

基于斑马鱼模型的5种甘草酸类药物心脏保护作用评价

李 伟^{1, 2}, 李晓彬^{3, 4*}, 董宇晴^{3, 4}, 于淑晴^{3, 4}, 陈红斗^{1, 2}, 张 驰⁵, 陆 伟^{1, 2}, 杨晴晴^{1, 2}

1. 南京鼓楼医院集团宿迁医院 药学部, 江苏 宿迁 223800

2. 徐州医科大学附属宿迁医院 药学部, 江苏 宿迁 223800

3. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103

4. 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

5. 南京鼓楼医院集团宿迁医院 肾内科, 江苏 宿迁 223800

摘 要: **目的** 利用斑马鱼模型评价异甘草酸镁注射液、甘草酸二铵注射液、复方甘草酸苷片、甘草酸二铵肠溶胶囊和注射用复方甘草酸单铵S 5种甘草酸类药物制剂的心脏保护作用。**方法** 利用正常发育至受精后48 h的心脏荧光转基因斑马鱼作为实验动物, 将斑马鱼随机分为对照组、阳性对照组、模型组和不同浓度甘草酸制剂样品组。在24孔板里分别给予不同浓度样品、阳性对照药物和造模药物, 加培养水至2 mL后, 置于(28±5) °C恒温光照培养箱让胚胎继续发育。24 h后, 用培养水清洗斑马鱼, 置于荧光倒置显微镜下观察斑马鱼心律变化并拍照。其中抗心律失常活性的阳性药为丹红注射液(9 μL·mL⁻¹), 造模药为特非那定(15 μg·mL⁻¹), 统计斑马鱼1 min的心率及静脉窦和动脉球之间的距离(SV-BA)。抗心衰活性的阳性药为地高辛(0.1 μg·mL⁻¹), 造模药品为阿霉素(60 μmol·L⁻¹), 统计斑马鱼1 min的心率、心包面积、心室短轴缩短率、每搏输出量及射血分数。**结果** 甘草酸二铵肠溶胶囊、注射用复方甘草酸单铵S及异甘草酸镁注射液有较好的抗心律失常活性, 注射用复方甘草酸单铵S具有较好的抗心衰活性。**结论** 5种甘草酸制剂在抗心律失常和抗心衰方面具有不同程度活性, 可为开发甘草酸类药物在心脏保护方面的适应症提供理论依据。

关键词: 甘草酸类药物; 斑马鱼; 抗心律失常; 抗心衰; 心脏保护; 异甘草酸镁注射液; 甘草酸二铵注射液; 复方甘草酸苷片; 甘草酸二铵肠溶胶囊; 注射用复方甘草酸单铵S

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)09-1995-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.006

Cardiovascular activity of five glycyrrhizic acid drugs based on zebrafish model

LI Wei^{1, 2}, LI Xiaobin^{3, 4}, DONG Yuqing^{3, 4}, YU Shuqing^{3, 4}, CHEN Hongdou^{1, 2}, ZHANG Chi⁵, LU Wei^{1, 2}, YANG Qingqing^{1, 2}

1. Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital Group Suqian Hospital, Suqian 223800, China

2. Department of Pharmacy, Suqian Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Suqian 223800, China

3. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

4. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Jinan 250103, China

5. Department of Nephrology, Nanjing Drum Tower Hospital Group Suqian Hospital, Suqian 223800, China

Abstract: Objective To evaluate the cardioprotective effects of five glycyrrhizic acid drugs: Magnesium Isoglycyrrhizinate Injection, Diammonium Glycyrrhizinate Injection, Compound Glycyrrhizin Tablets, Diammonium Glycyrrhizinate Enteric-coated Capsules and Compound Monoammonium Glycyrrhizinate S for Injection using zebrafish model. **Methods** Zebrafish with fluorescent transgenic heart from normal development to 48 h after fertilization were randomly divided into blank group, positive control group, model group and glycyrrhizic acid preparation sample group with different concentrations. Samples of different concentrations, positive control drugs and modeling drugs were given in 24-well plates, and 2 mL of culture water was added, then

收稿日期: 2024-03-28

基金项目: 江苏省中药骨干人才高级研修项目(苏中医科教[2022]17号); 宿迁市科技计划资助项目(K202203); 徐州医科大学附属医院发展基金项目(XYFY202237)

第一作者: 李 伟(1989—), 女, 硕士, 研究方向为临床药学。E-mail: liweicz@163.com

*通信作者: 李晓彬, 女, 博士, 研究方向为活性天然产物。E-mail: bin8566666@163.com

the embryos were placed in a $(28 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ constant temperature light incubator for continued development. After 24 h, zebrafish were cleaned with culture water and placed under inverted fluorescence microscope to observe the change of heart rate. Among them, Danhong Injection ($9 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) was the positive drug for antiarrhythmic activity, and terfenadine ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was the modeling drug. The heart rate of Zebrafish within 1 min and the distance between Sinus vena and bulb arterial (SV-BA) were analyzed statistically. The control drug for anti-heart failure activity was digoxin ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and the modeling drug was doxorubicin ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The heart rate, pericardial area, ventricular brachyaxis shortening rate, stroke output and ejection fraction of zebrafish within 1 min were statistically analyzed. **Results** Under the experimental conditions, Diammonium Glycyrrhizinate Enterocapsule Capsule, Compound Monoammonium Glycyrrhizinate S for Injection and Magnesium Isoglycyrrhizinate Injection have better anti-arrhythmia activity, and compound monoammonium glycyrrhizinate S for injection has better anti-heart failure activity. **Conclusion** These five glycyrrhizic acid drugs have different activities in anti-arrhythmia and anti-heart failure. This study can provide theoretical basis for developing the indications of these drugs in cardiac protection.

Key words: glycyrrhizic acid drugs; zebrafish; anti-arrhythmic; anti-heart failure; protection of heart; Magnesium Isoglycyrrhizinate Injection; Diammonium Glycyrrhizinate Injection; Compound Glycyrrhizin Tablets; Diammonium Glycyrrhizinate Enteric-coated Capsules; Compound Monoammonium Glycyrrhizinate S for Injection

心血管疾病严重危害人类健康,已经超过传染病成为全球死亡和致残的主要原因^[1]。现代药理研究表明,甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 可保护心肌收缩,恢复心脏功能,维持心脏结构,具有明显的、浓度相关性的抗心肌缺血和抗心律失常活性^[2-4]。甘草酸作为甘草的主要活性成分之一,其心脏保护作用受到关注。现有研究证实甘草酸作为高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)抑制剂,能抑制炎症因子分泌,对药物、心肌缺血再灌注及冠状动脉微栓塞等因素诱导的心肌损伤具有治疗作用,并能减弱动脉粥样硬化病变的程度^[5-8]。甘草酸由于三萜皂苷母核 18 位手性碳原子(C-18)构型的不同,存在一对差向异构体,分别为 18 α -甘草酸(18 α -GL)和 18 β -甘草酸(18 β -GL)。两者水解后可生成相应的 18 α -甘草次酸和 18 β -甘草次酸。不同构型的甘草酸在药理学、药效学、药动学和不良反应方面也存在差异^[9-13]。目前对于甘草酸的心血管活性研究,绝大多数研究使用了混合构型的甘草酸化合物或其代谢产物甘草次酸,少数研究使用了 18 α -GL。甘草酸类药物制剂如复方甘草酸苷片、甘草酸二铵注射液和异甘草酸镁注射液等是临床常用的抗炎保肝药物,尚未发现异甘草酸镁之外的其他甘草酸制剂在心脏保护方面的研究。由于不同的甘草酸制剂在甘草酸的构型等方面存在差异,其心脏保护作用也可能存在差异,但目前尚未发现关于不同甘草酸制剂心脏保护作用的对比评价研究。评价临床常用的不同甘草酸药物制剂的心脏保护作用,对于实现这类药物的“老药新用”具有重要价值。

斑马鱼具有体外受精、胚胎尺寸小、早期胚胎半透明及生长周期短等优势,符合实验动

物“3R”(减少、替代和优化)原则,已成为新的模式动物^[14-15]。斑马鱼的基因与人类同源性高,其心脏的结构和功能与哺乳动物具有高度相似性^[16]。与小鼠相比斑马鱼的静息心率(成年鱼约为每分钟 150 次)明显接近人类的平均心率,并且斑马鱼和人类动作电位都有一个长的平台期,在心电图上产生明显的心室除极和复极激动时间,而小鼠缺乏这种长平台期^[17-18]。目前已有大量的荧光转基因品系斑马鱼,可以直接观察体内心脏和血管的形态变化。因此,斑马鱼已成为研究心血管活性药物的重要模式动物^[19]。目前,利用特非那定和阿霉素分别诱导构建的斑马鱼心律失常和心衰模型已广泛应用于药物活性评价和作用机制研究中^[20-21]。本研究基于斑马鱼模型对不同甘草酸类药物制剂在抗心律失常和抗心衰活性方面进行系统评价和比较,为开发该类药物在心脏保护方面新的临床适应证提供依据。

1 材料

1.1 动物

实验用心脏荧光转基因斑马鱼由山东省科学院生物研究所药物筛选平台提供。斑马鱼成鱼在 $(28 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ 下饲养,明暗周期为 14/10 h,每日定点喂食 2 次。于前 1 天下午选择健康的成年斑马鱼以雌雄比例 2:2 放入排卵盒,次日亮灯时抽板,2 h 内收集鱼卵并加入 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚甲基蓝,鱼卵在 28°C 恒温光照培养箱中培养。实验用斑马鱼日龄为受精后 48 h。实验用斑马鱼按照美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》(第 8023 号,1996 年修订)进行饲养。在斑马鱼使用过程中严格遵照齐鲁工业大学(山东省科学院)动物保护和使用委员会

的规定,符合齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所实验动物福利伦理委员会(实验动物伦理批号SWS20220725)要求。

1.2 药物与主要试剂

异甘草酸镁注射液(批号220517104,正大天晴药业集团有限公司);甘草酸二铵注射液(批号21030525,华润双鹤利民药业有限公司);注射用复方甘草酸单铵S(批号01211002,山西普德药业有限公司);复方甘草酸苷片(批号21309,卫材药业有限公司);甘草酸二铵肠溶胶囊(批号220625110,正大天晴药业集团有限公司);特非那定(CAS:50679-08-8,上海源叶生物科技有限公司);丹红注射液(批号20230817,山东丹红制药有限公司);阿霉素(批号A3966,美国APEXBIO);地高辛(CAS:134523-03-8,上海吉至生化科技有限公司);二甲基亚砩[CAS:67-68-5,生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.3 仪器

IX73型奥林巴斯倒置显微镜及DP2-BSW图像采集系统(日本Olympus公司);Forma 3111型水套式CO₂培养箱(美国Forma公司);24孔细胞培养板(北京兰杰柯科技有限公司);LE204E/02电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 安全性评价实验及样品浓度选择

将正常发育至受精后48 h的心脏荧光转基因斑马鱼放入24孔板中,随机分成待测样品处理组及对照组,每组10个胚胎,同时设置2个复孔,各药品分别设200、400、800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3个质量浓度,每个质量浓度重复3次。将上述各组斑马鱼均置于(28±5)°C的恒温光照培养箱中共培养24 h。清洗斑马鱼后,观察斑马鱼存活情况,统计斑马鱼死亡数量。在800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下仍能存活,表明样品安全性良好,依据斑马鱼转换人用剂量的换算方法(专利申请公开号:CN113496071A;申请号202010256107.8),该浓度相当于人类每天服用4.8 g药物。在后续实验中若有效活性质量浓度高于100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,研究者考虑临床应用价值不大,不再增大浓度进行实验。因此后续实验测定选择25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为实验浓度,如果实验过程中发现模型组在25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 死亡,则继续进行更低浓度2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的活性测试。各药品浓度均按照含甘草酸类的成分来计算。

2.2 抗心律失常活性测定

将上述斑马鱼随机分成待测样品处理组、阳性

对照(丹红注射液)组、模型(特非那定)组及对照组,每组10个胚胎,同时设置2个复孔,每个浓度重复3次。除对照组外,各组均加入造模药特非那定(15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[20],样品处理组和丹红注射液组再分别给予不同浓度样品(使用无菌去离子水溶解,复方甘草酸苷片样品质量浓度为2.5、5.0、10.0、20.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,其余样品分别设置25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3个质量浓度)及丹红注射液(9 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$),置于(28±5)°C恒温光照培养箱让胚胎继续发育。24 h后,用培养水清洗斑马鱼,置于荧光倒置显微镜下观察斑马鱼心律变化。统计各组斑马鱼1 min的心率及静脉窦和动脉球之间的距离(SV-BA)。

2.3 抗心衰活性测定

实验用斑马鱼培养和分组同“2.2”项,除对照组外,各组均加入阿霉素(60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[22],样品处理组和阳性对照(地高辛)组再分别给予25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 不同浓度的5种甘草酸制剂样品及地高辛(0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。加培养水至2 mL后,置于(28±5)°C的恒温光照培养箱中培养24 h。清洗斑马鱼后,在荧光显微镜下观察斑马鱼心律变化,并拍照,统计斑马鱼1 min的心率和心包面积,计算心室短轴缩短率、每搏输出量及射血分数。

2.4 数据统计

利用GraphPad Prism 9.5.1软件进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,均数的两两比较用LSD-*t*检验,显著性水平设为 $\alpha=0.05$ 。绘图采用Graphpad Prism 9.5.1。

3 结果

3.1 安全性评价实验结果

与对照组相比,各样品组斑马鱼存活状态均正常(图1)。在800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质量浓度下仍能存活,表明样品安全性良好。

3.2 抗心律失常活性评价结果

3.2.1 心率统计结果 与对照组相比,模型组斑马鱼心率显著下降($P<0.001$),显示心律失常造模成功;与模型组比较,丹红注射液组斑马鱼心率上升明显,表现出抗心律失常活性;而与模型组相比,除甘草酸二铵注射液外,其他制剂样品均可不同程度的提高斑马鱼的心率(图2)。根据统计结果,甘草酸二铵肠溶胶囊、注射用复方甘草酸单铵S在测试浓度下均表现出抗心律失常作用($P<0.001$),异甘草酸镁注射液在中、高浓度(50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)下抗心律失常活性明显,复方



图1 各组斑马鱼的存活状态
Fig. 1 Survival status of zebrafish in each group

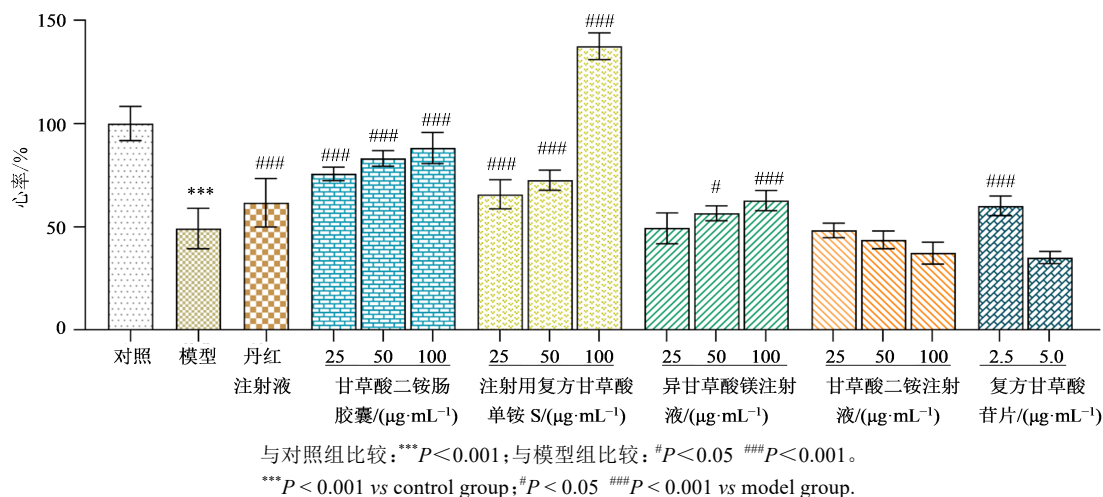
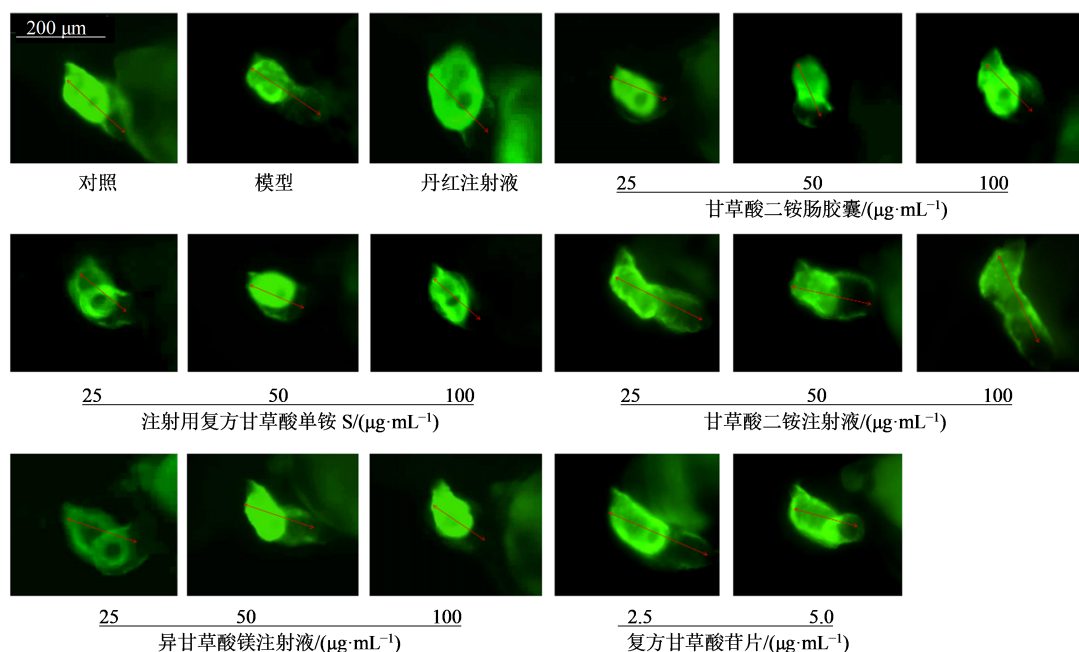
甘草酸苷片在浓度大于 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时具有斑马鱼毒性,造成鱼死亡,降低浓度 ($2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 则表现出显著抗心律失常活性。

3.2.2 SV-BA 结果 与对照组相比,模型组斑马鱼 SV-BA 距离显著增加 ($P < 0.001$),表明心律失常造模成功;与模型组相比,丹红注射液组斑马鱼 SV-BA 距离显著下降 ($P < 0.001$),表现出抗心律失常活性;各浓度样品组斑马鱼 SV-BA 距离均有不同程度变化。根据统计结果,各浓度的甘草酸二铵肠溶胶囊、注射用复方甘草酸单铵 S 及异甘草酸镁注射液组斑马鱼 SV-BA 距离具有明显恢复 ($P < 0.001$),其余两种样品仅在特定浓度下显示活性(图3、4)。复方甘草酸苷片组在给药浓度大于 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时造成斑马鱼死亡。

3.3 抗心衰活性评价结果

3.3.1 心率统计结果 与对照组相比,模型组斑马鱼心率下降 ($P < 0.001$),显示心衰造模成功;与模型组相比,地高辛组斑马鱼心率增加 ($P < 0.001$);各浓度样品组斑马鱼心率均有不同程度增加。根据统计结果,甘草酸二铵肠溶胶囊、甘草酸二铵注射液及注射用复方甘草酸单铵 S 在实验浓度下均能较好地改善造模药诱导的心率下降 ($P < 0.001$);复方甘草酸苷片和异甘草酸镁注射液仅在中、高浓度 (50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 时能够明显改善造模药诱导的心率下降 ($P < 0.01$ 、 0.001) (图5)。

3.3.2 心包面积统计结果 与对照组比较,模型组斑马鱼心包面积显著增加 ($P < 0.001$);与模型组比较,地高辛组斑马鱼心包面积减少 ($P < 0.001$);除甘

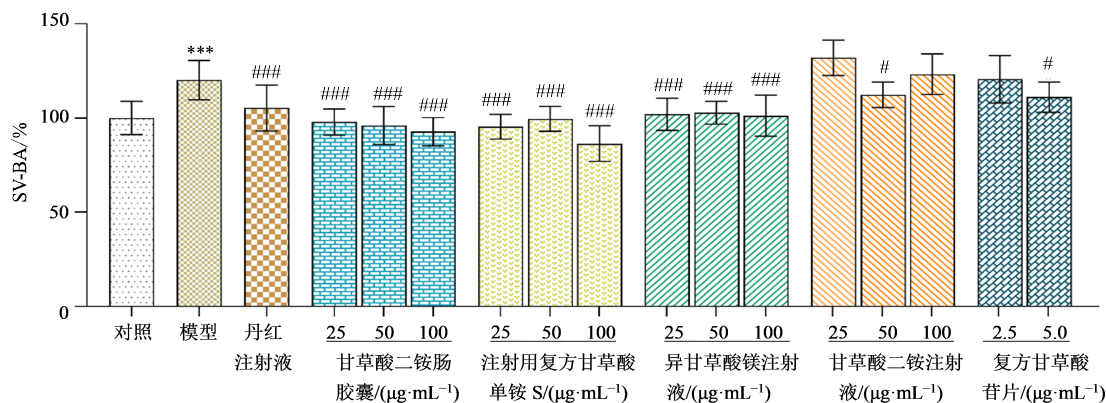
图2 抗心律失常活性实验中各组斑马鱼1 min心率统计结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig. 2 1 min heart rate of zebrafish in each group in antiarrhythmic activity test ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)图3 不同浓度样品对斑马鱼SV-BA距离的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig. 3 Effect of different concentration samples on SV-BA distance of zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

草酸二铵肠溶胶囊外,其他样品组斑马鱼心包面积有不同程度减少。根据统计结果,甘草酸二铵注射液及注射用复方甘草酸单铵S在实验浓度下均可显著改善阿霉素造成的心包水肿($P < 0.001$);异甘草酸镁注射液在质量浓度为25、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可显著恢复心包面积;复方甘草酸苷片质量浓度为25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可显著恢复心包面积(图6、7)。

3.3.3 心室短轴缩短率统计结果 与对照组相比,模型组斑马鱼心室短轴收缩率显著降低($P < 0.001$),表明心衰造模成功;与模型组比较,地高辛组斑马鱼心室短轴收缩率上升($P < 0.001$);各浓度

样品组斑马鱼心室短轴缩短率均有不同程度上升。注射用复方甘草酸单铵S和异甘草酸镁注射液在实验浓度下均能够较好地恢复阿霉素对斑马鱼心室短轴收缩率的影响($P < 0.001$);复方甘草酸苷片和甘草酸二铵肠溶胶囊在质量浓度为50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可显著改善斑马鱼心室短轴收缩率($P < 0.001$);甘草酸二铵注射液仅在质量浓度为50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可显著改善斑马鱼心室短轴收缩率($P < 0.001$)(图8)。

3.3.4 每搏输出量统计结果 与对照组相比,模型组斑马鱼每搏输出量显著减少($P < 0.001$),表明心衰造模成功;与模型组比较,地高辛组斑马鱼每搏

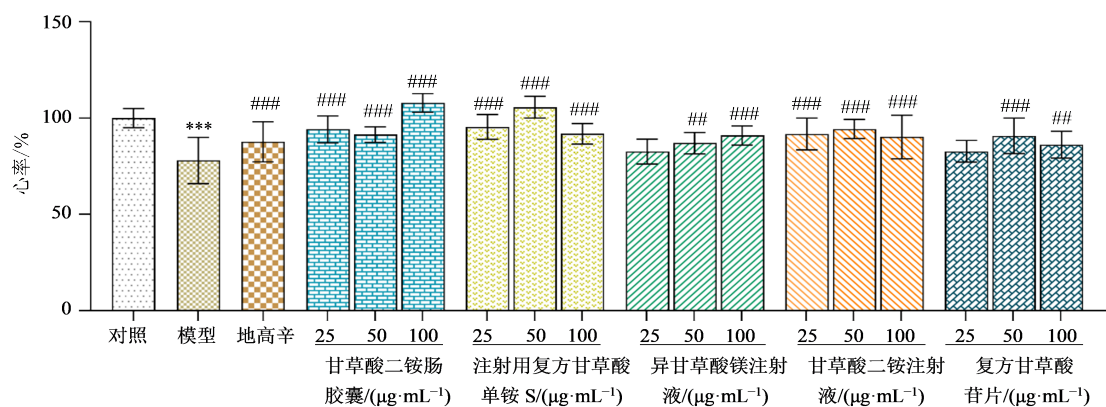


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 4 各组斑马鱼 SV-BA 距离 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 4 SV-BA distance of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 5 各组斑马鱼 1 min 心率 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 5 1 min heart rate of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

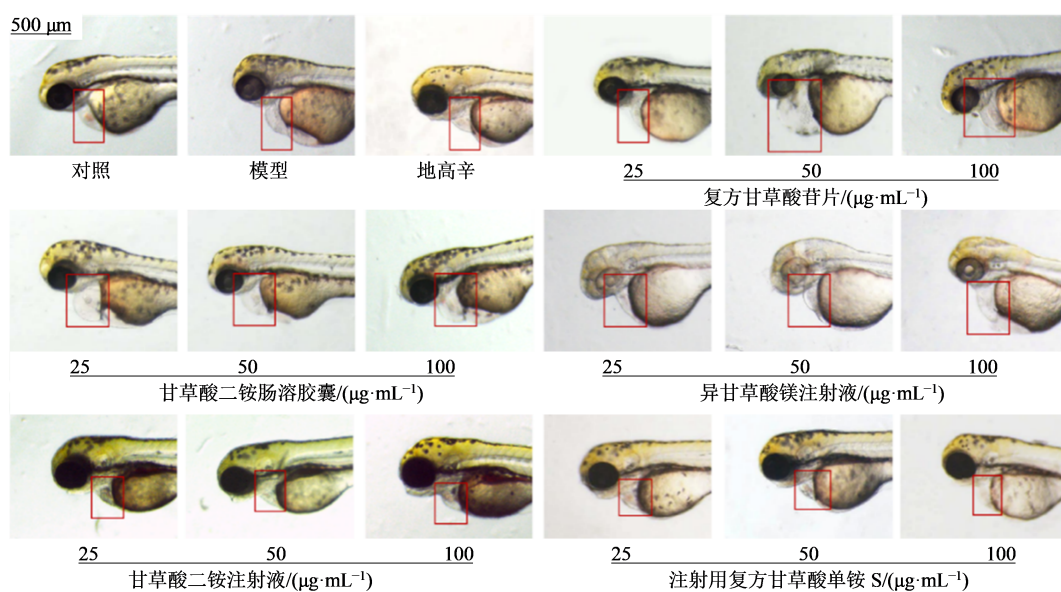
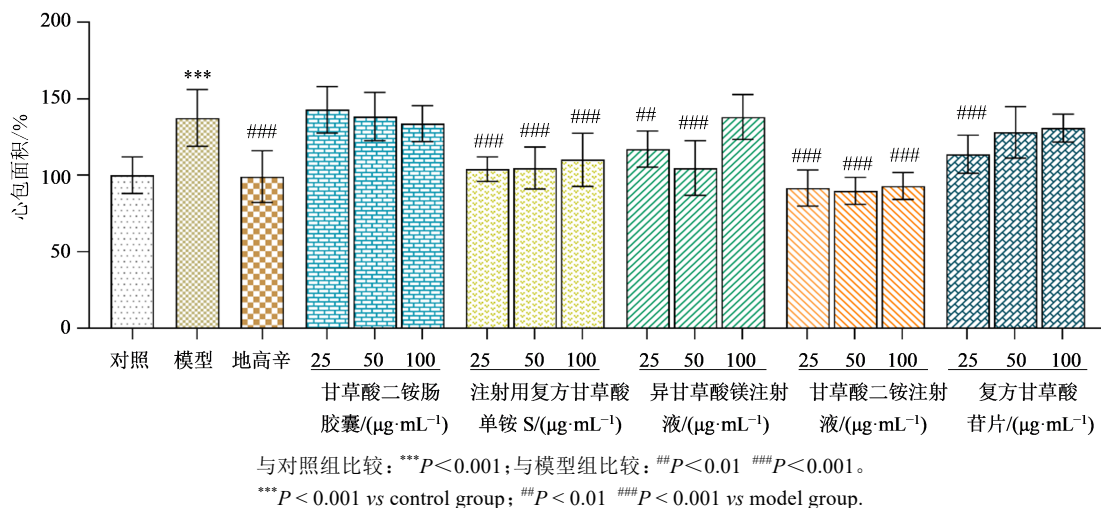
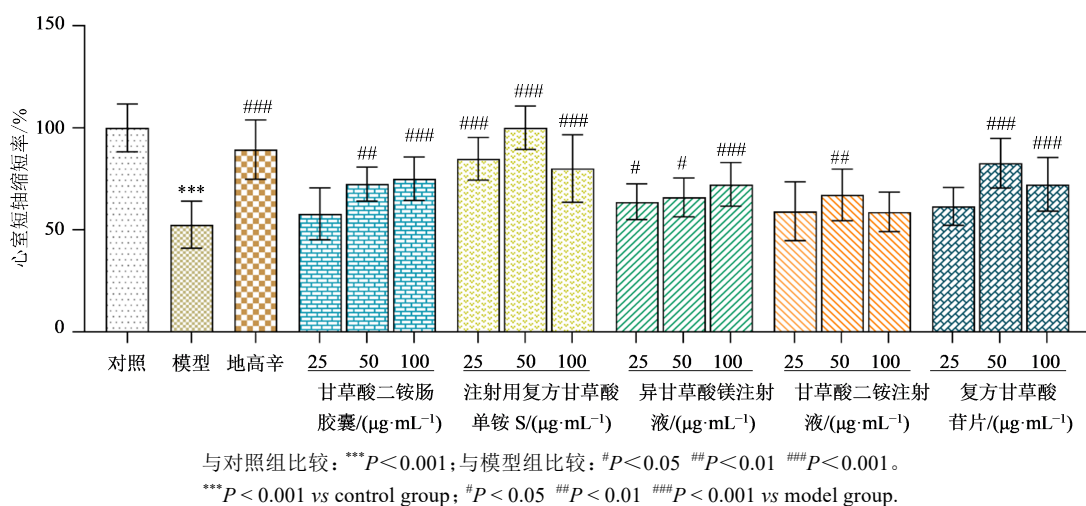


图 6 不同浓度样品对斑马鱼心包面积的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of samples on pericardial area of zebrafish

图7 各组斑马鱼心包面积($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig. 7 Pericardial area of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)图8 各组斑马鱼心室短轴缩短率($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig. 8 Ventricular short axis shortening rate of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

输出量显著增加($P < 0.001$);注射用复方甘草酸单铵S、异甘草酸镁注射液和复方甘草酸苷片组斑马鱼每搏输出量较模型组有显著增加。异甘草酸镁注射液在各浓度时对阿霉素诱导的斑马鱼每搏输出量的减少均具有明显的改善作用;注射用复方甘草酸单铵S在浓度为25、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可显著改善斑马鱼每搏输出量;复方甘草酸苷片在浓度为50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可显著改善斑马鱼每搏输出量(图9)。

3.3.5 射血分数统计结果 与对照组相比,阿霉素组斑马鱼射血分数下降,表明心衰造模成功;与阿霉素组比较,地高辛组斑马鱼射血分数上升,显示恢复射血分数的作用;注射用复方甘草酸单铵S和复方甘草酸苷片组斑马鱼射血分数有程度上升(图10)。

4 讨论

传统用药经验表明甘草可减轻附子毒性,附子的主要毒性成分和强心活性成分以双酯型生物碱为主,包括乌头碱、中乌头碱和次乌头碱等。李文等^[23]基于斑马鱼模型研究了甘草的主要有效成分甘草酸和甘草苷对乌头碱诱导的心脏毒性的改善作用,发现甘草酸及甘草苷可缓解乌头碱致斑马鱼的心包水肿,改善心脏表型、结构及功能异常等。庄开颜等^[16]首次利用斑马鱼模型比较了甘草酸、甘草素、甘草苷、异甘草素4种化合物对乌头碱所致斑马鱼心动过速及心包水肿的拮抗作用,发现甘草酸通过逆转体内活性氧(ROS)积累和心肌细胞凋亡,缓解乌头碱导致的斑马鱼心脏毒性。此外还有研究证实了甘草酸类药物对药物心脏毒性的保护作用,如对于异丙肾上腺素及三氧化二砷诱导的小鼠

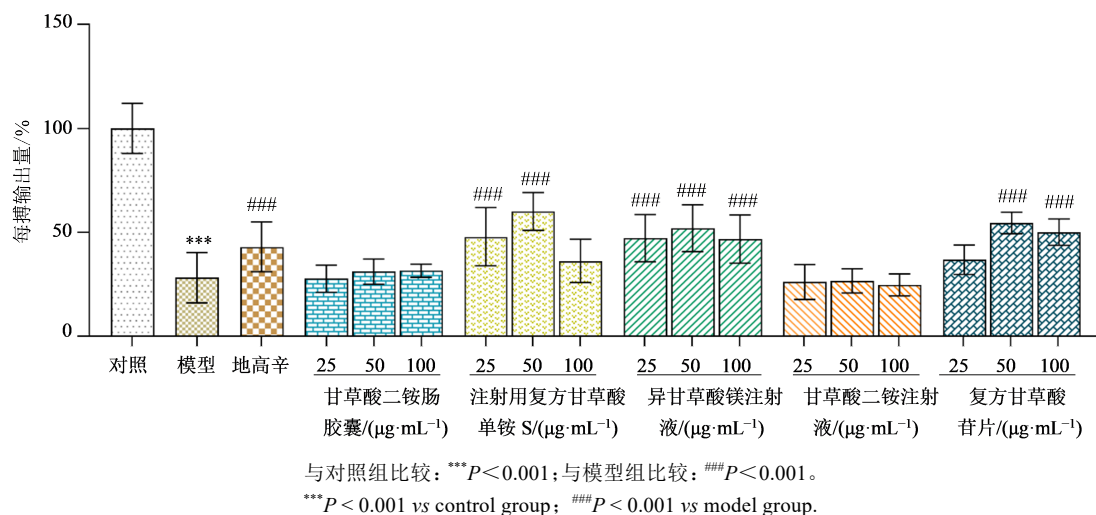


图9 各组斑马鱼每搏输出量($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 9 Stroke output of zebrafish in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

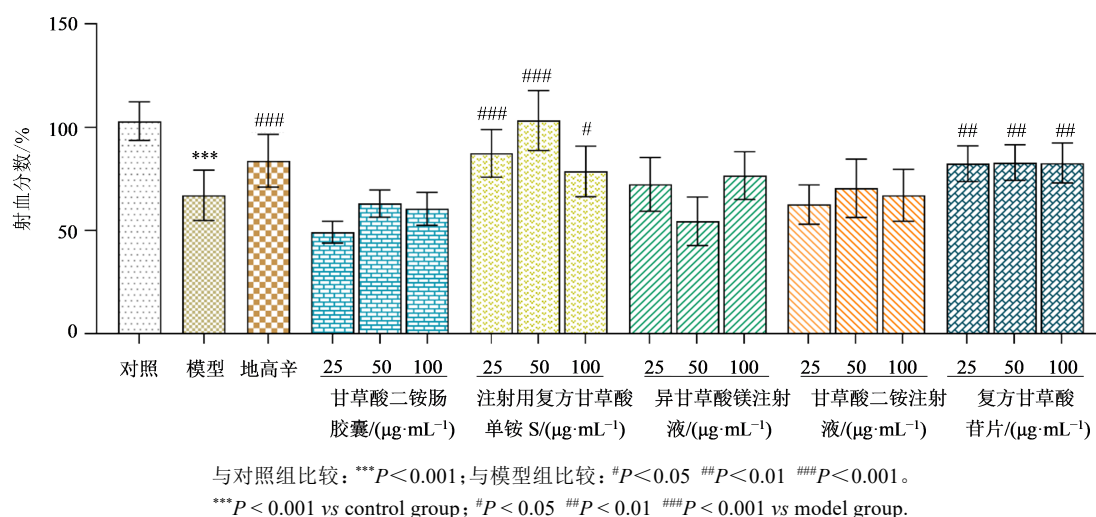


图10 各组斑马鱼射血分数($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 10 Zebra ejection fraction in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

心脏毒性,甘草酸及异甘草酸镁具有治疗和保护作用;甘草酸还可减轻抗癌药物舒尼替尼诱导的心脏毒性^[6, 24-26]。基于甘草酸类化合物心脏保护作用的上述研究,本研究首次利用心脏荧光转基因斑马鱼模型比较了异甘草酸镁注射液、甘草酸二铵注射液、复方甘草酸苷片、甘草酸二铵肠溶胶囊和注射用复方甘草酸单铵S这5种常用甘草酸类药物制剂的抗心律失常和抗心衰的活性,并发现这5种药物在斑马鱼模型中具有不同程度的心脏保护作用。在抗心律失常方面,各浓度组的甘草酸二铵肠溶胶囊和注射用复方甘草酸单铵S以及中、高浓度组的异甘草酸镁注射液可显著改善特非那定诱导的斑马鱼的心率降低与SV-BA距离增加;2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的复方甘草酸苷片仅能改善特非那定对斑马鱼心率

的影响;25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的异甘草酸镁注射液、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甘草酸二铵注射液和5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的复方甘草酸苷片仅能改善特非那定对斑马鱼SV-BA距离的影响。在抗心衰方面,注射用复方甘草酸单铵S的各浓度组均能显著改善阿霉素对斑马鱼心率、心包面积、心室短轴收缩率及射血分数的影响,25、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度组可显著改善阿霉素对斑马鱼每搏输出量的影响;复方甘草酸苷片50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度组可显著改善阿霉素对斑马鱼心率、心室短轴收缩率、每搏输出量和射血分数的影响,25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度组可显著改善阿霉素对斑马鱼心包面积和射血分数的影响;异甘草酸镁注射液在各浓度均能显著改善阿霉素对斑马鱼心室短轴收缩率和每搏输出量的影响,50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组可显著增加心率,

25、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组可显著改善心包水肿;各浓度组的甘草酸二铵注射液均可改善阿霉素对斑马鱼心率和心包面积的影响,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组可改善阿霉素对斑马鱼心室短轴收缩率的影响;各浓度组的甘草酸二铵肠溶胶囊均能改善阿霉素对斑马鱼心率的影响,50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组可改善阿霉素对斑马鱼心室短轴收缩率的影响。综合而言,甘草酸二铵肠溶胶囊、注射用复方甘草酸单铵S和异甘草酸镁注射液具有较好的抗心律失常活性;注射用复方甘草酸单铵S、复方甘草酸苷片具有较好的抗心衰活性;注射用复方甘草酸单铵S由于各项评价指标整体较好,可作为开发甘草酸类药物制剂心脏保护适应证的首选药物。本研究尚未发现以18 α -GL为主的异甘草酸镁注射液较其他制剂的显著优势。实验用的每支注射用复方甘草酸单铵S由甘草酸单铵160 mg、盐酸半胱氨酸120 mg及甘氨酸1 600 mg组成,而复方甘草酸苷片每片含甘草酸苷、甘氨酸和DL-蛋氨酸各25 mg。由于本项研究侧重于现有药物制剂新临床适应证的开发,尚未对上述复方制剂中各成分的作用分别评价。后续可对其各成分的心脏保护作用分别进行对比研究。

阿霉素作为一种经典的抗肿瘤药物已广泛用于治疗多种癌症,其最严重的不良反应就是心脏毒性,主要表现为不可逆性心肌损伤,最终导致扩张性心肌病和充血性心力衰竭。临床证据表明,当阿霉素在成人中的蓄积量超过400 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$ 时,心脏毒性的发生率明显增强^[21],这就意味着患者有可能为了减少心脏毒性而被剥夺了接受进一步治疗的机会。目前为止阿霉素引起心脏毒性导致心衰机制还不十分明确,也没有行之有效的防治方法。有研究证实ROS的产生是阿霉素毒性效应的病理生理基础^[27-28],通过氧自由基的连锁反应,进而引发脂质过氧化反应,使膜的通透性增加,导致细胞凋亡和炎症反应,而炎症和凋亡均可限制心脏功能。针对阿霉素的毒性机制,通过在具有抗炎作用的已上市药物中寻找改善其心肌毒性的治疗药物可作为一种解决阿霉素因心脏毒性而限制治疗的有效途径。本研究中的注射用复方甘草酸单铵S对阿霉素诱导的斑马鱼的心率降低、心包水肿、心室短轴收缩率降低、心脏每搏输出量及射血分数降低等方面均具有明显改善作用,可作为改善阿霉素心脏毒性的潜在有效治疗药物。

研究发现甘草酸类药物的心脏保护作用主要与Akt/mTOR、Nrf2及TLR4/NF- κ B等信号通路有

关。Lv等^[29]研究了甘草酸在阿霉素诱导的心脏损伤的作用机制,发现HMGB1在阿霉素诱导的自噬触发细胞死亡中起着至关重要的作用,甘草酸通过抑制HMGB1下调Akt/mTOR信号通路从而减轻阿霉素的心脏毒性。吴勇超等^[30]研究了异甘草酸镁注射液对阿霉素诱导的小鼠的心脏损伤的保护机制,发现与阿霉素组比较,异甘草酸镁组小鼠心脏组织中的Bax/Bcl-2、Caspase-3、NFF- κ B p65蛋白表达显著减弱,TUNEL检测证实凋亡细胞数量明显降低。表明异甘草酸镁能上调抑凋亡基因,下调促凋亡基因,抑制组织细胞凋亡,这个可能是改善阿霉素所致心脏损伤的分子机制。Zheng等^[26]研究了异甘草酸镁对三氧化二砷的心脏保护作用,发现异甘草酸镁可能通过激活Nrf2通路和抑制TLR4/NF- κ B通路,减轻三氧化二砷诱导的小鼠心脏毒性,与抗炎、抗氧化和抗凋亡作用有关。Cheng等^[21]研究发现甘草酸通过上调Nrf2/HO-1信号通路,抑制氧化应激、线粒体功能障碍和细胞凋亡,对阿霉素诱导的心脏毒性具有保护作用。李梦颖等^[31]发现甘草酸通过抑制L型钙离子通道,心肌收缩和心肌细胞钙瞬变改善异丙肾上腺素引起的急性心肌缺血。Zhu等^[32]发现甘草酸通过HMGB1-TLR4-GPX4通路调节炎症、氧化应激和铁死亡,从而改善心肌缺血/再灌注损伤。

本研究评价了5种甘草酸制剂的心脏保护作用,但这些药物心脏保护作用的相关机制仍需要更深入的分析 and 实验验证。此外,虽然不同甘草酸制剂中18 α -GL和18 β -GL的比例存在差异,但是由于药物制剂中其他成分的关系尚不能确切评价甘草酸在心脏保护中的构/效关系,不同构型甘草酸化合物的心脏保护作用是否存在差异仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Roth G A, Mensah G A, Johnson C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [2] Tang T J, Wang X, Wang L, et al. Liquiritin inhibits H₂O₂-induced oxidative stress injury in H9c2 cells via the AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway [J]. J Food Biochem, 2022, 46(10): e14351.
- [3] Wahab S, Annadurai S, Abullais S S, et al. *Glycyrrhiza glabra* (licorice): A comprehensive review on its phytochemistry, biological activities, clinical evidence

- and toxicology [J]. *Plants*, 2021, 10(12): 2751.
- [4] 岳丽晓, 李登云, 张晶晶, 等. 基于 AMPK/mTOR 自噬通路研究甘草酸二铵对柯萨奇病毒 B3 病毒性心肌炎小鼠的保护作用 [J]. *中草药*, 2023, 54(12): 3895-3902.
Yue X L, Li D Y, Zhang J J, et al. Protective effect of diammonium glycyrrhizinate on mice with coxsackievirus B3 myocarditis by regulating AMPK/mTOR autophagy pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(12): 3895-3902.
- [5] Yuan Y G, Li B, Peng W Z, et al. Protective effect of glycyrrhizin on coronary microembolization-induced myocardial dysfunction in rats [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2021, 9(1): e00714.
- [6] Xu Z F, Jin Y, Gao Z Z, et al. Autophagic degradation of CCN2 (cellular communication network factor 2) causes cardiotoxicity of sunitinib [J]. *Autophagy*, 2022, 18(5): 1152-1173.
- [7] Lai T F, Shen Y, Chen C C, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 908: 174353.
- [8] Boissady E, Abi Zeid Daou Y, Faucher E, et al. High-mobility group box 1-signaling inhibition with glycyrrhizin prevents cerebral T-cell infiltration after cardiac arrest [J]. *J Am Heart Assoc*, 2023, 12(3): e027749.
- [9] Huo X W, Meng X B, Zhang J, et al. Hepatoprotective effect of different combinations of 18 α - and 18 β -glycyrrhizic acid against CCl₄-induced liver injury in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109354.
- [10] Huo X W, Sun X K, Cao Z P, et al. Optimal ratio of 18 α - and 18 β -glycyrrhizic acid for preventing alcoholic hepatitis in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 172-178.
Huo X W, Sun X K, Cao Z P, et al. Optimal ratio of 18 α - and 18 β -glycyrrhizic acid for preventing alcoholic hepatitis in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 172-178.
- [11] 王旭, 陈红斗, 刘瑞霞, 等. 两种甘草酸制剂辅助治疗慢性乙型肝炎的疗效与经济学比较 [J]. *药物流行病学杂志*, 2021, 30(7): 482-485.
Wang X, Chen H D, Liu R X, et al. Comparison of the efficacy and economics of two glycyrrhizic acid preparations in the adjuvant treatment of chronic hepatitis B [J]. *Chin J Pharmacoevidemiol*, 2021, 30(7): 482-485.
- [12] Chen H D, Zheng F F, Wang M L, et al. Meta-analysis based on clinical RCTs: The effect of molecular epimerism on the safety of glycyrrhizic acid [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 3869698.
- [13] 刘莉, 韩刚. 不同构型的甘草酸对葛根素在大鼠体内的药代动力学影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 5(19): 2377-2380.
Liu L, Han G. Effect of different glycyrrhizin isomers on pharmacokinetics of puerarin in rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2019, 5(19): 2377-2380.
- [14] Zhang M, Peng Y, Wang M Y, et al. The influence of compatibility of Si-Ni Decoction with metabolism in intestinal bacteria on transports of toxic diterpenoid alkaloids from processed aconite root across Caco-2 monolayers [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228: 164-178.
- [15] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的中药安全性评价研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 278-287.
Fan Q Q, Li Z Q, Chen M L, et al. Research progress on safety evaluation of traditional Chinese medicine based on zebrafish model [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(1): 278-287.
- [16] 庄开颜, 高硕, 柳晴, 等. 基于斑马鱼模型和网络药理学的甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性生作用与机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(7): 1368-1376.
Zhuang K Y, Gao S, Liu Q, et al. Study of glycyrrhizic acid ameliorates cardiotoxicity of aconitine and potential mechanism based on zebrafish model and network pharmacology [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(7): 1368-1376.
- [17] Lane S, More L A, Asnani A. Zebrafish models of cancer therapy-induced cardiovascular toxicity [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2021, 8(2): 8.
- [18] Qiao L L, Chen X Y, Ren B X, et al. The specification of zebrafish (*Danio rerio*) heart electrocardiogram index characteristic responses to different types of pollutants [J]. *Chemosphere*, 2021, 267: 129199.
- [19] 周祥, 潘红焯, 许照, 等. 基于转基因血管荧光斑马鱼的芦丁、甘草酸、汉防己甲素、葛根素、柚皮素、鞣花酸、黄芩苷、大黄素、穿心莲内酯、苦参碱促血管新生活性初探 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(6): 1052-1059.
Zhou X, Pan H Y, Xu Z, et al. Preliminary study on angiogenesis promoting activities of rutin, glycyrrhizic acid, tetrandrine, puerarin, naringin, ellagic acid, baicalin, emodin, androgynolide and matrine in transgenic fluorescein zebrafish [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(6): 1052-1059.
- [20] Zhu Y Q, Li P H, Meng R H, et al. Lipid profiles of the heads of four shrimp species by UPLC-Q-exactive orbitrap/MS and their cardiovascular activities [J]. *Molecules*, 2022, 27(2): 350.
- [21] Cheng Y F, Wu X P, Nie X, et al. Natural compound glycyrrhetinic acid protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154407.
- [22] 徐卓然, 陈芳源, 沈莉菁, 等. 阿霉素对斑马鱼心脏毒性

- 的评估及机制探索 [J]. 诊断学理论与实践, 2016, 15 (1): 30-36.
- Xu Z R, Chen F Y, Shen L J, et al. Evaluation of adriamycin toxicity on heart of zebrafish and exploration of its mechanism [J]. Diagn Concepts Pract, 2016, 15(1): 30-36.
- [23] 李文, 杨晓琴, 章津铭, 等. 甘草酸和甘草苷对乌头碱诱导斑马鱼心脏毒性的拮抗作用 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 55-58.
- Li W, Yang X Q, Zhang J M, et al. The antagonistic effect of glycyrrhizic acid and liquiritin on aconitine induced cardiotoxicity in zebrafish [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2018, 34(3): 55-58.
- [24] Wu R N, Yu T Y, Zhou J C, et al. Targeting HMGB1 ameliorates cardiac fibrosis through restoring TLR2-mediated autophagy suppression in myocardial fibroblasts [J]. Int J Cardiol, 2018, 267: 156-162.
- [25] Ma D L, Zhang J P, Zhang Y Y, et al. Inhibition of myocardial hypertrophy by magnesium isoglycyrrhizinate through the TLR4/NF- κ B signaling pathway in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 55: 237-244.
- [26] Zheng B, Yang Y K, Li J H, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate alleviates arsenic trioxide-induced cardiotoxicity: Contribution of Nrf2 and TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 543-556.
- [27] Tai P P, Chen X Y, Jia G H, et al. WGX50 mitigates doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of mitochondrial ROS and ferroptosis [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 823.
- [28] An S Y, Jin S A, Seo H J, et al. Protective effect of secretory APE1/Ref-1 on doxorubicin-induced cardiotoxicity via suppression of ROS and p53 pathway [J]. ESC Heart Fail, 2024, 11(2): 1182-1193.
- [29] Lv X L, Zhu Y L, Deng Y G, et al. Glycyrrhizin improved autophagy flux via HMGB1-dependent Akt/mTOR signaling pathway to prevent Doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Toxicology, 2020, 441: 152508.
- [30] 吴勇超, 荣小翠, 李亚洲, 等. 甘草酸制剂对阿霉素所致小鼠心脏及肝脏损伤的抑制作用研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(4): 466-471.
- Wu Y C, Rong X C, Li Y Z, et al. Inhibitory effect of glycyrrhizic acid preparation on cardiac and liver injury induced by adriamycin in mice [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2021, 41(4): 466-471.
- [31] 李梦颖. 基于钙稳态的甘草酸心肌缺血保护作用及机制研究 [D]. 石家庄: 河北中医学院, 2020.
- Li M Y. Protective effect and mechanism of glycyrrhizic acid on myocardial ischemia based on calcium homeostasis [D]. Shijiazhuang: Hebei university of Chinese Medicine, 2020: 6-26.
- [32] Zhu K Y, Fan R, Cao Y C, et al. Glycyrrhizin attenuates myocardial ischemia reperfusion injury by suppressing Inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via the HMGB1-TLR4-GPX4 pathway [J]. Exp Cell Res, 2024, 435(1): 113912.

[责任编辑 齐静雯]