

• 药理与临床 •

基于多途径联合效应的甘草防治脓毒血症活性成分筛选及作用机制研究

梁龙鑫^{1,2}, 任璐彤³, 刘婷婷⁴, 高 源⁵, 徐 广⁵, 肖小河^{1,2*}, 柏兆方^{2*}

1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

2. 解放军总医院 第五医学中心 肝病医学部, 北京 100039

3. 内蒙古自治区人民医院 药学处, 内蒙古 呼和浩特 010010

4. 遵义医科大学第三附属医院(遵义市第一人民医院), 贵州 遵义 563002

5. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

摘要:目的 研究甘草中有效组分对脓毒血症的防治作用及机制。方法 采用小鼠骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDM)构建体外 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体激活模型及 H₂O₂ 诱导的氧化应激模型筛选出甘草抗炎、抗氧化应激的有效组分, 采用 ip 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 20 mg/kg)诱导 C57BL/6 小鼠脓毒血症致死模型以及脓毒血症模型, 评价致死模型中小鼠的生存率及脓毒血症模型小鼠腹腔灌洗液中巨噬细胞和中性粒细胞在渗出细胞中的占比以及外周血和腹腔灌洗液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平。结果 基于 BMDM 细胞 NLRP3 炎症小体激活模型筛选出甘草中有效组分刺甘草查耳酮, 可显著抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) p20 的蛋白表达及 IL-1 β 的释放($P<0.05$ 、 0.001)。基于 H₂O₂ 诱导的 BMDM 细胞氧化应激模型筛选出有效组分甘草酸, 其可改善 H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤, 显著升高细胞活力和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性($P<0.01$ 、 0.001), 降低活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生($P<0.001$)。基于 LPS 诱导的脓毒血症致死模型发现, 甘草酸高剂量组及刺甘草查耳酮低、高剂量组和联合组均可显著升高小鼠生存率($P<0.05$ 、 0.001), 并且联合用药组的效果优于甘草酸组和刺甘草查耳酮低剂量组。在脓毒血症小鼠模型中, 刺甘草查耳酮和甘草酸均可降低巨噬细胞和中性粒细胞在渗出细胞中的占比($P<0.001$), 降低外周血及腹腔灌洗液中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平($P<0.01$ 、 0.001), 同时联合组与单药组相比体现出更佳的作用效果($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 甘草活性成分刺甘草查耳酮与甘草酸联用可抑制 BMDM 细胞 NLRP3 炎症小体激活和氧化应激, 从而多途径地发挥较强的防治脓毒血症的作用, 为中药组分中药的研发及中药临床精准用药提供了新的研究思路。

关键词: 甘草; 组分中药; 联合增效; 刺甘草查耳酮; 甘草酸; 脓毒血症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)11-3524-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.014

Screening and mechanism study of active ingredients of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in prevention and treatment of sepsis based on combined effects of multiple pathways

LIANG Long-xin^{1,2}, REN Lu-tong³, LIU Ting-ting⁴, GAO Yuan⁵, XU Guang⁵, XIAO Xiao-he^{1,2}, BAI Zhao-fang²

1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Department of Liver Medicine, Fifth Medical Center, PLA General Hospital, Beijing 100039, China

3. Department of Pharmacy, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010010, China

4. Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (Zunyi First People's Hospital), Zunyi 563002, China

收稿日期: 2023-01-11

基金项目: 国家中医药传承创新团队项目(ZYYCXTD-C-202005); 国家自然科学基金重点项目(81930110); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81903891); 国家自然科学基金创新研究群体项目(81721002)

作者简介: 梁龙鑫, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: lianglongxin00@hotmail.com

***通信作者:** 柏兆方, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药药理与毒理研究。E-mail: baizf2008@hotmail.com

肖小河, 研究员, 博士生导师, 从事临床中药学研究。E-mail: pharmacy302xxh@126.com

5. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of effective components in Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) on the prevention and treatment of sepsis. **Methods** The effective components of anti-inflammation and anti-oxidant stress in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* were screened by NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome activation model and *in vitro* oxidative stress model induced by H₂O₂ in bone marrow-derived macrophages (BMDM). The mortality model of C57BL/6 mice induced by lipopolysaccharide (LPS, 20 mg/kg) and sepsis model were used to evaluate the survival rate of mice in mortality model, the proportions of macrophages and neutrophils in exudative cells in peritoneal lavage fluid, interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in peripheral blood and peritoneal lavage fluid of sepsis model mice. **Results** Based on NLRP3 inflammasome activation model in BMDM cells, the effective component (echinatin) of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* was screened out, which significantly inhibited the protein expression of cysteine-aspartate protease-1 (Caspase-1) p20 and the release of IL-1 β ($P < 0.05$, 0.001). Based on H₂O₂-induced oxidative stress model of BMDM cells, glycyrrhizic acid was screened out, which improved H₂O₂-induced oxidative damage of cells, significantly increased cell viability and superoxide dismutase (SOD) activity ($P < 0.01$, 0.001), and reduced the production of reactive oxygen species (ROS) ($P < 0.001$). Based on the death model of sepsis induced by LPS, it was found that glycyrrhizic acid high-dose group, echinatin low-, high-dose groups and the combined group significantly improved the survival rate of mice ($P < 0.05$, 0.001), and the effect of the combined drug group was better than that of glycyrrhizic acid group and echinatin low-dose group. In the mouse model of sepsis, both echinatin and glycyrrhizic acid reduced the proportions of macrophages and neutrophils in exudative cells ($P < 0.001$), reduced the levels of IL-1 β and TNF- α in peripheral blood and peritoneal lavage fluid ($P < 0.01$, 0.001). At the same time, the combined group had a better effect than the single drug group ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** The combination of echinatin and glycyrrhizic acid, active components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, can inhibit the activation of NLRP3 inflammasome and oxidative stress in BMDM cells, thus playing a strong role in the prevention and treatment of sepsis in multiple ways, which provides a new research idea for the research and development of traditional Chinese medicine components and the clinical precise use of traditional Chinese medicine.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; component-based Chinese medicine; combined synergism; echinatin; glycyrrhizic acid; sepsis

甘草始载于《神农本草经》，为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根和根茎，味甘性平，具有清热解毒、补气益脾、祛痰、止咳、缓急止痛、调和诸药等功效，常用于临床，且素有“十方九草”之称^[1]。此外，甘草作为我国传统的药食两用类中药，广泛应用于食品、保健品等多个领域。现代药理学研究表明，甘草具有保肝、抗炎^[2]、抗病毒^[3]、抗氧化^[4]、抗纤维化^[5]、抗肿瘤^[6]等多种药理活性，目前已被开发为复方甘草片、甘草酸二铵胶囊等多种中成药制剂。

脓毒血症是一种感染性的炎症反应综合征，可导致多种器官功能性障碍，具有发病率高、病死率高等特点^[7]，其发病机制较为复杂，涉及炎症反应、氧化应激等系列机体反应，现阶段虽然常规用药如广谱抗菌类药物、糖皮质激素等，均可起到良好的治疗效果，但临床应用中往往存在一定的局限性，如抗生素在明确感染细菌种类的早期脓毒血症的防治中可发挥较好的治疗效果，但长期使用易产生耐药性^[8]；大剂量、短疗程的糖皮质激素治疗方案可

能引起继发性感染^[9]。脓毒血症发病迅速，病情凶险，临床亟需针对脓毒血症发病特点的药物以实现临床药物的精准用药。

甘草及其成分具有调节促炎及抗炎细胞因子水平、提高免疫细胞活性等免疫调节作用^[10-17]。课题组基于前期工作基础，针对甘草展开了系列免疫活性研究^[18-21]。本研究发现刺甘草查耳酮、甘草酸是甘草中较强的抗炎、抗氧化的活性成分，多种成分在体内通过调节多个靶点产生多个效应从而起到治疗疾病的作用，并对比研究了二者联合用药在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的脓毒血症模型中的作用效果，以期初步阐明甘草活性成分协同抗脓毒血症的药效特征，为甘草相关制剂的新药研发提供实验基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 WT 雌性小鼠，6~8 周龄，体重 18~22 g，购自斯贝福生物技术有限公司，动物合格证号 SCXK (京) 2019-0010，饲养于解放军总医院第五医学中心动物实验室，温度 21~24 ℃，

12 h 光暗循环。动物实验经中国人民解放军总医院第五医学中心批准,符合《实验动物管理条例》要求,动物实验伦理批准号为 IACUC-2021-0012。

1.2 药品与试剂

甘草苷、甘草素、甘草次酸、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、光甘草定、刺甘草查耳酮、甘草酸、H2DCFDA 探针、巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体抑制剂 MCC950 (批号分别为 HY-N0376、HY-N0377、HY-N0180、HY-N2497、HY-N0270、HY-N0393、HY-N0269、HY-N0184、HY-D0940、HY-P7085、HY-I2815A) 均购自美国 MedChemExpress 公司,化合物质量分数均 > 98%; 异甘草苷、甘草酸单铵 (批号分别为 T5S0331、T6384, 质量分数 > 99%) 购自 TargetMol 公司; 甘草提取物 (批号 DST20220215) 购自成都乐天医药科技有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清、Opti-MEM 培养基 (批号分别为 11965092、C0232、2427634) 均购自美国 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、PBS (批号分别为 QN0746、SNM249) 购自北京百奥莱博科技有限公司; Lamin B 抗体 (批号 17416) 购自美国 CST 公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 抗体 (批号 AG-20B-004) 购自安诺伦 (北京) 生物科技有限公司; Ly-6G/Ly-6C 抗体、F4/80 抗体、CD11b 抗体 (批号分别为 108407、123108、101212) 均购自 Biolegend 公司; 总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测 (NBT 法) 试剂盒 (批号 S0109) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 细胞增殖与活性检测 (CCK-8 法) 试剂盒 (批号 ck04-500T) 购自上海同仁药业股份有限公司; IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 检测试剂盒 (批号分别为 1210602、1217202) 购自达科为生物技术有限公司; LPS、尼日利亚菌素、H₂O₂ (批号分别为 L2880、N7143、323381) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 抗小鼠 IgG 二抗 (批号 115-035-003) 购自美国 Jackson Immuno Research 公司。

1.3 仪器

HERAcell VIOS 160i 型 CO₂ 培养箱、TGL-18M 型低温高速离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SpectraMax iD5 型酶标仪 (美国 Promega 公司); PowerPac HC 型电泳仪、Trans-Blot 型转印槽

(美国 Bio-Rad 公司); FACSCanto™ II 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 小鼠骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDM) 的制备及培养

小鼠经乙醚麻醉后脱颈处死,使用 75%乙醇浸泡消毒 30 min, 无菌操作台中分离小鼠胫骨,用 37 °C 预热的 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素) 冲洗骨髓腔,使胫骨内容物均被冲出,收集混合液,加入 50 ng/mL M-CSF,吹打混匀,放入培养基,置于 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养 5~7 d 后,得到 BMDM 细胞。

2.2 NLRP3 炎症小体激活模型筛选甘草中 10 种活性成分

2.2.1 Western blotting 检测细胞上清液中 Caspase-1 p20 及细胞裂解液中 Caspase-1 p45 蛋白表达 BMDM 以 1×10^6 个/mL 接种于 12 孔板中,培养 24 h,待细胞贴壁完全后,更换为含 50 μ g/L LPS 的培养液,恒温培养 4 h。弃上清,分别加入含 40 μ mol/L 甘草苷、甘草素、异甘草苷、甘草次酸、芹糖异甘草苷、甘草酸单铵、芒柄花苷、光甘草定、刺甘草查耳酮、甘草酸的培养液,恒温培养 1 h,加入 NLRP3 炎症小体激活剂尼日利亚菌素 (7.5 μ mol/L) 刺激 30 min,另设置不含药物的对照组,收集细胞及上清液。细胞上清液加入 1/4 体积的三氯乙酸,于 -20 °C 储存 2 h 以上,待蛋白沉淀后,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入冰丙酮以清洗蛋白。弃去丙酮,加入 1 $\times$ Loading Buffer,混匀后制成上清蛋白样品。细胞加入裂解液提取蛋白,加入 1 $\times$ Loading Buffer,金属浴煮沸 15 min 使蛋白变性,得到细胞裂解蛋白样品。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后加入一抗孵育,洗涤后加入二抗孵育,显影^[22]。

2.2.2 细胞上清液中 IL-1 β 水平检测 按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清液中 IL-1 β 水平。

2.3 体外氧化应激模型筛选甘草中 10 种活性成分

2.3.1 CCK-8 法检测 H₂O₂ 对细胞活性的影响 BMDM 以 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板中,培养 24 h,待细胞贴壁完全后,分别加入 0、50、100、200、400、600、800、1000 μ mol/L 的 H₂O₂,每组设 3 个复孔,于培养箱中培养 12 h。弃去上清液,避光加入 CCK-8 试剂,孵育 30 min,采用酶标仪测定吸光度 (A) 值。

2.3.2 ROS 水平的检测 BMDM 以 1.2×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁完全后, 分别加入含 40 $\mu\text{mol/L}$ 甘草苷、甘草素、异甘草苷、甘草次酸、芹糖异甘草苷、甘草酸单铵、芒柄花苷、光甘草定、刺甘草查耳酮、甘草酸的培养液, 恒温培养 1 h 后, 加入 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 16 h, 另设置不含药物的对照组, 清洗细胞, 后加入 H2DCFDA 探针, 避光孵育 30 min, 使用流式细胞仪检测 ROS 水平。

2.4 CCK-8 检测刺甘草查耳酮和甘草酸对细胞活性的影响

2.4.1 刺甘草查耳酮和甘草酸对 BMDM 活性的影响 BMDM 以 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁完全后, 分别加入 0、31.25、62.5、125、250、500、1000 $\mu\text{mol/L}$ 甘草酸或 0、5、10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 刺甘草查耳酮, 每组设 3 个复孔, 于培养箱中培养 12、24 h, 检测 A 值。

2.4.2 刺甘草查耳酮和甘草酸对 H_2O_2 刺激的 BMDM 活性的影响 BMDM 以 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁完全后, 分别加入 200 $\mu\text{mol/L}$ 甘草酸或 40 $\mu\text{mol/L}$ 刺甘草查耳酮, 恒温培养 1 h 后, 加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 12 h, 检测 A 值。

2.5 刺甘草查耳酮和甘草酸对细胞 SOD 活性的影响

BMDM 以 1.2×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁完全后, 分别加入 200 $\mu\text{mol/L}$ 甘草酸或 40 $\mu\text{mol/L}$ 刺甘草查耳酮, 再加入 400、600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导氧化损伤, 刺激 12 h, 按试剂盒说明书检测 SOD 活性。

2.6 Western blotting 检测刺甘草查耳酮和甘草酸对细胞上清液中 Caspase-1 p20 及细胞裂解液中 Caspase-1 p45 蛋白表达的影响

BMDM 以 1×10^6 个/mL 接种于 12 孔板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁完全后, 更换为含 50 $\mu\text{g/L}$ LPS 的培养液, 恒温培养 4 h。弃上清, 分别加入含 25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 甘草酸或 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 刺甘草查耳酮的培养液, 恒温培养 1 h, 加入 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 尼日利亚菌素刺激 30 min, 另设置不含药物的对照组, 收集细胞及上清液。采用 Western blotting 检测细胞上清液中 Caspase-1 p20 及细胞裂解液中 Caspase-1 p45 蛋白表达。

2.7 ELISA 检测刺甘草查耳酮和甘草酸对细胞上清液中 IL-1 β 水平的影响

取“2.6”项下细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒

说明书检测细胞上清液中 IL-1 β 水平。

2.8 刺甘草查耳酮和甘草酸对 LPS 诱导的脓毒血症致死模型小鼠生存率的影响

基于课题组前期研究^[18]及预实验结果, 将甘草酸与刺甘草查耳酮的基础给药剂量均设置为 20 mg/kg。MCC950 作为 NLRP3 炎症小体的抑制剂, 可以延长 LPS 诱导的脓毒血症小鼠的存活率^[23-24], 本实验将其作为阳性对照药, 并根据课题组前期对炎症小体抑制的实验结果^[18-19], MCC950 剂量为 40 mg/kg。小鼠适应性喂养 3 d 后, 随机分为模型组, 甘草酸低、高剂量 (20、40 mg/kg) 组, 刺甘草查耳酮低、高剂量 (20、40 mg/kg) 组, 甘草酸 (20 mg/kg)-刺甘草查耳酮 (20 mg/kg) 组和 MCC950 (40 mg/kg) 组, 每组 12 只。造模前小鼠禁食 8 h, 各给药组 ip 相应药物, 模型组 ip 等体积的含 5% DMSO 和 5% 聚山梨酯-80 的生理盐水溶液, 预给药 1 h 后, 小鼠 ip LPS (20 mg/kg) 诱导脓毒性休克, 持续观察小鼠死亡情况, 每 2 小时记录小鼠死亡只数, 绘制生存率曲线。

2.9 刺甘草查耳酮和甘草酸对 LPS 诱导的脓毒血症小鼠模型炎症因子水平的影响

小鼠适应性喂养 3 d 后, 随机分为对照组、模型组、MCC950 (40 mg/kg) 组、甘草提取物 (1.3 g/kg)^[25]组、刺甘草查耳酮 (20 mg/kg) 组、甘草酸 (20 mg/kg) 组和甘草酸 (20 mg/kg)-刺甘草查耳酮 (20 mg/kg) 组, 每组 8 只。造模前小鼠禁食 8 h, 各给药组 ig 甘草提取物或 ip MCC950、刺甘草查耳酮、甘草酸, 对照组和模型组 ig 生理盐水或 ip 含 5% DMSO 和 5% 聚山梨酯-80 的生理盐水溶液, 预给药 1 h 后, 造模小鼠 ip LPS (20 mg/kg), 对照组小鼠 ip 等体积的生理盐水, 3 h 后取材, 收集腹腔灌洗液以及眼眶血。采用颈椎脱臼法处死小鼠, 将在冰浴中预冷的 PBS 注入小鼠腹腔内, 轻揉小鼠腹部 2 min, 随后取出腹腔内的 PBS, 得到腹腔灌洗液。将腹腔灌洗液分出部分用于 ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 和 TNF- α , 其余用于提取渗出细胞。渗出细胞使用 F4/80 抗体对巨噬细胞进行染色, 用 CD11b 抗体及 Ly6C/Ly6G 抗体对中性粒细胞进行染色, 使用流式细胞仪进行细胞计数。按试剂盒说明书测定外周血和腹腔灌洗液中 IL-1 β 和 TNF- α 水平。

2.10 统计学分析

采用 SPSS v23.0 和 GraphPad Prism 9.0.0 软件对实验数据进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差

异比较用单因素方差分析处理;生存曲线由 GraphPad Prism 9.0.0 绘制,组间差异采用 log-rank test。

3 结果

3.1 NLRP3 炎症小体激活模型筛选甘草活性成分

本研究建立了体外 NLRP3 炎症小体激活模型,对甘草中 10 种活性成分(甘草苷、甘草素、异甘草苷、甘草次酸、芹糖异甘草苷、甘草酸单铵、芒柄花苷、光甘草定、刺甘草查耳酮、甘草酸)抑制 NLRP3 炎症小体激活的效应进行了筛选,结果表明,刺甘草查耳酮可显著抑制尼日利亚菌素诱导的细胞上清液中 Caspase-1 p20 的蛋白表达($P<0.001$,图 1-A、B),对 Caspase-1 p45 蛋白表达没有显著影响(图 1-C),同时显著抑制 IL-1 β 分泌($P<0.05$,图 1-D),与课题组前期研究结果一致^[17],故认为刺甘草查耳酮作为甘草中抑制 NLRP3 炎症小体经典通路的标志性成分,拟将其选为后续联合使用的小分子之一。

3.2 体外氧化应激模型筛选甘草活性成分

采用 H₂O₂ 建立体外氧化应激模型,首先对

H₂O₂ 的细胞毒性进行了检测,结果显示 H₂O₂ 的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值为 491.6 μ mol/L (图 2-A),因此选用可诱导氧化应激产生且相对安全的浓度 200 μ mol/L 作为刺激浓度。如图 2-B 所示,甘草中 10 个活性成分均可显著抑制 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生($P<0.05$ 、0.01、0.001),其中甘草酸抑制效果最佳。因此,本实验将刺甘草查耳酮、甘草酸作为组分联合的研究对象进行下一步的研究。

3.3 刺甘草查耳酮、甘草酸的细胞毒性及抗氧化应激作用

根据上述实验结果,本研究筛选出了甘草 10 个成分中抑制炎症小体激活及抗氧化应激作用最强的 2 个活性成分——刺甘草查耳酮、甘草酸,接下来对二者的细胞毒性进行考察,发现 24 h 内二者均未出现明显的细胞毒性(图 3-A、B),刺甘草查耳酮和甘草酸可显著抑制 H₂O₂ 刺激的细胞活性降低($P<0.05$ 、0.01,图 3-C)。研究表明, H₂O₂ 诱导细胞产生 ROS 并进入氧化应激状态, SOD 活性降低^[26-28]。

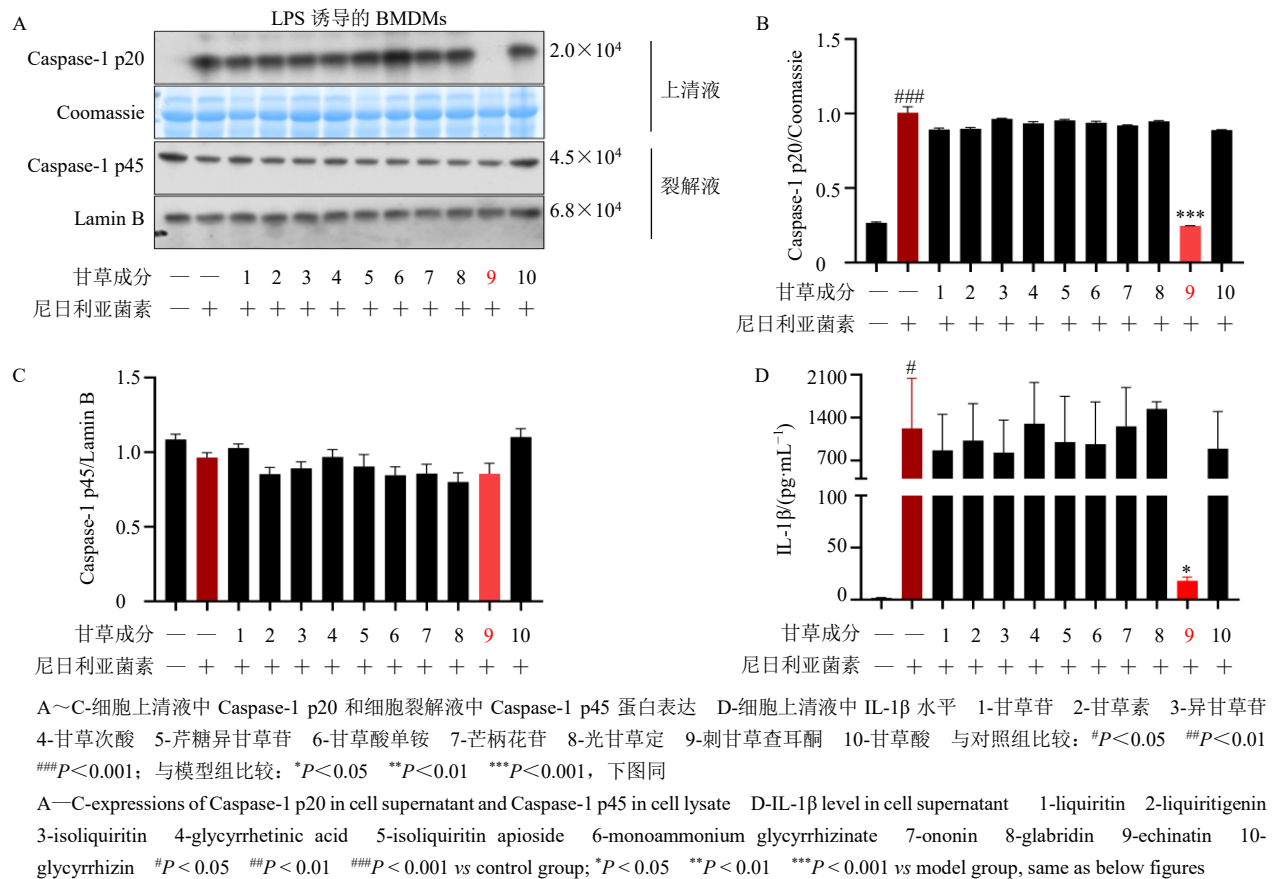


图 1 NLRP3 炎症小体激活模型筛选甘草活性成分 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Screening of active components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* by NLRP3 inflammasome activation model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

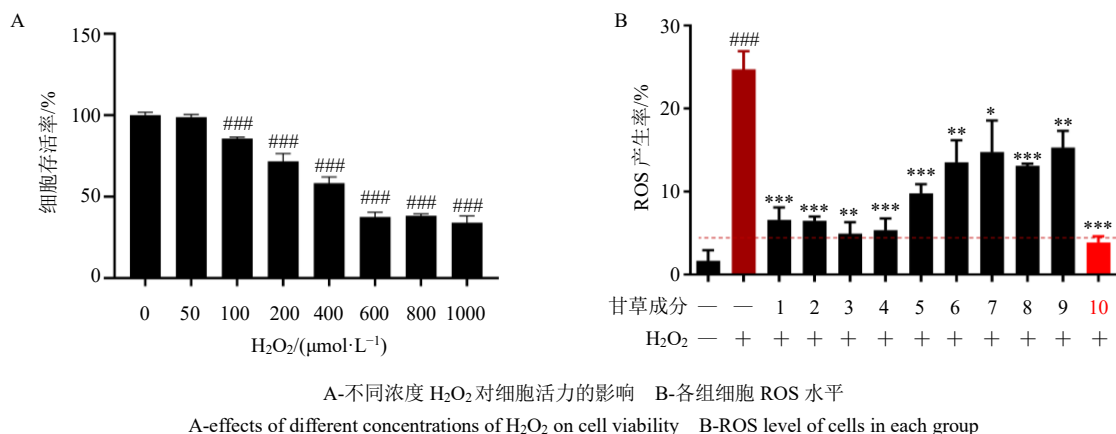


图 2 体外氧化应激模型筛选甘草活性成分 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Screening of active components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* by *in vitro* oxidative stress model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

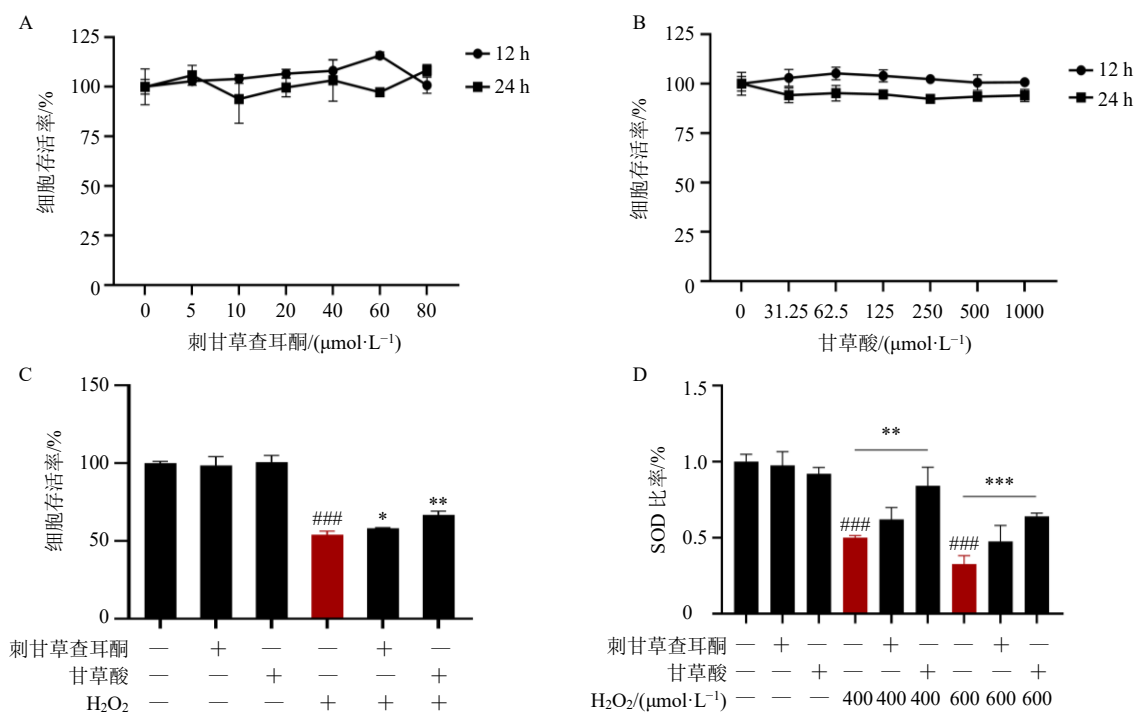


图 3 刺甘草查耳酮、甘草酸的细胞毒性和抗氧化应激作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

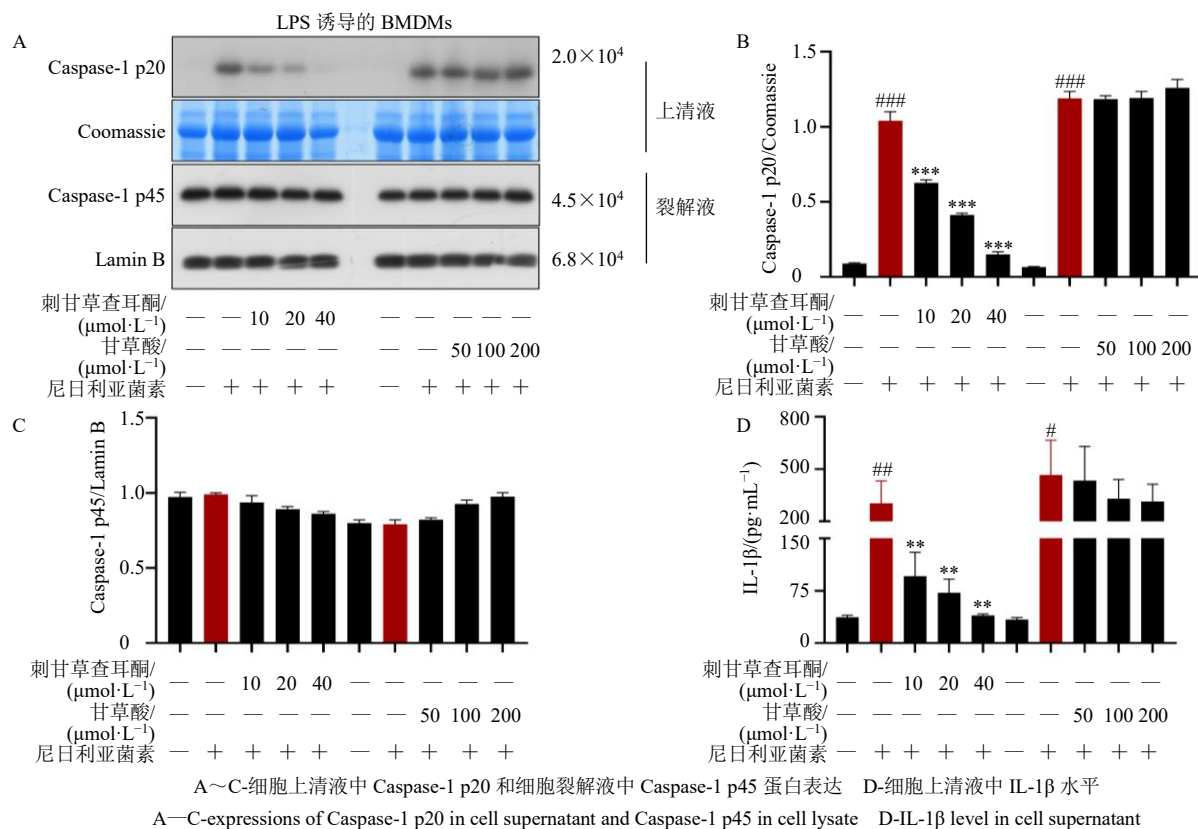
Fig. 3 Cytotoxicity and anti-oxidative stress effect of echinatin and glycyrrhizic acid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

如图 3-D 所示, 甘草酸显著上调 H₂O₂ 诱导的细胞中 SOD 活性 ($P < 0.01, 0.001$), 表明甘草酸具有恢复 SOD 活性的效应。

3.4 刺甘草查耳酮、甘草酸对 NLRP3 炎症小体的影响

进而对不同浓度的刺甘草查耳酮、甘草酸抑制 NLRP3 炎症小体的效应进行研究, 如图 4 所示, 刺甘草查耳酮可剂量相关性地抑制尼日利亚菌素诱导

的细胞上清液中 Caspase-1 p20 蛋白表达以及炎症因子 IL-1 β 的释放 ($P < 0.01, 0.001$), 但各剂量的甘草酸对细胞上清液中 Caspase-1 p20 的蛋白表达以及 IL-1 β 的释放均无明显作用, 且二者对细胞裂解液中 Caspase-1 p45 的蛋白表达均无明显影响。进一步地确定了刺甘草查耳酮、甘草酸抗炎、抗氧化应激的效果, 下一步的实验中将对研究刺甘草查耳酮-甘草酸组分联合在脓毒血症疾病模型的作用效果。

图 4 刺甘草查耳酮、甘草酸对 NLRP3 炎症小体的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effects of echinatin and glycyrrhizic acid on NLRP3 inflammasome ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 刺甘草查耳酮-甘草酸提高 LPS 诱导的脓毒血症致死模型小鼠的生存率

研究表明, ip LPS 可诱导小鼠脓毒血症, 机体产生激烈的免疫反应以对抗外来致病原, 产生过激的炎症反应从而导致小鼠死亡^[29]。如图 5 所示, 与模型组比较, 刺甘草查耳酮、甘草酸均可延长小鼠的存活时间 ($P < 0.05, 0.001$), 降低 72 h 内的死亡率; 且刺甘草查耳酮-甘草酸联合更有优势, 其治疗脓毒性休克的效果强于单独给予低、高剂量的甘草酸及低剂量的刺甘草查耳酮和阳性对照药物 MCC950。

3.6 刺甘草查耳酮-甘草酸协同作用于 LPS 诱导的脓毒血症模型

刺甘草查耳酮和甘草酸能够明显延长 LPS 诱导的脓毒血症模型小鼠的生存时间。进一步评价 LPS 诱导小鼠进入免疫风暴状态的情况下, 体内免疫细胞和细胞因子的水平以及药物干预的有效性。根据腹腔内渗出的巨噬细胞 (F4/80 $^{+}$) 和中性粒细胞 (CD11b $^{+}$ 、Ly6G $^{+}$) 在总细胞的占比越高, 则小鼠免疫越亢进^[18]。为了评价多种活性成分协同治疗脓毒血症的效果, 使用甘草酸、刺甘草查耳酮、甘草酸-刺甘草查耳酮联用以及甘草提取物对脓毒血症模型小

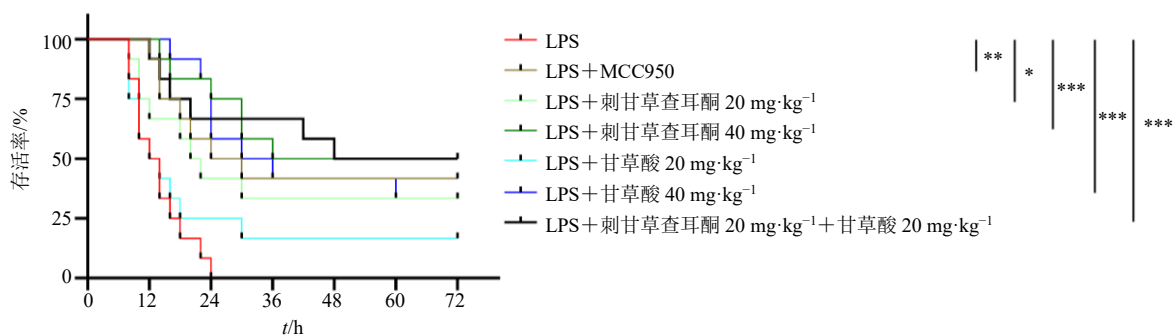


图 5 刺甘草查耳酮、甘草酸对 LPS 诱导的脓毒血症致死模型小鼠生存曲线的影响

Fig. 5 Effects of echinatin and glycyrrhizic acid on survival curve of mice in LPS-induced sepsis death model

鼠进行干预。如图 6-A 所示, ip LPS 可增加巨噬细胞和中性粒细胞的产生和渗出, 而药物干预后巨噬细胞和中性粒细胞的渗出较模型组显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 并且联合组与单药组有显著差异 ($P < 0.001$)。如图 6-B、C 所示, 刺甘草查耳酮和甘草酸可

以显著降低外周血和腹腔灌洗液中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 联合组的效果强于单独给药组 ($P < 0.05$ 、 0.001)。综合以上结果, 刺甘草查耳酮和甘草酸均可有效防治脓毒血症, 并且刺甘草查耳酮-甘草酸的联合使用效果更佳。

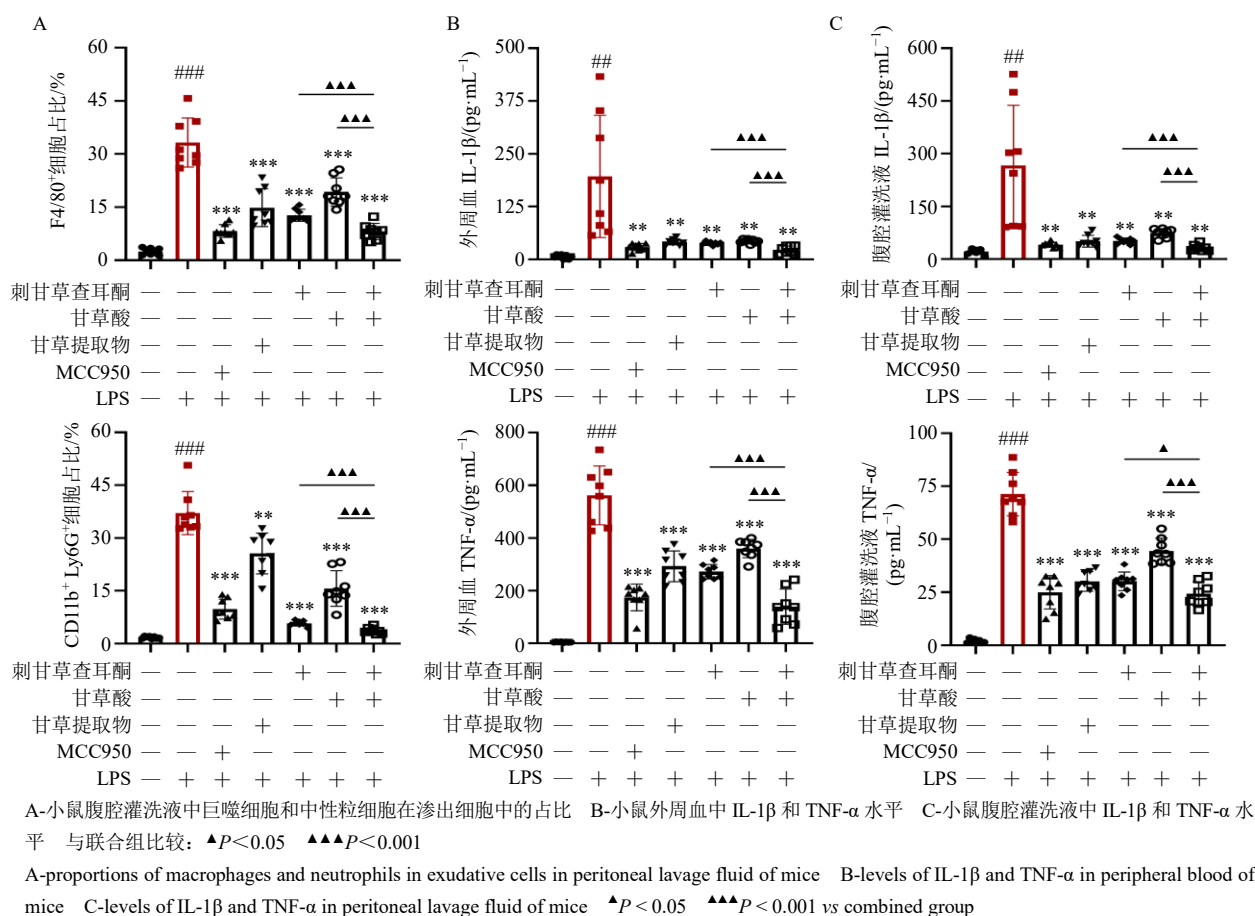


图 6 刺甘草查耳酮和甘草酸对 LPS 诱导的脓毒症小鼠模型的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effects of echinatin and glycyrrhizic acid on LPS-induced sepsis mice model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

脓毒血症的发生发展过程中常伴随着机体多重异常损伤, 其中以过度的炎症反应以及较强的氧化应激反应为其主要的表现特征^[30-32]。炎症反应和氧化应激在机体损伤中常发挥着协同的作用, 炎症反应的发生常伴随着氧化应激, 氧化应激可导致中性粒细胞炎症浸润扩大机体炎症反应的进程, 随着炎症反应的不断扩大会进一步地加重机体氧化应激水平^[33]。同样地, 氧化应激在炎症小体的激活中发挥着重要的作用, 是上游调控多种炎症小体激活的重要因素, 如氧化应激诱导的 ROS 的产生是 NLRP3 炎症小体的主要因素^[34]; 氧化应激诱导的线粒体损伤也是激活黑素瘤缺乏因子 2 (absent in melanoma 2,

AIM2) 炎症小体的主要因素^[35]。NLRP3 炎症小体是研究最多的炎症小体, 其激活后通过形成多蛋白复合物, 成熟并释放细胞因子, 诱导细胞焦亡^[36]。NLRP3 炎症小体过度激活可诱发和放大炎症反应, 引起和加重一系列的细胞损伤、免疫失调进而损害机体各个系统^[37-41], 这对于脓毒血症的病程发展是十分重要的^[42]。筛选发现靶向抗炎、抗氧化应激的药物活性成分, 对于精准防治脓毒血症具有重要意义。

传统中药作为天然药物的宝库, 多种中药及其单体已被证明可通过调控炎症小体及氧化应激等在许多疾病的治疗中起到良好的疗效, 在相关疾病的新药开发中极具潜力。甘草组分构成繁杂, 目前已

从中鉴定出了 400 多种成分, 其中三萜类及黄酮类化合物(如甘草酸、甘草素、光甘草定、刺甘草查耳酮等)是含量最高的 2 大类成分^[43], 多种成分已被证明具有治疗脓毒血症的作用^[18-19,44-45]。本实验建立了 LPS 诱导的 NLRP3 炎症小体激活模型以及 H₂O₂ 诱导的氧化应激模型, 研究了甘草中 10 种主要活性成分抗炎、抗氧化的作用效果, 结果表明刺甘草查耳酮可显著抑制 NLRP3 炎症小体激活, 减少尼日利亚菌素诱导的细胞上清液中 Caspase-1 p20 蛋白表达, 同时显著降低炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的产生; 此外, 甘草中的多种成分均可抑制 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生, 其中甘草酸的抑制效果强于其他成分, 表明刺甘草查耳酮、甘草酸可能是甘草中主要的抗炎、抗氧化的成分。进一步将刺甘草查耳酮-甘草酸联合应用于脓毒血症致死实验以及脓毒血症模型中, 结果表明, 刺甘草查耳酮-甘草酸可显著减低 LPS 的致死率, 显著降低脓毒血症模型小鼠体内巨噬细胞 F4/80⁺ 和中性粒细胞 CD11b⁺、Ly6G⁺ 比例, 降低外周血和腹腔灌洗液中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 水平, 且组分联合组效应均强于单独用药组, 证明刺甘草查耳酮-甘草酸在防治脓毒血症的过程中发挥了多途径协同增效作用, 其机制主要可能与抑制炎症小体激活及抗氧化相关。

多成分、多靶点、多效应是中药理论精髓, 中药组分中的协同作用或是临床作用效果的主要原因^[46]。本研究基于中药“组分-靶点-效应”, 从免疫炎症反应及氧化应激的途径联合评价了甘草中多种活性成分的作用效应, 并将其中抑制炎症小体效果有效成分(刺甘草查耳酮)与抗氧化效应强效成分(甘草酸)联合应用于脓毒血症模型中, 证明了甘草活性成分协同治疗脓毒血症的联合增效作用, 为脓毒血症联合治疗药物的研发提供了实验依据, 为组分中药的开发及中药临床精准联合用药提供了新的研究思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李娜, 张晨, 钟赣生, 等. 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(24): 7680-7692.
- [2] Yang R, Yuan B C, Ma Y S, *et al.* The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 5-18.
- [3] 张明发, 沈雅琴. 甘草及甘草酸类成分抗病毒性肺炎的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(7): 1452-1468.
- [4] 李念虹, 化敏, 戴衍朋, 等. 甘草抗氧化现代研究进展 [J]. 药学研究, 2020, 39(12): 5.
- [5] 蔡凤林, 王梅芳, 程雪琴, 等. 异甘草素对体外肺纤维化模型的作用及其机制 [J]. 医药导报, 2022(2): 41.
- [6] 李硕, 白金钊, 刘闰平. 18 β -甘草次酸增强固有免疫细胞中 I 型干扰素响应进而协同抑制肝癌生长的机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5034-5043.
- [7] Cecconi M, Evans L, Levy M, *et al.* Sepsis and septic shock [J]. *Lancet*, 2018, 392: 75-87.
- [8] 夏培元. 危重症感染治疗中抗菌药物的合理使用 [J]. 内科急危重症杂志, 2007, 13(6): 277-279.
- [9] Annane D, Bellissant E, Bollaert P E, *et al.* Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: A systematic review [J]. *JAMA*, 2009, 301(22): 2362-2375.
- [10] Yang N, Patil S, Zhuge J, *et al.* Glycyrrhiza uralensis flavonoids present in anti-asthma formula, ASHMITM, inhibit memory Th2 responses *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(9): 1381-1391.
- [11] Cheng A W, Wan F C, Wang J Q, *et al.* Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(1): 43-50.
- [12] Brush J, Mendenhall E, Guggenheim A, *et al.* The effect of *Echinacea purpurea*, *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza glabra* on CD69 expression and immune cell activation in humans [J]. *Phytother Res*, 2006, 20(8): 687-695.
- [13] Shi G X, Kong J R, Wang Y L, *et al.* *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through inhibiting of NF- κ B signaling pathways and modulating intestinal microbiota [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115640.
- [14] Hong Y K, Wu H T, Ma T, *et al.* Effects of *Glycyrrhiza glabra* polysaccharides on immune and antioxidant activities in high-fat mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2009, 45(1): 61-64.
- [15] Aipire A, Li J Y, Yuan P F, *et al.* *Glycyrrhiza uralensis* water extract enhances dendritic cell maturation and antitumor efficacy of HPV dendritic cell-based vaccine [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43796.
- [16] Huang Z L, Zhao Q, Chen M W, *et al.* Liquiritigenin and liquiritin alleviated monocrotaline-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome via inhibiting HSP60-induced inflammatory injury [J]. *Toxicology*, 2019, 428: 152307.
- [17] Li J Y, Tu Y, Tong L, *et al.* Immunosuppressive activity on the murine immune responses of glycyrol from *Glycyrrhiza uralensis* via inhibition of calcineurin activity [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(10): 1177-1184.

- [18] Xu G, Fu S B, Zhan X Y, *et al.* Echinatin effectively protects against NLRP3 inflammasome-driven diseases by targeting HSP90 [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(2): e134601.
- [19] Li Q, Feng H, Wang H B, *et al.* Licochalcone B specifically inhibits the NLRP3 inflammasome by disrupting NEK7-NLRP3 interaction [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(2): e53499.
- [20] 牟文清, 徐广, 赵佳, 等. 甘草活性成分对抗抑郁药诱导的肝损伤的防治作用 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6146-6154.
- [21] 王钧楠, 周永峰, 崔园园, 等. 甘草增强免疫的物质基础及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1844-1850.
- [22] Wang Z L, Xu G, Gao Y, *et al.* Cardamonin from a medicinal herb protects against LPS-induced septic shock by suppressing NLRP3 inflammasome [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4): 734-744.
- [23] Pan P, Shen M M, Yu Z Y, *et al.* SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4664.
- [24] Coll R C, Robertson A A, Chae J J, *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248-255.
- [25] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 88.
- [26] Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(4): 290-302.
- [27] Yang S, Zheng Y, Hou X. Lipoxin A4 restores oxidative stress-induced vascular endothelial cell injury and thrombosis-related factor expression by its receptor-mediated activation of Nrf2-HO-1 axis [J]. *Cell Signal*, 2019, 60: 146-153.
- [28] Xiao Y, Zhang X, Huang Q. Protective effects of Cordyceps sinensis exopolysaccharide-selenium nanoparticles on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 213: 339-351.
- [29] Hou X R, Xu G, Wang Z L, *et al.* Glaucocalyxin A alleviates LPS-mediated septic shock and inflammation via inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106271.
- [30] 蹇艾利, 郭乐, 申元英, 等. 脓毒血症的研究机制及免疫炎症因子吸附装置 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(20): 2550-2554.
- [31] 王小军, 廖涛. 急诊脓毒血症患者血清氧化应激指标水平与疾病预后相关性分析 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(10): 1288-1291.
- [32] van der Poll T, van de Veerdonk F L, Scicluna B P, *et al.* The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(7): 407-420.
- [33] Buettner G R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 300(2): 535-543.
- [34] Lin Q S, Li S, Jiang N, *et al.* PINK1-Parkin pathway of mitophagy protects against contrast-induced acute kidney injury via decreasing mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101254.
- [35] Liu T T, Xu G, Li Y R, *et al.* Discovery of bakuchiol as an AIM2 inflammasome activator and cause of hepatotoxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115593.
- [36] Broz P, Dixit V M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(7): 407-420.
- [37] Wang Z L, Xu G, Wang H B, *et al.* Icariside II, a main compound in *Epimedium Folium*, induces idiosyncratic hepatotoxicity by enhancing NLRP3 inflammasome activation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(9): 1619-1633.
- [38] Sharma B R, Kanneganti T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(5): 550-559.
- [39] Anderson F L, Biggs K E, Rankin B E, *et al.* NLRP3 inflammasome in neurodegenerative disease [J]. *Transl Res*, 2023, 252: 21-33.
- [40] de Carvalho Ribeiro M, Szabo G. Role of the inflammasome in liver disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 345-365.
- [41] Zhao N, Di B, Xu L L. The NLRP3 inflammasome and COVID-19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2021, 61: 2-15.
- [42] Hao H P, Cao L J, Jiang C T, *et al.* Farnesoid X receptor regulation of the NLRP3 inflammasome underlies cholestasis-associated Sepsis [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(4): 856-867.e5.
- [43] 李葆林, 麻景梅, 田宇柔, 等. 甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2438-2448.
- [44] Kwon H S, Park J H, Kim D H, *et al.* Licochalcone A isolated from licorice suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory reactions in RAW264.7 cells and endotoxin shock in mice [J]. *J Mol Med*, 2008, 86(11): 1287-1295.
- [45] Kang J S, Yoon Y D, Cho I J, *et al.* Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and improves survival of mice in experimental model of septic shock [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(3): 1187-1194.
- [46] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.

[责任编辑 李亚楠]