

# 川芎提取物改善曲妥珠单抗诱导心肌细胞损伤的 药效物质研究<sup>△</sup>

杨家慧<sup>1\*</sup>, 徐静<sup>1</sup>, 刘欣桐<sup>1</sup>, 曹波<sup>1</sup>, 余诺贤<sup>1,2</sup>, 张铭予<sup>1</sup>, 范林林<sup>1</sup>, 李春雨<sup>1#</sup>, 李国辉<sup>1#2</sup> (1. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院药剂科, 北京 100021; 2. 中国医科大学附属第一医院药学部, 沈阳 110001)



中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2025)03-0282-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2025.03.006

**摘要** 目的:探讨川芎提取物改善曲妥珠单抗相关心脏毒性药效的物质基础。方法:应用均匀设计和体外保护心肌细胞损伤的生物活性检测方法,结合化学指纹图谱进行谱效相关分析,探索川芎提取物改善曲妥珠单抗诱导心肌细胞损伤的药效成分。结果:均匀设计法优化结果显示,川芎最佳醇提取工艺为75%乙醇,9倍溶剂量,乙醇浸润35 min,超声提取30 min;均匀设计下的1—9号样本提取物均可改善曲妥珠单抗诱导的心肌细胞损伤,保护作用最强的为3号样本( $EC_{50}=0.037$ ),最弱的为2号样本( $EC_{50}=0.317$ )。谱效相关分析结果表明,川芎嗪、洋川芎内酯I、阿魏酸和正丁基苯酞等4个成分具有相关性,其中相关性最强的为川芎嗪( $r=0.68, P<0.05$ )。验证实验结果显示,川芎嗪活性最强,其次为阿魏酸、正丁基苯酞和川芎内酯I,与谱效相关分析结果基本一致。结论:醇提取方法能够影响川芎改善曲妥珠单抗诱导心肌细胞损伤的药效物质含量变化;川芎嗪、洋川芎内酯I、阿魏酸和正丁基苯酞为川芎提取物改善曲妥珠单抗诱导心肌细胞损伤的主要药效成分。本研究可为中药改善抗肿瘤药物相关心脏毒性的药效物质及关联临床疗效的质量控制方法提供科学依据。

**关键词** 乳腺癌; 曲妥珠单抗; 心肌细胞损伤; 川芎提取物; 谱效相关分析

## Pharmacoactive Substances of *Chuanxiong Rhizoma* Extract in Ameliorating Trastuzumab-Induced Myocardial Cell Injury<sup>△</sup>

YANG Jiahui<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, LIU Xintong<sup>1</sup>, CAO Bo<sup>1</sup>, YU Nuoxian<sup>1,2</sup>, ZHANG Mingyu<sup>1</sup>, FAN Linlin<sup>1</sup>, LI Chunyu<sup>1</sup>, LI Guohui<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To explore the underlying mechanism of *Chuanxiong rhizoma* extract in ameliorating trastuzumab-induced cardiotoxicity. **METHODS:** Homogeneous design and *in vitro* bioactivity assay for protection against myocardial cell injury were applied, combined with chemical fingerprinting for spectral correlation analysis, the pharmacodynamic components of *Chuanxiong rhizoma* extract in ameliorating trastuzumab-induced cardiomyocyte injury were explored. **RESULTS:** Homogeneous design showed that the optimal ethanol extraction process of *Chuanxiong rhizoma* was 75% ethanol, 9 times of solvent volume, ethanol infiltration for 35 minutes and ultrasonic extraction for 30 minutes. Under homogeneous design test, extracts of samples 1 to 9 could ameliorate trastuzumab-induced myocardial cell injury, the strongest protective effect was S3 ( $EC_{50}=0.037$ ), and the weakest was S2 ( $EC_{50}=0.317$ ). Results of correlation analysis showed that tetramethylpyrazine, tetramethylpyrrolactone I, ferulic acid and n-butylphthalide were correlated, and tetramethylpyrazine had the strongest correlation ( $r=0.68, P<0.05$ ). Validation experiments showed that ligustrazine had the strongest activity, followed by ferulic acid, n-butylphthalide and ligustractone I. The results were in agreement with the spectral correlation analysis. **CONCLUSIONS:** The alcohol extraction method can affect the content of *Chuanxiong rhizoma* extract in ameliorating trastuzumab-induced myocardial cell injury. Ligustrazine, ligustractone I, ferulic acid and n-butylphthalide are the main active components of *Chuanxiong rhizoma* extract in improving trastuzumab-induced myocardial cell injury. This study may provide a scientific basis for the quality control

△ 基金项目:北京市自然科学基金资助项目(No. L248025)

\* 硕士研究生。研究方向:中医药防治抗肿瘤药物相关不良反应。E-mail: yangjiahui0710@foxmail.com

# 通信作者 1:副主任药师。研究方向:中医药防治抗肿瘤药物不良反应。E-mail: licy@ cicams. ac. cn

# 通信作者 2:主任药师。研究方向:中西药联合抗肿瘤作用机制与合理用药研究。E-mail: lgh0603@ cicams. ac. cn

method of traditional Chinese medicine to improve cardiotoxicity associated with anticancer drugs.

**KEYWORDS** Breast cancer; Trastuzumab; Myocardial cell injury; *Chuanxiong Rhizoma* extract; Spectral effect correlation

乳腺癌是严重威胁女性生命健康的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。国家癌症中心数据显示,我国乳腺癌新发病例数居女性恶性肿瘤新发病例数的第2位<sup>[2]</sup>。人表皮生长因子受体-2(HER-2)阳性乳腺癌占有乳腺癌病例的20%~25%,其预后比HER-2阴性乳腺癌更差,有效的抗HER-2靶向治疗是改善预后的重要手段<sup>[3-4]</sup>。曲妥珠单抗是第1个针对HER-2的人源化单克隆抗体,作为HER-2阳性乳腺癌的一线治疗药物,临床治疗效果显著<sup>[5]</sup>。然而,该药的心脏毒性严重限制了其在临床中的安全应用<sup>[6]</sup>。1项长达7年的临床随访数据表明,曲妥珠单抗的心脏毒性表现为心律失常、心脏骤停、充血性心力衰竭等。目前,仅有右雷佐生是经美国食品药品监督管理局批准的心脏保护剂,用于预防蒽环类抗肿瘤药物导致的心脏毒性<sup>[7]</sup>。然而,由于右雷佐生会继发性恶性肿瘤和骨髓增生异常综合征,其临床使用受到限制<sup>[8]</sup>。对于靶向药物所致心脏毒性,临床上多采用停药观察或联合应用血管紧张素II受体拮抗剂、血管紧张素转换酶抑制剂及 $\beta$ 受体阻断剂等常见心脏保护药物,但是改善效果并不乐观,目前临床上尚缺乏其他有效防治的药物。

中医药在我国具有悠久的历史,在中西医结合抗肿瘤过程中,中医药可以起到增效减毒的作用<sup>[9]</sup>。川芎是临床常用中药,为伞形科植物川芎的干燥根茎,具有活血行气、祛风止痛的功效,主要用于心脉瘀阻之胸痹心痛、肝郁气滞之胁肋胀痛、肝血瘀阻之胸胁刺痛等<sup>[10]</sup>。现代研究结果表明,川芎能够改善血管内皮细胞功能、抗血栓形成以及保护心肌组织等,在心血管疾病的防治中表现出预防与治疗的双重效益;阿魏酸、川芎嗪和洋川芎内酯I等是川芎治疗心血管疾病的主要活性成分<sup>[11]</sup>。然而,川芎能否用于治疗曲妥珠单抗相关心脏毒性及其药效物质基础尚不清楚,需要进一步研究。为规避正交设计存在的因素与水平数受限、实验频次繁多等问题,本研究采用均匀设计,通过确保实验点在实验域内的均匀分布,执行与水平数相匹配的实验次数,获取全面且有效的数据结果。

本研究运用高效液相色谱(HPLC)及心肌细胞活性检测技术,借助均匀设计优化策略,对比分析不同提取工艺下川芎提取物对曲妥珠单抗诱导心肌细胞损伤的保护作用差异。结合化学指纹图谱,进行谱效相关分析,旨在探索川芎的最优提取工艺及其保护心肌细胞的药效活性成分。随后,通过单体成分活性验证,初步确定川芎提取物改善曲妥珠单抗诱导心肌细胞毒性的主要药效成分,为建立关联功效的川芎质量控制方法提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

小鼠HL-1心肌细胞,购自湖南丰晖生物细胞库。

### 1.2 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪、1260 DADWR型检测器(美国Agilent Technologies公司);Scout SE-SE402F型电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司];CP214型万分之一电子分析天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司];CV200型真空离心浓

缩仪(北京吉艾姆科技有限公司);数控超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);移液枪(德国Enppendorf公司);UPT-I-5型超纯水制备系统(四川优普超纯科技有限公司);粉碎机(武义海纳电器有限公司);zTS2-FL型倒置显微镜[尼康映像仪器销售(中国)有限公司];SC-3614型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);COUNTESS II型细胞计数器,BB150型二氧化碳培养箱,LEGEND MICRO 21R型冷冻型微量台式离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);H1MD型多功能微孔板检测仪(美国BIOTEK公司);高速冷冻离心机(德国热电实验设备有限公司奥斯特罗德分公司);LUX-24型电热恒温水浴锅(北京陆希科技有限公司)。

### 1.3 药品与试剂

川芎(产地四川,国药集团北京华邈药业有限公司,批号为73011511);曲妥珠单抗[罗氏制药(瑞士)有限公司,批号为20180073];阿魏酸(批号为17092501)、丁烯基苯酐(批号为23052505)、洋川芎内酯H(批号为23082605)、正丁基苯酐(批号为23050503)、6''-阿魏酰斯皮诺素(批号为23041004)、欧当归内酯A(批号为23051803)、川芎嗪(批号为24032202)、绿原酸(批号为22121606)、藁本内酯(批号为24010804)、洋川芎内酯A(批号为23101907)和洋川芎内酯I(批号为24032207)均购自成都普菲德对照品科技有限公司;75%乙醇(北京贞玉民生药业有限公司,批号为202212009);甲酸、甲醇、乙腈[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);青霉素-链霉素双抗混合溶液(北京索莱宝科技有限公司);盐酸盐缓冲液(PBS,美国Cytiva公司);胰蛋白酶消化液(北京中生奥邦生物科技有限公司);细胞活力检测试剂[CCK-8,北仁化学科技(北京)有限公司]。

### 1.4 样品溶液制备

精密称取干燥川芎粗粉0.50 g,以乙醇浓度(% $X_1$ )、溶剂量(倍, $X_2$ )、浸润时间(min, $X_3$ )和提取时间(min, $X_4$ )为指标,每个因素选取9个水平,应用均匀设计 $U_9(9^4)$ 表进行超声提取试验,详细的因素水平安排情况见表1。将每次实验获得的川芎醇提取液,浓缩得干浸膏,备用。

表1  $U_9(9^4)$ 川芎醇提均匀设计因素水平

水平	$X_1$ /%	$X_2$ /倍	$X_3$ /min	$X_4$ /min
S1	90	10	30	50
S2	80	5	50	25
S3	60	9	40	15
S4	50	12	55	40
S5	40	4	25	45
S6	30	11	20	20
S7	20	8	45	55
S8	10	6	35	30
S9	70	7	15	35

### 1.5 对照品溶液制备

精密称取适量川芎嗪、6''-阿魏酰斯皮诺素、阿魏酸、洋川芎内酯H、洋川芎内酯I、洋川芎内酯A、藁本内酯、绿原酸、正

丁基苯酚、丁烯基苯酚和欧当归内酯,各加入适量甲醇-水(7:3)溶液溶解后,补足液体、定容。精密量取相应标准品溶液混合,再次加入适量甲醇-水(7:3)溶液稀释、定容,得到对照品混合溶液:川芎嗪 7.6 mg/mL、6<sup>'''</sup>-阿魏酰斯皮诺素 6.1 mg/mL、阿魏酸 130.6 mg/mL、洋川芎内酯 H 35.6 mg/mL、洋川芎内酯 I 762.2 mg/mL、洋川芎内酯 A 321.4 mg/mL、藁本内酯 49.3 mg/mL、绿原酸 181.9 mg/mL、正丁基苯酚 111.6 mg/mL、丁烯基苯酚 15.4 mg/mL 和欧当归内酯 167.0 mg/mL。

### 1.6 色谱条件及指纹图谱分析

色谱分析在安捷伦 1200 高效液相色谱系统上进行,该系统配备有二元(四元)泵、二极管阵列检测器(dAD)、恒温控制自动采样器、柱隔室和 ChemStation 数据采集系统。使用 Agilent Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> 分析柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μmol/L)进行分析物分离。柱温 30 °C,检测波长 300 nm。流动相含有溶剂 A(乙腈)和溶剂 B(0.1% 甲酸)。最佳梯度洗脱程序:0~15 min,10%~16% A;15~32 min,16%~27% A;32~35 min,27%~37% A;35~60 min,37%~58% A;60~65 min,58%~10% A。注射体积为 5 μL,流速设定为 1.0 mL/min。运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,对 9 份提取液样品色谱峰进行比对,得到共有峰对照图谱、色谱峰峰面积及 9 份川芎样品的相似度值。热图分析应用 MetaboAnalyst 6.0 在线平台。

### 1.7 细胞培养

小鼠 HL-1 心肌细胞常规复苏后,培养在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗混合溶液的高糖培养基中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。细胞每 2 d 传代 1 次,取 3—7 代对数生长期的细胞用于后续实验。

### 1.8 细胞给药及分组

取对数生长期的 HL-1 细胞消化后,以 7 000 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中,贴壁生长 24 h 后给药。实验分为空白对照组、曲妥珠单抗组、川芎提取物不同剂量组、曲妥珠单抗+川芎提取物不同剂量组、曲妥珠单抗+单体组,每组设置 3 个复孔。给药时,弃去原有培养基,曲妥珠单抗组按照 2.5、5.0、7.0、10.0、13.7、15.0 μmol/L 的药物浓度梯度加入曲妥

珠单抗;川芎提取物不同剂量组在细胞中分别加入系列梯度浓度川芎提取液样品;曲妥珠单抗+川芎提取物不同剂量组每孔分别加入系列梯度浓度川芎提取液,孵育 1 h 后,每孔加入曲妥珠单抗溶液,使曲妥珠单抗溶液最终浓度为 7 μmol/L;曲妥珠单抗+单体组每孔分别加入不同浓度川芎嗪标准品溶液、阿魏酸标准品溶液、正丁基苯酚标准品溶液和洋川芎内酯 I 标准品溶液,孵育 1 h 后,每孔加入曲妥珠单抗溶液,使曲妥珠单抗溶液最终浓度为 7 μmol/L。给药后 48 h,检测各组细胞存活率。

### 1.9 CCK-8 法检测细胞存活率

按照 CCK-8 试剂盒说明书进行操作。细胞给药 48 h 后弃去培养基,每孔加入 100 μmol/L 的 CCK-8(体积比,DMEM 培养基:CCK-8=10:1)试剂,孵育 2.5 h 后,用 H1MD 型多功能微孔板检测仪于 450 nm 处测吸光度值[光密度(OD)],并依照以下公式计算细胞存活率。细胞存活率/%=(OD<sub>测得</sub>-OD<sub>Blank</sub>)/(OD<sub>Contrast</sub>-OD<sub>Blank</sub>)×100%。

### 1.10 统计学方法

按指纹图谱对照图谱选取已知物质峰,以其峰面积为自变量,川芎抗曲妥珠单抗损伤心肌细胞的保护性指标 1/半最大效应浓度(1/EC<sub>50</sub>)为因变量,应用 SPSS 软件进行 Pearson 相关分析,得到相关系数值并比较显著性。

## 2 结果

### 2.1 均匀设计实验结果

均匀设计用表和实验结果采用中国均匀设计学会和东北制药总厂共同研制的“均匀设计软件包”处理数据,将试验结果通过二次多项式逐步非线性回归分析,建立回归模型,结果见表 2 和图 1。*F* 检验表明,回归方程 1、3 在 α=0.01 的水平上,回归方程 4 在 α=0.02 的水平上,回归方程 2 在 α=0.05 的水平上,回归方程 5 在 α=0.09 的水平上均为显著;从 *S* 值(剩余标准差)来看,5 个响应模型均具有良好的预测精度,大小顺序为 3>2>5>1>4;比较回归方程拟合对比图,5 个图中的样本值和 *R* 拟合度值均具有较好的拟合精度;此外,模型的 *R* 值(负相关系数)也表明回归方程具有较高的预测精度。故使用该统计模型预测川芎醇提工艺参数对其有效成分提取的影响可行。

表 2 二次多项式逐步非线性回归结果

指标	回归方程	<i>R</i>	<i>F</i>	<i>S</i>
1/EC <sub>50</sub>	$Y=0.46124-1.15663X_4+1.39517X_1X_2-1.78932X_1X_4+1.80470X_4^2$	0.999	2.573×10	0.104
阿魏酸含量	$Y=-0.050970+0.672568X_4+0.777796X_1X_4+2.12566X_2X_3-2.85199X_2X_4+0.141414X_4^2$	0.999	3.598×10 <sup>2</sup>	0.020
正丁基苯酚含量	$Y=0.296736+1.36957X_1-2.48531X_2-0.852727X_1X_3+2.02601X_2^2+0.547402X_3^2$	0.999	7.477×10 <sup>5</sup>	0.000
川芎嗪含量	$Y=-0.208562+0.509276X_2-2.31952X_2X_3+1.54271X_3^2+1.06221X_3X_4$	0.999	1.147×10	0.691
洋川芎内酯 I 含量	$Y=0.121459+1.91977X_1-1.17898X_1^2-1.82688X_1X_3+1.13575X_1X_4+1.05543X_3^2$	0.999	8.390×10	0.036

注:*F*<sub>0.01</sub>(4,4)=15.977,*F*<sub>0.05</sub>(7,1)=2.368×10<sup>2</sup>,*F*<sub>0.01</sub>(7,1)=5.928×10<sup>3</sup>,*F*<sub>0.02</sub>(4,4)=10.899,*F*<sub>0.09</sub>(7,1)=72.813。

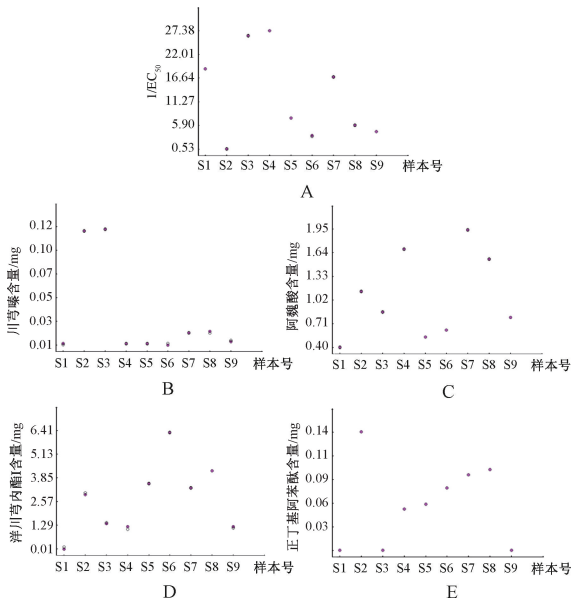
### 2.2 工艺条件的优化

通过对试验模型各指标逐一优化,得到理论最佳组合值及预测值,然后根据回归方程绘制等值线图,进一步分析各因素对每项指标的影响,结合实验原理和试验具体情况确定最佳工艺指标。指标 1/EC<sub>50</sub> 最高时各个因素组合:*X*<sub>1</sub>=90;*X*<sub>2</sub>=12;*X*<sub>3</sub>=15.3;*X*<sub>4</sub>=15.3。指标阿魏酸最高时各个因素组合:*X*<sub>1</sub>=90;*X*<sub>2</sub>=12;*X*<sub>3</sub>=55;*X*<sub>4</sub>=55。指标川芎嗪最高时各个因素组合:*X*<sub>1</sub>=10.5;*X*<sub>2</sub>=4.1;*X*<sub>3</sub>=55;*X*<sub>4</sub>=55。指标洋川芎内酯 I 最高时

各个因素组合:*X*<sub>1</sub>=90;*X*<sub>2</sub>=4.1;*X*<sub>3</sub>=55;*X*<sub>4</sub>=43.5。指标正丁基苯酚最高时各个因素组合:*X*<sub>1</sub>=90;*X*<sub>2</sub>=4.1;*X*<sub>3</sub>=55;*X*<sub>4</sub>=15.3。综合分析,为了保证 4 项指标都能取相对较大值,得到最优工艺条件为 *X*<sub>1</sub>=75,*X*<sub>2</sub>=9,*X*<sub>3</sub>=35,*X*<sub>4</sub>=30。

### 2.3 HPLC 指纹图谱分析

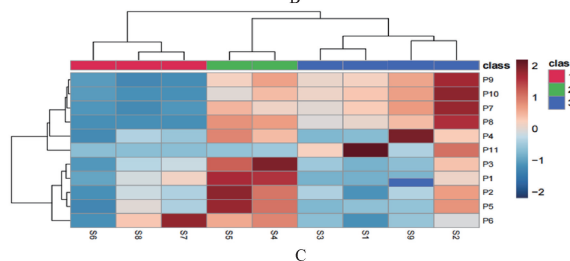
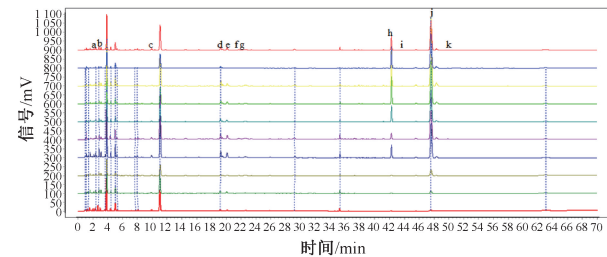
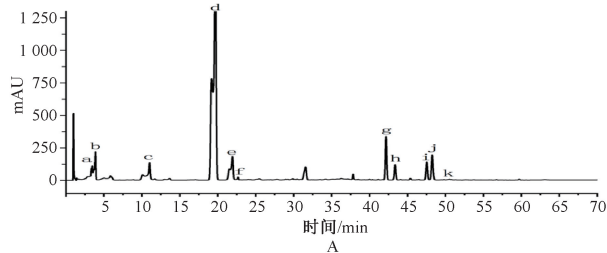
采集 9 份不同提取工艺制备的川芎提取液指纹图谱,并比较其相似度值。由图 2、表 3 可知,与对照图谱比较,S1—S9 的相似度依次为 0.952、0.967、0.988、0.981、0.977、0.907、



A.  $1/EC_{50}$ ; B. 川芎嗪含量; C. 阿魏酸含量; D. 洋川芎内酯 I 含量;  
E. 正丁基阿苯酐含量; 圆圈为样本数值, 圆点为方程拟合值。

图 1 回归方程拟和对比如

0.670、0.602、0.958, 提示 9 份川芎提取液样品中化学成分的整体差异性。与混合对照品溶液 (R) 比对, 11 个共有峰均指认成功 [图 2 (B)], 分别为川芎嗪 (P1)、绿原酸 (P2)、阿魏酸 (P3)、洋川芎内酯 I (P4)、洋川芎内酯 H (P5)、6''-阿魏酸斯皮诺素 (P6)、洋川芎内酯 A (P7)、正丁基苯酐 (P8)、藁本内酯 (P9)、丁烯基苯酐 (P10)、欧当归内酯 A (P11)。然后进行



A. 均匀设计中 9 份川芎样品的指纹图谱; B. 11 种单体化合物混合参考溶液的 HPLC 色谱图;

C. 均匀设计中 9 份川芎样品中 11 种已知物质的峰面积热图。

图 2 均匀设计中 9 个川芎样品的化学指纹图谱和热图分析

表 3 川芎提取物中各化学成分的保留时间和峰面积

峰	保留时间/min	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	对照图谱
P1	3.7	20	36	20	59	60	18	36	32	21	34
P2	3.9	423	1 218	750	1 368	1 726	405	752	843	766	917
P3	10.9	700	1 473	898	2 518	2 019	527	1 117	1 031	816	1 233
P4	19.7	998	1 745	970	1 852	2 217	591	1 106	1 256	3 046	1 531
P5	21.9	178	317	166	345	417	112	200	239	182	240
P6	22.6	0	25	13	45	38	0	64	33	15	26
P7	42.2	1 550	2 903	1 308	1 428	1 728	306	317	189	1 950	1 298
P8	43.4	64	127	59	89	94	0	0	0	78	57
P9	47.5	2 615	5 246	2 422	3 414	2 609	465	199	82	3 356	2 268
P10	48.3	340	677	297	359	266	34	0	0	415	265
P11	51.1	720	437	223	45	20	0	0	0	76	169

9 批样品的热图分析, 结果见图 2 (C), 这 9 批样品分为 2 大类, 第 1 类由 S6—S8 组成, 峰值强度相对较低; 第 2 类由 S1—S5 和 S9 组成, 峰值强度相对较高。

#### 2.4 川芎不同提取物改善曲妥珠单抗致心肌细胞损伤的研究

在 2.5~13.7  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内, 曲妥珠单抗对心肌细胞活性有明显抑制作用, 其中 7.0  $\mu\text{mol/L}$  抑制作用最强, 高达 58.366%, 因此选取 7.0  $\mu\text{mol/L}$  作为曲妥珠单抗诱导心肌细胞损伤模型的浓度, 见图 3。当川芎提取液生药浓度过高时, 亦会对心肌细胞的生长产生抑制作用, 因此, 本实验考察了 9 份川芎提取液的无毒剂量。考察 1—9 号系列无毒浓度川芎提取液对曲妥珠单抗诱导心肌细胞损伤的保护作用, 结果见图 4。可见, 9 份川芎样品均可改善曲妥珠单抗导致的心肌细胞损伤, 其中最强的为 S3, 最弱的为 S2, 保护作用强弱顺序为 S3 ( $EC_{50} = 0.037$ ) > S7 ( $EC_{50} = 0.038$ ) > S6 ( $EC_{50} = 0.053$ ) > S4

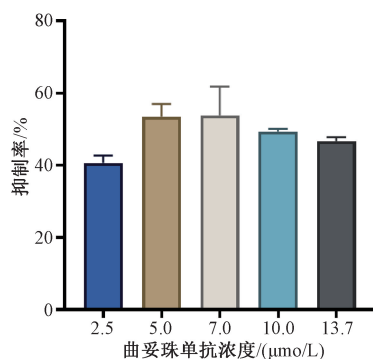
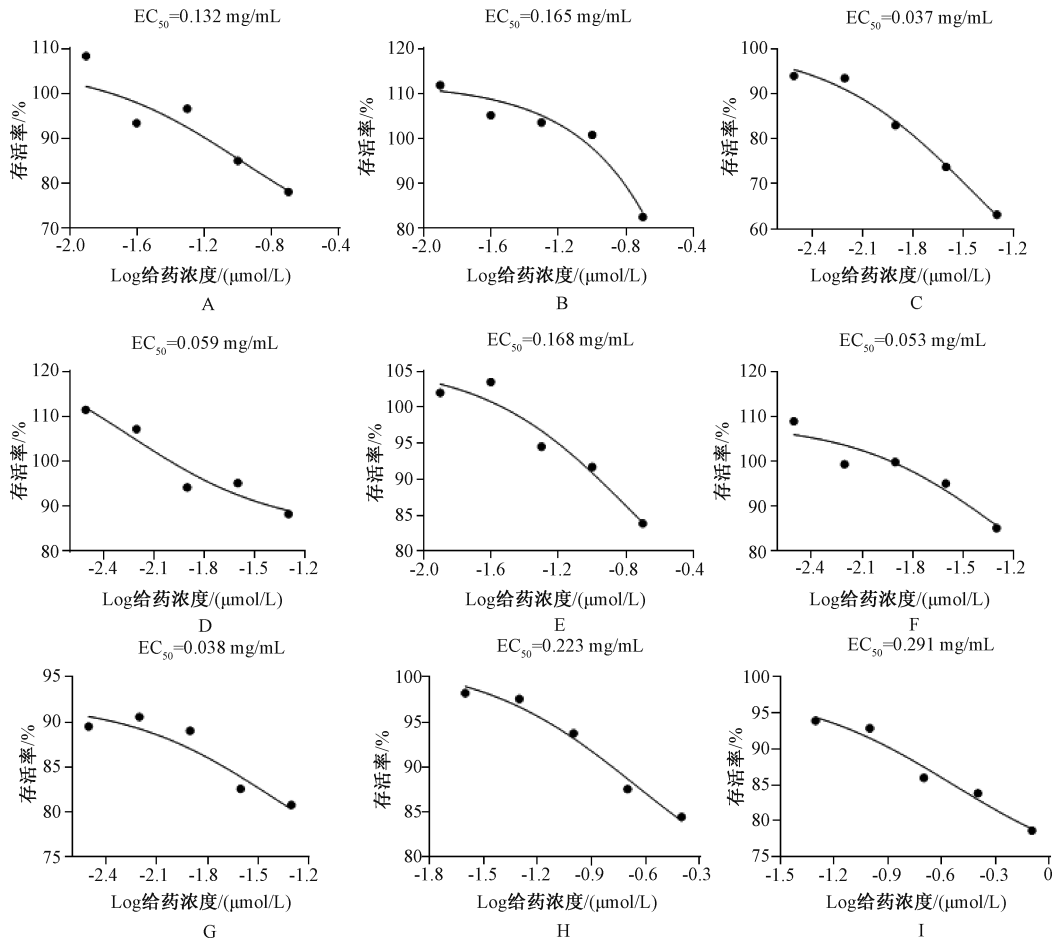


图 3 不同浓度曲妥珠单抗对心肌细胞的损伤作用

( $EC_{50} = 0.059$ ) > S1 ( $EC_{50} = 0.132$ ) > S5 ( $EC_{50} = 0.168$ ) > S8 ( $EC_{50} = 0.223$ ) > S9 ( $EC_{50} = 0.291$ ) > S2 ( $EC_{50} = 0.317$ )。



A. S1; B. S2; C. S3; D. S4; E. S5; F. S6; G. S7; H. S8; I. S9。

图4 川芎对曲妥珠单抗诱导的心肌细胞损伤的保护作用

## 2.5 相关分析

为了研究川芎提取物改善曲妥珠单抗诱导心肌细胞损伤的药效成分,将9份川芎提取样品中11个对照品的色谱峰峰面积与相对应的9个样品的心肌细胞的 $1/EC_{50}$ 进行Pearson相关分析。由图5可知,1—11号峰物质(P1川芎嗪,P2绿原酸,P3阿魏酸,P4洋川芎内酯I,P5洋川芎内酯H,P6 6''-阿魏酸斯皮诺素,P7洋川芎内酯A,P8正丁基苯酞,P9藁本内酯,P10丁烯基苯酞,P11欧当归内酯A)均与川芎心肌细胞保护率呈正相关。根据相关系数( $r$ ),大于0.3为有相关性,分别为川芎嗪、洋川芎内酯I、阿魏酸和正丁基苯酞等4个成分,其中相关性最强的为川芎嗪( $r=0.683, P<0.05$ )。

## 2.6 验证分析

根据相关分析结果,验证川芎嗪、阿魏酸、正丁基苯酞和洋川芎内酯I等4种活性成分单体在无毒的不同剂量下对曲妥珠单抗损伤心肌细胞的保护作用。细胞实验结果显示,4种成分均能对HL-1心肌细胞发挥保护作用,其中川芎嗪的 $1/EC_{50}$ 最高,其次为阿魏酸、正丁基苯酞和川芎内酯I,与谱效相关分析结果基本一致,见图6。

## 3 讨论

中药的提取工艺直接影响其有效成分的含量及最终治疗效果,因此,选择合适的提取方法尤为关键<sup>[12]</sup>。溶剂提取法因

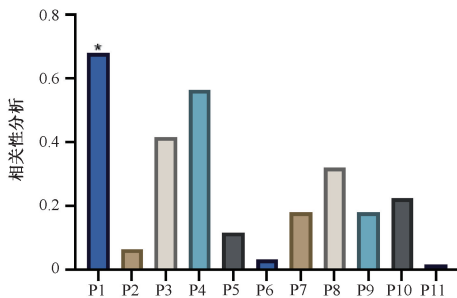
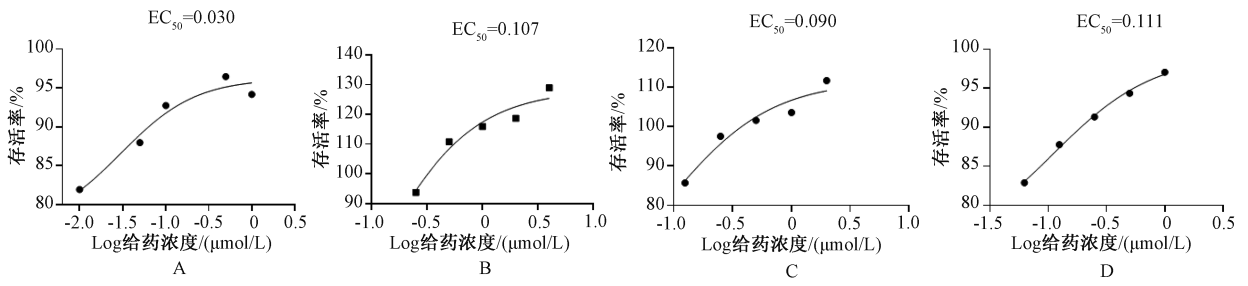


图5 均匀设计中9个川芎样品11个共有峰的Pearson相关系数( $P<0.05$ )

价格低廉、工艺简单,成为实验室和工业上应用最广泛的提取方法<sup>[13]</sup>。均匀设计通过确保实验点在实验域内的均匀分布,仅需执行与水平数相匹配的实验次数,获取全面且有效的数据结果,有效规避了正交设计中存在的因素与水平数受限、实验频次繁多<sup>[14]</sup>的问题。本研究运用均匀设计法,探究不同乙醇浓度、溶剂量、浸润时间和超声提取时间对川芎提取的影响,旨在优化提取工艺,最大限度地提取川芎中的药效成分。指纹图谱结果显示,9份川芎样品相似度值为0.602~0.988,揭示了不同提取条件下,提取液中的化学成分存在明显差异。

由于中药化学成分庞杂冗繁,中药质量控制对临床应用



A. 川芎嗪; B. 正丁基苯酞; C. 阿魏酸; D. 洋川芎内酯 I。

图 6 川芎嗪、正丁基苯酞、阿魏酸和洋川芎内酯 I 对曲妥珠单抗损伤心肌细胞的保护作用

具有重要的意义<sup>[15]</sup>。2015 年,美国食品药品监督管理局提出通过构建生物检测方法来评价中药和植物性药物的质量<sup>[16]</sup>。生物评价法通过在特定条件下,对供试药物在生物体系(如整体动物、离体组织、器官、微生物、细胞等)中产生的特定生物效应进行定性或定量评估,实现了与药物功效的直接关联<sup>[17]</sup>。尤其适用于成分复杂、难以通过理化方法准确测定或理化测定无法反映其临床功效的中药的质量控制<sup>[18]</sup>。本研究通过建立曲妥珠单抗诱导的心肌细胞损伤体外模型,考察川芎的最佳提取工艺和药效物质基础。通过优化川芎药材的最佳提取工艺(采用 75%乙醇作为溶剂,溶剂量为药材量的 9 倍,乙醇浸润 35 min,随后进行 30 min 的超声提取)最大程度提取关联临床功效的有效物质:川芎嗪、阿魏酸、正丁基苯酞和洋川芎内酯 I。川芎嗪为酰胺类生物碱,具有抑制血小板凝集、改善微循环的作用,在临床上主要用于缺血性心脏病的治疗<sup>[19]</sup>。有研究表明,川芎嗪通过精准调控磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶-3 $\beta$  信号通路有效保护心肌细胞<sup>[20]</sup>。另有研究表明,川芎嗪通过保护线粒体结构与功能、优化能量代谢过程、有效清除氧自由基、减轻细胞内钙超载现象、抑制心肌细胞凋亡、干预炎症反应进程、扰乱异常细胞信号通路以及改善内皮细胞功能等多个层面改善心肌细胞损伤<sup>[21]</sup>。Wang 等<sup>[22]</sup>研究发现,阿魏酸的衍生物 hmy-paa 能够选择性抑制琥珀酸脱氢酶的活性,进而减少细胞内活性氧的过度生成,从而缓解氧化损伤的程度,有效减轻心肌细胞在缺氧复氧过程中所遭受的损伤。Zhao 等<sup>[23]</sup>发现,正丁基苯酞通过调控磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的激酶 1/帕金蛋白通路有效调节心脏的线粒体自噬,从而显著减少心肌梗死的面积,改善心肌组织的结构,有效减轻心肌损伤程度。Wang 等<sup>[24]</sup>研究发现,洋川芎内酯 I 通过靶向微小 RNA-193a-3 并促进去甲基化酶 ALKBH5 的上调,减少甲基化水平,有效缓解了心肌细胞的自噬,从而保护心肌细胞免受损伤。而《中华人民共和国药典·一部》(2020 年版)中仅将阿魏酸作为川芎的唯一质量控制指标。因此,本研究为川芎改善曲妥珠单抗相关心肌细胞损伤的质量控制方法的提升提供了科学依据。

中药质量控制是涉及多成分的复杂系统,保持中药药效和生物学效应一致对于确保中药的安全性和有效性尤为重要。本研究将化学指纹图谱与心肌细胞活性检测方法结合,借助均匀设计方法,初步探究了川芎最佳乙醇提取工艺和改善曲妥珠单抗相关心肌细胞损伤的药效物质,为完善川芎功效相关的质量评价方法提供了参考依据。但川芎改善曲妥珠单抗相关心肌细胞损伤的活性成分川芎嗪、阿魏酸、正丁基苯酞和洋川芎

内酯 I 在动物体内和临床的疗效仍需要进一步研究。

[利益冲突:作者声明没有利益冲突;数据和材料的可用性:本研究中使用的(或)分析的数据集可通过合理要求从通信作者处获得]

## 参考文献

- [1] WILKINSON L, GATHANI T. Understanding breast cancer as a global health concern[J]. Br J Radiol, 2022, 95(1130): 20211033.
- [2] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] GONZALEZ-ANGULO A M, LITTON J K, BROGLIO K R, et al. High risk of recurrence for patients with breast cancer who have human epidermal growth factor receptor 2-positive, node-negative tumors 1 cm or smaller[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(34): 5700-5706.
- [4] BRUFISKY A M, MAYER M, RUGO H S, et al. Central nervous system metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer: incidence, treatment, and survival in patients from registHER[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(14): 4834-4843.
- [5] KREUTZFELDT J, ROZEBOOM B, DEY N, et al. The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2 + breast cancer therapies[J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(4): 1045-1067.
- [6] SWAIN S M, SHASTRY M, HAMILTON E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions[J]. Nat Rev Drug Discov, 2023, 22(2): 101-126.
- [7] MACEDO A V S, HAJJAR L A, LYON A R, et al. Efficacy of dexrazoxane in preventing anthracycline cardiotoxicity in breast cancer[J]. JACC CardioOncol, 2019, 1(1): 68-79.
- [8] CURRAN C F, NARANG P K, REYNOLDS R D. Toxicity profile of dexrazoxane (Zincard, ICRF-187, ADR-529, NSC-169780), a modulator of doxorubicin cardiotoxicity [J]. Cancer Treat Rev, 1991, 18(4): 241-252.
- [9] 张尚龙,连小龙,张楠,等. 顺铂联合中药活性成分抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 联勤军事医学, 2024, 38(3): 263-267.
- [10] 崔菊玲. 川芎在心血管疾病中的药理及临床应用[J]. 河南医学研究, 2021, 30(26): 4992-4994.
- [11] LIU J, LEI Z W, WANG Z C, et al. Ethnobotanical usages, phytochemistry, pharmacology, and quality control of chuanxiong rhizoma: a review[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 337(Pt 3): 118902.
- [12] 邢建录. 中药提取工艺的原理及影响中药提取效果的因素探讨[J]. 科技传播, 2014, 6(14): 138, 112.
- [13] 蔡国强,徐志杰,权琰,等. 天然产物提取技术研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2023, 42(4): 78-85.
- [14] 王玉珊,林德贵,林珈好. 中药组方优化试验设计方法概述

[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(3): 565-575.

[15] QU J B, ZHANG T D, LIU J X, et al. Considerations for the quality control of newly registered traditional Chinese medicine in China: a review[J]. J AOAC Int, 2019, 102(3): 689-694.

[16] WU C, LEE S L, TAYLOR C, et al. Scientific and regulatory approach to botanical drug development: a U. S. FDA perspective [J]. J Nat Prod, 2020, 83(2): 552-562.

[17] 李寒冰, 鄢丹, 武彦舒, 等. 基于抗病毒活性检测的板蓝根质量生物评价方法及优化研究[J]. 中草药, 2011, 42(8): 1560-1565.

[18] 张海珠, 肖小河, 王伽伯, 等. 中药质量评控的第一要义: 效应当量一致性[J]. 中草药, 2015, 46(11): 1571-1575.

[19] ZHANG H W, CHEN H Y, WU X, et al. Tetramethylpyrazine alleviates diabetes-induced high platelet response and endothelial adhesion via inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153860.

[20] YANG Q, HUANG D D, LI D G, et al. Tetramethylpyrazine exerts a protective effect against injury from acute myocardial ischemia by

regulating the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway[J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24: 17.

[21] WANG K, ZHOU Y, WEN C, et al. Protective effects of tetramethylpyrazine on myocardial ischemia/reperfusion injury involve NLRP3 inflammasome suppression by autophagy activation [J]. Biochem Pharmacol, 2024, 229: 116541.

[22] WANG F, PENG Q Q, LIU J F, et al. A novel ferulic acid derivative attenuates myocardial cell hypoxia reoxygenation injury through a succinate dehydrogenase dependent antioxidant mechanism [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 856: 172417.

[23] ZHAO X P, WANG Z, WANG L J, et al. The PINK1/parkin signaling pathway-mediated mitophagy: a forgotten protagonist in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Pharmacol Res, 2024, 209: 107466.

[24] WANG D Y, WANG D, JIN Q P, et al. Suxiao Jiuxin pill alleviates myocardial ischemia/reperfusion-induced autophagy via miR-193a-3p/ALKBH5 pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 125: 155359.

(收稿日期:2024-12-04 修回日期:2025-01-13)

(上接第 281 页)

DLQI 评分均较治疗前明显降低,且治疗组患者低于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明复方珍珠膏缓解外阴瘙痒效果更好,可明显提高患者的生活质量,治疗 1 个月后,治疗组患者瘙痒问题对生活质量的影 响已降至轻微水平,表明复方珍珠膏用药后起效更快。治疗组患者治疗 3 个月后的外阴皮肤弹性评分、皮肤颜色评分均低于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明复方珍珠膏用药后可改善患者外阴皮肤情况。两组患者药物依从性评分的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),表明两组患者在治疗期间均能按要求使用药物,保证药物治疗效果。从药物安全性角度看,治疗组患者的药品不良反应发生率低于对照组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。有研究结果显示,长期使用糖皮质激素具有一定的限制和要求,存在一定的用药风险<sup>[21]</sup>。复方珍珠膏为中药制剂,安全性较高,较少出现不良反应,可作为患者长期用药的选择。

综上所述,复方珍珠膏在治疗 NNEDV 患者外阴瘙痒方面效果好,止痒效果优于外用糖皮质激素,起效快,可提高患者生活质量,安全性较好。今后仍需要进一步扩大样本量,获得更高级别的循证医学证据,同时进一步探究复方珍珠膏止痒的分子生物学机制。

## 参考文献

[1] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018:228-232.

[2] 罗庆东, 张静, 姜德友. 阴痒源流考[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(3): 25-28.

[3] 刘正, 杜梓萱, 王奕博, 等. 复方珍珠膏药效学及安全性实验研究[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(11): 65-69.

[4] 杜惠兰. 中西医结合妇产科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006:884-914.

[5] FURUE M, EBATA T, IKOMA A, et al. Verbalizing extremes of the visual analogue scale for pruritus: a consensus statement[J]. Acta Derm Venereol, 2013, 93(2): 214-215.

[6] 王晓玲, 赵天恩, 张喜芹. 简体中文版皮肤病生活质量指标信度和效度初探[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(9): 791-793.

[7] 侯凯旋, 闫素英. 慢病患者药物依从性量表的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(2): 192-196.

[8] 李静然, 赵丽君, 李明珠, 等. 外阴苔藓类疾病诊治专家共识[J]. 中国妇产科临床杂志, 2023, 24(2): 220-224.

[9] 黄蕊, 韩璐, 曾力楠, 等. 外阴上皮非瘤样病变的治疗研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20(6): 760-763, 768.

[10] 中国医疗保健国际交流促进会 妇产分会 外阴阴道疾病项目专家委员会. 女性外阴硬化性苔藓临床诊治专家共识(2021 年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(1): 70-74.

[11] 宋美英, 李红梅. 外阴硬化性苔藓中医诊治研究进展[J]. 现代中医药, 2024, 44(3): 12-16.

[12] 刘仁圆, 左世国, 郑文兰. 基于数据挖掘探讨中药复方治疗外阴上皮内非瘤样病变的用药规律[J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(2): 86-90.

[13] 莫明月, 林江, 韦明婵. 珍珠粉解毒生肌作用与临床应用研究进展[J]. 广西中医药大学学报, 2015, 18(3): 77-79.

[14] 齐娜, 段文娟, 李雅婧, 等. 麝香酮药理作用的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8): 3042-3047.

[15] MA Y K, LI Y, LI X F, et al. Anti-inflammatory effects of 4-methylcyclopentadecanone on edema models in mice[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(12): 23980-23992.

[16] HE J, LV L, WANG Z Y, et al. Pulvis fellis suis extract attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in murine model of asthma [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 207: 34-41.

[17] 张程, 郝满良. 猪胆粉抗炎作用研究[J]. 河北农业大学学报, 2018, 41(2): 89-93.

[18] 时文凤, 曹艳, 曹国胜, 等. 矿物药石膏的研究进展[J]. 中药材, 2021, 44(7): 1793-1796.

[19] 尤淑霞, 吴德康, 刘圣金, 等. 白矾的基原考证及药理作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(7): 111-112.

[20] 赵洋洋, 郭玉洪, 黄汕梅, 等. 冰片引经作用的探讨及其分子机制研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 150-155.

[21] 陆家晴, 史玉玲. 糖皮质激素在皮肤科的应用[J]. 皮肤科学通报, 2021, 38(4): 304-311.

(收稿日期:2024-11-21 修回日期:2025-01-05)