. Heilongjiang Institute of Drug Control（Harbin 150088, China）; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine （Harbin 150088, China）; 3. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine （Harbin 150088, China）; 4. Harbin Normal University （Harbin 150500, China）

【Abstract】Varicella（Chickenpox）is caused by varicella-zoster virus（Varicella-zoster virus, VZV）, which exhibits high incidence and contagious in childhood. Primary VZV infection leads varicella and establishes latency in cranial nerves, dorsal root ganglia and autonomic nervous. VZV can relapse under the certain conditions and lead to herpes zoster（shingles）which is characterized by chronic postherpetic neuralgia（postherpetic neuralgia, PHN）and central nervous system complications. Currently, getting attenuated varicella vaccine is the most effective way to prevent VZV. In recent years, varicella vaccines were widely applied in our country, and this article provides an overview of status and research progress in varicella vaccine, which may provide a more comprehensive understanding of varicella vaccine in preventing varicella dissemination.

【Key words】 vzv; varicella; herpes zoster; postherpetic neuralgia; varicella vaccine

水痘-带状疱疹病毒（Varicella-zoster virus, VZV）属疱疹病毒亚科，是一种嗜神经双链 DNA 病毒，该病毒只有一个血清型，初次感染人后可引起水痘，随后潜伏于人的神经系统，病毒在以后的生活中可能会被重新激活，引起带状疱疹。1974 年 Takahashi 等人[1]使用减毒 Oka 株开发出水痘疫苗，用于预防水痘，并于 1995 年在美国纳入常规儿童疫苗接种计划，随后在 43 个国家推广[2]。带状疱疹疫苗于 2006 年在美国被批准使用[3]，虽然带状疱疹疫苗与水痘疫苗相比，病毒的滴度约是水痘疫苗的 14 倍，但是这些疫苗使用的病毒都是 Oka 株。

†作者简介：田辉，女，博士研究生，Email: 413783827@qq.com；白福良，男，博士研究生，Email:tcbfl@163.com;

*通讯作者：曲范娜，女，硕士研究生，电话：0451-87537011，Email: qfnqfn@163.com；

作者贡献：田辉、白福良负责全文撰写，赵超越、杨一荻、马驰、刘丽负责文献查阅与收集整理，曲范娜负责全文的撰写与修改。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

20 世纪 70 年代，水痘疫苗的出现，使水痘成为一种可通过特异性免疫预防的疾病[1]。目前接种水痘疫苗已成为防治水痘的主要措施，我国生产的水痘疫苗主要是 Oka 株减毒疫苗。Oka 株水痘疫苗耐受性通常良好。最常见的副作用是注射部位反应、发热和皮疹，在这些副反应中皮疹占一半以上，个别案例也被报道有其他的不良反应[4, 5]。在一项水痘疫苗 10 年安全性研究报告中，在接种疫苗 2 周后出现水痘样皮疹患者的病灶中检出野生型水痘-带状疱疹病毒，而接种疫苗 15～42 天发生水痘样皮疹的患者通常与疫苗毒株有关[4]。在另一项研究中，585 例接种疫苗的人中有 55 例出现了水痘样皮疹，其中 40 例确诊为野生型水痘-带状疱疹病毒，15 例为疫苗毒株[6]。因此，在注射水痘疫苗预防水痘时，也有患水痘的风险，特别是免疫力低下的人。

1 VZV 的生物学特征

VZV 病毒粒子外面是二十面体的核衣壳，核衣壳表面包裹着病毒的糖蛋白[7]。VZV 的 DNA 约有 125,000bp，至少 68 个开放阅读框（ORF）[8, 9]，具有长的和短的独特末端重复区域，可形成四种异构体，但主要以两个同分异构体为主。VZV 是最小的人类疱疹病毒，其基因编码至少 10 个糖蛋白，如 gB （gp II）、gC （gp IV）、gE（gp I）、gH （gp III） 和 gL [7]。VZV 感染细胞时 gE 的表达最丰富，gE 通过非共价键与 gI 相连，同时并已证明其还可以结合免疫球蛋白 G（IgG）的 Fc 片段[10]。gB 是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白，并可能在病毒进入体内起到重要作用[7]。gH 蛋白具有融合功能，可促进病毒在细胞间的传播，gH 在 gL 存在时进行糖基化形成异源二聚体来激活 gB[9, 11]。

VZV 的复制是和细胞高度相关的[12]，它可感染人二倍体细胞、黑色素细胞、Vero 细胞以及非洲绿猴肾细胞。目前的证据表明，和单纯疱疹病毒（Herpes simplex virus, HSV）一样，VZV 在进入细胞之前，其与低亲和力的受体结合，首先吸附于细胞表面的硫酸乙酰肝素蛋白多糖，2～7 天之内细胞发生病变[13]。电子显微镜的研究表明，大多数 VZV 病毒颗粒被封闭在胞浆空泡内，病毒颗粒在细胞质解体后才能到达外空间。病毒进入细胞质酸性溶酶体中，酸性溶酶体液泡裂解后才能导致上述结果发生[14]。VZV 对温度较敏感，在 56℃～60℃即可灭活。如果 VZV 的外膜被破坏，它将不再具有传染性，冷冻干燥保存是最优的保存方法，同时也是水痘减毒活疫苗在生产中使用的方法。

遗传变异或基因突变对 VZV 的影响是有限的。流行病学研究表明不同的 VZV 株很少表现出抗原变异，至今为止，并没有明显的病毒亚型被发现。年度流行水痘毒株在毒力上与常规流行性水痘毒株相比，并没有显示出任何差异，也不改变其在体外的复制[15]。

水痘的传染性具有非常严格的物种特异性，一些灵长类动物和小动物，可以感染 VZV，但感染后不会造成水痘疾病。在研究原发感染的发病机制方面，免疫缺陷小鼠发挥了一定的作用，在研究水痘潜伏期方面，虽然大鼠模型一直被证实是非常适用的，但也很难复制 VZV 体内再激活的临床疼痛表型[16, 17]。由于选用人尸检组织探究病毒潜伏期的局限性，未来的研究可能更多的依赖于诱导多能干细胞或人脑类器官模型等[18]。

2 水痘-带状疱疹的流行病学特征

VZV 是一个世界流行性病毒，但在温带气候地带，年度流行较为普遍，经常在春季爆发[19]。VZV 与其它疱疹病毒不同的是其通过飞沫传播、空气传播以及接触传播引发水痘，然后迅速蔓延到其他易感个体[20]。据报道，全球儿童和青少年的 VZV 血清阳性率在 90%以上，几乎所有未接种疫苗的人都会感染 VZV[21]。生活在温带地区的人通过感染水痘病毒或者接种疫苗获得免疫，而生活在热带地区的多达 50％以上的年轻人还没有原发性水痘感染，二次感染水痘更是罕见，但其患病的严重程度却高于温带地区[22, 23]。

带状疱疹的发病率则无明显季节性变化，它的发病率与年龄相关，年轻人中每年每 1000 人出现 1.2～3.4 例，在老年人中（年龄高于 65 岁）每年每 1000 人出现 3.9～11.8 例，甚至更高，并且以女性为主[24, 25]。除此之外，带状疱疹的常见危险因素还有免疫抑制、感染以及精神压力[26]。一项截止至 2021 年 1 月的 16 项研究综合分析证实糖尿病患者有更高的患病风险[26]。在 COVID-19 大流行期间，特别是在接种新冠疫苗后，VZV 的再激活也成了一个新的讨论点，现有所有疫苗均被发现存在重新激活 VZV 的可能。在以色列，接种 tozinameran（BNT162b2 mRNA 疫苗）后发生 HZ 的比例为 1.43%，接种 tozinameran/Comirnaty（BioNTec-Pfizer）疫苗后，HZ 病例超过了 4100 例，占该疫苗接种后报告事件总数的 1.3%[27, 28]。在美国疫苗不良事件报告系统中，接种 tozinameran/corminine 后出现 HZ 病例 2512 例，接种 spikevax 后出现 HZ 病例 1763 例，这些患者均有高血压、

自身免疫性疾病和免疫抑制等合并症状，这些患者的症状与常规 HZ 患者并无区别[29, 30]，也有其它研究证实部分有 VZV 疫苗接种史的患者在接种 COVID-19 疫苗后出现 HZ 症状[31]。

带状疱疹后神经痛（Post-herpetic neuralgia, PHN）是带状疱疹最为人们所熟知的并发症，可在带状疱疹皮疹后引起严重且持续的皮肤疼痛，针刺样、电击样、火烧样……持续时间多达 3 个月甚至 1 年以上，是一种高度难治性疾病且无特效药[32]。目前，人们对 VZV 再激活的认识要比之前广泛得多，VZV 再激活还可能导致带状疱疹血管病变、脊髓炎以及运动无力等神经系统疾病，它们也被称为带状疱疹综合征[33]，因此，应针对未确诊的急慢性脑或脊髓综合征病例开发一种诊断方法，确认是否由 VZV 再激活诱导的神经系统疾病。目前对带状疱疹的治疗多以抗病毒及对症治疗为主，但不少患者治疗效果不佳，因此接种疫苗是最有效的措施。

3 疫苗接种及其免疫效果

水痘减毒活疫苗已在日本、德国、美国等国家应用多年。免疫接种 1 岁以上未患过水痘的儿童和成人，产生的特异性抗体能在体内维持数年之久，对机体的免疫保护率较高。健康儿童接种单剂水痘疫苗后, 其抗体阳转率可达 95%。我国也在进行对 1 岁以上儿童接种水痘疫苗，目前市场上所采用的水痘疫苗是由 VZV 减毒活病毒 Oka 株经 MRC-5 或者 2BS 细胞培养制成。

接种水痘疫苗后，机体可产生体液免疫和细胞免疫。在体液免疫中，VZV 可诱导机体产生 IgG、IgM 和 IgA 抗体，该抗体结合到病毒的蛋白质上，包括糖蛋白、调节蛋白和结构蛋白以及病毒复制中的一些酶介导体液免疫[34]。抗 VZV 的抗体具有中和病毒的活性，其直接或在补体存在下，通过抗体介导的细胞毒作用裂解 VZV 感染的细胞。gH 和 gC 蛋白在机体内诱导补体独立的中和抗体，有研究表明，抗 gH 抗体可以调节病毒在细胞间的传播，甚至可能改变病毒在宿主细胞内的致病性[35]。在细胞免疫中，宿主通过抗原特异性 T 淋巴细胞介导免疫反应。在皮疹出现后 1～2 周内可检测到 T 细胞介导的免疫，由 CD4 和 CD8 效应 T 细胞和记忆 T 细胞组成，它们对水痘的恢复至关重要。接种水痘疫苗也会产生相应的 VZV 特异性的体液和细胞免疫反应，在感染水痘期间或疫苗接种后产生的记忆细胞有助于保护机体再次暴露于水痘病毒，这些反应之后也会通过内源性再暴露（潜伏病毒再激活）或外源性再暴露而增强。研究表明，VZV 特异性 T 细胞介导的免疫反应是维持潜伏在神经系统中的 VZV 处于亚临床状态的关键因素，当衰老或免疫抑制导致这种免疫反应下降时，VZV 将重新激活导致带状疱疹，为预防带状疱疹而开发的疫苗增强了这些免疫反应[36, 37]。

水痘遍布全世界，目前接种水痘疫苗是预防水痘最有效的方式，我国水痘接种的对象是 12 月龄～12 周岁的健康儿童。接种疫苗后一般无副反应，少数人接种后的 6 小时～18 小时可有短暂的一次性发热或轻微的皮疹，一般无需治疗即可自行消退，必要时可对症治疗，以减少危险发生。

现阶段我国人用水痘减毒疫苗是将水痘病毒 Oka 株在 MRC-5 或者 2BS 二倍体细胞中培养繁殖而获得的病毒冻干制品，疫苗可刺激机体产生抗水痘病毒的免疫力，用于预防水痘。水痘的病原体水痘带状疱疹病毒具有高度的传染性，人是唯一的宿主，极易传播，至今仍没有有效的药物治疗，接种水痘疫苗是预防该病的唯一有效的手段，尤其是在控制水痘爆发流行方面起到了非常重要的作用。

4 水痘疫苗安全性研究

几乎所有免疫功能正常的人，在自然感染水痘后获得终身免疫。有免疫力的母亲其婴儿出生后的前几个月会从母亲获得胎传抗体，从而对水痘具有一定的免疫力，而对无免疫力的母亲所生新生儿可采用注射水痘-带状疱疹免疫球蛋白进行应急接种预防。水痘免疫力的获得既可防止以后 VZV 的感染, 也可减少发生带状疱疹的可能性。虽然, 在实际工作中通常采用检测血清中相应的抗体来评价水痘既往感染史，或接种疫苗后的免疫反应。但有时病人血液中检测不到抗体,这也并不一定意味着对水痘易感，病人存在着相应的细胞免疫。

大量流行病学调查资料表明, 健康儿童接种水痘疫苗后是安全的。水痘疫苗的安全性意味着，VZV 可作为一个活病毒载体诱导机体对其他病原体的防御。研究显示，表达腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒 A 亚群及 B 亚群融合糖蛋白的 Oka 株对人体是安全的，水痘疫苗可做为一种疫苗载体开发下一代活疫苗[38, 39]。接种水痘疫苗后，约 18%的免疫者发生注射部位的轻微反应如疼痛、红肿，约 3%～5%的儿童产生局部皮疹。临床试验期间有 11,000 多名健康儿童、青少年和成人接种，结果表明水痘疫苗具有良好的耐受性[8]。另一项对 100 名健康婴儿、儿童和青少年的研究发现，水痘疫苗免疫反应良好，只有少数儿童出现接种部位疼痛和发红现象[40]。因此，接种水痘

疫苗，对具有免疫力的人未造成不良事件。

目前，市场上有两种带状疱疹疫苗对健康的老人是安全的，一种是 VZV 减毒活疫苗（Zostavax，默沙东），另一种是重组佐剂 VZV 糖蛋白 E 亚基疫苗（Shingrix, 葛兰素史克），两种疫苗的安全性和有效性均已在免疫功能正常的健康成人、选定的免疫功能受损患者和免疫疾病患者的临床试验中得到证实[30]。一项 617 例接受肿瘤坏死因子-α 抑制剂患者的随机对照试验表明，减毒活疫苗（Zostavax，默沙东）在该特定患者中具有良好的安全性[41]。与减毒带状疱疹活疫苗相比，重组疫苗对预防带状疱疹更有效，它可以诱导机体产生强烈的体液免疫和细胞免疫，在第二次接种后的 12 个月内持续高于接种前水平[42]。而且，重组疫苗在体内是不可复制的，因此对免疫功能低下患者也更安全的[43]，该疫苗于 2020 年 6 月 28 日在中国上市销售。2023 年 6 月 3 日，在中国疫苗行业协会主办的“水痘-带状疱疹病毒全生命期预防策略学术研讨会”上宣布首款国产带状疱疹减毒活疫苗正式上市，该疫苗将适用人群年龄扩至 40 岁以上，注射一针即可获得带状疱疹免疫，所需费用不足注射两针进口重组亚单位疫苗费用的一半。临床数据表明，注射一针国产带状疱疹疫苗即可实现体内高抗体 GMT（Mean geometric titre, GMT）水平，接种后无十分常见（发生率大于 10%）不良反应。

5 展望

虽然在减少水痘相关疾病方面取得了一定的成功，但目前的水痘-带状疱疹病毒减毒活疫苗（VZV, Oka 株）在神经组织中保留了野生型感染能力，可在脊神经节中长期潜伏并重新激活，可在疫苗接种者中引发带状疱疹和神经并发症，存在一定的安全问题。一种没有或降低皮肤及神经致病性的更安全的水痘疫苗将提高水痘疫苗接种的接受度，并有助于与目前的 vOka 疫苗一起预防和控制 VZV 相关的疾病。研究表明 ORF7 基因是 VZV 感染人皮肤和神经细胞所必须的[44, 45]，Zhao-jun Mo 等人开发了一种 ORF7 缺陷的 VZV 减毒活疫苗（v7D），体外和体内研究表明 v7D 在皮肤和神经细胞中缺乏复制和细胞间传播的能力，符合下一代水痘活疫苗病毒的关键安全标准。相同剂量的 v7D 和 vOka 在小鼠、大鼠、豚鼠和家兔中诱导相似的 VZV 特异性抗体和 T 细胞反应，在灵长类动物中也具有良好的耐受性和免疫原性[46, 47]。目前，该研究已在中国进行了 1 期临床试验（ChiCTR1900022284），获得了较好的人体内安全性和免疫原性数据[48]，该类疫苗的成功开发可以在最大安全程度下预防疾病的发生。

参考文献

[1] M. Takahashi, T. Otsuka, Y. Okuno, et al. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital [J]. Lancet, 2 （1974） 1288-1290.

[2] Response to Measles Outbreaks in Measles Mortality Reduction Settings: Immunization, Vaccines and Biologicals [J]. Geneva, 2009.

[3] M.N. Oxman, M.J. Levin, G.R. Johnson, et al. A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults [J]. N Engl J Med, 352 （2005） 2271-2284.

[4] S.A. Galea, A. Sweet, P. Beninger, et al. The safety profile of varicella vaccine: a 10-year review [J]. J Infect Dis, 197 Suppl 2 （2008） S165-169.

[5] Wise RP, Salive ME, Braun MM, et al.Postlicensure safety surveillance for varicella vaccine [J]. Am J Ophthalmol, 131 （2001） 153.

[6] N. Goulleret, E. Mauvisseau, M. Essevaz-Roulet, et al. Safety profile of live varicella virus vaccine （Oka/Merck）: five-year results of the European Varicella Zoster Virus Identification Program （EU VZVIP） [J]. Vaccine, 28 （2010） 5878-5882.

[7] S.L. Oliver, M. Zhou, A.M. Arvin, Varicella-zoster virus: molecular controls of cell fusion-dependent pathogenesis [J]. Biochem Soc Trans, 48 （2020） 2415-2435.

[8] S.E. Braspenning, T. Sadaoka, J. Breuer, et al. Decoding the Architecture of the Varicella-Zoster Virus Transcriptome [J]. mBio, 11 （2020）.

[9] S.L. Oliver, E. Yang, A.M. Arvin, Varicella-Zoster Virus Glycoproteins: Entry, Replication, and Pathogenesis [J]. Curr Clin

Microbiol Rep, 3 （2016） 204-215.
[10] B. Berarducci, J. Rajamani, L. Zerboni, et al. Functions of the unique N-terminal region of glycoprotein E in the pathogenesis of varicella-zoster virus infection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 107 （2010） 282-287.
[11] T. Lenac Rovis, S.M. Bailer, V.R. Pothineni, et al. Comprehensive analysis of varicella-zoster virus proteins using a new monoclonal antibody collection [J]. J Virol, 87 （2013） 6943-6954.
[12] N. Spernovasilis, M. Raissaki, I. Papakitsou, et al.Visceral Varicella-Zoster Virus Infection Presenting with Severe Abdominal Pain without a Rash in a Patient with Psoriatic Arthritis Treated with Infliximab Biosimilar and Steroids: A Case Report [J]. Mediterr J Rheumatol, 32 （2021） 280-284.
[13] M.J. Levin, A. Weinberg, D.S. Schmid, Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus [J]. Microbiol Spectr, 4 （2016）.
[14] M. Marin, H.C. Meissner, J.F. Seward, Varicella prevention in the United States: a review of successes and challenges [J]. Pediatrics, 122 （2008） e744-751.
[15] H. Ko, G.M. Lee, O.S. Shin, et al. Analysis of IE62 mutations found in Varicella-Zoster virus vaccine strains for transactivation activity [J]. J Microbiol, 56 （2018） 441-448.
[16] B.E. Warner, W.F. Goins, P.R. Kramer, et al. A Guide to Preclinical Models of Zoster-Associated Pain and Postherpetic Neuralgia [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 438 （2023） 189-221.
[17] M. Ou, J. Chen, S. Yang, et al. Rodent models of postherpetic neuralgia: How far have we reached? [J]. Front Immunol, 14 （2023） 1026269.
[18] P.G.E. Kennedy, T.H. Mogensen, Varicella-Zoster Virus Infection of Neurons Derived from Neural Stem Cells [J]. Viruses, 13 （2021）.
[19] K.M. Bakker, M.E. Martinez-Bakker, B. Helm, et al. Digital epidemiology reveals global childhood disease seasonality and the effects of immunization [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 113 （2016） 6689-6694.
[20] K.M. Bakker, M.C. Eisenberg, R. Woods, et al. Exploring the Seasonal Drivers of Varicella Zoster Virus Transmission and Reactivation [J]. Am J Epidemiol, 190 （2021） 1814-1820.
[21] N. Perez-Farinos, L. Garcia-Comas, R. Ramirez-Fernandez, et al. Seroprevalence of antibodies to varicella-zoster virus in Madrid （Spain） in the absence of vaccination [J]. Cent Eur J Public Health, 16 （2008） 41-44.
[22] A.A. Gershon, S.P. Steinberg, L. Gelb, Clinical reinfection with varicella-zoster virus [J]. J Infect Dis, 149 （1984） 137-142.
[23] J. Meyers, M. Logaraj, B. Ramraj, et al. Epidemic Varicella Zoster Virus among University Students, India [J]. Emerg Infect Dis, 24 （2018） 366-369.
[24] M.R. Paulsen, N.R. Patel, C. Sulis, et al. Human Papillomavirus, Herpes Zoster, and Hepatitis B Vaccinations in Immunocompromised Patients: An Update for Pharmacists [J]. J Pharm Pract, 34 （2021） 943-951.
[25] D. van Oorschot, H. Vroling, E. Bunge, et al. A systematic literature review of herpes zoster incidence worldwide [J]. Hum Vaccin Immunother, 17 （2021） 1714-1732.
[26] Y.X. Dai, F.Y. Yeh, Y.J. Shen, Y et al. Cigarette smoking and risk of herpes zoster: a population-based cohort study in Taiwan [J]. Clin Exp Dermatol, 46 （2021） 1293-1298.
[27] N. Barda, N. Dagan, Y. Ben-Shlomo, et al. Safety of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Setting [J]. N Engl J Med, 385 （2021） 1078-1090.
[28] R. Ruggiero, N. Balzano, R. Di Napoli, et al. Capillary leak syndrome following COVID-19 vaccination: Data from the European pharmacovigilance database Eudravigilance [J]. Front Immunol, 13 （2022） 956825.
[29] K. Katsikas Triantafyllidis, P. Giannos, I.T. Mian, et al. Varicella Zoster Virus Reactivation Following COVID-19 Vaccination: A Systematic Review of Case Reports [J]. Vaccines （Basel）, 9 （2021）.
[30] A. Patil, M. Goldust, U. Wollina, Herpes zoster: A Review of Clinical Manifestations and Management [J]. Viruses, 14 （2022）.

[31] J. Iwanaga, H. Fukuoka, N. Fukuoka, et al. A narrative review and clinical anatomy of herpes zoster infection following COVID-19 vaccination [J]. Clin Anat, 35 （2022） 45-51.
[32] P.G.E. Kennedy, A.A. Gershon, Clinical Features of Varicella-Zoster Virus Infection [J]. Viruses, 10 （2018）.
[33] P.G. Kennedy, Issues in the Treatment of Neurological Conditions Caused by Reactivation of Varicella Zoster Virus （VZV） [J]. Neurotherapeutics, 13 （2016） 509-513.
[34] A.A. Gershon, Varicella-zoster virus infections [J]. Pediatr Rev, 29 （2008） 5-10; quiz 11.
[35] T.J. Pasieka, L. Maresova, K. Shiraki, et al. Regulation of varicella-zoster virus-induced cell-to-cell fusion by the endocytosis-competent glycoproteins gH and gE [J]. J Virol, 78 （2004） 2884-2896.
[36] A. Weinberg, M.J. Levin, VZV T cell-mediated immunity [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 342 （2010） 341-357.
[37] S. Landmeier, B. Altvater, S. Pscherer, et al.Gene-engineered varicella-zoster virus reactive CD4+ cytotoxic T cells exert tumor-specific effector function [J]. Cancer Res, 67 （2007） 8335-8343.
[38] K. Murakami, Y. Mori, Use of a current varicella vaccine as a live polyvalent vaccine vector [J]. Vaccine, 34 （2016） 296-298.
[39] K. Murakami, M. Matsuura, M. Ota, et al. A recombinant varicella vaccine harboring a respiratory syncytial virus gene induces humoral immunity [J]. Vaccine, 33 （2015） 6085-6092.
[40] E.M. Paradis, O. Tikhonov, X. Cao, et al. Phase 3, open-label, Russian, multicenter, single-arm trial to evaluate the immunogenicity of varicella vaccine （VARIVAX） in healthy infants, children, and adolescents [J]. Hum Vaccin Immunother, 17 （2021） 4183-4189.
[41] J.R. Curtis, S.S. Cofield, S.L. Bridges, et al. The Safety and Immunologic Effectiveness of the Live Varicella-Zoster Vaccine in Patients Receiving Tumor Necrosis Factor Inhibitor Therapy : A Randomized Controlled Trial [J]. Ann Intern Med, 174 （2021） 1510-1518.
[42] A.F. Dagnew, N.P. Klein, C. Herve, et al. The Adjuvanted Recombinant Zoster Vaccine in Adults Aged >/=65 Years Previously Vaccinated With a Live-Attenuated Herpes Zoster Vaccine [J]. J Infect Dis, 224 （2021） 1139-1146.
[43] R. Harbecke, J.I. Cohen, M.N. Oxman, Herpes Zoster Vaccines [J]. J Infect Dis, 224 （2021） S429-S442.
[44] H.F. Jiang, W. Wang, X. Jiang, et al. ORF7 of Varicella-Zoster Virus Is Required for Viral Cytoplasmic Envelopment in Differentiated Neuronal Cells [J]. J Virol, 91 （2017）.
[45] A. Selariu, T. Cheng, Q. Tang, et al. ORF7 of varicella-zoster virus is a neurotropic factor [J]. J Virol, 86 （2012） 8614-8624.
[46] W. Wang, D. Pan, W. Fu, et al. Development of a skin- and neuro-attenuated live vaccine for varicella [J]. Nat Commun, 13 （2022） 824.
[47] W. Wang, D. Pan, T. Cheng, et al. Rational Design of a Skin- and Neuro-Attenuated Live Varicella Vaccine: A Review and Future Perspectives [J]. Viruses, 14 （2022）.
[48] Z.J. Mo, S.J. Huang, L.X. Qiu, et al. Safety and immunogenicity of a skin- and neuro-attenuated live vaccine for varicella: a randomized, double-blind, controlled, dose-escalation and age de-escalation phase 1 clinical trial [J]. Lancet Reg Health West Pac, 34 （2023） 100707.

尿石素类药物与 Keap1-Kelch 结构域亚区结合及其激活细胞抗氧化的比较研究

万盛杨[1]，李富豪[1]，康青[1]，汪鹏程*[1]

（[1]表面分析与化学生物学研究院，济南大学，山东省济南市，中国 250022）

【摘要】天然化合物能够通过自氧化或者调节细胞抗氧化系统，清除机体自由基，从而保护细胞。通过研究天然化合物修复神经元氧化应激的作用机理，并以此研发帕金森病（PD）新药已经成为当前研究热门。鞣花酸是一种多酚二内酯，作为一种天然抗氧化剂广泛存在于多种果蔬中。研究证明鞣花酸的尿石素类代谢产物，即尿石素 A、B、C、D（UA、UB、UC、UD）亦具有抗氧化、抗炎症等功能，然而目前尚不明确它们能否保护细胞免受 6-羟基多巴胺（6-OHDA）的毒性。本课题系统研究尿石素类化合物 UA、UB、UC、UD 对使用 6-OHDA 诱导的 PD 细胞模型的保护作用，并比较这四种药物在体外与 Keap1 蛋白的结合能力。通过分子对接（Molecular Docking）和等温滴定量热（ITC）实验比较尿石素类药物与 Keap1-Kelch 结构域亚区的结合能力；使用细胞毒性实验评估这些药物能否减轻 6-OHDA 诱导的细胞毒性；通过实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹等方法对抗氧化信号通路的相关基因和蛋白质进行研究。研究发现 UA、UB、UC、UD 能够竞争性地与 Keap1 蛋白结合，促使 Nrf2 与 Keap1 的解离，导致 Nrf2 累积并转移至细胞核内，进而激活 Nrf2-ARE 信号通路，提高相关抗氧化基因与蛋白质的表达，从而清除细胞内过剩的 ROS，发挥细胞保护的作用。

【关键词】尿石素、Keap1、抗氧化系统、分子对接、等温滴定量热

探索实践新的药品监督检验策略

万鑫

（湖北省药品监督检验研究院　湖北 430075）

【摘要】随着全球化的加速和医药业的蓬勃发展，药品监督检验显得越来越重要和紧迫。作为保障人民群众健康的一项重要措施，药品监督检验已经成为各国政府高度关注的领域。然而，由于药品监管法规复杂、药品品种繁多、监管部门职能不明确等原因，药品监督检验领域仍然存在各种问题。为了加强药品监管工作，提高监管效率和检验准确度，本文在此基础上，将开始探索实践新的药品监督检验策略。

【关键词】药品监督检验；药品监管；药品质量

在当前药品监督检验中，相关问题都需要得到有效的解决，以提高药品质量和监管质量为目标，保障广大人民的健康和生命安全。想要解决这些问题需要通过相关立法、规定和政策等方面的改革，进一步加强制药企业的规范管理和药品质量检验，并且提高监管部门的效率和信息化程度，切实增强监管部门对药品的监督和执法力度，严厉打击各种形式的不正行为，建立健全的药品监管体系，让广大人民群众能够放心地使用药品[1]。

1.当前药品监督检验中常见的问题

随着人们对健康的关注不断提高，药品市场也变得越来越重要。药品作为一种特殊的商品，需要经过苛刻的监管和质量检验，以保障人们的健康和生命安全。然而，在当前的药品监督检验中，仍然存在很多问题，其中的一些已经成为了常见的问题。

1.1 药品质量问题

由于制药企业在原材料采购、生产过程以及仓库环境管理等方面的不规范，使得药品中常常存在一些不合格的成分，可能对人体造成十分严重的危害。药品质量直接影响了临床用药安全，而在药品生产过程中一旦存在任何问题就会直接威胁到人们的生活质量和身体健康[2] 。此外，一些不法商家也会通过非法手段制造或者销售假冒伪劣药品，这种做法极大地破坏了药品市场的秩序，给人们的生命安全带来巨大的风险。

1.2 药品监管部门的监管不足

虽然国家和地方药品监管部门在药品监管中发挥了重要的作用，但是由于人员专业素质和各种因素的影响，监管部门的监管力度有时候不够严格，监管效果也有待进一步提高。此外，由于药品监管机构的信息化建设滞后，导致了监管不够及时和精确，跟不上时代的发展，这也成为了目前药品监督检验中的另一个问题。因此，除了加强监管部门的人员培训和专业素质提升外，还需推进药品监管的信息化建设[3]。通过利用先进的技术手段，加快监管信息的处理和传输，从而提高监管的时效性和准确性。同时，还需引入第三方监管机构，提高监管的公正性和透明度，确保药品市场的公平和有序。只有不断完善药品监管体系，才能更好地保障人民群众的用药安全。

1.3 坚决打击医药行业的各种不正之风

某些企业采用不正当的手段获取的相关资质或者监管部门放松了对企业的监管，都有可能导致不正当的利益得到实现，这种行为不仅严重破坏了市场经济的秩序，也严重损害了人民群众的利益和公共利益。此外，医药行业涉及人民的生命健康，如果企业没有严格的监管和规范，那么药品的质量就无法得到保障，会对患者造成严重的健康风险。因此，政府和监管部门应该加强监管，打击不正当的行为，维护公共利益和人民的健康权益。普通民众也应该增强自我保护意识，警惕不合法、不规范的医药产品和服务，保障自身和家人的健康和安全。

2.在药品监督检验中实现有效策略

2.1 利用信息化手段加强信息共享，减轻企业填报药品申报表的负担

随着信息化技术的日益发展，企业在药品申报过程中正逐渐采用信息化手段推进信息共享。这种做法不仅可减轻企业在申报表填报方面的负担，还能提升填报效率。同时，信息的共享使企业间交流更加便利，进一步促进药品审批流程的顺畅进行，提升了药品审批流程的效率，对药品企业具有较强的现实意义。因此，依托信息化

技术实现药品申报信息的共享，对于企业优化申报流程、提高效率具有重要价值[4]。

2.2 加快药品批准审批的速度，缩短时间成本，减轻药企的经济负担

加快药品批准审批的速度，能够大大缩短相关审批周期，从而降低企业的时间和成本负担。这为药企的研发和生产提供了更好的保障，有助于提高它们的经济效益和市场竞争力。同时，加快审批速度也能够让更多的创新药品更快地进入市场，满足患者的需求，推动医疗卫生事业的发展。因此，加快药品批准审批的进程，对于药企、患者和整个社会都有着积极意义。

2.3 采取流程优化措施，减少中间环节的审核，简化流程，优化管理

从而进一步提升监管效率。为了提高药品监管效率，可以针对一些特殊的药品管理环节采取流程优化措施。其中一项是减少中间环节的审核，避免流程繁琐，提升工作效率，将药品监管当中没必要的环节进行去除，实现药品监管环节的精细化。同时，可以针对流程进行简化，使得工作更加轻松快捷，将流程进行透明化，能够让各方人员都能看到具体情况。除此之外，也需要对管理进行优化，规范流程，保障管理的有效性[5]。通过这些措施，可以加强监管工作的精准度和准确度，从而进一步提升监管效率，提高工作质量。

3.结语

作为一项新活动，必须符合法律法规，并加强对药品质量和安全的监管，确保成果取得虚实和可持续性。可以建立严密的制度和标准，加强监管意识和责任意识的培养。在实践中，可以对申请药品生产企业进行细致的甄别，加强对申请企业信誉度的评估等措施，总之，通过加快监督检查的流程和优化药品管理，能够提高监管效率和检验准确度，降低药品生产和销售成本，并优化药品的供应状况。因此，我国应该积极探索和实践，确保药品质量和安全监管工作的无缝对接，保障人民群众的健康和生命安全。

参考文献

[1].杭州市食品药品监督管理局探索药渣规范管理的实践[J].浙江人大,2013(12):6.

[2] 李 岩[1]，张成颖[2]，李本淳[3]，王 彤[4].在药品监督管理中加强药品检验对用药安全性的影响[J].临床医药文献电子杂志，2020.44.183.02

[3]李肇寿.农村药品监督网络有效运行机制的探索与实践[J].中国药事,2006(01):8-9.

[4]吴维忠,沈朝相.建设城乡食品药品监督管理体系的实践与探索[J].现代食品,2016(08):10-14.

[5]于培明. 药品安全性问题研究[D].沈阳药科大学,2007.

Effect of CYP3A5 gene polymorphisms on tacrolimus blood concentrations and adverse events in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients

Wang Sheng, Li Yueran, Yang Kui, Liu Jun, Luan Jiajie

Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College (Yijishan Hospital of Wannan Medical College), Wuhu, China

【**Abstract**】**Objectives:** Tacrolimus is the core basic immunosuppressant after transplantation. Cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) is the main enzyme involved in tacrolimus metabolism, and rs776746A>G is the most frequently studied polymorphism in the CYP3A5 gene. The rs776746A>G (CYP3A5*3) single-nucleotide polymorphism in CYP3A5 alters the expression of this enzyme and tacrolimus trough blood levels. CYP3A5*3 may result in absent (*3/*3), partial (*1/*3) or normal (*1/*1) CYP3A5 expression. The aim of this study was to investigate the effect of CYP3A5 gene polymorphisms on tacrolimus blood concentrations and acute graft versus host disease (GVHD) in patients with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT).**Methods:** This study included adult patients who received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation at the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College (Yijishan Hospital of Wannan Medical College) from January 2021 to June 2022. Postoperatively, the patients received triple immunosuppressive regimen of tacrolimus + mycophenolate + prednisone for the prevention of acute graft versus host disease. The initial blood concentration was monitored on the 5th day after tacrolimus administration, and followed by once or twice a week. Adjust the dose of tacrolimus according to the target blood concentrations (10-15 ng/ml). Tacrolimus blood levels were obtained by fully automatic chemiluminescence immunoassay analyzer. Polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism was used to genotype for CYP3A5*3 allelic variants.**Results:** In a total of 50 transplant patients, 30 patients were detected with CYP3A5*3/*3 genotype, 15 patients with CYP3A5*1/*3 genotype, and 5 patients with CYP3A5*1/*1 genotype. The initial tacrolimus blood concentrations in allo-HSCT patients with CYP3A5*1/*1, *1/*3 and *3/*3 genes were 7.75 ng/ml, 8.61 ng/ml and 10.19 ng/ml, respectively; The initial blood concentration/dose（C/D）ratios were 4.08 ng/(ml·mg), 4.42 ng/(ml·mg) and 5.66 ng/(ml·mg), respectively. The C/D ratios of allo-HSCT patients carrying CYP3A5*1/*1, *1/*3 and *3/*3 genes were 4.35 ng/(ml·mg) and 4.71 ng/(ml·mg) and 5.58 ng/(ml·mg), 4.19 ng/(ml·mg), 4.56 ng/(ml·mg) and 5.71 ng/(ml·mg) in the second and third weeks after operation. These results showed that the blood concentration and C/D ratio of tacrolimus in patients with CYP3A5*3/*3 genotype were significantly higher than those in patients with CYP3A5*1/*3 or CYP3A5*1/*1 genotype. Moreover, the incidence of acute GVHD after allo-HSCT in patients with CYP3A5*1/*1 genotype was significantly higher than that in patients with CYP3A5*1/*3 or CYP3A5*3/*3 genotype.**Conclusions:** Most patients carry the mutant allele CYP3A5*3. CYP3A5 gene polymorphisms affect tacrolimus blood concentrations and acute GVHD after allo-HSCT. Therefore, preoperative CYP3A5 polymorphism analysis of allo-HSCT may help determine the optimal dose of tacrolimus in this population and reduce the occurrence of acute GVHD, further increasing the effect of transplantation. In addition, further prospective studies including more patients are needed to better evaluate the dosing algorithm to assist in the determination of tacrolimus dosage for this population.

【**Key words**】CYP3A5; gene polymorphisms; allo-HSCT; acute GVHD; blood concentrations

First Author：Sheng Wang, Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College (Yijishan Hospital of Wannan Medical College), wangsheng0820@126.com, Tel: 18656039823

Correspondence: Luan Jiajie, Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College (Yijishan Hospital of Wannan Medical College), luanjiajie757@163.com

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is an effective method for the treatment of various hematological diseases. Acute graft versus host disease (GVHD) is one of the major life-threatening complications after allo-HSCT, and prevention of severe GVHD is critical to the success of allo-HSCT [1]. At present, tacrolimus combined with mycophenolate is often used as one of the standard methods for the prevention of GVHD after allo-HSCT [1]. Tacrolimus is a macrolide antibiotic compound that inhibits the calcineurin pathway by binding to FK-binding proteins [2]. However, it has a narrow therapeutic index and requires therapeutic drug monitoring to prevent graft rejection as a result of inadequate immunosuppression with low drug levels or toxicity due to high drug levels. Tacrolimus is metabolized in the liver and small intestine by the CYP3A subfamily of enzymes. Although both CYP3A4 and CYP3A5 are involved in the metabolism of tacrolimus, previous studies have suggested that polymorphisms in the CYP3A5 gene are responsible for interindividual variations in tacrolimus bioavailability [3].

A polymorphism in intron 3 of the CYP3A5 gene affects the expression of this enzyme. The CYP3A5*3 allele produces a cryptic splice site and encodes an abnormally spliced mRNA with a premature stop codon; therefore, individuals homozygous for this allele (CYP3A5*3/*3) are referred to as non-expressors. The presence of the CYP3A5*1 allele will produce normal mRNA, leading to high expression of this enzyme in the intestine and liver; individuals expressing at least one CYP3A5*1 allele are referred to as expressors. Thus, expressors can be homozygous (CYP3A5*1/*1) or heterozygous (CYP3A5*1/*3) [4,5].

Previous studies showed that tacrolimus concentration-dose ratios achieved by expressors (CYP3A5*1/*3 or CYP3A5*3/*3) are 2-fold lower compared to non-expressors (CYP3A5*3/*3) [6]. Therefore, the aim of this study was to investigate the gene polymorphism of CYP3A5 and comprehensive analysis of tacrolimus blood concentration, C/D ratio and acute GVHD after allo-HSCT, and to explore whether patients' response to tacrolimus can be predicted by detecting CYP3A5 gene polymorphisms to determine the optimal dose of tacrolimus and reduce acute GVHD.

Materials and Methods

Patients

We included 50 adult patients who underwent allo-HSCT at the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College (Yijishan Hospital of Wannan Medical College) in Anhui, China. Postoperatively, patients received tacrolimus + mycophenolate + prednisone triple immunosuppressive therapy. The starting dose of tacrolimus is 0.15 mg/(kg.d) divided into two doses in the morning and evening. Subsequent doses are adjusted according to the blood concentration (the target blood concentration is maintained at 10-15 ng/ml). The dosage of mycophenolate was 0.75 g in the morning, 0.5 g in the middle and 0.5 g in the evening. After the operation, methylprednisolone 6 mg/d was given intravenously for 3 consecutive days, and then changed to 2 mg/(kg.d) of prednisone tablets on the 4th day. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics review committee of the institution. Written informed consent was obtained from all patients.

Genotype analysis

Genotype analysis of all patients were performed to identify the CYP3A5 allele. Peripheral blood samples were obtained to isolate white blood cells and extract genomic DNA. The gene polymorphisms were examined by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique and the Sequenom system according to the manufacturer's instructions (Jinan Gospel Medical Technology Co., LTD, China).

Statistical analyses

All data were presented as mean ± SD using GraphPad Prism (San Diego, CA) or mean (range, minimum to maximum) for all quantitative estimates. Tacrolimus trough blood levels between two groups were determined using one-way ANOVA test or Student's t-test and $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Characteristics of study population

In the 50 allo-HSCT patients who were included in the study, there were 29 males and 21 females (Table 1). The mean age was 36 ± 15 years and body weight was 50 ± 13 kg. After transplant, the incidence of acute rejection was 35%. There were no significant differences in age, gender and related biochemical parameters (hemoglobin, creatinine, alanine aminotransferase) between patients with different CYP3A5 genotypes.

Frequency of CYP3A5 genotypes and relation to tacrolimus blood concentration

The CYP3A5*1/*1, *1/*3, and *3/*3 genotypes were detected in 5 (10%), 15 (30%), and 30 (60%) of the 50 allo-HSCT patients (Table 1 and 2). Mean tacrolimus levels in the CYP3A5 *1/*1 group was 7.75 ng/ml (range 6.84 to 9.12 ng/ml), CYP3A5 *1/*3 group was 8.61 ng/ml (range 6.76 to 11.24 ng/ml), and CYP3A5*3/*3 group was 10.19 ng/ml (range 6.26 to 16.13 ng/ml) (Table 3). Tacrolimus blood concentration difference between expressors (CYP3A5*1/*1, *1/*3) and non-expressors (CYP3A5*3/*3) was significant when compared with independent t test ($P < 0.05$).

Effects of CYP3A5 genetic polymorphisms on blood concentration/dose（C/D）ratio

After allo-HSCT, the initial blood concentration/dose（C/D）ratios were 4.08 ng/(ml·mg), 4.42 ng/(ml·mg) and 5.66 ng/(ml·mg), respectively. The C/D ratios of allo-HSCT patients carrying CYP3A5*1/*1, *1/*3 and *3/*3 genes were 4.35 ng/(ml·mg) and 4.71 ng/(ml·mg) and 5.58 ng/(ml·mg), 4.19 ng/(ml·mg), 4.56 ng/(ml·mg) and 5.71 ng/(ml·mg) in the second and third weeks. The results showed that the C/D ratios of patients with CYP3A5*3/*3 genes were significantly higher than those with CYP3A5*1/*3 or CYP3A5*3/*3 gene patients (Table 4, $P < 0.05$).

Effect of CYP3A5 genetic polymorphisms on acute GVHD and tacrolimus toxicity

Acute GVHD after transplant was compared between the three CYP3A5 genotypes. Acute GVHD occurred in 22 of 50 patients after transplantation, with an incidence of 44.0%. Acute GVHD was significantly more frequent for CYP3A5*1*1 homozygotes (3 out of 5, 60.0%) than patients with CYP3A5*1/*3 (8 out of 15, 53.3%) or CYP3A5*3/*3 genotypes (11 out of 30, 36.7%) (Table 5). We examined the relation between CYP3A5 genetic polymorphisms and toxicity due to tacrolimus use, observed an increase in the incidence of toxicity in CYP3A5 non-expressors (CYP3A5*3/*3).

Conclusions

CYP3A5 gene polymorphisms affect tacrolimus blood concentrations and acute GVHD after allo-HSCT. Therefore, preoperative CYP3A5 polymorphism analysis of allo-HSCT may help determine the optimal dose of tacrolimus in this population and reduce the occurrence of acute GVHD, further increasing the effect of transplantation.

Discussion

Tacrolimus, the drug used to prevent GVHD in allo-HSCT, has wide inter-patient pharmacokinetic variability at the recommended initial dose [7,8]. Blood concentrations lower than 5 ng/ml indicate a high risk of GVHD, while blood concentrations higher than 15 ng/ml increase the occurrence of tacrolimus-related toxicity such as nephrotoxicity and

neurotoxicity [9-11]. Especially in the early stage after allo-HSCT, with a view to stably maintain the tacrolimus blood concentration at the recommended therapeutic window concentration of 5-15 ng/ml [12]. Tacrolimus has a narrow therapeutic range, which is further complicated by wide variation in intraindividual and interindividual bioavailability of the drug. Tacrolimus is metabolized by CYP3A4 and CYP3A5 in the liver and small intestine. Genetic polymorphisms in CYP3A5 affect the interindividual variability in tacrolimus trough blood levels [3].

CYP3A5*3 (rs776746) is an intragenic SNP that produces an alternatively spliced isoform in intron 3, produces a premature stop codon, and produces a nonfunctional CYP3A5 enzyme that reduces tacrolimus including tacrolimus Substrate drug metabolism, including drug, leads to increased drug plasma concentration [13-15]. Previous reports have shown that this SNP can independently affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of tacrolimus [16-18]. In kidney, heart, and lung transplant patients, more than 50 studies have shown that compared with CYP3A5*3/*3 genotypes, patients with CYP3A5*1/*1 or CYP3A5*1/*3 genotypes post-transplant, tacrolimus blood concentration was significantly reduced [16]. In addition, studies have shown that patients with CYP3A5*1 allele and CYP3A5*3/*3 genotype have statistically significant differences in the C/D ratio of tacrolimus in the second and third weeks after allo-HSCT [19].
In our study, we evaluated the effect of CYP3A5 genetic polymorphisms on tacrolimus blood concentrations and C/D ratios in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Our results showed that carriers of at least 1 active allele (CYP3A5*1) needed significantly higher doses of tacrolimus than patients homozygous for CYP3A5*3 (CYP3A5 non-expressors), and the C/D ratios of patients with CYP3A5*3/*3 genes were significantly higher than those with CYP3A5*1/*3 or CYP3A5*3/*3 gene patients. These results relied on the fact that carriers of CYP3A5*1 allele exhibit high levels of CYP3A5 expression and enzymatic activity, leading to higher daily dose requirement to achieve sufficient trough levels of tacrolimus. Such results have been reported previously in the literature concerning this polymorphism [20-24].

The present study is to investigate the effect of CYP3A5 gene polymorphisms on tacrolimus blood concentrations and acute GVHD in patients with allo-HSCT. We evaluated the risk of acute GVHD after transplant. We observed that patients with CYP3A5*1/*1 genotype had a higher risk of developing acute GVHD than CYP3A5*3 homozygotes. This observation is in agreement with the fact that carriers of the wild-type allele (CYP3A5*1) have higher levels of CYP3A5 expression, higher metabolic clearance of tacrolimus, and low trough concentrations resulting in acute GVHD. A previous study showed that CYP3A5*1 homozygotes had increased risk of acute rejection episodes (38%) than patients with CYP3A5*1/*3 (10%) or CYP3A5*3/*3 (9%) genotypes (P = 0.01) [25]. We studied the relation between CYP3A5 genotype and tacrolimus toxicity. We observed increased occurrence of toxicity in CYP3A5 non-expressors (CYP3A5*3/*3). This was expected because of high trough blood levels in these patients.

In conclusion, our results confirmed that CYP3A5 genetic polymorphism is an important factor in determining tacrolimus daily requirements and adjusting tacrolimus trough concentrations. Furthermore, it was shown in our study that genetic polymorphism is a risk factor for developing acute GVHD. Screening for this polymorphism in patients with allo-HSCT could be helpful to predict the best individualized tacrolimus oral dose and may prevent acute GVHD related to insufficient immunosuppression. Moreover, further prospective studies including more patients are needed to better evaluate the dosing algorithm to assist in the determination of tacrolimus dosage for this population.

Table 1. Comparison of clinical characteristics of the study population

Characteristic	CYP3A5*1/*1	CYP3A5*1/*3	CYP3A5*3/*3
Patients	5 (10%)	15 (30%)	30 (60%)
Age at transplant (y)	28 (26 to 32)	31 (24 to 47)	34 (22 to 53)
Gender (male/female)	3/2	8/7	18/12
Hemoglobin (g/dl)	9.7 (9.1 to 10.9)	10.1 (8.9 to 11.3)	9.8 (8.8 to 11.5)
Creatinine (mg/dl)	1.3 (1.1 to 1.6)	1.6 (1.2 to 1.8)	1.7 (0.9 to 2.3)
Alanine aminotransferase (U/L)	33(28 to 37)	37 (26 to 40)	39 (30 to 43)
	Disease types		
AA	1	3	5
ALL	1	4	4
AML	3	7	19
CML	0	1	2

Data presented as mean (minimum to maximum), number or number (%). AA: Aplastic anemia; ALL: Acute lymphoblastic leukemia; AML: Acute myeloid leukemia; CML: Chronic myelocytic leukemia

Table 2. Allelic and genotypic frequencies of CYP3A5

Gene	SNP	Genotype	n	Genotype frequency	Allele	n	Allele frequency
CYP3A5	rs776746	*1/*1（AA）	5	10%	*1（A）	25	25%
		*1/*3（AG）	15	30%	*3（G）	75	75%
		*3/*3（GG）	30	60%			

Table 3. Association between CYP3A5 genotypes and blood concentrations

Gene	Genotypes	Blood concentrations	P
CYP3A5	*1/*1	7.75 (6.84 to 9.12)	P < 0.05
	*1/*3	8.61 (6.76 to 11.24)	
	*3/*3	10.19 (6.26 to 16.13)	

Data presented as mean (minimum to maximum); $P < 0.05$, CYP3A5*1/*1 and CYP3A5*1/*3 vs. CYP3A5*3/*3

Table 4. Association between CYP3A5 genotypes and C/D ratios

	CYP3A5*1/*1	CYP3A5*1/*3	CYP3A5*3/*3	P
Initial	4.08	4.42	5.66	P < 0.05
Second week	4.35	4.71	5.58	
Third week	4.19	4.56	5.71	

Table 5. Association between CYP3A5 genotypes and acute GVHD

Gene	Genotypes	Acute GVHD	P
CYP3A5	*1/*1	3/5 (60.0%)	P < 0.05
	*1/*3	8/15 (53.3%)	
	*3/*3	11/30 (36.7%)	

Data presented as number (%); $P < 0.05$, CYP3A5*1/*1 vs. CYP3A5*1/*3 and CYP3A5*3/*3

References

[1] Lv M, Huang XJ. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in China: where we are and where to go. J Hematol Oncol. 2012;5:10.

[2] van Gelder T, van Schaik RH, Hesselink DA. Pharmacogenetics and immunosuppressive drugs in solid organ transplantation. Nat Rev Nephrol. 2014;10(12):725-31.

[3] Liu J, Chen D, Yao B, et al. Effects of donor-recipient combinational CYP3A5 genotypes on tacrolimus dosing in Chinese DDLT adult recipients. Int Immunopharmacol. 2020;80:106188.

[4] Vyhlidal CA, Pearce RE, Gaedigk R, et al. Variability in Expression of CYP3A5 in Human Fetal Liver. Drug Metab Dispos. 2015;43(8):1286-1293.

[5] Ang GY, Yu CY, Johari James R, et al. A study on the genetic polymorphisms of CYP3A5 among the Orang Asli in Malaysia using a next generation sequencing platform. Ann Hum Biol. 2018;45(2):166-169.

[6] Thervet E, Anglicheau D, King B, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. Transplantation. 2003;76(8):1233-1235.

[7] Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. Clin Pharmacokinet. 1995;2(6):404-430.

[8] Trifilio SM, Scheetz MH, Pi J, et al. Tacrolimus use in adult allogeneic stem cell transplant recipients receiving voriconazole: preemptive dose modification and therapeutic drug monitoring. Bone Marrow Transplant. 2010;45(8):1352-1356.

[9] Böttiger Y, Brattström C, Tydén G, et al. Tacrolimus whole blood concentrations correlate closely to side- effects in renal transplant recipients. Br J Clin Pharmacol. 1999;48（3）:445-448.

[10] Staatz C, Taylor P, Tett S. Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation. Nephrol Dial Transplant. 2001,16(9):1905-1909.

[11] Sikma MA, Hunault CC, van de Graaf EA, et al. High tacrolimus blood concentrations early after lung transplantation and the risk of kidney injury. Eur J Clin Pharmacol; 2017,73(5):573-580.

[12] Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high- dose, posttransplantation cyclophosphamide. Biol Blood Marrow Transplant. 2008,14(6):641-650.

[13] Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. Clin Pharmacol Ther. 2015;98(1):19-24.

[14] Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. Pharmacogenet Genomics. 2012;22(7):555-558.

[15] Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. Clin Pharmacokinet. 2010;49(4):207- 221.

[16] Khaled SK, Palmer JM, Herzog J, et al. Influence of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Genomic Variants on Tacrolimus/Sirolimus Blood Levels and Graft- versus- Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transpl. 2016;22(2):268-276.

[17] Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1（ABCB1）polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. Pharmacogenetics. 2004;14(3):147-154.

[18] Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008; 103(6):546-552.

[19] Iwamoto T, Monma F, Fujieda A, et al. Effect of Genetic Polymorphism of CYP3A5 and CYP2C19 and Concomitant Use of Voriconazole on Blood Tacrolimus Concentration in Patients Receiving Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Ther

Drug Monit. 2015; 37(5):581-588.
[20] Yu M, Liu M, Zhang W, et al. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Pharmacogenetics of Tacrolimus in Kidney Transplantation. Curr Drug Metab. 2018;19(6):513-522.
[21] Hesselink DA, Bouamar R, Elens L, et al. The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation. Clin Pharmacokinet. 2014;53(2):123-139
[22] Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. Clin Pharmacol Ther. 2015;98(1):19-24.
[23] Berger FA, Mulder MB, Ten Bosch-Dijksman W, et al. Differences in CYP3A genotypes of a liver transplant recipient and the donor liver graft and adjustment of tacrolimus dose. Br J Clin Pharmacol. 2019;85(8):1852-1854.
[24] Zuo XC, Ng CM, Barrett JS, et al . Effects of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics in Chinese adult renal transplant recipients: a population pharmacokinetic analysis. Pharmacogenet Genomics. 2013;23(5):251-261.
[25] Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, et al. Influence of CYP3A5genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008;103(6):546-552.

受体偏向性肿瘤免疫治疗白介素-2 类似物的研究进展

汪熙[1]，孙海滨[2]，滕业方[1]，吴娟[3]

（1.常州工业职业技术学院材料工程学院，江苏 常州 213164；2.扬子江药业集团江苏紫龙药业有限公司，江苏 常州 213100；3.江苏理工学院化工与环境学院，江苏 常州 213001）

【摘要】白介素-2(IL-2)是首个被应用于肿瘤免疫疗法的药物。其在临床应用中存在的发热、低血压、水盐代谢紊乱甚至毛细血管渗漏综合征(VLS)等副作用也极大地限制了进一步应用。近年来随着 IL-2 与 IL-2R 受体结合晶体结构的解析，为激发细胞类型特异性 IL-2 候选疗法的开发提供了重要的结构学信息。改造 IL-2Rα 低亲和力、IL-2Rβ 高亲和力以解决 IL-2 对调节性 T 细胞(T_{reg})的脱敏作用，并通过提高 PD-1 抗体疗效的定位重塑了 IL-2 在肿瘤免疫治疗中的潜在价值。本文从聚乙二醇化学修饰和定点突变技术两方面出发，对当前在研的受体偏向性白介素-2 的免疫疗法候选药物研究进展进行综述，为开发治疗肿瘤的新型 IL-2 类药物及疗法提供借鉴。

【关键词】白介素-2；肿瘤免疫；聚乙二醇修饰；定点突变

Research Progress on Receptor-biased Tumor Immunotherapy of Interleukin-2 Analogues

WANG Xi[1]， SUN Hai-bing[2]， TENG Ye-fang[1]， WU Juan[3]

（1.School of Materials Engineering, Changzhou Vocational Institute of Industry Technology；Jiangsu Changzhou 213164；2.Yangzijiang Pharmaceutical Group Jiangsu Zilong Pharmaceutical Co., Ltd, Jiangsu Changzhou 213100；3. School of Chemical Engineering and Environment, Jiangsu University of Technology, Jiangsu Changzhou 213001）

【ABSTRACT】Interleukin-2 (IL-2) was the first drug to be used in tumor immunotherapy. However, its side effects such as fever, hypotension, water and salt metabolism disorder and even vascular leakage syndrome (VLS), greatly limited its further clinical application. In recent years, the crystal structure analysis of the binding of IL-2 and IL-2R receptor has provided important structural information for stimulating cell type specific IL-2 candidate therapies development. The low affinity of IL-2Rα and high affinity of IL-2Rβ were modified to address the desensitization of IL-2 to regulatory T cells (T_{reg}), and the potential value of IL-2 in tumor immunotherapy was reshaped by improving the efficacy of PD-1 antibodies. This article reviewed the current research progress of receptor biased interleukin-2 immunotherapy candidate drugs based on the chemical modification of polyethylene glycol and site-specific mutation technology, which provides the reference for the development of novel IL-2 drugs and therapies for the treatment of cancer.

【KEY WORDS】interleukin-2; tumor immunotherapy ; polyethylene glycol modification; site-specific mutation

---

[基金项目] 中国博士后科学基金面上资助项目（2020M681533）

[作者简介] 汪熙（1987-），男，博士后，讲师，主要从事细胞因子类新药临床前研究。E-mail:15715185806@163.com.

[责任作者] 汪熙 E-mail:15715185806@163.com.

世界卫生组织国际癌症研究机构（IARC）发布的全球最新癌症负担数据显示：2021 年全球新发癌症病例 1929 万例，死亡病例 996 万例，其中我国新发癌症 457 万人，占全球 23.7%。恶性肿瘤(癌症)已成为严重威胁人类健康的公共卫生问题之一。放疗、化疗以及靶向治疗在提高患者生存质量和生存期方面取得了重大进展。然而，治疗过程中存在的严重副作用和耐药性也限制了上述疗法的深度应用[1,2]。随着对肿瘤治疗的深入研究，学者们转而聚焦于人体内的天然“抗癌战士”—免疫系统，并创造性地提出了“不直接杀死肿瘤细胞而是通过激活人体免疫系统来治疗癌症”。由此诞生的肿瘤免疫疗法掀开了抗癌领域的“第三次革命”[3]。免疫疗法的巨大优势在于其通过激活人体自身免疫系统，能够治疗大部分类型的肿瘤甚至是已经转移的晚期恶性肿瘤。同时，利用正常的免疫系统可以防止癌细胞进化出耐药性，从而降低癌症复发率[4]。2018 年 10 月，美国詹姆斯·P·艾利森（James P. Allison）教授和日本本庶佑（Tasuku Honjo）教授凭借在肿瘤免疫治疗方面所作出的开创性贡献获得诺贝尔生理学或医学奖。免疫治疗成为当前药物研究的热点之一。

白介素-2(interleukin-2，IL-2)是首个被用于肿瘤免疫疗法的药物，美国 FDA 基于高剂量 IL-2 在临床肿瘤免疫治疗中的显著疗效，分别于 1992 年和 1998 年批准白介素-2 (Aldesleukin) 用于晚期肾癌和恶性黑色素瘤的治疗[5]。然而，随着受众面的不断扩大，其在临床应用中存在的问题愈加凸显。一是不良反应较多。IL-2 可引起发热、呕吐、低血压等一般症状，还可导致水、盐代谢紊乱等功能异常；最严重的是毛细血管渗漏综合征(vascular leakage syndrome，VLS)，导致血管内液体积聚在肺和肝等器官中，随后引发肺水肿和肝细胞损伤，使患者不得不中止治疗。二是给药次数多、剂量大。由于 IL-2 在人体内半衰期较短(<15 分钟)，反复高频率的给药不仅加大了副作用，还降低了患者对治疗的依从性[6,7]。这极大地限制了 IL-2 相关疗法的进一步临床应用。免疫疗法的兴起重塑了 IL-2 在肿瘤治疗方面的巨大潜力，研究者们对 IL-2 与受体结合晶体结构的解析，为开发更加安全有效的 IL-2 类药物提供了重要的结构学信息和新机遇[8,9]。然而，目前鲜有基于蛋白生物学功能改造 IL-2 药物研究进展的系统综述报道，IL-2 在新药开发方面的巨大价值亟需正视。基于此，本文从 IL-2 生物学功能出发，对目前在研的基于受体偏向性的 IL-2 及其类似物在肿瘤免疫治疗领域的研究进展进行综述，为开发治疗肿瘤的新型 IL-2 类药物及疗法提供新的思路。

1 白介素-2 的结构与生物学活性

IL-2 是一种由糖蛋白组成的 I 型四 α-螺旋束细胞因子，它是细胞因子大家族中的重要一员，在激活与调节免疫细胞，介导 T、B 细胞活化、增殖与分化及在炎症反应中发挥重要作用[10-12]。

IL-2 含有 133 个氨基酸残基，该结构中第 58、105 和 125 位上含半胱氨酸残基(Cys)，其中第 58、105 位上半胱氨酸之间形成的二硫键对维持蛋白的空间构造和生物学活性具有十分重要的作用[13]。若第 125 位上半胱氨酸残基二硫键发生错配，将会造成天然空间构型破坏和生物学活性显著降低甚至完全丧失。因此，为了避免这种错配的出现和维持 IL-2 的生物学活性，采用基因工程技术开发 IL-2 药物时通常选择将 125 位的半胱氨酸突变为其它氨基酸残基[14]。1992 年美国 FDA 批准诺华研发的药物 Proleukin，用于治疗转移性肾癌和皮肤癌，使 IL-2 成为人类第一个肿瘤免疫治疗药物。其结构中 125 位半胱氨酸突变为丝氨酸(Ser)。注射用重组人白介素-2(欣吉尔)则是将 125 位半胱氨酸突变为丙氨酸(Ala)。

2 白介素-2 的信号转导及调控

IL-2 通过多种途径调节免疫刺激和免疫抑制之间的平衡：一方面，IL-2 通过诱导 CD_4^+ T 细胞增殖和分化为辅助性 T 细胞（包括 Th1 和 Th2 细胞）以及增加 CD_8^+效应 T 细胞和 NK 细胞的数量和活性来促进免疫应答。另一方面，IL-2 也同时通过信号转导和转录激活因子 5(Signal Transducer and Activator of Transcription 5) STAT5 磷酸化及其他途径，促进具有免疫抑制性的 CD_4^+、$Foxp_3^+$ 、T_{reg} 的生成和稳定来抑制免疫反应[15]。IL-2 通过结合效应细胞膜上白介素-2 受体(IL-2R)来实现其信号转导及调控进而发挥多种生物活性。IL-2 受体含有三个亚单位 P55、P70、P64，主要由较短的 α 链、具有传递信号的 β 链和普通 γ 链组成，分别为 IL-2Rα（CD25）、IL-2Rβ（CD122）和 IL-2Rγ 链（CD132）[16]。IL-2Rα 与 IL-2 低亲和力(K_d 值约为 10^{-8} M)结合，不具备信号传递功能。IL-2Rβ 主要负责与 Janus 激酶 1(Janus kinase 1，JAK1)结合，并且是 STAT5 磷酸化所必需的。单独的 γ 亚基虽然不具备亲和力，但 IL-2Rγ 为多个细胞因子所共享，对增殖信号至关重要[17]。

同时，IL-2R 还存在二聚体(IL-2Rβ-IL-2Rγ)或三聚体(IL-2Rα-IL-2Rβ-IL-2Rγ)这两种变体。其中，效应 T 细胞

(Effector T cell，T_{eff} 细胞)和自然杀伤细胞 (Natural Killer cell，NK 细胞)表达中等亲和力的 IL-2Rβγ(K_d 值约 10^{-9} M)并且对高浓度 IL-2 敏感[18]。因此，在高剂量下 IL-2 与异二聚体受体结合，能够介导肿瘤杀伤性的 CD_8^+效应 T 细胞的所需扩增。而调节性 T 细胞(regulatory T cell，T_{reg} 细胞)组成型表达高亲和力的 IL-2Rαβγ(K_d 值约为 10^{-11} M)，且 T_{reg} 细胞在机体无外来抗原刺激的情况下对 IL-2 的敏感性大于 NK、T_{eff} 等细胞。因此，低水平的 IL-2 能够以更大的亲和力与异三聚体受体 IL-2Rαβγ 结合，扩展表达高组成型 IL-2Rα 的免疫抑制性 CD_4^+和 CD_{25}^+从而发挥免疫调节的作用[19]。在传统肿瘤免疫治疗过程中，为了发挥更有效的肿瘤免疫杀伤作用，需要激活更多 T_{eff} 细胞，往往需要使用高剂量 IL-2，因此同时激活产生了大量抑制性的 T_{reg} 细胞，部分抵消了高剂量 IL-2 的肿瘤免疫治疗效果，也带来了 VLS 等毒副作用。

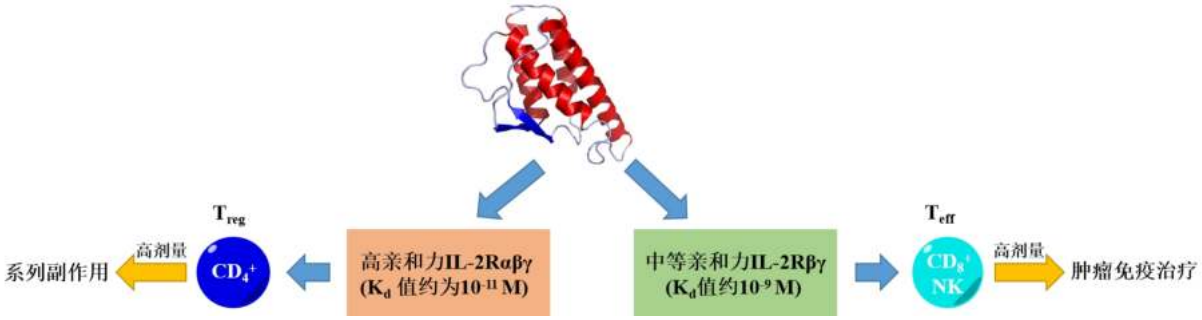


图 1　IL-2 与高、低亲和力受体结合调控下游信号转导及治疗作用发挥示意图

3 受体偏向性白介素-2 的免疫疗法药物开发

在传统的肿瘤免疫治疗中，IL-2 的辅助性治疗效果遭遇了难以突破的瓶颈。基于对 IL-2 的生物学功能及信号调控的深入揭示，研究人员试图通过改善和调控 IL-2 的受体选择性即选择性地偏向激动 IL-2Rβγ 而降低甚至完全不与 IL-2Rα 结合，从而偏向型激活肿瘤杀伤 CD_8^+细胞的活性，最大限度发挥 IL-2 的免疫刺激作用。以 PD-1 和 CTLA-4 为代表的免疫疗法的兴起，重塑了 IL-2 在肿瘤治疗方面的巨大潜力[20]。本文主要介绍和讨论以聚乙二醇化学修饰和定点突变体策略为代表的 IL-2Rβγ 受体偏向性白介素-2 药物的开发及在肿瘤免疫治疗中的应用。

3.1 PEG 修饰开发受体偏向性白介素-2

PEG 修饰即聚乙二醇修饰，是将 PEG 通过化学方法偶联到蛋白质或多肽分子上，从而提升多肽活性的一种方法。自 1977 年 Davies 用 PEG 修饰牛血清白蛋白以来，PEG 修饰技术广泛应用于多种蛋白质和多肽的化学修饰。PEG 修饰具有延长半衰期、降低免疫原性、减少毒副作用以及增强化学和生物稳定性等优势[21]。早在 20 世纪 80 年代就有学者对 IL-2 进行 PEG 修饰的研究，然而临床研究表明：修饰后的 IL-2 在黑色素瘤患者中的有效应答率低于未修饰的 IL-2，因此这一研究宣告失败[22]。而随着近年来 PEG 修饰 IL-2 的代表药物 NKTR-214 (Nektar Therapeutics)和 THOR-707 (Sanofi)与 PD-1/PD-L1 联合疗法先后在多个临床试验中取得的积极研究结果，使得 PEG 修饰策略在改善 IL-2 药物受体选择性方面的潜力被重新审视。

3.1.1 NKTR-214

Nektar Therapeutics(NKTR)成立于 1990 年，是一家以 PEG 修饰和先进的聚合物共轭技术平台开发候选药物的临床阶段生物制药公司，当前专用管道跨多个治疗领域包括肿瘤、疼痛、抗感染和免疫领域候选药物。NKTR-214 是由 Nektar Therapeutics 开发的新一代 PEG 化的 IL-2 药物。NKTR-214 的独特之处在于结构上它是由 IL-2 缀合 6 个可释放的 PEG 链得到的一种前药[23]。NKTR-214 选用的 PEG 修饰剂为分子量 20kD 的含有刚性芴环结构的两臂聚乙二醇琥珀酰亚胺碳酸酯。芴及其衍生物是一类重要的具有刚性平面联苯结构的化合物，分子内含有较大的共轭体系，这种特殊的刚性稠环结构使芴类化合物表现出许多独特的生物活性，在医药等多领域具有潜在的广泛应用[24]。该 PEG 可在弱碱和强碱性条件下发生 β-消去反应，进而发生降解脱落。NKTR-214 在体外由于 PEG 过度修饰而不具有生物活性，在注射进体内后随着 PEG 的逐渐脱落转变为活性相对最强的 1-PEG-IL-2 和 2-PEG-IL-2(平均修饰 1 个和 2 个 PEG 的活性形式)。同时，NKTR-214 上六个修饰位点的选择也生动地体现了药物分子的“设计”理念：通过优化 PEG 试剂和偶联反应促进在 IL-2/IL-2Rα（CD25）界面处聚

集的赖氨酸残基（K31、K34、K42、K47、K48、K75）上进行定点修饰；其中，PEG 恰好位于 IL-2/IL-2Rα 相互作用的关键疏水性结合位点附近。因此，IL-2 的 PEG 化可用于掩蔽与负责激活免疫抑制性 T_{reg} 的 IL-2Rα 亚基相互作用的 IL-2 区域，从而偏向型激活肿瘤杀伤 CD_8^+ T 细胞的活性。PEG 的修饰一方面可以降低 IL-2 的肾清除率和蛋白水解速度以延长半衰期，同时可以增加水溶性并降低免疫原性；另一方面 PEG 在体内的“程序式”降解脱落使得 IL-2 得以与 IL2Rβγ 受体结合提供持续的信号传导，驱动 CD_8^+ T 和 NK 细胞的增殖和激活，而不会在肿瘤微环境中不必要地扩增 T_{reg}[23,25]。

基于 NKTR-214 创新的开发理念和巧妙的结构设计，NKTR-214 单药治疗实体瘤的 I 期临床试验结果显示：患者接受 NKTR-214 治疗后肿瘤内的 CD_8^+ T 细胞和 NK 细胞相比治疗前增加 10 倍，PD-1 的表达在肿瘤浸润淋巴细胞中也增加了 2 倍，与此同时 T_{reg} 数量则无明显变化[26]。2017 年 11 月，肿瘤免疫治疗学会披露了 NKTR-214 联合纳武单抗 (Opdivo，欧狄沃) 治疗的早期数据，结果显示其对黑色素瘤的有效应答率高达 64%，吸引了全世界众多研究者的目光。2018 年 2 月，医药巨头百时美施贵宝 BMS 花费 36 亿美元购买 NKTR-214 的部分权益，拟同时开展以 NKTR-214 和 PD-1 抑制剂为基础的针对 20 种癌症的史上最大规模临床试验。肿瘤免疫治疗学会在 2018 年发布的数据显示，NKTR-214 联合纳武单抗的有效率稳定维持在 50%左右，尽管这一数据相比之前有所下滑，但是基于前期优异的临床表现，2019 年 8 月美国 FDA 仍批准了 NKTR-214 联合 PD-1 抑制剂 O 药获得“突破性疗法”认定，用于治疗初治无法手术切除或转移性黑色素瘤患者。NKTR-214 一时间成为生物医药界炙手可热的“明星药物”，被评为全球生物制药领域十大最具价值新药研发项目。然而，在随后开展的 NKTR-214 与单抗 O 药联合治疗转移性黑色素瘤的临床 III 期临床试验中相对于 O 药并未表现出额外的临床疗效，未达到无进展生存期(PFS)和总生存期(ORR)的主要终点，该临床试验研究宣告失败。2022 年 4 月，对 NKTR-214 联合 Opdivo 治疗肾癌三期临床、膀胱癌二期临床研究提前分析后，BMS 与 Nektar 宣布终止 NKTR-214 和单抗 O 药联合治疗的所有临床研究。

3.1.2 THOR-707

Synthorx(THOR)成立于 2014 年，是一家以非天然核苷酸和氨基酸进行位点特异性修饰技术平台设计靶向治疗药物的生物制药公司，当前其工程淋巴因子管道主要针对的治疗领域包括肿瘤、自身免疫性和炎症性疾病等。THOR-707 是由 Synthorx 开发的新一代定点 PEG 修饰的 IL-2 类似物，2019 年 12 月被法国制药巨头赛诺菲以 25 亿美元收购。THOR-707 的独特之处在于结构上它利用工程细菌在 IL-2 蛋白与 CD25 结合的界面上引入非天然氨基酸，将一种不可“切割”的 PEG 链精准连接在 IL-2 表面。在 IL-2 序列上进行突变，通过定点 PEG 修饰，不仅提高了 IL-2 的半衰期，还阻碍了 IL-2 和 IL-2Rα 亚基结合，从而偏向激动 IL-2Rβ，有效增加了效应 T 细胞和自然杀伤细胞的数量，同时避免 IL-2 类药物的高毒副作用[27]，是继 NKTR-214 之后又一个极具肿瘤免疫联合疗法临床应用潜力的偏向型 IL-2 激动剂。

临床前研究结果显示：在小鼠动物模型中，THOR-707 可将 T_{eff} 细胞在所有 CD_8^+ T 细胞中的比例提高到 60%以上，抗肿瘤有效应答率为 36%。此外，其与 PD-1 免疫检查点抑制剂联用可在增强 CD_8^+ T 细胞的免疫反应方面产生协同效应，同时在该模型上也显示出良好的安全性[28]。2021 年 4 月，赛诺菲公布 THOR-707（SAR444245）中期临床数据显示：患者在首次服用 THOR-707 后体内 CD_8^+ T 细胞和 NK 细胞数量增加，并且整个给药周期内持续增加，具有剂量递增效应；与 K 药（Keytruda，可瑞达）联合使用时，这种效应更加明显。与此同时，在该项研究中未观察到 CD_4^+ 调节性 T 细胞或嗜酸性粒细胞显著增加，表明 THOR-707 对 IL-2Rα 受体不具有选择性，与最初的分子结构设计理念相符。在安全性方面，THOR-707 未观察到剂量限制性毒性，单药剂量高达 24μg/kg，联合用药剂量高达 16μg/kg。第一次给药后最常见的治疗期间出现的不良事件（TEAE）包括流感样症状、发热、呕吐/恶心和寒战。THOR-707 良好的安全性表现也拓展了其在后续临床试验研究中的剂量爬坡空间，赛诺菲计划将单药Ⅱ期临床研究推荐剂量上调至每三周给药 24μg/kg 至 32μg/kg。2022 年 8 月，苏州信达生物发布公告称已与赛诺菲达成多项战略合作及许可协议，其中包括双方将合作开展 THOR-707 在中国的临床开发及商业化，包括探索联合信达的 PD-1 抑制剂达伯舒（信迪利单抗注射液）的一系列临床研究。目前 THOR-707 正在皮肤癌、胃肠癌、非小细胞肺癌/间皮瘤、头颈癌和淋巴瘤等多个适应症上开展全球临床Ⅱ期研究。

3.1.3 SHR-1916

SHR-1916 为江苏恒瑞医药自主研发的全新 PEG 修饰和位点突变的 IL-2 分子，也是国内首个递交 IND 的国产 IL-2 衍生物药物。除了采用与 NKTR-214、THOR-707 类似的 PEG 修饰策略，不同的是，恒瑞医药通过对一个或多个氨基酸位点进行突变设计构建多个 IL-2 突变体，通过结合亲和力、CTLL-2、Mo7e 细胞增殖活性筛选获得能够消除或降低对高亲和力受体（三聚体受体 IL2Rαβγ）的结合，同时不影响与中亲和力受体（二聚体受体 IL2Rβγ）结合的偏向性 IL-2 突变体类似物。SHR-1916 选用的 PEG 修饰剂为分子量 20kD 的非降解释放型 PEG，一方面延长了药物半衰期，另一方面加入的 PEG 基团能够减弱或阻止 IL-2 与受体三聚体的相互作用。SHR-1916 通过激活 JAK1/JAK3/STAT5 信号通路，促进 CD_8^+ T 和 NK 细胞增殖，发挥抗肿瘤作用。相较于 IL-2 本身，SHR-1916 对 T_{reg} 的激活降低、对免疫效应细胞的激活不受影响或增高。临床前研究结果显示：在人源肿瘤小鼠动物模型中，SHR-1916 在给药 27 天内表现出显著的抗肿瘤活性，对黑色素瘤生长抑制率高达 96%，同时未显示出明显的免疫原性[29]。SHR-1916 的Ⅰ期临床试验已于 2021 年 3 月开展，针对的适应症为晚期或转移性恶性肿瘤，预计未来将会与恒瑞自主研发的卡瑞利珠单抗开展一系列的肿瘤免疫联合疗法开发。

3.1.4 TransConIL-2β/γ

Ascendis Pharma 是一家应用独特的 TransCon（transient conjugation）技术平台开发创新药物，旨在解决目前长效给药技术的局限性并增加特定治疗的生物制药公司。TransConIL-2β/γ 是 Ascendis 借助 TransCon 技术自主研发的一款实现药物的全身持续释放以及局部（肿瘤内）释放的 IL-2 药物。TransConIL-2β/γ 的结构特点为在 IL-2 的 IL-2Rα 受体结合区域偶联一个稳定的分子量为 5kD 的直链 PEG，用以降低与与 IL-2Rα 的亲和力；在其 IL-2Rβ 受体结合区域则偶联一个可释放的分子量为 40kD 的直链 PEG 作为载体，抑制原型药物的活性并保护其免于被机体清除。当药物注射到体内时，在生理 pH 和温度条件下，使未修饰、具有活性的原型药物 IL-2 变体以预定的速率、可预测的方式进行释放，提供有效的抗肿瘤作用，同时降低毒性风险。临床前研究结果显示：在灵长类动物模型中，TransConIL-2β/γ 表现出较低的 Cmax 和较长的(> 30 小时)有效半衰期的缓释药代动力学。相对于 CD_4^+T 细胞、T_{reg} 细胞和嗜酸性粒细胞，TranConIL-2β/γ 更倾向于诱导 CD_8^+T 细胞、NK 细胞的强烈激活和扩增，同时没有引起细胞因子风暴或 VLS 的迹象[30]。目前，TransConIL-2β/γ 作为单一疗法或与帕博利珠单抗联合使用治疗局部晚期或转移性实体瘤的Ⅰ/Ⅱ期临床试验正在进行中。

3.1.5 8MW2311

8MW2311 为迈威生物自主研发的一款聚乙二醇化修饰的 IL-2 药物分子。2022 年 2 月，8MW2311 临床试验申请获得国家药品监督管理局 (NMPA) 受理，用于治疗晚期恶性肿瘤。8MW2311 注射入体内后，可刺激下游转录因子 STAT5 磷酸化，有效激发杀伤性 T 淋巴细胞 CD_8^+T 细胞的增殖，从而发挥药效。临床前研究结果显示：8MW2311 在肿瘤组织中富集并具有偏好地激活 CD_8^+ T 细胞的药理作用，在多种肿瘤模型中显示出持续有效的生长抑制作用，并且与免疫检查点药物（抗 PD-1 抗体）联用能表现出显著性增强的协同抑瘤效果。进入临床试验后，迈威生物将探索注射用 8MW2311 在晚期恶性肿瘤中的治疗价值和与已上市单抗开展一系列的肿瘤免疫联合疗法开发。

3.2 定点突变开发受体偏向性白介素-2

近年来 IL-2 与 IL-2R 受体结合晶体结构的解析，为激发细胞类型特异性 IL-2 候选疗法的开发提供了重要的结构学信息，IL-2 对 T_{eff} 和 T_{reg} 的激活机制得以被进一步揭示。IL-2 分子上氨基酸位点的突变构建并筛选受体偏向性白介素-2 类似物成为研究的热点之一。前面介绍的 SHR-1916 正是通过对一个或多个氨基酸位点进行突变设计构建筛选获得能够消除或降低对高亲和力受体结合，同时不影响与中亲和力受体结合的偏向性 IL-2 突变体[31]。目前，对 IL-2 和 IL-2R 复合体的晶体结构研究已经解析出 IL-2 与不同 IL-2R 亚基结合过程中起到关键作用的氨基酸。

3.2.1 RG7461

RG7461 为罗氏制药一种靶向性的免疫细胞因子，它含有一种工程改造的 IL-2 突变体和成纤维活化蛋白（FAP），FAP 在多种癌症上有表达[32]。在突变体构建上，罗氏制药通过对多个 CD25 结合区域的氨基酸进行突变筛选获得了能够显著降低与高亲和力受体 IL-2Rα 结合的关键氨基酸位点，如：将 42 位苯丙氨酸和 45 位酪氨酸突变成丙氨酸，72 位亮氨酸突变成甘氨酸。RG7461 的 IL-2 突变体中同时含有这三个位点的突变组合，该突

变体对 IL-2Rα 的亲和力降低，同时能够维持与 IL-2Rβ 的正常结合[33]。目前，RG7461 与罗氏制药的 PD-L1 单抗药物 Tecentriq（atezolizumab）正在联用开展针对实体瘤的临床 II 期试验，适应症为晚期或转移性头颈癌、食道癌和宫颈癌。

3.2.2 FSD13

基于 IL-2 受体的三维空间结构，上海科医联创生物联合美国马里兰大学和 UCLA 通过氨基酸定点突变研发了一款高效、低毒的 IL-2 突变体 FSD13。FSD13 上 65 位脯氨酸突变成赖氨酸，以最小的构象变化基本消除与 IL-2Rα 的结合[34]。临床前研究结果显示：相对于野生型 IL-2，FSD13 对 CD_4^+、CD_8^+ T 和 NK 细胞具有高效的激活和促增殖功能，显著增强 CD69 等的表达，在体外具有强大的肿瘤杀伤效力。在黑色素瘤小鼠动物模型中，FSD13 具有抑制肿瘤的生长和转移作用，降低调节性 T 细胞的比例，同时对肝脏和肺组织没有造成严重的毒副作用[35]。上海科医联创生物目前正联合肿瘤免疫检查点药物开展进一步的临床前研究。

3.2.3 IBI363

IBI363 是信达生物研发管线中的一款 PD-1/IL-2 抗体融合蛋白，将突变 IL-2 细胞因子与抗 PD-1 抗体融合，将 IL-2 通路刺激与 PD-1 免疫检查点阻断相结合用于晚期恶性实体瘤和淋巴瘤的治疗。信达生物采用其特有的酵母展示平台构建突变文库，通过对多个 CD25 和 CD122 结合区域的氨基酸进行突变筛选获得了能够显著降低与高亲和力受体 IL-2Rα 结合和提高与 IL-2Rβ 结合的关键突变位点，同时引入糖基化位点进一步去除 IL-2Rα 的结合[36]。IBI363 不仅在多种荷瘤药理学模型中展现出了良好抗肿瘤活性，在 PD-1 耐药和转移模型中也表现出了突出的抑瘤效力；同时，IBI363 在食蟹猴模型中具有良好的耐受性，并且在低至 0.03mg/kg 的剂量下诱导肿瘤模型显著的肿瘤消退，显示强大的抗肿瘤功效[37]。该药目前正在中国和澳大利亚开展一项Ⅰ期临床试验。

4 结语与展望

肿瘤免疫疗法已成为当下最引人瞩目的研究领域之一，其竞争核心在于如何提高响应率，转变冷肿瘤为热肿瘤。随着 PD-1、PD-L1、CTLA-4 等抗体药物市场竞争愈演愈烈，提高 PD-1 的免疫应答，将成为这个领域争夺的下一个“制高点”。而目前的候选药物也可谓是百花齐放，化疗药物、靶向药物的联合用药方案层出不穷。国内外目前已布局的 IL-2 管线已将近百款产品，国内也有十余款创新药在研。各家布局的策略也略有不同，有靠 License-in 做资源管线整合、也有自主研发做 PEG 修饰 IL-2 药物的。笔者认为，目前单一的开发策略都存在一定的局限性。PEG 修饰策略可能存在修饰位点在不同蛋白分子之间并不完全一致，导致部分 IL-2 蛋白不能选择性激活 CD_8^+ T 细胞和 NK 细胞，从而影响候选疗法的功效。PEG 修饰蛋白进入体内后的 PEG 链降解难以有效控制其释放位点和释放速率，可能会导致激活效应 T 细胞不足或激活过度等不利影响。同时，PEG 因其不可生物降解的特性，会在体内慢慢蓄积而表现出潜在的免疫原性[38]。IL-2 突变体通过改变 IL-2 表面的氨基酸，可有效赋予 IL-2 蛋白与特定 IL-2R 结合的选择性，然而它的一个潜在隐患是引入的基因变异可能引发针对 IL-2 突变体的免疫反应，从而降低潜在疗法的疗效。

IL-2 偏向性激动剂的药物开发当前还没有真正的成功先例，百时美施贵宝/Nektar 头部企业的临床失利也给 IL-2 药物研发增加了不确定性，但并未因此削弱各方的积极性，IL-2 这个老靶点对免疫细胞激活呈现的“双面性”仍将使其在未来竞争中占据一个重要位置。而如何更好地平衡对高亲和力和中等亲和力受体之间的结合选择性，实现用药的安全、可控、有效，仍需接受后续临床试验的验证。

参考文献

[1] 董学良,王会霞,李冬,等.调强放疗联合化疗治疗食管癌患者的临床疗效与安全性[J].癌症进展.2022,(5):453-456.

[2] JIANG H, YU K, CUI Y, et al. Combination of immunotherapy and radiotherapy for recurrent malignant gliomas: results from a prospective study [J]. Front Immunol, 2021,12:632547.

[3] ROSENBERG S. Raising the bar: the curative potential of human cancer immunotherapy [J]. Sci Transl Med, 2012,4:127ps8.

[4]王乐.肿瘤免疫疗法及临床应用的研究进展[J].河北医药.2022,(16):2520-2525.

[5]ROSENBERG S. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer [J]. J Immunol, 2014, 192(12):5451-5458.

[6]CHANG A, ROSENBERG S. Overview of interleukin-2 as an immunotherapeutic agent. Semin Surg Oncol, 1989, 5:385-390.
[7]TANG A, HARDING F. The challenges and molecular approaches surrounding interleukin-2-based therapeutics in cancer. Cytokine, 2019, 1(1):1-9.
[8]WANG X, RICKERT M, GARCIA K. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gammac receptors. Science, 2005, 310:1159-1163.
[9]KRIEG C, LéTOURNEAU S, PANTALEO G, et al. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(26):11906-11911.
[10] SPOLSKI R, LI P, LEONARD W. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18:648-659.
[11] BOYMAN O, SPRENT J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12:180-190.
[12] SIM G, MARTIN-OROZCO N, JIN L, et. al. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients [J]. J Clin Invest, 2014, 124:99-110.
[13] LANDGRAF B, WILLIAMS D, MURPHY J, et al. Conformational perturbation of interleukin-2: A strategy for the design of cytokine analogs [J]. Proteins, 1991, 9(3):207-216.
[14] SIM G, RADVANYI L. The IL-2 Cytokine Family in Cancer Immunotherapy [J]. Cytokine Growth F R, 2014, 25(4):377-390.
[15] STAUBER D, DEBLER E, HORTON P, et. al. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103:2788-2793.
[16] TANIGUCHI T, MATSUI H, FUJITA T, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 [J]. Nature, 1983, 302: 305-310
[17] MITRA S, LEONARD W J. Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: Mechanisms and strategies [J]. J Leukoc Biol, 2018, 103(4): 643-655.
[18] RICKERT M, WANG X, BOULANGER M, et al. The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor [J]. Science, 2005, 308:1477-1480.
[19] KLATZMANN D, ABBAS A. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(5): 283-294.
[20] CURRAN M, MONTAlLVO W, YAGITA H. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands in?ltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107:4275-84220.
[21] FISHBURN C. The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics [J]. J Pharm Sci, 2008, 97:4167-4183.
[22] YANG J C, TOPALIAN S L, SCHWARTZENTRUBER D J, et al. The use of polyethylene glycol-modified interleukin-2 (PEG-IL-2) in the treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma and melanoma. A phase I study and a randomized prospective study comparing IL-2 alone versus IL-2 combined with PEG-IL-2 [J]. Cancer, 1995, 76(4): 687-694.
[23] CHARYCH D, HOCH U, LANGOWSKI J, et.al. NKTR-214, an engineered cytokine with biased IL-2 receptor binding, increased tumor exposure, and marked efficacy in mouse tumor models [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22:680-690.
[24] 褚建波,沈群,陈启云.芴类衍生物的研究进展[J].河南科技大学学报: 医学版.2015,(2):154-156.
[25] CHARYCH D, KHALILI S, DIXIT V, et.al. Modeling the receptor pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of NKTR- 214, a kinetically- controlled interleukin-2 (IL-2) receptor agonist for cancer immunotherapy [J]. Plos One, 2017, 12:e0179431.
[26] BENTEBIBEL S, HURWITZ M, BERNATCHEZ C, et al. A First-in-Human Study and Biomarker Analysis of NKTR-214, a Novel IL-2-Receptor Beta/Gamma (βγ)-Biased Cytokine, in Patients With Advanced or Metastatic Solid Tumors

[J]. Cancer Discov, 2019, 9(6):711-721.
[27] MILLA M, PTACIN J, MA L, et al. THOR-707, a novel not-alpha IL-2, promotes all key immune system anti-tumoral actions of IL-2 without eliciting vascular leak syndrome (VLS) [J]. Ann Oncol, 2019, 30:v501.
[28] JANKU F, ABDUL-KARIM R, AZAD A, et al. Preliminary results from an open-label, multicenter phase 1/2 dose escalation and expansion study of THOR-707, a novel not-Alpha IL-2, as a single agent in adult subjects with advanced or metastatic solid tumors-ScienceDirect [J]. Eur J Cancer, 2020, 138:S11.
[29] 陈磊，胡齐悦，葛虎，等. 一种人白细胞介素 2 变体或其衍生物：中国，113383013 B [P]. 2022-11-04
[30] ROSEN?D, KVARNHAMMAR A, Laufer B, et al. TransCon IL-2 β/γ: a novel long-acting prodrug with sustained release of an IL-2Rβ/γ-selective IL-2 variant with improved pharmacokinetics and potent activation of cytotoxic immune cells for the treatment of cancer [J]. J Immunother Cancer, 2022, 10:e004991.
[31] 陈磊，胡齐悦，葛虎，等. 一种人白细胞介素 2 变体或其衍生物：中国，111647068 A [P]. 2020-09-11
[32] Nicolini V, Waldhauer I, Freimoser-Grundschober A, et al. Abstract 2217: Combining CEA-IL2v and FAP-IL2v immunocytokines with PD-L1 checkpoint blockade [J]. Cancer Res, 2016, 76(14 Suppl): 2217.
[33] 阿斯特，布鲁恩克，弗雷莫瑟格伦德肖伯，等. 突变体白介素-2 多肽：中国，103492411 A [P]. 2014-01-01
[34] 宋 波, 刘根桃. 低诱导抑制性 T 细胞的人白细胞介素 II 突变体及其用途:中国, 102101885B [P]. 2013-06-05.
[35] CHEN X, AI X, WU C, et al. A novel human IL-2 mutein with minimal systemic toxicity exerts greater antitumor efficacy than wild-type IL-2 [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10):989.
[36] 康立山，顾春银，付凤根，等. 新型白介素及其用途：中国，112105633 A [P]. 2020-12-18
[37] MORTARA L, BALLZA E, BRUNO A, et al. Anti-cancer therapies employing IL-2 cytokine tumor targeting: contribution of innate, adaptive and immunosuppressive cells in the Anti-tumor efficacy [J]. Front Immunol, 2018, 9:2905.
[38] ZAMAN R, ISLAM RA, IBNAT N, et al. Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins [J]. J Control Release, 2019, 301: 176-189.

黄芩素通过调节 SIRT1/P53 乙酰化抑制铁死亡减轻多粘菌素 B 导致的急性肾损伤

王博颖，李宏宇，吴胜，黄莹莹，余美玲

（蚌埠医学院，安徽，蚌埠 233000）

【摘要】目的：探究黄芩素通过调控 SIRT1/P53 乙酰化抑制铁死亡减轻多粘菌素 B(PMB)导致急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的作用机制。**方法：**比色法检测还原型谷胱甘肽(reduced glutathione，GSH)、丙二醛(malonaldehyde， MDA ）及 Fe^{2+}含量；化学荧光法检测 lipid peroxidation (Lipid ROS)含量；苏木精-伊红染色法（ hematoxylin-eosin，HE ）染色观察小鼠肾脏病理变化以及电子显微镜观察形态学变化；采用脂质体转染法在 HK2 细胞中过表达 GPX4，沉默 SIRT1 表达，小鼠肾脏腺病毒原位注射过表达 GPX4；Western blotting 方法检测 p53、NAD 依赖蛋白去乙酰化酶 1（ NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1，SIRT1 ），溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 members 11，SLC7A11)、核因子 E2 相关因子 2（ Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1（ Heme Oxygenase-1, HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4（ glutathione peroxidase 4，GPX4)、乙酰化 p53 等蛋白表达水平。**结果：**PMB 明显增加细胞内 Fe^{2+}、Lipid ROS、MDA 和 HO-1 水平，并降低 GSH、GPX4 和 SCL7A11 水平；在小鼠 AKI 模型中过表达 GPX4，升高的血尿素氮和血清肌酐水平显著降低，并减轻 PMB 诱导的线粒体损伤和肾损伤，降低了肾组织中 PTGS2、4HNE、的水平，并增加 GSH 水平，过表达 GPX4 可抑制 PMB 诱导的铁死亡；黄芩素预处理可增加细胞存活率，小鼠 AKI 模型中黄芩素明显降低了 PMB 升高的血尿素氮和血清肌酐水平，并显着降低 PMB 诱导的肾损伤；黄芩素可降低小鼠肾中铁、HO-1、Ptgs2 和 4HNE 水平，上调 PMB 降低的 SCL7A11、GPX4 和 GSH 水平；黄芩素预处理细胞后 GSH、GPX4 和 SCL7A11 的水平升高，同时降低细胞内 Fe^{2+}水平、Lipid ROS、MDA 和 HO-1 水平；PMB 处理后 P53 表达水平和 P53 K382 乙酰化水平升高，黄芩素通过上调 SIRT1 来降低 P53 乙酰化水平，沉默 SIRT1 表达则阻断了黄芩素的上述作用，这表明黄芩素通过上调 SIRT1 来降低 P53 乙酰化水平，从而抑制 PMB 诱导的铁死亡，最终减轻 AKI。**结论：**本研究通过体内和体外实验证实了黄芩素可通过抑制铁死亡来减轻 PMB 引起的肾损伤，并且黄芩素可通过调控 SIRT1/P53 乙酰化来抑制 PMB 诱导的铁死亡，为黄芩素治疗 PMB 所致肾损伤提供了理论参考。

【关键字】黄芩素、多粘菌素 B、铁死亡、肾损伤

2006-2020年湖南省儿童医院注射用炎琥宁致132例患儿不良反应分析

王方杰，王 婷，何莉梅，罗芳梅，蒋志平

（湖南省儿童医院药学部，湖南长沙 410007）

【摘要】目的：总结分析湖南省儿童医院患儿使用注射用炎琥宁所致药品不良反应（adverse drug reaction, ADR）的发生情况，促进儿童临床安全合理用药。**方法：**采用回顾性分析方法，对该院 2006 年 1 月-2020 年 12 月使用注射用炎琥宁治疗后发生的 132 例 ADR 报告进行统计分析，同时结合鱼骨图对 ADR 的发生进行根本原因分析，并对用药进行合理性评价。**结果：**132 例注射用炎琥宁所致 ADR 主要发生于 0-3 岁婴幼儿；最主要临床表现为皮肤及附件损害；严重 ADR 12 例，占 9.09%。ADR 的发生与超适应症、超疗程用药、静脉用药浓度与滴速及患者自身因素等相关。**结论：**临床应加强注射用炎琥宁的临床合理用药，及时监测与干预，减少不良反应的发生，提高儿童用药安全。

【关键词】炎琥宁；儿童；鱼骨图；不良反应

Analysis of 132 adverse drug reactions Induced by Yanhuning Injection from 2006-2020 in Hunan children's hospital

WANG Fangjie, WANG Ting, HE Limei, LUO Fangmei, JIANG Zhiping

Hunan Children's Hospital, Hunan Province Changsha, 410007

【Abstract】Objective: To summarize and analyze the occurrence of adverse drug reactions (ADR) caused by Yanhuning injection in hunan children's hospital in order to promote the rational drug use in clinic. **Methods:** Retrospective analysis method was used to analyze 132 ADR reports induced by Yanhuning injection from January 2006 to December 2020 and to evaluate the rational drug use. Root cause of ADR was also analyzed which combined with fish bone maps. **Results:** The 132 cases mainly occurred in 0-3 years old. The main clinical manifestation was skin and accessory damage . There are 12 cases severe ADR, accounted for 9.09%. The occurrence of ADR is associated with off-labled uses, hypercourse medication, intravenous medication concentration, drip speed and the patient's own factors. **Conclusion:** Reasonable clinical drug use of Yansunin for injection should be strengthened, timely monitoring and intervention to reduce the occurrence of adverse reactions and improve the drug safety of children.

【Keywords】Yanhuning; children; fishbone diagram; adverse drug reaction

注射用炎琥宁主要成分为穿心莲内酯，是由植物穿心莲提取物经酯化、脱水、成盐而制成的脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯钾钠盐，具有清热解毒、抗菌消炎的作用[1]。临床常用于病毒性肺炎与病毒性上呼吸道感染[2]，具有高效、低毒的特点，近年来在儿童及婴幼儿群体中得到越来越广泛的应用[3-4]。但其引起的不良反应（adverse drug reaction, ADR）也呈逐年上升趋势，特别是所致严重不良反应较为突出。因此，本研究对 2006 年 1 月-2020 年 12 月湖南省儿童医院使用注射用炎琥宁用药过程中的发生的 ADR 情况进行调查回顾分析，以期为临床用药提供警示作用，为儿童合理用药提供参考。

作者：王方杰（1989.01-），女，硕士，主管药师，研究方向：儿童个体化用药

1 资料与方法

资料收集

收集湖南省儿童医院 2006 年 1 月-2020 年 12 月上报至国家药品不良反应监测网的注射用炎琥宁 ADR 报告，共 132 例 ADR 报告纳入分析。纳入标准：注射用炎琥宁导致不良反应事件；排除标准：填报不完整及无法分析的报告。

方法

采用回顾性分析法，对 132 例 ADR 分别从患儿年龄、性别、有无药物过敏史及家族史、用药原因、给药途径与剂量、溶媒选择情况、ADR 类型、合并用药、ADR 发生时间发布、累及器官-系统及临床表现、严重 ADR 损害发生情况、关联性评价与转归等方面使用 Excel 软件进行统计分析，并根据 ADR 发生原因采取整改措施降低 ADR 发生率。

其中给药剂量参照《中国国家处方集：儿童版》[5]根据体表面积法计算儿童剂量=成人剂量×儿童体表面积/1.73m^2，换算得按 10mg/kg/日剂量给药。

ADR 关联性评价标准

根据国家食品药品监督管理局药品不良反应监测中心发布的 ADR 因果关系判断标准进行评价[6]：（1）时间因果关系；（2）是否符合注射用炎琥宁已知的 ADR 反应类型；（3）停药或减量 ADR 是否改善；（4）再次给药是否重复出现；（5）能否以其他原因如原患疾病、联合用药的作用或其他治疗的影响来解释。依照上述因果关系评价方法，将关联性评价分为肯定、很可能、可能、可能无关、待评价、无法评价 6 个等级，具体判定标准见表 1。因果关系评价是药物不良反应监测中最关键和最困难的问题，由本院从事 ADR 监测的两名专职药师进行判断，不一致者由第三名独立人员进行判定，最后经集体讨论加以确定。

表 1 因果关系判断结果

标准	肯定	很可能	可能	可能无关	待评价	无法评价
合理的时间顺序	是	是	是	是	是	是
已知药物的反应类型	是	是	是	是或否	不明	不明
去除原因可以改善	是	是	是或否	是或否	是或否	？
再次给药可重复出现	是	？	？	？	？	？
反应可有另外解释	否	否	是	是	是	是

注：？表示不明

2 结果

2.1 ADR 关联性评价

根据 ADR 关联性评价标准，18 例（13.64%）评价为肯定，77 例（58.33%）评价为很可能，27 例（20.45%）评价为可能，10 例（7.58%）为待评价。

2.2 一般资料

132 例注射用炎琥宁报告中患儿年龄分布在 1 月-15 岁，其中男性 87 例，女性 45 例，以 0-3 岁婴幼儿发生不良反应居多，见表 2。

表 2 发生 ADR 患儿的年龄性别分布

	分段	例数	构成比
年龄	0~1 岁	41	31.06%
	＞1~3 岁	51	38.64%
	＞3~7 岁	30	22.72%
	＞7~15 岁	10	7.58%

性别	男	87	65.91%
	女	45	34.09%
既往史	无	112	84.85%
	有	2	1.51%
	不详	18	13.64%
家族史	无	82	62.12%
	有	3	2.27%
	不详	47	35.61%
总计	\	132	\

2.3 原患疾病的分布

132 例注射用炎琥宁 ADR 报告中，患儿原发疾病的分布情况见表 3。主要为肺炎 45 例（34.09%），发热 35 例（26.52%），呼吸道感染 11 例（8.33%），腹泻 9 例（6.82%）。

表 3 ADR 原患疾病的分布

原患疾病	例数	构成比	原患疾病	例数	构成比
肺炎	45	34.09%	疱疹性咽峡炎	4	3.03%
发热	35	26.52%	败血症	3	2.27%
呼吸道感染	11	8.33%	传染性单核细胞增多症	2	1.51%
腹泻	9	6.82%	其他	18	13.64%
扁桃体炎	5	3.78%	总计	132	

2.4 注射用炎琥宁用法用量及联合用药情况

132 例注射用炎琥宁均为静脉滴注给药，说明书用法用量为静脉滴注一日 0.16g-0.4g，一日 1-2 次，小儿酌减或遵医嘱。其中 4 例存在超剂量用药，其余均符合用法用量。132 例报告中 30 例（占 22.73%）存在联合用药情况，其中头孢菌素类联合用药例数最多，共 20 例；青霉素类联合用药占 7 例，另有 3 例联合其他药物。具体联合用药情况见表 4。

表 4 ADR 报告中联合用药情况

药物类别	药物种类（例）	例数
青霉素类	阿莫西林（2）美洛西林（3）氨苄西林（1）哌拉西林他唑巴坦（1）	7
头孢菌素类	头孢哌酮舒巴坦（2）头孢曲松（1）头孢地嗪（1）头孢米诺（2）头孢唑肟（7）头孢匹胺（2）头孢硫脒（3）头孢他啶（1）头孢美唑（1）	20
其他	甲硫维生素 B1（1）复方维生素 3（1）奥拉西坦（1）	3
总计		30

（例）指联合用药例数

2.5 ADR 的发生时间分布

132 例注射用炎琥宁所致 ADR 中，54 例（占 40.91%）ADR 发生在用药开始后 0.5h 内，63 例（占 47.72%）发生在用药后 0.5h-1h 内，15 例（占 11.36%）发生在 1h 以上。发生 ADR 的患儿在停用注射用炎琥宁后或对症

治疗后转归均为好转或痊愈。

2.6 ADR 累及器官-系统及临床表现

注射用炎琥宁所致 ADR 主要累及皮肤及附件，主要表现为皮疹、瘙痒及斑丘疹等；其次为全身性损害，主要表现为发绀、高热面色潮红等。此外，还累及神经系统、呼吸系统及消化系统等，见表 5。

表 5 累及器官-系统及临床表现

累及系统-器官	主要临床表现（例数）
皮肤及其附件	皮疹（96），瘙痒（42），斑丘疹（10），荨麻疹（2），肿胀（6），红斑（5）
全身性反应	面色潮红（6），嘴唇发绀（8），面色苍白（2），寒战（4），发热（7），四肢发凉（3），四肢抖动（2），全身紫绀（1），鼻周发青（1），躯干潮红（1）
神经系统	剧烈哭吵（5），焦躁不安（2），胡言乱语（1）
呼吸系统	呼吸急促（4），呼吸音粗（1）
消化系统	腹痛（2），恶心（1），腹泻（1）
心血管系统	心动过速（2），胸闷（1），心悸（1）
其他	粒细胞减少（1）阴囊水肿（1）

2.7 严重 ADR 情况

注射用炎琥宁所致的 132 例 ADR 中，严重 ADR 占 12 例（9.09%），给药方式均为静脉滴注，且均为输注半小时内发生。12 例严重 ADR 中 11 例导致住院或住院时间延长，1 例导致其他重要医学事件。严重 ADR 的主要临床表现为紫绀、高热、寒颤、皮疹、呼吸急促等，12 例严重 ADR 经临床治疗后均痊愈或好转。

2.8 发生 ADR 因素及鱼骨图分析

ADR 发生的风险因素与超适应症、用法用量错误、药物浓度/滴速及患者自身问题等有关。对 ADR 进行根本原因分析，鱼骨图见图 1。

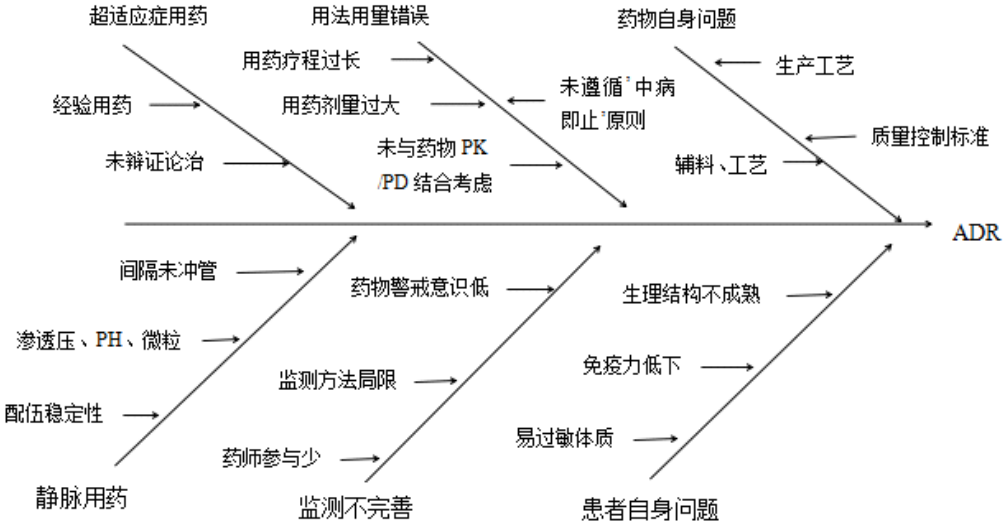


图 1 ADR 主要因素鱼骨图分析

2.9 ADR 发生率时间分布

2006-2020 年注射用炎琥宁致 ADR 发生率分布情况见图 2。2006-2014 年随着注射用炎琥宁使用例数的增加 ADR 发生率呈波动上升趋势，根据 ADR 的发生因素我院于 2015 年制定一系列措施加强对中药注射液的规范使用，近年来不良反应发生率逐渐下降。

3 讨论

3.1 注射用炎琥宁 ADR 报告的特点

注射用炎琥宁所致 132 例 ADR 中男女比例为 1.93:1，与王雪玲[7]等研究结果一致。其中婴儿 41 例（31.06%），幼儿 51 例（38.64%），相较于其他年龄组发生 ADR 概率更高，可能是由于一方面其各器官组织尚未发育成熟，免疫力低下，更易受外界病原菌侵袭，因而更易患病；另一方面生理功能不发育完善，对药物的代谢及耐受性较差，更易发生不良反应[8]。其中评价为“肯定”的标准中必须包括再激发重现试验，即再次用药后 ADR 再发生。但临床用药中怀疑某种药物发生 ADR，则一般不会再次采用，即再激发重现试验一般不明，故“很可能”所占评价结果比例最大。

3.2 注射用炎琥宁合理性评价

注射用炎琥宁说明书规定的适应症为病毒性肺炎与病毒性上呼吸道感染。如表 3 所示，原患疾病中主要用于肺炎 45 例（34.09%）、发热 35 例（26.52%）、呼吸道感染 11 例（8.33%）等，其他还用于治疗腹泻、急性肠炎等病毒感染及泌尿道感染、败血症等细菌感染性疾病等，存在超适应症用药现象。超适应症用药不仅存在法律风险，甚至因有些不良反应未被发现对患儿造成损害几率更大。国家药品监督管理局（第 23 期）[9]通报了炎琥宁的用药安全性问题，警示医护人员应严格掌握炎琥宁用药适应症，不得超剂量使用，权衡患者（尤其是儿童患者）的治疗利弊，谨慎用药。同时在选用非儿童中成药时，必须按照患儿年龄、体重或体表面积折算用法用量，不得超过一般成人用量。132 例中 4 例存在超剂量用药现象，儿童各器官系统尚未发育成熟，对药物的处置能力有限，超剂量使用可能更易发生 ADR 且症状更严重。

3.3 ADR 发生时间分布及临床表现

132 例注射用炎琥宁所致 ADR 报告中，54 例（40.91%）发生在首次用药 0.5h 内，63 例（47.72%）发生在用药 1h 内，与文献报告一致[10]。同时不良反应的出现与药物的滴注速度、浓度皆有一定的相关性，有报道每 1ml 溶媒中炎琥宁剂量≤1mg 时，不良反应发生率较低[11-12]，因此控制滴速与浓度也是降低 ADR 的关键环节之一。ADR 发生中主要临床表现为皮肤及附件损害，其次为全身性反应。因此建议临床医生在用药前详细询问过敏史，对曾发生过炎琥宁不良反应的患儿应禁用，有过敏体质的患儿应慎用，用药期间加强监护，特别是首次使用及用药 0.5h 内的监测，准备好急救措施，一旦发现异常，立即停药并急救。

3.4 联合用药

132 例中有 30 例存在联合用药情况，其中 27 例为与抗感染药物联合，与营养药联合有 3 例。注射用炎琥宁在 PH6-8 时较稳定，遇酸易还原成半酯而溶解度下降生成沉淀，碱性条件下可水解，因而炎琥宁与药物配伍引起溶液 PH 改变即出现不同程度化学变化[13-14]。有报道研究注射用炎琥宁不易与氨基糖苷类、喹诺酮类、维生素 B6、葡萄糖酸钙配伍使用，且与其他药物配伍使用时应注意时效性[15-16]。若必须配伍使用，最好使用不同输液器或输液前后采用 5%葡萄糖注射液冲管。同时药物应现配现用，避免因放置时间过长造成药物成分降解及效价降低而引发过敏反应。在本研究中未发现存在药物相互作用与配伍禁忌。

3.5 严重不良反应

注射用炎琥宁在制备过程中存在多步提取、精制及酯化成盐步骤，可能存在未除尽杂质，存在的蛋白质或生物大分子作为过敏原导致过敏反应发生[17-18]。贾歆等[19]报道成人注射用炎琥宁严重不良反应的临床表现包括呼吸困难、过敏性休克；消化系统症状如恶心、呕吐、腹泻及肝损害等；血液系统如白细胞、血小板减少及紫癜；其他如寒颤、高热、心悸、心动过速、血压下降等。本研究 12 例严重 ADR 临床症状为高热、发绀、心率加快、呼吸急促、皮疹（严重）、剧烈哭吵、腹泻（严重）等。与成人相比，儿童出现的严重 ADR 临床表现大致相同，但本次研究中儿童未见肝损害、紫癜、血压下降症状。本研究中 0-3 岁婴幼儿发生严重 ADR 的比例最高，且均为输液 0.5h 内发生，可能为其特殊的生理结构及代谢特点有关。因此在使用前一定要详细询问过敏史，特别是首次使用患儿，必要时可在使用前做皮试试验，用药期间密切观察，同时滴注期间速度应缓慢，警惕不良反应的发生。

3.6 整改措施

随着注射用炎琥宁使用数量的增多及存在多种用药不规范现象，ADR 发生例数呈逐年上升趋势。为保障患

儿用药安全，降低输液不良反应，结合国家中医药管理局发布的（2010）30 号文件《中成药临床应用指导原则》[20]，在使用非儿童专用中成药时应结合具体病情，在保证安全性与有效性的前提下，尽量采取口服与外用途径给药，慎重使用中药注射剂，并根据治疗效果缩短儿童用药疗程，及时减量或停药[21]。我院于 2015 年制定一系列规范中药注射液的规范使用措施，包括启动响应机制发布用药警示，加强对注射用炎琥宁的超适应症处方审核，加强西医师中医药专业知识的培训及申请中医师会诊，合理使用中药注射剂[22-23]。同时对临床进行用药宣教，对超适应症及用法用量医嘱定期公示并纳入绩效考核，并通知护理部严格执行注射用炎琥宁静脉输液前后冲管原则，避免与其他药物发生反应产生絮状沉淀。经过一系列整改措施，我院注射用炎琥宁致 ADR 发生率呈下降趋势，发生率由 0.11%降至 0.04%，药物用法用量及适应症均得到极大地规范。

综上所述，为减少注射用炎琥宁所致 ADR，临床应用需严格按照说明书辩证施治，根据患儿体重及体表面积计算给药剂量，避免超剂量与超适应症用药；并制定个体化的给药方案。重视并加强中药注射剂 ADR 的监测及上报工作，避免不良反应的发生，保障儿童用药安全。

参考文献：

[1] 李芙蓉. 炎琥宁联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的疗效分析[J]. 中国处方药，2017，14（11）：60-62.

[2] 陆玉丹，陆龙存.炎琥宁注射液在临床中的联合应用[J].中国医药指南，2019,26（11）:201-203.

[3] 唐俞芳, 张雷. 注射用炎琥宁在儿科应用情况分析[J].临床合理用药杂志，2019,7（34）: 133-134.

[4] 吕焕明，赵丽群，蔡洪熙，等. 炎琥宁注射液联合利巴韦林治疗小儿急性病毒性上呼吸道感染的临床疗效[J]. 临床合理用药杂志，2019，12（33）：81-82.

[5] 中国国家处方集编委会.中国国家处方集.儿童版[M]. 2013 年版. 北京：人民军医出版社, 2013:13.

[6] 国家药品不良反应监测中心. 药品不良反应术语使用指南[M].国家药品不良反应监测中心，2016.

[7] 王雪玲, 燕由美. 注射用炎琥宁在儿童中的安全应用分析[J].药学研究，2014,33（1）:59-62.

[8] 杨林勇, 刘新社, 萧伟, 等.我国常见儿童药物不良反应及对策研究[J].中国中药杂志, 2016,71（14）:2743-2748.

[9] 国家药品监督管理局.药品不良反应信息通报（23 期）关于穿琥宁、炎琥宁的用药安全性[R/OL].GGTG-2009-11992.https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/yjjsh/ypblfytb/20090901120001886.html

[10] 丁伟, 程刚, 董铎, 等. 582 例炎琥宁不良反应文献分析[J].中国药物警戒，2014,11（11）:675-680.

[11] 王双艳，李林，王铮，等. 临床药师对注射用炎琥宁滴速减慢的分析[J].中国医院药学杂志，2020，13（5）：24-30.

[12] 张宏丽, 黄婧, 王晶晶, 等. 2014—2019 年西安市 405 例炎琥宁注射液致药品不良反应报告分析[J]. 中国医院用药评价与分析，2019,20（11）:1395-1400.

[13] 王成, 许萍. 68 例炎琥宁临床配伍不良反应分析[J].中国实用医药, 2017,12（20）:191-195.

[14] 王丽英. 炎琥宁注射液的合理应用[J].中国药物经济学,2015,7（5）:15-20.

[15] 张静宇，张媛媛，王晶，等.炎琥宁注射液致儿童发生严重过敏反应的危险因素分析[J]. 中国药物警戒，2021，15（3）：56-60.

[16] 庞春燕.基于配伍禁忌的中成药合理用药探析[J].中国中医药信息杂志，2018，25（11）：126-129.

[17] 游庆霞, 赵粉霞, 张丽. 注射液炎琥宁不良反应的国内文献分析[J].中国医药导刊, 2010,12（10）：1776-1779.

[18] 韦敬土，班炳坤，孙蓉，等.注射用炎琥宁不良反应报告分析[J].中国民族民间医药，2016，25（18）：100-102.

[19] 贾歆. 注射用炎琥宁致严重不良反应 4 例报告[J].临床合理用药，2013,6（7）:46-48.

[20] 国家中医药管理局.中成药临床应用指导原则[EB /OL]. (2010-06-30) [2019-07-09].http://www.satcm.gov.cn/yizhengsi/gongzuodongtai/2018-03-24/3071.html.

[21] 贾雪琳，吴世福，霍艳飞，等. 932 例喜炎平注射液儿童不良反应的调研分析[J]. 儿科药学杂志,2020,26(9):49-53.

[22] 佃丽萍，韦晓庆，唐帆，等. 基于文献报道的复方苦参注射液不良反应与安全用药分析[J]. 中国医药导报，2020，17（35）：140-143.

[23] 任晓蕾，詹轶秋，张春燕，等.120 例中药注射剂致药品不良反应报告分析[J]. 中国医院用药评价与分析，2022，22（01）：122-124.

3720 例儿科住院不合理医嘱 Pareto 分析

王方杰，罗芳梅，王婷，何莉梅，张海霞

（湖南省儿童医院药学部，长沙 410007）

【摘要】目的：分析我院儿科不合理用药医嘱情况及原因，进一步提高临床合理用药水平。**方法：**收集我院 2019 年 1 月-2020 年 12 月住院不合理用药医嘱，采用帕累托图对不合理用药类型及涉及药物种类进行分析，联合鱼骨图法进行根因分析，制定改进措施。**结果：**我院不合理医嘱共计 3720 例，具体不合理用药因素可分为 12 类。帕累托图分析显示不合理用药类型主要因素为药物剂量不当、输液速度不当、药物浓度不当、溶媒选择不当或无、TPN 医嘱错误；次要因素为给药频率错误、电脑录入错误；一般因素为给药方式不合理、无适应症用药、遴选药物不适宜、配伍禁忌及重复用药。不合理用药医嘱涉及的药物主要种类包括抗菌药物、呼吸系统药物、电解质、维生素及营养药、消化系统药物及抗病毒药；次要种类为中成药、血液系统药物及神经系统药物；一般种类为免疫系统药物、解热镇痛药及糖皮质激素药。**结论：**通过帕累托图和鱼骨图方法分析儿科不合理用药类型并干预，促进儿童安全合理用药。

【关键词】不合理用药；医嘱；帕累托图；鱼骨图

Analysis of 3720 prescriptions with unreasonable drug use in pediatric inpatients by Pareto diagram diagram

WANG Fang-jie，YANG Zhi，WANG Ting，He Li-mei, ZHANG Hai-xia

(Department of Pharmacy, Hunan Childrens' Hospital, Changsha 410007,China）

【ABSTRACT】Objective：To analyze the situation and causes of irrational drug use in pediatric in our hospital，so as to improve the level of rational drug use in clinic. **Methods：**The medical orders for unreasonable drug use in our hospital from January 2019 to December 2020 were collected. The irrational drug use was analyzed by using Pareto diagram, and root cause analysis was conducted by combining fishbone diagram method to develop improvement measures. **Results：**There were 3720 cases of unreasonable medical orders in our hospital, and the specific irrational drug use factors could be divided into 12 categories. Pareto diagram analysis showed that the main factors of irrational drug use were improper drug dosage, improper infusion speed, improper drug concentration, improper or no solvent selection, and wrong parenteral nutrition order. The secondary factors were drug administration frequency error and computer input error. The general factors were unreasonable administration mode, no indications for drug use, unsuitable selection of drugs, incompatibility and repeated drug use. The main types of drugs referred to in the doctor's order for irrational use include antimicrobial agents, respiratory drugs, electrolytes, vitamins and nutrients, digestive drugs and antiviral drugs; the secondary types are proprietary Chinese medicines, blood system drugs and nervous system drugs; the general types are immune system drugs, antipyretic analgesics and glucocorticoid drugs. **Conclusion：**The Pareto diagram and fishbone diagram were used to analyze the types of irrational drug use in pediatrics and to promote safe and rational drug use in children.

【KEY WORDS】Irrational drug use; Medical orders; Pareto diagram; Fishbone diagram

儿童作为一个特殊的群体，身体各个器官和生理功能尚未发育完全，其对药物的吸收代谢、排泄能力与成人不同，对药物的敏感性更强，耐受性较差。不同年龄段儿童的身高、体重、体表面积及内脏功能等差别很大，

因此不能把儿童看作成人的缩小版，治疗疾病时仅仅按成人剂量进行简单的缩减[1-2]。目前我国儿童合理用药形势不容乐观，儿童安全合理用药已成为一个社会问题[3-5]。为保障患儿安全合理用药，我院施行住院医嘱实施审核制度。通过药师发现和干预不合理医嘱，对不合理医嘱进行分析总结，促进临床安全、经济、有效使用药物，降低不良反应发生率。本研究采用帕累托图分析我院 2019 年 1 月～2020 年 12 月审核登记的 3720 例不合理住院电子医嘱，确定不合理用药的主要类型，结合鱼骨图进行根因分析，并根据不合理用药原因制定相应的整改措施，促进儿童安全合理用药。

1. 资料与方法

1.1 一般资料

2019 年 1 月至 2020 年 12 月我院 HIS 系统住院医生工作站开具的电子医嘱，审核登记的不合理用药医嘱共 3720 例。共涉及新生儿科、危重症监护室、血液内科、神经内科、消化内科、普外科、泌尿科、心胸外科等三十多个小儿内外科病区。所有患者年龄均<18 周岁。

1.2 方法

药师以药品说明书为基础，《中华人民共和国药典（2020 年版）》[6]、《临床药物治疗学（第 4 版）》[7]、《抗菌药物临床应用指导原则（2015 年版）》[8]、《中国国家药品处方集（2013 年儿童版）》[9]及国家颁布的相关法规文件与循证医学为依据，分析不合理用药原因。药师通过审核药物剂量、给药频率及方式、输液速度、配伍禁忌等，将不合理医嘱按给药剂量不当、输液速度不当、药物浓度不当、全肠外营养（TPN）医嘱错误等 12 种类型，将不合理医嘱涉及药品分为 11 种，分别进行分类统计。

1.3 帕累托图

帕累托图又称为 80/20 原则，是按照发生频率大小顺序绘制的直方图，用于识别最有可能考虑影响过程或结果的变量行为的因子类别[10-12]。依据分类原则，通常将累计频率的不同因素按重要性分为 3 类。依据该原理将不合理医嘱的类型按从多到少进行排列，累计频率在 0-80%的因素为主要因素，记为 A 类；累计频率在 80-90%的因素为次要因素，记为 B 类；累计频率在 91%-100%的因素为一般因素，记为 C 类。

以不合理医嘱类型（或药物种类）为横坐标，不合理医嘱数为纵坐标作直方图，以累计频率为纵坐标作折线图，绘制出帕累托图。

1.4 鱼骨图

鱼骨图是一种发现问题“根本原因”的分析方法，特点是简洁实用、深入直观，是帮助全面了解问题、解决问题的利器[13]。本研究对“1.3”项中找出的不合理用药主要因素进行根因分析，找出各要素的相关原因，整理分析后绘制出鱼骨图。

2. 结果

2.1 不合理用药类型及帕累托图

2019 年 1 月-2020 年 12 月 3720 例不合理用药医嘱可分为 12 种类型。具体不合理用药类型及帕累托图见表 1 和图 1。以给药剂量不当（1199 例，32.27%）、输液速度不当（530 例，14.27%）、药物浓度不当（386 例，10.39%）、溶媒选择不当（334 例，8.99%）、TPN 医嘱错误（314 例，8.45 例）为主要因素。

表 1 不合理用药医嘱类型分类

序号	不合理用药类型	例数	构成比（%）	累计构成比（%）	因素类型
1	药物剂量不当	1199	32.27	32.27	A
2	输液速度不当	530	14.27	46.54	A
3	药物浓度不当	386	10.39	56.93	A
4	溶媒选择不当或无	334	8.99	65.92	A

5	TPN 医嘱错误	314	8.45	74.37	A
6	给药频率不当	256	6.89	81.26	B
7	电脑录入错误	218	5.87	87.13	B
8	给药方式不合理	138	3.71	90.84	C
9	无适应症用药	123	3.31	94.15	C
10	遴选药物不合理	118	3.18	97.33	C
11	配伍禁忌或药物不良相互作用	56	1.51	98.84	C
12	重复用药	43	1.16	100.00	C

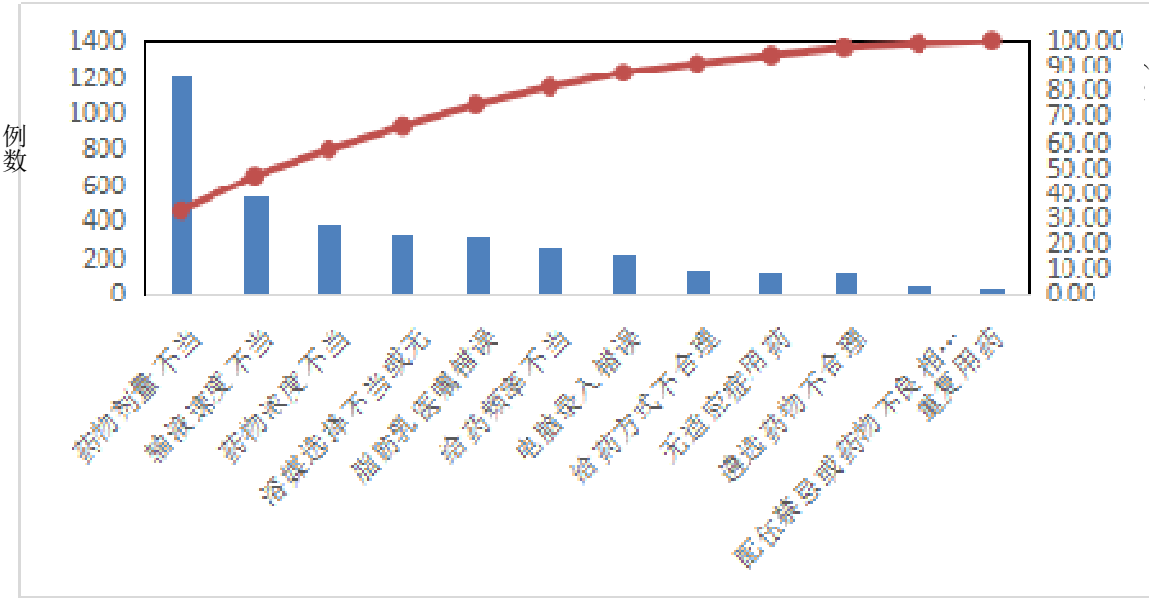


图 1 不合理用药医嘱类型帕累托图分析

2.2 不合理用药因素分析

2.2.1 药物剂量不当

药物剂量不当占所有不合理用药医嘱的 32.27%，居第 1 位，包括给药剂量过大 914 例（24.60%）与剂量过小或无效剂量 285 例（7.67%）.药物剂量大小对疾病治疗影响较为关键，过大已引起药物不良反应，过小达不到相应的治疗效果甚至无效[14].本研究中主要为抗菌药物剂量不当，如（1）某患儿 15 天, 3.1kg，医嘱氨苄西林 0.5g,q8h，根据《实用新生儿学（第 5 版）》[15]新生儿静脉滴注或注射用氨苄西林按体重 25～50mg/kg/次，严重感染可到 50-100mg/kg/次，分 3～4 次给药。一日最高剂量为按体重 400 mg/kg，该患儿给药剂量过大；（2）哌拉西林他唑巴坦根据中国药典 2020 版及说明书规定<9 个月以下婴幼儿剂量为 80mg/kg/次(按哌拉西林计)，≥9 个月婴幼儿剂量为 100mg/kg/次，大部分医嘱使用剂量过小，而药物剂量过小，不仅起不到抗菌作用，还易诱导细菌耐药性的产生。其他药物剂量不当还有二氧丙嗪、水合氯醛、西咪替丁等，均存在超剂量使用。

2.2.2 输液速度不当

输液速度不当占 14.27%，位居第 2 位。由于静脉输液直接入血的高风险性和儿童特殊的生理特点，选择适宜的输液速度以减少药物不良反应尤为重要[16]。本研究中给药速度不当主要见于某些有严格输液要求的药物，存在滴速过快或未按要求注明滴速的现象，如伏立康唑、维生素 K1、两性霉素 B 及某些化疗药物如氟尿嘧啶等，输注过快均可造成不同程度的用药风险。另外由于某些药物的特殊性质如核黄素磷酸钠见光易分解，须在半小时内滴注完，否则会降低治疗效果；维生素 K1 注射液因其赋形剂及助溶剂吐温 80 的影响滴注过快易引起过敏

反应，静脉推注<1mg/min。

2.2.3 药物浓度不当

药物浓度不当占不合理用药的 10.39%，居第 3 位。主要为抗菌药物浓度过高，如阿奇霉素一般为 1-2mg/ml，部分医嘱溶媒量少造成浓度过大，会产生恶心呕吐等胃肠道不良反应，造成患儿终止治疗，失去治疗依从性。克林霉素注射液浓度过高可致血栓性静脉炎，一般最大浓度不超过 6mg/ml，另有亚胺培南西司他丁、万古霉素浓度超过 5mg/ml 易引发红人综合征等。

2.2.4 溶媒选择不当或无

药物溶媒选择不当占 8.99%，居第 4 位。主要见于以下药物，例如（1）注射用奥美拉唑纳（海南灵康）用 5%葡萄糖注射液溶解，而奥美拉唑化学结构决定其具有弱碱性，在酸性条件下不稳定，建议遵循说明书采用 0.9%氯化钠注射液；（2）红霉素粉针使用 5%葡萄糖注射液溶解而未加碳酸氢钠注射液碱化；（3）多种微量元素注射液、注射用间苯三酚、水溶性维生素、溴己新粉针等采用含电解质的溶媒及某些对溶媒有严格要求的化疗药物如卡铂、顺铂等选择错误。另外还存在某些注射用药未开具溶媒医嘱的现象。

2.2.5 肠外营养（TPN）医嘱错误

肠外营养(parenteral nutrition, PN)成分较多，相互作用复杂，为保证其使用安全性，对肠外营养制剂质量要求较高。肠外营养医嘱错误占不合理用药的 8.45%，居第 5 位。主要表现为氨基酸浓度过低、输注时间超过 24h，渗透压过大、糖速过快等方面。氨基酸具有缓冲和调节 PH 的理化特点，能抵消 PH 的葡萄糖溶液对乳剂的破坏作用，防止破乳，最终浓度应≥2.5%；肠外营养制剂渗透压应接近与血浆渗透压，外周静脉输注时渗透压应≤900mOsm/L，中心静脉输注时应≤1200mOsm/L；避免摄入过量葡萄糖引起过度喂养与葡萄糖超载风险，新生儿肠外营养中葡萄糖推荐开始剂量 4-8mg/kg/min，1-2mg/kg/min 递增，最大不超过 11-14mg/kg/min[17]。这些医嘱错误均易导致 TPN 不稳定，且疗效不佳等问题。

2.3 不合理医嘱药物种类及帕累托图

3720 例不合理用药医嘱中，涉及的主要药物种类为抗菌药物（867 例，23.31%）、呼吸系统药物（672 例，18.06%）、电解质、维生素及营养药（514 例，13.82%）、消化系统药物（392 例，10.54%）及中成药（308 例，8.28%），见表 2 及图 2。

表 2 不合理医嘱药物种类及因素分类

序号	药物种类	例数	构成比	累计百分比	因素类型
1	抗菌药物	867	23.31%	23.31%	A
2	呼吸系统用药	672	18.06%	41.37%	A
3	电解质、维生素及营养药	514	13.82%	55.19%	A
4	消化系统用药	392	10.54%	65.73%	A
5	中成药	308	8.28%	74.01%	A
6	血液系统用药	263	7.07%	81.08%	B
7	神经系统用药	152	4.08%	85.16%	B
8	免疫系统用药	128	3.44%	88.60%	B
9	抗病毒药	102	2.74%	91.34%	C
10	解热镇痛药	98	2.63%	93.97%	C
11	糖皮质激素药	64	1.72%	95.69%	C
12	其他	160	4.30%	100.00%	C

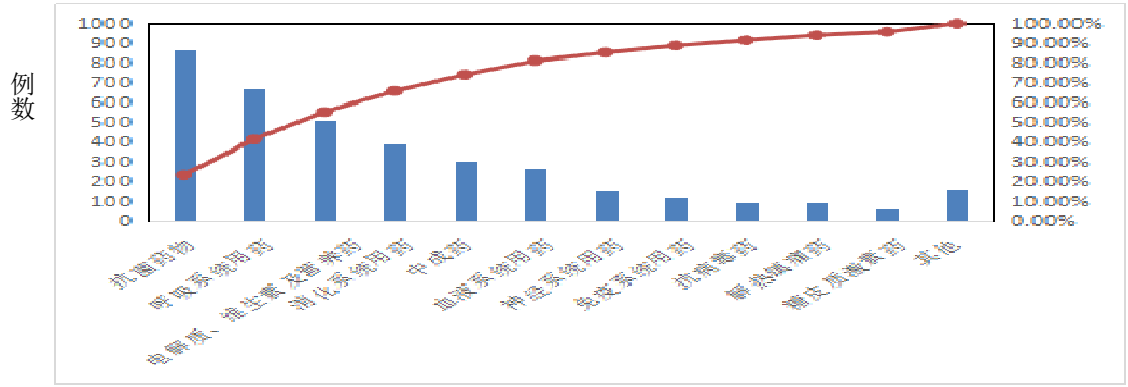


图 2 不合理用药种类帕累托图分析

2.4 不合理用药医嘱涉及的药物种类因素分析

2.4.1 抗菌药物使用不合理

因儿童抵抗力弱，多发感染性疾病，故抗菌药物是临床应用最广泛的一类药物。临床医生尤其是外科医生未深入掌握《抗菌药物临床应用指导原则》（2015 年版）及抗菌药物 PK/KD 理论，常采用经验用药导致其使用不合理占第一位，主要体现在无指征使用抗菌药物、抗菌药物选择不当、给药剂量及频率不当、联合应用不适宜等。如中枢神经系统感染，药物分布较低，抗菌药物剂量宜选择治疗范围的高限；单纯性下尿路感染时，一般药物的尿药浓度远高于血药浓度，宜用治疗剂量范围的底限[18]，但常出现抗菌药物剂量过高或过低的情况。单一药物不能有效治疗的感染需在有指征时联合用药，但常存在 2 种或 3 种抗菌谱重叠药物使用，如超广谱抗菌药碳青霉烯类药物亚胺培南西司他丁等与甲硝唑类联用。

2.4.2 呼吸系统用药使用不合理

由于婴幼儿免疫功能尚不完全成熟，住院患儿中肺炎最为多见，呼吸系统药物应用频率较高，出现不合理的概率也增大，占第二位。涉及药物包括平喘、祛痰、镇咳等药物，不合理主要表现为滴速、剂量、频率等错误。如（1）某患儿 2 岁，氨溴索注射液每日 2 次，每次 1 支，说明书规定 2 岁以下儿童每日 2 次，每次 1/2 支，2-6 岁每日 3 次，每次 1/2 支；（2）某患儿 1 岁 2 月，二丙嗪颗粒用量为一日 2 次，一次 1 袋，因其治疗量与中毒量接近，说明书规定不得超过极量，1-2 岁，一次 1/2 袋，3-4 岁，一次 1 袋，5-6 岁，一次 1.5 袋，医嘱中常出现剂量过大的情况，且有不良反应的案例发生。

2.4.3 电解质、维生素及营养药用药不合理

电解质、维生素及营养药为儿科疾病中的常用药，该类药物不合理医嘱中近 1/3 为葡萄糖酸钙注射液未注明滴注速度，该药静注过快可产生心律失常甚至心跳停止等严重不良反应，故应注明滴注速度且不超过 5ml/min。其他不合理用药还包括氯化钾注射液稀释终浓度超过 0.3%、多种微量元素注射液溶媒错误等。

2.4.4 消化系统用药不合理

该类药物涉及的医嘱错误主要表现为质子泵抑制剂（PPI）无适应症用药。根据《质子泵临床应用指导原则（2020 年版）》[19]规定儿童使用质子泵临床经验有限，主要用于小儿胃食管反流病、消化性溃疡和幽门螺旋杆菌的治疗。本研究中临床医生在围手术期常规应用质子泵抑制剂预防应激性溃疡，存在一定的滥用现象，需要进一步干预改善。

2.4.5 中成药使用不合理

中成药不合理使用主要表现在中药注射剂适应症不当、药物浓度不当、剂量不当等。如注射用炎琥宁说明书中适应症为病毒性肺炎与病毒性上呼吸道感染。但本研究中发现诊断如腹泻、疱疹性咽峡炎、支原体肺炎等中也多有应用，存在超适应症用药现象。

2.7 鱼骨图分析

运用鱼骨图进行根因分析，对不合理用药原因从人员、药品、制度、方法四个方面进行解析，见图 3.

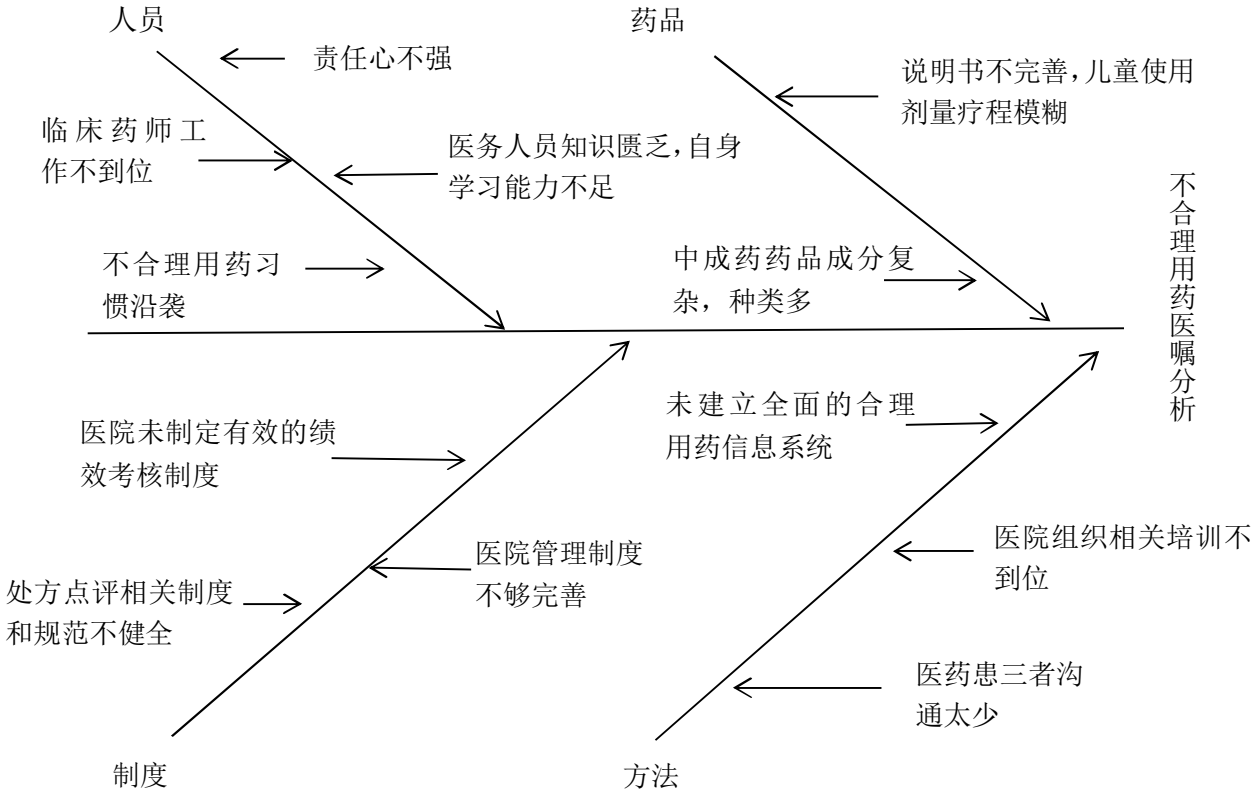


图 3 不合理用药医嘱鱼骨图分析

3 讨论

根据帕累托图与鱼骨图找出影响我院住院患儿不合理用药的原因，从方法、人员、制度方面三个方面进行针对性整改：（1）对所有的儿科医生、药师入岗前进行合理用药培训，在岗期间医院定期邀请专家进行合理用药知识讲座，特别是对抗菌药物合理使用及围手术期合理用药进行重点培训，提高医务人员对儿童安全合理用药理念；（2）编写我院常用儿科用药目录，完善儿童用法用量，更新最新儿童用药信息，对有特殊溶媒与特殊输液速度的药物定期内网公示；（3）加强临床药师查房制度，及时对医师进行合理用药宣教，以期做到对医嘱实时点评与及时干预；对医嘱问题存在较多的科室及时与科主任与临床医生沟通并反馈，及时发现问题并解决问题；（4）加强监督管理，临床药师每月将不合理医嘱结果汇总上报医务科及药事管理委员会，医务科对不合理医嘱排名靠前的科室进行处罚并督促其整改；将抗菌药物合理使用进行全院考核，并纳入年终绩效；（5）优化合理用药信息系统，与医院 HIS 系统连接，实时监督和干预用药医嘱。

综上所述，本研究中采用帕累托图分析法评价儿科不合理用药，内容明确，重点突出，不仅可以找出不合理用药的主要类型，还可以迅速直观了解不合理用药趋势；鱼骨图法用于不合理用药的根本原因分析，为制定干预措施提供有效依据。医疗行政机构可以以此为切入点，制定相应的整改措施，加大医务人员安全用药培训，促进临床合理用药，保障患儿用药安全。

参考文献

[1] 刘霞，施长城.儿科住院不合理用药现状和危险因素分析[J].中国医院药学杂志，2019,39(21)：2210-2217.

[2]李 忻，崔海珍，关丽英.我院 **2017** 年儿科住院患儿用药情况及不良反应分析[J]. 中国药物应用与监测，2018，15(6):352-356.

[3] 王磊. 儿童医院中成药超说明书及合理用药调查[J].中国药物与临床，2020,20(17)：2853-2860.

[4] 李静，何莉梅，张海霞，等. 我院病区不合理用药医嘱 Pareto 图分析[J]. 儿科药学，2019,11(6):189-192.
[5] Cowley E, Williams R, Cousins D. Medication errors in children: a descriptive summary of medication error reports submitted to the United States pharmcopeia[J]. Current Therapeutic Research, 2001,62(9): 627-640.
[6]国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知[S].2015 版，北京，中国医药科技出版社，2015：1-1509.
[7]程德云，陈文彬. 临床药物治疗学[M].第 4 版，北京，人民卫生出版社，2012：10-710.
[8]《抗菌药物临床应用指导原则》修订工作组. 抗菌药物临床应用指导原则[S]. 2015 年版，国卫办医发 2015[43]号.
[9] 胡仪吉，金有豫. 中国国家处方集(儿童版)[M].人民军医出版社，2013:3-818.
[10]刘金兰.管理统计学[M].第 1 版.天津：天津大学出版社，2007：14-19.
[11]吕天益，匡丽，陈明颖.1073 例热毒宁注射液临床用药帕累托图及鱼骨图分析[J]. 中国药物警戒，2020,17(10):745-750.
[12]梁力勉，余云霓，陈广斌，等. 基于帕累托图的某院新型冠状病毒肺炎不合理用药医嘱分析[J]. 中国医药用药评价与分析，2020,20(11):1383-1386.
[13]庄春阳，刘越南. 帕累托图和鱼骨图分析法在麻醉药品处方点评中的应用[J]. 中国药物经济学，2019，14(10):60-65.
[14]陈新谦，金有豫，汤光. 新编药物治疗学[M]. 第 17 版，北京，人民卫生出版社，2011：34-959.
[15]邵肖梅，叶鸿瑁，丘小汕. 实用新生儿学[M].第 5 版，北京，人民卫生出版社，2019:1-1067.
[16]周利军，沈绍清，吴斯宇，等. 某院实施静配医嘱审核服务的效果及成因分析[J].中国医药导报，2018,15（3）：176-180.
[17]欧洲儿科胃肠肝病与营养学会，等. 儿童肠外营养指南[J].中华儿科杂志，2018,56(12):885-896.
[18] 赵世玲. 抗菌药物所致不良反应发生情况及合理用药分析[J]. 临床合理用药杂志，2020,13(11):133-134.
[19] 国家卫生健康委合理用药专业委员会.质子泵抑制剂临床应用指导原则[S].2020 年版,国卫办医函(2020)973 号.

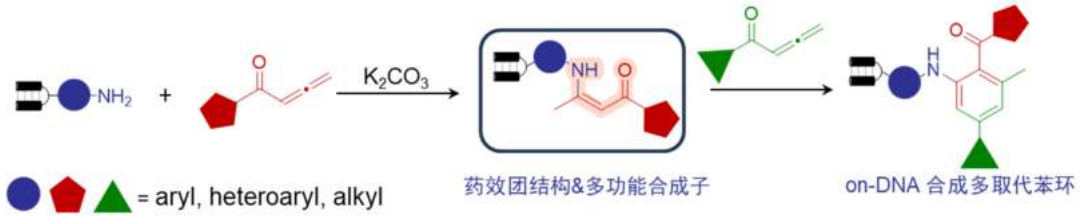
DNA 兼容的可控氨化反应构建烯胺酮结构

王辉宏[a,b]，范晓红[a,b]，张功[b]，方伟[**a]，李亦舟[**b]

（[a]重庆大学附属三峡医院药学部，重庆 404100；[b]重庆大学药学院，重庆 401331）

DNA 编码分子库（DEL）是目前制药领域前沿的先导化合物发现技术[1]，开发合成聚焦药效团结构并兼顾多样性的 DNA 兼容反应是 DEL 技术的物质基础[3]。烯胺酮广泛存在于多种活性分子中，特别是在具有抗菌活性的化合物中作为核心药效团[3]，同时该结构在有机合成中也可作为多功能中间体用以发散合成多种杂环体系[4]。然而合成这一结构的 DNA 兼容反应却并未报道。本文中，我们报道了一例基于联烯酮的 on-DNA 可控氨化反应来构建烯胺酮结构。该反应在 DEL 特有的反应条件下实现了烯胺酮结构的合成，避免了烯胺酮与体系中过量的联烯酮进一步加成环化。在后续的工作中，我们利用药效团分子骨架分步组合策略，基于两种不同类型的联烯酮，on-DNA 合成不对称的多取代芳环结构，这也是 DEL 中首例实现直接芳构化合成多取代苯环的反应。

【关键词】DNA 编码分子库，联烯酮，烯胺酮，抗菌药物



图一：DNA 兼容的联烯酮可控氨化反应

参考文献

[1] Song M., Hwang, G. T. *J. Med. Chem.*, 2020, *63*, 6578.

[2] Peterson, A.A., Liu, D.R. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2023, doi: 10.1038/s41573-023-00713-6.

[3] Amaye I. J., Haywood R. D., Mandzo E. M., Wirick J. J., Jackson-Ayotunde P. L., *Tetrahedron*, 2021, *83*, 131984.

[4] Chen X. Y., Zhang X., Wan J.-P., *Org. Biomol. Chem.*, 2022, *20*, 2356.

* 重庆市博士后科学基金项目（CSTB2023NSCQBHX0059, CSTB2022NSCQ-BHX0705）

**方伟 E-mail: 239491815@qq.com. 李亦舟 E-mail: yizhouli@cqu.edu.cn.

罕见病酶替代疗法药物重组人α-糖苷酶 A 酶活性测定方法研究

王绿音，张孝明，李晶#，梁成罡*

（中国食品药品检定研究院 激素室 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室，国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室，北京 102629）

【摘要】目的：基于酶反应动力学理论对重组人 α-半乳糖苷酶 A （recombinant human α-galactosidase A, rhα-GAL） 酶活性测定反应条件进行系统研究，建立更灵敏简便、准确稳定的 rhα-GAL 酶活性测定方法。**方法：**优化反应体系后的最适条件为：以 50 mmol·L^{-1} 对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷的为底物，酶浓度为 1.67 μg·mL^{-1},于 41℃水浴准确反应 15min 后，加入甘氨酸缓冲液（pH10.5）终止反应，采用酶标仪在 400nm 波长处测定产物对硝基苯酚的吸光值。**结果：**该方法专属性良好，rhα-GAL 在（0.42 ~ 3.33 μg·mL^{-1}）（r=0.999 8）浓度范围内与酶促反应速率呈良好的线性关系；rhα-GAL 在 50%、80%、100%、125%及 200%浓度水平验证溶液的回收率在 94.2%~101.8%范围内（n=18），测定结果的 CV 在 2.0%~5.5%（n=18），同一份供试品溶液的 12 次独立测定结果的 CV 为 2.21%；考察反应体系中的水浴温度、反应时间和底物浓度微小变化对测定结果的影响，结果表明方法的耐用性较好；复溶后的样品于 2~8℃存放 48h 稳定性较好；水解产物对硝基苯酚在（0.01~0.15 mmol·L^{-1}）（r=0.999 7）浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系，5 个浓度水平的回收率在 94.9%~105.1%之间（n=9），CV 均小于 2%（n=9）；采用该法分析 2 个已上市产品的酶活性。**结论：**建立了生色底物法测定重组人 α-半乳糖苷酶 A 的酶活性，该方法灵敏度高、精密度及准确度较好，可用于重组人 α-半乳糖苷酶 A 产品的酶活性评价和质量控制。

【关键词】罕见病用药；酶替代疗法；重组人 α-半乳糖苷酶 A；酶活性测定；生色底物法；方法验证

Study on the activity assay of recombinant human α-galactosidase A for enzyme replacement therapy of rare diseases

WANG Lü-yin, ZHANG Xiao-ming, LI-Jing#, LIANG Cheng-gang*

（Division of Hormone, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality Study and Evaluation of Biotech Products，Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality Study and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China）

【Abstract】Objective: Based on the kinetic theory of enzyme reaction, the assay conditions for the activity assay of recombinant human α-galactosidase A（rhα-GAL）were studied to establish a more sensitive, simple, accurate and stable method for determining the activity of rhα-GAL. **Methods:** The optimum conditions of the assay system were as follows: 50 mmol·L^{-1} p-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside was used as the substrate, the concentration of the enzyme was 1.67 μg·mL^{-1}, the reaction was accurately carried out in a water bath at 41℃ for 15min, then the reaction was terminated by

作者简介：王绿音，女，硕士，助理研究员，激素类药物质量控制研究。E-mail：wanglvyin@nifdc.org.cn。

* 通信作者：梁成罡，男，研究员，主从事激素类药物质量控制研究。E-mail：liangchenggang@nifdc.org.cn。

李晶，女，主任药师，主要从事激素类药物质量控制研究。E-mail：li_jing@nifdc.org.cn。

为共同通信作者。

glycine buffer （pH10.5）, and the absorbance was measured at 400nm using a microplate reader. **Results:** The method has good specificity. Rhα-GAL showed a good linear relationship with the enzymatic reaction rate in the range of （0.42 ~ 3.33 μg ·mL^{-1}） （r = 0.999 8）. The recoveries of validation solutions at 50%, 80%, 100%, 125% and 200% concentrations were in the range of 94.2%~101.8%（*n*=18）, the CVs of the measured results were between 2.0% and 5.5%（*n*=18）. The CV of 12 independent tests of the same sample was 2.21%（*n*=12）. The effects of slight changes in of water bath temperature, reaction time and substrate concentration in the reaction system on the results were investigated, confirming the good robustness of the method. The reconstituted sample showed good stability when stored at 2~8℃ for 48 h. P-nitrophenol showed a good linear relationship with the absorbance in the range of （0.01 ~ 0.15 mmol·L^{-1}） （r = 0.999 7）. The recoveries of p-nitrophenol solution at five concentrations were in the range of 94.9%~105.1% （*n*=9）, and the CVs were all below 2.0% （*n*=9）.The activity of two rhα-GAL products was determined by this method. **Conclusion：** A chromogenic substrate method was established to determine the activity of recombinant human α-galactosidase A and validated with well sensitivity, precision and accuracy, which can be used for the activity evaluation and quality control of the product.

【Key words】 rare disease products; enzyme replacement therapy; activity assay; chromogenic substrates assay; method validation

罕见病用药是用于治疗、诊断、预防罕见疾病的药品，具有发病率低、诊断难度大、治疗可及性差的特点[1]。溶酶体贮积症（lysosomal storage disorders, LSD）是一种与遗传因素密切相关的代谢性罕见病，由于溶酶体内的酶、转运蛋白或酶修饰剂等缺陷导致代谢物无法被有效降解而在溶酶体中过度贮积，引发进行性的多器官多系统病变[2,3]。法布里病是一种位于 X 染色体上编码 α-半乳糖苷酶 A 基因突变导致的遗传性溶酶体贮积症，已被列入中国首批罕见病目录，酶替代疗法（enzyme replacement therapy, ERT）是目前公认最有效的治疗手段[4,5]，患者需持续终生用药。注射用阿加糖酶 β（Fabrazyme，法布赞）和阿加糖酶 α 注射用浓溶液（Replagal，瑞普佳）分别于 2019 年和 2020 年在我国获准上市，目前尚无国产药物上市[6]。上述两个产品均系利用重组 DNA 技术生产的重组人 α-半乳糖苷酶 A（recombinant human α-galactosidase A, rhα-GAL），这是一种能够特异性催化 α-半乳糖从中性糖鞘脂（neutral glycosphingolipid）分子上水解的人溶酶体酸性水解酶。这种以 α-半乳糖为末端的中性糖鞘脂主要是酰基鞘氨醇三己糖苷（globotriaosylceramide, GL-3），还包括半乳糖神经酰胺（galabiosylceramide）等[7,8]。

重组人 α-半乳糖苷酶 A（EC 3.2.1.22）是一种分子量约为 100kD 的同源二聚体糖蛋白，由 2 个分子量约为 50kD 的亚基组成，每个亚基含 398 个氨基酸。成熟的 rhα-GAL 通过切除信号肽，随后在 4 个 N-连接糖基化位点引入糖链，进行翻译后糖基化修饰，通过甘露糖-6-磷酸（M6P）受体介导的路径靶向进入溶酶体[9]。作为一个结构复杂的糖基化修饰重组蛋白酶，酶活性是反映此类产品有效性的关键质量属性，研究建立特异性强、快速简便、准确稳定的酶活性测定方法对于产品的质量控制至关重要。目前，已上市产品采用可以被 rhα-GAL 催化水解的合成底物来测定其酶活性，分别为荧光底物 4-甲基伞形酮基-α-D-吡喃半乳糖苷和生色底物对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷，通过定量酶解底物产生的荧光分子 4-甲基伞形酮或发色基团对硝基苯酚检测酶活性。荧光底物法利用荧光分光光度计依次测定配制的标准曲线溶液和酶底物反应溶液中 4-甲基伞形酮的荧光值，由于 4-甲基伞形酮的荧光衰减较快，不够稳定，方法的准确性有待提高。与荧光底物法相比，生色底物法检测时间更短，产物对硝基苯酚也更稳定。但该方法采用外标法测定样品反应液中的对硝基苯酚，依赖于经标化的对硝基苯酚标准品，为充分溶解底物，在稀释溶液中加入了乙醇，这不仅会影响酶促反应速率，其挥发性还会导致方法精密度变差。因此，有必要对现有的酶活性测定方法进行优化，进一步提高方法的灵敏度、准确度和精密度。

本研究以酶反应动力学理论为指导，对生色底物法酶活性测定体系中的底物浓度、酶量、缓冲液的 pH 值、反应时间进行了优化，利用对硝基苯酚在 400nm 波长下的摩尔消光系数对该物质进行定量，建立了更灵敏、快速简便、准确稳定的 rhα-GAL 酶活性测定方法，并按照 ICHQ2 进行了方法学研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器 多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司，型号：SpectraMax M5e）；恒温水浴锅（美国 Thermo Scientific 公司，型号：HAAKE S30）；电子天平（METTLER TOLEDO 公司，型号：AG245）；超纯水机（美国 Millipore 公司，型号：Milli-Q IQ7000）。

1.2 试药 rhα-GAL 产品（企业 A，科室留样，批号：DW0305、DW0306、DW0283，每瓶 5mg）；rhα-GAL 产品（企业 B，科室留样，批号：TRVL22A04、TRVJ18A01、TRVB04A06，每瓶 3.5mg，3.5mL），对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷、对硝基苯酚、柠檬酸一水合物、无水磷酸氢二钠、甘氨酸、氢氧化钠、牛血清白蛋白、氯化钠均为分析纯，购自美国 Sigma 公司；实验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

稀释缓冲液 称取柠檬酸一水合物 4.15 g，无水磷酸氢二钠 4.30 g，加水 900 mL，加入 5% 牛血清白蛋白溶液 20 mL，混匀后测定溶液的 pH 值，如有必要，以 1mol·L^{-1} 柠檬酸溶液或 10mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 5.00，加水稀释至 1 000 mL。

底物溶液 称取对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷 15.00 g，加入稀释缓冲液 1000 mL，于室温下搅拌混匀 90 分钟直至完全溶解，制成每 1 L 含对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷 50 mmol 的底物溶液，分装冻存于-80 ℃。

终止缓冲液 称取甘氨酸 37.54 g，加水 900 mL 充分溶解，以 10 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 10.50，加水稀释至 1000 mL。

供试品溶液 取 rhα-GAL，照说明书加注射用水复溶为每 1 mL 含 5 mg rhα-GAL 的溶液，采用稀释缓冲液，先连续进行 2 次 10 倍稀释，再稀释 30 倍，3 次一共稀释 3000 倍，即为每 1 含 rhα-GAL 1.67 mg 的供试品溶液。

空白溶液 稀释缓冲液

2.2 测定方法

于 41 ℃水浴中避光解冻底物溶液，直至所有固体完全溶解，将底物溶液置于 41 ℃保温（不超过 5 小时）。取稀释缓冲液 500 μL，加入终止缓冲液 500 μL，混匀后加入酶标仪配套的光程校正比色皿中，放入酶标仪的比色皿槽中，用于校正最终反应混合液在 96 孔板种的液面光程。

精密量取底物溶液 225 μL 于 1.2mL 微管中，置于 41℃保温 5 分钟。用排枪加入供试品和空白溶液各 25 μL，立即计时，于 41 ℃准确反应 15 min，加入终止缓冲液 250 μL。混匀后取上述各反应混合溶液 200 μL 于透明 96 孔板中，打开酶标仪的光程路径校正，在 400nm 波长下测定空白和供试品溶液的吸光度。在上述条件下，定义每分钟水解底物产生 1 μmol·L^{-1} 对硝基苯酚所需要的酶量为一个酶活性单位 U，按下式计算比活性：

$$比活性=\frac{\Delta OD_{400}\times 稀释倍数\times 20}{\Delta t\times \varepsilon\times C}$$

式中比活性为每 1mg 重组人 α-半乳糖苷酶 A 的酶活性；

ΔOD_{400}为供试品反应液与空白溶液吸光度之差；

Δt为反应时间 15min；

ε为摩尔消光系数 18.3 L·mmol^{-1}·cm^{-1}；

C 为酶浓度，约 5 mg·mL^{-1}；

20 为供试品溶液在反应体系中的稀释倍数；

2.3 方法优化

酶活性测定的本质就是以最大反应速率表征酶量，因此需要对酶促反应体系中的关键实验条件进行优化，使得反应速率趋近于最大反应速率。

2.3.1 底物浓度 取 rhα-GAL，照“2.2”项下方法测定其在底物浓度分别为 0.5、2.5、6.0、12.0、19.2、36.0、42.0、48.0 mmol·L^{-1} 时的酶活性。以底物浓度 S 对比活性作图，得到 Michaelis-Menten 方程，计算酶动力学参数 K_m 和 V_{max}，K_m 为 5.0 mmol·L^{-1}，V_{max} 为 88 U·mg^{-1}。如图 1 所示，当底物浓度足够大时，反应速率趋近于最大反应速率，反应速率不受底物浓度影响，而与酶浓度呈正比。根据酶反应动力学理论，底物浓度通常选择 5~10K_m，本方法

中为 25~50 mmol·L^{-1}，同时还应综合考虑底物分子的溶解性[10]。原方法采用了更高浓度的底物溶液（100 mmol·L^{-1}），为了提高底物的溶解性，采用含乙醇的缓冲液进行配制，有机溶剂的加入不利于酶底物反应，其挥发性也会影响方法的精密度。本实验采用无有机溶剂的稀释缓冲液配制浓度为 50 mmol·L^{-1}（10K_m）的底物溶液，可实现充分溶解。通过进一步优化反应体系中底物和酶的加入体积，最终反应体系中底物与酶的摩尔比高于原方法，更有助于消除底物浓度对酶活性测定的影响。综上，选择 50 mmol·L^{-1} 的底物浓度进行酶活性测定。

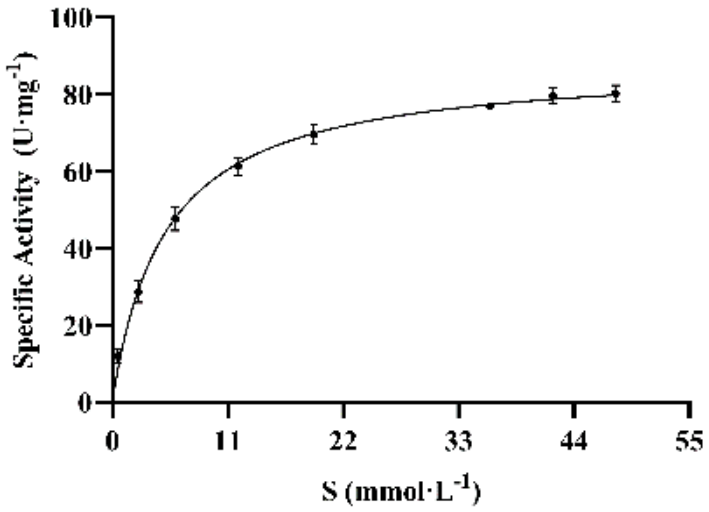


图 1　底物浓度对酶促反应速率的影响（Michaelis-Menten 曲线）（n=3）

Figure 1 Effect of substrate concentration on reaction rate （Michaelis-Menten curve）（n=3）

2.3.2 酶浓度 照“2.2”项下方法测定不同稀释倍数（12000、6000、3000、1500、750、375），对应的酶浓度为 0.42、0.83、1.67、3.33、6.67、13.33 mg·mL^{-1} 的供试品溶液的酶促反应速率 （ΔOD400·min^{-1}），考察酶浓度与反应速率的关系。根据 Michaelis-Menton 方程，当酶浓度远小于底物浓度时，反应速率与酶浓度成正比，当反应体系达到酶饱和后，底物浓度的迅速下降会使得反应速率增加变慢。如图 2B 所示，当加入的酶浓度在 0.42~3.33 mg·mL^{-1} 时，反应速率与酶浓度成线性增加；当加入的酶浓度大于 3.33 mg·mL^{-1} 时，反应速率增加幅度变小，不再与酶浓度成线性关系（图 2A）。由此可见，应选择小于等于 3.33 mg·mL^{-1} 的酶浓度。酶浓度为 3.33 mg·mL^{-1} 时，酶标仪测得的 OD_{400} 为 4.6 左右，超出了仪器的检测上限 4.0。而当酶浓度为 1.67mg·mL^{-1} 时 OD_{400} 读数为 2.8 左右，较好的处于仪器检测范围内，因此反应体系中加入的酶浓度应为 1.67mg·mL^{-1}。

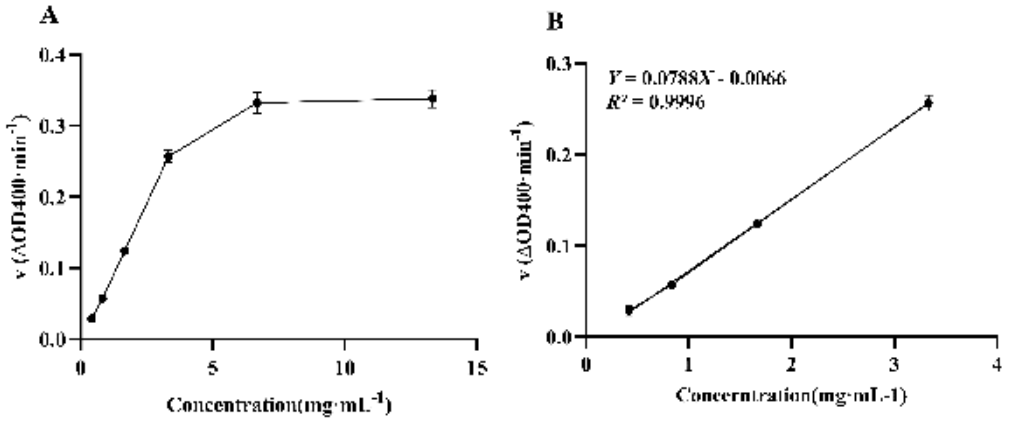


图 2　rhα-GAL 在不同酶浓度下的反应速率（n=3）

Figure 2 Reaction rates of rhα-GAL under different enzyme concentrations（n=3）

2.3.3 反应时间 取 rhα-GAL，照“2.2”项下方法测定不同反应时间（2、5、10、15、20、30min）的酶促反应速率（μmol·L^{-1}·min^{-1}），结果如图 3 所示。在反应时间 2~15min 内，反应速率较为恒定。随着酶催化反应的进行，底物浓度不断降低，反应速率越来越慢。反应时间超过 15min 后，反应速率开始下降。由于反应时间较短时，测定误差较大，本实验选择 15min 作为反应时间进行酶活性测定。

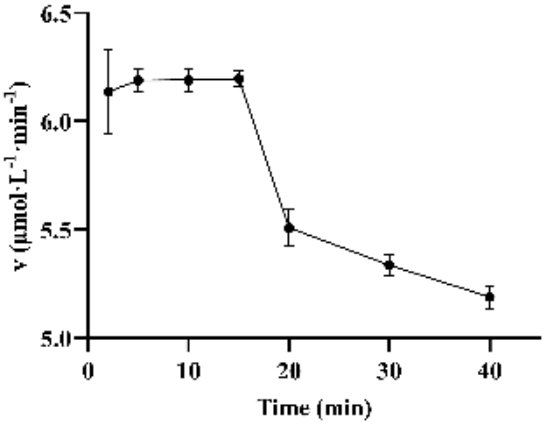


图 3　rhα-GAL 在不同反应时间的反应速率

Figure 3 Reaction rates of rhα-GAL under different reaction time（n=3）

2.3.4 稀释缓冲液的 pH 值 影响酶促反应速率的因素，除上述内因以外，还包括反应 pH、离子强度、反应温度等。为考察不同 pH 值对反应速率的影响，本实验采用不同 pH 值的稀释缓冲液制备供试品溶液。共配制 9 种不同 pH 值的稀释缓冲液，分别为 3.0、4.0、4.3、4.5、5.0、5.5、7.0、8.0 和 9.0。结果如图 4 所示，稀释缓冲液 pH 值为 5.0 时，反应速率最大，酶的催化能力最强。pH 值小于 4 或大于 5.5 时，偏离了最适 pH 范围，过酸或过碱导致酶失活，酶促反应速率显著下降。以 5.0 为最适 pH 值，也与 rhα-GAL 在人溶酶体 pH 为 5 的酸性环境中对底物进行水解的生物学功能相适应。

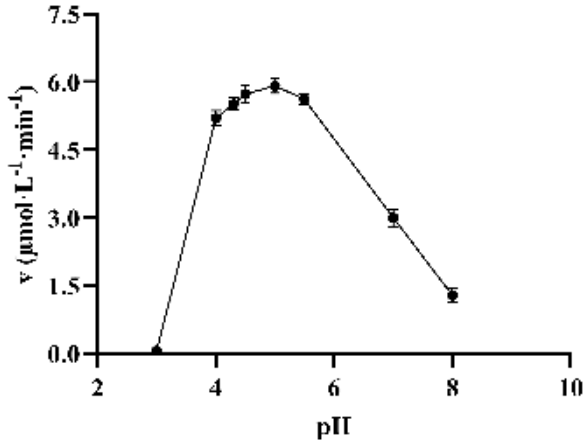


图 4　rhα-GAL 在不同 pH 条件下的反应速率

Figure 4 Reaction rates of rhα-GAL under different pH conditions（n=3）

2.3.5 反应温度和离子强度 作为 ERT 治疗用产品，rhα-GAL 最终进入人体细胞的溶酶体中发挥其水解作用。为更接近人体生理温度，选择 37℃作为方法的反应温度。实验中发现，将装有底物溶液的微管置于温度设置为 37℃的恒温水浴中保温 5 min 后，微管内温度仅为 35.3℃。将水浴温度设定为 41℃静置 5min 后，管内溶液温度可稳定在 37℃，因此水浴温度定为 41℃。在考察离子强度这一影响因素时，尝试配制了 7 种磷酸钠浓度不同的稀释

缓冲液，分别为 5、10、20、30、40、50 和 60 mmol·L^{-1}。结果表明，磷酸钠浓度不同的稀释缓冲液测得的酶活性没有显著差异（419.24、424.71、414.40、421.92、416.56、417.83、414.51 U·mL^{-1}, *P＞0.05）。即在本方法的反应体系中，Na^+的浓度范围为 5~60 mmol·L^{-1}。

3 方法学验证

3.1 专属性

以 rhα-GAL 制剂缓冲液作为辅料空白溶液、以稀释缓冲液代替供试品溶液作为样品空白溶液，取 rhα-GAL 分别按“2.2”项下方法进行测定。辅料空白溶液、样品空白溶液和 rhα-GAL 的吸光度平均值分别为 0.887、0.886、2.734，结果表明样品中的辅料基质对酶活性测定无干扰。

3.2 中间精密度

本验证考察不同实验人员、不同检测时间对方法中间精密度的影响，采用稀释缓冲液对 rhα-GAL 溶液（批号：DW0305）进行稀释，分别稀释 1500、2400、3000、3750、6000 倍，得到 5 个酶浓度为 0.42、0.83、1.67、3.33、6.67、13.33 mg·mL^{-1} 的待测溶液，rhα-GAL 浓度水平分别为 50%、80%、100%、125%及 200%。由 2 名实验人员按“2.2”项下方法在 3 天进行酶活性测定，每天每人重复测定 3 次，每次以 2 份结果的均值为测定值，结果见表 1。5 个浓度水平测定值的平均值分别为：205.21、322.13、403.15、486.11、759.66；变异系数（CV%）分别为 2.00、3.33、3.42、5.53、5.51%，符合中间精密度的可接受标准（≤15%）。

表 1 不同浓度水平 rhα-GAL 酶活性测定结果（n=18）

Table 1 The results of rhα-GAL activity measured at different concentration levels （n=18）

Concentration Levels	Ana1yst A（U·mL^{-1}）			Ana1yst B（U·mL^{-1}）		
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3
50%	201.85	220.85	211.03	208.06	187.13	213.08
	191.84	225.33	208.69	211.54	194.26	217.96
	198.21	215.87	215.87	194.64	188.72	200.27
80%	332.43	352.35	326.21	315.50	307.99	304.37
	324.83	353.81	328.82	309.82	313.37	301.80
	339.12	344.06	331.62	313.37	309.01	290.92
100%	398.22	402.67	407.24	387.26	409.71	423.22
	396.22	406.02	405.08	388.70	391.35	442.87
	395.73	404.70	401.35	384.95	398.69	412.69
125%	511.35	493.00	498.99	472.14	468.08	484.01
	507.79	490.75	496.15	478.95	462.89	496.15
	505.14	492.70	503.02	468.27	458.15	498.99
200%	770.30	769.33	750.63	736.37	752.06	787.74
	767.16	761.14	760.86	739.15	748.88	777.81
	768.73	762.89	747.01	743.61	745.89	784.39

3.3 重复性

取同一批 rhα-GAL（批号：DW0305），由 2 名实验人员分别按“2.1”项下方法平行制备 6 份，在同一天内按“2.2”项下的方法测定酶活性。12 份供试品溶液的测定结果的平均值为 403.10 U·mL^{-1}， CV%为 2.21%，符合重复性的可接受标准（≤10%）。

3.4 准确度

以本文中间精密度和重复性测定结果的平均值作为该批次 rhα-GAL（批号：DW0305）酶活性的参考值（403.13

U·mL^{-1}），以反映测定值与参考值之间的接近程度回收率（回收率%=酶活性测定值/酶活性参考值×100）来评价准确度。表 1 中 5 个浓度水平（50%、80%、100%、125%和 200%）的回收率分别为 94.22%、96.47%、100.01%、99.18%、101.81%，均在 90%~110%范围内，符合准确度的验证标准（75%~125%）。

3.5 线性与范围

以“3.2”项下 5 个待测溶液的酶活性参考值为 *X* 轴，以相应的测定值为 *Y* 轴，线性回归方程为 *Y*=0.9116*X*+0.0679，*r*=0.999 4，斜率接近于 1.0，表明本方法在 50%~200%的浓度水平范围内具有良好的线性。

3.6 耐用性

考察反应温度、反应时间、底物浓度发生微小变化对实验结果的影响。取 rhα-GAL，按照“2.1”项下制备供试品溶液，照“2.2”项下方法，将水浴锅温度分别设置为 40.5、41.0、41.5℃，测定酶活性；将同一份供试品溶液加至底物溶液中，分别反应 14、15、16min 后测定其酶活性；取浓度为 45、50、55mmol·L^{-1} 的底物溶液用于分析同一份供试品溶液的酶活性。结果表明（表 2），上述参数发生微小变化时，测定结果的 CV%均小于 5%，方法的耐用性符合可接受标准（≤10%）。

表 2 耐用性结果

Table 2 Results of robustness

Condition		Activity（U·mL^{-1}）	CV（%）
Temperature（℃）	40.5	391.73	
	41.0	404.65	2.44
	41.5	411.01	
Reaction time（min）	14	400.23	
	15	406.59	1.03
	16	408.08	
Concentration of substrate solution	45	401.60	
（mol·L^{-1}）	50	398.51	0.54
	55	397.46	

3.7 样品溶液的稳定性

取 rhα-GAL 加水复溶后存放于 2~8℃，分别于 0h、8h、24h、48h 取样进行酶活性测定。计算 8h、24h、48h 相对于 0h 酶活性测定结果之比，分别为 98.34%、96.86%、94.12%，均在 90%~110%之间。

3.8 对硝基苯酚的检测范围

本方法定义单位时间内 rhα-GAL 水解底物产生 1 μmol·L^{-1} 对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活性单位，采用消光系数法对产物对硝基苯酚进行定量。因此除了考察酶浓度与酶促反应速率的线性关系以外，还应考察对硝基苯酚与吸光度的线性范围。根据“3.1”项下样品空白溶液的测定结果可知，底物溶液在 400 nm 处存在较高的背景吸光度，因此本文在底物溶液中配制不同浓度的对硝基苯酚。为模拟酶促反应体系，于上述含不同浓度对硝基苯酚的底物溶液中加入等体积的终止缓冲液，通过测定各溶液在 400nm 波长下的吸光度计算对硝基苯酚浓度，从而评价对硝基苯酚在检测范围内的准确度和精密度。

3.8.1 准确度 精密称取对硝基苯酚 27.8 mg 于 25 mL 容量瓶中，加入“2.1”项下的底物溶液溶解并稀释至刻度线，即为对硝基苯酚浓度为 8 mmol·L^{-1} 的底物溶液。采用稀释缓冲液将含 8 mmol·L^{-1} 对硝基苯酚的底物溶液逐步稀释为每 1L 含对硝基苯酚 0.02、0.04、0.10、0.20 和 0.30 mmoL 的底物缓冲液，以底物溶液为空白溶液，同法制备各浓度水平的空白溶液。于上述各溶液中分别加入等体积的终止缓冲液，取 200 μL 于透明 96 孔板中，打开酶标仪的光程路径校正，在 400 nm 波长下测定吸光度，计算各溶液的ΔOD400。共进行 3 次实验，每次实验报告 3 份溶液测定结果的均值，通过消光系数法计算对硝基苯酚的毫摩尔浓度，通过计算回收率（测定值与理论值之比）评价准确度，测定结果见表 3。加入等体积终止缓冲液后，底物溶液中对硝基苯酚理论浓度分别为 0.01、

0.02、0.05、0.10 和 0.15 mmol·L^{-1}，5 个浓度水平的回收率均在 90.0%~110%之间，回收率较好。

3.8.2 线性与范围 以表 3 中对硝基苯酚的理论浓度对 3 次测定的ΔOD400 作图，结果见图 5，线性回归方程为 Y=17.60X+0.0158，r=0.999 7，水解产物对硝基苯酚在 0.01~0.15mmol·L^{-1} 浓度范围内与吸光度呈线性，对应的ΔOD400 范围为 0.183~2.745。

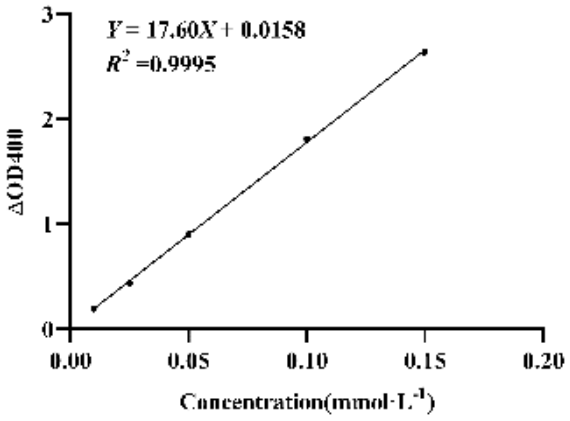


图 5　对硝基苯酚在不同浓度下的吸光度（n=3）

Figure5 Absorbance of p-nitrophenyl under different concentrations（n=3）

3.8.3 精密度 计算表 3 中各对硝基苯酚浓度水平的 CV 值，分别为 0.47%、1.55%、0.93%、0.90%和 0.25%，本方法在 0.01~0.15mmol·L^{-1} 对硝基苯酚范围内的 CV 小于 2%。

表 3 对硝基苯酚验证溶液回收率测定结果（n=9）

Table 3 Recoveries of p-nitrophenyl validation solutions （n=9）

		0.01 （mmol·L^{-1}）	0.025 （mmol·L^{-1}）	0.05 （mmol·L^{-1}）	0.10 （mmol·L^{-1}）	0.15 （mmol·L^{-1}）
Test1	Mean ΔOD40	0.192	0.434	0.894	1.815	2.642
	Experimental（mmol·L^{-1}）	0.010	0.024	0.049	0.099	0.144
	Recovery%	104.74%	94.94%	97.73%	99.19%	96.24%
Test2	Mean ΔOD40	0.193	0.445	0.900	1.790	2.633
	Experimental（mmol·L^{-1}）	0.011	0.024	0.049	0.098	0.144
	Recovery%	105.65%	97.19%	98.39%	97.82%	95.92%
Test3	Mean ΔOD40	0.192	0.432	0.911	1.821	2.629
	Experimental（mmol·L^{-1}）	0.010	0.024	0.050	0.099	0.144
	Recovery%	104.84%	94.40%	99.55%	99.49%	95.76%
Mean Recovery%		105.07%	95.51%	98.56%	98.83%	95.97%

3.9 样品测定

采用本方法对已上市的两种 rhα-GAL 产品进行酶活性测定，每批样品平行制备 3 份，来自生产企业 A 的 3 批 rhα-GAL 产品的比活性分别为 82.37、81.11、84.51 U·mg^{-1}，来自生产企业 B 的 3 批 rhα-GAL 产品的比活性分别为 79.74、88.39 和 85.72 U·mg^{-1}。

4 讨论与结论

我国的罕见病患者人数已超过 2000 万[11]，为改善 ERT 罕见病治疗酶类药物目前完全依赖国外进口的现状，国家大力支持罕见病用药的研制和生产，国内 ERT 罕见病酶类产品的开发正逐渐发展[12,13]。然而 ERT 罕见病酶类产品大多为含有多个糖基化位点的复杂糖蛋白，其质量评价方法，特别是酶活测定方法的开发和验证方案，仍是国内企业开发此类药物的主要技术挑战。作为 rhα-GAL 的关键质量属性，酶活性测定方法的优化与验证不仅有利于推动此类产品的质量标准提升与国际接轨，也为国内同类产品的早期研发、工艺优化、提升产品质量的可控性提供技术支持。

本研究对生色底物法测定体系中的关键因素进行了优化，根据酶反应动力学理论确定了最适底物浓度、酶浓度、反应时间、水浴温度和稀释缓冲液的 pH 值等最适酶促反应条件。采用该条件降低了所使用的底物浓度，解决了高浓度底物不易溶解的问题，避免了助溶剂乙醇的加入，提高了检测的灵敏度。本方法无需使用对硝基苯酚标准品，提高了检测效率，节省了检测成本，可以更灵敏、简便、准确地表征 rhα-GAL 的酶活性。根据 ICHQ2 对所建立的方法进行了完整的方法学验证，采用 50%、80%、100%、125%和 200%共 5 个不同的酶浓度水平评价方法的中间精密度和准确度，通过对同一份供试品溶液的 12 次测定评价重复性。此外，微调酶促反应温度、反应时间和底物浓度并未给实验结果带来明显变化。复溶后的样品于 2~8℃存放 48h 后，溶液稳定性较好。为确保产物对硝基苯酚在其检测范围内可被准确定量，采用底物溶液配制 5 个不同浓度的对硝基苯酚溶液，考察对硝基苯酚浓度与吸光度的线性关系，通过计算各浓度水平测定值相对于其理论值的回收率百分比以及各浓度水平 9 个测定结果的 CV 考察对硝基苯酚检测范围内的准确度和精密度。最后，采用本研究建立的方法对不同企业的 rhα-GAL 产品进行了酶活性测定。

综上所述，本研究优化建立了一种生色底物法测定重组人 α-半乳糖苷酶 A 的酶活性。与现有方法相比，本方法操作更简便、灵敏度更高、结果更稳定准确，可作为常规检验方法用于 rhα-GAL 产品的质量控制。

参考文献

[1] SUN YH, LIU SW. The development status and path of diagnosis and treatment of rare diseases and orphan drugs in China [J]. Chinese Pharmacological Bulletin（中国药理学通报），2023, 39（4）: 601–605.

[2] LIU Y, WU BB, WU XH, et al. Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology [J]. Journal of Jinan University（暨南大学学报），2013, 34（4）: 360–366.

[3] PASQUALE VD, SCARCELLA M, PAVONE ML. Molecular Mechanisms in Lysosomal Storage Diseases: From Pathogenesis to Therapeutic Strategies [J]. Biomedicines，2022, 10（4）: 922–925.

[4] DENG ML, ZHOU HY, ZHENG KX, et al. Expression, purification and functional verification of recombinant human α-galactosidase A in suspension CHO-S[J]. Chinese Pharmacological Bulletin（中国药理学通报），2023, 39（4）: 774–781.

[5] VAN DER VEEN S J., HOLLAK C E.M., VAN KUILENBURG A B.P., et al. Developments in the treatment of Fabry disease [J]. Journal of inherited metabolic disease，2020, 43（5）: 908–921.

[6] CHENG SY, KOU YZ, LUO JH. Research progress of enzyme replacement therapy for rare diseases products and their pharmaceutical assessment[J]. Chin Pharm J（中国药学杂志），2020, 55（13）: 1128–1132.

[7] GUCE AI, CLARK NE, SALGADO EN, et al. Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase[J]. J Biol Chem，2010, 285（6）: 3625–3632.

[8] MODREGO A, AMARANTO M, GODINO A, et al. Human α-galactosidase A mutants: priceless tools to develop novel therapies for Fabry Disease[J] . International Journal of Molecular Sciences , 2021, 22, 6518: 1–17. https://doi.org/10.3390/ijms22126518

[9] SHEN JS, BUSCH A, DAY TS, et al. Mannose receptor-mediated delivery of moss-made alpha-galactosidase A efficiency corrects enzyme deficiency in Fabry mice[J]. Journal of inherited metabolic disease，2016, 39（2）: 293–303.
[10] ZHANG F, CHENG LF, CAO H, et al. Optimization of lipase activity assay system based on enzyme reaction kinetic theory[J]. China Oils and Fats （中国油脂），2023,48（5）: 146–152.
[11] YU HY, ZHOU LR. Current situation of medicine supply policy for patients with rare disease in China and considerations on improvement[J]. Evaluation and analysis of drug-use in hospitals of China （中国医院用药评价与分析），2023,23（5）: 632–636.
[12] CAO YS, YANG Y, LIU MZ, et al. Expression and characterization of UCE, a key enzyme of lysosomal hydrolase to synthesize mannose-6-phosphate[J]. Chin Med Biotechnol（中国医药生物技术），2022,17（6）: 481–487.
[13] RANG WL, TAN YX, WANG YL, et al. Expression and identification of recombinant human α-galactosidase A in CHO cells [J]. Military Med（军事医学），2011,35（1）: 54–57.

体外仿生骨肉瘤模型的构建和在发掘新型药物分子靶标上的应用

王美棱[1]，徐念远[1]，李俊[1]，汤睿智[2*]，刘熙秋[1*]

（1.华中科技大学药学院、武汉市航空路 13 号、430030；2.武汉市中心医院、武汉市胜利街 26 号、430014）

骨肉瘤（Osteosarcoma，OS）是一种多发于儿童和青少年的侵袭性骨癌，目前接受治疗的病人 5 年生存率维持在 60-70%的水平，临床发现时多已发生肺转移，复发后死亡率高，5 年生存率只有 20%左右且 30 年来无明显提高[1]。虽然生物材料已被广泛应用于 3D 软组织肿瘤模型的制备，但基于 3D 生物材料的 OS 模型用于 OS 病理和药物发现的潜力仍未开发。以前对 OS 的研究主要依赖于 2D 培养，这往往无法真实模拟体内肿瘤的微环境，因此预测药物分子靶标和体内药物反应的能力较差[2]。随着组织工程学 3D 癌症模型的不断发展，与 2D 培养相比，它作为一种新的癌症研究工具能更好地重现体内肿瘤的侵袭转移、信号通路和药物反应[3]。在本课题组前期的研究中发现[4]，在仿生人体骨骼物理形貌和力学性质的 3D 打印支架上形成的体外骨肉瘤 3D 模型中，细胞的形态、功能和特征标志物的表达与临床骨肉瘤样本具有高度的一致性，从而证明了模拟基质微环境对肿瘤发生发展的重要性（*Materials Today Bio*，2022）。

骨具有高矿物质含量的特点，含有 70%的矿物质[5]，本文为了模拟骨骼的矿化，使用纳米羟基磷灰石（Hydroxyapatite，HAp）并通过添加可生物降解的 β-磷酸钙（Tricalcium phosphate，β-TCP）得到可控的生物降解速率和生物稳定的多孔陶瓷支架，进行 OS 细胞培养，以阐明 OS 在发展过程中的信号转导和药物反应中的作用机制。通过采用光固化成型技术，选用具有生物相容性良好的材料 HAp 和可生物降解的材料 β-TCP，开展陶瓷浆料 HAp 和 β-TCP 的组分设计，优选成形、脱脂、烧结等工艺参数，制备出了不同质量比的 β-TCP/HAp 多孔支架，制备流程如 Fig. 1 所示。用扫描电子显微镜（SEM）观察了烧结后的表面微观结构，所有支架都形成了致密的微观结构，大孔结构相互连通。经 X 射线衍射实验验证，HAP 峰随着 β-TCP/HAp 比例的增加而逐渐减少，并向 TCP 峰移动。纳米压痕方法得到支架的硬度以及杨氏模量符合密质骨的力学参数范围。综上，本研究制备的 TCP/HAp 多孔支架能够满足 OS 体内所需矿物质成分、物理形貌和力学性质等条件，满足了模拟骨基质微环境的条件，为后续 OS 信号传导和药物作用机制研究奠定基础。

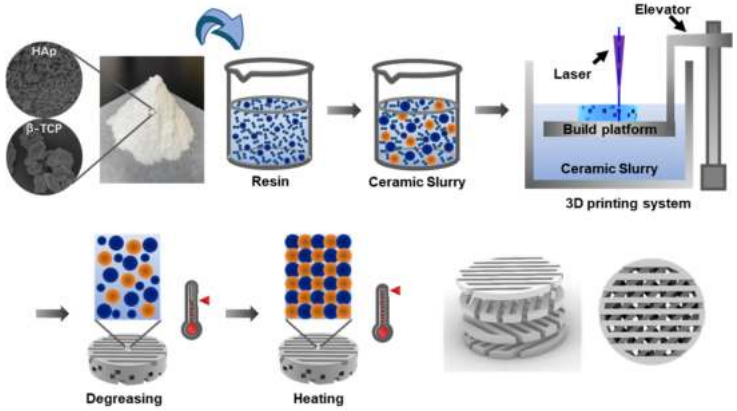


Fig. 1. A schematic summarizing the workflow for β-TCP/HAp porous scaffold preparation.

致谢：感谢华中科技大学分析测试中心提供的技术支持。本工作得到国家自然科学基金（82072083）、华中科技大学人才资助（5003514058）、武汉市中心医院科研基金（21YJ03）和学科建设计划（2021XK071）的支持。

随后通过 CCK-8 以及活死细胞染色对支架的生物相容性进行验证。结果显示在 TCP/HAp 比例较低时，细胞具有更好的增殖效果，活细胞也数量更多，说明具有良好生物相容性的 TCP/HAp 支架具有促进 OS 细胞生长的作用。使用 phalloidin 染色以及 SEM 成像观察细胞在支架上的形态。与传统的 2D 单层培养（TCPS）以及 3D 球囊培养（Spheroid）相比，第三天时，OS 细胞在支架上的扩散距离更大，并且观察到细胞与细胞、细胞与支架之间相互连接的 F-actin 长丝。SEM 成像如 Fig. 2 所示，支架上培养的 OS 细胞具有更大的铺展面积，伪足伸展更多。

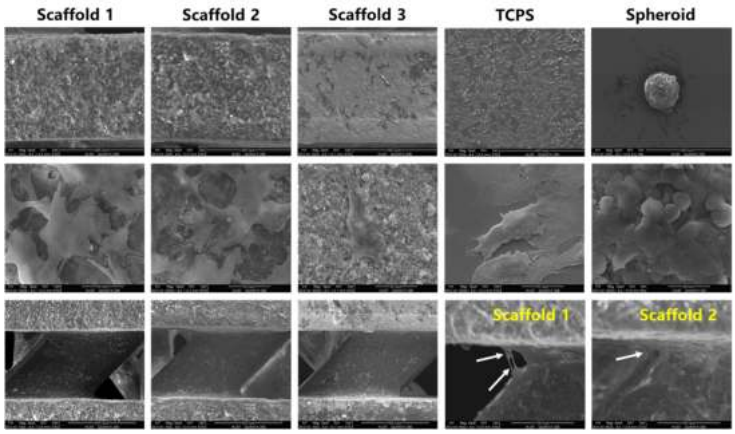


Fig. 2. SEM images of OS cells cultured in five conditions.

已知 OS 基因复杂性高且易于转移，转移形成是 OS 患者死亡的重要原因。本研究利用 TCP/HAp 多孔支架研究 OS 的上皮-间充质转化（Epithelial-mesenchymal transition，EMT）过程，这是肿瘤转移的一个重要阶段。免疫荧光染色结果显示，在 TCP/HAp 多孔支架中，上皮标志物 E-cadherin 的表达下调，而间充质标志物 Vimentin 表达上调，但在 TCPS 和 Spheroid 模型中的表达模式正好相反。说明在仿生支架中培养的 OS 细胞更多呈现为间充质细胞表型，其恶性程度更高，更容易发生转移，与 OS 的临床性状更为接近。

与原位肿瘤相比，许多转移瘤表现出不同的代谢特征，因此我们用代谢组学的方法分析了细胞培养上清。共鉴定了 800 余种代谢物，其中差异代谢物>400 个。代谢物主要集中在脂质、氨基酸、胆汁酸中，脂质代谢中的脂肪酸和不饱和脂肪酸的生物合成、亚油酸代谢等代谢通路主要富集在支架培养的 OS 模型中，结果由 Fig. 3 所示，提示 EMT 过程中的脂质代谢活跃，针对脂质代谢可能是抑制 OS 转移的潜在治疗策略。

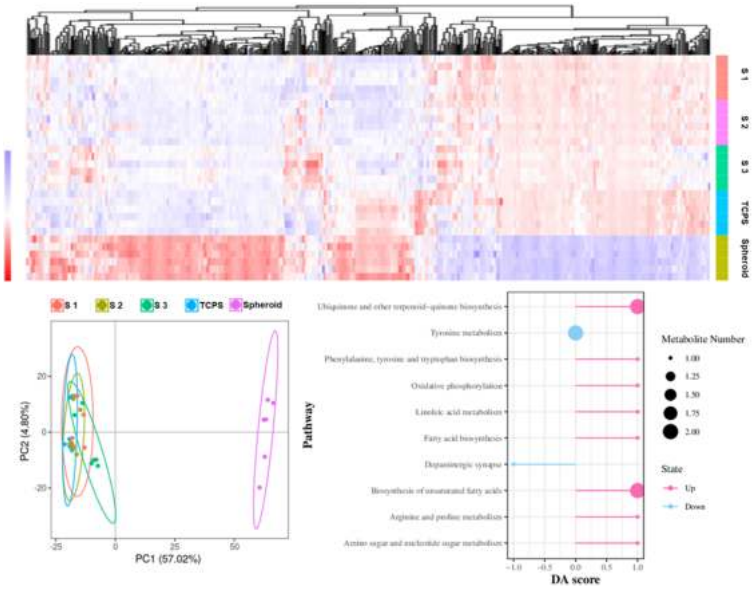


Figure 3. The Metabolism analysis of OS cells in five conditions.

脂肪酸是合成代谢和分解代谢过程中的重要燃料，可以从头合成或从细胞外吸收。细胞内的游离脂肪酸含量测定结果显示支架中的游离脂肪酸含量最多。进一步通过 Western blot 实验发现支架培养的 OS 模型中脂肪酸合成酶（Fatty acid synthase，FASN）出现显著性高表达，且受 PI3K-AKT 通路调控。因此，FASN 具备成为治疗 OS 的新型药物分子靶标的潜力，使用 PI3K-AKT 通路抑制剂（如 alpelisib、rapamycin 等）联合 FASN 抑制剂（如 cerulenin 等）可成为晚期 OS 新的治疗方法。

综上所述，3D 打印 TCP/HAp 多孔支架在力学性能、细胞反应等方面能够更好地模拟 OS 体内微环境。结合代谢组学分析发现，OS 细胞在支架上呈现出 EMT 现象并表现出脂质代谢活跃的特征。参与脂质代谢的 FASN 过表达受 PI3K-AKT 通路调控，可能成为晚期 OS 治疗的新靶点。我们的研究还发现，传统 2D 和 3D 培养可能会遗漏重要的 OS 药物靶点，而使用体外仿生 OS 模型有助于新型药物分子靶标的发掘和药物的高通量筛选。未来我们还将基于此模型研究患者特定的 OS 异质性和耐药机制。

【关键词】体外仿生骨肉瘤模型；3D 打印多孔支架；上皮-间质转化；新型药物分子靶标；肿瘤代谢

参考文献

[1] Izadpanah, S. , Shabani, P. , Aghebati-Maleki, A. et al. Prospects for the involvement of cancer stem cells in the pathogenesis of osteosarcoma[J]. J. Cell Physiol. 2020, 235, 4167-4182.

[2] E. L. S. Fong, S.-E. Lamhamedi-Cherradi, E. Burdett, V. et al. Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds[J]. Natl. Acad. Sci. 2013, 110, 6500-6505.

[3] Bian, S., Repic, M., Guo, Z. et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation[J]. Nat Methods, 2018, 15, 631–639.

[4] M.L. Wang, N.Y. Xu, R.Z. Tang, X.Q. Liu. A 3D-printed scaffold-based osteosarcoma model allows to investigate tumor phenotypes and pathogenesis in an in vitro bone-mimicking niche[J]. Mater. Today Bio. 2022, 15, 100295.

[5] Sommerfeldt, .D., Rubin, .C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton[J]. Eur. Spine. J. 2001, 10 (Suppl 2), S86–S95.

基于代谢组学研究甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的个体差异

王敏[1,2]，束庆[1,2]，张天祺[1,2]，罗雪梅[1,2]，柳航[1,2]，朱怀军[1,2]，葛卫红[1,2*]

（1. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，江苏 南京 210008；2. 南京临床药学中心，江苏 南京 210008）

【摘要】目的：寻找与甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎个体差异相关的生物标志物，从代谢调控角度解释甲氨蝶呤的个体差异。**方法：**选取2018年1月1日至2019年12月31日南京鼓楼医院风湿免疫科接受甲氨蝶呤规范化治疗的成年类风湿关节炎患者，收集患者的临床信息，依据治疗前后28个关节疾病活动度-血沉（DAS28-ESR）评分划分成甲氨蝶呤治疗有效组（22例）和无效组（17例）。借助超高效液相-四极杆-飞行时间质谱法采集两组患者的血清代谢轮廓谱，采用主成分分析和偏最小二乘判别分析等方法进行数据处理，筛选出甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎个体差异相关的生物标志物和代谢通路。**结果：**有效组和无效组患者接受甲氨蝶呤治疗前的红细胞沉降率、C反应蛋白和DAS28-ESR评分均无统计学差异；接受甲氨蝶呤治疗6个月后，有效组红细胞沉降率、C反应蛋白和DAS28-ESR评分显著低于无效组。甲氨蝶呤治疗有效组和无效组的血清代谢轮廓谱差异明显，与无效组相比，有效组9个差异代谢物水平下降，包括肉豆蔻酸、棕榈酸、色氨酸和尿苷等；27个代谢物水平上升，包括甘氨胆酸、鞘氨醇-1-磷酸、溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺等。这些差异代谢物主要聚焦于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、色氨酸代谢和酪氨酸代谢等通路。**结论：**本研究采用代谢组学方法，挖掘甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎有效组和无效组内源性代谢物的差异，从代谢调控角度探讨了甲氨蝶呤的个体差异。

【关键词】 甲氨蝶呤；类风湿关节炎；个体差异；代谢组学

Study the individual differences of patients with rheumatoid arthritis to methotrexate therapy based on metabolomics

WANG Min[1,2], SHU Qing[1,2], ZHANG Tian-qi[1,2], LUO Xue-mei[1,2], LIU Hang[1,2], ZHU Huai-jun[1,2], GE Wei-hong[1,2]

(1. Department of Pharmacy, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Jiangsu Nanjing 210008, China; 2. Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy, Jiangsu Nanjing 210008, China)

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To find out the biomarkers associated with the response to methotrexate (MTX) therapy in rheumatoid arthritis (RA), and explain the individual differences of MTX therapy from the perspectives of metabolomics. **METHODS**：RA patients who received MTX therapy from January 1, 2018 to December 31, 2019 in Rheumatology and Immunology Department of Nanjing Drum Tower Hospital were enrolled in this study. The clinical data of patients were collected. The patients were divided into the effective and non-effective groups of RA patients receiving MTX therapy based on the difference of 28-Joint disease activity score-ervthrocvte sedimentation rate before

基金项目 国家自然科学基金（编号：82204846）；江苏省医学创新团队项目（编号：CXTDA2017041）；南京市卫生科技发展专项资金-医学重点科技发展项目（编号：ZKX21016）；南京鼓楼医院临床研究专项资金（编号：2022-LCYJ-PY-14；2021-LCYJ-PY-37）

作者简介 王敏，女，副主任药师，电话：025-83106666，E-mail: wangmin19881013@126.com

*通讯作者 葛卫红，女，主任药师，博士生导师，电话：025-83106666，E-mail: 6221230@sina.com

and after MTX therapy. Ultra-performance liquid chromatography- quadrupole/time-of-flight mass spectrometry was adopted to acquire the serum profiles. Then principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis were conducted to find out the biomarkers and metabolic pathways associated with the response to MTX therapy. **RESULTS**：There were no significant differences in erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, and DAS28-ESR score between the effective and non-effective groups before MTX therapy. After six months of MTX therapy, the effective group showed significantly lower erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, and DAS28-ESR score as compared with the non-effective group. There existed obvious difference of the metabolic profiles between the effective and non-effective groups. As compared with the non-effective group, nine differential metabolites (i.e., myristic acid, palmitic acid, tryptophan, uridine, etc.) were reduced, while twenty-seven metabolites (i.e., glycocholic acid, sphingosine 1-phosphate, lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylethanolamine, etc.) were elevated in the effective group. These differential metabolites participated in phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, tryptophan metabolism, tyrosine metabolism and so on. **CONCLUSION**：Our study adopted metabolomics to dig out the differential metabolites between the effective and non-effective groups of RA patients receiving MTX therapy, and explored the individual differences of MTX therapy from the perspectives of metabolomic profiles.

【KEY WORDS】Methotrexate; Rheumatoid Arthritis; Individual Differences; Metabolomics

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis, RA）是一种以慢性、对称性、多关节炎症为特征的全身性自身免疫性疾病，其侵犯的靶器官主要是关节滑膜，也可侵犯肺部、心脏、血管、神经和眼等关节外器官[1]。美国风湿病学会（American College of Rheumatology, ACR）[2]和欧洲抗风湿病联盟（European League Against Rheumatism, EULAR）[3]有关类风湿关节炎治疗的指南均建议，一经诊断立即治疗。甲氨蝶呤（methotrexate）是治疗 RA 的基本药物，被称为治疗 RA 的“锚定药物”[4]。

甲氨蝶呤为叶酸还原酶抑制剂，最开始用于治疗肿瘤。上世纪 80 年代开始用于 RA 的治疗[5, 6]，具有抗炎、缓解关节肿痛、改善全身症状以及延缓疾病进程的作用。然而，临床上不是所有接受甲氨蝶呤规范化治疗的 RA 患者都能从中获益，约 1/3 的 RA 患者甲氨蝶呤治疗无效[7, 8]。因此，揭示甲氨蝶呤个体差异的内在原因对于提高 RA 治疗有效率具有重要的意义。Medcalf MR 等[9, 10]相继发表了有关 RA 患者接受甲氨蝶呤治疗前后（20 例），以及甲氨蝶呤治疗有效组（11 例）和无效组（9 例）机体内源性初级代谢产物、生物胺和脂质水平的差异。蔡萧君等[11]在动物水平上研究灌服甲氨蝶呤后大鼠体内内源性代谢物水平的变化。目前有关甲氨蝶呤治疗中国 RA 患者个体差异的非靶向代谢组学研究尚无文献报道。

鉴于此，本研究采用基于超高效液相-四极杆-飞行时间质谱法（ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q/TOF-MS）的代谢组学技术，挖掘甲氨蝶呤治疗有效组和无效组内源性代谢物的差异，从代谢调控角度揭示甲氨蝶呤个体差异的机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2018 年 1 月 1 日至 2019 年 12 月 31 日南京鼓楼医院风湿免疫科收治的 RA 患者。本研究经南京大学医学院附属鼓楼医院医学伦理委员会批准（批准号：2017-100-01）。

纳入标准[10]：符合 ACR/ EULAR 制定的 RA 诊断标准；中重度 RA 患者，28 个关节疾病活动度-血沉（28-Joint disease activity score-ervthrocvte sedimentation rat, DAS28-ESR）评分大于 3.2；年龄大于 18 岁；自愿签订知情同意书；接受甲氨蝶呤治疗前三个月未接受免疫抑制剂治疗；资料完整。

排除标准：合并其他风湿免疫性疾病者，如系统性红斑狼疮、干燥综合征等；妊娠期和哺乳期的女性；合并肝、肾及造血系统等严重疾病患者；未完成疗程、疗程中断患者；临床资料不全。

1.2 患者分组

DAS28-ESR 包括人体 28 个关节的压痛计数、肿胀计数、红细胞沉降率以及患者的自身综合评估 4 个项目。记录 RA 患者接受甲氨蝶呤治疗前 DAS28-ESR 评分，以及接受甲氨蝶呤治疗 6 个月后 DAS28-ESR 评分，并计

算治疗前后 DAS28-ESR 评分差异，记录为 ΔDAS28-ESR。将 ΔDAS28-ESR＞1.2 且规范化治疗后 DAS28-ESR≤3.2 定义为治疗有效，将 ΔDAS28-ESR≤1.2 或规范化治疗后 DAS28-ESR＞3.2 定义为无效组[12]。

1.3 样本前处理

RA 患者接受甲氨蝶呤治疗 6 个月后，于早晨 8 点-9 点间采集患者空腹静脉血 2mL，3 000rpm 离心 10min 取血清样本，置于-80℃冰箱冻存待用。精密量取血清样本 40 μL，置 1.5 mL 塑料离心管中，加入乙腈 160 μL，涡旋 5 min，高速离心（4℃，14 000 rpm，15 min）后，上清液移至 1.5 mL 塑料离心管中，再次高速离心（4℃，14 000 rpm，15 min）后所得的上清供 LC-MS 分析。

1.4 样本分析

色谱条件： ExionLC AD 型超快速高效液相色谱仪（日本 Shimadzu 公司），色谱柱为 Kinetex C18（2.6μm, 100 mm×2.1 mm），柱温为 40 ℃，进样器温度为 4 ℃。流动相为 0.1%甲酸水溶液（A）-乙腈（B）二元梯度系统（0-1min，90%-70%A；1-19min，70%-5%A；19-20min，5%A）。流速为 0.4 mL/min，进样体积为 5 μL。

质谱条件： TripleTOF5600+型高分辨质谱（美国 AB SCIEX 公司），电喷雾正离子和负离子监测模式，一级质谱质量扫描范围（m/z）：50-1 000，二级质谱质量扫描范围（m/z）：50-1 000，雾化气和辅助加热气：55 psi，气帘气：35 psi，碰撞能：35V，碰撞能分散度：15 V。

1.5 数据统计

质谱原始数据文件经 MSConvert 转换为 mzXML 格式后，用 XCMS 软件对数据进行解卷积、峰识别、峰对齐和保留时间校正等处理，得到包含保留时间、质荷比和峰面积的数据矩阵。所得数据矩阵经过“80%规则”、缺失值填补、归一化和标尺化等处理后[13]，导入 SIMCA-P（version 13.0，Umetrics Sweden）软件进行主成分分析（principle component analysis, PCA）和偏最小二乘法判别分析（partial least squares-discriminate analysis, PLS-DA）。基于 PLS-DA 模型参数变量投影重要性参数（variable importance in the projection，VIP）大于 1，以及 Mann-Whitney U 检验 P<0.05 筛选差异变量[13]。差异变量的鉴定按照以下步骤进行：首先整理差异变量的保留时间、一级和二级质谱信息，其次将差异变量的一级和二级质谱信息导入 HMDB 数据库进行检索，匹配代谢物信息；最后将代谢物与实验室已有标准品比对保留时间和质谱信息，完成差异变量的鉴定。将鉴定的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 数据库中进行代谢通路分析。

2 结果

2.1 患者基本特征

共纳入 39 例患者，其中甲氨蝶呤治疗有效组 22 例，无效组 17 例。两组患者性别、年龄、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、尿素氮、肌酐、治疗前红细胞沉降率、治疗前 C 反应蛋白、治疗前 DAS28-ESR 评分和甲氨蝶呤剂量均无统计学差异（P>0.05）。治疗后，甲氨蝶呤治疗有效组的红细胞沉降率、C 反应蛋白和 DAS28-ESR 评分显著低于甲氨蝶呤治疗无效组（P<0.05），Δ 红细胞沉降率、ΔC 反应蛋白和 ΔDAS28-ESR 显著大于甲氨蝶呤治疗无效组（P<0.05）。

表 1 患者一般资料

Tab 1 Clinical characteristics of the RA patients

项目	有效组	无效组	P
患者数	22	17	
年龄/岁	48.45±8.60	52.82±9.11	0.163
性别（男/女）	6/16	3/14	0.479
谷草转氨酶（$U\cdot L^{-1}$）	22.83±5.10	21.76±5.80	0.524
谷丙转氨酶（$U\cdot L^{-1}$）	24.69±5.41	22.50±6.31	0.315
尿素氮（$mmol\cdot L^{-1}$）	5.04±0.81	5.27±1.26	0.671
肌酐（$\mu mol\cdot L^{-1}$）	80.91±13.23	81.24±12.15	0.910
甲氨蝶呤剂量（$mg\cdot week^{-1}$）	9.66±1.60	10.29±1.50	0.279

治疗前红细胞沉降率/（$mm \cdot h^{-1}$）	51.64±7.72	50.24±10.03	0.495
治疗后红细胞沉降率/（$mm \cdot h^{-1}$）	23.41±5.81	42.47±9.22	<0.001
Δ 红细胞沉降率/（$mm \cdot h^{-1}$）	28.23±6.77	7.76±4.29	<0.001
治疗前 C 反应蛋白/（$mg \cdot L^{-1}$）	46.71±10.53	43.78±13.19	0.496
治疗后 C 反应蛋白/（$mg \cdot L^{-1}$）	14.94±6.86	34.06±11.18	<0.001
ΔC 反应蛋白/（$mg \cdot L^{-1}$）	31.78±8.74	9.71±6.61	<0.001
治疗前 DAS28-ESR 评分	5.18±0.79	4.99±0.98	0.401
治疗后 DAS28-ESR 评分	2.75±0.74	4.35±1.01	<0.001
ΔDAS28-ESR 评分	2.44±0.52	0.65±0.26	<0.001

2.2 典型色谱图

甲氨蝶呤治疗有效组和无效组典型色谱图如图 1 和图 2 所示。

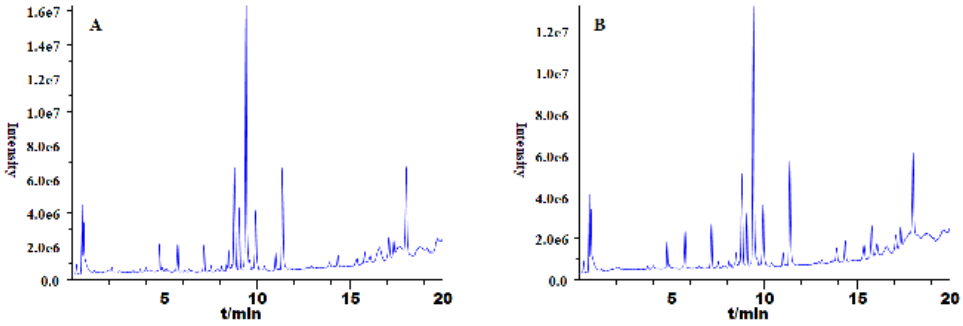


图 1 甲氨蝶呤治疗有效组（A）和无效组（B）正离子模式下的典型色谱图

Fig 1 The typical chromatographs for the effective (A) and non-effective (B) groups of RA patients receiving MTX treatment in positive detection mode

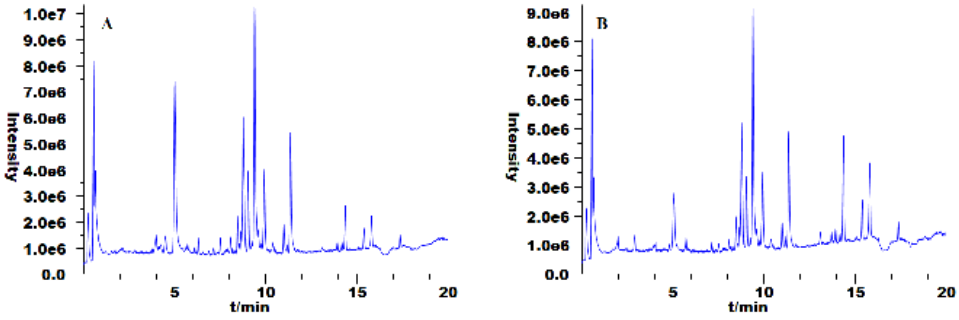


图 2 甲氨蝶呤治疗有效组（A）和无效组（B）负离子模式下的典型色谱图

Fig 2 The typical chromatographs for the effective (A) and non-effective (B) groups of RA patients receiving MTX treatment in negative detection mode

2.3 多元统计分析

正、负离子模式下采集的 UPLC-Q/TOF-MS 原始图谱经数据预处理后，导入 SIMCA-P 软件进行 PCA。PCA 得分图如图 3 所示。从图中可知，质控样本聚集在一起，提示分析方法稳定可靠[14, 15]；甲氨蝶呤治疗有效组和

无效组分布于椭圆形 95%置信区间的两个区域，提示两组样本的代谢轮廓存在差异。

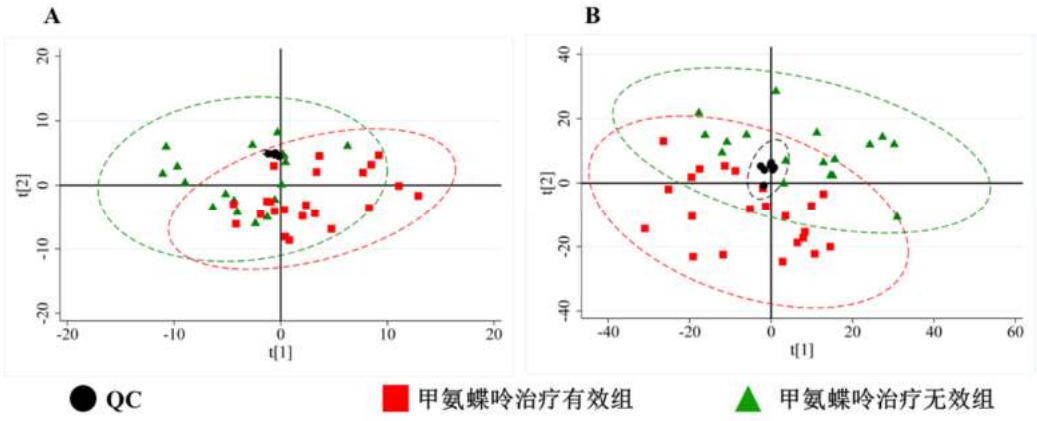


图 3 正离子模式（A）和负离子模式（B）的 PCA 得分图

Fig 3 PCA score plots in positive (A) and negative (B) detection modes

甲氨蝶呤治疗有效组和无效组 PLS-DA 分析显示，正离子检测模式 PLS-DA 模型参数为 R2X=0.262，R2Y=0.962，Q2=0.743；负离子检测模式 PLS-DA 模型参数为 R2X=0.274，R2Y=0.996，Q2=0.873。PLS-DA 得分图（见图 4）显示有效组和无效组分离明显。

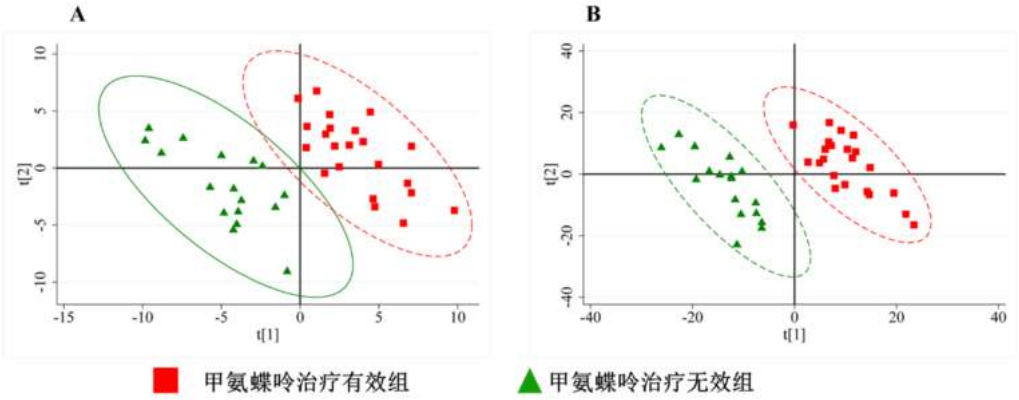


图 4 正离子模式（A）和负离子模式（B）的得分图 PLS-DA

Fig 4 PLS-DA score plots in positive (A) and negative (B) detection modes

2.4 差异代谢物信息

整合采用 PLS-DA 模型参数 VIP >1 和 Mann-Whitney U 检验 $P<0.05$，筛选甲氨蝶呤治疗有效组和无效组的差异代谢物，共鉴定出 39 个组间差异代谢物。将这 39 个差异代谢物与 Δ DAS28-ESR 评分做 Spearman 相关分析，参考文献报道[16]，以相关系数 0.3 为标准，进一步筛选差异代谢物。其中，吲哚-3-丙酸、十二烷酰基肉碱和十四碳二烯酰基肉毒碱与 Δ DAS28-ESR 的相关系数低于 0.3，则不用于后续分析。最终保留的 36 个差异代谢物信息见表 2，相关分析结果见图 5。与甲氨蝶呤治疗无效组相比，有效组 9 个差异代谢物水平下降，包括肉豆蔻酸、棕榈酸、色氨酸和尿苷等；27 个代谢物水平上升，包括甘氨胆酸、鞘氨醇-1-磷酸、溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺等。依据代谢物结构特征，36 个差异代谢物可归属于甘油磷脂类（20 个）、氨基酸类（4 个）、脂肪酸类（4 个）及其他类（8 个）。

表 2 差异代谢物信息

Tab 2 The information of differential metabolites

保留时间	质荷比	加和离子	质量准确度/ppm	代谢物	分子式	有效组 vs 无效组
7.16	583.2574	[M-H]-	2	胆红素	C33H36N4O6	↑
11.36	566.5553	[M-H]-	6	神经酰胺 d18:0/18:0	C36H73NO3	↑
10.70	199.1711	[M-H]-	4	十二烷酸	C12H24O2	↓
0.60	105.0192	[M-H]-	1	甘油酸	C3H6O4	↑
4.15	464.3053	[M-H]-	3	甘氨胆酸	C26H43NO6	↑
0.57	145.0616	[M-H]-	6	L-谷氨酰胺	C5H10N2O3	↓
1.21	203.0830	[M-H]-	2	L-色氨酸	C11H12N2O2	↓
0.75	182.0809	[M+H]+	1	L-酪氨酸	C9H11NO3	↑
9.39	409.2374	[M-H]-	3	溶血磷脂酸 16:0	C19H39O7P	↑
8.82	457.2376	[M-H]-	3	溶血磷脂酸 20:4	C23H39O7P	↑
9.90	522.3548	[M+H]+	1	溶血磷脂酰胆碱 18:1	C26H52NO7P	↑
9.20	590.3477	[M+FA-H]-	2	溶血磷脂酰胆碱 20:3	C28H52NO7P	↑
8.82	544.3356	[M+H]+	8	溶血磷脂酰胆碱 20:4	C28H50NO7P	↑
8.78	542.3219	[M+H]+	5	溶血磷脂酰胆碱 20:5	C28H48NO7P	↑
9.28	570.3537	[M+H]+	3	溶血磷脂酰胆碱 22:5	C30H52NO7P	↑
8.81	568.3375	[M+H]+	4	溶血磷脂酰胆碱 22:6	C30H50NO7P	↑
8.55	568.3376	[M+H]+	4	溶血磷脂酰胆碱 22:6	C30H50NO7P	↑
9.25	452.2788	[M-H]-	1	溶血磷脂酰乙醇胺 16:0	C21H44NO7P	↑
9.74	480.3071	[M+H]+	3	溶血磷脂酰乙醇胺 18:1	C23H46NO7P	↑
8.61	478.2915	[M+H]+	3	溶血磷脂酰乙醇胺 18:2	C23H44NO7P	↑
7.68	476.2750	[M+H]+	5	溶血磷脂酰乙醇胺 18:3	C23H42NO7P	↑
10.40	510.3535	[M+H]+	4	溶血磷脂酰乙醇胺 20:0	C25H52NO7P	↑
8.75	502.2881	[M+H]+	9	溶血磷脂酰乙醇胺 20:4	C25H44NO7P	↑
10.79	536.3693	[M+H]+	3	溶血磷脂酰乙醇胺 22:1	C27H54NO7P	↑
8.44	526.2909	[M+H]+	4	溶血磷脂酰乙醇胺 22:6	C27H44NO7P	↑
8.69	526.2913	[M+H]+	3	溶血磷脂酰乙醇胺 22:6	C27H44NO7P	↑
10.99	641.2962	[M+FA-H]-	3	溶血磷脂酰肌醇 18:2	C27H49O12P	↑
7.49	504.2688	[M-H20-H]-	8	溶血磷脂酰丝氨酸 18:1	C24H46NO9P	↑
1.57	129.0555	[M-H20-H]-	3	甲羟戊酸	C6H12O4	↓
14.76	227.2020	[M-H]-	2	肉豆蔻酸	C14H28O2	↓
16.71	255.2347	[M-H]-	7	棕榈酸	C16H32O2	↓
4.84	318.2999	[M+H]+	1	植物鞘氨醇	C18H39NO3	↓
0.63	128.0352	[M-H]-	1	焦谷氨酸	C5H7NO3	↑
15.73	747.5686	[M+FA-H]-	4	鞘磷脂 d18:1/16:0	C39H79N2O6P	↓
7.31	380.2547	[M+H]+	4	鞘氨醇-1-磷酸	C18H38NO5P	↑
0.61	243.0629	[M-H]-	3	尿苷	C9H12N2O6	↓

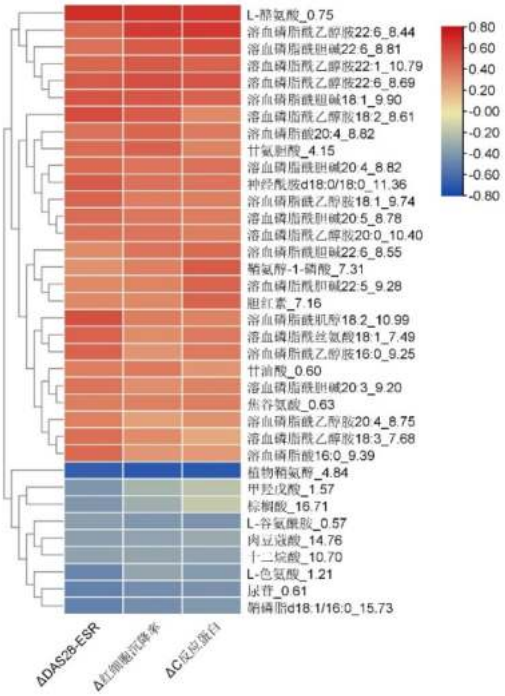


图 5 差异代谢物与临床指标的 Spearman 相关分析热图

Fig 5 Heatmap of Spearman correlation analysis between the differential biomarkers and the clinical indices

2.5 代谢通路分析

将筛选得到的 36 个差异代谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 数据库中进行代谢通路分析，共聚焦到 26 条代谢通路。以影响值大于 0.1 为标准筛选与甲氨蝶呤个体差异相关度高的代谢通路。结果（见图 6）提示，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、色氨酸代谢、酪氨酸代谢、萜类骨架生物合成以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢与甲氨蝶呤个体差异相关度较高。

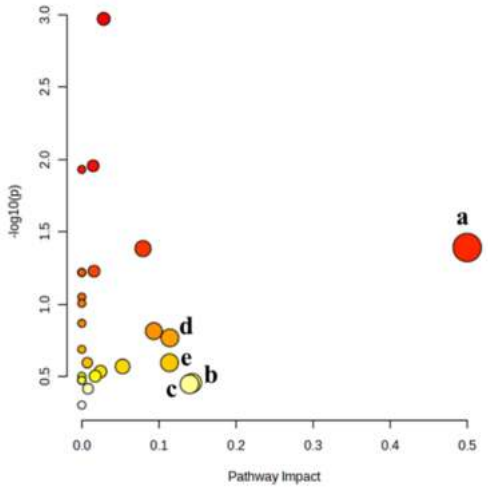


图 6 代谢通路分析

Fig 6 Pathway analysis

（a）苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成（phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis）；（b）色氨酸代谢（tryptophan metabolism）；（c）酪氨酸代谢（tyrosine metabolism）；（d）萜类骨架生物合成（terpenoid backbone biosynthesis）；（e）丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢（alanine, aspartate and glutamate metabolism）

3 讨论

RA 是一种以慢性、对称性、多关节炎症为特征的系统免疫疾病，患者遍及全球。我国患病率约为 0.42%[17]，由于 RA 常累及关节和关节外器官，致残几率较大，被称之为“不死癌症”[18]，给社会和患者都造成了严重的负担。甲氨蝶呤是治疗 RA 的基本药物。对于国人，甲氨蝶呤的推荐剂量为 10 mg/周[19]。依据患者耐受性和敏感性，临床治疗中采用剂量为范围为 5-30 mg/周[20]。本研究不干预患者治疗方案，临床医生根据患者状况和疾病情况制定甲氨蝶呤给药剂量。研究显示，即使进行规范化治疗，1/3 的患者甲氨蝶呤治疗无效。

在临床上，药物个体差异是一种普遍现象，是遗传、疾病和环境等因素综合作用的结果[21]。代谢组学研究的内源性小分子代谢物处于生物信息流的末端，涵盖了基因组、转录组、蛋白质组变化及相互间协调作用的终极信息。因此，代谢组学成为研究药物个体差异的有效手段[22]。本研究采用基于 UPLC-Q/TOF-MS 的非靶向代谢组学方法，筛选得到甲氨蝶呤治疗 RA 有效组和无效组的差异代谢物 36 个，其中 20 个为甘油磷脂类代谢物。

甘油磷脂类代谢物是生物膜的重要组成，在机体的物质转运、能量存储和信息传导中扮演着重要的角色[23]。依据取代基团，甘油磷脂可分为磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇等，其中磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺是含量最为丰富的甘油磷脂[24, 25]。与甲氨蝶呤治疗 RA 无效组相比，有效组甘油磷脂类代谢物水平较高。Li 等[26]采用皮下注射 II 型胶原和等量完全佐剂构建 RA 模型大鼠，发现模型鼠 LysoPC(20:4)、LysoPC(18:0)和 LysoPC(22:6)均显著下降。Tang 等[27]研究发现 RA 模型鼠连续灌服甲氨蝶呤后，血中磷脂酰乙醇胺水平显著上升。本研究结果与已有报道基本一致，可见甘油磷脂类代谢紊乱可能促进全身炎症，与甲氨蝶呤治疗 RA 的个体化差异相关。

本研究结果显示，氨基酸代谢与甲氨蝶呤治疗 RA 的个体化差异密切相关。氨基酸是合成蛋白质的原料，是构建免疫系统的基本材料[28]。多项研究显示氨基酸代谢与 RA 的发生发展密切相关[29, 30]。Zhou 等[31]采用基于 GC-MS 的代谢组学方法，对 33 例 RA 患者和 32 例健康受试者的血清指纹谱进行分析，结果显示，RA 患者血清中焦谷氨酸和酪氨酸水平显著下降，与 RA 发病机制密切相关。与之一致，本研究显示甲氨蝶呤有效组患者血清中两种氨基酸水平升高。

综上所述，本研究采用基于 UPLC-Q/TOF-MS 的代谢组学技术对甲氨蝶呤治疗 RA 有效组和无效组的患者血清代谢轮廓进行分析，从代谢调控角度揭示了甲氨蝶呤治疗 RA 的个体差异可能与甘油磷脂类、氨基酸类和脂肪酸类代谢相关，涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、色氨酸代谢和酪氨酸代谢等通路，为提高甲氨蝶呤治疗 RA 的有效率提供了一种潜在途径。

参考文献

[1] 韩宇飞, 高明利, 刘东武. 类风湿性关节炎的发病机制研究进展综述[J]. 中国卫生标准管理, 2021, 12(1): 162-165.

[2] Fraenkel L, Bathon JM, England BR, et al. 2021 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73(7):1108-1123.

[3] Smolen JS, Landewé RBM, Bergstra SA, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update [J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(1): 3-18.

[4] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. 中华内科杂志, 2018, 57(4): 242-251.

[5] Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, et al. Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med, 1985, 312(13): 818-822.

[6] 刘焕兴, 陈鸥, 丁蓓蓓, 等.甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎对 Th17 细胞甲基化的影响及其机制[J].中国医院药学杂志, 2020, 40(11):1 233-1237.

[7] Zhang T, Shu Q, Zhu H, et al. Serum proteomics analysis of biomarkers for evaluating clinical response to MTX/IGU therapy in early rheumatoid arthritis [J]. Mol Immunol, 2023, 153: 119-125.

[8] Szostak B, Machaj F, Rosik J, et al. Using pharmacogenetics to predict methotrexate response in rheumatoid arthritis patients [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020, 16(7): 617-626.

[9] Medcalf MR, Bhadbhade P, Mikuls TR, et al. Plasma metabolome normalization in rheumatoid arthritis following initiation

of methotrexate and the identification of metabolic biomarkers of efficacy [J]. Metabolites, 2021, 11(12): 824.

[10] Medcalf MR, Bantis LE, Shi P, et al. Plasma metabolomic profiling as a tool to identify predictive biomarkers of methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis [J]. Semin Arthritis Rheum, 2022, 56: 152056.

[11] 蔡萧君, 李宇, 胡杨, 等. 基于血液代谢组学技术的甲氨蝶呤抗类风湿性关节炎作用机制研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 242-248.

[12] England BR, Tiong BK, Bergman MJ, et al. 2019 Update of the American College of Rheumatology recommended rheumatoid arthritis disease activity measures [J]. Arthritis Care Res, 2019, 71(12): 1540-1555.

[13] Wang M, Xu J, Zhang Y, et al. Integrated multiplatform-based metabonomics and network analysis to explore the mechanism of Polygonum cuspidatum on hyperlipidemia [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2021, 1176: 122769.

[14] Ma GC, Wang TS, Wang J, et al. Serum metabolomics study of patients with allergic rhinitis [J]. Biomed Chromatogr, 2020, 34(3): e4739.

[15] 王姝瑞, 张翌蕾, 焦伟杰, 等. 益气通脉方对动脉粥样硬化模型小鼠血清代谢组学的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(17): 1788-1793.

[16] Deng K, Xu JJ, Shen L, et al. Comparison of fecal and blood metabolome reveals inconsistent associations of the gut microbiota with cardiometabolic diseases [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 571.

[17] 陈文, 刘燕. 甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎所致不良反应研究进展[J]. 实用药物与临床, 2023, 26(1): 88-92.

[18] Xing G, Liang L, Deng C, et al. Activity prediction of small molecule inhibitors for antirheumatoid arthritis targets based on artificial intelligence [J]. ACS Comb Sci, 2020, 22(12): 873-886.

[19] 贺龙全, 石颖, 邹庆华, 等. 甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的量效关系研究[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(18): 1853-1858.

[20] 杜思颖, 吕佩瑜, 林小青, 等. SLCO1B1 基因多态性与类风湿关节炎患者多聚谷氨酸化甲氨蝶呤浓度及疗效的关系[J].中国医院药学杂志, 2023, 43(6): 674-678.

[21] 王广基. 药物代谢组学与个体化用药的精准医疗[J]. 药学进展, 2017, 41(4): 241-244.

[22] 张志新, 高晓燕. 药物代谢组学研究现状[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6): 1093-1098.

[23] Bai Y, Gao Y, Lu X, et al. Lipidomics characterization of the alterations of Trichoderma brevicompactum membrane glycerophospholipids during the fermentation phase [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2019, 46(6): 809-818.

[24] Wang S, Tang K, Lu Y, et al. Revealing the role of glycerophospholipid metabolism in asthma through plasma lipidomics [J]. Clin Chim Acta, 2021, 513: 34-42.

[25] Wang X, Xu Y, Song X, et al. Analysis of glycerophospholipid metabolism after exposure to PCB153 in PC12 cells through targeted lipidomics by UHPLC-MS/MS [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 169: 120-127.

[26] Li R, Guo LX, Li Y, et al. Dose-response characteristics of Clematis triterpenoid saponins and clematichinenoside AR in rheumatoid arthritis rats by liquid chromatography/mass spectrometry-based serum and urine metabolomics [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 136: 81-91.

[27] Tang M, Gao X, Geng T, et al. Metabolomics analysis of the therapeutic effects of Qiwei Tongbi oral liquid on rheumatoid arthritis in rats [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 202: 114166.

[28] 陈辰, 蒋敬庭. 氨基酸代谢在肿瘤微环境及免疫治疗中作用的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志, 2022, 29(1): 63-69.

[29] Xu L, Chang C, Jiang P, et al. Metabolomics in rheumatoid arthritis: Advances and review [J]. Front Immunol, 2022, 13: 961708.

[30] Panfili E, Gerli R, Grohmann U, et al. Amino acid metabolism in rheumatoid arthritis: Friend or foe? [J] Biomolecules, 2020, 10(9): 1280.

[31] Zhou J, Chen J, Hu C, et al. Exploration of the serum metabolite signature in patients with rheumatoid arthritis using gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 127: 60-67.

复杂体系抗体药物分析新方法研究

王启钦*，江正瑾

（*暨南大学药学院，广东 广州 511436）

【摘要】恶性肿瘤是危害我国国民健康的重大疾病，发病率和死亡率一直处于上升趋势。抗体药物作为治疗恶性肿瘤的重磅生物药物，其具有靶向性强、疗效好和毒副作用低的特点，是全球新药研发热点。复杂体系抗体药物分析不仅是其新药研发急需解决的关键限速瓶颈，也是药物分析方法学研究的卡脖子难题。报告人近年来围绕抗体药物全生命周期分析技术瓶颈展开系统研究，主要针对传统靶抗原或蛋白配体亲和技术存在的免疫识别缺陷，提出发展“表位模拟肽-抗体药”靶向识别新策略，进而结合聚合物、膜、纳米材料、电化学、荧光及质谱等多重手段，开发了一系列多肽功能化生物分离新材料、生物传感检测新技术及生物质谱新方法，重点攻克抗体药（包含曲妥珠、贝伐珠、西妥昔、利妥昔等）在分离分析、临床 PK/PD、体内生物转化追踪分析及抗体偶联药物（anti-HER2 ADC: BAT8001、BAT8010）新药研发等方面存在的技术壁垒，从而推动抗体药物分析技术发展，满足新药研发需求。

【关键词】抗体药物，表位模拟肽，复杂生物体系，生物分离，体内命运追踪分析

The Dynamic Duo: Combining Gabapentin and Pregabalin for Postherpetic Neuralgia

Shuang-Ying Wang[1], Yan-fei Li[1], Fang-Jun Lv[1], Ju-Xiang Zhou, Hui-Long Tan[2]

邵阳市中心医院 药剂科 湖南 邵阳 422000

【**Abstract**】 Purpose：Postherpetic neuralgia (PHN) is a common complication of herpes zoster, which is not sufficiently relieved by a single first-line drug in tolerated doses. This study aimed to investigate the efficacy of combining gabapentin and pregabalin in patients with an inadequate response to conventional gabapentin or pregabalin treatment. **Methods**：The data of patients diagnosed with PHN and treated with a combination therapy of gabapentin and pregabalin in our hospital from 2018 to 2019 were retrospectively analyzed. Numeric Rating Scale (NRS) pain scores before and after monotherapy, NRS pain scores before and after combination therapy，and the duration of each therapy were analyzed. **Results**：A total of 20 eligible medical records were obtained. The NRS score before treatment in the combination therapy group was 4.95±1.61 and the NRS score after treatment was 2.75±1.52. There was a statistically significant difference between the NRS pain scores before and after combination therapy (mean of difference 2.20, 95% CI 1.46-2.94). The NRS scores before and after monotherapy had no significant difference. **Conclusion**：Combination therapy of gabapentin and pregabalin is worth trying for PHN patients after the failure of monotherapy. Future studies with a larger sample size and a randomized control trial are needed to evaluate the long-term efficacy of this approach.

【**Keywords**】Postherpetic neuralgia, combination therapy, gabapentin, pregabalin.

Introduction

Herpes zoster has a high incidence rate of approximately 0.59-0.77% among people above 50 years of age[1–6]. Postherpetic neuralgia (PHN) is a pain that persists for one month or more after the healing of the skin rash of herpes zoster (HZ)[7]. Herpes zoster can lead to a range of complications, with PHN being the most common, affecting approximately 13% of patients within 3 months and another 7% within 1 year[8–10]. The incidence and prevalence of HZ and PHN both increase with age, with approximately 65% of patients aged 60 and above developing PHN, and up to 75% in those aged 70 and above[11]. Higher rates have also been observed in immunocompromised populations[12]. PHN significantly impacts the quality of life and tricyclic antidepressants and antiepileptic drugs are recommended as first-line treatments[13]. Despite a paucity of evidence for the efficacy of these drugs with different mechanisms, the combined number needed to treat (NNT) was 6.4 for serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors, 7.7 for pregabalin and 7.2 for gabapentin, and unfortunately, many patients do not obtain sufficient pain relief in tolerated doses [13]. When treatment with one drug is partially but not sufficiently effective, combination therapy is often used[15].

In this study, a retrospective analysis of patients with PHN at our hospital found that combining gabapentin and pregabalin can achieve better efficacy in patients with an inadequate response to conventional gabapentin or pregabalin treatment.

Methods

The case data of patients diagnosed with PHN and treated with combination therapy of gabapentin and pregabalin in our hospital from 2018 to 2019 were retrieved. These patients were all initially treated with either gabapentin or pregabalin alone but switched to a combination therapy due to poor treatment outcomes. The age, gender, site of pain, Numeric Rating Scale (NRS for abbreviation) score at admission, NRS pain scores before combination therapy (NRS score after

monotherapy), NRS pain scores after combination therapy (NRS pain scores before discharge), the dosage of gabapentin and pregabalin, the number of days of monotherapy and combination therapy for all patients were all recorded.

Statistical Analysis

All data were analyzed by SPSS Software (version 25.0, IBM, New York, USA). The normality of continuous data distribution was determined by the Shapiro–Wilk test and presented as the mean ± standard deviation (SD). The paired samples test and Mann-Whitney U test was performed for the comparisons in the NRS pain scores and treatment duration of combination therapy and monotherapy. A 95% confidence interval of the median difference was used to express the cumulative morphine equivalent consumption. The level of statistical significance was established at $p < 0.05$.

Results

A total of 20 eligible medical records were obtained, with patients having normal liver and kidney function. The distribution of gender, age, number of patients with pain in different body parts, and the number of patients treated with either pregabalin alone or gabapentin are shown in Table 1.

Table1. Demographic Characteristics of the cases.

Demographic Variables	Cases (n=20)
Age(y)	
<50	2
51-60	5
61-70	5
71-80	6
>80	2
Gender	
Male	10
Female	10
Location of pain	
head and face	8
trunk	10
limbs	2
Number of patients treated with monotherapy before combination therapy	
gabapentin	16
pregabalin	4

In this study, a paired samples test was used to analyze the NRS pain scores before and after combination therapy. The NRS pain score before treatment in the combination therapy group was 4.95±1.61, and the NRS score after treatment was 2.75±1.52. There was a statistically significant difference between the two groups (mean difference 2.20, 95% CI 1.46-2.94, P=0.001), and statistical data are show in Table 2.

Table 2. Paired samples test for NRS pain scores before and after combination therapy.

	$\bar{x}$±SD	difference value (95% CI)	test	
			t	p
NRS pain scores before combination therapy	4.95±1.61	2.20 （1.46-2.94）	6.24	0.001
NRS pain scores after combination therapy	2.75±1.52			

$\bar{x}$ for mean, sd for standard deviation

The difference in NRS scores before and after monotherapy was analyzed using the Wilcoxon test. The NRS pain score before treatment in the monotherapy group was 5.10±1.52, and that after treatment was 4.95±1.60. There was no statistical significant difference between the two groups (rank mean 2, p=0.083). Statistical data are shown in Table 3.

Table 3. Wilcoxon test for NRS pain scores before and after monotherapy.

	$\bar{x}$±sd	Rank mean	test	
			Z	p
NRS pain scores before monotherapy	5.10±1.52	2.00	1.732	0.083
NRS pain scores after monotherapy	4.95±1.60			

$\bar{x}$ for mean, sd for standard deviation

The duration of monotherapy and combination therapy were compared using the Mann-Whitney U test, and the results showed that there was no statistically significant difference in the median treatment duration between the two groups (p = 0.14).

One patient experienced dizziness during treatment but did not stop taking the medication. The majority of patients received a dose of 150 mg/d of pregabalin (only one patient received 75mg/d), while gabapentin usually had a titration process starting from 0.3 g/d and mostly maintaining at a dose of 0.9 g/d, with 2 cases receiving 1.5 g/d. The gabapentin equivalent dose for most of the patients was less than 1800 mg/d (900 mg/d gabapentin and 150 mg/d pregabalin). The dose was far less than 3600 mg which is the recommended maximum daily dose of gabapentin.

Discussion

Gabapentin and pregabalin are the first-line drugs for PHN[14], although their mechanism for treating neuralgia remains unclear. The previously proposed mechanism of action, which involves a selective inhibitory effect on voltage-gated calcium channels containing the α2δ-1 subunit, has been largely dismissed in favor of other mechanisms[15]. Some research suggests that gabapentin and pregabalin modulate the release of sensory neuropeptides[16]. Based on current knowledge, these two drugs have the same mechanism of action, so combining them for PHN is not recommended. In our hospital, the drugs used for PHN are limited to gabapentin and pregabalin. When pain is not well controlled by monotherapy of either drug, a combination of the two may be given to avoid adverse effects of high doses. This attempt is not entirely without evidence, as early reports have shown that combining gabapentin and pregabalin can relieve the pain of refractory neuralgia and the case reported by Senderovich provides evidence for the existence of synergy between the two drugs that appear to work through the same mechanism of action [17,18].

Recently，the overuse of gabapentin and pregabalin have aroused the concern of the general public[19–22]. Addiction may increase as the dose increases and a combination of the two drugs requires a lesser dose of each drug, which could result in a reduction of addiction. However, a combination of both drugs may increase adverse effects and the literature has reported symptoms of dizziness and drowsiness after the combination of pregabalin and gabapentin, which improved after discontinuation of pregabalin [23] . In our study, one patient experienced dizziness, but no patients stopped the medication due to adverse reactions. From an analysis of the improvement of the NRS score, the combination therapy was effective, and only mild adverse reactions for one patient were observed. Patients who have failed to obtain sufficient pain relieve from monotherapy may benefit from this combination therapy.

Limitation

As a retrospective study, we can only obtain the NRS score of patients and the dose of the patients is almost fixed and low. When changing from monotherapy which failed to relieve pain to a combination therapy resulted in an increase in dosage, and it is unclear whether this efficacy is due to a simple additive effect or a synergistic effect. A prospective study should be designed to compare the theoretically equivalent doses of a single drug and a combination therapy to determine which is more effective in relieving PHN. Moreover, the best combination ratio of the two drugs remains unclear, which is also something that needs further study.

Conclusion

As a rescue therapy for refractory PHN, a combination of pregabalin and gabapentin therapy is worth investigation. Future studies are needed on the combined use of pregabalin and gabapentin with a larger patient sample size and within a randomized control trial, with follow up in order to evaluate long-term efficacy.

References

[1] Thompson RR, Kong CL, Porco TC, *et al*. Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia: Changing Incidence Rates From 1994 to 2018 in the United States[J/OL]. Clinical Infectious Diseases: *An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2021; 73(9): e3210-e3217. DOI:10/gjp3r7.

[2] Forbes HJ, Bhaskaran K, Grint D, *et al*. Incidence of acute complications of herpes zoster among immunocompetent adults in England: a matched cohort study using routine health data. *The British Journal of Dermatology*. 2021; 184(6): 1077-1084. DOI:10/fzm4.

[3] Buchan SA, Daneman N, Wang J, *et al*. Herpes zoster in older adults in Ontario, 2002-2016: Investigating incidence and exploring equity. *PloS One*. 2021; 16(2): e0246086. DOI:10/gr63dq.

[4] Sun X, Wei Z, Lin H, *et al*. Incidence and disease burden of herpes zoster in the population aged ≥50 years in China: Data from an integrated health care network. *The Journal of Infection*. 2021; 82(2): 253-260. DOI:10/gk82wq.

[5] Yang F, Yu S, Fan B, *et al*. The Epidemiology of Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia in China: Results from a Cross-Sectional Study. *Pain and Therapy*. 2019; 8(2): 249-259. DOI:10/gmgwfw.

[6] Curran D, Schmidt-Ott R, Schutter U, *et al*. Impact of herpes zoster and postherpetic neuralgia on the quality of life of Germans aged 50 or above. *BMC Infectious Diseases*. 2018; 18(1): 496. DOI:10/ghw9np.

[7] Saguil A, Kane S, Mercado M, *et al*. Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia: Prevention and Management. *American Family Physician*. 2017; 96(10): 656-663.

[8] Le P, Rothberg M. Herpes zoster infection. *BMJ (Clinical research ed.)*, 2019; 364: k5095. DOI:10/gpbn9h.

[9] Schmader K. Herpes Zoster[J/OL]. *Annals of Internal Medicine*, 2018, 169(3): ITC19-ITC31. DOI:10/grp97d..

[10] Johnson RW, Rice ASC. Clinical practice. Postherpetic neuralgia. *The New England Journal of Medicine*. 2014; 371(16): 1526-1533. DOI:10/gfj4wm.

[11] Wei S, Li X, Wang H, *et al*. Analysis of the Risk Factors for Postherpetic Neuralgia. Dermatology (Basel, Switzerland). 2019; 235(5): 426-433. DOI:10/ghb8c3.

[12] Curran D, Hunjan M, El Ghachi A, *et al*. Herpes zoster related healthcare burden and costs in immunocompromised (IC) and IC-free populations in England: an observational retrospective database analysis. *BMJ Open*. 2019; 9(8): e023502. DOI:10/gr63dv.

[13] Bates D, Schultheis BC, Hanes MC, *et al*. A Comprehensive Algorithm for Management of Neuropathic Pain. *Pain Medicine* (*Malden, Mass.*). 2019; 20(Suppl 1): S2-S12. DOI:10/gf6bvc.

[14] Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, *et al*. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Neurology*. 2015; 14(2): 162-173. DOI:10/f2x6qq.

[15] Finnerup N B. Nonnarcotic Methods of Pain Management. *The New England Journal of Medicine*. 2019; 380(25): 2440-2448. DOI:10/gjmwqk.

[16] Fehrenbacher JC, Taylor CP, Vasko MR. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. *Pain*. 2003; 105(1-2): 133-141. DOI:10/dkpmcq.

[17] Chow SP, Stevens S, Tran S, *et al*. Case Series: Synergistic Effect of Gabapentin and Adjuvant Pregabalin in Neuropathic Pain. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*. 2023; 37(1): 106-109. DOI:10/gr3pqm.

[18] Senderovich H, Jeyapragasan G. Is there a role for combined use of gabapentin and pregabalin in pain control? Too good to be true? *Current Medical Research and Opinion*. 2018; 34(4): 677-682. DOI:10/gg8bb7.

[19] Fonseca F, Lenahan W, Dart RC, *et al*. Non-medical Use of Prescription Gabapentinoids (Gabapentin and Pregabalin) in Five European Countries. *Frontiers in Psychiatry*, 2021, 12: 676224. DOI:10/gr3pqc.

[20] Driot D, Jouanjus E, Oustric S, *et al*. Patterns of gabapentin and pregabalin use and misuse: Results of a population-based cohort study in France. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2019; 85(6): 1260-1269. DOI:10/gg9r2r.

[21] Mayor S. Pregabalin and gabapentin become controlled drugs to cut deaths from misuse. *BMJ (Clinical research ed.)*. 2018; 363: k4364. DOI:10/jhdw.

[22] Bonnet U, Scherbaum N. How addictive are gabapentin and pregabalin? A systematic review. European Neuropsychopharmacology: *The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2017; 27(12): 1185-1215. DOI:10/gkpt5x.

[23] Ghayur MN. Potential Adverse Consequences of Combination Therapy with Gabapentin and Pregabalin. *Case Reports in Medicine*. 2021; 2021: 5559981. DOI:10/gr3pqk.

采用平行人工仿生膜法初步预测格列吡嗪片的生物等效性

王松，于明艳，张丹丹，刘文坤，陈德俊*

（山东省食品药品检验研究院，国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，山东省仿制药一致性评价工程技术研究中心，济南 250101）

【摘要】目的 采用平行人工仿生膜法（PAMPA）对药物的体外溶出与渗透速率进行研究，初步预测格列吡嗪片仿制制剂的生物等效性。**方法：**使用 Macro FLUX 型药物生物等效性预测系统，考察 3 个厂家受试制剂与参比制剂在空腹和饱腹条件下的溶出与渗透过程，通过比较渗透速率和总渗透量两个关键质量参数，预测受试制剂是否等效。**结果:** 已通过一致性评价的 1 批受试制剂关键质量参数的几何均值比的 90 %置信区间在 80.00 %～125.00 %范围内，另外 2 批受试制剂未在此区间。**结论:** 平行人工仿生膜法对制剂的处方筛选与生物等效性风险评价可提供技术支持。

【关键词】格列吡嗪片；平行人工仿生膜；溶出；渗透速率；生物等效性

Preliminary Prediction of Bioequivalence of Glipizide Tablets Based on Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

WANG Song, YU Ming-yan, ZHANG Dan-dan, LIU Wen-kun, CHEN De-jun*

(Shandong Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Shandong Research Center of Engineering ang Technology for Consistency Evalution of Generic Drugs, Jinan 250101)

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To preliminarily predict the bioequivalence of glipizide tablets by studying in vitro dissolution and permeation rate with parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA). **METHODS：**The Macro Flux for drug bioequivalence prediction system was used to investigate the dissolution and permeability process of three test preparations and reference preparation in fasting and fed state. To predict whether the preparation was bioequivalent by comparing two key quality parameters, namely permeation rate and amount. **RESULTS：**The 90% confidence interval of geometric mean ratio of quality parameters that one passed the consistency evaluation was in the range of 80.00%~125.00%, and the others did not fall into this interval. **CONCLUSION：**The PAMPA may provide support for the prescription screening and bioequivalence risk assessment of preparations.

【KEY WORDS】glipizide tablet; PAMPA; dissolution; permeation rate; bioequivalence

格列吡嗪（glipizide）为第二代磺酰脲类口服降糖药，通过刺激胰岛 β 细胞分泌内源性胰岛素，抑制肝糖原分解，促进肌肉对葡萄糖的利用，从而达到降血糖作用，对非胰岛素依赖型（Ⅱ）型糖尿病有效[1]。格列吡嗪片于 1971 年 4 月首次在巴西上市，原研辉瑞于 1984 年 5 月在美国上市格列吡嗪片，商品名为 Glucotrol。按照 BCS（biopharmaceutics classification system）分类，格列吡嗪属于 BCS II 类，即低溶解度、高渗透性的药物[2]。

口服给药与其它给药途径相比，具有用药方便、顺应性强、耐受性好等特点，是长期用药患者的首选给药形式。药物进入体内崩解后的溶解、解离以及渗透情况均会影响其在体内的吸收。溶出度实验可用于体外模拟胃肠道的崩解和溶出，但其在建立体内外相关性（IVIVC）方面仍存在缺陷。如机械装置运动状态单一，溶出介质的组成、pH 值不随时间而变化，与胃肠道内的层流液体状态和实际情况差异较大。因此，预测药物的体内行为还

应进行渗透性的考察，平行人工仿生膜法（PAMPA）是一种较为快速可靠的可预测药物渗透性的方法[3]，该法可模拟人体胃肠道细胞膜，测定药物被动转运的有效渗透性[4]。当溶出方法同时具有体内吸收预测能力时，才能够用于指导制剂处方筛选及生物等效性预测[5-8]。

本实验采用 PAMPA 法，建立空腹和饱腹状态下格列吡嗪片体外溶出-渗透模型，考察了 3 个不同厂家受试制剂与参比制剂在空腹与饱腹条件下溶出和渗透的差异，并初步预测了受试制剂与参比制剂的生物等效性。

1 材料与仪器

格列吡嗪对照品（中国食品药品检定研究院，批号 100281-201905，含量 99.9%）；参比制剂（Pfizer，批号 R93091，规格 5mg）；受试制剂 A（批号 200401，规格 5mg，已通过一致性评价），受试制剂 B（批号 53719002，规格 5mg），受试制剂 C（批号 9C016302，规格 5mg）；ASB 缓冲液（pH 7.4）（美国 Pion Inc 公司，批号：520945）；磷脂溶液（美国 Pion Inc 公司，批号：520852）；药物溶出模拟液固体粉末（英国 Biorelevant 公司，批号 FFF-0421-B）；无水磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠、氯化钠、冰醋酸、盐酸、二甲基亚砜均为分析纯；水为纯化水。

药物生物等效性预测系统（Macro Flux，美国 Pion Inc 公司）；溶出仪（Model 2500，美国 Distek 公司）；电子天平（MS205DU，瑞士 Mettler Toledo 公司）；酸度计（S400-K，瑞士 Mettler Toledo 公司）。

2 方法

2.1 标准曲线的建立

2.1.1 对照品溶液的制备：取格列吡嗪对照品适量，精密称定，用二甲基亚砜溶解并稀释制成每 1mL 含格列吡嗪 1mg 的溶液，作为对照品溶液。

2.1.2 供体室标准曲线的建立：将光纤探头置于 200 mL 空腹胃模拟液（pH 1.6）中，依次精密加入对照品溶液适量，得到每 1 mL 含格列吡嗪 0.3～1.5 μg 系列浓度的标准曲线溶液，采集数据后选取 274～284 nm 的波长范围，以二阶导数法校正后进行线性回归。

同法建立在空腹肠模拟液（pH 6.5）与饱腹胃肠模拟液（pH 5.0）中的标准曲线，标准曲线溶液的浓度均为含格列吡嗪 1.0～5.0 μg·mL^{-1}。以上标准曲线在相应浓度范围内线性关系良好，相关系数均大于 0.9999。

2.1.3 受体室标准曲线的建立：将光纤探头置于 50 mL ASB 缓冲液（pH 7.4）中，依次精密加入对照品溶液适量，得到每 1 mL 含格列吡嗪 0.1～0.5 μg 与 0.6～3.1 μg 系列浓度的标准曲线溶液，采集数据后选取 274～284 nm 的波长范围，以二阶导数法校正后进行线性回归，分别作为空腹与饱腹条件下受体室的标准曲线。以上标准曲线在相应浓度范围内线性关系良好，相关系数均大于 0.9999。

2.2 测定方法

照溶出度与释放度测定法（《中国药典》2020 年版四部通则 0931 第二法）[9]测定，以空腹胃模拟液（pH 1.6）800 mL，30 分钟时加入混合溶液（空腹肠模拟液与磷酸盐缓冲液等比混合）200 mL [转换为空腹肠模拟液（pH 6.5）]为溶出介质[或以饱腹胃肠模拟液（pH 5.0）1000 mL 为溶出介质]，转速为每分钟 50 转。精密量取 ASB 缓冲液（pH 7.4）12 mL，置于受体室中，微搅拌桨转速为每分钟 450 转，两室间以面积为 3.88 cm^2 的仿生膜（预先用 50 μL 磷脂溶液浸润）隔离，采集时间 200 分钟（空腹）与 240 分钟（饱腹），采样间隔 1 分钟。照紫外-可见分光光度法（《中国药典》2020 年版四部通则 0401），在 240～400nm 的波长范围内，采用光纤探头分别测定溶出杯和受体室中的吸光度，按公式（1）、（2）分别计算药物的渗透速率和总渗透量。

公式（1）

$$J = \frac{V}{A} \times \frac{dc}{dt}$$

式中 J 为渗透速率（Flux），即药物在单位时间内通过单位面积的速率（μg·min^{-1}·cm^{-2}）；$\frac{dc}{dt}$为单位时间内受体室中药物浓度变化速率（μg·mL^{-1}·min^{-1}）；V 为缓冲液的体积（mL）；A 为仿生膜膜面积（cm^2）。

公式（2）

$$T = C \times V$$

式中 T 为总渗透量（permeation amount），即药物在测定时间内通过仿生膜的总量（μg）；C 为最终时间点接收液中的药物浓度（μg·mL^{-1}）；V 为缓冲液的体积（mL）。

2.3 Macro Flux 型药物生物等效性预测系统原理

图 1 为本实验使用的体外溶出-渗透速率测定装置，通过在线的实时浓度监测功能，可对制剂的溶出和渗透进行同步考察。溶出杯作为供体室，内置生理相关溶媒以模拟胃肠道的 pH 环境，受体室中使用模拟血液漏槽条件的 ASB 缓冲液，中间由涂有磷脂溶液的人工仿生膜隔开，模拟人体小肠表皮细胞的环境，同时模拟脂溶性的磷脂双分子层及水溶性的细胞膜前端的绒毛层，药物在供体室和受体室中的浓度变化通过原位光纤实时检测。采用 AuPRO 分析软件进行数据处理，选取特定的波长范围进行二阶导数校正，可排除不溶辅料颗粒的散射干扰，保证数据准确性。该装置通过对药物在体内吸收的评估，建立了更现实的体内外相关性模型。

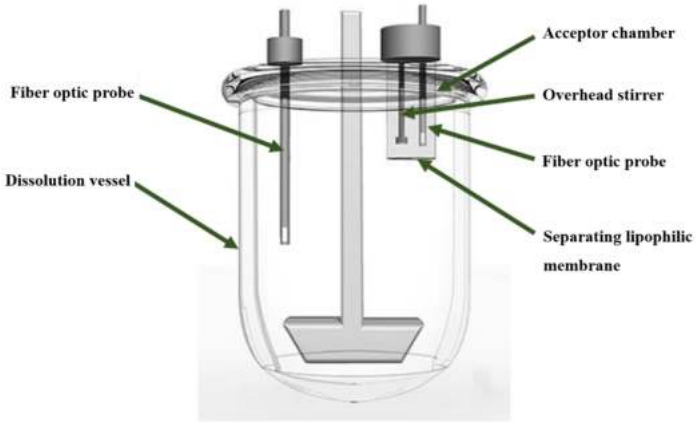


图 1　Macro Flux 药物生物等效性预测系统

Fig. 1　Macro Flux for Drug bioequivalence prediction system

3 结果

3.1 溶出度与渗透速率测定结果

参比制剂与 3 家受试制剂在空腹和饱腹条件下，溶出程度与渗透速率整体趋势一致，溶出度与渗透速率曲线见图 2。格列吡嗪片在 pH 1.6 的空腹胃液中溶出缓慢，受体室中格列吡嗪维持在低浓度水平。30 分钟经溶媒转换为 pH 6.5 的空腹肠液后，格列吡嗪片溶出迅速且完全，渗透速率明显增大。格列吡嗪片在 pH 5.0 的饱腹胃肠液中，格列吡嗪片的溶出经初始的快速增长后趋于平缓，最终的溶出量只达到 70 %，溶出不完全，但此时受体室中的渗透速率是空腹状态时的 3～5 倍。

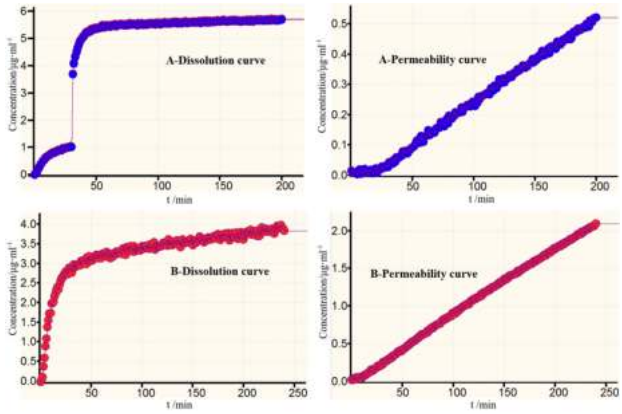


图 2　格列吡嗪片溶出度与渗透速率典型曲线（A-空腹；B-饱腹）

Fig. 2　Typical curve of dissolution and permeation rate of glipizide tablets (A-fastde; B-fed)

3.2 参比制剂与受试制剂的渗透速率与总渗透量比较

本实验截取受体室 75～140 min（空腹）与 100～150 min（饱腹）中测得的浓度值，以时间与浓度进行线性回归，将该时间段药物浓度变化速率（即线性方程斜率）代入公式（1）计算渗透速率，以 180 min 时测得的受体室接收液浓度代入公式（2）计算总渗透量。由表 1 与表 2 的计算结果可见，受试制剂 A 与参比制剂结果最为接近，受试制剂 B 的渗透速率和总渗透量均低于参比制剂，受试制剂 C 在空腹条件下的关键参数均高于参比制剂，在饱腹条件下均低于参比制剂。格列吡嗪片受试制剂与参比制剂的渗透曲线见图 3 与图 4。

表 1　空腹条件渗透速率与总渗透量测定结果

Tab. 1　Determination result of permeation rate and amount in fasted condition

Samples	Flux /μg·min^{-1}·cm^{-2}			Permeation amount /μg		
	data 1	data 2	data 3	data 1	data 2	data 3
Reference preparation	0.00841	0.00891	0.00792	4.81009	5.43743	5.17320
Test preparation A	0.00884	0.00878	0.00804	5.22262	5.45574	4.88275
Test preparation B	0.00681	0.00792	0.00724	4.80703	5.09930	5.21621
Test preparation C	0.00962	0.00990	0.00912	6.11355	6.26221	5.80805

表 2　饱腹条件渗透速率与总渗透量测定结果

Tab. 2　Determination result of permeation rate and amount in fed condition

Samples	Flux /μg·min^{-1}·cm^{-2}			Permeation amount /μg		
	data 1	data 2	data 3	data 1	data 2	data 3
Reference preparation	0.02706	0.02768	0.02811	24.5733	25.2450	25.2901
Test preparation A	0.02756	0.02892	0.02870	25.1331	25.9682	26.0799
Test preparation B	0.02388	0.02527	0.02474	21.5386	22.6310	22.5267
Test preparation C	0.02548	0.02502	0.02573	22.4846	22.4497	22.5483

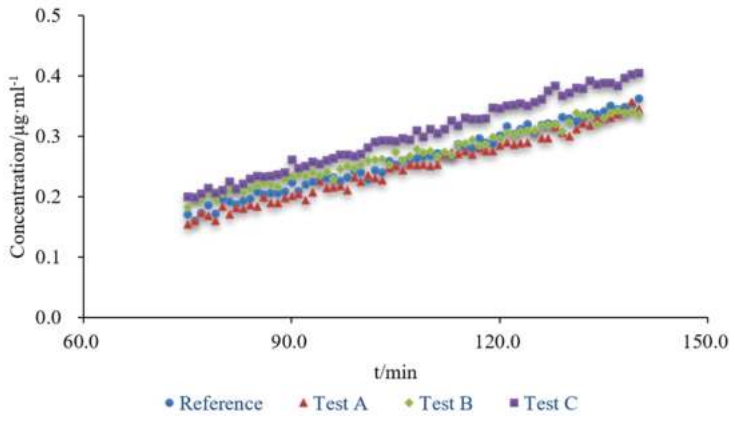


图 3.　空腹状态下格列吡嗪片渗透曲线（75～140 min）

Fig. 3　Permeability curves of glipizide tablets in fasted condition (75～140 min)

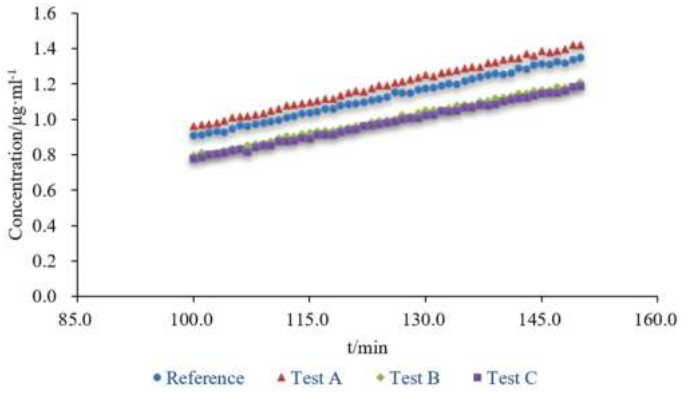


图 4.　饱腹状态下格列吡嗪片渗透曲线（100～150 min）

Fig. 4　Permeability curves of glipizide tablets in fed condition (100～150 min)

3.3 参比制剂与受试制剂生物等效性预测

预测制剂的生物等效性，可通过药动学参数中血药达峰浓度（Cmax）与药时曲线下面积（AUC）几何均值比值的 90 %置信区间进行比较。在 PAMPA 试验中，计算体内外相关的关键参数（渗透速率与总渗透量）的 90 %置信区间，进行等效性评估。

3 批受试制剂与参比制剂的计算结果见表 3，受试制剂 A 生物等效的 90 %置信区间均在 80.00 %～125.00 %之间，初步预测受试制剂与参比制剂在体外空腹和饱腹模拟试验中具有生物等效。因受试制剂 A 为已通过一致性评价产品，可验证此评价系统的准确性。受试制剂 B 与受试制剂 C 在空腹条件下的预测结果均超出了 80.00 %～125.00 %的范围，提示其存在生物不等效的风险。

表 3　参比制剂与受试制剂的 90 %置信区间

Tab. 3　90% CI of test and reference

Samples	Fasted condition		Fed condition	
	Flux / %	Amount / %	Flux / %	Amount / %
Test preparation A	92.75-110.68	91.46-110.36	98.34-107.26	99.28-106.24
Test preparation B	76.17-98.10	91.15-104.98	84.89-93.46	84.74-92.86
Test preparation C	105.63-121.33	110.32-125.51	89.81-94.22	89.51-90.18

4 讨论

4.1 受试制剂的选取

在进行 PAMPA 试验前，选择 0.15%SDS 的 pH 1.0 盐酸溶液、0.15%SDS 的 pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和 pH 7.4 磷酸盐缓冲液四种溶出介质，对国内 20 余家格列吡嗪片生产企业产品与参比制剂的溶出行为进行了考察，最终选取 3 家企业产品进一步开展了渗透试验。在溶出曲线与参比制剂相似的产品中选取受试制剂 A 与 B，其中受试制剂 A 为已通过一致性评价产品，可验证该方法的准确性，在溶出曲线不相似的产品中选择受试制剂 C。

格列吡嗪片在 pH 7.4 溶出介质中均为快速溶出，在其他 3 种溶出介质中，受试制剂 A、B 与参比制剂的相似因子均大于 50，受试制剂 C 与参比制剂的相似因子小于 50。经 PAMPA 试验预测，受试制剂 B 生物不等效，因此只进行溶出度的考察是不够的，需建立可模拟体内环境的体内外相关模型，溶出度方法与体内吸收相结合才具有指导意义[10]。

4.2 格列吡嗪片溶出与渗透行为分析

格列吡嗪是一种亲脂性弱酸，pKa 为 5.9。当溶媒的 pH 值大于药物的 pKa 时，药物解离度高，溶解度大，药物在溶液中大部分以离子形式存在；当溶媒的 pH 值小于药物的 pKa 时，药物解离受到抑制，溶解度小，药物

在溶液中主要以分子形式存在，而分子形式易于药物的跨膜转运。因此本实验中格列吡嗪片在饱腹条件下溶出不完全，而渗透速率是空腹条件时的 3～5 倍。

格列吡嗪片说明书中的用法指出，本品需餐前 30 分钟服用。与本实验所得结果相符，格列吡嗪片在空腹状态下易于溶出，饱腹状态下利于吸收。格列吡嗪片饭后快速吸收，降低血糖浓度，达到疗效。

4.3 受试制剂与参比制剂生物等效性分析

接受生物等效的标准为受试制剂与参比制剂关键参数的 90 %置信区间在 80.00 %～125.00 %之间，可初步预测受试制剂的生物等效。受试制剂 B 的 90 %置信区间整体偏低，在空腹与饱腹条件下溶出行为与参比制剂基本一致，渗透速率和总渗透量均低于参比制剂。提示可能是受试制剂在辅料的选择与用量方面存在差异，影响主药在仿生膜上的渗透，导致药物的生物利用度不同。受试制剂 C 在空腹条件下溶出速率快于参比制剂，在饱腹条件下溶出速率慢于参比制剂，溶出行为本身不一致，导致 90 %置信区间在空腹介质中整体偏高，在饱腹介质中整体偏低。提示受试制剂生物不等效的风险较高，需要优化处方。

本实验模拟空腹和饱腹条件下药物在体内的溶出-渗透过程，建立了药物在体内外相关性研究的技术路线，为仿制药处方筛选及预 BE 研究积累了理论和数据基础，可降低仿制制剂与参比制剂人体生物等效性试验失败的风险，对仿制药的生物等效性风险评价具有指导作用。

REFERNCES

[1] YANG X Y, XIN G J, WANG F, *et al*. Study on the relative bioavailability and bioequiavailability of Glipizide capsule[J]. *Jilin Medical Journal*（吉林医学），2006, 27 (11): 1343-1344.

[2] Intra-Agency Agreement Between the NICHD and the FDA: Oral Formulations Platform-Report 1 (2011) [EB/OL]. [2011] http://zy.yaozh.com/orangebook/NICHD_BCS.pdf

[3] GUAN H Y, ZHANG G C, NIU J Z, *et al*. Application of PAMPA in Drug Evaluation of Drug Consistency [J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*（中国药事），2020, 34(8): 891-896.

[4] LIU X J, LI W L, GUAN H Y, *et al*. Research progress of in vitro permeability research of generic drugs [J]. *Chinese Journal of New Drugs*（中国新药杂志），2022, 31(11): 1066-1071.

[5] WANG L, WU B, WANG T S, *et al*. Preliminary Prediction of Bioequivalence of Montelukast Sodium Chewable Tablets Based on Permeability Analysis[J]. *Chin Pharm J*（中国药学杂志），2019, 54(18): 1511-1514.

[6] WU B, ZHANG S D, WU Z W, *et al*. *In Vitro* and *in Vivo* Correlation of Two Reference Listed Drugs for Carbamazepine Tablets Announced by NMPA[J]. *Chin Pharm J*（中国药学杂志），2022, 57(11): 942-949.

[7] ZHANG D D, WANG S, LI Y J, *et al*. Preliminary Prediction of Bioequivalence of Pioglitazone Hydrochloride Preparations Based on Parallel Artificial Membrane Permeability Analysis[J]. *Food and Drug*（食品与药品），2022, 24(3): 227-233.

[8] NIU J Z, ZHANG G C, LIU Q, *et al*. Research on In Vitro FLUX Tests of Spironolactone Tablets with Parallel Artificial Membrane Permeability Assay[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*（中国药事），2021, 35(4): 415-421.

[9] *Ch. P* (2020) Vol Ⅳ（中国药典 2020 年版. 四部）[S]. 2020: 132-137.

[10] ENIKO B. The effect of formulation additives on in vitro dissolution-absorption profile and in vivo bioavailability of telmisartan from brand and generic formulations[J]. *Eur J Pharm*, 2018, 114(3): 310-317.

“4+7”注射类带量采购药品在我院的实施现状

王新[1]，张捷，冀召帅，毛乾泰，艾超*

（清华大学附属北京清华长庚医院，清华大学临床医学院，北京 102218）

【摘要】**目的：**分析某三级医院自 2021 年 5 月 29 日执行后一年内注射类药品的使用情况，为临床药事管理提供参考。**方法：**采用药物经济学方法回顾性分析，对第四批带量采购药品 3 种大品种注射液执行后一年的使用数量、使用金额、用药频度、日均费用等进行分析。**结果：**3 种注射液均 100%完成任务量，并且除盐酸氨溴索注射液外，其他中选药品的用药频度均大于原研药品，3 种注射液的日均费用远低于原研药品。**结论：**“4+7”带量采购药品在临床具有较高选择性，并且能够显著降低患者的就医压力，同时能够促进仿制药的发展和药物的合理使用。

【关键词】“4+7”带量采购；大品种注射液；用药频度；日均费用；仿制药

Implementation status of "4+7" injection drugs in a hospital

WANG Xin, ZHANG Jie, JI Zhao-shuai, MAO qian-tai, AI Chao*

(Beijing Tsinghua Changgung Hospital, School of Clinical Medicine, Tsinghua University, Beijing 102218)

【**Abstract**】**Objective:** To analyze the use of injectable drugs in a tertiary hospital within one year after implementation on May 29, 2021, so as to provide reference for clinical pharmaceutical management. **Method：** Pharmacoeconomic methods were used to retrospectively analyze the quantity, amount, DDDs and average daily cost (DDC) of three large varieties of injection of the fourth batch volume-based procurement drugs in one year after execution. **Results：**All the three injections completed 100% of the task volume, and except for ambroxol hydrochloride injection, the DDDs of other volume-based procurement drugs was greater than original research drugs, and the average daily cost (DDC) of the three injections was much lower than original research drugs. **Conclusion：**"4+7"volume-based procurement drugs have high selectivity in clinical practice, and can significantly reduce the pressure of patients seeking medical treatment, promote the development of generic drugs, rational use of drugs.

【**Key words**】"4+7"volume-based procurement; Large variety injection; DDDs; DDC; generic drugs

2019 年 1 月 17 日，国务院办公厅发布《国家组织药品带量采购和使用试点方案的通知》，选择在 11 个城市执行药品带量采购试点工作，通过以量换价，深化公立医院改革，降低群众医药负担，改善医疗保障[1]。此后带量采购工作持续进行，不断扩大，品种涵盖了众多慢性疾病领域用药。其中于 2021.5.29 正式执行的第四批国家药品带量采购，首次纳入了临床大品种注射液，因此本研究拟选择我院第四批大品种注射液的使用情况来分析带量采购政策的影响。

1 资料和方法

1.1 资料来源

通过医院信息系统（HIS）抓取我院第四批带量采购执行期间（2021.5.29-2022.5.28）大品种注射液中选药品及同通用名原研药品的使用情况，具体包括单支价格、使用数量、使用金额等数据。

1.2 方法

所得数据采用 excel 分析处理，分析大品种注射液的任务量完成情况、中选品种与原研药品使用数量比、使用金额比、用药频度比以及日均费用比。采用药物经济学分析法，依据《新编药物学》及药品说明书确定各药

物的限定日剂量值（DDD）[2]，用药频度（DDDs）＝药品消耗量/DDD，日均费用（DDC）＝药品的用药金额/DDDs。

2.结果

2.1 第四批带量采购大品种注射液

根据我院的诊疗范围以及药品使用情况，确定 3 种大品种注射液，分别为盐酸氨溴索注射液、注射用帕瑞昔布、注射用泮托拉唑钠，具体的中选及原研药品信息如表 1。其中带量采购政策带动原研药品联动降价，相关的原研药品降价幅度分别为 28.83%、26.46%、30.83%。

表 1　“4+7”带量采购大品种注射液信息

Table 1 Information of "4+7" large-variety injection purchased with quantity

药品名称	中选/原研	规格	厂牌	执行“4+7”前价格（元/支）	执行“4+7”后价格（元/支）	DDD 值
盐酸氨溴索注射液	中选	2ml:15mg	成都倍特药业股份有限公司	/	0.3800	120mg
	原研	2ml:15mg	西班牙勃林格殷格翰公司 Boehringer Ingelheim Espana,S,A.(上海勃林格殷格翰药业分装)	5.03	3.58	120mg
注射用帕瑞昔布钠	中选	40mg	江苏奥赛康药业有限公司	/	4.68	40mg
	原研	40mg	美国法玛西亚普强 Pharmacia and Upjohn Company(辉瑞制药有限公司分装)	110.53	81.28	40mg
注射用泮托拉唑钠	中选	40mg	成都百裕制药股份有限公司	/	2.68	40mg
	原研	40mg	德国 Takeda GmbH	101.00	69.86	40mg

2.2 中选药品任务量完成情况

在执行期间，3 种大品种注射液的实际采购量与规定的任务量相比，完成比均＞100%，其中，氨溴索注射液为 129.75%，注射用帕瑞昔布钠为 102.69%，注射用泮托拉唑钠为 348.19%。将任务量按照 12 个月进行平均进行分配，月度累计完成情况如图 2。

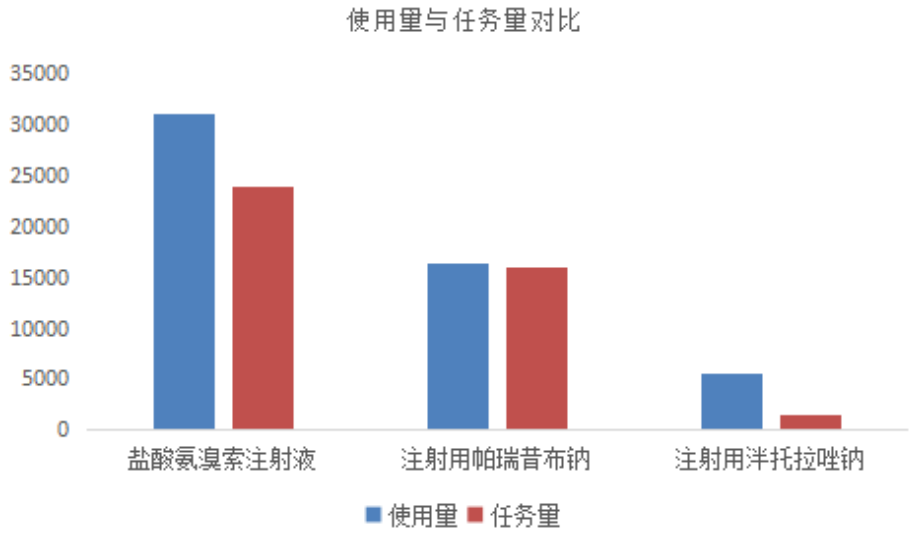


图 1 3 种大品种注射液使用量与任务量对比图

Figure 1 Comparison of injection dosage and task volume of three large varieties

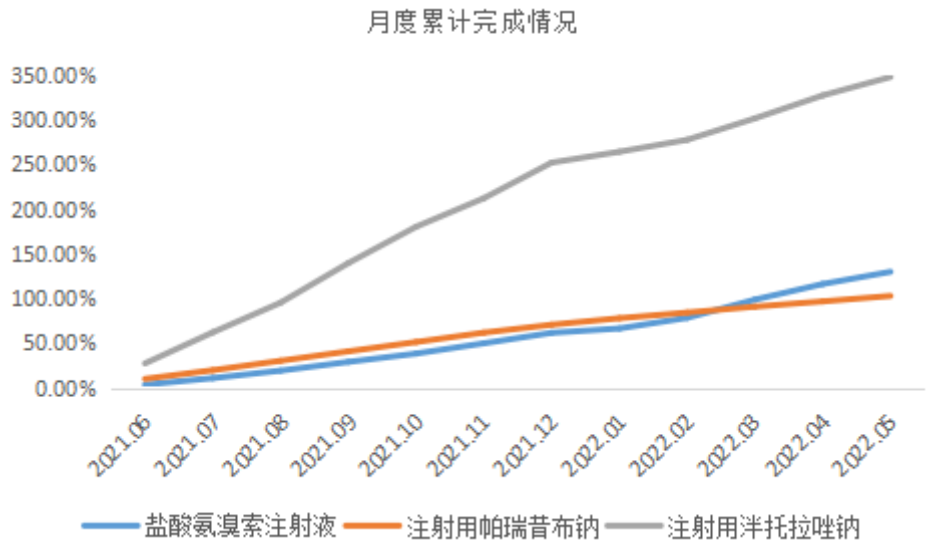


图 2　3 种大品种注射液月度累计情况变化趋势图

Figure 2 Change trend of the monthly accumulative situation of the three large varieties of injections

2.3 中选药品与原研药品使用量对比情况

3 种大品种注射液中选药品与原研药品的使用量对比图如图 3，其中注射用泮托拉唑中选品与原研药品的使用量对比最高为 196.58%，其次为注射用帕瑞昔布钠、盐酸氨溴索注射液。同时中选药品在同种通用名药品使用中占比依次为 66.28%、52.23%、28.49%。

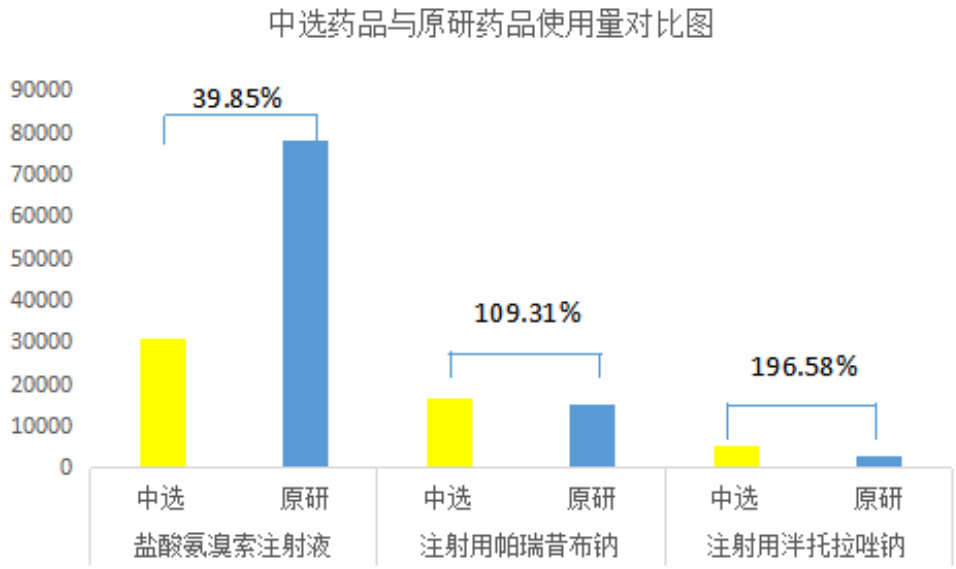


图 3　中选药品与原研药品的使用量对比图

Figure 3 Comparison of the usage of the selected drugs and the original drugs

2.4 中选药品与原研药品使用金额对比情况

3 种大品种注射液中选药品与原研药品的使用金额对比图如图 4，其中注射用帕瑞昔布钠与原研药品的使用金额相差最大，盐酸氨溴索注射液与原研药品金额比最小，占同种通用名使用金额最小。

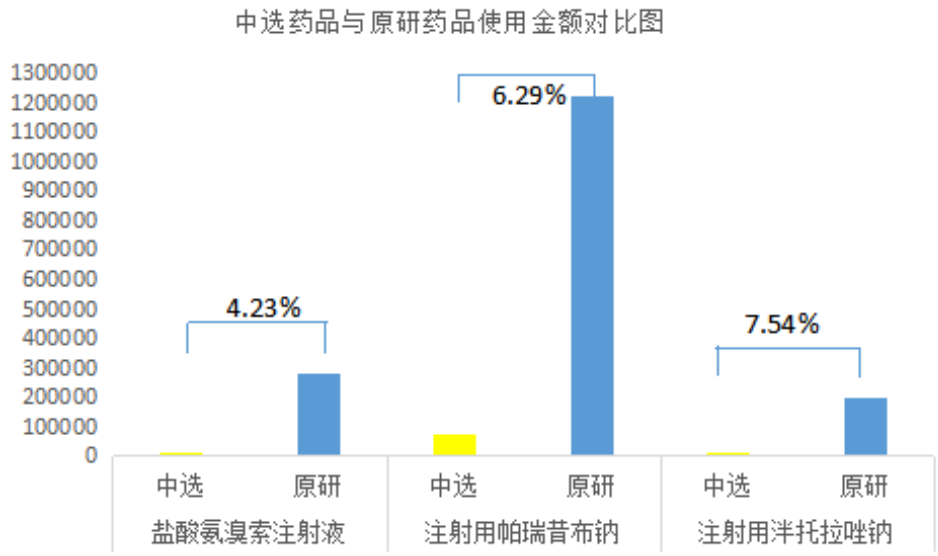


图 4 中选药品与原研药品使用金额对比图

Figure 4 Comparison of consumption amount of the selected drugs and the original drugs

2.5 中选药品与原研药品用药频度对比情况

3 种大品种注射液的用药频度（DDDs）对比图如图 5，其中只有盐酸氨溴索注射液中选药品的 DDDs 低于原研药品，其他两种注射液中选药品 DDDs 均大于原研药品。

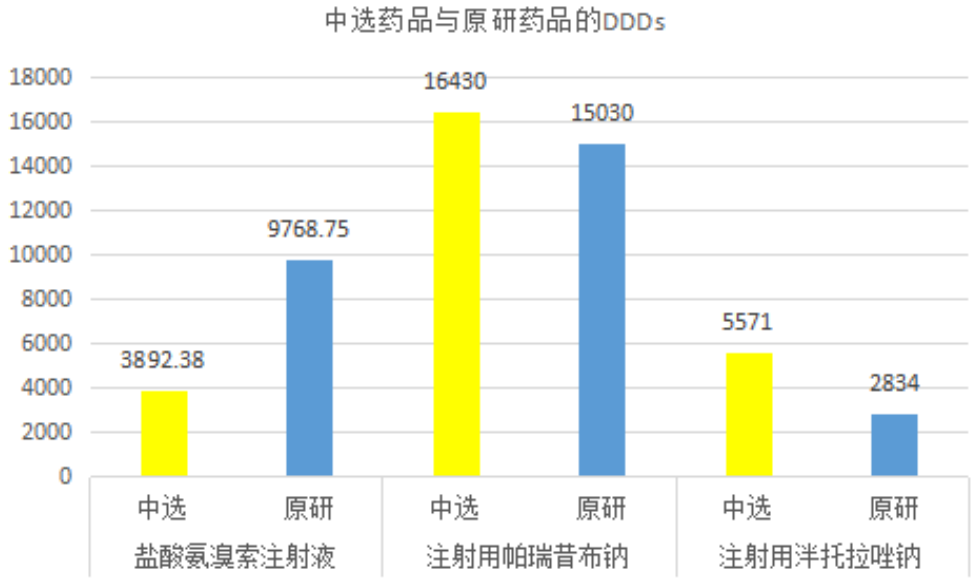


图 5 中选药品与原研药品的 DDDs

Figure 5 DDDs of the selected drug and the original drug

2.6 中选药品与原研药品日均费用对比情况

3 种大品种注射液中选药品与原研药品的日均费用（DDDc）对比图如图 6，其中中选药品的 DDDc 远低于原研药品，注射用帕瑞昔布与原研药品的 DDDc 相差最大。

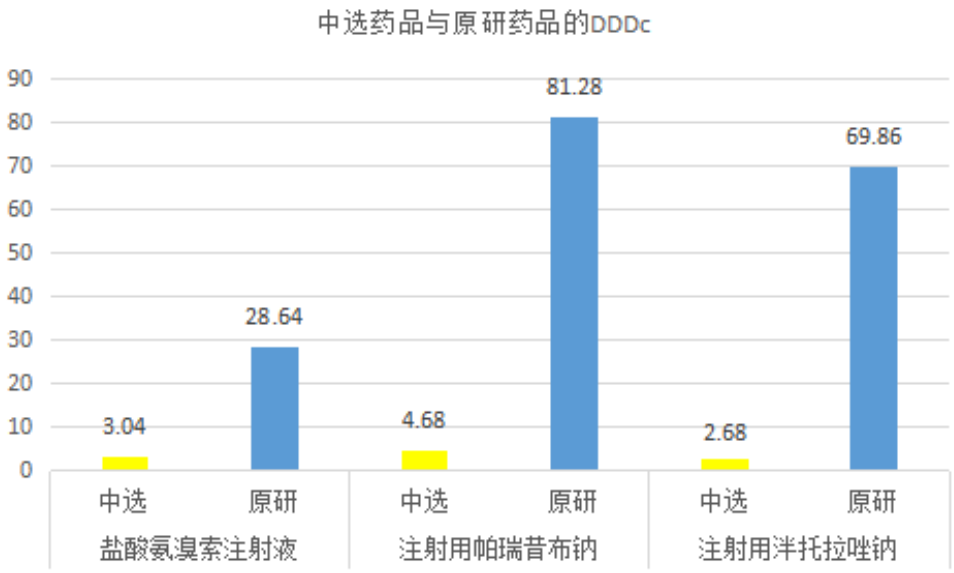


图 6 中选药品与原研药品的 DDDc

Figure 6 DDDc of the selected drug and the original drug

3、讨论

3.1 “4+7”带量采购完成情况

通过对“4+7”带量采购执行 1 年期间 3 种大品种注射液采购量与任务量对比来看，均 100%完成，说明临床对带量采购中选药品选择度与接受度较高，可能与随着带量采购工作持续进行有关，临床对于通过一致性评价的带量采购药品的疗效和安全性了解增加，在执行过程更加顺利。通过对月度累计完成图可以看出，执行初始中选药品使用量增长较快，随着年底医保结算周期结束，药品使用量增长幅度降低，因此在带量采购执行过程中，应该充分考虑季节、疾病特点、医保政策等对药品使用的影响，动态调整执行措施，以确保任务量顺利完成[3]。

3.2 “4+7”带量采购对药品费用的影响

医疗费用增长是目前全球面临的严峻问题，其中降低药品费用被认为是有力的措施。祛痰治疗目前已成为慢性气道炎症性疾病治疗的重要组成部分，祛痰治疗在改善患者临床症状、降低急性加重方面的临床价值[4]。盐酸氨溴索注射液的原研厂牌自 2000 年在我国注册上市以来，一直占据祛痰药的临床主要使用地位[5]。根据本研究，原研盐酸氨溴索注射液的 DDDc 为 28.64，中选药品的 DDDc 为 3.04，共计降低药品费用为 267944.18 元，采用中选药品可以显著降低患者的医疗压力。

根据《中国疼痛医学发展报告（2020）》数据显示，我国慢性疼痛患者人数超过 3 亿人，并且正以每年 1000 万到 2000 万的速度增长，疼痛已成为继心脑血管疾病、肿瘤之后第三大健康问题，严重影响人们的健康和生活质量。注射用帕瑞昔布作为非阿片类镇痛药品，广泛应用于术后镇痛、术前管理等，具有减轻炎症反应、降低外周和中枢敏化，提高疼痛阈值、不良反应小等特点[6]。原研药品的 DDDs 为 81.28，约为中选药品的 17 倍，中选药品在解决疼痛困扰方面惠及更多的患者。

注射用泮托拉唑钠作为质子泵抑制剂（PPI）类抑酸药，广泛应用于胃及十二指肠溃疡、胃食管反流、幽门螺杆菌感染等消化系统疾病[7]，通常需要 6 周以上的治疗疗程，而较高的 DDDs 可能会造成患者的依从性较差，从而中断治疗加重疾病进展。但中选药品的 DDDs 仅为 2.68，为保证治疗的连续性提供了重要选择。

3.3 带量采购对仿制药的影响

目前全球制药行业均面临着专利悬崖现象，据不完全统计,仅 2013-2017 年这 5 年内,全球就将有近 100 个畅销药品专利到期[8]，但在我国目前尚未出现明显的专利悬崖现象。我国正处在以仿制药为主、创新药为辅的阶段[9]，带量采购政策的实施能够很好地抓住仿制药市场，以较低的中选价格占领市场，通过买方力量集中，从而保

证和促进了药企的发展与进度。同时通过以量换价，刺激生产企业关注科技和控制成本之间的竞争，从而促进仿制药质量提升。此外，原研药品为了保持市场份额，虽然不能中选但也往往采取联动降价措施，促进了我国药品专利悬崖的产生[10]。并且随着带量采购实施的不断实施，更多药品纳入集采范围，将会产生更大的影响，进而带动我国仿制药相关法律制度的建立健全。

3.4 带量采购与 DRGs 付费

DRGs 是按照国际疾病诊断分类标准，根据病人的年龄、性别、临床诊断、治疗方式、疾病严重程度、合并症与并发症、转归等因素，将临床过程和费用消耗相似的病例分到同一个诊断相关组中，经过科学的模型测算进行定额给付[11]。DRGs 付费方式有利于缓解医保财政压力、避免过度医疗、推动医院成本管控、促进诊疗流程规范化等等优势，同时也要求医院必须提高成本管控能力，从粗放式的成本核算转变成精细化管理阶段，减少医疗资源的浪费，用最低的成本将病人的病治好，才能获得最大的盈余[12]。带量采购药品相较于其他类型药品，具有在保证药品质量的同时具有价格低廉的特点，因此在临床路径制定过程中具有较大优势，从而有利于 DRGs 付费中成本控制的要求，同时随着 DRGs 付费方式的推行，也将进一步带动和保证保证带量采购药品的应用，具有相辅相成的特点，从而更多获益给患者[13]。

参考文献

[1] 国务院办公厅.国务院办公厅关于印发国家组织药品集中采购和使用试点方案的通知国办发（2019）2 号[J].中国制药信息,2019（3）:7-10.

[2] 陈新谦，金有豫，汤光．新编药物学（第 17 版）[M]．北京：人民卫生出版社，2011：656－664.

[3] 金凡茂,叶芳敏,梁晓美,刘丽仙,陈陶陶.医院药品带量采购现状分析与管理对策探讨[J].中医药管理杂志,2021,29(06):121-124.DOI:10.16690/j.cnki.1007-9203.2021.06.055.

[4] 申永春,文富强.《慢性气道炎症性疾病气道黏液高分泌管理中国专家共识》解读[J].中国实用内科杂志,2016,36(02):131-132+136.

[5] 范倩倩,张波,李大魁,梅丹.注射用盐酸氨溴索的临床应用现状与思考[J].中国药学杂志,2015,50(09):816-820.

[6] 曹璐,雍素云,张鹏,左燕,李茁.帕瑞昔布钠与氟比洛芬酯用于外科手术超前镇痛疗效和安全性的 Meta 分析[J].临床药物治疗杂志,2022,20(03):73-80.

[7] 李世立,莫翠毅,许保.不同剂量泮托拉唑治疗消化性溃疡并上消化道出血临床观察[J].中国药业,2022,31(13):91-93.

[8] 刘友华,隆瑾,徐敏."专利悬崖"背景下制药业的危机及我国的应对[J].湘潭大学学报(哲学社会科学版),2015,39(06):80-84.

[9] 申团结,黄泰康.我国医药企业对专利悬崖期的药品仿制策略初探[J].中国新药杂志,2014,23(02):134-136+153.

[10] 孙言,朱正,杨莉.国家组织药品集中带量采购价格降幅影响因素分析[J].中国卫生政策研究,2022,15(02):54-59.

[11] 李乐乐,李怡璇.我国医保支付方式改革的治理路径分析——基于 DRG 与 DIP 的机制比较[J].卫生经济研究,2022,39(09):43-48.

[12] 冯丽会.DRG 支付改革下公立医院成本核算的思考与探索[J].财会学习,2022(07):85-87.

[13] 杨翼帆,王淑慧,杨凡,苏丽华,胡亚楠,段剑飞,刘瑞普.DRG 支付方式下医院管理模式探索[J].中国卫生标准管理,2021,12(03):25-28.

Electrochemical immunosensor AuNPs/NG-PANI/ITO-PET for the determination of BDNF in depressed mice serum

Yanping Wang[a], Yan Chen[a], Min Guo[a], Xiaohui Mo[a], Fangdi Hu[a], *, Yongling Du[b,] *

（[a] School of Pharmacy, Lanzhou University, State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Codonopsis Radix Industrial TechnologyEngineering Research Center, Gansu Province, Lanzhou, Gansu, 730000；[b] School of life science and engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730000, Gansu）

【**Abstract**】In this study, a novel electrochemical immunosensor was developed for the highly sensitive detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a well-known depression marker. The immunosensor was fabricated by modifying indium tin oxide-coated polyethylene terephthalate (ITO-PET) with N-doped graphene-polyaniline (NG-PANI) and gold nanoparticles (AuNPs) to enhance the conductivity and protein loading capacity. Subsequently, BDNF was immobilized onto the electrode surface via gold-sulfur bonds, followed by the attachment of biotinylated antibody (Biotin-Ab) and horseradish peroxidase-avidin (HRP-Avidin) to create the final immunosensor (HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET). The proposed immunosensor exhibited a linear range (0.781–400 pg/mL) with a low limit of detection (LOD) of 0.261 pg/mL (S/N = 3) and excellent reproducibility (RSD = 1.4%) and stability (92.7%, RSD = 3.1%). Additionally, the immunosensor demonstrated good anti-interference performance and good recovery (98.1%–107%). To evaluate the practical utility of the immunosensor, BDNF levels were quantified in the serum of mice with depression induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS). The results indicated that the serum BDNF levels were significantly decreased in the depression model group compared to the control group, highlighting the potential of this immunosensor for clinical detection of BDNF in depression diagnosis and treatment.

【 **Keywords** 】 Nitrogen-doped graphene-polyaniline (NG-PANI), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Electrochemical immunosensor

1.Introduction

The prevalence of depression is a significant public health issue, with severe consequences for those affected [1]. The current approach to diagnosis of depression primarily depends on the diagnostic criteria outlined in The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)[2], which is associated with a high rate of misdiagnosis[3]. Hence, there is a growing need for a precise and objective method for clinical diagnosis of depression. With the continuous development of experimental techniques, a plethora of biomarkers associated with depression have emerged, including Cortisol, human apolipoprotein A4 (ApoA4), heat shock protein 70 (HSP70), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF)[4-7]. BDNF, a homodimer protein of 27 kD[8], is closely linked to several major psychiatric disorders. The "depression neurotrophic hypothesis" [9] posits that low levels of BDNF are related to major depression. Primo de Carvalho Alves and Sica da Rocha [10] have observed critically lower levels of blood BDNF in patients with major depression than in the healthy group. Moshe et al.[11] have found that BDNF levels increase significantly after treatment for depression. Therefore, BDNF can serve as an ideal disease marker for diagnosing depression.

Corresponding authors. Tel./fax: +86-0931-8915686, +86-0931-2302664. * E-mail addresses: hufd@lzu.edu.cn (F. Hu)
duyl@lzu.edu.cn (Y. Du)

However, traditional BDNF determination methods such as Western blot (WB)[12] and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [13, 14] have limitations for use in early determination and continual monitoring due to their low variation in BDNF concentrations caused by early depression, technical expertise required, complex procedure, high cost, and non-portability. In contrast, the use of electrochemical immunosensors has emerged as a promising alternative for the detection of biological factors in body fluids, tissues, and cells quickly and has the characteristics of high efficiency, high selectivity, and non-destructiveness[15, 16], which has achieved rapid development in the determination of trace disease markers[17]. Bockaj et al.[18] constructed label-free immunosensors and Akhtar et al.[19] constructed dual-probe immunosensors to detect BDNF in human-derived blood samples with good sensitivity and selectivity. However, there is a lack of electrochemical sensors for the rapid and sensitive determination of BDNF concentrations in the serum of depression models. To address this gap, this study proposes an electrochemical immunosensor (HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET) for rapid and sensitive determination of BDNF in the serum of animal models of depression.

The HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET electrochemical immunosensor represents a promising approach for the detection of BDNF in serum samples. This novel sensor is based on low-resistance ITO-PET, which provides excellent electrical conductivity and light transmittance[20, 21], thereby allowing for the acquisition of both spectral and electrochemical signals[22-24], in addition, ITO-PET is flexible and has good stability and conductivity when stretched, twisted and bent[25]. Polyaniline (PANI), due to its low cost, good chemical stability, easy synthesis[26], good electrical, optical, and redox properties, is widely used in electronic and optical devices[27, 28]. PANI deposited by the Chronopotentiometry[29] has excellent photoelectric properties and high electrochemical activity; however, because of its particular polymerization form, PANI only has good conductivity in acidic environments ($2<pH<4$) and has poor conductivity or even no conductivity in neutral and alkaline solutions[30]. Studies have shown that the use of proton acid doping, carbon nanotube doping, or graphene doping can change the electrical activity of PANI in a neutral environment[31, 32]. As a graphene-modified material, nitrogen-doped graphene (N-Gr) improves the catalytic activity of the material significantly [33] and has good biocompatibility[34]. If N-Gr is mixed with PANI to prepare a new composite material (NG-PANI), which may have good conductivity and biocompatibility in neutral environments, so that it can be used for the detection of BDNF in serum. Additionally, metal nanoparticles are widely used in electrode modification because of their vast specific surface area, small particle size, and unique electronic-optical properties, especially the composite of metal nanoparticles (such as gold, platinum, silver, copper, target) with modified materials can improve its stability, electrochemical activity, and sensing performance[35-37]. Among many metal nanoparticles, gold nanoparticles (AuNPs) have better conductivity after being combined with PANI under the same conditions, which can increase the electronic transfer rate on the electrode surface[37]. Moreover, BDNF can be firmly bound to the electrochemical biosensor through the gold-sulfur bonds (Au-S) and intermolecular forces, which provides the possibility for BDNF determination. Third, the combination of biotin and streptavidin is the most robust noncovalent interaction in nature, being exceptionally stable against physical and chemical perturbations[38]. Biotinylated antibodies (Biotin-Ab) can specifically conjugate to horseradish peroxidase-labeled streptavidin (HRP-Avidin) as a signal amplification measure used to improve sensitivity and selectivity. Yang et al.[39] constructed an antibody-biotin-streptavidin-horseradish peroxidase sensor for the rapid and ultrasensitive determination of fumonisins, which also exhibited satisfactory recovery and detection limits.

This study developed a novel electrochemical immunosensor (HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET) for the accurate quantification of BDNF content in biological samples, as depicted in Fig. 1. The construction process was meticulously characterized by diverse analytical techniques, including scanning electron microscopy (SEM), Fourier infrared spectroscopy (FT-IR), and electrochemical methods, and the key parameters (such as NG-PANI deposition voltage, N-Gr to PANI ratio, deposition time of AuNPs and incubation time of BDNF) were optimized during the

construction process. Afterward, the immunosensor's analytical performance was evaluated by examining the differential pulse voltammetry (DPV) response values of BDNF standard solutions with different concentrations. Subsequently, the immunosensor was employed for the determination of BDNF concentrations in the serum samples of normal and chronically stressed mice (modeled by chronic unpredictable mild stress (CUMS)) to further validate its applicability. The serum BDNF concentrations were also measured by ELISA for comparative purposes, further validating the constructed immunosensor's analytical performance.

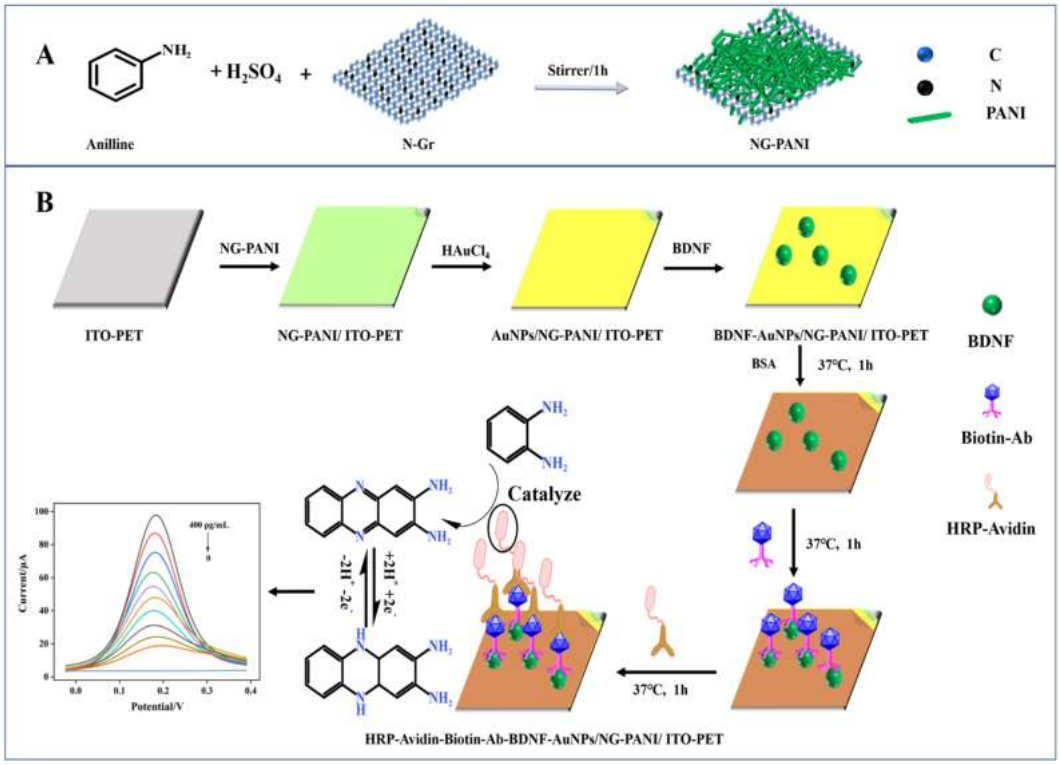


Fig. 1 Schematic of (A)Synthesis of NG-PANI, (B)Fabrication of immunosensor and detection of BDNF.

2. Experimental

2.1 Materials

2.1.1 Apparatus

Metrogm Autolab® Nova electrochemical workstation (Metrohm Co., Ltd.), the determination cell is composed of the traditional three-electrode system: the modified ITO-PET conductive film is the working electrode, the saturated calomel electrode (SCE) as the reference electrode and the platinum electrode is the auxiliary electrode, ITO-PET is purchased from Wesley (Foshan, China). PHS-3B type pH meter (Shanghai Precision Scientific Instrument Co., Ltd.); JJ110 PTFE electrode holder (Shanghai Sanmu Industry Co., Ltd.); KQ-50 Ultrasonic Cleaner (Kunshan Ultrasonic Instrument Co., Ltd.); DF-101S heat-collecting constant temperature heating magnetic stirrer (Zhengzhou Great Wall Science, Industry and Trade Co., Ltd.); FTIR-650 infrared spectrometer (Tianjin Guangdong Technology Co., Ltd.); JSM-6701F cold field emission scanning electron microscope (Japan Electron Optics Company) is used to characterize the morphology of the modified electrode.

2.1.2 Reagents

Nitrogen-doped graphene (500 mg, Nitrogen content: ~3.0wt% BET> 500) is purchased from Nanjing Xianfeng Nano

Material Technology Co., Ltd. (Nanjing, China); Hydrogen peroxide (30%, guaranteed reagent), gold chloric acid (analytical pure), BSA(biological reagent), anhydrous ether (> 98%, analytical pure) are purchased from Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd. (Shanghai, China); BDNF, Biotin-anti-BDNF and HRP-Avidin(biological reagent) are purchased from Elabscience(Shanghai, China); pH = 7.4 PBS (Phosphate-Buffered Saline) is purchased from Biosharp(Lanzhou, China); Tween-20 (> 99%, chemical pure), KCl (> 99.5%, analytical pure), and o-Phenylenediamine(chemical pure) are purchased from Shanghai Macklin Biochemical Co., Ltd (Shanghai, China).All experimental water is deionized water. The electrolyte solution is vented with nitrogen to remove oxygen, and the experiment is always carried out in a nitrogen atmosphere.

2.1.3 Experimental animals

20 Kunming mice weighing 18-22 g were purchased from Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (license number SYXK (GAN) 2019-0002). All the experimental procedures followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, eighth edition (ISBN-10: 0-309-15396-4) and were approved by the Ethics Committee of Lanzhou University.

2.2 Preparation of AuNPs/NG-PANI/ITO-PET

ITO-PET conductive film was cut into 20 mm×10 mm and ultrasonically cleaned with acetone, alcohol, and deionized water for 5 minutes. Then NG-PANI was deposited onto the ITO-PET surface by a mixed solution containing 0.3 M aniline, 0.5 M H_2SO_4, and 0.5 mg/100 mL N-Gr by chronopotentiometry at 1.1V for 400 s. Next, the NG-PANI/ITO-PET electrode was immersed in 0.1 M HCl to remove any remaining aniline monomer and oligomer from the polymer film. The electrode was then washed several times with deionized water and dried in a vacuum at 60°C for 24 hours to obtain a conductive NG-PANI/ITO-PET electrode. To create AuNPs/NG-PANI/ITO-PET, the prepared NG-PANI/ITO-PET electrode was placed in a 1 mg/mL $HAuCl_4$ solution, and then chronoamperometry was used to deposit the AuNPs onto the electrode at -0.3 V for 250 s. After washing several times, the basic electrode AuNPs/NG-PANI/ITO-PET was obtained.

2.3 Preparation of BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET

Subsequently, the preferred AuNPs/NG-PANI/ITO-PET electrode was carefully submerged in 1 mL of phosphate-buffered saline solution (pH = 7.4) containing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to allow for stable attachment of the protein on the electrode surface. Following this, the modified electrode was gently rinsed with phosphate-buffered saline with Tween-20 (PBST) to eliminate any weakly adsorbed BDNF molecules. Next, BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET was placed in 1 mL of buffer solution comprising 50 μL of 2% bovine serum albumin (BSA) and kept at 37 ℃ for 1 hour to block any other active sites and to prevent non-specific adsorption. The resulting BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET electrode was carefully stored at 4 ℃ to be used later for further investigations.

2.4 Electrochemical measurement and immune response

2.4.1 Characterization of basic electrodes

Cyclic voltammetry (CV) and Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) use a 10 mL 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ solution containing 0.10 M KCl as the electrolyte. CV's measurement conditions for the characterization of the basic electrode are: voltage range -0.4 V ~ 0.8 V; scanning speed is 50 mV/s. EIS test setting frequency range: 0.1 Hz～10^5 Hz, sine wave signal amplitude is 5 mV, voltage is 0.2 V. Before the measurement, the bottom liquid was vented with nitrogen to remove dissolved oxygen.

2.4.2 Immune response and BDNF measurement process

Firstly, BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET was washed with PBST and placed into EP tubes, where it was incubated at 37°C for 60 minutes in a 1 mL solution containing 50 μL of Biotin-Ab diluent, which was sufficient for the intended purpose. The electrode was then rinsed with PBST to remove any physically adsorbed Biotin-Ab and yield Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET. Subsequently, the electrode was transferred to another EP tube containing a 1 mL solution with 50 μL(sufficient) of HRP-Avidin and incubated at 37°C for 60 minutes, followed by washing it three times with washing solution. Ultimately, the HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET electrochemical immunosensor was obtained. To investigate the electrochemical response of the modified electrode, DPV was used in a 10 mL pH = 7.4 PBS buffer solution containing 2 mM o-phenylenediamine and 4 mM hydrogen peroxide. The DPV response values were obtained at different concentrations of BDNF, and the bottom liquid was vented with nitrogen to remove dissolved oxygen. Furthermore, a mathematical model was used to obtain the linear relationship between the concentration of the test solution and the electrochemical response value. DPV measurements were performed in the potential range of -0.3~ 0.8 V with a pulse amplitude of 25 mV, a pulse width of 50 ms, a pulse period of 0.5 s, and a potential increment of 5 mV.

2.5 Samples

2.5.1 Construction of CUMS model and serum sample collection

Initially, the mice were randomly assigned to two groups: the negative control group and the chronic unpredictable mild stress (CUMS) model group after a period of adaptive rearing. The CUMS protocol was performed according to the previously described methods[40]. Briefly, a series of stressors were applied once every day for two weeks in a random order, including 24 hours of food and water deprivation, exposure to damp sawdust for 24 hours, forced restraint for 2 hours, swimming in cold water at 4℃ for 5 min, and tail clamp for 1 min. To avoid repetition, the same stimulation method was not repeated within two days. At the end of the experiment, the mice were first anesthetized with anhydrous ether (purity > 98%). Then, the blood samples were immediately collected and stored at room temperature for 1 hour or overnight at 2-8 °C. The samples were then centrifuged at 2-8 °C at 1000× g for 15 minutes, and finally, the supernatant was collected to determine the content of BDNF in serum using the constructed electrochemical immunosensor and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques.

2.5.2 Behavioral abnormality evaluation

Behavioral abnormalities in CUMS-induced depression mice were assessed by behavioral characteristics, weight changes, and forced swimming immobility time, and successful induction of depression was determined by comparing the above behavioral of CUMS-model mice with normal mice.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of AuNPs/NG-PANI/ITO-PET

3.1.1 Electrochemical characterization of basic electrodes

Cyclic voltammetry (CV), current density and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to characterize the electrode's construction process. CV is an electrochemical technique that can be used to study the redox behavior of a system. The current measured in CV is related to the electrochemical reaction occurring at the electrode surface, which in turn is related to the surface area of the electrode. Fig S1 is the CV of the BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET construction process

Current density is a measure of the amount of electrical current flowing through a unit area of a material or surface. It is

typically measured in units of microamperes per square centimeter (μA/cm²) in electrochemistry. The current density takes into account the surface area of the electrode, allowing for a more accurate comparison of electrochemical performance between different electrode materials or modifications. By dividing the current (μA) by the surface area (cm²), the resulting current density (μA/cm²) provides a normalized value that reflects the electrochemical activity of the material or surface.

In this study, we investigated the electrochemical characteristics of the BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET construction process using various electrochemical techniques. As shown in Fig. 2**A**, our findings suggest that the deposition of PANI on the surface of ITO-PET significantly enhances the current density, albeit without the appearance of a complete pair of redox peaks, due to the poor conductivity of PANI in a neutral solution. By switching to NG-PANI, a combination of N-Gr and PANI, we observed a significant increase in the electrochemical activity in a neutral environment, which is conducive to the transfer of electrons. Chronoamperometry was used to combine AuNPs, leading to a slight increase in current density. Interestingly, upon incubating BDNF on the biosensor surface, we noted that the pair of redox peaks, which were present in the absence of BDNF, still flowed. However, the current density was significantly reduced, indicating the hindering effect of biomolecules on electrochemical reaction. This suggests that BDNF binding to the biosensor surface affects the electrochemical reaction, leading to a decrease in the current density. The observed binding interaction between BDNF and the biosensor surface offers insights into the detection mechanism and provides an opportunity to improve the sensitivity and specificity of the biosensor for BDNF detection.

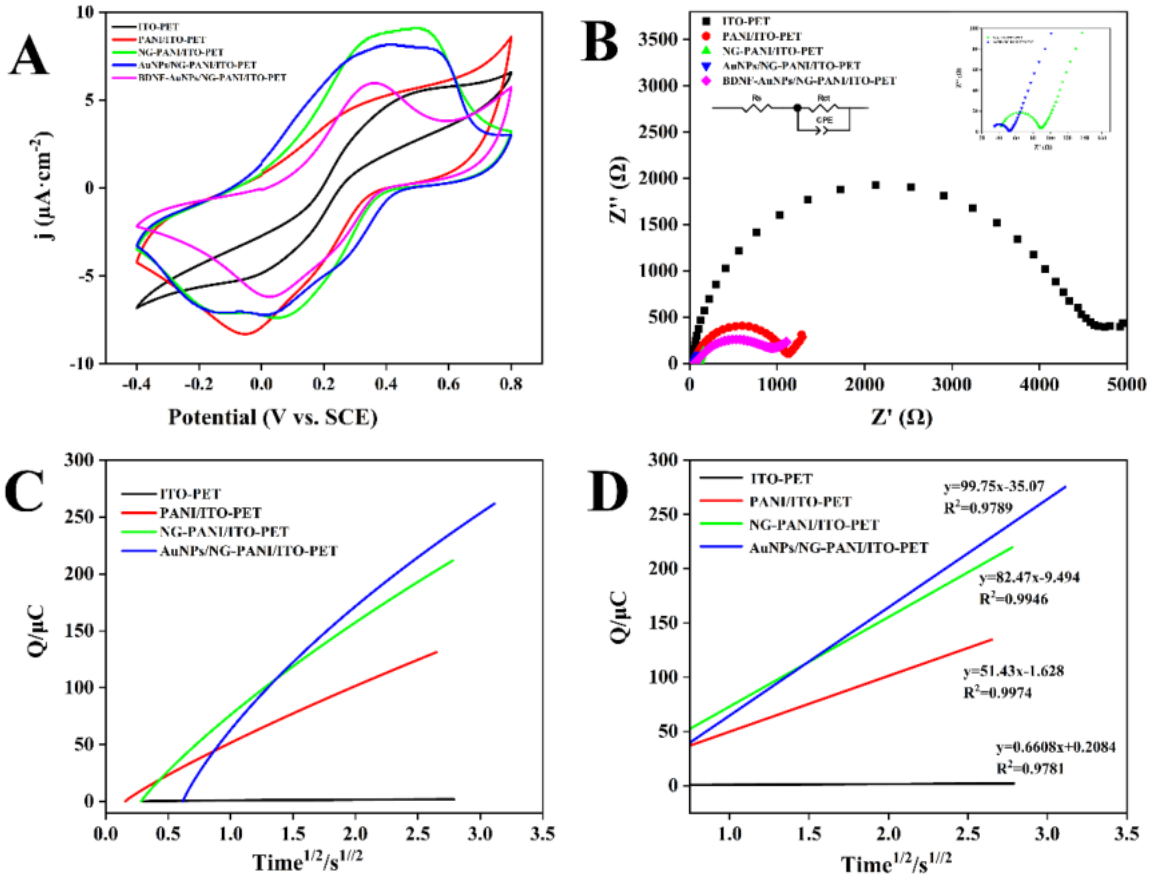


Fig. 2 (A) CVs of the electrode in a solution containing 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl (Scan rate: 50 mV/s); (B)EIS of the electrode in a solution containing 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl. The effective surface area characterization (C) and Q-$t^{1/2}$ fitting relationship (D) in a solution containing 1mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, 1.0 M KCl.

The binding mechanism of BDNF to the electrochemical biosensor was further investigated using EIS to monitor the resistance R_{ct} of the BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET construction. The high-frequency region of the Nyquist plot shown in Fig. 2**B** exhibits a semicircle that represents the electron transfer resistance related to the electrical conductivity at the electrode-electrolyte interface. The semicircle in the high-frequency region of PANI/ITO-PET and NG-PANI/ITO-PET was notably smaller than that of ITO-PET, demonstrating that PANI and NG-PANI possess excellent electrochemical performance, which effectively promotes the transfer of electrons on the electrode surface. Moreover, the incorporation of AuNPs/NG-PANI/ITO-PET led to a slight reduction in R_{ct} due to the high conductivity of AuNPs. However, upon successful construction of BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET, R_{ct} significantly increased, which indicates that the binding of BDNF to the electrode surface impeded the electron transfer. This result confirms the successful construction of BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET and provides valuable insight into the binding mechanism of BDNF to the electrochemical biosensor.

3.1.2 Characterization of effective surface area

In order to determine the electrochemical effective surface area of ITO-PET, PANI/ITO-PET, NG-PANI/ITO-PET, and AuNPs/NG-PANI/ITO-PET, four electrodes were subjected to chronocoulometric analysis using 1 mM K3[Fe(CN)6] as the probe molecule, as depicted in Fig. 2C. According to the Anson equation:

$$Q(t) = \frac{2nFAcD^{1/2}t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{dl} + Q_{ads}$$

Herein, c represents the concentration of the substrate in the electrolyte, D is the diffusion coefficient (the diffusion coefficient of 1 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ in 1.0 mol/L KCl solution is 6.3×10^{-6} cm^2/s), n is the number of electrons transferred, Q_{dl} is the electric double layer charge, Q_{ads} is the induced charge, A is the electrochemical effective surface area of the electrode, and F is the Faraday constant (96485.33289 ± 0.00059 C/mol). Fig. 2**D** showed that Q and $t^{1/2}$ have a good linear relationship. According to the slope of the linear equation, the electrochemical effective surface area of ITO-PET, PANI/ITO-PET, NG-PANI/ITO-PET, and AuNPs/NG-PANI/ITO-PET were calculated to be 1.03, 80.2, 128 and 155, respectively. This evidences that the effective surface area of these electrodes was substantially augmented, which in turn conferred more binding sites for biomacromolecules, thereby facilitating the ultrasensitive detection of BDNF.

3.1.3 Morphology characterization of modified electrodes

In the study, the Fourier-transform infrared (FT-IR) spectra of various materials were analyzed, including N-Gr/ITO-PET, PANI/ITO-PET, NG-PANI/ITO-PET, and AuNPs/NG-PANI/ITO-PET, as shown in Fig. 3**A, B**. The FT-IR spectra revealed a wealth of information about the chemical and physical properties of the materials. The presence of characteristic peaks in the spectra indicated the formation of specific chemical bonds and structural features in the materials. In particular, the FT-IR spectra of PANI showed peaks at 1580 cm^{-1} and 1489 cm^{-1}, which were attributed to the C=C stretching vibration of the quinone ring and the benzene ring, respectively. Additionally, peaks at 1298 cm^{-1} and 1124 cm^{-1} were caused by the C-N or $C-N^+$ stretching vibration in the benzene ring and the C-H bending vibration in the quinone ring. These characteristic peaks provided evidence for the formation of emeraldine salt in the intermediate state of polyaniline and demonstrated the good delocalization phenomenon in the prepared material. The FT-IR spectra of N-Gr showed absorption peaks of C=N and C-N bonds at 1156 cm^{-1} and 1160 cm^{-1}, respectively. When PANI was combined with N-Gr to form NG-PANI, the peak at 1119 cm^{-1} increased, which was attributed to the characteristic absorption of C-N. The similar infrared absorption observed in the FT-IR spectra of PANI and NG-PANI demonstrated that the basic structure of PANI remained intact after the addition of NG, thus proving the successful construction of NG-PANI.

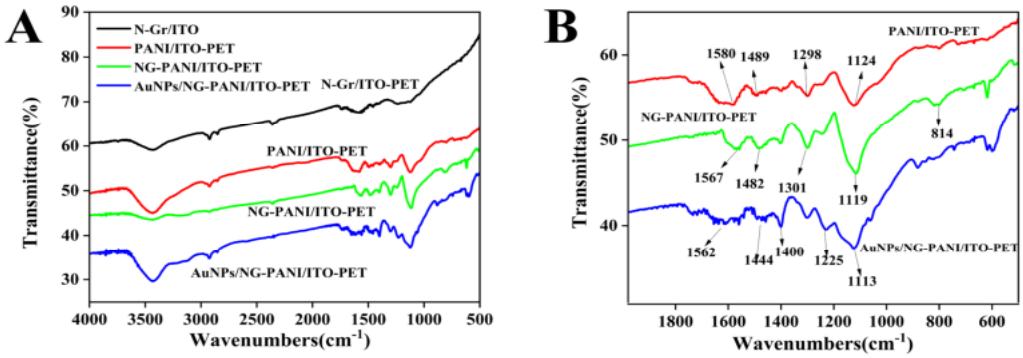


Fig. 3 FT-IR of N-Gr/ITO-PET, PANI/ITO-PET, NG-PANI/ITO-PET, AuNPs/NG-PANI/ITO-PET.

The FT-IR spectra of AuNPs/NG-PANI still showed the characteristic peaks of PANI, but a red-shift had occurred. This was likely due to the addition of gold nanoparticles, which increased the delocalization of π electrons in the NG-PANI composite and weakened the double bond of the carbonyl group. The effective electrostatic interaction between NG-PANI and AuNPs was demonstrated by the shift in the infrared absorption of the compound to the low-frequency region. Overall, the FT-IR spectra provided valuable insights into the chemical and physical properties of the various materials used in the study, and confirmed the successful preparation of the base electrode AuNPs/NG-PANI/ITO-PET.

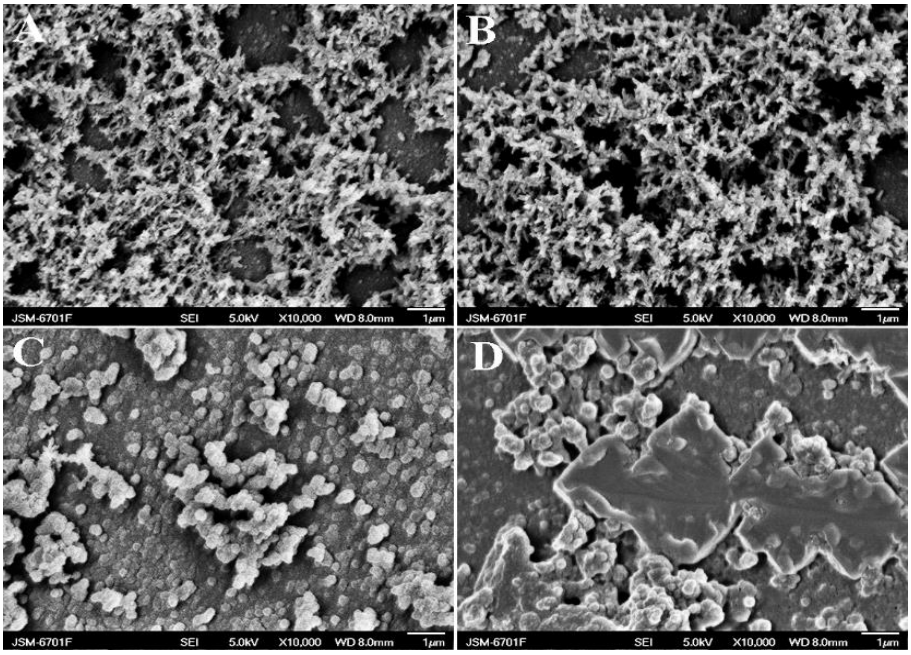


Fig. 4 SEM of PANI/ITO-PET (A), NG-PANI/ITO-PET (B), AuNPs/NG-PANI/ITO-PET (C), and BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET (D)

Scanning electron microscopy (SEM) was employed to analyze the morphology and structure of each modified electrode. As demonstrated in Fig. 4**A**, the PANI/ITO-PET electrode, prepared via Chronopotentiometry, exhibited needle-pointed nanorods, which not only substantially increased the effective surface area of the base electrode but also significantly improved its electrical conductivity. By incorporating a small amount of N-Gr into the PANI solution, as shown in Fig. 4**B**, the resulting NG-PANI/ITO-PET electrode still retained the nanorod characteristics of PANI/ITO-PET, while simultaneously increasing the surface layer thickness and effective porous structure of the modified material. This ultimately led to an even more extensive effective surface area and a slightly higher ion migration rate than PANI alone.

After washing the electrodes several times and depositing AuNPs, a thick gold film can be observed attached to the NG-PANI/ITO-PET electrode, as illustrated in Fig. 4**C**. The AuNPs were found to have a small particle size, high content, and retained some characteristics of the NG-PANI/ITO-PET, resulting in high electrical conductivity. Upon incubation with the antigen, as shown in Fig. 4**D**, BDNF was successfully attached to the surface of the AuNPs/NG-PANI/ITO-PET electrode, indicating a relatively large protein. These results suggest that the BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET electrode was successfully constructed, representing a promising approach for biosensing and bioanalytical applications.

3.2 Analytical characteristics of HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET

In this study, we aimed to evaluate the analytical performance of an immunosensor that was constructed using an HRP-Avidin-Biotin-Ab system through DPV. To ensure specific binding between BDNF and Biotin-Ab, we first blocked the remaining active sites on the electrode surface with BSA. We then immobilized a limited amount of BDNF on the electrode surface by combining it with a sufficient amount of Biotin-Ab. The surface residue Biotin-Ab was then rinsed off before HRP was immobilized on the immunosensor via specific binding between Biotin-Ab-BDNF and HRP-Avidin. Next, the immunosensor was placed in a 10 mL PBS buffer solution with a pH = 7.4 containing 2 mM o-phenylenediamine and 4 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) to achieve sensitive determination of BDNF content. HRP catalyzes the decomposition of H_2O_2, which converts o-phenylenediamine into 2,3-diaminophenothiazine, and the electrochemical signal is generated by a reversible reaction involving 2,3-diaminophenothiazine. The DPV electrochemical response value varies depending on the BDNF content, the more BDNF content in the solution, the more HRP was bound, and finally, the higher the DPV electrochemical response value. Thus, the DPV electrochemical response value is positively correlated with the amount of BDNF to be measured, enabling accurate quantification of BDNF levels.

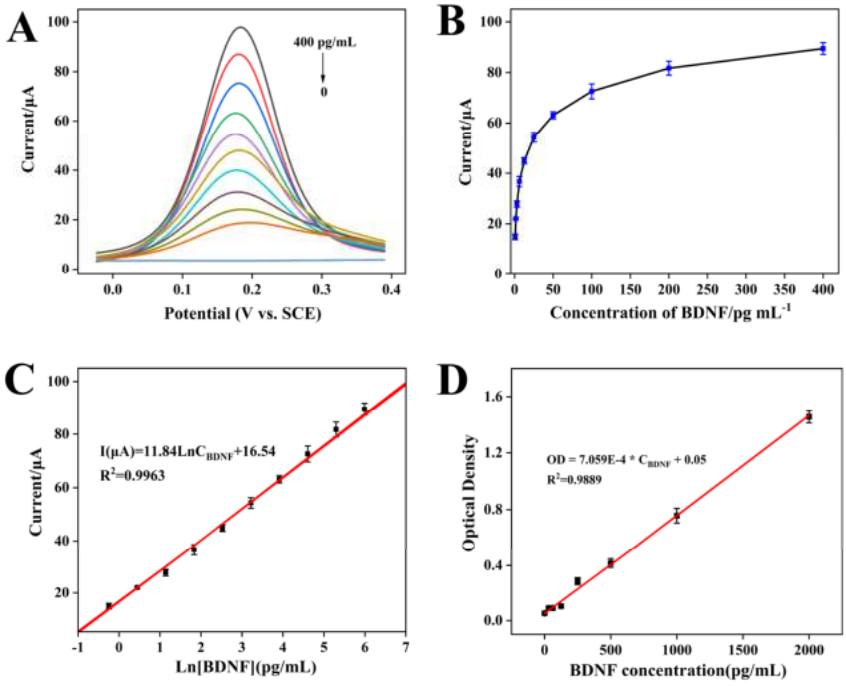


Fig. 5 (A) DPV of HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET to different concentrations of BDNF in 10 mL pH = 7.4 PBS buffer solution containing 2 mM o-phenylenediamine and 4 mM hydrogen peroxide (B) HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET detects the curve relationship between different concentrations of BDNF and the corresponding DPV response value. (C) Linear relationship of HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET vs. Ln C_{BDNF}. (D) Optical density and linear relationship of different concentrations of BDNF by ELISA

We prepared immunosensors using standard solutions containing varying concentrations of BDNF (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.781, and 0 pg/mL). The modified electrodes were washed and dried before being immersed in solutions containing 50 μL of sufficient Biotin-Ab and 50 μL of sufficient HRP-Avidin to form HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET electrochemical immunosensors with different HRP content. The immunosensors were then subjected to DPV in a 10 mL PBS buffer solution with a pH = 7.4, containing 2 mM o-phenylenediamine and 4 mM hydrogen peroxide, to determine the BDNF content in the sample. As shown in Fig. 5**A**, the DPV response of the HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET immunosensors gradually decreased as the concentration of BDNF in the test solution decreased. This observation confirms the successful construction of immunosensors for the rapid and sensitive determination of BDNF. The DPV response values were found to be positively correlated with the BDNF concentration in the samples.

The performance of the immunosensor was evaluated by analyzing various concentrations of BDNF standard solutions under the same conditions. The relationship between the DPV response value and the concentration of BDNF is depicted in Fig. 5**B**, and the linear correlation between the concentration of BDNF and its DPV response is presented in Fig. 5**C**. Within the concentration range of 0.781 pg/mL- 400 pg/mL, the DPV peak current exhibited a good linear correlation with LnC_{BDNF}. The linear equation was: I(μA) = (11.84 ± 0.21) LnC_{BDNF} + (16.54 ± 0.38), R^2=0.9963. Of particular significance is the exceptional adsorption capacity of the immunosensor, coupled with the impressive effective surface area of AuNPs/NG-PANI/ITO-PET, which contributed to the detection of low BDNF concentrations. The limit of detection (LOD) of the immunosensor was as low as 0.261 pg/mL (S/N=3), indicating that the method possessed superior sensitivity.

In order to compare the analytical performance of our immunosensor with another widely used analytical method, we also analyzed the standards containing different concentrations of BDNF using ELISA. As shown in Fig. 5**D**, the absorbance values corresponding to the different concentrations of BDNF analyzed by ELISA exhibited a good linear relationship. It was found that the OD of the ELISA showed a linear relationship with BDNF concentration in the range of 31.25-2000 pg/mL, with a linear equation of OD = (7.059E-4 ± 2.818E-5) C_{BDNF} (pg/mL) + (0.052 ± 0.008), R^2 = 0.9889, with a detection limit of 18.15 pg/mL. Combining two different analytical methods, our immunosensor showed even better analytical performance, with a lower detection limit and higher sensitivity.

The analytical performance of the HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET immunosensor was evaluated and compared with other reported assays for BDNF, as demonstrated in **Table 1**. The results showed that this novel immunosensor exhibited a remarkably higher sensitivity. This finding highlights the remarkable potential of the HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET immunosensor as a promising analytical tool for the rapid, accurate, and sensitive determination of BDNF in various biological and clinical samples.

Table 1 Comparison of the proposed immunosensor with previous works.

Determination methods	Linear range (pg/mL)	Detection limit (pg/mL)	Reference
ELISA	7.8 – 300		[41]
Dual probe immunosensor	4.0 – 600.0	1.5 ± 0.012	[18]
BDNF-MIP/SPE sensor	10 – 60	6	[42]
Immune microelectrode array	10 – 1.0×10^5	5	[43]
Interdigitated microelectrode	lower levels 1 – 10		[44]

biosensor	higher levels 2.5×10^5– 2.5×10^6		
microelectrode-based EIS immunosensor	0.5 – 50	0.3	[45]
HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET	0.781 – 400	0.261	This work

3.3 The selectivity, stability, and reproducibility

The present study aimed to evaluate the selectivity of the HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET immunosensor for BDNF detection in the presence of several depression markers, including HSP70, Apo-A4, Cortisol, and macromolecular leptin. Fig. 6 showed that the immunosensor had relatively high selectivity for BDNF when higher concentrations of interfering substances coexist with BDNF. When BDNF was mixed with interfering substances, the DPV values of each mixture were not significantly different compared with the BDNF standard solution. Remarkably, when only higher concentrations of interferents are present, the impurity signal intensity is weak compared to the high signal of BDNF. It showed that the electrochemical immunosensor HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET had good selectivity.

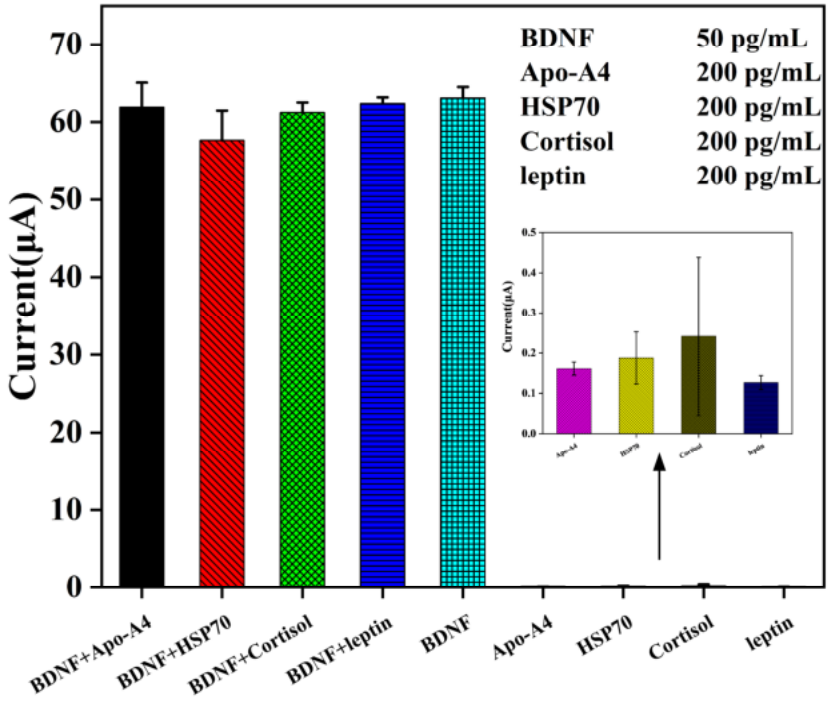


Fig. 6 Comparison of DPV values when free BDNF coexists with other depression markers and interfering ions

To assess the reproducibility of the HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET immunosensor, five replicates of the same concentration of BDNF solution were prepared and analyzed. The constructed electrochemical immunosensor was found to exhibit good reproducibility, as evidenced by the low relative standard deviation (RSD = 1.4%) obtained through DPV.

To investigate the stability of the sensor, five pieces of AuNPs/NG-PANI/ITO-PET were prepared in parallel and tested at

50 pg/mL of BDNF standard solution after 10 days of storage at room temperature. It was observed that the AuNPs/NG-PANI/ITO-PET still retained 92.7% of the initial performance (RSD = 3.1%).

These results indicate that the sensor was highly stable, which is a desirable property for practical applications in various biological and clinical settings.

3.4 Determination of BDNF in depression samples

To evaluate the reliability of the immunosensor in samples, we first mixed a known concentration of BDNF into the whole serum. We used the designed electrochemical immunosensor to calculate its recovery to verify its accuracy. As shown in **Table 2**, the recoveries of the constructed immunosensor varied from 98.1% to 107% in three independent experiments, indicating that the immunosensor is able to accurately measure BDNF levels in complex sample matrices. Additionally, the RSD all less than 8.9%, indicating that the method is reproducible and reliable. These results are promising for the potential application of this electrochemical immunosensor in clinical settings for the detection of BDNF in patients with depression.

Table 2 Comparison of determination for serum BDNF by Electrochemical immunosensor

Sample	Measured (pg/mL)[a]	Add pg/mL	Electrochemical immunosensor		
			Found (pg/mL)[a]	RSD (%)	Recovery (%)
1	5.52	10.0	16.0	3.5	103
2	6.49	20.0	28.3	8.5	107
3	5.52	40.0	44.4	8.8	98.1

[a] is the average of three consecutive measurements

To validate the efficacy of the constructed electrochemical immunosensor, we evaluated the concentrations of BDNF in collected serum samples using both the immunosensor and the ELISA method, as detailed in **Table 3**. First, we diluted the serum samples obtained from the model group and the control group mice by 100 times, enabling the ultrasensitive detection of BDNF. The immunosensor detected the serum BDNF content in the model mice to be 5.8 pg/mL (RSD = 7.8 %) and in the control mice to be 14.7 pg/mL (RSD = 8.7%), indicating that the BDNF content in the serum of CUMS-modeled mice was 0.58 ng/mL, whereas in the control group mice, it was 1.47 ng/mL.

In parallel, we employed the ELISA method to determine the BDNF levels in the serum of normal mice, which were determined to be 1.47 ng/mL (RSD = 4.3%), and 0.66 ng/mL (RSD = 8.3%) in the serum of CUMS-modeled mice, indicating that there was no significant difference between the two measurement methods. These results unequivocally demonstrate that our immunosensor was capable of accurately quantifying the BDNF content in serum samples obtained from both depressed and normal mice.

Table 3 Serum BDNF content of mice in each group

Sample	This work (ng/mL)[a]	RSD(%)	ELISA (ng/mL)[a]	RSD(%)
Control	1.47	8.7	1.47	4.3
Model	0.58	7.8	0.66	8.3

[a] is the average of three consecutive measurements

3.5 The limitations of HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET

Although our constructed sensor (HRP-Avidin-Biotin-Ab-BDNF-AuNPs/NG-PANI/ITO-PET) achieved highly sensitive and highly selective detection of BDNF in real serum samples. Nevertheless, we have identified several limitations that hinder its widespread use. Firstly, we use the HRP-Avidin-Biotin-Ab system in order to achieve a highly sensitive and selective detection, which leads to the disadvantage of many binding steps and long time spent. Secondly, the detection process requires the presence of BDNF antibodies (Biotin-Ab) and HRP-Avidin, resulting in the high cost of our sensor. Most importantly, the electrochemical sensor we constructed cannot be reused, leading to our high cost and low efficiency. Despite these drawbacks, the precise quantification of BDNF in mouse serum samples that our sensor achieves, adds valuable information to the study of depression, making it a useful tool for future research. Further optimization and improvement of the sensor design can address the current limitations and enhance its practicality for a broader range of applications.

4. Conclusion

BDNF is an important marker of depression, rapid and sensitive determination of BDNF content is of great significance for the early screening of depression. This work presented an immunosensor based on NG-PANI composite AuNPs for the specific determination of BDNF. NG-PANI increases PANI's surface layer thickness and effective porous structure by compounding N-Gr while retaining its nanorods, significantly improving the effective surface area, electrical conductivity, and protein loading capacity of the immunosensor, which are further enhanced after depositing AuNPs. The results from the selectivity and recovery assessment confirmed that our method is highly selective and accurate in the analysis of real samples. The disadvantages of our method are the cumbersome operation and the high price associated with HRP-Avidin-Biotin-Ab, as well as the fact that it is not reusable, which is a difficulty in achieving a highly sensitive assay. However, our sensor accurately achieved the quantitative detection of BDNF in mouse serum samples with no significant difference from the data measured by ELISA, which has a high prospect for development. Therefore, this electrochemical immunosensor is expected to be an effective method for early screening of depression and assessment of treatment efficacy in clinical settings.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81972018), the major science and technology project of Gansu Province (21ZD4FA013), the People's Livelihood Special Project from Technical Innovation Guide Plan of Gansu Province (20CX4FK014), the Key Talent Project of Organization Department of Gansu Provincial Party Committee ([2022] Gan-71), the Central Government Guiding Local Science and Technology Development Fund Project (22ZY1QA012), the Special Project of Science and Technology Commissioner of Gansu Province (22CX8GA009), the Talent Innovation and Entrepreneurship Project of Lanzhou (2017-RC-115, 2020-RC-41).

Reference

[1] P.E. Jenkins, I. Ducker, R. Gooding, et al (2021) Anxiety and depression in a sample of UK college students: a study of prevalence, comorbidity, and quality of life. J Am Coll Health 69:813-819.https://doi.org/10.1080/07448481.2019.1709474

[2] A. Koukopoulos, G. Sani (2014) DSM-5 criteria for depression with mixed features: a farewell to mixed depression. Acta Psychiatr Scand 129:4-16.https://doi.org/10.1111/acps.12140

[3] A.J. Mitchell, A. Vaze, S. Rao (2009) Clinical diagnosis of depression in primary care: a meta-analysis. The Lancet 374:609-619.https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)60879-5

[4] J. Keller, R. Gomez, G. Williams, et al (2017) HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. Mol Psychiatry 22:527-536.https://doi.org/10.1038/mp.2016.120

[5] B. Yuan, X. Sun, Z. Xu, et al (2020) Influence of genetic polymorphisms in homocysteine and lipid metabolism systems on antidepressant drug response. BMC Psychiatry 20:408.https://doi.org/10.1186/s12888-020-02798-4

[6] M.A. Pasquali, B.L. Harlow, C.N. Soares, et al (2018) A longitudinal study of neurotrophic, oxidative, and inflammatory markers in first-onset depression in midlife women. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 268:771-781.https://doi.org/10.1007/s00406-017-0812-z

[7] G. Kallies, M.A. Rapp, T. Fydrich, et al (2019) Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) at rest and after acute aerobic exercise in major depressive disorder. Psychoneuroendocrinology 102:212-215.https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.12.015

[8] H.I. Sheikh, E.P. Hayden, K.R. Kryski, et al (2010) Genotyping the BDNF rs6265 (val66met) polymorphism by one-step amplified refractory mutation system PCR. Psychiatr Genet 20:109-12.https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e32833a2038

[9] M.S. Khan, G.W.Y. Wu, V.I. Reus, et al (2019) Low serum brain-derived neurotrophic factor is associated with suicidal ideation in major depressive disorder. Psychiatry Res 273:108-113.https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.01.013

[10] L. Primo de Carvalho Alves, N. Sica da Rocha (2018) Lower levels of brain-derived neurotrophic factor are associated with melancholic psychomotor retardation among depressed inpatients. Bipolar Disord 20:746-752.https://doi.org/10.1111/bdi.12636

[11] H. Moshe, R. Gal, N. Barnea-Ygael, et al (2016) Prelimbic Stimulation Ameliorates Depressive-Like Behaviors and Increases Regional BDNF Expression in a Novel Drug-Resistant Animal Model of Depression. Brain Stimul 9:243-50.https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.10.009

[12] C.T. Dias, H.T. Curi, T.B. Payolla, et al (2020) Maternal high-fat diet stimulates proinflammatory pathway and increases the expression of Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adolescent mice hippocampus. Neurochem Int 139:104781.https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104781

[13] L. Lin, X.Y. Fu, X.F. Zhou, et al (2021) Analysis of blood mature BDNF and proBDNF in mood disorders with specific ELISA assays. J Psychiatr Res 133:166-173.https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.12.021

[14] H.R. Guo, B.L. Huang, Y.L. Wang, et al (2020) Effect of Escitalopram on Serum GDNF and BDNF Levels and 5-HT Level of Brain Tissue of Obsessive-Compulsive Disorder Rats. Cell Mol Neurobiol 40:991-997.https://doi.org/10.1007/s10571-020-00788-4

[15] A. Koyappayil, M.H. Lee (2020) Ultrasensitive Materials for Electrochemical Biosensor Labels. Sensors (Basel) 21.https://doi.org/10.3390/s21010089

[16] S. Campuzano, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron (2020) Revisiting Electrochemical Biosensing in the 21st Century Society for Inflammatory Cytokines Involved in Autoimmune, Neurodegenerative, Cardiac, Viral and Cancer Diseases. Sensors (Basel) 21.https://doi.org/10.3390/s21010189

[17] N.K. Bakirhan, G. Ozcelikay, S.A. Ozkan (2018) Recent progress on the sensitive detection of cardiovascular disease markers by electrochemical-based biosensors. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 159:406-424.https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.021

[18] M. Bockaj, B. Fung, M. Tsoulis, et al (2018) Method for electrochemical detection of brain derived neurotrophic factor

(BDNF) in plasma. Analytical Chemistry 90:8561-8566.https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01642
[19] M.H. Akhtar, K.K. Hussain, N.G. Gurudatt, et al (2018) Ultrasensitive dual probe immunosensor for the monitoring of nicotine induced-brain derived neurotrophic factor released from cancer cells. Biosensors and Bioelectronics 116:108-115.https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.049
[20] X. Yang, Y. Wang, X. Qing (2018) A Flexible Capacitive Pressure Sensor Based on Ionic Liquid. Sensors (Basel) 18.https://doi.org/10.3390/s18072395
[21] J. Palenzuela, A. Vinuales, I. Odriozola, et al (2014) Flexible viologen electrochromic devices with low operational voltages using reduced graphene oxide electrodes. ACS Appl Mater Interfaces 6:14562-7.https://doi.org/10.1021/am503869b
[22] J. Garoz-Ruiz, C. Guillen-Posteguillo, A. Colina, et al (2019) Application of spectroelectroanalysis for the quantitative determination of mixtures of compounds with highly overlapping signals. Talanta 195:815-821.https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.002
[23] A. Atifi, M.D. Ryan (2020) Voltammetry and Spectroelectrochemistry of TCNQ in Acetonitrile/RTIL Mixtures. Molecules 25.https://doi.org/10.3390/molecules25020303
[24] K. Tian, D. Li, T. Tang, et al (2018) A novel electrochemiluminescence resonance energy transfer system of luminol-graphene quantum dot composite and its application in H2O2 detection. Talanta 185:446-452.https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.064
[25] Y. Wang, B. Sun, H. Wei, et al (2022) Investigating immunosensor for determination of depression marker-Apo-A4 based on patterning AuNPs and N-Gr nanomaterials onto ITO-PET flexible electrodes with amplifying signal. Analytica Chimica Acta 1224:340217.https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340217
[26] H.X. Qiu, X.B. Han, F.L. Qiu, et al (2016) Facile route to covalently-jointed graphene/polyaniline composite and it's enhanced electrochemical performances for supercapacitors. Applied Surface Science 376:261-268.https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.03.018
[27] X. Guan, D. Kong, Q. Huang, et al (2019) In situ growth of a high-performance all-solid-state electrode for flexible supercapacitors based on a PANI/CNT/EVA composite. Polymers-Basel 11.https://doi.org/10.3390/polym11010178
[28] M. Turemis, D. Zappi, M.T. Giardi, et al (2020) ZnO/polyaniline composite based photoluminescence sensor for the determination of acetic acid vapor. Talanta 211:120658.https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120658
[29] Q. Qin, R. Zhang (2013) A novel conical structure of polyaniline nanotubes synthesized on ITO-PET conducting substrate by electrochemical method. Electrochimica Acta 89:726-731.https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.11.107
[30] Q. Tian, Y. Li, S. Jiang, et al (2019) Tumor pH-Responsive Albumin/Polyaniline Assemblies for Amplified Photoacoustic Imaging and Augmented Photothermal Therapy. Small 15:e1902926.https://doi.org/10.1002/smll.201902926
[31] R. Salahandish, A. Ghaffarinejad, E. Omidinia, et al (2018) Label-free ultrasensitive detection of breast cancer miRNA-21 biomarker employing electrochemical nano-genosensor based on sandwiched AgNPs in PANI and N-doped graphene. Biosensors and Bioelectronics 120:129-136.https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.025
[32] D.Z. Sun, Y.Y. Yu, R.R. Xie, et al (2017) In-situ growth of graphene/polyaniline for synergistic improvement of extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. Biosensors and Bioelectronics 87:195-202.https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.037
[33] Y. Cao, H. Yu, J. Tan, et al (2013) Nitrogen-, phosphorous- and boron-doped carbon nanotubes as catalysts for the aerobic oxidation of cyclohexane. Carbon 57:433-442.https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.02.016
[34] Q. Xin, H. Shah, W. Xie, et al (2021) Preparation of blue- and green-emissive nitrogen-doped graphene quantum dots from graphite and their application in bioimaging. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 119:111642.https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111642
[35] E. Paramo, S. Palmero, A. Heras, et al (2018) Carbon nanostructured films modified by metal nanoparticles supported on filtering membranes for electroanalysis. Talanta 178:736-742.https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.019

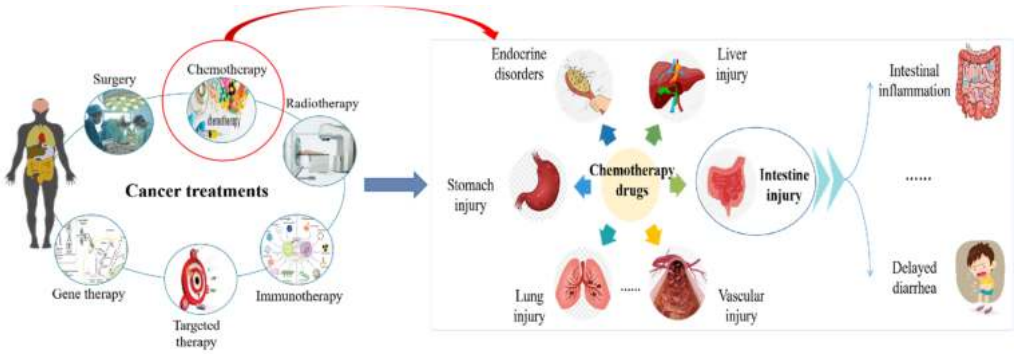
[36] A. Jouyban, E. Rahimpour (2020) Optical sensors based on silver nanoparticles for determination of pharmaceuticals: An overview of advances in the last decade. Talanta 217:121071.https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121071
[37] H. Rao, M. Chen, H. Ge, et al (2017) A novel electrochemical sensor based on Au@PANI composites film modified glassy carbon electrode binding molecular imprinting technique for the determination of melamine. Biosens Bioelectron 87:1029-1035.https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.074
[38] M. Diaz-Caballero, S. Navarro, S. Ventura (2021) Functionalized prion-inspired amyloids for biosensor applications. Biomacromolecules 22:2822-2833.https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00222
[39] H. Yang, Q. Zhang, X. Liu, et al (2020) Antibody-biotin-streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) sensor for rapid and ultra-sensitive detection of fumonisins. Food Chemistry 316.https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126356
[40] S. Antoniuk, M. Bijata, E. Ponimaskin, et al (2019) Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. Neurosci Biobehav Rev 99:101-116.https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.002
[41] B. Elfving, P.H. Plougmann, G. Wegener (2010) Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: pitfalls and solutions. J Neurosci Methods 187:73-7.https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.12.017
[42] V. Syritski, A. Öpik, R. Boroznjak, et al (2019) Advanced sensing materials based on molecularly imprinted polymers towards developing point-of-care diagnostics devices. Proceedings of the Estonian Academy of Sciences 68.https://doi.org/10.3176/proc.2019.2.07
[43] H. Xu, J. Luo, Y. Wang, et al,(2017), Label-free electrochemical detection of brain-derived neurotrophic factor based on a novel immune microelectrode array, 2017 IEEE 17th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO), pp. 584-589.
[44] Y.K. Yoo, J. Lee, J. Kim, et al (2016) Ultra-sensitive detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the brain of freely moving mice using an interdigitated microelectrode (IME) biosensor. Scientific Reports 6:33694.https://doi.org/10.1038/srep33694
[45] X. Xie, D. Liu, W. Wang, et al (2023) Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Determination of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Aqueous Humor for Diagnosis of Glaucoma. Analytical Chemistry 95:2087-2093.https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05033

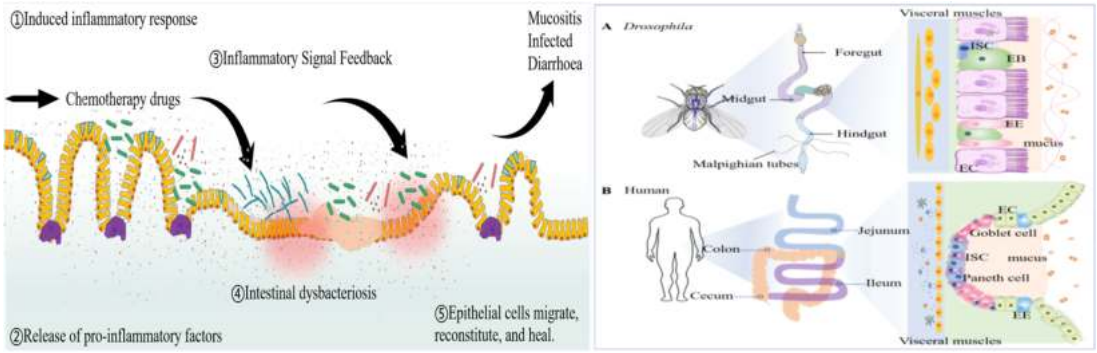
Qige Tablets — A new dosage form of Huangqi and Gegen for the treatment of chemotherapy-induced intestinal mucositis

Yixuan Wang（王艺璇）,Jianzheng He#（和建政）,Minghui Xiu#（修明慧）

（School of Public Health Clinical Laboratory Diagnostics，Gansu University of Traditional Chinese Medicine，LanZhou，Gansu Province，China）

【**Abstract**】**Background**：In recent years, the incidence and mortality of cancer worldwide is still on the rise, and chemotherapy drugs, as one of the three recognized treatments, most of which are non-selective drugs, can cause gastrointestinal side effects while killing tumor cells.The previous research of our group found that Astragalus kudzu root has unexpected effects in the treatment of chemotherapy-induced intestinal injury, and as a natural traditional Chinese medicine preparation, the side effects are very small, and it can be used as an alternative to some clinical antibiotics.As an increasingly common model organism, fruit flies not only have up to 75% of genes homologous to humans, but also have a highly similar gut structure to humans.





Method：We used 4mM irinotecan （CPT-11） feeding 10 days to construct a chemotherapy intestinal injury model of drosophila, and analyzed the role and mechanism of astragalus and kudzu in chemotherapy-induced intestinal injury through a variety of behavioral indicators （such as lifespan, food intake, excretion, Smurfs, etc.） and molecular

Author:Yixuan Wang,E-mail:3212489693@qq.com,Tel:17361552616

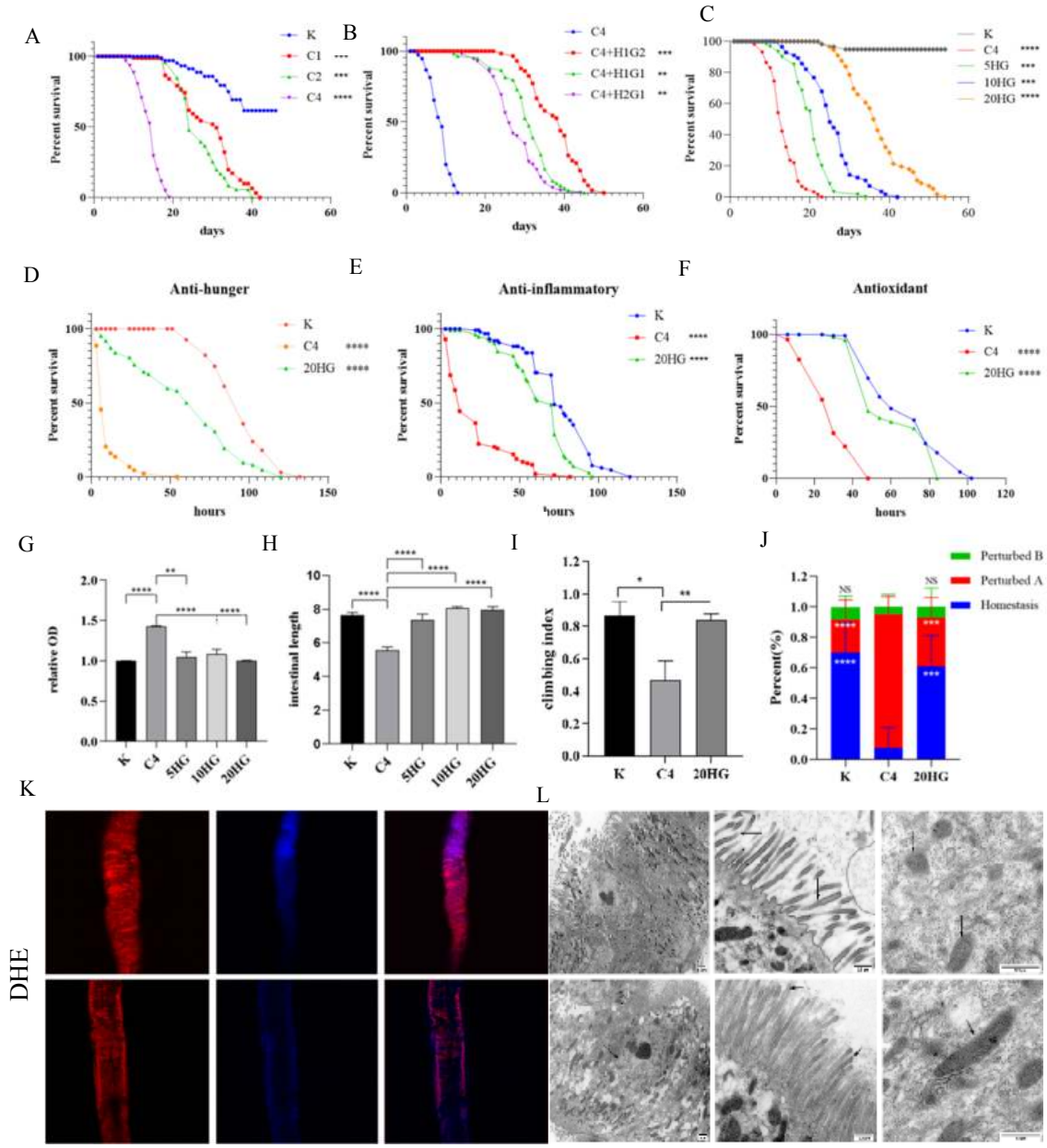
Advisor:Jianzheng He（和建政）,School of Basic Medicine,Ph.D.,

Associate Professor,（Email:hejianzheng1006@163.com）

Minghui Xiu（修明慧）,School of Public Health,Ph.D.,

Associate Professor,（Email:xiuminghui87@163.com）

indicators （such as intestinal ROS content, intestinal stem cell survival, proliferative cells, dead cells and intestinal inflammation, immunity, and apoptosis-related gene expression）, and produced a new dosage form for clinical treatment.**Results：** Radix Astragali combined with Radix Puerariae can prolong the life of fruit flies after irinotecan feeding, improve their increased excretion, shortened intestinal length, increase intestinal permeability, etc., and alleviate the accumulation of intestinal ROS, proliferative cells and increased dead cells caused by irinotecan.



Conclusions： The rematch and ratio of Astragalus kudzu root has a good therapeutic effect on chemotherapy intestinal injury, and as a complete traditional Chinese medicine preparation, the damage to the body is minimal, which can be applied to clinical treatment as a new medication idea to increase the guarantee for chemotherapy patients.

【**Keywords**】Astragalus memeranaceus；Radix Puerariae；Chemotherapy drugs；Intestinal mucositis

Repurposing CRISPR/Cas to Discover SARS-CoV-2 Detecting and Neutralizing Aptamers

Ju Zhang, Airu Zhu, Miao Mei, Jing Qu, Yalan Huang, Yongshi Shi, Meiying Xue, Jingfang Zhang, Renli Zhang*, Bing Zhou*, Xu Tan*, Jincun Zhao*, Yu Wang*

深圳大学 广东 深圳 518000

RNA aptamers provide useful biological probes and therapeutic agents. New methodologies to screen RNA aptamers would be valuable by complementing the traditional Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX). Meanwhile, repurposing CRISPR/Cas systems has expanded its utility far beyond their native nuclease function. Here, CRISmers: a CRISPR/Cas based novel screening system for RNA aptamers based on binding to a chosen protein of interest in a cellular context is present. Using CRISmers, aptamers are identified specifically targeting the Receptor Binding Domain (RBD) of the spike glycoprotein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Two aptamer leads enable sensitive detection and potent neutralization of SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants *in vitro*. Intranasal administration of one aptamer, further modified with 2'-Fluoro Pyrimidines (2'-F), 2'-*O*-Methyl Purines (2'-O), and conjugation with both cholesterol and polyethylene glycol of 40 kDa (PEG40K), achieves effective prophylactic and therapeutic antiviral activity against live Omicron BA.2 variant *in vivo*. The study concludes by demonstrating the robustness, consistency, and potential broad utility of CRISmers using two newly identified aptamers, but switching CRISPR, selection marker, and host species.

【Keywords】CRISPR/Cas, RNA aptamers, CRISmers, SARS-CoV-2

J. Zhang, M. Xue, B. Zhou

State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China

University of Chinese Academy of Sciences; Beijing, 100049, China

Beijing Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine; Beijing, 100005, China

E-mail: zhoubing@ioz.ac.cn

A. Zhu, J. Zhao

State Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, 510120, China

E-mail: zhaojincun@gird.cn

M. Mei, X. Tan

Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, Beijing Advanced Innovation Center for Structural Biology, Beijing Frontier Research Center for Biological Structure, MOE Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences, Center for infectious Disease Research, School of Medicine, Tsinghua University; Beijing, 100084, China

E-mail: xutan@tsinghua.edu.cn

J. Qu, Y. Huang, R. Zhang

Institute of Pathogenic Organisms, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention; Shenzhen, 518055, China

E-mail: renlizhangszcdc@aliyun.com

J. Zhang, Y. Shi, Y. Wang

College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University; Shenzhen, 518060, China

E-mail: yuwang@post.harvard.edu, ORCID ID (0000-0002-5188-4622)

J. Zhang

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine; Beijing, 100105, China

1. Introduction

Nucleic acid aptamers are a class of short, single-stranded DNA (ssDNA) or RNA oligonucleotides that bind to a wide range of targets from proteins to whole cells with high specificity and affinity. RNA aptamers have higher conformational flexibility than their DNA counterparts.[1] Compared with antibodies and peptides, aptamers exhibit several advantages, including ease of synthesis and storage, minimal batch-to-batch variation, cell- or animal-free composition, smaller size and shorter circulation, wider range of targets, lower immunogenicity, availability of site-specific chemical modifications and bio-conjunction.[2] Based on their unique biological and chemical characteristics, aptamers have been screened and developed for applications in diagnostics and therapeutics for many anomalies such as oculopathy,[3] inflammation,[4] and cancer.[5] The latest developments utilizing aptamer's capability to specifically target a protein or cell type to enhance the selectivity of delivery for another moiety such as a chemical drug (Aptamer-Drug Conjugates (ApDCs) or Aptamer Lipid-NanoParticles (ApLNP), might lead to a new paradigm shift in the field.[6-8]

RNA aptamers and their screening methodology, SELEX, were first reported in 1990.[9-11] SELEX represents an experimental directed evolution system to enrich for RNA aptamers with a certain property. In general, one cycle of SELEX includes the following steps: construction of a nucleotide sequence library, acquisition of the target molecules, incubation, affinity selection and recovery of binding complexes, amplification and analysis of recovered nucleotide sequences. SELEX has long been the gold standard for screening ssDNA or RNA aptamers, providing a large amount of high-quality modalities including several being approved or examined in clinic.[1, 12] A SELEX library typically consists of nucleotide sequences with a central region of random sequence, typically 20-60 nucleotides in length to present sufficient sequence diversity, and two flanking fixed sequences, typically 15-25 nucleotides in length, sufficient to be specifically complemented with primers for PCR amplification.[1, 13, 14] Nowadays, SELEX routinely utilizes next-generation sequencing to efficiently analyze the enriched oligonucleotides from a large amount of data. Modified SELEX such as Microfluidic-SELEX has been developed, which involves the use of microfluidic chips that allows for control of fluid movement and mixing.[15] SELEX has been carried out against purified proteins, whole cells, and live animals. Nonetheless, inherent limitations of SELEX suggest the need to develop complementary methodologies. For instance, recombinant-protein-based SELEX may not recapitulate the native conformations of target proteins.[16] Cell-based SELEX screening can only efficiently target proteins on the cell surface, which limits the number of applicable proteins and/or the concentration and conformation of the target proteins.[16, 17] Animal-based SELEX screening process is costly with a lack of specificity and throughput.[2] Therefore, complementary screening systems that are compatible with a native biological context but also efficient and scalable are highly desirable for the field.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) /Cas (CRISPR associated) system, RNA-guided endonucleases that cleaves double-strands of DNA, has proven to be a powerful and versatile genome editing tool.[18, 19] Reengineering and repurposing of CRISPR/Cas have enabled applications far beyond its native endonuclease function, including base editing and prime editing without the double-stranded break,[18] transcriptional activation and interference (CRISPRa and CRISPRi, respectively), epigenome engineering, and genomic DNA labeling.[20] This bewilderingly wide range of applications of the CRISPR/Cas system owes to its high specificity, facile programmability, and great compatibility with different cells, tissues and species.

Since the outbreak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), scientists worldwide are spearheading in all possible directions simultaneously with a common goal towards drugs and vaccines development against the virus. Hereof, nucleic acid medications represented by the mRNA vaccines have gained enormous momentum,[21, 22] while other forms including siRNAs and aptamers are also attracting significant interest.[23] Aptamers bear exciting opportunities in the development of diagnostics and therapeutics against SARS-CoV-2, given its beneficial properties distinct from those of antibodies and peptides. Several DNA and RNA aptamers screened by traditional SELEX have been reported for the detection and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro.[24-39]

Several natural aptamers, such as MS2 and PP7, and their binding proteins, have been utilized in engineering CRISPR/Cas systems for various applications, such as transcriptional activators and repressors, epigenetic modifiers, and fluorescent genomic DNA probes.[40, 41] In addition, an aptamer inhibitor against Cas9 protein was identified by SELEX to control its activity.[42] And a series of aptamer-linked CRISPR-based biosensors have been designed for biomarkers and pathogen detection.[43, 44] However, to the best of our knowledge, CRISPR/Cas systems have not yet been repurposed for screening aptamers so far. Here we present CRISmers: a novel RNA aptamer screening platform based on a new strategy to repurpose CRISPR/Cas. CRISmers brings aptamer screening system to the intracellular native biological context, thus less vulnerable to environmental fluctuation and providing a more biologically relevant condition for RNA and protein folding and their interaction. In CRISmers, individual cells as a physically sperate units are used to distinguish functional binding events from background noise. This might greatly increase the specificity and robustness of the system by avoiding the use of naked nucleotides, remnants of which could be easily amplified during PCR and bias the sequencing pool in SELEX. Using CRISmers, we successfully identified RNA aptamers with high specificity and affinity to the RBD of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Strikingly, an aptamer lead showed its potential as a new antiviral modality with potent neutralizing activity against live SARS-CoV-2 of the Omicron BA.2 variant both in cell culture and in animal experiments. The potential broad utility, and robust and consistent performance of CRISmers was also demonstrated by using orthogonal CRISPR/Cas systems, selection markers, and host species. Therefore, while the very first CRISmers screen targeted SARS-CoV-2, it can play an important role in the post-COVID-19 era in many directions as a fundamental tool to identify novel aptamers and RNA-protein interactions in general.

2. Results

2.1. Conceptual design of CRISPR/Cas9 based aptamer screening system

Based upon our previous experience in CRISPRa,[45] we envisioned a design wherein an aptamer is cloned into a loop on the single guide RNA (sgRNA) scaffold, while the target Protein of Interest (POI) is fused with transcriptional transactivation domains. Only when an aptamer binds to the POI can the transactivation domains be recruited to the dCas9-sgRNA complex and docked to the sgRNA-target sequence upstream of a minipromoter, which drives the expression of a selection marker gene (Figure 1A). The selection pressure is afforded by adding the selection antibiotic to enrich for cells expressing sgRNA scaffolds containing aptamers that bind the POI. Such a sgRNA library could be easily obtained by oligo synthesis containing random sequences, followed by pooled ligation into a lentiviral sgRNA expression construct. Pooled sgRNA constructs can be packaged into lentivirus particles and used for cellular transduction so that aptamer-encoding DNA sequences are integrated into the genomes of host cells. Upon selection with the antibiotics, aptamers with affinity to the POI can be identified by Next-Generation Sequencing (NGS) of the genomic DNA of the surviving cells (Figure 1B).

2.2. Validation and characterization of CRISPR/Cas9 based RNA aptamer identification

We first tested our conceptual design by using a Green Fluorescent Protein (GFP) aptamer identified previously from SELEX,[46] and a firefly-luciferase reporter, in which reporter expression could be activated by recruitment of CRISPRa to the upstream sgRNA target sequence derived from gaussia luciferase (gLuc target).[45] The GFP aptamer was appended to the sgRNA tetra loop (sgRNA 1.1) or stem loop 2 (sgRNA 1.2), respectively (Figure 1C), and GFP was fused with VP64, P65, and HSF1 transactivation domains (GFP-VPH) (Figure 1D). A monoclonal Human Embryonic Kidney 293T (HEK293T) cell line stably expressing dCas (293T/dCas) was co-transfected with plasmids expressing sgRNA 1.1-GFP apt or sgRNA 1.2-GFP apt, GFP-VPH, and luciferase reporter (Figure 1E). We detected significant luciferase signal when its transcription was driven from 9 tandem repeats, but not single copy, of gLuc sgRNA target sequences, indicating amplified assay sensitivity by recruiting more CRISPRa devices (Figure 1E and Figure S1, Supporting Information). Notably, GFP aptamer appended to the stem loop 2 (sgRNA 1.2) showed more efficient activation than that appended to the tetraloop (sgRNA 1.1) (Figure 1E).

Next, we replaced the luciferase reporter with a puromycin selection marker. Monoclonal dCas9/9× gLuc-Puro cell lines were generated by sequential lentiviral delivery of dCas9 and 9× gLuc-Puro reporter. These lines were screened upon a third round of lentiviral infection delivering a construct co-expressing the gLuc sgRNA with GFP aptamer fused to the stem loop 2 (sgRNA 1.2) and the GFP-VPH fusion protein (Positive Controls, PC), while a sgRNA with insertion of a random sequence in place of the GFP aptamer served as negative controls (NC) (Figure 1F and Figure S2A, Supporting Information). Puromycin was applied at different concentrations of 0.5 μg ml^{-1}, 1 μg ml^{-1} and 2 μg ml^{-1}, representing escalating selection pressure. Surviving clones were quantitated for each dCas9/9× gLuc-Puro cell line (Figure S2B, Supporting Information). Generally, the highest enrichment ratios (PC/NC) were observed with 2 μg ml^{-1} puromycin, an indication of proper selection pressure. Notably, clone No.4-53 showed consistently high PC/NC ratios, and was chosen for the following screening in this study (Figure 1F).

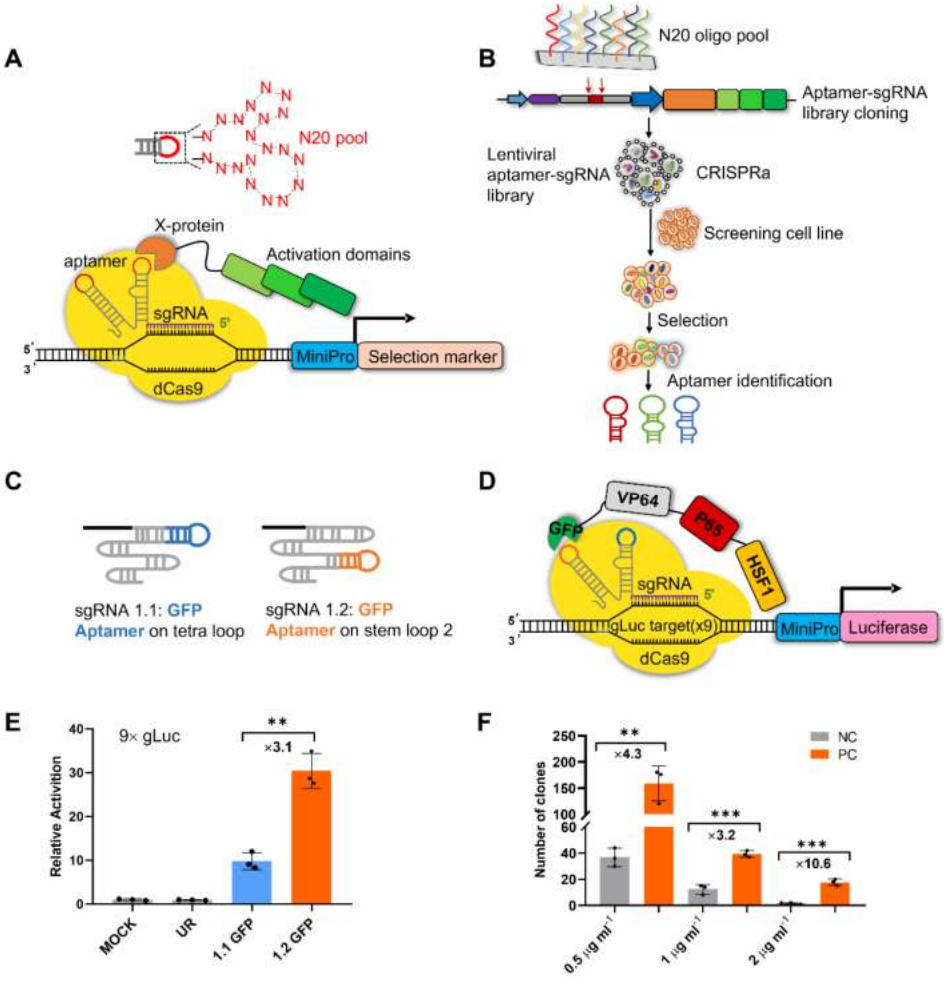


Figure 1. Conceptual design, proof of concept and key parameter characterizations of a CRISPR/Cas9-based aptamer screening system. A, B) Schematic illustrations of a conceptual molecular device repurposing CRISPR/Cas9 system to screen RNA aptamers (A) and the envisioned screening process (B). Key components are color-coded as the following: the aptamer is colored in red; the POI is colored in orange; the activation domains are colored in green; the mini promoter is colored in blue; the selection marker is colored in pink. C) a GFP aptamer was incorporated in the tetraloop of sgRNA scaffold (sgRNA 1.1) and the stem loop2 of sgRNA scaffold (sgRNA 1.2), respectively. D) Illustration of the luciferase reporter assay to detect the affinity binding of an aptamer to its GFP target. E) Results of a luciferase assay shown in Figure 1D, using 9 repeats of gLuc sgRNA target sequences (9× gLuc) to amplify the sensitivity. F) Quantification of the number of clones survived upon lentiviral delivery of sgRNA 1.2 and GFP-VPH into No.4-53 Monoclonal dCas9/9× gLuc-Puro cell line (Figure S2, Supporting Information). The Positive Control/Negative Control

(PC/NC) ratios were shown on the top and the puromycin concentration used was indicated at the bottom. Mock: transient transfection of control plasmids. UR: gLuc sgRNA 1.2-the negative control sgRNA used in luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold). 1.1 GFP: gLuc sgRNA 1.1-GFP aptamer. 1.2 GFP: gLuc sgRNA 1.2-GFP aptamer. NC: Lentiviral-sgRNA 1.2-the negative control sgRNA used in luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold)-GFP-VPH. PC: Lentiviral-sgRNA 1.2-GFP apt-GFP-VPH. N=3 biological replicates. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, two tailed *t* tests. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

2.3. A proposed work-flow of the CRISmers system

Based on the working model and key parameters that we established from the proof-of-concept experiments described above, we proposed a CRISPR based RNA aptamers screening system (CRISmers) (Figure 2A). The work-flow of one screening cycle can be divided into the following steps: first, construct a lentiviral-CRISmers random library. A pool of oligos containing a 20 nt random region flanked by two 40 nt fixed primer regions is synthesized and cloned into the stem loop 2 of gLuc sgRNA scaffold in a lentiviral expression construct. Restriction sites are in place for customization. Second, produce the CRISmers random library lentivirus. A pool of constructs co-expressing the gLuc sgRNA-aptamer library and one specific target protein of interest is packaged into lentivirus particles. Third, transduce the CRISmers random library lentivirus. The lentivirus particles are used to infect the No.4-53 monoclonal dCas/9× gLuc-Puro cell line. Fourth, select for puromycin resistance. 2 μg ml^{-1} puromycin is applied to the cell line to select for puromycin resistant cells. Fifth, extract genomic DNA. Sixth, read the screening information. Aptamer sequences are selectively amplified and analyzed by deep sequencing. Seventh, further CRISmers screening. The next cycle, when necessary, is initiated by subcloning the amplified aptamer sequences from the previous round into the original library shuttle construct. Primary hits identified from the screening are then further validated using a luciferase reporter assay.

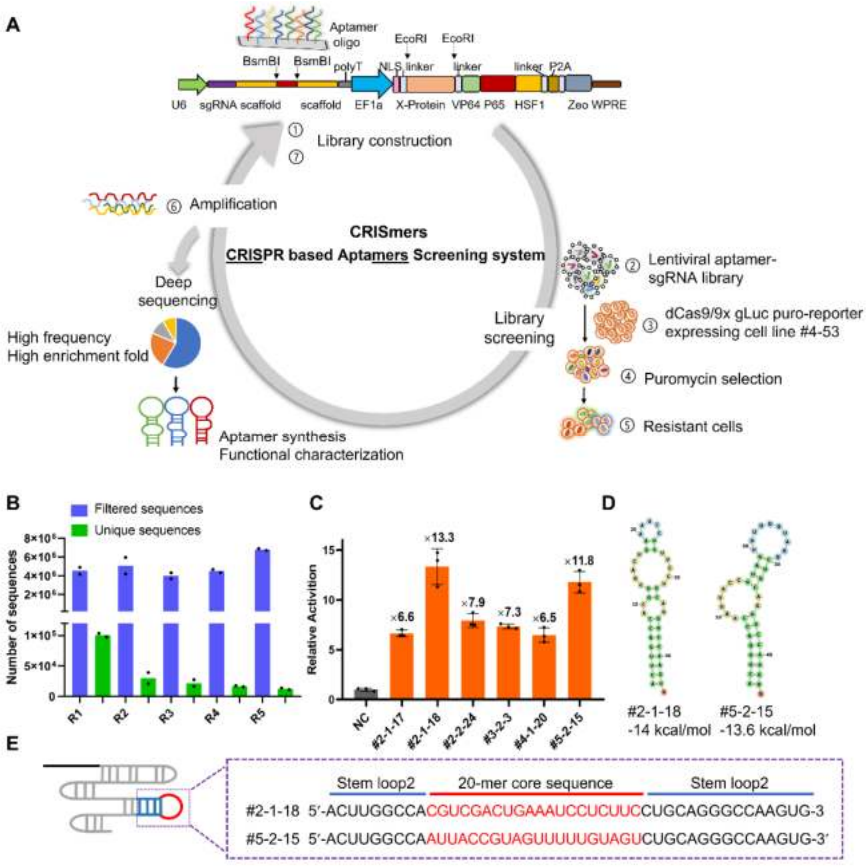


Figure 2. A proposed work-flow of the CRISmers system and CRISmers screening hits. A) Schematic illustration of

the CRISmers: RNA aptamer screening system based on CRISPR/Cas. The process of one screening cycle can be divided into these steps: (1) construction of a lentiviral-CRISmers random library, (2) production of the the CRISmers random library lentivirus, (3) CRISmes random library lentivirus infection of No.4-53 monoclonal dCas9 ×gLuc puro cell line, (4) selection for puromycin resistance cells, (5) preparation of genomic DNA from resistant cells, (6) selective PCR amplification of aptamer, deep sequencing, and analysis, (7) sub-library construction if necessary. B) Deep sequencing analyses of harvested aptamer sequences after each round of CRISmers. R: Selection rounds. C) Results of a luciferase reporter assay (Figure 1D) for parallel comparison of aptamer hits showing the highest activity from the secondary screen (Figure S3 and Table S1, Surpporting information). NC: the negative control sgRNA used in luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold). N=3 biological replicates. D) The secondary structures and the free energy of the two aptamers predicted by Mfold webserver are shown. E) Illustration of the sequences of two aptamers (#2-1-18 and #5-2-15) showing the highest fold of activation in the luciferase assay in Figure 2C. The 20-mer core sequence is colored in red (Table S1, Surpporting information).

2.4. RNA aptamer screening against the RBD of SARS-CoV-2 spike protein

Considering the urgent need to develop diagnostics and therapies against SARS-CoV-2 during the COVID-19 pandemic, we targeted the RBD of SARS-CoV-2 spike protein as the POI of our first CRISmers screen. Two independent parallel screens with five rounds of each were conducted. In the first round, the pooled N20 lentiviral library of gLuc sgRNA appending with random 20 nucleotides, a length sufficient to form configuration for effective protein binding,[1, 13, 14] to its stem loop 2 was transduced at a Multiplicity of Infection (MOI) of ≈3 to maximize the representation of the aptamer population in the infected cells. Then the following rounds was performed at a lower MOI of ≈0.1-0.2 to increase the probability that most cells receive only one aptamer. Aptamer yield converged to lesser unique sequences in each following round (R), after filtering out non-specific sequences (Figure 2B).[47] In round 4 and 5 (R4 and R5), the number of unique sequences appear to be no longer reduced significantly, indicating that enrichment was saturated.

2.5. Secondary screen and validation of top hits

We calculated and ranked the top 0.1% high frequency sequences and the top 15 sequences with the highest fold-of-enrichment (ratio of copy numbers in comparison against the previous round of screening) [47] from R2, R3, R4, and R5 pools and tested them in the aforementioned luciferase reporter assay as a secondary screen to validate the identified aptamers (Figure 1D and Figure S3, Supporting Information). It should be noted that the highly represented sequences may be the biased products of PCR amplification, thus not necessarily exhibiting high enrichment fold.[47] Moreover, in R4 screening and especially in R5, some high frequency or highly enriched sequences have been already selected and verified in the previous rounds, an indication of sufficient enrichment and CRISmers' performance consistency.

Aptamers that showed the most significant signal in the above secondary luciferase screening were identified and listed in Table S1 (Supporting Information). Among them, #2-1-18 and #5-2-15 showed the highest activity in a head-to-head comparison (Figure 2C, E). Therefore, we focused on these two aptamer leads hereafter. Figure 2D shows their secondary structures and free energy values predicted by Mfold webserver.[48] Paralleled examination of previously reported RNA aptamers and DNA aptamers targeting SARS-CoV-2 S-RBD in the luciferase reporter assay produced comparable level of activation (Figure S4A, Supporting information).[24-26, 28, 30, 33]

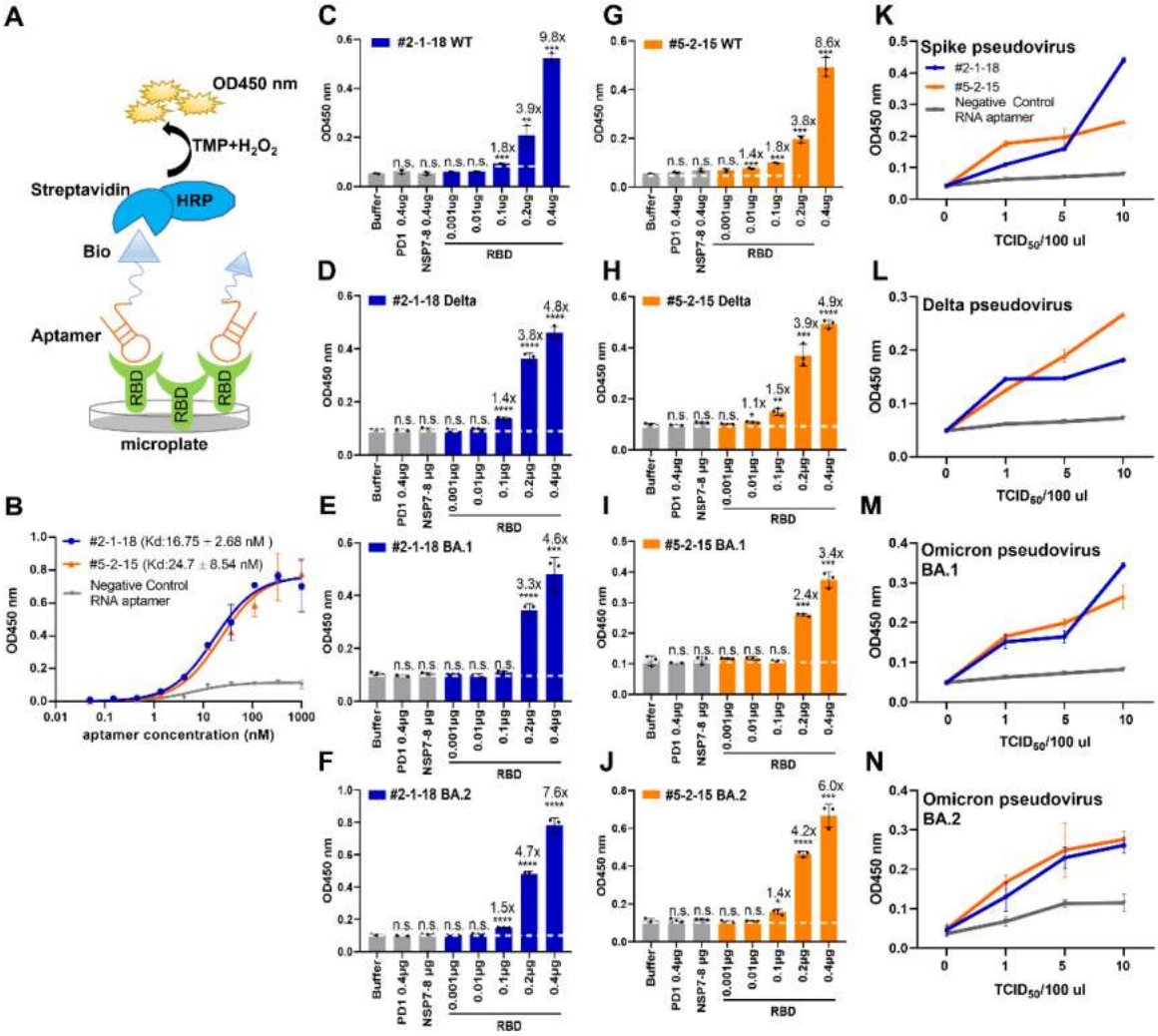


Figure 3. Examination of aptamer leads for detecting SARS-CoV-2 and its variants. A) A schematic depicting the enzyme-linked oligonucleotide assay (ELONA) assay. B) Examination of aptamers for their dose dependent ELONA activity to a fixed concentration of 250 ng of the RBD of SARS-CoV-2 Spike protein. A negative control RNA aptamer was used as a negative control. Examination of binding activity to RBD recombinant protein of the original SARS-CoV-2 (C and G), Delta (D and H), Omicron BA.1 (E and I) and Omicron BA.2 (F and J) using 100 nM aptamers. Recombinant protein PD-1 extracellular domain and SARS-CoV-2 NSP7-8 complex were used as negative controls for specificity. Examination of binding activity to the original SARS-CoV-2 pseudovirus (K), Delta (L) and Omicron BA.1 and BA.2 (M, N) using 100 nM aptamers. A negative control RNA aptamer was used as a negative control for specificity. TCID50: 50% tissue culture infective dose. Data show mean ± SD. N=3 biological replicates. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001, two - tailed *t* - tests. n.s., no significant difference. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

2.6. Using aptamers to detect SARS-CoV-2 pseudovirus and its variants

We next measured binding affinity of the two aptamers *via* an Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay (ELONA) (Figure 3A).[49] Both aptamers exhibited high-affinity binding to recombinant RBD, with *Kd* values of 16.75 ± 2.68 nM and 24.7 ± 8.54 nM for aptamers #2-1-18 and #5-2-15, respectively (Figure 3B). We then examined the binding activity when using 100 nM aptamers in ELONA by titrating RBD recombinant protein of the original SARS-CoV-2 (Figure 3C, G) or Delta (Figure 3D, H) or Omicron BA.1 (Figure 3E, I) and BA.2 (Figure 3F, J), and SARS-CoV-2 particles pseudotyped with

spike proteins of the original SARS-CoV-2 (Figure 3K), or the Delta (Figure 3L), or Omicron BA.1 and BA.2 variants (Figure 3M, N). Recombinant programmed death 1 (PD1) extracellular domain, non-structural proteins 7 and 8 (NSP7-8) protein complex of SARS-CoV-2, and a negative control RNA aptamer were included as negative controls in these assays. Both aptamers at 100 nM showed specific binding activity with RBD recombinant protein (Figure 3C, G) and all three pseudoviruses at a titer of 1 $TCID_{50}$ (50% tissue culture infective dose) and higher (Figure 3K-N). Importantly, their binding activities were maintained at 4 ℃, 25 ℃, and 37 ℃, indicating potential applications in a wide range of working temperature (Figure S4B, Supporting information).

2.7. Neutralizing activity of aptamers in cell culture against live SARS-CoV-2 variants of concern

Next, we examined whether these two aptamers could neutralize infection from live SARS-CoV-2 virus in a Biological Safety Level-3 (BSL-3) laboratory, considering that its binding to RBD might interrupt the interaction of spike protein to the human angiotensin-converting enzyme II (hACE2) receptor (Figure 4A). Consistent with binding activity to the pseudoviruses (Figure 3M), both aptamers showed dose-dependent inhibition against SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant (Figure 4B). The aptamer #5-2-15 showed stronger potency, with an IC_{50} lower than 0.6 ng ml^{-1}. Therefore, we also examined its neutralizing activity against live Delta variant. In fact, the aptamer #5-2-15 is also effective against Delta variant, although less efficient than that against Omicron BA.1 variant, with an IC_{50} of 20.28 ± 0.38 ng ml^{-1} (Figure 4C). Native RNA is vulnerable to RNase mediated degradation. To this end, we replaced 2' position of pyrimidines with fluorin (F) and purines with *O*-methyl (O) respectively to gain resistance.[1] Interestingly, 2'-F modified aptamers, but not 2'-O, exhibited consistent higher binding signal to the recombinant RBD protein of Omicron BA.2, the variant prevailing while this manuscript is being prepared (Figure S5A, B, Supporting information). And two types of modifications in aptamer #2-1-18 and #5-2-15, when combined, showed synergy in enhancing binding (Figure S5A, B, Supporting information). Further, we conducted Electrophoresis gel-Mobility Shift Assay (EMSA) to confirm their binding activity (Figure S5C, Supporting information).[50] When using recombinant RBD protein of the original SARS-CoV-2, 2'-F-O modifications of both aptamers led to enhanced shift, indicating stronger binding affinity (Figure S5D, Supporting information). No shift was observed when using a negative control RNA aptamer, an indication of specificity (Figure S5D, Supporting information). The binding specificity of 2'-F-O modified aptamers against both the original and Omicron BA.2 RBD were further validated by a RBD dose dependent shift and by dose dependent competition from unlabeled "cold" aptamers (Figure S5E, F, Supporting information).

Considering the gradual dominance of Omicron BA.2 variant while this work in being conducted, and the higher binding signal and neutralizing activity of the aptamer #5-2-15 among the leads in previous experiments, we next focused on further development of #5-2-15 against live Omicron BA.2 variant. Data showed consistently potent neutralizing activity upon #5-2-15-2'-F-O modifications, with an IC_{50} of 0.56 ± 0.64 ng ml^{-1} (Figure 4D). Polyethylene glycol with a 40 kDa molecular weight (PEG40K) is the most used to conjugate an aptamer therapeutic in the clinic,[1, 51-56] because of significant extension of aptamers' half-life from 24 to 96 hours and great improvement of the *in vivo* bioavailability.[1, 57-59] Moreover, it was recently reported cholesterol conjugation provided most effective inhibition against SARS-CoV-2 for a peptide inhibitor of virus membrane fusion with host cells, possibly due to cholesterol mediated cell surface presentation.[60] We therefore linked cholesterol-PEG40K moiety to the 5' end of #5-2-15-2'-F-O (Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O). PEG40K-#5-2-15-2'-F-O was also generated and examined. PEG40K and cholesterol conjugations, by itself or combined, again showed consistently potent neutralizing activity against live Omicron BA.2 variant (Figure 4E, F), with an IC_{50} of 3.10 ± 2.35 ng ml^{-1} and 1.85 ± 0.82 ng ml^{-1}, respectively. To validate whether activity is from the aptamer, we next examined these conjugating components without it, including cholesterol, PEG40K and Chol-PEG40K. Data showed that cholesterol alone could enhance SARS-CoV-2 infection, possibly due to SARS-CoV-2 requires cholesterol for viral entry

(Figure S6A, Supporting information), an observation consistent with previous reports.[61, 62] Neither PEG40K nor Cholesterol-PEG40K showed an obvious effect on SARS-CoV-2 infection (Figure S6B, C, Supporting information). Taken together, these data confirmed that, aptamer, not these chemical conjugations, is responsible for neutralizing activity against BA.2 virus.

2.8. Prophylactic and therapeutic activity against live Omicron BA.2 upon intranasal delivery

Having observed that PEG40K and Cholesterol conjugation did not infer with the aptamer's SARS-CoV-2 neutralizing action, we are encouraged to challenge these modalities for their *in vivo* activity, which, as far as we know, have not been reported so far.[38, 39] We examined the prophylactic and therapeutic effect of Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O aptamer against live Omicron BA.2 variant *in vivo*. Mice were treated with the Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O modified-aptamer intranasally 3 hours before or after SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant virus infection to model prophylactic and therapeutic treatments respectively. 24 hours and 48 hours later, lung tissue was collected for virus titer quantification (Figure 4G). As shown in Figure 4H, I, viral titers after prophylactic administration are profoundly reduced when measured by either RT-qPCR (Figure 4H), or in a functional Focus Reduction Neutralization Test (FRNT) (Figure 4I).[63] The reduction is by 94% on average at 24 hours and persistently by 91% on average at 48 hours as determined by FRNT (Figure 4I). Viral titers upon therapeutic treatment are also profoundly reduced (Figure 4J, K), by 78% on average at 24 hours and persistently by 94% on average at 48 hours by FRNT (Figure 4K). These results highlight the exciting potential of Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O aptamer to be further developed into a prophylactic and therapeutic modality against the highly transmissible Omicron variant.

Interestingly, in contrast to similar effects in cell culture (Figure 4E), PEG40K-#5-2-15-2'-F-O aptamer without cholesterol conjugation loses activity against live Omicron BA.2 *in vivo* (Figure S7, Supporting information), an indication of the requirement of efficient retention of the aptamer on the cell surface for its efficiency when delivered intranasally. This is consistent with a previous observation that cholesterol conjugation is required for activity of an intranasally delivered peptide inhibitor targeting SARS-CoV-2 membrane fusion with host cells.[60]

We also examined Chol-PEG6-#5-2-15-2'-F-O, in which PEG40K was replaced with that of a lighter molecular weight, and of a faster turnover *in vivo*.[59] As shown in Figure S8A (Supporting information), Chol-PEG6-#5-2-15-2'-F-O showed consistent Omicron BA.2 variant neutralizing activity in cell culture. Upon intranasal delivery to mice, its neutralizing activity was observed after 24 hours but did not persist to 48 hours (Figure S8B-E, Supporting information), a phenomenon that could be explained by the shorter life-span of PEG6 *in vivo* compared with that of PEG40K.[59] Further, Chol and PEG40K modifications are also necessary for *in vivo* efficacy of a previously reported RNA aptamer PB6-Ta (Figure S9).[33] Taken together, we identified 2'-F-O, Chol, and PEG40K modifications of the aptamer lead #5-2-15, when combined, rendered prophylactic and therapeutic activity against live Omicron BA.2 variant upon intranasal delivery *in vivo*.

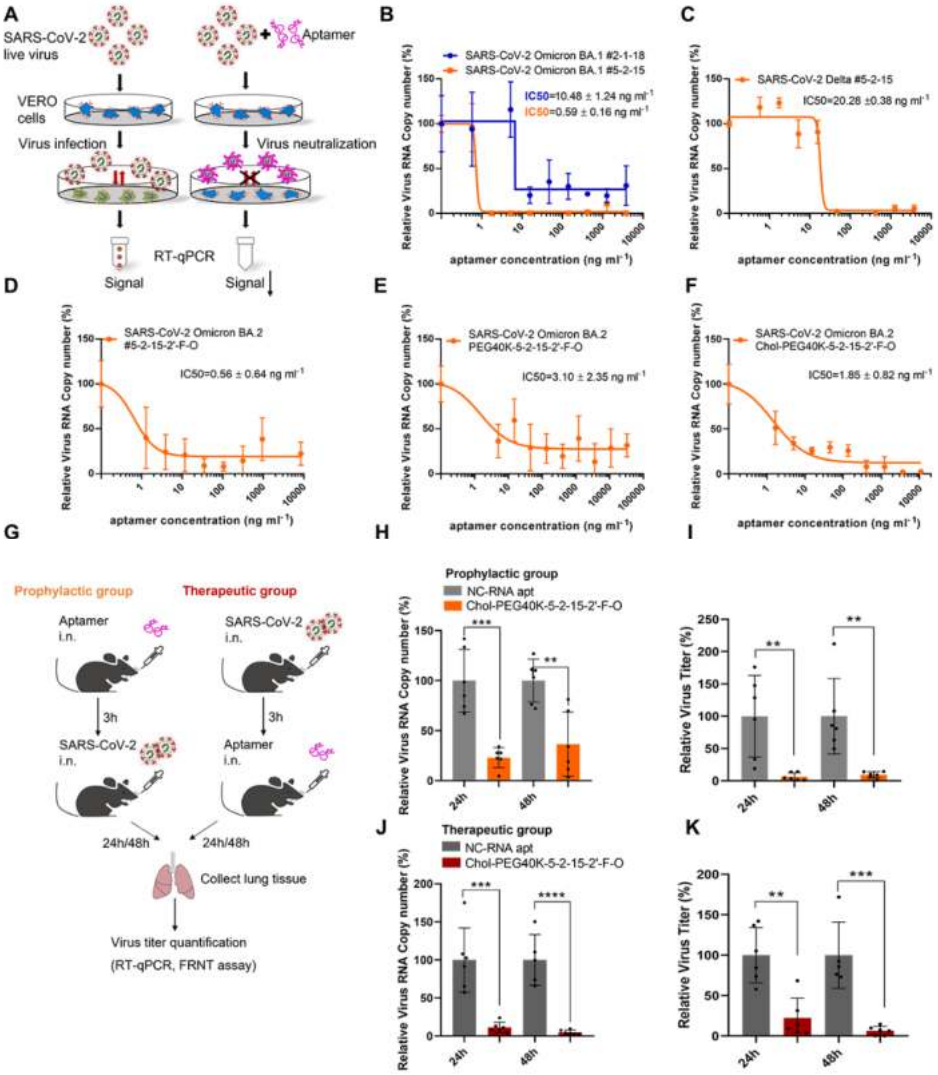


Figure 4. Neutralizing activity against live SARS-CoV-2 variants of concern. A) A cartoon showing the working principle of SARS-CoV-2 live virus neuralization assay. B) Quantification of relative virus RNA copy number to assess aptamer #2-1-18 and aptamer #5-2-15 for their activity against the infectivity of SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant. N=3 biological replicates. C) Quantification of relative virus RNA copy number to assess aptamer #5-2-15 for its activity against the infectivity of SARS-CoV-2 Delta variant. N=3 biological replicates. D) Quantification of relative virus RNA copy number to examine aptamer #5-2-15 with 2'-F-O modifications (#5-2-15-2'-F-O) for its neutralizing activity against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. N=6 biological replicates. E) Quantification of relative virus RNA copy number to assess aptamer 5'-40 kDa PEG -5-2-15 with 2'-F-O modifications (PEG40K-#5-2-15-2'-F-O) for its neutralizing activity against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. N=6 biological replicates. F) Quantification of relative virus RNA copy number to examine aptamer 5'-Cholesterol-40kDa PEG-#5-2-15 with 2'-F-O modifications (Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O) for its neutralizing activity against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. N=6 biological replicates. G) A schematic depicting the animal experiment to examine the prophylactic and therapeutic effect of intranasally (i.n.) delivered Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O against live SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant *in vivo*. H, I) Quantification of virus titer of lung tissue by RT-qPCR (H) and FRNT (I) to assess the prophylactic effect of aptamer Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. J, K) Quantification of virus titer of lung tissue by RT-qPCR (J) and FRNT (K) to assess the therapeutic effect of aptamer Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. NC-RNA apt: the negative control RNA aptamer. FRNT assay: focus reduction neutralization test. Readouts from negative

controls served as 100% for normalization. IC50s were indicated. Data show mean ± SD. For *in-vivo* experiment, n=6 biological replicates. ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001, two‐tailed *t*‐tests. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

2.9. Adaptation of CRISmers to orthogonal CRISPR/Cas systems, selection markers and host species.

Having successfully developed CRISmers and identified an aptamer lead effectively neutralizing SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant both *in vitro* and *in vivo*, we next asked whether the principle of CRISmers is broadly applicable by using two aptamer leads but switching to orthogonal CRISPR/Cas system, selection marker, and host species. As examples for demonstration, we used Un1Cas12f1, a newly developed mini version CRISPR system with a much smaller size (Figure 5A, B),[64-66] GFP as a marker compatible with fluorescent sorting (Figure 5C, D, Figure S10, Supporting information), kanamycin resistant gene as alternative selection marker for antibiotic enrichment (Figure 5E, F) , and *E. coli* as a bacterial host species (Figure 5E, F). Using aptamers #2-1-18 and #5-2-15, expected transactivation activity and enrichment of cells positive of selection markers were consistently observed (Figure 5), an indication of CRISmers' broad compatibility and utility, and its robustness and consistency in performance.

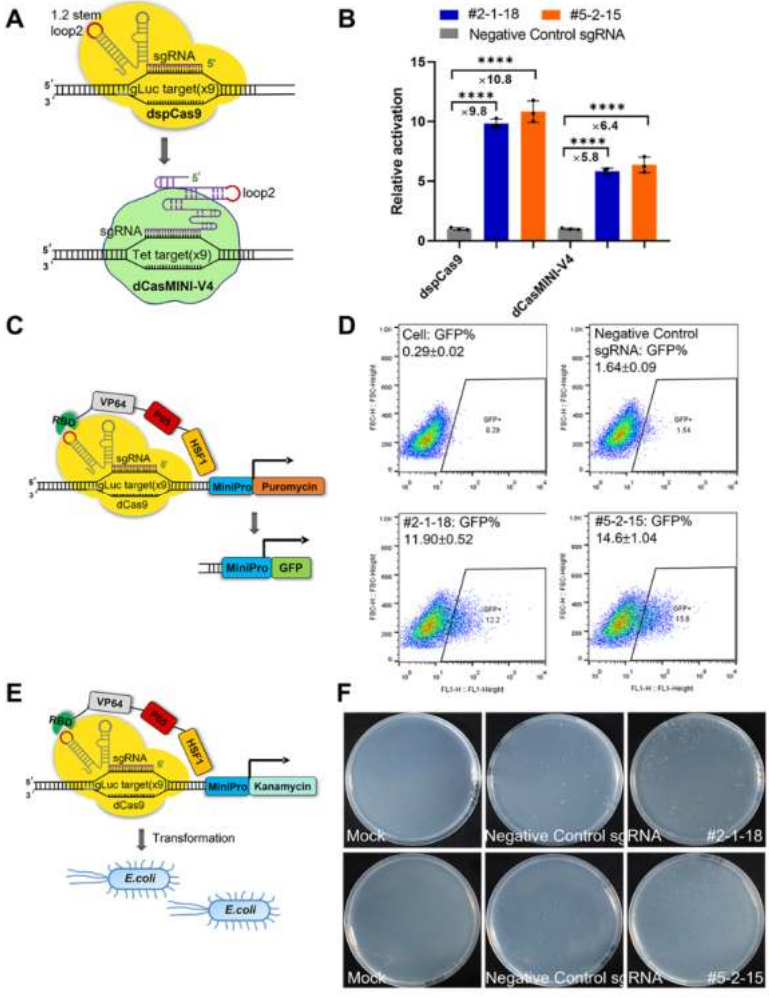


Figure 5. Adaptation of CRISmers to an orthogonal CRISPR/Cas, different selection markers and host species. A, B) dCasMINI-V4, an evolved version of Un1Cas12f1 CRISPR/Cas system, was used in place of CRISPR/Cas9 in CRISmers. The aptamer sequence was inserted into the loop 2 of its sgRNA scaffold. The firefly-luciferase reporter assay was used to examine activation. C, D) Switching the CRISmers selection marker to GFP. A negative control sgRNA used in luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold, NC). was

used as negative control. E, F) Switching host cells from human HEK293T to bacteria *E.coli.* Kanamycin was used for selection. Kanamycin in the LB agar plates was used at 100 μg ml^{-1} for #5-2-15 and 75 μg ml^{-1} for #2-1-18, respectively. Mock: plasmids control without kanamycin resistant gene. Exp: plasmids harboring #2-1-18 or #5-2-15 aptamer. Negative control sgRNA used in luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold, NC). N=3 biological replicates. ****P<0.0001, two‐tailed t‐tests. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

3. Conclusion

In summary, here we developed CRISmers, a novel system based on CRISPR/Cas for RNA aptamer screening, which marries the two powerful RNA-based systems. CRISmers adds a new tool in the CRISPR box, further unleashing its potential beyond the native nuclease function. Using CRISmers, we accomplished successful identification of aptamers targeting RBD of the SARS-CoV-2 spike protein. The aptamer leads are sensitive in detecting original SARS-CoV-2 pseudovirus as well as its Delta and Omicron variants. Strikingly, the leading aptamer #5-2-15 showed potent neutralizing activity against the live Omicron BA.2 variant virus, the dominant variant at the time of concluding this study, both in cell culture and in animal experiments. These results suggest its potential, when properly modified, of being further developed as an RNA aptamer based prophylactic and therapeutic modality against the highly transmissible Omicron variant. Finally, using the two aptamer leads identified herein, we concluded this study by showcasing the potential broad compatibility and utility, consistent and robust performance of CRISmers by switching spCas9 to new mini Un1Cas12f1, puromycin to GFP or kanamycin as selection markers, and host species from human HEK293T cells to bacterial *E. coli.*

CRISmers can be a powerful complement to the traditional SELEX, considering its unique characteristics. The entire screening process in our CRISmers system is carried out within cells, in which natural endogenous native biology conditions for folding and interaction of target proteins and RNAs would be better presented. The screening performance is also less likely to be affected by the experimental conditions such as buffer and temperature variations.[1] And the background noise of CRISmers, which is embedded into the dead cells upon antibiotic selection, is easier to abolish from the system comparing with nucleic acids in solution.[1] Meanwhile, what brings merits to CRISmers might also become limitations. Guide RNA appendage strategy limits its use only for RNA, not DNA aptamers. And due to native RNA production inside cells, nucleotide modification cannot be incorporated at the initial screening stage like SELEX does. Therefore, complementary use of CRISmers and SELEX might be necessary for many future studies.

While the current study used spCas9 and Un1Cas12f1 as the CRISPR/Cas scaffolds, puromycin, kanamycin, and GFP as the selection markers, human HEK293T cells and bacteria *E. coli* as hosts, similar strategy can be foreseen in other CRISPR species, selection markers, enrichment methods, and host species, etc., thus further expanding its applicability and the target coverage. Screening can be further scaled up readily as industry-scale mammalian cell culture or bacterial fermentation, used for recombinant protein and antibody production etc., are routine nowadays.

In this study, we chose the RBD of SARS-CoV-2 as our very first target to test the performance of the CRISmers system considering the urgency of the current global pandemic. To date, this is the first report that an aptamer targeting and neutralizing SARS-CoV-2 has ever been examined *in vivo* using live virus. Interestingly, we found that conjugations with both PEG with high molecular weight and cholesterol are necessary to maintain its SARS-CoV-2 neutralizing activity from cell culture to animal (Figure 4, Figure S7, Figure S8 and Figure S9, Supporting information). Multiplexing on nanoparticles might further enhance its potency in future.[37, 67] To our surprise，the aptamer lead #5-2-15 that we characterized most vigorously showed anti-SARS-CoV-2 activity across all variants of concern from Delta to Omicron

BA.2 that we have examined. Consistently，previous studies also observed other aptamers′ capability to avoid mutational escape.[37, 67] This is very different from neutralizing antibodies, almost all of which are vulnerable to mutations.[68] This highlights a possible inherent distinction of between protein and RNA. RNA by nature might be more flexible in conformation adaptation which might make it less vulnerable to mutations. CRISPR systems might be good examples. Guide RNAs, naturally occurring aptamers, can be swapped between CRISPR species within the same class and can still work fine with Cas proteins from another CRISPR system.[69]

In theory, CRISmers might be better suited to target intracellular proteins as they are localized within the cellular nucleus in the system in order to activate a selection reporter gene. However，on the other hand, as the delivery technologies for exogenous RNA evolve, a key contributing factor to the success of mRNA vaccines, intracellular targets will become more accessible to RNA therapeutics.[70] Last but not the least, CRISmers may also find broad utility for studying the fundamental RNA-protein interaction in general. Above all, we would anticipate a wide range of the applications of CRISmers in biomedical research beyond the COVID-19 era.

4. Experimental Methods

4.1. Reagents

His-tagged RBD of SARS-CoV-2 Spike Protein (S1N-C52H3), His-tagged RBD of SARS-CoV-2 Omicron BA.2 Spike Protein (SPD-C522g), Streptavidin-HRP (STN-NH115) and ELISA Buffer Set-96T (EBS-001) were purchased from ACROBiosystems (Beijing, China). High binding microplates (42592) were purchased from Corning (Kennebunk, USA). DNA sequences were synthesized by GenScript (Nanjing, China). RNA sequences were synthesized by Sangon Biotech (Beijing, China). All media for cell culture were purchased from Life Technologies (Shanghai, China). All reagents for library construction were purchased from New England BioLabs (Ipswich, USA). Firefly luciferase assay kits (T003) were purchased from Vigorous Biotechnology (Beijing, China). Blasticidin, hygromycin and puromycin were purchased from Invivogen (Toulouse, France). The Amplicon sequencing were performed in GENEWIZ (Suzhou, China). RNA extraction kits (06543588001) were purchased from Roche (Indianapolis, USA). RT-qPCR kits (ZC-HX-201-2) were purchased from BioGerm (Shanghai, China). Chemiluminescent EMSA Kit was purchased from Beyotime (Shanghai, China). Native and modified aptamers were synthesized by GENERAL BIOL (Anhui, China) and Biosyntech (Suzhou, China). For chemical-modified aptamers: 2’-F: 2’ position of pyrimidines with fluorin modification, Take aptamer #5-2-15 as an example: A**C**U**U**GG**CC**AA**UU**A**CC**G**U**AG**UUUUU**G**U**AG**U**C**U**G**C**A**GGG**CC**AA**GU**G**, 2’-O: 2’ position of purines with 2’-*O*-methyl modification, Take aptamer #5-2-15 as an example: **A**CUU**GG**CC**AA**UU**A**CC**G**U**AG**UUUUU**G**U**AG**UCU**G**C**AGGG**CC**AA**GU**G**, 2’-F-O: 2’ position of pyrimidines with fluorin and purines with 2’-*O*-methyl modifications.

4.2. Plasmids

To generate 293T/dCas9 stable cell line, dCas9 was cloned from the pMSCV_LTR_dCas9_VP64_BFP plasmid (a gift from Stanley Qi & Jonathan Weissman, Addgene plasmid #46912).[71] Multiple activation domains, including VP64 (V), P65 (P) and HSF1 (H), were cloned from Addgene plasmids (VP64 was amplified from pLenti_EF1a_SOX2, a gift from Feng Zhang, Addgene plasmid #35388;[72] P65 was amplified from SP_dCas9_VPR, a gift from George Church, Addgene plasmid #63798;[73] HSF1 was amplified from plenti_MS2_P65_HSF1 _Hygro, a gift from Feng Zhang, Addgene plasmid 61426).[74] Human codon nucleotide sequences encoding the S glycoprotein, the subunits of S glycoprotein (S1, amino acids 2 to 673, RBD amino acids 319 to 541, GISAID accession ID: EPI_ISL_414631), Delta variant (GISAID accession ID: EPI_ISL_2356230), Omicron BA.1 variant (GISAID accession ID: EPI_ISL_6825398), Omicron BA.2 variant (GISAID accession ID: EPI_ISL_8207301) and the hACE2 were synthesized by GenScipt. The negative control RNA

aptamer (NC-RNA apt) used in ELONA, EMSA and pseudovirus/live virus neutralization assay was provided by Sangon Biotech, whose sequence is ACUUGGCCAuuuuucuuuuucuuuuucuuuuuCUGCAGGGCCAAGUG. The negative control sgRNA (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold, NC) used in luciferase reporter assay was one without any aptamer appendage.

The 1× gLuc/9× gLuc target luciferase reporter plasmids (p1× gLuc target-miniPro-firefly; p9× gLuc target-miniPro-firefly) used in this study were constructed by inserting one copy or nine copies of the gLuc sgRNA target sequence upstream and firefly luciferase downstream of the mini promoter. The 9× gLuc target puromycin reporter plasmid (p9× gLuc target-miniPro-puromycin) was constructed by replacing firefly luciferase with puromycin. The aptamer appending gLuc sgRNA plasmids (phU6-gLuc sgRNA-1.1-BsmBI; phU6-gLuc sgRNA-1.2 BsmBI) were constructed by inserting the gLuc sgRNA sequence in pre-synthesized sgRNA 1.1 or sgRNA 1.2 backbone containing BsmBI sites in the tetra loop or stemloop 2, followed by incorporation of aptamers *via* BsmBI digestion and ligation. A GFP aptamer of canonical sequence was used in this study.[46] The lentiviral shuttle plasmid for library construction (phU6-gLuc sgRNA-1.2 BsmBI-EF1a-NLS-EcoRI-VPH) was generated by cloning EF1a promoter-nuclear localization signal (NLS)-EcoRI-VPH downstream of hU6-gLuc sgRNA-1.2 BsmBI. The 9× gLuc target GFP reporter plasmid (p9× gLuc target-miniPro-GFP) was constructed by puromycin with GFP. The 9× gLuc target kanamycin reporter plasmid (p9× gLuc target-miniPro-Kana^{+}) was constructed by replacing puromycin resistant gene with kanamycin resistant gene, and then inserted all CRISmers system's components (phU6-gLuc sgRNA-1.2 aptamer-EF1a-NLS-RBD-VPH, 3×NLS-dspCas9 and the 9× gLuc target-miniPro-kanamycin) into a plasmid (phU6-gLuc sgRNA-1.2 aptamer-EF1a-NLS-RBD-VPH-P2A-3× NLS dspCas9-3× polyA-9× gLuc target-miniPro-kanamycin-Amp promoter-ampicillin) to verify the expression of kanamycin. dUn1Cas12f1 (dCasMINI-V4) was cloned from pHR-PGK-SV40_NLS-dCasMINI-V4-VPR-c-Myc_NLS-mCherry-WPRE plasmid (a gift from Stanley Qi, Addgene plasmid #176269).[64] The aptamer sequence was in incorporated in the loop 2 of its sgRNA scaffold.[64]

4.3. Cell culture

HEK293T cells (ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM GlutaMAX (Thermo Fisher), 100 U ml^{-1} penicillin/streptomycin at 37℃ with 5%CO_2. HEK293T/dCas9 stable monoclonal cell line was generated *via* infection of HEK293T with lentiviral particles containing the dCas9 expression cassette, followed by monoclonal picking, expansion, and examination. The HEK293T/dCas9/9× gLuc puromycin reporter stable monoclonal cell line was produced *via* another round of infection to the monoclonal HEK293T/dCas9 cell line using lentiviral particles harboring the 9× gLuc target puromycin reporter. Monoclones were picked, expanded, and examined as described in Figure S2A (Supporting information). The polyclonal HEK293T/hACE2 stable cell line was generated by lentiviral transduction of HEK293T cells with pLenti-CMV-hACE2. Transient transfections were conducted using PEI (polysciences, Warrington) according to the manufacturer's recommended protocol.

4.4. CRISmers screening

4.4.1. Lentiviral-CRISmers random library construction

Human codon optimized nucleotide sequences encoding the RBD of Spike protein (S1, RBD amino acids 319 to 541, GISAID accession ID: EPI_ISL_414631) was synthesized by GenScipt. The RBD was first inserted into the library shuttle vector phU6-gLuc sgRNA-scaffold-1.2 BsmBI- scaffold-polyT-EF1a-NLS-linker-EcoRI-linker-VPH at the EcoRI restriction sites. Then N20 pooled oligos flanked by two 40 bp overlapping sequences (AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGGCCAnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnCTGCAGGGCCAAGTGG CACCGAGTCGGTGCTTTTTATCGA, synthesized by Sangon Biotech) were PCR amplified and cloned into the BsmBI

sites of the library vector phU6-gLuc sgRNA-scaffold-1.2 BsmBI-scaffold-polyT-EF1a-NLS-linker-EcoRI-WT RBD-EcoRI-linker-VPH with Gibson assembly ligation.[75, 76] The number of PCR cycles was limited to 15 cycles to minimize PCR bias and by-products. The High-fidelity polymerase Phusion Hot Start Flex 2 × Master Mix (NEB, Ipswich, USA, M0536S) was used for PCR. Then the PCR reaction was run on a 2% agarose gel and product ~140bp was purified using QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germany, 28104). After the gibson assembly, isopropanol precipitation was performed to purify and concentrate the library before pooled transformation. After 32℃ incubation for 18h post-transformation，we harvested all the surviving colonies and maxiprep the pooled library. Based on calculation of the number of colonies, we could estimate the diversity of the sgRNA-aptamer library to be 10 to the power of 8. Cloning of sub-libraries in the following rounds followed the same protocol, while using amplicons from the genomic DNA of surviving cells after selection.

4.4.2. CRISmers random library lentivirus production

HEK293T cells were seeded and cultured to achieve optimal confluency (~80-90%) for transfection. Lentiviral transgene expression plasmids, psPAX2 (Addgene plasmid #12260), and pMD2.G (Addgene plasmid #12259) were co-transfected. After 6 h post-transfection, culture plate medium was replaced with fresh DMEM containing 10% FBS, and cells were further cultured at 37℃. Virus supernatant was harvested 48 h and 72 h post-transfection, filtered with 0.45 μm syringe filters (PALL), and stored at -80℃ when necessary.

4.4.3. CRISmers random library lentivirus transduction

Lentiviral particles were used to infect the No.4-53 monoclonal dCas/9× gLuc-Puro cell line. Suspended cell infection was conducted, with 8 μg ml^{-1} polybrene (Sigma) added to the culture. The medium was changed after 8 h of infection. During the initial round of CRISmers, based on our calculation, 20 cells is presented for infection per sequence from the pooled library. And the pooled lentivirus particles were transduced at a Multiplicity of Infection (MOI of ≈3 to maximize the representation of the aptamer population in the infected cells. After the first round, most background RNA sequence is removed from the system and we maintain a coverage of >500 cells per sequence during sub-library transductions and a lower MOI of ≈0.1-0.2 was used to increase the probability that most cells receive only one aptamer.

4.4.4. Puromycin selection

The cells were initially plated at low density and left for 48 hours. After this, 2 μg ml^{-1} puromycin was added to select for puromycin-resistant cells. The medium was renewed on alternate days until there were no viable cells in the control plate of non-infected cells.

4.4.5. Genomic DNA extraction

The puromycin-resistant cells were subsequently cultured for an additional 5-7 days. The surviving cells were collected. Genomic DNA was extracted to amplify the aptamer sequences.

4.4.6. Deep Sequencing and analysis (Information read-out)

The N20 oligos region, flanked by two 40 bp overlapping sequences, was PCR amplified and deep sequenced by Genewiz. Sequences that were not at the correct size (140 bp; 20 bp 5′ primer +40 bp 5′ flanked region +20 bp random region +40 bp 3′ flanked region +20 bp 3′ primer) or did not contain the correct primer/flanked region sequences on each end were filtered out, resulting in over $>4 \times 10^6$ filtered sequences per round. These filtered sequences were then sorted by frequency.

To identify high affinity sequences, we calculated and ranked the top 0.1% high frequency sequences and top 15 sequences with highest fold-of-enrichment ratio of copy numbers in comparison against the previous round of screening [47] and tested them in the aforementioned luciferase reporter assay as a secondary validation. The next cycle, when necessary, was initiated by subcloning the amplified aptamer sequences from the previous round into the original library shuttle construct.

4.5. Validation of top hits (Luciferase reporter assay)

These identified aptamers were validated by luciferase reporter assay as a secondary screen. Aptamers were synthesized by Sangon Biotech and cloned into the BsmBI sites of the vector phU6-gLuc sgRNA-scaffold-1.2 BsmBI- scaffold-polyT-EF1a-NLS-linker-EcoRI-WT RBD-EcoRI-linker-VPH. HEK293T/dCas9 cells were seeded at 2.5×10^4 cells/well into 96-well assay plates. And transient transfection was performed the next day using PEI with plasmids expressing 9× gLuc target firefly/gaussia luciferase, hU6 -gLuc sgRNA-scaffold-1.2 aptamer-scaffold-polyT-EF1a-NLS-linker-EcoRI-WT RBD-EcoRI-linker-VPH and a renilla luciferase expression plasmid as transfection control. The phU6-gLuc sgRNA-scaffold-1.2 BsmBI- scaffold-polyT-EF1a-NLS-linker-EcoRI-WT RBD-EcoRI-linker-VPH plasmid was used as negative control. A total of 200 ng DNA was transfected, and each plasmid was transfected in equal amount. The medium was replaced with fresh medium 6 hours after transfection. The firefly/gaussia and renilla luciferase activities were recorded sequentially by Luminescence Counter (Perkin Elmer) 48 hours later.

4.6. Puromycin reporter assay

The hU6-gLuc sgRNA-1.2 GFP apt-EF1a-NLS-GFP-VPH lentivirus (PC) and the hU6-gLuc sgRNA-1.2 BsmBI scaffold -EF1a-NLS-GFP-VPH (NC) were packaged into lentivirus particles as described above. Each HEK293T/dCas9/9× gLuc puromycin reporter monoclonals was transduced with these particles and selected with escalating concentrations of puromycin (low: 0.5 μg ml^{-1}, medium: 1 μg ml^{-1}, high: 2 μg ml^{-1}). The number of surviving clones were counted.

4.7. GFP reporter assay

HEK293T cells were seeded at 15.625×10^4 cells/well into 24-well assay plates. And transient transfection was performed the next day using PEI with plasmids expressing 9× gLuc target GFP, hU6-gLuc sgRNA-1.2 #2-1-18 aptamer or hU6-gLuc sgRNA-1.2 #5-2-15 aptamer, and dCas9. A total of 800 ng DNA was transfected, and each plasmid was transfected in equal amount. The medium was replaced with fresh medium 6 hours after transfection. GFP^+ cells were counted using flow cytometry Calibur cell analyzer. Cells were first gated of FSC (Forward Scatter) vs SSC (Side scatter) to exclude cell debris The FITC (FL1) channel was selected without compensation.

Cells were then gated on FITC (FL1) channel, where the threshold was set by non-transfected control cells. Gates are drawn to define positive cells on the basis of negative cell controls (Figure. S10, Supporting information).

4.8. Examination of CRISmers in E. coli.

The Mock group plasmid (unrelated plasmids control without kanamycin resistant gene), NC group plasmid (kanamycin reporter plasmid but with a negative control sgRNA (NC) used in luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold) and experiment group (kanamycin reporter plasmid with aptamer) were transformed and all LB agar plates of ampicillin were incubated overnight at 32 ℃ for 14-16 hours, then transferred to 1 ml centrifuge tube with 600 μl LB medium with 100 μg ml^{-1} ampicillin and shaked at 32 ℃ for 3-4 h with 200 rpm. Then 100 μl culture was plated onto a LB agar plate with 100 μg ml^{-1} ampicillin and 100 μg ml^{-1} kanamycin (#5-2-15) or 75 μg ml^{-1} kanamycin (#2-1-18). These LB agar plates were cultured at 32 ℃ for another 14-18 hours.

4.9. SARS-CoV-2 pseudovirus production

HEK293T cells were seeded and cultured to achieve optimal confluency (~80-90%) for transfection and were co-transfected with 2 μg of plasmid encoding CMV-luciferase, 0.4 μg of Spike or Delta or Omicron, 0.2 μg of TAT, 0.2 μg of Rev and 0.2 μg of GAGpol in a 6-well plate each using PEI. After 6 hours post-transfection, culture plate medium was replaced with fresh DMEM containing 10%FBS. Virus supernatant was harvested 48 hours and 72 hours post-transfection, filtered with 0.45-μm syringe filters (PALL), and stored at -80℃ when necessary.

4.10. ELONA assay

For protein based ELONA assay, 96-well high-binding polystyrene microplates were pre-coated with 250 ng RBD proteins at 4 ℃ overnight. Then the plates were washed with wash buffer (PBS with 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4) for 3 times and blocked with blocking buffer (wash buffer with 2% (w/v) bovine serum albumin) for 30 min at 37 ℃. Serial dilutions of biotinylated RNA aptamers in sterilized dH_2O were added and incubation lasted for 1 h at 25 ℃. The plates were then washed with wash buffer for 3 times. 0.1 μg ml^{-1} streptavidin-HRP was added and incubated for 30 min at room temperature. Substrate buffer was added after 3 times of wash buffer washing and incubated for 20 min at room temperature, followed by addition of stop buffer (1 M sulfuric acid). The absorbance of optical density at 450 nm (OD450) was measured using a microplate reader. The *Kd* values of aptamers were estimated using the following equation.

$$Y=B_{max}X/(Kd+X)$$

The Y represents the mean value of OD450, Bmax is the maximal value of OD450 and X is the concentration of the biotinylated aptamer. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

As for ELONA using pseudovirus, different titers of the Spike pseudovirus and its variants Delta and Omicron were pre-immobilized on microplate and then treated with 100 nM biotinylated aptamers. The process that follows is the same with the protein-based ELONA. Pseudovirus titration was conducted following a previous report.[77]

4.11. EMSA assay

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) were performed according to the protocol provided by the Chemiluminescent EMSA kit (Beyotime Biotechnology, China). The fixed concentration of biotinylated aptamers (1 pmol) with varying ratio of SARS-CoV-2 WT RBD or SARS-CoV-2 Omicron RBD protein (1:0, 1:1, 1:10, 1:20, 1:50) in EMSA binding buffer were incubated at room temperature for 30 min. Besides, a fixed concentration of aptamers (1 pmol) and a 1:25 ratio of SARS-CoV-2 WT RBD or a 1:50 ratio of SARS-CoV-2 Omicron RBD protein with varying the cold aptamers (non-biotinylated aptamers, 1:1, 1:2, 1:100, 1:200) in EMSA binding buffer were incubated at room temperature for 30 min. After incubation, the samples were mixed with EMSA loading buffer, and the samples were run on a 4% polyacrylamide gel (4 ml 40% acrylamide/bis-acrylamide, 1 ml 1× TBE, 150 μl 10% APS, 10 μl TEMED, 625 μl 80% glycerol, and dH2O up to 20 ml) at 100 V for 1 hours and then transferred to a N^+ nylon membrane. After electrophoretic transfer, crosslinking was carried out with a hand-held UV lamp for 5-10 min. Then these biotin-labeled aptamers were detected by chemiluminescence.

4.12. SARS-CoV-2 live virus neutralization assay

The experiment was performed in the Biological Lafety Level-3 laboratory (BSL-3) at the Shenzhen Center for Disease Control and Prevention. All experiments involving live SARS-CoV-2 virus followed the approved standard operating procedures of the Shenzhen Center for Disease Control and Prevention BSL-3. The SARS-CoV-2 Delta virus, Omicron BA.1 virus and Omicron BA.2 virus were isolated from nasopharyngeal aspirate specimen of patients by Shenzhen Center

for Disease Control and Prevention (SARS-CoV-2/shenzhen/09/2022 (Delta); SARS-CoV-2/shenzhen/08/2022 (Omicron BA.1); SARS-CoV-2/shenzhen/13/2022 (Omicron BA.2)).

The VERO cells were seeded into 96 microplates (1.5×10^4 cells/well) and cultured overnight. The aptamers were incubated with SARS-CoV-2 virus in 2% FBS/DMEM at a final volume of 100 μl per well at indicated concentrations in a 5% (v/v) CO_2, 37 ℃ incubator for 1 h. Medium containing aptamers and live virus was then transferred to the VERO cell culture plates. After 2 hours incubation, the medium was replaced with 2% FBS/DMEM fresh medium and culture was continued. 48 hours later, media were harvested. RNA was extracted and quantitative reverse-transcription PCR (RT-qPCR) was performed to quantitate the viral RNA. The relative virus RNA copy number was analyzed by nonlinear regression to calculate IC_{50} value using GraphPad Prism 8.0.1 software.

4.13. Ethics statement

All protocols of animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of Guangzhou Medical University.

4.14. Animal experiment

All work with SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant virus was conducted in the Guangzhou Customs District Technology Center Biosafety Level 3 (BSL-3) Laboratory. The SARS-CoV-2 Omicron variant, BA.2, was used to infect wild type BALB/c mice.[78] Specific pathogen-free 5-6-week old female BALB/c mice were lightly anesthetized with isoflurane and intranasally challenged with 1×10^5 FFU of BA.2 live virus. For prophylactic group, mice were intranasally administered with modified RNA aptamers (10 μg each mouse) dissolved in dH_2O (75 μl each nostril) by a dropper 3 hours before infection. For therapeutic group, mice were intranasally treated with modified RNA aptamers at 3 hours post infection. 24 hours and 48 hours later, mice were applied to anesthesia and sacrificed before harvesting lungs tissue for virus tittering. Lungs were removed into PBS and homogenized. Clarified supernatants were harvested. RNA was extracted and RT-qPCR was performed to quantitate the viral RNA. Also, virus titers of clarified supernatants were assayed in Vero E6 cells and presented as FFU per gram of tissue using FRNT assay.[63] n=6 biological replicates.

4.15. Statistical Analysis

Data show mean ± SD. n=3 biological replicates unless otherwise noted. n=6 biological replicates in some of *in-vitro* and all *in vivo* live virus neutralization experiments (Figure 4D, E, F, H, I, J, K, Figure S7, Figure S8 and Figure S9, Supporting information). **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001, two‐tailed *t*‐tests. n.s., no significant difference. GraphPad Prism 8.0.1 software was used for statistical analysis.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

We would like to thank all colleagues in our laboratories. We are grateful to technical assistance from Dr. Junbiao Dai, Dr. Zhangli Hu, Dr. Deming Gou, Dr. Beixin Mo, Dr. Xinchun Chen (Shenzhen University, Shenzhen, China), and their laboratory members. We thank Dr. Chi-chung Hui (University of Toronto and the Hospital of Sick Children, Toronto, Canada) for his comments and suggestions on this study. We would also like to thank Dr. Sajid Naeem for his assistance of manuscript editing.

Our work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82273967 and No. 91957121 to Yu

Wang), Shenzhen Science and Technology Innovation Committee (No. JSGG20200807171801013 and No. KCXFZ202002011006448 to Yu Wang) and Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. Z190013 to Yu Wang).

Conflict of Interest disclosure

A provisional patent covering the CRISmers system and aptamers identified herein has been filed.

Author contributions

J. Z. and A. Z contributed equally to this work. Y. W. conceived and supervised the study. J.Z., R. Z., B.Z., X. T., and Y. W. designed experiments. J.Z., M. M., J. Q., A. Z., S.F., Y. S., M. X. performed experiments and acquired the data. J.Z., J.Z., J. Z., R. Z., B.Z., X.T., and Y. W. analyzed data. J.Z., X.T., J.Z., B.Z., and Y. W. wrote and revised the manuscript.

Data Availability Statement

The Data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article. Plasmids for CRISmers screening library construction and cell lines are available upon request.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))
Revised: ((will be filled in by the editorial staff))
Published online: ((will be filled in by the editorial staff))

References

[1] J. H. Zhou, J. Rossi, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017, *16*, 440.

[2] Y. Zhang, B. S. Lai, M. Juhas, *Molecules* 2019, *24*, 941.

[3] A. O. Garba, S. A. Mousa, *Ophthalmol. Eye Dis.* 2010, *2*, 75.

[4] J. Menne, D. Eulberg, D. Beyer, M. Baumann, F. Saudek, Z. Valkusz, A. Wiecek, H. Haller, G. Emapticap Study, *Nephrol. Dial. Transplant.* 2017, *32*, 307.

[5] N. Halama, A. Williams, M. Suarez-Carmona, J. Schreiber, N. Hohmann, U. Pruefer, J. Krauss, D. Jaeger, A. Froemming, D. Beyer, J. U. Jungnelius, A. Mangasarian, *Ann. Oncol.* 2020, *31*, S944.

[6] S. J. Ni, Z. J. Zhuo, Y. F. Pan, Y. Y. Yu, F. F. Li, J. Liu, L. Y. Wang, X. Q. Wu, D. J. Li, Y. Y. Wan, L. H. Zhang, Z. J. Yang, B. T. Zhang, A. P. Lu, G. Zhang, *Acs Appl. Mater. Interfaces* 2021, *13*, 9500.

[7] W. Xuan, Y. Peng, Z. Deng, T. Peng, H. Kuai, Y. Li, J. He, C. Jin, Y. Liu, R. Wang, W. Tan, *Biomaterials* 2018, *182*, 216.

[8] Z. Fu, J. Xiang, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*, 2793.

[9] C. Tuerk, L. Gold, *Science* 1990, *249*, 505.

[10] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* 1990, *344*, 467.

[11] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* 1990, *346*, 818.

[12] J. Yan, H. Xiong, S. Cai, N. Wen, Q. He, Y. Liu, D. Peng, Z. Liu, *Talanta* 2019, *200*, 124.

[13] M. Djordjevic, *Biomol. Eng.* 2007, *24*, 179.

[14] P. Bayat, R. Nosrati, M. Alibolandi, H. Rafatpanah, K. Abnous, M. Khedri, M. Ramezani, *Biochimie* 2018, *154*, 132.

[15] G. Hybarger, J. Bynum, R. F. Williams, J. J. Valdes, J. P. Chambers, *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, *384*, 191.

[16] C. Narayan, J. Kwon, C. Kim, S. J. Kim, S. K. Jang, *Analyst* 2020, *145*, 1473.

[17] M. Avci-Adali, M. Metzger, N. Perle, G. Ziemer, H. P. Wendel, *Oligonucleotides* 2010, *20*, 317.

[18] A. V. Anzalone, L. W. Koblan, D. R. Liu, *Nat. Biotechnol.* 2020, *38*, 824.

[19] G. W. Liu, Q. P. Lin, S. Jin, C. X. Gao, *Mol. Cell* 2022, *82*, 333.

[20] X. S. Xu, L. S. Oi, *J. Mol. Biol.* 2019, *431*, 34.

[21] R. Verbeke, I. Lentacker, S. C. De Smedt, H. Dewitte, *J. Control. Release.* 2021, *333*, 511.

[22] N. Chaudhary, D. Weissman, K. A. Whitehead, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021, *20*, 817.

[23] J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. B. Thomson, S. Chen, B. R. Leavitt, P. R. Cullis, R. van der Meel, *Nat. Nanotechnol.* 2021, *16*, 630.

[24] Y. Song, J. Song, X. Wei, M. Huang, M. Sun, L. Zhu, B. Lin, H. Shen, Z. Zhu, C. Yang, *Anal. Chem.* 2020, *92*, 9895.

[25] J. Li, Z. Zhang, J. Gu, H. D. Stacey, J. C. Ang, A. Capretta, C. D. M. Filipe, K. L. Mossman, C. Balion, B. J. Salena, D. Yamamura, L. Soleymani, M. S. Miller, J. D. Brennan, Y. Li, *Nucleic Acids Res.* 2021, *49*, 7267.

[26] X. Liu, Y. L. Wang, J. Wu, J. Qi, Z. Zeng, Q. Wan, Z. Chen, P. Manandhar, V. S. Cavener, N. R. Boyle, X. Fu, E. Salazar, S. V. Kuchipudi, V. Kapur, X. Zhang, M. Umetani, M. Sen, R. C. Willson, S. H. Chen, Y. Zu, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, *60*, 10273.

[27] A. Schmitz, A. Weber, M. Bayin, S. Breuers, V. Fieberg, M. Famulok, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, *60*, 10279.

[28] M. Sun, S. Liu, X. Wei, S. Wan, M. Huang, T. Song, Y. Lu, X. Weng, Z. Lin, H. Chen, Y. Song, C. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, *60*, 10266.

[29] A. Gupta, A. Anand, N. Jain, S. Goswami, A. Anantharaj, S. Patil, R. Singh, A. Kumar, T. Shrivastava, S. Bhatnagar, G. R. Medigeshi, T. K. Sharma, *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2021, *26*, 321.

[30] G. Yang, Z. Li, I. Mohammed, L. Zhao, W. Wei, H. Xiao, W. Guo, Y. Zhao, F. Qu, Y. Huang, *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021, *6*, 227.

[31] A. S. Peinetti, R. J. Lake, W. Cong, L. Cooper, Y. Wu, Y. Ma, G. T. Pawel, M. E. Toimil-Molares, C. Trautmann, L. Rong, B. Marinas, O. Azzaroni, Y. Lu, *Sci. Adv.* 2021, *7*, eabh2848.

[32] N. Kacherovsky, L. F. Yang, H. V. Dang, E. L. Cheng, Cardle, II, A. C. Walls, M. McCallum, D. L. Sellers, F. DiMaio, S. J. Salipante, D. Corti, D. Veesler, S. H. Pun, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, *60*, 21211.

[33] J. Valero, L. Civit, D. M. Dupont, D. Selnihhin, L. S. Reinert, M. Idorn, B. A. Israels, A. M. Bednarz, C. Bus, B. Asbach, D. Peterhoff, F. S. Pedersen, V. Birkedal, R. Wagner, S. R. Paludan, J. Kjems, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021, *118*, e2112942118.

[34] H. Saify Nabiabad, M. Amini, S. Demirdas, *Chem. Biol. Drug Des*. 2022, *99*, 233.

[35] I. Alves Ferreira-Bravo, J. J. DeStefano, *Viruses* 2021, *13*, 1983.

[36] Z. Zhang, R. Pandey, J. Li, J. Gu, D. White, H. D. Stacey, J. C. Ang, C. J. Steinberg, A. Capretta, C. D. M. Filipe, K. Mossman, C. Balion, M. S. Miller, B. J. Salena, D. Yamamura, L. Soleymani, J. D. Brennan, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, *60*, 24266.

[37] M. Sun, S. Liu, T. Song, F. Chen, J. Zhang, J. A. Huang, S. Wan, Y. Lu, H. Chen, W. Tan, Y. Song, C. Yang, *J. Am. Chem. Soc*. 2021, *143*, 21541.

[38] R. Amini, Z. Zhang, J. Li, J. Gu, J. D. Brennan, Y. Li, *Anal Sens* 2022, *2*, e202200012.

[39] Y. Zhang, M. Juhas, C. K. Kwok, *Trends Biotechnol* 2023, *41*, 528.

[40] A. Dominguez, W. Lim, L. Qi, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2016, *17*, 5.

[41] S. Wang, J. H. Su, F. Zhang, X. Zhuang, *Sci. Rep.* 2016, *6*, 26857.

[42] J. Zhao, R. Inomata, Y. Kato, M. Miyagishi, *Nucleic Acids Res.* 2021, *49*, 1330.

[43] H. Li, M. Li, Y. Yang, F. Wang, F. Wang, C. Li, *Anal. Chem.* 2021, *93*, 3209.

[44] H. Yang, R. Ledesma-Amaro, H. Gao, Y. Ren, R. Deng, *Biosens. Bioelectron.* 2023, *228*, 115189.

[45] J. Lu, C. Zhao, Y. Zhao, J. Zhang, Y. Zhang, L. Chen, Q. Han, Y. Ying, S. Peng, R. Ai, Y. Wang, *Nucleic Acids Res*. 2018, *46*, e25.

[46] J. M. Tome, A. Ozer, J. M. Pagano, D. Gheba, G. P. Schroth, J. T. Lis, *Nat. Methods* 2014, *11*, 683.

[47] M. Cho, Y. Xiao, J. Nie, R. Stewart, A. T. Csordas, S. S. Oh, J. A. Thomson, H. T. Soh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, *107*, 15373.

[48] M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* 2003, *31*, 3406.

[49] J. Xu, X. Zhang, S. Zhou, J. Shen, D. Yang, J. Wu, X. Li, M. Li, X. Huang, J. E. Sealy, M. Iqbal, Y. Li, *Sci. Rep.* 2017, *7*, 11796.

[50] L. M. Hellman, M. G. Fried, *Nat. Protoc.* 2007, *2*, 1849.

[51] M. G. Cohen, D. A. Purdy, J. S. Rossi, L. R. Grinfeld, S. K. Myles, L. H. Aberle, A. B. Greenbaum, E. Fry, M. Y. Chan, R. M. Tonkens, S. Zelenkofske, J. H. Alexander, R. A. Harrington, C. P. Rusconi, R. C. Becker, *Circulation* 2010, *122*, 614.

[52] E. K. Waters, R. M. Genga, M. C. Schwartz, J. A. Nelson, R. G. Schaub, K. A. Olson, J. C. Kurz, K. E. McGinness, *Blood* 2011, *117*, 5514.

[53] E. W. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, Jr., D. R. Guyer, A. P. Adamis, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, *5*, 123.

[54] J. P. Vavalle, M. G. Cohen, *Future Cardiol.* 2012, *8*, 371.

[55] G. J. Jaffe, D. Eliott, J. A. Wells, J. L. Prenner, A. Papp, S. Patel, *Ophthalmology* 2016, *123*, 78.

[56] G. Biesecker, L. Dihel, K. Enney, R. A. Bendele, *Immunopharmacology* 1999, *42*, 219.

[57] A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, *9*, 537.

[58] S. Ni, H. Z. Yao, L. L. Wang, J. Lu, F. Jiang, A. P. Lu, G. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.* 2017, *18*, 1683.

[59] A. A. D'souza, R. Shegokar, *Expert Opin. Drug Delivery* 2016, *13*, 1257.

[60] R. D. de Vries, K. S. Schmitz, F. T. Bovier, C. Predella, J. Khao, D. Noack, B. L. Haagmans, S. Herfst, K. N. Stearns, J. Drew-Bear, S. Biswas, B. Rockx, G. McGill, N. V. Dorrello, S. H. Gellman, C. A. Alabi, R. L. de Swart, A. Moscona, M. Porotto, *Science* 2021, *371*, 1379.

[61] D. W. Sanders, C. C. Jumper, P. J. Ackerman, D. Bracha, A. Donlic, H. Kim, D. Kenney, I. Castello-Serrano, S. Suzuki, T. Tamura, A. H. Tavares, M. Saeed, A. S. Holehouse, A. Ploss, I. Levental, F. Douam, R. F. Padera, B. D. Levy, C. P. Brangwynne, *Elife* 2021, *10*, e65962.

[62] S. Wang, W. Y. Li, H. Hui, S. K. Tiwari, Q. Zhang, B. Croker, S. Rawlings, D. Smith, A. F. Carlin, T. M. Rana, *EMBO J.* 2020, *39*, e106057.

[63] M. C. Whiteman, L. Bogardus, D. G. Giacone, L. J. Rubinstein, J. M. Antonello, D. Sun, S. Daijogo, K. B. Gurney, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018, *99*, 1430.

[64] X. Xu, A. Chemparathy, L. Zeng, H. R. Kempton, S. Shang, M. Nakamura, L. S. Qi, *Mol. Cell* 2021, *81*, 4333.

[65] Z. Wu, Y. Zhang, H. Yu, D. Pan, Y. Wang, Y. Wang, F. Li, C. Liu, H. Nan, W. Chen, Q. Ji, *Nat. Chem. Biol.* 2021, *17*, 1132.

[66] D. Y. Kim, J. M. Lee, S. B. Moon, H. J. Chin, S. Park, Y. Lim, D. Kim, T. Koo, J. H. Ko, Y. S. Kim, *Nat. Biotechnol.* 2022, *40*, 94.

[67] M. Sun, Z. Wu, J. Zhang, M. Chen, Y. Lu, C. Yang, Y. Song, *Nano Today* 2022, *44*, 101499.

[68] Y. Cao, J. Wang, F. Jian, T. Xiao, W. Song, A. Yisimayi, W. Huang, Q. Li, P. Wang, R. An, Y. Wang, X. Niu, S. Yang, H. Liang, H. Sun, T. Li, Y. Yu, Q. Cui, S. Liu, X. Yang, S. Du, Z. Zhang, X. Hao, F. Shao, R. Jin, X. Wang, J. Xiao, Y. Wang, X. S. Xie, *Nature* 2022, *602*, 657.

[69] J. Wei, L. Hou, J. Liu, Z. Wang, S. Gao, T. Qi, S. Gao, S. Sun, Y. Wang, *Elife* 2022, *11*, e77825.

[70] T. Adachi, Y. Nakamura, *Molecules* 2019, *24*, 4229.

[71] L. A. Gilbert, M. H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G. A. Brar, S. E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E. H. Whitehead, J. A. Doudna, W. A. Lim, J. S. Weissman, L. S. Qi, *Cell* 2013, *154*, 442.

[72] F. Zhang, L. Cong, S. Lodato, S. Kosuri, G. M. Church, P. Arlotta, *Nat. Biotechnol.* 2011, *29*, 149.

[73] A. Chavez, J. Scheiman, S. Vora, B. W. Pruitt, M. Tuttle, E. P. R. Iyer, S. Lin, S. Kiani, C. D. Guzman, D. J. Wiegand, D. Ter-Ovanesyan, J. L. Braff, N. Davidsohn, B. E. Housden, N. Perrimon, R. Weiss, J. Aach, J. J. Collins, G. M. Church, *Nat. Methods* 2015, *12*, 326.

[74] S. Konermann, M. D. Brigham, A. E. Trevino, J. Joung, O. O. Abudayyeh, C. Barcena, P. D. Hsu, N. Habib, J. S. Gootenberg, H. Nishimasu, O. Nureki, F. Zhang, *Nature* 2015, *517*, 583.

[75] J. Joung, S. Konermann, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, R. J. Platt, M. D. Brigham, N. E. Sanjana, F. Zhang, *Nat. Protoc.* 2017, *12*, 828.

[76] M. C. Canver, M. Haeussler, D. E. Bauer, S. H. Orkin, N. E. Sanjana, O. Shalem, G. C. Yuan, F. Zhang, J. P. Concordet, L. Pinello, *Nat. Protoc.* 2018, *13*, 946.

[77] J. Nie, Q. Li, J. Wu, C. Zhao, H. Hao, H. Liu, L. Zhang, L. Nie, H. Qin, M. Wang, Q. Lu, X. Li, Q. Sun, J. Liu, C. Fan, W. Huang, M. Xu, Y. Wang, *Nat. Protoc.* 2020, *15*, 3699.

[78] R. Uraki, M. Kiso, S. Iida, M. Imai, E. Takashita, M. Kuroda, P. J. Halfmann, S. Loeber, T. Maemura, S. Yamayoshi, S. Fujisaki, Z. Wang, M. Ito, M. Ujie, K. Iwatsuki-Horimoto, Y. Furusawa, R. Wright, Z. Chong, S. Ozono, A. Yasuhara, H. Ueki, Y. Sakai-Tagawa, R. Li, Y. Liu, D. Larson, M. Koga, T. Tsutsumi, E. Adachi, M. Saito, S. Yamamoto, M. Hagihara, K. Mitamura, T. Sato, M. Hojo, S. I. Hattori, K. Maeda, R. Valdez, I. s. team, M. Okuda, J. Murakami, C. Duong, S. Godbole, D. C. Douek, K. Maeda, S. Watanabe, A. Gordon, N. Ohmagari, H. Yotsuyanagi, M. S. Diamond, H. Hasegawa, H. Mitsuya, T. Suzuki, Y. Kawaoka, *Nature* 2022, *607*, 119.

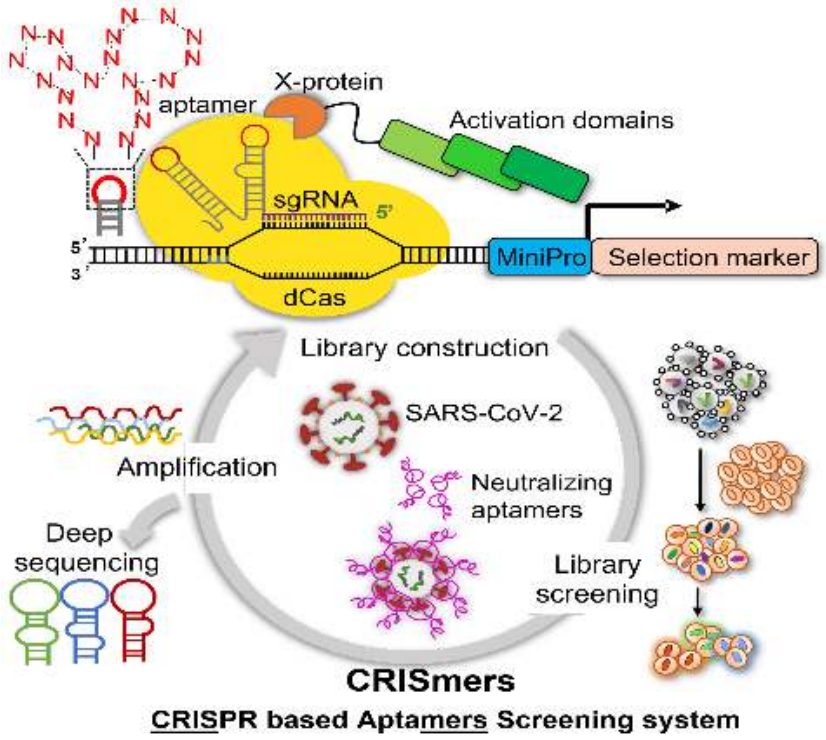
Table of Contents text (Short summary):

CRISmers，a novel CRISPR/Cas based system repurposed for screening RNA aptamers, provides an endogenous biological context for aptamer and protein folding and their interaction with target protein. Performance of CRISmers was showcased by identification of a potent neutralizing aptamer against the live SARS-CoV-2 Omicron variant *in vivo*. Further, CRISmers is compatible with varying CRISPR systems, host species, and cellular enrichment methods.

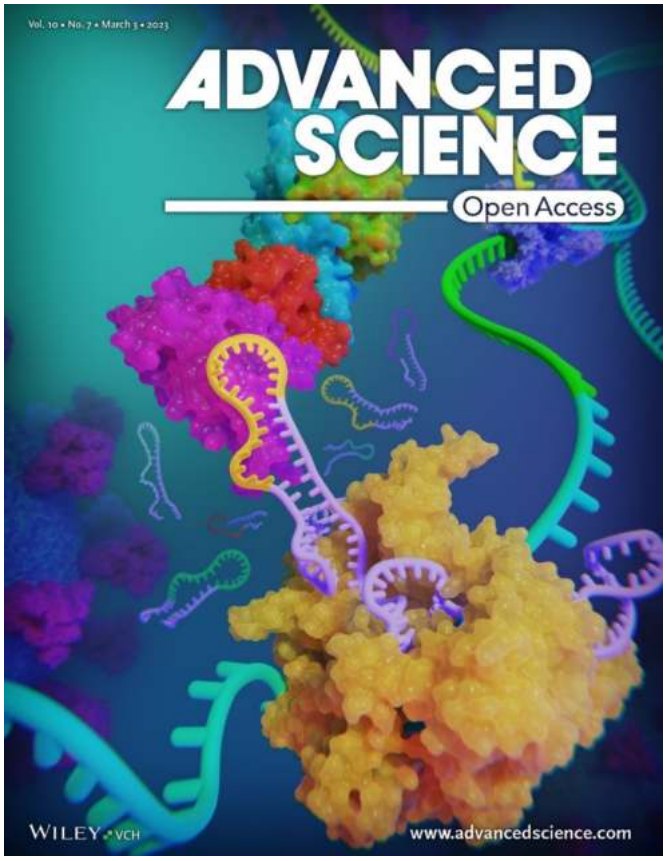
J. Zhang, A. Zhu, M. Mei, J. Qu, Y. Huang, Y. Shi, M. Xue, J. Zhang, R. Zhang*, B. Zhou*, X. Tan*, J. Zhao*, Y. Wang*

Repurposing CRISPR/Cas to Discover SARS-CoV-2 Detecting and Neutralizing Aptamers

Table of Contents figure:



Cover art



Supporting Information

Repurposing CRISPR/Cas to Discover SARS-CoV-2 Detecting and Neutralizing Aptamers

Ju Zhang, Airu Zhu, Miao Mei, Jing Qu, Yalan Huang, Yongshi Shi, Meiying Xue, Jingfang Zhang, Renli Zhang*, Bing Zhou*, Xu Tan*, Jincun Zhao*, Yu Wang*

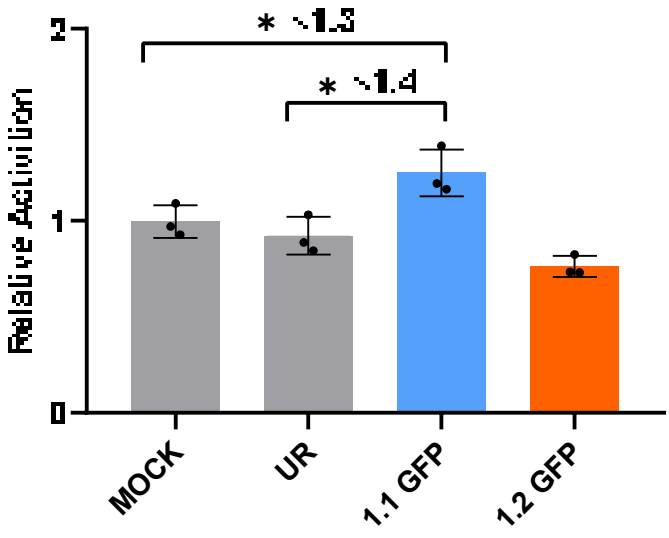


Figure S1. Key parameter characterization of a CRISPR/Cas9 based aptamer screening system. Results of a

luciferase assay shown in Figure 1E, but using 1 repeat of gLuc sgRNA target sequence (1× gLuc). Mock: transient transfection of control plasmids. UR: gLuc sgRNA 1.2-the negative control sgRNA used in luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold). N=3 biological replicates. *P<0.05, two‐tailed *t*‐tests. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

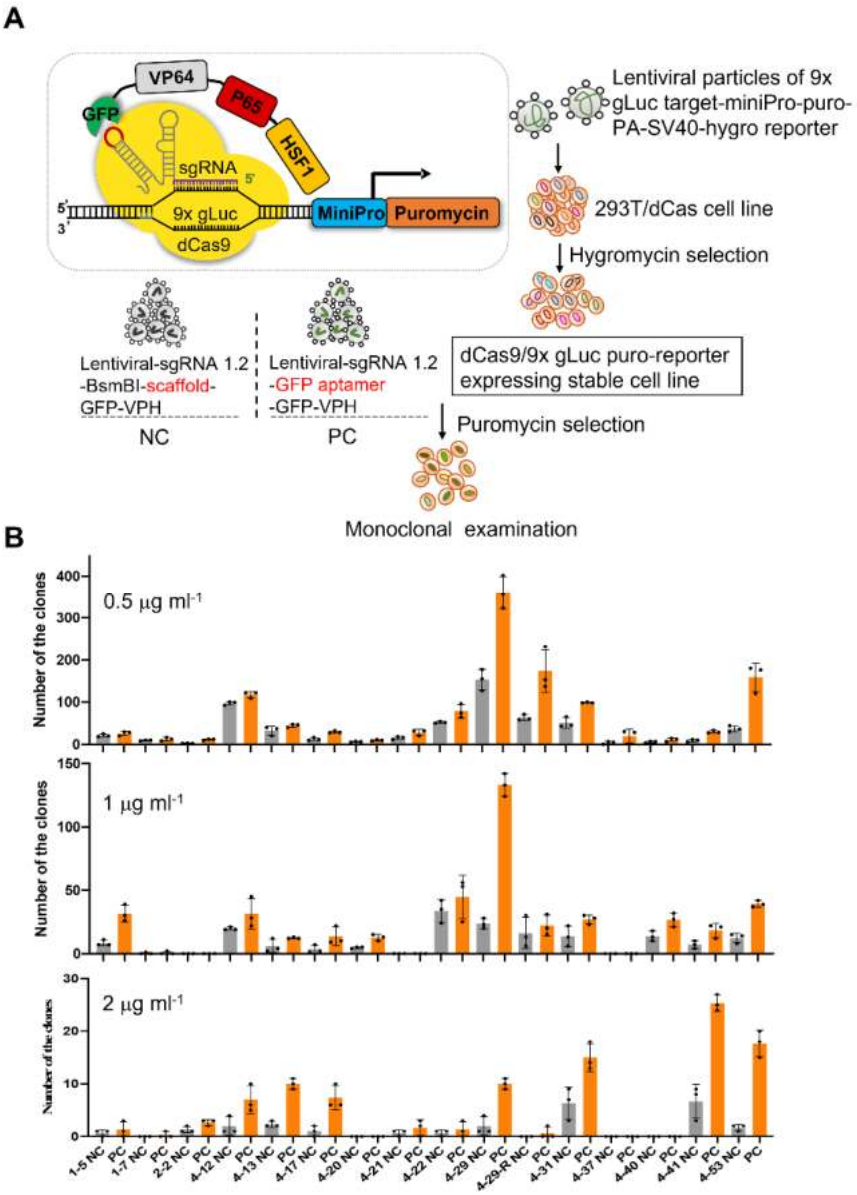


Figure S2. Construction and screening of monoclonal dCas9/9× gLuc-Puro cell lines. A) Schematic illustration of the gLuc puromycin reporter assay using GFP aptamer and the process of screening dCas9/9× gLuc-puro monoclonal cell lines. B) Results from a screen of dCas9/9× gLuc-puro monoclonal cell lines by quantifying the number of surviving clones after puromycin selection. Puromycin was applied at three different concentrations as shown in the graphs. NC: negative control; PC: positive control. n=3 biological replicates.

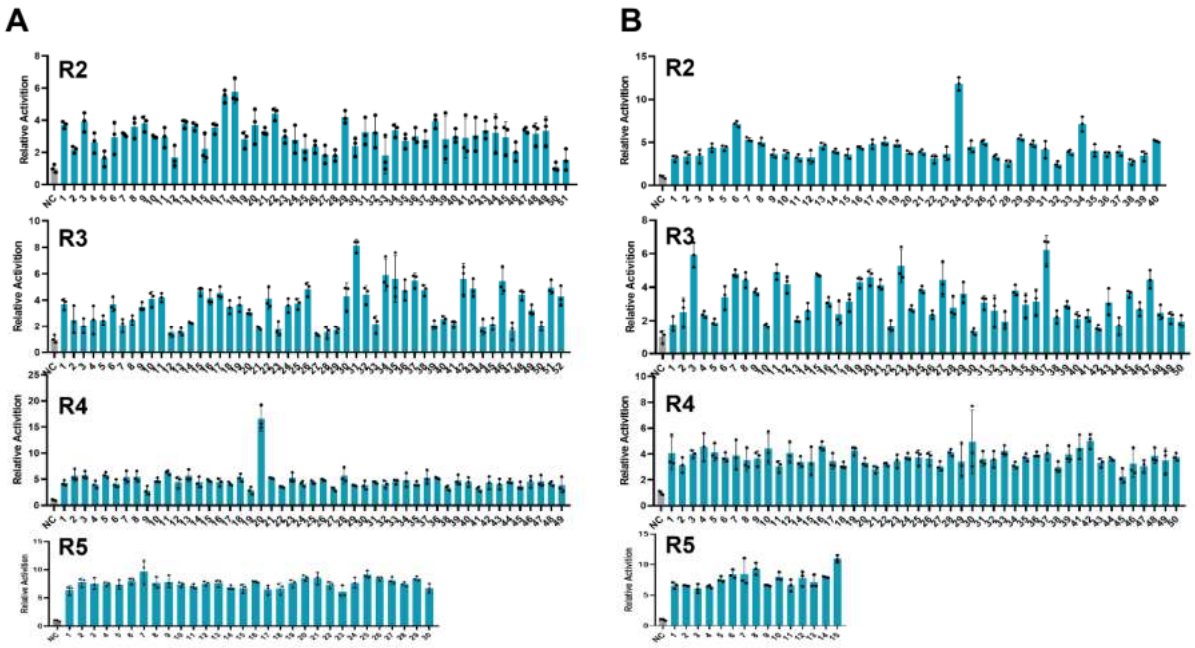


Figure S3. Secondary screens using luciferase reporter assay. The top 0.1% frequency sequences and the high enrichment-fold sequences derived from deep sequencing of aptamer amplicons harvested from round 2 (R2), R3, R4, and R5 were screened. Two parallel CRISmers primary screens were conducted (presented separately in A and B). NC: gLuc sgRNA 1.2-the negative control sgRNA used in the luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold). n=3 biological replicates.

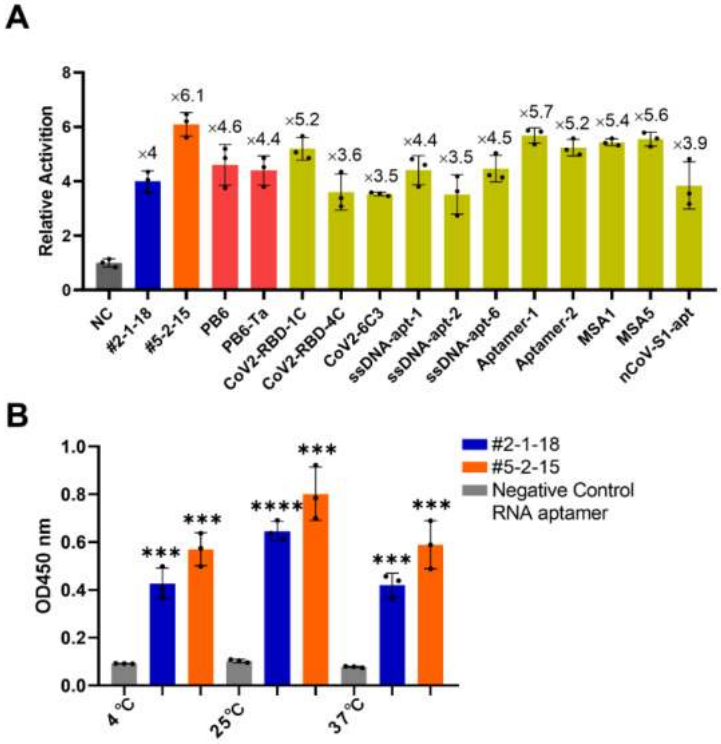


Figure S4. Examination of aptamer hits. A) Results of a luciferase reporter assay (Figure 1D) to examine aptamer hits and previously reported RNA (in red) and DNA aptamers (in dark yellow) identified from SELEX.[24-26, 28, 30, 33] NC: a

negative control sgRNA used in the luciferase reporter assay was gLuc target without any aptamer appendage (the sgRNA-1.2 BsmBI scaffold). B) Examination of binding activity of aptamer leads with RBD at 4℃, 25℃, and 37℃ by ELONA. A negative control RNA aptamer was used as a negative control. N=3 biological replicates. ***P<0.001, ****P<0.0001, two‐tailed t‐tests. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

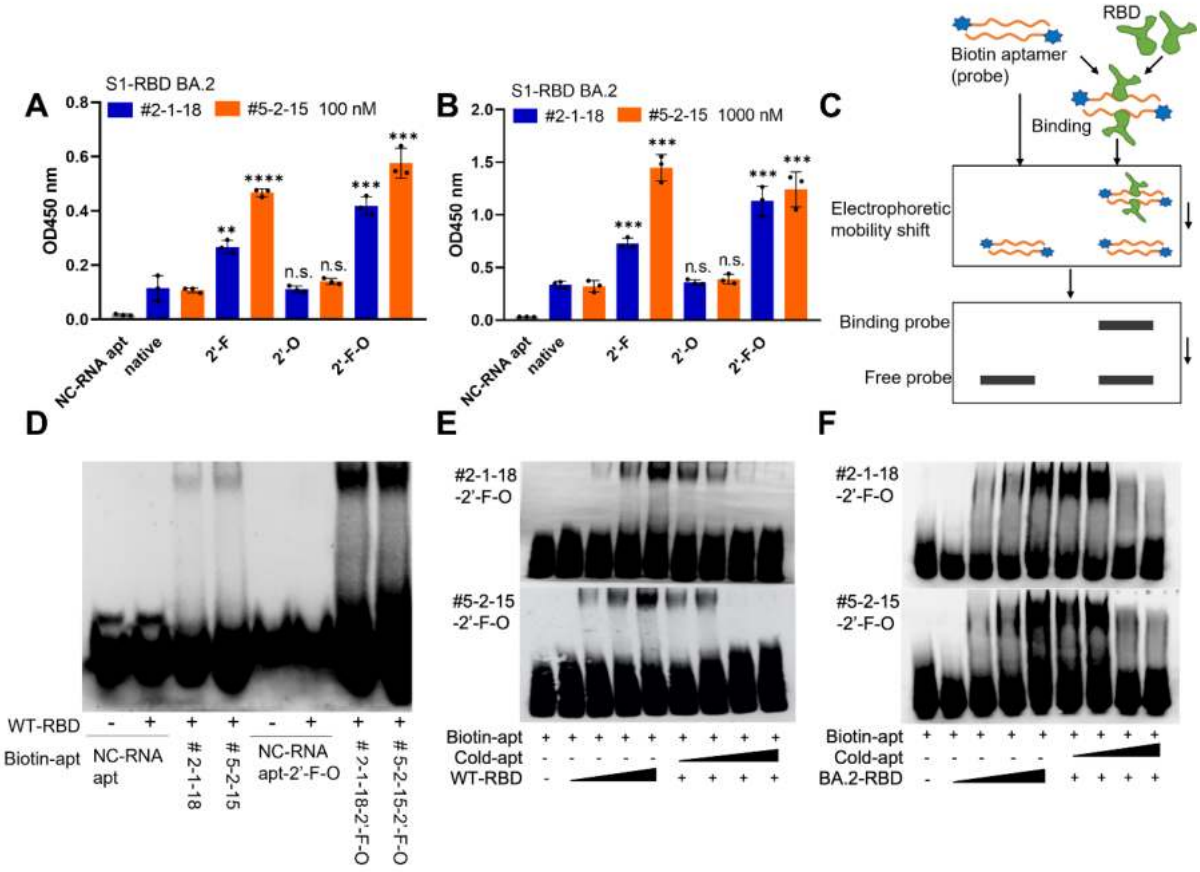


Figure S5. Examination of binding activity and specificity of modified aptamer leads with RBD. A, B) Examinations of native and modified aptamers of their binding activity to recombinant Omicron BA.2 RBD of SARS-CoV-2 Spike protein (250 ng) via ELONA, NC-RNA apt: the negative control RNA aptamer, native: native RNA aptamers with no modification, 2'-F: 2' position of pyrimidines with fluorin modification, 2'-O: 2' position of purines with 2'-O-methyl modification, 2'-F-O: 2' position of pyrimidines with fluorin and purines with 2'-O-methyl modifications. Aptamers were used with concentrations of 100 nM (A) and 1000 nM (B) respectively. C) A schematic depicting the Electrophoresis gel-Mobility Shift Assays (EMSA). D) EMSA results to compare native aptamers and 2'-F-O modified aptamers against recombinant RBD of the original SARS-CoV-2 Spike protein. E, F) EMSA examination of RBD dose dependent binding activity and specificity of modified aptamers against recombinant RBD of the original SARS-CoV-2 Spike protein (E) and Omicron BA.2 (F). A negative control RNA aptamer was used as a negative control. NC-RNA apt: the negative control RNA aptamer, NC-RNA apt-2'-F-O: the negative control RNA aptamer with 2'-F-O modification, Biotin-apt: biotinylated aptamer, Cold-apt: aptamer without biotin modification. N=3 biological replicates. **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001, two‐tailed t‐tests. n.s., no significant difference. All are compared with the respective native aptamer. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

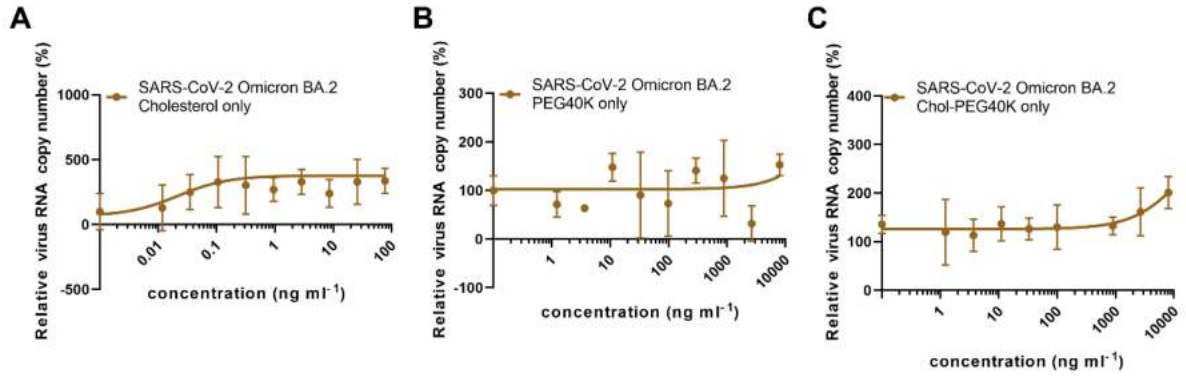


Figure S6. Examination of aptamer conjugating components for their activity upon live Omicron BA.2 variant. A) Quantification of relative virus RNA copy number of Cholesterol alone for its effect on SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. B) Quantification of relative virus RNA copy number of 40kDa PEG alone for its activity on SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. C) Quantification of relative virus RNA copy number of Cholesterol-40kDa PEG for its activity on SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. n=3 biological replicates.

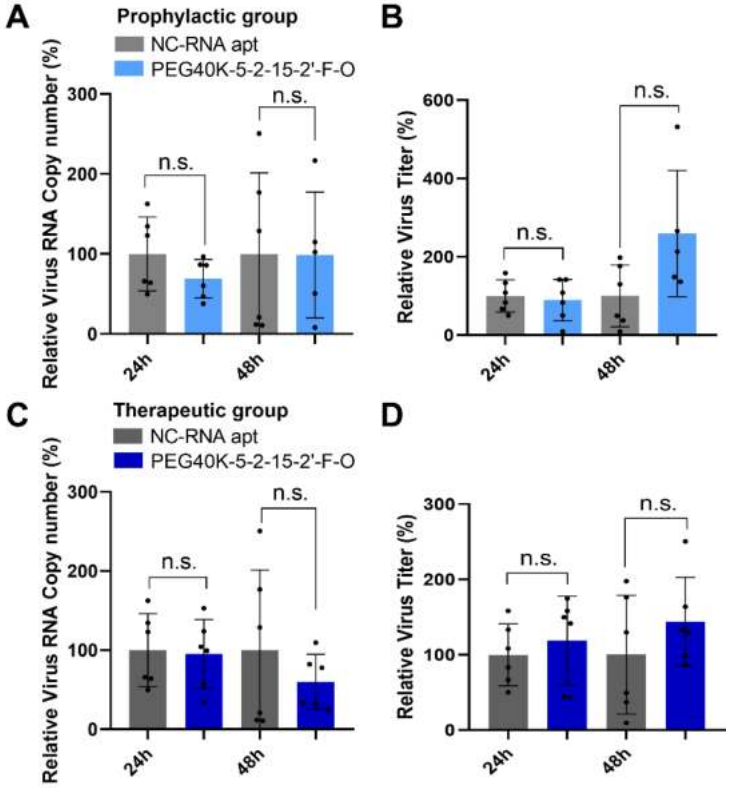


Figure S7. Examination the prophylactic and therapeutic activities of intranasally (i.n.) delivered PEG40K-#5-2-15-2'-F-O aptamer against live Omicron BA.2 variant *in vivo*. A, B) Quantification of virus titer of lung tissue by RT-qPCR (A) and FRNT (B) to assess the prophylactic effect of aptamer PEG40K-#5-2-15-2'-F-O against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. C, D) Quantification of virus titer of lung tissue by RT-qPCR (C) and FRNT (D) to assess the therapeutic effect of aptamer PEG40K-#5-2-15-2'-F-O against SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant. FRNT assay: Focus Reduction Neutralization Test. Readouts from negative controls served as 100% for normalization. NC-RNA apt: the negative control RNA aptamer. N=6 biological replicates. n.s., no significant difference, two‐tailed *t*‐tests. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

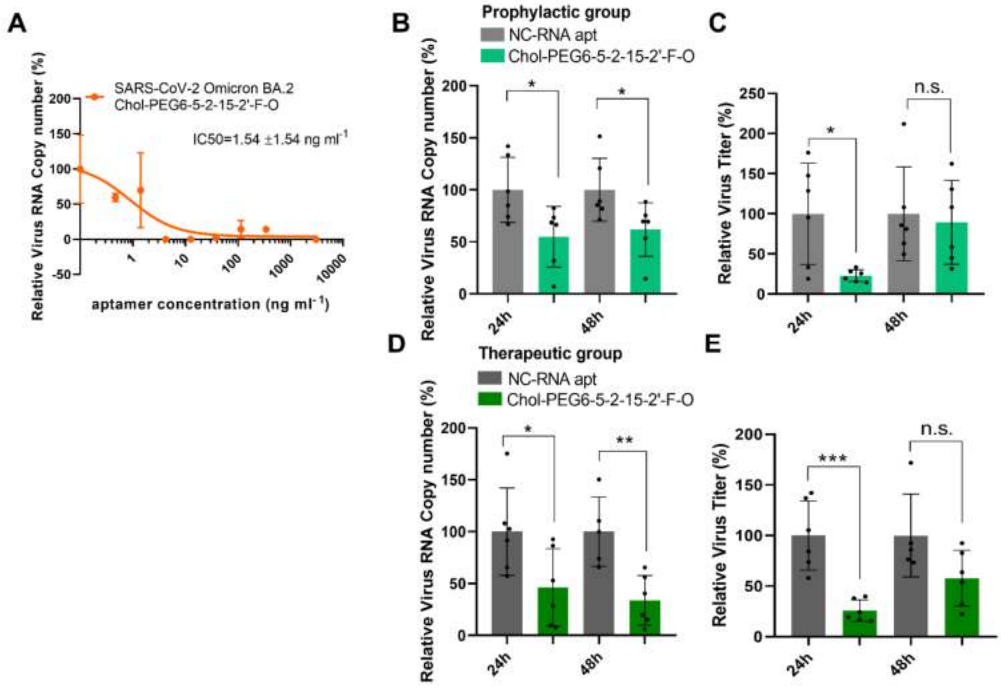


Figure S8. Examination of Chol-PEG6-#5-2-15-2'-F-O against live Omicron BA.2 variant in cell culture and animal experiments. A) Quantification of relative virus RNA copy number to examine Chol-PEG6-#5-2-15-2'-F-O for its neutralizing activity against live SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant in cell culture. n=3 biological replicates, Data show mean ± SD. B, C) Quantification of virus titer of lung tissue by RT-qPCR (B) and FRNT (C) to assess the prophylactic effect of Chol-PEG6-#5-2-15-2'-F-O against live SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant when delivered intranasally *in vivo*. D, E) Quantification of virus titer of lung tissue by RT-qPCR (D) and FRNT (E) to assess the therapeutic effect of Chol-PEG6-#5-2-15-2'-F-O against live SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant when delivered intranasally *in vivo*. FRNT assay: Focus Reduction Neutralization Test. Readouts from negative controls served as 100% for normalization. IC50s were indicated. NC-RNA apt: the negative control RNA aptamer, Data show mean ± SD. N=6 biological replicates. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, n.s., no significant difference, two‐tailed *t*‐tests. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

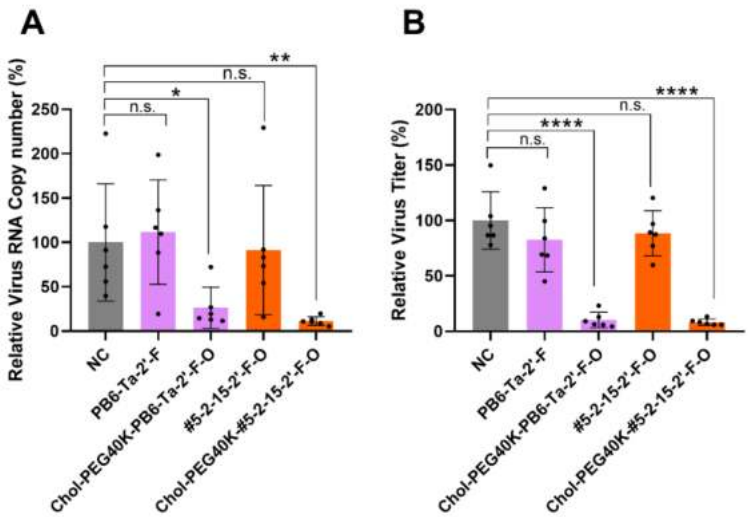


Figure S9. Examination the therapeutic effect of intranasally (i.n.) delivered PB6-Ta-2'-F, Chol-PEG40K-PB6-Ta-

2'-F-O, #5-2-15-2'-F-O and Chol-PEG40K-#5-2-15-2'-F-O aptamers against live Omicron BA.2 variant *in vivo* (Figure 4G). A, B) Quantification of virus titer of lung tissue by RT-qPCR (A) and FRNT (B) to assess the therapeutic effect of aptamers against live SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant 48 hours post administration. FRNT assay: Focus Reduction Neutralization Test. Readouts from negative controls served as 100% for normalization. NC-RNA apt: the negative control RNA aptamer. N=6 biological replicates. **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.0001, n.s., no significant difference, two‐tailed *t*‐tests. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

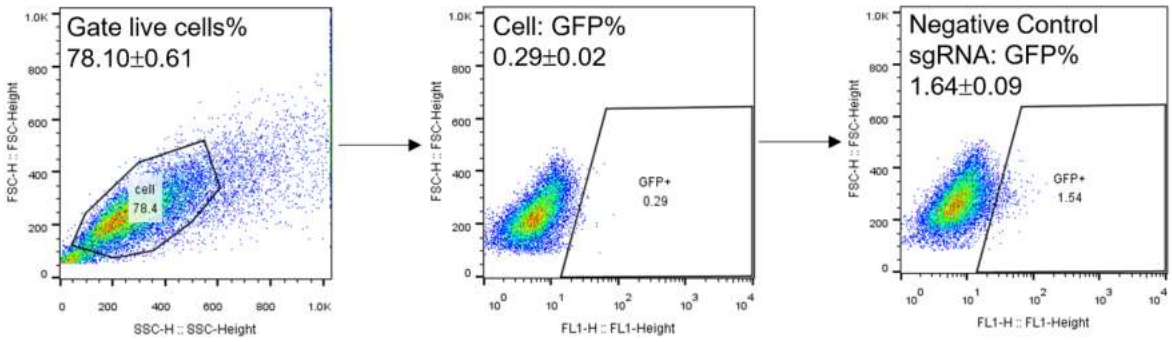


Figure S10. Cells gating of Flow cytometry experiment. Cells were gated of FSC (Forward Scatter) vs SSC (Side scatter) to exclude cell debris. The FITC (FL1) channel was selected without compensation. Cells were then gated on FITC (FL1) channel, where the threshold was set by non-transfected control cells. Gates are drawn to define positive cells on the basis of negative cell controls. The negative control sgRNA group was an example to illustrate. N=3 biological replicates. GraphPad Prism 8.0.1 software were used for statistical analysis.

Table S1

Sequences of aptamers characterized in this study

Aptamer ID	Full length aptamer sequences (5'-3')
NC-RNA apt	ACUUGGCCAUUUUUCUUUUUCUUUUUCUUUUUCUGCAGGGCCAAGUG
#2-1-17	ACUUGGCCACUCGGUAUCUAGUGCGCACUCUGCAGGGCCAAGUG
#2-1-18	ACUUGGCCACGUCGACUGAAAUCCUCUUCCUGCAGGGCCAAGUG
#2-2-24	ACUUGGCCAUGUUCGUUUUCGCCCCGUGGCUGCAGGGCCAAGUG
#3-2-3	ACUUGGCCAUCUUACAAUGUUUAGAAGGUCUGCAGGGCCAAGUG
#4-1-20	ACUUGGCCAUGUACAGAAUUCUCCCGGGUCUGCAGGGCCAAGUG
#5-2-15	ACUUGGCCAAUUACCGUAGUUUUUGUAGUCUGCAGGGCCAAGUG

通过式固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时测定动物源性食品中 10 种利尿剂类药物残留

王展华[1]，施贝[1]，朱蕾颖[1]，张翀宇[1],梁晶晶[1]，陈万勤[1]

（1. 国家市场监管重点实验室（功能食品质量与安全领域），浙江省市场局重点实验室（保健品质量安全重点实验室），浙江省食品药品检验研究院，杭州 310052）

【摘要】目的：建立固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱同时测定动物源性食品中 10 种利尿剂类药物残留量的方法。**方法**：样品经 80%乙腈提取，通过 captiva EMR-lipid 固相萃取柱富集净化后，使用 BEH C_{18} 色谱柱分离，以 0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇溶液为流动相按比例进行梯度洗脱，在 ESI^+/ESI^-模式下，采用质谱多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式分段扫描，外标法定量。同时对样品前处理方法、色谱条件和质谱参数进行优化，获得其准确度、灵敏度和精密度的评价。**结果**：10 种利尿剂在 2～80 ng/mL 范围内呈现良好的线性，相关系数 r 均大于 0.99，检出限范围为 2.0～5.0 μg/kg，定量限为 5.0～10 μg/kg，在 5、20、50 μg/kg 的加标浓度下回收率为 82.3～119.2%，相对标准偏差为 0.5～4.9%。**结论**：该方法准确、有效、重现性好，可用于动物源性食品中多种利尿剂的检测。

【关键词】通过式固相萃取；超高效液相色谱-串联质谱法；利尿剂；动物源性食品

Solid Phase Extraction Coupled with UPLC-MS/MS for Simultaneous Determination of 10 Diuretic Drug Residues in Animal Derived Foods

Wang Zhan-hua[1],Shi Bei[1],Zhu Lei-yin[1], Zhang Chong-yu[1], Liang Jinjin[1]， chen wanqin[1]

（1. Key Laboratory of Functional Food Nutrition and Quality Safety for State Market Regulation, Key Laboratory of Health Food Quality Safety of Provincial Market Regulation, Zhejiang Institute of Food and Drug Control, Hangzhou 310052）

【ABSTRACT】Objective：This study aims to establish a method for the simultaneous determination of 10 diuretic drug residues in foods of animal origin by solid phase extraction（SPE）and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry （UPLC-MS/MS）. **Methods：**The samples were extracted by 80% acetonitrile, enriched and cleaned up by a captiva EMR-lipid solid-phase extraction column, separated by a BEH C18 column with a proportional gradient elution with 0.1% formic acid water - 0.1% formic acid methanol solution as mobile phase, and quantified by external standard method in positive ion mode with a segmented scan in mass spectrometry multiple reaction monitoring （MRM） mode. The sample pretreatment method, chromatographic conditions and mass spectrometry parameters were also optimized to obtain an evaluation of their accuracy, sensitivity and precision. **Results：** The 10 diuretics showed good linearity in the 2-80ng/mL range with correlation coefficients r greater than 0.99. The limits of detection were in the range of 2.0-5.0 μg/kg and the limits of quantification were 5.0-10 μg/kg. The recoveries ranged from 82.3 to 119.2% at spiked concentrations of 5, 20 and 50 ng/kg with the relative standard deviations of 0.5 to 4.9%. **Conclusion：** The method is accurate, valid and reproducible and can be used for the determination of a variety of diuretics in foods of animal origin.

【KEY WORDS】pass-through Solid Phase Extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; diuretics; animal derived foods

利尿剂具有促进体内电解质和水分排出的作用，能使尿量增加。常见的利尿剂种类有噻嗪类（氢氯噻嗪、美托拉宗、氯噻酮）、髓袢利尿剂（呋塞米、布美他尼，托拉塞米）、保钾利尿剂（螺内酯、安体舒通）、渗透利尿剂（甘露醇、尿素）等[1,2]。利尿剂在临床上常被用于治疗脑水肿、高血压和心力衰竭，如噻嗪类利尿剂特别适用于轻中度高血压病人、肥胖及高血压合并心力衰竭的患者。利尿剂进入人体后，通过利尿和利钠作用减少循环血容量以及降低血管张力，可直接或间接地改变肾脏功能和组织学，导致肾小球滤过率下降和肾血流量减少[3]。其特殊的作用机制导致的副作用不容小觑，轻则电解质紊乱导致低钾低钠血症，重则产生心脏毒性和肾毒性引起肾小管堵塞、急性间质性肾炎等肾脏损害。同时，因具有稀释尿液中违禁药物浓度的效果[4]，利尿剂也被某些运动员用作不正当途径以逃避兴奋剂检查。自 1988 年汉城运动会起，利尿剂被国际奥委会医学委员会列为禁止使用的一类兴奋剂。

近年来，不少养殖户常在家畜养殖及疾病治疗过程中添加利尿剂，导致多种利尿剂残留在动物源性食品中。误食此类受污染食品不仅危害消费者的身体健康，也会导致运动员在不知情的情况下显示兴奋剂检测阳性损害比赛公平。为确保食品安全及竞技体育的公平性和纯洁性，动物源性食品中的利尿剂检测逐渐成为兴奋剂检测工作的重点。

目前，利尿剂的常用检测方法有气相色谱法（Gas Chromatography, GC）[5]、高效液相色谱法[6,7]（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）、气相色谱-质谱联用法（Gas Chromatography-Mass Sepetrometry, GC-MS）等，但其主要检测对象为人体及动物的尿液和血液，且能检测的利尿剂种类较少、检出限较高，无法满足脂肪、磷脂含量较高的动物源性食品中利尿剂残留的检测要求。

本文采用通过式 EMR-Lipid 固相萃取柱对动物源性食品中的脂肪、磷脂、蛋白质等进行吸附净化，结合超高相液相色谱质谱联用仪同时检测 10 种利尿剂（氨苯蝶啶、丙磺舒、呋塞米、精磺胺、坎利酮、螺内酯、氯噻嗪、氯噻酮、氢氯噻嗪、乙酰唑胺），实现了分离效率、灵敏度和检出限的提高，为检测动物源性食品中利尿剂残留提供了技术参考[8]。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

标准品：氢氯噻嗪（纯度 99.40%，批号 E0028250，北京曼哈格公司 Bepure）、氯噻嗪（纯度 98.90%，批号 E0025606，北京曼哈格公司 Bepure）、氨苯蝶啶（液体标准物质，储备液浓度 0.1006 mg/mL，批号 E0025576）、丙磺舒（纯度 99.80%，批号 E0027621，北京曼哈格公司 Bepure）、氯噻酮（纯度 99.20%，批号 E0019378）、乙酰唑胺（纯度 99.70%，批号 E0025397，北京曼哈格公司 Bepure）、呋塞米（纯度 99.10%，批号 E0027513，北京曼哈格公司 Bepure）、精磺胺（纯度 99.20%，批号 E0025620，北京曼哈格公司 Bepure）、螺内酯（纯度 99.90%，批号 E0028375，北京曼哈格公司 Bepure）、坎利酮（纯度 95.50%，批号 C0008889）。

ProElut PLS-A （200 mg，6mL） 固相萃取柱（北京迪马公司）；Captiva EMR-Lipid（6 mL, 600 mg，美国 Angilent 公司）；ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm 色谱柱（100 mm × 2.1 mm，1.8 μm，美国 Waters 公司）；Waters Acquity BEH C_{18} 色谱柱（100 mm × 2.1 mm，1.7 μm，美国 Waters 公司）；0.22 μm PTFE 过滤头（美国 Agilent 公司）。

甲醇（质谱纯，德国 Merck 公司）；甲酸（色谱纯，美国 sigma 公司）；乙腈（质谱纯，德国 Merck 公司）；除已注明外，所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Shimadzu LC-30A 高效液相色谱仪（日本岛津公司）； Milli-Q 超纯水仪（德国 Millipore 公司）；SCIEX Triple

Quad 5500+–QTRAP Activated 质谱仪（美国 ABSciex 公司）；MultiReax 多通道旋涡混合器（德国 Heidolph 公司）；LYNX 6000 超速离心机 （美国 Thermo 公司）；XPE 205 分析天平（瑞士 Mettler 公司）。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

利尿剂药物标准品储备液：往 10ml 容量瓶中分别精确称量 10 mg 的 9 种利尿剂参考物质（氢氯噻嗪除外），并用甲醇溶解至刻度，形成浓度为 1 mg/mL 的利尿剂标准品储备液，于-18℃以下保存，有效期 3 个月。氨苯蝶啶标准品为现成液体储备液，浓度 0.1 mg/mL。

利尿剂药物混合标准工作液：精密量取氢氯噻嗪等 9 种标准品储备液 0.01 mL 以及氨苯蝶啶 0.1 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 1 mg/L 的混合标准品中间液，再精密移取 1 mL 上述 1 mg/L 中间液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，配制成浓度为 100 μg/mL 的混合标准工作液。

利尿剂药物标准曲线溶液的配制：分别取 0.02、0.05、0.10 mL 的 1 mg/L 混合标准品中间液以及 0.02、0.04、0.08 mL 的 100 μg/mL 混合标准工作液至 1 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，得到浓度为 2、5、10、20、40、80 ng/mL 的标准曲线系列溶液。

1.3.2 样品前处理

称取约 2 g 试样（精确至 0.01 g）置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 乙腈和 2 g 磷酸二氢钾，振荡提取 30 min 后，于 0℃、9000 r/min 转速条件下离心 5 min，取出上清液置于新的 50 mL 离心管中，再加入 10 mL 乙腈重复提取 1 次，离心后合并上清液，待净化。采用 captiva EMR-lipid 固相萃取柱对上清液进行净化后，用 2 mL 乙腈-水（V/V=80/20）淋洗，收集全部流出液，并于 45℃下氮吹蒸干。用 2.0 mL 水-0.1%甲酸甲醇溶液溶解残渣，使用 0.22 μm PTFE 过滤头过滤至进样瓶，待测。

1.3.3 检测条件

仪器条件：色谱柱：Waters Acquity BEH C18（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；柱温：35℃；岛津 LC-30AD 超高效液相色谱系统串联 Applied Biosystems Qtrap 5500 三重四级杆质谱仪（包括二元泵，在线脱气，自动进样器）；流动相：0.1%甲酸混合水溶液（A）和 0.1%甲酸甲醇-乙腈混合溶液（V/V=1/1）（B）；梯度洗脱程序见表 1 ；流速：0.35 mL/min；进样量：2 μL。

表 1 流动相梯度洗脱比例

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.01	90	10
2.00	90	10
5.00	20	80
8.00	20	80
8.10	90	10
11.00	90	10

质谱条件：离子源：TurboV 电喷雾（Electron Spray Ionization, ESI）离子源；电离方式：正离子、负离子；离子源温度（Source Temperature, TEM）：500℃；雾化电压（IS）：5500 V；雾化气压力（GS1）：40 PSI；辅助加热气压力（GS2）：40 PSI；碰撞室入口电压：10 V；碰撞室出口电压：13 V；去簇电压（Declustering Potential, DP）、碰撞电压（Collision Energy, CE）、定性离子对、定量离子对、化合物分子量见表 2。

表 2　10 种利尿剂的定性、定量离子对及去簇电压（DV）、碰撞电压（CE）

分析物	母离子（m/z）	子离子（m/z）	去簇电压/V	碰撞电压/V
氢氯噻嗪	296.0	269.0*	-120	-27
Hydrochlorothiazide		205.0	-120	-30
氯噻嗪	294.0	214.2*	-100	-35
Chlorothiazide		179.0	-100	-55
氯噻酮	337.0	145.9*	-120	-40
Chlorthalidone		189.9	-120	-22
乙酰唑胺	221.0	83.1*	-50	-25
Acetazolamide		58.1	-50	-20
呋塞米	329.1	285.2*	-35	-20
Furosemide		205.0	-35	-30
精磺胺	284.1	205.0*	-80	-30
Fine sulfonamides		169.1	-80	-30
氨苯蝶啶	254.2	237.0*	120	35
Triamterene		168.2	120	46
丙磺舒	286.2	201.9*	120	20
Probenecid		120.9	120	33
螺内酯	341.1	187.2*	150	30
Spironolactone		107.1	150	35
坎利酮	341.1	187.2*	150	30
Canrenone		107.1	150	35

注：*为定量离子

2.条件优化

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 分离色谱柱的优化

本实验选择 Waters ACQUITY UPLC BEH-C18 色谱柱（2.1×100 mm，1.7 μm）和 ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm 色谱柱（2.1×100 mm，1.8 μm）两种 C18 柱分别进行分离试验。分析物中的坎利酮和螺内酯具有相同的前体和产物离子，属于同分异构体，需实现一定的分离效果[9]。结果表明，两种色谱柱均能实现 10 种利尿剂的分离，其中 Waters ACQUITY UPLC BEH-C18 色谱柱对同分异构体的分离效果更好，出峰清晰、分辨率高、响应高、拖尾现象较轻。因此，本实验选择 Waters ACQUITY UPLC BEH-C18（2.1×100 mm，1.7 μm）色谱柱进行分离。

2.1.2 液相色谱条件的优化

优化色谱条件可以尽量消除基质效应对目标峰的干扰，实现不同利尿剂的良好分离[10]。目前液相色谱检测利尿剂的研究方法中常用有机相为乙腈、甲醇，水相为 0.1%甲酸水。本实验对比了甲醇+0.1%甲酸水、乙腈+0.1%甲酸水作为流动相的提取效果。结果显示，在有机相为乙腈时响应值更高、回收率更好、分离效果明显，洗脱能力优于甲醇。而甲醇作为有机相时，保留时间延长，且出现色谱柱压增高的问题。为保护色谱柱及延长色谱柱的使用寿命，不推荐使用甲醇作为有机相。最终，我们选择 0.1%甲酸-水溶液为流动相 A，0.1%甲酸甲醇-乙腈混合溶液（V/V=1/1）为流动相 B。在此条件下 10 种利尿剂均分离效果良好。经实验进一步优化后的多反应监测提取离子流图见图 1。

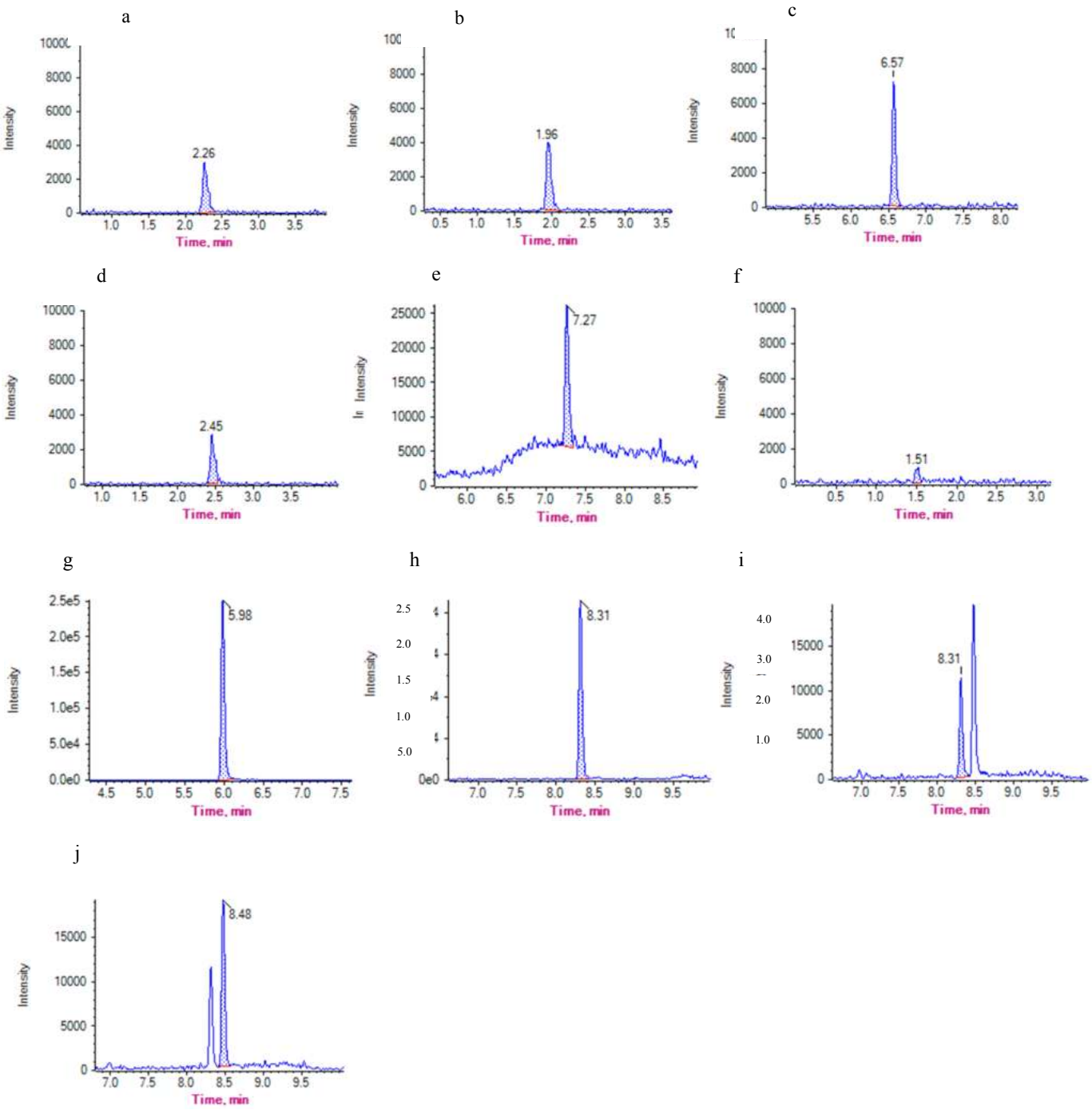


图 1　10 种利尿剂的多反应监测离子流色谱图

注.a 为氢氯噻嗪（Hydrochlorothiazide），m/z 296.0/269.0；b 为氯噻嗪（Chlorothiazide），m/z 294.0/214.2；c 为氯噻嗪（Chlorothiazide），m/z　294.0/214.2；d 为乙酰唑胺（Acetazolamide），m/z　221.0/83.1；e 为呋塞米（Furosemide），m/z　329.1/285.2；f 为精磺胺（Fine sulfonamides），m/z　284.1 / 205.0；g 为氨苯蝶啶（Triamterene），m/z　254.2/237.0；h 为丙磺舒（Probenecid），m/z　286.2/201.9；i 为螺内酯（Spironolactone），m/z　254.2/237.0；j 为坎利酮（Canrenone），m/z　254.2/237.0。

2.2 质谱条件的选择

将 1 mg/L 的 10 种利尿剂标准物质分别注入电喷雾离子源（ESI），在 ESI+/ESI-模式下进行扫描，通过一级

质谱（Q1）确定每个物质的母离子的质荷比，再进行二级质谱（Q2）扫描选出 2 个峰形较好且相应较高的离子作为子离子。实验发现氢氯噻嗪、氯噻嗪、氯噻酮、乙酰唑胺、螺内酯、呋塞米、坎利酮、精磺胺在正离子模式下得到的信号高且稳定[11]、分子碎片少，氨苯喋啶、丙磺舒则在负离子模式下扫描效果最佳。根据不同利尿剂的响应效果选择 ESI 模式，通过多反应监测扫描（MRM）优化相应质谱参数。优化结果见表 2。

2.3 净化条件的选择

动物源性食品中含有大量的蛋白质、脂肪、磷脂等脂溶性物质会干扰检测，同时对色谱柱造成一定污染与损害，需选择净化效果良好的固相萃取柱对杂质进行吸附。本实验对比 ProElt PLS-A（200 mg，6 mL）和 Captiva EMR lipid（300 mg，6 mL）两种固相萃取柱，发现两种固相萃取柱净化效能均较好。但与 ProElt PLS-A 相比，Captiva EMR-lipid 可高选择性、高效地去除脂质且不会造成分析物损失，并保持较高的回收率。故本实验最终选择 Captiva EMR-Lipid 固相萃取柱对样品进行净化。

2.4 提取溶剂的选择

检测利尿剂常用的提取溶剂有甲醇、乙腈。本实验对甲醇、乙腈的提取效果进行分析，发现乙腈沉淀蛋白质的效果优于甲醇，洗脱能力更强；而甲醇极性较强，会溶解更多的物质对实验形成干扰，并且洗脱时间较长。因此我们初步考虑使用乙腈进行提取。有研究表明[12]，当使用甲醇或乙腈纯溶剂提取时，动物源性食品中的肌肉组织会产生聚集使提取溶剂渗入样品的过程受阻，从而影响提取效果，而使用有机试剂的水溶液就可以有效避免这种聚集。同时，经另一项研究[13]发现，当乙腈-水溶液浓度小于 60%时，蛋白质不能充分变性；而纯乙腈又会导致蛋白质变性过快，在样品外部形成包裹效应，导致内部分析物提取不完全，使提取效率偏低。因此，本实验最终选取 80％乙腈-水作为提取溶剂。

2.5 基质效应

动物源性食品中内源性物质较多，以脂溶性物质为主，在使用高效液相色谱-串联质谱检测时容易造成干扰，产生严重的基质效应[14]，从而影响分析物信号强弱，导致定量结果不准确。本研究采取空白基质添加标准溶液的峰面积（A）与初始流动相中标准物质峰面积（B）之比对基质效应进行评价。结果表明，10 种利尿剂均受到不同程度的基质效应影响。本研究采用基质标准曲线法以减少基质效应，加强定量结果准确性。

3.结果与分析

3..1 方法学验证及样品测定

3.1.1 方法的检出限、定量限和线性范围

将混合标准工工作液配制成 2~80 ng/mL 的系列标准溶液，以质量浓度作为横坐标（X），不同利尿剂各自的峰面积值作为纵坐标（Y）绘制标准曲线，得到线性方程和相关系数 r。根据信噪比（S/N）≥3 确定检出限（LOD），S/N≥10 确定定量限（LOQ）。结果见表 3，可见方法在 2-80 ng/mL 内线性关系良好，线性相关系数 r 均大于 0.99。以 GB 31658.17-2021 规定为准，本方法检测出的 10 种利尿剂的定量限远低于 10μg/kg 的标准要求，可满足日常利尿剂残留检测的需求。

表 3　10 种利尿剂的线性方程、相关系数、检出限和定量限

化合物名称	线性范围/（ng/mL）	线性方程	相关系数（r^2）	检出限/（μg/kg）	定量限/（μg/kg）
氢氯噻嗪 Hydrochlorothiazide	2~80	Y=8870.00387X-2192.76356	0.99950	2.0	5.0
氯噻嗪 Chlorothiazide	2~80	Y=12601.04777X-1766.06453	0.99954	2.0	5.0
氯噻酮 Chlorthalidone	2~80	Y=18813.38042X-974.18006	0.99945	2.0	5.0
乙酰唑胺 Acetazolamide	2~80	Y=6803.83257X-2265.59128	0.99936	5.0	10.0
呋塞米	2~80	Y= 3.99085e4X-13130.52113	0.99955	5.0	10.0

Furosemide 精磺胺 Fine sulfonamides	2~80	Y= 1518.54937X + 545.35891	0.99826	5.0	10.0
氨苯蝶啶 Triamterene	2~80	Y=4.31899e5X-11748.42115	0.99593	2.0	5.0
丙磺舒 Probenecid	2~80	Y=7.55509e4X -18647.21651	0.99964	2.0	5.0
螺内酯 Spironolactone	2~80	Y=19335.28342X+1529.17604	0.99947	5.0	10.0
坎利酮 Canrenone	2~80	Y=3.48446e4X-19720.26251	0.99791	5.0	10.0

3.1.2 精密度与回收率

分别选取 5、20、50 μg/kg 三个浓度对空白样品进行加标回收试验，每个浓度水平平行测定 6 次，计算加标回收率及相对标准偏差（RSD%），具体见表 4。结果显示，10 种利尿剂的加标回收率范围为 82.3～119.2%，相对标准偏差范围为 0.5～4.9%。本方法精密度和准确度高、重现性好，准确可靠，适用于动物源性食品中多种利尿剂残留检测。

表 4　10 种利尿剂的加标回收率及其 RSD （n=6）

化合物名称	水平/（μg/kg）	回收率/%	RSD/%
氢氯噻嗪	5	111.3	1.8
Hydrochlorothiazide	20	105.9	3.4
	50	107.1	2.1
氯噻嗪	5	119.2	3.4
Chlorothiazide	20	115.0	2.2
	50	112.1	1.5
氯噻酮	5	108.4	1.3
Chlorthalidone	20	99.4	3.6
	50	97.0	1.3
乙酰唑胺	5	105.7	4.9
Acetazolamide	20	94.4	3.1
	50	102.0	3.1
呋塞米	5	104.3	2.6
Furosemide	20	99.7	1.1
	50	96.0	1.1
精磺胺	5	106.8	4.6
Fine sulfonamides	20	103.6	3.4
	50	101.3	0.5
氨苯蝶啶	5	118.7	3.2
Triamterene	20	102.5	1.9
	50	88.3	1.2
丙磺舒	5	103.7	3.1
Probenecid	20	95.2	2.6
	50	91.3	2.3
螺内酯	5	97.4	0.6
Spironolactone	20	87.4	3.1
	50	83.7	1.2
坎利酮	5	97.8	2.9
Canrenone	20	87.3	2.3
	50	82.3	3.6

3.1.3 实际样品测定

为评价方法的适应性，采用本方法测定了牛肉、猪肉（市售）中的利尿剂残留情况，结果表明，所有样品均未检出（小于定量限）10 种利尿剂成分，具体称样量及结果见表 5。

表 5　牛肉、猪肉中 10 中利尿剂残留量的检测

检品	化合物名称	称样量（g）	稀释倍数	定容体积（mL）	结果值
牛肉	氢氯噻嗪	2.0015 2.0355	1.0	2.0	未检出（小于定量限）
	氯噻嗪	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）
	氨苯喋啶	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）
	丙磺舒	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）
	氯噻酮	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）
	乙酰唑胺	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）
	呋塞米	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）
	精磺胺	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）
	螺内酯	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）
	坎利酮	2.0015 2.0355			未检出（小于定量限）

续表　牛肉、猪肉中 10 中利尿剂残留量的检测

猪肉	氢氯噻嗪	2.1136 2.0685	1.0	2.0	未检出（小于定量限）
	氯噻嗪	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）
	氨苯喋啶	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）
	丙磺舒	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）
	氯噻酮	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）
	乙酰唑胺	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）
	呋塞米	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）
	精磺胺	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）
	螺内酯	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）
	坎利酮	2.1136 2.0685			未检出（小于定量限）

4.结论

超高效液相色谱-串联质谱法具有较高灵敏度和特异性，可以同时对多组分化合物进行测定，在利尿剂等药物的痕量检测中被广泛使用。本研究建立了通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱同时测定动物源性食品中 10 种利尿剂类药物残留量的方法。样品经 80%乙腈提取能有效去除干扰物质，避免了动物源性样品中肌肉组织

的聚集引起阻流，实现内部分析物的充分提取。在 ProElt PLS-A 和 Captiva EMR lipid 通过式固相萃取柱之间选用了去除脂质效果更好的 Captiva EMR lipid 柱，保持了较高的回收率和良好分离效果的同时减少了实验步骤，节约样品处理所需要的时间，也避免了传统色谱柱使用时需要活化、平衡、洗脱等操作繁琐的问题。以 0.1%甲酸-水溶液（A）和 0.1%甲酸甲醇-乙腈混合溶液（V/V=1/1）作为流动相很大程度的消除了基质效应对目标峰的干扰，响应更高，分离效果更好，不会出现柱压增高的问题从而实现色谱柱的效果。因对同分异构体的分离效果更好，且峰形较好、分辨率高、拖尾现象较轻，选用 Waters ACQUITY UPLC BEH-C18 色谱柱。为排除动物源性食品中脂溶性物质和基质效应产生的干扰，本实验采用外标法加强定量结果的准确性。

经实验方法学验证，该方法检出限达 2.0 ~5.0 μg/kg、回收率达 82.3～119.2%、精密度较高，优于目前现行国家标准，能满足同时检测动物源性食品中多种利尿剂药物残留的检测要求，实现快速定性与定量筛查。

参考文献

[1] 秦旸，朱绍棠，张长久. 兴奋剂中利尿剂的检测方法[J]. 分析测试学报，2001，20（2）; 82-86.

[2] 张佳雨，汪宇，王林琳，等. 利尿剂的种类及其在心力衰竭治疗中的研究进展[J]. 实用心脑肺血管病杂志，2021，29（05）: 8-13+22.

[3] 赵晓亚，陈新艳，王晗，等. 分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肉中的 10 种利尿剂[J]. 分析科学学报，2021，37，（05）:643-648.

[4] 陈莲珍，杨昕，马金兰. 利尿剂与竞技运动[J]. 临床药物治疗杂志，2008，（03）: 43-45.

[5] Inmaculada G，Luis S，CruzOrtiz M. Three-way models and detection capability of a gas chromatoaraphy-mass spectrometrymethod for the determination of clenbuterol in severa biolodicalmatrices: the 2002/657/EC European Decision[J]. Ana Chi mActa.2004，（515）: 55-63

[6] Nochetto CB，Reimschuessel R，Gieseker C，*et al*. Determination of tricaine residues in fish by liquid chromatography[J]. J AOAC Int，2009，92（4）; 1241-1247.

[7] Scherpenisse P，Bergwerff AA. Determination of residues of tricaine in fish using liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta，2007，586（1-2）:407-410.

[8] 李文辉，刘佳，孙志文，等. 动物源性产品中 10 种利尿剂残留的超高液相色谱-串联质谱检测方法的研究[J]. 畜牧与兽医，2022，54（03）: 53-58.

[9] 张海超，王敬，洪灯，等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物源性食品中 46 种食源性兴奋剂残留量[J]. 食品科学，2022，43（14）: 338-345.

[10] 李文辉，孙志文，怀文辉，等. 鸡肉和鸡蛋中 5 种利尿剂残留的超高液相色谱-串联质谱检测方法研究[J]. 中国家禽，2021，43（10）: 67-71.

[11] 薛颖，花锦，高浩，等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉和猪肉中利尿剂残留量[J]. 食品工业科技，2021，42（03）: 230-235.

[12] 任晓伟，范力欣，何亮娜，等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中的 13 种利尿剂［J/OL］. 食品科学，2023: 1-13.

[13] 王翠霞，张兴梅，李桂芝，等. 蛋白质对测定血清中抗精神病类药物的影响及消除[J]. 光谱学与光谱分析，2013，33（09）: 2492-2495.

[14] 郑慷，寻知庆，何霜，等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定肌肉组织中 6 种噻嗪类利尿剂[J]. 肉类研究，2021，35（09）: 38-42.

基于天然小分子的超分子抗菌水凝胶研究进展

王志家，卢继辉，雷海民，王鹏龙[1*]

（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

【摘要】超分子自组装策略在纳米医学领域得到了广泛的应用，近年来中药化学成分的分子间相互作用尤其是化学成分的分子识别与超分子自组装受到越来越广泛的关注。具有特定结构天然小分子化学成分可不需要借助载体直接自组装形成水凝胶，打破了凝胶剂型需要借助高分子载体的瓶颈。本文主要对含天然小分子的超分子抗菌水凝胶进行综述，并总结了目前发现的天然小分子无载体超分子抗菌水凝胶。

【关键词】天然小分子 超分子 水凝胶 抗菌

在过去的几十年里，超分子抗菌材料由于不易产生耐药性和潜在的多种抗菌功能，为抗菌治疗提供了一种有前途的替代方案[1]。在许多抗菌伤口敷料中，水凝胶得到了广泛的研究，因为它们不仅提供了一个潮湿的环境来促进伤口愈合，而且有效地避免了换药过程中造成的二次伤口损害[2]。学者们已经开发出各种各样的抗菌水凝胶如金属纳米颗粒水凝胶、抗生素水凝胶、合成抗菌水凝胶和固有抗菌水凝胶，具有高的生物利用度、粘附性、可控性和有效性[3-5]。尽管有大量的抗菌水凝胶报道，但只有少数几个转化为临床应用。这可能归因于抗菌水凝胶的制备通常需要载体辅料或化学修饰，这在临床使用过程中可能会带来不可预测的风险。例如，合成高分子水凝胶材料在人体降解代谢过程中可能会产生毒性[6]，并且合成水凝胶材料由于合成步骤复杂而不易制备。此外，只有在对这些载体或化学修饰水凝胶进行系统评价后，如药效学评价、药代动力学、清除途径和安全性评价，才能进行临床试验。因此，它们需要较长的临床过渡期，包括不可预测的风险和巨大的成本，才能用于临床实践。探索一种简单、廉价、活性好、无载体、无化学修饰、安全性高的抗菌水凝胶对临床医学具有重要意义。而基于天然小分子成分的超分子抗菌水凝胶具备上述优势，逐渐受到了越来越多学者的关注。

1 基于天然小分子的聚合物超分子抗菌水凝胶

超分子区别于传统化学的主要思想是关注分子间可逆的、强度较弱的非共价键相互作用。与传统化学交联水凝胶相比，超分子具备诸多优势，因为弱相互作用伴随的物理性能使其具备合成简单、功能多样、高效等优点。此外，它们还可以通过氢键、π-π 堆积作用、静电引力、主-客体络合、金属-配体络合等多种方式自组装形成复杂的超分子结构[7-9]。水凝胶作为一种药物载体可以控制药物载量与释放，其制备方法一般需要加入天然高分子载体辅料或者合成高分子载体辅料，而具备不同功能的辅料分子同样赋予了水凝胶的多功能性。具有抗菌能力的多糖通常是天然大分子或其衍生物，如壳聚糖（CS）、透明质酸（HA）、海藻酸钠（SA）等，由于其无毒性、可生物降解性、生物相容性和丰富的自然来源，经常被用于水凝胶的制备[10,11]。

1.1 酚酸类复合抗菌水凝胶

酚酸类化合物包含大量酚羟基、羟基、羰基，可以通过氢键、静电引力、配位键和疏水作用等与多种材料发生相互作用。单宁酸（TA）是一种天然、水溶性的植物多酚，具有抗氧化性、附着力好、成本低等优点。有学者发现单宁酸能够在水凝胶中形成持久的苯酚-苯二酚平衡[12]，从而获得长期且可重复的黏附效果，在水凝胶创面敷料中的应用引起了诸多关注。Du 等研制了一种新型的聚乙二醇二丙烯酸酯/季铵化壳聚糖/单宁酸（PEGDA/QCS/TA）水凝胶敷料。它对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有良好的抗菌活性，对各种底物具有良好

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82073974）；北京市自然科学基金面上项目（7202116）；北京市科技新星计划（Z201100006820026）；中华中医药学会青年人才托举工程项目（CACM-2018-QNRC2-B08）；北京中医药大学重点攻关项目（2020-JYB-ZDGG-044）；中央高校基金科研业务项目（杰出青年基金 BUCM-2019-JCRC002、岐黄团队 2019-JYB-TD005）；北京市中药基础与新药研究重点实验室；

*通讯作者：王鹏龙，男，教授，研究方向为基于弱键化学探究中药物质基础与复方配伍机制。 Tel: (010)53912100, E-mail: wpl581@126.com；

的黏附能力，可适用于干、湿条件下的伤口[13]。Shi W 等使用苯硼酸改性透明质酸（HA-PBA）和 TA 开发出了一种基于硼酸酯动态共价键的新型动态水凝胶，可在温和条件下迅速凝胶化，具有良好的粘弹性、自愈性与剪切稀化能力。此外，同时使用 TA 作为银纳米粒子（AgNP）绿色合成的还原剂制备具有强效和广谱抗菌活性的杂化动态水凝胶[14]。金属离子容易与酚酸类化合物发生络合反应的特点也能改善水凝胶的材料学特性，例如在 TA-CNF 或 TA@CnC 表面存在大量邻苯二酚基团，可以与 CNF 包裹的 TA(TA@CNF)或 CnC 包裹的 TA(TA@CnC)结合，从而能够螯合金属离子并将它们吸附在表面，并由于氧化还原反应而形成深色水凝胶。图 1.3 显示了 Ag-TA@CNF 的形成机理[15]。没食子酸是中药五倍子中的主要成分，同时也可以由单宁酸水解生成[16]。Gong W 等将没食子酸（GA）与琼脂糖（AG）一起用于开发双网络水凝胶（GA-AG），具有优异的抗菌活性和生物相容性，可减少体内炎症并加速伤口愈合[17]。

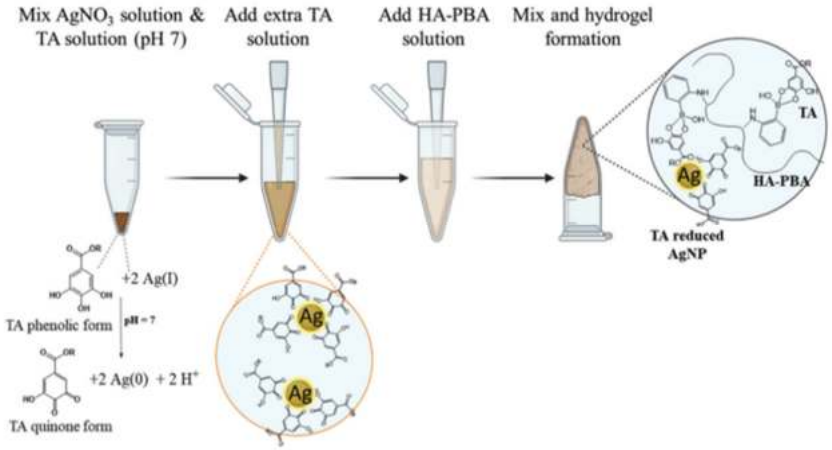


图 1.2 制备掺有银纳米粒子的 HA-PBA-TA 动态水凝胶的过程示意图[14]。

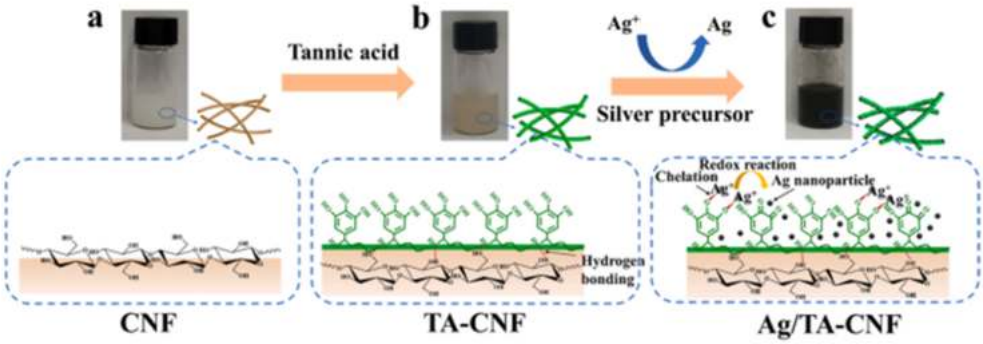


图 1.3 Ag-TA@CNF 形成机理[15]

1.2 黄酮类复合抗菌水凝胶

黄酮类成分是中药中最常见的化合物类型之一，具有抗氧化、抗菌、抗炎等作用，因此也有学者将其用于制备抗菌水凝胶伤口敷料[18,19]。冯传良[20]等将中药总黄酮与手性凝胶因子共组装，之后通过非共价键作用将手性组装体转移到聚乙烯醇和壳聚糖（CS）上，从而提高水凝胶的机械强度和吸水性，并具备粘附性、抗菌、持续释放、促进伤口愈合等多重作用。葛根素（PUE）是中药葛根中的代表性黄酮类成分，具有解酒、护肝、抗炎、心脏保护等作用[21]。有学者将葛根素作为草药中的自组装活性小分子引入 CS 水凝胶中，制备出具有互穿网络结构的 CS/PUE18 复合水凝胶，表现出可注射性、触变性、细胞相容性、抗菌、抗炎与 pH 依赖性，是一种缓释和控释的潜在载体[22]。另一项工作中受到中药研磨处理方法的启发，通过引入机械力促进 CS 和 PUE 的有效分子碰撞和自组装从而制备出中草药水凝胶 CS@PUE，具备协同抗菌和免疫调节性能，并可以促进伤口愈合[23]。也有学者将黄芩提取物与壳聚糖开发成热敏水凝胶，加入泊洛沙姆 407、海藻酸钠和纤维素衍生物制备而成，具有强

力的粘附性用于治疗牙周病[24]。

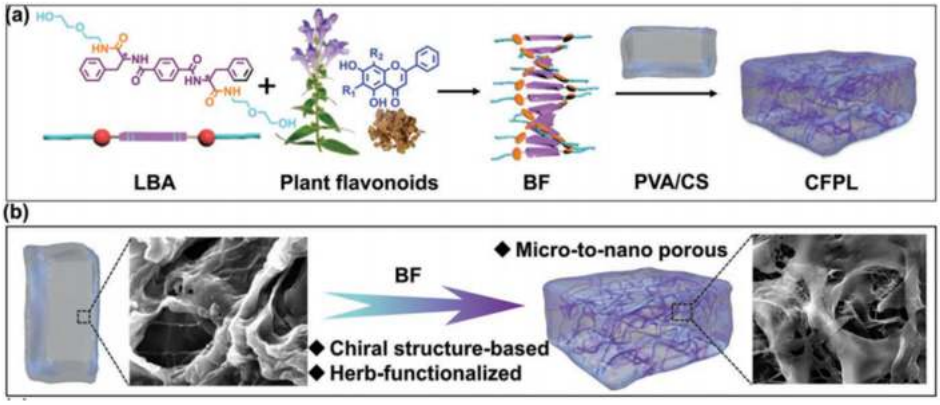


图 1.4 富含总黄酮的手性超分子水凝胶[20]

1.3 三萜类复合抗菌凝胶

三萜类化合物也是天然产物中存在最广泛的化合物之一，由 6 个异戊二烯单位组成。目前已经从天然三萜类化合物中发现了多种天然凝胶质如白桦脂酸、甘草次酸、齐墩果酸、羽扇豆醇等[25]，它们具有相似的五环三萜骨架，水溶性较差，需要借助不同的有机溶剂或与水混合溶剂中形成凝胶。甘草次酸（GA）具有抗菌作用[26]，可在多种有机溶剂中自组装形成凝胶如芳香溶剂、乙二醇、氯代烷烃纯溶剂体系。与甘草次酸结构类似的齐墩果酸，同样为齐墩果烷型五环三萜，不同的是在 C11 位羰基官能团以及羧基所在的位置。Bag 课题组探究了齐墩果酸在不同有机溶剂中的自组装行为[27]，结果表明其能在氯仿、DMSO、芳香溶剂、醇中形成稳定的凝胶态，透射电镜观察到在氯苯中凝胶的微观形态为纳米球。还有许多研究集中在对齐墩果烷型结构的修饰来制备超分子水凝胶，并可通过与其他分子共同作用设计复合水凝胶。Li 等将 GA 作为 β-环糊精（β-CD）的客体分子，形成 GA/β-CD 包合物（1:1），并分别借助 N,N'-二甲基丙烯酰胺与甲基丙烯酸酯设计合成共聚物 Poly(DMA-GA)和 Poly(DMA-CD)，由二者形成的超分子水凝胶显示出良好的生物相容性[28]。

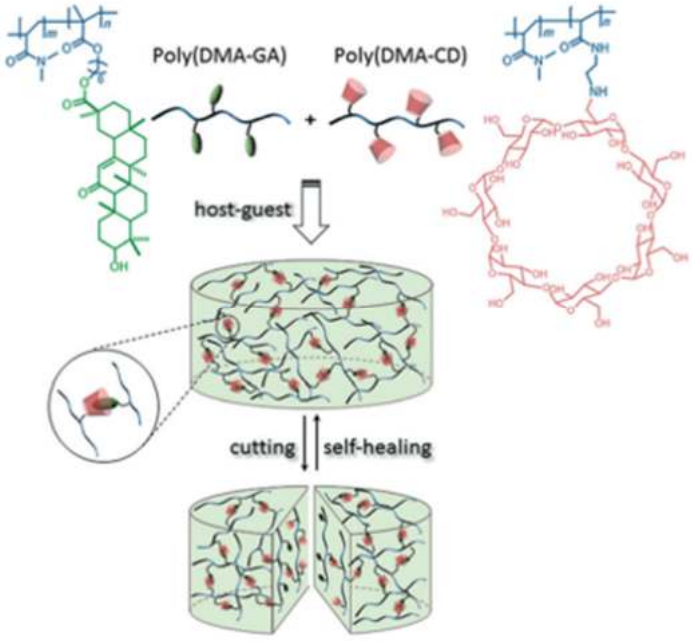


图 1.5 基于 GA 和 β-CD 单元之间的主客体相互作用，由 poly(DMA-GA) 和 poly(DMA-CD) 交联的超分子水凝胶的制备和自修复过程[28]

2 基于天然小分子的无载体超分子抗菌水凝胶

超分子水凝胶除上一节所述的高分子载体复合水凝胶外，目前不断涌现出关于无载体小分子成分自组装水凝胶的研究。它们可以通过单一成分或者二元成分通过非共价键相互作用有序自组装形成，不需要借助高分子载体辅料。小分子自组装与其结构密切相关，传统的两亲性分子含有一个极性的头基和一个或两个疏水尾端。极性头基可以是一系列官能团，包括羧酸、氨基酸、糖、磷酸或季胺等。疏水尾端形式多样，这类分子可以在水中形成各种聚集体如纤维沉淀与水凝胶等[29]。特别令人感兴趣的是由两个分子通过非共价键相互作用组装可以而成不同形态的超分子材料如纳米颗粒、纳米晶体与纳米水凝胶等[30-32]。此外这些组装可以被赋予独特的协同性质，而不仅仅是每个组分单独性质的组合。因此，探究天然成分超分子自组装水凝胶的复杂相互作用不仅有助于破译天然超分子自组装形成机制，还能够有目的设计药物应用形式，促进生物医学应用的深入基础研究。

2.1 抗菌肽自组装水凝胶

抗菌肽是一类动物和植物在免疫防御中产生的具有抗微生物活性的小分子肽，其抗菌作用机制可能是通过与细菌细胞膜结合使其破裂而导致细菌死亡，因此具有广谱的抗菌活性，对革兰氏阳性菌与阴性菌都有抑制作用，并且不易使细菌产生耐药性[33]。抗菌肽具有疏水和亲水部位，这对自组装具有重要意义。但天然抗菌肽存在缺陷，如结构不稳定，容易降解。为了解决这些问题，有研究者将 β-氨基酸或 α-D-氨基酸引入天然多肽序列中，设计合成多种抗菌肽类似物，使多肽结构的稳定性显著提高[34]，同时保持了优良的抗菌活性。另外，构建抗菌肽水凝胶是防止自身降解的另一种有效方法。近年来，由于抗菌肽优异的自组装能力，也涌现了多种无载体抗菌肽水凝胶。例如，Yan 等人将 Fmoc-氨基酸与 Ag^{+}进行配位形成了自组装水凝胶，如图 1.6 所示，可直接与细胞壁和细胞膜相互作用，导致质膜脱落和细胞质渗漏。具有局部给药和缓释、减少药物用量和毒性、提高生物利用度、延长药效等优点，并对大肠杆菌和金葡菌产生显著的抗菌效果[35]。Schneider 等人设计了一种富含赖氨酸的两亲性多肽（MAXI），可自组装形成的水凝胶具有广谱抗菌效果[36]。精氨酸含量对抗菌肽的抗菌活性具有决定性影响，因此将 MAXI 肽中的赖氨酸残基替换成精氨酸，开发了一系列抗菌水凝胶[37]。含有两个精氨酸残基的多肽（MARG1）自组装形成的水凝胶表现出优异的抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌性能以及良好的生物相容性。此外，该水凝胶具有机械刚性、剪切变稀性能，可以通过注射器塑形[38]。

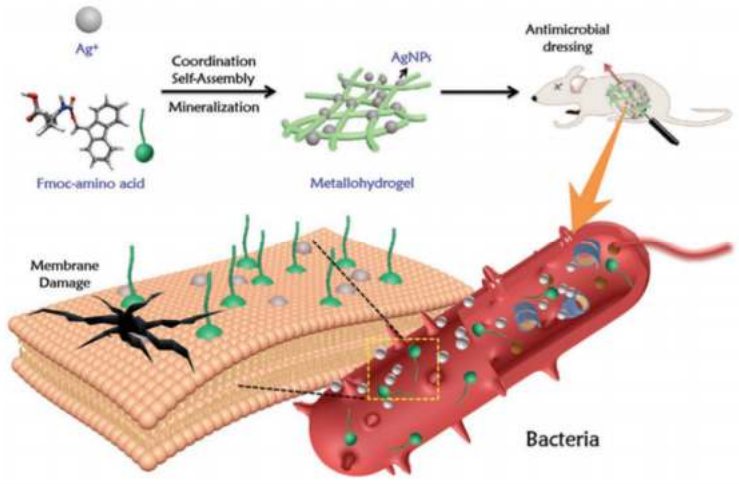


图 1.6 基于协同自组装 Ag^{+}配位 Fmoc-氨基酸金属水凝胶的形成及其作为抗菌敷料的应用[35]

2.2 中药小分子自组装抗菌水凝胶

近年来，由天然药物分子衍生的水凝胶体系如雨后春笋般涌现。与传统的水凝胶如聚合物水凝胶相比，天然药物分子衍生水凝胶的最大优点是天然药物分子不仅作为凝胶的骨架，而且还具有内在的药理活性。甘草酸（GA）是国老甘草的主要成分，由一个甘草次酸分子和两个葡萄糖醛酸分子组成两亲性结构，能够在水中自组装形成胶束、小泡、纤维网络和水凝胶[39,40]。有研究通过 Fe^{2+}诱导甘草酸成胶，不仅降低了其成胶浓度，并增强了水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性能[41]。此外，Qian 等将甘草酸与多种金属离子络合，发现不同金属离

子会影响甘草酸水凝胶的材料性质 [42]。Cai 等发现葛根素也可以自组装成具有优异抗氧化性能和极强耐酸性的水凝胶[43]，但其胶体性质不稳定，因此有研究对其加入高分子材料进行改性，上节已经对其进行了总结。调节蒽醌类成分大黄酸的 pH 能使其在水中通过 π-π 堆积作用力驱动自组装形成螺旋纤维，宏观表现为水凝胶，在体外与同等的游离药物相比，具有持久的疗效和较小的细胞毒性，并可减轻神经炎症[44]。Huang 等通过氢键和 π-π 堆积构建了没食子酸水凝胶[45]。由于没食子酸具有抗炎、抗菌、抗氧化等生物活性，该水凝胶可作为一种促进创面愈合的敷料。除了中药单体成分能自组装成水凝胶，本课题组还首次发现黄芩苷与小檗碱在适宜的 pH 条件下可通过静电引力结合形成 U 型两亲性分子，继续通过 π-π 堆积与疏水作用自组装形成水凝胶,并协同增强了小檗碱抑制金黄色葡萄球菌的能力[99]。我们还发现黄芩苷与血根碱能够自组装形成水凝胶，能够协同抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌，并能加速其感染的小鼠皮肤伤口愈合[46]。Hu 等发现没食子酸与白藜芦醇可通过 π-π 堆积组装形成二元纤维水凝胶，能够显著降低了内毒素诱导的巨噬细胞中的 ROS 和 NO 水平，抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌并加速细菌感染伤口愈合[47]。同时他们继续将没食子酸与甘草酸二铵共组装形成了具有良好机械性能与自愈性的二元水凝胶，具有缓释性能与良好细胞相容性，并具有广谱抗菌效果[48]。

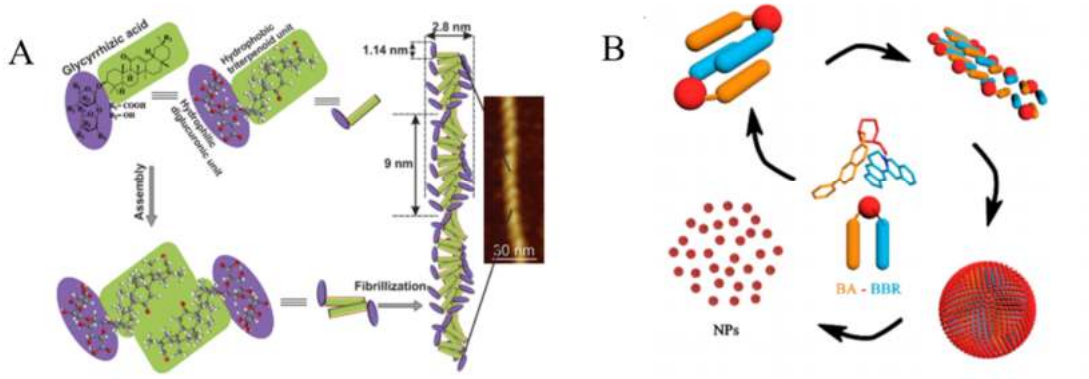


图 1.7 中药单体甘草酸成分与黄芩苷-小檗碱二元自组装水凝胶[30,44]

3 本节小结

天然小分子成分具备优异的药理活性与生物相容性，学者们利用加入载体辅料的传统水凝胶的制备方法开发出了多种抗菌水凝胶，同时也出现了许多无载体天然成分抗菌水凝胶。当超分子水凝胶由具有固有抗菌作用的凝胶剂组装而成时，可以被赋予抗菌性能。通过分子在水环境中的自组装，天然中药成分或多肽等可以转化为这些水凝胶的组成部分，并且可能起到协同增效作用，这也被越来越多的两亲性小分子在水中自组装成凝胶并保持甚至提高药效的自然趋势所支持。此外，笔者尝试综述无载体小分子水凝胶生物材料，但发现关于二元小分子自组装水凝胶的报道极少，本课题希望通过探究中药中二元小分子自组装水凝胶的形成机理与应用前景，以期为先进生物材料的开发提供新的思路。通过这种方法，不仅可以实现水凝胶形式药物的自我递送，还可以消除对载体材料的负载能力以及它们的生物相容性、生物降解性和生物可利用性相关的担忧。

参考文献：

[1] Xin Q., Shah H., Nawaz A., et al. Antibacterial carbon-based nanomaterials [J]. *Adv Mater.*, 2019, 31(45): e1804838.

[2] Winter GD., Scales JT. Effect of air drying and dressings on the surface of a wound [J]. *Nature*, 1963, 197: 91-2.

[3] Yang K., Han Q., Chen B., et al. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application [J]. *Int J Nanomedicine.*, 2018, 13: 2217-2263.

[4] Li S., Dong S., Xu W., et al. Antibacterial Hydrogels [J]. *Adv Sci(Weinh).*, 2018, 5(5): 1700527.

[5] Muir VG., Burdick JA. Chemically modified biopolymers for the formation of biomedical hydrogels [J]. *Chem Rev.*, 2021, 121(18): 10908-10949.

[6] Kharkar PM., Kiick KL., Kloxin AM. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments [J].

Chem Soc Rev., 2013, 42(17): 7335-72.
[7] Appel EA., Biedermann F., Rauwald U., et al. Supramolecular cross-linked networks via host-guest complexation with cucurbit[8]uril [J]. *J Am Chem Soc.*, 2010, 132(40): 14251-60.
[8] Li YQ., Zhu B., Li Y., et al. A synergistic capture strategy for enhanced detection and elimination of bacteria [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*., 2014, 53(23): 5837-41.
[9] Burnworth M., Tang L., Kumpfer JR., et al. Optically healable supramolecular polymers [J]. *Nature*, 2011, 472(7343): 334-7.
[10] Hu S., Zhi Y., Shan S., et al. Research progress of smart response composite hydrogels based on nanocellulose [J]. *Carbohydr Polym*., 2022, 275: 118741.
[11] Wang M., Deng Z., Guo Y., et al. Designing functional hyaluronic acid-based hydrogels for cartilage tissue engineering [J]. *Mater Today Bio*., 2022, 17: 100495.
[12] Zhao Q., Mu S., Long Y., et al. Tannin‐Tethered Gelatin Hydrogels with Considerable Self‐Healing and Adhesive Performances [J]. *Macromolecular materials and engineering*, 2019, 4: 304.
[13] Du X., Wu L., Yan H., et al. Multifunctional Hydrogel Patch with Toughness, Tissue Adhesiveness, and Antibacterial Activity for Sutureless Wound Closure [J]. *ACS Biomater Sci Eng.*, 2019, 5(5): 2610-2620.
[14] Shi W., Kong Y., Su Y., et al. Tannic acid-inspired, self-healing, and dual stimuli responsive dynamic hydrogel with potent antibacterial and anti-oxidative properties [J]. *J Mater Chem B*., 2021, 9(35): 7182-7195.
[15] Chen Y., Zhang Y., Mensaha A., et al. A plant-inspired long-lasting adhesive bilayer nanocomposite hydrogel based on redox-active Ag/Tannic acid-Cellulose nanofibers [J]. *Carbohydr Polym*., 2021, 255: 117508.
[16] 简辉, 吴鑫颖, 邱树毅, 等. 黑曲霉 B1401 生物法转化单宁酸制备没食子酸的研究 [J]. 中国酿造, 2016, 35(04): 24-28.
[17] Gong W., Wang R., Huang H., et al. Construction of double network hydrogels using agarose and gallic acid with antibacterial and anti-inflammatory properties for wound healing [J]. *Int J Biol Macromol*., 2023, 227: 698-710.
[18] Maleki SJ., Crespo JF., Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids [J]. *Food Chem*., 2019, 299: 125124.
[19] Hu B., Shen Y., Adamcik J, et al. Polyphenol-binding amyloid fibrils self-assemble into reversible hydrogels with antibacterial activity [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(4): 3385-3396.
[20] Sun M., Peng S., Zhao C., et al. Herb-functionalized chronic wound dressings for enhancing biological functions: multiple flavonoids coordination driven strategy [J]. *Adv. Funct. Mater*., 2022, 32, 2204291.
[21] 陈凯, 魏平慧, 史琳. 葛根异黄酮类成分的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(12): 2602-2610.
[22] Yuan H., Li W., Song C., et al. An injectable supramolecular nanofiber-reinforced chitosan hydrogel with antibacterial and anti-inflammatory properties as potential carriers for drug delivery [J]. *Int J Biol Macromol*., 2022, 205: 563-573.
[23] Chen B., Zhang H., Qiu J., et al. Mechanical force induced self-assembly of chinese herbal hydrogel with synergistic effects of antibacterial activity and immune regulation for wound healing [J]. *Small*, 2022, 18(21): e2201766.
[24] Chanaj-Kaczmarek J., Osmałek T., Szymańska E., et al. Development and evaluation of thermosensitive hydrogels with binary mixture of scutellariae baicalensis radix extract and chitosan for periodontal diseases treatment [J]. *Int J Mol Sci*., 2021, 22(21): 11319.
[25] 智康康, 杨鑫. 天然产物凝胶及其凝胶质 [J]. 化学进展, 2019, 31(09): 1314-1328.
[26] 高雪岩, 王文全, 魏胜利, 等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2695-2700.
[27] Bag B, Paul K. Vesicular and fibrillar gels by self-assembly of nanosized oleanolic acid [J]. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 2012, 1(2): 150-154.
[28] Li Y., Li J., Zhao X., et al. Triterpenoid-based self-healing supramolecular polymer hydrogels formed by host-guest interactions [J]. *Chemistry*, 2016, 22(51): 18435-18441.
[29] Li G., Fudickar W., Skupin M., et al. Rigid lipid membranes and nanometer clefts: motifs for the creation of molecular

landscapes [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*., 2002, 41(11): 1828-52.
[30] Li T., Wang P., Guo W., et al. Natural berberine-based chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6770-6781.
[31] Tian X., Wang P., Li T., et al. Self-assembled natural phytochemicals for synergistically antibacterial application from the enlightenment of traditional Chinese medicine combination [J]. *Acta Pharm Sin B*., 2020, 10(9): 1784-1795.
[32] Huang X., Wang P., Li T., et al. Self-assemblies based on traditional medicine berberine and cinnamic acid for adhesion-induced inhibition multidrug-resistant *staphylococcus aureus* [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*., 2020, 12(1): 227-237.
[33] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria [J]. *Nat Rev Microbiol*., 2005, 3(3): 238-50.2.
[34] Wade D., Boman A., Wahlin B., et al. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*., 1990, 87(12): 4761-5.
[35] Song J., Yuan C., Jiao T., et al. Multifunctional antimicrobial biometallohydrogels based on amino acid coordinated self-assembly [J]. *Small*, 2020, 16(8): e1907309.
[36] Salick DA., Kretsinger JK., Pochan DJ., et al. Inherent antibacterial activity of a peptide-based beta-hairpin hydrogel [J]. *J Am Chem Soc*., 2007, 129(47): 14793-9.
[37] Veiga A., Sinthuvanich C., Gaspar D., et al. Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels [J]. *Biomaterials*., 2012, 33(35): 8907-8916.
[38] Salick D A., Pochan D J., Schneider J. Design of an injectable β‐hairpin peptide hydrogel that kills methicillin‐resistant *staphylococcus aureus* [J]. *Advanced Materials*, 2010, 21(41): 4120-4123.
[39] Saha A., Adamcik J., Bolisetty S., et al. Fibrillar networks of glycyrrhizic acid for hybrid nanomaterials with catalytic features [J]. *Angewandte Chemie*., 2015, 127(18): 5498-5502.
[40] Zhao X., Zhang H., Gao Y., et al. A simple injectable moldable hydrogel assembled from natural glycyrrhizic acid with inherent antibacterial activity [J]. *ACS Appl Bio Mater*., 2020, 3(1): 648-653.
[41] Xu Z., Gao Z., Lu J., et al. Ferrous iron-induced formation of glycyrrhizic acid hydrogels for staphylococcus aureus-infected wound healing [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*., 2023, 221: 112977.
[42] Qian Y., Zheng Y., Jin J., et al. Immunoregulation in diabetic wound repair with a photoenhanced glycyrrhizic acid hydrogel scaffold [J]. *Adv Mater*., 2022, 34(29): e2200521.
[43] Cai Y., Zhang J., He Y., et al. A supramolecular hydrogel of puerarin [J]. *J Biomed Nanotechnol*., 2018, 14(2): 257-266.
[44] Zheng J., Fan R., Wu H., et al. Directed self-assembly of herbal small molecules into sustained release hydrogels for treating neural inflammation [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1604.
[45] Huang H., Gong W., Wang X., et al. Self-assembly of naturally small molecules into supramolecular fibrillar networks for wound healing[J]. *Adv Healthc Mater*., 2022, 11(12): e2102476.
[46] Zhijia Wang., Jihui Lu., Zhihua Yuan., et al. Natural carrier-free binary small molecule self-assembled hydrogel synergize antibacterial effects and promote wound healing by inhibiting virulence factors and alleviating the inflammatory response[J]. *Small*, 2023, 19(5): e2205528.
[47] Wang XC., Huang HB., Gong W., et al. Resveratrol triggered the quick self-assembly of gallic acid into therapeutic hydrogels for healing of bacterially infected wounds[J]. *Biomacromolecules*, 2022, 23(4): 1680-1692.
[48] He WY., Wang XC., Gong W., et al. Construction of an antibacterial hydrogel based on diammonium glycyrrhizinate and gallic acid for bacterial-infected wound healing[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*., 2023, 222: 112975.

“实战型”审方药师培养新模式的构建与实践

翁琰，王明明，赵美娜，蒋思洁，崔佳，王婧雯*

空军军医大学西京医院 陕西 西安 710000

【摘要】目的：构建“实战型”审方药师培养新模式。**方法：**从课程设置、教学方案、教学方法、考核方式、质量评价、培训成效、创新点等方面对审方药师培养模式进行研究，优化医院审方药师培养机制。**结果：**以审方的逻辑思维为主线，结合国内外审方要素及国家最新药政法规，形成了 4 大模块、包括 24 个学时的培训内容体系；采用案例法和 PBL 教学法授课，通过摸底考试、随堂测试、实践考核开展多环节质控考核，并对审方培训工作进行质量评价，结合学员培训后的感受和意见不断优化改进，最终形成“实战型”审方药师培养新模式。**结论：**该培训模式已连续 5 年在陕西省 8 个地市级举办的医院药师处方审核能力培训班中推广应用，累计线下培养 407 个基层医疗机构 760 名药师，充分提高了我省基层医疗卫生机构的处方审核能力和合理用药水平，提升了我国审方药师的教育质量和水平。

【关键词】审方药师、培养、模式、标准

随着医药卫生体制改革不断深入、公立医院综合改革措施逐步推进，处方审核已成为促进临床合理用药、提高医疗质量、保证患者用药安全的重要环节，也是药师专业技术价值的具体体现。2019 年 5 月，国家卫生健康委制定了 55 项三级公立医院绩效考核指标，其中药学相关指标如“点评处方占处方总数的比例、抗菌药物使用强度、住院患者基本药物使用率”等就有 14 项[1]；接着 2020 年 8 月，国家卫健委又印发了包括“处方/住院医嘱审核率、门诊处方点评率、住院患者注射剂使用率、急诊患者激素静脉输液使用率”在内的 15 项药事管理医疗质量控制指标[2]，药学工作对医院医疗质量和绩效考核排名的贡献度与重要性已经不言而喻。剖析这些指标，其核心和本质均指向用药的安全性与合理性。每一个指标合格与否，均建立在处方医嘱用药是否正确的基础上，而每张处方、每条医嘱用药是否合理均经过审方药师的审核把关，即药师是处方审核工作的第一责任人[3]。因此，审方药师要快速适应药学服务模式转型，掌握扎实过硬的审方知识与技能，发挥药师的专业技术价值，为患者提供高质量、有价值、有内涵的药学服务，切实为提高医院的医疗质量以及药学服务水平发挥药学人员的价值和贡献。

为使一线药师充分掌握处方审核的基本要素和临床思维方法，提高审方和临床实践能力，培养“实战型”审方药师，空军军医大学西京医院药学部作为陕西省药学会医院药学专委会主委单位，自 2018 年起便在培养审方药师的道路上不断探索创新，创建了陕西省审方药师培训标准，构建了“实战型”审方药师培养新模式，并在实践中不断优化并反复验证，取得了较好的效果。现对该培训体系和培养模式进行总结。

1 教学课程的设置

以审方的逻辑思维为主线，通过对一线药师进行问卷调研，结合国内外审方要素和国家最新药政法规要求，综合考虑进行教学课程设置。

1.1 问卷调研

针对在医院药学一线工作的药师，设计审方培训课程问卷调研，充分评估审方现状，准确掌握药师需求。问卷调研内容包括药师的基本情况、所在医院的处方审核现状、对处方审核课程的需求三部分，具体从五方面深入了解药师对课程的需求，即作为一名审方药师应该掌握的处方审核基本技能、处方审核中的难点、审方药师急需想提高哪方面能力、最想听关于处方审核哪些方面的内容、对于授课内容有什么意见和建议。线上线下共收集了 50 个医疗机构的 500 份调研问卷，整理分析调研结果为培训内容提供参考。

1.2 审方的逻辑思维

《医疗机构处方审核规范》要求：药师接收待审核处方，应对处方进行合法性、规范性、适宜性审核。这也是审核处方的一个逻辑思维顺序：先形式，再内容，即从审核医师资质，到审核处方格式、书写规范以及是

否符合《处方管理办法》规定要求，再到最核心的审核处方的用药合理性。所有这些都建立在审方药师充分掌握处方审核基本技能的基础上。所以在课程体系设置中，首先包括“处方合法性和规范性审核、处方适宜性审核、处方审核基本技能培训”这三个模块。

1.3 国内外审方要素

除了依据国内《处方管理办法》、《医疗机构处方审核规范》、《医院处方点评规范化操作手册》等法规对审方的要求外，还参考国外《Oxford Handbook of Clinical Pharmacy 》（英国）、《Clinical Skills for Pharmacists》（美国）等的审方标准以及对药师的综合技能要求制定课程内容。比如在教学大纲中，要求选取典型案例，充分考虑患者的体重和肝肾功能，判断药物的剂量、频率和途径是否合适；是否存在潜在的药物相互作用；是否对药物过敏或不耐受；是否需要进行治疗药物监测等。

1.4 国家最新药政法规

新医改形势下，随着“转变药学服务模式、加快药学服务高质量发展”等要求的提出，国家每年都会出台多个药学政策法规。作为一名合格的审方药师，必须第一时间掌握最新的药品集中采购、医保药品目录、三级公立医院绩效考核指标、药事管理医疗质控指标等法规内容，才能在处方审核中做出正确的判断。

综合以上四方面考虑，最终形成了包括 4 大模块、24 个学时的课程内容体系。见表 1。

表 1 审方药师培训课程体系

课程模块	课程内容
国家最新药学政策法规解读	1.国家质控视角下的处方审核
	2.医保政策解读与医疗机构实践
	3.集中带量采购工作解读及实践
	4.药学质控指标解读与实践
处方合法性和规范性审核	5.处方书写的合法性及规范性审核
处方适宜性审核	6.需皮试药物审核
	7.给药方法审核
	8.药物剂型审核
	9.给药途径审核
	10.重复用药审核
	11.药物相互作用审核
	12.配伍禁忌审核
	13.处方用药与临床诊断审核之禁忌症
	14.处方用药与临床诊断审核之妊娠期及哺乳期患者
	15. 处方用药与临床诊断审核之超说明书用药
	16.剂量与用法审核之儿童处方
	17.剂量与用法审核之肝功能不全患者
	18.剂量与用法审核之肾功能不全患者
处方审核基本技能培训	19.处方审核检索工具及应用
	20.麻、精、毒药品使用与管理
	21.高警示药品使用与管理
	22.药物不良反应判断与分析
	23.用药交代
	24.沟通技巧

2 教学方案的制定

遴选省内知名药学专家，包括各大医院在全国高知名度的总药师、药剂科主任以及资深临床药师，成立专家工作小组，对每一个教学环节工作进行论证。每名专家负责一个学时授课内容，所有专家集体备课。统一制定教案模板，包括每节课程的教学目的、基本要求、教学重点、教学难点、教学方法、授课内容与教学安排等，规范授课内容，突出教学重难点，避免主题发散。统一制定授课幻灯母版，包括封面、字体、背景、配色、布局，以及对处方案例及点评格式统一要求等，确保 24 个不同专家的 24 节课程内容呈现一套完整的课程体系。

3 教学模式的确定

紧密围绕教学主题，以审方需求为牵引，以优质师资为支撑，以技能提升为目标，以真实处方为案例，采用以问题为导向 (Problem-Based Learning，PBL) 的教学方法，理论与实践相结合，授课与测试相结合。先抛出问题，以学员为主体，以教师为导向，采用案例法、讲授法和 PBL 教学法，运用多媒体幻灯片演示，结合真实的处方，进行讨论式教学，培养学生解决问题的能力。

4 考核方式

培训期间，采用摸底考试、随堂测试和实践考核开展多环节考核质控，多种方式检验培训成效。所有学员全脱产集中培训 4 天。开始培训前先进行闭卷考试，题型为 2 道处方审核题和 30 道单选题，考核时间 30min，满分 100 分，对学员处方审核相关知识的掌握程度进行摸底。培训期间，每节授课内容配有 10 道线上考题，满分 100 分，授课完毕立即进行 10min 限时测试，检验学员对授课内容的掌握程度，督促学员上课专心听讲。整个课程体系学习完毕后，接着进行实践考核。每名学员随机抽取 2 道处方审核题和 1 道用药交代题，限时 6min 进行作答，满分 100 分，两名专家现场打分，取平均分。每名学员的考核总成绩=10%摸底考试成绩+30%随堂测试平均分+60%现场审方实践得分，排名前十将被评为优秀学员。通过多样考核方式以及优秀学员称号激励学员学习动力，促使学习效率的提高。

5 质量评价

为更好地了解学员对审方培训内容及各组织环节的意见和建议，总结经验，发现不足，及时优化改进，对审方培训工作进行质量评价。提前设计满意度调查表和意见反馈单，内容涉及学员对培训班的授课内容及深度、授课老师的语言表达及培训技巧、考核题目的难易程度、对自身工作帮助、对本次培训的意见及建议等方面。在实践考核结束、结业典礼之前，设置学员座谈会环节，让学员如实填写满意度调查表和意见反馈单，并给与充足的时间让学员畅谈自己的培训感受和建议，结合实际工作提出常见问题与老师互动讨论。

6 培训成效

该培训模式自建立以来，不断优化改进，已连续五年在我省西安、榆林、汉中、渭南、宝鸡、商洛、咸阳等 7 个地市级举办的医院药师处方审核能力培训班中推广应用，累计线下培养 407 个基层医疗机构的 760 名药师，充分提高了我省基层医疗卫生机构的处方审核能力和合理用药水平，提升了我国审方药师的教育质量，增加了学科和医院的品牌影响力。

7 创新点

审方药师培养新模式的课程体系没有按照常规的以疾病类型或药物药理作用分类进行设置，而是在对覆盖省、地、市、级不同层次一线药师的调剂和审方工作需求进行调研、充分评估审方现状、准确掌握基层药师需求的前提下，以审方的逻辑思维为主线，结合国内外审方要素和国家最新药政法规，综合考虑基层医院的规模、模式、运营等实际情况而制定的更适合基层医疗机构审方药师的课程体系。培训期间采用多环节质控考核，多维度提高培训效率。每开展一次培训，结合当地学员的满意度调查和意见反馈，对培训内容及组织环节进行优化调整，更符合基层医院审方药师培训的需求。

8 不足之处

鉴于考核方式并考虑培训成效，该培训模式更适合于线下开展，因此不能覆盖基层更多的药师。另外，学员水平参差不齐，一些底子不够扎实的药师可能对某些培训内容的理解和吸收较慢，加上四天集中式的高强度培训，学员课后消化知识的时间有限，所以可能会对一些知识点理解不够透彻。但这也正是激励学员努力的动力所在，在与其他学员们共同学习中发现自身不足，从而更有学习的动力。

结语

处方审核是药师职业技能的一项基本功，是药师职责的担当与体现。一张处方，连接的是医生和患者，而药师对处方进行审核的作用主要就体现在两方面：一方面是协助医生，将潜在的用药风险或错误降低；另一方面是为患者服务，将正确的药品交付患者，正确的使用方法及贮存方法告知患者。“实战型”审方药师培养新模式紧密结合医改方案和国家政策导向，满足当前医疗行业对审方药师技术提升转型的需求，使医疗机构一线药师充分掌握处方审核的基本要素，提高审方能力，发现存在或潜在的用药问题；通过搭建陕西省内药师学习交流平台，分享药师在审方过程中的经验及常见问题，补充药师审方所必须掌握的临床知识和临床思维方法，提高药师的药学服务水平和临床实践能力；同时鼓励更多药师参与到处方审核、合理用药监控的队伍中来，发挥药师专业化技术服务作用，保障患者的用药安全。

参考文献

[1] 关于印发国家三级公立医院绩效考核操作手册（2019 版）的通知. 国家卫生健康委办公厅，国卫办医函〔2019〕492 号，2019-05-22.

[2] 国家卫生健康委办公厅关于印发药事管理和护理专业医疗质量控制指标（2020 年版）的通知. 国家卫生健康委办公厅，国卫办医函〔2020〕654 号，2020-08-04.

[3] 关于印发医疗机构处方审核规范的通知. 国家卫生健康委员会办公厅，国家中医药管理局办公室，中央军委后勤保障部办公厅， 国卫办医发〔2018〕14 号，2018-06-29.

新医改下医院药学药事质控实践探索与研究

翁琰，崔佳，王明明，蒋思洁，席雅良，王婧雯*

空军军医大学西京医院　陕西 西安 710000

【摘要】目的：探索新医改下，为更好地推动医院药学高质量发展，如何在国家质控政策导向下进行医院药学药事质控实践。**方法：**从“药品质量安全、药品合理使用、药学服务技能”三大风险点入手，通过五大举措进行医院药学药事质控实践探索。**结果：**举措一“充分发挥药事会的决策职能”:充分发挥药事会作用，使院领导高度重视医院药学工作，15项药事管理质控指标被纳入医院医疗综合管理绩效考核，全部符合国家要求且部分全国领先。举措二“构建合理用药管控创新模式”：创建基于真实世界数据的药物治疗决策支持体系，通过打造药师、医师和管理者的临床用药监管责任共同体，明确三方责权利，实现优势互补齐抓共管。近年医嘱不合理率逐步降低、基本药物使用率持续提高、患者对临床药师满意度逐步提升、临床用药建议采纳率逐渐增加；举措三“建立药品三级质控监管体系”：建立科主任-质控小组-业务小组“三级质量安全监管体系”，创建科主任-分管副主任-质控小组-调剂组长四位一体的药品质量管控责任共同体，明确各级职责权限。通过对药品质量安全实施全流程闭环管理，促使药品质量管理持续改进。举措四“大力发展药学信息技术建设”：基于大数据平台构建药物风险全程监测系统。建立基于语义识别和关键指标筛查的药品不良反应主动监测与智能评估警示系统，实现多个指标异常时主动监测与预警，药师接到预警后可立即在线书写用药建议，实时推送给医生及时调整医嘱，将不良反应拦截在用药前，有效保护患者的用药安全。举措五“构建三位一体药师人才梯队”：打造学习型人才梯队，建立“审方药师、临床药师、质控药师”三类全新的培训体系及标准，创新模式已用于承办全军全国临床药学骨干及陕西省医院药师审方能力培训，成为临床药师师资培训全国示范单位。**结论：**围绕医院药学质控工作中三大风险点，我们从管理机制、管控模式、监管体系、信息技术、人才培养等方面进行5大举措实践探索，取得成效显著。

【关键词】医院药学，质控政策，质控实践，质量安全，合理用药，药学服务

人血管内皮因子 165 的 ssDNA 适配体半理性筛选与稳定性改造

吴凤梅[1]，黄冠鸿[1]，张海怡[2]，谢春芳[2]，刘大岭[2]，姚冬生[1,3,4]*

（1 暨南大学生物医药研究院，广州，510632；2 暨南大学生命科学技术学院物工程系，广州，510632；3 基因工程药物国家工程研究中心，暨南大学，广州，510632； 4 广东省生物工程药物重点实验室，暨南大学，广州，510632；）

【摘要】以血管内皮生长因子(VEGF)为靶点治疗眼部新生血管疾病和各种肿瘤血管生成的方法已大量报道。VEGF-A 是一种血管生长刺激因子，能够刺激内皮细胞的增殖、迁移和形成，在许多实体瘤[1]中过表达。VEGF-165 是一种 VEGF‐a 亚型，通过与受体 VEGFR-2(KDR)[2]结合发挥调控作用。因此，阻断 VEGF165 与其受体的相互作用被认为是抑制细胞增殖的一种治疗手段。抗 VEGF 的策略包括小分子[3]、核酸适配体[4]、抗体[5-6]或多肽/蛋白质[7]。本研究中借助于计算机的半理性设计多级筛选策略筛选得到抗 VGEF165 ssDNA 适配体。研究以重组人 VEGF165 蛋白为靶标，通过半理性设计构建具有唯一二级结构的 ssDNA 适配体随机虚拟文库，经过计算机预筛，圆二色谱法（Circular Dichroism，CD）和等温滴定微量热法（Isothermal Titration Calorimetry, ITC）复筛，最终获得三条与 $VEGF_{165}$ 表现出高亲和力的具有单一二级和三级构象的适配体 No.524、No.64 和 No.529。检测显示其与 $VEGF_{165}$ 的 Kd 值分别为 36.3 nM、79.3 nM 和 288 nM。生物细胞学实验测试显示这 3 条适配体在抑制由 rhVEGF$_{165}$ 诱导 HUVEC(Human Umbilical Vein Endothelial Cells，人脐静脉内皮细胞)增殖的现象中均表现出明显的抑制效果，其中亲和力最小的适配体 529 的抑制作用最强，抑制增殖效果可达 100%。目前文献报道的由 SELEX 筛选获得的适配体基本为多构象适配体，本研究的通过半理性设计筛选策略能够筛选获得 VEGF165 适配体为唯一构象，保证了适配体的靶向专一性。进一步通过理性设计对该适配体进行稳定性改进，获得了适配体 524_8m，529_11m，529_27.2m，529_11.12m，相比野生型，在 DNase I 消化条件下，它们的稳定性分别提高了 22.2%，30%，45.6%，393%。本研究的策略也可为其他适配体的筛选提供参考。

参考文献

[1]Tamma, R.; Annese, T.; Ruggieri, S.; Marzullo, A.; *etc.* VEGF-A and VEGFR2 rnascope determination in gastric cancer. J. Mol. Histol. 2018, *49* (4), 429–435.

[2]Kimoto, M.; Yamashige, R.; Matsunaga, K.; *etc.* Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. Nat. Biotechnol. 2013, *31* (5), 453–457.

[3]Hasegawa, H.; Sode, K.; Ikebukuro, K. Selection of DNA aptamers against VEGF165 using a protein competitor and the aptamer blotting method. Biotechnol. Lett. 2008, *30* (5), 829–834.

[4]Nonaka, Y.; Sode, K.; Ikebukuro, K. Screening and Improvement of an Anti-VEGF DNA Aptamer. Molecules. 2010, *15* (1), 215–225.

银杏达莫注射液安全性实验研究

吴森 吕晓君* 张菊 王平慧 李燕 徐小玲 沈佳特 何开勇

（湖北省药品监督检验研究院，武汉，430075）

第一作者 吴森（1982-），女，湖北黄冈人，工程师，本科，主要研究方向：药理毒理。电话：027-87705213，13971332164，E-mail：81748278@qq.com。

通讯作者 吕晓君(1983-)，女，湖北钟祥人，副主任药师，硕士，主要研究方向：药理毒理。电话：027-87705360，13476118549，E-mail: lvxiaojunwhu@foxmail.com。

摘要 目的：通过小鼠异常毒性试验和急性毒性试验、豚鼠全身主动过敏试验、体外溶血试验，对银杏达莫注射液质量标准的提高进行探索性研究，评价其安全性。**方法：**分别对企业 A、B、C 的银杏达莫注射液进行试验，依据《中国药典》2020 四部通则 1141 异常毒性检查法每批用 5 只小鼠进行异常毒性检查，另取小鼠每批 50 只进行急性毒性试验，测定银杏达莫注射液的半数致死量（LD_{50}）或最大耐受量（MTD），以确定其异常毒性检查方法；采用豚鼠全身主动过敏试验对银杏达莫注射液进行过敏性评价，以确定其过敏反应检查方法；采用常规体外试管法（肉眼观察法）及改进的体外溶血性试验法（分光光度法）对银杏达莫注射液进行溶血试验研究，以确定其溶血与凝聚检查方法。**结果：**1、企业 A 异常毒性试验小鼠全部死亡，测得 LD_{50} 为 20.8ml/kg、MTD 为 16.5ml/kg；企业 B 和 C 异常毒性试验小鼠未见死亡和异常反应，MTD 分别为 50ml/kg 和 40ml/kg。2、3 个企业的银杏达莫注射液对豚鼠静脉注射的无毒反应剂量为 0.83ml/kg，稀释 4 倍激发时（相当于人临床用量），未见过敏反应症状发生。3、 3 个企业的银杏达莫注射液的溶血作用存在差异，但在稀释 1.2 倍（相当于临床最大使用浓度 5%）时均未发生明显溶血反应。**结论：**建议银杏达莫注射液质量标准中增加异常毒性检查、过敏反应检查、溶血与凝聚检查作为控制风险的安全性检查项目，拟定方法为将银杏达莫注射液稀释 5 倍、4 倍、1.2 倍分别进行异常毒性检查、过敏反应检查、溶血与凝聚检查。

关键词：银杏达莫注射液；异常毒性；过敏；溶血

Experimental study on safety of Ginkgo Damo injection

Sen Wu，Xiaojun LV *，Ju Zhang ，Pinghui Wang，Yan Li，Xiaoling Xu，Jiate Shen， Kaiyong He

(Hubei Institute for Drug Control , Wuhan 430075, China)

The first author Sen Wu (1982-), female, born in Huanggang, Hubei Province,Engineer， bachelor, main research directions ： pharmacology and toxicology.

Tel: 027-87705213, 13971332164, E-mail: 81748278@qq.com.

Corresponding author Xiaojun Lv(1983-), female, born in Zhongxiang, Hubei Province, deputy chief pharmacist, master's degree, main research directions: pharmacology and toxicology.

Tel: 027-87705360, 13476118549, E-mail: lvxiaojunwhu@foxmail.com.

Abstract Objective: To explore the improvement of the quality standard of Ginkgo Damo injection and evaluate its safety through abnormal toxicity test and acute toxicity test in mice, guinea pig active allergy test and in vitro hemolysis test.

Methods: Ginkgo Damo injection from enterprises A, B and C were tested respectively. 5 mice were used in each batch for abnormal toxicity test according to the abnormal toxicity test method of General Rule 1141 of Part 4 of Chinese Pharmacopoeia 2020, and 50 mice were selected in each batch for acute toxicity test to determine the median

lethal dose (LD50) or maximum tolerable dose (MTD) of Ginkgo Damo injection.To determine its abnormal toxicity test methods;The anaphylaxis of Ginkgo Damo injection was evaluated by whole-body active allergy test in guinea pigs to determine the method of anaphylaxis.The hemolysis test of Ginkgo Damo injection was studied by conventional in vitro test tube method (naked eye observation method) and improved in vitro hemolysis test method (spectrophotometry method) to determine the hemolysis and coagulation test method.

Results: 1. All mice in the abnormal toxicity test of Enterprise A died, LD50 was 20.8ml/kg, MTD was 16.5ml/kg;No death or abnormal reaction was observed in mice tested for abnormal toxicity of enterprise B and C, and MTD was 50ml/kg and 40ml/kg, respectively.The non-toxic reaction dose of Ginkgo Damo injection from 2 and 3 enterprises to guinea pig intravenous injection was 0.83ml/kg, and no allergic reaction symptoms were observed when diluted 4 times and stimulated (equivalent to human clinical dosage).3. There were differences in the hemolysis effect of Ginkgo Damo injection from the three enterprises, but no obvious hemolysis reaction occurred when it was diluted 1.2 times (equivalent to 5% of the maximum clinical concentration).

Conclusion: It is recommended to add abnormal toxicity test, allergic reaction test, hemolysis test and coagulation test to the quality standard of Ginkgo Damo injection as safety check items to control risk.

The proposed method is to dilute Ginkgo Damo injection by 5 times, 4 times and 1.2 times to perform abnormal toxicity test, allergic reaction test, hemolysis test and coagulation test respectively.

Key words:

Ginkgo Damo injection;Abnormal toxicity;Allergies;Hemolysis

The study of Promoting the Rational Use of Sodium Valproate in the Intensive Care Unit

Sheng Wu[3*], Meiling Yu[1,2*], Boying Wang[3], Hongyu Li[1,2], Jinmeng Chen[3#], Jun Su[1,2#]

（[1]Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, 287 Changhuai Road, Bengbu, Anhui 233004, P.R. China；[2]Faculty of Pharmacy, Bengbu Medical College, 2600 Donghai Big Road, Bengbu, Anhui 233030, P.R. China；[3]Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, 287 Changhuai Road, Bengbu, Anhui 233004, P.R. China）

【**Abstract**】Sodium valproate (VPA) is a first-line anti-epileptic drug commonly used in clinical practice, this study aimed to determine the reasons for low serum levels of VPA in intensive care unit (ICU) patients in our hospital to promote more rational use of VPA in the ICU. Trough concentrations of VPA determined in 57 patients during 2017 and 2018 were retrospectively analyzed. The prescribed medicines for these patients were evaluated for potential drug interactions. The procedures adopted by the nursing staff for enteral tube administration of VPA tablets were also assessed. Moreover, it was recommended that the Pharmaceutical Management Committee introduce other dosage forms of VPA. The average trough concentration of VPA was 33.11 ± 19.14 μg/mL, and a trough concentration within the therapeutic range of 50–100 μg/mL was achieved in 22.8% of 57 patients. Of the 57 patients on VPA, 6 were found to be co-medicated with carbapenem antibiotics, which decreased blood VPA concentrations. Moreover, the incorrect enteral tube administration procedures used by the nurses resulted in significant drug loss. After education and training of the medical staff by clinical pharmacists, these two adverse factors were obviated. Furthermore, the hospital Pharmaceutical Management Committee adopted the recommendations and introduced VPA injection as a dosage form. After the intervention, data from a total of 88 patients on VPA in the ICU ward were collected from April 2019 to October 2022. The average VPA trough concentration in these patients was 67.69 ± 21.70 μg/mL, which was significantly higher than that before the intervention. The percentage of patients achieving a blood VPA concentration of 50–100 μg/mL increased to 80.7%. The use of VPA injection is favored in severely ill patients to reduce the use of gavage administration. Combination with carbapenem antibiotic drugs should be avoided. In addition, administration using a tube feeding procedure formulated by clinical pharmacists can increase the average trough concentration of sodium VPA, which is worthy of promotion.

【**Keywords**】Blood concentration monitoring, imipenem/cilastatin, interaction, meropenem, sodium valproate.

Introduction

Sodium valproate (VPA) is a first-line anti-epileptic drug commonly used in clinical practice. This drug has several advantages, including availability of diverse formulations, high efficacy, rapid onset of action, and low price. However, therapeutic drug monitoring of VPA, wherein blood VPA concentration is measured at designated intervals, is usually necessary to optimize individual dosage regimens due to significant individual variation in drug metabolism and the

*These authors contributed equally to this work.

Running title: Meiling Yu et al: Rational Use of Sodium Valproate

Corresponding author:

Dr. Jun Su, E-mail: sujun233433@126.com

Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, 287 Changhuai Road, Bengbu, Anhui 233004, P.R. China

Tel: +86 552 30866240 Fax: +86 552 30866240

Co-corresponding author:

Dr. Jinmeng Chen, E-mail: 1510647834@qq.com

Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, 287 Changhuai Road, Bengbu, Anhui 233004, P.R. China

nonlinear relationship between blood concentration and drug dose. Monitoring of blood VPA concentration can not only enable improved drug efficacy, but can also reduce the possibility of adverse drug reactions (1). Currently, 50–100 μg/mL is considered to be the optimal therapeutic range of the drug, i.e., the concentration range at which the patient will experience the desired clinical effect with a minimum of adverse reactions (2,3) .

Many factors affect the blood concentration of VPA, such as dosage form, age of the patient, co-medication with other drugs, and timing of drug administration. Because their physiological functions are not fully developed, sub-therapeutic levels, i.e., blood VPA concentrations below the minimum effective concentration, are seen in a relatively high proportion of children (4-7). In contrast, blood VPA concentrations higher than normal are seen in a large proportion of elderly patients due to the decline in their liver and kidney functions and the concomitant reduction in their ability to metabolize and eliminate drugs, sustained-release tablets are absorbed and metabolized slowly, achieving stable blood concentrations of the drug and peak plasma concentrations that are maintained for longer. Compared with regular, immediate-release dosage forms, sustained-release tablets are more likely to deliver the minimum effective concentration of drug (4-7). Carbapenem antibiotics can inhibit the conversion of sodium valproate glucuronide to free sodium valproate, resulting in a significant decrease in VPA blood concentration (4). In addition, studies have shown that phenobarbital and carbamazepine are hepatic enzyme inducers that can significantly induce the metabolism of VPA when co-administered, thereby reducing its blood concentration (6).

Nearly 50% of patients in the ICU of our hospital are postoperative craniocerebral disease patients, with some having additional pulmonary or central nervous system complications, or bloodstream infections. Prophylactic and therapeutic use of VPA is indicated in these patients to either prevent the occurrence of epilepsy after surgery or to treat it should it occur (8). Patients with lung and central nervous system complications or bloodstream infections often need treatment with carbapenem antibiotics. Co-medication of these antibiotics with valproate in a subset of these patients results in drug interactions that reduce the bioavailability of VPA. The medical staff at our hospital were not aware of these interactions.

In addition, most patients in the ICU are in an unconscious, comatose state and usually require tube feeding. VPA is one of the most common drugs administered by tube feeding in the ICU, but it was found that there were many problems associated with this route of administration. Improper use of tube feeding tools and loss of drug during administration, for example, reduced trough VPA concentrations. Consequently, to regulate the use of VPA in the ICU, our hospital clinical pharmacists intervened not only to change prescribing behavior, but also to establish standardized enteral tube feeding procedures for administration of VPA, moreover, oral solution or an injectable dosage form of VPA was suggested to the Pharmaceutical Management Committee. Our results showed that the average trough concentration of VPA in the ICU increased significantly from 33.11 ± 19.14 μg/mL before intervention to 67.69 ± 21.70 μg/mL after intervention. These interventional measures helped promote the rational use of VPA in the ICU. The aim of this prospective, interventional study was to identify the reasons for low serum trough levels of sodium valproate in ICU patients in our hospital, and to promote more rational use of VPA in the ICU through implementation of certain interventional measures.

Methods

Study design and setting

This prospective, pre-post, interventional study was performed at The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College. We included patients in the general wards as well as in the intensive care unit from January 2017 through December 2018. In the first surveillance period, for all patients in the general wards and the ICU who fulfilled the eligibility criteria, medical records were screened retrospectively for baseline blood VPA concentrations. The reasons for low blood VPA

concentrations in ICU patients were identified and, based on our results, interventional measures were implemented from January 2019 through March 2019 to promote rational use of VPA in the ICU. A second surveillance period from April 2019 through October 2022 was included to evaluate the effectiveness of the intervention. This study was approved by the Ethics Committee of Bengbu Medical College.

Patients

The control group included 171 subjects who received oral VPA tablets (0.2 g) or sustained-release VPA tablets (0.5 g) and had their blood VPA concentrations monitored between January 2017 and December 2018, including patients from pediatrics, neurology, neurosurgery, rehabilitation medicine, emergency medicine, respiratory medicine, and hematology. General information about the patients, including admission number, admission date, specimen collection time, blood VPA concentration, and doctor's advice and prescriptions, were recorded. The study group was comprised of 57 ICU patients who received oral VPA tablets (0.2 g) or sustained-release VPA tablets (0.5 g) by enteral tube feeding and had their blood VPA concentrations monitored between January 2017 and December 2018. A second study group was comprised of 88 ICU patients after the intervention (between April 2019 and October 2022). Inclusion criteria of the study were therapeutic indications for use of VPA, for example, epilepsy, or indications requiring prophylactic use of VPA. Exclusion criteria included severe liver or kidney dysfunction, short-term use of VPA, renal replacement treatment, and inappropriate sampling procedures.

Monitoring method

Blood sodium valproate concentrations were measured by fluorescence polarization immunoassay on an AxSYM automated analyzer (Abbott Laboratories, USA), used for serology tests and therapeutic drug monitoring, together with a sodium valproate kit (Abbott Laboratories). Concentrations of VPA were determined in serum samples according to standard operating procedures. The quality control error was less than 10%. This study involved two VPA formulations: VPA tablets (0.2 g) and sustained-release VPA tablets (0.5 g). Drug dosage was 0.4–1.2 g/d (qd, bid, or tid). The dose was adjusted, if necessary, based on the blood VPA concentration and clinical efficacy.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS software, version 20.0 (IBM). The distribution of the data was determined. Normally distributed continuous data were expressed as mean ± standard deviation and analyzed using Student's *t*-test. Categorical data were analyzed by χ^2 test. If the data were not normally distributed, the Wilcoxon rank-sum test was used. One-way analysis of variance was used for comparison of means of multiple groups. A *P*-value < 0.05 indicated statistical significance.

Results

Blood trough concentrations of VPA were significantly lower in ICU patients

Patients from pediatrics, neurology, neurosurgery, rehabilitation medicine, emergency medicine, respiratory medicine, and hematology between January 2017 and December 2018 were first collected in this study. We found that the average blood VPA concentration in these hospitalized patients was 56.09 ± 25.1 μg/mL and blood levels within the therapeutic range of 50–100 μg/mL were present in 55.6% of patients (table 1). The average blood concentration of VPA in the ICU patients was only 33.11 ± 19.14 μg/mL, which was significantly lower than that in other patients, and was within the therapeutic range of 50–100 μg/mL in only 13 patients (22.8%) (table 1).

Table 1 Blood concentration of VPA in patients from other wards and the ICU

Parameter	Other wards(n = 171 patients)	ICU ward(n = 57 patients)	*P*
Average blood concentration (μg/mL)	56.09 ± 25.1	33.11 ± 19.14	< 0.001
< 50 μg/mL	68 (39.8%)	44 (77.2%)	< 0.001
50–100 μg/mL	95 (55.6%)	13 (22.8%)	< 0.001
> 100 μg/mL	8 (4.6%)	0 (0%)	0.222

Main reasons for low blood concentrations of VPA in ICU patients

The reasons for the low blood concentrations of VPA observed in 44 of the 57 ICU patients were assessed (see the above table 1). As shown in table 2, co-medication with carbapenem antibiotics was the causative factor in 6 (13.6%) patients. Incorrect blood sample collection time was shown to be the contributing factor in 1 (2.3%) patient, when the steady-state trough concentration was not reached. In the remaining 32 patients, the low blood concentrations of VPA were attributed to drug loss resulting from faulty enteral tube administration procedures (of the 57 ICU patients, 32 (56.1%) patients were administered VPA tablets by tube feeding), so the reasons for low blood concentrations of VPA in 39 patients were found.

Table 2 Causes of low blood concentrations of VPA in 44 patients before intervention

Reason	Patients	Percentage
Combined with carbapenem antibiotics	6	13.6%
Drug loss	32	72.7%
Incorrect sampling time	1	2.3%
Other unknown reasons	5	11.4%

We observed that the drug was ground on paper and that a proportion of the dose remained on the paper after administration (Fig.1A and B). Moreover, after injecting the drug into the enteral feeding tube, a residual amount remained in the syringe (Fig.1C and D). Furthermore, the clinical pharmacists found that the nursing staff did not rinse the feeding tube after administration of the drug. These inappropriate procedures could result in significant drug loss during administration. We therefore concluded that the low blood VPA levels were possibly due to faulty enteral tube administration procedures adopted by the nursing staff in the ICU.

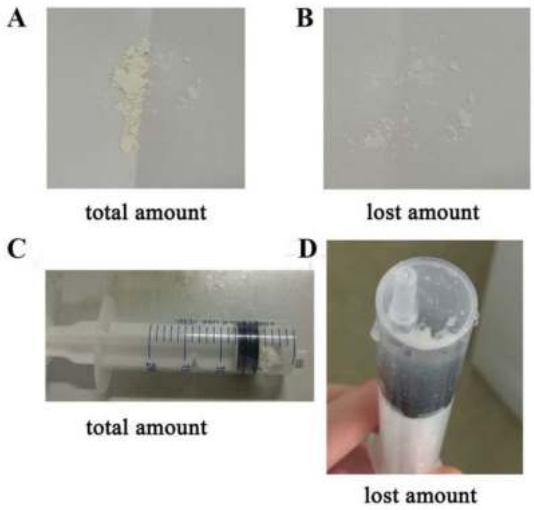


Fig.1. Drug loss during administration of VPA tablets by tube feeding. (A) Total amount of VPA tablets after grinding by nurses. (B) Lost amont of VPA tablets on paper. (C) Total amount of VPA tablets in the syringe. (D) Lost amont of VPA tablets in the syringe

Interventions

In response to the two main problems identified above, we undertook three interventional measures. First, it was recommended that dosage forms suitable for severely ill patients, such as injections, oral solutions or syrups, should be introduced by the hospital Pharmaceutical Management Committee. Second, we undertook training and education of the medical staff. For this, we provided feedback and shared the results of our study with the medical staff in this ward. We also gave lectures related to the subject and distributed relevant study materials. In our varied modes of communication with the medical staff, we emphasized, in particular, the adverse consequences of co-administration of VPA and carbapenems, and proposed measures to adjust the dosage regimen. Finally, we formulated standardized procedures for the administration of VPA tablets by tube feeding. In order to prevent drug loss during enteral tube feeding, a Standard Operating Protocol (SOP) was developed stating that VPA tablets must be ground in a specialized mortar instead of on paper (Fig.2). The SOP also required that after drug administration, the syringe be rinsed with 5–10 mL warm water to remove residual drug. In addition, we enforced the practice of washing of the enteral feeding tube with warm water to prevent adherence of the drug to the tube wall. Furthermore, we reminded the nursing staff to pay particular attention to the following issues: (1) avoidance of co-administration of VPA and montmorillonite powder by tube feeding, and (2) use of nasogastric tube rather than nasointestinal tube because VPA is absorbed in the stomach.

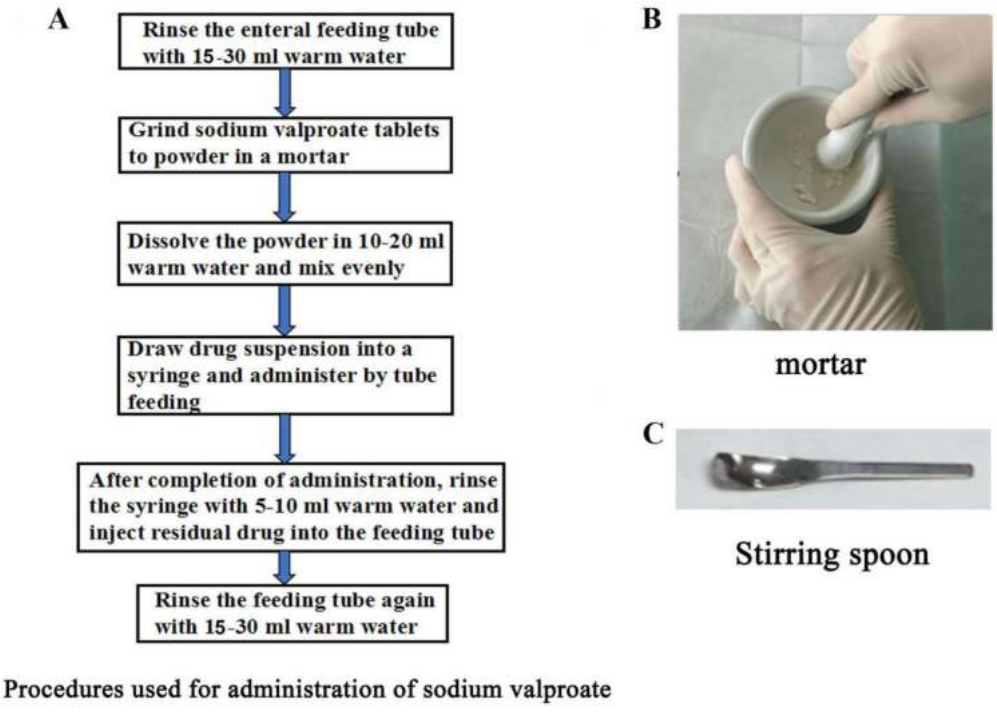


Fig.2. Procedures used for administration of VPA by tube feeding and tools used. (A) The procedures used for administration of VPA by tube feeding. (B, C) The tools for administrating VPA tablets.

Efficacy of the interventional measures

The VPA dosage form for injection was introduced by the Pharmaceutical Management Committee between January and March 2019. Data from a total of 88 patients in the ICU ward were collected from April 2019 to October 2022 after the intervention. Compared with 2017 and 2018, the use of VPA tablets decreased from 94.7% to 34.1% (Fig.3A and B), use of the injectable dosage form increased from 0 to 57 patients, other 30 patients received VPA tablets, 1 patient received VPA sustained release tablets after the intervention (Fig.3A and B). The proportion of patients receiving tube feeding

administration decreased from 56.1% (32/57) to 12.5% (11/88) corresponding to the change of dosage form to intravenous infusion of VPA (Fig.3C). After the intervention, there was no further combination of VPA and carbapenem antibiotic drugs.

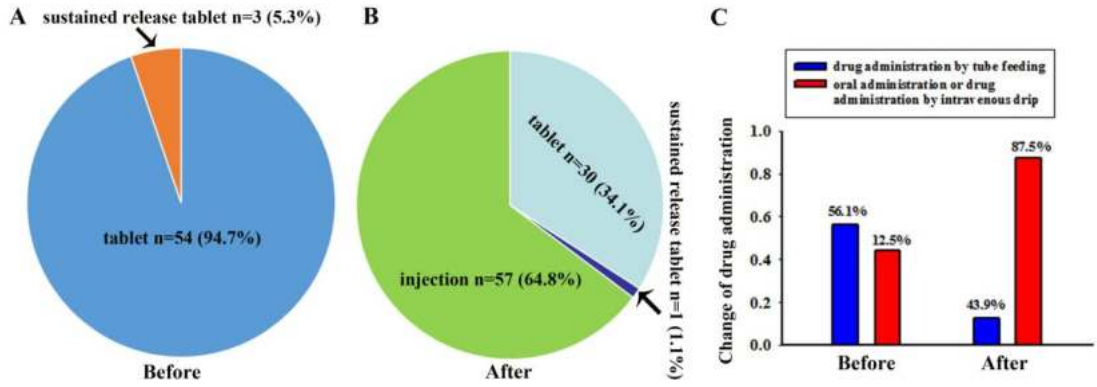


Fig.3. Changes of the dosage form and drug administration before the intervention and after the intervention. (A, B) Change of the dosage form before the intervention and after the intervention. (C) Change of drug administration before the intervention and after the intervention.

The results in table 3 showed that the average blood drug concentration significantly increased from 33.11 ± 19.14 μg/mL before the intervention to 67.69 ± 21.70 μg/mL after the intervention. The proportion of patients attaining a blood VPA concentration within the therapeutic range of 50–100 μg/mL also increased significantly from 22.8% before the intervention to 80.7% after the intervention (table 4). These results suggested that the rational use of VPA was significantly promoted in the ICU after implementation of interventions.

Table 3 Blood VPA concentration measurements before and after the intervention

	Patients	Average blood concentration (μg/mL)	*P*
Before	57	33.11 ± 19.14	< 0.001
After	88	67.69 ± 21.70	

Table 4 Comparison of blood concentrations of VPA before and after the intervention

Blood concentration (μg/mL)	Before		After		*P*
	Patients	Percentage	Patients	Percentage	
< 50	44	77.2%	14	15.9%	
50–100	13	22.8%	71	80.7%	< 0.001
> 100	0	0%	3	3.4%	

Discussion

This study determined the reasons for low blood concentrations of VPA in our hospital ICU patients. Based on our analyses, we subsequently instituted interventional measures, including introducing injectable dosage form of VPA, prohibiting the co-administration of VPA with carbapenem antibiotics, and standardizing the procedures used for administration of VPA by enteral tube feeding. We found that the average blood concentration of VPA increased from

33.11 ± 19.14 μg/mL before the intervention to 67.69 ± 21.70 μg/mL after implementation of interventional measures, suggesting that these measures significantly promoted the rational use of VPA in the ICU.

Monitoring blood VPA concentrations not only helps to improve drug efficacy, but also helps to reduce adverse drug reactions (Shaikh et al., 2018). In this study, on measuring blood VPA concentrations, we found irrational use of the drug in the ICU, in the form of co-medication with carbapenem antibiotics. There have been many reports suggesting that carbapenem antibiotics significantly reduce the blood concentration of VPA by inhibiting the conversion of sodium valproate glucuronide to free sodium valproate (9-12). We also observed the use of inappropriate protocols by nurses for administration of the drug via tube feeding. In order to prevent the irrational use of VPA in the ICU, the clinical pharmacists trained the concerned medical staff. This measure was supplemented by reminders and warning alerts to prevent co-medication with meropenem or imipenem/cilastatin sodium in 88 patients post-intervention.

Another important reason for the low blood concentrations of VPA in ICU patients was the apparent loss of drug during tube feeding (of 57 patients, 32 (56.1%) were administered VPA by tube feeding). This resulted in a significantly decreased dose of VPA. In order to solve this problem, clinical pharmacists formulated standard operating procedures for administration of the drug by tube feeding, including: (1) modification of the grinding method, i.e., from grinding on paper to grinding in a specialized mortar. (2) use of warm water to rinse the syringe after administration, and injection of the remaining drug. (3) rinsing the feeding tube with 20 mL of warm water after drug administration, to prevent the drug from remaining on the tube wall. (4) avoiding co-administration of montmorillonite powder and valproate tablets while tube feeding, and (5) replacing nasointestinal tubes with nasogastric tubes, because VPA is absorbed in the stomach. These interventions significantly increased blood concentrations of the drug.

In fact, irrational drug combinations and inappropriate procedures adopted during drug administration are medication errors. Medication errors refer to any kind of improper use of therapeutic or prophylactic medicines that can be prevented in clinical practice (13), such as prescription errors, errors in drug dispensing and distribution, errors in drug administration and monitoring, errors in medication guidance, as well as errors in drug regulation (14-16). Reports have showed that drug administration by tube feeding easily caused medication errors (17-20). In this study, the two main medication errors were prescription errors and drug administration errors. There were numerous instances of the latter, such as improper use of the administration tool, leading to a certain amount of the drug remaining on the paper, and improper administration procedures, like not rinsing the tube after drug administration, resulting in residual drug adhering to the tube wall. In some cases, the enteral tube was incorrectly placed. The major reason for these medication errors was that the concerned medical staff lacked specialized knowledge and skills. Some clinicians in the ICU were not aware that VPA should not be given concomitantly with carbapenem antibiotics. The nurses also had insufficient knowledge regarding the administration of drugs by enteral tube feeding.

The third reason for the low blood concentrations of drug in this study was that the tablet form of VPA is not the optimal formulation for tube feeding. The majority of critically ill patients are in a coma, so the optimal dosage form is an injectable dosage form to avoid tube feeding, or oral solution and syrups which are used by tube feeding. In hospitals that have a large number of critically ill patients admitted, formulations that are better suited for tube feeding, such as oral solutions or syrups, or injections should be considered.

Conclusions

On further inspection of the tube administration procedures adopted by nurses, we found significant medication errors for

other drugs as well in the ICU. For example, we discovered that the practice of administration of controlled-release formulations, warfarin, co-administration of montmorillonite powder and other drugs, long-term administration of nifedipine tablets, and others, all through tube feeding, as prescribed by the attending clinicians, was prevalent in the ICU. We have standardized all enteral tube administration procedures in the ICU. In conclusion, the interventional measures instituted by the clinical pharmacists at our hospital have significantly promoted the rational use of sodium valproate in the ICU.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to professor Xuhui Tong for revising the manuscript.

Funding

This work is supported by the 512 Talent Cultivation Plan Foundation of Bengbu Medical College (No. by51201320).

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

MY and JC drafted the manuscript. SW and BW collected the samples, HL analyzed the data and constructed the graphs. JS revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Ethics approval

Ethics approval and consent to participate Ethics approval (approval no. 2022KY012) was obtained from the Ethics Committee of The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College (Bengbu, China) and written informed consent was obtained from each patient.

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1.Shaikh AS, Liu H, Li Y, Cao L and Guo R: Therapeutic drug monitoring of valproic acid. Pakistan journal of pharmaceutical sciences 31:1773-1776, 2018

2.Brookes R L, Crichton S, Cda W, *et al:* Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, is associated with reduced stroke risk after previous ischemic stroke or transient ischemic attack. Stroke 49:54-61, 2018

3.Faggi L, Pignataro G, Parrella E, *et al:* Synergistic association of valproate and resveratrol reduces brain injury in ischemic stroke. International Journal of Molecular Sciences 19:172-186, 2018

4.Lan X, Mo K, Nong L, He Y and Sun Y: Factors Influencing Sodium Valproate Serum Concentrations in Patients with Epilepsy Based on Logistic Regression Analysis. Med Sci Monit 27:e934275, 2021

5.Tseng YJ, Huang SY, Kuo CH, *et al:* Factors to influence the accuracy of albumin adjusted free valproic acid concentration. J Formos Med Assoc 120:1114-1120, 2021
6.Charfi R, Lakhal M, Klouz A, Trabelsi S and Salouage I: Therapeutic Drug Monitoring of Valproic Acid in Children: A Prospective Study of The Effect of The Compliance and The Economic Level on the Trough Plasmatic Concentrations and Epileptic Seizures. Therapie 70:415-24, 2015
7.Ben Mahmoud L, Hakim A, Ghozzi H, *et al:* Influence of age and co-medication on the steady-state pharmacokinetics of valproic acid in Tunisian patients with epilepsy. Rev Neurol (Paris) 173:159-163, 2017
8.Michelucci R: Optimizing therapy of seizures in neurosurgery. Neurology 67:S14-8, 2006
9.Chen IL, Lee CH, Hsiao SC and Shih FY: Interactions between carbapenems and valproic acid among the patients in the intensive care units. J Crit Care 62:151-156, 2021
10.Thomas C, Priano J and Smith TL: Meropenem as an antidote for intentional valproic acid overdose. Am J Emerg Med 38:690.e1-690.e2, 2020
11.Yang X, Jiang Z, Jiang Y, *et al:* Determination of valproic acid and its six metabolites in human serum using LC-MS/MS and application to interaction with carbapenems in epileptic patients. Biomed Chromatogr 37:e5572, 2023
12.Huang CR, Lin CH, Hsiao SC, *et al:* Drug interaction between valproic acid and carbapenems in patients with epileptic seizures. Kaohsiung J Med Sci 33:130-136, 2017
13.Jin H, Xiao Z, Li M, Fu Q and Duffy VG: How do medication errors occur in the nursing communication process? Investigating the relationship between error types and error factors. Work 74:327-339, 2023
14.Rosenbloom JI, Sabol BA, Chung C, *et al:* Improving medication error identification with an inpatient maternal-fetal medicine pharmacist. Am J Obstet Gynecol 220:602-603, 2019
15.Manias E: Effects of interdisciplinary collaboration in hospitals on medication errors: an integrative review. Expert Opin Drug Saf 17:259-275, 2018
16.Marufu TC RN, Bower R RN, *et al:* Nursing interventions to reduce medication errors in paediatrics and neonates: Systematic review and meta-analysis. J Pediatr Nurs 62:e139-e147, 2022
17.Joos E, Verbeke S, Mehuys E, *et al:* Medication administration via enteral feeding tube: a survey of pharmacists' knowledge. Int J Clin Pharm 38:10-5, 2016
18.Boullata JI: Enteral Medication for the Tube-Fed Patient: Making This Route Safe and Effective. Nutr Clin Pract 36:111-132, 2021
19.Emami S, Hamishehkar H, Mahmoodpoor A, *et al:* Errors of oral medication administration in a patient with enteral feeding tube. J Res Pharm Pract 1:37-40, 2012
20.Boullata JI: Drug administration through an enteral feeding tube. Am J Nurs 109:34-42, 2009

基于风险矩阵法分析某院近三年药品不良反应现状与风险水平评估研究

吴永森，丁楠楠，卞芳，章激

湖北文理学院附属医院 襄阳市中心医院 442000

【摘要】目的：了解襄阳市某三甲医院上报药品不良反应的特点与现状，采用风险矩阵法对上报药品进行风险水平再评估，发现需重点监测药品类型，提出促进药品不良反应风险有效管理的措施，以减少患者的用药风险。**方法：**选取襄阳市某三甲医院 2013 年-2016 年上报至国家不良反应监测中心的药品不良反应报告，采用描述性统计方法，分别计算历年上报药品和涉及不良反应患者的年龄、性别以及药品的类型、剂型、不良反应严重程度及累及的器官等方面的分布数量与构成比情况；利用文献分析和专家咨询对所发生的不良反应进行分级评分，确定各药品发生不良反应的严重程度水平；统计分析各药品的使用消耗量和使用频度，计算各药品不良反应的发生频率，由此计算各药品的风险指数（不良反应严重程度乘以发生频率），并建立各药品的风险矩阵图，确定临床使用中出现的高风险区域药品的类型。**结果：**2013 年至 2016 年间，襄阳市某三甲医院共上报 685 例药品不良反应报告，涉及 205 种药品。药品不良反应多发生在中老年患者人群，剂型主要以注射剂为主;不良反应的症状主要表现为胃肠系统、血液及淋巴系统、皮肤及附件损害。应用风险矩阵法对各类药品进行风险再评估发现，药品不良反应的发生频率和严重程度均高于平均值，处于高风险区域的药物主要为抗肿瘤药和抗感染药。在抗肿瘤药物中，奥沙利铂、环磷酰胺、依托泊苷、伊立替康、多西他赛、吉西他滨为高风险区域药品；在抗感染药物中，夫西地酸钠、磺苄西林钠为高风险区域药品；在中药注射剂中，血必净、疏血通为高风险区域药品；心血管药物中，硝酸异山梨酯、单硝酸异山梨酯、特拉唑嗪为高风险区域药品。**结论：**医疗机构应关注中老年患者的用药风险问题，对抗肿瘤药和抗感染药，特别是这些药品中的注射剂实施重点监测和采取风险控制措施；在医院管理层面建立药品的使用频次，不良反应发生率和严重性案例的收集和汇总工作；在技术层面建立风险矩阵法，对不良反应进行实时风险再评估，及时发现高风险药品，提高医疗机构药品风险管理能力，最小化用药风险，保障患者临床安全用药。

【关键词】医院；药品不良反应；发生频率；严重程度；风险矩阵评估

A Study on the Status and Risk Assessment of Adverse Drug Reactions in a Hospital in Hubei Province——Based on Risk Matrix Analysis

Wu Yongsen，Ding Nnanan，Bian Fang，Zhang Ji

Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science 442000

【Abstract】Objective: This article aims are to investigate the characteristics and status of adverse drug reactions（ADR）reported by a tertiary hospital in Xiangyang City, Hubei Province, and evaluate the risk level of the reported drugs using the risk matrix method, then to find the drug types monitored specially, and further put forward promoting measures of the effective control of ADRs to ensure the patients' safety. **Methods:** ADR cases, which were reported to the monitoring center of national adverse reaction between 2013 and 2016, were collected from a tertiary hospital in Xiangyang City. Using a descriptive statistics method, we calculated the quantitative distribution and composition ratios of all drugs in annual reports, patients' age and sex, drug categories, dosage form distribution, severity as well as damages to human organs involved in ADRs. Then, we evaluated the rating grade and score of ADRs severity by literatures analysis and

experts' consultation. At the same time, We investigated drug consumption and daily defined doses (DDDs) and calculated the frequency of occurrence ADR. The risk scores were got by the multiplying of ADRs severity and the frequency of ADRs occurrence. Establishing a risk matrix for each drug is to determine the type of drug in the high risk area that appears in clinical use. **Results:** Among 685 ADR cases, there are 205 drug types. Most of the adverse drug reactions occur in the middle-elderly population involving pharmaceutical injection formulations. Adverse reactions are mainly manifested as gastrointestinal system, blood and lymphatic system, skin and accessories damage. According to the risk matrix method for risk assessment of various drugs, anti-tumor and anti-infective drugs lie in the high risk area, because the severity of ADRs and the frequency of ADRs occurrence were higher than the average. Meanwhile, among the anti-tumor drugs, Oxaliplatin, Cyclophosphamide, Etoposide, Irinotecan, Docetaxel, and Gemcitabine are high-risk area drugs. Sodium Fusidate and Sulbenicillin Sodium are high-risk area drugs in anti-infective drugs. Moreover, in Chinese traditional medicinal injection, Xuebijing and Shuxuetong are high-risk area drugs. In addition, Isosorbide Dinitrate, Isosorbide Monoitrate and Terazosin are high-risk area drugs in cardiovascular drugs. **Conclusions:** Medical institutions should pay more attention to the drug risk management in middle-aged and elderly patients. Specially, monitoring measures should be adopted to manage the anti-tumor and anti-infective injections. At the hospital management level, it is essential to collect and review drug DDD, the occurrence rate of ADR and the most serious cases; At the technology level, it is necessary to find high-risk drugs according to the risk matrix method and improve the management competence of medical institutions for control drug risk in order to ensure the safety of drug use.

【**Key words**】Hospital； Adverse drug reactions； Occurrence frequency； Severity； Risk matrix assessment

1.1 药品不良反应的定义与类型

药品不良反应（Adverse Drug Reaction, ADR）的概念世界卫生组织（WHO）定义为：“正常剂量的药品用于人体作为预防、诊断、治疗疾病或调节生理功能用途时出现的有害的和与用药目的无关的反应”[1]。我国《药品不良反应报告和监测管理办法》（卫生部令第 81 号，2011 年）对药品不良反应的定义是指，合格药品在正常用法用量下出现的与用药目的无关的有害反应[2]。严重药品不良反应是指，因使用药品引起以下损害情形之一的反应：导致死亡；危及生命；致癌、致畸、致出生缺陷；导致显著的或者永久的人体伤残或者器官功能的损伤；导致住院或者住院时间延长；导致其他重要医学事件，如不进行治疗可能出现上述所列情况的[3]。

药品作为与人类健康密切相关的一种特殊商品，在使用过程中具有二重性，一方面对人体有防治疾病的作用，另一方面发生有害作用的潜在风险。药品风险是指在使用药品过程中，对个人或人群造成用药伤害或损失事件发生的可能性[4]。药品风险既包括药品使用过程中潜在危害，也包括药品使用中造成的既成性伤害。

1.2 药品风险的类型

按照药品生命周期不同阶段分类，可分为药品缺陷风险，药品供应风险，药品使用风险；按照药品风险可预测性分类，可分为已知风险，可预测风险，未知风险；按照药品风险可控性分类，可分为可控制风险，不可控制风险；按照药品风险可接受程度分类，可分为可接受风险，合理风险，不可接受风险[5]。

1.3 风险评估方法在药品管理领域的应用

风险评估作为风险管理的关键程序之一，主要用于指导风险应对。在药品领域，风险评估的期望是评估药物对患者的风险，并且将其控制在一个可以接受的水平。依据 WHO 和 FDA 的风险分析指南，可知国际上使用的 7 种主要风险评估工具：可支持的统计学方法、风险排序与过滤法、失误树分析法(Fault Tree Analysis, FTA)、风险可操作性分析法（Hazard Operability Analysis, HAZOP）、风险分析与关键控制点法（Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP）、失败模式影响分析法（Failure Mode Effects Analysis, FMEA）、预期风险分析（Preliminary Hazard Analysis, PHA）。

目前我国对药品风险管理越来越重视，各种风险管理模式逐步引入药品领域，已有不少国内学者运用风险评估工具对药品风险进行评估。失败模式影响分析法（FMEA）在药品生产领域的应用，如 2013 年田英娜等对药品生产制粒工艺进行了 FMEA 分析[6]；风险分析与关键控制点法（HACCP）在中药注射剂生产质量管理中的

应用，如 2012 年陈芳等对中药注射剂生产进行了 HACCP 分析[7]；故障树分析法在新药的体外遗传毒性试验中的评价应用，如 2015 年李慧等在新药的安全性评价中使用了故障树分析法[8]。

医院药品风险管理主要是对用药过程产生的风险进行管理，可通过药品不良反应风险管理来实现，药品不良反应风险评估是其中的关键一环。国内目前并无比较有效的风险评估工具对医院用药过程的不良反应风险进行评估。2012 年卫生部《突发事件公共卫生风险评估管理办法》中提出的四种风险评估方法：专家会商法、德尔菲法、风险矩阵法、分析流程图法，逐步应用于突发公共卫生事件风险中，取得了一定的效果[9]。

风险矩阵法是一种识别项目管理中风险重要性的结构化方法，还可用于评估项目风险潜在影响。这是由美国空军电子系统中心采办工程小组首先提出的一种风险评估方法，并应用此法对各个项目风险进行评估[11]。风险矩阵是一个二维矩阵，将风险的概率和风险影响分配到矩阵中，不同的风险会落入不同的风险区域。目前国内已开展风险矩阵法进行项目风险管理，主要运用于金融、企业管理、项目开发等领域，如李云玮（2015）等建立风险矩阵模型评估 p2p 网贷风险[12]；郭彦伟（2016）等运用风险矩阵对隧道洞口失稳进行风险评估[13]；解秦保（2017）等采用风险矩阵法对海洋石油工程海外项目风险进行管理[14]。国内学者已将风险矩阵法引入医药卫生领域，如在公共卫生风险管理中已有一定的应用，2008 年利用风险矩阵法对北京奥运会期间各类公共卫生事件进行风险评估，为风险控制决策提供指导性建议[15]。由于药品风险的特殊性，其他领域的风险矩阵指标不适合药品风险，需要建立适用于药品风险评估的风险矩阵。目前吴长青、朱文涛等尝试建立风险矩阵对药品风险进行评估[16]，以药品不良反应发生率和严重程度二维来评价药品风险，不同风险区域的药品采取相应的风险管理措施。

研究方法与资料来源

2.1 研究方法

应用 Microsoft Excel 2010 对各年度不良反应上报的基本情况（例数、年龄、性别、损害部位、药品类别等）进行描述性研究。

建立药品不良反应严重程度分级评分标准，计算药品不良反应严重程度。根据各药品年使用量和限定日剂量（DDD），计算各药品年使用频度（DDDs），即年使用人次数。应用 Microsoft Excel 2010 对不良反应情况按时间、药品分类统计，对不良反应风险指数等进行计算，并建立各种不同类型药品的风险矩阵图。

（1）药品的使用频度（DDDs）：药品的使用频度=药品的消耗量/药品限定日剂量[27]

（2）药品不良反应的严重程度：药品不良反应的严重程度=各个药品不良反应症状对患者健康损害程度之和。对每个药品不良反应（ADR）症状的健康损害程度赋值，计算每个药品所有 ADR 症状的分值，用以衡量 ADR 的严重程度。

（3）药品不良反应发生频率＝不良反应发生例数/药品使用频度×100%

（4）依据风险的定义，药品的风险指数=不良反应发生频率×严重程度，从而计算出各个药品的风险指数，对其进行排序。

再计算药品不良反应发生频率、严重程度分值的对数值，分别在横轴、纵轴绘制风险矩阵图。

2.2 资料来源

2.2.1 数据来源

从国家不良反应监测系统抽取襄阳市某三甲医院 2019、2020、2021、2022 上报的、国家不良反应中心已接受的 685 例不良反应；通过医院 HIS 系统计算襄阳市某三甲医院四年各药品消耗使用情况。

2.2.2 数据处理

应用 Microsoft Excel 2010 对相关的数据结果进行处理，共计 685 例不良反应。其中 2019 年 276 例，2020 年 12 例，2021 年 188 例，2022 年 209 例，并将其按 ADR 报告时间、ADR 例数、一般症状及严重症状例数分别进行了汇总。

2.3 相关标准的制定

2.3.1 药品分类的标准：目前的不良反应文献关于药品分类的标准比较多，本次研究主要人民卫生出版社的《药理学》第五版、《新编药物学》第 16 版和 WHO 药品分类将本次涉及的药品分为调节水、电解质及酸碱平衡药，

呼吸系统疾病用药，激素类及影响内分泌药物，抗变态反应药，抗感染药物，抗肿瘤药物（包括　免疫调节药），麻醉药及辅助麻醉药，泌尿生殖系统疾病用药，皮肤科用药，生化制剂、酶类、生物制品，维生素、复方氨基酸制剂及其它营养药，消化系统用药，心血管系统用药，血液及造血系统用药，眼科用药，诊断用药及消毒用药，中枢神经系统用药，中药，其它。

2.3.2 药品 DDD 值：限定日剂量（Defined daily dose DDD）作为测定药物利用的单位，其定义为用于治疗目的成人的药物平均日剂量[28]。本次研究 DDD 值的确定主要采用 WHO-ATC 系统里的 DDD 或根据药品说明书确定 DDD，具体 DDD 值确定规则[29]：（1）药品说明书的规定量为一定范围时取平均值；（2）药品规范剂量及单位是根据药品规格来制定，固态药品：活性物质重量或单位；溶液：溶质重量或单位及溶媒体积，液态药品：液态药品体积；复方制剂以各成分活性物质的总量表示，无成分量时可用制剂最小单位来表述；（3）儿童成人共用药品：取成人量作为其 DDD；（4）预防治疗药品：取治疗量作为其 DDD；（5）首次剂量与维持剂量不同的药品：取维持量作为其 DDD；（6）说明书以体重或体表面积给药的药品：均以成人体重 70kg 或以成人体表面积 1.70m^2 计算值作为 DDD 值。

2.3.3 药品不良反应严重程度分级评分标准的制定

由于不良反应的复杂性，目前对于不良反应的严重程度没有统一的分级标准。现有的不良反应严重程度分级标准常基于症状持续时间、对身体造成的损害是否可逆、对患者的生活和工作的影响以及是否危及生命来区别。以下是目前各种国内外药品不良反应严重程度的分级标准。

2.3.3.1 世界卫生组织（WHO）药品不良反应严重程度分级标准[30]

I 级:有生命危险，需要立即停药和急救，或不良反应持续超过 1 个月；

II 级:患者症状明显，各器官病生理改变或检验异常，被迫停药和特殊治疗，对患者健康有直接影响，或不良反应持续超过 7 天；

III 级:患者不能耐受，被迫停药或减药，一般对症治疗后好转，对患者康复无直接影响；

V 级:患者可耐受，不需要停药或减药，一般对症处治疗后好转，或不需处理即恢复快，对患者康复无直接影响。

2.3.3.2 现有文献报道的药品不良反应严重程度分级标准[31]

轻度:反应轻微，症状不发展，不需要治疗，不影响工作、生活；

中度:症状明显，中度损害重要脏器，轻度影响工作、生活；

重度:严重损害重要脏器、系统，严重影响工作、生活，甚至缩短或危及生命、致残、丧失劳动力。

2.3.3.3 药品不良反应报告和监测管理办法(局令第 7 号)称药品严重不良反应是指因服用药品引起以下损害情形之一的反应[32]：

(1)引起死亡

(2)致癌、致畸、致出生缺陷

(3)对生命有危险并能够导致人体永久的或显著的伤残

(4)对器官功能产生永久损伤

(5)导致住院或住院时间延长

2.3.3.4 李利军等在对药品不良反应严重程度分级评分标准的制定及药品不良反应严重度指数的应用研究中[33]，提出按 ADR 对患者的危害程度及体现临床药学关注程度的分级标准，对不同程度的不良反应进行赋值进行量化分析如表 2-1 所示。

表 2-1 药品不良反应严重程度分级评分

药品不良反应严重程度分级	计分(分)
1 级：轻微的药品不良反应症状或疾病，停药后很快好转，无需治疗	1
2 级：造成病人短暂损害 ，不需要住院或延长住院时间，需要治疗或干预，易恢复	2
3 级：造成病人短暂损害 ，门诊病人需住院，住院病人需延长住院时间	3

4 级：造成病人永久性损害	4
5 级：对生命有危险	5
6 级：死亡	6

结合上述各种不良反应严重程度分级标准和专家问卷调查，建立本次研究中的药品不良反应严重程度分级评分标准表，不同的不良反应症状对患者产生不同程度的健康损害，按统计学的分位数原则划分严重程度，从轻到重的顺序分别赋予相应的分值为 0.25、0.5、0.75、1，以便于对于各个药品不良反应严重程度进行量化统计。本次研究中涉及到的药品不良反应症状的评分如表 2-2 所示。

表 2-2 药品不良反应严重程度分级标准

药品不良反应严重程度分级	健康损害程度计分（分）	具体不良反应症状表现
1 级：存在轻微的反应或疾病，症状不发展，一般无需治疗	0.25	恶心、呕吐、心慌、心悸、头痛、头晕、腹泻、腹胀、便秘、乏力、尿频、尿液异常、胃胀、烦躁不安等。
2 级：造成病人短暂损害，需要治疗或干预，易恢复。	0.5	皮疹、荨麻疹、发热、瘙痒、全身性水肿、肝功能异常等
3 级：造成病人永久性损害或对生命有危害。	0.75	骨髓抑制、过敏性休克、严重多形性红斑等
4 级：死亡	1	死亡

2.3.4 药品不良反应风险水平的判断标准

计算所有药品 ADR 的发生频率和 ADR 所致健康损害的严重程度的平均值，对药品 ADR 发生频率和严重程度高于平均值的，依据风险矩阵的思想，被视为处于高风险区域的药品，反之亦然；对高风险区域药品，在临床治疗中应重点加强管理和监测。

医院药品不良反应现状与风险水平评估的结果与分析

3.1 调查医院 2019-2022 年度药品不良反应报告的基本情况

3.1.1 各年度不良反应和新的、严重的不良反应例数

2019-2022 年调查医院上报不良反应 685 例，其中 2019 年上报的不良反应为 276 例，新的、严重的不良反应 12 例（4.3%）；2020 年上报的不良反应为 12 例，无新的、严重的不良反应；2021 年上报的不良反应为 188 例，新的、严重的不良反应 4 例（2.1%）；2022 上报的不良反应为 209 例，新的、严重的不良反应 20 例（9.6%）。

从上面可以看出，从 2019 年出现不良反应上报情况数量偏少，其他各年度不良反应数量均维持在 200 例左右，数量仍偏少，未出现逐年上升的情况，这可能与医院对不良反应监测不够重视、不良反应监测信息化程度不高、医务人员对不良反应认识存在误区等有关。新的、严重的不良反应数量和比例偏低，《药品不良反应报告和监测管理办法》中指出新的、严重的不良反应是我国不良反应报告和监测的重点，其报告的数量和比例是评价药品不良反应监测的重要指标。目前该院新的、严重的不良反应报告比例远低于我国目前的比例，更远远低于其他欧美国家的比例。加强不良反应监测特别是新的、严重的不良反应监测是医疗机构不良反应风险监测的重点。

3.1.2 发生药品不良反应患者年龄的分布情况

685 例不良反应中，对发生不良反应患者的年龄按照 0-10 岁、11-20 岁、21-30 岁、31-40 岁、41-50 岁、51-60 岁、61-70 岁、71-80 岁进行统计分析，其结果如表 2-3 所示。

表 2-3 发生不良反应患者年龄分布情况

年龄分段	发生不良反应例数	构成比（%）
0-10 岁	47	6.8
11-20 岁	20	2.9
21-30 岁	37	5.4
31-40 岁	56	8.2
41-50 岁	144	21.1
51-60 岁	175	25.5
61-70 岁	143	21.0
71-80 岁	58	8.5
大于 80 岁	5	0.7
总数	685	100

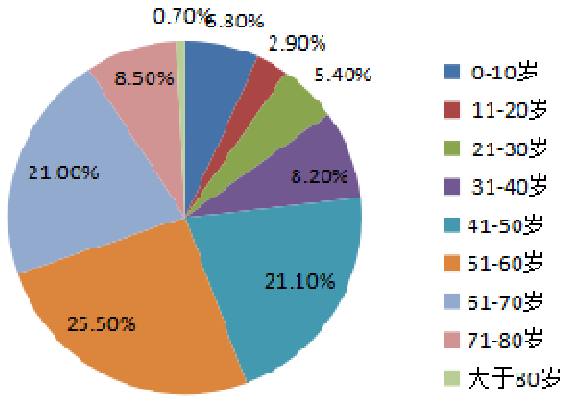


图 2-2　发生不良反应患者年龄分布图

从图 2-2 中可以看出随着年龄的增长，不良反应呈现不断增多的趋势，主要表现为大于 40 岁的患者不良反应明显增多，且出现不良反应的数量占总数的大部分。已有相关的报道老年人药动学改变、合并用药等原因在用药过程中容易发生不良反应[34]，与本次研究结果基本相符。对于老年人群应严格把握用药的适应症、用法用量以及合并用药，在临床用药过程中，应更注意不良反应的风险，严密监测不良反应情况和及时处理。

3.1.3 发生药品不良反应的患者性别分布

上报的 685 例不良反应中，对发生不良反应患者的性别进行统计分析，其结果为男性患者 312 例，女性患者 373 例，运用卡方检验进行统计分析，无统计学意义上的显著性差异。

3.1.4 药品不良反应累及疾病系统情况

对上报的 685 例不良反应中累及的疾病系统进行分类分析，统计结果见表 2-4 所示。

表 2-4 不良反应累及疾病系统情况

不良反应累及系统	例数	构成比（%）	不良反应表现
胃肠系统损害	302	43.5	恶心 呕吐 腹泻 胃不适 食欲不振 胃肠道反应 进食差 腹痛 乏力 胃胀 胃灼热 消化道灼热
血液及淋巴系统	125	20	骨髓抑制 造血系统反应 白细胞升高 红细胞减少 白细胞减少
皮肤及附件损害	130	18.7	皮疹　瘙痒　红疹 潮红 荨麻疹 多行型红斑

中枢及外周神经系统损害	52	7.5	头痛 头晕 局部麻木 局部颤抖 局限性抽搐
心血管系统损害	28	4	心悸 心慌 胸闷
全身性损害	12	1.7	全身性水肿 休克 寒颤发热 过敏性反应 过敏性休克
肝胆系统损害	12	1.7	肝功能轻度异常 肝功能异常
肌肉骨骼系统损害	8	1.2	肌痛 关节痛
用药部位损害	7	1	注射部位疼痛 用药部位麻木
泌尿系统损害	7	1	血尿 肾功能轻度异常
呼吸系统损害	6	0.9	呼吸困难 喘鸣
视觉障碍	6	0.9	视力异常 视物模糊
总数	695	100	

从表 2-3 中可以看出不良反应损害主要以胃肠系统损害（43.5%）为主，血液及淋巴系统损害（20%）第二，皮肤及附件损害（18.7%）次之，这与国内文献报道相似[35]。

3.1.5 发生不良反应的药品剂型和给药途径分布情况

685 例药品不良反应报告中涉及的药品剂型分布如图 2-3 所示，注射剂（包括注射液、粉针等）540 例占 78.8%、口服制剂（包括片剂、胶囊、丸剂、软胶囊、颗粒、口服溶液、缓释片、干混悬剂、滴丸等）140 例占 20.4%、其他制剂（栓剂、乳膏、滴眼液）5 例占 15.8%。给药途径以静脉滴注为主，口服次之。这与相应的文献报道和我国 2015 年度不良反应监测报告中指出的注射剂发生严重不良反应比例相一致。

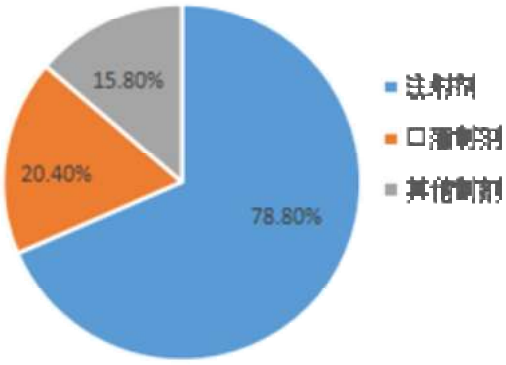


图 2-3 发生不良反应药品剂型分布图

3.2 发生不良反应药品的风险水平再评估结果

3.2.1 205 种药品的风险指数和风险矩阵

本次研究中发生不良反应的药品共 205 种，各药品 DDD 根据药品 DDD 值的确定原则分别进行确定，药品消耗量主要根据 2013-2016 年某医院药品销售使用情况统计而得，从而运用 Microsoft Excel 2010 根据药品使用频度 DDDs=药品消耗量/药品 DDD 计算出各药品使用频度。应用 Microsoft Excel 2010 计算各药品 ADR 例数和 ADR 严重程度。根据风险指数=不良反应严重程度 ×不良反应发生频率（ADR 例数/DDDs），并对其进行排序，结果如表 2-5 所示。以各药品不良反应发生频率的对数值为横坐标、严重程度的对数值为纵坐标，以发生频率的平均值和严重程度的平均值的常用对数为横纵坐标轴交叉点，建立各药品风险矩阵图 2-4 所示，将其划分为四个风险区域。

表 2-5　205 种药品的消耗量、DDD、DDDs 值以及风险指数值

药品名称	DDD	药品消耗量	DDDs	ADR 例数	ADR 发生频率（*10^{-4}）	ADR 严重程度	风险指数（*10^{-5}）
注射用奥沙利铂	220mg	6639550mg	30179	60	19.88	30.25	6014.12
注射用环磷酰胺	0.3g	5443.6g	18145	41	22.60	15.75	3558.83
注射用盐酸伊立替康	590mg	1190320mg	2017	11	54.54	5.50	2999.50
依托泊苷注射液	136mg	541500mg	3982	13	32.65	6.50	2122.05
多西他赛注射液	123mg	10172223mg	82701	54	6.53	28.50	1860.92
注射用奈达铂	150mg	1757710mg	11718	18	15.36	9.25	1420.89
注射用夫西地酸钠	1.5g	2575.75g	1717	7	40.77	2.75	1121.14
顺铂注射液	34mg	380760mg	11198	17	15.18	6.75	1024.74
注射用异环磷酰胺	1.2g	1649g	1374	6	43.67	2.00	873.36
注射用盐酸吉西他滨	1.7g	99347g	58439	31	5.30	14.50	769.18
注射用达卡巴嗪	0.5g	244.6g	489	2	40.90	1.25	511.25
注射用磺苄西林钠	15.0g	200043g	13336	12	9.00	5.50	494.90
血必净注射液	100ml	791680ml	7916	9	11.37	4.25	483.20
培门冬酶注射液	4250iu	678750iu	159	1	62.89	0.50	314.47
紫杉醇注射液	0.3g	26834g	89447	19	2.12	10.75	228.35
注射用培美曲塞二钠	0.85g	11981.5g	14095	8	5.68	2.75	156.08
阿奇霉素注射液	0.5g	359.5g	719	2	27.82	0.50	139.08
盐酸左氧氟沙星注射液	0.5g	97238g	194476	26	1.34	10.00	133.69
注射用头孢呋辛钠	3.0g	172191g	57397	11	1.92	5.50	105.41
注射用酒石酸长春瑞滨	6mg	18760mg	3126	2	6.40	1.50	95.97
氟尿嘧啶注射液	0.9g	12091.25g	13434	5	3.72	2.25	83.74
注射用甲泼尼龙琥珀酸钠	1g	1286.12g	1286	2	15.55	0.50	77.76
注射用三氧化二砷	12mg	25830mg	2152	2	9.29	0.75	69.70
碘海醇注射液	60ml	400350ml	6672	3	4.50	1.50	67.45
注射用硝酸异山梨酯	20mg	59540mg	2977	2	6.72	1.00	67.18
注射用头孢替唑钠	6.0g	627587g	104597	12	1.15	5.25	60.23
注射用盐酸吡柔比星	55mg	269120mg	41256	7	1.70	3.50	59.39
注射用亚叶酸钙	20mg	1743800mg	87190	9	1.03	5.50	56.77
替吉奥胶囊	40mg	1266240mg	31656	5	1.58	3.50	55.28
注射用替考拉宁	0.4g	2056g	5140	2	3.89	1.25	48.64
疏血通注射液	6ml	125762ml	20960	5	2.39	2.00	47.71
注射用五水头孢唑林钠	3.0g	12653g	4217	2	4.74	1.00	47.43
碘克沙醇注射液	30ml	294700ml	9823	3	3.05	1.50	45.81
注射用顺铂	34mg	37865mg	1114	1	8.98	0.50	44.88
甲磺酸阿帕替尼片	0.85g	3005g	3535	2	5.66	0.75	42.43
羟喜树碱注射液	20mg	23885mg	1194	1	8.38	0.50	41.88
阿莫西林克拉维酸钾片(7：1)	1.0g	4842g	4842	2	4.13	1.00	41.31
注射用唑来膦酸	4mg	19548mg	4887	2	4.09	1.00	40.92
注射用哌拉西林舒巴坦钠	14.0g	303530g	21680	4	1.85	2.00	36.90
异烟肼注射液	0.35g	661g	2203	1	4.54	0.75	34.04

复方氨基酸注射液(9AA)	375ml	562500ml	1500	1	6.67	0.50	33.33
单硝酸异山梨酯注射液	20mg	735520mg	36776	7	1.90	1.75	33.31
注射用美洛西林钠舒巴坦钠(4:1)	7.6g	394883g	51958	6	1.15	2.75	31.76
注射用硫酸长春新碱	1.5mg	3598mg	2398	1	4.17	0.75	31.28
注射用头孢西丁钠	6.0g	216811g	36135	5	1.38	2.25	31.13
注射用盐酸阿柔比星	30mg	27360mg	912	1	10.96	0.25	27.41
注射用头孢硫脒	3.0g	93785g	31261	4	1.28	2.00	25.59
小儿复方氨基酸注射液(18AA-Ⅰ)	20ml	294480ml	14724	3	2.04	1.25	25.47
苦黄注射液	35ml	143910ml	4111	1	2.43	1.00	24.32
岩黄连注射液	4ml	4210ml	1053	1	9.50	0.25	23.75
注射用伏立康唑	0.4g	423.5g	1058	1	9.45	0.25	23.63
注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠	4.0g	64602g	16150	3	1.86	1.25	23.22
注射用头孢孟多酯钠	6.0g	191248g	31874	4	1.25	1.75	21.96
卡培他滨片	4.25g	73140g	17209	3	1.74	1.25	21.79
注射用头孢他啶	4.0g	140366g	35091	4	1.14	1.75	19.95
聚维酮碘乳膏	0.2g	4512g	22560	3	1.33	1.50	19.95
盐酸特拉唑嗪片	10mg	25742mg	2574	1	3.89	0.50	19.43
卡莫氟片	800mg	1261200mg	1576	1	6.35	0.25	15.86
醋甲唑胺片	0.2g	951g	4755	1	2.10	0.75	15.77
盐酸利多卡因注射液	270mg	3600600mg	13335	2	1.50	1.00	15.00
药用炭片	6g	165150g	27525	4	1.45	1.00	14.53
雷公藤多苷片	75mg	1995000mg	26600	3	1.13	1.25	14.10
吉非替尼片	250mg	930000mg	3720	1	2.69	0.50	13.44
单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液	30mg	1174620mg	39154	3	0.77	1.75	13.41
注射用依托泊苷	130mg	498000mg	3830	1	2.61	0.50	13.05
静注人免疫球蛋白	1.8g	14239g	7910	1	1.26	1.00	12.64
尿路康颗粒	30g	60230g	2008	1	4.98	0.25	12.45
艾迪注射液	15g	247350g	16490	2	1.21	1.00	12.13
华蟾素注射液	15ml	139380ml	9292	2	2.15	0.50	10.76
注射用血栓通（冻干）	375mg	49205700mg	131215	6	0.46	2.25	10.29
注射用替硝唑	0.8g	8141g	10176	2	1.97	0.50	9.83
盐酸伊托必利分散片	150mg	392730mg	2618	1	3.82	0.25	9.55
盐酸氨溴索分散片	90mg	245700mg	2730	1	3.66	0.25	9.16
注射用阿莫西林钠克拉维酸钾	3g	162079g	54026	3	0.56	1.50	8.33
心脑清软胶囊	6 粒	18950 粒	3158	1	3.17	0.25	7.92
包醛氧淀粉胶囊	22.5g	149624g	6649	1	1.50	0.50	7.52
复方锌铁钙口服溶液	30ml	101060ml	3368	1	2.97	0.25	7.42
注射用七叶皂苷钠	15mg	815800mg	54386	4	0.74	1.00	7.35
盐酸克林霉素注射液	1.8g	24980g	13877	2	1.44	0.50	7.21
云胃宁胶囊	0.9g	29541g	32823	3	0.91	0.75	6.85
注射用亚胺培南西司他丁钠	2.0g	14938g	7469	1	1.34	0.50	6.69
乳果糖口服溶液	30ml	2815400ml	93846	4	0.43	1.50	6.39

注射用三磷酸腺苷二钠氯化镁	300mg	4843000mg	16143	2	1.24	0.50	6.19
复方甲氧那明胶囊	6 粒	160080 粒	26680	2	0.75	0.75	5.62
普瑞巴林胶囊	220mg	990000mg	4500	1	2.22	0.25	5.56
参麦注射液	35ml	1753580ml	50102	2	0.40	1.25	4.99
参芪扶正注射液	250ml	8289250ml	33157	2	0.60	0.75	4.52
布洛芬颗粒	0.8g	4752g	5940	1	1.68	0.25	4.21
维生素 AD 滴剂	1 粒	12240 粒	12240	1	0.82	0.50	4.08
缬沙坦氢氯噻嗪片	1 片	13503 片	13503	1	0.74	0.50	3.70
注射用美洛西林钠	6.0g	168862g	28143	1	0.36	1.00	3.55
注射用阿莫西林钠氟氯西林钠	5g	287841g	57568	2	0.35	1.00	3.47
注射用鹿瓜多肽	20mg	655624mg	32781	2	0.61	0.50	3.05
头孢地尼胶囊	0.6g	92044g	153406	3	0.20	1.50	2.93
注射用头孢曲松钠	2.0g	139796g	69898	2	0.29	1.00	2.86
注射用水溶性维生素	1 瓶	17896 瓶	17896	1	0.56	0.50	2.79
马来酸依那普利片	15mg	135165mg	9011	1	1.11	0.25	2.77
茶碱缓释片	0.4g	15213g	38032	2	0.53	0.50	2.63
注射用核糖核酸Ⅱ	200mg	3867850mg	19339	1	0.52	0.50	2.59
奥拉西坦注射液	4.0g	79915g	19978	1	0.50	0.50	2.50
双石通淋胶囊	6g	483732g	80622	2	0.25	1.00	2.48
注射用炎琥宁	600mg	6176880mg	10294	1	0.97	0.25	2.43
加巴喷丁胶囊	1.8g	18533g	10296	1	0.97	0.25	2.43
左乙拉西坦口服液	1g	10920g	10920	1	0.92	0.25	2.29
磷酸奥司他韦颗粒	150mg	3557100mg	23714	1	0.42	0.50	2.11
四逆散	18g	222912g	12384	1	0.81	0.25	2.02
脑苷肌肽注射液	12.5ml	315684ml	25254	1	0.40	0.50	1.98
维生素 K1 注射液	10mg	1271600mg	127160	2	0.16	1.25	1.97
吡嗪酰胺片	1g	26525g	26525	1	0.38	0.50	1.89
培哚普利片	4mg	54120mg	13530	1	0.74	0.25	1.85
注射用藻酸双酯钠	100mg	1359150mg	13591	1	0.74	0.25	1.84
盐酸贝那普利片	10mg	2241680mg	224168	4	0.18	1.00	1.78
盐酸非索非那定胶囊	150mg	8491680mg	56611	2	0.35	0.50	1.77
曲昔派特胶囊	0.3g	4256g	14187	1	0.70	0.25	1.76
天麻素注射液	0.8g	24309g	30386	1	0.33	0.50	1.65
醋酸甲地孕酮分散片	0.16g	2630g	16437	1	0.61	0.25	1.52
盐酸氨溴索注射液	37.5mg	6255675mg	166818	2	0.12	1.25	1.50
生脉注射液	40ml	1383100ml	34577	1	0.29	0.50	1.45
阿奇霉素干混悬剂	0.3g	5195.8g	17319	1	0.58	0.25	1.44
洛芬待因片	6 片	104300 片	17383	1	0.58	0.25	1.44
云南白药胶囊	1.5g	54864g	36576	1	0.27	0.50	1.37
蔗糖铁注射液	7.5ml	141000ml	18800	1	0.53	0.25	1.33
环吡酮胺阴道栓	1 枚	37695 枚	37695	1	0.27	0.50	1.33
注射用盐酸溴己新	4mg	163116mg	40779	1	0.25	0.50	1.23
醒脑静注射液	15ml	625180ml	41678	1	0.24	0.50	1.20

酚麻美敏片	6 片	132140 片	22023	1	0.45	0.25	1.14
阿法骨化醇软胶囊	0.5ug	167084ug	334168	3	0.09	1.25	1.12
碳酸钙 D3 片	2 片	181080 片	90540	2	0.22	0.50	1.10
乌灵胶囊	2.97g	136036g	45803	1	0.22	0.50	1.09
斑蝥酸钠维生素 B6 注射液	0.3mg	13745mg	45816	1	0.22	0.50	1.09
注射用单唾液酸四己糖神经节苷脂钠	30mg	1439320mg	47977	1	0.21	0.50	1.04
固肾安胎丸	3 袋	288009 袋	96003	2	0.21	0.50	1.04
丹参酮ⅡA 磺酸钠注射液	60mg	1455970mg	24266	1	0.41	0.25	1.03
阿托伐他汀钙片	15mg	5616520mg	374434	3	0.08	1.25	1.00
银黄含化片	10 片	273312 片	27331	1	0.37	0.25	0.91
尼莫地平片	120mg	3287700mg	27397	1	0.37	0.25	0.91
二维亚铁颗粒	15g	443460g	29564	1	0.34	0.25	0.85
酚磺乙胺注射液	1g	60014g	60014	1	0.17	0.50	0.83
注射用胸腺肽	50mg	4542880mg	90857	1	0.11	0.75	0.83
热毒宁注射液	20ml	1219120ml	60956	1	0.16	0.50	0.82
赖脯胰岛素注射液	10iu	623700iu	62370	1	0.16	0.50	0.80
头孢丙烯片	1.0g	193714g	193714	2	0.10	0.75	0.77
注射用奥美拉唑钠	60mg	3914480mg	65241	1	0.15	0.50	0.77
强力枇杷露	45ml	1474220ml	32760	1	0.31	0.25	0.76
注射用复方甘草酸单铵 S	100mg	6648000mg	66480	1	0.15	0.50	0.75
硝苯地平片	45mg	1498000mg	33288	1	0.30	0.25	0.75
冰珍清目滴眼液	1ml	33420ml	33420	1	0.30	0.25	0.75
果糖二磷酸钠注射液	7.5g	254840g	33978	1	0.29	0.25	0.74
前列地尔注射液	7.5ug	783120ug	104416	1	0.10	0.75	0.72
小金丸	4.2g	154129g	36697	1	0.27	0.25	0.68
注射用盐酸头孢替安	4.0g	296206g	74051	1	0.14	0.50	0.68
鸦胆子油乳注射液	20ml	745360ml	37268	1	0.27	0.25	0.67
熊去氧胆酸胶囊	0.6g	23912g	39853	1	0.25	0.25	0.63
参松养心胶囊	3.6g	147844g	41067	1	0.24	0.25	0.61
单硝酸异山梨酯缓释片	40mg	26291520mg	657288	4	0.06	1.00	0.61
复方苦木消炎分散片	10 片	413760 片	41376	1	0.24	0.25	0.60
利福平胶囊	0.6g	24855g	41425	1	0.24	0.25	0.60
地高辛片	0.25mg	83550mg	334200	2	0.06	1.00	0.60
羟苯磺酸钙胶囊	1.5g	65990g	43993	1	0.23	0.25	0.57
维生素 D 滴剂	2 粒	186696 粒	93348	1	0.11	0.50	0.54
盐酸氨溴索口服溶液	20ml	935200ml	46760	1	0.21	0.25	0.53
芪参益气滴丸	1.5g	141464g	94309	1	0.11	0.50	0.53
注射用脂溶性维生素(Ⅰ)	10ml	1026174ml	102617	1	0.10	0.50	0.49
二丁颗粒	12g	1290420g	107535	1	0.09	0.50	0.46
银杏达莫注射液	20ml	2159250ml	107962	1	0.09	0.50	0.46
甲硝唑氯化钠注射液	0.5g	28113g	56226	1	0.18	0.25	0.44
甲巯咪唑片	30mg	3378500mg	112616	1	0.09	0.50	0.44

异烟肼片	0.3g	17100g	57000	1	0.18	0.25	0.44
银杏叶软胶囊	1.35g	332694g	246440	2	0.08	0.50	0.41
脂必泰胶囊	0.48g	29008g	125092	1	0.08	0.50	0.40
生精胶囊	4.8g	305759g	63699	1	0.16	0.25	0.39
奥拉西坦胶囊	1.6g	209423g	130889	1	0.08	0.50	0.38
羟苯磺酸钙分散片	1.5g	203067g	135378	1	0.07	0.50	0.37
坤泰胶囊	6g	832266g	138711	1	0.07	0.50	0.36
依帕司他片	150mg	10617120mg	70780	1	0.14	0.25	0.35
硫酸特布他林注射液	0.625mg	45048mg	72076	1	0.14	0.25	0.35
复方苁蓉益智胶囊	12 粒	895464 粒	74622	1	0.13	0.25	0.34
地塞米松磷酸钠注射液	11mg	1670500mg	151863	1	0.07	0.50	0.33
注射用左卡尼汀	2.0g	164837g	82419	1	0.12	0.25	0.30
复方谷氨酰胺肠溶胶囊	7.5 粒	1262256 粒	168300	1	0.06	0.50	0.30
铝碳酸镁片	3g	261430g	87143	1	0.11	0.25	0.29
注射用脑蛋白水解物	60mg	11026980mg	183783	1	0.05	0.50	0.27
丹参川芎嗪注射液	7.5ml	754805ml	100640	1	0.10	0.25	0.25
复方氨基丁酸维 E 胶囊	6 粒	3704950 粒	617491	2	0.03	0.75	0.24
骨康胶囊	10.5 粒	1130400 粒	107657	1	0.09	0.25	0.23
吸入用硫酸沙丁胺醇溶液	2.5mg	313600mg	125440	1	0.08	0.25	0.20
复方甘露醇注射液	500ml	66988750ml	133977	1	0.07	0.25	0.19
枸地氯雷他定片	8.8mg	1303210mg	148092	1	0.07	0.25	0.17
硝苯地平缓释片(Ⅰ)	30mg	8892000mg	296400	1	0.03	0.50	0.17
多潘立酮片	15mg	2439360mg	162634	1	0.06	0.25	0.15
黄体酮胶囊	200mg	32528000mg	162640	1	0.06	0.25	0.15
盐酸二甲双胍缓释片	0.5g	174360g	348720	1	0.03	0.50	0.14
雷贝拉唑钠肠溶片	20mg	3692360mg	184618	1	0.05	0.25	0.14
乳酸亚铁片	0.6g	114836g	191393	1	0.05	0.25	0.13
百令胶囊	6g	1198659g	199776	1	0.05	0.25	0.13
枸橼酸莫沙必利分散片	15mg	3477000mg	231800	1	0.04	0.25	0.11
注射用还原型谷胱甘肽	1.2g	281583g	234652	1	0.04	0.25	0.11
硝酸异山梨酯片	20mg	4767500mg	238375	1	0.04	0.25	0.10
地塞米松片	1.5mg	473025mg	315350	1	0.03	0.25	0.08
复方嗜酸乳杆菌片	2.25g	715764g	318117	1	0.03	0.25	0.08
丹栀逍遥胶囊	3.15g	1061682g	337041	1	0.03	0.25	0.07
坤复康胶囊	3.8g	1289019g	339215	1	0.03	0.25	0.07
硝苯地平缓释片(Ⅱ)	30mg	11212200mg	373740	1	0.03	0.25	0.07
卡托普利片	37.5mg	17222500mg	459266	1	0.02	0.25	0.05
银丹心泰滴丸	0.35g	407841g	1165260	1	0.01	0.25	0.02
平均值			79128.01	3.34	3.28	1.45	128.55

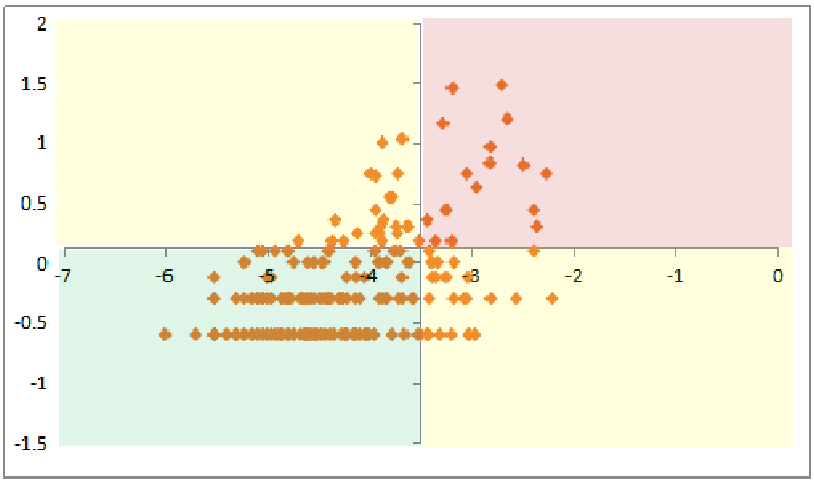


图 2-4　205 种药品的不良反应风险矩阵图

表 2-5 中药品风险指数平均值为 128.55×10^{-5}，高于此平均值的视为不良反应风险指数高的药品，可以看出不良反应风险指数高的药品 18 种，占 8.8%，其分别为注射用奥沙利铂、注射用环磷酰胺、注射用盐酸伊立替康、依托泊苷注射液、多西他赛注射液、注射用奈达铂、注射用夫西地酸钠、顺铂注射液、注射用异环磷酰胺、注射用盐酸吉西他滨、注射用达卡巴嗪、注射用磺苄西林钠、血必净注射液、培门冬酶注射液、紫杉醇注射液、注射用培美曲塞二钠、阿奇霉素注射液、盐酸左氧氟沙星注射液。其中抗肿瘤药物 13 种，抗感染药物 4 种，中药注射剂 1 种。

从图 2-4 中可以看出红色区域为不良反应发生频率高、严重程度高，属高风险区域，本次研究中处于高风险区域的药品有 16 种，其分别为注射用奥沙利铂、多西他赛注射液、注射用环磷酰胺、注射用盐酸吉西他滨、注射用奈达铂、顺铂注射液、依托泊苷注射液、注射用盐酸伊立替康、注射用磺苄西林钠、血必净注射液、注射用夫西地酸钠、注射用培美曲塞二钠、氟尿嘧啶注射液、注射用异环磷酰胺、注射用酒石酸长春瑞滨、碘海醇注射液。其中有抗肿瘤药物 12 种，抗感染药物 2 种，中药注射剂 1 种，诊断试剂（碘造影剂）1 种。与不良反应风险指数高的药品相比，有 10 种抗肿瘤药物、2 种抗感染药物相同。绿色区域为低发生频率、低严重程度，属低风险区域，本次研究中低风险区域的药品较多，主要有银丹心泰滴丸、卡托普利片、坤复康胶囊等。

3.2.2 不同治疗类别药品的风险指数和风险矩阵

对本次研究中的 205 种药品，按前述药品分类标准对其进行分类，共分为 18 类，分别对其不良反应例数，严重程度评分，使用频度（DDDs），风险指数进行分析，其结果如表 2-6 所示。以各类药品不良反应发生频率的常用对数为横坐标，严重程度的常用对数为纵坐标，不良反应发生频率的平均值和严重程度的平均值的常用对数为横纵坐标轴交叉点，建立各类药品风险矩阵图，将其划分为四个风险区域，如图 2-5 所示。

表 2-6 不同治疗类别药品的 DDD、DDDs 值和风险指数值

药品类别	药品种类	DDDs	ADR 例数	ADR 发生频率（*10^{-5}）	ADR 严重程度	风险指数（*10^{-5}）
抗肿瘤药物	34	808162.5	332	41.08	160.75	6603.61
抗感染药物	34	1498388	133	8.88	58.25	517.26
诊断用药	2	16495	6	36.37	3	109.11
中药	40	3977419.5	66	1.66	25.25	41.92
维生素及营养类	10	797561	17	2.13	16	34.08
生物制剂	1	7910	2	25.28	1	25.28
麻醉药品及辅助用药	1	13335	2	15	1	15

中枢神经系统用药	16	1403950	23	1.64	8.25	13.53
心血管用药	20	3391174	36	1.06	12	12.72
呼吸系统用药	9	541338	13	2.4	4.25	10.2
消化系统用药	15	1703663	22	1.29	6.75	8.71
皮肤科用药	1	60255	3	4.98	1.5	7.47
眼科用药	2	38175	2	5.24	1	5.24
激素类及影响内分泌药物	9	1242062	12	0.97	3.5	3.4
血液及造血系统用药	4	299771	4	1.33	1.25	1.66
抗变态反应药	2	204703	4	1.95	0.75	1.46
泌尿生殖系统疾病用药	1	37695	1	2.65	0.5	1.33
其他	4	216879	7	3.23	1.5	4.85
平均值			38.06	8.73	17.03	412.05

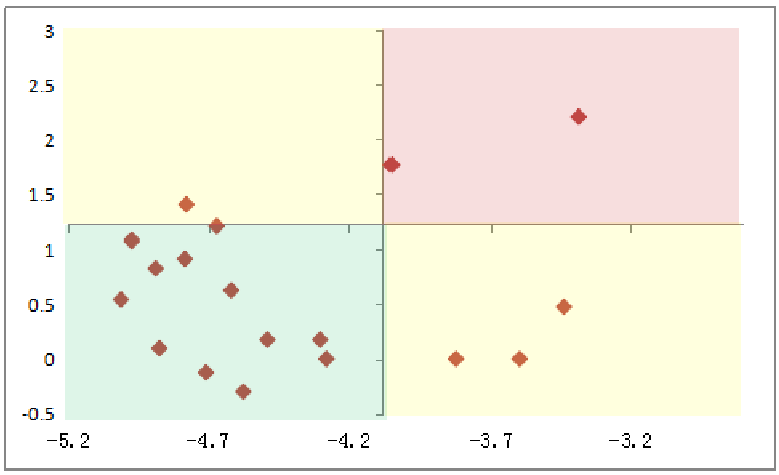


图 2-5 不同治疗类别药品的不良反应风险矩阵图

表 2-6 中各类药品的风险指数平均值为 412.05×10^{-5}，不良反应风险指数高于平均值的药品为抗肿瘤药物、抗感染药物。

从图 2-5 中可以看出红色区域为发生频率高、严重程度高，属高风险区域，本次研究中高风险区域的药品为抗肿瘤药物、抗感染类药物。绿色区域为低发生频率和低严重程度，属低风险区域，本次研究中低风险区域的药品为呼吸系统用药、消化系统用药、麻醉药品及辅助用药、生物制剂及其他。

3.2.3 抗感染药品的风险指数和风险矩阵

本次研究中的 205 种药品，按药品分类标准进行分类其中抗感染药物 35 种，各抗感染药物的不良反应例数，发生频率，严重程度评分，使用频度（DDDs），风险指数等如表 2-7 如示。以各抗感染药物不良反应发生频率的常用对数为横坐标，严重程度的常用对数为纵坐标，不良反应发生频率的平均值和严重程度的平均值的常用对数为横纵坐标轴交叉点，建立抗感染药物风险矩阵图，将其划分为四个风险区域，如图 2-6 所示。

表 2-7 抗感染药品的消耗量、DDD、DDDs 值和风险指数值

药品名称	DDD	药品消耗量	DDDs	ADR 例数	ADR 发生频率（*10^{-4}）	ADR 严重程度	风险指数（*10^{-5}）
注射用夫西地酸钠	1.5g	2575.75g	1717	7	40.77	2.75	1121.14
注射用磺苄西林钠	15.0g	200043g	13336	12	9	5.5	494.9
阿奇霉素注射液	0.5g	359.5g	719	2	27.82	0.5	139.08

盐酸左氧氟沙星注射液	0.5g	97238g	194476	26	1.34	10	133.69
注射用头孢呋辛钠	3.0g	172191g	57397	11	1.92	5.5	105.41
注射用头孢替唑钠	6.0g	627587g	104597	12	1.15	5.25	60.23
注射用替考拉宁	0.4g	2056g	5140	2	3.89	1.25	48.64
注射用五水头孢唑林钠	3.0g	12653g	4217	2	4.74	1	47.43
阿莫西林克拉维酸钾片(7：1)	1.0g	4842g	4842	2	4.13	1	41.31
注射用哌拉西林舒巴坦钠	14.0g	303530g	21680	4	1.85	2	36.9
异烟肼注射液	0.35g	661g	2203	1	4.54	0.75	34.04
注射用美洛西林钠舒巴坦钠(4:1)	7.6g	394883g	51958	6	1.15	2.75	31.76
注射用头孢西丁钠	6.0g	216811g	36135	5	1.38	2.25	31.13
注射用头孢硫脒	3.0g	93785g	31261	4	1.28	2	25.59
注射用伏立康唑	0.4g	423.5g	1058	1	9.45	0.25	23.63
注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠	4.0g	64602g	16150	3	1.86	1.25	23.22
注射用头孢孟多酯钠	6.0g	191248g	31874	4	1.25	1.75	21.96
注射用头孢他啶	4.0g	140366g	35091	4	1.14	1.75	19.95
注射用替硝唑	0.8g	8141g	10176	2	1.97	0.5	9.83
注射用阿莫西林钠克拉维酸钾	3g	162079g	54026	3	0.56	1.5	8.33
盐酸克林霉素注射液	1.8g	24980g	13877	2	1.44	0.5	7.21
注射用亚胺培南西司他丁钠	2.0g	14938g	7469	1	1.34	0.5	6.69
注射用美洛西林钠	6.0g	168862g	28143	1	0.36	1	3.55
注射用阿莫西林钠氟氯西林钠	5g	287841g	57568	2	0.35	1	3.47
头孢地尼胶囊	0.6g	92044g	153406	3	0.2	1.5	2.93
注射用头孢曲松钠	2.0g	139796g	69898	2	0.29	1	2.86
磷酸奥司他韦颗粒	150mg	3557100mg	23714	1	0.42	0.5	2.11
吡嗪酰胺片	1g	26525g	26525	1	0.38	0.5	1.89
阿奇霉素干混悬剂	0.3g	5195.8g	17319	1	0.58	0.25	1.44
头孢丙烯片	1.0g	193714g	193714	2	0.1	0.75	0.77
注射用盐酸头孢替安	4.0g	296206g	74051	1	0.14	0.5	0.68
利福平胶囊	0.6g	24855g	41425	1	0.24	0.25	0.6
甲硝唑氯化钠注射液	0.5g	28113g	56226	1	0.18	0.25	0.44
异烟肼片	0.3g	17100g	57000	1	0.18	0.25	0.44
平均值			45353	3.91	3.75	1.71	73.33

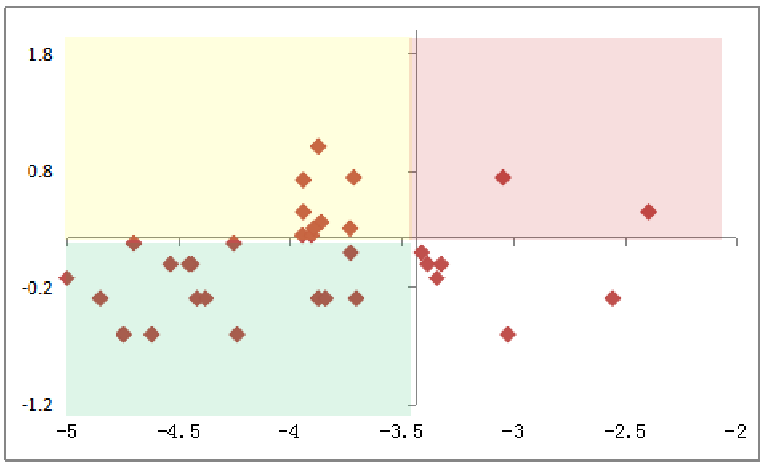


图 2-6 抗感染药品的不良反应风险矩阵图

表 2-7 中抗感染药物的风险指数平均值为 73.33×10^{-5}，风险指数高于平均值的抗感染药物为注射用夫西地酸钠、磺苄西林钠、头孢呋辛钠，阿奇霉素、盐酸左氧氟沙星注射液。

从图 2-6 中可以看出红色区域为发生频率高、严重程度高，属高风险区域，本次研究中高风险区域的抗感染药物为注射用夫西地酸钠、磺苄西林钠。

3.2.4 抗肿瘤药品的风险指数和风险矩阵

本次研究按药品分类标准分类共涉及抗肿瘤药物 34 种，其不良反应例数，发生频率，严重程度评分，使用频度（DDDs)，风险指数等如表 2-8 如示。以各抗肿瘤药物不良反应发生频率的常用对数为横坐标，严重程度的常用对数为纵坐标，不良反应发生频率的平均值和严重程度的平均值的常用对数为横纵坐标轴交叉点，建立抗肿瘤药物风险矩阵图，将其划分为四个风险区域，如图 2-7 所示。

表 2-8 抗肿瘤药品的消耗量、DDD、DDDs 值和风险指数值

药品名称	DDD	药品消耗量	DDDs	ADR 例数	ADR 发生频率 (*10^{-4})	ADR 严重程度	风险指数（*10-5）
注射用奥沙利铂	220mg	6639550mg	30179	60	19.88	30.25	6014.12
注射用环磷酰胺	0.3g	5443.6g	18145	41	22.6	15.75	3558.83
注射用盐酸伊立替康	590mg	1190320mg	2017	11	54.54	5.5	2999.5
依托泊苷注射液	136mg	541500mg	3982	13	32.65	6.5	2122.05
多西他赛注射液	123mg	10172223mg	82701	54	6.53	28.5	1860.92
注射用奈达铂	150mg	1757710mg	11718	18	15.36	9.25	1420.89
顺铂注射液	34mg	380760mg	11198	17	15.18	6.75	1024.74
注射用异环磷酰胺	1.2g	1649g	1374	6	43.67	2	873.36
注射用盐酸吉西他滨	1.7g	99347g	58439	31	5.3	14.5	769.18
注射用达卡巴嗪	0.5g	244.6g	489	2	40.9	1.25	511.25
培门冬酶注射液	4250iu	678750iu	159	1	62.89	0.5	314.47
紫杉醇注射液	0.3g	26834g	89447	19	2.12	10.75	228.35
注射用培美曲塞二钠	0.85g	11981.5g	14095	8	5.68	2.75	156.08
注射用酒石酸长春瑞滨	6mg	18760mg	3126	2	6.4	1.5	95.97
氟尿嘧啶注射液	0.9g	12091.25g	13434	5	3.72	2.25	83.74

注射用三氧化二砷	12mg	25830mg	2152	2	9.29	0.75	69.7
注射用盐酸吡柔比星	55mg	269120mg	41256	7	1.7	3.5	59.39
注射用亚叶酸钙	20mg	1743800mg	87190	9	1.03	5.5	56.77
替吉奥胶囊	40mg	1266240mg	31656	5	1.58	3.5	55.28
注射用顺铂	34mg	37865mg	1114	1	8.98	0.5	44.88
甲磺酸阿帕替尼片	0.85g	3005g	3535	2	5.66	0.75	42.43
羟喜树碱注射液	20mg	23885mg	1194	1	8.38	0.5	41.88
注射用唑来膦酸	4mg	19548mg	4887	2	4.09	1	40.92
注射用硫酸长春新碱	1.5mg	3598mg	2398	1	4.17	0.75	31.28
注射用盐酸阿柔比星	30mg	27360mg	912	1	10.96	0.25	27.41
卡培他滨片	4.25g	73140g	17209	3	1.74	1.25	21.79
卡莫氟片	800mg	1261200mg	1576	1	6.35	0.25	15.86
雷公藤多苷片	75mg	1995000mg	26600	3	1.13	1.25	14.1
吉非替尼片	250mg	930000mg	3720	1	2.69	0.5	13.44
注射用依托泊苷	130mg	498000mg	3830	1	2.61	0.5	13.05
注射用核糖核酸Ⅱ	200mg	3867850mg	19339	1	0.52	0.5	2.59
斑蝥酸钠维生素 B6注射液	0.3mg	13745mg	45816	1	0.22	0.5	1.09
注射用胸腺肽	50mg	4542880mg	90857	1	0.11	0.75	0.83
注射用左卡尼汀	2.0g	164837g	82419	1	0.12	0.25	0.3
平均值			23769	9.76	12	4.73	664.31

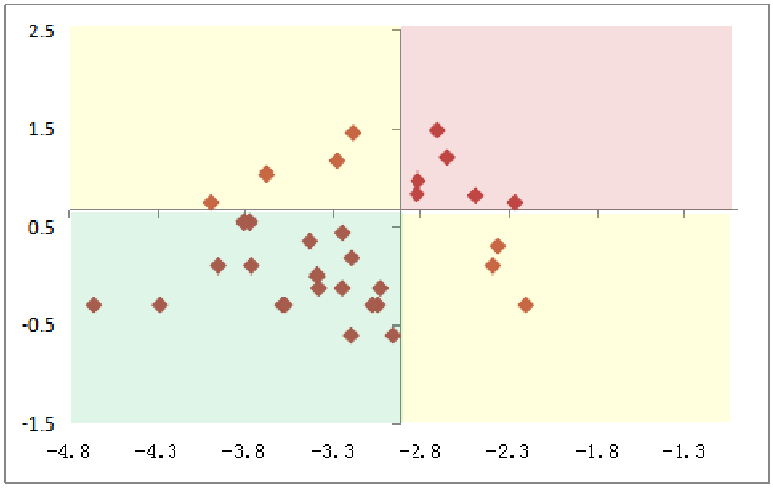


图 2-7 抗肿瘤药品的风险矩阵图

表 2-8 中抗肿瘤药品的风险指数平均值为 664.31×10^{-5}，风险指数高于平均值药品为注射用奥沙利铂、注射用环磷酰胺、依托泊苷注射液、注射用盐酸伊立替康、注射用奈达铂、顺铂注射液、注射用异环磷酰胺、注射用盐酸吉西他滨、多西他赛注射液。

从图 2-7 中可以看出红色区域为发生频率高、严重程度高，属高风险区域，本次研究中高风险区域的药品为注射用奥沙利铂、注射用环磷酰胺、依托泊苷注射液、注射用盐酸伊立替康、多西他赛注射液、注射用盐酸吉西他滨。

3.2.5 中药注射剂药品的风险指数和风险矩阵

中药注射剂发生不良反应数量和比例在不断增加，本次研究中共涉及到 14 种中药注射剂，其不良反应例数，发生频率，严重程度评分，使用频度（DDDs)，风险指数等如表 2-9 如示。以各中药注射剂不良反应发生频率的常用对数为横坐标，严重程度的常用对数为纵坐标，不良反应发生频率的平均值和严重程度的平均值的常用对数为横纵坐标轴交叉点，建立中药注射剂风险矩阵图，将其划分为四个风险区域，如图 2-8 所示。

表 2-9 中药注射剂药品的消耗量、DDD、DDDs 值和风险指数值

药品名称	DDD	药品消耗量	DDDs	ADR 例数	ADR 发生频率（*10^{-5}）	ADR 严重程度	风险指数（*10^{-5}）
血必净注射液	100ml	791680ml	7916	9	113.69	4.25	483.2
疏血通注射液	6ml	125762ml	20960	5	23.85	2	47.71
苦黄注射液	35ml	143910ml	4111	1	24.32	1	24.32
岩黄连注射液	4ml	4210ml	1053	1	95.01	0.25	23.75
艾迪注射液	15g	247350g	16490	2	12.13	1	12.13
华蟾素注射液	15ml	139380ml	9292	2	21.52	0.5	10.76
注射用血栓通	375mg	49205700mg	131215	6	4.57	2.25	10.29
参麦注射液	35ml	1753580ml	50102	2	3.99	1.25	4.99
参芪扶正注射液	250ml	8289250ml	33157	2	6.03	0.75	4.52
注射用炎琥宁	600mg	6176880mg	10294	1	9.71	0.25	2.43
生脉注射液	40ml	1383100ml	34577	1	2.89	0.5	1.45
醒脑静注射液	15ml	625180ml	41678	1	2.4	0.5	1.2
热毒宁注射液	20ml	1219120ml	60956	1	1.64	0.5	0.82
鸦胆子油乳注射液	20ml	745360ml	37268	1	2.68	0.25	0.67
平均值			32790	2.5	23.17	1.09	44.87

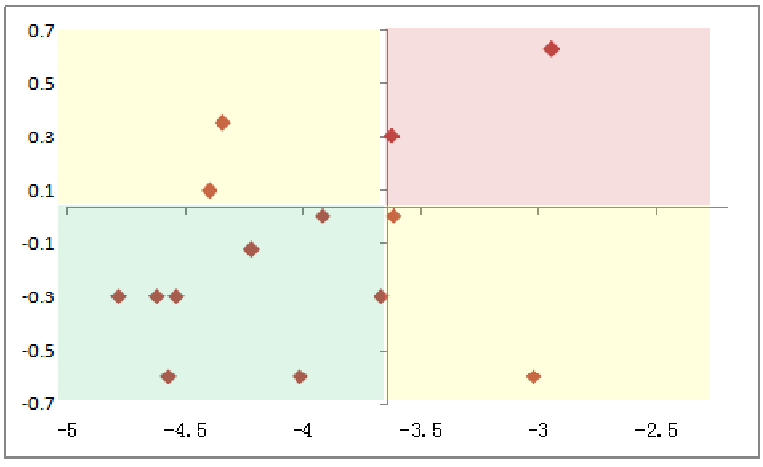


图 2-8 中药注射剂药品的风险矩阵图

表 2-9 中中药注射剂药品的风险指数平均值为 44.87×10^{-5}，风险指数高于平均值药品为血必净注射液、疏血通注射液。

从图 2-8 中可以看出红色区域为发生频率高、严重程度高，属高风险区域，本次研究中高风险区域的药品为

血必净注射液、疏血通注射液。

3.2.6 心血管药品的风险指数和风险矩阵

本次研究中按药品分类标准共涉及到 20 种心血管药物，其不良反应例数，发生频率，严重程度评分，使用频度（DDDs)，风险指数等如表 2-10 如示。以各心血管药物不良反应发生频率的常用对数为横坐标，严重程度的常用对数为纵坐标，不良反应发生频率的平均值和严重程度的平均值的常用对数为横纵坐标轴交叉点，建立心血管药物风险矩阵图，将其划分为四个风险区域，如图 2-9 所示。

表 2-10 心血管药品消耗量、DDD、DDDs 值、风险指数值

药品名称	DDD	药品消耗量	DDDs	ADR 例数	ADR 发生频率（*10^{-5}）	ADR 严重程度	风险指数（*10^{-5}）
注射用硝酸异山梨酯	20mg	59540mg	2977	2	67.18	1	67.18
单硝酸异山梨酯注射液	20mg	735520mg	36776	7	19.03	1.75	33.31
盐酸特拉唑嗪片	10mg	25742mg	2574	1	38.85	0.5	19.43
缬沙坦氢氯噻嗪片	1 片	13503 片	13503	1	7.41	0.5	3.7
马来酸依那普利片	15mg	135165mg	9011	1	11.1	0.25	2.77
培哚普利片	4mg	54120mg	13530	1	7.39	0.25	1.85
注射用藻酸双酯钠	100mg	1359150mg	13591	1	7.36	0.25	1.84
盐酸贝那普利片	10mg	2241680mg	224168	4	1.78	1	1.78
丹参酮ⅡA 磺酸钠注射液	60mg	1455970mg	24266	1	4.12	0.25	1.03
阿托伐他汀钙片	15mg	5616520mg	374434	3	0.8	1.25	1
硝苯地平片	45mg	1498000mg	33288	1	3	0.25	0.75
前列地尔注射液	7.5ug	783120ug	104416	1	0.96	0.75	0.72
单硝酸异山梨酯缓释片	40mg	26291520mg	657288	4	0.61	1	0.61
地高辛片	0.25mg	83550mg	334200	2	0.6	1	0.6
羟苯磺酸钙胶囊	1.5g	65990g	43993	1	2.27	0.25	0.57
羟苯磺酸钙分散片	1.5g	203067g	135378	1	0.74	0.5	0.37
硝苯地平缓释片(Ⅰ)	30mg	8892000mg	296400	1	0.34	0.5	0.17
硝酸异山梨酯片	20mg	4767500mg	238375	1	0.42	0.25	0.1
硝苯地平缓释片(Ⅱ)	30mg	11212200mg	373740	1	0.27	0.25	0.07
卡托普利片	37.5mg	17222500mg	459266	1	0.22	0.25	0.05
平均值			169558	1.8	8.72	0.6	6.89

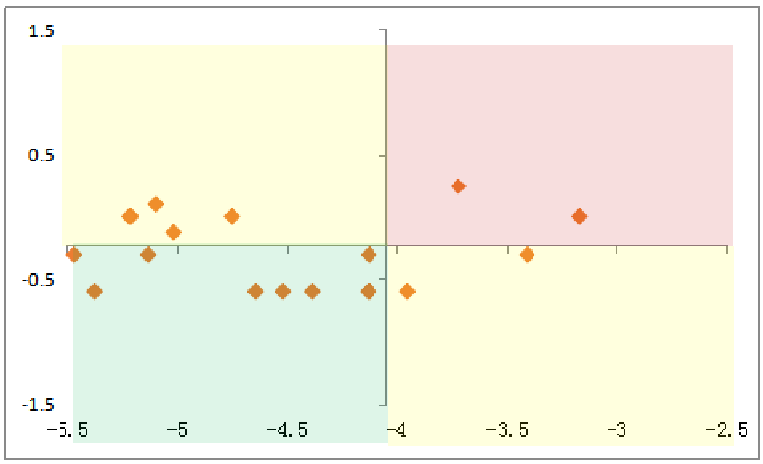


图 2-9 心血管药品的风险矩阵图

表 2-10 中心血管药品的风险指数平均值为 6.89×10^{-5}，风险指数高于平均值药品为注射用硝酸异山梨酯、单硝酸异山梨酯注射液、盐酸特拉唑嗪片。

从图 2-9 中可以看出红色区域为发生频率高、严重程度高，属高风险区域，本次研究中高风险区域的药品为注射用硝酸异山梨酯、单硝酸异山梨酯注射液。

4 讨论与建议

4.1 讨 论

4.1.1 调查医院对药品不良反应上报的数量不多，质量不高

我们的研究发现：某医院 2019-2022 年共上报 685 例，其中严重的共 36 例，占上报总数的 5.25%，2020 年药品不良反应上报数量为 12 例，新的、严重的数量为 0。

形成目前状况的主要原因包括：（1）医院领导未引起的足够重视；（2）医院的不良反应监测网络不完善；（3）医护人员对不良反应认识不足，存在一些认识的误区如不良反应上不上报无所谓，不良反应上报可能会引起医疗纠纷，不良反应上报影响了正常工作等。

目前，对于药品不良反应报告和监测工作各部门越来越越重视，2016 年《医疗质量管理办法》中第三十五条中指出“医疗机构应当建立药品不良反应、药品损害事件和医疗器械不良事件监测报告制度，并按照国家有关规定向相关部门报告，将不良反应列入医疗质量中的医疗安全风险防范”[36]。

4.1.2 调查医院发生的药品不良反应主要类型为注射剂，给药途径为静脉滴注

我们的研究发现：685 例药品不良反应报告涉及的药品中注射剂有 540 例，占总的 78.8%。

注射剂是指供注射用药物的灭菌溶液、混悬液或乳剂，是目前常用的剂型之一。据报道目前全球使用的药品 2-3 万种，其中注射剂约占 l/3，全球每年大约有 120 亿人次在使用注射剂治疗。注射剂发生不良反应的风险性比较大，主要表现为可能引起过敏、休克、皮疹等。导致注射剂发生不良反应增多的原因是药物直接进入血液，输液中 pH、内毒素、不溶性微粒影响以及输液量大、给药时间长、配伍复杂等[17]。目前我国已出台相应的的管理规定如《抗菌药物临床应用管理办法》，《关于进一步加强中药注射剂生产和临床使用管理的通知》，规范注射剂的合理应用，减少不良反应风险。

4.1.3 应用风险矩阵法方法，发现高风险区域药品主要有抗感染药品

我们的研究发现：抗感染药品的不良反应发生频率为 8.88×10^{-5}，严重程度为 58.25，高于不良反应发生频率的平均值 8.73×10^{-5}，严重程度的平均值 17.03。

高风险抗感染药品主要有注射用夫西地酸钠、磺苄西林钠。注射用夫西地酸钠为一种新型甾体类抗菌药物，通过抑制细菌的蛋白质合成而产生杀菌作用，对革兰氏阳性菌特别是葡萄球菌有强大的抗菌药物，其不良反应症状主要为肝功能异常、疼痛、静脉炎、皮疹等[18]。注射用磺苄西林钠是一种广谱半合成青霉素类抗生素，通过抑制细菌细胞壁合成发挥杀菌作用，其不良反应症状主要为高热、咯血、恶心、呕吐、全身瘙痒等[19]。医院

根据这二种抗菌药物的不良反应风险评估采取相应的风险管理措施：（1）通过医院各种信息渠道宣传夫西地酸钠、磺苄西林的不良反应情况，将不良反应风险告知医务人员。（2）规范临床的使用，严格把握临床的使用指征以及合理的用药剂量、疗程等，并定期开展夫西地酸钠、磺苄西林钠临床使用评价，加强监督管理。（3）完善医院的抗菌药物分级管理制度，将夫西地酸钠、磺苄西林钠纳入特殊级抗菌药物，严格限制其临床应用。（4）严密监测使用过程中出现的可能不良反应，及时处理。

4.1.4 应用风险矩阵法方法，发现高风险区域药品主要有抗肿瘤药品

我们的研究发现：抗肿瘤药品的不良反应发生频率为 41.08×10^{-5}，严重程度为 160.75，高于不良反应发生频率的平均值 8.73×10^{-5}，严重程度的平均值 17.03。

高风险的抗肿瘤药品主要有注射用奥沙利铂、注射用环磷酰胺、依托泊苷注射液、注射用盐酸伊立替康、多西他赛注射液、注射用盐酸吉西他滨等。目前在临床抗肿瘤中使用比较广泛，各种化疗方案中均有使用，其主要的不良反应表现为骨髓抑制和胃肠道反应，临床症状主要表现为白细胞减少、血小板减少、贫血、恶心、呕吐等。为降低抗肿瘤药物的不良反应风险，对这类药物可采取相应的风险管理措施：（1）制定化疗方案时，联合化疗选用疗效增加，减少不良反应的药物。（2）规范化治疗和个体化治疗，合理选择抗肿瘤药物和适宜剂量。（3）对可能发生的不良反应如胃肠道反应，可在化疗前服用止吐药如地塞米松片等，及时处理骨髓抑制如白细胞减少等不良反应。

4.2 对医疗机构药品不良反应监测的建议

通过本次研究和目前我国不良反应监测的现状，本人对医疗机构不良反应监测提出了一系列建议，以提高我国医疗机构药品不良反应监测水平，保障临床用药安全。

4.2.1 目前我国在药品不良反应监测方面的法律法规框架雏形已经建立完成，但是大多数条款仍然是原则性的规定，不够具体和全面，可操作性不强。对一些违反法律法规行为如不良反应的隐瞒不报哪个部门去认定、如何认定都没有详细的说明，虽然相应的惩罚很明确，但是实际却很难操作；一些国家对于医生有着强制不良反应报告的要求，对医疗机构不执行不良反应报告制度的行为也有明确的规定并承担着相应法律责任；而我国都没有明确的规定。缺乏相应的在技术方面的指导性文件，没有相应对所发生的药品不良反应分析、评价及报告的指南，使得相关部门在实际运用中各司其事。对于临床上因果关系不明确的药品不良事件，我国当前的法律法规也没有明确的定义，使得监管部门在执法时缺少真正的依据。完善我国药品中的相关法律，确定其法律地位，并且有相应的可操作性的惩罚措施，同时加大惩罚力度，因为关系着公众的生命安全，所以我们更不能懈怠。

4.2.2 目前医疗机构中普遍存在不重视药品不良反应情况，存在不报、少报、瞒报等情况。针对这一情况，应利用各种会议及文件，对医院领导进行药品不良反应知识培训，提高医院领导对药品不良反应的重视程度，促进医疗机构更好进行药品不良反应监测。在医院内部应加强医护人员的药品不良反应知识培训，宣传药品不良反应法律法则以及报告的程序，提高医护人员对药品不良反应的认识，增强医务人员上报药品不良反应的自觉性和积极性。将不良反应上报情况纳入医疗质量管理，进行目标责任考核，对积极上报的进行奖励，对不报、瞒报的进行处罚，通过行政管理手段提高医务人员开展药品不良反应监测。

4.2.3 充分发挥临床药师在不良反应监测中的作用。医院药学由传统的药品调剂向现代的以药学服务中心进行了转变，药师在合理用药和保障临床用药安全发挥着越来越重要的作用。近十年，随着临床药师队伍的不断壮大，临床药师由药房不断地走向临床，参与到临床工作中，与医护人员进行着密切的联系，传递药品不良反应的知识和信息，提高临床医护人员对不良反应的认识和重视。临床药师在临床工作中还可协助临床医护识别、处理、上报药品不良反应，降低药品不良反应风险，避免或减少药品不良反应的发生。

4.2.4 完善医疗机构不良反应监测制度和流程。目前医生和护士主要任务是治疗和护理，工作繁忙而沉重，导致无心上报药品不良反应，而目前的纸质版药品上报表复杂，建立药品不良反应监测网络，优化上报流程，可提高医护人员上报不良反应的积极性。其次，医疗机构应关注中老年患者的用药风险问题，对抗肿瘤药和抗感染药，特别是这些药品中的注射剂实施重点监测和采取风险控制措施；在医院管理层面建立药品的使用频次，不良反应发生率和严重性案例的收集和汇总工作；在技术层面建立风险矩阵法，对不良反应进行实时风险再评估，及时发现高风险药品，提高医疗机构药品风险管理能力，最小化用药风险，保障患者临床安全用药。

4.2.5 不断提高医疗机构不良反应风险评估能力，建立和健全医疗机构不良反应管理机制。目前国家不良反应监测中心定期通报不良反应监测情况及分析，各医疗机构根据国家不良反应监测中心通报情况和本医疗机构上报的不良反应进行药品不良反应风险评估，及时地将不良反应风险传达给医务人员，规范和合理地临床用药，加强使用过程中的不良反应风险监测和及时地处理药品不良反应风险，降低药品使用过程中的不良反应风险。

4.2.6 药品不良反应救济制度在部分发达国家已经被建立，这样就可以从根本上保障各方的权力和利益。我国可以参考其他国家相应领域的政策，建立并健全我国药品不良反应救济补偿机制，解决我国当前在处理相应药品不良事件混乱的局面，在实际运用中真正区分开药品质量缺陷事件、医疗事故和药品不良反应，让药品不良反应受害者得到应有的补偿，医疗机构也能够专注于自己的领域而不用应对相关医疗纠纷，使得各方权益都得到了保障。

参考文献

[1] WHO. International drug monitoring:the role of national centres. Tech Rep Ser WHO 1972，no498.

[2] 李桂芳,邵立君.药物不良反应的观察与用药安全管理[J].中国误诊学杂志,2010, 10(34):8545-8545.

[3] 曹军华,韩勇,陈东生.1596 例药品不良反应报告分析[J].药物流行病学杂志，2012(9):431-433.

[4] US Department of Health and Human Services, FDA. Development and Use of Risk Minimization Action Plans (Risk-Map Guidance).March 2005, Clinical Medial.

[5] 曾繁典.药品风险管理.药物流行病学杂志,2009(5):307-312.

[6] 田英娜,赵同双,孙建勋等.药物口服固体制剂制粒工艺风险的 FMEA 分析[J].中国药事,2013,27(1):27-32.

[7] 陈芳,黄泰康,姚丽娜.浅析在中药注射剂生产企业中建立危害分析和关键控制点管理体系[J].中国药房,2012(43):4122-4124.

[8] 李慧,黄哲.新药研发中体外遗传毒性试验风险故障树的构建及权重分析[J].中国新药杂志,2015(8):849-856.

[10] 邓晓婷,陈冠林,储大可等.突发公共卫生事件风险评估方法[J].中国预防医学杂志,2014,15(3):285-287.

[11] Paul R, Garvey P R, Lansdowne ZF. Risk matrix: an approach for identifying, assessing, and ranking program risks [J]. Air Force Journal of Logistics, 1998, 25:16-19.

[12] 李云玮,路晨.基于风险矩阵模型的 P2P 网贷风险分析[J].北京金融评论,2015(3):149-159.

[13] 郭彦伟,龚雪晴,杨利明.基于风险矩阵法的隧道洞口失稳风险评估[J].公路交通科技（应用技术版）,2016(8):35-36.

[14] 解秦保,李金富,王文伟等.浅谈海洋石油工程海外项目风险管理[J].项目技术管理,2017,15(2):62-65.

[15] 庞星火,刘秀颖.2008 年北京奥运会重大公共卫生事件风险评价方法的研究[J].首都公共卫生杂志,2009,(3)2:52-58.

[16] 吴长青,朱文涛.浅论风险矩阵法在药品风险评价中的运用[J].中国药物警戒,2010, 7(10):603-604.

[17] 钟洪兰,郭粤霞,李卫等.注射剂合理应用的探讨[J].中国药房,2010(26): 2486-2488.

[18] 刘近明,董秀芹.夫西地酸——理想的抗甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌药[J].国外医药抗生素分册,2002, 23(1):31-33.

[19] 邓林.磺苄西林钠在呼吸道系统治疗效果观察[J].中国实用医药, 2015(8):155-156.

临床药师参与多途径联合用药治疗广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染1例并文献复习

吴永森，杨丹，晏珊，丁楠楠，章激

（襄阳市中心医院，湖北文理学院附属医院　442000）

【摘要】目的：探讨广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染的早期诊断及治疗方案。**方法：**分析1例临床药师参与的颅脑外伤术后广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染患者的临床资料；并结合文献复习，分析广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染的治疗方案。**结果：**本例患者住院过程中，采用二代测序技术及降钙素原检测脑脊液辅助诊断；抗生素使用方案为多粘菌素B50万U静滴q12h+鞘内注射给药5万U/次/日，3-5天后改为隔日给药一次+多美罗培南2g静滴q8h联合米诺环素100mg口服bid。治疗2周后患者颅内感染好转，脑脊液细菌培养阴性。**结论：**对于广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染，多粘菌素B50万U静滴q12h+鞘内注射给药5万U/次/日，3-5天后改为隔日给药一次+多美罗培南2g静滴q8h联合米诺环素100mg口服bid有较好的治疗效果。

【关键词】广泛耐药鲍曼不动杆菌；颅内感染；临床药师；多粘菌素B；降钙素原；鞘内注射

神经外科开颅术后发生颅内感染是严重的手术并发症之一。因有血-脑屏障的存在，脑脊液中不能获得有效的药物浓度；而且颅内感染致病菌对大多数抗生素耐药；故不同于其他部位感染，颅内感染的治疗较为困难。鲍曼不动杆菌是不发酵糖的革兰阴性球杆菌，广泛分布于水、土壤、医院环境和人体皮肤表面，近年来已成为引起院内感染的最重要条件致病菌之一；给临床治疗带来很多困难。近期我院收治1例颅脑外伤开颅术后并发广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染患者，经多途径联合用药治疗取得较好的效果。

本研究对患者的诊疗过程进行总结分析，并复习相关文献。现报告如下

1 临床资料

1.1 一般资料 患者：男性，65岁，身高165cm　体重65kg　BMI 23.9kg/m2

突发意识障碍伴右侧肢体无力5小时，患者于5月12日上午7:00左右无明显诱因突发意识障碍，伴右侧肢体无力，伴恶心，无呕吐、小便失禁及肢体抽搐等症状，左侧肢体可不自主活动，家属一同送其到我院急诊科，查头部CT提示：左侧丘脑出血。急诊以“脑出血”收入神经外科。

起病来，患者精神、饮食、睡眠差，大小便未解，体力下降，体重无明显减轻。

有高血压病史1年，自服药物控制，具体不详。无糖尿病、心脏病、肾病等病史。否认输血及药物、食物过敏史，无吸烟，饮酒20年，每天饮酒量1两白酒，神志模糊，刺痛睁眼，查体配合欠佳，可遵嘱抬高右手，言语含糊不清，双瞳孔等大等圆，直径2.5mm，光反射灵敏，眼球活动可。

1.2 实验室检查 辅助检查：

血细胞分析：中性粒细胞百分比:81.1%↑；淋巴细胞百分比:16.5%↓；单核细胞百分比:2.2%↓；

嗜酸细胞百分比:0.1%↓；嗜酸细胞计数:0.01×10^9/L↓；

同型半胱氨酸:25.5umol/L↑；　B型钠尿肽前体(PRO-BNP):143.3pg/mL↑

脑部CT检查：

1. 左侧丘脑区血肿并破入脑室；血肿灶大小约为3.6cmx3.0cm。
2. 颅脑术后改变。
3. 双侧颞叶，左侧额叶脑软化灶。
4. 脑萎缩。

1.3 治疗经过　入院后治疗方案：止血、脱水、抗感染、补液、营养神经，随后全麻进行手术治疗：立体定向左侧丘脑血肿碎吸外引流术+左侧脑室外引流术+气管切开术。5月17日术后第一天查体：患者神志昏迷状，体温

发热，最高达 39.8 度。管切开状态，呼吸机已停，无言语，刺痛逃避。血肿腔引流管引流出 200ml 暗红色血性液体，脑室引流管引流出少量血性液体。 辅助检查：中性粒细胞百分比:88.5%↑纤维蛋白（原）降解产物:25.05mg/L ↑ 药物治疗：哌拉西林舒巴坦钠 5g ivgtt q8h+莫西沙星 0.4g ivgtt qd 治疗，5 月 22 日术后第 6 天，查体：患者神志仍呈昏迷状，体温发热，最高达 39 度，每日发热 2 次，血压不高，气管切开状态，无言语。血肿腔引流管已拔除，腰大池置管引流通畅，引流出 50ml 血性液体。辅助检查：CRP:21.9mg/L↑ PCT:0.138ng/ml 痰培养提示鲍曼不动杆菌（多重耐药）痰涂片检出革兰阳性球菌，治疗：血肿腔引流管留置 5 天，予以拔除，因血性脑脊液较多，遂留置腰大池引流管，持续释放脑脊液 10-15ml/24 小时，药物更换为去甲万古霉素 800 mg ivgtt q12h + 美罗培南 1g ivgtt q8h 抗感染治疗，6 月 3 日术后第 18 天，查体：患者神志呈浅昏迷状，体温发热，最高达 38.5 度，血压不高，气管切开状态，痰液极多，黄浓痰，无言语。脑脊液黄色混浊样。辅助检查：

脑脊液常规:有核细胞计数:8615*10^6/L↑脑脊液生化: 葡萄糖:0.04mmol/L↓ 微量总蛋:2.405g/L↑脑脊液培养提示鲍曼不动杆菌（多重耐药）头部 CT 显示：左侧丘脑血肿灶，较前吸收减小；双侧侧脑室积血同前密度减低。颅脑术后改变，颅内积气较前基本吸收。三脑室及双侧侧脑室扩张，脑积水可能。

治疗：

1.留置腰大池引流管，持续释放脑脊液 10-15ml/24 小时，2.药物更换为去甲万古霉素 800mg ivgtt q12h+头孢哌酮舒巴坦钠（舒普深）3g ivgtt q12h 抗感染治疗。患者自术后抗感染治疗 3 周后体温较前有好转，但仍有间断发热，最高

38.5 度，患者意识较差，脑脊液常规及生化仍提示感染！患者病情改善不明显，感染仍未控制，请药学部临床药师会诊。

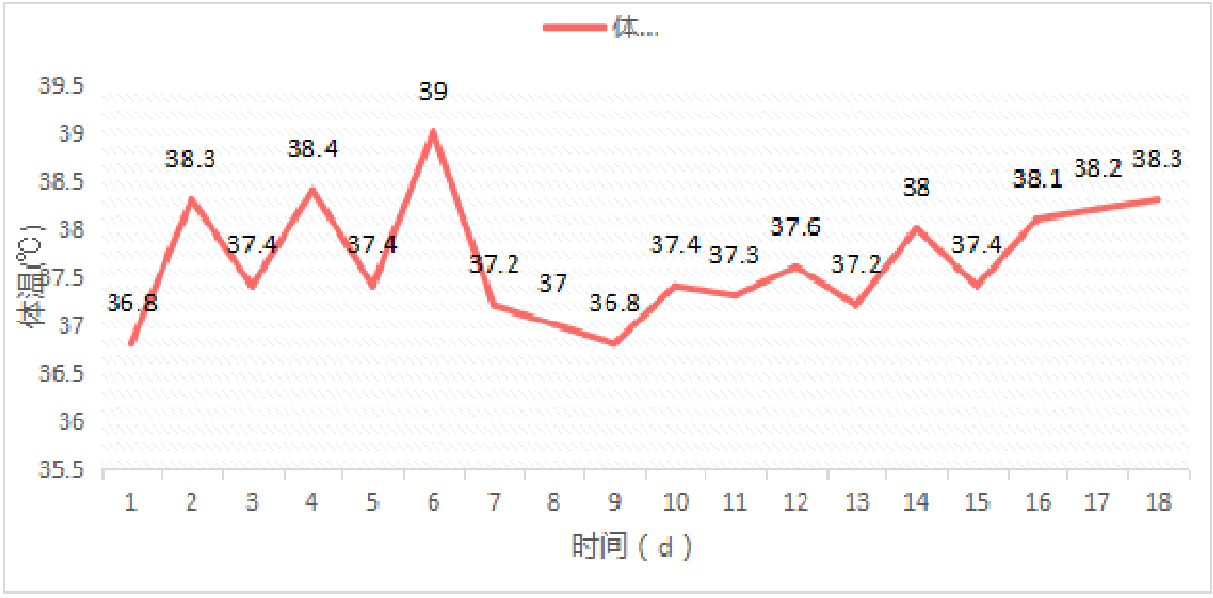


图 1 患者手术后体温变化趋势



图 2 脑脊液有核细胞计数变化趋势

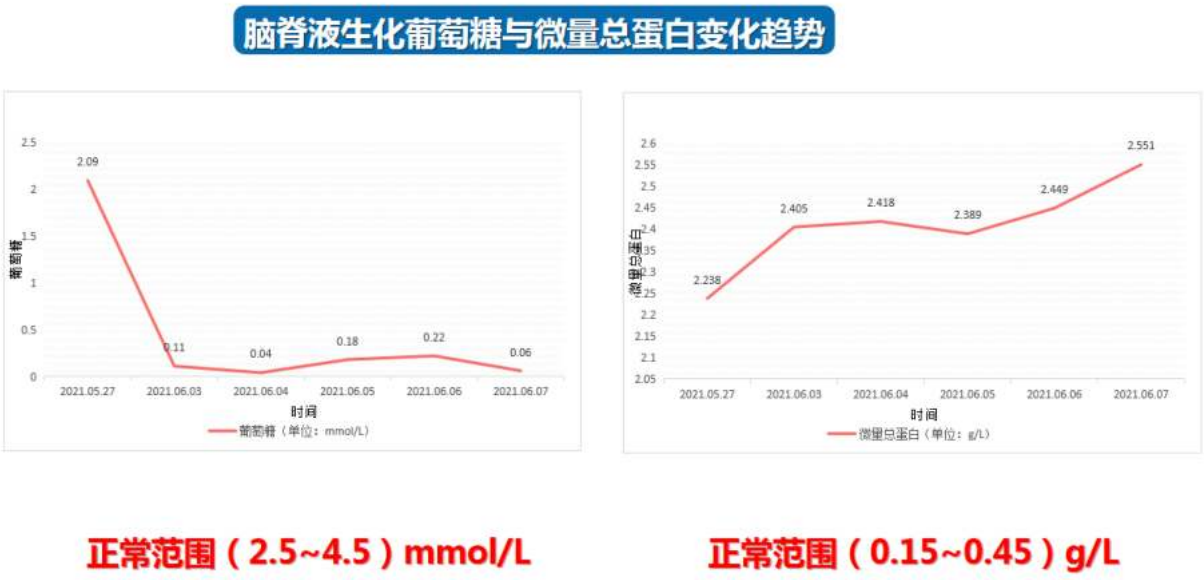


图 3 脑脊液生化葡萄糖与微量总蛋白变化趋势

姓名：[redacted]　患者编号：[redacted]　标本种类：脑脊液　标本号：
性别[redacted]　床　　号.　送检医师：杨振宇　临床诊断：
年龄[redacted]　科　　别：神经外科　采样时间：2021/6/3 10:06:50　接收时间：

项目	英文名称	结果	单位	参考
亚胺培南（泰能）		>8	ug/ml	R
妥布霉素		>8	ug/ml	R
替加环素		4	ug/ml	I
左氧氟沙星		>8	ug/ml	R
美洛培南		>8	ug/ml	R
米诺环素		4	ug/ml	S
庆大霉素		>8	ug/ml	R
氨苄西林/舒巴坦		>16/8	ug/ml	R
复方新诺明		>4/76	ug/ml	R
头孢哌酮/舒巴坦		>32/8	ug/ml	R
阿米卡星（丁胺卡那霉素）		>32	ug/ml	R
头孢他啶		>32	ug/ml	R
多粘菌素		<=1	ug/ml	I
头孢曲松		>32	ug/ml	R
头孢吡肟（马斯平）		>16	ug/ml	R
哌拉西林/他唑巴坦		>64/4	ug/ml	R
环丙沙星		>4	ug/ml	R

图 4 连续 3 天腰穿脑脊液细菌培养药敏提示：鲍曼不动杆菌（多重耐药）

临床药师综合分析后虑患者目前感染的责任致病菌为不同部位多重耐药鲍曼不动杆菌，建议停用万古霉素；美罗培南 2g 静滴 q8h 联合米诺环素 100mg 口服 bid；6 月 12 日术后第 27 天，查体：患者神志呈昏睡状，体温发热，最高达 38.7 度，血压不高，气管切开状态，痰液较前明显减少，黄浓痰，无言语，可间断遵嘱动作。辅助检查 脑脊液生化乳酸脱氢酶:580U/L↑ 葡萄糖:0.87mmol/L↓ 脑脊液常规有核细胞计数:611*10^6/L↑。外送脑脊液宏基因测序结果提示：鲍曼不动杆菌，

临床药师建议抗感染方案修改为： 多粘菌素 B50 万 U 静滴 q12h+鞘内注射给药 5 万 U/次/日，3-5 天后改为隔日给药一次+多美罗培南 2g 静滴 q8h 联合米诺环素 100mg 口服 bid，6 月 29 日（入院第 48 天） 6 月 26 日药物治疗已停，患者未发热，可自主睁眼，体温无发热，血压不高，气管切开状态，痰液较前明显 减少，无言语，可间断遵嘱动作。辅助检查：2021.6.26 白细胞计数:13.24×10^9/L↑；中性细胞百分数:89.3%↑； 脑脊液培养 5 天无细菌生长，未检出真菌，患者家属今日要求出院，给予办理

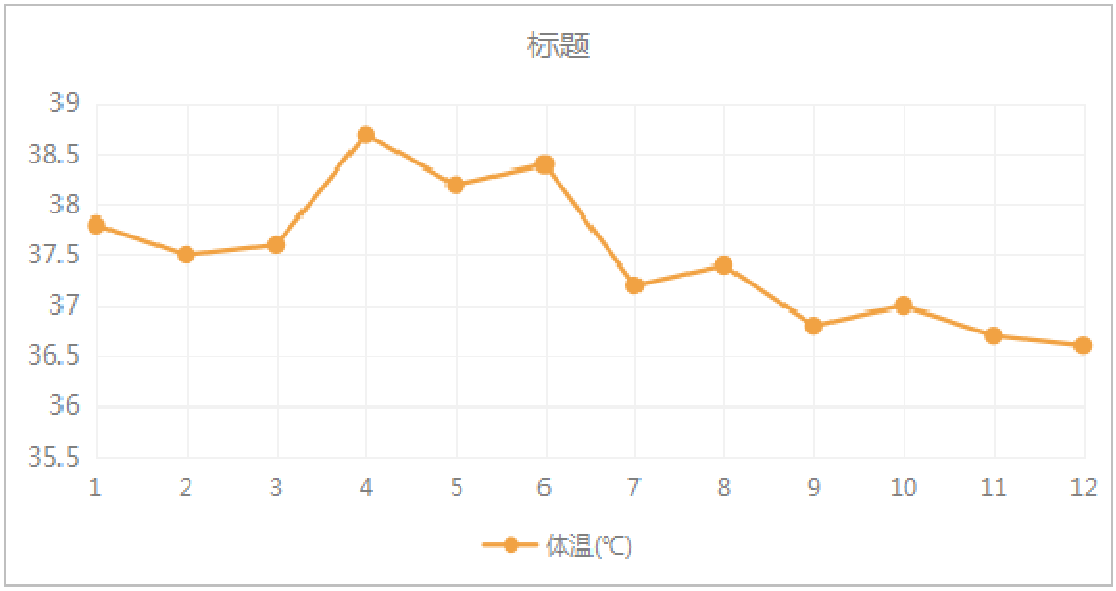


图 5 患者手术后体温变化趋势

2 讨论

鲍曼不动杆菌具有强大的获得耐药性和克隆传播的能力，多重耐药、广泛耐药、全耐药鲍曼不动杆菌呈世界性流 行，已成为中国院内感染最重要的病原菌之一[1] 。抗生素耐药鲍曼不动杆菌分为 3 类：耐多药（MDR）、广泛耐药 （XDR）和全耐药（PDR）。广泛耐药鲍曼不动杆菌是指仅对 1～2 种潜在有抗不动杆菌活性的药物（主要指替加环素和 / 或多黏菌素）敏感的菌株[2] 本例患者颅脑外伤术后出现持续高热，脑脊液检测示白细胞数增多，痰培养提示鲍曼不动杆菌（多重耐药） 痰涂片检出革兰阳性球菌，并针对革兰阳性菌经验性使用万古霉素治疗。后头皮分泌物培养出广泛耐药鲍曼不动杆菌时，立即行腰大池引流术；并且根据 2012 年《中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识》，对于多重耐药鲍曼不动杆菌引起的中枢神经系统感染推荐联合用药；遂调整抗生素方案为，美罗培南＋万古霉素 腰大池

持续引流术主要通过开放腰大池引流管，建立冲洗引流通道，及时清除脑室及蛛网膜下腔内的炎性物质及病原菌，避免其滞留所致继发性损害；同时该方法有利于动态观察脑脊液，随时行常规、生化检查和细菌培养，了解感染控制情况。6 月 12 日术后第 27 天，外送脑脊液宏基因测序结果提示：鲍曼不动杆菌，患者仍然持续发烧，指标也在上升，临床药师建议抗感染方案修改为：多粘菌素 B50 万 U 静滴 q12h+鞘内注射给药 5 万 U/次/日，3-5 天后改为隔日给药一次+多美罗培南 2g 静滴 q8h 联合米诺环素 100mg 口服 bid ，6 月 26 日药物治疗已停，患者未发热，可自主睁眼，体温无发热，血压不高，气管切开状态，痰液较前明显减少，无言语，可间断遵嘱动作。

鲍曼不动杆菌很少导致社区获得性脑膜炎，但却与神经外科术后颅内感染的关系日益密切，已经成为院内中枢神经系统感染主要的致病病原体；其引起的颅内感染的死亡率为 15％～71％[4] 本例患者术后持续高热，脑脊液白细胞数达 38 593 ×106/ L，蛋白含量增高及糖含量降低，头皮分泌物细菌培养为广泛耐药鲍曼不动杆菌；为明确诊断，行脑脊液降钙素原检测，结果为 1.37μ g / L；同时送脑脊液标本至华大医学检验所行感染病原高通量基因检测（NGS 技术），结果显示脑脊液中鲍曼不动杆菌检出序列数高，是主要的感染细菌；遂高度怀疑鲍曼不动杆菌感染。传统的微生物检测方法涉及的实验较多、操作繁琐、培养需要时间较长、准备和收尾工作繁多，且分辨率低；而微生物繁殖速度快，新毒株不断出现，也使传统检测方法的效率大打折扣[3]

神经外科术后颅内感染是严重、常见的并发症之一，并且因为血-脑屏障的存在，抗菌药物难以通过血-脑屏障，在颅内的药物浓度相对较低；所以当颅内感染广泛耐药菌时，其治疗就成为了临床的一大难题。 本例患者颅脑外伤术后并发颅内感染，且病情危重、持续高热，脑脊液白细胞数一度达到 38 593 ×106/ L；经采用脑脊液降钙素原检测和二代测序技术实现颅内感染的早期诊断，为及时的治疗提供了有效的保证。在连续多天多粘菌素 B50 万 U 静滴 q12h+鞘内注射给药 5 万 U/次/日，3-5 天后改为隔日给药一次+多美罗培南 2g 静滴 q8h 联合米诺环素 100mg 口服 bid 后，患者颅内感染得到控制及好转。由此可见，多粘菌素 B 对广泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染具有较好的疗效，鞘内注射多粘菌素 B 也能得到较好的效果。但由于本研究仅为个例患者诊断治疗过程的总结分析，故对于泛耐药鲍曼不动杆菌颅内感染的治疗方案及其有效性和安全性，仍需要进行大样本的临床研究证实，本案例以期对其他同仁可以参考。

参考文献

[1] 陈佰义，何礼贤，胡必杰，等．中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识［J］．中国医药科学，2012，2：3．

[2] 徐明．腰大池持续引流联合万古霉素鞘内注射治疗颅脑术后颅内感 染 的 临 床 观 察［J］．中 华 医 院 感 染 学 杂 志， 2013，23：1356．

[3] 张新华，姬广福，朱淑敏，等．腰大池引流加庆大霉素冲洗治疗鲍氏不动杆菌颅内感染疗效分析［J］．中华医院感染学杂志，2013，23：4776．

[4] 李玉伟，雷燕妮，陈必耀，等．闭合性重度颅脑损伤患者开颅术后颅内感染相关因素分析及对策 ［J］．临床神经外科杂志，2015，12：253

Control，2018，7：22．

[8] 姜红振，马晓东，周定标，等．颅脑外伤术后颅内感染相关危险素分析［J］．临床神经外科杂志，2012，9：155．

[9] 张淳，张媛媛．基因测序技术在细菌性传染病监测中的应用［J］．中国医学装备，2017，14：134.

1 例头孢哌酮钠舒巴坦钠致患者血小板急剧下降的用药分析与监护

吴永森，杨丹，丁楠楠，章激

襄阳市中心医院　湖北　襄阳 442000

临床药师参与 1 例肺部感染合并心脏起搏器植入术出现血小板急剧减少的患者诊治过程,查阅相关文献,协助医师确定致血小板减少的药物,讨论药源性血小板减少症的机制以及监护措施。通过停用可疑药物,患者血小板计数恢复正常值后,病情控制平稳,顺利出院。临床药师通过对患者进行药学监护,协助医师及时发现并处理药物相关不良反应,期间严密监测血常规及凝血功能,警惕血小板减少及出血并发症的发生,为其他临床药师在工作中遇到临床使用头孢哌酮舒巴坦治疗过程中,尤其是有高危因素患者出现类似情况提供一定的参考。

clinical pharmacists were involved in the diagnosis and treatment of a patient with pulmonary infection accompanied by a sharp decrease in platelets after cardiac pacemaker implantation. Relevant literatures were consulted to assist doctors in determining the drugs causing thrombocytopenia, and the mechanism and monitoring measures of drug-induced thrombocytopenia were discussed. By stopping the suspicious drugs, the patient"s platelet count returned to normal, his condition was under stable control and he was discharged smoothly. Clinical pharmacists to patients with pharmaceutical care, assist doctors found in time and deal with the adverse reaction of drugs, strict monitoring of blood routine and blood coagulation function during, wary of thrombocytopenia and bleeding complications, encountered in the work for other clinical pharmacists in clinical use of cefoperazone shu ba treatment process, especially in patients with high-risk factors appear similar to provide some reference.

基于真实世界研究 VKORC1 基因分型对华法林起始抗凝治疗的影响和临床指导意义

吴永森，丁楠楠，卞芳，章激

湖北文理学院附属医院 襄阳市中心医院 442000

【摘要】目的：探索 VKORC1-1639G>A 基因多态性对华法起始剂量和 INR 值的影响，从而为临床上开始服照法林后是否有必要进行相关基因检测提供指导。**方法：**回顾性分析 2021 年 1 月-2022 年 1 月在某医院心外科行瓣膜置换术后服用华法林、并进行基因检的患者，至少携带一个 VKORC1-1639G 等位基因患者入选华法林抵抗组，选取相同例数的 VKORCI-1639AA 型患者作为对照组，比较两组患者第 3 天、第 4 天、第 5 天 INR 值的差异；前 2 天、前 3 天、4 天华法林总剂量的差异。**结果：** 共纳入患者 100 人，其中华法林抵抗组 50 人，对照组 50 人。两组患者人口统计学资料和基础临床料无显著性差异，华法林抵抗组患者前 2 天、前 3 天、4 天华法林总剂量显高于对照组患者（除前 2 天总剂量 $p<0.05$ 外，其余 $p<0.01$）；华法林抵抗组患者第 2 天、第 3 天、第 4 天和第 天 INR 值显著低于对照组患者 ($p<0.01$)。通过条形图也可以直观地看出这一结果。**结论：**携带至少 1 个 VKORC1-1639G 等位基因的患者在前 5 天服用较大剂量华法林 INR 仍较低，可根据服药后 2-4 天的 INR 值选择性进行华法林相关药物基因检测并为临床用药提供指导。

【关键词】华法林；VKORC1 基因；抗凝治疗；临床指导意义

基因多态性对氯吡格雷个体化用药方案的影响和临床结果

吴永森,卞芳

（襄阳市中心医院 药剂科　湖北 襄阳 442000）

【摘要】目的：虽然 CYP2C19 基因多态性与氯吡格雷代谢之间的相关性已有明确研究，但目前未见基于基因分型调整氯毗格雷的剂量应用的报道。本研究选择 PCI 术后应用氯吡格雷治疗的患者，进行 CYP2C19 基因型检测及血小板聚集检测，考察患者氯吡格雷维持量、基因代谢类型、生理病理等因素与临床效应的相关性，为 PCI 术后患者氯吡格雷的药物治疗依据提供新的思路。**方法：**本实验选择 48 例 PCI 术后患者。所有患者均给予氯毗格雷常规维持剂量(75mg) 治疗，采用原位杂交技术检测 CYP2C19 基因的两个主要多态性位点，根据 CYP2C19 基因型将患者分成快代谢组，中间代谢组和慢代谢组。并采用 ADP 血小板聚集技术检测血小板功能。对维持剂量无效的患者，将氯吡格雷剂量加倍。**结果：**结果显示所有患者均无毒副作用。氯吡格雷低反应性与胰岛素抵抗密切相关。高血压和高脂血症患者对氯毗格雷抵抗的风险增加。在<65 岁女性患者中，氯毗格雷耐药的发生与 CYP2C19 多态性相关。**结论：**对于 PCI 术后氯毗格雷治疗的患者，仍缺乏 CYP2C19 基因多态性与氯毗格雷给药剂量的数据研究。尚需更严格的实验研究，为其临床应用提供更多指导。

基于 CYP2C9/VKORC1 基因检测指导静脉血栓患者的华法林个体化用药研究

吴永森,卞芳

襄阳市中心医院 药剂科　湖北 襄阳 442000

【摘要】目的：研究 2021 年-2022 年我院静脉血栓患者 CYP2C9/VKORCI 基因多态性的分布，通过基因指导组与传统给药组治疗效果的比较，证实基于 CYP2C9/VKORC1 基因检测指导静脉血栓患者的华法林个体化用药方法的必要性。**方法：**将静脉血栓患者分为 2 组，一组（167 例）采用确原位荧光杂交技术检测静脉血栓患者患者（未联用胺碘酮）的 CYP2C9/VKORC1 基因型，利用基因型指导华法林的个体化给药。另一组仅利用患者的凝血酶原时间国际标准化比值（PT-INR）给予华法林治疗。两组同时记录患者性别、年龄、华法林的初始给药剂量、稳定给药剂量及凝血酶原时间国际标准化比值（PT- INR）。比较两组不同治疗方案下静脉血栓患者的出血风险及到达目标 INR 的时间。**结果：**与基因指导组相比，传统给药组不仅存在 9%左右的出血风险，而且大部分静脉血栓患者在短时间内不能达到目标 INR 值。因此根据静脉血栓患者基因型及年龄、身高、体重、合并药物等因素综合计算，得出的华法林的给药剂量在临床上具有很好的指导意义。基因指导组 167 例静脉血栓患者中 CYP2C9*1/*1 基因型患者 153 例（91.62%），*1/*3 型患者 14 例（8.38%），未发现*1/*2 型患者。VKORC1-1639 AA 基因型患者 138 例（82.63%），AG 型患者 27 例（16.17%），GG 型患者 2 例（1.20%）**结论：**根据基因检测指导静脉血栓患者华法林个体化给药，可以获得更加准确的稳定维持剂量，使患者更快达到最佳稳定剂量。不仅可以避免患者的出血风险，还可以缩短患者达到目标 INR 的时间，进而较早的控制病情。

1 例别嘌醇致严重皮肤过敏及相关基因 HLA-B*58:01 的检测

吴永森,卞芳

（襄阳市中心医院 湖北 襄阳 442000）

【摘要】目的：探讨别嘌醇致严重皮肤过敏与 HLA-B*58:01 等位基因是否存在相关性。**方法：**采集因服用别嘌醇引起严重皮肤过敏的患者静脉血，利用荧光原位杂交技术（Fluorescence in sim hybridization，FISH）检测 HLA-B*58:01 等位基因。**结果：**该患者的 HLA-B*58:01 等位基因为阳性。**结论：**别嘌醇致严重皮肤过敏可能与 HLA-B*58:01 等位基因存在相关性，因此，建议患者在服用别嘌醇前进行 HLA-B*58:01 的基因检测，确保安全用药。HLA-B*58:01 阳性携带患者不宜使用别嘌醇，除非预期收益要明显大于 SJS/TEN 风险的增加。

口服阿托品致反复心肌梗死 1 例

伍建中，宋志平，游海涛

岳池县人民医院　药剂科 四川 638300

【摘要】患者男性，因突发胸痛反复入院。冠脉造影提示：前降支冠脉痉挛，前降支心肌桥形成，推注硝酸甘油后前降支痉挛明显改善。仔细询问患者病史，发现患者有阿托品不规律用药史，嘱患者停用阿托品，并对其进行用药教育，后续随访中未见心肌梗死相关住院事件。

【关键词】药源性疾病，阿托品，急性心肌梗死

患者，老年男性。因“突发胸痛 4+小时”于 2022-04-26 入院；临床表现如下：入院前 4+小时（2022-04-26 日 04:00），患者出现胸痛不适，位于胸骨中下段后方，呈压榨感，放射至背心，症状持续不缓解，伴有大汗，伴有腹部不适，不伴有黑蒙晕厥等症状。患者于 08:07 到达我院大门，08:09 到急诊科，08:10 首诊医师接诊，于 08:12 完善首份心电图（图 1）：窦性心律，下壁 Q 波。08:16 完善床旁 POCT，08:44 POCT 示：MYO：770.47 ng/ml，CK-MB：25.16 ng/ml，HS-CTNI：5.43 ng/ml，NT-proBNP：110.7 pg/ml，08:45 考虑 NSTEMI，8:47 给予双抗药物嚼服，8:50 给予肝素钠 4000u 静脉注射抗凝，Grace 评分极高危。09:15 复查心电图，09:18 心电图示：急性下壁心肌梗死（图 2），立即与患者及家属沟通后同意急诊 PCI 治疗，完善核酸检查，于 09:45 送入导管室行急诊 PCI。术中患者冠脉痉挛明显，予以硝酸甘油后（图 3）好转。其在住院期间该患者 HS-CTNI 的变化如图 4 所示。查询患者病历发现，患者多次我院住院史，于 2015 年因腹痛住院治疗，考虑胃肠道痉挛，病历中心电图描述：窦性心律，大致正常心电图(未见心电图)，心肌酶及 BNP 未见异常。2020.11.18 患者因“胸痛、腹痛 4+小时”住院，心电图提示窦性心律，完全性右束支传导阻滞，V1-V3 ST 段呈弧形抬高（图 5），床旁心肌酶未见明显异常，考虑诊断：1.冠心病 不稳定心绞痛，下壁 Q 波形成。住院期间复查心肌酶：3.6 ng/ml，故修正诊断为：急性前壁 ST 段抬高型心肌梗死。完善冠脉造影提示：前降支冠脉痉挛，前降支心肌桥形成，推注硝酸甘油后前降支痉挛明显改善（图 6），美托洛尔控制心室率，抑酸护胃、补液及对症支持治疗，患者症状缓解，于同期出院。其在住院期间的 HS-CTNI 变化如图 7 所示，嘱院外继续服用阿司匹林抗血小板，阿托伐他汀稳定粥样斑块，单硝酸异山梨酯扩张冠脉，硝苯地平控释片和依那普利控制血压。如今再次心梗，考虑药物依从性和生活习惯较差，因此对患者进行相关用药教育，仔细询问患者病史发现，患者有慢性胃炎病史，每当患者感胃部不适，就自行服用阿托品，剂量不等，未严格按照说明书服用，自觉症状严重时还会加大剂量，增加服用次数等。经文献查询[1-3]发现，阿托品有增加冠脉耗氧量的可能，因此建议患者停用阿托品，同时嘱口服左旋氨氯地平片，依那普利片降压，阿托伐他汀钙片稳定粥样斑块，尼可地尔片扩张冠状血管，阿司匹林抗血小板，泮托拉唑肠溶片护胃。后续随访未出现心肌梗死相关住院事件。

讨论： 2 型心肌梗死是指在无冠状动脉粥样硬化斑块破裂情况下，由心肌耗氧量增加或氧供减少导致的心肌坏死。阿托品为非选择性 M 受体阻滞剂，能够抑制受体节后胆碱能神经支配的平滑肌与腺体活动，也可消除迷走神经对窦房结的影响，使心率加快，由于该药对于 M 受体的选择性较差，存在不少的副作用，以往研究[1-3]报道，阿托品能够诱发心绞痛，甚至急性心肌梗死的情况，其机制阿托品可解除迷走神经的张力，使得交感神经作用突然占优势，使粥样硬化的冠状动脉 α 受体突然兴奋有关，增加心肌耗氧量，缩短冠状动脉供血期，加重心肌需血与缺血之间的平衡失调。该患者多次冠脉造影提示冠脉痉挛明显，原因不明，可能是由于长期大剂量服用阿托品有关。

药源性疾病指由药物不良反应导致机体某器官或组织发生功能性或器质性损害[4]。着临床用药品种不断增加，药源性疾病发病率呈上升趋势，2008 年至 2011 年美国住院患者发生药物不良事件共 9.44×10^6 例，占总住院人数约 6.28% [5] ，据统计， 2022 年全国药物不良反应监测网络累计收到《药品不良反应 /事件报告表》近 202.3 万份[6]，老年患者常伴有多种慢性疾病须长期联合多种药物治疗，机体药物代谢动力学的改变和内环境稳定的减退，是发生药源性不良反应的高危人群。药源性疾病的发生率不断增加，给人民的健康带来了很大的危害。目

前药源性疾病通常由科室医生负责诊治，相对于临床药师，医师因为日常工作繁忙，对药源性疾病了解相对较少，为临床药师提供了证明自己价值的机会。本例患者有高血压和冠心病病史，加之年龄较大，药物代谢方面和正常人已有所差异，对于受体的敏感性与正常人有所不同，因而对于阿托品的反应也有所差异，加之服用的剂量也相对正常剂量较大，因此导致了急性心肌梗死的发生。临床药师是药物警戒工作的具体组织者和直接参与者，在药源性疾病诊疗中，临床药师应积极发挥自身的专业特长，将被动监测转为主动警戒，从而减少药源性疾病的发生，为“健康中国行动”做出应有的贡献。

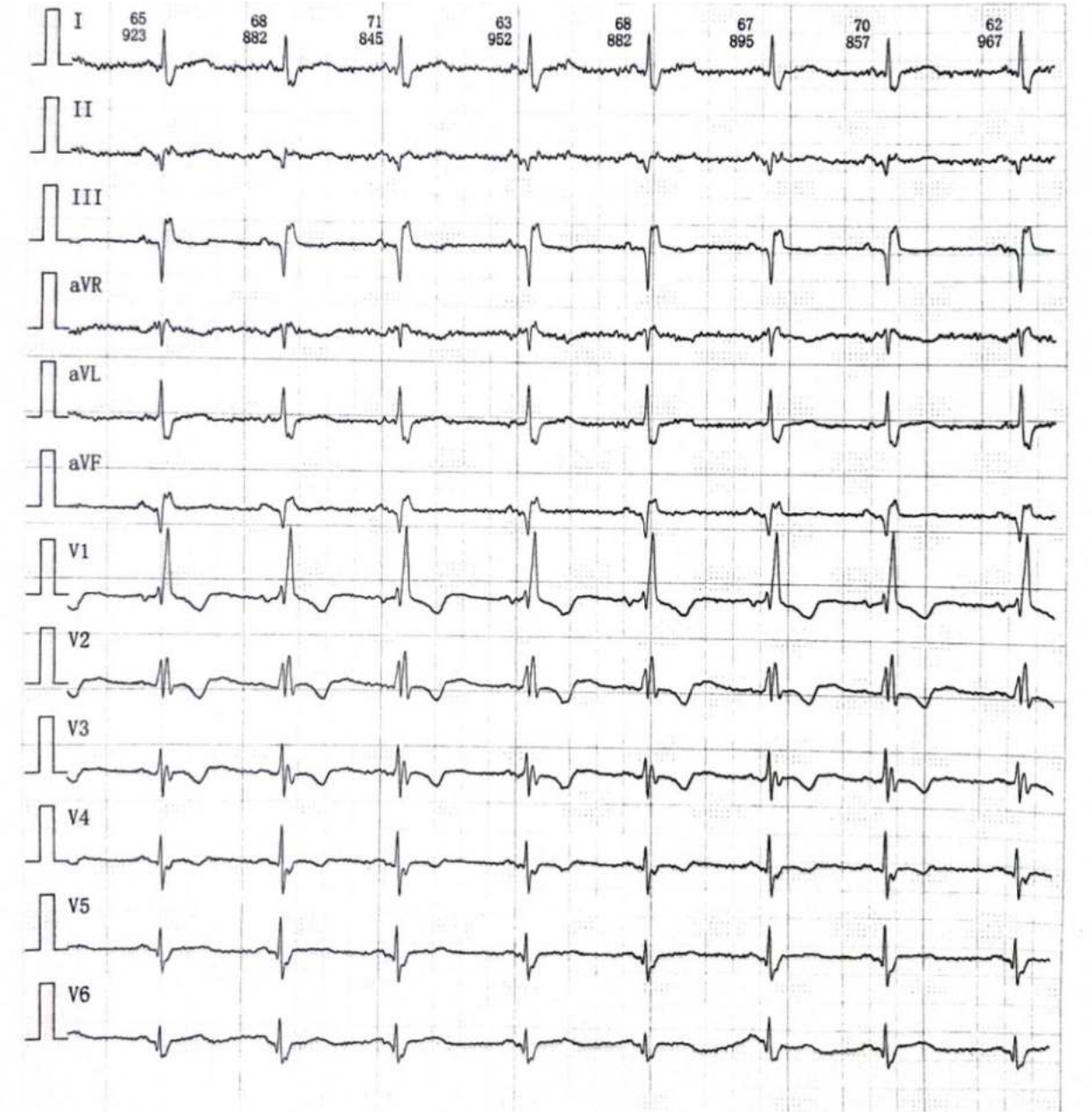


图 1

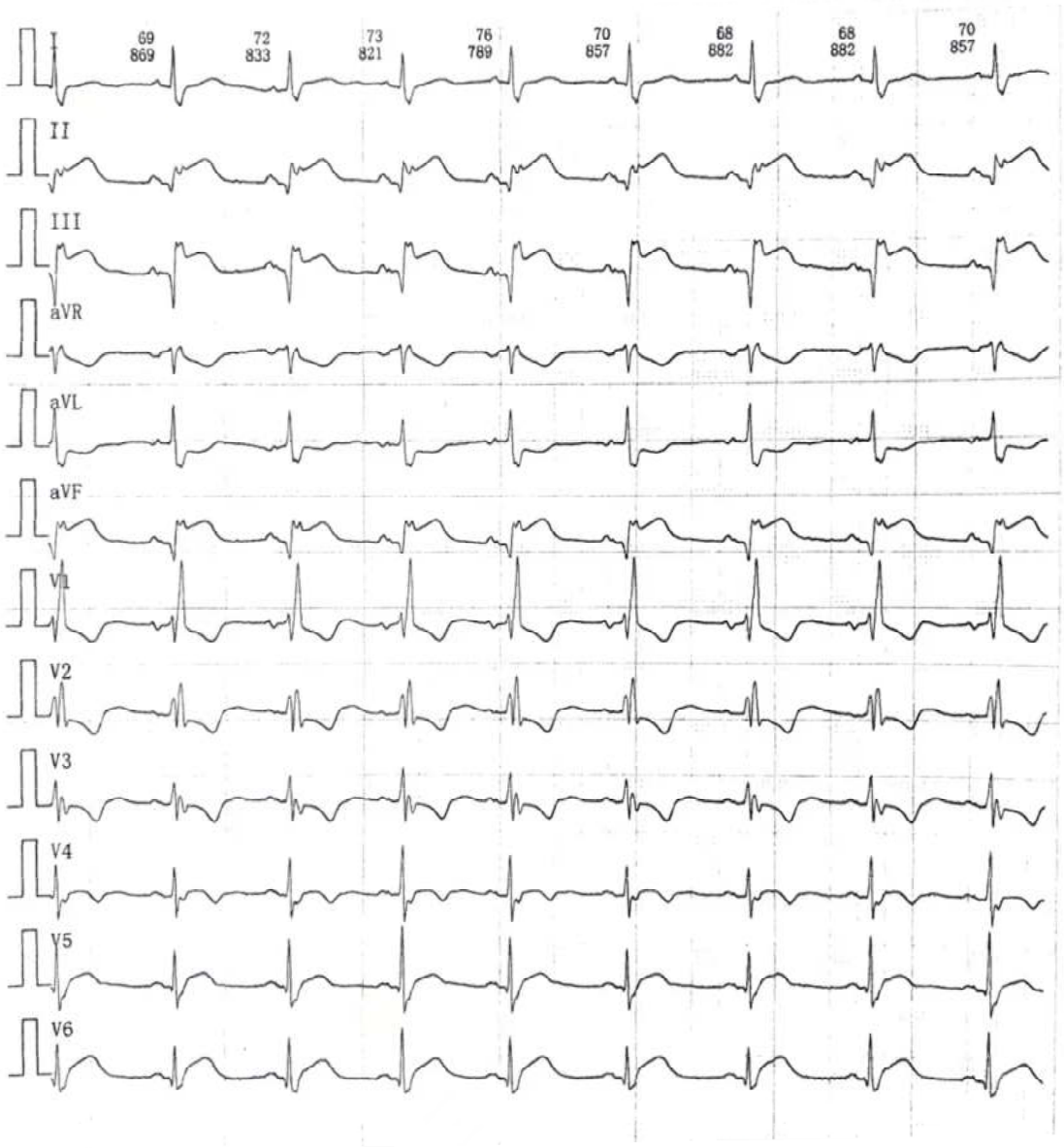


图 2



给予硝酸甘油前　　给予硝酸甘油后

图 3

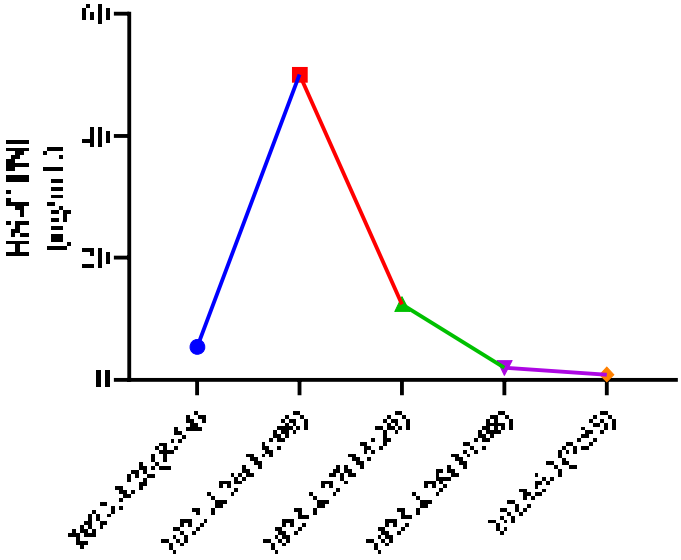


图 4

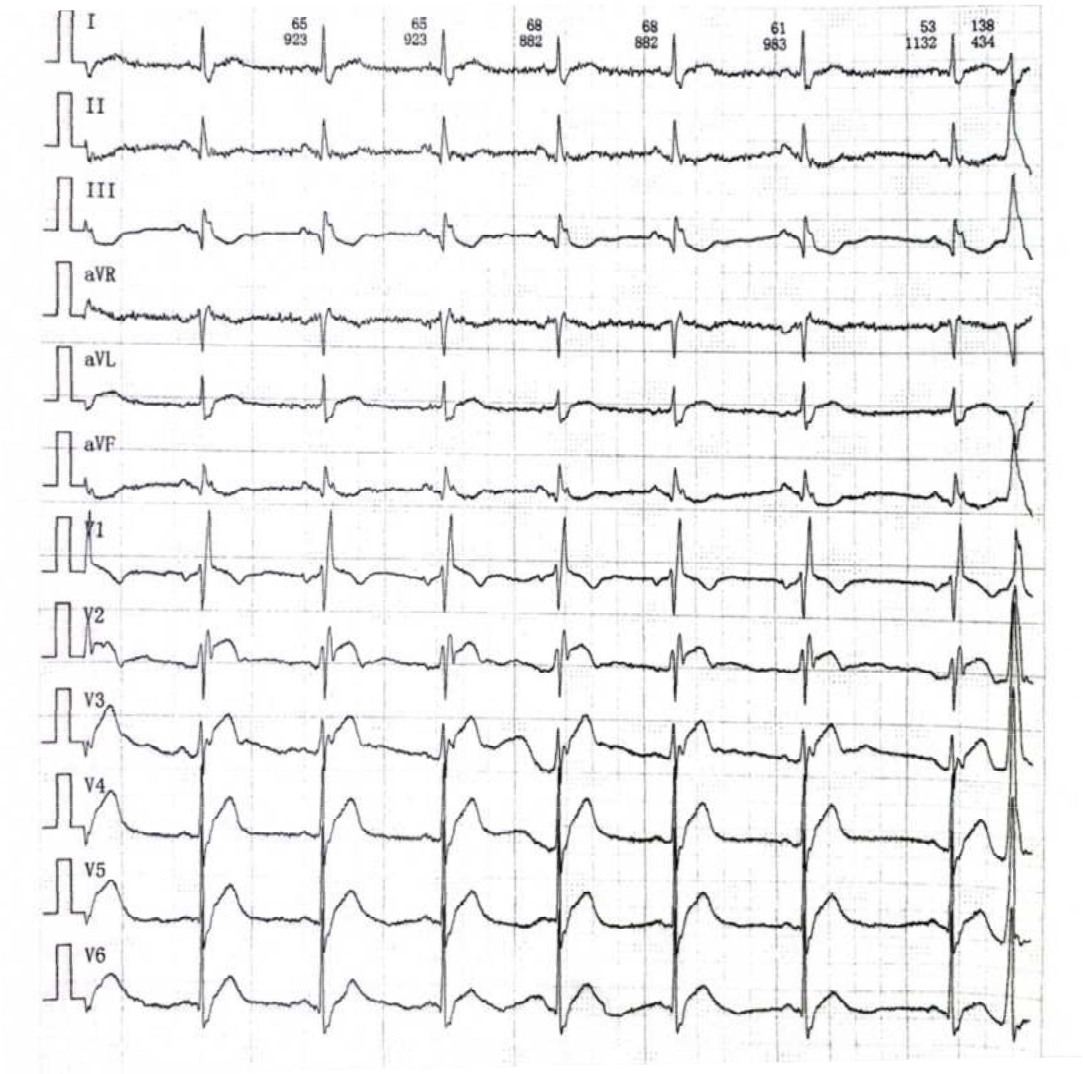

I
II
III
aVR
aVL
aVF
V1
V2
V3
V4
V5
V6
65 923
65 923
68 882
68 882
61 963
53 1132
138 434

图 5



给予硝酸甘油前　　给予硝酸甘油后

图 6

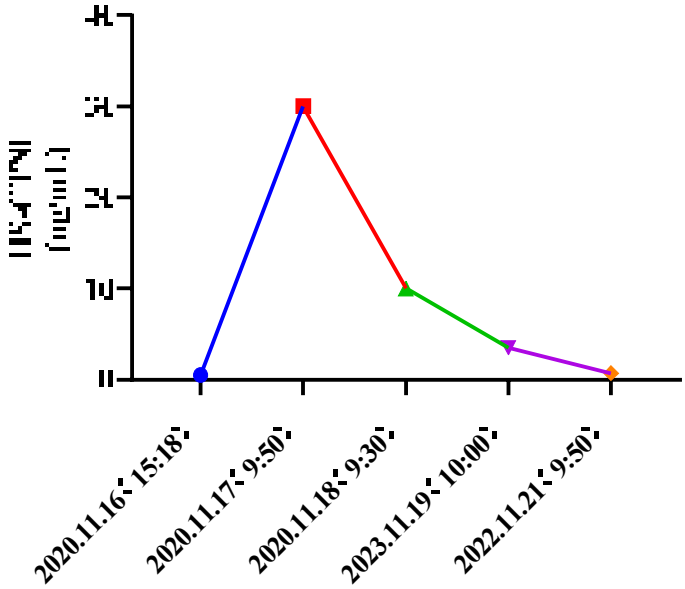


图 7

参考文献

[1] 何文一，邓国兰，侯佳宏. 阿托品试验诱发变异性心绞痛 1 例[J]. 重庆医学，2014，(30)：4128-4128. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.30.055.

[2] 邓锦清，刘泽. 肌注常规剂量阿托品引起心绞痛发作 1 例[J]. 实用医学杂志，2012，28(6)：867. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2012.06.002.

[3] 王力英，周从义. 阿托品诱发急性心肌梗死后再灌注心律失常 1 例[J]. 实用心电学杂志，2002(04)：274-275. DOI:10.13308/j.issn.1008-0740.2002.04.029.

[4] 刘坚，吴新荣，蒋琳兰．药源性疾病监测与防治[M]．北京：人民军医出版社，2009: 1 -2．

[5] Poudel D R , Acharya P , Ghimire S ,et al. Burden of hospitalizations related to adverse drug events in the USA: a retrospective analysis from large inpatient database[J]. Pharmacoepidemiology and Drug Safety, 2017.DOI:10.1002/pds.4184.

[6]国家药品不良反应监测年度报告（2022 年）[J].中国药物警戒，2023，20(06)：712-719. DOI：10. 19803/j. 1672-8629. 20230168.

基于 HPLC 特征图谱分析黄芩及其常用炮制品化学成分的变化

武开智[1△]，赵瑛瑛[1]，杨丽婷[1]，赵晓琴[1]，王琦[1]，王泽山[2✉]

（1.大同市综合检验检测中心，山西大同 037009；2.同药集团有限公司，山西大同 037006；）

【摘要】目的：利用 HPLC 对黄芩片及其 5 种炮制品（炒黄芩、酒黄芩、姜黄芩、醋黄芩、黄芩炭）中 3 种化学成分（黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素）的变化进行探讨分析，优化最佳色谱条件，建立 HPLC 特征图谱，同时采用一测多评法测定其含量，揭示不同炮制品中其化学成分的变化规律，为炮制工艺提供基础研究，为临床用药提供参考依据。**方法：**采用高效液相色谱 HPLC 技术，色谱柱 HPLCONE-3C18A (4.6 mm I.D × 100 mm3μm)；以 0.2%磷酸水溶液为流动相 A，以甲醇为流动相 B；梯度洗脱；流速 1ml/min；柱温 30℃；检测波长 280 nm。建立其特征图谱和一测多评法。**结果：**黄芩片与其 5 种炮制品 HPLC 特征图谱中有 7 个共有峰，指认出黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 3 个特征峰，重复性好，平均加样回收率在 94.9%～100.1%之间，RSD 为 2.3%。分析结果表明：黄芩及其 5 种炮制品化学成分基本一致，但 7 个峰峰面积变化相对较大。尤其是黄芩炭含量总和下降约 13 个百分点。**结论：**该方法简便准确，重复性好，可为综合评价黄芩及其 5 种炮制品的质量控制提供方法参考。

【关键词】黄芩片；炮制品；炒黄芩；酒黄芩；姜黄芩；醋黄芩；黄芩炭；HPLC；特征图谱；一侧多评法；黄芩苷；黄芩素；汉黄芩素；化学成分的变化。

黄芩为唇形科植物黄芩 Sc μ tellaria baicalensis Georgi 的干燥根[1]。始载于《神农本草经校注》[2]“主诸热黄疸，肠澼，泄痢，逐水，下血闭。（治）恶疮，疽蚀，火疡。”《本草纲目》载[3]：“宿芩乃旧根，多中空，外黄内黑，即今所谓片芩。”，“子芩乃新根，多内实，即今所谓条芩。”黄芩是现在临床上常用的中药材，有清热燥湿，泻火解毒，止血，安胎等功效，由于其生品气味苦寒，又有清热燥湿、止血，安胎之功，故历代医家颇重视其炮制，现临床常用的除生黄芩外，炮制品有酒黄芩、黄芩炭、炒黄芩、姜黄芩、醋黄芩等。本实验拟利用 HPLC 法对黄芩片及其上述 5 种炮制品（炒黄芩、酒黄芩、姜黄芩、醋黄芩、黄芩炭）中的 3 种化学成分（黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素）的变化进行分析，同时采用一测多评法测定其量的变化，通过比较分析其不同炮制品中化学成分的变化规律，为炮制工艺提供基础研究，为临床用药提供参考数据。

酒黄芩：收载于《中国药典》2020 年版黄芩饮片项下[1]。长于清上焦热及四肌表之湿热，止血，安胎，减轻其苦寒之性。炒黄芩：收载于《天津市中药饮片炮制规范（2018 年版）》等地方标准[4]。适宜于体弱患者、胃气素虚患者、上焦热证患者。黄芩炭：收载于《天津市中药饮片炮制规范（2018 年版）》等地方标准[4]。炭性收敛，故黄芩炭止血作用增强，用于治疗血热妄行之大出血效优。姜黄芩：《丹溪心法》书中有记载，曰“姜汁炒”[5]。生姜与黄芩之功协同，则可清除痰火，治疗痰热咳喘，肠胃湿热，止泻痢，作用尤佳。醋黄芩：《得配本草》云：“得米醋浸，炙七次为末，水服，治吐衄崩中下血”[6]。醋能行里，故醋黄芩长于清泻里热，凉血止血作用好。

经过不同工艺炮制的黄芩炮制品，其内在成分发生变化，然而其质量标准仅以黄芩苷为含量测定指标，不足以体现其质量和特性。为推动黄芩标准的现代化进程，建立有效的质量控制标准，更好地保证其临床应用的安全性和有效性，本研究利用高效液相色谱法（HPLC）对黄芩及其 5 种炮制品建立特征图谱、一测多评法进行比较分析；以阐明其化学成分的差异，为完善黄芩及其炮制品质量标准提供方法参考。

△第一作者：武开智，E-mail：458692659@qq.com

✉通信作者：王泽山 E-mail：18735082863@163.com

1 仪器与材料

1.1 仪器安捷伦 LC 1260Ⅱ高效液相色谱仪（紫外检测器）,月旭 HPLCONE-3C18A (4.6 mm I.D×100 mm3μm)色谱柱，瑞士梅特勒 MS105D μ 电子分析天平，德国赛多利斯 Practμm224-1CN 电子分析天平,鼎泰双频超声仪。

1.2 黄芩苷对照品购自天津阿尔塔科技有限公司, 批号 IST40031-FS1623912，含量为 94.2%；黄芩对照药材，批号：YH002801；黄芩素对照品，批号 491-67-8，含量≥98%；汉黄芩素对照品，批号 632-85-9，含量≥98%，均购于北京北方伟业计量技术研究院。甲醇为默克色谱纯，其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.3 药材研究用黄芩样品，是山西运城、陵川、山东汶上 3 个产地，经赵晓琴鉴定为唇形科植物黄芩 Sc μ tellaria baicalensis Georgi 的干燥根。3 个产地的黄芩均加工成 5 种炮制品（自制），酒黄芩炮制法采用《中国药典 2020 年版》标准；炒黄芩、黄芩炭炮制法采用《天津市中药饮片炮制规范 2018 年版》标准；姜黄芩、醋黄芩炮制法采用《中国药典 2020 年版》四部 0213 姜炙、醋炙法。样品具体信息见表 1。

表 1　黄芩及其 5 种炮制品样品信息汇总

样品编号	样品名称	产地信息	炮制方法	炮制执行标准	样品编号	样品名称	产地信息	炮制方法	炮制执行标准
S1	黄芩片	山西运城	饮片	中国药典（2020 年版）一部、四部	S10	炒黄芩	山西运城	清炒	《天津市中药饮片炮制规范（2018 年版）》
S2	黄芩片	山西陵川			S11	炒黄芩	山西陵川		
S3	黄芩片	山东汶上			S12	炒黄芩	山东汶上		
S4	酒黄芩	山西运城	酒炙		S13	姜黄芩	山西运城	姜炙	《中国药典（2020 年版）》四部 0213
S5	酒黄芩	山西陵川			S14	姜黄芩	山西陵川		
S6	酒黄芩	山东汶上			S15	姜黄芩	山东汶上		
S7	黄芩炭	山西运城	炒炭	《天津市中药饮片炮制规范（2018 年版）》	S16	醋黄芩	山西运城	醋炙	
S8	黄芩炭	山西陵川			S17	醋黄芩	山西陵川		
S9	黄芩炭	山东汶上			S18	醋黄芩	山东汶上		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱条件及系统适用性实验色谱柱：月旭 HPLCONE-3C18A (4.6 mm I.D×100 mm3μm)色谱柱；以 0.2%磷酸水溶液为流动相 A，以甲醇为流动相 B；进行梯度洗脱（0～40min，66%～34%A；）；流速为每分钟 1mL；检测波长为 280mm；进样量为 10μl；柱温为 30℃。理论塔板数应不低于 5000。黄芩高效液相特征图谱如图 1 所示。

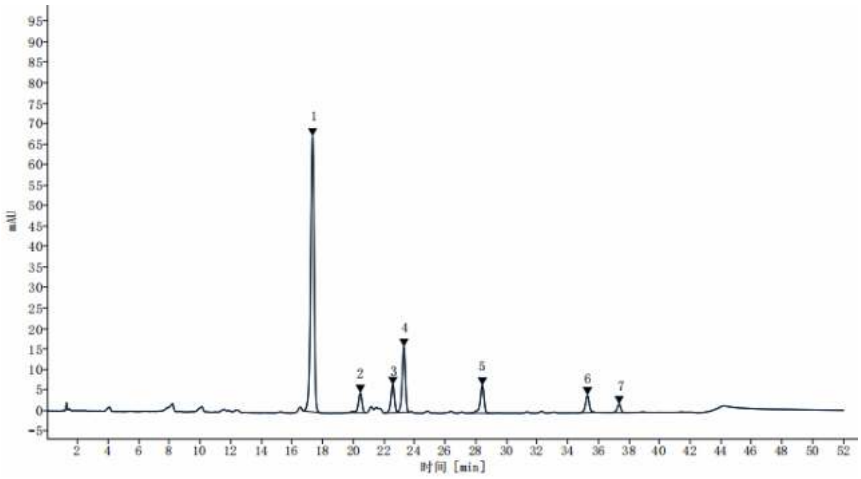


图 1 黄芩对照药材 HPLC 特征图谱

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 分别精密称取对照品黄芩苷 10.77mg、黄芩素 14.29mg、汉黄芩素 10.50mg，分别置于 25ml 的容量瓶中，加 70%甲醇溶解并定容至刻度。即得对照品储备液。

2.2.2 精密量取黄芩苷对照品储备液，得到质量浓度 20.29μg/ml、40.58μg/ml、81.16μg/ml、162.33μg/ml、202.91μg/ml、405.8141μg/ml 的黄芩苷对照品系列溶液，用于线性方程的考察。

2.2.3 精密量取黄芩苷对照品储备液 4ml 于 25ml 容量瓶中加 70%甲醇定容，即得 64.9μg/ml 的黄芩苷对照品溶液，用于含量测定。

2.2.4 取浓度为黄芩苷 40.6μg/ml、黄芩素 56.0μg/ml、汉黄芩素 41.2μg/ml 的混合对照品溶液，用于特征图谱中化合物定位。

2.2.5 黄芩对照药材按 2.3 样品方法提取制备，作为特征图谱中黄芩片的参照物。

2.3 供试品溶液制备

取各样品粉末（过 4 号筛）约 0.3g，精密称定，置于 150mL 具塞锥形瓶中，精密加 70%甲醇 100mL,密塞，称定重量，超声处理（功率 250W.频率 40kHz）30min，放冷，再称定重量，用 70%甲醇补足减失的重量，摇匀，离心(5000r/min)10min,倾取上清液，精密量取 1ml 置 10ml 容量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，过微孔滤膜（0.45μm）,即得。

2.4 系统适应性试验取对照品、供试品、空白样品溶液适量，在“2.1”色谱条件下进样测定，结果见图 2-图 4。由此可知，各成分分离度和理论塔板数良好，阴性无干扰。

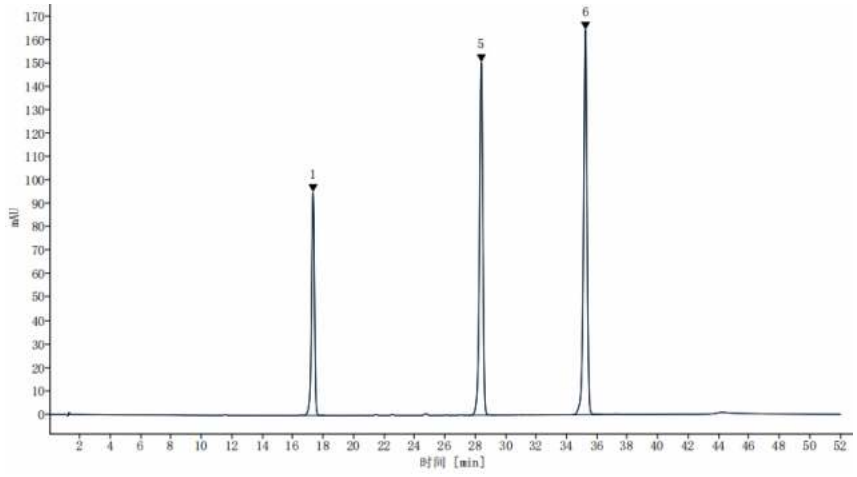


图 2 黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素混合对照品溶液 HPLC 色谱图

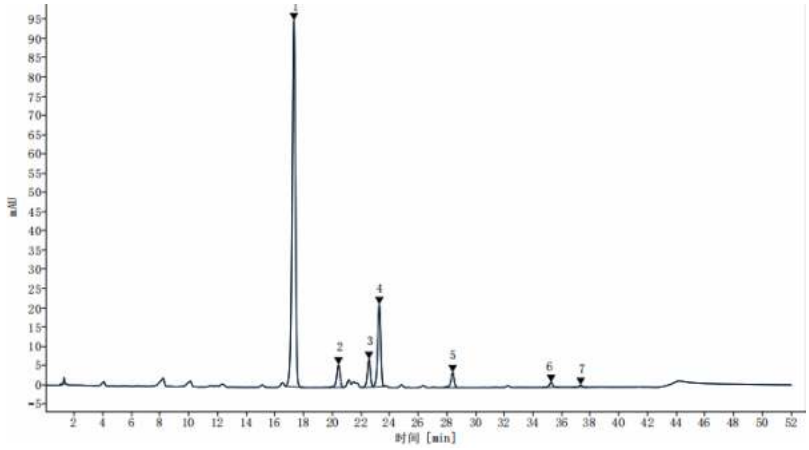


图 3S1 黄芩片 HPLC 色谱图

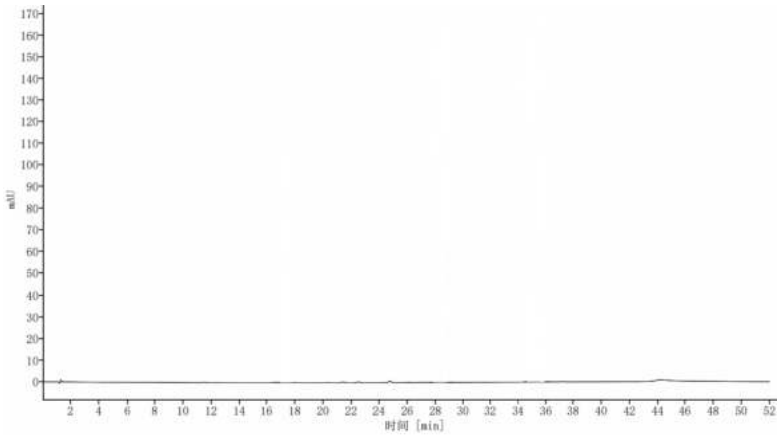


图 4 空白样品溶液 HPLC 色谱图

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围考察取 2.2.2 项下的黄芩苷对照品系列溶液,在 2.1 条件下进样分析，回归方程为 Y=34.275X+40.869，R=0.9995，结果表明黄芩苷在 0.02029μg-0.4058μg 范围内线性关系良好。

2.5.2 精密度试验取 2.2.4 项下的混合对照品溶液，连续进样 6 次，进样量：10μl，记录色谱峰，结果黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 3 个成分的相对保留时间的 RSD 分别为 0.10%、0.12%、0.19%，峰面积的 RSD 分别为 0.07%、0.18%、1.16%，结果表明精密度试验符合有关规定。

2.5.3 稳定性试验

在室温条件下，取同一供试品（S1 黄芩片），按“2.3”制备供试品溶液，在 2.1 条件分别于供试品溶液制备后 0、2、4、8、12、24h 进样分析，进样量：10μl，结果黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 3 个成分的相对保留时间的 RSD 分别为 0.14%、0.17%、0.24%，峰面积的 RSD 分别为 0.14%、0.29%、1.47%，表明在 24 小时内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验

取同一供试品（S1 黄芩片），取样 6 份，按“2.3”制备供试品溶液，做平行试验，每份进样 2 次，结果黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 3 个成分的相对保留时间的 RSD 分别为 0.14%、0.17%、0.24%，峰面积的 RSD 分别为 0.14%、0.29%、1.47%。记录黄芩苷峰面积，采用外标法计算，黄芩苷含量平均值为 0.1313mg/g，RSD 为 1.49%，结果表明重复性试验符合有关规定。

2.5.5 加样回收率试验

精密称取重复性考察测定后已知含量的供试品（S1 黄芩片），每份 0.15g，称取 6 份，分别置 150ml 具塞锥形瓶中，再分别加入黄芩苷对照品约 15mg，按 2.3 项下方法制备供试品溶液，并按 2.1 色谱条件测定，采用外标法计算回收率，结果黄芩苷平均回收率在 94.9-100.1 %之间，RSD 为 2.3%，结果表明加样回收率试验符合有关规定。结果见表 2。

表 2：黄芩苷回收率试验测定结果

取样量（g）	样品含量（mg）	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率（%）	平均回收率（%）	RSD（%）
0.1505	19.76	15.0012	34.3427	97.2	97.2	2.3
0.1511	19.84	14.9989	34.7913	99.7		
0.1503	19.73	15.0015	34.0003	95.1		
0.1509	19.81	15.0005	34.8306	100.1		
0.1501	19.71	15.0011	34.1785	96.4		
0.1516	19.91	15.0026	34.1479	94.9		

2.6 化学成分特征图谱的分析取 2.2.4 配制好的混合对照品溶液，黄芩对照药材和黄芩片(S1)及其 5 种炮制品(S4、S7、S10、S13、S16)，按 2.3 方法制备供试品溶液，按 2.1 色谱条件进样分析，各进样 10μl。从特征图谱可看出，有 7 个共有峰，指认出其中 3 个，即 1 号峰为黄芩苷，5 号峰为黄芩素，6 号峰为汉黄芩素，2、3、4、7 号峰未知。其图谱详见图 1-图 8，保留时间、峰面积详见表 3。

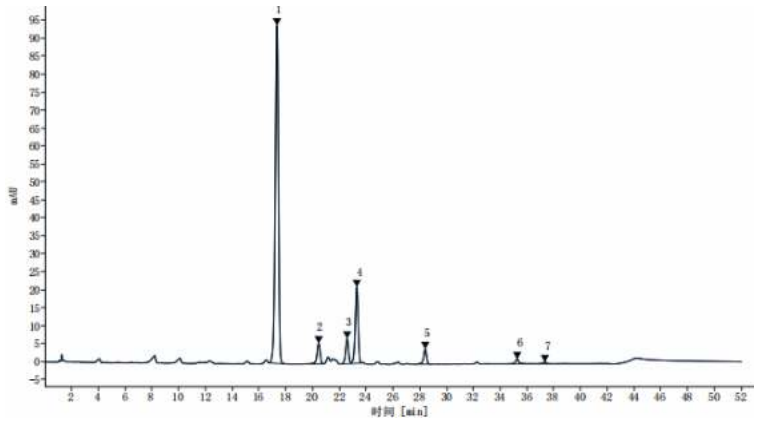


图 4　炒黄芩 HPLC 特征图谱

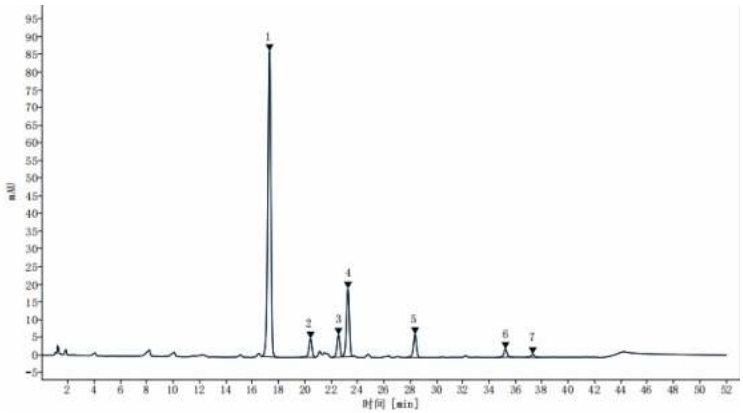


图 5　酒黄芩 HPLC 特征图谱

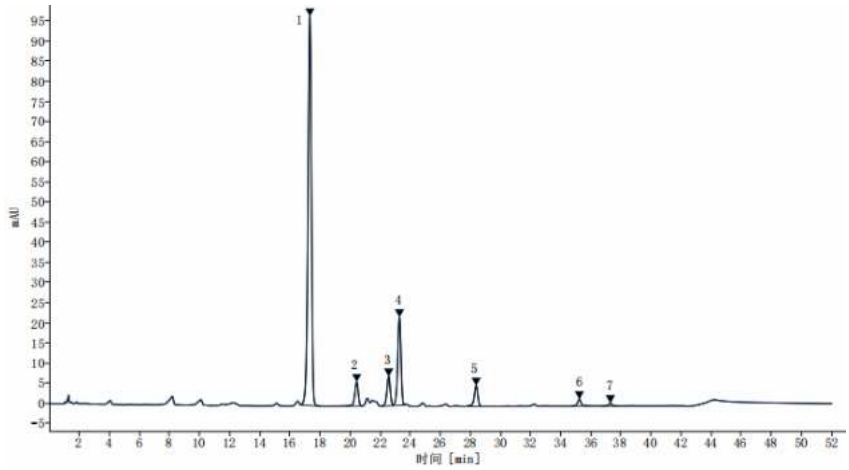


图 6　姜黄芩 HPLC 特征图谱

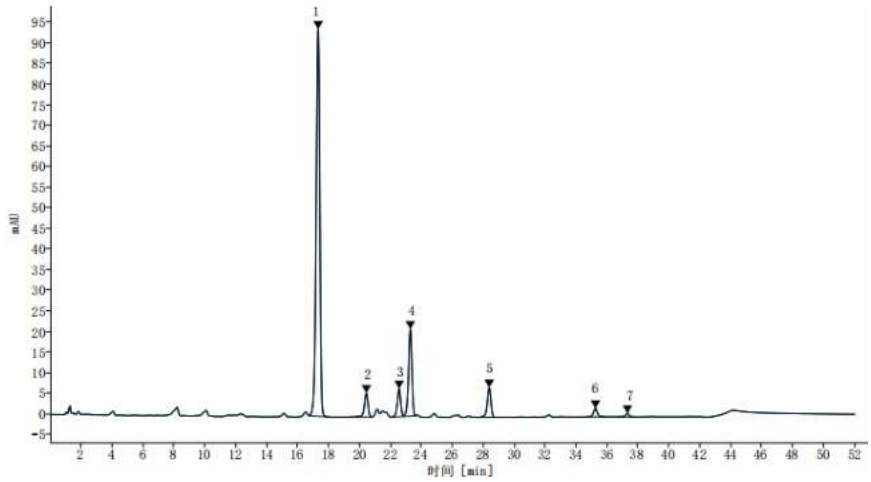


图 7 醋黄芩 HPLC 特征图谱

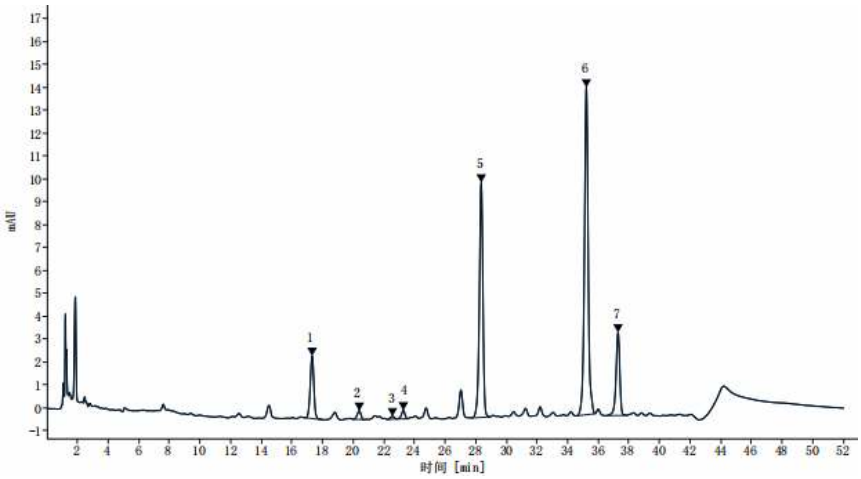


图 8 黄芩炭 HPLC 特征图谱

表 3　黄芩及其炮制品特征图谱保留时间、峰面积汇总表

样品色谱峰峰号与保留时间（min）范围		1 号峰 黄芩苷 17.30 (±5%)	2 号峰 （未知） 11.38 (±5%)	3 号峰 （未知） 13.77 (±5%)	4 号峰 （未知） 13.77 (±5%)	5 号峰 黄芩素 28.36 (±5%)	6 号峰 汉黄芩素 35.21 (±5%)	7 号峰 （未知） 37.77 (±5%)
混合对照品	保留时间（min）	17.30				28.36	35.21	
	峰面积 A	1285				2332	2671	
黄芩对照药材	保留时间（min）	17.31	20.42	22.55	23.27	28.39	35.26	37.33
	峰面积 A	1089	79	105	242	113	72	34
黄芩片	保留时间（min）	17.29	20.40	22.53	23.24	28.361	35.23	37.29
	峰面积 A	1542	95	110	323	66	21	8
炒黄芩	保留时间（min）	17.30	20.41	22.54	23.26	28.37	35.24	37.30
	峰面积 A	1526	92	107	322	69	22	8
酒黄芩	保留时间（min）	17.28	20.39	22.52	23.24	28.33	35.20	37.27
	峰面积 A	1404	85	96	292	107	40	14
醋黄芩	保留时间（min）	17.29	20.40	22.53	23.25	28.35	35.22	37.29
	峰面积 A	1526	93	103	321	115	35	13
姜黄芩	保留时间（min）	17.29	20.40	22.53	23.25	28.34	35.20	37.26
	峰面积 A	1575	96	112	332	85	29	11
黄芩炭	保留时间（min）	17.281	20.36	22.53	23.23	28.320	35.18	37.25
	峰面积 A	45	6	2	6	165	243	62

从上面图谱和表 3 可以看出，黄芩片与黄芩对照药材的特征图谱 7 个峰基本一致。

其 5 种炮制品与黄芩片特征图谱中的 7 个峰相比较，化学成分基本一致，但峰面积变化较大，原因是其炮制品局部受到的温度高低、时间长短和不同辅料的影响，区别如下：

炒黄芩：峰面积有少许区别，1、2、3 号峰面积下降约 2%；4、5、6、7 号峰的峰面积几乎无变化；酒黄芩：峰面积区别较大，1、2、3、4 号峰面积下降约 12%；5、6、7 号峰的峰面积增大约 70%。醋黄芩：峰面积区别较大，但 1、2、3、4 号峰变化不大，峰面积下降约 2%；5、6、7 号峰的峰面积增大约 50%。姜黄芩：峰面积区别较大，但 1、4 号峰面积升高约 2%；2、3 号峰面积几乎无变化，5 号峰黄芩素升高约 30%，6、7 号峰的峰面积增大约 40%。黄芩炭：峰面积变化最大，1 号峰黄芩苷的峰面积明显下降约 34 倍，2、3、4 号峰面积下降至极低，而 5 号峰黄芩素的峰面积大于黄芩片约 2.5 倍、6 号峰汉黄芩素的峰面积大于黄芩片约 11.5 倍， 7 号峰的峰面积明显增强，是黄芩片的 5 倍多（黄芩片中 7 号峰吸收强度十分低），而这也充分验证了中药炮制学中炒炭存性的理论的原理。

2.7 一测多评方法建立，对 3 种成分的含量测定

为了对黄芩及其 5 种炮制品的质量进行更好控制，在特征图谱的基础上，建立一测多评法，以黄芩苷为参照物，测定黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 3 个主要成分含量。其方法学考察同特征图谱。

2.7.1 相对校正因子[7]计算

采用多点校正法，精密吸取混合对照品溶液各 10、20、30、40、50μl，按照 2.1 项色谱条件进样，每个质量浓度进样 3 次，取平均值计算。以黄芩苷色谱峰（峰 1）为参比峰（s），根据 $F_{S/i}$ 的计算公式[$F_{S/i}=F_S/F_i=(As/Cs)/(A_i/C_i)$]计算黄芩素、汉黄芩素与内参物黄芩苷间的 $F_{S/i}$ ，结果 2 个待测成分与内参物的 $F_{S/i}$ 的 RSD 值均小于 5%，黄芩苷/黄芩素分别为 1.6051%、1.6355%、1.6616%、1.6422%、1.6799%，其平均值 1.64486%，RSD 为 1.72%；黄芩苷/汉黄芩素分别为 2.0102%、2.0911%、1.9898%、2.0896%、2.0068%，其平均值 2.0375%，RSD 为 2.39%。

2.7.2 测定法 分别精密吸取黄芩苷对照品溶液与供试品溶液各 10μl，注入液相色谱仪，测定。

以黄芩苷对照品的峰面积为对照，分别计算样品中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量，用待测成分色谱峰与黄芩苷色谱峰的相对保留时间确定。

黄芩素、汉黄芩素的峰位其相对保留时间应在规定值的±5%范围之内，相对保留时间校正因子如下：

以黄芩苷为参照物，黄芩素、汉黄芩素的相对保留时间如下：

待测成分（峰）	相对保留时间
黄芩苷	1.00
黄芩素	1.64
汉黄芩素	2.04

2.7.3 样品含量测定结果

所有样品按 2.3 制备供试品溶液，按 2.1 色谱条件重复进样 2 次，以黄芩苷为参照峰，按一测多评法计算含量，取平均值，18 批样品中黄芩片及各炮制品含量测定结果见表 4

表 4　黄芩及各炮制品含量测定结果

编号	单位（%）			合计（%）
	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	
S1	17.07	0.76	0.24	18.07
S2	17.04	0.69	0.22	17.95
S3	17.12	0.72	0.26	18.1
S4	15.55	1.15	0.46	17.16
S5	15.46	1.18	0.42	17.06
S6	15.67	1.19	0.39	17.25
S7	0.49	1.74	2.63	4.86
S8	0.46	1.78	2.55	4.79
S9	0.53	1.77	2.60	4.9
S10	16.70	0.78	0.21	17.69
S11	16.81	0.65	0.25	17.71
S12	16.63	0.73	0.22	17.58
S13	17.42	0.91	0.32	18.65
S14	17.36	0.88	0.35	18.59
S15	17.44	0.93	0.31	18.68
S16	16.89	1.24	0.39	18.52
S17	16.95	1.27	0.36	18.58
S18	16.83	1.29	0.33	18.45

本实验结果从上表可见：黄芩及其 5 种炮制品中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量变化相对较大。尤其是黄芩炭含量总和下降约 13 个百分点。

一测多评法即可解决中药对照品昂贵问题，又可解决多成分含量测定造成局限性的难题，从其特征图峰的数量、峰面积大小来评判黄芩各炮制品药材的质量与特性。

3 方法与结果

本实验对黄芩供试品的制备方法(超声、加热回流)、提取溶剂(甲醇、70%甲醇、乙醇)、超声时间(30、45、60 min)等进行了考察，最终确定为 70%甲醇超声提取 30 min。对不同流动相（甲醇-0.1%磷酸；乙腈-0.1%磷酸）、梯度洗脱时间（0-30-50nm；0-40nm），结合分离度、色谱峰和峰形、基线平稳程度等进行了考察，最终分别确定为 0.2%磷酸-甲醇、0-40nm；

针对市场和临床应用中黄芩及其炮制品存在混用的情况，本实验建立了黄芩及其炮制品的特征图谱，有 7 个共有峰，确认了其中的 1 号峰为黄芩苷、5 号峰为黄芩素、6 号峰为汉黄芩素，并通过分析特征图谱中这些化合物的吸收强度，来分析黄芩及其炮制品内在质量的区别。同时通过建立一测多评法，以黄芩苷色谱峰为参比峰（s），确定各色谱峰相对保留时间，测定其中 3 种化学成分黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量。同时揭示了黄芩及其不同炮制品中化学成分的变化规律，为黄芩的炮制加工提供基础研究。同时也希望能为临床用药更合理、有效地使用黄芩及其炮制品提供参考依据。

综合上述，本实验这种定量与定性相结合的 HPLC 法特征图谱表征测量方法操作简单，重复性好，为黄芩及其炮制品的质量控制提供了方法支持，有利于黄芩及其炮制品在中医临床病证的治疗中发挥更好的作用。本课题实验样本数量较少、2、3、4、7 号峰未确认，检测结果有待进一步完善与提高。

参考文献

[1]国家药典委员会.中国药典 • 2020 年版一部 ［S］北京：中国医药科技出版社，2020：314-315.

[2]《神农本草经校注》 尚志钧 学苑出版社.

[3]《本草纲目》 明 李时珍 北京科学技术出版.

[4]《天津市中药饮片炮制规范（2018 年版）》天津市市场和质量监督管理委员会. 2018：40-41.

[5]《丹溪心法》元朱丹溪中国医药科技出版社.

[6]中国古籍出版社，中华医书集成（第五册，本草类 I《得配本草 • 卷二》），清 • 严洁等. 1997 年.28

[7]杜清，陈志，吴江等. 一测多评法同时测定斑花黄堇药材中 4 种生物碱成分 [J]. 中草药，2021，52(10): 6038-60441.

玉米淀粉、硬脂酸镁对阿莫西林胶囊成品的影响研究

向延树[1]，杨芳[2]

（1.湖南康尔佳生物医药科技有限公司，湖南张家界 427000；2.常德市食品检验所，湖南常德 415000）

【摘要】目的：通过 48 个月的常温储存，0、3、6、9、12、18、24、36、48 个月考察玉米淀粉、硬脂酸镁在不同阶段对阿莫西林胶囊成品的影响；**方法：**不同时段，检查其溶出度、含量、有关物质、聚合物的变化；**结果：**阿莫西林胶囊通过 48 个月长期稳定性考察，检测指指符合规定；**结论：**在常温密封条件下，玉米淀粉、硬脂酸镁有利于阿莫西林胶囊的稳定性；确定本三个批次阿莫西林胶囊有效期 36 个月。

【关键词】阿莫西林胶囊、长期稳定性、玉米淀粉、硬脂酸镁

Effect of corn starch and magnesium stearate on Amoxicillin capsules

Xiang Yanshu[1]，Yang Fang[2]

（1. Hunan Kangerjia Biomedical Technology Co., LTD., Zhangjiajie 427000, China;2. Changde Institute for Food Inspection, Changde 415000, China）

【Abstract】Objective: To investigate the effects of corn starch and magnesium stearate on amoxicillin capsules at different stages after 48 months of normal temperature storage, 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 months. **Methods:** The changes of dissolution, content, related substances and polymers were examined at different time periods. **Results:** The long-term stability of amoxicillin capsule was investigated for 48 months. **Conclusion:** Corn starch and magnesium stearate are beneficial to the stability of amoxicillin capsules under normal temperature sealing condition. Determine the validity period of these three batches of amoxicillin capsules for 36 months

【Key words】amoxicillin capsules, long-term stability, corn starch, magnesium stearate

阿莫西林胶囊属青霉素类胶囊剂，适用于敏感菌（不产 B 内酰胺酶菌株）所致的下列感染，如溶血性链球菌、肺炎链球菌、葡萄球菌或流感嗜血杆菌所致中耳炎、鼻窦炎、咽炎、扁桃体炎等上呼吸道感染等。阿莫西林杀菌作用强，穿透细胞壁的能力也强，是目前应用较为广泛的口服青霉素之一。2018 年度，我公司开展阿莫西林胶囊一致性评价研究，用玉米淀粉、硬脂酸镁为辅料，用干法制粒法制成颗粒，通过胶囊灌装、铝塑铝内包装、纸盒外包装，形成样品。按此工艺生产连续生产三批次中试产品，批次分别为 20181105，20181106，20181107，产品留样进行长期稳定性考察，一是考察玉米淀粉、硬脂酸镁对制剂的稳定性，二是确定产品有效期。

1、仪器与试剂

1.1 仪器

ZDJ-400DS 多功能测定仪、AR1140/C 型电子天平（奥豪斯国家贸易（上海）有限公司）、Waterse2695 高

第一作者简介，向延树，男，1993 年毕业于湖南中医学院，副主任中药师，中药执业药师。从业期间，一直从事药学制剂生产和质量管理工作。

效液相色谱仪（美国 Waters 公司）、FADA-800RC 自动溶出仪（上海富科思分析仪器有限公司）、L6S 分光光度计（上海仪电分析仪器有限公司）

1.2 试药与试剂

阿莫西林胶囊（批号：20181105，20181106，20181107；规格：0.25g）

均有湖南康尔佳生物医药科技有限公司生产；阿莫西林对照品（批号 130409-201512，含量 86.9%）；青霉素对照品（批号 130431-201306，含量 93.1%)，均由中国食品药品检定研究院提供。磷酸二氢钾、磷酸二氢钠、氢氧化钠、磷酸、

无水甲醇均为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱纯; 卡氏试剂(Fluka 34805，美国 Sigma-Aldrich 公司) ; 水为超纯水。

2、方法

2.1 考察项目

有关物质、阿莫西林聚合物、水分、溶出度、装量差异、微生物限度、含量测定

2.2 考察方法

长期实验按留样包装，取上述样品，在常温库条件下温度 0~30℃，相对湿度 35%～75%的条件下储存，分别于第 0、3、6、9、12、18、24、36、48 个月各取样一次，考察性状鉴别有关物质、聚合物、水分、溶出度、装量差异、微生物限度、含量。

3、结果

3.1 有关物质

3.1.1 色谱条件与系统适用性实验

流动相的制备

0.05mol/L 磷酸盐缓冲液（取 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液，用 2mol/L 氢氧化钾溶液调节到 PH5.0）－乙腈（99：1）为流动相 A；0.05mol/L 磷酸盐缓冲液（PH5.0）－乙腈（80：20）为流动相 B.

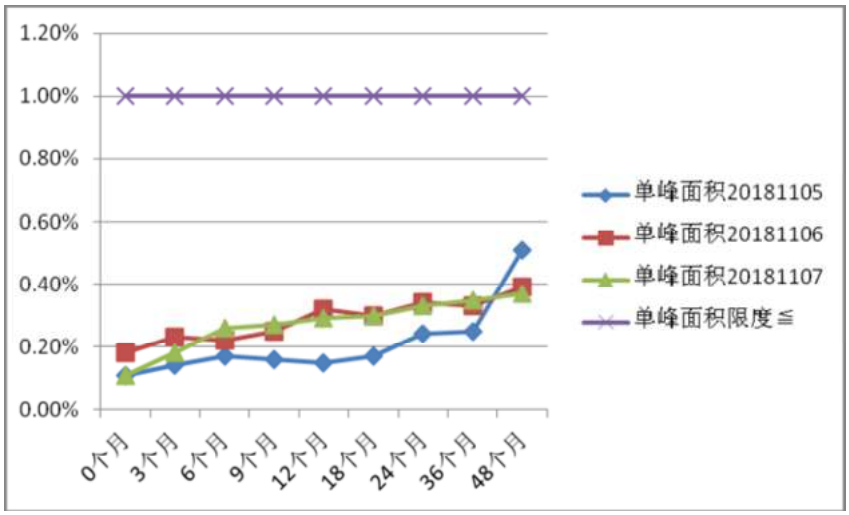
3.1.2 供试品溶液的制备：精密称取本品内容物 20.02mg，用流动相 A 溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 2.0mg（按 $C_{16}H_{19}N_2O_5S$ 计）的溶液，滤过，取续滤液测定。

3.1.3 对照品溶液的制备：精密称取本品内容物适量，用流动相 A 溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 20μg（按 $C_{16}H_{19}N_2O_5S$ 计）的溶液，作为对照溶液。

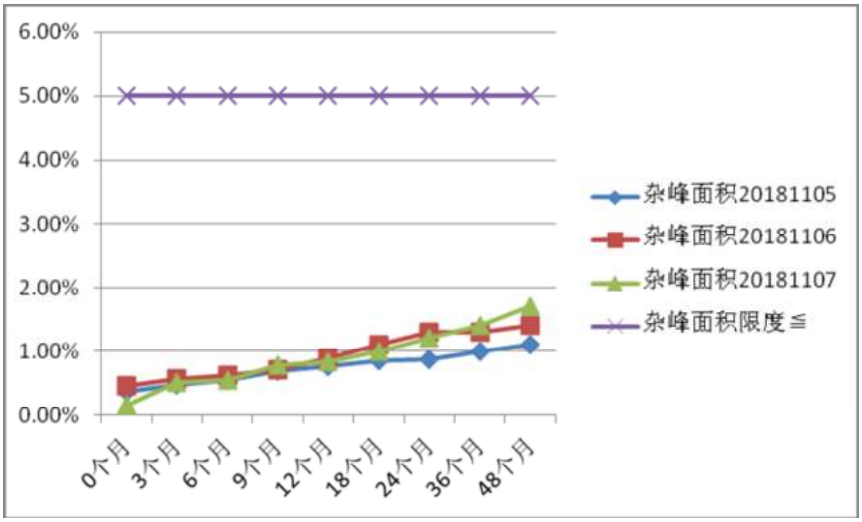
3.1.4 测定方法：先以流动相 A－流动相 B（92:8）等度洗脱，待阿莫西林峰洗脱完毕后立即按上表线性梯度洗脱。取阿莫西林系统适用性对照品适量，加流动相 A 溶解并稀释制成每 1ml 中约含 2.0mg 的溶液，取 20μl 注入液相色谱仪，记录的色谱图应与标准图谱一致。精密量取供试品溶液和对照溶液各 20μl，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。测定结果如下：

批次		0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月	24 个月	36 个月	48 个月
单峰面积	单峰面积 20181105	0.11%	0.14%	0.17%	0.16%	0.15%	0.17%	0.24%	0.25%	0.51%
	单峰面积 20181106	0.18%	0.23%	0.22%	0.25%	0.32%	0.30%	0.34%	0.33%	0.39%
	单峰面积 20181107	0.11%	0.18%	0.26%	0.27%	0.29%	0.30%	0.33%	0.35%	0.37%
杂峰面积和	20181105	0.37%	0.47%	0.54%	0.69%	0.76%	0.85%	0.87%	1.00%	1.10%
	20181106	0.46%	0.56%	0.62%	0.71%	0.88%	1.10%	1.30%	1.30%	1.41%
	20181107	0.15%	0.52%	0.54%	0.77%	0.84%	1.00%	1.20%	1.40%	1.70%

单峰面积折线图



杂峰面积和折线图



3.1.5 接受标准：有关物质杂单面积不得过 1.0%，杂峰面积和不得过 5.0%

3.1.6 判定结果：三个批次的有关物质杂单、杂峰面积和均符合规定，有关物质项均符合规定。

3.2 阿莫西林聚合物

3.2.1 流动相的制备

PH8.0 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液【0.05mol/L 磷酸氢二钠溶液一 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液（95：5）】为流动相 A；水为流动相 B.

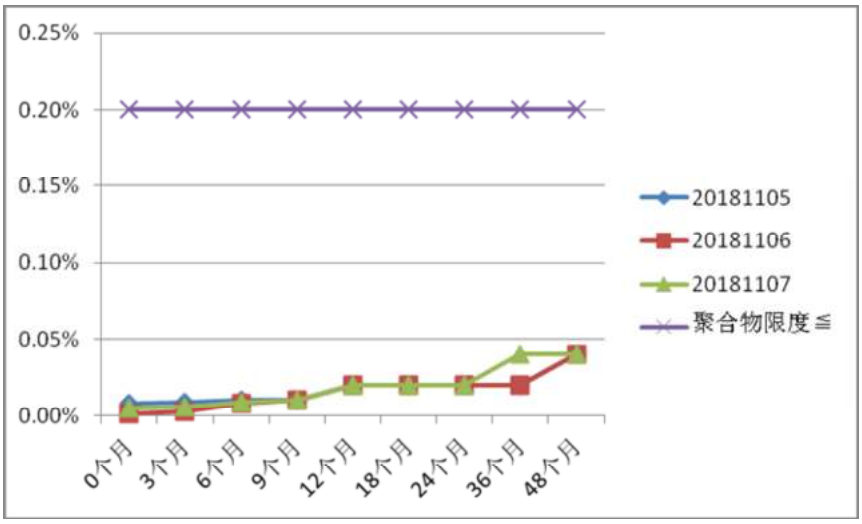
3.2.2 供试品及对照溶液的配制

供试品溶液的制备：称取本品内容物，混匀（约相当于阿莫西林，按 $C_{16}H_{19}N_2O_5S$ 计 0.2g），精密称定，置 10ml 量瓶中，加 2%碳酸钠溶液 5ml 使溶解，用水稀释至刻度，摇匀，取续滤液。

对照品溶液的制备：取青霉素对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释，制成每 1ml 中约含 0.2mg 的溶液。

3.2.3 测定方法：检测波长为 254nm。立即精密量取供试品溶液 100~200μl 注入色谱仪，以流动相 A 为流动相进行测定，记录色谱图。另精密量取对照溶液 100~200μl 注入色谱仪，以流动相 B 为流动相，同法测定。按外标法以青霉素峰面积计算，并乘以校正因子 0.1，即得。测定结果如下

批号	0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月	24 个月	36 个月	48 个月
20181105	0.008%	0.009%	0.010%	0.010%	0.020%	0.020%	0.020%	0.020%	0.040%
20181106	0.001%	0.003%	0.008%	0.010%	0.020%	0.020%	0.020%	0.020%	0.040%
20181107	0.005%	0.006%	0.009%	0.010%	0.020%	0.002%	0.020%	0.040%	0.040%



3.2.4 接受标准：聚合物不得过 0.2%

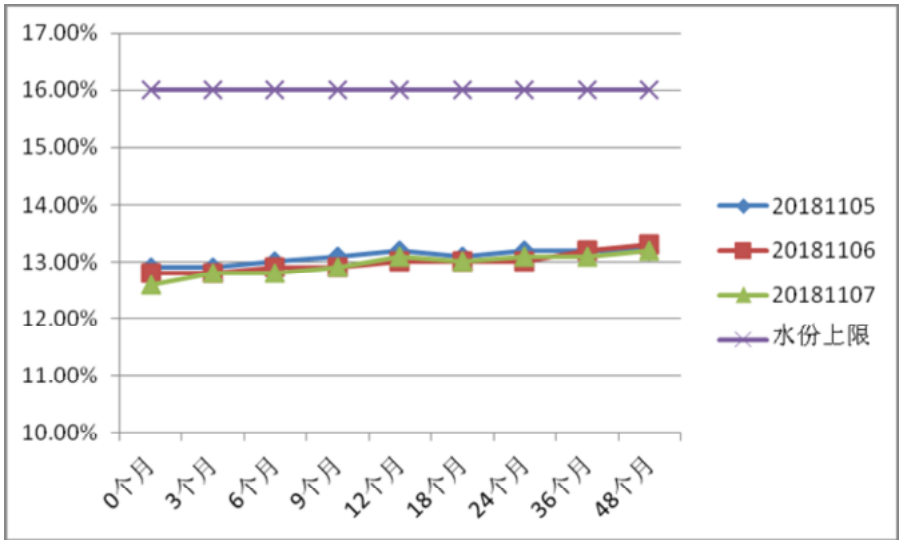
3.2.5 判定结果：三个批次的聚合物检测均符合规定。

3.3 水分

3.3.1 方法：取供试品，用卡氏水分测定法检测

	0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月	24 个月	36 个月	48 个月
20181105	12.9%	12.9%	13.0%	13.1%	13.2%	13.1%	13.2%	13.2%	13.2%
20181106	12.8%	12.8%	12.9%	12.9%	13.0%	13.0%	13.0%	13.2%	13.3%
20181107	12.6%	12.8%	12.8%	12.9%	13.1%	13.0%	13.1%	13.1%	13.2%

3.3.2 生成折线图如下：



3.3.3 接受标准：水分不得过 16.0%

3.3.4 判定结果：三个批次的水分检测均符合规定。

3.4 溶出度

取本品，照溶出度与释放度测定法（通则 0931 第一法　篮法）

溶出条件：以水 900ml 为溶出介质，转速为每分钟 100 转，依法操作，经 90 分钟时取样。

供试品溶液： 取溶液适量，滤过，精密量取续滤液适量，加水定量稀释制成每 1ml 中约含阿莫西林（按 $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 计）0.13mg 的溶液。

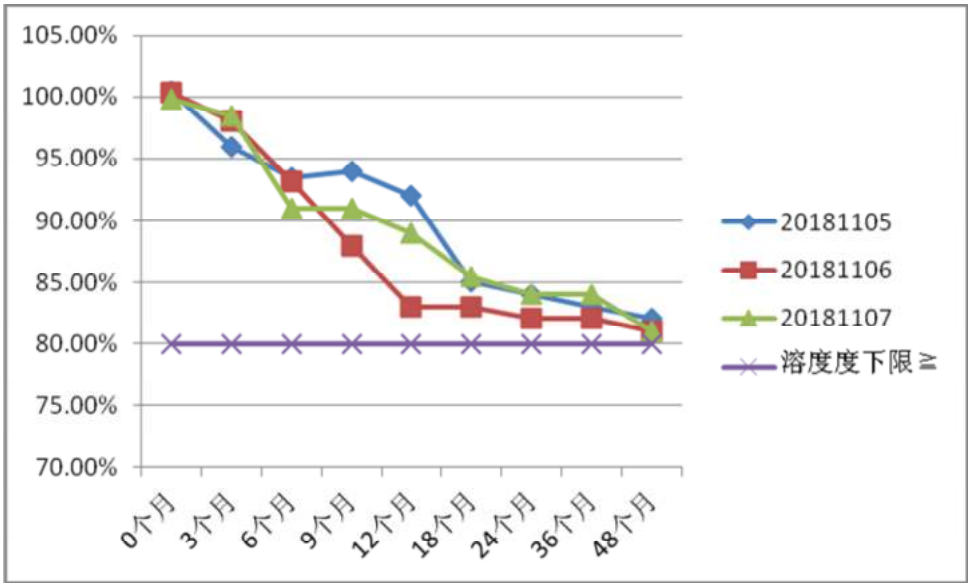
对照品溶液： 取阿莫西林对照品适量，加水溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含阿莫西林（按 $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 计）0.13mg 的溶液。

测定法： 取供试品溶液与对照品溶液，照紫外－可见分光光度法（通则 0401），在 272nm 的波长处测定吸光度，计算每粒的溶出量。

限度：标示量的 80%，应符合规定。

批号	0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月	24 个月	36 个月	48 个月
20181105	100.4%	96.0%	93.5%	94.0%	92.0%	85.0%	84.0%	83.0%	82.0%
20181106	100.3%	98.0%	93.2%	88.0%	83.0%	83.0%	82.0%	82.0%	81.0%
20181107	99.8%	98.5%	91.0%	91.0%	89.0%	85.5%	84.0%	84.0%	81.0%

生成折线图如下



3.3.3 接受标准：溶出度不低于标示量的 80%

3.3.4 判定结果：三个批次的溶出度检测均符合规定。

3.5 含量测定：高效液相色谱法（通则 0512）

色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液（用 2mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 酸碱度值 5.0）－乙腈（97.5:2.5）为流动相；检测波长为 254nm；进样体积 20 μl。

系统适用性试验

取阿莫西林系统适用性对照品约 25mg，置 50ml 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀。系统适用性溶液的色谱图与标准图谱一致。

供试品溶液：取装量差异项下的内容物，混合均匀，精密称取适量（约相当于阿莫西林按 $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 计 0.125g），加流动相溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含阿莫西林（按 $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 计）0.5mg 的溶液，滤过，取续滤液。

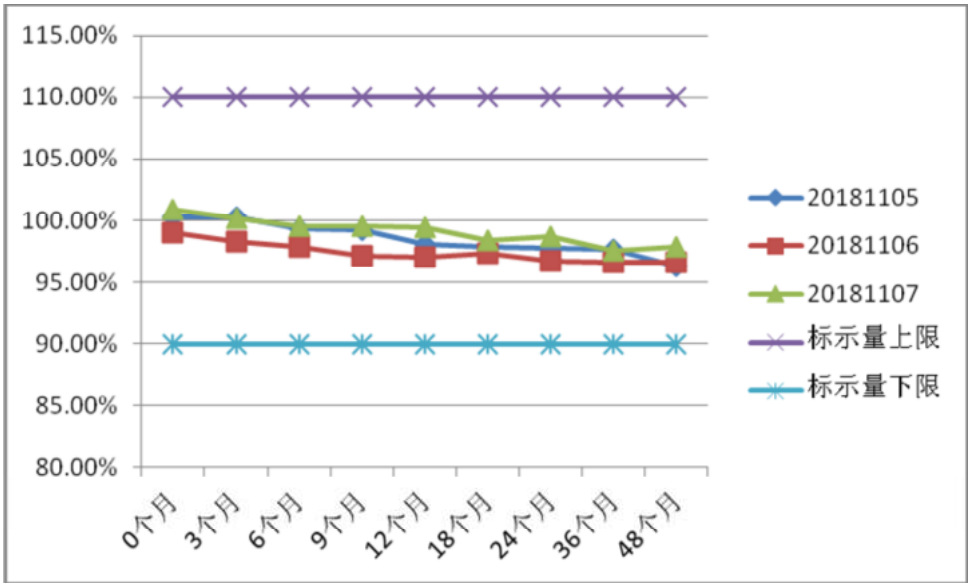
对照品溶液：取阿莫西林对照品适量，精密称定，加流动相溶解并定量稀释制成每 1ml 约含阿莫西林（按 $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 计）0.5mg 的溶液。

测定法：精密量取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。

测定结果如下（折算成标示量）

	0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月	24 个月	36 个月	48 个月
20181105	100.2%	100.2%	99.3%	99.2%	98.1%	97.9%	97.8%	97.6%	96.3%
20181106	99.0%	98.3%	97.9%	97.1%	97.0%	97.3%	96.7%	96.6%	96.6%
20181107	100.9%	100.1%	99.5%	99.5%	99.4%	98.4%	98.7%	97.5%	97.9%

生成折线图如下：



3.3.3 接受标准：按外标法以峰面积计算。按无水物计算，含阿莫西林按 $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 计应为标示量的 90.0%～110.0%。

3.3.4 判定结果：三个批次的含量检测均符合规定。

4、结论

阿莫西林胶囊(0.2 5g) 经长期考察 48 个月 ，其溶出度、含量、有关物质、聚合物与 0 月比较，均有变动，变动的值均在标准限度以内，各项检测结果均符合规定，表明该产品在该工艺条件下，质量稳定。参考我公司一致性评价前生产的阿莫西林胶囊(0. 25g) 的有效期，将一致性评价的阿莫西林胶囊(0.2 5g) 的有效期定为 36 个月 。

参考文献

[1]顾立强,魏仙妮,谢根英. HPLCHILIC 法测定联苯苄唑乳膏和凝胶中的咪唑[J]. 江西医药, 2021.

[2]南洋,王影,张丹,米欣. 片剂药物溶解方法对含量测定结果的影响[J]. 陕西省商洛市药品检验所, 2018.

[3]胡艳春. 浅谈阿莫西林的作用[J]. 中国医药指南, 2010.

[4]谭胜连,张涛,闵翠娥. 注射用头孢匹胺与注射用头孢匹胺钠的质量及稳定性对比[J]. 中国抗生素杂志, 2011.

[5]颜彦. 他唑巴坦钠质量研究[D]. 苏州大学, 2016.
[6]陆红彬. 头孢美唑钠合成工艺及质量标准研究[D]. 苏州大学, 2014.
[7]董嘉君,林锦生. 凝胶色谱法测定头孢地嗪钠中的高分子杂质[J]. 西北药学杂志, 2009.
[8]柳海波. HPLC 法测定乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液中的有关物质[J]. 江苏大同盟制药有限公司, 2014.
[9]李伟,薛宁宁. 阿莫西林胶囊 05g 稳定性考察[J]. 黑龙江医药, 2011.
[10]张体磊. 美洛西林钠的工艺改进[D]. 山东大学, 2015.
[11]马萍,程玉宝,王德刚,钟雅妮,熊渊. 阿莫西林颗粒中特定杂质的研究及控制[J]. 今日药学, 2014.
[12]贾广辉. 阿莫西林克拉维酸钾薄膜衣片的研制[D]. 河北医科大学, 2018.
[13]王茉莉,张菁,常俊山,张兰桐. 分子排阻法测定国产注射用替卡西林钠克拉维酸钾中的高分子聚合物[J]. 河北医科大学药学院, 2017.
[14]郭刚军,龙继明,黄艳丽,徐荣,李海泉. 多油辣木不同部位营养成分分析及评价[J]. 云南省热带作物科学研究所, 2016.
[15]林玉麟,王佩琳. 复方地巴唑氢氯噻嗪胶囊辅料的选择和生产工艺的改进[J]. 海峡药学, 2007.
[16]沈丹丹,吴群,梁涵雁,程义,沈川. HPLC 测定盐酸克林霉素原料和制剂的有关物质[J]. 中国抗生素杂志, 2021.
[17]章家伟,王向峰,宋觅,帅放文. 新型羟丙基淀粉空心胶囊在阿莫西林中的应用[J]. 国家药用辅料工程技术研究中心, 2016.
[18]张亚洲,樊兰兰,屈啸声,冯洁,魏涌标. RPHPLC 法测定阿莫西林克拉维酸钾干混悬剂 141 中阿莫西林[J]. 安徽医药, 2013.
[19]王景欣,仇俊新,丁平田. 阿莫西林克拉维酸钾片仿制制剂与参比制剂杂质谱对比分析[J]. 中国药剂学杂志(网络版), 2019.
[20]孟美英. 阿莫西林有关物质研究[J]. 北方药学, 2015.
[21]梁纪军,宋惠,高洁,宋冬梅,李冬梅. 阿莫西林分散片有关物质研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010.

十种畲药提取物的化学成分含量与体外抗氧化活性及其关联性分析

肖冰颖[1,2]，杨亿馨[3]，汪余嘉[2]，陈子春[1,2]，*林敏华[2]

（1. 福建医科大学研究生院，福州 350100；宁德师范学院附属宁德市医院药学部，宁德 352100；宁德师范学院医学院，宁德 352100）

【摘要】目的：探究金线莲、十二时辰、三叶青、小香勾、青钱柳、海金沙、异叶茴芹、白山毛桃根、盐肤木、山里黄根等 10 种闽产畲药总黄酮及总酚含量，评估其体外抗氧化活性，并分析其关联性。**方法：**采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法和福林酚试剂法分别检测 10 种畲药总黄酮与总酚含量，利用 DPPH、$ABTS^+$、FRAP 法评价其抗氧化活性，皮尔逊法分析总黄酮、总酚含量与抗氧化活性间的关联性。**结果：**（1）十种畲药提取物总黄酮含量范围为 12.43±0.03~326.40±3.05 mg/g，总酚含量范围为 12.15±0.8~303.88±0.07 mg/g，其中黄酮含量最高为异叶茴芹（326.40±3.05 mg/g），总酚含量最高为盐肤木（303.88±0.07 mg/g）。（2）盐肤木、青钱柳、三叶青的抗氧化活性较强；海金沙、异叶茴芹、小香勾、山里黄根、白山毛桃根抗氧化活性较中等；金线莲和十二时辰抗氧化活性较弱。（3）十种畲药总黄酮含量与 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除能力具有显著相关性，总酚含量与 FRAP 总抗氧化活性亦具有显著相关性。**结论：**10 种闽产畲药提取物均具有一定抗氧化能力，总黄酮与总酚化合物为其发挥抗氧化作用的活性成分。

【关键词】畲药；总酚；黄酮；抗氧化活性

The content of chemical components and in vitro antioxidant activity of extracts from ten she drugs and their correlation analysis

【Abstract】Objective: To investigate the total flavonoids and total phenols content of ten Fujian-produced She medicinal herbs, including *Anoectochilus roxburghii Wall. Lindl.*, *Clematis florida var. plena*, *Tetrastigma hemsleyanum Diels et Gilg*, *Ficus pandurata Hance*, *Cyclocarya*, *Lygodium japonicum Thunb. Sw.*, *Pimpinella diversifolia DC.*, *Actinidiaeriantha Benth*, *Rhus chinensis Mill.*, *Gradenia jasminoides Ellis*, etc., evaluate their antioxidant activity in vitro, and analyze their correlation. **Methods:** The content of total flavonoids and total phenols in ten She medicinal herbs was determined using sodium nitrite aluminum nitrate colorimetry and Folin-Ciocalteu reagent method, respectively. Their antioxidant activity was evaluated using DPPH, $ABTS^+$, FRAP methods, and the correlation between total flavonoids, total phenols content, and antioxidant activity was analyzed using Pearson method. **Results:** (1) The flavonoid content of ten She medicine extracts ranged from 12.43 ± 0.03 to 326.40 ± 3.05 mg/g, and the total phenolic content ranged from 12.15 ± 0.8 to 303.88 ± 0.07 mg/g. Among them, the highest flavonoid content was *Pimpinella diversifolia DC.* (326.40 ± 3.05 mg/g), and the highest total phenolic content was *Rhus chinensis Mill.* (303.88 ± 0.07 mg/g). (2) The antioxidant

基金项目：福建省自然科学基金面上项目（2020J011341）

宁德师范学院闽东畲药有效成分研究协同创新中心（2020Z03）

宁德师范学院临床药学服务创新团队（2023T06）

作者简介：肖冰颖，女，硕士研究生，主要研究方向：中药药理学.

通讯作者：林敏华. Email: linminhua@ndnu.edu.cn

activity of *Rhus chinensis Mill.*, *Cyclocarya*, and *Tetrastigma hemsleyanum Diels et Gilg* was strong; The antioxidant activity of *Pimpinella diversifolia DC.*, *Actinidiaeriantha Benth*, *Ficus pandurata Hance*, *Lygodium japonicum Thunb. Sw.*, and *Gradenia jasminoides Ellis* was moderate; The antioxidant activity of *Anoectochilus roxburghii Wall. Lindl.* and *Clematis florida var. plena* was weak. (3) There was a significant correlation between the total flavonoid content of ten She herbs and their DPPH or $ABTS^+$ free radical scavenging ability, as well as a significant correlation between the total phenolic content and the total antioxidant activity of FRAP. **Conclusion:** These ten Fujian-produced She medicine extracts all have a certain degree of antioxidant capacity. The total flavonoids and total phenolic compounds are the active components that exert antioxidant effects.

【Key words】 She medicine; Total phenol; Flavone; Antioxidant activity

畲医药是中国传统医药的重要组成部分[1]。随着对畲药植物资源调查、本草考证和药效物质基础研究的深入，独特的畲药资源日益受到人们的广泛关注，其药用价值亦逐渐获得人们的认可。福建省宁德市是畲药最重要的原产地之一，素有“畲药宝库”之称[2]。然而，目前宁德地区的畲药发展进程迟缓，研究基础薄弱，对畲药资源及品种缺少全面的调查研究，亟待深入挖掘探索，提高畲族青草药使用的安全性和有效性[3]。

氧化应激（oxidative stress，OS）是指氧化与抗氧化系统的平衡被破坏，氧自由基在体内大量蓄积超出机体清除氧自由基能力的一种应激状态[4]，是多种疾病发生发展的病理基础与始动因素，如神经退行性疾病、心血管疾病、恶性肿瘤和衰老等[5]。因此，氧化应激成为疾病治疗的明星干预环节，引发大量氧化应激的机制研究及抗氧化剂的筛选开发。抗氧化剂通过清除自由基，如过氧化物、氢过氧化物或脂质过氧化氢自由基等，抑制疾病发生过程中的氧化应激反应，从而延缓或阻止机体的氧化损伤[6]。研究报道，天然植物源抗氧化剂活性显著，且副作用少，是当前抗氧化剂研究开发的热点领域[7]。

畲药是具有海量生物资源的天然药物研发宝库，其提取物组成成分丰富，大多含有黄酮及酚类物质，极具抗氧化潜能，有望从中筛选出高效无毒的抗氧化剂。在体外抗氧化活性的检测方法中，1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl，DPPH）法、2,2’-联氮-二（3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐（2,2’-azino-bis（3-ethylbenzthiozoline-6）-sulphonic acid，ABTS）法和铁还原能力（ferric ion reducing antioxidant power，FRAP）法是基于测定抗氧化物质维持氧化还原状态能力的方法，操作简单快速，是较为常见的体外抗氧化能力测定方法[8]。

目前，有关畲药的抗氧化活性研究鲜见报道，且对于多种畲药抗氧化活性的对比评价研究更是少见。本研究选取十种常见的闽东道地畲药，对总黄酮与总酚含量进行定量分析与比较，以 DPPH、$ABTS^+$自由基清除能力和 FRAP 铁还原能力为指标，评估其体外抗氧化活性，并分析总黄酮、总酚含量与抗氧化活性的关联性，明确畲药抗氧化的物质基础，为畲药的现代化开发利用提供理论依据。

1 实验材料

1.1 药材

金线莲（Anoectochilus roxburghii Wall. Lindl.）、十二时辰（Clematis florida var. plena）、三叶青（Tetrastigma hemsleyanum Diels et Gilg）、小香勾（Ficus pandurata Hance）、青钱柳（Cyclocarya）、海金沙（Lygodium japonicum Thunb. Sw.）、异叶茴芹（Pimpinella diversifolia DC.）、白山毛桃根（Actinidiaeriantha Benth）、盐肤木（Rhus chinensis Mill.）、山里黄根（Gradenia jasminoides Ellis）购自福建省宁德市，经闽东畲族中草药协会副会长兰福禄鉴定。所有药材粉碎后过 80 目筛备用。

1.2 试剂

表 1-1　使用的主要试剂

试剂/试剂盒	厂家
福林酚试剂（P824172）	麦克林，上海
没食子酸标准品（G823638）	麦克林，上海
芦丁标准品（R817260）	麦克林，上海
DPPH 自由基检测试剂盒（A153-1-1）	建成生物，南京
ABTS 自由基检测试剂盒（S0119）	碧云天，上海
总抗氧化能力检测试剂盒（S0116）	碧云天，上海
亚硝酸钠（7632-00-0）	西陇科学，汕头
硝酸铝（7784-27-2）	西陇科学，汕头
氢氧化钠（S835850）	麦克林，上海
无水碳酸钠（S818014）	麦克林，上海
无水乙醇（64-17-5）	西陇科学，汕头
甲醇（67-56-1）	西陇科学，汕头

1.3 仪器

表 1-2　使用的主要仪器设备

仪器	制造商
KQ-300DE 型数控超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
UV-probe1780 紫外分光度计	岛津企业管理有限公司
FD-1A-50 冷冻干燥机	上海舜制仪器制造有限公司
SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵	郑州长城科工贸有限公司
N-13000-WB 旋转蒸发仪	上海爱郎仪器有限公司
酶标仪 Absorbance Reader	威士达医疗设备有限公司
AK-25 流水式粉碎机	温岭市奥力中药机械有限公司

2 实验方法

2.1 畲药提取物的制备

经文献查阅，采用超声辅助提取法，对十种闽产畲药进行提取。精密称取适量药材粉末，加入适量溶剂浸泡 1 h，依据文献中超声提取参数提取完全后过滤，合并滤液，旋转蒸发，真空冷冻干燥，得提取物，于 4℃保存备用。

表 2-1　十种畲药的超声提取参数

	提取溶剂	液料比	提取时间	提取次数	提取温度
白山毛桃根[9]	60%乙醇	1：30	30 min	2	60℃
海金沙[10]	70%乙醇	1：10	60 min	1	70℃
青钱柳[11]	60%乙醇	1：45	30 min	1	50℃
十二时辰[12]	60%乙醇	1：15	66 min	1	53℃
异叶茴芹[13]	40%乙醇	1：100	90 min	1	60℃
盐肤木[14]	60%乙醇	1：40	30 min	1	50℃
金线莲[15]	50%乙醇	1：40	72 min	1	43℃
小香勾	60%乙醇	1：30	30 min	2	70℃
三叶青[16]	60%乙醇	1：20	44 min	1	60℃
山里黄根[17]	40%乙醇	1：20	20 min	1	30℃

2.2 总黄酮含量测定

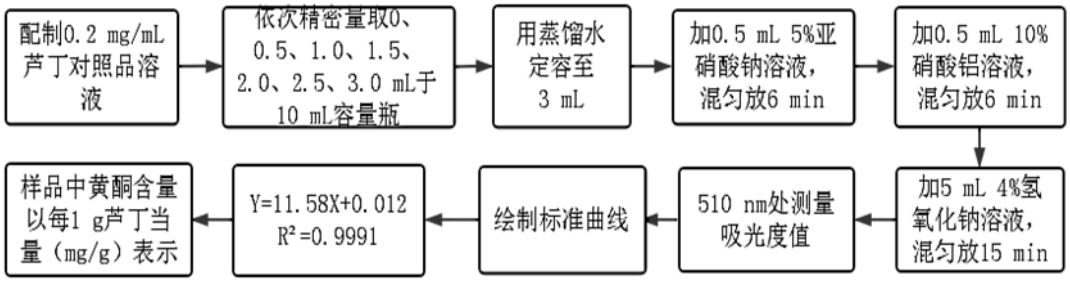


图 2-1　总黄酮含量测定流程图

2.3 总酚含量测定

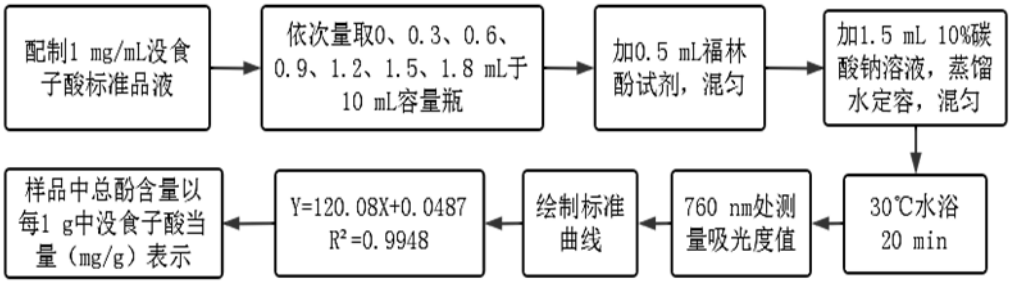


图 2-2　总酚含量测定流程图

2.4 抗氧化活性检测

表 2-2　抗氧化活性指标检测

步骤		DPPH 自由基清除率	$ABTS^{+}$自由基清除率	FRAP 抗氧化能力
配制工作液		工作液粉剂加 40 mL 无水乙醇充分溶解，4℃避光保存	配制 ABTS 母液，室温避光放置 20 h，80%乙醇稀释得 ABTS 工作液	TPTZ 稀释液、TPTZ 溶液、检测缓冲液按 10:1:1 混合，37℃孵育
配制标准液		标准品粉剂加 2 mL 80%甲醇溶解并稀释成不同浓度标准液	把 10 mM Trolox 标准溶液用 80%乙醇稀释成不同浓度标准液	100 mM $FeSO_4$•$7H_2O$ 溶液，用蒸馏水稀释成不同浓度标准液
加样	空白孔/管	400 μL 80%甲醇+600 μL 工作液	10 μL 蒸馏水+200 μL 工作液	5 μL 蒸馏水+180 μL 工作液
	标曲孔/管	400 μL 样品液+600 μL 80%甲醇	10 μL 不同浓度标准液+200 μL 工作液	5 μL 不同浓度标准液+180 μL 工作液
	检测孔/管	400 μL 样品液+600 μL 工作液	10 μL 不同浓度样品液+200 μL 工作液	5 μL 不同浓度样品液+180 μL 工作液
检测		混匀，25℃避光静置 30 分钟，测定 A_{517}	混匀，25℃孵育 2~6 分钟，测定 A_{405}	混匀，37℃ 孵育 3~5 分钟，测定 A_{595}
计算公式		DPPH 自由基清除率（%）=[1-（$A_{测定}$-$A_{对照}$）/$A_{空白}$]×100%	$ABTS^{+}$自由基清除率（%）=[（$A_{对照}$-$A_{样品}$）/$A_{对照}$]×100%	以达到相同吸光度所需 $FeSO_4$ 的毫摩尔数表示

2.5 抗氧化活性综合（APC）指数评估[18]

$$\text{APC 指数（\%）} = \frac{\text{该方法的测定值}}{\text{该方法测定的最大值}} \times 100\%$$

$$\text{综合 APC 指数（\%）} = \sum \frac{\text{每种方法的测定值}}{\text{该方法测定的最大值}\times\text{使用的方法总数}} \times 100\%$$

2.6 数据处理与统计学方法

每组试验平行操作 3 次。使用 SPSS 26.0 统计软件分析，结果采用均数（Mean）±标准差（SD）表示。组间差异比较采用单因素方差分析（ANOVA），两两比较采用沃勒-邓肯检验，关联性分析采用皮尔逊系数法。P<0.05（双侧）表明差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 畲药提取物总黄酮和总酚含量分析

由表 3-1 可知，本研究的十种畲药提取物中黄酮含量范围为 12.43~326.40 mg/g，含量由多到少依次排序为：异叶茴芹＞三叶青＞白山毛桃根＞海金沙＞青钱柳＞盐肤木＞小香勾＞山里黄根＞金线莲＞十二时辰，其中异叶茴芹的黄酮含量最高，为 326.40±3.05 mg/g，十二时辰的黄酮含量最低，为 12.43±0.03 mg/g。“海金沙与青钱柳”、“金线莲与十二时辰”之间总黄酮含量差异无统计学意义，其余不同畲药组间差异均具有统计学意义（P<0.05）。畲药提取物总酚含量范围为 12.15~303.88 mg/g，含量由多到少依次排序为：盐肤木＞青钱柳＞三叶青＞异叶茴芹＞白山毛桃根＞海金沙＞山里黄根＞小香勾＞十二时辰＞金线莲，其中盐肤木的总酚含量最高，为 303.88±0.07 mg/g，金线莲的总酚含量最低，为 12.15±0.08 mg/g。海金沙与白山毛桃根之间的总酚含量差异无统计学意义，其余不同畲药组间差异具有统计学意义（P<0.05）。

表 3-1　十种畲药提取物总黄酮和总酚含量

样品名称	总黄酮含量（mg/g）	总酚含量（mg/g）
异叶茴芹	326.40±3.05^{a}	95.78±0.69^{a}
三叶青	273.44±4.45^{b}	123.75±0.74^{b}
白山毛桃根	239.77±4.27^{c}	82.51±0.29^{c}
海金沙	215.13±0.73^{d}	80.18±0.18^{c}
青钱柳	211.59±8.55^{d}	194.14±0.71^{d}
盐肤木	190.44±0.13^{e}	303.88±0.07^{e}
小香勾	141.05±0.95^{f}	67.39±0.67^{f}
山里黄根	124.74±1.98^{g}	71.21±1.01^{g}
金线莲	12.49±0.01^{h}	12.15±0.08^{h}
十二时辰	12.43±0.03^{h}	13.57±0.02^{i}

注：同一列的不同字母代表存在显著性差异（P<0.05）。

3.2 畲药提取物体外抗氧化活性分析

本研究使用 DPPH 法和 $ABTS^{+}$法评价畲药提取物的自由基清除能力，采用 FRAP 法评价其总抗氧化能力[19]。当自由基清除率达到 50%时药物的质量浓度为 IC_{50} 值，值越小，表示畲药清除自由基的能力越强，其抗氧化能力亦越强[20]。由表 3-2 可知，DPPH 法测定结果显示，在这 10 种畲药提取物中盐肤木的自由基清除能力最强，IC_{50} 值为 0.013 mg/mL；其次为青钱柳，IC_{50} 值为 0.034 mg/mL；十二时辰和金线莲的自由基清除能力较低，IC_{50} 值均大于 1 mg/mL。“盐肤木、青钱柳、三叶青与小香勾”、“白山毛桃根、异叶茴芹、海金沙与山里黄根”之间 DPPH 自由基清除率 IC_{50} 值差异无统计学意义，其余不同畲药组间均具有显著性差异（P＜0.05）。$ABTS^{+}$法测定的结果同样显示，盐肤木的自由基清除能力最强，IC_{50} 值为 0.13 mg/mL；其次为三叶青，为 0.35 mg/mL；金线莲的清除能力最低，为 9.81 mg/mL。“白山毛桃根、海金沙和山里黄根”之间 $ABTS^{+}$自由基清除率 IC_{50} 值差异无统计学意义，其余各组间均具显著性差异（P<0.05）。FRAP 法测定结果显示，盐肤木的总抗氧化能力最强，FRAP 值为 13.50 mmol/g；金线莲和十二时辰的总抗氧化能力较低，FRAP 值均低于 1 mmol/g。“青钱柳与

三叶青”、“小香勾与山里黄根”、“异叶茴芹与海金沙”及“十二时辰与金线莲”之间 FRAP 值差异无统计学意义，其余各组间均具有显著性差异（$P<0.05$）。

表 3-2　十种畲药提取物的抗氧化活性

样品名称	DPPH 自由基清除率 IC_{50} 值（mg/mL）	ABTS+自由基清除率 IC_{50} 值（mg/mL）	FRAP 值（mmol/g）
盐肤木	0.013±0.001^{d}	0.13±0.02^{h}	13.50±0.28^{a}
青钱柳	0.034±0.003^{d}	0.44±0.02^{f}	2.60±0.11^{b}
三叶青	0.043±0.002^{d}	0.35±0.01^{g}	2.49±0.13^{b}
白山毛桃根	0.102±0.008^{c}	0.75±0.04^{d}	2.21±0.07^{c}
异叶茴芹	0.137±0.010^{c}	1.50±0.07^{c}	1.67±0.05^{d}
小香勾	0.046±0.008^{d}	0.67±0.06^{e}	1.21±0.02^{e}
海金沙	0.103±0.006^{c}	1.00±0.06^{d}	1.74±0.01^{d}
山里黄根	0.107±0.002^{c}	0.76±0.02^{d}	1.27±0.04^{e}
十二时辰	2.115±0.042^{b}	6.52±0.09^{b}	0.30±0.03^{f}
金线莲	2.276±0.019^{a}	9.81±0.36^{a}	0.16±0.02^{f}

注：同一列的不同字母代表存在显著性差异（$P<0.05$）。

3.3 抗氧化活性的综合指数分析

采用 APC 指数法对三种抗氧化活性指标进行综合评价，结果见表 3-3，畲药提取物 APC 综合指数从大到小排名为：盐肤木＞青钱柳＞三叶青＞海金沙＞异叶茴芹＞山里黄根＞小香勾＞白山毛桃根＞十二时辰＞金线莲。盐肤木三个检测指标的 APC 指数均为 100%，表明盐肤木的抗氧化活性最强；其余 9 种畲药提取物的抗氧化活性 APC 指数在 1.03~29.01%之间，其中青钱柳和三叶青的 APC 指数较高，分别为 29.01%和 28.61%，金线莲的 APC 指数最低为 1.03%。

表 3-3　10 种畲药提取物中抗氧化活性 APC 指数

样品名称	APC 指数/%			APC 综合指数/%	综合排序
	DPPH	$ABTS^{+}$	FRAP		
盐肤木	100.00（1）	100.00（1）	100.00（1）	100.00	1
青钱柳	29.55（3）	38.24（2）	19.26（2）	29.01	2

续表 3-3

样品名称	APC 指数/%			APC 综合指数/%	综合排序
	DPPH	$ABTS^{+}$	FRAP		
三叶青	37.14（2）	30.23（3）	18.44（3）	28.61	3
异叶茴芹	17.33（5）	12.75（5）	16.37（4）	15.48	5
白山毛桃根	8.67（8）	9.49（8）	12.37（6）	10.18	8
海金沙	19.40（4）	28.26（4）	8.96（8）	18.88	4
小香勾	13.00（7）	12.62（6）	12.89（5）	12.84	7
山里黄根	17.11（6）	12.15（7）	9.41（7）	12.89	6
十二时辰	1.99（9）	0.61（9）	2.22（9）	1.61	9
金线莲	1.33（10）	0.57（10）	1.19（10）	1.03	10

注：同一列括号中的数字表示抗氧化活性强弱排序。

3.4 抗氧化活性与总黄酮、总酚含量的关联性分析

根据表 3-4 显示，十种畲药提取物的 DPPH、$ABTS^+$自由基清除率 IC_{50} 值与总黄酮含量呈极显著负相关性（$P<0.01$），R^2 分别为 0.831 和 0.822；而 FRAP 总抗氧化能力与之相关性不显著。总酚含量则相反，FRAP 总抗氧化能力与总酚含量呈极显著正相关性（$P<0.01$），R^2 为 0.919，具有良好的线性关系；而 DPPH、$ABTS^+$自由基清除率 IC_{50} 值与总酚含量的相关性不显著，线性关系不佳。在与 APC 指数的相关性中，APC 指数与总酚含量呈极显著的正相关性（$P<0.01$），黄酮含量与其相关性不显著。

表 3-4　抗氧化活性与总黄酮、总酚含量的关联性分析结果

考察指标	总黄酮含量（mg/g)	总酚含量（mg/g)	DPPH 自由基清除率 IC_{50} 值（mg/mL）	$ABTS^+$自由基清除率 IC_{50} 值（mg/mL）	FRAP 值（mmol/g）	APC 指数
总黄酮含量（mg/g)	1	--	--	--	--	--
总酚含量（mg/g)	0.433	1	--	--	--	--
DPPH 自由基清除率 IC_{50} 值（mg/mL）	-0.831**	-0.559	1	--	--	--
$ABTS^+$自由基清除率 IC_{50} 值（mg/mL）	-0.822**	-0.584	0.977**	1	--	--
FRAP 值（mmol/g）	0.231	0.919**	-0.362	-0.391	1	--
APC 指数	0.307	0.955**	-0.428	-0.460	0.985**	1

注：**$P<0.01$。

4 讨论

本研究通过测定 10 种闽产畲药提取物的总黄酮与总酚含量，对比其体外抗氧化活性，进而分析总黄酮、总酚含量与抗氧化活性的关联性。结果显示，总黄酮含量排名前三的畲药为异叶茴芹、三叶青、白山毛桃根，其含量分别为 326.40±3.05 mg/g、273.44±4.45 mg/g、239.77±4.27 mg/g；总酚含量排名前三的畲药为盐肤木、青钱柳、三叶青，其含量分别为 303.88±0.07 mg/g、194.14±0.71 mg/g、123.75±0.74 mg/g；金线莲和十二时辰的总黄酮和总酚含量均偏低，但仍处于文献报道的含量范围内[21]。除药物本身该组分含量较低外，同时可能与提取溶剂、提取工艺相关[22]。

在不同抗氧化体系的实验中，总黄酮与总酚含量较高的畲药 DPPH、$ABTS^+$自由基清除能力和铁还原能力亦较高，表现出较强的抗氧化活性，如盐肤木、青钱柳和三叶青，与有关文献报道相吻合[23-24]。部分药材的黄酮含量高，而总酚含量相对较低，如异叶茴芹、白山毛桃根、海金沙、小香勾及山里黄根，其抗氧化活性虽低于排名前三的畲药，但仍较为显著，且与黄酮含量的大小排序基本保持一致。在赵良辉等[25]的研究中，亦已证实异叶茴芹总黄酮具有较强的抗氧化活性，海金沙结果亦与同类研究一致[26]。总酚和黄酮含量偏低的畲药，如金线莲、十二时辰，其抗氧化活性虽较其余畲药偏弱，但仍表现较好的抗氧化活性，与吴岩斌等[27]研究结果相符。因药物自身的结构性质及检测方法的反应原理不同[28]，三种体外抗氧化活性指标测定的结果存在一定差异。为综合评价十种畲药提取物的抗氧化活性，采用 APC 指数法比较，结果亦显示抗氧化活性综合前三为盐肤木、三叶青及青钱柳，金线莲抗氧化活性最弱，表明结果可靠。

以上结果同时提示畲药的总酚、总黄酮含量与抗氧化活性之间具有相似的变化趋势，故利用皮尔逊法进一步验证总酚和总黄酮含量与抗氧化活性之间的关联性。结果显示，总黄酮含量与 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除能力的相关性显著（$P<0.01$），与 FRAP 值相关性不显著；与之相反，总酚含量与 FRAP 值相关性显著，与 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除能力相关性不显著。可见，畲药发挥抗氧化作用的活性成分主要为总黄酮与总酚。陈琪等[29]指出，在不同的实验体系中，不同的物质可能对不同体系的抗氧化作用不同，对不同类型的自由基也存在选

择性作用。因黄酮、酚类物质的多样性，即使总含量较高，对于不同实验方法，具有抗氧化的有效化合物种类存在差异，故表现为总黄酮、总酚含量与不同抗氧化活性指标呈显著相关性[24]。其中，由于总酚的测定方法采取福林酚显色原理，与 FRAP 的铁离子还原法机制类似，两者均为多酚化合物还原金属离子显色法[30]，所以总酚含量与 FRAP 值呈极显著相关性；此外，多酚类化合物清除 DPPH 和 $ABTS^+$自由基时，易受如反应时间、溶剂、温度、pH、电离电势等多重因素的影响，结果较不稳定，故在本研究中未发现总酚含量与 DPPH、$ABTS^+$自由基清除能力的关联性[31]。本研究所使用的总黄酮含量测定是利用铝离子络合反应显色机制，本质是对具有邻苯二酚结构的化合物显色，而具有该类结构的黄酮类化合物更易形成交叉共轭体系，在与 DPPH、$ABTS^+$自由基反应时更加稳定，故总黄酮类含量与之呈显著相关性。

福建宁德地区是我国畲族人口最大的聚居地，因长期交通不便，经济发展落后，导致畲医药作为非物质文化遗产的优势潜力未得到充分挖掘。本研究首次明确十种闽产畲药的总黄酮、总酚含量，利用 DPPH、$ABTS^+$、FRAP、APC 法对比评价抗氧化活性，揭示抗氧化活性与总黄酮、总酚含量的关联性，初步阐明抗氧化活性的物质基础，对推动畲药的现代化发展具有重要意义。然而，本研究结果仍存在局限性：（1） 未考虑除黄酮、多酚类化合物外的其他抗氧化物质。各种天然抗氧化性物质在一定范围内具有增效或拮抗作用，可能影响抗氧化活性的结果[32]。（2） 未考虑其他活性物质对抗氧化活性的交互影响。（3） 仅考察体外化学性抗氧化指标，未在细胞、动物层面开展实验验证。（4） 未明确抗氧化物质基础的具体化合物种类。总体而言，仍亟需开展更多实验研究，纳入更多评价体系，从细胞、动物、临床多层次，探究精细的抗氧化机制，以明确畲药抗氧化的药效物质基础与分子调控机理。

5 结论

十种畲药间的总黄酮和总酚含量存在明显差异，其抗氧化活性亦存在差异。结果表明：（1）十种畲药提取物黄酮含量范围为 12.43~326.40 mg/g，总酚含量范围为 12.15~303.88 mg/g，其中黄酮含量最高为异叶茴芹（326.40±3.05 mg/g），总酚含量最高为盐肤木（303.88±0.07 mg/g）。（2）盐肤木、青钱柳、三叶青的总黄酮与总酚含量高，其抗氧化活性强；异叶茴芹、白山毛桃根、小香勾、海金沙、山里黄根的黄酮含量高，总酚含量较低，其抗氧化活性较中等；金线莲和十二时辰的黄酮与总酚含量均低，其抗氧化活性较弱。（3）总黄酮含量与 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除能力具有显著相关性，总酚含量与 FRAP 总抗氧化活性亦具有显著相关性，表明这十种畲药的抗氧化物质基础主要为总黄酮与总酚化合物。

参考文献

[1] 陈锋, 李鲜慧, 朱怀玲,等. 福建省特色畲医药发展研究[J]. 中国民族民间医药,2018,27(23):4-6.

[2] 李益长, 许陈颖, 陈丽冰. 闽东畲族药资源产业化开发现状与对策——以福安畲药为例[J]. 安徽农业科学,2016,44(05):133-135+154.

[3] 兰萌, 朱龙. 新时代下畲族医药发展展望[J]. 中医药通报,2022,21(06):54-56.

[4] 王俏, 张真真, 万贵平. 基于氧化应激探讨中医药治疗子宫内膜异位症的作用机制[J]. 中医药信息,2023,40(03):28-36.

[5] Sun J, He XM, Zhao MM, et al. Antioxidant and nitrite-scavenging capacities of phenolic compounds from sugarcane (Saccharum officinarum L.) tops[J]. Molecules, 2014,19(9):13147-13160.

[6] Al-Rimawi F, Abu-Lafi S, Abbadi J, et al. ANALYSIS OF PHENOLIC AND FLAVONOIDS OF WILD EPHEDRA ALATA PLANT EXTRACTS BY LC/PDA AND LC/MS AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2017,14(2):130-141.

[7] 马嘉洁, 赵端端, 全世航,等. 紫苏叶黄酮、多酚提取工艺优化及不同品种抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技,2023,44(12):344-352.

[8] 王晓宇, 杜国荣, 李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(03):247-252.

[9] 郑燕枝. 毛花猕猴桃根化学组分提取工艺及抗胃癌活性研究[D] :福建中医药大学,2013.

[10] 许秋雁, 欧阳玉祝. 海金沙中多酚的超声提取工艺研究[J]. 中国食品添加剂,2009(06):67-71.

[11] 张怡评, 杨婷, 洪专,等. 青钱柳多酚提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品工业,2021,42(06):212-216.
[12] 朱扶蓉, 滕春福, 李清禄. 响应面法优化畲药十二时辰总皂苷超声提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(12):2874-2878.
[13] 段菁菁, 王志新, 董琼. 超声辅助提取异叶茴芹多酚的工艺优化[J]. 农村经济与科技,2019,30(21):56-58.
[14] 李静凤. 盐肤木叶多酚与天然抗氧化剂复配及在油脂保鲜中的应用研究[D] :山西大学,2021.
[15] 郑晓艳, 郭月丽. Box-Benhnken 设计-响应面法优化金线莲中多酚的超声辅助提取工艺研究[J]. 江西中医药大学学报,2020,32(04):82-86.
[16] 王维华, 吴志庄, 牛广俊,等. 超声提取三叶青总黄酮工艺研究[J]. 海峡药学,2016,28(03):45-48.
[17] 黄潇, 刘婧, 彭水梅,等. 响应面法优化栀子中总多酚、总黄酮的提取工艺[J]. 中国药房,2017,28(28):3964-3968.
[18] Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, et al. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States[J]. J Agric Food Chem, 2008,56(4):1415-1422.
[19] 徐红霞, 李晓颖, 陈俊伟,等.不同品种枇杷果实的酚类物质成分和抗氧化能力比较分析[A].其他:浙江省农业科学院园艺研究所;丽水市农业局,2013.
[20] 李佳潞, 党辉, 杨梦洁,等. 不同品种柿子的多酚 单宁 黄酮含量及其抗氧化活性研究[J]. 农产品加工,2023(03):57-61.
[21] 陈健敏, 黄玮玥, 叶雅玲,等. 甘草提取物的功效及其作用机制研究陈健敏(莆田学院药学与医学技术学院,药物分析与检验医学福建省高校重点实验室,福建莆田 351100)[J]. 长江大学学报(自然科学版),2019,16(07):109-115.
[22] 王存堂, 高增明, 姜辰昊,等. 黄色洋葱皮不同溶剂多酚提取物的总酚、总黄酮含量及抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2019,40(20):325-328+339.
[23] 吴献, 徐章文, 谢丽欢,等. 盐肤木根的化学成分及抗氧化活性研究[J]. 药学研究,2019,38(01):1-7+62.
[24] 张进军, 张作法, 吕国英,等. 浙产三叶青地下地上部分抗氧化活性比较[J]. 浙江农业科学,2021,62(04):709-711.
[25] 赵良辉, 王张英, 王志新. 异叶茴芹总黄酮抗氧化活性研究[J]. 天津农业科学,2019,25(07):8-13.
[26] 贲永光, 李康, 李坤平,等. 海金沙不同溶剂提取物清除自由基活性的研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(19):8989-8991.
[27] 吴岩斌, 张超, 张秀才,等. 不同来源金线莲总黄酮含量及其体外抗氧化、降血糖活性研究[J]. 药学服务与研究,2017,17(03):206-209.
[28] Zhao L, Luo YC, Wang CT, et al. Antioxidant activity of protein hydrolysates from aqueous extract of velvet antler (Cervus elaphus) as influenced by molecular weight and enzymes[J]. Nat Prod Commun, 2011,6(11):1683-1688.
[29] 陈琪, 王伯初, 唐春红,等. 黄酮类化合物抗氧化性与其构效的关系[J]. 重庆大学学报(自然科学版),2003(11):48-51+55.
[30] 陈金祥. 酚酸抗氧化活性的构效关系及抗氧化机制的研究[D] :中北大学,2020.
[31] Muzolf M, Szymusiak H, Gliszczyńska-Swigło A, et al. pH-Dependent radical scavenging capacity of green tea catechins[J]. J Agric Food Chem, 2008,56(3):816-823.
[32] 蔡蒙杰, 曹明盼, 王杰,等. 18 种畲药植物的抗氧化能力比较[J]. 中成药,2013,35(10):2283-2286.

Unraveling the Nexus of Meteorological Dynamics, and Socio-economic Factors in MRSA Resistance in China

肖明漩，赵翊畅，颜苗，于锋

（中国药科大学基础医学与临床药学学院 江苏 南京 210000）

【**Abstract**】**Background:** Antibiotic resistance is a major global health problem. In the management of lower respiratory tract infections, the increase in antibiotic resistance rates of popular respiratory pathogens such as MRSA is a major public health problem. However, there are few studies on the prevalence and risk factors of MRSA infection in China. **Purpose:** We aimed to study the distribution characteristics of MRSA resistance rate and detection rate in China, and to explore the specific risk factors associated with it. **Methods:** In this study, the data of MRSA resistance rate and detection rate in 31 provinces from 2014 to 2021 were obtained from the China Antimicrobial Resistance Surveillance System(CARSS). Meteorological and socio-economic data were obtained either from the China Meteorological Data Service Centre (CMDC) online resources or the National Bureau of Statistics (NBS) database. Multiple linear regression was used to explore the potential infuncing factors of MRSA resistance rate and detection rate. **Results:** Our study revealed a statistically significant difference in MRSA resistance and detection rates ($P < 0.001$) among provinces with varying climate distribution. Pairwise comparisons demonstrated that the resistance rate in provinces distributed in subtropical and temperate regions differed significantly from those in provinces with different climates. Additionally, the detection rate in provinces with a monsoon climate exhibited a significant difference from those in provinces with other climates. Moreover, the final prediction model achieved a notable explanatory power, accounting for 36.9% of the variance in the resistance rate and 7.1% of the variance in the detection rate. **Conclusion:** This nationwide study found that meteorological factors like climate, temperature and precipitation are associated with MRSA resistance and detection in China, highlighting the need for ecology-guided antimicrobial resistance control and management strategies. Besides, meteorological conditions and climate distribution can be used effectively to predict MRSA resistance and detection rates in China.

【**Keywords**】Antibacterial resistance; surveillance; China; Methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

HPLC-RID 法测定不同来源右旋糖酐 40 中主要糖类残留物含量及其差异分析

谢升谷[1]，金朱雨[1,2]，孙逍[1]，黄巧巧[3*]

（1. 浙江省食品药品检验研究院，国家药品监督管理局仿制药评价关键技术重点实验室，浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室，杭州 310052；2. 中国药科大学，南京 211198；3. 浙江省医疗器械审评中心，杭州 310001）

【摘要】目的：建立高效液相色谱-示差折光法（HPLC-RID）测定不同生产工艺的右旋糖酐 40 原料药中主要的可能发酵残留物果糖、蔗糖的含量，并结合不同的生产工艺，对右旋糖酐 40 中糖类残留物的差异原因进行分析，为相关药品的质量评价及国家药品标准的制修订提供一定的参考依据。**方法：**采用 ZORBAX-NH_2 色谱柱，以乙腈-水（75:25）为流动相，流速 1.0 mL·min^{-1}，RID 为检测器，温度设置为 40℃，柱温 40℃，进样量体积 50μL。**结果：**所有批次右旋糖酐 40 原料药中蔗糖均未检出，采用醇沉法生产工艺的右旋糖酐 40 中果糖残留量为 0.005%~0.14%；采用膜过滤法生产工艺的右旋糖酐 40 未检出果糖残留量。**结论：**本文建立的 HPLC-RID 法能有效测定右旋糖酐 40 中的果糖和蔗糖残留量，方法专属性强、灵敏度高、稳定性好，简单易操作。不同工艺生产的右旋糖酐 40 中果糖残留量差异较大，采用膜过滤法制得的右旋糖酐 40 中果糖残留量显著低于醇沉法，因此有必要在质量标准中对果糖残留量予以控制。

【关键词】右旋糖酐 40；液相色谱-示差折光检测器；生产工艺；质量控制；果糖残留量

Determination of main carbohydrate residues in Dextran 40 by high performance liquid chromatography-refractive index detector method and analysis of the difference

XIE Sheng-gu[1]，JIN Zhu-yu[1,2]，SUN Xiao[1]，HUANG Qiao-qiao[3]

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, National Medical Products Administration Key Laboratory for Core Technology of Generic Drug Evaluation, Hangzhou 310052, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 3. Zhejiang Medical Device Evaluation Center, Hangzhou 310001, China)

【ABSTRACT】OBJECTIVE: To establish a high performance liquid chromatography-refractive index detector method for the determination of main potential carbohydrate residues fructose and sucrose concentration in dextran 40 raw materials from different of production processes, analyze the differences in carbohydrate residues in dextran 40 produced by different manufactures, and provide a reference for the quality evaluation of related drugs and the formulation or edit of national drug standards. **METHODS:** Isocratic elution was performed on a ZORBAX-NH_2 column. Mobile phase consisted of 75% acetonitrile and 25% water at a flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. RID was used as detector. The detector temperature and column temperature was 40℃ and the injection volume was 50 μL. **RESULTS:** Sucrose was not detected in all batches of dextran 40. Fructose residue could only be detected in dextran 40 which using alcohol precipitation

基金项目：国家药品抽验评价项目资助，浙江省药品监督管理局科技计划资助（2021005）

作者简介：谢升谷，男，副主任药师　研究方向：药品质量控制

*通讯作者：黄巧巧，女，副主任药师　研究方向：药品质量控制、医疗器械技术审评

production process, and the content was 0.005%~0.14%. No fructose residue was detected in the dextran 40 of manufacturer B using membrane filtration method. **CONCLUSION：** Apply this established HPLC-RID method to determine the content of fructose and sucrose in dextran 40. The method has strong specificity, high sensitivity, good stability and simple operation. The amount of fructose residual in dextran 40 produced by different processes varies greatly. The fructose residual in the raw material of dextran 40 obtained by membrane filtration is significantly lower than that by alcohol precipitation, it is necessary to control the fructose residue in the quality standard.

【KEYWORDS】Dextran 40; HPLC-RID; Production process; Quality control; Fructose residue

右旋糖酐类药物均由蔗糖经肠膜状明串珠菌 L.M-1226 号菌（Leuconostoc mesenteroides）发酵后生成的高分子葡萄糖聚合物，再进一步处理精制而得[1, 2]，根据重均分子量的差异可划分为右旋糖酐 70、40、20 等系列品种[3, 4]。由蔗糖发酵获得右旋糖酐粗粉经酸水解后，通过分离纯化并精制后获得右旋糖酐原料药。目前主流的分离纯化工艺共有二种，分别为醇沉法和膜过滤法[3, 4]。右旋糖酐 40 属于低分子量右旋糖酐，静脉注射后可提高血液的胶体渗透压而扩充血容量、维持血压[5, 6]。目前在医药临床领域应用最为广泛的是右旋糖酐 40 葡萄糖注射液，主要用于增加血浆容量，以抗休克为主[6, 7]。

以酶发酵法催化蔗糖制备右旋糖酐的反应体系中除了产物右旋糖酐外，还可能含有起始底物蔗糖、副产物果糖等糖类发酵残留物[8]。而现有右旋糖酐类药物（如右旋糖酐 70、40、20 等）国内外现行版质量标准，如 USP 现行版、EP11.0、中国药典 2020 年版等，均未对相关残留物进行控制。因此，为全面评估该类药物的质量及相关风险，有必要建立合适的分析方法对右旋糖酐中的主要可能的糖类残留物进行分析。本文以临床使用较为广泛的右旋糖酐 40 为研究对象，样品来源于国家药品监督管理局国家药品计划抽验项目，共收集到 4 家企业生产的原料药。采用 HPLC-RID 法，通过优化前处理过程及相关色谱条件，对原料药中的发酵副产物果糖和起始物料蔗糖进行测定，并结合不同的生产工艺进行分析，为该品种药物的工艺开发、质量评价和标准制修订提供一定的参考。

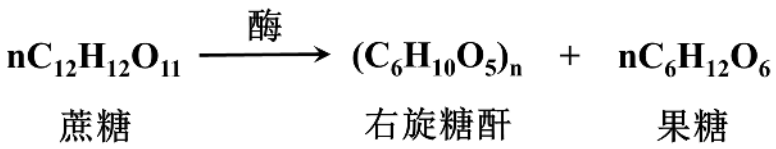


图 1 右旋糖酐发酵反应示意图

Fig. 1 Principle of the production of Dextran

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪配置 RID 检测器（美国 Agilent 公司），XPE205 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司），Milli-Q Advantage A10 超纯水系统（法国 Millipore 公司），JAC-5020 超声波清洗器（韩国科导公司），CT15RE 微量高速离心机（日本 Hitachi 公司）

1.2 标准品、耗材及原料药

果糖对照品（批号 100231-202008）、蔗糖对照品（批号 111507-202105）、葡萄糖对照品（批号 110833-201908）均由中国食品药品检定研究院提供，乙腈为色谱级，超纯水由实验室自制。

右旋糖酐 40 原料药共 12 批，分别生产自 4 家企业，每家企业各 3 批。样品均来源于国家药品监督管理局国家药品评价性监督抽验项目，样品涉及国内各个主要原料药生产单位，具有一定的代表性。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱采用 Agilent 公司 ZORBAX-NH_2 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），RID 检测器温度设置为 40℃，流动相为乙腈-水（75:25），流速 1.0 mL·min^{-1}，柱温 40℃，进样量 50μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液

精密称取果糖、蔗糖、葡萄糖对照品各约 50 mg，分别置于 5 mL 量瓶中，用乙腈-水（50:50）溶解并稀释至刻度，摇匀，即得对照品储备液，其浓度均约为 10 mg·mL^{-1}。

2.2.2 系统适用性溶液

精密量取“2.2.1”项下各对照品储备液各 1.0 mL，置同一 10 mL 量瓶中，加乙腈-水（50:50）稀释至刻度，摇匀，即得系统适用性溶液。

2.2.3 对照品溶液

精密量取“2.2.1”项下果糖、蔗糖对照品储备液各 1.0 mL，置同一 10 mL 量瓶中，加乙腈-水（50:50）稀释至刻度，即得混合对照品溶液，果糖、蔗糖浓度均约为 1.0 mg·mL^{-1}。

2.2.4 供试品溶液

精密称取右旋糖酐 40 原料药约 1.0 g，加水 5.0 mL，加热超声 30 min 后，加入 5.0 mL 乙腈混合均匀，以 10000 r·min^{-1} 的速度离心 10 min，取上清液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察

取“2.2.1”项下果糖、蔗糖对照品储备液溶液逐级稀释，稀释制成浓度分别为 0.04、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 mg·mL^{-1} 的系列对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。以各对照品的质量浓度 X（mg·mL^{-1}）为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归，绘制标准曲线，得到回归方程 Y 果糖=477382X+2727.9，r=0.9999；Y 蔗糖=491431x+1471.3，r=0.9999，说明果糖浓度在 0.04 mg·mL^{-1}~1.5 mg·mL^{-1} 之间、蔗糖浓度在 0.04 mg·ml^{-1}~1.5 mg·ml^{-1} 之间线性关系良好。

2.3.2 专属性考察

分别精密吸取系统适用性溶液、对照品溶液、供试品溶液及空白溶液[乙腈-水(50:50)]，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图（见图 2）。试验结果表明，果糖、蔗糖与葡萄糖分离度较好，果糖与蔗糖对应出峰位置无干扰，表明该法专属性良好。

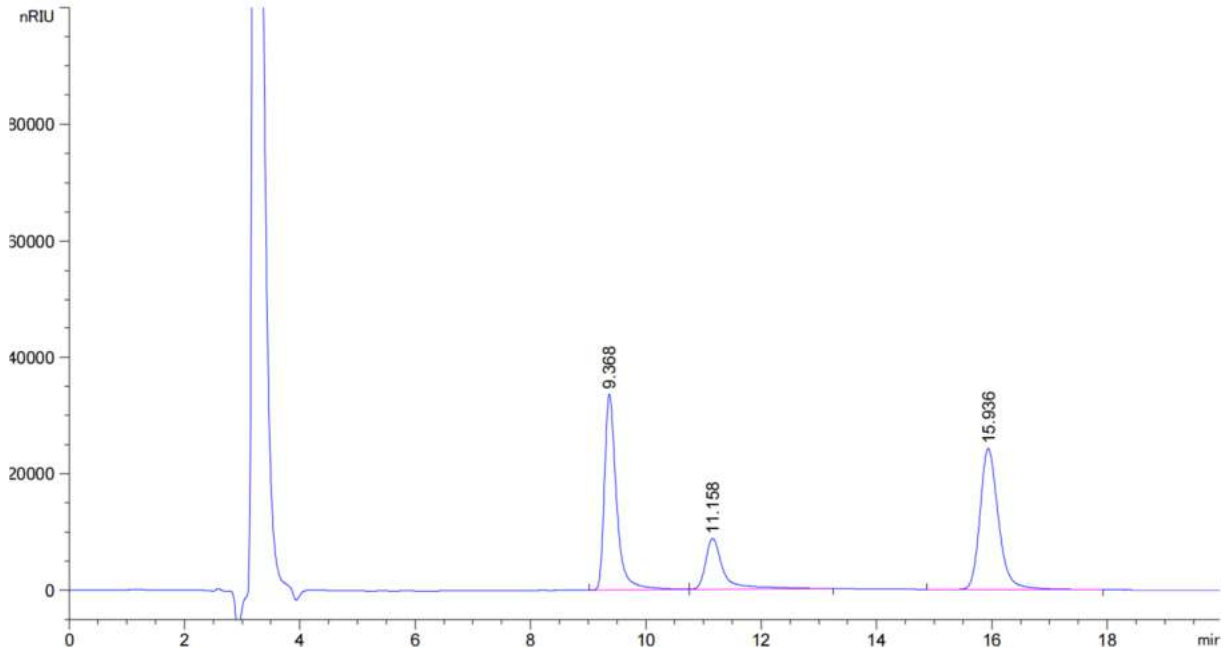


图 A（由左至右：果糖、葡萄糖、蔗糖）

Figure A (From left to right: fructose, glucose, sucrose)

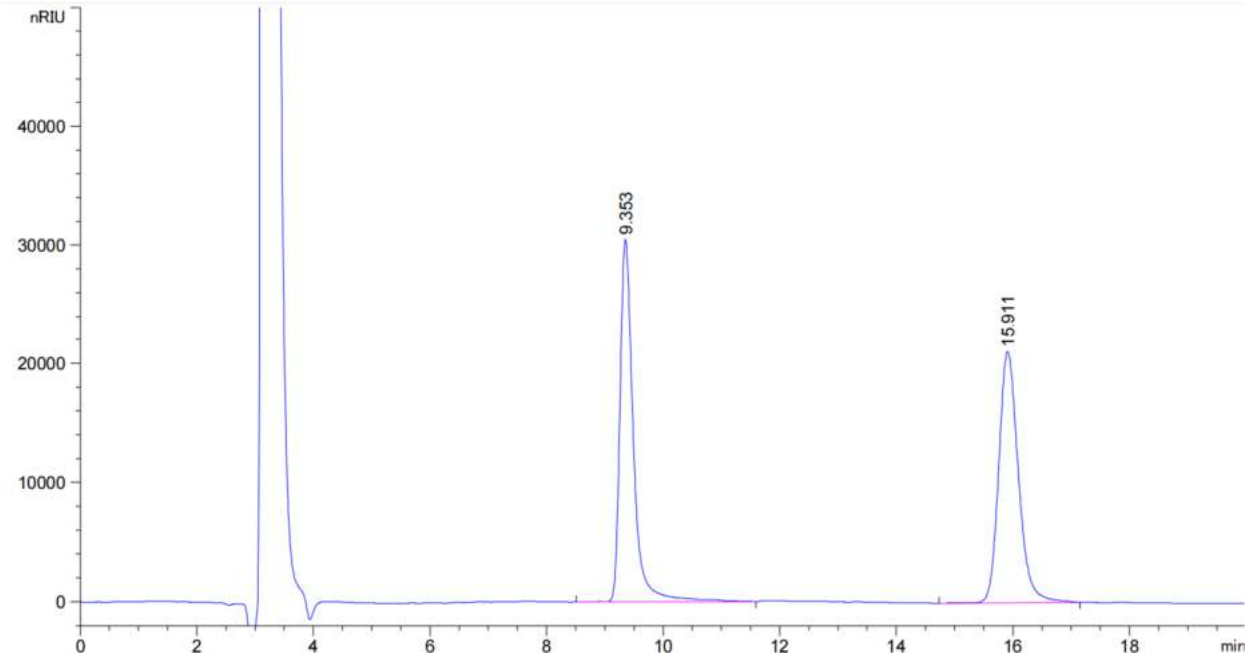


图 B（由左至右：果糖、蔗糖）

Figure B (From left to right: fructose, sucrose)

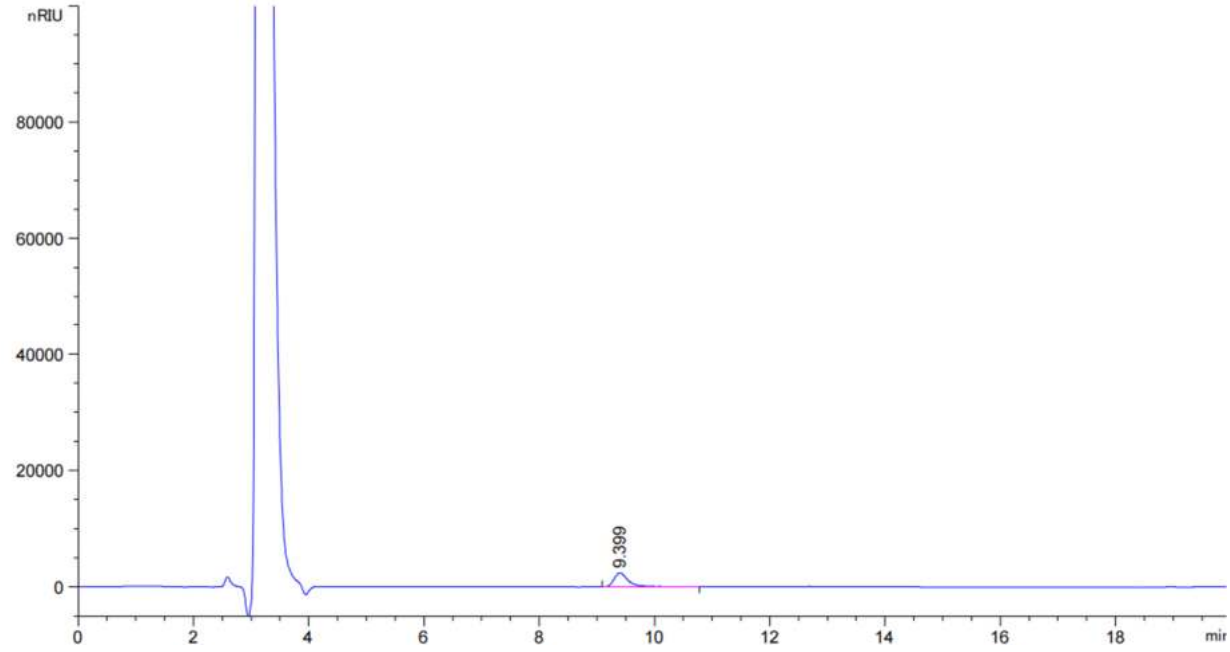


图 C 供试品溶液典型色谱图

Figure C

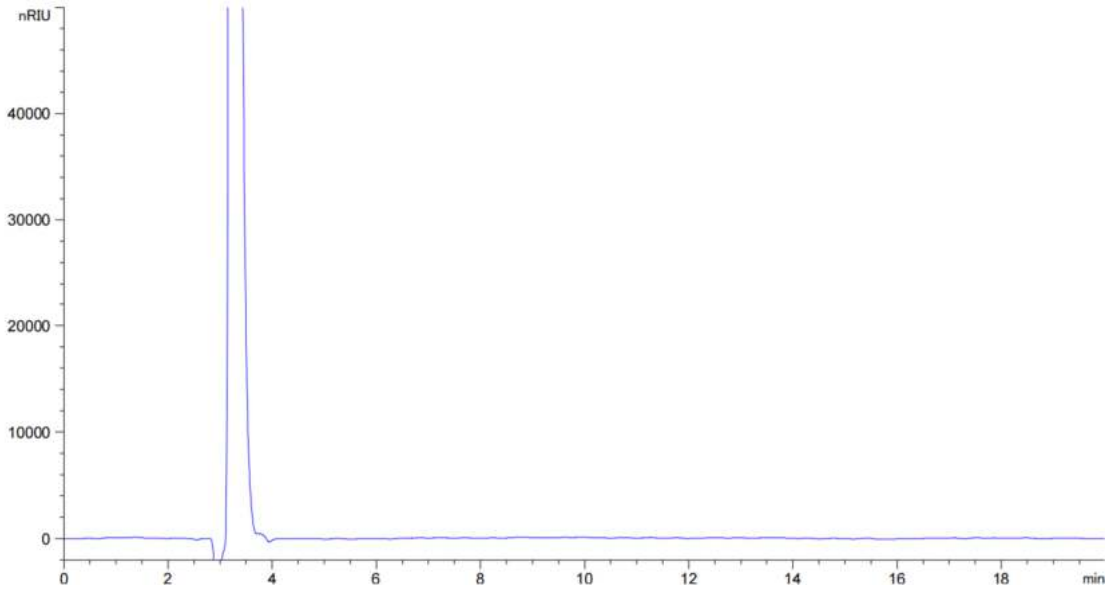


图 D

Figure D

图 2 系统适用性(A)、对照品(B)、供试品(C)和空白(D)溶液色谱图

Fig. 2 Chromatograms of system suitability solution (A), reference solution (B), test solution (C) and blank solution (D)

2.3.3 定量限与检测限

精密量取“2.2.3”项下的对照品溶液，用乙腈-水（50:50）逐级稀释，精密量取 50 μL，注入色谱仪进样测定，计算各色谱峰的信噪比，以信噪比约为 3 时的浓度为检测限，信噪比约为 10 时的浓度为定量限。测得果糖的定量限（*S*/*N*=15.2）为 0.01 mg·mL^{-1}；检测限（*S*/*N*=3.8）为 0.004 mg·mL^{-1}；蔗糖的定量限（*S*/*N*=11.6）为 0.01 mg·mL^{-1}；检测限（*S*/*N*=3.8）为 0.004 mg·mL^{-1}。

2.3.4 重复性试验

选取同一批次右旋糖酐 40 原料药，按“2.2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算同一样品中果糖、蔗糖的含量。果糖测定结果（n=6）平均值分别为 0.11%，其 RSD（n=6）值为 0.7%；蔗糖均未检出，表明本方法的重复性良好。

2.3.5 稳定性试验

选取同一批右旋糖酐 40 原料药样品制备而成的供试品溶液和对照品溶液，分别于 0、4、12、24、48 h 按“2.1”项下色谱条件测定，结果供试品溶液中果糖峰面积 RSD（*n*=45）为 1.1%；蔗糖均未检出；对照品溶液中，果糖峰面积 RSD（*n*=45）为 0.9%，蔗糖峰面积 RSD（*n*=45）为 1.2%；峰面积 RSD 值均小于 2.0%（*n*=45），表明对照品溶液、供试品溶液在 48 h 内稳定性良好

2.3.6 回收率试验

精密称取果糖、蔗糖对照品适量，用乙腈-水（50∶50）溶解并稀释制成浓度约为 10 mg·mL^{-1} 的对照品储备液。精密称取右旋糖酐 40 原料药约 1.0 g，分别加水 3.5、4.0、4.5、4.9 mL，加热、超声使溶解后，分别精密量取混合储备液 1.5、1.0、0.5、0.1 mL，混匀，再各自加入 5 mL 乙腈混合均匀，以 10000 r·min^{-1} 的速度离心 10 min，取上清液分别作 150%、100%、50%、10%回收率供试液。各浓度平行 3 份，按“2.1”项下色谱条件进行检测，计算加标回收率，结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab. 1 Results of the recovery experiment

物质名称 (substance)	浓度	加标量(added) mg·mL^{-1}	测定值(found) mg·mL^{-1}	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
果糖（fructose）	150%	1.51	1.53		100.0	1.6
		1.51	1.54	101.8		
		1.51	1.54			
	100%	1.01	1.01			
		1.01	1.01	100.3		
		1.01	1.02			
	50%	0.50	0.49			
		0.50	0.49	98.0		
		0.50	0.49			
	10%	0.10	0.10			
		0.10	0.10	100.0		
		0.10	0.10			
蔗糖（sucrose）	150%	1.51	1.51		100.0	0.5
		1.51	1.53	100.4		
		1.51	1.51			
	100%	1.00	1.01			
		1.00	1.02	100.3		
		1.00	0.98			
	50%	0.50	0.49			
		0.50	0.51	99.3		
		0.50	0.49			
	10%	0.10	0.10			
		0.10	0.10	100.0		
		0.10	0.10			

2.3.7 耐用性试验

分别采用不同型号色谱柱、流动相比例、柱温、流速、检测器温度等参数作耐用性考察，具体条件见表 2，各条件下含量结果与标准条件比较，相对标准偏差小于 2.0%，表明方法耐用性良好。

表 2 耐用性试验色谱条件

Tab. 2 Robustness test chromatography conditions

	条件 1	条件
色谱柱	Agilent ZORBAX-NH_2 色谱柱（规格：4.6 mm×250 mm，5μm）	Welch Ultimate XB-NH_2 色谱柱 (规格：250 mm×4. 6 mm，5μm)
RID 检测器温度	38℃	42℃
流动相	乙腈-水（76:24）	乙腈-水（74:26）
柱温	38℃	42℃
流速	0.9 mL·min^{-1}	1.1 mL·min^{-1}

2.4 结果

按“2.1”项下色谱条件进行检测，按外标法进行计算，对 12 批次右旋糖酐 40 原料药的测定结果进行汇总（表 3）。

表 3 样品测定结果汇总表

Tab. 3 Summary of determination results

生产企业 (manufacturer)	生产工艺 (Production Process)	批号 (lot number)	果糖含量 (fructose content)/%	蔗糖含量 (sucrose content)/%
		1	0.11%	<LOD
A	醇沉法	2	0.12%	<LOD
		3	0.14%	<LOD
		4	<LOD	<LOD
B	膜过滤法	5	<LOD	<LOD
		6	<LOD	<LOD
		7	0.006%	<LOD
C	醇沉法	8	0.005%	<LOD
		9	0.006%	<LOD
		10	<LOD	<LOD
D	/*1	11	<LOD	<LOD
		12	<LOD	<LOD

注 [1]：该样品的生产工艺经查询无法获取。

3 讨论

对样品中的果糖等糖类物质进行含量测定的方法很多，如 ELSD[9]、RID[10]、CAD[11]、质谱法[12]或柱前衍生法[13]等。其中柱前衍生法、质谱法相对灵敏度略高，但柱前衍生存在操作繁琐和衍生不一定完全、质谱法存在仪器较昂贵等缺点；ELSD 和 CAD 等则需载气辅助，因此选用使用相对较简单的 RID 检测器。但 RID 方法灵敏度往往略低，无法很好地满足右旋糖酐药物中的糖类残留物质的检测要求。

为保证方法具有较高的灵敏度，本文采用了加大供试品溶液浓度的处理方式，但是由于高浓度的右旋糖酐溶液具有一定的粘性，且易造成色谱柱的污染，故选择等体积的乙腈进行沉淀处理。利用右旋糖酐 40 在热水中易溶，在乙腈或乙腈-水混合溶液等溶剂中溶解性较差的特性，采用热水制备高浓度右旋糖酐 40 供试液，待全部溶解后加入等体积乙腈进行沉淀，将右旋糖酐 40 沉淀后离心，取上清液作为供试品溶液。通过此方法，保证大量的右旋糖酐 40 沉淀的同时，使上清液澄清透明，便于进样分析。在优化前处理方法时，称取右旋糖酐 40 适量加水 5.0 mL 加热溶解后，比较了分别加入 2.5、5.0、7.5 mL 不同体积乙腈混合均匀后制备的供试品溶液。加入 2.5 mL 乙腈处理离心后，制备的供试品溶液易发生浊光现象，较难制备澄清液体；加入 7.5 mL 乙腈处理离心后，制备液体较澄清，但最后定容体积较 5.0 mL 变大，导致方法灵敏度下降。故最后选择 5.0 mL 乙腈进行供试品溶液的前处理。

为进一步提高方法灵敏度，将进样体积提高至 50 μL，并对色谱条件进行优化，所建立的方法检测限为 0.004 mg/mL，约相当于样品中残留量的 0.004%，较好地满足了药品中有关物质控制的限量要求。本方法对流动相比例也进行了优化，在柱温及检测池温度为 40℃时，将流动相比例分别设置为乙腈-水（75∶25）与乙腈-水（80∶20），前者使系统适用性溶液中的各待测物分离度更好，且出峰更快，故选择乙腈-水（75∶25）作为流动相。由于右旋糖酐 40 原料药的主要制剂为右旋糖酐 40 葡萄糖注射液，为后续制剂样品中糖类残留物的研究，在系统适用性溶液中增加葡萄糖，以保证待测物果糖、蔗糖与葡萄糖的分离分析。

目前国内主流商业化右旋糖酐 40 原料药供应商共有 4 家，分别为国内供应商 A、B、C 共 3 家，进口原料供应商 1 家。右旋糖酐 40 原料均由蔗糖经发酵后生成的高分子葡萄糖聚合物，经处理精制而得。目前主流生产工艺有二种，分别为醇沉法和膜过滤法，具体工艺步骤如图 3 所示。蔗糖作为起始物料，经过多个不同阶段的纯化工艺后，其残余含量均未检出。果糖作为主要发酵副产物，其在发酵过程中与右旋糖酐等量产生，其在原料药残留的概率相对较高。结合测定结果，可以看出采用膜过滤工艺的右旋糖酐 40 原料药中的果糖残留含量较低，而采用醇沉工艺的样品由于具体工艺（尤其是醇沉和精制步骤）的参数的差异，不同企业测定结果差异较大，但是同一企业不同批次间差异较小。结合笔者前期不同工艺的分子量与分子量分布项目的质量差异研究[7]，可以推测进口右旋糖酐 40 有很大的可能是采用膜过滤工艺。

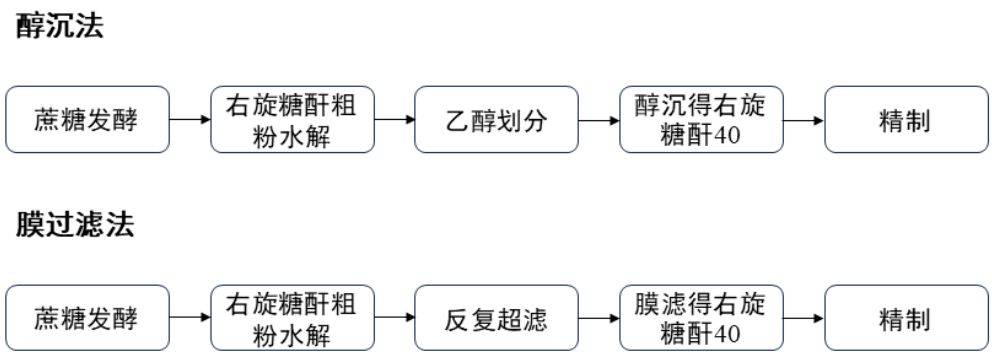


图 3 醇沉法和膜过滤法工艺图

Fig. 3 Process of alcohol precipitation method and membrane filter method

4 结论

小分子糖类极性大，在反相色谱柱上几乎没有保留，且没有紫外吸收[14, 15]。本研究利用氨基柱为固定相，结合示差折光检测器（RID），建立了右旋糖酐 40 原料药中主要糖类残留物果糖和蔗糖的测定方法。经验证，该方法的重复性、稳定性、回收率及线性关系均良好，方法简便、快速，能准确定量评价右旋糖酐 40 原料药中的残留糖类成分。

目前右旋糖酐制备主要是发酵后通过酸法或酶法等水解后，进行分子量划分，再通过醇沉法或膜过滤法进行纯化获得，广泛应用于食品、医药等行业[16, 17]。不同的生产纯化工艺，获得的产品质量良莠不一，且右旋糖酐 40 作为注射剂原料的产品，相对其他领域对于产品的质量要求最为严格。而目前右旋糖酐类注射液的不良反应较多[18-20]，现有多个药典质量标准中需控制的分子量与分子量分布等相关项目均无法很好的区分和表征不同来源右旋糖酐的内在质量差异[21]。作为注射用原料药，右旋糖酐系列原料药药典质量标准中均缺乏有关物质的控制，对工艺中的起始物料、发酵副产物、降解物质等相关杂质均缺乏合适的项目控制。本文通过比较多个来源的原料，找到具有一定质量区分度的指标来表征右旋糖酐 40 的内在关键质量，可一定程度上表征不同来源样品的纯度质量差异，同时也为相关药品国家质量标准的制修订提供了一定的参考。

参考文献

[1] JUMMA KAREEM A, ABDUL SATTAR SALMAN J. Production of Dextran from Locally Lactobacillus Spp. Isolates [J]. Reports of biochemistry & molecular biology, 2019, 8(3): 287-300.

[2] WANG T, JIANG Z, WANG Y, et al. Low Molar Mass Dextran: One-Step Synthesis With Dextransucrase by Site-Directed Mutagenesis and its Potential of Iron-Loading [J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2021: 747602.

[3] WANG Q, LIU T, XU X, et al. Dextran degradation by sonoenzymolysis: Degradation rate, molecular weight, mass fraction, and degradation kinetics [J]. International journal of biological macromolecules, 2021: 60-66.

[4] CHEN H, PU Y, ZOU Q, et al. Enzymatic degradation of aqueous dextrans as affected by initial molecular weight and

concentration [J]. Polymer Bulletin, 2021, 78(9): 4863-4876.
[5] 程冬. 色谱柱及标准曲线的选择对 HPGPC 法测定右旋糖酐分子量及分子量分布的影响 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(02): 367-372.
[6] 康璧, 帅维维, 程冬. HPGPC-CAD 和 HPGPC-RID 测定右旋糖酐 40 分子量及分子量分布的方法比较 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(11): 1954-1959.
[7] 孙逍, 谢升谷, 黄艳, et al. 不同来源右旋糖酐 40 葡萄糖注射液及原料样品中右旋糖酐 40 相对分子质量与相对分子质量分布质量差异成因研究 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57(04): 301-305.
[8] 黄双霞, 侯殿志, 陈华磊, et al. HPGFC 双柱串联检测右旋糖酐蔗糖酶催化产物及右旋糖酐聚合过程 [J]. 食品科学, 2018, 39(12): 191-198.
[9] SCHMIDT C M, ZüRN T, THIENEL K J F, et al. Development, optimization and validation of an HPLC-ELSD method for the analysis of enzymatically generated lactulose and saccharide by-products [J]. Food Chemistry, 2017, 215: 347-353.
[10] MA Rui, OUYANG Jia, LI Xin, LIAN Zhina, CAI Cong. Simultaneous determination of organic acids and saccharides in lactic acid fermentation broth from biomass using high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(01): 62-66.
[11] SATO K, YAMAMOTO T, MITAMURA K, et al. Separation of Fructosyl Oligosaccharides in Maple Syrup by Using Charged Aerosol Detection [J]. Foods, 2021, 10(12): 3160.
[12] JIN J, LAO J, ZHOU R, et al. Simultaneous Identification and Dynamic Analysis of Saccharides during Steam Processing of Rhizomes of Polygonatum cyrtonema by HPLC–QTOF–MS/MS [J]. Molecules, 2018, 23(11): 2855.
[13] OEFNER P J, VORNDRAN A E, GRILL E, et al. Capillary zone electrophoretic analysis of carbohydrates by direct and indirect UV detection [J]. Chromatographia, 1992, 34(5): 308-316.
[14] 刘潇潇, 戴慧贤, 刘学华, et al. HPLC 示差折光检测法同时测定参芪扶正注射液中单糖和寡糖的含量 [J]. 中国药房, 2012, 23(12): 1139-1141.
[15] 宫兴华, 郑磊, 李娟. HPLC-ELSD 法同时测定葡萄糖原料药中 6 种糖类有关物质的含量 [J]. 中国药房, 2021, 32(10): 1241-1245.
[16] 张九花, 常国炜, 马步, et al. 右旋糖酐制备及其应用研究进展 [J]. 甘蔗糖业, 2018, (02): 52-58.
[17] NAESSENS M, CERDOBBEL A, SOETAERT W, et al. Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications [J]. JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2005, 80(8): 845-860.
[18] 陈雪梅, 金国栋, 杜微微. 低分子右旋糖酐注射液的不良反应报告 [J]. 北方药学, 2013, 10(09): 40.
[19] 廖为志. 低分子右旋糖酐严重不良反应 46 例分析 [J]. 中国药师, 2010, 13(01): 138-139.
[20] 林素梅. 15 例低分子右旋糖酐不良反应浅析 [J]. 广西医学, 2004, (09): 1367-1368.
[21] 邹越霄, 王庆仙, 齐冬梅, et al. 中药糖类提取物的定性与定量方法研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(02): 710-718.

他克莫司个体内变异的文献计量学及可视化分析

谢文敏[1,2#]，王学彬[1]，王卓[1,2*]

（1.海军军医大学第一附属医院 药剂科，上海 200433；2.沈阳药科大学生命科学与生物制药学院，辽宁 沈阳 110016；）

【摘要】目的：通过对他克莫司个体内变异相关文献进行计量学及可视化分析，探索他克莫司个体内变异的研究现状。**方法：**全面系统地检索 2018 年至 2022 年中国知网（CNKI）和 Web of Science2 个数据平台关于他克莫司个体内变异研究的文献，应用文献计量学的研究方法和 VOSviewer 和 Citespace 软件对国家（地区）、机构、作者、关键词等进行分析和可视化展示。**结果：**共纳入 14 篇中文文献和 143 篇英文文献。在国家方面，美国是全球发文量最多的国家，近 5 年来在 TAC-IPV 研究领域的发文量为 41 篇，其次是中国，发文量为 24 篇。在期刊杂志方面， American journal of transplantation, Transplantation 和 Therapeutic drug monitoring 杂志排名前三位。在科研机构方面，复旦大学和鹿特丹伊拉斯姆斯大学医学院发文量排名第一。在作者方面，英文文献发文量最多的是 van gelder，其次是 hesselink, taber, mcgillicuddy，中文文献分别是李亚梅和白杨娟。中英文文献关键词主要集中为他克莫司、个体内变异性、移植、排斥、CYP3A4、影响因素、移植物功能等。通过关键词的共现、聚类、时间线及突现分析发现近五年该领域的研究热点集中在移植患者他克莫司个体内变异与影响因素（基因多态性、剂型等）以及临床结局的关系等。**结论：**本研究借助可视化研究软件，揭示了他克莫司个体内变异领域的研究热点、前沿及发展趋势，为后期他克莫司个体内变异的研究提供预判与参考。

【关键词】他克莫司；个体内变异；文献计量学；可视化分析；Citespace ; VOSviewer

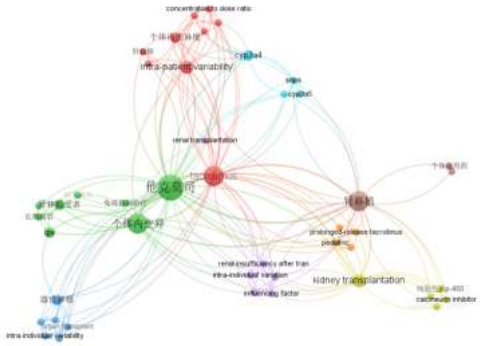


图 1：中文关键词共现

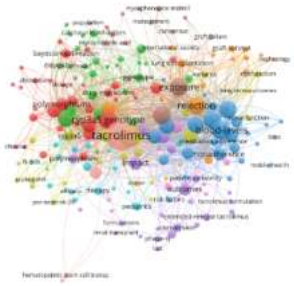


图 2：英文关键词共现

#第一作者（first author）：谢文敏（女）硕士研究生，E-mail：xiewenmin1011@163.com

*通信作者（corresponding author）：王卓，海军军医大学第一附属医院药剂科，E-mail：wangzhuo088@163.com

抗结核药物性肝损伤风险因素预测模型研究

徐璐[1]，魏渊[2]，吴静[1,*]

（[1]镇江市第三人民医院（江苏大学附属镇江三院），江苏镇江，212000；[2]江苏大学药学院，江苏镇江，202000）

【摘要】目的：基于深度学习构建抗结核药物性肝损伤风险因素预测模型，助力临床诊疗用药。**方法：**收集某地级市2019年1月1日~2022年10月31日结核住院患者相关信息并整合为多模态，利用多人工神经网络模型构建抗结核药物性肝损伤住院患者风险因素预测模型，同时构建多元Logistic回归模型，评价两种模型预测价值。**结果：**两种模型预测抗结核药物性肝损伤住院患者的相同风险因素为肝病史、年龄、未预防使用护肝药、营养不良，神经网络模型的准确度、灵敏度、特异度均高于多元Logistic回归模型，ROC曲线下AUC经检验存在统计学差异（P<0.05）。**结论：**相较传统回归模型，人工神经网络模型对抗结核药物性肝损伤住院患者风险因素预测价值更佳。

【关键词】抗结核药物性肝损伤；神经网络；Logistic回归；风险因素；预测模型

Study on Predictive Model for Anti-tuberculosis Drug-induced Liver Injury

Xu Lu[1], Wei Yuan[2], Wu Jing[1,*]

[1]The Third People's Hospital of Zhenjiang City（The Third Affiliated Hospital of Jiangsu University）, Zhenjiang 212000, China;

[2]School of Pharmacy Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China

【Abstract】Objective: To develop a prediction model of risk factors of anti-tuberculosis drug-induced liver injury based on deep learning, in order to promote the clinical treatment of drugs. **Methods:** Collect the relevant information of hospitalized patients with anti-tuberculosis drug-induced liver injury from January 1, 2019 to October 31, 2022 in a prefecture-level city. The above information were integrated into multimodality. A convolutional neural network was used to construct prediction model for hospitalized patients with anti-tuberculosis drug-induced liver injury, and multivariate logistic regression model was established at the same time. The prediction value of the two models is compared comprehensively. **Results:** The same risk factors predicted by the two models were underlying liver disease, age, length of stay, unused hepatoprotective drugs and mainutrition. The accuracy, sensitivity and specificity of the neural network model were higher than those of the multiple logistic regression model. There were statistical differences in AUC under ROC curve (P<0.05). **Conclusion:** The convolutional neural network model has a better predictive value.

【Key words】Anti-tuberculosis Drug-induced Liver Injury; Neural Network; Multiple Logistic Regression; Risk Factors; Prediction model

抗结核药物性肝损伤（anti-tuberculosis drug-induced liver injury，以下简称ATB-DILI）是结核治疗过程中常见的严重药物不良反应（adverse drug reaction，以下简称ADR），也是临床常见的药物性肝损伤（drug-induced liver injury，以下简称DILI）。出现ATB-DILI的原因涉及患者、药物、环境等多个层面，且存在各层面交互影响或

[第一作者简介]徐璐（1987-），女，江苏镇江，主管药师，江苏大学中级讲师，硕士，研究方向：临床药学。电话：0511-80578850，E-mail:xlytdx@126.com。

[通讯作者简介] 吴静（1976-），女，江苏镇江，副主任药师，本科，研究方向：医院药学。电话：0511-80578850，E-mail:971225501@qq.com。

基金项目:1.国家重点研发计划(2020YFE0205100)；2.镇江市社会发展指导性科技计划项目(FZ2022104)。

叠加作用[1-4]。我国对疾病防控高度重视，“十四五”规划明确提出“改革疾病预防控制体系，强化监测预警、风险评估、流行病学调查、检验检测、应急处置等职能。”因此，建立健全 ATB-DILI 预警机制并做到精准防控，显得尤为重要。

传统的预测模型多采用 Logistic 回归模型，往往不能保留局部特征和交互联系[5-7]，人工神经网络可保留以上特征和联系，可将患者、药物、环境等多个层面的多个因素交互叠加，从而得到特征性表达[8,10-11]。本研究基于卷积神经网络（convolutional neural network，以下简称 CNN），构建 ATB-DILI 风险因素预测模型，并与传统预测模型对比研究，为临床提供决策性诊疗支持。

1 资料与方法

1.1 研究对象

采用随机抽样法收集 2019 年 1 月 1 日~2022 年 10 月 31 日在某地级市专科医院及县级医院结核科收治的 3288 例结核住院患者，由地级市专科医院牵头，经该院伦理委员会审核并通过（202311），纳入患者均签署知情同意书。

纳入标准：①成年患者（≥18 岁）；②符合《肺结核诊断 WS288-2017》和《肺外结核的诊断和治疗》的结核诊断标准[12]；③均接受抗结核药物治疗且治疗过程和随访信息记录完整；④ATB-DILI 诊断标准：符合《抗结核药物性肝损伤诊治指南（2019 年版）》[4]的肝功能生化指标规定，并排除其他原因引起的肝损伤，RUCAM 量表（Roussel Uclaf Causality）评分≥3 分：肝损伤发生在使用抗结核药物后，停药后肝功能指标。排除标准：①肝功能异常由病毒性肝炎、酒精性肝炎、脂肪肝以及自身免疫性肝炎等引起；②病历资料缺失；③自动出院或死亡。

1.2 多元 Logistic 回归模型构建及验证

收集以上结核患者的相关资料，包括人口学资料、诊疗相关资料、实验室检查资料等。将结核患者所有相关信息进行单因素分析，筛选 P<0.05 的风险因素，代入多元 Logistic 回归计算分析 ATB-DILI 与以上风险因素关系。训练样本与测试样本回代，绘制 ROC 曲线，计算曲线下面积（AUC），评价预测的准确性。

1.3 人工神经网络模型构建及验证

将结核患者相关资料整合为 9 个模态，各模态下具体项目见表 1。人工神经网络结构分为三大模块：输入模块、学习模块以及输出模块。将多模态数据经输入模块输入，通过学习模块中的“卷积-池化-卷积-池化”学习其特征和交互联系，输出模块得到各模态的特征性表达。网络模型结构见图 1。该模型的训练样本与测试样本以 7:3 随机分配并回代，以 0.5 作为预测概率的分割点，计算灵敏度和特异度，绘制 ROC 曲线，计算 AUC，评价准确性。运用 Delong 检验比较两种模型 AUC，分析是否具有统计学差异（P<0.05）[8-9]。

表 1 多模态主要项目

模态名称	项目
基本信息模态	年龄 性别 身体质量指数 文化程度 婚姻状况 居住环境 职业 吸烟 饮酒
体征模态	心率 呼吸 体温 血压 血氧饱和度
结核诊断模态	结核治疗史 结核类型 是否耐药
既往史模态	糖尿病史 高血压病史 心脏病史 免疫缺陷史 肝病史 胆系疾病史 有无乙肝表面抗原携带 有无营养不良，有无预防性使用护肝药，有无使用激素
血常规模态	白细胞 红细胞 血红蛋白 血小板 中性粒细胞 淋巴细胞数 单核细胞 嗜酸性粒细胞 嗜碱性粒细胞
血凝功能模态	凝血酶原时间 活化部分凝血活酶时间 纤维蛋白原 D-二聚体
电解质模态	血钾 血钠 血氯 血钙
血糖血脂模态	空腹血糖 甘油三酯 胆固醇
免疫功能模态	免疫球蛋白 G 免疫球蛋白 A 免疫球蛋白 M 免疫球蛋白 D 免疫球蛋白 E 补体 C3 补体 C4

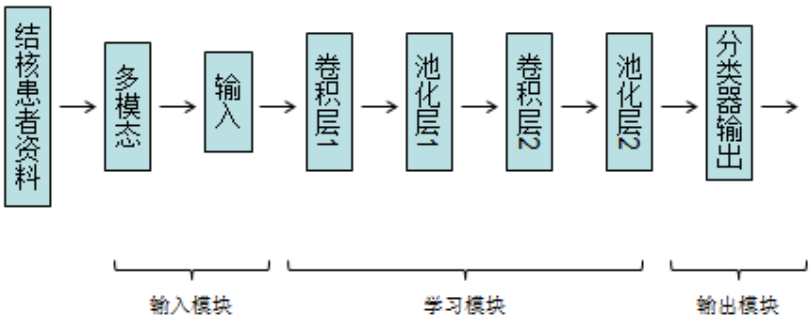


图 1 人工神经网络结构

1.4 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行数据整理和分析。计量资料采用 t 检验，以 $\bar{x}\pm s$ 描述，计数资料采用 χ^2 检验，以百分率（%）表示，$P<0.05$ 有统计学意义。其他处理见 1.2 及 1.3 项。

2 结果

2.1 患者基本情况

本次研究纳入结核患者 3012 例，实际发生 ATB-DILI294 例，占比 9.76%。

2.2 多元 Logistic 回归分析

单因素分析表明年龄、饮酒、结核治疗史、糖尿病史、肝病史、胆系疾病史、营养不良、预防性使用护肝药具有统计学意义（$P<0.05$）。单因素分析见表 2。将以上因素作为自变量代入多元 Logistic 回归模型，分析得到年龄、肝病史、营养不良、未预防性使用护肝药是 ATB-DILI 的风险因素（$P<0.05$）。多元 Logistic 回归分析见表 3。训练样本与测试样本的总体准确度分别为 81.02%、80.75%，具体见表 4。

表 2 结核患者发生 ATB-DILI 单因素分析

风险因素		ATB-DILI 数	总人数	比率（%）	χ^2	*P*
年龄(岁)	<60	92	1731	5.31	74.206	<0.001
	≥60	202	1281	15.77		
饮酒	有	110	957	11.49	4.784	0.029
	无	184	2055	8.95		
结核治疗史	有	68	561	12.12	4.36	0.037
	无	226	2451	9.22		
糖尿病史	有	79	667	11.84	4.221	0.04
	无	215	2345	9.17		
肝病史	有	154	732	21.04	107.64	<0.001
	无	140	2280	6.14		
胆系疾病史	有	85	721	11.79	4.427	0.035
	无	209	2291	9.12		
营养不良	Alb<35g/L	71	578	12.28	5.168	0.023
	Alb≥35g/L	223	2434	9.16		
预防性使用护肝药	有	44	631	6.97	5.902	0.015
	无	250	2381	10.50		

表 3 结核患者发生 ATB-DILI 多元线性回归分析

风险因素	*OR* 值	95%*CI*	*P*
年龄	3.335	2.576~4.318	<0.001
肝病史	4.072	3.182~5.212	<0.001
营养不良	1.331	1.012~1.750	0.005
未预防性使用护肝药	1.565	1.122~2.184	0.007

表 4 多元 Logistic 回归模型各样本效能（n=3102）

样本类型	实际值	预测值		准确率（%）
		未发生	发生	
训练样本	未发生	1623	101	94.14
	发生	299	85	22.13
	总体准确率（%）			81.02
测试样本	未发生	689	52	92.98
	发生	122	41	25.15
	总体准确率（%）			80.75

2.3 人工神经网络预测模型分析

该模型分析对 COVID-19 住院患者继发医院感染影响最大的前五位风险因素分别为肝病史、年龄、未预防使用护肝药、营养不良以及饮酒。训练样本与测试样本的总体准确度分别为 82.35%、81.53%，具体见表 5。

表 5 人工神经网络模型各样本效能（n=3102）

样本类型	实际值	预测值		准确率（%）
		未发生	发生	
训练样本	未发生	1671	94	94.67
	发生	278	65	18.95
	总体准确率（%）			82.35
测试样本	未发生	701	48	93.59
	发生	119	36	23.22
	总体准确率（%）			81.53

2.4 两种模型对比评价

神经网络模型各样本的准确度、灵敏度以及特异度，均高于 Logistic 模型，见表 6。绘制两种模型 ROC 曲线（图 2），计算多元 Logistic 回归模型和神经网络模型的 AUC 分别为 0.812 和 0.861。Delong 检验比较两种模型 AUC，存在统计学差异（*P*<0.05）。

表 6 比较两种模型的准确度、灵敏度、特异度

样本类型		准确度（%）	灵敏度（%）	特异度（%）
Logistic 回归	训练样本	81.02	46.73	90.05
	测试样本	80.75	45.58	88.92
人工神经网络	训练样本	82.35	71.25	93.18
	测试样本	81.53	66.25	92.76

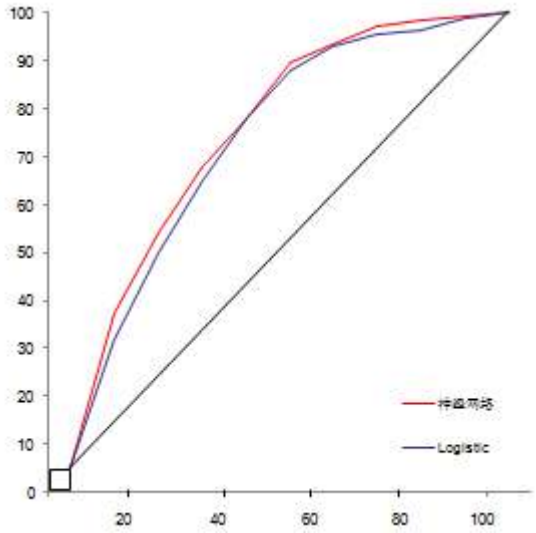


图 2 ROC 曲线图

3 讨论

结核病是严重影响公共卫生的慢性传染性疾病，我国结核患者总数位居全球第二，发病率居高不下。ATB-DILI 是结核治疗过程中常见的药物不良反应,文献报道 ATB-DILI 发生率 2.0%~28.0%，我国约为 9.5%~10.6%[4]。ATB-DILI 本身发病机制复杂，涉及多维度多层面，如患者因素（年龄、性别、用药依从性等）、药物因素（用药方案、疗程等）、其他因素（饮酒、吸烟、肝病史）等[2]。结核治疗周期漫长且存在多药联用，一旦出现 ATB-DILI，一方面明显影响肝脏功能，另一方面延误原发疾病治疗，容易出现耐药，甚至危及生命，同时加重患者身体和经济负担。

深度学习属于机器学习，可通过建立、模拟人脑学习的神经网络，来识别、分类各种图像、声音、文本等数据，建立人工神经网络是其重要基础和模型。人工神经网络是将人工神经元按照一定结构链接形成的网络，用于复杂信息的处理。其中卷积神经网络可通过局部感知、共享权值及池化等操作来充分保留局部特点和临近联系，以完成非线性映射，适用于影响层面多、信息量大且关联复杂的深入研究[8]。在医药领域，人工神经网络目前已用于影像学诊断和分类、药物识别和分类、药物靶标作用关系、药物相互作用、抗菌药物耐药性等，并取得良好效果[13-15]。

基于以上认知，本研究将 ATB-DILI 诸多影响因素整合为有助分类识别和融合的多模态，再经卷积神经网络中“卷积-池化-卷积-池化”逐层提取信息的特征性表达，通过分类器输出结果，从而构建 ATB-DILI 风险因素预测模型。同时建立多元 Logistic 回归模型，比较两种模型对预测 ATB-DILI 风险因素的适配度。

人工神经网络模型预测 ATB-DILI 风险因素为肝病史、年龄、未预防使用护肝药、营养不良以及饮酒，Logistic 模型预测风险因素为前四项。患者存在基础肝病，本身肝功能受损明显，不仅会提高 ATB-DILI 发生率，而且影响临床转归；高龄及营养不良患者身体机能减退，免疫力相对偏低，属于发生 ATB-DILI 的高危人群；长期饮酒患者肝功能负担重，用药期间易发生 ATB-DILI；预防性使用护肝药可在结核治疗过程中对肝脏功能起到保护作用，我国《抗结核药物性感损伤诊治指南（2019 年版）》建议对有高危因素的患者给予预防性保肝治疗对减少 ATB‑DILI 的发生具有一定作用，但对于无高危因素患者无充分证据。本研究与以往临床报道基本一致[1,2,5,7]。也进一步提醒结核诊疗中注意并预判以上几类患者发生 ATB-DILI 的可能性。

本研究证实两种模型均具有良好的预测价值。但在模型优选度方面，因神经网络模型 ROC 曲线下 AUC 检验以及各样本的灵敏性、特异性均明显高于 Logistic 模型，总体评价神经网络模型更佳。

本次研究局限性表现：研究时间限制以及研究人员短缺，导致本次研究不能进行长周期、多中心的深入研究和实践；个别风险因素未能进行更加细致的划分，如结核类型仅分为肺部结核和肺外结核等；考虑<18 岁患者

及妊娠期女性的特殊性，本次研究均未纳入。

4 意义

本次研究一方面加强了临床药师与临床医生、护士的沟通交流，提高了临床药学在诊疗中的作用，另一方面探索出适宜的 ATB-DILI 风险因素预测模型，有助于完善结核病诊疗手段及药物性肝损伤风险评估机制，降低 ATB-DILI 发生率，减轻患者经济负担，减少医疗资源浪费，促进疾病诊疗数字化智能化。

参考文献

[1]姚雷娜，胡宾.抗结核药物所致肝损伤的不良反应分析及风险因素研究[J].临床肺科杂志，2022，27（1）：62-67.

[2]李永红，李红恩，雷世鑫，等.抗结核药致中国人群药物性肝损伤危险因素的 Meta 分析[J].中国抗生素杂志，2021，46（6）：628-632.

[3]Jose C. Fernandez-Checa, Pierre Bagnaninchi, Hui Ye, et al. Advanced preclinical models for evaluation of drug-induced liver injury-consensus statement by the European Drug-Induced Liver Injury Network[J]. *J HEPATOL*, 2021, 75(4):935-959.

[4]中华医学会结核病学分会.抗结核药物性感损伤诊治指南（2019 年版）[J].中华结核和呼吸杂志，2019，42（5）：343-356.

[5]张敏，李星星，何霞，等.抗结核治疗中药物性肝损伤相关因素的 Logistic 回归分析[J].中国临床药理学杂志，2021，37（18）：2387-2393.

[6]Tao Zhong, Yuzheng Fan, Xiao-Li Dong, et al. An Investigation of the Risk Factors Associated With Anti-Tuberculosis Drug-Induced Liver Injury or Abnormal Liver Functioning in 757 Patients With Pulmonary Tuberculosis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12(8): 1-9.

[7]赵鹏，陈静，杨光红，等.住院结核患者抗结核药物性肝损伤的 Nomogram 风险预测模型构建[J].中华结核和呼吸杂志，2022，45（2）：171-176.

[8]周浦城，李从利，王勇，等.深度卷积神经网络原理与实践[M].北京：电子工业出版社，2020. 11-18.

[9]王惠茹，李秀红，李哲，等.多模态预训练模型综述[J].计算机应用，2023，43（4）：991-1004.

[10]Yogesh Kumar, Apeksha Koul, Ruchi Singla, et al. Artificial intelligence in disease diagnosis: a systematic literature review, synthesizing framework and future research agenda[J]. *Journal of Ambient Intelligence and Humanized Computing*, 2022, 13(1): 1-28.

[11]Skylar Connor, Ting Li, Ruth Roberts, et al. Adaptability of AI for safety evaluation in regulatory science: A case study of drug-induced liver injury[J]. *Frontiers in Artificial Intelligence*, 2022, 5(11): 1-9.

[12]中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,肺结核诊断(WS+288-2017)[S].中华人民共和国卫生行业标准,2017.

[13]吴树才，王新举，纪俊雨，等.基于深度学习卷积神经网络的肺结核 CT 诊断模型效能初探[J].中华结核和呼吸杂志，2021，44（5）：450-455.

[14]毋一帆.基于深度卷积神经网络的 X 光片肺结核检测和分类[D].西安：西北大学，2019.

[15]吴婷婷，余自成.人工神经网络技术在药学领域应用的研究进展[J].中国临床药学杂志，2021，30（1）：72-76.

临床药师对乙肝肝硬化患者的药学服务模式探索及评价

徐璐，吴静，郦晶，李梦莹，周兴蓓

镇江市第三人民医院（江苏大学附属镇江三院），江苏镇江，212000

【摘要】目的：应用药物治疗管理（MTM）结合欧洲医药保健网（PCNE）的模式对乙肝肝硬化患者进行药学服务，从临床疗效、安全性、人文效果以及药物相关问题方面分析药学服务成效。**方法：**将乙肝肝硬化患者随机分为药学组和仅接受传统治疗的对照组，临床药师运用 MTM 结合 PCNE 分类系统对药学组进行药学服务，分别从经济效果、临床疗效和安全性、人文结果进行比较，并分析药学组药物相关问题(DRPs)。**结果：**药学组的成本-效用比以及临床指标转归优于对照组，前者的药物不良反应相较后者在随访 3 个月时有统计学意义,用药依从性和生活质量在干预后和随访期间均有统计学意义（P<0.05）。药学组 DRPs 共计 52 个，类别主要为治疗效果不佳，原因主要有药物选择不合理和用法用量不合理，干预接受共计 46 个，共计解决 45 个。**结论：**MTM 结合 PCNE 分类系统的药学服务模式对乙肝肝硬化患者的治疗和后续随访起到了积极作用。

【关键词】临床药师；药物治疗管理；PCNE 分类系统；效果评价

Exploration and evaluation of pharmaceutical care model for patients with hepatitis B cirrhosis

Xu Lu, Wu Jing, Li Jing, Li Mengying, Zhou Xingbei

Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Zhenjiang City（The Third Affiliated Hospital of Jiangsu University）, Zhenjiang 212000, China

【Abstract】Objective: To provide pharmaceutical care for patients with hepatitis B cirrhosis by using the model of MTM combined with PCNE. To analyze the effectiveness of pharmaceutical care from the aspects of clinical efficacy, safety, humanistic effect and drug-related problems (DRPs). **Methods:** Patients with hepatitis B cirrhosis were randomly divided into the pharmaceutical group and the control group only receiving traditional treatment. Clinical pharmacists used MTM combined with PCNE to provide pharmaceutical care in the pharmaceutical group. Economic effects, clinical indicators, safety, medication compliance and quality of life were compared between the two groups during the treatment and follow-up period. DRPs were analyzed in the pharmaceutical group. **Results:** The cost-utility ratio and clinical indicators in the pharmaceutical group were better than those in the control group, the adverse drug reactions of the former were statistically significant compared with the latter at the 3 months follow-up, and medication compliance and quality of life were statistically significant after intervention and during follow-up (P<0.05). There were 52 DRPs in the pharmaceutical group, which mainly included poor therapeutic effect. The mainreasons are drug selection and unreasonable usage and dosage. There were 46 DRPs accepted by intervention, and 45 DRPswere completely solved and partially solved. **Conclusions:** The pharmaceutical care model of MTM combined with PCNE for patients with hepatitis B cirrhosis played a positive role in the treatment and follow-up period.

基金项目:1.镇江市重点研发计划（社会发展）面上项目(SH2021075)；2.江苏大学 2021 年度临床医学科技发展基金（JLY2021016）

[第一作者及通讯作者简介]徐璐（1987-），女，江苏镇江，主管药师，江苏大学中级讲师，硕士，研究方向：临床药学。ORCID:0000-0001-8192-1001。电话：0511-80578850，E-mail:xlytdx@126.com。

【Key Words】Clinical Pharmacist; Medication Therapy Management; Pharmaceutical Care Network Europe Drug-related Problem Classification; effectiveness assessment

乙肝肝硬化由慢性乙型病毒性肝炎（Chronic Hepatitis B，CHB）引发肝脏出现进行性、弥漫性的病变。该病常伴随多种并发症如肝源性胃溃疡、消化道出血、感染、肝性脑病、肝肾综合征、肝源性糖尿病等。我国乙肝肝硬化患者基数较大，据统计约有我国 CHB 患者约 2000 万~3000 万，而乙肝肝硬化患者约占约占 60%[1]。患者需要抗病毒、抗炎、抗肝纤维化治疗，同时防治并发症，用药复杂且疗程较长[2]，因而在治疗过程及预后阶段，容易出现药物相关问题（Drug Related Problems，DRPs），进而影响疾病的治疗，增加患者身体和经济负担，甚至危及生命。因此，临床药师采用专业规范的药学服务模式参与患者诊疗及随访，显得尤为重要。

药物治疗管理（Medication Therapy Management，MTM）是针对长期慢病患者用药而建立的药学服务模式，起源于国外[3-4]，我国目前尚处于起步阶段。不同于主要提供用药教育的传统药事服务，MTM 服务内容囊括了确认、解决和预防患者疾病治疗中的所有药物问题。其最大特点是人文关怀，即以患者为中心，由专业药师提供用药方案设计、调整、评估、咨询、教育等药学服务，同时也具备系统性、综合性、预见性等特点。欧洲医药保健网（Pharmaceutical Care Network Europe，PCNE）创建的 PCNE 分类系统，经多次改良和完善，可清楚和完整的展示 DRPs 分类、原因、干预、接受和解决情况，分类全面且使用比较简易[5]。该系统对 MTM 模式可起到很好的补充和辅助作用。

该模式的应用目前主要集中于 2 型糖尿病、高尿酸血症、缺血性脑卒中、肿瘤患者的药学服务，针对乙肝肝硬化患者诊疗过程及随访的全方位药学服务研究及报道未见[6-12]。在本研究中，临床药师使用 MTM 结合 PCNE 分类系统的服务模式，对乙肝肝硬化患者的治疗过程及随访进行全程参与，从经济效果、临床疗效、人文结果以及药物相关问题的发现、干预、解决等多方面分析药学服务成效。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2021 年 7 月 1 日~2021 年 12 月 30 日，在我院住院治疗的乙肝肝硬化患者。纳入标准：①年龄：18 岁~65 岁；②依照《慢性乙型肝炎防治指南》和《肝硬化诊治指南》的诊断标准[1,13]，诊断为乙肝肝硬化的患者；③签署知情同意书。排除标准：①无法正常交流；②住院期间未使用药物；③未遵医嘱出院；④无法随访。本研究经过镇江市第三人民医院医学伦理委员会批准同意（受理号：202231）。

1.2 分组与干预方法

被纳入患者通过简单随机法分为对照组和药学组。对照组患者接受基本诊疗和服务，药学组接受以肝科专职临床药师提供的药学服务，通过药学查房对患者用药、疾病进展、不良反应处置等进行监护和干预。药学服务流程严格按照 MTM 模式的五大核心要素：①药物治疗评估：患者基本信息，既往病史及用药史，药物不良反应史，评估用药依从性；②个人药物记录：患者住院期间所有用药的记录；③药物相关活动计划：针对用药方案或可能出现的用药问题提出建议或实施计划；④干预和/或提出参考意见：对治疗过程中出现的所有药物相关问题进行干预，对患者进行用药教育；⑤文档记录和随访：通过患者复诊、电话等方式进行随访，并将所有用药清单和药学服务内容记录在册。本研究中涉及的 DRPs 主要在③和④，引入 PCNE 分类系统进行分类及优化。

1.3 药学服务内容

1.3.1 药物治疗评估及记录

①在患者入院 48h 内，临床药师收集个人基本信息、主诉、现病史、既往病史、用药史、药物不良反应史、食物过敏史等。②根据患者治疗过程中用药，初步确定治疗过程中可能出现的 DRPs。

1.3.2 药物相关活动计划及干预

①参与患者初始用药方案制定，追踪并审核用药相关医嘱。②针对患者住院期间出现或潜在的 DRPs，使用 PCNE 分类系统 v9.0 版进行分类、归因，制定药学干预计划。③药学干预类型分为医师、药物和患者 3 个层面。医师层面涵盖药物的选择、用法用量的调整、疗程的确定、药物不良事件防范措施等；药物层面包括药物的使

用和药物不良反应处理；患者层面侧重用药教育，包括药物名称、适用证、用法用量、服药时间、疗程、常见不良反应、注意事项、饮食配合以及生活方式的相应改变等，同时跟踪并考察患者用药依从性。④记录 DRPs 接受度及解决情况。

1.3.3 药学随访及记录

在患者出院 1 个月和 3 个月时进行。采用门诊或电话随访，内容包括患者肝功能相关情况，用药依从性，有无药物不良反应等，并将随访内容记录于药物治疗管理手册。

1.4 结局评价指标

1.4.1 药物经济学

成本-效用比（CUR）=C/μ。C 为药品成本，μ=（量表实际得分－量表最低分值）/（量表最高分值－量表最低分值），该值由由欧洲五维健康量表（EuroQol Five-Dimensional Questionaire，EQ-5D）得到。量表共分五个维度，分别为行动能力、自我照顾能力、日常活动能力、疼痛或不舒服、焦虑或抑郁。本研究使用 EQ-5D-5L 评分，将以上每个维度分为五个水平，即没有困难、轻微困难、中等困难、严重困难、极度困难[14]。参考相关换算方法，在最高效用值为 1 的基础上，根据每个维度的评估水平，扣除对应系数值，得到该患者效用值。

1.4.2 临床疗效和安全性

主要从总胆红素（TBIL）、白蛋白（ALB）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、凝血酶原时间（PT）和肝脏硬度值（LSM）来评估临床疗效。其中 LSM 使用瞬时弹性成像技术 Fibroscan 测定。记录两组患者在治疗过程中发生的药物不良反应（ADR），评估两组用药安全性。

1.4.3 人文效果

应用 Morisky 问卷（Morisky medication adherence scale，MMAS-8）评估人文效果。MMAS-8 评分 8 分为依从性好；评分 6-8 分为中等；评分<6 分为差[15]。

1.4.4 DRPs

PCNE 分类系统主要应用于 MTM 的药物相关活动计划及干预，即 DRPs。运用 PCNE 分类系统 v9.0 版，分析治疗过程中及随访期间出现的 DRPs 类型、归因、干预办法、接受度及结果。

1.5 统计分析

采用 SPSS20.0 软件进行数据整理和分析。计量资料若符合正态分布，采用 t 检验，以 $\bar{x}\pm s$ 描述，不符合正态分布则采用非参数检验，以中位数 Median 和四分位间距 IQR 表示。计数资料采用 χ^2 检验，以百分率（%）表示，$P<0.05$ 有统计学意义。采用方差齐性检验比较两组患者依从性平均值情况，采用 Mann-Whitney U 检验和 Wilcoxon 符号轶检验比较组内和组间数据。

2 结果

2.1 研究对象一般情况

入选患者共 98 例，药学组 50 例，对照组 48 例。两组研究对象一般情况比较，均无统计学意义（$P>0.05$）。具体见表 1。

表 1 两组研究对象一般情况

Tab.1 Comparison of general data between two groups of patients

组别	性别（男/女）	年龄（岁）	体重（kg）	受教育程度			婚姻状况（已婚/未婚）	吸烟	饮酒	肝硬化分级			平均住院天数
				大专及以上	高中	初中及以下				A 级	B 级	C 级	
药学组（n=50）	32/18	54.23±6.78	62.15±15.81	15	19	16	44/6	9	12	4	29	17	13.78±5.02
对照组（n=48）	31/17	53.52±7.12	61.46±14.19	14	17	17	43/5	9	14	3	17	18	14.11±4.97
P	0.95	0.763	0.805		0.93		0.8	0.93	0.56		0.9		0.745

2.2 费用

药学组与对照组的日均住院费用为（80.53.±17.58）元和（81.02±18.68）元，日均药品费用分别为（45.07±17.64）元和（48.35±20.79）元，药占比分别为 55.96%和 59.67%。后两组数据均有统计学意义（*P*=0.039，0.033）。

2.3 临床疗效

药学组和对照组的 TBIL、ALB、ALT、AST、PT 和 LSM 在治疗前均无统计学意义（*P*>0.05）；两组的以上临床指标在治疗前后的组内和组间比较均有统计学意义（*P*<0.05）；治疗后和随访 1 月比较，对照组 ALT 和 AST 有统计学意义（*P*<0.05）；两组的临床指标在随访 1 月和 3 月的组间比较均有统计学意义（*P*<0.05）。具体见表 2。

表 2 两组患者临床疗效比较

Tab.2 Comparison of clinical efficacy between two groups of patients

组别	时间	TBIL(μmo•L^{-1})	ALB(g•L^{-1})	ALT(U•L^{-1})	AST(U•L^{-1})	PT(s)	LSM
药学组（n=50）	治疗前	37.51±4.20	29.82±3.93	133.73±10.22	115.12±9.32	17.93±2.01	13.70±3.92
	治疗后	15.34±3.51	37.51±2.64	32.20±4.81	29.39±4.68	12.05±1.67	8.81±3.12
	随访 1 月	16.02±3.60	38.23±2.55	32.61±5.29	29.78±5.16	12.46±1.83	8.06±2.40
	随访 3 月	16.90±4.33	37.69±3.25	33.83±5.05	31.03±4.95	12.79±1.97	7.84±2.73
对照组（n=48）	治疗前	36.80±4.12	30.11±3.87	134.44±8.95	118.04±8.71	18.04±1.99	14.01±3.25
	治疗后	19.63±3.34	33.49±3.52	38..39±4.13	38..39±4.13	14.21±1.58	12.30±3.14
	随访 1 月	20.91±4.01	32.68±3.96	49.03±6.89	49.03±6.89	14.67±1.84	12.15±2.32
	随访 3 月	24.83±4.66	32.41±4.13	58.92±7.02	58.92±7.02	16.01±2.11	12.30±2.81
P 组间值（治疗前）		0.086	0.108	0.098	0.089	0.102	0.105
P 药学组（治疗前后）		0.005	0.004	0.000	0.000	0.005	0.003
P 对照组（治疗前后）		0.007	0.018	0.000	0.000	0.009	0.036
P 组间值（治疗后）		0.037	0.032	0.018	0.009	0.049	0.027
P 药学组（治疗后和随访 1 月）		0.061	0.092	0.123	0.096	0.088	0.065
P 对照组（治疗后和随访 1 月）		0.070	0.078	0.002	0.003	0.091	0.125
P 组间值（随访 1 月）		0.039	0.010	0.001	0.000	0.021	0.001
P 药学组（随访 1 月和 3 月）		0.092	0.077	0.102	0.053	0.105	0.132
P 对照组（随访 1 月和 3 月）		0.022	0.001	0.017	0.016	0.052	0.133
P 组间值（随访 3 月）		0.008	0.030	0.005	0.007	0.046	0.008

2.4 安全性

药学组和干预组在治疗及随访过程中出现的 ADR 有皮疹、瘙痒、头痛、恶心、腹痛等，多为轻度或经及时处理后症状消失。药学组和对照组在随访 3 月有统计学意义（*P*<0.05）。具体见表 3。

表 3 两组患者 ADR 比较

Tab.3Comparison of adverse drug reactions between two groups of patients

组别	住院	随访 1 月	随访 3 月
药学组（n=50）	4（8.00%）	4（8.00%）	6（12.00%）
对照组（n=48）	7（14.58%）	9（18.75%）	14（29.17%）
P	0.30	0.11	0.035

2.5 人文结局

2.5.1 两组患者入院和出院时用药依从性比较

两组患者入院时用药依从性水平无统计学意义（*P*>0.05）。药学组出院时患者用药依从性水平为“中”和“高”的患者总数为 45 人（90%），明显高于入院时的 22 人（44%），该组入院时和出院时依从性水平有统计学意义（*P*<0.05）。具体见表 4。

表 4 两组患者用药依从性差异

Tab.4 Differences of medication compliance between two groups of patients

依从性水平	药学组（n=50）		对照组（n=48）		入院 药学组 vs 对照组	药学组 入院 vs 出院	对照组 入院 vs 出院
	入院（占比%）	出院（占比%）	入院（占比%）	出院（占比%）	*P*	*P*	*P*
低	28（56）	5（10）	27（56.25）	24（50）			
中	16（32）	27（54）	17（35.42）	18（37.5）			
高	6（12）	18（36）	4（8.33）	6（12.5）	0.816	0.000	1.739
合计	50	50	48	48			

2.5.2 两组患者依从性平均值比较

药学组在出院、1 个月、3 个月的平均值均显著大于对照组（*P*<0.05），药学组在出院后 1 个月、3 个月的依从性平均值逐步上升，同干预后比较有显著性差异（*P*<0.05）。两组同样存在分组效应&时间效应的显著性差异（*P*<0.05）。具体见表 5。

表 5 两组患者用药依从性均值比较

Tab.5 Comparison of means medication compliance between two groups of patients

组别	出院	1 个月	3 个月	时间效应		分组效应		时间&分组效应	
				F	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*
药学组（n=50）	5.47±0.51	6.65±0.89	6.88±0.82						
对照组（n=48）	4.70±0.55	5.13±1.01	5.20±0.76	95.73	0.000	6.014	0.025	9.725	0.003
F	0.124	9.637	13.026						
P	0.796	0.003	0.002						

2.5.3 两组患者干预前后生活质量比较

药学组在干预前和干预 3 个月后有显著性差异（*P*<0.05）；干预后 3 个月，药学组和对照组相比有显著性差异（*P*<0.05）。具体见表 6。

表 6 两组患者生活质量比较

Tab.6 Comparison of quality of life between two groups of patients

时间及项目	药学组（n=50）	对照组（n=48）	*P*
干预前	0.802	0.805	0.697
干预后 3 个月	0.851	0.812	0.003
P	0.001	0.502	

2.6 药学组 DRPs

2.6.1 DRPs 类别

临床药师在药学干预组患者住院期间发现 DRPs 共计 52 个，治疗效果欠佳 34 个（65.38%），有症状未治疗 8 个（15.38%），发生药物不良事件 4 个（7.70%），不必要的药物治疗 6 个（11.54%）。

2.6.2 DRPs 归因

DRPs 归因的主要原因集中在 C1 药物选择不合理（18，34.62%）和 C3 用法用量不合理（20，38.46%），其他原因有 C2 剂型不合理（3，5.76%）、C4 疗程不合理（6，11.54%）、C7 患者相关（5，9.62%）。原因具体分类及排序见图 1。

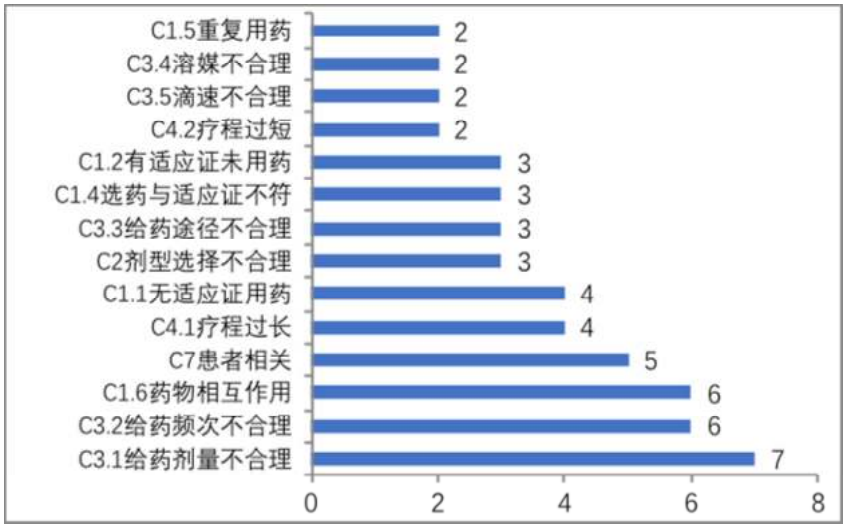


图 1 DRPs 归因

Fig.1 Causes of DRPs

2.6.3 DRPs 干预类型及接受度

临床药师对 52 个 DRPs 均进行干预。DRPs 干预接受（接受并完全执行+接受并部分执行）共计 46 个，总干预接受率达 89.29%。其中患者接受 22 个（47.83%），医师接受 14 个（30.43%），药物干预 10 个（21.74%）。

2.6.4 DRPs 解决情况

DRPs 全部解决 40 个（76.92%），部分解决 5 个（9.62%），未解决 7 个（13.46%）。未解决的 DPRs 中，有 6 个未接受临床药师干预建议，1 个为调整用药后，患者病情仍未改善。

3 讨论

两组患者的日均药品费用和药占比均有统计学意义，表明 MTM 结合 PCNE 的药学服务模式可在一定程度上减轻患者的经济负担。乙肝肝硬化患者病情和治疗效果的评估中，TBIL、ALB、ALT、AST、PT 均为重要指标，运用 Fibroscan 技术可在较短时间内判断肝脏纤维化病理状态[16]。药学组 ALT 和 LSM 的转归情况明显好于对照组，后续随访时的指标也明显优于对照组，初步表明以临床药师为主导的药物治疗管理模式在临床疗效方面起到积极作用。两组的药物不良反应发生情况在随访 3 月出现明显对比，表明临床药师对患者居家用药安全性的跟踪性服务起到了明显成效。

MMAS-8 问卷共有 8 条目，涵盖患者是否按时服药、是否漏服、服药是否有困难等，是经过临床广泛验证的用药依从性问卷[14]；EQ-5D-5L 量表用于评估患者生活质量，分类细化[15]。两种量表内容具体、使用简单、操作性强。药学组患者出院时用药依从性水平和生活质量明显高于对照组，且在整个药学服务过程中逐步提高。表明临床药师通过用药教育、合理用药咨询，心理干预，跟踪随访等多种途径进行的药物治疗管理，使得患者用药依从性取得了良好的效果，生活质量也有了显著提高。

药学组 DRPs 在治疗效果、用法用量、疗程方面的问题突出，涉及 DRPs 最多的药物有抗菌药、利尿剂、消

化系统用药、抗病毒药等。例：患者男，44 岁，因乙肝肝硬化+自发性细菌性腹膜炎住院后予头孢曲松+甲硝唑抗感染治疗，住院 3 天后患者感腹胀加重，查白细胞：13.5*10^9/L，临床药师建议改用哌拉西林他唑巴坦，更换方案后住院第 5 日腹胀感减轻，查白细胞：8.5*10^9/L，第 8 日无明显腹胀，查白细胞：7.2*10^9/L。患者女，55 岁，诊断乙肝肝硬化+腹水，医嘱呋塞米 20mg（1 片），口服，一日一次，查房发现患者每日加服用至 2 片，临床药师对患者讲解该药作用，以及用量过大可能导致的不良事件，嘱患者按照医嘱服用，患者听从。患者男，62 岁，诊断乙肝肝硬化+消化道溃疡，有上消化道出血病史，医嘱 0.9%氯化钠注射液 100ml+注射用奥美拉唑钠 40mg，静滴，一日一次，临床药师认为患者可正常进食，目前病情稳定，输液增加身体负担，建议改用口服制剂，医师采纳。表明临床药师运用 PCNE 分析及干预用药相关问题得到了普遍认可。

由于疫情影响和单中心研究现状，本次研究两组样本量有限；考虑肝硬化老年患者多有基础病、并发症较多且难处理、免疫力差等问题，本研究未将 65 岁以上患者纳入；乙肝患者抗病毒治疗是一个长期的过程，在研究过程中发现病毒学应答差别较大，因而未将乙肝病毒脱氧核糖核酸（Hepatitis B virus DNA，HBV DNA）作为临床疗效指标；因研究时间限制，药学随访在患者出院 3 个月后未再全部进行。下一步计划争取多中心合作，扩大样本量，延长随访期，关注 HBVDNA 在内的相关指标变化，更加深入进行药物经济学研究，为乙肝肝硬化患者的药学服务提供更多实践支持。

4 意义

随着教育和卫生事业的进步，越来越多的公民对医药保障的意识越来越强烈，对服务质量的要求也越来越高。我国“十四五”规划再次强调深化医药卫生体制改革，强化对慢性疾病的综合干预[17-18]。基于 MTM 结合 PCNE 分类系统的先进化药学服务模式，临床药师一方面可在住院诊疗过程中起到药学监护和合理用药咨询的作用，另一方面在患者出院后的随访过程中可进行药学服务和相关信息的收集和整理。我院临床药师对乙肝肝硬化患者开展 MTM 结合 PCNE 分类系统的药学服务模式在国内尚属首次，具有较强的实践意义，有利于提高临床药师的专业能力和认可度，为药师转型提供新的切入点和创新机遇，促进医药资源合理分配，对提升医药卫生服务水平具有现实和长远意义。

参考文献

[1]LIU J, LIANG WN, JINGg WZ, *et al*. Countdown to2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. *Bull World Health Organ*, 2019, 97(3): 230-238. DOI: 10.2471/BLT.18.219469.

[2]中华医学会肝病学分会.肝硬化诊治指南[J].临床肝胆病杂志，2019，35（11）：2408-2425.

[3]RODIS J L, SEVIN A, AWAD M H, *et a1*. Improving chronic disease outcomes through medication therapy management in Federally Qualified Health Centers[J]. *J Prim Care Community Health*, 2017, 8(4): 324-331.

[4]BARBARA P, MICHELE P, ALESSANDRO F. Proposal for the management of myopic traction maculopathy based on the new MTM staging system[J]. *EUR J OPHTHALMOL*, 2020, 31(6):3265-3276.

[5]ELISABETH S, INA R, OLAF R. Pharmaceutical Care Network Europe (PCNE) drug-related problem classification version 9.00: German translation and validation[J]. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 2021, 43:726-730.

[6]武明芬，朱斌，柳鑫，等.药物治疗管理（MTM）门诊服务模式探索与实践[J].中南药学，2019，17（8）：1336-1341.

[7]HALLEY T, LENA S, REBECCA C. Hypertension-Focused Medication Therapy Management: A Collaborative Pilot Program Uniting Pharmacists, Public Health, and Health Insurers in Wisconsin[J]. *Prev Chronic Dis*, 2020, 17(E105): 1-6.

[8]黄灿，闫素英.药师主导的药物治疗管理对获得性免疫缺陷综合征患者用药依从性及生活质量的影响[J].中国药学杂志，2021，56（19）：1607-1611.

[9]王鸯鸯，吴秋惠，陈皓然，等.药物治疗管理服务对慢性阻塞性肺病患者的效果评价[J].中国医院药学杂志，2020，40（23）：2453-2458.

[10]蔡永桥，李静，李静婷，等.基于药物治疗管理的支气管哮喘全程药学服务效果[J].医药导报，2021，40（7）：931-936.

[11]QINGQING C, ZHAO J, PING Z, *et al*. Characteristics of drug‐related problems among hospitalized ischemic stroke patients in China[J]. *Int J Clin Pharm,* 2020, 42(4): 1237-1241.

[12]RASHIDA M U, SULE A R, PERRAN F Y. Significance of a clinical pharmacist‐led comprehensive medication management program for hospitalized oncology patients[J]. *Int J Clin Pharm,* 2020, 42(4):652-661.
[13]中华医学会感染病学分会，中华医学会肝病学分会.慢性乙型肝炎防治指南（2019 年版）[J].临床肝胆病杂志，2019，35（12）：2648-2669.
[14]KRITTAPHAS K, PORNTIP P. Psychometric properties comparison between EQ-5D-5L and EQ-5D-3L in the general Thai population[J]. *Qual Life Res*, 2020, 29(12): 3407-3417.
[15]SUN J M, WEON Y L, JIN S H, *et al*. Accuracy of a screening tool for medication adherence: A systematic review and meta-analysis of the Morisky Medication Adherence Scale-8[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11):1-18.
[16]中国肝炎防治基金会，中华医学会感染病学分会，中华医学会肝病学分会和中国研究型医院学会肝病专业委员会.瞬时弹性成像技术诊断肝纤维化专家共识（2018 年更新版）[J].中华肝脏病杂志，2019，27（3）：182-191.
[17]方鹏骞，李昕昀.“十四五”期间我国医院的发展战略与重点方向[J].中国医院管理，2021，41（3）：6-10.
[18]陈慧，元廷芳，张瑞.关于编制“十四五”药品安全规划的思考[J].中国药师，2021，24（10）：1873-1876.

斑蝥酸钠维生素 B6 注射液致痉挛 1 例

[1]徐璐，[1]吴静，[2]周兴蓓

[1]镇江市第三人民医院（江苏大学附属镇江三院）药剂科，江苏镇江，212000；

[2]镇江市第三人民医院（江苏大学附属镇江三院）肝病科，江苏镇江，212000

【摘要】1 例乙肝肝硬化+原发性肝癌住院患者予斑蝥酸钠维生素 B6 注射液及其他药物治疗。首次静滴斑蝥酸钠维生素 B6 注射液约 10min 后突感腰背处肌肉剧痛、僵直，牵拉感明显。立即停止输液，予 5%葡萄糖注射液 100ml+葡萄糖酸钙注射液 10ml 静滴。患者晚些症状消退。第二日试静滴该药 5min 时患者诉腰背处疼痛，停用该药。患者使用其他药物未现以上不适。考虑该不良反应为斑蝥酸钠维生素 B6 注射液引起的痉挛。

【关键词】斑蝥酸钠维生素 B6；痉挛；药物不良反应

One Case of spasm induced by Cantharidin and Vitamin B6 injection

[1]Xu Lu, [1]Wu Jing, [2]Zhou Xingbei

[1]Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Zhenjiang Affiliated Jiangsu University, Zhenjiang 212003, China;

[2]Department of Hepatalogy, The Third People's Hospital of Zhenjiang Affiliated Jiangsu University, Zhenjiang 212003, China

【**Abstract**】A patient with hepatitis B cirrhosis and primary liver cancer was treated with cantharidate and vitamin B6 injection and other drugs. About 10min after the initial infusion of the drug, the back muscles suddenly felt severe pain and rigidity with pulling sensation. The infusion was stopped immediately and 100ml 5% glucose injection + 10ml calcium gluconate injection was given. The patient's symptoms subsided later. On the second day, the patient felt painful on the lumbar and back after 5 minutes of the infusion, and the drug was discontinued. The patient did not experience the above discomfort while using the other drugs. The adverse reaction was considered to be spasm induced by cantharidate and vitamin B6 injection.

【**Key words**】Cantharidate and vitamin B6; Spasm; Adverse drug reaction

1 临床资料

患者，男，70 岁。2021 年 7 月 28 日因“右上腹隐痛 1 月余”入院。患者有乙肝肝硬化病史 40 余年。无高血压、糖尿病史，无伤寒、结核等传染病史，无药物或食物过敏史，无酗酒史。患者 1 月余前无明显诱因下右下腹疼痛，呈阵发性隐痛，无放射痛，伴腹胀，无明显恶心、呕吐，大小便正常，近期体重无变化。入院查体：体温：36.5℃，脉搏：71 次/分，呼吸：17 次/分，血压：130/72mmHg。神清，精神一般，皮肤巩膜轻度黄染，未见肝掌，未见蜘蛛痣，浅表淋巴结未及肿大，心肺听诊无异常，腹部平坦，全腹无明显压痛、反跳痛，未及肿块，肝肋下、剑下未及，脾肋下未及，肝浊音界位于右锁骨中线 6、7、8 肋间，肝区无叩痛。查乙肝五项：

基金项目：镇江市社会发展指导性科技计划项目（FZ2022104）；镇江市重点研发计划（社会发展）面上项目（SH2021075）

[第一作者及通讯作者简介] 徐璐，女，硕士，主管药师，研究方向：临床药学，电话：0511-80578850，E-mail:xlytdx@126.com

Fund Programs: Zhenjiang Social Development Guiding Science and Technology Program Project(FZ2022104); Zhenjiang Key Research and Development Plan (Social Development) Project (SH2021075)

乙肝表面抗原：5771COI、乙肝 e 抗体：0.002COI、乙肝核心抗体 II：0.01COI，余正常。肿瘤筛查：甲胎蛋白：571.700ng/ml、糖类抗原 125：86.97u/ml、糖类抗原 19-9：119.10u/mL、细胞角蛋白 19 片段测定：3.62ng/ml，余正常。生化：总胆红素：47.8μmol/L，直接胆红素：24.6μmol/L，间接胆红素：23.2μmol/L，谷丙转氨酶：69U/L，谷草转氨酶：79U/L，碱性磷酸酶：141U/L，总胆汁酸：60.2μmol/L，胆碱酯酶：2.26KU/L。血常规：白细胞：$2.86*10^9$/L，红细胞：$2.98*10^{12}$/L，血红蛋白：103g/L，血小板：$45*10^9$/L，中性粒细胞数：$1.84*10^9$/L，淋巴细胞数：$0.74*10^9$/L。血凝五项：凝血酶原时间:17.8s、D-二聚体:1.70ug/ml，余正常。腹部 CT：肝右叶病变，肝硬化伴脾肿大，腹腔积液。诊断乙肝肝硬化、原发性肝癌。医嘱恩替卡韦片 0.5mg 口服 qd 抗病毒，螺内酯片 60mg 口服 qd 利尿，5%葡萄糖注射液 100ml+注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸 1g 静滴 qd 保肝，5%葡萄糖注射液 250ml+斑蝥酸钠维生素 B6 注射液 0.1mg（贵州柏强制药有限公司，规格：0.1mg/支，10ml×5 支，批号 2021060402）静滴 qd 抗肿瘤治疗。

患者住院第一日静滴斑蝥酸钠维生素 B6 注射液约 10min 后突感腰背处肌肉剧痛、僵直，牵拉感明显，疼痛处无法自主活动。考虑斑蝥酸钠维生素 B6 注射液引起的痉挛症状，立即停止输液，急查体温 36.9℃，脉搏 104 次/分，呼吸：21 次/分，血压 135/86mmHg，血氧饱和度 98%。急查血钙：2.27mmol/L，肌酸激酶：81U/L。予 5%葡萄糖注射液 100ml+葡萄糖酸钙注射液 10ml 静滴。5min 左右患者腰背部抽搐消失，疼痛明显缓解，10min 后疼痛症状消失。住院第二日上午再次静滴斑蝥酸钠维生素 B6 注射液并严密观察，5min 后患者诉腰背部疼痛，立即停止输液，患者疼痛症状消失。医嘱停用该药。患者使用其他药物未现以上不适。

2.讨论

患者两次腰背部痉挛症状与静滴斑蝥酸钠维生素 B6 注射液有明确的时间关联，停药或经其它处理后不适症状消失。Naranjo 评估量表评分 8 分，参照我国药品不良反应关联性评价方法，推断该不良反应很可能由斑蝥酸钠维生素 B6 注射液引起[2]。根据国际公认的的 Ashworth 痉挛评定法[3]，该患者不良反应发生时腰背部无法活动，表明肌张力高度增加，评定为 4 级。参考国际肿瘤化疗药物不良反应评价系统《常见不良事件评价标准（CTCAE）5.0 版》[4]，痉挛分级 3 级。

斑蝥酸钠维生素 B6 注射液已报道的药物不良反应有：皮疹、瘙痒、注射部位疼痛、乏力、畏寒、肢体麻木、发热、恶心、呕吐、腹痛、头晕、头痛、烦躁、胸闷、心悸、发绀、血压升高或下降、呼吸困难、过敏性休克等。笔者查阅该药品说明书和中外文献检索数据库，尚无腰背处痉挛报道[1]。因此，该药致腰背部痉挛为首次报道。

痉挛发生时的主要表现为肌肉出现非自主挛缩，突感剧痛，动作不协调，是上运动神经元受损的常见表现。目前普遍认为痉挛的发生机制为牵张反射弧的过度兴奋，即肌张力增高，导致皮质脊髓束损伤，引发运动障碍[5]。引起痉挛的原因主要有：寒冷，剧烈运动后肌肉收缩过快，出汗过多，疲劳过度，缺钙，癫痫发作以及中枢神经异常[6]。本例中患者经初步检查和鉴别后排除前五项原因。

临床上药物致痉挛案例报道较少，如帕罗西汀致手指痉挛，参芪扶正注射液致四肢麻木和双手痉挛，奥沙利铂致全身痉挛等，一般认为药物影响中枢神经系统所致[7-9]。斑蝥酸钠维生素 B6 注射液主要成分为斑蝥酸钠和维生素 B6。维生素 B6 的加入可在一定程度上改善斑蝥酸钠引起的消化系统不适如恶心、呕吐等。笔者查阅维生素 B6 相关资料，未见其致腰背部痉挛报道；而近年来维生素 B6 研究热门之一维生素 B6 相关性癫痫，即 VB6 缺乏性惊厥、VB6 依赖性癫痫和 VB6 反应性癫痫中出现的痉挛样症状，均为维生素 B6 缺乏或依赖所致，患者无癫痫发作史，无维生素 B6 相关性癫痫疾病，可排除维生素 B6 的原因[10-14]。斑蝥酸钠为结合斑蝥素，水溶性较好，但保留了斑蝥素的毒性作用[15-16]。斑蝥素的神经毒性症状主要有头晕、口舌或四肢麻木、抽搐、面瘫等，腰背部痉挛未见报道。结合已报道的神经毒性案例分析[17]，初步推断该药物不良反应可能为斑蝥酸钠通过抑制参与淋巴细胞激活的蛋白磷酸酶，达到免疫抑制作用，进而影响中枢神经系统兴奋性所致。

3.总结

在我国，斑蝥作为中药应用于皮肤病、犬咬伤等急症，已有两千余年的历史[9]。应用现代技术得到的斑蝥酸钠维生素 B6 注射液，属于第二代广谱抗肿瘤斑蝥制剂，临床常用于原发性肝癌、乙肝肝硬化、白细胞低下患者。该药是目前唯一既能抗肿瘤又可提升白细胞的专利化药物。建议临床在对症使用的同时，要特别注意该

药可能引发的毒性反应如呼吸系统毒性，消化系统毒性，心血管系统毒性，泌尿系统毒性，生殖系统毒性，免疫系统毒性以及神经系统毒性等[15-16]，谨慎用药；该药在静脉滴注速度不宜过快，建议 40-60d/min；用药过程中需密切观察患者表现，及时发现患者不适或其他异常情况，并立即进行生命体征监测和相关实验室检查，以便及时鉴别和处理不良反应。患者的治疗和用药需要医、药、护各方一起努力，共同保证临床用药安全。

参考文献

[1]李丽静，臧亚茹，梁君伟，等.斑蝥酸钠维生素 B6 注射液的疗效与安全性真实世界研究[J].肿瘤药学，2018，8（5）：799-807.

[2]Shenoy ES, Macy E, Rowe T, Blumenthal KG. Evaluation and Management of Penicillin Allergy: A Review[J]. *JAMA*, 2019, 321(2): 188-199.

[3]仲荣洲，褚立希，王陶黎，等.改良 Ashworth 屈肘肌张力评估与肱二头肌 B 超测量值相关分析[J].中国临床医学，2017，24（3）：387-390.

[4]Woo-Jin Lee, Soon-Tae Lee, Yong-Won Shin, et al. Teratoma Removal, Steroid, IVIG, Rituximab and Tocilizumab (T-SIRT) in Anti-NMDAR Encephalitis[J]. *Neurtherapeutics*, 2021, 18(1):474-487.

[5]叶富跃，杨堃，王子珍，等.法舒地尔联合丁苯酞对老年颅内动脉瘤血管内治疗后血管痉挛的影响[J].中国医院药学杂志，2021，41（6）：579-582.

[6]贾玉娟. 不同干预措施治疗多发性硬化所致痉挛的网络 Meta 分析[D].大同：山西医科大学，2016.

[7]李春.帕罗西汀致单纯手指痉挛 1 例[J].世界最新医学信息文摘，2019，19（78）：260-260.

[8]陈锡创，冯锦华，洪源泉.参芪扶正注射液致四肢麻木和双手痉挛 1 例[J].中国医院药学杂志，2016，36（8）：698-699.

[9]陈晓燕，许国清.一例奥沙利铂致全身痉挛患者的个案护理[J].实用临床护理学杂志，2020，5（24）：21-21.

[10]戴双双,周昀箐,王纪文.维生素 B6 反应性癫痫[J].癫痫杂志,2017,3(03):230-233.

[11]杨志仙,薛姣.维生素 B_6 相关性癫痫[J].中华实用儿科临床杂志,2016,31(24):1841-1848.

[12]刘丽. 维生素 B6 反应性婴儿痉挛病例报道[C]//第十三届江浙沪儿科学术会议暨 2016 年浙江省医学会儿科学学术年会论文汇编.,2016:873-874.

[13]代方方,张萍丽,孙士静,周士英,钱程,杨静,王纪文.维生素 B_6 反应性婴儿痉挛 2 例报告[J].中国实用儿科杂志,2016,31(02):159-160.

[14]薛姣,杨志仙,吴晔,熊晖,张月华,刘晓燕.维生素 B_6 反应性婴儿痉挛临床特征及预后分析[J].中华儿科杂志,2016,54(02):141-144.

[15]方莲花，杜冠华.中药斑蝥素的历史认识与评价[J].中药药理与临床，2018，34（5）:150-152.

[16]李济森，刘石涛，王平，等.斑蝥素衍生化活性及毒性规律研究进展[J].中草药，2019，50（7）：1734-1738.

[17]ZHANG Y, ZHOU X, ZHANG J, *et al*. Canthari-des poisoning： A retrospective analysis from 1996to 2016 in China[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*，2018，96：142-145.

仿生免疫凝胶体系在乳腺癌类器官构建和药敏检测中的应用研究

徐念远[1]、李俊[1]、王美棱[1]、汤睿智[2*]、刘熙秋[1*]

1.华中科技大学同济医学院药学院，湖北武汉

2.华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院,湖北武汉

【摘要】类器官是一种与体内空间结构相似的三维细胞复合体，作为模拟患者肿瘤药敏特征的模型具有潜在优势，有望在乳腺癌精准治疗方面发挥重要作用。据研究报道，肿瘤相关巨噬细胞（Tumor-associated macrophages, TAMs）与肿瘤的发生、进展、转移和预后复发相关。然而，在乳腺癌类器官中很少出现乳腺癌细胞与 TAMs 直接培养的体系，无法有效反映体内肿瘤免疫微环境的复杂状态以及相互调控作用。本课题组的前期研究发现巨噬细胞可以受到不同的细胞外基质的物理性质变化的影响，高孔隙率或大孔径的内部物理空间有利于 TAMs 的形成（Biomaterials Science, 2022）。基于此，我们利用前期已建立的凝胶体系，在体外构建了一种 TAMs 与乳腺癌细胞共同培养的肿瘤类器官模型，实现了乳腺癌发展中细胞存活、生长、增殖和细胞因子分泌的全过程观察，分子机制研究发现了 TAMs 通过影响 P13K-Akt 等关键性通路发挥促乳腺癌转移的作用。药敏检测发现，乳腺癌细胞与 TAMs 共培养模型已表现出对于表柔比星的显著耐受性，与临床结果更为符合，而这在常规的细胞培养中容易被忽视。该乳腺癌类器官模型制备过程相对简单，稳定均一，在药物筛选、基因编辑、个性化精准医疗服务领域等方面均可具有广泛的应用前景。

【关键词】乳腺癌类器官；免疫凝胶；肿瘤相关巨噬细胞；共培养体系；肿瘤耐药

1. 引言

乳腺癌作为危害女性健康的头号杀手，是一种具有高度异质性的复杂疾病，从基础研究到临床转化效率低下，其特性严重阻碍了乳腺癌的药物研发以及治疗手段的进展[1]，合适的研究模型对研发乳腺癌的高效治疗手段，改善乳腺癌临床治疗效果有着重大意义。类器官是一种与体内空间结构相似的三维细胞复合体，在细胞类型和肿瘤微环境等多个方面与来源器官有着极高的相似性，而且能够在体外 3D 培养体系中稳定扩增，作为模拟患者肿瘤药敏特征的模型具有潜在优势，有望在乳腺癌精准治疗方面发挥重要作用[2]。

肿瘤相关巨噬细胞（Tumor-associated macrophages, TAMs）是肿瘤多细胞体系的主要组成部分，据研究报道，TAMs 与肿瘤的发生、进展、转移和预后复发相关，受到国内外学者的广泛重视[3]。然而，在先前的乳腺癌类器官报道中，很少出现乳腺癌细胞与 TAMs 直接培养的体系，这些类器官无法反映体内肿瘤微环境的复杂状态以及相互调控。本课题组的前期研究发现巨噬细胞可以受到不同的细胞外基质的物理性质变化的影响，高孔隙率或大孔径的内部物理空间有利于 TAMs 的形成[4]（*Biomaterials Science*, 2022）。基于此，我们利用前期已建立的凝胶体系，在体外构建了一种 TAMs 与乳腺癌细胞共同培养的肿瘤类器官模型，可以更加真实的反映体内肿瘤组织的真实环境，为研究乳腺癌发展的分子机制以及药物响应性研究提供合适的体外模型支持。

2. 材料和方法

选择良好生物相容性的材料海藻酸钠，通过冷冻干燥技术制备凝胶，接种巨噬细胞和乳腺癌细胞进行培养。对比观察单一癌细胞培养体系（BK 组）、非接触培养体系（i 组）和共培养体系（D 组）中癌细胞形态上的区别。利用克隆形成和活死细胞染色观察乳腺癌类器官在第 4、7、10 天生长情况，并检测增殖标志物蛋白阳性率。通过 ELISA 法和荧光定量 PCR 技术检测特征性细胞因子的蛋白分泌和基因表达情况。通过转录组学对乳腺癌类器官中的癌细胞基因表达谱进行分析，筛选出 TAMs 影响癌细胞行为相关度排名前 10 的基因通路，进一步对重点蛋白进行蛋白互作网络分析，研究巨噬细胞促进乳腺癌发展可能的分子机制。最后验证了该类器官模型作为乳腺癌常规化疗药物（如表柔比星等）的药敏检测平台的可行性。

3. 结果

制备出的海藻酸凝胶支架的孔径为~200μm，孔隙率为~60%（图 1），成功构建了乳腺癌细胞与 TAMs 的共

培养模型。通过形态学观察，发现了 D 组与 BK 组和 i 组相比，肿瘤细胞团更大，且随着培养时间延长，显著性差异越明显（图 2）。与 BK 组和 i 组相比，D 组 Ki-67 蛋白的阳性率增加了 1 倍。活死细胞染色结果也发现 D 组的癌细胞增殖比另两组上调 3 倍。检测了癌细胞重要细胞因子分泌情况，D 组中与癌细胞发展相关的细胞因子（如 CCL17）相较对照组明显上调，印证了 TAMs 能够促进乳腺癌生长和恶化。RNA-seq 结果显示，D 组的差异基因主要集中在与癌症转移相关的 P13K-Akt 等通路上。药敏检测发现，乳腺癌细胞与 TAMs 共培养模型已表现出对于表柔比星的显著耐受性（图 3），与临床结果更为符合，而这在常规的细胞培养中容易被忽视。

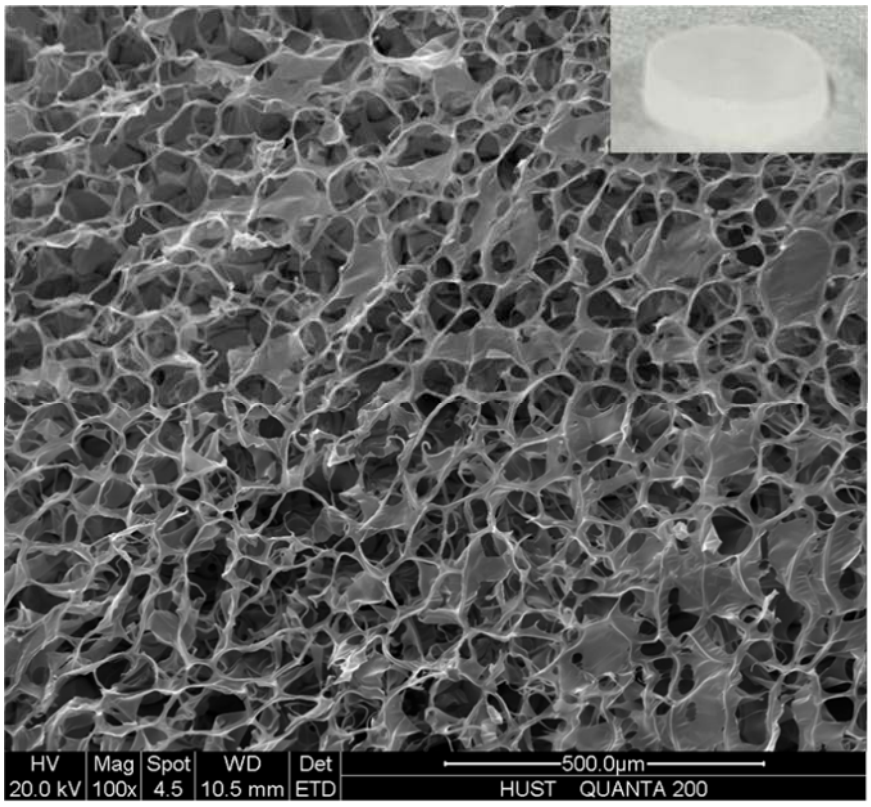


图 1：海藻酸钠冷冻凝胶内部形貌的扫描电子显微镜照片（右上：凝胶照片）

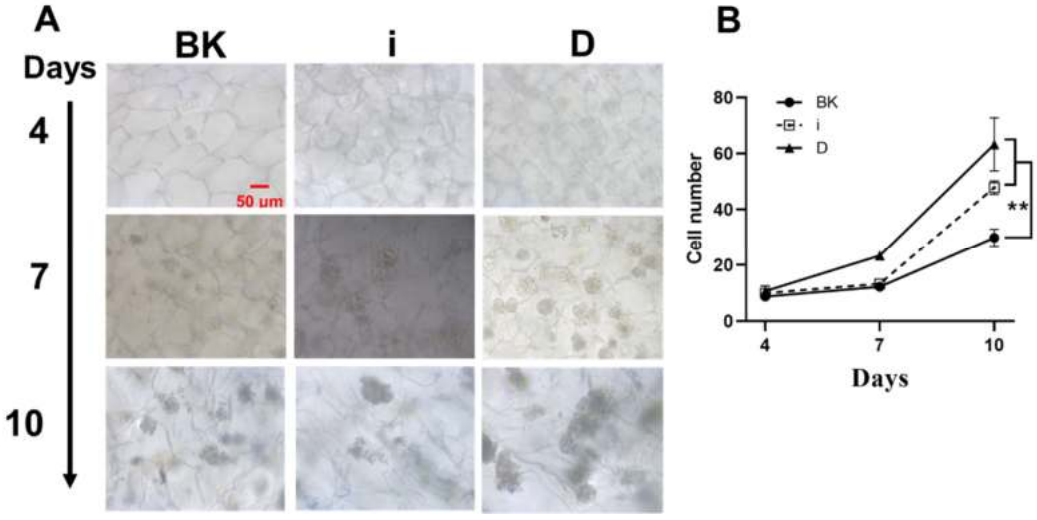


图 2： A：乳腺癌类器官细胞团在培养 4、7 和 10 天后的明场照片；B：乳腺癌类器官单个细胞团中含癌细胞数随时间的变化图。

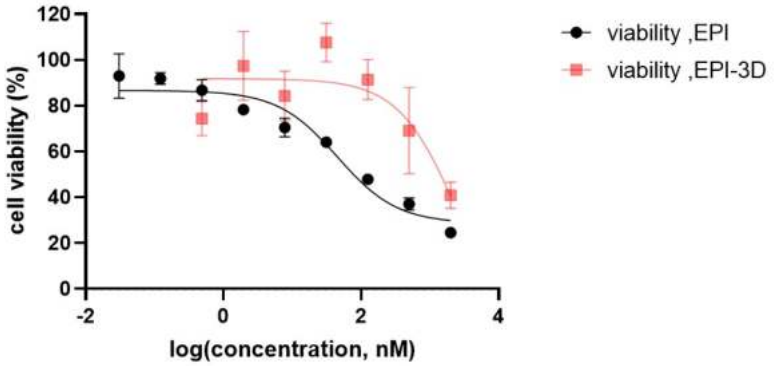


图 3：乳腺癌类器官（红色）与 2D 培养（黑色）与表柔比星共培养后的细胞存活率。

4. 讨论

本项目中构建的基于 TAMs 的乳腺癌类器官可以模拟体内肿瘤生长的真实情况，该制备过程相对简单，稳定均一，在药物筛选、基因编辑、个性化精准医疗服务领域等方面均可具有广泛的应用前景。随着肿瘤研究的深入，学者发现 TAMs 是肿瘤微环境中除癌细胞外富集最多的细胞，是肿瘤免疫微环境的重要组成部分[5]。TAMs 在肿瘤的发生和进展中的作用越来越受到关注，因此，将巨噬细胞引入待研究乳腺癌类器官至关重要。本研究发现，通过引入 TAMs 构建的乳腺癌类器官，能够显著促进乳腺癌的存活、生长和增殖，通过分子机制的探寻发现其在促转移和耐药中的独特作用，为将来作为肿瘤转移体外模型和药物筛选模型打下坚实基础。

5. 结论

我们成功构建了一种基于海藻酸凝胶支架的肿瘤细胞-TAMs 共培养的乳腺癌类器官体外仿生疾病模型，实现了乳腺癌发展中细胞存活、生长、增殖和细胞因子分泌的全过程观察，分子机制研究发现了 TAMs 通过影响 P13K-Akt 等关键性通路发挥促乳腺癌转移的作用。已利用此模型观察到对常规化疗药物的耐受性，与临床结果更加吻合。

参考文献：

[1] GOODING A J, ZHANG B, GUNAWARDANE L, et al. The lncRNA BORG facilitates the survival and chemoresistance of triple-negative breast cancers [J]. Oncogene, 2019, 38(12): 2020-41.

[2] ISHIGURO T, OHATA H, SATO A, et al. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications [J]. Cancer Sci, 2017, 108(3): 283-9.

[3] CHRISTOFIDES A, STRAUSS L, YEO A, et al. The complex role of tumor-infiltrating macrophages [J]. Nat Immunol, 2022, 23(8): 1148-56.

[4] LIU Z Z, XU N Y（共同第一作者）, WANG M L, et al. Physical confinement in alginate cryogels determines macrophage polarization to a M2 phenotype by regulating a STAT-related mRNA transcription pathway [J]. Biomater Sci, 2022, 10(9): 2315-27.

[5] DENARDO D G, RUFFELL B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(6): 369-82.

致谢：

本工作得到国家自然科学基金（82072083）、华中科技大学研究生创新基金（YCJJ202201047）、华中科技大学人才资助（5003514058）、武汉市中心医院科研基金（21YJ03）和学科建设计划（2021XK071）的支持。

从多肽药物到多肽制剂一体化研究

徐翔晖*

湖南大学，湖南省长沙市岳麓区天马路 37 号，410011

【摘要】近年来，多肽药物因特异性强、生物活性高、毒副作用低、未见显著耐药性等诸多优势而备受新药研发领域关注，全球已批准上市 100 余例多肽药物，利拉鲁肽、索马鲁肽等多肽药物年销量已超过 100 亿美元。当前，多肽药物研发以链状结构为主、包含少数环状结构；基础研究与临床数据显示，现有多肽药物存在理化性质差、易被降解、生物利用度低等突出问题，全面优化多肽药物的药效学及药代动力学、推动多肽药物源头创新是解决当前多肽药物临床困境的关键。我们以多肽分子树状结构创新为基础，以药物作用新靶点和新机制为导向，建立树状多肽分子拓扑结构、序列结构、手性结构及超分子结构的设计与合成新理论，创制出了一系列针对不同靶标、具备不同药理活性、具有可视化功能的树状多肽药物，高效诱导了耐药肿瘤细胞凋亡、自噬及坏死的多模态死亡，揭示了树状多肽药物诱导肿瘤细胞多模态死亡的干预机制，全面阐明了树状多肽药物的构效关系与药理药效，为肿瘤治疗提供了全新的分子实体药物。与此同时，我们仿球蛋白的树状多肽为基础，建立了树状多肽分子仿病毒衣壳结构组装与调控策略，提出了仿病毒高级功能化的分子修饰与超分子构筑方法，并赋予载体工具多模态成像功能可视化药物分子干预生命过程，构建了一系列可精准递送多尺度生物活性分子的多肽仿生载体，为解决临床分子治疗困境提供了有效的载体工具。

【关键词】树状多肽药物；仿生多肽载体；构效关系；靶向递送；肿瘤多模态死亡

参考文献

[1] Li, Y.; Xu, X*, et al. ACS Nano 2023, DOI: 10.1021/acsnano.3c05288.

[2] Li, Y.; Xu, X*. et al Small 2023, DOI: 10.1002/smll.202301656.

[3] X. Zhang; Xu, X*. Chemical Engineering Journal 2023, 465, 142698.

[4] Deng, C.; Xu, X.*; et al. Advanced Functional Materials 2022 32, 2206876.

[5] Li, Y.; Xu, X*. Journal of Controlled Release 2020 323, 483.

抗肿瘤多肽药物与靶向递送系统

Antitumor Peptide Drugs and Targeted Delivery System

徐翔晖

Department of Pharmacy, College of Biology, Hunan University, Changsha, Hunan, 410082 China

Email: xianghui.xu@hotmail.com; xianghui.xu@hnu.edu.cn

The occurrence and progression of diseases are often accompanied by various abnormal biochemical signals, including pH, metal ions, small molecules, and proteins. By detecting these disease-related biochemical signals, targeted delivery of therapeutic agents can be achieved, effectively addressing the critical challenges of reducing toxicity and enhancing efficacy in drug treatment.

Based on tumor-related biochemical signals, we have developed a series of bio-responsive peptide-based nanomedicines for precise antitumor therapy. Through the implementation of dynamic chemical bonds and controllable supramolecular assembly strategies, we have successfully driven innovations in structures and functionalities. Our peptide-based nanomedicines can effectively sense the acidic gradient environment, redox signals, and overexpressed proteases in tumor tissues and cells. By modulating chemical properties (e.g., surface charge distribution, molecular shielding, exposure of targeting moieties), as well as manipulating physical properties (e.g., size, shape, and morphological transformation), the peptide-based nanomedicines can adapt to or regulate the intricate disease microenvironment, thereby significantly enhancing the targeting efficiency and therapeutic effects for tumor treatment.

References

[1] Li, Y.; Xu, X*, et al. ACS Nano 2023, DOI: 10.1021/acsnano.3c05288.

[2] Li, Y.; Xu, X*. et al Small 2023, DOI: 10.1002/smll.202301656.

[3] X. Zhang; Xu, X*. Chemical Engineering Journal 2023, 465, 142698.

[4] Deng, C.; Xu, X.*; et al. Advanced Functional Materials 2022 32, 2206876.

[5] Li, Y.; Xu, X*. Journal of Controlled Release 2020 323, 483.

[6] Zhang, X; Xu, X.*; et al. Advanced Materials 2018, 30, 1707240.

[7] Li, Y.; Xu, X.*; et al. ACS Nano 2017, 11, 416.

[8] Zhang, X; Xu, X.*; et al. Angewandte Chemie International Edition 2015, 54, 4289.

两种血小板减少标准下利奈唑胺致重症患者血小板减少相关因素的回顾性研究

徐吟秋[1, 2]

（1. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，江苏 南京 210008；2. 南京临床药学中心，江苏 南京 210008）

【摘要】目的：依据两种不同的血小板减少标准，综合分析重症患者在使用利奈唑胺（LZD）期间，致其血小板减少的相关因素，并构建预测模型。**方法：**收集南京鼓楼医院重症监护室（ICU）2019 年 10 月至 2021 年 10 月，使用 LZD 治疗 92 例患者相关信息，开展回顾性研究。分别依据血小板下降超基线水平 30%及血小板下降至 $100\times10^9\cdot L^{-1}$ 两个标准，划分血小板减少组与非血小板减少组。首先比较两组患者一般资料，而后以多因素 Logistic 回归分析 LZD 致重症患者血小板减少的相关因素，并构建预测模型，以受试者工作特征曲线检验模型预测能力，其中置信度 α=0.05。**结果：**Logistic 回归结果表明，用药期间联合普通肝素、基线血肌酐值，与血小板下降超过 30%相关；而用药期间联合普通肝素、基线肌酐值、基线血小板计数与血小板低于 $100\times10^9\cdot L^{-1}$ 相关。对于血小板下降超过 30%以及血小板下降至 $100\times10^9\cdot L^{-1}$，预测模型的曲线下面积分别为 0.752（95% CI 为 0.652-0.853）和 0.803（95% CI 为 0.701-0.905）。**结论：**基线肌酐值与 LZD 用药期间联合普通肝素，是两种标准下 LZD 致血小板减少的共同相关因素，而用药期间，应在评估患者血小板减少风险后，选择合适的抗凝方法。

【关键词】重症患者；利奈唑胺；血小板减少；影响因素；不良反应；药学监护

Retrospective study on related factors of Linezolid-associated thrombocytopenia in critically ill patients according to two definitions of thrombocytopenia

XU Yinqiu[1, 2]

(1. Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, China 210008; 2. Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy, Nanjing, China 210008)

【Abstract】Objective: To study the related factors of thrombocytopenia in critically ill patients during the use of LZD, according to two different definitions of thrombocytopenia, and build prediction models. **Methods:** Information of 92 patients treated with linezolid in ICU of Nanjing Drum Tower Hospital from October 2019 to October 2021 were collected, to carry out a retrospective research. According to the two criteria of platelet decline which are platelet decline exceeding 30% of the baseline level and platelet decline to $100\times10^9\cdot L^{-1}$, platelet decline group and non-platelet decline group were divided. The general data of the two groups of patients was compared at first, and then the related factors of LZD-induced thrombocytopenia in critically ill patients were analyzed with a multivariate binomial logistic regression method, followed by building prediction models. The receiver operating characteristic curve (ROC) was used to test the predictive ability of the models. During the analysis, the confidence level α was 0.05. **Results:** Logistic regression results showed that

基金项目：南京鼓楼医院药学部科研专项。

作者简介：徐吟秋，男，硕士，药师，主要从事临床药学，Email：xuyinqiu24@163.com

combined use of unfractionated heparin during the LZD medication period and the baseline serum creatinine value were associated with a drop in platelets of more than 30%; while combined use of unfractionated heparin during the LZD medication period, the baseline creatinine value and the baseline platelet count were associated with platelets lower than $100\times10^9 \cdot L^{-1}$. For a drop of more than 30% of platelets and a drop of platelets to $100\times10^9 \cdot L^{-1}$, the area under the curve values of the prediction models were 0.752 (95% CI: 0.652-0.853) and 0.803 (95% CI: 0.701-0.905) respectively. **Conclusion:** Baseline creatinine value and combined use of unfractionated heparin are mutual factors for LZD-induced thrombocytopenia according to the two definitions. Moreover, during the LZD medication, the risk of thrombocytopenia should be evaluated before choosing anticoagulant agents.

【**Keywords**】linezolid; thrombocytopenia; critically ill patients; influencing factors; adverse effect; pharmaceutical care

利奈唑胺（LZD, linezolid）作为新型人工合成抗菌药物，在甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌（MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）、万古霉素耐药肠球菌(VRE, vancomycin resistant *enterococcus*)等耐药革兰氏阳性球菌感染中具有重要应用[1-3]。其通过结合核糖体 50S 亚单位抑制细菌 70S 翻译起始复合物形成，进而发挥抗菌效应[4]。对于成人、12 岁及以上儿童，美国感染性疾病学会推荐口服或静脉 LZD 600 mg q12h，用于 MRSA 感染[2]。此外，LZD 还联合其它抗结核药物治疗耐药结核杆菌的感染[5]。

LZD 为具有长抗菌后效应的时间依赖性抗菌药物[6]，说明书推荐采用 600 mg q12h 的剂量与给药频率。LZD 的表观分布容积适中，而蛋白结合率较低，口服吸收完全。LZD 在皮肤及皮肤软组织、肺组织中浓度较高[6]，因此被用于医院获得性肺炎、社区获得性肺炎以及皮肤和皮肤软组织感染中[7]。LZD 在血中的浓度较低，限制了其在血液感染中的应用。此外，美国感染性疾病学会还推荐 LZD 超说明书应用于 MRSA 骨髓炎、MRSA 中枢神经系统感染以及持续性 MRSA 菌血症的治疗中[2]。LZD 的代谢途径仍未完全明确，其主要通过非肾途径清除。研究表明，连续性肾脏替代治疗（CRRT, continuous renal replacement therapy）患者无需调整 LZD 的剂量[8]。

在 ICU 中，由于 MRSA、屎肠球菌等是常见的病原菌，LZD 具有较高的使用率。LZD 的不良反应包括外周神经痛[9]、贫血[10]、血小板减少[11-12]、高乳酸血症[13]等等。其中，血小板减少作为常见的不良反应，与 ICU 患者的死亡率升高具有相关性[14]。同时，由于 ICU 患者血流动力学特征、药代动力学特征、合并用药情况等等方面的特殊性，LZD 导致患者出现血小板减少的情况也各异。因此，有必要通过分析导致 ICU 患者血小板减少的相关危险因素，进而及时调整 LZD 用药方案，改善患者的治疗结局。

尽管目前已有一些对于 LZD 致血小板减少相关因素的研究[15-19]，其仍有值得进一步完善的空间。一方面，现有研究对于血小板减少的定义各异，因此有必要围绕不同的血小板减少标准，综合分析 LZD 致血小板减少的相关因素；另一方面，现有研究对于重症患者的相关因素关注不足，例如重症患者中常见的 CRRT 支持、联合使用的抗感染药物、联合使用的抗凝药物等等。因此，这一研究在现有基础上，结合重症患者用药特点，并依据不同的血小板减少标准，对 LZD 致重症患者血小板减少的相关因素展开综合分析。

1 方法

1.1 一般资料

收集南京鼓楼医院重症监护病区 2019 年 10 月至 2021 年 10 月使用 LZD 抗感染治疗的重症患者的相关资料。入选标准：（1）重症监护患者；（2）使用 LZD 目标性或经验性抗感染治疗的患者。排除标准：（1）患者使用 LZD 时间< 3 日；（2）基线血小板计数< $100\times10^9 \cdot L^{-1}$；（3）未定期监测血常规、LZD 血药浓度；（4）妊娠或哺乳期患者；（5）器官移植后状态患者；（6）合并有恶性肿瘤的患者。本研究经南京大学医学院附属鼓楼医院伦理委员会批准，项目编号：2021-648-01。

1.2 研究方法

借助医院电子病历系统，收集重症监护病区 2019 年 10 月至 2021 年 10 月使用了 LZD 并监测 LZD 血药谷浓度的患者 138 例。其中 LZD 为口服制剂（利奈唑胺片，江苏豪森，规格 0.6 g; 利奈唑胺片，Pfizer Pharmaceuticals LLC，规格 0.6 g）或静脉注射制剂（利奈唑胺注射液，Fresenius KabiNorge AS，规格 300 mL: 0.6 g；利奈唑胺葡萄糖注射液，江苏豪森，规格 100 mL:0.2 g 或 300 mL:0.6 g），初始给药方案均为 0.6 g q12h。按入选和排除标

准，共纳入患者 92 例。收集患者的相关信息，具体包括患者基本信息（性别、年龄、是否发生血流感染），患者使用 LZD 的信息（用药天数、LZD 谷浓度），患者使用 LZD 前的相关基线指标（血小板计数、白蛋白（ALB）、血肌酐（SCr）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）），患者使用 LZD 期间的联合用药情况（联合使用抗菌药物的种类、是否合并使用普通肝素、是否合并使用低分子肝素），以及患者使用 LZD 期间是否进行连续性肾脏替代治疗（CRRT）。其中，患者使用 LZD 前的基线指标，取距离患者开始使用 LZD 最近一次的检验指标；如果患者多次测定 LZD 谷浓度，则采用多次测试的最高谷浓度。

依据目前对于血小板减少的两种主要定义标准[15-16]，将患者划分为血小板减少组与非血小板减少组：（1）血小板计数相较于用药前的基线水平下降超过 30%；（2）血小板计数下降至 $100\times10^9\cdot L^{-1}$ 以下。以标准（1）划分，患者被划分为血小板减少组（n=46）与非血小板减少组（n=46）；以标准（2）划分，患者被划分为血小板减少组（n=31）与非血小板减少组（n=61）。

然后首先比较两组患者一般资料，而后采用二项 Logistic 回归方法分析 LZD 致重症患者血小板减少的相关因素，并构建预测模型，以受试者工作特征曲线（ROC）检验模型预测能力。

1.3 统计学方法

统计学分析采用 SPSS（版本：24.0）进行，其中置信度 α=0.05。依据不同的血小板减少划分标准，在两组患者的一般资料比较中，对于分类变量以例数（百分比）表示，采用 $\chi 2$ 检验；对于数值变量首先以 *K-S* 检验其是否符合正态分布，其中正态分布数据以平均值±标准差描述，以单因素 *t* 检验进行组间比较；非正态分布数据以中位数（四分位数间距）描述，组间比较采用 *Mann-Whitney U* 检验。同时，以多因素二元 Logistic 回归方法，分析不同标准下，LZD 致血小板减少的相关因素，其中自变量的筛选采用向后有条件法逐步回归，步进概率设置为 0.05。依据 Logistic 回归得到 Logistic 回归公式后，以受试者工作特征曲线（ROC）及 ROC 曲线下面积评价模型的预测能力。

2. 结果

2.1 患者一般资料及组间比较

研究共纳入 92 例患者，按照标准（1）血小板相较于基线水平下降超过 30%，有 46 例患者发生血小板减少，发生率为 50.0%；按照标准（2）血小板计数下降至 $100\times10^9\cdot L^{-1}$ 以下，有 31 例患者发生血小板减少，发生率为 33.7%。

按照标准（1）和标准（2），非血小板减少组与血小板减少组的一般资料比较结果如表 1 所示。按照标准（1），两组患者仅在 LZD 用药期间联合使用普通肝素，以及 LZD 用药前 AST 水平上的差异具有统计学意义（$P<0.05$）。而按照标准（2），两组患者同样在 LZD 用药期间联合普通肝素，以及用药前 AST 水平上的差异具有统计学意义（$P<0.05$）。此外，按照标准（2）划分的两组患者在用药前 Scr 水平、用药前血小板计数，以及 LZD 使用期间是否采用 CRRT 上的差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

表 1. 组间患者的一般资料比较

因素	标准（1）：血小板计数相较于用药前的基线水平下降超过 30%			标准（2）：血小板计数下降至 $100\times10^9\cdot L^{-1}$ 以下		
	否（n=46）	是（n=46）	P	否（n=61）	是（n=31）	P
性别						
男性/例	27（45.76%）	32（54.24%）	0.277	36（61.02%）	23（38.98%）	0.151
女性/例	19（57.58%）	14（42.42%）		25（75.76%）	8（24.24%）	
年龄/岁	68.2±16.3	64.8±14.3	0.332	67.5±18.0	66.7±13.2	0.797
血流感染						
否/例	33（51.56%）	31（48.44%）	0.650	43（67.19%）	21（32.81%）	0.786
是/例	13（46.43%）	15（53.57%）		18（64.29%）	10（35.71%）	
联合抗菌药物的个数/个	1(1, 1)	1(1, 2)	0.117	1(1, 2)	1(1, 2)	0.616

联合普通肝素						
否/例	39（60.94%）	25（39.06%）	0.002	51（79.69%）	13（20.31%）	<0.001
是/例	7（25.00%）	21（75.00%）		10（35.71%）	18（64.29%）	
联合低分子肝素						
否/例	22（43.14%）	29（56.86%）	0.142	30（58.82%）	21（41.18%）	0.090
是/例	24（58.54%）	17（41.46%）		31（75.61%）	10（24.39%）	
用药前 AST/ IU • L^{-1}	21.450 (16.050, 43.500)	30.050 (21.850, 75.475)	0.010	25.800 (17.000, 47.550)	33.100 (21.100, 72.700)	0.026
用药前 ALT / IU·L^{-1}	17.50 (11.03, 32.30)	19.40 (13.30, 47.83)	0.186	18.00 (11.15, 33.55)	18.20 (13.30, 48.50)	0.285
用药前 Scr/ μmol • L^{-1}	86.00 (61.00, 192.25)	104.50 (52.00, 164.50)	0.761	77.00 (49.00, 150.00)	145.00 (89.00, 184.00)	0.012
用药前 ALB / g • L^{-1}	31.7±4.8	31.4±5.0	0.788	31.6±4.0	31.6±5.6	0.956
用药前血小板计数/ $\times10^9$ • L^{-1}	182.50 (140.75, 243.00)	176.50 (136.75, 295.25)	0.530	212.00 (154.00, 295.50)	147.00 (120.00, 177.00)	<0.001
LZD 使用天数/日	8.5 (6.0, 11.5)	10.5 (7.0, 15.0)	0.107	10.0 (7.0, 14.5)	10.0 (7.0, 13.0)	0.977
LZD 谷浓度/ μg • mL^{-1}	6.800 (3.225, 12.900)	8.600 (4.808, 11.350)	0.524	7.700 (3.550, 12.100)	8.500 (4.810, 10.500)	0.776
用药期间 CRRT						
否/例	36（54.55%）	30（45.45%）	0.165	50（75.76%）	16（24.24%）	0.002
是/例	10（38.46%）	16（61.54%）		11（42.31%）	15（57.69%）	

2.2 血小板减少相关因素的 Logistic 回归

按照标准（1），输入表 1 中的因素进行 Logistic 回归。经过 13 步回归，方程中保留的变量及其统计结果如表 2 所示。其中，用药期间未联用普通肝素抗凝、用药前 Scr 水平是血小板较基线水平下降超过 30%的独立危险因素（$P < 0.05$）。最终得到的公式为，$Logit(P) = 3.159 – 0.007\times Scr - 2.901$（如果未联合普通肝素），其中 P 为血小板较基线水平下降超 30%的概率。

表 2. LZD 致血小板计数相较于基线水平下降超过 30%的相关因素

因素	β	Wald $\chi2$	P	OR	95% CI
未联用普通肝素	-2.901	14.008	<0.001	0.055	0.012~0.251
用药前 Scr	-0.007	8.608	0.003	0.993	0.988~0.998

依据标准（2），按照表 1 的因素进行 Logistic 回归。经 12 步回归，方程中保留的变量及其统计结果如表 3 所示。其中，用药期间未联用普通肝素抗凝、用药前 Scr、用药前血小板计数水平是血小板计数下降至 100×10^9 •L^{-1} 以下的独立危险因素（$P < 0.05$）。最终得到的公式为，$Logit(P) = 3.722 – 0.005\times Scr – 0.01\times$用药前血小板计数水平 $- 2.711$（如果未联合普通肝素），其中 P 为血小板计数下降至 100×10^9 • L^{-1} 的概率。

表 3.LZD 致血小板计数低于 $100\times10^9 \cdot L^{-1}$ 的相关因素

因素	β	Wald χ2	P	OR	95% CI
未联用普通肝素	-2.711	15.660	<0.001	0.066	0.017~0.255
用药前 Scr	-0.005	4.576	0.032	0.995	0.991~1.000
用药前血小板计数	-0.010	7.762	0.005	0.990	0.984~0.997

2.3 Logistic 回归公式的预测能力

按照标准（1）和标准（2），分别按照 2.2 节的公式，计算所有患者发生血小板减少的 Logit（P）值，并根据患者是否发生血小板减少，绘制的受试者工作曲线图（ROC）如图 1 所示。按照标准（1）和标准（2），计算的 Logit（P）值在 ROC 图中对应的曲线下面积（AUC）分别为 0.752（95% CI 为 0.652-0.853）与 0.803（95% CI 为 0.701-0.905），均大于 0.7。

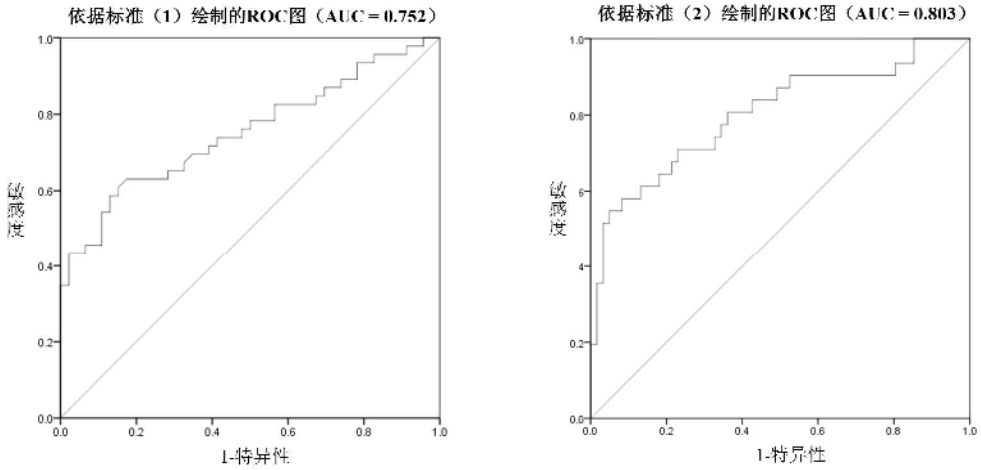


图 1. Logit（P）值与是否发生血小板减少的 ROC 图。其中左图为按照标准（1）计算的 Logit（P）值，右图为按照标准（2）计算的 Logit（P）值。

3. 讨论

按照标准（1）和标准（2），本研究血小板减少的发生率分别为 50.0%、33.7%，与文献报道[17-18]的发生率相当。一项历时十年的回顾性研究[14]显示，LZD 诱发血小板减少将增加重症患者的死亡风险，而 LZD 致血小板减少的发生率在 13.8%~60.5%[19]。因此，对于使用 LZD 的重症患者，在药学监护过程中预测其发生血小板减少的风险，并及时关注其血小板计数，将有助于改善患者预后。

本研究中，按照不同的血小板减少定义，经过单因素分析以及多因素 Logistic 回归分析后，基线肌酐值与 LZD 用药期间联合普通肝素，是 LZD 致血小板减少的共有的相关因素。其中值得注意的是，LZD 用药期间未使用普通肝素，在 Logistic 回归中具有较低的 OR 值，意味着其能够较高地降低患者发生血小板减少的概率，这对于重症患者的监护具有重要意义。同时在本研究中，使用普通肝素抗凝的患者（n＝28）的 75%为在 CRRT 期间采用普通肝素抗凝的患者（n=21），而一些研究发现[20-21]，血液透析患者采用普通肝素抗凝，可以导致肝素诱导的血小板减少症，通过检测相关抗体则可以帮助发现这一疾病。因此，尽管 CRRT 期间无需调整利奈唑胺剂量，仍有必要关注在 CRRT 中使用普通肝素抗凝的重症患者，并监测其血小板计数及肝素诱导的血小板减少症的相关抗体。

总体上，这一研究最终得到的 LZD 致血小板减少概率预测公式，AUC 值均大于 0.7，表明模型的预测能力良好。进而在使用 LZD 的重症患者中，需要对肾功能不全、基础血小板水平较低患者的血小板计数予以关注，

同时应特别关注联合使用普通肝素的患者。特别对于需要 CRRT 抗凝的患者，应综合考虑其肾功能与基线血小板计数，而对于发生血小板减少风险较高的患者，应选用枸橼酸抗凝等其它抗凝方式，进而保证患者使用利奈唑胺的安全性与有效性。

本研究仍有一定的不足与值得进一步探讨的内容。（1）目前的大部分研究[16,19,22-23]认为，肾功能不全将引起 LZD 蓄积，进而导致血小板减少。同时研究表明[24]，LZD 谷浓度与其致血小板减少的不良反应相关。但是，这一研究的相关因素中，同样包括了患者用药期间 LZD 的谷浓度，而血小板减少组与非血小板减少组患者的血药浓度差异并无统计学意义，且多因素 Logistic 回归结果也并未显示血小板减少与 LZD 的谷浓度相关。依据这一研究结果，某些经肾排泄的 LZD 代谢产物可能也是血小板减少的因素之一。但是由于 LZD 的代谢产物与代谢机制仍未被完全阐明，LZD 致血小板减少是否会与其代谢产物相关，值得开展进一步的研究。（2）对于重症卧床患者的体重信息难以收集，同时未对尿肌酐展开常规的监测，研究中暂未涉及这些因素。（3）这一研究纳入的患者数不足 100 例，提升样本量将有助于后续开展更为全面的分析。

4. 结论

两种不同的血小板减少标准下，结合单因素分析与多因素 Logistic 回归，重症患者在使用 LZD 期间未使用普通肝素，是共有的且重要的保护性因素。对于使用 LZD 的重症患者，应评估其发生血小板减少的风险后，选择合适的抗凝方式。同时还应关注重症患者基线血小板计数与使用 LZD 前 Scr 水平，而围绕以上因素构建的 LZD 致重症患者血小板减少的概率预测公式具有良好的预测性能。

参考文献

[1] ZahediBialvaei A，Rahbar M，Yousefi M，et al. Linezolid: a promising option in the treatment of Gram-positives[J]. J AntimicrobChemother，2017，72（2）：354-364.

[2] Liu C，Bayer A，Cosgrove SE，et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children: executive summary[J]. Clin Infect Dis，2011，52（3）：285-292.

[3] Watkins RR，Lemonovich TL，File TM Jr. An evidence-based review of linezolid for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): place in therapy[J]. Core Evid，2012，7：131-143.

[4] Batts DH. Linezolid-a new option for treating Gram-positive infections[J]. Oncology，2000，14（8 Suppl 6）：23-29.

[5] Tang S，Yao L，Hao X，et al. Efficacy, safety and tolerability of linezolid for the treatment of XDR-TB: a study in China[J]. EurRespirat J，2015，45（1）：161-170.

[6] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会. 抗菌药物药代动力学/药效学理论临床应用专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志，2018，41（6）：38.

[7] 陈愉，崔俊昌，佘丹阳，等.抗菌药物超说明书用法专家共识[J].中华结核和呼吸杂志，2015，38（6）：410-444.

[8] Li L，Li X，Xia Y，et al. Recommendation of Antimicrobial Dosing Optimization During Continuous Renal Replacement Therapy. Front Pharmacol，2020，11：786.

[9] Rho JP，SiaIG，Crum BA，et al. Linezolid-associated peripheral neuropathy[J]. Mayo ClinProc，2004，79（7）：927-930.

[10] Vinh DC，Rubinstein E. Linezolid: a review of safety and tolerability[J]. J Infect，2009，59（S1）：S59-S74.

[11] TessierJM，Puzio T，Young A，et al. Thrombocytopenia associated with linezolid therapy in solid organ transplant recipients: a retrospective cohort study[J]. Surg Infect (Larchmt) ，2015，16（4）：361-367.

[12] Waldrep TW，Skiest DJ. Linezolid-induced anemia and thrombocytopenia[J]. Pharmacotherapy，2002，22（1）：109-112.

[13] ImJH，BaekJH，Kwon HY，et al. Incidence and risk factors of linezolid-induced lactic acidosis. Int J Infect Dis[J] ，2015，31：47-52.

[14] Kim HS，Lee E，Cho YJ，et al. Linezolid-induced thrombocytopenia increases mortality risk in intensive care unit patients, a 10 year retrospective study[J]. J Clin Pharm Ther，2019，44（1）：84-90.

[15] Han X，Wang J，Zan X，et al. Risk factors for linezolid-induced thrombocytopenia in adult inpatients[J]. Int J Clin Pharm，

2021，in press.

[16] 张永煌，李宇，张蕾，等.TDM 联合 Logistic 模型对利奈唑胺致血小板减少症危险因素的研究[J].中国医院药学杂志，2019，39（14）：1485-1488.

[17] Cazavet J，BounesFV，Ruiz S，et al. Risk factor analysisfor linezolid-associated thrombocytopenia in critically illpatients[J]. Eur J ClinMicrobiol Infect Dis，2020，39（3）： 527-538.

[18] Williamson DR，Lesur O，Tétrault JP，et al. Drug-inducedthrombocytopenia in the critically ill: a case-control study[J].Ann Pharmacother，2014，48（6）：697-704.

[19] 刘彦鑫，刘婷婷，魏歌，等.利奈唑胺相关血小板减少症的危险因素分析及其风险预测模型的建立[J].解放军医学杂志，2021，46（8）：777-782.

[20] 张圣雨，宋惠珠，张秀红，等.血液透析患者以普通肝素抗凝致血小板减少的药学监护[J].医药导报，2018，37（4）：489-491.

[21] 李岩，李星亮.血液透析中普通肝素与低分子肝素诱导血小板减少症的临床分析[J].中国医药指南，2016，14（29）：91.

[22] 王立刚，刘智勇，杜晓明.利奈唑胺致血小板减少症的相关影响因素分析[J].中国药物评价，2018，35（6）：450-454.

[23] 蒋淑莹，张春红，胡卢丰，等.利奈唑胺相关性血液毒性的危险因素分析[J].中国现代应用药学，2018，35（5）：741-745.

[24] Matsumoto K，Shigemi A，Takeshita A，et al. Analysis of thrombocytopenic effects and population pharmacokinetics of linezolid: a dosage strategy according to the trough concentration target and renal function in adult patients[J]. Int J Antimicrob Agents，2014，44（3）：242-247.

浅析医药行业合规管理促进机制及合规体系建设路径

徐瑜蔓

（南京审计大学　江苏 南京 210000）

【摘要】刑事合规激励和行政合规激励促进执法部门对药品行业违法违规行为加大惩处力度的同时，对其宽大处理。由于药品性质特殊，刑事合规机制适用较为慎重，企业往往面临更大的行政处罚风险。实施药品合规激励的路径包括构建法律制度、转变药品监管执法理念、丰富行政监管手段、建立合规激励协议的报备与监督制度。

【关键词】企业合规；合规激励机制；医药企业

一、企业合规管理概述

（一）企业合规的起源

企业合规最早起源于美国。1977 年，为惩治美国公司在海外市场的贿赂行为，美国司法部门颁布《反海外腐败法》。1991 年，美国联邦量刑委员会发布《组织量刑指南》，要求对企业起诉和量刑时考虑其合规问题，合规管理制度首次通过法案形式产生法律约束力。20 世纪 90 年代后，美国政府推动贸易合作伙伴制定普遍的反腐败法案，一些西方国家开始探索建立企业合规计划。继美国《反海外腐败法》，英国于 2011 年通过《反贿赂法案》，法国 2016 年通过《萨宾第二法案》，巴西于 2014 年通过《反公司腐败法案》，FCPA 将其反腐败执法机制在全球范围内与其紧密合作的其他国家进行成功复制，推动全球的反腐败进程。近年来，除反商业贿赂，反垄断、反洗钱、诚信合规、数据保护合规、出口管制合规也成为企业合规计划重点关注范围[1]。

企业合规管理是与企业经营管理、企业财务管理相对应的概念。企业合规制度一般包含以下规定[2]。一是企业经营应当符合法律法规的规定，这里的法律法规不仅包括狭义的法律，也包括行政法规、部门规章、地方性法律、地方规章等。二是企业经营应当符合行业规范，遵守一定的商业规则。三是企业的涉外经营业务应当遵守国际法规、国际指南及国际标准。四是企业应当遵守自身内部制定的规章制度。国际合规指南、标准及国内颁布的合规规范引导企业建立完善和合规体系、规避经营中的合规风险，并引导企业将建立合规组织、合规风险识别和防控机制、合规体制审查与评价机制作为合规管理体系的重要内容。

（二）企业合规在我国的演进方式

早在 2006 年，我国就曾在金融领域推行合规管理制度。但直至 2018 年，中兴公司因违反美出口管制制度受到美方制裁，其在与 BIS 达成替代和解协议后，重建合规管理体系。这一事件引起中国企业对涉外业务合规的广泛关注。国务院国有资产管理委员会于 2018 年 11 月印发《中央企业合规管理指引（试行）》，以加强中央企业合规管理、提升合规经营管理水平，同期国家发展和改革委员会、外交部、商务部等联合印发《企业境外经营合规管理指引》，以提高企业合规管理能力、提升国际竞争力，避免违反国际组织及涉外业务合作国制定的合规管理文件以降低经营风险，这一年由此称为我国“合规元年”。此外，行政监管部门还对特定事项和特定行业建立各类合规标准（指引），如《经营者反垄断合规指南》、《平台经济领域的反垄断指南》等。行业协会如中国化学制药工业协会公布《医药行业合规管理规范》、中国证券业协会修订形成《证券公司合规管理有效性评估指引（2021 年修订）》、中国中小企业协会企业合规专业委员会牵头起草《中小企业合规管理体系有效性评价》团体标准[3]。2022 年 9 月，国务院国资委发布《中央企业合规管理办法》（以下简称《办法》）。《办法》作为第一部针对合规管理发布的部门规章，为中央企业建立完善的合规管理组织体系和合规管理制度提供制度基础，同时也为其他企业建立合规管理体系提供重要参考，是中国企业合规管理建设的风向标。

检察机关自2020年推动企业合规改革以来，经过两轮的探索和试点，已逐步探索形成企业合规不起诉制度，发布三批涉案企业合规典型案例，涉案企业合规改革试点工作不断加强[4]。此外，最高人民检察院分别于 2021、2022 年联合印发《关于建立涉案企业合规第三方监督评估机制的指导意见（试行）》及《涉案企业合规建设、评

估和审查办法（试行）》，引入第三方监管委员会，确立涉案企业合规建设体系的标准，建立合规整改监督和评估机制。企业合规整改暴露的制度难题使得重大单位犯罪案件分案处理机制、差异化合规整改机制、民行刑衔接机制亟待探索研究，引起刑法学界对单位犯罪理论的教义学反思，并对《刑事诉讼法》企业合规改革的程序性规定提出了立法要求。

（三）企业合规促进机制概述

企业合规具有以下三个方面的基本含义：一是企业经营遵循国内法律、国际规范、和其他商业规则，并要求员工、第三方合作伙伴依法依规经营；二是企业合规作为一种公司治理方式，旨在避免或减轻企业因违法违规经营带来行政责任、刑事责任；三是外部激励机制，使得企业合规成为行政及刑事宽大处理的依据。企业合规促进机制可归纳为企业内部治理与外部激励机制，外部激励机制进一步区分为行政激励机制、刑事激励机制、外国法及国际组织反制裁激励机制[5]。

企业合规管理与企业经营管理、企业财务管理共同成为当代公司的治理结构。完善企业内部治理水平作为建立企业合规制度的激励机制，是企业顺利运行、实现经营目标的并体现社会价值的重要因素。有效的企业合规制度契合“可持续发展 ”的公司治理理念，是引领公司可持续发展的保障。同时，持续运行并验证有效的合规体系可以及时识别公司经营中的潜在风险点，建立单位与员工之间的责任切割机制，使合规体系的建设成为企业免责的抗辩事由，保障企业可持续发展。

外部激励机制首先表现为行政激励机制。行政合规要求企业经营和管理均符合国家行政监管的相关规定，从而督促企业自我整改和自我监管。在我国转变政府职能、深化行政管理体制改革的背景之下，行政监管部门建立全行业、全领域的合规监管制度势在必行。企业合规在一定程度上降低企业国内行政处罚风险、促进企业与行政监管机关达成行政和解。此外，由于行政合规风险和刑事合规风险存在相互转化的可能，企业面临行政监管风险时，可能随着监管机关的调查，发现存在犯罪行为的，企业面临的风险就可能上升为刑事合规风险，存在遭受刑事追究的风险。

作为外部激励机制的刑事激励机制，企业合规是合规不起诉、减轻或免除刑罚以及无罪抗辩的重要依据。检察机关与涉案企业达成暂缓起诉协议的前提之一，是涉案企业必须自愿认罪、承认被指控的犯罪事实、积极配合调查、采取补救挽损措施，本质是合规出罪。我国目前创造了两种合规不起诉模式：一是“相对不起诉”（检察建议模式）、二是“附条件不起诉”（合规考察模式）。“合规不起诉”与“合规不捕”、“合规轻缓量刑”一起，作为企业改革合规改革试点工作的三大成果，是最高检《“十四五”时期检察工作发展规划》强调落实“少捕慎诉慎押”刑事司法政策的具体实践。

作为解除国际组织制裁的典型案例，湖南建工集团因存在《诚信合规指引》定义的欺诈行为受到世界银行制裁，造成重大损失。而后成功建立并实施合规计划，被世界银行解除制裁[6]。企业合规作为外国法及国际组织反制裁激励机制，是企业涉外业务受到监管的重要方式，是我国企业与国际监管组织达成和解、促进解除制裁的手段和依据。

（四）企业合规制度之意义与价值

企业合规提升企业内部治理能力，保护公司、股东、客户、员工及其他利益相关者的商业利益，实现企业可持续发展。企业免于重大处罚乃至破产，避免受到重大财产损失，挽救企业声誉，同时可以树立良好的企业形象，增强行业竞争力。保存大型企业能够避免员工大量失业、税收减少及产业链中断等严重后果，促使企业承担社会责任。作为行政激励制度与刑事激励制度的企业合规促进机制，其设立初衷即为“社会公共利益考量”的结果。合规计划作为建立企业合规体系的重要内容，包括通用合规计划及各种专项合规计划，以承担特定领域的社会责任。如数据保护合规计划，促使企业建立数据管理系统、保护客户个人隐私信息；环境保护合规计划，促使修护被破坏的生态环境、保持生态系统平衡；反垄断合规计划，维护公平有序的商业竞争环境等。此外，对于结构复杂的大型企业及新兴违法犯罪现象，企业合规有助于解决行政机关和司法机关的外部监管失灵。

二、合规管理促进机制分析

以下将从企业合规制度的内部和外部促进因素分别加以说明。

行政激励促进对企业合规的影响。20 世纪 60-70 年代美国企业频发企业垄断和商业贿赂事件，促使《反海

外腐败法》出台。2016 年美国 Akamai 公司向中国官员行贿案件中，该公司以制定合规计划、补救措施等换取与 SEC 签订不起诉协议。而 Facebook 因将用户信息提供给相关运营商受到美国司法部、美国联邦贸易委员会就隐私保护达成行政和解，并缴纳 1 亿美元罚款。在没有达成行政和解的案件中，减轻或免除处罚也可成为企业合规的行政效果。行政合规要求企业经营和管理均符合国家行政监管的相关规定，从而督促企业自我整改和自我监管。一方面，行政监管部门积极出台行政合规指导文件，引导企业建立合规管理体系。另一方面，违法违规经营的企业通过作出合规承诺或者提出合规整改计划来换取行政监管部门的宽大处理，比如暂缓行政执法活动、减免行政处罚、达成行政和解等。我国 2015 年在期货和证券领域执行行政和解，中国证监会在对行政相对人涉嫌违反期货行政法规案件进行处理，行政相对人可以申请交纳和解金、消除违法后果等，与监管部门达成行政和解协议，并终止调查执法程序，2019-2020 年中国证监会与高盛（亚洲）、上海司度等公司达成行政和解，涉案企业通过承诺加强内部管理、采取内部整个措施，换取监管部门终止行政调查。实践中缺乏行政和解的监督机制，企业承诺建立合规的效果无法进行检察验收、我国行政执法承诺已在反垄断和期货领域得到实施，2007 年《反垄断法》及 2019 年国务院反垄断委员会通过的《承诺指南》对行政执法承诺实施加以规定。2019 年《证券法》确定行政执法承诺制度，由《证券法实施办法》明确行政执法承诺制度框架。与美国行政和解制度不同，我国的行政执法承诺未将合规要素纳入该制度中，“纠正违法行为”、“赔偿损失“等更倾向于采取配合的补救措施，而未对其治理结构产生任何影响。因此在行政和解中优先引入执法承诺，以激励企业建立合规体系。

美国最早于 1991 年制定《联邦量刑指南》，将企业合规问题作为是否决定对涉刑事案件提起公诉的原因，1999 年美国司法部发布《企业诉讼指南》要求检察官在对企业起诉时考虑犯罪行为性质、是否初犯、是否建立合规计划、采取补挽救措施等八个方面的因素。英国《反贿赂法》则制定相称原则、高层承诺原则、风险评估原则、尽职调查、有效沟通等预防贿赂犯罪的六项原则，六项原则如充分实施则可以成为企业被取消指控的法定抗辩事由。而合规计划也可以成为减轻量刑的重要情节，主要表现为降低对企业的罚款数额。暂缓起诉协议制度起源于美国，在实践中演化为“暂缓起诉协议”和“不起诉协议”，后者目前已被英国、法国、加拿大、澳大利亚、新加坡等国改造并应用于企业犯罪案件。暂缓起诉协议制度的确立与上述国家采取的对抗诉讼制度一脉相承，然而一些采用职权主义诉讼制度的国家也采取以上方式。检察机关在这一制度下享有较大的自由裁量权，可以通过与涉案企业达成不起诉协议换取有罪判决和刑罚处罚。我国对刑事合规的适用方式以探索建立合规体系换取附条件不起诉、刑事宽大处罚等，最高人民检察院发布的司法案例反映出刑事合规已探索适用于更广泛的企业犯罪案件，然而由于企业合规激励机制与刑法理论的教义冲突，亟待从实体法角度完善单位犯罪理论、出罪入罪机制等，《刑事诉讼法》的程序性规范也并不是明确，学界提出应设定企业合规特别程序或探索在附条件不起诉章节中补充企业合规不诉。

外国法及国际指南对合规体系的促进机制。2006 年西门子因违反美国对商业贿赂的规定受到德国慕尼黑检察机关的调查，并且受到美国司法部与美国联邦证券交易委员会的联合调查，美国司法部以西门子在财务等方面违反《反海外腐败法》为由对西门子提起刑事指控，最终与美国证交会达成民事和解。通过重建合规计划，西门子不仅被美国采取宽大刑事处罚和行政处罚，也避免损失企业商誉，这对西门子这样的大型跨国企业在国际市场上维护交易资格、开拓市场、获取投资争取了重要条件资格。此外，2018 年中兴因违反美国出口管制受到 BIS 处罚，以建立出口管制合规计划、缴纳巨额罚换取替代和解协议。而湖南建工集团则因在国际银行招投标中的腐败、欺诈问题而以制定诚信合规计划换取世界银行提前解除制裁措施。企业涉外经营业务应当遵守外国法律法规、行业规范，以避免受到限制出口、罚款等制裁；对企业实施附条件经济制裁的国际组织以世界银行为代表的金融机构，世界银行对违规企业的制裁措施依次为“发出惩戒信”、“恢复原状及采取补救措施”、“附条件免于取消资格”、“附解除条件的取消资格”、“取消资格”、“永久取消资格”六种。我国企业受到的世界银行制裁涉及的违规行为主要是欺诈及腐败行为。因此企业合规计划应当根据其所在国际市场及业务往来的国际组织规定，做出特别说明，避免受到资格剥夺、经济震荡，防止对经济发展造成负面影响。

企业合规的另一方式是作为公司治理方式的合规，即企业为防范法律风险、减少损失将合规制度纳入公司治理结构中。中兴和湖南建工集团在合规制裁之后重建合规体系，将合规组织设置、合规风险防范、监控、应对、合规管理考核与评价列入专项合规计划中，合规计划完成情况得到监管和追踪，因此获得良好的实施效果。

美国《反海外腐败法》、英国《反贿赂法》、法国《萨宾第二法案》属于反腐败法律，合规机制也最先针对“反腐败合规”。而近年来国际组织将公司治理扩大到反垄断、数据保护、诚信合规等方面。《中央企业合规管理办法》作为对合规管理发布的第一个部门规章，对合规组织和职责、合规制度建设、运行机制、合规文化、信息化建设、监督问责等进行规范。国有企业在建设合规管理体系时，需要妥善处理不同效力等级规范和标准。目前大中型企业多以《中央企业合规管理办法》的制度规范为蓝本，结合企业业务领域、规模大小、经营风险制定内部合规制度。企业制定和运行合规体系必将产生一定成本，鉴于营利的驱动机制，企业并不需要对其制定的所有合规指标投入同等整改力度和人力、物力资源，而应针对合规风险的大小合理运用企业资源，通过执行内部合规制度降低行政合规、刑事合规、涉外国法和国际组织制裁风险。

三、医药行业合规体系建设路径

企业合规要求遵循两种视角下的制度规范，一是外部法律、法规、行业标准、道德要求等，涉外经营的企业还应当遵守国际指南、国际规范的要求；二是企业为防范违反外部合规风险制定的内部管理体系。医药行业是国民经济中关系国民健康、社会秩序稳定和经济发展的重要行业。在新冠病毒广泛传播、老龄化加剧和生育观念转变的社会环境下，药品质量监管机制和供应保障体系亟待健全完善。国家市场监管总局近期查处数十例涉疫物资价格违法典型案例以及四批涉疫药品和医疗用品违法典型案例，涉及哄抬药品、医疗器械价格、散布虚假涨价信息、违法发布广告、生产、销售不合格口罩、未经许可经营第三类医疗器械等案，并进行吊销营业执照、警告、罚款等行政处罚。此外，“山东冷链问题疫苗案”、“长春长生疫苗”案等涉及药品刑事案件严重危害药品使用安全，引起强烈的社会影响。因此，与一般行业相比，政府往往通过制定更为严格的法律和监管体系，以规范药品研发、生产、流通及使用。经过近 70 年的发展，建立合规管理体系已成为西方发达国家在企业业务经营、文化传播的重要组成部分。欧洲、美国、日本等发达国家已在大部分制药企业中建立较为完整的合规管理系统。目前，企业合规探索已从金融合规领域逐渐扩大至环境保护、重大责任事故案、假冒注册商标、虚假增值税发票等其他案件领域中，但仍集中在经济违法、经济犯罪领域。尽管医药行业的性质特殊，从如上案例中不难看出，行政违法行为案件涉及经济违法问题不在少数，而在医药企业涉及刑事案件中，则与药品质量相关的案件更为高发。因此应当加强立法、政府监管、制定指引性文件，并加强企业内部合规建设。

对于药品全流程监管的法律有《药品管理法》、《药品管理法实施条例》，国务院办公厅印发《药品上市许可持有人制度试点方案》，《关于推进药品上市许可持有人制度试点工作有关事项的通知》随后出台。对于药品研发、生产、流通环节制定专项质量管理规范，如《药品生产质量管理规范》（GMP）《药物临床试验质量管理规范》（GCP）、《药品经营质量管理规范》（GSP）等， 药品经营还应当符合《药品网络销售监督管理办法》、《反不正当竞争法（2017 修订）》、《药品进口管理办法（2012 修订）》等规范的要求。世界贸易组织于 2003 年通过关于实施专利药品强制许可制度是最后文件，规定发展中成员和最不发达成员因艾滋病、疟疾等及其他流行疾病因广泛传播造成公共健康受到严重威胁时，可在未经专利权人许可的情况下，在成员内部通过实施专利强制许可，生产、销售和使用治理上述疾病的药品。国际组织的特殊授权使紧急情况下生产、销售专利期未满的药品免受处罚。为构建药品行业合规激励机制、保障药品安全和社会稳定、维护企业利益关系人权利，应当加强立法、构建法律制度体系和法律监督体系，转变药品监管执法方式，将惩罚与整改相结合，行业协会发布合规管理规范以引导，促进企业内部合规体系建设。

（一）立法以完善法律制度体系

新修订《药品管理法》通过增设惩罚性赔偿、提高财产罚幅度，全面加大对违法违规行为处罚力度，对药品企业实行行政合规激励首先需要立法机关尽快推进法律制度的顶层设计。2021 年 3 月中国化学制药工业协会发布《医药行业合规管理规范》，为药品合规管理体系建设提供模本，在此基础上，监管部门应借鉴其他行业经验和尽快制定药品企业合规规范，指导企业构建合规体系。合规激励机制应当逐步探索适用于药品经营行业，例如反垄断和反不正当竞争，对于严重危害国民健康的药品质量违法犯罪案件则应慎重使用。《药品管理法》与《行政处罚法》 对从轻、从重、免于处罚的规定比较模糊，而规范性文件的减免处罚标准则过高，执法人员实践中对处罚权力的自由裁量空间较小，因此合规激励的实行和效果很难保证[7]。对此，立法机关通过指定《实施条例》细化执法自由裁量权的使用，以便药品监督管理部门及其他行政执法部门使用合规激励。

（二）加强医药行业行政监管

合规激励核心在于将企业合规建设成本转化为合规价值的外部制度措施，而涉及药品刑事犯罪由于侵害人身权利法益而不宜推进使用刑事合规激励，因此我国建立合规激励措施时可将激励作用点迁移，于行政监管中引导建立合规激励措施。若企业能够证明已经建立并实施有效的合规管理体系，对初次行政违法行为可给予减轻处罚、限期整改的要求，对无法整改的违法行为应通过加大惩罚性罚款等措施使涉案企业丧失再犯能力，并且应当取消对特定业务领域的行政许可。转变行政执法理念，将宽严相济的执法手段与整改激励相结合。出于监督行政监管权力滥用的考虑，合规激励协议应当向省级药品监督管理部门或者做出行政违法处罚的行政机关的省级领导或监督部门报备，建立合规激励协议内容、执行情况审查监督机制，防止执法者以权谋私，落实合规激励对引导药品企业依法依规经营的价值目标。建立药品安全监管机构和药品检验组织，为有效监督违法药品企业实施激励协议提供监管资源。在大数据、人工智能、云计算等科技手段高度发达的背景下，应将信息技术和人工智能技术纳入药品监管的范畴，搭建智能监管平台、丰富监管手段，实现对违法企业的全面动态监管，提高监管效率。

（三）行业协会发布指引性文件

中国化学制药工业协会制定的《医药行业合规管理规范》，从反商业贿赂、反垄断、财务与税务、产品推广、集中采购、环境、健康和安全、不良反应报告、数据合规及网络安全等十个方面阐述医药行业的合规管理主题，对医药企业开展合规管理提出要求。建立合规体系完善及保证有效实施仍需合规专业委员会及地方合规促进会持续跟踪。协会商议药品监管部门对药品行业风险点加强立法，推动执法创新，切实我国药品安全和药品产业的健康发展。

四、结论

药品行业法律法规体系包含一般法律制度、适用于各个流程的管理规范、特定药品例如中药、疫苗制剂、麻醉药品、医用毒性药品的专项规章制度。《中央企业合规管理办法》为中央企业建立合规管理组织体系和合规管理制度提供制度基础，对其他行业企业具有较强的借鉴和参考价值。企业合规要求遵循外部和内部两种视角下的制度规范，一是法律、法规、行业标准、国际指南、国际规范的要求以及道德标准；二是企业为防范违反外部合规风险制定的内部管理体系。医药行业建立合规管理体系首先应当通过立法使严格监管与严厉处罚紧密结合，对医药行业行为产生双重压力，实现合规激励对合规体系建设和完善的目标[8]。其次应当发挥行政监管及行政合规激励提升企业合规管理价值的作用路径，激发企业建设合规体系的内驱力，加强事前、事中监管，对侵害人民健康的违反犯罪行为严厉处罚。最后行业协会在现有规范基础上补充、完善合规管理指引性文件。企业合规内驱力是外部制度规范得以落实的重要方式，因此医药企业应当自身提高合规建设重要性观念、建立健全合规制度，以有效推动行业整体合规水平、提升国际市场竞争力。

参考文献

[1]尹云夏，李晓霞.中国企业合规的动力及实现路径[J].中国法律评论,2020(3):162.

[2]陈瑞华.企业合规制度的三个维度——比较法视野下的分析[J].比较法研究，2019(3):70.

[3]江苏省钢铁行业协会《企业合规管理体系有效性评价》解读 http://www.jsgt.org.cn/index.php/Home/Index/art/a_id/15282/c_id/41.html,2022 年 12 月 30 日.

[4]陈瑞华.企业合规不起诉改革的动向和挑战[J].上海政法学院学报(法治论丛),2022,37(6):29.

[5]陈瑞华.企业合规的性质[J].浙江工商大学学报(法治论丛),2021,(1):50.

[6]陈瑞华.湖南建工的合规体系[J].中国律师,2019,(11):89.

[7]陈涛，陈飞羽.药品企业行政合规激励机制：解析与进路[J].北京警察学院学报,2022,(3):11.

[8]赵艳蛟，伍琳，陈永法.国外企业业合规管理促进机制分析及对我国医药行业的启示[J].中国医药工业杂志,2021,52(7):969.

左氧氟沙星在前列腺组织的分布及其受发育阶段与感染的影响

徐子扬，王卓

（海军军医大学第一附属医院 药剂科，上海 200433）

【摘要】目的：前列腺炎是男性特有的重要疾病[1-4]，但由于血-前列腺屏障（blood-prostate barrier，BPB）的存在常使药物无法有效转运至目标组织部位，严重制约该类疾病的疗效[5,6]。前期预实验发现 BPB 的作用在不同成熟程度的前列腺上可能存在差别，为进一步探究前列腺发育程度以及感染与 BPB 调节机制的关系，以左氧氟沙星为治疗药物，通过微透析的方法，测定大鼠血液与前列腺中的药物游离浓度，并进行药动学分析。**方法：**健康成年雄性 SD 大鼠随机分为 3 组：A 组为前列腺处于青春期的小周龄大鼠，B 组为前列腺处于成熟期的大周龄大鼠，C 组为前列腺处于成熟期的大周龄慢性前列腺炎（Chronic bacterial prostatitis，CBP）模型大鼠。使用微透析探针和林格氏溶液以 1.5μL/min 的灌注速率收集前列腺与颈静脉透析液。通过 HPLC 测定前列腺与颈静脉透析液样品中的左氧氟沙星浓度，并通过非隔室模型进行分析。**结果：**左氧氟沙星在前列腺和颈静脉中游离左氧氟沙星的半对数浓度-时间曲线如图 1。可见 3 组的前列腺及血液游离浓度均在第一个采样点达到最高值，后呈逐渐下降，并在 9h 后趋近于 0。各组大鼠均在前 2 个测定点即可以达到药物峰值，A,B 组大鼠在 5h 前两组的前列腺和血液浓度存在比例关系，血中浓度约为前列腺中浓度的 2 倍。三组大鼠在不同时间点的前列腺药物游离浓度与血液浓度的比值如图 2，C 组大鼠在 0-6h 的 P/B 值始终高于 A,B 两组大鼠，6h 后趋于一致。C 组大鼠在 0-1h 的 P/B 值与 A，B 两组呈数量级变化，为 A，B 组的两倍。A 组大鼠在 1-9h 普遍高于 B 组大鼠，B 组大鼠在 0-1h 高于 A 组，也即在大鼠血液内及前列腺内药物游离浓度达到顶峰时，B 组大鼠的 P/B 值更高，可能与药物给予量相关。分析不同周龄大鼠前列腺 AUC0-t 以及 AUC0-∞与血 AUC0-t 以及 AUC0-∞比值（图 3）。通过单因素 ANOVA 检验，比较 B 组与 A 组大鼠的 AUC0-tP/B 和 AUC0-∞P/B，$P < 0.05$，B 组大鼠的 AUC0-tP/B 和 AUC0-∞P/B 与 A 组大鼠有差异，具有统计学意义，也即 B 组大鼠中相较于 A 组大鼠中药物游离浓度比值更低。比较 B 组与 C 组大鼠的 AUC0-tP/B 和 AUC0-∞P/B 比值，同样可以发现两组间有差异，具有统计学意义，即 B 组大鼠中相较于 C 组大鼠中药物游离浓度比值更低。**讨论：**A 组和 B 组大鼠之间观察到的前列腺和血液之间的游离浓度的水平的差异，反应前列腺成熟情况可能影响着血前列腺屏障的屏障作用的强弱，有研究表明不同周龄的大鼠的睾酮分泌量不同，表明处于不同周龄的 A 组和 B 组大鼠前列腺处于不同发育成熟阶段[7, 8]。A 组大鼠的 P/B 值在 1-9h 内均大于 B 组，可以推测在药物通过尾静脉进入后，大部分时间内前列腺尚未成熟的大鼠的前列腺的药物透过性更强，血前列腺屏障作用相对弱。并且 A 组与 B 组大鼠前列腺 AUC0-t 以及 AUC0-∞与血 AUC0-t 以及 AUC0-∞比值，P 值均小于 0.05，两组间有差异。表明在不同的前列腺成熟情况下，前列腺内的透过的相对药物浓度不同，印证血前列腺屏障的存在，也即在前列腺成熟的大鼠中，单位时间内前列腺内透过的相对药物量更小。意味着不同前列腺成熟情况与血前列腺屏障功能相关，愈成熟的前列腺血前列腺屏障功能更强。C 组大鼠的 Cmax 与 AUC 较 B 组显著减少，然而 C 组大鼠的 P/B 值在大部分时间内都高于 A,B 两组大鼠，并且 C 组与 B 组大鼠前列腺 AUC0-t 以及 AUC0-∞与血 AUC0-t 以及 AUC0-∞比值，P 值均小于 0.01，两组间有差异。同为前列腺发育成熟的大鼠，C 组较 B 组大鼠的前列腺对左氧氟沙星的透过性更强，血-前列腺屏障作用减弱，这可能与细菌性炎症对屏障结构破坏相关，通过影响关键结构蛋白，降低屏障作用，使进入前列腺的药物游离浓度更高。前列腺疾病与年龄相关的进展[9]，表明健康的老龄化过程中对药物治疗效果可能会有不同的影响。血前列腺屏障的存在可能也导致了年龄更大的人群药物的吸收程度更加困难，

基金项目：“国家自然科学基金（项目名称：整合膜蛋白对药物在血-前列腺转运中的影响规律与调节利用。编号：81870520）

作者简介：徐子扬 硕士研究生，E-mail：juvenilexu@126.com

通信作者：王卓，海军军医大学第一附属医院药剂科，E-mail：wangzhuo088@163.com

同时前列腺炎症也影响了血-前列腺屏障结构。前列腺发育成熟的大鼠血前列腺屏障对药物转运的限制更加明显，可以推测在前列腺成熟过程中，在前列腺组织中存在随年龄增加而改变的相关结构或者蛋白，通过加强血前列腺屏障的作用进而阻碍外来药物。类比屏障结构与功能研究都更加完整的血脑屏障，其通过紧密连接、低胞饮活性、高效转运蛋白及其代谢特性来维持大脑微环境[10]。我们推测血前列腺屏障可能也是一种高度动态的屏障。维持动态平衡的的屏障可能也是由某些转运蛋白组成，以及紧密连接也在其中可见且起到了相关作用，利用对蛋白的调节可以增加药物对前列腺的透过性。更好的开放血前列腺屏障，提高临床对前列腺炎症等相关疾病的治疗效果，具有较大的现实意义。

结论：不同的前列腺成熟阶段，前列腺内的透过的整体药量不同，前列腺成熟程度可能影响着血前列腺屏障对药物屏障作用的强弱，前列腺成熟的大鼠屏障作用更强；细菌感染也可能会减弱这种屏障作用，慢性前列腺炎大鼠模型的前列腺屏障作用较健康大鼠减弱，这可能与感染造成的屏障结构破坏有关。

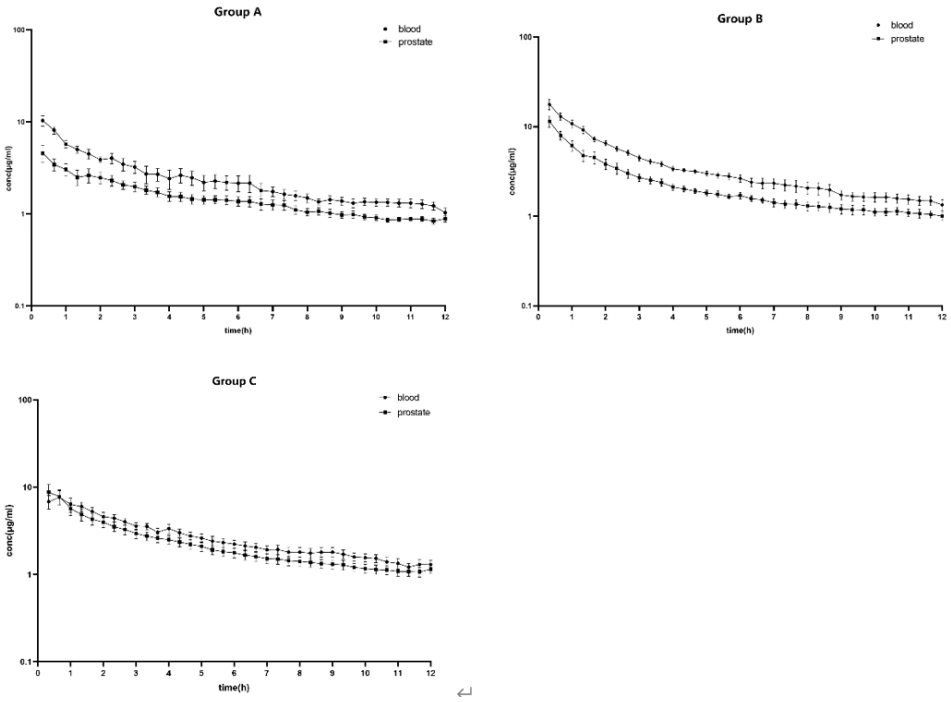


图 1 不同组大鼠血液和前列腺中游离左氧氟沙星的半对数浓度-时间曲线

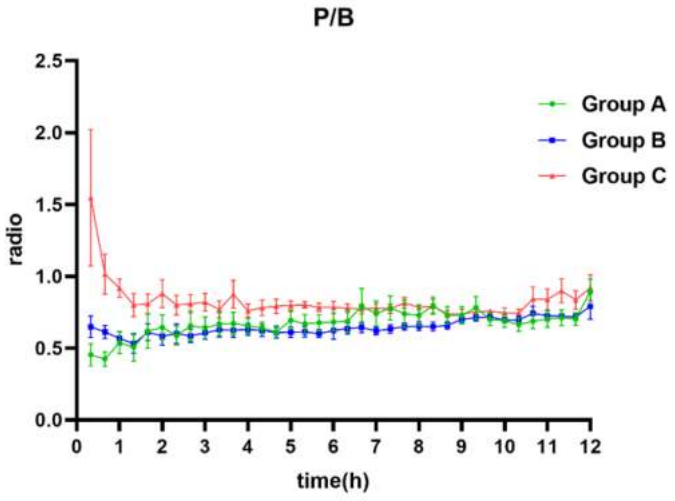


图 2 前列腺内药物游离浓度与血液游离药物浓度比值在不同组别大鼠中的比值随时间变化图

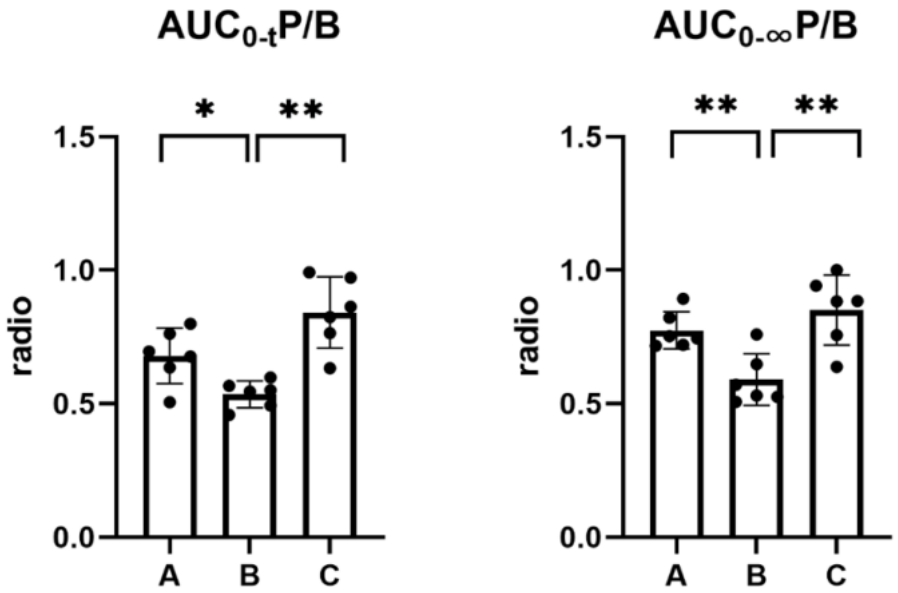


图 3 不同组别大鼠中前列腺 AUC_{0-t} 以及 $AUC_{0-\infty}$ 与血 AUC_{0-t} 以及 $AUC_{0-\infty}$ 比值柱状图

注：*为 $p<0.05$，**为 $p<0.01$，使用独立样本 t 检验，AUC_{0-t}P/B 为前列腺 AUC_{0-t} 与血 AUC_{0-t} 的比值，$AUC_{0-\infty}$P/B 为前列腺 $AUC_{0-\infty}$ 与血 $AUC_{0-\infty}$ 比值。

参考文献

[1] Rebecca,L.S.,Kimberly,D.M., Nikita S.W., et al. Cancer statistics,2023[J]. *CA Cancer J Clin*,2023,73(1):17-48.

[2] Chen, L., Chen, J. , Mo, F., et al. Genetic Polymorphisms of IFNG, IFNGR1, and Androgen Receptor and Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome in a Chinese Han Population[J]. *Dis Markers*.2021,2898336.

[3] Marquez-Algaba,E.,Pigrau,C.,Bosch-Nicolau,P., et al.Risk Factors for Relapse in Acute Bacterial Prostatitis: the Impact of Antibiotic Regimens[J]. *Microbiol Spectr*.2021,9(2):e0053421.

[4] Zhu, Y., Mo, M., Wei,Y. , et al. Epidemiology and genomics of prostate cancer in Asian men[J]. *Nat Rev Urol*.2021, 18(5):282-301.

[5] Fulmer,B.R.,Turner,T.T..A blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium[J]. *J Urol*.2000, 163(5):1591-4.

[6] Shang, Y., Cui,D., and Yi, S. Opening tight junctions may be key to opening the blood-prostate barrier[J]. *Med Sci Monit*. 2014,20:2504-7.

[7] Nazian, S.J.,Concentrations of free testosterone, total testosterone, and androgen binding protein in the peripheral serum of male rats during sexual maturation[J]. *J Androl*, 1986,7(1):49-54.

[8] Gong, E.Y., Park,E., Chattopadhyay,S., et al.Gene expression profile of rat prostate during pubertal growth and maturation[J]. *Reprod Sci*.2011,18(5):426-34.

[9] Bors, L., Toth, K., Toth,E.Z., et al. Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A Comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats[J]. *Brain Res Bull*.2018,139:269-277.

[10] Gustafsson, S., Eriksson,J., Syvanen, S., et al. Combined PET and microdialysis for in vivo estimation of drug blood-brain barrier transport and brain unbound concentrations[J]. *Neuroimage*.2017,155:177-186.

从西南植物药中找到 first-in-class 药物的研发密码

许敏

（昆明理工大学生命科学与技术学院 云南 昆明 650500）

【摘要】西南地区丰富的植物药驱动天然小分子的发现。这些结构骨架丰富、生物活性多样的天然小分子能可逆性的、可控性的调控相应的生物学变化。因此，以这些天然小分子为探针，能揭示疾病治疗的新作用机制、新靶点及新的信号转导通路，再基于这些新靶标或新机制，结合结构生物学，进行理性设计和结构优化，是发现原创药（first-in-class）的有效途径之一。但是，有效天然小分子的高效识别、理性设计和结构优化、探针设计和合成及靶标蛋白的高效发现及作用机制的诠释一直是瓶颈问题，制约了从西南丰富的植物药中研发原创药。我们研究团队长期依托西南植物药的资源优势，衷于其临床价值，通过 SBMN（结构导向分子网络的有效天然小分子的高效识别）、NFBDD（基于天然片段的药物设计和结构优化）、ABPPs（生物交联）等技术创新和探索，以西南抗乙肝病毒植物药叶下珠中分离并改造的天然小分子探针 PAC5，发现 hnRNPA2B1（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1，异质核核糖核蛋白 A2B1）可以作为乙肝治疗的新靶标蛋白，抑制 HBV 复制，实现 HBsAg 的 100%清除、甚至从肝脏清除 cccDNA。PAC5 是 hnRNPA2B1 的首个小分子激动剂，可显著抑制病毒。在感染野生型和耐药性 HBV 模型小鼠中，口服 PAC5 后，不仅清除了小鼠血液中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)的分泌，实现了乙型病毒性肝炎的功能性治愈，而且显著降低了肝脏组织中的 HBV DNA，cccDNA 和乙型肝炎核心蛋白的合成，有望实现完全治愈。此外，PAC5 在病毒感染小鼠中显示改善肝功能的能力。PAC5 促进 hnRNPA2B1 二聚体的形成及 hnRNPA2B1 从细胞核到细胞质的易位，随后激活 IRF3-TBK1 途径，导致 IFN-α/β表达和分泌的增加和 STAT1/2 磷酸化。进一步，基于结构生物学，我们理性设计和结构优得到了治疗乙肝的原创药，为西南植物药中研发原创药（first-in-class）提供了参加和借鉴。

【关键词】西南植物药，天然小分子，hnRNPA2B1，乙肝病毒，原创药

临床药师参与一例疑似普罗帕酮引起肉眼血尿的病例分析

杨慧[1,2]，张鑫[1]，韩华阳[1]，魏萌[1]

（1 东部战区总医院临床药学科，2 南京鼓楼医院药学部）

心房颤动（房颤）是临床常见的快速性心律失常，导致心房丧失收缩功能，血液容易淤滞于心房而形成血栓，增加发生卒中、心力衰竭和其他心脏相关并发症的风险。普罗帕酮为 IC 类广谱抗心律失常药，主要通过阻断钠通道，降低窦房结自律性，减慢房室传导，延长有效不应期，临床上常用于阵发性室性心动过速及室上性心动过速的治疗，使房颤转复为窦性心律。新型口服抗凝药利伐沙班通过直接抑制 Xa 因子，具有疗效确切，治疗窗宽，出血风险低的优势，已广泛用于非瓣膜性房颤的卒中预防。本文就 1 例房颤合并冠心病的患者，服用利伐沙班抗凝，并使用普罗帕酮控制心律失常后出现肉眼血尿的病例，探讨普罗帕酮可能引起血尿不良反应（Adverse drug reaction, ADR）的机制，为临床安全合理用药提供参考。

1. 病例介绍

1.1 基本情况

患者，男，76 岁，身高 170 cm，体重 70.5 kg。2023 年 2 月 6 日，以“反复心悸 2 年余，再发半天”入院。患者 2020 年 7 月无明显诱因出现心慌、胸闷，至我院就诊，诊断为房颤，于 2020 年 7 月 14 日行房颤射频消融术，规律服用普罗帕酮 0.3 g bid 控制房颤发作，利伐沙班 5 mg qd 抗凝。术后多次复发。2023 年 2 月 6 日早晨上楼梯时出现心悸，伴胸闷，呈阵发性，伴有头晕、模糊，偶有胸痛，无腹痛腹泻，无发热，无咳嗽咳痰等，遂就诊。患者目前精神尚可，体力正常，食欲正常，睡眠正常，体重无明显变化，大便正常，排尿正常。既往有高血压病史 10 年，最高血压 159/99 mmHg，口服乐卡地平 10 mg qd 降压，控制良好；曾右下肢、左肘关节骨折。有吸烟史 10 年，1 包/日，戒烟 8 年；有饮酒史 10 年，3 两/天，戒酒 8 年。

1.2 入院查体

体温 36.2 ℃，脉搏 98 次/分，呼吸 20 次/分，血压 111/73 mmHg。神志清楚，颈静脉无充盈或怒张，两肺呼吸音清，未闻及干湿性啰音，心率 106 次/分，心率绝对不齐，第一心音强弱不等，脉搏短绌，杂音未闻及，腹部平坦，双下肢不肿。

临床诊断：1、阵发性心房颤动；2、高血压 1 级（很高危）；3、冠状动脉硬化性心脏病。

2. 诊疗经过及 ADR 发生过程

入院后，初始治疗给予普罗帕酮注射剂 70mg iv 和普罗帕酮片 0.3g po bid 抗心律失常，利伐沙班片 5 mg po qd 抗凝。普罗帕酮注射剂静推后 1 小时，出现肉眼血尿，尿常规结果显示隐血阳性（+），蛋白阳性（+）。该患者肾功能正常，HAS-BLED 评分为 2 分（出血、年龄>65），提示低出血风险，且利伐沙班剂量为 5 mg qd，抗凝剂量不足，故考虑血尿为其他药物引起的 ADR。临床药师查阅资料，发现普罗帕酮导致血尿的 ADR 报道，建议普罗帕酮注射剂停药，普罗帕酮片减量；医师采纳，入院第 2 天停用普罗帕酮注射剂，普罗帕酮片的剂量调整为 0.15g po bid。入院第 3 天，患者尿色恢复正常。考虑到该患者患有房颤，CHA2DS2-VASc 评分为 2 分（高血压、年龄 65-74 岁），具备抗凝治疗适应症，应进行抗凝治疗，而利伐沙班 5 mg qd 抗凝不足，临床药师建议增加剂量；医师采纳，将抗凝方案调整为利伐沙班 10 mg po qd。患者未再出现出血症状，后病情好转出院。

[1] 作者简介：杨慧，女，药师，从事抗凝方向的临床药学研究，E-mail：yanghui_18@163.com；

通讯作者：魏萌，女，主管药师，从事抗凝方向的临床药学服务与研究，E-mail：carolmeng_0813@163.com。

基金项目：国家自然科学基金青年项目（No.82204720）。

3 重点问题分析

3.1 普罗帕酮引起血尿 ADR 分析

普罗帕酮属于 IC 类抗心律失常药物，通过减慢传导速度，终止折返激动，使房颤转复为窦性心律。普罗帕酮常见的 ADR 包括头痛、头晕、口干、恶心、呕吐、便秘等，有个别病人会出现房室传导阻滞、胆汁淤积性肝损伤等症状。说明书未显示普罗帕酮注射液或盐酸普罗帕酮片会损害造血系统以及引起血尿。本文患者平素无泌尿系统疾病，血、尿常规正常，凝血机制正常，无出血倾向。静注普罗帕酮 70mg iv 后 1 小时出现肉眼血尿，怀疑普罗帕酮的药物 ADR，故进行 Naranjo 评分，得分为 4 分（表 1），表明普罗帕酮治疗和血尿症状可能存在关联。经文献检索，发现 14 篇共 21 例普罗帕酮相关血尿的报道（表 2），所有患者服用普罗帕酮与血尿有明显的时间相关性，在普罗帕酮给药后不久发生血尿，停药后很快停止。因此，对普罗帕酮引起血尿的可能机制进行分析具有重要意义。

表 1 针对该患者的 Naranjo 评分

评价标准	答案	评分
该不良反应之前是否有结论性报告？	否	0
该不良事件是否在使用可疑药物后出现？	是	+2
停药或使用拮抗剂，不良反应是否改善？	是	+1
再次用药，不良反应是否复现？	未知	0
其他原因是否也可引起该不良反应？	是	-1
给予安慰剂，不良反应是否复现？	未知	0
血药浓度是否为中毒浓度？	未知	0
不良反应轻重程度是否与剂量增减有关？	是	+1
患者之前使用该药或相似药物是否发生类似的不良反应？	未知	0
该不良事件是否经过客观检查证实？	是	+1
总分		4 分

3.1.1 普罗帕酮用法用量对血尿的影响

普罗帕酮注射液静注总量不得超过 210 mg，起效后改为静滴或口服维持；盐酸普罗帕酮片最大日剂量 900 mg。在 21 例患者中，共有 20 例患者是在静注普罗帕酮注射液后出现血尿，只有 1 例是口服盐酸普罗帕酮片 150 mg tid 一周内持续血尿；此外 6 例患者入院前曾口服普罗帕酮片，日剂量 450-600 mg，未发现尿血症状，提示普罗帕酮注射液更容易引起血尿。共有 7 例患者静注普罗帕酮注射液剂量较大（达 210 mg），此外另有 4 例患者静注加后续静滴总剂量大于 210 mg，用药后短时间内即出现症状，故不排除血尿与单位时间内的用药剂量相关[1]。本文病例日常服用普罗帕酮片 0.3 g bid，无泌尿系统症状，入院后静注普罗帕酮 70 mg iv 出现肉眼血尿；普罗帕酮注射液停用，普罗帕酮片剂量减半后，血尿症状消失，故应考虑药物剂型、单位时间内用药剂量的影响。

3.1.2 基因型及药物代谢对血尿的影响

值得注意的是，这些病例都来源于中国患者，而未见其他国家报道类似的 ADR，提示该不良反应可能与药物基因组学特性有关。普罗帕酮可以通过两种不同的模式代谢，90%的患者可快速代谢为 5-羟基普罗帕酮（由 CYP2D6 介导）和 N-去丙基普罗帕酮（由 CYP3A4 和 CYP1A2 介导），另外 10%的患者代谢较慢，CYP2D6 活性降低，形成 5-羟基普罗帕酮的能力下降，而普罗帕酮的血药浓度显著升高。基因型不同的患者，在不良反应上存在一定差异。故 CYP2D6 可能是普罗帕酮引起血尿 ADR 的易感基因，检测 CYP2D6 基因型可能有利于解释普罗帕酮引发血尿的机制。

3.1.3 药物相关的免疫性溶血性贫血对血尿的影响

对机体而言，任何药物都属于异物，可能存在一定的抗原性，能够诱发变态反应的发生。药物相关的免疫性溶血性贫血属于免疫复合型溶血反应，少量药物即可诱发急性溶血，病情凶险，但停药后溶血迅速消失。文献指出，产生此种免疫反应与个体差异有关[2]。共 13 例患者既往曾经接受过普罗帕酮治疗，研究人员认为，由于这些患者体质过敏，再次用药时有可能诱发变态反应，产生临床症状，停药后消失[2-8]。本文亦不能排除因个体敏感而导致的药物相关的免疫

性溶血性贫血。

3.1.4 抗栓药对血尿的影响

大多数患者没有同时服用抗凝血药物和抗血小板药物，只有 1 例患者服用达比加群酯 110 mg bid，1 例患者服用阿司匹林 75mg qd，一例患者服用阿司匹林 0.1 g qd 并皮下注射低分子肝素钙 5000U bid。刘会卿等研究显示，停用普罗帕酮注射液及低分子肝素钙后，血尿症状好转，后续重新启动低分子肝素钙 5000U bid 抗凝治疗，未再出现血尿症状[9]。本文患者仅口服利伐沙班 5 mg qd，未服用其他抗凝抗板药物，抗栓剂量不足，且血尿消失后利伐沙班加量至 10 mg qd，未再次出现血尿，故暂不考虑抗栓药是引起血尿的直接原因。Chen 等指出，普罗帕酮及其主要代谢物 5-羟基普罗帕酮和 N-去丙基普罗帕酮为 P-gp 抑制剂，可能会提高达比加群酯活性代谢产物的血清浓度，产生更强的抗凝效果[10]。而利伐沙班也是 P-gp 底物，本文病例患有房颤，推荐利伐沙班抗凝剂量为 20 mg qd，但入院时剂量低至 5 mg qd，出血风险低，药物相互作用不足以引起出血。

3.2 房颤合并冠心病患者的抗凝方案

《冠心病合并心房颤动患者抗栓管理中国专家共识》[11]提出，根据 CHA2DS2-VASc 评分，如稳定性冠心病合并房颤患者具有抗凝指征，推荐应用卒中预防剂量的 OAC 单药治疗；对于无高出血风险的患者可考虑在长期 OAC（如利伐沙班）基础上加用阿司匹林 75～100 mg/d（或氯吡格雷 75 mg/d）；对于适合 NOAC 的患者，推荐 NOAC 优于 VKA。该患者 CHA2DS2-VASc 评分 2 分（高血压，年龄 65-74 岁），具有抗凝指征，且存在出血倾向（肉眼血尿），故推荐应用卒中预防剂量的 OAC 单药治疗。患者肾功能正常，可选择的 NOACs 有利伐沙班、艾多沙班和阿哌沙班。利伐沙班用于降低非瓣膜性房颤患者卒中风险的推荐剂量为 20 mg qd，考虑患者近期出血情况，建议给予 15 mg qd 剂量，服药期间密切观察出血风险。

4 总结

综上所述，本文病例使用普罗帕酮期间出现血尿 ADR，可能的原因包括药物剂型、单位时间内用药剂量，基因型及药物代谢个体差异、药物相关的免疫性溶血性贫血。通过对普罗帕酮引起血尿 ADR 的分析，药师提醒，对于临床上使用普罗帕酮的患者，应从小剂量开始用药，逐渐加量，尽量避免短时间大剂量静脉用药，减少 ADR 发生，并及时进行 ADR 监测。此外，针对普罗帕酮代谢基因 CYP2D6 基因型的检测，或进行药物溶血反应实验，将有助于患者获益。对于服用抗凝药或者抗血小板药的患者，也应常规监测凝血功能，防止抗栓药物引起出血。本次治疗过程中，药师综合考虑患者的用药情况，积极寻找证据，为患者制定合适的个体化治疗方案，保证了患者的用药安全。

表 2 普罗帕酮引起血尿不良反应的报道

年龄	性别	普罗帕酮用法用量	不良反应症状及指标检测	ADR 出现时间	ADR 持续时间	ADR 处置	再次使用普罗帕酮后 ADR	合并用抗栓药	既往普罗帕酮用药史	文献
81	男	150 mg po tid	肉眼血尿，尿隐血阳性，尿蛋白阳性	NA	7 d	停药	NA	达比加群酯 110 mg bid	NA	Chen et al, 2019[10]
34	女	105 mg iv	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），尿蛋白阳性（++）	40 min	1 d	停药	NA	无	70 mg iv	唐聚花等，2012[8]
49	男	140 mg iv	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），尿蛋白阳性（+）	1 h	1 d	停药	NA	无	NA	
27	女	70 mg iv（10 min）	肉眼血尿	40 min	2 d	停药	NA	无	剂量不详	杨廷发等，2011[7]
70	男	70 mg iv（10 min）+ 140 mg ivgtt	肉眼血尿	1 h	2 d	停药，补液	NA	无	剂量不详	
16	男	215 mg iv（30 min）	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），尿蛋白阳性（++）	1 h	3 d	停药，5%葡萄糖加能量合剂 ivgtt	NA	NA	NA	曲艳丽等，2008[2]
45	女	35 mg iv	肉眼血尿	4-6 h	NA	停药	NA	NA	NA	
76	男	105 mg iv	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），尿蛋白阳性（+）	1 h	12 h	停药，补液，停用低分子肝素钙	NA	阿司匹林 0.1 g po qd；低分子肝素钙 5000U 皮下注射 bid	NA	刘会卿等，2007[9]
47	女	140 mg iv（10 min）	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），	50 min	2 d	停药	NA	无	剂量不详	陈牧雷等，2006[3]
57	男	105 mg iv（10 min）	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），	1 h	1 d	停药	NA	无	剂量不详	
70	男	105 mg iv（30 min）+ 140 mg ivgtt	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），	12 h	2 d	停药	NA	无	剂量不详	

85	女	70 mg iv（10 min）+ 210 mg ivgtt	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++),	2.5 h	2 d	停药	NA	无	剂量不详	
45	男	500 mg iv + 140 mg ivgtt	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++）	12 h	1 d	停药	600 mg iv，10 h 后肉眼血尿	NA	150 mg po q8h	徐陵等，2003[12]
59	男	210 mg iv（1 h）	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），尿蛋白阳性（+）	2.5 h	2 d	停药，盐酸异丙嗪 25 mg im，酚磺乙胺 0.5 g im	NA	NA	150 mg po q6h	杨瑞贞等，2003[5]
66	男	150 mg iv（20 min）	肉眼血尿	4 h	1 d	停药	4 d 后 35 mg iv 未发现血尿；15 天后 210 mg iv，尿隐血及蛋白阳性	阿司匹林 75 mg po qd	150 mg po q6h	王兵等，2001[13]
56	男	210 mg iv（10 min）	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），尿蛋白阳性（+++）	30 min	1 d	停药	追踪 2 年余， 70-100mg iv 未再发现血尿	NA	NA	阎建玲等，2000[1]
66	男	140 mg iv	肉眼血尿，尿隐血阳性（++），尿蛋白阳性（++）	1 h	2 d	停药，碱化尿液，利尿补液	NA	NA	150 mg po q8h	梁晓丽等，2000[6]
34	男	140 mg iv（10 min）	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），尿蛋白阳性（++）	30 min	3 h	停药，5%碳酸氢钠 250 ml ivgtt	NA	NA	150 mg po tid	杨建新等，1995[14]
60	男	210 mg iv（22 min）	肉眼血尿，尿隐血阳性（+++），尿蛋白阳性（+）	2 h	3 d	停药，盐酸异丙嗪 25 mg iv，5%碳酸氢钠 250 ml ivgtt	NA	NA	NA	李洪俊等，1994[15]
62	女	210 mg iv（1.5 h）	肉眼血尿，尿隐血阳性（++），尿蛋白阳性（++）	3.5 h	NA	停药	NA	NA	NA	曾昭耆等，1991[4]
62	男	350 mg iv（2.5 h）	肉眼血尿，尿胆原阳性	4.5 h	5 d	停药	1 个月后 350 mg iv，尿隐血及尿胆原阳性	NA	200 mg po q8h 或 q8h	

参考文献

[1] 阎建玲, 唐邦熙. 静脉注射普罗帕酮致一过性血红蛋白尿一例 [J]. 中国循环杂志, 2000, 03): 36.

[2] 曲艳丽. 心律平致血红蛋白尿 2 例 [J]. 现代保健·医学创新研究, 2008, 5(32): 127.

[3] 陈牧雷, 何奇明. 静脉注射心律平引发血尿 4 例的报告 [J]. 中国医药导刊, 2006, 8(6): 441-2.

[4] 曾昭耆, 朱玲. 心律平所致溶血反应 [J]. 中华内科杂志, 1991, 04): 217-8.

[5] 杨瑞贞, 刘梅英. 静脉注射心律平致溶血反应 1 例 [J]. 山东医药, 2003, 43(8): 19.

[6] 梁晓丽, 邵仲英. 静脉注射普罗帕酮致溶血 1 例 [J]. 药物流行病学杂志, 2000, 9(1): 17.

[7] 杨廷发, 王少雄. 普罗帕酮引发肉眼血尿 2 例报告 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(4): 100-.

[8] 唐聚花, 李莉. 静脉注射普罗帕酮致血尿 20 例分析 [J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(16): 91-2.

[9] 刘会卿, 薛铮, 梁芳. 普罗帕酮治疗心律失常引起肉眼血尿 1 例 [J]. 临床荟萃, 2007, 22(5): 356-.

[10] CHEN S, DING W, YE J, et al. Propafenone-associated Gross Hematuria: A Case Report and Review of the Literature [J]. Clin Ther, 2019, 41(8): 1614-20.

[11] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 冠心病合并心房颤动患者抗栓管理中国专家共识 [J]. 中华心血管病杂志, 2020, 48(7): 552-64.

[12] 徐陵, 王青. 大剂量普罗帕酮静注致血尿 [J]. 药物不良反应杂志, 2003, 5(4): 259-60.

[13] 王兵, 李桂荣. 心律平致血红蛋白尿 1 例 [J]. 中国乡村医生, 2001, 06): 43.

[14] 杨建新，沈彦明，邸文会，刘浩德. 静脉注射心律平致血红蛋白尿一例 [J]. 中华血液学杂志, 1995, 04): 217.

[15] 李洪俊. 静脉注射普罗帕酮致血红蛋白尿一例 [J]. 中国循环杂志, 1994, 08): 467.

In vitro study on antitumor activity of aurantiamide acetate extracted from Polygonum capitatum

Yang Jie[1], Zhou Zhonghai[2], Chen Ling[2], Gao Ling[1], Lü Xiaoting[2], Hong Qian[3], Zhu Bin[1], Yang Yang[1,*]

(1. Department of Pharmacy; 2. Department of Clinical Laboratory and Pathology; 3. Department of Disease Prevention and Control, the Affiliated Huaihai Hospital of Xuzhou Medical University / the 71st Group Army Hospital of CPLA Army, Xuzhou, Jiangsu Province 221004, China)

【**ABSTRACT**】Aurantiamide acetate is a dipeptide derivative with antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and analgesic activities. However, its antitumor activity has not been documented. **Objective:** This study aimed to prepare aurantiamide acetate from *Polygonum capitatum* and investigate its antitumor activity *in vitro*. **Methods:** The petroleum ether extract fraction of 80% ethanol extract from *P. capitatum* was separated by silica gel column chromatography. Aurantiamide acetate was obtained and identified by physicochemical properties, MS and NMR spectral data. The inhibitory effect of different doses of this compound on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), human gastric cancer BGC-823 cells, lung cancer A549 cells and colorectal cancer Caco-2 cells was detected by CCK-8 method. Morphological changes of BGC-823 cells were observed under the inverted microscope. The effect of aurantiamide acetate on BGC-823 apoptosis and cycle was detected by flow cytometry. The expression of Bax and caspase-3 in BGC-823 cells was detected by Western blotting. **Results:** Aurantiamide acetate inhibited BGC-823, A549 and Caco-2 cell proliferation at the concentrations from 25 μmol/L to 100 μmol/L, but had no inhibitory effect on HUVECs at the concentrations from 12.5 μmol/L to 100 μmol/L. The inhibitory effect of Aurantiamide acetate was most pronounced on BGC-823 cell proliferation at IC_{50} of 56.73 μmol/L, most probably by increasing the protein expression of caspase-3 and Bax in BGC-823 cells, and arresting cell cycle in G2/M phase. **Conclusion:** This is the first time that we isolated aurantiamide acetate from *P. capitatum with a* purity of 98.21%, and found that Aurantiamide acetate could in inhibit the proliferation of various cancer cell types *in vitro*. This finding may provide a new resource for developing anti-tumor drugs in future.

【**Keywords**】aurantiamide acetate; *Polygonum capitatum*; antitumor activity; proliferation; apoptosis; cell cycle; apoptotic protein

1 Introduction

Aurantiamide acetate (N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-O-acetyl-L-phenylalanol) is a dipeptide derivative with a structure that resembles an endogenous peptide found in both tissues and plasma[1]. It was initially isolated from the nuts of *Piper wallichii* (Miq.) Hand.-Mazz. (also named *Piper aurantiacum* Wall.), the plant of the genus *Piper* in the family Piperaceae[2,3]. Later, researchers also isolated aurantiamide acetate from *Clematis terniflora*, *Portulaca oleracea* and *Baphicacanthus cusia*[4,5,6], and found that it had a specific cytotoxic effect on human malignant glioma U87 cells[4]. It is usually difficult to extract aurantiamide acetate from endogenous substances or plants due to its complex chemical structure and low-polarity. Currently, there is not much research on the antitumor activity and underlying action mechanism of aurantiamide acetate.

Polygonum capitatum Buch.-Ham. ex D. Don is a perennial herb of the genus *Polygonum* (Polygonaceae) mainly existing

*Corresponding author, E-mail: newyyang@smmu.edu.cn.com (Y. Yang);

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5618-3940 (Y. Yang)

in rural areas of Southwest China such as Jiangxi, Hunan, Hubei, Sichuan, and Guizhou provinces and some other Asian countries such as India, Nepal, Bhutan, Burma, and Vietnam[7]. Its leaves and stems can be used as a folk prescription or prepared as a diet[8]. Typically, the whole herb of *P. capitatum* has been used as a Miao ethnomedicine with the effects of clearing heat and removing dampness, detoxifying and relieving pain, harmonizing the blood and removing stasis, and relieving diuresis and drenching[9,10]. So, it has high edible, medicinal and economic value. The main chemical constituents are volatile oils, lignans, flavonoids, and phenolic compounds[11]. We have also commenced the research work on isolating and screening the pharmacological activities of the chemical constitutes from *P. capitatum,* and succeeded in identifying 71 known compounds and one new hydroxyjasmonic acid derivative[12,13,14,15,16,17].

To further investigate the compounds with well-defined pharmacological activities in *P. capitatum* and fully exploit medicinal resources, we intended to prepare aurantiamide acetate from its petroleum ether extract fraction and verify its antitumor activity *in vitro* in the present study.

2 Materials and Methods

2.1 Reagents and instruments

2.1.1 Instruments Instruments used in this study were Quintix 224-1CN electronic analytical balance (Sartorius Corporate, Germany); 1260 high performance liquid chromatograph (HPLC) system, including DAD detector (Agilent Technologies Inc., USA); MAT-212 fast atom bombardment mass spectrometer (Varian Inc., USA); Avance III 600 HD superconducting Fourier nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker Corporation, Switzerland); N-1100 rotary evaporator (Eyela Corporation, Japan); 4011-A2 biosafety cabinet (Qingdao Haier Co., Ltd., China); HF240 CO_2 thermostatic incubator (Shanghai Lishen Scientific Instrument Co., Ltd., China); TE 2000-S inverted microscope (Nikon Corporation, Japan); ST-360 microplate reader (Shanghai Kehua Experimental System Co., Ltd., China); LSR II flow cytometry (Becton, Dickinson and Company, USA); Trans-Blot SD semi-dry Western-blotting film transfer instrument (Bio-Rad Laboratories Co., Ltd., USA); DYY-6C electrophoresis instrument (Beijing Liuyi Biotechnology Co., Ltd., China).

2.1.2 Reagents Reagents used in this study were column chromatography silica gel (100-200 mesh) and thin layer chromatography (TLC) silica gel plates (HSGF254) (Yantai Jiangyou Silica Gel Development Co., Ltd., China; Batch No. 20140610); BD FITC Annexin V apoptosis detection kit (Becton, Dickinson and Company, USA; Batch No. 1271578); cell cycle analysis kit (Suzhou Yueya Co., Ltd., China; Batch No. 20211231); trypsin (Sigma-Aldrich Company Ltd., USA; Batch No. 110M7362V); CCK-8 kit, Bcl-2 antibody and caspase-3 antibody (Beyotime Biotechnology Co., Ltd., China; Batch No.: 112921220128, 071122220818, 03072220930); RPMI-1640 medium, DMEM medium and fetal bovine serum (FBS) (Gibco Inc., USA; Batch No.: 8122046, 8121641 and 2372879P). The ethanol used for extraction is of medical grade, water is purified, and other reagents are analytically pure.

2.1.3 Plant material The whole herbs of *P. capitatum* were purchased in September 2015 from Shibing County in Guizhou Province of China, which was identified by Professor Zhijun WU (Department of Pharmacy, the Affiliated Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of CPLA in Shanghai, China). The voucher specimens (No. 20150901) were deposited in the herbarium of the Pharmacy Department of Changzheng Hospital.

2.1.4 Cells Human gastric cancer BGC-823 cells were purchased from Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, the Chinese Academy of Sciences (Shanghai, China). Human lung cancer A549 cells were donated by the Oncology Department Laboratory of the Affiliated Changzheng Hospital. Human colorectal cancer Caco-2 cells were

purchased from Shanghai Jichun Industrial Co., Ltd. (Shanghai, China). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from Hangzhou Huixing Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou, China.

2.2 Methods

2.2.1 Extraction, separation, structure identification and purity

2.2.1.1 Extraction and separation The dried whole herbs (13 kg) of *P. capitatum* were chopped into smaller pieces, which were then macerated for 24 h and percolated with 80% ethanol solution (260L) at room temperature. An extract (1.9 kg) was yielded after removing the ethanol under reduced pressure. The extract was suspended in water and extracted with petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol (water saturated) in turn. The solvents were recovered to obtain different extract fractions. Then the petroleum ether extract fraction was weighed to 196 g.

The petroleum ether extract fraction (36 g) was separated by silica gel column chromatography (5 cm column diameter, 360 g silica gel of 100~200 mesh) sequentially eluting with the gradient solvent of petroleum ether - ethyl acetate (10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, *v/v*) and pure ethyl acetate to give the same fractions. The petroleum ether - ethyl acetate (2:1) eluting fraction was concentrated and evaporated to dry the solvent. Then it was dissolved with small amounts of petroleum ether and added tiny amounts of ethyl acetate dropwise. After standing, a pale-yellow powder was precipitated. After washing with small amounts of petroleum ether, compound **1** (35 mg) of white powder was acquired.

2.2.1.2 Structure identification A comprehensive analysis technique including physical and chemical methods, ultraviolet (UV), mass spectrometry (MS), ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, and 2D-NMR spectra was applied to identify the structure of compound **1**.

2.2.1.3 Purity detection The purity test of compound **1** was performed by HPLC using chromatographic Diamonsil C_{18}(2) column (5 μ, 250 mm×4.6 mm; Dikma Technology Co., Ltd., Beijing, China) and the peak area normalization method under the following conditions: mobile phase of methanol-water (90:10) with isocratic elution, wavelength at 230 nm, column temperature at 35°C and the flow rate at 1.0 mL/min.

2.2.2 Antitumor activity assay *in vitro*

2.2.2.1 Cell culture HUVECs and Caco-2 cells were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS)**;** BGC-823 cells and A549 cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS in a humidified incubator at 37°C, with 5% (volume fraction) CO_2. Depending on the growth of cells, the corresponding culture medium was supplemented every 1-2 days. When the cell density exceeded 80%, cell passage was performed. Logarithmically grown phase cells were used for subsequent experiments.

2.2.2.2 Preparation of solution 4.44 mg aurantiamide acetate powder was precisely weighed and dissolved in 1 mL dimethyl sulfoxide (DMSO) to prepare a master solution with a concentration of 10μmol/mL, which was divided into 100 μL plastic centrifuge tubes after filtration with the 0.22 μm microporous membrane, and stored in a refrigerator at -80°C. According to the preliminary test results, the parent solution was diluted with a medium solution to a concentration of 0, 12.5, 25, 50, and 100 μmol/L. The diluted samples were stored in a refrigerator for future experiments.

2.2.2.3 CCK-8 assay HUVEC, BGC-823, A549 and Caco-2 cells were respectively passaged twice, and the

concentration of cells in the logarithmic phase was adjusted to 1×10^4/mL, and then seeded into 96-well cell culture plates. The final concentrations (0, 12.5, 25, 50 and 100 μmol/L) of aurantiamide acetate solution were added, with three replicas in each group. After 24- or 48-h incubation in a CO_2 incubator, 20 μL CCK-8 reagent was added to each well, and the culture was continued for 2 h. The optical density (OD) of each group was detected with the enzyme marker at the wavelength of 450nm. The cell proliferation inhibition rate was calculated using the following equation: Cell proliferation inhibition rate (%) = $(OD_{control} - OD_{test}) / (OD_{control}) \times 100\%$[4]. The experiment was repeated three times independently.

2.2.2.4 Cell morphology analysis According to the results of the CCK-8 experiment, 25, 50 and 100 μmol/L three concentration gradients of aurantiamide acetate solution were co-cultured with BGC-823 cells for 48 h for the next experiment. The cell concentration of BGC-823 cells in logarithmic growth phase was adjusted to 1×10^5/mL after digestion with trypsin, and inoculated in a 6-well plate containing 4 mL culture medium per well. After 24-h cultivation, different concentrations (0, 25, 50 and 100 μmol/L) of aurantiamide acetate were added to the culture system for further 48 h, and changes in cell morphology were observed and photographed with the inverted microscope.

2.2.2.5 Cell apoptosis analysis The aurantiamide acetate induction step was basically the same as the experimental method for observing cell morphology. In brief, the cells were co-incubated with aurantiamide acetate at various concentrations for 48 h. After digestion with trypsin, cells were collected for apoptosis analysis. The cells were washed twice with PBS to prepare cell suspension. The cells were suspended with 1 × binding buffer solution and stained with AnnexinV-FITC/PI solution according to the instructions. After 15-min incubation at room temperature in the dark, stained cells were analyzed by flow cytometry. The experiment was repeated three times independently.

2.2.2.6 Cell cycle analysis After 48-h co-incubation with aurantiamide acetate, BGC823 cells were collected, washed and suspended in PBS. According to the instructions, 100 μL reagent A (trypsin) was added. After 10-min incubation at room temperature, 100 μL reagent B (RNase, pancreatic enzyme inhibitor, etc.) was added for another 10 min, and then 150 μL reagent C (PI) was added and continued to incubate for 15 min. Finally, cell population distribution in different phases was detected by flow cytometry, and the results were analyzed by FlowJo10.8 software. The experiment was repeated three times independently.

2.2.2.7 Western blotting The cells were incubated with aurantiamide acetate for 48 h according to the above experimental method. The cells were digested with trypsin, washed with 2 mL PBS, and prepared into cell suspensions. IP protein lysates containing PMSF chloride were added to the collected cell precipitates for cell lysis. After the cells were lysed on ice for 30 min, the protein supernatant was collected by centrifugation under low temperature conditions of 4°C. The protein concentration of each sample was detected using BCA protein quantitative determination. The protein samples from each group were subjected to electrophoresis, membrane transfer, blockage with QuickBlock™ blocking solution (TBSTx), incubation with the primary and secondary antibodies, color development with BCIP/NBT staining working solution, and washing with distilled water for 1-2 times to terminate the color development reaction. The expression of proapoptotic related proteins Bax and caspase-3 was detected using Western blotting, and protein blotting image analysis was performed using Image J 1.53 software. The experiment was repeated three times independently.

2.3 Statistical analysis

The experimental data are expressed as the mean ± standard deviation (SD). Statistical graphs were drawn using GraphPad Prism 8.0 software, and data were analyzed using SPSS 21.0 Statistics software. Statistically significant differences between groups were analyzed by one-way ANOVA, Pairwise comparisons between groups were performed using the *Dunnett-t* test. Examination of the level of α= 0.05, *P* values <0.05 was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Results of structure identification and purity detection

3.1.1 Results of structure identification Compound **1**: white powder; dissolved in chloroform, methanol. ESI-MS: *m/z* 445.2$[M+H]^+$, 443.2$[M-H]^-$. The molecular formula is $C_{27}H_{28}N_2O_4$ and the molecular weight is 444.2. ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$), δ: 7.75 (2H, d, *J*=7.8 Hz, H-2″, H-6″), 7.54 (1H, t, *J*=7.2 Hz, H-4″), 7.44 (2H, d, *J*=7.2 Hz, H-3″, H-5″), 7.28 (4H, m, H-3, H-5, H-3′, H-5′), 7.24 (1H, m, H-4), 7.18 (2H, m, H-2, H-6), 7.14 (1H, m, H-4′), 7.09 (2H, m, H-2′, H-6′), 7.07 (1H, m, N′-H), 6.56 (1H, d, *J*=8.4 Hz, N-H), 4.93 (1H, q, *J*=7.2 Hz, H-8′), 4.39 (1H, dddd, *J*=4.2, 4.8, 6.6, 7.8 Hz, H-8), 3.95 (1H, dd, *J*=4.8, 11.4 Hz, H-9), 3.90 (1H, dd, *J*=4.2, 11.4 Hz, H-9), 3.26 (1H, dd, *J*=6.6, 13.2 Hz, H-7′), 3.15 (1H, dd, *J*=7.8, 13.2 Hz, H-7′), 2.80 (1H, dd, *J*=6.6, 13.8 Hz, H-7), 2.75 (1H, dd, *J*=7.8, 13.8 Hz, H-7), 2.04 (3H, s, H-7″). ^{13}C-NMR (150MHz, $CDCl_3$), δ: 170.7 (C-1‴), 170.5 (C-9′), 167.1 (C-7″), 136.7 (C-1), 136.6 (C-1′), 133.6 (C-1″), 131.8 (C-4″), 129.3 (C-3, C-5), 129.0 (C-2′, C-6′), 128.6 (C-3″, C-5″), 128.5 (C-2, C-6), 128.5 (C-3′, C-5′), 127.1 (C-2″, C-6″), 127.0 (C-4), 126.6 (C-4′), 64.5 (C-9), 54.9 (C-8′), 49.4 (C-8), 38.5 (C-7′), 37.4 (C-7), 20.7 (C-2‴).

The above spectral data were basically the same as those reported in the literature[18]. Compound **1** was identified as aurantiamide acetate. Its molecular structure is shown in **Figure 1**. MS and NMR spectra are shown in Supplementary Material **Figure S1-S8**.

This was the first time that we isolated aurantiamide acetate from *P. capitatum*.

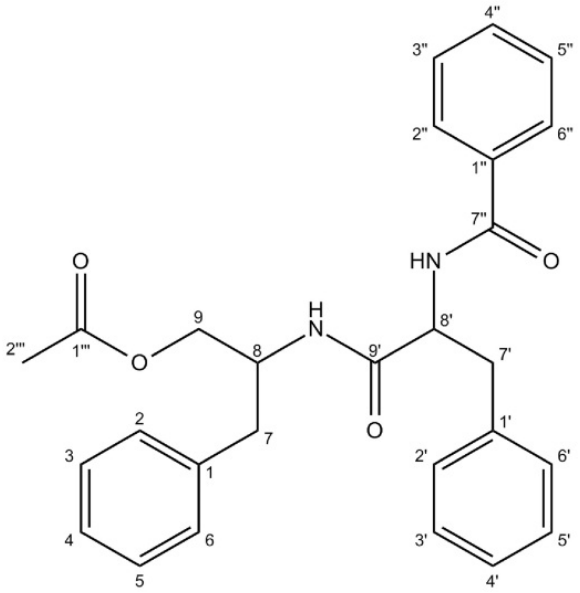
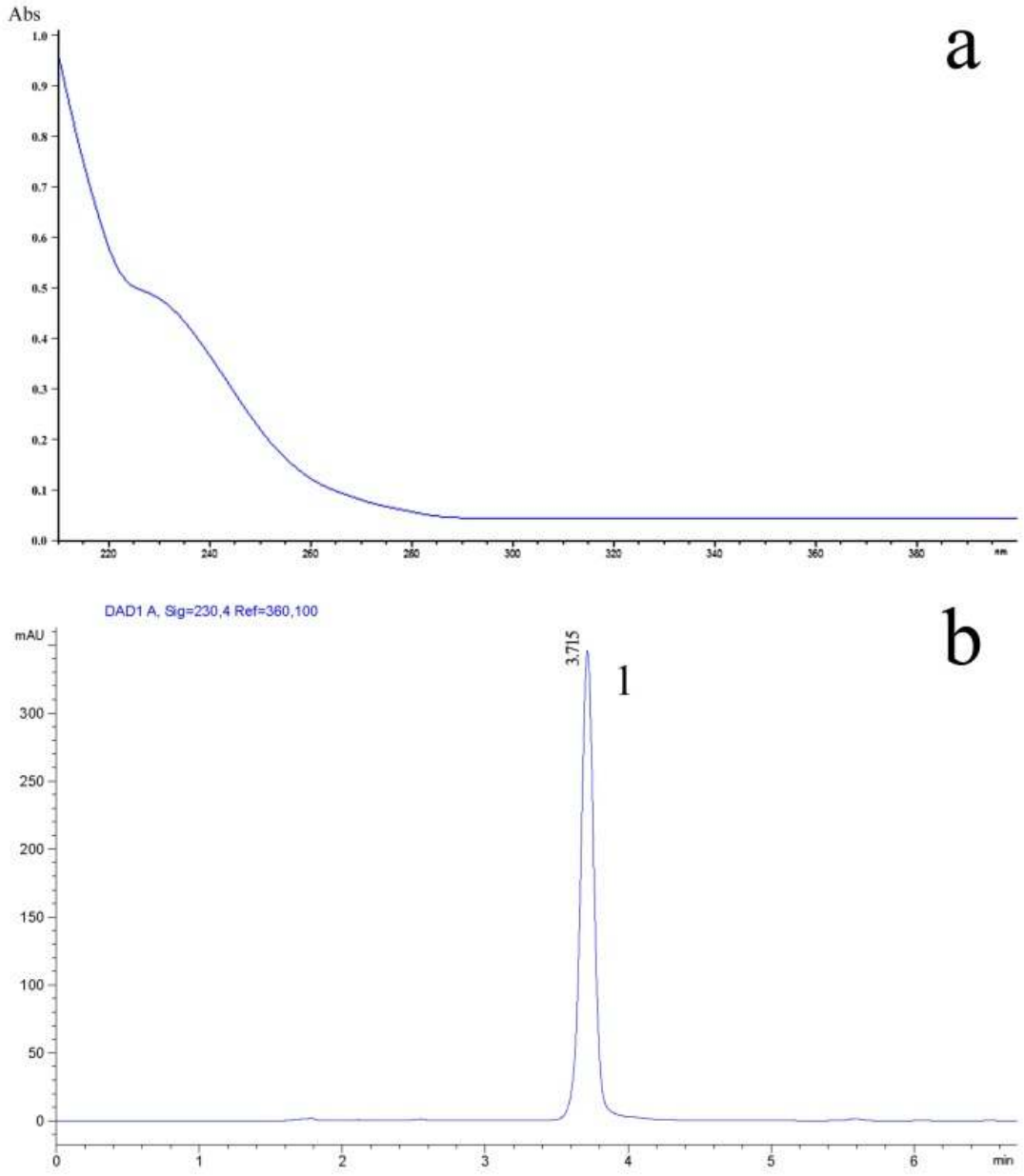


Figure 1 Molecular structure of aurantiamide acetate.

3.1.2 Results of purity detection The purity of aurantiamide acetate in compound **1** powder was 98.21%. Its UV spectrum and HPLC graph are shown in **Figure 2**.

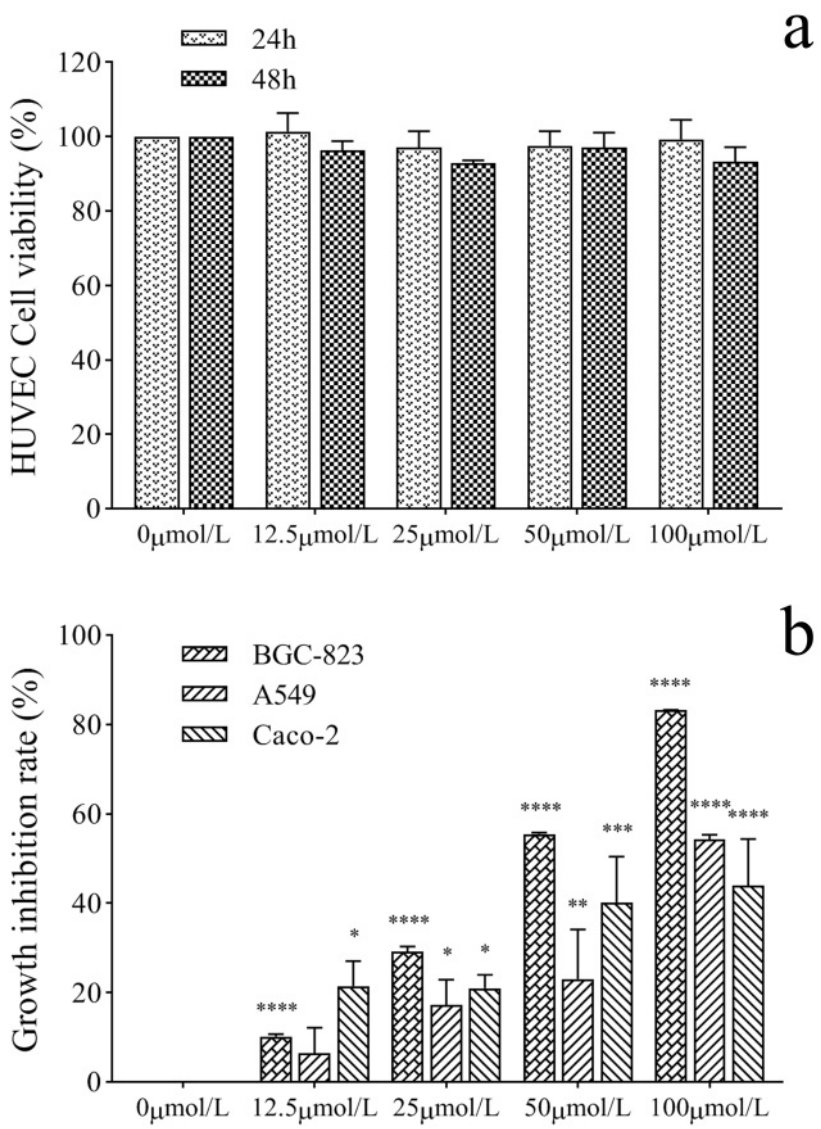


(a) UV spectrum graph. (b) HPLC graph. 1. aurantiamide acetate.

Figure 2 UV spectrum and HPLC graph of aurantiamide acetate.

3.2 Results of antitumor activity assay *in vitro*

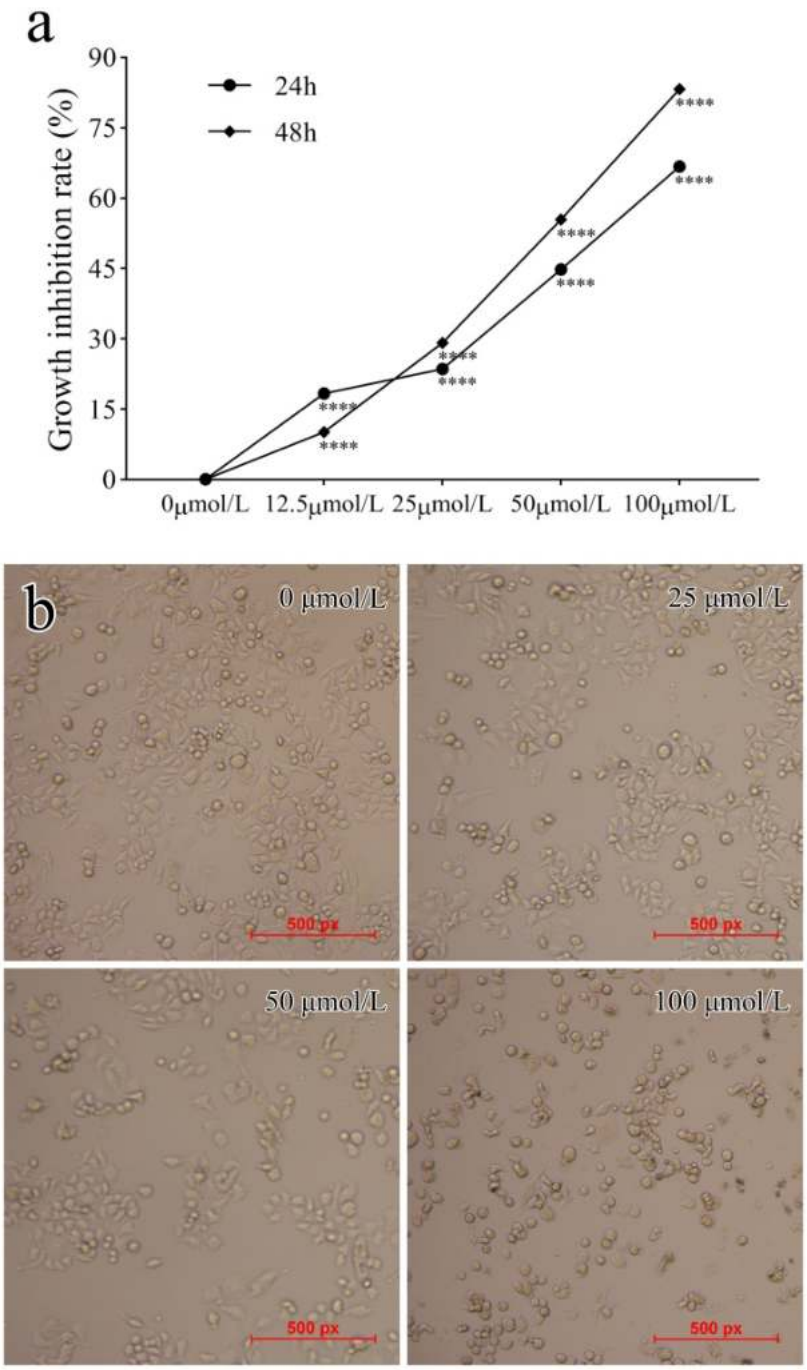
3.2.1 Inhibition of tumor cell proliferation After 48 h incubation, inhibitory activity was most pronounced in BGC-823 cells. Compared with 0 μmol/L group, the inhibition rate of BGC-823 cell proliferation in 12.5 μmol/L, 25 μmol/L, 50 μmol/L and 100 μmol/L aurantiamide acetate groups was significantly increased (all $P<0.0001$). Its IC_{50} was 56.73 μmol/L. Compared with 0μmol/L group, the inhibition rate of A549 cell proliferation in 25 μmol/L, 50 μmol/L and 100 μmol/L groups was significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.0001$, respectively). Compared with 0 μmol/L group, the inhibition rate of Caco-2 cell proliferation in 12.5 μmol/L, 25 μmol/L, 50 μmol/L and 100 μmol/L groups was significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ and $P<0.0001$, respectively). However, after 24 h and 48 h incubation, aurantiamide acetate had no inhibition on HUVEC cells proliferation ($P>0.05$). The results are shown in **Figure 3**.



(a) Aurantiamide acetate had no inhibition on HUVEC proliferation after 24- and 48-h incubation. (b) After 48-h co-incubation, aurantiamide acetate exhibited varying degrees of inhibitory effects on BGC-823, A549 and Caco-2 cells in a dose-dependent manner. Compared with 0 μmol/L group: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

Figure 3 Inhibitory effect of aurantiamide acetate on HUVEC proliferation in different culture durations and various human cancer cells after 48-h culture (n=3).

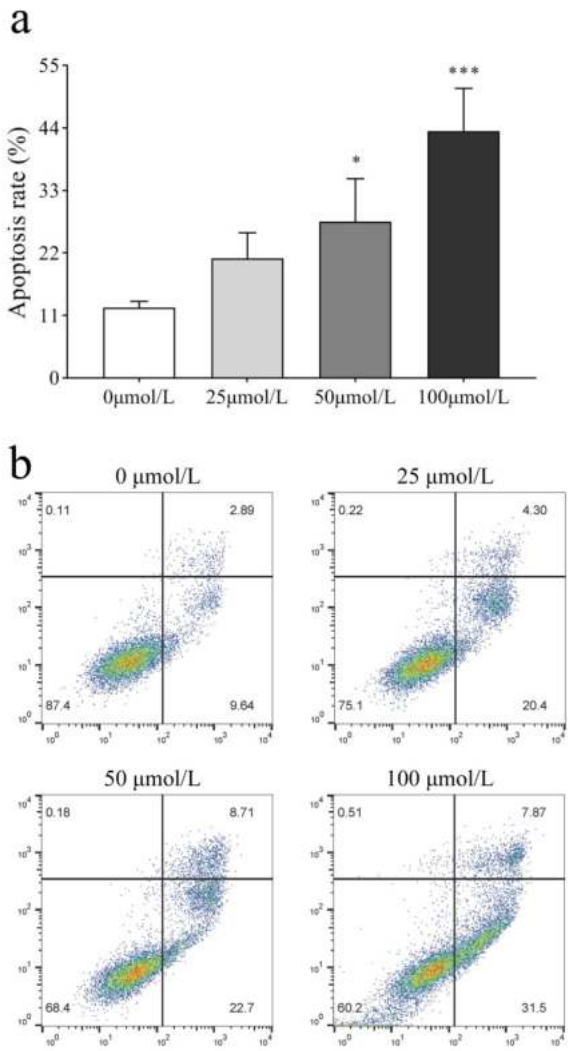
3.2.2 Morphological changes and proliferation inhibition of BGC-823 cells After 48 h incubation, BGC-823 cells in 0 μmol/L group showed favorable growth state, spindle-shaped iso-polygon, solid adhesion and elevated density, BGC-823 cells in the 25 μmol/L, 50 μmol/L and 100 μmol/L aurantiamide acetate groups became round and smaller, the nuclei was concentrated, the cell density was small, the adherent wall was loose, and there were floating cells, apoptotic bodies appeared around, showing obvious apoptotic characteristics. The apoptotic characteristics of 100 μmol/L group were the most obvious. Compared with 0 μmol/L group, after 24 and 48 h incubation, the proliferation inhibition rates of BGC-823 cells in 12.5 μmol/L, 25 μmol/L, 50 μmol/L and 100 μmol/L aurantiamide acetate groups were significantly increased (all P<0.0001). In the range of 25 μmol/L to 100 μmol/L, the inhibition of cell proliferation showed a time-dependent and dose-dependent effect. The results are shown in **Figure 4**.



(a) Inhibitory effect of aurantiamide acetate on BGC-823 cell proliferation for different culture durations (n=3). Compared with 0 μmol/L group, ****P<0.0001. (b) After 48-h incubation with different concentrations of aurantiamide acetate, BGC-823 cells showed apoptotic morphological characteristics under the inverted microscope (100×), and apoptosis became more pronounced with the concentration increasing.

Figure 4 Aurantiamide acetate inhibits BGC-823 cell proliferation and induces apoptosis.

3.2.3 BGC-823 cells apoptosis After 48-h incubation, the apoptosis rate of BGC-823 cells in 50 μmol/L and 100 μmol/L groups increased significantly in a dose-dependent manner as compared with that in 0 μmol/L group (P<0.05 and P<0.001), demonstrated that aurantiamide acetate inhibited BGC-823 cell proliferation by inducing apoptosis. The details are shown in **Figure 5**.



(a) BGC-823 cell apoptosis (n=3). Compared with 0 μmol/L group, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$. (b) Anexin V/PI staining flow cytometry.

Figure 5 Effect of aurantiamide acetate on BGC-823 cell apoptosis.

3.2.4 Cell cycle of BGC-823 cells After 48-h incubation, the proportion of G0/G1 BGC-823 cells was significantly decreased in 100 μmol/L group as compared with that in 0 μmol/L group ($P<0.01$). The proportion of BGC-823 cells in S phase was significantly decreased, while the proportion of BGC-823 cells in G2/M phase was significantly increased in 25 μmol/L, 50 μmol/L and 100 μmol/L groups (all $P<0.0001$). All these results showed that aurantiamide acetate inhibited cell proliferation by arresting cells in G2/ M phase. The details are shown in **Table 1** and **Figure 6**.

Table 1 Effect of aurantiamide acetate on BGC-823 cell cycle (n=3).

Group	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
0 μmol/L	59.61±0.56	35.33±1.25	4.54±0.45
25 μmol/L	54.14±1.40	26.23±0.58****	20.45±1.84****
50 μmol/L	52.71±0.49	26.28±1.57****	21.93±1.05****
100 μmol/L	47.29±6.11**	22.00±1.56****	27.34±1.05****

Compared with 0 μmol/L group, $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$.

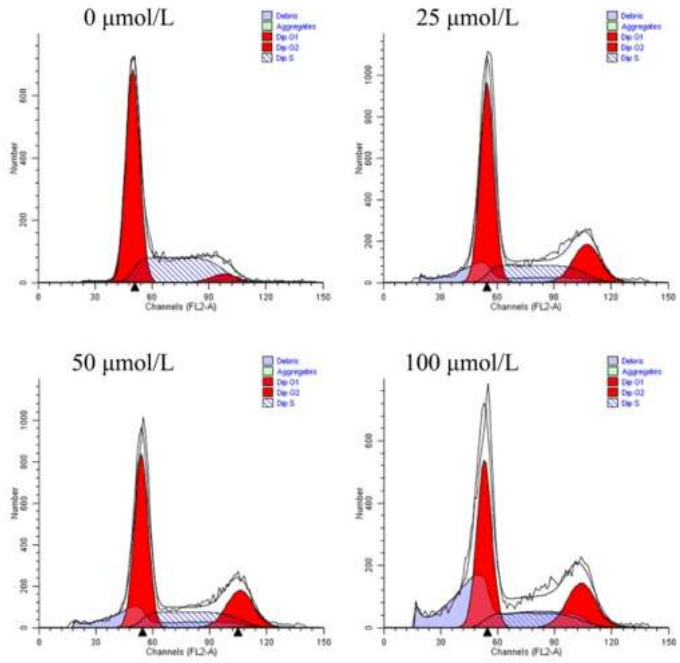
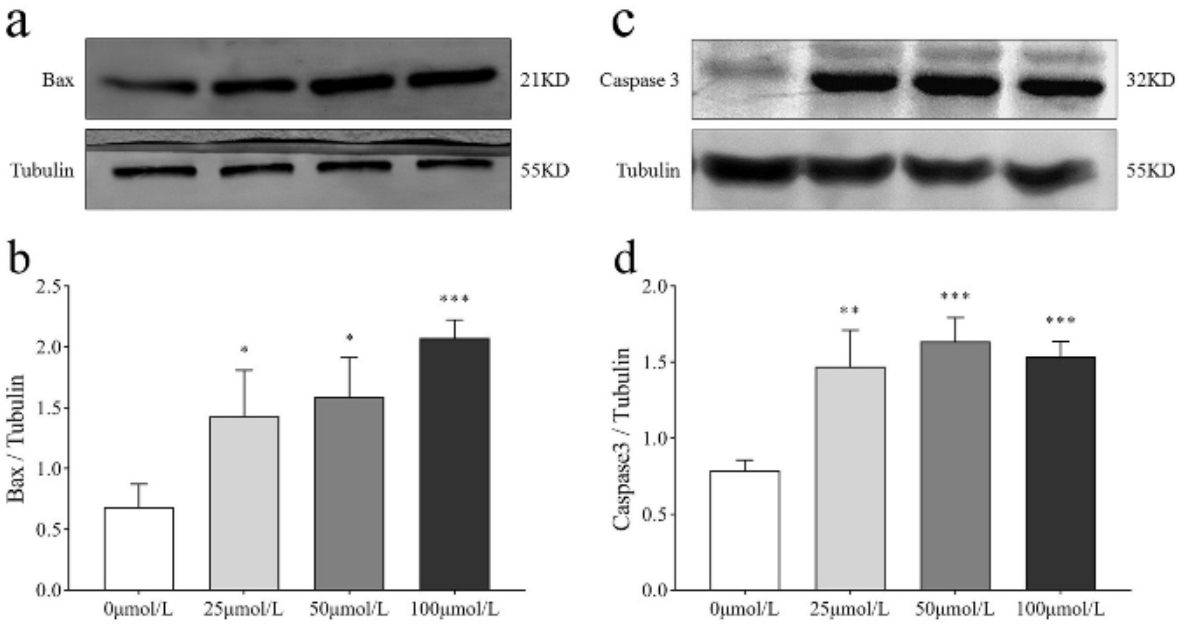


Figure 6 Effect of aurantiamide acetate on BGC-823 cell cycle by flow cytometry.

3.2.5 Protein expression of caspase and Bax in BGC-823 cells After 48-h incubation with aurantiamide acetate, caspase-3 and Bax protein expression in BGC-823 cells was markedly upregulated. Compared with 0 μmol/L group, the protein expression ratios of caspase-3 and Bax to Tubulin in BGC-823 cells were significantly higher than those in the control group in a dose-dependent manner, and this effect was especially pronounced at the concentrations of 50μmol/L and 100μmol/L. (P<0.001). The results are shown in **Figure 7**.



(a) Bax protein blotting. (b) Bax protein expression. Compared with 0 μmol/L group, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001. (c) Caspase-3 protein blotting. (d) Caspase-3 protein expression. Compared with 0 μmol/L group, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001.

Figure 7 Effect of aurantiamide acetate on BGC-823 cell protein expression (n=3).

4 Discussion

Malignant tumors are a significant factor in hindering the extension of human life expectancy, causing a serious social burden[19,20]. According to the latest global cancer burden data for 2020 provided by the International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization, China has the highest number of new cases and deaths in the world[21]. In 2022, lung cancer, colorectal cancer and stomach cancer are expected to be the top three new malignancies in China, with the total number of new cases about twice as high as in the United States. Lung cancer, liver cancer and stomach cancer are the top three expected deaths, with a combined death rate about five times that in the United States. The prevention and control of malignant tumors still face great challenges in China[22]. In recent years, tumor resistance to various chemotherapy drugs and targeted drugs has increasingly become a major issue in oncology treatment[23]. Vincristine, paclitaxel, camptothecin, podophyllin and other chemical components isolated from medicinal plants have been shown to have significant antitumor activities and have been widely used in clinical therapy[24].

Aurantiamide acetate is a dipeptide derivative originally isolated from the plant of *Piper wallichii*. It has many pharmacological activities such as antibacterial[25], antiviral[6], anti-inflammatory[18,26,27] and analgesic activities[28,29]. Aurantiamide acetate was shown to induce ultrastructural changes, and increase the number of autophagosomes and autolysomes in human malignant glioma U87 cells. Intratumoral injection of aurantiamide acetate was shown to inhibit tumor growth and increase the number of autophagic vacuoles in tumor-bearing naked mice[4]. However, there have been few studies on the effects of aurantiamide acetate on the proliferation and apoptosis of other tumor cells. It was reported that polyphenolic compound davidiin from *P. capitatum* has antitumor activity and can inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma cell lines[30]. The extract solution of *P. capitatum* at concentrations above 128 μg/mL could significantly inhibit the growth of logarithmic GES-1 cells[31]. In the process of screening for the antitumor active ingredients of *P. capitatum*, we isolated aurantiamide acetate from the oil ether extract of *P. capitatum.* To the best of our knowledge, this is for the first time that aurantiamide acetate was isolated from *P. capitatum*.

Cell proliferation is an important mechanism for the growth, development and regeneration of organisms, while cell hyperproliferation is an essential process for the development and progression of malignant tumors. The cell cycle is regulated by a complex regulatory network, which ensures that all stages of the cell cycle follow the correct procedures[32,33]. Apoptosis, a "programmed" cell death process that directly determines "fate" of cells[34,35], is a common mechanism by which various anticancer drugs lead to tumor cell death[36]. Regulation of the tumor cell cycle and induction of apoptosis have become important directions in the development of antitumor drugs. In this experiment, we first investigated the inhibitory effect of aurantiamide acetate on the proliferation of gastric cancer BGC-823, lung cancer A549 and colorectal cancer Caco-2 cells. The results showed that 25 μmol/L~100 μmol/L aurantiamide acetate could inhibit the proliferation of the above three human tumor cells *in vitro*, and has the most significant inhibitory activity on the proliferation of BGC-823 cells. On the other hand, it is exciting to find that HUVEC, as a normal human control cell, did not show significant growth inhibition effect under the same drug concentration conditions. Subsequently, we further investigated whether inhibition of BGC-823 cell proliferation by aurantiamide acetate was associated with induction of apoptosis and alteration of cell cycle. Changes in cell morphology can be used for initial observation and judge whether apoptosis occurs[37]. In this study, we co-cultured BGC-823 cells with a diluted concentration of aurantiamide acetate for 48 h. With the increase of the drug concentration, BGC-823 cells showed typical apoptotic features, such as cell shrinkage, nuclear pyknosis, and apoptotic bodies, and the apoptosis rate was significantly increased. In addition, there are two main pathways of cell apoptosis: mitochondrial apoptotic pathway or internal pathway, death receptor pathway or external pathway[38]. Bax is a member of Bcl-2 family and a typical apoptosis-promoting protein[39]. In the mitochondrial pathway, Bax can change the permeability of the mitochondrial

membrane, promote the release of mitochondrial cytochrome C and other apoptotic activators, conduct cell death signals, affect the cell status, determine cell life and death[40], and induce caspase pathway cascade reaction[41]. Caspase-3 is the most important terminal cleavage enzyme in the process of apoptosis, and plays a key role in the initiation and execution of apoptosis[42,43]. Upon activation of caspase-3, an intracellular death process is initiated. Western blotting showed that the administration of 25 μmol/L ~100 μmol/L aurantiamide acetate significantly promoted the expression of Bax and caspase-3 protein in BGC-823 cells. Our subsequent morphology and Western blotting experiments further demonstrated that aurantiamide acetate had a good effect on promoting apoptosis in BGC-823 cells.

Many experiments have shown that the induction of apoptosis by cell cycle arrest can effectively inhibit the proliferation of tumor cells. The cell cycle effect experiment in this study demonstrated that BGC-823 cells in the G0/G1 and S phases were reduced and arrested in the G2/M phase after co-culture with the appropriate concentrations of aurantiamide acetate, suggesting that aurantiamide acetate induced apoptosis of BGC-823 cells by blocking them in the G2/ M phase.

In summary, it was for the first time that we isolated aurantiamide acetate of high purity from the petroleum ether extract of 80% ethanol extract of *P. capitatum*. It was found that aurantiamide acetate had a strong inhibitory effect on the proliferation of human gastric cancer BGC-823 cells, primarily by altering the cell cycle and promoting apoptosis. This new finding may enrich the database of chemical composition of *P. capitatum*, expand the application range of the aurantiamide acetate, and tentatively elucidate its antitumor activity *in vitro*. However, further research is needed to determine whether aurantiamide acetate has a similar inhibitory effect on other tumors and clarify related molecular mechanisms.

Acknowledgements

This work was supported by Xuzhou Medical Young Talents Project (XWKJ2015-7) and the Science and Technology Talent Development Project of CPLA Army (ZG2019-174).

Disclosure statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Supplementary materials (Omitted)

References

[1] Fang ZY, Fang J, Gao CX, *et al*. Aurantiamide acetate ameliorates lung inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *BioMed Res Int*, 2022, 2022: 3510423.

[2] Banerji A, Das R. Aurantiamide & aurantiamide acetate: new amides from *Piper aurantiacum* wall. *Indian J Chem B*, 1975, 13: 1234-1236.

[3] Banerji A, Ray R. Aurantiamides: A new class of modified dipeptides from *Piper aurantiacum. Phytochemistry*, 1981, 20(9): 2217-2220.

[4] Yang Y, Zhang LH, Yang BX, *et al*. Aurantiamide acetate suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* by inhibiting autophagic flux. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(5): 1055-1064.

[5] Chen LJ, Liu Y, Jia DC, *et al*. Pharmacokinetics and biodistribution of aurantiamide and aurantiamide acetate in rats after oral administration of *Portulaca oleracea* L. extracts. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(17): 3445-3455.

[6] Zhou BX, Yang ZF, Feng QT, *et al*. Aurantiamide acetate from *Baphicacanthus cusia* root exhibits antiinflammatory and

anti-viral effects via inhibition of the NF-κB signaling pathway in Influenza A virus-infected cells. *J Ethnopharmacol*, 2017, 199: 60-67.

[7] Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. *Flora of China*. Beijing: Science Press. 1998, vol. 25(1), pp. 57-58.

[8] Huang WY, Cai YZ, Xing J, *et al*. Comparative analysis of bioactivities of four *Polygonum* species. *Planta Med*, 2008, 74(1): 43-49.

[9] Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. *Dictionary of Chinese herbal medicine*. (2nd ed.). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 2006, pp. 850-850.

[10] Pharmaceutical Administration of Guizhou Province. *Chinese crude drug and ethnic drug quality standard of Guizhou province* (1st ed.). Guiyang: Guizhou Science and Technology Press. 2003, pp. 147-147.

[11] Yang Y, Hong Q, Zhu B, *et al*. *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don: A review of its phytochemistry. *Food Sci Technol-Brazil*, 2022, 42: e110021.

[12] Yang Y, Cai F, Yang Q, *et al*. Study on chemical constituents of *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don (I). *Acad J Second Military Med Univ*, 2009, 30(8): 937-940.

[13] Yang Y, Yang YB, Zhu B, *et al*. Chemical Constituents of *Polygonum capitatum* Ⅱ. *Chin J Exp Tradit Med Formula*, 2011, 17(23): 92-94.

[14] Yang Y, Wu ZJ, Chen WS. Chemical constituents of *Polygonum capitatum*. *Chem Nat Compd*, 2015, 51(2): 332-335.

[15] Huang GH, Gao Y, Wu ZJ, *et al*. Chemical constituents from *Polygonum capitatum* Buch-Ham. ex D. Don. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 59: 8-11.

[16] Yang Y, Yang YB, Lu WQ, *et al*. A new hydroxyjasmonic acid derivative from *Polygonum capitatum*. *Chem Nat Compd*, 2017, 53(3): 417-421.

[17] Yang Y, Wang ZP, Gao SH, *et al*. Alkyl glycosides from n-butanol fraction of *Polygonum capitatum* Herbs. *J Chin Med Mater*, 2017, 40(8): 1846-1848.

[18] Yoon CS, Kim DC, Lee DS, *et al*. Anti-neuroinflammatory effect of aurantiamide acetate from the marine fungus *Aspergillus* sp. SF-5921: Inhibition of NF-κB and MAPK pathways in lipopolysaccharide-induced mouse BV2 microglial cells. *Int J Immunopharmacol*, 2014, 23: 568-574.

[19] Liu ZC, Li ZX, Zhang Y, *et al*. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2020. *J Multidiscip Cancer Manag*, 2021, 7(2): 1-13.

[20] Xia CF, Dong XS, Li H, *et al*. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin Med J*, 2022, 135(5): 584-590.

[21] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al*. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[22] Yin ZY, Wang MY, You WC, *et al*. Interpretation on the report of American cancer statistics, 2022 and comparison of cancer prevalence in China and America. *J Multidiscip Cancer Manag*, 2022, 8(2): 54-62.

[23] Esfahani K, Elkrief A, Calabrase C, *et al*. Moving towards personalized treatments of immune-related adverse events. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(8): 504-515.

[24] Chen FQ, Li JQ, Wang H, *et al*. Anti-tumor effects of Chinese medicine compounds by regulating immune cells in microenvironment. *Front Oncol*, 2021, 11: 746917.

[25] Ferreira EO, Salvador MJ, Pral EMF, *et al*. A new heptasubstituted (E)-aurone glucoside and other aromatic compounds of *Gomphrena agrestis* with biological activity. *Z Naturforsch C*, 2004, 59(7-8): 499-505.

[26] Isshiki K, Asai Y, Tanaka S, *et al*. Aurantiamide acetate, a selective cathepsin inhibitor, produced by *Aspergillus penicilloides*. *Biosci Biotech Bioch*, 2001, 65(5): 1195-1197.

[27] Wang HW, Gao SF, Li JM, *et al*. Hybrids of aurantiamide acetate and isopropylated genipin as potential anti-inflammatory

agents: The design, synthesis, and biological evaluation. *Chem Bio Drug Des*, 2020, 97(4): 797-808.
[28] Suhas R, Channe GD. Structure-based rationale design and synthesis of aurantiamide acetate analogues-towards a new class of potent analgesic and anti-inflammatory agents. *Chem Bio Drug Des*, 2012, 79, 850-862.
[29] Liu XB, Yang BX, Zhang L, *et al*. An *in vivo* and *in vitro* assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of *Clematis terniflora* DC. extract, participation of aurantiamide acetate. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 287-294.
[30] Wang Y, Ma JY, Chow SC, *et al*. A potential antitumor ellagitannin, davidiin, inhibited hepatocellular tumor growth by targeting EZH2. *Tumor Bio*, 2014, 35: 205-212.
[31] Wen LN, Luo ZX, Zhang S, *et al*. Study on cytotoxicity of *Polygonum capitatum* in gastric epithelial cells GES-1 in vitro. *Guizhou Med J*, 2014, 38(10): 878-880.
[32] DiazMoralli S, TarradoCasteliarnau M, Miranda A, *et al*. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(2): 255-271.
[33] Palmisano A, Zámborszky J, Oguz C, *et al*. Molecular network dynamics of cell cycle control: periodicity of start and finish. In: Banfalvi G (eds). Cell Cycle Synchronization. *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press. 2017, vol. 1524, pp. 331-349.
[34] Xiong SB, Mu TY, Wang GW, *et al*. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein Cell*, 2014, 5(10): 737-749.
[35] Xu P, Wu Q, Lu DY, *et al*. A systematic study of critical miRNAs on cells proliferation and apoptosis by the shortest path. *BMC Bioinformatics*, 2020, 21: 396.
[36] Croce CM, Reed JC. Finally, an apoptosis-targeting therapeutic for cancer. *Cancer Res*, 2016, 76(20): 5914-5920.
[37] Chen YQ, Zheng L, Liu JQ, *et al*. Mechanism of PC-3 Cells Apoptosis Induced by Shikonin. *Chin J Exp Tradit Med Formula*, 2016, 22(16): 159-162.
[38] Qian YF, Shi CY, Cheng C, *et al*. Ginger polysaccharide UGP1 suppressed human colon cancer growth via p53, Bax/Bcl-2, caspase-3 pathways and immunomodulation. *Food Sci Hum Wellness*, 2023, 12(2): 467-476.
[39] Roset R, Ortet L, Gil-Gomez G. Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. *Front biosci*, 2007, 12(20): 4722-4730.
[40] Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, *et al*. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol*, 1993, 4(6): 327-332.
[41] Muscari I, Adorisio S, Liberati AM, *et al*. Bcl-xL overexpression decreases GILZ levels and inhibits glucocorticoid-induced activation of caspase-8 and caspase-3 in mouse thymocytes. *J Transl Autoimmun*, 2020, 3: 100035.
[42] Liu YK, Chen KH, Leu YL, *et al*. Ethanol extracts of *Cinnamomum kanehirai* Hayata leaves induce apoptosis in human hepatoma cell through caspase-3 cascade. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 99-109.
[43] Iwai N, Yasui K, Tomie A, *et al*. Oncogenic miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma. *Int J Surg Oncol*, 2018, 53(1): 237-245.

基于二维码技术在门诊药学服务中的应用研究

杨敏[1]，张玮[2]

海南省妇女儿童医学中心，海南 海口 570100

海南医学院第一附属医院，海南 海口 570100

【摘要】目的：构建基于二维码的门诊用药指导科普体系，通过多维度创作助力药师药学服务延伸，同时为门诊患者提供高效的药学服务，降低用药风险。方法：以科普为基础，以药师为主导，从内容精细化、服务标准化、输出多元化以及药师科普队伍建设制度化 4 个方面着手，构建门诊用药指导科普体系。同时与医院 His 系统对接，实现门诊处方与二维码用药指导融合。结果：构建的门诊用药指导科普体系，可以实现药师药学科普“放进去”和“取出来”的知识与数据双驱动，培养药师转型的同时，助力了专科门诊诊疗服务。结论：通过构建基于二维码的门诊用药指导科普体系，使药学服务精细化、同质化、有形化、价值可衡量，助力药师药学服务的转型和升级,在门诊诊疗管理和药物治疗方面具有推广性和实践意义。

【关键词】药学服务；科普体系；二维码；信息化；药师技能培训

Research on Application of QR Code technology in outpatient pharmaceutical care

Yang Min, Zhang Wei

Hainan Women and Children’s Medical Center;Department of Pharmacy,Hainan Haikou 570100

The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University;Department of Pharmacy, Hainan Haikou 570100

【Abstract】 **Objective:** To construct a popular science system for outpatient medication guidance based on QR Code, to help pharmacists extend pharmaceutical care through multi-dimensional creation, and at the same time to provide efficient pharmaceutical care for outpatient patients and reduce medication risks. **Methods**: Based on popular science and dominated by pharmacists, a popular science system for outpatient drug guidance was constructed from four aspects: fine content, standardized service, diversified output and the construction and institutionalization of popular science team of pharmacists. At the same time, it can connect with His system of the hospital to realize the integration of outpatient prescription and QR Code medication guidance. **Results**: The construction of outpatient drug guidance and popularization system can realize the dual drive of "putting in" and "taking out" of knowledge and data for pharmacists' popularization of pharmaceutical science, which helps to train pharmacists' transformation and at the same time help specialist outpatient diagnosis and treatment services. **Conclusion:** The establishment of the QR Code-based outpatient medication guidance and popularization system makes pharmaceutical care refined, homogenized, tangible and measurable in value, helps the transformation and upgrading of pharmaceutical care for pharmacists, and has popularization and practical significance in outpatient diagnosis and treatment management and drug therapy.

【Key words】Pharmaceutical care; Science popularization system; QR Code; Imatization ; Pharmacist skill

一、引言

1.研究问题

门诊药房是药师同患者直接接触的窗口，是患者就医过程的最后环节[1-3]。药师如何运用专业知识，向患者提供科学的、与用药有关的服务，保障患者用药安全、优化患者治疗效果和节约治疗费用，并发现和解决与患者用药的相关问题，是目前药师药学服务转型和升级急需解决的问题。

2.研究背景

世界卫生组织发布数据显示，不合理用药已经成为当今全球的第四号杀手，全球 1/3 的患者死于用药不当。与药物不良事件相关的费用 1360 亿/年[4]，费用支出超过心血管疾病和糖尿病。

美国药品研究机构报告：3.7%的患者经历了临床相关的不良反应，其中 20%与药物相关。我国的不合理用药状况亦相当严重，调查显示“不合理用药占用药者的 12%～32%” [5]。

《健康中国 2030 规划纲要》[6]将健康生活普及放在了首要位置。强调了健康教育的重要性。习近平总书记在全国科技创新大会上提出了“科技创新和科学普及是实现创新发展的一体两翼，要把科学普及放在与科技创新同等重要位置”的重要指示。国务院《“十三五”国家药品安全规划》[7]中也提出了立体化科普宣传计划，以进一步增强人民群众安全合理用药的意识和水平。

2016 年国务院制定的《“健康中国 2030”规划纲要》，提出我国到 2030 年，实现全人群、全生命周期的慢性病健康管理。要实现这个目标，就需要为人民提供可持续性的、优质的医疗服务，而提高全民健康素养、普及医药学知识正是提供优质医疗服务的重要内容之一。

在健康中国大背景下的新医改，药学服务模式逐步转型为“以患者为中心”，力求实现患者用药的个体化和精准化。特别是在新冠疫情期间，医疗机构将信息技术、互联网平台与传统医药服务深度融合[8-10]，通过线上（Online）和线下（Offline）相结合的方式，为公众提供安全便捷的诊疗环境，也使得为公众、为患者提供高质量的药学服务成为常态化。

基于以上背景，我们拟构建一个全覆盖的、基于二维码的门诊用药指导科普体系，通过药师多维度创作，实现知识与数据双驱动，使药学服务精细化、同质化、有形化、价值可衡量，助力药师药学服务的转型和升级。

3.研究目的与意义

该项科普研究主要探索构建全覆盖药学科普体系的策略和路径，助力药师药学服务延伸。依托互联网微信二维码技术，将宣教的药品信息以科普的形式进行创作，以二维码形式输出，患者扫码处方以及用药指导手卡即可进行浏览，在门诊药房和门诊科室同步推进，同质化药师宣教内容，进一步提高公众的安全用药素养，减少药物相关不良事件发生，同时助力专科门诊医师，节约患教时间，为就诊患者提供便捷高效的药学服务，以保证用药过程安全有效。

二、研究方法

3.1. 科普团队组建及培训

团队不同年龄、不同资历梯度配置，确保科普材料的科学性及严谨性。科普团队定期开展业务培训，确保内容创作和内容输出的“量”和“质”。

3.1.1 团队组建

科普团队以临床药师为主，包括主任药师 2 名、副主任药师 2 名、主管药师 4 名，其中研究生 5 名共计 8 人组成。

科普团队设置文案审核组，文案撰写组和文案输出组。文案审核由高级药师负责，把握科普材料的科学性及严谨性；文案撰写内容包括疾病预防、证伪辟谣、时事热点以及药物知识；文案的输出为二维码形式，主要以图文和视频为主，由主管药师负责。



图 1 药学科普团队建设

3.1.2 团队培训

团队定期组织成员进行学习交流，由高级药师进行药学科普传播方式的授课；主管药师负责药学科普创作和输出的培训（成员均为热爱药学科普的药师）。

1）药学科普的选材

包含上游（疾病的预防）、中游（疾病的发生）和下游（疾病的治疗），药学科普重点不止局限于下游的药物治疗，上游和中游也是科普阵地。

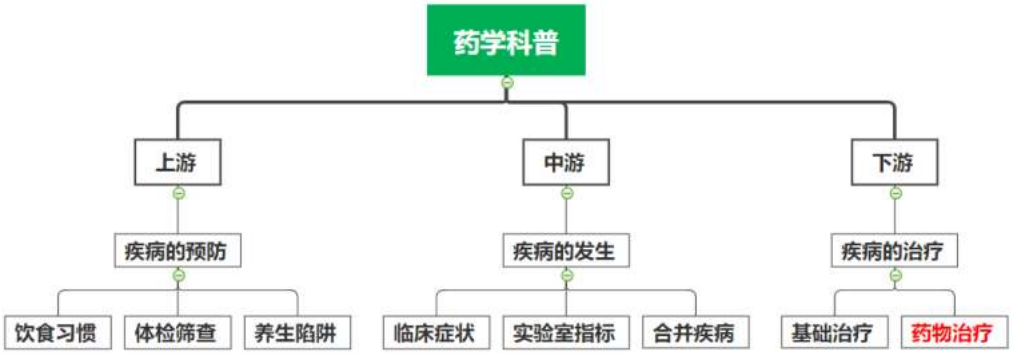


图 2 药学科普选材

2）药学科普的创作

药学科普创作需要讲究 7 个原则，分别为科学性、实用性、通俗性、思想性、可读性、可操作性和艺术性。



图 3 药学科普创作原则

3）药学科普迭代流程

采用三级药师质控制度：一级药师负责文案的撰写，二级药师负责文案的输出，三级药师负责文案的审核，逐级把关，确保药学科普作品的科学性和易读性。根据药师的药学专业特长以及擅长的创作形式，文案的撰写

和输出又细化成了不同的创作小组，进一步提高了科普创作的质量。

同时定期对药学科普能力进行评估，包括科普内容的阅读量、点赞量、评论量以及受众接受程度和满意度，不断完善科普体系，完成药学科普迭代。

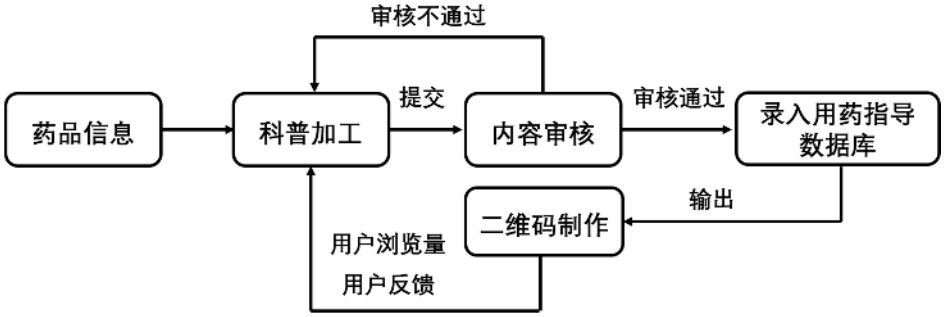


图 4 药学科普迭代流程

3.2 门诊处方嵌入二维码用药指导

与医院信息科对接，接入 Hiss 系统，提取患者药品处方信息，嵌入用药指导二维码，输出门诊处方；患者扫描处方上二维码，浏览处方药品用药指导，随时保存。

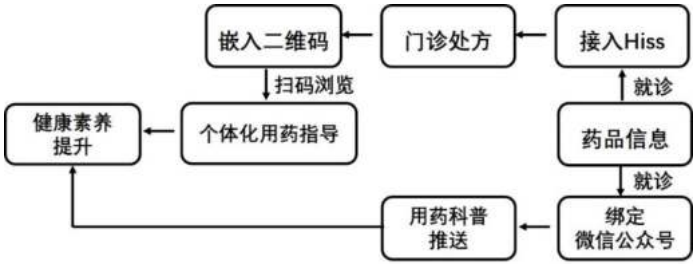




图 5 门诊处方嵌入二维码用药指导

3.3 门诊用药指导科普体系构建

3.3.1 主要内容：

包括门诊药房共性用药和门诊科室个性用药两部分（如图 6）。

1）门诊科室个性用药部分：以慢性疾病为出发点，构建全覆盖药学科普体系（与内分泌科室联合，制定了糖尿病用药科普体系）；

2）门诊药房共性用药部分：特殊剂型的用药指导，如吸入剂、缓控释制剂、滴眼剂、栓剂、胰岛素笔等。

3.2.2 科普干预方案：线上线下全程化：

1）线上：①构建全覆盖药学科普体系；②根据需求的用药知识点完成药学科普创作以及审核，并录入用药指导科普数据库；③接入 Hiss 系统，提取患者药品处方信息，嵌入用药指导二维码，输出门诊处方；

2）线下：①患者扫描处方上二维码，浏览处方药品用药指导，随时保存；②制作门诊药房共性用药宣教手卡和专科门诊用药宣教台历；③关注药学部科普公众号，推送用药健康资讯；④通过患教会、健康主题日活动开展用药指导以及健康认知测评；

3.2.3 患者管理系统：

1）三位一体：门诊药房、药学门诊、专科门诊多方位管理

2）三元融合：医师、药师、护士系统宣教



图 6 门诊药学服务构建体系

三、研究结果及分析

通过药学实践，结合指南、疾病管理路径，构建了 2 个专科门诊药学服务科普体系模型（内分泌科糖尿病用药和呼吸内科慢阻肺用药）以及一系列门诊用药宣教手卡和宣教台历，同时与信息科协作，接入 Hiss 系统，实现了门诊处方嵌入用药指导二维码。

4.1 门诊专科用药指导科普体系构建——糖尿病（内分泌科）

糖尿病药学科普体系知识库包含药物的使用，同时涵盖糖尿病相关的饮食、运动、自我监测、日常预防等在内 5 个元素（如图 7、表 1）。

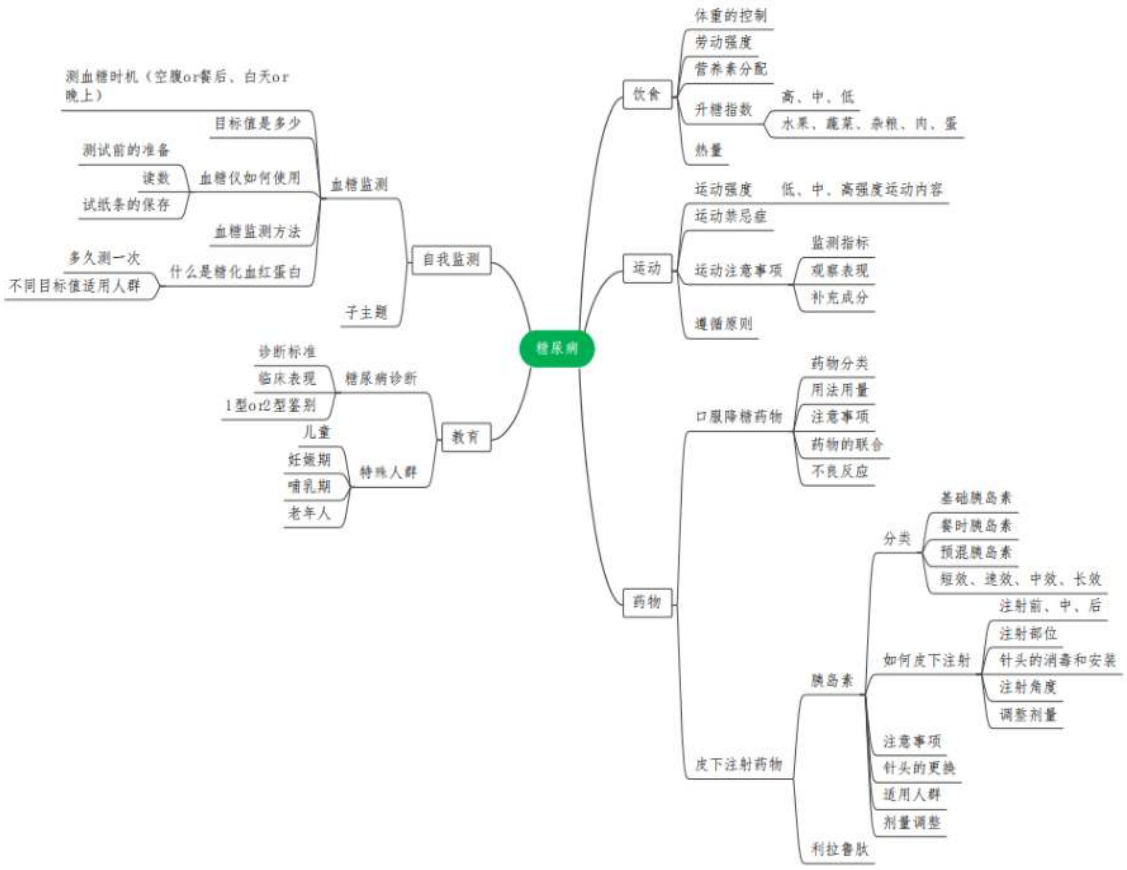


图 7 糖尿病患者“用药指导科普体系”模型

表 1 糖尿病患者“用药指导科普体系”内容（专科台历模板）

糖尿病药学科普	科普干预维度	科普内容
预防篇	筛查	1、如何识别高危人群（包括家族史、生活方式如吸烟、饮酒、运动、主食摄入情况等） 2、如何筛查糖尿病； 3、筛查周期以及检查项目 4、特殊人群的预防（儿童、老人、妊娠期、哺乳期）
	体格检查	身高、体重、计算体质指数（ BMI）、腰围、血压和足背动脉搏动。
诊断篇	临床症状	1、典型的临床表现（饮食量、尿量、饮水量、体重视力等具体变化）；
	实验室指标	诊断标准（随机血糖、空腹血糖、糖耐量负荷试验正常值以及异常值解读）
	分型	1、糖尿病类型（1 型糖尿病、2 型糖尿病、特殊类型糖尿病和妊娠期糖尿病）；2、2 型糖尿病与 1 型糖尿病鉴别要点
治疗篇	饮食治疗	1、饮食的原则和目标 2、三大营养物质选择和分配 3、血糖生成指数饮食有哪些 4、妊娠期糖尿病饮食注意事项
	运动治疗	1、运动的原则 2、可以选择的运动项目 3、运动前、中、后注意事项 4、自我评估运动量是否合适

	药物治疗	1、口服药物（双胍类、磺脲类、格列奈类、α-糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮类、DPP-4 抑制剂、SGLT2 抑制剂） 2、胰岛素（不同时效胰岛素的区分、注射方法和注意事项） 3、GLP-1 受体激动剂（特点和使用方法） 4、不良反应的监测与处理（低血糖、高血糖） 5、用药注意事项（漏服、药物相互作用）
	自我管理	1、血糖监测（监测时间、仪器选择和校准、试纸保存及处理） 2、需要掌握的糖尿病知识（获取途径、监测以及应对危险因素、情绪管理） 3、胰岛素笔的使用（不同笔芯的选择、给药时间、部位、针头的处理、注意事项） 4、血糖的控制目标 5、体重的管理（目标值、改善方式）
合并症管理	肾脏病变	1、筛查（筛查周期、体格检查、实验室检查）； 2、结果判定； 3、处理（生活预防和对症治疗）
	足部病变	
	视网膜病变	
	心血管病变	
	其他合并疾病	

4.2 门诊专科用药指导科普体系构建——慢阻肺（呼吸内科）

慢阻肺药学科普体系知识库包含药物的使用（其中包含了吸入剂和口服药物），以及慢阻肺合并疾病科普、院外的自我管理（包含饮食、运动、自我监测、肺功能锻炼等）在内 3 个维度，5 个用药科普干预点（如图 8、表 2）。



图 8 慢阻肺患者“用药指导科普体系”模型

表 2 糖尿病患者“用药指导科普体系”内容（专科台历模板）

慢阻肺药学科普	科普干预维度	科普内容
药物篇	吸入剂	1、认识装置、装置构造（加压定量、干粉、软雾、小容量）、装置特点比较、 2、装置选择、药物选择要求（单药、二联、三联） 3、装置的操作方法 4、装置的清洁和口腔护理 5、用药过程中的注意事项 6、不良反应的处理 7、特殊人群的使用要求 8、用药规范性评估

	口服药物	1、平喘药、祛痰药、抗过敏药 2、药物的联合、相互作用、注意事项 3、用药依从性评估
合并疾病篇	糖尿病	1、高危因素（人群、饮食结构、职业特点） 2、筛查（筛查周期、体格检查、实验室检查）； 3、生活预防
	高血压	
	心血管疾病	
	骨质疏松	
	精神疾病	
自我管理篇	自我评估	1、肺功能评估 2、日记记录（内容） 3、呼吸训练方式和方法（腹式呼吸、缩唇呼吸） 4、耐力训练（6 分钟步行距离测试）
	健康教育	1、诱发因素 2、推荐饮食（低碳水）、运动（强度和项目） 3、急性加重的识别、处理措施、疫苗的接种注意事项

4.3 门诊共性用药指导科普体系构建模型

以指南和共识为依据，以公众较为关注的用药内容为切入点，进行用药科普体系构建（如图 9）。

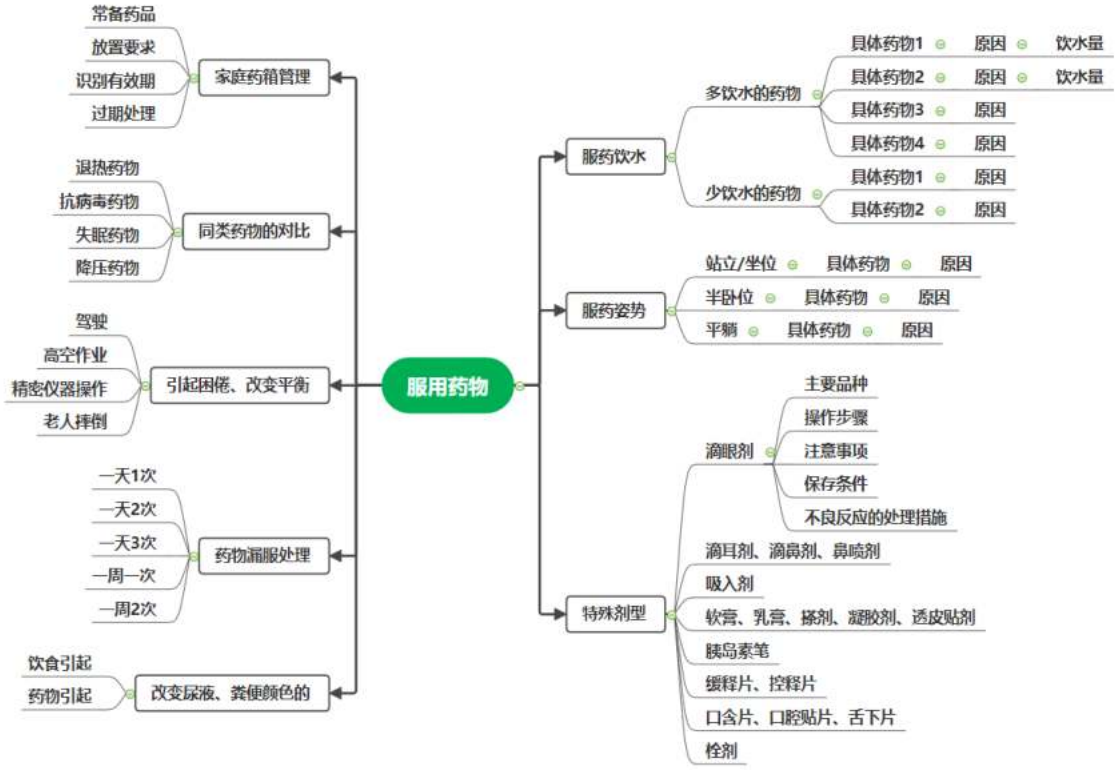


图 9 门诊共性“用药指导科普体系”模型

4.4 门诊用药指导二维码

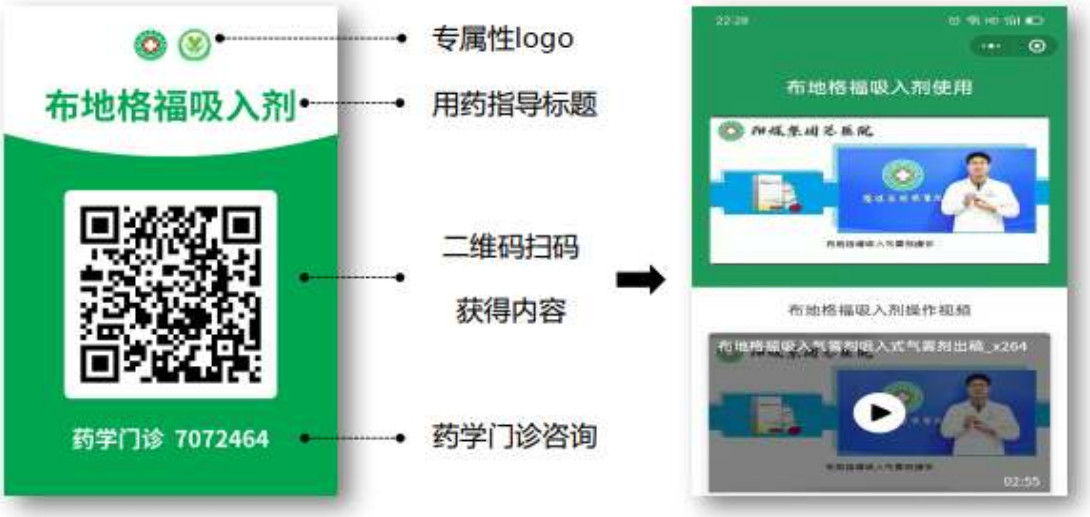
①门诊处方二维码





②门诊药房宣教手卡


专属性logo
要少喝水的药物
用药指导标题
二维码扫码
获得内容
药学门诊 7072464
药学门诊咨询
服药期间需要少喝水的药物
1、蒙脱石散，50ml/袋；
（水太多药物稀释，治疗腹泻的效果会降低）
2、复方铝酸铋颗粒、硫糖铝、磷酸铝（15-30ml/袋）；
（服药后在胃中形成保护膜，喝水会将保护膜冲掉）
3、止咳糖浆、甘草合剂；
（药物需黏附在咽喉部起作用）；
4、去氨加压素
（少喝水，避免水在体内蓄积）。


专属性logo
布地格福吸入剂
用药指导标题
二维码扫码
获得内容
药学门诊 7072464
药学门诊咨询
布地格福吸入剂使用
布地格福吸入剂操作视频
02:55


用药宣教手卡
以及门诊展板

③门诊专科宣教台历


糖尿病症状识别
典型的“三多一少”
多饮、多尿、多食和消瘦（体重下降）
糖尿病诊断
两个指标的解读
糖化血红蛋白（HbA1c）
评估患者三个月内血糖平均值
口服葡萄糖耐量试验（OGTT）
了解胰岛β细胞功能和机体对血糖的调节能力


糖尿病症状识别
糖尿病的诊断依据
01
什么是糖尿病
糖尿病如何诊断?
*糖尿病症状（典型症状包括多饮、多食、多尿和不明原因的体重下降）加上以下任意一项:
1）任意时间血浆葡萄糖水平≥11.1毫摩尔/升（200毫克/分升）或
2）空腹血浆葡萄糖（FPG）水平≥7.0毫摩尔/升（126毫克/分升）或
3）口服葡萄糖耐量试验（OGTT）中，2小时血糖（2hPG）水平≥11.1毫摩尔/升（200毫克/分升）。
*无糖尿病症状，则需另日重复检查上述血糖
*儿童的糖尿病诊断标准与成人一致


慢阻肺人群饮食注意
三忌、两注意
三忌：吃太饱、吃太咸、饮食缺钙
慢阻肺急性加重识别
出现以下几种症状时，及时到医院就诊
1、胸痛
2、蓝灰色嘴唇或者指甲
3、情绪非常低落或困惑
4、呼吸急促甚至不能说话


慢阻肺（COPD）人群饮食篇
慢阻肺（COPD）急性加重症状识别
COPD
1、呼吸急促:
周围氧气不够，不自觉加快呼吸的频次
2、呼吸加重:
呼吸时发出更大的声音
3、皮肤或指甲颜色改变
嘴唇或者指甲变成蓝灰色或紫色
4、不规则呼吸
呼吸的节奏变得不规律，有时很快，有时却很慢
5、咳嗽加重
干咳或者伴有黄色、绿色或带血的痰，躺下时咳嗽更加明显


胃药的正确服用时间
常见胃病
消化性溃疡，胃食管反流，慢性胃炎
儿童退热指南
儿童退热4大误区
1、滥用激素
2、滥用抗菌药物
3、重复使用退热药物
4、冰水灌肠、冷水、酒精擦身体


胃药的正确服用时间
儿童退热药物选择
1、布洛芬VS对乙酰氨基酚:
1）≤2月龄的儿童，禁用任何退热药物;
2）＞2月龄的儿童，可以使用对乙酰氨基酚，必要时可以每4-6小时一次，24小时内最多4次；
3）＞6月龄儿童，除了对乙酰氨基酚外，也可以使用布洛芬，必要时可以每4-6小时一次，也是24小时内不超过4次。。
4）布洛芬不推荐用于6个月以下儿童;
2、栓剂、混悬液、滴剂，如何选择呢?
1）儿童在有呕吐、不能口服或惊厥时可以优先选择栓剂，但对于可以口服的儿童，尽量选择口服剂型。
2）滴剂的总包装量一般比较小，浓度比较高，使用同样剂量时服用体积更小，因此更适合于小年龄儿童。
3）混悬液的体积一般比较大，一般配有量杯，适合较大的孩子选用。

4.5 微信公众号关注度

统计从 2022 年 3 月至 2023 年 2 月，微信公众号关注人数从 4256 人增加至 10478 人，平均每天新增增长 18 人（如图 10）。



图 10 微信公众号人群关注度

四、讨论

1、药学科普在提高民众医药素养方面发挥着重要的作用[11,12]。药学科普创作者必须具备循证思维，对证据的选择要准确，将专业知识与患者需求相结合，才能创作出优质药学科普作品。用好药学科普同样是药学服务模式的创新和延伸，搭建药学科普体系，实现药师药学科普的知识与数据双驱[13,14]。本研究中，首先要对患者需求进行前期深入调研，这样才能“取之于患，用之于患”；其次要在“数量”的基础上，保证“质量”，我们采用三级药师质控制度，严格把关，创作出浅显易懂又科学严谨的用药指导；最后还需要检验评估，通过用药认知度、规范度、满意度的评估，才能使药学服务精细化、同质化、有形化和价值可衡量。

2、药师是研究主体，也是主要实践者。我们建立了一个全覆盖的、基于二维码的门诊用药指导科普体系，药师能在第一时间准确定位药学科普知识点，将专业知识与不同群体的需求及其医药素养完美结合，从而创作出科学易读的优质药学科普作品。实现药师药学科普“取出来”和“传出去”的职业价值。同时与 His 系统对接完成了处方用药交代二维码的展示，实现了门诊药师用药交代内容同质化，具有极强的可操作性，有利于青年药师的快速培养。

3、实践中发现，无论是在门诊大厅还是专科诊疗科室，大部分患者在排队等待的同时，愿意用手机去扫描用药指导手卡和台历的二维码获取相关用药知识，同时能积极分享给身边的亲朋好友，指导的内容获得了就诊患者的认可。很多患者反映通过浏览二维码用药指导，很多不规范的用药方法得到了更正，同时也避免的相关不良事件的发生，药品使用更加安全放心。对门诊专科医师而言，助力门诊诊疗活动，提高了患者的医药学认知度，有效节约了患教时间。

4、本研究受时间、人员所限，下一步研究方向：1）优化科普形式，由图文科普向视频科普转化；2）吸收更多的科普药师加入，为青年药师培训提供平台；3）与更多的门诊专科协作，构建相应的用药指导科普体系；4）扩展药学服务范围，门诊+住院，实现人群的广覆盖；5）制定更为精准的药学干预流程及评价规范，提升同质化药学服务水平。

五、结论

通过构建基于二维码的门诊用药指导科普体系，将科普的“科学”和“普及”双向结合，实现药师药学科普“放进去”和“取出来”的知识与数据双驱动。“做好科普”使药师的药学服务精细化、同质化、有形化、价

值可衡量；“用好科普”使药师的药学服务在门诊患者用药指导、门诊专科诊疗助力中发挥积极作用，提高了合理用药水平，助力药师药学服务的转型和升级。最终实现了服务对象“看的懂、学得会、用得上”，为探索新的药学服务模式与思路提供了理论依据。

药师主导的基于二维码的门诊用药指导科普体系，提高了公众安全用药素养，减少了药物相关不良事件发生，助力专科门诊医师，节约患教时间，在疾病管理和治疗方面具有较好实践意义和科学价值。

参考文献

[1]王东友.门诊药房实施药学服务对患者用药安全性及依从性的影响[J].北方药学,2020,17(12):151-152.

[2]梁耀文,蔡钙强,林小华,黄伟平,梁文生.门诊药房开展药学服务的模式及对药学服务质量的影响分析[J].中国处方药,2020,18(07):57-58.

[3]陈美玲,尚丹婷,关焯梅,许惠英,朱红球,曾颖.我院门诊药房药学服务现状调查及建议[J].中国药房,2015,26(18):2465-2467.

[4]本刊编辑部.用“合理”为健康负责[J].中国卫生产业,2012,9(22):1.DOI:10.16659/j.cnki.1672-5654.2012.22.159.

[5]程锦梅.门诊药房药师开展临床药学服务探讨[J].实用医技杂志,2007(23):3202-3203.

[6]《“健康中国 2030”规划纲要》[J];中国肿瘤;2019 年 10 期

[7]栗征. 国务院印发"十三五"国家药品安全规划[J]. 中医药管理杂志, 2017(04):118-118.

[8]刘天一,侍晓萍,李中.我院信息化手段构建药学服务生态圈的实践[J].儿科药学杂志,2021,27(10):25-27.DOI:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2021.10.008.

[9]李思聪,聂小燕,韩晟,王瑞麟,史录文.我国互联网+背景下医院 O2O 药学服务模式发展研究[J].中国药房,2021,32(04):496-501.

[10]李婷婷,蒋思达.大数据背景下智慧药师信息服务平台研究[J].中国合理用药探索,2018,15(02):72-75.

[11]刘丹.新形势下精细化管理在提升门诊药房药学服务中的应用探讨[J].基层医学论坛,2021,25(26):3816-3818.DOI:10.19435/j.1672-1721.2021.26.064.

[12]姬莲花,常玉霞,付中华,李向东.基于第三方调研患者对门诊药房服务满意度影响因素及分析[J].医药论坛杂志,2021,42(12):60-62+67.

[13]胡晨吉,王世燕,金朝辉,郑明琳,郭毅,樊萍.医院“互联网+”门诊药学服务模式实践与效果[J].中国药业,2021,30(09):18-22.

[14]高洋洋,徐珽,金朝辉,王世燕,龙光利,郑明琳,郭毅,樊萍.新冠肺炎疫情期间基于互联网医药模式的门诊药学服务实践与探讨[J].中国医院药学杂志,2020,40(06):606-611.DOI:10.13286/j.1001-5213.2020.06.02.

非甾体类抗炎滴眼液围手术期防治白内障术后并发症的研究进展

杨诗语[1,3]，朱宝强[2,3]，张明名[1,3]，胡佳强[1,3]，龙恩武[1,3*]

（1.电子科技大学医学院 四川 成都 610054 2.西南医科大学药学院 四川 泸州 646000 3.四川省医学科学院·四川省人民医院/电子科技大学附属医院药学部，个体化药物治疗四川省重点实验室，四川 成都 610072）

【摘要】白内障是眼科第一大致盲疾病，临床常以手术治疗为主，但白内障术后常伴有多种眼部并发症，严重影响患者预后情况。非甾体类抗炎滴眼液凭借其抗炎作用，是眼科近年来用于防治与白内障手术相关的炎症和囊样黄斑水肿等术后并发症的常用眼用制剂。本文对非甾体类抗炎滴眼液在白内障术后的疗效和安全性进行综述，以期为临床合理用药提供依据。

【关键词】非甾体类抗炎滴眼液；白内障；围手术期；炎症；囊样黄斑水肿 OSID（Open Science Identity）开放科学（资源服务） 标识码:

Research progress in the prevention and treatment of postoperative complications of cataract surgery with nonsteroidal anti-inflammatory eye drops during the perioperative period

YANG Shiyu[1,3], ZHU Baoqiang[2,3], ZHANG Mingming[1,3], HU Jiaqiang[1,3], LONG Enwu[1,3*]

（1. School of Medicine of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan, 610054, China 2. School of Pharmacy of Southwest Medical University,Luzhou, Sichuan, 646000, China 3. Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Pharmacy of Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan, 610072, China）

【ABSTRACT】Cataract is the largest blinding disease in ophthalmology, and surgical treatment is often the main treatment in clinical practice. However, after cataract surgery, it is often accompanied by various eye complications, which seriously affects the prognosis of patients. Nonsteroidal anti-inflammatory eye drops are commonly used in ophthalmology in recent years to prevent and treat postoperative complications such as inflammation related to cataract surgery and cystic macular edema due to their anti-inflammatory effects. This article reviews the efficacy and safety of non steroidal anti-inflammatory eye drops after cataract surgery, in order to provide a basis for rational clinical medication.

基金项目：四川省科技计划项目（2021YFS0197）；中国研究型医院学会药物评价专委会临床重点药品使用监测和评价研究专项课题（Y2022FH-YWPJ01-201）

作者简介：杨诗语(2000-)，女，四川成都人，硕士在读，研究方向：临床药学，ORCID：0009-0002-8075-7574，电话：028-87393405，E-mail：yangshiyu14@126.com

通讯作者：龙恩武，男，四川安岳人，主任药师，博士学位，研究方向：临床药学，ORCID：0000-0003-0231-7397，电话：028-87393405，E-mail：dragon984169@126.com

【KEY WORDS】nonsteroidal anti-inflammatory eye drops; cataract; perioperative period; inflammation; cystoid macular edema

白内障（cataract）是指由蛋白质变性引起的晶状体混浊而导致的晶状体透明度丧失[1]，据估计，全世界约有 95 万人受到白内障的影响，是中等收入和低收入国家致居民失明的主要原因[2]。临床常以手术治疗为主，但白内障术后常诱发炎症反应、眼内压升高及囊样黄斑水肿（cystoid macular edema，CME）等并发症，严重影响了患者预后[3-4]。非甾体抗炎药（nonsteroidal anti-inflammatory drugs，NSAIDs）是常用的解热、镇痛、抗炎药物[5]，近年来在眼科领域的应用逐渐增加，其眼用制剂常于围手术期用于防治与白内障手术相关的炎症反应和囊样黄斑水肿等术后并发症[3-4]。基于此，本文以 NSAIDs 滴眼液在白内障术后防治多种并发症的机制、疗效和安全性进行综述，旨在为相关领域的临床合理用药提供理论依据。

1 白内障术后并发症概述

1.1 炎症反应 白内障术后炎症的发病率约为 0.02%-0.26%[5]，主要因手术机械损伤、人工晶状体异物反应、残余晶状体上皮刺激等原因导致，进而导致与白内障手术相关的眼部炎症并发症[6]。其中肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor-α, TNF-α）、白细胞介素（interleukin，IL）-1、IL-2、IL-6 与术后炎症形成密切相关[6-7]。术后眼内炎的诊断一般基于临床症状，包括疼痛、视力下降，以及包括眼睑水肿、结膜充血、前房炎症、脑膜下垂、人工晶状体（intraocular lens ，IOL）上的纤维膜（fibrillary membrane，FM）、后节炎症和玻璃体炎症的超声证据判断[8]。NSAIDs 的抗炎作用主要通过非选择性抑制环氧酶（cyclooxygenase，COX）-1 和 COX-2 来发挥抗炎和镇痛活性[9]，通过抑制 COX 途径，从而减少前列腺素类炎症介质生成, 抑制花生四烯酸途径的炎症反应[10]。近期有研究发现白内障术后超声乳化技术的提高可以有效预防炎症，同时全新的无滴技术也在临床实践中成功引入[12]。

1.2 囊样黄斑水肿 近年来，随着白内障手术的技术性完善，术后效果显著改善，但 CME 仍然是白内障术后视力下降最常见的原因之一[11]。CME 是黄斑视网膜增厚的一种形式，其特征是出现充满囊性液体的视网膜内间隙[12]，常发生在术后 4 个月内，发病高峰在术后 3-4 周[17]。对于未患糖尿病的白内障手术患者，血管造影 CME 的发生率高达 5%，且可能致永久性视力障碍[13]。Li SS 等人[13]通过 24 项随机对照试验（randomized controlled trials，RCTs）证明，对于 CME 的防治选用 NSAIDs 和皮质类固醇（corticosteroids，CS）联合治疗的效果优于单药治疗，同时可帮助患者术后视力的快速恢复，这与 Taubenslag KJ 等人[11]的研究结果相一致。

1.3 瞳孔缩小 由于手术损伤释放前列腺素而引起术中瞳孔缩小，而瞳孔散大不足，不仅对外科医生手术造成阻碍，同时会使术后出现并发症的概率增加[12]，包括囊破裂、玻璃体丢失、虹膜外伤或术后炎症[13]。美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）于 2014 年批准上市的 Omidira[去氧肾上腺素酮咯酸注射液(1%/0.3%)]，被用于预防术中瞳孔缩小和减轻术后疼痛[14]。美国一项多中心研究评估了 Omidira 在儿童白内障手术的安全性，研究通过同时评估了 Omidira 与去氧肾上腺素对术中瞳孔直径和术后疼痛的影响，结果表明前者在白内障手术期间更能维持瞳孔散大且术后疼痛水平更低[15]。

2 NSAIDs 在白内障围手术期的应用

2.1 常用 NSAIDs

NSAIDs 作为眼科中一类重要药物。近几年来多种 NSAIDs 已获批上市且于临床使用多年，如双氯芬酸、酮咯酸、奈帕芬酸和及溴酚酸等[16]。其中奈帕芬酸[17]和溴芬酸[18]适用于治疗白内障手术后疼痛和炎症，而酮咯酸[19]、双氯芬酸[20]仅批准适用于白内障手术后炎症。作为近几年 FDA 最新批准的 0.075%BromSite™（溴芬酸钠滴眼液）眼科制剂同时也是第一个获得 FDA 批准的用于术后炎症和预防白内障术后患者眼痛的 NSAIDs，目前用于治疗炎症和减少疼痛[21]。

2.2 术前 NSAIDs 的使用

Carlo Cagini 等[22]通过前瞻性临床随机试验，纳入 73 例接受白内障手术的患者，同时在术前给予部分患者奈帕芬酸的预处理，所有患者在术后均进行抗炎治疗。通过随访评估进行比较得出，术后 30 天预处理组炎症反应出现机率明显低于未处理组（$p<0.01$），因此术前给予奈帕芬胺可减少手术后一个月内白内障手术产生的炎症

反应。韩国一项前瞻性研究通过分组比较，术前用酮咯酸氨丁三醇（飞秒 NSAIDs 组）和不使用 NSAIDs（飞秒无 NSAIDs 组）对术中瞳孔面积的影响，得出用酮咯酸氨丁三醇会使瞳孔缩小的症状显著减少（P <0 .001）。同时瞳孔面积的绝对和相对减少显著低于飞秒无 NSAIDs 组（分别为 P =0 .019 和 P = 0.007）[23]。

为证明术前给予 NSAIDs 对于预防术后虹膜松弛综合征（intraoperative floppy iris syndrome，IFIS）有效，Tal Sharon 等[24]利用回顾性队列研究，纳入两家不同医院中接受白内障手术的 207 名患者，其中预处理组为在术前给予患者预防性药物（1%阿托品和 NSAIDs），非预处理组为医院未在术前对患者进行预治疗，对比结果显示，前者发生 IFIS 的概率显著降低（15.1%vs29.7%，p = 0.012）。

同时，为比较接受 NSAIDs 术前治疗是否会降低术后 CME 的发生率，Aleksej Medić 等[25]共纳入 55 例患者，随机分配至双氯芬酸组（n=27）或安慰剂组（n=28），前者在白内障手术前 7 天至手术后滴用双氯芬酸，与未接受任何围手术期 NSAIDs 治疗的患者相比，双氯芬酸组的中央黄斑厚度（central macular thickness，CMT)显著降低（F=13.57，p<0.001）。杨丽亚等[26]以白内障术前给予加替沙星眼用凝胶作为对照组，与加用普拉洛芬滴眼液的研究组进行比较，研究组的术后 CMT（125.3±6.9μm）,显著低于对照组的（138.4±7.6μm），且在术后 2w、4w 以及 6w，CME 发生率均明显低于对照组（P<0.05）。

2.2 术后 NSAIDs 的使用

Juthani VV 等[33]纳入 17 项 RCTs，用于评估 NSAIDs 是否在控制白内障术后炎症方面优于 CS。研究显示，虽然中等质量证据表明，治疗组之间的平均值没有差异（平均差异为 0.60，95%CI:-2.19 至 0.99），然而韩国一项多中心研究的结果显示 NSAIDs 组从结膜充血中恢复的速度比 CS 组快（0.30 ± 0.52 vs 0.44 ± 0.81，P=0.144），术后 1 周 CMT 的增加也小于 CS 组（7.87±22.46 vs 29.47±46.60μm，P<0.0001）[27]。因此，对于 NSAIDs 效果是否优于 CS，仍需要更多高质量的研究加以佐证。Duan 等[28]通过荟萃分析，评估 NSAIDs 治疗白内障手术后前房炎症的有效性和安全性，发现与安慰剂相比 NSAIDs 是缓解白内障术后炎症的有效药物，此外，双氯芬酸钠滴眼液与其他 NSAIDs 类相比，抗炎效果更显著。Zhao X 等[29]对 1175 例白内障手术患者进行研究，评估白内障术后用奈帕芬酸和酮咯酸的疗效和患者的耐受性，分析表明与酮咯酸相比，奈帕芬胺显著减少了术后眼部不适（RR=0.589，95%CI:0.436-0.794，P=0.001）和结膜充血（RR=0.253，95%CI:0.115-0.557，P= 0.001）。Alejandro Rodríguez 等[30]通过比较三种 NSAIDs（0.1%奈帕芬酸，0.03%氟比洛芬，0.4%酮咯酸）和对照组在无并发症的白内障术中抑制手术诱导的瞳孔缩小的有效性，结果显示与酮咯酸组（10.09%），氟比洛芬（9.84%）和对照组（13.83%）相比，奈帕芬酸组在手术结束时瞳孔缩小的占比最少（7.50%），证明这三种 NSAIDs 与对照组相比均可有效维持术中瞳孔散大，其中奈帕芬胺的效果最佳。

Sean McCafferty 等[38]通过双盲的 RCT，证明了 NSAIDs 在白内障术后预防 CME 的有效性。该实验通过将患者随机分配到安慰剂组和奈帕芬胺组，结果表明与安慰剂相比，局部使用 0.3%奈帕芬胺在白内障手术后使用可显着降低 CME 的发生率（p = 0.0001），另经二元 Logistic 回归分析了其他造成 CME 的影响因素（性别、年龄、种族、人工晶状体类型、NSAIDs 的使用和危险因素暴露），NSAIDs 的使用（value=1.32）明显强于其他潜在因素。NSAIDs 除了对正常白内障术后预防 CME 有效外，对于预防高危患者术后 CME 也同样有效。Singh RP 等[31]通过糖尿病合并白内障的患者发现，使用奈帕芬胺的患者 CME 发生率显著降低（4.1%vs15.19%，P < 0.001），该结论与 Sarfraz MH 等[31]的研究结果一致，奈帕芬胺组术后 CMT 平均频率变化（2.33±10.45μm），对照组（12.23±12.40μm），且前者发生 CME 的概率（3.3%）更低，对照组为 23.3%。

3 相关不良反应及救治

尽管 NSAIDs 类自引入眼科后，使用频次呈指数类增长，但其不良反应（adverse drug reactions，ADR）也不容小觑[41]。1999 年在美国白内障和屈光手术学会的调查中首次报道 NSAIDs 使用与角膜融化的关系，其中双氯芬酸与角膜融化或点状上皮病变的关系最为密切[42]。Rigas B 等[43]的研究证明 NSAIDs 滴眼液可能会进一步损害角膜上皮，诱导角膜病变，最终导致因 NSAIDs 诱导的角膜融化（NSAID-induced corneal melt，NICM）。同时有研究发现，对于高风险的患者（复杂的口腔手术、角膜去神经支配、角膜上皮缺损、糖尿病、眼表疾病、类风湿性关节炎、短时间内重复眼部手术）和在手术后（>14 天）或手术前（>24 小时）长期使用 NSAIDs 可能会导致角膜糜烂、溃疡和穿孔[44]。下述有几例对于 NSAIDs 使用后引起角膜融化的病例报告。Zahra Ashena 等[32]

报告 1 例女性高龄糖尿病患者在白内障术后使用 NSAIDs，期望降低 CME 发生风险，却导致角膜融化并伴视力丧失。Emily Cabourne 等[33]回顾性研究 13 例患者，术后均联合使用 CS 和 NSAIDs，在随访过程中共 5 例出现角膜融化，1 例出现角膜穿孔和眼内炎。研究者建议在联合使用 NSAIDs 和其他药物的过程中，应提高警惕，避免进一步损害角膜上皮。因此为了降低角膜融化和穿孔的风险，在白内障手术前对患者继往存在的眼表疾病进行细致的评估和管理，并提高对潜在角膜病变的认识。同时临床需进一步了解 NICM 发病机制并选择更安全的替代方案。并且对于容易发生角膜上皮破裂的患者，建议避免使用含有防腐剂的滴眼液，并谨慎使用 NSAIDs。

除以上关于角膜病变的 ADR 外，国内外均有报道关于皮肤疾病方面的病例报告。于莉等学者[34]发现患者在使用双氯芬酸钠滴眼液后导致 Steven-Johnson 综合征（Stevens-Johnson syndrome，SJS），一种严重的由免疫复合物所致的过敏性疾病。Miyazato H 等[43]报道有患者在使用 0.1%双氯芬酸钠滴眼液后眼睑出现瘙痒性红斑，最终引起过敏性接触性皮炎（allergic contact dermatitis，ACD）的病例报告。虽然这两种 ADR 的病例报告极为罕见，但当患者有局部用 NSAIDs 时，临床医生同样需要将该药纳入考虑范围，并第一时间处理 ADR 问题，保障患者的用药安全。

4 结语

随着白内障患病人数的日益增加，由白内障手术造成的社会负担同样加重，因此需要更高质量研究来确定围手术期 NSAIDs 对视力和 CME 的长期影响。虽然对于白内障术后引起的部分并发症，NSAIDs 有良好的临床表现，但迄今为止尚未有对预防和治疗白内障术后炎症和 CME 的最佳药物治疗方案。由此可见围手术期的最佳用药方案仍是眼科目前争议的热点，因此未来需要建立 NSAIDs 或其他更有效的疗法用于治疗，进一步完善对于白内障术后 ADR 的预防和治疗，为临床合理用药提供理论依据。

参考文献

[1]WANG CY,CAO YN,CHEN X,et al.Efficacy and safety of sodium bromfenac eye drops in the treatment of postoperative inflammation in cataract surgery A protocol for systematic review and meta-analysis[J].Medicine,2020,99(49):e23131.

[2]LIU YC ,WILKINS M ,KIM T,et al.Cataracts[J].The Lancet,2017,390(1004):600-612.

[3]MAZET R,YAMEOGO JBG, WOUESSIDJEWE D,et al.Recent Advances in the Design of Topical Ophthalmic Delivery Systems in the Treatment of Ocular Surface Inflammation and Their Biopharmaceutical Evaluation[J].Pharmaceutics,2020,12(6) :570.

[4]WENTZ SM,PRICE F ,HARRIS A,et al. Efficacy and safety of bromfenac 0.075% formulated in DuraSite for pain and inflammation in cataract surgery[J].Expert Opinion on Pharmacotherapy,2019,20(14):1703-1709.

[5]LALITHA P, SENGUPTA S, RAVINDRAN RD, et al. A literature review and update on the incidence and microbiology spectrum of post cataract surgery endophthalmitis over past two decades in India[J].Indian J Ophthalmol,2017,65(8):673–677.

[6]JIANG J,SHIHAN M HWANG Y,et al.Lens epithelial cells initiate an inflammatory response following cataract surgery[J].lnvestigative Ophthalmology&Visual Science,2018.59(12):4986-4997.

[7]BEDAR M S,KELLNER U.Clinical experience with the Clareon®lOL and the AutonoMe® implantation systeml[J].Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft,2020,117(11) : 1100 -1104.

[8]SENTHAMIZH T, ARAVIND H, SINGH TP. Factors associated with postoperative visual outcome in acute endophthalmitis after cataract surgery-a cross-sectional, analytical study[J]. Digit J Ophthalmol,2022,28(1):1-6.

[9]HUGO RIBEIRO, INÊS RODRIGUES, LEONARDO NAPOLEÃO,et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), pain and aging: Adjusting prescription to patient features[J].Biomedicine & Pharmacotherapy,2022,150:112958.

[10]周鹏翔,门鹏,陈逸,等.溴芬酸钠滴眼液治疗眼部炎症的卫生技术评估[J].中国药房.2018,29(18).

[11]TAUBENSLAG KJ,KIM SJ,GRZYBOWSKI A.Anti-inflammatory Pharmacotherapy for the Prevention of Cystoid Macular Edema After Cataract Surgery[J].American Journal of Ophthalmology,2021,232:1-8.

[12]HALKIADAKIS I, CHATZIRALLI I, DRAKOS E, et al.Causes and management of small pupil in patients with cataract[J].Oman J Ophthalmol,2017,10(3):220-224.

[13]GRZYBOWSKI A, KANCLERZ P. Methods for achieving adequate pupil size in cataract surgery[J].Curr Opin

Ophthalmol,2020,31(1):33-42.
[14]BRANDSDORFER ARI,PATEL SEJAL H,CHUCK ROY S.The role of perioperative nonsteroidal anti-inflammatory drugs use in cataract surgery[J].Current Opinion in Ophthalmology,2019,30(1):44-49.
[15]WILSON ME, TRIVEDI RH, PLAGER DA. Safety and efficacy data supporting U.S. FDA approval of intracameral phenylephrine and ketorolac 1.0%/0.3% for pediatric cataract surgery: clinical safety and pupil and pain management[J]. J Cataract Refract Surg,2020,46(6):873-878.
[16]RODRIGUES EB, FARAH ME, BOTTÓS JM, et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Treatment of Retinal Diseases[J]. Dev Ophthalmol,2016,55:212-220.
[17]Acuvail [package Insert]. Irvine, CA: Allergan, Inc.; 2014.
[18]Ilevro [package insert]. Fort Worth, TX: Alcon Laboratories, Inc.; 2014.
[19]Prolensa [package insert]. Tampa, FL: Bausch and Lomb Inc.; 2013.
[20]Voltaren [package insert]. Fort Worth, TX: Alcon Laboratories, Inc.; 2012.
[21]BromSite® [package insert]. Cranbury, NJ: Sun Pharmaceutical Industries, Inc.; 2016.
[22]CARLO CAGINI, ALESSIO CERQUAGLIA, ADRIANA PELLEGRINO,et al.Effect of preoperative topical nepafenac 0.1% on inflammatory response after uncomplicated cataract surgery in healthy subjects[J].Acta Ophthalmologica,2021,99(1):e70-e73.
[23]JUN JONG HWA,YOO, YOUNG-SIK,LIM SUNG A,et al.Effects of topical ketorolac tromethamine 0.45% on intraoperative miosis and prostaglandin E2 release during femtosecond laser–assisted cataract surgery[J]. Journal of Cataract & Refractive Surgery 43(4):492-497.
[24]TAL SHARON, IDAN HECHT, MAYA ATAR VARDI,et al.Preoperative atropine and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of intraoperative floppy iris syndrome[J].Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol,2022,260(3):893-900.
[25]ALEKSEJ MEDIĆ, TOMISLAV JUKIĆ, ANITA MATAS,et al.Effect of preoperative topical diclofenac on intraocular interleukin-12 concentration and macular edema after cataract surgery in patients with diabetic retinopathy: a randomized controlled trial[J].Croatian Medical Journal,2017,58(1):49-55.
[26]杨丽亚,杨旭,王绪保,等.非甾体类抗炎药应用于白内障乳化术前以预防黄斑囊样水肿的临床观察[J].现代诊断与治疗. 2020,31(01).
[27]KIM S, KO BY, KOH JW, et al Comparison of a preservative-free nonsteroidal anti-inflammatory drug and preservative-free corticosteroid after uneventful cataract surgery: multicenter, randomized, evaluator-blinded clinical trial[J]. J Cataract Refract Surg,2022,48(6):710-716.
[28]DUAN P,LIU Y,LI JW.The comparative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of anterior chamber inflammation after cataract surgery: a systematic review and network meta-analysis[J].Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology,2017,255(4):639-649.
[29]ZHAO X,XIA S,WANG E,et al.Comparison of the efficacy and patients’ tolerability of nepafenac and ketorolac in the treatment of ocular inflammation following cataract surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. PLoS One,2017,12(3):e0173254.
[30]RODRÍGUEZ-GARCÍA A, HERNÁNDEZ-CAMARENA JC, LÓPEZ-JAIME GR,et al. Effect of Topical Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on Pupillary Size During Uncomplicated Cataract Surgery[J]. J Refract Surg,2017,33(4):236-242.
[31]SARFRAZ MH, HAQ RI, MEHBOOB MA. Effect of topical nepafenac in prevention of macular edema after cataract surgery in patients with nonproliferative diabetic retinopathy[J]. Pak J Med Sci,2017,33(1):210 – 214.
[32]ZAHRA ASHENA, MAYANK A NANAVATY, AHMED S BARDAN,et al. Prophylactic Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs after Cataract Surgery and Corneal Melt[J].Journal of Current Ophthalmology,2021,33(4):485-491.
[33]EMILY CABOURNE, NICOLA LAU, DECLAN FLANAGAN, et al.Severe corneal melting after cataract surgery in patients prescribed topical postoperative NSAIDs and dexamethasone/neomycin combination therapy[J].Journal of Cataract and Refractive Surgery,2020,46(1):138-142.
[34]于凯,王一宇,常莉,等.双氯芬酸钠滴眼液致 Steven-Johnson 综合征 1 例[J].中国皮肤性病学杂志. 2014,28(06).

低氮低热卡肠外营养对胃肠癌患者术后恢复的影响

杨 婷

（海军军医大学第一附属医院 药剂科 200433）

【摘要】胃肠道癌症患者术后热氮量摄入不足，可能会影响机体恢复，但在术后急性应激期，能量和营养物质被严重消耗的情况下，高氮高热卡的补充可能反而引起患者机体多方面代谢的负担，造成多项指标异常，甚至增加术后感染并发症的风险。传统剂量的肠外营养（PN）在胃肠道癌症患者的术后使用上引发诸多争议，现就胃肠癌患者术后适宜时间内低氮低热卡 PN 支持的相关基础分析、临床使用现状以及临床研究进展进行综述。

【关键词】胃肠癌术后；低氮低热卡；肠外营养风险

Effect of low nitrogen and low calorie parenteral nutrition on postoperative recovery of gastrointestinal cancer patients

Yang Ting

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University 200433)

【**Abstract**】Insufficient intake of postoperative hot nitrogen in patients with gastrointestinal cancer may affect the recovery of the body. However, in the acute stress period after surgery, when energy and nutrients are seriously consumed, the supplement of high nitrogen and high caloric calorie may cause multiple metabolic burdens of the patient's body, resulting in multiple index abnormalities, and even increase the risk of postoperative infection complications. The traditional dose of parenteral nutrition (PN) has caused many controversies in the postoperative use of gastrointestinal cancer patients. This article reviews the relevant basic analysis, clinical use and clinical research progress of PN support for low nitrogen and low calorie calorie during the appropriate time after surgery in gastrointestinal cancer patients.

【**Key words**】Postoperative gastrointestinal cancer; Low nitrogen and low heat calorie; Parenteral nutrition risk

协同激活自体 NK 细胞和 cGAS-STING 通路的生物脂质体用于肿瘤免疫治疗的研究

杨学,居胜红

（东南大学放射科 江苏 210009）

Natural killer (NK) cell therapies primarily based on chimeric antigen receptor NK cells (CAR-NK) have been used in the clinic, raising hope for patients with mid to late-stage tumors. However, the efficacy of NK cell therapies is limited by insufficient antigen expression on the tumor cells surface. Herein, we proposed a universal "illuminate tumor homogenization antigen properties" (ITHAP) strategy, which achieved stable and controlled implantation of antigens on the surface of tumor cells by nanomedicine, thus completely enhancing the immune recognizability of tumor cells. The bio-liposomes (Pt@PL-IgG) were constructed for realizing the ITHAP strategy, which is composed of intermingled platelet membranes and liposomes, as well as carrying NK-activatable target antigen (IgG antibodies) and cisplatin pre-drug. Pt@PL-IgG targeted tumor cells by the autonomous drive of platelet membranes while achieving the implantation of IgG on tumor cell utilizing membrane fusion properties. In addition, the Pt-DNA complex combined with the NK cell-induced pyroptosis resulted in the release of substantial amounts of interferon (IFN), thus providing a synthase-stimulator of interferon genes (STING)-IFN-mediated positive immune microenvironment to further potentiate NK therapy. Anchoring cancer cells with NK-activatable target antigen might present a translational route for addressing the tumor heterogeneity challenges.

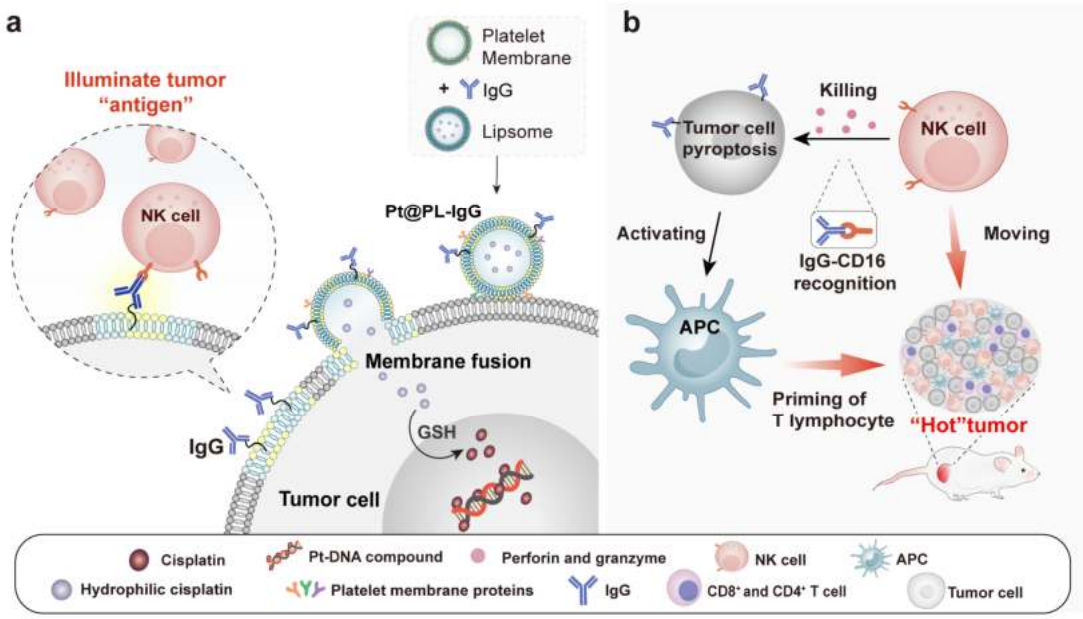


Figure1. Design of the illuminate tumor homogenization antigen properties (ITHAP) strategy

金丝桃苷对高脂饮食引起的肥胖伴胰岛素抵抗小鼠的保护作用

杨雪[1]，刘治国[1]，贾增永[1]，魏叶[2]，谭伟[1]，王晓燕[1]，张志勇[1]，张振江[1]，童德银[1]，王志荣[2]

（1.宿迁市第一人民医院（南京医科大学附属宿迁第一人民医院），江苏 宿迁 223800；2.徐州医科大学，江苏 徐州 221004）

【摘要】目的：研究金丝桃苷对高脂饮食引起的肥胖小鼠的代谢保护作用。**方法：**将 30 只 C57BL/6 小鼠随机分为低脂组（LDF）和高脂组（HDF）及高脂+金丝桃苷组（HDF+Hyp），每组 10 只，喂养 14 周后灌胃给予金丝桃苷，对照组给予溶媒。小鼠灌胃 9 周后收集血清检测生化指标及细胞因子，qRT-PCR 法检测肝脏内糖脂代谢相关基因，并观察肝脏形态。**结果：**给予金丝桃苷后，金丝桃苷组小鼠体重和空腹血糖较高脂组明显降低（P<0.05），且葡萄糖耐受能力显著增强（P<0.05）。金丝桃苷组小鼠血清的 TC、TG、LDL 及 HDL 的水平显著低于高脂组（P<0.05），肝脏内脂质沉积也较高脂组减少，而脂联素和瘦素水平均明显高于高脂组（P<0.05）。与高脂组相比，金丝桃苷组小鼠 SREBP1c、ACC、FAC 基因表达降低，而 AMPK 基因表达增加（P<0.05）。**结论：**金丝桃苷可降低高脂饮食小鼠的体重和血糖，改善胰岛素抵抗，抑制脂质合成，这些作用可能与 AMPK 及下游信号通路有关。

【关键词】金丝桃苷；肥胖；2 型糖尿病；胰岛素抵抗

Protective effect of hyperoside on obese mice with insulin resistance induced by high-fat diet

Liu Zhiguo[1], Yang Xue[1], Jia Zengyong[1], Wei Ye[2], Tan Wei[1], Wang Xiaoyan[1], Zhang Zhiyong[1], Zhang Zhenjiang[1], Tong Deyin[1], Wang Zhirong[2]

（1.The Affiliated Suqian First People's Hospital of Nanjing Medical University（Suqian First Hospital）, Suqian 223800, China; 2.Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China）

【Abstract】Objective：To study the metabolic protective effect of hyperoside on obese mice induced by high-fat diet. **Methods：**Totally 30 C57BL/6 mice were randomly divided into low-fat group （LDF）, high-fat group （HDF） and high-fat + hyperoside group （HDF+Hyp）, with 10 mice in each group. After 14 weeks, hyperoside was given by intragastric administration, and the solvent was given in control group. After 9 weeks of intragastric administration, the serum biochemical indexes and cytokines of the mice were detected, the expression of mRNAs related to glucose and lipid metabolism in liver was detected by qRT-PCR, and the morphology of the liver was observed. **Results：**After administration of hyperoside, the body weight and fasting blood glucose of mice in HDF+Hyp group were lower than those in HDF group （P<0.05）, and the ability of glucose tolerance was significantly enhanced （P<0.05）. The levels of serum TC, TG, LDL and HDL in HDF+Hyp group were lower than those in HDF group （P<0.05）, and the lipid deposition in liver was also reduced, while the levels of adiponectin and leptin were significantly higher than those in HDF group （P<0.05）. Compared with HDF group, the expression of SREBP1c, ACC and FAC genes in HDF+Hyp group was decreased, while the expression of AMPK gene increased significantly （P<0.05）.**Conclusion：**Hyperoside can reduce the body weight and blood glucose of mice fed with high-fat diet, improve the insulin resistance and inhibit the lipid synthesis, which may be related to AMPK and its downstream signaling pathway.

【Key words】Hyperoside; Obesity; Type 2 diabetes mellitus; Insulin resistance

作者简介：刘治国，男，硕士研究生，副主任药师，研究方向：中药活性成分筛选与研究、合理用药与药物临床试验，E-mail：liuzhiguo2700@163.com，18452510199

基金项目：宿迁市科技计划(S201720)；江苏省“六大人才高峰”项目(WSN-342)；宿迁市科技计划自然科学基金面上项目(K202119)；江苏省医学重点人才项目(QNRC2016480)

Triptolide induces liver injury by promoting ferroptosis via suppressing Nrf2 activation

杨艳，郭林，马嘉婷，肖明漩，颜苗

中南大学湘雅二医院 药剂科 湖南 长沙 410012

【**Abstract** 】**Backgrounds:**Triptolide (TP) is an epoxide diterpene lactone compound extracted from Tripterygium wilfordii. As the main active ingredient of Tripterygium wilfordii, it has anti-inflammatory, immunosuppressive, anti-tumor and other pharmacological activities. It can effectively treat rheumatoid arthritis, cancer and other diseases. However, due to its serious side effects, especially hepatotoxicity, its clinical application has been greatly limited. Therefore, it is urgent to elucidate the mechanism of TP-induced hepatotoxicity.**Objectives:**The purpose of this study was to investigate the role of ferroptosis, a new cell death mode, in the hepatotoxicity of TP and its potential mechanism through in vivo and in vitro experiments, in order to find effective targets for toxicity prevention and treatment and to provide theoretical basis for the prevention and treatment of hepatotoxicity of tripterygium wilfordii.**Methods:**（1）MTT assay was used to detect the cell survival rate of normal human liver L02 cells and normal mouse liver AML12 cells after TP treatment for 48 h to choose the appropriate concentration of TP. Western blot was used to detect the expression of SLC7A11, GPX4 and FTH1, and RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of PTGS2, NOX1 and TFR1 in order to assess the occurrence of ferroptosis. Subsequently, to evaluate the role of ferroptosis in TP-induced hepatocyte injury, AML12 cells were treated with TP combined with Ferrostatin-1 (Fer-1), a ferroptosis inhibitor. Cell survival rate, iron content and MDA level were detected. FerroOrange probe was used to detect intracellular Fe2+. And Fe2+, iron content and MDA levels were detected after GPX4 overexpression plasmid was transfected.（2）C57BL/6 mice were randomly divided into control group, TP group and TP+Fer-1 group (n=8/group). Serum ALT, AST and ALP levels were detected, and H&E pathological staining was performed on liver tissues. The mitochondrial structure of liver tissue was observed by TEM. Prussian blue staining, immunohistochemistry and kit were used to detect changes in iron content and lipid peroxidation products. Western blot and RT-qPCR were used to detect the expression of ferroptosis-related protein and mRNA.（3）The effects of TP on Nrf2 pathway in vitro and in vivo were measured by Western blot and RT-qPCR. Subsequently, ferroptosis- related protein, Fe2+, iron content and MDA levels were detected after Nrf2 overexpression plasmid was transfected into AML12 cells. In vivo, wild-type (WT) mice and Nrf2 knockout mice (Nrf2-/-) were selected as experimental subjects (n=6/group), which were divided into WT group, WT+TP group, Nrf2-/-group and Nrf2-/-+TP group. Serum ALT and AST were detected, and H&E staining was performed to evaluate the degree of liver injury. Total GSH, reduced GSH/GSSG, iron content, LPO and MDA levels were detected by relevant kits. The changes of key proteins of ferroptosis siganaling pathway were detected by Western blot. The nontargeted lipidomics of mouse liver tissue was analyzed by HPLC-MS. **Results:**（1）The survival rate of L02 and AML12 cells decreased with the increase of TP concentration. TP significantly increased the contents of iron content and MDA, significantly down-regulated the protein expressions of SLC7A11, GPX4 and FTH1, and significantly up- regulated the mRNA expressions of PTGS2, NOX1 and TFR1. In AML12 cells, compared with TP group, the hepatocyte survival rate in TP+Fer-1 group was increased, while the levels of iron content, Fe2+ and MDA levels were significantly decreased. And GPX4 overexpression inhibited TP-induced increase of iron content, Fe2+ and MDA levels.（2）Acute liver injury was caused by single administration of TP in mice. Compared to the Control group, serum ALT, AST and ALP levels in TP group were significantly elevated. Pathological changes like congestion, lobular disappearance, hepatocyte degeneration, necrosis appeared in the liver of TP group. Fer-1 pretreatment significantly alleviated liver injury caused by TP. The morphological changes of ferroptosis in mitochondria of TP group were observed by TEM, which is the

mitochondrial crista decreased or disappeared, and the mitochondrial membrane thickened. Prussia blue staining observed iron deposition in the liver of mice in TP group, and the kit detected abnormal increase of iron content in TP group. Immunohistochemical staining and kit detection revealed accumulation of 4-HNE and MDA in TP group, which were significantly relieved in TP+Fer-1 group. TP significantly down-regulated the protein expression of SLC7A11, GPX4 and FTH1 as well as the mRNA expression of FPN, and the combination of Fer-1 can restore their expression. In addition, TP increased mRNA expression of PTGS2, TFR1 and ACSL4. Combination of Fer-1 decreased the expression of PTGS2 but did not affect the expression of TFR1 and ACSL4. （3）TP significantly inhibited the expression of Nrf2 and HO-1 proteins in hepatocytes in vitro. Similarly, TP also significantly reduced the protein expression of Nrf2 and HO-1 and mRNA expression of GCLC and GCLM in vivo. Overexpression of Nrf2 restored the TP-induced downregulation of Nrf2, HO-1, SLC7A11, GPX4 and FTH1, and alleviated the TP-induced increase of iron content, Fe2+ and MDA. Nrf2 knockout increased the sensitivity of mice to TP-induced liver injury and ferroptosis. Compared with WT+TP group, Nrf2-/-+TP group showed more serious liver tissue pathological injury and higher ALT and AST levels. TP decreased total GSH and the GSH/GSSG ratio, down-regulated the protein expression of SLC7A11, GPX4 and HO-1, and significantly increased iron content, LPO and MDA levels. The same changes were observed in Nrf2-/- mice, and these changes were more significant after the intervention with TP in Nrf2-/- mice. Lipidomics analysis showed that there were significant differences in lipid metabolism profiles among the groups, and the effect of TP and the deletion of Nrf2 gene led to the disorder of lipid metabolism in the liver, supporting TP regulating ferroptosis and lipid disorder in liver through Nrf2. **Conclusions:** Ferroptosis was involved in liver injury caused by TP. The potential mechanism was that TP led to to iron accumulation in hepatocytes and lipid peroxidation by inhibiting Nrf2, thus inducing ferroptosis and liver injury.

【**Keywords**】 Triptolide; Ferroptosis; liver injury; Nrf2

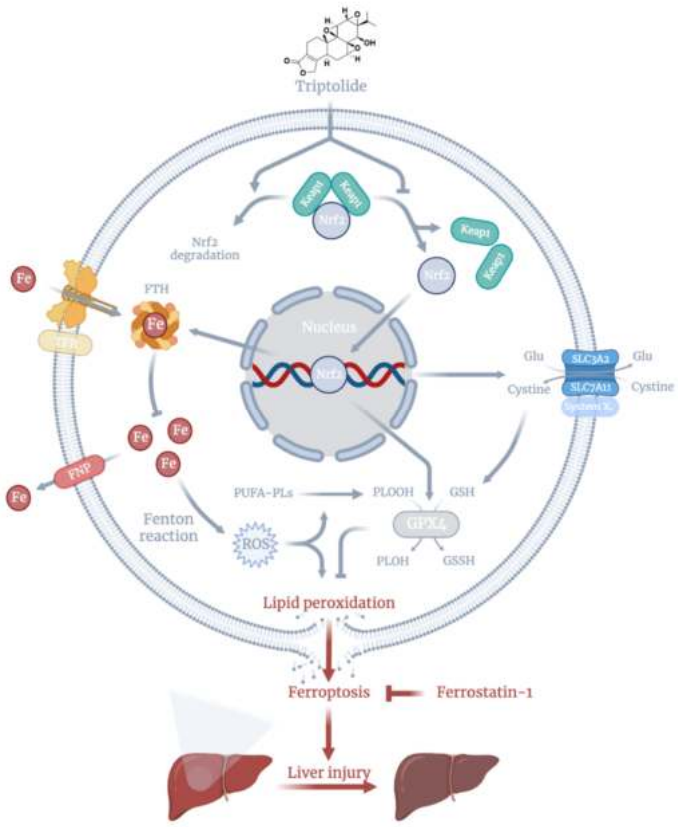


Figure 1 Diagram of possible molecular mechanisms of Triptolide-induced liver injury triggered by ferroptosis.

结直肠癌免疫治疗的毒性研究进展

杨洋，魏敏杰，李振华*

（中国医科大学药学院药理教研室，辽宁 沈阳 110122）

【摘要】结直肠癌（Colorectal cancer，CRC）的发病率和死亡率在世界范围内持续上升。CRC 患者的治疗在手术切除、化学治疗、放射治疗等传统治疗方面取得了很大进步，但是患者 5 年生存率仍然很低。近年来，免疫检查点抑制剂、嵌合抗原受体 T 细胞疗法、双特异性抗体以及联合治疗等癌症免疫治疗逐渐成为研究热点，并有望成为 CRC 治疗的新型有效手段。然而免疫治疗在 CRC 中的应用也导致了一系列免疫相关毒性和不良反应（Immune-related adverse events，irAEs），为进一步临床应用带来了挑战。本文就结直肠癌免疫疗法及其毒性的识别和干预方面的现状及研究进展进行综述。

【关键词】结直肠癌；免疫治疗；毒性；免疫相关不良反应

Research progress of immunotherapy and toxicity of colorectal cancer

YANG Yang，LI Zhen-hua*

（Department of Pharmacology, School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning, China）

【ABSTRACT】The incidence and mortality of colorectal cancer （CRC） continue to rise worldwide. The treatment of CRC patients has made great progress in traditional treatments such as surgical resection, chemotherapy, and radiotherapy, but the 5-year survival rate of patients is still very low. In recent years, cancer immunotherapies such as immune checkpoint inhibitors, chimeric antigen receptor T cell therapy, bispecific antibodies, and combination therapy have gradually become research hotspots, and are expected to become new and effective treatments for CRC. However, the application of immunotherapy in CRC has also led to a series of immune-related toxicity and adverse reactions（Immune-related adverse events, irAEs）, which has brought challenges to further clinical applications. This article reviews the current status and research progress of colorectal cancer immunotherapy and its toxicity identification and intervention.

【KEY WORDS】colorectal cancer; immunotherapy; toxicity; immune-related adverse reactions

结直肠癌（Colorectal cancer，CRC）是常见的消化道恶性肿瘤[1]，在全世界癌症死亡原因中位居前三[2,3]。最新的数据表明每年约有 100 万 CRC 新增病例，其中有大约 70 万人死于 CRC[4]。虽然发病率和疾病特异性死亡率在过去二十年中逐渐下降，但是年轻个体的发病率呈上升趋势。在我国以及一些不发达国家，由于医疗条件有限，很多 CRC 患者未能通过早期筛查发现，不能及时就诊。极少数患者即便是通过早期筛查及早发现，并进行了有效治疗，但患者 5 年存活率依旧较低，仍然会有复发的风险甚至可能继续发展为转移性疾病[5]。

对于 CRC 患者的治疗，常规疗法可以杀死快速增殖的肿瘤细胞，但是仍然具有复发率高、选择性差、耐药性等问题[6]。传统的药物治疗方法因缺乏治疗选择性、对健康组织的高毒性以及对癌细胞的非特异性而受到严重

［基金项目］中国医科大学引进人才启动基金（1210619010）；2021“双一流”科研经费（3110210603）

［作者简介］杨洋，女，硕士，中国医科大学药学院药理教研室，辽宁 沈阳 110122，E-mail：yy15575410922@163.com

［通讯作者］李振华，男，博士，教授，博士生导师，主要从事药物新型递送系统和肿瘤免疫治疗，E-mail：cmu.zhli@qq.com

限制。因此，急需研究出 CRC 治疗的新方法，提高治疗效果，减少毒副作用，延长患者的生存期。随着人们对癌症治疗更加深入的探索，肿瘤免疫疗法显示出巨大的潜力来革新癌症治疗，已成为克服恶性肿瘤的全新方法[7]。

癌症免疫疗法通过免疫系统识别并攻击癌细胞，可在多种实体瘤中诱导持久应答，目前已经改变了多种肿瘤的治疗方法[8]。免疫疗法的目标是诱导抗肿瘤免疫反应，主要有主动免疫疗法和被动免疫疗法，它们的区别在于与宿主免疫系统的相互作用以及所引起的反应类型不同。免疫疗法可使药物靶向靶部位具有高度特异性，以一种更精确、更有效的方式杀死癌细胞，很大程度上减少了对正常组织细胞的损伤[9]。到目前为止，已经开展了很多免疫疗法相关的临床试验用于 CRC 患者的治疗（见表 1）。但是，应用最多的是对恶性肿瘤具有抑制作用的免疫疗法，包括免疫检查点抑制剂、嵌合抗原受体 T 细胞疗法（Chimeric antigen receptor T cell therapy，CAR-T）和其他细胞疗法、针对癌胚抗原的 T 细胞双特异性抗体和溶瘤病毒疗法、自体细胞被动免疫和带有基因载体的癌症疫苗以及联合治疗等方法，但是大都产生了新的毒性反应，我们称其为免疫相关不良反应[10]（Immune-related adverse events，irAEs），包括自身免疫和非特异性炎症，如肠炎、肝炎、肺炎以及各种内分泌毒性等[11]。本文就检查点抑制剂、CAR-T 细胞疗法、T 细胞双特异性抗体和联合疗法等免疫疗法在 CRC 治疗中的应用及其毒性进行讨论，为免疫疗法在 CRC 中的进一步研究提供了方向。

表 1.研究结直肠癌免疫治疗的临床试验[12]

Table 1. Research on clinical trials of colorectal cancer immunotherapy[12]

研究名称	药物	靶标	研究人群	阶段
KEYNOTE-177（NCT02563002）	Pembrolizumab vs.standard therapy	PD-1	一线转移性 dMMR CRC	III
COMMIT Trial	Atezolizumab vs.	PD-L1	一线转移性 dMMR CRC	III
NRG-G1004/SW0G-S1610	FOLF0X/bevacizumab/atezolizumab vs.			
（NCT02997228）	FOLFOX/bevaci-zumab			
ATOMIC Trial Alliance A021502	FOLFOX/atezolizumab vs. FOLFOX	PD-L1	III 期 dMMR 结肠癌	III
（NCT02912559）				
MEDITREME （NCT03202758）	FOLF0X/durvalumab/tremelimumab	PD-L1	一线转移性 CRC	IB/II
		CTLA-4	（未指定 MMR）	
CheckMate 9X8 （NCT03414983）	FOLF0X/bevacizumab/nivolumab vs.	PD-1	一线转移性 CRC	II/III
	F0LFOX/bevacizumab		（未指定 MMR）	
ElevatION: CRC-101 （NCT03176264）	PDR001/bevacizumab/mFOLFOX6	PD-1	一线转移性 CRC pMMR	I
BACCI（NCT02873195）	Capecitabine/bevacizumab with	PD-L1	难治性转移性 CRC	II
	atezoli-zumab vs. capecitabine		（未指定 MMR）	
	bevacizumab			
NCT02981524	GVAX colon vaccine with	PD-1	转移性 CRC pMMR	II
	pembroli-zumab			
Quilt-2.004（NCT03050814）	F0LF0X/bevacizumab with or without	PD-L1	一线转移性 CRC pMMR	II
	Ad-CEA vaccine/avelumab			
NCT02860546	TAS-102 with nivolumab	PD-1	难治性转移性 CRC	II
			（pMMR）	
NCT03104439	Radiotherapy with nivolumab	PD-1	转移性 CRC pMMR 和	II
			dMMR	
NCT03307603	Y radioembolization with nivolumab	PD-1	转移性 CRC	I/II
NCT01274624	Reolysin with FOLFIR/bevaciizumab	N/A	转移性 CRC	I
			（未指定 MMR）	
NCT01394939	JX-594 （thymidine kinase-deactivated	N/A	转移 CRC	I/II

	vaccinia virus plus GM-CSF） with or without irinotecan		（未指定 MMR）	
COTEZO IMblaze370 （NCT02788279）	Cobimetinib with atezolizumab, atezoIi-zumab monotherapy vs. regorafenib	PD-L1 Mek	难治性转移性 CRC （仅限 dMMR； pMMR）	III
CheckMate 142 （NCT02060188）	Nivolumab/ipilimumab/drug: cobi-metinib or daratumumab or anti-LAG-3 antibody	PD-1 CTLA-4 Lag3 MEK CD38	预处理转移性 CRC pMMR 和 dMMR	II
CheckMate 9N9（NCT03377361）	Nivolumab/trametinib with or without ipilimumab	PD-1 CTLA-4 MEK	预处理转移性 CRC （未指定 MMR）	I/II
NCT03271047	Binimetinib with nivolumab with or without ipilimumab	PD-1 CTLA-4 MEK	预处理的转移性 CRC pMMR 突变 RAS	I/II
NCT03256344	Talimogene laherparepvec with atezoli-zumab	PD-L1	CRC 的肝转移	I
NCT03182894	Epacadostat with pembrolizumab with azacitidine	PD-1 IDO	转移性 CRC MSS	III
NCT02777710	Durvalumab plus CSF-1R TKI （pexidar-tinib）	PD-L1 CSF-1R	难治性转移性 CRC	I
NCT02559024	Ant-OX40 antibody （MEDI6469）	OX-40	CRC 的肝转移	I
NCT03081494	PDR001/regorafenib	PD-1	转移性 CRC pMMR	IB
QUILT-3.050 （NCT03169777）	Avelumab. bevacizumab, capecitabine, cetuximab, cyclophosphamide, 5-fluorouracil, fulvestrant, leuco- vorin, nab paclitaxel, nivolumab, omega -3-acid ethyl esters（Lovaza; Teva, North Wales, PA）, oxaliplatin, stereotacbic body radiation therapy, ALT-803, ETBX-011, ETBX-021, ETBX-051, ETBX-061, G1-4000, G1-6207, GI-6301, and haNK	Numerous	未指定转移性 CRC MMR	IB/II
NCT02834052	Pembrolizumab/poly-ICLC	PD-1 TLR3	预处理转移性 CRC pMMR	l/II
NCT02650713	TCB CEA （RO6958688） plus atezolizumab	PD-1 CEA	转移性癌症	l/II

1 免疫疗法在 CRC 治疗中的应用

1.1 免疫检查点抑制剂

免疫阻断疗法是目前临床上最重要且应用最广泛的一种免疫治疗方法。该方法安全可靠，已成为黑色素瘤、原发性肝癌、CRC 等多种恶性肿瘤标准疗法的一部分，尤其对 DNA 错配修复缺陷（DNA mismatch repair defect，dMMR）和高度免疫原性微卫星不稳定（Highly immunogenic microsatellite instability，MSI-H）的转移性 CRC 特

别有效[13]。目前具有显著临床疗效的靶标主要有程序化死亡蛋白 1（programmed cell death 1，PDCD1，也称 PD-1）及其配体（programmed cell death 1 ligand 1，PDCD1LG1，也称 PD-L1）和细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4（cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4，CTLA-4）。

PD-1/PD-L1 和 CLTA-4 抑制剂在免疫应答中都是共抑制分子，通过抑制相关的信号传导来诱导 T 细胞活化并刺激抗肿瘤免疫反应，最终杀死携带相关抗原的肿瘤细胞[14]。最早使用的一种免疫检查点抑制剂是 CTLA-4 抑制剂，阻断 CTLA-4 与其配体的结合从而增加 T 细胞的活化和增殖。PD-1/PD-L1 是通过改变 T 细胞与抗原提呈细胞或 T 细胞与靶细胞的接触时间来抑制参与 T 细胞活化的激酶[15]。表达 PD-1 的免疫细胞与表达 PD-L1 的肿瘤相结合后可抑制 T 细胞增殖、分化以及细胞因子的分泌，从而使 T 细胞活性受到抑制，导致机体的肿瘤免疫监控作用受损，引发肿瘤免疫耐受和逃逸。PD-1/PD-L1 抑制剂则阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合，恢复 T 细胞活性，调节组织免疫反应从而更好地发挥抗肿瘤作用。抗 PD-1/PD-L1 治疗的优势主要在于，它们可以增强对癌细胞的选择性，但不会有毒副作用，最大限度地减少对附带组织的损伤。目前，PD-1/PD-L1 以及抗 CTLA-4 的免疫疗法在转移性 CRC 的治疗研究中取得了很大进展，并且已有研究表明 dMMR 转移性 CRC 患者对 PD-1/PD-L1 的免疫疗法具有显著的临床反应[16]。FDA 批准用于 MSI-H 或 dMMR 晚期或转移性 CRC 治疗的检查点抑制剂主要有 PD-1 抑制剂派姆单抗和纳武单抗以及 CLTA-4 抑制剂伊匹单抗[17]。

1.2 嵌合抗原受体 T 细胞疗法

嵌合抗原受体 T 细胞疗法（Chimeric antigen receptor T cell therapy，CAR-T 细胞疗法），也称第三代细胞免疫疗法，是一种从患者的肿瘤、淋巴结或外周血中收集 T 细胞，将细胞经过纯化、体外扩增后回输到患者体内重新表达 CAR 蛋白的方法，以此来特异性识别癌细胞与正常细胞，增强抗肿瘤作用[18]。采用的 CAR 是由外部抗原结合结构域组成[19]，通常是靶向肿瘤细胞表面抗原的单链可变抗体片段与跨膜结构域和编码 T 细胞受体信号的胞内结构域相连接。CAR-T 细胞仅靶向在肿瘤细胞表面表达的分子[20]，因此排异反应小、患者耐受性好，特异性强且相对持久地杀伤肿瘤细胞。CAR-T 疗法只需注射一次即可，但是注射后细胞活性可保留十年之久，持久有效且副作用小[21]，在 CRC 的小鼠模型中已经证明了 CAR-T 细胞疗法的效果。临床试验研究发现，CAR-T 疗法进行难治的肝、肺转移性 CRC 治疗后，患者的情况有所改善，并且在 30 周后仍然保持稳定，通过 PET/CT 和 MRI 分析发现肿瘤的大小大幅度缩小[22]。表皮生长因子受体 2 抗体已被批准用于 CRC 的常规治疗且安全性较好。观察结果显示，靶向表皮生长因子受体 2 的 CAR-T 疗法可以完全抑制再发性肿瘤的形成和生长，抗肿瘤效果显著[23]。

1.3 双特异性抗体

局部和区域性 CRC 通常可以治愈，但是转移性结直肠癌（Metastatic colorectal cancer，mCRC）的总体生存率仅为 14%[24]，需要更有效的方法来治疗。双特异性 T 细胞增强抗体疗法是一种精确的免疫治疗方法，不仅能够靶向肿瘤相关抗原，还可以靶向 T 细胞抗原。T 细胞双特异性抗体的主要优点是通过人工免疫突触主动定向而被 T 细胞识别[25]，从而选择性杀伤癌细胞。

目前已开发出一种靶向癌胚抗原的双特异性抗体药物，称其为癌胚抗原-T 细胞双特异性抗体（Carcinoembryonic antigen-T cell bispecific antibody，CEA-TCB），可同时结合肿瘤细胞上的 CEA 和 T 细胞上的 CD3 [26]。CEA-TCB 是迄今为止唯一一个进入临床试验的 IgG 抗体，也是第一个在实体瘤，特别是 MSS 型 CRC 中显示功效的 T 细胞双特异性抗体。接受 CEA-TCB 单一疗法治疗的转移性 CRC 显示出良好的效果。CEA-TCB 的活性与 CEA 的表达密切相关[27]，在高度表达 CEA 的肿瘤细胞中可观察到较强的反应效果。有研究发现 CEA 在绝大多数 CRC 患者中广泛表达。相关性评估发现，CEA-TCB 与 CRC 的治疗之间存在某种关联[28]，因此我们可以认为应用 CEA-TCB 治疗的 CRC 患者具有较好的治疗效果。

2 联合治疗在 CRC 治疗中的应用

临床上常用的化疗药物由于自身严重的毒副作用以及缺乏靶向性[29]，不能准确将药物递送至肿瘤细胞发挥作用，而且在杀死肿瘤细胞的同时也会影响到正常细胞，给 CRC 患者带来了很大负担。常规 CRC 一线化疗药，如氟尿嘧啶、伊立替康、卡培他滨等患者使用后产生了严重的毒性反应，其中最常见的毒性反应包括呕吐、腹泻、高热性中性粒细胞减少症和血小板减少症等[30]。以目前使用较广泛的伊立替康为例，CRC 患者中约 50%对

伊立替康治疗有反应，但这其中有一半会出现严重的毒性反应。化疗药物引起的不良反应极大地限制了化学治疗在 CRC 中的临床应用，而且单靠任何一种免疫疗法都不可能明显改变 CRC 的预后，因此迫切需要开发新的治疗剂来进行 CRC 治疗。

常规化学疗法与其他疗法相结合，产生的协同作用将癌症的研究和治疗引入了一个新的方面，也就是所谓的联合疗法，化学治疗、放射治疗和靶向治疗与免疫治疗相结合是最直接最有效的方法。联合治疗可使用各种机制来降低 CRC 药物的耐药性，增强免疫活性的同时最大程度地减少与常规化学疗法相关的不良反应。不同的免疫疗法相互结合更有效果，常见的联合治疗策略有免疫抑制剂和小分子的组合或双功能特异性抗体，如 PD-1/PD-L1 和 CTLA-4[31]的结合。纳武单抗与小剂量伊匹单抗的联合治疗已获得批准用于同一类型曾接受过化疗的 MSI-H 或 dMMR 转移性 CRC 患者。临床前数据支持靶向癌胚抗原和 T 细胞上 CD3 的双特异性 T 细胞结合抗体与抗 PD-1/PD-L1 的组合。临床结果显示可大剂量使用 CEA-TCB 新型抗体（RO6958688）和 PD-L1 抑制剂（阿特珠单抗）来联合治疗转移性 MSS-CRC[32]。小分子免疫治疗剂也可以与抗体组合使用以达到协同治疗的目的。目前临床上 mCRC 的标准治疗方法是化学疗法与可阻断肿瘤信号传导或血管生成的单克隆抗体联合使用。研究表明，单抗与标准化疗药物结合使用可显著提高 CRC 患者的生存周期[33]。FDA 已经批准了四种单克隆抗体药物用于 CRC 治疗，贝伐单抗和雷莫昔单抗靶向 VEGF-VEGFR 血管生成途径，而西妥昔单抗和帕尼单抗则靶向 EGFR 途径，贝伐单抗降低具有免疫抑制作用的 VEGF 的水平，而西妥昔单抗通过降低抗体的细胞毒性来起到协同作用。联合治疗为临床研究带来了很多好处，为探索 CRC 的其他疗法奠定了基础，预计在不久的将来会有更多的药物以及其他药物组合的发现[34]。

3 免疫治疗的毒性反应及其干预措施

然而，许多临床研究发现，免疫检查点抑制剂因为诱导自身抗原产生免疫反应，使得患者自身免疫应答整体增强，易引起免疫系统紊乱，对患者正常的组织器官造成损害从而引起一系列 irAEs，包括皮肤毒性反应、胃肠道反应和内分泌功能障碍等[35]，需要高度重视及监测。内分泌功能障碍是免疫检查点抑制剂临床试验中最常见的 irAEs [36]。检查点抑制剂的 irAEs 大多数患者属于低级症状，这些症状包括贫血，淋巴细胞减少，瘙痒，皮疹，腹泻，口干，肝脏和胰腺酶升高，关节痛，肌痛咳嗽，呼吸困难，低烧和疲劳等。最常见的是出现疲劳、皮疹或瘙痒等低度皮肤毒性反应[37]，腹泻是第二常见的症状。临床试验结果显示，接受抗 CTLA-4 疗法的患者比接受抗 PD1 或抗 PD-L1 疗法的患者更容易发生颞动脉炎。PD-1/PD-L1 抑制的 IrAEs 还可能包括间质性肺炎、脑病和神经后遗症、格林-巴利综合征和心脏功能不全以及急性肾上腺皮质功能不全等[38]。PD-1 抗体的毒性随其所治疗的组织而变化。CTLA-4 阻断抗体在用药剂量较小时没有死亡病例，剂量越大毒性也越大。随着剂量的不断增大，3-4 级与药物相关的严重 irAEs 发生率也就越高。成功识别、管理检查点抑制剂毒性的关键是合理预防、早期诊断、尽快治疗，确保在用药期间与患者和患者家属之间进行良好的沟通和交流，并且迅速合理地采取相关措施进行治疗（见表 2）。

CAR-T 细胞疗法也会观察到可能的毒副作用，大多数 CAR-T 细胞的靶标也会在正常细胞中表达，所以可能会攻击正常细胞，在首次输注后的几天内会出现相关的不良反应。CAR-T 细胞疗法常见的 irAEs 主要有细胞因子释放综合征（Cytokine release syndrome，CRS）和肿瘤溶解综合征等[39]。CRS 主要是由于治疗后释放的大量细胞因子所导致的，临床表现包括持续性高热、恶心、食欲减退等。出现 CRS 时，通常使用糖皮质激素或 IL-6 受体抗体阻断剂尽早进行治疗[40]。在 CRC 患者治疗过程中严重的 CRS 并不常见，但仍需要进一步改善 CAR-T 技术以提高治疗效果并确保患者的安全性[41]。在一项研究中，进行 CAR-T 治疗的 mCRC 患者出现了严重的结肠炎。不仅如此，临床研究还发现，抗 HER2 靶向的 CAR-T 细胞疗法在晚期 CRC 患者中还出现了致命的急性呼吸衰竭综合征。为此研究发现，直接结合到 T 细胞表面的免疫药物递送系统，例如 IL-12，IL-7 受体和含有 IL-15 的脂质纳米颗粒，可以直接体内工程化 CAR-T 细胞以分泌细胞因子或表达免疫刺激配体。T 细胞工程化药物递送系统可以降低全身给药的毒副作用，同时将 T 细胞迁移到肿瘤部位，提高药物在疾病部位的渗透能力，增强其在肿瘤微环境中的活性并提高抗肿瘤反应性[42]。

抗体在药效学治疗方面具有很大优势，但是抗体自身的免疫原性也会引起一些副作用，主要有细胞因子风暴[43]、高血压等，具有乏力、头痛等症状。此外，也有患者出现了肺动脉高压，严重程度与剂量相关[44]。临床

开发过程中，CEA-TCB 剂量的确定需要花费很长时间。研究显示，可以使用建模的方法选择最佳方案和分步给药方案，确定临床开始剂量和有效剂量，设计早期临床试验以及进行毒性预测以避免毒副作用的产生[32]。

联合治疗不仅产生特异性抗原，同时也会诱导自身免疫反应。有研究发现，联合治疗过程中发挥协同作用的同时毒性反应也明显增加，irAEs 的发生率更高，例如 PD-1 和 CTLA-4 的组合[45]。多项研究显示，相比于检查点抑制剂的单独使用，免疫抑制剂联合使用时总体毒性的发生率以及死亡率会明显增加，尤其是 3 级以上严重的 irAEs 发生率更是明显升高。目前临床上，用于 mCRC 治疗的尼武单抗和伊匹单抗的组合显示出良好的治疗效果，12 个月总生存期为 85%，然而仍然有患者发生了严重的不良反应，发生 3-4 级严重 irAEs 的患者有 32%。

相较于其他治疗方法引起的不良反应，irAEs 具有延迟发作和持续时间长的特点，其发作的表现有所不同，毒性的特性、严重性和治疗方法也不同。在临床试验中已对 irAEs 进行分级，目前已经报道了多种罕见但严重的 irAEs 的临床症状，通常需要进行特殊处理。患者发生 irAEs 的情况和风险不同，因此对患者进行安全合理而又个性化的临床治疗至关重要。irAEs 的影响几乎可以覆盖人体各个器官组织，通常是用 1 mg / kg 泼尼松或其等效物进行治疗，难治性自身免疫甚至需要终止免疫治疗或替换其他免疫调节剂。缺乏个体化治疗可能会延迟对于 irAEs 的有效控制，需要及时对所有患者进行深入评估，并对高危患者进行监测以迅速发现 irAEs，尤其是头 12 周（四个周期），此时出现 irAEs 的风险似乎更高。

更好地了解免疫抑制才能预测患者的反应并提高治疗效果。检查点抑制剂 PD-1/PD-L1、CTLA-4 等在转移性 CRC 患者中的治疗极大地改善了许多被认为无法治愈的难治性 CRC 患者的预后，但是影响多个器官的 IrAEs 已成为其应用的主要障碍；CAR-T 细胞疗法对 CRC 的适用性仍有待证明，关于过继转移的 T 细胞浸入有限程度的担忧、CRC 的致密微环境，与全身细胞因子释放综合征有关的潜在安全性问题以及针对正常上皮细胞的靶上-瘤外效应仍有待解决；双特异性抗体以及以上几种方法的联合治疗也显示出良好的效果，但是目前它们的应用依然受到药物毒性的限制。现阶段正在进行一些试验探索其他免疫干预策略，包括疫苗的研究、溶瘤细菌或病毒或树突状细胞抗原与各种佐剂的结合等，目的是改善 CRC 在佐剂和转移性环境中的肿瘤免疫原性。

表 2. 检查点抑制剂的免疫相关不良事件[46]

Table 2. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors [46]

irAE 的类型	症状	发生率（%）		发作时期（周）	按严重程度治疗		
		PD1 或者 PDL1	PDl+ CTLA4		等级	治疗	停止 ICI?
皮肤	皮疹和瘙痒	15-20	40	3-6	1	抗组胺药/局部糖皮质激素	否
					2	外用皮质类固醇	否
					≥3	口服皮质类固醇	是
胃肠道	腹泻/结肠炎	10-20	44	6-8	1	保守治疗	否
					2	布地奈德	是
					≥3	皮质类固醇	是
肝	酶水平异常	<5	18	8-12	≥3	类固醇	是
内分泌	疲劳，恶心和头痛	10	不适用	不适用	不适用	不建议使用常规皮质类固醇	不适用

4 总结与展望

CRC 的发病率不断增长并趋于年轻化，传统的治疗方法因为毒副作用、耐药性等诸多缺陷在临床上受到了严重限制。免疫治疗通过诱导免疫反应特异性杀伤肿瘤细胞，因其精准靶向和特异性治疗等独特的优势迅速成为了 CRC 治疗的有效手段，尤其是在 MSI-H/dMMR 晚期或转移性 CRC 中具有广泛的应用前景。在这篇综述中，我们描述了免疫检查点抑制剂、嵌合抗原受体 T 细胞疗法、T 细胞双特异性抗体以及联合治疗等免疫疗法在治疗 MSI-H/dMMR 晚期或转移性 CRC 中的发生发展，重点介绍了这几种免疫疗法在 CRC 治疗中的应用及其产生的不良反应。我们还对 CRC 免疫疗法毒性的认识和管理进行了阐述，并提出了干预措施，以扩大 CRC 免疫疗

法的应用范围，为免疫疗法的基础研究、临床治疗以及未来研究方向提供参考。

越来越多免疫治疗相关研究的发现及其广泛应用，其在 CRC 中的临床应用也逐渐成为了研究热点。我们已经深刻意识到了解免疫毒性的重要性，认识免疫治疗的毒性反应并进行有效管理对临床实践至关重要（见表 3）。此外，考虑到引起 irAEs 的机制非常复杂，涉及许多方面的因素，而且 irAEs 的治疗方法单一，需要对 irAEs 的早期预测和解决机制提供更加深刻的见解。由于许多患者已经在接受免疫治疗，并且考虑到在未来几年中免疫治疗的使用有望增加，因此需要做更多的研究，提供更有针对性的干预措施，以更好地了解免疫治疗的临床安全性及其相关的危险因素，从而评估新的治疗前景。我们需要尽早识别并迅速采取免疫抑制或免疫调节等措施进行处理，今后仍需要进行更深入的研究以尽可能规避或降低不良反应发生的风险。

表 3.器官系统检查点抑制剂相关毒性的发生频率[12]

Table 3. Frequency of organ system checkpoint inhibitor-related toxicity[12]

器官/系统	病症	不良事件的发生频率（%）
皮肤	黄斑皮疹	约 30-50
	瘙痒	
	白癜风（黑色素瘤）	
	大疱性疾病	
	史蒂文斯-约翰逊/中毒性表皮坏死综合征	
胃肠道	结肠炎	约 20-40
	胃炎	
	回肠炎	
肝	肝炎	约 4-15
内分泌	甲状腺功能减退	约 10-50
	甲亢	
	肾上腺皮质功能减退	
	垂体炎	
	I 型糖尿病	
肺	肺炎	约 1-5
	结节病	
肌肉骨骼	关节痛	约< 1-15
风湿病	关节炎	
	肌炎	
	干燥综合征	
心脏	心肌炎	约< 1
	心包炎	
血液学	贫血	约<1-5
	淋巴细胞减少	
	血小板减少症	
	治疗后淋巴细胞增多，嗜酸性粒细胞增多，中性粒细胞增多	
肾	肾病	约<2-30
神经学	后可逆性脑病	约<4-15
	格林巴里综合征	
	周围神经病变	
	重症肌无力	

	无菌性脑膜炎	
	横向脊髓炎	
眼科	葡萄膜炎	约 1
	巩膜炎	
	沃格特-小柳-原田病	
	结膜炎	

参考文献

[1]张童童, 陈伟, 于溯洋, et al. 结直肠癌 PD-1/PD-L1 阻断治疗的耐药研究现状[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2021, 10（02）: 205-210.

[2] Aghabozorgi A S, Bahreyni A, Soleimani A, et al. Role of adenomatous polyposis coli （APC） gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives[J]. Biochimie, 2019, 157: 64-71.

[3]陈功, 张荣欣, 李丹丹, et al. 结直肠癌免疫检查点抑制剂治疗现状与展望[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25（10）: 947-955.

[4] Laporte G A, Leguisamo N M, Kalil A N, et al. Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018, 126: 168-185.

[5] Zhang Y, Chen Z, Li J. The current status of treatment for colorectal cancer in China: A systematic review[J]. Medicine（Baltimore）, 2017, 96（40）: e8242.

[6]陈海东. 结直肠癌患者的临床诊疗进展[J]. 吉林医学, 2020, 41（08）: 1965-1966.

[7] Michot J M, Bigenwald C, Champiat S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review[J]. Eur J Cancer, 2016, 54: 139-148.

[8] Kennedy L B, Salama A K S. A review of cancer immunotherapy toxicity[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70（2）: 86-104.

[9] Paczesny S, Pavletic S Z, Bollard C M. Introduction to a review series on emerging immunotherapies for hematologic diseases[J]. Blood, 2018, 131（24）: 2617-2620.

[10] Puzanov I, Diab A, Abdallah K, et al. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer （SITC） Toxicity Management Working Group[J]. J Immunother Cancer, 2017, 5（1）: 95.

[11] Carter B W, Bhosale P R, Yang W T. Immunotherapy and the role of imaging[J]. Cancer, 2018, 124（14）: 2906-2922.

[12] Overman M J, Ernstoff M S, Morse M A. Where We Stand With Immunotherapy in Colorectal Cancer: Deficient Mismatch Repair, Proficient Mismatch Repair, and Toxicity Management[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2018, 38: 239-247.

[13]Kalyan A, Kircher S, Shah H, et al. Updates on immunotherapy for colorectal cancer[J]. J Gastrointest Oncol, 2018, 9（1）: 160-169.

[14] Jenkins R W, Barbie D A, Flaherty K T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors[J]. Br J Cancer, 2018, 118（1）: 9-16.

[15] Lee L, Gupta M, Sahasranaman S. Immune Checkpoint inhibitors: An introduction to the next-generation cancer immunotherapy[J]. J Clin Pharmacol, 2016, 56（2）: 157-69.

[16] Sillo T O, Beggs A D, Morton D G, et al. Mechanisms of immunogenicity in colorectal cancer[J]. Br J Surg, 2019, 106（10）: 1283-1297.

[17] Palmieri D J, Carlino M S. Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity[J]. Curr Oncol Rep, 2018, 20（9）: 72.

[18]Sur D, Havasi A, Cainap C, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Colorectal Cancer[J]. J Clin Med, 2020, 9（1）.

[19] Feins S, Kong W, Williams E F, et al. An introduction to chimeric antigen receptor （CAR） T-cell immunotherapy for

human cancer[J]. Am J Hematol, 2019, 94（S1）: S3-s9.
[20] Hege K M, Bergsland E K, Fisher G A, et al. Safety, tumor trafficking and immunogenicity of chimeric antigen receptor（CAR）-T cells specific for TAG-72 in colorectal cancer[J]. J Immunother Cancer, 2017, 5: 22.
[21] Riley R S, June C H, Langer R, et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18（3）: 175-196.
[22] Teng R, Zhao J, Zhao Y, et al. Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells Repressed Solid Tumors and Their Relapse in an Established Patient-derived Colon Carcinoma Xenograft Model[J]. J Immunother, 2019, 42（2）: 33-42.
[23] Tang H J, Liu Y Q, Bian X C, et al. [Specific cytotoxicity of a novel HER2-based chimeric antigen receptor modified T lymphocytes against HER2-positive tumor cells][J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2017, 46（10）: 714-720.
[24] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67（1）: 7-30.
[25] Gonzalez-Exposito R, Semiannikova M, Griffiths B, et al. CEA expression heterogeneity and plasticity confer resistance to the CEA-targeting bispecific immunotherapy antibody cibisatamab （CEA-TCB） in patient-derived colorectal cancer organoids[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7（1）: 101.
[26] Bacac M, Klein C, Umana P. CEA TCB: A novel head-to-tail 2:1 T cell bispecific antibody for treatment of CEA-positive solid tumors[J]. Oncoimmunology, 2016, 5（8）: e1203498.
[27] Dudal S, Hinton H, Giusti A M, et al. Application of a MABEL Approach for a T-Cell-Bispecific Monoclonal Antibody: CEA TCB[J]. J Immunother, 2016, 39（7）: 279-89.
[28] Bacac M, Fauti T, Sam J, et al. A Novel Carcinoembryonic Antigen T-Cell Bispecific Antibody （CEA TCB） for the Treatment of Solid Tumors[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22（13）: 3286-97.
[29] Rejhová A, Opattová A, Čumová A, et al. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment[J]. Eur J Med Chem, 2018, 144: 582-594.
[30] Martinez-Balibrea E, Abad A, Martínez-Cardús A, et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy[J]. Br J Cancer, 2010, 103（4）: 581-9.
[31] Waidmann O. Recent developments with immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. Expert Opin Biol Ther, 2018, 18（8）: 905-910.
[32] Betts A, Van Der Graaf P H. Mechanistic Quantitative Pharmacology Strategies for the Early Clinical Development of Bispecific Antibodies in Oncology[J]. Clin Pharmacol Ther, 2020, 108（3）: 528-541.
[33] Wu Z, Guo H F, Xu H, et al. Development of a Tetravalent Anti-GPA33/Anti-CD3 Bispecific Antibody for Colorectal Cancers[J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17（10）: 2164-2175.
[34] Gibney G T, Weiner L M, Atkins M B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy[J]. Lancet Oncol, 2016, 17（12）: e542-e551.
[35] Joshi M N, Whitelaw B C, Palomar M T, et al. Immune checkpoint inhibitor-related hypophysitis and endocrine dysfunction: clinical review[J]. Clin Endocrinol （Oxf）, 2016, 85（3）: 331-9.
[36] Barroso-Sousa R, Barry W T, Garrido-Castro A C, et al. Incidence of Endocrine Dysfunction Following the Use of Different Immune Checkpoint Inhibitor Regimens: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. JAMA Oncol, 2018, 4（2）: 173-182.
[37] Hahn A W, Gill D M, Agarwal N, et al. PD-1 checkpoint inhibition: Toxicities and management[J]. Urol Oncol, 2017, 35（12）: 701-707.
[38] Wu X, Gu Z, Chen Y, et al. Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2019, 17: 661-674.
[39] Maus M V, Levine B L. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Community Oncologist[J]. Oncologist, 2016, 21（5）: 608-17.

[40] Lee D W, Gardner R, Porter D L, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome[J]. Blood, 2014, 124（2）: 188-95.
[41] Zhang C, Wang Z, Yang Z, et al. Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA（+） Metastatic Colorectal Cancers[J]. Mol Ther, 2017, 25（5）: 1248-1258.
[42] Bockamp E, Rosigkeit S, Siegl D, et al. Nano-Enhanced Cancer Immunotherapy: Immunology Encounters Nanotechnology[J]. Cells, 2020, 9（9）.
[43] Ghiringhelli F, Fumet J D. Is There a Place for Immunotherapy for Metastatic Microsatellite Stable Colorectal Cancer?[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1816.
[44] Jimeno A, Moore K N, Gordon M, et al. A first-in-human phase 1a study of the bispecific anti-DLL4/anti-VEGF antibody navicixizumab（OMP-305B83）in patients with previously treated solid tumors[J]. Invest New Drugs, 2019, 37(3): 461-472.
[45] Sibaud V. Dermatologic Reactions to Immune Checkpoint Inhibitors : Skin Toxicities and Immunotherapy[J]. Am J Clin Dermatol, 2018, 19（3）: 345-361.
[46] Ganesh K, Stadler Z K, Cercek A, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16（6）: 361-375.

性别和BMI指数对氟伏沙明药代动力学的影响：中国精神科患者的群体药代动力学模型

杨烨，张孜，戴丽静，郭徵豪，甘桐营，卢浩扬，倪晓佳，张明，尚德为，温预关*

（广州医科大学附属脑科医院，广东 广州 510370）

【摘要】目的：建立氟伏沙明在中国精神病患者中的群体药代动力学模型，定量研究影响氟伏沙明药代动力学的协变量，为更好实施氟伏沙明个体化用药提供参考。**方法：**回顾性收集2020年5月至2022年10月我院接受氟伏沙明治疗药物监测的患者资料，包括人口统计学资料、联合用药及肝肾功能指标。采用非线性混合效应模型（Nonlinear Mixed Effect Models, NONMEM）建立氟伏沙明群体药代动力学（Population Pharmacokinetic, PPK）模型，采用拟合优度图、归一化预测分布误差和自举法(1000次)对模型进行验证，并利用仿真模拟量化协变量对氟伏沙明药代动力学的影响。**结果：**采用一级条件交互作用估计(First-order Conditional Estimation with Interaction, FOCEI)描述氟伏沙明PPK模型，PPK模型包含131例患者的583份氟伏沙明血浆浓度数据，最终模型发现性别和身体质量指数(Body Mass Index, BMI)是氟伏沙明表观清除率（CL/F）的显著协变量。最终模型为CL/F=71.7×[1+0.0466×（BMI-21.16）]×（1-0.203×性别），（女性=1，男性=0）。氟伏沙明CL/F与BMI指数呈正相关，女性氟伏沙明CL/F显著低于男性。基于本研究最终模型的仿真模拟，建议BMI较低（BMI=14）患者的氟伏沙明最大给药剂量为200mg·d^{-1}，BMI中等（BMI=21）的患者为300mg·d^{-1}，BMI较高（BMI: 30～42）的患者为400mg·d^{-1}。**结论：**成功建立了氟伏沙明在中国精神科患者中的群体药代动力学模型，发现性别和BMI是影响中国患者氟伏沙明药代动力学的显著协变量，并通过仿真模拟推荐不同BMI人群的氟伏沙明每日最大给药剂量。

【关键词】氟伏沙明；群体药代动力学；治疗药物监测；剂量选择

Effects of Gender and BMI Index on the Pharmacokinetics of Fluvoxamine: a Population Pharmacokinetic Model in Chinese Psychiatric Patients

YANG Ye, ZHANG Zi, DAI Lijing, GUO Zhihao, GAN Tongying, LU Haoyang, NI Xiaojia, ZHANG Ming, SHANG Dewei，WEN Yuguan*

（The Affiliated Brain Hospital of Guangzhou Medical University，Guangzhou，Guangdong 510370，China）

【Abstract】Objective：To establish a population pharmacokinetic model of fluvoxamine in Chinese psychiatric patients, quantitatively study the covariates affecting the pharmacokinetics of fluvoxamine, and provide reference for better implementation of individualized medication of fluvoxamine. **Methods：** The data of the patients who received fluvoxamine therapeutic drug monitoring in our hospital from May 2020 to October 2022 were collected retrospectively,

基金项目: 广东省药学会临床用药研究基金（临床治疗精准用药专项，2022JZ34）；广东省医院药学研究基金资助项目（澳美基金，2022A22）；广东省医院协会药学科研专项基金（恒瑞，2021YXMS03）

作者简介: 杨烨，研究生，研究方向：临床药学。E-mail:yysheepleaf@163.com

通信作者: 温预关，主任药师，研究方向: 个体化用药研究，E-mail: wenyuguande@163.com。

including the data of demographics, drug combination, and liver and renal function indexes. Using nonlinear mixed effect models (NONMEM) to fluvoxamine population pharmacokinetic (PPK) Models, the model was validated by goodness-of-fit graphs, normalized prediction distribution errors, and bootstrapping (1000 times) , and the effect of covariates on fluvoxamine pharmacokinetics was quantified by simulation. Results first-order conditional estimation with interaction (FOCEI) was used to describe the fluvoxamine PPK model. The PPK model included 583 plasma concentration data from 131 patients, the final model found that gender and Body Mass Index (BMI) were significant covariates of apparent clearances (Cl/F) of fluvoxamine. The final model was CL/F=71.7×[1+0.0466×(BMI-21.16)]×(1-0.203×sex), (women=1, men=0). There was a positive correlation between the ratio of fluvoxamine CL/F and BMI, and the ratio of flavoxamine CL/F in women was significantly lower than that in men. Based on simulation simulations of the final model of this study, a maximum dose of fluvoxamine of 200 mg·d-1 was recommended for patients with a low BMI (BMI=14) and 300 mg·d-1 for patients with a moderate BMI (BMI=21), the patients with higher BMI (BMI: 30-42) were 400 mg·d-1. **Conclusion：** Fluvoxamine's pharmacokinetics model in Chinese psychiatric patients was successfully established. It was found that gender and BMI were significant covariates affecting the fluvoxamine pharmacokinetics of Chinese psychiatric patients, the maximum daily dose of fluvoxamine for different BMI groups was recommended by simulation.

【Key words】 Fluvoxamine; Population pharmacokinetics;Therapeutic drug monitoring; Dosage selection

醒脑再造丸质量标准研究

杨一荻[1,2,3]，曲范娜[1,2,3]，林林[1,2,3]，笔雪艳[1,2,3]（通讯作者）

(1.黑龙江省药品检验研究院，黑龙江 哈尔滨 150088；2.国家药品监督管理局中药质量研究与评价重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150088；3.黑龙江省中药质量研究与评价重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150088）

【摘要】目的：提升醒脑再造丸的质量控制标准。**方法**：采用薄层色谱法（TLC）对红参、黄连、冰片进行定性鉴别；对黄芪、淫羊藿、红花、黄连、枸杞子、决明子、珍珠进行显微鉴别；采用高效液相色谱法（HPLC）测定黄芪甲苷的含量，色谱柱为 Techmate C18-ST 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为乙腈-水（32: 68，*V*/*V*），流速为 1.0 mL/min，蒸发光散射检测器检测，柱温为 30℃。**结果**：红参、黄连、冰片的 TLC 图谱斑点清晰，分离度好，阴性对照无干扰；黄芪、淫羊藿、红花、黄连、枸杞子、决明子、珍珠的显微特征结构明显且专属；黄芪甲苷进样量在 0.5934～7.4177μg 范围内线性关系良好（$r=0.9991$，$n=6$）；精密度、稳定性、重复性试验结果均符合要求；平均加样回收率为 100.33%，RSD 为 2.43%（$n=6$）。**结论**：所建立的方法可靠、准确、专属性强，可以为醒脑再造丸质量标准的提升提供参考。

【关键词】醒脑再造丸；质量标准；薄层色谱法；显微鉴别；高效液相色谱法；黄芪甲苷

醒脑再造丸由黄芪、淫羊藿、石菖蒲、红参、当归、地龙等 36 味中药组成，具有化痰醒脑，祛风活络的功效。临床上主要用于治疗神志不清，语言蹇涩，肾虚痿痹，筋骨酸痛，手足拘挛，半身不遂[1],[2]。醒脑再造丸质量标准收载于卫生部药品标准中药成方制剂第四册[3]，现行标准中仅有【性状】和【检查】项，无任何定性鉴别、定量测定指标，不利于本品的质量控制。目前关于醒脑再造丸的研究较少[1],[4],[5]，为了更全面、科学地把控本品质量，进一步保证临床疗效，本研究对醒脑再造丸中黄芪、淫羊藿、红花、黄连、枸杞子、决明子、珍珠的专属显微特征进行鉴别；采用薄层色谱法（TLC）对红参、黄连、冰片进行定性鉴别；采用高效液相色谱法（HPLC）测定黄芪的主要药效成分黄芪甲苷含量，为醒脑再造丸质量标准的建立提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo VANQUISH 高效液相色谱仪（赛默飞世尔科技），DM2500 荧光显微镜（徕卡显微系统公司），XSE205DU 型电子天平（梅特勒-托利多国际有限公司），SK8200LHC 型超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司），TW20 通用水浴槽（优莱博技术有限公司）。

1.2 试药

黄芪甲苷对照品（批号为 110781-201717，含量 96.9%），人参皂苷 Rf 对照品（批号为 111719-201806，供鉴别用），盐酸小檗碱对照品（批号为 110713-201814，含量 86.7%），冰片对照品（批号为 110743-201706，含量 97.6%），黄连对照药材（批号为 121752-201801），均购自中国食品药品检定研究院；硅胶 G 薄层板（青岛海洋化工有限公司）；乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为娃哈哈纯净水。醒脑再造丸（哈药集团世一堂制药厂，批号分别为 2001102、2001111；龙晖药业有限公司，批号为 20180501），试验用阴性样品由实验室自制。

2 方法与结果

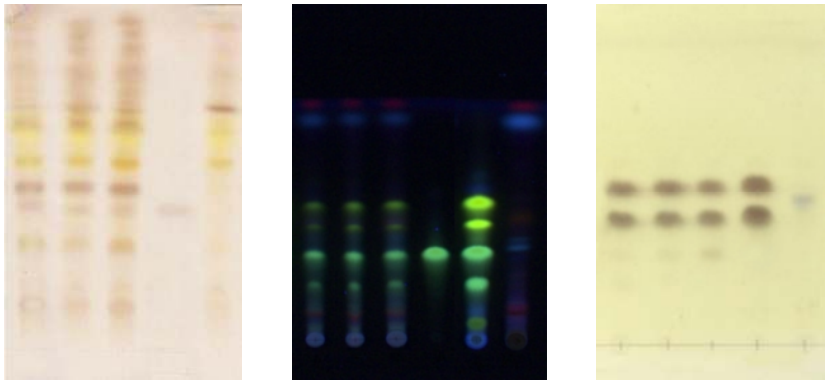
2.1 薄层色谱（TLC）鉴别

红参：取样品 1 丸，剪碎，加硅藻土 6g，研匀，加乙醚 50mL，加热回流 1 小时，弃去乙醚液，药渣挥去溶剂，加甲醇 50mL，超声处理 30 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加水 20mL 使溶解，用水饱和的正丁醇提取 2 次，每次 25mL，合并正丁醇提取液，用氨试液洗涤 2 次，每次 20mL，正丁醇提取液蒸干，残渣加水 10mL 使溶解，通过 D101 型大孔吸附树脂柱（内径为 1.5cm，长为 15cm），先后用水和 20%乙醇各 50mL 洗脱，弃去洗脱液，继用 80%乙醇 80mL 洗脱，收集洗脱液，蒸干，残渣加甲醇 1mL 使溶解，作为供试品溶液。取人参皂苷 Rf 对照品，加甲醇制成每 1mL 含 0.2mg 的溶液，即得对照品溶液。按处方工艺制备不含红参的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。吸取供试品溶液、对照品溶液和阴性对照品溶液各 10～15μl，分

别点于同一高效硅胶 G 薄层板上，展开剂为三氯甲烷-甲醇-水（13：7：2，*V/V/V*）10℃以下放置的下层溶液，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 105℃加热至斑点显色清晰，置日光下检视。供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰。详见图 1A。

黄连：取样品 1 丸，剪碎，加甲醇 50mL，加热回流 15 分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 5mL 使溶解，作为供试品溶液。取黄连对照药材 50mg，加甲醇 5mL，加热回流 15 分钟，滤过，滤液补加甲醇使成 5mL，作为对照药材溶液。取盐酸小檗碱对照品，加甲醇制成每 1mL 含 0.5mg 的溶液，即得对照品溶液。按处方工艺制备不含黄连的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。吸取供试品溶液、对照药材溶液、对照品溶液和阴性对照品溶液各 1μl，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，展开剂为甲苯-异丙醇-乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液（6：1.5：3：1.5：0.5，*V/V/V/V/V*），置氨蒸气饱和的展开缸内，展开，取出，晾干，置紫外光灯（365nm）下检视。供试品溶液色谱中，在与对照药材溶液色谱和对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色的荧光斑点，且阴性对照无干扰。详见图 1B。

冰片：取样品 2 丸，剪碎，置蒸发皿中，上盖一表面皿，置水浴上加热 10 分钟，用无水乙醇 0.5mL 溶解表面皿上的升华物，作为供试品溶液。取冰片对照品，加丙酮制成每 1mL 含 0.5mg 的溶液，即得对照品溶液。按处方工艺制备不含冰片的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。吸取对照品溶液 2μl，供试品溶液及阴性对照品溶液各 5μl，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，展开剂为环己烷-乙酸乙酯（17：3，*V/V*），展开，取出，晾干，喷以 5%香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰，置日光下检视。供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰。详见图 1C。



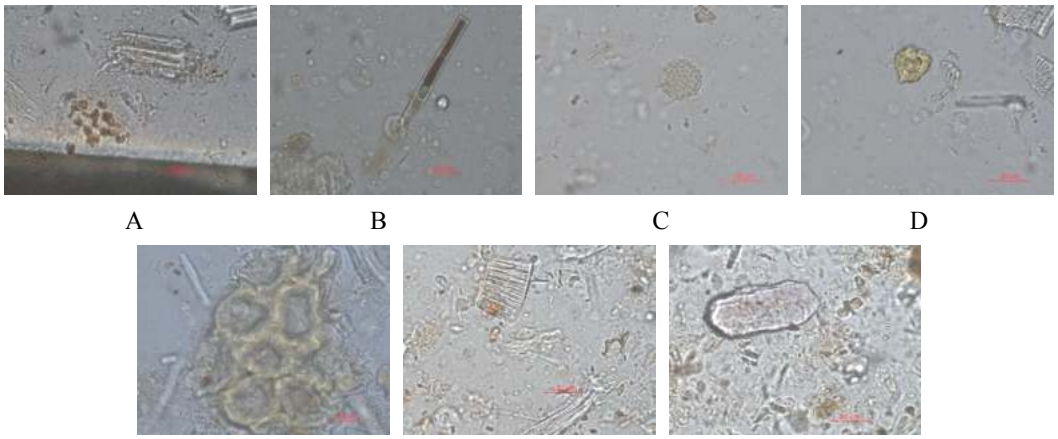
1-3.供试品溶液　4.对照品溶液　5.对照药材溶液　6.阴性对照品溶液

A.红参　B.黄连　C.冰片

图 1　薄层色谱图

2.2 显微鉴别

取样品 1 丸，剪碎，加适量水使溶散并浸泡过夜，弃去水液，挑取少量药渣置载玻片上，加水合氯醛溶液加热透化 2～3 次，盖上盖玻片，置显微镜下观察粉末特征结构。黄芪，纤维成束或散离，壁厚，表面有纵裂纹，初生壁常与次生壁分离，两端常断裂成须状，或较平截；淫羊藿，非腺毛由 4～9 个细胞组成，顶端细胞内常充满黄棕色物质；红花，花粉粒类圆形、椭圆形或橄榄形，具 3 个萌发孔，外壁有齿状突起；黄连，石细胞鲜黄色，大多成群或单个散在，呈类圆形、长方形、类方形、类三角形或类椭圆形，有的一段狭细或钝尖，层纹细密而明显，孔沟细，有时分枝；枸杞子，种皮石细胞表面观不规则多角形，壁厚，波状弯曲，层纹清晰；决明子，种皮栅状细胞无色或淡黄色，侧面观细胞 1 列，呈长方形，排列稍不平整，壁较厚，光辉带 2 条；珍珠（豆腐制），不规则碎块，半透明，具彩虹样光泽，表面显颗粒性，由数至十数薄层重叠，片层结构排列紧密，可见致密的成层线条或极细密的微波状纹理。详见图 2。结果表明黄芪、淫羊藿、红花、黄连、枸杞子、决明子、珍珠的特征结构明显且唯一，检出率高，可列入质量标准。



A B C D

E F G

A.黄芪　B.淫羊藿　C.红花　D.黄连　E.枸杞子　F.决明子　G.珍珠（豆腐制）

图 2 显微鉴别图

2.3 黄芪甲苷含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱：Techmate C18-ST 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈-水（32：68，*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；蒸发光散射检测器检测；柱温：30℃；进样量：对照品溶液 5 μl、20 μl，供试品溶液 5～25 μl。理论板数按黄芪甲苷峰计算应不低于 4000。

2.3.2 溶液制备

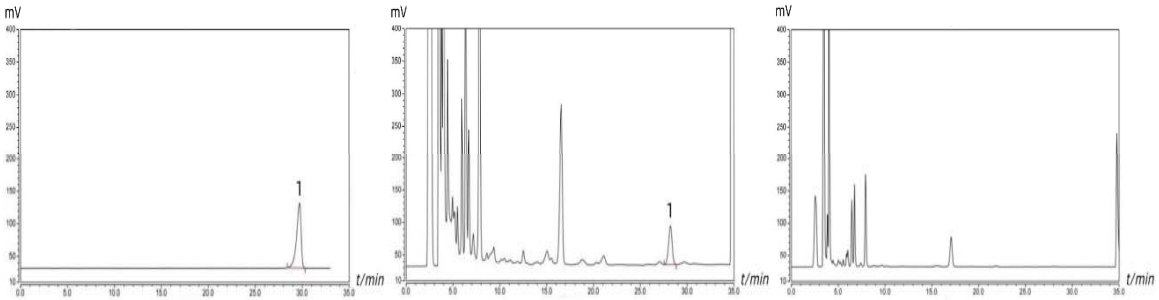
对照品溶液：取黄芪甲苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1mL 含 0.3mg 的溶液，即得。

供试品溶液：取重量差异项下的本品，剪碎，取 20g，精密称定，加硅藻土 12g，研匀后，取约 14.5g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 80mL，再加沸石数粒，称定重量，加热回流 1 小时，放冷，再称定重量，用甲醇补足重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 40mL，回收甲醇并浓缩至干，残渣加水 25mL，微热使溶解，用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次（30mL、30mL、20mL、20mL），合并正丁醇提取液，用氨试液充分洗涤 2 次，每次 25mL，弃去氨液，取正丁醇液蒸干，残渣加水 10mL 微热使溶解，放冷，通过 D101 型大孔吸附树脂柱（内径 1.5cm，长 12cm），以水 50mL 洗脱，弃去水液，再用 40%乙醇 30mL 洗脱，弃去洗脱液，继用 70%乙醇 100mL 洗脱，收集洗脱液，蒸干，用甲醇溶解并转移至 2mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，即得。

阴性对照品溶液：按处方工艺制备不含黄芪的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备，即得。

2.3.3 方法学考察

专属性试验：取对照品溶液 20μL，供试品溶液、阴性对照品溶液各 10μL，按 2.3.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相同保留时间处显相同色谱峰，且阴性对照无干扰，表明方法专属性良好。详见图 3。



A B C

1.黄芪甲苷

A.对照品溶液　B.供试品溶液　C.阴性对照品溶液

图 3 黄芪甲苷专属性试验高效液相色谱图

线性关系考察：精密量取 2.3.2 项下黄芪甲苷对照品溶液 2，4，5，15，20，25μL，按 2.3.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以进样量的对数值（X，μg）为横坐标，峰面积的对数值（Y）为纵坐标，进行线性回归，得回归方程 Y=0.6194X-0.3154（r = 0.9991，n = 6）。结果表明，黄芪甲苷在进样量 0.5934～7.4177μg 范围内线性关系良好。

精密度试验：取 2.3.2 项下对照品溶液适量，按 2.3.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 0.62%（n = 6），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取样品（批号 2001111）适量，精密称定，按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液，分别于 0，2，4，8，12，24h 时按 2.3.1 项下色谱条件进样测定。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 1.62%（n = 6），表明供试品溶液在 24h 内稳定性良好。

重复性试验：取样品（批号 2001111）适量，精密称定，按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液 6 份，按 2.3.1 项下色谱条件进样测定。结果黄芪甲苷的平均含量为 0.1619mg/g，RSD 为 3.83%（n = 6），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量的样品（批号 2001111）40g 与硅藻土 24g 的研匀样品 6 份，每份约 7.25g，精密称定，精密加入黄芪甲苷对照品适量，按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.3.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果（n = 6）

称样量（g）	样品含量（mg）	加入量（mg）	测得量（mg）	回收率（%）	平均值（%）	RSD（%）
7.2669	0.7338	0.6885	1.4290	100.99	100.33	2.43
7.2560	0.7327	0.6885	1.4430	103.18		
7.2613	0.7331	0.6885	1.4061	97.76		
7.2669	0.7337	0.6885	1.4211	99.85		
7.2507	0.7320	0.6885	1.4395	102.76		
7.2497	0.7319	0.6885	1.4027	97.43		

2.3.4 样品含量测定与含量限度

含量测定：取 3 批样品（批号分别为世一堂：2001102、200111；龙晖：201805010），按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.3.1 项下色谱条件进样测定，并计算含量。结果 3 批样品中黄芪甲苷含量分别为每丸 0.573，1.373，1.069mg。

含量限度：根据《中国药典》2020 年版一部规定，由黄芪中黄芪甲苷（黄芪甲苷含量不低于 0.080%）含量计算醒脑再造丸中黄芪甲苷最低理论值为每丸 0.494mg，结合制法工艺、实际生产情况以及样品实测结果，将转移率限定为 80%，初步拟定醒脑再造丸中黄芪甲苷含量不得少于 0.395mg/丸，各批样品含量均符合要求。

3 讨论

曾对样品中当归、川芎、制何首乌、大黄的薄层色谱鉴别展开研究，分别考察了两种供试品溶液制备方法和薄层色谱条件，但阴性均存在干扰，因此上述 4 味药材的薄层鉴别暂未列入醒脑再造丸质量标准。

黄芪具有增强造血功能、保护内皮细胞、强心、降血脂、保肝强肾等药理作用[6-11]。黄芪甲苷是黄芪的主要生物活性成分，且在黄芪中含量最高[12]。在黄芪甲苷含量测定方面，曾比较超声提取、回流提取以及冷浸过夜后索氏提取 3 种方法，考察 30min～4h 的提取时间、不同体积的萃取溶剂量、色谱柱、流动相等。最终，确定了 2.3.1 项下色谱条件。

综上所述，本研究中建立的醒脑再造丸中黄芪、淫羊藿、红花、黄连、枸杞子、决明子、珍珠的显微鉴别方法，红参、黄连、冰片的 TLC 鉴别方法，以及主要有效成分黄芪甲苷的含量测定方法，专属性、重复性良好，能较全面地对醒脑再造丸进行质量控制。

参考文献

[1] 李昕光,李杨,刘吉爽等.醒脑再造丸大蜜丸与水蜜丸的体外溶出度比较[J].药学研究,2017,36(09):523-526.

[2] 关聪,石雪微.醒脑再造丸的药理作用研究[J].黑龙江科技信息,2013(18):27.

[3] 卫生部药品标准 《中药成方制剂 》[S].第四册,1991：217.

[4] 吴庆淼,吴立军,杨志伟.醒脑再造丸质量标准研究[J].中国药品标准,2010,11(01):25-29.

[5] 孙莉,项颗.醒脑再造丸治疗中轻度老年血管性痴呆[J].长春中医药大学学报,2009,25(03):340-341.

[6] 叶晓滨.黄芪配伍益气活血补血药对研究进展[J].河南中医,2021,41(08):1285-1290.

[7] 李博,耿刚.黄芪的化学成分与药理作用研究进展[J].中西医结合研究,2022,14(04):262-264.

[8] 马艳春,胡建辉,吴文轩等.黄芪化学成分及药理作用研究进展[J].中医药学报,2022,50(04):92-95.

[9] 胡妮娜,张晓娟.黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J].中医药信息,2021,38(01):76-82.

[10] 姜辉,顾胜龙,张玉婷等.黄芪化学成分和药理作用研究进展[J].安徽中医药大学学报,2020,39(05):93-96.

[11] 唐冕,许晓芬.药用黄芪皂苷类化学成分及药理作用研究进展[J].中医药导报,2018,24(20):117-122.

[12] 白海英,张凯雪,包芳等.黄芪和红芪对比研究进展[J].西北药学杂志,2020,35(03):460-466.

Antitumor Drug - Liposome triggered release

TAN Jian-mei,GONG Ruo-han,YANG Yu-qiong,YANG Yu-xin,YANG Hui-li，Zhao Chang-hong*

（Hubei-Polytechnic-University,Huangshi435000,China）

【Abstract】

1.1.1Introduction:The way of triggered release such as Cell-mediated drug-delivery systems ,ltrasound-assisted drug delivery，Actively loading platinum（IV） prodrug ， functionalizing stealth-liposomes with an engineered ion channel.Their common advantage is that they effectively slow down the recurrent growth of the tumor and significantly improve the survival rate, but can not completely inhibit the regeneration of the tumor.Glioblastoma GBM is the most aggressive type of primary brain tumor with a good poor prognosis and a tendency to relapse.Surgery and radiation therapy are currently the only treatment options available.lack of specificity to cancer cells and acquired drug resistance hinder the treatment of GBM. And lead to disease recurrence.Lipid nanoparticles have been widely used in nanomedicine delivery systems because of their good properties

Methods:

1.2.1ltrasound-assisted drug delivery :

Ultrasound-assisted drug delivery is an emerging tech- nique that has the advantage of being non-invasive, effi- ciently and specifically targeted and controllable. While systemic drugs often show detrimental side effects, their ultrasound-triggered local release at the selected tissue may improve safety and specifity of therapy. An increas- ing amount of animal and preclinical studies demonstrates how ultrasound can also be used for increasing the efficacy of chemotherapeutic drug release to solid tumors. In par- ticular, this technique may be functional to reach uniform delivery of chemotherapeutic agents throughout tumors, which is naturally restricted by their abnormal vascularization and interstitial pressure.

This review deals with the physical mechanisms of ultra- sound, the different kinds of drug carriers （microbubbles, liposomes and micelles） and the biological phenomena use- ful for cancer treatment （hyperthermia, sonoporation, en- hanced extravasation, sonophoresis and blood-brain barri- er disruption）, showing how much ultrasonic drug delivery is a promising method in the oncological field.（6）

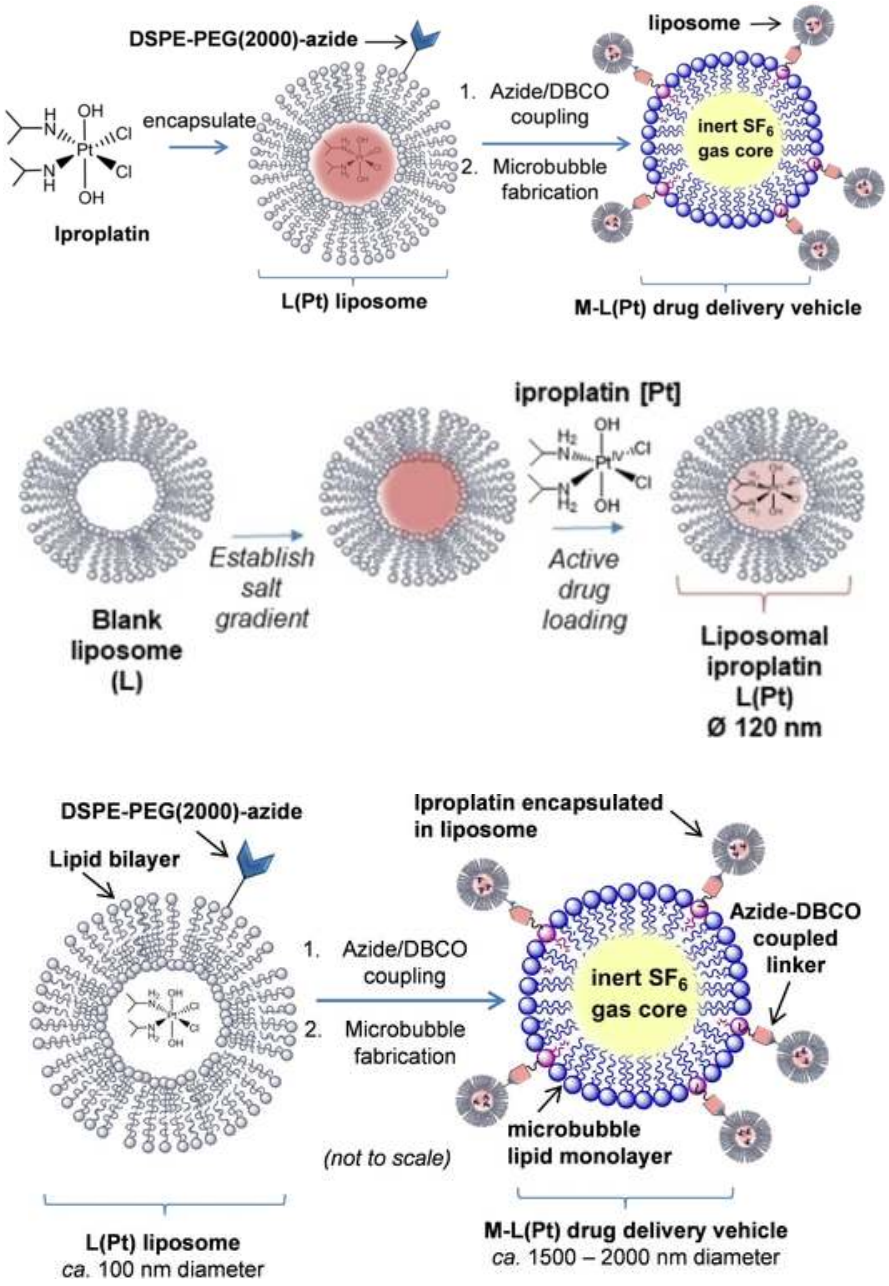
1.2.2The advantage of the ultrasound-assisted drug delivery:

Ultrasound-assisted administration is also proposed for oncology. This treatment allows for targeted release, improved delivery and enhanced extravasation into solid tumors. So far, microbubbles and liposomes have been used for drug delivery because of their thermodynamic stability, but they are cleared by the reticular endothelial system. On the other hand, micelle will not be cleared by reticular endothelial system.

1.3.1Actively loading platinum（IV） prodrug

iproplatin into liposomes has been achieved using a calcium acetate gradient. Microbubble-mediated release and accumulation of the prodrug in MCF7 cancer cells following ultrasound treatment demonstrates that this strategy can enable greater control over drug delivery.

*:corresponding author, Email:203157@hbpu.edu.cn



1.3.2the advantage and shortage of actively loading platinum（IV） prodrug :

The microbubbles were connected with liposomes by aziau- dbco chemistry, and the microbubble liposomes drug delivery vector （MB-L （platinum）） was assembled. Although ultrasound irradiation of ipro platinum-filled liposomes alone did not lead to detected uptake of platinum cells, the uptake of platinum cells by MB-L（platinum）carriers was observed in the absence and presence of ultrasound. In the absence of ultrasound, platinum uptake may be caused by a variety of factors, including the use of static cells model.Our preliminary investigation has identified the potential and current limitations of our ultrasound-mediated platinum （IV） anticancer drug delivery strategy. The modularization of MB-L delivery vector provides the potential to control the release of packaged platinum drugs near the tumor, which may significantly improve the delivery and reduce the miss activity of the drug.

1.4.1 functionalizing stealth-liposomes with an engineered ion channel :

Liposomal drug delivery vehicles are promising nanomedicine tools for bringing cytotoxic drugs to cancerous tissues

selectively. However, the triggered cargo release from liposomes in response to a target-specific stimulus has remained elusive. We report on functionalizing stealth-liposomes with an engineered ion channel and using these liposomes in vivo for releasing an imaging agent into a cerebral glioma rodent model. If the ambient pH drops below a threshold value, the channel generates temporary pores on the liposomes, thus allowing leakage of the intraluminal medicines. By using magnetic resonance spectroscopy and imaging, we show that engineered liposomes can detect the mildly acidic pH of the tumor microenvironment with 0.2 pH unit precision and they release their content into C6 glioma tumors selectively, in vivo. A drug delivery system with this level of sensitivity and selectivity to environmental stimuli may well serve as an optimal tool for environmentally-triggered and image-guided drug release.（7）

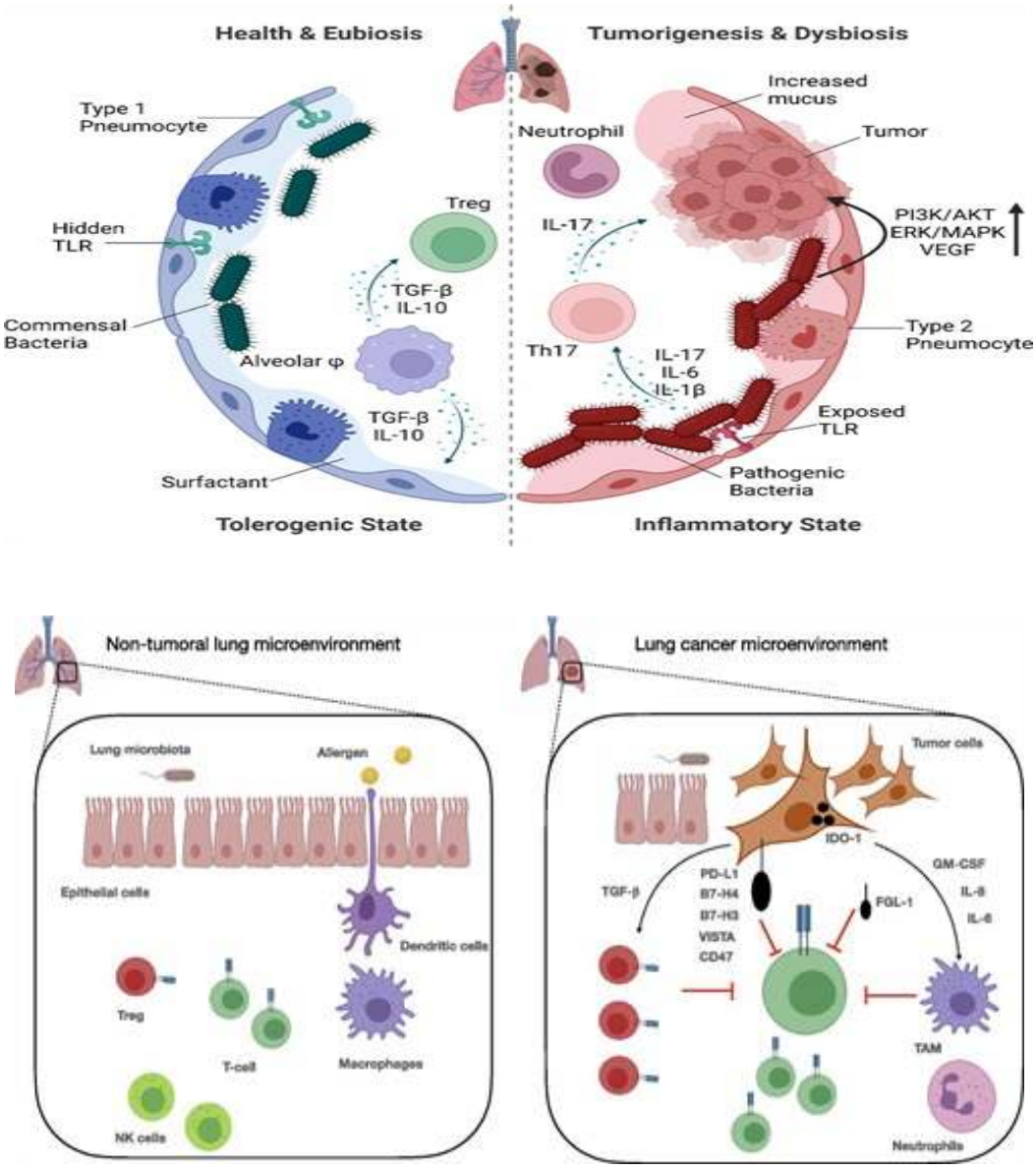
1.4.2the advantage and the shortage of the functionalizing stealth-liposomes with an engineered ion channel:
Chemotherapy is one of the main methods to treat cancer. In the past few decades, systemic chemotherapy intervention has witnessed an improvement in efficacy, significantly reducing the pathological and socio-economic impact of cancer, and improving the prognosis of untreatable tumors and multifocal tumor diseases. However, these treatments are often overshadowed by excessive harmful effects, mainly from the secondary health effects of therapeutic drugs.（7）

1.5.1The successful application of chimeric antigen receptor （CAR） T cells for the treatment of relapsed and refractory B-cell malignancies has ushered in a new frontier for the immunotherapy of cancer. Despite its successes, CAR T-cell therapy presents several challenges. Cytokine release syndrome （CRS） triggered by robust and exponential CAR T-cell expansion is the most common adverse effect and may be severe or life-threatening. Although modulation of the interleukin 6 axis was appreciated early on as a means to manage CRS, the exact underlying mechanisms leading to severe CRS remain to be elucidated. What is clear is that severe CRS involves recruitment of the broader immune system into a hyperinflammatory and unregulated state. Myeloid-derived cells appear to play a critical role in this regard and are at the center of active investigation.（1）

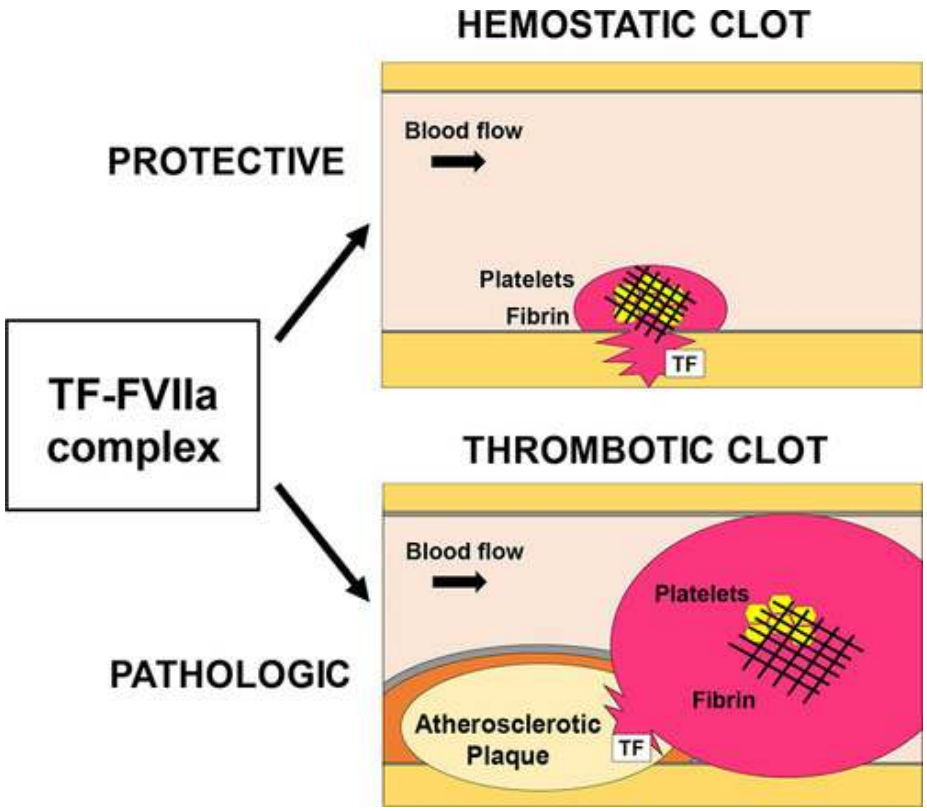
TABLE 1 - Incidence of Severe ICANS With CAR T-Cell Products in Clinical Trials

Disease Type	CAR T-Cell Product	Costimulatory Subunit	Target	n	Grade ≥3 ICANS, %	Median Onset of ICANS, d
ALL	Tisgenlecle 20	4-1BB	CD19	75	13	NR
ALL	KTE-X1926	CD28	CD19	45	38	7
ALL	19-28z CAR 21,27	CD28	CD19	53	42	5
ALL	FHCRC28	4-1BB	CD19	45	21	NR
CLL	CD19 CAR 4-1BB–CD3z-EGFRt29	4-1BB	CD19	24	25	NR
LBCL	Axicabtage ciloluecel23	CD28	CD19	108	28	4
LBCL	Tisa-cel25	4-1BB	CD19	93	12	6
LBCL	Lisocabtag maraleucel7	4-1BB	CD19	256	10	9
LBCL	Brexucabta autoleucel5	CD28	CD19	68	31	7
MM	Idecabtage vicleucel8	4-1BB	BCMA	33	3	NR
MM	JNJ-45289	4-1BB	BCMA	25	4	NR

CLL, chronic lymphocytic leukemia; MM, multiple myeloma; NR, not reported.



1.6.1Tissue factor （TF） is the high-affinity receptor and cofactor for factor （F）VII/VIIa. The TF-FVIIa complex is the primary initiator of blood coagulation and plays an essential role in hemostasis. TF is expressed on perivascular cells and epithelial cells at organ and body surfaces where it forms a hemostatic barrier. TF also provides additional hemostatic protection to vital organs, such as the brain, lung, and heart. Under pathological conditions, TF can trigger both arterial and venous thrombosis. For instance, atherosclerotic plaques contain high levels of TF on macrophage foam cells and microvesicles that drives thrombus formation after plaque rupture. In sepsis, inducible TF expression on monocytes leads to disseminated intravascular coagulation. In cancer patients, tumors release TF-positive microvesicles into the circulation that may contribute to venous thrombosis. TF also has nonhemostatic roles. For instance, TF-dependent activation of the coagulation cascade generates coagulation proteases, such as FVIIa, FXa, and thrombin, which induce signaling in a variety of cells by cleavage of protease-activated receptors. This review will focus on the roles of TF in protective hemostasis and pathological thrombosis.（2）



1.6.1Cell-mediated drug-delivery systems have received considerable attention for their enhanced therapeutic specificity and efficacy in cancer treatment. Neutrophils （NEs）, the most abundant type of immune cells, are known to penetrate inflamed brain tumours. Here we show that NEs carrying liposomes that contain paclitaxel（PTX）can penetrate the brain and suppress the recurrence of glioma in mice whose tumour has been resected surgically. Inflammatory factors released after tumour resection guide the movement of the NEs into the inflamed brain. The highly concentrated inflammatory signals in the brain trigger the release of liposomal PTX from the NEs, which allows delivery of PTX into the remaining invading tumour cells. We show that this NE-mediated delivery of drugs efficiently slows the recurrent growth of tumours, with significantly improved survival rates, but does not completely inhibit the regrowth of tumours（3）

1.7.1Near infrared light-mediated controlled release of azithromycin photosensitive liposomes and tumor therap
It is an effective means to increase the therapeutic effect of drugs and reduce the toxic and side effects to systematically realize the targeted delivery of drugs and the controlled release of drugs in time and space. In this study, DOX and hollow gold nanosphere （HAuNS） with near infrared photothermal conversion effect were wrapped in liposomes, and HER2ab was modified on the surface of liposomes. A near infrared photothermal photosensitive liposomes were constructed.

New drug-loaded photosensitive liposomes to achieve NIR-mediated drug-triggered release and multi-mode tumor treatment, and to provide a new possible way for clinical safe and effective treatment of tumors.

1.7.2Study on the transfer of oligodeoxynucleotides by a novel reductive response cationic liposomes（9）
In the field of malignant tumor treatment, oligodeoxynucleotides have a good prospect. Now a large number of oligodeoxynucleotides have entered the clinical trial stage. However, oligodeoxynucleotides have the weak ability to

degrade transmembrane easily, which limits their development in order to overcome these obstacles, oligodeoxynucleotides need efficient delivery system to improve stability and transmembrane ability. Therefore, it is of great significance to study an efficient and low toxicity transmission system which can improve the stability and transmembrane ability of oligodeoxynucleotides.

1.8.1AT101-Loaded Cubosomes as an Alternative for Improved Glioblastoma Therapy

AT101

a promising drug in glioblastoma multiforme （GBM） therapy due to its ability to trigger autophagic cell death but also to facilitate apoptosis in tumor cells. It does have some limitations such as poor solubility in water-based media and consequent low bioavailability, which affect its response rate during treatment. To overcome this drawback and to improve the anti-cancer potential of AT101, the use of cubosome-based formulation for AT101 drug delivery has been proposed. This is the first report on the use of cubosomes as AT101 drug carriers in GBM cells.

1.9.1Autophagy activation, lipotoxicity and lysosomal membrane permeabilization synergize to promote pimozide- and loperamide-induced glioma cell death（10）

1.9.2Advantages and disadvantages of liposomes activated by autophagy, adipotoxicity and lysosomal membrane permeability and their future development prospects.More and more evidence suggests that inducing fatal macrophage / autophagy is of potential significance in the treatment of glioblastomas （GBM）. Global proteome analysis after drug treatment also showed an increase in proteins associated with lipid and cholesterol metabolism. These changes were accompanied by the dissolution of cholesterol and other lipids, as well as the release of cathepsin B （CTSB） into the cytoplasm of MZ-54 wild type （WT） cells. LMP and cell death in automatic liquid level meter 5 and automatic liquid level meter 7 knockout（KO）cells were enhanced by the deletion of lysozyme receptor VCP（containing valine protein）. Under these conditions, the survival function of lysozyme was supported. In conclusion, LMP and cell death were induced by autophagy and adipotoxicity driven by imozole and loperidol. The results also support that the overactivation of autophagy and the induction of MP are a promising method for the treatment of GBM. Inducing fatal macrophage autophagy is of potential significance in the treatment of glioblastomas （GBM）. Global proteome analysis of previous work enzyme inhibitors and lipid activity significantly decreased the protein levels associated with lipid and cholesterol metabolism. In conclusion, our data show that LMP and cell death are induced by autophagy and adipotoxicity driven by pyrazole and loperidol. The results also support that the overactivation of autophagy and the induction of MP are a promising method for the treatment of GBM.

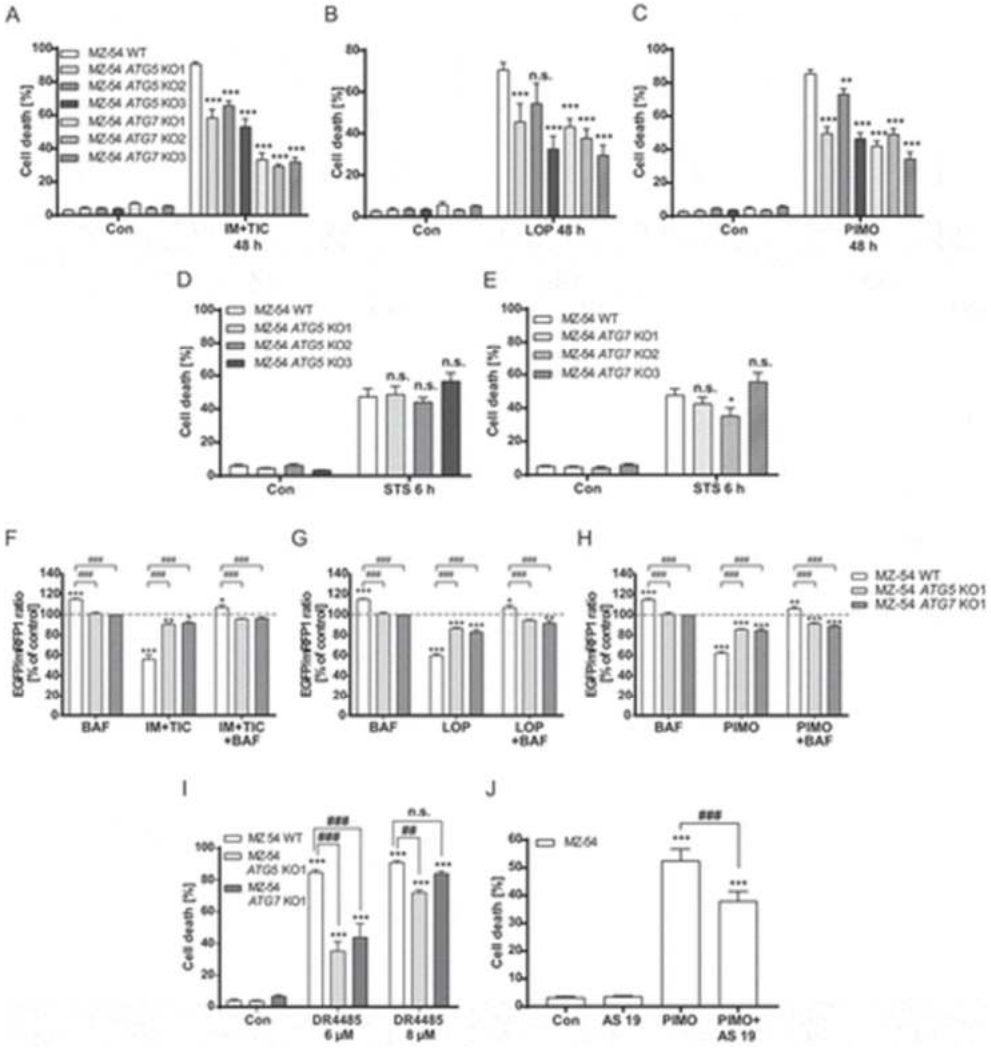
Results:

A total of 10 literatures were included. In the past five years, nano liposome technology has developed from single function to multi-function in the treatment of glioblastoma,from encapsulation of a single drug to encapsulation of multiple drugs, from the use of cell internal environment to magnetic release.from the methods of the Responsive release of Glioblastoma

Conclutions :

Many reports have reported SLN as an effective nanomedicine delivery system for the treatment of GBM, and it has repeatedly been shown to be a promising approach for improving therapeutic indices. Despite this, recurrent glioblastoma remains difficult to treat, and the addition of molecularly targeted therapies and anticancer drugs has only made some improvements. Currently, multiple LNP-based formulations have been proposed for different GBMA targeted therapies,

for example,Cell-mediated drug-delivery systems ,ltrasound-assisted drug delivery，Actively loading platinum（IV）prodrug ， functionalizing stealth-liposomes with an engineered ion channel.



（1）Cytokine Release Syndrome Biology and Management

（2）Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis

（3）Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence

（4）Ferroptosis and necroinflammation, a yet poorly explored link

（5）Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence

（6）Ultrasound-assisted drug delivery in Oncology

（7）Image guided drug release from pH-sensitive Ion channel-functionalized stealth liposomes into an in vivo glioblastoma model

（8）Near infrared light-mediated controlled release of azithromycin photosensitive liposomes and tumor therap

（9）Study on the transfer of oligodeoxynucleotides by a novel reductive response cationic liposomes

（10）Autophagy activation, lipotoxicity and lysosomal membrane permeabilization synergize to promote pimozide- and loperamide-induced glioma cell death

瑞香素化学结构、药理活性、生物活性及其制剂的研究进展

叶芳[1]，朴燕[1]，张越[2]，金莉莉*

（延边大学 融合学院，延吉 吉林 133002）

【摘要】瑞香素是我国首创的天然药物单体，是一种从传统中药植物中提取出来的香豆素类化合物，具有抗炎抗氧化、保护心脑血管、抗癌抗肿瘤等作用，目前对瑞香素的衍生物、毒性和生物活性等方面进行的研究较多，故本文就瑞香素的提取分离、药理活性及衍生物和其毒性生物活性及其制剂作一综合叙述，希望能为临床用药提供参考。

【关键词】瑞香素；药理活性；生物活性；制剂

【中图分类号】R285.5　　【文献标志码】A

Research progress on chemical structure, pharmacological activity, biological activity and preparation of Daphne

Ye Fang，Jin Lili*

（College of Integration Science, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin Province, China）

【**Abstract**】Daphne is the first natural drug monomer in China. It is a coumarin compound extracted from traditional Chinese medicine plants. It has anti-inflammatory, antioxidant, cardiovascular and cerebrovascular protection, anti-cancer and anti-tumor effects. In this paper, the extraction and separation, pharmacological activity, toxic biological activity and preparation of Daphne are described in a comprehensive manner, hoping to provide reference for clinical drug use.

【**Key words**】Daphne; Pharmacological activity; Biological activity; preparation

一、引言

瑞香（Daphne giraldii Nitsche），中文名祖师麻，1977 年版《中国药典》中记载瑞香科瑞香属植物。在传统医药中，瑞香具有祛风通络、祛瘀止痛的功效。主治牙痛、胃痛、肝区病（全国中草药汇编）等。过去几十年的研究证实，瑞香提取物或纯化合物(尤其是瑞香素)具有抗炎、抗伤害、细胞毒性、抗疟疾、镇静催眠和免疫调节作用等生物活性(Han, Li et al. 2020)。从瑞香中提取的化合物主要有香豆素类(Huyiligeqi, Dong et al. 2016)、黄酮类(Su, Wu et al. 2008)、糖苷类(Su, Wu et al. 2008)等化合物。

瑞香素(7,8-Dihydroxycoumarin)提取于瑞香中 (Gao, Chen et al. 2020) ，具有苯并吡喃酮结构，属于香豆素类化合物。瑞香素被认为是瑞香成分中是最丰富、最重要的化合物之一(Han, Li et al. 2020)。现有文献表明，大量瑞香科和其它植物中存在大量瑞香素。同时，瑞香素具有广泛的生物活性，例如抗炎抗氧化(Zhang, Gu et al. 2018, Gao, Chen et al. 2020)、抗肿瘤抗癌(Pei, Hu et al. 2021)、保护心脑血管(Yang, Jiang et al. 2021)等功能，减轻实验性脑脊髓炎征状（EAE）(Wang, Lu et al. 2016)、治疗阿兹海默(Ali, Jannat et al. 2016)等神经性疾病。另外，瑞香素还有保护肝肾的作用。临床上，瑞香素用于治疗腰痛、类风湿关节炎、凝血功能障碍、退热(Pei, Hu et al. 2021)等疾病，具有代谢调节、自噬调节、提高免疫力、清除自由基(Boulebd and Amine Khodja 2021)等作用。近年来，

通讯作者：金莉莉（1978 年—），博士，专业硕士生导师，（1）中药制剂现代化（2）天然物的活性成分研究

对瑞香衍生物进行的研究较多，特别是对瑞香素 C-3，C-4 号位上的结构修饰研究(Wang, Wang et al. 2020) (Xia, Chen et al. 2018)。

瑞香素是中国自主研发的天然药物，瑞香素胶囊是我国首创的新药，主要用于血栓闭塞性脉管炎及其他闭塞性血管疾病、冠心病的辅助治疗。但是，因为瑞香素水溶性、稳定性较差、生物利用度较低，所以目前正积极开发瑞香素的不同剂型，如纳米乳等，希望可以通过改变剂型达到提高其生物利用度的目的。

本综述将会总结瑞香素的药理活性和分子机制，并通过改变结构以及剂型等方式，来寻找提高其生物利用度较好的方法。

二、材料与方法

本综述基于国内外关于瑞香素的药理学、毒性、生物利用度、配方等方面的研究文献展开。本综述涉及的瑞香素相关信息均通过 Web of Science、PubMed、 ScienceDirect、 Elsevier、中国知网(CNKI)等全球公认的科学搜索引擎和数据库中以 daphnetin、瑞香素为关键词搜索获得。瑞香的资料来源为 1977 年版的《中国药典》。本文综合叙述了瑞香素的药理作用、分子机制、毒性、生物利用度和剂型，并讨论了目前研究存在的不足。

三、瑞香素的分离与化学结构

瑞香素具有苯并吡喃酮结构，属于香豆素类化合物，其分子式为C 9 H 6 O4，结构如图 1。1976 年，通过柱层析法，瑞香素首次于瑞香（祖师麻）中分离得到，并明确其化学结构为， 7，8-2 羟基香豆素(于, 张, and 王 1976)。瑞香素在多种中药中均能分离得到。如在唐古特瑞香中，周志明、吕彪等人对不同年限的唐古特瑞香的不同部位的活性物质进行了探索。其制备唐古特瑞香供试品的方法为加水超声，再过滤，最终得到提取物。他们发现 5 年的唐古特瑞香的茎皮中活性成分含量最高(周志明, 吕彪 et al. 2022)。程旭等人对长白瑞香各部分的药用成分进行了测量，提取方法为在干燥药材中加入乙醇，静置超声，再通过高效液相色谱法测含量，得出长白瑞香叶片中含量最高，高达 62.574mg/g 的结论(程 et al. 2022)。董俊丽、黄传奇等人从绿萝花中提取分离瑞香素，通过将绿萝花粗粉浸泡于乙醇中，并用乙酸乙酯萃取，再装入硅胶柱中，通过不同比例的二氯甲烷-丙酮洗脱，最终分离得到瑞香素(董俊丽, 黄传奇 et al. 2019)。

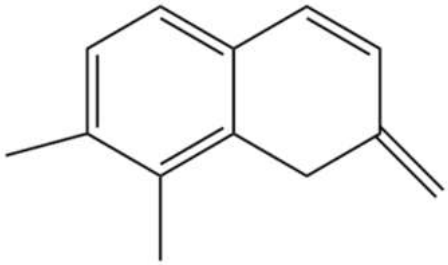


图 1：瑞香素的化学结构

四、 瑞香素的药理活性

瑞香素抗炎抗氧化的作用

NF-κB 信号通路是细胞发生炎症反应的最常见通路之一。核因子- kappab (NF-kappaB)，它控制一系列炎症细胞因子基因的表达(Kawai and Akira 2007)。瑞香素能减弱核因子-κB (NF-κB) 的转录活性(Yu, Wang et al. 2014)，达到抗炎的作用。在瑞香素减轻炎症疼痛研究中发现，瑞香素介导了脊髓 NF-κB 通路的负调节，以及它对炎症性疼痛小鼠 Nrf2/HO-1 信号通路优先激活，能够减轻炎症疼痛(Yang, Sheng et al. 2021)。银屑病是一种常见的皮肤炎症，在研究瑞香素对银屑病的治疗效果时，瑞香素可通过抑制 NF-κB 信号通路的方法，减轻 M5 诱导的 HaCaT 角质形成细胞增殖和炎症反应(Gao, Chen et al. 2020)。有相关研究表明瑞香素通过抑制 TLR4/NF-κB 介导的炎症信号通路，对脑 I/R 损伤起到神经保护和抗炎作用(Liu, Chen et al. 2016)。在瑞香素对炎症性气道疾病中的保护作用研究中发现，瑞香素主要通过调节非降解性 TRAF6 泛素化下调 NF-κB 活性，从而在内毒素性肺损伤中起着抗炎和保护作用(Yu, Lu et al. 2014)。

在研究瑞香素对关节炎的作用时，通过实验发现，瑞香素能显著降低胶原诱导的关节炎大鼠血清中 Th17-、Th2-和 th1 型的水平和 ROR γ t、NF-κB 和 CD77 通路的表达，而显著升高 Foxp3 和 IL-10 的表达，从而对关节炎有治疗效果(Yao, Fu et al. 2011)。据相关研究表明，瑞香素也会下调 PI3K/AKT/mTOR 信号通路，抑制 CIA-FLS 的增殖并抑制自噬以诱导细胞凋亡，从而对胶原性关节炎（collagen-induced arthritis，CIA）有潜在的治疗作用(Deng, Zheng et al. 2020)。Zhang 等人也研究证明，通过对 PI3K/AKT、MAPK 和 NF-κB 信号通路的调节，瑞香素有抗关节炎的能力(Zhang, Yao et al. 2020)。瑞香素可以增加促凋亡基因和蛋白的表达，导致结构性凋亡改变，增加早期和晚期 CIA 大鼠滑膜细胞凋亡，从而表现出对自身免疫性关节炎 autoimmune arthritis 的治疗作用。(Shu, Kuang et al. 2014)

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）会引起细菌性肺炎，瑞香素显著增强了 mTOR 依赖性自噬途径，从而增强了微噬细胞的杀菌活性和抑制了炎症反应，改善细菌性肺炎(Zhang, Zhuo et al. 2019)。同时，Yu 等人研究发现，瑞香素通过调控包括 IKK/I κ B、MAPKs 和 PI-3K/Akt 在内的一系列细胞内信号通路，抑制小胶质细胞的激活和促炎反应(Yu, Wang et al. 2014)。

瑞香素具有强大的抗氧化活性(Thuong, Hung et al. 2010)。通过 DPPH 法，测定瑞香素具有抗氧化活性(Witaicenis, Seito et al. 2014)。Keap1/Nrf2/ARE 系统是抗氧化应激的中枢防御机制，而瑞香素具有激活 Nrf2 的作用(Hassanein, Sayed et al. 2020)。Lv 等人发现瑞香素 通过上调 Nrf2 抗氧化信号通路对 t-BHP 引发的氧化损伤和线粒体功能障碍表现出保护作用(Lv, Liu et al. 2017)。瑞香素还可通过激活 Nrf2 依赖性抗氧化反应以防止砷诱导的人肺上皮细胞氧化损伤(Lv, Li et al. 2019)。瑞香素还可以通过调节 p38 MAPK 和 JNK 信号传导以及通过 ERK 信号传导增加 HSP70 的表达，来保护 PC12 细胞免受氧化应激损伤(Qi, Qi et al. 2016)。

瑞香素抗肿瘤抗癌的作用

通过近几十年的研究发现，炎症在白血病的扩大中起着至关重要的作用，苯诱导的白血病促炎因子包括肿瘤坏死因子-α，白细胞介素-1β (IL-1β), IL-2, IL-6, 和炎症介质包括核因子 NF-κB。瑞香素治疗的大鼠表现出促炎细胞因子减少的情况，从而起抑制癌症的作用(Pei, Hu et al. 2021)。瑞香素抑制肝癌的机制主要也是通过抑制抗氧化和炎症反应来实现(Li, Yang et al. 2022)，瑞香素还有抗血管生成的作用，所以对肝癌的治疗作用还可以通过使 Wnt/β-连环蛋白信号的失活(Liu, Pan et al. 2022)。

乳腺癌 (BC) 是一种持续性和冲动性代谢疾病。瑞香素通过 Nrf-2-Keap1 和 NF-kB 通路改善 7,12-二甲基苯[a]蒽诱导的乳腺癌发生(Kumar, Jha et al. 2016)。而对于 DMBA（20 mg 橄榄油）诱导的 Sprague-Dawley 大鼠乳腺癌，瑞香素则通过抑制 ERα、PR、EGFR 和 IGF1R，参与的通路有 MAPK1/2-JNK1/2-Akt pathway(Kumar, Sunita et al. 2018)。瑞香素对 MCF-7 细胞的抗增殖选择性表明，瑞香素可作用于雌激素依赖性肿瘤(Jiménez-Orozco, Rosales et al. 2011)。瑞香素 通过调节 AMPK/Akt/mTOR 通路触发 ROS 诱导的细胞凋亡并诱导细胞保护性自噬，具有卵巢癌的潜在治疗潜力(Fan, Xie et al. 2021)。

瑞香素通过降低 RhoA 和 Cdc42 表达抑制 LM8 小鼠骨肉瘤细胞的侵袭和迁移(Fukuda, Nakamura et al. 2016)。自然杀伤 (NK) 细胞是对抗肿瘤和病毒感染的有力武器。瑞香素在 IL-12 存在下通过 PI3K-Akt-mTOR 信号传导促进人类 NK 细胞活化的能力，可开发为癌症治疗的补充免疫调节剂(B. Yao et al. 2021)。

瑞香素保护心脑血管的作用

瑞香素预处理通过 TLR4/MyD88/NF-Κb 信号通路降低缺血再灌注后心脏损伤和室性心律失常的易感性(Yang, Jiang et al. 2021) 瑞香素通过改善 Nrf2/HO-1 轴和抑制 TGF-β1/Smad2/3 信号轴有效地抵消了 TAC 诱导的心脏肥大和纤维化，减轻横向主动脉缩窄诱导的小鼠心脏重塑(Syed et al. 2022)。

瑞香素抗肝肾毒性的作用

炎症和氧化应激在肾毒性中也起着重要作用。越来越多的证据表明，Nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2)是治疗肝病的关键药理学靶点(Jayasuriya, Dhamodharan et al. 2021)。瑞香素可通过抑制 NF-κB 和激活 Nrf2

信号通路，起到保护肝肾、减弱肝肾毒性的作用。

瑞香素通过激活 Nrf2 介导的 HO-1 表达来增强细胞抗氧化防御能力，从而对四氯化碳 (CCl4) 诱导的大鼠肝毒性有保护作用(Mohamed, Emam et al. 2014)；瑞香素通过抑制 ASK1/JNK 和 Txnip/NLRP3 活化对氧化应激驱动的肝毒性具有保护潜力(Lv, Zhu et al. 2020)；瑞香素还通过抑制 NLRP3 炎症小体、MAPK 和 NF-κB 活化以及诱导自噬来缓解脂多糖/d-半乳糖胺诱导的急性肝功能衰竭(Lv, Fan et al. 2018)。

瑞香素具有抵抗顺铂导致的肝肾毒性的作用。顺铂 (CDDP) 是一种广泛用于癌症治疗的药物，同时对肾脏具有肾毒性，瑞香素可增强顺铂的抗肿瘤活性，减轻顺铂诱导的急性肾毒性 ，其相关机制有上调 SIRT1/SIRT6-Nrf2 通路(Fan, Wei et al. 2020)、抑制 NF-κB 和激活 Nrf2 信号通路(Zhang, Gu et al. 2018)。Gentamicin（GM）是一种强效的抗菌药，但是其严重的肾毒性影响其使用，瑞香素可通过激活调节氧化应激和细胞凋亡的 Nrf2 来防止 GM 诱导的肾毒性(Fan, Gu et al. 2021)。瑞香素可抑制人 MC 中 HG 诱导的氧化应激、炎症反应和 ECM 积累，调整 Nrf2/keap1 和 Akt/NF-κB 通路，因此瑞香素可能是糖尿病肾病（DN）的治疗或预防剂(Xu, Guo et al. 2019)。

瑞香素在神经方面的作用

瑞香素具有神经保护作用(Singh, Singh et al. 2021)。瑞香素预处理可防止 N-methyl-d-aspartate（NMDA）诱导的神经元细胞丢失，逆转含有 NR2B 的 NMDA 受体的上调，并抑制 NMDA 暴露诱导的细胞内 Ca2+ 超载(Yang, Yang et al. 2014)的作用。瑞香素通过调控 MAPK 信号通路和 HSP70 表达来保护氧化应激诱导的神经元凋亡(Qi, Qi et al. 2016)。同时，瑞香素有改善神经退行性疾病的作用。血红素加氧酶-1 (HO-1)在 BV2 细胞中，是一种典型的抗氧化和抗炎因子，在瑞香素处理的 EAE 小鼠中观察到更高水平的 HO-1，瑞香素通过调节血红素加氧酶 1(HO-1)改善实验性自身免疫性脑脊髓炎(EVE)。(Wang, Zhu et al. 2020)。阿兹海默症（AD）的发病机制复杂，APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠中的 Aβ 沉积主要与星形胶质细胞活化和 APP 加工相关，瑞香素通过 STAT3/GFAP 信号通路改善 APP/PS1 小鼠的 Aβ 发病机制(Gao, Wang et al. 2022)。瑞香素还有治疗中风的潜力，在探究瑞香素对缺血性脑损伤是否具有神经保护作用的实验时，检测了瑞香素对海马 HT-22 细胞中谷氨酸毒性诱导的细胞死亡的保护作用，结果证明，瑞香素以浓度依赖性方式保护 HT-22 细胞中的谷氨酸毒性(Du, Tu et al. 2014)。

瑞香素在其它方面的作用

瑞香素通过抑制 ERK 和 NFATc1 通路减弱 LPS 诱导的骨溶解和 RANKL 介导的破骨细胞形成(Wu et al. 2019)。瑞香素通过激活 Wnt/GSK-3β/β-catenin 信号通路改善糖皮质激素诱导的骨质疏松症(Wang, Chen et al. 2020)。

瑞香素具有免疫抑制活性，有望制成免疫抑制剂。瑞香素的免疫抑制活性是通过抑制小鼠 T 细胞中的 NF-κB 和 NFAT 信号通路介导的，瑞香素具有潜在的免疫抑制剂作用(Song, Wang et al. 2014) 。瑞香素在体外对 LPS 诱导的 B 淋巴细胞表现出潜在的免疫抑制作用，研究证明瑞香素可以抑制 OVA 致敏小鼠的体液反应活性(Song, Jiang et al. 2021)。

瑞香素由于其胰岛素刺激特性和随后的细胞凋亡通路调节，可用于治疗糖尿病(Vinayagam and Xu 2017)。

瑞香素具有清除自由基的作用，例如可以清除 H2O、NO、HOO 和 NO2 活性等自由基(Boulebd and Amine Khodja 2021)。

瑞香素还具有治疗卵巢早衰的作用，它是一种 Nrf2 激活剂，增加 Nrf2 的表达，抑制 NLRP3 活化可以剂量依赖性方式挽救 D-半乳糖诱导的卵巢早衰（POF）(Zhang, Yu et al. 2022)。

瑞香素衍生物的药理作用

近年来，瑞香素衍生物进入研究范畴。在探索瑞香素及其 C-4 衍生物的结构-甲基化关系时，Xia 等人发现化合物的 Clint 可能受到 C-4 取代的强烈影响(Xia, Dou et al. 2018)，他们又用不同性质的基团取代瑞香素的 C-4，

C-3 位置，取代基的选择主要考虑基团的电子和亲脂性，发现在 C-4 位置引入一个吸电子亲水性基团，可以增强了抗氧化能力。在众多衍生物中，C-4 位为羧甲基取代的瑞香素衍生物的抗氧化能力最强，其抗氧化活性也是最强的。(Xia, Chen et al. 2018)。Wang 等人合成多个瑞香素衍生物，并就瑞香素衍生物的结构及其对为 G 蛋白偶联受体的激活和抑制关系做了讨论，由于 GPCRs 是代谢和神经系统疾病重要的药物靶点，所以瑞香素衍生物在未来有治疗代谢类疾病的潜力(Wang, Wang et al. 2020)。蛋白激酶是控制细胞增殖、分化和代谢中的关键酶。Yang 等人预测瑞香素作为蛋白激酶抑制剂可能需要 C8 处的羟基化(Yang, Zhao et al. 1999)。

五、瑞香素的生物活性及其制剂

目前瑞香素的制剂有瑞香素胶囊、注射剂等。之前的报道证实，局部注射瑞香素注射液曾导致 2 例过敏性休克(王明忠，宋国昌，张慧，刘和敏 1996)，目前该注射剂已被停用。Li 等人对瑞香复方注射液（CDI）的制备方法和质量控制进行了讨论(Li, Li et al. 1992)。在对瑞香素进行药动学相关研究时，Shan 等人用液质联用/质谱法对正常和佐剂性关节炎大鼠在口服祖师麻提取物后，测定活性化合物的药代动力学分布情况，试验结果表明大鼠处于病理状态时，瑞香素生物利用度显著降低(Shan, Qian et al. 2018)。

瑞香素的 Clint 可能受到 C-4 甲基化强烈影响(Xia, Dou et al. 2018)。研究证明，体内通过葡萄糖醛酸化广泛地清除瑞香素，瑞香素的 UGT 结合途径已被完全阐明(Liang, Ge et al. 2010)。在培养的人体细胞和纯化的人体 SULT 酶以及人体器官胞质溶胶中，瑞香素可以被硫酸化，为进一步研究瑞香素在体内通过硫酸化作用的代谢提供了基础(Han, Xi et al. 2016)。Liang 等人就体外人肝制剂中瑞香素的甲基化、葡萄糖醛酸化和磺化进行了代谢分析、途径比较和生物活性分析，发现甲基化是瑞香素清除的重要途径，可能与瑞香素在人体中的药理作用有关(Liang, Xia et al. 2016)。

目前，对瑞香素的新剂型正在开发中，如在瑞香素透皮贴剂中加入 Transcutol P (TP)，促进瑞香素的释放(Shen, Liu et al. 2018)。在海藻酸钠 (sodium alginate SA)-刺槐豆胶(locust bean gum LBG)制成的活性薄膜中，添加瑞香素，可以增加薄膜的抗菌率和抗氧化活性率，有被开发为食品级薄膜的潜力(Cheng, Cao et al. 2022)。

六、总结与讨论

瑞香素提取于瑞香（Daphne giraldii Nitsche）中，瑞香广泛应用于传统医药中，主要用于祛风通络、祛瘀止痛，主治牙痛、胃痛、肝区病等疾病。经过几十年的研究证明，瑞香提取物或纯化合物(尤其是瑞香素)具有抗炎、抗伤害、细胞毒性、抗疟疾、镇静催眠和免疫调节作用等生物活性(Han, Li et al. 2020)。

瑞香素的提取方法主要为多种色谱方法联合提取。提取分离方法主要是先用超声处理瑞香浸提液，再通过柱色谱和高效液相色谱分离纯化瑞香素。现有文献表明，瑞香素主要存在于瑞香科植物中。

瑞香素还具有多种药理活性，如抗炎抗氧化、抗肿瘤抗癌、保护心脑血管、抗肝肾毒性等作用，主要通过 NF-kB 和 Nfr2 通路起到治疗作用。瑞香素还有穿透血脑屏障的功能，这为其治疗神经系统提供可能，可用于减轻实验性脑脊髓炎（EAE）小鼠征状(D. Wang et al. 2020)、治疗阿兹海默(P. Gao et al. 2022)等神经性疾病。另外，瑞香素对肝毒性和肾毒性有抑制作用，可以起到了肝肾的保护作用。瑞香素临床上主要用于治疗腰痛、类风湿关节炎、凝血功能障碍、退热等症状(Pei, Hu et al. 2021)。瑞香素在代谢调节，自噬调节，提高免疫力，清除自由基(Boulebd and Amine Khodja 2021)等方面也发挥着作用。瑞香素具有苯并吡喃酮结构，其分子式为 C9H6O4，由于水溶性较差、不稳定等因素，目前正积极研究瑞香素衍生物结构和生物活性之间的关系，特别是对瑞香素 C-3，C-4 号位上的结构修饰，研究发现瑞香素衍生物具有抑制和激活 GPCRs(Yinan Wang et al. 2020)以及增强抗炎活性(Xia et al. 2018)等作用。

对瑞香素的药动学研究较少，已知的代谢方式主要有甲基化、磺化和葡糖糖磷酸化。瑞香素开发治疗各种炎症、心脑血管、癌症、神经退行性疾病，如在阿兹海默、中风等疾病治疗方面都具有极大潜力，然而目前瑞香素的制剂还较少，有待进一步的研究。瑞香素由于其强大的抗炎抗氧化活性以及其能穿透血脑屏障的功能，显露出良好的开发利用潜力，希望通过对瑞香素的研究，能够发掘其更好的药理作用，为人类和社会服务。

表 1：瑞香素的现代药理学研究

作用	模型/细胞系	有利方面	剂量	结果/机制/方法	参考文献
抗炎	以 LPS 刺激的 BV-2 细胞为模型		10，20，40，80，160μM	通过调控 IKK/IκB、MAPKs 和 PI-3K/Akt 等一系列胞内信号通路抑制小胶质细胞激活和促炎反应	(Wenwen Yu et al. 2014)
	complete Freund's adjuvant (CFA) 致小鼠炎性疼痛模型	镇痛	4；8mg/kg	炎症性疼痛小鼠脊髓 NF-κB 通路的负性调控及其对 Nrf2/HO-1 信号通路的优先激活	(Y. Yang et al. 2021)
	通过体外刺激 HaCaT 角质形成细胞建立银屑病角质形成细胞模型		20 μM；50 mg/cm2	减弱 IMQ 致小鼠皮损中 IL-6、IL-23A、IL-17A 等炎性细胞因子的上调。抑制 NF-κB 信号通路	(J. Gao et al. 2020)
	MCAO/R 模型	减轻脑 I/R 损伤	5，10，20mg/kg	降低 TNF-α、IL-1β和 IL-6 的过表达，减弱神经细胞凋亡。抑制 TLR4/NF-κB 介导的炎症信号通路	(J. Liu et al. 2016)
	脂多糖诱导的炎症和肺损伤		质粒转染和荧光素酶报告基因检测:20、40、60、80 和 160μM;动物实验:100μl;免疫荧光染色和共聚焦显微镜:160μM;	瑞香素显著下调 NF-κB 依赖信号通路 TNF-α 诱导蛋白 3 (TNFAIP3)，也称为 A20，似乎主要是通过调节非降解性 TRAF6 泛素化来下调 NF-κB 活性。	(Wen-wen Yu et al. 2014)
	牛 II 型胶原诱导的大鼠关节炎		4 mg/（kg·day）；1 mg/(kg·day）	上调 Tregs，下调 Th17-、Th2-和 th1 型细胞反应	(R. Yao et al. 2011)
	TNF-α 诱导 CIA-FLS 的增殖和凋亡		0~60 μg/mL；30 μg/mL	下调 PI3K/AKT/mTOR 信号通路，抑制细胞自噬从而诱导细胞凋亡	(Deng et al. 2020)
	IL -1β 诱导兔软骨细胞		5 -50 ng/mL；12, 24 and 48 ng/ml	抑制 IL -6、IL -12、MMP -3、MMP -9 和 MMP -13 的表达，刺激 IL -10 的产生。抑制 PI3K/AKT、MAPK 和 NF -κB 信号通路。促凋亡的 Caspase -3 和 BAX 减少，抗凋亡的 BCL -2 激活。	(X. Zhang et al. 2020)
	胶原诱导关节炎(CIA)大鼠模型		40 μg/mL	对 CIA 大鼠滑膜细胞促凋亡基因 DR3、PDCD5、FasL、p53 的去甲基化作用，降低 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 的基因表达，增加促凋亡基因 DR3、PDCD5、FasL、p53 的表达，进而导致 DR3、PDCD5、FasL、p53 蛋白表达增加。	(Shu et al. 2014)

	金黄色葡萄球菌引起的肺炎	传染病的治疗	10 mg/kg	增强 mTOR 依赖的自噬途径，导致增强噬菌体杀菌活性和抑制炎症反应。	(W. Zhang et al. 2019)
	DPPH 自由基清除试验;羟基自由基清除试验;超氧自由基清除试验;过氧(ABTS•+)自由基清除试验;次氯酸(HOCl)清除试验;TBARS 试验			自由基清除活性及脂质过氧化抑制作用	(Thuong et al. 2010)
	通过结肠内灌注 TNBS 诱导大鼠肠道炎症。	预防肠道炎症	2.5，5，10mg/kg	抑制脂质过氧化	(Witaicenis et al. 2014)
	顺铂诱导肾毒性;CCL4 诱导肝毒性;7,12-二甲基苯[a]蒽诱导乳腺癌			瑞香素抑制 ROS 生成、脂质过氧化、NF-κB 激活和促炎细胞因子。瑞香素上调 Nrf2 和 HO-1 的表达。瑞香素改善肝功能，抑制组织改变和脂质过氧化，增加 Nrf2 和 HO-1 基因表达。瑞香素抑制脂质过氧化，增强 GSH 和抗氧化酶，降低 NF-κB 表达，激活 Nrf2 通路。	(Hassanein et al. 2020)
	叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导的氧化损伤		0~120μg/ml；2.5, 5 or 10 μg/mL；1.25、2.5、5、10 μg/mL；0, 2.5, 5, 10, 20 or 40mM	Nrf2 抗氧化信号通路的上调	(H. Lv et al. 2017)
	砷诱导的人肺上皮细胞氧化损伤		2.5, 5 or 10μg/mL	Nrf2 依赖性抗氧化反应的诱导以及抗凋亡因子 Bcl-2 在人肺上皮细胞中的稳定性。	(X. Lv et al. 2019)
	H2O2 诱导 PC12 细胞凋亡		0, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 μM	通过 ERK 信号通路调节 p38 MAPK 和 JNK 信号通路，增加 HSP70 的表达。	(Qi et al. 2016)
抗肿瘤抗癌	苯诱导的大鼠白血病	抗炎	12.5;25;50mg/kg	促炎细胞因子如肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β (IL - 1β)、IL - 2、IL - 6 和炎症介质包括核因子 κB 的减少。鞘氨醛 - 1 - 磷酸受体 - 1 mRNA 表达上调	(Pei et al. 2021)
	二乙基亚硝胺(DEN)诱导大鼠肝癌	抑制抗氧化和炎症反应	10，20，30mg/kg	提高 MDA 水平，增加 GPx、SOD、GSH、CAT 和 GST。抑制 TC、TG、VLDL、LDL 和 HDL 水平。抑制总胆红素，增加总蛋白水平。抑制炎症因子和炎症介质。抑制 NF-κB 信号通路。	(D. Wang et al. 2020)

	MTT、菌落形成、流式细胞术和荷瘤实验			Wnt/β-catenin 信号的失活。	(C. Liu et al. 2022)
	12-二甲基苯(a)蒽(DMBA)诱发乳腺癌		20 mg/kg, 40 mg/kg ， 80 mg/kg	保护性 Nrf-2 和 HO-1 上调，Keap1 和 NF-kB mRNA 和蛋白表达同步抑制。抑制 p-AKT 可导致 NF-kB 表达减少，但对 p-ERK1/2 无效。	(Kumar, Jha, and Pattanayak 2016)
	dmba 诱导的乳腺癌		20, 40, and 80 mg/kg	抑制 ERα， PR, EGFR 和 IGF1R:参与 MAPK1/2-JNK1/2-Akt 通路	(Kumar et al. 2018)
	体内体外		体外 12.5 - 200 μM;50、100、200 μM;10 - 9 ~ 10 - 6 M;体内:17.5、35、70、140mg/kg	在体外或体内模型中，瑞香素均未诱导雌激素效应。	(Jiménez-Orozco et al. 2011)
	体内体外		细胞增殖:0、5、10、20、40μg/ml;菌落形成试验;流式细胞术;ROS 生成;免疫荧光;透射电镜;0、10、20、40μg/ml	调节 AMPK/Akt/mTOR 通路	(Fan, Xie, et al. 2021)
	Transwell 系统		WST-8 测定:1、3、10、30 或 100 μ M;细胞形状分析:0、3、30 μ M;	抑制高转移性小鼠骨肉瘤 LM8 细胞的侵袭和迁移，穿透 Transwell 膜的细胞比未处理的细胞更圆，降低 RhoA 和 Cdc42 的表达水平。	(Fukuda et al. 2016)
	K562 细胞	瑞香素与 NK 细胞免疫疗法联合治疗癌症		在 IL-12 存在的情况下，通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路促进人类 NK 细胞激活。	(B. Yao et al. 2021)
保护心脑血管	心肌 I/R 模型		2.5，5，10，20mg/kg	抑制 TLR4/ MyD88/NF-κB 信号通路	(F. Yang et al. 2021)
	Ang–II–体外诱导小鼠心肌细胞肥大和 TAC-诱导小鼠心肌肥大	病理性心脏肥厚及相关纤维化的治疗。	1.56 μg/ml to 200 μg/ml; 10 μg/ml and 20 μg/ml	改善 Nrf2/HO-1 轴，抑制 TGF-β1/Smad2/3 信号轴。	(Syed et al. 2022)
抗肝肾毒性	CCl4 暴露大鼠			清除烷基过氧自由基;在 CCl4 暴露的大鼠中通过 Nrf2 信号转录 HO-1	(Jayasuriya et al. 2021)
	四氯化碳(CCl4)诱导的大鼠肝毒性		4.5mg in 10% DMSO/kg 体重	诱导核因子红系 2 (NF-E2)相关因子 2 (Nrf2)的核易位，从而诱导细胞保护血红素加氧酶-1 (HO-1)的表达和活性。	(Mohamed et al. 2014)
	叔丁基过氧化氢(t-BHP)和对乙酰氨基酚(APAP)诱导的肝毒性		20, 40, or 80 mg/kg	抑制 ASK1/JNK 和 Txnip/NLRP3 的激活	(H. Lv et al. 2020)

	LPS/ GaLN 诱导小鼠 ALF		20、40、80 mg/kg	降低谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平、肿瘤坏死因子(TNF)-α、白介素(IL)-1β、IL-6 分泌、丙二醛(MDA)形成和髓过氧化物酶(MPO)水平，抑制一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2)蛋白表达，增加谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)含量。抑制 LPS/ GalN 诱导的核苷酸结合域(NOD)样受体蛋白 3 (NLRP3)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核因子 κB (NF-κB)信号通路的激活，通过提高促自噬蛋白的表达水平诱导自噬激活	(H. Lv et al. 2018)
	顺铂诱导的急性肾毒性	增强顺铂的抗肿瘤活性	顺铂诱导 AKI:40 mg/kg; 细胞培养和 CCK-8，活性氧生成测定:2.5、5 或 10 μg/ml	上调 SIRT1 和 SIRT6 在体内和体外的表达。抑制 NOX4 的表达水平，激活 Nrf2 易位和抗氧化酶 HO-1 和 NQO1，缓解氧化应激和线粒体功能障碍。抑制 CDDP 诱导的 NF-κB 和 MAPK 炎症通路，以及 p53 和 cleaved - caspase-3 凋亡通路.	(Fan et al. 2020)
	顺铂肾毒性	抑制炎症和氧化反应	2.5，5，10 mg/ kg	抑制 NF-κB，激活 Nrf2 信号通路	(L. Zhang et al. 2018)
	GM 诱导小鼠肾毒性		20mg/kg；40mg/kg	上调 Nrf2 及其调控的抗氧化酶 HO-1、NQO1、GCLC 和 GCLM 在体内外的表达水平	(Fan, Gu, et al. 2021)
	高糖(HG)诱导人系膜细胞(MCs)增殖。		10，20，40μM	降低活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)水平，诱导超氧化物歧化酶(SOD)活性。抑制 TNF-a、IL-1b、IL-6、纤连蛋白(FN)和 IV 型胶原(Col IV)的产生，增强核因子-红系 2 相关因子 2 (Nrf2)的表达，抑制 p-Akt 和 p-p65 水平，抑制 hg 诱导的氧化应激、炎症反应和 ECM 积累。Nrf2/keap1 和 Akt/NF-kB 通路部分介导该效应。	(Xu et al. 2019)

在神经方面的作用	体内体外			上调抗氧化剂(GSH 和 SOD)、抗凋亡蛋白(Bcl-2)水平，以及通过降低促炎细胞因子、执行 caspase-3、促凋亡- bax 和氧化应激标记物的水平。Nrf-2/HO-1 信号通路的激活和 HSP-70 的上调调控瑞香素对氧化应激诱导的神经元凋亡的保护，JNK-MAPK、JAK-STAT 和 TLR-4/NF-κB 信号通路的抑制，并与其 AChE、BChE 和 BACE-1 的抑制潜能有关。	(Singh, Singh, and Bhatti 2021)
	NMDA-诱导的神经兴奋性中毒		0.1, 1 and 10 μM	调节 Bcl-2 和 Bax 表达的平衡。逆转含 nr2b 的 NMDA 受体的上调，抑制 NMDA 暴露引起的细胞内 Ca2+过载，	(L. Yang et al. 2014)
	实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠模型		40, 80, and 160 μM	调控 HO-1	(D. Wang et al. 2020)
	淀粉样前体蛋白(APP)/早老素 1 (PS1)双转基因 AD 小鼠模型		100 mg/kg/day；	与星形胶质细胞活化和 APP 加工相关。	(P. Gao et al. 2022)
	谷氨酸诱导 HT22 细胞毒性与缺血性脑损伤		10 mg/kg body weight	t DAP 可减少 MCAO 和 H/I 损伤模型的梗死体积并改善神经功能。通过保持细胞 GSH 水平和 SOD 活性来防止谷氨酸中毒引起的细胞死亡。	(Du et al. 2014)
在其它方面的作用	体内脂多糖诱导小鼠颅骨骨溶解模型炎症性骨破坏	有治疗炎性骨溶解的潜力	1;5 mg/kg;2.5, 5, 10, and 15 μM;from 240 μM to 1.875 μM	抑制了 ERK 和 NFATc1 信号级联的激活。	(Wu et al. 2019)
	激素诱导的骨质疏松症		1mg/kg;4mg/kg	激活 Wnt/GSK-3β/β-catenin 信号通路	(Yongkui Wang et al. 2020)
	体内体外		0–64 mg/mL;4, 8, 16 mg/mL;	小鼠 T 细胞中 NF-kB 和 NFAT 信号通路的抑制	(B. Song et al. 2014)
	BALB/c 小鼠	瑞香以 OVA 为原型抗原对 BALB/c 小鼠的免疫抑制作用.	5, 10, and 20 mg/kg	升高血清免疫球蛋白 G (IgG)水平，以及 OVA 特异性 IgG 亚类 IgG1 和 IgG2b，降低 Th1 和 Th2 细胞因子的产生，抑制脾细胞增殖。	(B.-C. Song et al. 2021)

	体外	保护 INS-1 胰腺 β 细胞	1, 10, 20 and 40μM	降低脂质过氧化标志物水平，提高 STZ 诱导的 INS-1 细胞抗氧化酶活性。通过上调抗凋亡 Bcl-2 蛋白表达，下调促凋亡 Bax 和核因子 NF-κB 蛋白表达抑制细胞凋亡。	(Vinayagam and Xu 2017)
	量子化学计算			形式氢转移(FHT)、序贯电子转移质子转移(SETPT)、序贯质子损失电子转移(SPLET)和自由基加合形成(RAF)。	(Boulebd and Amine Khodja 2021)
	D-半乳糖诱导野生型和 Nrf2−/−小鼠卵巢衰老		15 or 30 mg/kg/d	激活抗氧化信号分子 Nrf2，抑制 TXNIP/NLRP3。	(M et al. 2022)
瑞香素衍生物	瑞香素 C-3 or C-4-位取代			瑞香素的 C-4 位置增强了其抗氧化能力，疏水苯基对其 C-3 和 C-4 取代的抗氧化活性均有负面影响。	(Xia et al. 2018)
	从 GPCRs 抑制剂到激活剂的瑞香素衍生物			采用 DAS-ELISA 法评价其体外生物活性	(Yinan Wang et al. 2020)
	香豆素及其衍生物的作用	在 C8 位点的羟基化可能是瑞香素作为蛋白激酶抑制剂所必需的		体外抑制酪氨酸特异性蛋白激酶、EGF 受体和丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶，包括 camp 依赖性蛋白激酶(PKA)和蛋白激酶 C (PKC)。瑞香素对 EGF 受体酪氨酸激酶的抑制作用与 ATP 具有竞争性，与肽底物无竞争性。	(E. B. Yang et al. 1999)

参考文献

[1] Al-Warhi, T., A. Sabt, E. B. Elkaeed and W. M. Eldehna (2020). "Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review." Bioorg Chem 103: 104163.

[2] Ali, M. Y., S. Jannat, H. A. Jung, R. J. Choi, A. Roy and J. S. Choi (2016). "Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from Angelica decursiva and Artemisia capillaris and structure-activity analysis." Asian Pac J Trop Med 9(2): 103-111.

[3] Bhattarai, N., A. A. Kumbhar, Y. R. Pokharel and P. N. Yadav (2021). "Anticancer Potential of Coumarin and its Derivatives." Mini Rev Med Chem 21(19): 2996-3029.

[4] Boulebd, H. and I. Amine Khodja (2021). "A detailed DFT-based study of the free radical scavenging activity and mechanism of daphnetin in physiological environments." Phytochemistry 189: 112831.

[5] Chen, H., S. Li, Y. Yao, L. Zhou, J. Zhao, Y. Gu, K. Wang and X. Li (2013). "Design, synthesis, and anti-tumor activities of novel triphenylethylene-coumarin hybrids, and their interactions with Ct-DNA." Bioorg Med Chem Lett 23(17): 4785-4789.

[6] Cheng, H., J. Cao, W. Liu, J. Mei and J. Xie (2022). "Characterization of Sodium Alginate-Locust Bean Gum Films Reinforced with Daphnetin Emulsions for the Development of Active Packaging." Polymers (Basel) 14(4).

[7] Deng, H., M. Zheng, Z. Hu, X. Zeng, N. Kuang and Y. Fu (2020). "Effects of daphnetin on the autophagy signaling pathway of fibroblast-like synoviocytes in rats with collagen-induced arthritis (CIA) induced by TNF-α." Cytokine 127: 154952.

[8] Du, G., H. Tu, X. Li, A. Pei, J. Chen, Z. Miao, J. Li, C. Wang, H. Xie, X. Xu and H. Zhao (2014). "Daphnetin, a natural coumarin derivative, provides the neuroprotection against glutamate-induced toxicity in HT22 cells and ischemic brain injury." Neurochem Res 39(2): 269-275.

[9] Fan, X., W. Gu, Y. Gao, N. Ma, C. Fan and X. Ci (2021). "Daphnetin ameliorated GM-induced renal injury through the suppression of oxidative stress and apoptosis in mice." Int Immunopharmacol 96: 107601.

[10] Fan, X., W. Wei, J. Huang, L. Peng and X. Ci (2020). "Daphnetin Attenuated Cisplatin-Induced Acute Nephrotoxicity With Enhancing Antitumor Activity of Cisplatin by Upregulating SIRT1/SIRT6-Nrf2 Pathway." Front Pharmacol 11: 579178.

[11] Fan, X., M. Xie, F. Zhao, J. Li, C. Fan, H. Zheng, Z. Wei, X. Ci and S. Zhang (2021). "Daphnetin triggers ROS-induced cell death and induces cytoprotective autophagy by modulating the AMPK/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer." Phytomedicine 82: 153465.

[12] Feng, D., A. Zhang, Y. Yang and P. Yang (2020). "Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities." Arch Pharm (Weinheim) 353(6): e1900380.

[13] Fukuda, H., S. Nakamura, Y. Chisaki, T. Takada, Y. Toda, H. Murata, K. Itoh, Y. Yano, K. Takata and E. Ashihara (2016). "Daphnetin inhibits invasion and migration of LM8 murine osteosarcoma cells by decreasing RhoA and Cdc42 expression." Biochem Biophys Res Commun 471(1): 63-67.

[14] Gao, J., F. Chen, H. Fang, J. Mi, Q. Qi and M. Yang (2020). "Daphnetin inhibits proliferation and inflammatory response in human HaCaT keratinocytes and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice." Biol Res 53(1): 48.

[15] Gao, P., Z. Wang, M. Lei, J. Che, S. Zhang, T. Zhang, Y. Hu, L. Shi, L. Cui, J. Liu, M. Noda, Y. Peng and J. Long (2022). "Daphnetin ameliorates Aβ pathogenesis via STAT3/GFAP signaling in an APP/PS1 double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Pharmacol Res 180: 106227.

[16] Han, S., L. Z. Li and S. J. Song (2020). "Daphne giraldii Nitsche (Thymelaeaceae): Phytochemistry, pharmacology and medicinal uses." Phytochemistry 171: 112231.

[17] Han, Z., Y. Xi, L. Luo, C. Zhou, K. Kurogi, Y. Sakakibara, M. Suiko and M. C. Liu (2016). "Sulfate conjugation of daphnetin by the human cytosolic sulfotransferases." J Ethnopharmacol 189: 250-252.

[18] Hassanein, E. H. M., A. M. Sayed, O. E. Hussein and A. M. Mahmoud (2020). "Coumarins as Modulators of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway." Oxid Med Cell Longev 2020: 1675957.

[19] He, Z., W. Dong, K. Yao, C. Qin and B. Duan (2018). "Retracted Article: Daphnetin inhibits proliferation and glycolysis in colorectal cancer cells by regulating the PI3K/Akt signaling pathway." RSC Adv 8(60): 34483-34490.

[20] Huyiligeqi, X. Dong, C. Yang, G. Xu, S. Cao, J. Fu, L. Lin and J. Ni (2016). "Chemical Constituents from Daphne giraldii Nitsche and Their Contents Simultaneous Determination by HPLC." Evid Based Complement Alternat Med 2016: 9492368.

[21] Jayasuriya, R., U. Dhamodharan, D. Ali, K. Ganesan, B. Xu and K. M. Ramkumar (2021). "Targeting Nrf2/Keap1 signaling pathway by bioactive natural agents: Possible therapeutic strategy to combat liver disease." Phytomedicine 92: 153755.

[22] Jiménez-Orozco, F. A., A. A. Rosales, A. Vega-López, M. L. Domínguez-López, M. J. García-Mondragón, A. Maldonado-Espinoza, C. Lemini, N. Mendoza-Patiño and J. J. Mandoki (2011). "Differential effects of esculetin and daphnetin on in vitro cell proliferation and in vivo estrogenicity." Eur J Pharmacol 668(1-2): 35-41.

[23] Kawai, T. and S. Akira (2007). "Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors." Trends Mol Med 13(11): 460-469.

[24] Kumar, A., S. Jha and S. P. Pattanayak (2016). "Daphnetin ameliorates 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis through Nrf-2-Keap1 and NF-κB pathways." Biomed Pharmacother 82: 439-448.

[25] Kumar, A., P. Sunita, S. Jha and S. P. Pattanayak (2018). "7,8-Dihydroxycoumarin exerts antitumor potential on DMBA-induced mammary carcinogenesis by inhibiting ERα, PR, EGFR, and IGF1R: involvement of MAPK1/2-JNK1/2-Akt pathway." J Physiol Biochem 74(2): 223-234.

[26] Li, G., J. Z. Li and J. W. Xie (1992). "[Preparation method and quality control of compound Daphne injection]." Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 17(11): 664-665, 702.

[27] Li, T., G. Yang, Q. Hao, X. Zhang and X. Zhang (2022). "Daphnetin Ameliorates the Expansion of Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma via Reduction of Inflammation and Oxidative Stress." J Oleo Sci 71(4): 575-585.

[28] Li, W. B., X. P. Qiao, Z. X. Wang, S. Wang and S. W. Chen (2020). "Synthesis and antioxidant activity of conjugates of hydroxytyrosol and coumarin." Bioorg Chem 105: 104427.

[29] Liang, S. C., G. B. Ge, H. X. Liu, Y. Y. Zhang, L. M. Wang, J. W. Zhang, L. Yin, W. Li, Z. Z. Fang, J. J. Wu, G. H. Li and L. Yang (2010). "Identification and characterization of human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the in vitro glucuronidation of daphnetin." Drug Metab Dispos 38(6): 973-980.

[30] Liang, S. C., Y. L. Xia, J. Hou, G. B. Ge, J. W. Zhang, Y. Q. He, J. Y. Wang, X. Y. Qi and L. Yang (2016). "Methylation, Glucuronidation, and Sulfonation of Daphnetin in Human Hepatic Preparations In Vitro: Metabolic Profiling, Pathway Comparison, and Bioactivity Analysis." J Pharm Sci 105(2): 808-816.

[31] Liu, C., J. Pan, H. Liu, R. Lin, Y. Chen and C. Zhang (2022). "Daphnetin inhibits the survival of hepatocellular carcinoma cells through regulating Wnt/β-catenin signaling pathway." Drug Dev Res 83(4): 952-960.

[32] Liu, J., Q. Chen, Z. Jian, X. Xiong, L. Shao, T. Jin, X. Zhu and L. Wang (2016). "Daphnetin Protects against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice via Inhibition of TLR4/NF-κB Signaling Pathway." Biomed Res Int 2016: 2816056.

[33] Lv, H., X. Fan, L. Wang, H. Feng and X. Ci (2018). "Daphnetin alleviates lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure via the inhibition of NLRP3, MAPK and NF-κB, and the induction of autophagy." Int J Biol Macromol 119: 240-248.

[34] Lv, H., Q. Liu, J. Zhou, G. Tan, X. Deng and X. Ci (2017). "Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death." Free Radic Biol Med 106: 38-52.

[35] Lv, H., C. Zhu, W. Wei, X. Lv, Q. Yu, X. Deng and X. Ci (2020). "Enhanced Keap1-Nrf2/Trx-1 axis by daphnetin protects against oxidative stress-driven hepatotoxicity via inhibiting ASK1/JNK and Txnip/NLRP3 inflammasome activation." Phytomedicine 71: 153241.

[36] Lv, X., Y. Li, Q. Xiao and D. Li (2019). "Daphnetin activates the Nrf2-dependent antioxidant response to prevent arsenic-induced oxidative insult in human lung epithelial cells." Chem Biol Interact 302: 93-100.

[37] Mohamed, M. R., M. A. Emam, N. S. Hassan and A. I. Mogadem (2014). "Umbelliferone and daphnetin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats via nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated heme oxygenase-1 expression." Environ Toxicol Pharmacol 38(2): 531-541.

[38] Pei, Q., P. Hu, H. Zhang, H. Li, T. Yang and R. Liu (2021). "Daphnetin exerts an anticancer effect by attenuating the pro-inflammatory cytokines." J Biochem Mol Toxicol 35(6): 1-8.

[39] Qi, Z., S. Qi, L. Gui, L. Shen and Z. Feng (2016). "Daphnetin protects oxidative stress-induced neuronal apoptosis via regulation of MAPK signaling and HSP70 expression." Oncol Lett 12(3): 1959-1964.

[40] Saleem, M., M. Asif, A. Parveen, H. S. Yaseen, M. Saadullah, A. Bashir, J. Asif, M. Arif, I. U. Khan and R. U. Khan (2021). "Investigation of in vivo anti-inflammatory and anti-angiogenic attributes of coumarin-rich ethanolic extract of Melilotus indicus." Inflammopharmacology 29(1): 281-293.

[41] Shan, J., W. Qian, L. Peng, L. Chen, A. Kang, T. Xie and L. Di (2018). "A Comparative Pharmacokinetic Study by UHPLC-MS/MS of Main Active Compounds after Oral Administration of Zushima-Gancao Extract in Normal and Adjuvant-Induced Arthritis Rats." Molecules 23(1).

[42] Shen, M., C. Liu, X. Wan, N. Farah and L. Fang (2018). "Development of a daphnetin transdermal patch using chemical enhancer strategy: insights of the enhancement effect of Transcutol P and the assessment of pharmacodynamics." Drug Dev Ind Pharm 44(10): 1642-1649.

[43] Shu, K., N. Kuang, Z. Zhang, Z. Hu, Y. Zhang, Y. Fu and W. Min (2014). "Therapeutic effect of daphnetin on the autoimmune arthritis through demethylation of proapoptotic genes in synovial cells." J Transl Med 12: 287.

[44] Singh, L., A. P. Singh and R. Bhatti (2021). "Mechanistic interplay of various mediators involved in mediating the neuroprotective effect of daphnetin." Pharmacol Rep 73(5): 1220-1229.

[45] Song, B., Z. Wang, Y. Liu, S. Xu, G. Huang, Y. Xiong, S. Zhang, L. Xu, X. Deng and S. Guan (2014). "Immunosuppressive activity of daphnetin, one of coumarin derivatives, is mediated through suppression of NF-κB and NFAT signaling pathways in mouse T cells." PLoS One 9(5): e96502.

[46] Song, B. C., M. M. Jiang, S. Zhang, H. Ma, M. Liu, Z. R. Fu, R. Wu and C. Y. Tong (2021). "Immunosuppressive activity of daphnetin on the humoral immune responses in ovalbumin-sensitized BALB/c mice." Immunopharmacol Immunotoxicol 43(2): 171-175.

[47] Su, J., Z. Wu, Y. Shen, R. Liu, C. Zhang, H. Li and W. Zhang (2008). "Flavonoids from Daphne giraldii Nitsche." Nat Prod Res 22(15): 1355-1358.

[48] Su, J., Z. J. Wu, W. D. Zhang, C. Zhang, H. L. Li, R. H. Liu and Y. H. Shen (2008). "Two new bis-coumarin glycosides from Daphne giraldii NITSCHE." Chem Pharm Bull (Tokyo) 56(4): 589-591.

[49] Syed, A. M., S. Kundu, C. Ram, U. Kulhari, A. Kumar, M. N. Mugale, P. Mohapatra, U. S. Murty and B. D. Sahu (2022). "Up-regulation of Nrf2/HO-1 and inhibition of TGF-β1/Smad2/3 signaling axis by daphnetin alleviates transverse aortic constriction-induced cardiac remodeling in mice." Free Radic Biol Med 186: 17-30.

[50] Thuong, P. T., T. M. Hung, T. M. Ngoc, T. Ha do, B. S. Min, S. J. Kwack, T. S. Kang, J. S. Choi and K. Bae (2010). "Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships." Phytother Res 24(1): 101-106.

[51] Vinayagam, R. and B. Xu (2017). "7, 8-Dihydroxycoumarin (daphnetin) protects INS-1 pancreatic β-cells against streptozotocin-induced apoptosis." Phytomedicine 24: 119-126.

[52] Wang, D., Z. Lu, H. Zhang, S. F. Jin, H. Yang, Y. M. Li and L. Y. Shi (2016). "Daphnetin Alleviates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Regulating Dendritic Cell Activity." CNS Neurosci Ther 22(7): 558-567.

[53] Wang, D., B. Zhu, X. Liu, Q. Han, W. Ge, W. Zhang, Y. Lu, Q. Wu and L. Shi (2020). "Daphnetin Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Through Regulating Heme Oxygenase-1." Neurochem Res 45(4): 872-881.

[54] Wang, Y., J. Chen, J. Chen, C. Dong, X. Yan, Z. Zhu, P. Lu, Z. Song, H. Liu and S. Chen (2020). "Daphnetin ameliorates glucocorticoid-induced osteoporosis via activation of Wnt/GSK-3β/β-catenin signaling." Toxicol Appl Pharmacol 409: 115333.

[55] Wang, Y., J. Wang, Z. Fu, R. Sheng, W. Wu, J. Fan and R. Guo (2020). "Syntheses and evaluation of daphnetin derivatives as novel G protein-coupled receptor inhibitors and activators." Bioorg Chem 104: 104342.

[56] Witaicenis, A., L. N. Seito, A. da Silveira Chagas, L. D. de Almeida, Jr., A. C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, S. H. Cestari and L. C. Di Stasi (2014). "Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives." Phytomedicine 21(3): 240-246.

[57] Wu, Y., J. Xu, Y. Liu, Y. Zeng and G. Wu (2020). "A Review on Anti-Tumor Mechanisms of Coumarins." Front Oncol 10: 592853.

[58] Wu, Z., H. Wu, C. Li, F. Fu, J. Ding, S. Shao, K. Li, X. Yu, Y. Su, J. Liang, X. Lin, G. Yuan, J. Zhou, F. Song, J. Zhao, J. Xu, Q. Liu and F. Xu (2019). "Daphnetin attenuates LPS-induced osteolysis and RANKL mediated osteoclastogenesis through suppression of ERK and NFATc1 pathways." J Cell Physiol 234(10): 17812-17823.

[59] Xia, Y., C. Chen, Y. Liu, G. Ge, T. Dou and P. Wang (2018). "Synthesis and Structure-Activity Relationship of Daphnetin Derivatives as Potent Antioxidant Agents." Molecules 23(10).

[60] Xia, Y. L., T. Y. Dou, Y. Liu, P. Wang, G. B. Ge and L. Yang (2018). "In vitro evaluation of the effect of C-4 substitution on methylation of 7,8-dihydroxycoumarin: metabolic profile and catalytic kinetics." R Soc Open Sci 5(1): 171271.

[61] Xu, K., L. Guo, H. Bu and H. Wang (2019). "Daphnetin inhibits high glucose-induced extracellular matrix accumulation, oxidative stress and inflammation in human glomerular mesangial cells." J Pharmacol Sci 139(2): 91-97.

[62] Yang, E. B., Y. N. Zhao, K. Zhang and P. Mack (1999). "Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor." Biochem Biophys Res Commun 260(3): 682-685.

[63] Yang, F., X. Jiang, H. Cao, W. Shuai, L. Zhang, G. Wang, D. Quan and X. Jiang (2021). "Daphnetin Preconditioning Decreases Cardiac Injury and Susceptibility to Ventricular Arrhythmia following Ischaemia-Reperfusion through the TLR4/MyD88/NF-Kb Signalling Pathway." Pharmacology 106(7-8): 369-383.

[64] Yang, L., Q. Yang, K. Zhang, Y. J. Li, Y. M. Wu, S. B. Liu, L. H. Zheng and M. G. Zhao (2014). "Neuroprotective effects of daphnetin against NMDA receptor-mediated excitotoxicity." Molecules 19(9): 14542-14555.

[65] Yang, T., X. Wang, L. Guo, F. Zheng, C. Meng, Y. Zheng and G. Liu (2022). "Daphnetin inhibits corneal inflammation and neovascularization on a mouse model of corneal alkali burn." Int Immunopharmacol 103: 108434.

[66] Yang, Y., Q. Sheng, Z. Nie, L. Liu, W. Zhang, G. Chen, F. Ye, L. Shi, Z. Lv, J. Xie and D. Wang (2021). "Daphnetin inhibits spinal glial activation via Nrf2/HO-1/NF-κB signaling pathway and attenuates CFA-induced inflammatory pain." Int Immunopharmacol 98: 107882.

[67] Yang, Y. Z., A. Ranz, H. Z. Pan, Z. N. Zhang, X. B. Lin and S. R. Meshnick (1992). "Daphnetin: a novel antimalarial agent with in vitro and in vivo activity." Am J Trop Med Hyg 46(1): 15-20.

[68] Yao, B., Q. Yang, Y. Yang, Y. Li, H. Peng, S. Wu, L. Wang, S. Zhang, M. Huang, E. Wang, P. Xiong, T. Luo, L. Li, S. Jia, Y. Deng and Y. Deng (2021). "Screening for Active Compounds Targeting Human Natural Killer Cell Activation Identifying Daphnetin as an Enhancer for IFN-γ Production and Direct Cytotoxicity." Front Immunol 12: 680611.

[69] Yao, R., Y. Fu, S. Li, L. Tu, X. Zeng and N. Kuang (2011). "Regulatory effect of daphnetin, a coumarin extracted from Daphne odora, on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis." Eur J Pharmacol 670(1): 286-294.

[70] Yu, W., H. Wang, H. Ying, Y. Yu, D. Chen, W. Ge and L. Shi (2014). "Daphnetin attenuates microglial activation and proinflammatory factor production via multiple signaling pathways." Int Immunopharmacol 21(1): 1-9.

[71] Yu, W. W., Z. Lu, H. Zhang, Y. H. Kang, Y. Mao, H. H. Wang, W. H. Ge and L. Y. Shi (2014). "Anti-inflammatory and protective properties of daphnetin in endotoxin-induced lung injury." J Agric Food Chem 62(51): 12315-12325.

[72] Zhang, L., Y. Gu, H. Li, H. Cao, B. Liu, H. Zhang and F. Shao (2018). "Daphnetin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting inflammatory and oxidative response." Int Immunopharmacol 65: 402-407.

[73] Zhang, M., X. Yu, D. Li, N. Ma, Z. Wei, X. Ci and S. Zhang (2022). "Nrf2 Signaling Pathway Mediates the Protective Effects of Daphnetin Against D-Galactose Induced-Premature Ovarian Failure." Front Pharmacol 13: 810524.

[74] Zhang, W., S. Zhuo, L. He, C. Cheng, B. Zhu, Y. Lu, Q. Wu, W. Shang, W. Ge and L. Shi (2019). "Daphnetin prevents methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection by inducing autophagic response." Int Immunopharmacol 72: 195-203.

[75] Zhang, X., J. Yao, Z. Wu, K. Zou, Z. Yang, X. Huang, Z. Luan, J. Li and Q. Wei (2020). "Chondroprotective and antiarthritic effects of Daphnetin used in vitro and in vivo osteoarthritis models." Life Sci 240: 116857.

[76] 程旭, 王莹傲, 胡祺鹏 and 金莉莉 (2022). "长白瑞香不同药用部位中多成分的含量测定." 延边大学医学学报 45(01): 28-31.

[77] 董俊丽, 黄传奇, 黄伟, 马浩然 and 刘剑敏 (2019). "绿萝花化学成分及其抗氧化活性." 中成药 41(07): 1578-1582.

[78] 王明忠，宋国昌，张慧，刘和敏 (1996). "黄瑞香注射液局部注射出现过敏性休克 2 例." 中国中药杂志(08): 503-504.

[79] 于明, 张元君 and 王明时 (1976). "祖师麻化学成分的研究." 中草药通讯(10): 13-17+22+49.

[80] 周蕙祯, 罗伟, 陈爽, 陈胡兰, 李国友 and 李丽梅 (2021). "瑞香狼毒花中香豆素成分及生物活性研究." 中草药 52(04): 943-950.

[81] 周志明, 吕彪, 闫芳, 张春云, 王海平, 王勤礼, 王建东, 徐涛, 张春梅 and 陈叶 (2022). "不同年限唐古特瑞香不同药用部位活性物质初探." 中国农学通报 38(14): 53-59.

1 例吸入特布他林致双手震颤的不良反应病例分析

易志攀

（邵阳市妇幼保健院(邵阳市妇女儿童医院） 药剂科 湖南 邵阳 422000）

一、前言

特布他林是一种 β_2 肾上腺素能受体激动剂，具有较强较快的舒张平支气管滑肌，增强纤毛运动清除呼吸道分泌物的作用，还能减少微血管渗出、调节肥大细胞和嗜酸性细胞炎性介质的释放，从而具有能抗炎和降低气道高反应的作用，是缓解慢性阻塞性肺疾病急性加重期呼吸困难症状的常用药，其不良反应包括肌肉震颤（通常表现为手颤），头痛，恶心，失眠，心动过速，低钾血症，行为异常等，本文就 1 例吸入特布他林致双手震颤的病例展开讨论和分析。

二、病史摘要

患者唐某，男，71 岁，身高 170cm，体重 70kg，BMI24.22kg/m^2，因“咳嗽、咳痰、气促加重 1 天”入院。患者诉年幼时有哮喘，后自行缓解， 2017 年无明显诱因出现咳嗽、咳少量白色黏液痰，晨起加重，冬春季节明显，伴有气促不适，活动后明显，既往住院诊断考虑“慢性阻塞性肺疾病急性加重”，予以对症支持治疗后症状缓解出院。2022 年 3 月 13 日无明显诱因再发咳嗽、咳中等量黄白色脓痰，晨起明显，伴胸闷、气促，活动后明显，无发热，无头痛、胸痛，无咯血、盗汗，无腹痛、腹泻等特殊不适。为进一步诊治来我院呼吸内科就诊。起病以来，精神尚可，食纳、睡眠欠佳，大小便正常，体重未见明显增减。有“高血压”病史 20 余年，症状控制可，有“冠心病”病史 3 余年，未予以特殊处理，年幼时有哮喘，后自行缓解。否认 “糖尿病”；否认“伤寒”“肝炎”等传染病史。无外伤及输血史，无食物及药物过敏史。患者有吸烟史（20 支/天，35 年）、无饮酒史、无粉尘接触史。

体格检查：T：36.7° C，P：97 次/分，R:21 次/分，BP：125/74mmHg，神清，唇无发绀，桶状胸，双肺呼吸运动增强，语颤减弱，叩诊过清音，双肺可闻及少量湿性啰音哮鸣音，无胸膜摩擦音。心率 109 次/分，心律齐，心音可，无杂音及心包摩擦音，腹软，无压痛及反跳痛，双下肢轻度水肿。

辅助检查：（2022 年 03 月 13 日我院急诊）

1.血常规：白细胞数目 14.46X10^9/L;中性粒细胞比率 75.2%;中性粒细胞数 10.87X10^9/L;淋巴细胞数 0.28X10^9/L;

2.血气：酸碱度 7.443;二氧化碳分压 40.3mmHg;氧分压 97.8mmHg;血氧饱和度 96.8%。

3.心电图：窦性心动过速，电轴右偏。

4.胸部 CT：1.考虑慢性支气管炎、肺气肿。2.双肺上叶陈旧性病灶；

5.血生化、凝血功能、新型冠状病毒核酸检测：阴性。

入院诊断：1.慢性阻塞性肺病伴有急性下呼吸道感染 2.支气管哮喘 3.高血压 3 级 4.冠状动脉粥样硬化性心脏病（1.心绞痛 2.心功能Ⅱ级）

出院诊断：1.慢性阻塞性肺病伴有急性下呼吸道感染 2.支气管哮喘 3.高血压 3 级 4.冠状动脉粥样硬化性心脏病（1.心绞痛 2.心功能Ⅱ级）5.脂肪肝 6.高脂血症 7.肾囊肿 8.双肾结石

治疗经过：

患者入院第 1 日，初步诊断慢性阻塞性肺病急性加重期，完善三大常规、血生化、心电图、痰细菌学、降钙素原、C-反应蛋白、结核抗体、血气、免疫球蛋白 lgE 等检查，立即给予经鼻导管氧疗，经验予以左氧氟沙星氯化钠注射液（0.5g ivgtt qd）抗感染，0.9%氯化钠注射液 50ml+注射用甲泼尼龙琥珀酸钠（40mg ivgtt qd）抗气道炎症，5%葡萄糖注射液 100ml+多索茶碱注射液 0.3g 松弛气道平滑肌，解痉平喘对症支持治疗。5%葡萄糖注射液 100ml+注射用溴己新 4mg 和乙酰半胱氨酸（0.2g po tid)、痰热清胶囊（1.2g po tid）化痰止咳，（中午 11：

43）予以硫酸特布他林雾化吸入用溶液 5mg+吸入用丙酸倍氯米松混悬液（2ml 雾化吸入 bid）扩张支气管缓解呼吸困难症状。入院第 4 日上午 10：00 时患者使用硫酸特布他林雾化吸入用溶液 5mg+吸入用丙酸倍氯米松混悬液（2ml 雾化吸入 bid）该组药液后，约半小时出现双手震颤的症状，下午 17：10 分再次雾化后出现双手震颤，告知医师，医师结合患者目前的情况，考虑药物引起不良反应的可能性大，给予停药。第五日（2022 年 3 月 17 日）早上 9 点，患者诉双手震颤症状缓解，给予停药处理后至 3 月 24 日出院，未再出现双手震颤的症状。

三、分析与讨论

针对该患者，着重进行以下几点分析讨论：

1、药品不良反应关联性评价

根据国家药品不良反应关联性评价标准，对该例不良反应进行关联性评价：（1）患者于 2022 年 3 月 13 日开始使用硫酸特布他林雾化吸入用溶液 5mg+吸入用丙酸倍氯米松混悬液（2ml 雾化吸入 bid），3 月 16 上午 10 点及下午 5：10 使用硫酸特布他林雾化吸入用溶液 5mg+吸入用丙酸倍氯米松混悬液（2ml 雾化吸入 bid）后均出现双上肢及手肌肉震颤，提示用药与药物不良反应发生有时间相关性；（2）硫酸特布他林雾化吸入用溶液说明书有对肌肉震颤的描述，属于已知的不良反应类型；（3）该患者停止硫酸特布他林雾化吸入用溶液这组药后第二天 9 点双上肢及手肌肉震颤症状好转；（4）该患者未再使用硫酸特布他林雾化吸入用溶液这组药，类似症状未再次出现；（5）患者既往有高血压 20 余年，一直规律服用氨氯地平降血压治疗，其与入院后静脉用的左氧氟沙星氯化钠注射液和多索茶碱注射液的说明书“不良反应”项下都有震颤的描述，但患者两次均在使用硫酸特布他林雾化吸入用溶液这组药出现手颤的情况，在单独停止使用硫酸特布他林雾化吸入用溶液这组药，余治疗方案不变的情况下，类似症状未再发生，暂可排除左氧氟沙星、多索茶碱注射液和氨氯地平片所致，因此此类症状是否因病情的影响不能明确。综上所述，考虑为硫酸特布他林雾化吸入用溶液是引发双上肢及手肌肉震颤的诱因，该患者出现双上肢及手肌肉震颤的不良反应与硫酸特布他林雾化吸入用溶液的关联性评价结果为“很可能”。

2、分析硫酸特布他林雾化吸入用溶液引起肌肉震颤的可能原因

（1）生理病理：有研究表明，气流阻塞患者在空腹状态下硫酸特布他林雾化吸入用溶液引起双手震颤不良反应的发生率明显高于非空腹患者[1]；可能是由于空腹时机体对药物反应的敏感性增强，一方面可能是空腹状态下机体代谢较弱，外界刺激给予机体一个“觉醒”状态，即压力源的作用，从而引发一系列生理变化；加上患者高龄、体质较差，故极易造成肌肉震颤等不适[2]。老年人器官功能老化，致使各种生理调节功能降低，代偿恢复速度减慢，免疫功能和维持机体内环境稳定的能力降低，对药物的适应性和应变能力减弱，易发生药品不良反应；与疾病本身的变化相混淆，增加了诊断和治疗的困难[3]。

（2）药品：β_2 受体激动剂可激动骨骼肌慢收缩纤维的受体，最终导致胞浆内钙离子浓度下降，影响骨骼肌兴奋收缩耦联，抑制肌收缩张力，使收缩融合分离导致肌肉震颤[4]， 好发于四肢和面颈部[5]。特布他林的不良反应中，震颤、强直性痉挛和心悸均为拟交感胺的作用所致。特布他林虽然是选择性的 β_2 受体激动剂，但也能兴奋骨骼肌和心脏上的 β 受体，引起骨骼肌震颤和心率加快。这些不良反应更容易发生在心血管疾病患者，甲状腺功能亢进者，有癫痫惊厥史、肝肾功能不全和老年人中[6]。患者有冠状动脉粥样硬化性心脏病，这也有可能是导致不良反应发生的重要因素。文献报道，特布他林会增加茶碱类所致震颤等不良反应发生概率；多索茶碱致四肢震颤时不能排除特布他林的影响[7-8]；临床医师与临床药师综合分析后认为，患者 3 月 16 日上午 10 点应用硫酸特布他林雾化吸入用溶液 5mg+吸入用丙酸倍氯米松混悬液（2ml 雾化吸入 bid）出现双上肢及手肌肉震颤反应，3 月 16 日下午五点使用该组药后双上肢及手肌肉震颤再次出现，3 月 17 日停用该组药后未再发作。故考虑双上肢及手肌肉震颤为硫酸特布他林雾化吸入用溶液所致的不良反应。

3、如何避免患者使用特布他林引起震颤的风险

有研究显示，β_2 受体激动剂不良反应与剂量相关，较小的起始剂量会减少不良反应发生的机率[9]。说明书推荐特布他林的成人每次剂量为经雾化器吸入 5mg 的药液，但患者是有心血管疾病的老年人，临床工作中对于可能发生肌肉震颤的高危患者，可将特布他林使用剂量调至低剂量 2.5mg[10]，且多索茶碱与特布他林联用会使发生震颤的不良反应的概率增加，因此多索茶碱注射液与特布他林雾化液联用时,应适当根据血药浓度调整多索

茶碱的用量，通过多索茶碱血药浓度监测控制该药血药浓度在（8.38±2.19）μg/ml,既可提高疗效,又可提高联合用药的安全性，减少不良反应的发生[11]。也可换用雾化罐面罩吸入给药，提高用药安全性[12]。对于双手震颤的患者，可指导患者缓慢活动肢体、行肢体按摩，避免长时间保持同一姿势[1]。有文献提到使用β2受体脱敏剂可以减少不良反应的发生[13]。临床药师分析所用药品及其不良反应的相关性，在不排除特布他林增加多索茶碱注射液所致双上肢及手震颤不良反应情况下，建议停止吸入特布他林雾化液，后观察病情变化，如四肢震颤未减轻，再考虑停用其他药物（如多索茶碱注射液），临床医师采纳。3 月 17 日停止吸入特布他林雾化液后未再次出现双上肢及手肌肉震颤。故临床药师分析双上肢及手肌肉震颤很可能为吸入特布他林雾化液所致，建议停用该药，其余治疗不变。

4、该患者吸入剂的选择

患者是慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘患者，吸入性糖皮质激素是治疗哮喘最有效的药物，无论疾病严重程度如何，它们都是所有持续性疾病患者的一线治疗[14]，丙酸氟替卡松是一种相对较新的吸入性糖皮质激素，对慢性稳定支气管哮喘患者的肺功能具有较好的疗效[15]，噻托溴铵是新型的长效抗胆碱药,其扩张支气管的作用优于目前在临床作为治疗慢性阻塞性肺疾病一线药物的异丙托溴铵,已被《COPD 全球防治倡议》推荐为稳定期 COPD 的基础用药[16]，患者肺功能：重度混合性肺通气功能障碍，医生予以布地格福吸入气雾剂，该吸入剂含有β2受体激动剂福莫特罗，若不能耐受，有文献指出可选用 AZD3199（吸入性超长效β2-肾上腺素受体激动剂），它比福莫特罗安全性更高，不良反应发生率极少，这可能和它更低的全身副作用水平相关[17]，也可联合丙酸氟替卡松吸入气雾剂和噻托溴铵粉吸入剂，或其他糖皮质激素吸入剂和 M 受体阻断剂。糖皮质激素吸入剂能抑制气道释放炎症介质，抑制机体炎症反应，改善气道功能，M 受体阻断剂可逆性地抑制 M 胆碱能受体，引起平滑肌松弛。极大缓解支气管平滑肌疲劳，从而改善肺通气[18]，二者联合发挥协同作用，故能有效提高疗效，改善患者临床症状[19]。

四、小结

该患者是一位慢性阻塞性肺病伴急性加重合并有高血压和冠心病的老年患者，使用特布他林引起双手震颤。在此次病例中临床药师利用自己掌握的药理知识，并查阅相关文献，及时上报了不良反应，药品不良反应的发生有可能与诸多因素（年龄、并发症、剂量、不同药品的不良反应的相关性等）相关，用药时应注意加强监测。临床药师作为医疗团队一员，要积极参与患者治疗，协助医师一起分析研究病情，积极查阅资料，根据自己的专业知识参与用药方案调整，在药物的使用及相互作用，不良反应等方面为医师提供参考，指导患者合理用药，发挥药学专业所长，贡献力量。

参考文献

[1] 祝雅静,刘娟.支气管舒张试验的不良反应观察[J].中国临床新医学,2019,12(12):1316-1320.

[2] 刘清,常芳.空腹输液引起的不良反应原因及护理对策[J].现代中西医结合杂志,2008,17(4):627-628

[3] 邵丹，毕铁琳，尹航，等. 吸入用复方异丙托溴铵溶液诱发震颤一例[J]. 中国医院用药评价与分析,2019,19(5):639-640.

[4] 王欣然.1 例特布他林雾化吸入致全身震颤不良反应的病例分析[J].海峡药学,2020,32(10):226-228.

[5] Baker MR, Baker SN. Beta-adrenergic modulation of tremor and corticomuscular coherence in humans［J］. PLoS One. 2012;7(11):e49088.

[6] 孙蕊蕊,段丹丹,李焕玲.特布他林致双上肢震颤 1 例[J].解放军药学学报,2017,33(05):485

[7] 唐晓霞,翁军,韩静.特布他林联合多索茶碱对慢性阻塞性肺疾病患者的疗效及患者呼吸动力学的影响[J].中国医院药学杂志,2020,40(15):1659-1662.

[8] 赖运明.多索茶碱联合硫酸特布他林雾化液、布地奈德混悬液对慢性阻塞性肺疾病患者气道重构及肺功能的影响[J].临床合理用药杂志,2022,15(18):81-84.

[9] Travers AH, Milan SJ, Jones AP, et al. Addition of intravenous beta(2)-agonists to inhaled beta(2)-agonists for acute asthma. Cochrane Database Syst Rev. 2012 Dec 12;12

[10] 安丽青,刘建国,李静,等. 雾化吸入低剂量布地奈德和特布他林治疗支气管哮喘急性加重期的疗效观察[A]. 中华医

学会.中华医学会第五次全国哮喘学术会议暨中国哮喘联盟第一次大会论文汇编[C].中华医学会:中华医学会,2006:278.
[11] 孙惠斌,张钟,刘正，等.基于多索茶碱血药浓度监测的剂量调整对该药与特布他林雾化液联用安全性的影响[J].药物不良反应杂志,2020(01):32-33-34-35-36-37.
[12] 邵丹，毕铁琳，尹航，等．吸入用复方异丙托溴铵溶液诱发震颤一例[J]．中国医院用药评价与分析,2019,19(5):639-640.
[13] Cazzola M, Page CP, Rogliani P, et al. β2-agonist therapy in lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 2013 Apr 1;187(7):690-6
[14] Holimon TD, Chafin CC, Self TH. Nocturnal asthma uncontrolled by inhaled corticosteroids: theophylline or long-acting beta2 agonists? Drugs. 2001;61(3):391-418
[15] Kolasani BP, Lanke VM, Diyya S. Influence of delivery devices on efficacy of inhaled fluticasone propionate: a comparative study in stable asthma patients[J]. J Clin Diagn Res. 2013 Sep;7(9):1908-12.
[16] CcelliB R, Machee W, Agusti A, et al. standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD a summary of the ATS/ERS position paper[J].Eur RepirJ,2004,23(6):932.
[17] Bjermer L, Rosenborg J, Bengtsson T,et al. Comparison of the bronchodilator and systemic effects of AZD3199, an inhaled ultra-long-acting β_2-adrenoceptor agonist, with formoterol in patients with asthma. Ther Adv Respir Dis. 2013 Oct;7(5):264-71.
[18] 白新会.噻托溴铵治疗稳定期慢性阻塞性肺疾病临床研究[J].当代医学,2011, 17(13):25-26.
[19] 邹丽涛.M 胆碱受体阻断剂联合吸入用糖皮质激素治疗喘息性慢性支气管炎的疗效观察[J].临床医学,2019,39(11):112-113.

Daurisoline 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制自噬诱导胶质瘤细胞凋亡并促进 TMZ 化疗敏感性

殷海棠[1,2]、郑志昌[1]、李明[1]、李琴[1]、赵青青[1]、杨继红[1*]、文志鹏[1*]

（1.贵州医科大学附属医院 药学部 贵州 550004；2.贵州医科大学药学院 贵州 550025）

【摘要】目的：探讨蝙蝠葛苏林碱（Daurisoline，DAS）对胶质瘤细胞增殖、凋亡的分子机制及其化疗敏感性。**方法：**1.CCK-8 法、Edu 实验、细胞克隆实验、PI/ Hoechst 33342、流式细胞术、裸鼠皮下成瘤实验检测 DAS 对胶质瘤细胞体外内增殖和凋亡能力，western blot 验证胶质瘤细胞中凋亡和周期相关蛋白水平表达。2.透射电镜、自噬流实验、AdPlus-mCherry-GFP-LC3B 腺病毒感染观察胶质瘤细胞中自噬变化，western blot 验证 DAS 对胶质瘤细胞自噬蛋白水平及其相关信号通路蛋白水平表达。3. western blot 检测 TMZ 对胶质瘤细胞自噬蛋白水平表达、AdPlus-mCherry-GFP-LC3B 腺病毒验证 TMZ 对胶质瘤细胞自噬变化。4. CCK-8 法、流式细胞术、Edu 实验、细胞克隆实验、PI/ Hoechst 33342、裸鼠皮下成瘤实验检测 DAS 联合 TMZ 对胶质瘤增殖和凋亡的影响，western blot 验证胶质瘤细胞中 DAS 联合 TMZ 自噬蛋白水平表达。**结果：**1、DAS 对胶质瘤细胞增殖和凋亡的研究结果：相比 control 组，各浓度 DAS 处理后以剂量和时间依赖性方式抑制细胞活力（$P<0.05$）。不同浓度 DAS 处理细胞 72h 后，明显抑制细胞增殖，诱导细胞发生凋亡和细胞 G1 期阻滞（$P<0.05$），并促进 Bax、Caspase-3、P27、P21 蛋白水平表达，降低 Cyclin D1、Cyclin E1、CDK2 蛋白水平表达（$P<0.05$）。2. DAS 对胶质瘤细胞自噬的研究结果：相比 control 组，不同浓度 DAS 处理细胞 72 h 后，LC3Ⅱ/Ⅰ、SQSTM1/P62、磷酸化 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达水平增加，细胞中自噬囊泡和黄色斑点数量增加（$P<0.05$）。使用巴弗洛霉素 A1 (Bafilomycin A1, Baf A1) 干预后，与 DAS 和 BafA1 单独处理组相比，DAS 和 BafA1 共同处理组中 LC3Ⅱ/Ⅰ表达水平无明显变化。3.TMZ 对胶质瘤细胞自噬研究结果：相比 control 组，不同浓度 TMZ 处理细胞后，LC3Ⅱ/Ⅰ蛋白水平表达增加、SQSTM1/P62 蛋白水平表达降低，细胞中红色斑点数量增加（$P<0.05$）。4. DAS 联合 TMZ 对胶质瘤细胞增殖和凋亡的研究结果：相比 DAS 或 TMZ 单药处理组，DAS 和 TMZ 共同处理组细胞活力明显降低，DAS 和 TMZ 联合处理组 PI 阳性细胞的比例明显高于 DAS 或 TMZ 单独处理组，DAS 和 TMZ 联合处理组显著提高细胞总凋亡百分比（$P<0.05$）。同时，相比 TMZ 单独处理组，DAS 和 TMZ 联合处理组 p62 蛋白表达增加，提示 DAS 通过抑制 TMZ 诱导的自噬促进其肿瘤杀伤作用（$P<0.05$）。**结论：**DAS 可以抑制胶质瘤细胞增殖，诱导胶质瘤细胞凋亡和细胞周期阻滞，并促进 TMZ 化疗敏感性，其机制可能与 DAS 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制自噬相关。

【关键词】蝙蝠葛苏林碱；胶质瘤；凋亡；自噬；PI3K/AKT/mTOR 信号通路；化疗敏感性

我院 2023 年 1-5 月份重点监控品种盐酸左氧氟沙星注射液用药合理性专项点评分析

尹权，沈谦，史友锦*

灌南县第一人民医院药剂科，江苏省连云港市 222500

【摘要】目的：探讨我院 2023 年 1-5 月份重点监控品种盐酸左氧氟沙星注射液用药合理性的专项点评结果，为临床合理用药提供参考。**方法：**以 2023 年 1 月~2023 年 5 月灌南县第一人民医院开具的 1489 张盐酸左氧氟沙星注射液处方为研究对象，统计药品使用信息，包括科室分布、患者性别与年龄分布、药物联用情况。基于相关标准及药品使用说明书，对处方中盐酸左氧氟沙星注射液的用药合理性进行评价，筛查不合理用药并分类统计，分析不合理问题。**结果：**根据统计数据，医院盐酸左氧氟沙星注射液使用以单一用药为主，占比 75.35%，使用排位列居前五的科室依次为呼吸内科、老年医学科、普外科、泌尿外科与传染科，药品使用占比分别为 23.97%、16.39%、13.77%、1216%、10.48%，合计 76.77%。主要使用的群体为 60 岁以上老年患者，占比 65.61%，男性患者盐酸左氧氟沙星注射液的使用率略高于女性患者，但差异分布不明显。处方点评结果显示，1482 张处方中的盐酸左氧氟沙星注射液使用合理，药品使用合理率 99.53%，余 7 张不合理，包括联合用药不适宜 3 张、遴选药品不适宜 2 张、无适应症用药 1 张、用法用量不适宜 1 张，处方不合理率 0.47%。**结论：**我院 2023 年 1-5 月重点监控品种盐酸左氧氟沙星注射液的临床使用合理率高，但仍有个别不合理处方，有待加强药品使用管理，进一步提高用药合理性。

【关键字】重点监控；盐酸左氧氟沙星注射液；合理用药

盐酸左氧氟沙星注射液为喹诺酮类抗菌药物，抗菌谱广且作用强，对多数肠杆菌科细菌、变形杆菌属、伤寒沙门菌属、志贺菌属、绿脓杆菌、流感杆菌等敏感，对部分肺炎链球菌、葡萄球菌、衣原体等也具有良好抗菌作用，适用于预防及治疗各种敏感菌株引起的成年人感染[1]。盐酸左氧氟沙星注射液广泛应用于临床多科室，虽在感染性疾病临床防治中发挥着重要作用，但受多种因素影响，存在不合理用药问题，而且随着药品的大量使用，由此所致细菌耐药及不良反应问题也受到广泛关注和重视[2]。2023 年 1 月中旬，国家卫生健康委办公厅发布了《第二批国家重点监控合理用药药品目录》，新增了包括左氧氟沙星在内的 6 种抗微生物药物。在这一背景下，我院也将盐酸左氧氟沙星注射液列为医院重点监控药品并对其开展了合理用药专项点评工作，现就点评结果进行汇报，具体如下：

1.资料与方法

1.1 一般资料

以 2023 年 1 月~2023 年 5 月灌南县第一人民医院开具的 1489 张盐酸左氧氟沙星注射液处方为研究对象。全部处方均为电子版西药处方，由医院药剂科统一调剂，内容齐全，对应病例均为来自不同科室的住院患者，资料信息完整有效。

1.2 方法

利用医院电子处方系统，调研 1489 张样本处方中盐酸左氧氟沙星注射液的使用情况，包括科室分布、使用患者的性别、年龄以及联合用药情况。另依据《抗菌药物临床应用指导原则》（国卫办医发〔2015〕43 号）、《国家抗微生物治疗指南》（2012 年）、《新编药物学》（第 18 版）、《中国药典》（2020 版）相关标准及药品使用说明书，对处方中盐酸左氧氟沙星注射液的用药合理性进行点评，点评采用电子处方点评与人工点评相结合的方式，筛查不合理处方并分类统计，分析不合理问题。

1.3 不合理用药基本判定

1.3.1 无适应症用药　违反医药原理，使用与诊断或病情记录无关的药品，即患者无明显需要使用盐酸左氧氟沙星注射液的病症而处方开具该药物。

1.3.2 用法用量不当　处方开具的药品使用方法和剂量不符合相关规定或与通常的医疗实践不一致，即盐酸左氧氟沙星注射液给药剂量过大或不足、给药疗程过长或过短、给药频次或用药时间不当。

1.3.3 联合用药不适宜　两种及以上药物无联合使用指征，或联合使用后使药效降低或产生毒副作用，即处方中无盐酸左氧氟沙星注射液联合用药指征而使用，或同时开具了与该药物存在配伍禁忌的药物。

1.3.4 遴选药品不适宜　患者具备使用某类药物的指征，但具体药品选用不当，并不符合患者实际病情，即患者需要预防性应用抗生素或接受抗感染治疗，但不宜使用盐酸左氧氟沙星注射液。

2.结果

2.1 药品基本使用情况

2.1.1 科室分布

根据样本处方科室分布的统计数据，医院盐酸左氧氟沙星注射液使用排位列居前五的科室依次为呼吸内科、老年医学科、普外科、泌尿外科与传染科，药品使用占比分别为 23.97%、16.39%、13.77%、1216%、10.48%，合计 76.77%，详见表 1。

表 1　样本处方科室分布统计

排序	科室	处方数（n）	百分比（%）
1	呼吸内科	357	23.97
2	老年医学科	244	16.39
3	普外科	205	13.77
4	泌尿外科	181	12.16
5	传染科	156	10.48
6	骨科	107	7.19
7	肿瘤科	72	4.86
8	神经外科	55	3.69
9	耳鼻喉科	38	2.55
10	其他	74	4.97
合计		1489	100.0

2.1.2 患者性别与年龄分布

根据处方中患者信息的统计数据，医院盐酸左氧氟沙星注射液的主要使用群体为 60 岁以上老年患者，占比 65.61%，无 18 岁以下儿童用药，青年患者使用占比最低。性别方面，男性患者盐酸左氧氟沙星注射液的使用率略高于女性患者，但分布差异在各个年龄段及总病例中均不明显，见表 2。

表 1　样本处方对应患者性别与年龄分布统计

年龄（周岁）	例数（男,%）	例数（女,%）	合计（n,%）
≤17 岁（儿童）	0（0）	0（0）	0（0）
18~39 岁（青年）	98（6.58）	90（6.04）	188（12.63）
40~59 岁（中年）	170（11.42）	154（10.34）	324（21.76）
≥60 岁（老年）	512（34.39）	465（31.23）	977（65.61）
合计	780（52.38）	709（47.62）	1489（100.0）

2.1.3 联合使用情况

根据统计数据，医院盐酸左氧氟沙星注射液临床使用以单一用药为主，占比 75.35%，少数三联，占比 1.28%，见表 3。

表 3　样本处方盐酸左氧氟沙星注射液与其他抗菌药物联用情况统计

排序	用药类型	处方数（n）	百分比（%）
1	单一用药	1122	75.35
2	二联用药	348	23.37
3	三联用药	19	1.28
	合计	1489	100.0

2.2 药品使用合理性评价

根据处方点评，1489 张样本处方中盐酸左氧氟沙星注射液使用合理处方 1482 张，药品使用合理率 99.53%，另筛查出盐酸左氧氟沙星注射液使用不合理处方 7 张，包括联合用药不适宜 3 张、遴选药品不适宜 2 张、无适应症用药 1 张、用法用量不适宜 1 张，处方不合理率 0.47%。具体点评结果见表 4。

表 4　盐酸左氧氟沙星使用不合理处方具体点评结果

不合理医嘱	住院号	科室	诊断	存在问题
联合用药不适宜	9000164018	胸外科病区	急性化脓性阑尾炎伴穿孔伴弥漫性腹膜炎,脂肪肝	患者 03.03--03.10 使用头孢他啶 2.0g bid、03.03--03.11 使用左氧氟沙星注射液 0.4g qd、03.03--03.08 使用甲硝唑氯化钠注射液三联用抗菌药物抗感染，过度使用抗菌药物。
	1110127513	老年医学科病区	急性心肌梗死,冠状动脉粥样硬化性心脏病,脑梗死,高血压,肺炎	患者两次血常规检查结果均正常，使用左氧氟沙星注射液联合哌拉西林抗感染，无指征联合使用。
遴选的药品不适宜	4010510794	普外科Ⅱ病区	急性阑尾炎伴局限性腹膜炎	患者无重度感染指征，01.17--01.24 使用头孢他啶 2g bid、左氧氟沙星注射液 0.4g qd 、甲硝唑氯化钠注射液 0.5g bid 三联用抗生素，不建议三联使用，头孢他啶联合甲硝唑氯化钠注射液基本就能覆盖腹腔感染。
	9000164008	普外科Ⅱ病区	二度烫伤,原发性高血压,肾结石	患者皮肤烫伤，04.27--05.03 预防感染选择左氧氟沙星注射液，不建议使用喹诺酮类药物，使用疗程偏长。
	1110048535	妇科病区	卵巢良性肿瘤,肝囊肿	患者术后 02.12--02.16 使用左氧氟沙星注射液预防感染，围手术期患者预防用药应为术前 0.5--1h，且用药时间不超过 24h，药品品种选择应为 1、2 代头孢。
无适应症用药	1110254943	创伤中心Ⅱ	L1、L2 椎体压缩性骨折、腰椎间盘突、糖尿病	患者诊断为“L1、L2 椎体压缩性骨折、腰椎间盘突、糖尿病”，无适应症使用盐酸左氧氟沙星注射液。
用法用量不适宜	1110535545	消化内科病区	结肠息肉,高血压 2 级	患者行肠息肉摘除术，04.16--04.19 术后使用左氧氟沙星注射液 0.4g qd 预防感染，无感染指征，用药疗程偏长。应为术前 0.5-1h 单次使用。

3.讨论

抗菌药物不合理使用会导致多种不良问题，包括延误治疗时机、浪费医疗资源、增加药物不良反应，增加细菌耐药性等，甚至会引起药源性疾病，酿成医疗事故[3]。因此，高度警惕抗菌药物不合理使用并有效制止切实且必要。盐酸左氧氟沙星注射液作为临床常用抗菌药物，在我院有着较高的使用率，根据笔者统计数据，2023 年 1 月~2023 年 5 月间我院共有出院患者 14156 人次，其中 1489 例使用过本品进行感染防治，药品使用率达 10.52%。另根据调研的药品使用信息，盐酸左氧氟沙星注射液的使用涵盖了超过 10 个临床科室，尤以呼吸内科、老年医学科、普外科、泌尿外科、传染科五个临床科室的使用占比高，可见本品在我院住院患者中应用广泛，将其列为重点药品加强监控，特别要重视高频用药科室的药品使用合理性，对保证患者用药安全而言具有重要意义。

根据调研结果，使用盐酸左氧氟沙星注射液的患者性别分布无明显差异，但年龄分布以 60 岁以上占比高，可见使用该药的患者多为老年人。盐酸左氧氟沙星注射液 18 岁以下患者禁用，有研究指出本品可引起肌腱炎、肌腱断裂、关节痛、肌无力等骨骼肌肉系统病变，这对于儿童生长发育的影响非常严重[4]。另有研究指出，本品可能造成骨细胞空性空泡变性坏死，不利于骨髓及关节软骨发育，因此不予儿童使用[5]。本研究中用药的 1489 例患者均为成年人，无儿童病例。老年人本品使用率高的原因分析：老年人组织器官功能衰退，免疫力低下，白细胞吞噬功能减弱，易发生感染[6]。需要注意的是，老年人对药物的耐受性低，相较中青年群体用药后易发生不良反应，而且程度较重[7]。因此，应当将老年患者作为合理用药及不良反应的重点监控人群。另外，本品主要经肾脏排泄，老年人肾功能减低，可能会出现持续高血药浓度，临床应用时也需引起重视，注意用药尽量，慎重给药[8]。联合用药方面，盐酸左氧氟沙星注射液既可单独使用，也可与其他抗菌药物联用，根据调研结果，我院以单一用药为主，二联用药次之。本品与其他药物联用时，需要考虑药物间相互作用。根据研究，盐酸左氧氟沙星注射液与多种抗感染类药物、抗病毒药物、质子泵抑制剂、中成药等一同使用会出现药液性状改变，因此本品不宜与其他药物同瓶混合或在同一根输液管内静脉滴注[9-10]。另外，对喹诺酮类过敏者、妊娠哺乳期妇女禁用本品，本品也应避免与茶碱类同时使用，确需使用则需要监测患者茶碱血药浓度调整左氧氟沙星剂量，确保用药安全[11]。

根据专项点评结果，我院 2023 年 1~5 月 1489 张盐酸左氧氟沙星注射液处方的用药合理率为 99.53%，可见我院对本品合理用药监管的成效显著，不过仍有个别用药不适宜、药品遴选不适宜、无适应症用药、用法用量不合理问题，可见我院本品合理用药监管仍存在进步空间。笔者基于我院临床工作实际，认为导致盐酸左氧氟沙星不合理的原因在于以下几点：临床医生药品相关理论知识掌握不详实；临床医师未能完全掌握药品使用相关规定与要求；临床医生工作疏忽；处方事前审核流于形式。对此，为了进一步提高我院盐酸左氧氟沙星注射液临床用药合理性，建议采取以下策略优化药品使用监管[12]：定期在临床科室开展药品相关培训与考核，将处方管理与药品使用相关规定作为常规项目进行培训和学习，定期组织学习和反思已经出现的不合理用药问题，引以为戒，为医生科学开具处方奠定基础；加强职业道德培训，树立临床医生合理用药重要性认识，培养严谨认真的工作态度，强化工作责任感与使命感，同时加大促合理用药的外力支持，强化奖惩机制与问责制度，增强管理和约束；处方审核是合理用药重要安全保障，建议进一步完善审核流程，加强处方审核监管工作，确保其真正发挥效用，最大限度避免不合理用药流入临床，确保患者用药安全。

参考文献

[1] 伍治中. 喹诺酮类抗菌药物临床应用的药学干预方法及意义探析[J]. 中国当代医药,2016,23(24):110-112.

[2] 詹小蕾,沈丽娜,刘烨. 药学干预对喹诺酮类抗菌药物临床合理用药的影响[J]. 临床合理用药杂志,2022,15(20):157-159.

[3] 杨俾忍. 喹诺酮类抗菌药物临床应用评价[J]. 中国现代药物应用,2020,14(15):193-194.

[4] 王富海,张爱珍,曾彩贤,等. 喹诺酮类抗菌药物的药理作用和临床合理应用探讨[J]. 中国合理用药探索,2018,15(1):75-77.

[5] 朱阁范. 喹诺酮类抗菌药物临床应用的药学干预方法及意义探析[J]. 海峡药学,2018,30(10):254-255.

[6] 徐艳艳,冯平,郭小红,等. 住院患者氟喹诺酮类抗菌药物的临床应用分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2011,11(2):124-125.

[7] 陆昊,夏海建,黄富宏. 某院左氧氟沙星注射液合理用药分析[J]. 中国药业,2019,28(14):91-93.

[8] 马改大. 喹诺酮类抗菌药物的药理作用和临床合理应用探析[J]. 中国药物与临床,2019,19(8):1347-1348.

[9] 刘念. 喹诺酮类抗菌药的临床应用效果及其临床合理应用与不良反应研究[J]. 当代医学,2022,28(16):172-175.

[10] 陈晓群,石禹,陆清溪,等. 处方前置审核联合 SD-PA 点评模式在抗菌药物专项处方点评中的应用[J]. 临床合理用药,2023,16(6):166-169.

[11] 廖静,刘云刚,耶钰晖. 持续抗菌药物专项处方点评对医院合理用药指标的影响[J]. 检验医学与临床,2022,19(20):2851-2853.

[12] 冯燕,张燕. 左氧氟沙星不良反应分析及临床合理用药效果观察[J]. 临床合理用药杂志,2021,14(23):157-158.

Analysis of adverse drug reactions/events of cancer chemotherapy and intervention mechanism research for danggui buxue decoction in bone marrow suppression

余彬[1,2]，闫锡大[1]，宁红[1]，罗亭[2]，许卉[2]

Bin Yu[1,2], Xida Yan[1], Yu Wang[1], Hong Ning[1], Hui Xu[2,*]

（1.药学部，国家卫生健康委员会核技术医学转化重点实验室，绵阳市中心医院·电子科技大学医学院附属绵阳医院，四川绵阳 621000；2.药学院，山东大学先进给药系统与生物技术药物协同创新中心，分子药理学与药物评价教育部重点实验室，烟台大学，山东烟台，264005）

（1.Department of Pharmacy, NHC Key Laboratory of Nuclear Technology Medical Transformation, Mianyang Central Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Mianyang 621000, China; 2. School of Pharmacy, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Yantai University, Yantai 264005, China）

ATTACHMENT:

Figures (5)

1. Flow chart of case screening

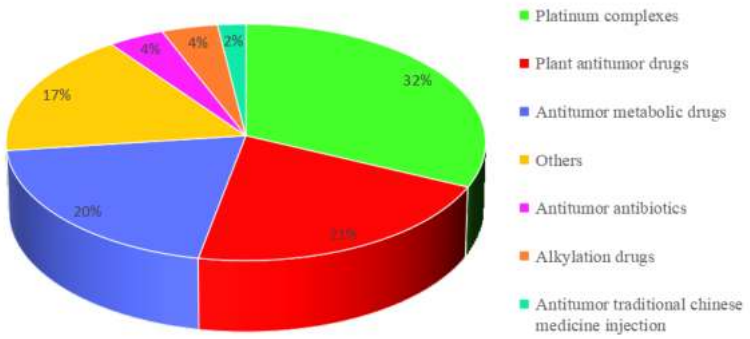


Figure 1. Types and proportion of chemotherapeutic drugs causing adverse reactions/events

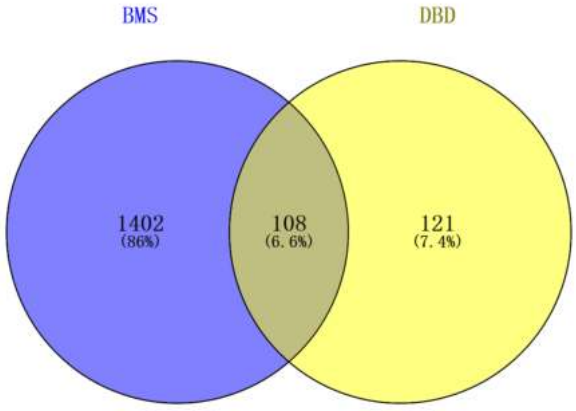


Figure 2. Venny diagram of BMS and DBD

*Correspondence: Hui Xu, xuhui@ytu.edu.cn

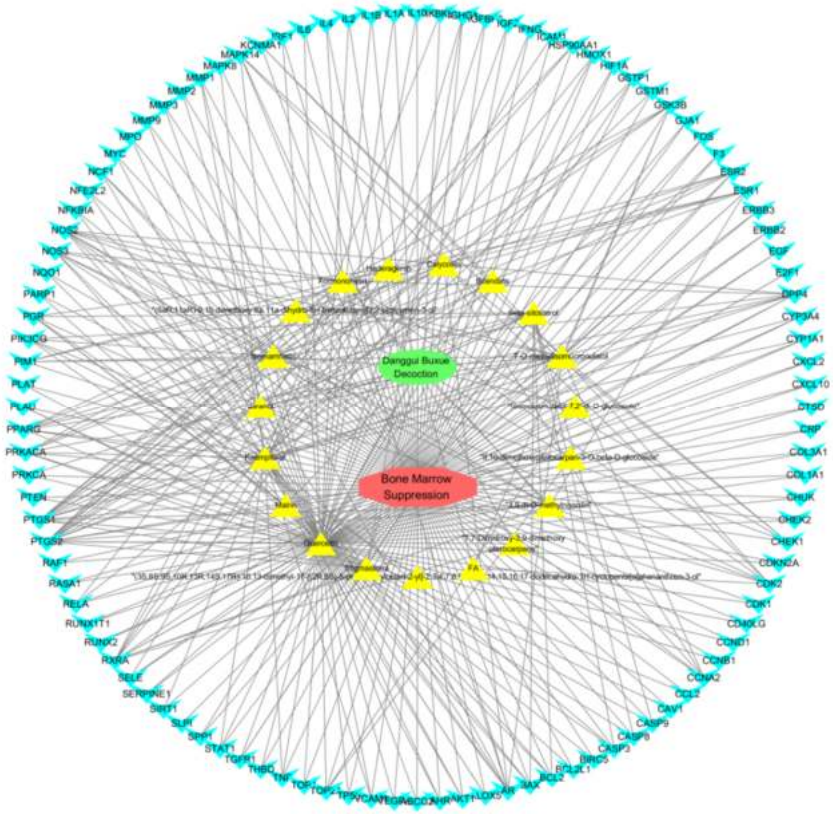


Figure 3. Drug-ingredient-target-disease network diagram

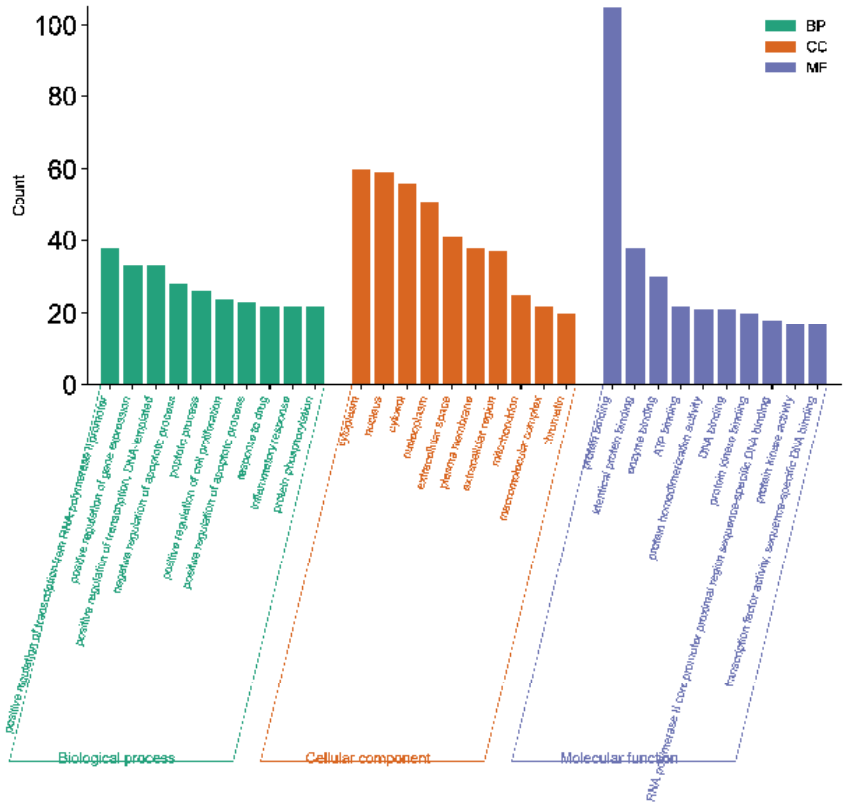


Figure 4. GO functional enrichment analysis

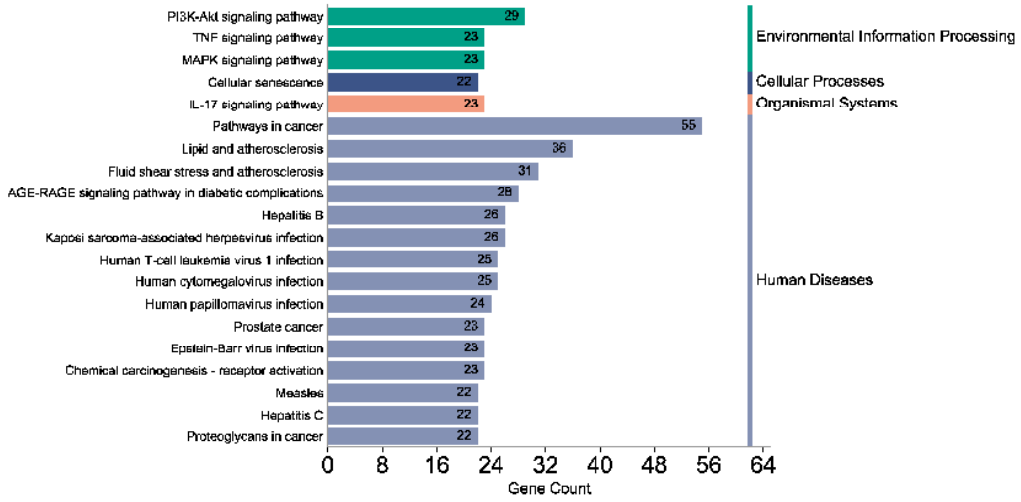


Figure 5. KEGG pathway enrichment analysis

Tables (6)

Table 1. Basic information and proportion of cancer patients

Serial NO.	Patients (n)	Gender (n)	< 60 for age (%)	≥ 60 for age (%)	Tumor diseases	Proportion (%)	χ^2 value	*p* value
1	26	M: 15 F: 11	4（26.67） 10（90.91）	11（73.33） 1（9.09）	Non-small cell lung cancer	12.44	26.000	<0.001
2	25	M: 10 F: 15	7（70.0） 10（66.67）	3（30.0） 5（33.33）	Colon cancer	11.96	25.000	<0.001
3	22	M: 13 F: 9	7（53.85） 7（77.78）	6（46.15） 2（22.22）	Rectal cancer	10.53	22.000	<0.001
4	19	M: 11 F: 8	7（63.64） 4（50.0）	4（36.36） 4（50.0）	Non Hodgkin's lymphoma	9.09	19.000	<0.001
5	15	M: 8 F: 7	7（87.50） 6（85.71）	1（12.50） 1（14.29）	Acute non lymphocytic leukemia	7.18	15.000	<0.001
6	12	M: 10 F: 2	9（90.0） 2（100.0）	1（10.0） 0（0.0）	Nasopharyngeal carcinoma	5.74	12.000	<0.001
7	11	M: 0 F: 11	0（0.0） 7（63.64）	0（0.0） 4（36.36）	Cervical carcinoma	5.26	/	/
8	11	M: 4 F: 7	4（100.0） 7（100.0）	0（0.0） 0（0.0）	Acute lymphoblastic leukemia	5.26	11.000	<0.001
9	8	M: 6 F: 2	3（50.0） 2（100.0）	3（50.0） 0（0）	Esophageal cancer	3.83	8.000	0.005
10	8	M: 0 F: 8	0（0.0） 8（100.0）	0（0.0） 0（0.0）	Breast cancer	3.83	/	/
11	6	M: 3 F: 3	2（66.67） 3（100.0）	1（33.33） 0（0.0）	Gastric cancer	2.87	6.000	0.014

12	6	M: 0 F: 6	0（0.0） 5（83.33）	0（0.0） 1（16.67）	Oophoroma	2.87	/	/
13	5	M: 4 F: 1	3（75.0） 0（0.0）	1（25.0） 1（100.0）	Small cell lung cancer	2.39	5.000	0.025
14	4	M: 4 F: 0	2（50.0） 0（0.0）	2（50.0） 0（0.0）	Pancreatic cancer	1.91	/	/
15	3	M: 1 F: 2	1（100.0） 2（100.0）	0（0.0） 0（0.0）	Multiple myeloma	1.44	3.000	0.083
16	3	M: 2 F: 1	1（50.0） 0（0.0）	1（50.0） 1（100.0）	Bladder urothelial carcinoma	1.44	3.000	0.083
17	2	M: 2 F: 0	0（0.0） 0（0.0）	2（100.0） 0（0.0）	Hodgkin's lymphoma	0.96	/	/
18	2	M: 0 F: 2	0（0.0） 0（0.0）	0（0.0） 2（100.0）	Epithelial carcinoma of the upper urinary tract	0.96	/	/
19	2	M: 0 F: 2	0（0.0） 0（0.0）	0（0.0） 2（100.0）	Renal cancer	0.96	/	/
20	2	M: 0 F: 2	0（0.0） 2（100.0）	0（0.0） 0（0.0）	Endometrial carcinoma	0.96	/	/
21	17	M: 11 F: 6	7（63.64） 6（100.0）	4（36.36） 0（0.0）	Others	8.13	19.000	<0.001
Prop-ortion (%)					100.0			

1.Note: M = Male, F = Female.

Table 2. Top 10 chemotherapy drugs with the most adverse reactions/events

Chemotherapy drugs	Cases（n）	Proportion（%）
Oxaliplatin	45	25.0
Cisplatin	36	20.0
Paclitaxel	28	15.56
Capecitabine	17	9.44
Cytarabine	17	9.44
Gemcitabine	12	6.67
Methotrexate	10	5.55
Tegio	5	2.78
Docetaxel	5	2.78
Etoposide	5	2.78
Total	180	100.0

Table 3. Severity of adverse reactions/events involving system organs of cancer patients

Systemic Organ Classification	Number of clinical symptoms (n)	Severity [n(%)]			
		General		Serious	
		Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Medical examination	76	18（23.68）	25（32.89）	27（35.53）	6（7.90）
Respiratory, thoracic and mediastinal diseases	56	11（19.64）	36（64.29）	9（16.07）	0（0.0）
Skin and subcutaneous tissue diseases	50	35（70.0）	12（24.0）	3（6.0）	0（0.0）
Gastrointestinal diseases	45	23（51.11）	15（33.33）	7（15.56）	0（0.0）
Nervous system diseases	26	7（26.92）	16（61.54）	3（11.54）	0（0.0）
The performance of general condition and medication site	24	17（70.83）	5（20.84）	2（8.33）	0（0.0）
Vascular disease	15	9（60.0）	6（40.0）	0（0.0）	0（0.0）
Skeletal muscle and connective tissue diseases	15	11（73.33）	4（26.67）	0（0.0）	0（0.0）
Heart disease	14	2（14.29）	12（85.71）	0（0.0）	0（0.0）
Immune system diseases	11	0（0.0）	0（0.0）	10（90.91）	1（9.09）
Kidney and urinary system diseases	7	1（14.29）	2（28.57）	4（57.14）	0（0.0）
Eye diseases	7	4（57.14）	2（28.57）	1（14.29）	0（0.0）
Blood and lymphatic diseases	5	2（40.0）	1（20.0）	2（40.0）	0（0.0）
Ear and labyrinthine diseases	3	0（0.0）	2（66.67）	1（33.33）	0（0.0）
Infection and infectious diseases	1	0（0.0）	1（100.0）	0（0.0）	0（0.0）
Total	355	140（39.44）	139（39.15）	69（19.44）	7（1.97）

Table 4. Active ingredients information of DBD

Molecule ID	Molecule Name	Molecular Structure	OB(%)	DL	Orginin
MOL000358	Beta-sitosterol	PGR, NCOA2, PTGS1, PTGS2, HSP90, PIK3CG, KCNH2, PPARG, DRD1, CHRM3, CHRM1, SCN5A, GABRA2, CHRM4, PDE3A, HTR2A, GABRA5, ADRA1A, GABRA3, CHRM2, ADRA1B, ADRB2, CHRNA2, SERT, OPRM1, GABRA1, CHRNA7, CAMC, BCL2, BAX, CASP9, NAPA, CASP3, CASP8, PRKCA, TGFB1, PON1, MAP2	36.91	0.75	Danggui
MOL000449	Stigmasterol	PGR, MCR, NCOA2, ADH1C, IGHG1, RXRA, NCOA1, PTGS1, PTGS2, ADRA2A, SLC6A2, SLC6A3, ADRB2, AKR1B1, PLAU, LTA4H, MAOB, MAOA, PRKACA, CTRB1, CHRM3, CHRM1, ADRB1, SCN5A, HTR2A, ADRA1A, GABRA3, CHRM2, ADRA1B, GABRA1, CHRNA7	43.83	0.76	Danggui
MOL000211	Mairin	PGR	55.38	0.78	Huangqi
MOL000239	Jaranol	NOS2, PTGS1, AR, SCN5A, PTGS2, ESR2, DPP4, HSP90AA1, CDK2, CHK1, TRY1, NCOA1, CALM	50.83	0.29	Huangqi

MOL000296	Hederagenin	PGR, NCOA2, CHRM3, CHRM1, GABRA2, GABRA3, CHRM2, ADRA1B, GABRA1, GRIA2, GABRA6, GABRA5, IGHG1, ADH1B, ADH1C, LYZ, COBT, PTGS1, SCN5A, PTGS2, RXRA, PDE3A, SLC6A2, CAMC	36.91	0.75	Huangqi
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	PGR	36.23	0.78	Huangqi
MOL000354	Isorhamnetin	NOS2, PTGS1, ESR1, AR, PPARG, PTGS2, PTP1B, ESR2, DPP4, MAPK14, GSK3B, HSP90AA1, CDK2, PIK3CG, PRKACA, TRYP1, PIM1, CCNA2, NCOA2, CALM, PYGM, PPARD, CHEK1, AKR1B1, NCOA1, F7, TR, NOS3, ACHE, GABRA1, MAOB, GRIA2, CALM, RELA, XDH, Ncf1, OLR1	49.60	0.31	Huangqi
MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	NOS2, PTGS1, CHRM3, TR, CHRM1, ESR1, ADRB1, SCN5A, PTGS2, NOS3, HTR3A, Adra2c, RXRA, ACHE, PDE3A, ADRA1B, ADRB2, ADRA1D, OPRM1, GABRA1, TRYP1, NCOA2, CALM	53.74	0.48	Huangqi
MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	NOS2, PTGS1, DRD1, CHRM3, TR, KCNC2, CHRM1, ESR1, AR, ADRB1, SCN5A, PPARG, GAS6, CHRM5, PTGS2, NOS3, ADRA2C, CHRM4, RXRA, OPRD1, PDE3A, HTR2A, ADRA1A, CHRM2, ADRA1B, SLC6A3, ADRB2, ADRA1D, SERT, ESR2, GABRA1, DPP4, MAPK14, GSK3B, HSP90AB1, CDK2, CHEK1, PRKACA, RXRBB, TRYP1, PIM1, CCNA2, NCOA2, KCNMA1, CAM	74.69	0.30	Huangqi
MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	PTGS2, TOP2A, NCOA2	36.74	0.92	Huangqi
MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	NOS2, PTGS1, CHRM3, TR, CHRM1, ESR1, SCN5A, PTGS2, HTR3A, RXRA, ACHE, ADRA1B, ADRB2, ADRA1D, GABRA1, HSP90AB1, CHRNA7, TRYP1, NOCA1, NCOA2, CAM, CHRM4	64.26	0.42	Huangqi
MOL000387	Bifendate	PTGS2, VEGFR2, FGFR, HSP90AB1, KCNMA1, PTGS1, TOP2	31.1	0.67	Huangqi
MOL000392	Formononetin	NOS2, PTGS1, CHRM1, ESR1, AR, PPARG, PTGS2, RXRA, PDE3A, ADRA1A, SLC6A3, ADRB2, SERT, ESR2, DPP4, MAPK14, GSK3B, HSP90AB1, CDK2, MAOB, CHEK1, PRKACA, TRYP1, PIM1, CCNA2, CAM, PKIA, TR, NOS3, ACHE, AMPC, JUNB, PPARG, IL4, SIRT1, ATP5F1B, MTND6, HSD3B, HSD3B1	69.67	0.21	Huangqi
MOL000417	Calycosin	NOS2, PTGS1, ESR1, AR, PPARG, PTGS2, RXRA, PDE3A, ESR2, DPP4, MAPK14, GSK3B, HSP90AB1, CDK2, CHEK1, PRKACA, TRYP1, PIM1, CCNA2, NCOA2, CAM, ADRB2	47.75	0.24	Huangqi

MOL000422	Kaempferol	NOS2, PTGS1, AR, PPARG, PTGS2, HSP90AB1, PIK3CG, PRKACA, NCOA2, DPP4, TRYP1, TR, CHRM1, NOS3, GABRA2, ACHE, SLC6A2, CHRM2, ADRA1B, GABRA1, TOP2, F7, CALM, RELA, IKBKB, AKT1, BCL2, BAX, TNF, NAPA, AHSA1, CASP3, MAPK8, XDH, MMP1, STAT1, CDC2, PPARG, HMOX1, CYP3A4, CYP1A2, CYP1A1, ICAM1, SELE, VCAM1, NR1I2, CYP1B1, ALOX5, HAS2, GSTP1, AHR, PSMD3, SLC2A2, NR1I3, INSR, DIO1, PPP3CB, PRXC1A, GSTM1, GSTM2, AKR1C3, SLPI	41.88	0.24	Huangqi
MOL000433	FA	CDK2, TR, GSK3B	68.96	0.71	Huangqi
MOL000439	Isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	TOP2A	49.28	0.62	Huangqi
MOL000442	1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	PTGS2, RXRA, HSP90AB1, TRY1	39.05	0.48	Huangqi
MOL000098	Quercetin	PTGS1, AR, PPARG, PTGS2, HSP90AB1, PIK3CG, NCOA2, DPP4, AR, TRY1, TOP2, TR, KCNH2, SCN5A, GAS6, ADRB2, MMP3, PRKACA, F7, NOS3, RXRA, ACHE, GABRA1, MAOB, RELA, AKT1, VEGFA, CCND1, BCL2, BCL2L1, FOS, CDK1, EIF6, BAX, CASP9, PLAU, MMP2, MMP9, MPK1, IL10, EGF, RBL1, TNF, NAPA, IL6, CDKN2A, AHSA1, CASP3, TP53, ELK1, NFKBIA, POR, ODC1, XDH, CASP8, TOP1, RAF1, SOD, PRKCA, MMP1, HIF1A, STAT1, RUNX1T1, LOC103184504, CDC2, HELS89N, ERBB2, PPARG, ACC1, HMOX1, CYP3A4, CYP1A2, CAV1, MYC, F3, GJA1, CYP1A1, ICAM2, IL1B, CCL2, SELE, VCAM1, PTGER3, IL8, PRKCB, BIRC5, DUOX2, NOS3, HSPB1, TGFB1, SULT1E1, MGAM, IL2, NR1I2, CYP1B1, CCNB1, PLAT, THBD, SERPINE1, COL1A1, IFNG, ALOX5, PTEN, IL1A, MPO, TOP2A, NCF1, ABCG2, HAS2, GSTP1, NFE2L2, NQO1, PARP1, AHR, PSMD3, SLC2A4, COL3A1, GYRB, CXCL11, CXCL2, DCAF5, NR1I3, CHEK2, INSR, CLDN4, PPARA, PPARD, HSPB1, CRP, CXCL10, CHUK, SPP1, RUNX2, RASSF1, E2F1, E2F2, ACP3, CTSD, IGFBP3, IGF2, CD40LG, IRF1, ERBB3, PON1, DIO1, PCOLCE, NPEPPS, HK2, NKX31, RASA1, PRXC1A, GSTM2, GSTM1	46.43	0.28	Huangqi

Table 5. The results of molecular docking

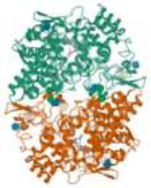
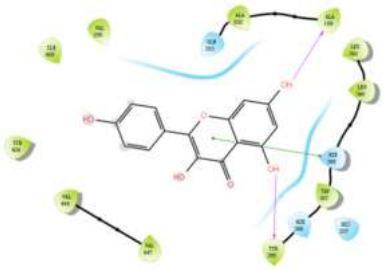
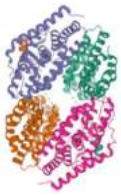
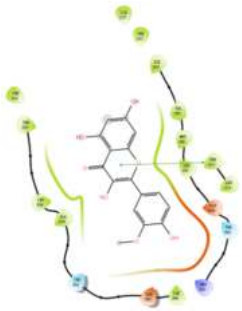
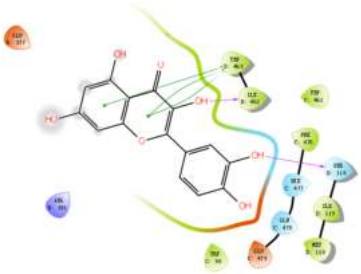
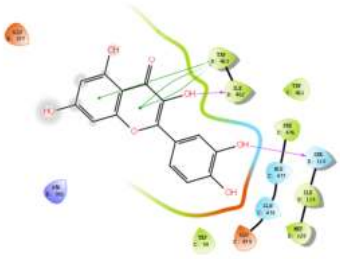
Target	PDB ID	Target Structure	Active ingredients	Affiffiffinity (kJ·mol^{-1})	Best-docked complex (2D)
PTGS2	5IKQ		Quercetin	-9.86	
			Kaempferol	-10.08	
			Isorhamnetin	-8.91	
			Formononetin	-7.90	
			7-O-methylisomucronulatol	-7.04	
PTGS1	6Y3C		Quercetin	-8.92	
			Kaempferol	-8.23	
			Isorhamnetin	-8.60	
			Formononetin	-8.48	
			7-O-methylisomucronulatol	-8.04	
RXRA	3FAL		Quercetin	-8.89	
			Kaempferol	-8.21	
			Isorhamnetin	-8.90	
			Formononetin	-8.11	
			7-O-methylisomucronulatol	-7.84	
NOS2	3E7G		Quercetin	-9.73	
			Kaempferol	-8.98	
			Isorhamnetin	-9.47	
			Formononetin	-8.70	
			7-O-methylisomucronulatol	-8.92	
PRKACA	2UW3		Quercetin	-9.46	
			Kaempferol	-9.01	
			Isorhamnetin	-8.52	
			Formononetin	-8.00	
			7-O-methylisomucronulatol	-8.38	

Table 6. ADMET profiling results of core ingredients

Ingredients	Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin	Formononetin	7-O-methylisomucronulatol
GI absorption	High	High	High	High	High
BBB permeant	No	No	No	Yes	Yes
P-gp substrate	Yes	No	No	No	No
CYP1A2 inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No	No
CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No	No
CYP2D6 inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
CYP3A4 inhibitor	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Toxicity					
Acute oral toxicity	III	II	III	III	III
Ames mutagenesis	In-active	Active	In-active	In-active	In-active
Carcinogenicity	In-active	In-active	In-active	In-active	In-active
Hepatotoxicity	In-active	Active	In-active	Active	In-active
Nephrotoxicity	In-active	In-active	In-active	Active	In-active

一例氯苯那敏治疗耳鸣患者的药物治疗分析

余伟[1]，祝曙光[2]，臧林泉[3]，黄花[1]，王亚刚[1*]

（1.深圳市福田区慢性病防治院 深圳 518048；2.广东药科大学附属第一医院 广州 510000；3.广东药科大学 广州 511400）

【摘要】耳鸣是临床上一种常见的症状，但其发病机制复杂，且临床治疗方法疗效有限，特别是药物治疗方面，往往因其潜在的严重副作用，在临床上使用受到一定限制。第一代抗组胺药氯苯那敏有较强的抗过敏作用，能减轻炎症反应，具有抑制中枢等作用，对耳鸣的治疗提供了新思路。

【关键词】耳鸣；氯苯那敏

Analysis of Chlorphenamine In The Treatment of Tinnitus

YU Wei[1],ZHU Shuguang[2],ZANG Linquan[3],HUANG Hua[1],WANG Yagang[1*]

（1.Shenzhenfutain Center For Chronic Disease Control,Shenzhen,518048;2.The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University,Guangzhou,510080;3.Guangdong Pharmaceutical University;Guangzhou;511400）

Abstract Tinnitus is a common symptom in clinical practice, but its pathogenesis is complex, and clinical treatment methods have limited efficacy. Especially, drug therapy is often limited in clinical use due to its potential serious side effects. The first generation antihistamine, Chlorphenamine, has strong anti allergic effect, reduces inflammatory reaction, inhibits central nervous system and other effects, providing a new idea for the treatment of tinnitus.

Keywords Tinnitus; Chlorphenamine

耳鸣的发病机制是比较复杂的，可能与心理问题、听觉系统以及神经系统等多种因素有关。给患者的工作、生活等带来极大不便与痛苦。且目前治疗耳鸣的方法十分有限，虽然也有部分药物可以缓解相关症状，但鉴于现有治疗药物可能存在的潜在的严重副作用，相关指南及 FDA 并不推荐使用药物来治疗耳鸣。因此寻找一款治疗耳鸣既安全有效，潜在副作用又小的药物是非常必要的。本文就使用氯苯那敏治疗一例患者耳鸣症状进行相关药物治疗分析。

1.病例情况

1.1 病历资料

患者文某，男，48 岁。2 周前无明显诱因出现双耳听力轻度下降，伴耳鸣、呈持续性，吞咽时加重，伴耳部堵塞感，无眩晕，无流水流脓、无发热、无恶心呕吐等不适；睡眠、食欲欠佳，大小便正常，目前无用药，未就诊及治疗。自觉影响生活今来院就诊，入院检查：T:36℃，P:72 次/分，R:16 次/分，BP:112/74 mmHg。一般情况尚可，呼吸平稳。鼻腔检查（—），左/右耳无牵拉痛，耳屏无压痛。耳镜检查：外耳道无红肿，未见脓性分泌物，耳膜完整，无充血。咽部无充血，两侧扁桃体无肿大，颈部淋巴无肿大，双肺呼吸音粗，未闻及干湿性啰音，心律齐，未闻及病理性杂音。血常规检查：嗜酸性粒细胞比例 10%。

1.2 治疗方案：处方马来酸氯苯那敏片 4mg，bid，po，共 10 片。

1.3 病例分析：5 天后患者复诊，自述失眠情况改善，耳鸣症状消失。

课题基金：广东省自然科学基金（2017A030313856）

作者简介：余伟，，硕士，主要从事药理作用及药物不良反应等研究；

通讯作者：王亚刚，男，硕士，E-mail:2074516002@qq.com

2.讨论

耳鸣一般是指在没有外界声源时，耳内或者颅内能感知到的声音[1]。耳鸣目前发病原因不明确，但是在大多数的情况下是没有根除治疗的方法。

耳鸣在单耳、双耳或颅内均可闻及。听到的响声有些可能是一种单独的响声，有些则是多种声响并存，声响的类型可有多种，如嘶嘶、嗡嗡等声响。鸣声的大小既可能持续不变，也可忽大忽小。耳鸣声持续的时间可能连续不断，也可间歇一段时间[1]。

氯苯那敏，属于 H_1 受体拮抗剂，也是第一代的抗组胺药。临床上主要的适应症是皮肤的过敏症：如荨麻疹、皮肤瘙痒症、湿疹、虫咬症、神经性皮炎、日光性皮炎等。也经常用于过敏性鼻炎、血管舒缩性鼻炎，药物及食物过敏等疾病的治疗[2]。

本案例中，患者中年男性，急性起病，以耳鸣、听力减退为表现，结合耳鸣发作特点以及血常规嗜酸性粒细胞比例偏高（10%），考虑患者为咽鼓管咽口的炎症可能性大，遂予以氯苯那敏进行治疗。在临床上目前尚未见有关氯苯那敏治疗耳鸣等研究及报道。

结合耳鸣发病机制及氯苯那敏药理作用机制，推断氯苯那敏治疗耳鸣可能通过以下几方面发挥治疗作用：

①抑制中枢神经系统的兴奋：研究发现睡眠障碍的发生与耳鸣的发生之间存在着紧密联系。有文献报道，在对比睡眠障碍患者和耳鸣的动物模型的结果中发现，两者的大脑边缘系统均存在激活反应[3-4]，实验结果表明，睡眠障碍和耳鸣的发生可能都与交感神经反应的增强有关[4-5]。相关指南中指出，对于慢性耳鸣，在临床上已经有多种类型的药物在应用，如抗心律失常药、抗惊厥药、抗焦虑药、抗抑郁药、肌肉松弛剂等对耳鸣均可能有效，但考虑到临床上此类药物可能存在的潜在的严重副作用；因此目前没有任何一种药物被推荐用于治疗慢性耳鸣。当然，如果耳鸣患者并发如焦虑、抑郁等相关的精神类症状，可能需要使用药物治疗。但如若耳鸣患者没有被诊断为抑郁，则不应使用抗抑郁药[1]。因此文献及其指南表明具有中枢抑制作用的药物可能对治疗耳鸣存在一定治疗效果。

此外，同属于抗组胺药的羟嗪，同样具有中枢镇静等作用，并且已有相关研究表明当舒必利联合羟嗪使用时，使得 81%的耳鸣患者的主观耳鸣知觉下降[6-7]。在本案例中，患者存在睡眠、食欲欠佳的情况，而氯苯那敏作为第一代的抗组胺药，具有明显的中枢抑制作用[2]，可快速促进患者入睡，且其临床应用时间长，副作用较小，安全性高，在一定程度上减轻耳鸣患者的痛苦。

②减轻血管紧张：有相关文献研究表明，有些耳鸣的发生可能和耳蜗内的血流不正常，以及血流加速或者管腔内狭窄等引起的血流紊乱有关[8]。在耳鸣患者的药物治疗指南中，是包括血管扩张这一类药物[9]。氯苯那敏具有强大的抗过敏作用，可以通过对抗因过敏反应导致的毛细血管扩张，进而降低毛细血管的通透性[2]，从而发挥减轻血管紧张的作用，以此来进一步改善耳鸣患者耳蜗内的血液循环，达到缓解耳鸣症状的作用。

③减轻炎症反应：耳鸣的发生与炎症因子之间的关系研究日趋深入。炎症因子以及相关信号通路的作用机制与耳鸣发生的关系也在不断的被探索，已经有相关文献报道炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1 可能是耳鸣发病的新机制[10-11]。并且临床上已经有较多案例使用如曲安奈德、地塞米松等糖皮质激素单独或者联合其他药物用于治疗耳鸣[12-14]。因此，抑制炎症反应可能也是治疗耳鸣的另一个思路。而第一代抗组胺药物氯苯那敏，通过发挥强大的抗过敏作用，抑制过敏介导的炎症，进一步减少促炎性细胞因子以及细胞黏附分子的表达，减轻耳鸣患者的炎症反应，以此达到缓解耳鸣的作用。

在《欧洲多学科耳鸣指南》中，对耳鸣治疗方法的建议，是明确提出了反对使用药物治疗耳鸣的意见。主要的原因是：目前没有相关研究证据证明存在一款专门治疗耳鸣安全且有效的药物，但有证据表明目前耳鸣使用的这些药物存在着潜在的严重副作用[1]。并且目前没有一种药物是被 FDA 批准用于治疗耳鸣的[14]。

因此寻找一款治疗耳鸣既安全有效且潜在副作用小的药物迫在眉睫。而在本案例中，氯苯那敏治疗一例耳鸣患者的作用效果显著，且相较于现在临床上已有的治疗耳鸣的药物其副作用及潜在的不良影响更小。并且已经有抗组胺药物羟嗪联合舒必利治疗耳鸣有效的研究报道[6-7]。为同为抗组胺药氯苯那敏治疗耳鸣又提供了一定的临床数据支持。因此将抗组胺药氯苯那敏老药新用，开发用于治疗耳鸣，是为临床治疗耳鸣提供了一种新的思路。且这个较为安全的氯苯那敏有望填补耳鸣药物治疗因药物潜在副作用而“无推荐药可用”的空缺。

参考文献

[1] 卢兢哲,钟萍,郑芸.欧洲多学科耳鸣指南：诊断、评估和治疗[J].听力学及言语疾病杂志,2020,28(01):110-114.

[2] 马来酸氯苯那敏片中文说明书，2015 年版，浙江瑞新药业股份有限公司.

[3] Henton A, Tzounopoulos T. What's the buzz? The neuroscience and the treatment of tinnitus[J]. Physiol Rev. 2021，101(4):1609-1632.

[4] 陈秀兰,秦兆冰,宋凡.耳鸣的特点与发病相关因素分析[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2021,28(05):313-315.

[5] Jackson ML, Howard ME, Barnes M. Cognition and daytime functioning in sleep-related breathing disorders[J]. Prog Brain Res,2011,190: 53-68.

[6] 覃江圆,陈慧英,韦廷佳等.多巴胺受体调节听觉功能及调控耳鸣机制的研究进展[J].中华耳科学杂志,2021,19(05):855-859.

[7] Lopez-Gonzalez MA, Moliner-Peiro F, Alfaro-Garcia J, et al. Sul‐piride plus hydroxyzine decrease tinnitus perception [J]. AurisNasus Larynx, 2007, 34(1):23-27.

[8] Sismanis A. Pulsatile tinnitus[J]. Otolaryngol Clin North Am ,2003，36（2）: 389–402.

[9] 张硕颖,张天虹.耳鸣相关治疗的研究进展[J].医学综述，2019,25（15）：3071-3075+3080.

[10] 胡守森,梅玲,陈建勇等.水杨酸盐毒性与大鼠耳蜗核炎症因子表达[J].中华耳科学杂志,2015,13(01):136-140.

[11] 刘广宇,张剑宁,黄平等.国内耳鸣文献回顾与思考[J].中华耳科学杂志,2022,20(05)：845-850.

[12] 孙永明,吴华,蔡雪花等.利多卡因联合醋酸曲安奈德耳后注射治疗急性耳鸣的疗效[J].临床合理用药,2023,16(15):141-143.

[13] 林高贵.银杏叶片联合地塞米松治疗神经性耳鸣的临床疗效研究[J].中国现代药物应用,2023,17(09):32-35.

[14] Langguth B, Elgoyhen AB, Cederroth CR. Therapeutic approaches to the treatment of tinnitus[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol,2019,59:291–313.

抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体的质量评价

俞小娟，于传飞，刘春雨，武刚，李萌，王文波，崔永霏，郭璐韵，付志浩，段茂芹，杨雅岚，崔春博，郭莎，赵雪羽，王兰*

（中国食品药品检定研究院卫生部生物技术产品检定及标准化重点实验室，国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室，北京 102629）

【摘要】目的：研究并建立针对抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体的关键质量属性质控方法。**方法：**采用报告基因法测定 PD-1 靶点的细胞生物学活性，运用流式细胞荧光法测定 CTLA-4 靶点的竞争结合活性；采用还原/非还原十二烷基磺酸钠毛细管电泳（Capillary Electrophoresis-sodium Dodecyl sulfonate，CE-SDS）和分子排阻色谱（Size Exclusion-High Performance Liquidchromatography，SEC-HPLC）进行抗体分子大小变异体的控制；运用成像毛细管等电聚焦电泳（Imaging Capillary Isoelectricfocusing Electrophoresis，iCIEF）测定电荷异质体；运用肽图对抗 PD-1/CTLA-4 双抗进行鉴别；运用高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）对糖基化进行控制；其他各项指标均应符合现行版《中华人民共和国药典》以及其他相关要求。**结果：**PD-1 靶点的细胞生物学活性半数最大效应浓度（Concentration for 50% of Maximal Effect，EC_{50}）值为（6.91 ± 0.78）nM•L^{-1}，相对参比品的生物学效价为（103.50 ± 13.08）%，RSD 为 12.64%；CTLA-4 靶点活性的 EC_{50} 值为（0.35 ± 0.28）nM•L^{-1}，相对参比品的生物学效价为（99.30 ± 9.15）%，RSD 为 8.32%；还原 CE-SDS 的轻链与重链峰面积之和百分比为（98.86 ± 0.02）%；非还原 CE-SDS 主峰峰面积百分比为（93.07 ± 0.13）%，片段百分比为（4.44 ± 0.13）%，聚体百分比为（2.49 ± 0.15）；SEC-HPLC 单体的峰面积百分比为（97.20 ± 0.01）%，聚合物峰面积百分比为（2.68 ± 0.01）%； iCIEF 分析的 A 峰组面积百分比为（38.43 ± 0.54）%，B 峰组面积百分比为（43.26 ± 0.32）%，C 峰组面积百分比为（11.31 ± 0.14）%，D 峰组面积百分比为（7.00 ± 0.17）%，；肽图检测抗 PD-1/CTLA-4 的单抗具有相应的特征图谱，能够用于鉴别；在糖型分析中，占比例最高的糖型为 G0F，含量为（41.06 ± 0.11）%，含唾液酸的糖型共有三种，分别为 G2F+G1F-NANA，G2F-NANA 和 G2F-2NANA，含量分别为（12.44 ± 0.12）%，（12.00 ± 0.05）%和（5.37 ± 0.05）%，含唾液酸糖型的总体含量为（29.80 ± 0.20）%。**结论：**针对抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体的关键质量属性，研究并建立了相应的质量控制方法，以确保其安全、有效和质量可控，为该类单抗产品的质量控制方法和策略提供参考依据。

【关键词】抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体；鉴别；纯度检测；活性检测

Quality Control Study of Recombinant Anti-PD-1/CTLA-4 Bispecific Antibody

Yu Xiaojuan, Yu Chuanfei, Liu Chunyu, Wu Gang, Li Meng, Wang Wenbo, Cui Yongfei, Guo Luyun, Fu Zhihao, Duan Maoqin, Yang Yalan, Cui Chunbo, Guo Sha, Zhao Xueyu,Wang Lan *

（Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products,National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China）

【Abstract】Objective: To study and establish quality control methods for critical quality attribute of bispecific anti-PD-1/CTLA-4 antibody. **Methods:** The biological activity of PD-1 target was determined by reporter gene assay, and the competitive binding activity of CTLA-4 target was determined by flow cytometry. The purity was controlled by reducing/non-reducing Sodium Dodecyl sulfonate Capillary Electrophoresis （CE-SDS） and Size exculpation-high Performance Liquidchromatography （SEC-HPLC）. Charge heterogeneity was determined by Imaging Capillary electricfocusing Electrophoresis （iCIEF）. Peptide map analysis was applied to identify bispecific anti-PD-1/CTLA-4

antibody. Glycosylation was controlled by High Performance Liquid Chromatography （HPLC） .All other quality control items shall comply with the current edition of Chinese Pharmacopeia and related guidelines. **Results:** The EC_{50} of PD-1 target was （6.91±0.78） nM• L^{-1}. The biological activity was （103.50±13.08） % and RSD was 12.64%. The EC_{50} of CTLA-4 target was （0.35±0.28） nM• L^{-1}. The biological activity was （99.30±9.15）% and RSD was 8.32%. The percentage of peak area of light chain and heavy chain was （98.86±0.02） %. The main peak area percentage of non-reducing CE-SDS was （93.07±0.13）%, fragment percentage was （4.44±0.13） %, and polymer percentage was （2.49±0.15）. The peak area percentage of SEC-HPLC monomer and polymer were （97.20±0.01） % and （2.68±0.01） %, respectively. The area percentage of peak A group, peak B group, peak C group and peak D group were （38.43±0.54）%, （43.26±0.32） %, （11.31±0.14） % and （7.00±0.17） %, respectively. Peptide mapping showed the specific spectrum of the bispecific anti-PD-1/CTLA-4 antibody, which could be adopted for identification test. In the analysis of glycotypes, the highest proportion of glycotypes was G0F, with a content of （41.06±0.11）%. There were three types of glycan containing sialic acid, namely G2F+ G1F-NANA, G2F-NANA and G2F-2NANA, with the content of （12.44±0.12） %, （12.00±0.05） % and （5.37±0.05） %, respectively. The total content of glycan containing sialic acid was （29.80±0.20）%. **Conclusions:** We studied and established the methods of critical quality attribute for bispecific anti-PD-1/CTLA-4 antibody to ensure its safety and effectiveness, which provides reference for the quality control methods and strategies of this type of bispecpecial monoclonal antibody.

【**Key words**】Anti- PD-1/CTLA-4 bispecific antibody; Identify; Purity detection; Biological activity detection

CTLA-4 和 PD-1 均属于目前研究较为成熟的免疫检查点，也是抗肿瘤药物开发的重要靶点[1, 2]。其中，PD-1 是存在于细胞毒性 T 淋巴细胞表面的受体，在与肿瘤细胞或抗原呈递细胞中的 PD-L1 或 PD-L2 配体结合后，可诱导效应 T 细胞和记忆 T 细胞的细胞耗竭，并引起 Treg 细胞的增加，导致免疫系统的抑制[3]。CTLA-4 是 Treg 细胞中的组成性表达分子，可阻断 T 细胞中 CD28 与抗原呈递细胞的 CD80/CD86 受体的相互作用，降低后者的激活，从而抑制细胞毒性 T 细胞的增殖[4]。

抗 PD-1 单抗的主要作用机制为与 T 细胞表面的 PD-1 或者肿瘤细胞表面的 PD-L1 相结合, 以阻断 PD-1 和 PD-L1 的相互作用, 从而逆转肿瘤细胞对效应型 T 细胞的抑制, 激活 T 细胞产生对肿瘤细胞的杀伤效应，而抗 CTLA-4 的单抗可解除 CTLA-4 对 T 细胞的抑制作用，上调 T 细胞的活化增殖，从而诱导或增强其抗肿瘤免疫反应。在临床使用中，PD-1 单一抗体易产生耐药性，为了应对该问题，FDA 已经批准了 PD-1 与 CTLA-4 单抗的联合应用，但是二者联用时，会有较高的免疫相关副作用发生，因而在临床上的使用受到了限制[5]。因此，PD-1/CTLA-4 双特异性抗体的开发成为全球药企的选择[6]，它有单抗难以比拟的治疗优势，但由于其分子结构和作用机制的复杂性，无论在前期的研发还是后期的质量控制方面都存在着很大挑战。

为了有效地对抗 PD-1/CTLA-4 的双特异性抗体产品进行质量控制，保证其安全、有效，并为后期其它双特异性抗体的开发和质控提供指导，本研究结合该产品的特点，采用国际先进的分析手段，建立了重组人源化抗 PD-1/CTLA-4 双特异抗体的质控方法，现将结果报道如下。

1. 材料与方法

1.1 供试品

重组人源化抗 PD-1/CTLA-4 双特异单克隆抗体（12.5mg•mL^{-1}）由申报单位提供。

1.2 细胞

Jurkat-CTLA-4-NFAT-luc（CTLA-4 靶点的转基因测活效应细胞）由本实验室构建，PD1 效应细胞和 PD-L1aAPC/CHPO-K1 细胞购自 Promega，293T-CTLA4 细胞由本实验室留存。

1.3 主要试剂及仪器

Bright-Glo™ Luciferase Assay System，购自 Promega 公司；RPMI 1640（L-glutamine and HEPES）培养基，Ham's F-12 培养基，Antibiotic G-418 Sulfate Solution，DMEM 培养基，0.25%胰蛋白酶，丙酮酸钠，MEM 非必须氨基酸，磷酸盐缓冲液，BLasticidin，胎牛血清购自 Gibco 公司；潮霉素 B 购自 Invitrogen 公司；牛血清白蛋白，购自 VETEC 公司；FITC Streptavidin，购自 Biolegend 公司。流式细胞仪 FACSCalibur 购自 BD 公司；ATPlite 试剂盒购自美国 PerkinElmer 公司；SDS-MW 分析试剂盒（390953），Beckman SDS-MW Gel Buffer（A30341），Beckman 毛细管（50 μmID × 65 cm）及 Beckman eCAP N-CHO 涂层毛细管均购自美国 Beckman Coulter 公司；1%甲基纤维素溶液，pI marker 7.55 及 10.10 购自美国 ProteinSimple 公司；Pharmalyte pH 3 ~ 10 和 pH 8 ~ 10. 5 购自美国 GE 公司；Agilent TC C-18 色谱柱（150 mm×4.6 mm, 5μm）购自美国 Agilent 公司；亲水相互作用液相色谱（hydrophilic interactionliquid chromatography，HILIC）柱（即 ACQUITY UPLCBEH 300 Amide 氨基柱）（2. 1 mm × 150 mm， 1. 7 μm）购自美国 Waters 公司；2-AB 购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；10、30 kD 超滤管购自德国 Sartorius 公司；Spectra MaxGeminiXS 多功能酶标仪及 SOFTMAX 分析软件购自美国 Molecular Devices 公司；BeckmanPA800 plus 毛细管电泳系统购自美国 Beckman 公司；iCE280 成像毛细管等点聚焦电泳系统购自加拿大 Protein simple 公司；WATERS 2695 HPLC 系统购自美国 Waters 公司。

1.4 活性测定

该双特异性抗体为抗 PD-1 的完整抗体 C 端连接抗 CTLA-4 的单链可变区片段（single chain antibody fragment，scFv）组合而成，可同时与 T 淋巴细胞上的表面抗原 PD-1 及 CTLA-4 相互作用，故活性测定需要测定 PD-1 靶点和 CTLA-4 靶点两个部分，其中 PD-1 靶点的细胞生物学活性采用报告基因法，CTLA-4 靶点的竞争抑制活性采用流式细胞荧光分选法。

1.4.1 细胞学活性（PD-1 靶点）

采用报告基因法，本方法选用 Promega 的 PD-1 effector 细胞（PD-1 效应细胞）和 PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞。PD-1 effector 细胞表达的 PD-1 分子结合于 PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞表面的 PD-L1 分子会抑制 TCR 信号通路从而抑制萤光素酶蛋白的表达。加入抗 PD-1/CTLA-4 双抗阻断 PD-1 与 PD-L1 结合并重新释放 TCR 信号通路激活萤光素酶蛋白的表达，因此萤光素酶蛋白的表达水平与 PD-1 抗体呈浓度梯度依赖关系，加入萤光素酶底物试剂后产生生物化学发光信号（如图 1）。具体试验操作如下：PD-L1 aAPC/CHO-K1 细胞复苏后于 Ham's F-12 培养基（含 10%FBS，200μg/mL Hygromycin B，250μg/mL Antibiotic G-418 Sulfate Solution）中 37℃、5% CO_2 培养，于检测前一天使用胰酶消化收集，调整活细胞密度至 4×10^4 个/孔，100 μL/孔，且活力不低于 90%，铺到 96 孔板中培养过夜（培养细胞贴壁时间要求大于等于 8 小时），检测当天完全弃掉培养基待用。将 PD-1/CTLA-4 单抗用检测培养基以 2000nM 的起始浓度开始往下进行 2.5 倍稀释至 3.28nM（8 个浓度）之后，再往下 20 倍稀释（2 个浓度）至 0.008nM，共 10 个浓度梯度，即 2000nM, 800nM, 320nM, 128nM, 51.20nM, 20.48nM, 8.19nM, 3.28nM, 0.16nM, 0.008nM，取 40μL/孔加入到 96 孔板中，每个浓度点设置 2 个复孔。PD-1 效应细胞复苏后在 RPMI 1640 L-glutamine and HEPES 培养基（含 10% FBS，200μg/mL Hygromycin B，500μg/mL Antibiotic G-418 Sulfate Solution，1mM 丙酮酸钠，0.1mM MEM nonessential amino acids）中 37℃、5% CO_2 培养，于检测当天收获细胞使用检测培养基 RPMI 1640 L-glutamine and HEPES 培养基（含 1%FBS）重悬，调整活细胞密度至 5×10^4 个/孔，40 μL/孔加入到 96 孔板中，即每个孔含 80 μL 的溶液，轻轻拍匀，置于 37℃，5%CO_2 培养箱中孵育 6 小时。取出 96 孔板，平衡至室温（22-25° C，约 5-10 分钟），每个实验孔加入 80 μL Bright-Glo™试剂，室温孵育 20 分钟。打开 Perkin Elmer EnVision 酶标仪选择读数，检测 RLU 值。使用 SOFTMAX 软件进行 4-PL 拟合，该方法的系统适用性要求为标准曲线 R^2 ≥0.90，平行复孔之间的发光值（RLU 值）的 CV 值（变异系数）应≤30%。

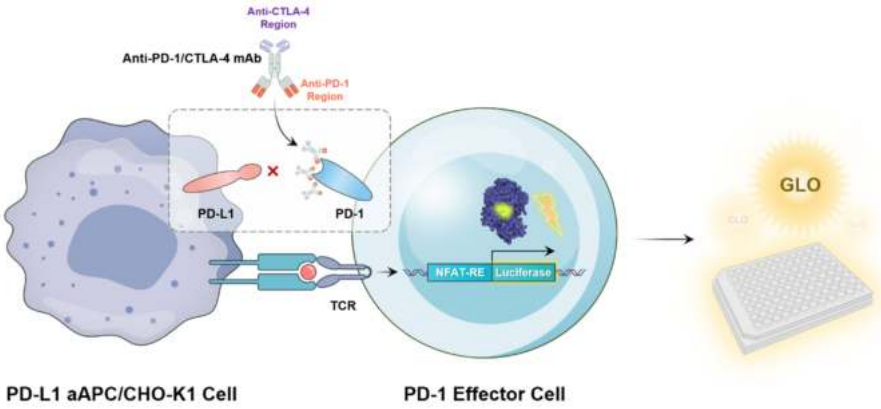


图 1 细胞学活性（PD-1 靶点）原理图

Fig. 1 Schematic diagram of biological activity（PD-1 target）

1.4.2 竞争结合活性（CTLA-4 靶点）

采用流式细胞荧光分选法，使用的 293T-CTLA-4 细胞表面含有 CTLA-4 分子，通过在实验板中加入 293T-CTLA-4 细胞后，再加入抗 CTLA-4 抗体与 hB7.1-hFc-Biotin 配体蛋白，使二者竞争与细胞表面的 CTLA-4 结合。孵育洗涤后，加入荧光二抗 FITC Streptavidin（荧光素），使其与 hB7.1-hFc-Biotin 配体蛋白结合，在激光激发后，荧光素产生荧光（如图 2）。因此荧光强度与 hB7.1-hFc-Biotin 配体蛋白的结合量呈正相关，与抗 CTLA-4 抗体的结合量呈负相关。具体试验流程如下：将 293T-CTLA-4 细胞复苏后于 DMEM 培养基（含 10%FBS）中 37℃、5% CO_2 培养，检测当天用胰酶消化后调整密度，以 1.5×10^5~2×10^5 个/孔的数量加入到 96 孔检测板中，离心后弃上清。将 PD-1/CTLA-4 单抗用 1%BSA 以 200nM 的起始浓度进行 1:3 稀释，共 8 个浓度，即 200nM，66.66 nM，22.22 nM，7.4 nM，2.46 nM，0.82 nM，0.28 nM，0.10 nM，取 100 μL 供试品加入到已经清洗完成的细胞中，轻轻混匀，置于冰上孵育 30 分钟，即完成供试品与细胞的孵育过程。使用 1%BSA 配制浓度为 40nM 的 hB7.1-hFc-Biotin 蛋白，取 100 μL/孔加入到相应实验孔中，轻轻混匀后，冰上孵育 60 分钟，即完成蛋白加入并孵育过程。之后 1600rpm，5min，5℃离心 96 孔检测板，弃掉上清，加入 100 μL/孔的 1%BSA 溶液，清洗细胞，之后离心去上清，再重复一次该步骤，共计完成两次细胞清洗过程。将荧光二抗 FITC Streptavidin 用 1%BSA 进行 500 倍稀释，取 100 μL/孔的量加入到实验孔中，轻轻混匀，置于冰上避光孵育 40 分钟，低温离心实验板，弃掉上清，加入 100 μL/孔的 1%BSA 溶液，清洗细胞，之后离心去上清，再重复一次该步骤，共计完成两次细胞清洗过程，之后每孔加入 100 μL 1%BSA 重悬细胞，使用 FACSCalibur 进行读数。使用 SOFTMAX 软件以浓度的对数为横坐标，MFI 值为纵坐标进行 4-PL 拟合得到回归曲线，该方法的系统适用性要求为标准曲线 $R^2\geq0.950$，平行复孔之间的发光值（RLU 值）的 CV 值（变异系数）应≤30%。

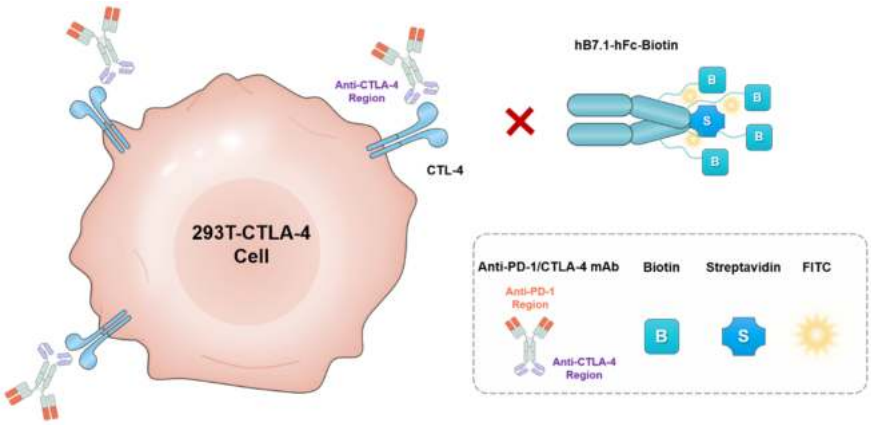


图 2 竞争结合活性（CTLA-4 靶点）原理图

Fig. 2 Schematic diagram of competitive binding activity （CTLA-4 target）

1.5 纯度分析

1.5.1 非还原/还原 CE-SDS

使用非还原/还原 CE-SDS 法进行分析，将 PD-1/CTLA-4 单抗加入适量 SDS-MW Sample Buffer 稀释成含蛋白约 0.5（非还原 CE-SDS）或 1mg•mL^{-1}（还原 CE-SDS）的溶液，再按 20:1 的比例加入碘乙酰胺（非还原 CE-SDS）或巯基乙醇（还原 CE-SDS）溶液，混合均匀后置于 70℃水浴中孵育 3 分钟，冷却至室温，12000rpm 离心 1 分钟，取上清液，采用 Beckman PA800 plus 毛细管电泳系统上样分析，其中非还原 CE-SDS 采用 10 kV 反相极性电动进样 40 秒，还原 CE-SDS 采用 5 kV 反相极性电动进样 20 秒，分离电压 15 KV，毛细管温度为 25 ℃，样品室温度为 6 ℃，使用 PDA 检测器，检测波长为 220 nm。该方法的系统适用性要求为：电泳图谱应与提供的典型电泳图谱相一致且供试品进样第一针和最后一针主峰的迁移时间差<1. 0 分钟。

1.5.2 SEC-HPLC

使用 SEC-HPLC 进行分析单抗供试品的纯度，采用色谱柱：TSK-G3000SW$_{XL}$，5 μm，300 Å，7.8mm × 300 mm；流动相：25mM 磷酸盐缓冲液（NaH_2PO_4-Na_2HPO_4），300mM 氯化钠，pH6.5；流速：0.8 ml•min^{-1}；上样量：8 μl（12.5 mg•mL^{-1}）；柱温：室温；样品池温度：4 ℃；检测波长：280 nm；检测时间：20 min。利用 WATERS 2695 HPLC 系统工作站对实验结果进行数据处理，采用面积归一化法计算单体峰和聚体峰的含量，该方法的系统适用性要求为每一针供试品的主峰理论塔板数应≥2000，主峰和聚体峰间的分离度应≥1.5。

1.6 电荷异质性

采用成像毛细管等电聚焦电泳（iCIEF）法进行分析，将样品用超纯水稀释至 5mg•mL^{-1} 。取 1440 μL 超纯水、875 μL 1%甲基纤维素、50 μL Pharmalytes 5-8、50 μL Pharmalytes 3-10、12.5 μL pI marker 5.85，以及 12.5 μL pI marker 9.22 配置预混液，然后取 5 μL 样品 与 195 μL 的预混液混合上样进行检测。分析条件：预聚焦电压 1.5 kV，持续 1 min；聚焦电压 3 kV，持续时间为 9min。该方法的系统适用性要求为：所有供试品特征峰的 pI 值与第一针供试品特征峰 pI 值相差范围在±0.10 之间。

1.7 鉴别试验

采用肽图进行鉴别分析，使用 Trypsin 酶解缓冲液将样品稀释至 2mg•mL^{-1}，取稀释后的样品 50 μL，加入 6 μL 1% Rapigest 溶液和 6 μL 50mmol/L TCEP 溶液，60℃还原反应 30 分钟；向还原后的样品中加入 4 μL 100 mM 碘乙酰胺溶液，在室温下避光反应 30 分钟；加入 20 μL 0.1 μg/ μL 的 Trypsin 溶液，在 37℃水浴中酶切 20 小时；酶切后加入 10%TFA 的乙腈溶液 4 μL，在 37℃反应 1 小时，12000rpm 离心 3 分钟；取上清使用超高效液相色谱系统，紫外检测器，Waters XBridge BEH C18 XP（2.5 μm，2.1×150mm）色谱柱进行样品的分离，在波长 214 nm 处检测。液相色谱条件：流动相 A 为 0.1% 的三氟乙酸-水溶液，流动相 B 为 0.1%的三氟乙酸-乙腈溶液，采用梯度洗脱（0~105 min，流动相 B 从 2%上升至 100%；106~120 min，流动相 B 从 100% 降低至 2%），流速为 0.2 mL•min^{-1} ，上样量为 10 μL，样品室温度为 5 ℃，柱温为 40℃。该方法系统适用性要求供试品的特征峰的相对保留时间在固定范围内；（以保留时间 79.7min 处的峰为参考峰）。

1.8 糖型分析

使用超高效液相色谱法进行含唾液酸糖型组分含量的分析，将样品用 50mM 的碳酸氢铵溶液稀释至 2 mg•mL^{-1}，以 25：1 的比例加入 PNGase F 于 37℃水浴中酶切反应 20 小时，向酶切后的样品中加入 3 倍体积的 -20℃预冷的乙醇， -20℃冰箱中放置 1 小时后 12000rpm 离心 10 分钟，使蛋白沉淀，取上清液适量至的离心管中，使用真空干燥离心机将样品干燥，向干燥后的样品中加入 2-AB 荧光标记试剂于 65℃反应 3 小时。使用 Waters H-Class 超高效液相色谱仪，荧光检测器进行分析，检测器激发波长 330 nm，发射波长 420 nm，流动相 A 为 50 mM 甲酸铵，pH 4.5；流动相 B 为乙腈，色谱柱为 Acquity UPLC Glycan （300A， 1.7 μm, 2.1×50 mm）；进样体积为 1 μL，柱温 40 ℃，样品盘温度 10 ℃。采用面积归一化计算含唾液酸糖型的含量。该方法系统适用性要求为供试品的图谱和提供的参考品的图谱一致。

2. 结果

2.1 细胞生物学活性（PD-1 靶点）

使用 SOFTMAX 软件对 Perkin Elmer EnVision 酶标仪的读数结果进行分析，其中以抗 PD-1/CTLA-4 单抗浓

度的对数值为横坐标，荧光素酶的信号值为纵坐标，构建的四参数曲线如图 3 所示，计算生物学活性的半数最大效应浓度（EC_{50} ），6 次试验测定的 EC_{50} 值为（6.91±0.78）nM•L^{-1} ，RSD 为 11.29%。相对参比品的生物学效价为（103.50±13.08）%，RSD 为 12.64%。

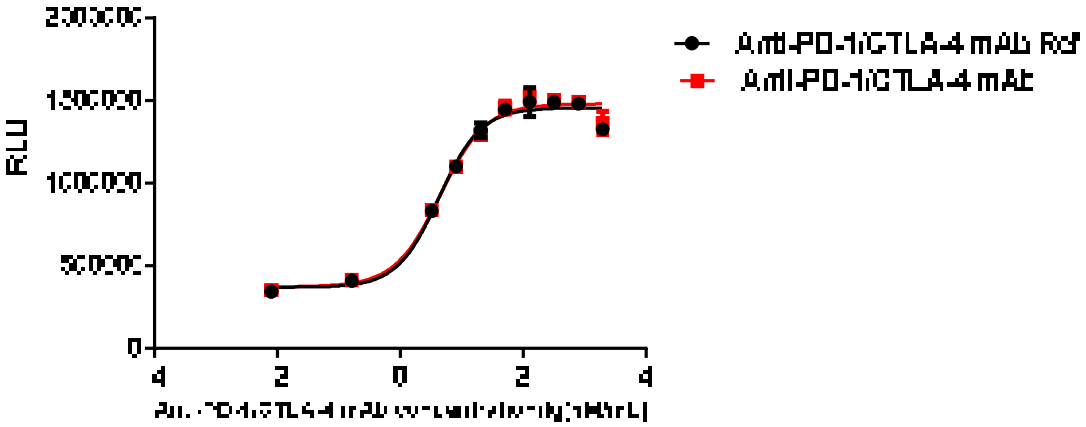


图 3 抗 PD-1/CTLA-4 双抗的细胞生物学活性（PD-1 靶点）效应曲线

Fig. 3 Biological activity （PD-1 target） effect curve of anti-PD-1 /CTLA-4 bispecific antibody

2.2 竞争结合活性（CTLA-4 靶点）

将流式细胞仪 FACSCalibur 所读的 MFI 值导入到 SOFTMAX 进行分析，其中以抗 PD-1/CTLA-4 单抗浓度的对数值为横坐标，MFI 值为纵坐标，构建的四参数曲线如图 4 所示，计算生物学活性的半数最大效应浓度（EC_{50}），6 次试验测定的 EC_{50} 值为（0.35±0.28）nM•L^{-1} ，RSD 为 10.42%。相对参比品的生物学效价为（99.30±9.15）%，RSD 为 8.32%。

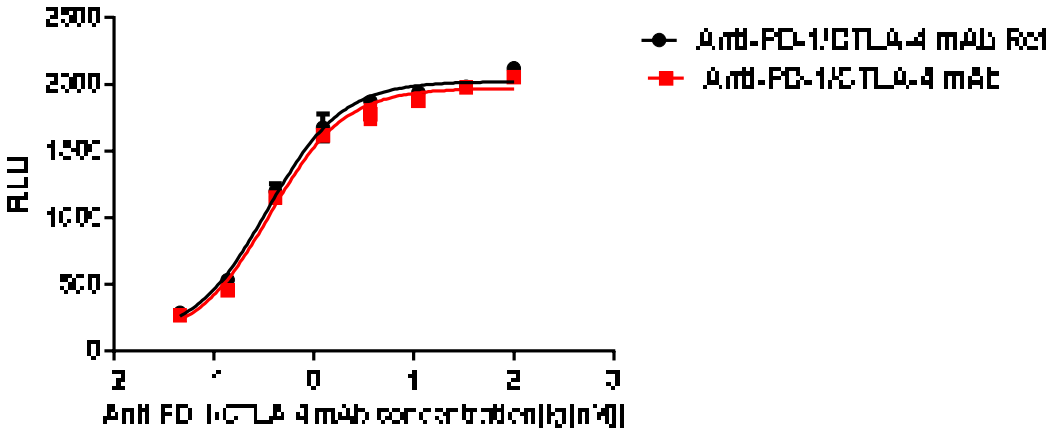


图 4 抗 PD-1/CTLA-4 双抗的竞争结合活性（CTLA-4 靶点）效应曲线

Fig. 4 Competitive binding activity effect curve （CTLA-4 target） of anti-PD-1 /CTLA-4 bispecific antibody

2.3 纯度

2.3.1 还原/非还原型 CE-SDS

还原 CE-SDS 典型图谱如图 5A 所示，经过 6 次试验测定，轻链与重链峰面积之和百分比为（98.86±0.02）%，RSD 为 0.02%。非还原 CE-SDS 典型图谱如图 5B 所示，测定结果：主峰峰面积百分比为（93.07±0.13）%，RSD 为 0.14%；片段百分比为（4.44±0.13）%，RSD 为 2.93%，聚体峰面积百分比为（2.49±0.15）%，RSD 为 0.21%。

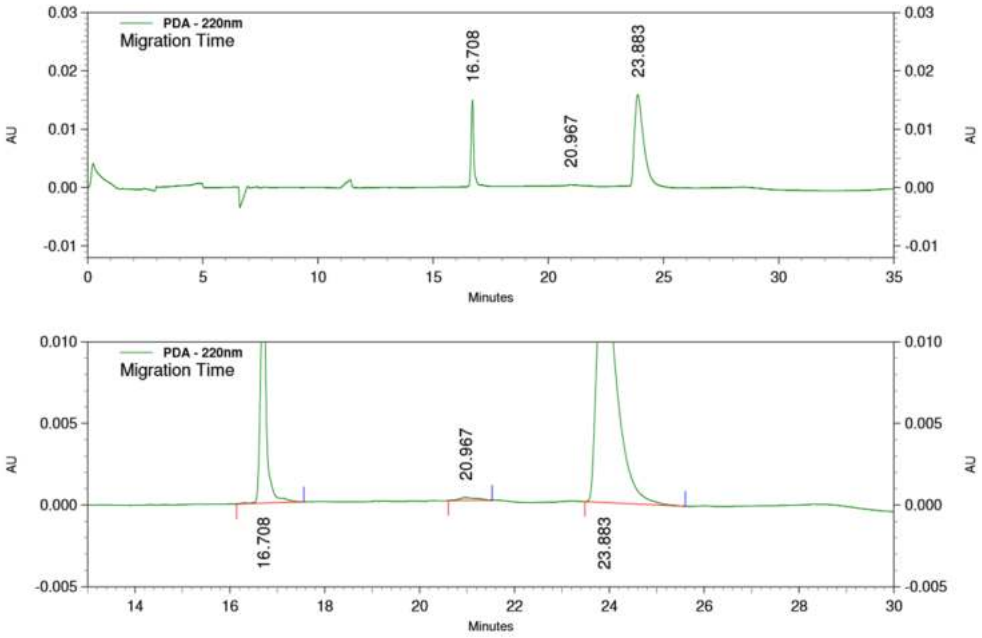


图 5A 抗 PD-1/CTLA-4 双抗的还原 CE-SDS 典型图谱

Fig. 5A rCE-SDS Chromatogram of anti-PD-1 /CTLA-4 bispecific antibody

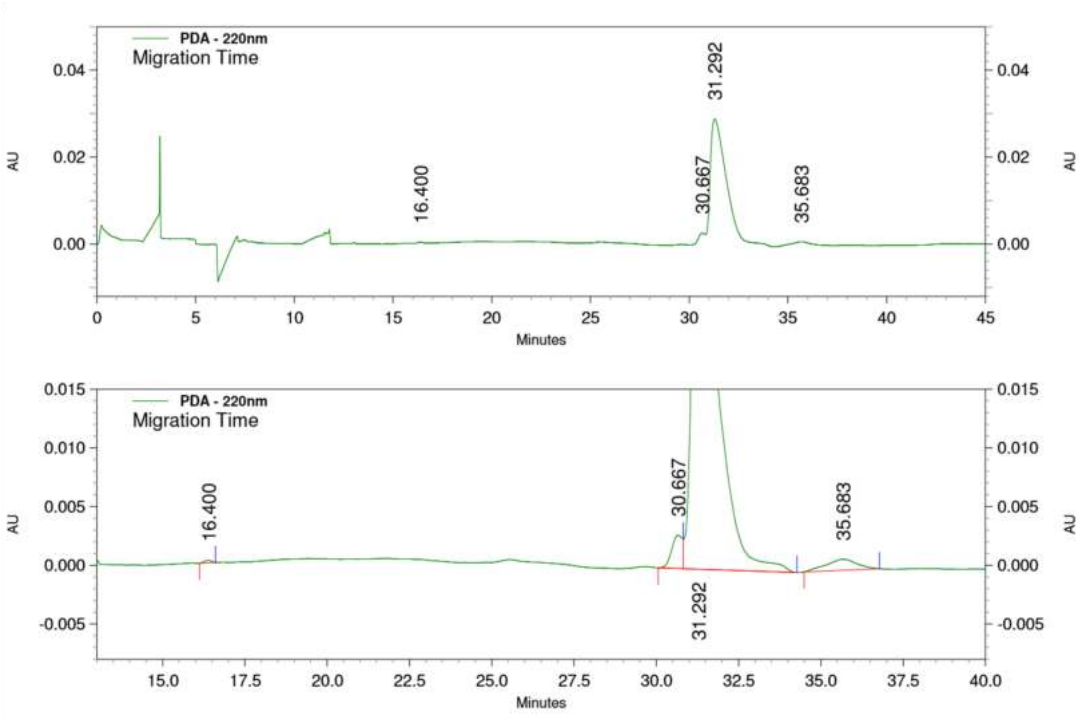


图 5B 抗 PD-1/CTLA-4 双抗的非还原 CE-SDS 典型图谱

Fig. 5B nCE-SDS Chromatogram of anti-PD-1 /CTLA-4 bispecific antibody

2.3.2 SEC-HPLC

SEC-HPLC 的典型图谱如图 6 所示，经过 6 次试验测定，SEC-HPLC 单体的峰面积百分比为（97.20±0.01）%，RSD 为 0.01%；聚体峰面积百分比为（2.68±0.01）%，RSD 为 0.37%。

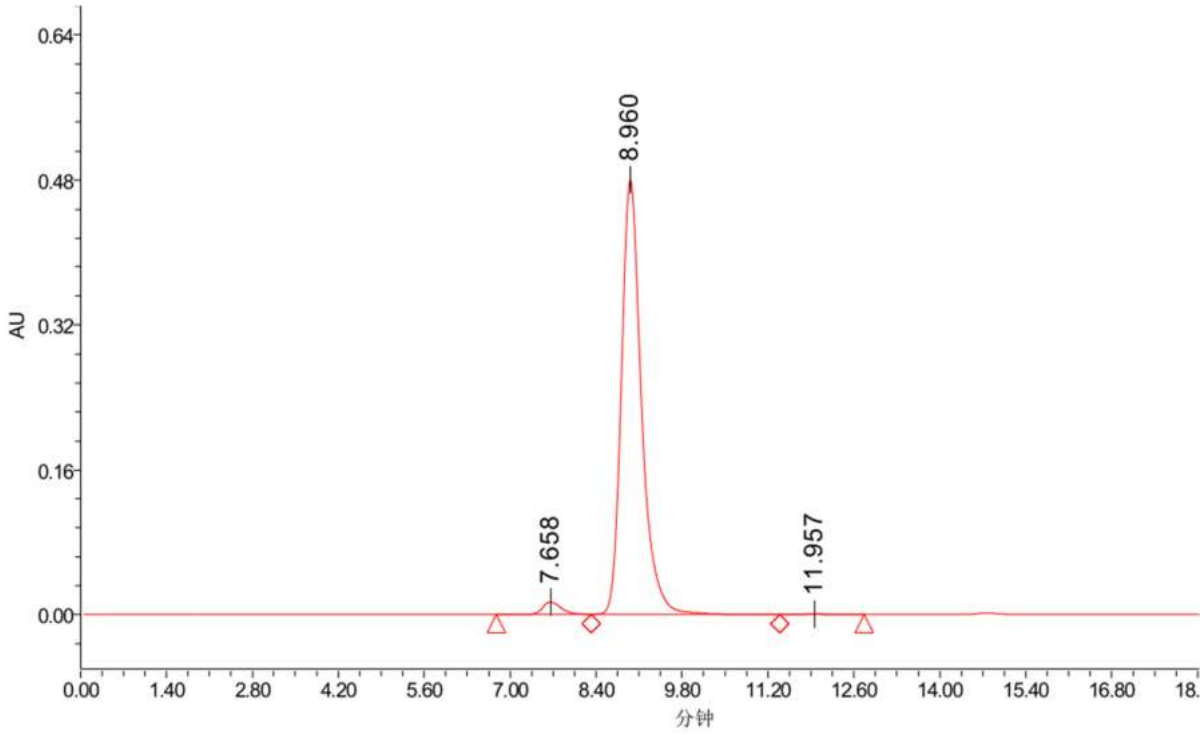


图 6 抗 PD-1/CTLA-4 双抗的 SEC -HPLC 典型图谱

Fig. 6 SEC -HPLC Chromatogram of anti-PD-1 /CTLA-4 bispecific antibody2.4 成像毛细管等电聚焦电泳（iCIEF）

iCIEF 分析结果的典型图谱如图 7 所示，6 次试验测定的 A 组峰面积百分比为（38.43±0.54）%，RSD 为 0.1.41%；B 组峰面积百分比为（43.26±0.32）%，RSD 为 0.74%；C 组峰面积百分比为（11.31±0.14）%，RSD 为 1.24%；D 组峰面积百分比为（7.00±0.17）%，RSD 为 2.43%。

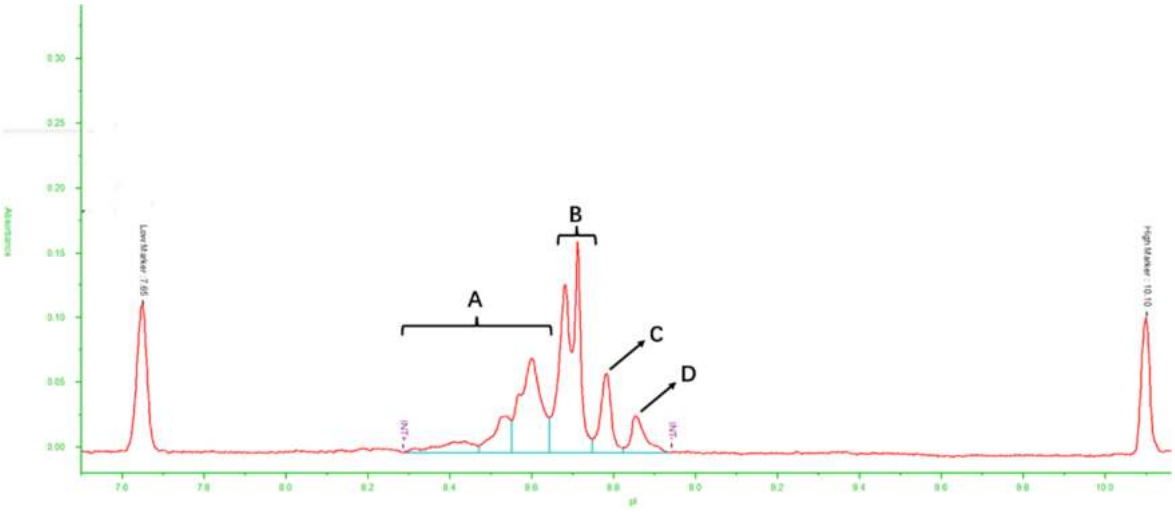


图 7 抗 PD-1/CTLA-4 双抗的 iCIEF 典型图谱

Fig. 7 iCIEF Chromatogram of anti-PD-1 /CTLA-4 bispecific antibody

2.5 肽图

肽图的鉴别的典型图谱如图 8 所示，样品各特征峰与参比标准品图谱目视具有可比性。

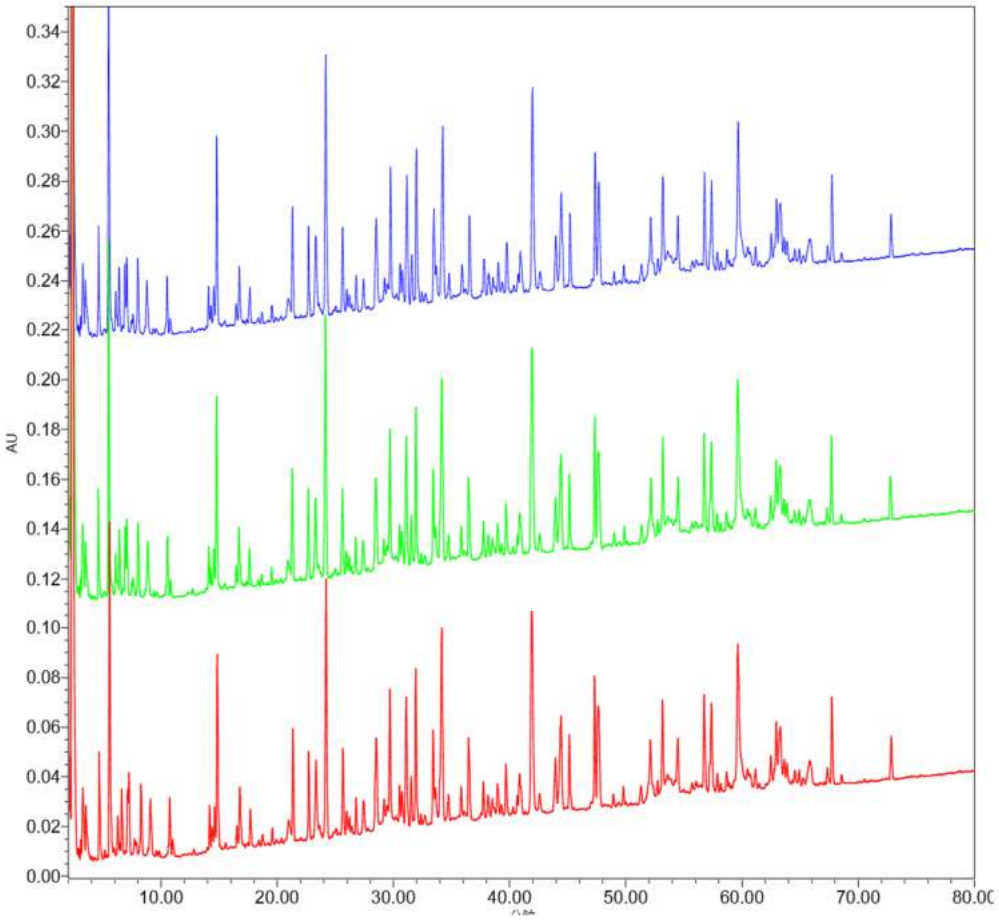


图 8 抗 PD-1/CTLA-4 双抗的肽图典型图谱

Fig. 8 Peptide Mapping Chromatogram of anti-PD-1 /CTLA-4 bispecific antibody2.6 糖型分析

糖基化分析的典型图谱如图 9 所示，糖型的命名见谱图，其中，占比例最高的糖型为 G0F，经 6 次试验测定的含量为（41.06±0.11）%，RSD 为 0.27%。含唾液酸的糖型共有三种，分别为 G2F+G1F-NANA，G2F –NANA 和 G2F-2NANA，经 6 次实验测定 G2F+G1F-NANA 含量为（12.44±0.12）%，RSD 为 0.96%；G2F-NANA 含量为（12.00±0.05）%，RSD 为 0.42%；G2F-2NANA 含量为（5.37±0.05）%，RSD 为 0.93%；含唾液酸糖型的总体含量为（29.80±0.20）%，RSD 为 0.67%。

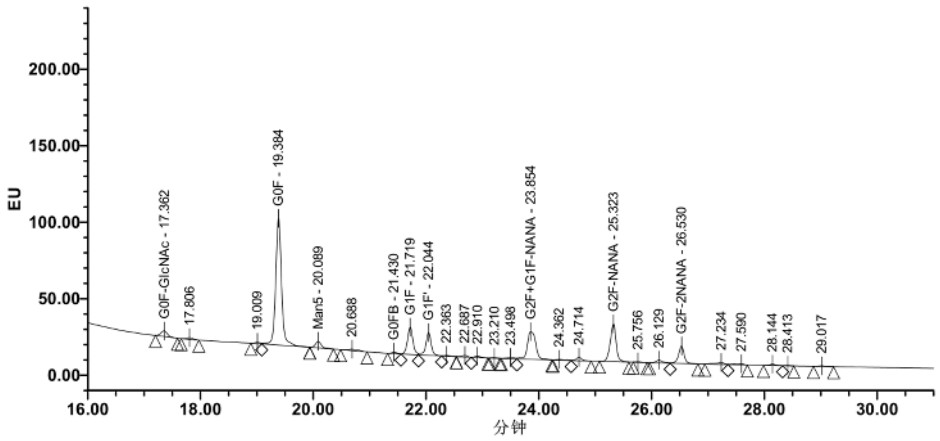


图 9 抗 PD-1/CTLA-4 双抗的糖型典型图谱

Fig. 9 Glycosylation Chromatogram of anti-PD-1 /CTLA-4 bispecific antibody

3. 讨论

随着研究的不断深入，抗体的靶点从传统的单一靶点逐渐再向多样化、复杂化过渡，抗体偶联药物、双特异性抗体，甚至四特异性抗体逐渐从研发走向上市。其中，双特异性抗体呈爆炸式增长，目前我国药企参与或者在国内申报的双特异抗体已经多达一百多个。从 2015 年友芝友申报第一款 HER2/CD3 双特异抗体，到 2020 年安进贝林妥欧的获批[7, 8]，都极大刺激了双特异抗体的发展。靶点方面，已经申报临床的抗体多数集中在 CD19，CD20，BCMA，HER2，TIGIT，EGFR，TGF-β，4-1BB，Claudin18.2 和 CD47 等靶点。在国内，除了康方生物的卡度尼利（AK104）外[9]，还有多款单抗申报临床。

活性是单抗的关键质量属性之一，阿斯利康的 MEDI5752 是国际上最早进入临床的 PD-1/CTLA-4 单抗[10]，最近报道的该单抗生物学活性测定方法为双靶点报告基因测活方法[11]，该方法构建两个工程细胞系：CHO/CD80/PD-L1 和 Jurkat/CTLA-4/PD-1/IL2- Luc。将细胞与梯度稀释的抗体孵育后，抗体在 Jurkat/CTLA-4/PD/1/IL2-Luc 细胞上与各自的抗原靶点（CTLA-4/PD-1）结合，导致荧光素酶蛋白浓度依赖性的表达，通过发光值反映抗体的生物学活性。本研究结合该单抗的结构特征，即与 CTLA-4 抗原呈弱结合状态，并参考 PD-1[12, 13]和 CTLA-4 单抗的活性测定方法[14, 15]，开发了报告基因法用于测定 PD-1 靶点的细胞生物学活性，流式细胞荧光分选法用于测定 CTLA-4 靶点的竞争结合活性，从而对抗 PD-1/CTLA-4 单抗的活性进行有效控制。采用还原/非还原 CE-SDS 配合 SEC-HPLC[16]的方法进行单抗纯度的控制，相比于 SDS-PAGE，CE-SDS 具有高分辨率、高自动化和高重复性的特点，近年来得到了广泛的应用[17]。由于 IEC-HPLC 法分离度有限，无法将组成复杂的双特异性抗体各电荷异质体完全分开，并且不易于平台，因此，我们针对该单抗的特点，建立了 iCIEF 的方法用于测定电荷的异质性。本研究建立了肽图的方法，使用 Trypsin 酶解之后，通过 UPLC 的方法对抗 PD-1/CTLA-4 的双抗进行分子水平的鉴别。该双特异性抗体的 N-糖糖型中含有唾液酸，而唾液酸是引起的抗体电荷异质性的重要原因，且各电荷异质体在糖型上主要差异在于唾液酸的比例，因此我们建立了 HPLC 法用于分析抗 PD-1/CTLA-4 单抗的糖基化，对含唾液酸糖型的总量进行控制[18]。

此外，本研究使用 Fortebio 分子相互作用的方法分别测定了 PD-1/CTLA-4 双抗与 CD16a 和 C1q 的亲和能力，结果表明该双抗与两种受体均无结合。同时，在膜表达 PD-1 的 293T-PD1 细胞系和膜表达 CTLA-4 的 293T-CTLA4 细胞系进一步验证了 PD-1/CTLA-4 双抗的 ADCC 和 CDC 活性，结果表明均无活性，即该双抗引起 ADCC 效应或 CDC 效应的风险极低。

本研究专门针对双特异抗体的质量控制开展研究，依据 ICH Q6B 的指导原则[19]，针对此类产品的关键质量属性建立了基于不同原理的质量控制方法，以保证该产品的安全性、有效性和质量可控性，对于我国双特异性抗体的早期研发和申报上市都有重大意义。

参考文献

1. Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012, 12（4）:252-264.

2. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM: CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 2018, 131（1）:58-67.

3. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC *et al*: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000, 192（7）:1027-1034.

4. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP: B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 2004, 21（3）:401-413.

5. Hassel JC, Heinzerling L, Aberle J, Bahr O, Eigentler TK, Grimm MO, Grunwald V, Leipe J, Reinmuth N, Tietze JK *et al*: Combined immune checkpoint blockade （anti-PD-1/anti-CTLA-4）: Evaluation and management of adverse drug reactions. *Cancer Treat Rev* 2017, 57:36-49.

6. Perez-Santos M: Bispecific anti-PD-1/CTLA-4 antibody for advanced solid tumors. *Pharm Pat Anal* 2020, 9（5）:149-154.

7. Goebeler ME, Bargou R: Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager （BiTE） with unique anti-tumor efficacy. *Leuk Lymphoma* 2016, 57（5）:1021-1032.

8. Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R: Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 2012, 136（3）:334-342.
9. Keam SJ: Cadonilimab: First Approval. *Drugs* 2022.
10. Dovedi SJ, Elder MJ, Yang C, Sitnikova SI, Irving L, Hansen A, Hair J, Jones DC, Hasani S, Wang B *et al*: Design and Efficacy of a Monovalent Bispecific PD-1/CTLA4 Antibody That Enhances CTLA4 Blockade on PD-1（+） Activated T Cells. *Cancer Discov* 2021, 11（5）:1100-1117.
11. Chen W, Pandey M, Sun H, Rolong A, Cao M, Liu D, Wang J, Zeng L, Hunter A, Lin S: Development of a mechanism of action-reflective, dual target cell-based reporter bioassay for a bispecific monoclonal antibody targeting human CTLA-4 and PD-1. *MAbs* 2021, 13（1）:1914359.
12. 于传飞, 黄璟, 杨雅岚, 倪永波, 王开芹, 王兰: 抗 PD-1 单抗生物学活性测定方法的联合验证. *药学学报* 2020, 55（05）:1010-1014.
13. Wang L, Yu C, Yang Y, Gao K, Wang J: Development of a robust reporter gene assay to measure the bioactivity of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapeutic antibodies. *J Pharm Biomed Anal* 2017, 145:447-453.
14. Liu C, Yu C, Yang Y, Cui Y, Zhang F, Wang L, Wang J: Development and validation of a reporter gene assay to determine the bioactivity of anti-CTLA-4 monoclonal antibodies. *Int Immunopharmacol* 2021, 101（Pt A）:108277.
15. Wang L, Yu C, Wang J: Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals. *Biotechnol Adv* 2020, 39:107466.
16. Hernandez-Longoria R, Hernandez-Ruiz Y, Gutierrez-Jasso F, Zarazua A: Validation of an analytical method for the quantification of human fibrinogen in pharmaceutical products by size-exclusion liquid chromatography （SEC-HPLC）. *Int J Hematol* 2021, 113（4）:480-492.
17. Rustandi RR, Washabaugh MW, Wang Y: Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products. *Electrophoresis* 2008, 29（17）:3612-3620.
18. Liu L: Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci* 2015, 104（6）:1866-1884.
19. Ich Harmonised Tripartite Guideline：Specifications：Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/ Biological Products Q6B[EB/OL].（1999-03）[2021-0703]. http：/www.ich.org /fileadmin/Public_Web_ Site/ICH_ Products/Guidelines/Quality/Q6B/Step4/Q6B_ Guideline. pdf.

突发事件中军队医疗机构药品应急保障的思考与实践

袁海龙

（空军军医大学 空军特色医学中心药剂科，北京，100142）

【摘要】突发事件的军队医疗机构应急药品保障取得了明显进步，仍存在药品应急保障意识的站位不高、药品应急保障亚目录还不够精准、药师在医疗支援中作用有待加强等薄弱环节。本文提出了对策建议，包括应急时刻确保药品供应、精准制定个性化保障目录和用量、提高安全合理用药水平、加强研发生产能力储备等，为应对突发事件提供高水平的药学支援。

【关键词】药品保障，应急医学救援，军队医疗制剂

突发事件主要包括地震等自然灾害、公共卫生事件及战争等特殊情况或意外事件。改革开放以来，随着我国经济高速发展，民生水平不断提高，跨地区乃至跨国间的人员交流日益频繁和密切，随之而来的是各种突发公共卫生事件（如埃博拉病毒、SARS、新型冠状病毒感染等）的风险增加，其产生频率、传播速度、传播规模越来越大[1,2]。因全球生态和气候环境变化，塌方、地震、洪涝、火灾等自然灾害频发和严重程度日益加剧，使得紧急医学救援的地位和作用更加突出[3]。此外，当前俄乌冲突仍在持续，不仅严重影响了欧洲的安全稳定，亦使我国周边安全形势更加严峻，特别是台独分裂分子的活动日益猖獗，使军事斗争卫勤准备的重要性和紧迫性日益凸显。在上述多样化需求背景下的应急医学救援体系中，医疗机构药品应急保障是其中的重要组成部分，特别是军队医疗机构药品应急保障更是为战而生、向战而行，在突发事件应急医学保障中发挥着不可替代的重要作用。

近年来，针对突发事件的应急医学救援药品保障体系建设受到高度重视，并已经取得了明显成绩和长足进步[4]，但面对新形势、新机遇和新挑战，仍存在诸多问题和薄弱环节。本文在回顾既往研究的基础上,对军队医疗机构药品应急保障的一些堵点和热点进行了散点透视，提出了加强军队医疗机构应急药品保障工作的对策建议。

1 军队医疗机构药品应急保障的基本情况

1.1 药品应急保障亚学科地位日益凸显。医院药学学科主要包括药品保障、制剂和临床药学等部分，药品供应保障和药事管理是医院药学的基础性工作，也是药师们的核心任务之一，俗语讲“基础不牢，地动山摇”，只有把握住了这个基本的定盘星，药学学科才能创新发展。其中，对于军队医疗机构而言，药品应急保障是药品保障的重要组成部分，也是职责使命所在。经历了三年的新冠疫情，面对错综复杂的安全形势，药品应急保障亚学科地位更加凸显，也得到了军队和医院层面的高度重视，创造了药品应急保障创新发展新的历史机遇。

1.2 信息化技术应用助推药品应急保障水平快速提升。原来大家心目中的药品应急保障往往是简单调剂，装箱贴封而成，科技含量不高。近年来，一些创新技术方法运用到药品应急保障中来，保障的精细化信息化水平得以快速提升。枉前课题组依托信息化手段基于临床治疗学的“伤情-技术-药品”映射模型，制定适度和适宜的应急保障药品标准化目录，并通过筹措渠道的优选辅助完成药品应急保障。药品应急保障系统的建设对缩短应急医疗救援响应时间，提高医疗救援效率具有重要意义[5]。多家军队医疗机构实现了部分应急药品管理信息化、可追踪、可溯源，大大提升了药品应急保障水平。

2 存在的问题

2.1 药品应急保障意识的站位不高。军队医疗机构高度重视学科发展，把学科和人才队伍建设放在了重中之重。就医院药学学科而言，创新药学技术服务，强化高水平人才培养，发表高影响因子文章，是学科建设的核心要素。然而，作为军队药学工作者，药品应急保障更是我们的主责主业，重视程度还有待提升。

作者简介：袁海龙，博士，研究员，博士生导师，研究方向为医院药学与中药制剂新技术。Email: yhlpharm@126.com

作者单位：北京，空军军医大学 空军特色医学中心药剂科，100142

2.2 药品应急保障亚目录还不够精准。各个医疗机构都有药品应急目录，但针对地震、疫情等个性化保障目录尚不完善。在发生突发事件时，针对不同人群数量、不同地域等尚还缺少信息化准确的决策，精准制定药品种类和数量，可能造成药品不够，也可能造成药品浪费[6-7]。

2.3 药师在医疗支援中作用有待加强。医疗救援中，医生和护士是主力军，这毋庸置疑。在突发事件中，几乎听不到药师的声音，缺少存在感成就感。其实，药品应急保障是医疗救援的重要组成部分，药师的作用不可替代。除了目录制定、药品供应、储存保管、调剂等工作外，药师能够提供更加有效的药学技术服务，确保用药安全有效。

3 军队医疗机构药品应急保障的发展策略

3.1 主责主业，应急时刻确保药品供应。自然灾害、公共卫生事件及战争等可能随时都会来临，军队医疗机构药师一定要居安思危，做好应急备战准备。2022 年 12 月，国家疫情按照“乙类乙管”放开，我们的信息药师由于平时训练有素，提前 10 天预警，紧急储备连花清瘟和布洛芬等相关药品，确保了医院新冠治疗药品不断供，基本保障了官兵用药和医疗救治需要。另外，军队医疗机构药品配送商多元化也非常重要，大型央企配送商为主体，民营配送商为补充。由于民营配送商管理更加高效，关键时刻往往会发挥重要作用。

3.2 智能决策，精准制定个性化保障目录和用量。国家有应急药品储备大目录，军队有战救药材目录，应结合国家和军队目录制定本医疗机构应急药品目录，在普适性基本目录基础上，补充制定个性化亚目录。运用信息化手段，构建药品决策模型，制定精准药品配备种类和数量。对药品包括市场上药品、军队特需药品和制剂进行赋码，信息化管理，确保全程可追溯。陈希课题组在突发公共卫生事件下应急资源需求预测、应急资源分配模型、应急物流网络设计、考虑心理或行为的应急管理问题等基础上，提炼了突发公共卫生事件下应急药品需求预测与分配决策的研究问题，提出了突发公共卫生事件下应急药品需求量预测与分配的方法[8]。

3.3 药学服务，提高安全合理用药水平。军队医疗机构药师在做好应急药品供应的同时，应充分关注药品安全合理用药，从幕后走向前台，为伤病员和患者提供一线药学服务，包括药学监护、用药教育、不良反应监测等，提高临床治疗效果，避免药源性伤害。疫情最严重的时候，我们的药师紧急编制了抗病毒药、退热药、免疫调节剂、中成药等的用药宣教手册，药师走到患者床旁，参与制定用药方案，开展药学监护，收到了较好的效果。

3.4 创新驱动，加强研发生产能力储备。军队医疗机构是为战存在的，除了正常市场上药品保障供应外，特别是全军区域（特色）制剂中心，研发生产军队特需药品和特色制剂作为补充保障也是使命担当。作为全军区域（特色）制剂中心，一是要储备研发能力。针对未满足的卫勤需求，创新驱动下研发产品，构建国家新药和军队特需药品转化平台；考虑到战时恶劣环境，部分需低温保存药品的储存环境不达标，我们研发了二氧化钛纳米涂层包材，可以有效控制温度，保障药品质量和用药安全；二是储备生产能力。军队医疗机构根据自身承担的卫勤任务，建设现代化自动化的生产线，储备生产配制能力。疫情高峰时，我们紧急生产制剂清热解毒口服液供应临床，并实施了部分区域保障，大大缓解了当时“一药难求”的巨大压力。当突发事件中有需求，可以快速完成药品生产配制任务而实施应急保障。

药品是突发事件医疗救援的重要保障，军队医疗机构药剂科应把应急药品保障作为主责主业，制定科学合理应急药品目录和亚目录，智能决策用量和分配，药品全流程可追溯，药师发挥专业特点提供高质量药学服务，同时做好研发生产能力的储备，为应对突发事件提供高水平的药学支援。

参考文献

[1] Guo YR, Cao QD, Hong ZS, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. Mil Med Res. 2020 Mar 13;7(1):11.

[2] 刘珏,梁万年,刘民,等. 基于应急管理理论的新型冠状病毒肺炎聚集性疫情防控效果评价指标体系的构建[J]. 中国全科医学, 2021, 24(17): 2122-2126.

[3] He J, Dang Y, Zhang W, et al. Perception of Urban Public Safety of Floating Population with Higher Education Background: Evidence from Urban China. Int J Environ Res Public Health. 2020 Nov 22;17(22):8663.

[4] 吴久鸿,柴逸峰,梁万年.突发公共事件药学保障与药品供应的战略思考[J].世界临床药物,2022,43(08):982-985.

[5] 翁邦碧,杨波,李玉良,等.医疗机构药品应急保障的信息化建设[J].临床药物治疗杂志,2021,19(05):85-88.
[6] 韩丹,丁一波,任磊,等.传染病防治药品遴选评价指标体系的构建[J].药物流行病学杂志,2023,32(06):641-647.
[7] 张炜健,施先亮,黄安强,等.重大公共卫生事件下应急药品储备方式优化分配策略[J].系统工程理论与实践,2022,42(01):110-122.
[8] 刘鑫. 突发公共卫生事件下应急药品需求量预测与分配方法研究[D].西安电子科技大学,2022.

叶酸与奥美沙坦酯夜间联用对非杓型 H 型高血压患者血压、炎症因子及内皮功能的影响

袁龙

（长治市人民医院　药剂科　山西 长治 046000）

【摘要】目的：观察叶酸与奥美沙坦酯夜间联用对非杓型 H 型高血压患者患者血压、炎症因子及内皮功能的影响。**方法：**选取 2020 年 01 月～2021 年 01 月我院收治的 186 例非杓型 H 型高血压患者为对象，采用奇偶数分组法分为对照组 91 例和观察组 95 例。对照组给予奥美沙坦酯治疗，观察组给予叶酸夜间联合奥美沙坦酯治疗。比较两组动态血压、冠状动脉内皮功能、血清同型半胱氨酸（Hcy）、炎症因子、脉搏波传导速度（PWV）的差异，统计两组安全性、杓型高血压发生率及心血管疾病危险分层情况。**结果：**两组治疗前动态血压、Hcy、炎症因子、PWV 比较，未见统计学差异（P>0.05）；与治疗前相比，两组血清 Hcy、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、PWV、高敏-C 反应蛋白（hs-CRP）及日间、夜间、24h 的收缩压（SBP）和舒张压（DBP）均较前下降，其中观察组治疗后 Hcy、炎症因子、PWV 及夜间和 24hSBP 低于对照组，其他血压状态与对照组比较，未见统计学差异（P>0.05）。两组治疗前冠状动脉内皮功能比较，未见统计学差异（P>0.05）；与治疗前相比，两组治疗后前降支中远段峰值血流速度变化率（$\triangle V_{LAD}$）、左主干内径变化率（$\triangle D_{LM}$）均较前下降，且观察组下降更明显（P<0.05）。两组治疗后前降支中远段峰值血流速度（$V0_{LAD}$）、左主干内径（$D0_{LM}$）与治疗前、对照组比较，均未见统计学差异（P>0.05）。观察组杓型高血压发生率为 56.84%（54/95）高于对照组的 41.76%（38/91），不良反应发生率为 9.47%（9/95）与对照组的 6.59%（6/91）比较，未见统计学差异（P>0.05）。观察组心血管疾病危险分层优于对照组，有统计学差异（P<0.05）。**结论：**叶酸与奥美沙坦酯夜间联用可改善非杓型 H 型高血压患者冠状动脉内皮功能，降低心血管疾病风险，纠正血压昼夜节律，且不增加不良反应。

【关键词】叶酸；奥美沙坦酯；非杓型 H 型高血压；心血管疾病风险；冠状动脉内皮功能；不良反应

某三甲医院2022年麻醉和第一类精神药品使用情况分析

袁龙

（长治市人民医院 药剂科 山西 长治 046000）

【摘要】目的：通过分析某三甲医院2022年麻醉和第一类精神药品的使用情况，为医院药品采购提供参考，对存在问题提出改进意见，促进临床合理用药。**方法：**通过信息管理系统（HIS系统）调取该院2022年麻醉和第一类精神药品使用数据，对数据进行整理分析。另抽取2022年每月15日门诊药房和中心药房麻醉和第一类精神药品处方和病例进行点评分析。**结果：**该院麻醉和第一类精神药品的使用中，吗啡注射液、麻黄碱注射液、吗啡缓释片（30mg）的DDDS位列前三名，使用频度高。瑞芬太尼粉针、羟考酮缓释片（40mg）、舒芬太尼注射液的DDC（日均费用）位列倒数，说明其日均费用较高。序号比大于1的药物有：吗啡注射液、麻黄碱注射液、可待因片；接近1的药物有：吗啡片、盐酸哌替啶注射液、布桂嗪注射液，说明同步性较好，价格便宜易于接受；小于1的药物有：舒芬太尼注射液、瑞芬太尼粉针等。舒芬太尼注射液处方占比约为23.0%，瑞芬太尼注射液处方占比约为18.3%，吗啡注射液约占10.5%，麻黄碱注射液处方占比约为9.8%，哌替啶注射液以及芬太尼注射液应用较少。DUI用于评价临床用药的合理性，小于等于1说明其用药合理。DUI大于1的有：羟考酮缓释片（40mg）、吗啡缓释片（30mg）、可待因片、吗啡注射液、瑞芬太尼粉针、羟考酮缓释片（10mg）,说明其可能存在不合理的临床用药，但是由于阿片类药物用于癌痛患者无“天花板”效应，因此其使用合理与否还需根据患者及用药情况进行分析。共点评门诊处方378张，住院患者病例768份，其中门诊处方合格率97.62%，住院医嘱合格率96.22%。**结论：**该院麻醉和第一类精神药品的管理工作正在逐步有序的推进，药品的品种配置也基本能够满足患者的临床用药需求，但是依旧存在不合理用药现象，在今后的工作中还需要不断完善和贯彻执行相关的管理制度，通过培训和学习更新临床医师的治疗理念和药学专业技术人员的审方能力。

【关键词】麻醉药品；第一类精神药品；药物利用指数；日均费用；处方点评；医院信息管理系统

利用信息化手段推动药品集中带量采购工作

袁龙

（长治市人民医院 药剂科 山西 长治 046000）

【摘要】目的：总结我院药品集中带量采购工作信息化建设实践，以期为药品集采工作的常态化开展提供借鉴。**方法：**建立健全制度，成立领导组，对接医院 HIS 系统，开发集采药品实时动态管理平台，医务科、药学部、信息科等通力合作进行执行情况督导检查，针对需要大量计算的任务环节进行信息系统开发，提高信息处理的自动化水平。**结果：**通过集采药品实时动态管理平台的建立，医院药品集中带量采购工作完成率达到了 100%。极大的节省了人力成本，提高了工作效率，同时提高了医务人员对药品集采工作的知晓程度，减轻了患者的经济负担，提高了患者的就医满意度。此外，全院合理用药指标也显著提升，与 2019 年相比，全院药占比由 29.89%降低到 24.16%；抗菌药物使用强度由 43.70DDDs 降低到 35.18DDDs; 出院患者次均药品费用由 3337.95 元降低到 2177.32 元; 门诊患者次均药品费用 97.05 元降低到 78.17 元。**结论：**通过信息化手段的引入，尤其是集采药品实时动态管理平台的建立，对于药品集中带量采购工作有着重要的推动意义，值得推广。

【关键词】药品集中带量采购；信息化；动态监测；合理用药

基于一测多评法的玉屏风剂中 8 个成分的测定及其质量评价

岳超，张文婷，徐普，施贝，袁堃，郑成，王峰，陈碧莲*

浙江省食品药品检验研究院，浙江 杭州 310052；国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室；家市场监管重点实验室（功能食品质量与安全领域）；浙江省省市场局重点实验室（保健食品质量安全重点实验室）

【摘要】建立测定玉屏风剂中升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯 III、苍术酮的一测多评方法，验证该方法在玉屏风剂质量分析中的应用的可行性与科学性。研究采用高效液相色谱法，以 5-O-甲基维斯阿米醇苷为内参照物，建立与其他 7 个成分的相对校正因子，利用相对校正因子计算玉屏风剂中 8 种成分的含量，并比较其与外标法含量测定结果的差异性。玉屏风剂中升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯 III、苍术酮的相对校正因子分别 1.009，1.925，2.147，0.822，0.708，1.066，0.1425。一测多评法的测得结果与外标法结果的相对标准偏差（RSD%）均小于 5.0%，表明结果无显著差异。研究联合聚类分析技术对含量测定结果进行分析，挖掘影响样品间质量差异的关键因子。研究结果可知，建立的以 5-O-甲基维斯阿米醇苷为内参物的一测多评法准确、科学、便捷、高效，可以用于玉屏风系列制剂中 8 个化合物的测定和玉屏风剂质量差异的分析。

【关键词】玉屏风剂；一测多评法；相对校正因子；聚类分析；质量评价

Determination of content of 8 components in YuPingfeng preparations by QAMS and chemometrics analysis

YUE Chao, ZHANG Wen-ting, XU Pu, SHI Bei, YUAN Kun, ZHENG Cheng, WANG Feng, CHENG Bi-lian*

Zhejiang Institute of Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; NMPA Kry Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine College of Pharmacy; Key Laboratory of Functional Food Nutrition and Quality Safety for State Market Regulation; Key Laboratory of Health Food Quality Safety of Provincial Market Regulation

【Abstract】To establish a quantitative analysis of multi-conponents by single marker (QAMS) method for 8 components (prim-O-glucosylcimifugin,calycosin-7-O-β-D-glucoside, cimifugin, 5-O-methylvisammioside, sec-O-glucosylhamaudol, formononetin, atractylodes lactone III, atractylone) in "YuPingFeng" Series Preparation(YPFSP), and verify the feasibiliy and scientificiity of the method in the quality analysis of YPFSP. The relative correction factors of 7 components were established by HPLC with 5-O-methylvisammioside as the internal reference substance. The contents of 8 components in YPFSP were calculated by using the relative correction factor, and the contents of each component were calculated by external standard method(EMS), and the difference between the two methods were compared. The relative

基金项目：浙江省药品监督管理局项目（2023020）；浙江省科技厅分析测试项目（LGC22H280007）

作者简介：岳超，电话：0571-86405513，E-mail: yuechao@zjyj.org.cn，主管中药师

研究方向：中药质量控制研究

*通讯作者：陈碧莲，E-mail：chenbilian@zjyj.org.cn,主任中药师

研究方向：食品药品质量控制及标准研究

correction factors(f_s/f_i) of prim-O-glucosylcimifugin, calycosin-7-O-β-D-glucoside, cimifugin, 5-O-methylvisammioside, sec-O-glucosylhamaudol, formononetin, atractylodes lactone III, atractylone were 1.009, 1.925, 2.147, 0.822, 0.708, 1.066, 0.1425 respectively. The relative standard deviation (RSD) values of 18 batches of YPFSP determianed by the QAMA method and external standard method were all less than 5.05%, and there was no significant difference. The relative correction factor established with 5-O-methylvisammioside as the internal reference material is accurate and easy to operate. The method of QAMS can be used for the quality evaluation of multi-index components in YPFSP. There were certain inherent quality differences in YPFSP

【Keyword】YuPingFeng Series Preparation; quantitative analysis of multi-conponents by single marker; relative correction factor; cluster analysis; quality research

“玉屏风”方由黄芪、防风、白术（炒）组成，是“扶正固表”的经典名方，具有益气、固表、止汗的功效，主要用于表虚不固、自汗恶风、面色晄白或体虚易感风邪者[1]。现代药理学研究表明，“玉屏风”方在调节机体免疫力方面表现突出，临床多参与到小儿咳嗽、哮喘、鼻炎、荨麻疹、肾病等多种疾病的联合治疗[2-9]。在“后疫情”时代，玉屏风及其加减方多次参与到提升免疫力疾病的临床治疗中，且使用频率上升明显。

经检索，目前国家药品监督管理部门批准的玉屏风剂文号中有 7 个剂型，口服液最多（88 个），丸剂（10 个）、颗粒剂（3 个）次之，胶囊、软胶囊、滴丸、袋泡茶各 1 个。现行质量标准中多以单味药材的薄层色谱检测和黄芪甲苷含量为质量控制指标评价药材质量。现阶段对于玉屏风剂的质量研究中，液体制剂多集中在汤剂，固制剂多为散剂和颗粒剂，且多为单一药材、单一指标成分的研究[10-14]，系列制剂质量的比较研究较少。笔者前期对玉屏风丸和玉屏风口服液的质量研究中发现[15-16]，样品间质量差异明显，单一物质的测定已经无法准确、全面的评价样品间的质量情况。且不同剂型样品生产过程和参数控制差异大，更是增加了药品质量控制和评价的难度。

一测多评（QAMS）法是通过测定单一成分实现多成分的同步定量的质量评价模式。可以节约对照品、简化实验操作、提升检验效率、降低人工成本。自 2006 年提出以来[17]，已经发展成为适合中药材及中药制剂质量评价新手段[18-22]。

本研究将采用 HPLC-QAMS 法，以 5-O-甲基维斯阿米醇为内参物，建立 8 个成分的相对校正因子，测定 6 个剂型共计 18 批玉屏风剂样品中各成分含量，评价样品质量，分析质量差异原因。

1 材料

1.1 试药

色谱级乙腈（Merk 公司），甲醇（国药试剂，分析纯），实验用水为纯化水。升麻素苷（纯度：96.2%，批号：111522-201712）；毛蕊异黄酮葡萄糖苷（纯度：97.6%，批号：111920-201606）；升麻素（批号：111710-200602）；5-O-甲基维斯阿米醇（纯度：97.4%，批号：111523-20181）；亥茅酚苷（批号：111714-200501）；白术内酯 III（纯度：99.9%，批号：111978-201501）；苍术酮（纯度：98.0%，批号：DST90607-107），均来自中国食品药品检定研究院；芒柄花素（纯度：98.0%，德思特生物公司，批号：DST91202-011）。实验样品为市购和网购样品，样品共计 18 批，详情见表 1。

表 1 18 批样品信息表

Tab.1 Information of 18 batches of samples

样品编号	企业编号	品名	样品编号	企业编号	品名
S1	X	口服液	S10	K	滴丸
S2	X	口服液	S11	JB	胶囊
S3	Z	口服液	S12	C	袋泡茶
S4	J	口服液	S13	H	丸
S5	G	颗粒	S14	H	丸

S6	G	颗粒	S15	H	丸
S7	Y	颗粒	S16	H	丸
S8	K	滴丸	S17	H	丸
S9	K	滴丸	S18	H	丸

*相同字母即为相同厂家

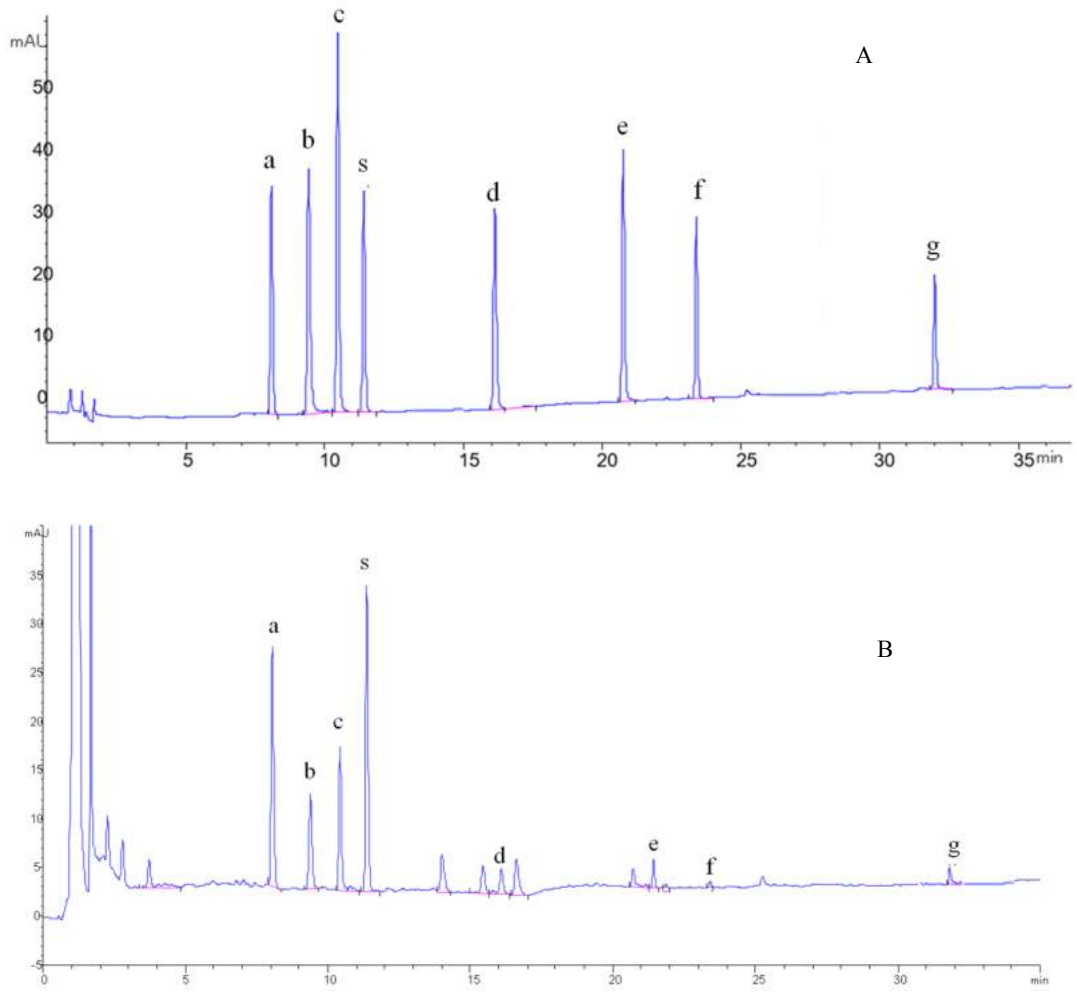
1.2 仪器

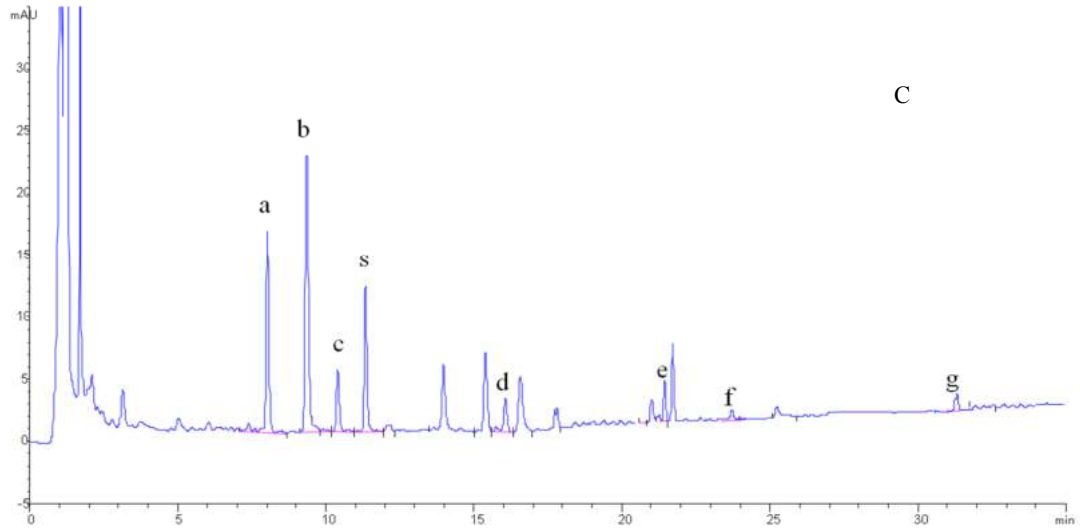
Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪（Agilent 公司）；Shimadzu XR-20AD 型高效液相色谱仪（Shimadzu 公司）；Thermo Ultimate 3000 型高效液相色谱仪（Thermo Fisher 公司）；Zorbax C_{18} 柱（4.6 mm × 150 mm，5 μm）；Ecllpse Plus C_{18} 柱（4.6 mm × 150 mm，5 μm）；Sunfire C_{18} 柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm），VP-ODS C_{18} 柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）。XPE-205 型电子天平（Mettler Toledo 公司）；有机微孔滤膜（0.22 μm）；KH5200DE 型超声清洗器（昆山禾创公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

乙腈(B)-水(A)为流动相进行梯度洗脱：0-15min，9%-30%(B)，15-30min，30%-90%(B)，30-35min，90%(B)，35-36min，90%-9%(B)，36-40min，9%(B)。检测波长为 220nm，Ecllpse Plus C18 柱进行分离，柱温：30℃，流速：1.1 mL/min，进样量 10 μL。8 个化合物的分离度均大于 1.5，理论塔板数按各成分色谱峰计均＞4683，阴性空白无干扰[16]，色谱图见图 1。





a.升麻素苷 b.毛蕊花糖葡萄糖苷 c.升麻素 s.5-O-甲基维斯阿米醇苷 d.亥茅酚苷
e.芒柄花素 f.白术内酯 III g.苍术酮

图 1：8 混合对照品（A），S10 样品（B），S5 样品（C）的色谱图

a. prim-O-glucosylcimifugin, b. calycosin-7-O-β-D-glucoside, c. cimifugin, s.5-O-methylvisammioside, d. sec-O-glucosylhamaudol, e. formononetin,
f. atractylodes lactone III, g. atractylone

Fig. 1 HPLC of 8 mixed reference solution(A), S10 test sample (B), S5 test sample (C)

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取上述 8 种对照品适量于容量瓶中，加甲醇稀释配制成对照品储备液，浓度：升麻素苷（1067mg·mL-1）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（1109 mg·mL-1）、升麻素（1249 mg·mL^{-1}）、5-O-甲基维斯阿米醇（1154 mg·mL^{-1}）、亥茅酚苷（1484 mg·mL^{-1}）、芒柄花素（1116mg·mL^{-1}）、白术内酯 III（402 mg·mL^{-1}）、苍术酮（506 mg·mL^{-1}）。按照实验需求，分别吸取 8 种对照品储备液于同一容量瓶中，加甲醇溶液稀释，得到混合对照品工作溶液，浓度分别为：升麻素苷（52.14 mg·mL^{-1}）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（55.46 mg·mL^{-1}）、升麻素（60.17 mg·mL^{-1}）、5-O-甲基维斯阿米醇（54.5 mg·mL^{-1}）、亥茅酚苷（67.2 mg·mL^{-1}）、芒柄花素（55.8 mg·mL^{-1}）、白术内酯 III（37.14 mg·mL^{-1}）、苍术酮（51.71 mg·mL^{-1}）。

2.3 供试品溶液制备

丸和口服液的样品制备方法见笔者前文研究[15-16]，不在此赘述。其他剂型样品研细，精密称取药品粉末 0.5g 置于 50mL 具塞锥形瓶中，加入 80%甲溶液 50mL，称定质量，超声提取 30min，放冷后加 80%甲醇溶液补足减失重量，摇匀，吸取上清液过 0.22μm 微孔有机滤膜，滤液待测。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围和定量下限考察

分别精密吸“2.2”项目下的混合对照品工作溶液，按照在“2.1 项”下色谱条件进行测定，以峰面积为纵坐标（y），对照品的浓度为横坐标（x），绘制标准曲线，计算回归方程及相关系数（r）。结果表明，在此实验条件下 8 个成分在相应质量浓度范围内线性关系良好。取“2.2 项”下的混合对照品溶液逐级稀释，按照“2. 1 项”下色谱条件进行测定，分别以信噪比（S/N）为 3 时相应的质量浓度作为检出限。详细结果见表 2。

表 2 8 个成分的线性关系与检出限信息

Tab. 2 Linear relationships, LODs of 12 chemical components

化合物名称	浓度范围（μg/mL）	回归方程	r	LOD（μg/mL）
升麻素苷	0.853-53.3429	y=28.11118x-14.07006	0.99968	0.0303
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.887-55.4526	y=54.33223x-32.50713	0.99958	0.0321
升麻素	0.999-62.4500	y=58.01897x-30.03340	0.99975	0.0168
5-O-甲基维斯阿米醇苷	0.921-57.7095	y=25.50499x-12.83675	0.99972	0.0235
亥茅酚苷	1.075-67.2000	y=20.88896x-15.68860	0.99961	0.0181
芒柄花素	0.964-55.8000	y=18.90121x-9.26168	0.99974	0.0119
白术内酯 III	0.371-37.1428	y=31.85857x-10.09473	0.99978	0.0102
苍术酮	0.517-51.7146	y=41.70006x-18.00683	0.99978	0.00714

2.4.2 精密度、稳定性、重复性考察

精密吸取“2.2 项”下混合对照品溶液 10 μL，重复进样 6 次，记录色谱峰峰面积，计算色谱峰面积 RSD%，结果表明表明仪器精密性良好。

平行制备 S10 样品供试品溶液 6 份，分别进样，依法测定，记录色谱峰面积，计算 8 个物质含量并计算 RSD%结果，结果表明该方法重复性良好。

取同 S10 供试品溶液，分别于 0，6，12，20，30，40，48h 进样，测定其含量结果，并计算 RSD%值，结果显示表明供试品在 48h 内稳定性良好。

2.4.3 加标回收率试验

依据样品生产工艺的差异，试验选择已知含量的 S5（颗粒）、 S10（滴丸）、S12（袋泡茶）样品，分别称取 9 份样品，分别加入混合对照品工作液 0.10、0.20、0.30mL 三水平浓度的标准品工作溶液（n=3），按上文中“2.3 项”下方法制备三水平浓度供试品溶液，计算加标回收率结果。结果表明该方法准确度良好。结果详见表 3。

表 3　8 个成分的精密度、重复性、稳定性及回收率试验结果

Tab.3 Precision, stability and repeatability of the established method and recoveries of 8 compounds

成分	精密度 RSD%	稳定性 RSD%	重复性 RSD%	平均回收率（RSD，n=9）		
				S5	S10	S12
升麻素苷	0.24	0.83	0.84	96.4%（1.64%）	97.3%（0.97%）	96.4%（2.43%）
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.59	0.92	0.36	95.2%（1.76%）	96.3%（1.32%）	97.2%（1.94%）
升麻素	0.54	0.87	0.72	94.4%（1.96%）	96.6%（1.99%）	95.2%（2.15%）
5-O-甲基维斯阿米醇苷	0.67	1.03	0.58	95.7%（2.07%）	95.8%（2.31%）	96.1%（1.58%）
亥茅酚苷	0.36	1.38	1.03	95.8%（2.14%）	95.3%（2.42%）	94.8%（2.54%）
芒柄花素	0.67	1.57	0.94	93.9%（2.06%）	95.3%（2.03%）	95.8%（2.41%）
白术内酯 III	1.06	0.93	0.85	93.4%（2.28%）	93.7%（2.11%）	96.5%（1.42%）
苍术酮	0.37	0.78	1.23	95.4%（2.18%）	95.6%（1.92%）	93.8%（2.70%）

2.5 相对校正因子 *f*（s/i）的建立

研究采用标准曲线相对斜率法以和浓度校正法。以 5-O-甲基维斯阿米醇苷为内参物，计算升麻素苷(a)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(b)、升麻素(c)、亥茅酚苷(d)、芒柄花素(e)、白术内酯 III(f)、苍术酮(g)7 个成分相对于 5-O-甲基维斯阿米醇苷(s)的相对校正因子。

2.5.1 相对校正因子的计算

斜率法：分别使用各成分标准曲线过原点的的线性斜率和不过原点的线性斜率，以 5-O-甲基维斯阿米醇苷(s)斜率/待测成分(i)的斜率计算各成分的校正因子。

浓度法（多点法）：精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液 2、5、10 μL，注入液相色谱仪中，连续进样 3 针，记录平均峰面积值。依据 QAMS 的相对校正因子计算公示，以 5-O-甲基维斯阿米醇苷为内参物，计算各组分的相对校正因子。

$$f_{s/i}=\frac{f_s}{f_i}=\frac{(\frac{W_s}{A_s})}{(\frac{W_i}{A_i})}=\frac{W_s\cdot A_i}{W_{si}\cdot A_s}$$

W 代表质量浓度，A 代表峰面积，s 代表内参物，i 代表其他待测物质

结果显示，通过原点的标准曲线斜率法、不通过原点的标准曲线斜率法以及浓度法三种方法计算出的校正因子结果值的 RSD%＜0.92%。考虑到目标物低浓度的覆盖的需求，研究选择通过原点的标准曲线线性斜率法计算出相对校正因子进行后续考察。

表 4 斜率法与浓度法建立的相对校正因子

Table 4 Relative correction factor calcnlated by slope method and concertration method

编号	成分名称	不过原点 线性斜率计算 f	过原点 线性斜率计算 f	浓度法 f	平均值	RSD%
1	升麻素苷(a)	0.999	1.009	1.021	1.01	0.89
2	毛蕊异黄酮葡萄糖苷(b)	1.923	1.925	1.954	1.93	0.73
3	升麻素(c)	2.138	2.147	2.17	2.15	0.63
4	亥茅酚苷(d)	0.825	0.822	0.812	0.826	0.68
5	芒柄花素(e)	0.704	0.708	0.715	0.709	0.65
6	白术内酯 III(f)	1.061	1.066	1.052	1.06	0.56
9	苍术酮(g)	1.417	1.425	1.448	1.43	0.92

2.6 相对校正因子 *f*（s/i）的耐用性评价

2.6.1 仪器和色谱柱对校正因子的影响

在 Agilent 1260、Shimadzu XR-20AD 和 Thermo Ultimate 3000 三种液相色谱系统考察 Zorbax C_{18}、Ecllpse Plus C_{18}、SunFire C_{18}、VP-ODS C_{18} 四根不同色谱柱对 *f* 的影响。选用不同型号高效液相色谱仪分别安装四种色谱柱，进样“2.1”项下混合对照品工作液 10 μL 测定 *f*（s/i）值。测量结果显示，各成分 *f*（s/i）的 RSD%均≤1.79%，表明仪器和色谱柱对所建立的 *f*（s/i）无影响。

表 5 不同仪器和色谱柱对校正因子的影响

Table 5 Relative correction factor of different instruments and different columns

仪器名称	色谱柱	*f(s/a)*	*f(s/b)*	*f(s/c)*	*f(s/d)*	*f(s/e)*	*f(s/f)*	*f(s/g)*
Aglient 1260	Zorbax SB C_{18}	1.009	1.954	2.17	0.812	0.715	1.052	1.448
	Ecllpse PlusC_{18}	1.012	1.903	2.292	0.826	0.723	1.174	1.464
	SunFire C_{18}	1.023	1.962	2.197	0.803	0.756	1.121	1.501
Shimadzu XR-20AD	Zorbax SB C_{18}	1.054	1.998	2.222	0.843	0.724	1.076	1.415
	Ecllpse PlusC_{18}	1.043	1.938	2.326	0.825	0.739	1.11	1.483
	SunFire C_{18}	1.013	2.015	2.215	0.798	0.725	1.121	1.497
Thermo Fisher U 3000	Zorbax SB C_{18}	1.075	2.113	2.356	0.843	0.731	1.164	1.510
	Ecllpse PlusC_{18}	1.068	2.036	2.384	0.845	0.752	1.124	1.423
	VP-ODS $_{C18}$	1.045	2.115	2.068	0.827	0.726	1.065	1.446
平均值		1.04	2.00	2.25	0.82	0.73	1.11	1.47
RSD%		2.26	3.50	4.22	1.99	1.79	3.54	2.23

2.6.2 色谱柱柱温对校正因子的影响

采用 Agilent 1260 高效液相色谱系统，使用 Zorbax C_{18} 色谱柱，在柱温为 25、30、35 和 40℃条件下考察柱温对校正因子的影响。测定结果如表 所示。此结果表明各成分 f（s/i）的 RSD%在 0.30%~3.25%，表明柱温对所建立的 f（s/i）无影响。

表 6 不同柱温对相对校正因子的的影响

Tab.6 Relative correction factor of different column temperatures

柱温（℃）	*f(s/a)*	*f(s/b)*	*f(s/c)*	*f(s/d)*	*f(s/e)*	*f(s/f)*	*f(s/g)*
25	1.021	1.954	2.175	0.812	0.715	1.052	1.448
30	1.028	1.946	2.325	0.796	0.723	1.087	1.503
35	1.031	1.962	2.224	0.824	0.706	1.032	1.461
40	1.027	1.958	2.132	0.805	0.731	1.086	1.435
平均值	1.03	1.96	2.21	0.81	0.72	1.06	1.46
RSD%	0.35	0.30	3.25	1.26	1.29	2.19	1.75

2.6.3 流速对校正因子的影响

采用 Agilent 1260 高效液相色谱系统，使用 Zorbax C_{18} 色谱柱，在 0.8、1.0、1.1、1.2 mL/min 流速条件下考察流速对校正因子的影响。测定结果显示，各成分 f（s/i）的 RSD%范围为 1.23-6.58%，表明体积流速对所建立的 f（s/i）无影响。

表 7 不同流速对相对校正因子的影响

Tab.7 Relative correction factor of different volume flow rates

体积流速（mL/min）	*f(s/a)*	*f(s/b)*	*f(s/c)*	*f(s/d)*	*f(s/e)*	*f(s/f)*	*f(s/g)*
0.8	1.063	1.889	2.34	0.751	0.666	1.188	1.543
1.0	1.021	1.954	2.175	0.812	0.715	1.052	1.448
1.1	1.054	1.913	2.424	0.756	0.714	1.126	1.552
1.2	1.136	1.925	2.246	0.832	0.752	0.999	1.392
平均值	1.07	1.92	2.30	0.79	0.71	1.09	1.48
RSD%	3.93	1.22	4.10	4.45	4.29	6.58	4.50

2.6.4 检测波长对校正因子的影响

研究使用 DAD 检测器对混合对照品溶液和玉屏风剂供试品进行全波长扫描的结果显示：白术内酯 III、苍术酮仅在 220 nm 处有最大吸收，其余化合物在 220 nm、254 nm、300 nm 条件下均有较强吸收，因此不考察白术内酯 III、苍术酮的 f（s/i）波长条件影响。实验考察了其余 6 个目标物在最大吸收波长条件下 f（s/i）的差异，毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素 2 个成分受波长影响大，在 254mn 波长条件下差异明显（SD＞10%）。

表 8 不同波长对校正因子的影响

Tab.8 Relative correction factor of different detection wavelengths

检测波（nm）	*f(s/a)*	*f(s/b)*	*f(s/c)*	*f(s/d)*	*f(s/e)*
220	1.021	1.924	2.175	0.812	0.715
254	1.105	1.597	2.412	0.821	0.731
300	1.072	1.872	2.169	0.834	0.711
SD%	4.23	17.57	13.86	1.11	1.06

2.7 待测组分色谱峰的定位

色谱峰的准确定位是一测多评应用的前提[17]，多采取保留时间差或者相对保留时间等参数定位。试验比较了不同色谱柱在不同仪器系统上的保留时间情况。结果显示，保留时间差法的波动幅度大，尤其是应用在本实验的大幅度变化洗脱程序时。研究最终选择相对保留值法 t(s/i）定位。

表 9 不同仪器和色谱柱测定玉屏风系类制剂中 8 个成分的 t(s/i）

Tab.9 Relative retention walues measured in different instruments and different columns

仪器名称	色谱柱	*f(s/a)*	*f(s/b)*	*f(s/c)*	*f(s/d)*	*f(s/e)*	*f(s/f)*	*f(s/g)*
Aglient 1260	Zorbax SB C_{18}	1.298	1.13	1.047	0.745	0.59	0.533	0.402
	EcllpsePlusC_{18}	1.351	1.21	1.062	0.762	0.546	0.528	0.388
	SunFire C_{18}	1.299	1.215	1.038	0.758	0.546	0.511	0.376
Shimadzu XR-20AD	Zorbax SB C_{18}	1.362	1.153	1.052	0.715	0.555	0.494	0.363
	EcllpsePlusC_{18}	1.298	1.095	1.004	0.706	0.537	0.492	0.375
	SunFire C_{18}	1.225	1.187	1.041	0.743	0.543	0.498	0.371
Thermo Fisher U 3000	Zorbax SB C_{18}	1.302	1.246	1.113	0.786	0.601	0.543	0.395
	EcllpsePlusC_{18}	1.215	1.195	1.033	0.768	0.592	0.526	0.401
	VP-ODS C_{18}	1.152	1.264	1.087	0.772	0.562	0.531	0.396
平均值		1.27	1.19	1.05	0.75	0.56	0.52	0.39
RSD%		4.83	4.31	2.84	3.31	4.07	3.46	3.50

2.8 QAMS 与外标法（EMS）测定的比较

为验证所建立的 QAMS 法的准确性及可行性，本研究运用外标法（EMS）和 HPLC-QAMS 法分别测定并计算 8 个成分的含量，比较 2 种方法检测结果的差异。各批次样品测定 2 次，取平均值。结果显示 2 种方法结果 RSD%结果＜5%，表明 HPLC-QAMS 法结果准确，可以替代 EMS 法用于玉屏风系列制剂中 8 个目标物的测定。

表 10 EMS 与 QAMS 测定玉屏风系列制剂中 8 个成分的含量比较（mg/g）

Tab.9 Comparison on content of 8 components determined by ESM and QAMS in YPFSP （mg/g）

编号	升麻素苷(a)			毛蕊异黄酮葡萄糖苷(b)			升麻素(c)			5-O-甲基维斯阿米醇苷(s)			亥茅酚苷(d)			芒柄花素(e)			白术内酯 III(f)			苍术酮(g)		
	EMS	QAMS	RSD%	EMS	QAMS	RSD%	EMS	QAMS	RSD%	EMS	QAMS	RSD%	EMS	QAMS	RSD%	EMS	QAMS	RSD%	EMS	QAMS	RSD%	EMS	QAMS	RSD%
S1	0.156	0.162	3.4	0.213	0.225	1.0	0.029	0.031	4.6	0.051	0.055	3.2	0.029	0.031	0.7	0.031	0.032	4.1	0.016	0.016	3.6	/	/	/
S2	0.061	0.069	2.2	0.279	0.292	1.0	0.028	0.027	3.5	0.033	0.034	2.8	/	/	/	0.025	0.027	2.1	0.016	0.016	2.6	0.007	0.006	3.7
S3	0.364	0.368	3.2	0.428	0.433	3.2	0.034	0.036	4.2	0.318	0.320	3.6	0.023	0.025	1.2	0.014	0.019	4.8	0.025	0.026	4.2	0.006	0.006	3.9
S4	0.106	0.112	3.0	0.175	0.172	2.9	0.035	0.035	1.3	0.108	0.112	1.8	0.017	0.021	1.9	0.023	0.024	3.5	0.089	0.092	2.7	/	/	/
S5	0.169	0.172	4.6	0.213	0.222	2.0	0.773	0.792	1.1	0.148	0.156	2.2	0.448	0.454	2.5	0.143	0.146	3.1	0.005	0.060	3.6	0.091	0.095	4.0
S6	0.123	0.128	3.6	0.167	0.174	1.9	0.552	0.564	0.9	0.118	0.122	3.4	0.459	0.481	3.2	0.116	0.121	3.8	0.090	0.009	4.0	0.105	0.108	3.4
S7	0.481	0.474	4.3	0.135	0.144	1.3	0.406	0.412	2.5	0.085	0.092	1.6	0.105	0.114	2.7	0.078	0.076	4.1	0.029	0.024	3.9	0.153	0.149	2.8
S8	0.199	0.090	1.4	0.141	0.135	3.3	0.132	0.121	3.9	0.282	0.276	4.3	0.445	0.428	3.6	0.360	0.351	3.5	0.139	0.129	3.1	0.094	0.098	3.9
S9	0.234	0.215	2.7	0.135	0.128	4.2	0.169	0.158	4.5	0.330	0.299	3.4	0.551	0.542	3.1	0.403	0.401	2.8	0.069	0.072	2.6	0.103	0.095	3.4
S10	0.253	0.233	2.0	0.096	0.093	3.6	0.206	0.212	3.9	0.378	0.387	1.9	0.433	0.426	2.8	0.175	0.178	3.2	0.002	0.002	1.6	0.079	0.082	4.3
S11	0.449	0.458	2.1	0.284	0.273	4.2	0.220	0.208	3.2	0.490	0.482	4.8	0.109	0.114	4.1	0.747	0.774	4.1	0.256	0.024	3.1	0.112	0.106	3.5
S12	0.709	0.698	3.1	0.553	0.549	1.8	0.087	0.092	4.1	0.102	0.098	3.8	0.300	0.315	2.8	0.159	0.163	2.8	0.135	0.137	2.4	0.875	0.868	1.2
S13	0.372	0.373	4.6	0.335	0.354	3.9	0.259	0.242	4.8	0.531	0.512	2.6	0.071	0.078	4.6	0.420	0.384	3.9	0.089	0.102	4.2	0.125	0.123	3.7
S14	0.495	0.450	4.5	0.477	0.447	4.6	0.225	0.226	0.4	0.671	0.682	1.1	0.068	0.073	5.0	0.456	0.461	0.8	0.043	0.051	3.3	0.258	0.221	5.0
S15	0.445	0.422	3.8	0.455	0.438	2.8	0.226	0.236	3.1	0.644	0.679	3.8	0.065	0.063	2.2	0.506	0.489	2.4	0.043	0.053	5.6	0.241	0.234	4.2
S16	0.465	0.433	4.9	0.435	0.432	0.5	0.197	0.203	2.1	0.649	0.673	2.5	0.069	0.071	2.0	0.432	0.422	1.7	0.045	0.048	4.5	0.230	0.244	5.8
S17	0.328	0.334	1.4	0.385	0.399	2.5	0.274	0.287	3.2	0.504	0.505	0.2	0.061	0.064	3.4	0.379	0.394	2.7	0.049	0.052	1.1	0.177	0.123	4.0
S18	0.501	0.486	2.1	0.445	0.429	2.6	0.196	0.200	1.4	0.573	0.598	3.0	0.071	0.073	2.0	0.483	0.492	1.3	0.046	0.050	3.5	0.407	0.391	2.3

2.9 聚类模式分析

实验选择 18 批样品中 8 目标物的含量为变量，采用 SPSS 22.0 软件，采用组间联系法，以平方 Euclidean 距离为测度进行聚类分析，结果见图 2。结果显示：类间距为 5，不同剂型均被区别开，且袋泡茶（S12）与其他样品差异最大；类间距为在 15 时间，丸剂与胶囊聚为一类，口服液、颗粒剂、滴丸剂聚为一类，袋泡茶单独为一类。样品的聚类结果与各剂型加工工艺差别反映结果一致。

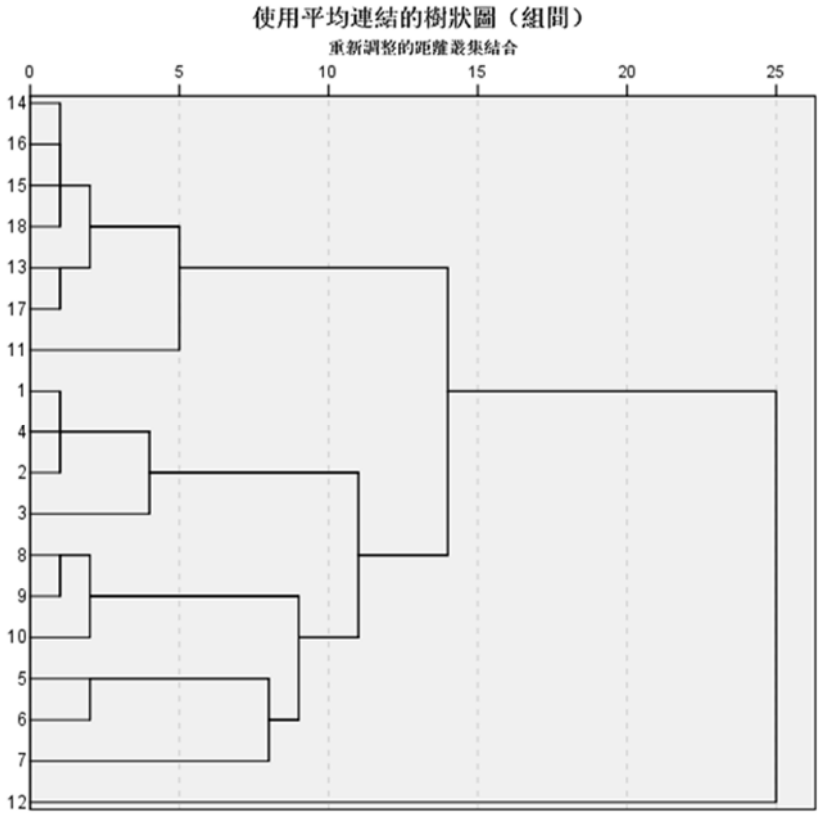


图 2 18 批样品的聚类分析结果树状图

Fig. 2 Dendrogram of 18 batches of samples

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

基于前期研究基础，本研究进一步对一测多评方法方法进行优化。笔者前期研究中测定制剂中 12 个目标物[15,16]，但应用于 QAMS 方法时，毛蕊异黄酮和槲皮素两个物质在不同色谱柱上出峰时间和顺序差异大；白术内酯 II 仅在 275nm 条件下有吸收，需要配合不同的色谱柱和液相条件修改波长切换时间，通用性差；白术内酯 I 含量极低，其相对校正因子且受色谱柱、流速、柱温影响大，因此以上 4 个物质不纳入本研究的目标化合物之中。研究目标物剂型差异大，梯度洗脱程序的流动相极性变化对保留时间影响大。经过前期对不同色谱柱的探索，试验最终确定 Zorbax C18 柱（4.6 mm × 150 mm，5 μm）、Ecllpse Plus C18 柱（4.6 mm × 150 mm，5 μm）、Sunfire C18（4.6 mm × 250 mm，5 μm）用于一侧多评方法的建立。Ecllpse Plus C18 柱可以很好的将亥茅酚苷、芒柄花素与前后的干扰峰分离。试验选择 Agilent 1260 高效液相色谱优化过的方法进行方法学考察。其次，为增加本研究方法的通用性，相较于前期的波长切换方法，本研究将波长条件简化为 220mn，降低了波长变化对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素校正因子的影响。

3.2 内参物的选择

5-O-甲基维斯阿米醇苷为内参物在制剂中含量适中，色谱信息稳定，价廉且以获得，且出分时间在色谱分

析时间的中间部位，可以减少计算相对保留时间时的系统误差，结合 DAD 光谱图辅助鉴别，可以准确的对其他目标物进行定位，因此选定其为为内参物。QAMS 方法的应用减低了多对照品配置过程中人为操作增加的准确度不确定性，同时省去多对照品储备液存储的环节，增加结果的准确性。如，苍术酮对照品常温下极不稳定，见光自身易氧化[23]，对配置和储存的要求高，加大了实验难度；市售芒柄花素对照品价格差异大且价格昂贵，增加了检验成本。

3.3 质量差异的评价

含量测定结果显示，不同剂型间 8 个化合物含量差异明显，相同剂型间可明显看出不同生产厂家的差异。颗粒和滴丸中，药材归属为黄芪的亥茅酚苷含量明显高于其他剂型；颗粒剂中，药材归属为防风的升麻素含量明显高于其他剂型；袋泡茶中苍术酮含量异常的高于其他剂型。结合聚类分析树状图推测引起差异的原因可能是工艺差异所致。

玉屏风剂加工工艺差异明显：丸剂为药材细粉直接水泛丸；袋泡茶“水提”黄芪、防风药材，提取液浓缩后直接加入白术（炒）生粉；颗粒、胶囊、滴丸、口服液均采用“水提醇沉” 处理黄芪和白术（炒）药材，将提取液浓缩后加防风挥发油成分，但胶囊剂在加入防风挥发油成分后有“密闭 2h”的技术要求。其次，比较工艺指标参数差异。各剂型主要差异集中在“水提”液的浓缩和“醇沉”中醇含量工艺上。胶囊剂、滴丸剂对于“水提”液的浓缩有明确的密度范围要求。颗粒、胶囊、滴丸剂、口服液均有“醇沉”步骤，除口服液外，上述各剂型对乙醇加入量均有明确要求，且对清膏的密度做明确要求，口服液仅有 “适量”的参数描述。生产过程的参数控制差异，导致不同厂家及批次间的质量一致性难以保证，口服液剂问题尤为突出。推测“醇沉”工艺是影响口服液样品间质量一致性差异的重要因素，且“水提醇沉”操作对于白术（炒）中指标成分影响大。

综上，本研究建立的 QAMS 法在测定玉屏风剂中的升麻素苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素、亥茅酚苷、芒柄花素、白术内酯 III、苍术酮、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量时，具有良好的重现性、稳定性及准确定，研究建立的方法具有可行性。多指标物质同时测定可以更加准确全面的评价玉屏风剂的内在质量差异，深刻挖掘引起质量差异的因素。本研究结果为玉屏风剂的质量标准完善和质量控制提升提供较好的参考价值。

参考文献

[1] 中国药典.一部[S].2020 版.

[2] 赵子申, 高雅丽, 刘文芳, 等. 玉屏风散现代药理学研究及皮肤科研究进展[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2018,17(02):187-189.

[3] 马凯, 刘颖, 康素刚, 等. 玉屏风散制剂的药学实验及临床应用进展研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2020,29(05): 565-570.

[4] 吴孝政, 黄高, 刘杨, 等. 玉屏风散对肺气虚证大鼠 JAK1/STAT3 通路及炎性反应的影响及相关机制研究[J]. 中华中医药学刊,2022-09-14.

[5] 黄纡寰, 胡小花, 曾晶晶, 等. 玉屏风散联合右归丸加减对肺肾两虚型 COPD 缓解期患者的疗效分析[J]. 中国药房, 2022,33(19): 2384-2387.

[6] 余何, 张伟明, 饶琪, 等. 玉屏风颗粒抑制肥大细胞及白细胞介素 31 缓解特应性皮炎大鼠的瘙痒症状[J].中药新药与临床药理,2022,33(08): 1017-1024.

[7] 钟欣欣, 王金华, 查旭山. 基于网络药理学研究玉屏风散治疗慢性湿疹的作用机制[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2022,21(04):304-310.

[8] 颜诗帆, 祝益民, 余婷,等. 基于网络药理学和分子对接研究玉屏风散对慢性肾小球肾炎的作用机制[J]. 时珍国医国药, 2022,33(05):1270-1275.

[9] 张利丹, 吕健, 谢雁鸣, 等. 玉屏风颗粒治疗反复呼吸道感染的有效性和安全性系统评价与 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2019,44(20): 4379-4389.

[10] 孙萌, 张金华, 张颜, 等. 防风色原酮类对照提取物在玉屏风颗粒含量测定中的应用[J].中国药学杂志, 2022,57(15): 1287-1292.

[11] 胥爱丽, 钟惠娴, 杨小龙, 等. UPLC-MS-MS 法同时测定玉屏风颗粒中 6 种皂苷类成分[J]. 广东药科大学学报, 2020,36(06):791-796.
[12] 廖小芳, 毕晓黎, 胥爱丽,等. 玉屏风颗粒 UPLC 指纹图谱建立和同时测定 8 种成分含量[J]. 中药材, 2019,42(02):348-352.
[13] 王丽. 高效液相色谱法测定玉屏风颗粒中黄芪甲苷含量[J].天津药学, 2018,30(03): 20-21.
[14] 吴拾保, 邓渝, 袁铭铭, 等. 玉屏风口服液 1 个异黄酮类及 3 个色原酮类成分的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2016,36(12): 2221-2225.
[15]岳超,徐普,刘柱,施贝,张文婷,王峰.HPLC 法同时测定玉屏风口服液中 12 种成分及质量一致性评价[J].中成药,2022,44(11):3434-3439.
[16]岳超,徐普,张文婷,赵超群,陶瑞,和肖营,赵竟凯,王峰.基于 HPLC 指纹图谱和多指标成分含量测定及化学模式分析的玉屏风丸的质量评价[J].药物分析杂志,2022,42(11):2019-2028.
[17]王智民,高慧敏,付雪涛,王维皓.“一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J].中国中药杂志,2006,(23):1925-1928.
[18]孙涵珠,杨琬卿,刘嘉灏等.基于一测多评与化学计量分析的滇重楼及其近缘种质量评价方法[J/OL].中华中医药学刊:1-19[2023-07-29].http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20230728.1106.002.html
[19]何天雨,梅茜,王晓丽等.基于一测多评法含量测定及薄层鉴别的经典名方竹茹汤颗粒剂的质量评价研究[J].中草药,2023,54(14):4511-4519.
[20] 占慧慧, 黄丹, 邓丹等. 基于一测多评策略的茯苓不同部位三萜酸分析研究[J]. 药物分析杂志,2023,43(06):1061-1074.DOI:10.16155/j.0254-1793.2023.06.18.
[21]王康,刘培,王思凡等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS、网络药理学和“双外标”一测多评法的复方车前片质量评价研究[J/OL].中国中药杂志:1-12[2023-07-29].DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20230605.302.
[22]郝延军,桑育黎,李宝林等.苍术酮的常温稳定性研究[J].中成药,2007(06):895-896.
[23]郝延军,桑育黎,李宝林等.苍术酮的常温稳定性研究[J].中成药, 2007(06): 895-896.

主动靶向脂质体在结直肠癌基因与免疫治疗中的研究进展

张婵[1]，王平[2]，魏敏杰[1]，李振华[1*]

（1.中国医科大学药学院药理教研室，辽宁 沈阳 110122；2.中国医科大学附属第四医院泌尿外科，辽宁 沈阳 110032）

【摘要】结直肠癌（Colorectal cancer，CRC）是世界上第三大致死的恶性肿瘤，采用传统方法治疗的结肠癌晚期病人的 5 年生存率还是相当低。由于传统药物递送系统限制了基因、免疫治疗药物的临床应用。对肿瘤微环境（TME）的深入研究，为 CRC 提供了许多新治疗策略。基于 TME 特征而精密设计的脂质体纳米主动靶向递送系统将基因、免疫治疗药物传递到特定的靶向部位，可以消除 TME 的免疫抑制，从而提高肿瘤免疫治疗的效果。此外，利用基因工程对免疫效应细胞进行基因修饰可增强宿主对肿瘤的免疫应答,达到抑制肿瘤的效果,表明免疫学和基因技术结合,是目前肿瘤免疫治疗发展的重要方向。本文讨论了基于脂质体主动靶向的基因治疗和免疫治疗在 CRC 中的应用，对其体内毒性进行了概述，并分析了肿瘤干细胞等研究的潜在应用，为未来 CRC 的治疗研究提供了新的方向。

【关键词】结直肠癌；脂质体；递药系统；脂质体毒性；免疫治疗

头孢克洛原料中聚合物杂质研究

张丹丹，刘文坤，赵海云，王松，陈德俊*

（山东省食品药品检验研究院，国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，山东省仿制药一致性评价工程技术研究中心，产业技术基础公共服务平台，济南 250101）

【摘要】目的：对头孢克洛原料中聚合物杂质的结构进行初步鉴定。**方法：**以 0.05mol·L^{-1} 磷酸盐缓冲液（pH 8.0）为溶剂，室温放置 4 天，制备聚合物降解溶液；采用 HPSEC 法对聚合物降解溶液中各杂质进行分离，结合二维液相脱盐技术、柱切换-LC/MS^n 技术，根据各杂质一级、二级精确质量信息及聚合机制，初步鉴定主峰前各杂质结构。**结果：**初步解析出头孢克洛原料聚合物降解溶液中 9 个杂质结构，且均属于聚合物杂质。**结论：**聚合物降解溶液可作为头孢克洛原料及制剂中聚合物杂质研究分析用系统适用性溶液。本研究中推测的聚合物杂质结构对头孢克洛原料及其制剂的杂质谱研究及质量控制有重要参考意义。

【关键词】头孢克洛；聚合物杂质；化学结构；柱切换-LC/MS^n；二维液相色谱

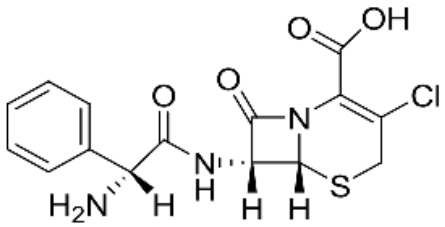
Structure identification of polymer impurities in cefaclor raw materials

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To identify the structure of polymer impurities in cefaclor raw materials. **METHODS：**The polymer degradation solution was prepared with 0.05mol·L^{-1} phosphate buffer (pH8.0) at room temperature for 4 days. The impurities in the polymer degradation solution were separated by HPSEC method, and the structure of the impurities before the main peak was identified according to the primary and secondary precise mass information of the impurities and the polymerization mechanism, combined with two-dimensional liquid desalination technology and column switching LC/MS^n technology. **RESULTS：**9 polymer impurity structures in the polymer degradation solution of cefaclor raw materials were preliminary elucidated, and all of them belongs to polymer impurity. **CONCLUSION：**The polymer degradation solution can be used as suitable solution for the study and analysis of polymer impurities in cefaclor raw materials. The predicted polymer impurity structures in this study have important reference significance for impurity profile study and quality control of cefaclor raw materials and its preparations.

【KEY WORDS】cefaclor; polymer impurities; chemical structure; column switch-LC/MS^n; 2D-HPLC

β-内酰胺类抗生素是临床广泛使用的抗菌类药物，此类药物在其原料与制剂的生产、运输、存储过程中易累积聚合物杂质[1]。聚合物杂质容易引发过敏反应甚至过敏性休克反应，但却是 β-内酰胺类抗生素杂质谱控制中的薄弱环节。随着分析技术的进步，对 β-内酰胺类抗生素中聚合物的认知也不断深入[1,2]。

头孢克洛（cefaclor）为第二代半合成头孢菌素类抗生素，最早由美国礼来制药公司研制成功。其作用机制是通过与细菌细胞内的青霉素结合蛋白相结合，进而抑制细菌细胞壁的合成，临床适用于敏感菌所致泌尿系统、呼吸系统、皮肤软组织感染等[3]。头孢克洛化学结构式见图 1，其 C7 位侧链上有自由氨基，易于与另一分子 β-内酰胺环聚合，从而生成头孢克洛聚合物杂质。



分子式：$C_{15}H_{14}ClN_3O_6S$ 分子量：367.04

图 1 头孢克洛化学结构式

Fig. 1 Chemical structure formula of cefaclor

目前，国内外药典对头孢克洛中的聚合物杂质均未予以控制。虽有文献采用 Sephadex G-10 凝胶色谱柱[4]及 TSKgel G2000SWxl 色谱柱法[5,6]对头孢克洛制剂中聚合杂质进行测定，但是对头孢克洛聚合物杂质的结构研究却鲜有报道。本文采用二维液相色谱法结合柱切换-LC/MS^n 法对头孢克洛原料中聚合物杂质进行分析，结合头孢克洛结构性质、杂质的质谱信息及聚合机制，推测聚合物杂质结构。

1 材料与方法

1.1 仪器

MS105DU 型电子天平，Thermo Q-Exactive plus 二维高效液相色谱-质谱联用仪（配有双三元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、变色龙软件、Q-Exactive plus 质谱检测器、Mass frontier7.0 软件）。

1.2 样品与试剂

头孢克洛原料药（生产厂家：Lupin Laboratories Limited）；磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠（分析纯；国药集团化学试剂公司）；磷酸（分析纯；天津科密欧化学试剂有限公司）；乙酸铵、乙腈（色谱纯；Fisher Scientific）；去离子水为屈臣氏瓶装纯净水。

1.3 高效凝胶排阻色谱（HPSEC）方法

色谱柱：TSK-gel G2000 SWxl（填料：球状亲水硅胶，300*7.8mm，5μm）；流动相：磷酸盐缓冲液[0.005mol/L 磷酸氢二钠溶液-0.005mol/L 磷酸二氢钠溶液(61: 39)]- 乙腈(94 : 6)；检测器：263nm；流速：0.5ml/min；柱温：25℃；进样体积：20μl；用于 HPSEC 法分离头孢克洛中聚合物杂质。

1.4 柱切换-LC-MS 法一维色谱系统

方法同 1.3 高效凝胶排阻色谱（HPSEC）方法，进样体积增加至 40μl。

1.5 柱切换-LC-MS 法二维色谱系统

色谱柱：Thermo Hypersil GOLD（C18，2.1*150mm，5μm）；流动相 A：5mmol/L 醋酸铵溶液，流动相 B：乙腈，梯度洗脱：0～ (t+6) min (t 为目标杂质在一维色谱系统的保留时间)，5%B（对目标杂质进行脱盐处理）；(t+6)→ (t+21) min，5%~95%B；(t+21)→ (t+26)min，95%B；(t+22)→ (t+27)min，5%B。切换阀：六通阀；切换用定量环体积：500μl。用于对一维色谱系统分离的聚合物杂质进行脱盐处理及质谱定性研究。

1.6 质谱条件

离子源：HESI；扫描电压：3.8kV；毛细管温度: 320℃；鞘气流速：40ml/min；辅助气流速：10ml/min；一级质谱方法：正离子模式，分辨率 70000，扫描范围 m/z 100～1500；二级质谱方法：分辨率 17500，NCE：10, 20, 30。

1.7 聚合物降解溶液配制

0.05mol/L 磷酸盐缓冲液（pH8.0）：0.05mol/L 磷酸氢二钠溶液-0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液（61:39），并用 1mol/L 的氢氧化钠试液调节 pH 值至 8.0。

聚合物降解溶液：精密称取头孢克洛原料约 140mg，置 10ml 量瓶中，加 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液（pH8.0）制成约含头孢克洛 14mg/ml 的溶液。室温条件下避光放置 4 天，滤过，精密量取续滤液 1ml，加水 10ml，摇匀。

2 结果

2.1 HPSEC 法分析头孢克洛原料中聚合物杂质

本研究参照中国药典 2020 年版头孢地嗪钠[7]有关物质 II 检查项以及文献资料[5]，对色谱条件进行优化，建立了 HPSEC 法，见 1.3 项下。以聚合物降解溶液为供试品溶液进行分析，在头孢克洛主峰之前分离出 6 个弱保留值杂质，即杂质 1-6，见图 2.

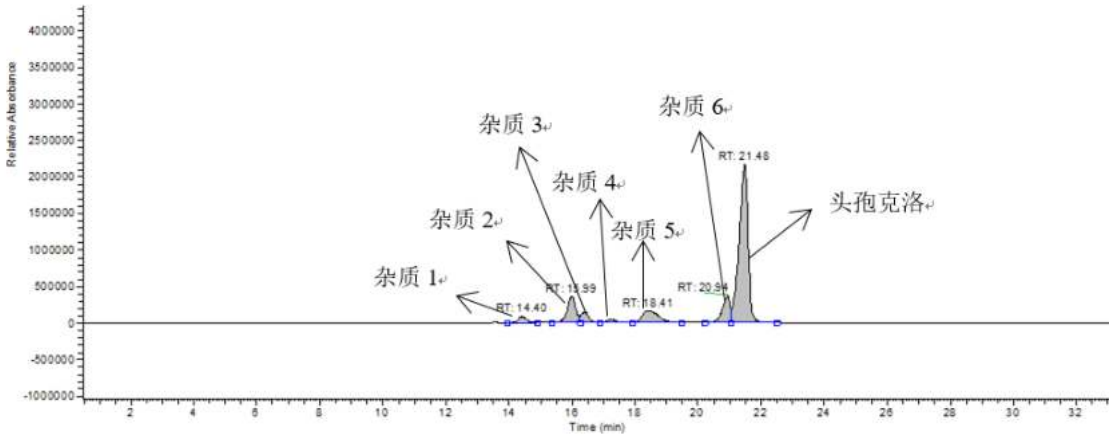


图 2 聚合物降解溶液的典型 UV 图谱（检测波长：263nm）

Fig. 2 Typical UV spectrum of polymer degradation solution (detection wavelength: 263nm)

2.2 柱切换-LC/MS 法鉴别头孢克洛聚合物的化学结构

采用在线柱切换-LC/MS 法将杂质 1-6 分别切入至定量环中，采用 1.5 项下分析方法，经脱盐处理后，输送至质谱中各组分的结构。

2.2.1 杂质 1 将杂质 1 经柱切换进入质谱后分析检出杂质 1-a（图 3）。

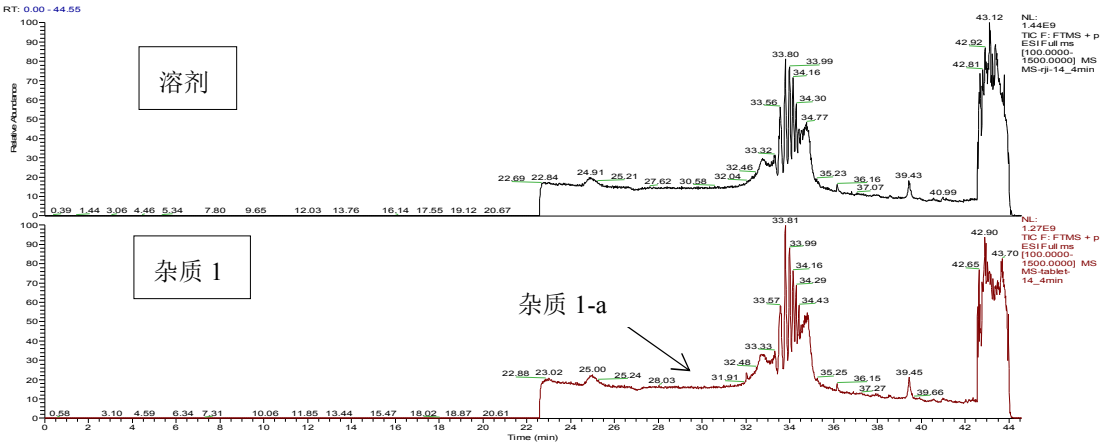


图 3 杂质 1 以及溶剂的质谱总离子流图

Fig. 3 Total ions chromatogram of impurity 1 and solvent

在杂质 1-a 的全扫描一级质谱图（图 4）中存在 *m/z*1030.17（z=1）、*m/z*1052.15（z=1）的准分子离子峰，分别为$[M+H]^+$、$[M+Na]^+$峰，因此推测杂质 1-a 的分子量为 1029Da。1032 峰、1034 峰为 1030 峰的氯同位素峰, 1030 峰、1032 峰、1034 峰丰度比为 9：6：1，表示分子内含 2 个氯原子，推测其结构如图 7 所示，属于聚合物杂质。

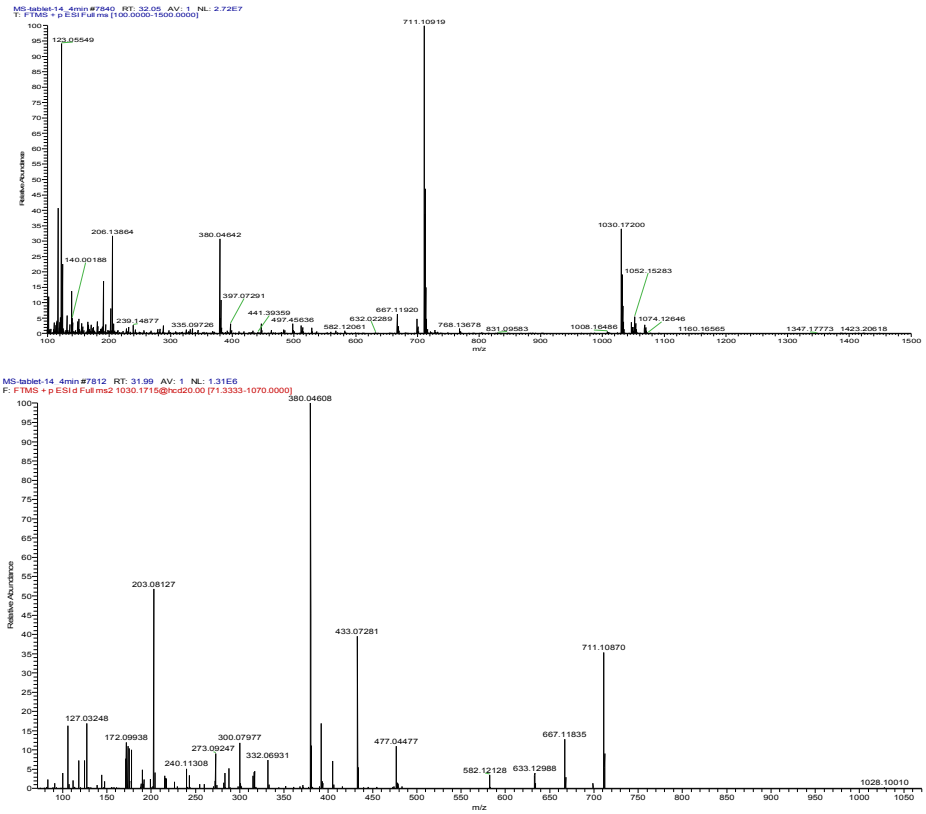


图 4 杂质 1-a 的典型质谱图

Fig. 4 Typical mass spectra of impurity 1-a

2.2.2 杂质 2 将杂质 1 经柱切换进入质谱后分析检出杂质 2-a（图 5）。

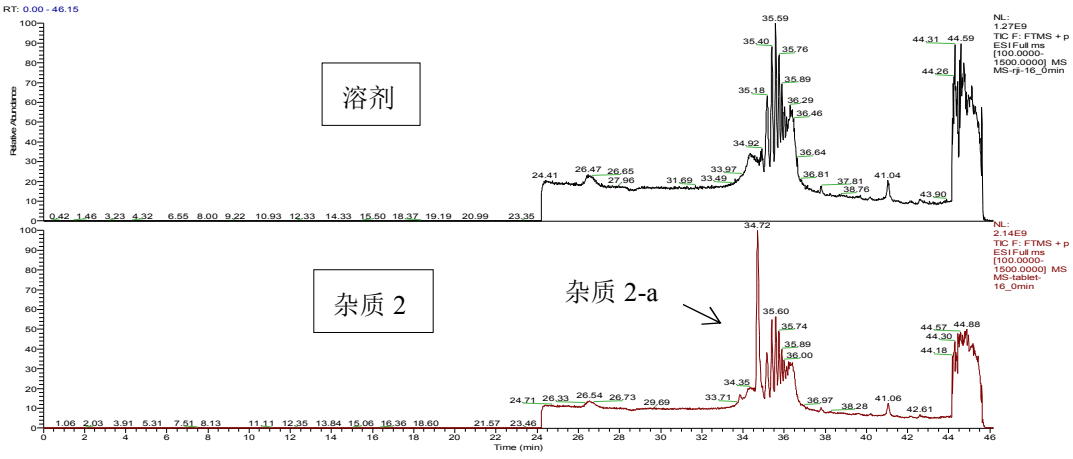


图 5 杂质 2 以及溶剂的质谱 TIC 图

Fig. 5 Total ions chromatogram of impurity 2 and solvent

在杂质 2-a 的全扫描一级质谱图（图 6）中存在 *m/z*1397.2（z=1）、*m/z*699.1（z=2）的准分子离子峰，为$[M+H]^+$、$[M+2H]^{++}$峰，因此推测杂质 2-a 的分子量为 1396Da。推测其结构如图 7 所示，属于聚合物杂质。

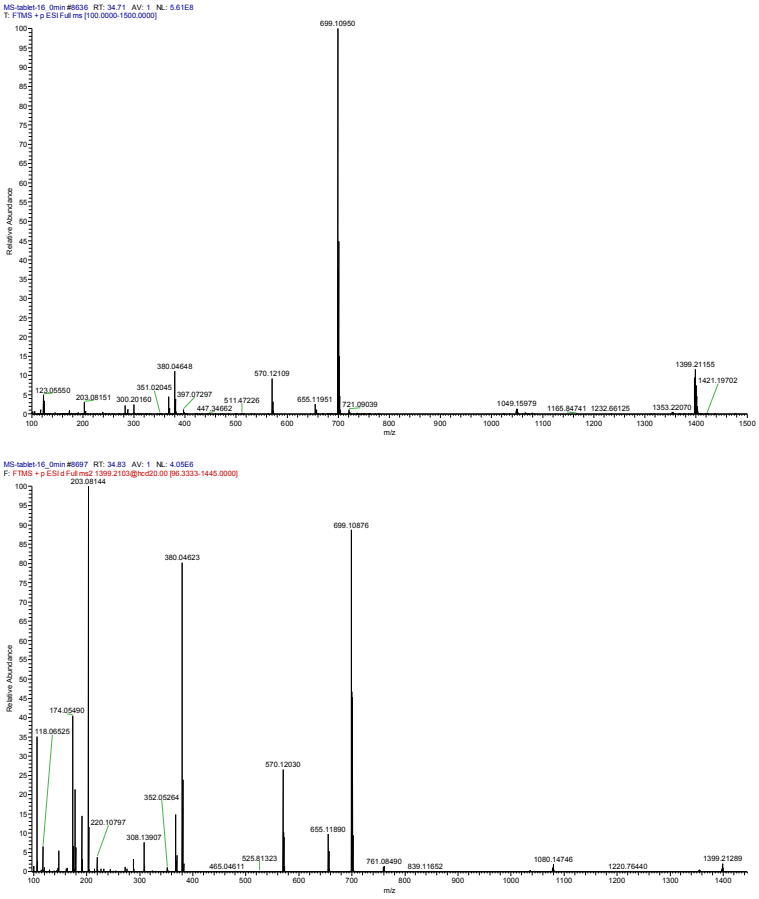
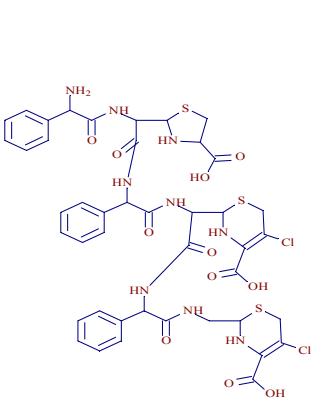
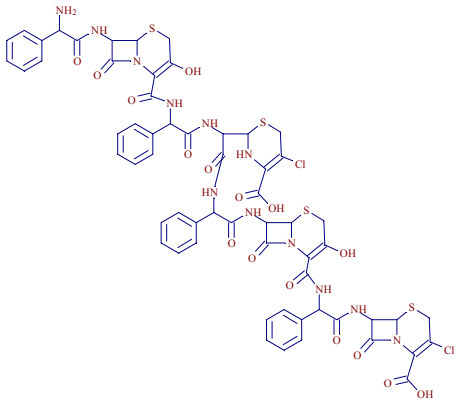


图 6 杂质 2-a 的典型质谱图

Fig. 6 Typical mass spectra of impurity 2-a



分子式：$C_{43}H_{45}Cl_2N_9O_{11}S_3$ Mr：1029.2



分子式：$C_{60}H_{54}Cl_2N_{12}O_{16}S_4$ Mr：1396.2

图 7 杂质 1-a、杂质 2-a 的推测化学结构

Fig. 7 Speculated chemical structure of impurity 1-a and impurity 2-a

2.2.3 杂质 3

将杂质 3 经柱切换进入质谱后分析检出杂质 3-a（图 8）。

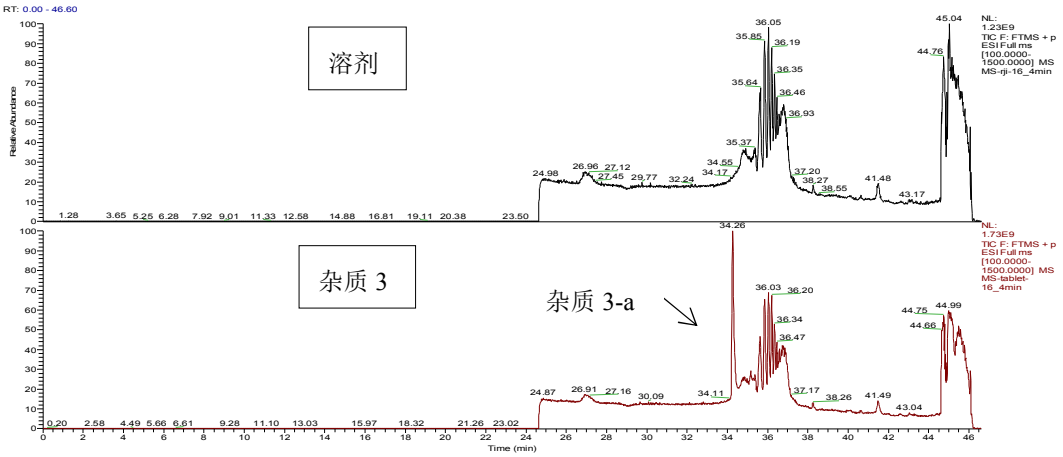


图 8 杂质 3 以及溶剂的质谱 TIC 图

Fig. 8 Total ions chromatogram of impurity 3 and solvent

在杂质 3-a 的全扫描一级质谱图（图 9）中存在 *m/z*935.1（z=1）、*m/z*468.1（z=2）的准分子离子峰，为$[M+H]^{+}$、$[M+2H]^{++}$峰，因此推测杂质 3-a 的分子量为 934Da。推测其结构如图 10 所示，属于聚合物杂质。

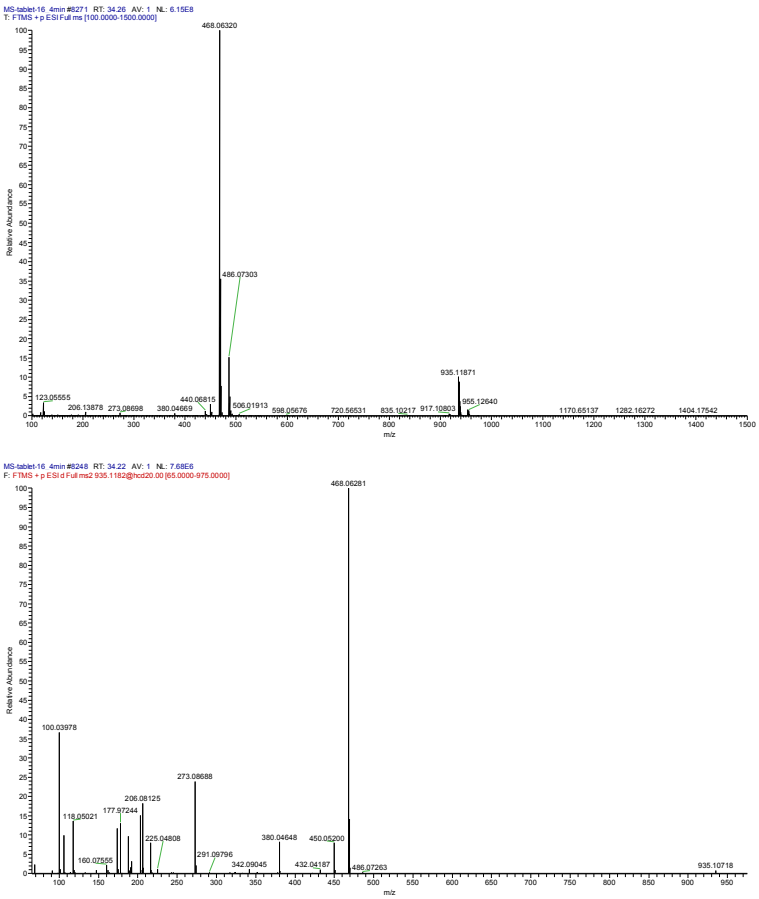
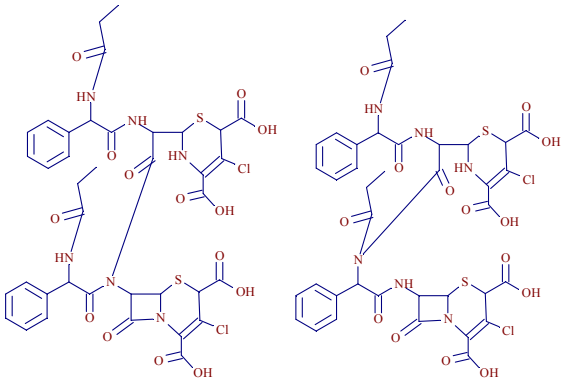


图 9 杂质 3-a 的典型质谱图

Fig. 9 Typical mass spectra of impurity 3-a



分子式：$C_{38}H_{36}Cl_2N_6O_{14}S_2$　Mr：934.1

图 10　杂质 3-a 的推测化学结构

Fig. 10 Speculated chemical structure of impurity 3-a

2.2.4　柱切换-LC/MS 法分析杂质 4

将杂质 4 经柱切换进入质谱后分析检出杂质 4-a（图 11）。

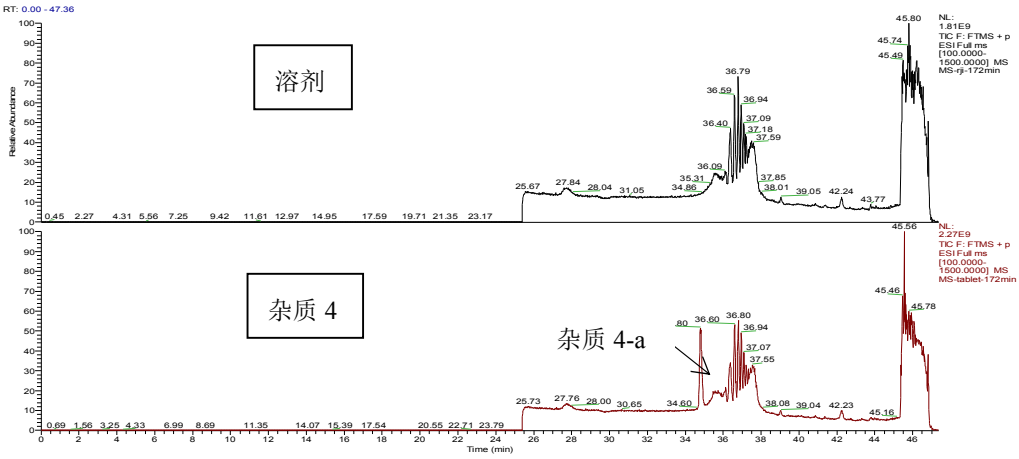


图 11　杂质 4 以及溶剂的质谱 TIC 图

Fig. 11 Total ions chromatogram of impurity 4 and solvent

在杂质 3-a 的全扫描一级质谱图（图 12）中存在 *m/z*879.1（z=1）、*m/z*440.1（z=2）的准分子离子峰，为$[M+H]^+$、$[M+2H]^{++}$峰，因此推测杂质 4-a 的分子量为 878Da。推测其结构如图 13 所示，属于聚合物杂质。

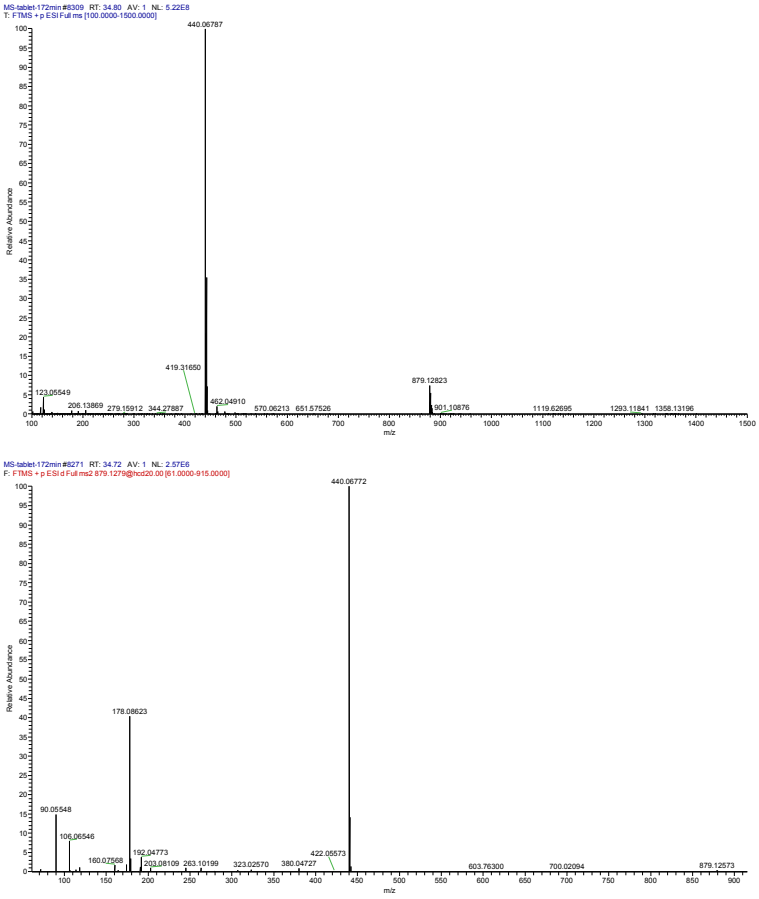
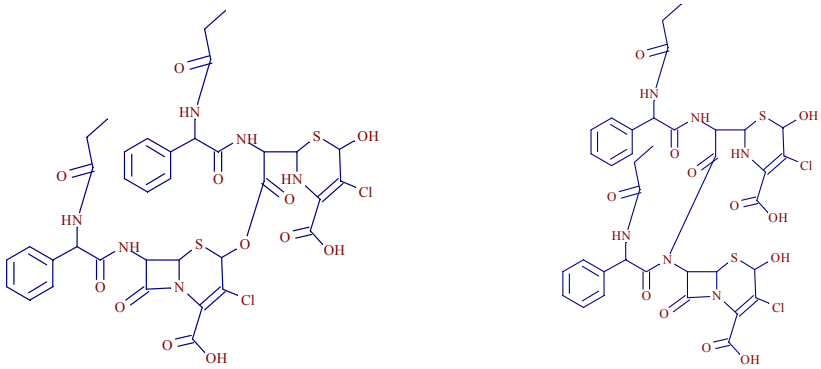


图 12 杂质 4-a 的典型质谱图

Fig. 12 Typical mass spectra of impurity 4-a



分子式：$C_{36}H_{36}Cl_2N_6O_{12}S_2$　Mr: 878.1

图 13　杂质 4-a 的推测化学结构

Fig. 13 Speculated chemical structure of impurity 4-a

2.2.5 柱切换-LC/MS 法分析杂质 5

将杂质 5 经柱切换进入质谱后分析检出四个杂质即杂质 5-a，杂质 5-b，杂质 5-c，杂质 5-d（图 14）。

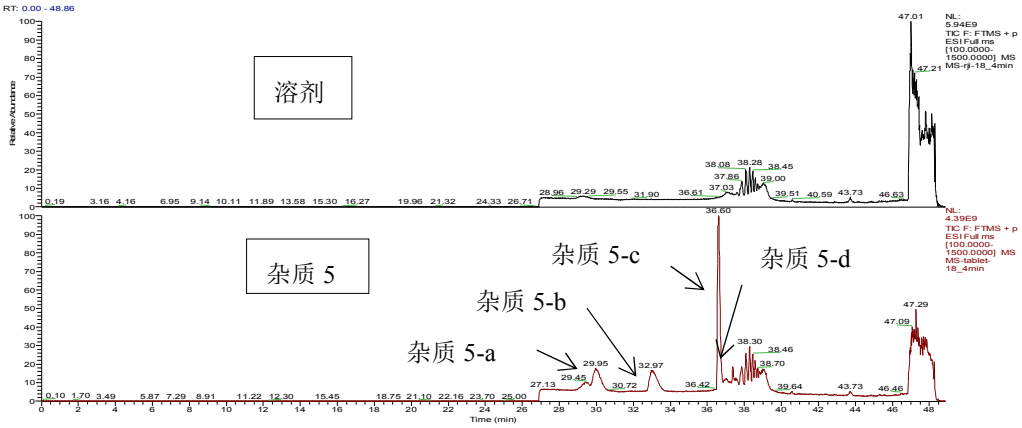


图 14 杂质 5 以及溶剂的质谱 TIC 图

Fig. 14 Total ions chromatogram of impurity 5 and solvent

在杂质 5-a 的全扫描一级质谱图（图 15）中存在 *m/z*699.2（z=1）、*m/z*350.1（z=2）的准分子离子峰，为$[M+H]^+$、$[M+2H]^{++}$峰，因此推测杂质 5-a 的分子量为 698Da。推测其结构如图 16 所示，为 5-c 的对映异构体，属于聚合物杂质。

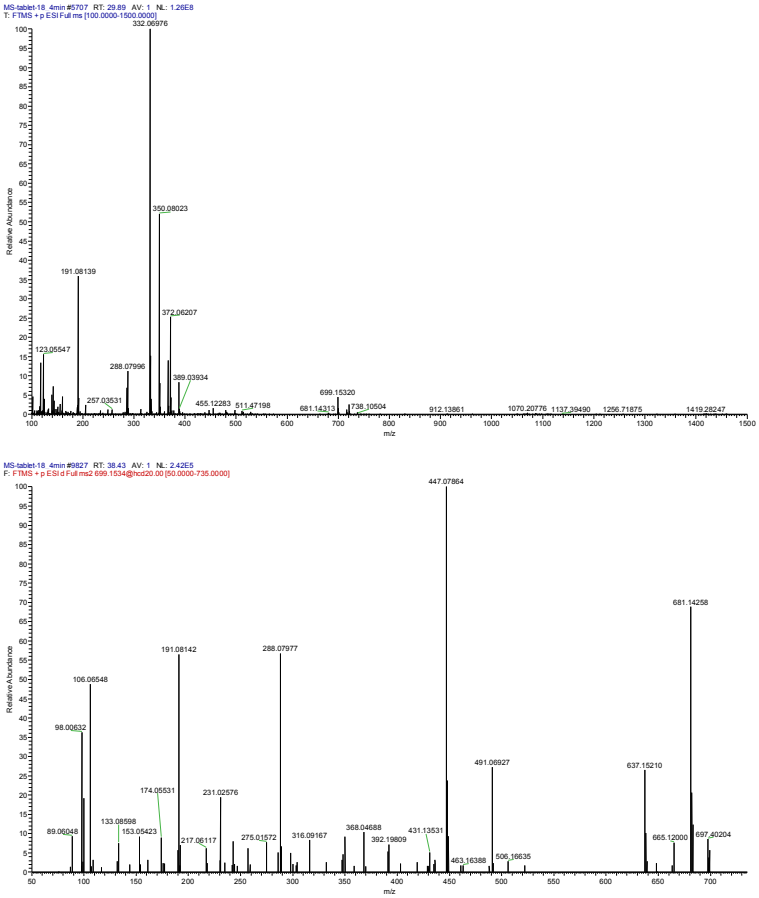
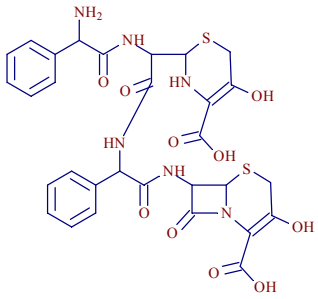
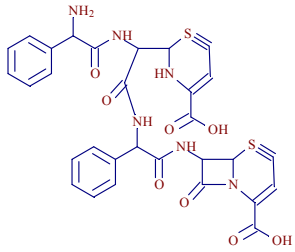


图 15 杂质 5-a 的典型质谱图

Fig. 15 Typical mass spectra of impurity 5-a



分子式：C30H30N6O10S2　Mr：698.1



分子式：C30H26N6O8S2　Mr：662.1

图 16 杂质 5-a、杂质 5-b 的推测化学结构

Fig. 16 Speculated chemical structure of impurity 5-a and impurity 5-b

在杂质 5-b 的全扫描一级质谱图（图 17）中存在 *m/z*663.1（z=1）、*m/z*332.1（z=2）、*m/z*685.1（z=1）的准分子离子峰，分别为$[M+H]^+$、$[M+2H]^{++}$、$[M+Na]^+$峰，因此推测杂质 5-b 的分子量为 662Da。推测该杂质由 7-氨基头孢烷酸中 5 位-S 发生氧化后脱水形成，其结构如图 16 所示，属于聚合物杂质。

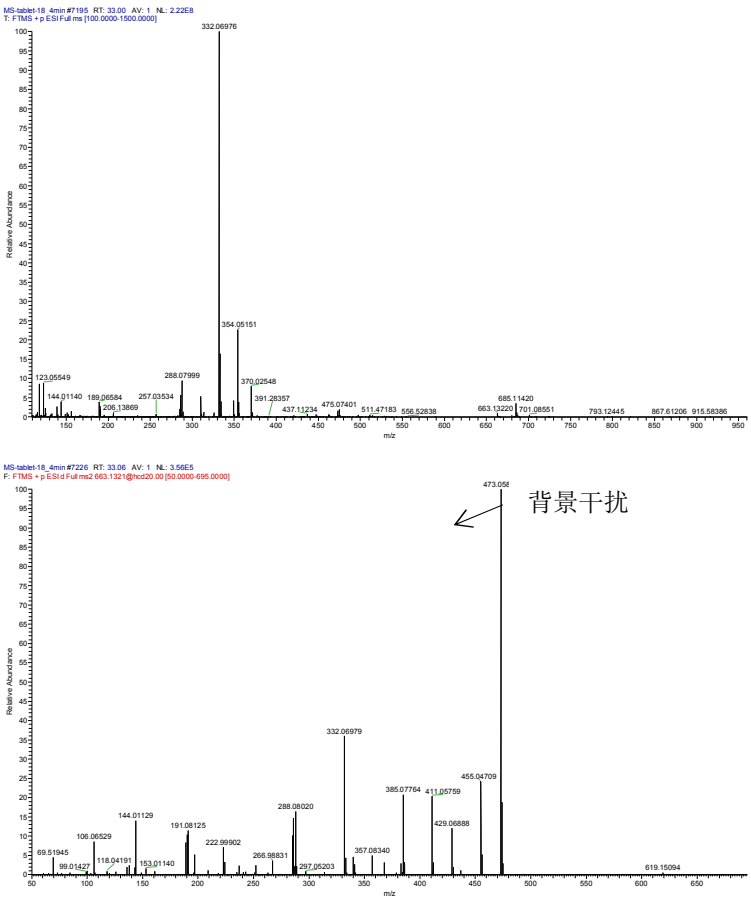


图 17 杂质 5-b 的典型质谱图

Fig. 17 Typical mass spectra of impurity 5-b

在杂质 5-c 的全扫描一级质谱图（图 18）中存在 *m/z*699.2（z=1）、*m/z*350.1（z=2）、*m/z*715.2（z=1）的准分子离子峰，分别为$[M+H]^+$、$[M+2H]^{++}$、$[M+NH_4]^+$峰，因此推测杂质 5-c 的分子量为 698Da。*m/z*699.2 离子峰

附近未见同位素丰度比为 3:1 的其他离子峰，推测化学结构中不含 Cl。推测头孢克洛 3 位-Cl 被-OH 取代后发生分子间聚合，推测其结构如图 19 所示，属于聚合物杂质。

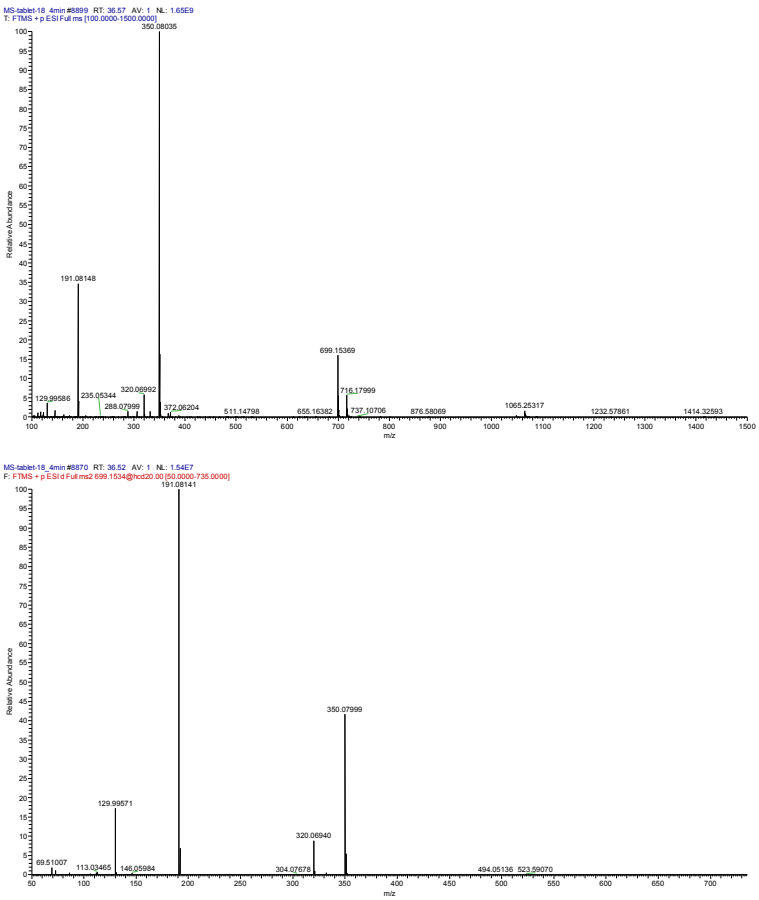
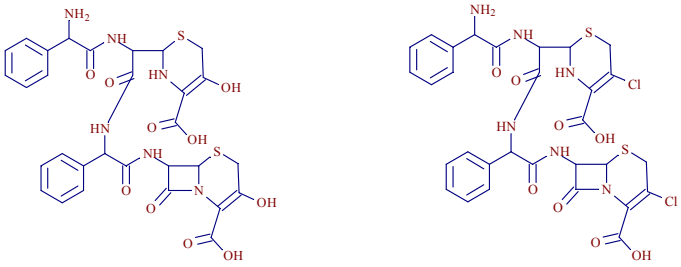


图 18 杂质 5-c 的典型质谱图

Fig. 18 Typical mass spectra of impurity 5-c



分子式：$C_{30}H_{30}N_6O_{10}S_2$ Mr：698.1　　分子式：$C_{30}H_{28}Cl_2N_6O_8S_2$ Mr：734.1

图 19 杂质 5-c、杂质 5-d 的推测化学结构

Fig. 19 Speculated chemical structure of impurity 5-c and impurity 5-d

在杂质 5-d 的全扫描一级质谱图（图 20）中存在 *m/z*735.1（z=1）、*m/z*368.0（z=2）的准分子离子峰，分别为$[M+H]^+$、$[M+2H]^{++}$峰，因此推测杂质 5-d 的分子量为 734Da，与头孢克洛二聚体分子量相同，推测为杂质 6-a 的对映异构体，化学结构如图 19 所示。

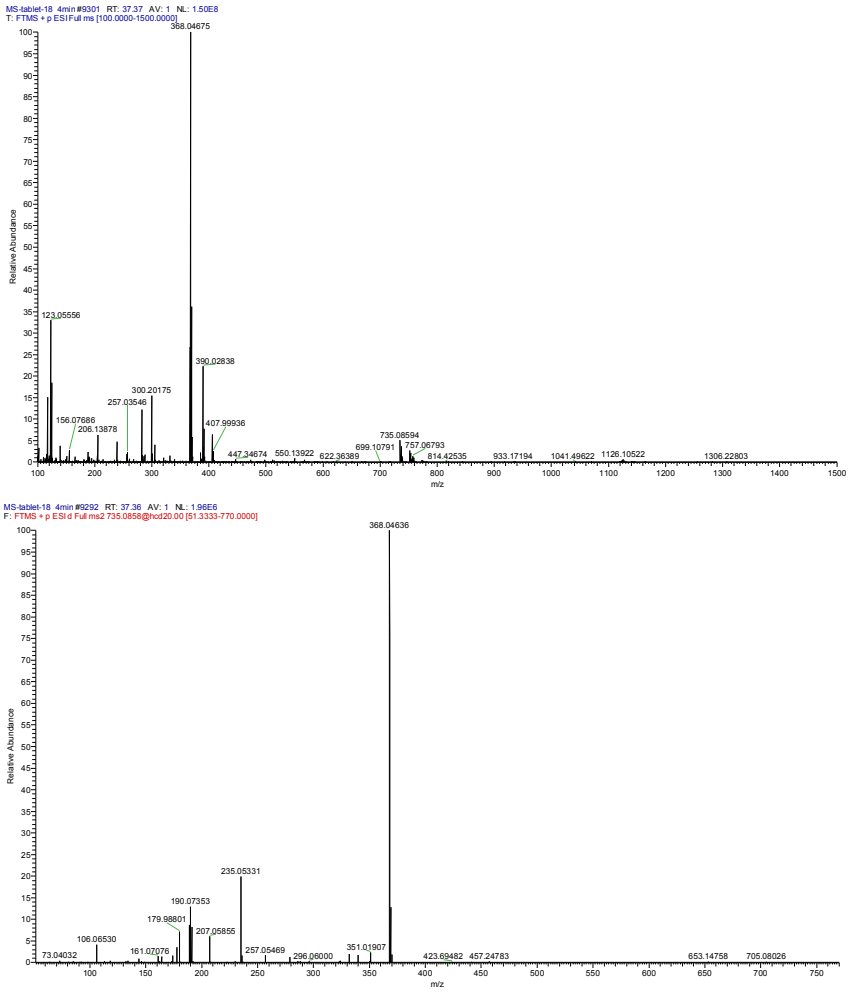


图 20 杂质 5-d 的典型质谱图

Fig. 20 Typical mass spectra of impurity 5-d

2.2.6 柱切换-LC/MS 法分析杂质 6

将杂质 6 经柱切换进入质谱后分析检出杂质 6-a（图 21）。

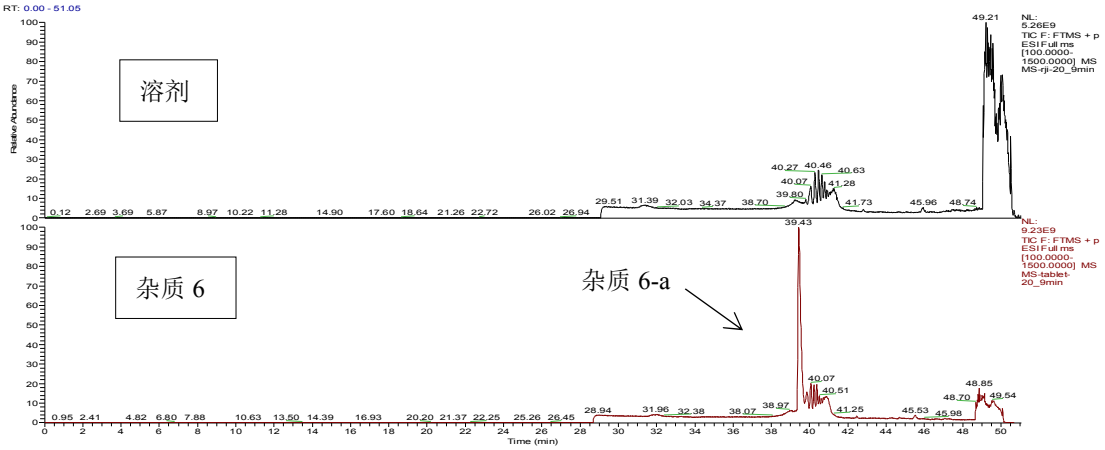


图 21 杂质 6 以及溶剂的质谱 TIC 图

Fig. 21 Total ions chromatogram of impurity 6 and solvent

在杂质 6-a 的全扫描一级质谱图（图 22）中存在 *m/z*735.1（z=1）、*m/z*368.0（z=2）的准分子离子峰，分别为$[M+H]^{+}$、$[M+2H]^{++}$峰，因此推测杂质 6-a 的分子量为 734Da，与头孢克洛二聚体分子量相同，初步判断为头孢克洛二聚体，推测为杂质 5-d 的对映异构体,化学结构如图 19 所示。

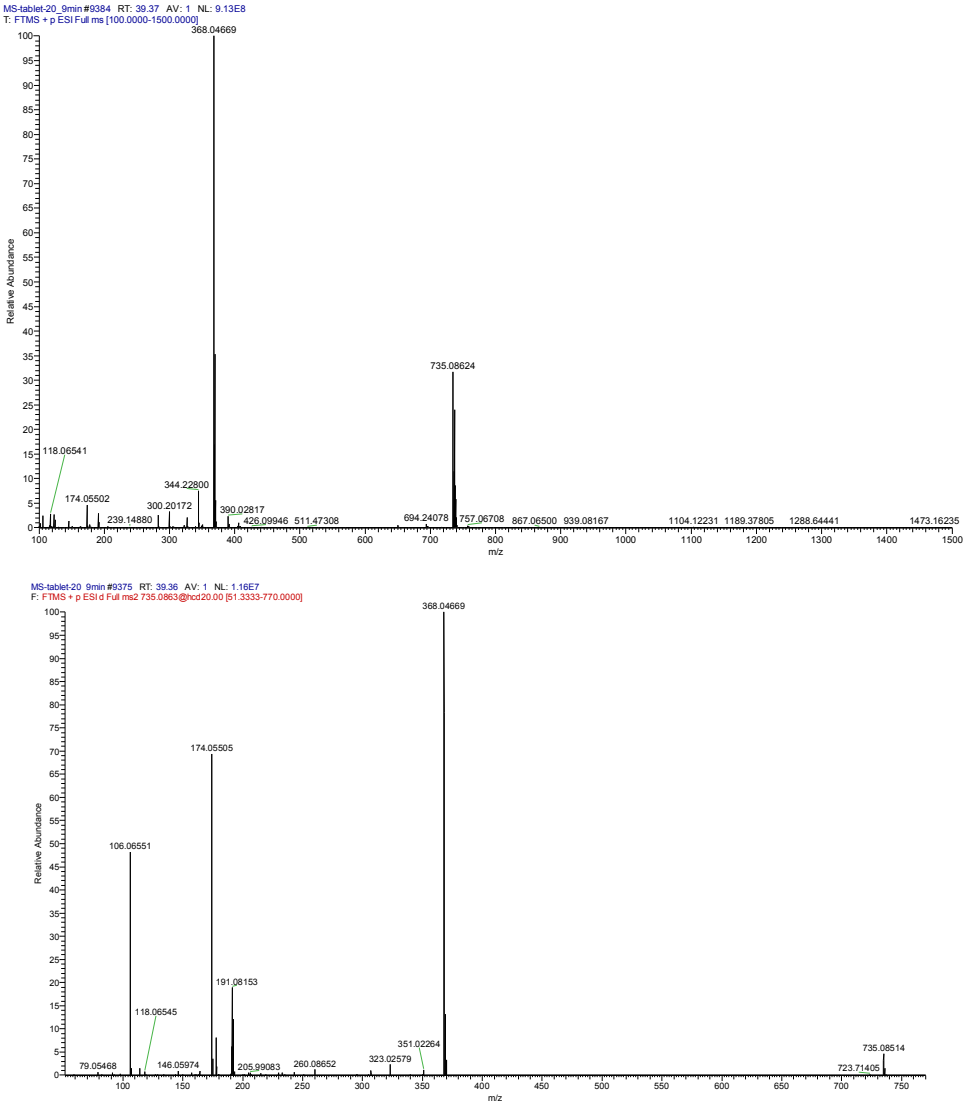


图 22 杂质 6-a 的典型质谱图

Fig. 22 Typical mass spectra of impurity 6-a

4 讨论

本研究制备了头孢克洛聚合物降解溶液，采用 HPSEC 法进行分析，同时结合 2D-HPLC、柱切换-LC/MS 现代色谱分析技术，对头孢克洛聚合物结构进行研究。结合头孢克洛结构性质、杂质的质谱信息及聚合机制，推测出聚合物杂质结构。本研究对头孢克洛聚合物杂质进行了初步的结构解析，对头孢克洛原料及制剂的杂质谱研究、质量控制具有重要参考意义，为后续聚合物研究提供了参考。

REFERNCES

[1] HU C Q. Impurity control strategy of β-lactam antibiotics polymer: the formation and development[J]. *Chinese Journal*

of New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(11): 1231-1244.

[2] HU C Q, JIN S H. Progress in polymer impurities in β-lactam antibiotics and their analytical techniques[J]. World Notes Antibiot(国外医药 抗生素分册), 1996, 17(5): 336-343.

[3] LIU B S, LI X T, ZHANG J L, *et al*. Research progress on enzymatic preparation of cefaclor[J]. *Chinese Journal of Antibiotics* (中国抗生素杂志), 2017, 42(05): 334-339.

[4] WANG Y L, WANG Y Z, CAI S G. Determination of the polymers in cefaclor capsules by SEC[J]. *Strait Pharmaceutical Journal* (海峡药学). 2012, 24(04): 41-44.

[5] CAO J, KAN J Y, XU W, *et al*. Determination of the Polymer in Cefaclor[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy* (中国现代应用药学), 2018, 35(10): 1466-1470.

[6] ZHANG Y, WANG L L, SUN L. Determination of high molecular impurities in cefaclor capsules by a molecular-exclusion chromatography method[J]. *Chinese Journal of Antibiotics* (中国抗生素杂志), 2018, 43(07): 863-865.

[7] *Ch.p(2020)* Vol Ⅱ (中国药典 2020 年版. 二部)[S]. 2020: 302-303.

吉非替尼抑制 EPHA2 表达导致皮肤屏障功能受损的机制研究

张江源，聂雪坤，陈子春，周素娟，林小惠，张立，钟弟，肖冰颖，蒋诗情，黄维英，林敏华*，汪余嘉*

（宁德师范学院附属宁德市医院，福建 宁德 352100）

【摘要】目的：研究吉非替尼导致皮肤屏障功能受损的可能机制，为降低 EGFR-TKIs 不良反应提供思路。**方法：**1.基于网络药理学及分子对接技术探讨吉非替尼导致皮肤屏障功能受损潜在机制；2.建立吉非替尼诱导小鼠皮肤屏障功能受损模型，HE 染色检测皮肤形态及角质层变化，免疫组化检测 K1、K10、DSG-1 分子表达；3.建立吉非替尼诱导 HaCaT 细胞损伤模型，RT-qPCR 和 Western-blot 法检测检测 HaCaT 细胞 K10、K17、CLDN4 的 mRNA 和蛋白表达及炎症因子 IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达；4.RT-qPCR 和 Western-blot 法检测小鼠皮肤组织及 HaCaT 细胞 EPHA2 蛋白表达。**结果：**1.网络药理学和分子对接结果显示 EPHA2 在吉非替尼诱导皮肤屏障受损的机制中发挥重要作用。2.吉非替尼导致小鼠背部皮肤及眼睑脱毛红肿，皮肤组织表皮增厚，K1、K17、DSG-1 分子表达增加；3.吉非替尼促进 HaCaT 细胞 K10/K17/IL-6/TNF-α 表达，抑制 CLDN4 表达；4.吉非替尼抑制 BALB/c 小鼠和 HaCaT 细胞 EPHA2 的 mRNA 和蛋白表达；5.EPHA2 激动剂（Ephrin-A1 Fc）可逆转吉非替尼的作用，抑制 HaCaT 细胞 K10/K17/IL-6/TNF-α 表达，促进 CLDN4 表达。**结论：**吉非替尼可能通过抑制 EPHA2 表达导致皮肤炎症反应和屏障功能受损。

【关键词】EGFR-TKIs，吉非替尼，EPHA2，皮肤屏障，网络药理

前言

吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌（Non-small cell lung cancer，NSCLC）疗效显著，但治疗期间出现不同程度的皮肤不良反应[1, 2]，影响患者的生活质量，严重者可致停药，甚至危及生命。研究表明，吉非替尼治疗期间皮肤毒性发生率为 30%～87%[3]，引发广泛关注。因此，探索吉非替尼的不良反应发生机制，对于其防治及相关药物的研发尤为重要。

皮肤表皮屏障受损是 EGFR-TKIs 诱导皮肤毒性的重要病理变化之一。角质层是构成皮肤表皮屏障的主要结构，其中富含蛋白的角质形成细胞（Keratinocytes，KC）对维持正常屏障功能，防止病原微生物侵入皮肤起重要作用。生理状态下，EGFR 信号通路主要抑制角质形成细胞的分化；而受到外界因素干扰，角质形成细胞的成熟及分化过程出现异常，表现出皮肤角质层细胞增多和受损[4]。因此，角质形成细胞生理状态改变可能是 EGFR-TKIs 引发皮肤毒性的关键原因之一[5]，EGFR-TKIs 可能通过促进角质形成细胞凋亡，调节角质形成细胞过度分化、迁移和炎症来影响细胞状态，进而诱导皮肤毒性[6, 7]。研究表明，EGFR-TKIs 主要是抑制角质形成细胞从基底层向外迁移，增加细胞之间的粘附，进一步加快角质层损伤，导致皮肤相关屏障功能发生障碍[8]。由于皮肤屏障功能受损与皮肤表皮层细胞紧密连接程度相关，经 EGFR-TKIs 治疗后，表皮层细胞迁移及粘附异常，导致紧密连接的破坏从而引发皮肤毒性[9]，但具体作用机制不明。

角蛋白（Keratin，KRT）作为角质形成细胞（KC）产生的特异性弹性纤维蛋白，对维持表皮屏障功能意义重大。Guttman-Yassky 等[10]发现 EGFR-TKIs 阻断皮肤中角质形成细胞的 EGFR 信号途径传导，导致角质形成细胞表达的角蛋白异常聚集，从而阻塞皮肤毛囊发育。此外，紧密连接（tight junctions，TJ）是皮肤屏障的另一重要组成部分[11]，其由胞质蛋白和跨膜蛋白组成，前者主要以闭锁小带蛋白 1（zonula occludens 1，ZO-1）等为主，后者包括水闸蛋白（claudins，CLDN）、闭锁蛋白（occludin，OCLN）和连接黏附分子（junctional adhesion molecules,

基金项目：福建省自然科学基金项目（2022J011215）；福建省自然科学基金项目（2023J011083）；福建省自然科学基金项目（2023J011085）

作者简介：张江源，男，硕士，研究方向：TKI 药物皮肤毒性。聂雪坤，女，硕士研究生，主管药师，研究方向：小儿用药专业临床药学

通讯作者：林敏华，女，主任药师，研究方向：心内科临床药学。汪余嘉，女，药师，研究方向：药理学。

JAMs）等。典型的紧密连接定位于表皮颗粒层，是复杂的细胞与细胞之间的连接结构，其控制着水、溶质等在细胞旁通路中选择性通行，同时也参与了 KC 增殖分化、凋亡以及细胞-细胞黏附等过程[12]。因此，EGFR-TKIs 可能通过影响角蛋白及紧密连接的表达损伤皮肤屏障功能，进而导致皮肤毒性。

细胞炎症反应也是 EGFR-TKIs 诱导皮肤毒性的重要因素之一。Lichtenberger 等[13][13]发现 EGFR 信号通路受阻后，角质形成细胞释放炎症趋化因子，促使炎性细胞聚集，从而加重皮肤炎症反应[13]。有研究发现在盐酸厄洛替尼干预正常小鼠模型中，厄洛替尼通过非受体酪氨酸激酶 janus 激酶 1（JAK1）/转录激活蛋白 3（STAT3）信号通路调控干扰素-γ（IFN-γ）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-2、IL-6、IL-10 及 IL-12A 等炎症因子水平表达，引发小鼠皮肤毒性[14]。EGFR-TKIs 导致皮肤中炎症细胞以及炎症因子的聚集，从而发生皮肤炎症诱发皮肤毒性，其具体分子机制有待进一步研究。

网络药理学与分子对接技术的应用，为探究药物、靶点、疾病三者间的联系，提供新的研究手段，为进一步诊断并治疗疾病、预测不良反应的发生原因等架起新的桥梁[15]。本研究旨在通过网络药理学方法，分析吉非替尼导致皮肤屏障功能受损的潜在机制，并运用分子对接技术对网络药理学结果进行初步验证；应用分子药理学方法在体内外水平进行实验验证，为优化 EGFR-TKIs 药物临床治疗及相关药物研发提供思路。

1 材料

1.1 实验动物和细胞

BALB/c 小鼠（雌性，6-8 周龄，20 g 左右），购自吴氏实验动物技术有限公司，本动物实验符合国家及福建医科大学实验动物中心规定的伦理学要求；

人角质形成细胞株 HaCaT 购自中国典型培养物保藏中心细胞库。

1.2 实验药物

吉非替尼片（批准文号：国药准字 J20180014）购于阿斯利康投资（中国）有限公司，规格：10 片装（250 mg/片）；

Gefitinib（ZD1839）：Selleck，美国；

重组小鼠蛋白 Ephrin-A1 Fc（639-A2-200）：R&D system，美国。

1.3 试剂和仪器

TRNzol 总 RNA 提取试剂（DP424）购于 TIANGEN，北京；GoScript Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)（A2791）购于 Promega，美国；Omni-Easy 即用型 BCA 蛋白定量试剂盒（ZJ102）购于雅酶，上海；western bright ECL 化学荧光试剂（K-12045-D50）购于 Advansta，美国；甲醛溶液（50-00-0）购于西陇科学，汕头；免疫组化检测试剂盒（KIT-5001）购于迈新，福州；小鼠 GAPDH 内参引物，10 μM（B661304）购于生工，上海；Cytokeratin 1 单克隆抗体（ab185628）、Cytokeratin 10 单克隆抗体（ab76318）、Desmoglein-1 单克隆抗体（ab124798）购于 Abcam，英国；1640 培养基（C11875500BT）及 0.25 %胰蛋白酶（25200-056）购于 Gibco，美国；胎牛血清（PS-FB5-SA）购于 Hyclone，美国；青霉素-链霉素溶液 100X（C0222）及 L-Glutamine（C0212）购于 Beyotime，上海。

Leica ASP300S 全自动组织脱水机、Leica RM2245 石蜡切片机及 HistoCore Arcadia 石蜡包埋机（Leica 公司，德国）；荧光倒置显微镜（Olympus，日本）；荧光定量 PCR 仪及 PCR 仪（Applied Biosystems，美国）；超微量紫外分光光度计（米欧仪器，杭州）；全波长酶标仪（Molecular Devices，美国）；低温高速离心机（Beckman，美国）；Ventana Benchmark XT 免疫组化机（罗氏，美国）细胞培养箱（ThermoFisher Scientific，美国）；超净工作台（Heal Force，上海）全自动细胞计数仪（博大博聚科技，上海）。

方法

2.1 网络药理学

2.1.1 吉非替尼和皮肤屏障相关靶点的搜集

使用数据库 PubChem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）中进行检索吉非替尼，下载吉非替尼的 2D 结构导入到 Swiss Target Prediction 数据库（http://swisstargetprediction.ch/）中，选择“pecies”为“homo sapiens”，获得潜在药物作用靶点。将以“skin barrier”作为关键词检索，分别从 OMIM 数据库（https://omim.org/）、GeneCards

数据库（https://www.genecards. org/）、GeneBank 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/）获得相关靶点。筛选 GeneCards 数据库中相关性得分＞1 的靶点。整合所有数据库获得的靶点，并去除重复靶点。将吉非替尼候选靶点与皮肤屏障相关靶点上传至仙桃学术在线作图平台（https://www.xiantao.love/）中维恩图绘制功能模块分析得到交集，从而获得吉非替尼导致皮肤屏障受损的靶点。

2.1.2 蛋白-蛋白相互作用（PPI）网络的构建

通过 String 数据库（STRING，https://cn.string-db.org/）构建共同靶基因蛋白互作网络，最低要求的交互得分设置为中等置信度 0.400，其他参数保持默认，去除网络中不连接的节点，以 TSV 格式导出。将蛋白互作数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件，利用 Cytoscape 软件中 cytoHubba 插件，根据最大团中心性（maximal clique centrality，MCC）分数筛选核心靶点。最大团中心性数值越大，说明这个基因在网络中的作用越重要。

2.1.3 GO 功能分析与 KEGG 通路富集

用 R 4.1.3 对 PPI 网络中的靶点基因进行基因本体（GO）分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）分析。以 P<0.05 和 Q<0.05 为显著性标准，筛选生物过程（Biological Process，BP）、细胞组成（Cell Component，CC）、分子功能（Molecular Function，MF）和信号通路，所得结果以柱状图或气泡图形式表示。

2.1.4 吉非替尼与核心靶点的分子对接

通过 Uniprot 数据库（https://www.uniprot.org/）查找关键作用蛋白基因的信息，再链接到 PDB 数据库下载蛋白 pdb 文件；通过 PyMOL 软件进行处理后，使用 AutoDockTools-1.5.6 进行吉非替尼与关键作用蛋白分子对接。使用 PyMOL 软件将吉非替尼与关键作用靶蛋白之间的相互作用可视化并显示为 3D 图。

2.2 实验

2.2.1 动物分组及给药

小鼠随机分为 4 组，每组 5 只，使用 4%硫化钠背部脱毛[16]，设置为正常组（PBS 溶液）、吉非替尼低剂量组（75 mg/kg）、中剂量组（150 mg/kg）、高剂量组（225 mg/kg）[14, 17, 18]。灌胃 1 次/天，40 天。观察小鼠皮肤有无皮疹、结痂、脱屑、渗出等皮肤炎症表现，并拍照记录。实验结束后颈椎脱臼处死，取皮肤组织保存起来。

2.2.2 细胞分组及给药

HaCaT 细胞在含有 10%胎牛血清（FBS）、1%双抗（青霉素、链霉素）和 1%谷氨酰胺的 RPMI 1640 完全培养基中，在 37℃细胞培养箱中以 5%CO2 培养。吉非替尼溶于 DMSO 溶液，重组小鼠蛋白 Ephrin-A1 Fc 溶于 PBS 溶液，在-20℃冰箱中避光保存。将 HaCaT 细胞（2×10^5 个细胞/孔）接种在 6 cm 的培养皿中，用 0、0.5、1.0、2.0μM 的吉非替尼处理 48 小时，吉非替尼（1.0μM）处理 47 h 后用 1.0μg/ml 的重组小鼠蛋白 Ephrin-A1 Fc 共孵育 1 小时[19]，分别收集细胞用于后续实验。

2.2.3 小鼠皮肤变化

观察小鼠皮肤有无皮疹、结痂、脱屑、渗出等皮肤炎症表现，并拍照记录。

2.2.4 HE 染色

皮肤组织置于包埋盒中存放在 4%多聚甲醛固定液 24 h，将固定液中的组织置于梯度乙醇和二甲苯溶液中进行脱水，随后置于石蜡中进行包埋，切片。将组织切片进行脱蜡、梯度乙醇水化、苏木素染色、盐酸乙醇分化、伊红染色操作，最后乙醇梯度脱水，并用二甲苯透明后，中性树胶封片。使用显微镜观察各组小鼠皮肤组织病理变化。

2.2.5 免疫组化

将组织切片置于免疫组化载玻片中，于 60 ℃烘箱中烤 2 h；将烤好的片子用二甲苯和梯度乙醇进行脱蜡水化；其次将切片组织用 3% H_2O_2 处理，室温放置 10 min 以灭活内源性酶。随后置于柠檬酸盐缓冲液煮沸 10 min，自然冷却至室温；用 5% BSA 封闭液室温孵育 20 min ；PBS 溶液冲洗，滴加山羊血清，滴加一抗并孵育 2 h，PBS 溶液冲洗，滴加适量生物素化山羊抗小鼠 IgG 室温 20 min，DAB 工作液避光染色 5 min，水洗后，用苏木素复染 1 min，盐酸水洗 1 s；最后乙醇梯度脱水，中性树胶封片，显微镜下观察皮肤中皮肤中 Ki67、K1、K10 及 DSG-1 表达变化情况。

2.2.6 细胞活力

取对数期细胞以 5000 个/孔接种于 96 孔板，细胞培养 24 h 后，用不同浓度吉非替尼药物预处理细胞 24 h、48 h、72 h，空白组加入等量的基础培养基。每组设 3 个复孔。培养结束后，每孔加入 20 μLMTS 试剂，继续培养 2 h，用酶标仪测定各孔 490 nm 处的吸光度值。

2.2.7 实时定量反转录聚合酶链反应

使用 Trizol 总 RNA 提取试剂从小鼠皮肤组织及 HaCaT 细胞中分离总 RNA，用 GoScript Reverse Transcription Mix 试剂盒将总 RNA（1 μg）逆转录成 cDNA，然后使用 Real-Time PCR 扩增仪与 Eastep qPCR Master Mix PCR 试剂盒将 cDNA 进行实时定量 PCR。PCR 的条件为：95 ℃，2 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min 40 个循环。列出了用于 PCR 的引物序列。

细胞实验引物

CLDN4	Forward	CCACAACATCATCCAAGACTTC
	Reverse	CAGAATACTTGGCGGAGTAAGG
IL-6	Forward	CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG
	Reverse	GGACTTTTGTACTCATCTGCAC
K17	Forward	TGAGATCAATGTGGAGATGGAC
	Reverse	CTGTCTTGCTGAAGAACCAATC
K10	Forward	GATAATGCCAACATCCTGC
	Reverse	CCTCCTCGTGGTTCTTCTT
TNF-α	Forward	CAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAAC
	Reverse	TTGAAGAGGACCTGGGAGTAGATGAG
EPHA2	Forward	CACCACAACATCATCCGCCTAGAG
	Reverse	CACGCTGAACTCGCCATCCTTC
AFDN	Forward	CCGACAAGCAAGAGCACCACTAG
	Reverse	TGCGATAATCTGGCTGCTGTTCTAC

动物实验

EPHA2	Forward	AGGGAGAAGGATGGTGAGTTCAGTG
	Reverse	AGGTTGCTGTTGACGAGGATGTTG

2.2.8 蛋白印迹实验

HaCaT 细胞（2×10^5 细胞/孔）接种于 6 cm 小皿，分别以 0、0.5、1.0、2.0 μM 浓度的吉非替尼处理 48 h，用 RIPA 裂解缓冲液处理后提取细胞蛋白；小鼠皮肤组织经液氮研磨成粉末加入 RIPA 裂解缓冲液处理提取组织蛋白。采用 BCA 法检测蛋白的浓度。根据目标蛋白的相对分子质量，制备了 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）。将等量的蛋白质（每个样品 20 μg）装载到 SDS-PAGE 上进行分离，并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。然后用 5%脱脂奶粉封闭膜 1 h、孵育一抗在 4 ℃过夜。用 TBST 洗涤 3 次后，再孵育二抗在室温下 1 h，最后凝胶成像系统检测蛋白条带。

2.2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 绘制统计图表，计量资料采用均数（Mean）±标准差（SD）表示，数据组间差异比较采用单因素方差分析（ANOVA），$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3.结果

3.1 吉非替尼导致皮肤屏障受损的网络药理学和分子对接结果

3.1.1 吉非替尼导致皮肤屏障受损作用靶点

通过 PubChem 数据库获得吉非替尼的 2D 结构（图 1.1）；在 Swiss Target Prediction 数据库检索获取药物成分靶基因，根据 Probability 数值大小排序得到前 100 个吉非替尼药物作用靶点。将吉非替尼作用靶点与 5640 个皮肤屏障作用靶点通过 Venny 图取交集，共得到 55 个交集靶点（图 1.2），即吉非替尼导致皮损的潜在作用靶点。

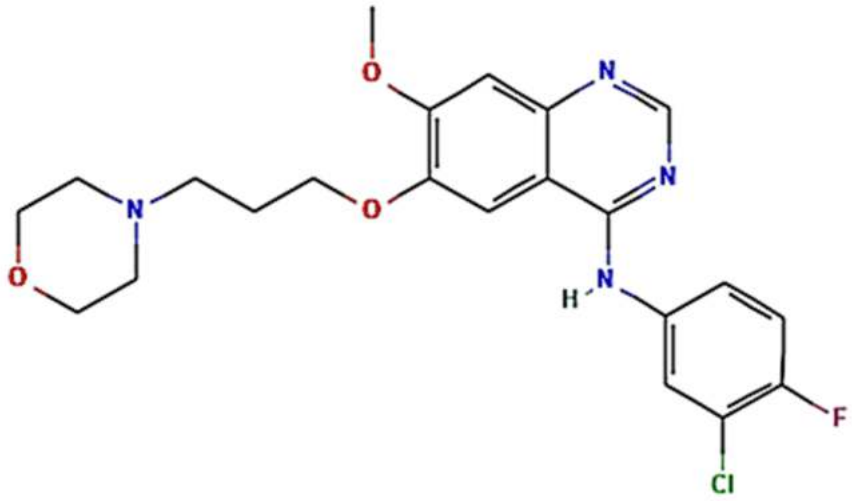


图 1.1 吉非替尼的化学结构

Figure 1.1 Chemical structure of gefitinib



图 1.2 吉非替尼与皮肤屏障靶点交集的 Venn 图

Figure 1.2 Venn diagram of the intersection of gefitinib and skin barrier damage targets

3.1.2 吉非替尼导致皮肤屏障受损的核心靶点蛋白

通过 String 数据库探索吉非替尼导致皮肤屏障受损的潜在作用靶点间的相互作用，共有 55 节点，期望边线值 28，实际 133 个边线，平均节点度 4.84，PPI 富集 P<1.0e-16；根据 MCC 分数得到 PPI 网络图（图 1.3），排在前十的核心靶点有 SRC、EGFR、FGR、FYN、YES1、ABL1、HCK、LCK、LYN 和 EPHA2（表 1.1）。

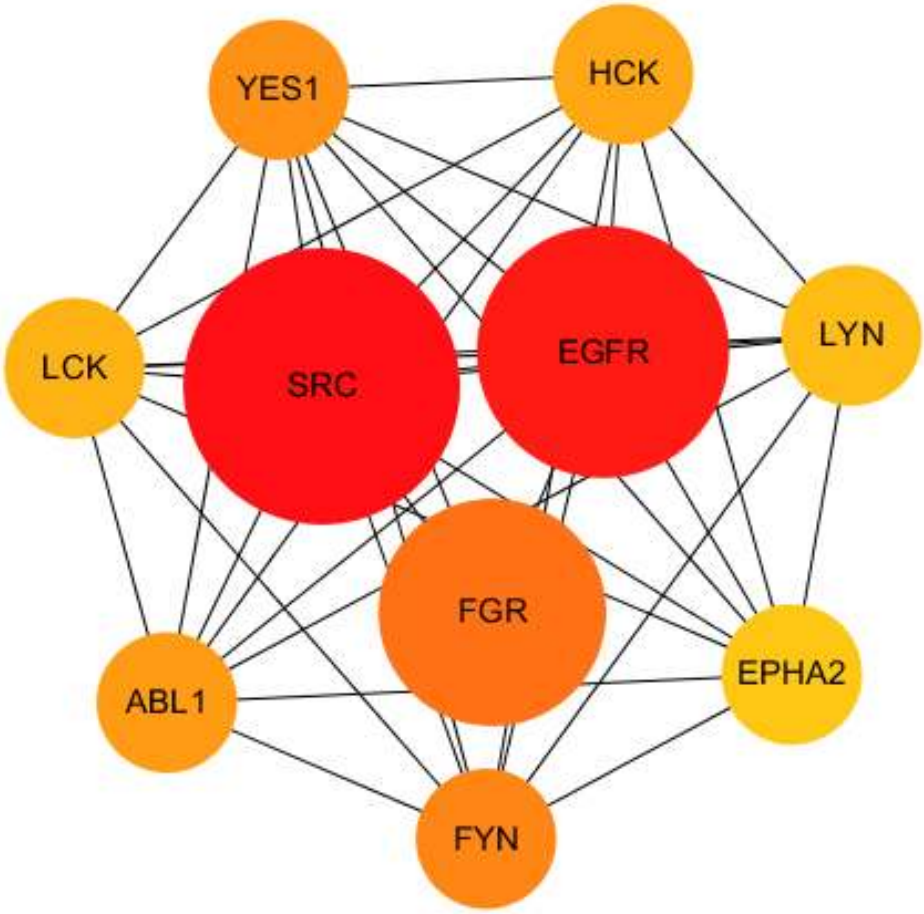


图 1.3 吉非替尼导致皮肤屏障受损的蛋白质-蛋白质相互作用网络

Figure 1.3 Protein-protein interaction network for skin barrier damage due to gefitinib

表 1.1 吉非替尼导致皮肤屏障受损的蛋白质-蛋白质相互作用网络中核心蛋白信息

Table 1.1 Information on core proteins in the protein-protein interaction network for skin barrier damage due to gefitinib

基因	UniProt ID	英文全称	中文全称	MCC
SRC	P12931	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src	4454551
EGFR	P00533	epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体	4084943
FGR	P09769	Tyrosine-protein kinase Fgr	酪氨酸蛋白激酶 Fgr	3710287
FYN	P06241	Tyrosine-protein kinase Fyn	酪氨酸蛋白激酶 Fyn	692238
YES1	P07947	Tyrosine-protein kinase Yes	酪氨酸蛋白激酶 Yes	677640
ABL1	P00519	Tyrosine-protein kinase ABL1	酪氨酸蛋白激酶 ABL1	583494
HCK	P08631	Tyrosine-protein kinase HCK	酪氨酸蛋白激酶 HCK	551520
LCK	P06239	Tyrosine-protein kinase Lck	酪氨酸蛋白激酶 Lck	531294
LYN	P07948	Tyrosine-protein kinase Lyn	酪氨酸蛋白激酶 Lyn	530646
EPHA2	P29317	Ephrin type-A receptor 2	肝配蛋白 A 型受体 2	409824

3.1.3 吉非替尼导致皮肤屏障受损作用靶点的 GO 功能富集分析

GO 功能富集分析结果涉及 1194 个生物过程（P<6.48e-55），其中排名前 10 的生物过程见（图 1.4），主要涉及到肽基酪氨酸磷酸化、修饰，蛋白质自磷酸化，激酶活性的正向调节，MAPK 级联的正向调节，磷脂酰肌醇 3-激酶信号调节等。得到细胞组成相关的条目 34 个，主要涉及分子功能如膜筏、膜微区、肌动蛋白丝、细胞-基质连接、粘着斑等。分子功能相关的条目 60 个，主要涉及肝配蛋白受体活性、跨膜肾上腺素受体活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等。

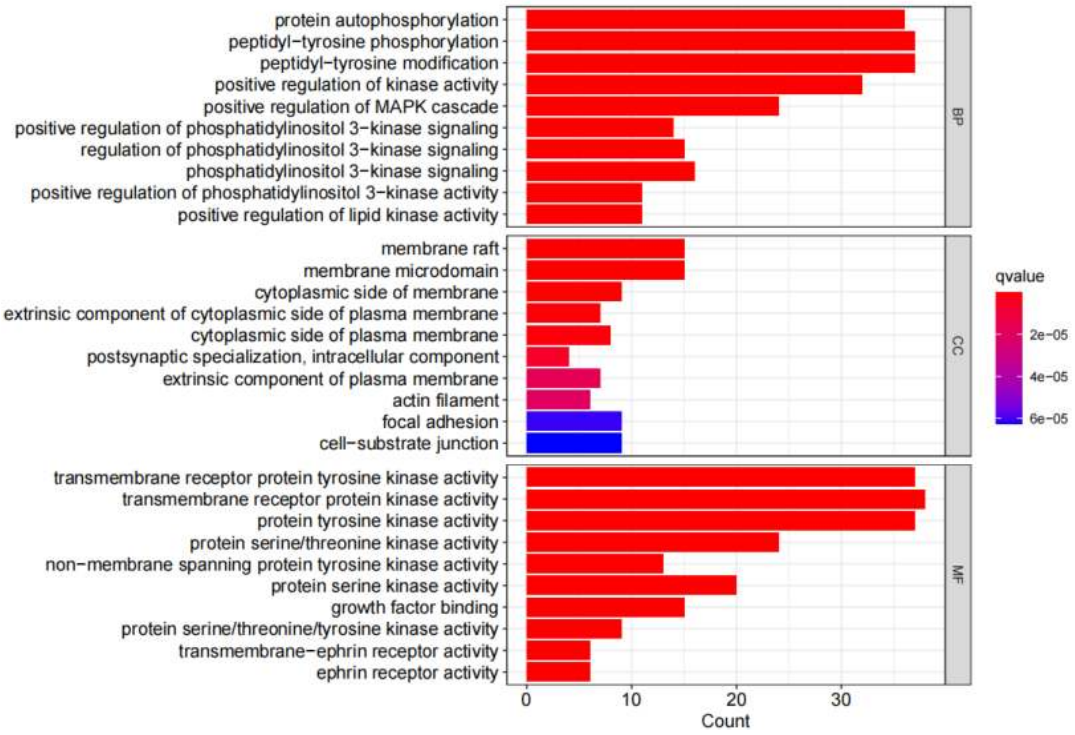


图 1.4 吉非替尼导致皮肤屏障受损靶点的基因本体富集分析（排序前 10 条目）

Figure 1.4 Gefitinib leads to the top 10 entries in the ranking of gene ontology enrichment analysis results for skin barrier damage targets

3.1.4 吉非替尼导致皮肤屏障受损靶点的 KEGG 通路分析

KEGG 通路富集分析共得到 103 条信号通路，排名前 30 位的信号转导通路（图 1.5）主要包括丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路、磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B（PI3K/Akt）信号通路、粘着斑、钙信号通路、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路等。

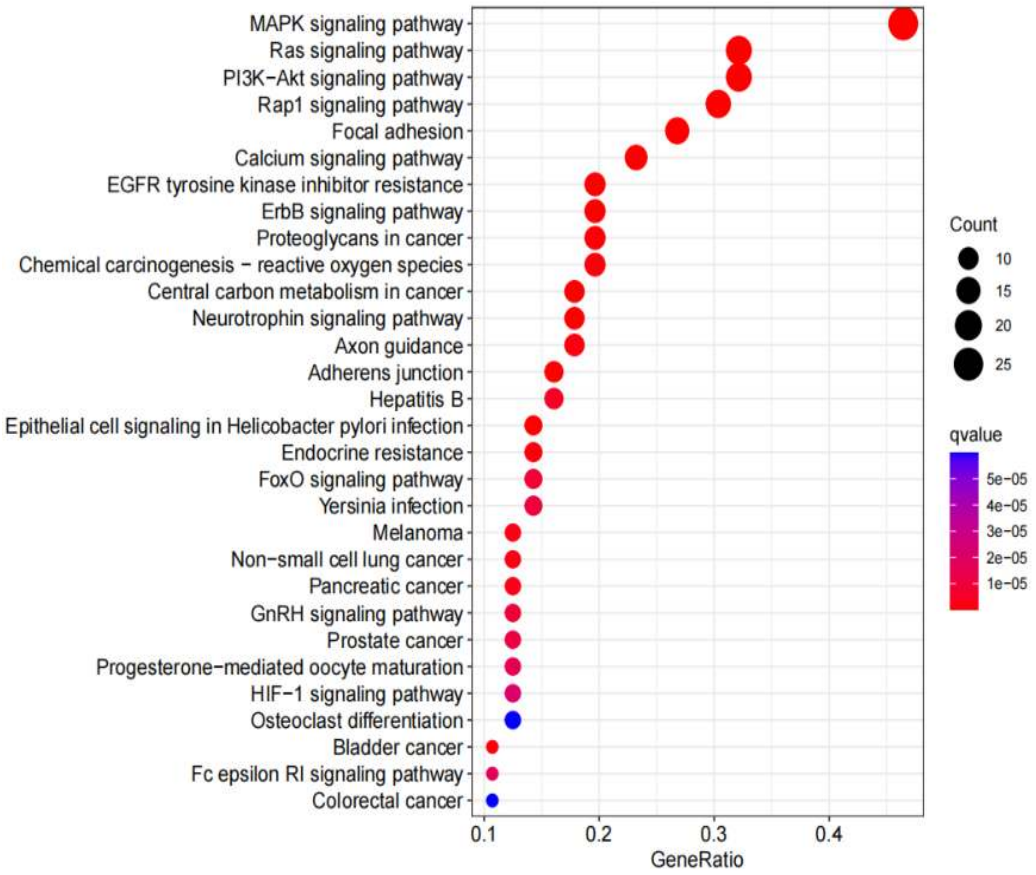


图 1.5 吉非替尼导致皮肤屏障受损靶点的 KEGG 通路富集分析（排序前 30 信号通路）

Figure 1.5 Gefitinib leads to enrichment analysis of the KEGG pathway in the top 30 signaling pathways at the target of skin barrier damage

3.1.5 吉非替尼与关键靶点蛋白分子对接

利用 AutoDockTools 计算吉非替尼与核心靶点蛋白进行分子对接验证（表 1.2）。结果显示吉非替尼与 10 个核心靶点蛋白的结合能均小于-5.0 kJ/mol，说明吉非替尼与核心靶点具有良好的结合能力，其中吉非替尼与 HCK、EGFR 以及 EPHA2 有很强的结合活性。对接结果在 PyMOL 软件中进行可视化处理，提示吉非替尼可能通过作用于上述核心靶点导致皮肤屏障受损的发生。吉非替尼与核心靶点蛋白分子对接示意图（图 1.6）。

表 1.2 吉非替尼与核心靶点蛋白分子对接

Table 1.2 Molecular docking of gefitinib to core skin barrier damage target proteins

基因	吉非替尼		
	PDBID	自由能（KJ/mol）	氢键数
HCK	5H0B	-12.00	2
EGFR	5UG9	-8.70	0
EPHA2	6Q7D	-7.60	0
LYN	6NMW	-6.60	0
LCK	1LKK	-6.60	2

FYN	7A2P	-6.25	0
ABL1	5OAZ	-6.20	2
YES1	2HDA	-5.90	3
SRC	6C4S	-5.60	3
FGR	7JT9	-5.40	0

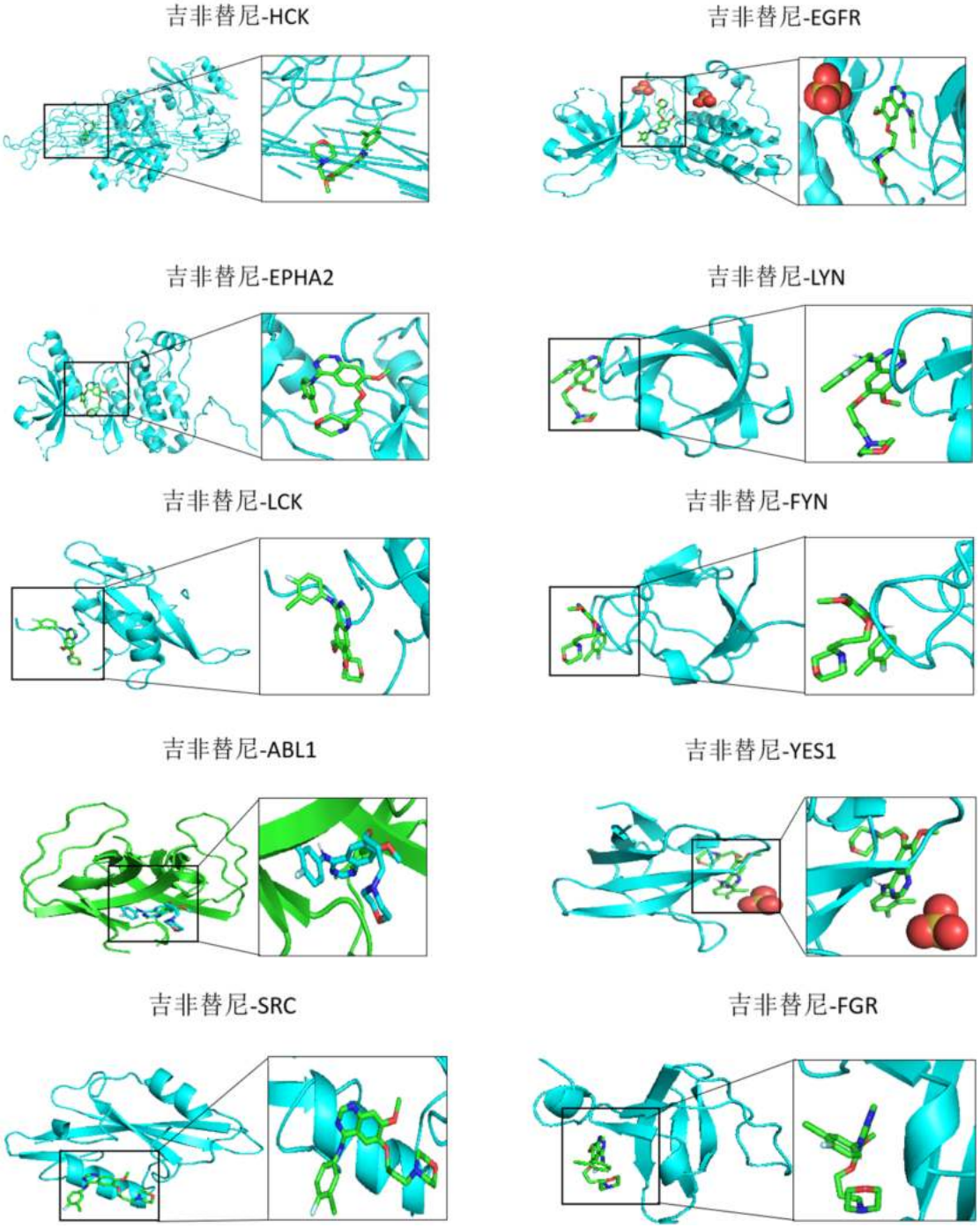


图 1.6 吉非替尼与皮肤屏障受损核心蛋白的分子对接模式图

Figure 1.6 Molecular docking pattern of gefitinib to core proteins of skin barrier damage

3.2 吉非替尼致 BALB/c 小鼠皮肤受损

3.2.1 吉非替尼诱导小鼠皮肤表皮损伤

BALB/c 小鼠各组分别给药，动态观察其皮肤状况。结果发现，给药至 40 天皮肤表皮损伤明显。与正常组相比，小鼠皮肤受损程度随给药浓度增加而逐渐加重，吉非替尼中剂量组背部出现红肿，眼周、嘴周出现脱毛；高剂量组小鼠背部干燥结痂，眼周、嘴周出现严重脱毛症状（图 2.1 A 和 B）。其次，取上述给药处理后的 Babl/C 小鼠，皮肤组织切片 HE 染色，观察并测量皮肤角质层厚度。结果显示，不同浓度的吉非替尼处理小鼠 40 天，低剂量组变化不明显，中、高剂量组角质形成细胞数量及表皮厚度均明显增加（P＜0.01）（图 2.1 C 和 D）。

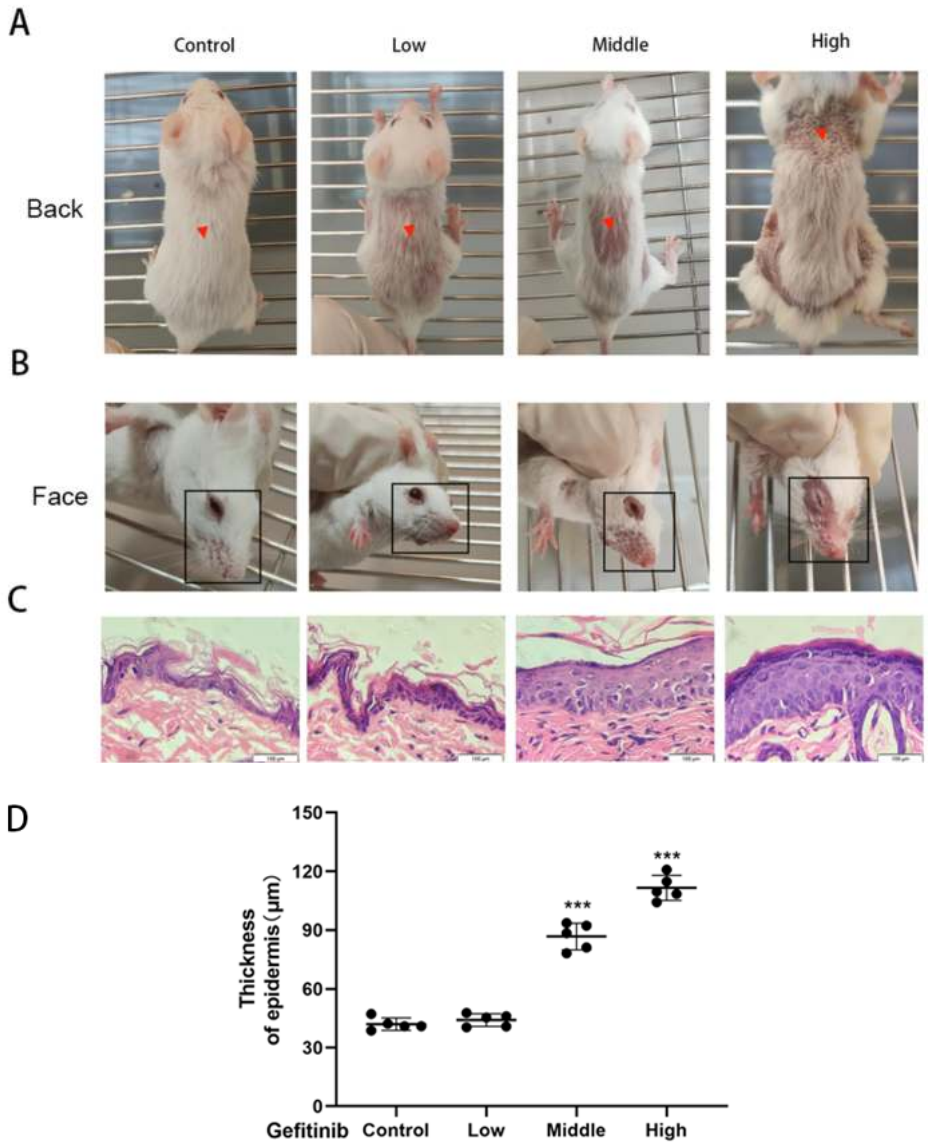


图 2.1 吉非替尼诱导小鼠皮肤表皮损伤

Figure 2.1 Gefitinib induces skin epidermal lesions in mice

(A) Skin changes on the back of mice given gefitinib by gavage at low doses (75 mg/kg), medium doses (150 mg/kg), and high doses (225 mg/kg) for 40 days; (B) changes to the skin on the face; (C) alterations in skin tissue as shown by HE staining; and (D) modifications in skin epidermal layer thickness in mice.Compared to control, **P<0.01 and ***P<0.001, n=5.

3.2.2 吉非替尼诱导小鼠皮肤组织屏障功能相关蛋白表达

BALB/c 小鼠给药处理后，镜下观察免疫组化小鼠皮肤组织中屏障功能相关蛋白表达。结果显示，与正常组相比，吉非替尼中、高剂量组 Ki67、角蛋白-1（Keratin 1，K1）、角蛋白-10（Keratin 10，K10）及桥粒芯糖蛋白-1（DSG-1）蛋白表达增加（图 2.2）。

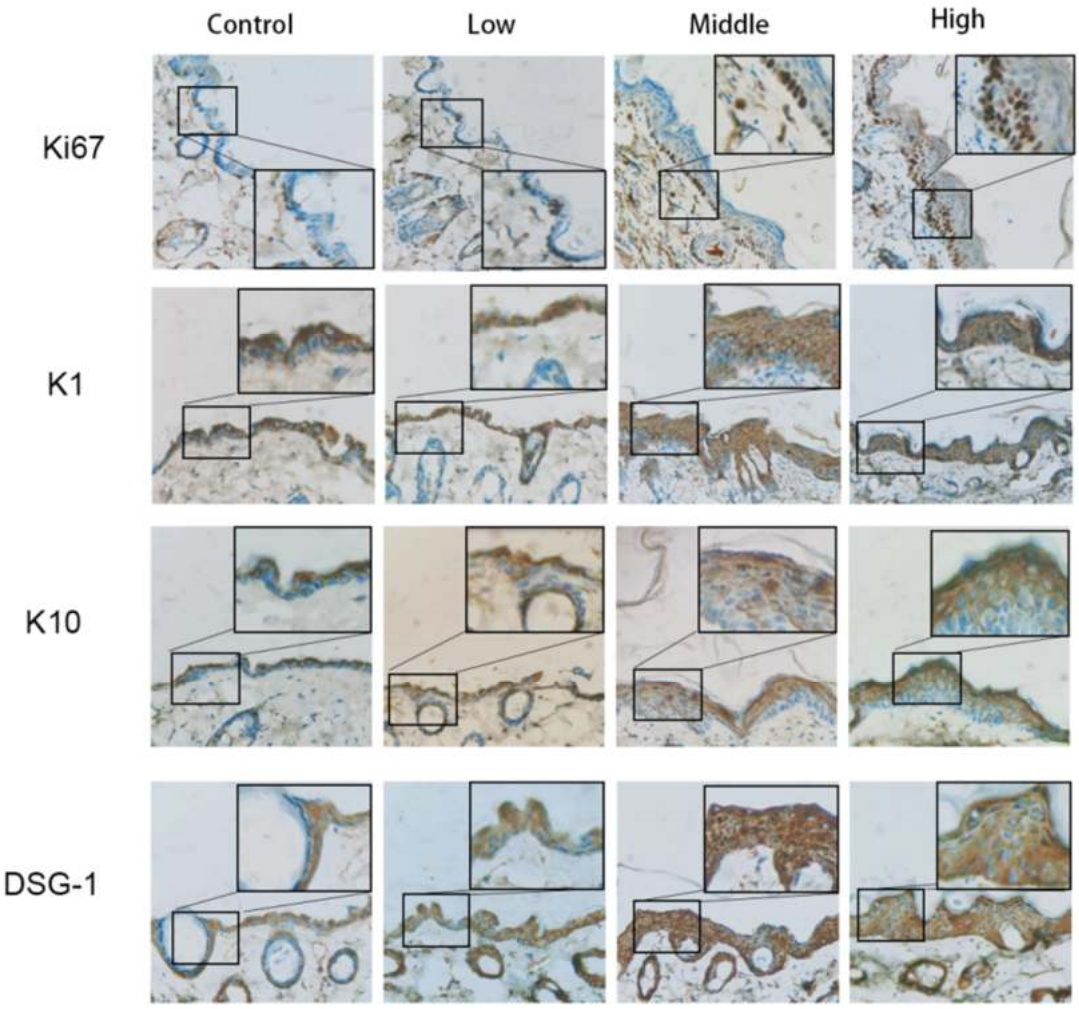


图 2.2 吉非替尼促进小鼠皮肤组织屏障功能相关蛋白表达（400x）

Figure 2.2 Effect of gefitinib on the expression of proteins related to skin barrier function in mice

BALB/c mice were treated with Gefitinib Low (75 mg/kg), Middle (150 mg/kg) and High (225 mg/kg) for and 40 days,detection of Ki67, K1, K10 and DSG-1 expression in skin tissues by immunohistochemistry.

3.3 吉非替尼诱导 HaCaT 细胞屏障功能损伤及炎症发生

3.3.1 吉非替尼抑制 HaCaT 细胞活力

不同浓度的吉非替尼分别处理 HaCaT 细胞 24 h、48 h 和 72 h，测定细胞活力。结果显示，与正常组相比，吉非替尼对细胞存活率有明显抑制作用（P<0.05）。72 小时细胞活力过低，无法满足后续实验，因此，选择吉非替尼浓度为 0.5 μM、1.0 μM、2.0 μM 干预 HaCaT 细胞 48 h 进行后续细胞实验（图 3.1）。

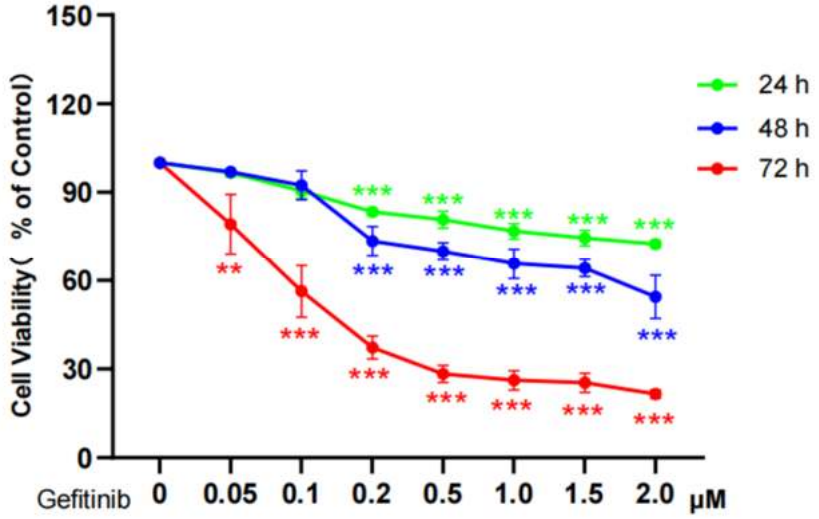


图 3.1 吉非替尼抑制 HaCaT 细胞活力

Figure 3.1. HaCaT cell viability is decreased by gefitinib.

Cells were treated with 0-2.0 μM Gefitinib for 24, 48 and 72 hours respectively. Absorbance values were detected by a microplate reader using the MTS method. ***P*<0.01 and ****P*<0.001 compared to control, n=3.

3.3.2 吉非替尼导致 HaCaT 细胞炎症反应及屏障功能受损

吉非替尼（0.5 μM、1.0 μM、2.0 μM）处理 HaCaT 细胞 48 h，qRT-PCR 检测炎症因子 *IL-6*、*TNF-α* mRNA 表达。与正常组相比，吉非替尼明显升高 *IL-6* mRNA 表达（*P*<0.01）；与正常组相比，2.0 μM 吉非替尼明显升高 *TNF-α* mRNA 表达（*P*<0.001）（图 3.2 A 和 B）。其次，qRT-PCR 和 Western Blot 检测 HaCaT 细胞屏障因子 K10、K17 及 CLDN4 mRNA 和蛋白表达水平。与正常组相比，吉非替尼明显促进 K10、K17 表达（*P*<0.01）；显著降低 *CLDN4* 表达（*P*<0.01）（图 3.2 C 和 D）。

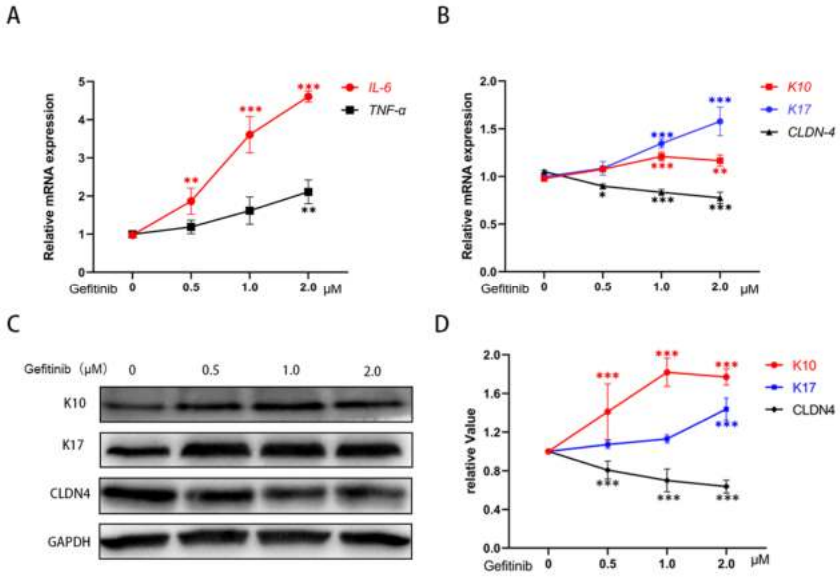


图 3.2 吉非替尼导致 HaCaT 细胞炎症反应及屏障功能受损

Figure 3.2 Gefitinib induced inflammatory reaction and barrier degradation in HaCaT cells.

（A）RT-qPCR analysis of IL-6 and TNF-α mRNA expression in HaCaT cells after 48 hours of treatment with various gefitinib

doses.（B） RT-qPCR analysis of K10 , K17 and CLDN4 mRNA expression in HaCaT cells after 48 hours of treatment with various gefitinib doses.（C,D） Western blot was used to identify the protein expression of K10, K17, and CLDN4 in each group of HaCaT cells..Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n=3.

3.4 吉非替尼抑制 EPHA2 表达导致皮肤屏障功能受损

3.4.1 吉非替尼抑制 BALB/c 小鼠及 HaCaT 细胞 EPHA2 表达

不同浓度吉非替尼处理 HaCaT 细胞和 BALB/c 小鼠，检测 EPHA2 表达。结果显示，吉非替尼处理 HaCaT 细胞和 BALB/c 小鼠后 *EPHA2* 的 mRNA 表达明显降低（*P*<0.01）（图 5.1 A）；另外，与正常组相比，吉非替尼处理 HaCaT 细胞和 BALB/c 小鼠后 EPHA2 的蛋白表达下调（*P*<0.01）（图 5.1 B 和 C）。

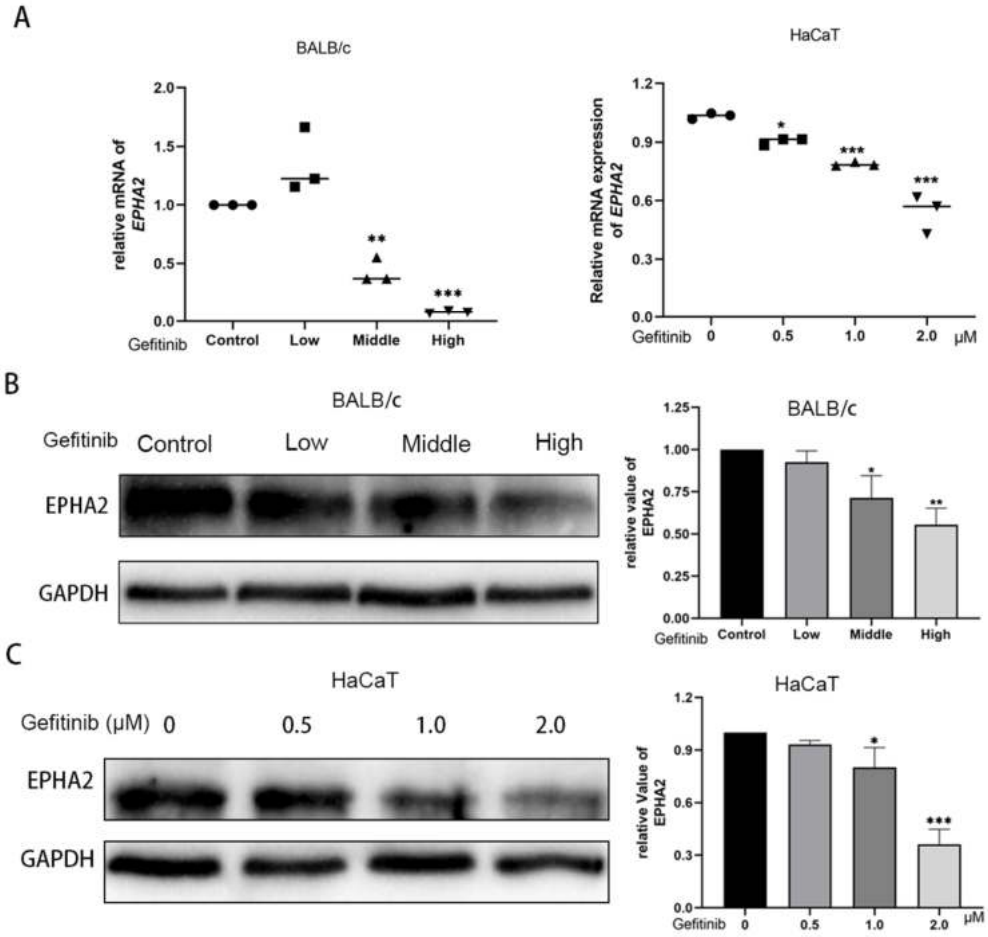


图 4.1 吉非替尼抑制 BALB/c 小鼠及 HaCaT 细胞 EPHA2 的表达

Figure 4.1 Gefitinib inhibits EPHA2 expression in BALB/c mice and HaCaT cells

（B）(A)Using qRT-PCR analysis of EPHA2 expression in mouse skin and HaCaT cells, gefitinib Low (75 mg/kg), Middle (150 mg/kg), and High (225 mg/kg) were given to BALB/c mice for 40 days. Additionally, different dosages of gefitinib were given to HaCaT cells for 48 hours. (B) A Western Blot experiment used to determine the expression of EPHA2 in mouse skin. (C) Western Blot analysis of the expression of EPHA2 in HaCaT cells after different gefitinib doses were applied.Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n=3.

3.4.2 EPHA2 激动剂（Fc）改善 HaCaT 细胞炎症反应及屏障功能

HaCaT 细胞经吉非替尼、吉非替尼联合 EPHA2 激动剂干预，qRT-PCR 检测 *IL-6*、*TNF-α* mRNA 表达。与正常组相比，吉非替尼组 *IL-6*、*TNF-α* mRNA 表达均显著上调（*P*<0.01）；与吉非替尼组相比，吉非替尼联合 EPHA2

激动剂（Fc）干预 HaCaT 细胞 *IL-6*、*TNF-α* mRNA 表达均显著下降（P<0.05）（图 4.2 A）。其次，HaCaT 细胞经吉非替尼、吉非替尼联合 EPHA2 激动剂干预，qRT-PCR 和 Western Blot 方法检测 K10、K17 及 CLDN4 mRNA 和蛋白表达水平。与正常组相比，吉非替尼处理的 HaCaT 细胞中 CLDN4 表达显著降低（P<0.01），K10、K17 表达显著上升（P<0.01）（图 4.2 B C 和 D）。

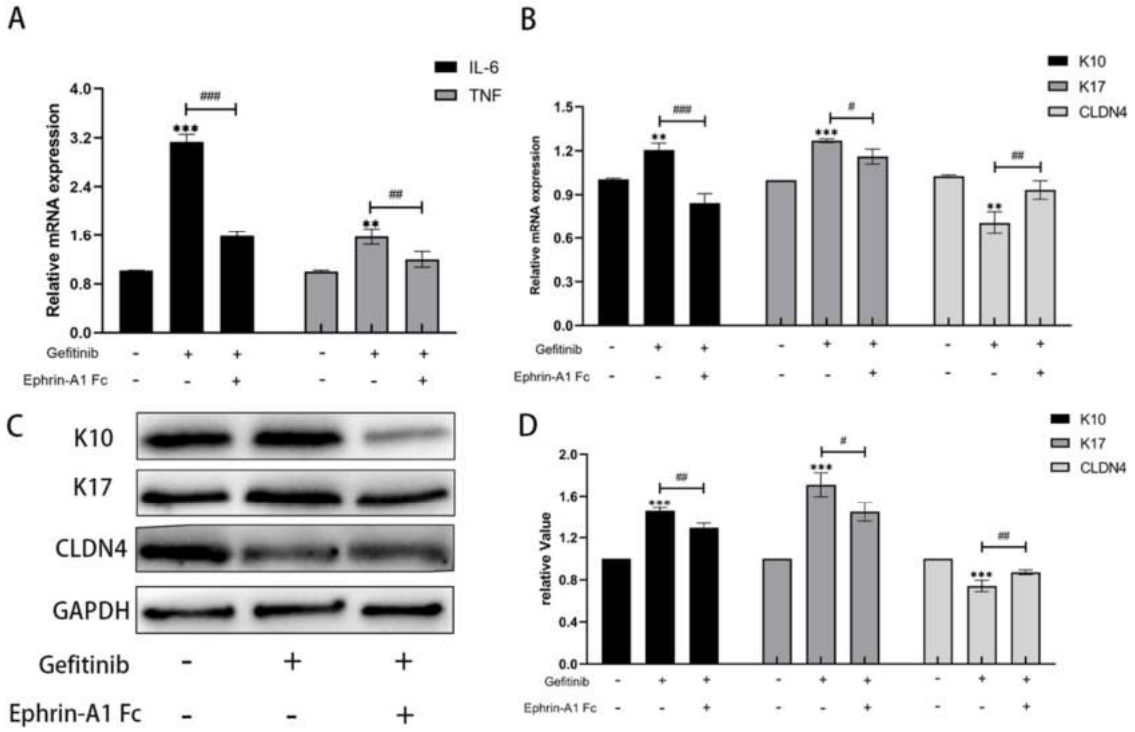


图 4.2 EPHA2 激动剂（Fc）改善 HaCaT 细胞炎症反应及屏障功能

EPHA2 agonist (Fc) improves the inflammatory response and barrier function of HaCaT cells.

1.0 μM Gefitinib and 1.0 μM Gefitinib in combination with recombinant mouse protein Ephrin-A1 Fc were given to HaCaT cells for 48 hours.(A) EPHA2 agonists (Fc) inhibit the mRNA expression of inflammatory factor in HaCaT cells.(B) EPHA2 agonists (Fc) promote gene mRNA expression of HaCaT cell barrier factor. (C D) EPHA2 agonist (Fc) alters protein expression of HaCaT cell barrier factor.Compared with the control group, compared with the gefitinib group, **P<0.01, ***P<0.001 ; $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01, n=3.

讨论

吉非替尼在临床上应用广泛，对于晚期非小细胞肺癌疗效可靠。但在使用过程中，患者出现不同程度的皮肤不良反应且发生率较高，限制其临床应用并影响治疗进程。因此，在接受吉非替尼治疗期间，探究其不良反应发生的机制是本研究的重点。

EGFR-TKIs 在人体内代谢复杂，构建其引发皮肤毒性相关的动物模型是研究关键。有研究发现 EGFR-TKIs 干预小鼠后，小鼠皮肤表皮层的厚度明显增加并有免疫细胞浸润[19, 20]。另有多个研究证实，EGFR-TKIs 诱导的动物皮肤毒性模型中可见皮疹部位组织中存在大量炎症细胞聚集、棘层松解、角化不全及表皮增厚等[21-23]。本实验以不同浓度吉非替尼诱导小鼠皮肤毒性，发现吉非替尼干预小鼠 40 天后背部出现红肿，面部眼睑唇角出现严重脱毛红肿症状，表皮厚度明显增加且呈剂量依赖性，与文献报道一致[14, 24]。但镜下观察没有明显的炎症细胞浸润，可能与诱导性 EGFR 抑制或缺失对成年鼠毛囊的生长发育无明显影响有关[13]，需进一步深入研究。

此外，吉非替尼干预后的小鼠皮肤组织中屏障功能相关蛋白（Ki67、K1、K10 及 DSG-1）表达明显增加，表明吉非替尼可能通过影响小鼠皮肤屏障功能而导致皮肤毒性。研究发现，Ki67 在正常表皮中仅局限于基底层中弱表达甚至不表达，而在受损的皮肤中表达异常活跃[25]。本实验中吉非替尼干预小鼠后，Ki67 表达增加，说明吉非替尼可促进小鼠皮肤中角质形成细胞增殖。有研究发现 EGFR-TKIs 能抑制角质形成细胞增殖[26]，与之相反的是，有研究报道 Toll 样受体 4（TLR4）可作为角质形成细胞增殖的负调节剂，其表达与 IL-6 成负相关[27, 28]。本研究推测可能吉非替尼导致小鼠中的炎症因子 IL-6 水平上升影响 TLR4 的表达，进而促进小鼠皮肤角质形成细胞的增殖，其具体机制仍需深入研究。研究发现吉非替尼导致大鼠皮肤中角蛋白-1（K1）表达增多，从而诱导皮肤角质形成细胞凋亡[17]。本实验发现与正常组相比，吉非替尼处理后小鼠皮肤表皮层中的角质形成细胞凋亡增多，细胞排列松散无秩序，提示吉非替尼在皮肤中的主要靶细胞可能是角质形成细胞。角蛋白-10（K10）不仅作为细胞骨架抵抗机械应力，在维持细胞增殖与分化、炎症反应及皮肤屏障功能等生物过程亦起非常重要的作用[29, 30]。角蛋白中间丝与桥粒之间的相互作用是通过角蛋白与桥粒蛋白的结合介导，共同维持皮肤屏障稳态[31]。EGFRi 药物干预三维微表皮体外模型，结果显示桥粒芯糖蛋白-1（DSG-1）表达明显增加[32]，提示 EGFR 信号通路被阻断后，可促进表皮中角质形成细胞的分化能力。本实验中，给予吉非替尼干预小鼠，K10 及 DSG-1 表达增加，促进了皮肤中角质形成细胞分化，从而导致皮肤角质层增厚，影响皮肤的正常屏障功能而诱导皮肤毒性。

基于上述动物实验，认为吉非替尼导致皮肤不良反应的主要靶细胞为皮肤基底层未分化的角质形成细胞。因此，本课题继而以角质形成细胞（HaCaT 细胞）为研究对象，用不同浓度的吉非替尼干预细胞进行机制研究。

课题首先基于网络药理学和分子对接方法，发现 EPHA2 可能参与吉非替尼导致皮肤屏障功能的损伤，但具体机制不明。EPHA2 是一种受体酪氨酸激酶，由肝配蛋白-A1 激活，调节细胞的迁移[33]、增殖和分化[34]，有助于维持表皮组织稳态。EGFRi 可诱导表皮角质形成细胞中肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白介素-6（IL-6）等表达，影响皮肤屏障相关蛋白产生，促进炎症，诱发皮损[7, 13, 35]。本实验中，吉非替尼干预 HaCaT 细胞后，炎症因子表达明显增多，EPHA2 表达明显降低，提示吉非替尼可能通过影响 EPHA2 的表达诱导角质形成细胞炎症发生。研究发现 EPHA2 缺陷小鼠中存在更多数量的淋巴和浸润性白细胞，相关炎症因子 mRNA 表达水平增加，而 EPHA2 激动剂（Ephrin-A1-Fc，Fc）可预防肠系膜缺血再灌注引起的损伤，减少肺区白细胞募集，IL-1β 和 TNF-α 水平减少[36]。本实验中 EPHA2 激动剂（Fc）联合吉非替尼干预角质形成细胞，发现 TNF-α 及 IL-6 的表达水平明显下降，表明吉非替尼通过抑制 EPHA2 的表达导致细胞炎症的发生。因此，EPHA2 可能是吉非替尼导致皮肤炎症反应的重要靶点之一。

表皮角蛋白和紧密连接蛋白是维持皮肤屏障功能的重要组成部分[37, 38]。其中，角蛋白 K10、K17 及紧密连接蛋白 CLDN4 均是其重要组成部分，与多种屏障相关的皮肤疾病的发生发展密切相关。K17 在正常皮肤中一般不表达或低表达，而皮肤受累或过度增殖时高度表达[39-40]，如银屑病。[39, 40]大疱性表皮松懈症与丘疹脓疱型痤疮中 CLDN4 表达均减少，与皮肤屏障功能受损密切相关[41]。本研究中，吉非替尼干预 HaCaT 细胞，K10 和 K17 水平明显增加，紧密连接蛋白 CLDN4 表达明显降低，说明吉非替尼可能通过影响上述蛋白的表达而导致细胞屏障受损，而 EPHA2 激动剂（Fc）处理后，K10 和 K17 的表达水平明显下降，紧密连接蛋白 CLDN4 表达上升，说明吉非替尼通过抑制 EPHA2 的活性影响角蛋白及紧密连接蛋白表达，导致细胞屏障功能受损而诱导皮肤损伤，与文献研究一致[42, 43]，为角蛋白及紧密连接蛋白在表皮角质形成细胞内依赖 EPHA2 的方式保护细胞屏障功能提供一定证据。

综上，吉非替尼可通过下调 EPHA2 的表达诱导表皮屏障功能受损和炎症反应，进一步揭示其在皮肤毒性不良反应中的可能机制，为开发相关治疗药物提供依据。但本研究仍存在一些局限性。有研究表明 EphA2 激活可拮抗表皮生长因子（EGF）和血小板衍生生长因子（PDGF）诱导的 Ras/ERK1/2 信号级联反应，从而抑制肿瘤细胞生长发育[44]；同时 EPHA2 激动剂通过抑制人黑素瘤细胞迁移和侵袭等行为发挥抗肿瘤作用[45]。实验中干预 EPHA2 通路是否会影响药物治疗效果需进一步实验研究。此外，EPHA2 激动剂是否能够改善吉非替尼诱导的小鼠皮肤损伤及从细胞和动物层面通过基因敲除或过表达形式验证吉非替尼与 EPHA2 之间直接作用以完善实验，是后期研究的重点。

结论

吉非替尼通过抑制 EPHA2 的表达导致皮肤屏障功能受损和皮肤炎症发生。

参考文献

[1] Ettinger D S, Wood D E, Aisner D L, et al. NCCN guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 2.2021[J].J Natl Compr Canc Netw,2021,19(3):254-266.

[2] 于佳,王镜辉,贺凡等.吉非替尼致严重剥脱性皮疹 1 例[J].中国医院药学杂志, 2022,42(12):1288-1290.

[3] Chen K L, Lin CC, Cho YT, et al. Comparison of skin toxic effects associated with Gefitinib, Erlotinib, or Afatinib treatment for non-small cell lung cancer[J]. JAMA Dermatol, 2016,152(3):340-342.

[4] Stoll SW, Benedict M, Mitra R, et al. EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-XL[J].Oncogene,1998,16 (11): 1493-1499.

[5] Zhang H, Westrom S, Kappelin P, et al. Exploration of novel candidate genes involved in epidermal keratinocyte differentiation and skin barrier repair in man[J]. Differentiation, 2021,119:19-27.

[6] Lu PH, Kuo TC, Chang KC, et al. Gefitinib-induced epidermal growth factor receptor-independent keratinocyte apoptosis is mediated by the JNK activation pathway[J]. Br J Dermatol, 2011,164(1):38-46.

[7] Kim JM, Ji J H, Kim Y S, et al. rhEGF Treatment Improves EGFR Inhibitor-Induced Skin Barrier and Immune Defects[J]. Cancers (Basel), 2020,12(11).

[8] Wakita H, Takigawa M. Activation of epidermal growth factor receptor promotes late terminal differentiation of cell-matrix interaction-disrupted keratinocytes[J]. J Biol Chem, 1999,274(52):37285-37291.

[9] Lee M W, Seo C W, Kim S W, et al. Cutaneous side effects in non-small cell lung cancer patients treated with Iressa (ZD1839), an inhibitor of epidermal growth factor[J]. Acta Derm Venereol, 2004,84(1):23-26.

[10] Guttman-Yassky E, Mita A, De Jonge M, et al. Characterisation of the cutaneous pathology in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with the EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib[J]. Eur J Cancer, 2010 ,46(11):2010-2019.

[11] Brandner J M. Importance of tight junctions in relation to skin barrier function[J]. Curr Probl Dermatol, 2016,49:27-37.

[12] Basler K, Brandner J M. Tight junctions in skin inflammation[J]. Pflugers Arch, 2017,469(1):3-14.

[13] Lichtenberger B M, Gerber P A, Holcmann M, et al. Epidermal EGFR controls cutaneous host defense and prevents inflammation[J]. Sci Transl Med, 2013,5(199):111r-199r.

[14] 邢海燕,刘玉萍,蒋祥亮等. “消疹方”水提液对盐酸厄洛替尼所致小鼠皮肤毒性的治疗作用研究及机制初探[J]. 江苏中医药, 2021,53(02):74-78.

[15] Gao L, Wang X D, Niu Y Y, et al. Molecular targets of Chinese herbs: a clinical study of hepatoma based on network pharmacology[J]. Sci Rep, 2016,6:24944.

[16] 铁茹,刘利兵,李旭波等. 硫化钠脱毛剂最佳脱毛浓度的探讨[J]. 陕西医学杂志, 2009,38(10):1283-1284.

[17] 万亮琴. 验方“芪银三两三”治疗吉非替尼诱导皮疹的作用及其机制研究[D]. 北京中医药大学, 2019.

[18] Zhang Y, Wang Y, Chen Z, et al. Comparison of gefitinib-induced skin adverse reactions (SAR) in C57BL/6 and FVB/N mice[J]. Toxicol Res (Camb), 2021,10(2):334-344.

[19] Ward N L, Bhagathavula N, Johnston A, et al. Erlotinib-induced skin inflammation is IL-1 mediated in KC-Tie2 mice and human skin organ culture[J]. J Invest Dermatol, 2015,135(3):910-913.

[20] Wan L, Wang Y, Tang Y, et al. Gefitinib-Induced cutaneous toxicities in brown norway rats are associated with macrophage infiltration[J]. Inflammation, 2020,43(6):2137-2146.

[21] Thewes M, Stadler R, Korge B, et al. Normal psoriatic epidermis expression of hyperproliferation-associated keratins[J]. Arch Dermatol Res, 1991, 283(7): 465-471.

[22] 张旭.EGFRIs 皮疹模型的建立及“止痒平肤液”治疗 EGFRIs 皮疹机制的实验研究[D].北京中医药大学, 2020.

[23] Chen L Y, You Q, Lv D Z, et al. GPCR-mediated EGFR transactivation ameliorates skin toxicities induced by afatinib[J].

Acta Pharmacol Sin, 2022,43(6):1534-1543.
[24] 雷琳. 足三里电针预处理对厄洛替尼诱发的皮肤炎性反应的早期干预及机制研究[D]. 湖北中医药大学, 2022.
[25] 黄剑秋. 银屑平丸对小鼠银屑病样模型皮损中表皮角质形成细胞 K10 和 Ki67 表达水平的影响[D]. 湖南中医药大学, 2019.
[26] Fang H, Wang Y, Xu L, et al. EGFR inhibitor gefitinib regulates barrier function in human epidermal keratinocytes via the modulation of the expression of claudins[J]. Int J Mol Med, 2019,43(3):1522-1530.
[27] Iotzova-Weiss G, Freiberger S N, Johansen P, et al. TLR4 as a negative regulator of keratinocyte proliferation[J]. PLoS One, 2017,12(10):e185668.
[28] Zhao S, Gao N, Qi H, et al. Suppressive effects of sunitinib on a TLR activation-induced cytokine storm[J]. Eur J Pharmacol, 2019,854:347-353.
[29] Saunders S P, Floudas A, Moran T, et al. Dysregulated skin barrier function in Tmem79 mutant mice promotes IL-17A-dependent spontaneous skin and lung inflammation[J]. Allergy, 2020,75(12):3216-3227.
[30] Utsunomiya A, Chino T, Utsunomiya N, et al. Homeostatic function of dermokine in the skin barrier and inflammation[J]. J Invest Dermatol, 2020,140(4):838-849.
[31] Wallace L, Roberts-Thompson L, Reichelt J. Deletion of K1/K10 does not impair epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity[J]. J Cell Sci, 2012,125(Pt 7):1750-1758.
[32] Joly-Tonetti N, Ondet T, Monshouwer M, et al. EGFR inhibitors switch keratinocytes from a proliferative to a differentiative phenotype affecting epidermal development and barrier function[J]. BMC Cancer, 2021,21(1):5.
[33] Miao H, Li D Q, Mukherjee A, et al. EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt[J]. Cancer Cell, 2009,16(1):9-20.
[34] Miao H, Burnett E, Kinch M, et al. Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation[J]. Nat Cell Biol, 2000,2(2):62-69.
[35] Niziol M, Oscilowska I, Baszanowska W, et al. Recombinant prolidase activates EGFR-dependent cell growth in an experimental model of inflammation in HaCaT keratinocytes. implication for wound healing[J]. Front Mol Biosci, 2022,9:876348.
[36] Okazaki T, Ni A, Baluk P, et al. Capillary defects and exaggerated inflammatory response in the airways of EphA2-deficient mice[J]. Am J Pathol, 2009,174(6):2388-2399.
[37] 番晓清,何黎.皮肤屏障受损与相关性皮肤病的研究进展[J].皮肤病与性病, 2021,43(06):741-743.
[38] 郭金竹,铁璐,王文慧.角蛋白 10 的功能与相关皮肤病[J].中国皮肤性病学杂志, 2022,36(01):118-122.
[39] Lin Y, Zhang W, Li B, et al. Keratin 17 in psoriasis: current understanding and future perspectives[J]. Semin Cell Dev Biol, 2022,128:112-119.
[40] Qiao P, Zhi D, Yu C, et al. Activation of the C3a anaphylatoxin receptor inhibits keratinocyte proliferation by regulating keratin 6, keratin 16, and keratin 17 in psoriasis[J]. FASEB J, 2022,36(5):e22322.
[41] 金玉梅,吴文娟,杨春艳等. 紧密连接蛋白 Claudins 与皮肤病发生相关性的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2021,35(03):329-332.
[42] Perez W B, Ventrella R, Kaplan N, et al. EphA2 proteomics in human keratinocytes reveals a novel association with afadin and epidermal tight junctions[J]. J Cell Sci, 2017,130(1):111-118.
[43] Han J, Wang L, Lv H, et al. EphA2 inhibits SRA01/04 cells apoptosis by suppressing autophagy via activating PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Arch Biochem Biophys, 2021,711:109024.
[44] Macrae M, Neve R M, Rodriguez-Viciana P, et al. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2[J]. Cancer Cell, 2005,8(2):111-118.
[45] Sakamoto A, Kato K, Hasegawa T, et al. An agonistic antibody to EPHA2 exhibits antitumor effects on human melanoma cells[J]. Anticancer Res, 2018,38(6):3273-3282.

HIV 感染合并糖脂代谢异常患者血清氨基酸谱的靶向代谢组学研究

张婧，陈艳芳，王明礼，李凌华，邹尚荣

广州医科大学附属市八医院 药学部/临床药学组 广州 广东 510060

【摘要】目的：探讨人类免疫缺陷病毒（HIV）感染合并糖脂代谢异常患者的氨基酸代谢谱特征，以及代谢-炎症-胰岛素抵抗相关网络，为探索 HIV 感染患者代谢并发症的疾病机制和作用靶点提供依据，为实现人群的精准治疗和健康管理提供参考。**方法：**纳入已接受 2 种核苷类反转录酶抑制剂+依非韦伦治疗至少 1 年的 HIV 感染或获得性免疫缺陷综合征（AIDS）患者，分为代谢正常组、血脂异常组和血糖异常组。采用超高效液相色谱-串联质谱方法定量检测患者血清中 24 种氨基酸水平，分析 HIV 感染合并不同程度糖脂代谢异常患者氨基酸代谢的特征性变化，并采用 Spearman 偏相关分析氨基酸水平与生化参数、炎症细胞因子等临床变量的相关性。**结果：**与健康对照组相比，各组 HIV/AIDS 患者的氨基酸代谢明显失调，表现为 5-羟色胺、精氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、S-腺苷甲硫氨酸、色氨酸、酪氨酸水平显著降低，瓜氨酸、同型半胱氨酸、犬尿氨酸水平显著升高；仅在血糖异常组中，亮氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸水平升高。结合单因素分析和 OPLS-DA 分析，共筛选得到 18 种氨基酸差异代谢物，其中血糖异常组的 KEGG 代谢通路主要涉及精氨酸生物合成与代谢、甲硫氨酸循环和色氨酸代谢。相关性分析表明，在 HIV/AIDS 患者中，14 种氨基酸差异代谢物与 TNF-α、CRP、IL-1β、Gal3 等炎症因子呈正相关，其中犬尿氨酸、鸟氨酸和同型半胱氨酸的水平与空腹血糖、胰岛素抵抗指数呈正相关。**结论：**本研究通过靶向代谢组学分析，揭示了 HIV 感染合并糖脂代谢异常患者血清氨基酸谱的变化特征，以及精氨酸代谢、甲硫氨酸循环和色氨酸代谢中的差异代谢物与慢性炎症、胰岛素抵抗的相关性。这些代谢参数可能是 HIV/AIDS 患者发生代谢并发症的潜在致病因素，并可能作为监测疾病进展和个性化治疗的重要靶点。

【关键词】HIV；糖脂代谢异常；氨基酸；代谢组学；炎症；胰岛素抵抗

临床药师引导住院患者参与用药安全的模式及应用评价

张 磊[1]，李浩[2]

（1.宜宾市第一人民医院药学部，四川宜宾 644000；2.宜宾市第一人民医院神经内科，四川宜宾 644000）

【摘要】目的：调查宜宾市第一人民医院神经内科住院患者在参与用药安全行为的现况，明确住院患者参与用药安全行为的影响因素，帮助药师掌握患者需求，为制定个性化的干预方案提供参考。**方法：**发放调查问卷给患者填写，共访谈和问卷调查宜宾市第一人民医院 2022 年 1 月到 6 月住院患者共计 110 名，按照数字随机法随机分成 2 组，其中对照组按照一般治疗流程，干预组加入临床药师帮助患者参与静脉输液用药安全，调查两组患者的积极度评分、自我管理效能评分及用药不良事件的差异。**结果：**干预组积极度、自我管理效能总分显著高于对照组（均 $P<0.05$）；口服给药的用药不良事件例数比对照组显著减少。**结论：**临床药师的参与可以提高患者对用药安全进行自我管理，有效防范药物不良事件的发生，对确保患者住院期间的用药安全具有重要作用。

【关键词】临床药师；评价；用药安全；用药模式

Clinical Pharmacists guide in-patients to participate in medicaiton safety model and application evaluation

ZHANG Lei[1], LI Hao[2]

[1]Department of Pharmacy, [2]Department of Neurology, The First People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan, 644000, China

【Abstract】Objective: To investigate the current situation of in-patients' participation in medication safety behaviors, further clarify the influencing factors of in-patients' participation in medication safety behaviors, help pharmacists master the needs of patients, and provide practical reference for the subsequent development of personalized intervention programs. **Methods:** Questionnaire suitable for this study, were used to stratify sampling method. A total of 110 in-patients were interviewed and surveyed from January 2022 to June 2022, and were randomly divided into 2 groups. In the control group, patients received general treatment process, and in the intervention group, patients received the help from clinical pharmacists for participating in intravenous infusion medication safety in addition. The differences of positive degree, self-management efficacy and adverse drug events between two groups were investigated. **Results:** The total scores of positive degree and self-management efficacy in the intervention group were significantly higher than those in the control group（$P<0.05$）; The number of adverse events of oral administration in the the intervention group was significantly lower than that in the control group. **Conclusion:**The participation of clinical pharmacists can help and improve the patients' self-management of drug safety, prevent the occurrence of adverse drug events, and play an important role on ensuring the safety of drug use during hospitalization.

【Keywords】Clinical pharmacist；evaluation；medicationg safety；pattern of medication

研究方向:医院药学，硕士，副主任药师，644000，四川省宜宾市翠屏区 65 号

一直以来，用药安全都是患者安全最突出问题。患者是疾病治疗的主体，患者正确参与对于疾病恢复能起到积极作用。倡导患者参与患者安全，是世界卫生组织为改善患者安全在全球倡导的重要举措[1]。我国早在 2007 年就将“鼓励患者参与医疗安全”放进了安全目标中，但部分患者因为文化程度和认知水平的差异等，无法正确参与到自身用药安全中。这不仅会阻碍医护人员临床医疗决策，影响护患沟通交流；而且会推迟疾病康复，甚至导致疾病恶化[2]。本研究团队构建基于临床药师帮助患者参与到安全理论框架的干预方案，探讨确保住院患者有效参与用药安全的模式及其评价。

1.资料与方法

1.1 一般资料

经申报宜宾市第一人民医院伦理委员会同意后，共访谈和问卷调查宜宾市第一人民医院 2022 年 1 月到 6 月住院患者共 110 名。采用数字随机法，随机选取常规的神经内科住院患者 55 例为对照组，另选取 55 例住院患者加入临床药师指导后患者参与静脉输液用药安全为干预组。纳入标准：本次住院已经 3 d 以上；年龄≥18 岁；住院期间接受药物治疗；意识清楚，理解与表达能力较好；自愿参加本次调查。排除标准：病情严重，民事行为能力受限者；与医院有未解决的医疗纠纷者。

1.2 评价方式

干预组：在入院前三天内给干预对象发放入院时评价问卷，并在入院后每天由临床药师完成相应的用药教育干预，交待其用药信息，鼓励其参与行为，并对不正确的行为予以纠正。在出院前一天予以发放出院时评价问卷。

对照组：在入院前三天内给干预对象发放入院时评价问卷，之后不做特别的教育干预，患者自我参与接受医务人员的诊疗，在出院前一天予以发放出院时评价问卷。

1.3 评价依据

1.3.1 患者积极度：采用积极度量表（Patient Activation Measure, PAM）[3-4]评估患者，使用 Likert5 级评分法，从“不适用”到“非常同意”分别计分 0-4 分。评判内容涉及知识、信心、技能三个维度，共有 13 个条目。

1.3.2 自我管理效能：采用用药安全行为量表[3-4]，评判患者在用药过程中是否有自我管理效能参与到用药安全的行为，采用 Likert5 级评分法，从“没有信心”到“非常有信心”分别赋值“1-5 分”。涉及包正性态度、自我减压、自我决策三个维度，共计 28 个条目。

1.3.3 用药不良事件发生次数情况：药品不良事件包括药品标准缺陷、药品质量问题、药品不良反应、用药失误以及药品滥用[5]。对比两组发生次数，旨在判断通过临床药师引导的干预组成效是否有意义。

1.4 评价依据

采用 SPSS22.0 对数据进行分析，符合正态分布计量资料采用均数±标准差表示，两组间采用独立样本 t 检验比较组间差异。计数资料按构成比表示，采用 χ^2 检验比较组间差异。P<0.05 时差异有统计学意义。

2.调查结果

2.1 积极度评分和自我管理效能评分

评价问卷回收率达到 100%。本研究结果显示:干预后，干预组积极度、自我管理效能评分显著高于对照组，差异有统计学意义（均 P<0.05）。（具体见表 1，2）

表 1 两组干预前后积极度评分比较

组别	例数	总分		知识		信心		技能	
		干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
对照组	55	32.75±1.43	33.11±1.56	4.83±0.68	4.92±0.72	9.92±0.69	9.97±0.71	19.37±1.12	19.67±1.09
干预组	55	33.24±1.65	37.28±1.82*	4.79±0.61	5.57±0.69*	9.86±0.61	10.21±0.98*	19.29±1.15	21.02±1.21*
t		-1.327	5.493	-1.169	2.638	-1.834	6.724	-1.009	7.029
p		0.183	0.001	0.245	0.000	0.083	0.001	0.336	0.000

**P<0.01

表 2 两组干预前后自我管理效能评分比较

组别	例数	总分		知识		信心		技能	
		干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
对照组	55	91.35±1.36	93.42±1.46	50.73±2.61	51.48±2.54	9.87±0.75	9.98±0.67	32.45±1.52	32.97±1.58
干预组	55	90.87±1.42	99.42±1.53	49.96±2.55	53.87±2.12	9.91±0.81	12.73±0.59	32.68±1.68	34.43±1.61
t		1.874	-9.458	1.549	-3.531	-0.913	-20.053	-0.352	-3.863
p		0.075	0.03*	0.156	0.002	0.378	0.000**	0.556	0.005**

*P<0.05，**P<0.01

2.2 用药方式和用药不良事件发生次数

将住院患者主要用药方式分为口服用药、静脉用药、以及其他方式。干预组中临床药师按照不同的给药途径进行用药教育引导。本次调查中住院患者主要为静脉用药占 70%(77/110)，口服用药占 27.3%(30/110)，其他方式 2.7%(3/110)。经 χ^2 检验，对比两组组差异，发现在口服药的服用上，两组用药不良事件差异有统计学意义（P<0.05），静脉给药及其他给药方式差异无统计学意义（P>0.05）。

表 3 两组患者住院期间用药不良事件次数比较

组别	例数	口服给药		静脉给药		其他	
		给药次数	用药不良事件	给药次数	用药不良事件	给药次数	用药不良事件
对照组	55	1539	9（0.58%）	1145	20（1.75%）	382	2（0.52%）
干预组	55	1559	2（0.13%）	1121	11（0.98%）	378	3（0.79%）
χ^2			3.363		1.925		0.000
P			0.033*		0.165		0.991

*P<0.05

3.讨论

3.1 对照组中住院患者参与安全用药现况

对照组中患者的积极度和自我管理效能评分的平均值为（33.11±1.56）和（93.42±1.46）。这与很多文献报道一致[6-9]，即患者自行参与用药安全的意识缺乏，积极性并不高。在调查中发现，很多患者害怕频繁提问或者咨询会引起医护人员反感，只有 38%的患者会在医护人员进行医疗操作时参与监督与询问。另外，患者参与的积极度和年龄也有一定关系[10]。年龄在 65 岁以下的患者参与用药安全的积极性更高，领悟信息能力也越强，参与用药安全的行为也较好。这可能跟年龄较大的患者，身体机能下降，自我照护能力不足有关。此外，文化程度较低的患者对疾病认知程度不高，参与健康管理能力也较差[11]。

3.2 干预组中住院患者参与安全用药现况

临床药师的参与起到了弥补对照组中存在的年龄、职业、受教育程度、生活阅历差异造成的参与度不高的情况。干预组中，不仅其患者的积极度和自我管理效能评分比对照组高，而且口服给药的用药不良事件比对照组显著减少。例如：内分泌科住院患者中一些首次发现糖尿病者，使用降糖药依从性差，不能按时按量服药，血糖忽高忽低，影响治疗效果；临床药师对类似患者进行耐心劝导，告之高血糖对主要疾病的影响，并将患者用药时间和口服剂量做成表格交给患者，嘱其每次给药后记录。通过定时观察记录、监测用药情况，患者依从性得到提高，不连续用药情况显著减少。另外一些特殊药品使用时的注意事项，临床药师也发挥了专业优势[12-13]。如，吸入用异丙托溴铵对眼睛有刺激性，雾化前应嘱咐病人遮盖双眼；含激素类药物吸入后要漱口以防止口腔内真菌感染；助消化药、止咳糖浆不宜热水送服；控释、缓释剂型不应掰开服用等。这些用药方法的教育不仅可以提高药效，而且降低了不良反应的发生。

干预组和对照组还有一个区别在于对出院带药的交代。对照组患者是接受护士的用药指导，但护士由于专业限制，对药品认识有限，能带给患者的用药指导也比较少，这也是导致对照组中患者的自我管理效能差的原因。而干预组中由临床药师将药品送到出院患者的床前，既可以核查患者出院带药处方的合理性，包括适应证是否合理、用法用量是否正确、是否存在药物相互作用等情况，又能告诉他们怎样使用药物，还有哪些需要注意的地方。实际经验表明，大多数患者都觉得这种做法非常人性化，也乐于接受[14]。

以上表明：通过临床药师帮助患者参与到安全理论框架中，这种干预方案能够提高患者的积极度和自我管理能力。

4.结语

由于临床药师的引导，住院患者更容易参与到用药安全中去，使之成为自身用药安全的主体，参与辨识和报告并发症，防范药物不良事件的发生，对医院安全管理也起到改善作用。

参考文献

[1] 中国医院协会.中国医院协会患者安全目标(2019 版)[J].中国卫生质量管理, 2019(12): 57-58.

[2] 滕苗，吕富荣，徐玲，等.医院评审评价中的患者安全[J].中国医院, 2016， 20(12): 10-12.

[3] 王冰寒，颜巧元，朱琴.住院患者参与用药安全行为量表的研制及信效度检验[J]. 中华护理杂志,2017，52(3): 377-380.

[4] 李娟，赵庆华，肖明朝，等.住院患者参与患者安全行为意愿的现状调查研究[J].护士进修杂志,2012,27(7): 643-645.

[5] 李苑雅,张艳,沈爱宗. 基于自发呈报系统药品不良反应信号检测方法的研究进展[J].安徽医药,2015,07:1233-1236.

[6] 孔淑贞，杨惠云，孔德玲，等. 2006-2016 年我国关于患者参与患者安全研究的文献计量分析[J].中国护理管理，2017，17(6): 814-818.

[7] 蒲春波．住院患者参与用药安全行为的现状分析[J].中西医结合护理(中英文)，2017，3(11)：64-66．

[8] Adams M A,Elmunzer B J,Scheiman J M.Effect of ahealth system ,s medical error disclosure program on gastroenterology-related claims rates and costs[J].Am J Gastroenterol,2014,109(4):460-464.

[9] 肖玲, 郑双江, 赵庆华, 等.患者安全:现状与对策[J].中国循证医学杂志, 2020, 20(4): 476-480.

[10] 朱琴, 颜巧元. 患者参与患者安全标准化管理方案的研究现状及启示 [J] . 中华护理杂志, 2018, 53(07): 893-896.

[11] 聂立婷, 徐奇, 殷秀敏,等. 患者参与患者安全行为理论模型的构建[J] . 中国医院管理, 2020, 40(10): 64-67.

[12] 施楠楠，甄健存，谢颖，等.临床药师慢病管理工作模式的探讨[J]. 临床药物治疗杂志，2015，13（1）：83-86.

[13] 李月阳，刘敏，王红玉，等.老年住院患者用药错误的干预与分析[J]. 药学实践杂志，2017，35(2):187-189.

[14] 张晓荧，张四喜，周微，等. 肾内科临床药师在药物整合服务中的实践探索[J].药学实践杂志，2015，33（1）：88-89.

DRG模式下临床药师在神经内科开展按病种分组进行用药医嘱点评的模式探讨*

张 磊[1]，李浩[2]

（1.宜宾市第一人民医院药学部，四川宜宾 644000；2.宜宾市第一人民医院神经内科，四川宜宾 644000）

【摘要】目的：探讨 DRG 模式下住院医嘱点评按病种分组分类点评的创新模式及其取得的效果分析。**方法：**选取我院神经内科 3 种常见疾病（分别是脑梗死、脑出血、脑动脉供血不足）的住院患者，从 2022 年 1 月-6 月期间，每个月定期安排临床药师对其进行住院医嘱合理性点评，发现用药问题及时与临床医生沟通，对不合理用药医嘱中用法用量不适宜、适应证不适宜等相关指标进行统计和分析，动态监控这 3 中疾病的患者住院药品次均费用、平均住院日的变化情况。**结果：**2022 年 1 月-6 月每月点评的不合理医嘱成逐月下降趋势，其中脑梗死组医嘱不合理率由点评前的 7.00％（113/1615）下降至点评后的 1.79％（32/1783）；脑出血组医嘱不合理率由点评前的 6.00％（147/2450）下降至点评后的 1.58％（40/2533）；脑动脉供血不足组医嘱不合理率由点评前的 6.26％（187/2986）下降至点评后的 1.81％（55/3035）。3 种疾病组的患者其住院药品次均费用分别都有所下降，其中脑梗死组（下降了 9.31%）；脑出血组（下降了 26.49%）；脑动脉供血不足（下降了 30.31%）。**结论：**神经内科通过按病种分组的点评模式管理，用药医嘱不合理率得到明显下降。该模式有助于促进降低住院患者药品次均费用，协助临床控制药品费用指数。

【关键词】按疾病诊断相关分组；病种分组；用药医嘱点评；临床药师；神经内科

【中图分类号】R95,　　**【文献标识码】**A

Discussion on the mode of clinical pharmacists' evaluation of medication orders by disease group in neurology department under DRG medical insurance payment mode

Zhang Lei[1], Li Hao[2]

(1.Department of Pharmacy1, The First People's Hospital of Yibin, Sichuan Yibin 644000, China;2.Department of Network information2 , The First People's Hospital of Yibin, Sichuan Yibin 644000, China)

【Abstract】Objective: To explore the innovative mode and effect analysis of inpatient medical order comment by disease classification under DRG medical insurance payment mode. **Methods:** Select inpatients with three common diseases (cerebral infarction, cerebral hemorrhage and cerebral artery insufficiency) in the department of neurology of our hospital, and regularly arrange clinical pharmacists to comment on the rationality of their inpatient medical orders every month from January to June 2022, and timely communicate with clinical doctors when finding medication problems, and make statistics and analysis on relevant indicators such as inappropriate usage and dosage, inappropriate indications, etc. in the unreasonable medication orders, Dynamically monitor the change of the average drug cost per time and the average hospital stay of the patients with these three diseases. **Results:**From January to June 2022, the unreasonable medical

*基金项目：宜宾市卫生健康委员会项目[2020-KYY-08]

第一作者：张磊，女，副主任药师，研究生学历，研究方向为医院药学、临床药学，电子邮箱 94597026@qq.com

orders reviewed monthly will decrease month by month, and the irrational rate of medical orders in the cerebral infarction group will decrease from 7.00% (113/1615) before the review to 1.79% (32/1783) after the review; The irrational rate of medical orders in the cerebral hemorrhage group decreased from 6.00% (147/2450) before the evaluation to 1.58% (40/2533) after the evaluation; The irrational rate of medical orders in the cerebral artery insufficiency group decreased from 6.26% (187/2986) before the review to 1.81% (55/3035) after the review. The average cost of hospitalization drugs for patients in the three disease groups decreased respectively, including the cerebral infarction group (decreased by 9.31%); Intracerebral hemorrhage group (decreased by 26.49%); Cerebral artery blood supply was insufficient (decreased by 30.31%). **Conclusion:** The department of neurology has significantly reduced the irrational rate of medication orders through the evaluation mode of grouping by disease. This model helps to promote the reduction of the average drug cost per time for inpatients and assist the clinical control of the drug cost index.

【**Keywords**】Group by disease diagnosis；Disease classification; Comments on medication orders; Clinical pharmacist; Internal Medicine-Neurology

2021 年 6 月，四川省医疗保障局联合四川省财政厅、四川省卫生健康委员会发布关于推广按疾病诊断相关分组（DRG）结合点数法付费的实施意见，提出借鉴攀枝花市试点做法，因地制宜，分类推进 DRG 点数付费模式[1]。按照政策要求，2022 年 1 月开始在宜宾市第一人民医院试运行，我院立即成立了 DRG 管理小组，由医保办牵头，药学部负责对药品的控费管理。本研究中由临床药师对神经内科前 3 种疾病进行分类的医嘱点评，旨在有效控制医疗费用的无效支出，助力神经内科顺应新支付模式进行高质量发展。

1 资料和方法

1.1 资料来源

收集宜宾市第一人民医院 2022 年 1 月—2022 年 6 月期间，神经内科住院患者长期医嘱共 42315 份医嘱审核，对不合理医嘱进行点评分析。

1.2 点评方法

通过医院 PASS 临床药学管理系统，每月定期对上一个月的神经内科住院医嘱按病种分类进行医嘱点评。根据药品说明书、2015 版《中国药典》、《临床用药须知》、第 17 版《新编药物学》、《306 种注射剂临床应用检索表》等参考资料及合理用药软件系统，对于不合理的医嘱进行分析统计。运用公式计算所开医嘱的不合理比例，不合理比例（%）＝不合理医嘱/总医嘱数 x 100%；统计经临床药师干预后成功修改的医嘱数及干预成功率，干预成功率（%）＝干预后成功修改的医嘱数 / 不合格医嘱数 x 100%。将计算后的数据及 6 个月后变化趋势进行统计分析，并总结不合理医嘱产生的原因和存在的问题。

1.3 观察指标

观察 3 个疾病组在进行处方点评干预前及 6 个月后的平均住院日、药品均次费用变化情况。

1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 对数据进行分析，符合正态分布计量资料采用均数±标准差表示，计数资料按构成比表示，采用卡方检验比较组间差异。两组间采用独立样本 *t* 检验比较组间差异。*P*<0.05 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 持续点评后不合理用药情况

2022 年 1 月－2022 年 6 月医嘱点评中最常见的不合理用药情况主要分为下几种：用法用量不适宜、遴选药物不适宜、溶媒选择不适宜、配伍禁忌、联合用药不适宜等。由图 1、2、3 可看出，经临床药师干预后，临床医生开始重视不合理医嘱，并积极对临床药师提出的不合理医嘱进行修改。2022 年 1 月-6 月每月点评的不合理医嘱成逐月下降趋势，其中脑梗死组医嘱不合理率由点评前的 7.00%（113/1615）下降至点评后的 1.79%（32/1783）；脑出血组医嘱不合理率由点评前的 6.00%（147/2450）下降至点评后的 1.58%（40/2533）；脑动脉供血不足组医嘱不合理率由点评前的 6.26%（187/2986）下降至点评后的 1.81%（55/3035）。

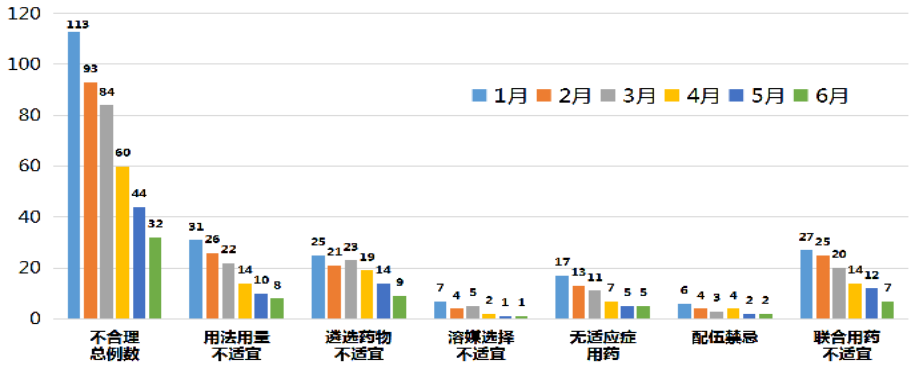


图 1　2022 年 1-6 月脑梗死病组医嘱点评的不合理情况比较

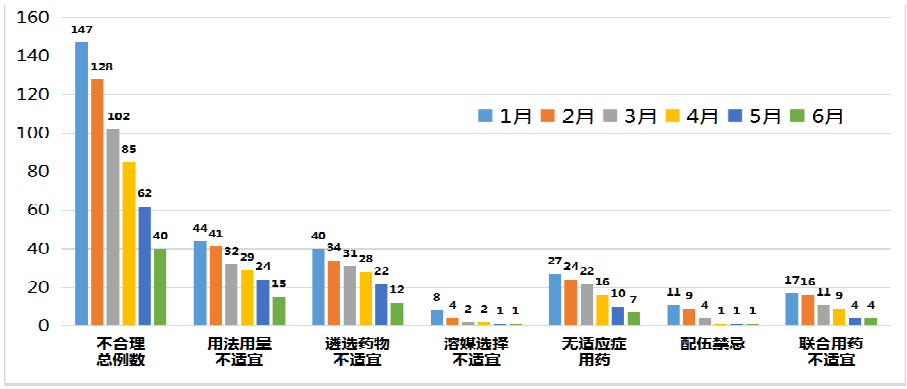


图 2　2022 年 1-6 月脑出血病组医嘱点评的不合理情况比较

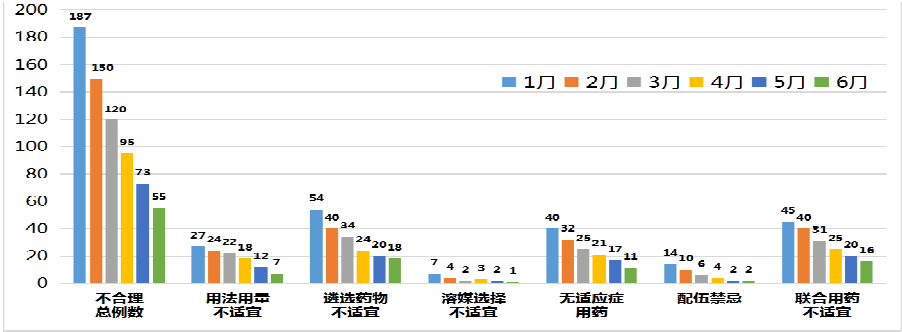


图 3　2022 年 1-6 月脑动脉供血不足病组医嘱点评的不合理情况比较

表 1　神经内科前 3 个常见病种中按药品使用总金额排序的前 5 位辅助药品品种

排名	脑梗死	脑出血	脑动脉供血不足
1	银杏叶提取物注射液	甘油果糖注射液	注射用烟酸
2	注射用烟酸	注射用氨甲环酸	倍他司汀注射液
3	丁苯酞注射液	复方曲肽注射液	氢溴酸山莨菪碱注射液
4	尼麦角林注射液	尼麦角林注射液	银杏叶提取物注射液
5	依达拉奉右嵌醇注射液	醒脑静注射液	尼麦角林注射液

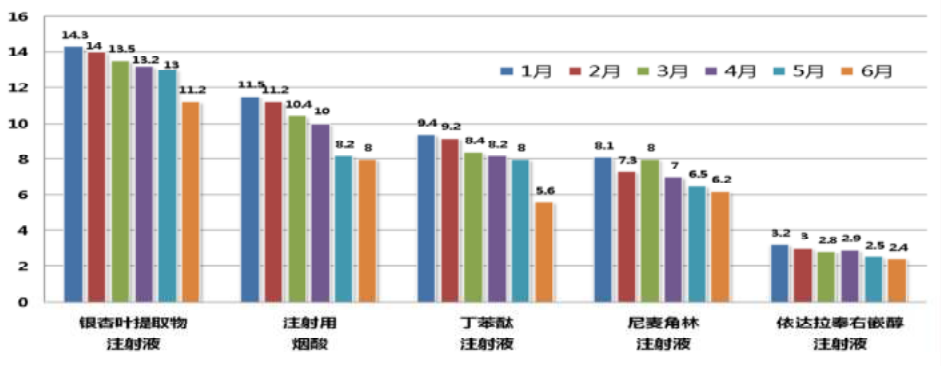


图 4　2022 年 1-6 月脑梗死病组前 5 种常用药品的用药总金额情况（万元）

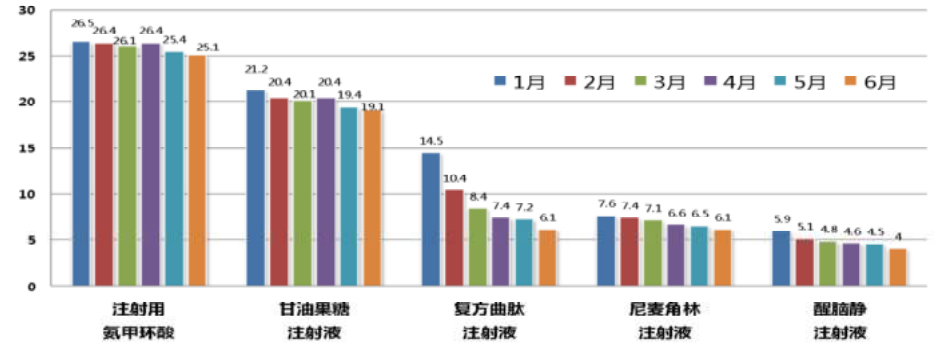


图 5　2022 年 1-6 月脑出血病组前 5 种常用药品的用药总金额情况（万元）

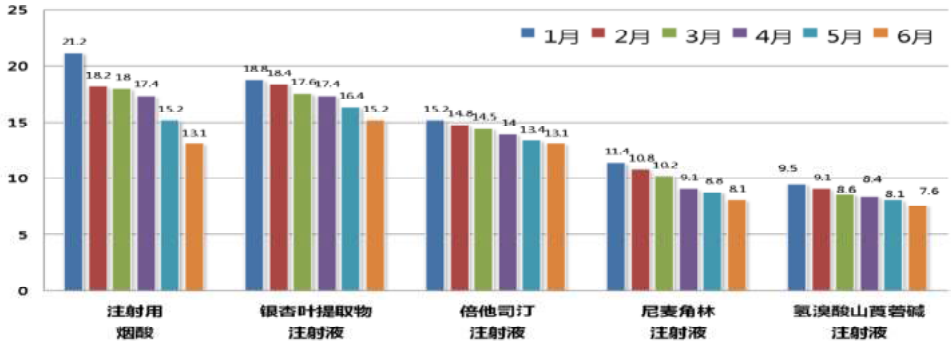


图 6　2022 年 1-6 月脑动脉供血不足病组前 5 种常用药品的用药总金额情况（万元）

表 2　2022 年 1-6 月干预前后 3 个病组观察指标比较

时间	脑梗死			脑出血			脑动脉供血不足		
	用药品种数(种)	平均住院日（天）	药品均次费用（元）	用药品种数	平均住院日	药品均次费用	用药品种数	平均住院日	药品均次费用
干预前	12.11±0.71	10.40±1.12	17420.44±61.25	9.24±0.52	14.68±1.27	14827.74±78.53	6.85±0.47	9.85±0.92	12212.24±89.52
干预 6 个月后	9.75±0.79*	8.41±1.22*	15798.67±63.83**	7.89±0.47*	12.25±1.14*	10899.03±76.63**	4.69±0.34*	7.53±0.83*	8511.34±88.82**

*P<0.05，**P<0.01

3 讨论

3.1 神经内科用药存在的主要问题及干预效果分析

从图 1、2、3 中可见，实施按病种进行医嘱点评的新模式并采取相应的干预措施后，3 个病组中脑动脉供血不足组的不合理医嘱率最为显著，降幅为 70.58%。从表 1 可见，神经内科常用的辅助用药主要为活血化瘀类药物。这类药物药理活性成分不一，但均能起到疏通部分血管、改善血流动力学，进而促进血液循环，挽救缺血脑组织[2]。神经内科在这 3 种疾病中都使用活血化瘀药较多，联合用药不适宜；部分药品应用指征不明确；同一药物存在静滴和口服同时使用情况[3]。

从图 4、5、6 中可见，注射用烟酸的用药金额降幅比较明显，特别是在脑动脉供血不足组中通过持续 6 个月的医嘱点评干预后已由长期金额排名第一位下降到第三位。烟酸又称维生素 B3，主要用于预防和治疗烟酸缺乏症[4]。其改善微循环、扩张小血管、缓解血管痉挛症状并不是它的主要适应症，对于脑梗死和脑动脉供血不足的患者可以运用其他改善微循环性价比更高的药品来代替。其次，该药本身还有降血脂的作用。但在临床工作中，医生更多关注了该药的扩血管作用，忽视了其降血脂作用，容易和其它口服降脂药联用，增加患者发生药物性肝损伤的风险[5]。

从表 1 中可见，神经内科常见 3 种疾病中用药金额排名靠前 5 位的药品中都有尼麦角林注射液。尼麦角林是一种半合成麦角生物碱衍生物。自 20 世纪 60 年代研发成功以来，已经在 50 多个国家注册使用[6]。国内也已被广泛应用于脑血管病、痴呆以及头晕等多种疾患。但这并不是它临床用量大的理由，在医嘱点评中我们发现，很多缺血性脑卒中患者在住院期间从入院到出院都在输注尼麦角林注射液，这才是其药品金额较大的原因。尼麦角林在急、慢性脑卒中患者的认知障碍、偏瘫、脑卒中后抑郁、失眠、意志缺失等方面，长期坚持治疗可有助于巩固疗效，其针对不同脑血管疾病疗程相应在 2 周到 6 个月不等[7]。但是，尼麦角林也有片剂，片剂和针剂的生物利用度并没有显著差异。所以，临床药师发挥本专业知识优势，建议医生在患者病情稳定后从静脉输注改为口服制剂，大大降低了患者的经济负担。

从表 2 中可见，经过持续的按病种进行医嘱点评干预后，三组的药品品种数指标得到了明细改善，这是由于在点评中临床药师加强了对于同一作用机制的药品尽量减少联合使用的管控。用药品种数的减少，必然会对患者药品次均费用的降低起到支撑作用，并且平均住院日指标在医嘱点评干预期间也并未增长，这说明其此项干预措施不仅能有效地控制药品费用，且也进一步优化了临床的治疗方案，使患者更早地康复出院。

3.2 按疾病分组进行医嘱点评的优势

我国正在将规范各级各类医院临床诊疗行为与应用 DRGs 协同推进，但很多医院尚未完全适应疾病诊断相关分组的付费方式，导致在该模式下医院的运行处于亏损状态[8-10]。从医院长久发展来看，需要医院内部进行整改督导，实现新模式下的扭亏为盈，而控制无效收入尤为重要。传统的医嘱点评，只能看出用药是否合理，但对于同病种的用药经济性方面不能很好地判断。比如：在脑动脉供血不足组中，氢溴酸山莨菪碱注射液单价为 50.16 元一支，而同样是解痉药的盐酸消旋山莨菪碱注射液单价才 2.38 元一支。从经济角度上来讲，选择最优性价比的药物可以更好地控制药品次均费用增幅[11]。通过按病种分组进行医嘱点评，可以使药品费用这一指标在同病种中得到横向比较，便于临床医师找到自己在药品费用指数管理方面的不足，更好地适应医保 DRG 支付模式，平衡好医疗控费和具有临床价值的部分昂贵创新药使用之间的矛盾[12]。同病种的轻症患者和重症患者之间应该有明显的费用区别，因为 DRG 的医保支付模式与 CMI 有紧密联系，CMI 高低，能反应医院综合技术难度和质量水平，以及学科综合能力与建设水平。对于临床药师而言，这种点评模式也更能体现精准用药服务，为建设药学服务数据库作了充分依据。

3.3 药学部开展按病种分组进行医嘱点评的措施

药学部安排专职临床药师负责对应科室常见病种的处方点评工作，将不合理用药的点评结果与对应科室负责人或医师进行沟通，纠正临床不合理用药习惯：

对于存在争议的用药问题，由医师和临床药师根据临床用药指南和其它循证材料进行协商。在重点药品的管控过程中，根据管控效果和临床医师提出的需求，对管控措施进行适当增减，形成了最终措施。处方点评及沟通是根据不同科室进行事后和或实时干预；“科室月份处方点评沟通单”是在月末整理并交予科室负责人；

对于用药不合理情况较严重的科室进行针对性的合理用药讲座；对于重点监控药品持续不改进的进行暂停供应及采取其它行政干预。结果表明，点评结果与医师沟通这一管控措施对重点药品的管控是积极有效的[13]。

3.4 药学部开展按病种分组进行医嘱点评的目标

随着 DRGs 支付方式改革的逐步推进，医疗服务成本管控已经成为提高医疗机构经济效益的重要手段之一，临床药师在管控药品费用的不合理增长的过程中有着不可替代的作用。管控药品节省下来的药品费用一方面为政府节省医保支出，同时也为医院创收。DRGs 医保支付制度改革，倒逼合理用药考核必然替代药占比考核[14]。药学部通过开展按病种分组进行医嘱点评，能更好地让药品使用合理性得到进一步改善，减轻了患者的经济负担，提高医院整体用药水平。

参考文献

[1]国家医疗保障局《关于印发疾病诊断相关分组（DRG）付费国家试点技术规范和分组方案的通知》（医保办发[2019]36号）,http://www.nhsa.gov.cn，/art/2019/10/24/art_37_1878.html

[2]李霞，黄玲梅，魏谭军，等．某院脑梗死患者中成药临床应用的药物相关问

题分析[J]．中南药学，2021，19（11）：2409-2414．

[3]李黎，朱亚宁，张丹等. DRG 付费模式下临床药师参与神经内科药品成本管控效果分析[J].中国药业,2022,31（10）:34-38.

[4] 陈国庆.烟酸注射液致过敏性休克 1 例[J].中国现代应用药学，2019，36（22）：2864.

[5] 张纾，林强，邓文，等.烟酸注射液药品不良反应报告分析[J].中国药物警戒，2020，17（12）：907-912.

[6] Winblad B,Florabanti M,Dolezal T,et al,Therapeutic use of nicergoline.Clinical Drug Investigation,2008,28:533-552.

[7] 尼麦角林应用建设专家组.尼麦角林在中老年神经系统疾病中的应用建议[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2012,14（11）:1141-1144.

[8] 王娟，王兴武. 疾病诊断相关组助推现代医院管理[J]. 中国药物与临床，2020，20（10）：1735-1736.

[9] 吴国安，战寒秋，刘慧，等. 公立医院改革下药品预算精细化管理与绩效考核探讨[J]. 中国医院管理，2020，40（12）：65-67.

[10] YUAN SW，LIU WW，WEI FQ，et al. Impacts of hospital payment based on diagnosis related groups（DRGs）with global budget on resource use and quality of care：A case study in China[J]. Iran J Public Health，2019，48（2）：238-246.

[11] 滕媛,王建群,李丽丽. 药学人员通过 PDCA 循环参与控制药占比的效果分析[J].中医药管理杂志,2021,29(01):104-105.

[12] 王晓丽, 李雪靖. 药物经济学在医院药师工作中的应用[J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(2): 243-245.

[13] 冯俊逸,石慧. 医院开展重点监控药品管理的实践与成效[J].现代医院管理,2020,18(05):83-86.

[14] 张韶辉,陈辰,徐宏峰,等. 临床药学质控体系建设在住院药占比控制中的成效分析[J].中国药物与临床,2019,19(18):3218-3219.

应对药品短缺的策略思考

张利利

（中国人民解放军空军特色医学中心药剂科　北京 100142）

【摘要】目的：分析我院药品短缺的品规及发生原因，为我院药品短缺保障制度的完善提供参考。**方法：**梳理我院药品保障基本目录，总结近两年内药品短缺的品规数量，分析原因，并评估对临床治疗产生的影响。**结果：**2021 年 8 月-2023 年 7 月约有目录品规数量 1%出现短缺，药品短缺主要是生产中断或供不应求、销售利润低、厂家政策调整等原因，基本通过同类药品替代的方式或者紧急调取外省资源等保障临床正常治疗。**结论：**药品短缺是医疗机构普遍存在的问题，是医疗隐患不容小觑的问题。建议药品短缺信息化管理，医疗机构库存不足及时预警；医疗机构成立药品短缺应急小组，由医生、药师及医务部管人员共同组成，确认是否临床必需，及时遴选替代品种并发布院内通知；建立药品短缺替代品种紧急采购审批的绿色通道，确保临床治疗需求。

基于 FAERS 数据库的免疫检查点抑制剂神经毒性信号挖掘与分析

张亮[1,2,3]，王洁[1,2]，方中坚[3]，周秋云[1,2]，张宇[2,4]，侯文洁[1,2]

（1.南京市胸科医院药学部，江苏 南京 210029；2. 南京医科大学附属脑科医院，江苏 南京 210029；3. 中国药科大学国家药物政策与医药产业经济研究中心，江苏 南京 211198；4. 南京市胸科医院呼吸内科，江苏 南京，210029）

【摘要】目的：探讨免疫检查点抑制剂(ICIs)所致神经系统不良事件（Adverse events, AEs）的特点及危险因素。

方法：收集 2017 年 1 月至 2022 年 12 月不良事件报告系统（FDA adverse events reporting system，FAERS）的数据，进行了一项观察性、回顾性的药物警戒研究。包括了使用抗 PD -1 、抗 PD - L1 和抗 CTLA-4 患者的不良事件。使用报告比值比(ROR)评估与 ICIs 相关的神经系统 AEs。

结果：在 46832 例相关报告中，共发现与神经系统相关的病例 3607 例(7.7%)，其中抗 PD-1 病例 1982 例，抗 PD-L1 病例 369 例，抗 CTLA-4 病例 363 例，联合治疗病例 893 例。与不使用 ICIs 药物相比，ICIs 药物有更高的神经系统并发症风险，包括垂体炎/垂体功能低下、重症肌无力、脑炎/脊髓炎、脑膜炎、吉兰巴雷综合症、血管炎和神经病。ICIs 联合治疗发生神经系统 AEs 风险与 ICIs 单一治疗相比可能更高，最显著的是垂体炎/垂体功能低下。

结论：使用 ICIs 与发生神经系统 AEs 风险升高有关，其中联合 ICIs 治疗的风险可能更高；AEs 发生风险与年龄、性别或转移状态无关；年龄较大、某些特定的癌症类型（黑色素瘤、非小细胞肺癌）可能有更高的致死性神经系统 AEs 发生风险。

【关键词】免疫检查点抑制剂；神经系统不良事件；FAERS 数据库

Neurotoxic signal mining and analysis of immune checkpoint inhibitors based on FAERS database

ZHANG Liang[1,2,3],WANG Jie[1,2], FANG Zhong-jian[3],ZHOU Qiu-yun[1,2], ZHANG Yu[2,4], HOU Wen-jie[1,2]

(1.Departemt of pharmacy, Nanjing Chest Hospital, Nanjing Jiangsu 210029, China; 2.Affiliated Nanjing Brain Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu 210029, China; 3.The Research Center of National Drug Policy & Ecosystem, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu 211198, China; 4.Departemt of respiratory, Nanjing Chest Hospital, Nanjing Jiangsu 210029, China)

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To investigate the characteristics and risk factors for neurologic Adverse events (AEs) induced by immune checkpoint inhibitors (ICIs). **METHODS：**An observational, retrospective, pharmacovigilance study based on the FAERS database collected between January 2017 and December 2022 was conducted. ICI-related AEs were defined as adverse reactions in patients using anti-PD-1, PD-L1, anti-CTLA-4. The report odds ratio (ROR) was used to assess the neurological AEs associated with ICIs. **RESULTS：**Among 46832 ICI-related reports, 3607 (7.7%) neurological case was found: 1982 with anti-PD-1, 369 with anti-PD-L1, 363 with anti-CTLA-4, and 893 with the combination of ICIs. In comparison to non-ICI drug use, ICIs use demonstrated higher risk for neurologic complication, including hypophysitis/hypopituitarism, myasthenia gravis, encephalitis/myelitis, meningitis, Guillain-Barre syndrome, vasculitis, and neuropathy. The risk of neurologic AEs associated with ICIs combination therapy was as high as or even higher than ICI monotherapy, most significantly in hypophysitis/hypopituitarism.

[作者简介] 张亮，男，博士，副主任药师。研究方向：医院药学与医药政策法规。Tel：025-58619845, E-mail: zhshine310@163.com

CONCLUSION：ICIs use is associated with a higher risk of neurological complications, with dual ICI therapy posing a higher risk, while older age, sex, or metastasis were not. Patients at older age, with certain cancer types(melanoma or non-small cell lung cancer), or on dual ICI therapy may be at higher risk of fatal neurologic AEs.
【KEY WORDS】 immune checkpoint; neurologic adverse events; FAERS database

近几年，免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)的上市改善了多种恶性肿瘤的预后，开启了肿瘤治疗的新时代。在不良事件（Adverse events, AEs）方面，最受关注的是自身免疫毒性[1]，而神经系统相关 AEs 的关注度相对较低。近几年有学者报道了与 ICIs 相关的脑炎、脊髓疾病、无菌性脑膜炎、吉兰巴雷综合症、周围神经病变和肌无力等个案，但以神经功能缺损甚至死亡的严重 AEs 居多[2-3]。现有数据分析 ICIs 相关的神经系统 AEs 发病率约 0.5-10%[4-5]。神经系统相关 AEs 症状与肿瘤症状(疲劳、乏力等)类似，故缺乏诊断特异性。因此，其发生率可能被低估[6]。为了提高 ICIs 类药物的合理用药水平，本文通过对美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）不良事件报告系统（FDA adverse events reporting system，FAERS）收集的神经系统不良事件数据进行分析，挖掘真实世界中的不良事件信号，为临床安全用药提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 数据来源与筛选

本研究使用 FAERS 数据库的数据，进行了一项观察性回顾研究。FAERS 数据库是一个公开可以获得的数据库，包含由医疗专业人员、消费者和药品制造商自发提交给 FDA 的不良事件报告，对其进行分析可以在早期挖掘出相应的安全信号，及时评估风险获益的安全状况，以及同一治疗类别中不同药物之间的对比。

FAERS 数据库由于是公开的数据库，信息匿名，不涉及治疗干预或收集生物样本，故无需知情同意。下载 FAERS 数据库中 2017 年 1 月至 2022 年 12 月不良事件和事件的报告，再导入 MySQL5.7 中进行提取，以 PD-1 通用名“nivolumab（纳武利尤单抗）”、“pembrolizumab（帕博利珠单抗）”，抗 PD-L1 通用名“atezolizumab（阿替利珠单抗）”、“avelumab（阿维单抗）”、“durvalumab（度伐利尤单抗）”，抗 CTLA -4“ipilimumab（伊匹单抗）”、“tremelimumab（替西木单抗）”为检索词进行搜索。FAERS 中的每一份报告都包含患者的基本特征、治疗指征以及药物治疗起始时间和不良事件的发生日期。

依据国际医学用语词典（Medical Dictionary for Regulatory Activities, MedDRA）中的系统器官分类（system organ class, SOC）对得到的数据进行器官分类，筛选出对应神经系统的首选术语作为研究对象。

1.2 数据处理和分析

根据比值失衡测量法的原理，本研究采用比值比（reporting odds ratio, ROR）和贝叶斯可信区间递进神经网络（Bayesian confidence propagation neural network，BCPNN）法来研究药物和 AEs 之间的联系。具体是通过计算 ROR 值和 95%置信区间（confidence interval, Cl）。BCPNN 法计算得到的信息组分（Information Component, IC）被用作统计信号检测的阈值，具体计算 IC 值的方法参考已有的文献[7-8]。本研究采用 Cochran- Armitage 检验评估 ICIs 相关的神经系统 AEs 在总体 AEs 中所占的比例。构建多元逻辑回归模型来计算神经系统 AEs 的 ROR 值，并依据年龄、性别和 ICIs 的使用情况进行调整。此外，为了方便描述基线特征与使用 ICIs 升高神经系统 AEs 风险之间的关系，笔者还对年龄、性别、转移状态和 ICIs 的类型行了调整多元逻辑回归分析，按年龄和性别分层进行亚组分析。并对易发生 ICIs 相关神经毒性人群进行了预估，使用 Wilcoxon 秩和检验评估从开始使用 ICIs 到发生 AEs 的时间。所有统计分析均采用 R 统计软件（3.6.2）

2 结果

2.1 检索到数据库中共有 3234567 份报告，有 46832 份报告与 ICIs 的使用有关，其中共 3607 例报告涉及神经系统 AEs。与抗 PD-1 单药治疗相关的不良事件共 1982 例；与抗 PD -L1 单药治疗相关的不良事件共 369 例；与抗 CTLA-4 单药治疗相关的不良事件共 363 例；抗 CTLA -4 联合抗 PD -1 或抗 PD-L1 的不良事件共 893 例。抗 PD-1 使用者的平均年龄为 65.2 岁，抗 PD-L1 使用者的平均年龄为 63.9 岁，抗 CTLA-4 使用者的平均年龄为 59.5 岁，接受联合治疗者的平均年龄为 60.2 岁。性别方面，1338 例(37.1%)为女性。从时间趋势上看，近年来报告的神经系统相关 AEs 的例数有所增加，见表 1。

表 1　与 ICIs 相关的神经系统 AEs 报告基本特征

Tab1　The characteristics of neurologic AEs associated with ICIs are reported

项目	整体（*n*=3607)	单药			联合(*n*=893)
		PD-1(*n*=1982)	PD-L1(*n*=369)	CTLA-4(*n*=363)	
平均年龄（岁）	62.7	65.2	63.9	59.5	60.2
性别——报告数（%）					
男	2236（62.0）	1270（64.0）	196（52.7）	229（62.6）	541（60.4）
女	1338（37.1）	691（34.9）	170（46.5）	133（37.2）	344（38.7）
缺失	33（0.9）	21（1.1）	3（0.8）	1（0.3）	8（0.9）
年份——报告数（%）					
2017	125（3.5）	36（1.8）	4（1.1）	58（15.8）	27（3.0）
2018	265（7.3）	111（5.6）	5（1.3）	86（24.3）	60（6.7）
2019	546（15.1）	317（16.0）	32（8.6）	69（18.9）	128(14.3)
2020	774(21.4)	497(25.0）	64（17.2）	46（12.6）	167（18.6）
2021	968（26.7）	521（26.4）	131（35.2）	49（13.4）	261（29.5）
2022	929(26.0)	500(25.2)	133(36.6)	55(15.0)	250(27.9)
适应症——报告数（%）					
黑色素瘤	861(34.8)	283(20.9)	12(4.3)	161(92.0)	405(60.6)
非小细胞肺癌	837(33.6)	638(47.1)	142(38.5)	0(0.0)	57（8.5）
泌尿肿瘤	391(15.7)	193(14.2)	48(16.9)	6(3.4)	144(21.5)
头颈部肿瘤	68(2.7)	63(4.6)	0(0.0)	1(0.6)	4(0.6)
乳腺癌	41(1.6)	12(0.9)	25(8.8)	0(0.0)	4(0.6)
妇科肿瘤	41(1.6)	12(0.9)	22(7.7)	2(1.1)	5(0.7)
霍奇金淋巴瘤	40(1.6)	40(2.9)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
胃癌	36(1.4)	31(2.3)	2(0.7)	0(0.0)	0(0.0)
肠癌	36(1.4)	19(1.4)	5(1.8)	0(0.0)	12(1.8)
神经内分泌肿瘤	31(1.2)	11(0.8)	10(3.5)	1(0.6)	9(1.3)
小细胞肺癌	27(1.1)	7(0.5)	4(1.4)	3(1.7)	13(1.9)
间皮瘤	22(0.9)	14(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(1.2)
肝胆胰肿瘤	18(0.7)	14(1.0)	3(1.1)	0(0.0)	1(0.1)
脑癌	10(0.4)	8(0.6)	2(0.7)	0(0.0)	1(0.1)
白血病	9(0.4)	3(0.2)	4(1.4)	1(0.6)	1(0.1)
非霍奇金淋巴瘤	7(0.3)	3(0.2）	2（0.7）	0（0.0）	2（0.3）
骨髓瘤	2（0.1）	2（0.1）	0（0.0）	0（0.0）	0（0.0）
发生转移——报告数（%）	451（12.5）	186（9.4）	19（5,.1）	50（13.8）	196（21.9）

2.2　2017-2022 年间各神经系统 AEs 与多因素分析的结果见表 2。神经系统 AEs 的不同类型分布从脱髓鞘疾病的 0.167(95% CI: 0.129-0.283)到神经病变的 2.829(95% CI: 2.331-3.042)。在多变量分析中，ICIs 单药治疗与较高的神经并发症风险相关，具体包括了垂体炎/垂体功能减退(ROR: 223.51, 95% CI: 141.77-273.38)，重症肌无力(ROR: 27.89, 95% CI: 21.11-29.63)，肌炎(ROR: 13.19, 95% CI: 13.60-16.77)，脑炎/脊髓炎(ROR: 14.97, 95% CI: 13.07-16.36)，脑膜炎(ROR: 5.98, 95% CI: 4.37-6.91)，吉兰巴雷综合症(ROR: 4.72, 95% CI: 3.45-6.69)，血管炎(ROR: 1.38, 95% CI: 1.12-1.56)以及神经病(ROR: 1.55, 95% CI: 1.21-1.75)，脱髓鞘疾病(ROR: 0.59, 95% CI 0.49-0.74)的发生风险较低；ICIs 联合治疗的神经系统 AEs 相关风险与 ICIs 单药治疗一样甚至更高，在垂体炎/垂体功能低下中

最为显著(ROR: 818.88, 95% CI: 699.14-973.41)。

表 2　ICIs 相关的神经系统 AEs 比例与多因素 logistic 回归分析结果

Tab2　Results of multivariate logistic regression analysis and proportion of neurologic ICIs - related AEs

结果	比例(%)		ROR	IC	多因素分析（ROR）			
	不用 ICI	用 ICI			年龄≥60 岁	男性	单药	联合
所有类型	3.48 (3.46-3.50)	7.18 (6.95-7.41)	2.15 (2.07-2.22)	1.50 (1.41-1.55)	0.69 (0.68-0.70)	0.79 (0.78-0.80)	2.18 (2.10-2.27)	3.92 (3.66-4.20)
垂体炎/垂体功能低下	0.006 (0.005-0.007)	1.793 (1.678-1.909)	297.99 (257.63-344.66)	8.40 (8.20-8.56)	0.78 (0.69-0.88)	1.16 (1.02-1.31)	223.51 (141.77-273.38)	818.88 (699.14-973.41)
重症肌无力	0.26 (0.024-0.027)	0.665 (0.594-0.736)	26.06 (23.00-29.52)	6.10 (5.81-6.31)	1.47 (1.31-1.64)	1.09 (0.97-1.22)	27.89 (21.11-29.63)	26.46 (20.21-34.66)
肌炎	0.064 (0.061-0.066)	1.065 (0.976-1.155)	16.84 (15.33-18.51)	5.40 (5.22-5.60)	1.04 (0.97-1.12)	1.33 (1.23-1.43)	13.19 (13.60-16.77)	18.39 (15.01-22.54)
血管炎	0.132 (0.129-0.136)	0.198 (0.160-0.237)	1.50 (1.23-1.83)	0.81 (0.40-1.22)	1.13 (1.07-1.19)	1.02 (0.97-1.08)	1.38 (1.12-1.56)	1.31 (0.77-2.22)
神经病变	2.696 (2.680-2.713)	2.829 (2.331-3.042)	1.00 (0.95-1.05)	0.00(-0.12-0.11)	0.77 (0.76-0.78)	0.80 (0.79-0.81)	1.55 (1.21-1.75)	1.27 (1.12-1.44)
吉兰巴雷综合症	0.024 (0.022-0.025)	0.185 (0.147-0.222)	7.86 (6.34-9.73)	4.00 (3.52-4.40)	1.13 (0.99-1.28)	1.86 (1.63-2.11)	4.72 (3.45-6.69)	14.75 (10.34-21.03)
脑膜炎	0.059 (0.056-0.061)	0.387 (0.333-0.441)	6.61 (5.71-7.65)	3.70 (3.41-4.02)	0.51 (0.46-0.55)	1.04 (0.96-1.13)	5.98 (4.37-6.91)	16.47 (12.98-20.91)
脑炎/脊髓炎	0.063 (0.060-0.065)	0.857 (0.777-0.938)	13.75 (12.40-15.24)	5.10 (4.85-5.27)	0.50 (0.46-0.54)	1.19 (1.10-1.28)	14.97 (13.07-16.36)	20.24 (16.45-24.90)
脱髓鞘疾病	0.603 (0.595-0.611)	0.167 (0.129-0.283)	0.31 (0.25-0.38)	2.40 (2.82-1.98)	0.25 (0.24-0.26)	0.54 (0.52-0.55)	0.59 (0.49-0.74)	0.25 (0.13-0.47)

2.3　表 3 中显示了发生神经系统 AEs 相关临床特征。发生脑膜炎的患者平均年龄最小(平均年龄 54.2 岁)，而发生肌无力的患者年龄最大(平均年龄 70.1 岁)。大多数与神经系统相关的 AEs 报告类型为严重(97.9%)。重症肌无力病死率最高(34.4%)，垂体炎/垂体功能低下病死率最低(9.1%)。

2.4　在不同类型的发生率方面，最常见的是神经病变(1357 例，2.9%)，其次是垂体炎/垂体功能低下(900 例，1.9%)、肌炎(533 例，1.1%)和脑炎/脊髓炎(432 例，0.9%)。不同类型 AEs 多因素分析结果见表 4，高龄(60 岁及以上)、性别和肿瘤转移状态与神经系统 AEs 风险增加无关，而特定的肿瘤类型(黑色素瘤、非小细胞肺癌和泌尿生殖系统肿瘤)与使用抗 CTLA-4（无论单药或是联合）引发神经系统 AEs 风险升高独立相关。年龄较大的患者发生重症肌无力(OR: 2.33, 95% CI: 1.51-3.46)和肌炎(OR: 1.90, 95% CI: 1.45-2.52)的风险较高，而脑膜炎的风险较低(OR: 0.37, 95% CI: 0.26-0.73)。男性患者较少发生脑膜炎(OR: 0.60, 95% CI: 0.32-0.89)、脑炎/脊髓炎(OR: 0.71, 95% CI: 0.58-0.96)和脱髓鞘疾病(OR: 0.48, 95% CI: 0.25-0.77)。在致死性神经系统 AEs 方面，较高的风险与年龄增长(OR: 1.87, 95% CI: 1.53-2.31)、黑色素瘤(OR: 1.48, 95% CI: 1.14-2.16)、非小细胞肺癌(OR: 1.52, 95% CI: 1.17-1.91)和 ICIs 联合治疗(OR: 1.55, 95% CI: 1.29-1.76)相关，而性别不是危险因素。

表 3　发生 ICIs 相关神经系统 AEs 患者的临床特征

Tab3　Clinical characteristics of patients who had neurologic ICI-related AEs

	总体(*n*=3607)	垂体炎/垂体功能低下(*n*=900)	重症肌无力(*n*=331)	肌炎(*n*=533)	血管炎(*n*=100)	神经病变(*n*=1357)	吉兰巴雷综合症(*n*=93)	脑膜炎(*n*=195)	脑炎/脊髓炎(*n*=432)	脱髓鞘疾病(*n*=95)
平均年龄(岁）	62.7	61.1	70.1	66.2	61.2	62.6	62.1	54.2	61.6	60.1
性别—报告数（%）										
男	2236（62.0）	569（63.2）	220（66.8）	387（72.6）	58（58.0）	827（60.9）	62（66.7）	102（52.3）	245（56.7）	52（54.7）
女	1338（37.1）	323（35.9）	110（33.2）	142（26.6）	39（39.0）	519（38.2）	29（31.2）	90（46.2）	180（56.7）	43（45.3）
缺失	33（0.9）	8（0.9）	0（0）	3（0.8）	3（3.0）	11（0.8）	2（2.2）	3（1.5）	7（1.6）	0（0）
出现不良事件中位时间（月）	1.33 [0.49,4.37]	2.46 [1.15,5.06]	0.89 [0.56,1.97]	0.99 [0.53,2.51]	1.12 [0.39,4.11]	1.38 [0.33,4.40]	2.30 [0.50,6.25]	1.53 [0.39,4.01]	1.48 [0.46,4.54]	3.8 4[1.43,13.21]
适应症—报告数（%）										
黑色素瘤	861(34.8)	342(56.6)	36(17.6)	99(26.7)	14(24.6)	301(30.9)	38(55.9)	61(41.2)	68(22.6)	17(34.7)
非小细胞肺癌	837(33.6)	112(18.4)	68(32.7)	139(37.1)	28(49.1)	389(39.9)	14(20.6)	39(26.4)	123(40.9)	22(44.9)
泌尿肿瘤	391(15.7)	95(15.6)	65(31.2)	75(20.0)	3(5.3)	130(13.3)	8(11.8)	22(14.9)	45(15.0)	6(12.2)
头颈部肿瘤	68(2.7)	11(1.8)	3(1.4)	11(2.9)	3(5.3)	34(3.5)	1(1.5)	2(1.4)	5(1.7)	2(4.1)
乳腺癌	41(1.6)	8(1.3)	2(1.0)	4(1.1)	1(1.8)	21(2.2)	3(4.4)	1(0.7)	5(1.7)	2(4.1)
妇科肿瘤	41(1.6)	7(1.1)	1(0.5)	7(1.9)	2(3.5)	18(1.8)	0(0.0)	3(2.0)	5(1.7)	0(0.0)
霍奇金淋巴瘤	40(1.6)	2(0.3)	1(0.5)	6(1.6)	0(0.0)	19(2.0)	2(2.9)	7(4.7)	8(2.7)	0(0.0)
胃癌	36(1.4)	13(2.1)	5(2.4)	7(1.9)	0（0.0）	9(0.9)	0(0.0)	0(0.0)	4(1.3)	0(0.0)
肠癌	36(1.4)	4(0.7)	5(2.4)	8(2.1)	2(3.5)	10(1.0)	3(4.4)	2(1.4)	7(2.3)	0(0.0)
神经内分泌肿瘤	31(1.2)	5(0.8)	3(1.4)	3(0.8)	0(0.0)	19(2.0)	0(0.0)	2(1.4)	4(1.3)	1(2.0)
小细胞肺癌	27(1.1)	2(0.3)	4(1.9)	3(0.8)	0(0.0)	3(0.3)	0(0.0)	2(1.4)	14(4.7)	0(0.0)
间皮瘤	22(0.9)	0(0.0)	7(3.4)	2(0.5)	2(3.5)	10(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(1.7)	0(0.0)
肝胆胰肿瘤	18(0.7)	2(0.3)	2(1.0)	5(1.3)	1(1.8)	7(0.7)	0(0.0)	1(0.7)	2(0.7)	0(0.0)
脑癌	10(0.4)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.3)	0(0.0)	4(0.4)	0(0.0)	4(2.7)	1(0.3)	0(0.0)

白血病	9(0.4)	1(0.2)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.2)	0(0.0)	1(0.7)	1(0.3)	0(0.0)
非霍奇金淋巴瘤	7(0.3)	2(0.3)	0(0.0)	0(0.0)	2(3.5)	2（0.2）	0(0.0)	0(0.0)	1（0.7）	0(0.0)
骨髓瘤	2（0.1）	0(0.0)	0（0.0）	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(0.7)	0(0.0)
发生转移—报告数（%）	451（12.5）	139(22.9)	41(20.1)	70(18.9)	13(22.8)	152(15.6)	16(23.5)	33(22.3)	31(10.3)	12(24.5）
ICIs—报告数（%）										
抗 PD-1	2867(79.6)	637(70.8)	301(90.9)	464(87.2)	80（80.0）	1112（81.9）	66（71.0）	167（85.6）	319（73.8）	70（73.7）
纳武利尤单抗	2017(56.0)	503(55.9)	187(56.5)	320(60.2)	49（49.0）	757（55.8）	50（53.8）	121（62.1）	227（52.5）	39（41.1）
帕博利珠单抗	872（24.1）	149（16.5）	115（34.3）	145（27.0）	31（31.0）	364（26.8）	18（19.4）	46（23.6）	92（21.3）	31（32.6）
抗 PD-1	374（10.3）	30（3.3）	24（7.2）	51（9.5）	13（13.0）	158（11.6）	15（16.1）	22（11.3）	94（21.8）	10（10.5）
阿替利珠单抗	284（7.8）	23（2.5）	15（4.5）	37（6.9）	11（11.0）	107（7.9）	10（10.8）	22（11.3）	81（18.8）	10（10.5）
阿维单抗	30（0.8）	1（0.1）	5（1.5）	5（0.9）	1（1.0）	17（1.3）	1（1.1）	0（0）	5（1.2）	0（0）
度伐利尤单抗	60（1.7）	6（0.7）	4（1.2）	9（1.7）	1（1.0）	34（2.5）	4（4.3）	0（0）	8（1.9）	0（0）
抗 CTLA-4	1262（34.9）	614（67.9）	63（18.8）	117（21.8）	21（21.0）	336（24.8）	44（47.3）	77（39.5）	114（26.4）	24（25.3）
伊匹单抗	1260（34.8）	612（67.9）	63（18.8）	117（21.8）	21（21.0）	336（24.8）	44（47.3）	77（39.5）	114（26.4）	24（25.3）
替西木单抗	2（0.1）	2(0.2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
联合治疗—报告数（%）	884(24.6)	377(41.9)	53(16.0)	95(17.8)	14(14.0)	249(18.3)	32(34.4)	71(36.4)	95(22.0)	9(9.5)
严重不良事件—报告数（%）	3524(97.9)	886(98.4)	331(100.0)	530(99.3)	96(96.0)	1306(96.2)	93(100.0)	194(99.5)	432(100.0)	95(100.0)
致死性不良事件——报告数（%）	666(18.5)	82(9.1)	114(34.4)	168(31.5)	15（15.0）	220（16.2）	24（25.8）	32（16.4）	110（25.5）	13（13.7）

表 4　ICIs 相关神经系统 AEs 的临床特征比值比

Tab4　Odds ratio of clinical characteristics for neurologic ICIs-related AEs

结果	年龄≥60 岁	性别（男）	适应症（参照其他类型肿瘤）			发生转移	ICI（参照抗 PD-1 单药治疗）		
			黑色素瘤	非小细胞肺癌	泌尿肿瘤		抗 PD-L1	抗 CTLA-4	联合治疗
所有类型	1.07 (0.98-1.18)	0.92 (0.84-1.00)	1.93（1.69-2.21）	1.40 （1.23-1.59）	1.50 （1.29-1.74）	1.02 (0.91-1.14)	0.94 (0.83-1.08)	1.48 (1.24-1.77)	1.85 (1.66-2.05)
垂体炎/垂体功能低下	1.03 (0.87-1.23)	1.04 (0.88-1.23)	3.17 (2.35-4.27)	1.49 1.01-1.93)	2.11 (1.50-2.96)	0.94 (0.77-1.15)	0.55 (0.35-0.86)	4.68 (3.56-6.15)	4.66 (3.81-5.70)
重症肌无力	2.33 (1.51-3.46)	0.98 (0.73-1.31)	1.09 (0.67-1.76)	1.04 (0.69-1.58)	2.45 (1.59-3.78)	1.38 (0.96-1.96)	0.38 (0.22-0.65)	0.20 (0.05-0.83)	0.98 (0.68-1.42)
肌炎	1.90 (1.45-2.52)	1.25 (1.00-1.57)	1.67 (1.18-2.36)	1.29 (0.95-1.77)	1.69 (1.18-2.42)	1.22 (0.92-1.61)	0.58 (0.40-0.84)	0.46 (0.24-0.98)	1.10 (0.84-1.45)
血管炎	1.71 (0.90-3.28)	0.77 (0.45-1.32)	0.87 (0.37-2.07)	1.31 (0.67-2.57)	0.19 (0.04-0.86)	2.37 (1.19-4.75)	1.06 (0.51-2.22)	0.69 (0.15-3.08)	0.98 (0.43-2.21)
神经病变	1.02 (0.89-1.18)	0.90 (0.79-1.03)	1.92 (1.55-2.38)	1.54 (1.27-1.86)	1.32 (1.04-1.68)	0.91 (0.76-1.10)	0.94 (0.77-1.14)	1.00 (0.74-1.35)	1.14 (0.95-1.36)
吉兰巴雷综合症	1.30 (0.76-2.21)	1.51 (0.88-2.59)	3.64 (1.62-8.20)	0.93 (0.39-2.20)	1.16 (0.44-3.06)	1.03 (0.57-1.86)	3.35 (1.65-6.81)	2.93 (1.30-6.62)	2.75 (1.47-5.14)
脑膜炎	0.37 (0.26-0.73)	0.60 (0.32-0.89)	2.03 (1.22-3.37)	1.17 (0.70-1.94)	1.40 (0.78-2.52)	1.17 (0.78-1.77)	1.18 (0.70-1.97)	0.59 (0.23-1.50)	2.08 (1.41-3.07)
脑炎/脊髓炎	0.80 (0.63-1.02)	0.71 (0.58-0.96)	1.12 (0.77-1.64)	1.33 (0.98-1.81)	1.19 (0.80-1.76)	0.64 (0.43-0.94)	2.11 (1.59-2.82)	1.25 (0.67-2.36)	2.00 (1.46-2.73)
脱髓鞘疾病	1.33 (0.68-2.57)	0.48 (0.25-0.77)	4.17 (1.31-13.3)	3.44 (1.17-10.1)	2.45 (0.68-8.91)	1.68 (0.82-3.45)	0.89 (0.37-2.14)	1.06 (0.34-3.26)	0.39 (0.13-1.14)
严重不良事件	1.06 (0.97-1.17)	0.91 (0.84-1.00)	1.92 (1.67-2.20)	1.41 (1.24-1.60)	1.51 (1.30-0.92)	1.03 (0.92-1.15)	0.95 (0.83-1.08)	1.46 (1.22-1.75)	1.89 (1.70-2.10)
致死性不良事件	1.87 (1.53-2.31)	1.03 (0.85-1.25)	1.48 (1.14-2.16)	1.52 (1.17-1.91)	1.37 (0.99-1.90)	0.83 (0.63-1.09)	0.52 (0.37-0.73)	0.73 (0.44-1.20)	1.55 (1.29-1.76)

2.5 在不良事件发生时间方面，开始使用 ICIs 后出现神经系统 AEs 的中位时间分布从重症肌无力 0.89 个月(0.56, 1.97)到脱髓鞘障碍 3.84 个月(1.43, 13.21)之间。整体的中位时间是 1.33 个月(0.33, 13.21)，见图 1。

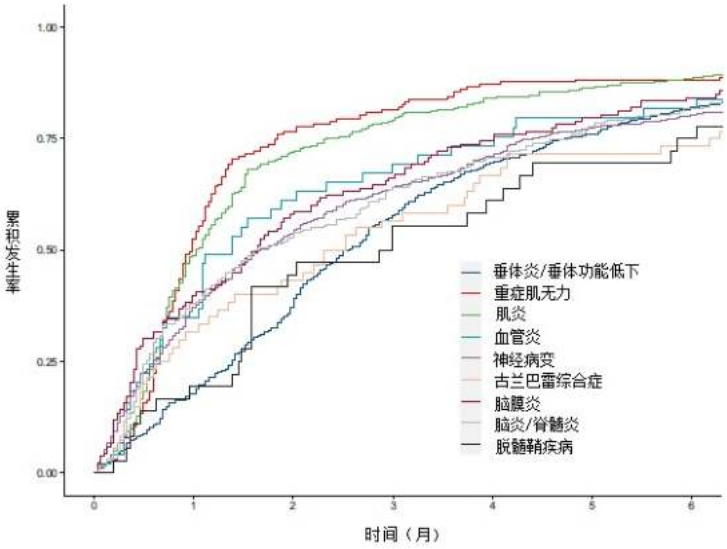


图 1　ICIs 用药到发生神经系统 AEs 的时间

Fig1　Time from ICIs administration to onset of neurologic adverse events

3 讨论

本文使用 FAERS 数据库进行回顾性研究发现：(1)ICIs 单药治疗与神经系统 AEs 的高风险相关，这些风险包括了垂体炎/垂体功能低下、重症肌无力、脑炎/脊髓炎、脑膜炎、吉兰巴雷综合征、血管炎和神经病变。其中最显著的是垂体炎/垂体功能低下，而接受 ICIs 联合治疗的风险更高；(2)年龄、性别和转移状态与神经系统 AEs 的发生率无相关性；(3)个别肿瘤类型与发生神经系统 AEs 较高的死亡风险有关；(4)与 ICIs 相关的重症肌无力和肌病的发病时间通常更早。

近几年 ICIs 无论是单药还是联合，其 AEs 的上报数量显著增加，这可能与这类药物批准的适应症越来越多有关。然而，与 ICIs 相关的神经系统 AEs 发生率尚不明确。Cuzzubbo S 的临床回顾型观察(共 9208 例接受 ICIs 治疗的患者)显示，抗 PD-1 组神经系统 AEs 发生率约为 6.0%；抗 CTLA-4 组约为 3.8%；联合治疗组约为 2.0%[2]。本文使用 FAERS 数据库计算出抗 PD-1 组约 4.2%；抗 PD-L1 组约 0.8%；抗 CTLA-4 组约 0.8%；联合治疗组约 1.9%。差异最大的在抗 CTLA-4 组，这可能与抗 CTLA-4 相关的神经系统 AEs 近一半都是垂体炎/垂体功能低下(614/1262 例，48.7%)有关。垂体炎/垂体功能低下导致死亡的可能性很小，其症状一般较轻微，临床中常归因于肿瘤的伴随症状；且发生时间较晚，这就导致数据库中相关的报告变少。FAERS 数据库中使用 ICIs 相关的神经系统 AEs 发生率与之前临床报道的基本一致。值得关注的是，年龄、性别和肿瘤转移状态并不是发生神经系统 AEs 的危险因素。然而，在年龄和性别的亚组分析中，能够观察到神经系统 AEs 风险的增加。例如，年龄较大是重症肌无力、肌炎和致死性 AEs 的危险因素；年龄较小是脑膜炎的危险因素；女性是脑膜炎、脑炎/脊髓炎和脱髓鞘疾病的危险因素。这些在以往的研究报道中并没有被发现。本研究也证实 FAERS 数据库是评估特定药物 AEs 发生风险的有效工具。

近年来，双检查点抑制剂联合使用已经在许多瘤种中显示出了更好的疗效。这也引起了对 AEs 风险的广泛担忧[9-11]，脑膜炎和脑炎/脊髓炎的风险增加可能来自联合治疗。虽然结果显示老年患者接受联合治疗发生神经系统 AEs 的风险不比年轻患者高，但这不排除是老年患者本身潜在的神经系统病变掩盖了与 ICIs 相关的 AEs 症状。在神经系统相关 AEs 死亡率方面，与单药治疗相比，年轻患者接受联合治疗的死亡率没有升高；而老年患者的死亡率升高了。

在以往的前瞻性或回顾性研究中，通常在治疗开始后 4 个月内观察到神经系统相关的 AEs[5]；本研究中，发生 AEs 的中位时间是 1.33 个月，与既往研究基本符合。之前的研究认为与单药治疗相比，联合治疗出现神经系统 AEs 的时间更早[12-13]；本研究却发现抗 PD- L1 单药治疗比抗 PD-1、抗 CTLA -4 和联合治疗更早出现神经系统 AEs。关于这一点差异，笔者认为不同研究显示 ICIs 相关的 AEs 风险不一致可能是由于不同患者种族和适应症导致了不同的风险概率。例如，在日本的研究中，抗 PD - L1 主要用于非小细胞肺癌；而在本研究收集的报告中，除了肺癌其他肿瘤的占比不低，如肾癌、膀胱癌和乳腺癌等。除了 AEs 总体发生时间，不同症状出现的先后也不一样。重症肌无力和肌炎的出现时间明显早于其他。与非 ICIs 导致的重症肌无力不同，ICIs 相关的重症肌无力通常伴随肌炎[14]。笔者分析，发生重症肌无力和肌炎具有某些共同的特征。与抗 PD-1 相比，使用抗 PD - L1 或抗 CTLA -4 出现重症肌无力和肌炎的风险明显更低，且联合治疗并不导致风险升高，这可能提示存在某种病理生理学特征导致了与 PD-1 相关的重症肌无力和肌炎，这还有待进一步证实。目前尚不清楚 ICIs 引起神经系统毒性的机制，最有可能是肿瘤组织和神经系统组织之间存在一些共同的抗原，而神经系统易受到由治疗引发的自身免疫反应的进攻[15]。

本文通过使用 FAERS 数据库评估 ICIs 治疗引发神经系统相关 AEs 风险。但本研究存在几点不足。(1)FAERS 数据库被 FDA 定期用于评估药品的安全性，具备客观性和权威性。但不同于临床试验数据，FAERS 数据库易混入各种不确定因素，包括既往病史、伴随治疗、给药剂量和用药频率等，因此，部分报告的因果关系存疑。例如，高剂量 ICIs(特别是抗 CTLA -4)可用于黑素瘤，这可能导致黑素瘤治疗的 AEs 例数增加，而早期 ICIs 获批的适应症以黑素瘤居多，这可能是它 AEs 报道较多的原因之一[16]。（2）FAERS 数据库属于自我报告性质，急性、严重或致命的 AEs 可能被过度报道；而短暂、缓慢、轻度或未被充分识别的 AEs 会被低估。例如，在 FAERS 数据库中，大多数垂体炎/垂体功能减退的报告登记为严重，共计 9.5%的病例导致死亡，远高于之前的临床报告[17]。垂体炎/垂体功能减退通常引起的是非特异性症状，如头痛和疲劳，而此类症状临床不易诊断，所以部分轻症被漏报，重症的发生率被高估。

4 结论

使用 ICIs 确实与一些神经系统并发症的风险升高有关，包括垂体炎/垂体功能低下、重症肌无力、脑炎/脊髓炎、脑膜炎、吉兰巴雷综合症、血管炎和神经病变；ICIs 联合治疗具有更高的风险；而年龄、性别和肿瘤转移状态与风险升高无关；年龄较大、个别肿瘤类型或接受双重 ICIs 治疗的患者可能有更高的致死性神经系统 AEs 风险。在 ICIs 使用越来越多的情况下（无论单药或是联合），更突出了医护工作者认识 ICIs 相关 AEs 的重要性。收集和分析的上市后药品警戒数据是非常有用和必要的，它可以提高我们对药品风险概况的认知。

参考文献

[1] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 22(12): 252-264.

[2] Cuzzubbo S, Javeri F, Tissier M, et la. Neurological adverse events associated with immune checkpoint inhibitors: review of the literature[J]. Eur J Cancer, 2017, 73(3): 1-8.

[3] Wang DY, Salem JE, Cohen JV, et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Oncol, 2018, 4(12): 1721-1728.

[4] Garcia CA, El-Ali A, Rath TJ, et al. Neurologic immunerelated adverse events associated with adjuvant ipilimumab: report of two cases[J].J Immunother Cancer, 2018, 6(1):83.

[5] Johnson DB, Manouchehri A, Haugh AM, et al. Neurologic toxicity associated with immune checkpoint inhibitors: a pharmacovigilance study[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 134.

[6] Reynolds KL, Guidon AC. Diagnosis and management of immune checkpoint inhibitor-associated neurologic toxicity: illustrative case and review of the literature[J]. Oncologist, 2019, 24(4): 435-443.

[7] Bate A, Lindquist M, EdwADRs IR, et al. A Bayesian neural network method for adverse drug reaction signal generation[J]. Eur J Clin Pharmacol, 1998, 54(4): 315-321,

[8] Salem JE, Manouchehri A, Moey M, et al. Cardiovascular toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: an

observational, retrospective, pharmacovigilance study[J]. Lancet Oncol, 2018, 19(12): 1579-1589.
[9] Zimmer L, Goldinger SM, Hofmann L, et al. Neurological,respiratory, musculoskeletal, cardiac and ocular side-effects of anti-PD-1 therapy[J]. Eur J Cancer, 60(1): 210-215.
[10] Spain L, Walls G, Julve M, et al. Neurotoxicity from immune-checkpoint inhibition in the treatment of melanoma: a single centre experience and review of the literature[J]. Ann Oncol, 2107, 28(2): 377-385.
[11] Kao JC, Liao B, Markovic S, et al. Neurological complications associated with anti–programmed death 1 (PD-1) antibodies[J]. JAMA Neurol, 2017,74(10): 1216-1222.
[12] Hassel JC, Heinzerling L, Aberle J, et al. Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): evaluation and management of adverse drug reactions[J]. Cancer Treat Rev, 2017, 57(6): 36-49.
[13] Sato K, Mano T, Iwata A, et al. Neurological and related adverse events in immune checkpoint inhibitors: a pharmacovigilance study from the Japanese Adverse Drug Event Report database[J]. J Neuro-Oncol, 2019, 145(1): 1-9.
[14] Suzuki S, Ishikawa N, Konoeda F, et al. Nivolumab-related myasthenia gravis with myositis and myocarditis in Japan[J].Neurology, 2017, 89(11): 1127-1134.
[15] Kennedy LC, Bhatia S, Thompson JA, et al. Preexisting autoimmune disease: implications for immune checkpoint inhibitor therapy in solid tumors[J]. JNCCN J Natl Compr Cancer Netw, 2019. 17(6): 750-757.
[16] Kao JC, Brickshawana A, Liewluck T. Neuromuscular complications of programmed cell Death-1 (PD-1) inhibitors[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2018, 18(10): 63.
[17] Wick W, Hertenstein A, Platten M. Neurological sequelae of cancer immunotherapies and targeted therapies[J]. Lancet Oncol, 2016, 17(12): e529-e541.

国家药品集中采购政策对钙离子拮抗剂使用的影响—以江苏省某胸部专科医院为例

张亮[1,2,3]，侯文洁[1,2]，周秋云[1,2]，王洁[1,2]，丁红梓[1,2]

（1.南京市胸科医院药学部，江苏 南京 210029；2. 南京医科大学附属脑科医院，江苏 南京 210029）

【摘要】目的：评估药品集中采购政策对相关钙离子拮抗剂消费的影响。**方法：**依据政策执行的时间截点分为对照组和干预组，采用中断时间序列模型对政策效果进行评价。**结果：**政策实施后，中标产品的购买量快速增长，增幅差异显著（β_2＝89.41）。对于非中标产品，干预组的购买量水平出现下降（β_2=-23.28），加入对照组进行比较后，该数字进一步下降，具有统计学意义（β_2=-115.34）。通过差异化模型评估发现，在所有可替代产品中，通过一致性评价的仿制药的采购量水平（β_2=-74.85）和支出水平（β_2=-344.93）在政策实施后下降更加明显。**结论：**药品集中采购的实施促进了中标产品的使用并减少了其替代产品的使用。

【关键词】钙离子拮抗剂；消费；药品集中采购政策；中断时间序列

The influence of national centralized drug procurement policy on the use of calcium antagonists —— A case study of a chest hospital in Jiangsu Province

ZHANG Liang[1,2,3], HOU Wen-jie[1,2],ZHOU Qiu-yun[1,2], WANG Jie[1,2], DING Hong-zi[1,2]

（1.Departemt of pharmacy, Nanjing Chest Hospital, Nanjing Jiangsu 210029, China; 2.Affiliated Nanjing Brain Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing Jiangsu 210029, China）

【ABSTRACT】OBJECTIVE：To evaluate the effect of National Centralized Drug Procurement on calcium antagonist consumption. **METHODS：**According to the time cut-off point of policy implementation, they were divided into control group and intervention group, quasi-experimental interrupted time series methods were used to assess the effects of the policy. **RESULTS：**After the implementation of the policy, the consumption of winning products increased rapidly, with a significant difference in growth （β_2 = 89.41）. For nonwinning products, the level of purchase volume decreased （β_2=-23.28） in the intervention group, and after adding the comparison group, this number fell further in statistical significance （β_2=-115.34）.Evaluation by differentiation model, among all substitutable products, the level of purchase volume （β_2=-74.85） and the level of expenditure （β_2=-344.93） of generic drugs that pass the consistency evaluation decreased significantly after the implementation of the policy. **CONCLUSION：**The implementation of centralized drug procurement promotes the use of bid-winning products and reduces the use of substitute products.

【KEY WORDS】calcium antagonist; consumption; National Centralized Drug Procurement policy; interrupted time series

[作者简介] 张亮，男，博士，副主任药师。研究方向：医院药学与医药政策法规。Tel：025-58619845, E-mail: zhshine310@163.com

钙通道阻滞剂（CCBs）是临床上最常用的一类心血管药物。治疗包括偏头痛、血管痉挛、心律失常和高血压等疾病。这类药包括复方制剂在内品种繁多，不同医生对药品存在不同偏好。为了降低药品价格，减轻患者经济负担，2019 年 1 月，国务院办公厅发布《国家组织药品集中采购和使用试点方案》[1]。首批药品集中采购政策（下文简称“集采政策”）的药品目录内 CCBs 类的药物是苯磺酸氨氯地平，其中标价格远低于原研品种，预计每年可以节省大量采购资金。但有研究表明，药品价格的降低并不表示能够抑制药品支出增长，因为不降价的药品用量可能大幅增加[2-3]。因此，笔者假设基于集采政策的实施可能会导致使用更多的其他品种，这并不是集采政策预期的结果。所以，本研究旨在评估集采政策对中标品种、非中标品种和潜在替代品种使用和支出的影响，并对该政策后续的执行和调整提出建议。

1.资料和方法

本文是探讨集采政策对口服钙离子拮抗剂使用的影响。因此，研究纳入了集采中标的苯磺酸氨氯地平片、非中标的苯磺酸氨氯地平片和潜在的可替代药物作为研究对象。可替代药物是指在临床使用中与苯磺酸氨氯地平有替代关系的药品。替代产品的纳入主要是指国家医疗保障局发布的《国家药品集中采购替代药品参考监测范围》中的品种。除此之外，还加上了含有钙离子拮抗剂的复方制剂。最终样本医院共有 12 种药品（不同厂家、不同规格视为不同品种）被纳入（表 1）。

表 1　纳入本研究的药品清单

Tab1　List of drugs included in this study

类别	通用名	规格	分类
中标产品	苯磺酸氨氯地平	5mg	
非中标产品	苯磺酸氨氯地平	5mg	
可替代产品	苯磺酸左旋氨氯地平	2.5mg	PCE
	非洛地平缓释片	5mg	原研
	非洛地平缓释片	2.5mg	原研
	尼群地平片	10mg	NPCE
	硝苯地平控释片	30mg	原研
	硝苯地平缓释片	20mg	NPCE
	硝苯地平片	10mg	NPCE
	氨氯地平贝那普利	5mg;10mg	NPCE
	缬沙坦氨氯地平	80mg;5mg	原研
	缬沙坦氨氯地平	80mg;5mg	PCE

依据集采政策的招标结果可分为中标产品、非中标产品和可替代产品。中标产品为国药容生制药生产的品种，规定剂量为 5mg，非中标产品为长期在用的其他制药企业生产的苯磺酸氨氯地平，可替代产品根据不同来源又将非中标产品分为三类:（1）原研药；（2）通过一致性评价的仿制药（以下简称“PCE”）；（3）未通过一致性评价的仿制药（以下简称“NPCE”）。研究涉及的药品见表 1。在中国，通过一致性评价（指质量和疗效一致性评价）的仿制药被认为疗效更有保障，可能比未通过一致性评价的仿制药价格更高。

从医院信息系统（The Hospital Information System, THIS）中获取了这 12 种药品于 2018.1.1-2021.12.31 共四年的采购记录。每个采购记录包含采购日期、通用名称、剂型、规格、药品生产企业、数量、支出等信息。

本研究评估了集采政策对钙离子拮抗剂采购量和采购支出的影响。采购支出按所有采购金额的总和计算，以人民币表示。为了使研究结果更为直观，购买量通过限定日剂量（DDD）计量。根据世卫组织的建议，DDD 是用于主要治疗目的的成人平均每日维持剂量。用药频度（DDDs）为药品总消耗量除以 DDD。

本文对集采政策实施前后购买量和采购支出的结果变量进行描述性。集采政策在江苏于 2020 年 1 月实施，故本文以 2018 年 1 月 1 日至 2019 年 12 月 31 日的数据作为对照组，2020 年 1 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日的数

据作为干预组进行研究。使用三个中断时间序列回归模型估算不同组的结果变量：模型 1 考虑干预组的结果，模型 2 考虑对照组的结果，模型 3 确定干预组减去对照组因变量后的差异。Durbin-Watson 统计量被用来检验是否存在自相关，Dickey-Fuller 统计量被用来检验不同时间的波动。所有数据按季度进行分析，第 4 季度（10、11、12 月）的个人变量设置为 1，其他季度设置为 0。使用 Stata SE 15.0 版本进行数据分析。各结果的分段回归模型如下：

$$Y_t=\beta_0+\beta_1*\text{time}_t+\beta_2*\text{intervention}_t+\beta_3*\text{timeafterintervention}+\beta_4*\text{season}+e_t$$

回归模型中 t 为月份标识符；Y_t 分别为模型 1、模型 2、模型 3 中干预组的因变量、对照组的因变量和干预组与对照组的因变量之差；time 为连续变量，表示从观察期开始的时间 t；干预是发生在集采政策实施之前（干预= 0）或之后（干预= 1）的时间 t 的指标变量；干预后时间表示一个连续变量，从干预开始算起的时间 t，在集采政策实施前编码为 0，在集采政策实施后编码为（t-8）；season 是一个气候变量，将第 4 季度（10、11、12 月）设置为 1，其他月份设置为 0。

在参数设置方面，β_0 估算时间为 0 时结果的基线水平；β_1 估算基线趋势；β_2 估算干预后的水平变化;；β_3 估算集采政策实施后结果的趋势变化，其中趋势表示结果变量的变化率，即斜率。另外，e_t 在时间 t 是一个误差项。第 4 季度（10、11、12 月）是一年中温度逐渐下降的时候，属于心血管疾病的高发季节，心血管药物的使用量可能会增加，因此设置了一个气候虚拟变量来控制药品使用的极值。

本研究的资料来源是药品采购数据，无个人信息和生物样本，无需伦理委员会同意。

2.结果

2.1 采购量的变化

根据 Durbin-Watson 的统计结果，采购量的数据中不存在自相关。因此，干预组和对照组的主要指标在集采政策实施前后具有平衡可比性。表 2 显示了中断时间序列回归对政策相关药品采购量的输出结果。

表 2　药品采购量的中断时间序列回归结果

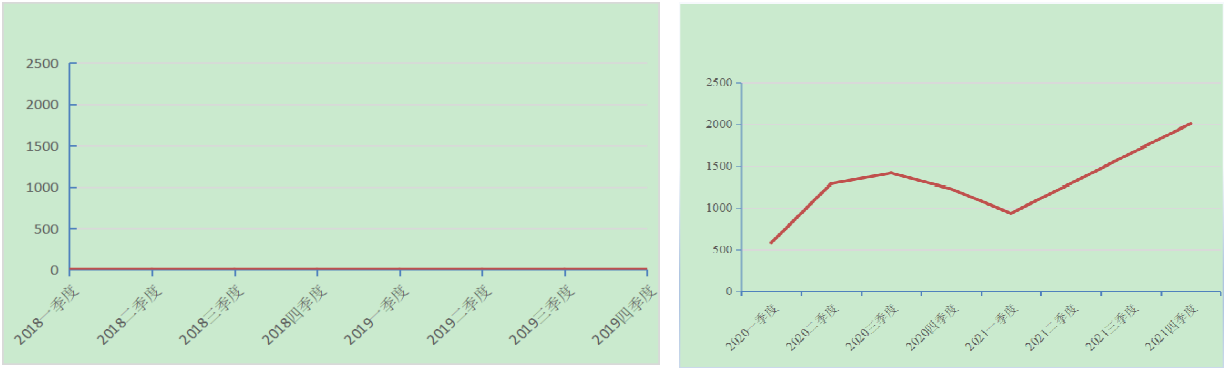
Tab2　The interrupted time series regression results of the purchase volume

种类		干预	比较	差别
苯磺酸氨氯地平	水平	56.3（7.73,115.63）*	93.73（6.02,165.83）*	-27.30（-111.43,58.33）
	趋势	-1.92（-8.76,6.03）	-9.22（-28.33,5.83）	8.12（-11.12,24.82）
	季度	65.23（30.57,92.75）*	90.45（36.08,141.89）*	-29.05（-107.37,46.73）
中标产品	水平	89.41（40.28,133.82）*	-	89.41（40.28,133.82）*
	趋势	4.27（-3.93,9.85）	-	4.27（-3.93,9.85）
	季度	16.44（-12.83,38.44）	-	16.44（-12.83,38.44）
未中标产品	水平	-23.28（-81.52,35.24）	94.15（7.95,169.85）*	-115.34（-212.81,-26.32）*
	趋势	-5.03（14.72,3.95）	-9.17（-24.58,7.59）	5.29（-12.13,23.11）
	季度	46.88（10.97,86.22）*	90.48（36.97,142.42）*	-41.72（-121.26,35.22）
仿制（PCE）	水平	-13.77（-68.52,45.36）	61.32（46.68,109.38）*	-74.85（-138.46,-4.95）*
	趋势	-1.99（-8.42,3.39）	-4.22（-12.73,3.24）	-1.87（-6.46,12.38）
	季度	33.41（3.17,59.43）*	46.16（17.44,70.82）*	-14.23（-63.58,39.17）
仿制（NPCE）	水平	-12.64（-31.46,3.22）	31.79（-36.62,104.72）	-49.64（-98.57,2.82）*
	趋势	-3.26（-5.42,-0.68）*	-6.38（-14.62,4.26）	4.08（-8.56,14.33）
	季度	12.04（3.21,23.82）*	49.95（8.55,89.24）*	-38.55（-75.24,6.02）*
原研	水平	1.87（-2.12,6.31）	-5.21（-17.62,6.43）	6.82（-4.22,18.66）
	趋势	-0.83（-0.99,-0.03）*	-0.06（-1.74,1.92）	-0.56（-1.63,1.37）
	季度	4.13（3.11,6.24）*	-1.78（-8.22,4.85）	6.11（0.23,12.35）*

*P＜0.05

2.1.1 中标产品

图 1 表示中标产品在两个组的季度购买量变化趋势。集采政策执行前，该医疗机构没有使用国药容声的中标产品。政策执行后，中标产品进入医疗机构并开始使用，中标产品的采购量快速增长，ITS 回归模型也显示实施集采政策后，干预组中标产品购买量显著提高（$\beta_2 = 89.41$）。



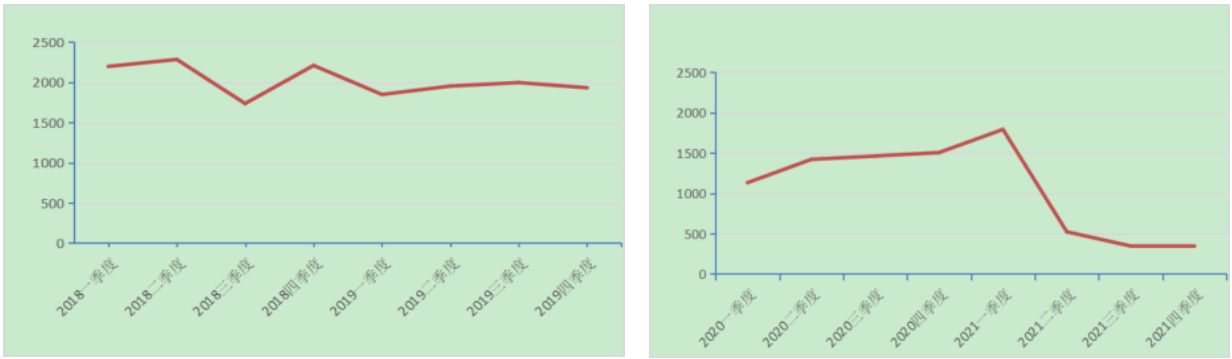
A B

图 1 中标产品在不同季度的采购量变化趋势（A.对照组；B.干预组）

Fig1 Change trend of purchase volume of winning products in different quarters（A.Control group; B.Intervention group）

2.1.2 非中标和可替代产品

从对照组的数据可以看出在集采政策执行前，非中标产品和可替代产品的购买量较平稳（图 2 和图 3）。干预组的数据显示集采政策执行后，非中标产品购买量从一开始就出现下降，2021 年一季度后采购量陡然下降；可替代产品的购买量一开始增加，2021 年一季度后也出现了明显下降。ITS 回归模型显示整个研究周期在加入干预组进行比较后，非中标产品和可替代产品的采购量均显著下降。进一步对可替代产品的不同类别（NPCE、PCE 和原研药）进行分析后发现干预组 NPCE 的购买量下降（$\beta 2$ =-12.64）；干预组 PCE 的购买量也出现了下降（β_2 =-13.77）。但在与对照组进行对比后，仅干预组的 PCE 的购买量的下降有统计学差异。



A B

图 2 非中标产品在不同季度的采购量变化趋势（A.对照组；B.干预组）

Fig2 Change trend of purchase volume of nonwinning products in different quarters（A.Control group; B.Intervention group）



A B

图 3 可替代产品在不同季度的采购量变化趋势（A.对照组；B.干预组）

Fig3 Change trend of purchase volume of alternatives products in different quarters（A.Control group; B.Intervention group）

2.2 采购支出的变化

根据 Durbin-Watson 的统计结果，购买支出数据之间不存在自相关。干预组和对照组的相关支出研究指标具有可比性。表 3 显示了中断时间序列回归对政策相关药品支出的输出结果。

表 3 药品采购支出的中断时间序列回归结果

Tab3 The interrupted time series regression results of the purchase expenditures

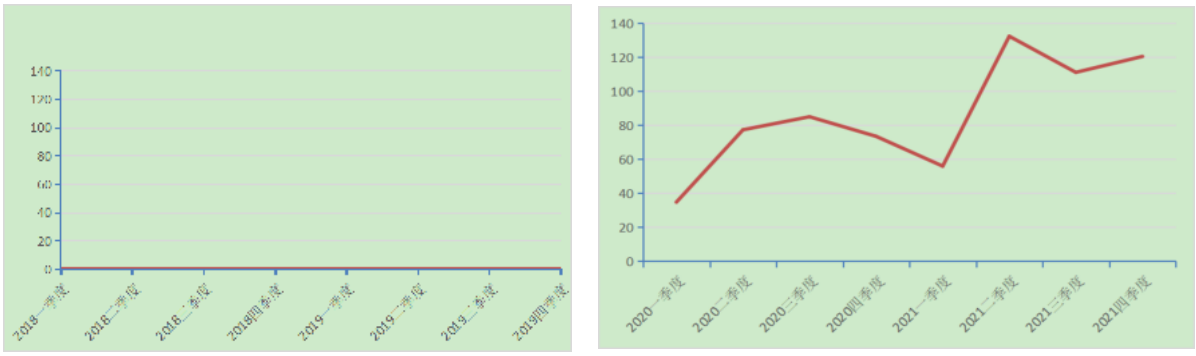
种类		干预	比较	差别
苯磺酸氨氯地平	水平	-19.82（-278.32,221.48）	462.44（88.26,834.41）*	-324.39（-733.55,106.26）
	趋势	-22.42（-56.45,10.26）	-53.92（-129.27,14.84）	16.47（-51.34,87.23）
	季度	252.31（114.56,384.66）*	466.42（221.12,668.84）*	-681.73（-926.38,-441.81）*
中标产品	水平	91.78（41.31.136.19）*	-	91.78（41.31.136.19）*
	趋势	3.86（-3.35,10.26）	-	3.86（-3.35,10.26）
	季度	16.22（-13.25,40.47）	-	16.22（-13.25,40.47）
未中标产品	水平	-108.91（-428.62,207.36）	456.89（88.16,822.31）*	-394.13（-827.91,43.73）*
	趋势	-28.66（-70.55,15.76）	-56.94（-127.96,16.22）	15.66（-53.08,83.73）
	季度	242.62（46.22,522.61）*	442.26（224.29,668.35）*	-682.16（-925.74,-441.95）*
仿制（PCE）	水平	-59.66（-350.14.230.61）	349.52（113.73,580.12）*	-344.93（-644.87,-53.76）*
	趋势	-13.16（-49.71,19.66）	-32.66（-78.95,5.72）*	17.23（-32.62,66.51）
	季度	166.63（4.82,324.71）*	233.93（96.72,341.52）*	-325.89（-554.66,-105.36）*
仿制（NPCE）	水平	-54.62（-115.92,-5.08）*	139.61（-41.91,319.43）	-199.17（-362.72,-30.06）*
	趋势	-8.51（-17.81,1.79）*	-19.75（-58.19,22.54）	7.96（-26.15,48.66）
	季度	48.53（-5.05,95.77）*	217.57（80.44,344.08）*	-169.49（-309.92,-23.18）*
原研	水平	12.34（-12.49,33.57）	-31.81（-111.04,46.67）	42.68（-25.19,104.11）
	趋势	-4.02（-6.42,-0.53）*	-2.70（-13.41,8.01）	0.69（-10.22,7.73）
	季度	28.27,（16.42,39.57）*	-7.33（-46.42,29.28）	32.13（-3.32,72.89）*

*P＜0.05

2.2.1 中标产品

图 4 显示了中标产品的季度购买支出变化趋势。采购量的变化趋势与采购支出的变化趋势基本一致，均为

从无到有，2021 年一季度后采购支出上升明显。ITS 回归模型显示干预组中中标产品的支出水平提高了 91.78，与对照组相比差异有统计学意义。由于对照组的该项支出为零，所以这一变化并无实际意义。



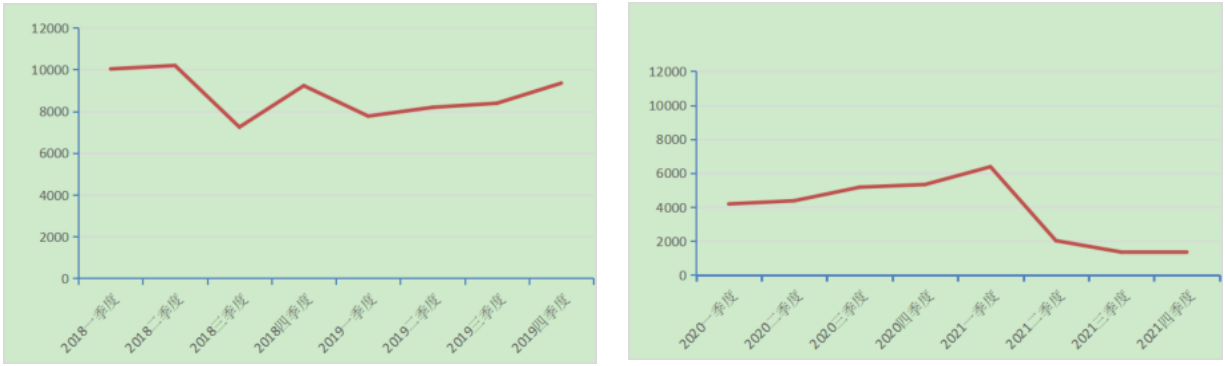
A　　B

图 4　中标产品在不同季度的采购支出变化趋势（A.对照组；B.干预组）

Fig4　Change trend of purchase expenditures of winning products in different quarters（A.Control group; B.Intervention group）

2.2.2 非中标和可替代产品

图 5 显示了两组中非中标产品和可替代产品的季度购买支出趋势。干预组中的非中标产品购买支出有所下降，2021 年一季度够后下降明显。ITS 回归模型分析在加入对照组进行比较后。降幅更大；干预组中可替代产品的支出基本保持稳定，2021 年一季度够后同样下降明显。在集采政策实施后，对干预组中 3 类非中标可替代产品（NPCE、PCE 和品牌药）进一步分析。发现 NPCE 的支出水平下降了 54.62，差异有统计学意义，并且与对照组进行比较后下降幅度更大（β2=-199.17）。干预组 PCE 支出水平与对照组相比有所下降；因此，模型反映两组之间的差异减小了 344.93，差异有统计学意义。由于原研药单价在集采政策执行后也降低，所以采购量和单价的双重降低使干预组的原研药采购支出大幅降低。



A　　B

图 5　非中标产品在不同季度的采购支出变化趋势（A.对照组；B.干预组）

Fig5　Change trend of purchase expenditures of nonwinning products in different quarters（A.Control group; B.Intervention group）

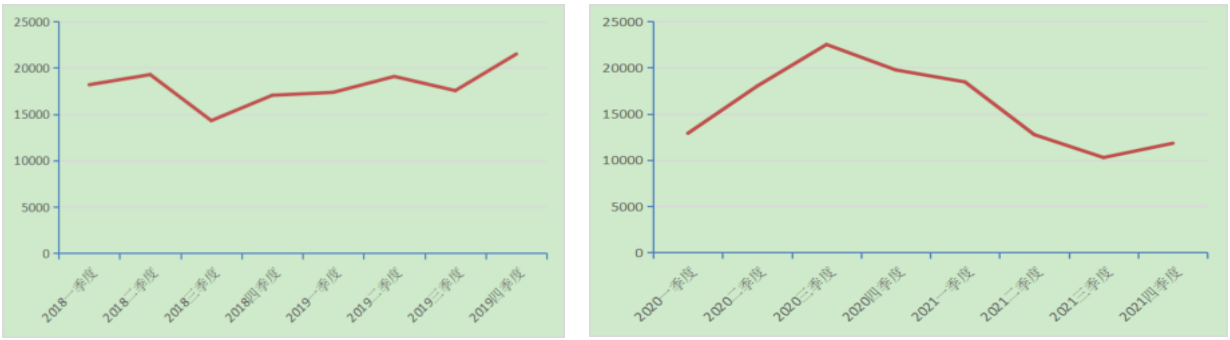


图 6　可替代产品在不同季度的采购支出变化趋势（A.对照组；B.干预组）

Fig6　Change trend of purchase expenditures of alternatives products in different quarters（A.Control group; B.Intervention group）

集采政策实施后，总体来说干预组苯磺酸氨氯地平总费用减少，替代药物费用增加，但变化趋势较为平稳（表 4）。但与对照组相比，替代药物费用增加显著，差异有统计学意义。

3.讨论

据笔者查阅，本文是第一次定量分析集采之前和之后钙离子拮抗剂的采购量和采购支出变化的研究。研究结论可为集采政策后续实施的调整提供参考。在集采政策实施前，中标的国药容声生产的苯磺酸氨氯地平并没有被样本医院采购。政策执行后，中标产品的采购量和采购支出快速增长，这符合政策的预期[4,5]。政策的核心就是鼓励医生优先使用中标的产品，以保证中标产品的采购量达到政府招标时承诺的水平。此外，中标产品价格下降可以大大提高患者对药品的负担能力，满足患者对药品的需求。政策实施后，样本医院非中标产品和可替代品种的购买量和支出水平相对于之前有所下降，但差异无统计学意义。但笔者进一步分析了替代品种不同类别之间的差异发现，PCE 的采购量和支出水平下降，而 NPCE 和原研药却在增加。虽然这些变化没有统计学意义，但对于 PCE 制造商来说，这不是一个积极的信号。开展一致性评价通常需要生产商投入大量资金，虽然通过一致性评价使生产商有机会参与全国带量采购的竞标，但在首轮的试点中，只允许一家生产商中标，其他制造商可能面临销售额迅速下降的问题。这可能会阻碍国内仿制药制造商参与一致性评价的积极性，在接下来的几轮集采中，这一点已经得到了改善，已由独家中标变为多家中标。值得注意的是，政策实施后，原研苯磺酸氨氯地平的价格有所下降，这是仿制药替代政策的效应之一，目的是促进原研药专利悬崖的到来。中标苯磺酸氨氯地平产品价格的大幅下降，带动了非中标产品的价格联动，进一步放大了降价效应，最终减轻了患者的经济负担。仿制药的替代效应已在许多国家得到了验证[6]。但需要注意的是，仿制药与原研药[7-9]在开发过程、药代动力学研究、药效学和临床疗效等方面存在一定差异。因此，对于心血管药物而言，仿制药的替代可能会导致治疗效果的下降，这也是后续集中采购纳入心血管药物时需要考虑的问题。

在实施集采政策后，考虑到干预组和对照组之间的差异，本研究观察了替代产品的购买量或支出改变的趋势，但变化并不显著，这似乎与预期的假设相矛盾，也与许多研究的结果不一致[4,5,10]。笔者认为这可能与不同的研究方法、不同的地理区域以及不同医生的处方习惯和经验有关。同时也有一些研究[11-12]表明，在政策实施后医生可能会因为担心中标产品的质量和疗效而给患者增加剂量和疗程。然而，增加的剂量和延长治疗又会升高不良反应的发生风险。因此，有必要在不同地区开展真实世界中中标产品和替代产品使用情况的研究，因为这可以为政策的调整提供最有力的支持。

本研究观察到从 2021 年一季度开始中标产品采购量急剧增加，同时非中标产品和可替代产品的采购量迅速下降。经调查和分析发现，2020 年样本医院的集采品种采购量未能完成。为了增加集采品种的用量，从 2021 年开始暂停使用了部分类似品种，所以才出现这一现象。在完成采购量后再考虑恢复部分品种的供应。笔者分析这会带来一些问题和不合理现象，患者的就诊时间（在完成约定购买数量之前或之后）决定了能够选择使用哪些产品，而不是有疾病状况和医疗需求。因此，如何解决这个矛盾还需要继续探讨更合适的一系列管理方式。

笔者建议，心血管药物的批量采购需要谨慎。首先，在确定采购量时，应综合考虑最合理的使用率，并为医院提供更灵活的管理办法。强制医院按照前一年的使用情况确定购买量可能不完全合理。第二，有必要建立监测系统。虽然没有观察到政策实施后替代产品用量激增的现象，但仍需要充分监测处方的变化趋势，以帮助确定政策对处方趋势的积极影响，防止医院不当使用药物。

本研究有几个局限性。首先，集采政策执行时间刚过 3 年，还未能追踪到政策的长期影响；第二，研究使用了药品的采购数据，这并不并不等同于临床实际使用。如果医院药品的库存量较大，或需要药品的患者比研究周期内预期的要少，那么实际使用情况就可能与采购数据不完全相符。第三，由于无法获得实际治疗情况的患者数据，所以无法判断增加的用量是否属于不合理使用。基于患者层面的进一步研究可以为该政策对患者的获益提供更有价值的评估。

样本医院在实施集采政策后，中标产品替代效应明显，且原研药的价格也在下降，对治疗成本的控制起到了积极作用。笔者认为今后需要开展基于患者和医生视角的大规模合理应用的研究和评价研究，以探索该政策的综合效果。

参考文献

[1]中华人民共和国中央人民政府. 国务院办公厅关于印发国家组织药品集中采购和使用试点方案的通知[EB-OL].（2019-01-17）[2020-12-31]. http://www.gov.cn-zhengce-content-2019-01 -17- content_5358604.htm.

[2]Acosta A, Ciapponi A, Aaserud M, et al. Pharmaceutical policies: effects of reference pricing, other pricing, and purchasing policies[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 2014（10）: CD005979.

[3]Kwon H, Bae S, Choi S, et al. Easy cuts, easy rebound: drug expenditures with massive price cuts in Korea[J]. Health Policy, 2019, 123 （4）: 388–392.

[4]Yang Y, Chen L, Ke X, et al. The impacts of Chinese drug volume- based procurement policy on the use of policy-related antibiotic drugs in Shenzhen, 2018-2019: an interrupted time-series analysis[J]. BMC Health Serv Res, 2021, 21（1）: 668.

[5]Chen L, Yang Y, Luo M, et al. The impacts of national centralized drug procurement policy on drug utilization and drug expenditures: the case of Shenzhen, China[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17（24）: 9415.

[6]Nardi R, Masina M, Cioni G, et al. Generic equivalent drugs use in internal and general medicine patients: distrust, confusion, lack of certainties or of knowledge? Part 2. Misconceptions, doubts and critical aspects when using generic drugs in the real world[J]. Ital J Med. 2014, 8（2）: 88–98.

[7]Vesga O, Agudelo M, Salazar BE, et al. Generic vancomycin products fail in vivo despite being pharmaceutical equivalents of the innovator[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54 （8）: 3271–3279.

[8]Bate R, Mathur A, Lever HM, et al. Generics substitution, bioequivalence standards, and international oversight: complex issues facing the Fda[J]. Trends Pharm, 2016, 37（3）: 184-191.

[9]Alexandra C, Aukje KM, Hubert GM, et al. Switching from originator brand medicines to generic equivalents in selected developing countries: how much could be saved?[J]. Value Health, 2012, 15（5）: 664-673.

[10]Jensen US, Muller A, Brandt CT, et al. Effect of generics on price and consumption of ciprofloxacin in primary healthcare: the relationship to increasing resistance[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65 （6）: 1286-1291.

[11]Mostafa S, Mohammad MA, Ebrahim J. Policies and practices catalyzing the use of generic medicines: a systematic search and review[J]. Ethiop J Health Sci, 2021, 31（1）: 167-178.

[12]Straka RJ, Keohane DJ, Liu LZ. Potential clinical and economic impact of switching branded medications to generics[J]. Am J Ther, 2017, 24（3）: 278-289.

Diterpene profiles of the South China Sea soft coral Sarcophyton mililatensis and their TNF-α inhibitory activities

Ling Zhang[a,#], Min Yang[b,#], Qing Bu[a], Zeng-Yue Ge[a], Xian-Yun Yan[a], Li-Gong Yao[b], Lin-Fu Liang[a,*], Yue-Wei Guo[b,*]

（[a]College of Materials Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, 498 South Shaoshan Road, Changsha 410004, China

[b]State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, 555, Zu Chong Zhi Road, Zhangjiang Hi-Tech Park, Shanghai 201203, China）

Eleven new diterpenes possessing the cembrane carbon framework, sarcoxacyclols A–F (1–6) and sarcomililatols C−G (7−11), three undescribed diterpenes with rare sarsolenane and capnosane skeletons, namely mililatensols A–C (12–14), together with six known analogs 15–20 were obtained from the South China Sea soft coral *Sarcophyton mililatensis*. Their structures were established by the extensive spectroscopic analysis as well as comparisons with the reported data in the literature. Moreover, their absolute configurations were determined by X-ray diffraction analysis, time-dependent density functional theory/electronic circular dichroism (TDDFT ECD) calculations, chemical reaction, and modified Mosher's method. In the bioassays, the macrocyclic diterpenes 1 and 8 exhibited potent TNF-*α* inhibitory activities (IC_{50} = 9.5, 6.1 μmol/L, respectively), which were similar to the positive control dexamethasone (IC_{50} = 8.7 μmol/L), without obvious cytotoxicity against RAW264.7 cells with CC_{50} values over 50 μmol/L, respectively. This study further enriched the chemical and biological diversity of *S. mililatensis*.

【Keywords】 *Sarcophyton mililatensis*, cembrane, sarsolenane, capnosane, TNF-α inhibitory activity

1. Introduction

Soft corals of the genus *Sarcophyton* (phylum Cnidaria, class Anthozoa, subclass Octocorallia, order Alcyonacea, family Alcyoniidae) are prolific in the South China Sea. It has been recognized as a rich source of bioactive substances with unique structural characteristics, including sesquiterpenes, diterpenes, diterpenes dimers, prostaglandins, steroids, ceramides, *etc*.[1,2] Till now, more than 300 diterpenes have been reported from ca. 18 species of this genus, except undefined species. Moreover, many diterpenes exhibited a broad range of notable biological activities,[1,2] for instance PTP1B inhibitory effect.[3] Their intriguing scaffolds and excellent bioactivities have gained great attention from synthetic chemists as challenging targets for total synthesis.[4,5]

In the course of our ongoing research aiming for structurally novel and biologically active secondary metabolites from South China Sea soft corals,[6] the title animal *Sarcophyton mililatensis* was collected from the Xigu Island, Hainan Province, China. Among all of the *Sarcophyton* species, *S. mililatensis* has rarely been investigated. There are only four reports of the chemical constituents and bioactivities of *S. mililatensis*.[7-10] Previous chemical investigation on the South China Sea soft coral *S. mililatensis* by us led to the discovery of sarcomililate A, an unprecedented diterpenoid with a tricyclo [11.3.0.0^{2,16}]hexadecane carbon framework.[7] Inspired by this study, and in order to disclose more chemically intriguing marine natural products, especially trace constituents, we recently conducted a continuing chemical

[#]These authors contributed equally to this work.

[*]Correspondence: lianglinfu@csuft.edu.cn (L.-F.L.), ywguo@simm.ac.cn (Y.-W.G.).

investigation of the Et_2O-soluble extract of the title soft coral. This investigation resulted in the isolation and characterization of eleven new cembrane diterpenes, sarcoxacyclols A–F (1–6) and sarcomililatols C−G (7−11), three rare sarsolenane and capnosane diterpenes, namely mililatensols A–C (12–14), together with six known analogs 15–20 (Figure 1). Hereto, the isolation, structure elucidation, and TNF-α inhibitory activities of these new isolates are described.

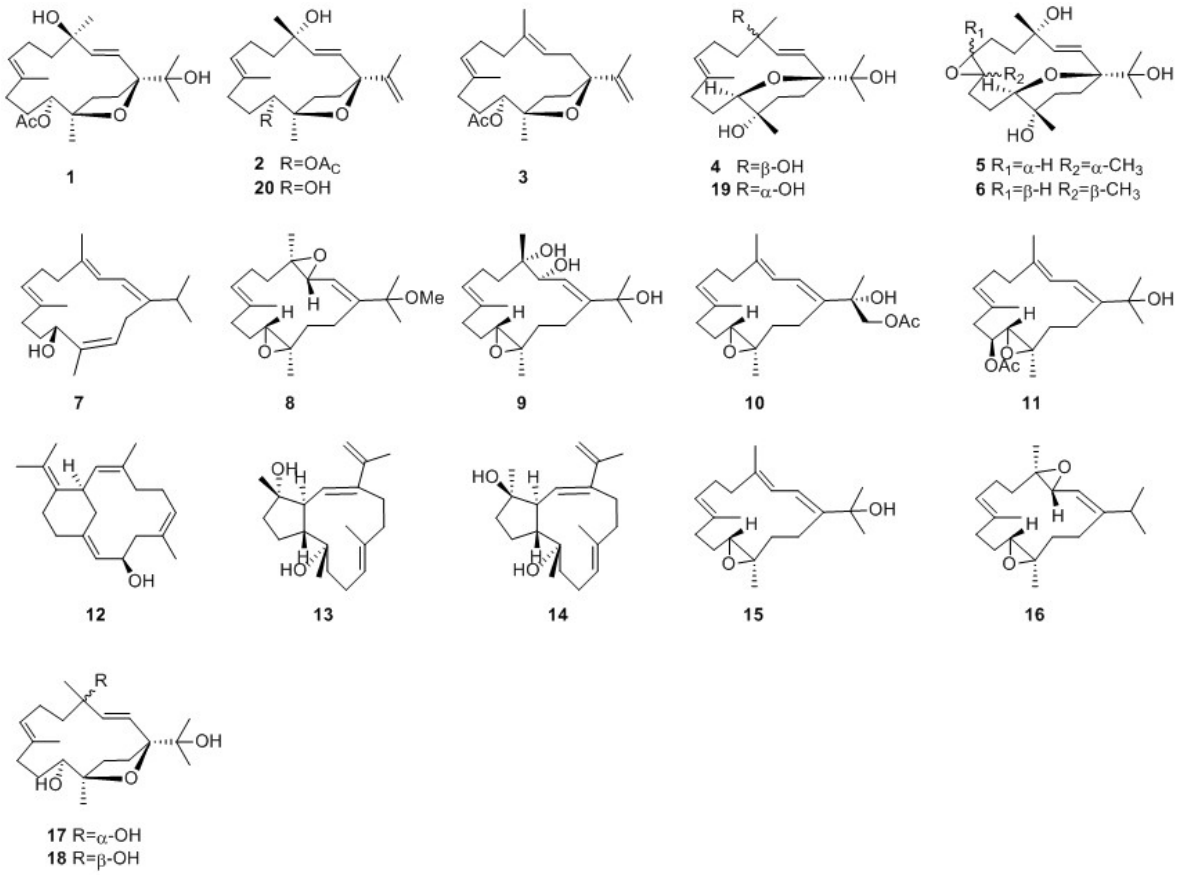


Figure 1. Structures of compounds 1–20.

2. Materials and Methods

2.1. General Experimental Procedures

Optical rotations were recorded on a Perkin-Elmer 241MC polarimeter. IR spectra were obtained on a Nicolet 6700 spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). CD spectra were measured on a JASCO J-810 instrument. NMR spectra were measured on a Bruker DRX-500 or Bruker DRX-600 spectrometer (Bruker Biospin AG, Fällanden, Germany). Chemical shifts (δ) were reported in ppm with reference to the solvent signals, and coupling constants (J) were in Hz. ESIMS spectra were obtained on a Finngan-MAT-95 mass spectrometer. HRESIMS spectra were measured on an Agilent 1290-6545 UHPLC-QTOF mass spectrometer. Commercial silica gel (Qingdao Haiyang Chemical Group Co., Ltd., Qingdao, China, 200–300 and 400–600 mesh), Sephadex LH-20 gel (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) were used for column chromatography, and precoated silica gel plates (Yan Tai Zi Fu Chemical Group Co., Yantai, China, G60 F-254) were used for analytical TLC. Reversed-phase (RP) HPLC was performed on an Agilent 1260 series liquid chromatography equipped with a DAD G1315D detector at 210 and 254 nm. A semi-preparative ODS-HG-5 column [5 μm, 250 × 9.4 mm] was employed for the purifications. All solvents used for column chromatography and HPLC were of analytical grade (Shanghai Chemical Reagents Co., Ltd., Shanghai, China) and chromatographic grade

(Dikma Technologies Inc., Foothill Ranch, CA, USA), respectively.

2.2. Biological Material

The specimens of *Sarcophyton mililatensis* were collected by SCUBA diving at Xigu Island, Hainan province, China, in May 2014, at a depth of -20 m and were frozen immediately after collection. They were identified by Prof. X.-B. Li from Hainan University. A voucher specimen is available for inspection at Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, under registration No. 14S-80.

2.3. Extraction and Isolation

The frozen animals (400 g, dry weight) were cut into pieces and extracted exhaustively with acetone at room temperature (3 × 1.5 L). The organic extract was evaporated to give a dark brown residue that was partitioned between Et_2O and H_2O. The upper layer was concentrated under reduced pressure to give a Et_2O portion (13.5 g). The Et_2O extract was separated into twenty-one fractions (A–U) by gradient silica gel column chromatography [0→100% Et_2O (EE) in petroleum ether (PE)]. Fraction J was further purified by Sephadex LH-20 [PE/CH_2Cl_2/MeOH (2:1:1)], followed by silica gel column chromatography [PE/EE (2:1)] to to yield seven subfractions J1–J7. Compound 2 (3.6 mg) was isolated from the seventh subfraction J7 by silica gel column chromatography [PE/EE (2:1)]. Subfraction J2D was further purified by RP-HPLC [MeCN/H_2O (90:10), 3.0 mL/min] to give compound 12 (2.5 mg, t_R = 6.2 min). Similarly, subfraction J2F was subjected to RP-HPLC [MeCN/H_2O (82:18), 3.0 mL/min] to yield compound 13 (3.1 mg, t_R = 8.6 min). Fraction P was further purified by Sephadex LH-20 [PE/CH_2Cl_2/MeOH (2:1:1)], followed by silica gel column chromatography [PE/acetone (3:1)] to afford three subfractions P1–P3. Purification of the subfraction P2 by RP-HPLC [MeOH/H_2O (90:10), 3.0 mL/min] to give compound 14 (3.2 mg, t_R = 12.4 min). Compounds 7 (4.1 mg) and 16 (3.2 mg) were obtained from fraction G following a two-stage separation beginning with Sephadex LH-20 column chromatography eluted with PE/CH_2Cl_2/MeOH (2:1:1), followed by silica gel column chromatography eluted with PE/EE (4:1, 3:1). The resulting sixth subfraction G6 was further purified by RP-HPLC [MeCN/H_2O(85:15),3.0 mL/min] to give compound 3 (1.8 mg, t_R = 36.7 min). Fraction Q was further purified by Sephadex LH-20 [PE/CH_2Cl_2/MeOH (2:1:1)], followed by silica gel column chromatography [PE/acetone (3:1)] to yield four subfractions (Q1–Q4). The first subfraction Q1 was subjected to silica gel column chromatography [PE/acetone (3:1)] to give compounds 8 (11.0 mg), 15 (127.9 mg), 18 (3.1 mg) and 20 (4.3 mg) were obtained by silica gel column chromatography [PE/ acetone(7:3)] along with the mixture. The mixture yielded compounds 5 (2.5 mg, t_R = 17.4 min), 6 (2.0 mg, t_R = 16.9 min), 17 (12.0 mg, t_R = 10.0 min), and 19 (3.4 mg, t_R = 9.7 min) by RP-HPLC [MeCN/H_2O (20:80, 40:60, 38:62), 3.0 mL/min], respectively. The second subfraction Q2 was divided into five subfractions (Q2A–Q2E) by silica gel column chromatography [PE/ acetone (7:3)]. Purification of subfraction Q2A by RP-HPLC [MeCN/ H_2O (70:30), 3.0 mL/min] to afford compounds 1 (8.0 mg, t_R = 12.5 min) and 10 (3.5 mg, t_R = 8.8 min). Similarly, compound 11 (4.1 mg, t_R = 13.5 min) was obtained from subfraction Q2B by RP-HPLC [MeCN/H_2O (66:34), 3.0 mL/min]. Subfraction Q3 was subjected to RP-HPLC [MeCN/H_2O (45:55), 3.0 mL/ min] to yield compound 9 (2.0 mg, t_R = 8.6 min). Compound 4 (3.6 mg, t_R = 4.9 min) was obtained from the fraction R by the two-step purification, including Sephadex LH-20 [PE/CH_2Cl_2/MeOH (2:1:1)] and the subsequent RP-HPLC [MeCN/H_2O (50:50), 3.0 mL/min].

2.4. Spectroscopic Data of Compounds

Sarcoxacyclol A (**1**): colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ −49.6 (c 0.35, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3430, 2971, 2925, 2853, 1732, 1456, 1373, 1241, 1169, 1080, 1028, 983 cm^{-1}; For ^1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) and ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) spectral data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 403.2448 ($[M+Na]^+$; calcd. for $C_{22}H_{36}NaO_5$, 403.2455).

Sarcoxacyclol B (2): colorless oil; $[\alpha]_D^{18}$ −36.8 (*c* 0.20, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3445, 2969, 2923, 2851, 1733, 1449, 1372, 1238, 1113, 1076, 1027, 964, 899 cm^{-1}; For ^1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) and ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) spectral data, see Table 1; HRESIMS *m/z* 385.2361 ($[M+Na]^+$; calcd. for $C_{22}H_{34}NaO_4$, 385.2349).

Sarcoxacyclol C (3): colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ +4.0 (*c* 0.35, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 2955, 2923, 2853, 1739, 1457, 1375, 1236, 1132, 1076 cm^{-1}; For ^1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) and ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) spectral data, see Table 1; HREIMS *m/z* 346.2507 (M^+; calcd. for $C_{22}H_{34}O_3$, 346.2502).

Sarcoxacyclol D (4): colorless crystals; mp 183.1-184.0°C; $[\alpha]_D^{25}$ +70.1 (*c* 0.35, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3440, 2920, 2850, 1463, 1383, 1078, 1047, 947 cm^{-1}; For ^1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) and ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) spectral data, see Table 2; HRESIMS *m/z* 361.2348 (M^+; calcd. for $C_{20}H_{34}NaO_4$, 361.2349).

Sarcoxacyclol E (5): colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ +45.8 (*c* 0.35, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3440, 2923, 2853, 1462, 1377, 1132 cm^{-1}; For ^1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) and ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) spectral data, see Table 2; HRESIMS *m/z* 377.2294 ($[M+Na]^+$; calcd. for $C_{20}H_{34}NaO_5$, 377.2298).

Sarcoxacyclol F (6): colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ +4.8 (*c* 0.20, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3443, 2917, 2849, 1574, 1538, 1457, 1384, 1131, 1049 cm^{-1}; For ^1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) and ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) spectral data, see Table 2; HRESIMS *m/z* 377.2295 ($[M+Na]^+$; calcd. for $C_{20}H_{34}NaO_5$, 377.2298).

Sarcomililatol C (7): colorless oil; $[\alpha]_D^{18}$ -185 (*c* 0.20, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3445, 2918, 1383, 1196, 1132, 1076 cm^{-1}; ^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Tables 3 and 4; HREIMS *m/z* 288.2440 ($[M]^+$; calcd for $C_{20}H_{32}O^+$, 288.2448).

Sarcomililatol D (8): colorless crystals; $[\alpha]_D^{25}$ -71 (*c* 0.25, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3446, 2931, 1457, 1383, 1239, 1170, 1072, 919, 876, 857, 799 cm^{-1}; ^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Tables 3 and 4; HRESIMS *m/z* 335.2597 ($[M+H]^+$; calcd for $C_{21}H_{35}O_3^+$, 335.2581).

Sarcomililatol E (9): colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ -3 (*c* 0.20, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3442, 2924, 2853, 1457, 1383, 1046 cm^{-1};^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Tables 3 and 4; HRESIMS *m/z* 361.2341 ($[M+Na]^+$; calcd for $C_{20}H_{34}NaO_4^+$, 361.2349).

Sarcomililatol F(10): colorless oil; $[\alpha]_D^{19}$ -30 (*c* 0.20, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3446, 2917, 2849, 1743, 1539, 1384, 1048 cm^{-1}; ^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Tables 3 and 4; HRESIMS *m/z* 385.2343 ($[M+Na]^+$; calcd for $C_{22}H_{34}NaO_4^+$, 385.2349).

Sarcomililatol G (11): colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ -84 (*c* 0.35, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3466, 2967, 2927, 1739, 1436, 1372, 1239, 1088, 1027, 960, 801 cm^{-1}; ^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Tables 3 and 4; HRESIMS *m/z* 385.2339 ($[M+Na]^+$; calcd for $C_{22}H_{34}NaO_4^+$, 385.2349).

Mililatensol A (12): white powder; $[\alpha]_D^{19}$ -51.8 (*c* 0.25, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3282, 2952, 2932, 2852, 1436, 1385, 1196, 1180, 1131, 1076, 1042, 990, 635 cm^{-1}; ^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Table 5; HREIMS *m/z* 286.2293 (M^+; calcd. for $C_{20}H_{30}O$, 286.2291).

Mililatensol B (13): colorless oil; $[\alpha]_D^{19}$ -50.8 (*c* 0.2, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3445, 2917, 2849, 1383, 1196, 1180, 1132,

1076 cm^{-1}; For ^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Table 5; HRESIMS *m/z* 327.2297 ([M + Na]$^+$; calcd. for $C_{20}H_{32}NaO_2$, 327.2295).

Mililatensol C (14): colorless oil; $[\alpha]_D^{19}$ -32.0 (*c* 0.25, $CHCl_3$); IR (KBr): ν_{max} 3447, 2921, 2851, 1494, 1383, 1196, 1180, 1132, 1076 cm^{-1}; For ^1H NMR and ^{13}C NMR data, see Table 5; HRESIMS *m/z* 327.2298 ([M + Na]$^+$; calcd. for $C_{20}H_{32}NaO_2$, 327.2295).

2.5. Anti-Inflammatory Activity Assay

The murine macrophage cell line RAW264.7 was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). In the bioassay for anti-inflammation, cells were cultured in DMEM containing 10% FBS, 2 mmol/L $_L$-glutamine, 100 μg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin in a humidified incubator of 5% CO_2 at 37 ˚C. For the cytotoxicity part, RAW264.7 cells were incubated with compounds or the media (0.125% DMSO in DMEM containing 10% FBS) for 24 h, respectively. CCK-8 reagents (20 μL per well) were added, and the OD values were collected after 1 h incubation at 450 nm (650 nm calibration) by a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). For the anti-inflammatory activity assay, RAW264.7 cells were incubated with compounds or the media (0.125% DMSO in DMEM containing 10% FBS), and then cells were primed with LPS (1 μg/mL) for 24 h. The supernatants were centrifuged and then measured using the mouse TNF-α ELISA kit. The CC_{50} and IC_{50} were estimated using the log (inhibitor) vs. normalized response non-linear fit (Graph Pad Prism 6.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Dexamethasone was used as a positive control.

2.6. Computational protocol

Torsional sampling (MCMM) conformational searches using OPLS_2005 force field were carried out by means of the conformational search module in the Macromodel 9.9.223 software applying an energy window of 21 kJ/mol. The Boltzmann populations of the conformers were obtained based on the potential energy provided by the OPLS_2005 force field, which afforded conformers above 1 % population for reoptimization. The reoptimization and the following TDDFT calculations of the reoptimized geometries were all performed with Gaussian 09 at the B3LYP/6-311G (d,p) level with IEFPCM solvent model for acetonitrile. Frequency analysis was performed as well to confirm that the reoptimized geometries were at the energy minima. Finally, the SpecDis1.62 software was applied to obtain the Boltzmann-averaged ECD spectra of the two compounds and visualize the results.

3. Results and Discussion

Freshly collected animals of *S. mililatensis* were immediately placed at -20 °C and kept frozen prior to extraction. The frozen samples were then extracted three times and the combined extract was separated by multiple rounds of chromatography to yield fourteen new diterpenes, sarcoxacyclols A−F (1−6), sarcomililatols C−G (7−11), and mililatensols A–C (12–14) along with six known related analogs 15−20 (Figure 1). These known compounds were readily identified as 11,12-epoxy-1(*E*),3(*E*),7(*E*)-cembratrien-15-ol (15),[11] (3*S*,4*S*,11*S*,12*S*,1*E*,7*E*)-3,4:11,12-bisepoxycembra-1,7-diene (16),[12] sarcophytrols M (17),[13] P (18),[13] Q (19),[13] and (2*E*,7*E*)-4,11-dihydroxy-l,12-oxidocembra-2,7,15-triene (20),[14] respectively, by comparisons of the NMR data and optical rotation with those reported in the literature. Notably, the single X-ray diffraction study of 15 was performed using Cu Kα radiation (λ = 1.54178 Å) and consequently its absolute configurations were unambiguously determined as 11*R*,12*R* [Flack parameter: -0.08(9)] (Figure 2).

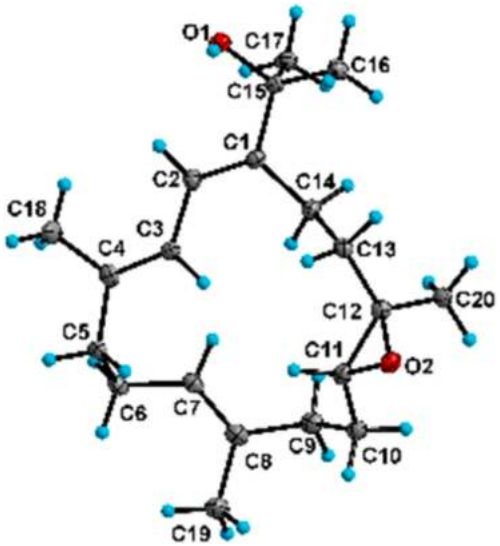


Figure 2. Perspective ORTEP drawing of X-ray structure of 15 (displacement ellipsoids are drawn at the 50 % probability level).

In our previous work, the absolute configuration of sarcophytrol M (17), a cembranediterpene possessing a furan ether isolated from the South China Sea soft coral *Sarcophyton trocheliophorum*, was determined as 1*S*,4*S*,11*S*,12*R* by the modified Mosher's method.[13] Based on the C-4 epimeric relationship between sarcophytrols M (17) and P(18), the absolute configuration of compound 18 could be assigned as 1*S*,4*R*,11*S*,12*R* in the present study, which was further confirmed by the same Cotton effects at ca. 208 nm in their experimental ECD spectra (Figure 3).

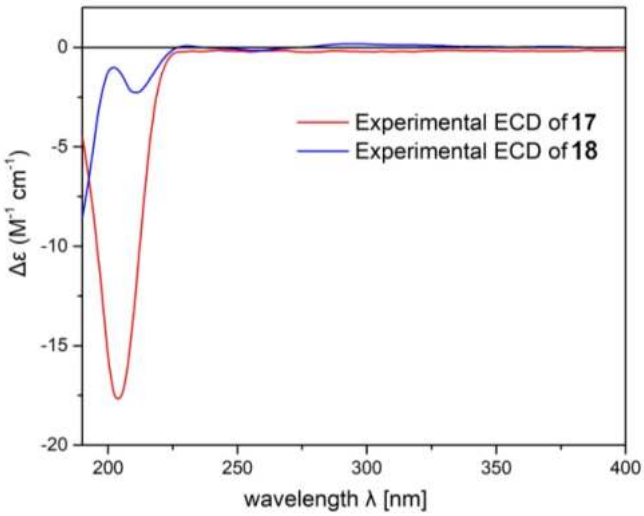


Figure 3. Experimental ECD spectra of compounds 17(red) and 18 (blue) in MeCN.

Table 1. 1H NMR and 13C NMR data for compounds 1–3.

No.	1 [a]		2 [a]		3 [b]	
	δ_H mult. (*J*, Hz)	δ_C, type	δ_H mult. (*J*, Hz)	δ_C, type	δ_H mult. (*J*, Hz)	δ_C, type
1		91.4, qC		88.1, qC		89.6, qC
2	5.55 d (15.8)	129.8, CH	5.68 d (15.5)	130.4, CH	2.14 m; 2.35 m	35.7, CH_2

3	6.11 d (15.8)	137.4, CH	5.92 d (15.5)	136.4, CH	5.12 t (6.0)	119.9, CH
4		72.4, qC		74.1,qC		136.6, qC
5	1.69 m; 1.86 m	41.6, CH_2	1.77 m; 1.82 m	43.5, CH_2	2.21 m	38.0, CH_2
6	2.01 m; 2.63 m	22.9, CH_2	2.20 m	24.3, CH_2	2.22 m	24.9, CH_2
7	5.42 dd (4.3, 10.5)	130.1, CH	5.37 dd (6.2, 8.8)	128.3, CH	5.18 t (6.0)	126.2, CH
8		132.1, qC		132.6, qC		132.9, qC
9	1.86 m; 2.00 m	34.8, CH_2	1.76 m; 2.00 m	34.2, CH_2	1.67 m; 2.02 m	33.8, CH_2
10	1.54 m; 1.89 m	27.3, CH_2	1.56 m; 1.96 m	27.3, CH_2	1.53 m; 1.85 m	27.5, CH_2
11	5.07 d (9.4)	77.1, CH	5.01 d (9.7)	76.5, CH	4.88 d (10.2)	75.7, CH
12		84.5, qC		84.2, qC		83.5, qC
13	1.58 m; 1.74 m	35.8, CH_2	1.59 m; 1.78 m	35.3, CH_2	1.55 m; 1.77 m	35.3, CH_2
14	1.68 m; 2.31 m	30.8, CH_2	2.03 m	35.3, CH_2	1.78 m; 1.93 m	32.0, CH_2
15		72.9, qC		149.5, qC		150.2, qC
16	1.12 s	24.6, CH_3	4.71 s; 4.96 s	109.4, CH_2	4.80 s; 5.10 s	110.1, CH_2
17	1.10 s	26.0, CH_3	1.71 s	19.2, CH_3	1.75 s	20.1, CH_3
18	1.34 s	29.0, CH_3	1.28 s	28.6, CH_3	1.56 s	16.8, CH_3
19	1.70 s	16.3, CH_3	1.66 s	17.1, CH_3	1.63 s	17.6, CH_3
20	1.16 s	20.7, CH_3	1.18 s	21.0, CH_3	1.18 s	21.8, CH_3
OAc		171.2, qC		171.2, qC		171.3, qC
	2.00 s	21.4, CH_3	2.05 s	21.4, CH_3	2.06 s	21.5, CH_3

[a] Recorded at 500 and 125 MHz for ^1H and ^{13}C in $CDCl_3$, respectively. [b] Recorded at 600 and 125 MHz for ^1H and ^{13}C in $CDCl_3$, respectively. Assignments were deduced by analysis of 1D and 2D NMR spectra.

Sarcoxacyclol A (1), which was obtained as a colorless oil, possessed the molecular formula $C_{22}H_{36}O_5$ on the basis of its HRESIMS ion peak at *m/z* 403.2448 ($[M+Na]^+$, calcd. for $C_{22}H_{36}O_4Na$, 403.2455), requiring five degrees of unsaturation. As revealed by the ^1H and ^{13}C NMR data (Table 1), there were one disubstituted double bond [δ_H 5.55 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-2) and 6.11 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-3); δ_C 129.8 (CH, C-2), 137.4 (CH, C-3)], one trisubstituted double bond [δ_H 5.42 (1H, dd, J = 4.3, 10.5 Hz, H-7); δ_C 130.1 (CH, C-7), 132.1 (qC, C-8)] and one acetyl group [δ_H 2.00 (3H, s, H_3-OAc); δ_C 21.4 (CH_3, *C*H_3-OAc), 171.2 (qC, *C*O-OAc)] in the molecule of 1. These functionalities accounted for three degrees of unsaturation. Thus, the remaining two degrees of unsaturation suggested the bicyclic framework of this compound. In fact, the NMR data of 1 closely resembled those of the co-occurring sarcophytrol P (18),[13] which was a cembrane diterpene possessed a tetrahydrofuran ether across C-1 and C-12 from the South China Sea soft coral *S. trocheliophorum*, revealing that they were structural analogues. Careful analysis of their NMR data disclosed the only difference was the presence of an acetoxyl group at C-11 in 1 instead of the hydroxyl in 18. This replacement was supported by the diagnostic HMBC correlations of H-11 (δ_H 5.07) and *C*O-OAc (δ_C 171.2), C-10 (δ_C 27.3) and C-12 (δ_C 84.5) (Figure 4). The observed NOE cross-peaks of H_3-18 (δ_H 1.34)/H-2 (δ_H 5.55), H-2/H_3-16 (δ_H 1.12), H_3-16/H-14b (δ_H 2.31) and H-14b/H_3-20 (δ_H 1.16) suggested the same orientation of H_3-16, H_3-18, and H_3-20 (Figure 5). Whereas the lack of the NOE correlation of H-11 (δ_H 5.07)/H_3-20 and the presence of H-3 (δ_H 6.11)/H-11 placed H-11 and H_3-20 on the opposite faces of this molecule. Therefore, 1 was the 11-acetylation derivative of 18, which was consistent with their 42 mass units difference. Considering their structural relationship, the absolute configuration of 1 was tentatively supposed as the same as that of 18.

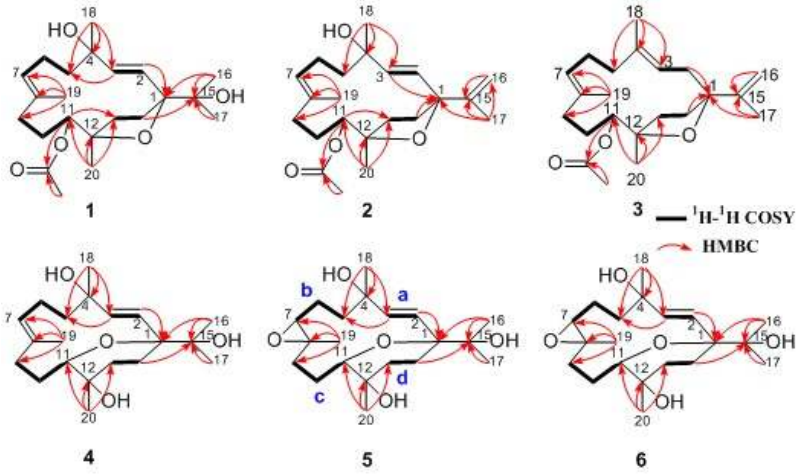


Figure 4. Selected key COSY and HMBC correlations for compounds 1–6.

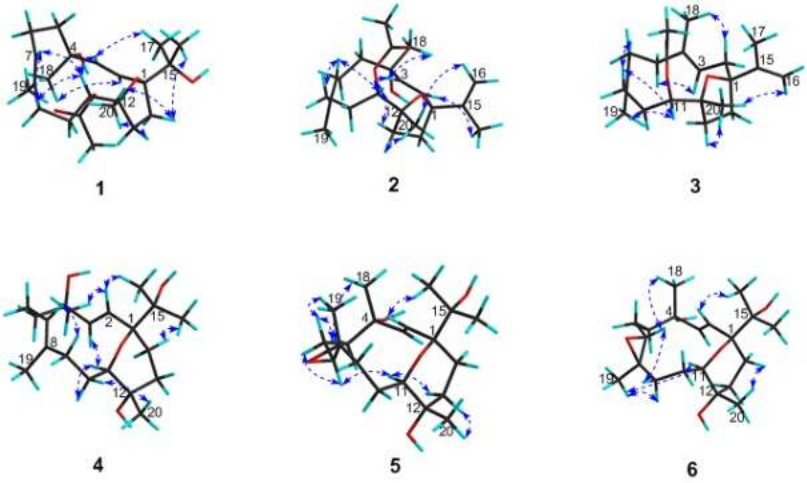


Figure 5. Selected key ROESY correlations for compounds 1–6.

Sarcoxacyclol B (2) was isolated as a colorless oil and had a molecular formula $C_{22}H_{34}O_4$ as established by the pseudo-molecular ion peak at *m/z* 385.2361 ([M+Na]$^+$, calcd. for $C_{22}H_{34}O_4Na$, 385.2349) in its HRESIMS spectrum, requiring six degrees of unsaturation. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra (Table 1) of 2 showed resonances attributed to one disubstituted double bond [δ_H 5.68 (1H, d, J = 15.5 Hz, H-2), 5.92 (1H, d, J = 15.5 Hz, H-3); δ_C 130.4 (CH, C-2), 136.4 (CH, C-3)], one trisubstituted double bond [δ_H 5.37 (1H, dd, J = 6.2, 8.8 Hz, H-7); δ_C 128.3 (CH, C-7), 132.6 (qC, C-8)], one terminal double bond [δ_H 4.71 (1H, s, H-16a), 4.96 (1H, s, 16b); δ_C 109.4 (CH_2, C-16), 149.5 (qC, C-15)], one acetyl [δ_H 2.05 (3H, s, H_3-OAc); δ_C 21.4 (CH_3, *C*H_3-OAc), 171.2 (qC, *C*O-OAc)]. All the above-mentioned functionalities accounted for four degrees of unsaturation, the left two indicated 2 was a bicyclic diterpene. Indeed, the NMR data of 2 were almost superimposed to those of 1, suggesting the structural similarity of both compounds. Further comparison of their NMR data disclosed their gross structures differed at the substituent attached to C-1, which was a propen-2-yl group in 2 whereas a peculiar isopropyl alcohol moiety in 1. This propen-2-yl group was assigned at C-1 based on the HMBC correlations from H_3-17 (δ_H 1.71) to C-1 (δ_C 88.1), C-15 (δ_C 149.5) and C-16 (δ_C 109.4) (Figure 4). Hereto, the planar structure of 2 was determined as the dehydration derivative of 1. The *cis*-orientation of the propen-2-yl group and CH_3-20 was deduced from the characteristic NOE cross-peak of H-16b (δ_H 4.96)/H_3-20 (δ_H 1.18). The strong NOE correlations between H-2 (δ_H 5.68) and H_3-17 (δ_H 1.71) and between H-3 (δ_H 5.92) H_3-18 (δ_H 1.28) implied that H_3-17 and H_3-18 were *trans*-oriented. These NOE correlations (Figure 5) indicated 2 and the co-isolated

diterpene sarcophytrol M (17)[13] shared the same configurations for the four chiral centers C-1, C-4, C-11 and C-12. Tentatively, the absolute configuration of 2 was assumed as 1*S*,4*S*,11*S*,12*R*.

Sarcoxacyclol C (3) was purified as a colorless oil with a molecular formula $C_{22}H_{34}O_3$, which was inferred from the HREIMS data (*m*/*z* 346.2507, M^+, calcd. for $C_{22}H_{34}O_3$, 346.2508). Its ^{1}H NMR data (Table 1) revealed the presence of three vinyl methyls at δ_H 1.63 (3H, s, H_3-19), 1.56 (3H, s, H_3-18) and 1.75 (3H, s, H_3-17), one methyl linked to a tertiary carbon at δ_H 1.18 (3H, s, H_3-20), one methyl of an acetyl group at δ_H 2.06 (3H, s, H_3-OAc), one proton linked to an oxygenated carbon at δ_H 4.88 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-11) and four olefinic protons at δ_H 4.80 (1H, s, 16a), 5.10 (1H, s, H-16b), 5.12 (1H, t, J = 6.0 Hz, H-3) and 5.18 (1H, t, J = 6.0 Hz, H-7), which were indicative of two trisubstituted double bonds and one terminal double bond. The ^{13}C NMR spectrum displayed 22 signals consisting of five methyls (δ_C 16.8, 17.6, 20.1, 21.5, 21.8), eight methylenes (including seven aliphatic δ_C 24.9, 27.5, 32.0, 33.8, 35.3, 35.7, 38.0, one olefinic δ_C 110.1), three methines (including one oxygenated δ_C 75.7, two olefinic δ_C 119.9, 126.2), and six quaternary carbons (including two oxygenated δ_C 83.5, 89.6, three olefinic δ_C 132.9, 136.6, 150.2, one carbonyl δ_C 171.3) (Table 1). These abovementioned structural features of 3 were reminiscent of the co-isolated 2. The interpretation of the 2D NMR spectra (Figures 4 and 5) suggested compounds 3 and 2 differed by the double bond at C-2/C-3 in 2 shifting to C-3/C-4 in 3 accompanied with the disappearance of the hydroxyl at C-4. This alteration was supported by the consecutive spinning protons system from H_2-2 (δ_H 2.14 m, 2.35 m) to H-3 (δ_H 5.12) along with the key HMBC correlations of H_2-2/C-1 (δ_C 89.6), H_3-18 (δ_H 1.56)/C-3 (δ_C 119.9), H_3-18/C-4 (δ_C 136.6), H_3-18/C-5 (δ_C 38.0) (Figure 4). The NOESY spectra of diterpenes 2 and 3 (Figure 5) showed similar distributions of NOE cross-peaks implying they shared the same configurations for the three chiral carbons C-1, C-11 and C-12. Based on the biogenetical consideration, the absolute configuration of 3 was tentatively supposed as 1*S*,11*S*,12*R*, and its structure was shown as depicted in Figure 1.

Table 2. 1H NMR and 13C NMR data for compounds 4–6.

No.	4 [a]		5 [b]		6 [b]	
	δ_H mult. (*J*, Hz)	δ_C, type	δ_H mult. (*J*, Hz)	δ_C, type	δ_H mult. (*J*, Hz)	δ_C, type
1		81.1, qC		81.8, qC		80.3, qC
2	5.20 d (16.4)	125.1, CH	5.44 d (15.9)	124.1, CH	5.53 d (16.0)	124.4, CH
3	6.11 d (16.4)	141.5, CH	5.75 d (15.9)	140.7, CH	6.26 d (16.0)	142.8, CH
4		72.7, qC		74.0, qC		73.6, qC
5	1.55 m; 1.93 m	43.3, CH_2	1.76 m; 2.03 m	42.4, CH_2	1.86 m	38.0, CH_2
6	2.06 m; 2.58 m	22.9, CH_2	2.08 m; 2.30 m	24.2, CH_2	1.59 m; 2. 02 m	25.0, CH_2
7	5.23 dd (5.1, 10.2)	131.0, CH	2.89 d (9.7)	66.8, CH	2.95 dd (4.2, 9.0)	67.0, CH
8		132.6, qC		61.9, qC		60.3, qC
9	1.51 m; 1.70 m	39.0, CH_2	1.41 m; 2.15 m	35.5, CH_2	1.41 m; 2.03 m	33.3, CH_2
10	1.42 m; 1.88 m	26.6, CH_2	1.42 m; 1.87 m	25.0, CH_2	1.46 m; 1.90 m	24.4, CH_2
11	3.35 t (4.1)	75.6, CH	3.51 t (5.1)	75.0, CH	3.49 t (10.8)	74.1, CH
12		70.9, qC		71.2, qC		70.3, qC
13	2.01 m; 2.21 m	37.3, CH_2	1.53 m; 1.70 m	37.3, CH_2	1.71 m	36.7, CH_2
14	1.54 m; 2.16 m	28.5, CH_2	1.60 m; 2.22 m	28.2, CH_2	1.61 m; 2.12 m	28.2, CH_2
15		75.1, qC		74.6, qC		75.0, qC
16	1.16 s	24.7, CH_3	1.16 s	24.8, CH_3	1.17 s	24.7, CH_3
17	1.09 s	24.1, CH_3	1.11 s	24.0, CH_3	1.14 s	24.4, CH_3
18	1.37 s	28.0, CH_3	1.28 s	27.7, CH_3	1.39 s	27.2, CH_3

19	1.70 s	15.2, CH_3	1.38 s	17.8, CH_3	1.27 s	15.5, CH_3
20	1.18 s	19.6, CH_3	1.17 s	19.2, CH_3	1.16 s	19.7, CH_3

[a] Recorded at 500 and 125 MHz for ^1H and ^{13}C in $CDCl_3$, respectively. [b] Recorded at 600 and 125 MHz for ^1H and ^{13}C in $CDCl_3$, respectively. Assignments were deduced by analysis of 1D and 2D NMR spectra.

Sarcoxacyclol D (**4**), colorless crystals, displayed a pseudo-molecular ion peak at *m*/*z* 361.2348 ($[M+Na]^+$, calcd. for $C_{20}H_{34}O_4Na$, 361.2349) in the HRESIMS spectrum, indicating that **4** possessed the same molecular formula $C_{20}H_{34}O_4$ as that of the co-isolate sarcophytrol Q (**19**).[13] Thus, four degrees of unsaturation were determined for this diterpene. The ^1H and ^{13}C NMR data (Table 2) revealed the presence of one trisubstituted double bond [δ_H 5.23 (1H, dd, J = 5.1, 10.2 Hz, H-7); δ_C 131.0 (CH, C-11), 132.6 (qC, C-8)], one disubstituted double bond [δ_H 5.20 (1H, d, J = 16.4 Hz, H-2), 6.11 (1H, d, J = 16.4 Hz, H-3); δ_C 125.1 (CH, C-2), 141.5 (CH, C-3)] and four oxygenated quaternary carbons [δ_C 70.9 (qC, C-12), 72.7 (qC, C-4), 75.1 (qC, C-15), 81.1 (qC, C-1)], which accounted for two degrees of unsaturation. The remaining two degrees of unsaturation strongly indicated one bicyclic structure incorporating a nonaromatic oxacycle for **4**. Indeed, compound **4** was identical in all respects with the co-occurring sarcophytrol Q (**19**), which was a diterpene possessing a tetrahydropyran ether across C-1 and C-11 previously isolated from the South China Sea soft coral *S. trocheliophorum*.[13] Their structural difference was at the reversed configuration of C-4, which was deduced from the chemical shift of C-4 upfield shifiting from δ_C 74.3 in **19** to δ_C 72.7 in **4**. This hypothesis was supported by the NOE correlations between H-2 (δ_H 5.20) and both H_3-16 (δ_H 1.16) and H_3-18 (δ_H 1.37) implying that H_3-16 and H_3-18 were co-facial (Figure 5). To elucidation of the absolute configuration, suitable single crystals of **4** were successfully obtained from the diethyl ether-acetone solvent system after many attempts. The X-ray diffraction experiment with Ga Kα radiation (λ = 1.34139 Å) unambiguously established the absolute configuration of **4** was 1*S*,4*R*,11*R*,12*S* (Flack parameter: −0.06 (9), Figure 6). Based on their epimeric relationship, the absolute configuration of **19** could be tentatively assumed as 1*S*,4*S*,11*R*,12*S*, suggesting the revision of configurations of C-11 and C-12 of **19** reported in the previous work.[13]

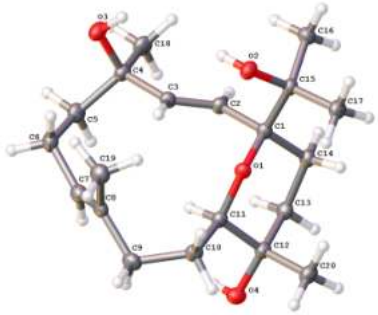


Figure 6. Perspective ORTEP drawings of X-ray structures of 4.

Sarcoxacyclol E (5) had a molecular formula $C_{20}H_{34}O_5$ deduced from a pseudo-molecular ion peak at *m*/*z* 377.2294 ($[M+Na]^+$, calcd. for $C_{20}H_{34}O_5Na$, 377.2298) in the HRESIMS spectrum, requiring four degrees of unsaturation. The ^1H and ^{13}C NMR data of 5 (Table 2) displayed the signals attributed to one disubstituted double bond [δ_H 5.44 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2), 5.75 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3); δ_C 124.1 (CH, C-2), 140.7 (CH, C-3)] and one epoxide group [δ_H 2.89 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-7); δ_C 66.8 (CH, C-7), 61.9 (qC, C-8)]. These two functionalities accounted for two degrees of unsaturation, the left two indicated 5 was a bicyclic diterpene. The interpretation of its ^1H–^1H COSY spectrum (Figure 5) disclosed four segments: a. H-2–H-3, b. H_2-5–H_2-6–H-7, c. H_2-9–H_2-10–H-11 and d. H_2-13–H_2-14. The HMBC correlations (Figure 4) from H_3-18 (δ_H 1.28) to C-3 (δ_C 140.7), C-4 (δ_C 74.0) and C-5 (δ_C 42.4) led to the connection of partial structures a and b via quaternary carbon C-4 bearing a hydroxyl group. The observed HMBC cross-peaks of

H_3-19 (δ_H 1.38)/C-7 (δ_C 66.8), H_3-19/C-8 (δ_C 61.9) and H_3-19/C-9 (δ_C 35.5) revealed the linkage of partial fragments b and c through C-8, accompanying with the fix of the epoxide group at C-7/C-8. The subunit d was found to be linked to subunits c and a by the oxygenated carbons C-12 and C-1 as deduced from the significant HMBC correlations of H_3-20 (δ_H 1.17) with C-11 (δ_C 75.0), C-12 (δ_C 71.2) and C-13 (δ_C 37.3), and of both H-2 (δ_H 5.44) and H-14 (δ_H 2.22) with C-1 (δ_C 81.8), respectively. A peculiar isopropyl alcohol group was recognized by the mutual HMBC correlations from H_3-16 (δ_H 1.16) and H_3-17 (δ_H 1.11) to C-15 (δ_C 74.6). This group was attached to C-1 indicating by the key HMBC cross-peaks of H_3-16/C-1 and H_3-17/C-1. Thus, the carbon framework of compound 5 was established as a cembrane skeleton. Indeed, the ^{13}C chemical shifts of the segment C-11–C-12–C-13–C-14–C-1 of 5 were nearly identical to those of the co-isolate 4, suggesting the hydroxyl group bonded to C-12 and a tetrahydropyran ring bridged C-1 and C-11. Thus, the planar structure of 5 was established as a epoxidation derivative of 4. The above-mentioned almost identical chemical shifts of the segment C-11–C-12–C-13–C-14–C-1 suggested the same configurations for the three chrial centers C-1, C-11 and C-12 in 4 and 5. The NOE correlations (Figure 5) between H-2 and H_3-17 and between H-3 and H_3-18, together with *trans* configuration of double bond Δ^2 (J = 15.9 Hz), suggested H_3-17 and H_3-18 were *trans*-orientated. This observation indicated the opposite configuration of C-4 in 5 compared with that of 4, which was further confirmed by the chemical shift of C-4 downfied shifting from δ_C 72.7 in 4 to δ_C 74.0 in 5. The diagnostic NOE cross-peak of H-7 (δ_H 2.89)/H-11 (δ_H 3.51) implied the co-facial orientation for H-7 and H-11. The *trans* geometry of the epoxide ring was deduced from the NOE cross-peaks of H-7/H-6a (δ_H 2.10) and H_3-19/H-6b (δ_H 1.46). Hereto, the structure of 5 was depicted as shown in Figure 1, and the absolute configuration was tentatively assumed as 1*S*,4*S*,7*S*,8*S*,11*R*,12*S*.

Sarcoxacyclol F (6) possessed the same molecular formula $C_{20}H_{34}O_5$ as that of sarcoxacyclol E (5), as deduced from the pseudo-molecular ion peak at *m/z* 377.2295 ($[M+Na]^+$, calcd. for $C_{20}H_{34}O_5Na$, 377.2298) in the HRESIMS spectrum. Inspection of NMR data of 6 (Table 2) revealed that the planar structure of 6 should be the same as that of 5, which was further supported by the extensive analysis of its 2D NMR spectra (Figure 4). The clear NOE cross-peak of H_3-19 (δ_H 1.27)/H-11 (δ_H 3.49) in the NOESY spectrum of 6 (Figure 5) suggested the same orientation for CH_3-19 and H-11 in 6, which was different from that of 5. The key NOE cross-peaks of H-7 (δ_H 2.95)/H-9a (δ_H 1.41) and H_3-19/H-9b (δ_H 2.03) was indicative of the *trans* geometry of the epoxide ring in 6. Consequently, 6 was established as the C-7/C-8 stereoisomer of 5, namely another epoxidation derivative of 4, and the absolute configuration was tentatively supposed as 1*S*,4*S*,7*R*,8*R*,11*R*,12*S*.

Table 3. ^1H NMR data for compounds 7–11.

No.	**7**[a]	**8**[b]	**9**[b]	**10**[a]	**11**[a]
1	-	-	-	-	-
2	5.94 d (11.1)	5.12 d (6.8)	5.67 d (10.0)	6.29 d (10.2)	6.28 d (10.2)
3	6.05 d (11.1)	3.33 d (6.8)	4.22 d (10.0)	5.81 d (10.2)	5.77 d (10.2)
4					
5	2.23 m; 2.13 m	2.10 m; 1.40 m	2.09 m; 1.49 m	2.20 m; 2.20 m	2.24 m; 2.24 m
6	2.34 m; 2.16 m	2.27 m; 1.95 m	2.30 m; 2.08 m	2.24 m; 2.18 m	2.29 m; 2.29 m
7	5.13 dd (4.8, 8.2)	5.37 t (6.9)	5.36 t (6.3)	5.26 t (5.3)	5.27 t (4.9)
8					
9	2.31 m; 2.04 m	2.29 m; 2.05 m	2.32 m; 2.19 m	2.27 m; 2.11 m	2.52 dd (6.3, 13.9); 2.33 dd (3.6, 13.9)
10	1.72 m	2.16 m	2.01 m	1.99 m	4.91 ddd (3.6, 6.3, 8.9)

11	1.44 m; 4.59 dd (2.7, 10.4)	1.29 m; 2.68 dd (3.4, 10.7)	1.53 m; 2.83 dd (2.3, 9.3)	1.48 m; 2.9 dd (3.7, 9.0)	3.15 d (8.9)
12					
13	5.47 t (7.8)	2.26 m; 1.15 m	2.28 m; 1.09 m	2.19 m; 2.19 m	1.95 m; 1.61 m
14	2.90 m; 2.90 m	2.29 m; 2.13 m	2.14 m; 2.14 m	2.11 m; 2.07 m	2.11 m; 2.05 m
15	2.36 m				
16	1.06 d (7.0)	1.30 s	1.35 s	1.34 s	1.34 s
17	1.06 d (7.0)	1.30 s	1.34 s	4.12 d (11.3) 4.03 d (11.3)	1.34 s
18	1.75 s	1.27 s	1.05 s	1.74 s	1.75 s
19	1.56 s	1.67 s	1.67 s	1.67 s	1.74 s
20	1.70 s	1.30 s	1.26 s	1.26 s	1.34 s
OMe		3.05 s			
OAc				2.08 s	2.10 s

[a] Recorded at 500 MHz in $CDCl_3$. [b] Recorded at 600 MHz in $CDCl_3$. Assignments were deduced by analysis of 1D and 2D NMR spectra.

Table 4. ^{13}C NMR data for compounds 7–11.

No.	7[a]	8[a]	9[a]	10[a]	11[a]
1	146.2, qC	147.0, qC	151.9, qC	142.1, qC	146.7, qC
2	116.9, CH	125.0, CH	121.4, CH	121,7, CH	118.4, CH
3	120.8, CH	59.5, CH	70.7, CH	120.0, CH	119.2, CH
4	135.6, qC	61.9, qC	74.5, qC	139.5, qC	138.9, qC
5	38.7, CH_2	38.4, CH_2	37.7, CH_2	38.3, CH_2	37.2, CH_2
6	25.3, CH_2	22.6, CH_2	24.1, CH_2	25.0, CH_2	25.0, CH_2
7	126.9, CH	125.7, CH	126.8, CH	127.2, CH	130.6, CH
8	134.2, qC	135.2, qC	133.9, qC	133.6, qC	130.4, qC
9	35.1, CH_2	37.0, CH_2	37.6, CH_2	36.9, CH_2	42.2, CH_2
10	31.4, CH_2	24.7, CH_2	24.3, CH_2	24.5, CH_2	71.9, CH
11	66.1, CH	62.4, CH	63.2, CH	60.8, CH	60.7, CH
12	139.5, qC	61.5, qC	62.0, qC	61.1, qC	61.4, qC
13	124.7, CH	40.0, CH_2	42.4, CH_2	38.6, CH_2	38.0, CH_2
14	27.4, CH_2	25.3, CH_2	24.8, CH_2	23.6, CH_2	22.6, CH_2
15	33.0, CH	77.5, qC	73.7, qC	74.9, qC	73.9, qC
16	22.6, CH_3	26.6, CH_3	29.7, CH_3	25.2, CH_3	29.6, CH_3
17	22.4, CH_3	25.2, CH_3	29.4, CH_3	70.6, CH_2	29.5, CH_3
18	17.5, CH_3	18.1, CH_3	23.0, CH_3	18.2, CH_3	18.6, CH_3
19	15.8, CH_3	14.9, CH_3	14.9, CH_3	15.2, CH_3	17.6, CH_3
20	17.9, CH_3	16.1, CH_3	16.5, CH_3	17.7, CH_3	18.9, CH_3
O*C*H_3		50.5, CH_3			
O*C*OCH_3				171.2, qC	170.5, qC
OCO*C*H_3				21.1, CH_3	21.4, CH_3

[a] Recorded at 125 MHz for ^{13}C in $CDCl_3$. Assignments were deduced by analysis of 1D and 2D NMR spectra.

Sarcomililatol C (**7**) was obtained as colorless oil. Its molecular formula was determined to be $C_{20}H_{32}O$ by the HREIMS ion peak at *m/z* 288.2440 M^+ (calcd. for $C_{20}H_{32}O$, 288.2448), indicating five degrees of unsaturation. Analysis of ^1H and ^{13}C NMR spectra of **7** disclosed 20 carbons, including five methyls, five sp^3 methylenes, two sp^3 methines, four sp^2 methines, and four sp^2 quaternary carbons. According to the ^1H and ^{13}C NMR data of **7** (Tables 3 and 4), four degrees of unsaturation were attributed to four trisubstituted double bonds [δ_H 5.94 (1H, d, *J* = 11.1 Hz), 6.05 (1H, d, *J* = 11.1 Hz), 5.13 (1H, dd, *J* = 4.8, 8.2 Hz), 5.47 (1H, t, *J* = 7.8 Hz) and δ_C 146.2, 116.9, 120.8, 135.6, 126.9, 134.2, 139.5, 124.7], thus the remaining one degree of unsaturation suggested the presence of a monocyclic system in **7**. Subsequently, the single ring was deduced to be a characteristic 14-membered macrocylic cembrane skeleton according to the ^1H–^1H COSY and HMBC correlations (Figure 7). ^1H–^1H COSY correlations revealed five structural fragments of consecutive proton systems extending from H-2 to H-3, from H-5 to H-7, from H-9 to H-11, from H-13 to H-14, and from H-15 to H-16 and H-17. These data, together with the key HMBC correlations of H_3-18/C-3, C-4, C-5, H_3-19/C-7, C-8, C-9, H_3-20/C-11, C-12, C-13, H_3-16/C-1, C-15, and H-2/C-1, C-14 led to the connections of five substructures to construct the cembrane skeleton of **7**. Further analysis of its ^1H and ^{13}C NMR data (Tables 3 and 4) revealed the presence of a hydroxyl group located at C-11 [δ_H 4.59 (1H, dd, *J* = 2.7, 10.4 Hz) and δ_C 66.1], which was confirmed by the diagnostic HMBC cross-peak of H_3-20/C-11. The geometries of the olefins were determined by the NOESY experiment (Figure 8). The clear NOE correlations of H-2 (δ_H 5.94)/H_3-16 (δ_H 1.06), H-3 (δ_H 6.05)/H-5b (δ_H 2.13), H_3-19 (δ_H 1.56)/H-6a (δ_H 2.34), and H_3-20 (δ_H 1.70)/H-13 (δ_H 5.47) indicated the '1*E*,3*E*,7*E*,12*Z*' geometry of the four trisubstituted double bonds Δ^1, Δ^3, Δ^7, and Δ^{12}. However, the relative configuration of C-11 couldn't be established due to the insufficient NOE correlations. To further determine the structure as well as the absolute configuration, the Mosher's method was applied. Unfortunately it was failed, probably due to the unstable property of **7** in the reaction solution. Then the approach TDDFT ECD was used. As shown in Figure 7, the assignment of the absolute configuration as 11*R* could be deduced from the excellent agreement between the experimental ECD spectrum of **7** and the calculated one for (11*R*)-**7**. Thus, the structure of **7** was established as shown in Figure 9.

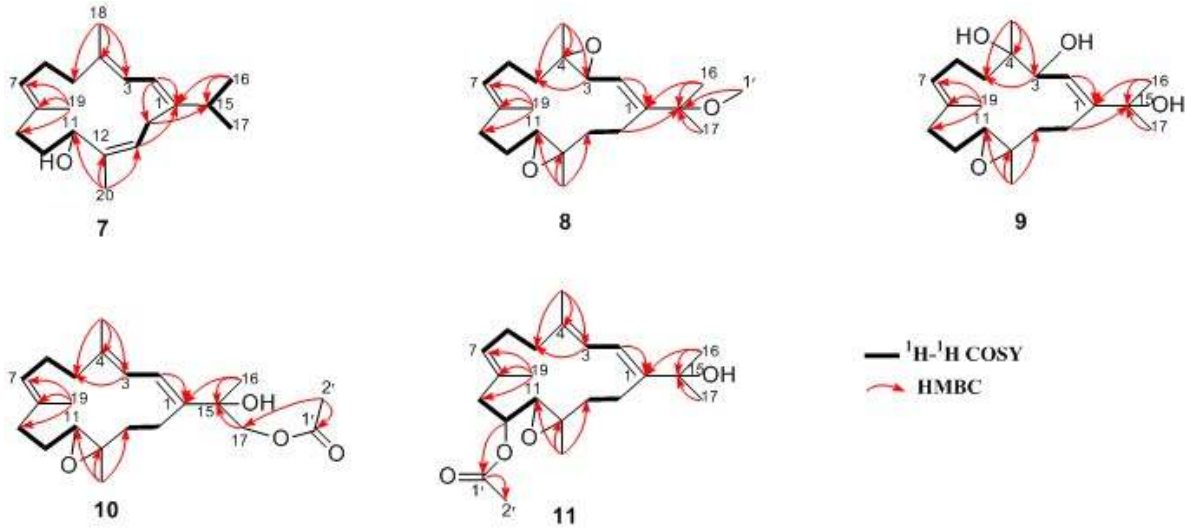


Figure 7. Selected key COSY and HMBC correlations for compounds 7–11.

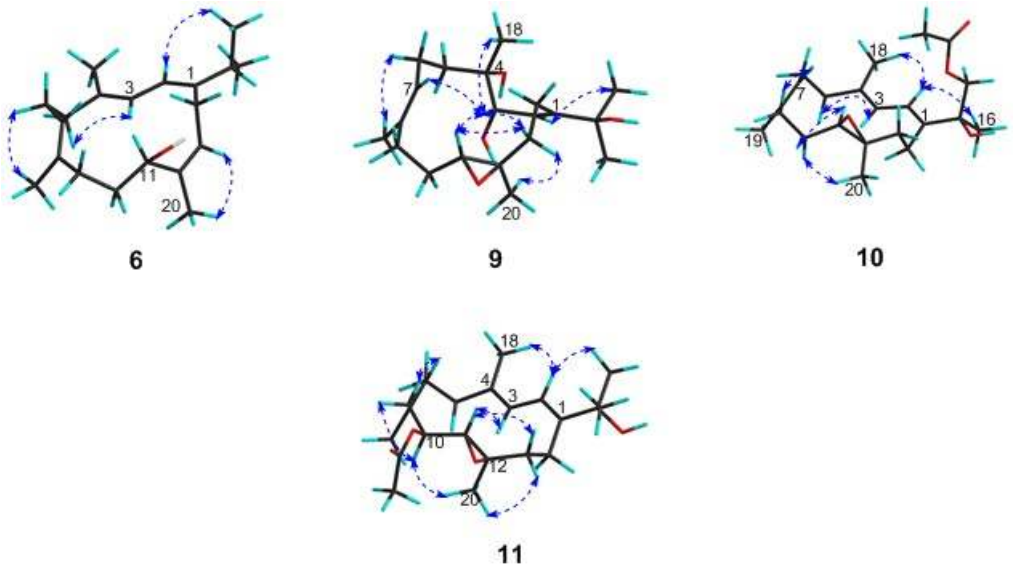


Figure 8. Selected key ROESY correlations for compounds 7 and 9–11.

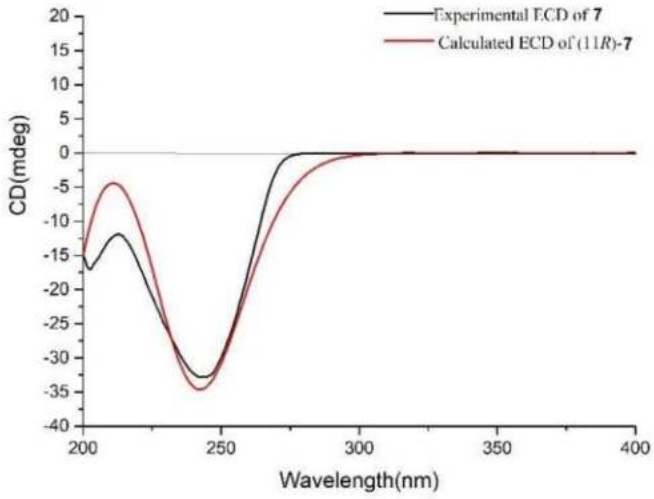


Figure 9. Experimental ECD spectrum (black) of 7 and calculated ECD spectrum (red) for 11*R*-7.

Sarcomililatol D (**8**), an optically active colorless oil, displayed a molecular formula of $C_{21}H_{34}O_3$ as established by the HRESIMS ion peak at *m*/*z* 335.2597 $[M+H]^+$ (calcd. for $C_{21}H_{35}O_3$, 335.2581). A careful analysis revealed that the NMR spectroscopic features of **8** (Tables 3 and 4) mostly resembled those of co-isolated macrocylic diterpene (3*S*,4*S*,11*S*,12*S*,1*E*,7*E*)-3,4:11,12-bisepoxycembra-1,7-diene (**16**).[12] In fact, the only difference was at the C-15 position, where the hydrogen in **16** was replaced by a methoxyl group (δ_H 3.05 and δ_C 50.5) in **8**. This replacement was consist with their 30 mass units difference and evidenced by the HMBC correlation of H_3-1′/C-15. Due to methoxylation, the chemical shift of C-15 was shifted downfield significantly from δ_C 33.8 in **7** to δ_C 77.5 in **8**. A detailed 2D NMR analysis (Figures 7 and 8) further confirmed the planar structure of **8**. In order to further confirm the structure as well as determine the absolute configuration, suitable single crystals of **8** were obtained. Thus, X-ray crystallography study using Cu Kα radiation (λ = 1.54178 Å) secured the deduced structure of **8**, also clearly disclosed its absolute configuration as 3*R*,4*R*,11*R*,12*R* [Flack parameter –0.03(7)] (Figure 10).

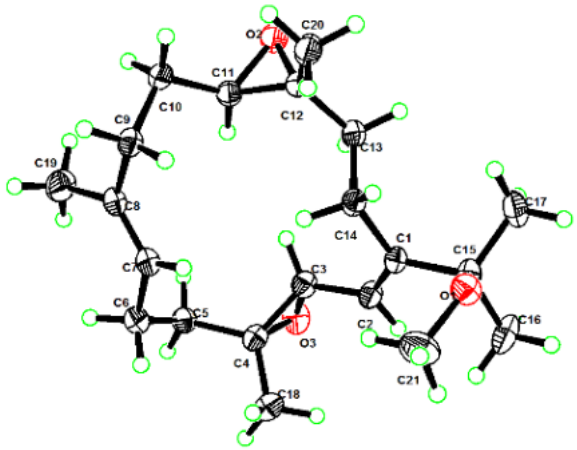


Figure 10. Perspective ORTEP drawing of X-ray structure of 8 (displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level).

Sarcomililatol E (**9**) was obtained as a colorless oil with the molecular formula $C_{20}H_{34}O_4$ as suggested by the HRESIMS ion peak at *m*/*z* 361.2341 $[M+Na]^+$ (calcd. for $C_{20}H_{34}O_4Na$, 361.2349). The ^1H and ^{13}C NMR data of **9** (Tables 3 and 4) showed high similarity to those of **8**, except for the presence of three hydroxyl groups at C-3, C-4 and C-15 in **9** instead of the epoxy moiety at C-3/C-4 and the methoxyl at C-15 in **8**. The key HMBC correlations of H_3-18/C-3, C-4, C-5, and H_3-16/C-1, C-15 supported these findings (Figure 7). Due to the change, the carbon chemical shifts of C-3 (δ_C 70.7) and C-4 (δ_C 74.5) were prominently shifted downfield ($\Delta\delta \approx -12$ ppm), whereas that of C-15 (δ_C 73.7) was shifted upfield ($\Delta\delta \approx +4$ ppm) compared to **8**. The relative configuration of **9** was determined as 3*S**,4*S**,11*R**,12*R** by the characteristic cross-peaks of H-11 (δ_H 2.83)/H-13b (δ_H 1.09), H_3-20 (δ_H 1.26)/H-13a (δ_H 2.28), H_3-18 (δ_H 1.05)/H-3 (δ_H 4.22) and H-11 (δ_H 2.83)/H-3 (δ_H 4.22) in the NOESY spectrum (Figure 8). With the elative configuration of **9** being elucidated, the following task was to determine its absolute configuration. Unfortunately, the attempt to apply the Mosher's method was failed, probably due to the scarce amounts of **9**. However, since **9** was 3,4,15-trihydroxyl derivative of **8**, from a biogenetic point of view, the absolute configuration of **9** could be tentatively assigned as 3*S*,4*S*,11*R*,12*R*.

The colorless oil, sarcomililatol F (**10**), had a molecular formula of $C_{22}H_{34}O_4$ deduced from its HRESIMS ion peak at *m*/*z* 385.2343 $[M+Na]^+$ (calcd. for $C_{22}H_{34}O_4Na$, 385.2349), indicating 58 mass units than that of co-occurred macrocylic diterpene 11,12-epoxy-1(*E*),3(*E*),7(*E*)-cembratrien-15-ol (**15**).[11] In fact, the ^1H and ^{13}C NMR spectra (Tables 3 and 4) of **10** closely resembled those of **15**, the only difference was the presence of an acetoxyl at C-17 in **10**, which agreed with their 58 mass units difference. The acetoxylation occurred at C-17 was evidenced by the diagnostic correlation from H_3-1′ to C-17 (Figure 7). Due to the acetoxylation, the carbon chemical shifts of C-17 (δ_C 70.6) was dramatically shifted downfield. As the patterns of NOESY correlations of **10** (Figure 8) were similar with those of **15**, and the absolute configuration of **15** was determined by X-ray diffraction in our study,[15] the absolute configuration of epoxy moiety in **10** could be assigned as 11*R*,12*R* accordingly on a biogenetic consideration. To determine the absolute configuration of C-15 in **10**, ECD spectra of both enantiomeric forms (11*R*,12*R*,15*R* and 11*R*,12*R*,15*S*) were computed by means of time-dependent density functional theory (TDDFT). As shown in Figure 11, the Boltzmann-averaged ECD spectrum of 11*R*,12*R*,15*S*-**10** displayed an identical curve compared to the experimental one. Consequently, the absolute configuration of **10** was established as 11*R*,12*R*,15*S*.

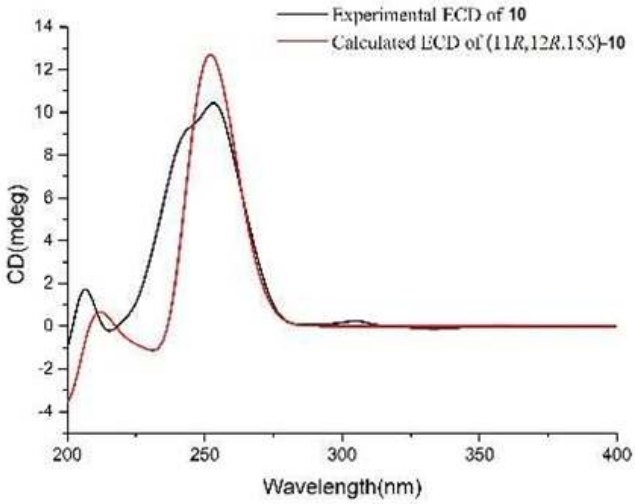


Figure 11. Experimental ECD spectrum (black) of 10 and calculated ECD spectrum (red) for 11*R*,12*R*,15*S*-10.

Sarcomililatol G (11) was obtained as an optically active colorless oil and its molecular formula was assigned as $C_{22}H_{34}O_4$ by the HRESIMS ion peak at *m*/*z* 385.2339 $[M+Na]^+$ (calcd. for $C_{22}H_{34}O_4Na$, 385.2349), implying 58 mass units than that of co-occurred macrocylic diterpene 15.[11] Its overall NMR data (Tables 3 and 4) were strongly reminiscent of those of 15, except for the presence of the signals of an acetoxyl group (δ_H 2.10, s; δ_C 170.5, 21.4) in 11, which was consistent with the extra 58 molecular mass units compared to 15. The characteristic HMBC correlation from H-10 to C-1′ (Figure 7) indicated the acetoxyl group attached to C-10. An extensive analysis of NOESY spectrum (Figure 8) revealed the key cross-peaks of H-11 (δ_H 3.15)/H-13b (δ_H 1.61), H_3-20 (δ_H 1.34)/H-13a (δ_H 1.95) and H_3-20 (δ_H 1.34)/H-10 (δ_H 4.91), indicating the β-orientation for the acetoxyl group and H-11 whereas α-orientation for the methyl group at C-12. Taking with the biogenetic consideration between 11 and 15, it was reasonable to expect that 11 had the same absolute configuration 11*R*,12*R* at the C-11 and C-12. Consequently, the absolute stereochemistry of C-10 could be deduced as 10*S* from the abovementioned relative configuration. To secure its absolute configuration, the chemical transformation and Mosher's reaction were performed (Figure 12). Firstly, the hydrolysis of 11 was conducted in the presence of K_2CO_3 in MeOH, yielding the diol 11a. To our delight, the subsequent treatment of 11 with (*R*)- and (*S*)-*α*-methoxy-*α*-trifluoromethylphenyl acetyl (MTPA) chlorides in dry pyridine successfully afforded the (*S*)- and (*R*)-MTPA ester derivatives 11s and 11r, respectively. The observed $\Delta\delta_{H(S-R)}$ value distribution pattern established the 10*S* absolute configuration for 11, which agreed with the previously proposed one. Thus, the absolute configuration of compound 11 was elucidated as 10*S*, 11*R*, 12*R*.

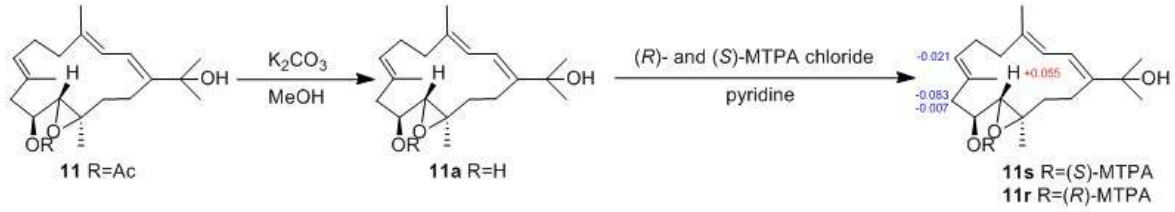


Figure 12. The chemical transformation and $\Delta\delta_H$ values [$\Delta\delta$ (in ppm)= δ_S–δ_R] obtained for (*S*)- and (*R*)-MTPA esters of compound 11 in pyridine-d_5.

Mililatensol A (**12**), a white powder, possessed the molecular formula $C_{20}H_{30}O$, which was deduced from the molecular ion peak at *m/z* 286.2293([M]$^+$, calcd. For $C_{20}H_{30}O$, 286.2291). The IR absorption at 3282cm^{-1} reveraled the existence of the hydroxyl group, which was in agreement with the presence of a secondary alcohol functionality [δ_H 4.37 (1H, dt, J = 2.8, 9.4 Hz, H-10), δ_C 68.4 (CH, C-10)] as indicated by the ^{1}H and ^{13}C NMR data (Table 5). Its ^{13}C NMR spectrum exhibited 20 carbon resonances assigned to four methyls, six methylenes, five methines (including three olefinic, δ_C 126.8, 127.6 and 128.1, and an oxygenated, δ_C 68.4), and five quaternary carbons (all olefinic, δ_C 122.6, 130.0, 131.3, 132.5, and 139.4) (Table 5), which were deduced from DEPT and HSQC experiments. In addition, its ^{1}H NMR spectrum displayed signals of four vinyl methyls at δ_H 1.64 (3H, s, H_3-18), 1.64 (3H, s, H_3-19), 1.67 (3H, s, H_3-16) and 1.69 (3H, s, H_3-17), and three olefinic protons at δ_H 4.95 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-7), 5.03 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-3) and 5.20 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-11), which were attributable to three trisubstituted double bonds (Table 5). Analysis of the ^{1}H–^{1}H COSY correlations (Figure 13) readily disclosed four spin-coupling segments from H_2-5 via H_2-6 to H-7, from H_2-9 via H-10 to H-11, from H_2-13 to H_2-14, and from H_2-20 via H-2 to H-3. On the basis of an HMBC experiment (Figure 13), these four fragments could be fully connected by inserting the "loose ends" of the quaternary carbon atoms of C-1, C-4, C-8, and C-12. The cyclododecane ring was constructed by the characteristic HMBC cross-peaks of H_3-18/C-3, C-4 and C-5, H_3-19/C-7, C-8 and C-9, H-11/C-12 and C-13. Moreover, the key HMBC correlations of H-2/C-1 and C-14, H2-13/C-12, and C-20 disclosed a typical cyclohexane ring. The joints of the two-carbon framework were C-2 and C-12, also indicated by the above-mentioned HMBC correlations. Furthermore, the HMBC correlations from H_3-16 to C-15 and from H_3-17 to C-1 and C-15 revealed a tetrasubstituted double bond $\Delta^{1(15)}$ at C-1 in the molecule. Thus, the planar structure of **12** was delineated as a new record of sarsolenane diterpenes. The NOESY (Figure 14) cross-peaks of H-3/H_3-18, H-7/H_3-19, and H-11/H-13a (δ_H 2.08) indicated that the double bonds Δ^3, Δ^7, and Δ^{11} in **12** took Z-geometry, respectively. The relative configurations of the two chiral carbons (C-2 and C-10) could be deduced from the NOESY cross-peaks of H-10 (δ_H 4.37)/H-20a (δ_H 2.30) and H-2 (δ_H 3.73)/H-20a. Hereto, the structure of **12** was temporally depicted as shown in Figure 1.

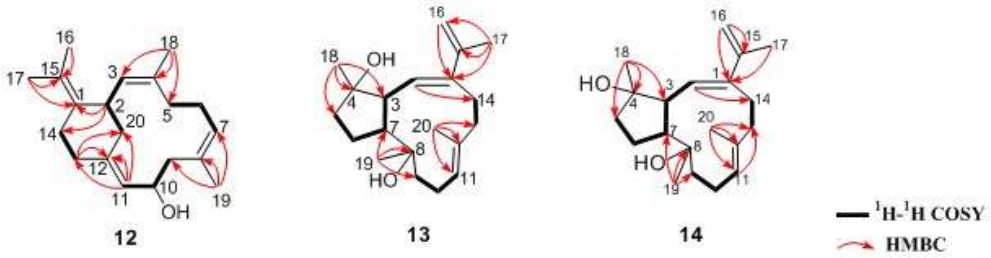


Figure 13. Selected key COSY and HMBC correlations for compounds 12–14.

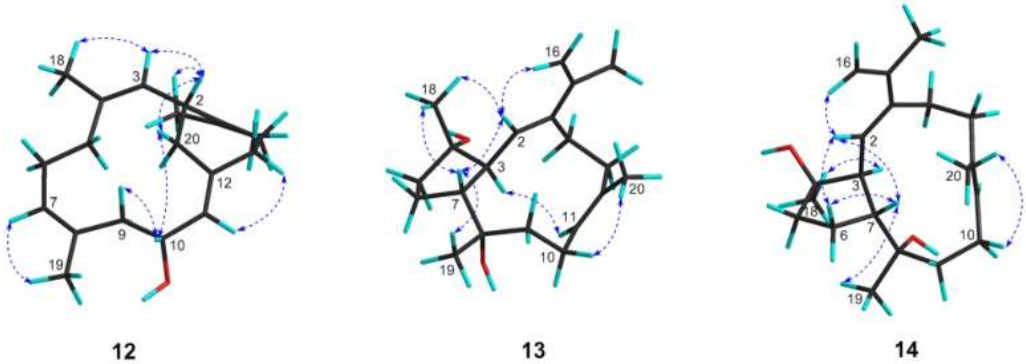


Figure 14. Selected key ROESY correlations for compounds 12–14.

Table 5. ^{1}H NMR and ^{13}C NMR data for compounds 12–14[a].

No.	12		13		14	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1		132.5, qC		142.8, qC		143.0, qC
2	3.73 td (3.4, 10.2)	37.5, CH	5.54 d (9.6)	130.0, CH	5.62 d (9.4)	129.2, CH
3	5.03 d (10.2)	128.1, CH	2.73 dd (9.6, 11.0)	51.2, CH	2.37 m	50.8, CH
4		130.0, qC		82.2, qC		83.0, qC
5	2.03 m	38.2, CH_2	1.76 m	39.6, CH_2	1.70 m; 1.80 m	39.5, CH_2
6	2.13 m	25.4, CH_2	1.37 m; 1.71 m	23.6, CH_2	1.30 m; 1.92 m	24.9, CH_2
7	4.95 t (7.4)	127.6, CH	2.05 m	57.2, CH	2.50 m	57.9, CH
8		131.3, qC		74.8, qC		74.5, qC
9	2.12 m; 2.41 d (12.4)	48.2, CH_2	1.61 m; 1.86 m	34.2, CH_2	1.59 m; 1.74 m	34.2, CH_2
10	4.37 dt (2.8, 9.4)	68.4, CH	2.05 m; 2.34 m	23.0, CH_2	2.01 m; 2.36 m	23.0, CH_2
11	5.20 d (9.4)	126.8, CH	5.29 dd (5.4, 10.0)	127.9, CH	5.24 dd (5.3, 10.1)	128.2, CH
12		139.4, qC		135.4, qC		135.0, qC
13	2.08 m; 2.28 m	36.8, CH_2	1.94 m; 2.25 m	35.9, CH_2	1.94 m; 2.24 m	35.6, CH_2
14	2.10 m; 2.63 m	26.7, CH_2	2.44 m; 2.81 dt (3.6,13.4)	27.4, CH_2	2.48 m; 2.52 m	28.0, CH_2
15		122.6, qC		141.3, qC		142.1, qC
16	1.67 s	20.6, CH_3	4.99 s; 5.09 s	112.8, CH_2	5. 00 s; 5.08 s	113.0, CH_2
17	1.69 s	20.2, CH_3	1.91 s	21.9, CH_3	1.91 s	22.0, CH_3
18	1.64 s	16.3, CH_3	1.12 s	24.2, CH_3	1.22 s	26.8, CH_3
19	1.64 s	18.0, CH_3	1.16 s	31.9, CH_3	1.19 s	32.3, CH_3
20	2.02 m; 2.30 m	36.2, CH_2	1.63 s	18.8, CH_3	1.66 s	18.8, CH_3

[a] Recorded at 600 and 125 MHz for ^{1}H and ^{13}C in $CDCl_3$, respectively. Assignments were deduced by analysis of 1D and 2D NMR spectra.

Mililatensol B (13) was obtained as colorless oil. Its molecular formula was ascertained as $C_{20}H_{32}O_2$ by the pseudo-molecular ion peak at *m/z* 327.2297 ($[M + Na]^+$, calcd. For $C_{20}H_{32}O_2Na$, 327.2295), requiring five degrees of unsaturation. The IR spectrum of compound 13 revealed characteristic absorption for hydroxyl at 3445cm^{-1}. Its ^{1}H and ^{13}C NMR data (Table 5) disclosed the presence of two trisubstituted double bonds (δ_H 5.54 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-2), δ_C 130.0 (C-2),142.8 (C-1) and δ_H 5.29 (1H, dd, J = 5.4, 10.0 Hz, H-11), δ_C 127.9 (C-11), 135.4 (C-12)), one terminal double bond (δ_H 4.99(1H, s, H-16a), 5.09 (1H,s,H-16b), δ_C 112.8 (C-16),141.3 (C-15)), two unprotonated oxygenated carbons (δ_C 74.8 (C-8), 82.2 (C-4)), two vinyl methyls (δ_H 1.63(3H, s, H_3-20), δ_C 18.8(C-20),and δ_H 1.91(3H, s, H_3-17), δ_C 21.9 (C-17)), and two methyls bonded to tertiary carbons (δ_H 1.12 (3H, s, H-18), δ_C 24.2 (C-18), and 1.16 (3H, d, H-19), δ_C 31.9 (C-19)). The above data were similar to those of pavidolide D (21) , previously isolated from the soft coral *Sinularia pavida*,[16] suggested a structural resemblance between them. In fact, a similar substructure of 5/9-fused bicyclo rings was present in both two compounds, which is a typical feature of capnosane skeleton. The major difference between compounds 13 and 21 centered on the C-1 isopropyl substituent, where the two doublet methyl resonances in 21 were replaced by a pair of singlets of an exo-methylene group (δ_H 4.99, 5.09; δ_C 112.8, 141.3) and an allylic singlet methyl (δ_H 1.91, δ_C 21.9) in 13 (Figure 13). Interpretation of the diagnostic HMBC correlations from H_3-17 to C-1, C-15, and C-16 (Figure 11) associated with the extra one degree of unsaturation in 13 were all consistent with an isopropenyl substituent at C-1. Therefore, compound 13 was condluded to be the 16,17-dehydro derivative of 21. The (*E*,*E*) geometry of the double bonds Δ^1 and Δ^{11} in 13 was confirmed upon the observation of the NOESY

cross-peaks of H-16b (δ_H 5.09)/H-2 (δ_H 5.54) and H-10a (δ_H 2.34)/H_3-20 (δ_H 1.63) (Figure 14). Furthermore, the NOE interactions of H-7 (δ_H 2.05)/H_3-18 (δ_H 1.12) and H-7/H_3-19 (δ_H 1.16), and the lack of H-7/H-3 (δ_H 2.73) revealed H-7, H_3-18, and H_3-19 were co-facial, while H-3 was the opposite. To establish the absolute configuration of 13, ECD spectra of both enantiomeric forms (3*S*,4*S*,7*R*,8*S* and 3*R*,4*R*,7*S*,8*R*) were calculated by employing time-dependent density functional theory (TDDFT), using NMR-demonstrated conformation as the initial structure input. The ECD calculations were conducted with the B3LYP/6-311G(d) basis set using the IEFPCM solvent continuum model with CH_3OH as the solvent. As shown in Figure 13, the experimental ECD spectrum of 13 in CH_3OH displayed one negative $\pi-\pi^*$ Cotton effect at 250 nm ($\Delta\varepsilon$ −1.11). Perfect agreement between the experimental ECD spectrum and the calculated one allowed the assignment of the absolute configuration as 3*S*,4*S*,7*R*,8*S*.

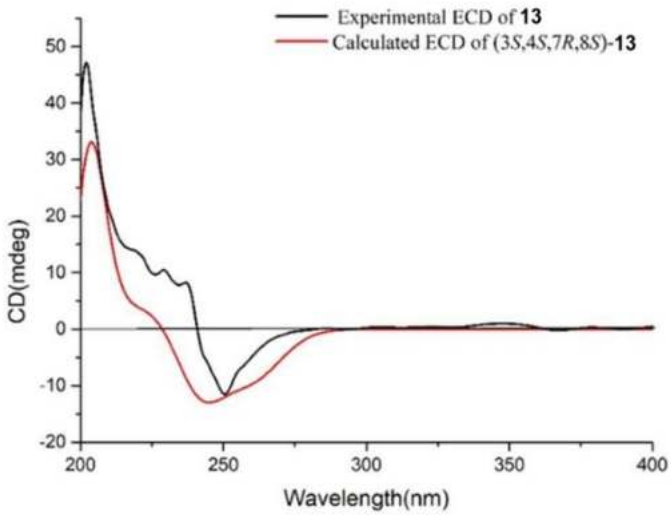


Figure 15. Experimental ECD spectrum (black) of 13 and calculated ECD spectrum (red) for 3*S*,4*S*,7*R*,8*S*-13.

The colorless oil **14** had the same molecular formula $C_{20}H_{32}O_2$ as **13**, which was disclosed by the pseudo-molecular ion peak in the HRESIMS experiment (*m/z* 327.2298 $[M + Na]^+$, calcd. for $C_{20}H_{32}O_2Na$, 327.2295). The ^1H and ^{13}C NMR (Table 1) as well as IR data of **14** closely resembled those of **13**, while 2D NMR (^1H–^1H COSY, HSQC, HMBC) analysis revealed both **14** and **13** having the same gross structure (Figure 13). The difference was due to the apparent upfield-shifted H-3 (δ_H 2.37) in **14** comparison with that (δ_H 2.73) of **13** accompanied by the downfield-shifted C-18 (δ_C 26.8), suggesting **14** to be a C-4 epimer of **13**.[16] The presence of NOESY correlation between H-3 and H_3-18 (δ_H 1.22) and the lack of NOE interaction between H-7 (δ_H 2.50) and H_3-18, as revealed in the ROESY spectrum (Figure 14) of **14**, further supported the structural assignment. Thus, the absolute configuration of **14** could be assigned as 3*S*,4*R*,7*R*,8*S*.

All the diterpenes 1−**14** were subjected to this bioassay using lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF-*α* protein release in RAW264.7 macrophages. As a result, they exhibited different levels of inhibition ratios ranging form 5.5% to 56.7% at a concentration of 20 μmol/L. Among them, only the new secondary metabolites **1** and **8** were judged as active compounds (inhibition ratios 52.4%, 56.7%, respectively). Further evaluation showed an IC_{50} value of 9.5 μmol/L for **1** and an IC_{50} value of 6.1 μmol/L for **8**. The results indicated **8** was a bit better than the positive control dexamethasone (IC_{50} = 8.7 μmol/L). Notably, diterpenes **1** and **8** displayed no obvious cytotoxic activity towards RAW264.7 cells (CC_{50} > 50 μmol/L). Although the elaborated mechanism is still under investigation, the current preliminary pharmacological results indicate that the natural macrocyclic compounds **1** and **8** could be developed as a new and

prospective chemotype of an anti-inflammatory lead compound or drug candidate.

4. Conclusions

In the present investigation on the diterpene profiles of the South China Sea soft coral *Sarcophyton mililatensis*, eleven new diterpenes possessing the cembrane carbon framework, sarcoxacyclols A–F (1–6) and sarcomililatols C−G (7−11), three diterpenes with unusual sarsolenane and capnosane skeletons, mililatensols A–C (12–14), together with six known analogs 15–20 were obtained and identified. Their structures including absolute configurations were established by the extensive spectroscopic analysis, X-ray diffraction analysis, time-dependent density functional theory/electronic circular dichroism (TDDFT ECD) calculations, chemical reaction, and modified Mosher's method. In the bioassays, the macrocyclic diterpenes 1 and 8 exhibited potent TNF-α inhibition (IC_{50} = 9.5, 6.1 μmol/L, respectively), which was similar to the positive control dexamethasone (IC_{50} = 8.7 μmol/L), and without no obvious cytotoxicity against RAW264.7 cells with CC_{50} values over 50 μmol/L, respectively. Although the elaborated mechanism is still under investigation, the current preliminary pharmacological results indicate that the natural macrocyclic compounds 1 and 8 could be developed as a new and prospective chemotype of an anti-inflammatory lead compound or drug candidate.

Acknowledgements

This research work was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (NSFC) (No. 41876194).

References

[1] Liang, L.-F.; Guo, Y.-W. Terpenes from the soft corals of the genus *Sarcophyton*: chemistry and biological activities. *Chem. Biodivers.* 2013, *10*, 2161-2196.

[2] Elkhawas, Y.A.; Elissawy, A.M.; Elnaggar, M.S.; Mostafa, N.M.; Al-Sayed, E.; Bishr, M.M.; Singab, A.N.B.; Salama, O.M. Chemical diversity in species belonging to soft coral genus *Sacrophyton* and its impact on biological activity: a review. *Mar. Drugs* 2020, *18*, 41.

[3] Liang, L.-F.; Kurtán, T.; Mándi, A.; Yao, L.-G.; Li, J.; Zhang, W.; Guo, Y.-W. Unprecedented diterpenoids as a PTP1B inhibitor from the Hainan soft coral *Sarcophyton trocheliophorum* Marenzeller. *Org. Lett.* 2013, *15*, 274-277.

[4] He, C.; Xuan, J.; Rao, P.; Xie, P.-P.; Hong, X.; Lin, X.; Ding, H. Total syntheses of (+)-sarcophytin, (+)-chatancin, (−)-3-oxochatancin, and (−)-pavidolide B: a divergent approach. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, *58*, 5100-5104.

[5] Takamura, H.; Kikuchi, T.; Iwamoto, K.; Nakao, E.; Harada, N.; Otsu, T.; Endo, N.; Fukuda, Y.; Ohno, O.; Suenaga, K.; et al. Unified total synthesis, stereostructural elucidation, and biological evaluation of sarcophytonolides. *J. Org. Chem.* 2018, *83*, 11028-11056.

[6] Yang, Q.-B.; Wu, Q.; Chen, J.-K.; Liang, L.-F. The soft coral *Sarcophyton trocheliophorum*: a warehouse of terpenoids with structural and pharmacological diversity. *Mar. Drugs* 2023, *21*, 30.

[7] Yang, M.; Li, X.-L.; Wang, J.-R.; Lei, X.; Tang, W.; Li, X.-W.; Sun, H.; Guo, Y.-W. Sarcomililate A, an unusual diterpenoid with tricyclo[11.3.0.$0^{2,16}$]hexadecane carbon skeleton, and its potential biogenetic precursors from the Hainan soft coral *Sarcophyton mililatensis*. *J. Org. Chem.* 2019, *84*, 2568-2576.

[8] Li, S.; Ye, F.; Zhu, Z.; Huang, H.; Mao, S.; Guo, Y. Cembrane-type diterpenoids from the South China Sea soft coral *Sarcophyton mililatensis*. *Acta Pharm. Sin. B* 2018, *8*, 944-955.

[9] Cuong, N.X.; Tuan, T.A.; Kiem, P.V.; Minh, C.V.; Choi, E.M.; Kim, Y.H. New cembranoid diterpenes from the Vietnamese soft coral *Sarcophyton mililatensis* stimulate osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Chem. Pharm. Bull.* 2008, *56*, 988-992.

[10] Minh, C.V.; Cuong, N.X.; Tuan, T.A.; Choi, E.M.; Kim, Y.H.; Van Kiem, P. A new 9,11-secosterol from the Vietnamese

sea soft coral, *Sarcophyton mililatensis*, increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Nat. Prod. Commun.* 2007, *2*, 1095-1100.

[11] Duh, C.-Y.; Hou, R.-S. Cytotoxic cembranoids from the soft corals *Sinularia gibberosa* and *Sarcophyton trocheliophorum*. *J. Nat. Prod.* 1996, *59*, 595-598.

[12] Bowden, B.F.; Coll, J.C.; Tapiolas, D.M. Studies of Australian soft corals. XXXIII. New cembranoid diterpenes from a *Lobophytum* species. *Aust. J. Chem.* 1983, *36*, 2289-2295.

[13] Liang, L.-F.; Chen, W.-T.; Li, X.-W.; Wang, H.-Y.; Guo, Y.-W. New bicyclic cembranoids from the South China Sea soft coral *Sarcophyton trocheliophorum*. *Sci. Rep.* 2017, *7*, 46584.

[14] Rao, C.B.; Satyanarayana, C.; Rao, D.S.; Rao, D.V.; Fahy, E.; Faulkner, D.J. Metabolites of the soft coral *Sinularia ovispiculata* from the Indian Ocean. *J. Nat. Prod.* 1993, *56*, 2003-2007.

[15] Bu, Q.; Yang, M.; Yan, X.-Y.; Yao, L.-G.; Guo, Y.-W.; Liang, L.-F. New flexible cembrane-type macrocyclic diterpenes as TNF-α inhibitors from the South China Sea soft coral *Sarcophyton mililatensis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022, *222*, 880-886.

[16] Shen, S.; Zhu, H.-J.; Chen, D.-W.; Liu, D.; van Ofwegen, L.; Proksch, P.; Lin, W.-H. Pavidolides A–E, new cembranoids from the soft coral *Sinularia pavida*. *Tetrahedron Lett.* 2012, *53*, 5759-5762.

复方重楼凝胶治疗虫咬皮炎的药效学研究

张梦迪，段玲霞，吴燕#

（空军特色医学中心 药剂科 100142）

【摘要】目的：针对抗震救灾部队官兵虫咬皮炎高发情况制备的新制剂复方重楼凝胶，对其进行虫咬皮炎药效学研究。**方法：**KM 小鼠，随机分成正常组、复方重楼凝胶组、布洛芬凝胶组，连续足底给药 7 天，热板法测定小鼠基础痛阈值及末次给药后 30、60、90 分钟的痛阈值。KM 小鼠，随机分成模型组、复方重楼凝胶组、丹皮酚软膏组，于右耳廓局部涂抹给药，连续 7 天，建立二甲苯致小鼠耳肿胀模型，计算肿胀度抑制率，检测血清中 TNF-α、IL-4 表达量。白化豚鼠，随机分成正常组、模型组（涂抹生理盐水）、复方重楼凝胶组、炉甘石溶液组，豚鼠足后背部脱毛并涂抹对应药物，连续 7 天，建立磷酸组胺致豚鼠皮肤瘙痒模型，记录 30 分钟内搔抓次数，检测血清中组胺浓度。白化豚鼠，建立皮炎模型后，随机分成正常组、模型组、复方重楼凝胶组、丹皮酚软膏组，耳朵造模部位涂抹对应药物，连续 7 天，记录耳部皮肤变化，检测耳组织匀浆中 INF-γ 浓度，HE 染色检测病理变化。**结果：**小鼠热板法镇痛实验中，复方重楼凝胶组小鼠痛阈值明显提高，并与布洛芬凝胶组相比无统计学差异。二甲苯致小鼠耳肿胀实验中，复方重楼凝胶组小鼠耳肿胀度与丹皮酚软膏组相比无统计学差异，与模型组相比具有显著抑制耳肿胀的作用，血清中炎症因子 TNF-α、IL-4 的表达量从大到小依次为模型组、丹皮酚软膏组、复方重楼凝胶组。豚鼠瘙痒模型实验中，复方重楼凝胶组豚鼠 30min 内搔抓次数明显少于模型组，具统计学差异，与炉甘石溶液组无显著差异，血清中组胺浓度小于模型组、接近于正常组表达量。豚鼠皮炎模型实验中，模型组豚鼠耳朵皮损较为严重，复方重楼凝胶组、丹皮酚乳膏组可以显著改善皮损状态；HE 染色结果显示，正常组表皮无增厚，模型组炎症细胞浸润、内皮细胞肿胀并增生、表皮角化过度、棘层肥厚，复方重楼凝胶组及丹皮酚软膏组皮肤无增厚，无炎症细胞浸润；复方重楼凝胶组、丹皮酚软膏组 INF-γ 浓度均低于模型组，且具有统计学差异。**结论：**复方重楼凝胶从镇痛、消肿、止痒、抗炎等方面解决虫咬皮炎造成的局部瘙痒、红肿、灼痛、皮损等问题，药效学考察为复方重楼凝胶的临床应用提供实验依据。

【关键词】复方重楼凝胶；虫咬皮炎；镇痛消肿；抗炎止痒

治疗青少年和成人重度斑秃新药：Ritlecitinib

张明名[1]，朱宝强[1,2]，杨诗语[1]，胡佳强[1]，龙恩武[1,2*]

（1.四川省医学科学院·四川省人民医院/电子科技大学附属医院药学部，个体化药物治疗四川省重点实验室，四川 成都 610072；2.西南医科大学药学院，四川 泸州 646000；）

【摘要】Ritlecitinib 是一款作用于 Janus 激酶 3 和肝细胞癌激酶家族的抑制剂，基于 2b-3 期临床研究结果，FDA 于 2023 年 6 月 23 日批准了 Ritlecitinib 用于治疗 12 岁及以上患者的重度斑秃。多项临床研究观察到患者使用 Ritlecitinib 后毛发再生，使用期间总体安全且耐受性良好。本文综述了该药的药理作用、药动学和临床研究结果，以期为该药在临床上安全、合理使用提供参考。

【关键词】Janus 激酶抑制剂；青少年；重度斑秃；Ritlecitinib

A new drug in treatment of severe alopecia areata in adolescents and adults: Ritlecitinib

ZHANG Ming-ming[1], ZHU Bao-qiang[1,2], YANG Shi-yu[1], HU Jia-qiang[1], LONG En-wu[1,2*]

(1.Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Pharmacy of Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan, 610072, China；2.School of Pharmacy of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

【ABSTRACT】Ritlecitinib, an inhibitor acting on the Janus kinase 3 and hepatocellular carcinoma kinase families, was approved by the FDA on June 23, 2023 for the treatment of severe alopecia areata in patients 12 years of age and older, based on the results of the Phase 2b-3 clinical study. Multiple clinical studies have observed hair regrowth in patients after using Ritlecitinib, which is generally safe and well tolerated during use. This article reviews the pharmacological effects, pharmacokinetics and clinical research results of the drug in order to provide reference for the safe and rational use of the drug in clinical practice.

【KEY WORDS】Janus kinase inhibitor; adolescent; severe alopecia areata; Ritlecitinib

斑秃（alopecia areata）是一种 T 细胞介导的自身免疫性疾病，其特征在于头皮或其他毛发覆盖表面上的非瘢痕性脱发，临床表现从小的脱发斑块到头皮或整个身体的弥漫性受累不等[1]。斑秃的终生患病率约为 2%，累及不同年龄、性别、种族或民族的人群，约 5%的斑秃患者可发展为完全脱发或泛发性脱发[2]。不仅如此，斑秃还严重影响患者的生活质量，并且与抑郁和焦虑的高发病率有关，给患者的心理和生活带来巨大压力[3]。斑秃的传统治疗方法因疗效有限或存在着潜在副作用，阻碍了临床的应用和推广，因此亟待更加有效的治疗药物投入治疗[4]。Ritlecitinib 为辉瑞公司研发的一款作用于 Janus 激酶（Janus kinase，JAK）3 和肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，TEC）激酶家族的抑制剂，是一种白色至灰白色至淡粉色固体，易溶于水，分子式为 $C_{22}H_{27}N_5O_4S$，分子量为 457.55g·mol^{-1}[5]，化学结构式见图 1。该药是美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准的第一个也是目前唯一一个可用于严重斑秃的青少年（12+）人群的药物。本文对 Ritlecitinib 的药理

[基金项目] 四川省科技计划项目（2021YFS0197）

[第一作者] 张明名，硕士在读，研究方向：临床药学，E-mail：1363109537@qq.com

[责任作者] 龙恩武，主任药师，博士，研究方向：慢病个体化治疗、真实世界研究、医疗大数据挖掘，E-mail：dragon984169@126.com

作用和临床研究进行总结和归纳，以期为青少年和成人重度斑秃的药物治疗研究及临床应用提供借鉴和参考。

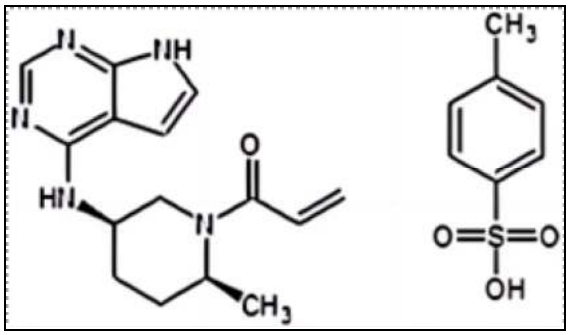


图 1 Ritlecitinib 结构式

Fig 1 Structural formula of Ritlecitinib

药理作用

斑秃的发病与毛囊的免疫豁免（immune privilege，IP）瓦解密切相关，使得毛囊更容易受到自然杀伤细胞和 $CD8^+$T 细胞的攻击。多种细胞因子在斑秃的发病中发挥了重要作用，包括干扰素-γ 和白细胞介素(interleukin，IL)-15，它们通过 JAK1、JAK2 和 JAK3 传递信号，参与斑秃的发生和发展。基于上述发现，抑制 JAK 通路成为了治疗斑秃的重要靶点[6]。$CD8^+$ T 细胞的免疫攻击需要 T 细胞受体（T cell receptor，TCR）识别自身抗原。主要组织相容性复合物所呈递的抗原与 TCR 的结合触发了影响了 T 细胞的分化和功能下游信号级联[7]。该途径的失调已被证明参与各种自身免疫疾病的发展[8]。在 TEC 激酶家族中表达的酪氨酸激酶主要在造血细胞中表达，包括 5 个成员，其中 3 个在 TCR 信号级联中发挥核心作用：IL-2 诱导型 T 细胞激酶、TEC 和静息淋巴细胞激酶。而 IL-2 诱导型 T 细胞激酶是 T 细胞中表达的主要 TEC 激酶，参与了斑秃患者头皮中激活的 T 细胞中识别的特定 TCR 信号，使 TEC 激酶成为斑秃药物开发的潜在靶点[9]。

目前已有的 JAK 抑制剂 deuruxolitinib、baricitinib 和 ruxolitinib（JAK1 和 JAK2），tofacitinib（JAK1 和 JAK3）的临床研究观察到的毛发再生已经证实了 JAK 靶点治疗斑秃的重要性[10,11]。Ritlecitinib 是作用于 JAK 3 和 TEC 激酶家族的一种口服、共价小分子选择性双重抑制剂。体外研究表明，Ritlecitinib 与 JAK 3 共价结合，对 JAK 3 的效力是对 JAK 1、JAK 2 和酪氨酸激酶 2 的 10000 倍以上。除此之外，Ritlecitinib 还能抑制 TEC 家族的 5 个成员，双靶点治疗发挥斑秃的治疗作用[12,13]。

药动学

Ritlecitinib 的药动学特征包括口服给药后 1 小时内达到血浆药物浓度峰值，且消除迅速，$t_{1/2}$ 为 1.3-2.3h，绝对口服生物利用度约为 64%。AUC0-tau 和 Cmax 与剂量成比例增加（日总剂量处于 200 mg 范围内）。血浆蛋白结合率约为 14%。每日一次（qd）给药方案通常在第 4 天达到稳态，每日两次（bid）给药方案通常在第 6 天达到稳态。Ritlecitinib 通过多种途径进行代谢，主要清除机制是谷胱甘肽相关的结合和细胞色素 P450（cytochrome P450 proteins，CYP）介导的氧化，涉及的主要亚型为 CYP3A4。放射性标记的 Ritlecitinib 约 66%在尿液中排出，20%在粪便中排出，约 4%以原型通过尿液排出。食物对 Ritlecitinib 的全身暴露没有临床上的显著影响。成人全身暴露与青少年无显著差异[5,14]。

临床研究

1 期临床试验

在人体临床研究中，Ritlecitinib 单次口服剂量高达 800 mg 和多次口服剂量高达 400mg（400mg qd 和 200mg bid）在健康受试者中是安全且耐受性良好。观察到生命体征、心电图和实验室数据稳定，未报告剂量限制性不良事件（adverse events，AE）。此外，无受试者符合方案规定的个体终止原则，研究中无死亡事件发生。在首次人体试验中报告了 3 起严重 AE，包括臀部脓肿（200mg qd）、藏毛窦脓肿（400 mg qd）和水痘感染（400 mg qd）。根据这些结果，临床试验中的拟定日剂量为 50 mg，安全性耐受的上限为口服 200mg qd[14]。

2 期临床试验

在一项评价口服 Janus 激酶抑制剂 Ritlecitinib 和 Brepocitinib 治疗斑秃的疗效和安全性的 IIa 期、随机、双盲、多中心、安慰剂对照研究（NCT02974868）[15]中，142 名 18 岁以上的斑秃患者固定性脱发的中位持续时间为 2.4 年，44%患有全秃[脱发严重程度工具（Severity of Alopecia Tool，SALT）评分为 100，即头皮上无毛发]或普秃（SALT 评分为 100 且无眉毛和睫毛），被随机分配至 Ritlecitinib 组（200 mg qd，治疗 4 周，后经 50 mg qd 治疗 20 周）、Brepocitinib 组（60 mg qd 治疗 4 周，后经 30 mg qd 治疗 20 周）及匹配的安慰剂组，进行为期 24 周的治疗。主要疗效终点为 24 周时评分较基线的变化。关键次要疗效终点是 SALT 评分（SALT 30）改善 30%的患者比例。结果显示，第 24 周时，Ritlecitinib 组 SALT 评分较基线变化与安慰剂组的最小二乘平均差异为 31.1（95%CI，18.8-43.5），Brepocitinib 组为 49.2（95% CI，36.6-61.7），与安慰剂组的两项比较均为 P <0.0001。50%（90% CI，38%-62%）接受 Ritlecitinib 的患者、64%（90% CI，51%-75%）接受 Brepocitinib 的患者和 2%（90% CI，0%-9%）接受安慰剂的患者达到 SALT 30。最常见 AE 为上呼吸道感染、鼻咽炎、头痛、痤疮和恶心。安慰剂组、Ritlecitinib 组和 Brepocitinib 组分别有 3 例（6%）、2 例（4%）和 4 例（9%）患者发生导致停药的 AE。仅 Brepocitinib 组 2 例患者发生严重 AE（横纹肌溶解）。总体而言，24 周 Ritlecitinib 治疗斑秃是有效的，患者耐受性良好。

ALLEGRO 是一项随机、双盲、多中心、2b-3 期试验（NCT03732807）[16]，评估了 Ritlecitinib 用于 12 岁以上斑秃患者的有效性和安全性。该研究筛选了 718 名年龄在 12 岁及以上的至少 50%头皮脱发的斑秃患者。研究分为 2 个阶段：第一阶段是安慰剂对照期，患者每日一次服药，按照 2：2：2：2：1：1：1 的比例随机接受 Ritlecitinib 200mg 负荷剂量 4 周，50mg 维持剂量 20 周（下文为 200mg+50mg，n=132），Ritlecitinib 200mg 负荷剂量 4 周，30mg 维持剂量 20 周（下文为 200mg+30mg，n=130），Ritlecitinib 50mg 24 周（下文为 50mg，n= 130），Ritlecitinib 30mg 24 周（下文为 30mg，n=132），Ritlecitinib 10mg 24 周（下文为 10mg，n=63），安慰剂 24 周；第二阶段是扩展期，为期 24 周，分配给安慰剂的患者被转换为 Ritlecitinib 50 mg，一组加用 200 mg 负荷剂量，4 周（下文为安慰剂至 200 mg + 50 mg，n=65），一组不加（下文为安慰剂至 50mg，n=66），Ritlecitinib 组的患者继续其维持剂量。在筛选、基线和第 4、8、12、18、24、28、34、40 和 48 周（或治疗结束）访视时进行临床评估，包括 SALT 评分、眉毛和睫毛脱发以及患者自我管理的患者总体印象变化。主要终点为第 24 周时 SALT 评分≤ 20。结果显示，在第 24 周，200mg+50mg 剂量组 SALT≤ 20 的应答率为 31%，50mg 剂量组的应答率为 23%，而安慰剂组仅为 2%，并且缓解率持续增加直至第 48 周（研究结束），与其他安慰剂对照试验一致[15,17]。研究期间最常见的 AE 是头痛、腹泻、痤疮、皮疹、荨麻疹、毛囊炎、发热、特应性皮炎、头晕、血肌酐磷酸激酶升高、带状疱疹、红细胞计数减少和口腔炎。截至第 48 周（包括随访期），Ritlecitinib200 mg + 50mg 组 131 例患者中有 108 例（82%）报道了 AEs, 200 mg + 30mg 组 129 例患者中有 105 例（81%），50 mg 组 130 例患者中有 110 例（85%），30mg 组 132 例患者中有 106 例（80%），10 mg 组 62 例患者中有 47 例（76%）报道了 AE。Ritlecitinib 组和安慰剂组的 AE 发生率相似，无死亡病例。ALLEGRO 试验证实了在青少年和成人斑秃患者中，使用 Ritlecitinib 50 或 30mg 剂量在 48 周内有效、总体安全且耐受性良好。

小结

基于目前已有的临床研究数据，Ritlecitinib 显示出良好的治疗斑秃效果，也因此成为第一个也是目前唯一一个用于治疗患有严重斑秃的青少年（12+）的药物，该药每日口服一次，使用方便，疗效确切，总体安全且耐受性好，未来将会给 12 岁以上的重度斑秃患者带来希望。Ritlecitinib 除了治疗斑秃外，治疗白癜风[18]、类风湿性关节炎[19]和中重度溃疡性结肠炎[20]的 2 期临床研究也已经完成。随着 Ritlecitinib 研究的新发现，相信未来 Ritlecitinib 会成为一种非常有前途的药物。

参考文献

[1] ZHOU C, LI X, WANG C, et al. Alopecia Areata: an Update on Etiopathogenesis, Diagnosis, and Management[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2021, 61(3):403-423.

[2] 陈东宇, 杨晓雨, 樊文龙, 等. 1990-2019 年全球斑秃疾病负担的流行病学分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2022,

36(07):763-768.
[3] OKHOVAT J P, MARKS D H, MANATIS-LORNELL A, et al. Association between alopecia areata, anxiety, and depression: A systematic review and meta-analysis[J]. J Am Acad Dermatol, 2023, 88(5):1040-1050.
[4] POURANG A, MESINKOVSKA N A. New and Emerging Therapies for Alopecia Areata[J]. Drugs, 2020, 80(7):635-646.
[5] PFIZER. FDA Approves Pfizer's LITFULO™ (Ritlecitinib) for Adults and Adolescents With Severe Alopecia Areata [EB/OL]. (2023-06-23)[2023-06-25]. https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/fda-approves-pfizers-litfulotm-ritlecitinib-adults-and.
[6] LENSING M, JABBARI A. An overview of JAK/STAT pathways and JAK inhibition in alopecia areata[J]. Front Immunol, 2022, 13:955035.
[7] SCHWARTZBERG P L, FINKELSTEIN L D, READINGER J A. TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4):284-95.
[8] GRAVANO D M, HOYER K K. Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells[J]. J Autoimmun, 2013, 45:68-79.
[9] SMITH S E, NEIER S C, REED B K, et al. Multiplex matrix network analysis of protein complexes in the human TCR signalosome[J]. Sci Signal, 2016, 9(439):rs7.
[10] GUPTA A K, WANG T, POLLA RAVI S, et al. Systematic review of newer agents for the management of alopecia areata in adults: Janus kinase inhibitors, biologics and phosphodiesterase-4 inhibitors[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2023, 37(4):666-679.
[11] YAN D, FAN H, CHEN M, et al. The efficacy and safety of JAK inhibitors for alopecia areata: A systematic review and meta-analysis of prospective studies[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:950450.
[12] TELLIEZ J B, DOWTY M E, WANG L, et al. Discovery of a JAK3-Selective Inhibitor: Functional Differentiation of JAK3-Selective Inhibition over pan-JAK or JAK1-Selective Inhibition[J]. ACS Chem Biol, 2016, 11(12):3442-3451.
[13] XU H, JESSON M I, SENEVIRATNE U I, et al. PF-06651600, a Dual JAK3/TEC Family Kinase Inhibitor[J]. ACS Chem Biol, 2019, 14(6):1235-1242.
[14] CLINICALTRIALS. Study To Evaluate The Efficacy And Safety Profile Of PF-06651600 And PF-06700841 In Subjects With Alopecia Areata [EB/OL]. (2020-05-26)[2023-06-25]. https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT02974868?intr=PF-06651600&cond=alopecia%20areata&rank=1.
[15] KING B, GUTTMAN-YASSKY E, PEEVA E, et al. A phase 2a randomized, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of the oral Janus kinase inhibitors ritlecitinib and brepocitinib in alopecia areata: 24-week results[J]. J Am Acad Dermatol, 2021, 85(2):379-387.
[16] KING B, ZHANG X, HARCHA W G, et al. Efficacy and safety of ritlecitinib in adults and adolescents with alopecia areata: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2b-3 trial[J]. Lancet, 2023, 401(10387):1518-1529.
[17] KING B, KO J, FORMAN S, et al. Efficacy and safety of the oral Janus kinase inhibitor baricitinib in the treatment of adults with alopecia areata: Phase 2 results from a randomized controlled study[J]. J Am Acad Dermatol, 2021, 85(4):847-853.
[18] EZZEDINE K, PEEVA E, YAMAGUCHI Y, et al. Efficacy and safety of oral ritlecitinib for the treatment of active nonsegmental vitiligo: A randomized phase 2b clinical trial[J]. J Am Acad Dermatol, 2023, 88(2):395-403.
[19] ROBINSON M F, DAMJANOV N, STAMENKOVIC B, et al. Efficacy and Safety of PF-06651600 (Ritlecitinib), a Novel JAK3/TEC Inhibitor, in Patients With Moderate-to-Severe Rheumatoid Arthritis and an Inadequate Response to Methotrexate[J]. Arthritis Rheumatol, 2020, 72(10):1621-1631.
[20] SANDBORN W J, DANESE S, LESZCZYSZYN J, et al. Oral Ritlecitinib and Brepocitinib for Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis: Results From a Randomized, Phase 2b Study[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2023.

头孢他定阿维巴坦临床应用评价标准建立和应用

张乃菊[1]

（蚌埠医学院第一附属医院药剂科 1　安徽 蚌埠 233004）

【摘要】目的：建立注射用头孢他啶阿维巴坦（CZA）药物利用评价（DUE）标准，同时进行回顾性应用分析，评价我院 CZA 临床使用合理性，为头孢他啶阿维巴坦的临床合理应用提供参考依据。**方法：**以注射用头孢他啶阿维巴坦药品说明书为基础，参照相关指南和专家共识，按照 DUE 路径建立头孢他啶阿维巴坦 DUE 标准；并以此为依据，采用回顾性研究方法，对我院 2020 年 5 月至 2023 年 2 月 43 例 CZA 住院患者的用药指征、用药过程、用药结果和管理指标进行合理性评价。**结果：**43 例病历中给药途径、溶媒、配伍禁忌和禁忌症完全符合评价标准。但用药指征符合率 41.9（18/43）；用法用量符合率 58.1%（25/43）；输注时间符合率 25.6%（11/43）；联合用药符合率 53.5%（23/43）；相互作用符合率 37.2%（16/43）；用药疗程符合率 41.9%（18/43）；CZA 使用前病原微生物送检率为 95.3%（41/43），病程记录符合率为 95.3%（41/43）；处方医师权限符合率 81.4%（35/43）；CZA 用药有效率为 61.9%（26/42）；43 例患者均未发现明显不良反应。**结论：**建立的《头孢他啶阿维巴坦 DUE 评价标准》能够评价头孢他啶阿维巴坦临床用药的全过程，本研究注射用头孢他啶阿维巴坦在给药途径、溶媒、配伍禁忌和禁忌症符合率达到 100%，但用药指证、用法用量、输注时间、联合用药、相互作用、用药疗程、病原微生物送检率、病程记录符合率和处方医师权限等方面需要改善。CZA 用药有效率为 61.9%（26/42），均未发现明显不良反应。

【关键词】头孢他啶阿维巴坦；药物利用评价；标准;合理用药

Evaluation of Application Rationality of Ceftazidime avibactam Based on Drug Utilization Evaluation Criteria

Naiju Zhang

[1]Department of Pharmacy, Anhui Engineering Technology Research Center of Biochemical Pharmaceutical, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China.

头孢他啶/阿维巴坦（Ceftazidime and Avibactam, CZA）是由第三代头孢菌素头孢他啶与 β-内酰胺酶抑制剂阿维巴坦钠组成的复合制剂，2015 年在美国上市，被批准用于成人（＞18 岁）治疗 cIAI（与甲硝唑联合使用）、cUTI（包括肾盂肾炎）或由指定的易感革兰氏阴性微生物引起的 HAP/VAP[1]。自 2019 年 5 月 21 日获得国家药品监督管理局 （National Medical Products Administration, NMPA）批准在中国境内上市，因对泛耐药甚至全耐药的肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌和奇异变形菌引起的感染有效，受到临床医师的青睐。随着用量的增加，不合理用药问题逐渐显现。目前并没有针对头孢他啶/阿维巴坦的实用的用药标准、规范的用药模式以及完善的用药监控评价体系。因此，本研究拟结合患者及临床实际等具体情况，同时借鉴世界卫生组织和欧美发达国家推荐的药物利用评价（ drug use evaluation，DUE） 体系和操作指南，探索建立头孢他啶阿维巴坦的 DUE 标准，并基于此标准回顾性评价我院所有使用头孢他啶阿维巴坦实际临床应用中的合理性，以期为重症感染患者临床合理应用头孢他啶阿维巴坦建立核心评价指标体系，为临床提高疗效、降低不良反应和

作者简介：张乃菊，女，硕士，副主任药师，Tel: (0552)3086240，E-mail:ziyuanznj@163.com

耐药率提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究对象为蚌埠医学院第一附属医院 2020 年 5 月 1 日－2023 年 2 月 28 日收治的使用注射用头孢他啶阿维巴坦（商品名：思福妥，2.5g /瓶，Pfizer Ireland Pharmaceuticals）进行治疗的重症感染患者。

1.2 建立标准

依据美国医院药剂师学会（american society of hospital pharmacists, ASHP）对 DUE 标准的相关规定[2]，参考 CZA 药品说明书[3]、《热病：桑福德抗微生物治疗指南》（第 50 版）[4]、《抗菌药物临床应用指导原则（2015 版）》[5] 、《β-内酰胺类抗生素/β-内酰胺酶抑制剂复方制剂临床应用专家共识》（2020 年版）[6]、《实用抗感染治疗学（第三版）》[7]等相关文献，结合医院的实际情况，组织院内、外专家（其中临床医学资深抗感染高级职称医师 6 名、临床药学高级职称药师 4 名及微生物检验高级职称技师 3 名） 对拟定的 DUE 标准，结合临床实际工作，从科学性、实用性及可行性方面进行修改和完善，形成最终标准，包括用药指征、用药过程、用药结果、管理指标四个部分以及各项目标值组成。结果见表 1。

表 1 注射用头孢他啶阿维巴坦 DUE 标准

评价项目		评价依据	评价结果
用药指征	细菌培养和药敏试验	已做细菌培养和药敏试验	0：符合；1：其他
	适应症	复杂性腹腔内感染（cIAI,联合甲硝唑）、复杂性尿路感染（含肾盂肾炎）、医院获得性肺炎和呼吸机相关性肺炎（HAP/VAP）。②治疗方案选择有限的成人患者中需氧型革兰阴性菌引起的严重感染。③CRO 感染的经验和目标治疗。	0：符合治疗用药选用该药物的原则，符合经验用药选用该药物的原则。1：选用与药敏试验结果不符；经验性选用药物不属于指南或循证证据强力支持的。2：相关治疗指南未推荐使用该药物的，如不首选国家基本药物，可以评价为不适宜。
	禁忌症	对本品或制剂中辅料过敏者 对头孢菌素类抗菌药物过敏者 对其他类型 β-内酰胺类抗菌药物（如青霉素、单酰胺菌素或碳青霉烯类）的严重超敏者（如速发过敏反应、严重的皮肤反应）	0：患者没有相关禁忌症；1：患者有禁忌症
管理指标	处方权限	特殊使用级抗菌药物临床应用会诊专家库人员	0：符合；1：其他
	会诊	抗感染小组指定的专业技术人员会诊	0：符合；1：其他
	病程记录	记录用药方案依据	0：符合；1：其他
	联用指征	单用 CZA 不能有效控制的混合感染、耐药菌感染、重症感染	0：符合；1：其他
	给药途径	静脉滴注	0：符合给药途径；1：其他
用药过程	给药剂量	①Ccr 51～90mL/min：2.5g q8h；②Ccr 为 30～50mL/min：1.25g q8h；③Ccr 10～30mL/min：0.94g q12h；④Ccr ＜10mL/min：0.94g q48h；⑤血液透析患者应该在血液透析后给药 0.94g q48h；⑥CRRT 给药剂量为 1.25g q8h[3]。	0：符合成人治疗用药给药剂量及时间间隔；1：其他
	溶媒选择	10mL 无菌注射用水复溶，复溶后的浓缩液应立刻全部转移至输液袋稀释使用。输液袋可为：注射用氯	0:溶媒符合；1：不符合

		化钠溶液（9 mg/mL，0.9% ）、注射用葡萄糖溶液（50 mg/mL，5% ）、注射用葡萄糖氯化钠溶液（葡萄糖 25 mg/mL，2.5% 和氯化钠 4.5 mg/mL，0.45% ）或乳酸林格氏液。输液体积为 100 mL。	
	滴注时间	任何剂量的头孢他啶阿维巴坦的输注时间均需 2h	0：符合；1：其他
	用药疗程	复杂性腹腔内感染疗程 5～14 天，医院获得性肺炎和呼吸机相关性肺炎 7～14 天，治疗方案选择有限的成人患者中需氧型革兰阴性菌引起的感染，疗程取决于感染的严重程度、病原菌、患者的临床情况和细菌学进展。	0：符合；1：其他
	配伍禁忌	除溶媒外，不与其他药物混合使用	0：符合；1：其他
	相互作用	不建议同丙磺舒合用、联用高剂量的头孢菌素类药物和肾毒性药物，如氨基糖苷类或强效利尿剂（如呋塞米），可能会对肾功能产生不良影响。避免联合氯霉素。	0：符合；1：其他
用药结果	临床疗效	细菌培养结果阴性或患者病程记录显示症状改善或治愈	0：符合；1：其他
	不良反应	①无不良反应发生 ②发生不良反应停药并作相应处理	0：开展 ADR 监测，有效避免不良反应带来损害；1：未开展 ADR 监测，未避免严重不良反应。

注：除非特别说明，均以 0 表示合理用药，1 表示不合理用药。使用 Cockcroft-Gault 公式[8]估算 Ccr。

1.3 监测方法与评价指标

采用回顾性分析的研究方法，借助医院住院患者信息管理系统对使用注射用头孢他啶阿维巴坦的住院患者进行回顾性评价。采集患者基本用药信息，包括住院号、姓名、性别、年龄、体重、科室、住院天数、主要基础疾病、CZA 使用前（后）抗菌药物使用情况、用药期间有无 ECMO 和或 CRRT，药物过敏史、用药前血肌酐、用药前肌酐清除率、用药中的血肌酐、用药中的肌酐清除率、感染诊断及依据[体温、白细胞、中性粒细胞比率、C 反应蛋白（CRP）、降钙素原（PCT）、影像学]等。 肌酐清除率（creatinine clearance，Ccr ml/min）通过 Cockcroft-Gault 计算法[8]，以入院当天的体重作为实际的体重。血肌酐（serum creatinine，Scr）值采用用药前 Scr 计算。男：Ccr=（140-年龄）*体重/（0.818*Scr）；女：Ccr=0.85*（140-年龄）*体重/（0.818*Scr）。使用 SPSS 24.0 软件处理数据，定量资料首先进行正态性检验，若满足正态分布采用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，不满足正态分布，采用中位数表示；计数资料采用百分率（%）表示。

1.4 治疗疗效及不良反应评价标准

1.4.1 疗效评定　根据《抗菌药物临床应用指导原则（2015 版）》[5]，治疗用药的临床疗效判定标准：症状、体征均已消失或完全恢复正常，且影像学和实验室等非微生物学指标均已恢复正常为治愈；临床症状、体征好转，和或细菌学清除或未清除为好转；症状、体征无改变或恶化，换用其他抗感染治疗方案为无效。总有效率（%）＝（临床治愈＋好转）/ 总例数×100% 。

1.4.2 不良反应 依据医院住院信息管理系统记录信息及不良发应发生时间评判不良反应。

2 结果

2.1 患者一般情况

共收集患者 43 例，其中男性 29（67.4%，29/43）例，女性 14（32.6%，14/43）例，男女比例 2.07：1；年龄范围为 17～90 岁，平均年龄（63.9±13.9）岁，平均体重（53.95±28.54）kg，平均用药天数为（9.4±4.9）d 。患者分布在 6 个科室，具体见图 1。所有患者均无药物过敏史。其中 13 例用药期间行连续性肾脏替代治疗

（continuous renal replacement therapy, CRRT），2 例用药期间使用静脉体外膜肺氧合（extracorporeal membrane oxygenation, ECMO）。

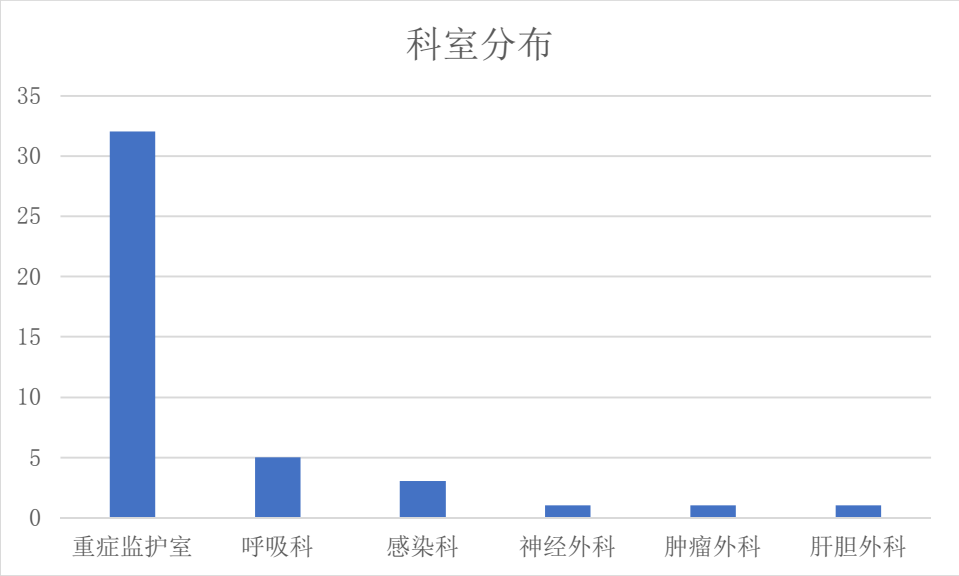


图 1 使用 CZA 的临床科室分布

2.2 基础疾病类型见表 2

表 2 基础疾病类型

基础疾病	病例数	百分比
风湿性和自身免疫性疾病	1	2.3%（1/43）
血液系统疾病	19	44.2%（19/43）
神经系统疾病	14	32. 6%（14/43）
心血管系统疾病	24	55.8%（24/43）
消化系统疾病	7	16.3%（7/43）
泌尿系统疾病	1	2.3%（1/43）
恶性肿瘤	6	14.1%（6/43）
呼吸系统疾病	22	51.2%（22/43）
肝功能障碍	19	44.2%（19/43）
肾功能障碍	18	41.9%（18/43）
糖尿病	12	27.9%（12/43）

2.3 细菌培养结果

多部位混合感染占 34.9%（15/43），所以标本数高于病例数。病原学来源（图 2），细菌培养结果（图 3）。

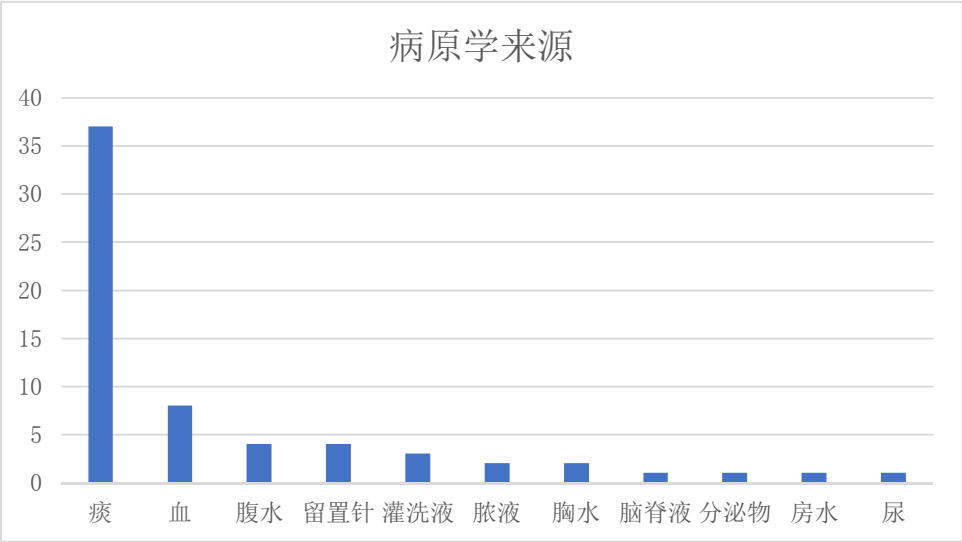


图 2 病原学来源

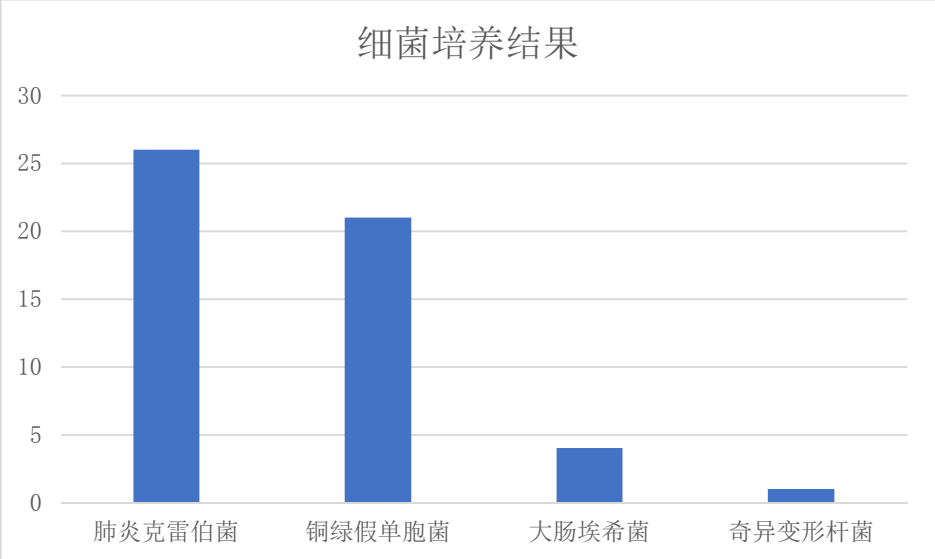


图 3 细菌培养结果

2.4 注射用 CZA DUE 评价结果见表 3。

表 3 注射用 CZA 评价结果

Tab.2 DUE evaluation result of IV administration of CZA

评价项目	指标名称	符合标准例数	符合标准比例/%
用药指征	适应症	18	41.9（18/43）
	禁忌症	43	100（43/43）
	病原微生物送检	41	95.3（41/43）
用药过程	感染指标	43	100（43/43）
	给药途径	43	100（43/43）
	溶媒选择	43	100（43/43）
	配伍禁忌	43	100（43/43）

	联合用药	23	53.5（23/43）
	给药剂量	25	58.1（25/43）
	用药疗程	18	41.9（18/43）
	相互作用	16	37.2（16/43）
	滴注时间	11	25.6（11/43）
用药管理	处方权限	35	81.4（35/43）
	病程记录	41	95.3（41/43）
	会诊	2	4.7（2/43）
用药结果	疗效评估	27	62.8（27/43）
	不良反应	43	100（43/43）

2.4.1 CZA 同期联合的抗菌药物见图 4，其中不适宜表现为联合头孢他啶 2g q8h 1 例；联合头孢哌酮舒巴坦 3g q8h 2 例；联合哌拉西林舒巴坦 1 例；腹腔感染单用头孢他啶阿维巴坦，未联合甲硝唑，说明书指出：复杂性腹腔感染需要联合甲硝唑治疗；联合亚胺培南西司他汀 1 例，患者全身多处检出 CRPA，亚胺培南西司他汀 MIC≥16，但头孢他啶，环丙沙星，左氧氟沙星敏感，应该单用头孢他啶 2g q8h 或头孢他啶联合环丙沙星/左氧氟沙星；联合磷霉素 1 例，患者痰培养示产 ESBL 肺炎克雷伯菌，亚胺培南西司他汀，哌拉西林他唑巴坦，头孢他啶，阿米卡星，头孢吡肟，妥布霉素均敏感，应该单用哌拉西林他唑巴坦、头孢哌酮舒巴坦或碳青霉烯类即可；痰和胸水均检出 CRKP，联用替加环素及奥硝唑 1 例，替加环素和奥硝唑均有抗厌氧菌作用，只需联合替加环素即可。

2.4.2 抗菌药物联用可能会发生相互作用对肾功能产生不良影响的药物见图 5。

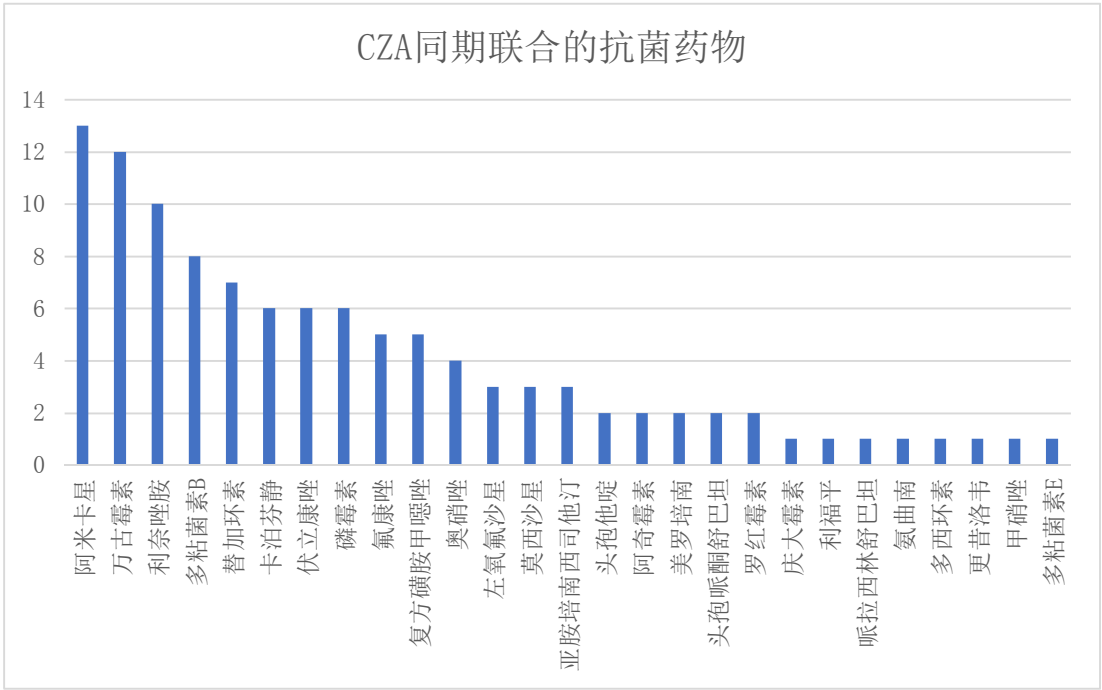


图 4 CZA 同期联合的抗菌药物

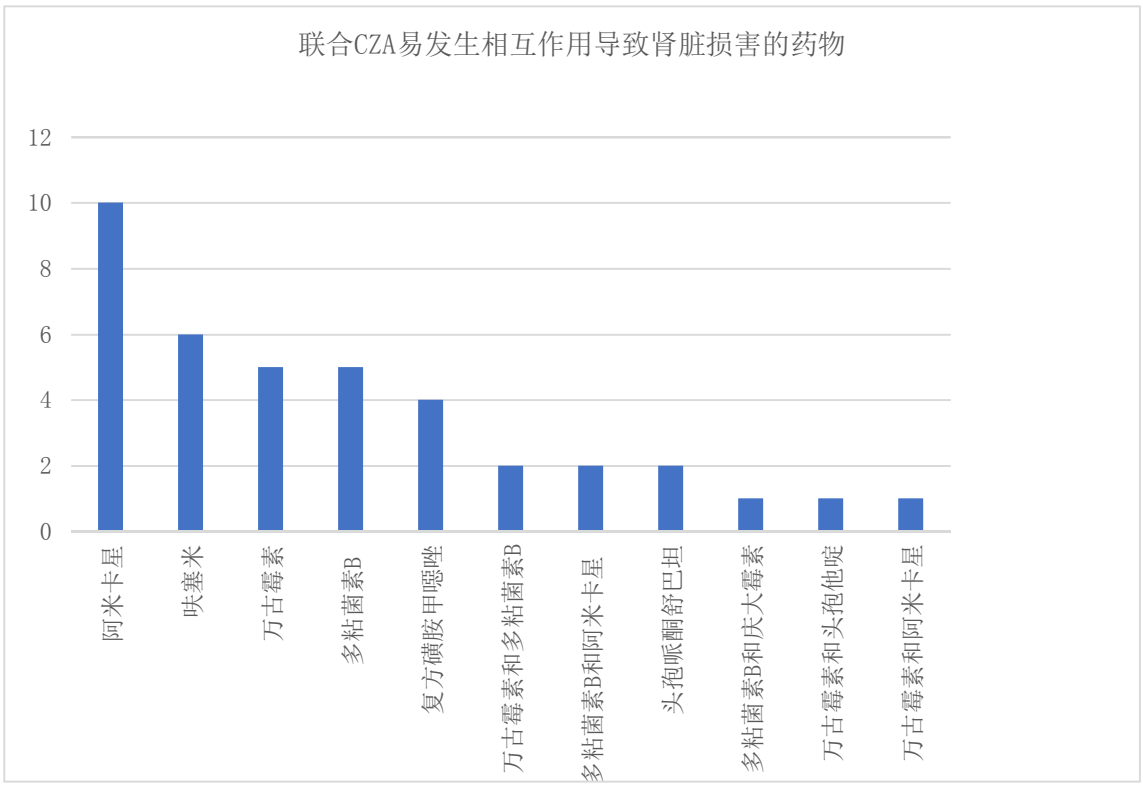


图 5 联合 CZA 易发生相互作用导致肾脏损害的药物

CZA 使用前、后抗菌药物使用情况见图 6 和图 7。

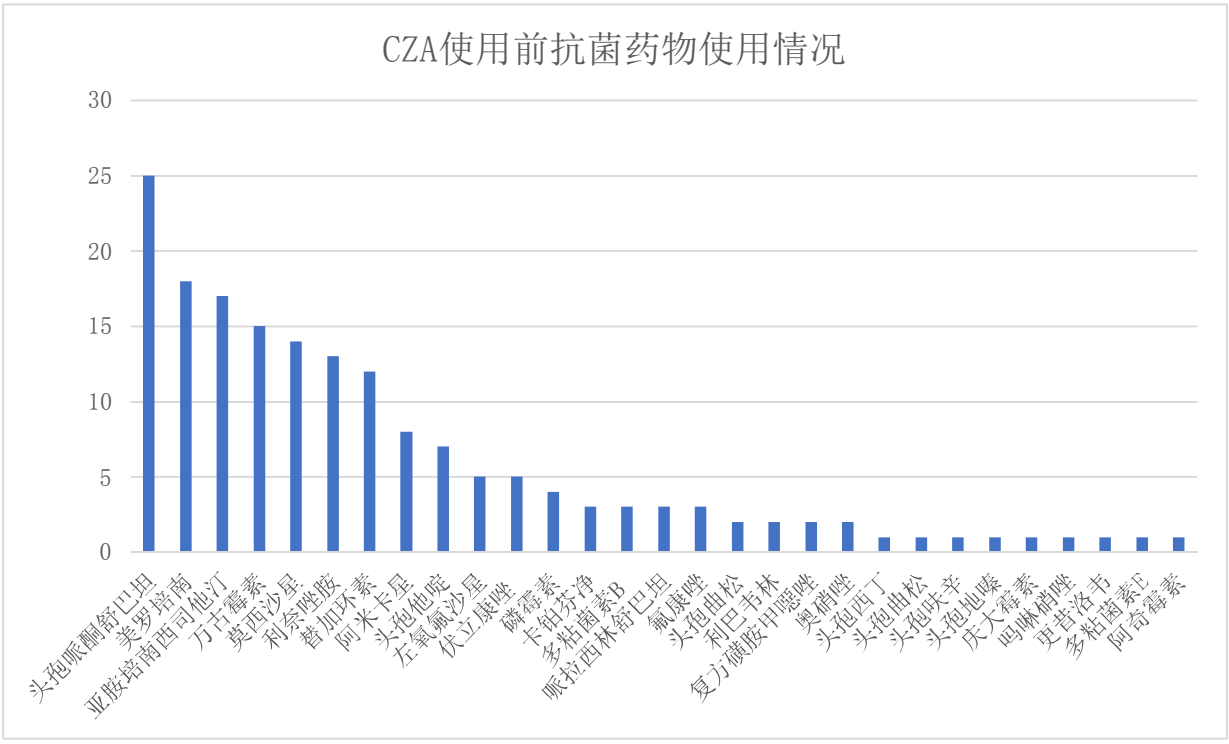


图 6 CZA 使用前抗菌药物使用情况

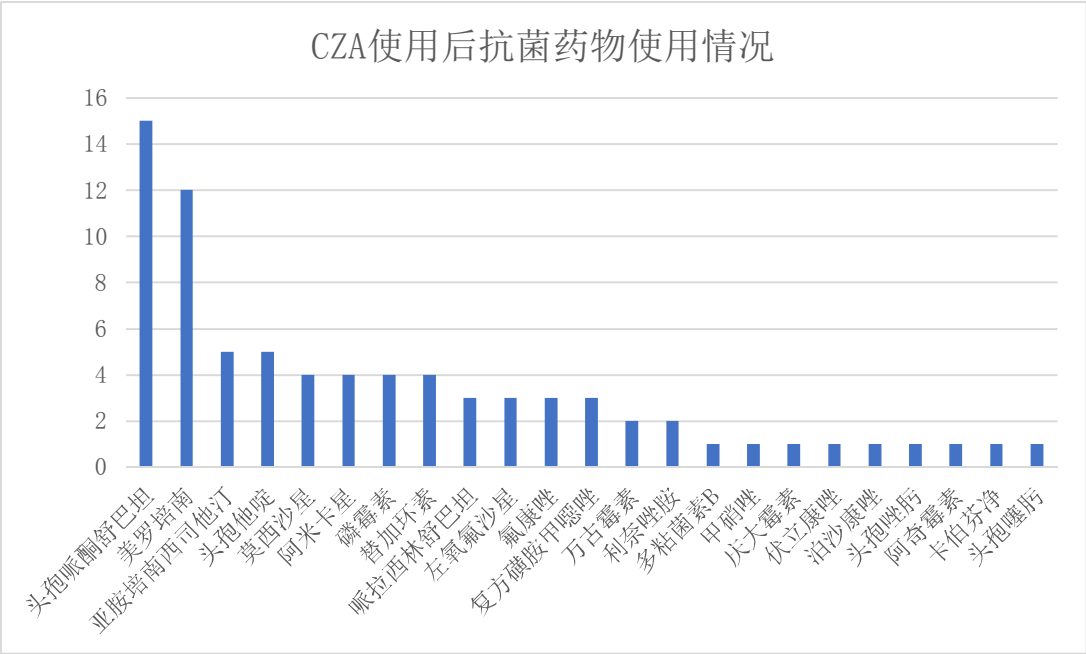


图 7 CZA 使用后抗菌药物使用情况

3 讨论

目前，除了药品说明书外，并没有规范、具体和实用的头孢他啶阿维巴坦应用标准，因此，本研究以美国 DUE 操作指南为标准基础，查阅相关文献，建立了头孢他啶阿维巴坦 DUE 标准。并以此为标准评价我院 CZA 合理使用情况。通过合理性评价发现，我院 CZA 在给药途径、溶媒符合率达到 100%，无配伍禁忌、禁忌症和未发现明显不良反应，但用药指证、用法用量、输注时间、联合用药、相互作用、用药疗程、病原微生物送检率、病程记录符合率和处方医师权限等方面需要改善。CZA 用药有效率为 61.9%（26/42）。

3.1 用药指征

用药指征符合率 41.9%（18/43）。CZA 使用前病原微生物送检率达 95.3%（41/43），需要加强在使用 CZA 使用前送检病原学标本的培训和宣传，甚至考评，确保送检率达 100%。病原微生物检出率最高的为肺炎克雷伯菌，其次为铜绿假单胞菌。其中肺炎克雷伯菌 96.2%（25/26）是 CRKP，铜绿假单胞菌 90.5%（19/21）为 CRPA，大肠埃希菌 50%（2/4）是 CRE。用药指征不符合表现为 2 例 CRAB 和 2 例洋葱伯克霍尔德菌（洋葱伯克霍尔德菌对 CZA 天然耐药）使用 CZA；7 例药敏报告单提示三代头孢或环丙/左氧氟沙星或氨基糖苷类或酶抑制剂复方制剂或碳青霉烯类敏感的铜绿假单胞菌或肺炎克雷伯菌使用 CZA；2 例无病原学证据，初始经验性抗感染治疗选择了 CZA。

3.2 用法用量

用法用量符合率 58.1%（25/43），CZA 没有基于性别、年龄、种族或肝功能损害的剂量调整要求[9]。CZA 80%～90%/85%以原型自尿中排泄。肾功能与 CZA 的血药浓度和疗效直接相关，中度至重度肾损伤患者需要调整剂量[10]。成人负荷剂量 CZA 2.5g q8h*2 剂 每次 2h 输注，维持剂量根据肾功能给药，Ccr ＞50-90 ml/min：2.5g q8h；肾功能受损时根据肌酐清除率给药即 Ccr 31～50 ml/min，1.25g q8h；Ccr 16～30ml/min，0.94g q12h；Ccr 6～15ml/min，0.94g q24h；Ccr <6ml/min，0.94g q48h。因此，对于肾功能不稳定的患者，至少应每日监测 Ccr 并据此调整 CZA 的剂量。CZA 均可通过血液透析，应在透析日血透后给药 0.94g q48h。CRRT 给药剂量为 1.25g q8h[3]。然而有研究报道 CRRT 是 CZA 治疗无效的唯一危险因素[11]。本研究用药期间有 12 例行 CRRT， 7 例治疗无效和 5 例好转，7 例治疗无效笔者考虑可能与患者病情危重、RRT 期间药物剂量不足或合并其它感染有关。因此，需要更多样本来证实 CRRT 对 CZA 临床疗效的影响。至于 ECMO 对头孢他啶阿维巴坦的影响，目前没有相关的文献报道，本研究 1 例患者使用 CZA 期间使用了 ECMO 后治疗无效。另外需要注意高肌酐清除率（Ccr

≥130ml/min）对头孢他啶阿维巴坦的疗效的影响。目前，对于高肌酐清除率如何进行剂量的调整，没有相关文献报道。本研究有 5 例高肌酐清除率（分别是 210.47 ml/min，131.27 ml/min， 136.86 ml/min，153.34 ml/min，218.71 ml/min），按照说明书给与常规剂量 2.5g q8h，临床疗效均为好转。

3.3 联合用药

目前，CZA 的临床用药仍建议以单药治疗为主[12]。Jorgensen 等[13]研究表明头孢他啶-阿维巴坦联合治疗方案相比于单药方案并不进一步改善患者预后，即使高危人群，如原发性血流感染、肺炎或 ICU 获得性感染，也未获益，反而增加了患者肾毒性的可能。与产 KPC 肠杆菌感染相反，产 OXA-48 肠杆菌感染的治疗中，大多数为头孢他啶-阿维巴坦单药治疗，一些研究中 87%患者为单药方案，单药治疗与联合治疗在有效率和死亡率方面没有差异，头孢他啶阿维巴坦单药治疗在多变量分析中不是死亡危险因素[14-15]。本研究单用 CZA 2 例,占比 4.7%（2/43），预后分别为治愈和好转。然而，选择单药或联合需要根据患者病情严重程度确定[16-17]。本研究联合用药符合率达 53.5%（23/43）。联合应用 1 种抗菌药物治疗 12 例（27.91%，12/43），联合应用 2 种抗菌药物治疗 12 例（27.91%，12/43），联合应用 3 种抗菌药物 5 例（11.63%，5/43），联合应用 4 种抗菌药物 6 例（13.96%，6/43），联合应用 5 种抗菌药物 2 例（4.66%，2/43），联合应用 6 种抗菌药物 2 例（4.66%，2/43），联合应用 8 种抗菌药物 1 例（2.33%，1/43）。本院联合用药率高与 2 种及 2 种以上复数菌感染以及多重耐药菌和泛耐药菌感染有关，也有部分原因为不合理用药。对于难治性 CRE 和 CRKP，笔者主张联合用药。有研究显示 CZA 联合磷霉素可将 CRKP 的 MIC 降至敏感折点以下，联合厄他培南或替加环素还可将产 OXA-48 酶肺炎克雷伯菌的 MIC 降至敏感折点以下，表现出较强的协同效应[18]。联合美罗培南、阿米卡星、氨曲南、多黏菌素或磷霉素可使其对肺炎克雷伯菌的 MIC 下降至 1/4，对铜绿假单胞菌的 MIC 下降至一半[19]。在联合用药药物选择方面，一项更深入的研究显示即使多粘菌素 B 敏感，仅部分菌株 CZA 与其具有协同作用；即使阿米卡星耐药，仍有菌株 CZA 与其具有协同作用。因此，建议联合用药前应请微生物老师做联合体外药敏试验[20]。CZA 可恢复产 kpc-3 的肺炎克雷伯菌对亚胺培南 80%和美罗培南 50%的敏感性，而对产 kpc-2 的肺炎克雷伯菌，碳青霉烯类的敏感性没有恢复[21]。因此，建议 CZA 联用亚胺培南或美罗培南用于产 kpc-3 的肺炎克雷伯菌。CZA 和亚胺培南联合应用能避免在产 KPC 肠杆菌科细菌中发生 CZA 耐药[22]。这些表明 CZA 和亚胺培南之间在体内具有更高的协同增效作用[21]。

3.4 相互作用

相互作用符合率 37.2%（16/43），表现为联合易发生相互作用致肾功能产生不良影响的药物：氨基糖苷类阿米卡星和庆大霉素、强效利尿剂呋塞米、多肽类万古霉素和多粘菌素 B、磺胺类复方磺胺甲噁唑、高剂量头孢菌素类药物头孢哌酮舒巴坦 3gq8h 和头孢他啶 2g q8h。

3.5 疗效分析

本研究调查结果显示用药有效率为 61.9%（26/42），患者最终治疗痊愈 1 例，好转 25 例，无效 16 例，1 例患者用药疗程≤48h 无法评价。临床有效率低原因可能为使用 **CZA 的患者疾病危重，且多为混合感染。**

3.6 不良反应发生情况

43 例患者均未在病程录中记载不良反应；有记载用药期间出现肝功能障碍和肾功能障碍各 1 例，但并未明确是 CZA 引起。口头征询所有床位医师的意见，均未发现明显的药物不良反应，这与文献研究结果一致[23-24]。

3.7 其它

病程记录符合率 95.3%（41/43），提示医生在使用特殊使用级抗菌药物时需要有病程记录其用药原因。处方医师权限符合率 81.4%（35/43），其他 9 例为非特殊使用级抗菌药物临床应用会诊专家库成员且职称为初中级医师开具 CZA。会诊符合率 4.7%（2/43），主要原因是开具 CZA 医嘱的科室有特殊使用级抗菌药物临床应用会诊专家库成员，无需再请其他科室人员会诊。用药疗程符合率占 41.9%（18/43），其余均表现为疗程不足，与头孢他啶阿维巴坦价格高，患者无力长期负担有关。输注时间符合率占 25.6%（11/43），其中未在医嘱中备注输注时间 32 例，输注时间 1 小时有 1 例。然而说明书指出 CZA 2.5g，1.25g 和 0.94g 的输注时间均为 2h。

依据我院 DUE 符合率，现提出如下 CZA 使用建议: （1）在使用 CZA 前，务必进行病原微生物送检；（2）需要有处方医师权限才能开具；（3）严格把握适应症，避免用药起点过高，如三代头孢菌素，氨基糖苷类或环

丙沙星/左氧氟沙星敏感等敏感的细菌，应首选使用；（4）应及时动态地根据肌酐清除率调整药物剂量，避免剂量过高导致药物不良反应；（5）需要在医嘱中备注输注时间 2 小时；（6）使用时需要在病程记录中详细记录用药理由；（7）腹腔感染需要联合甲硝唑，对于难治性 CRE 和 CRPA 联合用药前需要进行联合药敏实验，联合可能发生相互作用对肾功能产生不良影响的药物如氨基糖苷类、强效利尿剂、多肽类、磺胺类和高剂量头孢菌素类药物需密切关注患者尿常规、肾功能等，必要时行治疗药物监测。（8）规范用药疗程，避免疗程不足或疗程过长现象。

综上所述，临床药师依托专业优势，通过制定 DUE 标准对 CZA 在临床应用的使用情况进行评价，发现我院给药途径、溶媒、配伍禁忌和禁忌症均合理，但在适应证、病原微生物送检、处方医师权限、用法用量、输注时间、病程记录、联合用药、相互作用、用药疗程等方面仍存在部分不适宜情况，需进一步加强 CZA 合理用药宣传工作，及时纠正临床存在的不适宜情况，进一步规范 CZA 抗菌药物安全、合理使用，以保障患者用药安全。本研究不足之处是由于头孢他啶阿维巴坦是新药，刚刚在我国上市尚未进入医保目录且价格昂贵限制了其临床应用。我院也是通过外购此药用于耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌治疗，所以研究病例数较少。

参考文献

[1] US FDA. Avycaz （ceftazidime and avibactam） for injection, for intravenous use: US prescribing information. 2018. https://www. accessdata.fda.gov. Accessed 16 Mar 2018.

[2] American Society of Health-System Pharmacists. ASHP Guidelines on Medication-Use Evaluation[J]. Am J Health-Syst Pharm,1996,53（16）:1953-1955.

[3] 头孢他啶阿维巴坦参考说明书（Pfizer Ireland Pharmaceuticals）.

[4] Jay P. Sanford 著.热病：桑福德抗微生物治疗指南（第 50 版）[M].北京：中国协和医科大学出版社，2019：62.

[5] Ministry of Health.Management of clinical application of antimicrobial drugs[S].2015-8-27.

[6]《β-内酰胺类抗生素/β-内酰胺酶抑制剂复方制剂临床应用专家共识》编写专家组. β-内酰胺类抗生素/β-内酰胺酶抑制剂复方制剂临床应用专家共识（2020 年版）[J].中华医学杂志, 2020, 100（10）:738-747.

[7] 汪复，张婴元.实用抗感染治疗学（第 3 版）[M].人民卫生出版社，北京，2020：289.

[8] Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine[J]. Nephron. 1976,16（1）:31-41.

[9] European Medicines Agency. Zavicefta: summary of product characteristics. 2018. http://www.ema.europa.eu. Accessed 16 Mar 2018.

[10] Li J, Lovern M, Riccobene T, et al. Considerations in the Selection of Renal Dosage Adjustments for Patients with Serious Infections and Lessons Learned from the Development of Ceftazidime-Avibactam[J]. Antimicrob Agents Chemother,2020,64（4）:e02105-19.

[11] Vena A, Giacobbe D R, Castaldo N, et al. Clinical experience with ceftazidime-avibactam for the treatment of infections due to multidrug-resistant gram-negative bacteria other than carbapenem-resistant Enterobacterales[J]. Antibiotics,2020,9（2）:71-88.

[12]汤铂, 崔娜 . 头孢他啶/阿维巴坦临床应用中的若干问题[J]. 中华医学杂志, 2021, 101（41）: 3365-3370. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20210531-01240.

[13] Jorgensen SCJ, Trinh TD, Zasowski EJ, et al. Real-World Experience With Ceftazidime-Avibactam for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections[J]. Open Forum Infect Dis, 2019, 6（12）:ofz522.

[14] Sousa A, Pérez-Rodríguez MT, Soto A,et al. Effectiveness of ceftazidime/avibactam as salvage therapy for treatment of infections due to OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73（11）:3170-3175.

[15] De la Calle C, Rodríguez O, Morata L, et al. Clinical characteristics and prognosis of infections caused by OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in patients treated with ceftazidime-avibactam[J]. Int J Antimicrob Agents, 2019, 53（4）:520-524.

[16]Tsolaki V, Mantzarlis K, Mpakalis A, et al. Ceftazidime-avibactam to treat life-threatening infections by carbapenem-

resistant pathogens in critically ill mechanically ventilated patients[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64（3）:e02320-02319.

[17] Pogue JM, Bonomo RA, Kaye KS. Ceftazidime/ avibactam, meropenem/vaborbactam, or both? Clinical and formulary considerations[J]. Clin Infect Dis, 2019, 68（3）:519-524.

[18]Ojdana D, Gutowska A, Sacha P, Majewski P, Wieczorek P, Tryniszewska E. Activity of Ceftazidime-Avibactam Alone and in Combination with Ertapenem, Fosfomycin, and Tigecycline Against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. Microb Drug Resist. 2019 Nov;25（9）:1357-1364. doi: 10.1089/mdr.2018.0234. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31295055.

[19]Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, Rybak MJ. Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Colistin, or Fosfomycin against Well-Characterized Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2019 Jul 25;63（8）:e00779-19. doi: 10.1128/AAC.00779-19. PMID: 31182535; PMCID: PMC6658738.

[20]Manning N, Balabanian G, Rose M, Landman D, Quale J. Activity of Ceftazidime-Avibactam Against Clinical Isolates of Klebsiella pneumoniae, Including KPC-Carrying Isolates, Endemic to New York City. Microb Drug Resist. 2018 Jan/Feb;24（1）:35-39. doi: 10.1089/mdr.2016.0293. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28590820.

[21]Gaibani P, Lewis RE, Volpe SL, Giannella M, Campoli C, Landini MP, Viale P, Re MC, Ambretti S. In vitro interaction of ceftazidime-avibactam in combination with different antimicrobials against KPC-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolates. Int J Infect Dis. 2017 Dec;65:1-3. doi: 10.1016/j.ijid.2017.09.017. Epub 2017 Sep 22. PMID: 28951106

[22]Göttig S, Frank D, Mungo E, Nolte A, Hogardt M, Besier S, Wichelhaus TA. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae in vivo. J Antimicrob Chemother. 2019 Nov 1;74（11）:3211-3216. doi: 10.1093/jac/dkz330. PMID: 31365094.

[23]Che HC Wang R Wang J et al.Ceftazidime /avibactam versus carbapenems for the treatment of infections caused by Enterobacteriaceae: A meta-analysis of randomised controlled trials[J].Int J Antimicrob Agents 2019 54 6 : 809-813.

[24]Antoni Torres Nanshan Zhong Jan Pachl et al. Ceftazidimeavibactam Versus Meropenem in Nosocomial Pneumonia Including Ventilator-Associated Pneumonia R EP R OVE : A R andomised Double-Blind Phase 3 Non-Inferiority Trial J . Lancet Infect Dis 2018 18 3 : 285-295.

基于微信小程序的 OTO 药学服务在抗菌药物科学化管理中的应用

张玮[1]，杨敏[2]

海南医学院第一附属医院，海南 海口 570100

海南省妇女儿童医学中心，海南 海口 570100

【摘要】目的：探索基于移动互联网大数据平台构建信息化、科学化、精准化抗菌药物管理模式，提升安全用药水平，创新药学服务模式，为临床精准用药提供新的途径和治疗策略。**方法：**根据抗菌药物科学化管理要素为基本原则，设计开发抗感染方案速查微信小程序。同时通过 HIS 系统提取信息（微生物检验结果、抗菌药物使用数据等），嵌入微信小程序；临床药师定期点评（处方、住院病历）、监测和预警，对小程序后台进行功能维护和数据更新，再通过微信公众号，进行临床反馈和信息推送。**结果：**通过抗感染速查微信小程序的临床使用及线下反馈沟通，解决了临床抗感染用药查找费时、药物使用偏差、临床反馈滞后、干预手段欠缺等问题，微信小程序使用覆盖了 80%以上的临床科室，超过 100 个临床医师完成了注册，规范了临床用药，完善了抗菌药物管理体系。**结论：**基于微信小程序 OTO（线上-线下）服务模式，实现精准的抗感染药物治疗，能有效提高临床抗菌药物使用的规范性和有效性，在抗菌药物全程化、科学化管理方面有较好的实践意义和科学价值。

【关键词】抗菌药物；信息化管理；微信小程序；

Application of OTO Pharmaceutical Care based on WeChat Mini Program in Antimicrobial Stewardship

Zhang Wei, Yang Min

The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University;Department of Pharmacy, Hainan Haikou 570100

Hainan Women and Children's Medical Center;Department of Pharmacy,Hainan Haikou 570100

【Abstract】 Objective：To explore the construction of information, scientific and precise antibacterial drug management model based on the mobile Internet big data platform, improve the level of safe drug use, innovate the pharmaceutical care model, and provide a new approach and treatment strategy for clinical precision drug use.**Methods:** According to the basic principle of scientific management of antibacterial drugs, we designed and developed the wechat mini program of anti-infection program quick search. At the same time, information (microbiological test results, antibacterial drug use data, etc.) is extracted through HIS system and embedded into WeChat mini program; Clinical pharmacists make regular comments (prescriptions and hospitalization medical records), monitor and warn, maintain functions and update data in the background of mini program, and then provide clinical feedback and information push through wechat public account.**Results:** Through the clinical use of anti-infective quick check WeChat mini program and offline feedback communication, the problems of finding clinical anti-infective drugs, drug use bias, clinical feedback lag and lack of intervention methods were solved. The use of wechat mini program covered more than 80% of clinical departments, more than 100 clinicians completed registration, and standardized clinical drugs. The management system of antibacterial drugs has been improved.**Conclusion:** Based on the OTO (online-offline) service mode of wechat mini program, accurate anti-infective drug therapy can be achieved, which can effectively improve the standardization and effectiveness of clinical antibacterial drug use, and has good practical significance and scientific value in the whole process and scientific management of antibacterial drugs.

【Key words】Antibacterial drugs; Information management; WeChat mini program

1、背景目标

1.1 抗菌药物耐药现状严峻

近年来，细菌耐药已经成为公共健康领域的重大挑战，加强抗菌药物科学管理、减缓细菌耐药，越来越成为抗感染领域共同关注、非常紧迫的工作任务之一。如何让抗感染临床药师更好地融入到治疗团队发挥专业优势，为广大的医护人员提供高质量的药学服务，是我们目前面临的一大挑战。

1.2 临床用药不规范

我国可供临床使用的抗菌药物品种较多，涉及临床科室广，但在满足临床各类细菌感染性疾病需求的同时，大规模的使用抗菌药物带来了严峻的社会及经济后果，细菌耐药率增高，患者转归率降低，住院时间延长，治疗费用增加，不良反应发生率升高等。

目前，临床抗菌药物应用现状如下：①普遍、大剂量、长时间、不规范的预防应用抗菌药物；②不了解抗菌药物的药效学和药代动力学特征，随意制定治疗剂量、疗程，使抗菌药物不能发挥应有的作用；③抗菌药物的滥用导致耐药菌株的不断产生。抗菌药物不合理使用，最终形成恶性循环。

1.3 国家管理逐渐完善

国家对临床抗菌药物应用管理也日益重视，各项政策在不断完善，特别是 2019 年发布的《持续做好抗菌药物临床应用管理工作通知》，将加强信息化管理置于提升抗菌药物管理水平的重要位置，依托信息化手段，发挥其在辅助诊断、临床决策支持方面的积极作用，逐步实现抗菌药物科学化、精细化、智能化和个体化管理。

1.4 微信小程序普及

调查显示，目前微信使用人数已达 8 亿人之多，基于微信平台二次开发的应用程序显示出越来越明显的市场优势。微信小程序具有使用便捷、无需下载安装，扫面二维码即可浏览等特点，体现了“即用即走”的现代化理念，且自动更新，用后自动保存，使用体验更流畅。

基于以上背景，我们利用互联网+手段，基于微信小程序，构建了一个线上-线下（OTO）互动的抗菌药物科学化管理药学服务模式，进一步规范临床科室的抗菌药物使用。

2、实施过程

2.1 微信小程序构建

微信小程序以抗菌药物科学化管理要素为基本原则设计开发。

A．微信小程序分为临床药师后台整理编辑和临床医师前台使用两部分。

B．临床药师：程序的模块构建、抗感染数据库的建立，最新指南的整理发布、后台数据上传更新和在线用药解答；

C．临床医师：注册后可在平台进行以下内容检索：①已知感染部位（查找常见感染致病菌和用药方案）；②检出致病菌（查找敏感的抗菌药物和药物剂量）；③已知使用药物（查找药物的组织分布浓度和药动学参数）；④围手术期用药[6]（查找给药时机、遴选药物、给药疗程等）；⑤检索最新的抗感染指南、共识进行学习（附有下载链接）。

D．设置在线咨询模块，医师可选择进行及时的用药沟通（电话联系和微信咨询）

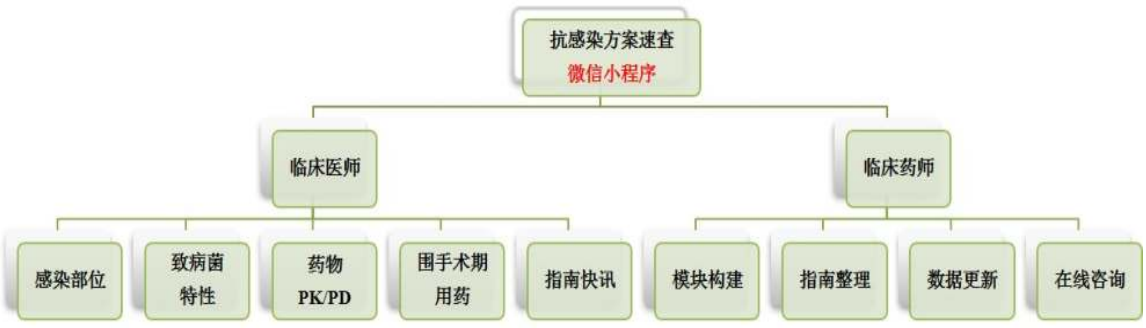


图 1　微信小程序架构



图 2　抗感染方案速查微信小程序界面

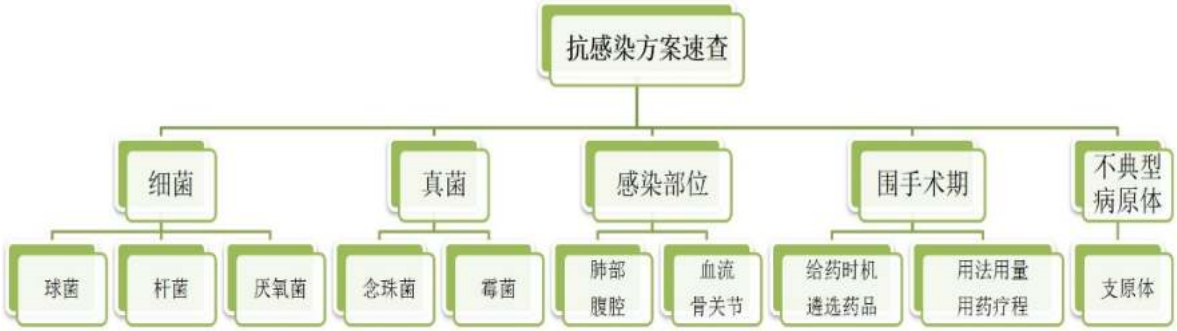


图 3　抗感染方案速查微信小程序内容



图 4　微信小程序感染用药推荐模块内容

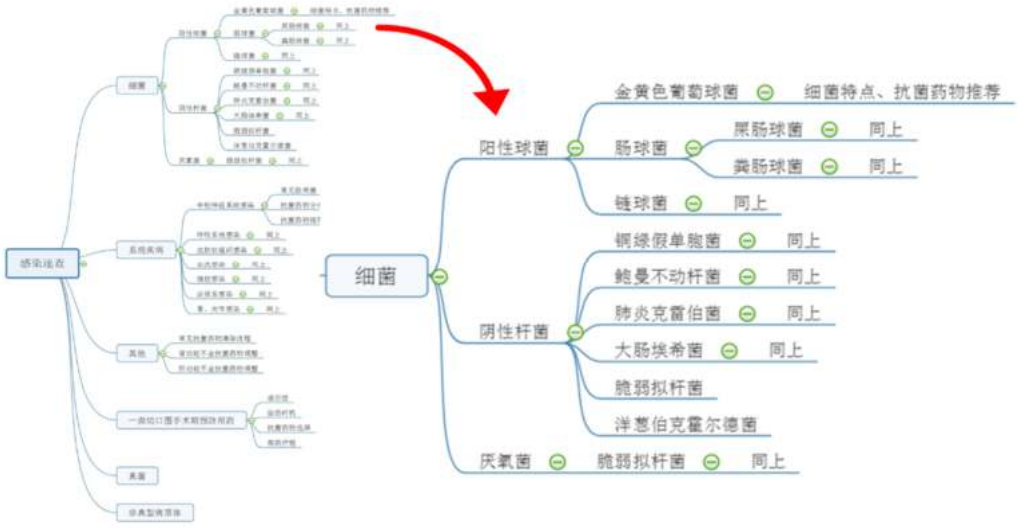


图 5　微信小程序感染具体用药推荐

2.2 微信小程序的应用

A．小程序制作成二维码，打印并发放科室；

B．临床医师注册使用；

C．定期发放问卷测评（抗感染小程序内容相关问卷），评估医师对抗感染药物的掌握程度；

D. 通过每月的一类切口和病历点评（专项点评和科室点评），分析临床医师抗感染用药规范性和存在问题，通过线下及时反馈沟通、并更新后台数据库；

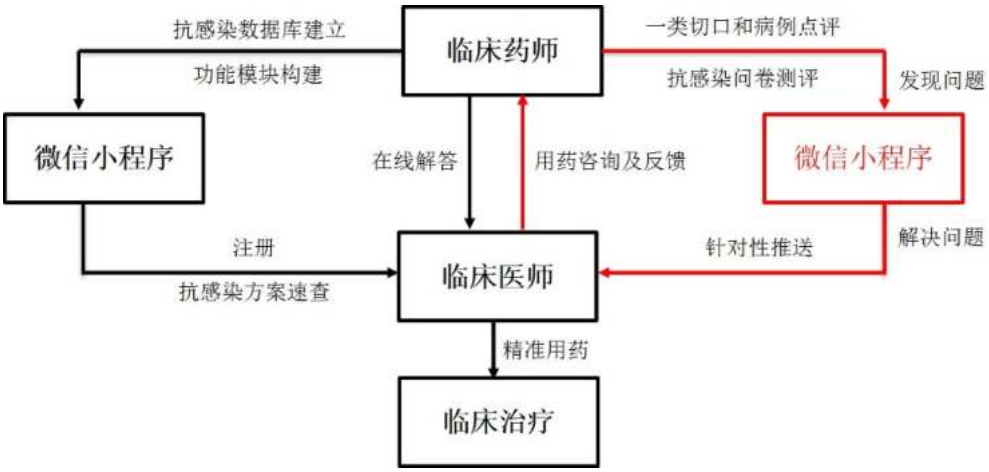


图 6　微信小程序应用流程

2.3 抗菌药物科学化管理

基于微信小程序，采用线上和线下（OTO）相结合的管理模式，形成医药一体，精准化用药流程，提升 抗菌药物管理水平。

线上部分：

通过 HIS 系统提取信息（微生物检验结果、抗菌药物使用数据等），嵌入微信小程序；同时临床药师定期点评（处方、住院病历）、监测和预警，对小程序后台进行功能维护和数据更新，关联微信公众号，及时反馈和推送信息。

线下部分：

通过抗菌药物科学化管理小组（AMS）多学科协作，定期开展抗菌药物培训（感染沙龙、知识点测评）、管理质控，降低抗菌药物使用率和使用强度，提高医生感染疾病的诊疗水平，促进抗菌药物合理使用。

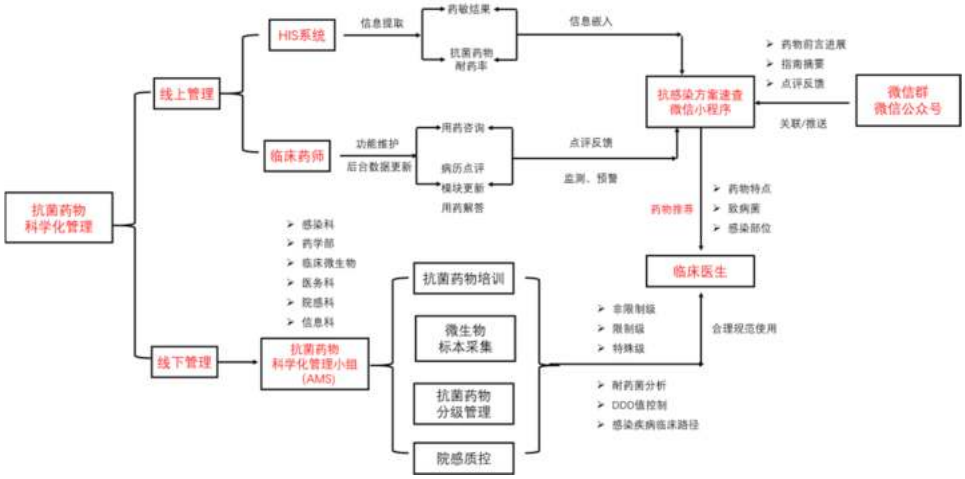


图 7　基于微信小程序 OTO 抗菌药物科学化管理流程

3、基于微信小程序的 OTO 抗菌药物科学化管理实施

我们以围手术期抗菌药物使用问题突出的骨科四区和骨科八区作为试点，进行实施，并对两个科室的围手术期给药时机、遴选药品、用药疗程、抗菌药物使用率和使用强度 5 个指标进行评价，逐步完善管理流程。

4、实施成效

通过 2020 年一年的实施，两个科室的 5 个评价指标均较 2019 年有显著降低，具体见图 8-11。



图 8



图 9



图 10



图 11

5、进一步推广

基于微信小程序 OTO 药学服务抗菌药物科学化管理模式，先在骨科等小范围内进行推广，管理效果显著，并以此模式为基础，围绕安全用药各要素，以落实国家《持续做好抗菌药物临床应用管理工作》为标准，进一步推广微信小程序应用，以达到覆盖全院 80%以上的临床科室，超过 100 个临床医师完成了注册，规范了临床用药，降低细菌的耐药性，完善了抗菌药物管理体系。

5.1 临床药师参与度明显提高

近年来抗感染会诊量逐年增加，2019-2020 年均超过了 500 份。面对细菌耐药性日趋严重，检出细菌多样化，临床医生在合理用药方面更加重视，更希望临床药师参与到患者疾病的诊疗活动中，在合理选择抗菌药物方面

给予专业的指导，详见图 12。

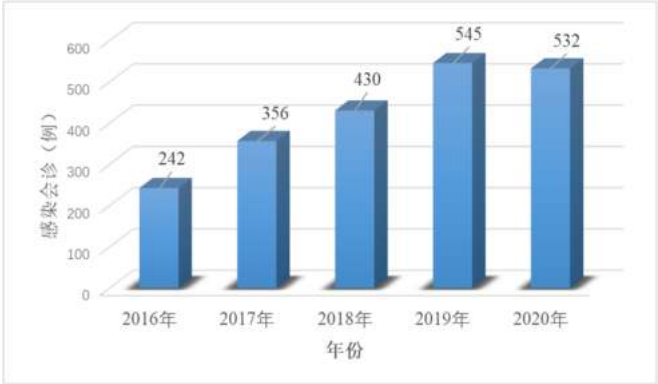


图 12　临床药学抗感染会诊量

5.2 临床医生满意度逐步提升

通过微信小程序，采用线上和线下（OTO）相结合的抗菌药物科学化管理模式，临床医生对抗菌药物合理使用意识大幅提升，药师价值得以充分体现，监测反馈率显著提高。规范了医生的抗菌药物使用，降低了抗菌药物使用强度，提升了临床科室对药学服务的满意度，详见图 13。

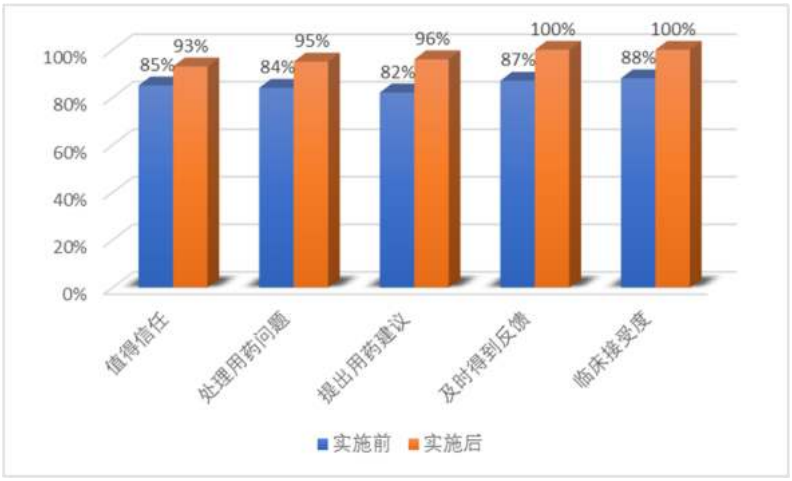


图 13　临床医生对临床药师抗感染参与满意度调查

5.3 抗菌药物科学化管控工作良性循环

临床药师科学管理工作动力提升明显，在信息化技术支撑下，通过会诊、点评、咨询交流、质控等工作发现问题、定期反馈科室、及时解决问题，并拓展形成规范化抗菌药物管理流程，提高了临床医生用药安全管理意识，全院抗菌药物使用率和使用强度维持在目标值以下，限制级和特殊级抗菌药物送检率逐步提高，细菌耐药率降低，医疗质量和安全水平进一步得到提升。（见图 14、图 15）



图 14

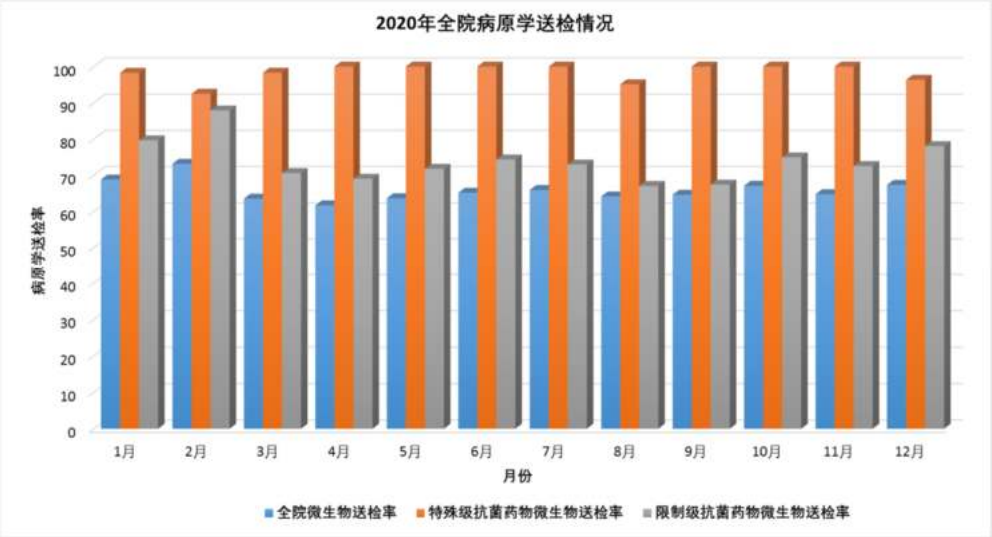


图 15

6、实践体会

我们构建的“基于微信小程序 OTO 药学服务抗菌药物科学化管理”模式，运用以临床问题为牵引，以临床药师为主导，结合信息化大数据，从技术、治疗、管理 3 个维度、实现 3 个创新，即基于信息化平台的用药指导交互系统；以临床用药为导向的抗感染速查体系；以用药科学化为指标的管理反馈机制。提高药师全流程参与，AMS 多学科协作，并通过规范化管理质控机制，实现精准的抗菌药物治疗，有效提高临床抗菌药物使用的规范性和有效性，在抗菌药全程化、科学化管理方面有较好的实践意义和科学价值。

基于微信小程序的信息化平台是医、药间专业性的交流平台，不仅仅是科普知识的发布，更注重于解决药物在应用环节的难题。通过这种方式，碎片化的零散用药经验都分类整合保存起来，成为宝贵的知识财富。中的应用通过开发微信小程序，把零散的药学信息归集起来形成一个知识库，为临床提供体系完善的药学服务；而临床的信息反馈可以让知识库的信息更有针对性地添加和更新。“互联网+药学服务”拉近了药师与医护人员的距离，为药师融入治疗团队提供了一个良好的契机。

移动应用程序的不断发展，药学服务的移动化和信息化的转型，作为新一代的药师，我们要用信息化互联

网的思维，积极投身到药学服务模式发展创新的浪潮中，构建药学服务的信息生态圈，在医疗改革中求合作、谋发展。

参考文献

[1] 世界卫生组织称,抗菌药物耐药性上报的国家增多,但现状仍堪忧[J].中华全科医师杂志,2020,19(11):1036-1036.

[2] 郭佳茹,商临萍.抗菌药物滥用现状分析及管理对策[J].中国社会医学杂志,2020,37(05):471-474.

[3] 孙友岭,张济永,孙连峰.临床不规范使用抗菌药物的分析[J].中国社区医师,2004(16):18-19.

[4] 国家卫生健康委办公厅关于持续做好抗菌药物临床应用管理工作的通知[J].中华人民共和国国家卫生健康委员会公报,2020(07):21-22.

[5] 徐娟,王斌,陈维红.基于微信小程序的药学服务平台开发与应用[J].中国药物与临床,2019,19(14):2450-2451.

[6] 韩国栋,谈进,孔德香,刘玲,王兆宇.抗菌药物科学化管理在骨科的应用效果分析[J].中国医疗管理科学,2020,10(06):29-32.

[7] 郑锦坤,许红雁,林晓春,李庆德,廖茂成,王箭,李莉,罗君. 运用 AMS 提升抗菌药物临床应用水平的实践和成效[C]. 广东省药学会.2020 第 25 届广东省药师周大会论文集.广东省药学会:广东省药学会,2019:630-644.

[8] 孙军连,章超,罗云,洪涛,肖婷.多学科诊疗模式（MDT）提高抗菌药物科学化管理（AMS）水平的研究[J].当代医学,2019,25(31):121-123.

[9] 王向阳,刘红月,马红超.抗菌药物信息化闭环管理对减少医院耐药菌感染的产生及其检出的影响[J].抗感染药学,2021,18(01):20-23.

[10] 黄娟,汪渝婷,王虹霞,曾明辉,杨勇.抗菌药物合理使用管理模式改进与实践[J].中国药业,2020,29(14):7-11.

[11] 王作君,车云秀,韦平,张敬一.医院药学信息化管理路径与效果评价[J].中国药房,2018,29(09):1162-1166.

[12] 王婷,李文斌,王纯叶,叶文威.信息化联合质控干预抗菌药物应用的研究[J].中国医学创新,2018,15(11):130-134.

慢阻肺患者“4+6 科普干预”管理路径构建与应用

张玮[1]，杨敏[2]

（海南医学院第一附属医院，海南 海口 570100；海南省妇女儿童医学中心，海南 海口 570100）

【摘要】目的：构建慢阻肺患者“4+6 科普干预”管理路径，通过多维度、全方位，为出院和门诊患者提供便捷高效的药学服务，降低用药风险，提高疗效，实现闭环药学服务，保证用药全过程安全有效。方法：根据慢阻肺疾病相关指南，结合药学查房实践，设计了涵盖用药在内的 5 个维度用药问卷筛查表。通过问卷筛查，发现慢阻肺患者治疗过程中存在的具体问题，以科普干预为主导，建立慢阻肺患者“4+6 科普干预”管理路径并实践。结果：基于 4 个维度、6 个干预技术、21 项干预内容和与干预内容相对应的各项评价标准，对慢阻肺患者进行全流程闭环式药学服务，通过路径干预和管理，规范了患者吸入剂操作、提高了对疾病的掌握程度、肺功能得到改善、用药依从性提高、疾病得到控制、进一步降低了医疗费用。结论：本研究从慢阻肺患者治疗问题出发，构建 “4+6 科普干预”管理路径，实现了药物治疗精准化；药学服务专业化；医、药、护、家属四元管理同质化，提高了慢阻肺患者用药的规范性和有效性，增强了患者自我管理水平，使疾病进一步得到有效控制，在慢阻肺疾病管理和药物治疗方面具有推广性和实践意义。

【关键词】慢阻肺；4+6 科普干预；管理路径；微信小程序

Construction and application of "4+6 popular Science intervention" management path for COPD patients

Zhang Wei, Yang Min

The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University;Department of Pharmacy, Hainan Haikou 570100

Hainan Women and Children’s Medical Center;Department of Pharmacy,Hainan Haikou 570100

【**Abstract**】 **Objective**：The "4+6 popular science intervention" management path for COPD patients was established to provide convenient and efficient pharmaceutical services for discharged and outpatients through multi-dimensional and comprehensive approaches, reduce medication risks, improve efficacy, realize closed-loop pharmaceutical services, and ensure the safety and effectiveness of the whole process of medication. **Methods**: According to the relevant guidelines for COPD disease and combined with the practice of pharmaceutical ward rounds, a 5-dimension medication questionnaire screening table was designed, including medication. Through questionnaire screening, specific problems existing in the treatment process of COPD patients were found. The management path of "4+6 popular science intervention" for COPD patients was established and put into practice based on popular science intervention. **Results**: Based on 4 dimensions, 6 intervention techniques, 21 intervention contents and evaluation criteria corresponding to the intervention contents, closed-loop pharmaceutical care of the whole process was conducted for patients with COPD. Through path intervention and management, The inhalant operation of patients has been standardized, the degree of disease mastery has been improved, the lung function has been improved, the medication compliance has been improved, the disease has been controlled, and the medical costs have been further reduced. **Conclusion:** In this study, starting from the treatment of COPD patients, a management path of "4+6 popular science intervention" was established to realize the precision of drug therapy. Pharmaceutical care specialization; The homogenization of the four-element management of medicine, medicine, nursing and family members has improved the standardization and effectiveness of medication for COPD patients,

enhanced the level of patients' self-management, and further effectively controlled the disease, which has extensive and practical significance in the management and drug treatment of COPD diseases.
【**Key words**】COPD; 4+6 popular Science intervention; Management path; WeChat mini program

1.背景目标

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)，是一种严重危害人类健康的慢性疾病。具有高患病率、高发病率、高致残率、高致死率、高经济负担率和低知晓率的“五高一低”特点，已成为现阶段最为突出的公共卫生与医疗问题之一。

很多慢阻肺患者，往往刚出院就因药物使用不规范等原因，病情加重而再次住院。表面上听懂了医生、护士、药师的用药指导，可再次住院后测评，使用规范性直线下降，平均掌握度不达 20%。再加上这类老年患者往往还合并有其他疾病，每天都吃许多种药物，很容易将药物混淆、吃错、发生不良事件。

如何改善患者这种状况？出院患者和门诊患者的用药能够得到持续管理显得尤为重要。本案例主要探讨药师如何对这类患者真正实现院内、院外持续用药跟踪，形成时间和空间上的闭环管理。

2.路径构建过程

我们从“哲学三问：我是谁？我从哪里来？我到哪里去？”引申到“药师三问”中，逐一进行展开叙述。

问题一：我是谁？

我是一名药师，前面的用药问题应由药师负责。因为药师不仅要对用药负责，更要对药物治疗的结局负责。

慢阻肺目前尚不能根治，但是通过有效的管理，能够使患者的病情得到满意的控制，提高生活质量。如何实现有效的管理？我们设想建立一个闭环的药物治疗管理路径。通过多维度、全方位，为出院患者和门诊患者提供便捷高效的药学服务，以保证用药全过程安全有效。

问题二：我从哪里来？

我从患者中来。问需于患明方向。

目前，我国慢阻肺患者将近 1 亿，40 岁以上人群中，平均每 8 人就有 1 个。我市又是煤炭城市，人群发病率高，基数大，老年患者尤为突出。截止 2020 年底，我院就诊的慢阻肺患者已达 4000 余人。

首先，我们从健康教育水平、疾病认知率、吸入剂掌握程度、肺功能控制以及用药依从性 5 个维度对慢阻肺患者进行问卷筛查，测评发现患者在疾病认知、吸入剂掌握、肺功能控制以及用药依从性方面均存在很大的盲区。

具体表现为：

1）认知率低，大多数人不了解慢阻肺疾病；不熟悉吸入药物，知识获取途径较为单一（图 1、图 2）。

2）吸入剂使用不规范，吸入过程中只要有一步操作不规范，就会降低药物疗效，病情就不能得到有效控制，这也是很多患者总问“我怎么吸了半个月一点都不管用”。（图 3）

3）自我管理薄弱， 缺乏有效的自我监测和肺功能训练，调查发现，82%的人群在最近的 3 个月内至少有一次急性加重，而将近一半的人群会在症状稍微好转后自行停药或减量（图 4）。

4）随访评估不足，院外后续的疾病管理评估滞后且执行不到位，也是患者自我控制差的一个重要原因。

5）缺少同质化的用药管理流程，医生、药师，护士所教各有不同。

6）信息的推送、收集、分析载体不够，时间和空间上的管理缺失。



图 1. 慢阻肺患者用药管理存在问题

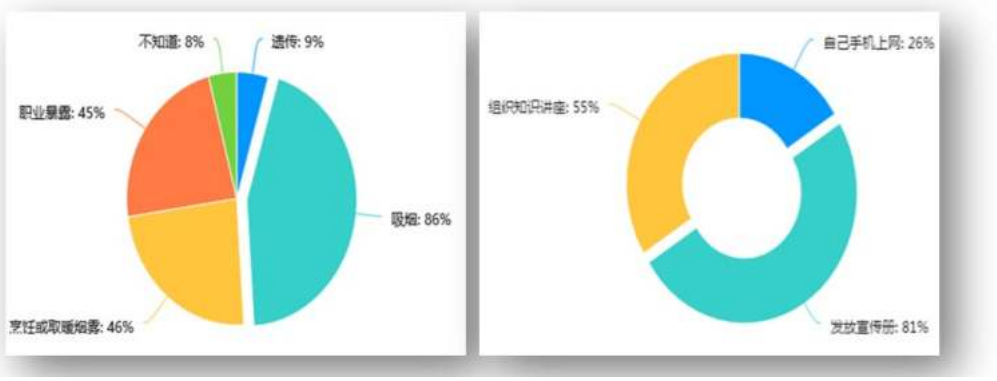


图 2. 慢阻肺患者疾病认知差、用药知识获取途径单一



图 3. 慢阻肺患者吸入装置使用不规范



图 4. 慢阻肺患者疾病控制不佳

2.1 路径构建

我们结合问卷结果及指南共识，建立了“4+6 科普干预”管理路径。路径以科普干预为主导，以解决慢阻肺患者疾病用药管理为目的，制定了包括慢阻肺药物管理、合并疾病药物管理、自我管理、跟踪随访在内的 4 个维度，吸入剂、口服药物、合并疾病、自我评估、健康教育、随访评估在内的 6 个干预技术以及相对应的装置选择、药物选择、操作测评、药物依从在内的 21 项干预内容和与干预内容相对应的各项评价标准（图 5、表 1）。

2.2 设置评价标准目的：

1）了解患者目前对疾病、、药物的掌握程度；

2）经过用药指导后评估患者听懂了多少；

3）评估患者听懂后能做出来多少；

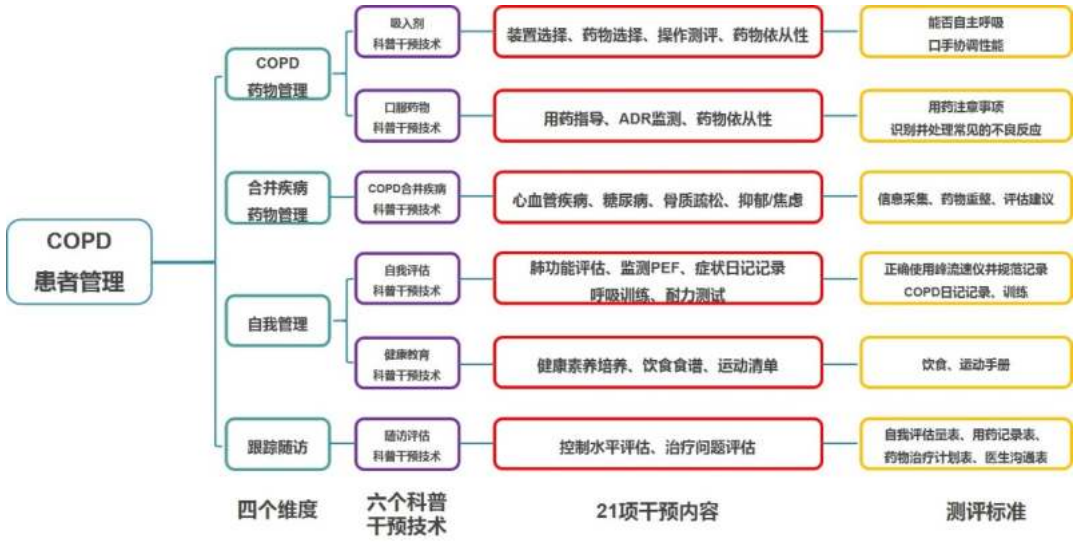


图 5. 慢阻肺患者 “4+6 科普干预”管理路径

表 1.“4+6 科普干预”管理路径测评指标及评价标准

测评维度	科普干预技术路径	干预内容	测评指标	评价标准
COPD 药物管理	吸入剂科普干预技术	装置选择	1.能否自主呼吸 2.能否吸入足够的气流 3.口手协调性能	装置选择正确
		药物选择	1.单用、联合 2.ICS、LAMA、LABA	药物选择适宜
		操作测评	1.认识吸入装置 2.完整操作 3.操作后装置的清洁和口腔护理	吸入操作规范
		药物依从性	用药疗程、服药剂量、药物调整	药物按疗程、剂量使用
	口服药物科普干预技术	用药指导	用法用量、注意事项、药物相互作用	药物使用正确
		ADR 监测	1.了解常见不良反应 2.掌握简单的处理原则	识别并处理常见的不良反应
		用药依从性	疗程、剂量、药物调整	药物按疗程、剂量使用

合并疾病药物管理	COPD 合并疾病药物管理科普干预技术	心血管疾病	MTM 管理 1.相应学科门诊诊疗 2.药学门诊患者信息采集、药物重整、评估建议	1.疾病认识提高 2.药学门诊定时评估、监测和档案建立 3.定时到医院随诊
		糖尿病		
		骨质疏松		
		抑郁/焦虑		
自我管理	自我评估科普干预技术	肺功能评估	CAT 问卷测评	坚持自我肺功能评估
		PEF 监测	峰流速仪使用、记录	正确使用峰流速仪并规范记录
		症状 日记记录	气紧、咳嗽、咳痰症状	COPD 日记完整记录
		呼吸训练	腹式呼吸、缩唇呼吸	掌握正确的呼吸训练
		耐力训练	6 分钟步行距离测试	呼吸耐力增强
	健康教育科普干预技术	健康素养培养	线下培训活动：健康大讲堂、科普资料、展板、药学义诊活动	1.科普资料的制作和发放 2.健康大讲堂的讲课及开展义诊活动
		饮食食谱	推荐食谱	饮食手册
		运动清单	推荐运动	运动手册
跟踪随访	随访评估科普干预技术	控制水平评估	1.检查患者症状或 PEF 日记； 2.评估控制症状水平； 3.评估有无并发症	管理档案 1.患者有完整的自我评估量表及记录数据 2. COPD 患者随访评估量表及指导建议 3.就诊信息采集表、预约信息采集表、用药记录表、药物重整记录表、医生沟通表 4、药物治疗管理执行方案
		治疗问题评估	1.评估依从性及影响因素 2.检查吸入装置使用情况及正确性 3.询问对其他有效干预措施的依从性 4.检查并确认 COPD 行动计划（控制水平及治疗方案的变更）	

2.3 路径使用流程

首先，整体评估患者的药物使用和疾病控制，根据得分发现主要问题和次要问题，然后进入干预路径，对应干预项测评，发现具体问题，定向指导，再进行掌握度测评，最后制定随访计划，完成闭环管理（如图 6）。

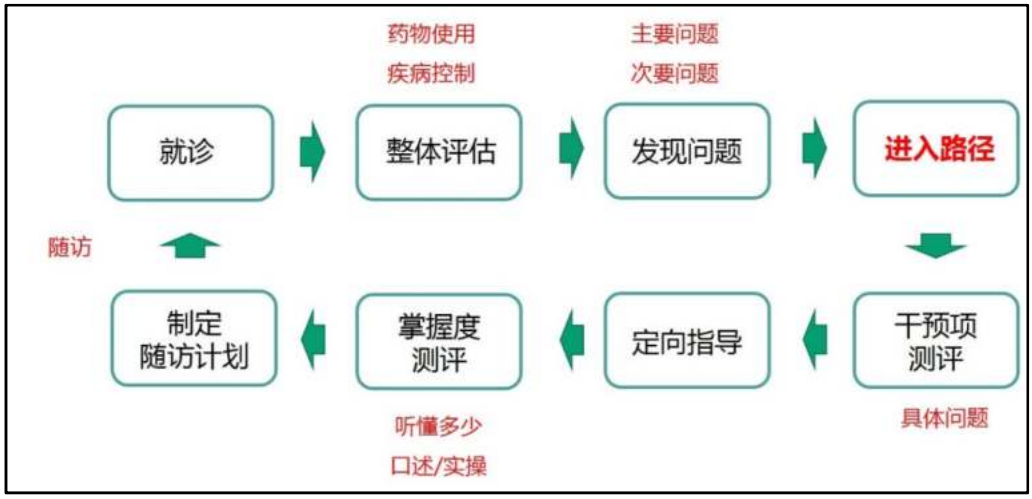


图 6. 慢阻肺患者诊疗流程

举例：当慢阻肺患者就诊时，我们先对其进行整体测评，如果发现患者自我管理维度欠缺，即进入自我管理项下的自我评估干预路径，测评肺功能，讲解日记记录的重要性，然后针对性的对其进行峰流速仪的使用指导、仪器掌握度测评（如图 7）。如果患者慢阻肺药物管理维度也存在问题，转到吸入剂干预路径下，对其进行吸入装置使用测评，发现漱口依从性不佳的具体问题，讲解漱口的重要性和漱口方式，提高患者漱口依从性（图 8）。如果患者吸烟，在健康教育干预路径下，我们会对其进行戒烟意愿、烟草依赖性评估，告知吸烟对疾病的危害，戒烟后潜在的戒断症状以及应对措施（图 9）。同时对患者进行饮食、运动的指导、肺功能的训练等。在跟踪随访维度下，和患者共同制定随访计划以及随访项目，让患者主动参与治疗管理（图 10）。

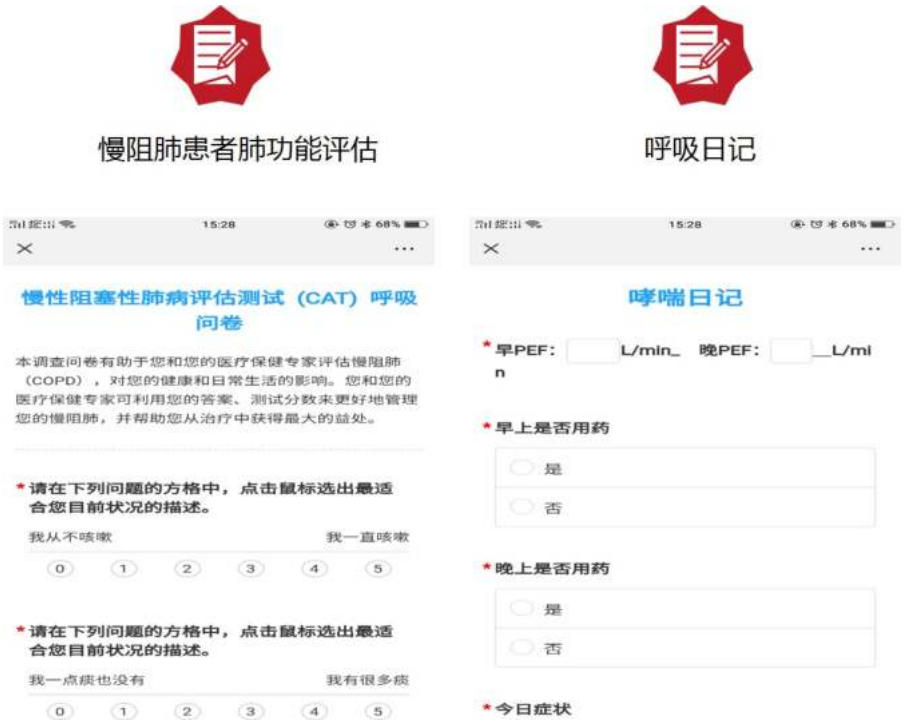


图 7. 慢阻肺患者自我评估科普干预



图 8. 慢阻肺患者吸入剂科普干预



图 9. 慢阻肺患者健康教育科普干预



图 10. 慢阻肺患者随访评估科普干预

2.4 管理体系

本路径设置了三位一体和四元融合的管理体系。三位一体即咳喘门诊、药学门诊、多学科联合门诊全方位管理；四元融合即医师、药师、护士、家属统一路径，同质化宣教。科普是主要的干预形式，分为线上和线下。线上，我们主要通过微信小程序管理患者的肺功能评估（如日记的打卡）、是否按时用药，视频教学。线下开展集中授课、药学科普进社区、随访评估（图 11）。

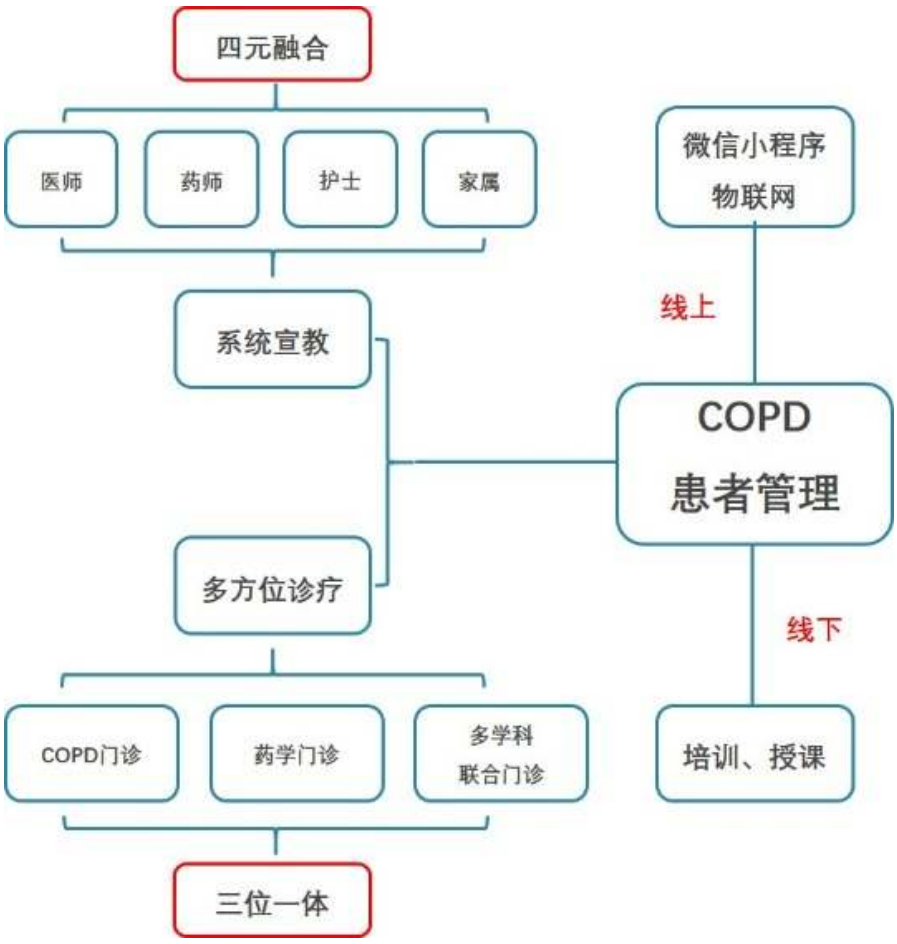


图 11. 慢阻肺患者药学科普管理体系

问题三：我到哪里去？

到患者中去。路径已经建立，效果如何，需要到患者中去实践，去检验，去丰富和不断完善。

3. “4+6 科普干预”路径实施

3.1 研究对象

我院呼吸内科确诊的 100 例慢阻肺患者。其中男性 72 例，女性 28 例。平均年龄 55.12±6.09。

3.2 研究方法

①入组：对 100 例慢阻肺患者进行吸入用药盲区筛查问卷测评（内容包括患者基本情况；疾病认知率；吸入剂操作；肺功能控制；用药依从性五部分），分析评估结果，从 100 例中按照入组标准，选取 76 人进行吸入剂临床干预研究（入组标准：确诊为 COPD 或 COPD 急性加重者，除外神志不清不能配合接受吸入剂指导或用药教育的患者）.

②**分组**：将 76 例患者随机分为对照组 37 例和科普干预组 39 例。

③**干预**：

对照组仅接受医师或护士常规的医疗服务，即向患者讲解药物吸入次数、吸入量、吸入时间和吸入方法等；

科普干预组在对照组基础上，通过“4+6 科普干预”管理路径进行干预，形式上采用线上和线下相结合。线上部分：问卷测评、观看视频操作、COPD 疾病视频讲解，在线咨询和解答；线下部分：定期组织疾病知识的讲座、操作的测评和示范指导，临床药师定期的随访（图 12）。

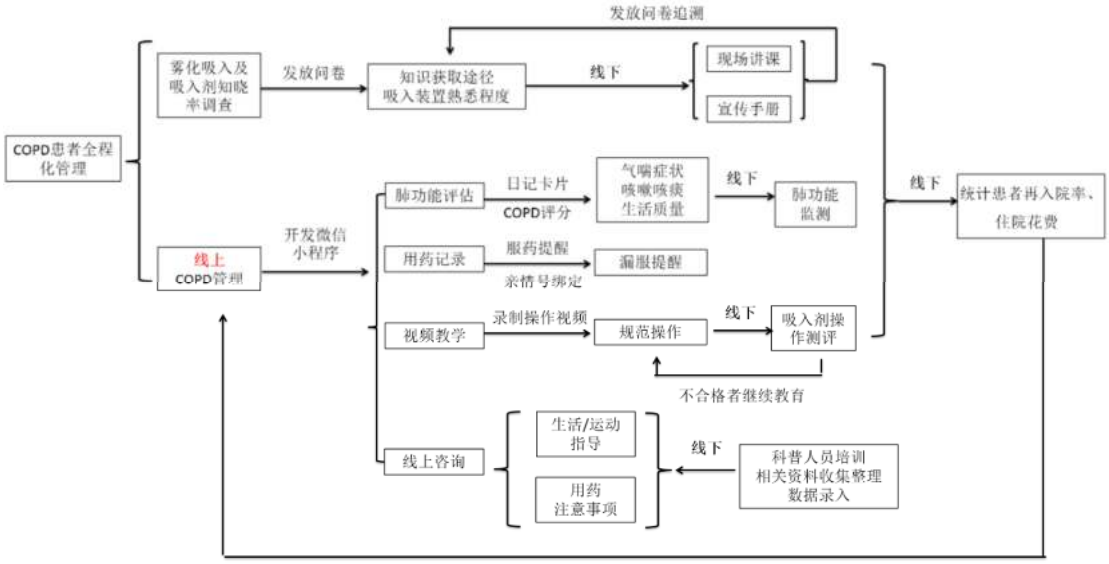


图 12. 慢阻肺患者分组科普干预流程

4.“4+6 科普干预”管理路径实施成效

从 2020 年 10 月份开始，我们采用 “4+6 科普干预”管理路径，对 76 名慢阻肺急性加重期的患者进行了分组对照研究，其中 39 人采用药学科普干预，结合线上-线下，以及咳喘药学门诊等多方位进行了管理。

经过 “4+6 科普干预”管理路径管理的患者，与普通干预患者相比，无论是吸入剂的操作熟练程度（表 2）、对疾病的认知（表 3），还是肺功能改善（表 4）、疾病控制（表 5）均显著提高。药物使用规范了，疾病得到了控制，生活质量获得提升，降低了医疗费用。

表 2. “4+6 科普干预”管理路径对患者吸入剂操作评分影响

项目	对照组		干预组	
	一般干预前	一般干预后	科普干预前	科普干预后
打开装置上药	2.50±0.63	2.69±0.48	2.41±0.62	2.82±0.39
呼吸调整	1.62±0.50	1.88±0.34	1.71±0.47	1.94±0.24
吸入药物	3.31±0.70	3.75±0.44*	3.11±0.78	3.94±0.24**
关闭装置	0.87±0.22	1.00±0.00*	0.85±0.23	1.00±0.00*
总得分	8.31±1.37	9.31±0.60*	8.01±1.25	9.71±0.48$^{**\#}$

*P＜0.05, **P＜0.01,干预后与干预前比较；$^{\#}P$＜*0.05,*科普干预后与一般干预后比较

表 3. “4+6 科普干预”管理路径对患者 COPD 疾病知识掌握情况影响

项目	对照组		干预组	
	一般干预前	一般干预后	科普干预前	科普干预后
COPD 疾病认知	4.87±1.45	6.00±1.46*	5.41±1.69	6.47±1.33*
药物使用方法	1.81±0.54	2.38±0.62*	2.00±0.50	2.47±0.51*
注意事项	2.31±0.60	2.68±0.48	2.35±0.49	2.82±0.53*
生活方式	1.18±0.40	1.50±0.52	1.18±0.39	1.88±0.33**
总得分	10.18±1.72	12.56±1.54**	10.94±1.85	13.64±1.26$^{**\#}$

*P＜0.05, **P＜0.01,干预后与干预前比较；$^{\#}P$＜*0.05,*科普干预后与一般干预后比较

表 4. “4+6 科普干预”管理路径对患者肺功能评估和症状评分影响

项目	对照组		干预组	
	一般干预前	一般干预后	科普干预前	科普干预后
FEV1 预计值	44.18±3.47	46.29±4.65	46.31±3.81	49.35±5.69
CAT 评分	22.65±4.36	20.06±2.41*	22.47±4.77	17.53±3.86*#

*$P<0.05$,干预后与干预前比较；#$P<0.05$,科普干预后与一般干预后比较

表 5. “4+6 科普干预”管理路径对患者疾病控制影响

组别	N	急发就诊人数	住院治疗人数	平均住院天数
对照组	37	19	10	8.44±1.75
干预组	39	12	7	5.76±1.29#

#$P<0.05$,科普干预后与一般干预后比较

5. 管理路径创新性

1）以科普干预为主导，构建并实施的创新型药学服务管理模式——“4+6 科普干预”管理路径，用患者能听懂的方式宣教，更贴近患者，更容易理解和接受，充分发挥了药师的作用；

2）方法创新，由点到线，再到面，以点作为辐射，上游和下游同时发力，消除管理盲区，实现药物治疗方案精准化。

3）技术创新，微信小程序，在线问卷测评，药师的服务更加信息化和多元化。

4）机制创新，以患者为中心，药师为纽带，实现了医、药、护、家属管理同质化。

6. 总结

通过“4+6 科普干预”管理路径的建立和应用，规范了慢阻肺患者药物治疗管理的药学服务标准，促进医师、药师、护士和家属形成同质化用药管理，进一步提升了患者的健康素养，加强疾病的控制，实现了院外和门诊患者药学服务的闭环管理，让更多的患者在“4+6 科普干预”管理路径中受益，是体现药学服务价值的有效方法。

参考文献

[1]陈亚红.2021 年 GOLD 慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗及预防全球策略解读[J].中国医学前沿杂志(电子版),2021,13(01):16-37.

[2]陈丽华,宋怡,何权瀛,莫莉.慢性阻塞性肺疾病患者多重用药现况及管理策略[J].中国呼吸与危重监护杂志,2021,20(05):362-365..

[3]中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组,中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2021 年修订版)[J].中华结核和呼吸杂志,2021,44(03):170-205.

[4]慢性阻塞性肺疾病互联网+健康管理的研究进展[J].世界最新医学信息文摘, 2018, 18(76):78+80.

[5]陆浩南, 郑则广, 刘妮,等. 慢性阻塞性肺疾病网络辅助诊疗平台的应用探讨[J]. 中国全科医学, 2016, 19(31):3799-3802.

[6]徐娟,王斌,陈维红.基于微信小程序的药学服务平台开发与应用[J].中国药物与临床,2019,19(14):2450-2451.

[7]刘岩.移动医疗在社区慢阻肺管理中的应用研究[J].实用临床护理学电子杂志,2020,5(03):72.

[8]陈蓓, 基于互联网的健康呼吸管理云平台的应用. 天津市,天津怡和嘉业医疗科技有限公司,2019-12-26.

[9]高红利,李素仙,高伟祺,陈维红.“互联网+手机 APP”的药学服务在 COPD 患者健康管理中的作用研究[J].药品评价,2019,16(06):3-5+12.

[10]盛玉青,王艳,房树华,于绍帅,陈昕晟,王娜.临床药师在药学科普活动中的作用[J].抗感染药学,2020,17(08):1223-1225.

[11]辛莉,邱凯锋.新媒体时代下医院药师药学科普传播能力提升[J].今日药学,2020,30(09):641-643.

[12]徐乐加,刘星菱,郑丹微,张平,黄际薇.“互联网+”模式下的线上药学门诊服务[J].现代医院,2021,21(09):1413-1415.

基于知识与数据双驱动的全覆盖药学科普体系构建与应用

张玮[1]，杨敏[2]

海南医学院第一附属医院，海南 海口 570100

海南省妇女儿童医学中心，海南 海口 570100

【摘要】目的：探索构建全覆盖药学科普体系的策略和路径，助力药师药学服务延伸。方法：剖析目前药师科普模式的不足，从内容精细化、服务标准化、输出多元化以及药师科普队伍建设制度化 4 个方面着手，构建药学科普体系的“盾”（做好科普）和“矛”（用好科普）。拟构建的科普体系中，“盾”包含科普选材（涵盖疾病的预防、发生和治疗三个阶段，内容细化到每一个具体的问题）、科普创作（包括 7 个原则+8 种形式）、科普能力评估（包括 4 个维度+20 个指标）和科普团队建设（三级药师质控制度）。“矛”包含 4 个药学服务场景和矩阵体系的搭建。结果：构建的药学科普体系，可以实现药师药学科普“放进去”和“取出来”的知识与数据双驱动。进一步使药学科普服务对象“看的懂、学得会、用得上”。结论：通过构建药学科普体系，实现药学科普服务覆盖各领域、各层级、各环节、各人群，提高合理用药水平，使药学服务精细化、同质化、有形化、价值可衡量，助力药师药学服务的转型和升级。

【关键词】药学服务；科普体系构建；科普传播；药师培训；

Construction and application of a full-coverage pharmacy science popularization system based on Knowledge and Data driven

Zhang Wei, Yang Min

The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University;Department of Pharmacy, Hainan Haikou 570100

Hainan Women and Children’s Medical Center;Department of Pharmacy,Hainan Haikou 570100

【Abstract】**Objective：** Explore the strategy and path of building a full-coverage of pharmaceutical science popularization system to help pharmacists extend pharmaceutical care. **Methods:** The deficiencies of the current mode of popularization of pharmaceutical science were analyzed, and the "shield" (good popularization of science) and "spear" (good popularization of science) of pharmaceutical science system were constructed from four aspects: fine content, standardized service, diversified output and institutionalization of popularization of science team of pharmacists. In the science popularization system to be constructed, "Shield" includes science popularization materials selection (covering three stages of disease prevention, occurrence and treatment, and the content is detailed to every specific problem), science popularization creation (including 7 principles +8 forms), science popularization ability evaluation (including 4 dimensions +20 indicators) and science popularization team construction (three-level pharmacist quality control system). "Spear" includes four pharmaceutical care scenarios and the establishment of matrix system. **Results:** The pharmaceutical science popularization system constructed can realize the dual drive of "putting in" and "taking out" of knowledge and data. Further make the pharmaceutical science service objects "Understood, learned and useful". **Conclusion:** Through the construction of pharmaceutical science popularization system, pharmaceutical science popularization services can

cover all fields, all levels, all links and all groups, improve the level of rational drug use, make pharmaceutical care refined, homogeneous, tangible and measurable, and help pharmacists to transform and upgrade pharmaceutical care.
【**Key words**】Pharmaceutical care; Construction of science popularization system; Science popularization and communication; Pharmacist training

1、背景

习近平总书记在全国科技创新大会上提出了“科技创新和科学普及是实现创新发展的一体两翼，要把科学普及放在与科技创新同等重要位置”的重要指示。国务院《“十三五”国家药品安全规划》中也提出了立体化科普宣传计划，以进一步增强人民群众安全合理用药的意识和水平。

2016 年国务院制定的《“健康中国 2030”规划纲要》，提出我国到 2030 年，实现全人群、全生命周期的慢性病健康管理。要实现这个目标，就需要为人民提供可持续性的、优质的医疗服务，而提高全民健康素养、普及医药学知识正是提供优质医疗服务的重要内容之一。

互联网的高速发展，使之成为了公众获得健康信息的主要媒介。但是，目前互联网上的健康信息鱼龙混杂，一方面，由于我国缺乏权威的健康信息服务标准.网络健康信息质量难以得到保障，存在着冗余、过时甚至夸大虚假信息的情况；另一方面，健康信息具有较强的专业性和复杂性，不具备医学教育背景的普通公众难以分辨，导致其在健康信息获取方面处于弱势地位，容易受到虚假、错误信息的误导甚至损害健康。

科普创作是科学工作者的使命，而药学科普创作更是宣传和践行合理用药的药学工作者的职责所在，属于专业性强，公众切身利益相关的领域。

2、药学科普现状

（1）科普内容：零散，规模小，不够系统化、标准化；只局限于用药，目标受众无法全面了解疾病整体知识；专业性强，药师和受众在医药学知识储备上的不对等性突出；

（2）科普输出：药学服务场景单一，缺少多维性和立体性；科普内容表现形式严肃有余、趣味性不足；文字为主，短视频等信息化手段运用欠佳；

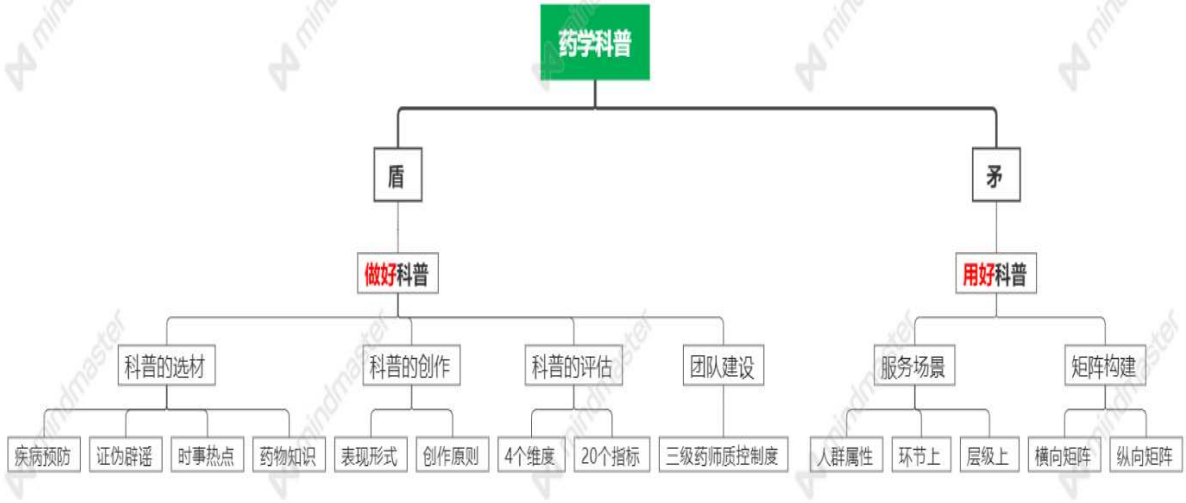
（3）科普队伍：药学科普人士缺乏；药师之间专业水平差异较大；创作可持续性不强，无偿创作居多，持续科普创作动力不足；科普创作的评价体系缺乏。

如何构建出一系列内容科学实用，贴近受众需求，使读者能够“看的懂、学得会、用得上，行之有效”，而且融"科学性、实用性、通俗性、思想性、艺术性、可读性、可操作性"于一体的医药学科普作品，是摆在我们药师面前的研究课题。

基于以上现状，我们拟构建一个全覆盖药师科普创作体系，实现知识与数据双驱动，使药师既能做好科普，同时又能用好科普。

3、药学科普的“盾”与“矛”——基于知识与数据双驱动的全覆盖药学科普体系构建

药学科普的“盾”与“矛”是做好科普和用好科普的结合。盾为守，是固本，需要搭建科普架构，层层有料，是为做好科普。矛为攻，是运用，拟在产生明显效果，得到服务人群的认可，是为用好科普；药学科普的“盾”与“矛”，一守一攻，两者相互结合，方可发挥最大效应。

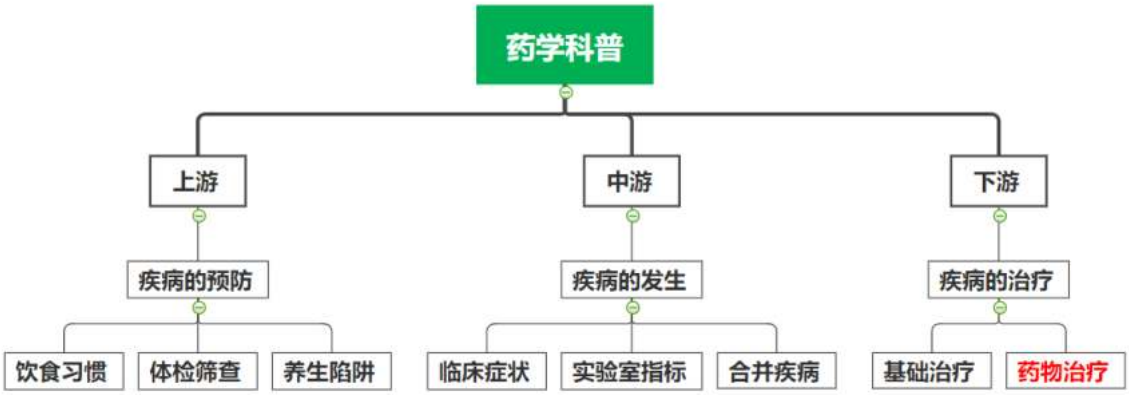


3.1 “盾”的体系构建

3.1 1 药学科普的选材

3.1.1.1 药学科普，不只局限于用药。

“未病先防，既病防变”，药学科普可以做很多延伸。药学科普包含上游（疾病的预防）、中游（疾病的发生）和下游（疾病的治疗），我们的药学科普重点不止局限于下游的药物治疗，上游和中游也可以是我们的科普阵地。



除了药物，我们还可以从 3 个方面取材：

第一，提升健康素养类。把握健康日契机，围绕公众所关心的健康问题，给予健康生活指导，宣传"预防第一，预防为主"的方针，加深人们对特定疾病的认识，提升人们健康意识，防患于未然。

第二，证伪辟谣类。宣传科学的诊断治疗疾病的方法，反对伪科学，让广大群众自身掌握常见病、多发病的临床表现，做好防治。

第三，时事热点类。聚焦突发公共事件，及时发出专业声音，对这些与医药相关的热点事件或舆论进行正确的引导，提高普通民众的医药素养。如“聪明药其实是精神药物”，“抗糖化面膜其实是交智商税”等。

3.1.1.2 药学科普，要细化到最小的问题。

WHO 提出用药安全 5 个关键时刻，即认识药品、服用药品、加用药品、检查药品和停用药品。通过药学科普，让患者充分了解用药安全的这 5 个时刻，是非常重要的，科普的知识点越细化，患者使用药物过程中安全性和有效性越高。



比如：“漏服，不是简单的一句：请不要在第二天加倍服用药物”，药物漏服不是药学科普的终点，而是下一个科普起点，漏服同样有深入拓展的空间。

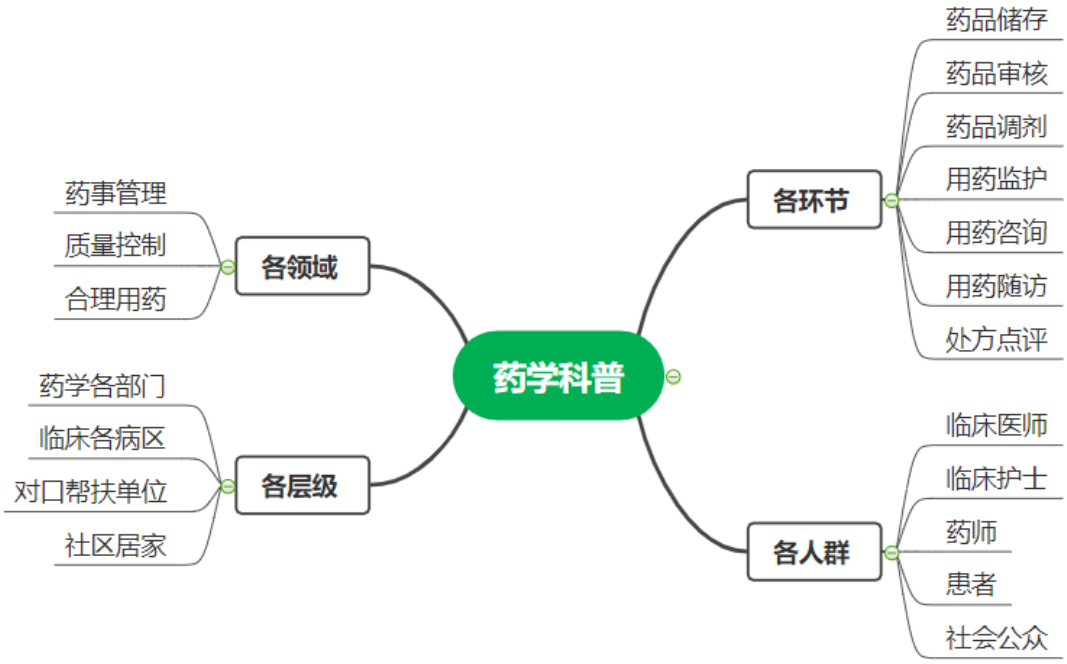


“从 1 到 100+”，患者提出的可能是一个小问题，而我们面对的可能是 100 个不同的患者，需要把一个问题拓展到 100+。发现问题，解决问题，进而在科普实践中不断补充到知识库中，提升药学服务质量。

3.1.1.3 药学科普，要从 4 个方面发力

以助力药师药学服务延伸为重点，药学服务体系需要覆盖各领域（药事管理、质量控制、合理用药等）、各层级（药学部各部门、各临床病区、对口帮扶单位、社区等）、各环节（储存、处方前置审核、处方调剂、用药监护与咨询、用药回访、处方点评等）、各人群（医师、护士、患者及社会公众）的各项管理制度，使药学科普

服务有章可循、有据可依。



3.2 药学科普的创作

3.2.1 药学科普创作，需要抓取独特视角。

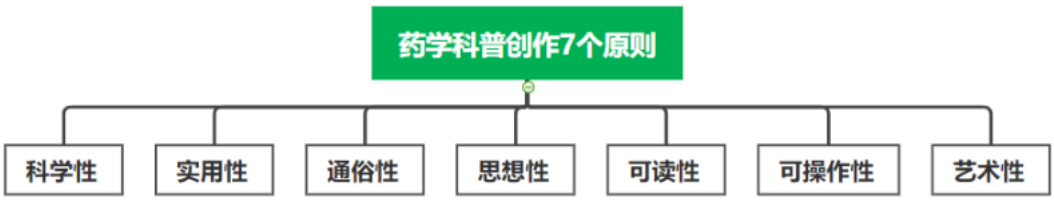
既要像望远镜，把遥远的似乎一般人不容易看清的事物拉近到眼前，让人惊讶于这么专业的事物原来是这么回事。譬如，国产和进口 HIV 疫苗的那些事。说明 HIV 疫苗的作用、分类、使用人群、价格差异以及使用注意事项等。

又要像显微镜，把我们身边的已经熟视无睹但有必须注意的事物放大十倍百倍，让人们明白原来用药问题含着丰富的科学原理。譬如，如何补钙的问题：一般人群每天的钙需求量是多少，摄入是否足够，什么人群需要补钙，有哪些钙剂可以补充，不同的钙剂补多少，补充时又需要注意些什么等。

选题不宜太大，把复杂的问题简单化，把简单的东西讲清楚。一篇科普文讲清楚一个科普点即可，药学科普才有指导意义。

3.2.2 药学科普创作的原则

药学科普创作需要讲究 7 个原则。



（1）科学性。科学性是医药学科普作品的生命，科普作品应基于最新的循证医学数据库或专业参考文献资料，药品说明书、指南、指导原则、专家共识都是科普的重要素材；对于科普作品的核心观点，应有质量较高的证据予以支持，尽量避免仅有专家意见或病例报告。恰当的证据选择有利于公众对健康科普信息的信任。不宜向公众发布未经临床研究证实的内容和医学界尚存争议的前沿研究内容。

（2）实用性。实用性是医药学科普作品存在的先决条件，要有实用价值。体现在作品上即所写的内容能否用来帮助人们防病治病，健康养生。医药学科普作品不应仅仅是被动的满足人们的需要，更应主动的给予人们科学的思维和方法，纠正防病、治病、保健强身领域里错误的思想，用案例来看待实用性，将人们导入科学的、文

明的、健康的生活方式。

（3）通俗性。通俗性是医药学科普创作的重要技法，要明确药师和受众在医药学知识储备上的不对等性。了解读者的接受能力，用他们熟悉的事物来比喻，用他们熟悉的语言来表达需要普及的医药学知识。尽量少用专门术语，化抽象为具体。创作人员也需要深入学习掌握医药学科学知识，才能深入浅出，使普及的内容融会贯通。

（4）思想性。思想性是科普作品的灵魂。医药学科普作品应从思想上影响读者，引导他们认识科学，通过医药学知识的普及来使人们理解、接受并学会运用。没有价值观传递的科普不具有价值。

（5）可读性。可读性是对医学科普作品写作和文字表达而言。具体要求作品层次清楚，逻辑通顺，可将医药学知识故事化，概念拟人化、卡通化；巧用网络词汇，增加科普作品趣味性。选题不要大了，篇幅不宜过长。

（6）可操作性。可操作性是指医药学科普作品不光是一般的知识普及，简单的介绍原理，而是将要普及的东西介绍的具体详尽，为读者提供切实可行的技术和方法，便于读者学习、掌握和应用。

（7）艺术性。使普通大众接受医药学专业科知识，须采用一定艺术表现形式，在不违背科学化的前提下，可以对文字做一些艺术化的处理，提倡使用文字与图片结合、动漫和短视频等新颖形式对公众发布科普内容。

3.2.3　药学科普创作的形式

以传统形式为基础，借助新媒介的传播优势，根据不同的科普受众，选择不同的科普创作形式。



3.3　药学科普的团队建设

采用三级药师质控制度：一级药师负责文案的撰写，二级药师负责文案的输出，三级药师负责文案的审核，逐级把关，确保药学科普作品的科学性和易读性。根据药师的药学专业特长以及擅长的创作形式，文案的撰写和输出又细化成了不同的创作小组，进一步提高了科普创作的质量。



3.4 药学科普的能力评估

按照“投入一产出一效果”的评价 w 框架，提出包括科普人员、基础设施、科普创作和活动组织 4 个维度、20 个指标的药学科普能力评价体系，指标选取既包括硬性指标，也包括软性指标。



4、“矛”的实践运用

4.1 药学服务场景

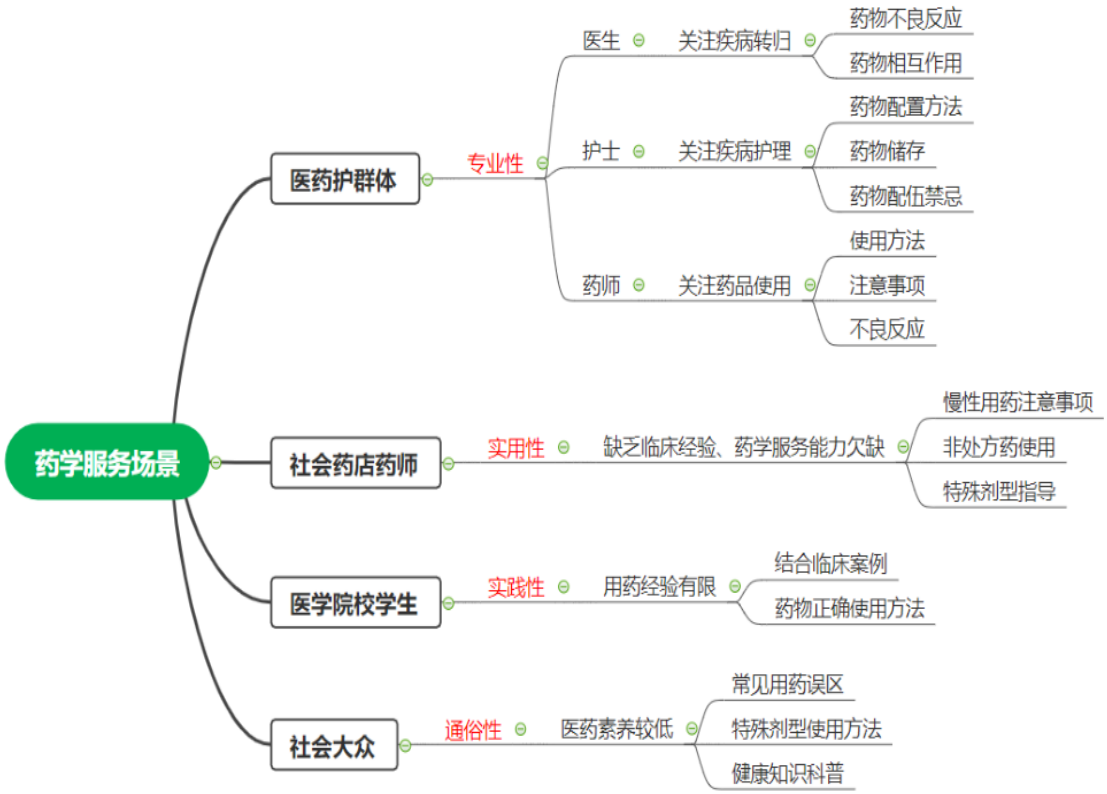
强化药学科普创作的受众导向，在保证内容具有科学性、易读性的前提下，还要兼顾不同类型的读者，使得科普精准有效。针对不同需求、不同医药素养的受众，药学科普作品还可以进一步精细划分，采取不同传播媒介、不同行文风格，实现精准传播。

1）面向医护等专业群体要突出专业性；

2）面向药店药师要突出实用性；

3）面向医学院校学生要突出实践性；

4）面向普通群众要突出通俗性。

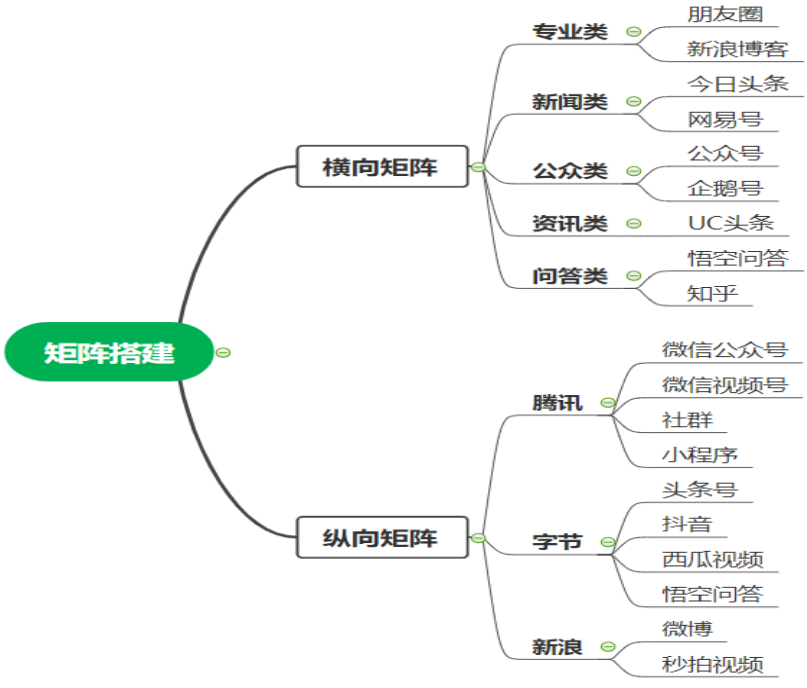


4.2 搭建矩阵体系

1）内容多元化。每个平台都有独特的内容风格，例如：公众号以图文为主，微博以 140 字内的短状态加照片为主，抖音以 15 秒到 1 分钟的视频为主。多平台建立账号，可以使内容形式多元化，吸引不同的受众群体。

2）分散风险。减少因平台波动带来的不确定性。

3）协同放大宣传效果。建立矩阵后，不同平台的用户及调性可以形成互补。



5、案例实践

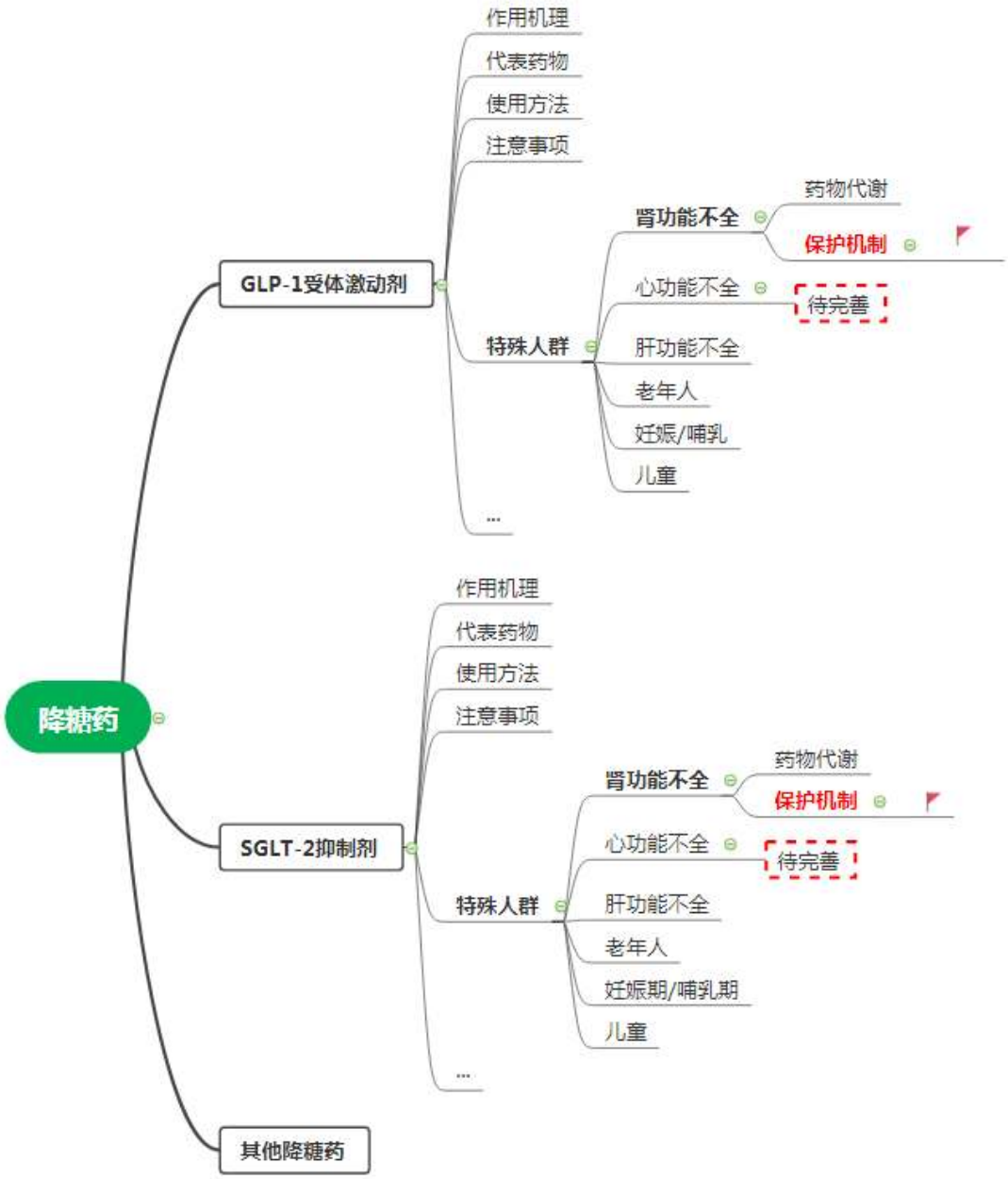
我们以糖尿病为例，通过临床药学实践，结合指南、疾病管理路径，构建了糖尿病药学科普体系模型，知识库不仅包含药物的使用，同时涵盖糖尿病相关的饮食、运动、监测、预防等元素，而且每一个元素都进行了至少三级的延伸（旨在将内容细化到最小点），药师通过科普体系模型，能够轻松找到科普点进行科普创作，并且在与患者互动过程中，不断发现新的问题，补充完善知识库数据。

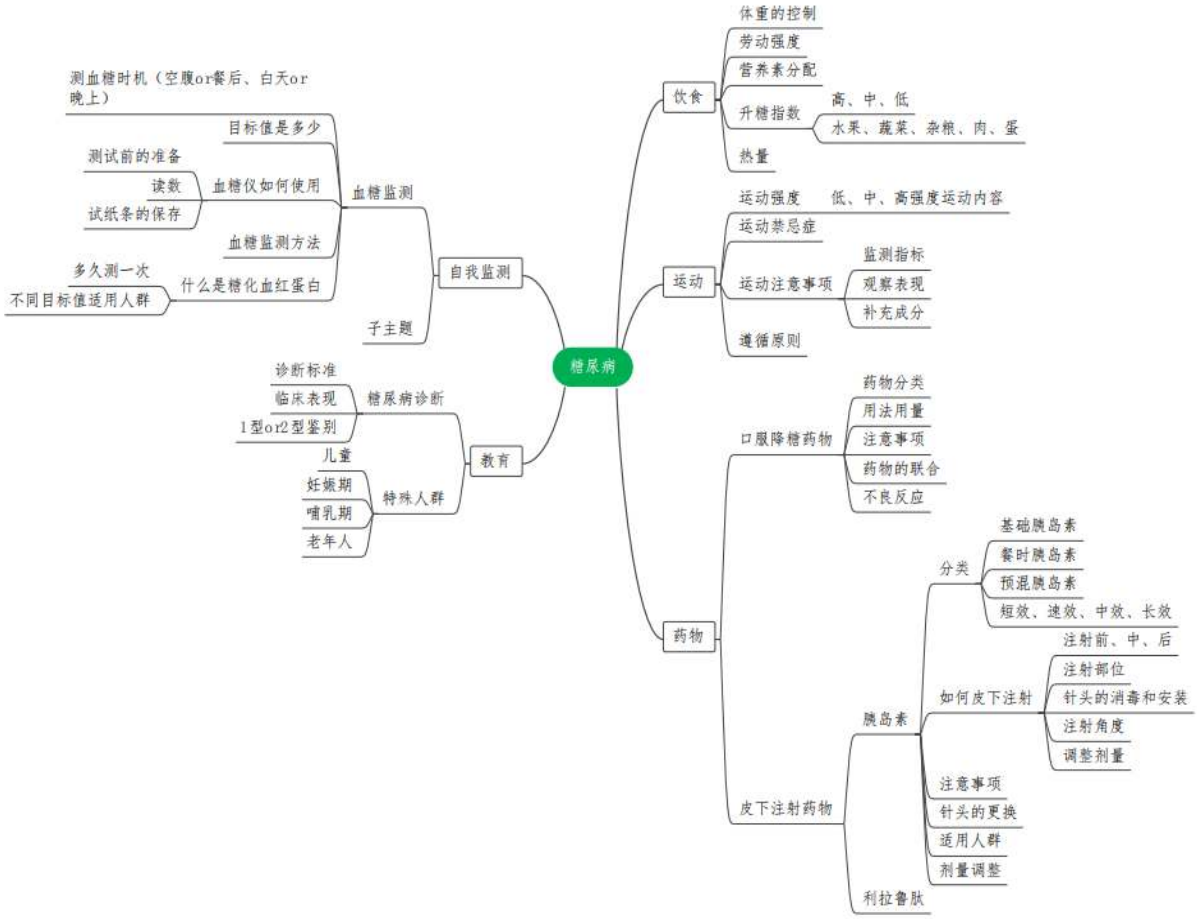
对于不同的服务场景，我们也可以很快的从数据库中检索到目标人群的关注点进行精准反馈。

如临床医生咨询 SGLT2 和 GLP-1 哪种降糖药对肾功能患者更好？药师可以直接从构建的科普体系中找到答案。

糖尿病——降糖药——SGLT2 和 GLP-1——特殊人群——肾功能不全人群使用特点——保护机制（小红旗处）；如果医生进一步咨询哪种药物对心脏保护更好？即作为一个新的知识点，通过循证补充到数据库中。

有了这样系统的、专业的、精细化的科普内容，大大促进了药师药学服务的质量和水平。药学科普服务有章可循、有据可依。实现了药师药学科普“放进去”和“取出来”的知识与数据双驱动。





6、展望

药学科普在提高民众医药素养方面发挥着重要的作用。一个优秀的药学科普工作者要学会从身边的案例和新政策、新问题中挖掘药学科普题材，一份优秀的药学科普作品必须同时具备科学性和易读性。药学科普创作者必须具备循证思维，对证据的选择要慎重、准确和明智，将专业知识与不同读者群体的需求及其医药素养完美结合，从而创作出科学易读的优质药学科普作品。

用好药学科普同样是药学服务模式的创新和延伸，搭建药学科普体系，针对不同的群体，能在第一时间准确定位药学科普知识点，借助新媒体，以图文、漫画、短视频、表演等形式，在不同的矩阵层级中输出，实现药师药学科普“取出来”和“传出去”的职业价值。

通过构建全覆盖药学科普体系，将“盾”和“矛”双向结合，实现药师药学科普“放进去”和“取出来”的知识与数据双驱动。“做好科普”使药师的药学服务精细化、同质化、有形化、价值可衡量；“用好科普”使药师的药学服务在各领域、各层级、各环节、各人群中发挥积极作用，提高合理用药水平，助力药师药学服务的转型和升级。最终实现服务对象“看的懂、学得会、用得上”，为探索新的药学服务模式与思路提供理论依据。

参考文献：

[1]龚银华,虞勋,杜娆,朱晔,钟文,许峰,陈喜东,吴斌,鲁广先,程宗琦.区域药学新媒体服务体系的构建与实践[J].中南药学,2022,20(01):230-234.

[2]杜宇,刘超,张敏.新冠疫情下构建我院互联网+合理用药的智慧药学服务平台的展望[J].中国现代医药杂志,2021,23(10):97-99.

[3]刘天一,侍晓萍,李中.我院信息化手段构建药学服务生态圈的实践[J].儿科药学杂志,2021,27(10):25-

27.DOI:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2021.10.008.
[4]张金,林琦,刘茂柏,杨木英.药学科普作品创作探讨——以福建医科大学附属协和医院药学科普团队作品为例[J].科普创作评论,2021,1(03):52-59.
[5]姜倩,李秦川,郭茜芮.基于德尔菲法构建“互联网+双向+游戏+科普”模式的药学科普交互平台[J].中国医院药学杂志,2021,41(19):2015-2020.DOI:10.13286/j.1001-5213.2021.19.17.
[6]苟静惠,刘松青,任燕,刘庆龙,李东炫,杜倩.基于熵权法-群决策特征根法的医疗机构药学科普能力评价研究[J].中国医院药学杂志,2021,41(17):1779-1784.DOI:10.13286/j.1001-5213.2021.17.15.
[7]王燕婷,戴媛媛,杨珺,董斌,贾贝,戚姝娅,乔涌起,李泰锋,李国辉.肿瘤药学科普创作的实践解析[J].中国医院药学杂志,2021,41(19):2011-2014.DOI:10.13286/j.1001-5213.2021.19.16.
[8]夏丹丹,潘灵莉,吴晓丽.精准化服务药学科普志愿者的需求和质量对策研究[J].中医药管理杂志,2020,28(19):186-187.DOI:10.16690/j.cnki.1007-9203.2020.19.087.
[9]辛莉,邱凯锋.新媒体时代下医院药师药学科普传播能力提升[J].今日药学,2020,30(09):641-643.
[10]宋敏,余靓平,杨帆,苏美琴,丁记者,温悦,欧阳华.药学科普志愿者的基本情况及专业素养现状调查[J].海峡药学,2020,32(08):226-229.

药师对重性精神病居家患者开展远程药学服务管理的效果分析

张玉良，陈桂根，徐孝荣，缪微微，申青

江苏省如皋市精神病防治医院 江苏 如皋 226500

【摘要】目的：探讨药师借助“互联网+重性精神病居家患者”模式（微信或微信群），对居家服药患者在线上、远程开展优质药学服务管理的实践效果。**方法：**随机选取就诊于我院精神科门诊的长期居家服药的重性精神病患者，计116例，在2022年2月-2023年1月一年间，药师对其中的58例作为对照组，采取常规窗口现场用药指导；对剩余的58例作为观察组，采取常规窗口现场用药指导之后，再开展持续远程优质药学服务管理指导，对比两组服务效果差异。**结果：**观察组在药师实施线上远程优质药学服务管理之后，患者不良反应发生后的处置率、对医嘱药物治疗方案的了解程度、对药学服务管理的满意度明显高于对照组；而患者治疗不合理用药发生率、患者病情加重复发率明显低于对照组，且P＜0.05，具有统计学意义。**结论：**药师借助“互联网+”模式，积极开展对重性精神病居家患者远程优质药学服务管理，可明显改善不合理用药情况，提高不良反应处置率，提升患者药学服务满意度，促进患者用药依从性、减少病情加重复发率等，值得药房、社会药店的药师借鉴推广、建议持续开展。

【关键词】互联网+患者　重性精神病　精准药学服务　长期居家服药　家庭药师

众所周知的，随着我国社会经济的持续发展，医疗技术水平也在不断地进步，老百姓对医技水平及服务质量的期望和要求也越来越高。如今，药品种类、规格、给药途径、药物制剂等等多种多样；药品作为一类特殊的商品，主要用途不外乎是治病救人，而药房是面向患者的主要服务窗口，药师如仅进行传统的窗口服务，就很有可能使得居家患者存在不合理用药的现象、或产生药物不良反应，得不到及时处置，不仅影响疾病的治疗进展与康复效果，还可能引发严重的后果、导致患者满意度下降。药师在窗口给患者配发完药品，并不意味着药学服务的全部完成。那么，如何提升药学服务质量管理内涵？怎样针对居家服药患者而延伸药学服务的“最后一米线”？这就成为了新时代药学工作者需要持续创新、探索的一门课题！为了提升精神病患者居家用药合理性、对医嘱治疗方案知晓率、药品不良反应处置率、及降低重性精神病居家复发率、提升药学服务管理质量，课题组药师借助“互联网+”模式，开展对重性精神病长期居家服药患者强化远程优质精准药学服务管理的实践探索研究，取得较好的效果。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选取前期就诊于我院精神科门诊的长期居家服药的重性精神病（主要指精神分裂症、严重精神障碍、病情控制不佳易发病致自伤伤人、易肇事肇祸、危害社会安全的）患者，共计116例，在2022年2月-2023年1月一年间，药师将其中58例作为对照组，对患者采取常规的窗口现场用药指导；对另外58例作为观察组，药师对患者采取常规窗口现场用药指导后，与之借助微信（和/或微信群）交流，开展持续跟踪、远程优质药学服务管理指导，对比两组效果差异。列入研究的116例患者中男性57例，女性59例，年龄最小者23岁，年龄最大者74岁，平均年龄为（45.28±12.63）岁；患重性精神病居家服药年限都在4年以上，最长61年，病程平均（29.41±10.73）年。将所有患者的一般资料应用统计学软件（SPSS 20.0版本）处理，P＞0.05，无统计学差异。对照**ICD-10,**研究对象所患疾病均符合精神疾病诊断标准，并将研究内容与目的都告知观察组的患者及家属、都明确表示自愿配合课题组科研工作 。

基金项目：江苏省南通市科技局民生课题：MSZ 21104

基金项目：江苏省南通市科技局（通科计2021-109号文件）基础民生课题

1.2 方法

对 58 例对照组的重性精神病患者，药师采取常规的窗口现场用药指导：在患者门诊取药时，依据处方告知居家服药的用法用量、常见注意事项、可能的药物不良反应、安全用药知识宣教、回答患者的用药咨询等等，即传统意义的窗口药学指导服务模式。

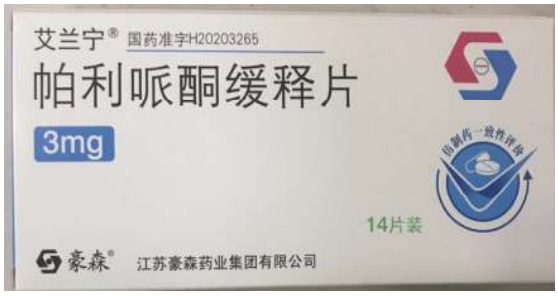
对 58 例观察组的重性精神病患者，药师除了同样采取以上的常规的窗口现场用药指导，同时征得患者或家属同意，与他们建立微信朋友关系，进行持续跟踪、借助“互联网+”模式，开展“点对点”优质服务、持续管理；也可征得患者或家属同意，搭建微信交流群，药师（也可邀请精神专科医生、护士、辅助检查技师等多专业志愿者加入）对患者及家属进行“点对面”互动，开展个性、和/或共性问题交流、强化落实医嘱、增加居家服药依从性，持续“远程”服务管理，替代家庭药师的部分职责功能，以弥补目前家庭药师人员不足、服务受限的缺陷，积极开通、延伸药学服务的“最后一米线”：

药师借助“互联网+”模式，对长期居家服药重性精神病患者(或家属)跟踪、随访，核实确认患者的疾病诊断、治疗方法；按照医嘱服药名称、规格、用法用量、给药时间的准确性；强调遵从医嘱、落实足量满疗程治疗的重要性和必要性；提醒患者增强服药治疗的依从性，以便提高效果、减少疾病复发；纠正个别治疗差错和不合理用药；提醒患者或家属切勿急于求成，自作主张增量、减量、停药缩短疗程；药师帮助患者分析用药合理性、让患者知晓治疗方案、告知患者不遵从医嘱治疗、导致病情加重、疾病复发而产生危害性。

药师借助“互联网+”模式，对长期居家服药重性精神病患者(或家属)宣传精神疾病相关的健康卫生知识、国家医药法律法规；转发或原创与精神疾病有关的保健科普文章、图片、视频影像等等，以提高患者及家属综合素质、减少患者不正确认识。例如有些患者对同一药品多个厂家生产的药品质量有疑问，只认准之前服用的厂家药品，药师在微信（群）里“科普”一下：不同厂家的同一药品质量相同的，都是通过国家药品监管部门进行质量“一致性评价”的，完全可以放心服用，让患者解除疑虑；例如某些患者通过药师在微信群里科普宣传，了解了法律法规对单次处方药量的规定及真正意图后，理解了医生为什么不同意患者一次性购买几个月甚至半年以上的药量，其实是为了预防药品不规范保存、便于患者定期复诊、及时发现不良反应、精准调整药量、完善治疗方案的。

（1）药师借助“互联网+”模式，方便解答居家服药重性精神病患者(或家属)的有关疑问：有些患者或家属取药回到家，就忘了、或看不懂、或不放心医生药师交代的服药剂量、使用方法等，通过微信询问，药师就运用文字、语音、视频等方法耐心解答，直到患者完全清楚满意为止。曾有患者对作为治疗精神疾病情感稳定剂的丙戊酸钠缓释片（喜复至，）的瓶盖不知怎么打开，微信询问药师，药师即刻微信视频、压下瓶盖逆时针旋转即可打开，反复示教，并且告诉患者该特殊设计是为防止小孩误服的，患者终于理解、学会；如有患者在服用治疗精神分裂症药物帕利哌酮缓释片（艾兰宁，）后，在大便里发现“原样药片”，怀疑消化道出现异常，很是惊慌，拍图片微信传来，药师微信告知：该药品是缓释剂型，特殊设计，药物有效成分在人体内从药片中间小孔缓慢释放，持续平稳发挥治疗作用，最终“空壳”原型随大便排出体外，纯属正常，不必惊慌；药师还将药片拍图编辑放大，微信传给患者，显示中间小孔，并将说明书相关内容截图发给他，让他释怀。







（2）药师借助“互联网+”模式，对长期居家服药重性精神病患者(或家属)提前告知某些药物的不良反应、如何处置，饮食配伍注意事项、药品贮存方法等，让患者对一些药物副作用早有心理准备、避免不正确饮食配

伍、不恰当贮存方法。告知患者既不要忽视药品说明书上列举的种种不良反应，也不要被说明书上的那么多不良反应所吓到，早了解、早预防、早处置。例如抗精神病药物氯丙嗪、利培酮等都可有少量的引起锥体外系反应（EPS），遵医嘱服用盐酸苯海索片可治疗；氟哌啶醇等常引起日光性皮炎，应避免皮肤裸露暴晒；氯丙嗪等可引起体位性低血压，提醒患者应该缓慢改变体位；奥氮平、齐拉西酮等抗精神病药物可致个别心率加快，心电图改变；氯氮平等药物可引起粒细胞数据下降、比例异常、肝肾功能变化，提醒患者经常到就近社区进行心电图、血常规、肝肾功能监测检查；发现药物不良反应，提醒就诊、及时处置，降低不良反应的危害性；微信嘱咐患者服药期间勿饮酒喝饮料，以防影响效果；该类药物常有嗜睡、失神、疲劳感，切忌驾车、高空作业等；微信提醒患者抗精神病药物、及配伍使用的抗焦虑失眠的二类精神药品等都要装柜加锁、规范保存，避光防潮，要定期整理家庭药箱，防止过期失效药品、确保居家服药安全、有效。

（3）药师也可邀请精神专科医生医技护理人员借助“互联网+”模式，对长期居家服药重性精神病患者(或家属)的就近医疗卫生单位的检查单进行线上解读，提出合理化建议，减少患者来回奔波。对患者手中的血常规、生化检查单、甚至心电图、CT、核磁共振、彩超等资料进行分析评估、病情 “会诊”，提出初步建议，供患者参考选择；发现“危急值”，提醒患者及时就诊，以免延误、失去最佳治疗时机；同时向患者家属宣讲居家照看、日常护理常识，提高患者生活质量。

总之，药师借助“互联网+”模式，对长期居家服药重性精神病患者(或家属)开展优质药学服务管理，借助微信、微信群、微信公众号平台等等方法途径，开展“互联网+患者”精准随访，了解病情状况、掌握患者心理动态；同时进行线上药学服务：推送精神科药学相关知识、信息、医疗保险政策、法律法规常识、国家优惠照顾政策，精神病健康卫生知识、居家照看、护理方法；提醒患者检查心脑肺肝肾等脏器功能、以及血压、血脂、血糖等生化检查，如有异常及时处置，随时跟踪关注患者病情进展、服药种类、服药依从性、治疗效果等；了解患者近期心理需求、解答患者提问、尽力解决患者实际困难等。并将患者居家用药后不良反应知晓处置率、患者对医嘱药物治疗方案的了解程度、患者不合理治疗用药比例、以及对药师药学服务的满意度、重性精神病加重复发情况，在观察组与对照组内进行问卷调查对比。

1.3 确定观察比较的指标项目

（1）对比两组患者不良反应发生后的处置率。（2）对比患者对医嘱药物治疗方案的了解程度。（3）对比两组患者存在治疗用药不合理例次。（4）对比两组患者对药师药学服务管理的满意度、（5）对比重性精神病复发例次。每项指标均设定量化评判标准细则。例如评价药学服务满意度的内容包括药学服务的有效性、即时性、服务的态度与质量等，每项内容分值为 0 分至 10 分，得分越高，说明药学服务管理质量越好，患者满意度越高，评价标准分为满意、一般满意）和不满意，前二者之和为服务满意度。

1.4 统计学分析

本次研究应用的统计学软件为 SPSS 20.0 版本，使用该软件分析所得数据，计量型数据用 $\bar{x} \pm S$ 表示，用 t 值检验；计数型数据用%表示，用 x^2 检验，分析计算后，得 $P<0.05$ 表示数据对比存在统计学差异、具有统计学意义。

2 结果

2.1 对比两组患者服药发生不良反应后的处置情况。

观察组不良反应发生后处置率明显高于对照组，对比差异显著，$P<0.05$，具体如表 1 所示。

表 1 不良反应发生后处置率对比[n（%）]（n=116）

组别	肝功能异常处置	血常规异常处置	血糖升高处置	其他 ADR 处置	ADR 发生后处置率%
对照组（n=58）	4	6	5	3	18（31.03）
观察组（n=58）	15	14	16	9	54（93.10）
X²值	-	-	-	-	4.5162
P 值	-	-	-	-	0.0381

2.2 对比两组患者对医嘱药物治疗方案知晓情况。

观察组患者对治疗方案知晓率明显高于对照组，说明用药依从性相对高，对比差异明显，具体如表 2 所示。

表 2 患者对医嘱药物治疗方案知晓率对比[n（%）]（n=116）

组别	知晓	一般知晓	不知晓	知晓率%
对照组（n=58）	17	19	22	36（62.07）
观察组（n=58）	33	22	3	55（94.83）
X^2值	-	-	-	5.1071
P 值	-	-	-	0.0365

2.3 对比两组患者存在治疗用药不合理情况。

观察组患者用药不合理情况明显少于对照组，对比差异明显，具体如表 3 所示。

表 3 两组患者存在用药不合理情况对比[n（%）]（n=116）

组别	药量错误	用药与诊断不符	用药重复	其他	不合理发生率%
对照组（n=58）	3	6	4	2	15（25.86）
观察组（n=58）	0	1	1	1	3（5.17）
t 值	-	-	-	-	4.6148
P 值	-	-	-	-	0.0263

2.4 对比两组患者对药学服务满意度情况。

观察组患者对药学服务满意度显著高于对照组，相比差异明显，P＜0.05，具体如表 4 所示。

表 4 药学服务满意度对比[n（%）]（n=116）

组别	满意	一般满意	不满意	满意度
对照组（n=58）	22	20	16	42（72.41）
观察组（n=58）	31	24	3	55（94.83）
X^2值	-	-	-	5.4318
P 值	-	-	-	0.0278

2.5 对比两组患者病情加重复发情况。

观察组患者病情加重复发率低于对照组，相比差异明显，P＜0.05，具体如表 5 所示。

表 5 患者病情加重复发对比[n（%）]（n=116）

组别/病情	加重	复发	稳定	加重复发率
对照组（n=58）	8	9	41	17（29.31）
观察组（n=58）	2	1	55	3（5.17）
X^2值	-	-	-	4.3852
P 值	-	-	-	0.0315

3 讨论

重性精神病患者症状多变、病情复杂，需要医生根据患者个体化病情使用药物治疗，若用药不合理、患者

依从性差，不仅不利于病情的康复，还容易出现不良反应，病情加重复发，严重者还会产生社会危害性、甚至危及患者生命安全，这就需要药师借助“互联网+患者”开展创新药学服务，远程针对居家患者的具体病情给予持续有效的用药指导，及时发现并纠正治疗方案中的不合理用药情况，避免对患者造成伤害，降低不良反应发生率，提高药学服务管理质量以及用药安全。

本次研究中观察组患者不良反应发生后的处置率、对医嘱药物治疗方案的了解程度、对药学服务管理的满意度明显高于对照组；而患者治疗用药不合理发生率、患者病情加重复发率明显低于对照组。

由此可见，药师是借助“互联网+患者”远程对重性精神病居家患者开展优质精准药学服务管理，可显著降低用药不合理情况、不良反应发生率，提高患者满意度，使得药师药学服务延伸至“最后一米线”，不仅更加贴近患者，充分体现药师专业价值，履行家庭药师的部分职能，而且更能体现新时代药师药学服务的深度、广度、和温度！值得借鉴推广、建议持续开展。

疏肝解郁胶囊联合帕罗西汀治疗居家抑郁症患者的效果分析

张玉良[1]，张怀玉[2]，申青[1]，陈桂根[1]，徐孝荣[1]

（1.江苏省如皋市精神病防治医院 226500；2.江苏省如皋市博爱医院 226500）

【摘要】目的：分析单用帕罗西汀、与疏肝解郁胶囊+帕罗西汀联合治疗居家抑郁症患者的疗效差异。方法：随机抽选 62 例长期居家服药、治疗效果不佳的焦虑抑郁症患者，将其分为观察组、对照组，各 31 例，对照组给予帕罗西汀治疗，观察组给予疏肝解郁胶囊+帕罗西汀联合治疗，治疗前后均开展家访，电话、微信随访、线上线下问卷调查，比较两组差异。**结果：**观察组生活质量评分、患者满意度、服药依从性、患者病情好转稳定率明显高于对照组，且 HAMD 评分明显低于对照组（P<0.05）。**结论：**居家抑郁症患者实施疏肝解郁胶囊+帕罗西汀联合治疗，能够有效减轻患者抑郁程度，提高患者服药依从性，从而改善患者生活质量、心理认知功能，增加对医务人员服务的满意度和病情好转稳定率，值得推广。

【关键词】疏肝解郁胶囊；帕罗西汀；居家抑郁症患者；心境障碍；心理认知功能

近一阶段以来，随着人们生活、学习、工作压力的不断增加，抑郁症（Major Depressive Disorder，MDD）患病率有逐年上升趋势。本病是常见的精神疾病之一，属于心境障碍、焦虑、抑郁障碍的主要类型。目前，临床对 MDD 发病根本因素尚未完全清晰，可能与患者生活经历、心理、生物刺激、社会环境等多种因素存在密切联系。常见症状可表现为兴趣减弱、情绪低落、焦虑多疑、认知功能下降等，若未予以及时有效的针对性治疗、控制病情恶化，患者可产生悲观厌世的扭曲心理，进而诱发自杀、伤人等行为、甚至迁怒医务人员、严重影响患者对医务人员的服务满意度。故而我们应该高度、严格重视 MDD 的规范治疗与预防，开展线上线下跟踪服务管理、积极消除其负面情绪，提高治疗效果质量就显得十分关键。但临床研究发现，MDD 病程一般较长，若长期使用单一抗抑郁药物，极易诱发不良反应，且存在一定的治疗局限性，进而影响患者治疗依从性[1]。在抗抑郁药物的基础上配合中成药疏肝解郁胶囊，能否有效弥补单一用药的局限性、降低药物不良反应？是否可有效减轻神经功能损伤，淡化抑郁程度、提高患者服药治疗依从性、改善其生活质量、认知功能、和对医务人员服务的满意度、提高患者病情好转稳定率？鉴于此，我们科研团队选取居家 MDD 患者，分别应用疏肝解郁胶囊联合抗焦虑抑郁药物帕罗西汀治疗、与单用帕罗西汀治疗进行效果量化分析，现报告如下：

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机抽选 62 例前期在我院精神专科门诊治疗、长期居家服药、效果不佳的抑郁症患者，将其分为对照组、观察组，各 31 例，在 2021 年 6 月—2022 年 1 月期间，对照组给予盐酸帕罗西汀片治疗，观察组给予疏肝解郁胶囊+帕罗西汀联合治疗。男女比例两组分别为：15:16、17:14 例，年龄分别为 20—65 岁、19—63 岁，均值分别为（41.62±4.91）岁、（42.85±4.73）岁，两组患者的一般资料、基础信息没有明显差异、无统计学意义（*P*>0.05）。

1.2 方法

对照组 MDD 患者仅给予盐酸帕罗西汀片（商标：万生力乐、北京福元医药生产，国药准字 H20133084，规格：20mg）治疗，剂量：20mg/次，1 次/天，清晨口服。观察组在上述服药基础上，再予以疏肝解郁胶囊（商标：康弘，四川济生堂药业有限公司生产，国药准字 Z20174037，规格：0.36g）治疗，剂量：0.72g/次，2 次/天，早晚口服，其中每天早晨帕罗西汀与舒肝解郁胶囊两种药物服用间隔>1 小时；治疗期间可依据患者病情、

基金项目：江苏省南通市科技局（通科计 2021-109 号文件）基础民生课题

课题名称：基于微信平台开展重性精神病患者远程服务管理的实践研究　课题编号：MSZ21104

抑郁程度，适当调整药物剂量[2]。两组患者均维持治疗 6 个月以上，每两个月至少随访一次，采用家访、或电话、微信等途径，借助语音、视频等多形式进行随访交流、线上线下开展跟踪服务管理、宣讲精神疾病健康心理知识；参考和应用汉密顿抑郁量表（HAMD）、美国研究健康调查表（SF—36 量表）、医疗服务满意度问卷、Morisky 用药依从性问卷(MMAS-8)等，制作、发放、收取调查问卷，线上线下详细了解患者病情发展状况、生活质量、对医疗服务的满意度、按医嘱服药治疗的依从性等，统计资料、量化数据，分析两组患者治疗的效果差异[3]。





1.3 确定评判指标项目

（1）在两组 MDD 患者治疗前、治疗后 3 周左右、之后每隔两月，应用汉密顿抑郁量表（HAMD）进行评估，HAMD 评分量化主要包括入睡困难、疑心病、抑郁情绪、精神焦虑、神经症状、体重增减程度等方面，总分以<7 分为正常，7—17 分为可能抑郁，18—24 分为肯定存在抑郁，>24 分为严重抑郁；同时应用国际通用的美国研究健康调查表（SF—36 量表）量化评价患者生活质量，主要包含躯体功能、心理功能、社会功能 3 项目，总分 0—100 分，评分越高，生活质量越好，分数与生活质量成正比[4]；

（2）每隔两月对两组患者进行医疗服务满意度问卷调查，评价医务人员线上线下跟踪服务满意度，内容包括患者认为医疗服务的有效性、即时性、服务的态度与质量等，每项内容分值为 0 分至 10 分，得分越高，说明患者满意度越高，间接反应了患者抑郁症状的改善、正确的心理认知是非判断功能的恢复程度高。评价标准分为满意、一般满意）和不满意，前二者之和为服务满意度；

（3）参考 Morisky 用药依从性问卷(MMAS-8)，设定本次依从性研究调查表，问卷调查表内容包括：①今天您是否忘记按时按医嘱服药了吗？②在过去的 1 周内，您是否有一次或几次忘记服用抗焦虑抑郁药？③)您 1 周前是否存在过有时忘记服药的现象？④您是否觉得坚持按医嘱服药治疗有困难吗？⑤治疗期间，当您觉得焦虑、强迫、抑郁症状加重或出现其他症状时，您是否在未告知医生而自行减少药量或停止服药？⑥当您觉得自己的焦虑抑郁症状已经得到控制时，您是否停止过服药？⑦当您外出旅行或长时间离家时，您是否有时忘记随身携带药物？⑧您觉得按时足量服药很困难吗？其中①-⑦题的备选答案为"是"、“否”，回答“是"记 0 分、回答“否”记 1 分；第 8 题备选答案为“从不”、“偶尔”、“有时”、"经常”、"所有时间”，在这五项中选一项，分别记 1 分、0.75 分、0.50 分、0.25 分和 0 分。量表满分为 8 分，得分<6 分认为依从性差，得分 6-8 分认为依从性良，得分 8 分认为依从性好[5]。

（4）本次研究结束后，全面评估患者焦虑抑郁疾病的治疗效果，比较观察组、对照组患者病情好转稳定率。

1.4 数据统计学处理

本次研究数据采用 SPSS （21.0 版） 软件统计分析，符合正态分布的计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间统计数据比较采用 t 检验；计数型数据用%表示，用 x^2 检验，均以 P<0.05 认为差异显著，具有统计学意义。

2 研究结果

对照组与观察组 MDD 患者在治疗前的生活质量、HAMD 评分量化数据比较，均无显著差异（P>0.05）；给予两种不同的治疗方案治疗后，观察组患者的生活质量、HAMD 评分；患者对医疗服务满意度、患者对医嘱用药治疗方案依从性、患者病情好转稳定率，均明显优于对照组患者（P<0.05），分别见表 1、表 2、表 3、表 4。

表 1 两组 MDD 患者生活质量、HAMD 评分比较（$\bar{x}\pm S$，分， n=62 ）

组别	生活质量		HAMD 评分	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组（n=31）	65.86±9.86	92.41±9.82	16.38±4.72	7.26±4.06
对照组（n=31）	66.03±10.28	74.53±9.18	16.17±5.48	12.73±4.69
t	0.024	4.769	0.073	6.185
P	0.863	0.002	0.815	0.002

表 2　两组 MDD 患者对医疗服务满意度对比[n（%）]（n=62）

组别	满意	一般满意	不满意	满意度 n（%）
观察组（n=31）	20	8	3	28（90.32）
对照组（n=31）	10	14	7	24（77.42）
X²值	-	-	-	4.2618
P 值	-	-	-	0.0286

表 3 两组 MDD 患者医嘱用药依从性对比[n（%）]（n=62）

组别	依从性差	依从性良	依从性好	依从性良好率 %
观察组（n=31）	3	12	16	28（90.32）
对照组（n=31）	9	16	6	22（70.97）
X²值	-	-	-	4.1946
P 值	-	-	-	0.0381

表 4 两组 MDD 患者病情好转稳定率对比[n（%）]（n=62）

组别	加重/未好转	好转	明显好转稳定	好转稳定率 %
观察组（n=31）	2	14	15	29（93.55）
对照组（n=31）	8	13	10	23（74.19）
X²值	-	-	-	4.3852
P 值	-	-	-	0.0305

3 讨论

近几年来，随着我国社会经济快速发展，各年龄段人群的工作、学习、生活压力都随之上升，加之不同年龄群体之间理念、思想等存在“代沟”、有较大差异，在自身、家庭、社会、环境等多种内外因素干扰下，使得 MDD 患病率逐年上升、且发病呈年轻化、易复发、难治愈的发展趋势。前期，医疗行业已将焦虑、强迫、抑郁症等归纳为精神系统疾病，属于常见的精神障碍类型。

帕罗西汀为临床 MDD 常用治疗药物，它是一种选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(简称 SSRIs)，通过抑制突触前膜对 5-羟色胺的再摄取，增强中枢神经系统中 5-羟色胺能的作用，从而发挥其药理效应。帕罗西汀主要的作用有：1、治疗各类的抑郁症，包括伴有焦虑的抑郁症和反应性抑郁症。常见的症状为睡眠障碍，对日常生活缺乏兴趣、乏力、食欲减退等。2、治疗强迫症。常见的强迫症状包括反复持续的，可引起明显焦虑的思想冲动或者想象，从而导致了重复行为或者心理活动。3、治疗伴有或不伴有恐怖的惊恐障碍，常见症状为惊恐发作、心

悸、出汗、胸闷、胸痛、麻木感以及濒死感等。帕罗西汀凭借其选择性作用于体内活性物质 5-HF 优势，已在临床得到广泛应用，具有抗焦虑抑郁作用显著、生物利用度高、口服后吸收良好、药物血液浓度半衰期长（T½ 达 24 小时，故而每天清晨口服一次即可）等特点。但临床研究也发现，若患者病期较长、病情严重，需要加大服药剂量、长时间持续用药；但是渐渐地，疗效也会“钝化”、减弱，产生一定的局限性，且易诱发不同程度的并发症和药物不良反应，可能直接影响部分患者胃肠正常功能，如出现恶心、厌食、腹泻等，造成肠胃刺激，进而降低患者服药治疗依从性，患者出现自行减药、停药、中断治疗现象，导致焦虑抑郁症复发、加重、心理扭曲、延长疗程、错失治疗时机[6]，同样的引起患者心理评判认知功能下降，转而对医疗服务的不满意。而疏肝解郁胶囊其以贯叶金丝桃、刺五加等中药为主要成分，具有健脾安神、疏肝解郁等作用，适用于轻、中度单相抑郁症属肝郁脾虚证者，症见情绪低落、兴趣低下迟滞、入睡困难、早醒、多梦、紧张不安、急躁易怒、食少纳呆、胸闷、疲乏无力、多汗、疼痛不适等[7]。通过临床实践，应用疏肝解郁胶囊联合帕罗西汀的治疗方案，则能够弥补、规避上述帕罗西汀临床治疗中出现的的缺陷，降低药物不良反应，提高患者执行医嘱方案的配合度和依从性，进一步强化抑郁症的治疗效能、使得患者渐渐恢复正确的判断认知功能，呈现良性上升的治疗效果。

本次研究发现，观察组患者生活质量评分明显高于对照组；HAMD 评分明显低于对照组；患者对医疗服务的满意度显著增加；患者按医嘱服药治疗依从性上升；患者病情好转稳定率较大提高，进一步证实了居家 MDD 患者应用疏肝解郁胶囊+帕罗西汀联合治疗，具有医学合理性、药理互补性。

综上所述，应用疏肝解郁胶囊+帕罗西汀联合治疗 MDD,可获得满意疗效，值得临床借鉴及推广。

参考文献

[1]刘翠霞；中西医结合治疗支气管哮喘寒哮证的临床观察　《云南中医中药杂志》；2017-11-27

[2]戴秀娥；心理干预与抗抑郁药物辅助治疗对于功能性消化不良患者生活质量的影响分析　《心理月刊》；2018-11-30

[3] 张玉良　药师运用微信参与治疗方案制定促进合理用药的实践　健康大视野　2020-7-13

[4]程晟；小剂量利尿剂治疗慢性心力衰竭的效果观察　《医药前沿》；2021-03-05

[5]陈强、曲珊珊、黄欣，中文版 MMAS-8 评价心血管慢病患者用药依从性的信效度分析与实践，中国药房，2019 年第 30 卷第二期

[6] 盐酸帕罗西汀片（北京福元医药生产，国药准字 H20133084）说明书，2013-02-22 核准、2019-11-22 修订。

[7] 疏肝解郁胶囊（四川济生堂药业有限公司生产，国药准字 Z20174037）说明书，2017-09-12 核准、2021-07-01 修订。

药师基于 PK/PD+TDM 理论在药物超常量治疗老年精神病的应用实践

张玉良

江苏省如皋市精神病防治医院　226500

【摘要】目的：探讨基于 PK/PD（药物代谢动力学与效应动力学）理论+TDM(治疗药物监测)数据，药师参与精神科居家患者病情讨论，在患者个体化精准药物治疗中的应用效果和价值。**方法：**运用溯源法，回顾一例精神病患者在居家药物治疗期间，药师借助微信、向患者（家属）线上讲解 PK/PD 理论，依据 TDM 监测数据所处该药物治疗血液浓度安全范围区间位置，建议医师大胆而谨慎予以抗精神病药物奥氮平短期内超说明书常规药量（低于药物治疗极量）治疗、控制患者精神病症状的效果分析。**结果：**药师基于 PK/PD 理论+TDM 数据，根据监测数据所处该药物治疗血液浓度安全范围区间位置、结合该患者既往病史、身体状况、精神症状、治疗过程，建议医生大胆而谨慎予以奥氮平短期内超说明书常规药量治疗（低于药物治疗极量），控制患者精神病症状，治疗效果明显好转。**结论：**药师基于 PK/PD 理论+TDM 在精神科个体化精准药物门诊治疗中，效果明显，具有实用价值，并且可以正确、准确、客观评判医师给予患者“超说明书”用药的治疗方案的合理性，在后期的医嘱处方点评中具有重要的支撑价值，对居家患者、住院病人均可适用推广。

【关键词】PK/PD 理论　治疗药物监测　精准药物治疗　个体化给药　居家服药

众所周知，医师诊断患者疾病，予以药物治疗，仍然是当前和今后很长一段时间的治病的主要手段或方法。至于医嘱每一位患者治病服药剂量的大小，能否做到精准个体化、动态调整，则至关重要。这不仅是关乎患者个体治病的安全有效性、经济舒适感，也是关乎家庭甚至社会和谐、健康中国、持续发展的大事！但是，目前患者治病服药剂量主要还是由医师根据病情作出诊断、结合医师个人和医疗行业多年临床经验、在药品法定说明书上的大众化的安全有效用药剂量范围内选定，难以避免地存在着考虑不周、评判误差、量程自由、以及存在相对谨慎保守、自我保护思想的情况，不能做到精准个体化足量动态调整用药，从而增加治疗费用，延迟治病疗程，影响了患者治疗效果和生活质量。

近年来基层医疗机构也已经积极开展治疗药物监测（TDM）,药师和医生可以借助 PK/PD 理论，依据“机体-病因-药品”三者在人体内相互动态关系（见图 1），准确掌握特定患者服药后某一时点某种药物血液浓度、恰当分析此浓度所处该药物安全有效范围的区段，从而心有底气地准确足量、甚至适当超出药物说明书的常规剂量上限、动态调整药量，以便及时恰当治疗疾病；同时也让药师和医生在事后处分点评中，能准确评判医嘱给药剂量、即患者治疗方案的正确有效适宜性。

PK 指 Pharmacokinetics,即药物代谢动力学，指体内药物浓度与时间的关系,定量描述所给剂量下体液药物浓度的变化过程，包括药物在体内吸收、分布、代谢、排泄的动态变化过程;PD 指 Pharmacodynamics 即药物效应动力学[1]。体内药物浓度与作用效应强度的关系（见图 2）,代表药物对机体病因产生的治疗作用和不良反应。pk/pd 参数可更准确的反映药物在体内治疗作用的动态过程，根据 PK/pd 理论+TDM,制定给药方案，可有效提高病因控制清除率、促进临床治疗效果、防止耐药产生。

近期，我们药师借助 PK/PD 理论+治疗药物浓度监测（therapeutic drug monitoring,简称 TDM），给予超常规药量成功治疗了多例精神病患者，现列举一例报告如下：

1.病例资料：

患者黄某某，门诊号 2020***0735，男，65 岁，已婚。患者 48 年前受惊吓后出现精神失常，在南通某精神病医院住院治疗，诊断为“精神分裂症”，病情好转后出院后长期居家服药。但是患者服药不规则、依从性不高，反复发病、病情变化。先后使用氯丙嗪、利培酮、碳酸锂、齐拉西酮、奥氮平片等药物及无抽搐电休克等治疗，效果一般，心肝肺肾等脏器功能正常、无其他躯体疾病。

2.治疗过程：

患者长期患精神病，对照 ICD-10 诊断为“双相情感障碍、目前伴有精神病性症状的躁狂发作”，近期予以奥氮平（江苏豪森药业）、丙戊酸镁缓释片（湖南湘中药业）口服，居家治疗，遵从医嘱，依据病情变化，家属渐次给患者调整药量分别至奥氮平 20mg/日、丙戊酸镁缓释片 1.0g/日，均分两次服用。

某日，药师借助微信回访家属，询问患者病情状况，家属反映患者近日精神症状渐渐严重，时常反复。查阅患者门诊电子病历，且家属也确认，该患者服用奥氮平片用量多日已达说明书常用药量（2.5-20mg/日）范围的上限。药师借助微信建议家属带患者来医院就诊。次日药师参与了该患者治疗方案讨论：综合考虑患者年龄、体质、病情、前期治疗过程等因素，在不宜更换其他药物治疗的情况下，借助 PK/PD 理论，遂建议监测患者现阶段奥氮平的血液药物浓度，根据检查结果来确定是否调整治疗方案。医师采纳、医嘱采血送检。经杭州佰辰医学检验所有限公司采用国际领先的 UPLC-MS/MS 技术检测的报告显示：该患者奥氮平血液药物浓度为 38.04ng/ml,（见报告单图 3）而奥氮平治疗精神疾病有效安全范围为 20.00-80.00ng/ml，仍处于中间偏下（见奥氮平血液浓度安全范围折线图 4）。

能否给予患者短期内超说明书常用药量治疗呢？

药师与医师等讨论评估、结合患者既往病史、目前病情、本次药物浓度检测结果，依据 PK/PD 理论，及奥氮平法定说明书相关内容、考虑到患者心脑肝肾功能状况良好，建议将患者每日服用奥氮平剂量调整为 25mg、分两次服药 ，丙戊酸镁缓释片用量暂不做调整，经上级医师和医务科同意执行；嘱咐家属密切关注患者病情变化、注意药物不良反应，十天后来医院复诊、药师线上跟踪回访。3.治疗结果：

十天后，患者来复诊，药师参与治疗方案完善交流，相关监测检查发现该患者近期精神症状较前期明显好转，没有明显药物不良反应，心脑肝肾功能血液生化跟踪检查正常，患者社会生活自理功能有所恢复。药物浓度检测报告显示：奥氮平 63.48ng/ml（安全有效范围 20.00-80.00ng/ml）、丙戊酸 80.65ng/ml（安全有效范围 50.00-100.00ng/ml）（见图 5）,均居中偏上（见图 6），经讨论综合评估，认为目前治疗方案应该安全有效合理，暂予以维持、并密切观察；后期治疗药量依据患者病情变化、功能恢复进展、血药浓度监测、心脑肝肾功能血液生化检查结果又作了动态调整、适时减量至 20mg/日及以下，于十多日后病情稳定好转，继续巩固治疗。

3.讨论分析：

治疗药物监测（TDM）是一门新兴的临床药学分支学科，在临床治疗中，TDM 通过高灵敏性的现代分析技术，对患者体液样本中药物及相关活性代谢物的浓度进行定量分析，以 PK/PD 理论即药代学和药效学理论为指导、解释血药浓度体内动态线性变化规律，结合临床指标，确定某药物安全有效治疗浓度范围，从而个体化动态调整患者药物治疗剂量，确保用药安全足量有效，又避免药物毒副反应，为临床治疗个体化足量、足疗程、精准用药提供可靠依据。

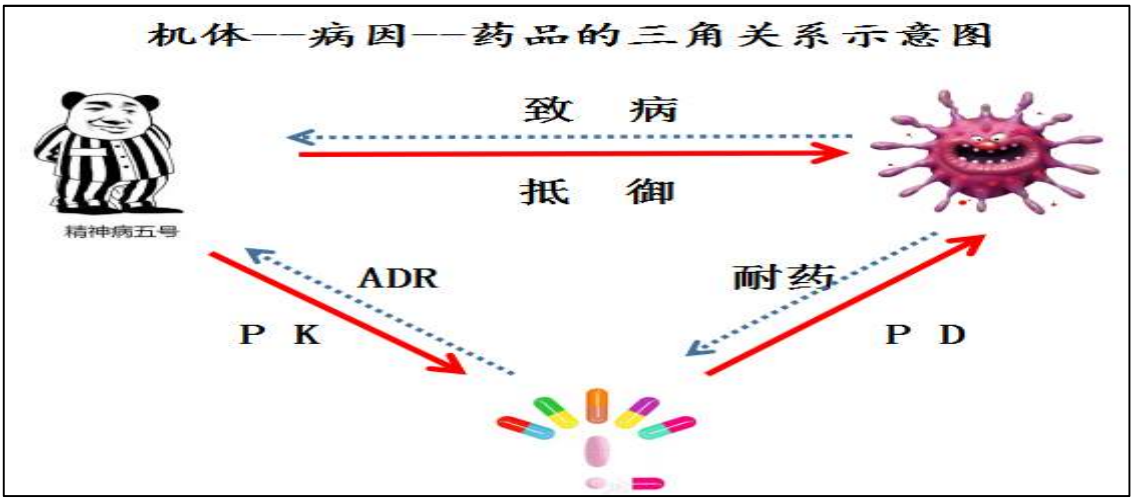
奥氮平法定说明书表明：在精神分裂症、双相情感障碍伴精神病发作、躁狂状态的治疗过程中，可以根据患者的病情症状在 2.5-20mg/天范围内调整选用服药剂量；建议仅在适当的临床评估后，起始治疗剂量可超过推荐剂量以上，加药间隔不少于 24 小时。停用奥氮平时应逐渐减少剂量。奥氮平片服药后 3.2 小时(1～4 小时)达血浆峰浓度，消除半衰期(t1/2b)平均 9 小时(3.6～14.3 小时)，表观分布容积(Vd)4.04～13.78L/kg，组织结合率高。奥氮平片经肝脏代谢，80%以代谢物形式出现在尿和粪中，主要代谢产物有氯氮平的 N-氧化物、N-去甲基氯氮平等[2]。患者服用奥氮平片后的各自血液浓度并不相同，PK/PD 理论认为是药物间相互作用影响、及个体药物耐受性、药物体内动力学代谢、转化、排泄的时间、程度等各不相同，因而药物有效治疗剂量、治疗效果反应肯定也因人因时而异。

目前医师对居家患者、住院病人药物治疗，习惯依据如奥氮平药品说明书临床用药剂量都在 2.5-20mg/日内凭经验选用，一般不考虑超出该范围。但我们药师借助借助 PK/PD 理论+血药浓度监测数据，经谨慎综合评估，及时建议大胆给予该患者短期间服用略超出奥氮平说明书上常用剂量范围的、低于极量（最小中毒量）的药物治疗，取得了满意效果。

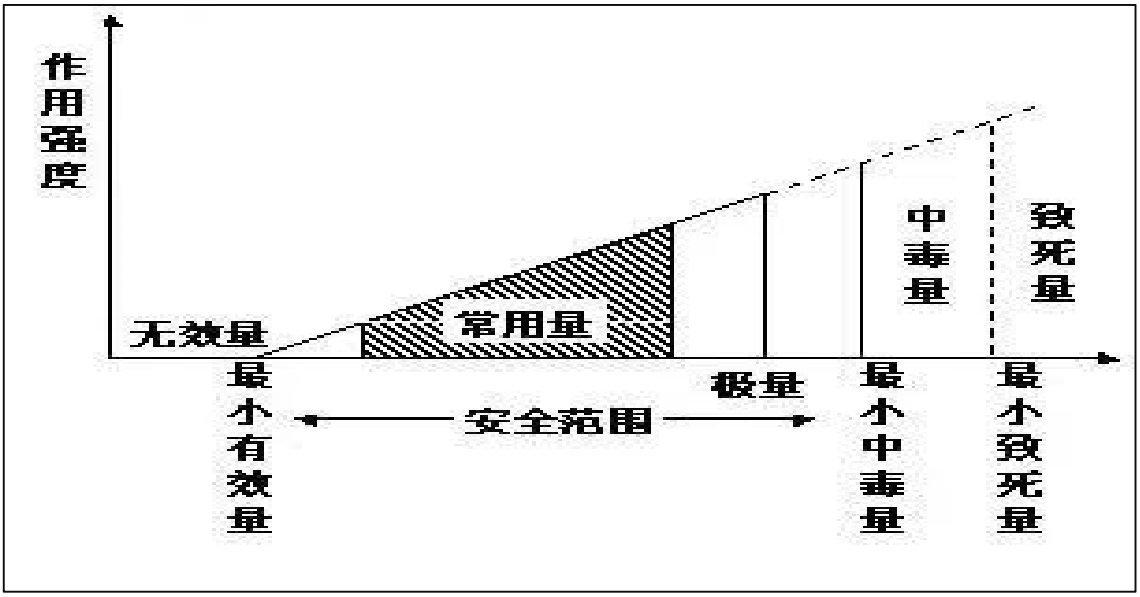
由此可见，药师和医师借助 PK/PD 理论，依据血液药物浓度监测报告，可以相对准确地掌握给患者服药剂量大小对血药浓度数据变化的影响程度；反之，同样依据该患者此时血药浓度的大小，可知现在给药剂量的安

全有效适宜性，从而心有底气地及时给予患者精准足量（甚至适当超出常规范围药量、但低于极量）的个体化用药，从而提高治疗效果、缩短治疗时程、减少医疗费用、降低不良反应、加快患者功能恢复、早日回归社会、改善患者生活质量、促进社会和谐[3]。

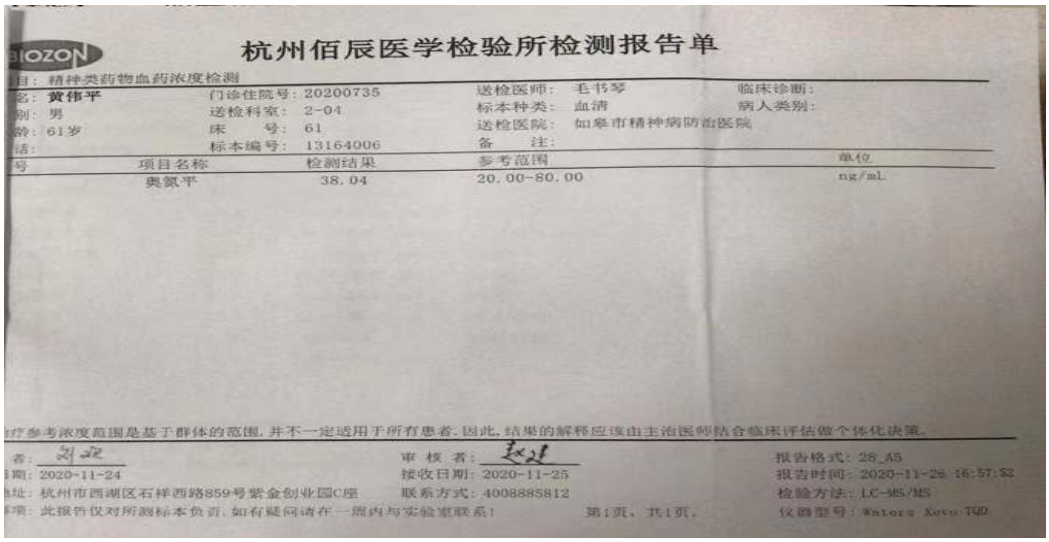
借助 PK/PD 理论+治疗药物监测手段、实时监测血药浓度的相关资料，既可以佐证当时治疗方案的科学性；也有利于药师和医师、及职能管理部门在事后恰当评判门诊处方、住院病历治疗方案的合理性，值得借鉴推广。



机体-病因-药品三角关系示意图　　图 1



药物作用强度与用药剂量相关度示意图　2



杭州佰辰医学检验所检测报告单

检测项目：精神类药物血药浓度检测

姓名	黄伟平	门诊住院号	20200735	送检医师	毛书琴	临床诊断	
性别	男	送检科室	2-04	标本种类	血清	病人类别	
年龄	61岁	床号	61	送检医院	如皋市精神病防治医院		
电话		标本编号	13164006	备注			

编号	项目名称	检测结果	参考范围	单位
	奥氮平	38.04	20.00-80.00	ng/mL

治疗参考浓度范围是基于群体的范围，并不一定适用于所有患者，因此，结果的解释应该由主治医师结合临床评估做个体化决策。

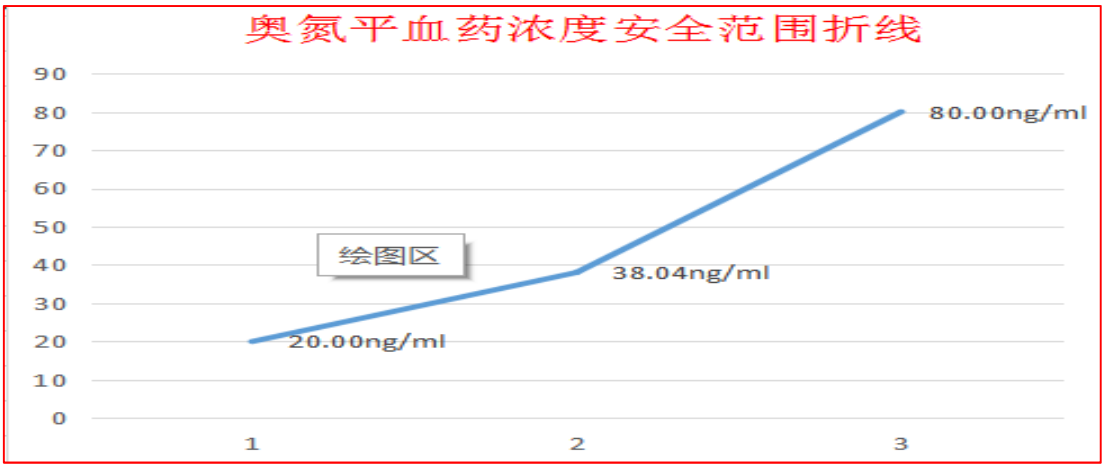
检验者：刘龙　　审核者：赵进　　报告格式：28_A5

采样日期：2020-11-24　　接收日期：2020-11-25　　报告时间：2020-11-26 16:57:52

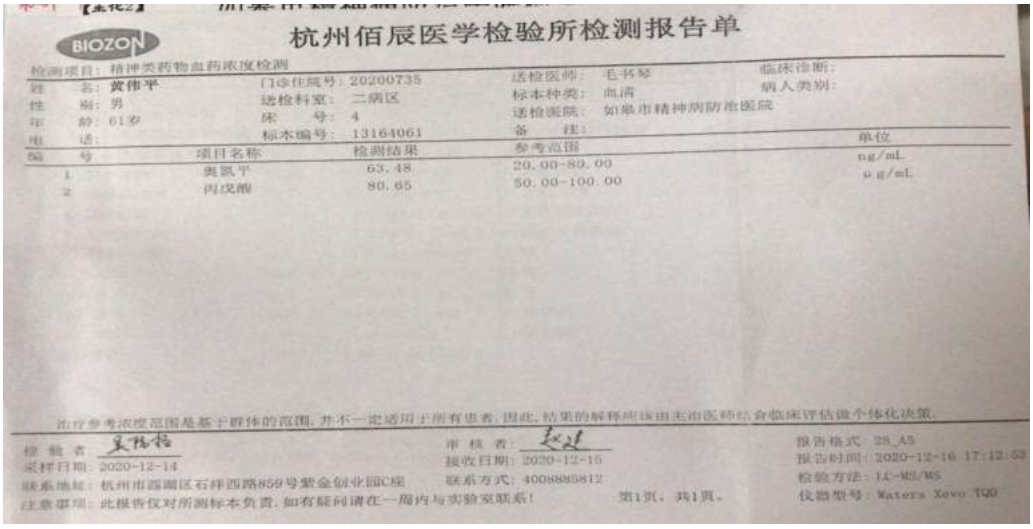
联系地址：杭州市西湖区石祥西路859号紫金创业园C座　　联系方式：4008885812　　检验方法：LC-MS/MS

注意事项：此报告仅对所测标本负责，如有疑问请在一周内与实验室联系！　　第1页，共1页。　　仪器型号：Waters Xevo TQD

报告单　图 3



折线图 4



杭州佰辰医学检验所检测报告单

检测项目：精神类药物血药浓度检测

姓名	黄伟平	门诊住院号	20200735	送检医师	毛书琴	临床诊断	
性别	男	送检科室	二病区	标本种类	血清	病人类别	
年龄	61岁	床号	4	送检医院	如皋市精神病防治医院		
电话		标本编号	13164061	备注			

编号	项目名称	检测结果	参考范围	单位
1	奥氮平	63.48	20.00-80.00	ng/mL
2	丙戊酸	80.65	50.00-100.00	μg/mL

治疗参考浓度范围是基于群体的范围，并不一定适用于所有患者，因此，结果的解释应该由主治医师结合临床评估做个体化决策。

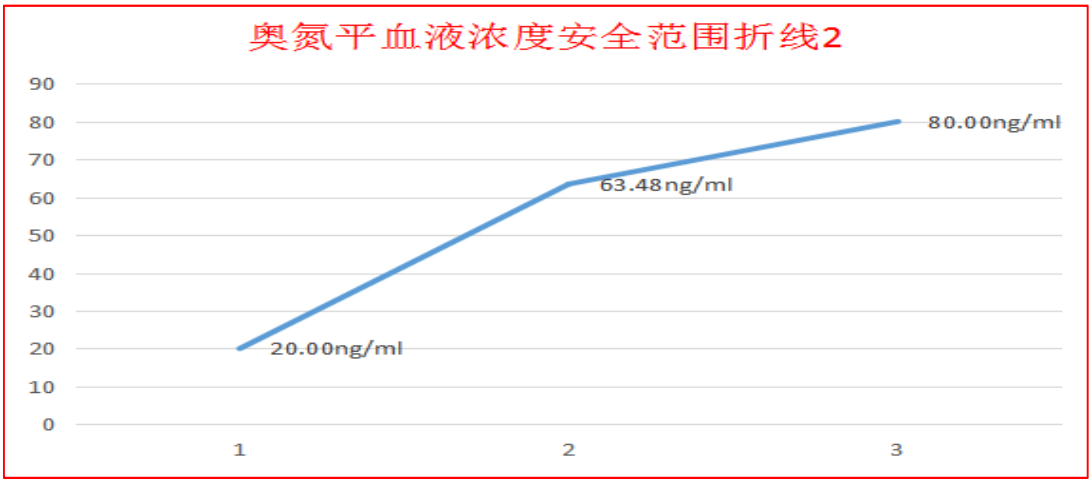
检验者：吴伟格　　审核者：赵进　　报告格式：28_A5

采样日期：2020-12-14　　接收日期：2020-12-15　　报告时间：2020-12-16 17:12:53

联系地址：杭州市西湖区石祥西路859号紫金创业园C座　　联系方式：4008885812　　检验方法：LC-MS/MS

注意事项：此报告仅对所测标本负责，如有疑问请在一周内与实验室联系！　　第1页，共1页。　　仪器型号：Waters Xevo TQD

报告单图 5



折线图 6

参考文献

[1] 孙宇飞，基于 PK-PD 关联分析研究定志小丸治疗阿尔茨海默病的药效物质基础及作用机制，中国科学技术大学博士论文，2020 年，27-28

[2] 奥氮平片说明书，核准日期 2007 年 1 月 11 日，修改日期 2018 年 5 月 14 日

[3] 陆维；黄庆之；陈云等，北京市社区严重精神障碍患者血药浓度参与意愿研究，精神医学杂志，2022 年 03 期，66-69

药学人员线上指导精神病患者居家防控感染的实践分析

张玉良，秦娟，朱晓玲，高玲，袁海霞

如皋市精神病防治医院　226500

【摘要】目的：探讨药学人员借助“互联网+”模式，对精神病患者开展线上指导居家防控细菌病毒感染的实践效果分析。**方法：**随机选取长期门诊治疗、居家服药的精神病患者共有126名，在2022年4月~2023年3月期间，对其中的63例患者为对照组，进行门诊窗口常规感染防控指导，另外的63例患者为观察组，在门诊窗口常规指导外，再借助微信（群）给予强化居家防控细菌病毒等感染指导。对比两组患者的感染防控效果。**结果：**观察组患者在线上获得药学人员的强化防控感染指导干预后，发生病毒性感冒、细菌性感染比例、感染后病程等都明显降低，相比于对照组，具有明显的优势，P＜0.05。**结论：**药学人员开展线上强化防控感染指导，能够有效增加精神病长期居家患者的健康卫生知识、感染防控技能，降低病毒细菌感染的几率和病程，提高其身体素质、生活质量和社会适应能力，提升患者对药学服务的满意度、有利于精神疾病的康复，也是对居家患者院前常规感染防控、当前常态化新冠肺炎疫情防控工作的有效支持，值得借鉴推广。

【关键词】线上指导　“互联网+”模式　精神病居家患者　感染防控

精神分裂症、焦虑抑郁症、心理疾病、双相情感障碍等在临床上属于较为常见的精神疾病，据统计总患病率达 10%左右。因为种种原因，其中的绝大多数精神病患者只能接受门诊治疗、长期居家服药。这些患者特别居住在偏远农村社区的大部分患者经济困难条件艰苦、生活环境较差、社会地位偏下、家庭看护不周、健康卫生知识缺乏，加上心理因素、精神疾病影响等等原因，常常比正常人更容易被病毒细菌等微生物感染、感染后病程更长、危害更大，严重降低患者身体素质，这不仅会影响患者的精神疾病治疗效果，还会延长患者其他疾病的病程，降低患者的生活质量。如何减少精神病居家患者病毒细菌等感染几率和病程？怎样针对居家精神病患者延伸健康卫生服务的“最后一米线”？成为药学人员必须面对的课题。本次针 126 例长期居家治疗的精神疾病患者开展研究，通过与传统的门诊窗口常规防控感染指导对比，分析远程跟踪强化居家感染防控指导的实践应用效果。现报告以下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机抽选前期在我院接受门诊治疗、长期居家服药的精神病患者 126 例，分为对照组和观察组，各 63 例。在对照组中，32 例男性，31 例女性，患者的年龄在 18~64 岁之间，平均（41.52±8.19）岁，病程在 5~42 年，平均（23.59±7.31）年；在观察组中，31 例男性，32 例女性，患者的年龄在 20~65 岁之间，平均（40.62±8.05）岁，病程在 6~39 年，平均（24.81±5.95）年。在开展研究前告知所有患者研究的目的、方法，均获得患者及家属的支持同意；同时排除了合并严重躯体基础疾病、生命体征不稳定、患者或家属不愿意参与的病例。本次研究在 2022 年 4 月--2023 年 3 月间进行，开展前已经向医院伦理委员会申请、备案获得批准。我们将对照组、观察组患者一般资料数据应用统计学软件（SPSS 21.0 版本）处理，P＞0.05，无统计学差异。对照 ICD-10,研究对象所患疾病均符合精神疾病诊断标准。

基金项目：江苏省南通市科技局（通科计 2021-109 号文件）基础民生课题

课题名称：基于微信平台开展重性精神病患者远程服务管理的实践研究

课题编号：MSZ21104

1.2 方法

1.2.1 药学人员（也可邀请高年资的精神病专科医生、护士、医技人员等志愿者参加）对对照组患者应用传统的、专科门诊常规的窗口口头居家感染防控知识指导，告知患者及家属治疗期间居家卫生、家庭照护等常见健康知识、注意事项、异常情况处置等等。

1.2.2 药学人员对观察组患者在应用传统的、专科门诊常规的医药学窗口口头健康卫生知识宣教指导，告知治疗期间居家感染防控常见知识、注意事项、异常情况处置等；同时征得患者、家属同意，建立微信朋友关系，应用“互联网+”形式，借助微信或微信群，“点对点、或点对面”分别讲解、强化针对患者个性化、群体化防控季节性、多发性、长期性的病毒细菌感染方案的重要目的意义；规范执行日常洗手、穿衣、饮食结构、健康卫生、防寒保暖等的重要性、严肃性、必要性；解答患者疑问；提醒或帮助居家患者对出现异常情况如病毒性感冒、上呼吸道感染、支气管肺炎、细菌性胃肠炎、心肌肝胆胰腺炎、发热、腹泻等等的分别应对处置，同时开展居家健康卫生、康复照护指导、医技检查资料如血常规、心肺肝肾功能、大小便化验、CT/彩超检查单的讲解分析等，同时与患者和（或）家属微信交流，进行“点对点”、“点对面”互动，开展个性、和/或共性问题交流、解答患者疑问，从而及时预防、发现、治疗感染，增加患者防控病毒或细菌性感染的效果、降低感染率、提高感染后及时治疗依从性、减少患者的心理顾虑、以免病情加重复发，同时帮助提升患者自信心、生活自理能力、社会适应能力和居家生活质量、增加患者对药学服务的满意度等等。内容如下：

（1）宣讲防控感染知识、提高健康生活自理能力层面：精神专科药学人员通过微信（群）转发相关图文视频链接、原创科普文章等，以直观简单明了、实用接地气的方式向患者宣传讲解病毒性、细菌性感染疾病的种类、特点、区别，居家防控感染的技术方法知识、抗病毒抗感染药物各自的作用机理、适用范围,切记不可没有医嘱情况下盲目代用、混用；让患者了解病毒、细菌感染性疾病及防治方法，不惧怕感染性疾病，做到感染前积极预防、感染后配合治疗，提醒患者居家感染防控措施，既要避免“不足”、也要防止“过度”；尽可能减少患者的心理情绪大幅度波动。药学人员可以建议科学调整患者的日常作息习惯，指导锻炼患者自行完成洗漱、进食、着衣、家务整理等多方面的日常生活行为，根据季节变化、气温升降时刻注意增减衣服、日常卫生、科学预防感染。并对患者的饮食和睡眠进行有针对性的科学调节指导，鼓励家属配合做好患者的居家照看护理、保障患者必要的物质生活需要，让患者慢慢自觉恢复自我健康卫生的生活能力的同时，也能体会到来自药学人员和家属的关爱，让人性化的专业服务融入到患者的居家感染防控、疾病康复全过程中，提高患者对药学服务的满意度。

（2）提高患者自我防控感染能力层面：药学人员真正把患者当做朋友，线上耐心强化引导患者学会自觉讲究卫生、时刻注意防控病毒性、细菌性感染，即使被感染后，要正确面对病情、积极配合治疗，注意控制情绪波动，并叮嘱患者要定时、足量、全程按医嘱服药、提高执行治疗方案依从性；远程指导患者自觉管控自己，鼓励开展病友间的交流。对积极配合、取得居家感染防控成效的患者给予微信点赞、鼓励他们“现身说法”，调动更多患者做好感染防控、配合治疗的积极性；同时药学人员持续对患者进行针对性的感染防控、康复卫生训练远程有效指导，对患者近期出现的生理心理等问题进行线上讲解梳理、干预教育。

1.3 确定分析评判指标，发放问卷调查表、量化数据、统计分析。

（1）对比两组患者的居家健康卫生、防控感染知识知晓率。制定日常生活中健康生活习惯、正确洗手方法、卫生知识、病毒性、细菌性感染防控处置方法等常识 100 条的问卷调查表，依据两组患者的正确得分比较，得分高的，表示患者的居家防控感染知识知晓率高。

（2）对比一年期间两组居家患者的病毒和（或）细菌感染人数、计算感染率。感染分为轻度（门诊口服药物治疗）、重度（急诊输液、住院治疗），两者之和为感染人数、计算感染率，感染率越低，表示患者感染防控效果越好。

（3）对比两组居家患者的病毒和（或）细菌感染的病程。病程分为短程（一天至三天）、中程（四天至七天）、长程（八天及以上），病程越短、短病程率高，表示感染防控效果越好。

（4）对比两组居家患者对医务人员的服务满意度。满意度分为不满意、基本满意、满意三级，后两者之和百分率为满意度百分率。

1.4 数据统计、分析处理

本次研究数据采用 SPSS （21.0 版） 软件统计分析，符合正态分布的计量资料以（$\bar{x}\pm s$ ）表示，两组间统计数据比较采用 *t* 检验；计数型数据用%表示，用 x^2 检验，均以 *P*<0.05 认为差异显著，具有统计学意义。

2 结果

观察组居家精神病患者的健康卫生、防控感染知识知晓率、患者感染后短病程率、患者对药学人员服务满意度，均明显高于对照组患者；患者居家病毒/细菌感染率明显低于对照组，（*P*＜0.05），分别见以下表。

表 1 两组患者的居家健康卫生、防控感染知识知晓率比较（$\bar{x}\pm s$，分， n=63/63）

组别	<60 分	60-80 分	>80 分	平均分
观察组（n=63）	3	22	38	86.31±5.29
对照组（n=63）	36	16	11	62.49±4.83
t	-	-	-	5..271
P	-	-	-	0.0168

表 2　两组居家患者的病毒和（或）细菌感染人数/率对比[n（%）]（n=63/63）

组别	未感染	轻度感染	重度感染	感染率 n（%）
观察组（n=63）	48	11	4	15（23.81）
对照组（n=63）	11	37	15	52（82.53）
X²值	-	-	-	4.3815
P 值	-	-	-	0.0316

表 3 两组居家患者的病毒和（或）细菌感染者的病程对比 a（%）]（a=15/52）

组别	短程	中程	长程	短病程率 a（%）
观察组（a=15）	10	3	2	10（66.67）
对照组（a=52）	16	19	17	16（30.77）
X²值	-	-	-	4.3815
P 值	-	-	-	0.0362

表 4　两组居家患者对医务人员的服务满意度对比[n（%）]（n=63/63）

组别	满意	基本满意	不满意	满意度 n（%）
观察组（n=63）	35	24	4	59（93.65）
对照组（n=63）	20	25	18	45（71.43）
X²值	-	-	-	4.6108
P 值	-	-	-	0.03162

3 讨论

精神疾病患者、特别是长期居家服药治疗的患者通常在患病期间表现出紧张恐惧、焦虑无助、心理自卑压力较大；社会适应性、生活自理能力下降等现象，同时患者身体的免疫力降低，加上健康卫生知识、感染防控常识缺乏、不良的居住环境、不当的生活习惯，极易发生病毒、细菌感染，感染后处置不当、治疗不及时、常

常导致感染病情加重、反复、病程延长，严重影响患者生理心理健康、降低患者生活质量、和对药学服务的满意度。

近年来，随着“互联网+”时代的到来，药学服务模式不断发展改革，创新性模式的服务逐渐出现。实践表明，药学人员借助微信（群）组团针对长期居家精神病患者，持续开展远程模式指导服务，从躯体、心理、生活、社会适应能力等方面对患者线上进行强化防控病毒细菌感染的常识科普、感染后的正确处置、康复指导，让患者感觉药学人员随时随地就在“自己身边”！不仅能够增加患者健康卫生知识、感染防控技能、降低患者被感染几率、缩短感染病程、减轻患者的孤独无助心理，还能够有效提升患者愉悦心态，使其更加愿意配合医药人员的工作，提高自信心和治疗依从性，减少了感染复发率，大幅提升患者对药学服务的满意度。

综上所述，药学务人员借助“互联网+”模式，持续给予精神疾病长期居家患者远程强化感染防控、健康卫生知识指导，能够降低病毒细菌感染率、促进其感染后快速康复，提升其生活质量，满足患者的需要，提高患者满意度，起到事半功倍的效果，让药学服务得到延伸、更加贴近患者；同时，也是对当前新冠肺炎疫情防控工作的有效支持，使得居家精神病患者真正感受到医疗服务的深度、广度、和温度！值得借鉴推广。

药师线上指导利培酮口服液精准治疗老年精神障碍的效果分析

张玉良，徐孝荣，陈桂根

（如皋市精神病防治医院 江苏省 南通市 226500）

【摘要】目的：探讨药师借助" 微信+" 模式，采用语音、文字、视频等形式，远程指导老年精神病患者正确使用利培酮口服液治疗的效果。**方法：**药师随机抽取 56 名长期（大于两年的）居家服用利培酮口服液治疗患有精神分裂症的老年（大于 50 岁）患者为研究对象，与患者（和/或家属），在 2022 年 3 月至 2023 年 2 月期间，借助" 微信+" 模式，采用点对面（微信群）或点对点（一对一微信）的语音、文字、视频通话等形式互动交流，远程普及推送精神健康知识、答疑解惑、指导患者正确量取药液的操作方法、准确执行医嘱用药的用法用量、告知个体化精准治疗方案的目的意义、提前预告可能出现的哪些 ADR、提醒患者定期作血压血糖血脂血粘度肝心脑肾肺胃肠等脏器功能检查以便及早预防或发现 ADR、如出现 ADR 后及时帮助应对和采取正确处置方法、收集监测并网上填报 ADR 信息报表，线上发放调查表，统计测评开展线上延伸药学服务期间，患者量取药液的操作方法正确率、执行医嘱的准确率、药物不良反应知晓及正确处置率、精神症状改善有效控制率、对远程医药学服务的满意度等，数据化统计、量表化分析，并与前一年度同期数据作比较。**结果：**相关统计数据明显优于前一年度的数据。**结论：**药师采取线上延伸医药学服务，对长期居家服用利培酮口服液治疗的精神分裂症老年患者有益，“智慧医疗”的深度、广度、和温度！值得推广。

【关键字】微信+模式、精准医药学服务、居家服药患者、线上家庭医药师

利培酮口服液，属抗精神病药，目前常用的有西安杨森药业生产的维思通 R、常州四药生产的单克 R、河北仁合益康药业生产的静得欣 R 等，常用于治疗急性和慢性精神分裂症以及其它各种精神病性状态的明显的阳性症状(如幻觉，妄想，思维紊乱，敌视，怀疑) 和明显的阴性症状(如反应迟钝，情绪淡漠及社交淡漠，少语) 等，治疗效果明显，口服液尤其适用于不便口服药物治疗的未成年人和老年患者。







课题文件 1：江苏省南通市卫健委　通卫科教【2022】21 号文件

课题名称：医务人员开展“互联网+老年精神病患者”居家服务管理的实践

课题编号：南通卫健委 MSZ2022084

课题负责人：徐孝荣、张玉良

课题文件 2：江苏省南通市科技局　通科计【2021】109 号文件

课题名称：基于微信平台开展重性精神病患者远程服务管理的实践研究

课题编号：南通科技局 MSZ2021104

课题负责人：张玉良　13862760519　770997856@qq.com

但是利培酮口服液容器都是棕色玻璃制品而易碎、为防小孩误服而应用特殊瓶盖、量取药液常用特殊抽吸管或量杯、对光线温度敏感、贮存要求严格、且不可避免存在药物不良反应等等，给长期居家服药治疗的患者特别是老年精神障碍患者带来某些不便：如特殊封口瓶盖拧不开、药液量取操作不规范、使用药量或多或少误差大、贮存不注意避光高温冷冻、出现不良反应后或慌张或不作处置或不知咋处置等，使得医嘱用药治疗方案执行率低下、用药剂量频次随意、疗程不足、个体化精准治疗效果不佳、病情反复发作等。针对这些问题，课题组药师借助＂微信+＂模式，采用语音、文字、视频通话等形式，远程指导老年精神病患者正确应用利培酮口服液，延伸医药学服务、拓展智慧医疗，取得成效，现作如下报告。

药师随机抽取 56 名长期（大于两年的）居家服用利培酮口服液治疗患有精神分裂症的老年（大于 50 岁）患者为研究对象，与患者（和/或家属），在 2022 年 3 月至 2023 年 2 月期间，借助＂微信+＂模式，采用微信公众号、视频号、点对面（微信群）或点对点（一对一微信）的语音、文字、视频通话等形式互动交流，远程推送居家服药注意事项、精神健康知识、线上答疑解惑、指导患者量取药液的正确操作方法、遵从医嘱用药的用法用量频次、告知个体化治疗方案的目的意义和准确执行医嘱的重要性必要性等。如借助微信视频通话，即时在线上模拟演练、如同“身临现场”反复指导患者或家属对棕色玻璃瓶盖逆时针按压旋转拧开，正确使用取药管或量杯、看准量器刻度标线、精确抽（量）取药液服用，确保药量精准；多次把说明书中的规格单位代号（mg/ml）、贮存避光、避免高温冷冻、防止小孩触碰误服、可能出现的不良反应注意事项、生产日期、有效期、失效期等等重点内容，截图放大，划线标记，在微信里讲解、答疑、提醒注意。

药师借助＂微信+＂模式，采用微信公众号、视频号、点对面（微信群）或点对点（一对一微信）的语音、文字、视频通话等形式互动交流，向长期居家老年精神障碍患者（家属）提前预告服用利培酮口服液可能出现的哪些药品不良反应（ADR），如本品具有 α 受体阻断活性, 因此尤其是在递增给药初期时 可能会发生(体位性) 低血压，个别患者出现锥体外系反应、皮疹、胃肠道反应等，所以提醒患者定期作血压血糖血脂血粘度肝心脑肾肺胃肠等脏器功能生化检查，以便及早预防或发现 ADR。如出现 ADR 后，让患者有思想准备也无需过度紧张，药师借助微信及时远程指导，帮助应对和采取正确的处置方法，鼓励患者（家属）借助微信传来不良反应表现如过敏皮疹、排泄物颜色变化等照片、脏器功能检查单图片等，主动报告反馈生命体征生化检查监测数据结果，便于药师帮助鉴别、核实、答疑，“会诊”、提供合理化建议，同时注意积极监测、追踪、辨别、收集分析，并在网上填报 ADR 信息报告表上传。

药品不良反应/事件报告表

报告基本信息

首次/跟踪报告：	首次报告	编码：	320682-1-038213-2023-00002
报告类型：	新的 一般	报告单位类别：	医疗机构

患者基本信息

患者姓名：	李桂兰	性别：	女	民族：	汉族	出生年月：	1948-11-09	年龄：	75 岁	体重：	59 （公斤）	联系方式：	13862757840
原患疾病：	器质性精神病					医院名称：	如皋市第二人民医院			病历号/门诊号：		1901131022	
既往药品不良反应/事件：	不详												
家族药品不良反应/事件：	不详												
相关重要信息：													

怀疑用药

序号	批准文号	商品名称	通用名称	生产厂家	生产批号	用法用量	给药途径	用药起止时间	用药原因
1	国药准字 H20183011	*静得欣	利培酮口服溶液 剂型：口服溶液	河北仁合益康药业有限公司	1063220202	3 毫克/ 1日 1 次	口服	从 2023-01-28 到 2023-02-05	精神障碍

并用药品

序号	批准文号	商品名称	通用名称	生产厂家	生产批号	用法用量	给药途径	用药起止时间	用药原因
该报告没有并用药品信息！									

不良反应/事件详细信息

不良反应/事件名称：	腹胀（一般）；嗳气（一般）	不良反应/事件发生时间：	2023-01-31
不良反应/事件过程描述：	患者患器质性精神病长期居家服药治疗，口服利培酮口服液控制精神症状，2023-01-28开始服用本批次口服液，01-31上午药师线上回访患者家属，询问治疗状况，，家属反映患者服药后，刚刚出现腹胀、嗳气现象，药师考虑可能是药物引起的不良反应，建议家属带患者到医院就诊。01-31下午患者在附近医院就诊，医嘱口服多潘立酮片对症治疗。02-05药师线上回访家属，家属反映患者腹胀、嗳气的症状已明显减轻好转。		
不良反应/事件结果：	好转		
停药或减量后反应/事件是否消失或减轻：	未停药或未减量		
再次使用可疑药品后是否再次出现同样反应/事件：	不明		
对原患疾病的影响：	不明显		

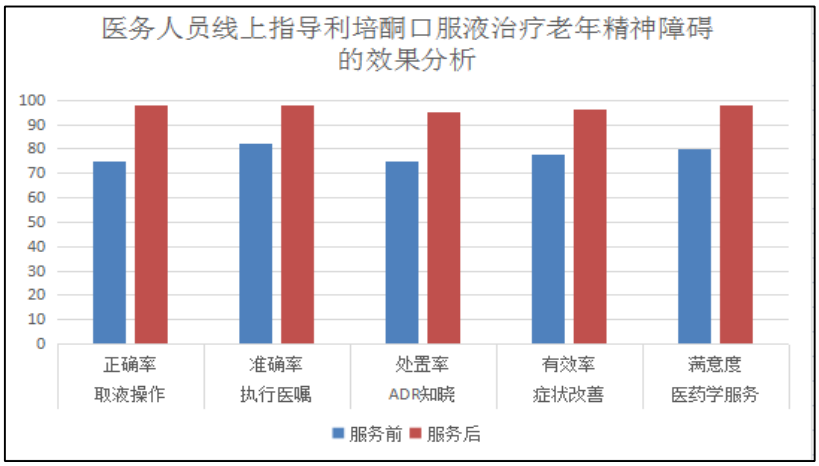
报告人信息：

关联性评价：	报告人评价：	可能	报告人签名：	张玉良
	报告单位评价：	可能	报告单位签名：	张玉良

药师借助＂微信+＂模式，采用微信公众号、视频号、点对面（微信群）或点对点（一对一微信）的语音、文字、视频通话等形式，对居家服用利培酮口服液治疗的老年精神障碍患者开展延伸医药学远程服务，互动交流。同时线上每隔三个月发放调查表，统计本次科研活动以来，患者（家属）以 100 为评分值，自评认为量取药液的操作方法正确率、执行医嘱治疗方案的准确率、药物不良反应知晓及正确处置率、精神症状改善病情有效控制率、对远程医药学服务的满意度等如实打分，药师通过语音视频复核、收集整理资料，数据化统计、量表化分析，获得本次远程医药服务活动开展以来五项考察项目的最终分值数据。在第四次线上发放调查表时，同时发放另一份调查表，请患者（家属）尽可能客观回顾、填写一年前即远程医药学服务开展前的五项考察项目的分值数据。对两组调查数据应用 SPSS20.0 版本软件，作统计分析比较。

线上指导利培酮口服液治疗老年精神障碍的前后效果对照表

项目	取液操作 正确率	执行医嘱 准确率	ADR 知晓 处置率	症状改善 有效率	医药学服务 满意度
服务前均分	75.1	82.2	74.9	78.2	80.1
服务后均分	97.9	98.1	94.8	96.1	97.9
浮动	+30.6%	+19.5%	+26.7%	+23.1%	+22.5%



由此可见， 药师借助＂微信+＂模式，采用微信公众号、视频号、点对面（微信群）或点对点（一对一微信）的语音、文字、视频通话等形式，对长期居家服用利培酮口服液治疗的老年精神障碍患者开展延伸医药学远程服务，互动交流，能够明显提高患者（家属）量取药液的操作方法正确率、执行医嘱治疗方案的准确率、药物不良反应知晓及正确处置率、精神症状改善病情有效控制率、对远程医药学服务的满意度等；能够及时发现、收集、监测药品不良反应并网上填报，弥补居家患者不良反应监测的空白盲区。

延伸医药服务最后“一米线”，借助“微信+”模式，开展远程精准医药学服务、争当“线上家庭药师”，补足患者居家服务缺失短板、体现“智慧医疗”！不仅能提升药学人员的业务技术水平和职业道德素养；更让居家服药患者切身感受到新时代“互联网+”医药服务的广度、深度、和温度！

参考文献

[1] 张谢稍，邓怀道，邵春秀. 远程药学服务干预在 T2DM 慢病管理中的作用研究 ，[J]. 北方药学，2019，16 （12）：172-173

[2] 张鹏，抗精神病药物不良反应分析［J］. 临床合理用药 杂志，2020，13（5）：120-121

[3] 张玉良，钱晓丽，秦锦子. 药师运用微信参与治疗方案制定促进合理用药的实践[J]. 健康大视野，2020（13）：63.

[4] 张明辉，张红卫，陈金兰. 60 例利培酮致锥体外系不良反应特点分析，［J］. 中国当代医药，2021（25）：98-99

[5] 张玉良，陈桂根，徐孝荣，药师对重性精神病居家患者开展远程药学服务的效果分析，[J]. 名医，2022（3）：192-194.

Skp2 与肿瘤

赵静[1]，曾祥平[1]

（1. 成都市第五人民医院药剂科，成都，610000）

【摘要】S 期激酶相关蛋白 2（ S-phase kinase-associated protein 2, Skp2）是 F-box 蛋白家族成员之一，在许多恶性肿瘤中均过表达。研究发现 Skp2 与肿瘤的不良预后以及耐药性有关。本篇综述简要介绍了 Skp2 在乳腺癌、肺癌、前列腺癌以及肠癌中高表达的情况，证实了 Skp2 对肿瘤细胞发生发展的重要性，同时期望可以为研究者提供思路，为癌症的治疗带来方向。

【关键词】S 期激酶相关蛋白 2　肿瘤

1. S 期激酶相关蛋白 2（Skp2）

S 期激酶相关蛋白 2（S-phase kinase-associated protein 2, Skp2）基因在 1995 年被首次克隆而被人知晓[1]。SKP2 是 F-box 蛋白家族成员之一。Skp2 参与 p27、p21、p57 等抑癌蛋白（p27、p21、p57 均为细胞周期抑制蛋白）的降解，在细胞周期调控、细胞生长、分化、增值、转移与凋亡等方面发挥重要作用[2]。已有许多证据表明 Skp2 与许多人类疾病有关，比如癌症[3]，自噬[4]等。

Skp2 在肿瘤的发生以及细胞周期的调控中起主要作用，并且在人类癌症中的过表达与不良的预后相关，其功能的紊乱是许多肿瘤细胞的特征[5]，Skp2 最著名的蛋白质底物是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1B(CDKN1B),也被称为 $p27^{Kip1}$ [6]。P27 通过灭活 cyclin-CDK 复合物以及阻止细胞周期 G1 到 S 期的转变来负调控细胞周期，Skp2 是 p27 降解的主要限速调节剂，过度表达的 Skp2 会影响到细胞周期的正常进程[7]。许多癌症都存在着低水平的 p27 和高水平的 Skp2 蛋白的情况[8]。对 Skp2 的深入研究或将为癌症的治疗带来新的希望与策略。本篇综述简要介绍了 Skp2 在乳腺癌、肺癌、前列腺癌以及肠癌中高表达的情况，引起广大学者注意，以期为癌症的治疗提供方向。

2. Skp2 在肿瘤中呈现高表达

2.1 乳腺癌

由 HidetoSonoda 等人开展的一项基于 169 例日本乳腺癌患者的研究表明，Skp2 高表达的患者的预后明显低于 Skp2 低表达的患者，并且与 Skp2 在乳腺癌患者中的表达与 p27 的表达呈负相关，表明 Skp2 可能是治疗乳腺癌的新靶标[9]。DENGFENG YE 等人展开了一项关于 genistein(4',5,7-trihydroxyisoflavone) 对乳腺癌细胞增殖，凋亡，细胞周期分布，迁移和侵袭的影响并探讨了其是否通过抑制乳腺癌细胞中的 Skp2 发挥抗肿瘤功能的研究，结果发现 genistein 显着抑制乳腺癌细胞的生长，迁移和侵袭，并以剂量依赖的方式诱导细胞凋亡。蛋白质印迹分析结果表明，在 genistein 处理过的乳腺癌细胞中，Skp2 的表达显着降低。此外，genistein 处理后，Skp2 的两个典型下游靶点 p21 和 p27 的蛋白质水平增加。这些结果证实 genistein 可能是通过抑制 Skp2 表达从而在乳腺癌细胞中发挥其抗肿瘤活性[10]。

2.2 肠癌

Haijin Chen 团队研究了 S 期激酶相关蛋白 2（Skp2）在结肠癌中的作用，结果表明 Skp2 蛋白在结肠癌的进展中具有重要作用，可以实现结肠癌的早期诊断，并为癌症治疗的分子靶标提供新的思路[11]。Cholomi Jung 等人在人类结肠癌细胞中研究了美洲菊 A(americanin A)的抗增殖和抗肿瘤活性，结果表明 americanin A 在体外和体内均抑制 HCT116 人结肠癌细胞的增殖，机制研究表明 americanin A 选择性靶向 Skp2 进行降解，进而稳定了 p27 并阻止细胞进入有丝分裂[12]。

作者简介：第一作者：赵静，药师，电子邮箱 1179698682@qq.com；通讯作者，曾祥平，副主任药师，电子邮箱 1192024071@qq.com

2.3 前列腺癌

前列腺癌是男性中比较常见的肿瘤，并且很多证据表明 Skp2 在前列腺癌的发生发展中起着很重要的作用，可能是治疗前列腺癌的有希望的靶标[13]。Woong Sub Byun 在体外细胞培养和体内动物模型中研究了 LJ-2618 的抗肿瘤潜力及其潜在的针对紫杉醇耐药性前列腺癌细胞的分子机制。研究结果表明 LJ-2618 对耐紫杉醇的人前列腺癌细胞具有抗增殖和抗肿瘤活性，其可能的机制是通过调节在紫杉醇耐药的前列腺癌细胞中 Skp2 表达以诱导 G2/M 细胞周期停滞，从而达到抑制对紫杉醇耐药的前列腺癌细胞的生长的目的[14]。并且有研究表明前列腺活检中 Skp2 的表达可以作为肿瘤发生转移的一个标志[15]。

2.4 肺癌

Skp2 在肺癌中常有上调的现象，Skp2 的小分子抑制剂是治疗肺部疾病的潜在药物[16]。YINGHUA JU 等人研究了 Glucosamine 对肺癌细胞增殖的影响以及调节细胞周期 G1/S 检查点的潜在机制。研究中采用流式细胞术评估了 Glucosamine 对细胞周期的影响。发现 Glucosamine 可抑制肺癌细胞增殖并抑制 Skp2 和 Cyclin E 的表达。同时，细胞周期蛋白 E（Thr62）和 p27Kip1（Thr187）的磷酸化水平有所下调，还发现了 Glucosamine 可将肺癌细胞阻滞在 G1/S 期。另外，研究还发现在转录水平，翻译水平和翻译后水平，Cyclin E 和 Skp2（两个关键的 G1/S 期调节子）的表达水平被 Glucosamine 抑制，研究结果表明，Glucosamine 通过抑制 Cyclin E 和 Skp2 蛋白的表达来将肺癌细胞阻滞在 G1/S 期，从而抑制肺癌细胞的增殖[17]。

3. 讨论

我们可以看到 Skp2 在乳腺癌、肺癌、肠癌、前列腺癌中都存在高表达的现象。此外，在其他的多种恶性肿瘤中均发现了 SKP2 的高表达，如白血病，胃癌，肝癌等。还有研究表明，Skp2 与恶性肿瘤患者的预后有关[18]。有研究发现 Skp2 在胃癌中的表达水平增加且 Skp2 表达阴性的患者预后较 Skp2 表达阳性的患者好[19]。Skp2 还被发现与耐药性有关[20]。文中还提到 Skp2 可能作为肿瘤是否发生转移的标志，这些都需进一步的研究。

所有的证据表明 Skp2 在肿瘤的发生发展中起着十分重要的作用。目前我们已知的是 Skp2 参与细胞周期调控，其水平在细胞周期的 G0/G1 期和 M 晚期/G1 早期较低，S 期达到最高值[21]，但是在参与细胞周期调控时，是否还有其他的细胞周期调控因子参与，还需要进一步的研究。

在开发 Skp2 抑制剂时，我们是否可以借助其他的比如蛋白水解靶向嵌合体技术（PROTAC），以开发更强更有效力的 Skp2 抑制剂[22]。

综上所述，Skp2 是一个值得研究的靶点，可能会为癌症的治疗带来意想不到的结果。

参考文献：

1. Hao, Z. and S. Huang, E3 ubiquitin ligase Skp2 as an attractive target in cancer therapy. 2015. 20(3): p. 474-490.

2. 王海娟, 郑雅宾, and 河. 张静, Skp2/p27 轴在结直肠癌发生发展中的作用机制研究. 临床外科杂志, 2021(11): p. 1054-1058.

3. Wu, J., et al., Skp2 modulates proliferation, senescence and tumorigenesis of glioma. Cancer Cell Int, 2020. 20: p. 71.

4. Gassen, N.C., et al., SKP2 attenuates autophagy through Beclin1-ubiquitination and its inhibition reduces MERS-Coronavirus infection. Nat Commun, 2019. 10(1): p. 5770.

5. Zhao, H., et al., SKP2 targeted inhibition suppresses human uveal melanoma progression by blocking ubiquitylation of p27. Onco Targets Ther, 2019. 12: p. 4297-4308.

6. Bochis, O.V., et al., The role of Skp2 and its substrate CDKN1B (p27) in colorectal cancer. J Gastrointestin Liver Dis, 2015. 24(2): p. 225-34.

7. Liu, Z., et al., Prognostic implication of p27Kip1, Skp2 and Cks1 expression in renal cell carcinoma: a tissue microarray study. J Exp Clin Cancer Res, 2008. 27: p. 51.

8. Zhao, Y., et al., Early mitotic inhibitor-1, an anaphase-promoting complex/cyclosome inhibitor, can control tumor cell proliferation in hepatocellular carcinoma: correlation with Skp2 stability and degradation of p27(Kip1). Hum Pathol, 2013. 44(3): p. 365-73.

9. Sonoda, H., et al., Significance of skp2 expression in primary breast cancer. Clin Cancer Res, 2006. 12(4): p. 1215-20.
10. Ye, D., Z. Li, and C. Wei, Genistein inhibits the S-phase kinase-associated protein 2 expression in breast cancer cells. Exp Ther Med, 2018. 15(1): p. 1069-1075.
11. Chen, H., et al., Interference of Skp2 effectively inhibits the development and metastasis of colon carcinoma. Mol Med Rep, 2014. 10(2): p. 1129-35.
12. Jung, C., et al., Antitumor Activity of Americanin A Isolated from the Seeds of Phytolacca americana by Regulating the ATM/ATR Signaling Pathway and the Skp2-p27 Axis in Human Colon Cancer Cells. J Nat Prod, 2015. 78(12): p. 2983-93.
13. Wang, Z., et al., Skp2: a novel potential therapeutic target for prostate cancer. Biochim Biophys Acta, 2012. 1825(1): p. 11-7.
14. Byun, W.S., et al., A novel selenonucleoside suppresses tumor growth by targeting Skp2 degradation in paclitaxel-resistant prostate cancer. Biochem Pharmacol, 2018. 158: p. 84-94.
15. Ben-Izhak, O., et al., Inverse relationship between Skp2 ubiquitin ligase and the cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1 in prostate cancer. J Urol, 2003. 170(1): p. 241-5.
16. Yokoi, S., et al., Amplification and Overexpression of SKP2 Are Associated with Metastasis of Non-Small-Cell Lung Cancers to Lymph Nodes. The American Journal of Pathology, 2004. 165(1): p. 175-180.
17. Ju, Y., et al., Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide, inhibits A549 and H446 cell proliferation by blocking G1/S transition. Mol Med Rep, 2013. 8(3): p. 794-8.
18. Wang, Z., et al., Skp2 is a promising therapeutic target in breast cancer. Front Oncol, 2012. 1(57).
19. 张永健, et al., Skp2 蛋白与原发性胃癌预后的关系. 中国老年学杂志, 2023(06): p. 1312-1315.
20. Wu, T., X. Gu, and H. Cui, *Emerging Roles of SKP2 in Cancer Drug Resistance.* Cells, 2021. 10(5).
21. 郭学海,, *Skp2 与肿瘤.* 长寿, 2020(6): p. 85.
22. Cai, Z., et al., *The Skp2 Pathway: A Critical Target for Cancer Therapy.* Semin Cancer Biol, 2020. 67(Pt 2): p. 16-33.

肠道微生物在肿瘤免疫治疗中的研究新进展

赵娟[1]，廖斌[1]，杨辉尧[1]，张海伟[1]

（重庆大学附属肿瘤医院　重庆 400000）

【摘要】免疫检查点抑制剂作为肿瘤治疗领域的新兴疗法，已成功应用于多种肿瘤。然而，总体响应率低、免疫相关毒副作用、耐药等问题的相继出现限制了免疫检查点抑制剂的临床应用。研究发现，肠道微生物与肿瘤免疫治疗结局密切相关，被认为是预测免疫治疗结局和干预免疫治疗的最具潜力的策略。本文就肠道微生物对免疫检查点抑制剂的疗效和相关不良反应的影响、干预肠道微生物改善免疫治疗结局的策略三方面进行综述，并讨论了肠道微生物在肿瘤免疫治疗领域的未来发展方向。

【关键字】肠道微生物；免疫治疗；免疫检查点抑制剂；免疫相关不良反应

免疫检查点抑制剂（Immune Checkpoint Inhibitors，ICIs）在临床的广泛应用开启了肿瘤免疫治疗新时代，目前临床常用的 ICIs 以程序性细胞死亡蛋白-1 （PD-1）、程序性细胞死亡蛋白 PD-1 配体（PD-L1）和细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4 （CTLA-4）等蛋白为靶点[1, 2]，已有十几种 ICIs 被批准用于多瘤种的一线治疗[3]。但肿瘤免疫治总体有效率不高，且治疗过程中发生的耐药和免疫相关不良反应（immunology related adverse events，irAEs）也限制了 ICIs 的临床应用[4-6]。因此，筛选适合 ICIs 治疗的肿瘤患者和提高肿瘤免疫治疗疗效在肿瘤免疫治疗时代具有重要意义。

肠道微生物是指人类胃肠道内存在的所有微生物组成，包括噬菌体，病毒，细菌，原生生物，蠕虫和真菌等。肠道微生物除维持肠道内稳态外，还参与人体多种生理病理过程[7-10]，如肠道微生物组异常可能与某些肿瘤的发生相关[11, 12]，且不同类型的肠道微生物谱可能与免疫治疗疗效和 irAE 相关[11, 12]。因此，调节肠道微生物可作为一种提高肿瘤免疫治疗疗效和/或减轻其 irAE 的策略。本文从肠道微生物与肿瘤免疫治疗关系的角度入手，讨论肠道微生物对 ICIs 治疗疗效和 irAE 影响，并报告通过调节肠道微生物来提高 ICIs 治疗疗效的研究进展，为肠道微生物在肿瘤免疫治疗领域的临床研究和应用提供参考。

1. 肠道微生物与抗肿瘤免疫治疗疗效

肠道微生物及其代谢产物对人体的免疫系统有着深远的影响，控制着机体对抗原的耐受和反应之间的微妙平衡[13, 14]。免疫检查点抑制剂（ICIs），包括 CTLA-4 和 PD-1/PD-L1 的单克隆抗体等，通过活化 T 细胞及 TCR 共刺激信号，解除抗肿瘤免疫抑制状态，增强抗肿瘤免疫效应，其疗效已在恶性黑色素瘤、非小细胞肺癌、结直肠癌等诸多肿瘤中被证实[15, 16]。越来越多的证据表明肠道菌群通过调节局部和全身免疫反应而影响 ICIs 疗效[17, 18]，相反，免疫治疗亦可影响肠道微生物的多样性，这种肠道微生物与 ICIs 的相互作用为干预肠道菌群以辅助免疫治疗的策略提供了理论基础和应用前景。

1.1 肠道微生物调节免疫治疗疗效的作用机制

2015 年，Sivan 等和 Vétizou 等两个研究小组同时在小鼠模型中发现 ICIs 治疗疗效受肠道微生物影响[19, 20]。Vétizou 等研究发现经广谱抗生素治疗或无菌饲养的小鼠对 CTLA4 抗体无应答，而喂食拟杆菌属细菌（如 B. fragilis、 B. thetaiotaomicron 或 Burkholderiales）可以恢复 CTLA4 抗体的免疫应答[20]，提示 CTLA4 抗体发挥抗肿瘤免疫活性需要特定肠道微生物群参与。而且在无菌饲养或广谱抗生素处理的荷瘤小鼠中，CTLA4 抗体诱导的 CD4+ T 细胞和肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）显著降低。同期另一项研究发现，PD-L1 单抗治疗有效的荷瘤小鼠肠道中的双歧杆菌的种类显著增加[19]。有趣的是，喂食双歧杆菌或与治疗有反应的小鼠共栖可使无免疫应答的荷瘤小鼠恢复免疫应答，进一步分析发现肠道菌群主要是通过促进树突细胞的成熟、增强其抗原呈递作用和 CD8+T 细胞肿瘤浸润来增强荷瘤小鼠免疫应答的。除拟杆菌属菌株和双歧杆菌菌株外，又有多种菌株被发现与 ICIs 治疗免疫应答有关[21]，如产气科斯林菌和粪肠球菌[22]、阿利斯贝斯属和普氏菌[23]、阿克曼菌[24, 25]等。

声明：本文未投过他刊或会议征文

目前研究发现，肠道微生物的代谢产物在肠道菌群调节肿瘤免疫微环境和影响抗肿瘤免疫应答中发挥重要作用[26]。肌苷是嗜粘蛋白阿克曼菌和假长双歧杆菌的嘌呤代谢产物，多项研究证明肌苷通过多种机制增强 ICIs 抗肿瘤免疫响应[27-29]。如，其可通过激活 IFN-γ 和 TNF-α 信号通路，增强 DC 细胞抗原呈递能力、肿瘤特异性 T 细胞的杀伤活性，并促进穿孔素和颗粒酶的释放，从而增强抗肿瘤免疫作用[27-29]。另外，其也可通过激活肌苷-A2AR-cAMP-PKA 信号通路刺激 cAMP 反应结合蛋白（cAMP response element-binding protein, pCREB）磷酸化，上调 IL12Rβ2 和 IFNγ 转录，促进 Th1 细胞在 TME 中的分化和积累[30]。同时，肠道微生物代谢产生的肌苷为 CD8+ T 细胞在葡萄糖缺乏时提供替代碳源，缓解肿瘤细胞对 CD8+ T 细胞能量代谢的限制[31]。短链脂肪酸（Short-chain fatty acids，SCFAs）是另一种备受关注的肠道微生物代谢产物。SCFAs 可通过 IL-12 信号通路诱导 CD8+ T 细胞表达 ID2，从而发挥胞毒性 T 细胞杀伤肿瘤细胞的作用，从而增强 ICIs 治疗效果[32]。单链脂肪酸中的戊酸和丁酸亦可通过促进 IFNγ、TNFα 等效应分子的表达以增强抗肿瘤作用[33]。此外，漆树酸、胆汁酸、色氨酸等肠道微生物代谢产物也能增强 ICIs 的抗肿瘤作用[26]。

1.2 肠道菌群与肿瘤免疫治疗疗效

多项回顾性研究表明，与未接受抗生素治疗的患者相比，开始 ICIs 治疗前或治疗期间接受广谱抗生素治疗的患者，其无进展生存期（progressive free survival，PFS）和总生存期（overall survival，OS）更短[34-36]。一项纳入 19 项研究，包括 2,740 例接受 ICIs 治疗的肿瘤患者 meta 分析研究发现：抗生素的使用与肿瘤患者的 OS （HR = 2.37; 95% CI = 2.05 - 2.75）和 PFS （HR = 1.84; 95% CI = 1.49-2.26）呈负相关，提示抗生素的使用可能降低抗肿瘤免疫效果[35]。Hakozaki 等通过分析 70 例晚期非小细胞肺癌（NSCLC）患者 ICIs 治疗前后的粪便样本发现：相对于抗生素使用组，未使用抗生素组患者的客观缓解率（objective response ratio，ORR）更高、OS 和 PFS 更长，ICIs 治疗响应组肠道微生物中的瘤胃菌和不动杆菌相对富集[37]，提示这两种菌群可能是免疫治的有益菌种。

肠道微生物与免疫治疗响应和疾病进展相关。一项队列研究收集了 94 名黑色素瘤患者 PD-1 治疗前后的粪便样本，用以评估肠道微生物组特征与 PD-1 治疗响应的相关性，发现治疗未进展者（non-progressors, NPs）和进展者（progressors, Ps）的微生物群组成在治疗后 9-10 个月时出现最大差异，其中在 NPs 中地中海杆菌属、布氏菌属、韦氏菌属、直肠杆菌属等丰度显著增加[38]。研究者进一步评估细菌种类与 PFS 的关联时发现拟杆菌属和变形杆菌门的成员似乎仅与 Ps 相关，而放线菌门和毛螺菌科的成员仅与 NPs 相关。除黑色素瘤以外，非小细胞肺癌（NSCLC）、肝细胞癌 （HCC）和肾癌患者 ICIs 治疗结局亦与肠道微生物结局显著相关[39-41]。

有趣的是，近期有研究发现肠道微生物中有些菌株对肿瘤免疫治疗疗效发挥起重要作用。一项纳入 165 例黑色素瘤患者样本的全球多中心临床研究发现，肠道中的假小链双歧杆菌、罗氏菌属和阿克曼菌与患者更好的免疫治疗响应相关。而且研究还发现，患者微生物组受到多种因素影响如患者体质、质子泵抑制剂使用和饮食习惯等[42]。另一项研究纳入了 47 例接受 PD-1/PD-L1 治疗的 NSCLC 患者，其结果发现与疾病进展患者相比，在疾病稳定和部分缓解的患者中，阿克曼菌的百分比较高[43]。除此之外，脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、伯克氏杆菌等多种菌株也被发现与 ICI 治疗疗效相关[20, 43]。虽然现在已有多项研究发现患者微生物组的某些菌株对改善肿瘤免疫治疗结局存在相关性，但由于研究纳入病例样本少，且肠道微生物组之间存在个体差异，导致研究结果差异较大，甚至矛盾。因此，未来相关临床研究需要对研究设计进一步优化，研究纳入的肿瘤类型进一步多样化，对可能影响免疫疗效的菌株需要进一步明确。

2. 肠道微生物与免疫相关不良反应

ICIs 在激活免疫治疗杀伤肿瘤细胞的同时，也会破坏宿主免疫平衡，改变肠道菌群组成和丰度，引起免疫相关性结肠炎、肺炎、心肌炎等免疫相关不良事件（irAEs）。例如，CTLA-4 抗体的使用可使粪便中拟杆菌目细菌和伯克霍尔德目细菌快速减少，梭菌目细菌相对增加[20]。一项真实世界研究结果显示，严重 irAEs 患者粪便中的链球菌、普拉梭菌和窄食单胞菌明显丰度较高，而轻度 irAEs 患者中普拉梭菌和毛螺菌丰度较高，利用这 5 种菌属细菌的丰度作为主要参数构建数学模型，成功区分严重程度不同的 irAEs 患者，提示某些肠道微生物可有效预测患者发生 irAEs 的严重程度[44]。未来，肠道微生物可以作为预测或监测 irAEs 潜在生物标志物。

新的证据发现，肠道微生物群在 irAEs 中具有双重作用。一方面，某些肠道微生物可抑制免疫治疗引起的不良反应。如双歧杆菌、脆弱拟杆菌和洋葱伯克霍尔德菌可改善 CTLA4 抗体导致的免疫相关性肠炎[20, 45]。一项前

瞻性研究结果表明，接受伊匹单抗治疗的转移性黑色素瘤患者中，耐受免疫治疗引起结肠炎的患者中拟杆菌门的细菌丰度增加[46]。另一方面，部分肠道细菌的存在也可能会加重 irAEs。在接受抗 PD-1 单抗治疗的黑色素瘤患者中，irAEs 增加与毛螺菌属和链球菌属细菌的富集相关[38]。一项纳入 26 例接受伊匹单抗治疗的转移性黑色素瘤患者的研究发现，基线时属于普拉梭菌和厚壁菌门的细菌丰度高的患者更易发生免疫治疗相关结肠炎[47]。有意思的是，研究显示部分肠道菌群增强 ICIs 疗效的同时，irAEs 的发生率也增加，这种现象被称为 ICIs 的“疗效-毒性耦合效应”[48-50]。例如，尽管属于普拉梭菌和厚壁菌门的细菌丰度高的黑色素瘤患者免疫治疗的 PFS 和 OS 延长，但这些患者发生结肠炎的风险也增加[47]。这种疗效和毒性正相关的“疗效-毒性耦合效应”也是目前 ICIs 临床实践中的重要挑战。

3. 肠道微生物调节策略

鉴于肠道微生物在抗肿瘤免疫治疗中的重要作用，通过人为调节肠道微生物来增强抗肿瘤免疫治疗疗效、降低 irAEs 发生率或严重程度已成为肿瘤免疫治疗领域新的研究方向。目前，已有多种肠道微生物调节策略在临床研究或临床实践中，粪菌移植（Fecal microbiota transplantation, FMT）、使用菌群调节剂等。

3.1 粪菌移植

FMT 是指将健康个体的肠道微生物通过口服冻干片或胃肠镜下给药的方式移植到患者肠道治疗疾病的一种肠道微生物调节策略，也是目前最直接和有效的策略。FMT 已被成功用于治疗艰难梭菌感染所致的伪膜性肠炎[51]。近年来，有研究者探索将免疫治疗获益者的肠道微生物移植给对免疫治疗无应答的患者，来增强免疫治疗疗效。在接受 PD-1 抗体治疗的转移性黑色素瘤患者中，将治疗敏感的患者肠道微生物移植给耐药的患者，结果显示接收 FMT 的患者免疫治疗应答得到改善[52, 53]。进一步分析还发现，粪菌移植后，受体患者肠道微生物中瘤胃球菌科和双歧杆菌科等治疗有益细菌丰度大幅增加，肠道固有层和肿瘤微环境中免疫细胞浸润和基因表达谱均呈现有利变化，进而逆转患者对 PD-1 抗体耐药。除黑色素瘤外，类似研究也在胃肠道肿瘤和前列腺癌中开展[54, 55]，这些研究均发现，FMT 能够改变接受者的肠道微生物组成，重新编程肿瘤微环境，部分逆转晚期和/或转移性肿瘤患者对 ICIs 治疗的耐药性。虽然 FMT 为改善肿瘤免疫治疗预后提供了新思路，但其在临床上的广泛应用仍然面临诸多挑战：合适的 FMT 供体的选择，FMT 移植剂量、给药途径、长期安全性等。因此，谨慎地开展随机对照临床试验以充分验证 FMT 调节肠道菌群的安全性以及 FMT 联合 ICI 的疗效是 FMT 临床应用的必经之路。

3.2 菌群调节剂

菌群调节剂指在适当剂量下可对宿主健康产生有益影响的益生菌和益生元等，可增强胃肠道免疫，维持肠道屏障完整性，产生有益代谢产物对抗病原体，提高免疫治疗效果，减少抗肿瘤治疗相关不良反应[56]。目前肿瘤治疗相关的研究主要集中在普拉梭菌、阿克曼菌和脆弱拟杆菌等少数菌株[57]。Vétizou 等通过给抗生素预处理或无菌饲养的小鼠灌胃脆弱拟杆菌可恢复小鼠对 CTLA4 单抗的免疫应答[20]。Xu 等发现阿克曼菌可通过促进肿瘤免疫相关细胞因子（如 IFN-γ 和 IL-2）的分泌，维持 PD-1 抗体的治疗效果[58]。

一项纳入 30 名转移性肾细胞癌患者的开放标签 I 期临床研究（NCT03829111），以 2:1 的比例随机分配，分别在每日口服或不口服菌群调节剂 CBM588 的情况下接受 nivolumab 和 ipilimumab 治疗，结果显示接受 nivolumab–ipilimumab 联合 CBM588 治疗患者的 PFS 显著长于未接受 CBM588 的患者（12.7 个月 Vs2.5 个月，HR=0.15，95%CI 0.05-0.47，P = 0.001）。此外，接受 CBM588 联合免疫治疗的患者的缓解率也高于单独使用免疫治疗组（58% vs 20%，P = 0.06）[59]。Hibberd 等发现结直肠癌患者服用菌群调节剂（乳酸双歧杆菌和嗜酸乳杆菌）后，肿瘤、黏膜和粪便中产丁酸盐细菌的丰度增加，尤其是普拉梭菌和梭状芽胞杆菌属（NCT03072641）[60]。一项纳入 5 项研究、1031 例晚期实体瘤患者 meta 分析发现，联合菌群调节剂和免疫治疗的患者具有更长的 OS（HR = 0.50, 95% CI: 0.30–0.85）和 PFS（HR = 0.51, 95% CI: 0.42–0.61）[61]。然而，在另一项纳入接受抗 PD-L1 治疗的 158 例晚期黑色素瘤患者研究中发现，联合使用商品化菌群调节剂患者的 PFS 短于未使用患者（17 个月 vs 23 个月，P=0.29），治疗反应比例也低于未使用者（59% vs 68%），但均无统计学意义[62]。尽管多项临床研究支持菌群调节剂在免疫治疗中的应用，但经过充分的临床验证之前，免疫调节剂联合免疫治疗的策略仍需谨慎使用。

4. 展望

虽然肠道微生物在提高免疫治疗疗效和减轻免疫相关不良反应表现出良好的前景，但临床研究数据仍然有限，相关治疗策略的探索还处于起步阶段，在广泛进行临床应用前，还有以下几个问题需要明确。

首先，需要明确哪些种类的细菌对哪种 ICIs 制剂具有正性或负性的调节作用。目前关于哪些微生物最“关键”，不同的研究结论存在较大差异，因此亟需阐明在各种 ICIs 治疗中是否存在一种或几种能够增强其疗效或降低 irAEs 的“关键”肠道微生物。其次，肠道微生物影响免疫治疗疗效和 irAEs 的机制需要进一步探明，为下一步开发肠道微生物调节剂提供理论和技术支持，细菌代谢产物、肠黏膜屏障功能等可能是值得关注的领域。再次，FMT 是调节肠道菌群最直接和有效的方法，因此，探索最佳供体选择标准、制剂方法、给药途径和 FMT 相关不良反应也是重要的研究方向。最后，目前的研究多集中在肠道微生物对免疫治疗的影响，而对其他部位微生物群的研究相对较少，如肿瘤局部的微生物群和远处的微生物群是否与远处肿瘤的发生、免疫治疗应答或 irAEs 的发生相关。此外，肿瘤局部微生物与肠道微生物之间的联系目前仍是未解之谜，将是未来肿瘤微生物的重要研究领域。同时，我们也必须意识到肠道微生物与免疫治疗的研究本身充满了挑战，如动物模型和人体肠道菌群的固有差异性极大地增加了临床前研究向临床转化的难度，FMT 等临床试验成本高风险大，新一代益生菌的规模化生产及质量控制，微生物组的组成受种族、地理和饮食影响具有差异性等。尽管未来的研究充满挑战，现有研究结果表明肠道微生物已成为肿瘤个体化精准治疗的前沿方向之一。肠道微生物与肿瘤免疫治疗的研究已然开启了“生态肿瘤学时代”，深入理解肿瘤、宿主、免疫系统和寄生微生物之间关系有助于开发出更有效的肿瘤治疗方法。

参考文献

[1] Morad G., Helmink B. A., Sharma P., Wargo J. A. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade （vol 184, pg 5309, 2021）. CELL. 2022, 185, 576-576.

[2] Arbour K. C., Riely G. J. Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer A Review. JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. 2019, 322, 764-774.

[3] Yu I. S., Wee K., Williamson L., Titmuss E., An J., Naderi-Azad S., Metcalf C., Yip S., Horst B., Jones S. J. M., Paton K., Nelson B. H., Marra M., Laskin J. J., Savage K. J. Exceptional response to combination ipilimumab and nivolumab in metastatic uveal melanoma: Insights from genomic analysis. MELANOMA RESEARCH. 2022, 32, 278-285.

[4] Qin S., Ren Z., Meng Z., Chen Z., Chai X., Xiong J., Bai Y., Yang L., Zhu H., Fang W., Lin X., Chen X., Li E., Wang L., Chen C., Zou J. Camrelizumab in patients with previously treated advanced hepatocellular carcinoma: a multicentre, open-label, parallel-group, randomised, phase 2 trial. LANCET ONCOLOGY. 2020, 21, 571-580.

[5] Nayak L., Molinaro A. M., Peters K., Clarke J. L., Jordan J. T., de Groot J., Nghiemphu L., Kaley T., Colman H., McCluskey C., Gaffey S., Smith T. R., Cote D. J., Severgnini M., Yearley J. H., Zhao Q., Blumenschein W. M., Duda D. G., Muzikansky A., Jain R. K., Wen P. Y., Reardon D. A. Randomized Phase II and Biomarker Study of Pembrolizumab plus Bevacizumab versus Pembrolizumab Alone for Patients with Recurrent Glioblastoma. CLINICAL CANCER RESEARCH. 2021, 27, 1048-1057.

[6] Wang M., Zhen H., Jiang X., Lu Y., Wei Y., Jin J., Li Q. Clinical observation of the efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of patients with advanced solid tumors. IMMUNITY INFLAMMATION AND DISEASE. 2021, 9, 1584-1595.

[7] Aggarwal V., Sunder S., Verma S. R. Disease-associated dysbiosis and potential therapeutic role of Akkermansia muciniphila, a mucus degrading bacteria of gut microbiome. FOLIA MICROBIOLOGICA.

[8] Gubatan J., Boye T. L., Temby M., Sojwal R. S., Holman D. R., Sinha S. R., Rogalla S. R., Nielsen O. H. Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Role in Pathogenesis, Dietary Modulation, and Colitis-Associated Colon Cancer. MICROORGANISMS. 2022, 10.

[9] Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLOS BIOLOGY. 2016, 14.

[10] de Vos W. M., Tilg H., Van Hul M., Cani P. D. Gut microbiome and health: mechanistic insights. GUT. 2022, 71, 1020-1032.

[11] Nomura M. Association of the gut microbiome with cancer immunotherapy. INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL

ONCOLOGY.
[12] Xu J., Liu M. Regulation of Cancer Immune Checkpoints Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy Concluding Remarks. In: Xu J, editor. REGULATION OF CANCER IMMUNE CHECKPOINTS: MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS AND THERAPY2020. p. 651-653.
[13] Brown E. M., Kenny D. J., Xavier R. J. Gut Microbiota Regulation of T Cells During Inflammation and Autoimmunity. In: Yokoyama WM, editor. ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, VOL 37, 20192019. p. 599-624.
[14] Zheng D., Liwinski T., Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. CELL RESEARCH. 2020, 30, 492-506.
[15] Ossato A., Damuzzo V., Baldo P., Mengato D., Chiumente M., Messori A. Immune checkpoint inhibitors as first line in advanced melanoma: Evaluating progression-free survival based on reconstructed individual patient data. Cancer medicine. 2022.
[16] Wu Y., Biswas D., Swanton C. Impact of cancer evolution on immune surveillance and checkpoint inhibitor response. Seminars in cancer biology. 2022, 84, 89-102.
[17] Li X., Zhang S., Guo G., Han J., Yu J. Gut microbiome in modulating immune checkpoint inhibitors. EBioMedicine. 2022, 82, 104163-104163.
[18] Roviello G., Iannone L. F., Bersanelli M., Mini E., Catalano M. The gut microbiome and efficacy of cancer immunotherapy. PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS. 2022, 231.
[19] Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J. B., Aquino-Michaels K., Earley Z. M., Benyamin F. W., Lei Y. M., Jabri B., Alegre M.-L., Chang E. B., Gajewski T. F. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. SCIENCE. 2015, 350, 1084-1089.
[20] Vetizou M., Pitt J. M., Daillere R., Lepage P., Waldschmitt N., Flament C., Rusakiewicz S., Routy B., Roberti M. P., Duong C. P. M., Poirier-Colame V., Roux A., Becharef S., Formenti S., Golden E., Cording S., Eberl G., Schlitzer A., Ginhoux F., Mani S., Yamazaki T., Jacquelot N., Enot D. P., Berard M., Nigou J., Opolon P., Eggermont A., Woerther P.-L., Chachaty E., Chaput N., Robert C., Mateus C., Kroemer G., Raoult D., Boneca I. G., Carbonnel F., Chamaillard M., Zitvogel L. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. SCIENCE. 2015, 350, 1079-+.
[21] Sun J.-Y., Yin T.-L., Zhou J., Xu J., Lu X.-J. Gut microbiome and cancer immunotherapy. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY. 2020, 235, 4082-4088.
[22] Matson V., Fessler J., Bao R., Chongsuwat T., Zha Y., Alegre M.-L., Luke J. J., Gajewski T. F. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. SCIENCE. 2018, 359, 104-+.
[23] Jin Y., Dong H., Xia L., Yang Y., Zhu Y., Shen Y., Zheng H., Yao C., Wang Y., Lu S. The Diversity of Gut Microbiome is Associated With Favorable Responses to Anti-Programmed Death 1 Immunotherapy in Chinese Patients With NSCLC. JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY. 2019, 14, 1378-1389.
[24] Salgia N. J., Bergerot P. G., Maia M. C., Dizman N., Hsu J., Gillece J. D., Folkerts M., Reining L., Trent J., Highlander S. K., Pal S. K. Stool Microbiome Profiling of Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Receiving Anti-PD-1 Immune Checkpoint Inhibitors. EUROPEAN UROLOGY. 2020, 78, 498-502.
[25] Derosa L., Routy B., Thomas A. M., Iebba V., Zalcman G., Friard S., Mazieres J., Audigier-Valette C., Moro-Sibilot D., Goldwasser F., Silva C. A. C., Terrisse S., Bonvalet M., Scherpereel A., Pegliasco H., Richard C., Ghiringhelli F., Elkrief A., Desilets A., Blanc-Durand F., Cumbo F., Blanco A., Boidot R., Chevrier S., Daillere R., Kroemer G., Alla L., Pons N., Le Chatelier E., Galleron N., Roume H., Dubuisson A., Bouchard N., Messaoudene M., Drubay D., Deutsch E., Barlesi F., Planchard D., Segata N., Martinez S., Zitvogel L., Soria J. C., Besse B. Intestinal Akkermansia muciniphila predicts clinical response to PD-1 blockade in patients with advanced non-small-cell lung cancer. NATURE MEDICINE. 2022, 28, 315-+.
[26] Lu Y., Yuan X., Wang M., He Z., Li H., Wang J., Li Q. Gut microbiota influence immunotherapy responses: mechanisms and therapeutic strategies. JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY. 2022, 15.
[27] Wang T., Gnanaprakasam J. N. R., Chen X., Kang S., Xu X., Sun H., Liu L., Rodgers H., Miller E., Cassel T. A., Sun Q.,

Vicente-Munoz S., Warmoes M. O., Lin P., Piedra-Quintero Z. L., Guerau-de-Arellano M., Cassady K. A., Zheng S. G., Yang J., Lane A. N., Song X., Fan T. W. M., Wang R. Inosine is an alternative carbon source for CD8（+）-T-cell function under glucose restriction. NATURE METABOLISM. 2020, 2, 635-+.

[28] Bird L. Microbial metabolite boosts immunotherapy. NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY. 2020, 20, 648-649.

[29] Shinohara Y., Tsukimoto M. Guanine and inosine nucleotides/nucleosides suppress murine T cell activation. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 2018, 498, 764-768.

[30] Mager L. F., Burkhard R., Pett N., Cooke N. C. A., Brown K., Ramay H., Paik S., Stagg J., Groves R. A., Gallo M., Lewis I. A., Geuking M. B., McCoy K. D. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. SCIENCE. 2020, 369, 1481-+.

[31] Renner K., Bruss C., Schnell A., Koehl G., Becker H. M., Fante M., Menevse A.-N., Kauer N., Blazquez R., Hacker L., Decking S.-M., Bohn T., Faerber S., Evert K., Aigle L., Amslinger S., Landa M., Krijgsman O., Rozeman E. A., Brummer C., Siska P. J., Singer K., Pektor S., Miederer M., Peter K., Gottfried E., Herr W., Marchiq I., Pouyssegur J., Roush W. R., Ong S., Warren S., Pukrop T., Beckhove P., Lang S. A., Bopp T., Blank C. U., Cleveland J. L., Oefner P. J., Dettmer K., Selby M., Kreutz M. Restricting Glycolysis Preserves T Cell Effector Functions and Augments Checkpoint Therapy. CELL REPORTS. 2019, 29, 135-+.

[32] Nomura M., Nagatomo R., Doi K., Shimizu J., Baba K., Saito T., Matsumoto S., Inoue K., Muto M. Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. JAMA NETWORK OPEN. 2020, 3.

[33] Luu M., Riester Z., Baldrich A., Reichardt N., Yuille S., Busetti A., Klein M., Wempe A., Leister H., Raifer H., Picard F., Muhammad K., Ohl K., Romero R., Fischer F., Bauer C. A., Huber M., Gress T. M., Lauth M., Danhof S., Bopp T., Nerreter T., Mulder I. E., Steinhoff U., Hudecek M., Visekruna A. Microbial short-chain fatty acids modulate CD8（+） T cell responses and improve adoptive immunotherapy for cancer. NATURE COMMUNICATIONS. 2021, 12.

[34] Lalani A.-K. A., Xie W., Braun D. A., Kaymakcalan M., Bosse D., Steinharter J. A., Martini D. J., Simantov R., Lin X., Wei X. X., McGregor B. A., McKay R. R., Harshman L. C., Choueiri T. K. Effect of Antibiotic Use on Outcomes with Systemic Therapies in Metastatic Renal Cell Carcinoma. EUROPEAN UROLOGY ONCOLOGY. 2020, 3, 372-381.

[35] Huang X.-Z., Gao P., Song Y.-X., Xu Y., Sun J.-X., Chen X.-W., Zhao J.-H., Wang Z.-N. Antibiotic use and the efficacy of immune checkpoint inhibitors in cancer patients: a pooled analysis of 2740 cancer patients. ONCOIMMUNOLOGY. 2019, 8.

[36] Tinsley N., Zhou C., Tan G., Rack S., Lorigan P., Blackhall F., Krebs M., Carter L., Thistlethwaite F., Graham D., Cook N. Cumulative Antibiotic Use Significantly Decreases Efficacy of Checkpoint Inhibitors in Patients with Advanced Cancer. ONCOLOGIST. 2020, 25, 55-63.

[37] Hakozaki T., Richard C., Elkrief A., Hosomi Y., Benlaifaoui M., Mimpen I., Terrisse S., Derosa L., Zitvogel L., Routy B., Okuma Y. The Gut Microbiome Associates with Immune Checkpoint Inhibition Outcomes in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH. 2020, 8, 1243-1250.

[38] McCulloch J. A., Davar D., Rodrigues R. R., Badger J. H., Fang J. R., Cole A. M., Balaji A. K., Vetizou M., Prescott S. M., Fernandes M. R., Costa R. G. F., Yuan W., Salcedo R., Bahadiroglu E., Roy S., DeBlasio R. N., Morrison R. M., Chauvin J.-M., Ding Q., Zidi B., Lowin A., Chakka S., Gao W., Pagliano O., Ernst S. J., Rose A., Newman N. K., Morgun A., Zarour H. M., Trinchieri G., Dzutsev A. K. Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1. NATURE MEDICINE. 2022, 28, 545-+.

[39] Derosa L., Routy B., Fidelle M., Iebba V., Alla L., Pasolli E., Segata N., Desnoyer A., Pietrantonio F., Ferrere G., Fahrner J.-E., Chatellier E. L., Pons N., Galleron N., Roume H., Duong C. P. M., Mondragon L., Iribarren K., Bonvalet M., Terrisse S., Rauber C., Goubet A.-G., Daillere R., Lemaitre F., Reni A., Casu B., Alou M. T., Silva C. A. C., Raoult D., Fizazi K., Escudier B., Kroemer G., Albiges L., Zitvogel L. Gut Bacteria Composition Drives Primary Resistance to Cancer Immunotherapy in Renal Cell Carcinoma Patients. EUROPEAN UROLOGY. 2020, 78, 195-206.

[40] Song P., Yang D., Wang H., Cui X., Si X., Zhang X., Zhang L. Relationship between intestinal flora structure and metabolite analysis and immunotherapy efficacy in Chinese NSCLC patients. THORACIC CANCER. 2020, 11, 1621-1632.
[41] Lee P.-C., Wu C.-J., Hung Y.-W., Lee C. J., Chi C.-T., Lee I. C., Yu-Lun K., Chou S.-H., Luo J.-C., Hou M.-C., Huang Y.-H. Gut microbiota and metabolites associate with outcomes of immune checkpoint inhibitor-treated unresectable hepatocellular carcinoma. JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER. 2022, 10.
[42] Lee K. A., Thomas A. M., Bolte L. A., Bjork J. R., de Ruijter L. K., Armanini F., Asnicar F., Blanco-Miguez A., Board R., Calbet-Llopart N., Derosa L., Dhomen N., Brooks K., Harland M., Harries M., Leeming E. R., Lorigan P., Manghi P., Marais R., Newton-Bishop J., Nezi L., Pinto F., Potrony M., Puig S., Serra-Bellver P., Shaw H. M., Tamburini S., Valpione S., Vijay A., Waldron L., Zitvogel L., Zolfo M., de Vries E. G. E., Nathan P., Fehrmann R. S. N., Bataille V., Hospers G. A. P., Spector T. D., Weersma R. K., Segata N. Cross-cohort gut microbiome associations with immune checkpoint inhibitor response in advanced melanoma. NATURE MEDICINE. 2022, 28, 535-+.
[43] Grenda A., Iwan E., Chmielewska I., Krawczyk P., Giza A., Bomba A., Frak M., Rolska A., Szczyrek M., Kieszko R., Kucharczyk T., Jarosz B., Wasyl D., Milanowski J. Presence of Akkermansiaceae in gut microbiome and immunotherapy effectiveness in patients with advanced non-small cell lung cancer. AMB EXPRESS. 2022, 12.
[44] Liu W., Ma F., Sun B., Liu Y., Tang H., Luo J., Chen H., Luo Z. Intestinal Microbiome Associated With Immune-Related Adverse Events for Patients Treated With Anti-PD-1 Inhibitors, a Real-World Study. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY. 2021, 12.
[45] Sun S., Luo L., Liang W., Yin Q., Guo J., Rush A. M., Lv Z., Liang Q., Fischbach M. A., Sonnenburg J. L., Dodd D., Davis M. M., Wang F. Bifidobacterium alters the gut microbiota and modulates the functional metabolism of T regulatory cells in the context of immune checkpoint blockade. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. 2020, 117, 27509-27515.
[46] Dubin K., Callahan M. K., Ren B., Khanin R., Viale A., Ling L., No D., Gobourne A., Littmann E., Huttenhower C., Pamer E. G., Wolchok J. D. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. NATURE COMMUNICATIONS. 2016, 7.
[47] Chaput N., Lepage P., Coutzac C., Soularue E., Le Roux K., Monot C., Boselli L., Routier E., Cassard L., Collins M., Vaysse T., Marthey L., Eggermont A., Asvatourian V., Lanoy E., Mateus C., Robert C., Carbonnel F. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2019, 30, 2012-2012.
[48] Naqash A. R., Ricciuti B., Owen D. H., Florou V., Toi Y., Cherry C., Hafiz M., De Giglio A., Muzaffar M., Patel S. H., Sugawara S., Burkart J., Park W., Chiari R., Sugisaka J., Otterson G. A., de Lima Lopes G., Walker P. R. Outcomes associated with immune-related adverse events in metastatic non-small cell lung cancer treated with nivolumab: a pooled exploratory analysis from a global cohort （vol 89, 451, 2020）. CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY. 2020, 69, 1189-1189.
[49] Verzoni E., Carteni G., Cortesi E., Giannarelli D., De Giglio A., Sabbatini R., Buti S., Rossetti S., Cognetti F., Rastelli F., Sobrero A., Turci D., Sternberg C. N., Porta C., Cappuzzo F., Tortora G., Tassinari D., Panni S., Pazzola A., Surico G., Raimondi A., De Giorgi U., Procopio G., Italian Nivolumab Renal Cell C. Real-world efficacy and safety of nivolumab in previously-treated metastatic renal cell carcinoma, and association between immune-related adverse events and survival: the Italian expanded access program. JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER. 2019, 7.
[50] Wardill H. R., Chan R. J., Chan A., Keefe D., Costello S. P., Hart N. H. Dual contribution of the gut microbiome to immunotherapy efficacy and toxicity: supportive care implications and recommendations. SUPPORTIVE CARE IN CANCER. 2022, 30, 6369-6373.
[51] Youngster I., Gerding D. N. Making Fecal Microbiota Transplantation Easier to Swallow: Freeze-Dried Preparation for Recurrent Clostridium difficile Infections. AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY. 2017, 112, 948-950.
[52] Baruch E. N., Youngster I., Ben-Betzalel G., Ortenberg R., Lahat A., Katz L., Adler K., Dick-Necula D., Raskin S., Bloch

N., Rotin D., Anafi L., Avivi C., Melnichenko J., Steinberg-Silman Y., Mamtani R., Harati H., Asher N., Shapira-Frommer R., Brosh-Nissimov T., Eshet Y., Ben-Simon S., Ziv O., Khan M. A. W., Amit M., Ajami N. J., Barshack I., Schachter J., Wargo J. A., Koren O., Markel G., Boursi B. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. SCIENCE. 2021, 371, 602-+.

[53] Davar D., Dzutsev A. K., McCulloch J. A., Rodrigues R. R., Chauvin J.-M., Morrison R. M., Deblasio R. N., Menna C., Ding Q., Pagliano O., Zidi B., Zhang S., Badger J. H., Vetizou M., Cole A. M., Fernandes M. R., Prescott S., Costa R. G. F., Balaji A. K., Morgun A., Vujkovic-Cvijin I., Wang H., Borhani A. A., Schwartz M. B., Dubner H. M., Ernst S. J., Rose A., Najjar Y. G., Belkaid Y., Kirkwood J. M., Trinchieri G., Zarour H. M. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. SCIENCE. 2021, 371, 595-+.

[54] Maleki S., Lenehan J., Burton J., Silverman M., Parvathy S. N., El-Hajjar M., Krishnamoorthy M. COMBINATION OF FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION FROM HEALTHY DONORS WITH ANTI-PD1 IMMUNOTHERAPY IN TREATMENT-NAIVE ADVANCED OR METASTATIC MELANOMA PATIENTS. JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER. 2020, 8, A11-A12.

[55] Park E. M., Chelvanambi M., Bhutiani N., Kroemer G., Zitvogel L., Wargo J. A. Targeting the gut and tumor microbiota in cancer. NATURE MEDICINE. 2022, 28, 690-703.

[56] Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein D. J., Pot B., Morelli L., Canani R. B., Flint H. J., Salminen S., Calder P. C., Sanders M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. NATURE REVIEWS GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY. 2014, 11, 506-514.

[57] Kazmierczak-Siedlecka K., Skonieczna-Zydecka K., Hupp T., Duchnowska R., Marek-Trzonkowska N., Polom K. Next-generation probiotics - do they open new therapeutic strategies for cancer patients? GUT MICROBES. 2022, 14.

[58] Xu X., Lv J., Guo F., Li J., Jia Y., Jiang D., Wang N., Zhang C., Kong L., Liu Y., Zhang Y., Lv J., Li Z. Gut Microbiome Influences the Efficacy of PD-1 Antibody Immunotherapy on MSS-Type Colorectal Cancer via Metabolic Pathway. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY. 2020, 11.

[59] Dizman N., Meza L., Bergerot P., Alcantara M., Dorff T., Lyou Y., Frankel P., Cui Y., Mira V., Llamas M., Hsu J., Zengin Z., Salgia N., Salgia S., Malhotra J., Chawla N., Chehrazi-Raffle A., Muddasani R., Gillece J., Reining L., Trent J., Takahashi M., Oka K., Higashi S., Kortylewski M., Highlander S. K., Pal S. K. Nivolumab plus ipilimumab with or without live bacterial supplementation in metastatic renal cell carcinoma: a randomized phase 1 trial. NATURE MEDICINE. 2022, 28, 704-+.

[60] Hibberd A. A., Lyra A., Ouwehand A. C., Rolny P., Lindegren H., Cedgard L., Wettergren Y. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. BMJ OPEN GASTROENTEROLOGY. 2017, 4.

[61] Wan L., Wu C., Wu Q., Luo S., Liu J., Xie X. Impact of probiotics use on clinical outcomes of immune checkpoint inhibitors therapy in cancer patients. CANCER MEDICINE.

[62] Spencer C. N., McQuade J. L., Gopalakrishnan V., McCulloch J. A., Vetizou M., Cogdill A. P., Khan M. A. W., Zhang X., White M. G., Peterson C. B., Wong M. C., Morad G., Rodgers T., Badger J. H., Helmink B. A., Andrews M. C., Rodrigues R. R., Morgun A., Kim Y. S., Roszik J., Hoffman K. L., Zheng J., Zhou Y., Medik Y. B., Kahn L. M., Johnson S., Hudgens C. W., Wani K., Gaudreau P.-O., Harris A. L., Jamal M. A., Baruch E. N., Perez-Guijarro E., Day C.-P., Merlino G., Pazdrak B., Lochmann B. S., Szczepaniak-Sloane R. A., Arora R., Anderson J., Zobniw C. M., Posada E., Sirmans E., Simon J., Haydu L. E., Burton E. M., Wang L., Dang M., Clise-Dwyer K., Schneider S., Chapman T., Anang N.-A. A. S., Duncan S., Toker J., Malke J. C., Glitza I. C., Amaria R. N., Tawbi H. A., Diab A., Wong M. K., Patel S. P., Woodman S. E., Davies M. A., Ross M. I., Gershenwald J. E., Lee J. E., Hwu P., Jensen V., Samuels Y., Straussman R., Ajami N. J., Nelson K. C., Nezi L., Petrosino J. F., Futreal P. A., Lazar A. J., Hu J., Jenq R. R., Tetzlaff M. T., Yan Y., Garrett W. S., Huttenhower C., Sharma P., Watowich S. S., Allison J. P., Cohen L., Trinchieri G., Daniel C. R., Wargo J. A. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response. SCIENCE. 2021, 374, 1632-+.

维生素 D 用于新冠防治的研究进展

郑冬妮[1]，罗威[2]，周后凤[1]

（1.成都市第五人民医院药剂科，611130，四川省成都市麻市街 33 号 2.西南医科大学药学院，646000，四川省泸州市龙马潭区香林路 1 段 1 号）

【摘要】2019 年出现新型冠状病毒肺炎（Corona Virus Disease 2019,COVID-19，简称新冠肺炎）以来，其药物治疗方案已发生了诸多变化，而关于维生素用于新冠的预防与治疗的研究也有诸多进展。本文共纳入国内外 25 篇文献，其中包含 Meta 分析、综述、系统评价和随机对照实验等。通过各种实验结果以及综述结果等，总结了国内外维生素 D 在新冠肺炎防治领域的实验研究和临床应用现状，为今后开发维生素 D 用于新冠防治提供参考。

【关键词】维生素 D；新冠肺炎；防治

Research progress of vitamin D in the prevention and treatment of COVID-19

Zheng Dongni[1]，Luo Wei[2]，Zhou Houfeng[1]

【**Abstract**】Since the outbreak of COVID-19 in 2019, there have been many changes in drug treatment, and the research on the use of vitamins in the prevention and treatment of COVID-19 has also made a lot of progress. This paper includes a total of 25 domestic and foreign literature. The experimental research and clinical application status of vitamin D in the field of new crown pneumonia prevention and treatment at home and abroad are summarized, and this paper provides reference for the future development of vitamin D for new crown prevention and treatment.

【**Key words**】Vitamin D; COVID-19；prevention and control

新冠肺炎是一种经呼吸道传染的急性感染性肺炎，病原体是一种先前未在人类中发现的新型冠状病毒。新型冠状病毒属于β属的冠状病毒，感染潜伏期 1～14 d，多为 3～7 d，潜伏期具有传染性，人群普遍易感。传染源主要是感染确诊患者和无症状感染者，传播途径主要经呼吸道飞沫传播和密切接触传播。临床可出现发热、头痛、咽痛、咳嗽、呼吸困难，甚至恶心、呕吐等症状。多数患者预后良好，部分严重病例可出现急性呼吸窘迫综合征或脓毒血症、休克，难以纠正的代谢性酸中毒及凝血功能障碍等，甚至死亡。

维生素 D 是一种脂溶性维生素，是维持高等动物生命所必需的营养素.人皮肤中 7-脱氢胆固醇经紫外线照射可转化成维生素 D3，即内源性维生素 D。外源性维生素 D 主要由动物性食物中获得，如鱼肝、蛋黄、奶油等，摄人后在胆汁作用下从小肠吸收入血。维生素 D2 和维生素 D3 对人体具有同样的生理作用，两者本身无生物活性，经膳食和光照获得的维生素 D2、维生素 D3 与血浆α-球蛋白结合被转运至肝脏经 25-羟化酶作用，变成 25 羟维生素 D3（25，（0H）D3），然后再在肾脏中混合功能氧化酶-1α羟化酶作用下转变成具有生物活性的 1，25 二羟基维生素 D3（l，25(OH)2D3），其活性比 25，（0H）D3 高 500—1000 倍，是维生素 D 的主要活性形式[1]。

目前对于新冠肺炎的防治措施尚且不足。李洁等[2]Meta 分析研究发现，维生素 D 缺乏与新型冠状病毒肺炎发病风险具有较强的相关性，确诊的新型冠状病毒肺炎病人与非新型冠状病毒肺炎病人相比，维生素 D 水平明

作者简介：第一作者，郑冬妮，女，本科，药师，研究方向为临床药学，（电子邮箱）361197378@qq.com；通讯作者，周后凤，女，大学本科，主任药师，研究方向为临床药学、药事管理，（电子信箱）510823751@qq.com。

基金：成都市医学科研课题（2021097）

显下降[SMD=-1.28,95%CI(-1.94,-0.62), P=0.000 1]。目前用于新冠防治的维生素研究以维生素 D 居多，研究形式包括了随机对照试验、临床 meta 分析、系统评价等，本文从药理作用、临床应用方面就维生素 D 用于新冠防治的研究进展做简要的综述。

1.新冠的预防

1.1 增强免疫力

单核细胞中 1，25(OH)2D3 的合成与固有免疫细胞的正常功能密切相关。骨化三醇作为维生素 D3 经肝脏和肾脏羟化酶代谢为抗佝偻病活性最强的 1，25(OH)2D3，可以通过增强巨噬细胞的趋化和吞噬反应及抗菌肽的产生来刺激天然免疫反应[3]。同时，维生素 D 对 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的免疫调节作用可通过直接作用于细胞增殖、分化、凋亡实现。HEINE 等[4]研究显示，维生素 D 通过调整 CD4+T 淋巴细胞减少细胞因子分泌，进而抑制 B 淋巴细胞的功能。此外，1，25(OH)2D3 可以抑制浆细胞的增殖和分化从而抑制免疫球蛋白 E(IgE)释放，抑制记忆 B 细胞形成，增加白细胞介素 10（IL-10）的产生。以上研究均表明，维生素 D 可通过增强调节性免疫反应来发挥防治病毒感染的作用。

1.2 抑制病毒

维生素 D 诱导气道表面液体上皮产生抗菌和免疫调节宿主防御肽，抗菌肽[5]。以至于可抑制多种包膜病毒（如疱疹 、带状疱疹 、EB 病毒 、丙型肝炎病毒 、埃博拉病毒等）。一项对越南儿童的随机调查实验[6]中证实了维生素 D 在减少呼吸道病毒感染方面的作用是显著的。同时 Charan 等[7]于 2012 年发表的纳入 5 项随机对照试验、涉及 1868 例患者的 Meta 分析结果显示，与安慰剂相比，预防性应用维生素 D 可显著降低呼吸道感染事件(包括流感)发生率(OR=0.582，95% CI:0.417～0.812，P=0. 001) 。

鉴于上述维生素 D 的免疫作用 、抗病毒作用及预防呼吸道感染等传染病的作用 ，纠正维生素 D 的缺乏，可提高自身的免疫能力，并作为一种辅助药物用以预防新型冠状病毒肺炎。

2.新冠的治疗

2.1 减轻肺炎严重程度

研究表明[8]，COVID-19 可通过血管紧张素转化酶 2(ACE2)受体感染并激活巨噬细胞，使细胞分泌的干扰素减少，细胞因子以及趋化因子(IL-1β、IL-6、肿瘤坏死因子（TNF）等)增多。这些聚集的单核巨噬细胞产生了大量炎症细胞因子(TNF、IL-6、IL-1β等)和诱导型一氧化氮合酶，从而增加了疾病的严重程度[9]。维生素 D 可抑制 Th1 免疫反应，有助于增强 Th2 和调节性 T 淋巴细胞的应答[10]，从而导致 Th1 相关的 IL-6、TNF-α等炎症细胞因子表达降低，Th2 相关的 IL-10 和 IL-2 等抗炎细胞因子表达升高[11]。在一项小鼠实验中[12]，抗炎因子 IL-10 与维生素 D 代谢呈正相关，当维生素 D 含量较高时，其体内抗炎因子 IL-10 的含量有所增加，可以有效地起到抗炎作用。另一项综述[13]研究了 IL-6 浓度是否可能影响 COVID-19 的结局，所提出的证据包括来自意大利健康人群的年龄分层的 IL-6 浓度与意大利年龄分层的 COVID-19 死亡高度相关。同时研究人员还引用了维生素 D 补充剂及其对 IL-6 浓度影响的试验，其中 11 项试验中有 8 项显示 IL-6 显著降低。没有发现显著下降的人群是健康的老年人、哮喘患者和糖尿病前期的成年人。因此推测适当补充维生素 D［1，25（OH）2D3，维生素 D 活性形式］可以有效地减轻新型冠状病毒肺炎的严重程度。

2.2 干预肾素-血管紧张素系统（RAS）

COVID-19 通过其最外层的刺突糖蛋白与人Ⅱ型肺泡上皮细胞表面的血管紧张素转化酶 2（ACE2）受体结合，并减少游离 ACE2 表达，从而通过 ACE 酶导致血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)过度生成。AngⅡ被发现可刺激肺成纤维细胞的生长、增殖和上调转化生长因子β(TGF-β)的表达，并通过产生活性氧和释放炎症细胞因子参与肺部炎症的生成[14]。

维生素 D 作为一种 RAS 的负调节剂，可以抑制肾素的表达和生成。徐军等[15]发现在脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)中，维生素 D 抑制了肾素、ACE 和 AngⅡ的表达，并增加了 ACE2 的浓度；维生素 D 可以通过激活 ACE2／Ang(I～Ⅶ)轴，抑制肾素和 ACE／AngⅡ／ATlR 轴来减轻 LPS 诱导的 ALI。另一项研究[16]发现，1，25(OH)2D3 可降低糖尿病大鼠的 ACE 浓度和 ACE／ACE2 比值，并提高 ACE2 浓度。

2.3 降低内皮功能障碍风险

四个阶段的内皮功能障碍被确定有助于炎症和凝血功能障碍。阶段一是新冠病毒通过 ACE2 受体进入感染后 I 型内皮细胞激活。这会导致抗凝血分子的流失。第二阶段是 II 型内皮细胞激活，导致促凝剂分子的从头合成。第三阶段为内皮细胞凋亡，包括内皮脱落和基底膜剥落。第四阶段为内皮细胞坏死。张俊杰和同事的研究[17]发现，维生素 D 可能通过降低氧化应激和核因子激活的 B 细胞的 κ -轻链增强(NF-κB)激活来预防内皮功能障碍。此外，一项涉及老鼠的实验室研究和 II 型肺泡上皮细胞研究[18]究发现，维生素 D 通过刺激 II 型肺泡上皮细胞增殖和迁移，减少上皮细胞凋亡，抑制 TGF-β 诱导的上皮间充质转化来减轻肺损伤。

2.4 降低血栓风险

事实上，在许多 COVID-19 病例中，肺血栓可能是氧饱和度降低和急性呼吸窘迫的原因。因此，可以降低血管内凝血功能障碍可能改善 COVID-19 的氧合和预后[19]。

高胰岛素血症降低了胆固醇的硫化作用到胆固醇硫酸盐，同时通过增加肾脏排泄促进镁的消耗，降低细胞内水平，通过隔离到脂肪细胞和抑制羟化激活降低维生素 D 状态。，以至于降低了羟基胆固醇硫酸基转移酶的活性，从而降低了红细胞、血小板和内皮细胞之间的质膜负电荷，从而增加了凝集和血栓形成[20]。Beer 等人[21]，在 一项安慰剂对照随机试验中，高剂量 1,25(OH)2D3，显示癌症患者血栓事件的数量显著减少。因此推测适当补充维生素 D 可以有效地降低血栓形成的风险。

3.维生素 D 的补充策略

补充维生素 D 可以作为呼吸道感染的一种有效的辅助治疗手段。流感、C0VID-19 等急性呼吸道疾病的高峰期通常是 25(0H)D3 浓度最低的时候。因此应在冬季前几个月开始补充维生素 D3，以将 25(OH)D3 的浓度提高到 20-30 ng / ml，预防急性呼吸道疾病[22]。而保护程度随 25(0H)D3 浓度增加而增加，最佳浓度 40～60 ng / ml，为了尽快达到这个水平，建议服用维生素 D10000iu / d，1 个月后剂量可以降到 5000iu / d[23]。同时为降低 C0VID-19 的风险和严重程度，1 周内予口服 20 万～30 万 iu 的维生素 D 负荷剂量，必要时 1 周后可以重复给药，但大剂量补充维生素 D 时一定要注意安全性[24]

对于上万国际单位的高剂量维生素 D 服用，目前也有实验证明了其安全性，在治疗中不会出现明显不良反应。一个为期 3 年的维生素 D 的研究[25]显示，补充维生素 D 的安全性在 400IU / d、4000IU / d 和 10000IU / d 的剂量下是相似的。该实验中，虽然在高剂量维生素 D 补充下高钙血症的发生率更高，但也是十分少见，并且是比较轻度、病程较短的高钙血症。

4.讨论

目前，《新型冠状病毒感染诊疗方案（试行第十版）》中对于新型冠状病毒感染的治疗方法有：抗病毒治疗（利托那韦片、阿兹夫定片、莫诺拉韦胶囊、单克隆抗体、人免疫球蛋白）、免疫治疗（糖皮质激素、IL-6 抑制剂）、抗凝治疗和中医治疗等。同时，中国营养学会 2020 年发布的《新型冠状病毒肺炎防治营养膳食指导建议》中指出，预防新冠肺炎可适当补充维生素。而通过光照、膳食及药物补充维生素 D，增加体内活性维生素 D 的水平，是预防 COVID-19、治疗 COVID-19 及延缓严重病程和减少疾病死亡的一个潜在选择。相比于口服用药，合理膳食和药物补充维生素 D 更能让人们接受。因此适当补充维生素 D 以防治新型冠状病毒值得我们进一步研究。

参考文献

[1] 刘璟瑜.维生素 D 或可防治新型冠状病毒肺炎[J].现代临床医学,2021,47(4):315-318.

[2] 李洁,蒋运兰,廖诗沁,刘露,陈曾丽,谢红梅.维生素 D 缺乏与新型冠状病毒肺炎发病风险及预后相关性的 Meta 分析[J].循证护理,2022,8(7):853-862.

[3] Miraglia Del Giudice M, Indolfi C, Strisciuglio C. Vitamin D: Immunomodulatory Aspects. J Clin Gastroenterol. 2018;52 Suppl 1, Proceedings from the 9th Probiotics, Prebiotics and New Foods, Nutraceuticals and Botanicals for Nutrition & Human and Microbiota Health Meeting, held in Rome, Italy from September 10 to 12, 2017:S86-S88.

[4] Heine G, Anton K, Henz BM, Worm M. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. Eur J Immunol. 2002;32(12):3395-3404.

[5] Gombart AF. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. Future Microbiol. 2009;4(9):1151-1165.

[6] Loeb M, Dang AD, Thiem VD, et al. Effect of Vitamin D supplementation to reduce respiratory infections in children and adolescents in Vietnam: A randomized controlled trial. Influenza Other Respir Viruses. 2019;13(2):176-183.

[7] Charan J, Goyal JP, Saxena D, Yadav P. Vitamin D for prevention of respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. J Pharmacol Pharmacother. 2012;3(4):300-303.

[8] Lau SKP, Lau CCY, Chan KH, et al. Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment. J Gen Virol. 2013;94(Pt 12):2679-2690.

[9] Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. Nat Rev Immunol. 2013;13(12):875-887.

[10] Shi Y, Liu T, Yao L, et al. Chronic vitamin D deficiency induces lung fibrosis through activation of the renin-angiotensin system. Sci Rep. 2017;7(1):3312. Published 2017 Jun 12.

[11] Mohammad S, Mishra A, Ashraf MZ. Emerging Role of Vitamin D and its Associated Molecules in Pathways Related to Pathogenesis of Thrombosis. Biomolecules. 2019;9(11):649. Published 2019 Oct 24.

[12] Chandler JD, Hu X, Ko EJ, et al. Metabolic pathways of lung inflammation revealed by high-resolution metabolomics (HRM) of H1N1 influenza virus infection in mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2016;311(5):R906-R916.

[13] McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, et al. Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness. Am J Respir Crit Care Med. 2020;202(6):812-821.

[14] Guo W, Shan B, Klingsberg RC, Qin X, Lasky JA. Abrogation of TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;297(5):L864-L870.

[15] Xu J, Yang J, Chen J, Luo Q, Zhang Q, Zhang H. Vitamin D alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulation of the renin-angiotensin system. Mol Med Rep. 2017;16(5):7432-7438.

[16] Malek Mahdavi A. A brief review of interplay between vitamin D and angiotensin-converting enzyme 2: Implications for a potential treatment for COVID-19. Rev Med Virol. 2020;30(5):e2119.

[17] Zhang J, McCullough PA, Tecson KM. Vitamin D deficiency in association with endothelial dysfunction: Implications for patients with COVID-19. Rev Cardiovasc Med. 2020;21(3):339-344.

[18] Kim DH, Meza CA, Clarke H, Kim JS, Hickner RC. Vitamin D and Endothelial Function. Nutrients. 2020;12(2):575. Published 2020 Feb 22.

[19] Gattinoni L, Coppola S, Cressoni M, Busana M, Rossi S, Chiumello D. COVID-19 Does Not Lead to a "Typical" Acute Respiratory Distress Syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2020;201(10):1299-1300.

[20] Cooper ID, Crofts CAP, DiNicolantonio JJ, et al. Relationships between hyperinsulinaemia, magnesium, vitamin D, thrombosis and COVID-19: rationale for clinical management. Open Heart. 2020;7(2):e001356.

[21] Beer TM, Venner PM, Ryan CW, et al. High dose calcitriol may reduce thrombosis in cancer patients. Br J Haematol. 2006;135(3):392-394.

[22] Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. BMJ. 2017;356:i6583. Published 2017 Feb 15.

[23] Smith EM, Jones JL, Han JE, et al. High-Dose Vitamin D3 Administration Is Associated With Increases in Hemoglobin Concentrations in Mechanically Ventilated Critically Ill Adults: A Pilot Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2018;42(1):87-94.

[24] Charoenngam N, Shirvani A, Kalajian TA, Song A, Holick MF. The Effect of Various Doses of Oral Vitamin D3 Supplementation on Gut Microbiota in Healthy Adults: A Randomized, Double-blinded, Dose-response Study. Anticancer Res. 2020;40(1):551-556.

[25] Billington EO, Burt LA, Rose MS, et al. Safety of High-Dose Vitamin D Supplementation: Secondary Analysis of a Randomized Controlled Trial [published correction appears in J Clin Endocrinol Metab. 2021 Mar 25;106(4):e1932]. J Clin Endocrinol Metab. 2020;105(4):dgz212.

米格列奈钙及其降解产物分离的研究

郑 航　张浩(通信作者)　孙海玲
湖北省药品监督检验研究院，湖北 武汉 430000

摘要：目的 研究在以水–乙腈–甲醇为流动相的色谱条件下，米格列奈钙和其降解产物分离情况。**方法** 对米格列奈钙原料分别进行光照、高温、酸、碱、氧化破坏性试验，用高效液相法分析米格列奈钙和其降解产物。**结果** 该色谱条件下，米格列奈钙质量浓度在 25.1~75.3 μg•mL^{-1} 的浓度范围内，线性关系良好，回归方程为 Y = 49377X–26303，r = 0.9999，检测限为 3.3 ng，能有效分离米格列奈钙和其降解产物。**结论** 本研究所用的色谱条件能有效分离米格列奈钙和其降解产物，为米格列奈钙原料有关物质检查提供参考。

关键词： 米格列奈钙；降解产物；流动相
中图分类号：R969.1

Study on the Separation of Mitiglinide Calcium and the Degradation Products

Zheng Hang Zhang Hao (corresponding author) Sun HaiLing
Hubei Institute of Drug Administration，Wuhan 430000,China;

ABSTRACT Objective To study the separation of mitiglinide calcium and the degradation products under chromatographic condition with water–acetonitrile–methanol as mobile phase. **Methods** After the mitiglinide calcium raw materials were subjected to light, high temperature, acid, alkali, and oxidation destructive tests, mitiglinide calcium and the degradation products were analyzed by HPLC. **Results** Mitiglinide calcium and the degradation products were effectively separated by the chromatographic conditions. There was a good linearity over the range of 25.1~75.3 μg•mL^{-1} for the concentration of mitiglinide calcium, and the regression equation was Y = 49377X–26303 (r = 0.9999, the detection limits 3.3 ng). **Conclusion** The method can effectively separate calcium mitiglinide and the degradation products, and provide a reference for the inspection of the related substances of the mitiglinide calcium raw materials.

KEY WORDS Mitiglinide Calcium; Degradation products; Mobile phase

米格列奈钙（Mitiglinide calcium）于 2004 年由日本橘生药品工业株式会社在日本首次上市，化学名为双[(2S)-2-苄基-3-(顺-六氢异吲哚-2-羰基)丙酸]单钙二水合物[1–2]。米格列奈钙是第三代格列奈类药物，作用机制为关闭胰腺 β 细胞膜上 ATP 依赖性 K^+通道，致细胞膜去极化，使 Ca^{2+}内流，刺激胰岛 β 细胞，胰岛素分泌量增多，血糖降低[3–5]，用于治疗非胰岛素依赖型糖尿病[6–8]。在制备及储藏米格列奈钙的过程中，由于外界条件的变化可能产生降解产物，降解产物会直接影响患者用药的安全性和有效性。通过文献检索确定米格列奈钙降解产物主要为 S-苄基丁二酸[9–11]。笔者选用 Agilent XDB–C18 色谱柱[12–15]，以水–乙腈–甲醇为流动相，使用高效液相法研究米格列奈钙与其降解产物的分离情况，

给米格列奈钙原料有关物资的检查提供参考[16–19]。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters e2695 HPLC 色谱仪（仪器编号 A0138H）；瑞士 Mettler XS205 分析天平（仪器编号 C0106H）；惠普 8453 型可见紫外分光光度计（仪器编号 E1108Z）。

1.2 试药

米格列奈钙原料（宜昌东阳光长江药业股份有限公司，批号 PRS-17023，含量 99.73%）；S-苄基丁二酸（宜昌东阳光长江药业股份有限公司，批号 MGC03-131114，含量 97.80%）；米格列奈钙对照品（宜昌东阳光长江药业股份有限公司，批号 MGC-1805001，含量 99.80%）。乙腈、甲醇为色谱纯，纯化水自制，磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

色谱柱：Agilent XDB–C18（250 mm×4.6 mm；5 μm）；流动相为水–乙腈–甲醇（50：45：5），用磷酸调 pH 至 3.0；柱温 30 ℃；样品盘温度 10 ℃；流速 1.0 mL•min^{-1}；进样量 20 μL。

检测波长的选择：称取米格列奈钙对照品 0.0267 g，置 100 mL 量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，在 200～400 nm 范围进行紫外扫描。结果表明，米格列奈钙在 207 nm 处有最大吸收峰，因此选择 207 nm 作为检测波长。

专属性试验：取 S-苄基丁二酸 0.0148 g，置 50 mL 量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，作为溶液；称取米格列奈钙对照品 0.0321 g，置 100 mL 量瓶中，精密加入 1 mL 上述溶液，用乙腈–水（50：50）稀释至刻度。取上述溶液 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 4 倍，结果见图 1，试验色谱条件下米格列奈钙峰及降解产物 S-苄基丁二酸能够有效分离。

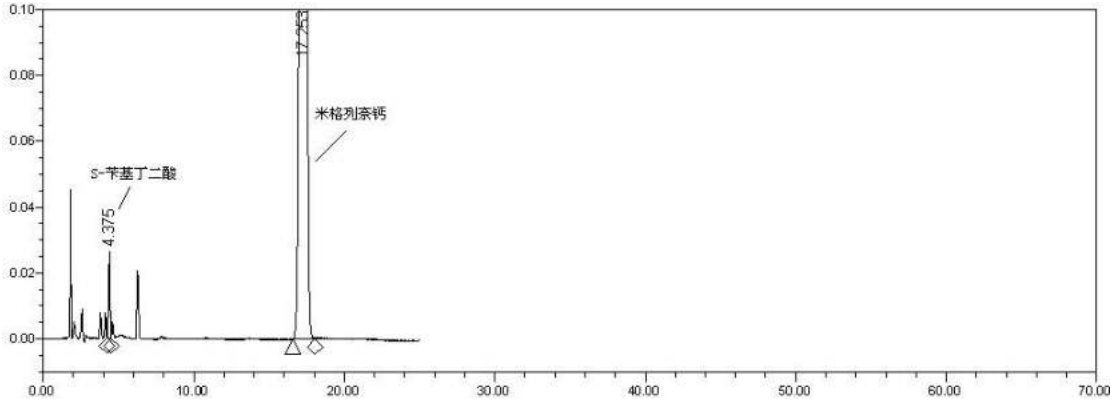


图 1 专属性试验 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of specific test

线性关系考察：精密称取米格列奈钙对照品 0.0502 g 置 100 mL 量瓶中，加乙腈–水（50：50）溶解并稀释至刻度，摇匀；分别精密量取 2.5 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL，分置 5 个 50 mL 量瓶中，用乙腈–水（50：50）稀释至刻度，摇匀。分别精密量取 20 μL 注入液相色谱仪，以溶液质量浓度 X（μg•mL^{-1}）为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归，回归方程为 Y = 49377X–26303，r = 0.9999。结果表明，米格列奈钙质量浓度在 25.1～75.3 μg•mL^{-1} 的浓度范围内，与峰面积呈良好线性关系。

检测限：精密称米格列奈钙对照品 0.0165 g，置 500 mL 量瓶中，加乙腈–

水（50：50）溶解并稀释至刻度，摇匀；取 1 mL 置 100 mL 量瓶中，加乙腈–水（50：50）溶解并稀释至刻度，摇匀，逐级稀释后，取 20 μL 注入至色谱仪中，同时测定检测器的基线噪音，取信噪比为 3：1 时的进样量为检测限，测得米格列奈钙的检测限为 3.3 ng，见图 2。

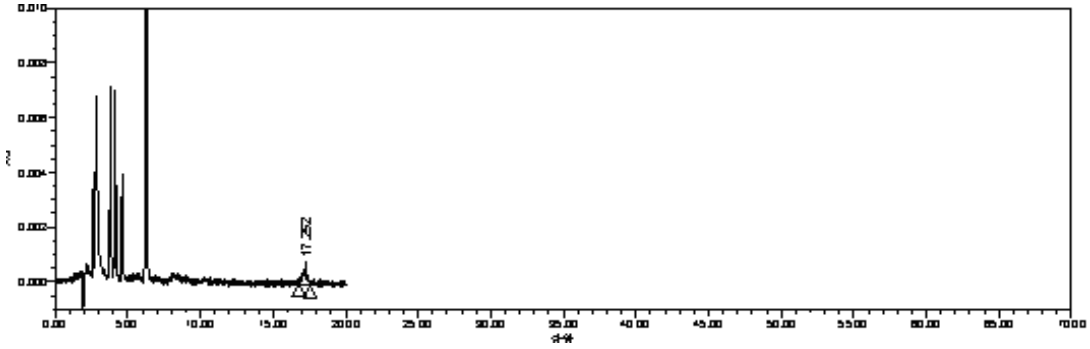


图 2 检测限 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of detection limit

精密度试验：精密称取米格列奈钙对照品 0.0500 g 置 100 mL 量瓶中，加乙腈–水（50：50）溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用乙腈–水（50：50）稀释至刻度，摇匀。取 20 μL 注入液相色谱仪，连续测定 6 次。结果峰面积 RSD 为 0.51%，表明精密度较好。

2.2 光照试验

取米格列奈钙原料，在 4500 LX 光源下直接照射 48 h；精密称取 0.0297 g，置 100 mL 量瓶中，加乙腈–水（50：50）使溶解并稀释至刻度，摇匀。取 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 4 倍，结果见图 3。米格列奈钙主峰 99.5%，杂质峰 4 个，降解产物不明显，主要产生 S-苄基丁二酸峰，杂质量为 0.2%，杂质总量较小，各杂质峰均能达到基本分离。

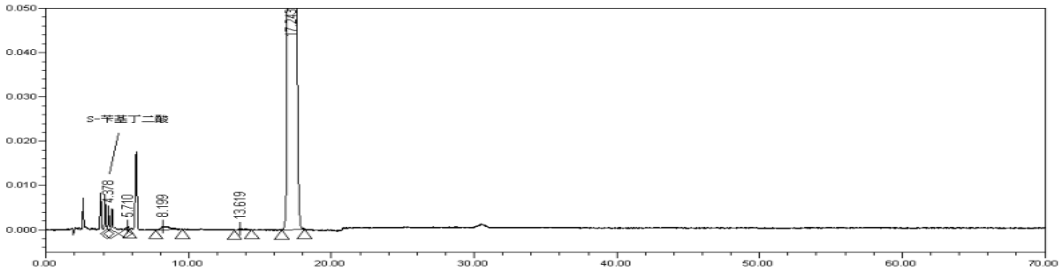


图 3 光照破坏 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC Chromatogram of destructive tests of light

2.3 高温试验

精密称取米格列奈钙原料 0.0291 g，置 100 mL 量瓶中，加乙腈–水（50：50）使溶解，置 95℃水浴中加热 7 h，取出，冷至室温，用乙腈–水（50：50）稀释至刻度，摇匀。取 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 4 倍，结果见图 4。米格列奈钙主峰 98.4%，杂质峰 4 个，降解产物不太明显。产生 S-苄基丁二酸峰，杂质量为 1.4%，各杂质量较小，各杂质峰均能达到基本分离。

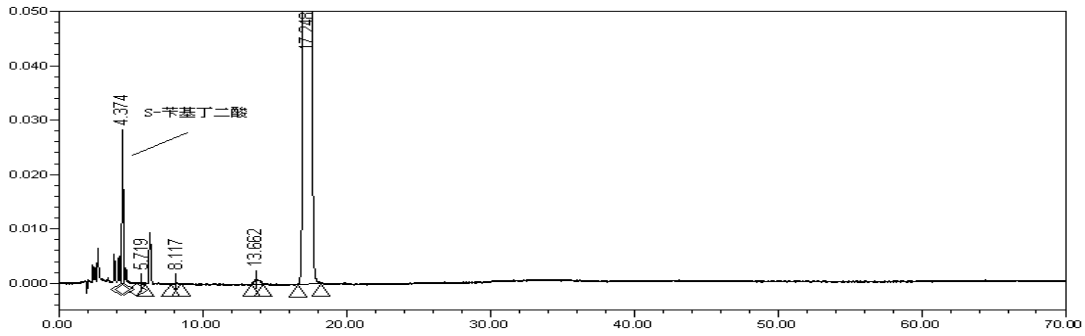


图 4 高温破坏 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC Chromatogram of destructive tests of high temperature

2.4 酸破坏试验

精密称取米格列奈钙原料 0.0306 g，置 100 mL 量瓶中，加乙腈–水（50：50）适量使溶解，加 1 mol•L^{-1} 的盐酸溶液 2 mL，振摇，置水浴中加热 1 h，取出，冷至室温，再加 1 mol•L^{-1} 的氢氧化钠溶液 2 mL，并调节 pH 至 7，用纯水稀释至刻度，摇匀。取 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 4 倍，结果见图 5。米格列奈钙主峰 63.9%，杂质峰 1 个，产生明显的 S-苄基丁二酸峰，杂质量为 36.1%，各杂质峰均能达到基本分离。

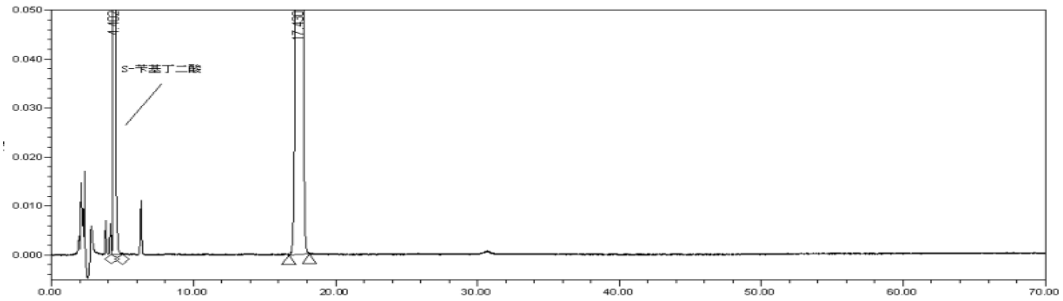


图 5 酸破坏 HPLC 色谱图

Fig.5 HPLC Chromatogram of destructive tests of acid

2.5 碱破坏试验

精密称取米格列奈钙原料 0.0301 g 置 100 mL 量瓶中，加水适量使溶解，加 1 mol•L^{-1} 的氢氧化钠溶液 2 mL，振摇，置水浴中加热 30 min，取出，冷至室温，再加 1 mol•L^{-1} 的盐酸溶液 2 mL 并调节 pH 至 7，用纯水稀释至刻度，摇匀。取 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 4 倍，结果见图 6。米格列奈钙主峰 90.2%，杂质峰 5 个，降解产物明显。产生明显的 S-苄基丁二酸峰，杂质量为 4.6%。；产生保留时间为 13.62 min 的新杂质，其杂质量为 4.0%。各杂质峰均能达到基本分离。

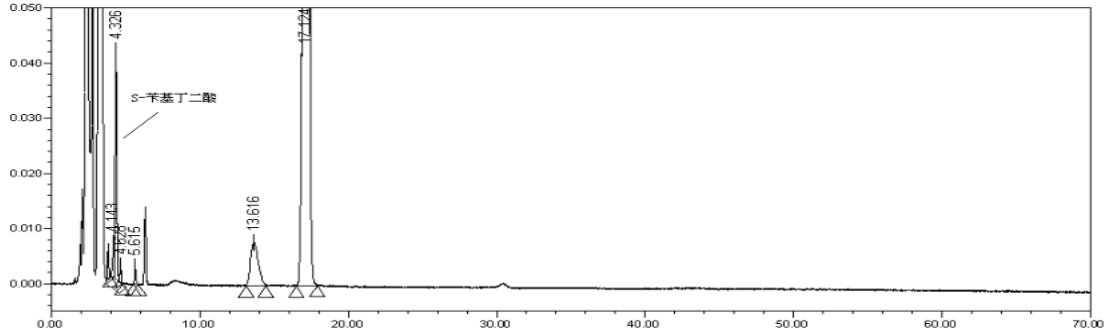


图 6 碱破坏 HPLC 色谱图

Fig.6 HPLC Chromatogram of destructive tests of alkali

2.6 氧化破坏试验

精密称取米格列奈钙原料 0.0302 g，置 100 mL 量瓶中，加水适量使溶解，加 3%的过氧化氢溶液 2 mL，振摇，置水浴中加热 1 h，取出，冷至室温，用乙腈–水（50：50）稀释至刻度，摇匀。取 20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 4 倍，结果见图 7。米格列奈钙主峰 67.6%，杂质峰 16 个，降解产物明显。产生明显的 S-苄基丁二酸峰，杂质量为 27.1%。；产生的杂质个数较多，杂质量较大。各杂质峰均能达到基本分离。

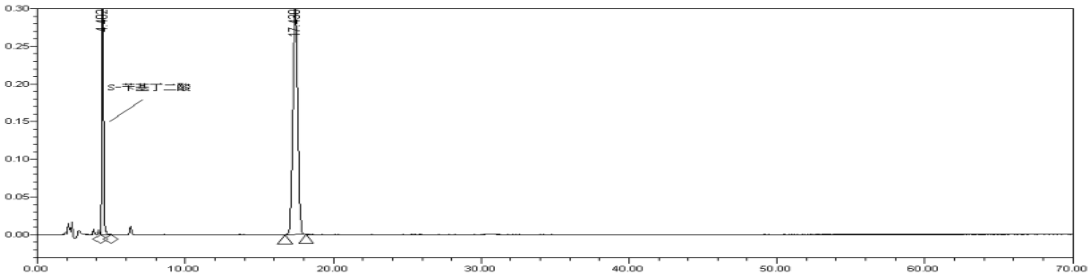


图 7 氧化破坏 HPLC 色谱图

Fig.7 HPLC Chromatogram of destructive tests of oxidative

2.7 耐用性试验

取碱破坏试验配制的溶液 20 μL，分别以水–乙腈–甲醇（50:45:5）和 0.025 mol•L^{-1} 磷酸二氢钾–乙腈（55：45）为流动相，注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间的 4 倍，见表 1。

表 1 不同流动相色谱结果

Table 1 Results of different mobile phase chromatography

	杂质个数	单个最大杂质（%）	杂质总量（%）
水–乙腈–甲醇（50:45:5）	6	4.6	9.8
磷酸二氢钾–乙腈（55：45）	4	4.2	8.7

结果表明，同色谱柱下水–乙腈–甲醇（50：45：5）作为流动相，有更灵敏的杂质分离度，分离出的杂质个数和总量明显优于 0.025 mol•L^{-1} 磷酸二氢钾–乙腈（55：45）为流动相的色谱条件。

3 讨论

乙腈与甲醇的混合溶液，强度高，黏度较小，柱压低，基线噪音小，柱效高，色谱峰拖尾因子达到测定要求，可以得到良好的试验效果。米格列奈钙 pKa 为 4.43，所以选择流动相用磷酸调节 pH 3.0 来抑制样品组分在解离，使米格列奈钙以分子形式在固定相上保留[20–21]。配合 C18 柱可使溶质的容量因子增大，分离度选择性改善，分离效果良好，同时载样量提高，其稳定性也更好。

使用 Agilent XDB–C18 色谱柱，以水–乙腈–甲醇（50：45：5）为流动相，检测波长 207 nm 的色谱条件下，能有效分离米格列奈钙及其降解产物，为米格列奈钙原料含量测定、有关物质的检查提供参考。

参考文献：

[1] 李纬, 王正泽, 林辉. 降糖药米格列奈钙的合成 [J]. 山东化工, 2016, 45 (20): 19–21.

[2] 梁廷, 侯杰. 米格列奈钙缓释片制备工艺与体外释放度研究 [J]. 中国执业药师, 2013, 10 (1): 21–24.

[3] 邵红维. 米格列奈联合地特胰岛素治疗新诊断 2 型糖尿病的临床观察 [J]. 中国医药指南, 2020, 18 (10): 95–96.

[4] 赖肖肖, 杨家军. 米格列奈联合阿卡波糖治疗 2 型糖尿病的临床疗效及其安全性 [J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12 (24): 19–20.
[5] MAI S, SHINYA U, CHIAKI K, et al. Ease of taking and palatability of fixed-dose orally disintegrating mitiglinide/voglibose tablets [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2019, 67 (6): 540–545.
[6] HIROSHI O, MUHEI T, GOJI H, et al. Comparison of the efficacy of repaglinide versus the combination of mitiglinide and voglibose on glycemic variability in japanese patients with type 2 diabetes [J]. Current Pharmaceutical Design, 2019, 25 (43): 4600–4605.
[7] 袁扬, 梁军, 刘艳梅, 等. 米格列奈对比阿卡波糖治疗 2 型糖尿病有效性和安全性的多中心、开放、随机对照临床研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 2018, 26 (03): 221–226.
[8] 李彦萍. α-葡萄糖苷酶抑制剂联合米格列奈治疗 2 型糖尿病的效果评价 [J]. 当代医药论丛, 2020, 18 (15): 125–126.
[9] 吉同琴, 唐燕平. HPLC 法测定米格列奈钙中的 R-异构体含量 [J]. 药学与临床研究, 2007, 15 (4): 336–338.
[10] 宋劲燕, 黄牧童, 刘辉, 等. 高效液相色谱法用于米格列奈钙含量和有关物质的研究 [J]. 科技情报开发与经济, 2008, 18 (2): 135–136.
[11] 张晓丽, 凌益平, 骆雅琴, 等. 米格列奈钙 3 个主要降解杂质的研究 [J]. 中国药房, 2016, 27 (1): 64–66.
[12] 张志成, 沈甜妹, 冯婉玉. 高效液相色谱法测定米格列奈片剂中米格列奈的含量 [J]. 中国药物与临床, 2010, 10 (1): 69–70.
[13] 曾檀, 霍丹群, 周祥敏, 等. 高效液相色谱法测定米格列奈钙原料药的有关物质 [J]. 中国药业, 2013, 22 (17): 28.
[14] 马玖芬, 魏海英, 蔡永选, 等. 高效液相色谱法米格列奈钙原料药的含量和有关物质 [J]. 河北省科学院学报, 2008, 25 (1): 49–51.
[15] 陈晓. 米格列奈胶囊的稳定性考察 [J]. 海峡药学, 2018, (8): 68–70.
[16] MAYA S E, EMAN D, MOHAMMED R E, et al. Chromatographic separation of the novel hypoglycemic drug mitiglinide in its bulk powder and pharmaceutical formulation: forced degradation and validated stability-indicating HPTLC/densitometry and HPLC/UV methods [J]. Journal of AOAC International, 2020, 103(3): 736–742.
[17] 孟霞, 彭敬东. HPLC 法测定米格列奈钙及其有关物质 [J]. 分析试验室, 2008, 27 (S2): 14–18.
[18] 刘雅婷, 张行飞, 杨常成. HPLC-MS/MS 法测定米格列奈的血药浓度 [J]. 解放军药学学报, 2017, 33(1): 53–56.
[19] 高玉秋, 孙冬梅. HPLC 法测定米格列奈的有关物质 [J]. 齐鲁药事, 2008 (02): 96–97.
[20] 徐红, 侯健. 高效液相色谱的色谱柱的类型和流动相的选择方法 [J]. 计量与测试技术, 2010 (2): 10.
[21] 李珉, 刘海涛, 侯金凤, 等. 米格列奈及其 3 个异构体杂质的反相液相色谱分离及质谱碎裂分析 [J]. 色谱, 2019, 37 (04): 412–417.

热毒宁注射液治疗老年急性肺炎的临床疗效及其对血清炎症因子的影响

郑宏，周怡彤（通讯作者），叶宁，叶飞翔，何林锋

桂林医学院附属医院急诊医学科，广西 桂林 541001

【摘要】目的：本研究旨在探讨热毒宁注射液治疗老年急性肺炎的临床疗效及对其对血清炎症因子的影响效果。**方法：**选取 2022 年 5 月至 2022 年 10 月因老年急性肺炎来我院急诊科住院治疗的 64 名患者为研究对象，随机分为对照组和治疗组，对照组使用常规抗感染方案进行治疗，治疗组在常规治疗方案基础上加用热毒宁注射液强化治疗，对两组患者治疗前后白细胞计数、C 反应蛋白、降钙素原、白细胞介素-6、血清淀粉样蛋白 A 等血清炎症因子的变化情况及胸部 CT 改善时间、住院时长等指标进行比较。**结果：**经过治疗后，治疗组的血清炎症因子指标以及 CT 改善时间、住院时长普遍低于对照组，差异有统计学意义（P＜0.05）。**结论：**热毒宁注射液在治疗老年急性肺炎方面有着较好的临床治疗效果，对患者血清炎症因子改善效果显著，值得在临床进行推广使用。

【关键词】热毒宁注射液；老年急性肺炎；临床疗效；血清炎症因子

急性肺炎是急诊科最为常见的一种呼吸系统疾病，主要表现为发热、咳嗽、咳痰，伴有食欲减退，双肺可闻及湿性啰音，随病情进展可出现呼吸急促的情况[1-2]，老年患者占了急性肺炎当中很大的一部分[3]。老年急性肺炎患者普遍存在免疫力低下、体质差的情况，并且多数存在合并基础疾病的情况，所以急性肺炎症状普遍较重，如不及时进行有效救治会严重影响该类患者的预后，并且导致死亡率上升[4-5]。因此，由于老年急性肺炎对患者的身心健康影响严重，所以从改善患者病情及生存质量角度考虑，采取及时有效的诊疗方案非常关键。热毒宁注射液是种纯中药制剂，是在经验方的基础之上，通过现代化加工技术进行分离、提取、纯化、精制而成[6]。热毒宁注射液主要是由栀子、金银花、青蒿 3 味中药组成[7]，在退热、抗感染及镇痛方面具有良好的效果，并且副作用少[8-9]。在本次研究中，取 2022 年 5 月至 2022 年 10 月因老年急性肺炎来我院急诊科住院治疗的 64 名患者为研究对象，来观察热毒宁注射液治疗老年急性肺炎的临床疗效及其对血清炎症因子的影响，其研究内容如下。

1.资料及方法

1.1 一般资料

选取 2022 年 5 月至 2022 年 10 月因老年急性肺炎来我院急诊科住院治疗的 64 名患者为研究对象，采用随机数字表法分为试验组和对照组，对照组使用常规抗感染方案进行治疗，治疗组在常规治疗方案基础上加用热毒宁注射液强化治疗，每组各 32 例。64 例患者中包含 40 例男性，24 例女性，年龄阶段为 66 岁～ 75 岁，平均为（68.12±6.43）岁。两组患者在性别、年龄等一般资料上差异无统计学意义（P ＞ 0.05），具有可比性。

纳入标准：1.年龄在 65 至 75 岁之间。 2.符合急性肺炎诊断标准。3.提供签署的知情同意书。

排除标准：1.诊断急性肺炎已超过 48 小时。2.存在恶性肿瘤病史。3.精神病患者。4.对热毒宁药物过敏患者。5.其余判定不适合参加本次试验或无法完成随访的患者。

1.2 方法

对照组：予以西医常规内科抗感染治疗，包括吸氧、止咳、平喘等其他治疗手段，根据痰培养、血培养以及药敏结果选用合适抗生素。

治疗组：在上述基础上予以热毒宁(江苏康缘药业)20ml+ 0.9%氯化钠注射液 250ml 静脉滴注，一天一次，连用 7 天。

①基金项目：广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题（GXZYZ20210004）。

②通信作者：周怡彤，E-mail:853471649@qq.com

1.3 观察指标

对两组患者治疗前后白细胞计数(WBC)、C 反应蛋白(CRP)、降钙素原（PCT）、白细胞介素-6（IL-6）、血清淀粉样蛋白 A(SAA)等血清炎症因子的变化情况及胸部 CT 改善时间、住院时长等指标进行比较。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析：研究对象一般资料中的计数资料用频数、百分比描述,计量资料用均数±标准差或者四分位数描述；对于符合正态分布的一般资料采用卡方检验和 F 检验,对于非正态分布的计量资料进行 Kruskal-Wallis-H 秩和检验；两组间的比较用 t 检验，检验显著性水平为 P≦0.05。

2.结果

治疗组的血清炎症因子指标以及 CT 改善时间、住院时长普遍低于对照组，差异有统计学意义（P＜0.05）。详情见表 1、表 2、表 3。

表 1 两组治疗前后 WBC、CRP、PCT 指标水平比较（x ± s）

组别	例数	治疗前			治疗后		
		WBC(10^9/L)	CRP(mg/L)	PCT（ng/mL)	WBC(10^9/L)	CRP(mg/L)	PCT（ng/mL)
治疗组	32	13.13±5.50	83.11±59.55	5.97±17.44	7.54±3.59	12.46±20.30	0.36±0.50
对照组	32	12.31±8.49	66.58±60.89	3.81±17.58	10.80±6.67	21.56±14.96	2.12±2.93
t		0.459	1.098	0.494	-2.44	-2.04	-2.13
P		0.648	0.276	0.423	0.018	0.046	0.043

表 2 两组治疗前后 IL-6、SAA 指标水平比较（x ± s）

组别	例数	治疗前		治疗后	
		IL-6(pg/mL)	SAA(mg/L)	IL-6(pg/mL)	SAA(mg/L)
试验组	31	128.83±325.27	119.18±63.68	21.08±23.75	22.96±22.81
对照组	31	132.10±417.15	98.65±80.19	38.81±34.06	40.38±32.51
t		-0.035	1.134	-2.415	-2.418
P		0.972	0.261	0.019	0.016

表 3 两组 CT 改善时间、住院时长比较（x ± s）

组别	例数	CT 改善时间(日）	住院时长（日）
试验组	31	5.94±2.97	7.82±4.05
对照组	31	8.57±4.36	11.69±5.62
t/x^2		-2.812	-3.165
P		0.007	0.002

3.讨论

急性肺炎主要是由细菌、病毒及微生物感染引起[10]，由于老年人整体生理结构老化，呼吸系统功能减退，出现人体预防及免疫疾病能力下降，加上普遍老年人合并多种基础疾病及营养不良，均易造成老年急性肺炎疾病的发生[11-12]。老年急性肺炎有些时候发病隐匿，前期不存在急性肺炎的特异性表现，从而导致出现漏诊甚至误诊情况，延误了治疗时机，从而使症状进一步加重，甚至出现了心力衰竭、肝肾衰竭及凝血功能障碍等严重并发症，增加了患者死亡风险[13-14]。因此，针对此类患者选择及时而有效的用药方式是改善患者预后及减少死

亡率的关键所在。

热毒宁注射液是国家二类新药，其主要化学成分包括倍咖啡酰奎宁酸、半萜类、酚酸类、香豆素类、木脂素类、黄酮类、环烯醚萜类等[15-16],是国内最为常用的抗菌、抗病毒的中成药剂，热毒宁注射液具有清热、疏风、解毒的功效，在治疗高热、咳嗽咳痰、寒战及全身疼痛等方面均具有良好的治疗效果，并且安全性性高，并发症较少[17] 。

本文旨在研究热毒宁注射液对老年急性肺炎治疗效果影响，为临床上治疗老年急性肺炎提供理论基础，从而减轻老年急性肺炎患者的病痛，加快我国中医药在老年疾病上的应用，为我国老年急性肺炎患者谋求福祉。在本研究中治疗组的血清炎症因子指标以及 CT 改善时间、住院时长普遍低于对照组，差异有统计学意义（P＜0.05）。热毒宁注射液在治疗老年急性肺炎方面有着较好的临床治疗效果，对患者血清炎症因子改善效果显著，值得在临床进行推广使用。

参考文献

［1］白显利.盐酸氨溴索联合盐酸丙卡特罗治疗老年急性肺炎的疗效［J］.中国卫生工程学，2019，18（2）：293-294.

［2］陈天游.哌拉西林钠他唑巴坦联合盐酸氨溴索治疗老年急性肺炎的临床疗效评价［J］. 中国医药指南，2019，17（7）：80-81.

［3］余茜.盐酸氨溴索联合不同药物对老年急性肺炎的疗效研究［J］.数理医药学杂志，2019，32（6）：912-913.

［4］张娇.联用盐酸氨溴索和头孢哌酮舒巴坦钠对老年急性肺炎患者进行治疗的效果［J］.当代医药论丛，2018，16（20）：168-169.

［5］吴松刚.加替沙星联合盐酸氨溴索治疗老年急性肺炎的临床观察［J］.临床医药文献电子杂志，2018，5（63）：128.

［6］周小琳，宋香清.热毒宁注射液不同稀释浓度治疗儿童急性上呼吸道感染的疗效与安全性观察［J］.药学与临床研究，2015（5）：494-496.

［7］葛雯，李海波，于洋，等 .热毒宁注射液化学成分、药理作用及临床应用研 究 进 展［J］.中草药，2017，48（5）：1027-1036.

［8］王冬梅.用热毒宁注射液对老年肺炎患者进行治疗的效果评估［J］.当代医药论丛，2018，16（17）：155-156.

［9］龚立云.热毒宁注射液治疗病毒性急性气管-支气管炎的效果观察［J］. 医学信息，2018，31（8）：144-145.

［10］ 郝菁菁.研究盐酸氨溴索联合不同药物治疗老年急性肺炎的效果［J］.海峡药学，2018，30（2）：151-152.

[11] 府思纯.莫西沙星联合哌拉西林钠他唑巴坦钠治疗重症肺炎疗效观察[J].现代诊断与治疗,2018,29(22):3635-3637.

[12] 张小红,王红丽.哌拉西林钠他唑巴坦钠联合左氧氟沙星治疗 78 例老年社区获得性肺炎的疗效及安全性[J].临床医学研究与实践,2018,3(25):15-16.

［13］曹珺. 盐酸氨溴索联合不同药物治疗老年急性肺炎疗效对比观察[J].现代诊断与治疗，2016，27(11)：2034-2035.

［14］ 蒋定中. 加替沙星联合雾化吸入盐酸氨溴索治疗老年急性肺炎的临床观察［J］.实用医技杂志，2015，22（5）：550-551.

［15］商旭芳，董丽.热毒宁注射液治疗老年患者急性上呼吸道感染临床观察［J］. 中国现代药物应用，2015，9（18）：154-155.

［16］郭鸿，李同荟，刘保良，等.特殊人群应用热毒宁注射液的合理性与安全性现状［J］. 临床合理用药杂志，2016，9（23）：175-176.

［17］郭朝斌 . 系统评价热毒宁注射液治疗毛细支气管炎的疗效与安全性［J］. 世界最新医学信息文摘，2019，19（15）：25-26.

PDCA 循环在我院静配中心感染管理中的应用研究

郑晓阳

（阳江市人民医院药学部 制剂科 广东 阳江 529500）

【摘要】目的：分析 PDCA 循环在我院静配中心感染管理中的应用效果。**方法：**回顾分析我院 2019 年 1 月至 2020 年 1 月期间的 26 名静配中心感染管理人员和 2020 年 7 月至 2021 年 7 月期间静配中心 25 名感染管理人员，分别为对照组和观察组，对照组接受常规管理，观察组接受 PDCA 循环管理，比较两组感染管理控制状况，如空气沉降菌生成率、感染事件发生率等。**结果：**观察组空气沉降生成率 7.53%低于对照组空气沉降生成率 38.46%（P<0.05），观察组共发生医院感染 32 例，对照组共发生医院感染 30 例，其中因静配药物而导致的，观察组共 1 例，对照组共 8 例，观察组静配药物感染率 3.13%低于对照组 26.67%（P<0.05）。观察组工作人员工作质量评分高于对照组（P<0.05）。**结论：**将 PDCA 循环用于医院静配中心感染管理中，可显著降低空气沉降菌生成率、感染事件发生率，确保医院静配用药安全，提升环境洁净度，值得推广。

【关键字】管理；感染；静配中心；PDCA 循环；空气沉降菌生成率

医院的重要科室之一则为静脉药物集中配置中心（PIVAS）[1]，此为专业护士和药学人员集中调配静脉输液使用药物，以及无菌操作的主要科室，在提升医疗质量方面有积极意义。但若医院静配中心出现感染事件等，则诱发院内群体感染的机率性较大，同时也会影响静脉用药疗效，甚至对患者生命安全造成威胁。所以，确保医院静配中心感染管理质量对医院和患者、以及医护人员等均有积极意义。已有研究表明[2]，将 PDCA 循环管理用于医院静配中心感染管理中，可显著降低空气沉降菌生成率、感染事件发生率等，提升工作人员工作质量。但目前医学界此方面报告较少，仍有不少学者致力于此点探讨中。现本研究中共纳入我院 2017 年 1 月至 2018 年 3 月期间 26 名静配中心管理人员和 2019 年 1 月至 2020 年 3 月期间 25 名静配中心管理人员对比论述 PDCA 循环管理的优势。具体报告如下：

1.资料及方法

1.1 一般资料

回顾分析我院 2019 年 1 月至 2020 年 1 月期间的 26 名静配中心感染管理人员和 2020 年 7 月至 2021 年 7 月期间静配中心 25 名感染管理人员，分别为对照组和观察组。对照组：受教育程度：12 例中专，10 例本科及以上，4 名大专；入职时间为 1.3-18 年，平均为（5.86±1.21）年，年龄 22-38 岁，平均为（28.21±1.21）岁，女性 12 名，男性 14 名；观察组：受教育程度：11 名中专，11 例本科及以上，3 名大专；入职时间为 1.2-18 年，平均为（5.81±1.20）年，年龄 21-39 岁，平均为（28.25±1.20）岁，女性 11 名，男性 14 名。基本资料无统计学意义（P>0.05）。

1.2 方法

对照组接受常规管理，药学配置、查看、分发等均依据原有规章制度和模式进行管理。观察组接受 PDCA 循环模式管理：

①计划阶段：依据医院静配中心监测的空气沉降菌记录，查找发生细菌的原因、可能发生的问题等。此外，按照静配中心实际状况制定干预措施。消毒处理静配中心后 30min 后，实施空气采样和检测，确定仓内对角线部位、更衣室、洁净区等部位为采集点。动态测试、静态测试时，暴露培养皿的时间分别为<4h、>30min，每次培养基则需确定对照试验，明确检验培养基有无出现污染状况。

②执行阶段：成立医院静配中心感染控制小组，由护士长、药学人员、护士等人员组成，小组长由护士长担任。小组需定期检查静配中心感染管理状况，每月反馈与报告，整改所发现问题，检测静配中心微生物状况。此外，需培训静配中心各人员掌握规章制度和管理规范，同时需培训药学人员、护理人员有关感染管理的相应

知识，提升药学人员、护理人员在消毒方面的依从性，增强其责任感和慎独意识等。按照规章制度适用一次性无菌用品，禁止使用不合格或缺陷药品。

③检查阶段：定期自检静配中心存在的问题，让静配中心人员集体讨论、分析、总结问题，并针对问题提出整改措施，以便在下阶段时进行改进或纠正。

④处理阶段：静配中心全体人员开会学习已发现问题，并讨论分析。查找污染问题的原因，并正确落实。

1.3 指标判定

空气监测采用沉降法，空气中生物粒子自然降至培养基平皿中，培养相应时间后，合适条件下则会生成菌落，计数菌落，可评估洁净环境中活微生物数，判定静配中心空气洁净度。

记录其静配药物感染事件发生率。

依据《静脉用药集中调配操作规程》、《医疗机构消毒技术规范》、《静脉用药集中调配质量管理规范》等法规性文件评估静配中心工作质量，包含静配中心管理、服务态度、文书书写等方面，各方面分值为 0-100 分，评分越低越表明越良好。

1.4 统计学方法

用统计学软件（SPSS22.0 版本）分析数据，t 检验计量资料，表示为$\bar{x}\pm s$，X^2 检验计数资料，表示为%，若 $P<0.05$，则有统计学意义。

2.结果

2.1 空气沉降生成率、感染率

观察组空气沉降生成率 7.53%低于对照组空气沉降生成率 38.46%（P<0.05），观察组共发生医院感染 32 例，对照组共发生医院感染 30 例，其中因静配药物而导致的，观察组共 1 例，对照组共 8 例，观察组静配药物感染率 3.13%低于对照组 26.67%（P<0.05）。见表 1：

表 1：比较空气沉降生成率[n，(%)]

组别	细菌培养次数	细菌培养皿个数	沉降菌生成数（cfu/m3）	沉降菌的生成率（%）
观察组	13	598	45	7.53
对照组	13	598	230	38.46
x^2	--	--	161.6152	
P	--	--	0.0001	

2.2 工作人员工作质量

观察组工作人员工作质量评分高于对照组（P<0.05），见表 2：

表 2：比较工作人员工作质量（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	静配中心管理	服务态度	文书书写
观察组	25	81.20±1.21	79.58±1.24	79.58±2.32
对照组	26	65.32±2.32	61.20±2.32	63.32±1.02
t	--	30.4636	35.0776	32.6183
P	--	0.0001	0.0001	0.0001

3.讨论

PDCA 循环管理具有标准性和科学性，整个实施过程包含计划、执行、检查、处理等阶段[3]。采用 PDCA 循环管理对工作质量和效益均有明显提升效果，不仅可以运用到医院静配中心，还可应用到其他管理中，如耗材

管理、不合理医嘱管理、药品配送管理、差错管理等[4]。医院感染会加大患者死亡率和发病率，患者痛苦加大的同时，也对医院静配中心工作人员的工作负荷有所加大，进而对医院和患者双方均不利。医院静配中心发生污染，则诱发群体性事件的可能性非常大，对患者用药安全有直接性影响，甚至威胁到患者生命。为提升静配中心管理质量，有学者提出采用 PDCA 循环管理模式管理静配中心[5-6]，认为可降低感染率。本研究结果也显示，观察组空气沉降生成率 7.53%低于对照组空气沉降生成率 38.46%，静配药物感染率 3.13%低于对照组 26.67%，观察组工作人员工作质量评分高于对照组（P<0.05），同时证实了 PDCA 循环管理的优势。近年一般将 PDCA 循环管理应用到护理风险管理中，通过查找原因、制定计划、落实计划、检查监督、反馈等环节进行实施，取得了良好效果。本研究中，在计划阶段，明确静配中心出现微生物感染的原因，并在消毒后 30min 采样和监测空气状况，确定采集点，严格依据制定措施落实，定期检测感染状况，每月分析并报告，及时反馈，培训工作人员，确保下一循环进行改进，避免发生同样的问题。

综上，将 PDCA 循环用于医院静配中心感染管理中，可显著降低空气沉降菌生成率、感染事件发生率，确保医院静配用药安全，提升环境洁净度，值得推广。

参考文献

[1] 赵雪峰,纪翠翠. PDCA 循环管理在降低糖尿病患者静配中心感染发生率的应用观察[J]. 糖尿病天地,2020(2):33-34.

[2] 刘琴,厉晨,罗峰. PDCA 循环用于静配中心感染管理中的效果观察[J]. 实用临床护理学电子杂志,2020,5(48):174.

[3] 晏海凤. PDCA 循环模式在静脉用药调配中心感染管理中的应用效果[J]. 中国民康医学,2020,32(7):164-165,168.

[4] 朱雅楠,张鑫. 静脉用药调配中心采用 PDCA 循环管理模式对院感控制的效果分析[J]. 医药前沿,2020,10(21):227-228.

[5] 陈秋凤,葛延铭,林夏茵. PDCA 循环模式下的洁净管理对静脉用药调配中心空气中清洁度的影响[J]. 抗感染药学,2019,16(7):1172-1174.

[6] 黄彩玲,蔡倩萍,李宝瑜. PDCA 循环模式在静配中心感染管理中的应用分析[J]. 微量元素与健康研究,2018,35(6):94,封 3.

AGTR1 靶向近红外荧光探针用于结肠癌分子成像

周坤城，罗超，涂远彪*

（江西中医药大学癌症研究中心，江西 南昌 330004）

【摘要】结肠癌是世界上第二大最常见的癌症相关死亡原因，手术治疗是唯一根治结肠癌的治疗方式。结肠癌手术治疗成功的关键在于癌组织边界的准确界定。尽管结肠癌靶向荧光探针的研究广泛，但结肠癌的靶向治疗依然是一个挑战。我们发现，血管紧张素 II 的 I 型受体（AGTR1）在多种结肠癌细胞中高度表达。因此，我们通过异硫氰酸荧光素（FITC）与花菁类近红外染料 MPA 分别标记了 AGTR1 靶向配体血管紧张素 II（Angiotensin II，Ang II），构建了荧光探针 FITC-PEG_4-Ang II 和 MPA-PEG_4-N_3-Ang II，并在体内外评价了其用于 AGTR1 高表达结肠癌 HT29 靶向成像的潜力。多种体外细胞实验表明，探针 FITC-PEG_4-Ang II 可与结肠癌细胞 HT29 特异性结合。皮下、原位异种移植肿瘤模型的近红外荧光活体成像结果表明，探针 MPA-PEG_4-N_3-Ang II 能以高对比度靶向检测 AGTR1 高表达的 HT29 肿瘤，且表现出强的肿瘤内滞留能力，为结肠癌 HT29 长时间成像窗口提供了可能。注射探针 8 小时后的主要器官离体荧光定量结果指出，皮下和原位 HT29 肿瘤模型中，肿瘤与正常结肠信噪比分别为 10.23 ± 0.97 和 5.33 ± 0.65，展现出了探针 MPA-PEG_4-N_3-Ang II 在体内高信噪比检测 AGTR1 高表达结肠癌的潜力。综上所述，基于 Angiotensin II 的近红外荧光探针 MPA-PEG_4-N_3-Ang II 是 AGTR1 阳性结直肠癌靶向成像和手术导航的潜在工具。

Carbamazepine induced Adverse Drug Reactions: A simple, economical detection to identify patients carrying the HLA-B*15:02 allele using PCR-RFLP method

Xuan Zhou

Department of Pharmacy, Anhui Mental Health Center, Hefei, China.

【**Abstract**】**Background:** *HLA-B*15:02* allele is strongly associated with Carbamazepine-induced SJS/TEN in subjects of Han Chinese. In this study, we developed a novel PCR-RFLP approach to detect the *HLA-B*15:02* mutation in high effectiveness. **Methods:** *rs2844682* and *rs3909184* have been previously suggested as tag SNVs for *HLA-B*15:02*. For *rs3909184*, A 1221bp fragment was amplified by PCR, digested with *Pml* I restriction endonuclease and separated by 2.5% agarose gel electrophoresis for PCR-RFLP analysis. For *rs2844682*, we constructed the *Eco*R I restriction site by site-directed mutagenesis by overlapping PCR and amplified a 1077bp fragment, then digested with *Eco*R I restriction endonuclease and separated by 2.5% agarose gel electrophoresis for PCR-RFLP analysis. **Results:** It was verified by pyrosequencing that *HLA-B*15:02* genotype could be detected by PCR-RFLP method, and the process was simple, accurate and economical. **Conclusions:** We developed a sensitive, simple and economical approach to detect *HLA-B*15:02* genotype, and can be the preferred new method when genotyping another SNP site.

【**Keywords**】Carbamazepine, PCR-RFLP, overlapping PCR, site-directed mutagenesis , *HLA-B*15:02*, single nucleotide polymorphism

Background

Carbamazepine is an important drug for treating seizure disorders, bipolar disorder, trigeminal neuralgia, and chronic pain. It was found to be associated with hypersensitive reactions ranging from a mild maculopapular exanthema (MPE) to life-threatening severe cutaneous reaction (SCR), including Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN) [1,2]. Initial study suggested that MHC *HLA-B*1502* allele is strongly associated with CBZ-induced SJS/TEN in subjects of Chinese/Asian ethnicity [3,4].

rs2844682 and *rs3909184* have been previously suggested as tag SNVs for *HLA-B*15:02*. The SNP *rs2844682* G>A is located at position 30978375 on Chromosome 6, while *rs3909184* G>C,T is located at position 30731607 [5,6]. Although genetic testing can greatly improve patient care and reduce the potential for ADRs, the uptake of screening has been limited because of the technical and economic barriers associated with conventional HLA haplotyping methods. Due to the highly polymorphic nature of the complex, the “gold-standard” for HLA haplotyping is sequencing-based methods (SBT) and other specialized techniques, such as polymerase chain reaction-based sequence specific priming and microbead hybridization. However, these strategies are time consuming and expensive. This may limit the availability of such testing in patient groups in which it should be offered.

In the wild-type condition of *rs3909184*, there is a palindromic sequence of CAC**G**TG near the SNP site (the SNP site is in bold), which is the restriction endonuclease recognition site of *Pml* I. After amplifying the upstream and downstream sequence of *rs3909184* and digesting with *Pml* I, the wild-type is able to be digested by the enzyme, but the mutant is not.

For *rs2844682*, when the SNP site is mutated from G to A, there is a sequence of G**A**ATTG near the SNP site (the SNP site is in bold), according to the method described in the previous literature, when we mutate the last G to C, then the *Eco*R I recognition site can be obtained, and if it is digested at this time, it is a mutant type, and if it not, it is a wild type.

Different from previously reported article [7], which designed long primers for site-directed mutagenesis, and then digest the product with restriction enzyme to cut out small fragments of several tens of base pair, but the small fragments are difficult to detect. Here, we perform site-directed mutagenesis by overlapping PCR method to amplify long sequence, the length of the digested fragments can be freely designed to facilitate detection.

Mutagenesis by overlap extension has previously been described as a method for both site-directed mutagenesis to create base substitutions, insertions or deletions and production of chimeric genes by combining two DNA fragments without a need for restriction sites [8]. In separate PCR reactions, two fragments of a target sequence are amplified by using, for each reaction, one universal and one mutagenic primer. The two intermediate products with terminal complementarity form a new template DNA by duplexing in a second reaction. During this so-called overlap extension, the fused product is amplified with the help of the two universal primers. To obtain a high mutant yield, it is necessary to fractionate and purify the products of the first PCR reaction by gel electrophoresis [9].

Methods:

Clinical samples

A total of 20 patients was involved in this research, Informed consent was obtained from all patients.

Genomic DNA extraction

2 mL of venous blood was drawn and placed in an ethylenediamine tetraacetic acid · potassium ion ($EDTA \cdot K^+$) anticoagulant tube, stored at -80 ℃ until use.

Genomic DNA (gDNA) was extracted from the venous blood using the Genomic DNA Purification Kit (Sparkjade, Shandong) according to the manufacturer's instructions.

Amplified the gene fragment covering rs3909184.

Due to the presence of multiple continuous A or T in the gene fragment covering *rs3909184* (such as 21 consecutive T, 9 A, etc.), it is easy to form an in-chain hairpin structure during amplification and amplification failure. Through experiments, a pair of primers F1 and R1 were designed. Through the gradient PCR of annealing temperature (55℃-65℃), it is found that the annealing temperature has little effect on the amplification and can be well amplified. Therefore, the extracted gDNA was used as template and F1 and R1 in the primer sequence table below were used as primers to amplify the 1221bp full-length gene fragment.

The PCR reaction was performed using the following cycling conditions: 95℃ for 20 s, 60℃ for 20 s, 72℃ for 40 s, 35 cycles. The predicted PCR product was confirmed by electrophoresis in 2.5% agarose gel containing ethidium bromide.

Amplified the gene fragment covering rs2844682

The G site near the SNP of *rs2844682* (located at position 30978375 on Chromosome 6) was mutated to C by site-directed mutagenesis, and then the full-length gene fragment of *rs2844682* was obtained by overlapping PCR.

a. The gDNA was used as the template, and P1 and P4 in the primer sequence table were used as primers for site-directed mutagenesis to amplify the gene fragment with a full length of 685bp. (The site is marked in red as the mutation site) The gDNA was used as the template, and P2 and P3 in the primer sequence table were used as primers to amplify the gene fragment with a full length of 417bp.

The PCR reaction was performed using the following cycling conditions: 95℃ for 20 s, 60℃ for 30 s, 72℃ for 20 s, 30 cycles. The predicted PCR products were confirmed by electrophoresis in 2.5% agarose gel containing ethidium bromide.

b. There was no need to purify the PCR products of the two fragments, and 0.2μL of the product was taken from each fragment, and the two templates were allowed to self-extend for 10 cycles without primers to form full-length gene fragments.

The PCR reaction was performed using the following cycling conditions: 95℃ for 20 s, 60℃ for 30 s, 72℃ for 20 s, 10 cycles.

c. After self-extend reaction, the product was removed in time, and 1μL of P1 and P2 primers were added, and continue the amplification reaction after blowing and mixing with pipettor.

The PCR reaction was performed using the following cycling conditions: 95℃ for 20 s, 60℃ for 30 s, 72℃ for 40 s, 30 cycles. The predicted PCR product size was 1077bp and confirmed by electrophoresis in 2.5% agarose gel containing ethidium bromide.

If the amplified product still has obvious miscellaneous bands, we can obtain our target gene fragment by Gel Extraction Kit.

PCR-RFLP analysis

First, the PCR products were purified by using PCR Purification Kit (Sparkjade, Shandong), then the purified products were digested by restriction enzyme.

For gene fragment covering *rs3909184*, the purified product was incubated at 37 ° C for 4 h. The digestion reaction included 8.0 μL of PCR purification product, 1 μL of restriction enzyme *Pml* I, 2.0 μL of 10×NE Buffer, and 9 μL RNase free water.

For gene fragment covering *rs2844682*, the purified product was incubated at 37 ° C for 4 h. The digestion reaction system included 8.0 μL of PCR purification product, 1 μL of restriction enzyme *Eco*R I, 2.0 μL of 10×TaKaRa H Buffer, and 9 μL RNase free water.

The reaction was terminated by adding Loading Buffer and gel electrophoresis was carried out on 2.5% agarose gel (80 V for 30 min).

Result

Figure 1 shows the amplification results of the gene fragments where *rs3909184* and *rs2844682* are located. The results

show that *rs3909184* has a clear and unique band while *rs2844682* can obtain a single clear and specific band through 10 cycles of self-extension before overlapping PCR.

Figure 2 shows the PCR-RFLP analysis results of *rs3909184* and *rs2844682*. The results showed that for *rs3909184*, homozygous wild-type digestion produced two bands sized 323bp and 898bp, homozygous mutant-type digestion only produced one band of 1221bp, heterozygous mutant-type digestion produced three bands sized 1221bp, 323bp and 898bp, respectively.

For *rs2844682*, homozygous wild-type digestion will only have one fragment of 1077bp, homozygous mutant-type digestion will produce two bands sized 682bp and 395bp, and heterozygous mutant-type digestion will produce three bands sized 1077bp, 395bp and 682bp, respectively.

Discussion

For the amplification of *rs3909184*, because there were multiple continuous A and T near the SNP site, which could not be avoided during amplification, inappropriate primers were likely to fail to amplify due to the formation of intra-strand hairpin structure. We synthesized three pairs of primers, and only one pair of primers could achieve good amplification. Our strategy is to synthesize a longer sequence, avoid the continuous A or T that can be avoided, and make it exist in the middle part of the sequence for which cannot be avoided, because when there is a continuous A or T at the end of the sequence, it is easy to form a hairpin structure in the complementary pairing.

For the amplification of *rs2844682*, we referred to the method described by Li *et al* [7]. while improving it. In fact, the primers we used for site-directed mutagenesis do not meet the requirements of conventional site-directed mutagenesis primer design, which requires that the mutation site should be located in the central or 5' end of the primer, but not in the 3' end of the primer, because this may lead to the bases after the mutation site cannot bind to the template and thus cannot be extended. However, in this method, because the base of the SNP site is uncertain, the primer cannot be combined with the SNP site. Therefore, one primer mutation site designed by us can only be at the 3' end, and the other one is at the 5' end. Fortunately, our experimental results showed that the mutation site located at the fourth base of the 3' end can also be successfully amplified.

When performing overlapping PCR after obtaining two gene fragments, we first used the two fragments as templates and carried out self-extension without primers to produce a full-length sequence. If primers were added to amplify directly, three products would be produced, then we have to do the gel extraction operation before enzyme digestion. Due to the existence of complementary sequences (i.e., mutation primer sequences, P3 & P4), the two fragments can be self-extended under the action of polymerase after annealing. Our experimental results show that the self-extension of 10 cycles can effectively remove most of the short fragments, and then add the primer to amplify the full-length sequence we need.

Conclusions

In general, compared with the HLA genotyping based on the PCR-SBT method, we developed an economical, simple, accurate and low equipment requirement for the detection of *HLA-B*15:02* genotype PCR-RFLP method, which can greatly reduce the cost of test. Compared with the reported PCR-FRLP method, our method is easier to observe the results of enzyme digestion. In the reported method, the fragments digested by the enzyme are only tens of base pair, it is difficult to observe bands by agarose-gel electrophoresis. However, in our experimental method, the size of the bands can be freely

designed, which is easy to observe.

The method we developed can be extended to genotyping other SNPs, such as *CYP2C9*2 (rs1799853)* and *CYP2C9*3 (rs1057910)*, which significantly affect warfarin metabolism, and *rs9923231* of *VKORC1*, which affects warfarin efficacy. They can mutate and construct the restriction endonuclease recognition sites of *Sca* I, *Kpn* I and *Sma* I respectively for genotyping. For other example, psychiatric drugs such as clozapine, olanzapine and risperidone may have adverse reaction of tardigrade dyskinesia, and *rs1800497* of *ANKK1* is related to this adverse reaction, so we can try to mutate and construct *Sal* I digestion site for genotyping. This method is simple to operate and can complete genotyping within 24 hours, which can be the preferred method when genotyping a single SNP site.

References

[1] Marson, AG, Al-Kharusi, AM, Alwaidh, M, Appleton, R, Baker, GA, & Chadwick, DW, et al. (2007). The SANAD study of effectiveness of carbamazepine, gabapentin, lamotrigine, oxcarbazepine, or topiramate for treatment of partial epilepsy: an unblinded randomized controlled trial. The Lancet (9566).

[2] Wiffen Pj, Derry, Moore Ra, McQuay Hj (2005). Carbamazepine for acute and chronic pain in adults (review). Cochrane Database Syst Rev, 15(3), 335.

[3] Zhang Y, Wang J, Zhao LM, Peng W, Shen GQ, & Xue L, et al. (2011). Strong association between *HLA-B*1502* and carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in mainland Han Chinese patients. European Journal of Clinical Pharmacology.

[4] Hung SI, Chung WH, Jee SH et al (2006) Genetic susceptibility to carbamazepine induced cutaneous adverse drug reactions. Pharmacogenet Genomics 16:297–306.

[5] Bakker, Pi. De, et al. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. Nature genetics 38.10(2006):1166-72.

[6] Hung, SI, et al. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. Pharmacogenetics and genomics 4(2006):16.

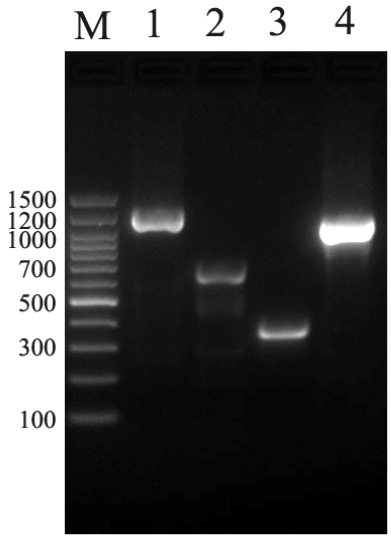
[7] Li, Wan Ming, et al. Highly sensitive detection of the $PIK3CA^{H1047R}$ mutation in colorectal cancer using a novel PCR-RFLP method. BMC Cancer (2016).

[8] Urban, and A. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. Nucleic Acids Research 25.11(1997):2227-2228.

[9] Dai C, CX Miao, and LU Guang-Xiu. Site-directed Mutagenesis Based on Overlap Extension PCR. Progress in Modern Biomedicine (2010).

Table 1. PCR primers used in this study

Primers	Sequences
F1	5'-GTAGATGTTCAGAGTATCCCTGGAAGG-3'
R1	5'-CTGCATAATTAGTTGGGACCTGTGGAC-3'
P1	5'-GCACTAGCATAGTGTTTGGCACT-3'
P2	5'-CAACAGCCTTGACCTTGGTTTATAC-3'
P3	5'-GATCATGACCATCTCTATGGCGAAT-3'
P4	5'-ATTCGCCATAGAGATGGTCATGATC-3'



M:100bp DNA Ladder Marker

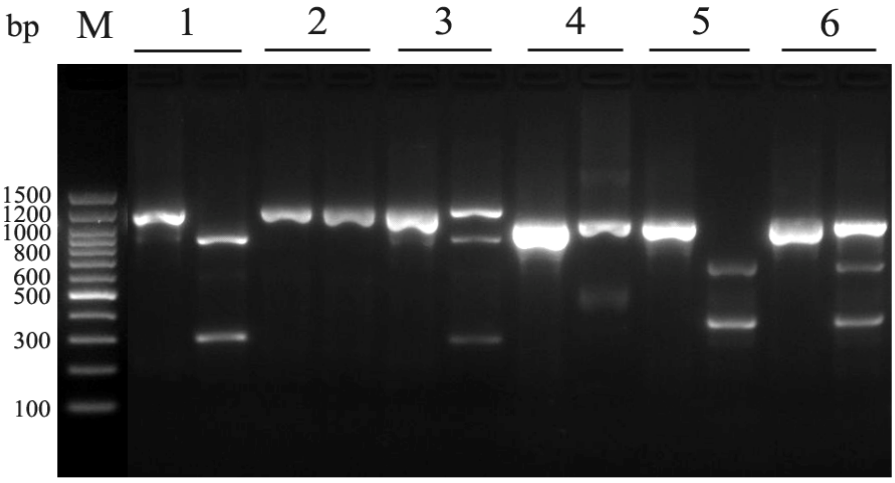
1: *rs3909184* full-length gene PCR product

2: *rs2844682* long fragment gene PCR product

3: *rs2844682* short fragment gene PCR product

4: *rs2844682* full-length gene PCR product

Figure 1. Gel electrophoresis analysis showed that amplification of rs3909184 & rs2844682



M:100bp DNA Ladder Marker ; 1: *rs3909184* wide type homozygote PCR product & digestion product

2: *rs3909184* mutant homozygote PCR product & digestion product

3: *rs3909184* mutant heterozygote PCR product & digestion product

4: *rs2844682* wide type homozygote PCR product & digestion product

5: *rs2844682* mutant homozygote PCR product & digestion product

6: *rs2844682* mutant heterozygote PCR product & digestion product

Figure 2. PCR-PFLP analysis of rs3909184 & rs2844682

成都市某三甲医院门诊患者用药风险 KAP 调查和影响因素分析

周杨

（成都市第五人民医院，四川 成都 611130）

【摘要】目的：了解成都市第五人民医院门诊患者用药知识－态度－行为（KAP）的现状，探讨其影响因素，为有针对性的开展药学服务指明方向。**方法：**通过调查问卷的形式，对该院门诊患者进行 KAP 调查，将结果导入到 excel 软件中进行整理汇总，采用 SPSS 进行统计。多重线性回归分析影响患者用药风险 KAP 的因素，将知识、态度、良好行为、不良行为进行 Pearson 相关性分析。**结果：**共收集有效问卷 505 份。患者用药的知识、态度、良好行为、不良行为平均得分分别为（75.93±15.20）、（32.25±4.85）、（21.37±3.89）、（46.92±9.77），多重线性回归结果显示年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、受教育程度、职业是患者用药知识的影响因素；年龄和月收入是患者用药态度的影响因素；年龄、月收入、医疗保障状况是患者用药不良行为的影响因素。知识、态度与不良行为之间存在显著相关性。**结论：**该院门诊患者总体用药风险为低风险，主要不足之处为抗菌药的使用和过期药品的处理方面，要根据患者的年龄、月收入情况、医疗保险状况等进行针对性的合理用药宣教。

【关键词】KAP；用药风险；调查问卷；影响因素

Investigation and influencing factors analysis of medication risk KAP among outpatients in a Grade III hospital in Chengdu

Zhou Yang

（Chengdu Fifth People's Hospital,Chengdu ,611130,China）

【Abstract】Objective：To understand the current situation of knowledge-attitude-behavior （KAP） of outpatient patients in Chengdu Fifth People's Hospital, and to explore the influencing factors, so as to provide direction for targeted pharmaceutical services. **Methods：**KAP survey was conducted on outpatients of the hospital through the form of WeChat questionnaire star, and the results were imported into excel software for sorting and summarizing. SPSS was used for reliability and validity test, descriptive statistics and multiple linear regression analysis to identify the factors affecting the risk of medication use. The knowledge, attitude, good behavior and bad behavior of patients were analyzed by Pearson correlation analysis. **Results：**A total of 505 valid questionnaires were collected. The average scores of patients' medication knowledge, attitude, good behavior and bad behavior were （75.93 ± 15.20）, （32.25 ± 4.85）, （21.37 ± 3.89） and （46.92 ± 9.77） respectively. The results of multiple linear regression analysis showed that age, monthly income, residence, medical insurance status, education level and occupation were the influencing factors of patients' medication knowledge; age and monthly income were the influencing factors of patients' medication attitude; age, monthly income and medical insurance status were the influencing factors of patients' bad medication behavior.

基金项目：中国药学会科技开发中心科普项目（编号 CMEI 2022KPYJ00175）

成都市卫生健康委员会医学科研课题项目（编号 CMEI 2021010）

作者简介：周杨（1987-），男，汉族，主管药师，硕士研究生。研究方向：临床药学。E-mail:zy02@163.com

Significant correlation existed between knowledge, attitude and bad behavior. **Conclusion：**The overall medication risk of the clinic's patients was low risk, with the main deficiencies being the use of antibiotics and the handling of expired medications. Targeted and reasonable medication education should be carried out according to the patient's age, monthly income, medical insurance status, etc.

【Key words】KAP；risk of medication；questionnaires；influence factors

自我药疗指消费者使用药物处理自己所意识到的不适或症状，或是暂时或持续地自行使用有医嘱的针对其慢性或再发病症的处方药物[1]。近几年我国采用自我药疗居民的比例也呈快速上升趋势，有研究表示生活在城市和西部地区的调查对象自我药疗发生率较高[2]，自我药疗作为自我保健的一部分被更多的患者选择，而由此带来的滥用、乱用以及药物损害等问题也日益严重[3]。

知－行－信（KAP）调查是研究受访者对于某种事物的知识、态度以及行为影响的一种方式，它将人们行为的改变分为获取知识、产生信念、形成行为三个连续过程[4]。在医药领域，有许多研究[5-8]通过 KAP 调查问卷了解不同地区居民用药行为现状，但目前尚无针对成都地区三甲医院门诊患者用药 KAP 的调查及有关自我药疗行为的研究。本研究旨在探讨影响成都市某三甲医院门诊患者用药风险 KAP 的因素，并对影响用药 KAP 的因素进行综合分析，为本区域患者提供更好的针对性的用药服务提供参考。

1 资料与方法

1.1 调查对象

将成都某三甲医院门诊患者作为研究对象，被调查者的年龄限制为 19 岁及以上，涵盖了不同性别、月收入、居住地、受教育程度等条件的人群。

1.2 调查方法

1.2.1 调查方式

本次调查主要采用微信线上调查的方式开展，调查时间为 2022 年 12 月至 2023 年 3 月。

1.2.2 调查问卷

调查问卷参考中国药学会科技开发中心设计的《中国患者用药行为风险 KAP 调查问卷》。该问卷主要包括两个部分：（1）患者基本信息（性别、年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、受教育程度、工作状况、职业 8 个因子）（2）患者用药行为风险 KAP 调查。包括对药品及药品使用的看法与观点、使用药品过程中的行为、对开展的用药教育活动的接触频率及态度。将第二部分设计为知识，态度，良好行为，不良行为四个维度。

1.2.3 问卷结果的评价标准

问卷采用五级量表进行计分，根据赞同程度和行为发生的频率进行赋值，极不赞同/从不/极无必要为 1 分，不赞同/偶尔/没必要为 2 分，一般/不清楚/时常为 3 分，赞同/经常/有必要为 4 分，极为赞同/总是/极有必要为 5 分。其中知识维度得分越高，用药风险越大；态度维度得分越高，说明对开展用药教育活动的参与度及态度越好；良好行为得分越高，说明用药行为越正确；不良行为维度得分越高，说明不良用药行为发生的频率越高，用药风险越大，具体分级见表 1。

表 1　各维度评分标准

Tab1　Scoring standards for each dimension

风险程度	无风险	低风险	高风险
知识	28～56	57～84	＞84
态度	＞33	23～33	11～22
良好行为	＞21	15～21	7～14
不良行为	17～34	34～51	＞51

1.3 统计分析

将问卷信息导入 Excel 中，采用 SPSS 26.0 对调查问卷的具体指标进行统计分析。以单因素方差分析、多重线性回归分析成都市第五人民医院门诊患者用药行为风险 KAP 得分的影响因素。

2 结果与分析

2.1 患者人口学特征

共 505 份问卷，男性占 54.9%，女性占 45.1%；年龄在 50 岁以下的患者占比 56.6%；月收入在 2000－4000 元的患者人数最多，占比 37.0%；城镇患者人数多于农村，占比 52.9%；参与社会基本医疗保险占 44.2%；中专或高中学历人数最多，占 27.1%；无/失业占 45.1%；从事医疗机构的人数最多占 16.6%。

2.2 患者用药 KAP 得分情况

以性别、年龄、居住地、医疗保障状况、受教育程度、工作状况、职业为自变量，以知识、态度、良好行为、不良行为得分为因变量，分析患者用药风险的影响因素及得分情况见表 2。

2.2.1 患者用药知识的得分情况

患者用药知识的平均得分为（75.93±15.20）分，总体为低风险，最高分为 102 分，最低分为 28 分，有 26.34% 的患者不合理用药存在高风险。不同年龄、月收入、居住地、医疗保险状况、受教育程度、职业的患者知识得分差异有统计学意义（P＜0.001）。

2.2.2 患者用药态度的得分情况

患者用药态度的平均得分为（32.25±4.85）分，总体为低风险，最高分为 55 分，最低分为 11 分，在接触用药知识讲座或用药教育活动中，69.11%的患者时常/经常/总是“通过网络、微信等阅读合理用药知识的宣传资料”，该问题平均分为 2.82 分。在对开展用药教育活动必要性的看法中，38.42%的患者认为有必要/极有必要开展“社区合理用药知识讲座”。不同年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、工作状况、职业的患者态度得分差异有统计学意义（P＜0.05）。

2.2.3 患者用药行为的得分情况

患者良好行为平均得分为（21.27±3.89）分，总体无风险；不良行为的平均得分为（46.92±9.77）分，总体低风险。8 个自变量对患者良好行为得分差异无统计学意义，不同年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、受教育程度、工作状况、职业的患者不良用药行为得分差异有统计学意义（P＜0.001）。

表 2 门诊患者人口学特征及用药行为风险 KAP 得分情况

Tab 2 Demographic characteristics of outpatients and medication behavior risk KAP score

人口学特征	人数	构成比/%	知识（75.93±15.20）		态度（32.25±4.85）		良好行为（21.37±3.89）		不良行为（46.92±9.77）	
			得分	P 值	得分	P 值	得分	P 值	得分	P 值
性别				0.733		0.75		0.495		0.390
男	277	54.9	75.73±17.64		32.31±4.91		21.27±4.00		47.26±10.2	
女	228	45.1	76.18±11.59		32.18±4.79		21.5±3.75		46.50±9.24	
年龄/岁				＜0.001		0.013		0.112		＜0.001
19-34 岁	137	27.1	69.27±16.82		31.55±6.00		20.76±4.73		43.91±11.6	
35-49 岁	149	29.5	72.46±16.88		31.81±4.86		21.83±4.24		44.70±9.80	
50-64 岁	72	14.3	80.35±10.76		32.42±3.21		21.21±3.14		48.31±7.54	
65 岁以上	147	29.1	83.50±8.22		33.27±4.13		21.56±2.77		51.28±6.76	
月收入/元				＜0.001		＜0.001		0.530		＜0.001

1000 元以下	43	8.5	72.91±15.82		32.49±6.01		20.63±4.66		46.86±10.1	
1000-2000 元	54	10.7	79.44±15.22		32.61±5.06		21.93±3.18		47.89±10.5	
2000-4000 元	187	37	82.78±8.64		33.26±3.04		21.49±2.92		50.53±6.78	
4000-6000 元	110	21.8	78.33±13.19		32.43±4.24		21.16±2.86		48.29±8.73	
6000 元以上	111	22	61.49±15.72		30.12±6.47		21.41±5.75		39.02±10.1	
居住地				＜0.001		0.001		0.421		＜0.001
城镇居民	267	52.9	69.96±16.61		31.60±5.60		21.5±4.75		43.84±10.9	
农村居民	238	47.1	82.63±9.81		32.98±3.73		21.23±2.59		50.37±6.78	
医疗保障状况				＜0.001		0.016		0.391		＜0.001
社会基本医疗保险	223	44.2	67.40±17.35		31.52±6.12		21.61±5.08		41.43±10.9	
商业保险	47	9.3	78.21±14.40		31.79±3.83		21.43±3.80		47.85±8.40	
自费医疗	87	17.2	84.53±4.73		33.17±3.19		21.54±2.13		52.25±3.78	
公费医疗	73	14.5	83.47±6.84		33.16±2.58		21.25±2.34		51.53±4.69	
其它	75	14.9	82.56±7.70		32.77±4.09		20.59±2.24		51.95±5.94	
受教育程度				＜0.001		0.103		0.597		＜0.001
研究生	45	8.9	61.93±18.74		31.47±7.16		21.04±5.10		40.58±11.3	
本科	124	24.6	65.79±17.65		31.31±5.93		21.73±5.49		41.31±11.0	
大专	103	20.4	80.63±9.58		32.59±3.97		20.83±2.53		49.43±7.58	
中专或高中	137	27.1	82.61±8.92		32.88±3.50		21.57±2.63		50.83±6.25	
初中	69	13.7	81.30±8.35		32.57±4.24		21.41±3.44		48.62±8.76	
小学	27	5.3	80.30±14.20		32.59±4.73		21.30±3.47		49.41±9.52	
工作状况				＜0.001		0.002		0.256		＜0.001
在职	166	32.9	65.31±17.52		31.15±5.60		21.52±5.31		40.57±10.9	
离退休	111	22	81.05±9.44		32.83±4.42		21.77±3.20		49.05±7.52	
无/失业	228	45.1	81.17±11.13		32.77±4.32		21.07±2.81		50.50±7.33	
职业				＜0.001		0.001		0.314		＜0.001
企业工人	68	13.5	74.84±14.48		30.79±6.00		21.21±4.60		44.13±9.68	
公司职员	57	11.3	64.68±17.00		30.16±6.25		21.40±5.99		39.65±11.1	
机关干部	51	10.1	82.31±7.35		33.43±3.18		21.14±1.97		49.98±4.91	
医疗机构	84	16.6	70.27±20.49		33.05±4.28		22.44±4.02		44.86±11.6	
教师	39	7.7	83.28±7.99		32.97±3.03		21.13±2.09		51.46±5.37	
企业经营管理	39	7.7	81.69±7.85		33.85±3.72		20.51±2.91		51.46±5.80	
自由职业	43	8.5	81.56±8.83		31.98±3.86		21.37±3.54		48.70±8.13	
学生	42	8.3	70.14±16.42		32.43±7.12		20.90±4.04		45.43±10.9	
其它	82	16.2	80.26±10.99		32.32±3.56		21.32±3.19		49.99±8.28	

表 3　门诊患者用药行为风险 KAP 得分的多重线性回归分析结果

Tab 3　Multiple linear regression analysis of medication behavior risk KAP scores in outpatients

（常量）	知识		态度		良好行为		不良行为	
	t	P	t	P	t	P	t	P
性别	1.195	0.233	-0.117	0.907	0.619	0.536	-0.357	0.721
年龄	6.646	0.000	3.167	0.002	1.645	0.101	5.228	0.000
月收入	-4.024	0.000	-3.147	0.002	-0.794	0.428	-2.673	0.008
居住地	3.028	0.003	1.369	0.172	0.338	0.736	0.156	0.876
医疗保障状况	3.851	0.000	0.525	0.600	-1.501	0.134	5.536	0.000
受教育程度	2.765	0.006	-0.612	0.541	0.585	0.559	0.256	0.798
工作状况	1.004	0.316	-0.828	0.408	-1.129	0.259	1.930	0.054
职业	-2.033	0.043	0.848	0.397	0.684	0.494	-0.481	0.631

表 4　年龄对患者用药行为风险 KAP 的多重线性回归分析结果

Tab 4　Multiple linear regression analysis of age on medication behavior risk KAP

年龄	知识			态度			不良行为		
	未标准化系数	标准化系数	P	未标准化系数	标准化系数	P	未标准化系数	标准化系数	P
19-34 岁	-3.186	-0.093	0.056	-0.265	-0.024	0.643	-0.792	-0.036	0.472
50-64 岁	7.891	0.182	0.000	0.605	0.044	0.382	3.601	0.129	0.007
65 岁以上	11.040	0.330	0.000	1.460	0.137	0.009	6.574	0.306	0.000
35-49 岁	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 5　月收入对患者用药行为风险 KAP 的多重线性回归分析结果

Tab 5　Multiple linear regression analysis results of monthly income on medication behavior risk KAP

月收入	知识			态度			不良行为		
	未标准化系数	标准化系数	P	未标准化系数	标准化系数	P	未标准化系数	标准化系数	P
1000 元以下	11.420	0.210	0.000	2.371	0.137	0.005	7.842	0.224	0.000
1000-2000 元	17.958	0.366	0.000	2.494	0.159	0.002	8.871	0.281	0.000
2000-4000 元	21.289	0.677	0.000	3.140	0.313	0.000	11.511	0.569	0.000
4000-6000 元	16.841	0.458	0.000	2.310	0.197	0.000	9.273	0.392	0.000
6000 元以上	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.3 患者用药 KAP 影响因素分析　将 8 个基本信息设为自变量，4 个维度设为因变量进行多重线性回归分析。

2.3.1 患者用药知识的影响因素

患者的年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、受教育程度、职业显著影响患者用药知识得分（P＜0.05）。19-34 岁患者的知识得分最低，65 岁以上的患者知识得分最高，随着年龄的增长，知识得分增高，说明用药风险随之增高，见表 4；收入为 6000 元以上的患者用药知识得分最低，月收入在 2000-4000 元的患者，用药知识得分最高，用药认知相对匮乏，见表 5；城镇居民用药知识得分显著低于农村居民；拥有社会基本医疗保险患者的知识得分显著低于其他医保类型；研究生和本科学历的患者知识得分显著低于大专、中专或高中、初中和小学学历的患者，见表 6；职业为学生、公司职员和医疗机构的患者知识得分较低，用药风险也低，见表 7。

表 6　受教育程度对患者用药知识的多重线性回归分析结果

Tab 6 Results of multiple linear regression analysis of educational level and medication knowledge

受教育程度	未标准化系数	标准化系数	t	P
研究生	-18.363	-0.345	-5.816	0.000
本科	-14.506	-0.411	-5.266	0.000
大专	0.335	0.009	0.119	0.905
中专或高中	2.310	0.068	0.846	0.398
初中	1.008	0.023	0.342	0.732
小学	0	0	0	0

表 7　职业对患者用药知识的多重线性回归分析结果

Tab 7　Results of multiple linear regression analysis of occupational effects on medication knowledge

职业	未标准化系数	标准化系数	t	P
企业工人	4.564	0.103	2.005	0.046
公司职员	-5.590	-0.117	-2.333	0.020
机关干部	12.040	0.239	4.859	0.000
教师	13.008	0.229	4.809	0.000
企业经营管理	11.418	0.201	4.222	0.000
自由职业	11.284	0.207	4.311	0.000
学生	-0.131	-0.002	-0.050	0.960
其它	9.982	0.242	4.607	0.000
医疗机构	0	0	0	0

2.3.2 患者用药态度的影响因素

不同年龄和月收入的患者显著影响用药态度，随着年龄增长，态度得分越高，提示老年人对开展用药教育的需求较大，月收入 6000 元以上的患者用药态度得分最低，月收入 2000-4000 元的患者用药态度得分最高，说明用药知识越匮乏的人群反而更渴望学习用药知识，见表 5。

2.3.3 患者用药不良行为的影响因素

不同年龄、月收入和医保状况显著影响患者用药不良行为的水平，随年龄的增长，患者发生用药不良行为的频数越大；月收入 6000 元以上的患者用药不良行为的得分最低，月收入 2000-4000 的患者用药不良行为得分最高，说明用药认知越正确的患者其发生用药不良行为的频率越低，见表 5。医疗保险为社会基本医疗保险的患者用药不良行为得分最低，发生不良行为的频数最少，见表 8。

表 8　医保状况对患者用药不良行为的多重线性回归分析结果

Tab 8　Results of multiple linear regression analysis of medical insurance status on adverse drug use behavior of patients

医保状况	未标准化系数	标准化系数	t	P
商业保险	6.416	0.191	4.746	0.000
自费医疗	10.818	0.418	10.160	0.000
公费医疗	10.099	0.364	8.891	0.000
其它	10.512	0.383	9.349	0.000
社会基本医疗保险	0	0	0	0

2.4 知识-态度-行为的 Pearson 相关性分析

通过进一步分析影响患者用药行为风险 KAP 的因素，发现年龄、月收入同时影响知识、态度、不良行为得分；医疗保险状况影响知识得分的同时也影响不良行为得分，故进一步探讨四个维度之间的相关性，结果见表 9。知识、态度、不良行为之间存在显著相关性，与其他研究一致，即用药知识与行为之间联系紧密[6]。提示可以通过提升患者的用药知识和态度来影响不良用药行为的发生情况。重点关注其相同影响因素，针对不同年龄、月收入和医疗保险状况的人群开展用药教育活动。

表 9　K-A-P 相关性分析

Tab 9　Correlation analysis of　KAP

维度	知识	态度	良好行为	不良行为
知识	1			
态度	0.299**	1		
良好行为	-0.066	0.288**	1	
不良行为	0.796**	0.366**	-0.038	1

** 在 0.01 级别（双尾），相关性显著。

3 讨论

3.1 患者用药的知识维度

知识平均得分为（75.93±15.20）分，总体为低风险。31.29％的患者表示“自我感觉症状减轻时可以减少药物的剂量”；29.31％的患者认为“抗菌药就是消炎药”；27.92％的患者认为“当周围的人感冒发烧或生其它病时，可以服用抗菌药进行预防”，仅有 9.7％的患者认为“同时服用的抗菌药物种类越多，病就好得越快”。可见患者对抗菌药有一定的认知，但本次调查中患者用药知识问题错误率最高的 3 个问题中有 2 个都与抗菌药的使用有关，抗菌药的使用风险依然较高。尤其是近年来细菌的耐药率逐年升高[9]，提示我们作为药师要通过各种渠道宣传抗菌药物的合理使用从而改变患者对抗菌药的错误认知。2017 年对四川省居民用药行为风险 KAP 的调查[10]也表明 47.0%的受访者误认为“抗菌药就是消炎药”；56.9%的受访者仍误认为“只要自己不滥用抗菌药，就不会产生耐药性”。可见患者对抗菌药的认知有一定提高，但抗菌药的使用问题仍然是最突出的问题，药师不仅要针对不同群体，也要针对不同知识内容进行用药宣教。此外还要改善患者用药依从性问题，根据世界卫生组织（WHO）的数据,全球 25%至 50%的患者未能按医嘱服药[11]，尤其在慢性疾病方面，而优质的药学服务可显著改善患者用药依从性，确保临床治疗效果[12-14]。

3.2 患者用药的态度维度

从患者接触各种用药教育活动的频率来看，超过一半的患者经常接触此类活动，说明门诊患者的参与度高。在对开展用药教育活动的看法中，38.42％的患者认为有必要/极有必要开展“社区合理用药知识讲座”，但大多数患者的看法为“一般/不清楚”。进一步分析可能与我院开放的免费线上用药咨询服务有关，大部分患者会选择通过微信等线上咨询或学习合理用药知识，而线下学习渠道较少，对患者来说也更陌生，提示药师可以通过走进社区，面对面指导患者用药，提高用药教育效果。

中青年患者的态度得分低于老年患者，分析其可能原因有：中青年多在职，空闲时间少；可获取信息的渠道多，学习能力强，知识储备丰富；老年人基础疾病较多，用药的种类多，时间长，对合理用药的需求更大[15]，但获得的用药指导较少。而月收入中等的患者态度得分最高，通过相关性分析可知与其知识相对匮乏有关。这些结果提示根据不同年龄段、不同收入程度设计不同的宣教方式和内容更有意义。

3.3 患者用药行为维度

在良好行为维度，36.24％的患者从不或偶尔“持医生处方去药房购买处方药”，30.10％的患者表示从不或偶尔“在服用药品之前查阅药品包装上的药品批准文号”，提示应加大安全用药宣传力度，充分发挥药师指导合理用药方面的作用。在不良行为维度，77.82％的患者表示“将家里过期的药品丢弃在垃圾箱”，78.81％的患

者表示“用药时，每次都会考虑自身身体状况”。随意处理过期药品的危害甚大，而我国过期药品回收面临诸多困境，导致家庭源过期药品常随生活垃圾处理[16]，除了应完善法律法规体系也要对药品消费者进行教育，扩大过期药品回收的知晓率，在进行用药教育时也要关注患者情绪变化，过分关注身体状况可能引起焦虑。根据影响因素可以对年龄较大和其它种类医疗保险的患者进行重点的用药教育。

3.4 调查的局限性

由于本次调查位于疫情特殊时期，只采用了线上问卷方式。今后可根据调查结果优化题目设置，多渠道收集数据，多层次更精确的反映影响患者用药行为风险 KAP 的影响因素，为药学服务的开展提供参考。

本研究采用问卷调查方法，对成都市某三甲医院门诊患者的用药行为现状及其风险水平进行了大规模地数据调查，通过数据分析进一步评估用药风险发现大部分患者有较良好的用药认知，具有积极的用药态度以及较为正确的用药行为，但是在抗菌药物认知和使用、药品购买认知以及过期药品处理等方面还存在较大隐患，作为药师需加强用药宣教。同时用药指导时还应考虑不同年龄、收入、职业和医疗保险类型的人群特点，采取不同的方式以提高用药教育效果。本研究也为成都市门诊患者药学服务的开展与制定有关用药安全的政策提供了一些依据，具有一定参考价值。

参考文献

[1]Organization W H.The role of the pharmacist in self-care and self-medication[J].World Health Organization.Essential Drugs and Medicines Policy-WHO/EDM,1998.

[2]王壮飞，管晓东，周越. 中国中老年人自我药疗发生率及影响因素研究:基于 CHARLS 2011 年，2013 年和 2015 年的面板数据[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,2019,06:430-438.

[3]吴小丽，冯译影.自我药疗的调研分析[J].中国现代药物应用，2014，8（2）:222-223.

[4] Chaw PS，Höpner J，Mikolajczyk R. The knowledge，attitude and practice of health practitioners towards antibiotic prescribing and resistance in developing countries-A systematic review [J]. J Clin Pharm Ther，2018，43（5）：606-613.

[5]李蒙，李智娣，蓝高爽.天津市某三甲医院门诊患者用药行为风险 KAP 调查及影响因素研究.中国医院药学杂志，2021，41（6）:645-650.

[6]张威风，李颖，罗欢. 安徽省居民中成药用药风险 KAP 调查及影响因素研究[J]. 安徽医学，2023，01:107-112.

[7]马利云,蔡培珊,赵瑛. 武汉市居民用药安全知信行调查及影响因素分析[J]. 中国药师，2022，07:1203-1209.

[8]苏美琴，丁记者，欧阳华. 基于“KAP”理论对厦门市社区居民用药风险调查及影响因素研究[J]. 中国医院药学杂志，2020，12:1375-1379.

[9]胡付品，郭燕，朱德妹，等．2020 年ＣＨＩＮＥＴ中国细菌耐药监测[J].. 中国感染与化疗杂志，2021，21（4）：377－387.

[10]冯双，边原，胡明，等. 2017 年四川省居民用药行为风险知信行的调查分析[J]. 中国新药与临床杂志，2018，06:369-374.

[11]钟园园.提高患者用药依从性的“黑科技”[J].中国药店，2021（2）:39-41.

[12]王坤，曹桂萍.不同药学服务模式对患者用药依从性的影响[J].中国处方药，2018，16（8）:50-51.

[13]李飞高,刘西哲,马颖超. 2020 年度河北省居民用药行为风险知识态度行为调查[J]. 西北药学杂志，2022，04:168-174.

[14]蒋逸韬，包欣然，陈懿玲.基于家庭储药和过期药品处理调研浅析家庭源过期药品回收[J]. 今日药学，2019,11:765-768.

[15] Krueger Katrin,Botermann Lea,Schorr Susanne G,et al.Age-related medication adherence in patients with chronic heart failure :A sysematic literature review[J]. International journal of cardiology，2015，184:728-735.

[16]冯振，叶桦，唐至佳.社会药房执业药师针对处方药和非处方药开展药学服务的同异性[J].中国临床药学杂志，2022，31（4）:298-301.

近红外漫反射光谱法在西红花质量检测中的应用

周颖[1]，盛晓慧[2]，郑成[1]，陈碧莲[1*]

（1.浙江省食品药品检验研究院，国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室，浙江杭州 310052；

2. 杭州谱育科技发展有限公司， 浙江杭州 310052）

【摘要】目的：采用近红外漫反射光谱法建立西红花中干燥失重、西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量近红外校正模型，为实现西红花快速检测奠定技术基础。**方法：**以 900 批西红花为试验材料，利用水分-灰分测定仪测定西红花的干燥失重，利用超高效液相色谱（UPLC）测定西红花苷 I 和西红花苷 II、苦番红花素含量。使用近红外分析仪采集样品的近红外光谱信息，对采集的光谱信息采用多种光谱预处理算法（标准正态变量变换法（SNV）、去趋势校正算法(DT)、多元散射校正（MSC）、Savitzky-Golay 平滑、Savitzky-Golay 导数、均值中心化）相结合的方式进行光谱数据预处理，结合偏最小二乘法（PLS1）建立光谱数据和待测样品组分之间的校正模型。通过比较不同光谱数据预处理算法建立的校正模型效果，选择最佳光谱数据预处理方法，以期提升所建西红花干燥失重以及西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量校正模型的模型性能，并采用盲样对模型的预测准确性进行验证。**结果：**多元散射校正(MSC)+Savitzky-Golay 平滑+Savitzky-Golay 导数+均值中心化为最佳的近红外光谱数据预处理方法；建立了干燥失重、西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量的近红外校正模型。**结论：**建立的干燥失重、西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量近红外校正模型可以快速、无损、准确地预测西红花药材的质量。

【关键词】近红外漫反射光谱法；西红花；干燥失重；西红花苷 I；西红花苷 II；苦番红花素

Application in Quality Detection of Saffron by Near-infrared Diffuse Reflectance spectroscopy

ZHOU Ying[1], SHENG Xiao-hui[2], ZHENG Cheng[1], CHEN Bi-lian[1*]

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, State Drug Administration Key Laboratory for Quality Evaluation of Proprietary Chinese Medicines, Hangzhou 310052, China; 2. (1.Hangzhou Puyu Technology Development Co., Ltd. Hangzhou 310052）

【Abstract】Objective：A near-infrared diffuse reflectance spectroscopy method was established near-infrared prediction model for drying loss, crocin I, crocin II, and crocin content of saffron, which lays the foundation for rapid detection of saffron. **Method：** 900 batches of saffron were used as experimental materials, and the drying weight loss of saffron was measured by moisture ash analyzer. The content of saffron I, saffron II, and saffron was determined by Ultra high performance liquid chromatography (UPLC). The near-infrared spectral information of saffron were collected by near-infrared analyzer. The spectral information is preprocessed by different preprocessing methods including Standard Normal Variable Conversion (SNV), Trending Correction (DT), Meta Scattering Correction (MSC), Savitzky Golay Smoothing, Savitzky Golay Derivative or Mean Centralization. Combining partial least squares (PLS1), the best spectral preprocessing method was selected by comparing with different preprocessing methods to establish near-infrared prediction model for the drying weight loss, the content of saffron I, saffron II, as well as crocin, and verified the predictive accuracy of the

基金项目: 浙江省药品监督管理局计划项目（2021001）

作者简介: 周颖，女，主管药师 研究方向：中药质量控制，

* 通讯作者: 陈碧莲，女，主任中药师 研究方向：中药质量控制，Tel: (0571) 86459402

model. **Result：**Multi scattering correction (MSC)+Savitzky Golay smoothing+Savitzky Golay derivative+mean centering is the optimal method for preprocessing near-infrared spectral information and near-infrared prediction models for drying loss, crocin I, crocin II, and crocin content was established. **Conclusion：** A near-infrared prediction model for drying loss, crocin I, crocin II, and crocin content has been established, which can accurately and efficiently predict the quality of saffron.

【**Keywords**】Near infrared diffuse reflectance spectroscopy; Saffron; Loss on drying; Saffron I; Saffron II; crocin

西红花为鸢尾科植物番红花(Crocus sativus L.)的干燥柱头，主产于西班牙、希腊、法国及中亚西亚一带，我国上海、浙江、江苏等地栽培。西红花性平，味甘，归心、肝经，具有活血化瘀，凉血解毒，解郁安神，用于经闭癥瘕，产后瘀阻，温毒发斑，忧郁痞闷，惊悸发狂[1]。西红花不仅是名贵药材，也是人们青睐的一种保健品。近几年伴随着伊朗的西红花产区种植面积每年以 30%的速度递增，以及国际货币形势的变化，使得西红花在我国报关报检规模迅速扩大。由 2014 年不到 400 公斤到 2020 年的近 20 吨，西红花以强劲的势头涌入我国口岸。批次多，检验周期短，严重限制了检验的时效性，也使得检验成本大大提高。

近红外光是一段波长范围在 780～2526 nm 的电磁波，主要反映的是含氢基团（如 C-H，N-H，S-H，O-H 等）的倍频和组合频吸收，具有丰富的样品结构和组成信息。近红外光谱分析技术（Near infrared spectroscopy, NIR）是一项基于近红外光谱技术与化学计量学分析模型技术的综合分析技术，可实现对含有 C-H、N-H、O-H 等有机官能团的样品进行快速、无损定量分析。近红外漫反射光谱法通过化学计量学能将样品的近红外光谱信息与其表征的性质数据建立定量分析模型，利用该分析模型可实现对样品的近红外光谱定性定量分析[2-5]。该方法在不同领域的研究中多有应用。目前国内外对于西红花近红外检测工作多集中在真伪鉴别上，如 Castro Rafael C 等[6]采用 NIR 光谱与多元曲线分辨-交替最小二乘（MCR-ALS）耦合，建立西红花样品中 4 种混伪品的鉴别和定量。Amirvaresi Arian 等[7]采用 NIR 和中红外（MIR）光谱用于番红花掺假检测；王巧等[8]利用近、中红外光谱数据特征建立分类模型，实现了对不同产地西红花的快速准确鉴定；李庆等[9]采用云端-互联便携式近红外技术结合化学计量学对西红花与其常见伪品(红花、玉米须等)和掺伪品进行现场快速真伪鉴别及掺伪量的定量预测。Eman Shawky 等[10]采用近红外光谱-多元分析用于红花柱头常见植物混伪品的快速鉴定、检测和定量。刘江弟[11]采用近红外光谱法对 98 批产自中国与伊朗的西红花药材进行质量研究，完成了其商品规格等级的划分等相关研究。 Shuailing · Li 等[12]采用近红外光谱结合化学计量学技术快速测定藏红花中的藏红花素。然而目前尚未开展采用近红外漫反射分析技术测定干燥失重、西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量快速检测研究，因此开展与进口药材标准检测指标相一致的西红花近红外漫反射快速定量分析模型显得尤为重要。

本论文采用近红外漫反射光谱法对西红花进行测定，建立了西红花药材粉末中干燥失重、西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素的 NIR 校正模型，并用于未知样本中西红花上述参数的测定，旨在为西红花药材大规模进出口建立可用于现场检测快速的质量评价体系。

1 材料与方法

1.1 材料

从中华人民共和国浙江各海关抽取来自伊朗的西红花共 900 批。对照品西红花苷 I（批号：111588-201704，含量 88.4%）、西红花苷 II（批号：111588-201705，含量 92.2%）、苦番红花素（批号：112056-202001，含量 97.6%）均购自中国食品药品检定研究院；乙腈，甲醇（色谱纯，德国西格玛公司）；乙醇为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；水为超纯水。

1.2 仪器与设备

EXPEC 1370 近红外光谱分析仪(谱育科技有限公司，配有 RIMP 近红外测量分析软件)。Ultimate3000 型超高效液相色谱仪（赛默飞世尔科技（中国）有限公司）；prepASH 340 全自动水分灰分分析仪（瑞士普利赛斯）；电子天平 XPE-2015 型（梅特勒-托利多仪器上海有限公司）；Milli-PAK 型去离子水发生器（美国密理博公司）。

1.3 西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量测定以及干燥失重测定

依据中国药典 2020 年版测定各含量及干燥失重[1]。

1.4 样品的处理与采集

抽样后在实验室进行避光保存。将西红花利用粉碎机粉碎，过筛后将样品粉末装进密封袋后置于阴凉处保存。以漫反射方式采集西红花样品在近红外光谱区域 1000～2500 nm，分辨率 6 nm。开机后，先打开软件预热 30 分钟，预热结束后将样品放置在近红外分析仪配套的样品盘中进行扫描和光谱信息采集。试验重复装样 3 次，每次重复采集 3 条光谱；另外采集光谱信息前，将需要扫描的西红花粉末样品提前置于近红外分析仪所在实验室以适应温度等环境因素，减少环境变化对试验过程产生的影响。

1.5 样品集的划分

从 900 批西红花样品中随机选取 800 个样品作为近红外预测模型的校正集，其余 100 个样品作为盲样用于近红外校正模型的验证，用来检测最终建立的模型效果。采用 8 折交叉验证（K-Fold Cross Validation），8 折交叉验证把样本数据随机的分成 8 份，每次随机的选择 7 份作为训练集，剩下的 1 份做测试集。当一轮完成后，重新随机选择 7 份来训练数据。若干轮（小于 8）之后，选择损失函数评估最优的模型和参数。

1.6 近红外光谱信息的预处理方法

样品近红外光谱信息会受到噪音、仪器、环境中其它散射光等的干扰，进而影响近红外模型的准确性。对采集的近红外光谱信息进行预处理可以在一定程度上降低上述干扰因素对近红外模型造成的影响。从近红外成分分析仪中导出西红花的近红外光谱信息。对获得的光谱信息进行预处理以后建立偏最小二乘法（PLS）模型，采用的预处理方法包括标准正态变量转换法（standard normal variate transformation，SNV）、去趋势校正(Trend correction，DT)、元散射校正（multiplicative scattering correction，MSC）、Savitzky-Golay 平滑、Savitzky-Golay 导数、均值中心化。通过学生化残差图剔除异常样品，最后结合偏最小二乘法进行建模。

1.7 特征光谱变量的选择

采用全光谱建模难免会包含一些与待测组分无关的噪声波段，删除这段波长一方面可以简化模型，同时能剔除不相关的光谱变量，从而达到增加校正模型预测能力和稳定性的目的，基于上述原因拟去掉头尾波段最终选择 1050-2400 nm 作为特征光谱波段用于建模。

1.8 建模方法和模型评价

拟采用学生残差图剔除异常样品，以相关系数(Coefficient of determination, RC)、标准校准偏差(Standard Error of Calibration ，SEC)、交叉验证的校正标准偏差(Standard Error of Cross Validation，SECV)以及范围误差比(the ratio of performance to deviation for calibration，RPD)作为模型的评价指标[14]。当 SECV <= SEC *1.2，RC 较高（接近 1）以及 RPD 值大于 1.4 小于 2.0 时认为所建模型较可靠，RPD 值大于 2.0 时证明校正模型的预测能力最好、稳定性最强。以上数据分析均在软件 RIMP 近红外测量分析软件（杭州谱育科技发展有限公司）中进行。

2 结果与分析

2.1 西红花的近红外原始光谱

800 个西红花的光谱如图 1 所示，从图中可以看出，NIR 在 1200、1450、1700、1950、2100、2300 nm 附近存在较强的吸收，同时 1380 和 1580 cm-1 附近存在 2 个较弱的吸收峰。其中 1200、1400nm 附近的吸收峰主要是由 C-H 键和 O-H 键的伸缩振动所产生的。2100 和 2300nm 处的吸收峰主要来源于 CH3 中的一级倍频和糖类中的 C-H 键的组合频和 O-H 键的伸缩振动。不同西红花的光谱趋势一致，整个 1050～ 2400nm 区域内光谱差异较小，但是又不完全重合，这说明样本整体保持一致，但不同样本之间又存在差异。

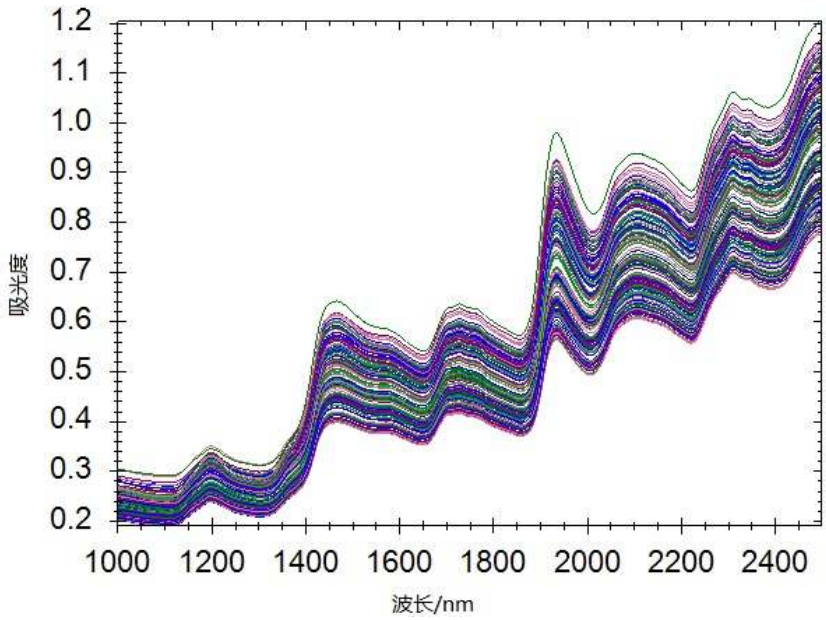


图 1. 800 批西红花的原始近红外光谱

Fig.1 Original near-infrared spectrum of 800 saffron samples

2.2 样品集的划分

由由于存在异常样品，在剔除样品后将样本集划分为 8 个大小相似的互斥子集，并在划分时保持数据分布的一致性，每次用 7 个子集的并集作为训练集，剩余的做测试集，进行 8 次训练，最后取 8 次结果的均值。。

2.3 光谱数据预处理

表 1 是采用标准归一化（SNV）、去趋势校正(DT)、多元散射校正（MSC）、Savitzky-Golay 平滑、Savitzky-Golay 导数、均值中心化这 6 种预处理方法进行多种组合对光谱数据进行处理后的建模效果。将原始光谱分别按照方法 1、方法 2、方法 3 这 3 种预处理以后建立 PLS 模型，模型的效果如表 1 所示。

表 1 不同预处理方法后建立的 PLS 模型效果

Tab. 1 Effect of PLS model established after different pretreatment methods

预处理	指标	RC	SEC	SECV	RPDC	主因子	样本个数	性质范围
方法 1	苷 I+苷 II	0.87	1.0289	1.1149	2.028	12	822	[10.1, 19.9]
	干燥失重	0.95	0.2994	0.3201	3.203	10	769	[6.5, 11.2]
	苦番红花素	0.89	0.6924	0.7627	2.193	12	813	[7, 14.8]
方法 2	苷 I+苷 II	0.90	0.8687	0.9859	2.294	15	797	[10.1, 18.9]
	干燥失重	0.96	0.2542	0.2763	3.571	12	746	[6.5, 11.2]
	苦番红花素	0.91	0.6213	0.6836	2.412	13	793	[7, 14.8]
方法 3	苷 I+苷 II	0.86	1.0299	1.1030	1.960	11	810	[10.1, 18.9]
	干燥失重	0.95	0.2962	0.3250	3.203	11	769	[6.5, 11.7]
	苦番红花素	0.86	0.7617	0.8186	1.960	11	824	[7, 14.8]

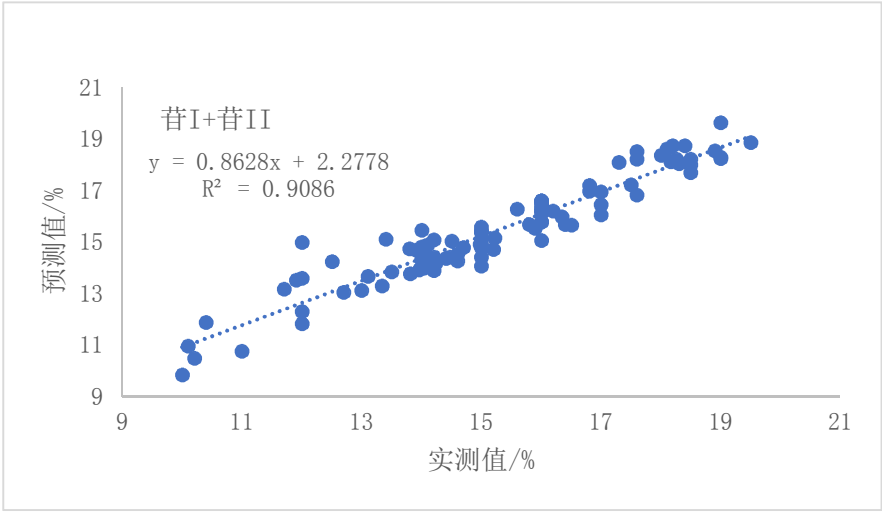
注: 方法 1 代表标准正态变量变换(SNV);去趋势校正(DT);Savitzky-Golay 平滑;Savitzky-Golay 导数;均值中心化；方法 2 代表多元散射校正(MSC);Savitzky-Golay 平滑;Savitzky-Golay 导数;均值中心化；方法 3 代表 Savitzky-Golay 平滑;Savitzky-Golay 导数;均值中心化；

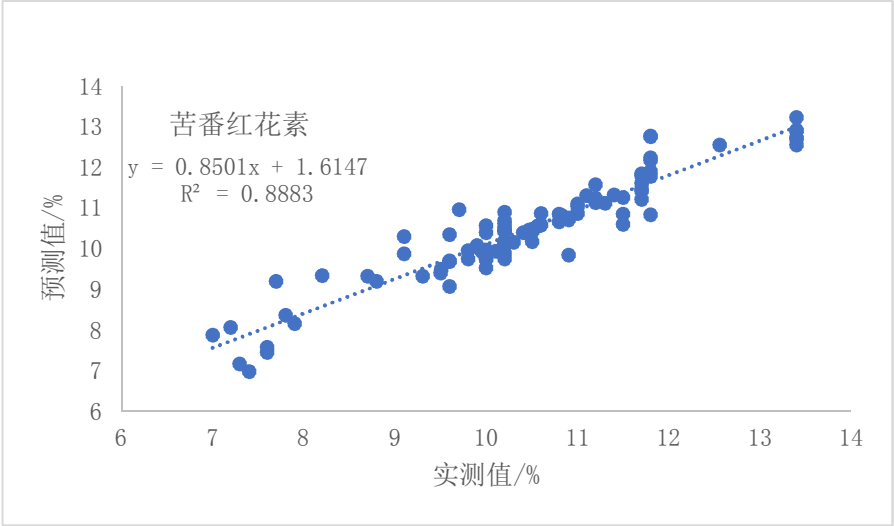
RPD计算依据：$\mathrm{RPD}=\frac{1}{\sqrt{1-R^2}}$

由表 2 可知，西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量以及干燥失重近红外校正模型的最优光谱预处理算法为多元散射校正(MSC)+Savitzky-Golay 平滑+Savitzky-Golay 导数+均值中心化，其中校正集的西红花苷 I 与西红花苷 II 之和、苦番红花素含量以及干燥失重相关系数 RC 分别为 0.90，0.91，0.96，SEC 值分别为 0.8687，0.6213，0.2542；SECV 值分别为 0.9859，0.6836，0.2763。该法所建立的预测模型主成分数分别为 15，13，12，RC 值均达到较高水平，且 SEC 和 SECV 均处在较低的水平，其中 RPD 分别为 3.203，3.571，3.203，表明该模型的预测效果较好。

2.4 模型的验证和评价

为了进一步验证近红外校正模型的准确性，将 100 个独立盲样导入 PLS 模型之中，对模型的预测性能进行检验。结果如图 2 所示，西红花中西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量以及干燥失重的实测值与预测值线性相关较好。为了进一步验证方法的准确性，通过成对 t 检验，在置信水平为 95%时，P 值为 0.9634 高于 a (0.05) ，表明预测值与测量值之间没有显着差异。结果表明 100 批西红花盲样中西红花苷 I+西红花苷 II、苦番红花素含量以及干燥失重预测值与其实测值之间存在显著的相关性（西红花苷 I+西红花苷 II r^2=0.9086、苦番红花素 r^2=0.8883、干燥失重 r^2=0.9344），表明所建模型的预测准确度较高。





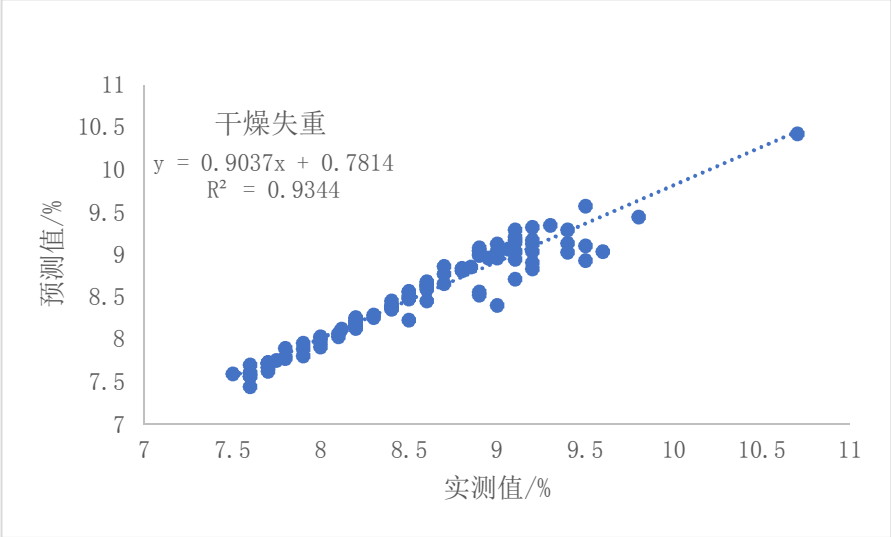


图 2 测试集样品的线性回归

Fig.2 Linear regression of test set samples

3 结论

利用近红外漫反射光谱技术结合光谱预处理算法建立了西红花中西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素含量以及干燥失重的偏最小二乘(PLS) 模型，能够用于快速、无损地测定西红花质量。文中比较了 3 种预处理算法对模型性能的提升效果，其中，多元散射校正(MSC)+Savitzky-Golay 平滑+Savitzky-Golay 导数+均值中心化为最优的预处理方法。采用最优预处理方法使得模型的的 RC 值达到 0.90 以上，结果表明，该种预处理方法可以提高模型的预测准确性和稳健性。基于该种方法建立了稳健的西红花校正模型，为进一步建立西红花质量快速评价体系提供了技术支撑。

参考文献

[1] 国家药典委员会．中华人民共和国药典（一部）2020 年版 [S]．北京: 中国医药科技出版社, 2020: 134.

[2] 阮治纲, 李彬. 近红外光谱分析技术的原理及在中药材中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 408-417.

[3] 黄志伟,郭拓,黄文静, 等.近红外光谱技术在名贵中药材质量评价中的研究进展[J].中草药,2022,53(20):6328-6336.

[4] 褚小立, 陈瀑, 李敬岩, 等. 近红外光谱分析技术的最新进展与展望 [J]. 分析测试学报, 2020, 39(10): 1181-1188.

[5] 刘贤, 韩鲁佳. 近红外漫反射光谱法快速测定秸秆青贮饲料成分含量 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(11): 2016-2020.

[6] Castro Rafael C.,Ribeiro David S.M.,Santos João L.M.,etal. Near infrared spectroscopy coupled to MCR-ALS for the identification and quantification of saffron adulterants: Application to complex mixtures[J]. Food Control, 2021, 123:107776..

[7] Amirvaresi Arian, Nikounezhad Nastaran, Amirahmadi Maryam, etal. Comparison of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy based on chemometrics for saffron authentication and adulteration detection[J]. Food Chemistry, 2021;344:128647.

[8]王巧,熊丰,王游游等.红外光谱结合化学计量学鉴别西红花的产地[J].化学试剂,2023,45(03):112-119.

[9] 李庆,闫晓剑,赵魁等.基于云端-互联便携式近红外技术现场快检西红花真伪[J].光谱学与光谱分析,2020,40(10):3029-3037.

[10] Eman Shawky, Rasha M. Abu El-Khair, Dina A. Selim. NIR spectroscopy-multivariate analysis for rapid authentication, detection and quantification of common plant adulterants in saffron (Crocus sativus L.) stigmas[J]. LWT, 2020,122:109032.

[11] 刘江弟. 近红外光谱法评价西红花药材的质量[D].江苏大学,2017.

[12] Shuailing Li, Qingsong Shao, Zhonghua Lu, etal. Rapid determination of crocins in saffron by near-infrared spectroscopy combined with chemometric techniques[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 190: 283-289.

[13] 梁子超, 李智炜, 赖铿, 等. 10 折交叉验证用于预测模型泛化能力评价及其 R 软件实现[J]. 中国医院统计, 2020(4) : 289-292.

[14] 刘桂松. Vis-NIR 光谱判别分析的几类模式识别方法研究[D]. 暨南大学, 2015.

代谢障碍相关脂肪性肝病：铁死亡相关机制及潜在药物

朱宝强[1,2]，李文渊[2*]，张明名[2]，杨诗语[2]，龙恩武[1,2]

（1. 西南医科大学药学院 四川 泸州 646000 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院/电子科技大学附属医院药学部，个体化药物治疗四川省重点实验室，四川 成都 610072）

【摘要】铁死亡是一种程序性细胞死亡机制，表现为铁代谢异常所致的铁过载和脂质过氧化。近年来在糖尿病、心脑血管疾病和肝病的致病机制研究中，均发现了铁死亡的参与，已成为医学热点研究之一。MAFLD 被认为是一类同时患有代谢性疾病和脂肪肝的“多系统”疾病，包括单纯肝脂肪变性和非酒精性脂肪肝炎，部分可发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌。近期研究发现，代谢性疾病与脂肪肝互为致病因素，而铁死亡在二者的致病过程中均发挥了重要作用，铁死亡可能是代谢性疾病和 MAFLD 的共同靶点。本文梳理归纳了铁代谢和铁死亡的病理生理机制、代谢性疾病和脂肪肝中铁死亡的关系及针对铁死亡的 MAFLD 治疗药物和潜在活性物质，以期为读者提供新的见解。

【关键词】铁死亡，代谢障碍相关脂肪性肝病，药物治疗

Metabolic Dysfunction-associated Fatty Liver Disease: related mechanisms and potential drugs of Ferroptosis

ZHU Bao-qiang[1,2], LI Wen-yuan[2*], ZHANG Ming-ming[2], YANG Shi-yu[2], LONG En-wu[1,2]

（1.School of Pharmacy of Southwest Medical University,Luzhou, Sichuan, 646000,China 2.Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Pharmacy of Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan, 610072, China）

【ABSTRACT】Ferroptosis is a programmed cell death mechanism, manifested as iron overload and lipid peroxidation caused by abnormal iron metabolism. In recent years, the participation of ferroptosis has been found in the pathogenesis of diabetes, cardio cerebral vascular disease and liver disease, which has become one of the hot medical research topics. MAFLD is considered a "multisystem" disease that simultaneously suffers from metabolic diseases and fatty liver disease, including non-alcoholic fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. Some may develop into liver fibrosis, cirrhosis, and even liver cancer. Recent studies have found that metabolic diseases and fatty liver are mutually pathogenic factors, and ferroptosis plays an important role in the pathogenesis of both. Ferroptosis may be the common target of metabolic diseases and MAFLD. This article summarized the pathophysiological mechanism of iron metabolism and ferroptosis, the relationship between metabolic diseases and iron death in fatty liver, and MAFLD therapeutic drugs and potential active substances for ferroptosis, in order to provide new insights for readers.

【KEY WORDS】ferroptosis; metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; medication

作者简介：朱宝强，男，硕士在读，药师，研究方向：慢病个体化治疗，E-mail：zbq160911@163.com

* 通讯作者：李文渊，女，硕士，主管药师，研究方向：慢病个体化治疗、糖尿病药物治疗，E-mail：782020980@qq.com

代谢障碍相关脂肪性肝病（metabolic dysfunction-associated fatty liver disease，MAFLD），又名非酒精性脂肪肝病，包括单纯的肝脂肪变性（non-alcoholic fatty liver，NAFL）和非酒精性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis，NASH），部分可发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌。基于前期的研究基础和临床证据，2020 年，国际专家小组对其定义和诊断标准做出了更新[1]。目前，MAFLD 被认为是一类同时患有代谢性疾病和脂肪肝的“多系统”疾病。其中代谢性疾病满足以下三项条件之一：肥胖/超重、2 型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM）、其他代谢异常指征，而脂肪肝的诊断基于肝活检组织学、影像学或血液生物标志物检查提示存在肝部脂肪病变。NAFLD 的更名突出了脂肪肝与代谢性疾病之间紧密的联系，也强调了控制代谢性疾病进展在 MAFLD 的治疗管理中的重要性。目前，临床建议使用多种药物（如降糖药、调脂药、抗氧化剂等）进行全面的控制和管理[2]。

铁死亡是一种新型程序性细胞死亡形式，主要表现为胞内铁代谢异常导致的铁过载和脂质过氧化。铁死亡的主要致病机制包括三个方面：铁代谢异常或高铁摄入引起的铁过载、不饱和脂肪酸脂化进程的活跃及抗氧化修复系统的损伤。近几年，在癌症、糖尿病、心脑血管疾病、肝脏疾病的研究中，均发现铁死亡参与其中，已成为医学研究的热点方向之一。现有证据表明，代谢性疾病与脂肪肝互为致病因素，而铁死亡在二者的致病过程中均发挥了重要作用，若铁死亡存在于多个系统，且贯穿了整个致病过程，或许铁死亡可作为代谢性疾病和脂肪肝的共同靶点，对其抑制可改善 MAFLD 的进展。基于此，本文汇总了与 MAFLD、代谢性疾病、铁死亡相关的研究，并对相关药物的治疗潜力进行分析和探讨，旨在为读者提供一些新的参考。

铁代谢与铁死亡的生理病理机制

铁死亡作为一种新的细胞损伤机制，主要表现为胞内铁代谢异常导致的铁过载和脂质过氧化损伤，胞内铁代谢及铁死亡的生理及致病机制主要涉及以下三个方面，具体机制见图 1。第一，铁代谢是一个复杂过程，部分代谢环节的紊乱和失调可导致铁死亡。正常情况下，血浆中的转铁蛋白（transferrin，Tf）与转铁蛋白受体 1（transferrin receptor 1，TfR1）结合后，铁离子可进入细胞内，前列腺跨膜上皮抗原 3（six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3，STEAP3）作为金属还原酶家族中的一员，具有亚铁还原酶活性，可将 Fe^{3+}还原为 Fe^{2+}，并通过二价金属转运蛋白 1（divalent metal transporter 1，DMT1）和锌转运体 8/14（zinc transporter 8/14，ZIP8/14）两种转运蛋白运送到胞质中，形成不稳定铁池（liable iron pool，LIP）。游离的 Fe^{2+}可经多聚胞嘧啶结合蛋白[poly(rC)-binding protein 1，PCBP1]转移到 Ferritin[铁蛋白重链 1（ferritin heavy chain 1，FTH1）发挥关键作用]中，被还原为 Fe^{3+}维持胞内铁平衡，也可转运至线粒体加以利用。此外，二价铁也可通过细胞膜铁转运蛋白（ferroportin 1，FPN1）运送至胞外。在此过程，核受体辅激活因子 4（nuclear receptor coactivator 4，NCOA4）可调控铁蛋白（Ferritin）在溶酶体中的降解。当铁代谢过程异常（如 ferritin 降解增加、TfR1 表达增加、FPN1 表达减少）时，会造成胞内 Fe^{2+}积聚，通过 Fenton 反应与过氧化物形成羟基过氧化物，PUFA-PL 可成为作用靶点，产生大量过氧化脂质。第二，PUFA-PL 的过量合成可作为 OH^-的底物，促进过氧化脂质的形成诱导铁死亡。多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acids，PUFAs）和磷脂（phospholipid，PL）为主要反应物质，其中涉及到长链脂酰辅酶 A4 合成酶（acyl-CoA synthetase long-chain family member 4，ACSL4）、溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3（lysophosphatidylcholine acyltransferase 3，LPCAT3）、脂氧合酶（lipoxygenases，LOXs）等关键酶。第三，胞内存在一系列抗氧化防御系统可调节活性氧（reactive oxygen species，ROS）及过氧化脂质产生的 Lipid ROS，抵抗铁死亡：①GSH-GPX4 是细胞内固有的清除过氧化脂质的酶，其合成原料为谷胱甘肽（glutathione，GSH）。胱氨酸经 Xc^- System 转运进入胞内发生一系列反应生成 GSH，可进一步生成谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4，GPX4）。发生铁死亡的细胞中，Xc^- System-GSH-GPX4 通路通常不活跃。②Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1（keap1）-核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor E2-related factor 2，Nrf2）通路作为胞内抗氧化通路直接或间接地调控下游抗氧化因子[如血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1，HO-1)]表达，改善铁死亡[3]。③三磷酸鸟苷环化水解酶 1（GTP cyclohydrolase-1，GCH1)/四氢生物喋呤（tetrahydrobiopterin，BH4）/二氢叶酸还原酶（dihydrofolate reductase，DHFR)通路也可促进辅酶 Q（CoQ）的合成，抑制脂质过氧化物的积累，抵抗铁死亡；④铁死亡抑制蛋白 1（ferroptosis suppressor protein 1，FSP1）作为一种氧化还原酶，可以将 CoQ 还原为 CoQH2（一种捕获亲脂性自由基的抗氧化剂），可阻止脂质过氧化物的积累。⑤线粒体内也存在一套防御系统抵抗铁死亡，如线粒体铁蛋白（mitochondrial ferritin，FtMt）通过储存铁来降低铁含量；线粒体中的 GPX4

和二氢乳清酸脱氢酶（dihydroorotate dehydrogenase，DHODH）可清除产生的过氧化脂质；位于线粒体膜上的 CDGSH 铁硫结构域 1（CDGSH iron sulfur domain 1，CISD1）和电压依赖性阴离子通道（voltage-dependent anion channel，VDAC2/3）分别调控着线粒体内铁浓度和呼吸底物含量。除上述主要生理病理机制外，研究还发现一些参与了铁代谢的关键因子，如 p53 蛋白一方面可通过抑制二肽基肽酶 4（dipeptidyl peptidase 4，DPP4）抑制铁死亡，又可通过抑制溶质载体家族 7 成员 11（solute carrier family 7 member 11，SLC7A11）基因来促进铁死亡，在癌症治疗中颇具潜力；ROS 的积聚可引起内质网应激继而影响过氧化物酶体增殖物激活受体（Peroxisome proliferator activated receptor，PPAR）的活性，并通过炎症信号通路波及铁代谢。相关研究发现，在代谢性疾病和 MAFLD 中均涉及部分通路的损伤和失衡，从而表现出铁死亡。

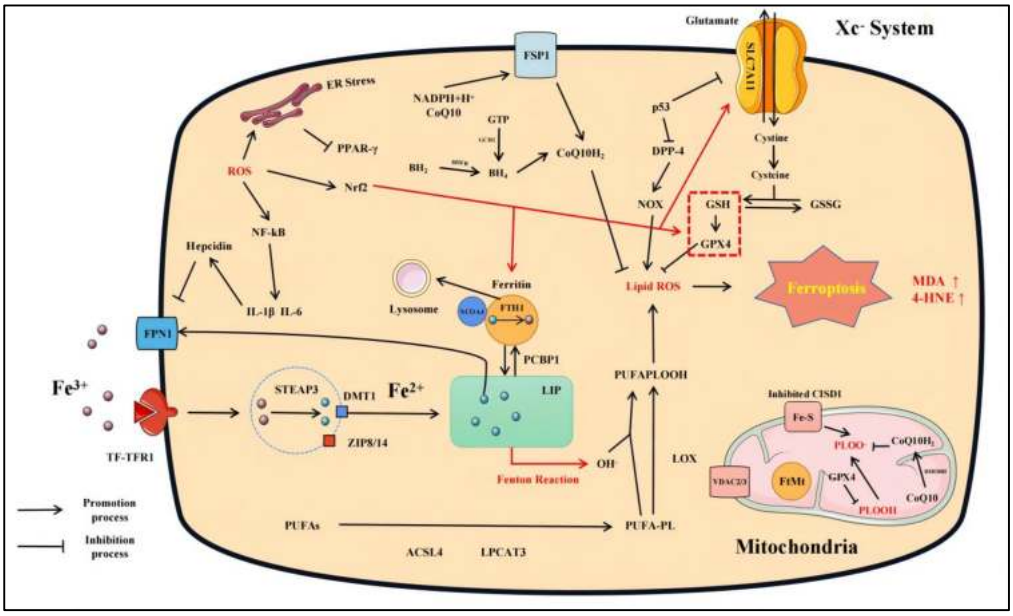


图 1 铁死亡相关通路及机制

Figure 1 Ferroptosis-related pathways and mechanisms

MAFLD 中的铁死亡

目前，许多临床研究显示 MAFLD 患者肠道铁吸收和体内铁代谢水平出现异常。Hoki T 等人进行的口服铁吸收试验表明，NASH 的患者表现为肠道铁吸收增加，这与铁调节蛋白调控的 DMT1 表达增加相关[4]。血清铁蛋白水平是反应体内铁储备和铁代谢功能的关键指标。一项横断面研究结果显示：血清铁蛋白与 MAFLD 的发病率存在正相关关系（β=23.07 (10.32，35.81)，p=0.0004）[5]。多项真实世界研究表明，MAFLD 患者的血清中会表现出铁蛋白增加的现象（患有 MAFLD：166.41±161.36；没有 MAFLD：131.90±142.36，p<0.0001）[6]，且高铁蛋白血症患者和高铁摄入饮食人群与正常人相比，MAFLD 的发病率显著增加（与最低铁摄入量组≤16.68mg/天相比，最高剂量组≥40.79mg/天的优势比为 2.11，95% CI: 1.60-2.80，p＜0.001），高铁蛋白血症的患者表现出更严重的脂代谢和糖代谢紊乱、更高的转氨酶水平（p < 0.05），在组织病理学方面，血清铁蛋白升高与脂肪变性加重和铁染色阳性比例升高有关（p < 0.05）[7]-[8]。一项利用开放全基因组关联研究数据库开展的双样本孟德尔随机化研究也证实了遗传预测的肝铁每标准差增加与 MAFLD 风险增加相关（比值比 1.193，95%CI: 1.074-1.326，p =0 .001），遗传预测的 MAFLD 与血清铁蛋白水平升高显著相关（数据集 1：β=0 .038，95%CI:0 .014-0.062，p = 0.002;数据集 2：β=0 .081，95%CI:0.025-0.136，p = 0.004）[9]。

既往基础研究同样探究了铁摄入量是否与 MAFLD 相关。一项研究比较了缺铁的高热量饮食与正常铁的高热量饮食喂养的 HFE 小鼠肝脂肪病变进展，结果显示缺铁小鼠的肝脏重量较低，铁转运蛋白和铁调控基因表达较少[10]。高铁饮食诱导的小鼠肝细胞中 4-羟基壬烯醛(4 hydroxyl nonenal，4-HNE)和丙二醛（malondialdehyde，

MDA）水平（两种铁死亡标志物）明显增加[11]。同时，另一项基础研究发现，在肝细胞特异性 Trf 敲除小鼠（Trf-LKO）模型中，喂食高铁饮食会增加铁死亡诱导的肝纤维化的发生率，使用铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 可有效逆转肝纤维化[12]。在 MAFLD 的整个进程中，从单纯的脂肪变性到 NASH[13]，及转变为为肝纤维化[14]，铁死亡可能参与了 MAFLD 的疾病发展。

代谢性疾病中的铁死亡

1 T2DM

T2DM 主要以胰岛素抵抗为特征，meta 分析结果显示：T2DM 患者中 MAFLD 的患病率为 55.5%（95% CI, 47.3-63.7）[15]。T2DM 患者可表现出肝脏的胰岛素抵抗，引起脂肪堆积，加速 MAFLD 的发展。最近的研究证明糖尿病可通过铁死亡对肝脏造成影响：一项研究观察了糖尿病雄性 C57BL/6 小鼠的肝脏病理学变化，发现与正常小鼠相比，糖尿病小鼠肝脏可出现纤维化症状，且促炎促氧化标志物水平增加，抗脂质过氧化活性减弱，铁死亡抑制剂 Fer-1 可有效逆转和延迟糖尿病小鼠肝脏不良结局，这主要表现在肝酶和甘油三酯水平的改善、肝脏 Nrf2、GPX4 等抗氧化系统的增强、白介素（interleukin，IL）-6、肿瘤坏死因子 α （tumor necrosis factor-α，TNF-α）等炎症信号的减弱[16]。

除 IR 外，胰岛 β 细胞功能缺陷和损伤也是 T2DM 的病理特征之一[17]，T2DM 可表现为胰腺（尤其是胰岛）过量的铁沉积[18]，并引起胰腺功能减退。体内铁代谢与 T2DM 发病相关。一项 meta 分析汇总了铁代谢与 T2DM 间的相关性，12 项病例对照研究和队列研究结果显示，血清铁蛋白升高与 T2DM 的患病高度相关（OR=1.43, 95% CI 1.29–1.59）。此外，地中海贫血[19]、血色素沉着症[20]伴随的铁过载也与胰岛 β 细胞损伤和 IR 呈现出相关性。铁作为铁硫（Fe-S）簇的重要成分，参与了胰岛 β 细胞内线粒体氧化及合成、加工、分泌胰岛素的过程[21]，因此胰岛 β 细胞需要摄取一定量的铁进行胞内代谢，当胞内铁代谢出现紊乱，会影响上述代谢过程[22]，诱发铁死亡。之前，研究者也用 STZ（一种诱导糖尿病诱导剂）和 Fer-1（铁死亡抑制剂）在雄性 C57BL / 6 小鼠中进行了对比试验，证实小鼠胰岛 β 细胞损失与铁死亡相关，此外，在高葡萄糖、促炎细胞因子，过氧化氢和 STZ 诱导 Rin-5F 细胞铁死亡的体外试验中，也发现了胞内 ROS 增加、Nrf2-GPX4 通路活性下降、线粒体膜电位降低的现象[23]。

2 超重/肥胖

肥胖是一种内分泌、营养、代谢性疾病，其特点是脂肪在体内过度堆积和储存。肥胖与代谢性疾病患病率增加相关，而 MAFLD 则代表了肥胖和代谢综合征在肝脏的综合表现。一项来自法国的研究表明，符合代谢综合征的肥胖个体，有 20%以上患有 NASH[24]。在肝脏和白色脂肪组织中表达的促炎性细胞因子是肥胖与 MAFLD 连接的重要分子信号通路。与肥胖并行的慢性低水平炎症导致促炎性细胞因子（如 IL-6 和 TNF-α [25]）增加，可能通过内分泌的方式直接参与肝脏病理学。此外，脂肪组织产生的许多脂肪因子已被证实能够影响 MAFLD 的发展，如：瘦素、脂联素和抵抗素等[26]。铁稳态和脂肪因子存在紧密关系：铁水平的高低可能影响多种脂肪因子的产生[27]。一项研究利用富铁饮食喂养的小鼠构建了一种铁过载的模型，在此类小鼠上观察到与胰岛素抵抗相关的脂肪因子水平上调，并导致脂肪细胞显著减小，还与内脏脂肪组织的增生肥大也有一定关系[28]。GPX4 是改善脂质过氧化水平的重要酶，对抑制铁死亡具有重要意义。最新研究发现，在脂肪组织 GPX4 特异性缺失的小鼠身上观察到了白色脂肪细胞增大以及全身炎症，表现为血清 TNF-α 水平升高。而在离体的 GPX4 活性受损的脂肪细胞中，同样观察到了氧特异性表位水平增加，如 4-HNE，以及自发性的炎症反应，表现为 TNFα、IL-1β、IL-6 的产生增加。这意味着 GPX4 参与抑制脂质过氧化，阻止脂肪组织炎症和低水平系统炎症[29]。在高脂饮食喂养的肥胖小鼠也身上观察到了 GPX4 表达显著下降[30]，而肥胖的 GPX4 缺陷小鼠出现了肝脏脂质过氧化，并且加剧了胰岛素抵抗和 MAFLD[31]。

3 其他代谢障碍

血脂异常与脂肪肝存在密切的相关性，可作为独立的预测因素[32]。日常高脂饮食会加重肝脏的代谢负担，造成肝脏脂肪堆积，调脂治疗和减脂饮食也被推荐为 MAFLD 的治疗管理措施，而 MAFLD 也可反向引起血脂异常，并与血管钙化呈现相关性[33]，显著增加心血管疾病风险[34]-[35]。血脂异常影响血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的功能，可引起动脉粥样硬化，动脉粥样硬化病变的血管内皮细胞中也被证明存在铁过载和铁死亡现象。

在最新的声明中，高血压也被作为MAFLD的一个风险因素，而高血压也是MAFLD的主要临床结局之一[36]，二者间具有很强的双向关联[37]。血管紧张素Ⅱ作为升高血压的关键因子，在最近的研究中被证明可诱导星型胶质细胞分泌炎症炎症因子、促进铁死亡，引起铁死亡标志物增加，参与了高血压小鼠心脏重塑、心肌肥大、缺血性再灌注损伤等多种病理过程[38],[39]。

MAFLD是一种涉及到多个系统的复杂性疾病，肥胖、T2DM、高血脂、脂肪肝病四者之间相互影响，提高共病可能性，又共同增加了罹患心血管疾病的风险（图2）。我们可以发现：铁死亡也直接影响到了胰岛β细胞、肝细胞、血管内皮细胞以及脂肪细胞的正常功能，而各系统的紊乱促进了糖脂代谢失调,进一步累及多个器官，促进了MAFLD的发生和进展。铁死亡似乎贯穿了代谢性疾病和MAFLD的致病过程。在代谢性疾病中，往往伴随着体内铁代谢的紊乱，目前已将这种特征命名为代谢异常铁过载综合征，多发生于超重、T2DM等患者中，并且可进展为MAFLD。

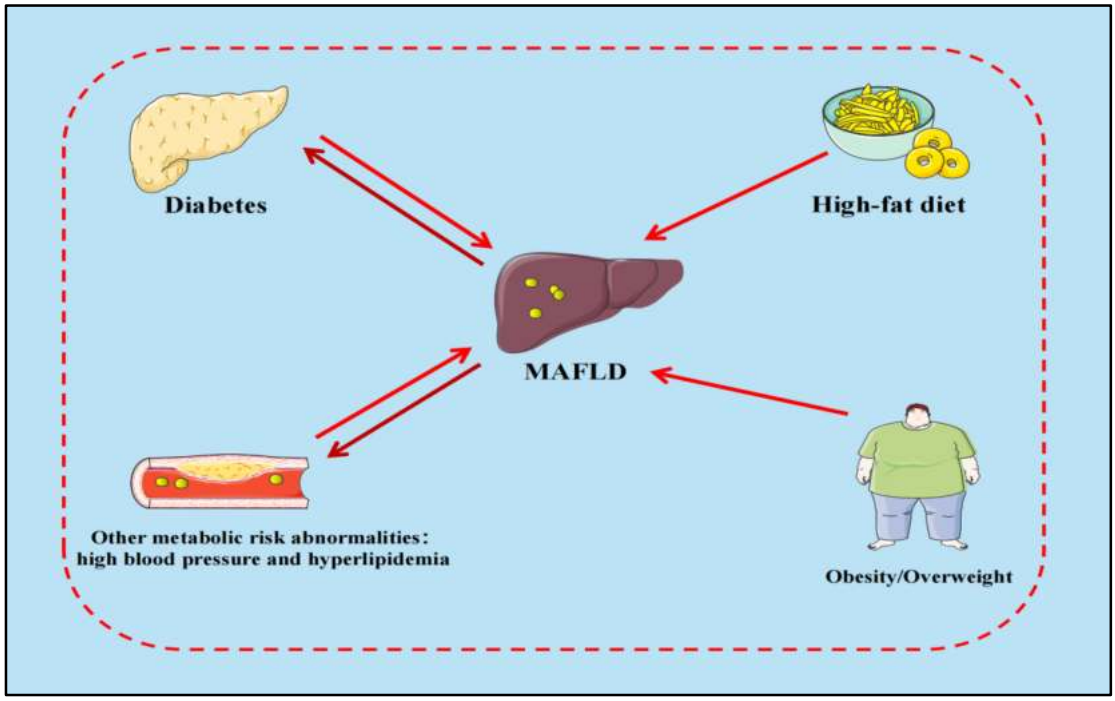


图2 MAFLD与代谢性疾病风险关联

Figure 2 Risk association between MAFLD and metabolic disease

MAFLD治疗药物与铁死亡

目前，相关研究主要通过以下三个途径抑制MAFLD相关的铁死亡：通过减少过量的铁摄入或调节铁代谢过程减少胞内铁过载、增强脂质过氧化防御系统并提高抗氧化因子的表达、调节参与脂质氧化过程关键酶的活性，减弱不饱和脂肪酸的脂化过程，主要作用靶点包括铁代谢过程中的关键蛋白、ACSL4、GPX4、Nrf2等。本文汇总了临床试验中对MAFLD表现出疗效的药物在肝病以及其他疾病中的抗铁死亡机制。旨在分析和探讨MAFLD治疗药物在不同靶点中的共性及潜在的治疗靶点（表1）。

目前指南推荐降糖药物（包括利拉鲁肽和吡格列酮）作为MAFLD的治疗药物，而二甲双胍、二肽基肽酶4抑制剂、钠-葡萄糖协同转运体抑制剂虽然在临床试验中表现出一定的疗效，但证据强度不足，尚不作为首选推荐药物[40,41]。噻唑烷二酮类已被认为是一种铁死亡的抑制剂[42,43]，主要是通过抑制ACSL4减少不饱和脂肪酸的脂化过程，Wei S等人[44]发现罗格列酮在肝细胞中可通过ACSL4改善砷诱导的铁死亡，而吡格列酮在神经元中通过增加PPAR-γ表达，下调环加氧酶（Cyclooxygenase，COX）2的表达[45]，与Nrf2协同作用也表现出抗铁死亡的活性[46]，此外，研究指出，吡格列酮还可通过稳定Fe-S簇减少CISD1抑制时线粒体内的铁死亡[47]。利拉鲁肽在一项研究中也被证明在改善铁代谢、提高GPX4活性等多个方面可延缓db/db小鼠的脂肪肝进展[48]，在神经

元细胞中也发现了利拉鲁肽的多种相似的抗铁死亡机制[49]。其他主要降糖药物尚无与肝脏铁死亡相关的研究，但其他基础研究表明，二甲双胍可上调 Nrf2 抑制血管内皮细胞的铁死亡，减轻高脂血症相关的血管钙化[50]、改善软骨细胞铁死亡减轻骨关节炎[51]，同时通过可以通过沉默调节蛋白（Sirtuin1，SIRT3）/ AMPK / 雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）途径，升高 GPX4 水平抵抗铁死亡，延缓多囊卵巢综合征小鼠发病进展[52]；维格列汀在神经元中可上调 GPX4 改善铁死亡[53]，可能发挥类似 p53 的对 DPP4 的抑制作用减轻脂质过氧化[54]。钠-葡萄糖协同转运体抑制剂在糖尿病肾病小鼠肾小管细胞[55]及心衰小鼠的心肌细胞[56]中也发挥了抗铁死亡的作用，可通过稳定 SLC40A1，减少 FPN1 的泛素化降解。

血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂和他汀类药物分别被相关指南推荐用于 MAFLD 患者高血压和高血脂的治疗，既往研究发现缬沙坦有改善脂肪肝小鼠肝脏血流情况、降低转氨酶水平的额外效应[57]，阿托伐他汀可通过缓解铁死亡改善异丙肾上腺素引起的心肌重塑，但相关研究证据较少，仍需进一步的验证[58]。

2023 年国际脂质专家组发布的针对 MAFLD 的营养食品疗法的意见书[59]中，提及了多种营养补剂（包括维生素 D、维生素 E、水飞蓟宾、绿茶提取物、姜黄素、不饱和脂肪酸、小檗碱、白藜芦醇等）在延缓 MAFLD 进展方面的有益临床数据。它们在基础研究中也被证明具有调控铁死亡的作用，且部分药物可能在糖尿病和脂肪肝中同时获益。此外，部分内源性靶点活性分子和生物类似物已进入临床Ⅱ-Ⅲ期试验，如成纤维细胞生长因子 21 类似物[60]、farnesoid X 受体激动剂奥贝胆酸[61]。相关研究发现成纤维细胞生长因子 21 和 farnesoid X 受体也参与了铁死亡的调控过程。

随着研究的不断深入，新兴的潜在靶点和受体也不断出现，PPAR、farnesoid X 受体等可能也是铁死亡的关键靶点[62,63]。此外，能量应激相关的 AMP 激活的蛋白激酶（amp-activated protein kinase，AMPK）也被发现有效应对铁死亡[64]，这些新靶点与以往通路的串扰和关联可能提供一个改善和逆转 MAFLD 中铁死亡的更加清晰的方向。

其他活性药物分子与铁死亡

在基础研究中，许多药物活性成分和内源性物质也表现出改善代谢性疾病和脂肪肝中铁死亡的活性，今后可能会成为关键的药物分子，作用于相关靶点，改善 MAFLD 的症状。而一些新发现的靶点也正不断为我们扩展基础研究的思路。因此，我们对有效的药物活性成分进行了归纳汇总（表 2）。

总结与展望

综上可以发现，代谢性疾病与脂肪肝互为风险因素，存在密切的联系，各种代谢性疾病和脂肪肝均表现出铁过载和铁死亡的特征，且铁死亡可能间接增加代谢性疾病和脂肪肝的相互关联，促进了 MAFLD 的的发生和发展。

而在药物治疗方面，很多临床研究表明降糖药是治疗 MAFLD 的关键药物，似乎在其他细胞中发挥了抗铁死亡的作用，也与前面介绍的关键靶点相关，具有抗铁死亡的潜力，加上固有的的降糖作用，可能是全面控制 MAFLD 发生和发展的理想选择。此外，临床研究中的营养补充剂和中药活性成分也可有效对抗铁死亡，可能具有不容小觑的治疗优势。MAFLD 作为一种涉及多个系统的疾病，若能发现像降糖药一样对代谢性疾病和 MAFLD 均有效的药物，不管是控制风险因素还是有针对性地治疗 MAFLD 都可能具有良好的治疗效果。

铁死亡作为一种新的细胞程序性死亡方式，逐渐引起全球医药研究人员的关注，越来越多的研究证实了铁死亡在 MAFLD 中发挥的关键影响，其研究证据值得在更多的动物模型及患者中进一步进行研究，我们相信未来会有更多的研究揭示铁死亡的调控机制，从而为靶向铁死亡防治 MAFLD 提供有力的依据。

表 1 临床试验中的 MAFLD 治疗药物的抑制铁死亡的机制

Table 1 Mechanism of MAFLD treatment drugs in clinical trials to inhibit ferroptosis

药物	其他疾病	肝脏疾病
	降糖药	
噻唑烷二酮类	神经元：PPAR-γ↑(与 Nrf2 协同作用)、COX2↓	肝细胞：ACSL4↓、稳定被抑制的 CISD1 中的 Fe-S 簇
利拉鲁肽	神经元：Mtft↑、TfR1↓FPN1↑FTH1↑、SLC7A11↑GPX4↑、ACSL4↓	肝细胞：TfR1↓、FPN1↑、SLC7A11↑、Nrf2/HO-1/GPX4↑、GSH ↑、超氧化物歧化酶↑
二肽基肽酶 4 抑制剂	神经元：GPX4 ↑	
	结直肠癌细胞：DPP4↓	
二甲双胍	软骨细胞：GPX4↑、ACSL4↓	
	血管内皮细胞：Nrf2↑、GPX4↑、ACSL4↓	
	小鼠卵巢：GPX4、SIRT3↑	
钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂	肾小管细胞：稳定 FPN1 中的 SLC40A1 减少泛素化降解	
	心肌细胞：TfR1、ACSL4、NADPH 氧化酶↓，GSH、FTH1 ↑	
	营养疗法	
水飞蓟宾[65]		肝细胞：NCOA4↓
维生素 E[66],[67],[68]	神经元：15-LOX↓、GPX4↑	肝细胞：15-LOX↓，与 GPX4 可协同作用
维生素 D[69],[70]	胰岛 β 细胞：核因子 kappa-B↓、DMT1↓	肝细胞：keap1-Nrf2-GPX4↑、抑制核因子 kappa-B 降低铁调素表达
二十二碳六烯酸[71],[72]	血管内皮细胞：SLC7A11↑	
	神经元：Nrf2↑	
虾青素[73],[74]	RAW264.7 细胞：Nrf2/HO-1↑	肝细胞：Nrf2/HO-1 ↑
白藜芦醇[75],[76]	胰岛 β 细胞：减少内质网应激、PPAR-γ↑	肝细胞:铁调素、Ferritin、DMT1, TfR↓、FPN1↑
小檗碱[77],[78]	胰岛 β 细胞：GPX4↑	
	心肌细胞：TfR、P53↓，Nrf2-HO-1、NQO1、FTH1、GPX4↑	
绿茶提取物[79],[80]	胰腺 β 细胞：GSH、GPX4↑	肝细胞：GSH、GPX4↑、ACSL4↓
姜黄素[79,81,82,83]	心肌细胞：Nrf2↑	肝细胞：Nrf2、HO-1、GPX4↑
	肺上皮细胞：SLC7A11、FTH1、GPX4↑、TfR1↓	
	胰腺 β 细胞：GSH、GPX4↑	
	临床试验中其他有效地药物	
双环醇[84]		肝细胞：Nrf2/GPX4↑
成纤维细胞生长因子 21[85]		肝细胞：Nrf2/HO-1↑
奥贝胆酸[86]	小鼠子宫：GPX4、SLC7A11↑	

注：↑表示靶点激活、表达增加、通路上调；↓表示靶点抑制、表达减少、通路下调

表 2 改善 MAFLD 中铁死亡的其他活性物质/药物

Table 2 Other active substances/drugs to improve ferroptosis in MAFLD

活性物质/活性药物	细胞/模型	靶点和效应	来源
对胰岛 β 细胞和肝细胞均有作用			
铁螯合剂（Deferiprone、Deferoxamine）		螯合铁并抑制脂质过氧化	Chen J[87]
Ferrostatin-1 、Liproxstatin-1		通过调节铁代谢降低肝脏铁水平	Jiang H[88] Li D[89]
槲皮素	Pancreatic beta cells of C57BL/6J mice with diabetes	MDA↓GSH、VDAC2↑	Li D[89]
	steatotic L-02 cells、C57BL/6J mice	COX2、ACSL4↓、GPX4↑、线粒体 ROS↓	Jiang JJ[90]
在肝细胞中表现出抗铁死亡活性			
银杏内酯 B	ApoE-/- mice、HepG2 cells	Nrf2↑	Yang Y[91]
脱氢枞酸	Fatty liver mice	Nrf2↑	Gao G[92]
益母草碱	Wistar rats	核因子 kappa-B↓、Nrf2↑	Salama SA[93]
胸腺素 β4	L-02 cells	GPX4↑	Zhu Z[94]
富马酸二甲酯	C57BL/6 mice、HepG2 cells/L-02 cells	Nrf2↑	Zhang Y[95]
褐藻糖胶	Sprague-Dawley rats	DMT1, FPN1↓、p62, Nrf2, SLC7A11, GPX4↑	Xue M[96]
甘草酸苷	L-02 cells	Nrf2↑, HO-1↑, GPX4↑	Wang Y[97]
甜菜碱	C57BL/6 mice	稳定 ZIP14、FPN1	Li Y[98]
D-半胱氨酸	Hepa 1-6 cells	维持 GSH 水平	Homma T[99]
芹菜素	AML12 cells	GPX4↑、减少铁摄入	Han D[100]
乌司他丁	L-02 cells、C57BL/6 mice	Nrf2-HO-1 通路↑	Wang C[101]
VBIT-12	C57BL/6J mice	抑制线粒体 VDAC1 寡聚化	Niu B[102]
牛磺酸	Male Kunming mice	减轻线粒体损伤、GSH↑、GPX4↑	Zhang Z[103]
五味子素 B	SD rats	Nrf2, GPX4, ↑、NADPH 氧化酶↓	Shi H[104]
姜烯酮 A	HepG2 cells	Nrf2-GPX4 通路↑	Chen Y[105]
齐墩果酸	C57BL/6 male mice	GPX4, SLC7A11↑	Ouyang C[106]

注：↑表示靶点激活、表达增加、通路上调；↓表示靶点抑制、表达减少、通路下调

参考文献

[1] Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. J Hepatol. 2020;73(1):202-209.

[2] Badmus OO, Hillhouse SA, Anderson CD, et al. Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): functional analysis of lipid metabolism pathways. Clin Sci (Lond). 2022 Sep 30;136(18):1347-1366.

[3] Song X, Long D. Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. Front Neurosci. 2020 Apr 21;14:267.

[4] Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, et al. Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal

transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2015;62(3):751-761.

[5] Yang N, Lu Y, Cao L, et al. The association between non-alcoholic fatty liver disease and serum ferritin levels in American adults. J Clin Lab Anal. 2022;36(2):e24225.

[6] Wang JW, Jin CH, Ke JF, et al. Serum iron is closely associated with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in type 2 diabetes: A real-world study. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Sep 5;13:942412.

[7] Yang Z, Wu J, Li X, et al. Association between dietary iron intake and the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease: A cross-sectional study. Medicine (Baltimore). 2019;98(43):e17613.

[8] Wang Q, Zhu M, Li H, et al. Hyperferritinemia Correlates to Metabolic Dysregulation and Steatosis in Chinese Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. Diabetes Metab Syndr Obes. 2022;15:1543-1552.

[9] He H, Liao S, Zeng Y, et al. Causal relationships between metabolic-associated fatty liver disease and iron status: two-sample Mendelian randomization. Liver Int. 2022 Oct 13.

[10] Crawford DHG, Ross DGF, Jaskowski LA,et al. Iron depletion attenuates steatosis in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease: Role of iron-dependent pathways. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2021 Jul 1;1867(7):166142.

[11] Long EK, Olson DM, Bernlohr DA. High-fat diet induces changes in adipose tissue trans-4-oxo-2-nonenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal levels in a depot-specific manner. Free Radic Biol Med. 2013;63:390-398.

[12] Yu Y, Jiang L, Wang H, et al. Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis. Blood. 2020;136(6):726-739.

[13] Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, et al. Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. Cell Death Dis. 2019;10(6):449.

[14] Pan Q, Luo Y, Xia Q, et al. Ferroptosis and Liver Fibrosis. Int J Med Sci. 2021;18(15):3361-3366.

[15] Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. J Hepatol. 2019;71(4):793-801.

[16] Stancic A, Velickovic K, Markelic M, et al. Involvement of Ferroptosis in Diabetes-Induced Liver Pathology. Int J Mol Sci. 2022;23(16):9309.

[17] Gao Z, Yan W, Fang Z, et al. Annual decline in β-cell function in patients with type 2 diabetes in China. Diabetes Metab Res Rev. 2021;37(2):e3364.

[18] Coffey R, Knutson MD. The plasma membrane metal-ion transporter ZIP14 contributes to nontransferrin-bound iron uptake by human β-cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2017 Feb 1;312(2):C169-C175.

[19] Noetzli LJ, Mittelman SD, Watanabe RM, et al. Pancreatic iron and glucose dysregulation in thalassemia major. Am J Hematol. 2012;87(2):155-160.

[20] Pelusi C, Gasparini DI, Bianchi N, et al. Endocrine dysfunction in hereditary hemochromatosis. J Endocrinol Invest. 2016;39(8):837-847.

[21] Marku A, Galli A, Marciani P, et al. Iron Metabolism in Pancreatic Beta-Cell Function and Dysfunction. Cells. 2021;10(11):2841.

[22] Bruni A, Pepper AR, Pawlick RL, et al. Ferroptosis-inducing agents compromise in vitro human islet viability and function. Cell Death Dis. 2018;9(6):595.

[23] Stancic A, Saksida T, Markelic M, et al. Ferroptosis as a Novel Determinant of β-Cell Death in Diabetic Conditions. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:3873420.

[24] Frey S, Patouraux S, Debs T, et al. Prevalence of NASH/NAFLD in people with obesity who are currently classified as metabolically healthy. Surg Obes Relat Dis. 2020 Dec;16(12):2050-2057.

[25] Jorge ASB, Andrade JMO, Paraíso AF, et al. Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF-alpha are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III

obesity. Obes Res Clin Pract. 2018 Jan-Feb;12(Suppl 2):1-8

[26] Britton LJ, Subramaniam VN, Crawford DH. Iron and non-alcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2016 Sep 28;22(36):8112-22.

[27] FERNÁNDEZ-REAL J M, MCCLAIN D, MANCO M. Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes[J/OL]. Diabetes Care, 2015, 38(11): 2169-2176.

[28] DONGIOVANNI P, RUSCICA M, RAMETTA R, et al. Dietary Iron Overload Induces Visceral Adipose Tissue Insulin Resistance[J/OL]. The American Journal of Pathology, 2013, 182(6): 2254-2263.

[29] Schwärzler J, Mayr L, Radlinger B, et al. Adipocyte GPX4 protects against inflammation, hepatic insulin resistance and metabolic dysregulation. Int J Obes (Lond). 2022 May;46(5):951-959.

[30] Kobayashi H, Matsuda M, Fukuhara A, et al. Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jun;296(6):E1326-34.

[31] Katunga LA, Gudimella P, Efird JT, et al. Obesity in a model of gpx4 haploinsufficiency uncovers a causal role for lipid-derived aldehydes in human metabolic disease and cardiomyopathy. Mol Metab. 2015 Apr 21;4(6):493-506.

[32] Zou Y, Zhong L, Hu C, et al. LDL/HDL cholesterol ratio is associated with new-onset NAFLD in Chinese non-obese people with normal lipids: a 5-year longitudinal cohort study. Lipids Health Dis. 2021;20(1):28.

[33] Zhu RR, Gao XP, Liao MQ, et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With Aortic Calcification: A Cohort Study With Propensity Score Matching. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:880683.

[34] Park J, Kim G, Kim BS, et al. The associations of hepatic steatosis and fibrosis using fatty liver index and BARD score with cardiovascular outcomes and mortality in patients with new-onset type 2 diabetes: a nationwide cohort study. Cardiovasc Diabetol. 2022 Apr 16;21(1):53.

[35] Bril F, Sninsky JJ, Baca AM, et al. Hepatic Steatosis and Insulin Resistance, But Not Steatohepatitis, Promote Atherogenic Dyslipidemia in NAFLD. J Clin Endocrinol Metab. 2016 Feb;101(2):644-52.

[36] Tang X, Shi Y, Du J, et al. Clinical outcome of non-alcoholic fatty liver disease: an 11-year follow-up study. BMJ Open. 2022;12(6):e054891.

[37] Li G, Peng Y, Chen Z, et al. Bidirectional Association between Hypertension and NAFLD: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Int J Endocrinol. 2022;2022:8463640. Published 2022 Mar 24.

[38] Zhang X, Zheng C, Gao Z, et al. SLC7A11/xCT Prevents Cardiac Hypertrophy by Inhibiting Ferroptosis. Cardiovasc Drugs Ther. 2022;36(3):437-447.

[39] Zhang Z, Tang J, Song J, et al. Elabela alleviates ferroptosis, myocardial remodeling, fibrosis and heart dysfunction in hypertensive mice by modulating the IL-6/STAT3/GPX4 signaling. Free Radic Biol Med. 2022;181:130-142.

[40] Tokushige K, Ikejima K, Ono M, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. J Gastroenterol. 2021;56(11):951-963.

[41] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology. 2018;67(1):328-357.

[42] Kung YA, Chiang HJ, Li ML, et al. Acyl-Coenzyme A Synthetase Long-Chain Family Member 4 Is Involved in Viral Replication Organelle Formation and Facilitates Virus Replication via Ferroptosis [published online ahead of print, 2022 Jan 18]. mBio. 2022;13(1):e0271721.

[43] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. Nat Chem Biol. 2017 Jan;13(1):91-98.

[44] Wei S, Qiu T, Wang N, et al. Ferroptosis mediated by the interaction between Mfn2 and IREα promotes arsenic-induced nonalcoholic steatohepatitis. Environ Res. 2020;188:109824.

[45] Liang H, Tang T, Huang H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ ameliorates neuronal ferroptosis after traumatic brain injury in mice by inhibiting cyclooxygenase-2. Exp Neurol. 2022;354:114100.

[46] Duan C, Jiao D, Wang H, et al. Activation of the PPARγ Prevents Ferroptosis-Induced Neuronal Loss in Response to Intracerebral Hemorrhage Through Synergistic Actions With the Nrf2. Front Pharmacol. 2022;13:869300.

[47] Yuan H, Li X, Zhang X, et al. CISD1 inhibits ferroptosis by protection against mitochondrial lipid peroxidation. Biochem Biophys Res Commun. 2016;478(2):838-844.

[48] Song JX, An JR, Chen Q, et al. Liraglutide attenuates hepatic iron levels and ferroptosis in db/db mice. Bioengineered. 2022;13(4):8334-8348.

[49] An JR, Su JN, Sun GY, et al. Liraglutide Alleviates Cognitive Deficit in db/db Mice: Involvement in Oxidative Stress, Iron Overload, and Ferroptosis. Neurochem Res. 2022;47(2):279-294.

[50] Ma WQ, Sun XJ, Zhu Y, et al. Metformin attenuates hyperlipidaemia-associated vascular calcification through anti-ferroptotic effects. Free Radic Biol Med. 2021;165:229-242.

[51] Yan J, Feng G, Ma L, et al. Metformin alleviates osteoarthritis in mice by inhibiting chondrocyte ferroptosis and improving subchondral osteosclerosis and angiogenesis. J Orthop Surg Res. 2022;17(1):333.

[52] Peng Q, Chen X, Liang X, et al. Metformin improves polycystic ovary syndrome in mice by inhibiting ovarian ferroptosis. Front Endocrinol (Lausanne). 2023;14:1070264.

[53] Zhang Y, Zhang X, Wee Yong V, et al. Vildagliptin improves neurological function by inhibiting apoptosis and ferroptosis following intracerebral hemorrhage in mice. Neurosci Lett. 2022;776:136579.

[54] Xie Y, Zhu S, Song X, et al. The Tumor Suppressor p53 Limits Ferroptosis by Blocking DPP4 Activity. Cell Rep. 2017;20(7):1692-1704.

[55] Huang B, Wen W, Ye S. Dapagliflozin Ameliorates Renal Tubular Ferroptosis in Diabetes via SLC40A1 Stabilization. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:9735555.

[56] Ma S, He LL, Zhang GR, et al. Canagliflozin mitigates ferroptosis and ameliorates heart failure in rats with preserved ejection fraction. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2022;395(8):945-962.

[57] van der Graaff D, Chotkoe S, De Winter B, et al. Vasoconstrictor antagonism improves functional and structural vascular alterations and liver damage in rats with early NAFLD. JHEP Rep. 2021 Nov 25;4(2):100412.

[58] Ning D, Yang X, Wang T, Jiang Q, Yu J, Wang D. Atorvastatin treatment ameliorates cardiac function and remodeling induced by isoproterenol attack through mitigation of ferroptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2021;574:39-47.

[59] Rizzo M, Colletti A, Penson PE, et al. Nutraceutical approaches to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A position paper from the International Lipid Expert Panel (ILEP). Pharmacol Res. 2023;189:106679.

[60] Luo Y, Decato BE, Charles ED, et al. Pegbelfermin selectively reduces secondary bile acid concentrations in patients with non-alcoholic steatohepatitis. JHEP Rep. 2021;4(1):100392. Published 2021 Nov 12.

[61] Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial [published correction appears in Lancet. 2019;394(10215):2184-2196.

[62] Xing G, Meng L, Cao S, et al. PPARα alleviates iron overload-induced ferroptosis in mouse liver. EMBO Rep. 2022;23(8):e52280.

[63] Shu YY, Gao WK, Chu HK, et al. Attenuation by Time-Restricted Feeding of High-Fat and High-Fructose Diet-Induced NASH in Mice Is Related to Per2 and Ferroptosis. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:8063897.

[64] Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. Nat Cell Biol. 2020;22(2):225-234.

[65] Song XY, Liu PC, Liu WW, et al. Silibinin inhibits ethanol- or acetaldehyde-induced ferroptosis in liver cell lines. Toxicol In Vitro. 2022;82:105388.

[66] Zhang X, Wu S, Guo C, et al. Vitamin E Exerts Neuroprotective Effects in Pentylenetetrazole Kindling Epilepsy via Suppression of Ferroptosis. Neurochem Res. 2022;47(3):739-747.

[67] Tavakol S, Seifalian AM. Vitamin E at a high dose as an anti-ferroptosis drug and not just a supplement for COVID-19 treatment. Biotechnol Appl Biochem. 2022;69(3):1058-1060.

[68] Carlson BA, Tobe R, Yefremova E, et al. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. Redox Biol. 2016;9:22-31.

[69] Mei G, Zhou F, et al. Vitamin D decreases pancreatic iron overload in type 2 diabetes through the NF-κB-DMT1 pathway. J Nutr Biochem. 2022;99:108870.

[70] Cheng K, Huang Y, Wang C. 1,25(OH)2D3 Inhibited Ferroptosis in Zebrafish Liver Cells (ZFL) by Regulating Keap1-Nrf2-GPX4 and NF-κB-hepcidin Axis. Int J Mol Sci. 2021;22(21):11334.

[71] Shi P, Song C, Qi H, et al. Up-regulation of IRF3 is required for docosahexaenoic acid suppressing ferroptosis of cardiac microvascular endothelial cells in cardiac hypertrophy rat. J Nutr Biochem. 2022;104:108972.

[72] Wang X, Xiao A, Yang Y, et al. DHA and EPA Prevent Seizure and Depression-Like Behavior by Inhibiting Ferroptosis and Neuroinflammation via Different Mode-of-Actions in a Pentylenetetrazole-Induced Kindling Model in Mice. Mol Nutr Food Res. 2022;66(22):e2200275.

[73] Luo L, Huang F, Zhong S, Ding R, Su J, Li X. Astaxanthin attenuates ferroptosis via Keap1-Nrf2/HO-1 signaling pathways in LPS-induced acute lung injury. Life Sci. 2022;311(Pt A):121091.

[74] Cai X, Hua S, Deng J, et al. Astaxanthin Activated the Nrf2/HO-1 Pathway to Enhance Autophagy and Inhibit Ferroptosis, Ameliorating Acetaminophen-Induced Liver Injury [published online ahead of print, 2022 Sep 12]. ACS Appl Mater Interfaces. 2022;10.1021/acsami.2c10506.

[75] Zhang X, Jiang L, Chen H, et al. Resveratrol protected acrolein-induced ferroptosis and insulin secretion dysfunction via ER-stress- related PERK pathway in MIN6 cells. Toxicology. 2022;465:153048.

[76] Wang H, Jiang C, Yang Y, et al. Resveratrol ameliorates iron overload induced liver fibrosis in mice by regulating iron homeostasis. PeerJ. 2022;10:e13592. Published 2022 Jun 8.

[77] Bao L, Jin Y, Han J, Wang W, Qian L, Wu W. Berberine Regulates GPX4 to Inhibit Ferroptosis of Islet β Cells. Planta Med. 2023;89(3):254-261.

[78] Song C, Li D, Zhang J, Zhao X. Berberine hydrochloride alleviates imatinib mesylate - induced cardiotoxicity through the inhibition of Nrf2-dependent ferroptosis. Food Funct. 2023;14(2):1087-1098.

[79] Kose T, Vera-Aviles M, Sharp PA, et al. Curcumin and (-)- Epigallocatechin-3-Gallate Protect Murine MIN6 Pancreatic Beta-Cells Against Iron Toxicity and Erastin-Induced Ferroptosis. Pharmaceuticals (Basel). 2019;12(1):26.

[80] Ding SB, Chu XL, Jin YX, Jiang JJ, Zhao X, Yu M. Epigallocatechin gallate alleviates high-fat diet-induced hepatic lipotoxicity by targeting mitochondrial ROS-mediated ferroptosis. Front Pharmacol. 2023;14:1148814.

[81] Wei Z, Shaohuan Q, Pinfang K, Chao S. Curcumin Attenuates Ferroptosis-Induced Myocardial Injury in Diabetic Cardiomyopathy through the Nrf2 Pathway. Cardiovasc Ther. 2022;2022:3159717. Published 2022 Jul 15.

[82] Tang X, Li Z, Yu Z, et al. Effect of curcumin on lung epithelial injury and ferroptosis induced by cigarette smoke. Hum Exp Toxicol. 2021;40(12_suppl):S753-S762.

[83] Sun X, Zhang X, Yan H, et al. Protective effect of curcumin on hepatolenticular degeneration through copper excretion and inhibition of ferroptosis. Phytomedicine. 2023;113:154539.

[84] Geng Q, Zhang P, Liu X, et al. Effect of berberine and bicyclol on Chinese patients with nonalcoholic fatty liver disease: a retrospective study. Postgrad Med. 2022;134(5):507-515.

[85] Wu A, Feng B, Yu J, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates iron overload-induced liver injury and fibrosis by inhibiting ferroptosis. Redox Biol. 2021;46:102131.

[86] Cao L, Qin R, Liu J. Farnesoid X receptor protects against lipopolysaccharide-induced endometritis by inhibiting ferroptosis and inflammatory response. Int Immunopharmacol. 2023;118:110080.

[87] Chen J, Li X, Ge C, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease. Cell Death Differ. 2022;29(3):467-480.

[88] Jiang H, Zhang X, Yang W, et al. Ferrostatin-1 Ameliorates Liver Dysfunction via Reducing Iron in Thioacetamide-induced Acute Liver Injury in Mice. Front Pharmacol. 2022;13:869794. Published 2022 Apr 12.

[89] Li D, Jiang C, Mei G, et al. Quercetin Alleviates Ferroptosis of Pancreatic β Cells in Type 2 Diabetes. Nutrients. 2020;12(10):2954. Published 2020 Sep 27.

[90] Jiang JJ, Zhang GF, Zheng JY, et al. Targeting Mitochondrial ROS-Mediated Ferroptosis by Quercetin Alleviates High-Fat Diet-Induced Hepatic Lipotoxicity. Front Pharmacol. 2022;13:876550. Published 2022 Apr 12.

[91] Yang Y, Chen J, Gao Q, et al. Study on the attenuated effect of Ginkgolide B on ferroptosis in high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease. Toxicology. 2020;445:152599.

[92] Gao G, Xie Z, Li EW, et al. Dehydroabietic acid improves nonalcoholic fatty liver disease through activating the Keap1/Nrf2-ARE signaling pathway to reduce ferroptosis. J Nat Med. 2021;75(3):540-552.

[93] Salama SA, Abdel-Bakky MS, Mohamed AA. Upregulation of Nrf2 signaling and suppression of ferroptosis and NF- κ B pathway by leonurine attenuate iron overload-induced hepatotoxicity. Chem Biol Interact. 2022;356:109875.

[94] Zhu Z, Zhang Y, Huang X, et al. Thymosin beta 4 alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting ferroptosis via up-regulation of GPX4. Eur J Pharmacol. 2021;908:174351.

[95] Zhang Y, Zhao S, Fu Y, et al. Computational repositioning of dimethyl fumarate for treating alcoholic liver disease. Cell Death Dis. 2020;11(8):641. Published 2020 Aug 18.

[96] Xue M, Tian Y, Sui Y, et al. Protective effect of fucoidan against iron overload and ferroptosis-induced liver injury in rats exposed to alcohol. Biomed Pharmacother. 2022;153:113402.

[97] Wang Y, Chen Q, Shi C, et al. Mechanism of glycyrrhizin on ferroptosis during acute liver failure by inhibiting oxidative stress. Mol Med Rep. 2019;20(5):4081-4090.

[98] Li Y, Jiang W, Feng Y, et al. Betaine Alleviates High-Fat Diet-Induced Disruptionof Hepatic Lipid and Iron Homeostasis in Mice. Int J Mol Sci. 2022;23(11):6263.

[99] Homma T, Osaki T, Kobayashi S, et al. d-Cysteine supplementation partially protects against ferroptosis induced by xCT dysfunction via increasing the availability of glutathione. J Clin Biochem Nutr. 2022;71(1):48-54.

[100] Han D, Yao Y, Chen L, et al. Apigenin ameliorates di(2-ethylhexyl) phthalate-induced ferroptosis: The activation of glutathione peroxidase 4 and suppression of iron intake. Food Chem Toxicol. 2022;164:113089.

[101] Wang C, Liu T, Tong Y, et al. Ulinastatin protects against acetaminophen-induced liver injury by alleviating ferroptosis via the SIRT1/NRF2/HO-1 pathway. Am J Transl Res. 2021;13(6):6031-6042.

[102] Niu B, Lei X, Xu Q, et al. Protecting mitochondria via inhibiting VDAC1 oligomerization alleviates ferroptosis in acetaminophen-induced acute liver injury. Cell Biol Toxicol. 2022;38(3):505-530.

[103] Zhang Z, Liu D, Yi B, et al. Taurine supplementation reduces oxidative stress and protects the liver in an iron-overload murine model. Mo. 2014;10(5):22l Med Rep55-2262.

[104] Shi H, Yan Y, Yang H, et al. Schisandrin B Diet Inhibits Oxidative Stress to Reduce Ferroptosis and Lipid Peroxidation to Prevent Pirarubicin-Induced Hepatotoxicity. Biomed Res Int. 2022;2022:5623555.

[105] Chen Y, Zhu S, Chen Z, et al. Gingerenone A Alleviates Ferroptosis in Secondary Liver Injury in Colitis Mice via Activating Nrf2-Gpx4 Signaling Pathway. J Agric Food Chem. 2022 Oct 5;70(39):12525-12534.

[106] Ouyang C, Ma X, Zhao J, et al. Oleanolic acid inhibits mercury chloride induced-liver ferroptosis by regulating ROS/iron overload [published online ahead of print, 2023 May 8]. Ecotoxicol Environ Saf. 2023;258:114973.

新型双重内皮素受体拮抗剂：Aprocitentan

朱宝强[1,2]，卫愿奎[1]，张明名[2]，杨诗语[2]，叶云[3]，龙恩武[1,2*]

（1.西南医科大学药学院，四川 泸州 646000；2.四川省医学科学院·四川省人民医院/电子科技大学附属医院药学部，个体化药物治疗四川省重点实验室，四川 成都 610072；3.西南医科大学附属医院药学部，四川 泸州 646000）

【摘要】Aprocitentan 是一款作用于双重内皮素受体拮抗剂，基于 3 期临床试验的有效证据，该药已于 2022 年 12 月 20 日向美国食品药品监督管理局提交了新药申请，用于治疗难治性高血压。目前，多项临床研究证实了 Aprocitentan 降压作用优良，患者耐受性良好。本文综述了 Aprocitentan 的药理作用、临床前及临床研究，旨在为今后以内皮素受体为靶点的降压药物研究提供借鉴和参考。

【关键词】内皮素受体；拮抗剂；难治性高血压；Aprocitentan

Novel dual endothelin-receptor antagonist: Aprocitentan

ZHU Bao-qiang[1,2], WEI Yuan-kui[1], ZHANG Ming-ming[2], YANG Shi-yu[2], YE Yun[3], LONG En-wu[1,2*]

(1. School of Pharmacy of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China 2. Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Pharmacy of Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan, 610072, China 3. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

【ABSTRACT】Aprocitentan is a dual endothelin receptor antagonist. Based on the effective evidence of the phase III clinical trial, the drug has submitted a new drug application to the Food and Drug Administration on December 20, 2022 for the treatment of refractory hypertension. At present, multiple clinical studies have confirmed that Aprocitentan has excellent antihypertensive effects and good patient tolerance. This article reviews the pharmacological effects, preclinical, and clinical studies of Aprocitentan, with the aim of providing reference and guidance for future research on antihypertensive drugs targeting the endothelin receptor.

【KEY WORDS】endothelin receptor; antagonist; treatment-resistant hypertension; Aprocitantan

难治性高血压（treatment-resistant hypertension，TRH）是指使用了至少 3 种不同药理学类别的抗高血压药物，包括长效钙通道阻滞剂，肾素-血管紧张素系统的阻断剂（血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素受体阻断剂）以及最大耐受剂量和适当给药频率的利尿剂，血压仍不受控制（130/80mmHg），或服用≥4 种降压药物血压才能得到有效控制的高血压状态[1]。我国尚未有 TRH 的全面统计结果，但据美国流行病学数据，高血压患者中 TRH 的比例约为 12%-15%[2]，仍然是占比可观，亟待解决的疾病问题。Aprocitentan 为强生集团和 Idorsia 公司联合研发的一款作用于双重内皮素受体拮抗剂，基于 3 期临床试验的有效证据，该药已于 2022 年 12 月 20 日向美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）递交新药申请，批准用于 TRH 患者的治疗。本文对 Aprocitentan 的药理作用、临床前及临床研究进行总结和归纳，旨在为今后以内皮素受体为靶点的降压药物研究提供借鉴和参考。

[第一作者] 朱宝强，药师，硕士在读，研究方向：慢病个体化治疗、真实世界研究，E-mail：1395462567@qq.com

[责任作者] 龙恩武，主任药师，博士，研究方向：慢病个体化治疗、真实世界研究、医疗大数据挖掘，E-mail：dragon984169@126.com

药理作用

内皮素（endothelin，ET）是一种由内皮细胞自分泌或旁分泌的血管活性肽，以 ET-1 亚型活性最强，具有调节血管张力、细胞增殖、纤维化、炎症因子、儿茶酚胺和醛固酮的分泌等功能[3]，人体内的内皮素受体主要分为 a 型和 b 型两种受体，血管平滑肌细胞同时表达 ETa 受体和 ETb 受体，而内皮细胞仅表达 ETb 受体，ET-1 可通过激活平滑肌细胞上的两种受体引起血管收缩，也可通过激活内皮细胞上的 ETb 受体，进一步引起一氧化氮介导的血管舒张[4]。越来越多的研究发现，ET-1 的生理作用与高血压的病理生理学存在许多相似之处，如内皮功能障碍、血管张力增加、炎症、纤维化、组织重塑和终末器官损伤等，而对 ET 受体的阻断也被证明可有效降低血压，已成为高血压的新兴研究靶点。同时，TRH 患者通常具有较低的血浆肾素活性，较高的醛固酮和脑利钠肽水平以及盐敏感性[5]，且与 TRH 本身及与 TRH 密切相关的风险因素也存在 ET-1 升高的表现[6]，使得二者的联系日益凸显。

目前临床已研发出波生坦、马昔腾坦等 ET 受体拮抗剂，但仅批准用于肺动脉高压的治疗，虽然之前相关的临床试验已证实其降压潜力，但由于此类药物存在不同程度的不良反应，如波生坦引起头痛、潮红、腿部水肿、血清转氨酶水平无症状升高等不良事件[7]，马昔腾坦引起鼻咽炎、头痛和贫血等反应[8]，严重阻碍了其在高血压中的应用。

Aprocitentan（ACT-132577）结构式为(N-[5-(4-溴苯基)-6-[2-[(5-溴-2-嘧啶基)氧基]乙氧基]-4-嘧啶基]-氨基磺酰胺)，为马昔腾坦的活性代谢产物，通过体外试验测得其与 ETa、ETb 的抑制率比为 1:16[9]，可与血浆蛋白高度结合，并通过尿液和粪便排泄[10]。与马西替坦类似，但与波生坦不同，该药不会干扰胆盐稳态，无肝毒性。

临床前研究

Trensz F 等人完成了一项在低肾素模型（醋酸脱氧皮质酮盐性高血压大鼠）和正常肾素模型（自发性高血压大鼠）进行的针对 Aprocitentan 降压作用的动物实验[11]。此研究发现，盐敏感状态的高血压大鼠体内 ET-1 表达程度增强，而 Aprochitan 与缬沙坦和依那普利可协同降低两组大鼠的血压，且针对低肾素特征的血压更加明显，此外，在接受依那普利治疗的低肾素模型大鼠中，与螺内酯相比，联合 Aprochitan 可进一步降低血压，且不会引起肾损伤。该研究在一定角度上证实了盐敏感性高血压与 ET-1 的关联性，并初步肯定了 Aprochitan 的药理活性，为其在临床的探索开辟方向。

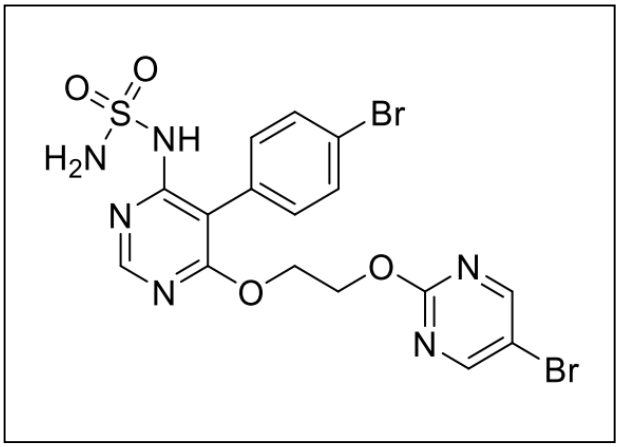


图 1 Aprocitentan 结构式

Fig 1 Structural formula of Aprocitentan

临床研究

1 期临床试验

Sidharta PN 等人评估了 Aprocitentan 在健康成人（18-45 岁）和老年人（65-80 岁）中单剂量和多剂量情况下的耐受性、安全性、药代动力学（pharmacokinetics，PK）和药效学（pharmacodynamics，PD）[12]。试验共分为三组：A 组对 6 名健康成人进行单剂量 5mg 的开放标签试验；B 组对 32 名健康成人行单剂量 25、100、300 和 600 mg Aprocitentan 或安慰剂的随机双盲对照试验（每组中 6 名使用药物，2 名使用安慰剂）；C 组对 34 名

受试者行单日 5、25 和 100mg Aprocitentan 或安慰剂，连续 10 天的随机双盲对照试验（100mg 剂量组为 8 名老年受试者，其余剂量组为健康成人，各组均为 2 名使用安慰剂，其余使用药物），所有组内男女比为 1:1。PK 结果显示，达峰时间（T_{max}）为 3~9 小时，半衰期（$t_{1/2}$）为 41.3-46.8h。高剂量时吸收较慢，8 天后达稳态。食物使吸收速率增加约 1h，基于性别、食物或年龄的曲线下面积（area under curve，AUC）仅存在微小差异。PD 结果以血浆 ET-1 浓度反应 ET 受体的拮抗程度，给药 25mg 以上时，ET-1 浓度与剂量成正比，在健康个体中，无治疗相关的血压变化，但也未发生内皮素系统紊乱。研究中最常见的不良反应是头痛、恶心、体位性直立性心动过速及鼻塞，但大多不良反应为轻度，仅少数中至高剂量组为中度，仅 2 名受试者因不良反应退出研究（上呼吸道感染、咽部刺激）。

一项单中心、双盲、安慰剂对照、随机化、I 期研究（NCT03586570）[13]纳入了 20 例健康日本和高加索健康受试者，比较了受试者每日接受一次 25mg Aprocitentan 或者安慰剂（比例为 4:1），持续 10 天，并监测至末次给药后 216 小时，旨在研究多次给予 25 mg Aprocitentan 后的 PK、安全性和耐受性。结果显示，稳态时，日本和高加索受试者 T_{max} 分别为 4 和 3h，$t_{1/2}$ 分别为 49.1 和 48.8h。两个种群的累积指数均在 3 左右。在 1 个给药间隔内，峰浓度（C_{max}）与 AUC_{τ}（1 个给药间隔期间血浆浓度-时间曲线下的面积）的几何平均比（geometric means ratio，GMR）约为 1（90%CI，0.87-1.30）。两组中 Aprocitentan 均安全且耐受性良好。研究认为，高加索受试者和其他种族受试者之间的 Aprocitentan 药代动力学不太可能存在显著差异。在任何种族中，Aprocitentan 可以高达 25 mg 的剂量水平施用，无需剂量调整。

一项双盲、随机、安慰剂对照、交叉研究（NCT02708004）[14]入组了 28 例高钠饮食的健康受试者，将三种剂量的 Aprocitentan（10、25 或 50 mg/天，持续 9 天）与安慰剂进行比较，探究 Aprocitentan 对高钠饮食健康受试者体重的影响。在 10 mg、25 mg 和 50 mg 剂量下，观察到 Aprocitentan 组增加的体重（安慰剂校正后的平均增重[90%CI]）分别为 0.43kg[0.05-0.80]、0.77kg[0.03-1.51]、0.83kg[0.33-1.32]。观察到血红蛋白和尿酸降低。血浆容量最多增加 5.5%，无剂量反应关系。在 10 mg 和 25 mg 剂量下尿钠排泄减少，但在 50 mg 剂量下未减少。因此，在高钠饮食的健康受试者中，Aprocitentan 产生适度的体重增加，无明显的钠潴留。

一项双中心、开放标签、单剂量研究（NCT04252495）[15]纳入了 8 名中度肝损伤受试者和 9 名健康受试者，旨在评估单次口服 25mgAprocitentan 后，14 天内的 PK、安全性及耐受性。结果表明，中度肝损伤受试者与健康受试者的 PK 相似，T_{max} 约为 4h，C_{max} 无差异，GMR=1.03（90% CI，0.86-1.24），而肝损伤受试者 $t_{1/2}$ 略延长（56.4hvs48.3h），表观清除率略低（251ml/Lvs309ml/L）。Aprocitentan 耐受性良好，头痛是受试者报告的唯一不良事件。基于此，研究认为，Aprocitentan 可用于轻度和中度肝损伤的受试者，无需调整剂量。

一项单中心、开放标签、单剂量研究（NCT03165071）[16]纳入了 8 名严重肾损伤损伤受试者（预估肾小球滤过率为 21.9 ml/min/1.73 m^2）和 8 名健康受试者，旨在评估单次口服 50mgAprocitentan 后，17 天内的 PK、安全性及耐受性。结果显示，严重肾损伤受试者与健康受试者的 PK 相似，T_{max} 分别为 7.6h 和 5h，C_{max} 无差异，GMR=1.04（90% CI，0.85-1.28），而肾损伤受试者 t1/2 略延长（53.2hvs47.4h），清除率略低。此外，Aprocitentan 在严重肾损伤患者中耐受性良好，两组无显著差异。基于此，轻度、中度或重度肾功能的受试者可使用，而无需调整剂量。

此外，相关学者评估了 Aprocitentan 与乳腺癌症抵抗蛋白（breast cancer resistance protein，BCRP）底物瑞舒伐他汀之间的相互作用程度[17]以及与细胞色素 P450（cytochrome P450 proteins，CYP）3A 酶系底物咪达唑仑的相互作用潜力[18]。结果表明：Aprocitentan 不影响 BCRP，可与依赖于 BCRP 转运的药物同时给药，同时也可与作为 CYP3A 底物的药物一起给药，无需调整剂量。

2 期临床试验

Verweij P 等人开展了一项随机、双盲、平行研究（NCT02603809）[19]旨在评估 1-2 级原发性高血压患者对 Aprocitentan 的剂量-反应相关性。490 名患者平均坐位舒张压（sitting diastolic blood pressure，SiDBP）≥90 至 <110 mmHg，且在安慰剂磨合期内依从性≥80%）被随机分配到不同剂量的 Aprocitentan 组（5 mg、10 mg、25 mg、50 mg）、安慰剂组或 20 mg 的赖诺普利组，进行为期 8 周的治疗，主要结局指标为第 8 周患者的无人值守自动化诊室血压（unattended automated office blood pressure，uAOBP）对比基线的变化值。结果显示：第 8 周时，10、

25 和 50 mg 药物组的坐位收缩压（sitting systolic blood pressure，SiSBP）/SiDBP 与安慰剂相比，分别降低 7.05/4.93、9.90/6.99 和 7.58/4.95 mmHg（P≤为 0.014）；与赖诺普利相比，SiSBP/SiDBP 降低 4.84/3.81 mmHg（p=0.093，p=0.030）。Aprocitentan 与安慰剂组的不良反应发生率相似（22.0%-40.2%vs36.6%），最常见的不良反应是头痛和鼻、咽炎。报告了 3 例严重不良反应，但均与治疗无关。药物组仅 1.2%-3.7%的受试者因不良反应停止治疗（安慰剂组为 6.1%，赖诺普利组为 3.7%，p＞0.05）。高剂量组（25g 组和 50 mg 组）中有 4 例患者出现轻至中度外周水肿。其中有 3 例体重发生变化（0-1.1kg），血红蛋白降低 0.5-1.4g/dL，提示可能存在液体潴留和血液稀释。总体来看，本研究安全性与耐受性良好，10mg 与 25mg 剂量-反应水平为后续研究提供了基础。

3 期临床试验

PRECISION 为一项多中心、盲法、随机、平行组的 3 期研究（NCT03541174）[20]旨在评估 Aprocitentan 针对难治性高血压患者的有效性和安全性。该研究共纳入 730 名筛查前一年至少服用了 3 种包括利尿剂在内的降压药物，但经 uAOBP 监测，SiSBP 仍不低于 140 mmHg 的患者。研究分为三个阶段：第一阶段进行了为期 4 周的双盲、随机、安慰剂对照试验（患者按 1:1:1 分别接受 12.5mg、25mg 的 Aprocitentan 及安慰剂治疗）；第二部分进行了为期 32 周的患者单盲试验（完成第一阶段的 704 名患者均进行 25mg 的 Aprocitentan 治疗）；第三阶段进行了为期12周的随机、双盲、安慰剂对照撤药期（614名患者重新分配，按1:1分别接受25mg的Aprocitentan及安慰剂治疗），主要结局指标、关键次要结局指标分别为从基线到第 4 周的 SiSBP 变化、从戒断基线（第 36 周）到第 40 周的 SiSBP 变化。结果显示：与基线相比，4 周时诊室收缩压变化：12.5mg 组最小二乘均值下降 15.3mmHg，25mg 组下降 15.2mmHg，安慰剂组下降 11.5mmHg，12.5mg 组与安慰剂组差异为-3.8mmHg（p=0.0042），25mg 组与安慰剂组差异为-3.7mmHg（p=0.0046）。此外，第 40 周时（停药 4 周后），与 Aprocitentan 组相比，使用安慰剂的 SiSBP 显著增加（5.8mmHg，95%CI:3.7-7.9，p<0.0001）。研究期间最常见的不良事件是轻度至中度水肿或液体潴留，在第一阶段，接受 12.5mg、25 mg 和安慰剂治疗的患者不良事件发生率分别为 9%、18%和 2%，第二阶段 25 mg 药物组为 18.2%，第三阶段 25 mg 药物组和安慰剂组分别为 2.6%和 1.3%。试验期间，发生 11 例紧急治疗死亡，但均与药物作用无关，而肝功能紊乱仅在 25mg 药物组发现（各组发生率为 0.4%-2.3%）。

小结

基于 ET 的生理特点、高血压的病理特征及以往治疗的肺动脉高压的 ET 拮抗剂其活性代谢物的药效学和药动学特点，研究者们另辟蹊径，发现 Aprocitentan 并克服以往 ET 拮抗剂的不良反应，实现 TRH 的临床实践，整个探索历程是一个巧妙的研究思路的体现，值得我们学习和借鉴。从整体的临床结果来看，Aprocitentan 具备降压效果持久、水钠潴留及肝肾损伤发生率低且可控、耐受性良好的特点，FDA 对其上市申请正处于受理阶段，有望成为基于内皮素受体新靶点的新一代降压药物，为 TRH 的治疗开辟新的治疗途径，发掘新的治疗方案，进一步缓解高血压的治疗负担。

参考文献

[1] Carey RM, Calhoun DA, Bakris GL, et al. Resistant Hypertension: Detection, Evaluation, and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. Hypertension. 2018;72(5):e53-e90.

[2] 蒋雄京,王继光.难治性高血压——何去何从？[J].中国循环杂志,2022,37(08):761-765.

[3] 范景如,郭舜奇.内皮素受体拮抗剂在高血压治疗中的研究进展[J].中华高血压杂志,2017,25(07):632-635.

[4] Boutari C, Siskos F. Novel Dual Endothelin Inhibitors in the Management of Resistant Hypertension. Life (Basel). 2023;13(3):806. Published 2023 Mar 16.

[5] Gaddam KK, Nishizaka MK, Pratt-Ubunama MN, et al. Characterization of resistant hypertension: association between resistant hypertension, aldosterone, and persistent intravascular volume expansion. Arch Intern Med. 2008;168(11):1159-1164.

[6] Clozel M. Aprocitentan and the endothelin system in resistant hypertension. Can J Physiol Pharmacol. 2022;100(7):573-583.

[7] Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. N Engl J Med. 1998;338(12):784-790.

[8] Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med. 2013;369(9):809-818.

[9] Iglarz M, Binkert C, Morrison K, et al. Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. J Pharmacol Exp Ther. 2008;327(3):736-745.

[10] Sidharta PN, Fischer H, Dingemanse J. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Aprocitentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist, in Humans. Curr Drug Metab. 2021;22(5):399-410.

[11] Trensz F, Bortolamiol C, Kramberg M, et al. Pharmacological Characterization of Aprocitentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist, Alone and in Combination with Blockers of the Renin Angiotensin System, in Two Models of Experimental Hypertension. J Pharmacol Exp Ther. 2019;368(3):462-473.

[12] Sidharta PN, Melchior M, Kankam MK, et al. Single- and multiple-dose tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the dual endothelin receptor antagonist Aprocitentan in healthy adult and elderly subjects. Drug Des Devel Ther. 2019;13:949-964. Published 2019 Mar 22.

[13] Fontes MSC, Dingemanse J, Sidharta PN. Multiple-Dose Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Aprocitentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist, in Healthy Japanese and Caucasian Subjects. Clin Pharmacol Drug Dev. 2021;10(7):718-725.

[14] Gueneau de Mussy P, Sidharta PN, Wuerzner G, et al. Effects of the Dual Endothelin Receptor Antagonist Aprocitentan on Body Weight and Fluid Homeostasis in Healthy Subjects on a High Sodium Diet. Clin Pharmacol Ther. 2021;109(3):746-753.

[15] Fontes MSC, Dingemanse J, Halabi A, et al. Single-dose pharmacokinetics, safety, and tolerability of the dual endothelin receptor antagonist Aprocitentan in subjects with moderate hepatic impairment. Sci Rep. 2022;12(1):19067.

[16] Sidharta PN, Ulč I, Dingemanse J. Single-Dose Pharmacokinetics and Tolerability of Aprocitentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist, in Subjects with Severe Renal Function Impairment. Clin Drug Investig. 2019;39(11):1117-1123.

[17] Sidharta PN, Dingemanse J. Effects of Multiple-Dose Administration of Aprocitentan on the Pharmacokinetics of Rosuvastatin. Clin Pharmacol Drug Dev. 2020;9(8):995-1002.

[18] Sidharta PN, Dingemanse J. Effect of Multiple-Dose Aprocitentan Administration on the Pharmacokinetics of Midazolam in Healthy Male Subjects. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2020;45(2):227-234.

[19] Verweij P, Danaietash P, Flamion B, et al. Randomized Dose-Response Study of the New Dual Endothelin Receptor Antagonist Aprocitentan in Hypertension. Hypertension. 2020;75(4):956-965.

[20] Schlaich MP, Bellet M, Weber MA, et al. Dual endothelin antagonist Aprocitentan for resistant hypertension (PRECISION): a multicentre, blinded, randomised, parallel-group, phase 3 trial. Lancet. 2022;400(10367):1927-1937.

精神专科医院中成药安全性评价分析

朱浩浩*，蒋颖，沈远，周勤，陆荣荣，杜志强#

（江南大学附属无锡市精神卫生中心，江苏无锡 214151）

【摘要】目的：分析精神专科医院中成药药品不良反应（Adverse Drug Reaction，ADR）的原因及特点，并提出改善对策，为促进临床安全、合理用药提供参考。**方法：**回顾性分析无锡市精神卫生中心 2014 年 1 月至 2021 年 12 月收集的 54 例中成药 ADR 报告资料，运用 Excel 表格对患者性别及年龄、中成药种类、给药方式和药物剂型、ADR 累及系统或器官、ADR 类型及严重程度、ADR 因果关系判断及转归情况等方面进行统计汇总。**结果：**54 例中成药 ADR 报告中，男性与女性比例为 1:1.08，60 岁以上老年患者最多 35 例（64.81%）；涉及 8 类中成药物，共 27 个品种，其中心血管类药物最多 26 例（48.15%）；引起 ADR 的给药途径中口服给药最多有 29 例（53.70%），其次是注射给药 24 例（44.45%）；ADR 累及系统（或器官）中，全身性损害和肝肾功能损害占比最多各 11 例（20.37%）；发生新的 ADR 有 14 例（25.93%）；严重的有 14 例（25.93%），其中新的严重的中成药 ADR 有 2 例（3.70%）；发生的 ADR 均与中成药关联密切，发生后及时给予对症治疗、停药、减量等处理，好转 36 例（66.67%），治愈 13 例（24.07%），未好转 3 例（5.56%），不详 2 例（3.70%）。**结论：**中成药所致 ADR 与患者性别及年龄、中成药种类、给药方式和药物剂型等密切相关，临床在给患者使用中成药时，尤其是注射剂，应注意个体差异，严格按照说明书的用法用量，并加强 ADR 监测，使用前了解过敏史，减少 ADR 的发生率；同时临床药师应加强对中成药 ADR 的监测上报力度和培训，以及加强对患者的宣教力度，提高中成药用药安全意识，确保临床使用中成药越来越科学、规范、安全、合理。

【关键词】中成药；不良反应；精神专科；合理用药

中成药属于中华民族的智慧结晶，大多数是从天然动植物中提取，并经过多种工序制备成各种剂型，应用于临床治疗中。公众普遍认为中成药能够起到“有病防病，无病强身”的功效，相较于西药，药性温和，具有较少的毒副作用[1]。随着我国对中医中药的大力扶持，中成药的研究也在不断的深入开展，临床治疗中中成药的使用率不断增加[2]。然而，随着中成药使用率不断增加，由于各种因素导致的中成药药品不良反应（Adverse Drug Reaction，ADR）发生率也日益增多。药品不良反应轻者可致患者遭受一定痛苦，重者则可危及其生命，因此，中成药的临床使用安全性应引起重视[3]。

在不同的医疗机构中中成药的使用数量、种类存在较大的差异性，我院属于精神专科医院，临床上使用的大多是治疗精神抑郁、定志安神、助眠、益智等，以及对症缓解治疗精神抑郁类西药所致不良反应的中成药。虽然临床使用有一定的理论基础，但是缺乏标准化、系统化的临床循证证据来评价其安全性。因此，在临床用药期间，开展药品不良反应监测工作，能够为中成药药品的临床应用安全、有效提供可靠的数据[4]。本研究对 2014 年 1 月-2021 年 12 月无锡市精神卫生中心收集的 54 例中成药 ADR 报告进行汇总，统计分析不良反应发生的原因及特点，并提出改善对策，为促进临床安全、合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料

回顾性分析无锡市精神卫生中心 2014 年 1 月至 2021 年 12 月收集的 54 例中成药 ADR 报告资料。纳入标准：患者使用中成药导致发生不良反应，ADR 报告资料均上报至国家药品不良反应中心，报告资料完整，用药、ADR 等信息明确。排除标准：西药 ADR 报告，不能确定 ADR 与中成药直接相关的报告。

1.2 方法

对 54 例中成药 ADR 报告中患者性别及年龄、中成药种类、给药方式和药物剂型、ADR 累及系统或器官、ADR 类型及严重程度、ADR 因果关系判断及转归情况等方面进行统计汇总。

1.3 统计学方法

运用 Excel 表格处理不良反应数据，计数资料采用例数、百分率（%）表示。

2 结果

2.1 中成药 ADR 患者性别及年龄分布

收集的 54 例中成药 ADR 报告中，男性 26 例（48.15%），女性 28 例（51.85%），男性与女性比例为 1:1.08；在年龄构成方面，均为＞20 岁的成年人，其中 21-60 岁之间的患者有 19 例（35.19%），60 岁以上老年患者 35 例（64.81%）。（详见表 1）

表 1 ADR 报告中患者性别及年龄分布

年龄段（岁）	男	女	合计	占比（%）
21-30	2	3	5	9.26
31-40	0	1	1	1.85
41-50	4	1	5	9.26
51-60	5	3	8	14.81
61-70	9	7	16	29.63
71-80	4	6	10	18.52
81-90	2	5	7	12.96
＞90	0	2	2	3.70
合计	26	28	54	-
占比（%）	48.15	51.85	-	100.00

2.2 中成药 ADR 涉及的中成药种类及相关药物

54 例中成药 ADR 中涉及药物种类 8 类，共 27 个药物品种，其中心血管类药物最多，共 26 例（48.15%），其次是神经系统类和骨伤科类，各 9 例（16.67%）。（详见表 2）

表 2 ADR 涉及的中成药种类及相关药物

药物种类	相关药物	例数	占比（%）
心脑血管类	银杏内酯注射液（8）、丹红注射液（4）、注射用血塞通（3）、生血宝合剂（3）、醒脑静注射液（1）、疏血通注射液（1）、生脉注射液（1）、强力定眩胶囊（1）、脉络通颗粒（1）、红花黄色素氯化钠注射液（1）、灯盏生脉胶囊（1）、大活络胶囊（1）	26	48.15
神经系统类	舒肝解郁胶囊（5）、乌灵胶囊（1）、巴戟天寡糖胶囊（1）、复方苁蓉益智胶囊（1）、九味镇心颗粒（1）	9	16.67
骨伤科类	注射用骨瓜提取物（5）、骨康胶囊（3）、麝香追风膏（1）	9	16.67
呼吸系统类	蒲地蓝消炎口服液（2）、苏黄止咳胶囊（1）	3	5.56
胃肠类	六味安消胶囊（2）	2	3.70
糖尿病类	木丹颗粒（2）	2	3.70
抗炎保肝类	肝爽颗粒（1）、雷公藤多苷片（1）	2	3.70
提高免疫力滋补保健类	鹿血晶（1）	1	1.85
合计		54	100.00

2.3 中成药 ADR 涉及的给药方式和药物剂型

54 例中成药 ADR 中，口服给药方式有 29 例（53.70%），注射给药方式 24 例（44.45%），外用给药方式 1 例（1.85%）。发生中成药 ADR 的剂型主要有胶囊剂 17 例（31.48%）、注射剂 16 例（29.63%）。（详见表 3）

表 3 中成药 ADR 涉及的给药方式和相关药物

给药方式	例数	占比（%）	药物剂型	例数	占比（%）
口服	29	53.70	胶囊剂	17	31.48
			颗粒剂	5	9.26
			液体合剂	3	5.56
			片剂	2	3.70
			口服溶液剂	2	3.70
静脉滴注	24	44.45	注射剂	16	29.63
			粉针剂	8	14.82
外用	1	1.85	贴剂	1	1.85
合计	54	100.00		54	100.00

2.4 中成药 ADR 累及系统（或器官）及临床表现

中成药 ADR 累及系统（或器官）中，全身性损害和肝肾功能损害占比最多各有 11 例（20.37%），主要临床表现为过敏反应、肝肾功能异常；其次是消化系统 10 例（18.52%），主要临床表现恶心、腹泻；皮肤及附属器官占 9 例（16.77%），主要临床表现皮疹。（详见表 4）

表 4 中成药 ADR 累及系统（或器官）及临床表现

系统或器官	例数	占比（%）	临床表现
全身性损害	11	20.37	过敏反应（5）、乏力（2）、静脉炎（2）、发冷（1）、发抖（1）
肝肾功能损害	11	20.37	肝功能异常（10）、肾功能异常（1）
消化系统	10	18.52	恶心（4）、腹泻（3）、呕吐（1）、胃肠道不适（1）、便秘（1）
皮肤及附属器官	9	16.67	皮疹（6）、过敏性皮炎（1）、皮肤变色（1）、丘疹（1）
心血管系统	6	11.11	皮肤潮红（3）、心慌（2）、心悸（1）
神经系统	6	11.11	头晕（3）、视物模糊（1）、睡眠减少（1）、锥体外系反应（1）
呼吸系统	1	1.85	呼吸困难（1）
合计	54	100.00	

2.5 中成药 ADR 类型及严重程度

54 例报告中成药 ADR 类型中，已知的 ADR 有 40 例（74.07%），新的 ADR 有 14 例（25.93%）；中成药 ADR 严重程度结果：ADR 造成不严重的 40 例（74.07%），严重的 14 例（25.93%）；其中新发生的严重的中成药 ADR 有 2 例（3.70%）。（详见表 5）

表 5 中成药 ADR 类型及严重程度

严重程度 / 类型	一般（例）	占比（%）	严重（例）	占比（%）	合计	占比（%）
已知的（例）	28	51.85	12	22.22	40	74.07
新的（例）	12	22.22	2	3.70	14	25.93
合计	40	74.07	14	25.93	54	100.00

2.6 中成药 ADR 因果关系判断及转归情况

54 例报告中成药 ADR 因果关系判断结果：可能 42 例（77.78%），很可能 11 例（20.37%），肯定 1 例（1.85%）。ADR 发生后及时给予对症治疗、停药、减量等处理，其中好转 36 例（66.67%），治愈 13 例（24.07%），未好转 3 例（5.56%），不详 2 例（3.70%）。（详见表 6）

表 6 中成药 ADR 因果关系判断及转归情况

因果关系 转归情况	可能（例）	占比（%）	很可能（例）	占比（%）	肯定（例）	占比（%）	合计	占比（%）
好转（例）	26	48.15	10	18.52	0	0	36	66.67
治愈（例）	11	20.37	1	1.85	1	1.85	13	24.07
未好转（例）	3	5.56	0	0	0	0	3	5.56
不详（例）	2	3.70	0	0	0	0	2	3.70
合计	42	77.78	11	20.37	1	1.85	54	100.00

3 讨论

随着国家对中医药的重视以及对中医药事业投入的增加，中成药制剂新品种、新剂型不断开发。随之而来的是中成药导致药品不良反应(adverse drug reaction，ADR)的报道也在增多，引起了各方关注。

目前我院中成药在临床中应用日趋广泛，由其引起的药物不良反应也逐渐增多。

3.1 中成药 ADR 与个体情况的关系

本研究发现，男性与女性比例为 1:1.08，女性 ADR 发生率高于男性，可能是由于女性的特殊生理结构会影响药物的敏感性和不良反应的耐受性[5][6]。在年龄构成方面，ADR 患者均为＞20 岁的成年人，其中中成药所致 ADR 的患者在 21-60 岁之间有 19 例（35.19%），有研究表明，ADR 在 60 岁以上的老年患者中发生比例最高[7][8]，本研究中＞60 岁的有 35 例（64.81%），占比最高。其原因可能是老年患者常常患有多种基础疾病，合并使用多种药物，用药复杂，有时需要中西药合用，药物之间往往存在相互作用[8]，且老年患者服药依从性差，常无法准确掌握药物的用法用量，容易出现不合理用药，从而引起 ADR 的发生。同时老年患者由于身体器官机能随年龄增长而逐渐退化，药物在体内代谢、排泄能力降低，导致在体内蓄积，也容易引起 ADR[10]。因此，建议临床上应将老年患者作为中成药 ADR 的重点监控对象，加强对中成药致 ADR 的监测，及时采取相应措施并关注转归情况，同时结合老年患者生理特点及病史等个体差异性，制定个体化给药方案，密切关注其用药情况，对其用药后反应加强监测，并适时调整用药方案，减少中成药 ADR 的发生率[11]，保证老年患者用药安全。

3.2 ADR 与中成药种类及相关药物的关系

本研究中成药 ADR 共涉及药物种类 8 类，共 27 个药物品种，其中心血管类药物最多，26 例（48.15%），其次是神经系统类和骨伤科类，各 9 例（16.67%）。这主要是由于本研究中成药 ADR 涉及的人群大部分是＞60 岁的老年患者，临床上老年人使用活血化瘀的心血管类、骨伤科类药物情况比较多，而且心血管类药物通常作用于患者血管靶细胞上，极易产生较多副作用[12]。神经系统类药物是我院患者主要以精神抑郁为主，需要长时间服用神经系统类药物，为患者开具此类中成药处方期间，存在中西药联合使用、疗程过长、预防用药等问题，极易增加患者服药之后的不良反应发生率[13]。因此，在临床治疗期间，建议应有专业素质水平较高的中医师参与会诊，提高对中成药物的重视度，促进合理用药，避免发生超说明书使用、药物相互作用、配伍禁忌、无指征用药等问题，减少中成药 ADR 的发生率。

3.3 ADR 与中成药给药方式和药物剂型的关系

本研究发现，患者口服给药后 ADR 最高，有 29 例（53.70%），其次是注射给药 24 例（44.45%），外用给药 1 例（1.85%），与刘洋等[14]研究结果一致。其中发生中成药 ADR 的剂型主要有胶囊剂 17 例（31.48%）、注射剂 16 例（29.63%）。分析其原因，考虑我院精神患者的特殊性，服药依从性较差，在临床上一般使用胶囊剂和注射剂等方便其用药，且大多数中成药注射剂说明书中的不良反应都写了“暂未发现明显不良反应”，使得临

床与患者觉得使用中成药注射剂疗效显著，不良反应少。然而使用中成药注射剂静脉给药，一是由于中成药注射剂成分比较复杂，容易受制药工艺影响，在制备时未能充分去除一些大分子物质，容易引起变态过敏反应，比一般西药注射剂的 ADR 发生率高[15]。二是由于静脉给药不经过肝脏代谢，直接进入血液，血药浓度较高，再加上与输液配伍后，易使其 pH 值、内毒素及渗透压发生改变，致中成药注射剂的的稳定性受到影响，从而引起 ADR[16]。因此，建议临床在制定给药方案时，应选择合理的给药方式，遵循“能口服不静脉”的用药原则。在使用中成药注射剂静脉给药前，应告知患者在出现不适时及时反馈。同时，临床静配中成药注射剂时，要注意观察其质量，避免输液配伍反应、杂质等出现，加强中成药用药监控，一旦觉察到异样，应积极采取有效对症措施进行救治，根据情况减量、停药，减少中成药 ADR 发生率。

3.4 中成药 ADR 累及系统（或器官）及临床表现的分析

54 例中成药 ADR 累及系统（或器官）中，以全身性损害和肝肾功能损害占比最多各有 11 例（20.37%），主要临床表现为过敏反应、肝肾功能异常；考虑原因部分中成药含有何首乌、苦参等伤肝成分，长期服用导致肝功能指标异常；中药注射剂缺乏完善的质量控制标准，导致临床输液出现过敏反应等全身性损害。其次是消化系统 10 例（18.52%），主要临床表现恶心、腹泻；考虑原因主要是中成药对胃肠刺激较大，尤其对老年患者来说，胃肠道反应较重。皮肤及附属器官占 9 例（16.77%），主要临床表现皮疹；考虑原因与其他系统相比较而言，皮肤及其附件在临床上受到的损害更易于观察[17]。中成药 ADR 有很多影响因素，如患者的过敏史、药物的剂型、特殊人群儿童或妇女等[17]。因此，临床在使用中成药前首先应了解清楚患者既往是否存在中成药物或其成分过敏，对于有药物过敏史或特异体质者应谨慎用药；同时医护和临床药师必须要加强对其他系统（或器官）的 ADR 监测，用药期间加强血常规、肝功能等指标的监测，及时发现不良反应给予相应的措施对症处理，最大程度上减轻不良反应的程度[20]。

3.5 中成药 ADR 类型及严重程度的分析

根据原卫生部颁布的《药品不良反应报告和监测管理办法》，新的药品不良反应，是指药品说明书中未载明的不良反应，或者不良反应发生的性质、程度、后果、频率与说明书描述不一致或者更严重的，且临床从未报道过的[20]。54 例中成药 ADR 报告中，新的 ADR 有 14 例（25.93%），严重的 14 例（25.93%），新的严重的中成药 ADR 有 2 例（3.70%）。本研究发现中成药新的、严重的 ADR 发生率较高，分析原因可能是中成药往往临床前研究不够充分，缺乏足够的数据支撑，其说明书标注的 ADR 描述过于简单，有些甚至是“尚不明确”，这些都是患者使用中成药的潜在风险。因此，临床应重点对中成药新的、严重的 ADR 加强关注，配合上报国家，并适时修改药品说明书，同时国家药品监管部门应加强规范化管理药品说明书的审批和修订，确保公众的用药安全。

3.6 中成药 ADR 因果关系判断及转归情况的分析

本研究 54 例报告中成药 ADR 因果关系判断，均与中成药关联密切，其中可能有关 42 例（77.78%），很可能 11 例（20.37%），肯定 1 例（1.85%）。ADR 发生后绝大多数通过停用或减少剂量、对症治疗等方法好转或痊愈，其中好转 36 例（66.67%），治愈 13 例（24.07%），未好转 3 例（5.56%），不详 2 例（3.70%），无致死致残致畸情况。由此可见，临床应严格监测患者使用中成药，及时的对症治疗，有助于改善药物不良反应。

4 总结

综上所述，重点分析我院中成药 ADR 的规律特点，发现中成药所致 ADR 与患者性别及年龄、中成药种类、给药方式和药物剂型等密切相关，临床在给患者使用中成药时，应严格按照说明书的用法用量治疗；对于精神患者和＞60 岁的老年患者使用中成药时要加强用药监测，需要特别关注其使用中成药期间的用法用量、注意事项、配伍禁忌，以及用药后的不良反应等；及时发现 ADR 并采取相应的措施，以减少伤害，避免 ADR 加重；对于容易导致 ADR 的中成药注射剂，使用前了解清楚患者的过敏史，使用时需要注意个体差异，以有效地减少中成药注射剂 ADR 的发生率。同时临床药师应加强对中成药 ADR 的监测上报力度和培训，以及加强对患者的宣教力度，提高中成药用药安全意识，确保临床使用中成药越来越科学、规范、安全、合理。

参考文献

[1] 王春晓,王红娟,张厚莉,等.对某三级甲等医院 159 例中成药不良反应回顾与分析[J].泰山医学院学报,2020,41(3):219-222.

[2] 陈映红.我院儿科 115 例不良反应分析[J].海峡药学,2018,30(10):263-264.

[3] 郭虎.270 例中成药不良反应 Pareto 最优分析[J].中国药业,2019,28(5):87-89.

[4] 朱峰,吕晓川,高峰,等.中成药不良反应的诱发原因及热点问题分析[J].中国临床保健杂志,2018,21(1):127-130.

[5] 梁伟意.2016-2018 年 575 例药品不良反应危险因素分析[J].中国处方药,2020,18(7):72-73.

[6] 李香荷,唐娜.63 例中成药致新的药品不良反应报告分析[J].海峡药学,2019,31(12):237-239.

[7] 李旭,于军.老年人合理用药分析[J].中国老年学杂志,2019,39(7):1789-1791.

[8] 王雅,邹泽,李飞,等.中成药不良反应 159 例报告分析[J].安徽医药,2019,23(11):2320-2323.

[9] 江南,周香意,江彦.衡阳市中医医院 148 例中成药药品不良反应报告分析[J].中国社区医师,2019,35(13):9-10.

[10] 马志会.我院 2015 年—2017 年中成药不良反应分析报告[J].基层医学论坛,2019,23(16):2328-2330.

[11] 吕小琴,马敏康,朱勇,等.中成药说明书安全性信息及不良反应监测数据分析[J].中国现代应用药学,2019,36(4):109-114.

[12] 郑鹤斌.115 例中成药不良反应分析[J].中国当代医药,2021,28(23):222-225.

[13] 张力,唐仕欢.我院 2017 年中成药在临床中的合理用药情况及分析[J].现代中药研究与实践,2018,32(3):74-76.

[14] 刘洋,范峥,常馨予,等.我院祛瘀及清热类中药致新的和严重的不良反应 298 例分析[J].中国药房,2018,29(8):1091-1094.

[15] 彭国平,李存玉.中药注射剂安全性的分析与思考[J].南京中医药大学学报,201935(6):744-751.

[16] 张祥霞,唐丽娜,王丽.163 例中成药致药品不良反应报告[J].中国医院用药评价与分析,2018,18(10):1423-1425,1429.

[17] 于泓,梅俊,张萍,等.牛黄降压中成药治疗原发性高血压疗效与安全性系统评价[J].北京中医药,2019,38(5):487-491.

[18] 贾新梅.某中医医院 391 例药品不良反应报告分析[J].甘肃医

[19] 药,2018,37(11):1030-1034,1042.

[20] 程华尧,朱灿阳.海南省妇女儿童医学中心门急诊儿童中成药临床应用分析[J].安徽医药,2019,23(10):2101-2104.

[21] 中华人民共和国卫生部.药品不良反应报告和监测管理办法[EB/OL].北京:中华人民共和国卫生部,2011-5-4[2021-10-26].http://www.gov.cn/flfg/2011-05/24/content_1870110.htm.

基于 COSO-ERM 视角的疫苗企业风险评价体系构建与实证研究

朱价[1]，丁宇琦[1]，沈泓[1]，刘柱[1]，茅鸯对[2*]

（1.浙江省食品药品检验研究院，杭州 310052；2. 浙江药科职业大学，浙江宁波 315000）

【摘要】目的：构建疫苗企业风险评价体系并进行实证研究。**方法：**基于 COSO-ERM 视角，构建疫苗企业风险评价体系，运用 AHP-FCE 评价模型进行综合量化评价。**结果：**构建了 1 个目标层、8 个准则层、28 个指标层的疫苗企业风险评价指标体系，并以 A 疫苗生产企业为例，采用 AHP 对评价指标进行赋权，采用 FCE 对指标进行综合评价，得到整体评价的风险值。**结论：**数据表明 A 疫苗生产企业处于中等风险水平，探索到风险值较高的 3 个准则层指标和 8 个指标层指标，提示该疫苗企业应从提升管理策略出发，重点关注战略、应急、文化、产品、审查等重点风险领域。

【关键词】疫苗；COSO-ERM；风险评价；AHP-FCE

Construction and Empirical Study for Risk Evaluation System of Vaccine Enterprise Based on COSO-ERM

ZHU Jia[1], DING Yu-qi[1], SHEN Hong[1], LIU Zhu[1], MAO Yang-dui[2*]

（1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou, 310052, China; 2. Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315000, China）

ABSTRACT **OBJECTIVE** Establish the risk evaluation system of vaccine enterprise and carry out the empirical study. **METHODS** Based on COSO-ERM, the risk evaluation system of vaccine enterprise was establish. AHP-FCE evaluation model was applied for the comprehensive quantitative evaluation. **RESULTS** An evaluation index system of vaccine enterprise was constructed with 1 target layer, 8criteria layers, and 28 indicator layers. Taking vaccine enterprise A as an example, AHP was applied to assign weight of the evaluation indexes, and FCE was applied to comprehensively evaluate the indexes, then the risk value of the overall evaluation was obtained. **CONCLUSION** The results showed that vaccine enterprise A was at a medium risk level, and 3 criteria layer's indexes and 8 indicator layer's indexes with high risk values were explored, which suggested that the vaccine enterprise should focus on key risk areas such as strategy, emergency response, culture, product and review to improve management strategies.

KEY WORDS vaccine; COSO-ERM; risk evaluation; AHP-FCE

疫苗产业与国家安全、公共卫生安全和人民群众生命健康休戚相关，是药品监管科学研究领域的重中之重。第一，从产品属性角度考虑，疫苗由于其生物制品本身的天然复杂性[1]，在生产过程中受到污染的概率比一般药品要高，产业链中任一环节出现问题，都可能给终产品带来巨大的安全隐患，因此需引入风险管理理念，保证疫苗生产的安全、有效、可控。第二，从产业发展角度考虑，有研究统计我国现有疫苗制药企业 45 家，能生产预防 35 种疾病的疫苗，年生产能力达到十亿剂[2]，但目前许多疫苗企业对风险管理的理解和实操停留在表面，多

基金项目：浙江省科技厅科技计划项目资助（2021C35127），浙江省药品监管科技计划项目（2023016）

作者简介：朱价，女，硕士，主管药师　研究方向：医药技术经济与管理研究、药事管理

*通讯作者：茅鸯对，女，副教授，硕士　研究方向：药物警戒、医疗人工智能　E-mail：maoyangdui@163.com

用于应付日常的外部检查，而非来源于内生性的管理动力，积极性和主动性有待提升。第三，从国际战略角度考虑，在如今复杂多变的国际经济环境中[3]，产业发展要求提升核心竞争力和品牌价值，深入开展风险管理、风险评价及对策研究，不断提升疫苗产品质量，缩小与国际领先进口疫苗的质量差异，这是我国疫苗企业稳定而长效发展的有力保障。

基于 COSO-ERM 的风险管理视角[4]，研究和设计风险评价体系并开展实证研究，能够为推动疫苗企业按照系统性、科学性、可行性原则组织生产与管理提供新的思路。采用层次分析法确定评价体系中各评价指标的权重，采用模糊综合评价法建立各评价指标的隶属函数，以 A 疫苗生产企业为例进行实证研究，实现疫苗企业的整体风险评估并提出相应的管理提升对策。本文为疫苗企业的风险管理技术选择提供理论依据，也为其他药品生产企业的风险评价和风险防范提供一定的参考。

1 COSO-ERM 相关理论

COSO-ERM 是指由美国反财务欺诈委员会下属的发起人委员会（The Committee of Sponsoring Organizations of the Treadway Commission，以下简称 COSO）发布的《企业风险管理——整合框架》（Enterprise Risk Management - Integrated Framework，以下简称 ERM）[5]。COSO-ERM 从整合理念核心出发，对全面风险管理作出了详细定义，能够有效提升企业风险管理水平，是目前公认的全面风险管理框架之一[4]，在综合分析评估企业风险管理方面具有一定的权威性。COSO-ERM 在 2014 年首次发布后，经过十余年的发展于 2017 年修订为正式版《企业风险管理——与战略和绩效相结合》（Enterprise Risk Management-Integrating with Strategy and Performance，以下简称 COSO-ERM 2017）[6]，由治理与文化、战略与目标设定、绩效、审查与修订、信息沟通与报告五个部分及其对应的 20 项指导原则构成，更加强调融合的意识与实践，见图 1。目前，COSO-ERM 已在许多领域得到广泛应用[4, 7]，但很少有研究将其运用于药品企业尤其是疫苗企业。

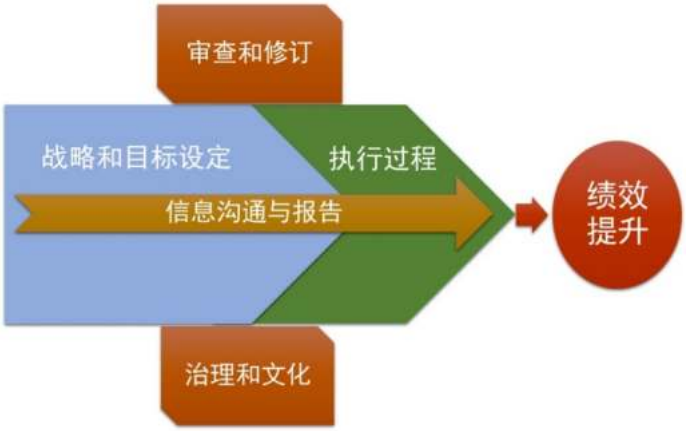


图 1 COSO-ERM 2017 框架图

Fig.1 Framework of ERM 2017

2 风险评价体系的构建

疫苗生产是一个复杂的系统工程，不仅涉及到生产环节硬件设备和管理环节软件设备，还涉及到原材料、生产、成品检验等生产活动，以及社会责任等。基于 COSO-ERM 视角，从治理与文化、战略与目标设定、绩效、审查与修订、信息沟通与报告五个方面出发，以疫苗生产安全为基础，整合生产经营活动的支持性要素，综合考虑疫苗质量的可持续性发展目标，初步构建了“1、8、28”三个层次的风险评价指标体系框架结构，如表 1 所示：

1 个目标层，即以疫苗企业风险评价为目标；8 个准则层，包括生产控制活动、人员因素、仪器设备与化学品、产品质量、治理和文化、战略和目标、审阅和修订、应急和风险管理；对准则层每个指标进行具体化的细分，可直接反映每个准则层的整体和细节情况，共遴选出含有 28 个具体评价内容的分指标。

表 1 疫苗企业风险评价指标体系

Tab.1 Index system of risk evaluation for vaccine enterprise

目标层（X）	准则层（Y）	指标层（Z）	具体评价内容
疫苗产品风险评价	生产控制活动 A	采购环节控制 A1	原材料是否可追溯、合格率情况、质检方式是否合理
		生产环节控制 A2	操作是否规范，技术是否成熟
		储运环节控制 A3	运输是否高效，冷链控制能否达标
		废弃物处理环节控制 A4	废弃物是否规范处理、达标排放
	人员因素 B	安全意识和水平 B1	安全意识和知识储备、接受培训频率
		健康状况 B2	是否定期体检、注射相关疫苗获得免疫保护
		应激反应能力 B3	操作规范熟练度，发生偏差时具备有效应激反应
		个体安全防护 B4	安全防护硬件水平
	仪器设备与化学品 C	安全监测和报警装置 C1	设备是否有安全监测和报警装置
		设备安全防护水平 C2	设备是否有相应的安全防护管理，有维护和保养
		危化品的储存使用 C3	危化品管理是否按标准执行，使用是否合规
		危化品的监管 C4	是否对危化品使用进行管理并定期监督
	产品质量 D	生产体系 D1	是否有配套生产体系认证
		成品检测 D2	自检合格率、抽检合格率情况
		标准执行情况 D3	标准采用情况、执行情况
	治理和文化 E	治理能力 E1	组织是否专业独立、组织机构是否健全
		企业文化 E2	是否有提升员工使命感、凝聚力和上进心的企业文化
		管理者素质 E3	管理者是否具备高素质、能高效处理企业内各项事宜
	战略和目标 F	社会责任 F1	员工流失率、企业信用评价
		目标设定 F2	根据质量可持续制定适时的战略和目标
		持续改进能力 F3	是否有寻求改进的意愿，具备改进的执行力
	审阅和修订 G	内外环境评估 G1	内外部环境信息是否高效整合，有效评估
		内外部信息沟通 G2	内外部信息充分沟通，促进互利共赢
		运行情况审查 G3	是否做好生产和内部控制的监督检查
	应急和风险管理 H	隐患排查和整改 H1	是否有隐患排查和整改制度并高效执行
		定期应急演练 H2	是否开展定期应急演练并效果良好
		问责机制 H3	是否设定问责机制，将应急和风险管理工作责任到人
		应急管理硬件 H4	是否具备应急通讯、救援物资、疏散通道等硬件条件

3 风险评价实证研究

3.1 AHP-FCE 方法概述

目前国内外常用的评价方法主要包括数据包络分析法[8, 9]、主成分分析法[10]、灰色关联分析法[11]、德尔菲法[12]、层次分析法[13, 14]、模糊综合评价法[15]以及组合评价方法[14, 16, 17]等。层次分析法（Analytic Hierarchy Process，简称 AHP）-模糊综合评价法（Fuzzy Comprehensive Evaluation，简称 FCE）是将 AHP 与 FCE 相结合的一种评价方法，发挥了 AHP 操作直观、层次分明、有效性强的优点和 FCE 系统性强、解决模糊现象、处理多种因素的优点，减少评价过程中主观判断和模糊性等问题带来的影响，使最终的评价结果更加准确可靠。

3.1.1 层次分析法（AHP）

运用 AHP 对不同层级的指标进行权重判定和计算，步骤如下：

首先，采取两两比较的方法，根据不同专家对各指标重要性进行打分赋值，a_{ij} 为风险 i 对风险 j 的相对重要程度，则：

$$a_{ij} = \frac{1}{a_{ji}} \tag{1}$$

在此基础上，构造两两比较的判断矩阵：

$$A_n = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \cdots & a_{2n} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix} \tag{2}$$

然后，采用算术平均法将矩阵中的各元素按列作归一化处理，计算判断矩阵的最大特征根 $\lambda_{\max}$ 和权向量 ω_i，并分别计算各指标对上一层指标的权重：

$$\omega_i = \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{n}\frac{a_{ij}}{\sum_{k=1}^{n}a_{kj}}(i,j = 1,2,\ldots,n) \tag{3}$$

$$A\omega = \lambda_{max}\omega \tag{4}$$

接着，根据判断矩阵的最大特征根进行一致性检验，一致性指标 CI 的计算公式为：

$$CI = \frac{\lambda_{max}-n}{n-1} \tag{5}$$

同时，根据矩阵阶数 n 查询一致性指标 RI 数值，再计算一致性比率 CR，其计算公式为：

$$CR = \frac{CI}{RI} \tag{6}$$

若计算结果 $CR<0.1$，则通过一致性检验，由归一化得到的某一层次各指标的权重可以接受；若 $CR>0.1$，则未通过一致性检验，需要新构建矩阵。

3.1.2 模糊综合评价法（FCE）

运用 FCE 可对受到多种因素影响的对象作出一个总体的评价，步骤如下：

首先，需确定综合评价的因素集 U，将影响总体评价对象的 n 种因素建立一个集合：

$$U = [U_1, U_2, U_3, \ldots, U_n] \tag{7}$$

那么，U_i=[U_{i1}，U_{i2}，U_{i3}，…，U_{im}](i=1，2，…，n)则为第 i 种因素下的 m 种因素，即二级指标，以此类推。

同时，确定评价集 V，对每个指标的重要程度赋予一个等级，最终选出理想结果：

V=[V_1，V_2，V_3，…，V_n] （8）

其中，n 为评价等级数，如：V_1 为“优”，V_2 为“好”，V_3 为“良”等。

然后，根据专家投票评价结果，获得评价矩阵，其中，r_{mn} 表示专家对第 n 个因素评价为 V_n 时的综合评价情况：

$$R_n = \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & \cdots & r_{1n} \\ r_{21} & r_{22} & \cdots & r_{2n} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ r_{m1} & r_{m2} & \cdots & r_{mn} \end{bmatrix} \tag{9}$$

接下来，进行模糊综合评价运算，若已知权向量 W=(ω_1, ω_2, ω_3, …, ω_n)，则可采用加权平均法计算评价矩阵 B，计算公式为：

$$B = (b_1, b_2, b_3, \ldots, b_m) \tag{10}$$

$$b_j = \sum_{j=1}^{n}\omega_j r_{ij}\ (j = 1,2,3,\ldots,n) \tag{11}$$

3.2 基于 AHP 的评价指标赋权

以 A 疫苗生产企业为研究对象，邀请到 10 位来自生物医药研究领域，工作 5 年以上的中级职称以上人员或工作 8 年以上的质量管理人员参加调查，利用 1-9 标度法[18]对已构建的风险评价指标体系的不同指标进行打分，

并运用 AHP 进行统计分析，依次计算指标体系中准则层（Y）对目标层（X）的 8 个一级指标权重，指标层（Z）对准则层（Y）的 28 个二级指标权重。综合权重为一级指标权重乘以二级指标权重的结果，指标权重计算情况见表 2。

表 2 评价指标体系各指标权重情况

Tab.2 Index weight from all levels of evaluation index system

准则层（Y）	一级指标权重	*CR*	指标层（Z）	二级指标权重	*CR*	综合权重	排序
生产控制活动风险 A	0.0401		采购环节控制不稳定 A1	0.1176		0.0047	25
			生产环节控制不稳定 A2	0.5175		0.0208	16
			储运环节控制不稳定 A3	0.0611	0.0051	0.0025	27
			废弃物处理环节控制不稳定 A4	0.3038		0.0122	19
人员风险 B	0.0708		安全意识和水平不到位 B1	0.0960		0.0068	24
			健康状况不稳定 B2	0.4658	0.0103	0.0330	13
			应激反应能力不稳定 B3	0.1611		0.0114	20
			个体安全防护不到位 B4	0.2771		0.0196	17
仪器设备与化学品风险 C	0.0218		安全监测和报警装置不到位 C1	0.5115		0.0112	21
			设备安全防护水平不稳定 C2	0.3146	0.0069	0.0069	23
			危化品的储存使用不到位 C3	0.1160		0.0025	26
			危化品的监管不到位 C4	0.0580		0.0013	28
产品质量风险 D	0.1812	0.0238	生产体系不稳定 D1	0.5571		0.1009	3
			成品检测不到位 D2	0.3202	0.0092	0.0580	7
			标准执行情况不到位 D3	0.1226		0.0222	15
治理和文化风险 E	0.2022		治理能力不稳定 E1	0.2973		0.0601	6
			企业文化不完善 E2	0.1638	0.0046	0.0331	12
			管理者素质波动 E3	0.5390		0.1090	2
战略和目标风险 F	0.2204		社会责任不到位 F1	0.1638		0.0361	10
			目标设定不到位 F2	0.2973	0.0046	0.0655	5
			持续改进能力不到位 F3	0.5390		0.1188	1
审阅和修订风险 G	0.1145		内外环境评估不到位 G1	0.1976		0.0226	14
			内外部信息沟通不稳定 G2	0.3119	0.0269	0.0357	11
			运行情况审查不到位 G3	0.4905		0.0562	8
应急管理风险 H	0.1491		隐患排查和整改不到位 H1	0.1165		0.0174	18
			定期应急演练不到位 H2	0.0660	0.0853	0.0098	22
			问责机制不到位 H3	0.2467		0.0368	9
			应急管理硬件不稳定 H4	0.5708		0.0851	4

根据表 2 的计算结果，评价指标体系各级判断矩阵的一致性检验均 $CR<0.1$，说明权重结果是合理可信的，可以作为后续综合评价的研究基础。

由计算结果可知，准则层（Y）对目标层（X）的 8 个一级指标权重：

$$\omega = [0.0401, 0.0708, 0.0218, 0.1812, 0.2022, 0.2204, 0.1145, 0.1491] \quad (12)$$

指标权重大小排序为：战略和目标风险＞治理和文化风险＞产品质量风险＞应急管理风险＞审阅和修订风

险＞人员风险＞生产控制活动风险＞仪器设备与化学品风险，表明多数专家认为在该疫苗品种风险评价中，战略和目标风险、治理和文化风险、产品质量风险是重点关注的风险领域。指标综合权重是指标层（Z）对目标层（X）的权重，权重较高影响较大的指标分别为：持续改进能力不到位（0.1188）、管理者素质波动（0.1090）、生产体系不稳定（0.1009）、应急管理硬件不稳定（0.0851）、目标设定不到位（0.0655）、治理能力不稳定（0.0601）、成品检测不到位（0.0580）、运行情况审查不到位（0.0562），这些指标应作为该疫苗品种风险管理时重点关注的评价指标。

3.3 基于 FCE 的指标综合评价

通过文献查阅和专家咨询结果，将风险评价指标体系中的各项指标分为 5 个等级，确定的评价集为：

$V=[V_1，V_2，V_3，\ldots，V_5]$ （13）

其中，5 个等级分别为：低风险（$V1$），较低风险（$V2$），中等风险（$V3$），较高风险（$V4$），高风险（$V5$）。对应的评价分数集设置为：

$Z=[1，3，5，7，9]$ （14）

邀请上述 10 位专家，对 A 疫苗生产企业的评价指标体系各二级指标的风险等级进行评分，综合得到二级指标的模糊评价矩阵，见表 3，并根据 FCE 计算综合隶属度。

表 3 评价指标体系各指标风险程度隶属度统计表

Tab.3 Statistics of subordination degree from all levels of evaluation index system

准则层（Y）一级指标	指标层（Z）二级指标	评价等级				
		低风险	较低风险	中等风险	较高风险	高风险
生产控制活动风险 A	采购环节控制不稳定 A1	0.2	0.3	0.4	0.1	0
	生产环节控制不稳定 A2	0.1	0.5	0.4	0	0
	储运环节控制不稳定 A3	0.1	0.3	0.3	0.2	0.1
	废弃物处理环节控制不稳定 A4	0.2	0.1	0.5	0.2	0
人员风险 B	安全意识和水平不到位 B1	0	0.5	0.3	0.2	0
	健康状况不稳定 B2	0.7	0.1	0.2	0	0
	应激反应能力不稳定 B3	0	0.3	0.5	0.2	0
	个体安全防护不到位 B4	0.5	0.2	0.2	0.1	0
仪器设备与化学品风险 C	安全监测和报警装置不到位 C1	0.4	0.2	0.2	0.2	0
	设备安全防护水平不稳定 C2	0.1	0.3	0.5	0.1	0
	危化品的储存使用不到位 C3	0.7	0.3	0	0	0
	危化品的监管不到位 C4	0.4	0.3	0.2	0.1	0
产品质量风险 D	生产体系不稳定 D1	0.5	0.3	0.2	0	0
	成品检测不到位 D2	0.7	0.1	0.2	0	0
	标准执行情况不到位 D3	0.7	0.2	0.1	0	0
治理和文化风险 E	治理能力不稳定 E1	0.4	0.3	0.1	0.2	0
	企业文化不完善 E2	0.3	0.3	0.4	0	0
	管理者素质波动 E3	0.7	0.2	0.1	0	0
战略和目标风险 F	社会责任不到位 F1	0.6	0.3	0.1	0	0
	目标设定不到位 F2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2
	持续改进能力不到位 F3	0.1	0.5	0.2	0.2	0
审阅和修订风险 G	内外环境评估不到位 G1	0	0.3	0.3	0.4	0
	内外部信息沟通不稳定 G2	0.2	0.5	0.3	0	0
	运行情况审查不到位 G3	0.2	0.5	0.3	0	0

应急管理风险 H	隐患排查和整改不到位 H1	0	0.2	0.5	0.1	0.2
	定期应急演练不到位 H2	0.2	0.7	0.1	0	0
	问责机制不到位 H3	0	0.4	0.2	0.2	0.2
	应急管理硬件不稳定 H4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2

进而根据模糊综合评价运算，得到一级指标的模糊评价矩阵：

$$R=\begin{bmatrix}0.1421 & 0.3427 & 0.4243 & 0.0847 & 0.0061\\ 0.4646 & 0.1983 & 0.2579 & 0.0791 & 0.0000\\ 0.3405 & 0.2489 & 0.2712 & 0.1396 & 0.0000\\ 0.5885 & 0.2237 & 0.1877 & 0.0000 & 0.0000\\ 0.5454 & 0.2461 & 0.1492 & 0.0595 & 0.0000\\ 0.1819 & 0.3781 & 0.2134 & 0.1673 & 0.0595\\ 0.1605 & 0.4605 & 0.3000 & 0.0790 & 0.0000\\ 0.1274 & 0.3394 & 0.1713 & 0.1752 & 0.1868\end{bmatrix} \quad (15)$$

同时，根据前述 AHP 权重计算结果，一级指标权重：

$$\omega=[0.0401,0.0708,0.0218,0.1812,0.2022,0.2204,0.1145,0.1491] \quad (12)$$

根据模糊综合运算，评价矩阵 B 计算结果为：

$$B=[0.3404,0.3101,0.2122,0.0961,0.0412] \quad (16)$$

再根据评价分数集进行综合评价分数计算，可以得出风险值：

$$Q=B\times Z=3.3753 \quad (17)$$

该风险值介于 3 和 5 之间，说明按照评价分数集的设置规则，可以判断 A 疫苗生产企业处于中等风险水平。

同理，计算准则层（Y）一级指标的风险值，并与每个指标的权重相乘进行加权风险值的计算，亦可得到指标层（Z）二级指标的风险值和加权风险值，如下表 4 所示：

表 4 评价指标体系各指标风险值

Tab.4 Risk value from all levels of evaluation index system

准则层（Y）一级指标	风险值	加权风险值	排序	指标层（Z）二级指标	风险值	加权风险值	排序
生产控制活动风险 A	3.9399	0.1580	7	采购环节控制不稳定 A1	3.8	0.0179	25
				生产环节控制不稳定 A2	3.6	0.0749	14
				储运环节控制不稳定 A3	4.8	0.0120	26
				废弃物处理环节控制不稳定 A4	4.4	0.0537	19
人员风险 B	2.90316	0.2055	6	安全意识和水平不到位 B1	4.4	0.0299	22
				健康状况不稳定 B2	2.0	0.0660	16
				应激反应能力不稳定 B3	4.8	0.0547	18
				个体安全防护不到位 B4	2.8	0.0549	17
仪器设备与化学品风险 C	3.42002	0.0746	8	安全监测和报警装置不到位 C1	3.4	0.0381	21
				设备安全防护水平不稳定 C2	4.2	0.0290	23
				危化品的储存使用不到位 C3	1.6	0.0040	27
				危化品的监管不到位 C4	3.0	0.0039	28
产品质量风险 D	2.19812	0.3983	5	生产体系不稳定 D1	2.4	0.2422	4
				成品检测不到位 D2	2.0	0.1160	10
				标准执行情况不到位 D3	1.8	0.0400	20
治理和文化风险 E	2.44572	0.4945	3	治理能力不稳定 E1	3.2	0.1923	7
				企业文化不完善 E2	3.2	0.1059	12
				管理者素质波动 E3	1.8	0.1962	6

				社会责任不到位 F1	2.0	0.0722	15
战略和目标风险 F	4.08902	0.9012	1	目标设定不到位 F2	5.4	0.3537	3
				持续改进能力不到位 F3	4.0	0.4752	1
				内外环境评估不到位 G1	5.2	0.1175	9
审阅和修订风险 G	3.5952	0.4117	4	内外部信息沟通不稳定 G2	3.2	0.1142	11
				运行情况审查不到位 G3	3.2	0.1798	8
				隐患排查和整改不到位 H1	5.6	0.0974	13
				定期应急演练不到位 H2	2.8	0.0274	24
应急管理风险 H	4.90922	0.7320	2	问责机制不到位 H3	5.4	0.1987	5
				应急管理硬件不稳定 H4	4.8	0.4085	2

从上表可以得出，在准则层（Y）中，风险值较高的前三个一级指标为：战略和目标风险、应急管理风险和治理和文化风险，需要引起重视和关注。细化到指标层（Z）二级指标中，风险值较高的前八个二级指标分别为：持续改进能力不到位、应急管理硬件不稳定、目标设定不到位、生产体系不稳定、问责机制不到位、管理者素质波动、治理能力不稳定、运行情况审查不到位，需要及时关注这些风险，并制定措施有效控制风险，避免风险可能产生的损失。

4 风险防控与管理提升策略

根据实证研究结果，针对 A 疫苗生产企业，探索到风险值较高的 3 个准则层指标和 8 个指标层指标。实证数据提示该疫苗企业应在众多可能产生的风险中重点关注这些风险，从管理提升策略出发，尤其关注战略、应急、文化、产品维稳、审查等重点内容。

4.1 重视战略目标管理

在战略目标管理中，需要重点防范持续改进能力与目标设定不到位的风险。针对持续改进能力不到位的风险：首先要及时捕捉市场需求变化，并结合使用者即接种人群的反馈，将需求转化为疫苗新产品的研发、保障持续满足市场需求。其次，鼓励全员参与质量改进活动，真正实现产品质量的可持续。此外，持续保障信息系统的完善和建设，推动企业内外部的沟通与资源交流。针对目标设定不到位的风险：要做好充足的环境分析，遵循成本效益原则，明确所选择的战略目标与企业承担的风险能力相匹配，并形成具体的、可衡量的、可挑战的业务目标，与企业的使命、愿景和核心价值观保持一致。

4.2 完善应急管理能力

在完善应急管理能力中，需要重点关注应急管理硬件不稳定与问责机制不到位的风险。针对应急管理硬件不稳定的风险：确认定期采购应急救援物资和设备，以防范高温、火灾、有毒溶剂等影响安全的因素。同时，认真安装和定期检查，防止应急管理硬件不起作用或发生差错，还须定期进行应急演习，切实提高全体人员自求能力。针对问责机制不到位的风险：在生产环节，重点围绕生产人员、仪器设备、物料管理、工艺操作、生产环境等方面质量管理工作和细节内容制定问责机制。在流通环节，严格监控销售业务、落实疫苗企业强制责任险、完善疫苗批签发抽样制度、实时监控储存和运输冷链，并对相应内容细化问责机制。

4.3 提升文化治理水平

提升文化治理水平中，要重点防范管理者素质波动和治理能力不稳定的风险。针对管理者素质波动的风险：首先，应明确管理者具备查找公司管理问题、整合风险管理、推动审查机制的能力。其次，管理者应适时推动建立和完善疫苗企业管理的运营架构。再有，通过吸引、发展、奖励等措施满足管理者实际需求，在企业内部培养和留住管理人才。针对治理能力不稳定的风险：应强调管理层对风险的监督管理，明确监督原则，能够及时纠正管理偏见，并突出强调治理文化的融入，将问责机制、沟通渠道和偏差管理与之有机结合。

4.4 维稳产品质量核心

产品质量是疫苗生产企业的生命线，针对生产体系不稳定的风险，例如来源于微粒和微生物等环境中的污染风险，以及洁净区中人员和物品等对产品造成的交叉污染等，应进行严格控制与管理，从而在生产过程中避免

接种污染、培养污染、收获污染、传代污染等方面带来的污染风险，以及压力管理故障、温度控制故障、监测数据不对称等带来的环境风险，严格保障疫苗产品的质量。

4.5 严把运行审查功能

针对运行情况审查不到位的风险，首先，通过监督和考核等形式做好体系运行情况监控，内部定期进行内审和管理评审，外部定期接受审查，对审查过程中的原始数据、分析记录等资料进行审核，并加强内部整改和管理完善。其次，要重点关注趋势性指标的分析研究和数据完整性、可靠性，对关键质量指标进行持续监测。

5 结语

风险管理是疫苗企业在战略设计、机会识别、创造和维护价值过程中不可或缺的关键内容。风险评价是风险管理的一个重要环节。基于 COSO-ERM 视角的疫苗企业风险评价体系能够以较好的量化风险指标得出客观的评价结果，鼓励疫苗企业对目标设定、应急处理、风险识别、文化提升、内控管理、信息监控等全链条角度进行有效变革，从而推动疫苗产业高质量发展。

参考文献

[1]郭舒杨, 邱晓, 金苏, 等. 已上市疫苗生产变更研究相关问题探讨 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(08): 1013-1016.

[2]刘璐璐. 我国疫苗生产企业的发展策略研究 [J]. 中国市场, 2023, (09): 103-105.

[3]曾宪奎. 后疫情时代我国产业链动态安全性问题研究 [J]. 湖北社会科学, 2022, (08): 74-80.

[4]郭玲玲, 吴晓英, 刘小兰, 等. 医院感染风险评估及 COSO-ERM 优化管理体系研究 [J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(09): 829-836.

[5]吕宏艳. 浅述 coso 新框架下企业内部控制与风险管理的思考 [J]. 现代经济信息, 2019, (01): 40+42.

[6]舒伟, 左锐, 陈颖, 等. COSO 风险管理框架的新发展及其启示 [J]. 西安财经学院学报, 2018, 31(05): 41-47.

[7]黄怡然, 刘丽琴. COSO-ERM 框架下高校采购业务内部流程风险管理 [J]. 实验室研究与探索, 2019, 38(11): 290-293.

[8]李俊龙, 谭涛. 研究与开发机构科技创新效率测度及提升对策——基于数据包络分析和 Malmquist 指数法 [J]. 科技管理研究, 2023, 43(04): 94-99.

[9]田浩国, 高山, 杨令. 基于三阶段数据包络分析模型的苏浙沪皖经济圈医院运行效率研究 [J]. 中国卫生资源, 2023, 26(01): 61-65.

[10] 任赛赛, 张志清, 潘为高, 等. 基于聚类分析和主成分分析的不同产地龙船花全草质量评价 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(11): 4225-4232.

[11] CHEN H X, ZHANG L, ZOU W J, et al. Regional differences of air pollution in China: comparison of clustering analysis and systematic clustering methods of panel data based on gray relational analysis [J]. Air Qual Atmos Health, 2020, 13(10): 1257-1269.

[12] 沈绮云, 欧阳河, 欧阳育良. 产教融合目标达成度评价指标体系构建——基于德尔菲法和层次分析法的研究 [J]. 高教探索, 2021, (12): 104-109.

[13] AJAYI O G, NWADIALOR I J, ODUMOSU J O, et al. Assessment and delineation of groundwater potential zones using integrated geospatial techniques and analytic hierarchy process [J]. Applied Water Science, 2022, 12(12): 276.

[14] 吕晨, 涂天诚, 杨天一, 等. 多校区高校创新型人才培养模式选择探析——基于层次分析法和熵权法的分析 [J]. 中国高校科技, 2022, (07): 55-60.

[15] 刘引鸽, 杨雨欣, 包江川, 等. 基于模糊综合指数法的陕西省水资源脆弱性评价 [J]. 水资源与水工程学报, 2022, 33(06): 18-27.

[16] 孟凡兴, 杨明, 王浩, 等. 基于 AHP-FCE 的辐射事故应急演习评估研究 [J]. 核技术, 2022, 45(11): 70-79.

[17] 王莉, 马衔青, 王涛, 等. 基于 IAHP-熵权法和模糊综合评价法的市政有限空间气体安全风险评价 [J]. 科学技术与工程, 2023, 23(03): 1319-1325.

[18] 任云良. 基于 1-9 标度法的交互性资产绩效管理评价体系 [J]. 实验技术与管理, 2017, 34(11): 259-262.

大陆首例 Dinutuximab beta 治疗神经母细胞瘤药学监护

邹俊[1]，樊利春，[1]袁晓军[2]，顾硕[3]，钱晓文[4]，李艳[1]，吴维学[1]，王仁媛[1]

1、海南省妇女儿童医学中心(复旦大学附属儿科医院海南分院)，海口 57031；2、上海交通大学医学院附属新华医院，上海 200092；3、海南医学院第一附属医院，海口 570102； 4、复旦大学附属儿科医院，上海 201102；

【摘要】目的：海南省妇女儿童医学中心与上海新华医院、百济神州生物科技有限公司启动针对神经母细胞瘤项目，中国大陆首例 GD2 单抗 Dinutuximab beta 于 2020 年 11 月在海南省妇女儿童医学中心乐城分院使用；为大陆首例达妥昔单抗β注射液（Dinutuximab beta）治疗神经母细胞瘤进行药学监护。**方法：**查询 2012 抗肿瘤药物临床试验终点技术指导原则、2016 儿科人群药物临床试验技术指导原则、2017 成人用药数据外推至儿科人群的技术指导原则等制定患儿用药剂量。**结果：**首次使用 Dinutuximab beta 面临国外已报道的风险和各种未知风险，首例患儿每周期前 10 天内连续输注给药（共 240 小时），不良反应轻微可控，Dinutuximab beta 药代动力学优势显著，相同累积给药剂量下带来 3-4 倍药物曝露，短期给药谷浓度≥1μg/ml，持续激活抗体效应机制长达 6 个月。**结论：**数据显示可显著提升神经母细胞瘤患者的 5 年无事件生存率及总生存率，2021 年 8 月达妥昔单抗β（Dinutuximab beta，又称：迪妥昔单抗）注射液获得中国国家药品监督管理局（NMPA）批准上市(国药准字 SJ20210023)，适用于：1）治疗≥12 月龄的高危神经母细胞瘤患者，这些患者既往接受过诱导化疗且至少获得部分缓解，并且随后进行过清髓性治疗和干细胞移植治疗；2）治疗伴或不伴有残留病灶的复发性或难治性神经母细胞瘤。

【关键字】神经母细胞瘤；达妥昔单抗β；药学监护；药代动力学

Activity-preserved stabilization of mRNA lipoplexes by lyophilization in dextran solution for room temperature storage

Mu He, Uday Kumar Chinta, Fei Wu and Tuo Jin*

School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, 800 Dongchuan Road, Shanghai 200240, China

【**Abstract**】While mRNA vaccines have been proven to be highly effective for preventing and/or symptom-relieving of infective diseases during the pandemic of COVID-19, their stability (the needs of cold chain) and chemotoxicity (from the cationic excipients) remain issues of concern. Here, we report an easily achievable formulation method, lyophilization in a dextran solution, to stabilize mRNA lipoplexes by which room temperature storage of mRNA nano-formulations may become feasible.

【**Keywords**】 dextran, mRNA vaccine, thermal stability, *in vitro* transfection

The success of mRNA vaccines in responding and ending the pandemic of COVID-19 has sparked active discussions of further applications and improvement of these nucleic acid medicines.[1, 2] In terms of improvement, an issue that the COVID-19 mRNA vaccines by Pfizer-BioNTech and Moderna had to be stored at -70°C and -20°C, respectively, to achieve 6 months shelf life were frequently raised.[3] In order to enable mRNA vaccine formulations to stand at ambient temperature, scientists reported several methods including powder technology, stabilizing agents and freeze drying.[4-6] We tried an easily achievable formulation method, lyophilizing mRNA lipoplexes in a dextran solution, to "lock" the nanostructure of mRNA/lipid in the matrix of the polysaccharide, and found that transfection activity of the mRNA was well preserved in room temperature when Luciferase mRNA was used as the reporting reagent.

Dextran 70k was chosen in this study because of its proven biocompatibility as blood substitute since the Second World War. It is widely used in biomedical applications nowadays.[7, 8] We first formulated Luciferase mRNA with a commercial reagent, Lipofectamine MessegerMax, to nano-lipoplexes according to the manual of MessengerMax, then suspended the sample in dextran 70k solutions to various dextran concentrations (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, w/v). The suspensions were frozen at -40°C overnight and lyophilized for 24 hours. The lyophilized products were stored at ambient temperature for 3 days, respectively, prior to transfection activity examination. HeLa and HEK 293 cell lines were chosen to assay transfection rate of the lipoplexes stored in the dextran matrix of various dextran contents. The luciferase signals were detected by using Luciferase Assay System 24 hours post transfection and cell viability was analyzed by CellTiter-Fluor at the same time. As summarized **Figure 1**, Luciferase activity was 100% preserved for the lipoplexes suspended in the dextran-70k solution of 2% or above. Transfection activity was greatly compromised for the lipoplexes suspended in the dextran concentration of reduced concentration (1%). That suspended in 0% dextran centration was completely inactive. The lipoplexes suspended in the dextran solutions of 2%, 3% and 4% showed a transfection activity remarkably higher than the freshly prepared control (**Figure 1**). We would attribute this "over activity" to experiment error between two sampling systems, while the "lower activity" of the lipoplex suspended in the dextran concentration of higher stored may be due to reduced cell growth rate in viscous dextran solutions.[9]

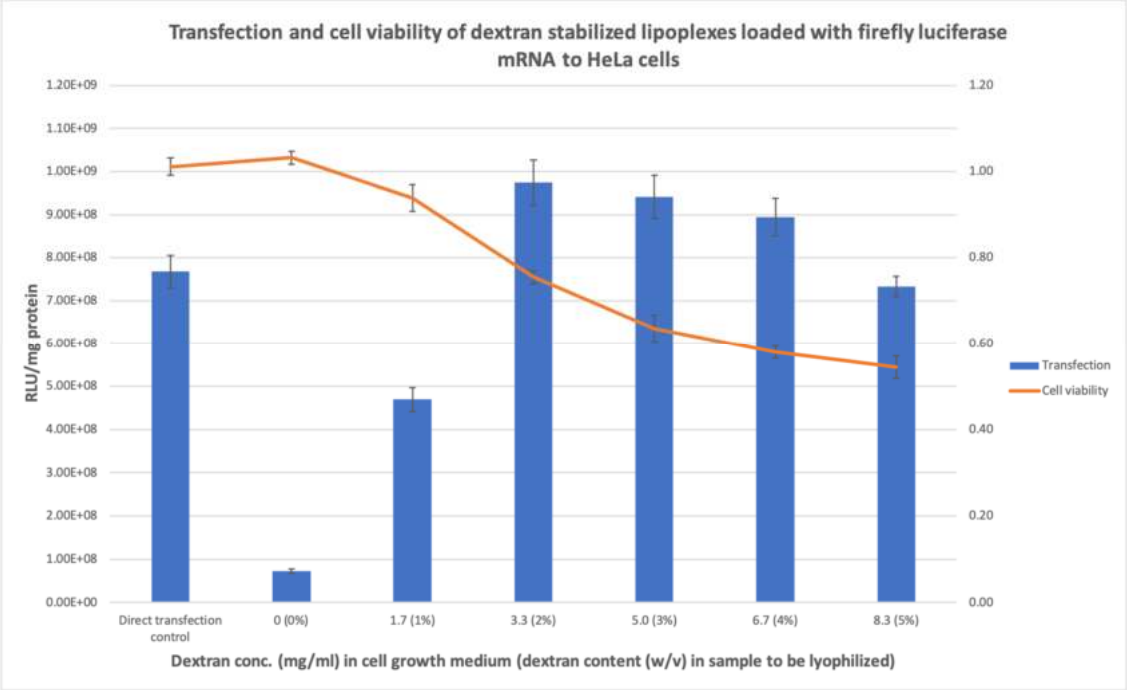


Fig. 1 transfection and cell viability results of dextran stabilized lipoplexes loaded with firefly luciferase mRNA to HeLa cells

In conclusion, lyophilization in dextran solution may represent an effective yet easy achievable way resolve the stability and cold chain issue of mRNA vaccines.

Acknowledgement

We thank BioDosage Tech Co., Ltd. for funding this research.

Reference

1.M. W. Tenforde, W. H. Self, K. Adams, M. Gaglani, A. A. Ginde, T. McNeal, S. Ghamande, D. J. Douin, H. K. Talbot and J. D. Casey, *Jama*, 2021, 326, 2043-2054.

2.M. J. Hogan and N. Pardi, *Annual review of medicine*, 2022, 73, 17-39.

3.A. J. Barbier, A. Y. Jiang, P. Zhang, R. Wooster and D. G. Anderson, *Nature biotechnology*, 2022, 40, 840-854.

4.K. D. Popowski, A. Moatti, G. Scull, D. Silkstone, H. Lutz, B. L. de Juan Abad, A. George, E. Belcher, D. Zhu and X. Mei, *Matter*, 2022, 5, 2960-2974.

5.P. Zhao, X. Hou, J. Yan, S. Du, Y. Xue, W. Li, G. Xiang and Y. Dong, *Bioactive materials*, 2020, 5, 358-363.

6.M. N. Uddin and M. A. Roni, *Vaccines*, 2021, 9, 1033.

7.U. Klotz and H. Kroemer, *Clinical pharmacokinetics*, 1987, 12, 123-135.

8.E. Díaz-Montes, *Polysaccharides*, 2021, 2, 554-565.

9.M. S. Croughan, E. S. Sayre and D. I. Wang, *Biotechnology and bioengineering*, 1989, 33, 862-872.

圣和药业
SANHOME

南京圣和药业股份有限公司
NANJING SANHOME PHARMACEUTICAL CO.,LTD.

圣 和 的 使 命	让更多的人享受健康的快乐
圣 和 的 愿 景	通过帮助患者延长生命周期，提高生活质量， 让圣和成为医生和患者最值得信赖的企业
圣 和 的 目 标	成为世界一流的制药企业
圣和的核心价值观	以客户为中心，以高绩效的奋斗者为根本， 长期坚持艰苦奋斗与自我批评
圣和的七大法宝	客户第一、绩效为先、诚信正直、团队合作、 自我批判、快速执行、拥抱变化
圣和的经营方针	营销是龙头、研发是源动力、质量是生命线、 守法合规是底线

让更多的人享受
健康的快乐



圣和药业 SANHOME

南京圣和药业股份有限公司



企业简介

圣和药业是一家集新药研发、药品生产和自主学术推广为一体的国家重点高新技术企业，有员工近两千人,其中具有大学以上学历的员工占87%以上，博士、硕士数百人，企业从事创新药研发的专业科研人员400余人。公司在南京建有独立的研发中心、生产基地和原料药生产基地，并在云南建有野生中药材种植基地。

圣和以“让更多的人享受健康的快乐”为使命，坚持“以客户为中心，以高绩效的奋斗者为根本，长期坚持艰苦奋斗与自我批评”的核心价值观，构建了以产品与创新、运作与交付及销售与服务三大业务板块为核心，各职能部门为支撑的医药价值链体系，致力实现“成为世界一流的制药企业”的企业目标，努力为振兴民族医药工业，为人类健康事业谱写新的篇章。

成为世界一流的制药企业

我们以科学引领创新，

探索、开发具有全球突破性的医疗药物，

从而研发并制造出更安全更有效的药品;

以创新引领未来，

以全球化战略眼光引领行业前瞻发展，

成为世界一流的制药企业。