

山茱萸炮制增效成分脱水莫诺昔元的抗炎活性及肝保护作用

王泽萍, 豆昕悦, 施 考, 宁 燕, 王天阳, 曹 岗*, 韩 欣*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311400

摘 要: 目的 探讨山茱萸主要成分莫诺昔(morroniside, MO)的炮制转化成分脱水莫诺昔元(sarracenin, SA)的抗炎及肝保护作用。方法 采用超高效液相色谱法对 MO 及 SA 进行鉴定; 将对数生长期的人单核细胞白血病 THP-1 细胞随机分为对照组、模型组及 MO 低、高剂量(25、100 $\mu\text{mol/L}$)组和 SA 低、高剂量(25、100 $\mu\text{mol/L}$)组, 采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)联合腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)刺激 THP-1 细胞构建炎症细胞模型, 各给药组分别给予不同浓度的 MO 及 SA, Western blotting 法检测细胞总蛋白中含 NLR 家族 PYRIN 域蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、丝氨酸/苏氨酸激酶 (protein kinase B, Akt) 及磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 (phosphorylation protein kinase B, p-Akt) 的表达以及细胞培养液中 IL-1 β 的蛋白表达; 将雄性 Balb/c 小鼠随机为对照组、SA 组 (50 mg/kg)、对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP, 300 mg/kg) 组和 APAP (300 mg/kg) + SA 低、中、高剂量 (5、25、50 mg/kg) 组, 各给药组小鼠 ig 相应质量浓度 SA 2 h 后, 除对照组及 SA 组小鼠外, 其余各组小鼠 ig APAP, 24 h 后麻醉处死小鼠, 检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 及肝脏组织中丙二醛 (malonic dialdehyde, MDA) 水平, 检测组织病理学变化情况, 检测小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体 1 (mouse EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, EMR1, 又称 F4/80)、NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 (cysteinyI aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)、IL-1 β 、p-Akt 及 Akt 的蛋白表达情况。结果 体外实验表明 SA 与 MO 均能抑制巨噬细胞中 NLRP3 及 IL-1 β 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且 SA 的药效要优于 MO; 体内实验进一步发现 SA 能够抑制 APAP 诱导的小鼠血清中 ALT、AST 及肝脏组织中 MDA 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 改善肝脏病理损伤, 网络药理学揭示 SA 的抗炎及肝保护作用与 Akt 通路有关。结论 SA 是山茱萸炮制增效成分, 能够通过调控 Akt 通路发挥抗炎及肝保护作用。

关键词: 山茱萸; 莫诺昔; 脱水莫诺昔元; 抗炎; 肝保护

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0154-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.016

Anti-inflammatory and liver protective effects of sarracenin from synergistic ingredients in processed *Corni Fructus*

WANG Zeping, DUO Xinyue, SHI Kao, NING Yan, WANG Tianyang, CAO Gang, HAN Xin

College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory and hepatoprotective effects of sarracenin (SA), a processed and transformed component of morroniside (MO) from Shanzhuyu (*Corni Fructus*). **Methods** Ultra performance liquid chromatography was used for the identification of MO and SA. *In vitro*, firstly, THP-1 cells were randomly divided into control group, model group, MO (25, 100 $\mu\text{mol/L}$) groups and SA (25, 100 $\mu\text{mol/L}$) groups. Among these, model groups, including MO and SA groups were established by lipopolysaccharide (LPS) combined with adenosine triphosphate (ATP), while MO and SA groups were treatment with doses of MO as well as SA, Western blotting was used to detect the expressions of NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3), interleukin-1 β (IL-1 β), protein Kinase B (Akt), and phosphorylation protein kinase B (p-Akt) in cells as well as the expression of IL-1 β in the supernatants. *In vivo*, male Balb/c mice were randomly divided into control group, SA alone group

收稿日期: 2024-08-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82104394); 浙江省基础公益研究项目 (LY23H280008); 浙江中医药大学校级科研项目 (2024JKZKTS09); 浙江省中医药科技项目 (2025ZR104)

作者简介: 王泽萍, 硕士研究生, 研究方向中药药理。E-mail: wangzeping200008@163.com

*通信作者: 曹 岗, 研究员, 博士生导师, 从事中药炮制研究。E-mail: caogang33@163.com

韩 欣, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药药理。E-mail: xinhan@zcmu.edu.cn

(50 mg/kg), acetaminophen (APAP) group, APAP + SA group (5, 25, 50 mg/kg), among these, SA groups were intragastric administration with different doses of SA, 2 h later, except control group and SA alone group, the mice in other groups were given a single APAP (300 mg/kg) by gavage, and mice were executed under anesthesia after 24 h. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in serum, the level of malonic dialdehyde (MDA) in liver tissue and histopathological changes were detected. Moreover, Western blotting and immunofluorescence were performed to detect the expression of mouse EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (EMR1, F4/80) and NLRP3, the protein expressions of NLRP3, cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase-1), IL-1 β , p-Akt and Akt were also evaluated by Western blotting. **Results** *In vitro*, both SA and MO could inhibit the expressions of NLRP3 and IL-1 β proteins in macrophages ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the efficacy of SA was superior to that of MO. *In vivo* further revealed that SA could inhibit the increase of serum ALT, AST, and liver MDA levels induced by APAP in mice ($P < 0.05, 0.01, 0.001$) and improved liver pathological injury, and network pharmacology revealed that the anti-inflammatory and hepatoprotective effects of SA were related to the Akt pathway. **Conclusion** SA is a synergistic ingredient of *Corni Fructus*, which can play anti-inflammatory and liver protective effects by regulating Akt pathway.

Key words: *Corni Fructus*; morroniside; sarracenin; anti-inflammatory; liver protection

肝脏作为人体主要免疫器官, 具有强大的修复能力, 当其遭受外来刺激时, 能够利用自己的免疫功能对抗并修复刺激产生的损伤^[1]。在这一过程中, 往往伴随着肝细胞受损及免疫细胞的浸润, 当肝脏受到大量或反复的刺激时, 肝细胞损伤、细胞外基质沉积加剧, 则进展为肝纤维化, 若不及时加以干预将发展为肝硬化甚至是肝癌, 严重威胁人类健康^[2-3]。目前, 在全球范围内药物性肝损伤的发病率逐年升高, 其中, 对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是临床常用于治疗发热的药物, 但其过量使用可能会导致严重的肝损伤甚至肝衰竭^[4-5]。研究发现, 免疫应答在 APAP 诱导的急性肝损伤 (acetaminophen-induced liver injury, AILI) 中发挥重要作用, 其中免疫细胞, 特别是巨噬细胞, 具有诱导炎症以加重肝损伤和清除残留物修复肝组织的双重作用^[6]。然而, 目前美国食品药品监督管理局 (food and drug administration, FDA) 批准的治疗肝损伤的药物甚少, 因此寻找低毒、高效且具有抗炎作用的药物对于改善肝损伤具有重要的科学价值。

中药治疗慢性肝病具有不良反应少的独特优势, 并已在世界范围内, 特别是在我国得到广泛应用。中医认为肝纤维化的发生是由外感湿热疫毒、劳逸失度、禀赋不足等引起的, 病机为肝脾失调、气滞血瘀, 继而湿热蕴结、瘀血阻络, 迁延而致肝肾不足, 而发为胁下癖积、胸胁满痛、胸脘痞满等^[7]。临床治疗以疏肝、养肝、健脾、和胃等为原则, 通过调畅气机、疏散气郁、以通为用, 避免蕴结于肝。研究发现, 芍药、温郁金、党参等^[8-11]均具有肝保护功效。五脏中肝属木, 山茱萸得木气最厚, 故养肝山茱萸为最宜^[12-13]。

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus*

officinalis Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 最早记载于《神农本草经》中, 性微温, 味酸而涩, 无毒, 归肝、肾经, 具有滋补肝肾和收敛固脱之功效。山茱萸生品长于敛阴止汗, 经酒制后药性温和, 长于滋补肝肾^[14]。为适应临床“辨证施治”的用药特点, 山茱萸需根据不同的临床需求选择合适的炮制工艺。研究表明, 山茱萸具有抗炎、抗氧化及肝保护作用^[15], 据此, 前期研究采用化学与生物学结合的方式筛选出具有最佳肝保护作用的山茱萸炮制工艺, 即高压酒蒸山茱萸 (制品)^[16], 通过进一步实验发现高压酒蒸山茱萸的肝保护、抗炎作用均优于生品, 这与山茱萸炮制前后成分变化密切相关^[17-18]。已有研究发现, 山茱萸主要含环烯醚萜苷、多糖、有机酸、鞣质等成分, 其中莫诺苷 (morroniside, MO) 是一种环烯醚萜苷类化合物, 是山茱萸中的主要活性成分之一, 具有抗炎、抗氧化、肝保护作用^[18]。研究发现, MO 进入胃肠道循环会发生糖苷键断裂并水解成苷元成分^[19], 前期实验表明, 山茱萸高压酒蒸后 MO 的含量降低, 而与 MO 具有同样母核结构的脱水莫诺苷元 (sarracenin, SA) 的含量升高^[20]。然而, SA 是否是由 MO 在炮制过程中转化而来尚未明晰。不仅如此, MO 能够抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的巨噬细胞炎症反应和氧化应激^[16]。据此, 本研究采用巨噬细胞模拟体外炎症, 并结合动物实验验证 SA 的肝保护作用, 为揭示中药炮制增效的科学内涵提供新思路。

1 材料

1.1 细胞株及动物

人单核白血病 THP-1 细胞, 由山东理工大学张玉老师捐赠, 经鉴定无支原体污染。

SPF 级 Balb/c 雄性小鼠, 48 只, 体质量 18~22 g, 由杭州启真实验动物科技有限公司提供, 许可证号 SCXK(浙) 2019-0010。所有小鼠饲养在浙江中医药大学实验动物中心无特定病原体(specific pathogen free, SPF)屏障系统中, 饲养期间自由饮食和饮水。本研究动物实验经浙江中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 202009A012)。

1.2 药品与试剂

山茱萸由浙江中医药大学朱波教授及刘考铨教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *C. officinalis* Sieb.et Zucc.的干燥成熟果肉; 对乙酰氨基酚(质量分数 $\geq 99\%$, 批号 B14A9E58584)购自上海源叶生物科技有限公司; MO(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 DST210508-039)、SA(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 DSTDT005401)对照品购自成都乐美天医药科技有限公司; TGF- β (批号 1218209)购自美国 PeproTechInc 公司; 豆蔻酸佛波醇乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, 批号 P8139-1MG)、嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP, 批号 A2383)购自美国 Sigma 公司; RPMI-1640 培养基(批号 8122664)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 10099141)购自美国 Gibco 公司; LPS(批号 L8880)、青霉素-链霉素双抗(批号 P1400)、高效 RIPA 裂解液(批号 R0010)购自北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(批号 P0015L)Cy3 标记山羊抗大鼠二抗(批号 A0507)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔二抗(批号 A0423)、抗荧光淬灭封片液(含 DAPI, 批号 P0131)、山羊血清(批号 C0265)、细胞增殖/毒性检测试剂(cell counting kit-8, CCK8, 批号 C0048L)、BeyoECL Star(批号 P0018AM)均购自上海碧云天生物科技有限公司; 重组半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase-1, 批号 ab179515)、小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体(mouse EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, EMR1, 又称 F4/80, 批号 ab16911)抗体购自英国 abcam 公司; 含 NLR 家族 PYRIN 域蛋白 3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3, 批号 15101S)、丝氨酸/苏氨酸激酶(protein kinase B, Akt, 批号 CS4691)抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β , 批号

16806-1-AP)、 β -肌动蛋白(β -actin, 批号 66009-1-Ig)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH, 批号 60004-1-Ig)抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 SA00001-2)购自武汉三鹰生物技术有限公司; HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 BA1050)购自武汉博士德生物工程有限公司; 中性福尔马林固定液(批号 R51930)购自金克隆生物技术有限公司; 磷酸(色谱级, 批号 E2013059)购自上海阿拉丁生化有限公司; 切片石蜡(批号 P815420)购自上海麦克林科技股份有限公司; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色液(批号 E489517)购自上海阿拉丁科技股份有限公司; 乙醇(分析纯, 批号 20200615)购自广东光华科技股份有限公司; 甲醇(质谱级, 批号 22015202)、乙腈(质谱级, 批号 JA096730)购自德国 Merck 公司; O.C.T 包埋剂(批号 1587-00)购自美国 SAKURA 公司; 曲拉通(Triton X-100, 批号 A2424335)购自上海麦克林生化科技有限公司; 4%多聚甲醛固定液(批号 BL539A)购自陕西白鲨生物科技有限公司。

1.3 仪器

IMS-40 型雪花制冰机(常熟市雪科电器有限公司); XW-80A 型涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); EPS 300 型电泳仪(上海天能科技有限公司); Fluor Chem 型蛋白印迹成像系统(美国 Bio-Techne 公司); AXIO SCOPE.A1 型蔡司正置荧光显微镜(德国蔡司公司); 225D-1CN 型十万分之一电子天平、BSA124S 型万分之一电子天平(德国赛多利斯公司); ACQUITY UPLC H-CLASS PIUS 型高效液相(美国 Waters 公司); Unique-S15 型 RO-DI 超纯水仪(厦门锐思捷科学仪器有限公司); VELOCITY 18R 型台式高速冷冻离心机(澳大利亚 Dynamica 公司); RM2255 型半自动石蜡切片机(德国 Leica 公司); NX 50 型冷冻切片机(赛默飞世尔科技公司); 3100 型全自动生化分析仪(日本日立公司)。

2 方法

2.1 MO 的模拟炮制

取适量黄酒, 与 MO 混合均匀, 并调整至 pH 2, 经高压酒蒸后干燥得 MO 模拟炮制品粉末。

2.2 超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)法检测

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取 MO、SA 对照品, 加相应体积的甲醇配制成质量浓度

为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取模拟炮制后的干粉, 根据炮制前称取的 MO 质量加入相应体积的甲醇复溶至质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱程序为 0~0.3 min, 5% B; 0.3~2.0 min, 5%~7% B; 2.0~5.0 min, 7% B; 5.0~7.0 min, 7%~14% B; 7.0~8.0 min, 14%~20% B; 8.0~11.0 min, 20% B; 11.0~15.0 min, 20%~90% B; 15.0~16.0 min, 90% B; 16.0~16.2 min, 90%~5% B; 16.2~18.0 min, 5% B; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.3 mL/min; 进样体积 1 μL ; 检测波长 254 nm。

2.3 细胞培养、造模及给药

THP-1 细胞培养在 RPMI-1640 完全培养基、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下。取对数生长期的 THP-1 细胞, 离心重悬后, 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板, 加入 PMA (100 nmol/L) 孵育 48 h 诱导细胞贴壁。THP-1 细胞随机分为对照组、模型组及 MO 低、高剂量 (25、100 $\mu\text{mol/L}$) 组和 SA 低、高剂量 (25、100 $\mu\text{mol/L}$) 组, 除对照组外, 均给予 LPS (100 ng/mL), MO、SA 给药组加入相应浓度药物培养 3.5 h 后, 除对照组外给予 ATP (30 mmol/L) 培养 0.5 h。

2.4 细胞存活率检测

将对数生长期的 THP-1 细胞 4×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h 后分别加入不同浓度 (0.781 25、1.562 50、3.125 00、6.250 00 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0125、0.025 0、0.050 0、0.100 0、0.200 0 mmol/L) 的 MO、SA 含药培养液, 培养 24 h, 加入 CCK-8 溶液 4 h 后, 酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.5 Western Blotting 检测相关蛋白表达

取给药后的细胞及上清液, 提取细胞总蛋白及细胞上清蛋白, 用 BCA 检测试剂盒测定蛋白浓度, 将蛋白与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 5 min 得蛋白样品。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, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 NLRP3 (1:1 000)、IL-1 β (1:1 000)、 β -actin (1:20 000)、GAPDH (1:50 000)、p-Akt (1:1 000) 以及 Akt (1:2 000) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, 洗膜后加入相应的次级

抗体, 室温封闭 2 h, 加入 ECL 化学发光液进行显色, 于化学成像分析仪上拍照, 采用 Image-J 软件统计灰度值。

2.6 动物造模、分组及给药

动物适应性饲养 1 周后随机分为对照组、SA 组 (50 mg/kg)、APAP (300 mg/kg) 组和 APAP (300 mg/kg)+SA 低、中、高剂量 (5、25、50 mg/kg) 组, 每组 8 只。给药组分别给予 ig 不同质量浓度的 SA, 对照组和模型组给予 ig 等体积的 0.25% 羧甲基纤维素钠溶液。2 h 后, 除对照组及 SA 组外, 其余各组小鼠 ig 给予 APAP (300 mg/kg), 24 h 后对小鼠进行麻醉, 待小鼠麻醉完全后, 进行颈动脉取血, 收集血清及肝脏组织, 用于后续实验。

2.7 血清生化指标及肝脏组织丙二醛 (malonic dialdehyde, MDA) 检测

根据试剂盒说明书, 使用全自动血清生化分析仪对小鼠血液中的丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 进行分析; 取肝脏组织匀浆后, 根据试剂盒说明书, 对小鼠肝脏组织中 MDA 水平进行检测。

2.8 组织病理学检测

取小鼠肝脏浸泡于 10% 的甲醛水溶液进行固定, 1 周后, 取固定后的小鼠肝脏, 切厚度约 3 mm 的切片放入组织包埋盒中, 流水过夜冲洗后, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡后, 制成肝脏蜡块, 使用切片机将肝脏石蜡块, 切成 4 μm 的切片。将肝脏组织切片放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱进行融蜡, 按照说明书进行 HE 染色, 用中性树胶封片, 于显微镜下观察组织病理学变化情况。

2.9 网络药理学研究

SA 结构由 PubChem 网站中获取并导入至 SwissTargetPrediction 网站中进行药物靶点预测。采用 GeneCards 网站获取所需的炎症靶点, 将 SA 与炎症取交集得到共有靶点; 通过 STRING 网站进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建, 并导入 Cytoscape 3.7.1 软件进行构建, 依据 degree 值排序前 10 作图, 进行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。

2.10 组织免疫荧光染色

取肝脏组织, 置于 O.C.T 包埋剂中进行包埋, 使用冷冻切片机将包埋后的组织切成厚度为 4 μm

的冷冻切片,随后放入甲醇-丙酮(1:1)溶液中固定 10 min, PBS 洗涤, 5%山羊血清封闭 1 h, 加入相应的一抗, 4℃孵育过夜, 次日常 PBS 洗涤后加入对应的二抗, 室温孵育 1 h, PBS 洗涤后, 加入抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)进行封片, 于蔡司正置显微镜下进行图像采集。

2.11 统计学分析

实验数据均采用 GraphPad Prism(San Diego, CA, 美国)统计软件进行统计处理, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单向方差分析采用统计学检验进行比较分析。

3 结果

3.1 MO 在高压酒蒸中含量变化

如图 1 所示, 山茱萸在高压酒蒸后, 其主要成分 MO 含量有所降低, 研究表明 MO 在酸性环境下易发生水解而形成昔元^[21], 因此对成分中与 MO 具有相同母核结构的成分进行解析, 发现与 MO 具有相同母核结构的 SA 含量明显升高 ($P < 0.001$)。

3.2 SA 为 MO 的炮制转化成分

为探究 SA 是否为 MO 炮制转化后的成分, 将 MO 模拟炮制样品按照“2.2.2”项下供试品制备的方法制备样品溶液, 在“2.2.3”项下色谱条件进样, 由系统计算并转换成图谱形式, 记录图谱, 并使用 MO 对照品进样比对, 结果发现 MO 在模拟炮制的条件下会转化成其他成分, 经过对比 SA 对照品, 证实了 SA 是 MO 的炮制转化成分(图 2-A~C)。通过结构推测, 其可能的转化规律为 MO 在炮制过程中会发生糖苷键断裂并脱水形成 SA。

3.3 细胞毒性评价

为探究 MO 与 SA 的药理作用差异, 采用 THP-1

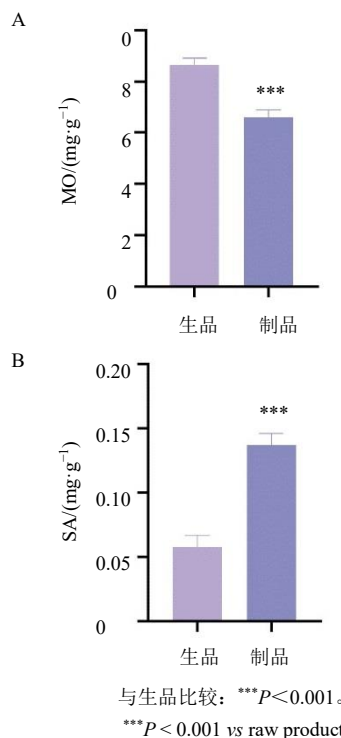


图 1 山茱萸高压酒蒸前后 MO 及 SA 含量变化

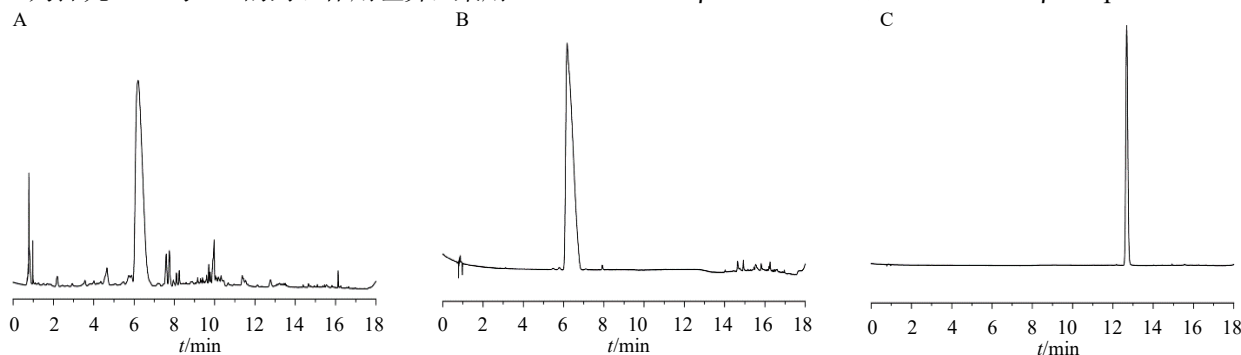
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Changes of MO and SA contents before and after high-pressure wine steaming of *Corni Fructus* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞评价 MO、SA 的细胞毒性, 结果表明, MO 在 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以下对 THP-1 细胞均无毒副作用, SA 也显示出相同的结果, 见图 3。结合参考文献报道^[22], 选定给药浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 以及 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为药物的低、高浓度并进行后续的实验。

3.4 MO 与 SA 的体外抗炎活性

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组中 NLRP3、IL-1 β 以及细胞培养上清液 IL-1 β (supernatant-IL-



A-MO 模拟炮制品; B-MO 对照品; C-SA 对照品。

A-MO simulated concoction; B-MO standard; C-SA standard.

图 2 模拟炮制过程中 MO 转化为 SA 的规律探究

Fig. 2 Exploration of law of conversion of MO to SA in simulated concoction process

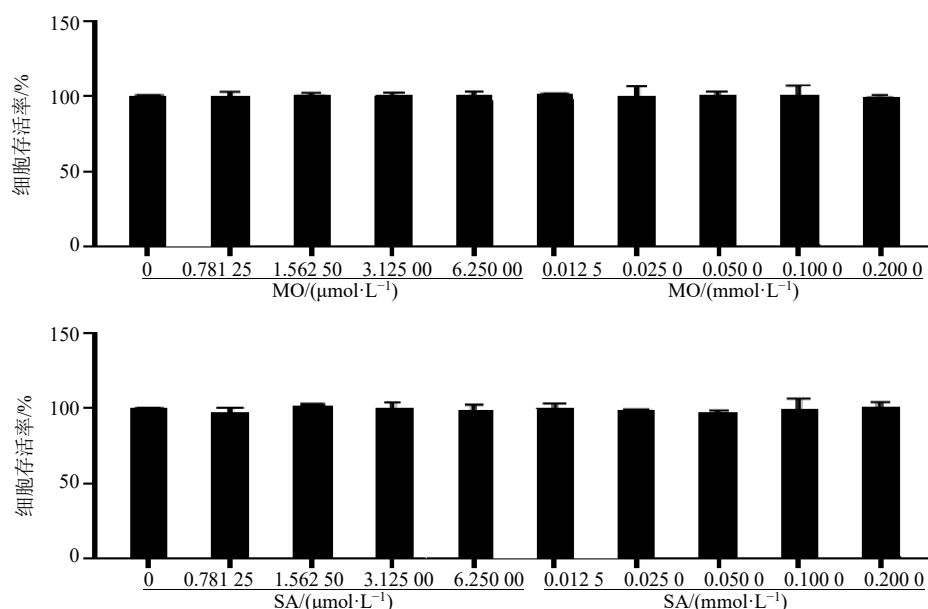
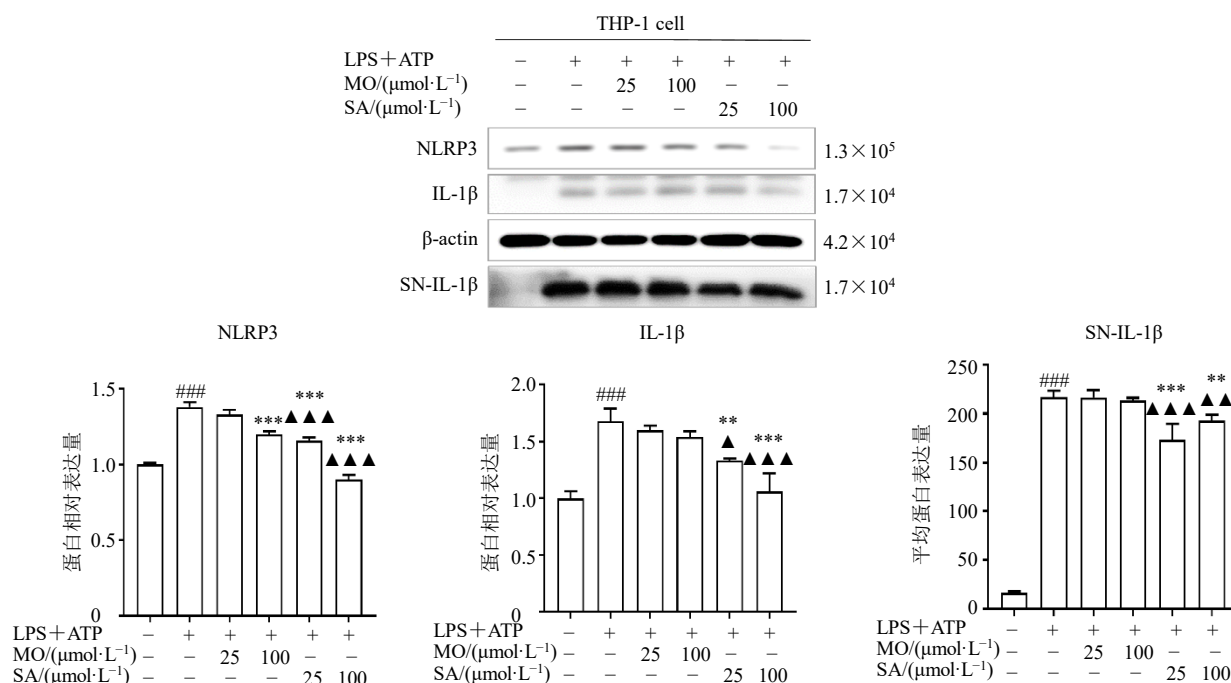


图 3 MO 及 SA 的细胞毒性检测 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Cytotoxicity detection of MO and SA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与相同剂量 MO 比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ ▲▲▲ $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ ▲▲▲ $P < 0.001$ vs same dose of MO group.

图 4 MO 及 SA 的抗炎作用评价 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Evaluation of anti-inflammatory effects of MO and SA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

1 β , SN-IL-1 β) 的蛋白水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, SA 低、高浓度组的 NLRP3 及 IL-1 β 的表达均显著下降 ($P < 0.01, 0.001$); 与相同剂量 MO 比较, SA 的药效更为显著 ($P < 0.05$ 、

0.01、0.001)。

3.5 SA 改善 APAP 诱导的小鼠肝功能异常

肝细胞损伤往往伴随着 ALT 及 AST 指标的升高, 因此临床上将 ALT 及 AST 的升高作为肝

功能受损的表征^[23]。如图 5 所示, 单次高剂量给予 APAP 会导致肝细胞损伤的发生, 伴随着血清中 ALT 及 AST 水平的升高, 而 SA 的给药能够抑制这一现象的发生 ($P < 0.05$ 、 0.001), 且呈剂量相关。肝脏损伤过程中还会导致 MDA 水平的增加^[24], 与对照组比较, APAP 组小鼠肝脏中 MDA 的水平显著升高 ($P < 0.001$); 与 APAP 组比较, APAP+SA 组的小鼠肝脏中的 MDA 水平显著降低 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性, 另外, 与对照组比较, SA 组小鼠血清 ALT、AST 及肝脏组织中 MDA 均无显著差异, 上述结果表明 SA 在安全剂量下能够改善 APAP 诱导的肝细胞损伤。

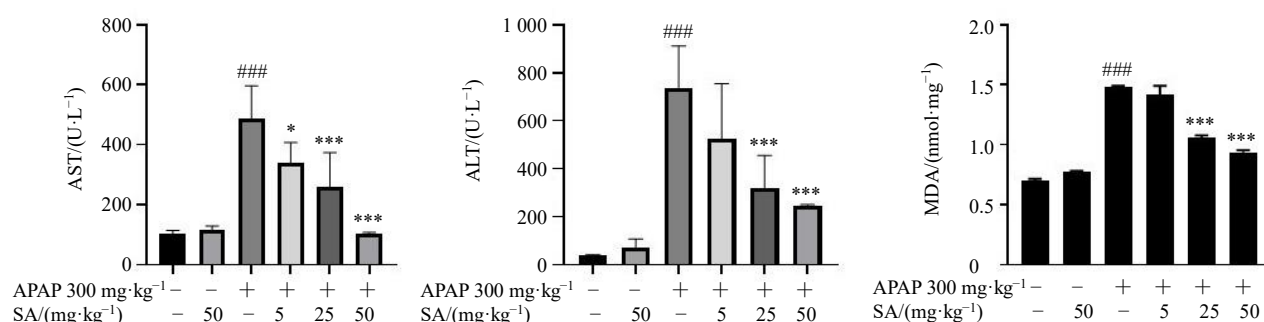
3.6 SA 改善 APAP 诱导的小鼠肝脏组织病理学改变

HE 染色结果如图 6 所示, 对照组及 SA 组小鼠, 肝小叶结构正常、排列整齐; APAP 组小鼠中肝脏中出现大面积肝细胞坏死, 核固缩增多, 肝组织列紊乱, 炎细胞浸润增加; APAP+SA 不同剂量组小鼠肝脏组织形态完整, 排列紧密有序, 与对照

组接近。

3.7 SA 改善 APAP 诱导的小鼠巨噬细胞募集与炎症小体的活化

肝脏炎症的发生往往伴随着巨噬细胞的募集, 提示巨噬细胞在机体的炎症反应中发挥关键作用^[25]。为评价 SA 的体内抗炎作用, 采用免疫荧光对巨噬细胞的表面标记物 F4/80 的表达进行检测。如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组的平均荧光强度显著升高 ($P < 0.001$), 提示在 APAP 诱导的急性肝损伤中伴随着巨噬细胞的募集; 与 APAP 组比较, APAP+SA 各剂量组的 F4/80 平均荧光强度则显著降低 ($P < 0.001$), 且与对照组比较, SA 组无显著性差异, 提示 SA 能够改善巨噬细胞的募集。为进一步评价 SA 的抗炎作用, 采用免疫荧光对 NLRP3 炎症小体的表达进行检测, 如图 7 所示, APAP 诱导的 NLRP3 的升高在 SA 给药后被逆转, 提示 SA 能够在改善巨噬细胞募集的同时亦能改善炎症小体的活化。



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与 APAP 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs APAP group, same as below figures.

图 5 SA 对 APAP 诱导的小鼠肝功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Effect of SA on APAP-induced liver function indexes in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

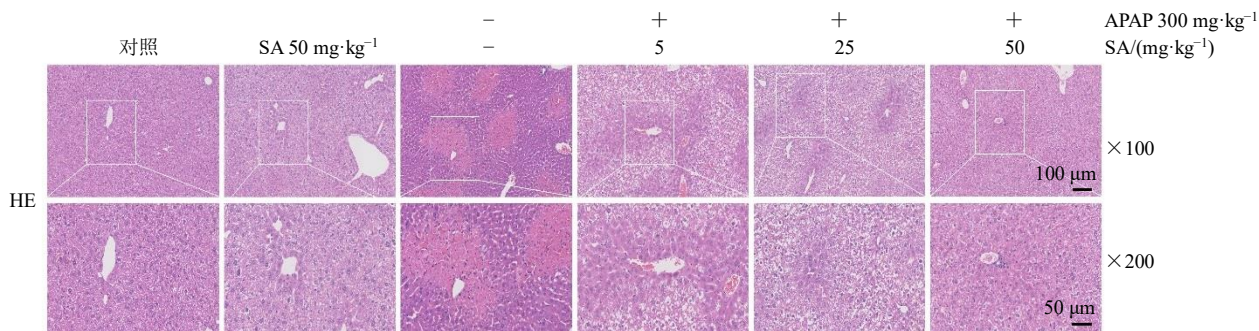


图 6 SA 对 APAP 诱导的小鼠肝脏组织病理学的作用 (HE, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of SA on liver histopathology induced by APAP in mice (HE, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

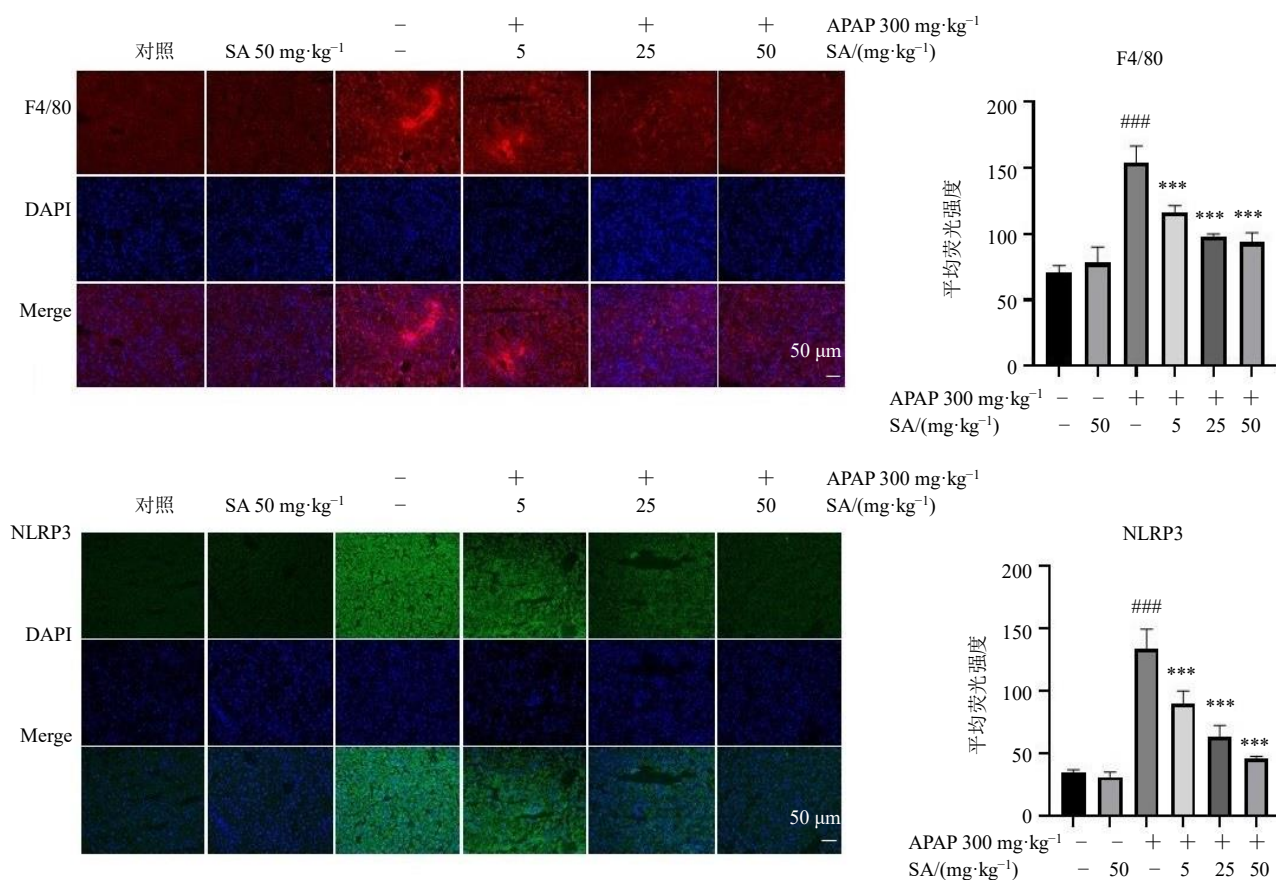


图 7 SA 改善 APAP 诱导的小鼠巨噬细胞募集与炎症小体的活化 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 SA improves APAP-induced macrophage recruitment and activation of inflammatory vesicles in mice ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.8 SA 抑制 APAP 诱导的小鼠 NLRP3 介导的炎症反应发生

在炎症反应过程中, NLRP3 炎症小体的活化往往会招募 Caspase-1 并诱导其剪切体的形成, 进一步促进前体 IL-1 β 向成熟型 IL-1 β 转化, 加剧炎症反应的发生^[26]。为进一步评价 SA 的抗炎作用, 采用 Western blotting 检测 APAP 诱导的急性肝损伤中炎症相关蛋白 NLRP3、IL-1 β 以及 Caspase-1 的表达。如图 8 所示, 与对照组比较, APAP 组 NLRP3、IL-1 β 以及 Caspase-1 的表达显著升高 ($P < 0.001$); 与 APAP 组比较, APAP+SA 组上述炎症指标则显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001) 且 APAP+SA 高剂量组效果更显著。与对照组比较, SA 组上述炎症指标无显著性差异。因此, SA 可能通过抑制 APAP 诱导的小鼠 NLRP3 炎症小体活化发挥抗炎及肝保护作用。

3.9 SA 发挥抗炎及肝保护作用的潜在机制

如图 9 所示, 采用 SwissTargetPrediction 网站预测, 去除重复后获得 102 个 SA 靶点; 通过对

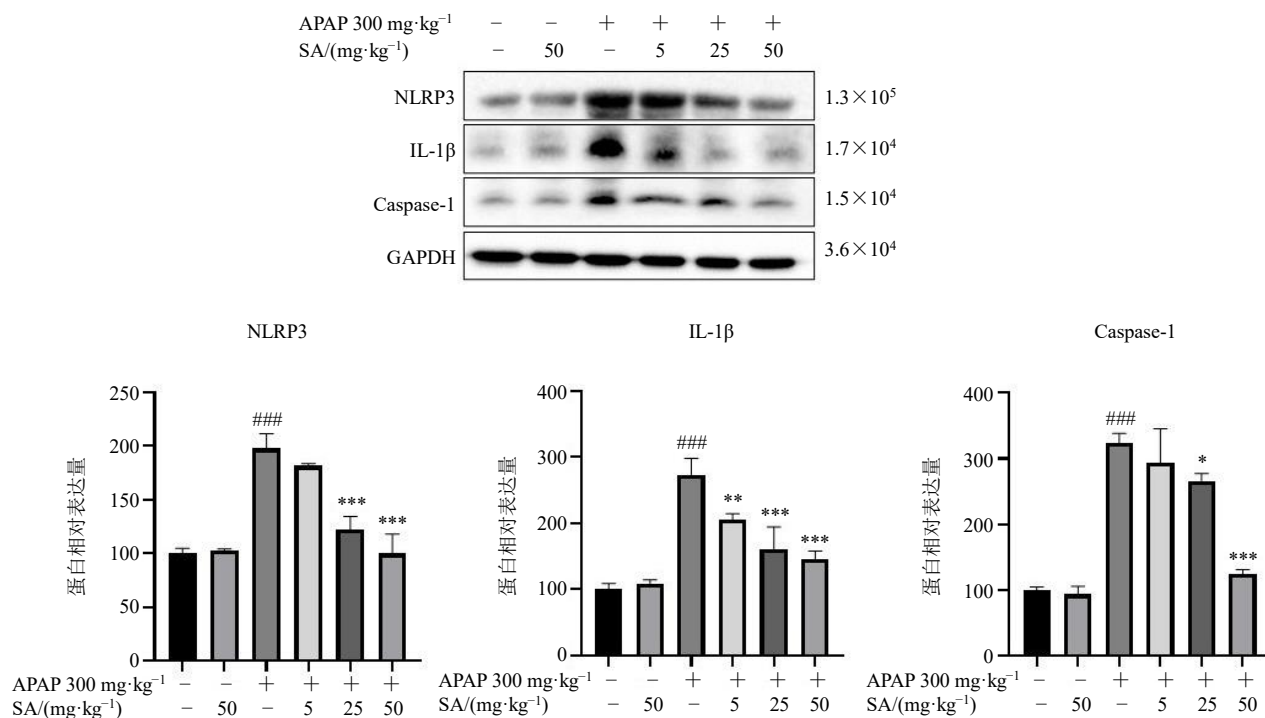
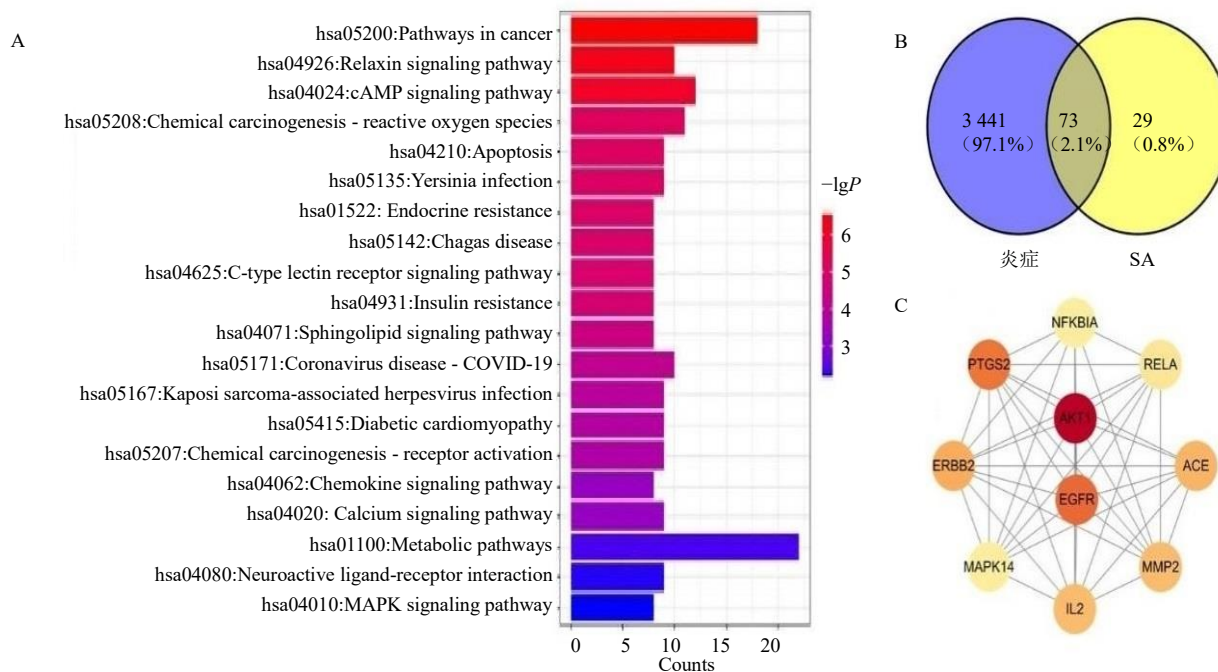
GeneCards 数据库的搜索, 合并并去除重复项后获得 3 514 个靶点。通过 Venny.2.1 收集到 73 个交叉靶点, 并通过 Cytoscape 3.7.1 构建了“成分-潜在靶点”网络并依据 degree 值排序选择前 10 进行展示。此外, KEGG 通路分析表明, SA 发挥抗炎及行使肝保护作用的潜在机制与 Akt 通路密切相关。

3.10 SA 调控 Akt 途径发挥抗炎及肝保护作用

如图 10-A、B 所示, 与对照组比较, APAP 组 p-Akt 的表达显著升高 ($P < 0.001$); 与 APAP 组比较, SA 组表达显著降低 ($P < 0.001$)。如图 10-C、D 所示, 与对照组比较, 模型组 p-Akt 的表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, SA 高剂量组表达显著降低 ($P < 0.001$)。因此, 本研究通过网络药理学预测并结合体内外的实验共同验证了 SA 调控 Akt 途径发挥抗炎及肝保护作用的潜在机制。

4 讨论

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *C. officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉^[27], 其中富含环烯醚

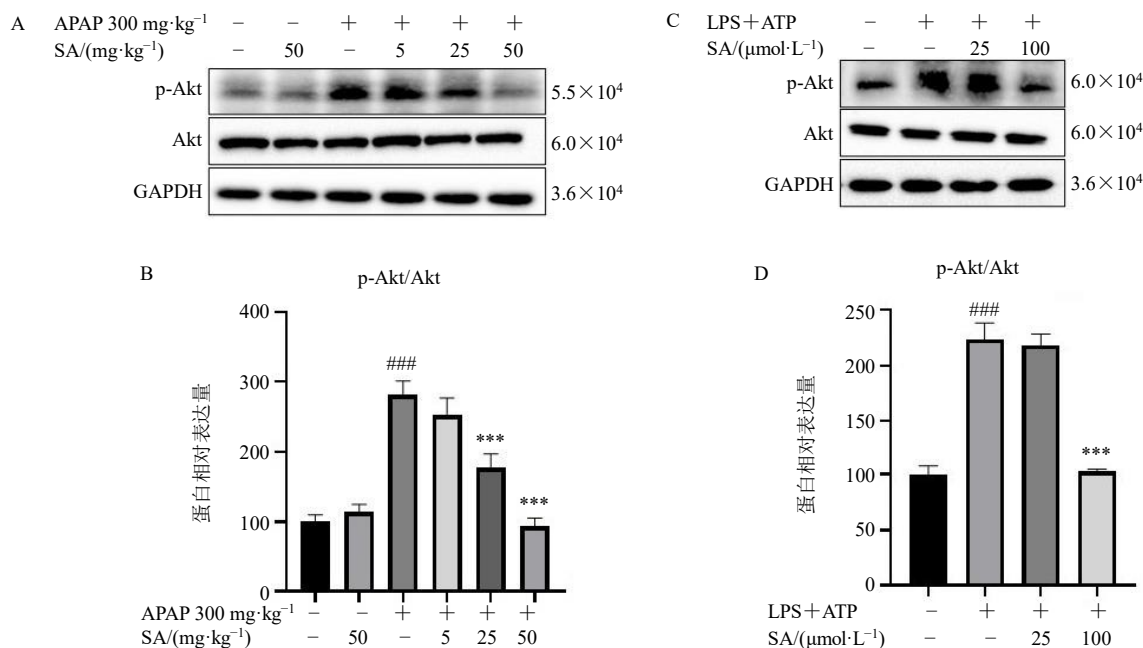
图 8 SA 抑制 APAP 诱导的小鼠 NLRP3 炎症小体活化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 8 SA inhibits APAP-induced activation of mouse NLRP3 inflammatory vesicles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A-KEGG 通路图; B-SA 与炎症的 Venn 图; C-degree 值排名前 10 的靶点图。

A-KEGG pathway map; B-Venn diagram of SA versus inflammation; C-map of the top ten targets ranked based on degree values.

图 9 网络药理学预测 SA 发挥抗炎及肝保护的潜在机制

Fig. 9 Potential mechanisms by which network pharmacology predicts that SA exerts anti-inflammatory and hepatoprotective effects



A-小鼠组织中 p-Akt 及 Akt 蛋白印迹图; B-THP-1 细胞中 p-Akt 及 Akt 的蛋白印迹图; C-小鼠组织中 p-Akt 及 Akt 蛋白的相对表达量; D-THP-1 中 p-Akt 及 Akt 蛋白的相对表达量。

A-protein blots of p-Akt and Akt in mouse tissues; B-protein blots of p-Akt and Akt in THP-1; C-relative expression of p-Akt and Akt proteins in tissues; D-relative expression of p-Akt and Akt proteins in THP-1 cell.

图 10 SA 调控 Akt 途径发挥抗炎及肝保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 SA modulates Akt pathway to exert anti-inflammatory and hepatoprotective effects ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

萜苷类、多糖类及酸类物质等多种成分^[28]。现代药理研究表明山茱萸具有较好的抗炎活性作用^[29],并且具有一定的肝保护作用^[30]。结合传统炮制理论和现代炮制工艺,本课题组对山茱萸酒蒸法的炮制工艺进行了考察,发现山茱萸生品、炮制品均能发挥肝保护作用,而高压酒蒸品改善作用更佳^[16]。同时,山茱萸在炮制过程中的成分变化,尤其是作为山茱萸的标志性成分 MO^[31],其炮制前后的含量变化值得关注。基于前期的实验结果,本研究发现在炮制过程中,MO 的含量有所减少。由此提出猜测并且由其结构推断转化产物或为 SA。为验证该推断,将 SA 对照品与其进行比对,结果证明,在炮制之后 MO 部分转化为 SA,由于黄酒中的成分复杂,为了避免杂峰的影响,本研究使用与黄酒含醇量相同的乙醇进行模拟炮制,结果同样证明了脱水莫诺昔元的生成。为进一步确定 SA 与山茱萸炮制后增加肝保护作用的相关性,开展了后续实验研究。

肝脏疾病的发生往往伴随着巨噬细胞活化及肝细胞损伤的发生,在这一过程中,骨髓来源的单核细胞会募集到损伤部位,参与肝脏炎症反应的发生^[32],因此使用 PMA 诱导 THP-1 细胞贴壁,并使用 LPS 联

合 ATP 刺激 THP-1 分化来模拟体外炎症反应,同时给予不同浓度的 MO 与 SA,结果显示在同等的给药浓度下 SA 对 NLRP3 炎症小体的活化及 IL-1 β 的释放的抑制作用均优于 MO,提示 MO 的转化产物 SA 可能是高压酒蒸山茱萸中发挥抗炎作用的重要组分。

为进一步评价 SA 的肝保护作用,采用 APAP 诱导的急性肝细胞损伤作为评价对象,APAP 作为临床上常用的解热镇痛药,其过量使用可能会导致肝毒性和急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)^[33]。而 ALT、AST 是检测肝损伤的重要指标,结果表明 SA 能够使上述指标趋于正常水平。同时本研究发现使用 SA 能对 APAP 诱导的肝损伤进行修复,并且存在剂量相关性,结果表明在给药剂量为 50 mg/kg 时效果最佳。不仅如此,SA 的高剂量组给药能抑制 APAP 诱导的肝脏中 MDA 水平的升高,减少肝脏中巨噬细胞的募集及 NLRP3 炎症小体介导的炎症反应的发生,这些结果均证实了 SA 的抗炎及肝保护作用。采用网络药理学分析联合分子生物学技术揭示了 SA 发挥抗炎与肝保护作用的机制与 Akt 通路密切相关。

综上,本研究揭示了 SA 是山茱萸炮制发挥肝保护作用增效的成分之一,其能够通过调控 Akt 通路

发挥抗炎及肝保护作用,为阐释中药炮制的科学内涵奠定了一定的基础,也为山茱萸炮制品的开发提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Parlar Y E, Ayar S N, Cagdas D, *et al.* Liver immunity, autoimmunity, and inborn errors of immunity [J]. *World J Hepatol*, 2023, 15(1): 52-67.
- [2] Wang F D, Zhou J, Chen E Q. Molecular mechanisms and potential new therapeutic drugs for liver fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 787748.
- [3] 孙悦, 刘莹, 王磊, 等. 鳖甲煎丸抗肝纤维化作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(2): 522-529.
- [4] Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Semin Liver Dis*, 2019, 39(2): 221-234.
- [5] Devarbhavi H, Asrani S K, Arab J P, *et al.* Global burden of liver disease: 2023 Update [J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 516-537.
- [6] Wang J C, Zhang L L, Shi Q, *et al.* Targeting innate immune responses to attenuate acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 202: 115142.
- [7] 王河, 陈少锋, 谭蓓蓓. 中药治疗肝纤维化研究进展 [J]. *内蒙古中医药*, 2023, 42(2): 128-131.
- [8] Wei C L, Qiu J, Wu Y Y, *et al.* Promising traditional Chinese medicine for the treatment of cholestatic liver disease process (cholestasis, hepatitis, liver fibrosis, liver cirrhosis) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 297: 115550.
- [9] Sun Y K, Zhang Y F, Xie L, *et al.* Progress in the treatment of drug-induced liver injury with natural products [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 183: 106361.
- [10] Qi X Y, Zheng S G, Ma M Y, *et al.* Curcumin suppresses CCF-mediated hepatocyte senescence through blocking LC3B-lamin B1 interaction in alcoholic fatty liver disease [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 912825.
- [11] Wang T X, Duan K L, Huang Z X, *et al.* Tanshinone functions as a coenzyme that confers gain of function of NQO1 to suppress ferroptosis [J]. *Life Sci Alliance*, 2023, 6(1): e202201667.
- [12] 汪得利, 陈俊良, 赵云燕. 张锡纯临床应用山茱萸经验撷菁 [J]. *山东中医药大学学报*, 2019, 43(2): 135-138.
- [13] 李岚欣, 陈民. 基于“木郁达之”探讨从肝论治高血压 [J]. *江西中医药*, 2024, 55(12): 19-21.
- [14] 张嘉妮, 戴冰, 李玉星, 等. 酒制山茱萸炮制研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(12): 1604-1608.
- [15] Gao X, Liu Y, An Z C, *et al.* Active components and pharmacological effects of *Cornus officinalis*: Literature review [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 633447.
- [16] Han X, Ding C, Ning Y, *et al.* Optimizing processing technology of *Cornus officinalis*: Based on anti-fibrotic activity [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 807071.
- [17] 鲁静, 陈天朝, 马彦江, 等. 炮制对山茱萸有效成分含量的影响 [J]. *中医药信息*, 2020, 37(2): 43-46.
- [18] Bhuia M S, Chowdhury R, Ara I, *et al.* Bioactivities of morroniside: A comprehensive review of pharmacological properties and molecular mechanisms [J]. *Fitoterapia*, 2024, 175: 105896.
- [19] Li X N, Wang Q, Zhang X W, *et al.* HPLC study of pharmacokinetics and tissue distribution of morroniside in rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(2): 349-355.
- [20] Han X, Ning Y, Dou X Y, *et al.* *Cornus officinalis* with high pressure wine steaming enhanced anti-hepatic fibrosis: Possible through SIRT3-AMPK axis [J]. *J Pharm Anal*, 2024, 14(5): 100927.
- [21] 周洪亮, 方祝元, 常星洁, 等. 基于莫诺昔转化的山茱萸环烯醚萜苷提取工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(9): 26-28.
- [22] Sun Y, Zhu Y, Liu X, *et al.* Morroniside attenuates high glucose-induced BMSC dysfunction by regulating the Glol/AGE/RAGE axis [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(8): e12866.
- [23] Zhang C J, Meyer S R, O'Meara M J, *et al.* A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction [J]. *J Hepatol*, 2023, 78(5): 998-1006.
- [24] Yuan R, Tao X, Liang S, *et al.* Protective effect of acidic polysaccharide from *Schisandra chinensis* on acute ethanol-induced liver injury through reducing CYP2E1-dependent oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2018, 99: 537-542.
- [25] Im D S. Pro-resolving effect of ginsenosides as an anti-inflammatory mechanism of *Panax ginseng* [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 444.
- [26] Fu J N, Wu H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [27] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 29.
- [28] 赵彦博, 李天浩, 马常阳, 等. 药食同源植物山茱萸活性成分提取、健康功效与应用研究进展 [J]. *食品科学*, 2024, 45(20): 2012-2023.
- [29] Kim M J, Bae G S, Jo I J, *et al.* Loganin protects against pancreatitis by inhibiting NF- κ B activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 765: 541-550.
- [30] Dong Y, Feng Z L, Chen H B, *et al.* *Corni Fructus*: a review of chemical constituents and pharmacological activities [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 34.
- [31] Sun X Y, Xue S J, Cui Y X, *et al.* Characterization and identification of chemical constituents in *Corni Fructus* and effect of storage using UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS [J]. *Food Res Int*, 2023, 164: 112330.
- [32] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [33] Yan M Z, Huo Y Z, Yin S T, *et al.* Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions [J]. *Redox Biol*, 2018, 17: 274-283.

[责任编辑 罗 曦]