



- ◎ 《中国学术期刊网络出版总库》(CNKI) 收录
- ◎ 《国家科研论文集中发布平台》收录
- ◎ 《万方数据知识服务平台》收录
- ◎ 《中文科技期刊数据库》收录
- ◎ 《超星“域出版”平台》收录
- ◎ 《中国核心期刊(遴选)数据库》收录
- ◎ 《中国学术期刊影响因子年报》统计源期刊

ISSN 2095-4646

CN 42-1839/R

# 湖北科技学院学报

JOURNAL OF HUBEI UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

## 医学版

MEDICAL SCIENCES

第39卷 第5期  
总第(197)期  
Vol.39 No.5  
**2025**

**5**

中国·咸宁  
XIANNING CHINA



## 湖 科 学 人

**朱 蕤**，女，1983年8月出生，湖北咸宁人，中共党员，医学博士，教育部高等学校青年骨干教师国内访问学者，副教授，硕士生导师。

2004年本科毕业于湖北大学生物技术专业，2007年硕士毕业于华中科技大学微生物学专业，2015年博士毕业于武汉大学

病原生物学专业。2007年至今湖北科技学院医学部基础医学院医学微生物学教研室任教，现任口腔与眼视光医学院院长助理。兼任中国微生物学会委员，湖北微生物学会理事会青年委员，湖北微生物学会医学微生物专委会委员，湖北省微生物与免疫学分会常务委员，湖北省预防医学会微生态分会委员。

近年研究方向为炎性肠病及相关结直肠癌药物开发及分子机制。先后主持湖北省自然科学基金项目2项，湖北省教育厅科研项目2项，湖北省卫生健康委员会面上项目1项，咸宁市科技局项目1项，横向项目1项。以第一作者或通信作者发表高水平论文12篇。指导学生大学生创新创业计划项目国家级1项，省级1项。指导学生学科竞赛获省级三等奖三项，优秀奖一项。荣获“咸宁市香城人才”“湖北科技学院双师双能型教师”“先进工作者”等荣誉称号。



# 目 次

## 药学研究

- 青砖茶水提取物对小鼠急性胃溃疡保护作用研究 ..... 熊方,王乐,郑敏,等(369)
- 草甘膦经LRH-1/SR-B1通路加重小鼠胆固醇结石的机制 ..... 王贝贝,赵雪,晏彪,等(374)
- 棕榈酸通过抑制AMPK-Nrf2/HO-1轴诱导大鼠心肌细胞铁死亡 ..... 凌莉,任展宏,王定森,等(380)
- 白桦脂酸通过下调c-Myc抑制宫颈癌SIHA细胞的增殖与迁移 ..... 祝巧云,朱波(386)
- 竹节参总皂苷调节自噬减轻PFOS暴露所致PC12细胞损伤的研究 ..... 刘慧敏,皮雪姣,王婷,等(391)
- 三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌的作用机制研究 ..... 谢孟婷,刘复兴,宁志丰,等(396)
- (S)-2-氰基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐的合成 ..... 刘春燕,李倩,郭丽媛,等(401)
- 柚皮苷微孔渗透泵片的制备研究 ..... 陈媛媛,张瀚锴,要辉,等(406)
- 多巴丝肼片在中国健康人体内的生物等效性研究 ..... 尹咸森,宋欢,甘方良,等(412)

## 基础医学研究

- PVA/PSBMA/AgNPs两性离子水凝胶伤口敷料的辐射制备及其抗菌抗污性能研究 .....  
..... 周士忠,张洋林,李月生,等(416)
- 阳离子聚合物基医用多功能水凝胶敷料的制备及其性能研究 ..... 李甲,王彩,郑敏,等(422)

## 临床医学研究

- MHD 患者发生抗生素脑病的临床特征及预测模型的构建与评价 ..... 饶少锋,吴丽民,吴 旦,等(428)
- BMAL1 基因与吸烟及高血压交互作用对 T2DM 的影响 ..... 钟欣恬,常微微,方正美,等(434)
- NOC2L、SLFN11 在结直肠癌中的检测及其临床价值研究 ..... 郭振南,祝 凯,张万里,等(439)

## 护理学研究

- 健康教育结合营养干预在慢阻肺肺部感染患者中的应用效果评价 ..... 张 孟,朱 静,赵 欣(443)
- 预见性护理在小儿外周静脉留置针输液中的应用分析 ..... 曹 雪(448)

## 综 述

- 卒中后认知障碍的研究进展及针灸治疗现状 ..... 郑泽颖,叶清景(451)
- 二氢杨梅素治疗糖尿病及并发症的研究进展 ..... 黄兴琼,张丹丹,张胜南,等(456)

封二:湖科学人/朱 蕤

封三:《湖北科技学院学报(医学版)》稿约

责任编辑 丁 磊 陈拥彬  
英文审校 汪 雯 蔡 飞  
                  欧阳昌汉 莫启贵  
统计学审稿 陈子敏

CONTENTS OF MAIN ARTICLES

**Study on the Protective Effect of Qingzhuan Dark Tea Water Extract on Acute Gastric Ulcers in Mice** .....  
..... *XIONG Fang, WANG Le, ZHENG Min, et al*(369)

**Glyphosate Exacerbated Mouse Cholesterol Gallstones via the LRH-1/SR-B1 Pathway** .....  
..... *WANG Bei-bei, ZHAO Xue, YAN Biao, et al*(374)

**Palmitic Acid Induced Ferroptosis in Rat Cardiomyocytes by Inhibiting the AMPK-Nrf2/HO-1 Axis** .....  
..... *LING Li, REN Zhan-hong, WANG Ding-miao, et al*(380)

**Betulinic Acid Inhibits the Proliferation and Migration of Cervical Cancer SIHA Cells Through Downregulation of c-Myc Protein** .....  
..... *ZHU Qiao-yun, ZHU Bo*(386)

**Effect of Saponins from *Panax Japonicus* on Autophagy after PFOS Exposure in PC12 Cells** .....  
..... *LIU Hui-min, PI Xue-jiao, WANG Ting, et al*(391)

**A Study on the Mechanism of Trifluoperazine Dihydrochloride in Prostate Cancer** .....  
..... *XIE Meng-ting, LIU Fu-xing, NING Zhi-feng, et al*(396)

**Synthesis of (S)-2-Cyano-4,4-Difluoro-Pyrrolidine p-Toluenesulfonate** .....  
..... *LIU Chun-yan, LI Qian, GUO Li-yuan, et al*(401)

**Preparation of Naringin Microporous Osmotic Pump Tablets** .....  
..... *CHEN Yuan-yuan, ZHANG Han-lei, YAO Hui, et al*(406)

<b>Bioequivalence Study of Levodopa and Benserazide Hydrochloride Tablets in Healthy Chinese Subjects</b> .....	
.....	<i>YIN Xian-miao, SONG Huan, GAN Fang-liang, et al</i> (412)
<b>Radiation Preparation of PVA/PSBMA/AgNPs Amphoteric Hydrogel Wound Dressings and its Antibacterial and Antifouling Properties</b> .....	
.....	<i>ZHOU Shi-zhong, ZHANG Yang-lin, LI Yue-sheng, et al</i> (416)
<b>Preparation and Performance of Cationic Polymer-Based Medical Multifunctional Hydrogel Dressings</b> .....	
.....	<i>LI Jia, WANG Cai, ZHENG Min, et al</i> (422)
<b>Clinical Characteristics, Establishment and Evaluation of Prediction Model for Antibiotic-Associated Encephalopathy in Maintenance Hemodialysis Patients</b> .....	
.....	<i>RAO Shao-feng, WU Li-min, WU Dan, et al</i> (428)
<b>The Interaction of BMAL1 Gene with Smoking and Hypertension on the Impact of T2DM</b> .....	
.....	<i>ZHONG Xin-tian, CHANG Wei-wei, FANG Zheng-mei, et al</i> (434)
<b>Detection and Clinical Value of NOC2L and SLFN11 in Colorectal Cancer</b> .....	
.....	<i>GUO Zhen-nan, ZHU Kai, ZHANG Wan-li, et al</i> (439)
<b>Evaluation of the Effect of Health Education Combined with Nutritional Intervention in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Infection</b> .....	
.....	<i>ZHANG Meng, ZHU Jing, ZHAO Xin</i> (443)
<b>Analysis of the Application of Predictive Nursing in Indwelling Needle Infusion for Pediatric Peripheral Veins</b> .....	
.....	<i>CAO Xue</i> (448)
<b>Research Progress of Post-stroke Cognitive Impairment and the Current Situation of Acupuncture Combined Therapy</b> .....	
.....	<i>ZHENG Ze-ying, YE Qing-jing</i> (451)
<b>Research Progress of Dihydromyricetin in the Treatment of Diabetes Mellitus and its Complications</b> .....	
.....	<i>HUANG Xing-qiong, ZHANG Dan-dan, ZHANG Sheng-nan, et al</i> (456)

引文格式:熊方,王乐,陈勇,等.青砖茶水提取物对小鼠急性胃溃疡保护作用研究[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):369-373.

# 青砖茶水提取物对小鼠急性胃溃疡保护作用研究\*

熊方<sup>1,2</sup>,王乐<sup>1,2</sup>,陈勇<sup>1,2</sup>,谢琛<sup>1,2</sup>,胡晓茵<sup>3</sup>,冯露<sup>3</sup>,郑敏<sup>1,2\*\*</sup>

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100;2.湖北省智慧康养产业技术研究院;  
3.咸宁市公共检验检测中心)

**摘要:**目的 研究青砖茶水提取物(QDTE)对无水乙醇诱导小鼠急性胃溃疡的保护作用。方法 将40只昆明雄性小鼠随机分为空白组(Control组)、模型组(Model组)、阳性对照组(50mg/kg 硫糖铝,Sucralfate组)、QDTE给药组(2.56g/kg QDTE,QDTE组),Control组和Model组给予生理盐水,其余2组按相应药物剂量,1次/d,连续灌胃7d,最后一次给药2h后,除Control组给予等体积生理盐水,其余3组灌胃无水乙醇(10mL/kg)建立急性胃溃疡模型,1h后取材,计算溃疡指数、溃疡抑制率,测定血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX-2、PGE2含量。HE、PAS染色观察胃组织病理变化,免疫组化法测各组小鼠胃组织中表皮生长因子(EGF)蛋白表达水平。结果 与Control组相比,Model组小鼠溃疡指数明显上升,溃疡抑制率为0,血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX-2、PGE2含量升高( $P < 0.01$ ),HE染色可见Model组胃黏膜腺体结构破坏严重,伴有大量炎症细胞浸润,PAS染色显示阳性物质消失,黏蛋白损伤严重;与Model组相比,QDTE干预后降低了溃疡指数,提高溃疡抑制率,显著降低血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX-2、PGE2含量,增加胃黏膜组织EGF的阳性细胞表达( $P < 0.05$ )。结论 青砖茶水提取物对急性小鼠胃溃疡有一定的保护作用,能够促进黏膜再生修复以及降低炎症因子表达水平。

**关键词:**青砖茶;青砖茶水提取物;急性胃溃疡

中图分类号:R573

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0369-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025032601



## Study on the Protective Effect of Qingzhuan Dark Tea Water Extract on Acute Gastric Ulcers in Mice

XIONG Fang, WANG Le, ZHENG Min, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology,  
Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the protective effect of Qingzhuan Dark Tea Water Extract (QDTE) on acute gastric ulcer induced by absolute ethanol (AE) in mice. **Methods** Forty male Kunming mice were randomly divided into control group, model group, positive control group (50 mg/kg sucralfate, sucralfate group), and QDTE administration group (2.56 g/kg QDTE, QDTE group). Control group and model group were given normal saline, while the other two groups were given the corresponding drug doses once a day for 7 consecutive days. Two hours after the last administration, except for the control group which received an equal volume of normal saline, the other three groups were orally administered AE (10mL/kg) to establish an acute gastric ulcer model. One hour later, the samples were collected, and the ulcer index and ulcer inhibition rate were calculated. The contents of TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2, and PGE2 in serum were determined. The morphology and pathological changes of gastric tissue were observed by HE and PAS staining. The expression level of epidermal growth factor (EGF) protein in gastric tissue of each group was measured by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the ulcer index of mice in the model group significantly increased, the ulcer inhibition rate was 0, and the contents of TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2, and PGE2 in serum increased ( $P < 0.01$ ). HE staining showed that the glandular structure of gastric mucosa in model group was severely damaged, accompanied by a large number of inflammatory cell infiltrations. PAS staining showed that the positive substances disappeared and the mucin was severely damaged. Compared with the model group, QDTE intervention reduced the ulcer index, increased the ulcer inhibition rate, significantly reduced the contents of TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2, and PGE2 in serum, and increased the positive cell expression of EGF in gastric mu-

\* 基金项目:咸宁市重点科技研发项目(2021SFYF003);湖北科技学院科研创新团队项目(2023T10);湖北省智慧康养产业技术研究院专项(2022HX182)

\*\* 通信作者, E-mail:409581863@qq.com

cosa tissue ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** QDTE has a certain preventive and protective effect on acute gastric ulcer in mice, which may be related to reduce the expression levels of inflammatory factors and promote of gastric mucosal regeneration and repair.

**KEY WORDS:** Qingzhuan Dark Tea; Qingzhuan Dark Tea Water Extract; Acute gastric ulcer

胃溃疡主要由黏膜攻击因素与防御因素失衡引起,多发生在胃窦小弯侧和胃体处,临床表现为反复发作的周期性上腹疼痛<sup>[1-3]</sup>。胃溃疡的发生有多种诱因,常见不规律的饮食作息、吸烟、非甾体抗炎药不恰当使用等,长期的心理应激也会增加发病风险<sup>[4]</sup>。其中,酒精作为一种有机溶剂,能迅速破坏胃表面的黏膜层和黏膜细胞,导致胃黏膜代谢功能障碍<sup>[5]</sup>。目前用于治疗胃溃疡的常规药物包括质子泵抑制剂、H<sub>2</sub>受体拮抗剂和胃黏膜保护药<sup>[6]</sup>,虽然有比较显著的抑制胃酸分泌和中和胃酸的作用,但是以上药物大多采用化学方法制备而成,长期使用会给机体带来副作用,也会干扰胃部的正常生理功能<sup>[7]</sup>。青砖茶属于深度发酵的黑茶,由老青茶压制而成,外观多呈砖块样,是湖北咸宁赤壁的特产<sup>[8-9]</sup>。现代药理研究<sup>[10]</sup>表明,青砖茶不仅可以生津解渴、利尿解毒、消臭除菌,还具有广泛的药理作用,主要包括免疫调节、抗氧化、调节肠道菌群、降血糖、降脂等,长期饮用青砖茶可以一定程度上预防胃肠疾病。本文针对青砖茶水提物(QDTE)对急性乙醇性胃溃疡的预防保护作用进行探究,促进青砖茶药食两用保健品开发,为急性酒精性胃溃疡治疗提供有效的实验支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器

ME204E型电子天平(梅特勒公司);HH-4数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);Spectra Max 190-多功能酶标仪(美谷分子仪器有限公司);DZF-6022真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);冻台(武汉俊杰电子有限公司);移液枪(武汉塞维尔生物科技有限公司);正置光学显微镜(日本尼康);包埋机(武汉俊杰电子有限公司);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)。

### 1.2 药品及试剂

无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);硫糖铝(上海华源安徽仁济制药有限公司);TNF- $\alpha$ 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号YJ002095);IL-6试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号YJ063159);PGE<sub>2</sub>试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号YJ028719);COX-2试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号YJ037732);EGF抗体(Affinity,批号AF5148)。

### 1.3 动物

健康SPF级雄性昆明小鼠40只,体质量18~20g,由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物许可证号:SCXK(鄂)2020-0018。放于鼠笼饲养,昼夜交替,环境温度24℃~26℃,湿度40%~60%。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 青砖茶水提物的制备

参考相关文献<sup>[11]</sup>,根据实际情况进行修改后,取9年青砖茶(湖北省赵李桥茶厂有限责任公司,1.7kg/块)按照茶水比1:10,100℃水浸提30min,过滤收集滤液,真空冷冻干燥,制备茶叶提取物,密封包装,-20℃保存备用。

#### 1.4.2 动物分组给药及急性胃溃疡模型建立

40只雄性昆明小鼠适应性喂养一周后,随机分为4组,每组10只,分别为:空白组(Control组)、模型组(Model组)、阳性对照组(50mg/kg硫糖铝,Sucralfate组)、QDTE给药组(2.56g/kg QDTE,QDTE组),Control组和Model组给予生理盐水(10mL/kg),其余2组按相应药物剂量,1次/d,连续给药7d。人体每日的青砖茶饮用量为17g,依据《动物与人的每千克体重剂量折算系数表》转换成小鼠每天饮茶量,经计算小鼠每日灌胃青砖茶2.56g/kg<sup>[12]</sup>。灌胃给药期间每3天记录小鼠体质量变化以及进食饮水、毛发、大小便、精神状态等一般情况<sup>[13]</sup>。

造模前一天禁食禁水。末次灌胃给药后2h,除空白组外,其余各组灌胃无水乙醇(10mL/kg)建立急性胃溃疡模型,空白组给予等容积生理盐水灌胃,1h后摘眼球采血,颈椎脱臼处死小鼠。以小鼠胃组织可见明显胃黏膜充血和线性血斑判断成功建立小鼠急性胃溃疡模型<sup>[14]</sup>。

#### 1.4.3 样本采集

摘眼球取血,静置30min后,4℃、3000r/min离心20min,分离血清,-80℃保存。随后解剖取胃,沿胃大弯剪开,生理盐水冲洗后吸干、称重。观察胃黏膜损伤并拍照,切取10mm×2mm胃组织,4%多聚甲醛固定待镜检用,剩余组织生理盐水洗净,-80℃冻存备用。

#### 1.4.4 胃黏膜损伤评价

采用Image J软件分析胃黏膜图像,测量黏膜出血面积及总面积,按公式分别计算溃疡指数以及溃疡抑制率<sup>[15]</sup>。

胃溃疡指数/% = (胃黏膜出血面积/胃组织总面积) × 100%。

胃溃疡抑制率/% = (模型组溃疡指数-实验组溃疡指数)/模型组溃疡指数 × 100%<sup>[16]</sup>。

#### 1.4.5 胃组织病理观察

取部分小鼠胃组织于4%多聚甲醛溶液中固定,脱水后进行石蜡包埋,组织蜡块进行HE、PAS染色后于光学显微镜下观察胃组织病理改变。

#### 1.4.6 ELISA 检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX-2、PGE2 的含量

按照 ELISA 试剂盒说明书中操作方法进行检测。

#### 1.4.7 免疫组织化学方法检测胃黏膜 EGF 蛋白表达情况

取出经4%多聚甲醛固定的胃组织,按照说明书对胃组织石蜡切片进行免疫组化染色、中性树胶封片,于显微镜下观察。使用 Image J 软件分析光密度值。

#### 1.5 统计学方法

所有实验数据均以(均数 ± 标准差)表示,运用 Graphpad prism 8.0.2 进行统计学分析并绘图,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 青砖茶水提取物对小鼠生理行为及体质量的影响

由图 1A 可知,灌胃期间,各组小鼠身体和精神状态良好,能够自主进食饮水,大小便正常,饲养过程中无脱毛和死亡现象;除正常组外的各组小鼠经无水乙醇诱导后相继出现了应激反应(图 1B),表现为毛发湿冷、身体团缩、肢体协调性下降,提示造模成功。小鼠体重是评估其生长发育状况的直接指标,如图 1C 所示,青砖茶水提取物组小鼠体重与正常组有相同的变化趋势,表明水提取物对小鼠体重没有影响。

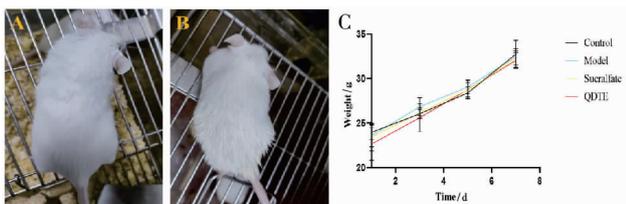


图 1 小鼠行为活动与体重变化

### 2.2 青砖茶水提取物对酒精诱导小鼠胃黏膜损伤保护作用的肉眼观察

由图 2 可知,大体观察胃组织形态学显示,正常组小鼠胃黏膜完整,胃壁光滑,无出血点,整体呈淡粉

色;与 Control 组相比,Model 组小鼠胃组织损伤严重,局部充血水肿并伴有明显的糜烂和大量线状及点状出血,说明无水乙醇诱导小鼠急性胃溃疡模型建立成功;与 Model 组相比,Sucralfate 组和 QDTE 组的黏膜损伤和充血红肿情况得到缓解,粘膜颜色接近淡粉色,只有个别出血点,未见溃疡、糜烂等情况。以上结果说明青砖茶水提取物对酒精性胃溃疡有较好的保护作用。

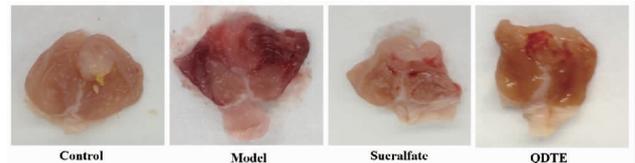
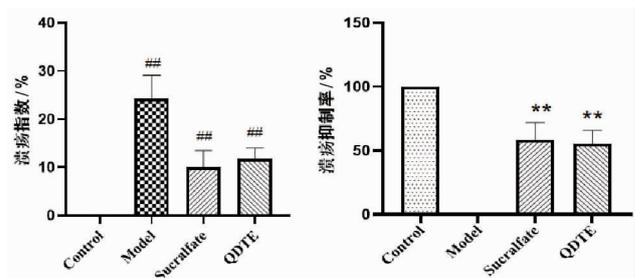


图 2 小鼠胃溃疡的宏观观察

### 2.3 青砖茶水提取物对酒精性胃黏膜损伤小鼠溃疡指数、溃疡抑制率的影响

由图 3 可知,与 Control 相比,Model 组溃疡指数显著增高( $P < 0.01$ ),表明乙醇诱导小鼠出现明显胃黏膜损伤;与 Model 组相比,Sucralfate 组和 QDTE 组均能显著降低胃黏膜溃疡指数( $P < 0.01$ );与 Control 相比,Sucralfate 组和 QDTE 组溃疡抑制率分别为 58.31% 和 55.14% ( $P < 0.01$ )。



与 Control 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较, ## $P < 0.01$ ;  $n = 10$ 。

图 3 小鼠溃疡指数与溃疡抑制率比较

### 2.4 青砖茶水提取物对酒精致小鼠胃黏膜损伤病理形态的影响

由图 4 可知,Control 组胃腺体结构完整光滑,黏膜上皮细胞排列整齐,无炎症细胞浸润,未见溃疡发生。Model 组小鼠胃黏膜腺体结构被严重破坏,大量炎症细胞浸润组织,说明造模成功且与现有研究结果一致<sup>[17]</sup>。说明过量饮酒会对胃黏膜造成严重损伤。相反,与 Model 组相比较,Sucralfate 组和 QDTE 组胃组织病理变化均有明显改善,溃疡周围黏膜形态趋于正常,见少量炎症细胞浸润,其中 QDTE 组结构完整性有所改善,炎症细胞积累和浸润较少,但仍有腺体排列紊乱。

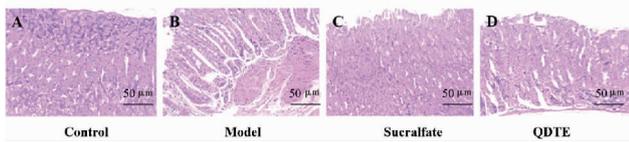


图4 各组小鼠胃组织病理学图

胃粘液中含有丰富的黏蛋白,生理情况下覆盖在胃黏膜表面起到抵御胃酸侵袭的作用,经PAS染色,粘蛋白显示为蓝紫色。由图5可知,Control组小鼠黏蛋白较完整,粘膜层覆盖大量的PAS阳性物;与Control组相比,Model组小鼠胃组织黏膜层上皮破损、PAS阳性物消失,黏蛋白损伤严重;与Model组相比,Sucralfate和QDTE组PAS阳性物均有不同程度表达,其中QDTE组表现为黏膜层的黏蛋白排列紧密,且具有一定的厚度,说明该组小鼠胃黏膜上皮再生和恢复能力强。

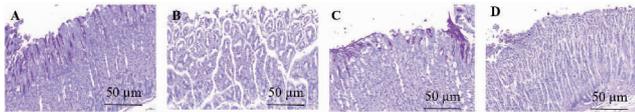
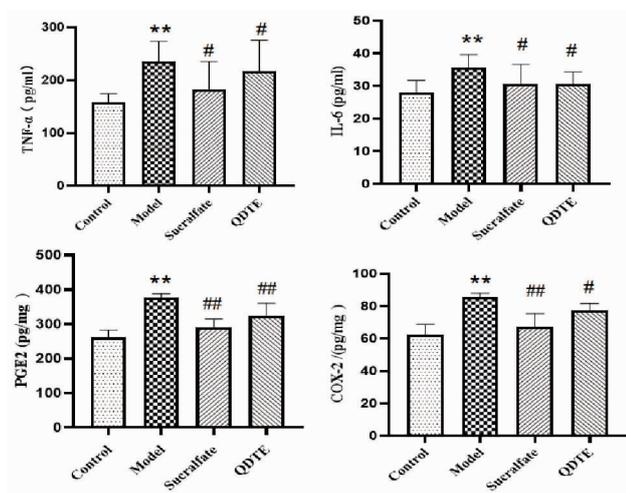


图5 各组小鼠胃组织PAS染色图

## 2.5 青砖茶水提取物对炎症因子的影响

TNF- $\alpha$  和 IL-6 是两种经典的促炎细胞因子,在胃黏膜损伤中发挥关键作用。生理情况下胃黏膜分泌的 COX-2 较少,胃组织受到刺激后会大量分泌,并且 COX-2 能够催化 PGE2 的合成。由图6可知,与Control组相比,模型组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、PGE2、COX-2 均显著升高 ( $P < 0.01$ )。与 Model 组相比,Sucralfate 和 QDTE 组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、PGE2、COX-2 水平显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

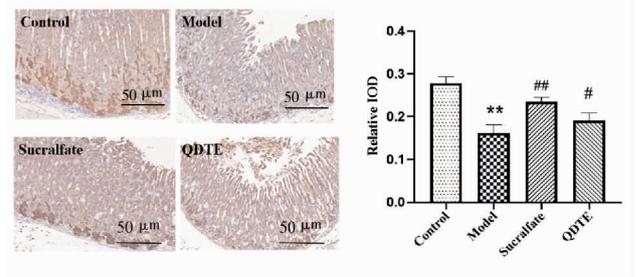


与Control组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与Model组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;  $n = 10$ 。

图6 各组小鼠血清中相关炎症因子含量的比较

## 2.6 免疫组化染色黏膜 EGF 蛋白表达情况

EGF 作为关键的胃黏膜保护因子,通过促进上皮细胞增殖和增强粘液分泌,有效加速黏膜修复。如图7所示,Control组中 EGF 主要在细胞质表达,阳性表达为棕色。与Control组比较,Model组胃黏膜 EGF 水平因酒精损伤而显著降低 ( $P < 0.01$ );与Model组相比,QDTE组小鼠胃黏膜中 EGF 水平增加 ( $P < 0.05$ ),Sucralfate组显著增加 ( $P < 0.01$ )。上述结果表明QDTE可影响 EGF 水平的表达并增强屏障功能,从而降低溃疡形成风险,这与上皮细胞的快速修复和粘液分泌的增加有关。



与Control组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与Model组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;  $n = 10$ 。

图7 各组小鼠胃组织 EGF 蛋白表达情况

## 3 讨论

酒精性胃溃疡模型是一种广泛应用于急性胃黏膜损伤的实验模型,可较大程度上模拟人类胃黏膜损伤的病理过程,常用于评估药物对胃的保护作用<sup>[18]</sup>。本研究显示,青砖茶水提取物可降低胃溃疡指数,提高溃疡抑制率。组织病理学结果显示,给予青砖茶水提取物预处理后,黏膜损伤轻微,炎症细胞积累和浸润较少,但仍有腺体排列紊乱,但与模型组相比,损伤情况得到改善;PAS染色显示,给予青砖茶水提取物预处理后,黏膜层的黏蛋白排列紧密,且具有一定的厚度,说明茶汤组小鼠胃黏膜上皮再生和恢复能力强。这些结果表明青砖茶水提取物对酒精引起的胃黏膜损伤有较好的保护作用。

研究表明,乙醇对胃黏膜的刺激可促进促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 分泌,炎症也是乙醇诱发胃损伤的机制之一<sup>[19]</sup>。血清中的 TNF- $\alpha$  作为炎症级联反应的始动因子,可通过激活免疫细胞和炎症通路触发早期炎症<sup>[20]</sup>。IL-6 作为典型的炎症细胞因子,在溃疡的发生过程中起重要作用<sup>[21]</sup>。本研究发现青砖茶水提取物能够下调促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平,抑制炎症的进一步发展,进而有效发挥胃黏膜保护效应。

生理情况下胃黏膜分泌的 COX-2 较少,在遭受外

来刺激的情况下则分泌增加;COX-2 是 PGE2 合成酶, PGE2 可促进黏膜修复,维持黏膜完整性,增强黏膜防御功能<sup>[22-23]</sup>。EGF 是一种重要的生物活性肽,可以抑制胃酸和胃酶的分泌,增加胃黏膜和糖蛋白的合成和分泌,维护胃黏膜的完整性。在本研究中,给予青砖茶水提物后,一定程度上降低了 COX-2、PGE2 的表达,并伴随 EGF 的水平显著升高。提示青砖茶水提物可减少胃黏膜合成、分泌和释放 COX-2、PGE2,提高内源性 EGF 表达水平,增强胃黏膜生长修复与屏障防御功能,这与现有的研究结果是一致的<sup>[24]</sup>。

综上所述,青砖茶水提物对急性酒精性胃溃疡具有较好的预防保护作用,通过改善相关炎症因子,促进黏膜再生,增强防御功能,减少酒精对胃组织的损伤。该研究为青砖茶水提物在胃溃疡治疗中提供了新的思路。

## 参考文献:

- [1] DA S D, MARTINS J, DE OLIVEIRA D R, et al. Effect of allantoin on experimentally induced gastric ulcers: pathways of gastroprotection[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 821:68
- [2] FAHMI A A, ABDUR-RAHMAN M, ABOUL N A, et al. *Pulicaria crispa* mitigates gastric ulcer induced by ethanol in rats: role of treatment and auto healing[J]. *Biomarkers*, 2019, 24(3):286
- [3] YAMAMICHI N, YAMAJI Y, SHIMAMOTO T, et al. Inverse time trends of peptic ulcer and reflux esophagitis show significant association with reduced prevalence of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Ann Med*, 2020, 52(8):506
- [4] HAVENS J M, CASTILLO-ANGELES M, NITZSCHKE S L, et al. Disparities in peptic ulcer disease: a nationwide study[J]. *Am J Surg*, 2018, 216(6):1127
- [5] BRYAZKA D, GRISWOLD M G, REITSMA M B, et al. Alcohol and health-authors' reply[J]. *Lancet*, 2022, 400(10365):1766
- [6] 杨黎娜,王君,王爽. 芍药甘草汤对大鼠酒精性胃溃疡的保护作用及其可能机制研究[J]. *河北中医药学报*, 2023, 38(3):1
- [7] FREEDBERG D E, KIM L S, YANG Y X. The risks and benefits of long-term use of proton pump inhibitors: expert review and best practice advice from the American gastroenterological association[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4):706
- [8] 赖建东,马梦君,余子铭,等. 青砖茶风味轮及滋味类型模型的构建[J]. *粮食与油脂*, 2025, 38(4):91
- [9] 赖建东,许欣玮,肖乐维,等. 基于青砖茶文化的茶艺创编及融入师范专业教育实践的应用探究[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2025, 45(2):9
- [10] 黄逢阳,谭倩怡,张娜,等. 青砖茶的加工工艺、品质及生理作用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(20):104
- [11] 周方. 茶叶对高脂饮食诱导大鼠肥胖的预防作用及机制研究[D]. 湖南:湖南农业大学, 2023
- [12] 解晓敏,马梦君,韦华琴,等. 青砖茶特色中药茶饮的减肥作用研究[J]. *茶叶通讯*, 2023, 50(4):522
- [13] 丁丽婷,潘世杰,胡婕伦,等. 燕麦多糖对小鼠急性胃黏膜损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2022, 43(9):150
- [14] 李平香,高瑞阳,李景尧,等. 四白汤对乙醇诱导下小鼠胃溃疡的防治作用研究[J]. *天津中医药*, 2024, 41(8):1030
- [15] YE H Y, SHANG Z Z, ZHANG F Y, et al. *Dendrobium huoshanense* stem polysaccharide ameliorates alcohol-induced gastric ulcer in rats through Nrf2-mediated strengthening of gastric mucosal barrier[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 236:124001
- [16] 余敏,李雨峰,孙伟浩,等. 铁皮石斛提取物对急性酒精性胃溃疡小鼠的保护作用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2024, 41(11):1500
- [17] NABIL G, AHMED Y H, AHMED O, et al. Argel's stemmoside C as a novel natural remedy for mice with alcohol-induced gastric ulcer based on its molecular mechanistic pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 327:117970
- [18] FU S, CHEN J, ZHANG C, et al. Gastroprotective effects of *periplaneta americana* l. extract against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing apoptosis-related pathways[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:798421
- [19] TAMADDONFARD E, ERFANPARAST A, FARSHID A A, et al. Safranal, a constituent of saffron, exerts gastro-protective effects against indomethacin-induced gastric ulcer[J]. *Life Sci*, 2019, 224:88
- [20] AL-SADI R, GUO S, YE D, et al. TNF-alpha modulation of intestinal tight junction permeability is mediated by NIK/IKK-alpha axis activation of the canonical NF-kappaB pathway[J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(5):1151
- [21] LI Q, HU X, XUAN Y, et al. Kaempferol protects ethanol-induced gastric ulcers in mice via pro-inflammatory cytokines and NO[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(3):246
- [22] 刘文,杜平,卿勇军,等. 基于“药辅合一”的芍药甘草胃漂浮片对急性胃溃疡家兔的药效及机制研究[J]. *中草药*, 2019, 50(3):647
- [23] SLOMIANY B L, SLOMIANY A. Syk: a new target for attenuation of *helicobacter pylori*-induced gastric mucosal inflammatory responses[J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(2):203
- [24] 吕帅宜,林开文,邓雨婷,等. 山奈素对小鼠乙醇型胃溃疡的影响及其机制[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2021, 31(6):517

(收稿日期:2025-03-26)

引文格式:王贝贝,赵雪,徐旭龙,等.草甘膦经LRH-1/SR-B1通路加重小鼠胆固醇结石的机制[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):374-379.

# 草甘膦经LRH-1/SR-B1通路加重小鼠胆固醇结石的机制\*

王贝贝<sup>1,2</sup>,赵雪<sup>1,2</sup>,徐旭龙<sup>1,2</sup>,张晓琳<sup>1,2</sup>,晏彪<sup>2\*\*</sup>

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100;2.湖北科技学院医学部基础医学院)

**摘要:**目的 探究草甘膦诱导胆固醇结石的加重作用及其分子机制。方法 以C57BL/6雄性小鼠为实验对象,通过致石性膳食构建胆固醇结石病模型。小鼠随机分为4组( $n=10$ ):正常对照组(CON)、草甘膦暴露组(GLY)、胆固醇结石造模组(CS)及造模+草甘膦暴露联合组(CS+GLY),实验周期为6周。观察小鼠体重变化及胆囊结石形成状况;检测血清生化指标;对肝和胆囊组织HE染色,通过RT-qPCR法对肝脏中参与胆固醇代谢通路的基因表达进行定量分析;利用分子对接预测草甘膦与胆固醇结石病相关靶点的结合程度。结果 CS+GLY组小鼠体质量增长最快,胆囊内可见结石,血清ALT、AST、TC、LDL-C水平均显著升高(与CS组比, $P<0.01$ ),血脂异常加剧;病理学结果显示CS+GLY组肝细胞肿大、肝小叶中央静脉管腔增大和胆囊黏膜增厚。RT-qPCR结果表明,CS+GLY组肝组织FXR mRNA表达降低,而LRH-1、SR-B1 mRNA表达升高(与CS组比, $P<0.01$ )。分子对接结果表明,草甘膦与FXR、LRH-1及SR-B1均有良好的对接活性,结合能分别为-10.46、-5.10、-9.29 kJ/mol。结论 草甘膦可加重胆固醇结石的发生,作用机制或与其可能通过抑制肝脏组织FXR表达,进而干扰LRH-1/SR-B1通路,导致血清脂质代谢异常和肝胆损伤有关。

**关键词:**草甘膦;胆固醇结石病;FXR;LRH-1/SR-B1

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0374-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025032010



## Glyphosate Exacerbated Mouse Cholesterol Gallstones via the LRH-1/SR-B1 Pathway

WANG Bei-bei, ZHAO Xue, YAN Biao, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the exacerbating effect of glyphosate on cholesterol gallstone and elucidate its underlying mechanisms. **Methods** The experimental protocol was conducted on male C57BL/6 mice, in which a lithogenic diet was administered to establish a cholesterol gallstone disease model. Mice were randomly allocated into four groups: normal control (CON), glyphosate-exposed (GLY), cholesterol stone model (CS), and combined model + glyphosate (CS + GLY) groups, with a 6-week experimental duration. Parameters evaluated included body weight changes and gallstone formation status. Serum biochemical profiles were quantified, and hepatic and gallbladder tissues were conducted by Hematoxylin-Eosin (HE) staining. The transcriptional levels of cholesterol metabolism-associated genes in hepatic tissue were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). The binding affinities between glyphosate and cholesterol gallstone-related molecular targets were predicted by molecular docking simulations. **Results** The CS + GLY group exhibited accelerated body mass gain, gallstone occurrence, and significantly elevated serum ALT, AST, TC, and LDL-C levels (vs. CS,  $P<0.01$ ), indicating exacerbated dyslipidemia. Histopathological analysis revealed distinct pathological alterations in the CS + GLY group, characterized by hepatocyte hypertrophy, enlargement of central venous lumina in hepatic lobules, and thickening of gallbladder mucosa. RT-qPCR results showed that the down-regulated hepatic FXR mRNA level, and upregulated LRH-1 and SR-B1 mRNA levels in CS + GLY group (vs. CS,  $P<0.01$ ). Molecu-

\* 基金项目:湖北省自然科学基金青年项目(2023AFB478);国家自然科学基金青年项目(42307547)

\*\* 通信作者, E-mail: yanbiao@hbust.edu.cn

lar docking confirmed robust binding interactions between glyphosate and FXR/LRH-1/SR-B1, with binding energies of  $-10.46$ ,  $-5.10$ ,  $-9.29$  kJ/mol, respectively. **Conclusion** Glyphosate can aggravate cholesterol gallstone pathogenesis through inhibiting FXR expression in liver tissue, thereby interfering with the LRH-1/SR-B1 pathway, resulting in abnormal serum lipid metabolism and liver and hepatobiliary damage.

**KEY WORDS:** Glyphosate; Cholesterol gallstones; FXR; LRH-1/SR-B1

胆固醇结石(cholesterol stone, CS)作为一种多因素致病性疾病,其发生机制涉及遗传易感性和环境因素等相互作用<sup>[1]</sup>。有报道称,该疾病在亚洲地区的发病率高达10.7%<sup>[2]</sup>。在影响胆固醇结石病理进展的诸多因素中,饮食因素尤为关键,特别是饮食中同时含有胆固醇和胆酸,这是诱导胆囊结石形成的必要条件<sup>[3]</sup>。致石性饮食模型中的高脂高热摄入可扰动“肝疏泄-胆枢机”动态平衡,大量脂质堆积肝脏,胆汁排泄不畅,胆囊收缩障碍,影响胆囊形态<sup>[4]</sup>。已有研究<sup>[5]</sup>证实,胆固醇结石患者的肝脏脂质代谢存在异常,其胆汁中胆固醇、磷脂和胆汁酸三种有机成分的比例失调。

草甘膦(glyphosate, GLY)是一种在环境中广泛使用的除草剂,其生态毒性以及对人类健康的潜在风险,已成为当前环境医学研究的重要方向之一<sup>[6]</sup>。研究表明,GLY及其制剂对生物的神经系统、血液、肝脏、肾脏、生殖发育和内分泌系统均表现出不同程度的毒性作用<sup>[7-9]</sup>。其中,肝毒性已被证实与肝脂代谢紊乱密切相关<sup>[10]</sup>。Mesnage等<sup>[11]</sup>研究结果显示,长期接触低剂量GLY可对大鼠肝脏造成功能性损害。此外,江海坝<sup>[12]</sup>研究也发现,GLY能够诱导肝细胞凋亡相关基因的表达,同时引发炎症反应,紊乱肝脏正常的脂质代谢过程。本研究旨在探究GLY暴露是否会加重胆固醇结石病,及其潜在的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

试剂:GLY(CAS:1071-83-6,美国Sigma),TRIzol试剂(美国Invitrogen),总胆固醇(T-CHO,货号:A111-1-1)、甘油三酯(TG,货号:A110-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C,CAS:A113-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C,CAS:A112-1-1)、谷丙转氨酶(ALT,货号:C009-2-1)、谷草转氨酶(AST,货号:C010-2-1)购自南京建成生物工程研究所。仪器:IX-70显微镜(日本Olympus)、Elx800酶标仪(美国Bio-Tek)、ABI QuantStudio 1 荧光定量PCR仪(美国Thermo)、SCI1000-G逆转录仪(美国SCILOGEX)。

### 1.2 实验动物与分组

40只6周龄(18~20g)C57BL/6J雄性小鼠[许可

证号SCXK(辽)2020-0001],饲养于标准清洁环境[温度 $(20 \pm 2)$ ℃,相对湿度50%~60%],期间自由饮水和进食。所有实验操作均经我院实验动物伦理委员会批准(IACUC-2023-03-101)。受试小鼠随机分为4组( $n=10$ ):对照组(CON组,食用普通饲料)、GLY 1mg/(kg·d)灌胃组(GLY组,食用普通饲料)、造模组(CS组,食用造模饲料)、造模及GLY 1mg/(kg·d)灌胃组(CS+GLY组,食用造模饲料),连续处理6周。GLY先以纯水配制浓度为1mg/L原液( $-20$ ℃避光保存),再配制为0.1mg/L药液[灌胃剂量1mg/(kg·d)]。

造模饲料是高胆固醇(1%)、高胆酸钠(0.5%)和纯化鼠粮(D191107),由戴茨生物科技(无锡)有限公司提供。实验开始前,所有饲料均经过紫外线消毒灭菌处理。高胆固醇高胆酸钠纯化鼠粮配方和成分见表1。

表1 高胆固醇高胆酸钠纯化鼠粮配方与成分

成分	单位热量值/(kcal/g)	重量/g	热量/(kcal)
Casein(酪蛋白)	4	177	708
L-Cystine(L-胱氨酸)	4	3	12
reliSucrose(蔗糖)	4	200	800
Comstarch(玉米淀粉)	4	248	992
Dyetrose(麦芽糊精)	4	150	600
Milkfat(无水奶油)	9	100	900
Ethoxyquin(乙氧基喹啉)	0	0.02	0
Cellulose(纤维素)	0	50	0
Mineral Mix #210088(复合矿物质)	0	10	0
Calcium Carbonate(碳酸钙)	0	5.5	0
Dicalcium Phosphate(磷酸氢钙)	0	13	0
Potassium Citrate(柠檬酸钾)	0	16.5	0
Vitamin Mix #300050(复合维生素)	4	10	40
Choline Bitartrate(酒石酸胆碱)	0	2	0
Cholesterol(胆固醇)	0	10	0
Sodium Cholate(胆酸钠)	0	5	0

### 1.3 血清及组织样本收集

给药6周后,小鼠禁食12h(允许自由饮水)。用异戊巴比妥钠麻醉小鼠,通过心脏采血的方式收集血液样本,静置2h,4℃3000r/min离心10min,取血清 $-80$ ℃保存至检测。仰卧位固定,采用腹部正中切口打开腹腔,摘取肝脏、胆囊并进行称重。将一部分肝

脏,胆囊组织固定于多聚甲醛中,其余保存至 $-80^{\circ}\text{C}$ 用于后续检测指标。血清中 ALT、AST、LDL-C、HDL-C、TC 及 TG 等生化指标的测定严格遵循试剂盒制造商提供的标准化操作步骤进行。

#### 1.4 小鼠胆囊结石观测

经麻醉处理的小鼠被置于仰卧位并固定,沿腹正中线逐层打开腹腔。通过胆囊三角区域的解剖分离,胆囊管及动脉被切断,胆囊组织得以完整剥离。在此过程中,胆囊内部包含的胆汁及其可能存在的结晶或结石均呈现明显可视状态,并同步进行影像记录。

#### 1.5 小鼠肝脏、胆囊组织病理形态检测

肝、胆囊样本采集后,使用4%多聚甲醛溶液进行固定处理,随后经石蜡包埋和切片制备流程。为评估药物干预效果,对肝脏和胆囊组织分别实施苏木精-伊红(H&E)染色,进而观察各组实验动物在给药后肝脏与胆囊组织的形态学改变。

#### 1.6 肝脏 FXR、LRH-1、SR-B1 的 mRNA 表达检测

肝组织经 Trizol 研磨提取 RNA,并对其纯度和浓度进行检测。根据逆转录试剂盒的操作指南,将获得的 RNA 转录为 cDNA。将合成的 cDNA 与特异性引物结合,按照 PerfectStart<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix (+ Dye II) 试剂盒(全式金, AQ602)的标准化流程,执行两步法 PCR 扩增:首先在 $95^{\circ}\text{C}$ 条件下预变性 $30\text{s}$ ,随后进行40个循环,每个循环包括 $95^{\circ}\text{C}$ 变性 $5\text{s}$ 和 $60^{\circ}\text{C}$ 退火 $30\text{s}$ 。实验中以 GAPDH 作为内参基因,通过测定各样本的 Ct 值,运用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目标基因 mRNA 的相对表达水平。各基因引物序列如表 2 所示。

表 2 各基因引物序列

基因	引物序列(5' to 3')
GAPDH F	CCTCGTCCCGTAGACAAAATC
GAPDH R	TGAGGTCAATGAAGGGTCTCT
FXR F	GGGCCTTCTACAAGGCCTTTC
FXR R	GAGCGGTACTCGGACATC
LRH-1 F	TGAGGAACAACCTCCGGAAAA
LRH-1 R	CAGACACTTTATCGCCACACA
SR-B1 F	ACCCATCGGTCATCGACTTG
SR-B1 R	CCGACAACAACGTTTGGACC

#### 1.7 GLY 与 FXR、LRH-1、SR-B1 蛋白的分子对接

应用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取 GLY(PubChem CID:3496)的 3D 结构式,导出为 SDF 格式文件后通过 OpenBabel 分子格式转换工具转换为 mol2 格式文件;应用 PDB 数据

库(<https://www.rcsb.org/>)获取 FXR(PDB:1OSV)、LRH-1(PDB:1YUC)、SR-B1(PDB:3R69)蛋白的 PDB 格式文件,经 PyMOL 软件执行去水、去残基等预处理操作。应用 AutoDock4.2.6 软件对蛋白和小分子模型进行加氢、去除水分子、设置受体与配体等预处理,并运用 AutoDock Vina 软件完成分子半柔性对接,结果保存为 PDBQT 格式文件,通过 OpenBabel 分子格式转换工具转换为 PDB 格式文件。最后运用 PyMOL 软件进行可视化分析。

#### 1.8 统计学方法

实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。应用 GraphPad Prism 8.0.2 软件,通过单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示组间差异具有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 小鼠体质量监测及胆囊结石情况

各组小鼠的体质量变化趋势见图 1A,实验结束后各组体质量数据呈现统计学差异(图 1B)。与 CON 组平均体质量( $21.62 \pm 1.10$ )g 相比,CS + GLY 组小鼠体质量增长最为显著,最高为( $23.00 \pm 1.75$ )g。这提示膳食高胆固醇与 GLY 暴露在促进小鼠体重增长方面具有协同作用。胆囊组织学分析(图 1C)显示,处理 6 周后,CON 组与 GLY 组胆汁均维持正常淡黄色透明液态特征且胆囊容积较小;CS 模型组则呈现典型造模成功特征:异常深褐色浑浊胆汁、泥沙样结晶沉积及胆囊显著膨胀。值得注意的是,CS + GLY 组胆囊内形成的黄白色颗粒状结石在形态学与单一 CS 模型组存在差异。

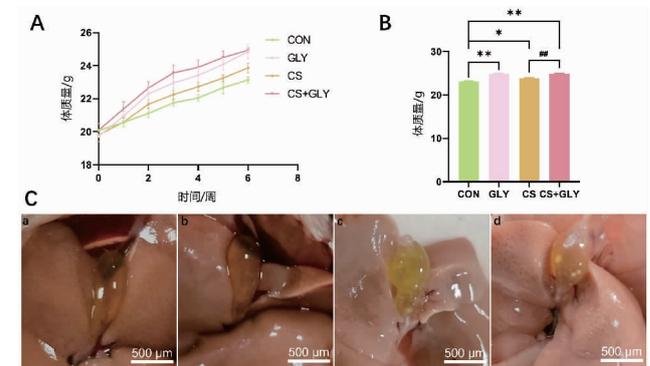


图 1 小鼠体质量及胆囊结石结果

#### 2.2 血清生化指标检测

根据表 3 的血清生化检测数据,与 CON 组比较,在 CS 组中,TC、TG、LDL-C 以及 ALT、AST 的浓度均明显上升( $P < 0.01$ ),证实了造模膳食高胆固醇能够诱

发实验动物的血脂代谢紊乱。GLY 组相较于 CON 组,不仅表现出 TC、TG、LDL-C 和 ALT、AST 水平的增加,同时 HDL-C 含量显著降低( $P < 0.05$  或  $< 0.01$ ),这一系列变化表明 GLY 暴露亦可对脂质代谢和肝脏功能造成明显影响。此外,在 CS + GLY 联合组中,与单独 CS 处理组相比,TC、TG、LDL-C 及 AST、ALT 的上升幅度更为显著( $P < 0.05$  或  $< 0.01$ ),说明联合作用加剧了血脂代谢的异常。

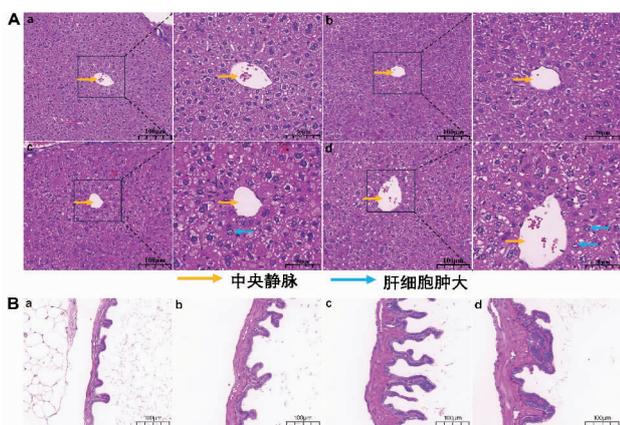
表 3 小鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C、ALT 和 AST 水平变化( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别 Group	CON	GLY	CS	CS + GLY
TC/(mmol/L)	1.20 ± 0.07	2.50 ± 0.09 *	5.62 ± 0.15 **	6.84 ± 0.15 ##
TG/(mmol/L)	0.50 ± 0.03	0.78 ± 0.03 *	0.89 ± 0.02 **	1.03 ± 0.03 #
LDL-C/(mmol/L)	0.97 ± 0.08	1.59 ± 0.09 *	2.36 ± 0.12 **	2.80 ± 0.11 #
HDL-C/(mmol/L)	2.88 ± 0.09	2.10 ± 0.08 *	1.88 ± 0.04 **	1.54 ± 0.07 #
ALT/(U/L)	6.20 ± 0.34	10.40 ± 0.26 **	11.74 ± 0.33 **	13.30 ± 0.40 #
AST/(U/L)	6.48 ± 0.21	9.32 ± 0.30 **	10.93 ± 0.29 **	12.16 ± 0.28 #

与 CON 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与 CS 组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

### 2.3 小鼠肝、胆囊组织病理学结果

肝脏组织病理学结果分析(图 2A)显示,CON 组小鼠的肝实质结构保持正常状态,肝细胞索呈规则排列,未见形态学改变;CS + GLY 组则呈现显著的肝细胞病理改变,表现为肝细胞肿胀,中央静脉管腔增大。胆囊病理学分析(图 2B)显示,CON 组胆囊壁结构完整,未发现病理性增生;CS 组则表现为黏膜层增厚,胶原纤维沉积增加,而 CS + GLY 联合组的胶原纤维沉积程度更为显著。



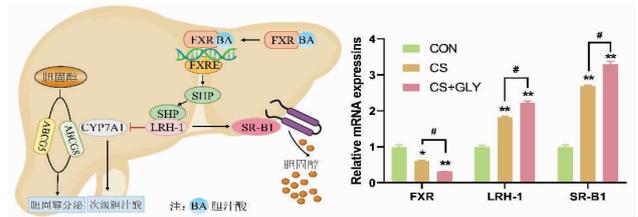
A. 肝脏 HE 染色;B. 胆囊 HE 染色(a. CON 组, b. GLY 组, c. CS 组, d. CS + GLY 组)。

图 2 肝、胆囊组织病理学结果

### 2.4 小鼠肝脏组织 FXR、LRH-1、SR-B1 的 mRNA 表达

各组小鼠肝脏组织 FXR、LRH-1、SR-B1 的 mRNA 表达变化见图 3。与 CON 组相比,CS 组、CS + GLY 组

FXR 的 mRNA 表达量显著降低( $P < 0.05$  或  $< 0.01$ ), LRH-1、SR-B1 的 mRNA 表达量显著升高( $P < 0.01$ );与 CS 组相比,CS + GLY 组 FXR 的 mRNA 表达量显著降低( $P < 0.01$ ), LRH-1 和 SR-B1 的 mRNA 表达量显著升高( $P < 0.01$ )。

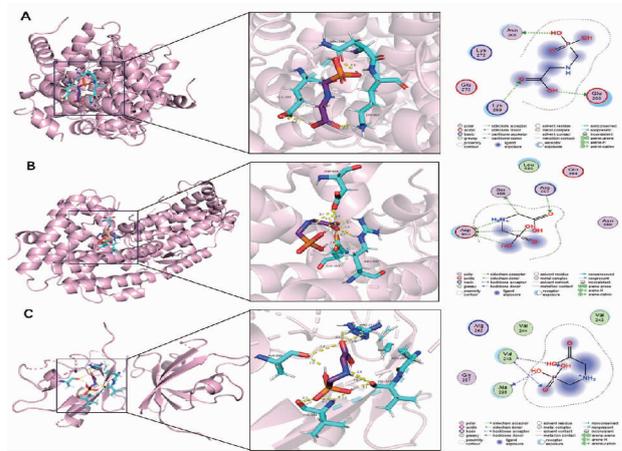


与 CON 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与 CS 组比较, # $P < 0.01$ ;n=3。

图 3 各组小鼠肝脏组织 FXR、LRH-1、SR-B1 的 mRNA 表达比较

### 2.5 分子对接结果

分子对接分析可以预测 GLY 与胆固醇结石病相关靶点之间的结合程度。运用分子对接验证 FXR、LRH-1、SR-B1 与 GLY 的对接结合程度,PyMOL 2.6 软件进行可视化处理(见图 4)。对接结果显示,GLY 通过 3 个氢键与受体 FXR 蛋白的 ASN-268、GLU-265、LYS-269 残基结合;GLY 通过 8 个氢键与受体 LRH-1 蛋白的 ASP-460、GLU-384、ARG-507 残基结合;GLY 通过 10 个氢键与受体 SR-B1 蛋白的 ALA-280、ARG-242、VAL-243 以及 VAL-245 残基结合。FXR、LRH-1、SR-B1 与 GLY 的分子对接能量依次为 -10.46、-5.10、-9.29kJ/mol,具有较好的对接活性。推测 GLY 可能通过 FXR、LRH-1、SR-B1 三个目标靶点影响胆固醇结石病的发生。



A. GLY 与 FXR;B. GLY 与 LRH-1;C. GLY 与 SR-B1。

图 4 GLY 与 FXR、LRH-1、SR-B1 蛋白的分子对接结果及 2D 相互作用图

### 3 讨论

已有文献<sup>[13]</sup>指出,膳食胆固醇过量摄入可显著提升胆汁胆固醇饱和度,这一生理变化是胆固醇结晶

形成的关键病理基础。实验数据证实<sup>[14]</sup>,采用高胆固醇结合胆酸盐的饲喂方案能够成功诱导实验动物发生胆固醇性胆结石,其发生率可达90%。C57BL/6品系小鼠因其对胆固醇结石的特殊易感性而被广泛采用,且雄性个体较雌性更易出现胆结石<sup>[15]</sup>,基于此,本实验选取雄性C57BL/6小鼠作为研究对象。造模结果显示,与对照组相比,模型组小鼠胆囊体积增大,肉眼可见胆囊内出现泥沙样结石沉积,同时胆汁颜色偏黄且质地较浑浊,与李勇男<sup>[16]</sup>的研究结果相符,提示成功建立了胆固醇结石病小鼠模型。

作为细胞代谢的关键产物,血脂的代谢状况与胆固醇结石的发生密切相关。胆汁的理化性质改变往往源于血液脂质成分的代谢失调<sup>[17]</sup>。研究<sup>[18]</sup>表明,胆固醇结石模型小鼠血清生化指标如TC、TG、LDL-C浓度比正常小鼠显著增加。本研究中,与CON组相比,CS组小鼠血清中TC、TG以及LDL-C均出现显著上升趋势,同时HDL-C水平则显著下降,这一现象说明血清总胆固醇的过量堆积会促使肝脏胆固醇含量上升,继而导致胆汁中胆固醇含量增加,最终提高了结石形成的风险。相关研究<sup>[19]</sup>提出,GLY暴露显著影响人体的脂质代谢过程,导致多种脂质成分发生改变。与CS组相比,CS+GLY组中TC、TG和LDL-C浓度显著升高,HDL-C浓度显著降低,这一现象为GLY加剧脂质代谢异常,从而诱发胆囊胆固醇结石的病理机制提供了新的实验依据。

CS组小鼠血清ALT、AST含量均显著升高,这一肝功能指标提示CS组小鼠肝脏组织发生了病理性改变;进一步对肝组织HE染色,发现CS组小鼠肝细胞出现显著肿胀现象,细胞排列松散,同时可见脂滴空泡,且肝细胞损伤程度与造模时间呈正相关。肝毒性是GLY主要的毒性作用<sup>[20]</sup>,本研究中低剂量GLY的长期暴露,显著升高模型小鼠血清中ALT、AST含量,使肝细胞肿胀程度加重,脂滴空泡数量增多,肝细胞损伤情况加重。有研究<sup>[21]</sup>指出,胆固醇结石模型小鼠胆囊壁明显增厚,胶原纤维扩充增多,这些病理变化会导致胆囊收缩功能发生障碍。通过胆囊组织HE染色,发现CS组小鼠胆囊黏膜增厚,黏膜胶原纤维扩充增多,说明CS小鼠胆囊结构和功能已受损,出现明显的炎症反应。这可能是由于CS组小鼠摄入了过多的高胆固醇高胆酸钠致石饲料,导致小鼠血清中的TC、TG水平显著升高,肝细胞脂质过度累积,同时胆囊收缩功能出现障碍,胆汁排泄受阻,从而影响了机体的正常脂质代谢过程。这种情况持续刺激胆囊内壁,最终导致胆囊的形态结构发生改变。上述结果表明,GLY暴露在一定程度上也加剧了致石性饮食小鼠

胆囊组织的损伤程度。

肝受体同源物-1(LRH-1)是核受体家族的重要成员,具有配体依赖性转录激活特性,在胆固醇代谢调控中发挥关键作用<sup>[22]</sup>。临床研究<sup>[23-24]</sup>发现,胆囊胆固醇结石患者肝脏组织中LRH-1 mRNA表达升高,提示LRH-1可能通过调控其靶基因的表达,导致胆汁中胆固醇呈现过饱和状态,加速胆囊胆固醇结石的形成。SR-B1是肝细胞表面摄取高密度脂蛋白(HDL)的受体<sup>[25]</sup>,其异常高表达可显著提升胆汁内胆固醇水平,从而增加胆固醇结石的发生概率<sup>[26]</sup>。LRH-1能够与SR-B1基因启动子区域发生特异性结合,进而调控该基因的转录表达<sup>[27]</sup>。分布于肝脏和肠道等组织的法尼醇X受体(FXR),可通过上调小异源二聚体伴侣蛋白(SHP)的表达,对LRH-1的转录激活功能产生抑制作用<sup>[28]</sup>。根据已有的研究<sup>[29]</sup>,GLY暴露可导致肠肝损伤,引起肠-肝轴功能失调,并通过抑制肝脏FXR的表达,最终影响胆汁酸合成和胆固醇代谢途径。本研究结果表明,与CS组相比,CS+GLY组的FXR mRNA表达显著降低,而LRH-1、SR-B1 mRNA表达显著上调,提示GLY对上述胆固醇结石病相关基因的干扰作用。为了进一步验证GLY是否通过调控FXR、LRH-1、SR-B1蛋白表达直接或间接影响胆固醇结石病,基于分子对接技术,分析了GLY与FXR、LRH-1、SR-B1三种蛋白之间的潜在相互作用。结果显示,GLY与FXR、LRH-1、及SR-B1均表现出良好的对接活性。由此推测,GLY可能通过抑制FXR表达,增强对LRH-1/SR-B1的干扰效应,促进肝细胞对血清HDL-C的摄取,致使胆汁内胆固醇含量增加,进而造成胆固醇过饱和状态,显著增加结石形成的风险。

综上,GLY可能通过下调肝脏组织FXR的表达水平,继而增强LRH-1对SR-B1调控作用,最终导致血脂异常、肝脏损伤以及胆囊功能障碍,加重致石性饮食诱导的小鼠胆固醇结石病发生。鉴于小鼠与人类在胆固醇代谢途径及胆汁酸代谢机制上存在一定的种属差异,GLY对小鼠胆固醇结石的影响是否可直接外推至人体,仍需通过系统的体内实验与体外研究进一步证实。

## 参考文献:

- [1]于晓鹏.超高效液相色谱-质谱法对结石患者胆汁的代谢组学鉴定结果探讨与虎杖苷对胆固醇结石形成的影响和机制研究[D].沈阳:中国医科大学,2023
- [2]苗彦国,薛东波,张伟辉.胆囊胆固醇结石成因及其治疗研究进展[J].肝胆胰外科杂志,2016,28(2):155
- [3]宋森涛,曾欣,谢渭芬.胆囊结石发病机制的研究现状[J].

- 胃肠病学,2019,24(12):750
- [4]周智慧.基于“腑以通为用”从DAG-PKC通路调控胆囊动力的胆固醇结石机制研究[D].福州:福建中医药大学,2021
- [5]韩天权,蒋兆彦,张圣道.胆石病人肠肝循环途径脂质代谢异常的分子生物学研究进展[J].中华肝胆外科杂志,2008,14(4):2
- [6]WILLIAMS A L,WATSON R E,DESESSO J M. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure;a critical analysis[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev,2012,15(1):39
- [7]赵伟,曹曦予,吴艳萍,等.草甘膦致小鼠机体氧化损伤作用的研究[J].毒理学杂志,2011,25(5):364
- [8]ASTIZ M,DE ALANIZ M J T,MARRA C A. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals[J]. Environ Toxicol Pharmacol,2009,28(3):465
- [9]朱国念,楼正云,孙锦荷.草甘膦对水生生物的毒性效应及环境安全性研[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(3):309
- [10]MARINO M,MELE E,VIGGIANO A,et al. Pleiotropic outcomes of glyphosate exposure:from organ damage to effects on inflammation,cancer, reproduction and development[J]. Int J Mol Sci,2021,22(22):12606
- [11]MESNAGE R,ANTONIOU M N. Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity[J]. Front Public Health,2017,5:316
- [12]江海圳.草甘膦对小鼠肝脏生物钟和糖脂代谢的影响[D].咸阳:西北农林科技大学,2022
- [13]DI CIAULA A,GARRUTI G,FRÜHBECK G,et al. The role of diet in the pathogenesis of cholesterol gallstones[J]. Curr Med Chem,2019,26(19):3620
- [14]ASAI Y,YAMADA T,TSUKITA S,et al. Activation of the hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  subunit pathway in steatotic liver contributes to formation of cholesterol gallstones[J]. Gastroenterology,2017,152(6):1521
- [15]ALEXANDER M,PORTMAN O W. Different susceptibilities to the formation of cholesterol gallstones in mice[J]. Hepatology,1987,7(2):257
- [16]李勇男.姜黄素预防胆囊胆固醇性结石形成中作用机制的研究[D].沈阳:中国医科大学,2020
- [17]翟星月.基于LRH-1相关信号通路探讨胡椒碱抑制小鼠胆固醇结石形成作用及机制[D].沈阳:辽宁中医药大学,2019
- [18]李炯,陆巍,梁晓强,等.升清胶囊对胆固醇结石小鼠胆固醇及肝脏B类清道夫受体的影响[J].中国中西医结合杂志,2016,36(11):1369
- [19]ZHANG F,ZHANG Q,LIU X,et al. Human serum lipidomics analysis revealed glyphosate may lead to lipid metabolism disorders and health risks[J]. Environ Int,2023,171:107682
- [20]MURIOZ J P,SILVA-PAVEZ E,CARRILLO-BELTRAN D,et al. Occurrence and exposure assessment of glyphosate in the environment and its impact on human beings[J]. Environ Res,2023,231(Pt 3):116201
- [21]李勇男,吴硕东,田雨.姜黄素联合胡椒碱在预防小鼠胆囊胆固醇性结石中的作用[J].中国普外基础与临床杂志,2015,22(12):1453
- [22]温海霞,刘国艺,倪江.孤儿核受体肝受体同系物-1以及与雌激素相互调节作用[J].生殖医学杂志,2007(2):124
- [23]杨士勇,韩天权,时开网,等.胆石病人肝脏核受体LRH-1及其调控基因表达的研究[J].中华肝胆外科杂志,2009,15(5):325
- [24]JIANG Z Y,PARINI P,EGGERTSEN G,et al. Increased expression of LXR alpha,ABCG5,ABCG8,and SR-BI in the liver from normolipidemic,nonobese Chinese gallstone patients[J]. Journal of Lipid Research,2008,49(2):464
- [25]李许霞,徐明国.B类1型清道夫受体在心血管疾病中的作用[J].岭南心血管病杂志,2023,29(5):567
- [26]韩立博,薛荣泉,夏医君,等.SR-BI蛋白在胆囊胆固醇结石中的作用研究进展[J].国际外科学杂志,2020,47(10):5
- [27]FREEMAN L A. The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter[J]. Journal of Lipid Research,2004,45(7):1197
- [28]SONG L,HOU Y,XU D,et al. Hepatic FXR-FGF4 is required for bile acid homeostasis via an FGFR4-LRH-1 signal node under cholestatic stress[J]. Cell Metab,2025,37(1):104
- [29]YAN B,SUN Y,FU K,et al. Effects of glyphosate exposure on gut-liver axis:metabolomic and mechanistic analysis in grass carp (ctenopharyngodon idellus)[J]. Science of The Total Environment,2023,902:166062

(收稿日期:2025-03-20)

引文格式:凌莉,华玉,季慧敏,等.棕榈酸通过抑制 AMPK-Nrf2/HO-1 轴诱导大鼠心肌细胞铁死亡[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):380-385.

## 棕榈酸通过抑制 AMPK-Nrf2/HO-1 轴诱导大鼠心肌细胞铁死亡\*

凌莉<sup>1</sup>,华玉<sup>1,2</sup>,季慧敏<sup>1</sup>,朱蕤<sup>3</sup>,肖钰杰<sup>3</sup>,姜敏生<sup>2</sup>,任展宏<sup>3\*\*</sup>,王定森<sup>2\*\*</sup>

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100;2.咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院I期临床研究中心;3.湖北科技学院医学部基础医学院)

**摘要:**目的 探讨腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)对棕榈酸(PA)诱导的大鼠心肌细胞铁死亡的作用及其机制。方法 用PA处理H9c2细胞24h,CCK-8检测PA对细胞活力的影响,通过RT-qPCR和Western blot检测AMPK、Nrf2、HO-1以及铁死亡相关因子的表达变化,并采用探针法检测细胞脂质过氧化物(LPO)水平的变化。进一步用AMPK激动剂AICAR或抑制剂Compound C预处理,评估上述指标变化。同时,利用试剂盒分别检测各组细胞中铁离子、MDA和GSH水平的变化。结果 PA增加细胞LPO含量,降低AMPK、Nrf2、HO-1和铁死亡相关因子SLC7A11、GPX4的蛋白和基因表达水平;然而,AMPK激动剂AICAR预处理逆转PA诱导的细胞损伤,提高细胞GSH,降低MDA和铁水平;相反,AMPK抑制剂Compound C则进一步加剧损伤,降低细胞GSH,增加MDA和铁水平( $P < 0.05$ )。结论 PA通过下调AMPK调控Nrf2/HO-1信号通路,从而诱导大鼠心肌细胞铁死亡。

**关键词:**棕榈酸;腺苷酸激活蛋白激酶;铁死亡;Nrf2/HO-1信号通路

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0380-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025031308



## Palmitic Acid Induced Ferroptosis in Rat Cardiomyocytes by Inhibiting the AMPK-Nrf2/HO-1 Axis

LING Li, REN Zhan-hong, WANG Ding-miao, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the role of adenylate activated protein kinase (AMPK) and its mechanism on palmitic acid (PA)-induced ferroptosis in rat cardiomyocytes. **Methods** The H9c2 cells were treated with PA for 24 hours, and the effect of PA on cell viability was detected by CCK-8. The expression levels of AMPK, Nrf2, HO-1, and ferroptosis-related factors were detected by RT-qPCR and Western blot. And the lipid peroxidation level was detected by lipid peroxidation assay kit. Further pretreatment with AMPK agonist AICAR or inhibitor Compound C was performed to evaluate the changes in the above indicators. Meanwhile, iron assay kit, MDA kit and GSH assay kit were utilized to detect the changes in the content of iron ions, MDA and GSH in each group, respectively. **Results** PA increased the content of LPO and decreased the protein and gene expression levels of AMPK, Nrf2, HO-1, ferroptosis-related factors SLC7A11 and GPX4. However, pretreatment with the AMPK agonist AICAR reversed PA-induced cell damage, increased cellular GSH levels, and decreased MDA and iron levels. In contrast, the AMPK inhibitor Compound C further exacerbated the damage, decreased the cellular GSH level, and increased MDA and iron levels ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** PA induces ferroptosis in rat cardiomyocytes by modulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway through down-regulation of AMPK.

**KEY WORDS:** Palmitic acid; Adenylate activated protein kinase; Ferroptosis; Nrf2/HO-1 signaling pathway

\* 基金项目:糖尿病与血管病变专项项目(2022TNB04);湖北科技学院科研创新团队项目(2022T01)

\*\* 通信作者, E-mail:18211070620@163.com; wangmiao23235@126.com

糖尿病心肌病(diabetes cardiomyopathy, DCM)是长期、严重糖尿病患者并发的一种以心肌结构和功能异常为特征的心肌病变,主要表现为心肌细胞肥大、心肌纤维化、心肌收缩和舒张功能障碍等<sup>[1-2]</sup>。尽管血糖控制手段不断进步,但 DCM 患者仍面临显著的心衰风险<sup>[3]</sup>。

在糖尿病状态下,心肌细胞的能量代谢发生改变,脂肪酸氧化增加,导致心肌细胞内脂质积累,进而引发心肌细胞脂毒性<sup>[4]</sup>。游离脂肪酸中的棕榈酸(PA)在心肌中异常蓄积,通过诱发脂质过氧化、内质网应激等途径直接损伤心肌细胞<sup>[5-6]</sup>。近年来的研究发现,铁死亡是一种铁依赖的脂质过氧化驱动的新型细胞死亡方式,在 DCM 心肌组织中被特异性激活<sup>[7]</sup>。铁死亡的激活与心肌细胞内铁离子积累和脂质过氧化物的过度积累密切相关,进一步加剧了心肌细胞的损伤。

腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是细胞能量代谢的核心调控因子,其通过感知细胞内三磷酸腺苷(ATP)与一磷酸腺苷(AMP)的比值(ATP/AMP)变化,在能量代谢与氧化应激调控中发挥关键作用,现已成为肥胖、糖尿病等代谢性疾病治疗的关键治疗靶点<sup>[8-9]</sup>。尽管 AMPK-Nrf2 通路在心肌缺血再灌注损伤中的抗铁死亡作用已被证实<sup>[10]</sup>,但其在糖尿病心肌病特征性脂毒性微环境(如 PA 蓄积)中的调控规律及机制特异性仍不明确。基于此,本研究以 AMPK 为调控靶点,建立 PA 诱导的 H9c2 大鼠心肌细胞脂毒性模型,探讨脂毒性如何通过铁死亡途径影响糖尿病心肌病的发病机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药物和试剂

棕榈酸钠(P5585-10G, Sigma); DMEM 高糖培养基(SH30022, 赛默飞世尔生物化学制品有限公司); p-AMPK/AMPK (AP1171/A1229, ABclonal)、Nrf2 (A3577, ABclonal)、HO-1 (A1346, ABclonal)、胱氨酸/谷氨酸转运蛋白 SLC7A11 (A2413, ABclonal)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 GPX4 (A11243, ABclonal)、 $\beta$ -actin (AC006, ABclonal); AICAR (HY-13417, 美国 MCE 生物科技公司)和 Compound C (HY-13418A, 美国 MCE 生物科技公司); RNA isolater Total RNA Extraction Reagent (R401-01, 南京 Vazyme 生物技术公司)和 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR (R333-01, 南京 Vazyme 生物技术公司); CCK-8 细胞活力试剂盒(BB4202, 贝博生物); 还原性谷胱甘肽(glutathione, r-glutamyl cysteinyl + glycine, GSH)测定

试剂盒(A006-2-1, 南京建成生物工程研究所)、组织铁测定试剂盒(A039-2-1, 南京建成生物工程研究所)、细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(A003-4-1, 南京建成生物工程研究所)和细胞核蛋白提取试剂盒(W037-1-1, 南京建成生物工程研究所), 脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581/591 C11, S0043M, 上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 仪器

多功能荧光酶标仪(ELx800, 美国 Bio-Tek 公司); Mini-Sub Cell GT 水平电泳仪(美国 Bio-Tek 公司); Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Module (170-3935, 美国 Bio-Tek 公司); Gel Doc EZ 凝胶成像系统(Gel Doc EZ imaging system, 美国 Bio-Tek 公司)和 CFX Connect<sup>™</sup> 荧光定量 PCR 检测系统(1855200, 美国 Bio-Tek 公司); 奥林巴斯 IX73 倒置荧光显微镜 (IX73, 日本 Olympus 公司); 高速冷冻离心机 (CP100NX, 德国 Eppendorf 公司)。

### 1.3 细胞培养和分组

大鼠心肌细胞 H9c2 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中, 采用含 10% 胎牛血清(FBS)、100U/mL 青霉素和 100 $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基进行培养。用对数生长期细胞进行实验。实验分为对照组(DMEM 完全培养基); PA 60 $\mu$ mol/L 组: 60 $\mu$ mol/L 的 PA 处理 H9c2 细胞 24h; AMPK 激动剂组: 用含 AICAR 10 $\mu$ mol/L 的培养基培养 24h; AMPK 抑制剂组: 用含 Compound C 10 $\mu$ mol/L 的培养基培养 24h; AMPK 激动剂 + PA 组: 用含有 AICAR 10 $\mu$ mol/L 培养基预处理 2h 后再加入 PA 60 $\mu$ mol/L 培养 24h; AMPK 抑制剂 + PA 组: 用含有 Compound C 10 $\mu$ mol/L 培养基预处理 2h 后再加入 PA 60 $\mu$ mol/L 培养 24h。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 CCK-8 法检测

将 H9c2 细胞接种于 96 孔板, 待细胞生长到 70% 密度, 将不同浓度(20、40、60、80、100 $\mu$ mol/L)的 PA 加入孔中, 孵育细胞 24h。在每孔加入 CCK-8 溶液 10 $\mu$ L, 孵育细胞 20min, 使用酶标仪在 450nm 处测定吸光度(A450nm)值。细胞存活率(%) = (实验组 A450nm - 空白组 A450nm) / (细胞对照组 A450nm - 空白组 A450nm)  $\times$  100%。

#### 1.4.2 探针法检测

将 H9c2 细胞接种至 24 孔板, 细胞分组与处理同 1.3。收集分组处理后的细胞, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入含 10 $\mu$ mol/L C11 BODIPY 荧光探针的 DMEM 基础

培养基,37℃避光孵育20min,PBS清洗两次以去除多余染料。倒置荧光显微镜检测细胞绿色荧光强度,以评估细胞脂质过氧化情况。

#### 1.4.3 Western 蛋白印迹法

将 H9c2 细胞接种至 6 孔板,细胞分组与处理同 1.3。收集分组处理后的细胞,PBS 洗涤 3 次,加入 RIPA 裂解液,放在冰上裂解 30min,每隔 10min 混匀 1 次。4℃,8000 × g 离心 30min,收集上清液,用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度。使用与相对分子质量符合的分离胶浓度进行电泳,并将蛋白转印至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉或牛血清蛋白封闭 PVDF 膜 2h 后加入一抗(SLC7A11, GPX4, AMPK, Nrf2、和 β 肌动蛋白抗体,均 1:1000 稀释,HO-1 抗体 1:10000 稀释)4℃孵育过夜。加入二抗(1:1000 稀释)室温下孵育 2h。ECL 显色曝光后用 Image J 软件进行蛋白条带积分吸光度(integrated absorbance, IA)分析。以 β 肌动蛋白为内参蛋白,待测蛋白相对表达水平用 IA 目标蛋白/IA 内参蛋白比值表示。

#### 1.4.4 RT-qPCR 检测

将 H9c2 细胞接种至 6 孔板,细胞分组与处理同 1.3。收集分组处理后的细胞,PBS 洗涤 3 次,每孔加入 0.5mL 总 RNA 提取试剂,将细胞裂解液收集到 1.5mL 无酶 EP 管,进行 RNA 分离、沉淀、洗涤。从总 RNA 中提取 1μL 样本,Nanodrop 2000 系统测量 RNA 浓度和 A260/A280 比值。合格的 RNA 按 Vazyme 逆转录试剂盒进行反应,程序为 50℃ 15min,85℃ 5s,4℃ 合成 cDNA;产物立即用于实验或 -80℃ 保存。取稀释 5 倍后的 cDNA,按照 real-time PCR 说明书进行反应,反应程序为:预变性 95℃ 5min,95℃ 10s,60℃ 30s,40 个循环;溶解曲线为:95℃ 15s,60℃ 60s,95℃ 15s。每组设置 3 个复孔,β-actin 作为内参基因,运用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的方法进行数据统计。各基因引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列表

Primer 名称	序列(5' to 3')
Nrf2	Forward:CAACTACTCCAGGTGCCC
	Reverse:AGTGACTGAAACGTAGCCGAA
AMPK	Forward:GAAGATCGGACACTACGTGC
	Reverse:ACTGCCACTTTATGGCTCTGC
SLC7A11	Forward:TGTCAACCATTGGCTATGTCT
	Reverse:GCCGCTCAGAAAAGGTCAC
HO-1	Forward:CAAGCATATACCCGCTACCT
	Reverse:CCAGAGTGTTCATTCGAGCA
GPX4	Forward:GGAGCCAGGGAGTAACGAAG
	Reverse:TCTCCATGAGGAACTTGGTGAA
β-actin	Forward:AAAACTGGAACGGTGAAGG
	Reverse:GTACAATCAAAGTCCCTCGGC

#### 1.4.5 细胞内铁含量测定

将 H9c2 细胞接种至 6 孔板,细胞分组与处理同 1.3。每孔加入适量提取液,冰水浴进行超声细胞破碎,在 4℃ 下 8000 × g 离心 10min。取上清液 0.5mL 加入 1.5mL 铁显色剂作为测定管,0.5mL 双蒸水加入 1.5mL 铁显色剂作为空白管,0.5mL 铁标准应用液加入 1.5mL 铁显色剂作为标准管。充分混匀,沸水浴 5min,冷却后 8000 × g 离心 10min。取上清液 1.0mL,在酶标仪 520nm 处使用双蒸水调零,测各管吸光度(ΔA)值,计算细胞内铁的含量细胞铁含量( $\mu\text{mol/gprot}$ ) =  $[(C_{\text{标准液}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{提取}} \times 10^3 \times 55.845] / C_{\text{样本}} \times V_{\text{提取}}$ 。

#### 1.4.6 MDA 含量检测

将 H9c2 细胞接种至 6 孔板,细胞分组与处理同 1.3。每孔加入裂解液中吹打裂解,充分涡旋后静置 5min,取 5μL 进行 BCA 法蛋白质定量。加入试剂盒中的工作液,充分混匀,95℃ 反应 20min,冰浴静置 5min,10 000 × g 离心 10min。取上清液加至 96 孔板中,在酶标仪 532nm 处测定吸光度值,根据 MDA 的标准曲线计算样品中的 MDA 浓度,并用标准蛋白进行校准。MDA 含量( $\mu\text{mol/gprot}$ ) =  $C_{\text{MDA}} / C_{\text{样本}}$ 。

#### 1.4.7 GSH 含量检测

将 H9c2 细胞接种至 6 孔板,细胞分组与处理同 1.3。每孔加入 1mL GSH 检测试剂,超声处理细胞样品,4℃ 高速冷冻离心机 10000 × g 离心 10min 后,加入工作液 37℃ 孵育 10min。立即取上清在酶标仪 412nm 处测定吸光度值(A)。GSH 含量( $\mu\text{mol/gprot}$ ) =  $[(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \times \text{标准管浓度} \times \text{GSH 分子量} \times \text{稀释倍数}] / [(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times C_{\text{样本}} \times 1000]$ 。

#### 1.4.8 核质分离

将 H9c2 细胞接种至 6 孔板,细胞分组与处理同 1.3。PBS 洗涤细胞 3 次后,4℃ 高速冷冻离心机上 10 000 × g 离心 2min,弃上清液。加入 200μL 浆蛋白提取试剂,混匀后冰浴静置 10min,再高速涡旋,4℃ 高速冷冻离心机上 10 000 × g 离心 10min,取上清液为细胞质蛋白。将沉淀物加入 50 ~ 100μL 的核蛋白提取试剂,高速涡旋 15s,冰浴静置 10min。再次进行高速涡旋,4℃ 高速冷冻离心机上 10 000 × g 离心 10min,取上清液为细胞核蛋白。

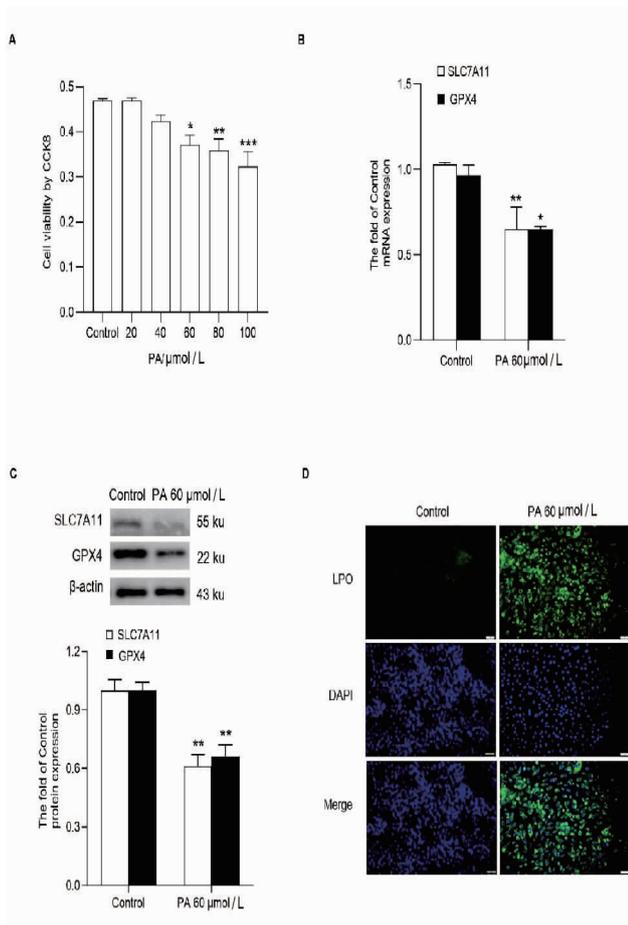
### 1.5 统计学方法

实验结果数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 GraphPad Prism 9.5 统计软件进行数据分析。多组间检验采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PA 诱导心肌细胞发生铁死亡

如图 1 所示,与对照组相比,不同浓度 PA 处理后,细胞存活率呈下降趋势,在 60 $\mu\text{mol/L}$  具有统计学意义( $P < 0.05$ ),因此,本研究选用该浓度进行后续试验。与对照组相比,PA 60 $\mu\text{mol/L}$  组铁死亡相关因子 SLC7A11 和 GPX4 的基因与蛋白表达均显著降低( $P < 0.05$ );PA 组的 LPO 绿色荧光信号明显强于对照组,表明 PA 诱导下细胞内发生了脂质过氧化反应,PA 可诱导心肌细胞铁死亡的发生。

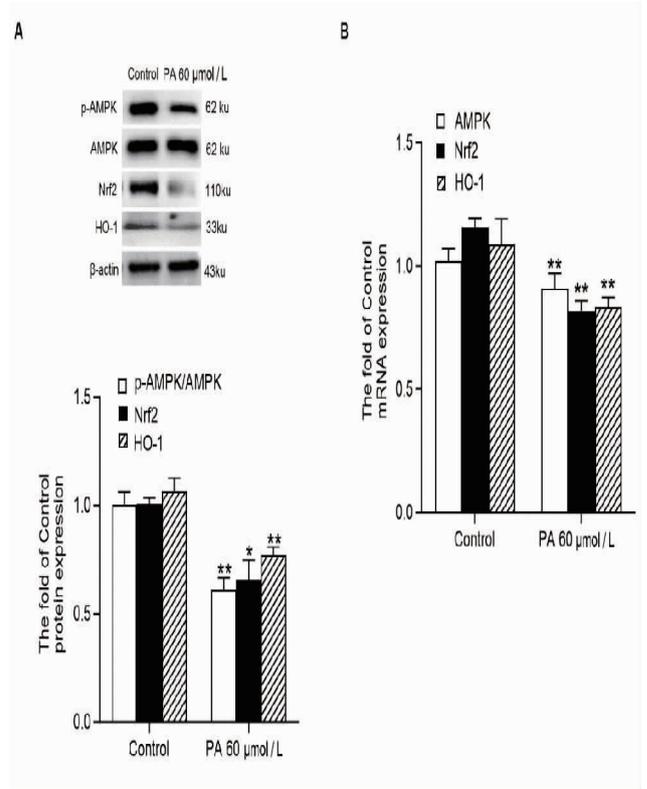


A. CCK-8 试剂盒检测细胞活力;B. RT-qPCR 检测 GPX4 和 SLC7A11 mRNA 的表达水平;C. Western 印迹法检测 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平;D. 脂质过氧化水平检测(标尺:50 $\mu\text{m}$ );与 Control 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 3$ 。

图 1 PA 对细胞活力、铁死亡蛋白、基因和脂质过氧化的影响

### 2.2 PA 刺激糖尿病心肌细胞,AMPK 和 Nrf2/HO-1 表达下调

如图 2 结果显示,与对照组相比,PA 60 $\mu\text{mol/L}$  组 AMPK、Nrf2 和 HO-1 蛋白和 mRNA 表达水平均明显降低( $P < 0.05$ )。

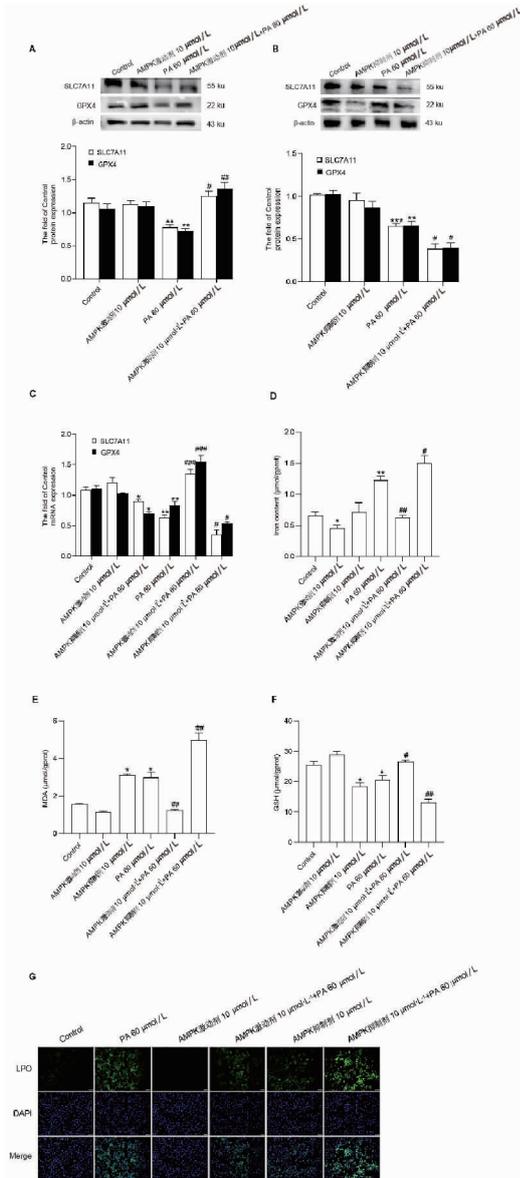


A. Western 印迹法检测 AMPK、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平;B. RT-qPCR 检测 AMPK、Nrf2 和 HO-1 的 mRNA 表达水平(与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )。

图 2 PA 对 AMPK、Nrf2 和 HO-1 蛋白及基因的影响

### 2.3 AMPK 调控 PA 诱导的糖尿病心肌细胞铁死亡

图 3A ~ 3C 结果显示,与对照组相比,AMPK 抑制剂组与 PA 组细胞铁死亡相关因子 SLC7A11 和 GPX4 蛋白与基因表达显著下调( $P < 0.01$ );与 PA 组相比,AMPK + PA 激动剂组显著提高 SLC7A11 和 GPX4 蛋白与基因的表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而 AMPK + PA 抑制剂组却进一步下调 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白与基因表达( $P < 0.05$ )。图 3D ~ 3G 结果显示,PA 刺激 24h 后,细胞的铁含量和 MDA 含量显著升高,AMPK 激动剂组的处理显著降低了铁和 MDA 含量,AMPK 抑制剂组的处理却提高了 MDA 含量( $P < 0.01$ )。GSH 检测结果显示,与对照组相比,PA 处理显著降低了细胞的 GSH 含量( $P < 0.05$ ),与 PA 组相比,AMPK 激动剂 + PA 组显著提高 GSH 含量( $P < 0.01$ )。LPO 的荧光结果显示,与对照组相比,PA 处理能使细胞 LPO 绿色荧光增强;与 PA 组相比,AMPK 激动剂 + PA 组荧光强度明显下降,而 AMPK 抑制剂 + PA 组荧光强度更强,这反映了在 PA 刺激条件下,AMPK 激动剂组可以降低其诱导的 LPO 积累,从而改善铁死亡,而 AMPK 抑制剂组的作则与其相反。

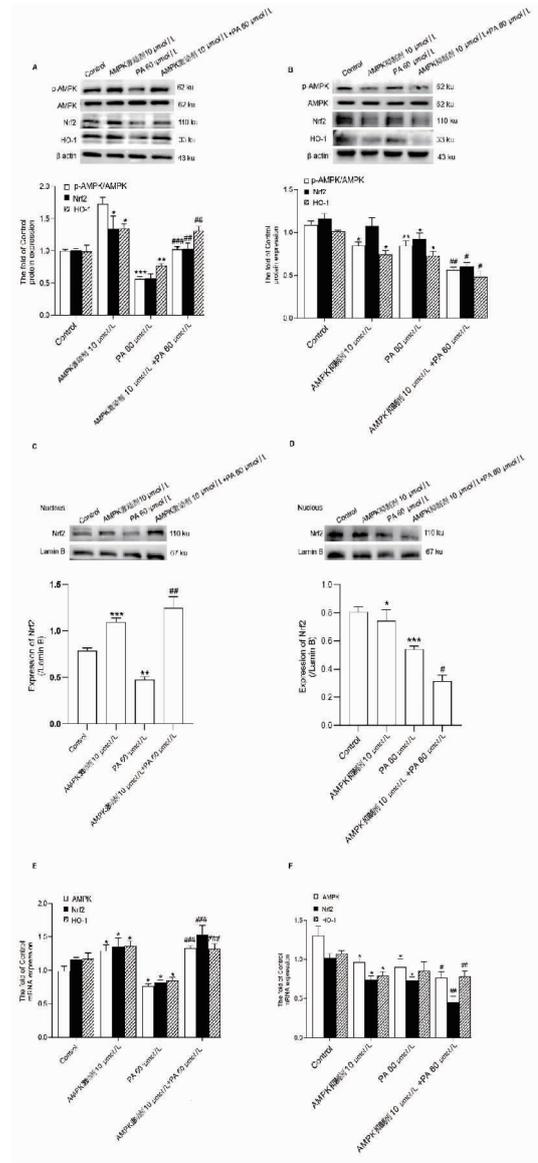


A, B. Western 印迹法检测 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平; C. RT-qPCR 检测 GPX4 和 SLC7A11 mRNA 的表达水平; D. 检测细胞铁含量; E. 检测细胞 GSH 含量; F. 检测细胞 MDA 含量; G. 脂质过氧化水平检测 (标尺: 50μm); 与 Control 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 PA 组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , n=3。

图3 AICAR 和 Compound C 对 PA 诱导 H9c2 铁死亡的影响

### 2.4 AMPK 调控 PA 刺激后的心肌细胞 Nrf2/HO-1 通路

图4结果显示,与PA组相比较,AMPK 激动剂组与 AMPK 激动剂 + PA 组的 AMPK、Nrf2 和 HO-1 蛋白与基因表达明显升高 ( $P < 0.01$ ), AMPK 抑制剂组与 AMPK 抑制剂 + PA 组组则显著下调以上蛋白与基因的表达水平 ( $P < 0.05$ )。与 PA 组相比, AMPK 激动剂组与 AMPK + PA 激动剂组的 Nrf2 的核蛋白水平表达明显升高,相反, AMPK 抑制剂组与 AMPK + PA 抑制剂组显著降低了核 Nrf2 的表达水平 ( $P < 0.05$ )。



A, B. Western 印迹法检测 AMPK、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平; C, D. Western 印迹法检测 Nrf2 的核蛋白表达水平; E, F. RT-qPCR 检测 AMPK、Nrf2 和 HO-1 的 mRNA 表达水平(与 Control 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 PA 组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , n=3)。

图4 AICAR 和 Compound C 对 AMPK、Nrf2 和 HO-1 蛋白及基因的影响

### 3 讨论

DCM 作为常见糖尿病并发症,是造成糖尿病患者死亡率增加的重要原因之一。深入研究其机制对改善糖尿病患者的预后具有重要意义<sup>[11]</sup>。本研究发现,PA—糖尿病患者血清中显著升高的游离脂肪酸之一,能够显著抑制心肌细胞 AMPK 磷酸化,进而减少 Nrf2 核累积并下调 HO-1 表达。这种抗氧化防御系统的损伤导致谷胱甘肽耗竭、脂质 ROS 累积,最终引发铁死亡。鉴于 PA 在糖尿病代谢紊乱环境中的异常累积,本研究结果可能为 DCM 的靶向干预提供了新的

潜在策略。

在糖尿病状态下,持续的高血糖和血脂异常会导致心肌细胞长期暴露于高浓度 PA 环境中<sup>[12]</sup>。本研究发现 PA 通过抑制 AMPK 活性来干扰 Nrf2/HO-1 通路,这与既往文献<sup>[13]</sup>报道的糖尿病患者心肌组织抗氧化能力显著降低的结果一致。更重要的是,PA 作为强效脂毒性分子,可促进心肌细胞内脂质异常堆积,引发心肌脂毒性<sup>[14]</sup>。这种脂毒性微环境不仅加剧氧化应激,还会破坏细胞膜磷脂的氧化还原平衡,进而触发铁死亡(ferroptosis)。这一过程已被证实与糖尿病心肌病的特征性心肌损伤和重构密切相关。因此,PA 介导的心肌脂毒性和铁死亡可能是糖尿病心肌病发生发展的重要推动因素。

AMPK 是生物能量代谢调节的关键分子,大量研究证实,AMPK 在调节细胞糖脂代谢、保护内皮细胞功能、调节细胞自噬、氧化应激和衰老方面发挥着至关重要的作用<sup>[15-16]</sup>。有文献报道,AMPK 通过磷酸化被激活后可通过抑制 mTOR 的磷酸化来抑制心脏肥大<sup>[17]</sup>,而心脏肥大是肥胖和高脂饮食导致心肌重构的重要特征之一。本研究通过使用 AMPK 激动剂 AICAR 和抑制剂 Compound C 进行干预,进一步证实了 AMPK 在 PA 诱导的铁死亡中的关键调控作用。AICAR 预处理能够显著上调 AMPK、Nrf2 和 HO-1 的蛋白水平,降低细胞 LPO 水平,提高细胞 GSH 含量,降低 MDA 和铁含量,从而减轻 PA 诱导的铁死亡。相反,AMPK 抑制剂 Compound C 则下调了 AMPK、Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 的表达水平,导致细胞 LPO 水平升高,GSH 含量降低,MDA 和铁含量升高,从而加重 PA 诱导的铁死亡。

综上所述,PA 通过下调 AMPK 来调控 Nrf2/HO-1 信号通路诱导大鼠心肌细胞发生铁死亡,这一发现为理解糖尿病心肌病的发病机制提供了新的理论依据。这说明,靶向激活 AMPK-Nrf2/HO-1 通路(如通过 AMPK 激动剂或 Nrf2 诱导剂)可以有效缓解 PA 诱导的脂毒性心肌损伤及铁死亡,这为糖尿病心肌病的治疗提供了潜在的新策略。

## 参考文献:

[1] CHEN Y, HUA Y, LI X, et al. Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 42

[2] 项云, 梁潇, 鲍翠玉, 等. 中药基于 Nrf2 信号通路治疗糖尿病心肌病的研究进展[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2023, 37(1): 76

[3] MATSUSHITA K, HARADA K, KOHNO T, et al. Prevalence

and clinical characteristics of diabetic cardiomyopathy in patients with acute heart failure[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2024, 34(5): 1325

- [4] LI D, ZHANG L, GONG Q, et al. The role of myocardial energy metabolism perturbations in diabetic cardiomyopathy: from the perspective of novel protein post-translational modifications[J]. *Clin Epigenetics*, 2025, 17(1): 15
- [5] YIN W, XU H, BAI Z, et al. Inhibited peroxidase activity of peroxiredoxin 1 by palmitic acid exacerbates nonalcoholic steatohepatitis in male mice[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 598
- [6] LIM Y, KIM S, KIM E K. Palmitate reduces starvation-induced ER stress by inhibiting ER-phagy in hypothalamic cells[J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1): 65
- [7] TIAN M, HUANG X, LI M, et al. Ferroptosis in diabetic cardiomyopathy: from its mechanisms to therapeutic strategies[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15: 1421838
- [8] LIN S C, HARDIE D G. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 299
- [9] CANBOLAT E, CAKIROGLU F P. The importance of AMPK in obesity and chronic diseases and the relationship of AMPK with nutrition: a literature review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 63(4): 449
- [10] WANG Z, YAO M, JIANG L, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced ferroptosis via AMPK/GSK-3 $\beta$ /Nrf2 axis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113572
- [11] 艳梅, 吴红彦. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2024, 12(3): 21
- [12] WANG H, WANG J, CUI H, et al. Inhibition of fatty acid uptake by TGR5 prevents diabetic cardiomyopathy[J]. *Nat Metab*, 2024, 6(6): 1161
- [13] KHAN A W, JANDELEIT-DAHM K A M. Atherosclerosis in diabetes mellitus: novel mechanisms and mechanism-based therapeutic approaches[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2025, 22(7): 482
- [14] 周宇, 刘涛, 鲍翠玉. 棕榈酸诱导 H9C2 心肌细胞脂毒性损伤模型的建立[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2018, 32(2): 102
- [15] YU H, LIU Q, CHEN G, et al. SIRT3-AMPK signaling pathway as a protective target in endothelial dysfunction of early sepsis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 106: 108600
- [16] DAI G, LI Y, ZHANG M, et al. The regulation of the AMPK/mTOR axis mitigates tendon stem/progenitor cell senescence and delays tendon aging[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(5): 1492
- [17] ZHAO Y J, WU W H, NIU K M, et al. Xinkeshu formula restrains pathological cardiac hypertrophy through metabolic remodeling via AMPK/mTOR pathway[J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156309

(收稿日期:2025-03-13)

引文格式:祝巧云,朱波.白桦脂酸通过下调 c-Myc 抑制宫颈癌 SIHA 细胞的增殖与迁移[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):386-390.

## 白桦脂酸通过下调 c-Myc 抑制宫颈癌 SIHA 细胞的增殖与迁移

祝巧云<sup>1</sup>,朱波<sup>2\*</sup>

(1.咸宁市咸安区中医医院妇产科,湖北咸宁 437000;2.湖北科技学院医学部基础医学院人体解剖学教研室)

**摘要:**目的 探讨白桦脂酸(BA)抑制宫颈癌 SIHA 细胞的恶性生物学行为及部分分子机制。方法 在恒温恒湿 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养宫颈癌 SIHA 细胞,将细胞与不同浓度梯度的 BA 孵育后进行细胞增殖和迁移检测。采用 MTT 法检测 SIHA 细胞的光密度值,接着评价同一浓度下 BA 对 SIHA 细胞抑制的时间依赖性;平板克隆形成实验检测宫颈癌 SIHA 细胞的单细胞克隆增殖能力;通过 Transwell 小室迁移和侵袭实验来评估宫颈癌 SIHA 细胞的迁移能力;蛋白质免疫印迹(Western blot)实验检测 BA 影响宫颈癌 SIHA 细胞中 c-Myc 蛋白表达水平的情况;Rescue 实验检测 BA 是否通过 c-Myc 通路介导其抑制作用。结果 BA 可以剂量和时间依赖性地抑制宫颈癌 SIHA 细胞的存活和增殖能力,浓度依赖性地抑制 SIHA 细胞的迁移和侵袭能力;在一定剂量范围内,BA 可以引起癌基因 c-Myc 蛋白质表达下调,c-Myc-saRNA 可以部分抵消 BA 的抑制作用。结论 BA 对宫颈癌 SIHA 细胞的增殖与迁移具有抑制作用,其作用机制与下调 c-Myc 蛋白表达有关。

**关键词:**白桦脂酸;宫颈癌;SIHA;c-Myc;迁移

中图分类号:R737

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0386-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025010610



## Betulinic Acid Inhibits the Proliferation and Migration of Cervical Cancer SIHA Cells Through Downregulation of c-Myc Protein

ZHU Qiao-yun,ZHU Bo

(Obstetrics and Gynecology Department,Xian'an Traditional Chinese Medicine Hospital,  
Xianning Hubei 437000,China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the inhibitory effect and partial molecular mechanism of betulinic acid (BA) on the malignant biological behavior of cervical cancer SIHA cells. **Methods** Cervical cancer SIHA cells were cultured in cell incubator with constant temperature and humidity and treated with different concentration gradients of BA to detect the proliferation and migration ability. The optical-density of SIHA cells was detected by MTT assay, and then the time-dependent inhibition of SIHA cells by BA at the same concentration was evaluated. The single cell clonal proliferation ability of SIHA cells was detected by plate clone formation assay. The migration and invasion ability of SIHA cells were evaluated by Transwell cell small chamber migration and invasion assay. The c-Myc protein expression level in SIHA cells treated with BA was detected by Western blot assay. Rescue assay was applied to demonstrate whether the inhibitory effect of BA was mediated by c-Myc pathway. **Results** BA could inhibit the survival and proliferation of SIHA cells in a time and dose-dependent manner, as well as the migration and invasion in a dose-dependent manner. In a certain dose range, BA down-regulated the expression of oncogene c-Myc protein. c-Myc-saRNA can partly counteract the inhibition effect of BA. **Conclusion** BA can inhibit the proliferation and migration of cervical cancer SIHA cells, and its mechanism is related to the down-regulation of c-Myc protein expression.

**KEY WORDS:** Betulinic acid; Cervical cancer; SIHA; c-Myc; Migration

\* 通信作者, E-mail: zhubo251953@163.com

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,全球女性癌症死亡的主要原因之一。在发展中国家,宫颈癌新增病例为45.2万例,排名第二<sup>[2]</sup>,其病理类型分为鳞癌、腺癌、鳞腺癌,持续感染高危人乳头瘤病毒(HPV)是最主要的原因。宫颈癌的远处转移扩散与长期生存率低有关,其中原位癌高发年龄为30~50岁,浸润癌为45~55岁<sup>[3]</sup>,近年来发病有年轻化趋势。手术仍然是早期宫颈癌患者的主要治疗方法,局部晚期肿瘤采用化疗<sup>[4]</sup>。

白桦脂酸(Betulinic acid, BA)是存在于蒲桃树叶、白桦树皮、酸枣仁等植物中的天然羽扇豆烷型五环三萜化合物,具有抗肿瘤、抗HIV、调血脂、抗糖尿病等作用<sup>[5]</sup>。BA通过体内与体外机制抑制癌细胞的生长,并靶向mTOR信号来抑制胰腺癌的凋亡<sup>[6]</sup>。BA通过抑制炎症与血管的生成,导致细胞周期停滞,最终导致三阴性乳腺癌细胞凋亡<sup>[7]</sup>。BA可以通过线粒体依赖性和非依赖性途径诱导卵巢癌细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。本文探索BA对宫颈癌细胞的抑制作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

人宫颈癌细胞株SIHA购自斑马生物技术公司,RPMI1640培养基、胎牛血清购自佰欧公司,双抗为碧云天生物技术公司生产,96孔板为Corning公司产品。BA购自上海源叶生物公司,MTT、二甲基亚砜(DMSO)为SIGMA公司产品。GAPDH Rabbit Monoclonal Antibody(AF0006)购自Beyotime生物公司,c-Myc单克隆抗体购自Abclonal公司。酶标仪(天逸510S-071CB)购自美国Bio-Tek公司,BCA蛋白定量检测试剂盒、蛋白提取试剂盒和SDS-PAGE凝胶试剂盒均购自白鲨生物。电泳仪(EPS 600)购自雅酶公司,倒置显微镜(TH4-200)购自奥斯维公司。其他试剂为生化分析纯。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细胞培养

使用RPMI-1640完全培养基(10% FBS、90% RPMI-1640、1%青霉素链霉素双抗)在37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱内培养宫颈癌SIHA细胞。

#### 1.2.2 MTT法

待SIHA细胞长至对数增长期时,消化传代后,以每孔 $5 \times 10^5$ 接种于96孔板中。接下来的实验步骤参照以前发表的文献<sup>[9]</sup>,BA的浓度设定为0、5、10、20、40、80 μmol/L。

#### 1.2.3 平板克隆形成实验

实验步骤参照以前发表的文献<sup>[9]</sup>,BA的浓度设定为0、5、10、40 μmol/L。

#### 1.2.4 Transwell小室侵袭和迁移实验

具体实验步骤参照以前发表的文献<sup>[9]</sup>,BA的浓度设定为0、5、10、40 μmol/L。

#### 1.2.5 蛋白检测

用不同浓度梯度(0、5、10、40 μmol/L)BA与SIHA细胞孵育24h后,提取细胞总蛋白,接下来的实验步骤参考以前发表的文献<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.6 saRNA激活c-Myc蛋白的表达

根据文献报道的方法<sup>[11]</sup>,设计针对人c-Myc基因启动子区的三对小激活RNA(small activating RNA, saRNA),saRNA的序列见表1。以Lipofectamine2000为转染试剂,采用瞬时转染的方法转进宫颈癌SIHA细胞。Western blot检测转染效果。

表1 saRNA序列

saRNA名称	起始处	正义链序列	反义链序列
saRNA-1	63	GUGACUAUUC AACCGCAUA	UAUGCGGUUGAAUAGUCAC
saRNA-2	31	GAGGAGUACUGGAGGAAA	UUUCCUCCAGUAACUCCUC
saRNA-3	787	AGCAGUACUGUUGACAAA	UUUGCAAACAGUACUGCU
saRNA-control	-	ACUUACGAGUGACAGUAGA	UCUACUGUCACUCCUAAGU

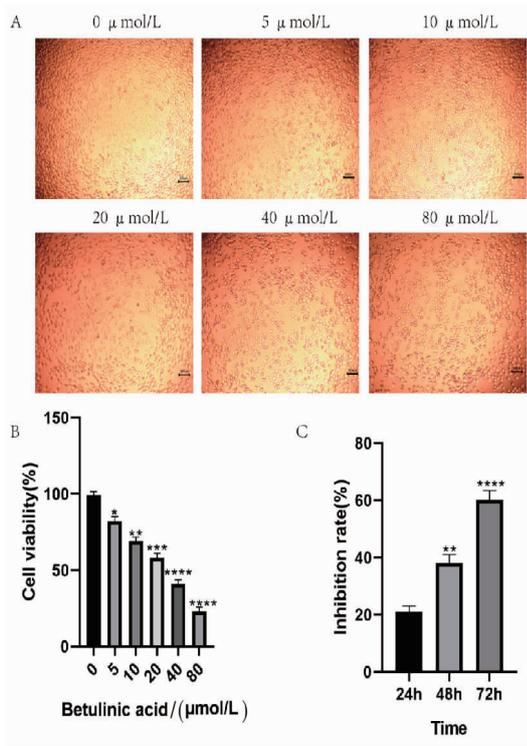
### 1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0进行统计分析及绘图,数据结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,并用One-Way ANOVA进行分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 BA对宫颈癌SIHA细胞存活和增殖能力的影响

通过MTT实验检测BA对SIHA细胞存活和增殖能力的抑制情况,如图1所示,不同浓度BA(0、5、10、20、40、80 μmol/L)作用24h后,SIHA细胞的活力逐渐被抑制,普通光学显微镜下观察表现为细胞逐渐失去典型多角形,变圆、漂浮,光密度值(OD)逐渐减少,说明其抑制程度随BA浓度的增加而增强,呈现剂量依赖性,经计算, $IC_{50}$ 为28.52 μmol/L。为了评估时间依赖性,本文选取10 μmol/L的浓度来测算。随着时间的推移,10 μmol/L BA呈时间依赖性抑制人宫颈癌细胞株SIHA的增殖,表现为OD值逐渐减少。

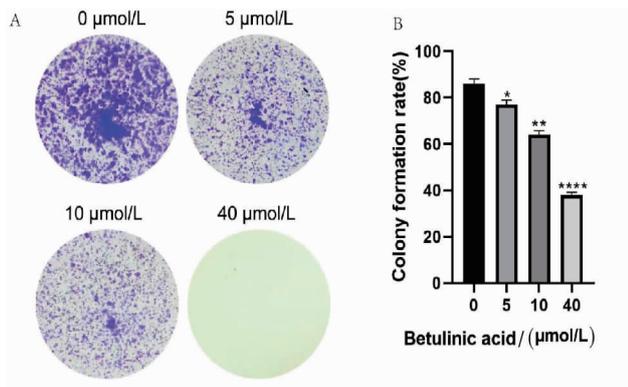


A. BA 作用于 SIHA 细胞 24h 后的细胞白光图 ( $\times 100$ ); B. 一定浓度梯度的 BA 与 SIHA 细胞孵育 24h 后, BA 对 SIHA 细胞增殖的影响(与空白对照组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001, n=3$ ); C. 与  $10\mu\text{mol/L}$  BA 孵育 24, 48, 72h 后, SIHA 细胞的增殖能力被时间依赖性抑制(与 24h 组比较,  $**P < 0.01$ ,  $****P < 0.0001, n=3$ )。

图 1 BA 对 SIHA 细胞增殖的影响

## 2.2 BA 对宫颈癌 SIHA 细胞克隆形成能力的影响

平板克隆形成实验反映了单个癌细胞的增殖和集落形成能力。如图 2 所示,一定浓度梯度的 BA ( $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ ) 孵育后, BA 浓度依赖性抑制了宫颈癌 SIHA 细胞的克隆形成能力,表现为肉眼可见的克隆逐步减少。

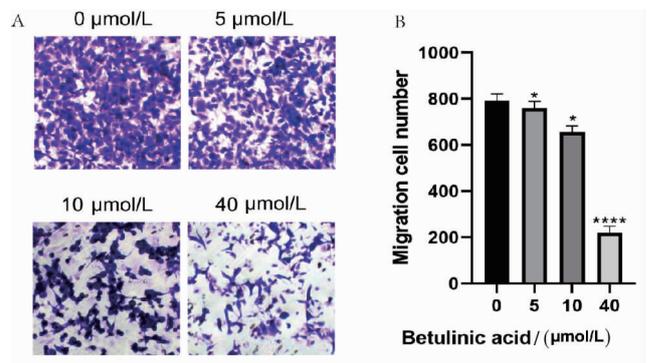


A. 不同浓度的 BA 对 SIHA 细胞的克隆形成图; B. 不同浓度 BA 对 SIHA 细胞的克隆数统计图(与空白对照组比较,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $****P < 0.0001, n=3$ )

图 2 BA 对 SIHA 细胞克隆形成能力的影响

## 2.3 BA 对宫颈癌 SIHA 细胞的纵向迁移能力的影响

Transwell 小室迁移实验反映了癌细胞的纵向迁移能力。如图 3 所示,与一定浓度梯度的 BA ( $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ ) 孵育后, BA 浓度依赖性抑制了宫颈癌细胞的迁移,表现为穿过基底膜的细胞逐渐减少。

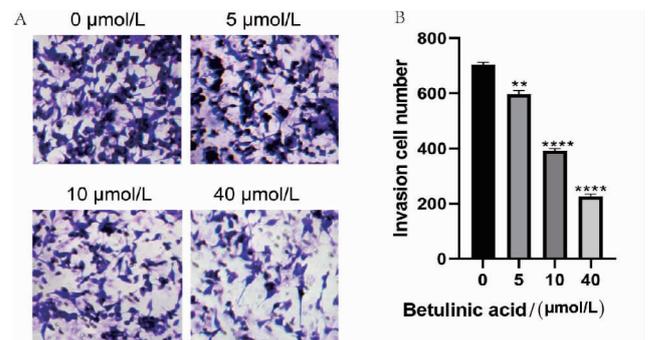


A. 不同浓度的 BA 对 SIHA 细胞纵向迁移的抑制情况 ( $\times 20$ ); B. BA 对 SIHA 细胞纵向迁移能力抑制的统计图(与空白对照组比较,  $*P < 0.05$ ,  $****P < 0.0001, n=3$ )

图 3 BA 抑制 SIHA 细胞纵向迁移

## 2.4 BA 对宫颈癌 SIHA 细胞侵袭的影响

Transwell 小室侵袭实验反映了癌细胞的侵袭能力。如图 4 所示,一定浓度梯度的 BA ( $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ ) 与 SIHA 细胞孵育后, BA 浓度依赖性抑制了宫颈癌 SIHA 细胞的侵袭能力,表现为穿过基底胶和基底膜的细胞逐渐减少。

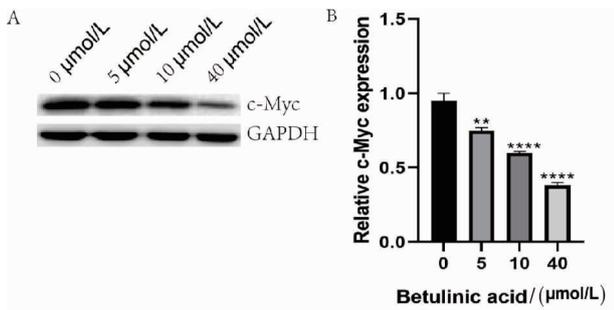


A. 不同浓度的 BA 对 SIHA 细胞侵袭能力的影响 ( $\times 20$ ); B. BA 对 SIHA 细胞侵袭抑制的统计图(与空白对照组比较,  $**P < 0.01$ ,  $****P < 0.0001, n=3$ )

图 4 BA 抑制 SIHA 细胞侵袭

## 2.5 BA 对宫颈癌 SIHA 细胞 c-Myc 蛋白表达的影响

如图 5 所示,从经 BA 孵育后的宫颈癌细胞中提取总蛋白,实施 Western blot 检查,发现 BA 剂量依赖性 ( $0$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ ) 下调了宫颈癌 SIHA 细胞 c-Myc 蛋白的表达,说明 BA 可能通过下调 c-Myc 基因的翻译抑制宫颈癌 SIHA 细胞的增殖和迁移。

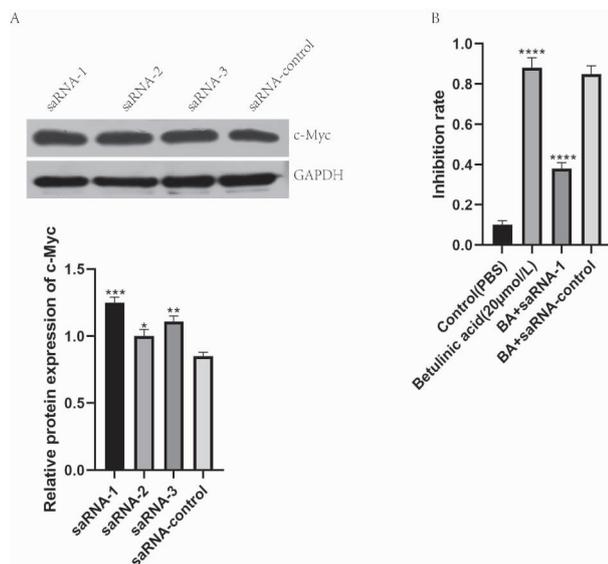


A. Western blot 结果图; B. Western blot 结果统计图(与空白对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ )。

图5 BA对SIHA细胞c-Myc蛋白表达的影响

## 2.6 c-Myc表达的抑制作用

转染 c-Myc-saRNA 后,发现 SIHA 细胞的 c-Myc 蛋白表达显著上调,其中 c-Myc-saRNA-1 激活效果最明显(图 6A),利用 20 μmol/L BA 与 SIHA 细胞共孵育,发现 c-Myc-saRNA-1 可以部分抵消 BA 对 SIHA 细胞的抑制作用(图 6B),说明 BA 对宫颈癌 SIHA 细胞的抑制作用部分通过下调 c-Myc 蛋白的表达而实现。



A. c-Myc-saRNA 可以在 SIHA 细胞中上调 c-Myc 的蛋白表达水平; B. c-Myc-saRNA 可以部分抵消 BA 对宫颈癌 SIHA 细胞的抑制作用(与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ )。

图6 c-Myc-saRNA BA对宫颈癌SIHA细胞的作用

## 3 讨论

宫颈癌是全球女性常见的癌症之一,也是导致癌症相关死亡率的原因。几乎所有的宫颈癌都与人类乳头瘤样病毒(HPV)感染有相关性<sup>[12]</sup>。包括宫颈鳞状细胞癌(70%)、宫颈腺癌(25%)和混合组织学肿瘤。虽然能在普查中及时确诊,但后期的生存率却很低,仅为一年半时间<sup>[13]</sup>。

BA 是一种五环三萜类化合物,在自然界中广泛存在,最早分离于生长在非洲东部的鼠李科常绿植物的树皮,但主要来源是从白桦树皮中提取纯化<sup>[14]</sup>。BA 及其衍生物作为生物制剂在抗癌和 HIV 治疗等方面表现出了巨大的潜能,在机体的抗氧化损伤和免疫调节过程中发挥着重要作用,是一类很有潜力的药物先导化合物,对于新药的研发具有重要价值<sup>[15]</sup>。BA 在许多癌细胞中具有抗增殖特性,如胰腺癌、胃癌、乳腺癌、肾癌、卵巢癌等。Guo 等<sup>[16]</sup>通过体外和体内实验证明 BA 均以剂量依赖性方式明显抑制胰腺癌,并且通过特异性靶向 mTOR 信号而不是 Nrf2 或 JAK2 来抑制胰腺癌。Atas 等<sup>[17]</sup>通过评估 EMT 标志物 SNAIL-1 和 SDC-2 来研究 BA 对肾细胞癌细胞的抗转移作用,通过细胞毒性测定剂量处理 BA,SDC-2 的表达水平降低,并且抑制癌细胞的增殖与迁移。

许多原癌基因已被证明参与调节细胞凋亡和癌症发生。Myc 原癌基因编码一个转录因子家族,是人类癌症中常见的激活癌基因之一。在正常生长的成人组织中,c-Myc 表达与生长有关,当静止的组织被刺激生长时,如在再生肝中,c-Myc 表达增加,当扩增时表明预后不良。细胞生长的停止通常伴随着 c-Myc 表达的大幅降低。当使用反义寡核苷酸来降低 c-Myc 的表达水平,即使不会导致死亡,也会导致生长抑制。它在癌症中的作用是普遍存在的,因为它促进生长、细胞周期进程、代谢和生存<sup>[18]</sup>。c-Myc 涉及多种细胞过程,包括增殖、分化、细胞凋亡和代谢<sup>[19]</sup>,长期培养的成纤维细胞中加入生长因子,诱导 c-Myc 基因表达,可刺激细胞增殖;当撤去生长因子,且下调 c-Myc 基因表达时,细胞停滞在 G<sub>1</sub> 期而不增殖。c-Myc 与正调节的生长因子协同促进细胞增殖,而与具有负调控的生长抑制基因 Fas、FasL 和 Bas 结合后可加速细胞凋亡。成骨肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、何杰金氏病及头部肿瘤等都有 Myc 基因的扩增或过度表达<sup>[20]</sup>。

尽管越来越多的研究提示<sup>[21-22]</sup>原癌基因 c-Myc 卷入宫颈癌的发生和发展,但是 c-Myc 的突变更多地是被作为宫颈癌预后不良的生物标志物,而不是起决定作用的驱动因素<sup>[23]</sup>。Riou 等<sup>[24]</sup>发现在 93 例早期宫颈癌中 c-Myc 基因的过表达预示着更高的复发风险,c-Myc 基因的检测联合淋巴结转移状况分析能更精确地预测复发风险。Ocadiz 等<sup>[25]</sup>发现在 35 例墨西哥妇女宫颈癌样本中约 90% 存在 c-Myc 基因的扩增和/或重排。但是迄今为止,似乎未见 c-Myc 基因在宫颈癌中的功能学研究。本研究发现 BA 可以剂量依赖性下调宫颈癌 SIHA 细胞的恶性生物学行为和 c-

Myc 蛋白的表达,且 saRNA 上调 c-Myc 基因的表达后可以部分抵消 BA 的抑制作用,间接地证实了 c-Myc 基因在宫颈癌中的致瘤性功能。

总之,本研究通过体外实验证明 BA 能有效抑制宫颈癌细胞的增殖和迁移,且通过下调 c-Myc 蛋白的表达得以实现。后续将进行裸鼠体内实验验证 BA 是否在体内具有相同的作用,为临床应用提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] ZHANG S, XU H, ZHANG L, et al. Cervical cancer: epidemiology, risk factors and screening [J]. *Chinese J Cancer Res*, 2020, 32(6): 720
- [2] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A, et al. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12
- [3] GU J, CHEN C, CHEN Y, et al. High-expression of BCL10 inhibits cell-mediated immunity within the tumor immune micro-environment [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1616321
- [4] MARKOVINA S, RENDLE K A, COHEN A C, et al. Improving cervical cancer survival-a multifaceted strategy to sustain progress for this global problem [J]. *Cancer Am Cancer Soc*, 2022, 128(23): 4074
- [5] LOU H, LI H, ZHANG S, et al. A review on preparation of betulinic acid and its biological activities [J]. *Molecules*, 2021, 26(18): 5583
- [6] GUO Y, ZHU H, WENG M, et al. Chemopreventive effect of betulinic acid via mTOR-Caspases/Bcl2/Bax apoptotic signaling in pancreatic cancer [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 178
- [7] WEBER D, ZHANG M, ZHUANG P, et al. The efficacy of betulinic acid in triple-negative breast cancer [J]. *SAGE Open Med*, 2014, 2: 2050312114551974
- [8] CHAN C K, AIMAGAMBETOVA G, UKYBASSOVA T, et al. Human papillomavirus infection and cervical cancer: epidemiology, screening, and vaccination-review of current perspectives [J]. *J Oncol*, 2019, 2019: 3257939
- [9] 蔡敬, 贾爱亭, 曾凤娇, 等. 阿苯达唑对人食管鳞癌细胞 KYSE-150 的抑制作用 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2024, 38(4): 287
- [10] 魏瑶璐, 李燕, 黄圣, 等.  $\beta$ -榄香酮对人食管癌细胞 Eca-109 的抑制作用 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2023, 37(1): 15
- [11] WANG X L, WANG J, HUANG V, et al. Induction of NANOG expression by targeting promoter sequence with small activating RNA antagonizes retinoic acid-induced differentiation [J]. *Biochem J*, 2012, 443(3): 821
- [12] LIU Y, LI R, LIU J, et al. Exploring the role of the vaginal microbiome in HPV infection dynamics: a prospective cohort study [J]. *iScience*, 2025, 28(5): 112476
- [13] WANG Y, LIN A Y, WANG D D, et al. In situ phenotypic and karyotypic co-detection of aneuploid TCs and TECs in cytological specimens with abnormal cervical screening results [J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 945
- [14] 陈芳玲, 楼雅楠, 孔祥倩, 等. 三萜类化合物抗肿瘤及其作用机制的研究进展 [J]. *中医药导报*, 2018, 24(17): 45
- [15] SANEJA A, SHARMA L, DUBEY R D, et al. Synthesis, characterization and augmented anticancer potential of PEG betulinic acid conjugate [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 73(4): 616
- [16] GUO Y, ZHU H, WENG M, et al. Chemopreventive effect of betulinic acid via mTOR-Caspases/Bcl2/Bax apoptotic signaling in pancreatic cancer [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 178
- [17] ATAS M N, ERTUGRUL B, İPLİK E S, et al. The inhibitory effect of betulinic acid on epithelial-mesenchymal transition pathway in renal cell carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2022, 39(11): 170
- [18] KANSARA M, TENG M W, SMYTH M J, et al. Translational biology of osteosarcoma [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 722
- [19] STOELZLE T, SCHWARB P, TRUMPP A, et al. C-Myc affects mRNA translation, cell proliferation and progenitor cell function in the mammary gland [J]. *BMC Biology*, 2009, 7: 63
- [20] MILLER D, THOMAS S, ISLAM A, et al. C-Myc and cancer metabolism [J]. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18(20): 5546
- [21] WANG X, JIANG C, LI Q, et al. Serinc2 drives the progression of cervical cancer through regulating myc pathway [J]. *Cancer Med*, 2024, 13(19): e70296
- [22] LI Y, ZHANG R, ZHANG J, et al. Association between recurrence of high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix and p16, C-myc and PIK3CA proteins-a single-center retrospective study [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2025, 83(1): 1151
- [23] LIAO L M, SUN X Y, LIU A W, et al. Low expression of long noncoding XLOC\_010588 indicates a poor prognosis and promotes proliferation through upregulation of c-Myc in cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(3): 616
- [24] RIOU G F, BOURHIS J, LE M G. The c-myc proto-oncogene in invasive carcinomas of the uterine cervix; clinical relevance of overexpression in early stages of the cancer [J]. *Anticancer Res*, 1990, 10(5A): 1225
- [25] OCADIZ R, SAUCEDA R, CRUZ M. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix [J]. *Cancer Res*, 1987, 47(15): 4173

(收稿日期: 2025-01-06)

引文格式:刘慧敏,皮雪姣,韩元春,等.竹节参总皂苷调节自噬减轻 PFOS 暴露所致 PC12 细胞损伤的研究[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):391-395.

# 竹节参总皂苷调节自噬减轻 PFOS 暴露所致 PC12 细胞损伤的研究

刘慧敏<sup>1,2</sup>,皮雪姣<sup>1</sup>,韩元春<sup>1</sup>,董文欢<sup>1</sup>,张一丹<sup>1</sup>,王 婷<sup>1\*</sup>

(1. 武汉科技大学医学院,湖北 武汉 430065;2. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院)

**摘要:**目的 探讨竹节参总皂苷(SPJ)对全氟辛烷磺酸盐(PFOS)的神经毒性以及 PC12 细胞自噬的干预作用。方法 将 PC12 细胞暴露于 100、200、300、400、500  $\mu\text{mol/L}$  的 PFOS,利用甲基噻唑基四唑(MTT)法检测细胞活力;Western blot 法检测自噬相关蛋白的表达变化。同时采用 5、25、50  $\mu\text{g/mL}$  SPJ 预保护 PC12 细胞后,用 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS 和不同浓度 SPJ 共孵育,MTT 检测细胞活力;Hoechst 染色检测细胞凋亡;2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针标记检测细胞活性氧水平;Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3、p62 蛋白表达变化。结果 不同浓度 PFOS 暴露后,与对照组比较,100、200、300、400 和 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS 显著降低 PC12 细胞活力( $P < 0.01$ ),500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS 组 LC3 蛋白表达显著上升( $P < 0.05$ ),400 和 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS 暴露组 p62 蛋白表达显著上升( $P < 0.05$ ),不同浓度 PFOS 组 Beclin1、Atg5、Atg12 蛋白表达水平无明显变化;给予不同浓度的 SPJ 干预后,与 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS 组比较,50  $\mu\text{g/mL}$  SPJ 组细胞凋亡数量减少,活性氧水平降低( $P < 0.01$ ),25 和 50  $\mu\text{g/mL}$  SPJ 表现为细胞活力明显增高( $P < 0.01$ ),LC3 和 p62 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ )。结论 竹节参总皂苷可通过调节自噬途径减轻 PFOS 暴露所致 PC12 细胞损伤。

**关键词:**全氟辛烷磺酸盐;竹节参总皂苷;自噬

中图分类号:R28

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)04-0391-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2024122710



## Effect of Saponins from *Panax japonicus* on Autophagy after PFOS Exposure in PC12 Cells

LIU Hui-min, PI Xue-jiao, WANG Ting, et al

(College of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430065, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the neurotoxic effect of Perfluorooctane Sulfonates (PFOS) and the intervention effects of Saponins from *Panax japonicus* (SPJ) on PC12 cell. **Methods** The PC12 cells were exposed to 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS, cell viability was detected by Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT). The levels of autophagy-related proteins were assessed using Western blot. PC12 cells were pretreated with different concentrations of SPJ (5, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ ), then incubated with 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS and various concentrations of SPJ. The cell viability was detected by MTT. The cell apoptosis was detected by Hoechst staining. The cellular reactive oxygen species levels were measured by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe labeling. Autophagy-related proteins such as LC3 and p62 were detected through Western blot. **Results** After exposure to different concentrations of PFOS, the viability of PC12 cells in 100, 200, 300, 400 and 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), when compared to control cells. The expression of LC3 protein in 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS exposure group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), as well as the expression of p62 protein in 400 and 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS exposure groups ( $P < 0.05$ ). There were no significant changes in Beclin1, Atg5 and Atg12 protein expression in different concentration PFOS exposure groups. Compared with 500  $\mu\text{mol/L}$  PFOS exposure group, the number of apoptotic cells and the levels of reactive oxygen species in the 50  $\mu\text{g/mL}$  SPJ group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, the cell viability was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the expressions of LC3 and p62 proteins were significantly decreased in 25 and 50  $\mu\text{g/mL}$  SPJ groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SPJ can reduce the damage of PC12 cells induced by PFOS exposure by regulating autophagy pathway.

**KEY WORDS:** Perfluorooctane sulfonates; Saponins from *Panax japonicus*; Autophagy

全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonates, PFOS)是全氟化合物家族中具有代表性的一种持久性有机污染物<sup>[1]</sup>。PFOS 广泛存在于各种环境介质如

水体、土壤、大气中,并随着生物链不断在生物体和人体内富集;其在人体内的主要蓄积部位为肝脏、肾脏、血液和大脑,在大脑中的蓄积浓度可达到血液中的

\* 通信作者, E-mail: wt197391@wust.edu.cn

32%,并能产生发育毒性、肝脏毒性、肠道毒性以及神经毒性<sup>[2]</sup>。自噬是一种以细胞成分降解和循环利用为特征的生理过程。自噬在缺氧、营养缺乏和其他形式的压力下作为生存反应被激活,以祛除受损蛋白质和功能失调的细胞器。目前研究<sup>[3]</sup>证明,PFOS能够通过溶酶体-线粒体轴和受损的线粒体自噬发挥促细胞凋亡作用,从而引发肝毒性。竹节参(*panax japonica rhizoma*)是五加科人参属植物竹节参的干燥根茎,作为中药材被收录在《中国药典》中,其发挥功效的活性成分是竹节参总皂苷(saponins from *panax japonicus*, SPJ),具有抗炎、抗凋亡和抗氧化等药理作用<sup>[4]</sup>。有研究表明,SPJ通过氧化应激、细胞凋亡、自噬水平发挥神经保护作用,改善认知缺陷<sup>[5]</sup>。但是SPJ对PFOS诱发大鼠神经细胞损伤的保护作用是否与自噬水平有关尚不清楚。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞株与药物

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12细胞)由三峡大学医学院惠赠。

竹节参总皂苷由三峡大学医学院何毓敏博士赠予,用无菌PBS溶液配制并混匀充分,微孔滤膜过滤,4℃避光保存。

PFOS母液配制:称取269.115mg的PFOS,用1mL DMSO配制成500mmol/L的母液,用完全培养基稀释1000倍至500 $\mu$ mol/L,临用前再分别稀释至所需的PFOS浓度,涡旋振荡均匀。PFOS溶解在DMSO中,最终在培养基中的浓度为0.1%。

#### 1.1.2 主要试剂

全氟辛基磺酸钾盐(PFOS,罗恩试剂公司);RPMI-1640培养基(GIBCO公司);胎牛血清(Gemini Bio公司);青霉素/链霉素双抗溶液、四甲基偶氮唑盐(MTT)、无菌PBS溶液(武汉科瑞生物技术有限公司);0.25%胰酶溶液(浙江吉诺生物医药技术有限公司);DMSO(细胞培养级,大连美仑生物技术有限公司);活性氧检测试剂盒、Hoechst染色液(上海碧云天生物技术有限公司); $\beta$ -actin(GB11001,武汉赛维尔生物科技有限公司);LC3(14600-1-AP)、p62(18420-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,兔抗);Beclin1(WL02508)、Atg5(WL02411)、Atg12(WL03144,万类生物科技有限公司,兔抗)。

#### 1.1.3 仪器

BSA224S电子天平购于德国赛多利斯股份公司;Tanon-4600化学发光成像显影仪购于上海天能科技

有限公司;311二氧化碳细胞培养箱购于赛默飞世尔科技有限公司;JP-201A单板微量振荡器购于上海派旗仪器有限公司;IX73 Olympus倒置荧光显微镜购于奥林巴斯公司;Victor Nivo多功能酶标仪购于PerkinElmer股份有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞培养及处理

PC12神经细胞以RPMI-1640培养基培养于37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱,选择对数生长期细胞进行试验。

筛选PFOS浓度:计数完成后,将细胞悬液稀释至 $5 \times 10^4$ 个/mL,每孔加入100 $\mu$ L细胞悬液,培养箱培养,待细胞贴壁后,设置对照组(Control)、PFOS组。对照组设置为溶剂对照组(含0.1% DMSO的完全培养基),PFOS组每孔加入100 $\mu$ L不同浓度(100、200、300、400、500 $\mu$ mol/L)PFOS溶液,刺激24h后每孔避光加入20 $\mu$ L MTT(5mg/mL),培养4h后,弃上清,每孔避光加入150 $\mu$ L DMSO,低速震荡10min,在490nm处检测吸光度值,计算细胞活力。

筛选PFOS刺激下的SPJ浓度:计数完成后,将细胞悬液稀释至 $3 \times 10^4$ 个/mL,每孔100 $\mu$ L细胞悬液,培养箱培养,待细胞贴壁后,设置对照组(Control)、500 $\mu$ mol/L PFOS组、500 $\mu$ mol/L PFOS + 5 $\mu$ g/mL SPJ组、500 $\mu$ mol/L PFOS + 25 $\mu$ g/mL SPJ组以及500 $\mu$ mol/L PFOS + 50 $\mu$ g/mL SPJ组。PFOS + SPJ组中加入不同浓度SPJ母液(SPJ的终浓度为5、25、50 $\mu$ g/mL)预保护PC12细胞,12h后吸除培养基。PFOS组加入含500 $\mu$ mol/L PFOS的完全培养基,PFOS + SPJ组分别加入含500 $\mu$ mol/L PFOS和各浓度SPJ的完全培养基,培养24h后计算细胞活力,方法同上。

### 1.2.2 Hoechst染色检测细胞凋亡

取对数生长期细胞接种于24孔板,细胞分组及给药方式同1.2.1。使用PBS洗涤1次,加入250 $\mu$ L Hoechst染色液,37℃培养箱中培养30min,弃去染液,用PBS洗涤2~3次,在激发波长350nm、发射波长461nm下观察。

### 1.2.3 DCFH-DA荧光染料检测细胞内活性氧水平

取对数生长期细胞接种于24孔板,细胞分组及给药同1.2.1。使用无血清培养液洗涤1次,加入250 $\mu$ L稀释好的DCFH-DA,37℃培养箱中培养30min,弃去染液,用无血清培养液洗涤2~3次,在激发波长488nm、发射波长525nm下观察。

### 1.2.4 Western blot检测自噬通路相关蛋白表达

取对数生长期细胞接种于35mm培养小皿,细胞分组及给药同1.2.1,收集细胞提取总蛋白。检测蛋白浓度,95℃变性5min,80V电泳30min,120V电泳

80min,冰浴转膜1h,封闭1h,一抗4℃孵育过夜(抗体浓度为1:1000),TBST洗3次,二抗室温孵育1h(抗体浓度为1:5000),TBST洗3次,ECL化学发光法显影,采用Image J软件进行灰度值分析。

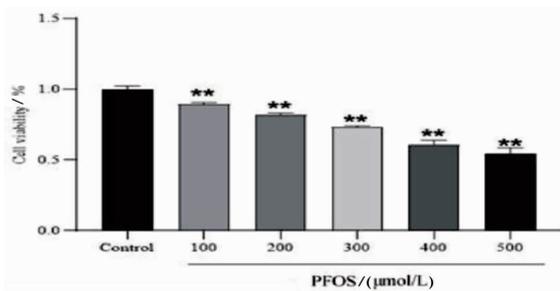
### 1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析,多组的组间比较采用单因素方差分析,总体方差齐,则通过LSD-t检验;方差不齐则用Dunnett's T3进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度PFOS暴露对细胞活力的影响

MTT结果显示,100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS暴露组细胞存活率分别为89.38%、81.75%、73.21%、60.82%和54.75%。与对照组相比,各处理组细胞存活率均明显降低( $P < 0.01$ )。根据实验结果,选取500 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的造模浓度。见图1。

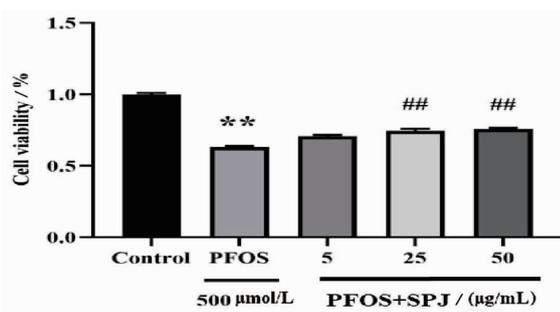


与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 6$ 。

图1 PFOS暴露对PC12细胞活力的影响

### 2.2 SPJ对PFOS暴露PC12细胞活力的影响

如图2所示,500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS暴露组的细胞存活率为63.24%,与对照组相比,明显降低( $P < 0.01$ );给予不同浓度的(5、25和50 $\mu\text{g/mL}$ ) SPJ干预后发现,25和50 $\mu\text{g/mL}$  SPJ干预组的细胞存活率为74.46%和75.86%。与PFOS暴露组比较,细胞存活率明显增高( $P < 0.01$ )。

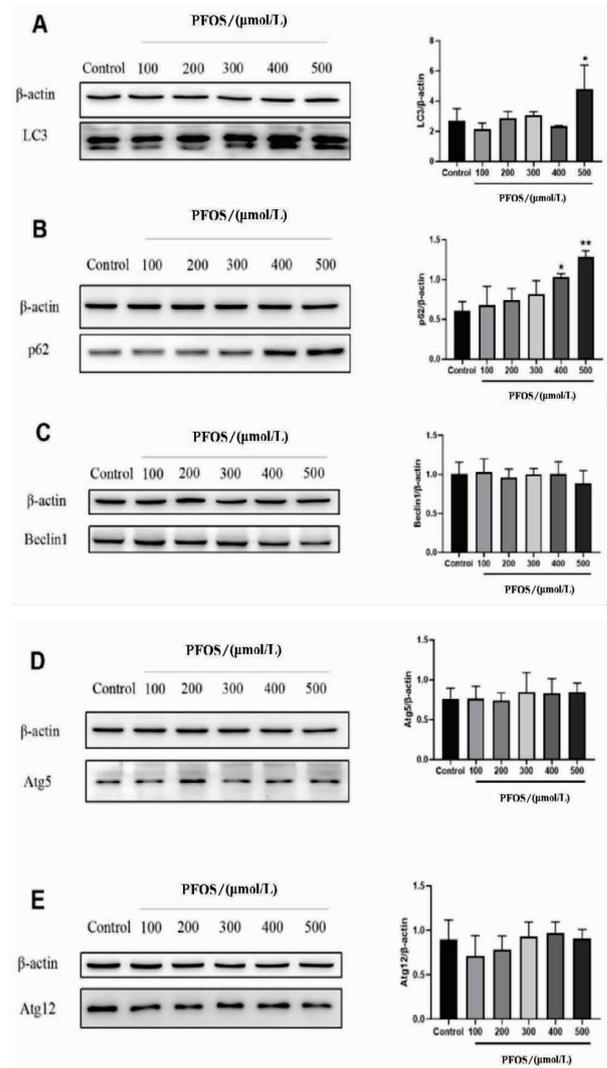


与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS组比较, ## $P < 0.01$ ,  $n = 6$ 。

图2 SPJ对PFOS暴露PC12细胞活力的影响

### 2.3 不同浓度PFOS暴露对PC12细胞自噬相关蛋白表达变化的影响

PC12细胞暴露于不同浓度的PFOS(100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$ )后,与对照组相比,500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS暴露使得PC12细胞LC3蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。400和500 $\mu\text{mol/L}$ 的PFOS暴露使得PC12细胞p62蛋白表达显著上升( $P < 0.05$ ),其它浓度的PFOS组无显著差别,见图3。



与Control组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图3 PFOS暴露对PC12细胞自噬相关蛋白表达变化的影响

### 2.4 SPJ对PFOS暴露致PC12细胞凋亡的影响

结果如图4所示,在同样的显微镜背景参数设置下,与对照组相比,500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS暴露细胞后,大量细胞出现亮蓝色,这证明PFOS对PC12细胞的损伤作用。与500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS组相比,50 $\mu\text{g/mL}$  SPJ预处理后,细胞亮蓝色减少,说明SPJ减少细胞凋亡数量,具有保护作用。

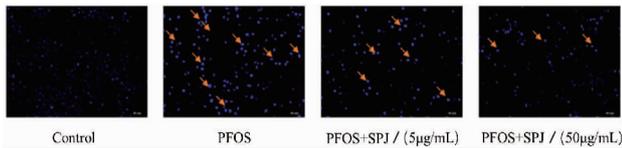
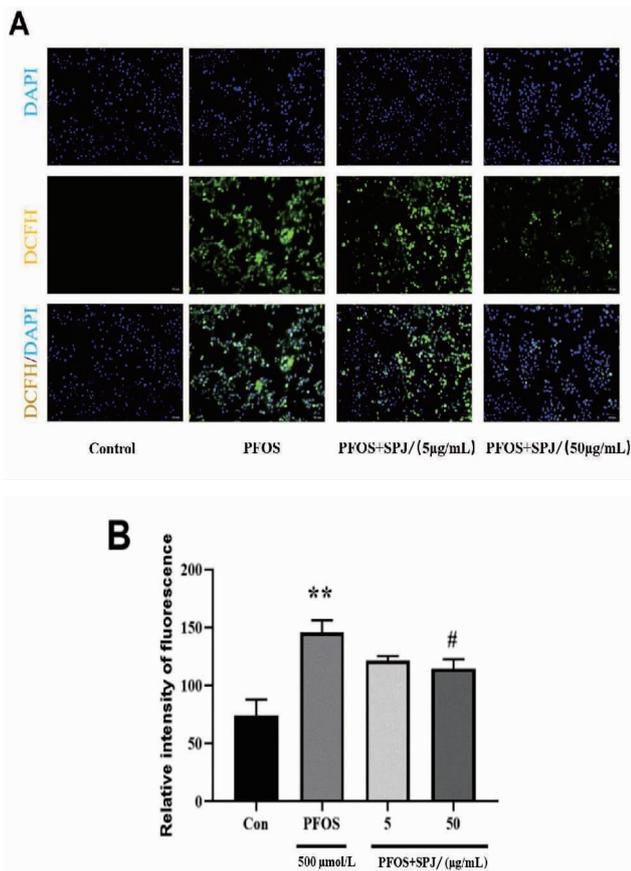


图4 SPJ对SPF暴露PC12细胞后细胞凋亡的影响( $\times 100$ )

## 2.5 SPJ对PFOS暴露致PC12细胞活性氧水平的影响

结果如图5所示,与对照组相比,500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS组荧光强度显著增加,表明PFOS会增加PC12细胞活性氧水平( $P < 0.01$ );与500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS组相比,50 $\mu\text{g/mL}$  SPJ干预组ROS荧光强度显著降低,SPJ显著降低PC12细胞活性氧水平( $P < 0.05$ )。

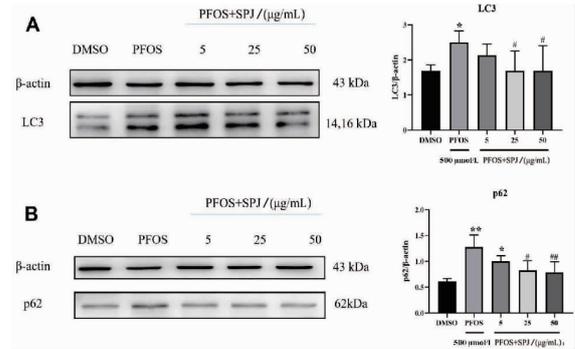


与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与PFOS组比较,# $P < 0.05$ , $n = 3$

图5 SPJ对PFOS暴露PC12细胞后活性氧水平的影响( $\times 100$ )

## 2.6 SPJ对PFOS暴露致PC12细胞自噬相关蛋白表达变化的影响

与对照组比较,500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS暴露后PC12细胞的LC3和p62蛋白表达显著上升( $P < 0.05$ ),给予5、25、50 $\mu\text{g/mL}$  SPJ干预后,与PFOS组比较,25和50 $\mu\text{g/mL}$  SPJ干预组LC3和p62蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),见图6。



与Control组比较,\* $P < 0.05$ ;与PFOS组比较,# $P < 0.05$ , $n = 3$

图6 SPJ对PFOS暴露PC12细胞后自噬相关蛋白LC3、p62蛋白表达变化的影响

## 3 讨论

PC12细胞是来源大鼠嗜铬细胞瘤的细胞株,具有神经元特性。研究<sup>[6]</sup>显示,PFOS激活自噬导致C57小鼠神经元损伤,显示出神经毒性作用。本研究以PC12细胞为研究对象,利用MTT法检测PFOS对PC12细胞存活率的影响,结果显示100、200、300、400和500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS暴露组的细胞存活率分别为89.38%、81.75%、73.21%、60.82%和54.75%。与对照组比较,各处理组细胞存活率均明显降低。在本研究中发现,500 $\mu\text{mol/L}$  PFOS暴露增加PC12细胞凋亡和细胞活性氧水平,这表明PFOS对神经细胞具有毒性,与Slotkin等<sup>[7]</sup>结果一致。

目前研究证实,PFOS神经毒性的作用机制可能与钙稳态破坏、兴奋性神经递质释放增多、氧化应激增加和自噬激活等相关。研究表明,PFOS暴露0.5~24h后L-O2细胞中的线粒体铁过载,溶酶体铁的额外增加,从而诱导肝细胞铁死亡<sup>[8]</sup>。PFOS加速了线粒体钙单向转运蛋白的表达,使随后的线粒体钙积累,抑制自噬<sup>[9]</sup>。同时Ren等<sup>[6]</sup>发现PFOS暴露小鼠表现出明显的认知障碍、焦虑、神经元变性以及皮层和海马突触超微结构的异常,这些异常与自噬激活导致神经元损伤有关。自噬是一种保守的溶酶体途径,可循环利用受损或不必要的细胞成分<sup>[10]</sup>。最常见的自噬形式是巨自噬,其通过自噬体形成一个双层膜结构,将大分子物质或受损细胞器包裹起来,送入溶酶体进行降解和回收利用<sup>[11]</sup>。两种泛素样偶联系统ATG12-ATG5-ATG16L1和LC3-I/LC3-II对于自噬体膜的延伸和闭合是必不可少的,缺少它们的成分,如ATG5,会导致自噬抑制<sup>[12]</sup>。最近的研究越来越关注自噬在大脑中的作用,因为它与神经变性有关<sup>[13]</sup>。有研究表明,40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的PFOS暴露会诱导心肌细胞毒性,增加LC3、p62和泛素化蛋白的水平,自噬

体积累<sup>[14]</sup>。而本实验结果显示,PC12 细胞暴露 400 和 500 $\mu\text{mol/L}$  的 PFOS 后,LC3 的蛋白表达水平明显增加,p62 水平也明显升高。结果表明,PFOS 可能通过自噬通路对神经细胞产生毒性。

竹节参可用于散淤、止血、消肿、镇痛、清热祛痰、止咳,同时具有补益强身的作用。研究显示,从竹节参中提取的竹节参总皂苷具有抗氧化、抗炎、调节免疫等多种作用<sup>[15-16]</sup>。竹节参总皂苷可减轻衰老大鼠脑组织的神经元损伤,降低神经炎症反应的发生<sup>[17]</sup>。竹节参总皂苷通过调节线粒体功能改善  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导神经细胞损伤,发挥神经保护作用。Pi 等<sup>[16]</sup>发现竹节参总皂苷通过减轻小胶质细胞炎症和增强小胶质细胞自噬来改善老年大鼠的认知缺陷,可用于治疗神经退行性疾病。Huang 等<sup>[18]</sup>证实竹节参总皂苷可以通过增强基础自噬改善衰老大鼠的心脏功能。综上,本研究假设竹节参总皂苷通过调节巨自噬系统减轻 PFOS 暴露所致的 PC12 细胞损伤。选用浓度为 5、25、50 $\mu\text{g/mL}$  的 SPJ 来预处理 PFOS 暴露的 PC12 细胞。经 25 和 50 $\mu\text{g/mL}$  SPJ 预处理后发现,细胞活力明显增加,LC3 和 p62 的蛋白表达水平下降,这表明 SPJ 能抑制 PFOS 诱导 PC12 细胞自噬水平激活,从而发挥对 PC12 细胞的保护作用。

综上所述,竹节参总皂苷可上调 PFOS 暴露所致 PC12 细胞活力的降低,减少细胞凋亡、降低活性氧水平,其机制可能与抑制 PFOS 暴露导致的自噬过度激活有关,该研究为防治 PFOS 暴露所致的神经毒性提供一定的实验依据。本研究具有一定的局限性,并未在细胞水平进行更深层次的验证;对照组设置为含 0.1% DMSO 的完全培养基,但没有设无任何处理的阴性对照组;由于实验过程中细胞代数的增长,细胞状态不稳定,导致单独进行 PFOS 毒性实验和后面进行 SPJ 预处理实验中的 500 $\mu\text{mol/L}$  的 PFOS 暴露组细胞存活率不一致。

## 参考文献:

[1] HAO Y, CHEN X, WANG K, et al. Fabrication of tailored imprinted layer and cladded layer on magnetic nanomaterials with enhanced specificity for recognition of PFOS [J]. *Anal Chim Acta*, 2025, 1349: 343799

[2] WANG M, LI Q, HOU M, et al. Inactivation of common airborne antigens by perfluoroalkyl chemicals modulates early life allergic asthma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118 (24): 57

[3] YAO X, SHA S, WANG Y, et al. Perfluorooctane sulfonate induces autophagy-dependent apoptosis through spinster 1-mediated lysosomal-mitochondrial axis and impaired mitophagy [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 153(1): 198

[4] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版

社, 2020: 144

[5] WANG T, DI G, YANG L, et al. Saponins from *Panax japonicus* attenuate D-galactose-induced cognitive impairment through its anti-oxidative and anti-apoptotic effects in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(9): 1284

[6] REN S, WANG J, DONG Z, et al. Perfluorooctane sulfonate induces ferroptosis-dependent non-alcoholic steatohepatitis via autophagy-MCU-caused mitochondrial calcium overload and MCU-ACSL4 interaction [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 280: 116553

[7] SLOTKIN T A, MACKILLOP E A, MELNICK R L, et al. Developmental neurotoxicity of perfluorinated chemicals modeled *in vitro* [J]. *Environ Health Perspect*, 2008, 116(6): 716

[8] YUAN Z, SHAO X, MIAO Z, et al. Perfluorooctane sulfonate induced neurotoxicity responses associated with neural genes expression, neurotransmitter levels and acetylcholinesterase activity in planarians *dugesia japonica* [J]. *Chemosphere*, 2018, 206: 150

[9] LI J, FENG R, YANG W, et al. Lysosomal iron accumulation and subsequent lysosomes-mitochondria iron transmission mediate PFOS-induced hepatocyte ferroptosis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 284: 116890

[10] ZHOU A, WANG L, PI X, et al. Effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on cognitive behavior and autophagy of male mice [J]. *J Toxicol Sci*, 2023, 48(9): 513

[11] ARBOGAST F, SAL-CARRO R, BOUFENGHOUR W, et al. Epidermal maintenance of langerhans cells relies on autophagy-regulated lipid metabolism [J]. *J Cell Biol*, 2025, 224(2): e202403178

[12] WEI F, WANG Y, YAO J, et al. ZDHHC7-mediated S-palmitoylation of ATG16L1 facilitates LC3 lipidation and autophagosome formation [J]. *Autophagy*, 2024, 20(12): 2719

[13] LIU D, LIU N Y, CHEN L T, et al. Perfluorooctane sulfonate induced toxicity in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes via inhibiting autophagy-lysosome pathway [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 69: 104988

[14] WANG J, HE L, WANG S, et al. Therapeutic effect of the total saponin from *Panax Japonicus* on experimental autoimmune encephalomyelitis by attenuating inflammation and regulating gut microbiota in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 315: 116681

[15] QIU L, FENG R, WU Q S, et al. Total saponins from *Panax japonicus* attenuate acute alcoholic liver oxidative stress and hepatosteatosis by p62-related Nrf2 pathway and AMPK-ACC/PPARalpha axis *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116785

[16] PI X J, ZHAO Q Q, WANG J X, et al. Saponins from *Panax japonicus* attenuate cognitive impairment in ageing rats through regulating microglial polarisation and autophagy [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 1117

[17] DENG L L, WAN J Z, YUAN D, et al. Protective effects of total saponins from *Panax japonicus* on  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced injury via mitochondria pathway in SH-SY5Y Cells [J]. *Zhong Yao Cai*, 2015, 38(8): 1690

[18] HUANG H, WANG T, WANG L, et al. Saponins of *Panax japonicus* ameliorates cardiac aging phenotype in aging rats by enhancing basal autophagy through AMPK/mTOR/ULK1 pathway [J]. *Exp Gerontol*, 2023, 182: 112305

(收稿日期: 2024-12-27)

引文格式:谢孟婷,刘艳,贾爱亭,等. 三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌的作用机制研究[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):396-400.

# 三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌的作用机制研究\*

谢孟婷<sup>1</sup>,刘艳<sup>1</sup>,贾爱亭<sup>1</sup>,蔡敬<sup>1</sup>,刘复兴<sup>1\*\*</sup>,宁志丰<sup>2\*\*</sup>

(1. 湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁 437100;2. 湖北科技学院医学部基础医学院人体解剖学教研室)

**摘要:**目的 采用网络药理学、分子对接技术以及细胞实验等手段,探究三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌细胞作用机制。**方法** 通过数据库筛选出三氟拉嗪二盐酸盐的靶点及前列腺癌相关靶点,进行可视化网络与蛋白相互作用网络(PPI)的构建,随后进行GO和KEGG富集分析,最后通过分子对接软件对潜在的靶点进行验证。细胞实验中,采用不同浓度梯度的三氟拉嗪二盐酸盐处理前列腺癌细胞(RM-1),通过MTT比色法和平板克隆实验验证其对细胞增殖的抑制作用;借助划痕实验和Transwell侵袭迁移实验展现对癌细胞侵袭、迁移特性的干预效果。**结果** 网络药理学分析成果显示,三氟拉嗪二盐酸盐对抗前列腺癌所涉及的靶点有70个,KEGG富集分析进一步揭示,该药物能够凭借癌症相关通路、PI3K-AKT等多条关键信号传导通路,施展其显著的抗前列腺癌功效。分子对接结果与细胞实验数据表明,三氟拉嗪二盐酸盐与核心靶点之间展现出极为理想的结合活性,其对前列腺癌细胞的活力、增殖、迁移以及侵袭能力的抑制作用呈现出鲜明的剂量依赖性特征。**结论** 三氟拉嗪二盐酸盐可能通过多种靶点抑制前列腺癌细胞增殖,且抑制能力与剂量呈正比。

**关键词:**三氟拉嗪二盐酸盐;前列腺癌细胞;增殖;网络药理学;分子对接

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)04-0396-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025010714



## A Study on the Mechanism of Trifluoperazine Dihydrochloride in Prostate Cancer

XIE Meng-ting, LIU Fu-xing, NING Zhi-feng, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To use network pharmacology, molecular docking technology, and cell experiments to deeply explore the mechanism of trifluoperazine dihydrochloride on prostate cancer. **Methods** The targets of trifluoperazine dihydrochloride and prostate cancer-related targets were screened out through the database and a visual network and protein-protein interaction network (PPI) were constructed, followed by GO and KEGG enrichment analysis was carried out, and finally, the potential targets were verified by molecular docking software. In the cell experiment, prostate cancer cells were treated with trifluoperazine dihydrochloride at different concentration gradients. The MTT colorimetric method and plate clone formation experiment were used to verify its inhibitory effect on cell proliferation. The scratch experiment and transwell invasion and migration experiment were employed to demonstrate the intervention effect on the invasion and migration characteristics of cancer cells. **Results** The results of network pharmacology analysis showed that trifluoperazine dihydrochloride has 70 targets involved in the fight against prostate cancer. KEGG enrichment analysis further revealed that the drug can exert its significant anti-prostate cancer effect through multiple key signal pathways such as cancer-related pathways and PI3K-AKT pathway. The molecular docking results showed that trifluoperazine dihydrochloride has an extremely ideal binding activity with the core targets. And its inhibitory effect on the vitality, proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells showed a distinct dose-dependent characteristic. **Conclusion** Trifluoperazine

\* 基金项目:湖北省重点研发计划大健康专项(2022BCE011)

\*\* 通信作者, E-mail: Liufx6505@126.com, 279503735@qq.com

dihydrochloride may inhibit prostate cancer cell proliferation through multiple targets, and the inhibitory ability is proportional to the dose.

**KEY WORDS:** Trifluoperazine dihydrochloride; Prostate cancer cell; Proliferation; Network pharmacology; Molecular docking

前列腺癌被认为是西方国家癌症相关死亡的最高原因,以中老年为主,在全球范围内是男性癌症相关死亡的第二大原因<sup>[1]</sup>。随着人口的老化,前列腺癌的发病率也不断上升<sup>[2]</sup>。目前,其治疗方法包括手术切除、放射疗法及激素疗法<sup>[3]</sup>。但这些方法对晚期癌症患者疗效不佳,患者预后较差,生活质量难以保障。因此,开发更安全、更有效的治疗药物已成为当务之急。

三氟拉嗪二盐酸盐是一种抗精神病药吩噻嗪剂,自1960年以来一直被认为既有效又安全<sup>[4]</sup>。最近的证据表明,三氟拉嗪二盐酸盐在体外和体内均具有显著的抗癌作用<sup>[5]</sup>,能够抑制多种癌细胞,如纤维肉瘤 HT1080、白血病、乳腺癌和人 A549 肺腺癌细胞的增殖<sup>[6-8]</sup>。

基于此,本研究综合运用网络药理学、分子对接技术和细胞实验,旨在深入探究三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌的作用机制,为前列腺癌的治疗提供新的思路和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

前列腺癌细胞 RM-1, 1640 培养基 (Servicebio 公司), 三氟拉嗪二盐酸盐 (上海源叶生物科技有限公司, CAS 号: 440-17-5, 99% HPLC), 胰酶 (Biosharp 公司), FBS (索莱宝公司), CO<sub>2</sub> 培养箱 (ESCO 公司), 荧光显微镜 (OLYMPUS)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 三氟拉嗪二盐酸盐靶点的筛选

在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取三氟拉嗪二盐酸盐的分子结构, 从 SwissTargetPrediction、Targetnet 和 PharmMapper 等数据库对三氟拉嗪二盐酸盐的作用靶点进行预测, 然后将各药物数据库中的靶点进行合并, 剔除所有重复靶点。根据 UniProt 数据库修正目标蛋白质的名字, 校正后的目标蛋白名称都为三氟拉嗪二盐酸盐的潜在目标蛋白。

#### 1.2.2 前列腺癌疾病靶点的筛选

搜索关键词“prostate cancer”, 利用 Gene Cards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org>) 数据库寻找与前列腺癌相关靶标, 同时, 以前列腺癌为靶点, 三氟拉嗪二盐酸盐为靶点绘制

韦恩图。

#### 1.2.3 构建三氟拉嗪二盐酸盐靶点网络及蛋白相互作用网络

利用 STRING 数据库, 搭建药物-疾病共同靶标蛋白之间相互作用的网络图谱。完成图谱构建后, 选用 Cytoscape (3.8.1) 软件对其实施可视化处理, 从而能够清晰直观地展现出共同靶标蛋白之间的相互关系。

#### 1.2.4 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析

为了探究三氟拉嗪二盐酸盐在癌症中的作用机制, 利用 DAVID 数据库 (<http://david.ncifcrf.gov>) 获取靶点-通路信息。将 DAVID 数据输入交集区, 设定“Homo sapiens”作为研究对象, 将显著性设置为  $P < 0.05$ , 以确保研究结果的可信度。同时, 借助微生信在线网站进行了 GO 与 KEGG 富集分析, 从而深入探究三氟拉嗪二盐酸盐在抗癌过程中的关键通路。

#### 1.2.5 三氟拉嗪二盐酸盐与关键靶点分子对接

利用蛋白数据库 PDB (<https://www.rcsb.org>) 获取了该过程中的关键靶点蛋白。在此基础上, 采用 AutoDock Vina 1.5.6 软件, 对三氟拉嗪二盐酸盐与其关键靶点的分子对接进行研究, 对具有最低结合能的分子进行筛选。最后, 用 Pymol 软件对最佳结果进行绘图。

#### 1.2.6 细胞培养以及检测细胞增殖的能力

将 RM-1 细胞置于无菌箱中含 10% 血清的 1640 培养液, 等到细胞状态良好时进行实验。

取对数生长期的 RM-1 细胞, 在 96 孔板上, 以每孔 8000 个细胞进行培养。待细胞在孔内生长期达 80% 时, 分别添加浓度为 0、0.25、0.5、1、2、4  $\mu\text{mol/L}$  的三氟拉嗪二盐酸盐, 处理时长设定为 24h。结束后加入 MTT 溶液, 培养箱培养 4h, 随后每个孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 溶液, 放在摇床上振荡 30min 充分溶解。接着, 使用酶标仪来测定各孔的 OD 值, 细胞抑制率按方程 (药物组 OD 值/对照组 OD 值)  $\times 100\%$  进行计算。为保证结果的准确性与可靠性, 连续进行 3 次实验。

#### 1.2.7 细胞平板克隆形成

在进行细胞实验时, 先取对数生长期的 RM-1 细胞, 再将每孔 1500 个细胞在 6 孔板中均匀分布。经过 24h 之后, 配置含有药物的培养基, 药物浓度为 0、0.5、1、2  $\mu\text{mol/L}$ , 然后置入培养箱中进行 10 ~ 14d 的培养。在此期间, 显微镜下可以观察到单独细胞组成的细胞群落。培养结束后, 用 PBS 清洗细胞 2 ~ 3 遍,

然后用预冷却的甲醛固定 20min,再用 0.1% 结晶紫对其进行 20min 的染色,洗去过量的染料后进行拍照。实验重复 3 次。

### 1.2.8 细胞横向迁移(划痕实验)

首先将  $2 \times 10^5$  个/孔 RM-1 细胞接种于 6 孔板中,等到细胞密度达到 90% 以上时进行细胞划痕实验。向 6 孔板中加入 2mL 浓度分别为 0、0.5、1、 $2 \mu\text{mol/L}$  的三氟拉嗪二盐酸盐,24h 后拍照。通过划痕宽度变化评估细胞横向迁移能力。利用软件 Image-J 测定细胞的迁移面积(S),统计细胞伤口愈合面积,按照表达式  $(S_{0h} - S_{24h})/S_{0h} \times 100\%$  计算细胞迁移率。实验重复 3 次。

### 1.2.9 细胞纵向迁移与侵袭(Transwell 实验)

在不含血清的培养基中饥饿 RM-1 细胞 6h,制备侵袭组和迁移组,侵袭实验组添加基质凝胶,迁移组不添加基质凝胶,于培养箱内置 30min 后,于上室添加 10 万个细胞,下室每孔分别加入 0.5mL 浓度为 0、0.5、1、 $2 \mu\text{mol/L}$  的三氟拉嗪二盐酸盐,24h 后进行结晶紫染色,并拍照计数。

## 1.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析并绘图,以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,用 One-Way ANOVA 对数据进行分析, $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 三氟拉嗪二盐酸盐抗前列腺癌作用的靶点

通过将 170 个三氟拉嗪二盐酸盐靶点和 6893 个前列腺癌靶点进行交集运算,最终得到 70 个交集靶点,即为三氟拉嗪二盐酸盐抗前列腺癌的靶点,如图 1 所示。

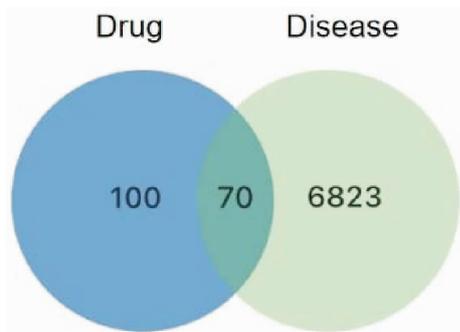


图1 三氟拉嗪二盐酸盐与前列腺癌靶点交集的韦恩图

### 2.2 共同靶点蛋白互作网络图

运用 STRING 数据库对三氟拉嗪二盐酸盐抗前列

腺素作用的靶点进行 PPI 网络分析,利用 Cytoscape 软件进行处理。结点的颜色越暗,表示这个节点的度值就越高,同时,该结合分数也会越大,见图 2。筛选出 top10 的关键靶点分别是 AKT1、HTR2、ADRD2、MTOR、SLC6A4、JAK2、HTR2C、SLC6A3、HTR1A、CYP2D63,如表 1 所示。

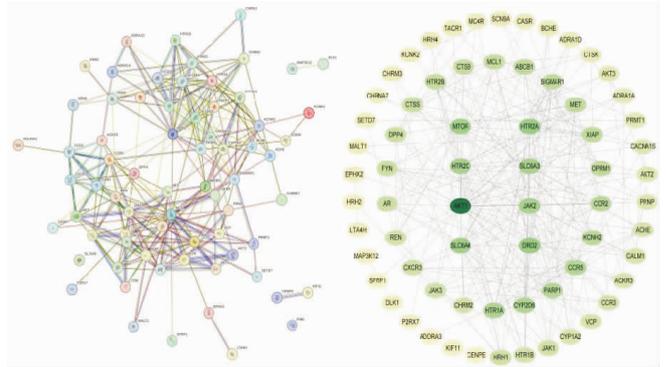


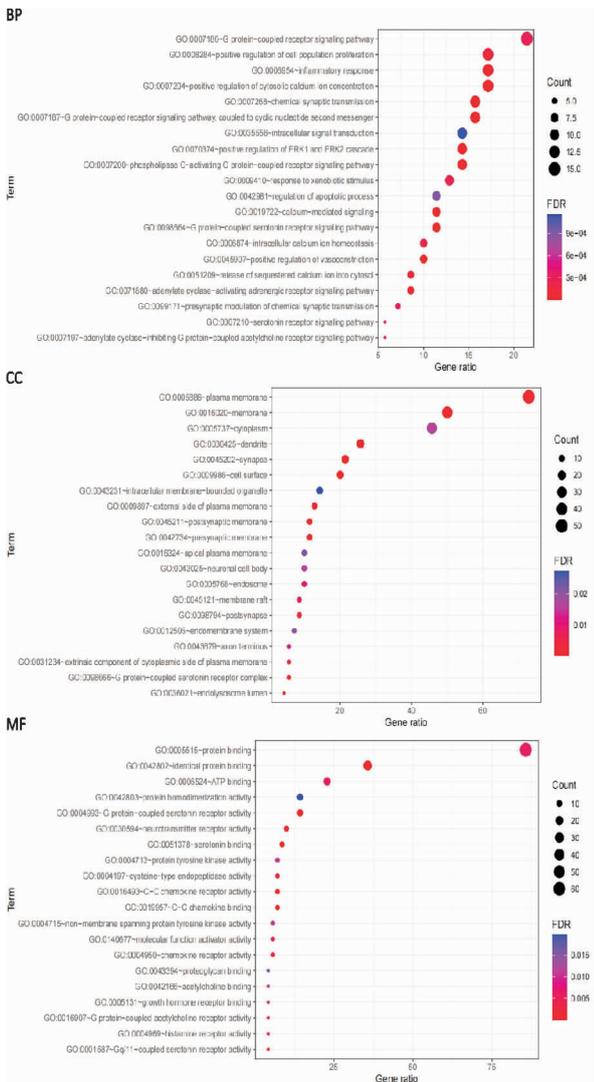
图2 三氟拉嗪二盐酸盐抗前列腺癌的 PPI 蛋白互作网络图

表1 三氟拉嗪二盐酸盐抗前列腺癌的拓扑学参数(TOP10)

No	Gene	Degree	Betweenness	Closeness
1	AKT1	33.0	1333.5658	0.18157181
2	HTR2A	17.0	179.57039	0.1679198
3	DRD2	17.0	323.65903	0.17312661
4	MTOR	16.0	107.03197	0.1670823
5	SLC6A4	16.0	102.18753	0.16421568
6	JAK2	15.0	100.549034	0.1654321
7	HTR2C	15.0	144.85014	0.16183574
8	SLC6A3	15.0	223.83298	0.17268041
9	HTR1A	14.0	67.16126	0.16262136
10	CYP2D6	14.0	53.42321	0.16262136

### 2.3 GO 功能富集和 KEGG 通路分析

首先,采用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 对 GO 和 KEGG 的富集进行研究,并设定  $P < 0.05$  的阈值,接着,利用 R 语言对富集结果进行可视化。从图 3 和图 4 可以看出,其中最重要的生物过程(BP)有负调节凋亡、蛋白质磷酸化和正向调节等;细胞组分(CC)主要由细胞膜、胞质、细胞核等组成;其分子作用(MF)包括 ATP 结合、蛋白丝氨酸激酶活性等。另外,肿瘤相关的信号通路包括 PI3K-AKT 等。



(BP:生物学过程,CC:细胞组分,MF:分子功能)

图3 三氟拉嗪二盐酸盐抗前列腺癌的GO功能富集分析

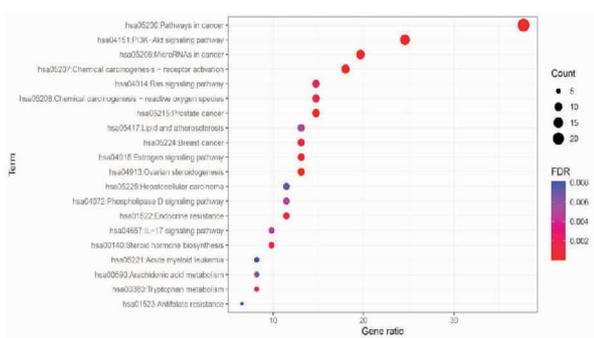


图4 三氟拉嗪二盐酸盐抗前列腺癌的KEGG通路富集分析

## 2.4 三氟拉嗪二盐酸盐与核心靶点的分子对接分析

通过三氟拉嗪二盐酸盐与核心靶点 AKT1 的分子对接,获得 -6.10kcal/mol 的结合能。结合能 < -5.0kcal/mol 时被视为结合能力良好,因此,小分子三氟拉嗪二盐酸盐可以很好的与 AKT1 结合,见图 5。

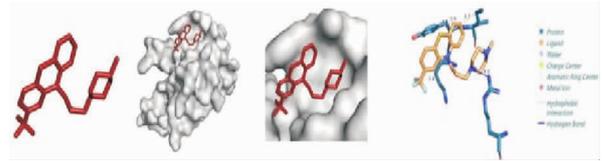
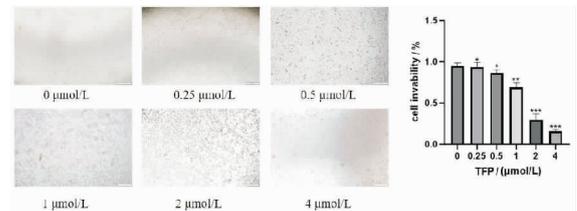


图5 三氟拉嗪二盐酸盐抗前列腺癌关键靶点 AKT1 分子对接图

## 2.5 三氟拉嗪二盐酸盐抑制前列腺癌 RM-1 的增殖

MTT 实验测定了三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌细胞 RM-1 的增殖能力。IC<sub>50</sub> 为 1.445 μmol/L。从图 6 看出,与对照组相比,当三氟拉嗪二盐酸盐浓度为 1 μmol/L 时,细胞的形态开始皱缩、体积变小,当浓度在 2 μmol/L 时活细胞逐渐减少,当浓度 4 μmol/L 时仅存少量活细胞,表明三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌细胞的增殖有抑制作用。

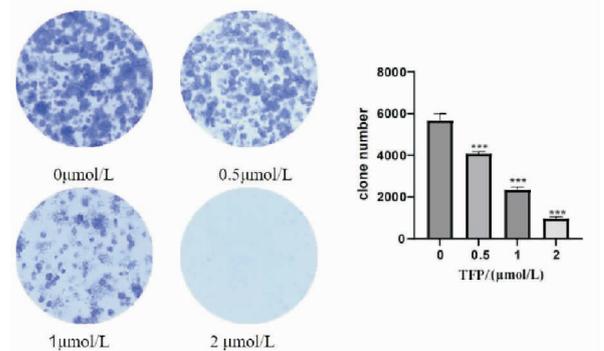


与空白对照组相比,\*\*\*P<0.001,\*\*P<0.01,\*P<0.1,n=3。

图6 三氟拉嗪二盐酸盐对 RM-1 细胞增殖的影响(×10)

## 2.6 三氟拉嗪二盐酸盐抑制前列腺癌细胞的克隆形成

通过平板克隆实验测定三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌细胞克隆形成作用的影响。从图 7 可以看出,当用不同浓度的三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌细胞处理后,其克隆形成能力随着药物浓度的增加而降低,这说明三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌细胞 RM-1 有明显的抑制作用,且具有浓度依赖性。



与空白对照组相比,\*\*\*P<0.001,n=3。

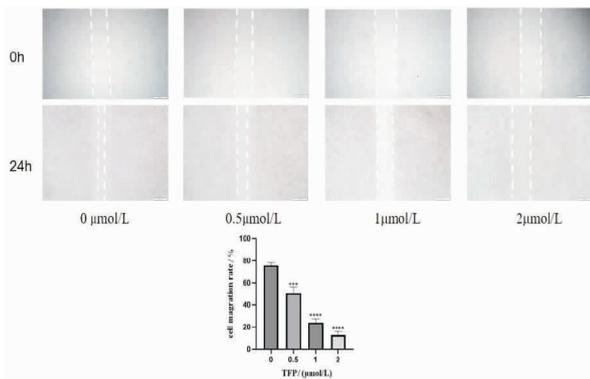
图7 三氟拉嗪二盐酸盐对 RM-1 细胞克隆形成能力的影响

## 2.7 三氟拉嗪二盐酸盐抑制前列腺癌 RM-1 的迁移与侵袭能力

在划痕试验中, RM-1 细胞展现出了横向迁移能力。从图 8 的数据看出, 经过 24h 的处理, RM-1 细胞的划痕宽度会随着三氟拉嗪二盐酸盐浓度的升高而显著增大。具体来看, 在空白组、0.5  $\mu\text{mol/L}$  组、1  $\mu\text{mol/L}$  组以及 2  $\mu\text{mol/L}$  组中, RM-1 细胞的愈合面积分别为 75.66%、50.33%、32.33% 和 12.67%, 组间差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这一实验结果充分表明, 三氟拉嗪二盐酸盐对 RM-1 细胞横向迁移能力的抑制作用呈现出明显的浓度依赖性, 即随着药物浓度的增加, 抑制效果越强。

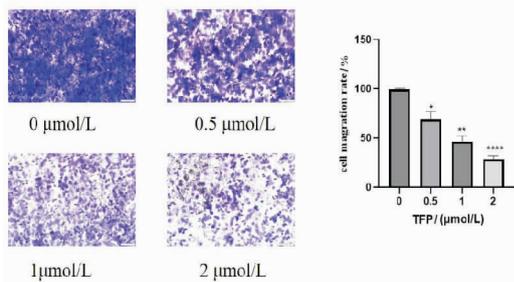
从图 9 可以看出, 三氟拉嗪二盐酸盐在 0.5、1 和 2  $\mu\text{mol/L}$  组中对 RM-1 细胞的纵向迁移抑制率分别为 69.00%、46.33% 和 28.67%。研究结果显示, 三氟拉嗪二盐酸盐对 RM-1 细胞具有明显的抑制作用, 且这种作用随药物浓度的增加而增强。

对 RM-1 细胞的纵向侵袭能力进行检测, 见图 10, 与空白对照相比, 0.5、1 和 2  $\mu\text{mol/L}$  组的 RM-1 细胞侵袭抑制率分别为 63.00%、50.33%、34.00%, 说明 RM-1 细胞的侵袭能力受到三氟拉嗪二盐酸盐的抑制。



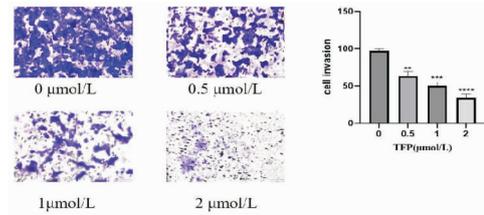
与空白对照组相比,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ ,  $n = 3$ 。

图 8 三氟拉嗪二盐酸盐对 RM-1 细胞横向迁移能力的影响 ( $\times 4$ )



与空白对照组相比,  $*P < 0.1$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.0001$ ,  $n = 3$ 。

图 9 三氟拉嗪二盐酸盐对 RM-1 细胞纵向迁移能力的影响 ( $\times 20$ )



与空白对照组相比,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ ,  $n = 3$ 。

图 10 三氟拉嗪二盐酸盐对 RM-1 细胞纵向侵袭能力的影响 ( $\times 20$ )

## 3 讨论

本研究通过网络药理学分析, KEGG 富集分析表明, 三氟拉嗪二盐酸盐主要作用于前列腺癌相关通路和 PI3K-AKT 信号通路。在人类癌症的发生发展过程中, PI3K/AKT 信号通路占据着极为关键的地位, 是公认的最重要的致癌途径之一, 其中第 1 类 PI3K 与肿瘤的关联更为紧密。该信号通路的主要作用是促进细胞增殖并抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。AKT 作为 PI3K-AKT 信号通路的关键靶点, 在肿瘤发生时会被激活, 进而对下游通路进行调控。目前, AKT 已成为研究的重点, 它在转录、蛋白合成、细胞代谢、生长以及增殖等细胞功能的各方面都发挥着至关重要的作用。在众多肿瘤中, AKT1 作为 AKT 的一个亚型<sup>[10]</sup>, 备受瞩目。AKT1 被公认为是一种原癌基因, 在大量肿瘤组织中, AKT1 的表达量都处于较高水平, 其特征也最为显著。分子对接发现三氟拉嗪二盐酸盐与核心蛋白 AKT 具有良好的结合活性, 所以, 本研究推断出三氟拉嗪二盐酸盐可能是通过影响 PI3K-AKT 信号通路来发挥抗肿瘤的作用。

体外细胞实验结果进一步证实了三氟拉嗪二盐酸盐对前列腺癌 RM-1 细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭具有显著的抑制作用, 且呈现明显的剂量依赖性。这与网络药理学和分子对接的结果相互印证, 表明三氟拉嗪二盐酸盐可能通过多靶点、多通路的协同作用, 抑制前列腺癌细胞的恶性生物学行为。这些研究成果为三氟拉嗪二盐酸盐在前列腺癌治疗中的应用提供了重要的理论支撑和实验依据, 预示着其在前列腺癌治疗领域具有可观的应用前景。然而, 要将三氟拉嗪二盐酸盐真正应用于临床实践, 仍需大量深入的研究工作, 这包括进一步明确其详细的作用机制、评估其在体内的安全性和有效性等, 为前列腺癌患者带来切实的益处。

综上所述, 三氟拉嗪二盐酸盐是一种极具开发价值的抗肿瘤药物。本研究的实施将会为前列腺癌的防治提供一个新的途径, 但其机理及临床效果尚待深入研究, 以便更好地应用于临床实践中。

(下转第 405 页)

引文格式:刘春燕,李倩,梁梓健,等.(S)-2-氰基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐的合成[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):401-405.

## (S)-2-氰基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐的合成\*

刘春燕<sup>1</sup>,李倩<sup>2</sup>,梁梓健<sup>1</sup>,吴诗<sup>1</sup>,郭丽媛<sup>1\*\*</sup>,黄胜堂<sup>1</sup>

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100;2.湖北健康职业学院护理系)

**摘要:**目的 合成 DPP-4 抑制剂中间体(S)-2-氰基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐。方法 以 N-Boc-反式-4-羟基-L-脯氨酸甲酯为起始原料,经氧化、氟化、水解、酰胺化、脱水、脱保护成盐六步反应合成目标化合物,并考察反应条件对反应结果的影响。结果 以 TEMPO 为氧化催化剂,以 DAST 为氟化剂,氢氧化锂水解,碳酸氢铵酰胺化,三氟乙酸酐脱水,对甲苯磺酸脱 Boc 保护得到中间体,总收率达 60% 以上。结论 该合成路线操作简便,后处理简单,收率较高,为 DPP-4 抑制剂相关的合成研究提供了参考。

**关键词:**(S)-2-氰基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐;合成;DPP-4 抑制剂

中图分类号:R914

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0401-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025031902



## Synthesis of (S)-2-Cyano-4,4-Difluoro-Pyrrolidine p-Toluenesulfonate

LIU Chun-yan, LI Qian, GUO Li-yuan, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To synthesize the DPP-4 inhibitor intermediate (S)-4,4-difluoropyrrolidine-2-carbonitrile p-toluenesulfonate. **Methods** The target compound was synthesized starting from N-Boc-trans-4-Hydroxy-L-proline methyl ester. The synthesis involved six steps: oxidation, fluorination, hydrolysis, amidation, dehydration, and deprotection to form a salt. Additionally, the effects of reaction conditions on the outcomes were investigated. **Results** The intermediate was obtained using TEMPO as an oxidation catalyst and DAST as a fluorinating agent, followed by lithium hydroxide hydrolysis, ammonium bicarbonate amidation, trifluoroacetic anhydride dehydration, and p-toluenesulfonic acid de-Boc protection, with an overall yield of over 60%. **Conclusion** This synthetic route is easy to operate, with simple post-processing and high yields, and provides a reference for synthetic research related to DPP-4 inhibitors.

**KEY WORDS:** (S)-4,4-difluoropyrrolidine-2-carbonitrile p-toluenesulfonate; Synthesis; DPP-4 inhibitor

糖尿病(DM)是一种以高血糖为特征的代谢性疾病。截至2022年,全球≥18岁成年糖尿病患者数量已增至8.28亿<sup>[1]</sup>。糖尿病患者中大多数是2型糖尿病患者,2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种慢性代谢性疾病,主要特征为高血糖、胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足<sup>[2]</sup>。DPP-4酶抑制剂是治疗2型糖尿病的新型降血糖药物,与传统的糖尿病治疗药物胰岛素和磺脲类药物相比,具有减少低血糖症发生、从根本上改善糖尿病进程的发展和长期使用不会影响体重等多方优势<sup>[3-4]</sup>,而且在糖尿病并发症中也表现出良好的治疗效果<sup>[5-6]</sup>,对癌症等疾病具有有益活性<sup>[7-8]</sup>。目前,已经开发了多个上市的DPP-4酶抑制剂(结构见图1)。

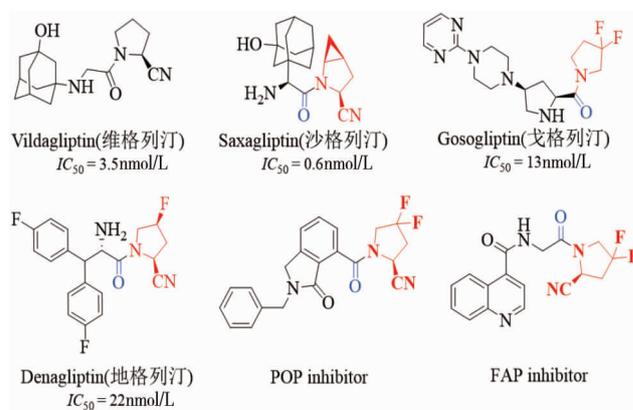


图1 部分已上市的DPP-4抑制剂及含有4,4-二氟-2-氰基吡咯烷结构单元的药物

\* 基金项目:湖北科技学院校内培育科研项目(2018-19X040);湖北科技学院药学院2018年度药学重点学科专项科研项目(2019-20ZY16)

\*\* 通信作者,E-mail:471861351@qq.com

这些 DPP-4 抑制剂多含有 2-氟基吡咯烷、3,3-二氟吡咯烷、2-氟基-4-氟吡咯烷等吡咯烷结构单元。研究<sup>[9]</sup>表明,以上结构单元是此类药物具有活性的必需基团,可以与 DPP-4 的 S1 口袋结合,从而提高化合物的 DPP-4 抑制活性。同时,2-氟基-4,4-二氟吡咯烷是脯氨酰寡肽酶<sup>[10]</sup>和成纤维细胞活化蛋白(FAP)抑制剂<sup>[11]</sup>重要的结构单元。本文以含有吡咯烷结构中间体的合成文献为参考<sup>[11-15]</sup>,结合课题组经验<sup>[16]</sup>,将 *N*-Boc-反式-4-羟基-L-脯氨酸甲酯作为起始原料,经氧化、氟化、水解、氨解、脱水和脱保护六步反应,以较高产率得到(S)-2-氟基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐,为后续研究开发抗糖尿病药物 DPP-4 抑制剂提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

仪器:Bruker AV-400 核磁共振仪,X-4 数字显示显微熔点测定仪(巩义市予华仪器有限公司),LCMS-8040 岛津液质联用色谱仪。

试剂:*N*-Boc-反式-4-羟基-L-脯氨酸甲酯、2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物(TEMPO)、三氯异氰尿酸(TCCA)、二乙胺基三氟化硫(DAST)、氢氧化锂、碳酸氢铵、吡啶、二碳酸二叔丁酯[(Boc)<sub>2</sub>O]、对甲苯磺酸(TsOH)、三氟乙酸酐(TFAA)、无水硫酸钠和溶剂均购买于武汉格奥化学技术有限公司,分析纯;无水溶剂的处理:1,4-二氧六环、四氢呋喃先用氢氧化钾预干燥至少 24h 后再加钠和二苯甲酮回流;乙腈先用五氧化二磷回流过夜后氩气保护常压蒸出,换为氯化钙回流;二氯甲烷加氯化钙回流。

### 1.2 合成路线与方法

以 *N*-Boc-反式-4-羟基-L-脯氨酸甲酯为起始原料,经氧化、氟化、水解、氨解、脱水和脱保护反应合成(S)-2-氟基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐,合成路线见图 2。

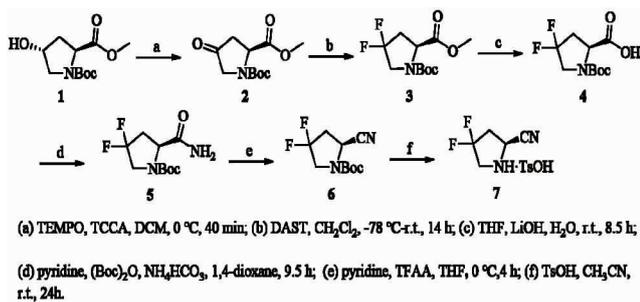


图 2 (S)-2-氟基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐合成路线

#### 1.2.1 *N*-Boc-4-氧代-L-脯氨酸甲酯①的合成

氩气保护下,向 100mL 三颈瓶内先后加入 *N*-Boc-反式-4-羟基-L-脯氨酸甲酯(3.81g, 15.5mmol)、无水二氯甲烷(25mL, 氯化钙干燥后使用)、三氯异氰尿酸(3.79g, 16.3mmol)。冰水浴下机械搅拌 10min 后缓慢滴加 TEMPO(2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物, 0.07g, 0.5mmol, 溶于 5mL 无水二氯甲烷),室温继续反应 30min。反应液倾倒在垫有硅藻土的布氏漏斗中,抽滤除去不溶性固体,再用 50mL 二氯甲烷洗涤硅藻土,滤液经饱和碳酸氢钠溶液、硫代硫酸钠溶液、氯化钠溶液洗涤,有机层用无水硫酸钠干燥,浓缩得无色油状物(3.56g),收率 94.5%。无需纯化。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.74(dd, *J* = 38.5, 10.1Hz, 1H), 3.86(d, *J* = 7.0Hz, 2H), 3.74(s, 3H), 2.91(dd, *J* = 16.6, 14.8Hz, 1H), 2.56(d, *J* = 18.9Hz, 1H), 1.45(s, 9H)。LC-MS:244[M + H]<sup>+</sup>。

#### 1.2.2 *N*-Boc-4,4-二氟-L-脯氨酸甲酯②的合成

氩气保护下,向 250mL 二颈瓶加入化合物①(10.30g, 42.4mmol),再加入无水二氯甲烷(75mL), -78 °C 缓慢滴加 DAST(二乙胺基三氟化硫, 13mL, 81.3mol, 25mL 无水二氯甲烷稀释),约 30min 滴完。3h 后缓慢升至室温,继续反应 14h。将反应液缓慢滴入 0 °C 的饱和碳酸氢钠溶液中,边滴边搅拌,至无气体放出。分液后,水层用二氯甲烷多次萃取,合并有机层后用饱和氯化钠溶液洗涤,水层再用二氯甲烷多次萃取,合并有机层用无水硫酸钠干燥,过滤浓缩,粗产物经硅胶柱快速纯化[洗脱剂:V(石油醚)/V(乙酸乙酯) = 10/1],得无色油状物(9.20g),收率 82.6%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.63-4.37(m, 1H), 3.95-3.77(m, 2H), 3.76(s, 3H), 2.77-2.62(m, 1H), 2.51-2.40(m, 1H), 1.44(d, *J* = 18.8 Hz, 9H)。LC-MS:266[M + H]<sup>+</sup>。

#### 1.2.3 *N*-Boc-4,4-二氟-L-脯氨酸③的合成

向 100mL 二口瓶中加入化合物②(2.97g, 11.2mmol)、四氢呋喃(25mL),冰水浴下滴加氢氧化锂(0.55g, 22.6mmol, 15mL 水溶解),机械搅拌反应 8.5h。浓缩反应液,剩余物加入水(10mL)溶解,二氯甲烷(10mL)洗涤除去有机物,水层经 5N 盐酸(5mL)酸化后再用乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥再减压浓缩,得白色固体,置于 40 °C 下真空干燥(2.80g),收率 100%。m. p.: 123 °C ~ 124 °C; <sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.48(s, 1H), 4.71-4.38(m, 1H), 3.97-3.67(m, 2H), 2.84-2.45(m, 2H), 1.45(d, *J* = 18.9Hz, 9H)。LC-MS:252[M + H]<sup>+</sup>。

### 1.2.4 (S)-N-Boc-2-甲酰胺基-4,4-二氟吡咯烷④的合成

氩气保护下,向 250mL 的两口烧瓶中加入依次加入化合物③(7.19g, 28.6mmol)、1,4-二氧六环(65mL)、吡啶(3.5mL, 43.5mmol)、(Boc)<sub>2</sub>O(10.0mL, 43.6mmol)、碳酸氢铵(3.54g, 44.3mmol), 室温下机械搅拌反应 9.5h。减压浓缩,剩余物用二氯甲烷(20mL)溶解,经 1N 盐酸(10mL)、饱和氯化钠(5mL)洗涤,多次用二氯甲烷萃取水层,合并二氯甲烷层,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩得淡黄色固体(6.93g),置于 40℃ 下真空干燥,收率 96.8%。m. p.: 73℃ ~ 74℃; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.79 (s, 1H), 6.27 (d, J = 60.1Hz, 1H), 4.47 (s, 1H), 3.94-3.59 (m, 2H), 2.67 (d, J = 90.4Hz, 2H), 1.44 (s, 9H)。LC-MS: 251 [M + H]<sup>+</sup>。

### 1.2.5 (S)-N-Boc-2-氨基-4,4-二氟吡咯烷⑤的合成

氩气保护下,向 100mL 三颈瓶加入化合物④(4.06g, 16.2mmol)、无水四氢呋喃(50mL, 经过金属钠干燥),冰水浴下缓慢滴加吡啶(5.8mL, 71.8mmol, 经过氯化钙干燥)、三氟乙酸酐(2.5mL, 17.8mmol), 滴加完后继续冰水浴下反应 4h 后停止。反应液浓缩,剩余物用二氯甲烷(80mL)溶解,后经 1N 盐酸溶液酸化、饱和碳酸钠溶液、饱和氯化钠溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩,加正己烷(50mL)振摇析出白色固体,抽滤得滤饼,置于 40℃ 下真空干燥(3.06g),收率 81.3%。m. p.: 114℃ ~ 116℃; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.72 (d, J = 35.3Hz, 1H), 3.79 (t, J = 10.7Hz, 2H), 2.72 (dt, J = 13.1, 6.6Hz, 2H), 1.51 (s, 9H)。LC-MS: 233 [M + H]<sup>+</sup>。

### 1.2.6 (S)-2-氨基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐⑥的合成

氩气保护和冰水浴下,向 100mL 三颈瓶加入化合物⑤(1.35g, 19.4mmol)、对甲苯磺酸(3.35g, 2.44mmol)、乙腈(15mL)。加完后反应液室温反应 24h。反应液浓缩至粘稠状,加无水乙酸乙酯(30mL, 无水硫酸钠干燥 4h 以上)振摇析出大量结晶,抽滤,滤饼用无水乙酸乙酯(10 mL)洗涤,置于 40℃ 下真空干燥得白色结晶(1.76g),收率 99.5%。m. p.: 127℃ ~ 128℃; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.69 (d, J = 8.3Hz, 2H), 7.36 (d, J = 7.9Hz, 2H), 5.18-5.00 (m, 1H), 3.97-3.78 (m, 2H), 3.15-2.94 (m, 2H), 2.39 (s, 3H)。LC-MS: 133 [M + H]<sup>+</sup>。

## 2 结果

### 2.1 N-Boc-4-氧代-L-脯氨酸甲酯①的合成

考察了反应温度、TEMPO 用量和反应时间,发现

增加 TEMPO 的用量对反应有很大的影响,TEMPO 用量为 0.03eq. 时产率有明显提高。文献报道<sup>[11]</sup> N-Boc-4-羟基-L-脯氨酸甲酯的氧化反应采用在 TEMPO (0.02eq.) 催化下的三氯异氰尿酸室温氧化,收率仅有 74%。本研究表明,反应条件为 0.03eq. TEMPO 在 25℃ 下反应 30min, 可使产率达到 94.5%, 见表 1。

表 1 反应条件对 N-Boc-4-氧代-L-脯氨酸甲酯产率的影响

组别	TEMPO 用量/eq.	反应温度/℃	反应时间/mins	收率/%
1	0.01	0	30	74.2
2	0.02	0	30	80.3
3	0.02	25	30	82.5
4	0.03	25	30	94.5
5	0.03	25	40	89.6

### 2.2 N-Boc-4,4-二氟-L-脯氨酸甲酯②的合成

DAST 是一种常用的氟化试剂,溶剂中存在活泼氢时易于变化。Jansen 等<sup>[11]</sup>报道在室温下滴加氟化试剂,收率仅有 60%, 比较低;参考 Wang 等<sup>[17]</sup>的合成方法对反应溶剂、反应温度和后处理进行了研究,结果如表 2 所示。反应溶剂二氯甲烷应是无水二氯甲烷,否则在滴加 DAST 时会出现冒雾气情况,反应收率会明显降低,因此,应尽可能提高溶剂二氯甲烷的干燥程度。此外体系温度应充分降低至 -78℃ 以下再缓慢滴加 DAST (约 3s/滴),可提升产率至 82.6%。反应完成后反应液应缓慢滴入 0℃ 饱和碳酸氢钠溶液中,边滴加边搅拌至无气体放出为止,若滴加速度过快,会极大增加副产物的产生,不利于后处理,影响反应收率。本步骤关键在于无水操作、滴加氟化试剂的温度和速度、后处理方法。

表 2 反应条件和后处理对 N-Boc-4,4-二氟-L-脯氨酸甲酯产率的影响

组别	反应溶剂	滴加温度/℃	后处理方式	收率/%
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 干燥)	0	加入冰水中	44.2
2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (CaH <sub>2</sub> 干燥)	25	加入冰水中	61.0
3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (CaH <sub>2</sub> 干燥)	0	缓慢滴加入冰水中	70.5
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (CaH <sub>2</sub> 干燥)	-78	缓慢滴加入冰水中	82.6

### 2.3 N-Boc-4,4-二氟-L-脯氨酸③的合成

甲酯的水解采用的是氢氧化钾甲醇溶液的水解方法,产率为 86.0%。为了提高收率,本实验考察了碱和溶剂体系对收率的影响,见表 3。经验证,以氢氧化锂为碱,在水和四氢呋喃混合溶剂体系中反应,水解

产物收率可达 99.5%,可见水和四氢呋喃混合体系具有提高产率的作用,原因是四氢呋喃增加了 *N*-Boc-4,4-二氟-L-脯氨酸甲酯在体系中的溶解度。相较氢氧化钾和氢氧化钠,氢氧化锂水解效果更温和,更适用于本反应。水解产物无需进一步纯化即可用于下一步反应。

表3 反应条件对 *N*-Boc-4-二氟-L-脯氨酸产率的影响

组别	反应溶剂	碱	收率/%
1	MeOH	KOH	86.0
2	$V_{H_2O}:V_{THF}=1:1$	KOH	88.7
3	$V_{H_2O}:V_{THF}=1:1$	NaOH	90.3
4	$V_{H_2O}:V_{THF}=1:1$	LiOH	99.5

#### 2.4 (S)-*N*-Boc-2-甲酰胺基-4,4-二氟吡咯烷④的合成

酰胺化反应文献报道<sup>[11]</sup>的是用氨的甲醇溶液作为氨源,DCC(二环己基碳二亚胺)和 HONSu(*N*-羟基丁二酰亚胺)为缩合剂。但氨气在室温下易挥发,不便于操作且不易提高反应的收率。因此,考察了实验室常见的氨源:氨水和碳酸氢铵,见表4。首先采用碳二亚胺类缩合剂法<sup>[16]</sup>,以氨水为反应试剂,配合 EDCl/HOBT[1-乙基-3-(3-二甲基丙胺)碳二亚胺/1-羟基苯并三唑]缩合体系使用,收率有了一定的提高,但不易于降低成本且操作不够简便。而采用混合酸酐法,以碳酸氢铵为氨源,配合(Boc)<sub>2</sub>O进行酰胺化反应可以非常简便地以96.8%高收率得到(S)-*N*-Boc-2-甲酰胺基-4,4-二氟-吡咯烷,反应原理是 *N*-Boc-4,4-二氟-L-脯氨酸先与(Boc)<sub>2</sub>O反应形成混合酸酐,碳酸氢铵在反应放热时分解生成氨气,作为氨源参与反应,活化的混合酸酐与氨发生亲核取代反应,形成酰胺。

表4 反应试剂对(S)-*N*-Boc-2-甲酰胺基-4,4-二氟吡咯烷产率的影响

组别	氨源	缩合剂	收率%
1	NH <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH	DCC/HONSu	72.0
2	NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O	DCC/HONSu	65.3
3	NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O	EDCl/HOBT	84.3
4	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	(Boc) <sub>2</sub> O	96.8

#### 2.5 (S)-2-氟基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐⑥的合成

胺类物质易于被氧化而变质,因此,一般以各种盐的形式保存。不同的盐性质差别很大。三氟乙酸盐和盐酸盐易于潮解,不易于保存和操作,也不容易从体系中析出。本文使用对甲苯磺酸成盐获得很好

的结果。参考 Wang 等<sup>[17]</sup>的方法使用对甲苯磺酸脱去 Boc 保护基团,反应完后浓缩,在无水的乙酸乙酯中析出大量的固体,以 99.5% 产率得到(S)-2-氟基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐。此盐在空气中不易吸潮,非常便于保存。

### 3 讨论

本文以 *N*-Boc-4-羟基-L-脯氨酸甲酯为起始原料,经氧化、氟化、水解、酰胺化、脱水、脱保护成盐六步成功合成了 DPP-4 抑制剂中间体(S)-2-氟基-4,4-二氟吡咯烷对甲苯磺酸盐。各步反应产物通过<sup>1</sup>H NMR 得以确认。最优反应条件为:以 TEMPO 为催化剂,比例为原料(*n*):TEMPO(*n*)=1:0.03eq.,在室温下反应 30min 得到收率为 94.5% 的氧化产物;-78℃下缓慢滴加氟化剂 DAST,后处理采用将反应液缓慢滴入 0℃饱和碳酸氢钠溶液中的方式合成氟化产物;以氢氧化锂为碱水解,碳酸氢铵酰胺化,三氟乙酸酐脱水,对甲苯磺酸脱 Boc 保护均可直接获得固体产品。第⑤种化合物没有讨论,因为化合物合成非常顺利,产率也比较高,故未做优化处理。本实验的合成方法易于操作,后处理简单,收率高,为 DPP-4 抑制剂的相关研究提供了参考。

### 参考文献:

- [1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2022, 183: 109119
- [2] ANNA G, DEBORA C, BRETT P, et al. Neutrophils and their role in the etiopathogenesis of type 1 and type 2 diabetes [J]. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2021, 38(1): e3483
- [3] SHAO D W, ZHAO L J, SUN J F. Synthesis and clinical application of representative small-molecule dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2024, 272: 116464
- [4] WU M Z, TENG TH K, TSANG C T W, et al. Risk of hyperkalaemia in patients with type 2 diabetes mellitus prescribed with SGLT2 versus DPP-4 inhibitors [J]. *European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy*, 2024, 10(1): 45
- [5] KAWANAMI D, TAKASHI Y, TAKAHASHI H, et al. Renoprotective effects of DPP-4 inhibitors [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 246
- [6] NAG S, MANDAL S, MUKHERJEE O, et al. DPP-4 Inhibitors as a savior for COVID-19 patients with diabetes [J]. *Future Virology*, 2023, 18(5): 321
- [7] ALROUJI M, AL-KURAISHY H M, AL-BUHADILY A K, et

- al. DPP-4 inhibitors and type 2 diabetes mellitus in parkinson's disease: a mutual relationship [J]. *Pharmacological Reports*, 2023, 75(4):923
- [8] NIAZMAND A, NEDAEINIA R, VATANDOOST N, et al. The impacts of dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4) inhibitors on common female malignancies: a systematic review [J]. *Gene*, 2024, 927:148659
- [9] KUMAR S, MITTAL A, MITTAL A. A review upon medicinal perspective and designing rationale of DPP-4 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 46:116354
- [10] KUBYSHKIN V, MYKHAILIUK P K. Proline analogues in drug design: current trends and future prospects [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(22):20022
- [11] JANSEN K, HEIRBAUT L, VERKERK R, et al. Extended structure-activity relationship and pharmacokinetic investigation of (4-quinolinoyl) glycyL-2-cyanopyrrolidine inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(7):3053
- [12] JUNG H J, NAM E H, PARK J Y, et al. Identification of BR102910 as a selective fibroblast activation protein (FAP) inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 37:127846
- [13] PLESCIA J, DE CESCO S, PATRASCU M B, et al. Integrated synthetic, biophysical, and computational investigations of covalent inhibitors of prolyl oligopeptidase and fibroblast activation protein  $\alpha$  [J]. *J Med Chem*, 2019, 62(17):7874
- [14] DEACON C F. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2020, 16(11):642
- [15] 郭丽媛, 董志艳, 黄胜堂, 等. 维格列汀重要中间体合成工艺研究 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2017, 31(3):185
- [16] 郭丽媛, 董志艳, 吴远强, 等. S-2-氟基吡咯烷三氟乙酸盐的合成工艺优化 [J]. *化学与生物工程*, 2017, 34(7):31
- [17] WANG J, FENG Y, JI X, et al. Synthesis and biological evaluation of pyrrolidine-2-carbonitrile and 4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile derivatives as dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(23):7418

(收稿日期:2025-03-19)

(上接第400页)

## 参考文献:

- [1] WILSON T K, ZISHIRI O T. Prostate cancer: a review of genetics, current biomarkers and personalised treatments [J]. *Cancer Rep (Hoboken)*, 2024, 7(10):e70016
- [2] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5):584
- [3] ACHARD V, PUTORA P M, OMLIN A, et al. Metastatic prostate cancer: treatment options [J]. *Oncology*, 2022, 100(1):48
- [4] MARQUES L O, LIMA M S, SOARES B G. Trifluoperazine for schizophrenia [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004, 2004(1):CD003545
- [5] MILLER D R, THORBURN A. Autophagy and organelle homeostasis in cancer [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(7):906
- [6] GULINO A, BARRERA G, VACCA A, et al. Calmodulin antagonism and growth-inhibiting activity of triphenylethylene antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1986, 46:6274
- [7] CHEN Q Y, WU L J, WU Y Q, et al. Molecular mechanism of trifluoperazine induces apoptosis in human A549 lung adenocarcinoma cell lines [J]. *Mol Med Rep*, 2009, 2:811
- [8] POLISCHOUK A G, HOLGERSSON A, ZONG D, et al. The antipsychotic drug trifluoperazine inhibits DNA repair and sensitizes non small cell lung carcinoma cells to DNA double-strand break induced cell death [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6:2303
- [9] 董兰, 赵冰洁, 曾凤娇, 等. 马钱子碱抑制骨肉瘤的作用机制 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2023, 37(4):277
- [10] 阮诗剑, 蔡敬, 谢孟婷, 等. 基于网络药理学和细胞实验探索柳穿鱼黄素对前列腺癌细胞的作用 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2024, 38(5):400

(收稿日期:2025-01-07)

引文格式:陈媛媛,张瀚镭,舒璟,等.柚皮苷微孔渗透泵片的制备研究[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):406-411.

## 柚皮苷微孔渗透泵片的制备研究\*

陈媛媛<sup>1</sup>,张瀚镭<sup>1</sup>,舒璟<sup>1</sup>,蒋凯<sup>2</sup>,白育庭<sup>3</sup>,闵清<sup>1,4</sup>,要辉<sup>1,4\*\*</sup>

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100;2.联勤保障部队第九零四医院常州医疗区药剂科;  
3.湖北科技学院医学部临床医学院;4.湖北科技学院鄂南特色中药湖北省工程研究中心)

**摘要:**目的 制备包含柚皮苷的微孔渗透泵片,并针对该片剂的处方展开系统优化工作。方法 采用干法制粒压片法制备片芯,并通过聚乙二醇400(PEG400)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、包衣增重3个因素对包衣液进行3水平的Box-Behnken响应面实验。综合考虑单因素以及Box-Behnken响应面实验的结果确定最佳的处方组成。结果 最优片芯处方为柚皮苷20mg、乳糖42.9%、氯化钠14.3%、羟丙甲基纤维素4.6%、聚乙烯吡咯烷酮4%、十二烷基硫酸钠11.4%、可溶性淀粉11.4%。包衣液处方为3%乙酸纤维素、55%聚乙二醇400、30%邻苯二甲酸二丁酯、包衣增重3%。3批柚皮苷微孔渗透泵片在24h时的累计释放度均接近80%。试验结果与模型预测值基本一致,相对误差均小于5%,表明按处方制备的微孔渗透泵片质量稳定,重现性良好。体外释药行为表明,柚皮苷微孔渗透泵片24h内缓慢释药。结论 最优处方制备的柚皮苷微孔渗透泵片具控释释药性能,可以作为柚皮苷新型剂型研究的参考。

**关键词:**柚皮苷;微孔渗透泵片;单因素实验;Box-Behnken响应面;处方优化

中图分类号:R944.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0406-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025031205



## Preparation of Naringin Microporous Osmotic Pump Tablets

CHEN Yuan-yuan, ZHANG Han-lei, YAO Hui, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medicine College, Hubei University of Science and Technology,  
Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To prepare microhole osmotic pump tablets containing naringin and conduct a systematic optimization of the formulation of these tablets. **Methods** The tablet core was prepared by the dry granulation and tableting method. The Box-Behnken response surface test was performed on the coating solution by three factors: polyethylene glycol 400(PEG400), dibutyl phthalate(DBP) and coating weight gain. The optimal prescription was obtained by combining the results of single factor and Box-Behnken response surface test. **Results** The optimal formulations of the tablet core were naringin 20mg, lactose 42.9%, sodium chloride 14.3%, hypromellose 4.6%, polyvinylpyrrolidone 4%, sodium lauryl sulfate 11.4%, and soluble starch 11.4%. The formulations of the coating solution were 3% cellulose acetate, 55% polyethylene glycol 400, and 30% dibutyl phthalate, with a coating weight gain of 3%. The results showed that the cumulative release rates of three batches of naringin microporous osmotic pump tablets were all close to 80% at 24h. The experimental results were basically consistent with the model prediction values, with relative errors all less than 5%. This indicates that the microporous osmotic pump tablets prepared according to the determined formulation had stable quality and good reproducibility. The *in vitro* drug release behavior showed that the naringin microporous osmotic pump tablets released the drug slowly within 24h. **Conclusion** Naringin microporous permeable tablets prepared with optimal prescription have controlled release properties, and can be used as a reference for the research on the new formulation of naringin.

**KEY WORDS:** Naringin; Microhole osmotic pump tablets; Single-Factor experiment; Box-Behnken Response surface methodology; Formulation optimization

\* 基金项目:湖北省教育厅科研计划项目(B2023166);湖北科技学院博士启动项目(BK202206)

\*\* 通信作者, E-mail: hkyh003@163.com

柚皮苷是葡萄柚中含有的一类黄酮类物质,也是一种存在于中草药化橘红、枳实以及骨碎补中的活性成分,化学名称为5,7,4'-三羟基黄酮-7-O-新橙皮苷。柚皮苷具有抗氧化、神经保护、抗炎等多种生物活性<sup>[1-2]</sup>。尽管柚皮苷口服吸收佳,但普通制剂存在半衰期短、血药浓度不稳、生物利用度低等问题<sup>[3]</sup>。而且传统柚皮苷制剂需每日服用2~3次。开发可减少服药频率的柚皮苷缓控释制剂,对提升患者生活质量、满足临床治疗需求具有重要意义。

随着给药系统理论研究的深入以及新型药用功能性辅料的不断涌现,缓控释制剂发展迅速。口服渗透泵制剂属于缓控释型制剂,其中渗透泵片作为重要的药物缓控释制剂,依据结构与适用药物类型,分为初级渗透泵片、多室渗透泵及微孔渗透泵片<sup>[4-5]</sup>。初级渗透泵结构简单,适用于易溶性药物,片芯含易溶高渗辅料,包衣膜由不溶性高分子材料制成,需用激光等手段在膜上开小孔,实现药物恒速释放<sup>[6]</sup>。多室渗透泵片用于难溶性药物,含药层与动力层外裹包衣膜,含药层膜上有孔,接触水后,推动层溶胀材料吸水膨胀,推动药物从释药孔持续释放<sup>[7]</sup>。微孔渗透泵片适用于水溶性较好的药物,通过在包衣材料中添加水溶性致孔剂(如聚乙二醇400),遇水形成微孔实现药物恒速释放,工艺简单,能避免单一释药孔弊端<sup>[8-10]</sup>。

基于此,本实验将柚皮苷制成微孔渗透泵片,可恒速释药、提升生物利用度,减少服药次数与不良反应,释药均匀稳定且工艺简单。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

柚皮苷原料药(20220305,春秋生物);氯化钠(NaCl,20230608,国药); $\alpha$ -乳糖一水合物(B2010080,阿拉丁);羟丙甲基纤维素(HPMC,R29011T128458,源叶生物);聚乙烯吡咯烷酮K30(PVPK30,K2224627,阿拉丁);十二烷基硫酸钠(SDS,20210728,国药),可溶性淀粉(220202,汉中秦发),丙酮(20151222,国药),聚乙二醇400(PEG400,20201228,国药),邻苯二甲酸二丁酯(DBP,20200904,国药);乙纤维素(CA,20180119,国药)。

万分之一电子分析天平(BP211D型,岛津)、单冲压片机(THDP-6型,天闾机械)、智能溶出试验仪(ZRS-8G,天津大学)、包衣抛光机(TBY-300型,腾涂科技),紫外分光光度计(EL04093505型,安捷伦),高效液相色谱仪(LC-2050,岛津),电热鼓风干燥箱(GZX-9140MBE,博迅实业),超纯水机(PGH-4-AS,武

汉品冠)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 柚皮苷含量测定

最大吸收波长的选择:将柚皮苷、乳糖、NaCl、HPMC、PVPK30、SDS、可溶性淀粉以pH6.8的磷酸水缓冲溶液进行稀释,配制成特定浓度的溶液后,选取pH6.8的磷酸水缓冲溶液为空白对照,于200~400nm区间内开展紫外吸光度扫描。

制定标准曲线:精密称定干燥至恒重的柚皮苷,以pH6.8的磷酸水缓冲溶液作为溶剂,配制成浓度分别为0.2、1、5、20、40、80 $\mu$ g/mL的溶液,在上述确定的最大吸收波长处,分别测定各溶液的紫外吸收度值,进而绘制标准曲线。

#### 1.2.2 柚皮苷微孔渗透泵片的制备

柚皮苷微孔渗透泵片制备分为两个步骤,先进行含药片芯的制备,选择硬度合格的片芯进行后续的包衣处理,具体过程描述如下。

片芯的制备:按处方规定量精准称取填充剂、渗透压促进剂、pH调节剂、崩解剂等辅料,与主药柚皮苷采用等量递加进行混合,待药物与辅料充分搅拌均匀后,使用80目筛进行筛分处理。由于湿法制粒时,物料黏度太大,所制片剂硬度太小,无法成型,因此本实验采用粉末直接压片法制备片芯,使用6mm浅凹冲模,借助单冲压片机压制片芯。

片芯的包衣:按处方量称取适量的包衣材料、致孔剂和增塑剂用丙酮进行溶解,形成澄清透明的状态,将包衣液密封保存,以备后续使用。片芯检测合格后包衣。DBP为包衣材料,PEG400为致孔剂,丙酮为包衣溶剂,配制包衣液浓度为3%,将片芯放置于包衣锅内,当包衣膜增重到处方要求时停止,取出包衣片并在40 $^{\circ}$ C烘箱中进行老化处理,时间不少于12h。

#### 1.2.3 药物释放度的评价

释放度的测定参照《中国药典》溶出度与释放度测定法的要求<sup>[11]</sup>,以800mL pH6.8的磷酸水缓冲溶液为释放介质,转速75r/min,温度(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C,在实验开始后的0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、12、24h吸取溶出介质3mL(同时补充等体积等温度介质),于最大吸收波长处测定吸光度,根据标准曲线计算累计释药率,并校正稀释效应。

### 1.3 统计学方法

结果表示为(平均值 $\pm$ 标准差),使用Design-expert软件进行非配对t检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 最大吸收波长的确定

实验结果见图1~2,光谱扫描图显示柚皮苷在283nm处有最大吸收峰,除柚皮苷外其余辅料按处方量混合后进行紫外检测,结果表明混合辅料在此处无紫外吸收,对后续采用紫外法进行定量检测无干扰,故选择283nm作为后续定量实验用检测波长。

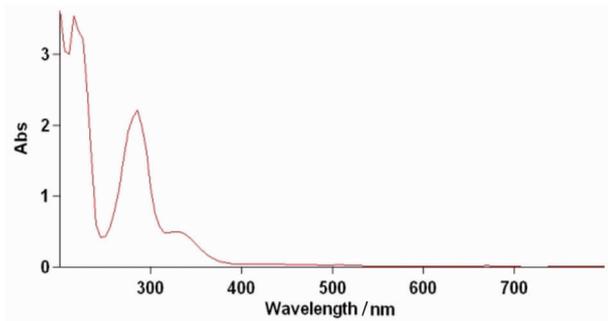


图1 柚皮苷的全波长扫描图谱

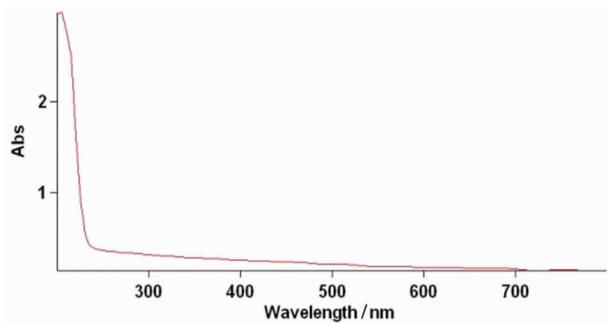


图2 混合辅料的全波长扫描

### 2.2 定量方法标准曲线范围确定

用pH6.8的磷酸盐缓冲液对柚皮苷进行配制,稀释浓度根据后续释放度检测的测试条件来换算。在283nm波长处,对各含药溶液的吸光度值展开测定。基于所测得的吸光度值以及与之对应的浓度数据,开展回归分析,得出回归方程为 $A = 0.0293C + 0.0153$ 。A指的是吸光值,C表示质量浓度。该方程的相关系数 $R^2 = 0.9994$ ,这一结果显示,柚皮苷溶液的吸光度值与质量浓度之间呈现良好的线性关系。最终实验结果表明柚皮苷在 $0.2 \sim 80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,其紫外吸收度与配制的药物质量浓度具有较优良的线性关系,可以使用此标准曲线进行后续定量实验的研究。

### 2.3 包衣液处方优化

#### 2.3.1 包衣液材料的选择

CA作为一种热塑性纤维素衍生物,因其良好的

成膜性和可控的透水率,在缓控释制剂中得到了广泛的应用。本实验中通过调节CA的浓度并以丙酮为溶剂,成功制备包衣溶液。同时,调节增塑剂DBP和致孔剂PEG400的用量来优化包衣膜性能,实现对药物的释放速率和程度的精准控制。

前期实验制备了3种不同浓度(2%、3%、4%)的乙酸纤维素丙酮溶液,加入DBP用作增塑剂,实验显示(图3)2%的乙酸纤维素丙酮溶液包衣,成膜性较差,并且在体外溶出实验结束后包衣膜不完整,有突释现象;而4%的溶液成膜性好,但体外溶出实验结果发现药物释放速度太慢,24h药物释放度约60%;故本实验选择3%乙酸纤维素丙酮溶液作包衣液。

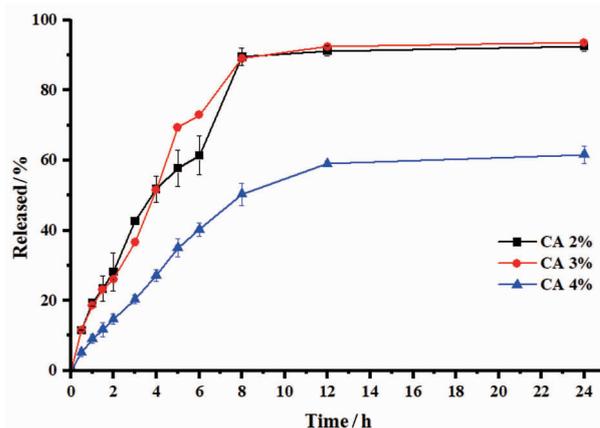


图3 CA用量对药物释放的影响

微孔渗透泵片的释药通道由包衣膜内水溶性致孔剂溶解形成。参考相关文献及预实验<sup>[12-13]</sup>,基于PEG等常用致孔剂中PEG400对膜通透性调节作用显著的特点,选定PEG400作为致孔剂。固定DBP用量与包衣增重条件下,在包衣液中分别加入0%、50%、100%CA质量的PEG400制备包衣膜。结果显示,PEG400用量与药物释放速率呈正相关,但过量(100%CA质量)会导致衣膜完整性破坏,引发突释。

固定其他参数,考察10%、30%、60%CA质量的DBP用量影响,发现增塑剂比例提升显著延缓释放进程,累计释放量降低。本实验还通过控制包衣增重率考察膜厚对药物释放的影响,其计算公式为:

$$\text{衣膜增重率} = \frac{\text{包衣后片重} - \text{包衣前片芯重量}}{\text{包衣前片芯重量}} \times 100\%$$

最终将包衣增重范围控制在2%~4%,并采用Box-Behnken响应面法对包衣液处方配比进行优化。

#### 2.3.2 Box-Behnken响应面实验设计

预实验和单因素实验表明,确定PEG400、DBP含量以及包衣增重率是影响柚皮苷微孔渗透泵片释放的关键因素。鉴于此,选择PEG400含量为A(%),

DBP 含量为 B(%),包衣增重率 C(% )为处方考察变量,以渗透泵片在 2、5、24h 的累计释放量 Y2、Y5、Y24 之和为评价指标,开展三因素三水平(-1、0、1)的 Box-Behnken 响应面实验,因素水平和代码见表 1,实验安排及结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 响应面因素和水平代码

因素	水平代码		
	-1	0	1
A(%)	30	55	80
B(%)	20	30	40
C(%)	2	3	4

表 2 Box-Behnken 响应面安排及实验结果

序号	A	B	C	Y2/%	Y5/%	Y24/%
1	55	30	3	28.03	46.43	93.66
2	30	30	2	35.10	50.31	71.28
3	55	30	3	20.33	52.17	92.43
4	55	40	2	38.14	53.30	76.43
5	55	30	3	22.06	55.36	88.02
6	55	20	2	19.03	30.08	67.07
7	80	30	2	34.48	51.85	83.9
8	55	30	3	22.42	50.82	94.01
9	30	20	3	14.40	38.27	57.66
10	80	20	3	21.64	45.91	65.92
11	80	30	4	25.35	52.33	68.78
12	30	30	4	20.49	49.50	71.34
13	55	30	3	27.32	53.85	93.86
14	55	40	4	14.44	37.78	57.04
15	55	20	4	15.10	41.22	62.46
16	30	40	3	15.19	45.14	63.54
17	80	40	3	27.92	51.22	72.32

### 2.3.3 Box-Behnken 响应面优化实验结果与分析

用 Design-expert 软件统计,以 Y2、Y5、Y24 为评价指标分别对各考察因素,得二项式拟合方程:  $Y2 = 24.03 + 3.03A + 3.19B - 6.42C + 1.37AB + 1.37AC - 4.94BC + 1.47A^2 - 5.71B^2 + 3.36C^2 (R^2 = 0.8906)$ ;  $Y5 = 54.82 + 1.84A + 3.96B + 0.8C - 0.31AB - 0.3975AC - 7.21BC + 3.21A^2 - 7.39B^2 - 3.62C^2 (R^2 = 0.9211)$ ;  $Y24 = 92.40 + 3.39A + 2.03B - 4.88C + 0.13AB - 3.8AC - 3.7BC - 9.73A^2 - 17.81B^2 - 8.84C^2 (R^2 = 0.9817)$ 。

Box-Behnken 试验方差分析(表 3)显示:所选二次模型具有统计学意义( $P < 0.0001$ ),失拟项不显著( $P = 0.3908$ ),校正决定系数  $r = 0.9582$ ,表明模型预

测性能良好。

根据表 4 中的数据及分析结果可知:在对 Y2 的影响因素方面,变量 C 对 Y2 的影响达到极显著水平;变量 B、交互项 BC 以及二次项  $B^2$  对 Y2 具有显著影响。对于 Y5 而言,变量 B、交互项 BC 以及二次项  $B^2$  对其影响呈现极显著状态,二次项  $C^2$  对 Y5 的影响显著。而在影响 Y24 的众多因素中,变量 A、C,二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对 Y24 的影响极为显著,交互项 AC、BC 同样对 Y24 有着显著影响。

表 3 2h、5h、24h 二次回归方程的方差分析

时间	标准差	均值	复相关系数	校正相关系数	预测相关系数	信噪比
2h	2.68	75.28	0.8906	0.7500	0.0228	8.2489
5h	2.91	51.15	0.9211	0.8197	0.5796	11.1126
24h	2.68	75.28	0.9817	0.9582	0.8413	16.1510

表 4 Y24 回归方程系数显著性检验

因素	Y2		Y5		Y24	
	F	P	F	P	F	P
模型	6.33	0.0118	9.08	0.0041	41.75	<0.0001
A	5.34	0.0541	3.19	0.1172	12.78	0.0090
B	5.94	0.0450	14.78	0.0063	4.58	0.0696
C	24.05	0.0017	0.6042	0.4624	26.56	0.0013
AB	0.5459	0.4827	0.0454	0.8374	0.0094	0.9254
AC	0.5475	0.4834	0.0746	0.7927	8.02	0.0253
BC	7.13	0.0320	24.56	0.0016	7.60	0.0282
$A^2$	0.6603	0.4432	5.12	0.0580	55.51	0.0001
$B^2$	10.01	0.0158	27.13	0.0012	185.88	<0.0001
$C^2$	3.46	0.1052	6.52	0.0380	45.82	0.0003

### 2.3.4 效应面分析

将三个变量中的一个固定为中值,借助 Design-expert 软件绘制 Y2、Y5、Y24 的效应面图。由图 4~6 可知,Y2 随着 PEG400 含量的加大而增加,Y5 和 Y24 随着 PEG400 含量的加大先增大后减小;Y2、Y5、Y24 的值均随着 DBP 含量的增加呈现先上升后下降的趋势,且随包衣增重的增加而降低,这与方差分析结果相符。

借助 Design-Expert 软件对构建的模型开展优化与预测工作。结合实际操作的可性,经综合考量,筛选出缓释片的最优包衣处方:包衣增重设定为 3%,PEG400 用量占比 55%,DBP 用量占比 30%。

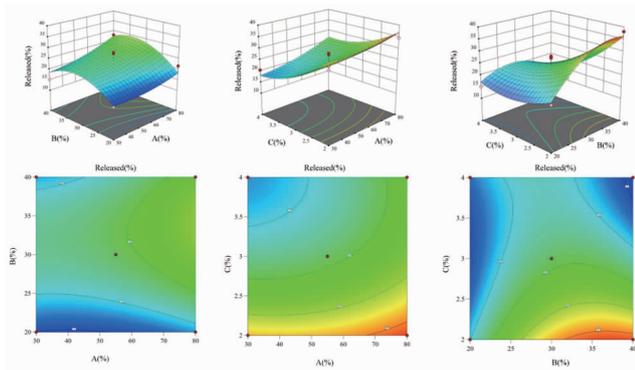


图4 PEG 400(A)、DBP(B)、包衣增重(C)对2h的累计释放度影响等高线和响应面图

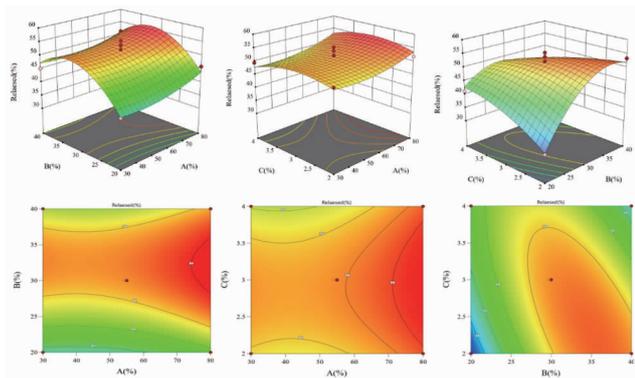


图5 PEG 400(A)、DBP(B)、包衣增重(C)对5h的累计释放度影响等高线和响应面图

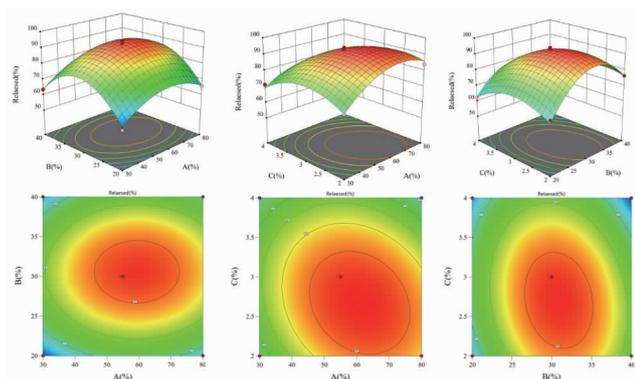


图6 PEG 400(A)、DBP(B)、包衣增重(C)对24h的累计释放度影响等高线和响应面图

## 2.4 验证及释药机制讨论

### 2.4.1 验证

根据最终实验确定的最佳处方,平行制备3批含药微孔渗透泵片,并对这3批样品开展体外释放度检测,如图7、表5,结果显示,3批柚皮苷微孔渗透泵片在24h时的累计释放度均接近80%。试验结果与模型预测值基本一致,相对误差均小于5%,表明按所确定的处方制备的微孔渗透泵片质量稳定,重现性良好。

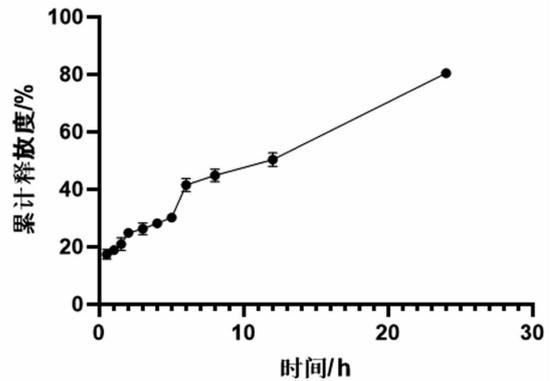


图7 柚皮苷微孔渗透泵片三批累计释放度(n=3)

表5 验证实验结果表(n=3)

累计释放度/%	Y2	Y5	Y24
预测值	25.403	42.377	79.488
实测值( $\bar{x} \pm s$ )	26.413 ± 1.01	45.653 ± 1.70	80.776 ± 1.41
相对误差/%	3.8	3.7	1.7

### 2.4.2 释药机制讨论

采用零级、一级及 Higuchi 动力学模型拟合制剂释放曲线(表6),以决定系数( $r^2$ )评估模型拟合优度。结果显示零级动力学模型呈现最佳拟合( $r^2 = 0.97347$ ),表明该制剂体外释放符合零级释药机制。

表6 释药模型拟合结果

数学模型	拟合方程	$r^2$
零级	$Y = 0.11955 + 0.01222t$	0.97347
一级	$\ln(100 - Y) = -0.21283t + 0.34223$	0.94808
Higuchi	$Y = 0.07468t^{1/2} + 0.03133$	0.93343

### 2.4.3 稳定性

随机抽取一批已制备的柚皮苷微孔渗透泵片,放入瓶中,在室温下放置。三个月后取出,对渗透泵片的外观性状、药物含量、累计释放度以及片重差异的变化情况展开考察<sup>[12]</sup>。考察结果详见表7,两组无统计学差异( $P > 0.05$ )。

表7 长期实验结果(n=3)

放置时间/d	外观性状	含量/(mg/片) 柚皮苷	累计释放度/%			片重差异/%
			2h	5h	24h	
0	类白色 外形完整光洁 气微	15.62 ± 0.017	26.14 ± 0.031	45.65 ± 0.076	80.77 ± 0.14	2.61 ± 3.39
90	类白色 外形完整光洁 气微	15.50 ± 0.025	27.63 ± 0.049	46.26 ± 0.087	81.02 ± 0.12	2.54 ± 2.36

### 3 讨论

本实验制备的柚皮苷微孔渗透泵制剂,创新地在包衣膜中添加水溶性聚合物<sup>[13]</sup>,遇水后聚合物溶解,于包衣膜上形成多个微孔。这种设计巧妙规避了传统单一制孔方式易出现的局部药物浓度过高、释药孔堵塞致使药物释放不完全等弊端,促使药物能够以较为稳定的速度持续释放<sup>[14]</sup>。体外溶出实验数据表明,在 pH1.2 的盐酸溶液与 pH6.8 的磷酸盐缓冲溶液等不同溶出介质中,该制剂的释放动力学特征并无显著差异,充分契合渗透泵控释机制<sup>[15]</sup>。这意味着胃肠道环境中常见的 pH 值波动以及机械蠕动等因素,基本不会干扰其药物释放规律,呈现出良好的体内外相关性。

借助单因素实验初步筛选出影响因素,再通过响应面实验深入探究,最终确定了包衣的最佳处方:PEG400 用量为 55%、DBP 用量为 30%、包衣增重为 3%。该处方在多次重复实验中均展现出良好的重现性。体外释放度实验数据显示,该柚皮苷微孔渗透泵片在前 24h 的药物释放过程呈现典型的零级动力学特征,能够有效延缓药物释放进程。

相较于以往的渗透泵制剂研究,本实验所制备的柚皮苷微孔渗透泵制剂在多个方面展现出独特优势<sup>[16]</sup>。在制备工艺上,摒弃了传统复杂且成本较高的制孔工艺,采用添加水溶性聚合物形成微孔的方式,显著简化了制备流程,降低了生产成本。在释药方式上,多微孔设计极大地改善了药物释放的均匀性与稳定性。不过,在释药的核心原理层面,本制剂与传统渗透泵制剂一致,均是以渗透压作为药物释放的主要驱动力。

本研究极大地拓展了渗透泵制剂领域的研究范畴,为开发新型、高效的缓控释制剂提供了全新的思路与方法,从理论层面进一步丰富和完善了药物控释理论体系,为后续相关研究奠定了重要基础。从实用层面来讲,对于长期需要服药的患者而言,该柚皮苷微孔渗透泵制剂具有显著的临床价值,它能够有效延长药物的作用时间,减少患者每日的服药次数,提高患者的用药依从性。同时,平稳的药物释放特性可降低血药浓度的波动,减少药物不良反应的发生,增强了制剂在临床应用中的安全性。

在本次研究过程中,整体实验现象与预期相符,研究成果能够合理阐释各项实验现象,未出现明显的异常情况。然而,针对该制剂在长期储存条件下的稳定性,目前研究仍存在不足。例如,长期储存过程中,包衣膜的物理化学性质是否会发生改变,其微孔结构

是否会因环境因素(如温度、湿度等)而出现变形、堵塞或孔径变化,进而影响药物释放特性,这些方面尚缺乏深入研究与数据支撑。

### 参考文献:

- [1] ESUOLA O L, ESAN O O, MAIKIFI S A, et al. Therapeutic effects of naringin on bisphenol a-induced oxidative stress damage in nervous and reproductive systems of cockerel chickens [J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2025, 11(4): e70322
- [2] 林琴,朱瑛凯,林艳铭,等. 柚皮苷调控 lncRNA GASS 改善骨关节炎软骨细胞线粒体凋亡[J]. *康复学报*, 2025, 35(3): 265
- [3] 徐坤勇,杜茂波,郭建忠,等. 柚皮苷制剂研究进展[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(16): 58
- [4] 梁欢欢,曹晔,李双双,等. 口服缓控释制剂研究进展[J]. *军事医学*, 2021, 45(12): 945
- [5] 赵堂开,葛婷婷,王琢文,等. 山奈酚微孔渗透泵片的制备工艺研究[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2023, 37(6): 495
- [6] 刘曦,武娟霞,刘宁,等. 不同来源国产产业化渗透泵片激光打孔设备考察比较[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(2): 207
- [7] PATRICK L, DOMINIK S, GERARDO A, et al. Nematic suspension of a microporous layered silicate obtained by forceless spontaneous delamination via repulsive osmotic swelling for casting high-barrier all-inorganic films[J]. *Science Advances*, 2022, 8(20): eabn9084
- [8] CHEN H, FANG D, WANG X, et al. Fabrication of osmotic pump tablets utilizing semisolid extrusion three-dimensional printing technology [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 665: 124668
- [9] 曾棋平,杨丽娜,刘建清,等. 水飞蓟素磷脂复合物微孔渗透泵控释片比格犬体内药动学及体内外相关性研究[J]. *药学实践与服务*, 2023, 41(12): 741
- [10] HU J, ZHANG L, LI W, et al. Modelling the controlled drug release of push-pull osmotic pump tablets using DEM [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, 660: 124316
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 167
- [12] 张玲玲, 阙晓, 蒲婷, 等. 致孔剂及其用量对盐酸吗啡渗透泵片体外释放度的影响 [J]. *中国药业*, 2024, 33(17): 16
- [13] 聂琴, 吴静澜, 罗坤顺, 等. 阿司匹林包合物微孔渗透泵片制备及释药机制考察 [J]. *科学技术与工程*, 2025, 25(1): 84
- [14] NI Q, LI Z, BAQING L, et al. Strap-on buoyant device to enhance gastrointestinal tract retention of felodipine osmotic pump tablets [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2024, 25(8): 260
- [15] DAVE V, SREENATH S, BHADU R G, et al. Size-tuned silver nanoparticles by a non-gassing electro-osmotic pump-driven microfluidic device [J]. *Journal of the Indian Chemical Society*, 2025, 102(5): 101641
- [16] 张栋梁, 奚泉, 苗佳颖. 挤出型单室渗透泵片释药性能的影响因素考察 [J]. *中国医药工业杂志*, 2021, 52(2): 219

(收稿日期:2025-03-12)

引文格式:尹咸森,宋欢,夏睿,等.多巴丝肼片在中国健康人体内的生物等效性研究[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):412-415.

## 多巴丝肼片在中国健康人体内的生物等效性研究

尹咸森<sup>1,2</sup>,宋欢<sup>1,2</sup>,夏睿<sup>3</sup>,丁峰<sup>1,2</sup>,姜敏生<sup>1,2</sup>,张艺<sup>1,2</sup>,郭东生<sup>2</sup>,甘方良<sup>2\*</sup>

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100;2.咸宁市中心医院临床药理机构办公室;  
3.鄂州市中心医院药学部)

**摘要:**目的 评价多巴丝肼片受试制剂和参比制剂在中国健康受试者中的生物等效性和安全性。方法 按照两序列四周完全重复交叉设计,76例健康志愿者分为空腹40例和餐后36例,每周分别使用多巴丝肼片受试制剂或参比制剂,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法检测血浆中左旋多巴和2,3,4-三羟基苄基肼的药物浓度,最后使用药动学软件计算其药动学相关参数和评价其生物等效性。结果 空腹状态下,受试制剂与参比制剂左旋多巴的 $C_{max}$ 为(4545.413±1992.017)和(4708.300±2341.716)ng/mL, $AUC_{0-4}$ 为(6531.0±1296.0)和(6571.6±1426.9)h·ng/mL, $AUC_{0-∞}$ 为(6581.6±1295.2)和(6616.1±1425.8)h·ng/mL;餐后状态下,受试制剂与参比制剂左旋多巴的 $C_{max}$ 为(3090.471±1565.144)和(2860.762±1300.407)ng/mL, $AUC_{0-4}$ 为(5565.3±1226.5)和(5530.8±1140.3)h·ng/mL, $AUC_{0-∞}$ 为(5621.3±1225.8)和(5585.8±1140.7)h·ng/mL。空腹状态下受试制剂和参比制剂2,3,4-三羟基苄基肼的 $C_{max}$ 为(54.341±14.709)和(56.965±17.084)ng/mL, $AUC_{0-4}$ 为(156.9±40.2)和(161.4±42.0)h·ng/mL, $AUC_{0-∞}$ 为(163.7±42.3)和(168.1±44.2)h·ng/mL;餐后试验受试制剂和参比制剂2,3,4-三羟基苄基肼 $C_{max}$ 为(45.748±10.160)和(44.722±9.959)ng/mL, $AUC_{0-4}$ 为(155.3±32.3)和(158.6±30.8)h·ng/mL, $AUC_{0-∞}$ 为(161.9±34.3)和(165.0±32.5)h·ng/mL。药动学参数最小二乘几何均值比的90%置信区间均落在80%~125%判定范围内。结论 两种制剂在空腹和餐后条件下具有生物等效性,试验中未发生严重不良反应,安全性良好。

**关键词:**左旋多巴;2,3,4-三羟基苄基肼;生物等效性;药动学

中图分类号:R915

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0412-004

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025031209



## Bioequivalence Study of Levodopa and Benserazide Hydrochloride Tablets in Healthy Chinese Subjects

YIN Xian-miao, SONG Huan, GAN Fang-liang, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To evaluate the bioequivalence and safety of the test and the reference formulation of Levodopa and Benserazide Hydrochloride tablets in healthy Chinese subjects. **Methods** According to a two-sequence, four-period, completely replicated crossover design, 76 healthy volunteers were divided into 40 fasting cases and 36 postprandial subjects. In each cycle, they were respectively administered the test formulation or the reference formulation of Madopar tablets. The plasma concentrations of levodopa and 2,3,4-trihydroxybenzylhydrazine were determined by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and the pharmacokinetic parameters were calculated using pharmacokinetic software to evaluate the bioequivalence. **Results** Under fasting conditions, the  $C_{max}$  of levodopa of the test formulation and the reference formulation were (4545.413±1992.017) and (4708.300±2341.716) ng/mL, respectively; the  $AUC_{0-4}$  were (6531.0±1296.0) and (6571.6±1426.9) h·ng/mL, respectively; and the  $AUC_{0-∞}$  were (6581.6±1295.2) and (6616.1±1425.8) h·ng/mL, respectively. Under postprandial conditions, the  $C_{max}$  of levodopa of the test formulation and the reference formulation were (3090.471±1565.144) and (2860.762±1300.407) ng/mL, respectively; the  $AUC_{0-4}$  were (5565.3±1226.5) and (5530.8±1140.3) h·ng/mL, respectively; and the  $AUC_{0-∞}$  were (5621.3±1225.8) and (5585.8±1140.7) h·ng/mL, respectively. Under fasting conditions, the  $C_{max}$  of 2,3,4-trihydroxybenzylhydrazine of the test formulation and the reference formulation were (54.341±14.709) and (56.965±17.084) ng/mL, respectively; the  $AUC_{0-4}$  were (156.9±40.2) and (161.4±42.0) h·ng/mL, respectively; and

\* 通信作者, E-mail: ganfang9876@163.com

the  $AUC_{0-\infty}$  were  $(163.7 \pm 42.3)$  and  $(168.1 \pm 44.2)$  h · ng/mL, respectively. Under postprandial conditions, the  $C_{max}$  of 2,3,4-trihydroxybenzylhydrazine of the test formulation and the reference formulation were  $(45.748 \pm 10.160)$  and  $(44.722 \pm 9.959)$  ng/mL, respectively; the  $AUC_{0-t}$  were  $(155.3 \pm 32.3)$  and  $(158.6 \pm 30.8)$  h · ng/mL, respectively; and the  $AUC_{0-\infty}$  were  $(161.9 \pm 34.3)$  and  $(165.0 \pm 32.5)$  h · ng/mL, respectively. The 90% confidence intervals of the least squares geometric mean ratios of the pharmacokinetic parameters fell within the 80% ~ 125% range. **Conclusion** The two formulations were bioequivalent under both fasting and postprandial conditions. No serious adverse reactions occurred during the trial, and the safety was good.

**KEY WORDS:** Levodopa; 2,3,4-trihydroxybenzylhydrazine; Bioequivalence; Ph-armacokinetics

帕金森氏病(PD)又称为震颤麻痹,是一种神经系统退行性疾病,降低患者的运动能力和认知能力。PD多发生于中老年以上的人群,随着中国老龄化进程加快,我国PD的医疗负担也不断加重<sup>[1-3]</sup>。多巴丝肼片是用于治疗PD的复方制剂,它包含左旋多巴和苄丝肼两种成分。其中左旋多巴通过血脑屏障进入中枢经脱羧化后转换为多巴胺发挥药理作用,但是口服的部分左旋多巴会在脑外分解,苄丝肼可以抑制外周左旋多巴的脱羧,减少外周副作用,提高左旋多巴利用率,协同改善麻痹症状<sup>[4-6]</sup>。

本研究对重庆药友制药有限责任公司研制的多巴丝肼片和上海罗氏制药有限公司持证的原研对照药品(美多芭)进行人体生物等效性研究,评价其疗效和安全性,为新药上市提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与仪器

受试制剂(T),重庆药友制药有限责任公司生产的多巴丝肼片,规格:左旋多巴200mg与苄丝肼50mg(相当于盐酸苄丝肼57mg);批号:2306020;含量:左旋多巴99.2%、盐酸苄丝肼98.1%。参比制剂(R),上海罗氏制药有限公司持证,山东新华制药股份有限公司生产的多巴丝肼片,规格:左旋多巴200mg与苄丝肼50mg(相当于盐酸苄丝肼57mg);批号:YT0570;含量:左旋多巴100.4%、盐酸苄丝肼98.6%。UPL-Class液相色谱仪、Xevo TQ-S质谱仪和UNIFI 1.8.0.0数据处理软件均由美国Waters公司生产、离心机(Thermo Fisher Thermo)。

### 1.2 受试者选择

入选标准:①年龄 $\geq 25$ 周岁,不限性别;②男性受试者的体重 $\geq 50.0$ kg,女性受试者的体重 $\geq 45.0$ kg,体重指数(BMI)19 ~ 26kg/m<sup>2</sup>(包括边界值);③受试者需在知情同意书上签字。

排除标准:①有药物、食物或其他物质过敏史,或对本品中任何成分过敏者;②首次服用研究药物前30d内使用过肝药酶抑制剂或诱导剂的药物;③首次服用研究药物前7d内有消化道症状(腹泻、便秘、恶

心、呕吐,或腹泻便秘交替性发作);④首次服用研究药物前14d内接种过疫苗或计划在试验期间接种疫苗者;⑤可能因其他原因不能完成本试验或研究者认为不应纳入者。

### 1.3 试验方案

#### 1.3.1 试验设计

本试验采用单中心、随机、开放、单剂量、两制剂、四周期、两序列完全重复设计。

#### 1.3.2 给药方法与血样采集时间

所有入组受试者随机分为人数相等I组和II组。根据受试者的试验号码将他们平均分配到2个给药程序(T-R-T-R或R-T-R-T)之一。每周期每位受试者分别服用受试制剂(T)或参比制剂(R)中的一种,每周仅给药1次,清洗期为7d。分为空腹试验和餐后试验两部分。

空腹试验给药前禁食至少10h,于给药当天早上在黄光下服用药物并饮240mL常温水。给药前后1h内不能饮水,午餐于给药4h后进食,晚餐于给药10h后进食(均为统一的清淡食物)。于给药前(0h)及给药后10、15、20、30、40、50min、1、1.25、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、8、12h(共19个点)采集4mL静脉血。

餐后试验于给药当天早上进食高脂高热量餐,药物需要进餐后且以开始进餐时间30min内服用。分别于给药前(0h)及给药后0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、8、12h(共19个点)采集4mL静脉血。

### 1.4 生物样本处理及分析

预先加入稳定剂,提前一天或在采集当天准确移取40 $\mu$ L稳定剂至贴有标签的冻存管。按照方案规定的时间点,采集4mL的静脉血到枸橼酸钠真空采血管中,轻晃使血液和抗凝剂混匀,最后放入冰浴中。血样采集后1h内在2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C条件下1700g离心10min。离心后,用移液器准确量取800 $\mu$ L上层血浆两份,分别转移至贴有标签并预先装好40 $\mu$ L稳定剂的冻存管中(一份为检测管,一份为备份管),立即充分混匀,并放置于冰浴上。混匀好的血浆直接置于-60 $^{\circ}$ C ~ -90 $^{\circ}$ C超低温冰箱保存,从全血采集到血浆置于冰箱整

个操作未超过2h。采用衍生化-蛋白沉淀法对人血浆样品进行预处理,然后用液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)在正离子、多反应监测模式(MRM)下,以电喷雾离子化(ESI)为电离技术而进行的分析检测,测定血浆中左旋多巴和2,3,4-三羟基苯基胍的浓度。

### 1.5 药代动力学参数计算及生物等效性分析

对各受试者的给药剂量和血药浓度-实际采血结束时点数据,采用Phoenix WinNonlin 8.2 (Certara, USA)软件,以非房室模型法(NCA模块)计 $T_{max}$ 、 $C_{max}$ 、 $AUC_{0-1}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $\lambda_z$ 、 $t_{1/2}$ 等药动学参数。将受试制剂与参比制剂的主要药动学参数( $C_{max}$ 、 $AUC_{0-1}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ )经自然对数转换后使用混合线性模型进行多因素方差分析,并进一步采用双向单侧t检验及置信区间法计算受试制剂与参比制剂主要药动学参数( $C_{max}$ 、 $AUC_{0-1}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ )最小二乘几何均值比(受试制剂/参比制剂)及其90%置信区间。

## 2 结果

### 2.1 试验入组和完成情况

空腹试验入组40例健康志愿者,均完成试验,其中28例为男性,12例为女性,平均年龄( $33.0 \pm 5.0$ )岁,平均体重( $63.9 \pm 7.3$ )kg,平均身高( $166.0 \pm 7.9$ )cm,平均体重指数( $23.2 \pm 1.8$ ) $kg/m^2$ 。

餐后试验入组36例健康受试者,34例完成试验,其中1例受试者于第1周期给药前脱落,脱落原因为“受试者自行退出研究”,另1例受试者于第3周期给药前脱落,无第3周期和第4周期浓度及药动学参数数据。在进入安全集的病例中30例为男性,5例为女性,平均年龄( $33.0 \pm 5.0$ )岁,平均体重( $64.4 \pm 7.5$ )kg,平均身高( $167.8 \pm 6.9$ )cm,平均体重指数( $22.8 \pm 1.9$ ) $kg/m^2$ 。

### 2.2 血药浓度-时间曲线

受试者空腹、餐后单次口服受试制剂和参比制剂后左旋多巴和2,3,4-三羟基苯基胍的平均血药浓度-时间曲线见图1~2。两条曲线趋势高度重叠,表明受试制剂与参比制剂在体内的吸收和消除过程相似。

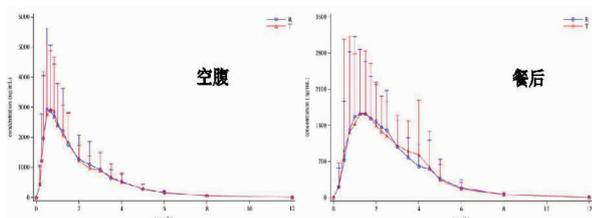


图1 左旋多巴的平均血药浓度-时间曲线

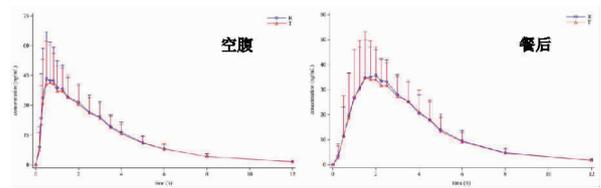


图2 2,3,4-三羟基苯基胍的平均血药浓度-时间曲线

### 2.3 药代动力学参数

受试者空腹、餐后口服多巴丝肼后,左旋多巴和2,3,4-三羟基苯基胍的主要药动学参数见表1~2。结果表明,受试制剂与参比制剂的药代动力学特征相似。

表1 受试者空腹、餐后口服多巴丝肼后左旋多巴的主要药动学参数

药代动力学参数	空腹		餐后	
	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂
$C_{max}/(ng/mL)$	4545.413±1992.017	4708.300±2241.716	3090.471±1565.144	2860.762±1300.407
$T_{max}/(h)$	0.83(0.2~3.50)	0.83(0.33~4.00)	1.75(0.50~4.50)	1.52(0.50~5.00)
$AUC_{0-1}/(h \cdot ng/mL)$	6531.0±1296.0	6571.6±1426.9	5565.3±1226.5	5530.8±1140.3
$AUC_{0-\infty}/(h \cdot ng/mL)$	6581.6±1295.2	6616.1±1425.8	5621.3±1225.8	5585.8±1140.7
$t_{1/2}/(h)$	1.52±0.30	1.54±0.32	1.46±0.31	1.45±0.29
$\lambda_z/(1/h)$	0.47±0.09	0.47±0.10	0.50±0.11	0.50±0.10

表2 受试者空腹、餐后口服多巴丝肼后2,3,4-三羟基苯基胍的主要药动学参数

药代动力学参数	空腹		餐后	
	受试制剂	参比制剂	受试制剂	参比制剂
$C_{max}/(ng/mL)$	54.341±14.709	56.965±17.084	45.748±10.16	44.722±9.959
$T_{max}/(h)$	0.67(0.25~3.00)	0.67(0.25~3.00)	1.51(0.50,4.50)	1.75(0.50,4.50)
$AUC_{0-1}/(h \cdot ng/mL)$	156.9±40.2	161.4±42.0	155.3±32.3	158.6±30.8
$AUC_{0-\infty}/(h \cdot ng/mL)$	163.7±42.3	168.1±44.2	161.9±34.3	165.0±32.5
$t_{1/2}/(h)$	2.56±0.39	2.54±0.40	2.46±0.34	2.40±0.37
$\lambda_z/(1/h)$	0.28±0.04	0.28±0.04	0.29±0.04	0.30±0.05

### 2.4 生物等效性评价

左旋多巴和2,3,4-三羟基苯基胍的生物等效性分析见表3~4。本试验中,针对左旋多巴,受试制剂与参比制剂的 $C_{max}$ 采用参比制剂校正的平均生物等效性方法(RSABE)评价生物等效性,受试制剂与参比制剂最小二乘几何均值比落在80.00%~125.00%,且单侧95%置信区间上限 $\leq 0$ ;左旋多巴受试制剂与参比制剂的 $AUC_{0-1}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 以及2,3,4-三羟基苯基胍受试制剂与参比制剂的 $C_{max}$ 、 $AUC_{0-1}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 采用平均生物等效性方法(ABE)评价生物等效性,其最小二乘几何均值比的90%置信区间均落在80.00%~125.00%。以上结果表明:空腹和餐后条件下,两制剂生物等效。

表3 生物等效性分析(空腹)

样品	药动学参数	最小二乘几何均值及比值				S <sup>2</sup> WR	SWR	参比制剂个体内变异/%	单侧95%置信区间上限	采用方法
		T(n=40)	R(n=40)	T/R值/%	T/R比值的90%CI					
左旋多巴	C <sub>max</sub> /(ng/mL)	4108.324	4115.625	99.82	89.35-111.52	0.1476	0.3842	39.89	-0.0840	RSABE
	AUC <sub>0-4</sub> /(h·ng/mL)	6403.4	6421.9	99.71	96.85-102.66	0.0122	0.1107	11.10	-	ABE
	AUC <sub>0-∞</sub> /(h·ng/mL)	6455.0	6467.7	99.80	96.96-102.73	0.0121	0.1102	11.05	-	ABE
2,3,4-三羟基苯基胍	C <sub>max</sub> /(ng/mL)	52.283	54.599	95.76	90.88-100.89	0.0424	0.2060	20.82	-	ABE
	AUC <sub>0-4</sub> /(h·ng/mL)	6403.4	6421.9	97.30	95.22-99.42	0.0064	0.0802	8.04	-	ABE
	AUC <sub>0-∞</sub> /(h·ng/mL)	6455.0	6467.7	97.53	95.53-99.57	0.0062	0.0789	7.91	-	ABE

表4 生物等效性分析(餐后)

样品	药动学参数	最小二乘几何均值及比值				S <sup>2</sup> WR	SWR	参比制剂个体内变异/%	单侧95%置信区间上限	采用方法
		T(n=35)	R(n=35)	T/R值/%	T/R比值的90%CI					
左旋多巴	C <sub>max</sub> /(ng/mL)	2777.485	2603.980	105.62	95.70-116.57	0.1373	0.3706	38.36	0.0685	RSABE
	AUC <sub>0-4</sub> /(h·ng/mL)	5459.0	5422.0	100.69	97.77-103.69	0.0131	0.1147	11.50	-	ABE
	AUC <sub>0-∞</sub> /(h·ng/mL)	5516.0	5478.0	100.70	97.79-103.69	0.0132	0.1150	11.54	-	ABE
2,3,4-三羟基苯基胍	C <sub>max</sub> /(ng/mL)	44.509	43.675	101.87	98.31-105.55	0.0191	0.1380	13.87	-	ABE
	AUC <sub>0-4</sub> /(h·ng/mL)	152.1	155.6	97.74	95.92-99.60	0.0048	0.0690	6.91	-	ABE
	AUC <sub>0-∞</sub> /(h·ng/mL)	158.5	161.9	97.92	96.16-99.71	0.0046	0.0678	6.79	-	ABE

## 2.5 安全性评价结果

空腹试验:在服药的40例受试者中,受试制剂(T)组有18例受试者共发生32次不良事件,不良事件发生率为45.0%(18/40)。参比制剂(R)组有15例受试者共发生23例次不良事件,不良事件发生率为37.5%(15/40)。

餐后实验:在服药的35例受试者中,受试制剂(T)组有7例受试者共发生7次不良事件,不良事件发生率为20.0%(7/35)。参比制剂(R)组有10例受试者共发生13次不良事件,不良事件发生率为28.6%(10/35)。

本研究所有不良事件的严重程度均为I级。结果表明,受试制剂与参比制剂在中国健康受试者中具有良好的安全性。

## 3 讨论

根据以往文献<sup>[7-8]</sup>,本研究调整个体内变异系数为30.00%,计算出空腹和餐后试验满足统计学检验效能需求的受试者例数为32例和28例,考虑到脱落率约20%。最终空腹和餐后受试者例数确定为40例和36例。

本研究中参比制剂空腹C<sub>max</sub>的个体变异率为39.89%,餐后左旋多巴C<sub>max</sub>的个体变异为38.36%。根据《高变异药物生物等效性研究技术指导原则》<sup>[9]</sup>,本研究空腹和餐后试验均采用四周期、两序列、完全重复交叉设计,可大大减少个体内变异,使试验数据更可靠。并且C<sub>max</sub>药动学参数的生物等效性评价采用RSABE,解决了高变异药物药物研究中样本量过大、置信区间过宽的问题。

本研究主要考察多巴丝胍片受试制剂和参比制剂生物等效性。结果显示,针对主要活性物质左旋多巴,餐后条件下受试制剂和参比制剂的C<sub>max</sub>、AUC<sub>0-4</sub>及AUC<sub>0-∞</sub>较空腹条件下均降低,T<sub>max</sub>均延长,应为服用高脂高热量餐影响药物的吸收所致<sup>[10-11]</sup>。在临床指导用药中建议餐前1h或餐后2h给药,这样可以避免高蛋白、高脂肪食物对左旋多巴摄取的竞争效应并促进更快速的起效。

## 参考文献:

- [1] 张文滨,汪永杰,令焱,等. 1990—2021年中国帕金森病疾病负担分析和预测[J]. 中华疾病控制杂志,2025,29(1):74
- [2] QI S, YIN P, WANG L, et al. Prevalence of parkinson's disease: a community-based study in China [J]. Mov Disord, 2021,36(12):2940
- [3] ZHU J, CUI Y, ZHANG J, et al. Temporal trends in the prevalence of Parkinson's disease from 1980 to 2023: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Healthy Longev, 2024,5(7):e464
- [4] 沈意康. 多巴丝胍片的研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2020
- [5] 陈先文,王刚,陈生弟. 帕金森病药物治疗研究进展[J]. 重庆医科大学学报,2024,49(5):542
- [6] MURAKAMI H, SHIRAIISHI T, UMEHARA T, et al. Recent advances in drug therapy for parkinson's disease [J]. Intern Med, 2023,62(1):33
- [7] 梅和坤,王瑾,柴栋,等. 仿制药生物等效性试验样本量估算探讨[J]. 中国新药杂志,2017,26(24):2898
- [8] 钱真真,武红莉,于亚南,等. 药物临床试验中常见医学统计学概念及样本量估算[J]. 中国医药导报,2023,20(32):164
- [9] 苏晶,刘亚利. 高变异药物生物等效性试验方案设计的探讨[J]. 中国新药杂志,2019,28(22):2693
- [10] 张艳宝,高慧桃,崔馨戈,等. 口服药物食物影响研究进展[J]. 中国新药杂志,2023,32(18):1843
- [11] DENG J, ZHU X, CHEN Z, et al. A review of food-drug interactions on oral drug absorption [J]. Drugs, 2017,77(17):1833

(收稿日期:2025-03-12)

引文格式:周士忠,张洋林,唐冬旭,等.PVA/PSBMA/AgNPs两性离子水凝胶伤口敷料的辐射制备及其抗菌抗污性能研究[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):416-421.

# PVA/PSBMA/AgNPs两性离子水凝胶伤口敷料的辐射制备及其抗菌抗污性能研究\*

周士忠<sup>1</sup>,张洋林<sup>1</sup>,唐冬旭<sup>1</sup>,刘坤<sup>1</sup>,李月生<sup>2,3,\*</sup>

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100;2.湖北科技学院辐射化学与功能材料湖北省重点实验室;3.湖北科技学院核技术与化学生物学院)

**摘要:**目的 利用电子束辐射制备兼具抗菌、抗生物污染性和生物相容性的医用多功能两性离子水凝胶,以满足生物医用材料在伤口敷料等领域的应用需求。**方法** 运用两步辐射技术预聚合甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱(SBMA)得到聚甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱(PSBMA),以聚乙烯醇(PVA)和PSBMA为基质,引入纳米银粒子(AgNPs),经冷冻-解冻和电子束辐射协同交联,制备PVA/PSBMA/AgNPs水凝胶。通过FTIR、XPS等表征分析其组分结构、元素组成及相互作用机制。进一步测试其凝胶分数、溶胀率、亲水性、体外抗菌性能、抗生物污染性能及生物相容性等性能。**结果** 在20kGy辐射剂量下PVA/PSBMA水凝胶凝胶分数达84.04%,交联效果最佳。3mL AgNPs掺杂时,水凝胶抗菌性能最优,具有良好的溶胀以及亲水性能,同时蛋白质吸附量低至 $4.38\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,细胞毒性测试细胞存活率 $>90\%$ ,细胞毒性检测观察细胞无明显毒性。**结论** 基于两步辐射技术制备的PVA/PSBMA/AgNPs两性离子复合水凝胶,具有良好的抗菌、抗生物污染性能和生物相容性,有望成为新型高效伤口敷料。

**关键词:**水凝胶;辐射制备;聚乙烯醇;聚甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱;纳米银粒子

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0416-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025030706



## Radiation Preparation of PVA/PSBMA/AgNPs Amphoteric Hydrogel Wound Dressings and its Antibacterial and Antifouling Properties

ZHOU Shi-zhong, ZHANG Yang-lin, LI Yue-sheng, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** Using electron beam irradiation to prepare multifunctional medical zwitterionic hydrogels with antibacterial and anti-biofouling properties along with biocompatibility, aiming to meet the application demands of biomedical materials in wound dressings and other fields. **Methods** A two-step irradiation technique was used to pre-polymerize methacryloyloxyethyl sulfobetaine (SBMA) into poly(sulfobetaine methacrylate) (PSBMA). Using poly(vinyl alcohol) (PVA) and PSBMA as matrices, silver nanoparticles (AgNPs) were introduced to prepare the PVA/PSBMA/AgNPs hydrogel through a combination of freeze-thaw cycles and electron beam radiation crosslinking. The component structure, elemental distribution, and interaction mechanisms were characterized through FTIR and XPS analyses so as to further evaluate the properties including gel fraction, swelling ratio, hydrophilicity, *in vitro* antibacterial activity, anti-biofouling efficacy, and biocompatibility. **Results** At a radiation dose of 20 kGy, the PVA/PSBMA hydrogel achieved a gel fraction of 84.04%, indicating optimal crosslinking efficiency. When loaded with 3 mL of AgNPs solution, the hydrogel exhibited optimal antibacterial performance along with favorable swelling capacity and hydrophilicity. Additionally, the protein adsorption was as low as  $4.38\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; the MTT assay showed cell viability above 90%, and live/dead cell staining revealed no significant cytotoxicity. **Conclusion** The zwitterionic PVA/PSBMA/AgNPs composite hydrogel prepared through the two-step radiation technique has good antibacterial efficacy, robust anti-biofouling properties, and excellent biocompatibility, and is expected to become a novel high-performance wound dressing.

**KEY WORDS:** Hydrogel; Radiation preparation; Polyvinyl alcohol; Poly methacryloyloxyethyl sulfobetaine; Silver nanoparticles

\* 基金项目:国家自然科学基金(11405050);湖北省自然科学基金联合创新基金重点项目(2025AFD387);湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队项目(T2020022);武汉儿童医院博士启动基金(2024FEBSJJ006);湖北科技学院科技发展基金(2020TD01、2022HX104)

\*\* 通信作者, E-mail: frank78929@163.com

伤口愈合作为动态的病理生理过程,其微环境调控易受细菌感染及生物污染等因素干扰<sup>[1-2]</sup>。传统的医用敷料常因抗菌、抗污性能不足或生物相容性差,常常导致继发感染和愈合延迟<sup>[3]</sup>。近年来,水凝胶敷料因其高含水量、优异透气性及模拟细胞外基质特性等独特优势已成为研究热点,但在抗菌性能与生物安全性调控方面仍面临着界面功能化设计难题<sup>[4]</sup>。两性离子水凝胶材料甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱(methacryloyloxyethyl sulfobetaine, SBMA),其分子内正负电荷对共存的结构特性,在生理条件下维持材料表面电中性,通过静电诱导水合作用形成致密的水化层,可以有效抵抗非特异性蛋白质吸附和细菌黏附<sup>[5-6]</sup>。纳米银粒子(silver nanoparticles, AgNPs)具有广谱抑菌、高效杀菌等优点,在加速伤口修复进程中发挥重要作用。通过引入纳米银粒子作为功能化修饰,可以进一步提高材料的抗菌性能,加速伤口修复<sup>[7]</sup>。聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)作为生物相容性高分子材料,可通过辐射交联构建三维网络结构<sup>[8]</sup>。相较于化学交联法存在的残留毒性风险及物理交联的稳定性缺陷<sup>[9]</sup>,电子束辐射技术凭借其无引发剂添加、交联度精确可控及环境友好等优势,成为制备医用级水凝胶的理想选择<sup>[10]</sup>。

本研究通过两步辐射法,以电子束预辐聚合甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱,形成聚甲基丙烯酰乙基磺基甜菜碱(poly methacryloyloxyethyl sulfobetaine, PSBMA),将PVA、PSBMA和AgNPs三者相结合,经过循环冻融预处理后进行二次辐射交联,制备出一种新型的PVA/PSBMA/AgNPs医用复合水凝胶。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

#### 1.1.1 试剂

PVA(国药试剂有限公司);SBMA(上海源叶生物科技有限公司);AgNPs(10nm,1000ppm)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);PBS缓冲液(phosphate buffer saline, 粉剂,1X,生工生物工程上海股份有限公司);牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、钙黄绿素-乙氧基甲酯/碘化丙啶(calcein acetoxymethyl ester/propidium iodide, AM/PI)细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(购自碧云天生物技术有限公司);胰酶、NCTC clone 929(L929)细胞、L929培养基、PBS缓冲溶液(武汉普诺

赛生命科技有限公司);去离子水为实验室自制。

#### 1.1.2 仪器

集热式恒温加热磁力搅拌器(DF-101S, 巩义予华仪器有限责任公司);冷冻干燥机(SCIENTZ-10N, 宁波新芝生物科技股份有限公司);傅里叶变换红外光谱仪(港东 FTIR-650, 天津科技发展股份有限公司);接触角测量仪(北京东方德菲仪器有限公司);X射线光电子能谱仪(K-Alpha, 美国赛默飞世尔科技公司);超声波清洗机(CH06BM, 苏州创汇惠电子有限公司);高压灭菌锅(DZF-6030, 上海一恒科学仪器有限公司);洁净工作台(SW-CJ-IG, 苏净集团国泰公司);二氧化碳细胞培养箱(Forma 310, 美国赛默飞世尔科技公司);荧光倒置显微镜(IX51, 日本奥林巴斯);台式超纯水机(UPT-11—10T, 四川优普超纯科技有限公司);酶标分析仪(318C+, 上海沛欧仪器有限公司);1 MeV 直线电子加速器(电压1000kV, 美国 wasik 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PVA/PSBMA 水凝胶的制备

采用两步辐射共聚交联法制备,称取10g SBMA于烧杯中,加入10g去离子水,在氮气的氛围下磁力搅拌至完全溶解,在室温下以电子束射线辐照总剂量20kGy,剂量率5kGy/pass,形成PSBMA预聚体前驱体溶液。

称取10g PVA于烧杯中,加入70g去离子水,在90℃下磁力搅拌3h,待PVA完全溶解后加入20g预辐照的PSBMA预聚体前驱体溶液,搅拌至完全溶解,得到澄清透明溶液,静置,除气泡。

将均匀混合后的前驱体溶液平铺在直径为90mm的培养皿中(平铺液厚度约2.0mm),经过循环冻融。在室温下以电子束射线辐射凝胶膜,吸收总剂量为5~30kGy,剂量率5kGy/pass。辐射聚合后得到不同辐射剂量的PVA/PSBMA水凝胶样品。将制备好的凝胶于去离子水中浸泡48h,并用大量去离子水洗涤以去除未反应的组分。

### 1.2.2 PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶的制备

称取10g PVA于烧杯中,加入70g去离子水,在90℃下磁力搅拌3h,待PVA完全溶解后加入20g预辐照的PSBMA预聚体前驱体溶液,搅拌至完全溶解。分别取1、3、5mL AgNPs溶液,超声处理1h后加入PVA溶液中,搅拌至充分混合,静置除气泡。将混合溶液平铺在直径为90mm的培养皿中(厚度约2.0mm),经过循环冻融,并在室温下接受电子束辐射总剂量为20kGy,剂量率5kGy/pass交联。将制备好的凝胶浸泡于去离子水中48h,并用大量去离子水洗涤以去除未交联的组分。

### 1.2.3 PVA、PVA/PSBMA 及 PVA/PSBMA/AgNPs 水凝胶凝胶分数和溶胀率分析

凝胶分数测定:称取 5g 辐射制备的凝胶样品(初始质量  $W_0$ ),用冷冻干燥机除水至恒重,记录干燥后质量。将干燥后的凝胶样品在 PBS 中浸泡 48h,再用冷冻干燥机干燥至恒重,记录最终质量( $W_s$ )。凝胶分数(Gel)为  $W_s$  与  $W_0$  干燥后干凝胶重量的比率。

$$\text{Gel}(\%) = W_s / W_0 \times 100\%$$

溶胀率测定:称取 5g 辐射制备的凝胶样品,用冷冻干燥机除水至恒重,记录干燥后质量(初始质量  $W_0$ )。随后浸泡于 PBS 中,每隔一段时间取出凝胶用湿润的滤纸擦去表面多余水分,用电子天平称量至恒定重量,记录为质量  $W_1$ ,计算样品的溶胀率。

$$\text{SR}(\%) = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100\%$$

### 1.2.4 红外分析(FTIR)

将辐射合成后的水凝胶,用研钵充分研磨至足够细小的粉末。将水凝胶粉末、溴化钾按照一定的比例混合均匀,研磨至细粉,然后压成透明的薄片。在傅立叶红外光谱仪下测定  $4000\text{cm}^{-1} \sim 400\text{cm}^{-1}$  范围波长的吸收峰,根据特征峰,分析水凝胶官能团的变化。

### 1.2.5 X 射线光电子能谱(XPS)

采用美国 Thermo Scientific 有限公司的 K-Alpha X-射线光电子能谱仪,对水凝胶的表面电子态与表面成分进行精确测定,确定样品表面存在的元素种类。

### 1.2.6 接触角测定

将水凝胶充分冷冻干燥后,在水凝胶样品表面的中心位置滴加一定体积的测试液体。借助摄影系统对材料表面的水滴进行图像采集,利用水接触角测试仪对材料的亲水性进行研究。

### 1.2.7 蛋白吸附实验

辐射制备好的水凝胶用 PBS 清洗 3 遍,将其浸泡于  $37^\circ\text{C}$  的 PBS 环境下 1h 备用,将水凝胶裁剪为直径 8mm 的小圆片,加入到 48 孔板中,每组重复 3 次。将  $500\mu\text{L}$  BSA 溶液分别加入到每个孔里。 $37^\circ\text{C}$  孵育 2h 后,将水凝胶片取出,并用 PBS 清洗 3 次。然后加入  $500\mu\text{L}$  2% SDS 溶液, $37^\circ\text{C}$  摇床孵育 2h,将所吸附的蛋白从凝胶膜上解离出来。通过 BCA 蛋白质检测试剂盒以及蛋白质标准曲线进行后续分析。通过公式计算确定水凝胶吸附的蛋白质质量  $Q$ 。

$$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2) = (C \times V) / S$$

其中: $C$  表示溶液中蛋白质的浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); $V$  表示溶液体积( $\mu\text{L}$ ); $S$  表示水凝胶片的表面积( $\text{cm}^2$ )。

### 1.2.8 体外抗菌测试

通过抑菌圈法测试水凝胶的抗菌性能。取活化后的大肠杆菌均匀涂布在固体培养基表面。将制备好的水凝

胶用 PBS 清洗 3 次后裁剪成直径为 8mm 小圆片放入培养皿中,利用抑菌圈法分析水凝胶的抑菌能力。

### 1.2.9 细胞毒性测试

用 MTT 法检测细胞活力,将 L929 细胞分别接种于 96 孔板及 6 孔板,置于 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  培养箱、90% 的 DMEM 葡萄糖培养基中进行培养。在每个孔中加入不同组分水凝胶的浸取液 1mL,对照组加入等体积的 L929 培养基,培养 24h 后加入 MTT 试剂进行测试。

AM/PI 染色液检测 L929 细胞凋亡。在每个孔中加入不同组份水凝胶的浸取液 1mL,对照组加入等体积的 L929 培养基,在六孔板中加入 Calcein-AM/PI 染色液,进行双染测试,并使用倒置荧光显微镜观察细胞。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 与 GraphPad Prism 9.5 软件完成统计分析,计量数据以( $\bar{x} \pm s$ )呈现。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较则选用独立样本  $t$  检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。为确保结果的科学性,所有实验均重复 3 次及以上。

## 2 结果

### 2.1 样品的表征

本研究初期阶段先着力于探究二元复合水凝胶体系(PVA/PSBMA),如图 1a 所示,当辐射剂量为  $20\text{kGy}$  时,PVA/PSBMA 水凝胶辐射交联效果最好。辐射能使高分子材料中的分子吸收能量,产生激发态分子和自由基,PVA、PSBMA 中的碳碳双键断开从而引发交联反应,在这个过程中 PVA 和 PSBMA 也会发生接枝交联反应。随着辐射剂量的增加,聚合物对能量的吸收过度。聚合物在聚合过程中容易发生交联和断裂。分子链过度断裂,凝胶分数反而下降<sup>[11]</sup>。

图 1b 中分别为 PVA、PVA/PSBMA 以及不同含量的载纳米银水凝胶的红外光谱图,与 PVA 相比, $3200 \sim 3600\text{cm}^{-1}$  处 O-H 的伸缩振动吸收峰变化非常明显,变得更宽,这是因为 PSBMA 的磺酸基( $-\text{SO}_3^-$ )可以与 PVA 中的羟基形成氢键或离子-偶极相互作用。 $2800 \sim 3000\text{cm}^{-1}$  处观察到 C-H 对称和不对称伸缩振动吸收峰明显变宽,其原因是季铵基团 $[-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2]$ 存在更多的甲基( $-\text{CH}_3$ )基团在复合水凝胶中<sup>[12]</sup>。 $1730\text{cm}^{-1}$  的吸收峰对应的是甲基丙烯酸酯骨架中  $-\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动峰<sup>[13]</sup>。 $1038\text{cm}^{-1}$  附近处,这里是 PSBMA 中的  $-\text{SO}_3^-$  基团在此的特征吸收峰<sup>[14]</sup>。表明 PVA/PSBMA/AgNPs 医用复合水凝胶成功合成。

通过 X 射线光电子能谱(XPS)对 PVA/PSBMA/AgNPs 医用复合水凝胶的化学成分及其表面状态进

行了分析。由图 1(c~h)可知,全图谱中显示了碳(C 1s)、氧(O 1s)、氮(N 1s)和银(Ag 3d)的特征峰,AgNPs 成功引入 PVA/PSBMA 基质中。C 1s 谱图可拟合为 C-C/C-H/C=C(284.81eV)、C-O/C-N(286.32eV)和 O-C=O(288.86eV)三个峰,与 PVA 和 PSBMA 的化学结构一致;N 1s 谱图中 C-N 键的结合能为 402.3eV,PSBMA 的季铵基团峰位于 399.4eV,表明 PSBMA 中的氮原子主要以季铵基团形式存在;O 1s 谱图中显示了四个特征峰,分别位于 530.51eV、531.48eV、532.34eV 和 533.53eV,对应于 O-Ag、O=C

C、O-H/S-O 和 O-C 键。其中,O-Ag 峰(530.51eV)存在表明 AgNPs 与聚合物基质中的氧原子存在弱配位作用,而 O=C(531.48eV)、O-H/S-O(532.34eV)和 O-C(533.53eV)峰则分别反映了羰基、羟基/磺酸基和醚键的存在;S 2p 谱图中显示了  $\text{RSO}_3^-/\text{Sp}_{1/2}$ (167.80eV)、 $\text{RSO}_3^-/\text{Sp}_{3/2}$ (167.49eV),证实了 PSBMA 中磺酸基团的存在。Ag 3d 谱图中 Ag 3d<sub>3/2</sub>、Ag 3d<sub>5/2</sub> 峰分别位于 367.91eV 和 373.76eV,表明 Ag 主要以单质银形式存在。综上,XPS 图谱确证了水凝胶的结构,证明 PVA/PSBMA/AgNPs 制备成功。

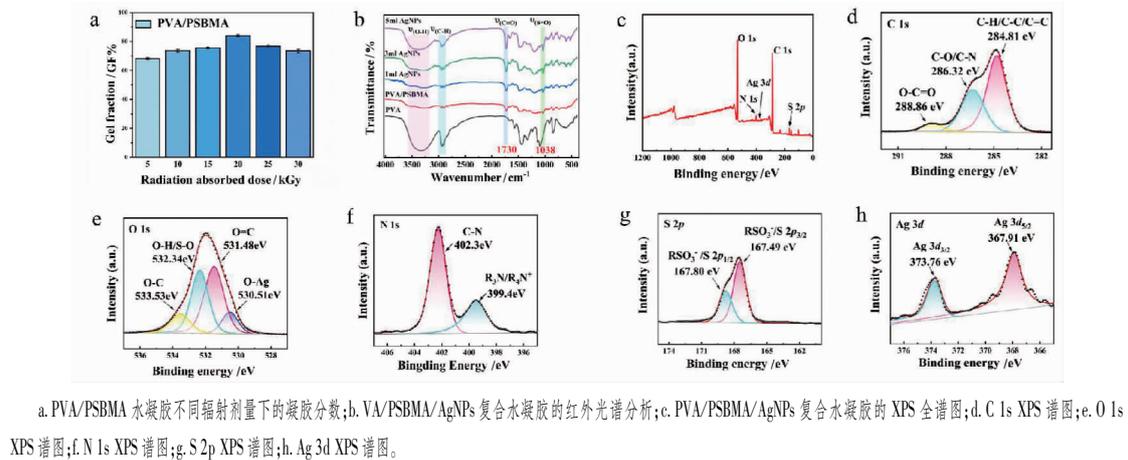


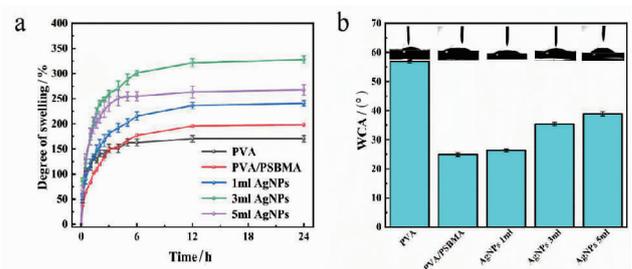
图 1 PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶表征

## 2.2 水凝胶吸水溶胀性能及亲水性分析

结果如图 2a 所示,在 0~6h 内,水凝胶溶胀速率较快,6h 以后水凝胶达到溶胀平衡,最高溶胀率为  $(327.74 \pm 7.51)\%$ 。随着 AgNPs 浓度的增加,水凝胶的平衡溶胀率呈现先升高后降低的趋势。当 AgNPs 添加为 3mL 时,水凝胶的平衡溶胀率达到最大值。这可能是由于低浓度 AgNPs 的加入在一定程度上破坏了 PVA 分子链间的氢键作用,使网络结构更加疏松,有利于水凝胶溶胀。当 AgNPs 浓度过高时,AgNPs 在 PVA/PSBMA 网络结构中的物理交联作用增强,限制了水分子的渗透和扩散,导致水凝胶溶胀率下降<sup>[15]</sup>。

表面亲水性是调控材料生物抗污性能的关键界面特性,较低的接触角值表明材料表面具有更好的亲水性,这有助于减少细菌的黏附及蛋白质的吸附,从而提升材料的抗生物污染能力。结果如图 2b 所示,与纯 PVA 水凝胶相比,引入 PSBMA 组分水凝胶的表面接触角减小,亲水性显著增强。这是因为 PSBMA 分子链上带有亲水性的  $-\text{SO}_3^-$  引发的强表面水合效应<sup>[16]</sup>。随着 AgNPs 浓度的增加,水凝胶的表面接触角逐渐上升,亲水性有所下降,这可能是由于大多数表面亲水性基团被均匀分布的 AgNPs 所覆盖<sup>[15]</sup>。然

而,相较于纯 PVA,引入了 AgNPs 的水凝胶接触角仍呈现出一定程度的降低,说明两性离子在材料表面抗污性能方面具有显著优势,为开发不同的抗污材料提供了新的思路。



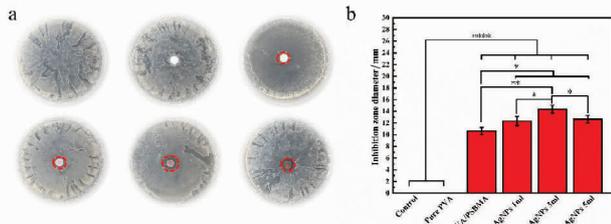
a. PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶 24h 溶胀率;b. PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶接触角。

图 2 PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶溶胀性能及亲水性分析

## 2.3 体外抗菌结果分析

本研究选取典型致病菌大肠杆菌为模型,通过抑菌圈法系统评估 PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶的抗菌特性。由图 3a 可知,与对照组相比,纯 PVA 水凝胶无任何抑菌活性,而 PSBMA 组分的水凝胶形成了一定

范围的抑菌圈,这主要归因于 PSBMA 分子中  $-N^+(\text{CH}_3)_2$  可以与细菌细胞膜上的重要组分如蛋白质和脂质等作用,从而影响细胞膜的正常结构和功能,达到抑菌效果<sup>[17]</sup>。此外,PSBMA 与 AgNPs 的抗菌功能形成协同效应。不同含量 AgNPs 水凝胶的抑菌圈直径如图 3a、b 所示,1、3、5mL AgNPs 掺杂的时候抑菌圈直径分别为  $(12.33 \pm 0.76)$ 、 $(14.36 \pm 0.7)$ 、 $(12.63 \pm 0.67)$  mm,表明 AgNPs 的加入显著增强了水凝胶的抗菌性能。然而,当 AgNPs 浓度超过 3mL 时,抑菌圈面积有所下降,可能是由于高浓度 AgNPs 的聚集效应降低比表面积,导致活性位点减少,进而削弱抗菌效果<sup>[18]</sup>。



a. 大肠杆菌的抑菌圈结果;b. 水凝胶抑菌圈直径分析(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=3$ )。

图3 PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶体外抗菌结果分析

#### 2.4 蛋白质吸附性能测试

实验结果如图 4 所示,有两性离子特性的 PSBMA 组分展现出显著抗蛋白吸附优势,二元复合水凝胶的蛋白质吸附量分别从  $9.95$  降到了  $2.51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。这是由于 PSBMA 分子链上的  $-\text{SO}_3^-$  基团通过强水合作用形成动态水合屏障,有效阻止蛋白质的吸附<sup>[16]</sup>。AgNPs 的引入导致 BSA 吸附量略微上升。这种微弱的吸附增强可能源于 BSA 分子中硫醇基 ( $-\text{SH}$ ) 与 AgNPs 表面间的特异性 Ag-S 配位作用,从而促进 BSA 的吸附<sup>[19]</sup>。尽管如此,与纯 PVA 水凝胶相比,PVA/PSBMA/AgNPs 水凝胶仍表现出优异的抗蛋白质吸附性能,证实两性离子组分在维持材料抗污性能方面具有重要价值。

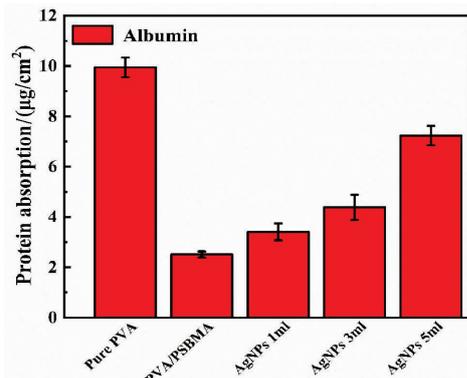
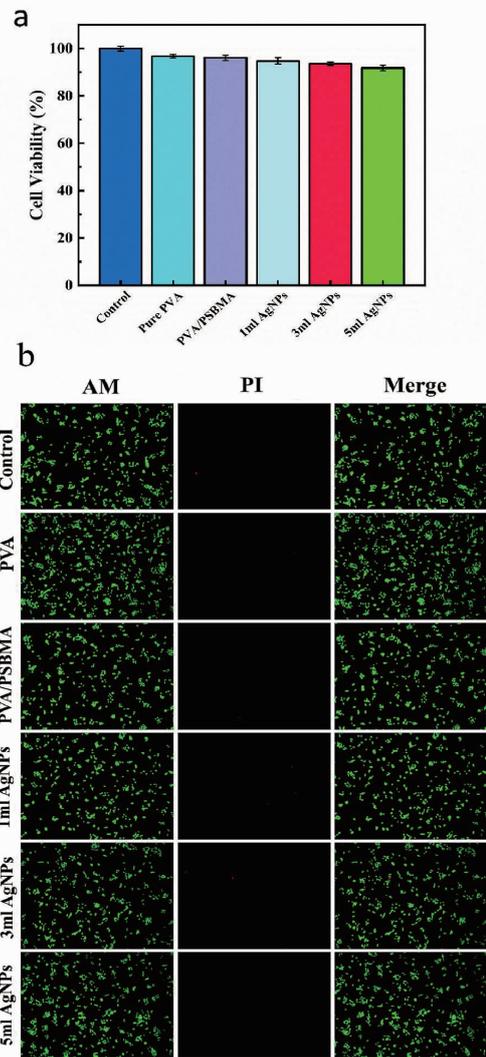


图4 PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶蛋白质吸附量

#### 2.5 细胞毒性试验

MTT 结果如图 5a 所示,尽管与对照组相比,AgNPs 的引入导致 L929 细胞存活率呈现轻微下降趋势,但所有实验组(含不同浓度 AgNPs)的细胞存活率均高于 90%,表明其具有良好的生物相容性。在倒置荧光下观察细胞活死染色(图 5b),进一步证实了 AgNPs 的加入均没有表现出明显的细胞毒性。



a. MTT 测试结果;b. AM/PI 染色检测 L929 细胞凋亡。

图5 PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶细胞毒性试验

### 3 讨论

本研究基于两步电子束辐射技术制备的 PVA/PSBMA/AgNPs 复合水凝胶,是通过 PSBMA 与 AgNPs 抗菌-抗污双功能协同效应且具有优异生物相容性水凝胶材料,为新型水凝胶伤口敷料的研发开拓了新方向。

从制备技术层面来看,两步辐射法具有独特优势。第一步通过预辐照精准调控 SBMA 聚合为 PSB-

MA,相较于传统的一步聚合方法,能更有效地避免单体过度自聚等副反应,便于后续的二次交联。第二步结合循环冻融与二次辐射交联,在20kGy辐射剂量下凝胶分数达到84.04%,在无化学引发剂条件下实现PVA网络与PSBMA的高效交联,避免了化学交联的毒性残留风险,是一种高效绿色交联工艺。将AgNPs直接引入PVA/PSBMA体系中。XPS分析显示AgNPs与聚合物基质中的氧原子形成结合能为530.51eV的O-Ag弱配位作用,表明AgNPs通过化学相互作用稳定负载于网络内。

从性能方面来看,PSBMA凭借其两性离子特性,通过分子内正负电荷对的动态平衡维持材料表面电中性,诱导形成致密水化层,接触角测试显示其表面亲水性优异,接触角低于30°,同时蛋白质吸附实验表明其吸附量低至4.38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,有效抵抗非特异性蛋白吸附。此外,PSBMA分子链中的季铵基团通过阳离子与细菌膜表面负电荷的静电作用破坏细胞膜完整性,抑制细菌代谢活性并导致胞内物质泄漏,实现初步抑菌。AgNPs通过直接接触破坏细菌膜结构,实现高效杀菌。二者的协同作用构建了“动态抗污界面-纳米抗菌”双重机制,从物理屏障阻隔与纳米颗粒介导的细菌灭活两个维度提升抗菌抗污效能,为开发高效稳定型伤口敷料提供了理论依据与工艺优化方向。

然而,本实验还存在一定的不足之处,虽然AgNPs的引入可以显著增加水凝胶的抗菌活性,但是AgNPs的团聚作用会降低其抗菌效能,其长期生物安全性仍需通过系统性体内实验进一步验证。其次,虽然水凝胶具有较好的体外抗蛋白质吸附能力,但在其复杂微生物环境下的长效抗污染能力可能产生一定的衰减,未来研究可聚焦于优化纳米银颗粒的分散稳定性及其长期生物相容性的系统性验证,同时,建立多维评价体系,以解析水凝胶在真实生物界面中的长效抗污染机制与性能衰减规律。

综上所述,PVA/PSBMA/AgNPs两性离子复合水凝胶在抗菌、抗生物污染和生物相容性方面展现出了优异性能,为新型医用敷料的开发提供了新的思路和方向。通过对现有问题的深入研究和改进,有望推动该材料在伤口愈合及生物医学工程领域的广泛应用。

## 参考文献:

- [1] 谢文静,周宏福,郭安然,等. 医用温敏/自显影聚(N-异丙基丙烯酰胺)-共聚-四碘磷酸水凝胶的制备及性能研究[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2022,36(5):373
- [2] 皮思豪,王自瑶,谢琛,等. 天然生物基水凝胶在快速止血医用敷料上的研究进展[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2023,37(3):244
- [3] 李甲,李淑,林钰洋,等. 水凝胶生物粘合剂用于软组织止血修复的研究进展[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2024,38(6):549
- [4] 刘坤,唐冬旭,付婵丽,等. 功能性水凝胶伤口敷料的辐射制备及其研究进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2024,42(5):3
- [5] LI Q, WEN C, YANG J, et al. Zwitterionic biomaterials[J]. Chemical Reviews,2022,122(23):17073
- [6] YAO M, WEI Z, LI J, et al. Microgel reinforced zwitterionic hydrogel coating for blood-contacting biomedical devices[J]. Nature Communications,2022,13(1):5339
- [7] 唐冬旭,刘坤,付婵丽,等. 基于PBNPs-Ag纳米粒子的ROS清除和抗菌协同作用促进伤口愈合行为研究[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2024,38(4):301
- [8] 饶璐,刘东亮,赵媛,等. 高强度氧化石墨烯/高取代羟丙基纤维素/聚乙烯醇复合水凝胶的辐射制备及其机械性能[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2023,39(6):29
- [9] AHMED M S, ISLAM M, HASAN M K, et al. A comprehensive review of radiation-induced hydrogels: synthesis, properties, and multidimensional applications[J]. Gels,2024,10(6):381
- [10] MORE A P, CHAPEKAR S. Irradiation assisted synthesis of hydrogel: a review[J]. Polymer Bulletin,2024,81(7):5839
- [11] KHALID M, JAMEEL F, JABRI T, et al.  $\alpha$ -Terpineol loaded, electron beam crosslinked polyvinyl alcohol/tapioca starch hydrogel sheets; fabrication, characterization and evaluation of wound healing potential on a full thickness acid burn wound[J]. RSC Advances,2024,14(38):28058
- [12] FU L, LIU K, YANG J, et al. Adsorption behaviors of ctDNA and biological activities based on polyvinyl alcohol/polyethylene glycol/quaternized chitosan composite hydrogel[J]. Molecules,2024,29(23):5770
- [13] ŞENER RAMAN T, KUEHNERT M, DAIKOS O, et al. A study on the material properties of novel PEGDA/gelatin hybrid hydrogels polymerized by electron beam irradiation[J]. Frontiers in Chemistry,2023,10:1094981
- [14] MOHANDOSS S, VELU K S, MANOHARADAS S, et al. Synthesis, characterization, and evaluation of silver nanoparticle-loaded carboxymethyl chitosan with sulfobetaine methacrylate hydrogel nanocomposites for biomedical applications[J]. Polymers,2024,16(11):1513
- [15] 王鑫,周卓,岳振歌,等. PVA-甜玉米芯多糖纳米银复合薄膜的制备及草莓保鲜应用[J]. 精细化工,2024,41(9):2018
- [16] 唐婧怡,徐一帆,李敬. 磺基甜菜碱型两性离子聚合物pSBMA研究进展[J]. 高分子通报,2023,36(3):316
- [17] WEI M, WANG H, WU J, et al. Multihydrogen bond modulated polyzwitterionic removable adhesive hydrogel with antibacterial and hemostatic function for wound healing[J]. ACS Applied Materials & Interfaces,2024,16(17):21472
- [18] MILLOUR M, GAGNE J P, DOIRON K, et al. Silver nanoparticles aggregative behavior at low concentrations in aqueous solutions[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,2020,603:125191
- [19] CHEN Z. Surface hydration and antifouling activity of zwitterionic polymers[J]. Langmuir,2022,38(15):4483

(收稿日期:2025-03-07)

引文格式:李甲,李华民,黎新如,等.阳离子聚合物基医用多功能水凝胶敷料的制备及其性能研究[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):422-427.

# 阳离子聚合物基医用多功能水凝胶敷料的制备及其性能研究\*

李甲<sup>1</sup>,李华民<sup>2</sup>,黎新如<sup>3</sup>,刘伊林<sup>3</sup>,李淑<sup>1</sup>,仲澳珍<sup>1</sup>,邓丽娟<sup>2</sup>,王彩<sup>1,3\*\*</sup>,郑敏<sup>1,3\*\*</sup>

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100;2.咸宁市中心血站;  
3.湖北科技学院医学部生物医学工程与医学影像学院)

**摘要:**目的 设计制备一种具有抗菌、止血性能的阳离子聚合物基水凝胶医用敷料,评估其用于抗菌、止血的性能表现,为医用伤口敷料的开发奠定基础。方法 以聚乙烯亚胺(PEI)、羧甲基壳聚糖(CMCS)、丙烯酰胺(AM)为原料,在交联剂N,N-亚甲基双丙烯酰胺的(MBA)的作用下,通过一步自由基聚合法制得阳离子聚合物基医用多功能水凝胶敷料(PEI/CMCS/PAM)。在对其微观形貌、力学性能、吸水溶胀性能以及粘附性能等性能表征的基础上,进一步通过体外抗菌实验、体外全血凝结实验以及体内肝脏穿刺止血实验评估抗菌止血性能。结果 PEI/CMCS/PAM水凝胶医用敷料呈现出特征性的多孔网络结构,压缩强度可达(137.60±4.32)kPa,具有良好的吸水溶胀能力和组织粘附能力,与猪皮的粘附强度可达(5.50±0.52)kPa,可以很好地贴附于人体关节处,并在弯曲、拉伸的状态下仍可维持贴合状态。进一步的体外抗菌实验及体外凝血实验结果显示,PEI/CMCS/PAM水凝胶医用敷料具有较好的抑菌效果,对大肠杆菌的抑制率可达(98.4±2.2)%,对金黄色葡萄球菌的抑制率可达(96.7±2.7)%。在止血方面,该医用水凝胶敷料与血液接触后可诱导血小板与红细胞聚集,加速凝血过程。结论 本研究通过自由基聚合法制备得到PEI/CMCS/PAM水凝胶医用敷料,既能满足创面对敷料多种物理性能的需求,还具有较好的抗菌、止血效果,有望作为一种新型创面敷料应用于临床。

**关键词:**阳离子聚合物;水凝胶;抗菌;止血

中图分类号:R17

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0422-007

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025011010



## Preparation and Performance of Cationic Polymer-Based Medical Multifunctional Hydrogel Dressings

LI Jia, WANG Cai, ZHENG Min, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To design and prepare a cationic polymer-based hydrogel medical dressing with antibacterial and hemostatic properties, and to evaluate its performance for antibacterial and hemostasis, so as to lay a foundation for the development of medical wound dressings. **Methods** Polyethylenimine (PEI), carboxymethyl chitosan (CMCS) and acrylamide (AM) were used as raw materials, and cationic polymer-based medical multifunctional hydrogel medical dressings (PEI/CMCS/PAM) were prepared by a one-step free radical polymerization method with the crosslinking agent N,N-methylenebisacrylamide (MBA). On the basis of the characterization of its microscopic morphology, mechanical properties, self-healing properties and adhesion properties, the antibacterial and hemostatic properties of PEI/CMCS/PAM hydrogel dressings were further evaluated by *in vitro* antibacterial experiments, *in vitro* whole blood coagulation assays, and *in vivo* liver puncture hemostasis experiments. **Results** The PEI/CMCS/PAM hydrogel medical dressings showed a characteristic porous network structure, a compressive strength of (137.60±4.32)kPa, excellent water absorption and swelling capacity, and tissue adhesion, with an adhesion strength of (5.50±0.52)kPa to pig skin. It adheres well to human joints and maintains adhesion even in bending and stretching conditions. Further *in vitro* antibacterial experiments and *in vitro* coagulation assays showed that PEI/CMCS/PAM hydrogel medical dressings exhibit ex-

\* 基金项目:湖北科技学院博士启动基金(BK202201);湖北科技学院科研团队创新项目(2023T10);湖北省智慧康养产业技术研究院专项(2022HX182);湖北省大学生创新创业训练计划项目(S202410927031);咸宁市自然科学基金项目(2022ZRKX064);咸宁市科学技术研究与开发专项(2023SFYF068)

\*\* 通信作者, E-mail: wangcai@hbust.edu.cn; xyzhengmin@hbust.edu.cn

cellent antibacterial activity, with inhibition rates of  $(98.4 \pm 2.2)\%$  against *Escherichia coli* and  $(96.7 \pm 2.7)\%$  against *Staphylococcus aureus*. In terms of hemostasis, the medical hydrogel dressing can induce the aggregation of platelets and red blood cells and accelerate the coagulation process after contact with blood. **Conclusion** In this study, PEI/CMCS/PAM hydrogel medical dressings were prepared by a one-step free radical polymerization method, which can not only meet the needs of wound dressings with multiple physical properties, but also have good antibacterial and hemostatic effects, and are expected to be used as a new type of wound dressings in clinical practice.

**KEY WORDS:** Cationic polymers; Hydrogels; Antibacterial; Hemostasis

由急性创伤、外科手术和慢性疾病造成的细菌感染和严重出血仍然是伤口愈合、修复中的重大挑战<sup>[1]</sup>。目前临床上常采用绷带、纱布、无菌棉等干性敷料覆盖或包裹伤口,发挥止血和保护伤口免受细菌感染的作用<sup>[2-3]</sup>。然而这类产品在使用时仍存在着许多不可避免的缺陷:首先,这类“非完全封闭型”的伤口敷料屏障能力有限,仅能对空气中的一小部分灰尘和细菌等杂质起到物理隔离作用且无法创造抗菌环境<sup>[4]</sup>;其次,棉纱类伤口敷料保湿性不佳,在吸收大量血液和伤口渗出液后易干结成块,在更换时易粘连伤口,使伤口撕裂,对患者造成继发性伤害<sup>[5]</sup>。因此,设计有效的伤口敷料已成为现代医疗系统中迫切需要解决的问题。

聚乙烯亚胺(PEI)是一种含有大量氨基结构的高分子阳离子聚合物,可以通过“接触杀菌”的方式靶向细菌胞膜上带负电荷的蛋白,导致细菌的膜结构发生破坏,抑制细菌的生长<sup>[6-8]</sup>。被应用于伤口止血时,PEI与血液中带负电荷的红细胞和血小板发生静电吸引,促进红细胞和血小板在受损部位的粘附和聚集,加速血液凝固<sup>[9]</sup>。壳聚糖(CS)是一种天然来源的碱性阳离子多糖,由于其优异的促凝特性、抗菌活性和生物相容性,在抗菌止血材料、创面敷料、药物递送等领域被广泛应用<sup>[10-11]</sup>。然而,CS在生理pH条件下往往不溶于水,不利于生物降解,严重限制了其进一步的生物应用<sup>[12]</sup>。羧甲基壳聚糖(CMCS)是壳聚糖经过羧甲基化得到的产物,研究<sup>[13]</sup>表明,CMCS作为CS的水溶性衍生物,在生理pH条件下具有更优异的水溶性,并保留了CS大多数固有活性,是一种具有良好应用前景的生物材料。聚丙烯酰胺(PAM)是一种由丙烯酰胺单体聚合而成的线性高分子聚合物,具有高亲水性和良好的生物相容性,常用于构建水凝胶载体材料<sup>[14-15]</sup>。

水凝胶是一种由亲水性聚合物网络组成的三维网状结构,具有质地柔软、湿润以及与天然细胞外基质(ECM)相似的特点<sup>[15-17]</sup>。其超过90%的含水量能够为伤口提供长期的湿润环境,有助于细胞的迁移和组织生长、促进伤口愈合<sup>[3,16]</sup>。本文通过一步自由基聚合物法,将PEI、CMCS和丙烯酰胺(AM)有效地结合在聚合物网络中,得到一种多组分医用水凝胶敷料

(PEI/CMCS/PAM)。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

恒温磁力搅拌器(DF-101S,上海力辰邦西仪器科技有限公司);超纯水机(FST-RO-10,上海富诗特环保科技有限公司);电子天平(BS224S,美国Sartorius公司);力学万能测试机(KZ-DSC-500,苏州科准测控有限公司);傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet iS 10,英国赛默飞公司);电子扫描显微镜(TESCAN MIRA LMS,捷克Tescan公司);台式震荡培养箱(ZHP-100G,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);生化培养箱(SPX-80B-II,上海贺德实验设备有限公司);真空冷冻干燥机(ALPHA 1-4 LD plus,德国Christ公司)。

聚乙烯亚胺(PEI,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);羧甲基壳聚糖(CMCS,上海麦克林生化股份有限公司);丙烯酰胺(AM,成都市科龙化工试剂厂);N,N-亚甲基双丙烯酰胺(MBA,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);过硫酸铵(APS,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);四甲基乙二胺(TEDMA,上海麦克林生化股份有限公司);无水氯化钙( $\text{CaCl}_2$ ,国药集团化学试剂有限公司);戊巴比妥钠(上海氟德化工有限公司);无菌采血针、枸橼酸钠采血管(威海赛威医疗科技有限公司);营养琼脂(中国惠兴生化试剂有限公司);大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)(南京便珍生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 材料制备

(1)新鲜全血的制备。健康SD大鼠(200~250g),腹腔注射2%戊巴比妥钠溶液使其麻醉,选择心脏脉搏最明显处刺入无菌采血针以收集新鲜全血,将所需量的新鲜全血存储在枸橼酸钠采血管中,摇匀以防止血液凝固。

(2)CMCS/PAM和PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料的制备。CMCS/PAM医用水凝胶敷料的制备:将CMCS粉末和AM粉末按质量比1:5的比例溶解于10mL去离子水溶液中搅拌过夜,按照顺序依次加入20 $\mu\text{L}$ 的MBA水溶液(质量分数2%),10 $\mu\text{L}$ 的APS水溶液(质量分数5%)和50 $\mu\text{L}$ 的TEDMA溶液,静置

10~25min后即得 CMCS/PAM 医用水凝胶敷料。PEI/CMCS/PAM 医用水凝胶敷料的制备:其制备方法与 CMCS/PAM 医用水凝胶敷料相似,将 CMCS 粉末和 AM 粉末按质量比 1:5 的比例溶解于 10mL PEI 水溶液中(质量分数 10%),搅拌过夜,按照顺序依次加入与 CMCS/PAM 医用水凝胶敷料等量的 MBA 水溶液(质量分数 2%),APS 水溶液(质量分数 5%)和 TED-MA 溶液,静置 10~25min 后即得 PEI/CMCS/PAM 医用水凝胶敷料。

1.2.2 红外光谱测定

采用傅里叶变换红外光谱仪分析 CMCS 以及 CMCS/PAM、PEI/CMCS/PAM 水凝胶之间的化学结构及其相互作用。测试前,将 3 种样品采用真空冷冻干燥至恒重,然后研磨成粉,采用 KBr 压片法进行测试,测试光谱范围为 500 ~ 4000cm<sup>-1</sup>。

1.2.3 表观形貌观测

通过电子扫描显微镜观察水凝胶的表观形貌。测试时,将水凝胶在真空冷冻干燥机中冷冻干燥至恒重,再置于液氮中脆断,将样品断面进行喷金处理,采用电子扫描显微镜在加速电压 10.0kV 下放大 100 倍观察样品的表观形貌。

1.2.4 力学性能评价

通过使用力学万能机测试水凝胶 CMCS/PAM 和 PEI/CMCS/PAM 的压缩强度来评价其力学性能。在压缩测试中,使用 24 孔板制备圆柱形水凝胶样品,设置测试参数为:压缩 10mm/min,压缩应变为圆柱体高度的 80%。由公式①计算水凝胶的压缩强度:

$$TX = \frac{F_n}{A} \dots\dots\dots ①$$

式中:TX 为压缩强度(Pa);F<sub>n</sub> 凝胶材料所受到的压缩作用力(N);A 为凝胶材料的受力面积(m<sup>2</sup>)。

1.2.5 组织粘附性能评价

水凝胶 CMCS/PAM 和 PEI/CMCS/PAM 的粘附性能采用搭接剪切实验进行测试,以新鲜离体猪皮为基材(20mm × 50mm)。将两片相同的猪皮通过 20mm × 20mm × 2mm 片状水凝胶粘合在一起,室温放置 60min 后,在力学万能机上以 10mm/min 的速度进行 180° 剥离,直至水凝胶与基底材料完全分离,记录拉伸过程中的最大剥离力。按公式② 计算搭接-剪切粘附强度:

$$\sigma = \frac{F_{max}}{S} \dots\dots\dots ②$$

式中:σ 为水凝胶的搭接-剪切粘附强度(Pa);F<sub>max</sub> 为最大剥离力(N);S 为受力面积(m<sup>2</sup>)。

通过宏观粘附性实验进一步评价 PEI/CMCS/

PAM 医用水凝胶敷料粘附性能。制备 20mm × 10mm 的水凝胶样品并用亚甲基蓝染色,通过将染色后的水凝胶与手指关节部位的皮肤直接接触,并使水凝胶的空间位置发生改变,进而观察水凝胶的粘附情况。其次,通过将水凝胶粘附于人体手背处并进行剥离实验来评价水凝胶应用于人体皮肤时的组织残留情况。

1.2.6 溶胀性能评价

用称重法测试水凝胶 CMCS/PAM 和 PEI/CMCS/PAM 的溶胀率(SR)。在室温条件下,将一定量的水凝胶(W<sub>0</sub>)置于磷酸盐缓冲液(PBS)中浸泡,在特定时间点捞出并用滤纸吸干其表面水分,称重记为 W<sub>1</sub>,按公式③计算各时间段的溶胀百分率。

$$SR(\%) = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100 \dots\dots\dots ③$$

式中:W<sub>0</sub> 为水凝胶的初始重量(g);W<sub>1</sub> 为各时间段水凝胶的重量(g)。

1.2.7 抗菌性能评价

采用平板计数法评价凝胶材料的体外抗菌活性。将 1cm<sup>3</sup> PEI/CMCS/PAM 水凝胶与 5mL 浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL 的菌液共培养,并设置空白对照组。在生化培养箱中孵育 24h 后取上述与水凝胶共培养的菌液 50μL 涂于牛肉膏琼脂固体培养基板上。在 37℃ 下孵育 24h 后,观察拍照,并根据细菌计数统计计算抗菌率。抗菌率的计算见公式④。

$$\text{抗菌率}(\%) = \frac{N_{control} - N_{sample}}{N_{control}} \times 100 \dots ④$$

式中:N<sub>control</sub> 为空白组的菌落数,N<sub>sample</sub> 为凝胶材料组的菌落数。

1.2.8 体外止血效果评价

通过体外全血凝结实验来评价水凝胶的止血效果。在实验中,首先使用圆形模具制备出直径为 8mm 的圆形水凝胶样品(n = 4)。随后,将水凝胶样品置于洁净的 24 孔板中,将 200μL 预先制备的大鼠新鲜抗凝全血滴加在待测水凝胶样品表面,加入 10μL 氯化钙溶液(0.2mol/L)重钙化,此后在各个所需时间点用生理盐水轻柔洗涤各孔至洗涤液呈澄清透明状以去除未凝结的游离红细胞,并观察血液凝结情况。

此外,通过测定水凝胶的体外凝血时间(BCT)和和凝血指数(BCI)来进一步评价 PEI/CMCS/PAM 医用水凝胶敷料的止血性能。在体外凝血时间(BCT)测试中,首先将一定量的水凝胶样品放置在 5mL 离心管中,并置于 37℃ 水浴锅中孵育 5min。随后,将 1mL 大鼠新鲜抗凝全血和 50μL 氯化钙溶液(0.2mol/L)依次加入离心管中,混合均匀后,每隔 15s 将试管进行倒置,观察试管中血液流动情况,待血液完全凝固时

记录凝血时间,空白对照组为不加水凝胶材料组。在体外凝血指数(BCI)测试中,首先在PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料表面滴加100  $\mu\text{L}$  大鼠新鲜抗凝全血,随即加入氯化钙溶液(0.2mol/L),37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2min,随后加入5mL去离子水在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育3min,使未凝血液中的红细胞发生破裂。每组取3个重复样本,并设置空白组为对照组。随后吸取100 $\mu\text{L}$ 裂解后的液体加入96孔板,用酶标仪读取545nm处的吸光度,计算体外凝血指数(BCI)值。BCI按照公式⑤计算得到。

$$BCI(\%) = \frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{control}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots \textcircled{5}$$

式中: $OD_{\text{sample}}$ 为样品组的吸光度, $OD_{\text{control}}$ 为空白组的吸光度。

### 1.2.9 体内止血效果评价

PEI/CMCS/PAM水凝胶的体内止血效果通过大鼠肝脏出血模型来评价。先将约200g的SD大鼠用2%戊巴比妥钠溶液麻醉,固定在手术台上,将大鼠腹部剃毛,剖开腹部露出肝脏,用一次性注射器对大鼠肝脏表面进行穿孔,待出血后,立即用水凝胶材料覆盖伤口并进行计时,并记录其在5min时的出血量。其中PEI/CMCS/PAM水凝胶组为实验组,空白组做对照组。每组实验重复3次,实验结果取平均值。

### 1.3 统计学方法

数据采取SPSS 16.0和GraphPad Prism 6进行统计学分析。数据形式均以(平均数 $\pm$ 标准差)表示,多组数据之间的比较采用one-wayANOVA检验,两组数据之间采用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。所有实验均重复3次及以上以确保实验的可靠性和准确性。

## 2 结果

### 2.1 红外光谱测定

如图1所示,羧甲基壳聚糖在1502 $\text{cm}^{-1}$ 、1618 $\text{cm}^{-1}$ 、1640 $\text{cm}^{-1}$ 和3412~3556 $\text{cm}^{-1}$ 处出现了特征吸收峰,分别代表了C-N伸缩振动(酰胺III带)、N-H弯曲振动(酰胺II带)、C=O伸缩振动(酰胺I带)和N-H以及O-H的伸缩振动<sup>[17]</sup>。与CMCS相比,CMCS/PAM水凝胶中由于丙烯酰胺(AM)的存在,使得该水凝胶在1502 $\text{cm}^{-1}$ 、1618 $\text{cm}^{-1}$ 、1640 $\text{cm}^{-1}$ 和3412~3556 $\text{cm}^{-1}$ 处出现了峰强度增强。此外,相较于CMCS/PAM,由于PEI的加入,使得PEI/CMCS/PAM水凝胶在1502 $\text{cm}^{-1}$ 、1618 $\text{cm}^{-1}$ 、1640 $\text{cm}^{-1}$ 和3412~3556 $\text{cm}^{-1}$ 处的峰强度出现了进一步的增强。可知,相较于水凝胶

CMCS/PAM,PEI/CMCS/PAM水凝胶的红外光谱中没有发现新的峰出现,说明PEI与CMCS/PAM之间没有形成新的共价键<sup>[18]</sup>。

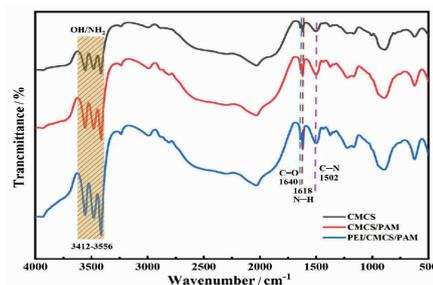


图1 红外光谱图

### 2.2 表观形貌

由图2可知,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料水凝胶含有大量的三维蜂窝状孔洞结构,有助于促进细胞渗透和新组织生成,在伤口愈合过程中起着重要的作用<sup>[19]</sup>。

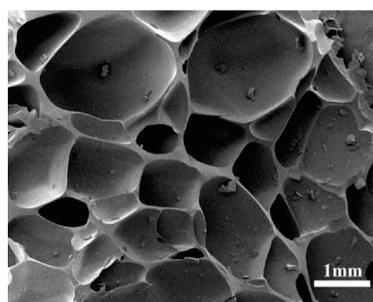


图2 表观形貌图

### 2.3 力学性能

结果如图3所示,在80%压缩应变的条件下,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料的力学强度可达(137.60 $\pm$ 4.32)kPa,低于CMCS/PAM水凝胶(186.60 $\pm$ 2.37)kPa( $P < 0.05$ )。导致PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料力学性能下降的原因可能是随着阳离子聚合物聚乙烯亚胺(PEI)的增加,PEI所带的正电荷在水凝胶中产生的静电相互作用降低了水凝胶的交联密度,使力学性能下降<sup>[17]</sup>。

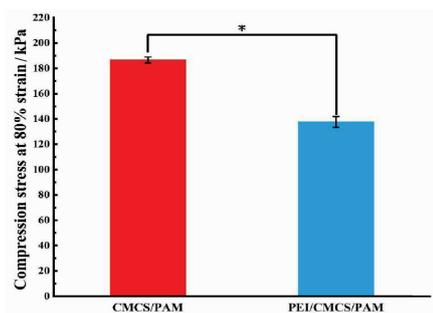


图3 力学强度测试结果(\* $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )

## 2.4 组织粘附性能

图4测试结果显示,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料在猪皮组织上的粘附强度可达 $(5.5 \pm 0.52)$  kPa,显著高于CMCS/PAM水凝胶组 $(2.7 \pm 0.64)$  kPa( $P < 0.01$ )。其原因可能是PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料中PEI分子提供的丰富正电荷与猪皮组织表面所带的负电荷发生了静电相互作用,从而与猪皮组织表面形成了牢固的粘合力<sup>[20-21]</sup>。

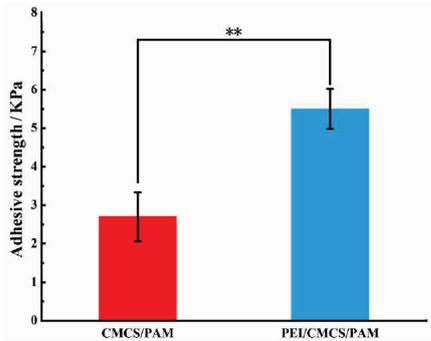


图4 粘附强度测试结果 (\*\*  $P < 0.01, n = 4$ )

由图5可知,水凝胶可以紧紧粘附在手指关节的皮肤上,且在弯折、拉伸状态下,仍可保持良好的贴合性。这是由于PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料表面丰富的-OH和-NH<sub>2</sub>可以与人体皮肤表面的官能团形成氢键和静电相互作用,故粘附效果较佳。此外,由图6可知,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料能够与皮肤紧密贴合,且在剥离之后无任何残留物且无过敏发红现象,说明该水凝胶生物相容性较好,在应用时可与皮肤直接接触。



图5 PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料在指关节的粘附示意图

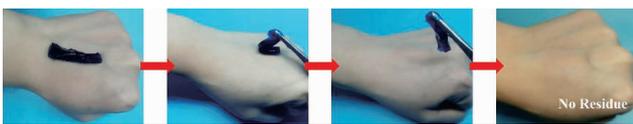


图6 PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料在手掌表面的粘附-剥离的效果示意图

## 2.5 吸水溶胀性能

通过记录PBS溶液中医用水凝胶敷料质量随时间变化计算水凝胶的溶胀比,结果如图7所示,CMCS/PAM和PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料在室温条件下50h时均可达到体外溶胀平衡,此时PEI/CMCS/PAM水凝胶敷料的溶胀率可达 $(328.30 \pm 7.$

32)% 高于CMCS/PAM水凝胶 $(238.00 \pm 8.40)$ %。这说明PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料中PEI的加入增强了水凝胶吸水溶胀性能,具有较强的吸收伤口渗出液的能力。

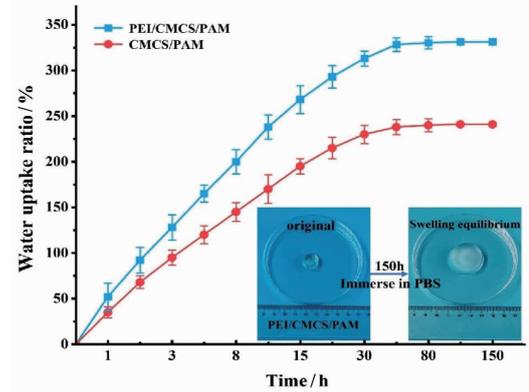
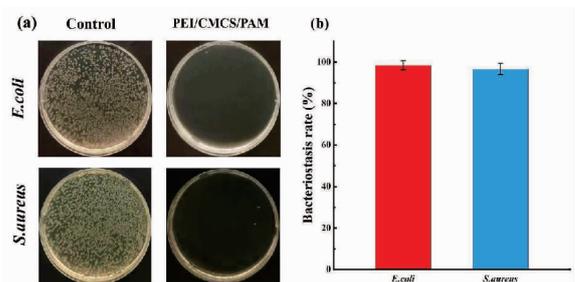


图7 溶胀性能示意图

## 2.6 体外抗菌性能

PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料的抑菌效果对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果如图8所示,相较于空白对照组,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料对两种试验菌均有较好的抑制效果,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制率分别为 $(98.4 \pm 2.2)$ %和 $(96.7 \pm 2.7)$ %。以上结果表明,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料具有良好的抗菌性能,在防止细菌感染方面具有很大的应用潜力。



a. PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作用的平板计数效果图;b. PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料的抑菌率示意图。

图8 PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料的抗菌效果示意图

## 2.7 体外止血效果

本研究通过体外凝血实验测试了PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料的凝血效果。如图9所示,空白对照组中,大鼠血液在2min后开始凝固。而在血液中加入PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料后,10s时可见24孔板表面粘附有大量红细胞和血小板,30s时即形成肉眼可见的血凝块,此外由图10a可以看出当水

凝胶组(右)血液凝固时,空白组(左)的血液仍在流动,如图10b、10c中所示,与空白对照组相比,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料组的凝血时间(BCT)和凝血指数(BCI)都有所下降( $P < 0.001$ ),这是由于PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料中所含有的阳离子聚合物聚乙烯亚胺上大量的正电性氨基结构,可通过静电相互作用,促进带负电荷的红细胞和小板的有效聚集和活化,进一步提高凝血效率。

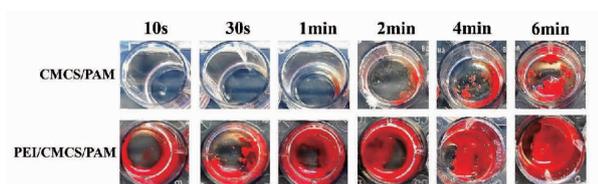
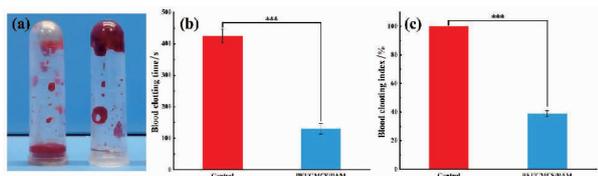


图9 体外全血凝结实验示意图

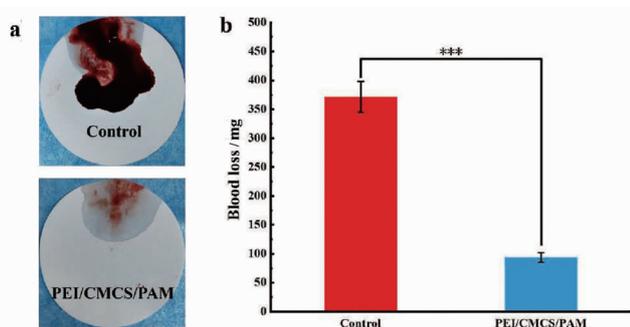


a. 空白对照组(左)和PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料组(右)凝血情况的图片;b. PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料的体外凝血时间(BCT);c. 凝血指数( $***P < 0.001$ )。

图10 体外凝血时间(BCT)和体外凝血指数(BCI)测试结果图

## 2.8 体内止血效果

使用无菌注射器对大鼠肝脏进行穿刺损伤后,血液从伤口溢出。在使用PEI/CMCS/PAM水凝胶敷料后,失血量为 $(93.57 \pm 8.17)$ mg,低于空白组 $(371.29 \pm 26.85)$ mg( $P < 0.001$ )。通过对比,PEI/CMCS/PAM水凝胶敷料展现出高效的止血效果,见图11。



a. 空白对照组和PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料组体内止血效果实物图;b. 空白对照组和PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料组失血量数据图( $***P < 0.001$ )。

图11 体内止血效果图

## 3 讨论

本研究通过简单的一步自由基聚合制备了一种以聚乙烯亚胺、羧甲基壳聚糖、丙烯酰胺为基材的

医用水凝胶伤口敷料PEI/CMCS/PAM,具有丰富的三维蜂窝状孔洞结构,能够为水凝胶提供足够的空间以吸收伤口渗出液。其次,制备的水凝胶具有优异的力学性能,其压缩强度可达 $(137.6 \pm 4.32)$ kPa,尽管PEI/CMCS/PAM水凝胶的力学性能相较于CMCS/PAM水凝胶显著降低,然而与其他水凝胶相比仍具有较好的性能<sup>[22]</sup>,可为伤口创面提供坚韧的保护屏障。粘附实验证明了PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料具有优异的组织粘附性,可在弯折、拉伸状态下仍保持良好的组织贴合性,且在去除后无任何残留物、无过敏发红现象。

溶胀实验表明,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料的最高溶胀率可达300%以上,能够保障材料具有优异的吸收伤口渗出液的能力,避免伤口感染。在体外抗菌实验中,基于阳离子聚合物聚乙烯亚胺的静电吸附抗菌作用以及羧甲基壳聚糖的协同抗菌作用,该PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料可实现对大肠杆菌 $(98.4 \pm 2.2)\%$ 的抑制效果和对金黄色葡萄球菌 $(96.7 \pm 2.7)\%$ 的抑制效果。最后,在体外凝血实验以及体内肝脏穿刺止血实验中,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料中聚乙烯亚胺分子提供的丰富正电荷,可快速中和血液中红细胞和血小板表面的负电荷,促进了红细胞和血小板的有效聚集和活化,为血凝块的形成起到了正向调节作用。综合以上结果表明,PEI/CMCS/PAM医用水凝胶敷料具有良好的潜在临床应用效果,是一种较有前景的医用伤口敷料。

## 参考文献:

- [1] HUANG R, BIAN Y, WANG W, et al. Antibacterial chitosan/organic rectorite nanocomposite-conjugated gelatin/ $\beta$ -cyclodextrin hydrogels with improved hemostasis performance for wound repair[J]. Carbohydr Polym, 2025, 349: 122961
- [2] 刘雯, 刘凤, 孙鹏飞, 等. 水凝胶黏合剂用于止血的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2024, 13(2): 308
- [3] 马莉, 仇威王, 吴德群. 抗菌止血水凝胶医用敷料的制备及其性能研究[J]. 纺织科学与工程学报, 2022, 39(4): 28
- [4] YAN M, HU S Y, WANG Z G, et al. Antibacterial, fatigue-resistant, and self-healing dressing from natural-based composite hydrogels for infected wound healing[J]. Biomacromolecules, 2024, 25(4): 2438
- [5] ALIBOLANDI M, MOHAMMADI M, TAGHDISI S M, et al. Synthesis and preparation of biodegradable hybrid dextran hydrogel incorporated with biodegradable curcumin nanomicelles for full thickness wound healing[J]. Int J of Pharm, 2017, 532(1): 466
- [6] 梁敬时, 曾佳铭, 李俊杰, 等. 阳离子抗菌聚合物[J]. 化学进展, 2019, 31(9): 1263

(下转第433页)

引文格式:饶少锋,吴丽民,吴旦,等. MHD 患者发生抗生素脑病的临床特征及预测模型的构建与评价[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):428-433.

# MHD 患者发生抗生素脑病的临床特征及预测模型的构建与评价\*

饶少锋,吴丽民\*\*,吴旦,葛亮,陈勇

(咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院,湖北 咸宁 437100)

**摘要:**目的 探讨尿毒症维持性血液透析(MHD)患者发生抗生素脑病(AAE)的临床特点及危险因素,并建立预测模型。**方法** 回顾性分析在我院行 MHD 治疗并使用抗生素的患者,按照住院期间是否发生抗生素脑病分为阳性组和阴性组,其中阳性组 29 例,阴性组 111 例。比较两组临床特征,采用二元 Logistic 回归分析发生抗生素脑病的影响因素,通过 R 语言构建 Nomogram 预测模型并通过 ROC 曲线及临床决策曲线评估模型的预测能力。**结果** 与阴性组相比,阳性组使用抗生素时间长,C 反应蛋白(CRP)更高,合并有乙肝或丙肝占比高,联用抗生素及透析通路为导管占比高,白蛋白、血磷、甲状旁腺激素低( $P$  均  $<0.05$ )。阳性组和阴性组的生存率无统计学意义( $P >0.05$ )。二元 Logistic 回归分析结果显示,是否联用抗生素、是否合并有乙肝或丙肝,透析通路为导管及 CRP 是维持性血液透析患者发生抗生素脑病的独立危险因素。列线图模型的 ROC 曲线下面积为 0.82,阈值概率大约 12%~68% 的区间可临床获益。**结论** 联用抗生素、合并有乙肝或丙肝、透析通路为导管及高 CRP 是 MHD 患者发生抗生素脑病的危险因素,本研究建立的预测模型对在临床上预测 MHD 患者发生 AAE 有一定的参考价值。

**关键词:**血液透析;抗生素脑病;临床特点;预测模型

中图分类号:R692.5

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)04-0428-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025031702



## Clinical Characteristics, Establishment and Evaluation of Prediction Model for Antibiotic-Associated Encephalopathy in Maintenance Hemodialysis Patients

RAO Shao-feng, WU Li-min, WU Dan, et al

(Xianning Central Hospital/The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science And Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the clinical characteristics and risk factors of maintenance hemodialysis (MHD) in uremia patients combined with antibiotic-associated encephalopathy (AAE), and establish a prediction model. **Methods** Retrospectively analysed patients diagnosed of MHD in Xianning Central Hospital and treated with antibiotics. 29 cases and 111 cases were respectively divided into positive and negative groups according to the pathologies whether occurred encephalopathy during the hospital stays. The clinical characteristics of two groups were compared, and Binary Logistic regression was used to analyze the influencing factors of AAE. Nomogram prediction model was constructed by R language and the prediction ability of the model was evaluated by ROC curve and clinical decision curve. **Results** Compared with the negative group, the positive group had longer time of antibiotics use, higher CRP level, higher proportion of patients infected with hepatitis B or C and combined antibiotic using and dialysis pathways used as catheters (all  $P <0.05$ ). The positive group had lower

\* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2020CFB836);咸宁市中心医院院级课题(2020XYB018)

\*\* 通信作者, E-mail:110214768@qq.com

level of albumin, serum phosphate, PTH (all  $P < 0.05$ ). There was no statistically significant difference in survival rates between the positive and negative groups ( $P > 0.05$ ). The results of the binary Logistic regression analysis showed that whether to use antibiotics in combination, whether to infect hepatitis B or C, the value of CRP, and the dialysis pathways used as catheters were independent risk factors for MHD complicated with AAE. The area under the ROC curve of the nomogram model was 0.82, and the threshold probability of about 12% ~ 68% could bring benefits to the clinic. **Conclusion** The combined use of antibiotics, infected with hepatitis B or C, dialysis via catheter, and high CRP level are risk factors for AAE in MHD patients. The prediction model established in this study had a certain reference value in clinic for predicting the occurrence of AAE in MHD patient.

**KEY WORDS:** Hemodialysis; Antibiotic-associated encephalopathy; Clinical features; Prediction model

血液透析是尿毒症患者维持长期生存的最常见方式,尿毒症维持性血液透析(MHD)患者并发症多、免疫力低,为感染的高发人群,国外研究统计约50%的患者至少会发生1次与感染相关的住院治疗<sup>[1-2]</sup>。由于MHD患者抗生素排泄率下降,药代动力学异常,药物易在体内蓄积引起各种神经精神症状,如何有效预防和降低抗生素脑病(AAE)的发生是临床医生面临的主要难题之一<sup>[3]</sup>。因此,充分了解引起AAE的临床特点并给予正确的处理尤为重要。本研究收集我院MHD患者的临床资料,探讨其中发生AAE患者临床特点及影响因素并建立预测模型,为后续此类患者的预防、诊断和治疗提供参考和经验。

## 1 资料与方法

### 1.1 AAE的诊断及排除标准

诊断标准:①使用抗生素期间出现中枢神经系统症状,如胡言乱语、肌肉抽搐、谵妄、嗜睡、癫痫等;②停药及加强透析后症状消失;③经实验室检查、头颅CT或MRI排除水电解质酸碱平衡紊乱、血糖异常、代谢性脑病及脑血管意外等所致脑病。

排除标准:①既往有精神疾病者;②合并有肝硬化、活动性肺结核、血液系统疾病、恶性肿瘤、严重心衰、自身免疫疾病的患者;③资料缺失及随访失败的患者。

### 1.2 一般资料

纳入2017年4月1日至2023年12月31日在我院诊断为MHD并第一次使用抗生素的住院患者140例。按照住院期间是否发生AAE分为阳性组29例,阴性组111例。本研究为回顾性病例对照研究,获得咸宁市中心医院医学伦理委员会批准(咸医伦字-K[2024]012号)。

### 1.3 观察指标

收集患者基线临床资料及入院的实验室检查结果:年龄、性别、身高、高血压病史、糖尿病史、传染病

史(乙肝、丙肝)、使用抗生素的原因(呼吸道感染、导管感染、败血症、手术用药等)及抗生素名称、使用天数、是否联用、透析通路的类型(内瘘、导管)、维持性血液透析时间(按月计算)、血液实验室指标等。甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、D-Ⅱ聚体、凝血酶原国际标准化比值(INR)、纤维蛋白原(Fb)、肌红蛋白(Mb)、肌钙蛋白(Tn)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、脑利钠肽(BNP)。所有入组患者随访至2024年6月30日,记录生存率。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 25.0软件和R语言4.3.1软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 视为差异具有统计学意义。连续性计量资料符合正态分布采用 $(\bar{x} \pm s)$ 形式表示,非正态分布采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 形式表示;方差齐的正态分布资料组间比较采用两独立样本 $t$ 检验,方差不齐或非正态分布资料比较采用非参数秩和检验。分类资料采用频数或百分比描述,组间差异比较采用卡方检验。将上述检验中 $P < 0.05$ 作为协变量纳入Logistic分析进一步确定危险因素。基于独立危险因素,用R语言建立Nomogram预测模型并通过ROC曲线及临床决策曲线评估模型的预测能力。

## 2 结果

### 2.1 MHD患者用药原因及用药情况

使用抗生素最常见的原因是呼吸道感染占55.00%(77/140);处于第2位的是导管相关感染占10.00%(14/140)。发生感染后 $\beta$ -内酰胺类(青霉素类、头孢类、碳青霉烯类)常作为首选药物占70.71%(99/140); $\beta$ -内酰胺类中最常用的为头孢类占47.14%(66/140)。联用抗生素最常见的组合是头孢类联合喹诺酮类,占联合用药30.00%(6/20)。具体见表1。29例MHD患者发生AAE的具体用药名称及至症状出现的用药时间见表2。

表1 用药原因及用药情况

	项目	例数	
使用抗生素原因	呼吸道感染	77	
	导管相关感染	14	
	尿路感染	11	
	败血症	8	
	手术用药(阑尾炎、人工血管瓣关节置换、痔疮、肝脓肿)	9	
	胰腺炎	2	
	胃肺炎	3	
	鼻窦炎	1	
	阴道炎	2	
	皮肤感染	3	
	不明原因发热及其他并发症预防用药	10	
	抗生素种类	β-内酰胺类	20
		青霉素类	66
		头孢类	13
碳青霉烯类		3	
万古霉素类		17	
喹诺酮类		1	
硝基咪唑类		1	
联合用药方案		2	
硝基咪唑类+喹诺酮		1	
碳青霉烯类+喹诺酮		1	
万古霉素类+喹诺酮	6		
头孢类+喹诺酮	1		
万古霉素+碳青霉烯类	1		
万古霉素+青霉素类	2		
万古霉素+头孢类	1		
青霉素类+碳青霉烯类	1		
头孢类+碳青霉烯类	1		
硝基咪唑类+碳青霉烯类	1		
三联及其他	3		

表2 29例阳性患者用药明细及至症状发生用药时间

序号	用药情况	至症状发生使用天数/d
1	哌拉西林钠舒巴坦钠	7
2	美罗培南+奥硝唑	9
3	头孢克洛+左氧氟沙星	10
4	头孢唑肟钠他唑巴坦钠	6
5	头孢吡肟钠他唑巴坦钠	13
6	头孢吡肟钠他唑巴坦钠	13
7	头孢吡肟钠他唑巴坦钠	9
8	头孢吡肟钠舒巴坦钠+亚胺培南西司他丁钠	5
9	头孢替唑+莫西沙星	5
10	头孢吡肟钠舒巴坦钠	12
11	头孢吡肟钠舒巴坦钠	14
12	亚胺培南西司他丁钠	7
13	头孢吡肟钠舒巴坦钠	14
14	亚胺培南西司他丁钠	13
15	亚胺培南西司他丁钠	6
16	头孢美唑钠	6
17	头孢吡肟钠舒巴坦钠+万古霉素	13
18	头孢他啶	10
19	哌拉西林钠他唑巴坦钠+比阿培南	11
20	头孢吡肟钠舒巴坦钠+左氧氟沙星	14
21	亚胺培南西司他丁钠	5
22	头孢唑肟钠+奥硝唑	39
23	头孢吡肟钠他唑巴坦钠+左氧氟沙星	13
24	头孢吡肟钠他唑巴坦钠+左氧氟沙星	10
25	头孢吡肟钠他唑巴坦钠	11
26	头孢吡肟钠他唑巴坦钠	11
27	比阿培南	6
28	亚胺培南西司他丁钠	7
29	美罗培南+利奈唑胺+头孢呋辛钠	16

2.2 两组临床资料比较

与阴性组比较,阳性组使用抗生素时间长,合并有乙肝或丙肝占比高,联用抗生素及透析通路为导管占比高( $P$ 均 $<0.05$ );ALB、P、PTH低,CRP更高( $P$ 均 $<0.05$ )。两组其余指标比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表3。

表3 两组临床资料比较

项目	阴性组(n=111)	阳性组(n=29)	$t/Z/\chi^2$	$P$	
性别[n(%)]	男	72(64.86)	15(51.72)	1.688	0.194
	女	39(35.14)	14(48.28)		
传染病[n(%)]	有	9(8.82)	8(38.10)	8.304	0.004
	无	102(91.18)	21(61.90)		
透析通路[n(%)]	导管	54(48.65)	21(72.41)	5.221	0.022
	内瘘	57(51.35)	8(27.59)		
是否联用抗生素[n(%)]	是	9(8.82)	11(37.93)	16.701	0.000
	否	102(91.18)	18(62.07)		
年龄/岁	62(53.68)	61(49.69)	-0.17	0.865	
BMI/(kg/m <sup>2</sup> )	22.98±3.53	22.02±2.68	1.370	0.173	
糖尿病[n(%)]	40(36.04)	9(31.03)	0.222	0.637	
抗生素使用时间/d	8(5,11)	11(7,13)	-2.402	0.016	
维持透析时间/月	6(0,24)	8(1,8)	-0.902	0.637	
实验室指标	WBC/( $\times 10^{12}$ /L)	8.31±3.86	9.84±6.71	-1.065	0.289
	N/%	78.4(70.05,84.58)	80.6(76.55,88.8)	-1.949	0.051
	Hb/(g/L)	100.30±26.57	99.70±24.18	0.112	0.911
	PLT/( $\times 10^9$ /L)	171.63±83.84	170.34±54.59	0.079	0.937
	CRP/(mg/L)	16.2(5.20,49.94)	53.33(5.91,89.05)	-2.291	0.022
	ALT/(U/L)	13(8,21)	9(6,19)	-1.765	0.078
	AST/(U/L)	17(12,24)	15(12.5,22.55)	-0.785	0.432
	TB/( $\mu$ mol/L)	7.44(5.29,9.67)	7.1(5.51,9.61)	-0.033	0.973
	ALB/(g/L)	40(36.3,42.5)	37.8(35.85,40.8)	-2.018	0.035
	GLB/(g/L)	29.52±2.41	29.9±7.15	-0.098	0.922
	K/(mmol/L)	5.2±0.532	4.52±0.17	1.158	0.249
	Na/(mmol/L)	136.15±3.46	134.83±3.45	1.824	0.070
	Cl/(mmol/L)	102.51±5.99	100.93±5.55	1.284	0.201
	Ca/(mmol/L)	2.07±0.31	2.14±0.23	-0.982	0.328
	P/(mmol/L)	1.69±0.68	1.30±0.51	3.113	0.002
	Fe/( $\mu$ mol/L)	9.16±7.19	8.69±9.20	0.78	0.437
	Mg/(mmol/L)	0.93±0.17	0.89±0.14	1.074	0.285
PTH/(pg/mL)	295(113.09,433.15)	115.72(62.41,251.71)	-2.717	0.007	
PT/s	11.8(11.3,12.8)	12.3(11.5,13.65)	-1.922	0.055	
APTT/s	31.82±6.11	32.98±7.74	3.518	0.513	
D-Ⅱ/( $\mu$ g/mL)	1.74±2.78	1.80±2.49	0.017	0.673	
INR	1.03(0.97,1.12)	1.09(0.99,1.19)	-1.69	0.091	
Fb/(g/L)	4.22±1.33	3.91±1.48	2.862	0.147	
TC/(mmol/L)	1.5(1.07,2.10)	1.39(0.84,2.18)	-0.712	0.477	
TC/(mmol/L)	3.73(3.06,5.06)	3.72(2.86,4.63)	-0.593	0.553	
LDL/(mmol/L)	1.93(1.50,2.93)	1.95(1.61,2.97)	-0.067	0.947	
HDL/(mmol/L)	1.05(0.85,1.26)	1.00(0.84,1.15)	-0.503	0.615	
Mb/(ng/mL)	260(184,0,427.6)	253.5(127.0,396.0)	-1.141	0.254	
Tn/(pg/mL)	25.9(13.4,70.9)	24.6(18.15,64.4)	-0.368	0.713	
CK-MB/(ng/mL)	8.3(2.6,14.5)	9.7(4.8,15.6)	-1.177	0.239	
BNP/(ng/L)	398.1(153.10,1123.46)	575.85(166.27,1725.65)	-0.787	0.254	

注:白细胞、球蛋白、血钾、血磷、铁离子、APTT、D-Ⅱ聚体、Fb经以10为底的对数转化后服从正态分布。

### 2.3 两组生存率比较

两组随访至2024年6月,阴性组纳入111例,其中69例存活,42例死亡;阳性组纳入29例,其中14例存活,15例死亡。两组生存率行long-rank分析,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图1。

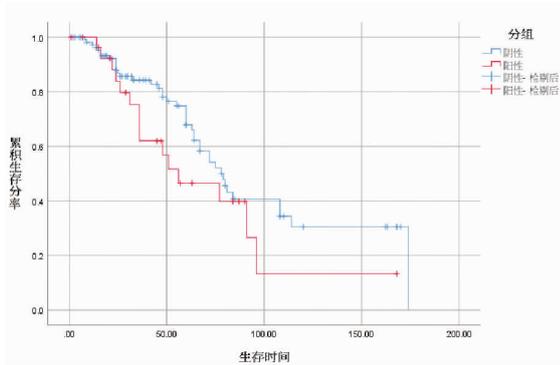


图1 两组生存率分析

### 2.4 MHD患者发生AAE的影响因素分析

将两组有差异的统计学指标纳入二元 Logistic 回归分析,是否联用抗生素( $OR = 0.160$ )、是否合并有乙肝或丙肝( $OR = 7.712$ ),透析通路为导管( $OR = 0.261$ )及CRP( $OR = 1.009$ )是尿毒症发生抗生素脑病的独立危险因素。见表4、5。

表4 自变量的赋值

变量	赋值
因变量 抗生素脑病	否0,是1
自变量 抗生素是否联用	否0,是1
透析通路	动静脉内瘘0,透析导管1
传染病	否0,乙肝或丙肝1

表5 MHD患者发生抗生素脑病的影响因素分析

影响因素	OR(95% CI)	P
是否联用	0.160(0.041,0.624)	0.008
透析通路	0.261(0.082,0.827)	0.022
使用天数	1.003(0.905,1.112)	0.948
ALB	0.923(0.829,1.027)	0.139
P	0.436(0.156,1.221)	0.114
PTH	0.999(0.997,1.002)	0.615
CRP	1.009(1.000,1.018)	0.041
传染病	7.712(1.891,31.454)	0.004

### 2.5 MHD患者发生抗生素脑病预测模型的构建与评价

为直观展现维持性血液透析患者使用抗生素后

发生脑病的风险,基于二元 Logistic 回归分析中有意义的指标(是否联用抗生素、透析通路、CRP、是否合并传染病),建立MHD患者发生AAE的列线图(图2),Nomogram模型预测发生AAE的ROC曲线下面积(AUC)为0.82(图3)。为评估模型净收益,我们通过R语言mda软件包绘制决策曲线(图4),阈值概率12%~68%的区间可临床获益。

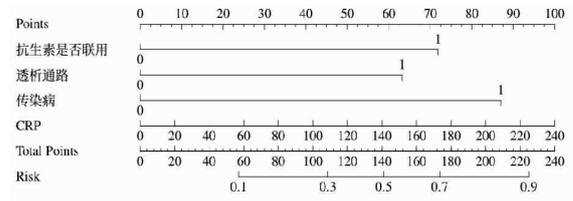


图2 MHD患者发生AAE的列线图

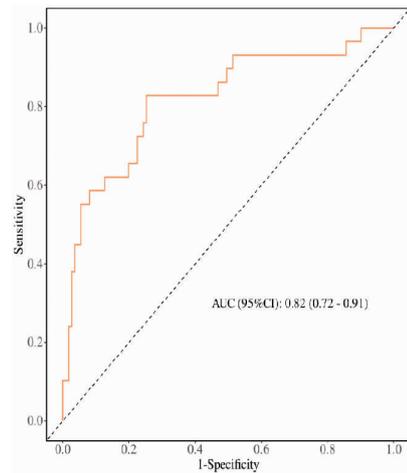


图3 MHD患者发生AAE预测模型的ROC曲线

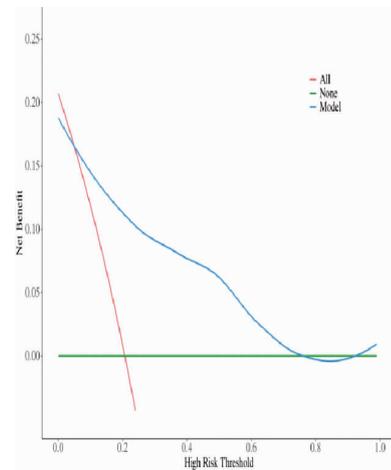


图4 MHD患者发生AAE的模型决策曲线

## 3 讨论

近年来,MHD患者出现AAE的报道正在逐渐增多并引起医生的重视<sup>[4-5]</sup>。一旦AAE发现不及时或

处理不合理,轻则导致病情反复使住院时间延长,重则出现昏迷甚至死亡。目前,关于 MHD 患者发生 AAE 的研究多为病例报告以及个别抗生素的小样本的临床分析<sup>[6-7]</sup>,本研究通过收集近 7 年 MHD 患者使用抗生素的临床资料,通过多因素分析得出 MHD 患者发生 AAE 的独立危险因素并构建预测模型,以帮助临床医师对发生 AAE 的高危患者进行早期识别及干预。

本文结果显示呼吸道感染是 MHD 患者最常见的感染部位,发生感染后最常用的抗生素为  $\beta$ -内酰胺类中的头孢类,最常见的联合用药方式为  $\beta$ -内酰胺类联合喹诺酮类。单因素分析发现,阳性组使用抗生素时间长、联合使用抗生素比例大,炎性指标 CRP 及中性粒细胞比率更高,而 ALB、Hb、TG、TC、LDL 等营养性指标均较阴性组低,但只有 ALB 的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。感染会导致血-脑屏障完整性的改变、通透性增强;贫血会导致大脑缺氧;而血浆白蛋白水平降低导致抗生素的蛋白结合减少,更多游离的抗生素可以自由穿过血脑屏障,使抗生素进入中枢神经系统的量增加;内源性尿毒症毒素(如潜在的神经毒性胍基化合物)的存在,可能会增加患者对抗生素相关神经毒性的易感性,这些因素均可导致 AAE 的发生,这与国内外的研究一致<sup>[8-9]</sup>。Kim 等<sup>[9]</sup>认为使用抗生素时间长、联合使用抗生素及炎性指标高者大部分感染都比较重,在重症感染患者中,循环炎性细胞因子直接或间接通过氧化应激作用于中枢神经系统也可诱发脑病,需排除这一混杂因素的干扰。

$\beta$ -内酰胺类具有广谱、高效、机体对其耐受性好等特点,为临床上最常用的抗生素,其发病机制可能与干扰中枢神经系统抑制性递质  $\gamma$ -氨基丁酸受体的功能,使神经元兴奋性增高有关<sup>[10-11]</sup>。从收集到的病例看,头孢哌酮钠舒巴坦钠和头孢哌酮钠他唑巴坦钠致 MHD 患者发生 AAE 的例数最多,共达 9 例。头孢哌酮可经肝肾排泄,肝脏清除率为 0.8,而舒巴坦或他唑巴坦约 90% 由肾脏排泄,常规血液透析不易清除,而血液灌流或血液透析滤过可清除,造成上述比例高的原因也和科室及医生的用药习惯有关。美罗培南和亚胺培南西司他丁均可透过血脑屏障诱发癫痫。亚胺培南在 C2 位置有更多的氨基酸侧链,对 GABA 受体会产生更强的抑制作用导致癫痫发作,西司他丁钠还可以抑制肾肽酶阻断亚胺培南在肾脏内的代谢<sup>[12-13]</sup>。本研究中有 1 例重症感染患者使用头孢哌酮钠舒巴坦钠联合亚胺培南西司他丁钠 5d 后即引起 AAE 发作,可能与此原因有关。

喹诺酮类药物为使用最多的抗生素之一,在组织

液中分布广泛、抗菌谱广,对社区获得性肺炎及不明原因感染有良好抗菌作用,常与头孢或其他种类抗生素联合用药用于重症感染治疗。体外喹诺酮类药物对大鼠脑部海马区域的研究<sup>[14]</sup>显示,它能影响多巴胺 D2 受体和 N-甲基-D-天冬氨酸受体而引起精神症状。因喹诺酮类有一定的亲脂活性,可透过血脑屏障,蓄积时更易导致脑脊液药物浓度高从而诱发脑病<sup>[15]</sup>。

阳性组透析通路中导管占比大,达 72.41%,考虑与透析时血液再循环及抗生素及毒素清除率低有关,再加上选择这种通路的患者年龄较大、血管条件差,更容易发生 AAE。MHD 患者存在继发性甲状旁腺功能亢进,高钙会使血管钙化、钙离子脑内沉积,本研究发现阳性组 PTH 和血磷较阴性组低 ( $P < 0.05$ )。Wang 等<sup>[16]</sup>研究表明低 PTH 和血磷可能与感染和营养不良有关。

AAE 是临床上 MHD 患者使用抗生素治疗各类感染性疾病时常遇到的棘手问题,一旦发生不得不停用或换用抗生素,停药使患者的感染情况较难控制,并需要临时行血液灌流、血液透析滤过等治疗<sup>[17]</sup>,增加患者的经济负担和死亡风险。本研究二元 Logistic 多因素分析发现,联用抗生素、合并有乙肝或丙肝、透析通路为导管及高 CRP 是 MHD 患者发生 AAE 的危险因素。故临床上如果能根据患者感染程度、透析通路、营养状况、是否合并乙肝或丙肝、药物耐受性、药物代谢和排泄途径等因素个体化选择和调整抗生素用量,早期甄别高危患者,则能减少甚至防止 AAE 的发生。

本研究发现,阳性组合并有乙肝或丙肝比例高,但两组在生存率上无统计学意义,这与 Huang 等<sup>[18]</sup>的研究不一致,考虑与样本量不大、随访时间不长有关。本研究为单中心研究,且收集资料时未能考虑患者住院期间其他药物与抗生素的影响,未完整记录研究对象的脑电图情况及实验室指标变化情况,具有一定的局限性;建立的预测模型可为识别 MHD 患者使用抗生素发生 AAE 的风险提供一定参考,对实施早期干预避免不良结局有一定的借鉴意义。未来应进一步加大样本量,延长患者的随访时间,开展前瞻性、多中心的研究,得出更可靠的结论。

## 参考文献:

- [1] DALRYMPLE L S, JOHANSEN K L, CHERTOW G M, et al. Infection-related hospitalizations in older patients with ESRD [J]. American Journal of Kidney Diseases, 2010, 56(3): 522
- [2] 孙杨杨, 鄢艳, 邹梦林. 维持性血液透析患者发生感染相关住院的临床特征和危险因素分析[J]. 中华肾脏病杂志,

- 2020,36(6):435
- [3] 孔钦翔,张照如,李家斌. 抗菌药物相关性脑病研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2017,42(7):621
- [4] TAKANO T, KABURAGI M, MORIKUBO S, et al. Ceftriaxone-related encephalopathy in a patient with end-stage renal disease and high ceftriaxone concentrations in cerebrospinal fluid and plasma: a case report[J]. *Cureus*, 2023, 15(10):e46401
- [5] 余建峰,金劲松,龙利,等. 慢性肾衰竭患者发生抗生素脑病的预测模型的建立和评价[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2023,12(1):1
- [6] SUZUKI S, NAITO S, NUMASAWA Y, et al. Encephalopathy induced by high plasma and cerebrospinal fluid ceftriaxone concentrations in a hemodialysis patient[J]. *Internal Medicine*, 2019, 58(12):1775
- [7] 庞欣欣,张雅歌,石秀杰,等. 比阿培南致老年血液透析患者抗生素脑病1例[J]. 医药报,2020,39(11):1570
- [8] 余建峰,金劲松,龙利,等. 慢性肾衰竭患者发生抗生素脑病的预测模型的建立和评价[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2023,12(1):1
- [9] KIM J H, KIM T, KIM W, et al. The incidence and predictors of antibiotic-associated encephalopathy: a multicenter hospital-based study[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1):8747
- [10] DE SARRO A, DE SARRO G. Adverse reactions to fluoroquinolones. an overview on mechanistic aspects[J]. *Curr Med Chem*, 2001, 8(4):371
- [11] LINDQUIST C E, DALZIEL J E, CROMER B A, et al. Penicillin blocks human alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S GABAA channels that open spontaneously[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 496(1-3):23
- [12] SUNAGAWA M, MATSUMURA H, SUMITA Y, et al. Structural features resulting in convulsive activity of carbapenem compounds: effect of C-2 side chain[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1995, 48(5):408
- [13] 孔钦翔,张照如等. 抗菌药物相关性脑病研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2017,42(7):621
- [14] BRAR K S, KUMAR V, JOHRI S. Association of a tourettelike syndrome with sparfloxacin[J]. *Med J Armed Forces India*, 2006, 62(4):381
- [15] ISHIBASHI Y, KIMURA S, SUZUKI I. Responses to antibiotics in human iPSC-derived neurons based on the clinical antibiotic-associated encephalopathy classification[J]. *Toxicological Sciences*, 2022, 47(10):429
- [16] WANG H, LIU D. Retrospective case-control study on screening risk factors of antibiotic-associated encephalopathy in patients with chronic kidney disease[J]. *BMJ Open*, 2022, 12(12):e064995
- [17] 何珊,杨能源. 慢性肾功能衰竭透析患者抗生素脑病的防治与护理[J]. 吉林医学,2015(11):2384
- [18] HUANG Q, LI J, HUANG N, et al. Clinical characteristics and outcomes of antibiotic-associated encephalopathy in patients with end-stage kidney disease[J]. *Renal Failure*, 2022, 44(1):1708

(收稿日期:2025-03-17)

(上接第427页)

- [7] 朱欣怡,丁圣刚,聂旋,等. 抗菌阳离子聚合物的研究进展[J]. 功能高分子学报,2023,36(3):221
- [8] LIU M, LI J, LI B. Mannose-modified polyethylenimine: a specific and effective antibacterial agent against escherichia coli[J]. *Langmuir*, 2018, 34(4):1574
- [9] HE Q, GONG K, AO Q, et al. Positive charge of chitosan retards blood coagulation on chitosan films[J]. *J Biomater Appl*, 2013, 27(8):1032
- [10] KEAN T, THANOU M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(1):3
- [11] NI P, YE S, XIONG S T, et al. A chitosan-optimized polyethylenimine/polyacrylic acid multifunctional hydrogel for reducing the risk of ulcerative arterial bleeding[J]. *J Mater Chem B*, 2023, 11(23):5207
- [12] 蒋安康,周聪,李闯,等. 自愈壳聚糖抗菌水凝胶的制备及其性能研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版),2024,46(5):730
- [13] SHARIATINIA Z. Carboxymethyl chitosan: properties and biomedical applications[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120:1406
- [14] ZHU H L, YANG T G, CHEN S N, et al. Construction and characterization of chitosan/poly(acrylamide-[2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride) double-network hydrogel with enhanced antibacterial activity[J]. *Adv Compos and Hybrid Mater*, 2023, 6(6):192
- [15] 李甲,李淑,林钰洋,等. 水凝胶生物粘合剂用于软组织止血修复的研究进展[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2024,38(6):549
- [16] RICE J, MARTINO M M, DE L L, et al. Engineering the regenerative microenvironment with biomaterials[J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2(1):57
- [17] 刘志华,林依洋,陈爽,等. 仿生天然高分子水凝胶在医用材料方面的应用[J]. 高分子通报,2024,37(2):162
- [18] LI J, LI S, ZHONG A Z, et al. A Self-gelling powder based on polyacrylic acid/polyethyleneimine/polyethylene glycol for high-performance hemostasis and antibacterial activity[J]. *Polymers*, 2024, 16(24):3516
- [19] 李招玉,李向平,杨少玲,等. 氧化κ-卡拉胶/聚丙烯酰胺水凝胶的制备与表征[J]. 食品与发酵工业,2024,50(20):153
- [20] FAN H, WANG J, TAO Z, et al. Adjacent cationic-aromatic sequences yield strong electrostatic adhesion of hydrogels in seawater[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):5127
- [21] HUANG G, TANG Z, PENG S, et al. Modification of hydrophobic hydrogels into a strongly adhesive and tough hydrogel by electrostatic interaction[J]. *Macromolecules*, 2022, 55(1):156
- [22] ZHANG S, HUANG C, SUN Z, et al. C-phycoerythrin and quaternized chitosan based antibiotic-free hydrogels with antioxidant and antibacterial activity for wound healing[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 302:140647

(收稿日期:2025-01-10)

引文格式:钟欣恬,周露萍,邹一然,等. BMAL1 基因与吸烟及高血压交互作用对 T2DM 的影响[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2025,39(5):434-438.

# BMAL1 基因与吸烟及高血压交互作用 对 T2DM 的影响\*

钟欣恬,周露萍,邹一然,张 涛,常微微\*\*,方正美\*\*

(皖南医学院公共卫生学院,安徽 芜湖 241002)

**摘要:**目的 探讨昼夜节律核心基因 BMAL1 多态性与环境交互作用对 2 型糖尿病(T2DM)遗传易感性的关联。方法 采用病例对照研究设计,纳入 608 例 T2DM 患者(病例组)和 614 例健康对照者。通过问卷收集一般信息及生化指标,采用 TaqMan 探针法对 BMAL1 基因 3 个 SNPs(rs9633835、rs12364562、rs6486122)进行基因分型。应用 Logistic 回归分析基因多态性与 T2DM 的关联,R 软件分析基因-环境交互作用。结果 T2DM 组吸烟、饮酒比例及甘油三酯(TG)、空腹血糖(FBG)水平高于对照组( $P$  均  $< 0.05$ )。分层分析显示,吸烟者中 rs9633835 TT 基因型与 T2DM 风险降低相关(校正  $OR = 0.518$ ,95%  $CI: 0.303 \sim 0.885$ , $P = 0.016$ ),高血压人群中 rs12364562 GG 基因型与风险增加相关(校正  $OR = 1.605$ ,95%  $CI: 1.181 \sim 2.181$ , $P = 0.002$ )。交互作用分析表明,rs9633835 与吸烟存在协同相乘交互作用( $OR = 1.556$ ,95%  $CI: 1.147 \sim 2.109$ ),rs12364562 与高血压亦存在相乘交互作用( $OR = 1.362$ ,95%  $CI: 1.034 \sim 1.796$ )。结论 BMAL1 基因 rs9633835 和 rs12364562 多态性可能通过与环境因素交互作用影响 T2DM 患病风险,吸烟及高血压人群的基因型特异性干预或具临床意义。

**关键词:**BMAL1;2 型糖尿病;高血压;吸烟;空腹血糖

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)04-0434-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025030409



## The Interaction of BMAL1 Gene with Smoking and Hypertension on the Impact of T2DM

ZHONG Xin-tian, CHANG Wei-wei, FANG Zheng-mei, et al

(Wannan Medical College School of Public Health, Wuhu Anhui 241002, China)

**ABSTRACT:** **Objective** Exploring the association between polymorphisms of the core circadian rhythm gene BMAL1 and environmental interactions on genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** A case-control study design was adopted, enrolling 608 T2DM patients (case group) and 614 healthy controls. General information and biochemical indicators were collected through questionnaires. Genotyping of three SNPs (rs9633835, rs12364562, rs6486122) in the BMAL1 gene was performed using the TaqMan probe method. Logistic regression analysis was used to examine the association between gene polymorphisms and T2DM, and R software was employed to analyze gene-environment interactions. **Results** The T2DM group had higher proportions of smoking and alcohol consumption, as well as higher levels of triglycerides and fasting blood glucose compared to the control group (all  $P < 0.05$ ). Stratified analysis showed that the rs9633835 TT genotype was associated with a reduced risk of T2DM among smokers (adjusted  $OR = 0.518$ , 95%  $CI: 0.303 \sim 0.885$ ,  $P = 0.016$ ), while the rs12364562 GG genotype was associated with an increased risk in the hypertensive population (adjusted  $OR = 1.605$ , 95%  $CI: 1.181 \sim 2.181$ ,  $P = 0.002$ ). The interaction analysis revealed that rs9633835 has a synergistic multiplicative interaction with smok-

\* 基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(2024AH051941);国家级大学生创新创业训练计划项目(202410368064);皖南医学院大学生科研资助金项目(WK2024XS29)

\*\* 通信作者, E-mail: wwc8586@wnmc.edu.cn; fzm2018@wnmc.edu.cn

ing ( $OR = 1.556, 95\% CI: 1.147 \sim 2.109$ ), and rs12364562 also exhibits a multiplicative interaction with hypertension ( $OR = 1.362, 95\% CI: 1.034 \sim 1.796$ ). **Conclusion** The polymorphisms rs9633835 and rs12364562 in the BMAL1 gene may influence the risk of T2DM through interactions with environmental factors, and genotype-specific interventions in populations with smoking and hypertension may have clinical significance.

**KEY WORDS:** BMAL1; Type 2 Diabetes; Hypertension; Smoking; Fasting blood glucose

2型糖尿病(T2DM)是全球范围内的重要公共卫生问题。国际糖尿病联盟预测,2021年全球糖尿病患者约为5.37亿,到2045年可能增至7.83亿<sup>[1]</sup>。该病由遗传与环境因素共同作用引发,其中家族史显著增加患病风险——若父母(尤其母亲)患T2DM,子女患病风险提高40%~70%,直系亲属的终身患病风险是无家族史者的3~6倍<sup>[2]</sup>。尽管全基因组关联研究(GWAS)已发现144个相关遗传变异<sup>[3]</sup>,但仅能解释约10%的遗传度<sup>[4]</sup>,表明其发病机制仍需深入解析。

昼夜节律核心调控因子BMAL1基因最近倍受关注,该基因与Clock基因形成异二聚体,驱动周期基因(PER1-3、CRY1-2)的节律性表达,同时参与能量代谢、脂肪细胞分化及葡萄糖稳态调控<sup>[5]</sup>。在胰腺β细胞中,BMAL1-CLOCK振荡系统通过调节胰岛素分泌影响T2DM发生<sup>[6]</sup>。遗传学证据显示,BMAL1基因多态性与T2DM存在关联:rs6486122位点呈现弱相关性<sup>[7]</sup>,rs7950226变异在欧洲人群中显著相关,且rs7950226-rs11022775单倍型与疾病风险增加有关<sup>[8]</sup>。此外,特定多态性还影响代谢表型,如rs12363415与糖化血红蛋白(HbA1c)水平相关<sup>[9]</sup>。本文深入解析BMAL1基因多态性对揭示疾病机制、开发个体化干预策略的重要意义,有望为T2DM的预防和治疗提供新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究采用病例对照设计,病例组为医院内分泌科确诊的608例T2DM患者,对照组为同期同区域体检中心614例健康个体。病例组纳入标准参照2020年《中国2型糖尿病防治指南》<sup>[10]</sup>:具有典型的糖尿病症状(多饮、多尿、伴有原因不明的体重下降)并加上随机(餐后任意时间,没有刻意不吃饭)血糖 $\geq 11.1$  mmol/L,和/或典型的糖尿病症状加上空腹(禁止摄入食物8h)血糖 $\geq 7.0$  mmol/L,和/或典型的糖尿病症状加上口服葡萄糖耐量试验2h血糖 $\geq 11.1$  mmol/L,和/或典型的糖尿病症状加上糖化血红蛋白(HbA1c) $\geq 6.5\%$ ,和/或规律降糖治疗患者。排除标准:①严重肝、肾、心脑血管疾病患者;②感染性疾病或全身大

动脉疾病患者;③近期服用影响肝功能或升高血糖药物的患者。对照组为与病例组性别、年龄匹配的健康个体,排除严重心、脑、肾疾病及癌症患者。本研究经皖南医学院伦理委员会批准(2022 NO. 14),所有参与者均知情同意。

### 1.2 资料收集

通过自制问卷收集研究对象的一般信息、生活方式、行为习惯及体检数据。总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及空腹血糖(FBG)等由医院检验中心测定。

### 1.3 仪器与试剂

本研究应用的主要仪器与试剂:QuantStudio 7 Flex实时PCR系统(美国Applied Biosystems公司),AU5821全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司),K5800超微量分光光度计(中国北京凯奥),Fast qPCR mix引物和MGB探针(中国南京骥骜生物有限公司)。

### 1.4 SNP选择

BMAL1基因位于染色体11p15.3(基因ID:406;位点NC\_0000011.10),全长110.6kbps,包含27个外显子。从美国国家环境健康科学研究所(NIEHS)SNPinfo网站(SNPINFO, <https://snpinfo.niehs.nih.gov/>)筛选MAF $\geq 0.05$ 的BMAL1基因3个SNPs(rs12364562、rs6486122、rs9633835),采用连锁不平衡(LD)方法选择 $r^2 \geq 0.8$ 的标签SNPs(tagSNPs)作为候选SNPs。

### 1.5 DNA提取和基因分型

采集空腹外周静脉血5mL,使用EDTA抗凝管收集,4h内预处理,3000r/min离心10min,分离血浆后保存于 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱,剩余血样采用蛋白沉淀剂法提取DNA,保存于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱。采用TaqMan探针法在PCR仪进行基因分型和读取结果。反应体系为5 $\mu\text{L}$ ,包含各0.1 $\mu\text{L}$ 上下游引物、0.2 $\mu\text{L}$  TaqMan探针、10ng模板DNA、1.8 $\mu\text{L}$  qPCR混合液及1.8 $\mu\text{L}$ 无酶水。反应条件:50 $^\circ\text{C}$  2min,95 $^\circ\text{C}$  10min,95 $^\circ\text{C}$  15s和60 $^\circ\text{C}$  1min共40个循环。引物和探针序列见表1。

表1 BMAL1 基因位点探针和引物序列

位点	探针和引物序列			
rs9633835	探针	FAM-TTGCTCAAGAATTGCAATGT	VIC-TTGCTCAAGAACTGCAATG	
	引物	5'TGGCTTCAGGACATACAGTAAGA3'	5'GCACCTGGCCAATTTATTATTTT3'	
rs12364562	探针	FAM-CTGGCAAGGCTGA	VIC-CTGGCAAGGCTGA	
	引物	5'ACGTTGCTGTGGAATAAAGTAACTTAT3'	5'CGTGAGGAACAGTTTGGTAGCT3'	
rs6486122	探针	FAM-TTGAGAGATTAATAAGTATGCT	VIC-TTGAGAGACTAATAAGTATG	
	引物	5'CACTTGGATGCCCTCAGTAAATAT3'	5'CGAAGACACTGTGGCATGCT3'	

## 1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以(均数 ± 标准差)表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料以频数(构成比)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;Hardy-Weinberg 平衡(HWE)采用 Fisher 精确  $\chi^2$  检验;采用 logistic 回归分析基因变异与 T2DM 的关联,计算比值比(OR)及 95% 置信区间(CI)。交互作用分析采用 R4.1.3 软件, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 研究对象的基本特征

T2DM 组与对照组的基本特征总结见表 2。两组间年龄、性别、高血压、收缩压、舒张压、TC、HDL-C、LDL-C 水平构成没有统计学差异( $P > 0.05$ );T2DM 组的吸烟、饮酒、TG、FBG 水平高于对照组( $P < 0.05$ )。

表2 研究对象的一般特征

变量	对照组(n=614)	T2DM组(n=608)	$t/\chi^2$	P
年龄/岁	59.68 ± 10.59	59.83 ± 10.61	0.252	0.801
性别[n(%)]				
男	351(57.2)	335(55.1)	0.530	0.466
女	263(42.8)	273(44.9)		
收缩压/mmHg	134.39 ± 17.84	134.12 ± 18.35	0.260	0.795
舒张压/mmHg	77.82 ± 11.07	78.79 ± 12.39	1.448	0.148
TC/(mmol/L)	4.67 ± 3.43	4.53 ± 1.32	0.910	0.363
TG/(mmol/L)	1.71 ± 1.41	2.02 ± 1.96	3.257	0.001
HDL-C/(mmol/L)	1.45 ± 1.9	1.39 ± 0.7	0.755	0.451
LDL-C/(mmol/L)	2.73 ± 1.02	2.81 ± 1.49	1.074	0.283
FBG/(mmol/L)	5.35 ± 1.05	8.59 ± 4.59	16.986	<0.001
高血压[n(%)]				
是	286(46.6)	260(42.8)	1.800	0.180
否	328(23.4)	348(57.2)		
吸烟[n(%)]				
是	39(6.4)	99(16.3)	30.077	<0.001
否	575(93.6)	509(83.7)		
饮酒[n(%)]				
是	38(6.2)	74(12.2)	13.131	<0.001
否	576(93.8)	534(87.8)		

### 2.2 BMAL1 基因多态性与 T2DM 的关联分析

对照组中 rs9633835、rs12364562 和 rs6486122 位点的等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)( $P > 0.05$ )。在总人群中,未发现两组间 BMAL1 3 个位点基因型和等位基因分布频率存在统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 3。

表3 BMAL1 基因 3 个位点多态性各等位基因及基因型频率的分布

基因型	对照组(n=614)	T2DM组(n=608)	$\chi^2$	P	$P_{HWE}$	
rs9633835	CC	193	192	2.845	0.241	0.054
	CT	281	300			
	TT	140	116			
	C	667	684	0.924	0.336	
	T	561	532			
rs12364562	TT	445	415	3.811	0.149	0.240
	TG	151	165			
	GG	18	28			
	T	1041	995	3.814	0.051	
	G	187	221			
rs6486122	TT	230	244	1.267	0.531	0.966
	TC	292	270			
	CC	92	94			
	T	752	758	0.312	0.577	
	C	476	458			

进一步分层分析显示,在吸烟者中,rs9633835 位点 CC、CT、TT 基因型和等位基因在 T2DM 组与对照组间分布频率有统计学差异( $P < 0.05$ ),与 T2DM 患病风险降低相关,校正饮酒状态和 TG 后,相加模型和显性模型的 OR 值(95% CI)分别为 0.518(0.303 ~ 0.885)和 0.364(0.139 ~ 0.954), $P$  值分别为 0.016 和 0.040;在高血压人群中,rs12364562 位点 TT、TG、GG 基因型和等位基因在 T2DM 组与对照组间分布频率有统计学差异( $P < 0.05$ ),与 T2DM 风险增加相关,校正吸烟状态、饮酒状态和 TG 后,相加模型和显性模型的 OR 值(95% CI)分别为 1.605(1.181 ~ 2.181)和 1.711(1.185 ~ 2.471), $P$  值分别为 0.002 和 0.004。结果见表 4。对饮酒、rs6486122 进行分层分析,均未显示两组间基因型分布有统计学差异( $P > 0.05$ )。

表4 rs9633835 在吸烟者中和 rs12364562 在高血压人群中与 T2DM 易感性的关联分析

位点	基因型	T2DM 组	对照组	$\chi^2$	P	OR(95% CI)							
						相加模型	P	显性模型	P	隐性模型	P		
rs9633835	CC	33	6	6.017	0.049	0.518(0.303~0.885)	0.016	0.364(0.139~0.954)	0.040	0.452(0.200~1.024)	0.057		
	CT	46	19										
	TT	20	14										
	C	112	31									6.342	0.012
	T	86	47										
rs12364562	TT	214	165	9.358	0.009	1.605(1.181~2.181)	0.002	1.711(1.185~2.471)	0.004	2.279(0.959~5.417)	0.062		
	TG	64	79										
	GG	8	16										
	T	494	409									10.392	0.001
	G	80	111										

### 2.3 交互作用分析

进一步对有意义的分层变量进行交互作用分析。结果显示,吸烟、高血压与 BMAL1 基因多态性在 T2DM 风险中无相加交互作用。然而, BMAL1 rs9633835 与吸烟存在协同相乘交互作用, OR (95% CI) 为 1.556 (1.147~2.109); BMAL1 rs12364562 与高血压也存在协同相乘交互作用, OR (95% CI) 为 1.362 (1.034~1.796), 见表 5。在控制 rs9633835 与吸烟的交互作用

后:当 rs9633835 = CC 时,吸烟净效益为 OR = 6.469, 当 rs9633835 = CT 时,吸烟净效益为 OR = 2.497, 当 rs9633835 = TT 时,吸烟净效益为 OR = 1.876。在控制 rs12364562 与高血压的交互作用后:当 rs12364562 = TT 时,高血压净效益为 OR = 0.712, 当 rs12364562 = TG 时,高血压净效益为 OR = 1.249, 当 rs12364562 = GG 时,高血压净效益为 OR = 1.667。

表5 吸烟、高血压和 BMAL1 基因多态性与 T2DM 风险的相加和相乘交互作用

交互项目	相加交互*			相乘交互*	
	RERI(95% CI)	AP (95% CI)	S	OR(95% CI)	P
吸烟和 rs9633835	-6.187(-12.346~-0.027)	-18.050(-53.220~17.120)	-0.119(NA)	1.556(1.147~2.109)	0.004
高血压和 rs12364562	1.187(-0.067~2.441)	0.678(0.270~1.026)	-2.353(NA)	1.362(1.034~1.796)	0.028

\* RERI 和 AP 的 95% CI 不包含 0, S 的 95% CI 不包含 1 表示存在相加交互作用;通过 logistic 模型乘法项计算相乘交互作用的 P 值。

### 2.4 BMAL1 基因多态性与 FBG 水平的比较

由于 T2DM 组的血糖水平可能受降糖药物影响,定量性状分析仅针对对照组进行。比较 rs9633835、rs12364562 和 rs6486122 位点不同基因型的 FBG 水平,未发现统计学差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

本研究通过病例对照设计探讨了 BMAL1 基因多态性与 T2DM 遗传易感性的关系。结果显示,在总人群中, BMAL1 基因多态性与 T2DM 无显著关联,但在吸烟者和高血压人群中分别发现 rs9633835 和 rs12364562 位点与 T2DM 患病显著相关。

本研究选择了 3 个位点评估 BMAL1 基因多态性与 T2DM 的相关性,结果显示在总体人群中无显著关联。在亚洲地区, Yamaguchi 等<sup>[11]</sup>在日本的一项多中

心队列研究中探讨了 BMAL1 基因变异与 T2DM 的关联,未观察到显著相关性。在欧洲人群中, Woon 等<sup>[8]</sup>发现 rs7950226 多态性与 T2DM 显著相关,但在多位点校正后,这种关联不再显著。此外, rs7950226 和 rs11022775 的单倍型与 T2DM 相关,但在另一项中国汉族人群研究中未发现相关性,研究者认为,这种结果差异可能由遗传异质性引起<sup>[12]</sup>。尽管另一项欧洲血统的 GWAS 表明 BMAL1 基因 rs6486122 位点与 T2DM 存在弱相关性<sup>[7]</sup>,但在本研究并未得到类似发现。除种族差异外,本研究的样本量较小可能也是导致结果不一致的重要因素。基于大多数先前研究的结果和本研究的发现,我们推测 BMAL1 基因的单一位点突变可能不足以直接影响 T2DM 易感性,遗传易感性还可能受到合并症或不健康生活方式的调节。

本研究进一步基于关联分析进行了分层分析。结果显示,高血压 rs12364562 和吸烟 rs9633835 在 T2DM 遗传易感性中存在显著的相乘交互作用。流行病学证据表明,高血压和 T2DM 是相互影响的危险因素<sup>[13]</sup>。在土耳其的一项全国性调查中发现,67.5% 的 T2DM 患者同时患有高血压,凸显了糖尿病与其他慢性疾病的共存现象<sup>[14]</sup>。在随访超过 8 年的 UKB 队列中,高血压人群的 T2DM 发病率显著高于血压正常人群[(2.42 vs 1.01)/1000 人年]<sup>[15]</sup>。而在参与 Framingham 心脏研究的白人女性中,这一差异可达 10 和 2.8<sup>[16]</sup>。基于本研究结果,rs12364562 与 T2DM 的遗传关联可能受到高血压合并症的调节。rs12364562 与 BMAL1 基因内含子中的 rs12363415 存在强连锁不平衡( $D' = 0.94$ ),而 rs12363415 已被报道与 T2DM 患者的 HbA1c 水平相关<sup>[9]</sup>。此外,本研究发现 rs9633835 在吸烟者中与 T2DM 风险降低相关。不健康的生活方式(如吸烟)在大型 UK Biobank 队列中被证实对 T2DM 风险具有重要影响<sup>[17]</sup>。本研究结果表明,在烟草暴露背景下,BMAL1 与 T2DM 风险降低相关,提示烟草对遗传易感性的调节作用。这一结果进一步证实了基因与环境交互作用在 T2DM 发展中的贡献,提示携带 rs12364562 G 等位基因合并高血压的个体患 T2DM 的风险增加,而携带 rs9633835 T 等位基因合并吸烟的个体患 T2DM 的风险可能降低。尽管高血压和吸烟与 BMAL1 的遗传变异对 T2DM 的易感性存在相乘交互作用,然而,协同交互作用的机制尚不明确。

综上所述,BMAL1 SNP 与 T2DM 的关联在总体人群中不显著,但 rs12364562 和 rs9633835 分别在高血压和吸烟亚组中显示出与 T2DM 的关联。此外,考虑到 T2DM 的复杂性和多基因遗传特征,未来研究应进一步探讨 BMAL1 与其他基因及环境因素的交互作用,以更全面地理解其在 T2DM 发病机制中的作用。

## 参考文献:

- [1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119
- [2] MEIGS J B, CUPPLES L A, WILSON P W. Parental transmission of type 2 diabetes: the framingham offspring study[J]. *Diabetes*, 2000, 49(12): 2201
- [3] MORRIS A P, VOIGHT B F, TESLOVICH T M, et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(9): 981
- [4] MANOLIO T A, COLLINS F S, COX N J, et al. Finding the missing heritability of complex diseases[J]. *Nature*, 2009, 461(7265): 747
- [5] AMENEIRO C, MOREIRA T, FUENTES-IGLESIAS A, et al. BMAL1 coordinates energy metabolism and differentiation of pluripotent stem cells[J]. *Life Sci Alliance*, 2020, 3(5): e201900534
- [6] FSN R, PENG X, XIE L, et al. Importance of Bmal1 in Alzheimer's disease and associated aging-related diseases: Mechanisms and interventions[J]. *Aging Cell*, 2022, 21(10): e13704
- [7] HUANG J, SABATER-LLEAL M, ASSELBRTGS F W, et al. Genome-wide association study for circulating levels of PAI-1 provides novel insights into its regulation[J]. *Blood*, 2012, 120(24): 4873
- [8] WOON P Y, KAISAKI P J, BRAGANCA J, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(36): 14412
- [9] ŠKRLEC I, MILIC J, CILENSEK I, et al. Circadian clock genes and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Gene*, 2019, 701: 98
- [10] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)(上)[J]. *中国实用内科杂志*, 2021, 41(8): 668
- [11] YAMAGUCHI M, UEMURA H, ARISAWA K, et al. Association between brain-muscle-ARNT-like protein-2 (BMAL2) gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in obese Japanese individuals: a cross-sectional analysis of the Japan multi-institutional collaborative cohort study[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2015, 110(3): 301
- [12] 李鹏涛. 线粒体功能基因 MFN2、ESRRA 和生物钟调控基因 Bmal1、Clock 与 2 型糖尿病遗传易感性的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012
- [13] TANAKA A, NODE K. Pathogenic connection between hypertension and type 2 diabetes: how do they mutually affect each other? [J]. *Hypertens Res*, 2022, 45(11): 1840
- [14] SABUNCU T, SONMEZ A, EREN M A, et al. Characteristics of patients with hypertension in a population with type 2 diabetes mellitus. Results from the turkish nationwide survey of glycemic and other metabolic parameters of patients with diabetes mellitus (TEMED hypertension study) [J]. *Prim Care Diabetes*, 2021, 15(2): 332
- [15] SONG Z, YANG R, WANG W, et al. Association of healthy lifestyle including a healthy sleep pattern with incident type 2 diabetes mellitus among individuals with hypertension [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2021, 20(1): 239
- [16] WEI G S, COADY S A, GOFF DC J R, et al. Blood pressure and the risk of developing diabetes in african americans and whites: ARIC, CARDIA, and the framingham heart study [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(4): 873
- [17] YE Z, LI J, GU P, et al. Early-life tobacco smoke exposure, genetic susceptibility and the risk of type 2 diabetes in adulthood: a large prospective cohort study [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 893: 164698

(收稿日期: 2025-03-04)

引文格式:郭振南,祝凯,聂述敏,等. NOC2L、SLFN11 在结直肠癌中的检测及其临床价值研究[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2025,39(5):439-442.

# NOC2L、SLFN11 在结直肠癌中的检测及其临床价值研究\*

郭振南<sup>1</sup>, 祝凯<sup>1</sup>, 聂述敏<sup>2</sup>, 张友俊<sup>1</sup>, 张万里<sup>3\*\*</sup>

(1. 通山县人民医院普外科, 湖北 通山 437600; 2. 通山县人民医院麻醉科; 3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化肿瘤外科)

**摘要:**目的 研究肿瘤组织 NOC2 类核仁相关转录抑制因子(NOC2L)、SLFN11 表达在结直肠癌中的临床价值。方法 实时荧光定量聚合酶链式反应检测直肠癌患者(CRC 组)及结直肠良性疾病患者(对照组)病理组织 NOC2L、SLFN11 表达,采用 Spearman 或 Pearson 相关。预测结直肠癌预后不良效能采用 ROC 分析,预后不良危险因素采用 Cox 回归分析。生存分析采用 K-M 生存模型。结果 CRC 组患者 NOC2L 高于癌旁组织和对照组( $P < 0.05$ ),SLFN11 低于癌旁组织和对照组( $P < 0.05$ )。CRC 组 NOC2L 表达与病理分级、Ki-67、浸润深度、区域淋巴结、远处转移、TNM 分期成正相关( $r > 0, P < 0.05$ ),SLFN11 表达与病理分级、Ki-67、浸润深度、区域淋巴结、远处转移、TNM 分期成负相关( $r < 0, P < 0.05$ )。NOC2L 联合 SLFN11 预测结直肠癌预后不良的敏感度、特异度均高于 NOC2L、SLFN11( $P < 0.05$ )。NOC2L  $\geq 1.15$ 、SLFN11  $\leq 0.68$  为结直肠癌预后不良的独立危险因素( $P < 0.05$ )。NOC2L  $\geq 1.15$  且 SLFN11  $\leq 0.68$  结直肠癌患者中位生存期显著低于 NOC2L  $< 1.15$  或 SLFN11  $> 0.68$  患者( $P < 0.05$ )。结论 NOC2L、SLFN11 表达可为结直肠癌病情及预后评估提供客观证据,两者联合检测可显著提高在结直肠癌预后不良预测中的效能。

**关键词:**结直肠癌;NOC2 类核仁相关转录抑制因子;SLFN11;临床病理特征;临床价值

中图分类号:R735.3

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)04-0439-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025011303



## Detection and Clinical Value of NOC2L and SLFN11 in Colorectal Cancer

GUO Zhen-nan, ZHU Kai, ZHANG Wan-li, et al

(Department of General Surgery, Tongshan County People's Hospital, Tongshan Hubei 437600, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the clinical value of NOC2L and SLFN11 expression in tumor tissues in colorectal cancer. **Methods** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of NOC2L and SLFN11 in pathological tissues of patients with rectal cancer (CRC group) and patients with benign colorectal diseases (control group). Spearman or Pearson correlation was used for correlation analysis. ROC analysis was used to predict the poor prognosis of colorectal cancer, and Cox regression analysis was used for risk factors for poor prognosis. K-M survival model was used for survival analysis. **Results** The NOC2L in CRC group was higher than that in adjacent tissues and control group ( $P < 0.05$ ), while SLFN11 was lower than that in adjacent tissues and control group ( $P < 0.05$ ). In the middle CRC group, NOC2L expression was positively correlated with pathological grade, Ki-67, invasion depth, regional lymph nodes, distant metastasis, and TNM stage ( $r > 0, P < 0.05$ ), while SLFN11 expression was negatively correlated with pathological grade, Ki-67, invasion depth, regional lymph nodes, distant metastasis, and TNM stage ( $r < 0, P < 0.05$ ). NOC2L combined with SLFN11 had higher sensitivity and specificity in predicting poor prognosis of colorectal cancer than those of NOC2L and SLFN11 alone ( $P < 0.05$ ). NOC2L  $\geq 1.15$  and SLFN11  $\leq 0.68$  were independent risk factors for poor prognosis of colorectal cancer ( $P < 0.05$ ). The median survival of colorectal cancer patients with NOC2L  $\geq 1.15$  and SLFN11  $\leq 0.68$  was significantly lower than that of patients with NOC2L  $< 1.15$  or SLFN11  $> 0.68$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of NOC2L and SLFN11 can provide objective evidence for the disease progression and prognosis evaluation of colorectal cancer. The combined detection of the two can significantly improve the efficacy in predicting poor prognosis of colorectal cancer.

**KEY WORDS:** Colorectal cancer; NOC2L; SLFN11; Clinicopathological characteristics; Clinical value

\* 基金项目:湖北省自然科学基金(2020HBA214)

\*\* 通信作者, E-mail: drzhangwanli@hust.edu.cn

结直肠癌发病率高及发病人口基数大而显著增加家庭及国家医疗负担,提高结直肠癌诊疗水平及改善预后为事关国计民生的重大医疗问题<sup>[1]</sup>。结直肠癌发病机制与基因表达异常密切相关,基因检测为结直肠癌诊疗策略制定、疗效评估及药物调整提供精准的基因水平证据<sup>[2]</sup>。NOC2 类核仁相关转录抑制因子(NOC2 like nucleolar associated transcriptional repressor, NOC2L)具有促进肿瘤细胞恶性生物学行为、肿瘤免疫耐受及逃逸等多种功能,其表达上调为多种恶性肿瘤预后不良的危险因素<sup>[3-4]</sup>。Schlafen 家族成员 11 (schlafen family member 11, SLFN11)具有修复损伤脱氧核糖核酸及抑制细胞癌变等功能,为新近发现的肿瘤细胞恶性增殖的负性调控机制<sup>[5-6]</sup>。NOC2L、SLFN11 基因功能及在结直肠癌发病机制中的作用尚未明确,本研究检测结直肠癌肿瘤组织 NOC2L、SLFN11 表达,分析其与临床病理特征的相关性及临床价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择 2020—2022 年本院诊疗的 102 例结直肠癌患者(CRC 组)及 68 例结直肠良性疾病患者(对照组)为研究对象。CRC 纳入标准:①经肠镜或术后病理检查确诊,符合《中国结直肠癌诊疗规范(2020 年版)》诊断标准<sup>[7]</sup>;②有完整的临床病理资料及明确的病史;③经影像学检查或病检明确 TNM 分期;④随访无脱访,均随访至研究终点或死亡;⑤ ECOG 评分 0~2 分;⑥排除合并其他良恶性肿瘤、结直肠转移癌等。对照组包括结直肠炎性疾病 37 例、良性息肉 31 例。两组基线临床资料具有可比性,见表 1,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。本研究经本院医学伦理委员会审核批准(026)。

表 1 两组基线临床资料比较

组别	例数	性别 (男/女)	年龄/岁	ECOG 评分/分	体重指数 (kg/m <sup>2</sup> )	病变位置 (结肠/直肠)	家族史 (有/无)
CRC 组	102	60/42	57.59±7.11	1.53±0.49	22.64±3.07	62/40	9/93
对照组	68	42/26	57.26±7.48	1.51±0.51	22.58±3.12	45/23	7/61

### 1.2 NOC2L、SLFN11 表达检测

CRC 组取肿瘤组织及癌旁组织,对照组取结直肠肠镜活检病变组织。提取两组新鲜病理组织总 RNA 后检测 NOC2L、SLFN11 表达,检测方法为实时荧光定量聚合酶链反应,其中 NOC2L 正向引物为 5'-CG-GCACAAGAAGGACACTTCC-3',反向引物为 5'-TC-

CGTCAAGGTCCACTGCATGA-3';SLFN11 正向引物为 5'-AGCCTGACAACCGAGAAATGGG-3',反向引物为 5'-GGAGTACTACTGGTCTGCTAAGG-3';GAPDH 正向引物为 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3',反向引物为 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 分别计算 NOC2L、SLFN11 相对 GAPDH 表达量,相对表达量越高表示 NOC2L、SLFN11 基因 mRNA 表达水平越高。

### 1.3 预后随访

CRC 组患者每 3 个月随访及复查 1 次,复查内容包括肿瘤标志物、腹部增强 CT 及肠镜等。随访时间终点为 2024 年 12 月,随访患者预后状况(死亡、存活),其中出现肿瘤相关死亡、严重并发症(恶性肠梗阻、恶病质等)定义为预后不良。

### 1.4 统计学方法

采用 Graphpad prism 及 R 语言统计模块进行数据处理及统计分析。均数比较采用 *t* 检验或单因素方差分析(组间比较采用 Holm-Sidak 检验)。计数资料采用  $\chi^2$  检验。采用 ROC 曲线分析 NOC2L 联合 SLFN11 检测的敏感度及特异度。相关性分析采用 Spearman 秩相关或 Pearson 线性相关。多因素 Cox 回归分析结直肠癌死亡的危险因素。生存分析采用 K-M 生存模型并 Log rank 比较。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NOC2L、SLFN11 表达比较

CRC 组肿瘤组织 NOC2L 表达高于 CRC 组癌旁组织和对照组( $P < 0.05$ ),SLFN11 表达低于癌旁组织和对照组( $P < 0.05$ )。癌旁组织和对照组 NOC2L、SLFN11 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 NOC2L、SLFN11 表达比较

组织	例数(n)	NOC2L	SLFN11
CRC 组肿瘤组织	102	1.15±0.21*#	0.68±0.12*#
CRC 组癌旁组织	102	0.74±0.13#	0.97±0.15#
对照组病理组织	68	0.73±0.15	0.96±0.13

与 CRC 组癌旁组织比较,\* $P < 0.05$ ;与对照组比较,# $P > 0.05$ 。

### 2.2 结直肠癌 NOC2L、SLFN11 表达与临床病理特征的关系

CRC 组肿瘤组织 NOC2L、SLFN11 表达在病理分级、Ki-67、浸润深度、区域淋巴结、远处转移、TNM 分期中的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。中低分化、Ki-

67 ≥ 70%、浸润深度 T3 ~ T4、区域淋巴结 N3、远处转移 M1 及 TNM 分期 III ~ IV 期患者 NOC2L 表达高于高分化、Ki-67 < 70%、浸润深度 T1 ~ T2、区域淋巴结 N0 ~ N2、远处转移 M0 及 TNM 分期 I ~ II 期患者 ( $P < 0.05$ ), SLFN11 表达低于高分化、Ki-67 < 70%、浸润深度 T1 ~ T2、区域淋巴结 N0 ~ N2、远处转移 M0 及 TNM 分期 I ~ II 期患者 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 NOC2L、SLFN11 表达与结直肠癌临床病理特征的关系

临床病理特征		例数(n)	NOC2L	SLFN11	P
性别	男	60	1.13 ± 0.19	0.66 ± 0.11	0.745
	女	42	1.16 ± 0.23	0.69 ± 0.14	
年龄	≥55 岁	66	1.17 ± 0.22	0.67 ± 0.12	0.811
	<55 岁	36	1.13 ± 0.24	0.69 ± 0.13	
病变位置	结肠	62	1.16 ± 0.23	0.66 ± 0.11	0.901
	直肠	40	1.14 ± 0.18	0.70 ± 0.14	
病理类型	腺癌	92	1.14 ± 0.19	0.69 ± 0.13	0.843
	其他	10	1.17 ± 0.23	0.66 ± 0.10	
病理分级	高分化	50	1.11 ± 0.16	0.72 ± 0.13	0.031
	中低分化	52	1.19 ± 0.19	0.62 ± 0.08	
Ki-67	<70%	59	1.11 ± 0.09	0.72 ± 0.11	0.016
	≥70%	43	1.21 ± 0.23	0.61 ± 0.09	
浸润深度	T1-T2	40	1.09 ± 0.12	0.74 ± 0.12	<0.001
	T3-T4	62	1.22 ± 0.19	0.60 ± 0.08	
区域淋巴结	N0-N2	70	1.07 ± 0.11	0.75 ± 0.13	<0.001
	N3	32	1.25 ± 0.24	0.59 ± 0.07	
远处转移	M0	83	1.06 ± 0.14	0.76 ± 0.15	<0.001
	M1	19	1.24 ± 0.25	0.59 ± 0.07	
TNM 分期	I ~ II 期	67	1.09 ± 0.16	0.73 ± 0.13	<0.001
	III ~ IV 期	35	1.22 ± 0.24	0.61 ± 0.08	

### 2.3 结直肠癌 NOC2L、SLFN11 表达与临床病理特征的相关性

CRC 组 NOC2L 表达与病理分级、Ki-67、浸润深度、区域淋巴结、远处转移、TNM 分期成正相关(相关系数  $r > 0$ ,  $P < 0.05$ ), SLFN11 表达与病理分级、Ki-67、浸润深度、区域淋巴结、远处转移、TNM 分期成负相关(相关系数  $r < 0$ ,  $P < 0.05$ ), 见表 4。

表 4 结直肠癌 NOC2L、SLFN11 表达与临床病理特征的相关性

临床病理特征	NOC2L		SLFN11	
	r	P	r	P
病理分级	0.717	0.006	-0.639	0.031
Ki-67	0.658	0.014	-0.684	0.028
浸润深度	0.684	0.027	-0.689	0.003
区域淋巴结	0.692	0.009	-0.632	0.027
远处转移	0.683	0.021	-0.617	0.042
TNM 分期	0.681	0.036	-0.628	0.003

### 2.4 NOC2L 联合 SLFN11 预测结直肠癌患者预后不良效能

NOC2L 联合 SLFN11 预测结直肠癌患者预后不

良的敏感度、特异度及 AUC 显著高于 NOC2L、SLFN11 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。

表 5 NOC2L、SLFN11 预测结直肠癌预后不良的效能

检测指标	敏感度	特异度	P	AUC	S.E	95% CI
NOC2L	0.611	0.592	0.017	0.633	0.074	0.426 ~ 1.025
SLFN11	0.604	0.612	0.025	0.618	0.067	0.409 ~ 1.117
NOC2L 联合 SLFN11	0.858	0.877	0.003	0.865	0.109	0.452 ~ 1.203

### 2.5 结直肠癌预后不良危险因素分析

多因素 Cox 回归分析显示 NOC2L ≥ 1.15、SLFN11 ≤ 0.68、病理分级中低分化、Ki-67 ≥ 70%、浸润深度 T3-T4、区域淋巴结 N3、远处转移 M1 及 TNM 分期 III 期-IV 期预后不良的独立危险因素 ( $P < 0.05$ ), 见表 6。

表 6 结直肠癌死亡危险因素多因素 Cox 回归分析

因素	赋值	B	SE	Wald $\chi^2$	Exp(B)	95% CI	P
NOC2L ≥ 1.15	<1.15=0, ≥1.15=1	1.149	0.126	17.512	3.155	1.146 ~ 5.164	0.027
SLFN11 ≤ 0.68	>0.68=0, ≤0.68=1	1.057	0.118	16.459	2.878	1.089 ~ 4.667	0.031
病理分级	高分化=0, 中低分化=1	0.466	0.064	15.122	1.594	1.054 ~ 2.133	0.014
Ki-67	<70%=0, ≥70%=1	0.512	0.077	14.065	1.669	1.092 ~ 2.245	0.029
浸润深度	T1-T2=0, T3-T4=1	0.709	0.089	15.491	2.032	1.056 ~ 3.008	0.045
区域淋巴结	N0-N2=0, N3=1	0.835	0.101	13.684	2.305	1.142 ~ 3.468	0.028
远处转移	M0=0, M1=1	1.011	0.109	15.877	2.748	1.113 ~ 4.384	0.019
TNM 分期	I ~ II 期=0, III ~ IV 期=1	0.945	0.097	13.674	2.573	1.045 ~ 4.101	0.037

### 2.6 NOC2L、SLFN11 表达与结直肠癌生存期关系

本研究至随访终点时 CRC 组存活 71 例, 死亡 31 例。NOC2L ≥ 1.15 且 SLFN11 ≤ 0.68 结直肠癌患者中位生存期为 (31.02 ± 3.43) 月, NOC2L < 1.15 或 SLFN11 > 0.68 结直肠癌患者中位生存期为 (38.77 ± 4.02) 月, NOC2L ≥ 1.15 且 SLFN11 ≤ 0.68 结直肠癌患者中位生存期显著低于 NOC2L < 1.15 或 SLFN11 > 0.68 患者 (Log Rank = 15.165,  $P < 0.001$ ), 见图 1。

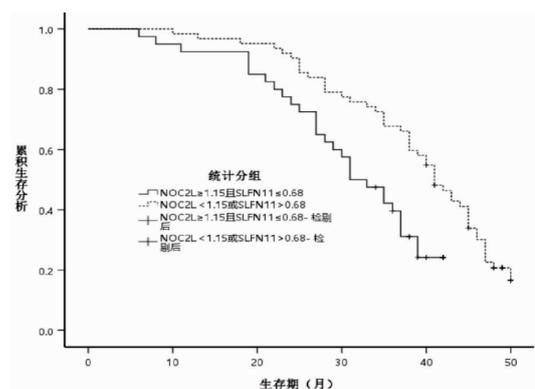


图 1 肿瘤组织 NOC2L、SLFN11 表达与结直肠癌生存期 K-M 生存曲线

### 3 讨论

NOC2L可通过乙酰化 P53 基因抑制其抑癌基因功能而发挥促癌基因作用,越来越多的研究发现 NOC2L/P53 信号通路在肿瘤细胞恶性生物学行为、肿瘤微环境改变及微血管生成中具有至关重要的作用<sup>[8]</sup>。TCGA 数据库生物信息学研究表明 NOC2L 在乳腺癌、胰腺癌及舌鳞癌中表达上调<sup>[9]</sup>。凡丹丹等<sup>[4]</sup>发现喉癌患者肿瘤组织 NOC2L 表达显著上调且与生存期及预后等因素相关。NOC2L 作为新近发现的基因其功能尚未明确,基于目前 NOC2L 功能的研究进展推测其可能在结直肠癌中具有促癌基因功能。本研究发现结直肠癌患者 NOC2L 表达显著升高,与 TNM 分期等病情严重程度指标、预后及生存期密切相关,提示 NOC2L 基因在结直肠癌发病机制具有重要作用,可为其病情及预后评估提供客观证据。

SLFN11 基因在各种因素诱导产生 DNA 损伤时通过与 RPA1 交互作用结合至损伤位点,抑制细胞周期激活并同源重组修复损伤的 DNA 而维持基因 DNA 完整性,SLFN11 基因功能下降可导致细胞过度增殖及基因突变<sup>[10]</sup>。越来越多的研究证实 SLFN11 基因与肿瘤细胞恶性生物学行为、肿瘤免疫逃避耐受及化疗药物耐药等密切相关,SLFN11 低表达为肿瘤预后不良的危险因素,为恶性肿瘤诊疗策略制定、方案调整等潜在的基因水平标志物<sup>[11-12]</sup>。Zhou 等<sup>[13]</sup>体外实验发现 SLFN11 通过 mTOR 途径靶向 RPS4X 抑制肝细胞癌的肿瘤发生和转移。Miladinov 等<sup>[14]</sup>采用酶联免疫吸附法检测 155 例结直肠癌患者血清 SLFN11 蛋白表达,发现 SLFN11 水平显著下调且与死亡风险负相关。目前结直肠癌中 SLFN11 基因表达与临床病理特征、病情及预后的关系研究极少,本研究发现结直肠癌患者 SLFN11 表达显著降低且为预后不良的危险因素,提示 SLFN11 基因为结直肠癌病情及预后评估潜在的标志物。

目前结直肠癌病情及预后评估的主要指标为 CA199 等肿瘤标志物及基于增强 CT 评估的 TNM 分期,存在临床应用敏感度低、普适性差及滞后性强等不足,尤其不适合于无实体瘤的根治术后结直肠癌患者,探索可重复性强的新型标志物为临床亟待解决的重大问题<sup>[15-16]</sup>。随着基因检测技术显著进步及在临床中的应用推广,越来越多的研究证实在结直肠癌中的敏感度及特异度高于影像学分期等传统指标,具有可重复性强、简单快捷及效费比高等优势<sup>[17-18]</sup>。当前单个基因指标检测尚存在无法兼顾敏感度及特异度等缺点,理论上多个指标联合检测可提高敏感度及特

异度,其中两个指标联合检测具有临床应用价值高而费效比低等优点<sup>[19-20]</sup>。本研究中,SLFN11 联合 NOC2L 预测结直肠癌患者预后不良效能显著高于 NOC2L、SLFN11,表明 SLFN11 联合 NOC2L 检测可显著提高其在结直肠癌预后不良预测中的效能,在临床应用中应将两者紧密结合以提高敏感度及特异度。

综上所述,结直肠癌患者 NOC2L、SLFN11 表达与临床病理特征、预后不良及生存期显著相关,为结直肠癌病情及预后评估的标志物,两者联合检测可显著提高在结直肠癌预后不良预测中的效能。值得注意的是,本研究存在检测指标仍依赖于结直肠癌肿瘤标本及纳入研究对象少等不足,SLFN11 联合 NOC2L 检测在结直肠癌中的临床价值有待于大规模临床试验探索。

### 参考文献:

- [1] 朱德祥,任黎,许剑民. 中国结直肠癌肝转移诊断和综合治疗指南(2023 版)[J]. 中国普通外科杂志,2023,32(1):1
- [2] 许云,费宇彤,陈楠,等. 结直肠癌化疗期中医疗指南[J]. 北京中医药,2023,42(4):348
- [3] 周林,鲁号锋,东富强,等. 胰腺癌外周血 miR-122-5p、NOC2L 表达与临床病理特征及预后的相关性[J]. 疑难病杂志,2024,23(11):1297
- [4] 凡丹丹,高芳芳,邹婧,等. 喉癌肿瘤组织 NOC2L、p53 表达及其临床价值研究[J]. 疑难病杂志,2024,23(10):1177
- [5] KACZOROWSKI M, YLAYA K, CHŁOPEK M, et al. Immunohistochemical evaluation of schlafen 11 (SLFN11) expression in cancer in the search of biomarker-informed treatment targets: a study of 127 entities represented by 6658 tumors[J]. Am J Surg Pathol, 2024, 48(12): 1512
- [6] MU A, OKAMOTO Y, KATSUKI Y, et al. The role of SLFN11 in DNA replication stress response and its implications for the Fanconi anemia pathway[J]. DNA Repair (Amst), 2024, 141: 103733
- [7] 中国结直肠癌诊疗规范(2020 年版)[J]. 中国实用外科杂志, 2020, 40(6): 601
- [8] LI Y, WANG L, LIU X, et al. NIR promotes progression of colorectal cancer through regulating RB[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2021, 1868(1): 118856
- [9] XU L, TAN A C, WINSLOW R L, et al. Merging microarray data from separate breast cancer studies provides a robust prognostic test[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9: 125
- [10] METZNER F J, WENZL S J, KUGLER M, et al. Mechanistic understanding of human SLFN11[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 5464
- [11] ZHANG B, STEWART C A, WANG Q, et al. Dynamic expression of Schlafen 11 (SLFN11) in circulating tumour cells as a liquid biomarker in small cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 2022, 127(3): 569
- [12] WINKLER C, KING M, BERTHE J, et al. SLFN11 captures cancer-immunity interactions associated with platinum sensitivity in high-grade serous ovarian cancer[J]. JCI Insight, 2021, 6(18): e146098

(下转第 447 页)

引文格式:张孟,朱静,赵欣.健康教育结合营养干预在慢阻肺肺部感染患者中的应用效果评价[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):443-447.

## 健康教育结合营养干预在慢阻肺肺部感染患者中的应用效果评价

张孟,朱静,赵欣

(蚌埠医科大学第一附属医院急诊内科,安徽蚌埠233000)

**摘要:**目的 探究基于跨理论模型的健康教育结合营养干预在慢阻肺肺部感染患者中的应用效果。方法 将本院收治的90例慢阻肺肺部感染患者,根据随机表法划分为对照组( $n=45$ )和观察组( $n=45$ ),对照组实施标准的营养干预策略,观察组实施基于跨理论模型的健康教育结合营养干预方案。分别于干预前及干预后14d,观察两组营养状况,免疫功能 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 水平,血气指标二氧化碳分压( $PaCO_2$ )、动脉血氧分压( $PaO_2$ )、酸碱度(pH)指标水平,以及护理依从性。结果 干预后14d,两组ALB和PA指标均升高,且观察组高于对照组,两组NRS2002评分均下降,且观察组低于对照组( $P<0.05$ );两组 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 水平均提高,且观察组高于对照组( $P<0.05$ );两组 $PaCO_2$ 水平均降低,且观察组低于对照组,两组 $PaO_2$ 及pH指标水平均升高,且观察组高于对照组( $P<0.05$ );干预后观察组依从性良好率95.56%优于对照组82.22%( $P<0.05$ )。结论 通过改善营养状态、增强免疫功能、优化血气分析指标以及提高依从性,基于跨理论模型的健康教育结合营养干预在慢阻肺肺部感染患者中取得了显著的应用效果。

**关键词:**跨理论模型;健康教育;营养干预;慢阻肺肺部感染

中图分类号:R563

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0443-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025030512



## Evaluation of the Effect of Health Education Combined with Nutritional Intervention in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Infection

ZHANG Meng, ZHU Jing, ZHAO Xin

(Emergency Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu Anhui 233000, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the application effect of health education based on the Transtheoretical Model combined with nutritional intervention in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung infection. **Methods** Ninety patients with COPD and lung infection admitted to our hospital were enrolled and divided into a control group ( $n=45$ ) and a study group ( $n=45$ ). The control group received a standard nutritional intervention strategy, while the study group received a transtheoretical model-based health education combined with nutritional intervention. Nutritional status (serum albumin (ALB), prealbumin (PA) levels, Nutritional Risk Screening 2002 score (NRS2002)), immune function ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ , and  $CD4^+/CD8^+$  levels), blood gas indicators (partial pressure of carbon dioxide ( $PaCO_2$ ), partial pressure of arterial oxygen ( $PaO_2$ ), and pH levels), as well as nursing compliance, were observed before and 14 days after the intervention in both groups. **Results** 14 days after the intervention, ALB and PA levels increased in both groups, with those in the study group higher than those in the control group. The NRS2002 scores decreased in both groups, with lower scores in the study group ( $P<0.05$ ).  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ , and  $CD4^+/CD8^+$  levels increased in both groups, with higher levels in the study group ( $P<0.05$ ).  $PaCO_2$  levels decreased in both groups, with lower levels in the study group.  $PaO_2$  and pH levels increased in both groups, with higher levels in the study group ( $P<0.05$ ). After the intervention, the compliance rate was 95.56% in the study group, which was higher than that in the control group (82.22%) ( $P<0.05$ ). **Conclusion** By improving nutritional status, enhancing immune function, optimizing blood gas analysis indicators, and increasing compliance, health education combined with nutritional intervention based on the transtheoretical model has achieved significant results in patients with COPD and lung infections.

**KEY WORDS:** Transtheoretical model; Health education; Nutritional intervention; Chronic obstructive pulmonary disease and lung infection

慢性阻塞性肺疾病(COPD),又称慢阻肺,是一种以持续气流受限为特征的慢性支气管炎或肺气肿,常伴随肺心病和呼吸衰竭等并发症,给患者的生命质量带来显著影响<sup>[1]</sup>。慢阻肺的主要症状包括慢性咳嗽、咳痰和呼吸困难,尤其在活动后呼吸困难表现尤为显著。该病多发于中老年人,长期吸烟、职业性粉尘和化学物质接触、空气污染以及有慢阻肺家族史等因素是主要的高危人群<sup>[2]</sup>。据世界卫生组织估计,全球约有3.28亿人患有慢阻肺,已成为全球第三大死亡原因,且其致残率和病死率较高<sup>[3]</sup>。在我国,慢阻肺患者人数约1亿,已经成为与高血压和糖尿病并列的主要慢性疾病之一,给无数家庭带来沉重的经济负担<sup>[4]</sup>。尽管慢阻肺的预防和治疗方法不断改进,但其高患病率和高致死率依然是全球公共卫生面临的重大挑战。目前,公众对慢阻肺的认知仍较低,肺功能检查和规范治疗的普及率不高,这进一步加剧了疾病的危害性<sup>[5]</sup>。跨理论模型(TTM)作为一种成熟的行为改变理论,提供了理论框架来指导个体在不同阶段进行健康行为的改变。本研究旨在结合TTM与营养干预,探索其在改善慢阻肺肺部感染患者健康状况中的应用效果。

## 1 资料与方法

### 1.1 纳入排除标准

纳入标准:①符合中华医学会呼吸病学分会制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2021年修订版)》<sup>[6]</sup>中诊断标准,且经影像学检查确诊;②出现肺部感染指征;③临床资料完整;④患者意识清晰能够配合完成本研究;⑤患者及家属知情同意本研究。

排除标准:①合并恶性肿瘤及其他呼吸系统疾病者;②既往胸外科手术史;③重要脏器功能衰竭者;④语言及听力障碍者;⑤精神疾病者。

### 1.2 一般资料

纳入2022年4月至2024年3月间,本院收治的90例慢阻肺肺部感染患者,依据随机数字表法进行分组,各45例。两组基础资料相当( $P > 0.05$ ),具体见表1。

表1 两组基础资料比较

组别	例数	性别		平均年龄/岁	平均病程/年
		男	女		
观察组	45	26(57.78)	19(42.22)	67.53±8.09	3.87±1.44
对照组	45	24(53.33)	21(46.67)	68.04±9.21	3.91±1.49

### 1.3 方法

两组均依据具体病情接受包括常规吸氧、抗感染

措施、支气管扩张治疗及祛痰等在内的综合治疗方案。

对照组实施标准的营养干预策略,即患者入院后,由医护人员与专业营养师共同口头阐述饮食指导原则,并建议采取分餐制,即少量多次进食。饮食结构上,推荐以碳水化合物、蛋白质、脂肪按5:2:3摄入,同时鼓励增加富含维生素的果蔬类食品的摄入量。

观察组实施基于跨理论模型的健康教育结合营养干预方案,具体如下。

(1)跨理论模型的健康教育。①前意向阶段。评估患者认知:首先,医护人员需要评估患者对慢阻肺和肺部感染相关知识的了解程度,以及他们对改变不良生活习惯的意愿;建立信任关系:通过耐心的倾听和同理心的沟通,与患者建立信任关系,为后续的健康教育奠定基础;提供基础信息:向患者介绍慢阻肺和肺部感染的基本知识,包括病因、症状、治疗方法等,同时强调改变不良生活习惯的重要性。②意向阶段。激发内在动机:通过分享成功案例、数据对比等方式,激发患者改变不良生活习惯的内在动机;制定初步计划:与患者共同制定行为改变的初步计划,如戒烟、限酒、改善饮食习惯等;提供情感支持:医护人员需要给予患者情感上的支持,帮助患者克服改变过程中的困难和挑战。③准备阶段。细化计划:根据患者的具体情况,细化行为改变的计划,包括时间、地点、方式等;提供技能培训:为患者提供戒烟技巧、营养搭配等技能培训,帮助其更好地执行计划;设定明确目标:与患者共同设定短期和长期目标,以衡量行为改变的进展和效果。④行动阶段。监督执行情况:定期与患者沟通,监督其行为改变的执行情况,及时给予反馈和建议;调整计划:根据患者的实际情况和反馈,适时调整行为改变计划,确保其可行性和有效性;提供持续鼓励:及时给予患者鼓励和支持,增强其坚持行为改变的信心和动力。⑤维持阶段。巩固成果:帮助患者巩固行为改变的成果,防止其回到不良生活习惯;定期随访:定期进行随访和评估,了解患者的病情变化和行为习惯;提供持续支持:为患者提供持续的健康咨询和心理支持,帮助他们保持健康的生活方式。

(2)营养干预。①饮食调理。制定个性化食谱:根据患者的营养需求和病情,为其制定个性化的食谱,确保摄入足够的蛋白质、维生素和矿物质等营养物质;高蛋白食物:如鱼、肉、蛋、奶等,有助于维持患者的肌肉量和免疫功能;高维生素食物:如新鲜蔬菜和水果,富含维生素C、维生素E等抗氧化物质,有助于减轻肺部炎症和损伤;矿物质补充:如钙、铁、锌等,有助于维持患者的骨骼健康和免疫功能;避免刺激性食物:叮嘱患者避免食用辛辣、油腻、易产气等刺激性食物,以免

加重气喘和腹部饱胀感;少量多餐:鼓励患者采用少量多餐的饮食方式,减轻胃肠道负担,提高营养吸收效率。②营养补充。蛋白质补充:慢阻肺患者由于呼吸困难和咳嗽等症状,容易导致能量消耗增加和营养不良。因此,需要适量补充蛋白质,如蛋白粉、牛奶等,以维持身体正常的生理功能;维生素和矿物质补充:慢阻肺患者容易缺乏维生素D、钙等营养素,需要适量补充以维持骨骼健康和免疫功能。③饮食教育。讲解营养知识:向患者及其家属讲解营养知识,包括各种营养素的作用、食物来源等,提高患者对营养干预的认识和重视程度;指导烹饪方法:提供简单易行的烹饪方法,如清蒸、炖煮等,帮助患者更好地制作健康美味的餐食。④监测与评估。定期监测:定期监测患者的体重、营养状况等指标,以及时发现并纠正营养不良等问题;评估效果:根据监测结果和患者的反馈,评估营养干预的效果,并适时调整干预方案。

#### 1.4 观察指标

(1)营养状况:分别于干预前及干预后14d,采用全自动生化仪测量患者血清白蛋白(ALB)、前白蛋白(PA)指标情况。采用营养风险筛查2002(NRS2002)<sup>[7]</sup>量表评估营养风险,总评分涵盖疾病严重性、营养状态恶化程度及年龄三个维度,若NRS2002的总评分 $\geq 3$ 分,则判定为患者存在营养风险。

(2)免疫功能:在干预前及干预后14d的清晨空腹时段,各采集患者外周静脉血5mL,运用流式细胞技术测定T淋巴细胞中的CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平。

(3)血气指标:采用动脉血气分析仪测量二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)以及酸碱度(pH)指标水平。

(4)依从性<sup>[8]</sup>:将患者完全配合临床工作人员的工作安排、严格遵循医嘱、无负面情绪和恐惧心理等表现视为依从性高;对于愿意接受指导但略有犹豫,经适度提醒后能够配合的患者,视为依从性一般;而对于不积极合作、有显著抵触情绪,或完全不配合的患者,则视为依从性差。依从性良好率=(高依从性+依从性一般)/总人数 $\times 100\%$ 。

#### 1.5 统计学方法

使用SPSS 26.0分析处理数据,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )描述,行t检验;计数资料用[n(%)]表示,行 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 视为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 两组营养状况比较

干预后14d,两组ALB和PA指标均升高,且观察

组高于对照组,两组NRS2002评分均下降,且观察组低于对照组( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 两组营养状况比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	ALB(g/L)		PA(mg/L)		NRS2002评分/分	
		干预前	干预后14d	干预前	干预后14d	干预前	干预后14d
观察组	45	31.23 $\pm$ 4.36	37.67 $\pm$ 5.14 <sup>*#</sup>	147.64 $\pm$ 12.53	175.26 $\pm$ 15.83 <sup>*#</sup>	2.53 $\pm$ 0.89	1.49 $\pm$ 0.51 <sup>*#</sup>
对照组	45	30.94 $\pm$ 4.22	33.53 $\pm$ 4.91 <sup>*</sup>	145.82 $\pm$ 12.48	157.28 $\pm$ 15.43 <sup>*</sup>	2.51 $\pm$ 0.92	1.84 $\pm$ 0.47 <sup>*</sup>

与同组干预前比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 两组免疫功能比较

干预后14d,两组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>水平平均提高,且观察组高于对照组( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 两组免疫功能比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	CD3 <sup>+</sup> /%		CD4 <sup>+</sup> /%		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	
		干预前	干预后14d	干预前	干预后14d	干预前	干预后14d
观察组	45	53.87 $\pm$ 4.47	67.92 $\pm$ 5.32 <sup>*#</sup>	27.42 $\pm$ 2.64	38.33 $\pm$ 3.42 <sup>*#</sup>	1.03 $\pm$ 0.36	1.85 $\pm$ 0.23 <sup>*#</sup>
对照组	45	54.25 $\pm$ 4.52	63.74 $\pm$ 5.91 <sup>*</sup>	27.83 $\pm$ 2.71	36.41 $\pm$ 3.75 <sup>*</sup>	1.01 $\pm$ 0.34	1.49 $\pm$ 0.22 <sup>*</sup>

与同组干预前比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 两组血气指标比较

干预后14d,两组PaCO<sub>2</sub>水平均降低,PaO<sub>2</sub>及pH指标水平均升高,且观察组变化大于对照组( $P < 0.05$ )。见表4。

表4 两组血气指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	PaCO <sub>2</sub> /mmHg		PaO <sub>2</sub> /mmHg		pH	
		干预前	干预后14d	干预前	干预后14d	干预前	干预后14d
观察组	45	53.71 $\pm$ 7.34	41.92 $\pm$ 5.48 <sup>*#</sup>	66.42 $\pm$ 5.83	84.27 $\pm$ 4.62 <sup>*#</sup>	7.12 $\pm$ 0.12	7.39 $\pm$ 0.17 <sup>*#</sup>
对照组	45	54.26 $\pm$ 7.56	48.74 $\pm$ 5.79 <sup>*</sup>	67.83 $\pm$ 5.92	79.48 $\pm$ 5.45 <sup>*</sup>	7.11 $\pm$ 0.14	7.26 $\pm$ 0.16 <sup>*</sup>

与同组干预前比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.4 两组依从性比较

干预后,观察组依从性良好率95.56%优于对照组82.22%( $P < 0.05$ )。见表5。

表5 两组依从性比较[n(%)]

组别	例数	依从性高	依从性一般	依从性差	良好率
观察组	45	28(62.22)	15(33.33)	2(4.44)	43(95.56) <sup>*</sup>
对照组	45	16(35.56)	21(46.67)	8(17.78)	37(82.22)

与对照组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

慢阻肺患者的肺部感染症状多样且严重,包括发热、咳嗽、咳黄脓痰、胸闷、气喘以及呼吸困难等。在

病情严重时,患者可能出现呼吸衰竭,表现为全身皮肤黏膜紫绀、头痛、头晕甚至昏迷。对于这部分患者,需要积极的抗炎、抗感染治疗,并配合解痉平喘、止咳、祛痰、雾化、氧疗等综合处理,在必要时,还需使用呼吸机辅助通气,以改善患者缺氧的状况<sup>[9]</sup>。慢阻肺的患病率和病死率在我国居高不下,且呈上升趋势,这主要与吸烟、生物燃料暴露、空气污染等危险因素密切相关,受教育程度、幼儿期慢性咳嗽、家族呼吸系统疾病史和体质指数等因素亦有影响<sup>[10]</sup>。针对不同的暴露因素,应制定相应的预防措施以降低慢阻肺的患病率。此外,慢阻肺肺部感染患者还面临着诊断率低、治疗不规范等问题,由于肺功能检查的可及性相对有限,普通人群对慢阻肺的认识不足,导致诊断率低。同时,在医疗服务和药物供应的可及性方面也存在明显的区域差异,使得部分患者无法获得及时有效的治疗,因此,需要进一步提高慢阻肺的诊断率、药物治疗的可及性和患者自我管理能力和在各级医疗机构中对慢阻肺的诊疗指南进行推广,使慢阻肺的诊治更加规范。

跨理论模型(TTM)作为一种行为改变理论,为健康教育提供了坚实的理论基础,它强调个体在行为改变过程中的不同阶段和动机,为制定个性化的健康教育提供了有力的理论框架<sup>[11]</sup>。该模型强调个体在改变健康行为过程中经历的各个阶段,包括前意向阶段、意向阶段、准备阶段、行动阶段和维持阶段。通过这一框架,可以为慢阻肺患者提供更加系统且有针对性的健康教育干预,帮助他们在每个阶段采取相应的措施,从而实现行为改变和健康改善。在本研究中,我院利用 TTM 对患者进行深入的评估,识别其所处的行为改变阶段,并根据其需求提供针对性的健康教育。这种个性化的教育方式不仅提高了患者对营养干预的认知和接受度,还促进了健康行为的形成和维持。同时,根据患者的营养评估结果,制定个性化的饮食计划,确保患者获得充足的能量、蛋白质、维生素和矿物质等营养素,以支持身体的修复和免疫功能的提升。

本研究结果显示,在干预后 14d,两组患者的 ALB 和 PA 指标均有所升高,且观察组的升高幅度显著高于对照组,与卢小雨等<sup>[12]</sup>研究相似。ALB 和 PA 是反映机体营养状况的重要指标,它们的升高表明营养干预有效改善了患者的营养状态。这一改善不仅有助于维持患者的肌肉质量和免疫功能,还减少了感染的风险,为后续的康复奠定了基础。充足的蛋白质摄入对于修复受损的肺组织、维持呼吸肌功能至关重要。同时,维生素和矿物质的补充也促进了免疫细胞的增殖和分化,提高了机体的免疫力。与此同时,两组患

者的 NRS2002 评分均有所下降,且观察组患者的下降幅度更大,与张继华等<sup>[13]</sup>研究一致。NRS2002 评分是评估住院患者营养风险的有效工具,其下降表明患者的营养风险得到了有效控制,这一结果进一步证实了 TTM 健康教育结合营养干预在降低患者营养风险方面的有效性。

在免疫功能方面,两组患者的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 水平均有所提高,且观察组患者的提高幅度更为显著,与马升军等<sup>[14]</sup>研究相似。这些免疫细胞是机体抵抗外部病原体的重要防线,免疫细胞指标水平的升高表明营养干预有效增强了患者的免疫功能。营养状态的改善不仅直接影响了免疫细胞的增殖和分化,还通过减少感染风险、维持呼吸道完整性等间接途径增强了免疫功能,这一改善不仅有助于减少肺部感染的发生,还提高了患者对抗疾病的能力。此外,TTM 健康教育通过提高患者对健康行为的认知,促进了健康行为的形成和维持,这也有助于增强免疫功能。

血气分析指标的结果显示,两组患者的 PaCO<sub>2</sub> 均有所降低,而 PaO<sub>2</sub> 及 pH 值均有所升高,且观察组患者的改善程度更为显著,与冯辽辽等<sup>[15]</sup>研究相符。这些指标的改善反映了患者呼吸功能的优化和酸碱平衡的维持。营养状态的改善有助于支持呼吸肌的功能,提高肺部的通气效率,从而减少二氧化碳的滞留,增加氧气的利用。同时,肺组织的修复和再生也改善了肺部的气体交换功能,进一步提高了血气分析指标。值得注意的是,干预后观察组患者的依从性良好率高达 95.56%,显著优于对照组的 82.22%。这一结果表明 TTM 健康教育在提高患者依从性方面的有效性,通过识别患者所处的行为改变阶段,提供了符合其需求的教育策略,使患者更容易理解和接受。同时,持续的心理支持和家庭、社会的参与也增强了患者的积极性和自信心,提高了他们的依从性。这种多维度的支持网络使得观察组患者在干预过程中保持了高度的参与度和积极性。

综上所述,基于跨理论模型的健康教育结合营养干预在慢阻肺肺部感染患者中取得了显著的应用效果。通过改善营养状态、增强免疫功能、优化血气分析指标以及提高依从性,该干预方案为患者带来了全面的健康益处。同时,本研究还存在一些局限性,样本量相对较小,可能限制了结果的普遍性和可靠性。未来,将进一步扩大样本量,深入研究 TTM 在不同患者群体中的适用性,并优化健康教育内容和方法,以期 COPD 肺部感染患者提供更加精准、有效的健康管理服务。

## 参考文献:

- [1] 段先红. 慢性阻塞性肺疾病合并肺结核患者护理工作中采用综合护理干预的临床效果[J]. 中国防痨杂志, 2024, 46(z1):182
- [2] 李少群, 徐金富, 郑亮, 等. 上海市闵行区老年人群慢性阻塞性肺疾病患病率及影响因素分析[J]. 同济大学学报(医学版), 2023, 44(6):864
- [3] 张馨月. 慢阻肺急性加重患者D二聚体与病情严重程度的相关性及其在抗凝治疗中的应用价值[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022
- [4] 黄美清. "中国成人肺部健康研究" 首项成果发布 我国慢阻肺患者人数近亿[J]. 中华医学信息导报, 2018, 33(8):1
- [5] 陈霄, 史娟, 唐幼玲. 慢性阻塞性肺疾病患者合并支气管扩张的相关影响因素模型构建及其预防措施分析[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2024, 38(1):43
- [6] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组, 中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2021年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44(3):170
- [7] 唐文君, 曾珠, 孙增涛, 等. 外周血T淋巴细胞亚群变化对于慢阻肺患者急性加重期相对危险性的评价[J]. 临床肺科杂志, 2023, 28(10):1511
- [8] 陈双萍, 邓敏, 文珂. 家属参与制订的全程健康教育方案对老年慢性阻塞性肺疾病患者的影响[J]. 齐鲁护理杂志, 2022, 28(17):77
- [9] 薛明汕. 炎症和能量代谢通路在慢阻肺进展中的机制探索及临床意义[D]. 广州: 广州医科大学, 2021
- [10] 费丽萍, 许望东, 范颂, 等. logistic回归和分类树在慢阻肺影响因素分析中的应用[J]. 黑龙江医学, 2023, 47(13):1541
- [11] 冯双, 吴玉卓. 基于跨理论模型指导的健康教育对肺结核患者自我管理行为及生活质量的影响[J]. 国际医药卫生导报, 2023, 29(7):5
- [12] 卢小丽, 李卡, 黄明君, 等. 基于跨理论模型的营养教育在肺癌术后患者中的应用研究——以四川大学华西医院为例[J]. 现代预防医学, 2020, 47(1):44
- [13] 张继华, 张丽琼, 杨耀鹏, 等. 营养和心理干预联合肺康复训练操对慢阻肺患者的疗效[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(2):110
- [14] 马升军, 郑艾波, 沈奕播, 等. 个性化营养干预对老年慢性阻塞性肺疾病病人肺功能及免疫状态的影响[J]. 实用老年医学, 2024, 38(7):683
- [15] 冯辽辽, 李喜艳, 卫姝岑. 肺部感染合并慢阻肺疾病急性加重期患者的营养干预分析[J]. 贵州医药, 2023, 47(10):1611

(收稿日期:2025-03-05)

(上接第442页)

- [13] ZHOU C, LIU C, LIU W, et al. SLFN11 inhibits hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis by targeting RPS4X via mTOR pathway[J]. Theranostics, 2020, 10(10):4627
- [14] MILADINOV M, ROSIC J, ERIC K, et al. Analysis of the prognostic potential of schlafen 11, programmed death ligand 1, and redox status in colorectal cancer patients[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(20):15083
- [15] TAKAHASHI T, SHIGEYASU K, KONDO Y, et al. Predictive marker for response to trifluridine/tipiracil plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer patients[J]. BMC Cancer, 2025, 25(1):1
- [16] HAMFJORD J, GUREN T K, GLIMELIUS B, et al. Exploring early kinetic profiles of CEA, ctDNA and cfDNA in patients with RAS-/BRAF-mutated metastatic colorectal cancer[J]. Clin Colorectal Cancer, 2024, 12: S1533. doi: 10.1016/j.clcc.2024.11.004
- [17] ALI M A, ZAHRA O S, MORSI M I, et al. Predictive role of [(18)F] FDG PET-CT radiomic parameters for KRAS/BRAF/EGFR mutations in metastatic colorectal cancer patients[J]. EJNMMI Rep, 2024, 8(1):42
- [18] FORMICA V, DI GRAZIA A, BONOMO M V, et al. Circulating hepcidin levels are an independent predictor of survival in microsatellite stable metastatic colorectal cancer patient candidates for standard first-line treatment[J]. Cancers (Basel), 2024, 16(23):3977
- [19] ZHAO W, CHEN Y. Efficacy and safety of immune checkpoint inhibitors in heavily pretreated patients with microsatellite stable metastatic colorectal cancer: a real-world retrospective study[J]. Am J Cancer Res, 2024, 14(11):5378
- [20] MA L X, TITMUS E, LOREE J M, et al. Plasma arginine as a predictive biomarker for outcomes with immune checkpoint inhibition in metastatic colorectal cancer: a correlative analysis of the CCTG CO.26 trial[J]. J Immunother Cancer, 2024, 12(12):e010094

(收稿日期:2025-01-13)

引文格式:曹雪.预见性护理在小儿外周静脉留置针输液中的应用分析[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):448-450.

# 预见性护理在小儿外周静脉留置针输液中的应用分析

曹雪

(咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院儿内科,湖北咸宁 437100)

**摘要:**目的 探讨预见性护理在小儿外周静脉留置针输液中的应用效果。方法 选择我科住院的 252 例外周静脉留置针输液的患儿为研究对象,随机分成观察组 126 例和对照组 126 例。对照组采用常规护理模式,观察组实行预见性护理干预,比较两组患儿输液时渗漏发生率、疼痛评分、依从性和家属护理满意度。结果 相较于对照组,观察组输液渗漏发生率及疼痛评分低,输液依从性及家属护理满意度高,差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。结论 预见性护理的应用能降低小儿外周静脉留置针输液渗漏的发生率,减轻疼痛,同时提升患儿输液时的依从性及家属对护理的满意度,降低了护患矛盾和纠纷。

**关键词:**预见性护理;外周静脉留置针输液;儿童;渗漏发生率;护理满意度

中图分类号:R473.72

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0448-003

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025040815



## Analysis of the Application of Predictive Nursing in Indwelling Needle Infusion for Pediatric Peripheral Veins

CAO Xue

(Xianning Central Hospital/The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology,  
Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT:** **Objective** Exploring the effects of anticipatory nursing interventions in children peripheral intravenous indwelling needle infusion. **Methods** A total of 252 pediatric patients undergoing peripheral intravenous infusion were enrolled in our department as study subjects, and randomly divided into 126 cases in the observation group and 126 cases in the control group. The control group used conventional nursing model and the observation group implemented anticipatory nursing intervention. The incidence of leakage, pain scores, adherence and family satisfaction with nursing care during infusion of pediatric patients between the two above groups. **Results** Compared with the control group, the incidence of infusion leakage and pain scores in the observation group were lower. The infusion compliance and family care satisfaction were higher. The differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The application of anticipatory care can reduce the incidence of infusion leakage of children peripheral intravenous indwelling needles, reduce the pain, and meanwhile enhance the compliance of pediatric patients during infusion and the satisfaction of their families with nursing care, and reduce the conflicts and disputes between nurses and patients.

**KEY WORDS:** Anticipatory care; Indwelling needle infusion; Children; Incidence of leakage; Nursing satisfaction

外周静脉留置针输液作为目前住院患儿最常用的治疗手段<sup>[1]</sup>,一方面因其能较长时间维持静脉通路从而减少反复穿刺导致的血管损伤,减轻了护士的工作量,但同时也因患儿血管纤细、哭闹好动、依从性差,输液时极易发生渗漏<sup>[2]</sup>。一旦渗漏,不仅影响治疗效果,延长住院时间,还会导致渗漏部位肿胀疼痛甚至出现感染组织坏死等,引发护患矛盾和纠纷<sup>[3]</sup>。因此,在临床护理工作中保证小儿外周静脉留置针输

液安全尤为重要。基于此,本研究对小儿外周静脉留置针输液中应用预见性护理的效果进行分析,为减少静脉输液渗漏的发生提供参考依据。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

研究对象为 2024 年 6 ~ 10 月在我科住院行外周静脉留置针输液治疗的 252 例患儿。依照随机数字

表法分为观察组和对照组,每组 126 例。纳入标准:①年龄 $\leq 2$ 岁;②输注药物在 2 种以上,输注时间 $> 60\text{min}$ ;③输液治疗 3d 以上。排除标准:合并皮肤破溃、皮疹、出血点等。观察组中,男 70 例,女 56 例,平均年龄 $(1.37 \pm 0.23)$ 岁;对照组中,男 68 例,女 58 例,平均年龄 $(1.29 \pm 0.21)$ 岁。比较两组患儿一般资料无差异( $P > 0.05$ )。医院伦理委员会已批准本研究,患儿家属均知情并签署同意书。

## 1.2 方法

对照组给予常规输液护理模式。观察组实行预见性护理措施,具体如下:①成立由护士长、护理组长和责任护士等组成的输液安全护理小组,依照患儿各自的生活特点和心理特征制定个性化的护理方案,明确管理职责,将小儿外周静脉留置针输液渗漏纳入护理质量考核核心指标。②病房电视播放动漫节目及儿童歌谣,床头摆放儿童玩具,墙壁张贴可爱鲜艳的卡通画。护士主动下病房和患儿及家属沟通交流,同患儿玩耍、做游戏等。③输液前,护理小组与患儿家属积极沟通,就患儿的病情、治疗措施、使用药物及可能的反应等作详细说明,对家属进行宣教,告知输液过程中的高风险环节,用和蔼亲切充满自信的语言与家属交流,让其能有预见性的参与到输液安全护理工作中,从而更好地配合。护理小组通过评估患儿的精神心理、静脉血管及输注用药等方面,对穿刺部位和输液途径进行合理选择,同时做好输液渗漏的预防工作。留置针穿刺操作由高级责任护士执行,初级责任护士协助,选择粗直弹性好的血管,遵循规范操作流程进行穿刺。穿刺成功后用透明无菌敷贴固定留置针,确保针头稳固的同时方便观察穿刺部位周围的皮肤。④输液过程中每 10min 责任护士定期巡视病房,关注患儿的输液情况及可能的不良反应,一旦发现输液渗漏,马上记录上报并采取有效措施进行处理。及时纠正家属照护不当的地方,提高患儿的舒适感。⑤输液完毕后使用无菌生理盐水进行封管,保持留置针通畅。向家属着重强调减少患儿留置针附近关节活动强度的重要性,注意保暖,避免哭闹、大汗,保证充足的休息,定期观察穿刺部位周围皮肤情况,遇问题及时反馈。

## 1.3 观察指标

①比较两组输液渗漏发生率:记录两组患儿静脉输液渗漏发生例数,输液渗漏发生率( $\%$ ) = 输液渗漏发生例数/静脉输液总例数 $\times 100\%$ <sup>[4]</sup>。②评估两组输液时疼痛程度:依照 NIPS 评估量表<sup>[5]</sup>进行疼痛评分,分值越高,疼痛程度越重。③比较两组输液时的

依从性:患儿输液时全程躺卧,偶哭闹躁动为完全依从;患儿常出现哭闹躁动,经家属或护士搂抱哄睡后坚持输液完毕,称为部分依从;患儿哭闹不止,躁动不安,需家属及护士搂抱四处走动勉强完成输液,称作不依从。依从性( $\%$ ) = (完全依从例数 + 部分依从例数)/总例数 $\times 100\%$ <sup>[6]</sup>。④调查家属对护理的满意度:依照住院病人满意度调查表对护理人员的服务态度、知识宣教、沟通能力、穿刺水平、护理技巧等方面测评打分,共 10 项,每项 1~4 分,分别对应不满意、一般、基本满意、满意,满分 40 分,分值越高,家属对护理的满意度越高<sup>[7]</sup>。

## 1.4 统计学方法

所得数据应用统计软件 SPSS 19.0 进行分析,两组患儿疼痛评分及护理满意度以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用  $t$  检验,输液渗漏发生率及依从性以例( $\%$ )表示,采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组输液渗漏发生率比较

观察组输液渗漏发生率 2.38% (3/126) 比对照组 9.52% (12/126) 低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 两组静脉输液时疼痛程度比较

观察组疼痛评分 $(3.69 \pm 1.38)$  分比对照组 $(4.37 \pm 1.54)$  分低( $P < 0.05$ ),说明观察组疼痛程度较对照组轻。

### 2.3 两组输液时依从性比较

观察组输液时依从性 93.65% 比对照组 73.02% 高( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 两组患儿输液时依从性比较 [ $n(\%)$ ]

组别	例数( $n$ )	完全依从	部分依从	不依从	依从性
观察组	126	94(74.60)	24(19.05)	8(6.35)	118(93.65)*
对照组	126	62(49.21)	30(23.81)	34(26.98)	92(73.02)

与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

### 2.4 家属对护理满意度比较

观察组家属护理满意度 $(35.29 \pm 4.32)$  分比对照组 $(31.32 \pm 3.37)$  分高( $P < 0.05$ )。说明对于护理效果,观察组家属比对照组更满意。

## 3 讨论

小儿外周静脉留置针输液因患儿年龄小,容易哭闹躁动,难以保持长时间安静状态,同时因其静脉血

管细且管壁薄,陪护家属对静脉输液的相关知识和注意事项了解甚少,输液时极易发生渗漏,加重了患儿痛苦,影响治疗效果,甚至会引发护患矛盾和纠纷。因此,有必要提前从患儿、陪护家属及护理人员等各个方面充分考虑到可能导致渗漏发生的因素,进而通过积极有效的护理干预措施来降低输液渗漏的发生。

本研究观察组在小儿外周静脉留置针输液中采用预见性护理措施后,渗漏发生率2.38%低于对照组9.52% ( $P < 0.05$ )。分析原因系加强了对患儿家属的宣教工作,对发生输液渗漏的高风险环节进行了详细告知,提高了家属对输液安全的认知,调动了参与输液管理的积极性,减少了患儿哭闹躁动导致的留置针针头脱落事件。在出现输液渗漏后第一时间通知责任护士,护理小组及时采取有效措施避免情况恶化。同时通过输液安全护理小组的成立及管理职责的明确,凝集团队智慧,避免导致输液渗漏发生的不当操作,及时总结,精准掌握科室患儿输液渗漏发生的原因,就输液安全管理进行有针对性的培训,从长远角度避免小儿外周静脉留置针输液渗漏的发生,与范嘉佳等<sup>[8]</sup>报道的“护士技能和素质的强化培训能有效提升输液护理的质量与效率”一致。

相较于对照组,观察组患儿疼痛评分低,依从性高,家属护理满意度高 ( $P < 0.05$ ),不难看出预见性护理干预能有效减轻患儿的痛苦,提升输液时的依从性,提高家属的护理满意度。考虑原因是病房环境的童趣化布置分散了患儿的注意力,护理人员善意的语言和良好的行为消除了恐惧心理。输液安全护理小组成员输液前与家属就患儿病情及相关注意事项等进行沟通交流,拉近了彼此之间的距离,增进了信任和配合。同时在全面评估患儿的身体状况后合理选择血管,由经验丰富的高年资护士负责静脉穿刺,保证了穿刺成功率,输液过程中加强了病房的巡视,及时处理发现的问题,留置针封管后又向家属强调了重

要环节,共同保证了患儿输液安全。这与李馨宇等<sup>[9]</sup>提到的观点“预见性护理在小儿静脉输液安全管理中起到了重要的作用”相同。本研究受限于时间和人力,仅抽取一家三甲医院的儿科住院患儿,样本量小,有必要在今后的研究中选取更多医院更多科室,让样本更具有代表性。

综上所述,预见性护理应用于小儿外周静脉留置针输液中,能够增强护理人员的工作责任心,调动家属参与护理管理的积极性,有效减少渗漏的发生,减轻患儿痛苦,提升输液的依从性,同时显著提高家属对护理的满意度,值得在临床儿科护理工作中推广。

### 参考文献:

- [1]张春梅. 小儿静脉输液渗漏治疗的护理进展[J]. 妇幼护理,2023,3(21):5044
- [2]史巧维,刘倩. 循证护理在小儿静脉输液心理护理中的应用[J]. 贵州医药,2023,47(2):324
- [3]陈晓春,徐红贞,梁玉琴,等. 儿童外周静脉留置针输液渗出预防的最佳证据应用[J]. 护理与康复,2021,20(4):71
- [4]王彦. 小儿静脉注射强刺激性药物渗漏风险及防护的探讨[J]. 实用临床护理学电子杂志,2020,5(27):110
- [5]张梦莹,张释元,胡雪晴,等. 婴幼儿桡动脉采血中四分之一定位联合触摸法对一次性采血成功率与 CRIES 评分的影响[J]. 实用临床护理学电子杂志,2022,7(6):70
- [6]王秀伟,申慧丽. “洞察-应答-支持”情绪疏导法在小儿静脉输液中的应用[J]. 临床医学工程,2021,28(12):1691
- [7]谢开屏,何桂娥,蓝珍. 自制输液防护套在小儿静脉输液管理中的应用[J]. 中国卫生标准管理,2021(20):151
- [8]范嘉佳,樊军,龙莘莘. 小儿静脉输液渗漏原因分析及对策[J]. 康颐,2021(2):32
- [9]李馨宇,姚春艳,肖清. 预见性护理程序的临床应用现状[J]. 全科护理,2022,20(25):3476

(收稿日期:2025-04-08)

引文格式:郑泽颖,叶清景.卒中后认知障碍的研究进展及针灸治疗现状[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):451-455.

# 卒中后认知障碍的研究进展及针灸治疗现状

郑泽颖<sup>1</sup>,叶清景<sup>2\*</sup>

(1.福建中医药大学,福建福州350000;2.福建中医药大学附属厦门市中医院)

**摘要:**卒中后认知障碍(PSCI)作为血管性认知障碍重要部分,严重影响患者生活质量,其发病与大脑结构、脑血管危险因素、免疫、“肠-脑轴”等多因素相关。针灸治疗为PSCI康复提供新思路,如联合康复训练、药物、电刺激等,但目前存在穴位处方和治疗方式不统一、研究样本量小且设计有局限、作用机制研究不深入等问题。本文对PSCI的研究进展及针灸治疗现状进行总结,以期未来加强研究,挖掘针灸治疗PSCI的潜力,为患者提供更有效的治疗手段。

**关键词:**卒中后认知障碍;针灸;治疗

中图分类号:R245

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)05-0451-006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025032403



## Research Progress of Post-stroke Cognitive Impairment and the Current Situation of Acupuncture Combined Therapy

ZHENG Ze-ying, YE Qing-jing

(Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian 350000, China)

**ABSTRACT:** Post-stroke cognitive impairment (PSCI), as an important part of vascular cognitive impairment, severely impacts patients' quality of life. Its pathogenesis is associated with multiple factors, such as brain structure, cerebrovascular risk factors, immunity, and the “gut-brain axis”. Acupuncture offers new avenues for PSCI rehabilitation, such as combined rehabilitation training, medication, and electrical stimulation. However, current challenges include inconsistent acupoint prescriptions and treatment modalities, small study sample sizes and design limitations, and limited understanding of mechanisms of action. This article summarized the research progress and current status of acupuncture treatment for PSCI, hoping to strengthen future research, explore the potential of acupuncture for PSCI, and provide more effective treatment options for patients.

**KEY WORDS:** Post-stroke cognitive impairment; Acupuncture; Therapy

随着社会生活模式的改变,卒中患者的数量逐年增高,卒中后遗症是困扰卒中患者的一大难题。近年来,关于卒中后认知障碍(post-stroke cognitive impairment, PSCI)的研究热度逐年升高。PSCI是血管性认知障碍的重要组成部分,近1/3卒中后患者及其家庭受PSCI困扰,带来严重的社会、经济、情感负担,约44%的患者在卒中后2~6个月出现整体认知功能障碍<sup>[1]</sup>。虽然大量卒中幸存者的认知功能障碍不足以达到痴呆的诊断标准,但仍会影响生活质量。一项纳入1995年至2017年间发表的23项研究的系统性综述<sup>[2]</sup>发现,卒中后第1年的PSCI合并无痴呆的患病率为38%,即每10位卒中幸存者中就有4位患有非

痴呆标准的认知障碍。

PSCI的恢复及改善程度密切关系着患者的生活质量,针灸运用于脑卒中康复是中医研究的重要方面,目前的研究在传统针灸的基础上不断突破常规,实现针灸与多手段结合,以提高PSCI的临床疗效。

### 1 PSCI的定义与评估

#### 1.1 PSCI的中西医定义

PSCI是指在卒中事件后出现并持续到6个月时仍存在的以认知损害为特征的临床综合征,依据认知受损程度,划分为卒中后认知障碍非痴呆(post-stroke

\* 通信作者, E-mail: 13959223348@163.com

cognitive impairment no dementia, PSCIND) 和卒中后痴呆(post-stroke dementia, PSD)<sup>[3]</sup>。卒中后出现的任何程度的认知功能损害都可以归属为 PSCI 范畴,而 PSD 是认知功能不断损害的最终结果。在《美国中风协会的科学声明》中指出,PSCI 在卒中后的第一年发病率可高达 60%,大约 44% 的人群卒中后 2~6 个月都会发生认知功能的受损<sup>[4]</sup>。

PSCI 在中医古籍中未见其对应病名。“卒中”可归于“中风”范畴,根据症状又可称“仆击”“偏枯”“薄厥”等,“认知障碍”所对应的中医病名可能有“痴呆”“呆病”“善忘”等,历代医家对此二病均有不同的认识和记载。至清朝叶天士开始将“中风”及“呆病”联系起来,后《杂病源流犀烛》一文中指出“中风后善忘”,正式认识到“中风”后脑络受损、痹阻不通而或是失于濡养,可使神机失用,发为“痴呆”。

## 1.2 PSCI 的评估方法

PSCI 通常要在卒中后 3~6 个月完成评估,确诊需具备“明确的卒中诊断”“存在认知损害”及“卒中和认知损害的时序关系”三个要素<sup>[3]</sup>。传统临床评估常推荐采用的方法有简易精神状态检查(MMSE)、蒙特利尔认知评估量表(MoCA)、神经行为认知状况检查量表(NCSE)及神经心理学测试等<sup>[5]</sup>,但目前有新的研究表明,老年认知功能减退知情者问卷(IQ-CODE)及阿登布鲁克认知能力检查-修订版(ACE-R)对 PSCI 筛查的准确度更优<sup>[6]</sup>,有助于临床 PSCI 的诊断更为明确。

## 2 原因和机制

### 2.1 PSCI 与大脑

#### 2.1.1 PSCI 与大脑结构

PSCI 与大脑结构相关。通常情况下,小血管病变是引起血管性认知障碍或痴呆最重要的危险因素,但 PSCI 的区别在于其继发于脑卒中后,且影像学可明确诊断大脑病灶的发生,相较于隐匿的小血管病变,卒中时损伤的脑区面积更明显,可直接导致脑组织、结构破坏,造成大脑拓扑改变,通过复杂脑网络分析技术,可以发现 PSCI 与卒中后引发归一化特征路径长度的增加以及右侧海马节点效率的降低有关,网络拓扑结构破坏是其发病的结构基础<sup>[7]</sup>。卒中后患者的脑组织出现破坏,大脑会在几分钟内进行重塑,以弥补神经组织功能的缺失,重塑后的大脑功能与卒中前有差别;在运用动态静息状态功能的 MRI 技术,研究急性缺血性卒中患者的运动网络连接的瞬态配置<sup>[8]</sup>表明,缺血性脑卒中会导致不同网络之间的连通性发

生变化、网络交互的时间发生改变。对于缺血性脑卒中患者而言,梗死累及大脑皮层及皮层下时可发现认知功能有明显下降,且与梗死体积的大小有关,梗死灶越大,神经功能缺失越严重,增加罹患 PSCI 的风险<sup>[9]</sup>。在一项收集了 2950 例患者样本的统计分析中,左额颞叶、左丘脑和右顶叶的梗死与 PSCI 关系更为密切<sup>[10]</sup>。故脑卒中致大脑组织结构损伤是 PSCI 发病最初的基础。

#### 2.1.2 PSCI 与脑血管危险因素

包含房颤、糖尿病、饮酒、吸烟等在内的血管危险因素是 PSCI 的重要影响因素之一。卒中后进行适当的血管风险管理,包括抗血小板、抗高血压、他汀类药物及抗凝药物的治疗等方式可以减少认知障碍的发生率,积极的血管危险因素治疗可能可以通过预防血管总负担潜在地预防 PSD<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12]</sup>表明,在有血管危险因素的前提下,患者 MoCA 评分更低,表现出的注意力更差;患有房颤的患者在卒中后第 18 个月时语言功能较差,患有冠心病的患者在第 18 个月则体现在 MoCA 评分较差。血压是血管危险因素中的关键,适当的运用降压药对 PSCI 患者的认知能力有保护作用,例如血管紧张素 II 受体阻滞剂可以减轻炎症、保护血管内皮和线粒体功能、维护血脑屏障和脑血流量。然而新的研究<sup>[13]</sup>表明高血压可能是 PSCI 的保护因素,对于部分卒中后患者而言需要依赖较高的血压来维持卒中后的脑灌注,尤其在老年患者身上更为明显。目前总体而言,没有血管危险因素的患者 PSCI 发病率更低,已患 PSCI 的无血管危险因素病人预后效果更好。

### 2.2 PSCI 与非神经系统性病变

#### 2.2.1 PSCI 与免疫

免疫系统是人体重要的卫外屏障,也是加重卒中后血管性损害的重要因素。全身免疫炎症指数(SII)是近年受关注的一种新型综合炎症指标,综合参考了外周淋巴细胞、中性粒细胞、血小板计数。研究<sup>[14]</sup>发现,急性缺血性脑卒中认知障碍患者的 SII 指数明显高于无认知障碍的患者,即使在控制了一些相关因素(如性别、年龄等)后,SII 评分仍与 PSCI 之间存在明显的正相关。脑缺血后机会释放损伤相关的因子,激活大脑内的免疫细胞并促进外周先天免疫发生,从而加重血管损伤。另有研究<sup>[15]</sup>表明,先天免疫标志物——包括中性粒细胞百分比、中性粒细胞值、NLR 和 SII 的升高增加了 PSCI 的患病风险,而适应性免疫标志物升高则与之相反,例如淋巴细胞比率升高反而会使 PSCI 的患病风险降低。这些免疫指标的监测可能可以为临床提供 PSCI 进展及预后的辅助判断

依据。

### 2.2.2 PSCI 与“肠-脑轴”学说

William James 和 Carl Lange 的微生物-肠-脑轴(MGBA)学说是指肠道微生物群和中枢神经系统通过神经、内分泌及免疫机制相互作用,形成双向调节轴,肠道微生物群的种类和数量的病理性变化会破坏MGBA信号,影响缺血性脑卒中的预后。研究<sup>[16]</sup>表明,PSCI患者肠道微生物群出现明显改变,丰富度减少。短链脂肪酸(SCFA)是肠道菌群的代谢产物,它的缺乏与否与PSCI的发生显著相关,SCFAs可以与游离脂肪酸受体作用,从而抑制组蛋白去乙酰化,经血脑屏障进入大脑,影响小胶质细胞,减少神经系统炎症,在MGBA中发挥重要作用,而卒中后肠道产生SCFA的菌群减少,降低了卒中后神经炎症的抑制作用,从而加速PSCI的发生。此外,菌群代谢产物脂多糖(LPS)和丁酸盐也参与了PSCI患者体内肠-脑之间的相互作用。当卒中患者肠道生态失衡时,大肠杆菌等革兰阴性菌合成大量LPS,过量的LPS与Toll样受体结合,进而导致促炎细胞因子产生,引发全身炎症反应,破坏血脑屏障,使其他毒性代谢物、病原体等进入大脑,加重脑损伤,加速PSCI进程。丁酸盐可以使Akt磷酸化,抑制小胶质细胞活化,缩小梗死面积及减少神经元凋亡,调节中枢神经系统,对PSCI的预后起正向作用<sup>[17]</sup>。

### 2.2.3 PSCI 与胰岛素样生长因子(IGF)-1、Tau蛋白

有研究<sup>[18]</sup>运用酶联免疫吸附试验对患者血清进行分析,发现PSCI患者的血清胰岛素样生长因子(IGF)-1较非PSCI组患者低,Tau蛋白水平较非PSCI患者高;基于Logistic分析,(IGF)-1、Tau蛋白均为老年型缺血性脑卒中患者发生PSCI的独立危险因素。Tau蛋白磷酸化程度影响神经元变性,其病理性升高是诱发PSCI的危险因素;(IGF)-1在神经元生长、凋亡、能量代谢中起重要调控作用,在卒中动物模型中具有神经保护性<sup>[19]</sup>, (IGF)-1水平降低则神经保护作用减弱,PSCI患病风险增高。

### 2.2.4 PSCI 与 HALP 评分

HALP评分整合部分免疫状态指标,包括血红蛋白、白蛋白、淋巴细胞和血小板<sup>[20]</sup>,通过采集空腹外周静脉血指标即血常规等,进行HALP评分。对于急性缺血性卒中患者,与非PSCI组相比,PSCI组的HALP评分更低,具体表现为血红蛋白、白蛋白、淋巴细胞数较低,而血小板计数则略高。较低HALP评分反应患者较低的营养状态和较活跃的炎症反应,HALP评分 $\leq 33.90$ 分与PSCI发展显著相关<sup>[21]</sup>。

## 2.3 PSCI 与卒中前脑储备

PSCI的发病与卒中前的认知有关,其一参考指标为卒中前的文化水平,PSCI发生概率与文化程度呈负相关<sup>[22]</sup>,教育水平越高表示认知储备越好,卒中后则有更多神经代偿资源以抵消相关病理生理变化。研究<sup>[23]</sup>发现,受教育程度低的患者罹患PSCI的概率是受教育高的患者的3.03倍。不同个体的大脑储备、认知储备、大脑维持和代偿程度不同,在卒中后能抵消不同程度的功能损害,这种代偿称为“病理弹性”,尽管卒中后大脑物理结构破坏,但它仍能以某种方式提供维持剩余认知功能的能力。生活经历会影响大脑储备,通过后天的训练,可以提升脑储备量,接受越高的教育获得的认知储备越大,在卒中后神经退化时可以形成对冲,减轻脑损伤带来的功能丧失<sup>[24]</sup>。

## 3 针灸治疗现状

### 3.1 针灸理论指导PSCI治疗

用中医针灸理论指导干预PSCI治疗,为PSCI诊疗提供多条思路。针灸可从调本位、固先天、补后天三方面对PSCI患者进行干预治疗,即“通督脉调心脑”“益肾精充脑髓”“补脾胃输精微”三部分并调,达到治疗的目的。“通督醒神”针刺法依据“脑为髓海”“督脉入络脑”的观点提出督脉经气虚少及瘀阻是导致认知功能异常的关键,故总结出“通督醒神”为治疗PSCI总纲,主穴取“百会”“神庭”<sup>[25]</sup>。“脑肠同治”针刺以脑-肠轴为基础,针刺从经络循行及功能再析PSCI发病的关系,发现足阳明胃经、手阳明大肠经和手太阳小肠经循行路线均经过头面,加之胃肠道消化和吸收水谷精微并向外布散,向上可滋养脑髓,以上与“脑-肠”轴途径重合,故取穴时除头部局部取神庭、百会、四神聪外,还在远端配用足三里、合谷,共奏和胃健脾、开窍醒神、安神益智之效<sup>[26]</sup>。“毒损脑络-从化”理论认为浊毒是诱发PSCI的关键物质,会使脑络失养、受损,故治疗关键在于解毒,祛除毒邪以减少损害,从而使脑络气畅血和,神机自复。针刺选穴多以化痰祛瘀解毒,除头部选穴外加取丰隆、足三里、血海<sup>[27]</sup>。“心-脑-肾轴”以督脉为枢机,病位在脑,发病关键在心神失用,发病根本在肾虚髓减,三者自上而下相通,选穴应顾及三者同治,故取四神聪、百会、神庭治脑,神门、内关调心,三阴交、太溪益肾<sup>[28]</sup>。“涌泉灸”在针刺的基础上加艾灸涌泉以益精填髓、开窍醒神、疏通经络,通过艾灸的温补作用促进肾气生成和肾精的积累,从而达到补肾充髓养脑的目的来改善PSCI患者的症状<sup>[29]</sup>。

## 3.2 针灸联合其他方法干预

### 3.2.1 针灸联合康复训练

PSCI 康复治疗包含多方面。运动疗法依据患者的情况制定运动计划,有氧运动可以改善患者注意力,提高神经可塑性,改善认知表现;作业治疗更具有针对性的锻炼患者的生活能力,包括穿衣、洗漱、进食等日常活动,帮助患者早日实现生活能力自理,促进认知恢复<sup>[30]</sup>。康复机器人广泛运用于卒中后的治疗,可以改善卒中后患者的肢体功能运动,进而改善病人心理状态。有研究<sup>[31]</sup>表明,手法治疗联合康复机器人治疗能降低患者体内 CRP 指标,降低炎症反应,保护脑神经,延缓 PSCI 进程。

在康复训练的基础上配合针灸治疗,与单纯康复治疗相比,可以进一步提高 PSCI 患者的认知水平执行功能<sup>[32]</sup>。临床研究<sup>[33]</sup>证实,在认知康复训练基础上加予“通督调神”针刺法,即患侧取穴百会、神庭、印堂、四神聪、肩髃、曲池、外关、合谷、梁丘、足三里、解溪、太冲,留针 30min,施以平补平泻法,4 周后患者的认知能力、生活自理能力和运动功能均比未行针刺干预组有更大的提升。除针刺外,艾灸在治疗 PSCI 方面也被发现有临床疗效,有言“药之不及,针之不到,必须灸之”,在康复基础上对百会、神庭行艾条旋起灸,每次 15~20min,1 次/d,每周 5 次,4 周后患者的认知、生活、记忆、执行等能力较单纯进行康复训练组有更明显的进步,这可能与艾灸热效应改变血流动力学、扩张脑血管、改善供氧有关<sup>[34]</sup>。

### 3.2.2 针灸联合药物治疗

胆碱酯酶抑制剂和非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂治疗是临床研究中证明有较好疗效的药物,PSCI 患者经 6 个月胆碱酯酶抑制剂治疗后认知功能可保持较稳定水平<sup>[35]</sup>。临床推荐胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐、卡巴拉汀为改善认知功能和日常生活的一线用药<sup>[1]</sup>。

针药结合治疗 PSCI 是临床的一大趋势。“靳三针”联合多奈哌齐治疗 PSCI,取穴“颞三针”“四神针”及“智三针”,有效率明显高于单纯多奈哌齐干预组,颞三针取穴位置对应了大脑颞叶位于头皮的投射区,刺激此区可能可以改善语言、记忆功能,智三针穴取神庭穴及两侧本神穴,与神志病治疗密切相关,四神针为前、后、左、右四神聪穴,位于巅顶,汇聚诸身之阳,刺之可调阳气而复脑络经气<sup>[36]</sup>。此外,中药复方与针灸联合也逐渐受到关注,有荟萃分析表明,针灸联合其他疗法治疗 PSCI 疗效显著,但针灸联合中药方剂可能是最有效方法,但临床应用需根据患者证型选择穴位和中药方剂<sup>[37]</sup>。

### 3.2.3 针刺联合电刺激

电针在原始针刺基础上连接电针仪,可以对被治疗者产生持续的刺激,普遍运用于临床治疗中。一项纳入了 896 例实验患者的荟萃分析表明,电针组的 MMSE、MoCA、FMA 积分的改善程度优于对照组,电针组 P300 潜伏期低于对照组且波幅高于对照组,说明电针的运用可以提高 PSCI 的临床疗效<sup>[38]</sup>。有研究发现,电针不仅可以改变大鼠海马形态,还起到抑制小胶质细胞的激活、减弱 TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 信号通路的作用,抑制 NLRP3 相关炎症细胞因子的 mRNA 水平而减少神经炎症发生,以此提高大鼠学习和记忆能力<sup>[39]</sup>;也可通过抑制 P2X7R 表达,减少炎症和活性氧,改善缺血性中风大鼠的记忆损伤<sup>[40]</sup>;电针还可通过介入 mTOR-NLRP3 自噬-炎症途径干预 PSCI,包括减少 MCAO 大鼠细胞凋亡、炎症、自噬等进程<sup>[41]</sup>;此外,电针或许能够通过增强 BDNF/TRKB/CREB 信号通路中相关蛋白的水平,刺激突触可塑性关键蛋白 PSD-95 和 SYN 的产生,修复突触的超微结构,强化突触的适应能力,从而减轻因脑缺血再灌注损伤而导致的大鼠认知功能下降<sup>[42]</sup>。

## 3.3 针灸治疗 PSCI 问题与挑战

### 3.3.1 统一处方与治疗规范

当前,在针灸治疗 PSCI 领域,穴位处方和治疗方式繁杂多样,尚未形成统一规范。不同的研究成果以及临床医生在实际操作中,于穴位选择、针刺手法运用、治疗频率设定和疗程安排等方面均存在显著差异。这种状况不仅使得研究结果难以相互比较和整合,也给该疗法的推广应用带来了困难,致使难以对针灸治疗 PSCI 的实际疗效进行客观、准确的评估。

### 3.3.2 样本量大小与研究设计

关于针灸治疗 PSCI 的临床研究存在样本量偏小的问题,同时研究设计也存在一定局限性。在研究过程中,随机对照实施的不够严格,无法有效控制混杂因素对研究结果的影响;盲法的应用不够完善,可能导致研究结果受到主观因素干扰。这些问题严重削弱了研究结果的可靠性和说服力,使得研究成果难以在更广泛的范围内得到认可和推广。此外,现有研究大多侧重于观察短期疗效,对于针灸治疗 PSCI 的长期效果及安全性,缺乏深入、系统的研究,无法为临床实践提供全面的参考依据。

### 3.3.3 研究机制深度不足

尽管目前研究者已对针灸治疗 PSCI 的作用机制展开了一定的研究探索,但整体研究深度仍有待提高。现有的多数研究仅从神经递质水平、脑血流变化等较为基础的层面进行初步分析,对于针灸刺激所产

生的信号如何通过复杂的神经传导通路对大脑神经功能进行调节,以及针灸在基因表达、蛋白质组学等微观层面所产生的影响,仍需进一步探索。要实现针灸治疗 PSCI 内在机制的全面认识,还需不断研究,以进一步优化针灸治疗方案,提升其临床疗效。

#### 4 小 结

PSCI 是临床面临的卒中后难题,与患者生活质量息息相关,其发病机制并非单一,是多个系统综合作用的结果,故在诊疗过程中,应从整体出发,早期发现和预防,采用多元化康复手段制定个性化方案,帮助患者早日回归家庭。针灸作为一种传统的中医疗法,在治疗卒中后认知障碍方面具有独特的优势和潜在的应用价值,其通过多种机制,能够有效改善 PSCI 患者的认知功能。目前,针灸治疗 PSCI 仍面临一些问题和挑战,未来,需要加强相关研究,制定标准化治疗方案,开展高质量的临床研究,深入探索作用机制,进一步挖掘针灸在治疗 PSCI 中的潜力,为广大 PSCI 患者提供更有效的治疗手段。

#### 参考文献:

[1] LO J W, CRAWFORD J D, DESMOND D W, et al. Profile of and risk factors for poststroke cognitive impairment in diverse ethnoregional groups[J]. *Neurology*, 2019, 93(24): e2257

[2] SEXTON E, MCLOUGHLIN A, WILLIAMS D J, et al. Systematic review and meta-analysis of the prevalence of cognitive impairment no dementia in the first year post-stroke[J]. *European Stroke Journal*, 2019, 4(2): 160

[3] 汪凯,董强,郁金泰,等.卒中后认知障碍管理专家共识 2021[J]. *中国卒中杂志*, 2021, 16(4): 376

[4] EL HUSSEINI N, KATZAN I L, ROST N S, et al. Cognitive impairment after ischemic and hemorrhagic stroke: a scientific statement from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2023, 54(6): e272

[5] 张通,赵军,李雪萍,等.中国脑血管病临床管理指南(第2版)(节选)—第8章脑血管病康复管理[J]. *中国卒中杂志*, 2023, 18(9): 1036

[6] 马玉霞,杨依依,魏晓琴,等.卒中后认知障碍评估工具筛查准确性的 Meta 分析[J]. *中国全科医学*, 2024, 27(32): 4066

[7] 蔡玉姣,李洋,杜睿,等.基于脑结构网络分析技术对卒中后认知障碍的预测研究[J]. *临床放射学杂志*, 2024, 43(6): 905

[8] BONKHOFF A K, ESPINOZA F A, GAZULA H, et al. Acute ischaemic stroke alters the brain's preference for distinct dynamic connectivity states[J]. *Brain*, 2020, 143(5): 1525

[9] 曾译萱,刘焯,王银雪,等.急性轻型缺血性卒中后认知障碍临床及影像学特征分析[J]. *阿尔茨海默病及相关病杂志*, 2022, 5(2): 103

[10] WEAVER N A, KUIJF H J, ABEN H P, et al. Strategic infarct locations for post-stroke cognitive impairment: a pooled analysis

of individual patient data from 12 acute ischaemic stroke cohorts[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(6): 448

[11] MIJALLOVIĆ M D, PAVLOVIĆ A, BRAININ M, et al. Post-stroke dementia—a comprehensive review[J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 11

[12] AAM S, GYNNILD M N, MUNTHER-KAAS R, et al. The impact of vascular risk factors on post-stroke cognitive impairment: the nor-COAST study[J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 678794

[13] HE A, WANG Z, WU X, et al. Incidence of post-stroke cognitive impairment in patients with first-ever ischemic stroke: a multicenter cross-sectional study in China[J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2023, 33: 100687

[14] BAO Y, WANG L, DU C, et al. Association between systemic immune inflammation index and cognitive impairment after acute ischemic stroke[J]. *Brain Sci*, 2023, 13(3): 464

[15] ZHAO P, ZHANG G, WANG Y, et al. Peripheral immunity is associated with cognitive impairment after acute minor ischemic stroke and transient ischemic attack[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 16201

[16] LIU Y, KONG C, GONG L, et al. The association of post-stroke cognitive impairment and gut microbiota and its corresponding metabolites[J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 73(4): 1455

[17] 吕转,王亚敏,刘瑞东,等.肠道微生物-肠-脑轴与卒中后认知障碍的相关性研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(9): 1073

[18] 方建伟,沈永玲,程飞,等.血清 IGF-1、Tau 蛋白对老年轻型缺血性脑卒中患者卒中后认知障碍的预测价值[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(13): 3158

[19] WANG R, BAO H, ZHANG S, et al. MiR-186-5p promotes apoptosis by targeting IGF-1 in SH-SY5Y OGD/R model[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(13): 1791

[20] 周涛,哈斯也提·依不来音. HALP 评分在卒中后认知障碍发生中的作用[J]. *内蒙古医学杂志*, 2024, 56(6): 719

[21] 周涛,戴莉莉,宋雨影,等.缺血性卒中急性期 HALP 评分与卒中后认知障碍相关性研究[J]. *海南医学院学报*, 2024, 30(13): 982

[22] 涂舒婷,林嘉滢,庄金阳,等.卒中后认知障碍发病现状及相关因素分析:一项基于脑卒中全周期康复的多中心横断面研究[J]. *中国全科医学*, 2024, 27(23): 2829

[23] DING M Y, XU Y, WANG Y Z, et al. Predictors of cognitive impairment after stroke: a prospective stroke cohort study[J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 71(4): 1139

[24] STERN Y, BARNES C A, GRADY C, et al. Brain reserve, cognitive reserve, compensation, and maintenance: operationalization, validity, and mechanisms of cognitive resilience[J]. *Neurobiol Aging*, 2019, 83: 124

[25] 阮晓迪,高静,吕转,等.通督醒神针刺法对脑缺血再灌注后学习记忆障碍模型大鼠海马组织 AMPA 受体及其辅助蛋白表达的影响[J]. *中医杂志*, 2023, 64(23): 2435

[26] 黄桂榕,林琴,许文威,等.“脑肠同治”针刺疗法治疗卒中后认知障碍的临床效果[J]. *中国当代医药*, 2024, 31(3): 129

[27] 李冰,王嘉麟.从“毒损脑络-从化”理论探讨卒中后认知障碍病机及针刺治疗思路[J]. *山东中医杂志*, 2024, 43(5): 508

引文格式:黄兴琼,张丹丹,陈迷,等.二氢杨梅素治疗糖尿病及并发症的研究进展[J].湖北科技学院学报(医学版),2025,39(5):456-460.

## 二氢杨梅素治疗糖尿病及并发症的研究进展\*

黄兴琼,张丹丹,陈迷,张胜南\*\*

(湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁437100)

**摘要:**本文总结了二氢杨梅素(DMY)在糖尿病及其并发症如糖尿病心肌病、糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病神经性疼痛、糖尿病抑郁症和糖尿病脑病等的应用研究,并阐明了其在上述过程中涉及的潜在机制和信号通路,有望为DMY在糖尿病及其并发症领域的未来研究提供更好的理解,为DMY作为临床药物的开发提供参考。

**关键词:**二氢杨梅素;糖尿病;糖尿病并发症

中图分类号:R587

文献标识码:A

文章编号:2095-4646(2025)04-0456-005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

DOI:10.16751/j.cnki.2095-4646.2025010310



### Research Progress of Dihydromyricetin in the Treatment of Diabetes Mellitus and its Complications

HUANG Xing-qiong, ZHANG Dan-dan, ZHANG Sheng-nan, et al

(School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100, China)

**ABSTRACT:** This article summarized the research on the application of DMY in diabetes and its complications such as diabetic cardiomyopathy, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, diabetic neuropathic pain, diabetic depression and diabetic encephalopathy. It clarified the potential mechanisms and signaling pathways involved in the above process for DMY. This study is hopeful to provide a better understanding for future research on DMY in the field of diabetes and its complications, and provide a promising reference for the development of DMY as a clinical drug.

**KEY WORDS:** Dihydromyricetin; Diabetes; Complications of diabetes

糖尿病是一种由胰岛素分泌缺陷或胰岛素抵抗引起的高血糖为特征的代谢性疾病。流行病学研究报告指出,预计到21世纪中叶,全球糖尿病患者会达到7亿人左右<sup>[1]</sup>。糖尿病长期高血糖还会损害各种组织和器官如心脏、肾脏、眼睛、周围神经、大脑等。临床上对于糖尿病相关内容研究较多,但仍缺乏安全有效的理想药物治疗。

二氢杨梅素(DMY)属于黄酮类化合物,广泛存在于葡萄科蛇葡萄属植物中<sup>[2]</sup>。DMY药理活性非常广泛,Xu等<sup>[3]</sup>发现DMY可以延缓糖尿病及其并发症的进展,从而改善患者的生活质量。此外,DMY还具有抗氧化活性、清除自由基、修复氧化应激相关损伤的

药理作用<sup>[4]</sup>。近年来DMY的抗炎作用也有报道<sup>[5]</sup>。本文详细总结了DMY在糖尿病及其并发症中作用的现状,为糖尿病及其并发症的药物研发提供有效参考。

#### 1 DMY在糖尿病中的作用

胰岛素是机体内重要的代谢激素,它能促进机体内肝脏、骨骼肌和脂肪对血液中葡萄糖的摄取和利用<sup>[6]</sup>。当这些发挥生理效应的靶器官对胰岛素敏感性下降,就会出现胰岛素抵抗(IR)<sup>[7]</sup>。IR状态下,体内葡萄糖代谢出现障碍。即使胰岛素分泌代偿性增加,但体内血糖浓度不降反升。胰岛素分泌与血糖之

\* 基金项目:湖北省自然科学基金(2024AFB494);湖北科技学院博士科研启动基金(BK202440)

\*\* 通信作者, E-mail: 1106908581@qq.com

间的长期失衡,会导致胰岛 $\beta$ 细胞分泌功能受损促进糖尿病的发生<sup>[8]</sup>。

研究<sup>[9]</sup>表明,炎症因子失调是引发 IR 的重要因素之一。核内转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 可抑制 PI3K/AKT 信号通路,参与 IR<sup>[10]</sup>。c-Jun 氨基端激酶(JNK)可降低胰岛素受体底物(IRS-1)的表达及磷酸化水平,进而抑制 PI3K-AKT 通路,参与 IR 的发生<sup>[11]</sup>。Hou 等<sup>[12]</sup>采用高脂饲料(HFD)诱导小鼠 IR,结果显示 HFD 导致脂肪组织中炎症因子增加,DMY 激活脂肪组织能量代谢传感器并抑制 HFD 诱导的 NF- $\kappa$ B 和 JNK。DMY 逆转了 HFD 诱导的对 IRS-1 和 AKT 的抑制,最终增加了葡萄糖摄取转运蛋白 4 表达;其体外实验结果也进一步证实 DMY 可以改善由 TNF- $\alpha$  处理 3T3L1 细胞诱导的胰岛素抵抗模型<sup>[12]</sup>。这些研究表明 DMY 改善了 HFD 小鼠中炎症诱导的 IR。

## 2 DMY 在糖尿病并发症中的作用

### 2.1 糖尿病心肌病

糖尿病心肌病(DCM)是最常见的糖尿病并发症之一,以心肌肥大、纤维化和心肌微血管病变等为主要特征。高血糖可直接诱导促炎因子分泌并使炎症过程持续发展,引起心肌细胞肥大、线粒体功能障碍、内质网应激和死亡、成纤维细胞增殖、胶原生成,进而促进 DCM 的发展<sup>[13]</sup>。此外,高血糖会使活性氧(ROS)过量产生,诱发炎症反应,引起线粒体损伤和心肌细胞凋亡,最终导致心功能不全、心重构和心力衰竭,因而,糖尿病患者心脏炎症会增强加重 DCM<sup>[14]</sup>。

Wu 等<sup>[15]</sup>报道了在糖尿病小鼠中,DMY 通过降低白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平发挥抗炎作用,从而预防链脲佐菌素(STZ)诱导小鼠糖尿病性心肌病的发展。Sirtuin 3(SIRT3)是一种在心脏表达的去乙酰化酶,它通过调节蛋白质能量代谢或细胞凋亡来抵御氧化应激<sup>[16]</sup>。SIRT3 缺失加剧高血糖诱导的线粒体损伤,增加 ROS 累积,使 NLRP3 炎症小体活化,促进心肌细胞的坏死性凋亡,最终加重小鼠 DCM;DMY 处理能增加 SIRT3 的表达以保护 STZ 诱导的小鼠糖尿病心肌病,使糖尿病心肌病的发展得到控制<sup>[17]</sup>。

### 2.2 糖尿病视网膜病变

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病常见的微血管并发症之一,且发病年龄逐渐呈年轻化趋势。临床将 DR 的损害过程分为早期阶段的微血管瘤形成、视网膜出血、硬性渗出,晚期阶段的新生血管形成、纤维增

殖膜形成、视网膜脱落等不同病理进程,这是导致糖尿病患者失明的原因之一<sup>[18]</sup>。

高血糖被认为是影响 DR 发生、发展的主要因素。高血糖能够诱导蛋白激酶 C 径、多元醇途径、己糖胺途径以及晚期糖基化终末产物形成等引起氧化应激<sup>[19]</sup>。氧化应激可导致细胞焦亡、凋亡和自噬,继而引发炎症反应,导致线粒体功能障碍和细胞凋亡,对视网膜神经血管造成损伤。

研究<sup>[20]</sup>表明高糖(HG)刺激的 ARPE-19 细胞中 ROS 含量显著增加而引发氧化应激,这被认为是 DR 发展的主要致病因素。而 DMY 可以通过下调 HG 环境下 miR-34a 的表达来保护 ARPE-19 细胞免受氧化应激和凋亡<sup>[21]</sup>。体内研究<sup>[22]</sup>表明,DMY 可减轻 DR 视网膜血管渗漏、新生血管形成等病理特征,降低视网膜组织中 ROS 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水平。机制上,DMY 可抑制 Poldip2-Nox4-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号通路的激活,下调血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子(VEGF)等重要血管功能指标,改善视网膜血管功能,降低 DR 中氧化应激,抑制视网膜血管生成<sup>[22]</sup>。以上研究表明,DMY 可能是一种具有治疗 DR 的潜力药物。

### 2.3 糖尿病肾病

糖尿病肾病(DN)是由糖尿病引起的肾脏微血管疾病,是糖尿病最严重、最致命的并发症之一。早期肾小球容积增加,肾小球滤过率增高,引起肾小球细胞外基质沉积及肾纤维化,晚期发展为结节性肾小球硬化,最终导致肾功能衰竭。目前,DN 诱发因素包括高血糖、晚期糖基化终末产物、炎症因子以及氧化应激等<sup>[23]</sup>。

糖尿病患者高血糖引起的代谢异常、肾细胞自噬抑制和细胞外基质异常沉积通常会导致 DN<sup>[24]</sup>。同时,高糖条件下,细胞自噬被抑制,无法及时清除受损的细胞及细胞器,导致肾脏损伤<sup>[25]</sup>。AMPK 可促进机体能量代谢和自噬,减轻肾脏损伤<sup>[26]</sup>。陈红等<sup>[27]</sup>发现 DMY 通过激活 AMPK/mTOR 信号通路,促使细胞自噬,抑制转化生长因子- $\beta$ 1 的表达,减少肾小球细胞外基质的沉积,延缓 DN 的发展。HG 刺激肾小球系膜细胞过度增殖,导致细胞外基质成分和炎症黏附因子如细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和 VCAM-1 的过度产生和积累,导致 DN 的发生发展<sup>[28]</sup>。鞘氨醇激酶-1(SphK1)是糖尿病肾纤维化炎症的关键调节因子,可触发 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[29]</sup>。体外和体内研究证实,DMY 通过抑制 SphK1 酶活性,阻止 NF- $\kappa$ B 活化,进而抑制其下游靶蛋白如 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,对糖尿病肾纤维化具有保护作用<sup>[30]</sup>。这些发现证实 DMY 治

疗 DN 的临床应用,并有助于未来 DN 的药物开发。

#### 2.4 糖尿病神经性疼痛和糖尿病抑郁症

糖尿病神经性疼痛(DNP)和抑郁症(DP)是糖尿病的常见并发症,二者相互影响。糖尿病患者因长期血糖过高,导致各种组织慢性损伤。DNP 主要临床表现为四肢麻木、疼痛、灼热、感觉减退等,并伴有痛觉过敏、自发性疼痛、异常性疼痛,甚至发展至糖尿病足溃疡、截肢或抑郁样行为,严重影响患者的生活<sup>[31]</sup>。DP 主要表现为情绪低落,悲观消沉。与其他糖尿病并发症相比,DNP 是重要的抑郁症决定因素,可以增加抑郁症的严重程度<sup>[32]</sup>。DNP 和 DP 合并症严重影响糖尿病患者生活质量,比单独的 DNP 或 DP 更难治疗。脑源性神经营养因子(BDNF)广泛存在于周围和中枢神经系统中。研究表明 BDNF 与周围神经损伤后慢性疼痛引起的抑郁有关<sup>[33]</sup>。学者发现,BDNF 浓度的调节与抑郁症病因直接相关,其浓度的上调具有缓解抗抑郁样作用,而下调会加剧抑郁症<sup>[34-35]</sup>。原肌球蛋白受体激酶 B(TrkB)是 BDNF 的高亲和力受体,许多研究也证实了 BDNF/TrkB 参与神经病理性疼痛的进展,减少脊髓背角的 BDNF/TrkB 信号产生抗神经病理性疼痛的作用<sup>[36]</sup>。此外,研究<sup>[37]</sup>表明 DMY 可以抑制模型大鼠海马的脊髓和背根神经节中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和 TNF- $\alpha$  的表达,进而影响 BDNF/TrkB,减轻 DNP 和 DP 的合并症。因此,DMY 有望成为治疗糖尿病神经病理性疼痛合并抑郁症的潜在有效药物。

#### 2.5 糖尿病脑病

糖尿病脑病(DE)是由糖尿病引发的一种慢性进行性认知损害,临床上常伴有神经电生理及影像学改变。糖尿病引起的认知障碍主要表现在语义记忆、情景记忆、工作记忆、视觉空间能力、语言流畅度和知觉能力等受损方面<sup>[38]</sup>。研究<sup>[39]</sup>表明高血糖、氧化应激、炎症、海马突触可塑性改变、神经元钙稳态的破坏、脑微血管损伤及脑内胰岛素信号通路的异常等因素均参与 DE 的发病过程。

糖尿病引起的氧化应激会使大脑不同区域发生氧化损伤,从而导致认知功能障碍<sup>[40]</sup>。在高血糖和糖代谢受损的情况下,甲基乙二醛(MG)的积累会导致线粒体呼吸功能障碍和 ROS 产生增加,这可能是认知功能障碍的关键原因<sup>[41]</sup>。有研究<sup>[42]</sup>证实,乙二醛酶 1(Glo-1)过表达可降低糖尿病大鼠高血糖引起的晚期糖基化终末产物水平升高和氧化应激。在 MG 处理的 PC12 细胞中,DMY 增加了 Glo-1 的表达水平,同时逆转了 MG 诱导的 D-乳酸水平降低。DMY 还抑

制由 MG 诱导的 ROS 的产生,并增加 GSSG 水平和 GSH/GSSG 比率,以恢复不平衡的细胞氧化还原稳态并增强 Glo 系统的活性<sup>[43]</sup>。综上所述,DMY 也可能是 DE 潜在的治疗药物。

### 3 小结

DMY 为藤茶主要有效成分之一,具有黄酮类化合物无毒、药理活性多样的特点,是一种开发前景广阔天然化合物。DMY 不仅可作用于糖尿病及其并发症的多个靶点并调节关键信号通路,还能改善高血糖症及其相关的大血管和微血管并发症。此外,DMY 在肝脏疾病、代谢性疾病、癌症、神经退行性疾病、精神疾病、细菌感染、骨质疏松症、肾损伤等疾病的治疗中也发挥着重要作用。因此,DMY 有着丰富的前期基础和广阔的研究前景,未来可借助生物信息学进一步研究,以丰富中药单体治疗糖尿病及其并发症的理论基础,助力新药开发和临床应用。

尽管 DMY 具有良好的药理作用,但其稳定性差、溶解度低、代谢吸收快等缺点,使其在临床应用中生物利用度较弱、给药能力低,在一定程度上限制了其潜在的药用价值<sup>[44]</sup>。有研究者<sup>[19]</sup>认为通过纳米技术、环糊精包合和共结晶可以提高 DMY 水溶性,磷脂复合物和酰化技术可以提高 DMY 脂溶性,这对 DMY 在药物中的应用有很大帮助,这可能是未来研究的一个方向。

### 参考文献:

- [1] BOMMER C, HEESEMAN E, SAGALOVA V, et al. The global economic burden of diabetes in adults aged 20-79 years: a cost-of-illness study [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(6):423
- [2] ZHANG J, CHEN Y, LUO H, et al. Recent update on the pharmacological effects and mechanisms of dihydromyricetin [J]. *Front Pharmacol*, 2018, (25)9:1204
- [3] XU B, HUANG S, WANG C, et al. Anti inflammatory effects of dihydromyricetin in a mouse model of asthma [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(6):3674
- [4] TAN G, ZHANG M, FENG J, et al. Effects of pretreatment by the flavanol ampelopsin on porcine kidney epithelial cell injury induced by hydrogen peroxide [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2010, 9(4):598
- [5] QI S, XIN Y, GUO Y, et al. Ampelopsin reduces endotoxin inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(1):278
- [6] TOKARZ V L, MACDONALD P E, KLIP A. The cell biology of systemic insulin function [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(7):2273

- [7] PETERSEN M C, SHULMAN G I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance[J]. *Physiological Reviews*, 2018, 98(4): 2133
- [8] LIMA L M T R. Insulin resistance underlying type 2 diabetes[J]. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2019, 7(6): 424
- [9] ESSER N, LEGRAND-POELS S, PIETTE J, et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 105(2): 141
- [10] GUO C, HUANG T, CHEN A, et al. Glucagon-like peptide 1 improves insulin resistance *in vitro* through anti-inflammation of macrophages[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2016, 49(12): e5826
- [11] SOLINAS G, VILCU C, NEELS J G, et al. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity[J]. *Cell Metab*, 2007, 6(5): 386
- [12] HOU L, JIANG F, HUANG B, et al. Dihydromyricetin ameliorates inflammation-induced insulin resistance via phospholipase C-CaMKK-AMPK signal pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021(1): 8542809
- [13] RAJESH M, MUKHOPADHYAY P, BÁT KAI S, et al. Cannabinoid receptor 2 activation alleviates diabetes-induced cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress, and fibrosis[J]. *Geroscience*, 2022, 44(3): 1727
- [14] ABUKHALIL M H, ALTHUNIBAT O Y, ALADAILEH S H, et al. Galangin attenuates diabetic cardiomyopathy through modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111410
- [15] WU B, LIN J, LUO J, et al. Dihydromyricetin protects against diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017(1): 3764370
- [16] GONG Y, TANG N, LIU P, et al. Newcastle disease virus degrades SIRT3 via PINK1-PRKN-dependent mitophagy to reprogram energy metabolism in infected cells[J]. *Autophagy*, 2022, 18(7): 1503
- [17] SONG S, DING Y, DAI G L, et al. Sirtuin 3 deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy via necroptosis enhancement and NLRP3 activation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(2): 230
- [18] WANG W, LO A C Y. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1816
- [19] KANG Q, YANG C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications[J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101799
- [20] TENCONI P E, BERMUDEZ V, ORESTI G M, et al. High glucose-induced phospholipase D activity in retinal pigment epithelium cells: new insights into the molecular mechanisms of diabetic retinopathy[J]. *Exp Eye Res*, 2019, 184: 243
- [21] LI W, XIAO H. Dihydromyricetin alleviates high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in human retinal pigment epithelial cells by downregulating miR-34a expression[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 27(14): 387
- [22] GUI S Y, WANG X C, HUANG Z H, et al. Nanoscale coordination polymer Fe-DMY downregulating Poldip2-Nox4-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pathway and alleviating diabetic retinopathy[J]. *J Pharm Anal*, 2023, 13(11): 1326
- [23] A/L B VASANTH RAO V R, TAN S H, CANDASAMY M, et al. Diabetic nephropathy: An update on pathogenesis and drug development[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(1): 754
- [24] TUNG C W, HSU Y C, SHIH Y H, et al. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2018, 23(4): 32
- [25] KUME S, THOMAS M C, KOYA D. Nutrient sensing, autophagy, and diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2012, 61(1): 23
- [26] EGAN D F, SHACKELFORD D B, MIHAYLOVA M M, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy[J]. *Science*, 2011, 331(6016): 456
- [27] 陈红, 公欣华, 陈丽君, 等. 二氢杨梅素激活 AMPK 通路预防糖尿病肾病的作用研究[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(34): 6613
- [28] LIU J J, YEOH L Y, SUM C F, et al. Vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1, is associated with diabetic kidney disease in Asians with type 2 diabetes[J]. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2015, 29(5): 707
- [29] WANG C, XU T, LACHANCE B B, et al. Critical roles of sphingosine kinase 1 in the regulation of neuroinflammation and neuronal injury after spinal cord injury[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18: 1
- [30] WEN M, SUN X, PAN L, et al. Dihydromyricetin ameliorates diabetic renal fibrosis via regulating SphK1 to suppress the activation of NF- $\kappa$ B pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2024, 978: 176799
- [31] NARANJO C, REGUERO L D, MORATALLA G, et al. Anxiety, depression and sleep disorders in patients with diabetic neuropathic pain: a systematic review[J]. *Expert Rev Neurother*, 2019, 19(12): 1201
- [32] D'AMATO C, MORGANTI R, GRECO C, et al. Diabetic peripheral neuropathic pain is a stronger predictor of depression than other diabetic complications and comorbidities[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2016, 13(6): 418
- [33] FUKUHARA K, ISHIKAWA K, YASUDA S, et al. Intracerebroventricular 4-methylcatechol (4-MC) ameliorates chronic pain associated with depression-like behavior via induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(6): 971
- [34] HURLEY L L, AKINFIRESOYE L, NWULIA E, et al. Antide-

- pressant-like effects of curcumin in WKY rat model of depression is associated with an increase in hippocampal BDNF[J]. Behav Brain Res, 2013, 15(239):27
- [35] KHAN H, AMIN S, PATEL S. Targeting BDNF modulation by plant glycosides as a novel therapeutic strategy in the treatment of depression[J]. Life Sci, 2018, 1(196):18
- [36] CAO T, MATYAS J J, RENN C L, et al. Function and mechanisms of truncated BDNF receptor TrkB. T1 in neuropathic pain[J]. Cells, 2020, 9(5):1194
- [37] GE H, GUAN S, SHEN Y, et al. Dihydromyricetin affects BDNF levels in the nervous system in rats with comorbid diabetic neuropathic pain and depression[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):1
- [38] ARVANITAKIS Z, WILSON R S, BIENIAS J L, et al. Diabetes mellitus and risk of alzheimer disease and decline in cognitive function[J]. Arch Neurol, 2004, 61(5):661
- [39] UMEGAKI H. Type 2 diabetes as a risk factor for cognitive impairment: current insights[J]. Clin Interv Aging, 2014, 28(9):1011
- [40] 朱贵梅. 二氢杨梅素通过下调 JNK 信号拮抗高糖诱导的 PC12 细胞凋亡[D]. 衡阳: 南华大学, 2017
- [41] DI LORETO S, ZIMMITTI V, SEBASTIANI P, et al. Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons[J]. Int J Biochem Cell B, 2008, 40(2):245
- [42] SONG H, GUAN Y, ZHANG L, et al. SPARC interacts with AMPK and regulates GLUT4 expression[J]. Biochem Bioph Res Co, 2010, 396(4):961
- [43] JIANG B, LE L, PAN H, et al. Dihydromyricetin ameliorates the oxidative stress response induced by methylglyoxal via the AMPK/GLUT4 signaling pathway in PC12 cells[J]. Brain Res Bull, 2014(109):117
- [44] LIU L, YIN X, WANG X, et al. Determination of dihydromyricetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study[J]. Pharmaceutical Biology, 2017, 55(1):657

(收稿日期:2025-01-03)

(上接第 455 页)

- [28] 安成飞, 赵琦, 杜宇征. 基于“心-脑-肾轴”探讨卒中后认知障碍病机及针刺取穴思路[J]. 中医杂志, 2021, 62(24):2135
- [29] 叶炎生, 杨庆镗, 朱定钰, 等. 涌泉灸对肾精亏虚型卒中后认知障碍患者认知功能及下肢运动功能的影响[J]. 中国针灸, 2023, 43(9):1021
- [30] 杨强玲, 俞文骏, 张紫馨, 等. 脑卒中后认知障碍的现代康复治疗进展[J]. 按摩与康复医学, 2022, 13(9):72
- [31] 卢旭霞, 韩彦青. 康复机器人对脑卒中后认知障碍病人认知功能、神经功能缺损程度及炎性因子的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(9):1721
- [32] ZHUO P, HUANG L, LIN M, et al. Efficacy and safety of acupuncture combined with rehabilitation training for poststroke cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2023, 32(9):107231
- [33] 陈悦琦, 汪婷婷, 史骏超, 等. 通调督脉针刺法配合认知康复训练治疗脑卒中后认知障碍疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2024, 40(7):1413
- [34] 刘芳, 修火琴, 林茜, 等. 艾灸对卒中后认知障碍患者认知与执行功能及血清同型半胱氨酸水平的影响[J]. 山西中医药大学学报, 2025, 26(1):85
- [35] KIM J O, LEE S J, PYO J S. Effect of acetylcholinesterase inhibitors on post-stroke cognitive impairment and vascular dementia: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2020, 15(2):e0227820
- [36] 唐梁, 陈志宁, 梁伟海, 等. 靳三针联合多奈哌齐治疗卒中后认知障碍的研究观察[J]. 广州医药, 2022, 53(2):23
- [37] LI S, WANG D, ZHANG Y, et al. The efficacy of acupuncture combined with other therapies in post stroke cognitive impairment: a network meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(29):e34086
- [38] 詹杰, 王学文, 程南方, 等. 电针治疗脑卒中后认知障碍的系统评价[J]. 中国针灸, 2017, 37(10):1119
- [39] BIAN J, LIU C, LI X, et al. Electroacupuncture improves the learning and memory abilities of rats with PSCI by attenuating the TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway on the hippocampal microglia[J]. Neuroreport, 2024, 35(12):780
- [40] LIN B, WANG M, CHEN X, et al. Involvement of P2X7R-mediated microglia polarization and neuroinflammation in the response to electroacupuncture on post-stroke memory impairment[J]. Brain Res Bull, 2024, 212:110967
- [41] LANG J, LUO J, LANG J, et al. Electroacupuncture alleviated post-stroke cognitive impairment via the mTOR/NLRP3-mediated autophagy-inflammatory pathway[J]. Eur J Med Res, 2024, 29(1):532
- [42] 袁洁, 高静, 苏凯奇, 等. 电针对脑缺血再灌注损伤诱导的学习记忆障碍大鼠 BDNF/TRKB/CREB 信号通路和海马突触可塑性的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(9):843

(收稿日期:2025-03-24)

## 《湖北科技学院学报(医学版)》稿约

《湖北科技学院学报(医学版)》是国内外公开发行的医药卫生类综合性学术期刊,以我校为重点,报道科研、医疗等方面的新成果、新技术、新经验。内容包括基础医学、临床医学、新技术、新方法、综述讲座等。欢迎投稿,欢迎订阅。来稿要求如下:

- 1 文稿应具有科学性、真实性,重点突出,文字简练,数据可靠。论著和综述一般6000字,经验、调查、技术方法一般5000字。
- 2 学术论文、研究报告一般分为引言、材料和方法、结果、讨论四部分;临床分析、个案报道一般分为临床资料和讨论两部分。论著需附250字左右的结构式中、英文摘要,摘要内容包括目的、方法、结果和结论,且中、英文要一致。在摘要后正文前附中、英文关键词3~8个和中国图书资料分类号(中图分类号)。关键词选用《医学主题词注释字顺表》中的术语。
- 3 文中各层次的标题应简短明确,节段层次序号分别用阿拉伯数字“1”“1.1”“1.1.1”形式表示。专用名词用统一医学科技名词,翻译名词应附原文。简化字按1986年10月10日国务院批准重新公布的《简化字总表》书写。统计学符号按GB3358—82《统计学名词及符号》的有关规定书写。
- 4 图表应少而精,其内容与文字不可重复。必要的图表应按规定绘制,表格用三线表,要有表序和表题、图序和图题。照片应对比度好,清晰可辨,并附说明。
- 5 参考文献以亲自阅读近5年的重要文献为主,提倡引用本学报的论文,勿引用未公开发表的文章。参考文献附于文末,按文中出现先后为序,在文中引用处的右上角标以带方格括号的数字。论著一般不超过10条,综述不超过20条。书写格式如下:

**期刊** [序号] 作者(一至三位作者,将其姓名均写出,之间用逗号隔开;三位以上作者,只写前三位作者,后加等).文题[J].刊名,年,卷(期):起页

[1]袁学文.输血传播病毒(TTV)研究新进展[J].咸宁医学院学报,1999,13(3):198

[2]OLIVETTIG, ABBIR, QUAINI F, et al. Apoptosis in the failing human heart [J]. N Engl J Med, 1997, 336: 1131

**书籍** [序号] 作者(主编).书名[M].卷次.版次.出版地:出版社,年:起页.(或作者.题目.见:主编.书名[M].卷次.版次.出版地:出版社,年:起页)

[3]王慕逖.儿科学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2001:285

[4]宁寿葆.循环系统疾病.见:王慕逖主编.儿科学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2001:285

6 稿件应以Word电子稿通过本网站 <http://xbbjb.hbust.edu.cn> 在线投稿系统投稿,来稿一律文责自负。编辑部对来稿有修改权,如不同意修改请在来稿时声明。

7 来稿请附作者单位介绍信,证明文稿的真实性,无一稿两投,署名无争议等情况。各级重大科技攻关和基金的科研成果论文,可以优先发表,请在介绍信中说明项目名称。

8 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、“中国期刊网”和“万方数据系统(ChinaInfo)数字化期刊群”。凡本刊录用的稿件,由编辑部统一纳入上述系统。不同意者在来稿时声明,以便另行处理。

9 本刊不退稿,作者请自留底稿。若投稿后3个月内未见回音,作者可另投他刊。投稿注册请写明稿件联系人的详细通讯地址、邮政编码和电话。

《湖北科技学院学报(医学版)》编委会

主任: 李岱

副主任: 白育庭 胡旺平

委员: (按姓氏笔画为序)

马萍 王诗 王俊芳 白育庭 宁志丰 朱海丽  
 刘超 李岱 李玲 闵清 沈定文 张侠  
 陈子敏 陈拥彬 陈黄琴 陈清杰 武阳 欧阳昌汉  
 周燕红 胡旺平 查文良 高卉 黄翠萍 梅武轩  
 鲍翠玉 蔡飞 蔡慧兰

特邀委员: (按姓氏笔画为序)

邓启红 郑州大学教授、博士生导师  
 李华 华中科技大学教授、博士生导师  
 李秋柏 华中科技大学教授、主任医师、博士生导师  
 杨旭 华中师范大学教授、博士生导师  
 杨智宽 爱尔眼科医院集团有限公司教授、博士生导师



微信公众号



超星数字期刊

# 湖北科技学院学报(医学版)

Journal of Hubei University of Science  
and Technology ( Medical Sciences )

( 1987年创刊 双月刊 )

第39卷 第5期 ( 总第197期 )

2025年10月出版

主管单位: 湖北省教育厅

主办单位: 湖北科技学院

编辑出版: 湖北科技学院学报编辑部

主编: 李岱

副主编: 白育庭 胡旺平

执行副主编: 陈拥彬

封面设计: 张利平

网 址: <http://xbbjb.hbust.edu.cn>

邮 箱: [XNXYXB@163.com](mailto:XNXYXB@163.com)

邮 编: 437100

电 话: (0715) 8266018

地 址: 湖北省咸宁市咸宁大道88号

印 刷: 咸宁市万达文化传媒有限公司

Administrated: Hubei Provincial Department of Education

Sponsored: Hubei University of Science and Technology

Edited, Published: The Editorial Department of Journal of Hubei  
University of Science and Technology

Editor-in-Chief: LI Dai

Deputy Editor-in-Chief: BAI Yuting, HU Wangping

Executive Deputy Editor-in-Chief: CHEN Yongbin

Cover Designer: ZHANG Liping

Website: <http://xbbjb.hbust.edu.cn>

E-mail: [XNXYXB@163.com](mailto:XNXYXB@163.com)

Postcode: 437100

Telephone: (0715)8266018

Address: 88 Xianning Ave., Xianning City, Hubei

Printed: Xianning Wanda Culture and Media Co. td

ISSN 2095-4646

CN 42-1839/R

ISSN 2095-4646



定价 15.00 元/期