

丹参水提物对野百合碱诱导大鼠肝窦阻塞综合征的抑制作用

张 泽, 孟 宇, 董世缘, 陆 宾, 黄镇林*, 季莉莉*

上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室, 上海 201203

摘要: **目的** 探讨丹参水提物对肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) 的作用及机制。**方法** 以野百合碱诱导大鼠 HSOS, 给予丹参水提物后, 通过血清生化指标检测、肝脏病理切片观察以及肝组织基质金属蛋白酶 9 (metalloproteinase-9, MMP-9) 蛋白表达测定, 评价丹参水提物对 HSOS 的抑制作用。通过 TCMSP、HERB 与 GeneCards 等数据库交联分析, 获取丹参水提物抑制 HSOS 的关键靶点, 并应用 STRING 与 DAVID 等数据库富集信号通路; 进一步采用 qRT-PCR 与 Western blotting 对数据库结果予以验证。**结果** 与模型组比较, 丹参水提物可显著抑制野百合碱诱导的大鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活力 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低肝脏 MMP-9 蛋白表达 ($P < 0.05$), 并改善肝窦充血、中央静脉内皮脱落、III 区肝细胞坏死等病变。网络药理学分析筛选得到核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 以及一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2) 等关键基因, 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析结果表明, 以上靶基因主要富集于活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、TNF 和 NF- κ B 等信号通路。丹参水提物可降低野百合碱诱导的丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和 ROS 含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少 F4/80、Ly6G 阳性细胞浸润数目 ($P < 0.05$ 、 0.01), 诱导 Nrf2 核转位 ($P < 0.01$), 促进谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚单位 (catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase, GCLC)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶修饰亚基 (glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)、HO-1 及醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1) 等基因的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 升高 GCLC、GCLM、HO-1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.001); 并抑制 NF- κ B 核转位 ($P < 0.001$), 降低 TNF、IL-1 β 、IL-6、NOS2、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 基因表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 升高 TNF- α 、IL-1 β 、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白 (phosphorylated inhibitor of NF- κ B, p-I κ B) 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.001)。**结论** 丹参水提物可通过激活 Nrf2 抗氧化信号通路, 抑制 NF- κ B 炎性信号通路, 而抑制野百合碱诱导的 HSOS。

关键词: 丹参水提物; 肝窦阻塞综合征; 网络药理学; 氧化应激损伤; 炎症; 丹酚酸 B; 丹参酮 I; 丹参酮 II_A; 隐丹参酮

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)05-1567-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.015

Effect of *Salvia miltiorrhiza* water extract on inhibiting monocrotaline-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome rats

ZHANG Ze, MENG Yu, DONG Shiyuan, LU Bin, HUANG Zhenlin, JI Lili

Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Ministry of Education, Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of *Salvia miltiorrhiza* water extract (SWE) on inhibiting hepatic sinusoidal obstruction syndrome (HSOS). **Methods** Monocrotaline (MCT) was used to induce HSOS in rats, SWE was given for protection. The effect of SWE on inhibiting HSOS was evaluated through detection of serum biochemical indicators, observation of liver pathological sections, and determination of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in liver tissue. Through cross-linking

收稿日期: 2023-10-24

基金项目: 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程青年岐黄学者计划; 上海市浦江人才计划项目 (22PJ1412900)

作者简介: 张 泽 (1997—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药药理研究。Tel: 13720325445 E-mail: gmyz1921@163.com

*通信作者: 季莉莉 (1976—), 女, 研究员, 主要从事药物性肝损伤及其解毒, 中药改善肝损伤、血管损伤的研究。

Tel: 18001750981 E-mail: lichenyue1307@126.com

黄镇林 (1988—), 男, 副研究员, 主要从事中药改善肝脏疾病研究。Tel: 13127529867 E-mail: Zhenlin163@163.com

analysis of databases such as TCMSP, HERB and GeneCards, the key targets of SWE in inhibiting HSOS were obtained and databases such as STRING and DAVID were used to enrich signaling pathways. qRT-PCR and western-blotting were further used to verify the database results. **Results** Compared with model group, SWE significantly inhibited the aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities in serum of rats induced by MCT ($P < 0.05, 0.01$), decreased MMP-9 expression in liver ($P < 0.05$), alleviated hepatic sinusoidal congestion, central vein endothelial shedding and zone III hepatocyte necrosis. Key genes were screened by network pharmacology analysis, including nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*Nrf2*), heme oxygenase-1 (*HO-1*), nuclear factor- κ B p65 (*NF- κ B p65*), tumor necrosis factor (*TNF*), interleukin-6 (*IL-6*), *IL-1 β* , nitric oxide synthase 2 (*NOS2*), etc. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis results showed that the above target genes were mainly enriched in signaling pathways such as reactive oxygen species (ROS), TNF and NF- κ B. SWE reduced the contents of malondialdehyde (MDA) and ROS induced by MCT ($P < 0.05, 0.01$), reduced the number of F4/80 and Ly6G positive cell infiltration ($P < 0.05, 0.01$), induced *Nrf2* nuclear translocation ($P < 0.01$), and promoted the gene expressions of catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase (*GCLC*), glutamate cysteine ligase modifier subunit (*GCLM*), *HO-1*, and quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), increased the protein expression levels of *GCLC*, *GCLM* and *HO-1* ($P < 0.05, 0.001$), inhibited NF- κ B nuclear translocation ($P < 0.001$), reduced *TNF*, *IL-1 β* , *IL-6*, *NOS2*, cyclooxygenase-2 (*COX-2*) gene expressions ($P < 0.05, 0.001$), increased TNF- α , IL-1 β and phosphorylated inhibitor of NF- κ B (p-I κ B) protein expression levels ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** SWE can inhibit NF- κ B inflammatory signaling pathway by activating *Nrf2* antioxidant signaling pathway, and inhibit HSOS induced by MCT.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge. water extract; hepatic sinusoidal obstruction syndrome; network pharmacology; oxidative stress injury; inflammation; salvianolic acid B; tanshinone I; tanshinone II_A; cryptotanshinone

中草药相关肝损伤 (herb-induced liver injury, HILI) 是指由传统中药、天然药物及其相关制剂所导致的肝损伤^[1]。目前已有报道, 作为天然植物性毒素的吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 广泛存在于 6 000 多种植物中^[2], 由于摄入不当而引起中毒的案例屡见不鲜。自 1920 年以来, 全球已有超过 17 000 例 PAs 诱导肝毒性的病例报道, 而我国自 1980 年以来有超过 2 000 例, 其中导致死亡超过 200 例, PAs 导致的肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) 已成为中药肝损伤研究的热点之一^[3]。常见中药如猪屎豆、野百合、千里光、土三七等均含有 PAs, 过量摄入易诱发 HSOS、肝纤维化及肝硬化等不良后果^[4-5]。

HSOS 又称肝小静脉闭塞症 (hepatic veno-occlusive disease, HVOD), 是指肝血窦、肝小叶中央静脉和小叶下静脉损害导致管腔闭塞或狭窄而引发的急性门脉高压, 病理特征主要是以腺泡 III 区肝窦淤血和肝功能损伤^[6]。HSOS 的发病机制较为复杂, 发病过程较为急促, 在治疗药物方面, 目前仅有去纤苷被 FDA 批准用于治疗干细胞移植引起的 HSOS, 但去纤苷价格昂贵, 获得条件苛刻且有出血风险, 使其临床应用较为受限^[7]。另外, 我国多数 HSOS 患者的发病原因是误服含 PAs 的草药。而去纤苷对于 PAs 诱导 HSOS 的治疗效果尚不明确, 还需更多的实验与临床研究予以探讨。因此, 开发

针对 PAs 诱导 HSOS 的治疗药物, 具有重大意义。

丹参是唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 首载于《神农本草经》, “味苦, 微寒, 主心腹邪气, 肠鸣幽幽如走水, 寒热积聚, 破微除瘕, 止烦满, 益气”, 被列为上品。《中国药典》2020 年版中记载其功效为活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈, 主治胸痹心痛、脘腹胁痛、癥瘕积聚、热痹疼痛、心烦不眠、月经不调、痛经经闭、疮疡肿痛等^[8]。丹参是国内常用的临床大宗中药之一, 具有广泛的生物活性, 尤其是对心脑血管疾病的疗效确切, 故在临床上被广泛地应用。丹参的主要化学成分可分为以丹酚酸、丹参素为主的水溶性成分, 和以丹参酮、隐丹参酮为主的脂溶性成分^[9-10]。研究表明, 丹参具有抗细胞凋亡、抗炎、抗癌、改善血液循环、抗肝纤维化、抗血栓形成、抗动脉粥样硬化等多种药理作用^[11-15]。丹参以上药理活性使其在临床被广泛应用, 但是丹参是否可以治疗 HSOS, 其具体机制目前鲜有报道。故本研究主要探讨丹参治疗 PAs 诱导 HSOS 的作用, 并借助网络药理学手段与分子生物学技术探讨其机制, 为临床上 HSOS 治疗寻求方案, 也为丹参作为保肝药物的推广提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 购

自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物合格证号 SYXK (沪) 2020-0009。动物自由饮食饮水, 饲养环境恒温恒湿, 昼夜交替, 温度 22~24 °C, 相对湿度 30%~60%。动物实验经上海中医药大学伦理委员会批准 (批准号 PZSHUTCM2303280001)。

1.2 药材

丹参饮片 (批号 180701) 购自江西普正制药有限公司。

1.3 药品与试剂

野百合碱 (批号 PRF9033044) 购自成都普瑞法生物; 天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒 (批号 20230318)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒 (批号 20230330)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号 20230401) 购自南京建成生物工程研究所; β -actin 抗体 (批号 HO0705) 购自杭州华安生物技术有限公司; 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 抗体 (批号 44090) 购自美国 GeneTex 公司; 基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 抗体 (批号 8)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 抗体 (批号 8)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 抗体 (批号 1)、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白 (phosphorylated inhibitor of NF- κ B, p-I κ B) 抗体 (批号 15) 购自美国 CST 公司; 谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚单位 (catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase, GCLC) 抗体 (批号 5500008623) 购自美国 Abclonal 公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抗体 (批号 K0220)、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体 (批号 b2013) 购自美国 Santa Cruz 公司; Lamin B1 抗体 (批号 F040309)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶修饰亚基 (glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM) 抗体 (批号 F087409) 购自 Abways 公司; F4/80 抗体 (批号 1043287-2)、Ly6G 抗体 (批号 1001236-21) 购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊兔抗 (批号 128689)、HRP 标记的山羊鼠抗 (批号 RF234703) 购自美国 Jackson Immuno Research 公司; H2DCFDA 探针 (批号 CB1345A)、NE-PERTM 细胞核和细胞质提取试剂盒 (批号 XB344872) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Trizol 试剂 (批号 AME1160A) 购自美国 Life Technology 公司; ECL 化学发光试剂 (批号 00112876) 购自美国 Millipore 公司; PrimeScript[®] RT Master Mix (批号 AL13653A)、

SYBR[®] Premix Ex TaqTM (批号 H6103060) 购自日本 Takara 公司; TNF、一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2)、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、GCLC、GCLM、醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1)、HO-1、IL-1 β 、IL-6、 β -actin 引物由上海捷瑞生物工程股份有限公司合成。

1.4 仪器

DC-NSG-50L 型多功能提取浓缩机组 (上海达程实验设备有限公司); LGJ-10 型冷冻干燥机、TY002217 型 NanoDrop2000c 超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); VS120 型病理切片扫描机 (日本 Olympus 公司); Synergy H4 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 042BR08871 型蛋白电泳仪、500W 型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); SL-II 型 4 °C 层析柜 (北京德天佑科技发展有限公司); XS-204 型电子分析天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司); ES-VM25 型涡旋振荡仪 [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司]; 5404 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); 超纯水过滤仪 (美国 Millipore 公司); 278861666 型 QuantStudio 6 flex 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Life Technology 公司)。

2 方法

2.1 丹参水提物和野百合碱溶液的制备

2.1.1 丹参水提物的制备 称取丹参饮片 1 kg, 加入 8 倍量水, 回流提取 2 h, 滤过, 制成干浸膏, 减压浓缩为丹参水提物粉末。经高效液相色谱法分析, 丹酚酸 B 质量分数为 3.24%, 丹参酮 I、丹参酮 II_A 和隐丹参酮总质量分数为 0.07%。

称取丹参水提物粉末 2.16 g, 置 50 mL 离心管中, 加入 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 40 mL, 振荡均匀, 即得 54 mg/mL 丹参水提物混悬液, 用于丹参高剂量组动物给药。取该溶液 10 mL, 置 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液稀释, 即得 18 mg/mL 丹参水提物混悬液, 用于丹参低剂量组动物给药。根据大鼠体质量, 以 5 mL/kg 给药, 丹参给药剂量分别为 270、90 mg/kg。

2.1.2 野百合碱溶液的制备 称取野百合碱粉末 720 mg, 以 0.1 mol/L HCl 溶液溶解, 以 0.5 mol/L NaOH 溶液调至中性, 加入超纯水补足体积为 40 mL, 即得 18 mg/mL 野百合碱溶液。根据大鼠体质量, 以 5 mL/kg 给药, 野百合碱给药剂量为 90 mg/kg。

2.2 分组、造模与给药

32 只雄性 SD 大鼠适应性饲养后, 根据体质量

随机分为对照组、模型组和丹参水提取物低、高剂量(90、270 mg/kg)组,每组 8 只。动物适应性饲养结束并首次禁食 12 h 后 ig 野百合碱,ig 野百合碱后的 5、29 h 各组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水,期间不禁食。ig 野百合碱 36 h 后禁食 12 h,禁食完毕后处死大鼠并收集血液和肝脏组织。

2.3 血清 ALT、AST 活性的检测

各组大鼠血液样本静置 1~2 h 后,850×g 离心 15 min,取上清,按照试剂盒说明书检测 ALT、AST 活性。

2.4 肝脏病理学观察

取各组相同部位肝小叶,用 10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,切为 5~6 μm 薄片,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察,评估肝损伤情况。

2.5 网络药理学分析

根据 TCMSp、HERB 数据库检索中药丹参所含成分,根据所含成分生物利用度及其类药性对丹参成分进行筛选,将筛选后的丹参成分导入 SissTarget Prediction 数据库中预测丹参的潜在靶点,在 GeneCards 数据库进一步获取肝窦阻塞综合症的相关靶点,将丹参所得靶点和 HSOS 所检索靶点取交集获得丹参抑制 HSOS 作用靶点,将交集靶点通过 STRING 数据库进行蛋白互作分析,并通过 Cytoscape 3.9.1 软件进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建得到核心靶点;再将所得核心靶点运用 DAVID 数据库进行基因本体(gene ontology, GO)功能及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,根据 GO 数据库和 KEGG 数据库分析,并将分析结果以成分-靶点-通路的网络气泡图进行展示。

2.6 肝组织活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量测定

准确称取 30 mg 肝组织,加入 9 倍量的预冷的 PBS 制成 10%组织匀浆,离心弃上清,得到的沉淀用 PBS 清洗 2 次,加入预冷的 PBS 溶液(含 10 μmol/L H₂DCFDA),避光孵育 1 h,测得荧光值和蛋白浓度,以空白组进行标准化校准得到 ROS 值。

2.7 免疫组化实验

石蜡包埋肝组织,依次以二甲苯、乙醇、水梯度洗脱,脱蜡至水;切片放入 3%过氧化氢溶液,室温避光孵育 25 min,以 5%牛血清白蛋白封闭;封闭后切片以 F4/80 或 Ly6G 抗体于 4 ℃孵育过夜;孵育完成后以二抗室温孵育 1 h,洗脱二抗后加 DAB 显色液,阳性为棕黄色。

2.8 qRT-PCR 检测肝组织 *TNF*、*NOS2*、*COX-2*、*GCLC*、*GCLM*、*NQO1*、*HO-1*、*IL-1β* 和 *IL-6* 基因表达

取适量肝组织加 Trizol 制成匀浆液,置冰上 5 min,静置后加入氯仿 200 μL 振荡 15 s 混匀,4 ℃、12 000×g 离心 15 min 后,取上层液体转入新的预冷离心管;转移后的液体中加入等量异丙醇上下颠倒摇匀,静置 10 min 后 4 ℃、12 000×g 离心 10 min 后轻柔吸去上清留底部沉淀,加入预冷的由 DEPC 水配制的 75%乙醇轻柔摇晃,4 ℃、7 600×g 离心 5 min 后吸去乙醇,将离心管的盖子打开置于超净工作台上通风晾干;根据所得沉淀的量加入适量体积的 DEPC 水充分溶解,即为 RNA 溶液,−80 ℃保存备用。肝组织 RNA 根据 PrimeScript® RT Master Mix 试剂盒说明书步骤逆转录为 cDNA,得到的 cDNA 按照 SYBR green premix 试剂盒说明进行操作;在实时荧光定量 PCR 仪上进行 Real-time PCR 扩增。目标基因的相对表达量用 *β-actin* 标准化,采用 2^{−ΔΔC_t} 法进行数据计算,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	TTCGTTGCCGGTCCACACCC	GCTTTGCACATGCCGGAGCC
<i>TNF</i>	ATGGGCTCCCTCTCATCAGT	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC
<i>NOS2</i>	GGCTGTCAGAGAGCCTCGTGGCTTTGG	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC
<i>COX-2</i>	CAAGCACAAATAGATGCACAAGAAG	ATATAGAATGCGTAGAGAGGGGAG
<i>GCLC</i>	CGGAGGAACGATGTCTGAGT	CTGGGGAATGAAGTGATGGT
<i>GCLM</i>	CAATGACCCGAAAGAACTGC	ACTTGATGATTCCCCTGCTCT
<i>NQO1</i>	GACAGGAGCGACCAGCACATTC	GTACTGGCCGGTCTCCGTACC
<i>HO-1</i>	CAATGACCCGAAAGAACTGC	CTCGTGGAGACGCTTTACAT
<i>IL-1β</i>	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	TGCTCATGTCCTCATCCTGGAAGG
<i>IL-6</i>	AGTTGCCCTTCTGGGACTGA	ACTGGTCTGTTGTGGGTGGT

2.9 Western blotting 检测肝组织 MMP-9、Nrf2、GCLC、GCLM、HO-1、p65、TNF- α 、IL-1 β 和 p-I κ B 蛋白表达

精密称取一定量的肝组织,加入 10 倍量的含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液,冰上匀浆 2 min,冰上静置 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、7 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 使蛋白变性,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。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,于 5% 牛血清白蛋白中封闭 1 h,放入含有相应一抗的 TBST 缓冲液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;洗脱未结合的一抗,将 PVDF 膜放入含有相应二抗的 TBST 缓冲液中室温孵育 1 h,洗脱未结合

的二抗后,置于凝胶成像仪中用 ECL 显影液显色。

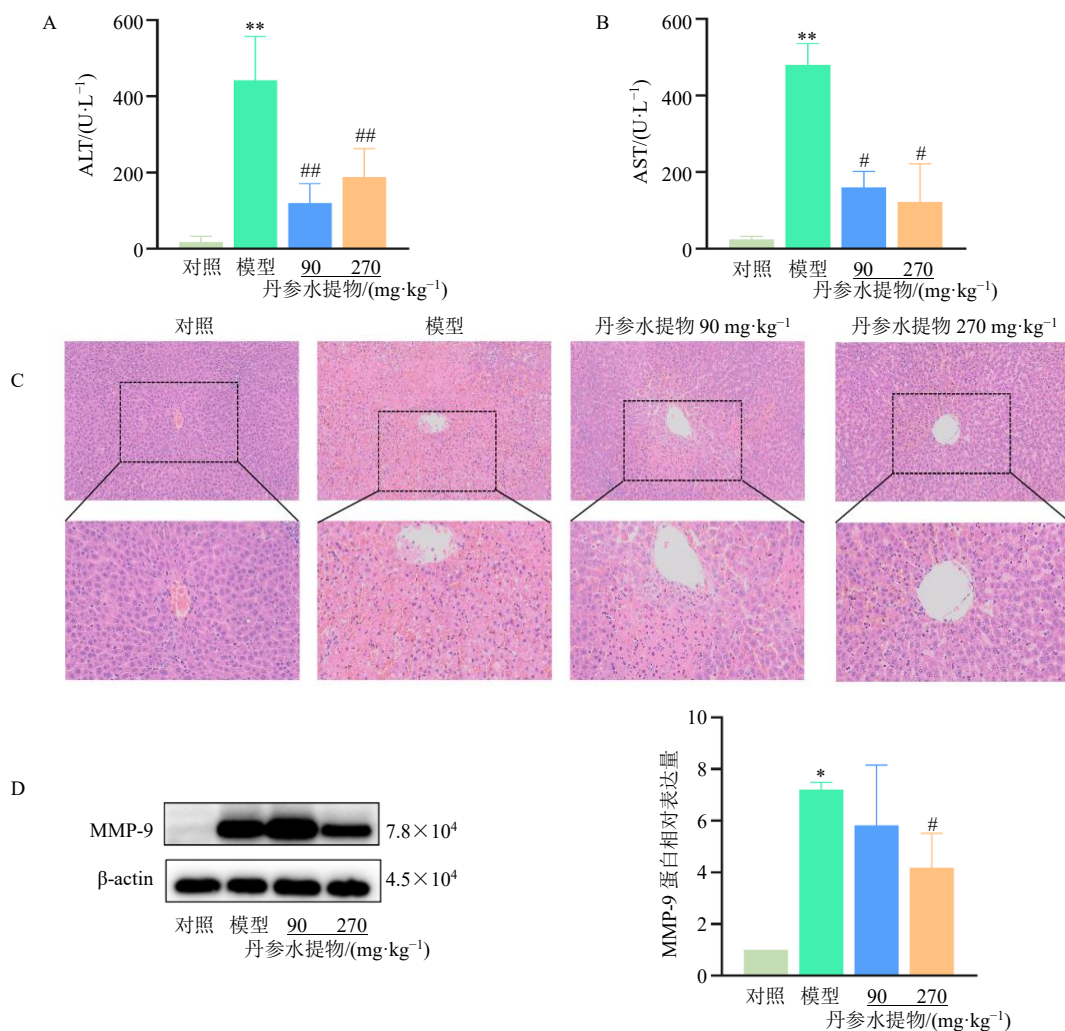
2.10 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 16.0 软件中的单因素方差分析进行处理,组间两两比较采用 LSD- t 检验。

3 结果

3.1 丹参水提取物抑制野百合碱诱导的大鼠 HSOS

如图 1-A、B 所示,野百合碱可诱导大鼠血清 ALT、AST 活力显著升高 ($P < 0.01$),而不同剂量(90、270 mg/kg)丹参水提取物可显著抑制野百合碱诱导升高的 ALT、AST 活力 ($P < 0.05$ 、0.01)。病理切片(图 1-C)观察结果显示,模型组大鼠中央静脉内皮脱落,肝小叶实质细胞大面积坏死、炎症细胞浸润,且肝窦出血明显,出血区域覆盖 III 区与



A-血清 ALT 活力; B-血清 AST 活力; C-肝脏组织病理 (HE, $\times 100$); D-肝脏 MMP-9 蛋白表达; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同。

A-ALT activity in serum; B-AST activity in serum; C-liver histopathological observation (HE, $\times 100$); D-MMP-9 protein expression in liver; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 丹参水提取物抑制野百合碱诱导的大鼠 HSOS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3 \sim 5$)

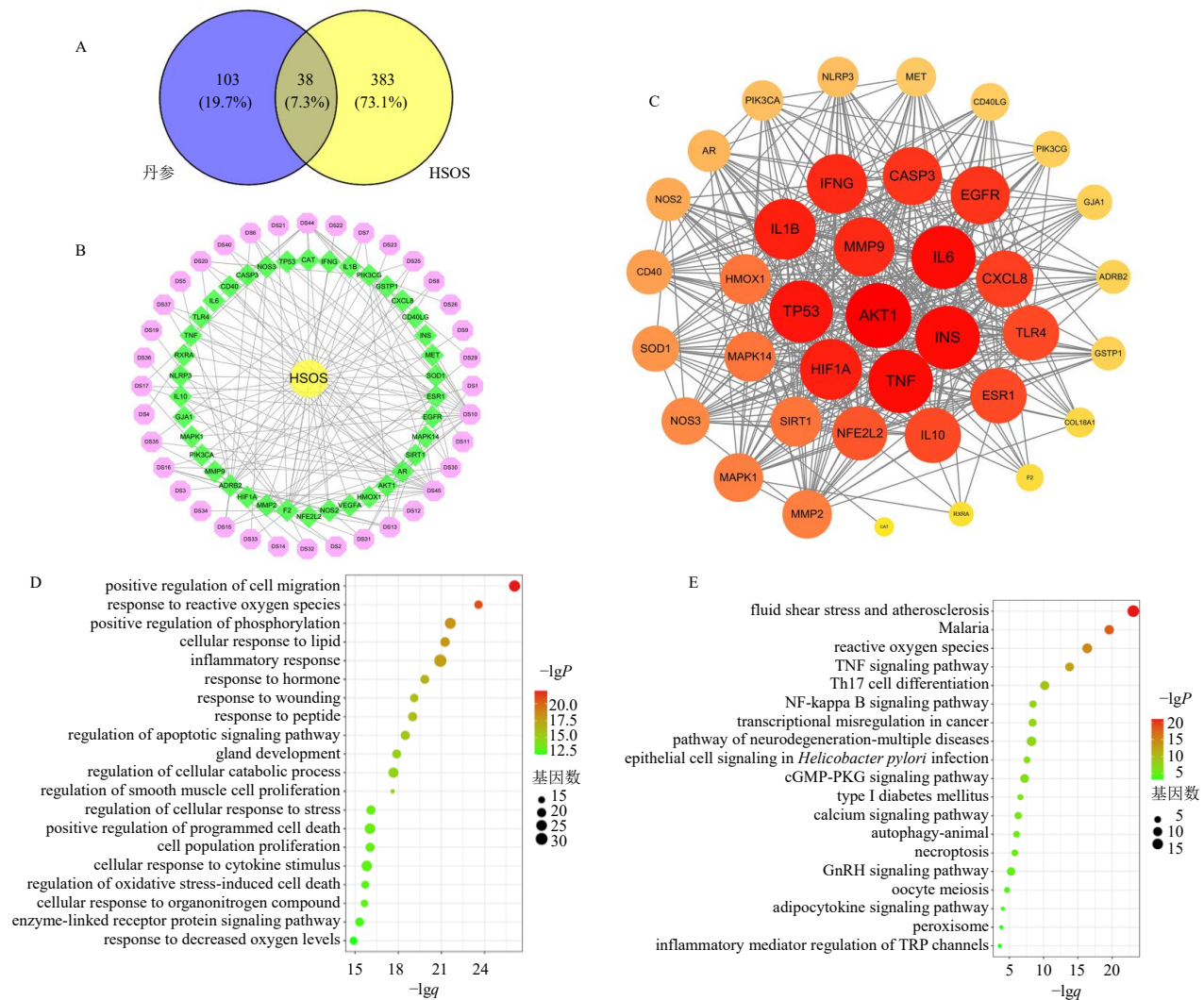
Fig. 1 *S. miltiorrhiza* water extract inhibits monocrotaline-induced HSOS in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3 \sim 5$)

II 区, 并延伸至 I 区(汇管区)周围, 但不同剂量丹参水提物均可抑制以上肝脏病理变化, 其中高剂量组药效更为显著; 给予高剂量丹参水提物后, 大鼠中央静脉内皮完整, 无明显炎性浸润与实质细胞坏死, 肝窦出血区域面积减少, 仅 III 区(中央静脉区)周围有小部分肝窦出血。MMP-9 可通过降解细胞外基质导致肝窦内皮细胞脱落, 在 HSOS 的发生发展过程中具有重要作用^[16]。如图 1-D 所示, 高剂量丹参水提物可显著降低野百合碱升高的肝脏 MMP-9 蛋白表达水平($P<0.05$)。以上结果说明丹参水提物具有抑制野百合碱诱导的 HSOS 的作用。

3.2 基于网络药理学对丹参-HSOS 生信分析

通过 TCMSP、HERB 数据库检索丹参所含化合

物, 并根据所含化合物的生物利用度和类药性对丹参成分进行筛选, 将筛后的丹参成分导入 Swiss TargetPrediction 数据库得到丹参的潜在靶点 103 个, 从 GeneCards 数据库获取 HSOS 潜在靶点 383 个, 将化合物靶基因和疾病靶基因取交集获得丹参抑制 HSOS 的作用靶点共计 38 个(图 2-A); 进一步将上述靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 分析, 并通过 Cytoscape 3.9.1 软件进行 PPI 网络构建得到核心靶点(图 2-B、C); 运用 DAVID 数据库进行 GO 分析和 KEGG 通路分析, 得到关键信号通路(图 2-D、E)。综合网络药理学结果分析可知, 氧化应激和炎症相关反应在丹参水提物抑制野百合碱诱导的 HSOS 起重要调控作用。



A-丹参-HSOS 靶点韦恩图; B-丹参-HSOS 基因网络; C-丹参-HSOS 的 PPI 网络; D-交集靶基因 GO 富集分析; E-KEGG 富集分析。

A-*S. miltiorrhiza*-HSOS target Venn diagram; B-*S. miltiorrhiza*-HSOS gene network; C-PPI network of *S. miltiorrhiza*-HSOS; D-GO enrichment analysis of intersection target genes; E-KEGG enrichment analysis.

图 2 基于网络药理学对丹参-HSOS 生信分析

Fig. 2 Bioinformatics analysis of *S. miltiorrhiza*-HSOS based on network pharmacology

3.3 丹参水提物抑制野百合碱诱导的大鼠氧化应激损伤

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肝组织 ROS 以及 MDA 水平均显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 丹参水提物各剂量组 ROS 水平均显著降低 ($P<0.01$), 丹参水提物高剂量组肝组织 MDA 水平显著降低 ($P<0.05$)。以上结果提示丹参水提

物可显著抑制野百合碱诱导的肝脏氧化应激损伤。

3.4 丹参水提物促进野百合碱大鼠肝脏 Nrf2 核转位激活

根据网络药理学分析结果, Nrf2 信号通路对丹参水提物抑制 HSOS 具有重要作用。Western blotting 结果显示, 高剂量丹参水提物可逆转野百合碱引起的 Nrf2 核转位减少 ($P<0.05$, 图 4-A); 同时, Nrf2

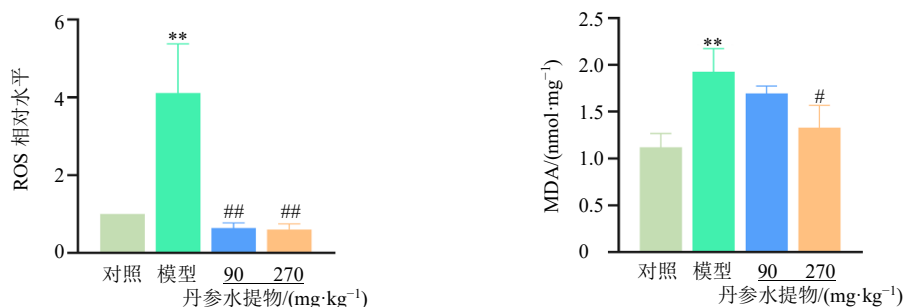
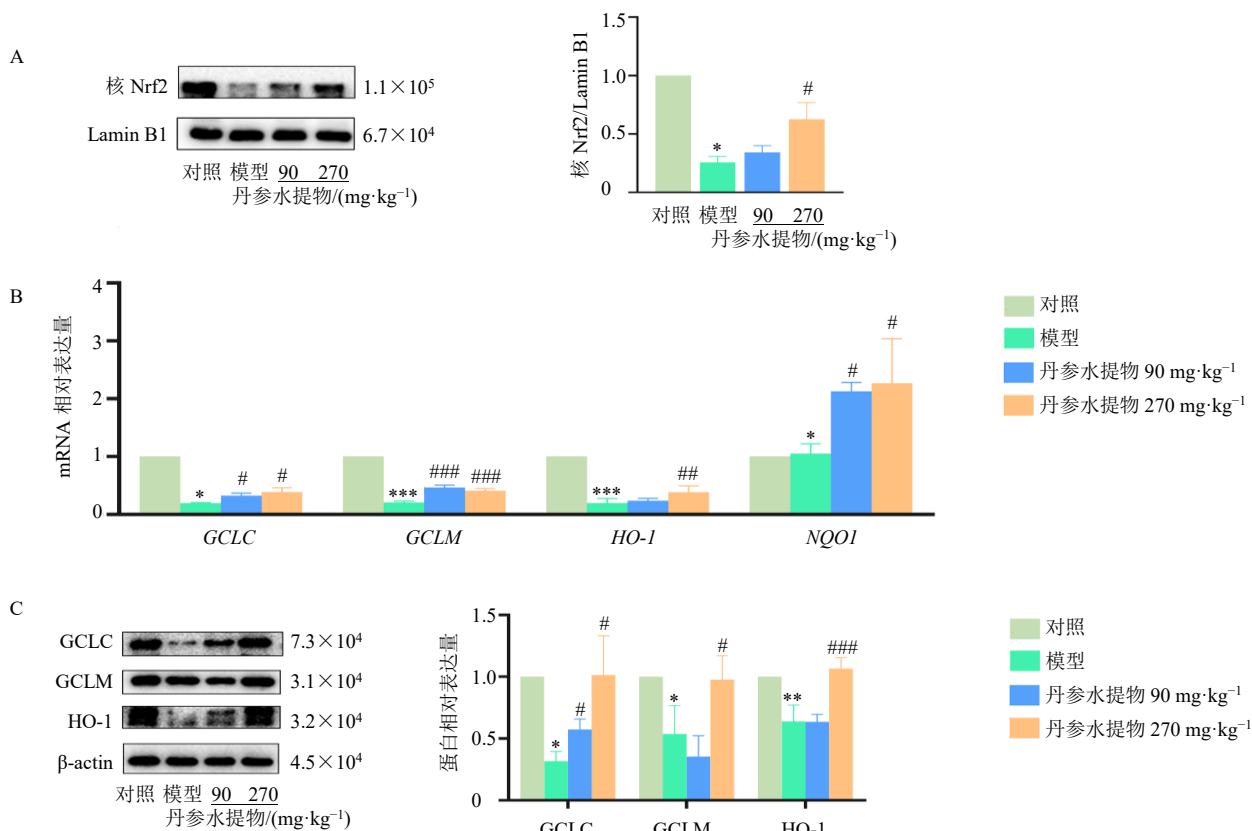


图 3 丹参水提物抑制野百合碱诱导的大鼠肝脏氧化应激损伤 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 *S. miltiorrhiza* water extract inhibits monocrotaline-induced liver oxidative stress injury in rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)



A-大鼠肝组织 Nrf2 核转位; B-肝脏 *GCLC*、*GCLM*、*HO-1* 与 *NQO1* mRNA 表达; C-肝脏 *GCLC*、*GCLM* 与 *HO-1* 蛋白表达。

A-Nrf2 nuclear translocation in liver tissue of rats; B-mRNA expressions of *GCLC*, *GCLM*, *HO-1* and *NQO1* in liver; C-protein expressions of *GCLC*, *GCLM* and *HO-1* in liver.

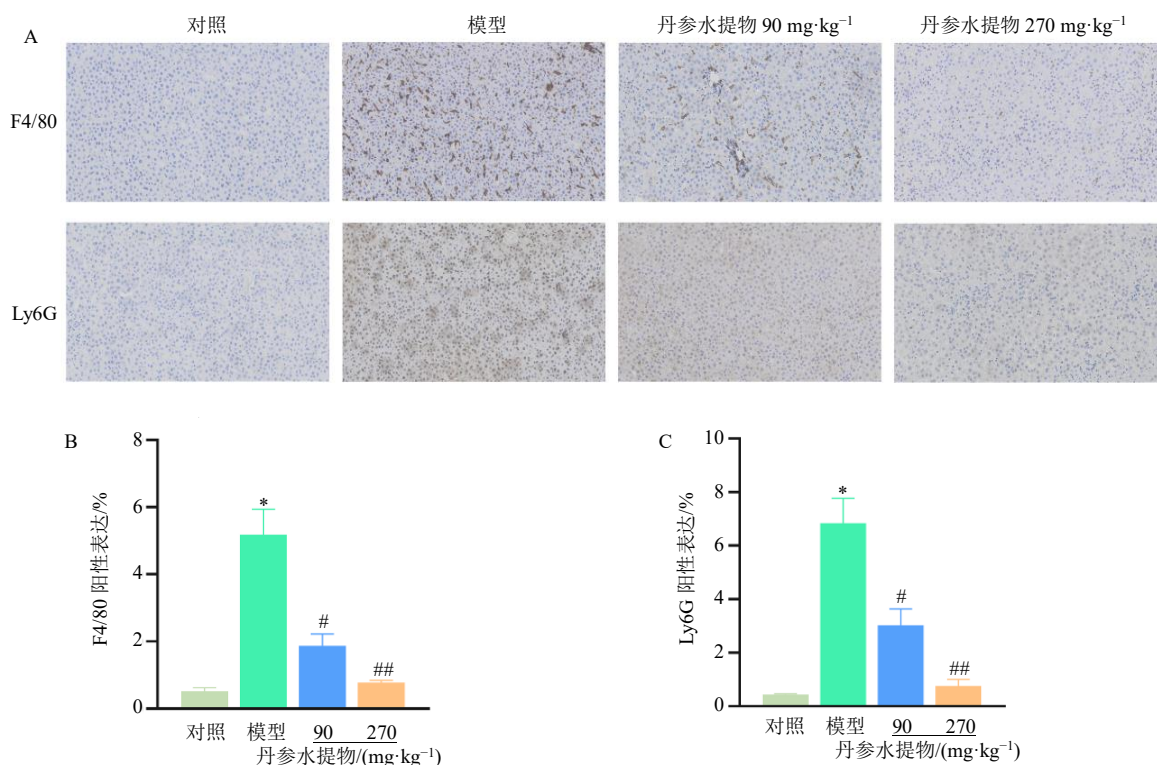
图 4 丹参水提物促进野百合碱诱导的大鼠肝脏 Nrf2 核转位激活 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 *S. miltiorrhiza* water extract induces activation of Nrf2 nuclear translocation in liver of monocrotaline-induced rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

下游抗氧化基因表达检测结果(图 4-B)显示,与模型组比较,丹参水提物各剂量组肝组织 *GCLC*、*GCLM* 以及 *NQO1* 基因表达水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.001),丹参水提物高剂量组 *HO-1* 基因表达水平显著升高 ($P<0.01$)。Western blotting(图 4-C)结果显示,高剂量丹参水提物可逆转野百合碱引起的 *GCLC*、*GCLM* 与 *HO-1* 蛋白表达水平下降 ($P<0.05$ 、 0.001)。

3.5 丹参水提物抑制野百合碱诱导的大鼠炎症损伤

F4/80 和 Ly6G 分别是巨噬细胞和中性粒细胞的细胞表面标志物。如图 5 所示,野百合碱诱导大鼠肝脏 F4/80 和 Ly6G 阳性细胞数显著增加 ($P<0.05$),而各剂量丹参水提物可显著抑制肝脏细胞的炎性浸润 ($P<0.05$ 、 0.01)。以上结果提示丹参水提物可抑制野百合碱诱导产生的肝脏炎性损伤。



A-大鼠肝组织 F4/80 阳性细胞或 Ly6G 阳性细胞浸润免疫组化结果 ($\times 100$); B-F4/80 阳性细胞计数; C-Ly6G 阳性细胞计数。

A-immunohistochemical staining results of rats hepatic tissue F4/80 positive cells or Ly6G positive cells infiltration ($\times 100$); B-counting of F4/80 positive cells; C-counting of Ly6G positive cells.

图 5 丹参水提物抑制野百合碱诱导的大鼠炎症损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 *S. miltiorrhiza* water extract inhibits monocrotaline-induced inflammatory damage in rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

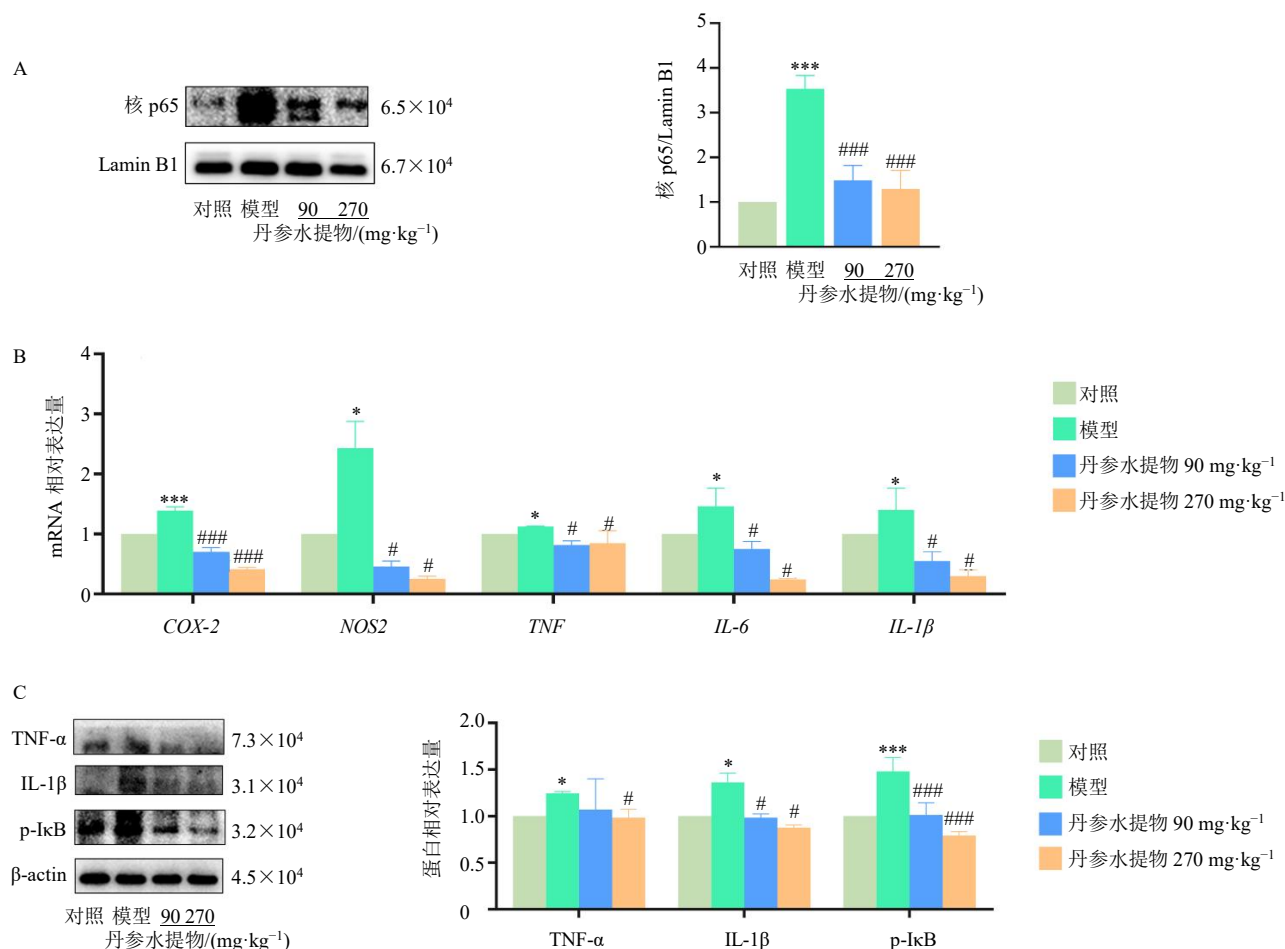
3.6 丹参水提物减少 NF- κ B 入核并抑制其下游炎性因子表达

根据网络药理学分析结果, NF- κ B 以及 TNF 信号通路在 HSOS 形成过程中具有重要作用。Western blotting 结果显示,野百合碱可诱导 NF- κ B p65 核转位显著增加 ($P<0.001$, 图 6-A),而各剂量丹参水提物可抑制野百合碱引起的 p65 核转位情况 ($P<0.001$)。NF- κ B 下游炎性因子基因表达(图 6-B)结果显示,各剂量丹参水提物均显著抑制野百合碱诱导的 *COX-2*、*NOS2*、*TNF*、*IL-6* 以及 *IL-1 β* 基因表达 ($P<0.05$ 、 0.001);此外, Western blotting 结果(图 6-C)也显示,不同剂量丹参水提物可显著降低

TNF- α 、IL-1 β 以及 p-I κ B 的蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、 0.001)。以上结果提示丹参水提物通过调控 NF- κ B 信号轴抑制野百合碱诱导的肝脏炎性损伤。

4 讨论

HSOS 虽发病率低,但仍由于其危重性和复杂性受到各界广泛关注。HSOS 的诱因主要包括大量的放化疗药、干细胞移植,以及误服含 PAs 的药物或食物,在我国最常见的诱因主要是由于误服土三七等有毒中药导致^[16-18]。野百合碱是一种典型的 PAs,其次碱部分具有 C-1,2 位不饱和双键, PAs 本身不具有肝毒性,但经过代谢后的吡咯却会导致强烈的肝毒性^[19]。野百合碱诱导的大鼠模型具有临床



A-肝组织 p65 核转位; B-肝组织 COX-2、NOS2、TNF、IL-6 以及 IL-1β 基因表达; C-肝组织 TNF-α、IL-1β 以及 p-IκB 蛋白表达。

A-p65 nuclear translocation in liver tissue; B-gene expressions of COX-2, NOS2, TNF, IL-6 and IL-1β in liver tissue; C-protein expressions of TNF-α, IL-1β and p-IκB in liver tissue.

图 6 丹参水提取物减少 NF-κB 入核并抑制其下游炎症因子表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 *S. miltiorrhiza* water extract reduces NF-κB entering nucleus and inhibits downstream inflammatory factor expressions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

HSOS 患者的典型特征, 如中央静脉内皮脱落、肝窦出血、实质细胞坏死以及窦周纤维化等, 因此被广泛地应用于各类实验研究。通过检测大鼠血清生化指标, 肝脏 MMP9 蛋白表达以及肝脏病理切片观察, 证实丹参水提取物具有良好的抑制 HSOS 的药效。

HSOS 的发生始动因素是肝窦内皮细胞 (hepatic sinusoidal endothelial cell, HSEC) 受损; PAS 进入体内后被肝脏细胞色素氧化酶 P450 (cytochrome P450, CYP450) 代谢活化形成脱氢吡咯生物碱 (dehydro-pyrrolizidine alkaloids, DHPAs); DHPAs 随即与细胞内蛋白质、DNA 以及 RNA 形成复合物, 造成细胞死亡, 内皮细胞受损脱落后导致肝窦内皮完整性破坏, 使红细胞进入 Disse 间隙, 以机械力进一步破坏肝窦内皮, 并活化凝血系统, 使肝窦

形成淤阻, 进一步造成实质细胞缺氧坏死^[20]。不仅如此, 炎症反应也随之发生。课题组前期研究发现, 受损的肝窦内皮细胞可通过释放损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 激活 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) /NF-κB 信号通路, 介导肝炎症损伤从而加剧 HSOS^[21]。中药天然活性成分如表儿茶素、甘草素与甘草苷等可通过减少 DAMPs 释放, 抑制 TLR4/NF-κB 信号通路, 发挥改善 HSOS 的药效^[22-23]。已有研究表明, 丹参预防给药可以抑制 NF-κB 信号通路, 减少下游炎症介质释放, 降低炎症损伤, 从而抑制土三七诱导 HSOS^[24]。以上研究提示丹参可预防 HSOS 发生, 但丹参对 HSOS 是否具有治疗作用尚未可知。本实验中, 网络药理学筛选结果也提示 NF-κB 信号通路

是丹参水提物改善 HSOS 的关键通路, 实验结果表明, 丹参水提物可抑制 NF- κ B 核转位, 降低促炎细胞因子的表达, 缓解炎症, 从而抑制野百合碱诱导的 HSOS。

除炎症反应以外, 氧化应激损伤也在 HSOS 的形成中具有重要调控作用^[23]。研究表明, DHPAs 可通过与细胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 共价结合而外排, 但是当 GSH 被过度消耗之后, 活跃的 DHPAs 导致肝脏严重氧化应激受损^[25]。课题组前期研究发现, 绿原酸、黄芩素、槲皮素、儿茶素及表儿茶素等中药活性成分均能通过激活 Nrf2 抗氧化信号通路, 缓解氧化应激损伤, 从而抑制 HSOS^[24,26-28], 激活 Nrf2 不仅抵御氧化应激损伤, 还可通过减少 DAMPs 的释放而缓解炎症, 因此 Nrf2 是治疗 HSOS 的重要靶点^[24]。研究显示, 丹参水提物可通过调控 Nrf2/HO-1 信号通路, 抵御氧化应激损伤, 从而发挥抗心血管血瘀综合征的药效^[29]。以上结果提示丹参水提物可能有激活 Nrf2 的作用, 本研究发现丹参水提物可以降低野百合碱诱导升高的 ROS、MDA 含量, 并逆转野百合碱诱导的 Nrf2 核易位减少, 以及下游 GCLC、GCLM、NQO1 以及 HO-1 等抗氧化酶的表达降低现象, 从而抵抗氧化应激损伤。以上结果提示丹参水提物可通过激活 Nrf2 核转位, 缓解氧化应激, 改善 HSOS。

综上, 丹参水提物能够有效地抑制野百合碱诱导的 HSOS, 其机制和调控氧化应激、抑制炎症有关。本研究为丹参治疗 HSOS 提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会药物性肝病学组. 药物性肝损伤诊治指南 [J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(11): 810-820.
- [2] Edgar J A, Molyneux R J, Colegate S M. Pyrrolizidine alkaloids: Potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(1): 4-20.
- [3] Zhu L, Zhang C Y, Li D P, *et al.* Tu-San-Qi (*Gynura japonica*): The culprit behind pyrrolizidine alkaloid-induced liver injury in China [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(8): 1212-1222.
- [4] Chen Z, Huo J R. Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations [J]. *Neth J Med*, 2010, 68(6): 252-260.
- [5] 徐静, 汪茂荣. 土三七导致肝小静脉闭塞综合征研究进展 [J]. 实用肝病杂志, 2013, 16(1): 94-96.
- [6] Valla D C, Cazals-Hatem D. Sinusoidal obstruction syndrome [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2016, 40(4): 378-385.
- [7] Bagal B, Chandrasekharan A, Chougale A, *et al.* Low, fixed dose defibrotide in management of hepatic veno-occlusive disease post stem cell transplantation [J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2018, 11(1): 47-51.
- [8] 清·顾观光辑, 杨鹏举校注. 神农本草经 [M]. 第 2 版. 北京: 学苑出版社, 2002: 77.
- [9] 徐静瑶, 刘小琳, 佟玲, 等. 高效液相色谱法测定注射用丹参多酚酸中 6 种水溶性成分的含量 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(14): 1599-1603.
- [10] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609-618.
- [11] 李强, 曹陈军, 陈奕, 等. 对丹参素药理作用的研究进展 [J]. 当代医药论丛, 2019, 17(10): 16-18.
- [12] Bosch K, McLaughlin M M, Esterly J S, *et al.* Impact of vancomycin treatment duration and dose on kidney injury [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2014, 43(3): 297-298.
- [13] You S P, Ma L, Zhao J, *et al.* Phenylethanol glycosides from *Cistanche tubulosa* suppress hepatic stellate cell activation and block the conduction of signaling pathways in TGF- β 1/smads as potential anti-hepatic fibrosis agents [J]. *Molecules*, 2016, 21(1): 102.
- [14] 梅俪凡, 欧银娟, 林飞燕. 丹参酮 II_A 对 TLR4/NF- κ B 信号通路下游炎症因子的影响及其临床意义 [J]. 临床医学, 2016, 36(2): 43-44.
- [15] 席加喜, 张华君, 陈晓宇. 丹参酮 II_A 磺酸钠注射液对万古霉素致肾损伤模型大鼠的保护作用及其机制研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(22): 3081-3084.
- [16] Stan R V. Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(4): 621-643.
- [17] Auvinen K, Lokka E, Mekkala E, *et al.* Fenestral diaphragms and PLVAP associations in liver sinusoidal endothelial cells are developmentally regulated [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15698.
- [18] Vion A C, Rautou P E, Durand F, *et al.* Interplay of inflammation and endothelial dysfunction in bone marrow transplantation: Focus on hepatic veno-occlusive disease [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2015, 41(6): 629-643.
- [19] 文良志, 孙文静, 刘凯军, 等. 吡咯里西啶生物碱性肝损伤研究进展 [J]. 传染病信息, 2017, 30(4): 209-211.
- [20] Deleve L D, Wang X D, Tsai J, *et al.* Sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease) in the rat is prevented by matrix metalloproteinase inhibition [J]. *Gastroenterology*,

- 2003, 125(3): 882-890.
- [21] Huang Z L, Chen M W, Wei M J, *et al.* Liver inflammatory injury initiated by DAMPs-TLR4-MyD88/TRIF-NF- κ B signaling pathway is involved in monocrotaline-induced HSOS [J]. *Toxicol Sci*, 2019, 172(2): 385-397.
- [22] 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.
- [23] Huang Z L, Jing X Q, Sheng Y C, *et al.* (-)-Epicatechin attenuates hepatic sinusoidal obstruction syndrome by inhibiting liver oxidative and inflammatory injury [J]. *Redox Biol*, 2019, 22: 101117.
- [24] 杨丽. 土三七诱导小鼠 HVOD 模型的建立及丹参对 HVOD 预防性治疗的实验研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [25] Yang M B, Ruan J Q, Fu P P, *et al.* Cytotoxicity of pyrrolizidine alkaloid in human hepatic parenchymal and sinusoidal endothelial cells: Firm evidence for the reactive metabolites mediated pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 243: 119-126.
- [26] Jing X Q, Zhang J Q, Huang Z L, *et al.* The involvement of Nrf2 antioxidant signalling pathway in the protection of monocrotaline-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in rats by (+)-catechin hydrate [J]. *Free Radic Res*, 2018, 52(4): 402-414.
- [27] Zheng Z Y, Shi L, Sheng Y C, *et al.* Chlorogenic acid suppresses monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome: The potential contribution of NF- κ B, Egr1, Nrf2, MAPKs and PI3K signals [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 46: 80-89.
- [28] Zhang J Q, Sheng Y C, Shi L, *et al.* Quercetin and baicalein suppress monocrotaline-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 795: 160-168.
- [29] Wei B, Sun C, Wan H, *et al.* Bioactive components and molecular mechanisms of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in promoting blood circulation to remove blood stasis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116697.

[责任编辑 李亚楠]