

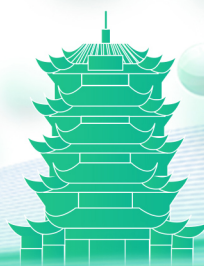


中华中医药学会 中药毒理学与安全性研究分会2024年学术年会

促进学科融合，传承创新，推动中药毒理学发展

论文集

2024年10月26日-28日
中国·武汉



目 录

基于溃疡性结肠炎雷公藤多苷调控 S100A8 抑制 TLR4/NF- κ B 通路研究	(1)
赵旦娅, 钦丹萍	
人参总皂苷对急性缺氧所致大鼠心肌损伤的保护作用	(17)
罗凯, 杨军, 王仁杰, 钱庆元, 马舒禾, 王宇光, 高月, 李茂星	
基于 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 信号通路癫痫清含药血清对小胶质细胞铁死亡的影响	(29)
王籍贤, 齐越, 黄培池, 夏春鹏, 范广坤	
含砷中药复方减毒配伍研究进展及砷体内命运关键影响因素探讨	(49)
曾慧敏, 江珍红, 史云霞, 杨建豪, 黄凯峰, 伍振辉, 杨明, 徐焕华, 高月	
苯甲酰芍药苷抑制铁死亡的抗溃疡性结肠炎机制研究	(68)
李林慧, 罗小芬, 孙琛, 汤洋, 唐菲, 黄冬琴, 李玲, 谭洋	
“有故无殒”理论的现代诠释	(78)
乔世杰, 付超, 唐文, 王章林, 王志斌, 韩海瑞, 童康, 王洋, 李灿东	
民族药药效学与安全性研究	(88)
张泰源, 张青兰, 王政, 王兴桂	
白屈菜生物碱毒理学及安全性研究进展	(97)
陈文婷, 洪传彬, 牛凯琦, 律广富, 王雨辰, 张红印, 王恩鹏, 黄晓巍, 辛国	
机器学习在反药组合研究中的应用现状与思忖	(105)
陈俞含, 张渝曼, 刘兆兰	
从栀子的效-毒双向作用论合理用药与科学监管	(121)
崔爽, 田婧卓, 梁爱华	
马兜铃酸的靶向分离和多成分定量分析新方法研究进展	(138)
闵心怡, 赵奕, 赵翔宇, 饶艳敏, 陈亨业, 付海燕, 兰薇	
雷公藤复方配伍减轻肝损伤的机制研究	(157)
周玲玲, 周学平, 朱华旭, 冯哲, 谢彤	
栽培模式与生长年限对黄连生长发育和产量形成的影响研究	(163)
陈玉欣, 李瑶瑶, 韩黎, 班小泉, 周高, 王有为	
中药毒代动力学研究进展	(174)
张 洵, 闫赋琴, 徐风华	
云南土沉香不同部位提取物中多酚类成分含量测定	(182)
宋娜丽, 夏海梅, 何婧, 张菊, 李婧怡, 赵霞	
基于数据挖掘的白鲜皮毒性特点分析	(192)
胡珂璇, 宋亚刚, 齐玉璞, 武香香, 苗明三	

- 大数据视域下的方剂中药功效统一分类体系构建研究 (209)
李可千, 张美微, 朱彦, 姚克宇
- 基于费式弧菌快速检测吴茱萸配伍减毒趋势及成分结构相识性和虚拟筛选机制
研究 (236)
张程, 李伊娜, 黄颖, 于文润, 王晓强, 孔澳, 王宇光, 高月
- Toxicological safety evaluation of diallyl trisulfide through acute and subacute
toxicity studies in ICR mice (254)**
Zhenhui Wu, Bodan Tu, Shubei Li, Junru Chen, Pan Shen, Wei Zhou, Chunyu Cao, Zengchun Ma,
Xianglin Tang, Chengrong Xiao, Yihao Wang, Yue Gao
- A characterized ethanol extract of Rosa rugosa inhibits hepatic stellate cell
activation through elevating Hint1 and subsequent upregulation of Smad7 .. (257)**
Zhiyong Zheng, Yecheng Lei, Tiantian Zhang , Hui Sun , Chuo Wang , Anning Song ,
Xukun Deng, Guangwen Shu
- Ellagic acid protect against the cytotoxic effects of aristolochic acid I on human
renal tubular epithelial cells (258)**
Shanshan Zheng, Xiao Lei, Qian Fu, Arslan Yusufu, Hui Sui, Xukun Deng, Guangwen Shu
- To explore the mechanism of action of Sishen Pill in the treatment of
colitis-associated colorectal cancer based on intestinal flora (259)**
Zhao Lina, Li Jing, Liu Mingyu, Xu Zhili
- Limonin relieves TGF- β -induced hepatocyte EMT and hepatic stellate
cellactivation *in vitro* and CCl₄-induced liver fibrosis in mice via upregulating
Smad7 and subsequent suppression of TGF- β /Smad cascade (261)**
Zhili Yao, Chenxi Dai, Arslan Yusuf, Hui Sun,Xiao Lei,Tiantian Zhang, Xukun Deng,
Guangwen Shu
- Protective Effect of Ellagic Acid on Aristolochic Acid I-Induced Acute Kidney
Injury in Mice..... (262)**
Yanglu Song, Hui Sun, Qian Fu, Chenxi Dai, Arslan Yusufu, Guangwen Shu, Xukun Deng
- Ellagic acid affects TGF- β -induced EMT in AML-12 cells by regulating Nrf2 and
NLRP3 pathways (264)**
Anning Song, Tiantian Zhang, Jing Liu, Xiao Lei, Chuo Wang, Xukun Deng, Guangwen Shu
- The effect of novel angiotensin II receptor antagonist TSST on arterial blood
pressure and tension of the isolated thoracic aortic ring in rabbits (265)**
李晶, 赵李娜, 刘铭雨, 徐志立
- Theaflavine inhibits hepatic stellate cell activation through modulating**

PKA/LKB1/AMPK/GSK3β cascade and subsequent enhancement of Nrf2 signaling	(266)
Qi Deng, Hui Sun, Tiantian Zhang, Anqi Zhu, Xiao Lei, Chuo Wang, Xukun Deng, Guangwen Shu	
Pharmacokinetic studies of alkamides, a pair of cis-trans isomers	
<i>N</i>-isobutyl-2<i>E</i>,4<i>E</i>,8<i>Z</i>,10<i>E</i>/<i>Z</i>-dodecatetraenamide, from Asari Radix et Rhizoma by UHPLC-MS/MS.....	(268)
Fujie Cai, Hanxue Wang, Qi Xie, Zhejun Xie, Zedong Xiang, Rui Dang, Wenkang Liu, Huida Guan, Xuemei Cheng, Changhong Wang	
Human UDP-glucuronosyltransferase 1As catalyze Aristolochic acid D	
<i>O</i>-glucuronidation to form a lesser nephrotoxic glucuronide	(272)
Dong-Zhu Tu, Guang-Bo Ge	
Characterization of alkaloids and metabolites in rat plasma and tissues after oral administration of Zuojin Pill using UHPLC-Q-TOF-MS	(275)
Ze-dong Xiang, Chang-hong Wang	
Cigarette smoke up-regulates thromboxane A₂ receptor in rat mesenteric artery via AMPK/SIRT1 and MAPK/NF-κB pathways.....	(278)
Qian Li, Yumeng Chen, Xuyan Wang, Xinya Xu Jiping Liu, Bin Wang, Chuan Wang	
Hepatocyte oncosis induced by Sophoraflavanone G through calcium overload and its preventive strategies	(279)
Jing Liu, Congwei Wang, Yuruo Gong, Han Li, Mingzhong Jiang, Xinzhou Yang, Xiaojun Li	
Resveratrol restores palmitic acid induced lipid accumulation in HepG2 by acetylation-mediated lipophagy	(281)
Kaihong Zhao, Bai Xue, Qiuyue Liao, Haiyang Zhao, Liangwei Li, Xinrui He, Xiaojun Li	
基于双疾病联合生信分析的黄独素 B 毒效双重作用及机制研究	(283)
赵金全, 李会军	
基于分子自组装理论探讨中药药效及毒性物质基础的研究进展	(286)
郑宝鑫, 梁爱华	
分子印迹聚合物在中药减毒/安全性方面的研究进展	(288)
郑宝鑫, 梁爱华	
补肾活血颗粒对帕金森病小胶质细胞免疫调节的作用机制研究	(290)
王鹏, 耿小涵, 陈琦, 李绍旦, 杨明会	
喜炎平注射液安全性实验研究	(293)
易艳, 李春英, 张宇实, 赵雍, 王连媚, 潘辰, 田婧卓, 韩佳寅, 刘素彦, 梁爱华	

综合 Meta 分析、网络药理学和分子对接的百蕊颗粒治疗肺炎分子机制研究	(295)
彭静, 刘林慧, 高萍, 余学钊, 李巧玲	
中药毒性认知创新与安全精准用药	(297)
柏兆方, 湛小燕, 王伽伯, 肖小河	
整合表观遗传学、蛋白质组学和代谢组学揭示冬凌草甲素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导的生殖毒性	(298)
高昕月, 林溢凡, 张健, 陈梦婷, 温嘉欣, 吴亚娇, 吴齐斌, 朱安	
五味子甲素调控 PI3K/AKT 信号通路对结直肠癌的治疗作用	(300)
刘铭雨, 赵李娜, 李晶, 李子悦, 许晴, 徐志立	
基于网络毒理学及分子垂钓技术的天山假狼毒肝毒性物质基础及机制研究	(301)
蒙湘, 黄先莉	
马兜铃酸与肝癌相关性及其低丰度马兜铃酸 I 相关中药的安全性研究	(303)
李承贤, 方志斌, 王寅康, 赵旭, 王伽伯, 柏兆方, 肖小河	
基于效应靶标互作的中药配伍减毒新策略—以白芍配伍补骨脂为例	(308)
许颖杰	
基于网络药理学、分子对接以及体内外实验探究清肺除湿颗粒治疗痤疮机制	(310)
孟煜, 台宗光, 陈中建, 朱全刚	
基于毒性测试新技术方法的中药“客观识毒-科学控毒-精准用毒”安全性研究	(312)
李遇伯, 许妍妍, 魏金霞, 王玉明, 范思邈	
基于“肝病血致”探索吡咯里西啶生物碱致肝窦阻塞综合征的发病机制	(313)
贺益盛, 宋子敬, 马江, 林鸽	
CYP1A2 在补骨脂致肝损伤中的作用及机制研究	(315)
张彩, 魏渊	
基于血清毒理学的箭叶淫羊藿致肝毒性研究	(316)
董雨桐, 邱丽珍, 龙姜洁, 呼延皓冉, 周昆	
脑-肝相互作用在中药肝毒性的研究进展	(317)
杨春启, 王宇光, 高月	
细辛水煎液及其主要马兜铃酸类成分对小鼠的长期毒性研究	(319)
王连喆, 刘美婷, 赵雍, 易艳, 李春英, 田婧卓, 柳辰玥, 梁爱华	
黄连素联合光动力学疗法对红色毛癣菌抑制作用研究	(321)
吴晓梅, 陈春林	

阿魏酸脂质体纳米颗粒的非临床急性毒性研究及阿魏酸的网络药理学分析 (323)	黄浩, 轩艳, 马增春
用于高通量筛选潜在肺纤维化毒性药物的 PPAR γ 响应荧光素酶报告系统的构建与应用 (324)	林学洋, 杨屹, 王永安, 骆媛
基于生物活性的法半夏品质评价 (325)	龙熠, 邓军, 丑凌芸, 蒙湘, 雷雨晨, 黄先菊
基于网络药理学及实验验证探讨马鞭草治疗药物性肝损伤的作用机制 (327)	陈金香, 李汉伟, 宋亚刚, 朱平生, 苗明三, 乔靖怡
亚油酸纳米乳的口服吸收及其对急性肺损伤的作用机制研究 (329)	廖秋月, 朱红霞, 刘雅楠, 赵凯洪, 张志姍, 张炜, 李小军
泽泻改善胆管结扎致小鼠肝纤维化的药效与机制研究 (331)	董跨, 张祎, 唐莹莹, 王汎江, 余婷, 丁丽丽, 熊爱珍, 谷丽华, 杨莉, 王峥涛
基于人源化 UGT1A4 小鼠模型的泽泻三萜 AB23A 降低千里光碱肝毒性的研究 (333)	王金圆, 张兆兰, 贾夏丽, 陈岩, 丁丽丽, 董跨, 熊爱珍, 王长虹, 杨莉, 王峥涛
葡萄糖醛酸化胆汁酸分析方法的建立及其在吡咯里西啶生物碱毒性评价中的应用 (334)	王金圆, 黄幼媚, 张兆兰, 唐莹莹, 丁丽丽, 熊爱珍, 杨莉, 王峥涛
高原气虚血瘀证动物模型研究进展 (335)	王智星, 黄丽郡, 沈宝英, 赖成材, 高月
仙茅的化学成分、药理及毒理研究进展 (336)	孟晶, 梁爱华
高原气虚证动物模型研究进展 (338)	黄丽郡, 王智星, 沈宝英, 赖成材, 高月
獐芽菜对皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护效应 (340)	丑凌芸, 盛望龙, 龙熠, 蒙湘, 雷雨晨, 黄先菊
微流控精密肝切片体系与静态精密肝切片体系在肝细胞功能、形态和代谢能力的比较研究 (342)	杨云, 林嘉伟, 夏冰, 宫平, 齐莹, 刘婷, 杨依靠
三种胆红素检测方法在中药色素干扰下的血清样本中的准确性评价 (344)	张海静, 夏冰, 赵春晖, 张国壮, 吴哲, 刘婷
养胃安神方对高原失眠大鼠的催眠作用及机制研究 (345)	李芳, 张娴颢, 叶岸平, 马增春, 高月

从 PKM2 调控自噬探讨“金钱草杀雷公藤毒”的相杀减毒作用	(347)
宋玲玲, 王君明, 纪丽婕, 张月月, 巫晓慧, 张天柱, 杜晨杰, 何庆文	
西洋参提取物对多柔比星所致心脏损伤的作用机制研究	(349)
鲍会云, 张浩, 丁小云, 王虎, 李婷婷, 黄思, 徐立雯, 汤喜兰	
小鼠不同肺炎模型的建立及比较研究	(351)
岳星男, 韩佳寅, 潘辰, 张宇实, 赵雍, 张晓萌, 吴静雯, 唐璇, 梁爱华	
植物精油干预肥胖作用研究进展	(353)
吴凤玲, 李清, 周姗姗, 黄小英, 梁新丽, 杨明, 董伟	
淫羊藿苷对肿瘤微环境巨噬细胞极化表型的影响及抗乳腺癌转移作用研究	(354)
申培博, 倪英倩, 柳荷, 韩秀珍	
栀子引起肝脏毒性的生物标志物研究	(355)
田婧卓, 崔爽, 赵雍, 王连媚, 柳辰玥, 梁爱华	
基于家兔模型的华蟾素注射液及其四种成分的血管刺激性研究	(356)
张晓萌, 韩佳寅, 潘辰, 唐璇, 岳星男, 李春英, 易艳, 赵雍, 刘素彦, 张宇实	
补骨脂孕期给药肾毒性研究	(357)
柳辰玥, 田婧卓, 刘素彦, 韩佳寅, 张宇实, 潘辰, 王连媚, 孟晶, 王星文, 马琳, 梁爱华	

基于溃疡性结肠炎雷公藤多苷调控 S100A8 抑制

TLR4/NF- κ B 通路研究

赵旦娅¹, 钦丹萍²

(1 浙江中医药大学第一临床医学院, 杭州 310053; 2 浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006;)

[摘要] 研究目的: 筛选溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的核心基因, 研究雷公藤多苷 (Tripterygium wilfordii polycoride, TWP) 治疗 UC 的作用机制。
材料与方法: 本研究分为三项内容, 首先构建 TNBS/乙醇构建 UC 大鼠模型, 基于 Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 芯片, 对大鼠结肠进行表达谱芯片检测以筛选与 UC 炎症及 TWP 治疗均相关的核心基因-S100A8, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 分析发现 S100A8 与 TLR4/NF- κ B 通路高度相关, 随后通过体内实验评估 TWP 的药效及对 S100A8 的影响, 利用表面等离子共振技术 (SPR) 分析 S100A8 与 TWP 的结合力。随后体外实验通过 TWP 干预 LPS 诱导 THP-1 细胞炎症, qRT-PCR、蛋白质印迹法、免疫荧光等方法检测 S100A8 与 TLR4/NF- κ B 通路、末端炎症因子表达, 研究 TWP 的作用机制; 并以 LPS、人 S100A8 重组蛋白 (rhS100A8)、TLR4 抑制剂 (TAK-242) 刺激 THP-1 细胞, 验证 S100A8 与 TLR4/NF- κ B 通路的关系。最后, 通过质谱分析 TWP 活性成分, 为 TWP 调控 S100A8 可能的活性成分研究奠定基础。**结果:** 基因芯片分析发现, S100a8 在 UC 大鼠模型组升高 143 倍, TWP 治疗后, S100a8 表达下降 148 倍。体内实验显示 TWP 能减少 S100A8 结肠浸润, 降低 DAI 评分, 减轻组织病理学减轻, 显著缓解结肠炎症活动。SPR 显示 TWP 与 S100A8 有较好的结合力。体外实验进一步说明 TWP 降低 THP-1 炎症反应中 S100A8 表达及 TLR4/NF- κ B 通路激活, 减少 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 等末端炎症因子表达, 增加 *IL-10*、*TGF- β* mRNA 等抗炎因子表达。体外实验也验证了 rhS100A8 增加 TLR4/NF- κ B 通路关键节点及末端炎症因子表达, TAK-242 抑制 TLR4 活性后, 下游通路及炎症因子表达均下降。质谱分析 TWP 中富含多种活性成分, 相对含量较多的是雷公藤碱戊、雷公藤定宁 A、雷公藤春碱、雷公藤红素等活性成分。**结论:** S100A8 是 UC 炎症的核心基因, 其调控作用与 TLR4 相关; TWP 通过调控 S100A8, 进而抑制 TLR4 信号通路, 缓解 UC 肠道炎症反应; TWP 具有多种活性成分, 进一步确定与 S100A8 结合成分与结合位点是今后深化研究的方向。

[关键词] 溃疡性结肠炎, 雷公藤多苷, S100A8, TLR4/NF- κ B 通路

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 属于自身免疫性疾病, 发病率在全球范围内逐年增加。目前药物干预是治疗 UC 的主要方法, 一线药物包括 5-氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫调节剂和生物制剂, 但临床应用均存在疗效的局限性及副反应对药物应用的限制性, 因此, 研究其它有效药物已成为新的热点。

雷公藤多苷(Tripterygium wilfordii polycoride, TWP)是从卫矛科植物雷公藤中提取精制的中药制剂, 具有抗炎免疫调节功效^[3], 我们将其用于临床 IBD 患者的治疗, 发现其免疫调控作用能缓解 IBD 疾病的炎症活动^[4]。我们进一步发现 TWP 能抑制 TLR4 信号通路、p38 MAPK 信号通路, 下调炎症因子表达, 改善 UC 大鼠肠道病变, 抗炎效果与剂量呈正比^[10]。

炎症期间的内源性损伤相关分子模式 (Damage associated molecular patterns, DAMPs) 近年来备受关注, S100 蛋白属于 DAMPs 的主要成员, 在组织损伤期间释放并与先天免疫细胞上的模式识别受体结合, 引发炎症反应^[6]。目前已明确 S100A8 与免疫炎症有关, 但 S100A8 的致炎特点以及 TWP 对其的调控作用仍不明确, 因此开展本项研究。

一、材料与方法:

首先本研究构建 TNBS/乙醇 UC 大鼠模型, 对其进行结肠表达谱芯片检测, 筛选与 UC 炎症及 TWP 治疗均相关的靶基因, 明确 S100a8 的表达, 在体内实验中评估 TWP 的药效及对 S100A8 的影响, 再通过表面等离子技术 (SPR) 对 TWP 与 S100A8 进行结合力分析。随后体外实验进一步研究 TWP 对 S100A8、TLR4/NF- κ B 通路的作用; 体外实验验证 S100A8 与 TLR4/NF- κ B 通路的关系。最后通过质谱鉴定 TWP 可能的活性成分。

1.TWP 对 UC 大鼠肠道炎症及相关靶基因作用

该实验方案由浙江中医药大学动物伦理委员会批准。将 90 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组, 分别为正常对照组、模型对照组、AZA 组、TWP 低剂量组、TWP 中剂量组、TWP 高剂量组, 每组 15 只。适应性喂养 1 周, 使体重达到 (200 \pm 20) g。禁食 24 h, 10%水合氯醛 3 ml/kg 腹腔麻醉后, 将石蜡油润滑过的深静脉置管由肛门缓慢插入结肠约 8 cm 处, 模型组和药物组按每只大鼠 0.002 ml/g 15% TNBS+0.25 ml 50%乙醇进行灌肠, 正常对照组按 0.002 ml/g 生理盐水+0.25 ml 生理盐水进行灌肠, 灌肠结束加推 0.3 ml 空气, 用棉签堵住大鼠肛门, 轻柔大鼠

腹部 1 min 并倒置 5 min，造模结束后将大鼠平放，自然清醒后常规饮食。造模 3 d 后建立大鼠 UC 模型。

正常对照组、模型对照组：给予 0.01ml/g 生理盐水灌胃；AZA 组：将 AZA 研成细末后加生理盐水制成混悬液，以 0.01 ml/g 的灌胃量灌胃；TWP 低、中、高剂量组：将 TWP 研成细末，在细末中加生理盐水制成混悬液，按 3 组大鼠以 TWP 3、6、12 mg/kg 的剂量分别制成每毫升含有 0.3、0.6、1.2 mg TWP 混悬液，以 0.01 ml/g 的灌胃量灌胃。以上药物每天 1 次，连续 14 d。末次给药 24 h 后，处死大鼠，除正常对照组外，均留取病变最明显处结肠组织标本进行相关检测。

1.1 组织炎症与表达谱芯片检测

1.1.1 表达谱芯片分析平台

本研究利用 Affymetrix 开发的 Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 芯片，进行大鼠结肠转录组分析。此芯片包含了大鼠基因组 31000 个 probe sets，代表 28000 个明晰的大鼠基因。其芯片数据库来源于 GenBank, dbEST, RefSeq 等权威数据库，并且探针序列经过与贝勒医学院公布的大鼠基因组组装草图 (2002) 比对分析而精炼。

1.1.2 差异基因筛选及富集分析

前期研究发现，UC 大鼠模型中，TWP 高剂量组抗炎效果优于低、中剂量组^[10]，故本研究选择 TWP 高剂量组进行后续检测。在正常对照组、模型组、TWP 高剂量组中各选取 3 只大鼠进行结肠表达谱芯片检测，使用 Gene Spring Software 11.0 将原始数据归一化处理，通过 limma 包对正常对照组、模型组、TWP 高剂量组的表达谱芯片数据进行差异分析，筛选标准为 pvalues 小于 0.05，foldchange 大于等于 2，小于等于 0.5，筛选出差异基因 (DEGs)。基于 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 中的 Ingenuity® Knowledge Base 数据库对 DEGs 进行功能富集分析。

1.1.3 组织学评估

麻醉前称量所有大鼠，解剖后迅速收集整个结肠，测量结肠总长度和体重。取结肠远端组织进行病理组织检查。用 PBS 洗涤组织，4%多聚甲醛室温固定 24 小时。石蜡包埋后，通过切片机切割 4μm 厚的切片，用苏木精-伊红 (H&E) (Biosharp, Hefei, China) 染色以进行病理组织学分析。

1.1.4 免疫组化

免疫组化试剂盒及 DAB 底物试剂盒购自中山金桥生物技术有限公司（中国北京）。将大鼠结肠组织用石蜡包埋后切成厚约 4 μ m 的薄片后，先后使用二甲苯及乙醇进行脱蜡水化，将切片置于 TRIS-EDTA（PH 9.0）抗原修复液中，微波炉中加热进行抗原修复，滴加内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 分钟，0.3%Triton 透化 15 分钟，5%BSA 封闭 1 小时，将切片与 S100A8 抗体（爱必信，中国上海，1:100）在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 中洗涤三次后，用过氧化物酶偶联的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。DAB 室温孵育 10，最后用苏木精复染。用奥林巴斯 VS120 显微镜(VS120-S6-W)拍摄，通过 Image J 分析免疫组化结果。

2.表面等离子共振技术（Surface Plasmon Resonance, SPR）

采用直接法，利用 Biacore T200（GE Healthcare）将蛋白 S100A8 直接固定在 NTA 芯片（GE Healthcare）上，即：先用 running buffer（10mM PBS, pH7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl）将 S100A8 稀释到 50ug/ml，然后利用捕获的方法将其固定在 NTA 芯片上，然后再用氨基偶联（GE Healthcare）将其化学偶联，偶联量约 3600RU。TWP 先用 100%DMSO 溶解，然后再用 running buffer 将其稀释到一定浓度浓度梯度，再分别检测不同浓度的 TWP 与蛋白 S100A8 的结合，最终的数据用 Biacore evaluation software 3.0 按 1: 1 模型进行 kinetics 或 affinity 拟合分析。

3.TWP 调控 S100A8 致炎作用

3.1 细胞培养及干预

THP-1 细胞购自 ATCC，已进行 STR 鉴定及支原体检测。使用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养，培养时常规使用支原体清除剂（雅酶，中国），处于指数增殖期的细胞用于实验。根据实验分组，给予 LPS、TWP、AZA、rhS100A8 干预细胞。

3.2 CCK-8 实验

通过 Cell Counting Kit-8（CCK8, WST-8, Dojindo, 日本）测定细胞活力。将细胞在 100 μ L 培养基中以 30 \times 10⁴/ml 的密度接种并培养到 96 孔（Corning, USA）中，用不同浓度的 TWP（0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20 μ g/mL）、LPS（1 ug/ml）、rhS100A8（1ug/ml）处理细胞，4h/8h 后每孔加入 10 μ L CCK-8

试剂后继续培养 2 h。使用多模式酶标仪 (PerkinElmer, EnSpire, 新加坡) 在 450 nm 处分析吸光度, 没有细胞的孔作为空白孔, 细胞的增殖以吸光度表示。所有实验重复 3 次进行。

3.3 提取总 RNA 以及 qRT-PCR 检测

将细胞离心后收集细胞沉淀, 用 TRIzol 试剂分离总 RNA, 微量核酸蛋白分析仪 (Nanodrop one) 测定 RNA 浓度, 使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo science) 逆转录成 cDNA。使用 PowerUp SYBR Green Reagent (Thermo science) 通过荧光定量 PCR 仪 (Rohce, lightcycler 480II) 进行 qRT-PCR 检测。基因 (mRNA) 使用 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 方法计算相对表达水平。用于 RT-PCR 的引物序列如表 1 所示。

表 1. Primers for qRT-PCR

Gene	Primer sequences
<i>h-S100A8</i>	Forward 5'-TTGCTAGAGACCGAGTGTCTCCTCAG-3' Reverse 5'-GCCACGCCCATCTTTATCACCAG-3'
<i>h-TNF-α</i>	Forward 5'-AGCCCTGGTATGAGCCCATCTATC-3' Reverse 5'-TCCCAAAGTAGACCTGCCCAGAC-3'
<i>h-IL-1β</i>	Forward 5'-GGACAGGATATGGAGCAACAAGTGG-3' Reverse 5'-TCATCTTTCAACACGCAGGACAGG-3'
<i>h-IFN-γ</i>	Forward 5'-CTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGC-3' Reverse 5'-CGACCTCGAAACAGCATCTGACTC-3'
<i>h-TLR4</i>	Forward 5'-ACCTGATGCTTCTTGCTGGC-3' Reverse 5'-GAGCTGAAATGGAGGCACCC-3'
<i>h-MyD88</i>	Forward 5'-TCTTGAACGTGCGGACACAG-3' Reverse 5'-TGTGTCTCCAGTTGCCGGAT-3'
<i>h-NF-κB</i>	Forward 5'-TATTTGAAACACTGGAAGCACG-3' Reverse 5'-CCGGAAGAAAAGCTGTAAACAT-3'
<i>h-TRAF6</i>	Forward 5'-GCACGCCACCTACAAGAGAACAC-3' Reverse 5'-CCAGAGTCGGGTATAACGCTCAAAC-3'
<i>h-TBK1</i>	Forward 5'-CCAGTCTTCAGGATATCGACAGCAG-3' Reverse 5'-TTCGGATGAGTGCCTTCTTGATGTG-3'
<i>h-TRAM</i>	Forward 5'-TCCTGCCCTCTTTCTCTCTTGG-3' Reverse 5'-CCCCTCTGTTGTATTGCTGTGCTC-3'
<i>h-β-actin</i>	Forward 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3' Reverse 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'

3.4 蛋白免疫印迹实验

使用含有 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 缓冲液 (Beyotime, Shanghai, China) 提取细胞中总蛋白质, 使用 BCA 试剂盒 (Biosharp, Hefei, China) 进行定量。蛋白质条带通过 SDS-PAGE 分离, 转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore, USA) 上。转膜结束后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1h, 用 TBST 洗三次, 每次 5 分钟, 按照不同抗体要求的稀释比在 4°C 下孵育过夜。TBST 洗涤三次后, 将膜与辣根过氧化物酶偶联二抗在室温下孵育 1 小时, 最后使用 ECL 增强化学发光 (BioSharp, Hefei, China) 进行曝光, 用 ImageJ 软件进行灰度值分析。不同抗体的稀释比为: TLR4 (santacruz, USA, 1:1000), MyD88 (Abcam, USA, 1:3000), TRAF6 (CST, USA, 1:1000), TRAM (Abcam, USA, 1:2000), TBK1 (CST, USA, 1:1000); NF- κ B p65 (Abcam, USA, 1:5000), p NF- κ B p65 (CST, USA, 1:1000); S100A8 (Abcam, USA, 1:1000), GAPDH (Affinity, China, 1:5000)

3.5 细胞免疫荧光

将细胞接种至 24 孔板, 按照分组情况处理后, 收集细胞, 500ul PBS 重悬, 甩片机将细胞甩至载玻片上, 每张片子 5-7 万个细胞。4% 多聚甲醛固定 30 分钟, 0.3% triton 透化 30 分钟 (染色 TLR4 时不用透化), 5% BSA 室温封闭 30 分钟。用 TLR4 抗体 (1:100, Santa Cruz, USA)、S100A8 抗体 (1:100, Santa Cruz, USA)、NF- κ B p65 抗体 (1:100, Santa Cruz, USA) 4°C 孵育过夜, 山羊抗兔 IgG 二抗 Alex Fluor 594 (1:500, HuaBio, 杭州, 中国) 室温孵育 2h, 孵育结束后用 PBS 洗片 3 次, 每次 5 分钟, 自然风干后, 使用抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI) (Absin, 上海, 中国) 封片。通过免疫荧光显微镜 (Olympus IX51, Olympus Corp, Tokyo, Japan) 进行成像, 每组至少取 3 个视野, 使用 ImageJ 软件对荧光强度进行量化。

4. TWP 样品制备及 UPLC-Q-TOF-MS 条件

取 TWP 样品 1.0 g, 加入乙酸乙酯 30ml, 超声 30min 后旋干, 残渣加入 10 ml 甲醇摇匀, 取 2 ml 液体离心 5 分钟, 取上清液。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1×150 mm, 1.8 μ m), 柱温 30°C, 进样体积 2 μ L, 流速为 0.3 mL/min, 检测波长: 190~400 nm, 流动相比比例: A 相乙腈, B 相 0.1% 甲酸水溶液, 梯度见表 1。设定 ESI-Negative/Positive ion mode 为质谱检测模式。最后根据测定的峰面积可推测活性成分的相对含量, 根据峰面积从大到小进行排序, 选择排名前

10 的活性成分进行展示。

表 2 流动相梯度

Time (min)	A%	B%
0~4	10~22	90~78
4~48	22~40	78~60
48~91	40~95	60~5
91~95	95	5
95~95.1	95~10	5~90
95.1~98	10	90

5.统计方法

数据表示用算术平均值 \pm 平均值的标准误差 (SEM) 表示。使用 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, USA) 分析数据, 通过单因素方差分析 (ANOVA) 评估组间统计学上的显著差异, 使用 Tukey 的进行显著差异检验, $P < 0.05$ 表示有显著差异。

二、实验结果:

(一) S100a8 在 UC 大鼠肠道炎症高表达, TWP 显著抑制其表达

1.表达谱芯片分析发现 S100a8 是 UC 炎症及 TWP 治疗均相关的核心基因

我们对模型组与 TWP 高剂量组各自上调及下调的前 10 个差异基因绘制热图 (Figure 1A), 并筛选出两组数据后交集的 2077 个 DEGs (Figure 1B), 经 IPA 分析后, 挑选高期望值 (Exp.Value) 的基因倍数进行倍数绘图 (Figure 1C), 发现 *S100a8*、*Spink3*、*Pyy*、*Gcg*、*Fabp1*、*SLC12A8*、*Prok2* 等基因在模型组和 TWP 高剂量组中均剧烈波动, 但现有文献未发现 *Spink3*、*Pyy*、*Gcg*、*Fabp1*、*Slc12a8*、*Prok2* 与 UC 有显著的生物学意义。而 S100A8 与 UC 的关系逐渐被认知, 研究发现 S100A8 能激活 NF- κ B 通路参与 UC 炎症^[6], S100A8 的异二聚体又被称为钙卫蛋白, 是炎症性肠病的诊断标志物, 与 UC 有显著的生物学意义。*S100a8* 在模型组中表达较正常组上升 143 倍, 经 TWP 干预后, *S100a8* 的表达量随之下降 148 倍, 并且在炎症环境中 TWP 的干预使得 *S100a8* 出现了不同方向的剧烈变化, 提示 S100A8 可能是 UC 炎症的核心基因, 而 TWP 对其具有明显的调控作用。

IPA 结果显示 (Figure 1D), DEGs 涉及多条炎症通路, 其中 NF- κ B 通路富集最为显著, 与 TLR 通路也有较高的相关性。已知 TLR4/NF- κ B 通路是 UC 的重要通路, 与该通路相关的基因很有可能是疾病的核心基因。因此表达谱芯片分

析提示 S100A8 与 TLR4/NF- κ B 通路致炎很可能具有相关性。

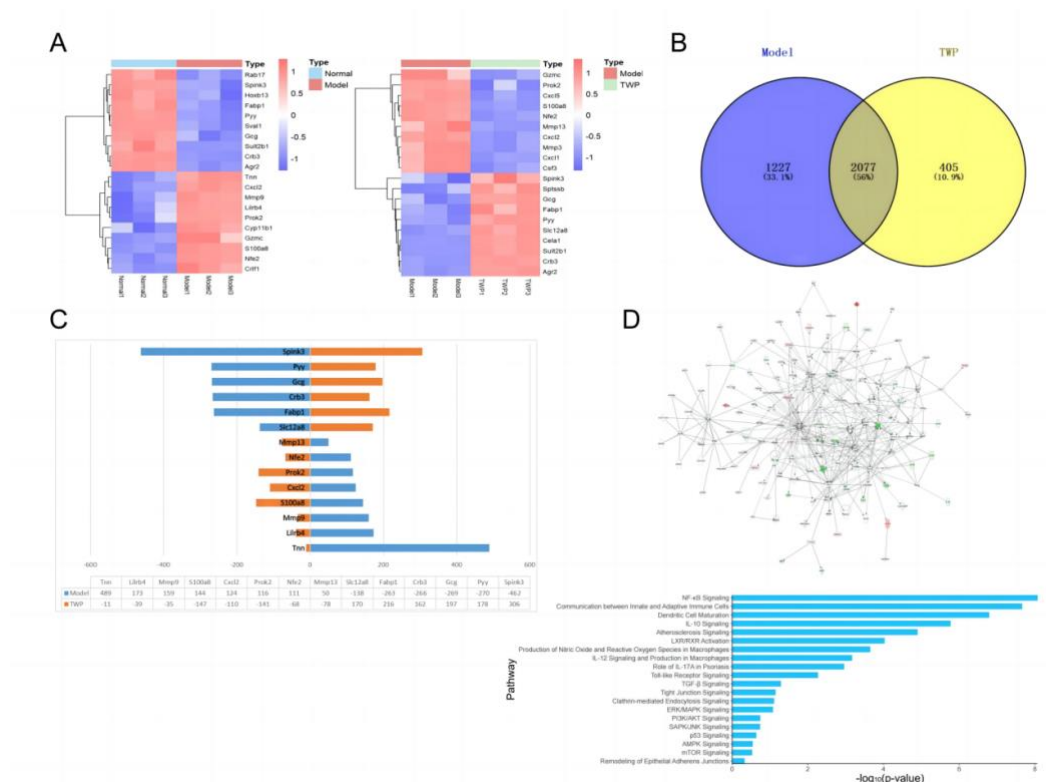


Figure 1.(A)正常对照组 vs 模型组和模型组 vs TWP 高剂量组差异倍数 TOP 10 基因热图；(B) 两组差异基因取交集的韦恩图；(C) 部分基因在各组中的差异倍数；(D) DEGs 的 IPA 分析。横坐标为通路富集的显著性水平 P 值取 $-\log_{10}$ 通路，纵坐标为通路名字，数值越高越显著。

2.TWP 降低结肠炎症 S100A8 表达，减轻 UC 大鼠肠道炎症活动，

实验结果显示，TWP 缓解 UC 大鼠体重下降 (Figure 2A) 和结肠长度缩短 (Figure 2B),降低疾病活动指数 (DAI) (Figure 2C)；TWP 治疗减轻 UC 大鼠的结肠组织损伤，减少结肠中炎性细胞浸润，改善隐窝损伤，TWP 高剂量组、AZA 组结肠炎症评分均低于模型对照组 (Figure 2D)。

为了研究 TWP 在体内对 S100A8 的调节作用，免疫组化对 UC 大鼠结肠中 S100A8 进行观测。实验结果显示，S100A8 在 TNBS/乙醇诱导的 UC 大鼠结肠组织中显著上调，TWP 干预能有效减少 S100A8 表达，并呈现剂量依赖性 (Figure 2E)。

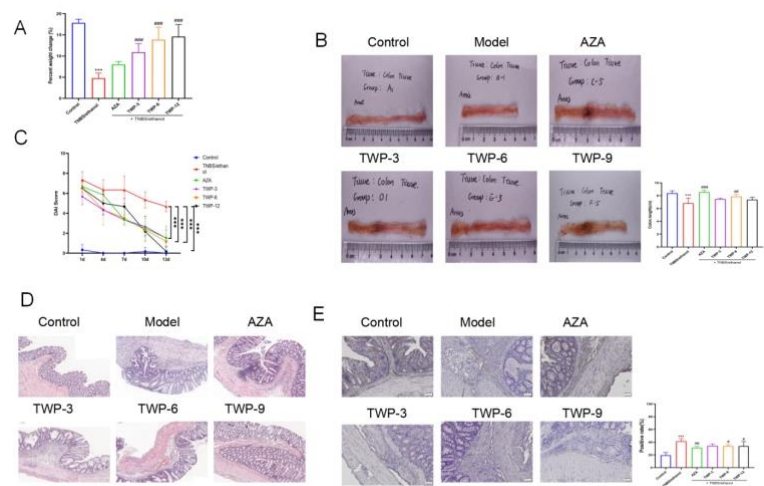


Figure 2. (A) UC 大鼠体重增长百分比；(B) 结肠长度分析；(C) DAI 评分变化；(D) 结肠 HE 染色（放大倍数：10X）；(E) 结肠 S100A8 免疫组化分析（放大倍数：10X）

3.SPR 分析 S100A8 与 TWP 的结合强度

体内实验显示 TWP 对 S100A8 有明显的调控作用，为了解 TWP 与 S100A8 的结合状况，我们进一步应用 SPR 技术分析 TWP 中与 S100A8 蛋白结合强度（Figure 3）。结果显示 S100A8 与 TWP 之间的结合呈现明显的浓度依赖，KD 为 1.967uM，具有较好的结合力（表 3）。

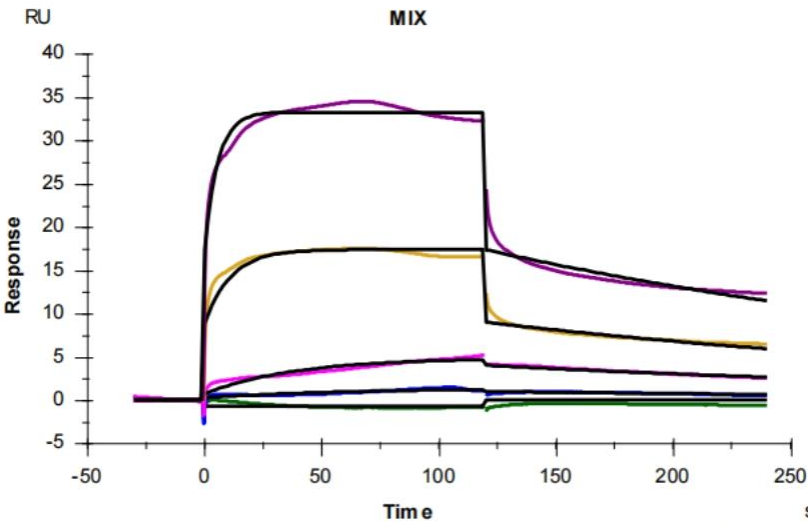


Figure 3. 蛋白 S100A8 与不同浓度 TWP 结合的 Biacore 传感图。（浓度从低到高依次为 6.25, 12.5, 25, 50, 100uM，其中彩色是实际检测线，黑色线是拟合线）

表 3 TWP 与 S100A8 表面等离子共振

Ligand	Analyte	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
S100A8	TWP	1777	0.003495	1.967E-6

(二) TWP 调控 *S100A8* 表达，抑制 TLR4/NF- κ B 通路的致炎作用

为了研究 TWP 的细胞毒性，分别用 0.313、0.625、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ TWP 处理 THP-1 单核细胞 8 小时，细胞活力 $>80\%$ 则判定为细胞毒性较小，可用于后续实验。结果表明，TWP 剂量在 5 $\mu\text{g/ml}$ 以下没有细胞毒性；随后 TWP 联合 LPS 干预 THP-1 单核细胞 8h，结果表明，两者联合干预时，TWP 剂量在 4 $\mu\text{g/ml}$ 以下细胞毒性较小 (Figure 4A)。故以此为条件，开展炎症的相关研究。

1. TWP 能降低 THP-1 细胞炎症时 *S100A8* 的表达水平

为研究 TWP 对 *S100A8* 的调控作用，将 THP-1 细胞用 LPS 预处理 1h 后，添加 TWP (1、2、4 $\mu\text{g/ml}$) 干预 8h，AZA 为阳性对照组，随后检测 *S100A8* mRNA、蛋白表达以及荧光强度。结果显示，LPS 干预 8h 后，*S100A8* mRNA (Figure 4B)、蛋白表达 (Figure 4C) 以及免疫荧光强度 (Figure 4D) 显著升高，TWP 干预后各项指标显著下降，并呈现剂量依赖性，说明 TWP 对 *S100A8* 有调控作用。

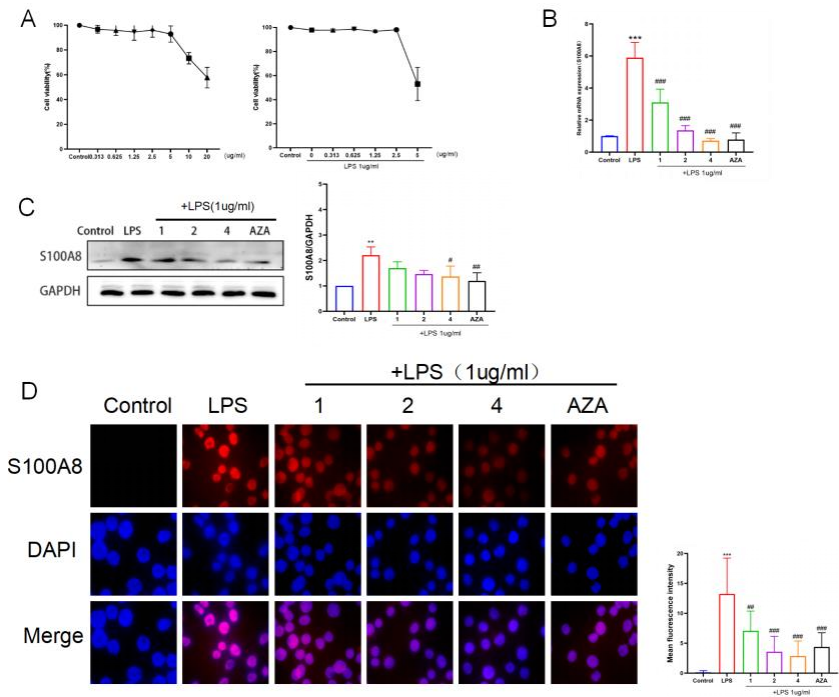


Figure 4. (A) TWP 单独干预 8h 对 THP-1 细胞活力的影响以及 TWP 联合 LPS 联合干预对 THP-1 细胞活力的影响；(B) LPS 刺激及 TWP、AZA 干预后 *S100A8* mRNA 表达；(C) *S100A8* 蛋白表达；(D) *S100A8* 免疫荧光强度 (放大倍数: 100X)
数据表示为三个独立实验的平均 \pm SD，与 Control 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与 LPS 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ 。

2.TWP 减弱 THP-1 细胞炎症时 TLR4 表达

为研究 TWP 的抗炎机制, qRT-PCR 检测 *TLR4* mRNA 表达, WB 检测 TLR4 蛋白表达水平, 免疫荧光检测 TLR4 荧光强度变化。结果显示, LPS 刺激 THP-1 单核细胞 8h 后, TLR4 mRNA、蛋白表达以及荧光强度均显著增加, 经 TWP 干预后, TLR4 mRNA (Figure 5A)、蛋白表达 (Figure 5B) 以及荧光强度 (Figure 5C) 均显著降低, 并且呈现剂量依赖性, 说明 TWP 能显著减弱 LPS 诱导的 TLR4 活化。

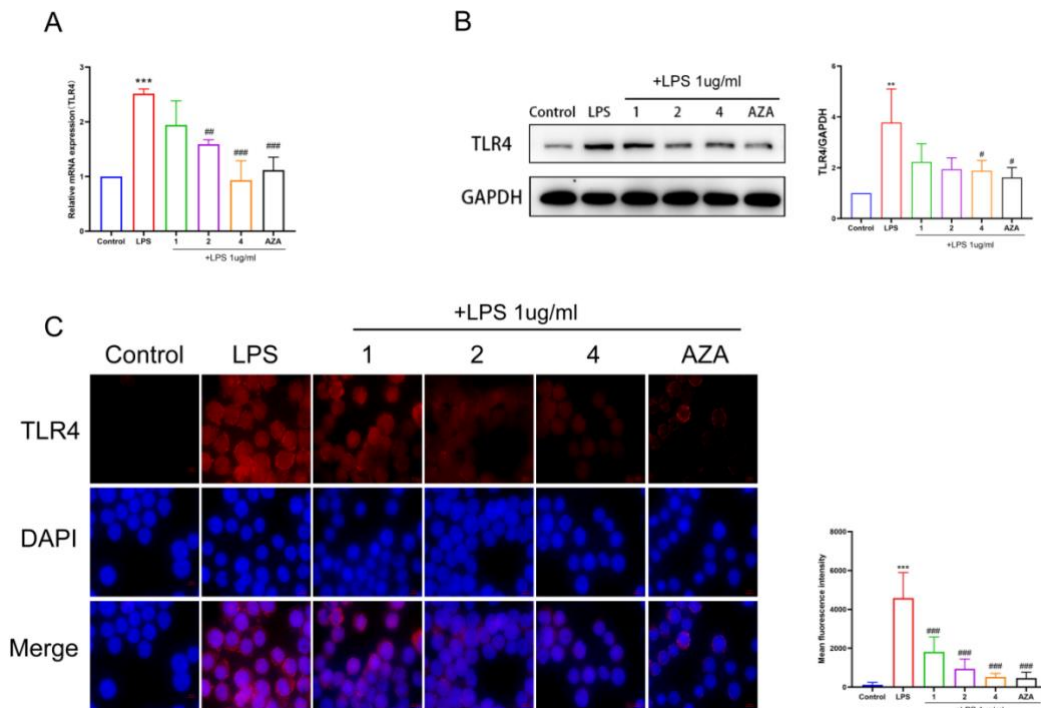


Figure 5. TWP 对 LPS 诱导的 THP-1 单核细胞中 TLR4 表达的影响
TLR4 mRNA 变化; (B) TLR4 蛋白变化; (C) TLR4 荧光强度变化 (放大倍数: 100X)

3.TWP 抑制 THP-1 细胞炎症时 TLR4/NF- κ B 通路活化

TLR4/NF- κ B 通路是 UC 的主要发病机制之一^[11]。为了明确 TWP 具体的作用途径, 检测了 TLR4/NF- κ B 通路中的关键节点。结果显示 LPS 刺激后, *MyD88*、*TRAF6*、*TRAM*、*TBK1*、*NF- κ B p65* mRNA 水平虽未见明显升高, 但是 *MyD88*、*TRAF6*、*TRAM*、*TBK1*、p NF- κ B p65 蛋白水平表达显著增加 (Figure 6A-C), TWP 干预后, 各指标的蛋白表达水平均有不同程度下降, 并显著抑制了 NF- κ B p65 核转位 (Figure 6C), 且药效呈剂量依赖性, 提示 TWP 抗炎机制与抑制 TLR4/NF- κ B 通路有关。

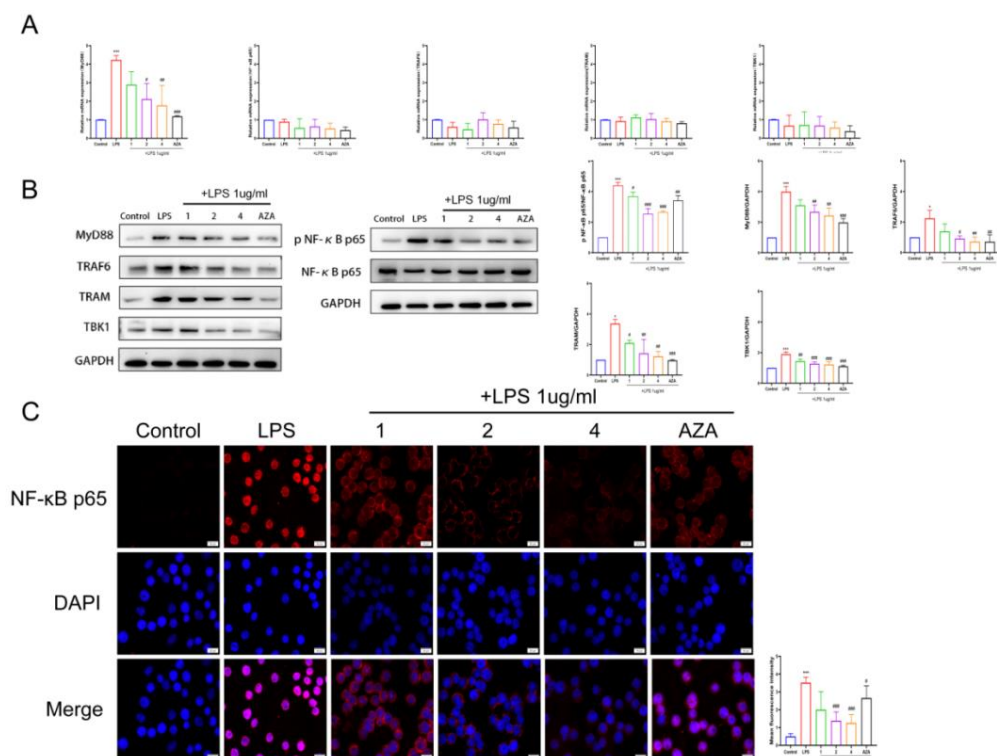


Figure 6. (A-B) TLR4/NF-κB 通路各关键节点 mRNA 及蛋白表达变化; (C) NF-κB p65 核转位变化

4.TWP 减少 THP-1 细胞炎症时炎症因子释放，增加抗炎因子水平

为研究 TWP 对 LPS 诱导的细胞炎症的抑制作用，qRT-PCR 检测促炎因子 *TNF-α*、*IL-1β*、*IFN-γ* mRNA 以及抑炎因子 *IL-10*、*TGF-β* mRNA 表达水平。结果表明，LPS 增加 *TNF-α*、*IL-1β*、*IFN-γ* mRNA 水平，减少 *IL-10*、*TGF-β* mRNA 水平，TWP 干预后，各项促炎因子表达下降，抑炎因子表达增加 (Figure 7A-B)。

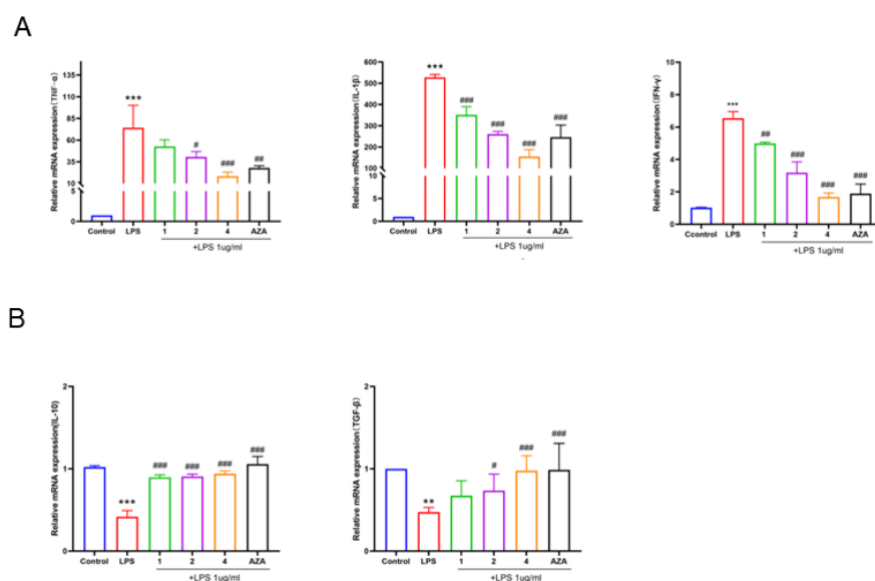


Figure 7. (A) LPS 刺激及 TWP、AZA 干预后 *TNF-α*、*IL-1β*、*IFN-γ* mRNA 表达; (B) *IL-10*、*TGF-β* mRNA 表达

(三) *S100A8* 调控 TLR4/NF- κ B 通路致炎作用验证

逐渐有研究发现, *S100A8* 调控 TLR4/NF- κ B 通路, 本文也证实了这一点。rhS100A8 联合 TAK-242 干预 THP-1 细胞。实验结果显示, rhS100A8(1 μ g/ml) 干预 THP-1 细胞 24h 后细胞活力下降, TAK-242(2 μ M) 预处理 2h 后再联合 rhS100A8 干预, 4h 和 8h 后细胞活力均下降 (Figure 8A), 因此选择联合干预 4h。实验进一步发现, S100A8 激活细胞中 TLR4/NF- κ B 通路, 末端炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 表达增加; TAK-242 阻断 TLR4 活性后, S100A8 的致炎作用随之减弱, 下游通路未被明显激活, 末端炎症因子表达减少 (Figure 8B、C)。

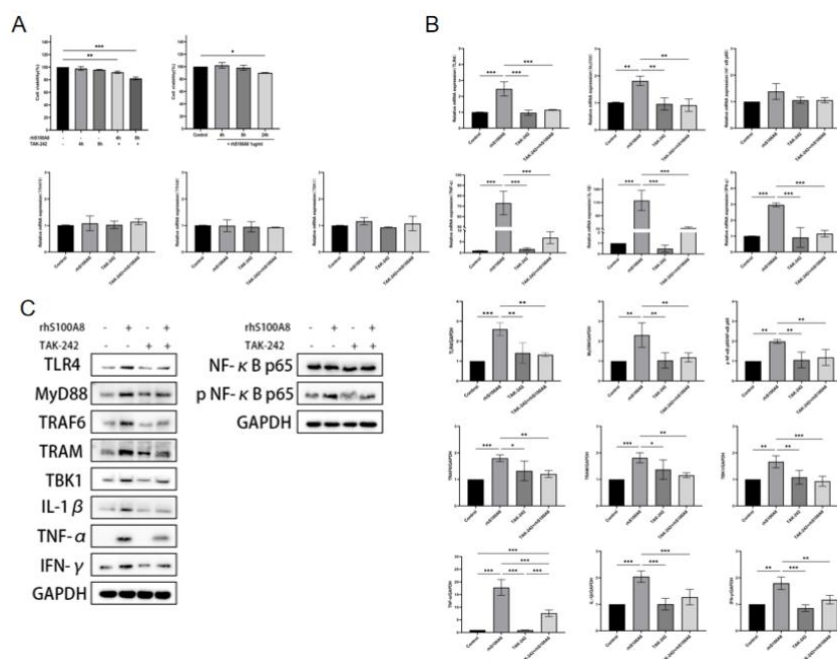


Figure 8. (A) rhS100A8 干预 THP-1 细胞 4h、8h、24h 后或 rhS100A8 联合 TAK-242 干预 4h 后, CCK-8 检测细胞活力, (B) rhS100A8 干预 THP-1 细胞 4h 后, qPCR 检测 *TLR4* 信号通路及末端炎症因子 mRNA 表达; (C) rhS100A8 干预 THP-1 细胞 4h 后, WB 检测 TLR4/NF- κ B 通路各关键节点的蛋白表达

(四) TWP 中的主要活性成分分析

谱数据采集软件为 Analyst TF 1.7.1, 数据处理软件为 Peakview 1.2。在正负离子模式下获得质谱图 (Figure 9), 根据样品多级质谱信息, 结合天然产物高分辨质谱数据库及相关文献, 从 TWP 原料粉样品中鉴定出 52 个化合物, 目前已知的化合物有 25 个, 按照峰面积筛选相对含量最多的前 10 种活性成分, 具体见表 4。

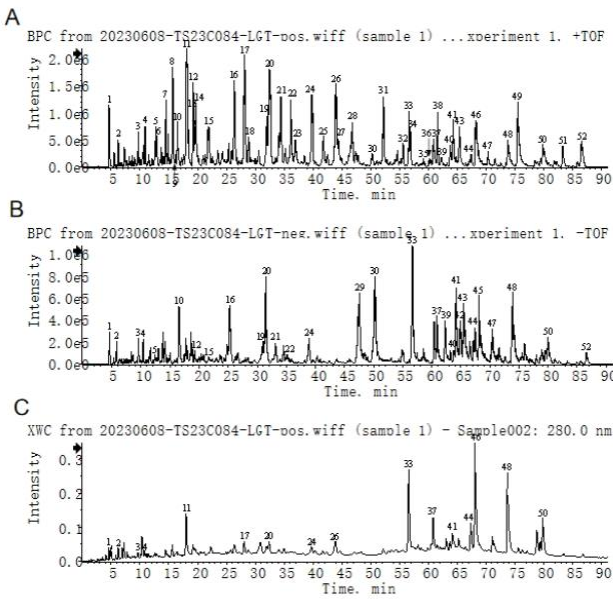


Figure 9. (A-B) TWP 中 UPLC-HRMS 基峰离子流图 (BPC) -正/负离子模式; (C) UPLC 紫外色谱图-UV 280 nm

表 4. TWP 中主要活性成分

中文名	名称	峰面积	分子式	分子量
雷公藤碱戊	Wilfordine	258908190	C ₃₆ H ₄₅ NO ₁₈	779.26
雷公藤定宁 A	Wilfordinine A	192265154	C ₃₆ H ₄₅ NO ₁₇	763.27
雷公藤春碱	Wilfortrine	173701382	C ₄₁ H ₄₇ NO ₂₀	873.27
雷公藤红素	Celastrol	141924432	C ₂₉ H ₃₈ O ₄	450.28
去甲泽拉木醛	Demethylzeylasteral	130992003	C ₂₉ H ₃₆ O ₆	480.25
雷公藤康碱	Wilfordconine	109378624	C ₃₉ H ₄₅ NO ₁₉	831.26
雷公藤定碱	Wilfordine	100809544	C ₄₃ H ₄₉ NO ₁₉	883.29
/	Chiapenine ES-IV	98441193	C ₃₄ H ₄₁ NO ₁₇	735.24
/	Hypoglaunine A	97179495	C ₄₁ H ₄₇ NO ₂₀	873.27
远志酸异构体	Polygalic acid isomer	97129771	C ₂₉ H ₄₄ O ₆	488.31

三、讨论

虽然 TWP 能缓解 UC 炎症活动，S100A8 具有致炎作用，TWP 缓解 UC 炎症作用是否与 S100A8 致炎相关，目前尚不明确。为此，基于 TNBS/乙醇 UC 大鼠模型，通过对模型组/对照组以及 TWP 高剂量组/模型组进行 IPA 分析，选择筛选那些在模型组中表达量异常变化的，并且在 TWP 高剂量组中表达量与模型组变化相反的那些基因，通过对表达谱芯片的分析，结果发现，在模型组中，表达量上升最高的几个基因分别是 *Tnn*(488 倍)、*Lilrb4*(173 倍)、*Mmp9* (159 倍)、

S100a8(143 倍)等, 表达量下降最大的几个基因分别为 *Spink3*(462 倍)、*Pyy*(269 倍)、*Gcg*(269 倍)、*Crb3*(266 倍)。在 TWP 高剂量组中, 表达量上升最高的几个基因分别是 *Spink3* (306 倍)、*Fabp1*(216 倍)、*Gcg*(197 倍)、*Pyy* (178 倍) 等, 表达量下降最大的几个基因分别为 *S100a8*(147 倍)、*Prok2*(141 倍)、*Cxcl2*(110 倍)、*Mmp13* (78 倍)。在此可以看到, 差异较大的基因可以被分为两类: 第一类是那些在模型组中变化较大, 而在 TWP 高剂量组中变化不大的基因, 如 *Tnn*; 第二类是在模型组与 TWP 高剂量组中同样变化较大, 并且在模型组和高剂量组中其表达量变化趋势相反, 如 *S100a8*。从生物学意义来讲, 一个对 UC 有重要作用的靶基因应该是一个在 UC 组织中表达量发生剧烈上升或下降变化的基因, 而要与 TWP 治疗应答具有关联的靶基因, 应该是经 TWP 治疗后会趋于或恢复正常的基因。按照这个标准, 我们发现 *S100a8*、*Spink3*、*Pyy*、*Gcg*、*Fabp1*、*Slc12a8*、*Prok2* 均符合以上趋势。其中 *Spink3*、*Pyy*、*Gcg*、*Fabp1*、*Slc12a8*、*Prok2* 等基因目前与 UC 的关系缺乏有力的文献支撑, 而 *S100A8* 与 UC 的关系逐渐被认知, 研究发现 *S100A8* 能激活 NF- κ B 通路参与 UC 炎症^[6]。因此, 我们有理由把对 UC 的发病以及 TWP 治疗 UC 均相关的靶基因瞄准到 *S100a8* 上。IPA 分析进一步提示, *S100a8* 可能与 TLR4/NF- κ B 通路关联, 虽然目前已有研究发现 *S100A8* 通过 TLR4/NF- κ B 通路介导多种疾病, 但是 *S100A8* 是否调控该通路促进 UC 炎症发展仍不清楚, 因此需要进一步研究明确。

已知 TLR4/NF- κ B 通路是 UC 炎症的主要途径之一, TWP 对该通路有抑制作用。目前逐渐关注到 *S100A8* 与 UC 的关系^[6], 但是 *S100A8* 与 TLR4/NF- κ B 通路的关系以及在 UC 中发挥的作用仍有待于进一步明确, TWP 能否通过 *S100A8* 调控 TLR4/NF- κ B 通路也缺乏充分阐明。本项研究体外实验发现 *S100A8* 高表达时, TLR4/NF- κ B 通路也同步活化, TNF- α 等末端炎症因子表达增加, IL-10 等抗炎因子表达随之降低; 体内实验进一步发现, UC 大鼠肠道 *S100a8* 表达增加时, 肠道炎症反应剧烈; 给予 TWP 干预能降低 *S100A8* 表达, 并抑制 TLR4/NF- κ B 通路, 减少末端炎症因子表达, 增加抗炎因子表达, 缓解 THP-1 及 UC 大鼠肠道炎症反应, 并且 TWP 这种作用呈现出了剂量依赖性。由此提示, TWP 对 *S100A8* 与 TLR4/NF- κ B 通路均有作用, 但我们仍需明确在这个作用过程中, TWP 主要调控哪一节点发挥了抗炎作用。

针对这个问题，我们对 S100A8 和 TLR4/NF- κ B 通路进行了初步验证。通过体外添加 TAK-242 抑制 TLR4 后，再给予 rhS100A8 干预，发现 TLR4/NF- κ B 通路激活程度受到显著抑制，末端炎症因子表达显著降低。除 TNF- α 蛋白外，TAK-242+rhS100A8 组中的各项指标与对照组相比无统计学差异。以上提示 S100A8 主要通过 TLR4 发挥致炎作用，其作用位点位于该通路的上游阶段。

TWP 能抑制 S100A8 表达，为了进一步研究 TWP 与 S100A8 的关系，我们又进行了 SPR 实验，证实了 TWP 与 S100A8 具有较好的结合力，提示 TWP 确能结合 S100A8 发挥免疫调控作用。因此，TWP 调控 S100A8 发挥抗炎作用应是其发挥免疫调控作用的途径之一。

由于 TWP 具有多种成分，采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析发现其中相对含量最高的 10 种活性成分分别是 Wilforidine（雷公藤碱戊）、Wilfordinine A（雷公藤定宁 A）、Wilfortrine（雷公藤春碱）、Celastrol（雷公藤红素）、Demethylzeylasteral（去甲泽拉木醛）、Wilfordconine（雷公藤康碱）、Wilfordine（雷公藤定碱）、Chiapenine ES-IV、Hypoglaunine A、Polygalic acid isomer（远志酸异构体），其中雷公藤红素与 UC 的研究最多，其具有调节肠道菌群、调节氧化应激等作用^[27-28]。以上成分可能是 TWP 在体内发挥药效的关键活性成分，但这些活性成分是否与 S100a8 结合发挥抗炎作用目前仍是未知数，本项研究的结果可为今后的 TWP 与 S100a8 结合的具体成分及结合位点研究提供一个方向，值得进一步探索。

四、结论

本项研究揭示了以下发现：（1）S100A8 是 UC 炎症的核心基因，也是 TWP 调控 UC 炎症的重要靶基因；（2）S100A8 能调控 TLR4/NF- κ B 通路，初步验证提示其调控作用位于 TLR4 的上游；（3）TWP 能与 S100A8 结合，下调 S100A8 表达，抑制 TLR4/NF- κ B 通路活化，减少末端炎症因子释放，缓解 UC 大鼠肠道炎症活动；（4）TWP 活性成分多样，与 S100A8 结合发挥抗炎作用的具体成分有待深化研究。

参考文献：略

人参总皂苷对急性缺氧所致大鼠心肌损伤的保护作用

罗凯^{1,2}, 杨军^{1,2}, 王仁杰^{1,2}, 钱庆元^{1,3}, 马舒禾^{1,2}, 王宇光¹,

高月¹, 李茂星^{1,2,3}

(1. 军事科学院军事医学研究院, 北京, 100850; 2. 甘肃中医药大学药学院, 兰州, 730020;

3. 兰州大学药学院, 兰州 730020)

[摘要] 探讨人参总皂苷对急性缺氧所致大鼠心肌损伤的影响。56 只 SPF 级雄性大鼠随机分为正常组, 缺氧 1 d 组、3 d 组、5 d 组、7 d 组, 缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组和缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组。正常组大鼠舱外正常饲养, 其他各组大鼠放于低压低氧动物实验舱中饲养。在各组大鼠缺氧时间节点时, 以心脏超声、心电图、血生化、心脏组织病理等指标来评价大鼠心肌损伤。结果显示, 与正常组相比, 随着缺氧时间的增加, ①心输出量(CO)、每搏输出量(SV)、左心室射血分数(EF)和左心室短轴缩短率(FS)在第 3 d 时显著下降($P<0.01$), 第 5 d 和第 7 d 有逐渐回升的趋势; ②T 波第 7 d 显著升高($P<0.01$), QRS 群间期第 3 d 显著缩短($P<0.05$), PR 间期第 7 d 最显著缩短($P<0.05$)。③肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CKMB)、乳酸脱氢酶(LADH)、 α -羟丁酸脱氢酶(HBDH)第 5 d 升高最显著($P<0.01$), 乳酸(LACT)第 3 d 和 7 d 显著升高($P<0.01$)。④第 1 d 大鼠心肌细胞无明显变性、坏死, 第 3 d 出现心肌细胞空泡增多, 第 5 d 出现炎症细胞浸润, 少量心肌纤维嗜酸变, 第 7 d 出现大量炎症细胞浸润, 心肌纤维嗜酸变增多, 部分心肌纤维溶解。与缺氧 5 d 组相比, 大鼠给与人参总皂苷预防后, 左心室射血分数、左心室短轴缩短率明显上升, QRS 群间期、PR 间期有上升趋势; CK、CKMB、LADH、HBDH、LACT 明显下降; 大鼠心肌细胞无明显损伤。因此, 暴露于 6500 m 低压低氧环境中 5 d 时, 大鼠心肌出现显著且稳定的损伤, 且给与人参总皂苷能够预防大鼠心肌损伤。

[关键词] 缺氧; 心肌损伤; 大鼠; 人参总皂苷

[基金项目] 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-D-202207)

[第一作者] 罗凯, 研究生, E-mail: 1957928332@qq.com

[通讯作者] 高月, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药理方向, E-mail: gaoyue@bmi.ac.cn;
李茂星, 研究员, 主要从事中药药理方向, E-mail: limaox2020@aliyun.com

Protective effect of ginseng total saponin on acute hypoxia-induced myocardial injury in rats

LUO kai^{1,2}, YANG Jun^{1,2}, WANG Renjie^{1,2}, QIAN Qingyuan^{2,3}, MA Shuhe¹,
LI Maoxing^{1,2,3}, GAO Yue²

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730020;
2. Academy of Military Sciences, Military Medical Academy, Beijing 100850; 3. School of
Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730020)

[Abstract] To investigate the effects of ginseng total saponin on acute hypoxia-induced myocardial injury in rats. Forty SPF grade male rats were randomly divided into normal group, hypoxia 1 d group, 3 d group, 5 d group, 7 d group, hypoxia 5 d + ginseng total saponin low dose group and hypoxia 5 d + ginseng total saponin high dose group. The rats in the normal group were kept outside the chamber, and the rats in the other groups were kept in the hypobaric hypoxia animal experimental chamber. Myocardial injury was evaluated by cardiac ultrasound, electrocardiogram, blood biochemistry, and cardiac histopathology at the time nodes of hypoxia time in each group. Compared with the normal group, with the increase of hypoxia time, ①cardiac output (CO), stroke volume (SV), left ventricular ejection fraction (EF), and left ventricular short-axis shortening (FS) decreased significantly on the third day ($P<0.01$), and tended to rebound gradually on the fifth day and seventh day; ② the T-wave was significantly elevated on the seventh day ($P<0.01$), and the QRS cluster intervals were shortened significantly on the third day ($P<0.05$), and the PR interval was most significantly shortened on the seventh day ($P<0.05$). ③ Creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme (CKMB), lactate dehydrogenase (LADH), and α -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH) were most significantly elevated on d 5 ($P<0.01$), and lactate (LACT) was significantly elevated on the third day and seventh day ($P<0.01$). ④ On the first day, there was no obvious degeneration and necrosis of rat cardiomyocytes. On the third day, increased vacuolation of cardiomyocytes appeared. On the fifth day, inflammatory cell infiltration with a small amount of eosinophilic changes of myocardial fibers appeared. And on the seventh day, a large amount of inflammatory cell infiltration

with increased eosinophilic changes of myocardial fibers and partial myocardial fibrillar lysis appeared. Compared with the hypoxia group for 5 d, rats given ginseng total saponin prophylaxis showed a significant increase in left ventricular ejection fraction, left ventricular short-axis shortening rate, and a tendency for an increase in QRS cluster interval and PR interval; CK, CKMB, LDH, HBDH, and LACT decreased significantly; And there was no significant damage to cardiomyocytes in the rats. So significant and stable myocardial injury was observed in rats exposed to 6500 m hypobaric hypoxia for five days, and the administration of ginseng total saponin was able to prevent myocardial injury in rats.

[Key words] Hypoxia; Myocardial injury; Rat; ginsenosides

我国是世界上高原地域面积最大、边境线最长、居住人口最多的国家。而高原低气压的特殊气候环境，影响着高原地区的经济以及我国的国防安全。尤其近年来边境军事形势复杂严峻，战士快速进入高原环境成为战略需求，而急性高原损伤成为影响高原地区军队战斗力的关键因素。

随着海拔的升高，大气中氧分压快速下降。人体在短时间内由平原地区进入高海拔地区时血氧饱和度会下降，出现多脏器功能障碍^[1]。心脏是机体从外界获取氧气、运输氧气的动力来源，是高耗氧、高耗能器官。心脏对缺氧的敏感性非常高，即使在高原缺氧环境下短期暴露，也会受到不同程度的损伤^[2]。低压低氧的代偿后果包括心率加快、心肌收缩力增强。然而，过度代偿或失代偿可导致严重的高原诱发性心脏损伤，从而引发急性或慢性高山病以及高原心脏病^[3]。急性低压低氧情况反而会使最大心输出量减少^[4]，进一步引起心律失常和局部缺血^[5]；同时造成乳酸酸中毒、线粒体能量产生减少和细胞死亡，甚至可能导致心力衰竭甚至死亡^[6]。高原气压低、空气稀薄，人参补气宁心，是补气要药，而人参皂苷是其中的主要成分，研究发现人参皂苷能显著抑制心肌梗死大鼠的心肌损伤，减轻氧化应激，改善心功能等作用。并且在抗炎及耐缺氧、调节免疫系统方面也显示出良好的药理活性，是一种很有开发潜质的药物^[7,8,9]。然而人参皂苷在治疗高原缺氧导致的心肌损伤这块研究甚少，本研究拟采用大鼠急性高原缺氧心肌损伤模型，从心脏超声检查、心电图检查、病理学变化、以及心肌酶谱等多角度探讨人参皂苷对大鼠急性高原心肌损伤的保护作用，为急性低压低氧环境下心肌损伤的研究提供实验基础。

1 材料

动物 56 只 SPF 级 SD 健康雄性大鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司），体重 180 g~220 g。动物生产许可证号：SCXK（京）2021-0011。动物实验和操作按照中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院科研管理伦理委员会的程序（伦理审查编号:2022KYLL031）和《实验动物护理和使用指南》进行。

药品与试剂 人参总皂苷（延边安帝康华生物科技有限公司，20220310），CK（批号：75547101）、CKMB（批号：76576901）、HBDH（批号：71834201）、LDH（批号：72604101）、LACT（批号：72459601）生化试剂（上海罗氏诊断

有限公司), 异氟烷(江苏恒丰强生物技术有限公司), 戊巴比妥(NO: 57-33-0, SIGMA), 10%多聚甲醛, 生理盐水。

仪器 DMCF50 型低压低氧动物实验舱(上海塔望智能科技有限公司); VINN06 LAB 型便携式小动物超声仪(飞依诺科技股份有限公司); RM6240E 型多通道生理信号采集处理系统(成都仪器厂); 小动物麻醉机(美国 VMRVMR 公司); 全自动生化分析仪 cobas c311(上海罗氏诊断有限公司); 5430R 型低温离心机(德国艾本德公司)。

2 实验方法

2.1 模型构建、动物与给药方法分组

SD 大鼠适应性饲养 3 d 后随机分成正常组, 缺氧 1 d 组、3 d 组、5 d 组、7 d 组, 缺氧 5 d+人参高剂量组, 缺氧 5 d+人参低剂量组共 7 组, 每组 8 只。缺氧 5 d+人参高、低剂量组分别灌胃人参总皂苷 100 mg/kg、50 mg/kg, 放入低压低氧舱前 2 d 开始给药, 一共给药 7 d。

实验舱参数设定: 模拟海拔高度 6500 m, 升降速度 10 m/s, 舱内压力 44.2 kPa, 舱内氧分压 9.6 kPa, 温度 25.4°C, 湿度 50% RH。缺氧组大鼠放置在动物实验舱内, 每天早上开舱更换垫料、补充食物和饮用水不超过 1 h, 对照组大鼠除放于动物实验舱外, 其他饲养条件与缺氧组一致。

2.2 体质量测定

记录大鼠进低压低氧动物实验舱后每天的体质量变化。

2.3 大鼠麻醉

将大鼠放入通有异氟烷的麻醉盒, 麻醉后以仰卧姿势固定在动物操作平台上, 口鼻塞入麻醉面罩, 以浓度为 1~2%, 流量为 0.3~0.4 L/min 的异氟烷维持麻醉。

2.4 心电图检查

大鼠麻醉后, 利用多通道生理信号采集处理系统进行心电图检查。将正极、负极、地线分别插入到麻醉大鼠的左下肢、右上肢和右下肢皮下; 设置参数: 采样频率 1 kHz, 心电模式通道, 扫描速度 20 s/div, 灵敏度 2 mv, 时间常数 0.02 s, 滤波频率 100 Hz, 选择原始波, 开始测量。

2.5 大鼠超声心动图检查

心电图检查结束后，将脱毛膏涂抹在大鼠的胸部和上腹部，2 分钟后，用湿纱布或湿纸巾擦去脱毛膏（在大鼠进舱前剃除其胸毛）。将小动物超声仪的超声探头置于鼠胸骨旁，垂直于胸骨，显示左胸骨旁长轴切面。于乳头肌水平，应用 M 超声记录左心室运动曲线，分别测量左心室后壁收缩期厚度、左心室舒张末期内径和收缩末期内径等。计算心输出量（Cardiac output, CO）、每搏输出量（Stroke volume, SV）左室短轴缩短率（Fractional shortening of left ventricle, FS）、左心室射血分数（Left ventricular ejection fraction, EF）等。

2.6 大鼠血液生化检查

2%戊巴比妥溶液腹腔注射麻醉后，腹主动脉取血 4 ml 置于促凝管中，静置 2 小时后离心（3000 rpm, 15 min），吸取血清，利用罗氏全自动血液生化分析仪检测肌酸激酶（Creatine kinase, CK）和肌酸激酶同工酶（Creatine kinase myocardial band, CKMB）、乳酸（Lactic acid, LACT）、乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase, LDH）、 α -羟丁酸脱氢酶（ α -Hydroxybutyrate dehydrogenase, HBDH）等生化参数。

2.7 大鼠心脏组织病理检查

腹主动脉取血后，摘取心脏，生理盐水冲洗干净，10%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋。连续切片（厚度 4 μ m），HE 染色，镜下观察右心室心肌组织病理变化情况。

2.8 数据统计

使用 Graphpad prism 8.0 软件对数据进行分析并制图，组间比较采用单因素方差分析。

结 果

1 不同急性缺氧时间对大鼠体质量的影响

缺氧组大鼠体质量在进舱后 1 d 时明显下降，进舱后 5 d~7 d 缓慢升高，但仍然明显低于对照组，人参总皂苷组大鼠的体重下降没有模型组严重。

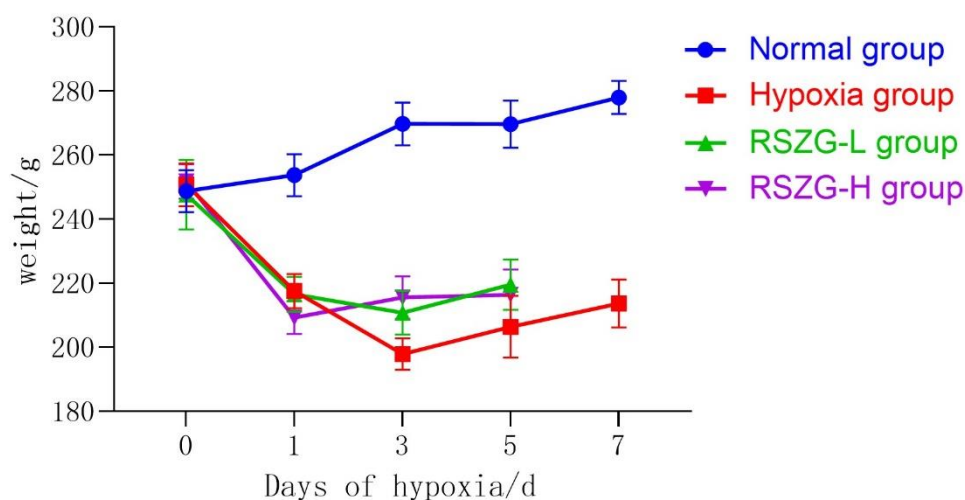


图 1: 不同缺氧时间对大鼠体质量的影响

2 不同急性缺氧时间对大鼠心脏结构和功能的影响

通过小动物超声仪可清晰地显示大鼠左心室结构和 M 超声记录左心室运动曲线, 如图 2 所示。随着缺氧时间延长, 缺氧组大鼠心脏功能出现下述变化 (见图 3): 心输出量 (CO)、每搏输出量 (SV)、左心室射血分数 (EF) 和左心室短轴缩短率 (FS) 逐渐下降, 第 3 d 最明显 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 第 5 d 和第 7 d 有逐渐回升的趋势。与缺氧 5 d 组相比, 缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组和缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组大鼠 FS 均明显上升 ($P<0.05$), SV 和 CO 均有上升趋势; 缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组大鼠 EF 明显上升 ($P<0.05$)。

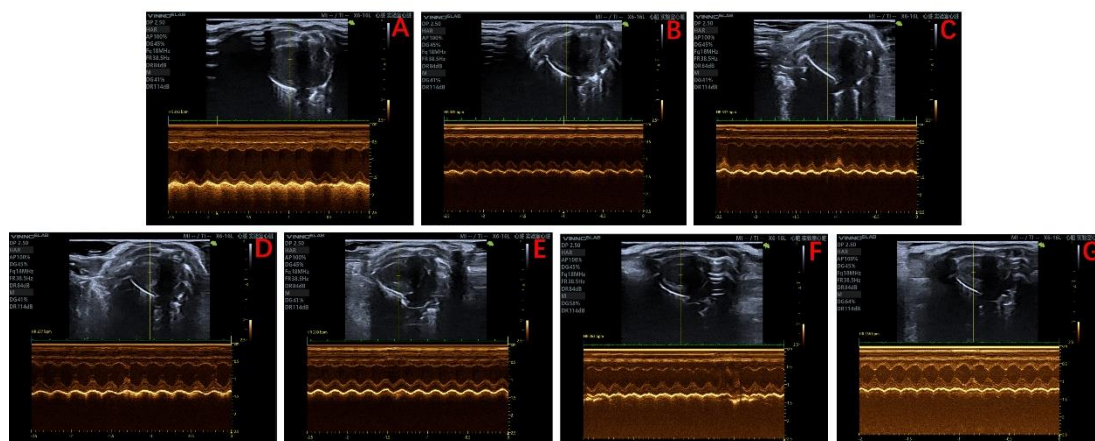


图 2: 左心室运动曲线 M 型超声波中的长轴

(A: 正常组 B: 缺氧 1 d 组 C: 缺氧 3 d 组 D: 缺氧 5 d 组 E: 缺氧 7 d 组
F: 缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组 G: 缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组)

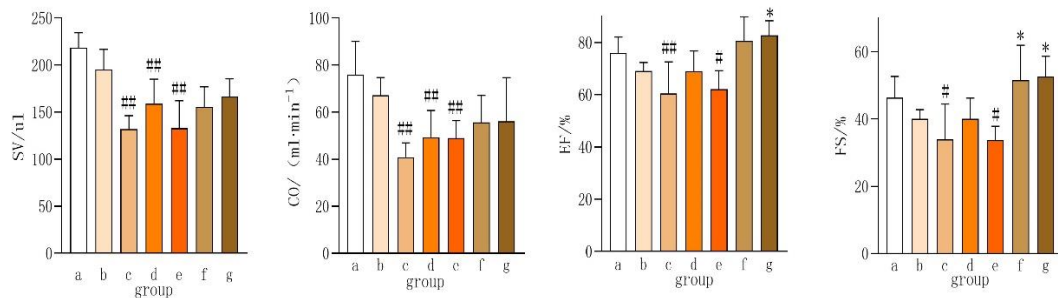


图 3：不同缺氧时间以及给药后对大鼠心脏功能的影响

(a: 正常组 b: 缺氧 1 d 组 c: 缺氧 3 d 组 d: 缺氧 5 d 组 e: 缺氧 7 d 组
f: 缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组 g: 缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组)

与正常相比, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$; 与缺氧 5d 组相比, *: $P<0.05$

3 不同急性缺氧时间对大鼠心电图的影响

随着缺氧时间延长, 缺氧组大鼠心电图出现以下变化 (见图 4、图 5): T 波升高, 第 7 d 最显著 ($P<0.05$), ST 偏移量有升高趋势, 但没有统计学差异; Q-T 间期缩短, 第 3 d 最显著 ($P<0.05$); QRS 群间期和 S-T 间期有下降趋势, 但没有统计学差异。缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组和缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组与缺氧 5 d 组相比: T 波下降, QRS 群间期、Q-T 间期有回升趋势。

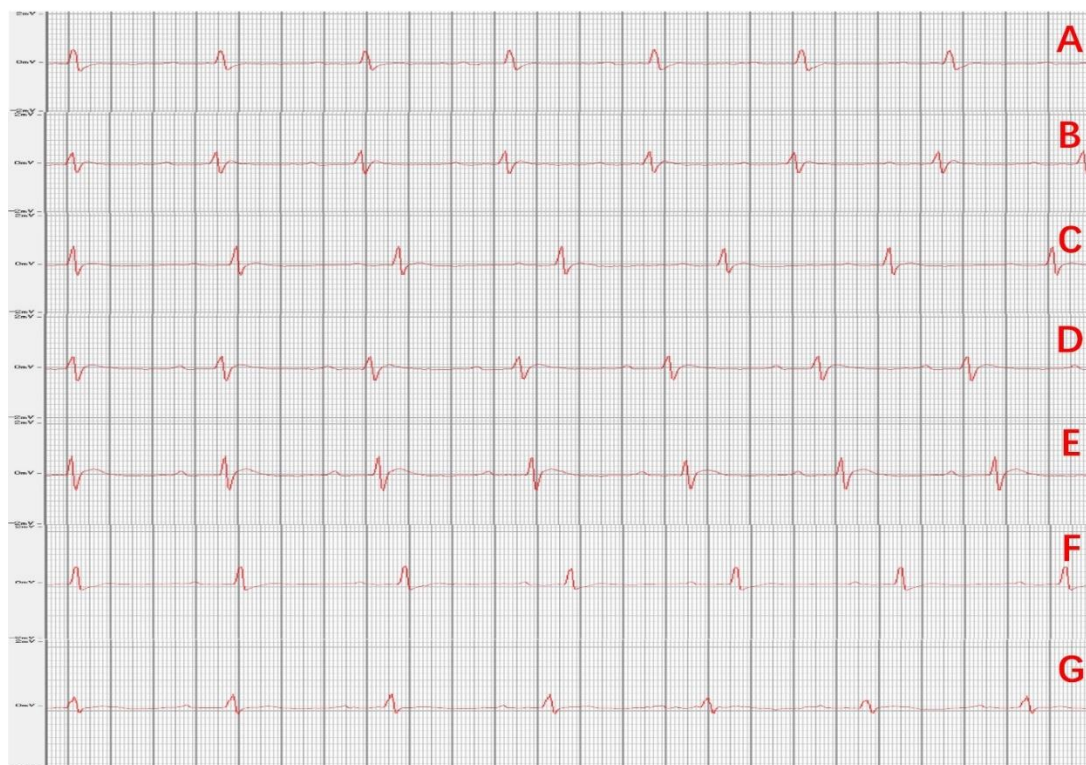


图 4：不同缺氧时间及给药后对大鼠心电图的影响

(A: 正常组 B: 缺氧 1 d 组 C: 缺氧 3 d 组 D: 缺氧 5 d 组 E: 缺氧 7 d 组
F: 缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组 G: 缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组)

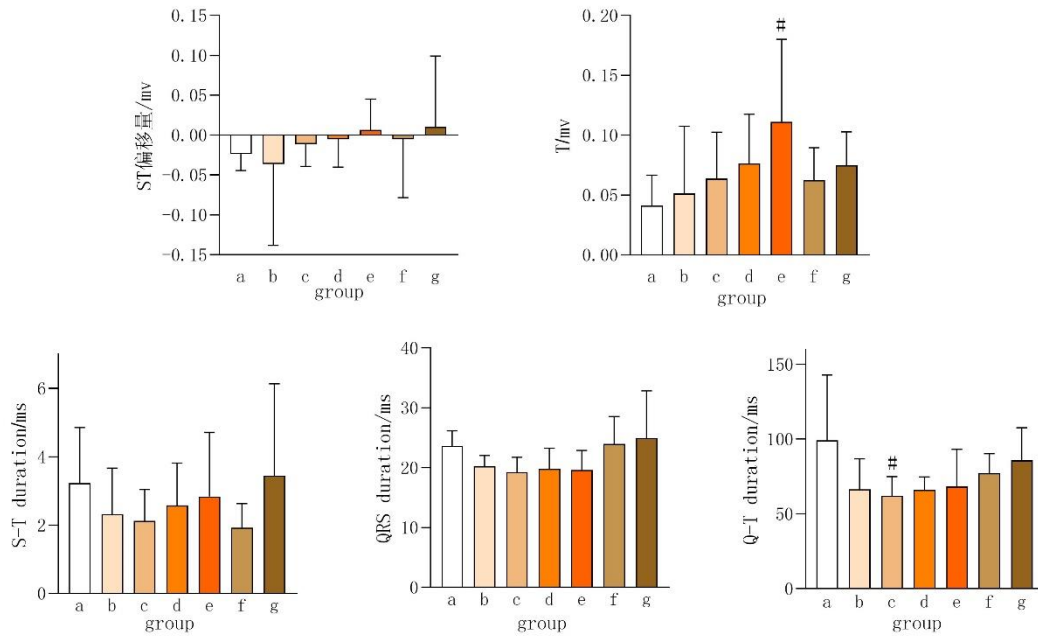


图 5：不同缺氧时间及给药后对大鼠心电指标的影响

(a: 正常组 b: 缺氧 1 d 组 c: 缺氧 3 d 组 d: 缺氧 5 d 组 e: 缺氧 7 d 组
f: 缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组 g: 缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组)
与对照组相比, #: $P<0.05$

4 急性缺氧对大鼠血生化指标的影响

随着缺氧时间的延长,缺氧组大鼠肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CKMB)、乳酸脱氢酶(LDH)、羟丁酸脱氢酶(HBDH)、乳酸(LACT)都有增加趋势,在第 3d 或第 5d 最显著 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) (见图 6)。缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组和缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组与缺氧 5 d 组相比: 肌酸激酶、肌酸激酶同工酶、乳酸脱氢酶、羟丁酸脱氢酶、乳酸均显著降低 ($P<0.01$)。

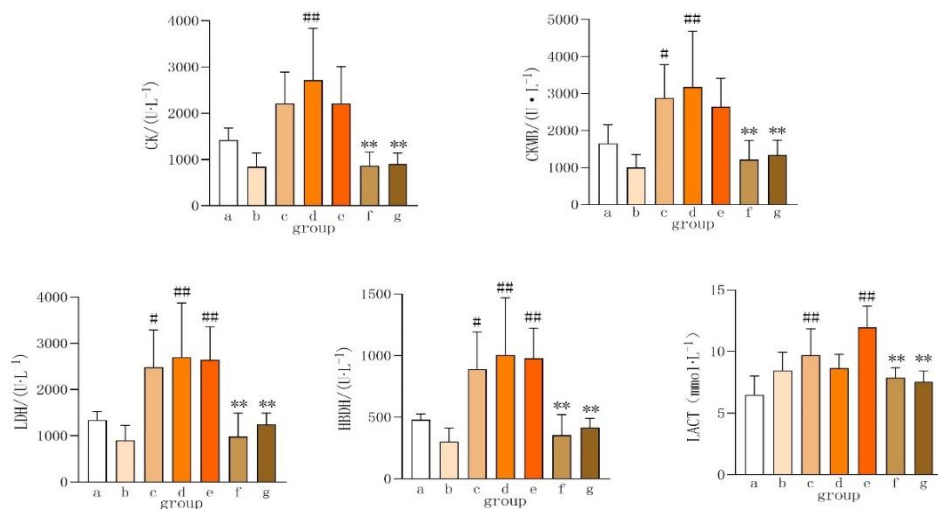


图 6：不同缺氧时间及给药后对大鼠血生化指标的影响

(a: 正常组 b: 缺氧 1 d 组 c: 缺氧 3 d 组 d: 缺氧 5 d 组 e: 缺氧 7 d 组
f: 缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组 g: 缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组)
与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

5 急性缺氧对大鼠心脏组织形态学的影响

大鼠右心室心肌病理情况如图 7 所示: 对照组大鼠心肌细胞排列整齐、紧密, 结构清晰, 无明显变性、坏死; 缺氧 1 d 组大鼠心肌细胞与正常组大鼠心肌细胞基本无差别, 排列整齐, 无明显变性、坏死; 缺氧 3 d 组大鼠心肌细胞排列紊乱, 心肌细胞空泡增多 (如黑色箭头所示); 缺氧 5 d 组大鼠心肌细胞空泡增多 (如黑色箭头所示), 少量炎症细胞浸润 (红色箭头所示), 少量心肌纤维嗜酸变 (如蓝色箭头所示); 低压低氧 7 d 大鼠心肌细胞空泡严重 (如黑色箭头所示), 大量炎症细胞浸润 (红色箭头所示), 心肌纤维嗜酸变增多 (如蓝色箭头所示), 部分心肌纤维溶解 (如黄色箭头所示); 缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组和缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组大鼠心肌与正常组大鼠心肌细胞基本无差别。

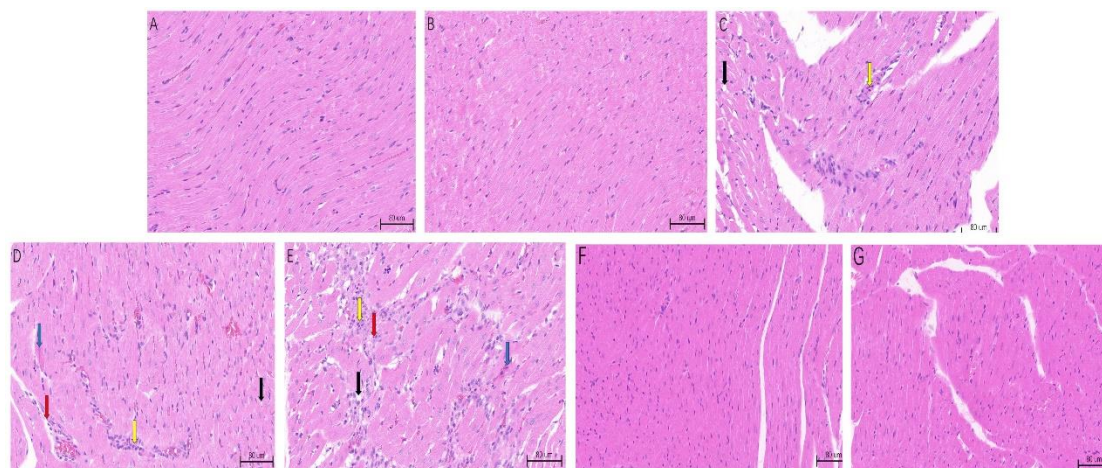


图 7: 不同缺氧时间及给药后对大鼠右心室心肌的影响 (HE $\times 40$)

(A: 正常组 B: 缺氧 1 d 组 C: 缺氧 3 d 组 D: 缺氧 5 d 组 E: 缺氧 7 d 组
F: 缺氧 5 d+人参总皂苷低剂量组 G: 缺氧 5 d+人参总皂苷高剂量组)

讨 论

前期预实验初探了大鼠放于低压低氧舱 1~7 d 大鼠的超声、心电图、血生化相关指标, 发现从大鼠心肌损伤程度看, 第 5 d 时大鼠心肌损伤相对比较严重, 所以这一批实验, 探讨了对缺氧 5 d 的大鼠模型的预防效果。心肌是机体中耗氧量最高的组织之一, 当机体暴露于急性缺氧环境时, 由于氧分压降低, 血氧饱和度下降, 机体会通过增加心肌收缩力, 进而增加心输出量 (CO) 的方式来增加获氧^[10]。每搏输出量 (SV)、左心室射血分数 (EF) 和左心室短轴缩短率可以

反应心肌收缩功能, 缺氧组大鼠在缺氧后 SV、EF 和 FS 均下降, 3 d~7 d 下降明显, 提示大鼠的心肌已经受到损伤, 所以缺氧组大鼠在缺氧后心输出量逐渐降低, 心输出量出现不增反降, 且第 3 d 最显著。有研究证明人参总皂苷可以增加冠状动脉血流、主动脉血流, 但心输出量没有显著差异, 原因可能归因于心输出量是通过冠状动脉血流和主动脉血流的总和来计算的^[11]。

心电图检查同样是评价心功能的重要方法, 缺氧后大鼠 T 波振幅增加, PR 间期和 QRS 群间期缩短, ST 间期、QT 间期和 ST 段改变。QT 间期表示心室去极化和复极化时间, 缺氧后可以改变复极化时间。T 波振幅升高提示有心肌缺血, P-R、QRS 间期在心电图呈现为缩短趋势, 提示容易伴有快速心律失常, 并发心动过速^[12]。人参总皂苷已被证明可以改善心电图变化, 例如 QRS 波群、QT 间期和 RR 间期^[11]。

心肌酶是反映心肌损伤的生化指标, 缺氧后 CK、CKMB、LADH、HBDH 升高, 且第 5 d 最显著, 但第 7 d 反而下降。心肌细胞在缺氧第 3 d 开始出现细胞空泡, 到第 5 d 已经出现炎症细胞浸润和心肌纤维嗜酸变, 到第 7 d 时心肌细胞空泡严重, 大量炎症细胞浸润, 心肌纤维嗜酸变增多, 部分心肌纤维溶解。给予人参总皂苷后, 缺氧大鼠心肌细胞损伤和炎症水平都明显降低。人参总皂苷已被作为治疗炎性疾病的药物, 已有证明多种人参总皂苷单体能够抑制促炎因子, 并促进抗炎因子表达而发挥抗炎作用^[12]。

血气指标是反映大鼠缺氧程度的常用指标, 但本研究中大鼠从氧舱取出后, 超声检查和心电检查需要较长时间, 长时间复氧和麻醉会使得血气核心指标 PaO₂ 和 SO₂ 等失去意义^[13]。本研究只测定了乳酸堆积水平 (LACT)。结果显示, 与正常组相比, 低压低氧组大鼠随着缺氧时间的增加, LACT 水平有逐渐增加的趋势, 说明随着低压低氧天数的增加, 大鼠缺氧程度也随之加重。给与大鼠人参总皂苷后, 可以减轻缺氧大鼠的缺氧程度。

综上所述, 本实验模拟了 6500 m 低压低氧环境下大鼠 1~7 d 的心肌损伤变化, 发现在第 3 d 时大鼠心功能开始降低, 在第 5 d 时, 多项心肌损伤指标变化显著, 表明大鼠心肌已明显损伤。而在给与缺氧大鼠人参总皂苷后, 可明显降低缺氧大鼠心肌损伤。6500 m 低压低氧环境 5 d 可作为低压低氧心肌损伤模型的时间节点, 可以开展低压低氧环境对心肌损伤的相关研究。

参考文献

- [1] 吴天一.高原医学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社.2020-1.3.
 - [2] 李政波, 张进, 王雪. 高原低氧环境短期暴露对官兵心脏的影响 [J]. 西北国防医学杂志, 2019, 40 (03): 174-178.
 - [3] Jia N, Shen Z, Zhao S, et al. Eleutheroside E from pre-treatment of *Acanthopanax senticosus* (Rupr.etMaxim.) Harms ameliorates high-altitude-induced heart injury by regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via NLRP3/caspase-1 pathway. *Int Immunopharmacol.* 2023; 121:110423.
 - [4] Calbet JA, Robach P, Lundby C. The exercising heart at altitude. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(22):3601-13.
 - [5] Woods DR, Boos C, Roberts PR. Cardiac arrhythmias at high altitude. *J R Army Med Corps.* 2011; 157(1):59-62.
 - [6] Williams RS, Benjamin IJ (2000) Protective responses in the ischemic myocardium. *J Clin Invest* 106:813–818.
 - [7]Xue Y, Fu W, Yu P, Li Y, Yu X, Xu H, Sui D. Ginsenoside Rc Alleviates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Reducing Mitochondrial Oxidative Stress and Apoptosis: Role of SIRT1 Activation. *J Agric Food Chem.* 2023;71(3):1547-1561.
 - [8] Zhang LP, Jiang YC, Yu XF, Xu HL, Li M, Zhao XZ, Sui DY. Ginsenoside Rg3 Improves Cardiac Function after Myocardial Ischemia/Reperfusion via Attenuating Apoptosis and Inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:6967853.
 - [9]Gan XT, Karmazyn M. Cardioprotection by ginseng: experimental and clinical evidence and underlying mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(9):859-868.
 - [10] 格日立.高原医学[M].北京: 北京大学医学出版社.2020.11:49-51.
 - [11] 冯振龙, 赵彤, 成祥等. 模拟高原低压低氧环境对大鼠心脏结构和功能影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35 (02): 173-177+4.
 - [12] 乔慧娴. 胺碘酮联合艾司洛尔对心肌梗死后心律失常患者 QRS 间期、P-R 间期的影响 [J]. 临床研究, 2021, 29 (11): 66-68.
 - [13] 钱庆元, 潘锦超, 杨军等. 不同缺氧干预对低压低氧模型鼠血气及红细胞相关指标的影响 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2023, 52 (06): 777-784.
-

基于 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 信号通路癫痫清含药血清对 小胶质细胞铁死亡的影响

王籍贤¹, 齐越^{1, 2*}, 黄培池², 夏春鹏¹, 范广坤¹

(1.辽宁中医药大学药学院, 沈阳 116600; 2.江苏省徐州医药高等专科学校药学技术系, 徐州 221116)

[摘要] **目的:** 研究癫痫清含药血清 (DXQ) 调节 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 对小胶质细胞铁死亡的影响。**方法:** 小胶质细胞分别设置为对照组、模型组 (0.01 mmol·L⁻¹ Erastin)、铁死亡抑制剂 Fer-1 单独组 (0.001 mmol·L⁻¹)、DXQ 低剂量单独组 (DXQ-L)、DXQ 高剂量单独组 (DXQ-H), Fer-1 与 Erastin 合并组 (0.001 mmol·L⁻¹ Fer-1+0.01 mmol·L⁻¹ Erastin)、DXQ-L 治疗组 (DXQ-L+0.01 mmol·L⁻¹ Erastin)、DXQ-H 治疗组 (DXQ-H+0.01 mmol·L⁻¹ Erastin)。利用 CCK-8 法考察细胞存活率; 免疫荧光法检测 xCT、GPX4 的蛋白表达水平; Western Blot 法检测铁死亡关键蛋白 GPX4、ACSL4、FPN1、xCT 的表达; 线粒体膜电位法测定线粒体膜电位; ROS 探针法检测细胞内活性氧含量、亚铁离子试剂盒检测细胞内亚铁离子含量; 在此研究基础上, 沉默小胶质细胞 *GPX4* 基因, 分别设为阴性对照组 (*si-NC* 组)、基因沉默组 (*si-GPX4* 组)、DXQ-H+阴性对照组 (*si-NC+DXQ* 组)、DXQ-H+基因沉默组 (*si-GPX4+DXQ* 组), RT-qPCR 测定 *GPX4* mRNA 表达, Western Blot 法检测 ACSL4、xCT、FPN1、GPX4 蛋白水平; 免疫荧光法检测 GPX4 及 HO-1 的共表达。**结果:** 与 Con 组相比, Erastin 模型组 GPX4、xCT、FPN1 的蛋白表达下调, 线粒体膜电位水平下降, ACSL4 表达、ROS 释放量、亚铁离子含量升高 ($P<0.05$); 与 Erastin 模型组相比, 各给药组可增加 GPX4、xCT、FPN1 蛋白及线粒体膜电位水平, 降低 ACSL4 表达、ROS 释放量及亚铁离子含量 ($P<0.05$); *GPX4* 基因沉默后, 与 *si-NC* 组相比, *si-GPX4* 组 *GPX4* mRNA 表达下降; GPX4、xCT、FPN1、HO-1 蛋白水平显著降低, ACSL4 蛋白水平、MDA 含量升高; 与 *si-GPX4* 组相比, *si-GPX4+DXQ* 组可逆转上述情况。**结论:** DXQ 可通过 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 信号通路, 调控抗氧化损伤相关蛋白, 抑制小胶质细胞铁死亡。

[关键词] 小胶质细胞; 铁死亡; 癫痫清含药血清; GPX4; 活性氧; Erastin

[基金项目] 徐州市科技局课题 (No.KC22134), 江苏省药品监督管理局科研计划项目 (202309)

[第一作者] 王籍贤, 在读硕士, 从事神经药理学研究, E-mail: Wang13386857842@163.com

[通信作者] 齐越, 教授, 硕士生导师, 从事中药新药药理、神经药理学研究, E-mail: Jiadg2003@126.com

Effect of Dianxianqing drug-containing serum on microglial ferroptosis based on FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 signaling pathway

Wang Jixian¹ Qi Yue^{1, 2*} Huang Peichi² Xia Chunpeng¹ Fan Guangkun¹

(1 School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2 Department of Pharmaceutical Technology, Xuzhou Medical Higher Vocational School, Jiangsu Province)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Dianxianqing medicated serum (DXQ) on microglial ferroptosis by regulating FPN1/xCT/GPX4/ACSL4. **Methods:** Microglial cells were set up as control group, model group (0.01 mmol·L⁻¹ Erastin), ferroptosis inhibitor Fer-1 group (0.001 mmol·L⁻¹), DXQ low-dose group (DXQ-L), DXQ high-dose group (DXQ-H), Fer-1 and Erastin combined group (0.001 mmol·L⁻¹ Fer-1+0.01 mmol·L⁻¹ Erastin), DXQ-L treatment group (DXQ-L+0.01 mmol·L⁻¹ Erastin), and DXQ-H treatment group (DXQ-H+0.01 mmol·L⁻¹ Erastin). The CCK-8 method was used to investigate the cell survival rate. The immunofluorescence method was used to detect the protein expression levels of xCT and GPX4. The Western Blot method was used to detect the expression of key ferroptosis proteins GPX4, ACSL4, FPN1, and xCT. The mitochondrial membrane potential method was used to determine the mitochondrial membrane potential. The ROS probe method was used to detect the intracellular reactive oxygen species content, and the ferrous ion kit was used to detect the intracellular ferrous ion content. Based on this study, the GPX4 gene of microglia was silenced, and the cells were set as the negative control group (*si-NC* group), gene silencing group (*si-GPX4* group), DXQ-H+negative control group (*si-NC*+DXQ group), and DXQ-H+gene silencing group (*si-GPX4*+DXQ group). RT-qPCR was used to determine the expression of GPX4 mRNA, and Western Blot was used to detect the protein levels of ACSL4, xCT, FPN1, and GPX4. The co-expression of GPX4 and HO-1 was detected by immunofluorescence. **Results:** Compared with the Con group, the protein expressions of GPX4, xCT, and FPN1 in the Erastin model group were downregulated, the mitochondrial membrane potential level decreased, and the ACSL4 expression, ROS release, and ferrous ion content

increased ($P < 0.05$); compared with the Erastin model group, each drug-treated group increased the GPX4, xCT, and FPN1 protein levels and mitochondrial membrane potential levels, and decreased the ACSL4 expression, ROS release, and ferrous ion content ($P < 0.05$); after GPX4 gene silencing, compared with the *si-NC* group, the *si-GPX4* group had a decreased GPX4 mRNA expression; the GPX4, xCT, FPN1, and HO-1 protein levels were significantly decreased, and the ACSL4 protein level and MDA content were increased; compared with the *si-GPX4* group, the *si-GPX4*+DXQ group could reverse the above situation. Conclusion: DXQ can regulate antioxidant damage-related proteins and inhibit microglial ferroptosis through the FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 signaling pathway.

[Key words] microglia; ferroptosis; Dianxianqing drug-containing serum; GPX4; reactive oxygen species; Erastin

小胶质细胞作为中枢系统神经中固有的免疫细胞,可成为抵御外源性和内源性损伤的第一道防线,被认为是大脑的“守门人”,具有维持神经系统功能稳定的作用^[1]。铁作为大脑中含量较多的过渡金属,其稳态的失衡,参与多种神经退行性疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病和肌萎缩侧索硬化症等^[2-5]。脑细胞中以小胶质细胞铁储存能力较强,并随着疾病的进程积累铁,铁沉积导致小胶质细胞发生铁死亡^[6-7]。铁死亡(ferroptosis)是一种铁依赖性的新型的细胞死亡方式,其作用效应形态、分子及生化特征等方面的方式与凋亡、自噬、坏死等其他细胞死亡均有所不同,主要机制是在二价铁或脂氧合酶的作用下,催化细胞膜上高表达的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,从而诱导小胶质细胞发生铁死亡^[8-9]。因此,抑制小胶质细胞的铁死亡可能具有改善神经退行性疾病的作用。

癫痫清(专利号: ZL 2011 1 0069494)由多种中药组成,表现为熄风豁痰、消散瘀滞、益智醒脑等功效^[10]。课题组前期研究发现^[11-12],癫痫清颗粒可通过调控小胶质细胞免疫微环境、保护神经元发挥抗神经退行性疾病的作用,但是否可抑制小胶质细胞铁死亡,尚不明确。基于前期研究基础,本实验通过 Erastin 刺激小胶质细胞,建立铁死亡模型,同时应用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 和 *GPX4* 基因沉默,探讨癫痫清含药血清(DXQ)抗小胶质细胞铁死亡机制,以期 DXQ 在神经退行性疾病中的应用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器和设备

恒温培养箱(型号: CLM-170B-8-NF),新加坡 ESCO 公司;超净台(型号: SW-CJ-2FD),江苏苏净安泰空气技术有限公司;自动细胞计数仪(型号: IC1000),上海睿钰生物科技有限公司;倒置荧光显微镜(型号: DMI3000B),德国 Leica 公司;细胞离心机(型号: cell smart),北京鼎昊源科技有限公司;台式微量高速冷冻离心机(型号: NX-1R),北京鼎昊源科技有限公司;酶标仪(型号: INFINITE 200 PRO),瑞士 Tecan 公司;垂直电泳槽湿转膜系统(型号: 041BR118462),美国 BIO-RAD 公司;化学发光成像仪(型号: Azure 300),美国 Azure Biosystems 公司;PVDF 膜(型号: 0000254071),美国 Millipore 公司。

1.2 药物和试剂

Ferrostatin-1 (批号: 267347), 美国 MCE 公司; 癫痫清, 辽宁省中医药研究院中药药理室提供; Erastin (批号: 232930), 美国 MCE 公司; 一氧化氮检测试剂盒 (批号: 112223240219), 上海碧云天生物科技股份有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Glutathione Peroxidase 4, GPX4) (批号: 10020795), 武汉三鹰生物技术有限公司; 胱氨酸/谷氨酸反向转运体 (System Xc-, xCT) (批号: 1080354-17), 艾博抗(上海)贸易有限公司; 长链酰基辅酶 A 合成酶 (Acyl-CoA Synthetase 4, ACSL4) (批号: 00125165), 武汉三鹰生物技术有限公司; 膜铁转运蛋白 1 (Ferroportin 1, FPN1) (批号: 00133868), 武汉三鹰生物技术有限公司; 活性氧检测试剂盒 (批号: 111922230327), 上海碧云天生物科技股份有限公司; 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号: 062022230512), 上海碧云天生物科技股份有限公司; 细胞亚铁比色法试剂盒 (批号: WU0526T68158), 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; *si-GPX4* (批号: 1943183592), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 异丙醇 (批号: 20220729), 永华化学股份有限公司; 氯仿 (批号: 20170803), 国药集团化学有限公司。

1.3 实验动物和细胞

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 每只重量 180-220g, 购买于辽宁长生生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (辽) 2020-0001, 本实验采用的实验方案已通过辽宁省中医药研究院动物伦理委员会审核批准 (批准号 2023024)。

小胶质细胞购自于武汉普诺赛公司。

2 方法

2.1 癫痫清含药血清 (DXQ) 的制备

按体重将 15 只 8 周龄的 SD 大鼠随机分成 3 组, 分别为空白组 (Con 组), 癫痫清低剂量组 (DXQ-L), 癫痫清高剂量组 (DXQ-H), DXQ-H 组给药 20 g 生药/kg, DXQ-L 组给药 10 g 生药/kg, 空白组给予等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 7 d。最后一次给药 1 h 后, 用 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 在腹主动脉采血, 3000 r·min⁻¹, 离心 15 min, 得癫痫清含药血清与正常大鼠血清。

2.2 细胞培养及传代

将小胶质细胞株放置在高糖 DMEM 培养基中 (内含 10% 的胎牛血清, 100 U·mL⁻¹ 青霉素以及 100 U·mL⁻¹ 的链霉素), 培养于 37 °C, 体积分数为 5% CO₂

的培养箱中,细胞生长至 90%左右进行细胞传代。弃去旧培养基,PBS 洗 3 次,取 1 mL 0.25%的胰酶加入到培养瓶内,消化 2 min 左右,将其置于显微镜下观察,若细胞呈圆形,流沙状滑落时,则迅速加入 2 mL 含有质量分数为 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液终止消化,均匀吹打细胞悬液后转移至 15 mL 离心管中,1200 r·min⁻¹,常温离心 3 min,弃去上清液,再加入新鲜含有质量分数为 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,再次均匀吹打细胞,使细胞重悬。传代比例为 1: 3,每 2 d 传代一次。

2.3 细胞分组

取对数生长良好的小胶质细胞,培养于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中,每两 d 换液一次,分别设置分组为对照组(Con 组)、模型组(Erastin 组)、Fer-1 组(0.001 mmol·L⁻¹)、癫痫清含药血清低剂量组(DXQ-L 组)、癫痫清含药血清高剂量组(DXQ-H 组),Fer-1 治疗组(Era+Fer-1 组)、癫痫清含药血清低剂量治疗组(Era+DXQ-L 组)、癫痫清含药血清高剂量治疗组(Era+DXQ-H 组)。各组不同比例含药血清配置如下:① DXQ-L 组、Era+DXQ-L 组 5%浓度:5% 癫痫清含药血清+5%正常大鼠血清+90%基础培养基;② DXQ-H 组、Era+DXQ-H 组 10%浓度:10% 癫痫清含药血清+90%基础培养基;③ Con 组、Erastin 组、Fer-1 组、Era+Fer-1 组:10%正常大鼠血清+90%基础培养基;

2.4 CCK-8 法检测细胞生存率

取对数生长良好的小胶质细胞,以每孔 1×10⁵/ml 的密度接种于 96 孔板中,每组三个复孔。待细胞生长至细胞瓶底的 50%左右时,弃上清,PBS 洗 3 次,进行药物处理,随后在 37℃,体积分数为 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 12、24、48 h,加入 10 μL CCK-8 试剂,放回细胞培养箱中孵育 1 h,排除孔内气泡,采用酶标仪 450 nm 测定吸光度(OD₄₅₀)值。

2.5 线粒体膜电位法测定线粒体膜电位

按照线粒体膜电位检测试剂盒说明书操作,取对数生长状态良好的小胶质细胞,按照每孔 1×10⁵/ml 的密度接种于板底置有圆形玻璃爬片的 24 孔板中,待细胞生长至细胞瓶底的 50%左右时,弃除上清,2 mL PBS 洗净 3 次,待药物处理 48 h 后,弃上清,2 mL PBS 清洗 1 次,将 Rhodamine 123(1000X)和透明染色缓冲液按 1: 1000 的比例,加入细胞孔里,每孔 200 μL,37℃,体积分数为 5% CO₂

的细胞培养箱孵育 20 min, 弃去上清, 用不含血清的 DMEM 培养液清洗 3 次, 加入抗荧光淬灭封片液, 将其置于荧光显微镜下拍照记录。

2.6 ROS 探针法检测细胞内活性氧含量

按照活性氧检测试剂盒说明书操作, 取对数生长状态良好的小胶质细胞, 按照每孔 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于底部置有圆形玻璃爬片的 24 孔板中, 待细胞生长至细胞瓶底的 50% 左右时, 弃除上清, PBS 洗净 3 次, 药物处理 48 h 后, 弃掉旧培养液, PBS 清洗 1 次, 按照 1: 1000 的比例用不含血清的 DMEM 培养液稀释 DCFH-DA, 加入细胞孔里, 每孔 200 μL , 在 37°C , 体积分数为 5% CO_2 的细胞培养箱中孵育 20 min, 弃去上清, 用不含血清的 DMEM 培养液洗板 3 次, 加入抗荧光淬灭封片液, 将其置于荧光显微镜下拍照记录。

2.7 细胞亚铁比色法测试盒检测细胞内亚铁离子含量

按照细胞亚铁比色法测试盒说明书操作, 离心收集各组细胞, 用细胞计数仪分别测定各组细胞的细胞数, 约每 1×10^6 个细胞加入 0.2 mL 的试剂一冰上裂解 10 min, 随后 15000 g 离心 10 min, 分离得上清液作为待测样品, 将 80 μL 待测样品与不同浓度标准品, 分别加入酶标板相应孔中, 并设置 2 个复孔, 在其中加入 80 μL 试剂三, 充分混匀, 在 37°C , 体积分数为 5% CO_2 的条件下孵育 10 min, 使用酶标仪在 593 nm 处测定 OD 值。

2.8 免疫荧光法检测转染前后各组细胞 GPX4、xCT、HO-1 的蛋白表达

将对数生长期的的小胶质细胞以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于预置圆形玻璃爬片的 24 孔板, 施加相应药物处理 48 h, 移除上清, PBS 洗涤 1 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 免息荧光封闭液室温封闭 10 min, 减少非特异性结合, 分别加入一抗 GPX4 (1: 500)、xCT (1: 500)、HO-1 (1: 400) 4°C 冰箱过夜, 避光加入荧光二抗 (1: 500), 室温孵育 1 h, DAPI 室温染色 5 min, PBS 洗涤 3 次, 加入抗荧光淬灭液封片, 荧光显微镜下拍照记录。

2.9 Western Blot 法检测转染前后各组细胞中 GPX4、FPN1、xCT、ACLS4 蛋白表达

利用高效 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 定量, 每孔上 25 μg 总蛋白电泳, 湿转法转膜, 全程冰浴, QuickBlock™ 封闭液室温摇床封闭 20 min 后, 4°C 冰箱孵育一抗 GPX4 (1: 1000)、FPN1 (1: 500)、xCT (1: 1000)、ACLS4

(1: 2000) 过夜, 将膜与二抗 (1: 3000) 在室温下摇床孵育 2 h, PBS 清洗 3 次, 每次 10 min, 滴加 ECL 发光液进行曝光成像, 利用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.10 小胶质细胞转染与分组

将对数生长期的的小胶质细胞以每孔 $4 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种在 6 孔板中, 待细胞密度达到 30% 左右时, 配制 *si-RNA* 复合物, 室温孵育 15 min, 弃除上清, 分别将 *si-GPX4*、*si-NC* 复合体和相应药物加入相应 6 孔板孔中, 将细胞分为阴性对照组 (*si-NC* 组)、基因沉默组 (*si-GPX4* 组)、癫痫清含药血清+阴性对照组 (*si-NC*+DXQ-H 组)、癫痫清含药血清+基因沉默组 (*si-GPX4*+DXQ-H 组), 在 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 48 h。

2.11 RT-qPCR 检测细胞中 *GPX4* 表达

将转染后的各组细胞弃除上清, PBS 洗涤 1 次, 转移至无酶 ep 管中, 加入 Trizol 充分裂解后, 加入氯仿并剧烈震荡至形成奶昔状混合物, 静置 5 min, 于 4 °C, 12000 g, 离心 15 min, 吸取上层水相, 移入新的无酶 ep 管中, 加入等体积异丙醇, 轻轻颠倒后静置 10 min, 再次离心, 弃上清, 以乙醇洗涤 RNA 沉淀两次, 并离心去除乙醇, 晾干后得总 RNA, 进行浓度检测。引物序列由上海生工生物工程有限公司定制合成。cDNA 扩增条件为 94 °C 预变 3 min, 94 °C, 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 40 个循环, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析数据, 引物序列 *GPX4* 正向: 5'-GCCAAAGTCCTAGGAAACGC-3', 反向: 5'-CCGGGTGAAAGGTTTCAG GA-3'; β -actin 正向: 5'-GATATCGCTGCGCTGGTCG-3', 反向: 5'-CATTCCCACCATACCCT-3'。

2.12 丙二醛(MDA)含量检测试剂盒检测各组细胞 MDA 含量

按照 MDA 含量检测试剂盒说明书操作, 离心收集经药物干预后的转染细胞, 使用细胞计数仪对各组细胞进行计数, 离心后弃上清, 按每 500 万细胞加入 1 mL 提取液的比例破碎细胞, 超声波功率 200 W, 超声 3 s, 间歇 10 s, 循环 30 次, 8000 g, 4 °C 离心 10 min, 取上清, 置冰上备用, 在干净的 2 ml ep 管中依次加入 MDA 工作液、蒸馏水/样本及试剂三, 反应体系在 100 °C 水浴中保持 60 min, 冰浴冷却, 室温 10000 g, 离心 10 min。取 200 μL 上清加入 96 孔板中, 利用酶标仪在 532 nm 和 600 nm 波长处测定吸光度 (OD_{532} 及 OD_{600})。

2.13 统计学分析

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 IBM SPSS Statistics 27 以及 GraphPad Prism 9 统计学软件进行单因素分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组细胞用药后活率水平比较

通过 CCK-8 法检测各组细胞不同用药浓度后活率水平变化。结果显示, 不同浓度的 DXQ 作用小胶质细胞 48 h 时, 与对照组相比, 血清含量升至 5% 时 OD₄₅₀ 显著升高, 血清含量 10% 时 OD₄₅₀ 开始降低 ($P < 0.05$); 不同浓度的 Fer-1 作用小胶质细胞 48 h 时, 与对照组相比, 0.5 μM 组 OD₄₅₀ 显著升高, 0.001 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 OD₄₅₀ 开始降低 ($P < 0.05$); 不同浓度的 Erastin 作用小胶质细胞 48 h 时, 与对照组相比, 细胞 OD₄₅₀ 呈阶梯式下降 ($P < 0.05$) (见图 1)。故选择 5%DXQ, 10%DXQ, 0.001 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fer-1 和 0.01 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Erastin 为工作浓度, 作用 48 h 进行后续实验。

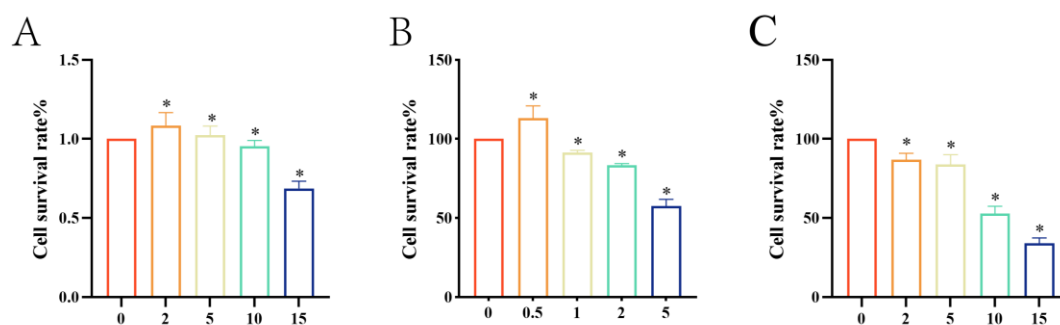
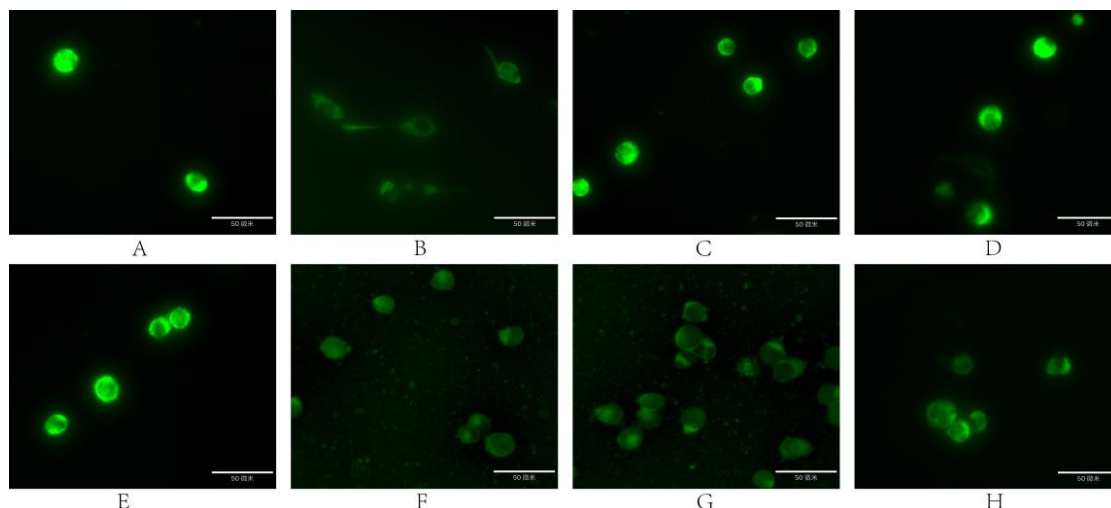


图 1 不同浓度 DXQ (A 组)、Fer-1 (B 组)、Erastin (C 组) 对小胶质细胞增殖的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of DXQ (group A), Fer-1 (group B) and Erastin (group C) on microglia proliferation

注: 与对照组相比, $*P < 0.05$

3.2 DXQ 对各组细胞线粒体膜电位水平的影响

本实验应用线粒体膜电位检测试剂盒检测小胶质细胞中线粒体膜电位的表达情况。结果显示, 与 Con 组相比, Erastin 组荧光减弱, 线粒体膜电位表达水平显著下调, Fer-1 组、DXQ-L 组、DXQ-H 组荧光强度相当, 线粒体膜电位表达无显著差别; 与 Erastin 组相比, Era+Fer-1 组、Era+DXQ-L 组、Era+DXQ-H 组荧光上调, 线粒体膜电位表达水平增强, 其中, Era+DXQ-H 组荧光较强, 线粒体膜电位表达水平较高 (见图 2)。



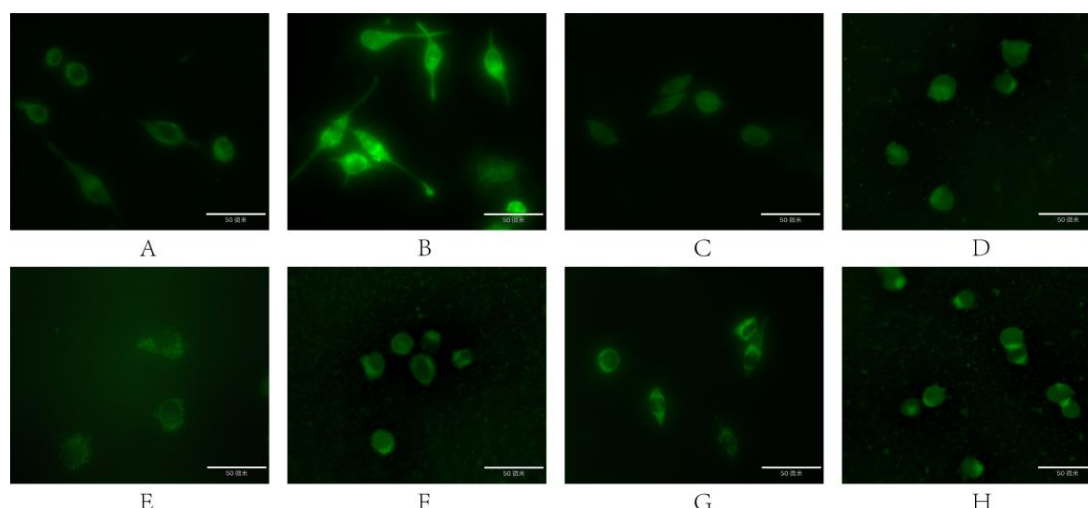
A. Con 组 B.Erastin 组 C.Fer-1 组 D.DXQ-L 组 E.DXQ-H 组 F.Era+Fer-1 组 G.Era+DXQ-L 组 H.Era+DXQ-H 组

图 2 各组细胞中线粒体膜电位的表达情况 (×40)

Fig.2 Expression of mitochondrial membrane potential in each group (×40)

3.3 DXQ 对各组细胞 ROS 水平的影响

本实验应用活性氧检测试剂盒对小胶质细胞中 ROS 的表达情况进行检测。结果显示，与 Con 组相比，Erastin 组表现为较强的绿色荧光，ROS 表达水平升高，Fer-1 组、DXQ-L 组、DXQ-H 组荧光强度相当，ROS 表达水平无显著差别；与 Erastin 组相比，Era+Fer-1 组、Era+DXQ-L 组、Era+DXQ-H 组荧光强度较弱，ROS 表达水平减弱（见图 3）。



A.Con 组 B.Erastin 组 C.Fer-1 组 D.DXQ-L 组 E.DXQ-H 组 F.Era+Fer-1 组 G.Era+DXQ-L 组 H.Era+DXQ-H 组

图 3 各组小胶质细胞中 ROS 的表达情况(×40)

Fig.3 Expression of ROS in microglia in each group (×40)

3.4 DXQ 对各组细胞内亚铁离子含量水平的影响

本实验应用细胞亚铁离子(Fe^{2+})比色法测试盒对小胶质细胞中的铜离子浓度进行检测,结果显示,与 Con 组相比,Erastin 组的 Fe^{2+} 含量显著升高, Fer-1 组、DXQ-L 组、DXQ-H 组的 Fe^{2+} 含量无显著差异 ($P<0.05$); 与 Erastin 组相比, Era+Fer-1 组、Era+DXQ-L、Era+DXQ-H 组 Fe^{2+} 含量下降,其中 Fer-1 组与 Era+DXQ-H 组的 Fe^{2+} 含量下降显著 ($P<0.05$) (见图 4)。

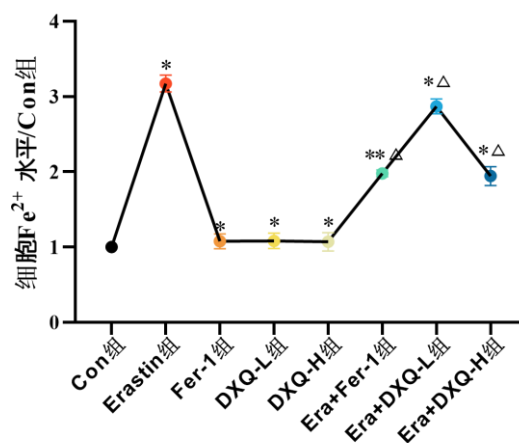


图 4 各组细胞总 Fe^{2+} 含量变化

Fig.4 Changes in total Fe^{2+} content in each group

注: 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组相比, $\Delta P<0.05$ 。

3.5 DXQ 对各组细胞 GPX4、xCT 的蛋白表达的影响

本实验采用免疫荧光染色检测 DXQ 对各组细胞铁死亡重要蛋白 GPX4, xCT 的蛋白表达的影响。GPX4 主要分布在细胞质中, 呈红色荧光, xCT 位于细胞膜上, 呈绿色荧光。结果显示, 与 Con 组相比, Erastin 组 xCT、GPX4 荧光强度减弱, 表达显著降低, Fer-1 组、DXQ-L 组、DXQ-H 组荧光强度相当, xCT 表达无显著变化; 与 Erastin 组相比, Era+Fer-1 组、Era+DXQ-L 组、Era+DXQ-H 组荧光升高, GPX4、xCT 表达上调, 其中 Era+DXQ-H 组荧光强度更高 (见图 5, 6)。

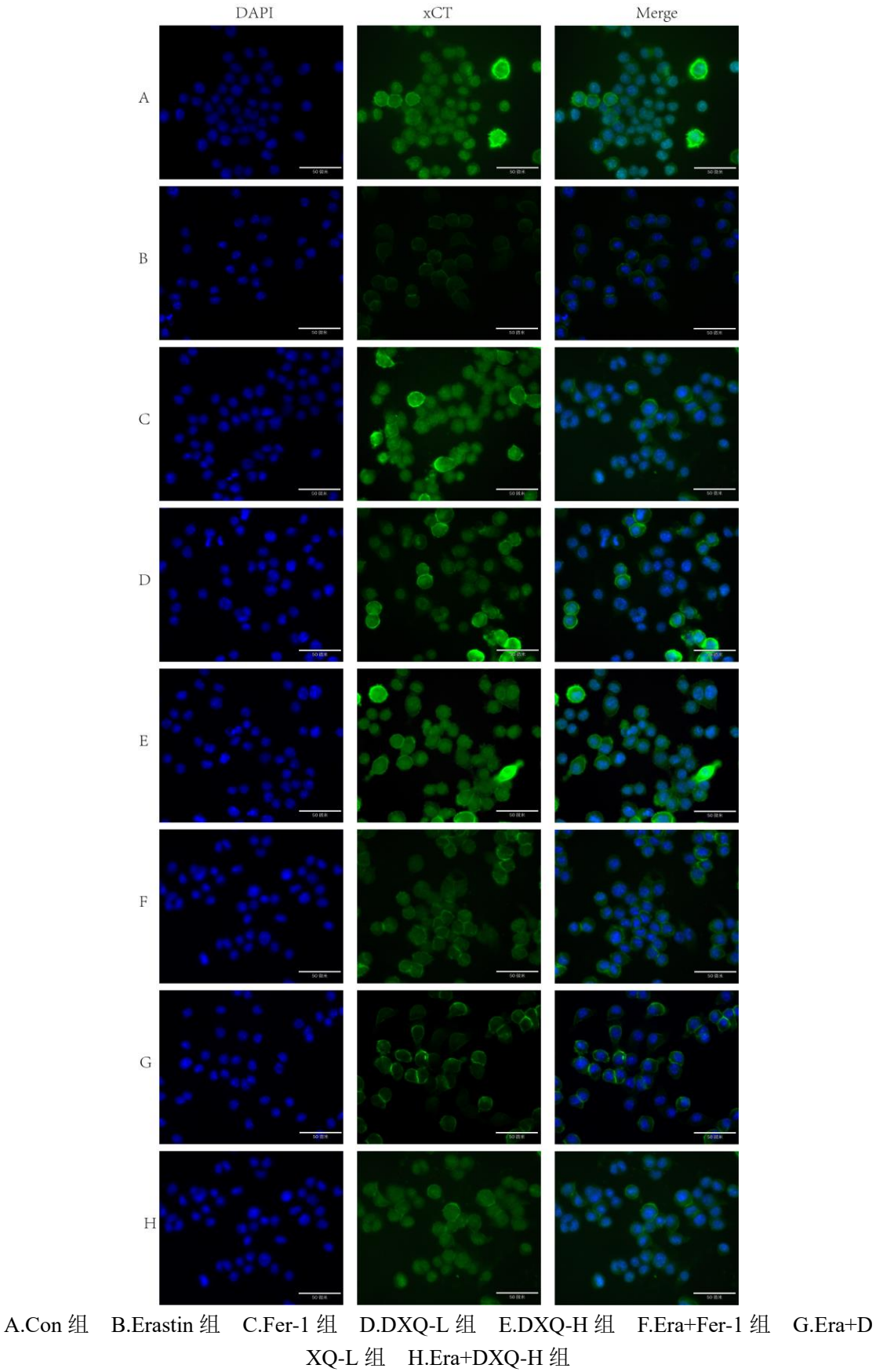
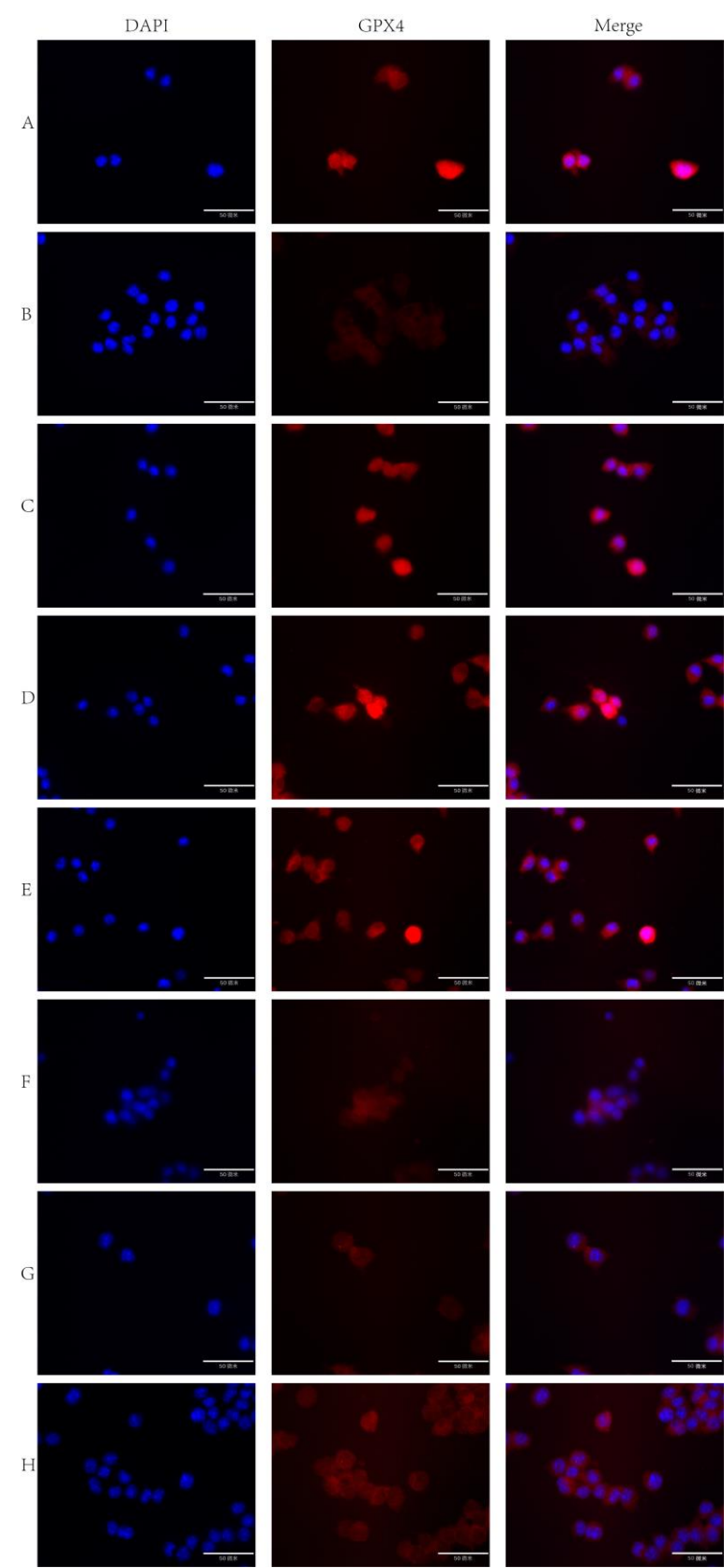


图 5 各组细胞中 xCT 的表达情况(×40)

Fig.5 Expression of xCT in cells in each group (×40)



A.Con 组 B.Erastin 组 C.Fer-1 组 D.DXQ-L 组 E.DXQ-H 组 F.Era+Fer-1 组 G.Era+DXQ-L 组 H.Era+DXQ-H 组

图 6 各组细胞中 GPX4 的表达情况(×40)

Fig.6 Expression of GPX4 in cells in each group (×40)

3.7 DXQ 对各组细胞 GPX4、FPN1、xCT、ACSL4 水平的影响

本实验通过 Western Blot 法检测 DXQ 对各组细胞铁死亡标志性蛋白 GPX4、xCT、FPN1、ACSL4 蛋白表达水平。结果如下，与 Con 组相比，Erastin 组 FPN1、GPX4、xCT 的蛋白表达降低，ACSL4 的蛋白表达升高，Fer-1 组、DXQ-L 组、DXQ-H 组无显著差异 ($P<0.05$)；与 Erastin 组相比，Era+Fer-1 组、Era+DXQ-L 组、Era+DXQ-H 组 FPN1、GPX4、xCT 的蛋白表达升高，ACSL4 的蛋白表达降低，Era+DXQ-L 组 FPN1、xCT 的蛋白表达升高，GPX4 无显著差异，ACSL4 的蛋白表达降低 ($P<0.05$) (见图 7)。

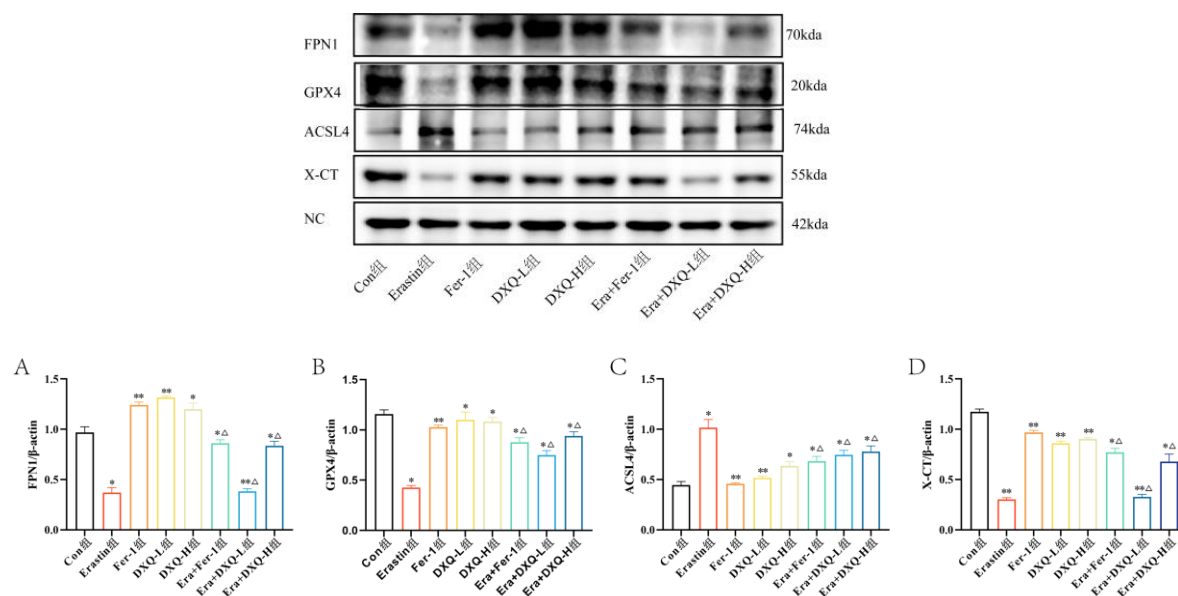


图 7 DXQ 对小胶质细胞铁死亡关键蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of DXQ on the expression of key proteins of ferroptosis in microglia

注：与对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组相比， $\Delta P<0.05$ 。

3.6 RT-qPCR 检测细胞中 GPX4 mRNA 表达

通过 RT-qPCR 检测细胞中铁死亡基因 GPX4 的转录表达水平，研究 DXQ 对铁死亡关键基因的影响。结果显示，在敲低 GPX4 基因的情况下，与 si-NC 组相比，si-GPX 组的 GPX4 的基因表达明显下调 ($P<0.05$)；与 si-GPX 组相比，si-GPX+DXQ-H 组 (10%含药血清，下同) 的 GPX4 基因表达上调 ($P<0.05$) (见图 8)。

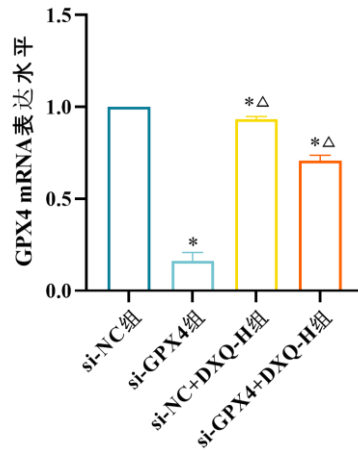


图 8 铁死亡基因 GPX4 在各组中的转录表达水平

Fig.8 Transcriptional expression levels of ferroptosis gene GPX4 in each group

注：与对照组相比，* $P<0.05$ ；与模型组相比， $\Delta P<0.05$ 。

3.7 DXQ 对转染后各组细胞 GPX4、FPN1、xCT、ACLS4 水平的影响

本实验通过 Western Blot 法检测 DXQ 对各组细胞转染后铁死亡标志性蛋白 GPX4、xCT、FPN1、ACSL4 蛋白表达水平。与对照组相比，*si-GPX4* 组 FPN1、GPX4、xCT 的蛋白表达降低，ACSL4 的蛋白表达升高（ $P<0.05$ ）；与 *si-GPX4* 组相比，*si-GPX4+DXQ-H* 组 FPN1、GPX4、xCT 的蛋白表达升高，ACSL4 的蛋白表达降低（ $P<0.05$ ）（见图 9）。

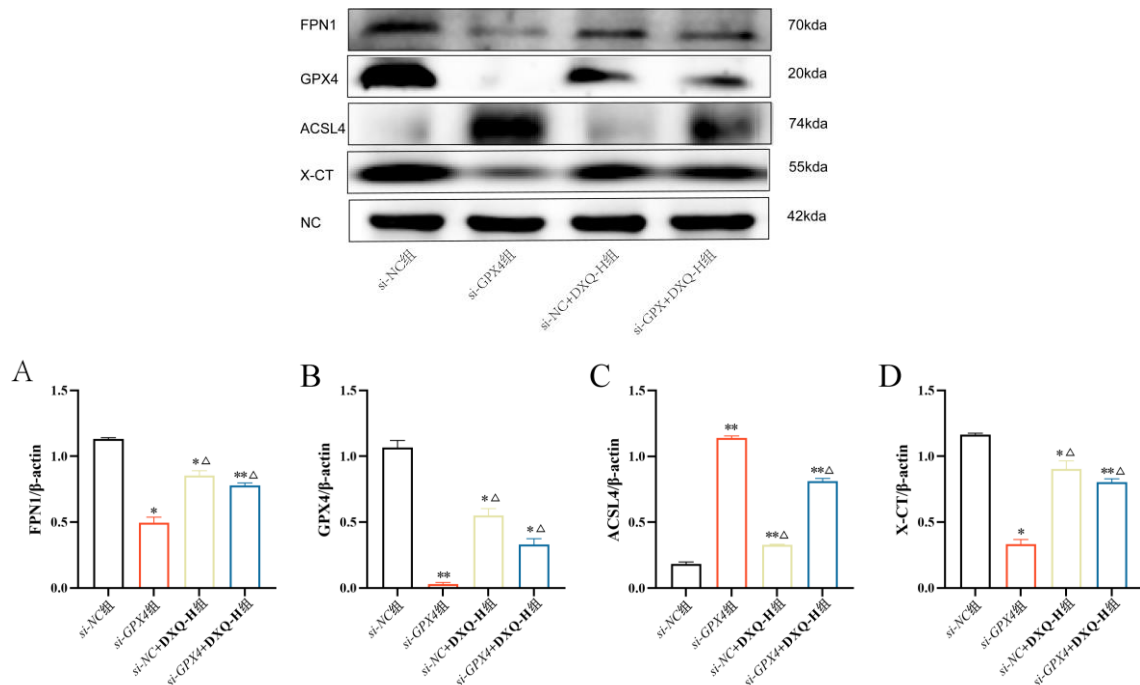


图 9 DXQ 对小胶质细胞沉默 GPX4 后铁死亡关键蛋白表达的影响

Fig.9 Effect of DXQ on the expression of key proteins of ferroptosis after microglia silencing GPX4

注：与对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组相比， $\Delta P<0.05$ 。

3.8 DXQ 对各组细胞 MDA 含量水平的影响

本实验采用 MDA 含量检测试剂盒检测各组小胶质细胞中 MDA 含量，结果显示，与 *si-NC* 组相比，*si-GPX4* 组的 MDA 含量显著上调；与 *si-GPX4* 组相比，*si-GPX4*+DXQ-H 组 MDA 含量明显降低（见图 10）。

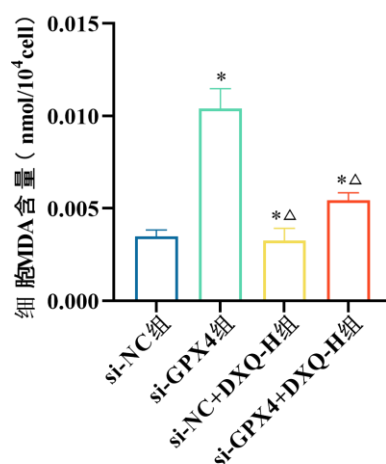


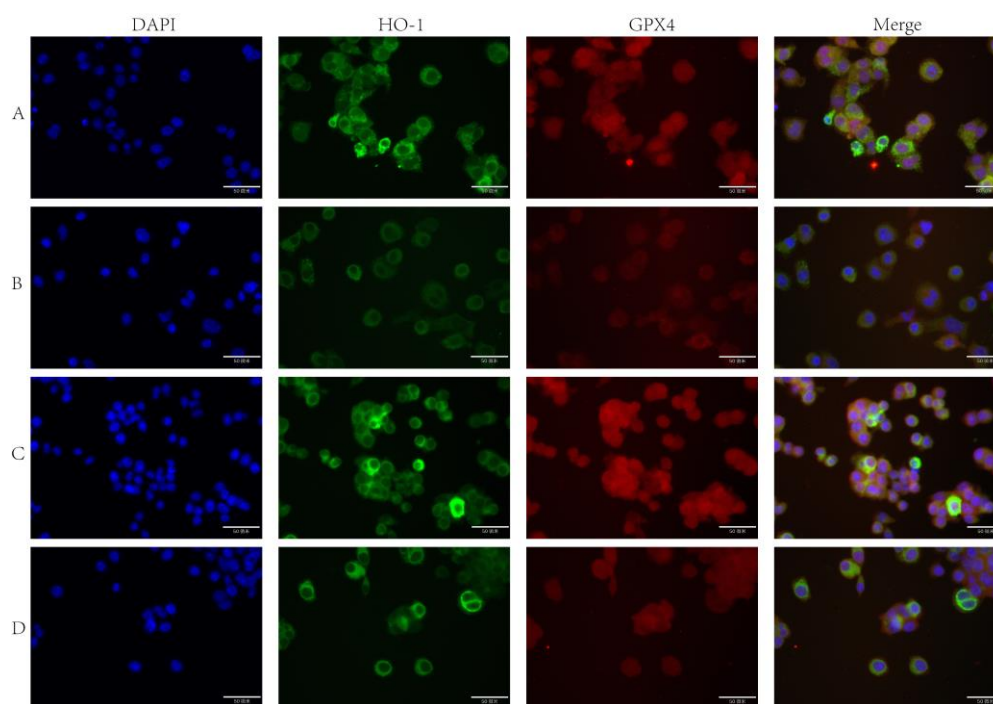
图 10 DXQ 对各组细胞 MDA 含量水平的影响

Fig.10 Effect of DXQ on the level of MDA content in cells in each group

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ；与模型组相比， $\Delta P < 0.05$ 。

3.9 DXQ 对敲低 GPX4 后各组细胞 GPX4、HO-1 的蛋白表达的影响

本实验采用免疫荧光检测 DXQ 对转染后各组细胞铁死亡关键因子 GPX4，抗氧化相关蛋白 HO-1 表达变化。GPX4 呈红色，HO-1 呈绿色。结果显示，与 *si-NC* 组相比，*si-GPX4* 组的荧光强度均减弱，HO-1、GPX4 表达下调，*si-NC*+DXQ-H 组无明显差异；与 *si-GPX4* 组相比，*si-GPX4*+DXQ-H 组荧光强度均增强，GPX4、HO-1 表达上调（见图 11）。



A.si-NC 组 B.si-GPX4 组 C.si-NC+DXQ-H 组 D.si-GPX4+DXQ-H 组

图 11 转染后各组细胞中 GPX4、HO-1 的表达情况($\times 40$)

Fig.11 Expression of GPX4 and HO-1 in cells after transfection ($\times 40$)

4 讨论

神经退行性疾病多发于老年人，伴随人口老龄化的加剧，其患病率也在逐年上升^[12]。近年来，有诸多文献证实神经退行性疾病的产生和发展与铁死亡有着密切的关系^[13]。随着研究的深入，越来越多的学者认为小胶质细胞铁死亡可能是引起神经退行性疾病的一个重要机制^[14]。本研究以小胶质细胞为实验对象，GPX4 为研究靶点，考察 DXQ 对小胶质细胞铁死亡的抑制作用。铁死亡抑制剂 Fer-1 (Ferrostatin-1) 具有强抗氧化能力，可以减少细胞中不稳定的铁池，抑制由铁和脂质体中痕量脂质氢过氧化物引发的过氧化，在还原铁存 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 在的情况下消除脂质氢过氧化物，通过抑制铁死亡关键因子 GPX4 发挥抗铁死亡作用^[15]，因此在本研究中作为阳性对照药。

在 Ersatin 诱导的小胶质细胞铁死亡模型中，我们利用 CCK-8 实验确定了 Fer-1(48 h 0.001)、Ersatin(48 h 0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和癫痫清含药血清(48 h 5%/10%)的剂量与作用时间。Chen Ma^[16]研究表明，细胞内增多的 Fe^{2+} 可促使线粒体在有氧化过程会产生大量的 ROS，过度堆积的 ROS 促进线粒体膜电位崩解，线粒体膜通透性增加，细胞发生铁死亡。本研究结果表明，DXQ 可减少 Fe^{2+} 及 ROS

的堆积,提高线粒体膜电位和小胶质细胞的生存率。

铁死亡的重要标志是 GPX4、xCT、FPN1 的失活与 ACSL4 的上调^[17-18]。GPX4 可通过催化谷胱甘肽发挥抗氧化作用,中和脂质过氧化物,保护细胞,减轻氧化损伤^[19]。xCT 主要承担胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白的转运功能,维持细胞产生谷胱甘肽^[20]。铁死亡发生时,细胞中 GPX4/xCT 受到抑制,细胞的抗氧化能力随之下降,ROS 增加^[21]。因此,调控 xCT/GPX4 可有效抑制 ROS 的产生;FPN1 可调节铁的输出,通过抑制 xCT/GPX4 的表达,加速铁死亡进程^[21]。ACSL4 主要参与催化花生四烯酰辅酶 A 生物,触发磷脂过氧化,增加细胞对铁死亡的敏感性^[22]。

本研究采用 Western Blot 法检测各组细胞中 xCT、FPN1、GPX4、ACSL4 蛋白表达,免疫荧光染色观察 GPX4、xCT 蛋白的变化。实验结果显示,DXQ 能使 GPX4、xCT、FPN1 的蛋白表达、线粒体膜电位水平显著升高,ACSL4 表达降低,说明 DXQ 可能通过 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 通路抑制了由 Erastin 引起的小胶质细胞铁死亡,且以 DXQ-H 组效果最好,此剂量用于后续实验中。

为了进一步确认 DXQ 抑制小胶质细胞铁死亡与 GPX4 有关,我们对小胶质细胞进行了 GPX4 基因沉默。PCR 结果显示, *si-GPX4* 组 GPX4 mRNA 表达下降,说明 GPX4 基因沉默效果良好,与 *si-GPX4* 组比较,DXQ 可增加 GPX4 mRNA 表达;说明 DXQ 对小胶质细胞的生存率的影响与 GPX4 有关。在接下来的实验中,我们进一步考察了铁死亡的标志性蛋白 GPX4、FPN1、xCT、ACSL4,结果表明,DXQ 对上述指标均具有改善作用。研究发现,HO-1 在神经退行性疾病中有抗氧化的作用,可以保护神经细胞^[23],减少 MDA 含量可抑制铁死亡促进神经功能恢复^[24]。本研究结果显示,与 *si-GPX4* 组比较,DXQ 可以增加 HO-1 蛋白水平,减少 MDA 含量。以上研究说明,DXQ 可通过 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 信号通路发挥抗氧化作用,抑制小胶质细胞发生铁死亡。

综上所述,DXQ 可以抑制小胶质细胞铁死亡,这可能与抑制小胶质细胞内 Fe^{2+} 含量、调控铁转运失衡以及抗氧化损伤相关蛋白有关,其作用靶点为 GPX4,相关信号通路为 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4。

参考文献

- [1] 苗珠月, 魏汝恒, 刘可心, 等.髓样细胞触发受体 2——缺血性脑卒中治疗的新靶点[J].中国免疫学杂志, 2024, 40(07): 1510-1514.
- [2] Xiang Y, Song X, Long D. Ferroptosis regulation through Nrf2 and implications for neurodegenerative diseases[J]. Arch Toxicol, 2024, 98(3): 579-615.
- [3] 付世青, 杨杰, 王芳.铁死亡在阿尔茨海默病中的作用[J].中国医学创新, 2024, 21(18): 184-188.
- [4] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology and Disease[J]. Cell, 2017, 171(2): 273-85.
- [5] 田梅, 刘亚玲, 李志广, 等.铁聚集及铁死亡在肌萎缩侧索硬化症中的研究进展[J].临床神经病学杂志, 2023, 36(05): 389-392.
- [6] 金昊, 杨立朝.脑缺血后小胶质细胞线粒体碎片介导神经元铁死亡及靶向干预策略[J].中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(07): 503-504.
- [7] 赵宇威, 王伟轩, 师凡, 等.醋酸铅暴露致小胶质细胞系 BV-2 细胞铁死亡的机制研究[J].环境与职业医学, 2022, 39(08): 895-901.
- [8] Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-282.
- [9] 孙靖烨, 萧文泽, 周艳雯, 等.基于抗氧化蛋白探讨中医药改善糖尿病肾病铁死亡的潜在靶点[J].中药新药与临床药理, 2024, 35(09): 1445-1452.
- [10] 杨彩瑜, 李荧, 齐越, 等.癫痫清颗粒调控 Sigma 1 受体抑制阿尔茨海默病模型小鼠炎症小体研究[J].中国现代医生, 2022, 60(02): 29-33+197.
- [11] 齐越, 贾冬, 张艳军, 等.癫痫清颗粒介导线粒体自噬对 P301S 小鼠 tau 蛋白的影响[J].中国药房, 2023, 34(14): 1712-1718.
- [12] 房小楠, 李昭, 贾冬, 等.癫痫清颗粒对阿尔茨海默病小鼠模型细胞焦亡影响[J].辽宁中医药大学学报, 2023, 25(01): 20-25.
- [13] Reichert CO, de Freitas FA, Sampaio-Silva J, et al. Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8765.
- [14] 温彩燕.白花丹素减少 LPS 激活的 BV-2 小胶质细胞中促炎细胞因子的表达[J].中国病理生理杂志, 2018, 34(05): 831.
- [15] 齐越, 贾冬, 张艳军, et al.癫痫清颗粒介导线粒体自噬对 P301S 小鼠 tau 蛋白的影响[J].中国药房, 2023, 34(14): 1712-1718.
- [16] Miotto G, Rossetto M, Di Paolo ML, et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1[J]. Redox Biol, 2020, 28: 101328.
- [17] 常熙雯, 赵安鹏, 钟艳, 等.高原低氧暴露后小鼠海马铁死亡相关通路的变化[J].生理学报, 2024, 76(04): 507-516.
- [18] 董朋涛, 王峥, 张青, 等.中药基于铁死亡机制防治糖尿病肾病[J].中医学报, 2024, 39(09): 1894-1903.
- [19] Feng X, Wang S, Sun Z, et al. Ferroptosis Enhanced Diabetic Renal Tubular Injury via HIF-1alpha/HO-1 Pathway in db/db Mice [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 626390.
- [20] Tang D, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. Cell Research, 2020, 31(2): 107-125.
- [21] Xie Y, Kang R, Klionsky DJ, et al. GPX4 in cell death, autophagy, and disease[J].

- Autophagy. 2023; 19(10): 2621-2638.
- [22] JIA B, LI J, SONG Y, et al. ACSL4-Mediated Ferroptosis and Its Potential Role in Central Nervous System Diseases and Injuries[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(12): 10021.
- [23] Dong H, Qiang Z, Chai D, et al. Nrf2 inhibits ferroptosis and protects against acute lung injury due to intestinal ischemia reperfusion via regulating SLC7A11 and HO-1[J]. Aging (Albany NY), 2022, 12(13): 12943-12959.
- [24] Chen J, Yang L, Geng L, et al. Inhibition of Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 facilitates neurological recovery after stroke by regulation ferroptosis[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15(6): 632354.

含砷中药复方减毒配伍研究进展及砷体内命运关键影响因素探讨

曾慧敏^{1,2}, 江珍红³, 史云霞⁴, 杨建豪¹, 黄凯峰¹, 伍振辉⁵, 杨明^{1,2*},

徐焕华^{1,2*}, 高月⁵

- (1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
2. 江西中医药大学经典名方现代中药创制全国重点实验室, 南昌 330004;
3. 南昌大学第二附属医院分子医学江西省重点实验室, 南昌 330006;
4. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 南昌 330004;
5. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] 中药安全性关系到人民群众健康和生命安全, 保证中医临床安全用药是医药卫生领域的重大需求。近年来, 中医药临床循证证据逐年增多, 中医药的疗效越来越受到国际认可。然而, 伴生的、不可忽视的中药的安全性问题仍饱受质疑, 特别是“毒性”中药材的应用更是备受关注, 中药安全性问题已严重制约中医药的现代化和国际化。减毒配伍研究一直是中医药领域关注的前沿科学问题之一, 是保障中药安全性的关键环节。基于此, 本文以含砷中药复方为例, 对含砷中药复方减毒配伍研究进展进行综述, 并对砷甲基化代谢中 As3MT 调控的甲基供体平衡稳态在砷制剂体内命运中的作用进行探讨, 为含砷中药复方临床安全合理应用提供理论指导, 也为该类制剂的减毒配伍研究提供新的思路和方法。

[关键词] 含砷制剂; 中药复方; 减毒配伍; As3MT; 甲基供体平衡稳态

[基金项目] 国家自然科学基金(82304857); 江西省自然科学基金项目(20224BAB216105、20232BAB206167); 中药研制与中药安全性创新团队(ZYYCXTD-D-202207)

[第一作者] 曾慧敏, 硕士研究生, 主要从事中药药理研究。zenghuimin@jxutcm.edu.cn

[通信作者] 徐焕华, 副教授, 主要从事中药药理与毒理研究, E-mail: huanhua323@jxutcm.edu.cn;

杨明, 教授, 主要从事中药炮制及药剂研究, E-mail: lab215@163.com.

Study on the toxicity of arsenic-containing preparations and the process of arsenic in vivo

ZENG Hui-min^{1,2}, JIANG Zhen-hong³, SHI Yun-xia⁴, YANG Jian-hao¹, HUANG Kai-feng¹, WU Zhen-Hui⁵, YANG Ming^{1,2*}, XU Huan-hua^{1,2*}, GAO Yue⁵

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, 2. National Key Laboratory for the Modernization of Classical and Famous Prescriptions of Chinese Medicine, 3. Jiangxi Key Laboratory of Molecular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China, 4. Research Center for Differentiation and Development of Traditional Chinese Medicine Basic Theory, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China., 5. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] The safety of traditional Chinese medicine (TCM) is closely related to the health and life safety of the people, and ensuring the safe use of TCM in clinical practice is a major demand in the field of medicine and health. In recent years, the number of high-quality clinical evidence-based evidences for TCM has increased year by year, and the efficacy of TCM has increasingly been recognized internationally. However, the accompanying and unavoidable safety issues of TCM are still subject to doubts, especially the application of "toxic" traditional Chinese medicinal materials, which has attracted much attention. The safety issues of TCM have seriously restricted the modernization and internationalization of TCM. The research on detoxifying compatibility has always been one of the frontier scientific issues in the field of TCM and a key link to ensure the safety of TCM. Based on this, taking arsenic-containing TCM formula as an example, this article summarizes the research progress on detoxifying compatibility of arsenic-containing TCM formula and explores the role of As3MT-regulated methyl donor balance steady state in the fate of arsenic preparations in vivo, which can provide theoretical guidance for the safe and reasonable clinical application of arsenic-containing TCM formula and also provide new ideas and methods for the research on detoxifying compatibility of this type of preparation.

[Key words] Arsenic-containing preparation; TCM formula; Toxicity attenuation with compatibility; As3MT; Methyl Donor Balance

保证中医临床安全用药是医药卫生领域的重大需求^[1-3]。近 10 年国家药品不良反应监测年度报告显示（图 1），不良反应总事件数从 2014 年的 132.8 万份逐年递增至 2023 年的 241.9 万份。虽然中药相关不良反应报告数占比保持逐年下降的趋势，从 2014 年的 17.3% 降至 2023 年的 12.6%。但中药年度不良反应报告数基本维持在 20 万件水平，2023 年甚至突破 30 万件^[4]。该数据趋势一定程度上从侧面反应了随着中医药临床循证证据逐年增多^[5, 6]，中医药的疗效越来越受到国际认可。然而，伴生的、不可忽视的中药的安全性问题仍饱受质疑，中药安全性问题形势依然严峻，特别是“毒性”中药材的应用更是备受关注。

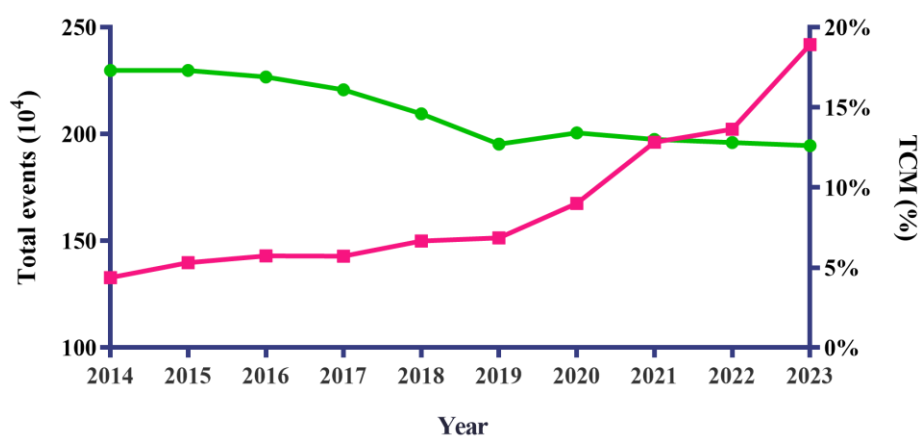


图 1 近 10 年国家药品不良反应年度监测报告总事件数及中药占比

Figure1 Total number of events and proportion of TCM in the annual monitoring report of adverse drug reactions in China in the past 10 years

含砷中药复方，以复方黄黛片（RIF）为例，作为全球唯一上市的口服砷剂，对急性早幼粒细胞白血病（APL）的疗效确切^[7, 8]，RIF 联合全反式维甲酸（ATRA）形成的双口服方案展现了高缓解率、高安全性、低复发率、高便捷性及优越的可及性等特点^[9]，也受益于双口服方案治疗模式的推广，中国的 APL 患者早期死亡率处于国际低水平，APL 治疗位于国际最前沿^[10]。APL 虽然疗效确切，但一直以来，含砷制剂的安全性严重制约着此类药物的临床应用和推广，已成为该类药物产业发展的痛点之一。减毒配伍研究一直是中医药领域关注的前沿科学问题，特别是针对“毒性”中药，“基于中医临床常用‘有毒’中药减毒配伍研究”更是被写入国家自然科学基金委员会“十四五”第一批重大项目指南，也成为解决此类药物产业发展痛点的有效途径之一^[11, 12]。基于此，以含砷中药复方为例，本文对含砷中药复方减毒配伍研究进展进行综述，并探讨砷甲基转移酶（As3MT）调控

的甲基供体平衡稳态在砷制剂体内命运中的作用,可为含砷中药复方临床安全合理应用提供理论指导,也为该类制剂的减毒配伍研究提供新的思路和方法。

1 含砷中药复方来源及功能主治

本文对含砷中药复方指的是含有雄黄、砒霜为代表性中药的复方制剂,对2020 版《中国药典》、文献发表及蒙药记载的此类复方制剂收集整理,结果如表 1 所示,共有 39 种含雄黄或雌黄的含砷中药复方,功能主治主要包括清热解毒、消肿止痛、化痰消积和镇惊开窍等方面,与雄黄配伍的复方中,频次出现前三的分别为:牛黄、朱砂和冰片。

表 1 含砷中药复方信息
Table 1 Information on arsenic-containing traditional Chinese medicine

来源	名称	药味数	功能主治
2020 版 《中国 药典》	阿魏化痞膏	24	化痞消积。用于气滞血凝,癥瘕痞块,脘腹疼痛,胸胁胀满
	安宫牛黄丸/ 散	11	清热解毒,镇惊开窍。用于热病,邪入心包,高热惊厥,神昏谵语;中风昏迷及脑炎、脑膜炎、中毒性脑病、脑出血、败血症见上述证候者
	纯阳正气丸	16	温中散寒。用于暑天感寒受湿,腹痛吐泻,胸膈胀满,头痛恶寒,肢体酸重
	红灵散	7	祛暑,开窍,辟瘟,解毒。用于中暑昏厥,头晕胸闷,恶心呕吐,腹痛泄泻
	局方至宝散	9	清热解毒,开窍镇惊。用于热病属热入心包、热盛动风证,症见高热惊厥、烦躁不安、神昏谵语及小儿急热惊风
	克痢痧胶囊	12	解毒辟秽,理气止泻。用于泄泻,痢疾和痧气(中暑)
	六应丸	6	清热,解毒,消肿,止痛。用于火毒内盛所致的喉痹、乳蛾,症见咽喉肿痛、口苦咽干、喉核红肿;咽喉炎、扁桃体炎见上述证候者。亦用于疳痈疮疡及虫咬肿痛
	梅花点舌丸	14	清热解毒,消肿止痛。用于火毒内盛所致的疔疮痈肿初起、咽喉牙龈肿痛、口舌生疮
	牛黄抱龙丸	10	清热镇惊,祛风化痰。用于小儿风痰壅盛所致的惊风,症见高热神昏、惊风抽搐
	牛黄解毒片	8	清热解毒。用于火热内盛,咽喉肿痛,牙龈肿痛,口舌生疮,目赤肿痛
	牛黄解毒丸	8	清热解毒。用于火热内盛,咽喉肿痛,牙龈肿痛,口舌生疮,目赤肿痛
	牛黄清宫丸	18	清热解毒,镇惊安神,止渴除烦。用于热入心包、热盛动风证,症见身热烦躁、昏迷、舌赤唇干、谵语狂躁、头痛眩晕、惊悸不安及小儿急热惊风

牛黄清心丸 (局方)	29	清心化痰, 镇惊祛风。用于风痰阻窍所致的头晕目眩、痰涎壅盛、神志混乱、言语不清及惊风抽搐、癫痫
牛黄消炎片	7	清热解毒, 消肿止痛。用于热毒蕴结所致的咽喉肿痛、疔、痈、疮疖
牛黄镇惊丸	18	镇惊安神, 祛风豁痰。用于小儿惊风, 高热抽搐, 牙关紧闭, 烦躁不安
牛黄至宝丸	12	清热解毒, 泻火通便。用于胃肠积热所致的头痛眩晕、目赤耳鸣、口燥咽干、大便燥结
七珍丸	9	定惊豁痰, 消积通便。用于小儿急惊风, 身热, 昏睡, 气粗, 烦躁, 痰涎壅盛, 停乳停食, 大便秘结
庆余辟瘟丹	74	辟秽气, 止吐泻。用于感受暑邪, 时行痧气, 头晕胸闷, 腹痛吐泻
痧药	11	祛暑解毒, 辟秽开窍。用于夏令贪凉饮冷, 感受暑湿, 症见猝然闷乱烦躁、腹痛吐泻、牙关紧闭、四肢逆冷
暑症片	15	祛寒辟瘟, 化浊开窍。用于夏令中恶昏厥, 牙关紧闭, 腹痛吐泻, 四肢发麻。
速效牛黄丸	11	清热解毒, 开窍镇惊。用于痰火内盛所致烦躁不安、神志昏迷及高血压引起的头目眩晕。
小儿化毒散	12	清热解毒, 活血消肿。用于热毒内蕴、毒邪未尽所致的口疮肿痛、疮疡溃烂、烦躁口渴、大便秘结。
小儿惊风散	5	镇惊熄风。用于小儿惊风, 抽搐神昏。
小儿清热片	11	清热解毒, 祛风镇惊。用于小儿风热, 烦躁抽搐, 发热口疮, 小便短赤, 大便不利。
小儿至宝丸	25	疏风镇惊, 化痰导滞。用于小儿风寒感冒, 停食停乳, 发热鼻塞, 咳嗽痰多, 呕吐泄泻。
牙痛一粒丸	4	解毒消肿, 杀虫止痛。用于火毒内盛所致的牙龈肿痛、龋齿疼痛。
医痫丸	11	祛风化痰, 定痫止搐。用于痰阻脑络所致的癫痫, 症见抽搐昏迷、双目上吊、口吐涎沫。
郁金银屑片	19	疏通气血, 软坚消积, 清热解毒, 燥湿杀虫。用于银屑病(牛皮癣)。
周氏回生丸	14	祛暑散寒, 解毒辟秽, 化湿止痛。用于霍乱吐泻, 瘀胀腹痛。
珠黄吹喉散	9	解毒化腐生肌。用于热毒内蕴所致的咽喉口舌肿痛、糜烂。
紫金錠	7	辟瘟解毒, 消肿止痛。用于中暑, 脘腹胀痛, 恶心呕吐, 痢疾泄泻, 小儿痰厥; 外治疗疮疖肿, 疔腮, 丹毒, 喉风。
复方黄黛片 ^[13]	4	清热解毒, 益气生血。用于急性早幼粒细胞白血病
文献 青黄散 ^[14, 15]	2	治疗骨髓增生异常综合征
(万胜)化风丹 ^[16]	20	息风镇痉、豁痰开窍

蒙药制剂 ^[17]	哈它嘎各其	7	消炎止痛、清热解毒、活血消肿、改善局部血液循环、生肌收敛、促进肉芽组织增生、加速伤口愈合等作用
	嘎木朱尔（枯疮七味散）	7	生肌，收敛，杀粘
	蟾酥七味丸	7	杀黏虫、消肿
	姜黄三味丸	3	解毒、杀黏、腹泻、消肿
	泻黏剂	14	杀黏虫、泻下

2 含砷中药复方制剂及 As₂O₃ 配伍减毒研究的现状

在 CNKI 中以表 1 中展示的含砷中药复方名（中文名）为关键词，时间范围从 2000 年 1 月至 2024 年 9 月，剔除会议报纸文献，筛选目前对于含砷复方制剂相关文献；在 Web of Science 核心数据集中，选择 all fields 以表 1 含砷复方制剂名（英文名）收索，进一步以“雄黄配伍 (Realgar Compatibility or Synergistic)” or “雄黄减毒 (Realgar Reduce toxicity or Toxicity attenuation)” 这两关键词进一步检索，两数据库共筛选符合含砷制减毒配伍相关文献 118 篇。按研究对象降序排列分别是牛黄解毒片/丸（42 篇）、安宫牛黄丸（33 篇）、复方黄黛片（14 篇）、六神丸（7 篇）、牛黄清心丸（6 篇）、青黄散（5 篇）、和其他 11 篇（单篇频次<5 篇）。通过对现有文献整理，我们发现目前对于含砷制剂配伍研究多聚焦于拆方（方中一味草药与雄黄配伍）/或全方与该方去雄黄后药效进行对比研究，研究较为浅显，缺乏更深层次研究。

雄黄发挥药效作用的为可溶性砷，现研究多聚焦于单体成分，因此，在 Web of Science 的核心数据集中，检索范围 all fields 检索词为“arsenic and attenuate”，最终检索时间范围确定为 2003 年 6 月至 2025 年 1 月，剔除会议论文、评论文章、会议摘要、社会资料和信件，剩余文献 724 篇，对 724 篇文献用 6.2 版 CiteSpace 进行关键词分析，从关键词发现最早关注并热度持续最长的词是砷暴露、激活、活性氧，生长，砷毒性、DNA 损伤；中间出现强度高的词为癌症、饮用水、脂质过氧化物、诱导氧化应激、新陈代谢、体外；近年受关注的主题为氧化应激、健康、信号通路、肝脏；突显现强度最高的词为氧化应激。

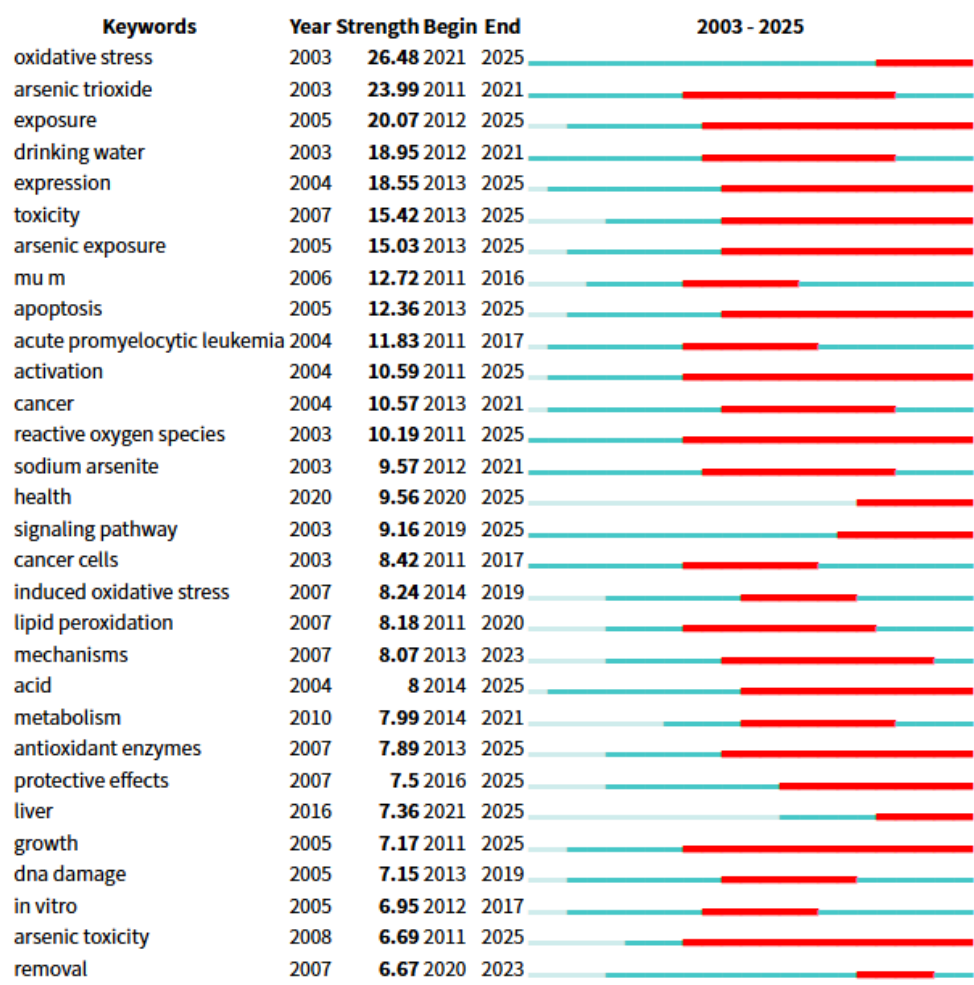


图 2 引文爆发次数最强的前 30 个关键词

Figure 2 Top 30 keywords with the strongest citation bursts

3 含砷中药复方减毒配伍研究进展

3.1 基于整体毒性评价角度开展的减毒配伍研究

在整体配伍层面研究含砷制剂如何发挥减毒作用。¹H NMR 代谢组学结果显示牛黄解毒片（NHJDP）中大黄、黄芩、桔梗可以缓解雄黄毒性，通过调节受雄黄影响的能量代谢、胆碱代谢、氨基酸代谢和肠道菌群紊乱。NHJDP 的配伍可以减少雄黄在小鼠全血中砷生物蓄积，降低砷毒性^[18]。41mg/kg 和 134mg/kg 雄黄通过上调促炎性 LOX 衍生，CYP 衍生的 HETE 和 COX 衍生的 PG 刺激大鼠肝脏炎症，但同等剂量下的雄黄组合成六神丸不刺激大鼠产生炎症反应^[19]。复方黄黛片作为治疗急性早幼粒白血病（APL）的重要制剂之一，因其含有毒性中药雄黄，其安全性也一直被考察，研究发现由于合理组方将雄黄毒性减弱，长期间断服药则无明显毒副作用^[20]。RIF 联合常规化学药治疗 APL 的疗效和安全

性良好,口服 RIF 与静脉注射 ATO 相比,在 APL 患者获益方面相当,但 RIF 相比于 ATO 具有更低的用药风险,安全性更高^[7]。

在缺血性中风大鼠模型中发现含有朱砂和雄黄的安宫牛黄丸 (AGNHW) 通过减少梗死面积,保持血脑屏障完整,改善神经功能。从 AGNHW 去除朱砂和/或雄黄神经保护功能消失,雄黄或朱砂单独使用时也没有神经保护作用,说明雄黄和朱砂是 AGNHW 神经保护的必须成分^[21]。朱砂和雄黄共同暴露小鼠 4 周后,与 AGNHW 的草药配伍可通过 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路的失活及 NF- κ B 活化阻断减少炎症反应,提高抗氧化能力和抑制炎症损伤减轻朱砂和雄黄引起的肝肾毒性^[22]。除此之外,AGNHW 中草药成分可以下调砷汞中毒小鼠的摄取蛋白 (AQP9 和 OQT1) 的表达,并上调外排蛋白 (P-gp, MRP2 和 MRP4) 的表达,降低肝肾毒性及砷汞积累^[23]。在 LPS 致大鼠脑损伤影响中均验证朱砂和雄黄是 AGNHW 和万胜化风丹 (WSHFD) 的有效成分,对 LPS 诱导的神经毒性具有保护作用。WSHFD 可显著减轻 LPS 诱导的 DA 摄取能力和 TH 阳性神经元数量的下降,抑制小胶质细胞活化,LPS 诱导的 ROS 产生降低,减轻 LPS 诱导的 TNF α , iNOS, IL-1 β mRNA 表达的升高和 COX-2, WSHFD 降低或去除低雄黄和朱砂含量神经保护功能减弱或消失^[24, 25]。AGNHW 可以增加 β 功率,增加 M 受体在皮层中的亲和力和脑中乙酰胆碱的含量,而去除朱砂和雄黄的 AGNHW 作用不明显^[26]。AGNHW 可在内毒素引起的脑损伤大鼠中提高皮层的胆碱能系统功能,增强脑干胆碱能系统的皮质激活上行链路,提高皮层活性水平,增强 EcoG 的激活,从而促进人体的觉醒;AGNHW 和雄黄可以抑制脂多糖诱导的多巴胺摄取减少,减弱细胞内 ROS 的产生、TNF- α , iNOS, IL-1 β 和 COX-2 的 mRNA 表达^[27];AGNHW 有升高肾上腺素的趋势,与模型相比,3,4-二羟基苯基乙酸水平降低,去甲肾上腺素水平降低,并且可以明显降低 5-羟基吲哚乙酸水平,但是没有朱砂和雄黄的 AGNHW 有所不同,去甲肾上腺素水平明显高于模型组和 AGNHW 组,多巴胺水平也明显高于所有组,单用雄黄可以明显降低 5-羟基色胺^[28]。说明朱砂和雄黄在促进 AGNHW 对内毒素引起的脑损伤的清醒作用中起重要作用。雄黄作为重金属中药之一,其本身虽具有一定的毒性,但用之得当也可发挥治病救人的作用,如果因为雄黄有毒而将其盲目剔除,将会失去含雄黄该类制剂原有的功效,影响疾病的治疗。

3.2 基于砷价态及体内命运角度开展的减毒配伍研究

基于砷的价态及其体内命运角度的减毒配伍研究是对整体毒性评价层面的进一步深化。文献研究表明,砷在体内外存在不同的价态,而不同的砷价态与砷的毒性密切相关^[29, 30]。研究表明,牛黄解毒片全方配伍可降低雄黄可溶性砷的溶出量^[31, 32],董菊、徐智等进一步研究结果显示,经人工胃液和肠液仿生提取发现^[33],除牛黄解毒片全方外,影响雄黄中可溶性砷溶出的药味是甘草、黄芩和大黄,在全方中去除此 3 味药后,可溶性砷溶出量显著高于全方组。整理汇总配伍药味对雄黄可溶性砷降幅依次为蟾酥(93.6%)、大黄(84.9%)、甘草(81.1%)、麝香(71.3%)、黄芩(66.3%/55.1%)、石膏(60.2%)、牛黄(86.4%/40.9%/11.4%)和桔梗(39.4%)、黄连(49.3%)、珍珠(29.4%/14.7%)、冰片(27.6%)、栀子(25.2%)、郁金(25.0%)^[34]。

在体内生物学转化这一环节,生成砷配合物是降低雄黄毒性的机制之一,但砷代谢产物到底是发挥增毒还是减毒效应存在争议(详见第 4 节和第 5 节),王秀萍等^[35]研究发现,六神丸中存在的半胱氨酸能与砷结合生成砷配合物,急性毒性测试结果表明半胱氨酸砷配合物的半致死量为 650mg/kg,明显高于 As_2O_3 的 150 mg/kg,借此达到减毒效应。大鼠单次口服高剂量安宫牛黄丸后血砷含量显著低于雄黄组, C_{\max} 和 AUC 显著降低,张庆丽等^[36, 37]研究发现服用六神丸后其血中砷平均滞留时间与雄黄单用相比显著缩短,血浆中 DMA 浓度较高而 As^{V} 浓度较低。

3.3 课题组围绕复方黄黛片开展的含砷制剂减毒配伍研究进展

以复方黄黛片为含砷制剂代表,高月研究员课题组从减毒配伍角度切入,分别从 CYP450 酶^[38, 39]和 As3MT 酶介导的药物体内相互作用^[40]、体外配伍对雄黄中可溶性砷溶出、配伍对急性毒性和亚急性毒性的影响^[41]、肠道菌群^[42, 43]以及骨髓基质细胞稳态^[44]等多个角度开展了 RIF 的减毒配伍研究。综合来说,从不同角度阐明丹参配伍雄黄具有减轻雄黄毒性效应,例如,在急性和亚急性毒性实验中,丹参与雄黄配伍可将雄黄的 LD_{50} 值从 2756.73mg/kg 显著拉升至 7538.86mg/kg,且能够逆转雄黄所致的体重下降、肝毒性等不良事件;砷暴露降低了肠道微生物群的丰富度和多样性,基于肠道菌群角度展开配伍研究结果表明丹参可通过修复肠道黏膜屏障,维持肠道菌群稳态和多样性,逆转雄黄引起的肠

道通透性增加,以达到减毒目的;基于体内外溶出及仿生提取策略,发现在胃内酸性环境下,雄黄与丹参或青黛配伍对 As^{V} 的溶出无显著影响,但进入肠道内的弱碱性环境下,雄黄与青黛配伍组对 As^{V} 的溶出有显著的促进作用,而雄黄与丹参配伍依然与雄黄单用相比,依然无显著性差异。除上述减毒配伍的效应研究外,在减毒配伍机制研究上,主要有 $\text{As3MT/m}^6\text{A/NLRP3}$ 轴^[45]介导的肝脏细胞焦亡, ACSF2 ^[46]、 GSTZ1 ^[47]和 HMOX1 ^[48]等基因介导的心肌细胞铁死亡, As3MT 扰动甲基供体平衡稳态 3 条技术路线。

3.4 梳理砷在体内代谢过程及其关联的酶

砷在自然界内无处不在,动物可以从空气、水、食物将砷摄入体内。砷进入机体会经历体外(砷溶出)到体内(吸收)、体内生物学转化(分布和代谢)、肾脏排出(排泄)这 4 个环节。三价砷可以直接甲基化,而五价砷不易被细胞吸收,通常被还原为三价砷。摄入的砷大部分在肝脏中代谢,肝细胞吸收三价砷,在肝细胞内,随后发生结合和甲基化。目前研究发现砷体内代谢途径越来越多样化,虽然现有两篇综述对砷代谢过程进行梳理^[49, 50],但仍然存在不足,因此在此基础上进行整合及补充砷进入机体中所涉及的过程。

表 2 砷体内代谢过程及涉及主要蛋白/酶
Table 2 The metabolic process of arsenic in vivo and the main proteins/enzymes involved

代谢过程	作用砷价态	主要参与蛋白/酶	关键节点
吸收	iAs ^V	磷酸盐转运蛋白（Pho）	iAs ^V 在化学上与磷酸盐（Pi）相似，iAs ^V 进入大多数细胞主要由 Pi 转运蛋白介导。
	iAs ^{III} 和 MAs ^{III} (亚砷酸甲酯)	葡萄糖渗透酶（GLUT1）	机制较为复杂研究还不深入，可能通过糖醇肌醇/聚合起作用。
	iAs ^{III}	水通道蛋白 7（AQP7）	主要位点是在脂肪组织中，主要识别溶液中中性物质 As（OH） ⁻ 的形式。
	iAs ^{III}	水甘油通道蛋白 9（AQP9）	位于肝细胞的正弦质膜，具有双向作用。在中性 pH 值中，As ³⁺ 主要以 As（OH） ₃ 的形式存在，AQP9 可能将其识别为类似于甘油的中性无电荷小溶质，以促进摄取 ^[51] 。
砷价态转化	iAs ^V 转化为 iAs ^{III}	砷酸盐还原酶，谷胱甘肽作为还原剂	iAs ^{III} 毒性更大，但更容易甲基化。五价砷（iAs ^V 、MMA ^V 和 DMA ^V ）最初被两个当量的 GSH 还原成相应的三价砷化合物，同时形成一个当量的 GSSG ^[52] 。
	iAs ^V 转化为 iAs ^{III}	嘌呤核苷磷酸化酶（PNP）	早期研究发现二硫苏糖醇（DTT）和 6-氧代嘌呤核苷（鸟苷或肌苷）存在下，PNP 催化 As ^V 还原为 As ^{III} 。现研究推翻了此过程，具体过程仍然存在争议 ^[53] 。
	DMA ^V 还原为 DMA ^{III}	谷胱甘肽 S-转移酶 omega 1（GSTO1）	以谷胱甘肽（GSH）依赖性方式催化 DMA ^V 还原为 DMA ^{III} 。
砷甲基化	iAs 甲基化形成亚砷酸盐（MAs ^{III} ）、二甲基亚砷酸盐（DMA ^{III} ）和挥发性三甲基胂（TMA）	砷 +3 甲基转移酶（AS3MT）	AS3MT 在其辅因子存在下在 C33 和 C62 处含有 S-甲基半胱氨酸。
	催化 MAs ^{III} 和 iAs ^{III} 甲基化	亚砷酸盐 S-腺苷甲硫氨酸甲基转移酶（ArsM）	在 ArsM 蛋白作用下，MAs ^{III} 可被甲基化成 DMA ^V 和 TMA ^{III} ，iAs ^{III} 先甲基化为 MAs ^{III} 后再甲基化为 DMA ^V ^[54] 。

	iAs ^V 甲基化为单甲基砷二谷胱甘肽 (MADG)	砷甲基转移酶 (Cyt19)	iAs ^V 还原为 iAs ^{III} 后, iAs ^{III} 与 GSH 形成复合物, 产生砷三谷胱甘肽(ATG), ATG 在 SAM 存在下被 Cyt19 甲基化为 MADG ^[55] 。
砷外排	iAs ^{III}	ArsB	离子转运蛋白超家族, 是一种逆向转运蛋白, 可通过 H/As (OH) 从细胞中挤出 As ^{III} 与电化学质子梯度。
	iAs ^{III}	Acr3	Acr3 两个残基可能参与准金属易位, 残基介导的转运作用仍然未知, 但可以合理推测出残基对 iAs ^{III} 具有选择性。
	As ^V	ArsJ	糖酵解酶和有机砷外排通透酶的偶联是 As ^V 抗性的新型转运途径。ArsJ 是五价砷的唯一外排通位酶。
	对三价砷适用, 除 DMA ^{III}	ArsK	ArsK 通过减少这些化合物的细胞积累来减少 As ^{III} 和 MAs ^{III} , 但不对 As ^V 、DMA ^{III} 起作用。
	亚砷酸盐(MAs ^{III})	ArsP	两个半胱氨酸残基的每一侧都有脯氨酸残基, 它们会在螺旋中产生弯曲, 并使硫醇彼此足够接近, 从而结合膜胞质侧的 MAs ^{III} , 将 MAs ^{III} 释放到外部介质中。
砷排泄	砷胆道排泄 (亚砷酸钠在肝脏甲基化成 MMA 和 DMA 后排泄)	ABC 转运蛋白 (MRP2/cMOAT 转运蛋白)	MRP2/cMOAT 转运 GSH 和 GSH 偶联物, 砷的胆道运输取决于砷-GSH 复合物的形成以及它们通过 MRP2/cMOAT 从肝细胞转运到胆汁中 ^[56] 。
	MAs ^{III} (细胞到血液)	水甘油通道蛋白 9 (AQP9)	在细胞内, iAs ^{III} 被甲基化并还原为 MAs ^{III} 。然后, 内部生成的 MAs ^{III} 流出肝细胞, 并通过 AQP9 沿其浓度梯度进入血液 ^[57] 。
	尿液主要 DMA ^V (排出体外)	主要在肝脏进行甲基化	在肝脏甲基化为 DMA ^V 后, 排泄到血液后进入尿液中。

As3MT 是三价砷的砷甲基化关键酶，砷的甲基化可以加速砷排泄并降低砷体内滞留^[58]，与 MMA 或 iAs 相比，DMA 从体内排出的速度更快，砷甲基化促进尿液中砷的排泄^[59]。As3MT 在消除组织中砷、清除尿液中的砷和预防砷毒性方面发挥着关键作用。与类似剂量的野生型（WT）小鼠相比，KO 小鼠在砷给药后数小时在许多组织类型（包括肝脏、膀胱和肾脏）中表现出显着更高的砷浓度和更高比例的 iAs^[60]。WT 小鼠相比，KO 小鼠中 iAs 的全身清除速度要慢得多。虽然诸多研究证明 As3MT 在砷甲基化代谢方面发挥重要作用，但是仍存在很多争议。因此本文将对 As3MT 体内作用进行着重讨论。

4 含砷制剂减毒配伍研究面临的关键科学问题

长期以来，含砷制剂经体内代谢后究竟发挥“减毒”还是“增毒”效应一直存在争论。而争论的焦点主要围绕的是砷甲基化代谢产物一甲基砷（MMA）和二甲基砷（DMA）的毒性潜能及转化关系。2023 年，药理与毒理学领域顶刊 *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 发表综述 认为^[61]：“砷生物甲基化的代谢机制通过将其转化为危害最小、最容易排泄的五价甲基化代谢物。然而，为了使甲基化途径继续完成，还原为高毒性的中介三价形式是不可避免的。砷暴露的净健康结果取决于宿主的甲基化能力，而甲基化能力取决于其推进其目标最终产品的效率和砷负荷。因此，甲基化效率低下和/或暴露过载的不利情况导致砷消除能力丧失，有毒中间体的过量生产超过了砷相关病理的阈值。在所有受砷暴露的情况下，砷甲基化都可以通过营养干预来加强，以便效益大于成本”。更深的层次反映的是效应靶器官肝脏中甲基供体的竞争性分配及稳态的变化，而体内的砷代谢由 As3MT 酶主导。由此，含砷制剂的减毒配伍研究衍伸出两个待解决的关键科学问题：一是 As3MT 如何扰动甲基供体平衡稳态？二是 As3MT 扰动的甲基供体平衡稳态对砷体内命运、效应结局的影响是什么？

5 As3MT 调控的甲基供体平衡稳态影响砷体内代谢

甲基化是一种简单而重要的生物化学过程，可简单理解为甲基（-CH₃）在体内各种生物活性化合物之间的转移，因在肿瘤调控、表观遗传方面的重要作用，DNA 甲基化和 m⁶A 甲基化一直是生物医学研究的热点和前沿^[62]。与 DNA 甲基化和 m⁶A 甲基化相比，砷甲基化代谢极少被关注，且容易被混淆。但由于细胞内各类甲基化反应所需的甲基供体几乎均由 S-腺苷甲硫氨酸（SAM）贡献，使

得三者之间互相牵绊。无机砷（iAs）的甲基化代谢过程对甲基供体的消耗势必会影响到细胞内其他甲基化反应的水平，进而影响细胞的生理进程和疾病的发生发展^[63]。因此，以甲基供体为核心的甲基化平衡稳态或可成为 As3MT 主导的含砷制剂减毒配伍研究的关键节点。

As3MT 主导的砷甲基化代谢是 iAs 体内命运的起点，虽然我们的前期研究证实 As3MT 主导的甲基化代谢在丹参与雄黄配伍中发挥减毒作用，但一直以来，学者们对 iAs 的体内代谢究竟发挥减毒还是增毒作用争论不休^[64]。持“减毒”观点的学者认为，iAs 进入机体后，通过甲基化转化的产物 MMA 和 DMA 因蛋白结合力降低以及结合位点的减少^[65]，更容易被肾脏排泄，最终降低机体砷暴露的水平，达到减毒目的；持“增毒”观点的学者认为^[66]，MMA 和 DMA 的毒性远高于 iAs^{III/V}，数据表明 MMA^{III}遗传毒性和细胞毒性的潜能分别是 iAs^{III/V} 的 386 倍和 270 倍，而 DMA^{III}这一数值分别为 54 倍和 77 倍^[67]。截止当前，“减毒”or“增毒”仍无定论，基于对已有研究基础和文献挖掘分析，我们提出一种整合的新观点，该观点认为：“减毒/增毒效应与 iAs 暴露的剂量和时间有关，在短期高剂量 iAs 暴露时，As3MT 酶介导的 iAs 甲基化主要起到解毒排毒作用，而在长期低剂量暴露时，As3MT 被持续激活在低活性状态，使得 iAs 甲基化代谢产物 MMA 和 DMA 长期在体内蓄积，其毒性及对机体的损害作用要远远大于 iAs 本身”。这种整合观点更契合以甲基供体为核心的甲基化平衡与 iAs 体内转化过程(图 3)，即合理地解释了 iAs 在环境污染（长期微剂量）或砷剂治疗（短期高剂量）对机体产生的毒害作用^[68, 69]，也为基于 As3MT 和甲基化平衡角度解读含砷中药复方的减毒配伍机制研究提供了新的思路。

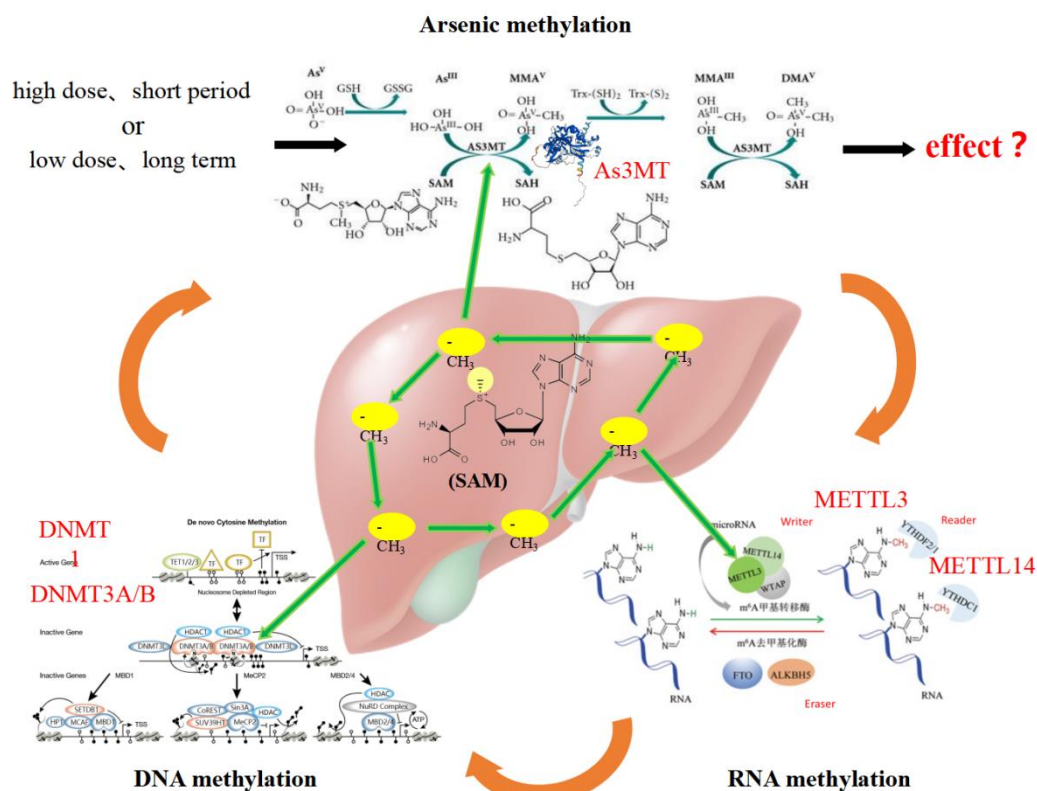


图3 甲基化供体平衡稳态及其在砷体内命运中的作用猜想

Figure 3 Hypothesis on the homeostatic balance of methylation donors and their role in the fate of arsenic in vivo

6 总结

本文梳理了现行版药典收载、文献、及蒙药制剂中含砷方剂，通过对现有研究进行整合分析。为含砷制剂临床的合理应用提供了理论支撑。并就当前领域争论的焦点问题“砷在体内的活化是发挥增毒还是减毒效应”展开讨论并提出新见解、提出两个拟解决的关键科学问题，进一步探讨了 As3MT 调控的甲基供体平衡稳态对砷制剂体内命运影响及可能的效应路径，为后续“有毒”中药，特别是含砷制剂的减毒配伍研究提供了新的研究思路和技术路线，具有较高的学术价值及参考意义。

参考文献

- [1] 高月, 梁爱华, 范晓辉, et al. 中药安全性研究——方法、应用与前景 [J]. *Engineering*, 2019, 5(01): 165-78.
- [2] 梁爱华, 高月, 张伯礼. 含马兜铃酸中药的安全性问题及对策 [J]. *中国食品药品监管*, 2017, (11): 17-20.
- [3] 高月, 马增春, 张伯礼. 中药大品种二次开发的安全性关注及再评价意义 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(01): 1-4.
- [4] 国家药品监督管理局. 国家药品不良反应监测年度报告 (2023 年) [Z]. 2024
- [5] HUANG M, LIU Y Y, XIONG K, et al. The role and advantage of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of COVID-19 [J]. *J Integr Med*, 2023, 21(5): 407-12.
- [6] ZHANG J, LI Y, ZHANG B, et al. Evidence-based traditional Chinese medicine research: Beijing Declaration [J]. *J Evid Based Med*, 2020, 13(2): 91-2.
- [7] ZHU H H, HU J, LO-COCO F, et al. The simpler, the better: oral arsenic for acute promyelocytic leukemia [J]. 2019, 134(7): 597-605.
- [8] ZHU H H, HUANG X J. Oral arsenic and retinoic acid for non-high-risk acute promyelocytic leukemia [J]. *New Engl J Med*, 2014, 371(23): 2239-41.
- [9] ZHU H H, WU D P, JIN J, et al. Oral tetra-arsenic tetra-sulfide formula versus intravenous arsenic trioxide as first-line treatment of acute promyelocytic leukemia: a multicenter randomized controlled trial [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(33): 4215-21.
- [10] MA Y F, LU Y, WU Q, et al. Oral arsenic and retinoic acid for high-risk acute promyelocytic leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 148.
- [11] 高月, 李川, 梁爱华, et al. 常用“有毒”中药减毒配伍研究进展及策略 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(08): 1989-94.
- [12] 高月. 基于临床的中药安全性及合理用药策略 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(02): 140-3.
- [13] WANG L, ZHOU G B, LIU P, et al. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(12): 4826-31.
- [14] 王文儒, 丁宇斌, 唐旭东. 青黄散为主复方治疗骨髓增生异常综合征综述 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(06): 2757-61.
- [15] 吴雨荷, 肖海燕, 全日城, et al. 青黄散联合低强度化疗对老年急性髓系白血病患者生存期及预后因素的分析 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2022, 17(08): 1609-14.
- [16] ZHANG F, LU Y F, WU Q, et al. Role of cinnabar and realgar of WSHFD in protecting against LPS-induced neurotoxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(3): 822-8.
- [17] 娜琴, 美丽, 桂芝, et al. 4 种蒙药制剂中配伍药物对雄黄可溶性砷含量的影响研究 %J 内蒙古医科大学学报 [J]. 2022, 44(06): 569-72.
- [18] XU W, XU S, KUANG Y, et al. Compatibility of Niu Huang Jie Du Tablets Results in Attenuated Arsenic Bioaccumulation and Consequent Protection against Realgar-Induced Toxicity in Mice [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 2022.
- [19] WANG J, DING L, ZHOU J, et al. Target lipidomics approach to reveal the resolution of inflammation induced by Chinese medicine combination in Liu-Shen-Wan against realgar overexposure to rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249.

- [20] 成玉斌, 向阳, 徐学新, et al. 复方黄黛片治疗急性早幼粒细胞白血病过程中肝肾毒性的临床研究 [J]. 临床血液学杂志, 2011, 24(07): 429-31.
- [21] TSOI B, WANG S, GAO C, et al. Realgar and cinnabar are essential components contributing to neuroprotection of Angong Niu Huang Wan with no hepatorenal toxicity in transient ischemic brain injury [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2019, 377.
- [22] LI A, ZHANG J-Y, XIAO X, et al. Hepatorenal protective effects of medicinal herbs in An-Gong-Niu-Huang Wan (AGNH) against cinnabar- and realgar-induced oxidative stress and inflammatory damage in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 119: 445-56.
- [23] WANG S, XIAO X, LI A, et al. The Herbal Constituents in An-Gong-Niu-Huang Wan (AGNH) Protect against Cinnabar- and Realgar-Induced Hepatorenal Toxicity and Accumulations of Mercury and Arsenic in Mice [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021.
- [24] ZHANG F, LU Y, WU Q, et al. Role of cinnabar and realgar of WSHFD in protecting against LPS-induced neurotoxicity [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(3): 822-8.
- [25] CHEN C, ZHANG B-B, HU A-L, et al. Protective role of cinnabar and realgar in Hua-Feng-Dan against LPS plus rotenone-induced neurotoxicity and disturbance of gut microbiota in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 247.
- [26] ZHU K-J, SUN J-N. Study on effect and mechanism of cinnabaris and realgar in promoting awake of endotoxin-induced brain injury rat applied with Angong Niu Huang Wan [J]. Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica, 2014, 39(20): 4007-12.
- [27] ZHANG F, LU Y, LIU J, et al. Realgar is active ingredient of Angong Niu Huang pill in protection against LPS-induced neuroinflammation [J]. Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica, 2010, 35(24): 3333-8.
- [28] ZHU K-J, SUN J-N, MA C-H, et al. Effect of Angong Niu Huang pill and heavy metal constituents on EcoG of brain damage caused by LPS in rats [J]. Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica, 2007, 32(10): 949-53.
- [29] KUIVENHOVEN M, MASON K. Arsenic Toxicity [M]. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Kelly Mason declares no relevant financial relationships with ineligible companies.; StatPearls Publishing [J]. Copyright, 2024, StatPearls Publishing LLC. 2024.
- [30] LIU J, WEN Y, MO Y, et al. Chemical speciation determines combined cytotoxicity: Examples of biochar and arsenic/chromium [J]. J Hazard Mater, 2023, 448: 130855.
- [31] XU W, XU S, ZHANG S, et al. Arsenic Bioaccessibility of Realgar Influenced by the Other Traditional Chinese Medicines in Niu Huang Jie Du Tablet and the Roles of Gut Microbiota [J]. 2019, 2019: 8496817.
- [32] 宋玲玲, 韩冬月, 林瑞超, et al. 矿物药雄黄的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(03): 433-40.
- [33] 董菊, 严晓鹰, 王明艳, et al. 牛黄解毒片配伍影响雄黄砷毒性的动物实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(02): 317-9.
- [34] 徐文峰, 金鹏飞, 徐硕, et al. 含雄黄中药复方牛黄解毒片毒性的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(18): 38-41.
- [35] 王秀萍 曹, 路雪雅. 六神丸中重金属的存在状态及其与有机成分相互作用的研究 [J].

- 微量元素与健康研究, 2003, (04): 27-8.
- [36] 张庆丽, 吴倩, 谢媛媛, et al. 六神丸和雄黄中砷的组织分布研究 [J]. 药学学报, 2011, 46(06): 701-6.
- [37] 张庆丽, 吴倩, 谢媛媛, et al. 六神丸和雄黄中砷的毒代动力学研究 [J]. 毒理学杂志, 2011, 25(05): 332-5.
- [38] 徐焕华, 汪美汐, 谭洪玲, et al. 临床用量的复方黄黛片及大剂量雄黄对大鼠肝脏主要药物代谢酶的影响 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(03): 593-9.
- [39] XU H H, HAO F R, WANG M X, et al. Influences of Realgar-Indigo naturalis, A Traditional Chinese Medicine Formula, on the Main CYP450 Activities in Rats Using a Cocktail Method [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 2374624.
- [40] 姜腊. 基于药物代谢途径探究复方黄黛片中君药雄黄的体内命运 [D]; 安徽医科大学, 2019.
- [41] XU H-H, MA Z-C, SHI Q-L, et al. Synergistic effect and different toxicities of adjuvant components of Realgar – Indigo Naturalis formula [J]. Chinese Herbal Medicines, 2018, 10(2).
- [42] JIANG Z, SUN Y, WU Z, et al. Dissection of scientific compatibility of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia from the perspective of toxicology [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116895.
- [43] 孙宇婷, 徐焕华, 聂窈, et al. 雄黄及三氧化二砷对小鼠肠道菌群的初步探究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(01): 142-8.
- [44] ZHANG X, CHEN H, HUANG X, et al. Single-cell transcriptomics profiling the compatibility mechanism of As(2)O(3)-indigo naturalis formula based on bone marrow stroma cells [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 151: 113182.
- [45] QIU T, WU C, YAO X, et al. AS3MT facilitates NLRP3 inflammasome activation by m(6)A modification during arsenic-induced hepatic insulin resistance [J]. 2023, 39(5): 2165-81.
- [46] LUO L, ZHANG S, GUO N, et al. ACSF2-mediated ferroptosis is involved in ulcerative colitis [J]. Life Sci, 2023, 313: 121272.
- [47] WANG Q, BIN C, XUE Q, et al. GSTZ1 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib-induced ferroptosis via inhibition of NRF2/GPX4 axis [J]. 2021, 12(5): 426.
- [48] JENNINGS P, CARTA G, SINGH P, et al. Capturing time-dependent activation of genes and stress-response pathways using transcriptomics in iPSC-derived renal proximal tubule cells [J]. 2023, 39(4): 1773-93.
- [49] GUO H, LI X, ZHANG Y, et al. Metabolic characteristics related to the hazardous effects of environmental arsenic on humans: A metabolomic review [J]. Ecotox Environ Safe, 2022, 236.
- [50] GARBINSKI L D, ROSEN B P, CHEN J. Pathways of arsenic uptake and efflux [J]. Environment International, 2019, 126: 585-97.
- [51] LIU Z J, CARBREY J M, AGRE P, et al. Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(4): 1178-85.
- [52] DOERGE D R, TWADDLE N C, CHURCHWELL M I, et al. Reduction by, ligand exchange among, and covalent binding to glutathione and cellular thiols link metabolism and disposition of dietary arsenic species with toxicity [J]. Environment International, 2020, 144.
- [53] NÉMETI B, GREGUS Z. Glutathione-dependent reduction of arsenate in human erythrocytes -: a process independent of purine nucleoside phosphorylase [J]. Toxicological Sciences,

- 2004, 82(2): 419-28.
- [54] ZHOU Q, ZHANG J, CHEN J. Methylation of arsenic differs with substrates in *Arcticibacter tournemirensis* R1 from an As-contaminated paddy soil [J]. Science of the Total Environment, 2022, 838.
- [55] HAYAKAWA T, KOBAYASHI Y, CUI X, et al. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19 [J]. Archives of Toxicology, 2005, 79(4): 183-91.
- [56] KALA S V, NEELY M W, KALA G, et al. The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic [J]. The Journal of biological chemistry, 2000, 275(43): 33404-8.
- [57] LIU Z J, STYBLO M, ROSEN B P. Methylarsonous acid transport by aquaglyceroporins [J]. Environmental Health Perspectives, 2006, 114(4): 527-31.
- [58] ANTONELLI R, SHAO K, THOMAS D J, et al. *AS3MT*, *GSTO*, and *PNP* polymorphisms: Impact on arsenic methylation and implications for disease susceptibility [J]. Environmental Research, 2014, 132: 156-67.
- [59] PETERS B A, HALL M N, LIU X, et al. Renal function is associated with indicators of arsenic methylation capacity in Bangladeshi adults [J]. Environmental Research, 2015, 143: 123-30.
- [60] CURRIER J M, DOUILLET C, DROBNA Z, et al. Oxidation state specific analysis of arsenic species in tissues of wild-type and arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase-knockout mice [J]. Journal of Environmental Sciences, 2016, 49: 104-12.
- [61] EL-GHIATY M A, EL-KADI A O S. The Duality of Arsenic Metabolism: Impact on Human Health [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2023, 63: 341-58.
- [62] GREENBERG M V C, BOURC'HIS D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease [J]. /A, 2019, 20(10): 590-607.
- [63] SOZA-RIED C, BUSTAMANTE E, CAGLEVIC C, et al. Oncogenic role of arsenic exposure in lung cancer: A forgotten risk factor [J]. N/A, 2019, 139: 128-33.
- [64] KHAIRUL I, WANG Q Q, JIANG Y H, et al. Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds [J]. #N/A, 2017, 8(14): 23905-26.
- [65] SHEN S, LI X F, CULLEN W R, et al. Arsenic binding to proteins [J]. Chem Rev, 2013, 113(10): 7769-92.
- [66] THOMAS D J, LI J, WATERS S B, et al. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2007, 232(1): 3-13.
- [67] MASS M J, TENNANT A, ROOP B C, et al. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic [J]. Chem Res Toxicol, 2001, 14(4): 355-61.
- [68] STYBLO M, VENKATRATNAM A, FRY R C, et al. Origins, fate, and actions of methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic: progress and prospects [J]. Arch Toxicol, 2021, 95(5): 1547-72.
- [69] SANZ M A, FENAUX P, TALLMAN M S, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet [J]. 2019, 133(15): 1630-43.

苯甲酰芍药苷抑制铁死亡的抗溃疡性结肠炎机制研究

李林慧^{1,2}, 罗小芬¹, 孙琛^{1,2,3}, 汤洋^{1,2}, 唐菲^{1,2}, 黄冬琴^{1,2},

李玲^{1,2*}, 谭洋^{1,2*}

(1.湖南中医药大学 药学院 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室 湖南 长沙 410208; 3. 陕西中医药大学, 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的** 研究苯甲酰芍药苷通过下调铁死亡的抗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 作用机制。**方法** 以 C57BL/6 小鼠为研究对象, 自由饮用 3.5% 的葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS), 连续 7 天, 构建小鼠 UC 模型。探究 BP 是否有抗 UC 效果。将 60 只 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组 (n=10): 空白对照组、模型对照组、苯甲酰芍药苷 (benzoylpaeoniflorin, BP) 低、中、高剂量组、阳性药对照 (Ferrostatin-1, Fer-1) 组。每天观察各组小鼠体重及一般情况, 七天之后计算疾病活动指数 (DAI 评分); 测量结肠长度; 采用透射电镜观察结肠组织超微结构及线粒体结构形态; 采用 HE 染色法观察结肠组织病理形态变化; 采用蛋白免疫印迹法 (Western Blot, WB) 检测 GPX4、SLC7A11 蛋白的表达水平观察肠黏膜损伤情况。在明确 BP 抗 UC 作用的前提下, 将 C57BL/6 小鼠随机分为四组: 空白对照组、模型对照组、BP 高剂量组、BP 高剂量+铁死亡激动剂 (Erastin), 参照前文实验方法和检测指标研究 Erastin 对 BP 抗 UC 作用的影响。**结果** 1.与模型对照组相比, BP 的干预能抑制 DSS 诱导的小鼠体重、结肠缩短 ($P<0.05$) 以及结肠病理损伤。2.BP 的干预能上调小鼠结肠组织中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白的表达 ($P<0.05$), 减少结肠上皮细胞线粒体损伤。3.给予铁死亡激动剂后, BP 抗 UC 的效果明显减弱。**结论** 苯甲酰芍药苷能通过抑制铁死亡发挥抗 UC 作用。

[关键词] 苯甲酰芍药苷; 铁死亡; 溃疡性结肠炎

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (82305086); 湖南省自然科学基金青年项目(2022JJ40307); 湖南省自然科学基金面上项目 (2024JJ5307)。

[第一作者] 李林慧 Tel:15674079113 E-mail:1960965178@qq.com;

[通信作者] 李玲 Tel:13808472975 E-mail:zyll319@163.com; 谭洋 Tel:15116430592 E-mail:

004746@hnucm.edu.cn。

Study on the mechanism of benzoylpaeoniflorin anti-ulcerative colitis by inhibiting ferroptosis

LI Lin Hui^{1,2}, LUO Xiao Fen¹, SUN Chen^{1,2,3}, TANG Yang^{1,2}, TANG Fei^{1,2}, HUANG
Dong Qin^{1,2}, LI Ling^{1,2*}, TAN Yang^{1,2*}

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, College of pharmacy, Changsha China
410208 ; 2. Key Laboratory of Modern Research of TCM, Education Department of Hunan
Province, Changsha China 410208; 3. Co-Construction Collaborative Innovation Center for
Chinese Medicine Resources Industrialization by
Shaanxi & Education Ministry, Shaanxi University of Chinese Medicine
, Xi'an Yang China 712046)

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-ulcerative colitis (UC) mechanism of benzoylpaeoniflorin by down-regulating ferroptosis. **Methods** C57BL/6 mice were treated with 3.5% dextran sulfate sodium (DSS) for 7 days. To explore whether BP has anti-UC effect. Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into 6 groups (n=10) : blank control group, model control group, benzoylpaeoniflorin (BP) low, medium and high dose groups, and positive control group (Ferrostatin 1, Fer-1). The body weight and general condition of mice in each group were observed every day, and disease activity index (DAI score) was calculated after seven days. Measurement of colon length; The ultrastructure and mitochondrial structure of colon were observed by transmission electron microscope. HE staining was used to observe the pathological changes of colon. The expression levels of GPX4 and SLC7A11 were detected by Western Blot (WB) to observe the intestinal mucosal injury. Under the premise of clear anti-UC effect of BP, C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: blank control group, model control group, BP high dose group, BP high dose + ferroptosis, The effects of Erastin on the anti-UC effect of BP were studied according to the experimental methods and detection indexes mentioned above. **Results** 1. Compared with the model control group, BP intervention could inhibit DSS induced body weight, colon shortening ($P<0.05$) and colon pathological injury. 2. BP intervention can up-regulate the expression of GPX4 and SLC7A11 proteins in mouse colon tissues ($P<0.05$) and reduce the mitochondrial damage of colon epithelial cells. 3. After the administration of ferroptosis agonists, the anti-UC effect of BP was significantly weakened. **Conclusion** Benzoylpaeoniflorin can play an anti-UC role by inhibiting ferroptosis.

[Key words] benzoyl paeoniflorin; ferroptosis; Ulcerative colitis

溃疡性结肠炎（ulcerative colitis, UC）是一种非特异肠道炎症性疾病。UC 以腹痛、腹泻以及血便为突出临床表现。随着生活饮食的改变，患病者逐年增加。UC 缠绵反复，治愈率低，被世界卫生组织认定为当代难治消化系统疾病之一^[1]。

铁死亡（ferroptosis）是一种新型铁依赖性细胞死亡，主要表现为线粒体形态萎缩，膜密度增加而细胞核大小正常。铁死亡发生的本质是铁离子依赖的脂质过氧化产物超量蓄积引起的以线粒体改变为主的氧化损伤^[2]。研究发现，铁死亡参与了 UC 的发生发展过程^[3]。

中医治疗 UC 有着丰富的经验，据文献考证，白芍在中医临床治疗 UC 过程使用频率位居前列^[4]。苯甲酰芍药苷（benzoylpaeoniflorin, BP）是从白芍中分离得到的活性单体^[5]，具有调控氧化应激的功能^[6]。本研究主要研究 BP 的抗 UC 作用，并从抑制铁死亡的角度探讨其作用机制。

1. 材料和方法

1.1 实验材料和动物

健康雄性 C57BL/6 小鼠，SPF 级，6 周龄，体重 20 ± 2 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，生产许可证号：SYXK（湘）2019-0009，动物质量合格证号：430727231100581426。所有实验动物常规饲养于 XX 动物实验中心。本实验经 XX 实验动物伦理委员会批准，批准号：LL2023031302。阳性药物（Ferrostatin-1, Fer-1），购自 MCE 公司，批号：HY-100579。谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4, GPX4）抗体，购自湖南艾方生物科技有限公司，批号：AF11931。溶质载体家族 7 成员 11（Solute carrier family 7 member 11, SLC7A11）抗体购买自武汉爱博泰克有限公司，批号：A2413。葡聚糖硫酸钠（dextran sulfate sodium, DSS）购自大连美伦生物技术有限公司，批号：MB5535。BCA 试剂盒购自新赛美生物科技有限公司批号：WB6501。

1.2 动物分组、建模和干预

所有实验小鼠均适应性喂养一周，按照实验目的分为两部分进行实验。第一部分，将 60 只小鼠随机分为六组：空白对照组、模型对照组、BP 低、中、高剂量组，以及阳性对照组。UC 模型建造方法如下，正常组给予正常饮用水，其余各组以 3.5% DSS 作为饮用水进行干预 7 d。造模开始后，阳性对照组小鼠每天腹腔注射铁死亡抑制剂 Fer-1 1 mg/kg，其余各组给予等体积生理盐水注射。BP

低、中、高剂量组小鼠分别按照小鼠体重给予 BP 20、40 和 80 mg/kg 进行灌胃，每天灌胃 1 次，共干预 7 d。空白对照组、模型对照组和阳性对照组小鼠于相同时间点给予生理盐水灌胃干预。第二部分，将 40 只小鼠随机分为四组：空白对照组、模型对照组、BP 高剂量组、BP 高剂量+Erastin 组。造模开始后，BP 高剂量组小鼠按照体重给予 BP 80 mg/kg 进行灌胃，每天灌胃 1 次，共干预 7 d。BP 高剂量+Erastin 组在给予 BP 干预期间，腹腔注射铁死亡激动剂 Erastin 30 mg/kg，每两天干预 1 次。空白对照组、模型对照组小鼠于相同时间点给予生理盐水灌胃干预，灌胃体积与 BP 高剂量组小鼠保持一致。7 d 后将所有小鼠的饮用水替换成纯净水，禁食不禁水 24 h，以戊巴比妥钠麻醉后，颈部脱臼处死小鼠，收集结肠组织。

1.3 观察指标和方法

1.3.1 测量结肠长度：取小鼠结肠至肛门直肠端，测量其自然长度并记录。

1.3.2 DAI 评分：每日称量小鼠体重，观察其质量变化、粪便形态及便血情况，参照表 1 进行 DAI 评分。

表 1. DAI 评分指标

大便性状	大便隐血或便血	体重下降 (%)	计分
正常	阴性	0	0
软便	阴性	1-5	1
软便	隐血阳性	5-10	2
腹泻	隐血阳性	10-15	3
腹泻	肉眼便血	>15	4

1.3.3 HE 染色：距肛门约 1 cm 处截取结肠组织约 1 cm，用 4%多聚甲醛溶液固定，并经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋，包埋后进行切片、脱蜡复水。常规 HE 染色后用中性树胶封片，显微镜观察小鼠结肠组织结构及病理损伤。

1.3.4 透射电镜：取结肠组织保存于电镜固定液中，制备切片，通过透射电镜观察组织中杯状细胞、紧密连接、微绒毛，以及上皮细胞线粒体结构形态的变化情况。

1.3.5 蛋白免疫印迹法：取小鼠结肠，放至 2 mL 研磨管中，按照每 100 mg 组织加入 1 mL 裂解液的比例加入裂解液，后用匀浆机匀浆，冰上裂解 0.5 h，4 °C 条件下 12000×g 离心 20 min。BCA 法测定蛋白浓度后，Western blot 检测小鼠结肠

组织 GPX4、SLC7A11 的表达。采用 Image J 软件分析 Western blot 结果，以目的蛋白与内参的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.3.6 统计学分析：应用 SPSS 软件进行统计学处理，计量资料均用均值 \pm 标准差表示，数均采用单因素方差分析，数据符合正态分布且方差齐性采用单因素方差分析，否则用秩和检验。 $P<0.05$ 表示具有统计学意义， $P<0.01$ 表示有显著统计学意义。

2.实验结果

2.1 苯甲酰芍药苷具备显著抗溃疡性结肠炎作用

如图 1 所示，与空白对照组比较，模型组小鼠体重明显减少，结肠缩短（ $P<0.01$ ）。病理切片和电镜观察显示，模型组小鼠结肠组织黏膜固有层腺体结构被破坏，杯状细胞丢失明显，隐窝消失或结构扭曲，炎性细胞广泛浸润达到黏膜下层等病理改变；相较之下，阳性对照药和 BP 各个剂量均能在一定程度上抑制小鼠的体重减轻和结肠的损伤，减少 DAI 评分（ $P<0.01$ 或 0.05 ），且 BP 高剂量组的干预效果与阳性对照药相当。各给药组小鼠肠黏膜状态均见好转，仅存在轻度的充血水肿，炎细胞浸润程度明显减少，且 BP 的干预作用存在一定的量效关系。

通过透射电镜观察 BP 对结肠炎小鼠组织超微结构的影响，空白对照组上皮结构完整，上皮微绒毛排列整齐，紧密连接完整，清晰可见。模型对照组微绒毛脱落，排列不齐，紧密连接结构模糊，细胞膜及细胞器膜溶解破裂。BP 干预组结肠上皮微绒毛缺损、上皮细胞形态异常和紧密连接结构缺失有所改善，其中 BP 高剂量组和阳性对照组小鼠结肠超微结构损伤最轻，仅部分微绒毛轻度变短，上皮细胞整体结构较完整，少数细胞核染色质凝集。

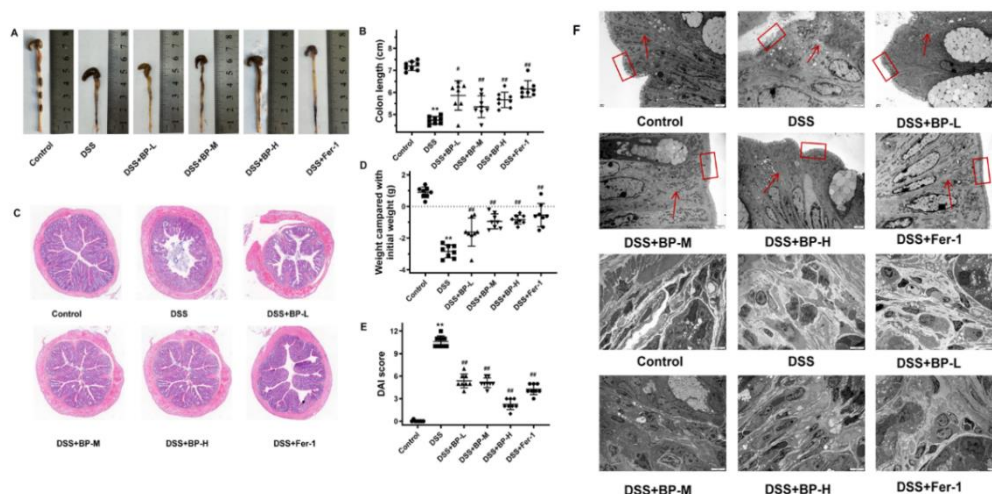


图 1 苯甲酰苄胺对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠影响。A 和 B. 苯甲酰苄胺对溃疡性结肠炎小鼠结肠长度的影响；C. 苯甲酰苄胺对溃疡性结肠炎小鼠病理切片的影响；D. 苯甲酰苄胺对溃疡性结肠炎小鼠体重的影响；E. 苯甲酰苄胺对溃疡性结肠炎小鼠 DAI 评分的影响。F. 苯甲酰苄胺对溃疡性结肠炎小鼠组织超微结构的影响。**, 与 Control 组比较, $P<0.01$; #, 与 DSS 组比较, $P<0.05$; ###, 与 DSS 组比较, $P<0.01$ ($n=6$ 或 8)。

2.2 苯甲酰苄胺改善溃疡性结肠炎小鼠结肠组织铁死亡相应指标变化

如图 2 所示, 与模型对照组比较, BP 的中、高剂量能够显著上调结肠组织中 GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平($P<0.01$ 或 0.05), 其中 BP 高剂量组中 GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平较阳性药对照组高。模型对照组线粒体形态改变, 包括线粒体膜变得致密并伴随体积变小, 以及外膜破裂和线粒体嵴的减少或消失。给药组在一定程度上恢复线粒体结构、体积, 其中 BP 高剂量组线粒体嵴清晰可见, 表明 BP 维护肠黏膜屏障完整性, 发挥抗溃疡性结肠炎作用可能与下调铁死亡有关。

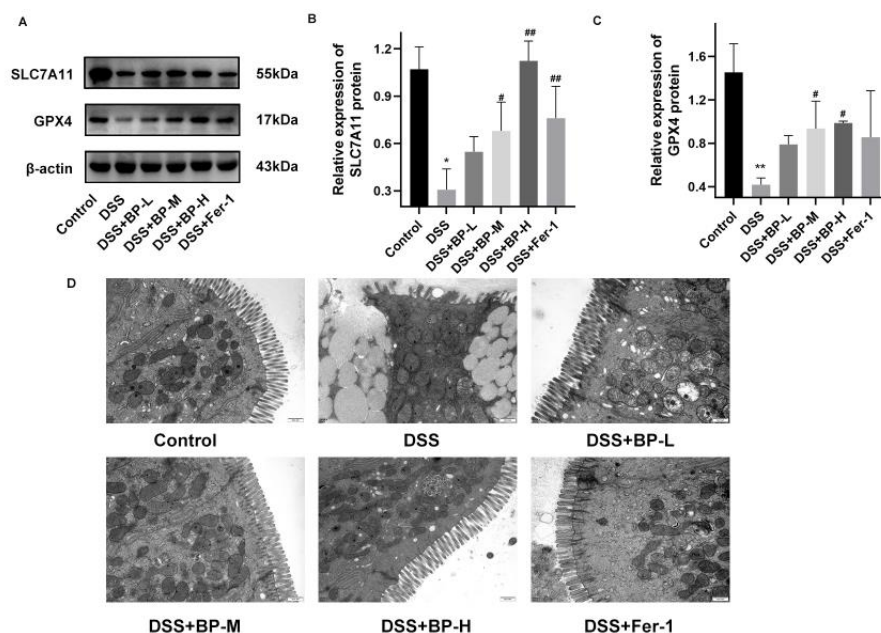


图 2 苯甲酰芍药苷对 DSS 干预的结肠组织中铁死亡的调控作用。A-C. 苯甲酰芍药苷对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 SLC7A11、GPX4 蛋白表达的影响;D. 苯甲酰芍药苷对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中线粒体形态的影响。*, 与 Control 组比较, $P<0.05$; **, 与 Control 组比较, $P<0.01$; #, 与 DSS 组比较, $P<0.05$; ##, 与 DSS 组比较, $P<0.01$ ($n=3$)。

2.3 铁死亡激动剂 Erastin 削弱苯甲酰芍药苷抗溃疡性结肠炎作用

如图 3 所示, 与 BP 高剂量组相比, BP 高剂量+Erastin 组小鼠结肠组织线粒体形态改变, 线粒体膜变得致密并伴随体积变小, 外膜破裂和线粒体嵴的减少。BP 高剂量+Erastin 组结肠组织中 GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。

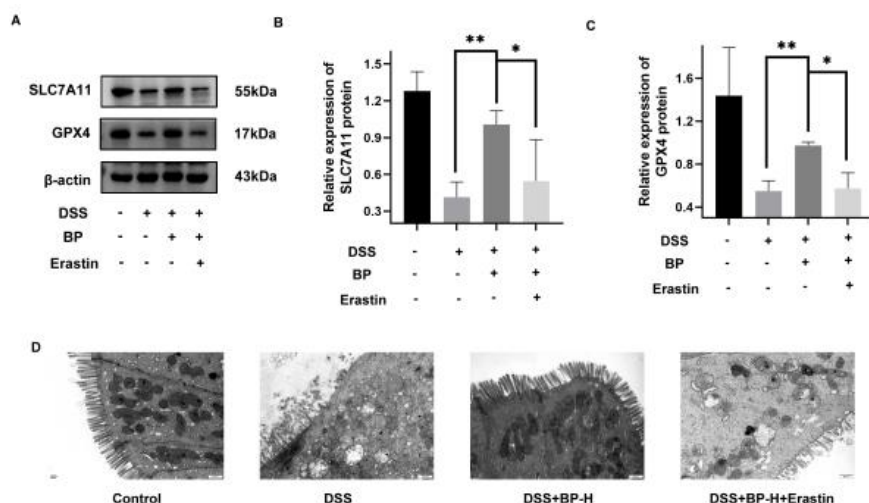


图 3 苯甲酰芍药苷抑制铁死亡发挥抗溃疡性结肠炎作用。A-C. 苯甲酰芍药苷抑制铁死亡对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 SLC7A11、GPX4 蛋白表达的影响;D. 苯甲酰芍药苷抑制铁死亡对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中线粒体形态的影响。*, 与 Control 组比较, $P<0.05$; **, 与 Control 组比较, $P<0.01$; #, 与 DSS 组比较, $P<0.05$; ##, 与 DSS 组比较, $P<0.01$ ($n=3$)。

与此同时，相较于 BP 单独干预，BP 高剂量+Erastin 组结肠可见结肠缩短，DAI 评分高，黏膜固有层腺体结构被破坏，杯状细胞丢失明显，隐窝消失或结构扭曲，炎性细胞广泛浸润达到黏膜下层；肠上皮细胞微绒毛形态缺损、紧密连接模糊（图 4）。由此可见，铁死亡激动剂 Erastin 的干预显著削弱了 BP 的抗 UC 作用。

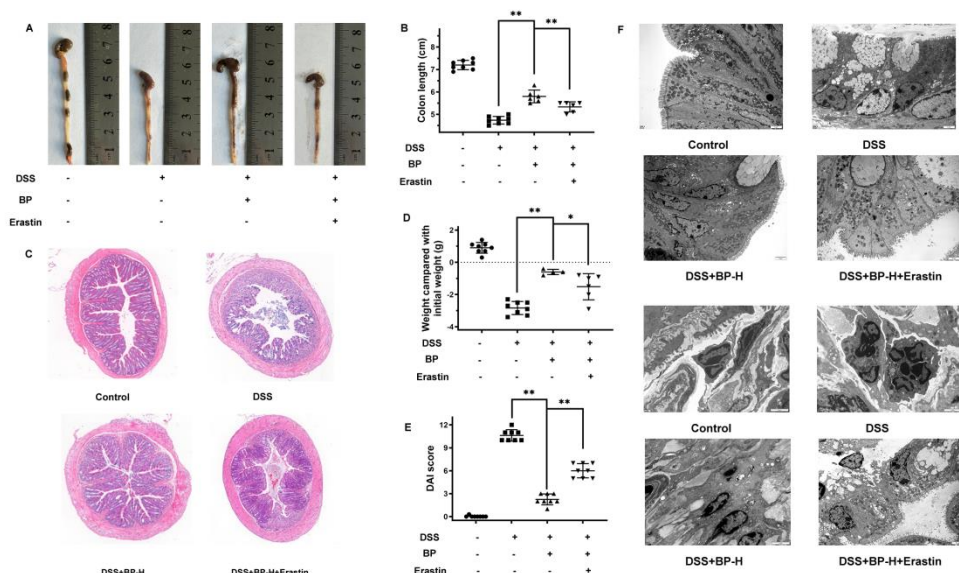


图 4 Erastin 干预对苯甲酰芍药苷抗溃疡性结肠炎作用的影响。A 和 B. Erastin 干预对苯甲酰芍药苷减轻溃疡性结肠炎小鼠结肠长度缩短和损伤的影响；C. Erastin 对苯甲酰芍药苷干预后溃疡性结肠炎小鼠病理切片的影响；D. Erastin 对苯甲酰芍药苷干预后溃疡性结肠炎小鼠体重的影响；E. Erastin 对苯甲酰芍药苷干预后溃疡性结肠炎小鼠 DAI 评分的影响。F. Erastin 对苯甲酰芍药苷干预后溃疡性结肠炎小鼠组织超微结构的影响。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (n=6 或 8)。

3.讨论

UC 是一种非特异肠道炎症性疾病。目前临床治疗常用 5-氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫调节剂等药物进行治疗，控制病程，但长期使用疗效降低，不良反应多等问题日益凸显，给患者带来巨大的身心不适和经济负担^[7]。中医药在治疗 UC 具有独特优势。溃疡性结肠炎在中医学中属于“泄泻”、“痢疾”等病范畴^[8]。吴鞠通言“泄而腹满甚，脾阴病重也”，患者因禀赋不足，或饮食、劳倦、久病等损伤脾胃，脾气受损，水谷精微不归正化，酿生水湿，下注于大肠，乃致泄泻、泻痢等症候，而泄之愈久，耗液伤阴愈重^{[9][10]}。因此中医在治疗 UC 的过程中往往会注重对阴液的保护，具有敛阴功效的白芍在中医治疗 UC 时使用频率位居各中药的前列^[4]。苯甲酰芍药苷是从白芍中分离得到的活性单体^[5]，本实验研究表

明, BP 的灌胃干预能够显著减轻 DSS 所诱导的小鼠溃疡性结肠炎损伤, 并能改善小鼠体重减轻以及便血等 UC 的临床症状。

铁死亡是大量脂质过氧化物介导膜损伤引起的一种铁依赖性细胞死亡^[10]。过量 Fe^{2+} 通过芬顿反应 (Fenton reaction) 催生激活大量的脂质活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX), 使得肠上皮细胞大量死亡, 促进 UC 的发生发展。研究表明抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 减少是铁死亡发生的重要指标, GPX4 可以将细胞毒性物质脂质氢过氧化物 (lipid hydroperoxide, L-OOH) 还原成无毒性脂醇 (lipidol, L-OH)^[12], 发挥出抗氧化能力, 减少脂质 ROS 的产生, 抑制铁死亡的发生。GPX4 的主要产物为谷胱甘肽 (glutathione, GSH)^[13]。GSH 合成由半胱氨酸控制, 而体内半胱氨酸主要由溶质载体家族 7 成员 11 (Solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 介导的胱氨酸反向还原而成。SLC7A11 介导的 GPX4 合成途径在阻止脂质过氧化以及抵抗过氧化应激中发挥关键作用。

铁死亡相关信号在 DSS 诱导的 UC 小鼠结肠组织中存在高表达, 过高的铁死亡表达是肠上皮细胞死亡, 从而引发 UC 的主要原因。而下调铁死亡水平可显著减轻组织的炎症损伤^[14]。BP 的干预可显著上调 UC 小鼠结肠组织中 GPX4、SLC7A11 等蛋白的表达水平, 并能减少肠上皮细胞中线粒体的铁死亡样损伤。在给予铁死亡激动剂 Erastin 时, BP 的抗 UC 效果明显减弱。上述研究表明, 苯甲酰芍药苷抗 UC 的作用与下调铁死亡有关。本实验的开展在一定程度上揭示了敛阴中药白芍防治 UC 的科学内涵。

参考文献

- [1] Shao B, Yang W, Cao Q. Landscape and predictions of inflammatory bowel disease in China: China will enter the Compounding Prevalence stage around 2030[J]. *Front Public Health*. 2022, 10:1032679.
- [2] 梅胜兰, 夏中元, 孟庆涛, 周金剑. 细胞铁死亡发生机制的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26 (21).
- [3] Huang J, Zhang J, Ma J, et al. Inhibiting ferroptosis: A novel approach for ulcerative colitis therapeutics[J]. *Oxid Med Cell Longev*. 2022, 2022:9678625.
- [4] 章芳珍, 吴德玲, 赵宏苏, 许凤清, 张伟, 郑良超. 苯甲酰芍药苷灌胃给药的代谢产物芍药苷的药动学研究 [J]. *中药新药与临床药理*. 2019, 30(12): 1490-1496.
- [5] Kim C, Sim H, Bae JS. Benzoylpaeoniflorin activates anti-inflammatory mechanisms to mitigate sepsis in cell-culture and mouse sepsis models [J]. *Int J Mol Sci*. 2022, 23(21):13130.
- [6] 刘玲, 邱相君, 和素娜, 杨晖, 王等, 杨雪梅. 芍药苷对 LPS 脑损伤模型小鼠氧化应激和能量代谢的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (14) :2871-2875.
- [7] 王春霞, 葛俊李, 李芳, 赵鲲鹏, 邵士俊, 杨扶德, 冯金梁. 中药治疗溃疡性结肠炎作用及机制研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(02):270-282.
- [8] 蒋志滨, 高洁, 李文, 柴艺汇, 管连城, 陈云志. 痛泻要方干预肝郁脾虚型溃疡性结肠炎机制探讨 [J]. *时珍国医国药*. 2018, 29(9):2121-2123.
- [9] 张晓明, 柳越冬, 都静, 臧思源. 中医学理论指导下的溃疡性结肠炎病因病机研究进展 [J]. *中华中医药学刊*. 2023.
- [10] 徐逸, 顾庆华. 论理脾阴法在溃疡性结肠炎治疗中的应用 [J]. *中国中医急症*. 2019, 28(11):2002-2004 .
- [11] Xu M, Tao J, Yang Y, Tan S, Liu H, Jiang J, Zheng F, Wu B. Ferroptosis involves in intestinal epithelial cell death in ulcerative colitis[J]. *Cell Death Dis*. 2020, 11(2):86.18.
- [12] Martin H. L, Teismann P. Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson’s disease. *The FASEB Journal*. 2009, 23(10):3263–3272.
- [13] Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer:ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. *Protein Cell*. 2021, 12(8):599-620.
- [14] Yang X, Sun X, Zhou F, Xiao S, Zhong L, Hu S, Zhou Z, Li L, Tan Y. Protocatechuic acid alleviates dextran-sulfate-sodium-induced ulcerative colitis in mice via the regulation of intestinal flora and ferroptosis [J]. *molecules*. 2023, 28(9):3775.

“有故无殒”理论的现代诠释

乔世杰¹，付超²，唐文¹，王章林³，王志斌¹，韩海瑞¹，童康¹，

王洋¹，李灿东^{1✉}

(1. 福建中医药大学中医证研究基地，福建省福州市闽侯上街邱阳路 1 号，350122；2. 四川省南充卫生学校；3. 福建中医药大学中医学院)

[摘要] 中医药以维护人体生命健康著称，也常常因其毒性而被诟病。然而，如何正确看待中医药的安全性与毒性，对中医药的毒副作用进行评价是中医药能否良性可持续发展的基石。《黄帝内经》提出“有故无殒”之论，阐明了妊娠积聚邪实，临床虽使用峻烈方药，但之于母体和胎元无碍，对于中医临床影响深远。本文基于“创造的诠释学”之实谓、意谓、蕴谓、当谓、必谓五个辩证层次诠释“有故无殒”理论，认为“有故无殒”中“故”之外延为“状态”，临床为规避中医药的不良反应和毒副作用，应宏、中、微“三观并用”，定性定量结合仔细辨识人体“生理特点”“病理特点”“体质”“证”“病”等状态，突出方与“状态”之间的联系，方与“状态”相应，则会减少中医药毒副作用之殒患。

[关键词] 有故无殒；创造的诠释学；中医药安全性；中医状态

[基金项目] 国家中医药管理局第二届全国名中医传承工作室建设项目（国中医药办人教函〔2022〕245 号）

[第一作者] 乔世杰，在读博士研究生，18950362963，2277605219@qq.com

[通信作者] 李灿东，fjzylcd@126.com

Modern interpretation of the theory of “You Gu Wu Yun”

Qiao Shijie¹, Fu Chao², Tang Wen¹, Wang Zhanglin², Wang Zhibin¹, Han Hairui¹,
Tong Kang¹, Wang Yang¹, Li Candong¹

(1.Traditional Chinese Medicine Syndrome Research Base, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian 350122; 2.Nanchong Health School of Sichuan Province; 3.School of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine)

[Abstract] Traditional Chinese medicine is known for maintaining human life and health, but it is often criticized for its toxicity. However, how to treat the safety and toxicity of traditional Chinese medicine correctly, and how to evaluate the toxic and side effects of traditional Chinese medicine are the cornerstone of the benign and sustainable development of traditional Chinese medicine. Huangdi Neijing put forward the theory of "You Gu Wu Yun", and clarified that pregnancy accumulated pathogenic factors and substance. Although clinical use of drastic prescription, it did not affect the mother and fetus, which had a profound impact on the clinical practice of traditional Chinese medicine. Based on the five dialectical levels of the hermeneutics of creation, this paper interprets the theory of "cause without death". It believes that in the "You Gu Wu Yun", the "reason" is extended to the "state". In order to avoid the adverse reactions and toxic side effects of traditional Chinese medicine, the "three views" of macro, medium and micro should be used together. The combination of qualitative and quantitative identification of "physiological characteristics", "pathological characteristics", "constitution", "syndrome" and "disease" of the human body, highlighting the relationship between the prescription and "state", and the corresponding prescription and "state", will reduce the incidence of toxic and side effects of traditional Chinese medicine.

[Key words] You Gu Wu Yun; Creative Hermeneutics; TCM safety; TCM state

21 世纪,医学目的正在由“治疗疾病”向“维护健康”转变,“健康中国”战略应运而生,“治未病”思潮重新刮起,使中医药成为更多人的选择,然而,其毒副作用也层见叠出^[1]。因此,如何在中医理论指导下,正确看待中医药的安全性,对中医药毒副作用进行评价,使其更加充分发挥中医药的特色与优势,成为当前亟需解决的问题。本文基于“创造的诠释学”之实谓、意谓、蕴谓、当谓、必谓五个辩证层次诠释“有故无殒”理论,认为“有故无殒”中“故”的外延为“状态”,临证融宏、中、微观参数于一体辨识人体状态,强调方与“状态”之间的关联性,方与“状态”相应,从而通过深层次梳理总结中医药“有故无殒”学术思想,对其进行创造性地诠释以进一步探讨中医药“辨证论治”的精髓,有助于从源头上使人们对中医药的安全性和毒性进行改观,更好发挥中医药学整体综合的原创优势,促进中医药理论和临床的传承与发展,让中医药维护人类健康发挥更大作用。

1 “创造的诠释学”渊薮

诠释学由西方传入中国,初起被哲学和传统经学的研究者重视,使中国传统哲学在现代化转型方面受到关注并引发热烈讨论^[2]。傅伟勋教授 1972 年在撰写《老子对于‘道’的看法》一文时,面对两千多年古今关于《老子》的众多诠释颇感困扰,考虑如何既涉及历史传统对《老子》进行连续传承,又能发掘其中藏有的丰富哲理,对其批判超越使之转化重生^{[3]2}。其就相互关联的诠释学问题步步探讨,认为融合考据之学、义理之学于一体,依文解义与依义解文结合,且接续吸纳适时、新进的观念,如此才能使诠释学真正具有学术研究的进步性、无涯性且又免于教条之下^{[3]2-3}。1984 年,其在台湾大学首次以“创造的诠释学”为主题进行演讲,构建包含“实谓、意谓、蕴谓、当谓、必谓”五个层次的诠释方法论规则体系,在传统主义的保守立场与反传统主义的冒进立场之间采取中道,认为真正的诠释学应批判继承与创造发展双管齐下^{[3]10}。“创造的诠释学”原是针对哲学原典研究而构想,后因其属一般方法论,其适用功能可扩展至思想传统等的延续、继承、重建、转化或现代化等广义的诠释学课题。

2 从创造的诠释学认识“有故无殒”

基于创造的诠释学的方法论,从“实谓”到“必谓”层次通过对“有故无殒”原本考证,脉络分析,熟悉、探讨不同的诠释进路并发掘深层义理,批判性考察

并建立独创的诠释学创新,超越局限并解消内在难题,以此从批判继承转变为创造发展,完成“有故无殒”的前诠释学的原典考证、依文解义的析文诠释、历史诠释、批判诠释和创造诠释。

2.1 “有故无殒”的实谓

实谓层次为创造的诠释学起点,其探究典籍文本原貌,强调通过原典考证、校勘等基础研究,阐述原思想家或原典实际上说了什么,将停留在纯粹客观的原初资料的朴素语词状态予以呈现,属于前诠释学的原典考证。

“有故无殒”出于《黄帝内经》:“黄帝问曰:妇人身重,毒之何如?岐伯曰:有故无殒,亦无殒也。”(《素问·六元正纪大论》)此即狄尔泰所倡“随后体验”功夫中之“(原来作家的)体验”——“(体验形成作品的)表现”的形成过程。然而,现行关于“有故无殒”词句的考证、校勘已确定,即“有故无殒”虽有“纯客观性”的原本资料存在,但不等于可获至原典或原思想家的关于其诠释的金钥匙并对此进行客观诠释,即“随后体验”。此间仍存在一段毋庸讳言的差距。为缩小此差距,不应固执地局限于原典直接表达出来之语而使之停滞不前,即要上升到意谓层次对其进行诠释学探索。

2.2 “有故无殒”的意谓

意谓层次即指针对原典的脉络、逻辑、层面(或次元)等的语意分析,尽量客观地诠释原思想家或原典指谓,即其想要表达什么,属于依文解义的析文诠释。因“有故无殒”在逻辑和层面上表现不明显,故本文针对“有故无殒”,通过借用“日常语言分析法”中的脉络、用法为方法论灵感,采撷传统说法及辞典中的字辞定义,就字词或句子在不同的特定脉络范围,分析其脉络意义及蕴涵,对其进行脉络分析式的意谓诠释。

故,《说文解字》中释为“使为之也……凡为之必有使之者。”即缘故,原因;原文中“故”释为“大积大聚”——帝曰:愿闻其故何谓也?岐伯曰:大积大聚,其可犯也,衰其大半而止,过者死。(《素问·六元正纪大论》)后世医家多禀此说,例王冰^[4]将“故”注解为“大坚癥瘕”,张景岳^[5]注“故,如下文大积大聚之故”。然尚有医家认为,“故”为寒热之病;张隐庵^[6]在《黄帝内经素问集注》中记载:“此言胎孕积聚”,并进一步对其进行细化:“亦有阴阳寒热之分”;高士宗^[7]在《黄帝素问直解》中直言:“有寒热之病……谓之有故”。

孙谊和于智敏^[8]通过考诸古代文献,认为“故”的内涵有三:病;宿病、沉年痼疾;原因,缘故;因此故既可代表疾病,又可代表病因。

殒,《一切经音义》引《声类》云:“殒,没也”,即死亡;《重广补注黄帝内经素问》中论述:“上无殒,言母必全。亦无殒,言子亦不死也”;《中医名词术语精华辞典》中也将其注为“死亡”^[9]。也有医生认为“殒”为“伤害”,张介宾^[5]在《类经》中指出:“殒,伤也”;薛雪^[10]在《医经原旨》中也曾提到“殒,伤也”。

由此可见,“有故无殒”意谓即指治疗妊娠积聚时,恰当使用活血化瘀之“有毒”方药于母体和胎元无碍^[11-13]。然而,在意谓层次进行的脉络分析从而发现的上述“有故无殒”脉络意义,并非来源于整体思想的深层理解,无法真正透视“有故无殒”的深度。限于其停留于平面分析层次的局限性,亟需对“历史积淀”的关于“有故无殒”的原典诠释进行探讨,即诠释“有故无殒”的蕴谓。

2.3 “有故无殒”的蕴谓

蕴谓层次即通过对原思想家与继承者间关于原典前后思维的理路线索分析,探讨其就原典的种种诠释义理,发掘原思想家所指的可能思想蕴涵,属于历史诠释。如是熟悉不同的诠释进路,可避免片面性诠释或主体性揣测的产生,扩大诠释学视野而获至相当有说服力的原典或原思想家的深层义理。

“有故无殒”最早记载于《黄帝内经》,但其理论得到高度重视,仲景对“有故无殒”发挥到极致,《金匮要略·妇人妊娠病脉证并治第二十》中分别以附子汤、桂枝茯苓丸、当归贝母苦参丸治疗妊娠腹痛、漏下、小便难,无畏其大辛大热之性、活血化瘀之效和苦寒攻下之性用,“观其脉证,知犯何逆,随证治之”;继仲景之后,王冰提出以破积愈癥之药治之,既可盖存其大,又可服毒不死,母全子安;李杲认为“孕妇有病,毒之无殒”;张景岳论述其为“有是故而用是药”,如此则有病病当,故“孕妇不殒,胎亦不殒”,李中梓、章虚谷、陈修园等也均执此说;高士宗提出“有寒热之病”而“用寒热之毒”则无陨灭之患等;日本浅田宗伯论述“有故无殒”不独治妊娠病,如见他证,亦如此,使这一理论应用到临床其他相关病证之中;延及王朴斋,其认为药中病,何伤胎之有?药不中病,虽平淡之药,足以伤胎,其对“有故无殒”理论进一步延伸,深入到“辨证论治”的思想之中。

由上观之，以上基于“有故无殒”的意谓对其不断继承和逐步发挥以进行实谓诠释，即：首先，“有故无殒”的内涵延伸为治疗妊娠病时，合适使用峻烈之“有毒”方药于母体和胎元无碍，治疗范围由妊娠积聚扩至妊娠病^[14-16]。其次，“有故无殒”的内涵结合为“有是证用是药”，在治疗疾病时，精心辨证，严格使用“有毒”方药于人体无碍；因其蕴含辨证思维的特点，又被用于恶性肿瘤、内伤杂病等的治疗^[17-19]。除此之外，“有故无殒”的深度挖掘为依据“有故无殒”理论，有学者开展中药安全性评价理论和模式、中药毒性、相关疾病“毒”药施用策略研究等^[20-26]。如是超越意谓层次关于“有故无殒”的平面分析，一定程度上获取其深层义理以触及积淀下来的历史深度。

2.4 “有故无殒”的当谓

当谓层次即在对获至的原典深层义理进行批判性考察，发掘其结构底下的义理根基。其间要求诠释者卓越的诠释学洞见，建立独创的诠释学创新，更进一步救活原思想家的义理，为原思想家说出他应当说出的话，属于批判诠释。

虽然以上“有故无殒”的意谓、蕴谓对其内涵研究进行了丰富和发展，但所提出的“有故无殒”治疗范围有的是针对妊娠积聚病，有的是针对妊娠病，有的是“有是证用是药”，有的是对其进行深度挖掘。这样对于有故无殒的诠释似乎只注重某个方面，适用范围只局限于局部，未对有故无殒进行整体思辨，系统、综合地将其统一，把握其实质。除此之外，临床上有部分患者存在无“故”的情况，若运用现有“有故无殒”内涵，此时则无法对其“故”进行归纳总结，更无法处方予以治疗；尚且随着“治未病”思潮兴起，中医药在成为更多人的选择的同时更要坚持中医基础理论对中医药研究的指导作用，以正视中医药的安全性与毒性。

中医状态学是在中医理论指导下，应用系统科学的方法和中医整体思维开展健康状态理论和健康状态辨识方法研究^{[27]2}。系统科学的理论是中医状态学的重要理论基础，中医在认识论上，立足于整体状态及其规律把握人体生命状态^{[27]6}。状态是中医辨证诊断的核心^{[27]16}。状态偏颇是疾病发生的内因，决定证的转归和疾病的预后^{[27]41}。根据整体与局部的关系，状态纵向分类包含了生理特点、病理特点、体质、证、病^{[27]41}；基于“中医状态”提出“有故无殒”中“故”之外延为“状态”，即按照人体生理特点、病理特点、体质、证、病的不同，临证恰当

使用方药，以期于在确保药物安全的前提下，有效治疗疾病。

因此，“有故无殒”的当谓即指在治疗疾病时，辨识人体状态，强调方药与机体状态的联系，方药与状态相符合，“方态相应”，即方与“生理特点”“病理特点”“体质”“证”“病”相应，如是回归中医经典本原，以中药的偏性纠偏救弊，使得具有二重性的中医药疗效、毒性充分选择性表达其“效”作用，规避其“毒副作用”。如此这般掘发“有故无殒”思想体系的思想结构，认为“有故无殒”中“故”的内涵是人体整体状态的反映，将“中医状态”引入“有故无殒”中能够弥补现有认识之不足，更好地从全局出发理解和把控“有故无殒”，深入于无“故”探索“有故无殒”，开展中医药研究，正确看待中医药的安全性与毒性，对中医药毒副作用进行评价，更加充分发挥中医药的特色与优势，可使“有故无殒”内涵更有灵感生气且启迪临床用药观念。

2.5 “有故无殒”的必谓

必谓层次即指在讲活原思想家思想的基础上批判地超越其局限性，且为解决原典所未能完成的内在难题，阐述如今需要我们践行什么，属于创造诠释。

基于上述分析，《素问·六元正纪大论》中“有故无殒”使用范畴可扩至人体状态，以“方-生理特点”“方-病理特点”“方-体质”“方-证”“方-病”相应为具体表现形式。

如是准确判断人体“生理特点”“体质”等“故”之状态使得成为实现“方-态”相应的最大化和减少中医药“无殒”的关键因素之一，也是对于“有故无殒”的创造诠释，即其必谓。

传统辨“证”以“中观”层面“症状、体征”信息为主，定性、半定量结合辨识人体“状态”，据此处方用药，其主观性大、更多依靠医者的经验和思维。如常山虽有截虐之功，更有兴奋子宫之患；麻黄虽有平喘之效，却又兴奋心脏；万文谟^[28]此时用来治疗妊娠发疟、病窦综合征的患者时非得心应手，而致使流产、气喘加重之“殒”。自微观辨证^[29]提出以来，其借助中医理论的指导，确实可弥补既往某些疾病中医传统诊治的不足，为其提供客观依据，使“辨证”更加明确，“论治”更有针对性，从而促使辨证用药减、避毒^[21]。有学者对慢性萎缩性胃炎脾虚湿浊型患者以“参苓白术散+胃黏膜微观指标”辨证用药，疗效显著^[30]。还有学者^[31]基于“有故无殒”理论，开展大黄证(病)-量-毒-效关系

研究,发现大黄对于慢性肝损伤的可能“治疗窗”。

然而中药安全性不仅和证、病联系,与代谢、免疫相关,更受体质等机体状态差异的影响。“人有能耐毒者,有不胜毒者”,分别予以厚、薄药对其进行治疗。王伽伯等^[32-33]通过研究发现,何首乌肝损伤与特异质机体状态密切相关,提出“免疫应激三因致毒假说”并建立评价模型,对临证筛选易感人群、生物标志物提供指导等。但其像大多数学者一样,借用化学药品毒性研究方法多以单味药为对象,离开复方孤立揭示;还有学者又借助现代毒理学的研究方法,一般使用正常动物模型,抛弃“状态”片面反映^[34]。中医方剂以数千年的人体应用历史来展现其对于维护人体生命健康的疗效和安全^[33],对于此,有学者使用麻黄附子细辛汤(MXF),以正常、肾阳虚外感病证复合模型小鼠为研究对象,从作用靶器官、耐受性差异、量-效/毒关系等定性定量分析发现,MXF可以改善肾阳虚外感小鼠的机体机能“低下”状态,各宏观、微观药理指标明显改善,显示“量-效”关系,且呈非线性并具有“拐点”属性,超过药物剂量则显示“量-毒”关系;而对正常状态的小鼠呈现明显“量-毒”线性关系。此研究较全面对“有故无殒”理论进行阐释,对于重新审视中医药的毒性提供了思路,具有积极的启发意义。

以上虽依据“有故无殒”理论开展较为全面的中医药研究,但人是生活在社会的人,天人合一,人还受自然环境因素的影响,如何将季节、五运六气、地理环境等相关因素纳入相关中医药安全性研究、关注中医药对人体安全性的动态变化、将微观指标转化为微观参数赋予其中医内涵并作为中医药安全评价标准等仍然是今后需要考虑和解决的问题。

人体是一个开放的复杂巨系统,临床疾病病机复杂,据此,宏、中、微观“三观并用”^[35],借助宏观(天、地、时)、中观(生、心、社)、微观(理、化、病)参数,定性定量结合,才能整体、系统地辨识人体“生理特点”“病理特点”“体质”“证”“病”等状态,突出方与“状态”之间的联系,“方态相应”,使之更加针对性地选方用药,辨“状态”论治而减毒、避毒。此即“有故无殒”的必谓。

3 小结

综上所述,基于“创造的诠释学”之实谓、意谓、蕴谓、当谓、必谓五个辩

证层次诠释“有故无殒”理论，认为“有故无殒”之“故”的外延为“状态”，临证宏、中、微“三观并用”，融宏、中、观参数于一体，定性定量结合辨识人体状态，依据人体生理特点、病理特点、体质、证、病的不同，临证恰当使用方药，“方-生理特点”“方-病理特点”“方-体质”“方-证”“方-病”相应，“方态相应”，则会减少中医药毒副作用之殒患。如此引进“创造的诠释学”来诠释“有故无殒”有利于更加全面、深刻、正确地广布其义，希冀着重于“有故无殒”理论对中医药研究的指导作用，进一步探讨中医药“辨证论治”的精髓，更好发挥中医药学整体综合的原创优势，促进中医药理论和临床的传承与发展，让中医药维护人类健康发挥更大作用。

参考文献

- [1]周荣易,王娇娇,韩新民.对中药毒性问题的思考[J].时珍国医国药,2016,27(7):1679-1682.
- [2]闫敏敏.还原与创造—诠释学视野下清代《黄帝内经》训释研究[D].北京中医药大学,2022.
- [3]傅伟勋.从创造的诠释学到大乘佛学[M].台湾:台湾东大图书公司,2021.
- [4]王冰.重广补注黄帝内经素问[M].北京:人民卫生出版社,1963:501.
- [5]张景岳.类经[M].北京:中国医药科技出版社,2011:189.
- [6]张志聪.黄帝内经素问集注[M].北京:中国医药科技出版社,2014:286.
- [7]高士宗.黄帝素问直解[M].北京:科学技术文献出版社,1980:612.
- [8]孙谊,于智敏.“有故无殒”发微[J].中华中医药杂志,2009,24(11):1418-1420.
- [9]李经纬,余瀛鳌,蔡景峰.中医名词术语精华辞典.天津:天津科学技术出版社,1996:307.
- [10]薛雪集注;洪丕谟,姜玉珍点校.医经原旨[M].上海:上海中医学院出版社,1992:185.
- [11]曾薇薇,陆齐天,杨冰祎,等.基于“有故无殒,亦无殒也”探讨活血化瘀药物在妊娠病中的运用[J].陕西中医,2020,41(9):1289-1291.

- [12]周毅萍,李祥云,李祥云应用活血化瘀类药治疗妊娠病验案 3 则[J].中华中医药杂志,2017,32(8):3537-3540.
- [13]周丽,邹宇,刘玉章,等.正常和血瘀证大鼠对莪术生殖发育毒性反应的差异[J].江苏中医药,2013,45(4):69-71.
- [14]达美君.简明中医语词辞典.上海:上海科学技术出版社,2004:56.
- [15]时燕平,夏桂成.浅谈对妊娠“有故无殒亦无殒也”的认识[J].湖北中医杂志,1998(5):23-24.
- [16]王婧,骆斌,蒋燕.略谈《内经》“有故无殒”及其临床意义[J].北京中医药大学学报,2009,32(11):733-736.
- [17]邢玉瑞.“有故无殒亦无殒”思想古今应用探讨[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(8):1045-1046.
- [18]邹宝生.“有故无殒,亦无殒也”的临床应用体会[J].陕西中医,2007(10):1440.
- [19]刘乃元,张冬梅.“有故无殒亦无殒”临证应用举隅[J].陕西中医,1999(9):411-412.
- [20]王进,王旭东,吴承艳,等.本草学毒性理念的源流探考与论述范式的诠释[J].中草药,2017,48(1):197-202.
- [21]丁樱.从《黄帝内经》“有故无殒”谈儿童风湿免疫疾病治疗中的药“毒”及“毒”药的应用[J].北京中医药大学学报,2023,46(4):445-449.
- [22]王丽平,罗文佳,欧莉,等.“有故无殒”理论指导下基于肝细胞 Bax/Bcl-2 凋亡通路的何首乌“毒-证”机制研究[J].中药药理与临床,2019,35(6):82-87.
- [23]李阳,韩姗姗,代彦林,等.基于“有故无殒”思想探讨雷公藤制剂对儿童的性腺毒性[J].中国中医基础医学杂志,2023,29(4):692-696.
- [24]Zeng LN, Ma ZJ, Zhao YL, et al. The protective and toxic effects of rhubarb tannins and anthraquinones in treating hexavalent chromium-injured rats: the Yin/Yang actions of rhubarb[J]. J Hazard Mater. 2013 Feb 15;246-247:1-9.
- [25]Fang F, Wang JB, Zhao YL, et al. A comparative study on the tissue distributions of rhubarb anthraquinones in normal and CCl₄-injured rats orally administered rhubarb extract[J]. J Ethnopharmacol. 2011 Oct 11;137(3):1492-7.
- [26]涂灿,何琴,周元园,等.基于代谢组学的大黄对正常和肝纤维化大鼠双向作用对比研究[J].药学报,2018,53(7):1139-1147.
- [27]李灿东主编.中医状态学[M].北京:中国中医药出版社,2016.
- [28]李宿根,柴文若.万文谟谈临证得失二三事[J].浙江中医杂志,1999(1):30-31.
- [29]沈自尹.微观辨证和辨证微观化[J].中医杂志,1986(2):55-57.
- [30]李枝锦,吴平财.微观辨证论治脾虚湿浊型慢性萎缩性胃炎临床疗效及对血清胃泌素、胃蛋白酶原的影响[J].时珍国医国药,2022,33(3):643-646.
- [31]Wang JB, Zhao HP, Zhao YL, et al. Hepatotoxicity or hepatoprotection? Pattern recognition for the paradoxical effect of the Chinese herb *Rheum palmatum* L. in treating rat liver injury[J]. PLoS One. 2011, 6(9):e24498.
- [32]李春雨,李晓菲,涂灿,等.基于内毒素模型的何首乌特异质肝损伤评价[J].药学报,2015,50(1):28-33.
- [33]王伽伯,崔鹤蓉,柏兆方,等.精准医学下的中药安全性评价策略和方法:病证毒理学[J].药学报,2016,51(11):1681-1688.
- [34]周宜,陈钢,夏丽娜,等.从《内经》“有故无殒”思想看中药毒性研究[J].中国中医基础医学杂志,2007(5):342-343.
- [35]夏淑洁,吴长汶,李灿东.宏、中、微“三观并用”的中医状态辨识模式探讨[J].医学争鸣,2020,11(6):39-42.

民族药药效学与安全性研究

张泰源，张青兰，王政，王兴桂

（贵州中医药大学，贵州省贵阳市，5550000）

[摘要] 民族药作为我国传统医药的重要组成部分，承载着各个民族独特的医疗智慧和实践经验。近年来，随着对民族医药的重视程度不断的提高，民族药的药效学与安全性研究也是作为科研工作者及临床工作者所必须研究的重点之一，只有不断的丰富民族药的理论基础，才能更长久的为广大的人民的身体健康保驾护航。

民族药药效学的研究旨在揭示其治疗疾病的作用机制和效果，各个民族医生在治疗疾病过程中，由于缺乏理论知识的支撑，他们难以对其治病的药效学明确的阐述清楚，只知其所犯之疾病有效果，对人体的健康有好处，但并不知道其具体的作用机理。随着现代科技的快速发展，药物的药效学也随之快速兴起。比如某药的药效学具体是哪些成分对疾病起到治疗作用，通过细胞生物学、分子生物学和药理实验，深入研究该药在抗炎、抗肿瘤、免疫调节、心血管保护方面的药效作用。

安全二字不仅对患者，而且对医生都是很重要的。对患者而言，安全合理用药才能保证患者所患之疾病能够快速的康复，而对医生而言，安全同样重要，一旦涉及安全事故，将会导致这个医生无法再有行医资格，最终就算其医术载高明也会无法再施展。所以采用严格的毒理实验方法，对民族药的急性毒性、慢性毒性、生殖毒性、遗传毒性等进行评估是极其重要的。同时，民族药与其他药物联合使用可能产生的相互毒副作用、以及药物在特殊人群（如孕妇、儿童、老年人）中的安全性评价是非常重要的。研究发现，不仅是经过几千年传承的中药对人体肝肾等有损伤，而且民族药对人体同样是有一定的损伤，有损伤并不代表就取缔它，相反，通过掌握其可控的安全性，也会使其为人民的健康服务。

综上，民族药药效学与安全性研究对于传承和发展民族医药、保障公众健康具有重要的意义。虽然目前的成果小有成就，但仍需要不断努力，以充分发挥民族药的优势，为人类的健康事业做出更大的贡献。本文旨在探讨民族药药效学与安全性研究的现状、方法及意义，为民族药的现代化发展提供参考。

[关键词] 民族药、药效学、安全性

[第一作者] 张泰源（1997-），男，贵州中医药大学，硕士，研究方向：针灸特色方法（民族医外治法）；
2245877153@qq.com，13158089015

[通信作者] 王政（1963-），男，贵州中医药大学，主任医师，研究方向：针灸特色方法（民族医外治法）；
王兴桂（1966-），女，贵州中医药大学，正高级实验师，研究方向：民族医外治法

引言

民族药是指少数民族使用的、以民族传统医药理论和实践指导的药物，具有鲜明的地域性和民族传统。据统计，我国 55 个少数民族中有大约 80% 的民族有自己独特的民族药物，其中独立的民族医药体系占 1/3。随着时代的进步，我国分别于 2019 年颁布《中共中央 国务院关于促进中医药传承创新发展的意见》和 2020 年颁布《关于促进中药传承创新发展的实施意见》对民族药与中药的结合，以及传承中医药、民族医药文化^[1-2]。

1 民族医药理论发展

我国是多民族国家，各个民族在日常生活实践之中，不断总结出适合自己民族所犯疾病的治疗、预防疾病的经验方法，衍生出具有极其民族特色的医药体系。目前民族医药的体系大概分为以下三种：一是已经具有完备的医药理论体系，如藏族、维吾尔族、傣族等民族医药体系；二是已有医药文献专著记载，具有丰富的诊疗技术与药物临床用药经验，但其理论体系并不是十分完整，还有待完善，如苗族、土家族等民族医药；三是具有丰富的医疗技术和药物应用经验，但无文字史料记载，只是通过口传相授在本民族内进行传承的医疗体系，如水族、布依族等民族医药^[3]。总之，民族医药的发展仍有一段艰苦的路程走。

2 民族药药材现状

民族药大多数来源于本民族居住地区的天然药物，如冬虫夏草、天山雪莲、鬼见愁等，也有一些药物与国外其他民族的交往和交流，使用一些交叉或进口的药物，但均有民族特色。如西红花、藏族药与蒙古药等。目前藏族药与汉族药共用的药物有 300 多种，蒙古族与汉族药物共有 400 多种，维吾尔族与汉族共用的有 155 种^[1]。另外，苗族民族地区更有“千年苗医，万年苗药；三千苗药，八百单方”的歌诀^[4]。

民族药大量的研究发展，各个民族逐步形成了自己特有的地方标准，然而由于民族药大部分都是经老一辈口传相授，固然很难形成固定的文字材料，最终导致大量民族药并没有自己完善的标准体系。而现今部分民族地区生态脆弱，动、植物资源有限，一些具有民族特色的药物已经出现减少的现象，同时适宜生态环境也日趋破坏或恶化，对民族药的挖掘研究便是迫在眉睫。

3 民族药药学发展现状

民族药多以丸、散、蜜膏剂等传统制剂为常见，其工艺简单，充分体现了简便廉验的优点。民族药逐渐从传统单一的制剂到产业化，包含民族药农业、民族药工业、民族药流通业和民族药知识经济业四个主体环节，同时民族药也逐渐国际化，主要包括立项调研、化学、生产与质控，非临床研究，临床研究，上市后研究，以及注册申报工作。民族药逐渐走向世界。民族医药在世界中医药联合会带领下不断形成各个民族医药专业委员会，如世界苗侗瑶民族医药专委会等。

贵州是一个少数民族聚居地区，全省少数民族人口占 2000 万左右，贵州民族医药的特色不仅“简便廉验”而且更具有“奇”的特殊魅力。贵州中医药大学是全省唯一的高等中医药高校，同时民族医药是贵州中医药大学特色的学科方向。贵州中医药大学将民族药药学与中药学融合培养，为民族药的发展注入坚实人才力量，加强民族医药文化的传承与发展^[4]。

二、民族药药效学研究

（一）研究方法

1 体内实验

体内实验通过建立动物疾病模型，观察民族药对疾病症状、生理指标和病理变化的影响，以评估其药效。选择合适的动物模型是体内实验成功的关键，动物模型应尽可能的模拟出人类疾病病理生理过程，以便更为精确的评估民族药的疗效。临床试验主要分为：I 期初步临床药理学及人体安全性评价；II 期治疗作用初步评价；III 期治疗作用确认阶段；IV 期新药上市后应用研究^[5]。四个临床试验都有体内实验，其中最重要的是 I 期初步临床药理学及人体安全性评价。I 期实验是在完整的生物体内进行研究，能够更真实的反映药物在复杂的生理或病理环境之中发生药效作用。例如，对于心血管疾病的研究，可以选择大鼠或小鼠的高血压模型、心肌梗死模型等；对于肿瘤疾病，可以选用植入瘤模型或基因工程小鼠的种属。当然，在进行动物体内实验研究的时候，也需要考虑到动物的种属、品系、年龄、性别等因素对实验结果的影响。

动物体内实验疗效具有一定的可行性了，再确认小范围随机盲法进行 II 期治疗作用初步评价，只有药物能够完全适应于某疾病之后，可以普遍的推广。临床试验的四个期，都涉及体内实验。卢显兴等通过体内药效学结合网络药理学探究丝穗金粟兰的抗炎镇痛机制，证实瑶药丝穗金粟兰的药效学作用机制^[6]。

2 体外实验

细胞培养技术是常见的体外实验方法之一,细胞培养是指将从体内的组织中提取的细胞,模拟其体内生长环境,置于无菌、适宜温度和酸碱度的条件下,保证细胞充足的营养并不断生长繁殖的实验方法。例如,在研究民族药对肿瘤细胞增殖的抑制作用,采用 MMT 法或 CCK-8 法检测细胞的活力^[7-9]。

酶活性测定也是重要的体外实验方法,民族药对酶具有一定的抑制或激活作用,通过测定相关酶的活性变化,来揭示其药理作用机制。何军伟等研究发现民族药玉簪可以抑制乙酰胆碱酶的药理活性,探讨对相关疾病中的潜在作用^[10]。

分子生物技术在民族药的体外实验中发挥着重要的作用。运用实时定量 PCR、Western Blotting 等方法,可以检测出药物作用后细胞体内基因和蛋白的表达水平变化,从而可以了解到药物在分子水平作用靶点和信号通路。藏药植物具有特殊的生长环境,活性成分众多,对治疗多种疾病均具有显著的疗效,日益规范的分子生物学技术不仅在保护稀缺的藏药资源,而且对其有效成分及微量成分的合成与转化都具有极其重要的作用^[11]。

民族药体外实验研究方法丰富多样,通过这些方法初步揭示民族药的药效物质基础和作用机制,为民族药的传承、创新和发展提供有力的支撑。

(二) 研究内容

1 治疗作用

民族医药历史悠久,是各民族人民与疾病作斗争的经验集成。相比于现代医学的治疗具有廉价、便捷、高效、副作用小等优势。蒙医文献记载三红酒炮制槟榔可增强益肾之功效,同时对肾脏损伤性的疾病能够有效的保护肾功能作用。藏药红景天可改善脑微循环,促进血管舒张,抑制血栓形成,降低氧化应激和炎症反应,对大脑痉挛有较好的治疗作用^[12]。

2 作用机制

覃建峰等研究发现苗药阿锐布对小鼠肾损伤有良好的防治作用,其作用的机制可能与其所含的活性物质抗氧化作用相关^[13]。李成付等观察发现民族药铁包金对脂多糖诱导的抑郁样行为的干预作用,通过信号通路 FGF2/FGFR1 阐述民族药对抑郁症的治疗作用机制^[14]。

三、民族药安全性研究

(一) 研究方法

1 急性毒性实验

急性毒性是指药物在单次或 24h 内多次给予后一定时间内所产生的毒性反应^[15]。拉毛草等通过对小鼠进行藏药齐如巴的急性毒性反应发现, 其毒性低或无毒, 这一研究不仅促进民族药的发展, 而且为药食同源的发展也有促进作用^[16]。梁艳等研究蒙药制剂宝根续筋药贴经皮给予的急性毒性、刺激性的动物实验, 并表明其安全性良好, 为蒙药制剂在临床上治疗提供有效的实验验证, 降低其对人体的伤害^[17]。

2 长期毒性实验

观察动物连续给药一段时间后产生的毒性反应, 评估药物的潜在慢性毒性。何乌云嘎等通过建立蒙药手参的定性定量分析, 对手参粉进行长期毒性研究, 评价其安全性, 为临床应用提供实验支撑。具体做法是对动物进行 3 个月的给予手参粉灌喂, 分别于 45 天、90 天和停药 15 天后对动物各项指标进行检测, 最后综合评价手参粉的毒性表现^[18]。阎莉等通过动物实验研究发现壮药依肝达安全剂量在 $43.33\sim 173.33\text{kg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[19]。

3 特殊毒性实验

特殊毒性实验包括遗传毒性、生殖毒性、致癌性和依赖性试验等, 评估药物对遗传物质、生殖系统和致癌风险的影响^[20]。

遗传毒性实验是采用细菌、哺乳动物细胞等测试受试物是否会引起基因突变、染色体畸变、以及 DNA 损伤的实验。我国中药的遗传毒性起步比较晚, 在上个世纪 70 年代之后才得到重视, 民族药和中药部分药材是同科属种, 只是名称不太相同, 目前研究的药材之中具有遗传毒性的药物有生川乌、盐附子、九节菖蒲等等, 遗传毒性的研究对中药及民族药都具有一定的价值^[21-22]。

生殖毒性是指某些药物在治疗疾病的同时会造成生殖系统的疾病, 例如雷公藤, 多项的研究证实雷公藤具有抗炎、抗肿瘤以及免疫抑制的作用, 但是在治疗过程中会造成各种毒副作用, 主要是以肝毒性、胃肠道毒性以及生殖毒性等, 为降低雷公藤的生殖毒性, 陈鑫等通过微针的方式发现, 能够降低雷公藤的毒副作用, 对人体的毒副反应比起口服要小得多^[23]。

（二）安全性评价指标

1 一般观察

动物实验一般观察指标：实验过程中定时称量记录动物体重,并观察记录动物毛发、反应灵敏性、进食情况等一般状态。生理形态学和病理形态学观察在实验过程中也具有一定的参考价值^[24]。

临床试验的一般观察指标主要包括生物学指标：性别、年龄、民族、和生活习惯。通过对受试对象的一般观察，初步了解受试对象的基本情况，以及在实验过程中能否适应所做的实验，以及最终的疗效做出评价。

2 血液生化指标

血液检验是临床中最常见的检测项目之一，血液生化指标结果对临床诊断和治疗具有极其重要的参考意义，动物在实验结束之后也会采取其血清做血液指标分析，分析所做的药物药效学，为临床治疗提供实验支撑^[25]。

临床试验生化指标包括肝功能、肾功能等，主要通过对相关指标进行分析之后确定受试对象是否具有加入实验项目的资格，如果出现严重的 ADR，受试者不耐受，不可纳入项目范围，将拒绝加入临床项目研究。

3 组织病理学检查

动物实验组织病理学检查通常从大体观察开始，包括对器官的大小、形态、颜色、质地等外观特征的评估，初步判断是否存在异常。例如，肿大的肝脏可能提示肝脏炎症或者动物形成肿瘤。动物脏器采集之后，将对其进行固定、脱水、包埋、切片和染色等一系列的处理，在显微镜下进行详细的细胞和组织学分析。主要对动物脏器的形态、结构变化，细胞间的连接和排列，以及组织中炎症细胞的浸润、纤维组织的增生。血管的改变等等。动物实验为临床研究提供了理论支撑，促进了医学的发展^[26]。

临床实验研究的组织病理学不仅能够明确的诊断疾病，还能评估疗效和监测疾病的进展。在治疗过程中，通过对比治疗前后的组织切片，可以了解到肿瘤是否有缩小、炎症是否减轻，从而能够及时的调整治疗策略。

四、民族药药效学与安全性研究的意义

（一）促进民族药的现代化发展

民族药是我国传统医药宝库中的璀璨明珠，承载着各个民族独特的医疗智慧和实践经验。但是，随着现代医学快速的发展，民族药也面临着诸多挑战，促进其现代化成为当务之急的任务。

民族药的发展离不开现代科技手段，深入分析民族药的化学成分、药理作用和药效机制。通过现代化的技术和实验方法，对民族药的有效成分作用靶点和途径进行阐述，为其临床应用提供科学依据。民族药的质量标准和规范化生产是非常重要的，需建立严格的质量控制体系，规范的药材种植、采集、加工和炮制流程，对于稀缺药材利用现代化技术进行推广，引入人工栽培技术，扩大种植数量，确保民族药的质量稳定、安全有效。同时，加强对民族药知识产权的保护，鼓励创新研发，激发更多企业和科研机构的积极性。此外，培养专业的人才也是推动民族药现代化发展的关键。民族药世代以来的传承都是靠口传相授，培养专业的人才，打破传统传承方式的壁垒，使民族药更加适应现代化的发展。

（二）保障患者用药安全

民族药一直在各民族之间口传相授，但其用药的安全性是无从考证的。为保障患者的用药安全，在药物作用疾病之前，可以对药物进行动物实验，这就需要培养更多专业的人员进行研究，确保每一味药物投入临床使用之前，其安全性都是完全可以保障。

（三）丰富药物资源

民族药是各民族在长期生活实践中形成独特的民族诊疗体系、用药经验和治疗效果。对于民族药的丰富，保护野生资源更好。加强民族药物资源的保护是基础，建立自然保护区，对珍稀和濒危的民族药用植物进行重点保护，禁止过度采挖和破坏其生长环境。为推动民族药物的丰富发展，通过人工种植和养殖是关键。通过现代化技术，建立适合民族药自身生存的环境，扩大民族药的数量，满足人类疾病药物治疗需求，以期减少对野生民族药物的依赖性。

（四）传承和弘扬民族文化

民族药的研究有助于保护和传承民族医药文化，促进各民族之间融合发展。

传承是民族药物发展的基础。加强传统医药知识的收集、整理和保护。对于各民族之间口传相授的秘方和经验用药,可以通过走访民间医师、记录传统配方和疗效。对于毒副作用不太清楚的民族药物,通过现代科技手段进行分析,将其毒副作用降至最低。弘扬民族药物需要加强宣传和推广,让更多的人了解民族药物的独特价值和疗效,打破对民族药物的误解和偏见。推广民族文化的渠道可以通过举办医药文化展览、科普讲座以及义诊活动等形式,向更多人展示民族药物的魅力。

五、结论

民族药作为我国传统医药的瑰宝,具有广阔的应用前景和开发价值。加强对民族药药效学和安全性的研究,是推动民族药现代化发展、保障公众健康、丰富药物资源和传承民族文化的重要举措。未来,应进一步加大研究投入,采用先进的技术和方法,深入开展民族药的基础和临床研究,为民族药的合理应用和可持续发展提供科学依据。

参考文献

- [1] 杨忠奇,唐雅琴,凌燕,杜彦萍,元唯安,邹冲,唐健元,胡思源,高蕊,张磊.民族药人用经验研究的技术要点[J].中国中药杂志,2023,第 48 卷(5): 1402-1406.
- [2] 丁侃,成莉,扎巴,等.民族医药经典名方文献整理和挖掘的方法与要点[J].中国中药杂志,2021,46(19):5 123.
- [3] 马双成.民族药研究专栏[J].药物分析杂志,2022,第 42 卷(8): 1287-1289.
- [4] 刘晓梦,胡志平.苗药现代研究进展[J].黔南民族医专学报,2017,第 30 卷(2): 152-153.

- [5] 闫宏, 刘中国, 李芳, 闫欣. 中药制剂临床研究中常见问题分析[J]. 中国药物与临床, 2016, 第 16 卷(11): 1596-1597.
- [6] 卢显兴; 奉建芳; 丘琴; 黄秋艳; 陈玉敏. 基于体内药效学结合网络药理学的丝穗金粟兰抗炎镇痛作用研究[J]. 中国现代中药, 2022, 第 24 卷(7): 1253-1261.
- [7] 辛彩虹, 旷劲松, 李敬林. 益气解毒活络中药对高糖高脂诱导的人肾小球系膜细胞增殖及 TNF- α 、IL-6 表达的作用影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 第 38 卷(4): 108-111.
- [8] 丁明宁. 中药决明子基于 AMPK-自噬通路改善非酒精性脂肪肝的作用及机制研究[D]. 北京中医药大学, 2023.
- [9] 吴娟. 细胞培养技术理论研究及应用注意事项[J]. 贵阳中医学院学报, 2018, 第 40 卷(3): 29-32.
- [10] 何军伟, 杨丽, 钟国跃. 民族药玉簪的化学成分、药理活性、临床应用及质量控制研究进展[J]. 中草药, 2016, 第 47 卷(23): 4295-4300.
- [11] 赵舒媛, 胡月, 贾榕, 张亚美, 惠探月, 赵丽丽, 凌春燕, 向蓓蓓. 藏药植物的分子生物学研究现状和展望[J]. 药物生物技术, 2022, 第 29 卷(5): 515-521.
- [12] 官喜龙, 徐静, 陈轶尘, 等. 基于生物信息学筛选红景天苷对大鼠缺血 / 再灌注神经保护作用的相关基因[J]. 中国药理学通报. 2020, 36(12): 1764—70.
- [13] 覃建锋, 王恒, 梁子聪, 等. 苗药阿锐布对四氯化碳致小鼠急性肾损伤的保护作用[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(8): 21-23.
- [14] 李成付, 张秋萍, 万慧琪, 许光辉, 易立涛. 民族药铁包金基于 FGF2/FGFR1 通路改善抑郁样行为的机制研究[J]. 中医药通报, 2021, 第 20 卷(1): 66-69.
- [15] 梁艳, 伍春梅, 陈婉月, 张宪哲, 张敬文, 宋映莲, 赵美玲, 王张, 何浚治. 宝根续筋药贴经皮给予的急性毒性、刺激性和过敏性研究[J]. 中国民族民间医药, 2023, 第 32 卷(15): 15-22.
- [16] 黄芳华, 王庆利. 《药物单次给药毒性研究技术指导原则》解读[J]. 中国新药杂志, 2015, 第 24 卷(4): 386-389, 399.
- [17] 拉毛草, 占堆, 陈静, 魏荣锐. 藏药齐如巴的急性毒性研究[J]. 亚太传统医药, 2023, 第 19 卷(1): 38-40.
- [18] 何乌云嘎. 蒙药手参的质量标准和长期毒性试验研究[D]. 内蒙古民族大学, 2023.
- [19] 阎莉, 韦松基, 杨斌. 壮药依肝达对大鼠长期毒性的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2012, (2): 378-381.
- [20] 赵梓邯, 张琳, 李文斌, 侯俊玲, 王文全, 崔洁, 张莉. 中药毒性与安全性评价研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 第 24 卷(20): 208-216.
- [21] 高梅, 张蓉, 徐娜, 陈凯, 王欣欣, 张岱州. 药物遗传毒性评价研究关注点[J]. 中国新药杂志, 2024, 第 33 卷(14): 1417-1423.
- [22] 韩佳寅, 易艳, 梁爱华, 张宇实, 李春英, 赵雍, 王连媚, 李桂琴. 中药遗传毒性研究思路和方法[J]. 中国中药杂志, 2015, (14): 2696-2700.
- [23] 陈鑫, 张永萍, 徐剑, 刘耀. 雷公藤甲素的现代研究进展[J]. 贵州中医药大学学报, 2021, 第 43 卷(5): 85-89.
- [24] 徐宏喜主编. 中药药理学 第 3 版[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2019.
- [25] 张金月, 惠敏, 道力给艳, 张子英, 张楠, 曹晓东, 朱晓伟, 韩帅. 医学实验动物采血方式及检前因素对生化指标的影响[J]. 医学理论与实践, 2024, 第 37 卷(9): 1480-1483.
- [26] 赖梦雨, 周向梅, 赵德明, 杨利峰. 实验动物病理学检测与实施成果[J]. 实验动物科学, 2021, 第 38 卷(3): 75-78.

白屈菜生物碱毒理学及安全性研究进展

陈文婷¹, 洪传彬¹, 牛凯琦¹, 律广富², 王雨辰¹, 张红印³, 王恩鹏²,

黄晓巍^{1,3*}, 辛国^{4*}

(1.长春中医药大学 药学院, 长春 130117; 2.长春中医药大学 吉林省人参科学研究院, 长春 130117; 3.长春中医药大学 东北亚中医药研究院, 长春 130117; 4.长春中医药大学附属医院, 长春 130021)

[摘要] 白屈菜生物碱作为一类重要的天然药物成分,在临床中展现出广泛的应用前景,但其潜在的毒性和安全性问题一直是研究的热点。本综述系统总结了近年来白屈菜生物碱毒理学及安全性研究的最新进展。阐述其包括细胞凋亡诱导、氧化应激和 DNA 损伤在内的主要毒性机制,以及其独特的毒代动力学特征。综合分析白屈菜生物碱急性毒性、慢性毒性和特殊毒性(如生殖毒性、免疫毒性和神经毒性)的研究成果。重点探究其在临床使用中的安全性问题,如治疗剂量的安全性评估、长期用药的安全性监测以及药物的相互作用等。基于综合分析指出当前研究中存在的挑战,并对未来研究方向提出展望。本研究旨在为白屈菜生物碱的安全合理使用提供科学依据,同时为相关领域的深入研究提供参考。

[关键词] 白屈菜生物碱; 毒理学; 安全性; 药物相互作用

[基金项目] 中国民族医药学会科研项目(2023ZY147-36); 吉林省中医药管理局科研项目(2023041); 吉林省发展和改革委员会科研项目(2021C011)

[第一作者] 陈文婷, 硕士研究生, 主要从事心脑血管及内分泌药理研究, E-mail:1849329089@qq.com

[通信作者] 辛国, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为中药学研究, E-mail:360356051@qq.com; 黄晓巍, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为中药药理学研究, E-mail:15948000740@163.com。

Progress of Toxicology and Safety Studies on Alkaloids of *Cylindrospermum album*

CHEN Wen-ting¹, HONG Chuan-bin¹, NIU Kai-qi¹, LV Guang-fu², WANG
Yu-chen¹, ZHANG Hong-yin³, WANG En-peng², HUANG Xiao-wei^{1,3*}, XIN Guo^{4*}

(1.School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Jilin Changchun 130117;
2.Pharmacology Group of Traditional Chinese Medicine, Jilin Ginseng Research Academy,
Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130117; 3.Northeast Asia Research
Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Jilin
Changchun 130117; 4.Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine,
Changchun, 130021)

[Abstract] As an important class of natural pharmaceutical ingredients, the alkaloids of *C. alba* show a wide range of applications in the clinic, but their potential toxicity and safety issues have been a hot topic of research. This review systematically summarizes the recent progress of the toxicology and safety studies on Celandine alkaloids in recent years. The main mechanisms of toxicity, including apoptosis induction, oxidative stress and DNA damage, as well as its unique toxicokinetic characteristics, are described. To comprehensively analyze the research results on the acute toxicity, chronic toxicity and specific toxicity (e.g., reproductive toxicity, immunotoxicity and neurotoxicity) of *C. alba* alkaloids. It focuses on the safety issues in clinical use, such as safety assessment of therapeutic doses, safety monitoring of long-term use and drug interactions. In addition, based on the comprehensive analysis, the challenges in the current research are pointed out and the future research directions are prospected. The aim of this study is to provide a scientific basis for the safe and rational use of leucocephala alkaloids, as well as a reference for in-depth research in related fields.

[Key words] Celandine alkaloids; Toxicology; Safety; Drug-drug interactions

白屈菜生物碱是一类重要的天然药物成分,主要存在于白屈菜科、毛茛科和罂粟科植物中。其代表性化合物包括白屈菜碱(chelidonine)、白屈菜红碱(sanguinarine)、小檗碱(berberine)和血根碱(chelerythrine)等。这些生物碱因其广泛的药理活性,如抗炎、抗菌、抗肿瘤等,在临床中展现出良好的应用前景^[1]。然而,与其显著药理作用相伴随的是其潜在的毒性风险,这一直是制约其临床应用的重要因素。近年来,随着分析技术和研究方法的进步,白屈菜生物碱的毒理学特征及其安全性问题得到了更为深入的研究。本综述旨在系统总结近十年白屈菜生物碱毒理学及安全性研究的最新进展,为白屈菜生物碱的安全合理使用提供科学依据,同时为相关领域的深入研究指明方向。

1 白屈菜生物碱的毒性机制

白屈菜生物碱可通过多种途径诱导细胞凋亡。白屈菜碱和白屈菜红碱可通过激活 caspase 级联反应,促进细胞色素 c 的释放,从而诱导细胞凋亡^[2]。白屈菜红碱可通过上调 p53 和 Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达,在人肝癌细胞 HepG2 中诱导细胞凋亡^[3]。小檗碱则可通过调节 miR-23a/PTEN/Akt 信号通路,在人胃癌细胞中诱导细胞凋亡^[4]。这些机制共同构成了白屈菜生物碱诱导细胞凋亡的复杂网络。

氧化应激是白屈菜生物碱毒性作用的另一重要机制。白屈菜红碱可显著增加细胞内活性氧(ROS)的产生,导致线粒体功能障碍和细胞凋亡^[5]。小檗碱可通过诱导 ROS 产生和激活 JNK 信号通路,在人结肠癌细胞中引起氧化应激损伤^[6]。血根碱则可通过影响谷胱甘肽水平和抗氧化酶活性进而诱导氧化应激^[7]。这些发现揭示了氧化应激在白屈菜生物碱毒性中的关键作用。

DNA 损伤是白屈菜生物碱毒性的第三个主要机制。研究表明^[8],白屈菜红碱可通过与 DNA 分子直接结合,导致 DNA 链断裂和染色体畸变。小檗碱可通过上调 γ -H2AX 的表达,在人乳腺癌细胞中诱导 DNA 双链断裂^[9]。此外,血根碱也被报道可通过干扰 DNA 修复机制,增加基因组不稳定性^[10]。这些 DNA 损伤效应可能是白屈菜生物碱潜在遗传毒性的基础。

2 白屈菜生物碱的毒代动力学特征

白屈菜生物碱的毒代动力学特征对其毒性作用的强度和持续时间具有重要影响。研究表明^[11],小檗碱口服后生物利用度较低,约为 1%左右。相比之下,

白屈菜红碱的吸收较快,其口服生物利用度约为 30-50%^[12]。通过 Caco-2 细胞模型研究发现,白屈菜碱主要通过被动扩散方式跨膜吸收^[13]。白屈菜生物碱在体内的分布模式也存在差异。利用高效液相色谱法发现,小檗碱主要分布在肝脏、肾脏和肠道^[14]。白屈菜红碱则倾向于在肺、肝和脾等器官中蓄积^[15]。值得注意的是,一些白屈菜生物碱,如血根碱,能够穿过血脑屏障,这可能与其潜在的神经毒性有关^[16]。白屈菜生物碱主要在肝脏中进行代谢。小檗碱主要通过 CYP2D6 和 CYP1A2 酶系代谢,生成多种氧化和脱甲基产物^[17]。白屈菜红碱则主要通过 CYP3A4 和 CYP1A2 酶系代谢^[18]。白屈菜碱代谢则较为广泛,CYP3A4、CYP2D6、CYP1A2、CYP2C9 都是参与其代谢的重要代谢酶^[19]。白屈菜生物碱主要通过肾脏排泄和胆汁-肠道循环排出体外。研究显示^[20],小檗碱在大鼠体内的半衰期约为 4-6 h,主要以原形和代谢产物的形式从尿液中排出。白屈菜红碱的排泄较慢,其半衰期可达 24-36 h^[21]。此外,部分白屈菜生物碱及其代谢产物可通过胆汁排入肠道,并可能发生肠肝循环^[22]。

3 白屈菜生物碱的毒性研究

3.1 急性毒性

白屈菜生物碱的急性毒性研究主要集中在其 LD₅₀ 值的测定及急性中毒症状的观察。研究发现^[23],小檗碱在小鼠口服给药的 LD₅₀ 为 329 mg·kg,主要表现为肝肾功能损害和神经系统症状。白屈菜红碱的急性毒性较强,其在大鼠腹腔注射的 LD₅₀ 仅为 24.30 mg·kg^[24]。白屈菜碱的急性毒性相对较低,其在小鼠口服给药的 LD₅₀ 为 400 mg·kg^[25]。而血根碱的急性毒性较高,其在小鼠静脉注射的 LD₅₀ 为 9.4 mg·kg,主要引起心血管系统和呼吸系统功能障碍^[26]。

3.2 慢性毒性

慢性毒性研究揭示了白屈菜生物碱长期暴露的潜在风险。对小鼠进行为期 15 周的小檗碱给药研究,发现给药剂量为 5 mg·kg·day 会出现肝脏脂肪变性和动脉粥样硬化^[27]。白屈菜红碱的慢性毒性研究表明,长期给药 5 mg·kg·day 可导致实验动物体重减轻和免疫功能抑制^[28]。据观察,白屈菜碱在大鼠肺组织中诱发剂量依赖性慢性毒性,导致肺充血和血性腹水^[29]。

3.3 特殊毒性

白屈菜生物碱还表现出一些特殊的毒性效应,主要包括生殖毒性、免疫毒性

和神经毒性。白屈菜生物碱的生殖毒性研究结果各异。当小鼠受精卵被 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}$ 小檗碱处理 48h, 囊胚细胞数量显著减少, 当处理时长延长至 72h, 囊胚发育受到抑制^[30]。低剂量白屈菜碱对大鼠生殖功能无明显影响^[31]。值得注意的是, 白屈菜红碱具有潜在的致畸作用, 在怀孕大鼠中可导致胎鼠骨骼发育异常^[32]。研究发现^[33], 低剂量小檗碱可增强小鼠的免疫功能, 而高剂量则表现出免疫抑制作用。白屈菜红碱在较低剂量下即可抑制 T 细胞增殖和细胞因子分泌。对血根碱的免疫毒性进行研究, 发现其可通过影响 NF- κ B 信号通路抑制 B 细胞活化, 从而影响体液免疫反应^[34]。据研究^[35], 小檗碱可导致大鼠海马神经元凋亡增加和学习记忆能力下降。白屈菜红碱也被报道可通过诱导氧化应激损伤脑组织。血根碱可通过影响神经递质平衡, 在体外培养的神经元中诱导细胞毒性^[36]。但白屈菜碱在常规剂量下未显示明显的神经毒性。

4 临床使用中的安全性问题

4.1 治疗剂量的安全性评估

临床研究为白屈菜生物碱的安全使用提供了重要依据。对小檗碱在 2 型糖尿病患者中的应用进行为期 12 周的随机对照试验, 结果显示在每日剂量 1.0 g 的情况下, 未观察到严重不良反应, 仅有少数患者出现轻度胃肠道不适^[37]。白屈菜碱作为抗炎药物在临床中的应用也得到了安全性评估。研究表明^[1], 在口服剂量不超过 60mg/天的情况下, 白屈菜碱对肝肾功能无明显影响, 但建议对有肝功能不全的患者进行剂量调整。白屈菜红碱和血根碱由于其较强的细胞毒性, 在临床使用中受到较多限制。因这两种生物碱主要用于外用制剂, 在此剂型下未发现明显的全身毒性。

4.2 长期用药的安全性监测

长期使用白屈菜生物碱的安全性问题引发广泛的关注。对连续服用小檗碱 6 个月的慢性肝病患者进行跟踪研究, 发现在每日剂量 0.5g 的情况下, 患者的肝功能指标未见明显异常, 但建议定期监测肝肾功能^[38]。白屈菜碱的长期使用安全性相对较好。一项为期 2 年的观察性研究显示, 长期低剂量 (30mg/天) 使用白屈菜碱治疗慢性胆囊炎患者, 未发现明显的蓄积毒性, 但仍建议定期进行血常规和肝功能检查^[39]。

4.3 药物相互作用

研究表明^[40],小檗碱可抑制细胞色素 P450 酶系,特别是 CYP2D6 和 CYP3A4。因此,同时服用经这些酶代谢的药物时需谨慎,可能需要调整剂量。白屈菜红碱被报道可增强某些抗生素的作用,这可能与其影响细菌细胞膜的通透性有关^[41]。然而,这种协同作用也可能增加不良反应的风险,需要在临床应用中加以注意。此外,由于部分白屈菜生物碱具有抗血小板聚集作用,与抗凝药物联用时可能增加出血风险。因而对于正在使用华法林等抗凝药的患者,建议谨慎使用白屈菜生物碱类药物。

5 总结与展望

白屈菜生物碱作为一类重要的天然药物成分,具有广泛的药理活性和临床应用前景,但其潜在的毒性也不容忽视。通过对其毒性机制、毒代动力学特征、各类毒性研究结果以及临床使用中安全性问题的综合分析,为其安全使用提供科学依据。未来的研究应着重于阐明更深层次的毒性机制,评估长期低剂量暴露的影响,以及新型给药系统的安全性评估等方面。只有通过不断深入的研究,才能更好地平衡白屈菜生物碱的疗效和安全性,为其在临床中的广泛应用奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] Li XL, Sun YP, Wang M, et al. Alkaloids in *Chelidonium majus* L: a review of its phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1440979.
- [2] 林惠莹,赵永兵,李荣强,等.白屈菜药理作用及质量标志物预测分析[J].*中兽医医药杂志*,2022,41(02):41-45.
- [3] Lin Y, Zhang Q, Xie B, et al. Chelerythrine-Induced Apoptotic Cell Death in HepG2 Cells Involves the Inhibition of Akt Pathway and the Activation of Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptotic Pathway[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(9):1837.
- [4] Tillhon M, Guamán Ortiz LM, Lombardi P, et al. Berberine: new perspectives for old remedies[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(10):1260-7.
- [5] Zhou J, Wang Y, Fu Y, et al. Chelerythrine induces apoptosis and ferroptosis through Nrf2 in ovarian cancer cells[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2024, 70(3):174-181.
- [6] Feng Q, Hu K, Hu H, et al. Berberine derivative DCZ0358 induce oxidative damage by ROS-mediated JNK signaling in DLBCL cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 125(Pt A):111139.

- [7] Zhang Y, Luo Z, Zhao R, et al. Sanguinarine induces ferroptosis of colorectal cancer cells by upregulating STUB1 and downregulating GPX4[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2024, 44(8):1537-1544.
- [8] Chen N, Qi Y, Ma X, et al. Rediscovery of Traditional Plant Medicine: An Underestimated Anticancer Drug of Chelerythrine[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:906301.
- [9] Wang J, Liu Q, Yang Q. Radiosensitization effects of berberine on human breast cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(5):1166-72.
- [10] Duda-Madej A, Viscardi S, Szewczyk W, et al. Natural Alkaloids in Cancer Therapy: Berberine, Sanguinarine and Chelerythrine against Colorectal and Gastric Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(15):8375.
- [11] 周剑雄,吴送姑,龚俊波,等.小檗碱的药理活性以及提升其口服生物利用度的策略[J].*药学报*,2022,57(05):1263-1272.
- [12] 林雪玲,李英,郭梦情,等.小檗碱通过调控胰岛素抵抗肝源性外泌体 miR-383-5p 促进星形胶质细胞 AQP4 表达的作用研究[J/OL].*中国中药杂志*,1-11[2024-10-10].
- [13] Krizhanovska V, Sile I, Kronberga A, et al. The Cultivation of *Chelidonium majus* L. Increased the Total Alkaloid Content and Cytotoxic Activity Compared with Those of Wild-Grown Plants[J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(9):1971.
- [14] 陈倩倩,司席席,刘丹,等.大鼠灌服青连宁心胶囊后盐酸小檗碱的组织分布研究[J].*中国药房*,2016,27(13):1785-1787.
- [15] Attia HG, Elmataeeshy ME, Aleraky M, et al. The assessment of pharmacokinetics and neuroprotective effect of berberine hydrochloride-embedded albumin nanoparticles via various administration routes: comparative in-vivo studies in rats[J]. *J Microencapsul*, 2024, 41(7):576-600.
- [16] Wang DJ, Wang X, Li SL, et al. Sanguinarine modulates microglial function via PPAR γ activation and protects against CNS demyelination[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 127:111408.
- [17] Guo Y, Pope C, Cheng X, et al. Dose-response of berberine on hepatic cytochromes P450 mRNA expression and activities in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1):111-8.
- [18] 毛煦,王倩.P450 酶介导的氯化白屈菜红碱体外代谢活化研究[J/OL].*沈阳药科大学学报*,1-9[2023-03-22].
- [19] 张慧霞,王鑫,刘有平,等.白屈菜碱在大鼠肝微粒体中代谢的酶动力学及 CYP450 酶特异性抑制剂对其代谢的影响[J].*沈阳药科大学学报*,2015,32(04):276-280.
- [20] Chen W, Miao YQ, Fan DJ, et al. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12(2):705-11.
- [21] Shen LX, Liu GF, Song JS, et al. Sex differences in the pharmacokinetics and tissue residues of *Macleaya cordata* extracts in rats[J]. *Xenobiotica*, 2022, 52(1):46-53.
- [22] Xiao L, Xue Y, Zhang C, et al. The involvement of multidrug and toxin extrusion protein 1 in the distribution and excretion of berberine[J]. *Xenobiotica*, 2018, 48(3):314-323.
- [23] Kheir MM, Wang Y, Hua L, et al. Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(4):1105-10.
- [24] 林飞,马新群,吕廉,等.白屈菜红碱对小鼠、大鼠和犬的急性毒性试验研究[C]//中国科学技术协会学会,福建省人民政府.经济发展方式转变与自主创新——第十二届中国科学技术协会年会(第三卷).中国药品生物制品检定所;湖南省劳动卫生职业病防治所,;2010:4.
- [25] Maji A K, Pratim Banerji P B. *Chelidonium majus* L.(greater celandine)-a review on its

- phytochemical and therapeutic perspectives[J]. 2015:10-27
- [26] 李志,曹燕,伍勇,等.血根碱的急性毒性研究[J].中兽医医药杂志,2014,33(06):49-50.
- [27] Rad SZK, Rameshrad M, Hosseinzadeh H. Toxicology effects of *Berberis vulgaris* (barberry) and its active constituent, berberine: a review[J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(5):516-529.
- [28] Yi J, Ye X, Wang D, et al. Safety evaluation of main alkaloids from *Rhizoma Coptidis*[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1):303-10.
- [29] Li X L, Sun Y P, Wang M, et al. Alkaloids in *Chelidonium majus* L: a review of its phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1440979.
- [30] Sugimoto T, Kato Y, Tsunoda Y. The effect of berberine treatment on the reversibility of the development of mouse zygotes and gametes, and on the fertilization and subsequent development[J]. J Mamm Ova Res, 2012, 29(1): 75-81.
- [31] Chyad A H, Al-Janabi O S I, Ibrahim O M S, et al. Effect of *Chelidonium majus* L. root extract on cyclophosphamide-induced testicular toxicity in rats[J]. Adv. Anim. Vet. Sci, 2024, 12(1): 69-76.
- [32] Wang PQ, Yin ZH, Kang WY. Advance in studies on pharmacological activities of chelerythrine[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2013, 38(17):2745-9.
- [33] Song D, Hao J, Fan D. Biological properties and clinical applications of berberine[J]. Front Med, 2020, 14(5):564-582.
- [34] Shi Y, Liu Y, Xie K, et al. Sanguinarine Improves Intestinal Health in Grass Carp Fed High-Fat Diets: Involvement of Antioxidant, Physical and Immune Barrier, and Intestinal Microbiota[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(7):1366.
- [35] Zhang X, Zhang X, Wang C, et al. Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF- κ B expression, ameliorated BBB permeability[J]. Brain Res, 2012, 1459:61-70.
- [36] Li P, Wang YX, Yang G, et al. Sanguinarine Attenuates Neuropathic Pain in a Rat Model of Chronic Constriction Injury[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021:3689829.
- [37] Askari VR, Khosravi K, Baradaran Rahimi V, et al. A Mechanistic Review on How Berberine Use Combats Diabetes and Related Complications: Molecular, Cellular, and Metabolic Effects[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 17(1):7.
- [38] Asbaghi O, Ghanbari N, Shekari M, et al. The effect of berberine supplementation on obesity parameters, inflammation and liver function enzymes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Clin Nutr ESPEN, 2020, 38:43-49.
- [39] Szentmihályi K, Szöllősi-Varga I, Then M. Elements, alkaloids and antioxidant value of *Chelidonium majus* L. and the extracts obtained by different extraction methods[J]. European Chemical Bulletin, 2021, 10(1): 58-66.
- [40] 王晓杰,张恒,刘素彤,等.小檗碱治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制及联合用药研究进展[J/OL].中国实验方剂学杂志,1-14[2024-10-08].
- [41] Miao F, Yang X J, Zhou L, et al. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their antibacterial activity[J]. Natural Product Research, 2011, 25(9): 863-875.

机器学习在反药组合研究中的应用现状与思忖

陈俞含¹，张渝曼²，刘兆兰^{1*}

(1, 北京中医药大学中医学院, 北京, 100029)

2, 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京, 100029)

[摘要] “十八反”“十九畏”等反药组合虽然被视为中药配伍禁忌，但自古以来仍不乏应用反药组合于临床治疗并取得效者。随着近年来药理毒理实验的开展和临床研究的进行，部分反药组合的配伍机理、治疗效果、不良反应风险、使用宜忌条件逐渐被阐明，但限于其作用机制和临床数据的复杂性，仍有相当一部分配伍的内在科学本质并未被完全发现，尚未达到临床推广条件。而机器学习作为人工智能的重要分支之一，对于多变量及多维数据具有良好的分析和建模能力。因此本文就机器学习在反药组合研究中的进展进行综述，探析其在数据上、算法上、应用场景上存在的不足及潜在的原因，并提出完善数据来源、提高数据质量、增强算法的可解释性与拓宽应用场景等建议。

[关键词] 反药组合；配伍禁忌；十八反；十九畏；机器学习

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目（82374298）；北京中医药大学学科后备带头人支持计划（90010960920033）；国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目——中医药循证医学（No.zyyzdxk-2023249）

[第一作者] 陈俞含，卓越中医八年制本硕连读在读，E-mail: 20210123184@bucm.edu.cn；

[通信作者] 刘兆兰，博士，教授，博士生导师，研究方向：中医药循证评价方法学，E-mail: lzl1019@163.com

Application Status and Consideration of Machine Learning in the Research of Antagonisms Combination

CHEN Yuhan¹, ZHANG Yuman², LIU Zhaolan^{1*}

(1, School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2, School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] Although the combinations of antagonisms such as the “Eighteen Antagonisms” and “Nineteen incompatibilities” were considered as taboos in traditional Chinese medicine dispensing, there have been clinical applications of these combinations that have proven effective since ancient times. In recent years, with the conduct of pharmacological and toxicological experiments as well as clinical research, the dispensing mechanisms, therapeutic effects, risks of adverse reactions, and conditions for use and contraindications of some antagonisms have been gradually elucidated. However, due to the complexity of their mechanisms of action and clinical data, a considerable part of their underlying scientific nature has not been fully discovered, and thus have not yet met the conditions for clinical promotion. Machine learning, as an important branch of artificial intelligence, has excellent analysis and prediction capabilities for multivariate and multidimensional data. Therefore, this article reviewed the progress of machine learning in the research on antagonisms, analyzed its deficiencies in data, algorithms, and application scenarios as well as the potential reasons, and proposed suggestions such as improving data sources, enhancing data quality, enhancing the interpretability of algorithms, and broadening application scenarios.

[Key words] antagonisms combination ; prohibited combination ; eighteen antagonisms; nineteen incompatibilities; machine learning

“十八反”“十九畏”等反药组合是中医学基本理论之一^[1]，历来被认为是中药配伍禁忌的重要内容，然而从古至今，仍有部分医家并不认为其是绝对的配伍禁忌，将其应用于多个中医方剂和中成药等中药制剂中，并取得了良好的临床疗效^[2]。而随着反药组合相关实验研究与临床研究的深入探索，越来越多的研究者与临床医生认为反药组合并不是绝对的“反”，而是有条件的反，其应用亦有一定条件限制，若用药合理亦可增强疗效而避免毒副作用与不良反应^[3]。但鉴于反药组合配伍原理、治疗机制、毒理机制、临床应用宜忌条件等方面的复杂性，仍有相当一部分反药组合的作用机理和合理用药原则并未被完全阐明^[4]。而机器学习作为人工智能的核心技术之一，可模仿人类思维，通过大量数据的训练，可以发现事物规律、分析并解决问题、预测事物的未来发展趋势，对于解决变量众多的复杂数据具有独特优势^[5]。近年来机器学习逐渐被应用于反药组合的基础与临床研究中，因此，本文将就其应用现状进行综述，并深入分析目前存在的不足及其潜在原因，展望未来的发展方向。

1. 机器学习的分类及其在反药组合研究中的应用概况

机器学习旨在模拟人类的思维过程、学习能力和知识存储，系统通过算法从数据中获取特征信息以自动学习数据的内在模式进行相应决策^[6]。机器学习根据其学习模式可分为监督学习、无监督学习、强化学习及半监督学习^[7]。半监督学习以生成式对抗网络为代表^[8]，主要应用于 CT 和 MRI 等医学影像的识别与判读中，在反药组合研究中尚未见运用。而监督学习与无监督学习在现今的反药组合研究中应用最为广泛。无监督学习所使用的训练数据无标记标签，常用于解决聚类、降维、关联规则等问题，如属于无监督学习的 Apriori 关联算法、系统聚类、层次聚类、拓扑分析等均被广泛应用于含反药组合的临床处方数据挖掘中^{[9][10][11][12][13]}，而主成分分析（PCA）则常用于基因组或转录组数据的降维。而监督学习所使用的训练数据存在标记标签，常用于解决分类和回归问题^[14]，如属于监督学习的支持向量机（SVM）、随机森林（RF）则常用于反药组合作用靶点及机制的预测，逻辑回归、决策树、RF 则常用于反药组合不良反应风险因素和预测模型的构建。监督学习亦可根据是否集成分类划分为单一分类（如 SVM、决策树等）和集成学习，集成学习包括以极端梯度提升树（XGBoost）、轻量梯度提升机（LightGBM）等算法为代表的 Boosting 方法和以 RF 为代表的 Bagging

方法^[15]。集成学习相比单一分类法具有更高的准确性和泛化能力，可减少过拟合风险^[16]，正被逐渐运用于反药组合不良反应预测模型构建等研究中。而强化学习虽尚未见其在反药组合研究中的运用，但随着其发展与完善，树状置信区间上界（upper confidence bounds for trees）等强化学习算法也开始逐步应用于靶蛋白构象和药物体内代谢过程与分子动力学预测^{[11][12][17][18][19][20]}，具有与反药组合研究良好的结合潜力。

而随着机器学习的深入发展，逐渐演化出了深度学习，它与传统机器学习均属于机器学习，其主要区别在于深度学习的性能常随着数据量的增加而不断优化，并且具备自动提取数据特征的能力^[21]，属于传统机器学习的进一步发展阶段。深度学习以神经网络为基础，通过复杂网络模型进行运算^[22]，与中医药临床是基于辨病、辨证、辨质、三因制宜的复杂诊疗模式及中药复方是通过多成分、多靶点、多通路的作用模式异曲同工，因此，深度学习也在反药组合研究中得到了初步运用，如基于临床与实验数据，通过卷积神经网络等构建反药组合不良反应风险的预测模型^{[13][23][24][25]}。

2. 机器学习在反药组合研究中的应用进展

2.1 人用经验挖掘

人用经验是中医学理论形成和发展的基础^[26]，而“十八反”“十九畏”等反药组合理论也正是基于大量临床实践与人用经验的基础上进而总结升华为中医理论。迄今为止已有相当一部分临床医生在临床实践中使用反药组合，并积累了丰富的控制“毒-效”平衡、提高反药组合的有效性与安全性的临床经验，因此，开展反药组合人用经验的挖掘对于促进其临床合理用药的推广具有重要意义。然而，中医临床诊疗过程中涉及辨病、辨证、辨质、组方配伍、剂量剂型及给药次数控制等复杂因素，导致传统的统计学方法难以满足人用经验挖掘的需求。而机器学习由于其强大的数据整理、分析、挖掘能力，为人用经验的深入挖掘提供了一种行之有效的研究方法。

如胡方媛等通过网络重叠社团、聚类分析等机器学习方法进行分析发现，含有“丁香-郁金”十九畏组合的临床方剂^[27]常用于肝郁气滞的呃逆、胃痛等消化道疾病，常用配伍比例为 1：2，常见不良反应包括呕吐、消化道出血等。李梦雯等通过无尺度复杂网络的 COPRA 算法对含有“人参-五灵脂”组合的古今方

剂进行统计分析,发现该反药组合常用于气虚血瘀证,常配伍甘草、黄芪、当归、蒲黄等活血益气药^[28]。朱丽明等通过关联规则与聚类分析挖掘发现常亚霖善用“半夏-附子”“红参-五灵脂”等反药配伍,相反相成,以治冷痰、瘀毒等证^[29]。牛晓骥等通过关联规则与聚类分析挖掘得出,王付善于使用“人参-藜芦”“附子-半夏”“海藻-甘草”等十八反药对扶正化痰散结治疗胃癌^[30]。

机器学习的应用有效促进了人用经验的挖掘,但现有的研究多局限于适应病证、全方配伍等方面,并未覆盖中医临床诊疗各要素,因此在未来仍需进一步深入挖掘。

2.2 “毒-效”机制探究

对反药组合的物质基础和毒理、药理机制的研究,是阐明反药组合“反”或“不反”和揭示其应用宜忌条件的重要方法。然而,由于中药复方成分、代谢途径、毒-效双向作用机制复杂,而现有检测手段难以完整揭示体内代谢过程,使得反药组合的机制研究相比成分较为单一的化学药物乃至其他中药复方更具复杂性与挑战性。而机器学习对于复杂网络的强理解与分析作用,为反药组合“毒-效”机制探究提供了新方法。

龙伟等在构建中药方剂网络的基础上,分析方剂网络性质,并通过中药化学空间和空间降维发现“十八反十九畏”药对存在明显疏远关系,揭示了反药组合的复杂网络性质与化学空间特性^[31]。李遇伯等通过 SVM 对代谢组学分析所得的心脏毒性生物标志物进行筛选,最终确定了“半蒺藜及攻乌”反药组合的 7 个心脏毒性生物标志物^[32]。李梢等则提出可以采用网络毒理学与机器学习结合的方法,通过构建药物-化学成分-靶蛋白-基因-通路网络,进行网络分析与预测进而获取反药组合潜在不良反应的作用机制^[33]。樊启猛等通过中药超分子和网络动力学相结合等方法,揭示了十八反配伍的作用机理是多种有效成分通过非共价结合形成超分子体系,与人体发生印迹作用产生相应的药效与毒效^{[34][35]}。该网络动力学方法将超分子结构视为网络靶点进行动力学研究,以多层复杂网络作为研究对象也正符合中药配伍及复方多成分多靶点的作用特点,相比以往的单成分药物动力学研究有助于更精准地揭示中药复方及反药组合在体内的代谢过程与作用机制。而本团队则通过网络稳定性测试算法评估了含“海藻甘草”反药组合的海藻玉壶汤的药物-化学成分-作用靶点-通路网络的稳定性和显著性,进而使

用随机游走化算法（RWR）结合动物实验验证预测并揭示了海藻玉壶汤基于 PI3K/Akt/Cycling D1/Bcl-2 通路干预甲状腺肿大的作用机制^[36]。

2.3 反药组合临床应用中药物不良反应情况的预测与监测

由于部分反药组合的安全性和不良反应尚未完全明确，开展大规模前瞻性临床试验的条件尚不完全成熟，而反药组合的应用现状多为部分医生单独使用，不同来源的数据间异质性明显，数据隔离问题显著，加之众多临床病案缺乏长期随访，开展回顾性研究仍存在困难。因此，开展反药组合临床应用过程中的不良反应信息采集，对于评估其临床安全性至关重要。

然而当今我国实行的药物不良反应报告体系中不良反应信息来源多为定点医院或大型医疗机构，而中医临床体系中存在大量私人诊所和小型医馆等，一定程度上限制了不良反应信息的搜集与上报。随着社交网络媒体的大规模覆盖，众多未经医院途径上报的药物不良反应信息出现在了社交媒体上，而张洪亮利用机器学习与 AI 大模型，通过 API 访问和网页爬虫等在社交媒体、新闻报道等舆情中自动检索搜集药物不良反应信息^[37]，相比传统的报告系统和临床试验，可以获得更全面的药物不良反应数据，提高了监测的广度和全面性。此外，反药组合的安全性和不良反应信息分散记载于众多古今文献、数据库与媒体网络中，增加了不良反应信息搜集整理难度。而李伟清等通过神经网络模型，实现了对不良反应报道文献中药物名称、类型、不良反应内容等信息的自动提取^[38]。孙凤等则基于 BioLinkBert 算法构建文本分类模型和实体识别模型，对文献的文本信息自动化分析得到药物安全性 PICO 信息^[39]。机器学习强大的信息搜集和自动化整理分析能力，有效提高了不良反应数据的采集和提取的质量与效率。

药物不良反应信息的采集是为了更好的帮助临床工作者预测临床不良反应风险和辅助临床决策，然而鉴于反药组合配伍复杂，其适用对象亦存在病种、病证、体质、群体的多样性，人工进行不良反应风险评估与预警存在难以精确定量评估、容易遗漏相关要素等问题，而机器学习具备良好的建模与预测能力，为该问题提供了新的解决方案与发展方向。

现有的预测方法主要包括两种，其一是基于现有的不良反应数据进行预测。如袁家斌等通过 BERT 深度学习算法对社交媒体数据中获得的药物不良反应信息进行结构化与编码，进而结合无监督对比学习 UCL 损失函数和有监督对比学

习 SCL 损失函数进行模型训练,进而通过 Softmax 函数进行药物不良反应预测^[40]。廖容花等通过 SVM、RF、贝叶斯网络、图神经网络、卷积神经网络等机器学习算法对药物不良反应数据集进行训练,得到药物不良反应预测模型,并通过数据映射技术和 API 等为临床医生实时提供药物不良反应风险评估、预警和决策支持等^{[40][41]}。杨伟等利用 Bagging 集成策略与谱聚类算法通过随机采样将药物不良反应数据划分为 T 个平衡子集,进而通过 Boosting 集成算法对其数据进行训练,将得到的分类器集成得到药物不良反应预测模型^[42]。

其二是基于药物的化学性质和作用机制进行预测。如金敏等构建了一个用于预测药物不良反应的端到端深度学习算法框架,通过嵌入权重的图神经网络提取药物活性分子结构特征,进而利用基于多头注意力机制的 Transformer Decoder 模块通过自回归的方式预测药物潜在的不良反应^[43]。王雪莹等对药物相似性网络、药物不良反应信号网络、化学结构相似性网络、靶蛋白结构域相似性网络、基因本体注释相似性网络等多源数据集成后,进而通过递进神经网络模型法等对药物不良反应进行预测^[44]。李遇伯等基于代谢组学分析所得的心脏毒性生物标志物通过 SVM 构建了“十八反”的靶器官毒性早期预测系统,准确率可达 90%^[32]。

在后续研究中,可基于网络融合算法或 Stacking 集成算法等对基于不良反应数据和药物自身特征的两类预测模型进行融合,提高预测精度和模型的稳健性。且现有的预测模型大多未考虑患者的体质、证候等因素,在后续的模型完善工作中应进一步补充此类中医诊疗要素,以使预测模型更符合中医辨证论治、因人因质制宜的诊疗思想。

3.机器学习助力反药组合深化研究和合理运用的展望与思考

3.1 数据基础维度

3.1.1 完善药物成分与作用靶点、通路数据库,提高数据可靠性

数据是机器学习算法进行不断训练、验证和优化的基础,原始数据的质量也直接影响了算法的准确性、稳健性和泛化能力,而用于模型训练的数据如果存在错误,甚至可能导致模型的决策失败^[23]。然而,现有的中药化学成分数据库中缺乏化学成分含量信息,无法进行量效关系与毒效关系分析^[45],现有数据库中的化学成分信息未根据品种、炮制方法、用药部位等因素加以细分。此外,现有数据库中的化学成分和吸收利用度等信息均以口服给药为前提,并未考虑到临床给药途

径的复杂性,如甘遂以汤剂、散剂、丸剂等不同方式入药并吸收入体内,人体吸收利用的有效成分与含量是否发生变化,数据库中均尚未有相关信息,同时亦未考虑不同药物的体内代谢过程的差异性^[46],如皂苷类药物口服吸收利用度差^[50],但在体内多种药物代谢酶的作用下发生生物转化或药物代谢,会造成失活或活化进而产生新的不同药理作用。

同时,部分数据库中的数据还缺乏引证信息,来源不明,可靠性存疑,其数据与实验结果差异显著^[45],如 TCMSP 数据库中显示甘草的化学成分包含 280 种^[47],而经高效液相色谱法等证实的成分仅有不到 50 种^{[48][49]},又如该数据库预测小檗碱的口服利用度为 38%^[51],但实验结果表面其实际口服利用度约为 0.37%^[52]。此外,亦有部分疾病数据库收录的疾病靶点与经实验验证的实际靶点存在明显偏差,如经过美国食品药品监督管理局(FDA)认证的阿尔兹海默症治疗靶点仅有 3 个^[18],但部分基于 Genecards 疾病数据库的阿尔兹海默症研究却收录了多达一万多个靶点^[19]。以上原因均在一定程度上影响了数据的可靠性和实际价值,也限制了机器学习模型的优化和数据的深入挖掘。

鉴于此,笔者建议相关的药物、疾病、蛋白质、通路数据库应一方面提高数据质量,明确数据来源,对于经实验数据进行计算整合而形成的新数据建议标明原始数据信息和算法计算过程,以提高数据可信度,对于纳入的数据亦应进行适当筛选,排除存在明显实验错误或学术不端文章中的数据,同时亦应对数据库定期更新,纳入新的实验数据,排除不合理数据,标注存疑数据以供其他研究者参考。

另一方面应进一步拓展数据库信息的丰富度,尤其是对于中药数据库应补充药用部位、炮制方法、品种、代谢过程与参数、毒理药理机制、化学成分含量等内容^[45],以使其数据分析更符合中医临床实际。

此外,机器学习算法尤其是深度学习和强化学习在预测化合物-靶点关联性、靶蛋白结构特征、药物的体内代谢过程等方面具有良好的准确率和运算速率,如通过卷积神经网络和循环神经网络识别目标靶蛋白的特异性结构特征,从而提高蛋白质结构和动力学预测的准确性,或通过树状置信区间上界(upper confidence bounds for trees)强化学习算法应用于分子转移路径的采样^[17],帮助对小分子化合物与靶蛋白的构象与动力学预测。将深度学习与强化学习等多种机器学习算法

融合，并结合适当的实验验证，有助于靶蛋白结构特征提取和降维分析^[10]，有效提高了分子动力学和药物代谢过程的预测精度，促进对未知数据的探索，加快数据基础的完善。

3.1.2 深化人用经验的数据挖掘，构建全诊疗要素的数据链

反药组合的人用经验与临床应用数据是评估其安全性、有效性的重要切入点，然而现有研究纳入的临床病案未经评估与筛选导致质量参差不齐，反药组合的应用经验与案例分散于大量文献中而未经系统归纳与整合，临床病案数据挖掘多局限于适应病证和配伍。因此，在今后研究中应当在提高数据质量的基础上，拓宽数据的挖掘深度与广度。

①对于有条件开展随访的病例，应事先设计随访方案并严格执行^[20]，且其随访应包括用药有效性和不良反应评估两个方面，建议随访内容包括症状、体征和实验室检查指标等方面。而对于中医古籍、中医药辞典、已故名老中医资料等无法开展随访的病案，则可根据现有的中医医案证据评价分级进行质量评估，剔除质量过低的病案，有疗效记录者亦可考虑结合 FP-Growth 算法，并根据疗效对中药数据进行加权^[20]。

②在进行病案质量筛选的基础上，构建反药组合人用经验和临床案例数据库，以供更深入的数据挖掘和更广泛的经验推广。

③现有的临床数据挖掘多以病历记载为研究资料，然而随着近年来名老中医学术思想的扎根理论与三角互证研究的不断发展，诊疗现场的图像、影像、旁人观察、对话等资料亦被证明具有重要的临床价值，可与病历记载互为补充^[53]，提高临床资料的丰富度和可信度，故可开展更为广泛的反药组合临床应用案例与经验的整理，拓宽资料来源，提高资料质量。

④使用剂量、比例、炮制品种、入药方式、给药次数等因素亦可影响反药组合在实际应用中的有效性与安全性^[4]，如既往对“甘遂-半夏”反药组合的研究发现，醋甘遂与炙甘草配伍的比例为 1：（8-20）时利尿作用最强而无明显毒副作用，而当配伍比例>（20：1）或<（7：1）时，则可能存在肝毒性^{[54][55][56]}，在甘遂与甘草以 1：15 的比例配伍条件下，生甘遂与炙甘草配伍则较生甘遂与生甘草配伍肝损伤明显减轻，甘遂以研末入药利尿作用更强但肝肾毒性也随之增加，而生甘草与醋甘遂配伍反而会降低甘遂半夏汤全方的利尿作用^[57]。鉴于此，在

未来基于临床医家应用反药组合的数据挖掘与真实世界研究中，应适当采用 Lasso 回归、XGBoost 等相关机器学习算法，挖掘其使用反药组合过程中影响效-毒关系的核心要素，增加挖掘深度，构建一条涵盖“适应病证-配伍原理-组方思想-药材品种-药材炮制-剂量-配伍比例-入药方式-给药次数-服药时间”等要素的反药组合临床合理应用证据链。

3.2 算法模型维度

根据数据集的特征，选择相匹配的算法是保障算法模型准确性的关键。然而，现有研究中仍存在算法选择不恰当的问题，如 K-means 聚类算法本适用于连续性变量，但有部分研究将其用于不涉及连续变量的处方配伍规律研究，影响了聚类结果的可靠性^[58]。出现此类问题的原因可能与中医药研究人员对于机器学习等人工智能知识的学习基础较为薄弱有关，今后应加强对中医药研究人员在人工智能理论与应用方面的培训，同时在研究过程中亦应遵循或参考相关机器学习研究指南^[59]以提高研究规范性与质量。而在研究中亦应对所选择的机器学习算法的基本原理和适配性加以说明。

此外，机器学习模型需要不断的训练和优化。进行合理的模型预训练，进行测试集和外部验证集验证，开展交叉验证，对算法模型进行参数和输出调整亦是提高模型准确度、灵敏度和泛化能力的重要方法^[59]。鉴于中医临床和反药组合数据的复杂性，对于同一个或同一类数据集，亦可使用传统机器学习、深度学习、强化学习中多种不同类型的机器学习算法，分别进行训练和测试，进而根据准确率、灵敏度、特异度、召回度等指标对各个模型进行评价，从而筛选出最具可靠性和数据适配性的机器学习算法，同时亦可对性能较佳的多个模型通过 Stacking 集成算法进行融合，从而进一步提高模型的准确性和稳健性，减少过拟合风险。而对于机器学习算法而言，预测准确性固然重要，但模型可解释性亦不容忽视。可解释性原则被认为是 AI 系统的基本原则之一^[60]。尤其是对于反药组合不良反应预测等临床预测模型，模型的可解释性一方面可以帮助临床工作者更好地理解该模型得出相应计算结果的计算逻辑，提高模型的可信度，帮助医生更好地决策，另一方面更有助于发现模型存在的预测偏差，帮助研发人员完善算法^[61]。同时模型的可解释性也是医学法律、道德、临床伦理的要求^[60]。但在现有的反药组合乃至中医药相关机器学习算法的研究中，仍有大部分研究并未对其模型的可解

释性进行分析和报告。

因此,一方面需要对内在可解释性传统模型如逻辑回归、K 近邻等进一步优化,提高其预测准确度和应用范围,并提高对内在可解释性改进模型如可解释提升机(EBM)等的认识和运用。但受限于内在可解释性模型应用范围有限,因此另一方面可将其他机器学习算法与事后解释方法相结合,如与模型无关的局部解释算法(LIME)或 SHAP 方法相结合,通过变量一致性、排序一致性、符号一致性等指标对其可解释性进行评价^[62]。

3.3 应用场景维度

在现有的反药组合研究中,机器学习多应用于临床数据与人用经验挖掘、分子机制研究、不良反应监测与预测模型研发三个方面,但其中部分研究仅采用了传统机器学习或单一分类法,而尚未进行深度学习或集成学习算法的探索,而有部分研究方向本可与机器学习相结合而尚未实现两者的融合。

在临床数据挖掘层面,①现有的临床数据和人用经验挖掘中,多采用聚类算法、关联算法等无监督学习用于处方规律研究,因而在一定程度上忽视了从诊断到治疗的整体辨治过程,使得相关的反药组合应用与配伍原理多停留于理论层面,而无法从数据层面加以解释。而监督学习更善于进行因果逻辑的分析和核心变量的判断,鉴于中医临床诊治思维复杂,单一分类的监督学习算法可能存在精确度较低、泛化能力不足等问题,因此在未来可采用 RF 或 XGBoost 等集成学习算法,或基于与中医复杂诊疗思维网络类似的深度学习算法如卷积神经网络,对不同反药组合的应用对象特征、使用宜忌条件等加以挖掘,从数据层面印证人用经验及相关医家理论。

②而鉴于临床专家的笔记、医患对话、带教讲解等资料的重要性,但此类资料数量庞大、整理成本较高,因此可充分利用机器学习和 AI 大模型在语言识别、文本处理、信息提取等方面的优势对其加以整理和识别,如通过星火语言大模型将医患对话记录和带教讲解录音识别为文字,进而基于星火文字大模型或神经网络对文字信息中的关键内容进行提取。

③此外,对于临床病案的质量评估与筛选,亦可通过卷积神经网络或循环神经网络等算法,构建病案质量自动评价筛选的 AI 模型,以此减少人工成本与人工错误率。

在分子机制研究层面,现有的机器学习相关研究多集中于核心靶点及通路的预测,而对于现有实验手段存在较大难度的研究内容,如未知靶蛋白的构象、药物分子的体内动力学和完整代谢路径、受体-配体的结合位点与模式等,亦可将机器学习应用其中,如基于 BioNetGen 软件通过 OED 函数构建机器学习模型,可助于预测蛋白表达水平随时间的变化,进而帮助关键靶标及体内代谢过程的确定^{[11][12]}。又如通过 BP 神经网络、循环神经网络等深度学习对蛋白结构特征进行识别,以提高分子动力学模拟的准确率^{[13][24][25]}。

在不良反应监测与预测层面,对于信息监测,可使用机器学习与 AI 大模型对病历、文献、社交网络等多种途径所反馈的反药组合不良反应信息进行搜集和实时更新,同时可构建反药组合不良反应信息及其机制的数据库。此外,基于中药复方不良反应信息的监测、搜集与分析,亦可发现尚未发现的潜在反药组合,在“十八反”“十九畏”的基础上进一步拓宽反药组合的范围。

而对于不良反应的预测,现有的预测模型多基于药物的化学特征和作用机制、应用人群的生理病理特点等进行预测,而未充分考虑中医证候和体质与不良反应风险的关系。机器学习在四诊信息采集、辅助证候与体质诊断等方面均具有一定优势,可基于不良反应数据集通过集成学习及深度学习挖掘中医体质、证候等要素与不良反应的相关性,进一步完善预测模型,进而在预测模型的实际运用中,可通过图像分割算法、图神经网络、语言大模型等帮助采集四诊信息,进而采用 XGBoost、RF、神经网络等辅助临床医生完成辨病辨证辨质,并根据预测模型进行不良反应风险评估、预警和随访监测。

4.小结

本文就机器学习在人用经验与临床数据挖掘、毒-效机制探究、药物不良反应情况的预测与监测等反药组合研究中的应用现状进行了总结。机器学习虽然在反药组合研究中已经取得了一定进展,但仍存在用于模型训练的数据质量不高、引证信息缺乏、不同来源的数据间存在数据隔离、数据挖掘深度不足,算法选取不当、可解释性存疑等问题,在后续研究中应进一步提高数据质量,拓宽数据覆盖广度,增加数据挖掘深度,合理选取算法模型,提高算法的准确性、可解释性和泛化能力,将机器学习与 AI 大模型有机结合并合理拓宽机器学习的应用场景,以促进机器学习与反药组合的实验与临床研究的相辅相成,减少研究成本,提高研究效率。

参考文献

- [1] 周祯祥,唐德才主编;邓毅,金华,崔瑛等副主编.全国中医药行业高等教育十四五规划教材 临床中药学[M].北京:中国中医药出版社,2021.06.:88
- [2] 葛友涛,肖倩倩,高毅,等.中药“十八反”之反药配伍的可行性思考[J].中医杂志,2023,64(17):1734-1739.DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.17.002.
- [3] 柳海艳,修琳琳,陈绍红,等.基于经典名方探讨“十八反”反药组合应用的宜忌条件[J].北京中医药大学学报,2023,46(06):752-757.
- [4] 十八反十九畏理论的分层分类认识及其用于临床安全风险评估的药学专家共识[J].医药导报,2024,43(06):841-849.
- [5] Deo Rahul C. Machine Learning in Medicine[J]. Circulation, 2015, 132(20):1920-30.
- [6] Handelman G S, Kok H K, Chandra R V, et al. eDoctor: machine learning and the future of medicine[J]. Journal of Internal Medicine, 2018, 284(6):603-619.
- [7] Jiang Tammy, Gradus Jaimie L, Rosellini Anthony J. Supervised Machine Learning: A Brief Primer[J]. Behavior Therapy, 2020, 51(5):675-687.
- [8] Huynh Tri, Nibali Aiden, He Zhen. Semi-supervised learning for medical image classification using imbalanced training data[J].Computer Methods and Programs in Biomedicine, 2022, 216:106628.
- [9] Yan Jun, Wang Xiangfeng. Unsupervised and semi-supervised learning: the next frontier in machine learning for plant systemsbiology[J]. The Plant Journal, 2022, 111(6):1527-1538.
- [10] Chen Wei, Sidky Hythem, Ferguson Andrew L. Nonlinear discovery of slow molecular modes using state-free reversible VAMPnets[J]. The Journal of Chemical Physics, 2019, 150(21):214114.
- [11] Blinov Michael L, Faeder James R, Goldstein Byron, et al. BioNetGen: software for rule-based modeling of signal transduction based on the interactions of molecular domains[J]. Bioinformatics, 2004, 20(17):3289-91.
- [12] Mertins Susan D. Capturing Biomarkers and Molecular Targets in Cellular Landscapes From Dynamic Reaction Network Models and Machine Learning[J]. Frontiers in Oncology, 2022, 11:805592.
- [13] Elia Venzani Niccolo Alberto, Basciu Andrea, Vargiu Attilio Vittorio, et al. Machine Learning Integrating Protein Structure, Sequence, and Dynamics to Predict the Enzyme Activity of Bovine Enterokinase Variants[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2024, 64(7):2681-2694.
- [14] Wang Hanchen, Fu Tianfan, Du Yuanqi, et al. Scientific discovery in the age of artificial intelligence[J]. Nature, 2023, 620(7972):47-60.
- [15] Zou Bin, Jiang Hongwei, Xu Chen, et al. Learning Performance of Weighted Distributed Learning With Support Vector Machines[J]. IEEE Transactions on Cybernetics, 2023, 53(7):4630-4641.
- [16] Cai Zhaoxiang, Poulos Rebecca C, Liu Jia, et al. Machine learning for multi-omics data integration in cancer[J]. iScience, 2022, 25(2):103798.
- [17] Shin Kento, Tran Duy Phuoc, Takemura Kazuhiro, et al. Enhancing Biomolecular Sampling with Reinforcement Learning: A Tree Search Molecular Dynamics Simulation Method[J]. ACS Omega, 2019, 4(9):13853-13862.

- [18] Zeng Peng, Su Hong-Fei, Ye Chao-Yuan, et al. A Tau Pathogenesis-Based Network Pharmacology Approach for Exploring the Protections of Chuanxiong Rhizoma in Alzheimer's Disease[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13:877806.
- [19] 梁建文, 王晋平, 谢荣鑫, 等. 淫羊藿治疗阿尔茨海默病作用机制的网络药理学与分子对接研究[J]. *湖北民族大学学报: 医学版*, 2022, 39(1):6-11.
- [20] 但文超, 赵国桢, 何庆勇, 等. 中医药处方数据挖掘的常见问题辨析与展望[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(17):4812-4818. DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20230512.501.
- [21] Gupta Rohan, Srivastava Devesh, Sahu Mehar, et al. Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery[J]. *Molecular Diversity*, 2021, 25(3):1315-1360.
- [22] Chan Heang-Ping, Samala Ravi K, Hadjiiski Lubomir M, et al. Deep Learning in Medical Image Analysis[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, 1213:3-21.
- [23] 郭竞曦, 杨艳君, 朱毛毛, 等. 以再评价再发现为基础的中药再创新开发策略[J]. *中草药*, 2024, 55(19):6455-6464.
- [24] Lee Minhyeok. Recent Advances in Deep Learning for Protein-Protein Interaction Analysis: A Comprehensive Review[J]. *Molecules*, 2023, 28(13)
- [25] Saharkhiz Saber, Mostafavi Mehrnaz, Birashk Amin, et al. The State-of-the-Art Overview to Application of Deep Learning in Accurate Protein Design and Structure Prediction[J]. *Topics in Current Chemistry*, 2024, 382(3):23.
- [26] 王桂彬. 古代经典名方人用经验证据体系构建现状及问题分析[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(03):1127-1130.
- [27] 胡方媛, 李梦雯, 范欣生, 等. 基于网络重叠社团发现的十九畏丁香-郁金同方配伍分析[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(01):316-319.
- [28] 李梦雯, 范欣生, 张泠杉, 等. 基于复杂网络等方法的十九畏人参-五灵脂同方配伍探析[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(18):3623-3627. DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.2017.0140.
- [29] 朱丽明, 向雪姣, 马天翔, 等. 基于数据挖掘常亚霖对治疗乳腺增生用药规律的研究[J]. *中国现代医生*, 2024, 62(17):76-79+83.
- [30] 牛晓骥, 马丽娟, 马铭悦, 等. 基于数据挖掘技术研究王付使用经方治疗胃癌用药规律[J]. *新中医*, 2024, 56(14):138-144. DOI:10.13457/j.cnki.jncm.2024.14.027.
- [31] 龙伟, 邳馨, 向剑, 等. 中药方剂网络与中药化学空间的构建与分析[J]. *北京中医药大学学报*, 2011, 34(11):729-732+740.
- [32] 李遇伯, 局亮, 邓皓月, 等. 基于毒性整体早期评价的“十八反”中药配伍禁忌毒性表征的研究思路及方法[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(06):960-966.
- [33] 李梢, 汪博洋, 曹亮, 等. 基于网络靶标理论和技术的中药研发实践[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(22):5965-5976. DOI:10.19540/j.cnki.cjcmm.20230923.701.
- [34] 樊启猛, 贺鹏, 李海英, 等. 基于超分子“印迹模板”整合分析中药“十八反”配伍禁忌[J]. *中草药*, 2019, 50(12):2777-2784.
- [35] 贺福元, 周宏灏, 罗杰英. 多成分药物代谢网络动力学数学模型建立及参数分析[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, (12):1321-1331.
- [36] Yu-Han Chen, Ping-Ping Yang, Chun-Lan Feng, et al. Exploration on the mechanism of therapeutic and toxic bidirectional effects of Haizao Yuhu decoction based on machine learning and data mining[J]. *Med Data Mining*, 2023, 6(4):21. doi: 10.53388/MDM202306021.

- [37] 张洪亮.一种基于舆情监测的药物不良反应发现方法及系统[P].北京市:CN202410502606.9,2024-07-30.
- [38] 李伟清,张跃伟,冯文锋.药物不良反应信息的提取方法、设备及计算机程序产品[P].浙江省:CN202410802041.6,2024-07-23.
- [39] 孙凤,李德阳,孙文,等.基于药物不良反应信息的信息提取方法及其系统[P].北京市:CN202410145152.4,2024-06-07.
- [40] 袁家斌,丁瑶,查可可.一种基于对比学习的药物不良反应检测方法[P].江苏省:CN202311718577.1,2024-04-12.
- [41] 廖容花,王晨,潘才冠,等.一种药物不良反应智能识别预防系统[P].广东省:CN202410215797.0,2024-05-17.
- [42] 杨伟,谢飞彪,向兴华,等.一种药物不良反应的预测模型构建方法、系统及介质[P].北京市:CN202410761825.9,2024-09-10.
- [43] 金敏,赵博涛,龚后武,等.基于深度学习异构网络的药物不良反应预测方法及系统[P].湖南省:CN202410473488.3,2024-08-02.
- [44] 王雪莹,史晓伟,李东洁.一种基于多源数据的药物不良反应预测方法[P].黑龙江省:CN202410456124.4,2024-07-19.
- [45] 曾鹏,周航.网络药理学“异病-异方”关键成分筛选同质化现象思考[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(18):177-191.DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20221114.
- [46] Baker Steven Andrew, Rutter Jared. Metabolites as signalling molecules[J]. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 2023, 24(5):355-374.
- [47] Ru Jinlong, Li Peng, Wang Jinan, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6:13.
- [48] 张倩云,董文敏,王新宏,等.UPLC-LTQ-Orbitrap-MS法分析甘草干姜汤配伍前后化学成分变化[J].中成药,2023,45(01):311-316.
- [49] 曾文莉,李鹏跃,代云桃,等.甘草炮制品主要化学成分的比较及质量传递规律研究[J].中国现代中药,2024,26(04):711-719.DOI:10.13313/j.issn.1673-4890.20231007004.
- [50] 宋玮,郑伟,张洁,等.中药皂苷类成分的体内代谢研究进展[J].药学学报,2018,53(10):1609-1619.DOI:10.16438/j.0513-4870.2018-0470.
- [51] Fan Jin-Hua, Xu Min-Min, Zhou Li-Ming, et al. Integrating network pharmacology deciphers the action mechanism of Zuojin capsule in suppressing colorectal cancer[J]. Phytomedicine, 2021, 96:153881.
- [52] Feng Xinch, Wang Kun, Cao Shijie, et al. Pharmacokinetics and Excretion of Berberine and Its Nine Metabolites in Rats[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11:594852.
- [53] 于河,王雨菡,马雪颜,等.解析名老中医传承扎根理论研究实施中的常见问题[J].中华中医药杂志,2022,37(12):6956-6961.
- [54] 王茜.甘遂半夏汤中甘遂与甘草反药组合的配伍宜忌条件实验研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [55] 王茜,钟赣生,王宏蕾,等.甘遂半夏汤中甘遂与甘草不同比例配伍对癌性腹水模型大鼠生物效应影响的研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(4):177-181.
- [56] 王茜,钟赣生,王宏蕾,等.甘遂与甘草不同比例配伍对癌性腹水模型大鼠心肾功能及病理形态的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(12):3527-3531
- [57] 王茜.甘遂半夏汤中甘遂与甘草反药组合的配伍宜忌条件实验研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [58] Qiu Xiaotian, Yao Dengfeng, Kang Xinch, et al. Blockchain and K-Means Algorithm for

- Edge AI Computing[J]. Computational Intelligence and Neuroscience, 2022, 2022:1153208.
- [59] Klement William, El Emam Khaled. Consolidated Reporting Guidelines for Prognostic and Diagnostic Machine Learning Modeling Studies: Development and Validation[J]. Journal of Medical Internet Research, 2023, 25:e48763.
- [60] Kayode Gbolade O, Montemore Matthew M. Latent Variable Machine Learning Framework for Catalysis: General Models, Transfer Learning, and Interpretability[J]. JACS Au., 2023, 4(1):80-91.
- [61] Nagin Daniel S, Jones Bobby L, Passos Valéria Lima, et al. Group-based multi-trajectory modeling[J]. Statistical Methods in Medical Research, 2016, 27(7):2015-2023.
- [62] 罗泉.可解释机器学习研究及其在临床预后预测中的应用[D].中国人民解放军海军军医大学,2024.DOI:10.26998/d.cnki.gjuyu.2024.000123.

从栀子的效-毒双向作用论合理用药与科学监管

崔爽，田婧卓，梁爱华*

（中国中医科学院 中药研究所，北京 100700 中国）

[摘要] 中药栀子具有显著的清热解毒、利胆保肝等药理活性，在临床上广泛用于热病心烦，湿热黄疸，淋证涩痛，火毒疮疡等病证。栀子被列于《既是食品又是药品的物品名单》，常常被用作食品和保健品的原料。然而，近年来的毒理学研究显示栀子具有一定的潜在肝毒性，如果使用不合理有可能导致用药风险，因此亟需搞清楚栀子效-毒双向作用及其科学内涵。笔者将基于目前临床、药理以及毒理研究进展，论述栀子的效-毒双向作用特点及可能机制，并提出栀子的临床合理用药与科学监管的思考。

[关键词] 栀子；肝保护；肝毒性；效-毒双向作用；作用机制

[基金项目] 国家自然科学基金（82192913）；中国中医科学院科技创新工程（C12021A04801，C12021B016）；国家重点实验室基金（ZG2024001-03）

[第一作者] 崔爽，博士研究生，从事中药对胆汁淤积性肝损伤的治疗作用及机制研究，Tel: 18810617873，E-mail: 1306167309@qq.com

[通信作者] 梁爱华，博士，研究员，从事中药药理与毒理研究，Tel: 13901014419，E-mail: ahliang@icmm.ac.cn

From the effect-toxicity bidirectional action of *Gardenia jasminoides* on rational drug use and scientific regulation

CUI Shuang, TIAN Jing-zhuo, LIANG Ai-hua*

*(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing
100700, China)*

[Abstract] The Chinese medicine gardenia has remarkable pharmacological activities such as clearing heat and removing toxins, inducing gallbladder and protecting the liver, and is widely used in clinics for feverish disease and heartburn, damp-heat jaundice, gonorrhea and astringent pain, and fire-poisonous sores and ulcers, and so on. Gardenia is listed in the List of Items that are both Food and Drugs, and is often used as an ingredient in food and health products. However, in recent years toxicology research has shown that gardenia has certain potential hepatotoxicity, if the use of irrational may lead to the risk of medication, so there is an urgent need to figure out the gardenia effect - toxicity two-way role and its scientific connotation. This paper will be based on the current clinical, pharmacological, and toxicological research progress, discuss the gardenia effect - toxicity two-way action characteristics and possible mechanism, and put forward the gardenia's clinical rational use of medicine and scientific supervision of thinking.

[Key words] *Gardenia jasminoides*; hepatoprotection; hepatotoxicity;
potency-toxicity bidirectional action; mechanism of action

栀子作为卫生部颁布的第一批药食两用中药，具有泻火除烦，清热利湿，凉血解毒等功效；用于热病心烦，湿热黄疸，淋证涩痛，血热吐衄，目赤肿痛，火毒疮疡等病证。栀子被列于《既是食品又是药品的物品名单》，因此其广泛用作中成药、保健食品和不同食品的原料。现代药理研究表明，栀子对胆汁淤积性肝病、化学性肝损伤、肝纤维化等肝脏疾病及肝损伤具有较好的改善作用。然而，毒理学研究发现动物长时间给予栀子可引起明显的肝损伤或其他不良反应^[1]，严重时甚至会导致死亡^[2]。在临床上，栀子主要以复方形式使用。文献报道了临床上含栀子中成药的不良反应 1053 例，涉及品种 22 种，其中 2012 年至 2016 年国家药品不良反应监测系统收录含栀子中成药引起的药物性肝损伤病例共 41 例^[3]，主要表现为皮肤黏膜黄染、肝功能异常等。目前对栀子的药效作用、毒性作用具有较广泛的研究，然而对其效-毒作用相关性及效-毒作用机制的关联性未见深入探讨。本文将基于目前临床、药理以及毒理研究进展，论述栀子的效-毒双向作用特点及可能机制，并提出栀子的临床合理用药与科学监管的思考。

1 栀子的临床应用概况

栀子是茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实，性寒，味苦，入心、肺、三焦经。栀子的化学成分包括以栀子苷为代表的环烯醚萜苷类、挥发油、多糖类、黄酮类、有机酸、二萜类化合物等成分。栀子具有保肝利胆、抗炎、抗菌、解热镇痛、抗病毒、抗肿瘤等药理作用，可治疗温病热郁心胸、肝胆湿热郁结、血热妄行等症。含栀子的方剂和中成药在临床上广泛用于治疗各类病证，仅 2020 年版《中国药典》收录的含栀子的中成药就多达 116 种。根据处方、制法、规格、用法与用量等信息，笔者对含栀子的中成药中栀子的日服最大剂量进行了梳理，见表 1。栀子入药以生品为主，日服最大剂量范围在 0.137~16 g，94.83% 的中成药中栀子的日服剂量均低于 10 g，栀芩清热合剂中的栀子日服剂量最大，为 16 g。只有少数品种日用剂量在高于 7 g 的较高剂量范围，但其中包括小儿退热合剂、小儿退热颗粒等儿童用药，需要特别警惕其潜在的肝损伤风险。

含栀子的中成药的功效以清热解毒为主，此类病症病程急，用药时间相对较短，目前临床暂无明确的不良反应报告，仅部分含栀子的中药注射剂如清开灵注射液等被发现在用药过程中会出现过敏性休克等较为严重的不良后果，但这些不

不良反应呈偶发状态，经停药及对症处理后转归良好^[3]。也有部分含梔子的中成药用于治疗病程较长的疾病，如梔子豉汤、解忧安神颗粒、越鞠丸和丹梔逍遥丸被用于治疗焦虑抑郁症（≥1 个月）^[4]；梔子厚朴汤被用于联合治疗老年慢性阻塞性肺疾病合并睡眠障碍，连续给药 1 个月^[5]；梔子豉汤被用于联合治疗更年期女性慢性咳嗽，疗程为 2-4 个月^[6]；茵芪肝复颗粒被报道用于慢性乙型肝炎肝硬化的治疗，疗程更是长达 6 个月^[7]。有报道称临床应用含梔子的中成药灵莲花颗粒治疗更年期综合征心肾不交证时会引起胃部不适、恶心干呕、腹胀以及 ALT 升高等异常，发生率 2.54%^[3]。临床前研究显示，梔子在动物上引起肝损伤与剂量和用药时间有关。然而，目前临床上使用含梔子中成药时往往缺乏对肝脏功能生化指标的监测，因此，含梔子中成药在临床上的实际肝损伤情况并不清楚。

表 1 2020 年版《中国药典》一部中的含梔子中成药品种及其梔子日服最大剂量分布
Table 1 Distribution of gardenia-containing proprietary Chinese medicines in the 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia (Part 1) and their maximum daily dose of gardenia

中成药	梔子日服最大剂量
牛黄清宫丸、安宫牛黄散、安宫牛黄丸、鹭鸶咯丸*、清咽润喉丸、茵梔黄口服液*、茵梔黄软胶囊*、茵梔黄泡腾片*、茵梔黄胶囊*、茵梔黄颗粒*、筋痛消酊、防风通圣丸、防风通圣颗粒、牛黄上清丸*、新雪颗粒、复方牛黄清胃丸、速效牛黄丸、黄连上清胶囊、芎菊上清丸、消肿止痛酊、导赤丸、明目上清片、牛黄净脑片、牛黄上清片*、牛黄上清软胶囊*、清火梔麦丸*、清火梔麦片*、清火梔麦胶囊*、牛黄上清胶囊*、小儿清肺止咳片、安脑片、羚羊清肺丸、黄连上清片、芎菊上清片、龙泽熊胆胶囊、芎菊上清丸（水丸）、复方牛黄消炎胶囊、泻肝安神丸、安宫降压丸*、清开灵颗粒*、五味沙棘散、清开灵片*、清开灵软胶囊*、清开灵泡腾片*、清开灵胶囊*、荷叶丸、耳聋丸、龙胆泻肝丸、安脑丸、小儿清热片*、羚羊清肺颗粒、黄连上清丸、黄连上清颗粒、开光复明丸*、解郁安神颗粒*、清热解毒片、唇齿清胃丸、止红肠辟丸、龙胆泻肝丸（水丸）*、清咽利膈丸、茵胆平肝胶囊、万氏牛黄清心丸、通窍耳聋丸、分清五淋丸	1g 以下
清开灵注射液*、泻青丸*、清肺抑火丸、六味木香散、二母宁嗽丸、妇科分清丸、清开灵口服液*、当归龙荟丸、梔子金花丸*、牛黄至宝丸*、黄疸肝炎丸*、越鞠二陈	1-3g

丸、加味逍遥口服液（合剂）、越鞠保和丸*、加味逍遥丸、连参通淋片、清淋颗粒	
*、清胃黄连丸（大蜜丸）、天麻钩藤颗粒、清胃黄连丸（水丸）、清胃黄连片、灵	
莲花颗粒*、鼻渊舒胶囊*、小儿感冒宁糖浆、鼻窦炎口服液、小儿豉翘清热颗粒*、	
舒胆胶囊、胆康胶囊*、越鞠丸*、外伤如意丸、乌军治胆片*	
天智颗粒、清热解毒口服液、清肝利胆口服液*、清肝利胆胶囊*、克感利咽口服液*、	4-6g
三子散*、功劳去火片、茵山莲颗粒、金蝉止痒胶囊、丹膝颗粒、鼻渊舒口服液*	
八正合剂*、茵芪肝复颗粒*、小儿退热合剂（口服液）*、小儿退热颗粒*	7-10g
梔芩清热合剂*	11g 以上
小儿肝炎颗粒、拔毒膏、国公酒、京万红软膏、祛伤消肿酊	无法计算

注：*表示该品种含量测定的指标成分包括梔子苷。

2 梔子的肝脏保护及机制研究

梔子主要含有环烯醚萜苷类、有机酸酯类、黄酮类、酚酸类等化学成分，对对乙酰氨基酚（acetaminophen, APAP）致急性肝损伤、 α -萘基异硫氰酸盐（ANIT）诱导的胆汁淤积性肝病、脂多糖（LPS）引起的化学性肝损伤、对硫代乙酰胺（TTA）诱导的肝纤维化等各类肝损伤具有明显的改善作用，甚至对肝癌也有一定的治疗作用，其机制主要与改善药物代谢酶活性、维持胆汁酸稳态、抑制炎症通路、改善氧化应激、改善脂质代谢、抑制肝细胞凋亡等有关。

2.1 改善胆汁淤积性肝病

梔子改善胆汁淤积可能与调节胆汁酸代谢有关。Qin^[8]等研究发现梔子水提取物（21、42 mg/kg）通过影响初级胆汁酸的生物合成和胆汁分泌途径影响胆汁酸代谢，进而治疗急性胆汁淤积性肝病。梔子的主要有效成分梔子苷（100 mg/kg）通过激活胆汁酸代谢相关的核受体肝脏法尼醇 X 受体（FXR），抑制胆汁酸合成限速酶（CYP7A1）的表达降低胆汁酸的生物合成，并通过调控胆汁酸转运体（BSEP、OST 等）促进胆汁酸排泄；同时，还通过抑制另一核受体孕烷 X 受体（PXR）及其调控的转运体（OATP2）表达，降低基底外侧胆汁酸的摄取。总而言之梔子苷通过影响肝细胞内胆汁酸的合成和排泄，降低肝内胆汁酸水平，进而改善 ANIT 诱导的大鼠胆汁淤积性肝损伤^[9]。

此外，梔子及活性成分还可通过发挥抗炎活性缓解胆汁淤积性肝病中因胆汁酸蓄积导致的炎症反应。梔子苷（50mg/kg）能通过抑制 NF- κ B-STAT3 通路，降

低炎性因子表达而发挥抗炎活性^[10]。同样, 栀子多糖能够通过抑制另一炎症通路 TLR4/NF- κ B 改善肝脏炎症^[11]。而京尼平苷酸作为一种新型的 NLRP3 特异性共价抑制剂, 可直接与 NLRP3 共价结合, 通过阻断肝细胞和肝巨噬细胞之间的串扰抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 减轻胆汁淤积性肝病诱发的肝脏炎症损伤^[12]。

2.2 对药物诱导的急性肝损伤有明显的改善作用

研究表明, 在 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠和 LPS 诱导的 THP-1 细胞模型中, 栀子苷通过抑制甲基化 CpG 结合蛋白 2 (MeCP2) 调节 MeCP2-Hh 通路, 下调音猬因子 (Shh) 和 GLIS 家族锌指蛋白 1 的表达, 上调跨膜受体 PTCH1 的表达, 降低促炎因子 IL-6 和 TNF- α 的水平而表现出抗炎作用^[13]。此外, 有效成分藏红花素对黄曲霉毒素 B1 和二甲基亚硝胺诱导的早期急性肝损伤也表现出化学预防作用^[14]。

栀子可以通过抗氧化对雷公藤多苷诱导的小鼠肝损伤 (药物性肝损伤) 产生肝保护作用。栀子苷通过提高氧化应激相关的指标, 包括谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、SOD、MDA、CAT、GSH 等活性, 缓解模型的氧化应激损伤和炎症反应, 促进组织修复与再生^[15]。此外, 栀子苷还可以通过影响肝药酶活性, 抑制 CYP2E1 的上调, 进而减轻肝脏中 GSH 和 MDA 的积累而产生抗氧化应激的作用, 明显改善 APAP 引起的急性肝损伤^[16]。除栀子苷外, 栀子黄也被认为可能是栀子抗氧化作用的主要成分^[17]。

栀子显著的抗炎和抗氧化作用同样在其他肝脏疾病的治疗中发挥着重要的作用, 我们也会在后文中展开阐述。

2.3 改善非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)

在高脂高胆固醇饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎模型中, 联合使用栀子苷 (90mg/kg) 和绿原酸 (1.34 mg/kg) 能够减少巨噬细胞分泌的细胞因子包括 TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、单核细胞趋化蛋白 (MCP-1) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的表达, 同时降低 Kupffer 细胞数量, 并抑制其活性, 降低该模型中的炎症反应^[18]。另外, 栀子苷通过激活 Nrf2/HO-1/AMPK/PI3K/mTOR 信号通路, 抑制 mTORC 及其相关蛋白的磷酸化, 保护小鼠和 HepG2 细胞免受 NAFLD 诱导的氧化应激和炎症的影响^[19]。另一研究发现, 栀子苷 (100 mg/kg)

对高脂饮食大鼠肝脂肪变性的治疗作用还可能与其调节肝脏脂质合成与代谢、改善胰岛素抵抗和刺激过氧化物酶体增殖物启动受体 α (PPAR α) 的表达有关^[20]。

2.4 改善酒精性脂肪性肝病

栀子苷 (20, 40, 80mg/kg) 能够显著改善酒精性脂肪性肝病中肝损伤和肝脏脂质过氧化 (LPO) 水平的过度升高, 通过上调肝脏 GSH、GST、GPx、CuZn-SOD 和 CAT 等抗氧化酶的表达改善氧化应激损伤^[21]。此外, Wei 等^[22]通过高通量 catTFRE 方法和基于准确强度的绝对定量的方法发现, 肝细胞核因子-1 α (HNF-1 α)、HNF-4 α 和 PPAR α 是栀子苷 (60 mg/kg) 改善酒精性脂肪变性的关键转录因子, 通过影响这些转录因子能够与下游靶基因 Hpd、Ppil3、Cth、Rgn、G6pc 和 Akr1d1 产生相互作用, 对调节肝脏脂质稳态产生积极影响, 进而发挥肝脏保护作用。

2.5 改善肝纤维化

肝纤维化形成的关键在于肝星状细胞的激活以及细胞外基质的过度沉积。研究发现, 栀子具有较好的改善肝纤维化的作用。栀子及栀子苷能明显抑制肝脏组织疤痕形成及胶原沉积, 下调肝纤维化指标 III 型前胶原, IV 型胶原, 层粘连, 透明质酸酶水平, 抑制 HSCs 的活化, 下调转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 和 I 型胶原的表达从而阻止 CCl₄ 诱导的肝纤维化进程^[23-25]。此外, 栀子苷 (40 mg/kg) 通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路, 部分降低 TGF- β 1 诱导的人肝星状细胞 LX-2 和肝纤维化小鼠 p-Smad2 和 p-Smad3 的水平^[26]。在胆管结扎诱导的肝纤维化模型中, 栀子苷的保护作用与调节 SIRT1/FXR 信号通路、恢复胆汁酸稳态和抑制 NLRP3 炎性小体的激活密切相关^[27]。藏红花素 (100 mg/kg) 作为栀子的活性成分, 通过下调 TGF- β 、 α -SMA 和胶原 I- α 的表达, 上调基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 基因表达, 对 TTA 诱导的小鼠肝纤维化发挥潜在的抗纤维化活性^[28]。

2.6 改善急性肝衰竭

栀子的有效成分京尼平通过抗凋亡作用明显改善急性肝衰竭。在静脉注射激动性抗 Fas 抗体 Jo2 诱导的急性肝衰竭 (ALF) 模型中, 京尼平 (150 mg/kg) 通过抑制 caspase-3 和 caspase-8 的激活、快速降低肝细胞的线粒体膜电位, 显著降低小鼠的死亡率, 在 Fas 介导的鼠原代肝细胞中同样表现出明显的抗凋亡作用,

而且京尼平也明显的增强 Ca^{2+} 诱导的线粒体通透性转变的抗性^[29]。在氨基半乳糖 (GalN) /LPS 诱导的 ALF 模型中, 京尼平通过抑制肝脏中胞浆细胞色素 c、衔接蛋白 TRADD 表达、caspase-3 和 caspase-8 活性以及增加 TUNEL 阳性细胞数进而发挥抗凋亡作用^[30]。同时显著降低磷酸化受体相互作用蛋白 3 (RIP3) 和 RIP1 的表达以及增加 RIP1/RIP3 坏死小体复合物的数量, 减少细胞膜破裂和细胞死亡, 进而产生改善 ALF 的作用^[31]。

2.7 延缓肝癌发生发展

研究发现, 口服给予栀子多糖 (500 mg/kg) 对肝癌 Hca-f 实体瘤的抑制率达 49 %^[32]。京尼平能够抑制人肝癌细胞 HepG2 和 MHCC97L 的运动性和侵袭性, 抑制原位肝癌移植小鼠肝癌细胞的肝内侵袭, 其机制可能与 p38/TIMP-1/MMP-2 信号通路的激活有关^[33]。栀子苷与其衍生物五乙酰基栀子苷能够提高 GST 和 GSH-Px 活性, 通过偶联 GSH 与 AFB1 环氧化物, 抑制 AFB1 诱导的 DNA 修复合成^[34]。绿原酸在体内均能通过清除过量的 ROS 和激活 Nrf2 及其下游信号通路, 缓解因放射诱导的细胞凋亡和 DNA 损伤^[35]。此外, 五乙酰基栀子苷 (1, 2mg/kg) 还能够明显降低 AFB1 诱导的直径大于 0.3 mm 的 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 阳性病灶数量, 对于肝早期癌变具有化学预防作用^[36]。

3 栀子的肝毒性及机制研究

3.1 栀子的肝毒性特点

虽然栀子的肝脏保护作用显著, 但是大量研究表明栀子在剂量较高或给药时间较长的情况可能会引起肝损伤, 病理表现为肝小叶结构紊乱、炎性细胞浸润、肝细胞弥漫性坏死以及胆管细胞增生等, 严重甚至会导致动物死亡^[2]。细胞实验可见培养液上清中酶学指标异常, 肝细胞膜通透性增加、细胞核形态破坏、核内染色质凝集、核荧光强度升高, 细胞生长阻滞等^[37, 38]。

3.2 栀子的潜在毒性物质基础

有学者研究发现栀子水提物对正常大鼠肝细胞 BRL-3A 的抑制作用强于醇提物, 推测水提物因成分复杂, 潜在毒性成分较多, 可能存在协同抑制作用, 故相较于醇提物其毒性更大^[39]。任艳青^[37]等用不同浓度京尼平和栀子苷孵育人肝癌 HepG2 细胞, 发现前者较后者具有更强的肝细胞毒性作用, 有研究表明京尼平可自发转化为京尼平双醛化合物, 与肝蛋白游离氨基酸和赖氨酸 (ϵ) 残基的

伯胺基发生共价结合反应，毒性程度与生成的京尼平-氨基酸残基加合物含量有关^[40]。因此相较于栀子苷，京尼平可能才是栀子肝毒性的关键物质。

此外，还有研究提出了新的观点。栀子苷在体内经肠菌去糖基化生成京尼平，随后入血发生葡萄糖醛酸化和环切割反应转化为为京尼平的葡萄糖醛酸缀合物^[41, 42]。有研究发现当京尼平（80mg/kg）剂量过高时，葡萄糖醛酸化饱和，京尼平与肝内非蛋白巯基化合物结合致使其含量呈剂量依赖性下降，考虑到京尼平在体外与谷胱甘肽和半胱氨酸的巯基具有显著的反应性，因此栀子诱导的肝毒性可能与栀子苷转化为京尼平过程中京尼平过度消耗肝内非蛋白巯基化合物（保护肝细胞免受毒性物质损伤）有关^[43]。

3.3 栀子的肝毒性机制

3.3.1 栀子通过影响药物代谢酶活性诱导肝损伤

CYP450 是重要的 I 相代谢酶，其中，CYP3A4 含量最高，约占人肝脏 CYP450 总量的 30%~40%。相关研究证明，栀子粗提物（2 g/kg）显著抑制大鼠肝脏 CYP3A 单加氧酶的活性及 CYP3A 相关蛋白的表达，而大剂量（250 mg/kg）栀子苷通过抑制 CYP3A2 活性，导致栀子苷的毒性成分消耗减慢，在体内大量蓄积，最终导致肝毒性^[44-46]。胡燕珍^[47]等通过毒理基因组学确定 CYP2C23 是栀子苷诱导肝毒性相关的标志基因。京尼平（ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M）显著抑制人肝癌 HepG2 细胞中 CYP3A4 和 CYP2C19 mRNA 和蛋白的表达，对 CYP2D6 有明显的诱导作用^[48]。此外，WEI^[49]等使用蛋白质组学方法发现甘氨酸 n-甲基转移酶（GNMT）和糖原磷酸化酶（PYGL）是较 ALT 和 AST 更为灵敏地用于提示大剂量栀子苷诱导的肝损伤的生物标志物，这对提高药物诱导肝毒性的有效监测具有指导意义。

3.3.2 栀子通过干扰胆汁酸代谢而诱发胆汁淤积性肝损伤

栀子苷引起的肝损伤，特别是胆汁淤积性肝损伤，可能与干扰胆汁酸代谢有关。Tian^[50]等灌胃给予正常大鼠 300 mg/kg 栀子苷后诱导了胆汁淤积性肝损伤，肝脏总胆汁酸（TBAs）水平和牛磺酸结合型胆汁酸（t-CBAs）水平显著增加，其中以 TCDCA 和 TDCA 升高最为明显。机制研究发现栀子苷可能通过显著下调肝脏 FXR 和 SHP，上调 CYP7A1 的表达，使得肝内胆汁酸合成增多；同时，显著下调肝脏中 BSEP 和 NTCP 的表达，使得肝内胆汁酸排泄受阻，最终导致肝细胞内胆汁酸大量蓄积而诱发胆汁淤积肝损伤。

3.3.3 栀子通过诱导氧化应激而产生肝损伤作用

体内实验结果表明,灌胃给予大鼠大剂量栀子($9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[51]后可使肝组织 SOD、MDA 及 GSH-PX 水平显著降低,MDA 水平显著升高,提示氧化应激可能是栀子致肝毒性的机制之一。另一项研究表明,京尼平($200\text{ }\mu\text{M}$)能够通过刺激 NAPH 氧化酶、ROS 产生以及激活 SAPK/JNK1/2 途径等诱导大鼠肝癌细胞 FaO 和人肝癌细胞 Hep3B 凋亡^[52]。LI^[38]等的研究同样证实京尼平($100, 200, 300\text{ }\mu\text{g/mL}$)和栀子苷($300\text{ }\mu\text{g/mL}$)能影响大鼠肝脏细胞 BRL-3A 正常生长,通过与 NF- κ B 或 TNFR1 受体紧密结合,破坏细胞抵抗氧化应激的能力,进而诱导氧化应激,导致细胞凋亡。

3.3.4 栀子通过诱导炎症反应而产生肝毒性

研究表明高剂量的栀子水提取物(660 mg/mL)、栀子苷(200 mg/mL)和京尼平($25, 50\text{ mg/mL}$)通过激活 NF- κ Bp65 或 MAPK 信号通路,上调大鼠肝组织 NF- κ Bp65、环氧化酶-2(COX-2)和 iNOS 蛋白表达,促进血清 TNF- α 、IL-6 和 NO 含量升高,诱发炎症反应,最终产生肝毒性^[39]。

3.3.5 栀子通过诱导肝细胞凋亡而引起肝毒性

栀子及活性成分引起的肝毒性还可能与诱导肝细胞凋亡有关。王坤^[53]等用栀子水煎液(9 g/kg)灌胃给予大鼠后发现肝脏细胞 Bax 表达显著升高,Bcl-2 表达显著降低。京尼平通过促进细胞色素 c 的释放以及 caspase-3/9 的激活,进而诱导 p38MAPK 介导的细胞凋亡^[54]。过量的栀子苷(300 mg/kg)诱导的肝损伤可能通过激活 ATF、Jun、Hmga、Irf 和 Etv 等关键转录因子,参与细胞凋亡、死亡或坏死所实现的^[22]。此外,京尼平可明显降低 HepG2 细胞线粒体膜电位,促进细胞色素 C 释放至细胞质,增加细胞膜通透性,而当进一步增大浓度至 $1000\text{ }\mu\text{mol/L}$,还能诱导 Hep G2 细胞发生表现为细胞核的固缩及核内染色质的凝集的晚期细胞凋亡^[37]。

4 讨论与展望

4.1 肝脏是栀子发挥效毒双向作用的重要靶器官

肝脏是人体重要的免疫器官,具有分泌胆汁、储存糖原、参与白蛋白以及各种凝血因子的合成的作用,同时作为主要的代谢器官,负责分解和转化药物^[55]。研究表明,解热、补肾、活血化瘀药是保肝中药的三大主要来源,同时退热、活

血化瘀药也是引起中药肝毒性的最主要诱因,这也说明保肝中药也可能对肝脏产生不良影响^[55, 56]。栀子作为清热类药物,善于清利下焦肝胆湿热,常用于治疗肝胆湿热郁证之黄疸,是中医临床常见的保肝利胆药。但是栀子中的栀子苷、京尼平通过研究已被证实具有明确的肝毒性作用^[56]。因此肝脏是栀子发挥药效和毒性双向作用的重要靶器官。

4.2 栀子的肝保护/肝毒性可能具有相同或相似的作用靶点

通过对栀子肝保护/肝毒性机制的研究发现,栀子产生不同效果可能存在着相同或相似的靶点。较低剂量栀子苷可使 CYP3A2 酶活性提高,而大剂量栀子苷却诱导 CYP3A2 酶活性下降,提示不同剂量的栀子苷可通过诱导或抑制 CYP3A2 酶活性对体内药物的蓄积产生相反的作用^[44]。300 mg/kg 栀子苷可通过显著下调 FXR 和 SHP,上调 CYP7A1 表达,同时下调 BSEP 和 NTCP mRNA 的表达,影响肝内胆汁酸的合成和排泄,致使肝脏胆汁酸蓄积,导致肝脏损伤^[50]。与之相反,100 mg/kg 栀子苷能够改善 ANIT 诱导胆汁淤积性肝损伤,通过上调 FXR、PXR 和 SHP 表达降低肝内胆汁酸合成,抑制 OATP2 降低肝内胆汁酸摄取,并上调 BSEP 和 OST β 的表达促进肝内的胆汁酸外排,从而降低肝内胆汁酸蓄积^[9]。由此说明 FXR 介导的胆汁酸合成和排泌通路可能是栀子产生肝毒性和发挥肝脏保护作用的共同通路。此外,栀子及有效成分产生肝损伤或肝保护作用也都涉及了炎症、氧化应激和细胞凋亡通路,作用靶点也基本类似(NF- κ Bp65、MAPK、促炎因子的表达、caspase 的激活等),只是调节作用完全相反。整体来说,栀子及其成分所产生的肝保护和肝毒性可能是通过作用在相同或相似的靶点及通路上实现的。

4.3 栀子的效/毒与剂量和用药时间密切相关,在临床上应注意合理用药

栀子作为清热解毒代表药物,属于大宗传统中药材,善于清利下焦肝胆湿热,常用于治疗肝胆湿热郁证之黄疸,以及血淋、热淋涩痛等小便不适症状,是中医临床常见的保肝利胆药。2020 版《中国药典》规定,临床栀子常用剂量为 6-10 g^[57],对于多种肝脏疾病均有明显的改善作用,保肝效果明显。但是一项研究则指出当栀子用量超过 30 g 会诱发显著肝毒性^[58],由此可以看出,剂量在栀子的毒/效上起到了关键作用,当过量使用时可能会引起与肝保护相反的肝毒性作用。杨洪军等^[59]证实大剂量栀子水提物(3.08 g/kg)(相当于生药 9 g/kg,相当于 9

倍临床等效量)、醇提物(1.62 g/kg)和有效成分栀子苷(0.28 g/kg)连续 3 d 给予正常大鼠能引起明显的肝毒性。此外,单次口服给药 574 mg/kg 或以上的栀子苷可诱导大鼠急性肝毒性,这种毒性常在口服后 24~48h 出现^[2]。但是在实际应用中,也有栀子的用量超过了《中国药典》规定的最大剂量却未表现出毒性反应的事例,比如茵陈蒿汤中栀子的用量为临床等效剂量的 10 倍,但在临床应用过程中暂无明显不良反应,这可能与组方中栀子与其他中药配伍的减毒增效作用有关^[53]。

此外,用药时间也是栀子产生毒效双向反应的重要因素。有研究表明采用常规治疗剂量(100 mg/kg)栀子苷灌胃给予大鼠 26 周可观察到明显的肝损伤作用,病理显示肝细胞内药物颗粒沉积明显,炎性细胞浸润,并伴有轻度至中度胆管增生,而这个剂量给予 1 周时却对 ANIT 诱导的胆管增生有明显的改善作用,因此可以看出用药时间过长,即使给予的是常规的治疗剂量仍有引起肝损伤隐患^[60]。所以,在治疗疾病过程中,超量和过长时间应用栀子可能会增加罹患肝损伤的风险,在临床应用含栀子中成药时需注意合理用药,如需超量或长期用药的情况下需密切监测肝损伤指标。

4.4 栀子的效/毒物质重叠,有的成分(如栀子苷)既是有效成分又是潜在的肝毒性成分,需要制定该类成分在药材中合理的含量范围标准,以避免潜在毒性物质的过量摄入而造成安全隐患

栀子苷被认为是栀子产生药效和毒性反应的重要物质,其产生的肝保护和肝毒性的双重效应与剂量和时间具有密切关系,所以合理选择用药剂量,控制给药时间,避免栀子苷过度蓄积,对于有效提高栀子药效、降低毒性反应具有重要临床意义。2020 版《中国药典》规定,栀子临床常用剂量为 6-10 g^[57],栀子中含栀子苷不得少于 1.5%,而市售栀子中栀子苷含量最高可达 6%,远高于临床剂量。因此,笔者建议在《中国药典》的栀子的【含量测定】中,不仅对栀子苷的最低含量做出规定,还需增加栀子苷的最高含量标准,以降低可能存在的肝肾毒性风险^[60]。此外,对于栀子的临床用药,笔者认为,一方面,应针对可能摄入过量而造成肝肾毒性的栀子制定严格的工艺制作和临床用药标准,审慎合理用药。另一方面,针对含栀子中成药的临床使用,应注意合理辨证,科学配伍减毒,制定客观的用药方案和规范,以降低和避免临床用药风险。

4.5 基于“有故无殒”理论客观看待栀子的效/毒关系，对于阐明栀子肝保护/肝毒性科学内容具有重要意义

纵观现有文献报道，栀子的安全性研究主要是基于正常动物进行的，越来越多的学者认为这样的评价方法忽略了机体的不同状态即正常状态和疾病状态的差异，与临床的实际应用存在较大差异。“有故无殒”理论强调不能孤立地看待药物本身是否有毒性，而是要明确药物与机体病症状态之间的关系，因此以“有故无殒”理论为指导，采用疾病动物模型进行中药安全性评价，更能准确地反映中药作用临床患者的真实情况^[61]。笔者前期在 ANIT 诱导的胆汁淤积性肝损伤模型的基础上给予过量的栀子苷后并未观察到如正常大鼠般的肝毒性现象，相反该剂量却表现出明显的降低肝内胆汁酸水平，改善胆汁淤积的肝脏保护作用。此外另一研究也证实大剂量栀子水提物（200 mg/kg）在 TTA 致小鼠肝纤维化以及慢性 TAA 暴露肝氧化应激条件下也产生了治疗作用，而非肝损伤作用^[62]。综上所述，相同剂量的栀子在不同状态（正常、疾病）下表现出截然不同的效应（毒性、药效）。当机体处于正常状态或药不对症时，栀子作用于人体本身，展现肝毒性作用；当机体处于病症或疾病状态，栀子作用于病邪，则表现出以肝保护为主的治疗作用，即所谓“有病则病受之，无病则体受之”，充分说明了栀子等中药的毒性不是固定不变的，在不同的病证状态下具有差异性表达，因此我们在研究过程中应着眼于中药毒/效-证的对应关系及机体内在变化规律的研究，基于“有故无殒”理论辩证且科学的评价中药的毒/效作用的内涵，这对正确阐释栀子及其他中药的安全性具有重要意义^[63]。

4.6 建议对栀子的应用范围进行科学监管，以降低栀子的用药风险

鉴于栀子药食两用特点，其常被用作食品添加剂和保健食品成分，其中，最常用的保健功能是对化学性肝损伤的辅助保护作用，这与栀子的保肝利胆功效相一致^[64]，此外清热类或减肥类保健食品中也常常添加栀子。国家对于食品和保健食品的管控并不严格，加上人们一般认为其安全性相对较高，因此在作为食品和保健品应用时，栀子的服用剂量和使用时间随意性较大。鉴于栀子正常状态下过量或过长时间服用可因药物蓄积而导致肝毒性，同时考虑药物性肝损伤存在一定隐匿性，因此不排除长期服用含栀子的食品和保健品可能有诱发肝损伤，甚至是肝纤维化、肝衰竭等严重后果的风险。故而建议将有潜在肝损伤风险的栀子从

“药食两用”的名单中剔除，并提高含有梔子等保健品和药物的日常监管和使用规范，以降低梔子诱发肝损伤的风险，确保其用药安全。

参考文献

- [1]李春楠, 吕经纬, 兰梦, 等. 中药梔子保肝和肝毒性双重作用研究进展[J]. 吉林中医药, 2022, 42(11): 1337-1340.
- [2]DING Y, ZHANG T, TAO J S, et al. Potential hepatotoxicity of geniposide, the major iridoid glycoside in dried ripe fruits of *Gardenia jasminoides* (Zhi-zi) [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(10): 929-933.
- [3]李会芳, 宋海波, 王伽伯, 等. 2020 年版《中国药典》一部中含梔子中成药的不良反应回顾性分析[J]. 中成药, 2022, 44(07): 2391-2395.
- [4]田磊, 栗俞程, 白明, 等. 梔子及其方剂配伍治疗抑郁症研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(14): 239-247.
- [5]乐益, 乐璐潇, 佟鑫萍. 梔子厚朴汤治疗老年 COPD 合并睡眠障碍的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(08): 154-157.
- [6]张灏, 许鹤龄, 吕红, 等. 甘麦大枣汤联合梔子豉汤治疗更年期女性慢性咳嗽[J]. 吉林中医药, 2021, 41(10): 1319-1321.
- [7]官川博, 张毅宏, 刘德强, 等. 茵陈肝复颗粒联合阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎肝硬化的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(07): 1350-1354.
- [8]QIN S, TIAN J, ZHAO Y, et al. *Gardenia* extract protects against intrahepatic cholestasis by regulating bile acid enterohepatic circulation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 1): 117083.
- [9]WANG L, WU G, WU F, et al. Geniposide attenuates ANIT-induced cholestasis through regulation of transporters and enzymes involved in bile acids homeostasis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 196: 178-185.
- [10]TAN Z, LIU A, LUO M, et al. Geniposide Inhibits Alpha-Naphthylisothiocyanate-Induced Intrahepatic Cholestasis: The Downregulation of STAT3 and NF[Formula: see text]B Signaling Plays an Important Role [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(4): 721-736.
- [11]FANG S, WANG T, LI Y, et al. *Gardenia jasminoides* Ellis polysaccharide ameliorates cholestatic liver injury by alleviating gut microbiota dysbiosis and inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 205: 23-36.
- [12]SONG M, CHEN Z, QIU R, et al. Inhibition of NLRP3-mediated crosstalk between hepatocytes and liver macrophages by geniposidic acid alleviates cholestatic liver inflammatory injury [J]. *Redox Biol*, 2022, 55: 102404.
- [13]MA T T, LI X F, LI W X, et al. Geniposide alleviates inflammation by suppressing MeCP2 in

- mice with carbon tetrachloride-induced acute liver injury and LPS-treated THP-1 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 739-747.
- [14]LIN J K, WANG C J. Protection of crocin dyes on the acute hepatic damage induced by aflatoxin B1 and dimethylnitrosamine in rats [J]. *Carcinogenesis*, 1986, 7(4): 595-599.
- [15]WANG J, MIAO M, QU L, et al. Protective effects of geniposide against Tripterygium glycosides (TG)-induced liver injury and its mechanisms [J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(1): 165-173.
- [16]YANG S, KUANG G, JIANG R, et al. Geniposide protected hepatocytes from acetaminophen hepatotoxicity by down-regulating CYP 2E1 expression and inhibiting TLR 4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105625.
- [17]陈阳, 张浩, 王文君, et al. 栀子黄多酚含量与抗氧化活性的相关性研究 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(10): 125-128.
- [18]XIN X, JIN Y, WANG X, et al. A Combination of Geniposide and Chlorogenic Acid Combination Ameliorates Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice by Inhibiting Kupffer Cell Activation [J]. *Biomed Res Int*, 2021: 6615881.
- [19]SHEN B, FENG H, CHENG J, et al. Geniposide alleviates non-alcohol fatty liver disease via regulating Nrf2/AMPK/mTOR signalling pathways [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(9): 5097-5108.
- [20]MA T, HUANG C, ZONG G, et al. Hepatoprotective effects of geniposide in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(4): 587-593.
- [21]WANG J, ZHANG Y, LIU R, et al. Geniposide protects against acute alcohol-induced liver injury in mice via up-regulating the expression of the main antioxidant enzymes [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015, 93(4): 261-267.
- [22]WEI J, MAN Q, DING C, et al. Proteomic Investigations of Transcription Factors Critical in Geniposide-Mediated Suppression of Alcoholic Steatosis and in Overdose-Induced Hepatotoxicity on Liver in Rats [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(11): 3821-3830.
- [23]兰天, 曾志, 陈颖华. 栀子苷改善 CCl₄ 引起的小鼠肝纤维化损伤的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(16): 1752-1755.
- [24]付南燕, 周林华, 徐娟. 栀子苷对肝纤维化大鼠 TGF- β 1、TIMP-1 表达的影响[J]. *宜春学院学报*, 2018, 40(03): 42-46+72.
- [25]钱正月, 李俊, 黄成, 等. 栀子柏皮汤不同配伍对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的治疗作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(01): 68-72.
- [26]周林华, 陈晓. 栀子苷通过 TGF- β 1/Smad 信号通路抑制肝纤维化和肝星状细胞活化[J]. *生理学报*, 2022, 74(02): 217-224.
- [27]QIN T, HASNAT M, WANG Z, et al. Geniposide alleviated bile acid-associated NLRP3 inflammasome activation by regulating SIRT1/FXR signaling in bile duct ligation-induced liver fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154971.
- [28]ALGANDABY M M. Antifibrotic effects of crocin on thioacetamide-induced liver fibrosis in mice [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(4): 747-754.
- [29]YAMAMOTO M, MIURA N, OHTAKE N, et al. Genipin, a metabolite derived from the herbal medicine Inchin-ko-to, and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2000, 118(2): 380-389.
- [30]KIM S J, KIM J K, LEE D U, et al. Genipin protects lipopolysaccharide-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 635(1-3):

- 188-193.
- [31]SEO M J, HONG J M, KIM S J, et al. Genipin protects d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury through suppression of the necroptosis-mediated inflammasome signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 812: 128-137.
- [32]石若夫, 李大力, 田春宇, 等. 栀子多糖的抗肿瘤活性研究[J]. *林产化学与工业*, 2002, 22(04): 67-70.
- [33]WANG N, ZHU M, TSAO S W, et al. Up-regulation of TIMP-1 by genipin inhibits MMP-2 activities and suppresses the metastatic potential of human hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46318.
- [34]TSENG T, CHU C, WANG C. Comparison of geniposide and its acetylated derivative for the inhibition of aflatoxin b1-induced DNA-repair synthesis in rat primary hepatocyte [J]. *Oncol Rep*, 1994, 1(1): 165-168.
- [35]YIN X, HE X, WU L, et al. Chlorogenic Acid, the Main Antioxidant in Coffee, Reduces Radiation-Induced Apoptosis and DNA Damage via NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Activation in Hepatocellular Carcinoma [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4566949.
- [36]LIN Y L, HSU J D, CHOU F P, et al. Suppressive effect of penta-acetyl geniposide on the development of gamma-glutamyl transpeptidase foci-induced by aflatoxin B(1) in rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2000, 128(2): 115-126.
- [37]任艳青, 田宇柔, 李琛, 等. 京尼平苷及其体内代谢产物京尼平对 HepG2 细胞毒性的比较及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(12): 1755-1761.
- [38]LI C, LAN M, LV J, et al. Screening of the Hepatotoxic Components in Fructus Gardeniae and Their Effects on Rat Liver BRL-3A Cells [J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3920.
- [39]李春楠. 中药栀子不良反应与肝肾毒性机制研究[D]. 江西中医药大学, 2020.
- [40]LI Y, PAN H, LI X, et al. Role of intestinal microbiota-mediated genipin dialdehyde intermediate formation in geniposide-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 377: 114624.
- [41]HAN H, YANG L, XU Y, et al. Identification of metabolites of geniposide in rat urine using ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(21): 3339-3350.
- [42]DING Y, HOU J W, ZHANG Y, et al. Metabolism of Genipin in Rat and Identification of Metabolites by Using Ultraperformance Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 957030.
- [43]YAMANO T, TSUJIMOTO Y, NODA T, et al. Hepatotoxicity of geniposide in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 1990, 28(7): 515-519.
- [44]周淑娟, 李强, 刘卫红, 等. 栀子苷对大鼠肝指数、肝功能及肝脏微粒体中 CYP3A2 的影响[J]. *中医研究*, 2010, 23(03): 20-22.
- [45]李晓静, 严东明, 冯琴, 等. 栀子苷及京尼平的动物肝毒性机制研究进展[J]. *世界中医药*, 2021, 16(17): 2652-2656.
- [46]侯健, 孙娥, 宋捷, 等. 肝脏药物代谢酶 CYP450 与中药肝毒性的关系[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(15): 2774-2780.
- [47]胡燕珍, 李德凤, 张毅, 等. 基于基因组学策略的京尼平苷肝毒性标志基因研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(19): 4234-4240.
- [48]GAO L N, ZHANG Y, CUI Y L, et al. Evaluation of genipin on human cytochrome P450

- isoenzymes and P-glycoprotein in vitro [J]. *Fitoterapia*, 2014, 98(8): 130-136.
- [49]WEI J, ZHANG F, ZHANG Y, et al. Proteomic investigation of signatures for geniposide-induced hepatotoxicity [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(12): 5724-5733.
- [50]TIAN J, ZHU J, YI Y, et al. Dose-related liver injury of Geniposide associated with the alteration in bile acid synthesis and transportation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8938.
- [51]王坤, 金若敏, 陈长勋. 栀子与黄连解毒汤肝毒性的比较研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(14): 2365-2369.
- [52]KIM B C, KIM H G, LEE S A, et al. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(9): 1398-1407.
- [53]王坤, 金若敏, 陈长勋. 茵陈蒿汤与栀子肝毒性的比较研究[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(01): 8-12.
- [54]YANG X, YAO J, LUO Y, et al. P38 MAP kinase mediates apoptosis after genipin treatment in non-small-cell lung cancer H1299 cells via a mitochondrial apoptotic cascade [J]. *J Pharmacol Sci*, 2013, 121(4): 272-281.
- [55]HE S, YI Y, HOU D, et al. Identification of hepatoprotective traditional Chinese medicines based on the structure-activity relationship, molecular network, and machine learning techniques [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 969979.
- [56]HE S, ZHANG C, ZHOU P, et al. Herb-Induced Liver Injury: Phylogenetic Relationship, Structure-Toxicity Relationship, and Herb-Ingredient Network Analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3633.
- [57]中国药典: [S]. 2020: 293.
- [58]XU L M, LIN Q X. [Hepatic toxicity of Chinese herbal medicine] [J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2007, 15(7): 534-535.
- [59]杨洪军, 付梅红, 吴子伦, 等. 栀子对大鼠肝毒性的实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(13): 1091-1093.
- [60]田婧卓, 梁爱华, 易艳, 等. 栀子及其复方栀子豉汤长期用药潜在安全风险研究及建议 [J]. *中国食品药品监管*, 2018, (10): 25-34.
- [61]王伽伯, 崔鹤蓉, 柏兆方, 等. 精准医学下的中药安全性评价策略和方法:病证毒理学[J]. *药理学学报*, 2016, 51(11): 1681-1688.
- [62]SHIN M R, LEE J A, KIM M, et al. Gardeniae Fructus Attenuates Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Mice via Both AMPK/SIRT1/NF- κ B Pathway and Nrf2 Signaling [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(11): 1837.
- [63]邢玉瑞. “有故无殒亦无殒”思想古今应用探讨[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(08): 1045-1046.
- [64]张怡光, 唐仕欢, 贾蕾, 等. 含栀子保健食品配方原料应用分析[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(22): 4470-4474.

马兜铃酸的靶向分离和多成分定量分析新方法研究进展

闵心怡, 赵奕, 赵翔宇, 饶艳敏, 陈亨业, 付海燕, 兰薇*

(中南民族大学 药学院, 湖北 武汉 430074)

[摘要] 马兜铃酸(Aristolochic acids, AAs)是一类硝基菲羧酸的总称,天然存在于马兜铃属(*Aristolochia* L.)及细辛属(*Asarum* L.)等马兜铃科植物中。研究表明 AAs 具有强烈的肾毒性、致突变和致癌等毒副作用,严重威胁人体健康。因此,对马兜铃酸类成分进行准确、高效的监控是保障中药临床用药安全的关键。本文综述了近五年马兜铃酸类成分的靶向分离和多成分同时定量检测新方法,分析比较了各种方法的优缺点,并对其发展趋势进行了展望。

[关键词] 马兜铃酸; 靶向分离; 多成分定量分析; 固相萃取; 色谱-质谱法

[基金项目] 磁性分子印迹荧光纳米复合物靶向传感阵列对新会陈皮真实性检测研究(32372429)

[第一作者] 闵心怡(2001-),女,汉族,江西南昌人,硕士,研究方向:中药分析与质量控制。

[通信作者] 兰薇,讲师,研究方向:中药分析与质量控制, E-mail:lanwei@mail.scuec.edu.cn

Research Progress on New Methods for Targeted Separation and Multi-component Quantitative Analysis of Aristolochic Acids

Min Xin-yi, Zhao Yi, Zhao Xiang-yu, Rao Yan-min, Chen Heng-ye, Fu Hai-yan,

Lan Wei*

(School of Pharmaceutical Science, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

[Abstract] Aristolochic acids (AAs) are a class of nitrophenanthrene carboxylic acids naturally occurring in plants belonging to the Aristolochiaceae family, such as *Aristolochia* L. and *Asarum* L. Studies have shown that AAs exhibit potent nephrotoxicity, mutagenicity, and carcinogenicity, posing severe threats to human health. Therefore, accurate and efficient monitoring of AAs is crucial for ensuring the safety of traditional Chinese medicine (TCM) in clinical use. This paper reviews the recent advancements in targeted separation and simultaneous multi-component quantitative detection methods for AAs, analyzes and compares the advantages and disadvantages of various methods, and provides an outlook on their future development trends.

[Key words] Aristolochic acids; Targeted isolation; Detection; Solid phase extraction; Chromatography-mass spectrometry

马兜铃酸 (Aristolochic acids, AAs) 是一类具有硝基菲羧酸结构的有机化合物, 广泛存在于马兜铃属 (*Aristolochia* L.) 及细辛属 (*Asarum* L.) 等马兜铃科植物中。这些植物在传统中医药中曾被广泛应用, 因其具有祛痰、抗菌、调节血压和抗生育等多种药理活性。然而, 自 1993 年比利时学者首次报道含 AAs 的中药与肾纤维化及上尿路移行细胞癌之间存在关联以来, AAs 的毒理学特性逐渐受到全球关注^[1]。随后的研究进一步证实了 AAs 具有强烈的肾毒性、致突变和致癌性^[2], 对人体健康构成严重威胁。因此, 对马兜铃酸进行准确、高效的监控, 不仅关乎中药的临床用药安全, 也直接影响到公众健康和国际形象。

在我国, 中药安全性和有效性一直备受重视。针对马兜铃酸毒性问题, 国家药品监督管理局采取了多项改革措施, 从加强监管、完善标准、指导临床用药到推动科学研究与技术创新等多个方面入手, 来确保含马兜铃酸成分中药材的安全使用^[3]。然而, 由于 AAs 极可能在某些中药材及其制剂中以微量或痕量存在, 且中药材成分复杂, 基质干扰严重, 使得对毒性化合物的靶向分离和多成分定量分析成为一项极具挑战性的任务。靶向分离技术需要能够高效、选择性地从复杂基质中提取 AAs, 同时保持其结构和活性不变。而多成分定量分析则要求能够同时准确测定多种 AAs 及其代谢产物, 以全面评估其毒性和风险。随着分析化学和材料科学的快速发展, 一系列新型靶向分离和多成分定量分析方法应运而生。这些方法在提高检测灵敏度、准确性和效率方面展现出巨大潜力^[4], 为深入研究 AAs 的毒性机制、制定科学合理的风险控制策略提供了有力支持。本文综述了近年来马兜铃酸类成分的靶向分离和检测新方法, 分析比较了各种方法的优缺点, 并对其发展趋势进行了展望, 旨在为进一步研究 AAs、保障中药安全提供参考。

1 AAs 靶向分离新方法

中药及其制剂中的 AAs 常以痕量存在, 且存在复杂的化学成分和基质干扰, 因此探索高效的靶向分离方法成为提高检测准确性和灵敏度的关键。近年来, 针对马兜铃酸 (AAs) 的靶向分离技术取得了显著进展, 固相萃取 (Solid-phase extraction, SPE) 是 AAs 靶向分离的主要方法, 具有回收率高、操作简单、省时省力的优点, 主要包括磁性固相萃取 (Magnetic-solid phase extraction, M-SPE)、分子印迹聚合物固相萃取 (Molecularly imprinted polymer-solid phase extraction, MIP-SPE) 以及其他新型固相萃取方法。

1.1 磁性固相萃取

M-SPE 是一种基于液-固色谱原理，以磁性材料作为吸附剂的分散固相萃取技术。磁性纳米颗粒由于比表面积大，具有非常强的萃取能力。

Liu 等^[5]通过 MSPE-HPLC 法用于在血浆中有效富集马兜铃酸 I (AAI) 和马兜铃酸 II (AAII)，合成了一种杂化磁性聚合物-多孔琼脂糖 MNs@SiO₂M@DNV-A，该方法灵敏度高，吸附容量大。Ji 等^[6]还通过 MSPE-HPLC 法对中药汤中 AAI 进行靶向分离与检测，合成了 Fe₃O₄@SiO₂-TPM@StVp 磁性微球，预处理时间小于 10 min，洗脱溶剂小于 1.5 mL，成功应用于 5 种单味中药汤和 3 种中药复方汤中 AAI 的测定。Shu 等^[7]采用腺嘌呤包覆的磁性碳纳米管实现了高效的 AAs 靶向分离，其靶向吸附原理在于腺嘌呤同时具有氨基和共轭系统，使得腺嘌呤与 AAs 存在氢键、静电和 π - π 共轭的多重作用机制。Guo 等^[8]建立了一种 MSPE 结合超高压液相色谱-串联质谱的方法，用于小鼠血清和组织中 AAI 的分析，吸附量高达 93.1 mg/g。该吸附剂合成简单，样品预处理速度快，检测方法灵敏度高，可用于复杂基质中痕量 AAI 样品的检测。

1.2 分子印迹固相萃取

分子印迹技术可利用 MIP 选择性靶向提取目标物。该方法通过模板分子与功能单体共聚合成 MIP，去除模板后形成特定尺寸的印迹空腔，用于特异性识别目标分析物。

Lu 等^[9]采用 AAI 作为模板分子通过表面分子印迹技术制备了一种 MIP。为优化 AAI 检测的前处理步骤提供了一种新思路。印迹分子为 3.11，但未能实际应用在真实样品中。Cao 等^[10]成功研发了一种以铜为结合位点、Fe₃O₄ 为核心的新型金属介导磁性分子印迹聚合物 (Cu-MIP)，其最大吸附容量高达 349.72 mg/g。这项研究不仅显著提升了 AAI 的去除效率，更重要的是，通过模拟工业规模的应用，打破了 AAI 去除技术仅限于实验室应用的局限。

Wang 等^[11]以 1,10-邻菲咯啉-4-羧酸为虚拟模板通过溶胶-凝胶法成功合成了一种虚拟分子印迹二氧化硅材料 (MIS)。该材料对 AAI 具有更高的吸附能力，并已成功应用于朱砂莲中 AAI 的靶向分离。Du 等^[12]成功研发了一种创新的比率荧光传感，采用钙钛矿量子点技术构建的分子印迹聚合物。该传感不仅展现了对

细辛中 AAS 的高灵敏检测能力，还同时能检测丁香酚。通过观察传感器所呈现出的色彩变化，用目视法对丁香酚与 AAS 的定性识别，并实现了半定量测量，这一进步极大地丰富了视觉检测手段的应用范畴。Xiong 等^[13]采用采用表面印迹法合成了一种具有热敏和磁特性的分子印迹聚合物(TMMIPs)。TMMIPs 可通过调节温度实现 AAI 可控吸附和释放，同时采用磁分离，既可显著缩短洗脱时间，减少在洗脱过程中有机溶剂的消耗。该新型的分子印迹材料进一步扩展了 AAI 在复杂样品预处理的新策略，具体过程如图 1 所示。

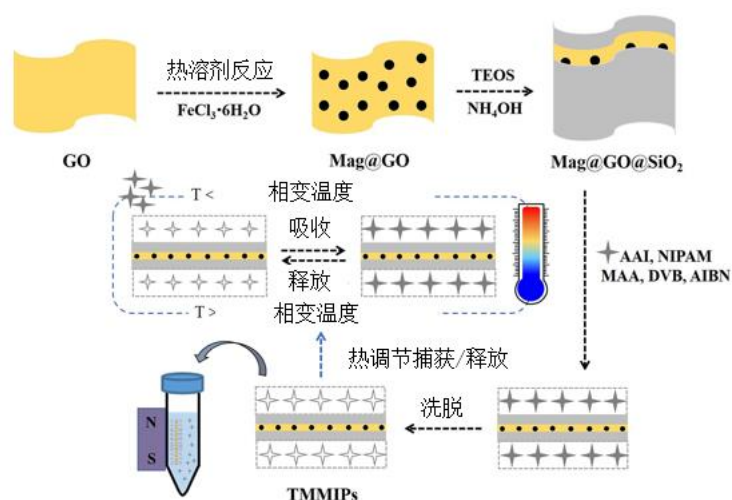


图 1 热/磁性吸附剂 (TMMIPs) 制备过程以及其温度影响机制、磁灵敏度示意图^[13]

Fig.1 Schematic diagram of preparation process of thermal/magnetic adsorbent (TMMIPs) and its temperature influencing mechanism and magnetic sensitivity^[13]

1.3 其他固相萃取

Shu 等^[14]采用壳聚糖修饰的碳微线圈 (CMCs) 对 AAI 进行靶向分离。碳微线圈 (CMCs) 与 AAs 存在 π - π 共轭作用，同时，壳聚糖中含有丰富的氨基，AAI 中含有羧基，两者通过静电作用形成络合物。结果表明，CMC@CS 具有优秀的吸附能力和选择性，可有效地排除内源性杂质的干扰，高效地从中药材中靶向分离 AAI。但是，壳聚糖在高温下易出现分解，仅适用于在 200 °C 以内对 AAs 的分析。随后 Shu 等^[15]又建立一种微固相萃取结合 HPLC 法对中药中 AAI 进行靶向分离和检测。该方法将合成三聚氰胺修饰的金属有机骨架材料制备成一种微型过滤器对 AAI 进行靶向分离，该方法已成功应用于 2 种中成药和 2 种中药材中 AAI 的检测。

Chen 等^[16]建立一种将双离子液体固定于 ZIF-67 有机金属框架材料作为固相

吸附剂对 AAI 进行靶向分离的方法。结果表明, 在 25 °C、120 min 内, ZIF-67@EIM-MIM 吸附剂的吸附量较高, 是一种理想的含 AAI 中药材的预处理材料。Zhang 等^[17]以 UiO-66-NH₂ 和 N-甲基丙烯酰胺 (NMA) 为单体通过原位聚合制备出了金属有机骨架 (MOF) 复合整体柱对中药中 AAI 进行靶向分离。该方法将整体柱串联 C18 分析柱, 可实现中药中 AAI 在线靶向分离和含量检测。Fang 等^[18]采用氯咪唑-乙基咪唑双离子液体固定于二氧化硅 (Sil@IM-BIM) 得到容量为 16.7 mg/g 的吸附剂。该吸附剂成功应用于 5 种半夏属植物和 4 种含这些天然成分的止咳药中, 提取分离得到 2.4~70.9 µg/g 马兜铃酸。

综上所述, AAs 靶向分离新方法虽然采用了不同的技术和材料, 但共同之处在于都致力于提高分离效率和准确性, 同时减少基质干扰。磁性固相萃取、分子印迹固相萃取以及其他新型固相萃取方法都通过设计具有特定功能和结构的吸附材料, 实现了对 AAs 的高效、选择性分离。然而, 这些方法也存在不同之处。磁性固相萃取主要依赖于磁性纳米颗粒的强萃取能力和易于磁分离的特点; 分子印迹固相萃取则利用分子印迹聚合物对目标分析物的高选择性和特异性识别能力; 而其他新型固相萃取方法则更加注重材料的创新和多功能性, 如壳聚糖修饰的碳微线圈、双离子液体固定的有机金属框架材料等。这些差异使得每种方法在不同应用场景下具有独特的优势和适用性, 共同推动了 AAs 靶向分离技术的发展。

表 1 固相萃取在靶向分离 AAs 的应用

Tab.1 Application of solid phase extraction in separation and enrichment of AAs

吸附材料	吸附量 (mg/g)	LOD (µg/mL)	回收率 (%)	RSD (%)	参考文献
MNs@SiO ₂ M@DNV-A	40.75	0.002	92.2~95.3	1.4~3.5	[5]
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -TPM@StVp	/	0.05	80.9~89.6	2.6~4.9	[6]
CNT/Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -A	25.61	0.05	92.7~97.5	/	[7]
MNP@COF	93.1	1.84~2.21	94.3~109.1	0.2~0.8	[8]
MIP	1.5	/	/	/	[9]
Cu-MIP	349.72	0.006	50~68	/	[10]
MIS	/	0.03	64.94~77.73	≤0.8	[11]
MISCsPbBr ₃ @MIP	/	/	90.10~97.62	1.3~2.4	[12]
TMMIPs	8.51	0.27	79.03~99.67	5.78	[13]

CMC@CS	77.72	0.1	82.9~90.1	0.8~4.5	[14]
ZIF-67@EIM-MIM	50.9	0.02	82.9~90.1	3.5~4.0	[16]
UIO-66-NH ₂ @NMA	35.4	0.1	91.1~106.5	0.9~6.1	[17]
MOF@MAA-MA	25.57	0.02	93.8~111.1	0.6~4.6	[15]
Sil@IM-BIM	16.69	/	70.0~110.6	3.5~9.1	[18]

2 AAs 的检测新方法

2.1 色谱法

2.1.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法（High performance liquid phase - fluorescence detection, HPLC）因其分离性能好、准确度和灵敏度高，成为检测中药中 AAs 的主要方法。HPLC-UV 是最常用的手段，检测波长通常为 254 nm，流动相多为水-乙腈/甲醇，并添加调节剂以优化分离效果。对于含有复杂基质的中药材或中药制剂，常采用超声提取（ultrasonic extraction, USE）、固相萃取^[5,6,8-19]、QuEChERS^[20]等提取净化方式来减少样品中非目标化合物的干扰。为了进一步提高检测灵敏度，可通过化学衍生法将无荧光的 AAI 转变为发荧光的 ALI，采用高效液相-荧光检测法（HPLC-FLD）对 AAI 进行检测。

Wang 等^[21]利用半胱氨酸中的巯基诱导脱硝反应，使不发荧光的 AAs 转化为发荧光的马兜铃次酸（Aristololic acids, ATAs）对 AAs 进行检测。Chan 等^[22]通过 Zn 粉将 AAI 转化为产生荧光 ALI，采用 HPLC-FLD 对 AAI 进行检测。另外，Yuan 等^[23]通过 Fe 粉将 AAs 转化成 ALs，利用高效液相色谱耦合荧光检测器和二极管阵列检测器（HPLC-FLD-DAD）方法实现同时测定 6 种 AAs 和 5 种 ALs。

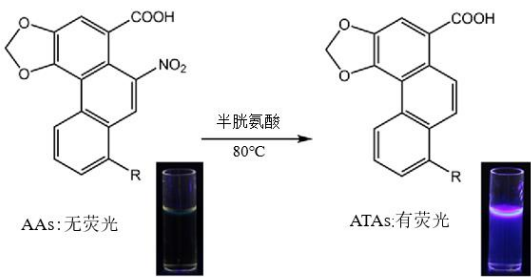


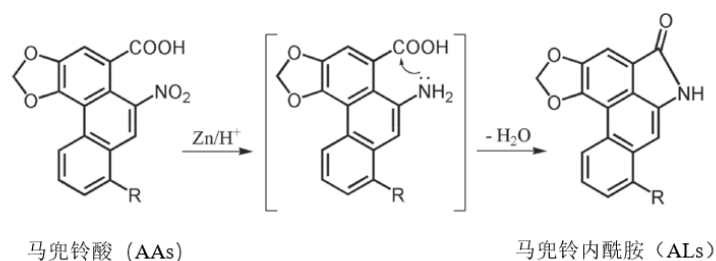
图 2 半胱氨酸诱导 AAs（AAI, R = OCH₃; AAI, R = H）转化为有荧光的 ATAs^[21]

Fig.2 Cysteine induced AAs (AAI, R = OCH₃; AAI, R = H) were converted into fluorescent ATAs^[21]

此外, Zhang 等^[24]建立了一种高效液相色谱-电化学检测法(High performance liquid chromatography - electrochemical detection, HPLC-ECD)测定木香药材中 AAI 和 AAI^{II}的方法。该方法基于 AAs 存在硝基苯基团, 所以 AAs 十分适合在还原模式下通过电化学检测器进行检测。结果表明, 在-0.8 V 的检测电位下, AAI 和 AAI^{II}在 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围呈良好线性关系。

2.1.2 色谱-质谱法

色谱-质谱联用 (High performance liquid chromatography - mass spectrometry, HPLC-MS) 技术结合了色谱的高分离效能和质谱的高选择性、高灵敏度。目前, 从马兜铃属植物提取出来的 AAs 化合物有 160 多种, 由于一些成分难以获得对照品, 采用 HPLC 法难以实现多个 AAs 化合物的准确定性与定量, 而 HPLC-MS 技术在样品 AAs 检测中具有灵敏度更高^[25], 定性能力更强的优点。因此, HPLC-MS 技术已经成功应用于中药材饮片、中成药、食品等不同样品中多种 AAs 成分的检测。



超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）实现了对复方半夏片中款冬花与细辛两类内源性毒素的测定，成功量化分析了其中 3 种吡咯里西啶生物碱成分及 5 种马兜铃酸成分的含量。

表 2 高效液相色谱及色谱-质谱联用技术在检测中药中 AAs 的应用

Tab.2 Application of HPLC and LC-MS in the detection of AAs in traditional Chinese medicine

分析方法	样品	分析物	前处理方法	线性范围 (μg/mL)	R ²	回收率 (%)	检出限 (μg/mL)	参考文献
HPLC-UV	马兜铃	AAI	SPE	0.40~10.0	0.9918	80.9~89.6	0.050	[6]
	冠心苏合丸	AAI	USE+SPE	0.500~24.0	0.9999	92.7~97.5	0.050	[7]
		AAII		0.500~20.0	0.9995	92.6~99.4	0.025	
	关木通	AAI	USE+SPE	0.100~300	0.9999	50.0~68.0	0.006	[10]
	中草药	AAI	回流提取+ 减压干燥 +SPE	0.100~200	0.9987	64.9~77.7	0.030	[11]
	细辛	AAI	USE	1.71~343	0.9940	90.1~97.62	/	[12]
	鱼腥草	AAI	回流提取+ 减压干燥 +SPE	0.0800~30.0	0.9996	79.0~99.7	26.7×10 ⁻³	[13]
	马兜铃	AAI	USE+SPE	0.500~150	0.9998	73.6~77.7	0.100	[14]
	细辛 木通 通迪胶囊 龙胆泻肝丸	AAI	Mini-SPE	0.250~40.0	0.9999	93.8~111.1	0.020	[15]
	天仙藤	AAI	SPE	1.20~132	0.9800	96.2~100	0.020	[16]
HPLC	五种中药材	AAI	SPE	0.0440~400	0.9994	91.1~106.5	0.013	[17]
	三种中成药	AAI	USE+SPE	195~4870	0.9998	85.4	58.0	[19]
HPLC-MS/MS	中成药	AAI	QuEChER	0.100~1000	0.9994	96.6~103	/	[20]
		AAII	S+D-SPE		0.9997	73.6~77.7		
HPLC-ECD	四种中药材	AAI	USE+SPE(C18)	1.00×10 ⁴ ~	0.9980	98.1~101	3.40	[21]
		AAII		5.00×10 ⁴	0.9970	98.1~101		
HPLC-DAD	北细辛	AAI	USE	0.530~26.5	0.9999	99.4	10.6	[26]
		AAII		0.376~3.76		98.0	18.8	
HPLC-MS	华细辛	9-OH	USE	0.200~2.00		100	12.0	
	汉细辛	AAI		0.468~4.68		100	15.2	
		ALI		2.04~20.4		99.6	12.2	

UPLC-Q QQ-MS/ MS	细辛	ALII	USE	4.00~100	0.9950	91.9~106		[27]
		AAI					3.00	
		AAII					5.00	
		AAIII					25.0	
		AAIV					20.0	
UPLC-M S/MS	复方半夏片	AAI	USE	510~2150	0.9999	86.8~120.5		[28]
		AAII					0.06	
		AL-I					0.09	
		AA-IV					0.3	
		A					0.4	
		AA-VII					0.5	
		a						

然而，MS 在含量低或基质影响较大样品定量检测时，其检测结果并没有比紫外检测器的灵敏度高，张朝辉等^[29]分析了影响 MS 灵敏度的原因主要有离子源、检测模式、改性剂、基质干扰、质谱参数等方面。因此，在利用 MS 对 AAs 定性定量分析时，可从以上方面考虑，探索适宜检测条件。值得注意的是，通过衍生化手段即利用 Zn/H⁺诱导的硝化还原，能将 AAs 转化为电离效率更高 ALs，从而提高了 MS 检测的灵敏度^[30-32]。Chan 等^[30]通过实验验证，当 AAs 转化 ALs 时，HPLC-MS/MS 法比 HPLC-FLD 法灵敏度更高，该方法测定 AAI 和 AAII 检测限为 0.02 ng/mL 和 0.04 ng/mL。

表 3 基于衍生化的 AAs 检测方法
Tab.3 Detection methods based on derived AAs

分析方法	样品	分析物	前处 理 方法	衍生条 件	产物	线性范围	R ²	回收率 (%)	检出限 (ng/mL)	参考 文献
HPLC-FL D	马兜铃	AAI AA-II	USE	半胱氨 酸还原	ATAs	0.096 ~ 4.80 μg/mL	0.9992	无	0.271 0.254	[21]
	马兜铃									
	天仙藤		USE	Zn/H ⁺	ALs	0.0230 ~ 1.79 μmol/L	0.9998	94.3±5.3	0.390	[22]
	关木通	AAI AAII								
HPLC-FL D-DAD	广防己		USE	Fe/H ⁺	ALs	0.0250 ~ 78.7 μmol/L	0.9999	89.7±6.9	0.520	[23]
	青木香									
	细辛		USE	Fe/H ⁺	ALs	4.00 ~ 60,000 ng/mL	0.997	94.5~99.2	0.200	[23]
	7 种中药	6 种 AAs								
	2 种中药	5 种 ALs								
	制剂									

HPLC-M S/MS	小麦粉	AAI	SPE(C	Zn/H ⁺	ALs	0.100 ~ 50.0 ng/mL	0.9996 0.9999	89.8 ± 9.9	0.0200	[30]
	玉米粉	AAII	18)					89.3 ±	0.0400	
	土壤							10.3		
						0.0850 ~ 85.0		79.0 ±		
	蔬菜	AAI	USE+	Zn/H ⁺	ALs	nmol/L	0.9991	4.0	0.0300	[32]
		AAII	SPE			0.950 ~ 95.0 nmol/L	0.9994	90.0 ± 3.0	0.400	

2.1.3 薄层色谱法

薄层色谱法常用于含 AAs 中药材、中药制剂的定性鉴别。随着薄层色谱技术的进一步发展，形成的高效薄层色谱技术所用固定相颗粒直径更小，提高了检测的分离度、灵敏度、缩短了分析时间。在定量分析上，一般采用薄层色谱扫描仪来完成，如 Poonam Agrawal 等^[33]建立了马兜铃酸的高效薄层色谱(HPTLC)分析方法。该方法采用硅胶 60F254 薄层层析板，通过正己烷:氯仿:甲醇溶剂体系进行展开。该方法灵敏度高、选择性好、耗时短和成本低，可用于含有 AAs 药材及其制剂的标准化检测和质量评价。

2.2 光谱法

2.2.1 荧光传感法

荧光传感法检测 AAs 基本原理是 AAs 与探针的相互作用可导致探针荧光发射信号的变化，其变化的程度与 AAs 的含量呈线性相关。并且这些探针还可能出现肉眼可见的颜色变化，实现 AAs 的可视化检测，具有快速、简便的优势。不过，也存在容易被干扰、特异性不足等缺点。

Liu 等^[34]设计合成了一种新型荧光接枝共轭聚合物 PPE-OB-PEG。结果表明，PPE-OB-PEG 对 AAs 具有较高的灵敏度和选择性。该方法基本原理是 PPE-OB-PEG 分子作为电子供体，AAs 作为电子受体，当两者能级相匹配时，发生光致电子转移(PET)产生荧光猝灭，其荧光变化与 AAI 浓度在 $1.00 \times 10^{-7} \sim 8.00 \times 10^{-5}$ mol/L 内呈现良好的线性关系，并且能在 30 s 内完成检测，证明了 PPE-OB-PEG 可实现对中药样品中 AAs 的快速、准确检测。Ye 等^[35]以 BDDb 席夫碱类荧光化合物为基础，合成了分子印迹比例荧光探针 (MIRF 探针)。该探针基于分子印迹作用，可对 AAI 进行特异性识别，还利用 AAI 对荧光探针有淬灭

作用, 530 nm 下的探针荧光信号变化与 AAI 浓度在 1.0 ~ 120.0 $\mu\text{mol/L}$ 呈现良好线性关系。同时, MIRF 探针荧光颜色也发生了由黄色逐渐变为绿色再变为蓝色变化, 具备现场可视化检测中药中 AAI 应用价值。Guo 等^[36]基于 click 反应设计并合成了一种以含有三唑的四羧基取代四苯乙烯化合物(TPE), 将 TPE 与 Zn(II) 离子进行溶剂热组装, 获得了具有以 TPE 为配体的多孔发光金属框架 $\text{Zn}_3[(\text{TCPTAPE})-(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_2]$ 。由于富氮三唑与含质子分析物之间的相互作用, AAI 导致了 TPE 荧光猝灭。结果表明, 该方法猝灭效率为 96%、检测限为 1.02 $\mu\text{mol/L}$, 可选择性、灵敏地检测 AAI。Song 等^[37]利用新型发光金属有机骨架 (Zn-MOF) 研制出一种可用于定量检测生物体液中痕量 AAI 的选择性纸张传感器, 是一种快速、简单、低成本检测 AAs 的分析方法。Wu 等^[38]设计一种溶菌酶修饰金纳米簇 (Lys-AuNCs) 的纸张传感器对 AAI 进行检测。该方法是基于 AAI 与溶菌酶存在相互作用, 当溶菌酶与 AAI 结合时, 将导致 Lys-AuNCs 明亮的红色荧光发生静态猝灭。结果表明, 650 nm 下 Lys-AuNCs 处荧光变化与 AAI 浓度在 0.0375~3.0 mmol/L 内呈现良好的线性关系。总的来说, 与大型仪器检测方法相比, 基于荧光分析检测平台具有简单、快捷优点, 在未来的食品、环境、药品有关 AAs 检测显示出巨大的潜力。

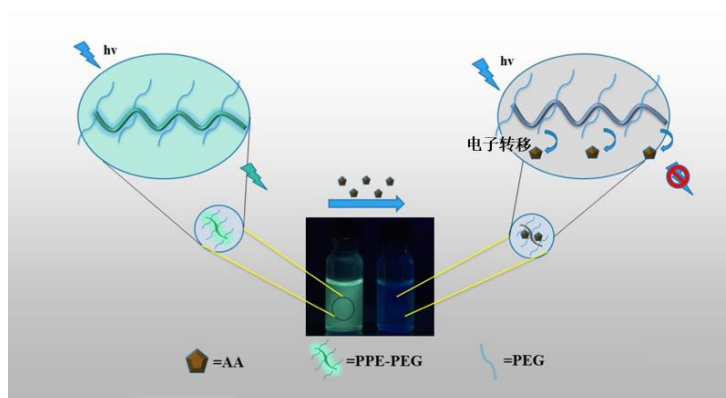


图4 新型荧光接枝共轭聚合物测定 AAs 原理图^[34]

Fig.4 Schematic diagram of novel fluorescence graft conjugated polymers for determination of AAs^[34]

2.2.2 表面增强拉曼散射光谱法

表面增强拉曼散射光谱 (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) 法主要利用待测分子在纳米尺度的粗糙表面或颗粒体系所具有的异常光学增强现象, 已

成功应用于 AAs 的检测。若用普通拉曼光谱对目标物进行检测灵敏度较差，而基底增强材料是增强拉曼信号的关键。

Gao 等^[39]成功合成了具有核壳结构的牛血清白蛋白 (BSA) 修饰的银纳米颗粒 AgNPs@BSA。该方法基于牛血清白蛋白含有大量的硫醇、胺和羧酸，BSA 与 AAI 可通过强非共价相互作用结合，同时，牛血清蛋白修饰的 AgNPs 表现出较高稳定性，有利于 SERS 对 AAs 检测。此外，Gao 等^[40]还建立了一种 SERS 与荧光光谱结合的双光谱法对 AAI 进行实时监测。结果表明，以 Ag@Au 作为基底增强材料，可以显著增强拉曼信号。同时，通过人蛋白血清和激光共聚焦实验表明 Fe^{2+} 可渗透进入细胞膜，将细胞内 AAI 转变成具有荧光特性 ALs，通过荧光光谱法对其检测。因此，该方法具备检测内源性 AAI 的潜力。而 Ouyang 等^[41]不仅利用 AAI 和 AAT 不同的 SERS 和荧光效应，还借助石墨烯辅助富集与磁检索策略，即 AAI 易被 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ 颗粒所吸附，而 AAT 由于空间位阻较大，导致吸附能力较弱。因而，富集提取后的 AAI 通过 SERS 法检测，而 AAT 通过荧光光谱法检测。结果表明，与未加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ 颗粒相比，SERS 检测灵敏度提高约 20 倍。

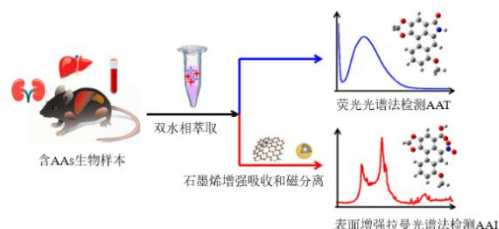


图 5 表面增强拉曼光谱法结合荧光光谱法对 AAs 的检测^[40]

Fig.5 Detection of AAs by surface - enhanced raman and fluorescence spectrometry^[40]

2.2.3 其他光谱法

化学发光 (ChemiLuminescence, CL) 是利用化学反应过程中产生一定波长的光，从而对目标化合物进行检测的方法。化学发光具有灵敏度高、不需要复杂的仪器、无散射光干扰等优点。Oraby 等^[42]基于 AuNPs 对鲁米诺-铁氰化钾体系的增强作用，采用简单、准确的顺序注射分析化学发光法对 AAI 进行检测。结果表明，鲁米诺-铁氰化钾-AuNPs-AAI 体系中测定 AAI 在 10 ~ 20000 ng/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系。同时，该方法利用天然长叶薄荷和薄荷植物提取物绿色合成 AuNPs，因此可减少化学试剂的使用，实现更绿色环保的分析过程。

近红外光谱法（Near infrared spectroscopy, NIR）技术是一种对中药中 AAs 定性和定量分析新方法，具有快速、简单、无损、成本低等优点。Chen 等^[43]运用端到端一维卷积神经网络（1D-CNN）模型结合 NIR 来区分 AAs 及其类似物。孙伟明等^[44]建立了一种 NIR 结合主成分分析法（PCA）对关木通、川木通以及含有不同浓度的 AAI 的淀粉样本进行定性、定量分析。研究结果表明，所建立的定性模型能够对关木通、川木通和含有 AAI 的淀粉样品准确判别。

2.3 免疫分析法

免疫分析法是一种利用抗原和抗体特异性反应对目标化合物进行定性和定量的方法，具有高特异性、快速、灵敏度高等优点。不足在于抗体制备困难，活性无法保证，容易产生假阳性等问题。

2.3.1 荧光免疫分析法

Ou 等^[45]通过合成 620 nm 红色发射碳点（rCDs），建立了一种抗 AAI 的荧光免疫分析法（FIA）。该方法原理是 AAs 的包被抗原与单克隆抗体（mAb）结合后，酶标二抗的辣根过氧化物酶（HRP）可催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）形成 oxTMB，由于内滤效应使得 rCDs 发生荧光淬灭。该法与化学发光免疫分析法进行比较，加入红色发射碳点的荧光免疫分析法灵敏度提高了 5 倍。

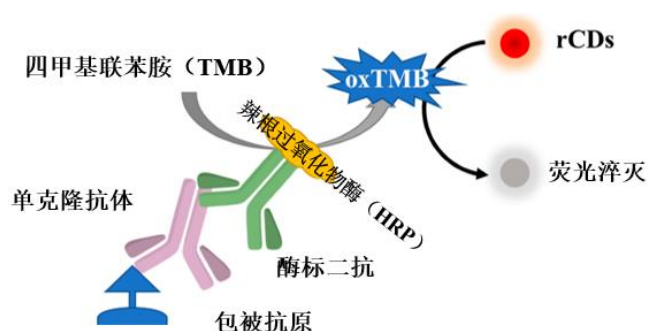


图 6 抗 AAI 荧光免疫分析法检测原理^[43]

Fig.6 Principle of anti-AAI fluorescence immunoassay^[43]

2.3.2 酶联免疫分析法

Chen 等^[46]建立了一种基于竞争模式的胶体金免疫层析试纸条（ICS）对 AAI 进行检测。该方法是基于 AAI 和检测线上包被抗原之间存在免疫竞争，当 AAI 与标记抗体结合时，导致较少的标记抗体与包被抗原结合，检测线颜色逐渐消失。结果表明，在最优条件下该方法对 AAI 的目视检出限为 6 ng/mL，灵敏度高，满

足中国中药细辛的最大检出限 10 mg/kg 要求,可用于中药材中 AAI 的快速检测。免疫层析试纸条不需要任何专门的设备,适合于中药中 AAs 快速现场检测和大量样品筛选。但是,目前只能通过试条显色进行半定量检测判断样品中 AAs 浓度是否超标。与此同时, Li 等^[47]建立了一种用于中药中 AAI 快速检测的纳米金 (GNP) 免疫层析分析法 (ICA)。结果表明,所研制的侧向流动 ICA 条目视检测限和截止限分别为 0.25 $\mu\text{g/g}$ 和 0.5 $\mu\text{g/g}$, 并且在 5 分钟内可实现可视化检测。

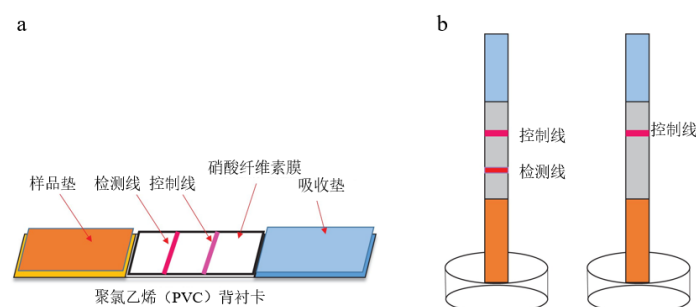


图 7 a. 横向流动 ICA 条带的组成; b. 阴性、阳性样本检测横向流 ICA 条带^[45]

Fig.7 a. Composition of the lateral-flow ICA strip ; b. Lateral-flow ICA strip detection with negative and positive sample^[45]

2.4 电化学分析法

电化学分析法是利用物质的电化学性质,测定化学电池的电位、电流或电量变化进行分析的方法。

Wang 等^[48]采用了水热法合成一种二硫化钼/多壁碳纳米管 ($\text{MoS}_2\text{@MWCNTs}$) 纳米复合材料修饰的玻璃碳电极方法,对中草药中 AAs 进行定量检测。该方法是基于 AAs 存在硝基苯结构容易被还原,通过氧化还原反应用于 AAs 的定量分析。结果表明,电化学传感器在 0.2 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AAs 浓度范围内呈现良好线性关系,检测限为 0.06 $\mu\text{mol/L}$,是一种对中药中 AAs 快速、经济的定量检测方法。随后, Wang 等^[49]又采用有序介孔碳 (OMC) 修饰玻璃碳电极 (OMC/GCE) 的电化学传感器对 AAs 进行检测。结果表明,良好的介孔结构增强了电极比表面积和电子电导率,与单独的玻璃碳电极相比,有序介孔碳修饰玻璃碳电极具有更高电化学活性,进一步扩展了电化学传感法在 AAs 检测中的应用。

3 总结与展望

随着新型材料和技术的发展, AAs 的靶向分离和多成分同时定量检测方法取得了显著进展。磁性固相萃取、分子印迹固相萃取以及其他固相萃取方法, 为 AAs 的高效分离提供了多样化选择。同时, 色谱法、光谱法、免疫分析法和电化学分析法等方法的应用, 为 AAs 的定性和定量分析提供了丰富手段。展望未来, 马兜铃酸(AAs)的靶向分离与多成分同时定量分析方法将朝着更加高效、精准、环保的方向发展。在靶向分离方面, 随着新型纳米材料和分子印迹技术的不断突破, 将开发出更多特异性高、吸附能力强、稳定性好的吸附材料, 实现对 AAs 及其代谢产物的高效、选择性分离。同时, 多模态分离技术的融合, 如将磁性固相萃取与分子印迹技术相结合, 将进一步提升分离效率和准确性。在多成分同时定量方面, 高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)将继续发挥核心作用, 特别是高分辨质谱和串联质谱技术的应用, 将实现对复杂基质中多种 AAs 及其代谢产物的同时定性和定量分析, 大大提高检测能力和效率。此外, 新兴的光谱技术如表面增强拉曼散射光谱(SERS)和荧光传感技术, 因其高灵敏度和快速响应特性, 有望成为 AAs 多成分定量分析的新工具。结合人工智能和机器学习算法, 对检测数据进行智能分析和处理, 将进一步提升分析效率和准确性。同时, 注重开发环境友好型检测材料和试剂, 减少有机溶剂的使用和废弃物的产生, 符合绿色化学的发展趋势。综上所述, 未来马兜铃酸的靶向分离与多成分同时定量分析方法将在技术创新、多学科交叉融合和绿色化学理念的指导下, 不断取得新的突破和进展, 为中药安全监管、毒理学研究和公众健康保障提供更加科学、高效的技术支持。

参考文献

- [1] 孙婉瑾,金实,姜楠,等.理气消癭片中马兜铃酸 A 的限量检查及急性毒性试验[J].湖北大学学报(自然科学版),2019,41(05):501-505.
- [2] 江振洲,王欣之,孙丽新,等.中药毒性评价的技术方法与应用[J].药学进展,2013,37(11):545-554.
- [3] 戴忠,刘静,郭日新,等.含马兜铃酸的中药现状及相关问题思考[J].中国现代中药,2024,26(08):1283-1293.
- [4] Capriotti A L , Cavaliere C , La Barbera G ,et al.Recent Applications of Magnetic Solid-phase Extraction for Sample Preparation[J].Chromatographia, 2019, 82: 1251-1274.

- [5] Liu X L, Luo Y, Fan Yu , et al. Magnetic quaternary ammonium polymer bearing porous agarose for selective extraction of Aristolochic acids in the plasma. *Journal of Chromatography A*, 2024, 1726: 464965.
- [6] Ji F Q, Jin R R, Luo C, et al. Fast determination of aristolochic acid I (AAI) in traditional Chinese medicine soup with magnetic solid-phase extraction by high performance liquid chromatography[J]. *J. Chromatogr. A*, 2020, **1609**.
- [7] Shu H, Chen G N, Wang L, et al. Adenine-coated magnetic multiwalled carbon nanotubes for the selective extraction of aristolochic acids based on multiple interactions[J]. *J. Chromatogr. A*, 2020, **1627**.
- [8] Guo W J, Shi Z S, Zhang J, et al. Analysis of aristolochic acid I in mouse serum and tissues by using magnetic solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS[J]. *Talanta*, 2021, **235**.
- [9] 陆雅婷,苏志恒,梁永红.马兜铃酸I磁性分子印迹聚合物的制备[J].广西医科大学学报,2021,38(01):183-188..
- [10] Cao Y, Shi H, Lan Z, et al. Efficient Separation of Aristolochic Acid I from Caulis Aristolochiae Manshuriensis (Guan-Mu-Tong) with Copper Mediated Magnetic Molecularly Imprinted Polymer[J]. *SSRN Electronic Journal*, 2023, 35.
- [11] Wang L, Zhang C, Chen Y, et al. Dummy molecularly imprinted silica materials for effective removal of aristolochic acid I from kaempfer dutchmanspipe root extract[J]. *Microchem. J.*, 2020, **152**.
- [12] Du Z C , Yu L L, Zeng C Y, et al. Dual-template molecularly imprinted double emission proportional fluorescence sensor based on CsPbBr₃ and CsPb(Br/I)₃ perovskite quantum dots for visual, selective and sensitive detection of methyl eugenol and aristolochic acid A. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2024, 417: 136189.
- [13] Xiong H, Fan Y, Mao X, et al. Thermosensitive and magnetic molecularly imprinted polymers for selective recognition and extraction of aristolochic acid I[J]. *Food Chem.*, 2022, **372**: 131250.
- [14] Shu H, Ge Y H, Xu X Y, et al. Hybrid-type carbon microcoil-chitosan composite for selective extraction of aristolochic acid I from Aristolochiaceae medicinal plants[J]. *J. Chromatogr. A*, 2018, **1561**: 13-19.
- [15] Shu H, Chen G N, Wang L, et al. Metal-organic framework grafted with melamine for the selective recognition and miniaturized solid phase extraction of aristolochic acid I from traditional Chinese medicine[J]. *J. Chromatogr. A*, 2021, **1647**, 462155.
- [16] Chen P, Li X, Yan X, et al. Solid-Phase Extraction of Aristolochic Acid I from Natural Plant Using Dual Ionic Liquid-Immobilized ZIF-67 as Sorbent[J]. *Separations*, 2021, **8(2)**, 22.
- [17] Zhang M M, Liu H Y, Han Y M, et al. On-line enrichment and determination of aristolochic acid in medicinal plants using a MOF-based composite monolith as adsorbent[J]. *J. Chromatogr. B*, 2020, **1159**.
- [18] Fang L W, Tian M L, Yan X M, et al. Dual ionic liquid-immobilized silicas for multi-phase extraction of aristolochic acid from plants and herbal medicines[J]. *J. Chromatogr. A*, 2019, **1592**: 31-37.
- [19] 曾蒲军, 黄晓燕, 李靖云. HPLC 法测定七十味松石丸中马兜铃酸I的含量 [J]. 海峡药学,2021, **33(09)**: 31-33.
- [20] Zhang J H, Wang Y A, Sun J, et al. QuEChERS pretreatment combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of

- aristolochic acids I and II in Chinese herbal patent medicines[J]. *Rsc Advances*, 2020, **10**(42): 25319-25324.
- [21] Wang Y, Chan W. Determination of aristolochic acids by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**(25): 5859-64.
- [22] Chan W, Lee K C, Liu N, et al. A sensitivity enhanced high-performance liquid chromatography fluorescence method for the detection of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acid in herbal medicines[J]. *J. Chromatogr. A*, 2007, **1164**(1-2): 113-9.
- [23] Yuan J, Liu Q, Zhu W, et al. Simultaneous analysis of six aristolochic acids and five aristolactams in herbal plants and their preparations by high-performance liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection[J]. *J. Chromatogr. A*, 2008, **1182**(1): 85-92.
- [24] Zhang J. Detection Aristolochic Acids 1 and 2 in Costustoot via Electrochemical Method and Liquid Chromatography[J]. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2016: 6830-6837.
- [25] Chan C K, Pan G R, Chan W. Analysis of aristolochic acids inHouttuynia cordataby liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J. Mass Spectrom.*, 2021, **56**(4).
- [26] 张翠英, 俞捷, 刘广学, 等. 3 种马兜铃酸和 2 种马兜铃内酰胺在北细辛、华细辛及汉城细辛不同部位的分布及含量分析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, **21**(07): 1295-1305.
- [27] 欧爱芬, 黄嘉乐, 董杨静, 等. 超高效液相色谱-串联三重四极杆串联质谱法测定细辛中的 4 种马兜铃酸[J]. 现代食品科技,2022,**38**(05):296-303+80.
- [28] 张万青, 陈佩文, 刘潇潇, 等.UPLC-MS/MS 检测伤痛宁片中 5 个马兜铃酸成分[J]. 中国现代中药,2024,26(08):1319-1325.
- [29] 张朝辉, 周娜姣, 刘星, 等. 药品、环境和食品中马兜铃酸分析检测方法的研究进展[J]. 分析化学, 2021, **49**(11): 1792-1803.
- [30] Chan C K, Pavlovic N M, Chan W. Development of a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for aristolochic acids detection: Application in food and agricultural soil analyses[J]. *Food Chem.*, 2019, **289**: 673-679.
- [31] Chan C K, Chan K K J, Pavlovic N M, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of aristolochic acids in soil samples collected from Serbia: Link to Balkan endemic nephropathy[J]. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, **34**.
- [32] Au C K, Zhang J, Chan C K, et al. Determination of Aristolochic Acids in Vegetables: Nephrotoxic and Carcinogenic Environmental Pollutants Contaminating a Broad Swath of the Food Supply and Driving Incidence of Balkan Endemic Nephropathy[J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 2020, **33**(9): 2446-2454.
- [33] Agrawal P, Laddha K. Development of validated high-performance thin layer chromatography for quantification of aristolochic acid in different species of the Aristolochiaceae family[J]. *J. Food Drug Anal.*, 2017, **25**(2): 425-429.
- [34] Liu J L, Xu C L, Yang T, et al. Developed a novel sensor based on fluorescent graft conjugated polymer for the determination of aristolochic acid in traditional Chinese medicine[J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2019, **222**.
- [35] Ye J P, Cai X, Zhou Q, et al. Molecularly imprinted ratiometric fluorescent probe for visual and fluorescent determination of aristolochic acid I based on a Schiff-base fluorescent compound[J]. *Microchimica Acta*, 2020, **187**(11).

- [36] Guo C R, Ying Y M, Yu M X, et al. Nitrogen-Rich Tetraphenylethene-Based Luminescent Metal-Organic Framework for Efficient Detection of Carcinogens[J]. *Acs Omega*, 2021, **6**(3): 2177-2183.
- [37] Song L J, Liu M Y, Tian F L, et al. A Novel Luminescent Metal-Organic Framework as a Remarkable Sensor for Detecting Aristolochic Acids in Biological Fluids[J]. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2021, **2021**(17): 1695-1700.
- [38] Wu S Q, Yin K P, Sun Y, et al. Gold nanoclusters-based paper sensor for the visualized detection of nephrotoxic aristolochic acids[J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2021, **340**.
- [39] Gao Y, Xuan T, Chen F, et al. Protein-docking strategy boosting Raman detection sensitivity for aristolochic acid I[J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2020, **304**.
- [40] Gao C, Zhang Q J, Ma L P, et al. Dual-spectroscopic real-time monitoring of the reduction reaction between aristolochic acid I and Fe^{2+} and its bio-application[J]. *J. Phys. Org. Chem.*, 2021, **34**(7).
- [41] Ouyang L, Zhang Q, Ma G N, et al. New Dual-Spectroscopic Strategy for the Direct Detection of Aristolochic Acids in Blood and Tissue[J]. *Anal. Chem.*, 2019, **91**(13): 8154-8161.
- [42] Oraby H F, Alarfaj N A, El-Tohamy M F. Gold nanoparticle-enhanced luminol/ferricyanide chemiluminescence system for aristolochic acid-I detection in medicinal plants and slimming products[J]. *Green Chem Lett Rev*, 2017, **10**(3): 138-147.
- [43] Chen X Y, Chai Q Q, Lin N, et al. 1D convolutional neural network for the discrimination of aristolochic acids and their analogues based on near-infrared spectroscopy[J]. *Anal. Methods*, 2019, **11**(40): 5118-5125.
- [44] 黄婷, 赵如意, 徐文林, 等. 基于近红外光谱技术快速检测中药制剂中马兜铃酸含量的实验研究 [J]. *福建医药杂志*, 2019, **41**(02): 122-126.
- [45] Ou A F, Chen Z J, Zhang Y F, et al. Preparation of Anti-Aristolochic Acid I Monoclonal Antibody and Development of Chemiluminescent Immunoassay and Carbon Dot-Based Fluoroimmunoassay for Sensitive Detection of Aristolochic Acid I[J]. *Foods*, 2021, **10**(11).
- [46] Chen X R, Huang T, Huang Z B, et al. Development of an immunochromatographic test strip for the rapid detection of aristolochic acid A in herbal medicinal materials[J]. *Phytochem. Anal.*, 2022, **33**(3): 441-451.
- [47] Li S Z, Wu X L, Song S S, et al. Development of ic-ELISA and an immunochromatographic strip assay for the detection of aristolochic acid ROMAN NUMERAL ONE[J]. *Food Agric. Immunol.*, 2019, **30**(1): 140-149.
- [48] Wang Y, Mamat X, Li Y T, et al. Glassy Carbon Electrode Modified via Molybdenum Disulfide Decorated Multiwalled Carbon Nanotubes for Sensitive Voltammetric Detection of Aristolochic Acids[J]. *Electroanalysis*, 2019, **31**(7): 1390-1400.
- [49] Wang Y, Qiao M F, Baikeli Y, et al. Soft-templated mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode for sensitive and selective detection of aristolochic acids[J]. *J. Hazard. Mater.*, 2020, **385**.

雷公藤复方配伍减轻肝损伤的机制研究

周玲玲¹, 周学平², 朱华旭¹, 冯哲², 谢彤²

(1.南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2.南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 雷公藤是治疗风湿免疫病的常用药物,但其毒副作用明显。本研究以首届国医大师周仲瑛教授治疗类风湿关节炎的经验方---清络通痹方为载体,选择临床常见的肝毒性为切入点,从物质-代谢-毒性关联视角多维度探索雷公藤复方配伍减轻肝毒性的机制。研究结果显示:复方配伍能调节雷公藤自身代谢和内源性糖脂代谢而发挥减毒效应;通过调控核受体-代谢酶、Nrf1-线粒体、Nrf2-抗氧化和细胞器互作途径,改善脂质过氧化损伤、线粒体损伤和肝细胞过度自噬与凋亡,从而起到保护肝脏的作用;不同功效药物配伍通过细胞、分子调控网络的不同环节发挥减毒效应。研究为指导雷公藤的临床安全合理应用提供科学依据,有着重要的理论意义和实用价值。

[关键词] 配伍减毒; 雷公藤; 代谢; 肝毒性

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook.f.) 是中、西医界公认的治疗风湿免疫病常用药物, 临床疗效确切, 备受国内外学者的关注, 但临床常见肝、肾、生殖系统等毒副作用^[1-2], 尤以肝毒性为多^[3]。因此, 如何降低其毒性而不影响疗效, 是临床应用中亟待解决的难题。

中药复方的增效减毒是中医药的特色和优势, 已有的临床和实验研究均提示: 复方配伍减毒可能是实现雷公藤合理用药目的的主要途径。清络通痹方 (雷公藤复方) 是国医大师周仲瑛教授的经验方, 治疗类风湿关节炎安全有效, 团队从长期的临床应用中得到启示, 创新性提出“异类相制”配伍减毒理论, 认为有毒中药通过与不同性味、不同功效中药的合理配伍, 以调其偏性、制其毒性, 能减轻或消除毒性, 又可全面兼顾病情、增强药效^[4]。本团队以清络通痹方 (雷公藤、生地、三七、僵蚕、青风藤) 为载体, 选择临床常见的肝毒性为切入点, 从物质-代谢-毒性关联视角多维度解析雷公藤复方配伍减轻肝损伤的机制。

1 雷公藤代谢性肝损伤特点及复方配伍的减毒效应

研究分别采用大、小鼠等不同动物及 L-02、HepG2、HepaRG 等肝细胞株, 将雷公藤与清络通痹复方中不同功效药物分别配伍进行干预, 结合含药血清和主要活性组分 (雷公藤甲素、三七总皂苷、梓醇), 通过多种体内、外研究发现: 一定剂量的雷公藤或其毒性成分雷公藤甲素可引起动物肝组织和肝细胞损伤, 出现肝功能指标异常, 肝脏过氧化指标改变, 肝细胞坏死、水肿、脂肪变性和炎细胞浸润等; 糖脂代谢产物水平升高; 肝细胞亚细胞结构损伤, 线粒体膜破坏、嵴断裂、空泡变性, 内质网减少、断裂。研究也发现, 雷公藤复方或复方组分配伍均能有效改善上述异常改变, 尤以全方效果最优, 雷公藤分别配伍三七、生地效果次之^[5-7]。

团队的研究结果提示雷公藤肝毒性与代谢存在一定的关联。因此, 拟从代谢角度研究复方配伍减轻雷公藤肝毒性的机制。

2 复方配伍减轻雷公藤肝毒性的机制

肝脏是重要的代谢解毒器官, 也是糖类及脂质代谢的主要场所。毒性剂量的雷公藤可能通过改变外、内源性代谢 (药物自身代谢和肝脏糖脂代谢) 过程导致肝损伤, 复方配伍不同功效的药物可能从不同途径影响代谢过程, 从而发挥减毒效应。

2.1 复方配伍调节雷公藤自身代谢和肝脏糖脂代谢而发挥减毒效应

2.1.1 调节雷公藤自身代谢

雷公藤毒性成分主要是二萜内酯类（雷公藤甲素等），同时又是主要药效成分。团队采用指纹图谱及指标性成分含量测定方法研究了复方配伍前后雷公藤中上述化学成分的变化情况，结果发现复方配伍后无新的化合物产生，雷公藤甲素等二萜内酯类成分在水提取液中的含量均有所降低，尤以全方及配伍三七、生地较为显著。上述结果证明了复方配伍使雷公藤中毒性成分呈缓慢溶出的特征，改善了配伍前的“突释”现象，这可能是雷公藤复方配伍减毒的机制之一^[8,9]。

进一步采用清络通痹全方、雷公藤分别配伍方中各药，给予模型动物后发现，全方及各配伍组中雷公藤甲素的最高血药浓度下降，半衰期延长，作用时间也相对延长；雷公藤甲素在肝脏、肾脏中的分布均有下降趋势，代谢时间延长。上述结果证明了雷公藤通过配伍三七、生地等药，可显著降低毒性^[10]。该过程可能是由于配伍使得雷公藤甲素等毒性成分在治疗域内吸收强度减弱、作用时间相对延长，从而起到了控释和缓释调节作用。

2.1.2 调节肝脏糖脂代谢

团队的研究发现，雷公藤所致的肝损伤多伴有糖类及脂质代谢异常，如生化指标血糖、血脂异常，基因芯片检测显示糖脂代谢相关基因表达改变等^[11]。进一步由气质联用代谢组学及液质联用代谢组学平台，分析雷公藤配伍前后大鼠血浆和肝组织代谢谱的变化。结果显示复方配伍使机体的代谢谱发生了变化，全方能够纠正雷公藤引起的肝损伤，雷公藤分别配伍生地、三七的作用次之。三七和生地可能是通过纠正机体的氨基酸代谢和脂肪酸代谢发挥配伍减毒作用^[12,13]。分析代谢通路的关键代谢酶，发现雷公藤产生肝毒性主要来源于机体内脂肪酸水平的升高^[14]，复方配伍可使肝组织中升高的脂肪酸水平降低。

研究结果表明：雷公藤可同时影响机体的外、内源性代谢，复方配伍可通过调节雷公藤引起的外、内源性代谢变化而发挥减毒效应。配伍减毒效应的实现与影响雷公藤药物代谢过程和内源性代谢相关，且以调节内源性糖脂代谢为主。

2.2 复方配伍通过调节肝脏代谢酶减轻雷公藤肝毒性

肝脏代谢酶在内、外源性代谢过程中均发挥着重要的作用，其中细胞色素P450（CYP450）酶活性对I相代谢的降解反应起着决定性作用；葡萄糖醛酸转移酶（UGT）是II相代谢时最重要的一种酶，可使毒性物质解毒失活。

为了解雷公藤肝损伤过程中肝脏代谢酶的变化和复方配伍对上述变化的影

响,团队建立了 CYP450 同工酶温孵体系和超高效液相色谱-质谱联用分析方法,发现毒性剂量的雷公藤可导致肝内 CYP3A、CYP2C9、CYP2C19 酶活性的下降,全方组大鼠肝脏 CYP450 含量显著升高;酶促动力学研究表明,三七改善雷公藤抑制 CYP3A 的作用较明显,而生地改善雷公藤抑制 CYP2C19 的作用较明显^[15]。配伍三七、青风藤调节 UGT1A1 和 UGT1A6 的表达,配伍三七、僵蚕增加 UGT2B7 在内质网中的表达^[16]。

上述对大鼠肝脏 I/II 相代谢酶的分析提示,复方配伍可能通过对药物代谢酶及多种亚酶活性、表达和定位的调节,减轻雷公藤肝毒性。

2.3 复方配伍调控核受体-代谢通路减轻雷公藤肝毒性

核受体是一组转录调控因子,一类为药物代谢性核受体,如孕烷 X 受体 (PXR)、组成型雄烷受体 (CAR) 等;一类为糖脂代谢性核受体,如过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs)、肝 X 受体 (LXR)、法尼醇 X 受体 (FXR) 等。核受体在机体药物代谢、药物解毒过程及糖脂代谢调控中起着重要作用。

2.3.1 复方配伍调控核受体-代谢通路的主要靶点

团队采用基因芯片技术筛选及分析雷公藤复方配伍前后差异基因,发现其与 CYP450 酶、PPAR 等核受体、脂肪酸延长等有关。雷公藤可下调 CYP8B1、CYP2E1、CYP2C、CYP2B 等代谢酶基因的表达,清络通痹方可上调 CYP3A4、CYP2E1、CYP8B1 等代谢酶基因的表达。PCR 进一步验证,清络通痹方可逆转雷公藤导致的大鼠肝脏核受体 PXR、CAR、PPAR 转录水平的降低。

2.3.2 复方配伍调控核受体-代谢通路减轻肝细胞损伤的机制

团队分别研究了 PXR、CAR^[17,18]等核受体在雷公藤肝毒性中的角色及对外、内源性代谢的调控作用,在此基础上探索复方配伍减轻肝毒性的机制。研究发现雷公藤复方组分配伍可影响 CAR 的表达,进一步诱导 CYP3A4、CYP2C9、UGT1A6 等 I/II 相代谢酶的表达,促进雷公藤自身代谢。研究表明调控核受体-代谢网络是复方配伍减毒的重要机制之一,不同功效药物作用的靶点存在差异,复方配伍通过多靶点、多通路作用实现网络性调控效应是“异类相制”减毒的分子生物学基础。

2.4 复方配伍调节肝细胞自噬和凋亡减轻雷公藤肝毒性

雷公藤干扰代谢可诱发线粒体和内质网应激,其在细胞自噬激活和凋亡机制中起着重要作用,雷公藤极性代谢产物亦可引起肝细胞线粒体损伤、氧化应激,影响细胞自噬和凋亡。

团队研究中发现,雷公藤可降低肝细胞线粒体膜电位,升高细胞的活性氧(ROS)水平,诱导肝细胞自噬小体形成,促使自噬蛋白微管相关蛋白轻链 3(LC3)、Bcl-2 同源结构域蛋白(Becline 1)与促凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)的表达水平升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平下降,引起肝细胞过度自噬,诱导细胞凋亡/坏死^[19-22]。

研究还发现配伍的活性组分主要通过调节核转录因子 Nrf1/2 的表达,影响 Nrf1 下游线粒体转录因子 A(TFAM)和细胞色素 C(Cyt-C),降低线粒体损伤和细胞凋亡;增加 Nrf2 下游基因 NQO1 和 HO-1 转录,增强抗氧化酶的抗氧化作用,从而保护线粒体;且多种组分调控线粒体-内质网互作的信号通路的不同环节,逆转雷公藤诱导的肝细胞线粒体/内质网应激-自噬-凋亡,降低雷公藤肝毒性。可进一步从肝细胞自噬和凋亡着眼,深入探讨复方配伍减轻雷公藤毒性的关键机制。

3 结语

依据疾病的病机立法组方,合理配伍有毒中药,起到增效减毒的双重效应,与单纯的对应性配伍解毒药物有异。从辨证论治过程来看,临床在确定治法之后,依法遣药组方,通过不同功效药物的合理配伍,发挥其相辅相成、相反相制的综合作用,以符合辨证论治的要求。本研究提示,清络通痹方的减毒效应以生地、三七较明显,僵蚕次之,从该方“异类相制”配伍的内涵而言,生地、三七味甘,且三七性温,可减雷公藤之苦寒,体现为性味相制;三七活血祛瘀、僵蚕化痰散结,二者与雷公藤配伍属异效相制;诸药合用既契合类风湿关节炎肝肾阴虚、风湿痰瘀痹阻的复杂病机,全面兼顾病情、增强药效,又以性味相制、异效相制的交互相呈方式,通过物质代谢及多途径、多环节、多靶位的生物调控网络,发挥复方“异类相制”配伍减毒作用。进一步研究物质-代谢-细胞器互作在复方配伍减毒中的复杂网络关系,开展不同有毒中药配伍减毒的共性规律研究,对诠释中医整体观,指导临床组方用药以提高疗效,具有重要的理论和实际意义。

参考文献

- [1] LI XX, DU FY, LIU HX, et al. Investigation of the active components in Tripterygium wilfordii leading to its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 162:238-243.
- [2] JING XP, CHENG WW, GUO S, et al. Toxic effects of Tripterygium wilfordii Hook F on the reproductive system of adolescent male rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95:1338-1345.
- [4] 周学平, 周玲玲, 王旭. 基于“异类相制”理论探讨中药复方的配伍减毒作用[J]. 中医杂志, 2013, 54(4):271-272.
- [5] 陆艳, 谢彤, 张亚杰, 等. 基于“异类相制”理论的雷公藤复方配伍对 CYP450 酶系的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3):1050-1056.
- [6] FENG Z, ZHOU C, DONG S, et al. Catalpol and panax notoginseng saponins synergistically alleviate triptolide-induced hepatotoxicity through Nrf2/ARE pathway[J]. Toxicol In Vitro, 2019, 56:141-149.
- [7] ZHOU LL, ZHOU C, FENG Z, et al. Triptolide-induced hepatotoxicity can be alleviated when combined with Panax notoginseng saponins and Catalpol[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 214:232-239.
- [8] 刘蒙竹, 张新龙, 潘林梅, 等. 清络通痹方中雷公藤配伍减毒的化学基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7):107-112.
- [9] 孙龙, 张本永, 朱华旭, 等. 清络通痹精简方中雷公藤“异类相制”减毒机制的化学基础[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11):50-54.
- [10] ZHANG BY, ZHANG QC, LIU MZ, et al. Increased involvement of Panax notoginseng in the mechanism of decreased hepatotoxicity induced by Tripterygium wilfordii in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 185:243-254.
- [11] 耿姗, 冯哲, 袁呈晨, 等. 雷公藤复方配伍对大鼠肝脏代谢酶基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6):140-144.
- [12] 谢彤, 周学平, 林丽丽, 等. 基于“异类相制”的雷公藤复方配伍减毒代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6):1123-1129.
- [13] 谢彤, 李桓, 陆艳, 等. 基于代谢组学探讨清络通痹方配伍生地黄和三七对雷公藤肝毒性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8):3462-3467.
- [14] XIE T, ZHOU XP, WANG SC, et al. Development and application of a comprehensive lipidomic analysis to investigate Tripterygium wilfordii-induced liver injury[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408:4341-4355.
- [15] LU Y, XIE T, ZHAGN YJ, et al. Triptolide induces hepatotoxicity via inhibition of CYP450s in rat liver microsomes[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17:15.
- [16] LI M, WANG J, FU L, et al. Network pharmacology-based prediction and verification of Qingluo Tongbi Formula to reduce liver toxicity of Tripterygium wilfordii via UGT2B7 in endoplasmic reticulum, Med Sci Monit, 2020, 26:e920376.
- [17] 周玲玲, 耿姗, 陆伟, 等. 雷公藤调控核受体 CAR-代谢酶引起肝毒性的机制研究[C]. 2016 年第六届全国药物毒理学年会论文集, 2016:414-415.
- [18] FU L, ZHOU LL, GENG S, et al. Catalpol coordinately regulates phase I and II detoxification enzymes of Triptolide through CAR and NRF2 pathways to reduce Triptolide-induced hepatotoxicity[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129:110379.
- [19] Yu ZC, Feng Z, Fu L, et al. Qingluotongbi formula regulates the LXR α -ERS-SREBP-1c pathway in hepatocytes to alleviate the liver injury caused by Tripterygium wilfordii Hook. F. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 287: 114952.
- [20] Zhang LL, Li CQ, Fu L, et al. Protection of catalpol against triptolide-induced hepatotoxicity by inhibiting excessive autophagy via the PERK-ATF4-CHOP pathway. Peer J, 2022, 10:e12759. DOI 10.7717/peerj.12759.
- [21] Zhou J, Li M, Yu ZC, et al. Protective effect of Qingluotongbi formula against Tripterygium wilfordii induced liver injury in mice by improving fatty acid beta-oxidation and mitochondrial biosynthesis[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 80-88.
- [22] 刘春晖, 周玲玲, 马可迅, 等. 从自噬角度研究雷公藤甲素引起 HepG2 细胞肝毒性的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10):99-103.

栽培模式与生长年限对黄连生长发育和产量形成的影响研究

陈玉欣^{1,2}，李瑶瑶²，韩黎¹，班小泉¹，周高^{1,2}，王有为^{1*}

(1. 武汉大学药学院 中药与天然产物研究所，湖北 武汉 430071

2. 湖北工业大学生命科学与健康工程学院 制药工程系 发酵工程教育部重点实验室 工业发酵省部共建协同创新中心，湖北 武汉 430068)

[摘要] 本研究在有黄连种植产区的湖北利川，进行六个月的定点取样。通过比较三种常用栽培模式下种植的三种生长年限黄连的株高、分蘖数、鲜重、土壤含水量、叶绿素含量及根系活力，研究栽培模式对不同生长年限黄连生长发育和产量形成的影响效应，初步确定促进黄连产量形成的生长年限和栽培模式。结果表明，三种栽培模式中，4年生和5年生的黄连在混交林和杉树下生长比简易棚下的各项生长指标更好，其中混交林下的黄连生长发育优势更明显。然而，与简易棚下比较，混交林下种植的3年生黄连植株鲜重和分蘖数种植降幅明显。另外随着生长年限增加，黄连的生长发育有所减缓。因此，建议在混交林中栽培黄连，在生长至第3年时搭建简易棚增加遮荫度，栽培第四年除去简易棚，并长足5年后收获。

[关键词] 黄连；栽培模式；生长年限；叶绿素含量；根系活力

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82104536)；湖北省自然科学基金青年基金项目(2020CFB197)；湖北工业大学博士启动基金项目(BSQD2020034)；2022年省级大学生创新创业训练计划项目(S202210500070)

[第一作者] 陈玉欣(1986—)，女，讲师，主要从事民族药药理学及药代动力学研究。E-mail:

yuxinc@hbut.edu.cn

[通信作者] 王有为(1956—)，男，教授，主要从事中药资源及中药药理学研究。E-mail: wyw@whu.edu.cn

Study on the influences of cultivation mode and growth age on the growth and yield formation of *Coptis chinensis*

[Abstract] In this study, six-month sentinel sampling was conducted in Lichuan, Hubei Province, which has production area for *Coptis chinensis* cultivation. The plant height, tiller number, fresh weight, soil water content, chlorophyll content and root activity of *Coptis chinensis* for three growth period planted under three common cultivation modes were compared to study the effects of cultivation modes on the growth, development and yield formation of *Coptis chinensis* for different growing years. The growth period and cultivation patterns promoting the yield formation of *Coptis* *coptis* were preliminarily determined. The results showed that among the three cultivation modes, the 4 years and 5 years *Coptis chinensis* grew better under mixed forest and Chinese fir tree than under simple shed, and the advantage of *Coptis chinensis* growth under mixed forest was more obvious. However, the fresh weight and tiller number of 3-year *Coptis chinensis* planted under mixed forest decreased significantly compared with that under simple shed. In addition, with the increase of growth period, the growth and development of *Coptis* *coptis* slowed down. Therefore, it is recommended to cultivate *Coptis chinensis* in mixed forests, build a simple shed to increase shade in the third year of growth, remove the simple shed in the fourth year of cultivation, and harvest five years later.

[Key words] *Coptis chinensis*; cultivation mode; growth period; chlorophyll content; root activity.

0 引言

黄连 *Coptis chinensis*, 毛茛科黄连属多年生草本植物, 产自四川、湖北、山东、安徽、浙江、江西等地^{[1][2]}。干燥的黄连根茎可作中医治疗药材, 炮制品种包括黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C.Y.Cheng et Hsiao 和云连 *Coptis teeta* Wall., 分别习称为“味连”、“雅连”、“云连”, 其性寒, 味苦, 归心、脾、胃、肝、胆、大肠经, 具有清热燥湿, 泻火解毒等功效^[3]。现代药理学研究表明, 黄连具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗动脉粥样硬化、抗心肌缺血/再灌注损伤、抗糖尿病、抗心律失常和抗肿瘤作用^[4]。

黄连作为传统中药材, 应用广泛。宋代以前的方书中总记载 3.2 万多方剂, 含黄连的方剂约占 5%左右^[5]。随着中药材产业迅速发展以及其活性的逐步开发, 黄连的需求量不断上升, 野生资源不足以满足大众需求; 且野生黄连对生长环境要求严格, 各品种野生产量锐减, 甚至濒临灭绝, 目前流通于市场的多为上述三种黄连的栽培品, 占比最大的为味连^[6]。因此加快提高黄连栽培品产量, 确定具有科学依据的栽培技术对黄连的产量提升具有重要意义。

作为现存商品品种产量最大的味连, 大多产自重庆石柱、湖北利川和四川彭州等地, 其中利川又以建南镇为核心产区^[7]。因此本研究以建南镇为中心, 对各栽培模式和生长年限的黄连进行随机取样, 通过对黄连各项生长指标的测定, 获得提升黄连生长发育的栽培方式, 为黄连栽培技术的改善提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

752N 紫外可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); SE402F 电子天平 (上海奥豪斯仪器有限公司); DPX 电热恒温培养箱 (上海福玛实验设备有限公司); 游标卡尺; 打孔器; 研钵。

1.2 药物与试剂

95% 乙醇、2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC)、琥珀酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙酸乙酯、硫酸 (国药集团化学试剂有限公司); 次硫酸钠 (上海麦克林生化科技股份有限公司)。

1.3 采样地概况

本试验于 2010 年 6~12 月在湖北省利川市所属建南镇周边箭竹溪乡黄连栽培基地随机取样, 具体地点见表 1。

表 1 采样地信息
Table 1 Information of sampling points

栽培模式	生长年限	采样点编号	纬度	经度	海拔
简易棚下栽连	3 年	1	30°22'41.7"	108°38'33"	1391
		2	30°22'31.3"	108°35'15.2"	1376
		3	30°22'16.4"	108°34'36.9"	1365
	4 年	2	30°22'34.9"	108°35'14.1"	1383
		3	30°22'15.3"	108°34'36"	1351
		4	30°21'49.4"	108°34'53.6"	1367
	5 年	2	30°22'33.2"	108°35'14.1"	1384
		3	30°22'15.6"	108°34'35.1"	1347
		4	30°21'49.5"	108°34'52.9"	1364
	3 年	1	30°22'36.8"	108°34'33.2"	1397
		5	30°23'39.2"	108°33'43.4"	1473
		6	30°23'00.7"	108°36'34.4"	1433
杉树下栽连	4 年	1	30°22'41.1"	108°34'23.5"	1399
		5	30°23'38.5"	108°33'44.2"	1441
		6	30°23'00.7"	108°36'34.4"	1433
	5 年	1	30°22'37.5"	108°34'33.5"	1393
		5	30°23'38.9"	108°33'44.5"	1462
		6	30°23'00.3"	108°36'34.8"	1414
	3 年	1	30°22'47.6"	108°34'32.5"	1407
		5	30°23'37.8"	108°33'44.5"	1462
		7	30°22'19.1"	108°34'54.5"	1367
	4 年	1	30°22'47"	108°34'31.3"	1402
		5	30°23'38.9"	108°33'46.2"	1442
		7	30°22'19"	108°34'55.1"	1347
混交林下栽连	5 年	1	30°22'45.9"	108°34'32.1"	1400
		5	30°23'39.6"	108°33'47.9"	1439

1.4 方法

1.4.1 黄连生长指标测定

6-12 月,按照表 1 所述指定采样点,对三种栽培模式下三种生长年限的黄连随机取样 10 株完整植株,统计其株高,求其平均值。抽取其中 8 株计分蘖数,计算平均值。每组样品抽取 3 株,称量鲜重获取平均值。同时随机挖取每个采样点区域的土壤 3 盒,80 °C 烘干至恒重,根据以下公式测定其含水量。

$$\text{土壤含水量 } W = (W_a - W_b) \div W_c \times 100\%$$

式中 W_a 为鲜土和盒子重量; W_b 为烘干土重和盒子重量; W_c 为原土重。

1.4.2 黄连叶绿素含量测定

随机取各组新鲜黄连植株的叶片,避开叶脉打孔称重,每组三份。分别加入适量 95 %乙醇,充分研磨后过滤。滤液在容量瓶中定容至 25 mL。紫外分光光度计分别在波长 645、663 nm 处测定其吸光度, 95 %乙醇作为空白对照。根据以下公式计算出所测叶片叶绿素含量。

$$C_a = 12.72A_{663} - 2.59A_{645}$$

$$C_b = 22.88A_{645} - 4.67A_{663}$$

$$\text{叶绿体含量 (mg} \cdot \text{g}^{-1}) = C \times V \times 10 / W \times 1000$$

式中: A_{645} 、 A_{663} 为提取液于 645 nm、633 nm 处所测吸光度;

C (叶绿素浓度) = $C_a + C_b$;

V 为提取液体积, 25 mL;

W 为叶片重量, 0.40 g。

1.5 根系活力的测定

使用 TTC 法^[8], 获得标准曲线: $y=0.0026X-0.0007$ 。每组中抽取 3 株黄连, 称取根尖 0.30 g, 按方法处理, 即可求出四氮唑还原强度 C 。

$$\text{四氮唑还原强度}[\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = C \div (M \times t)$$

其中 C 为四氮唑还原量; M 为根重, 即 0.30 g; h 为反应时间。

2 结果

2.1 三种栽培模式对三种生长年限黄连株高的影响

由图 1 可看出随着月份的增长, 于简易棚下栽培的三种生长年限的黄连均有株高减小的趋势; 杉树下, 3 年和 5 年生黄连株高有下降趋势, 4 年生黄连株高

变化不明显；在混交林栽培模式中，三种生长年限株高的变化没有明显规律。通过计算平均值，发现在简易棚下的黄连株高：4 年生（14.14 cm）>5 年生（12.89 cm）>3 年生（12.07 cm）；杉树下的黄连株高：5 年生（17.13 cm）>3 年生（15.53 cm）>4 年生（12.98 cm）；混交林下的黄连株高：3 年生（17.48 cm）>4 年生（14.43 cm）>5 年生（14.19 cm）。

综上，4 年生黄连株高在三种栽培模式中差异不明显，推测 4 年生的黄连处于地下部分旺盛生长阶段。三种生长年限的黄连，均存在简易棚下的植株生长慢于其他两种栽培模式的现象，可能与不同栽培方式的遮荫度有关。

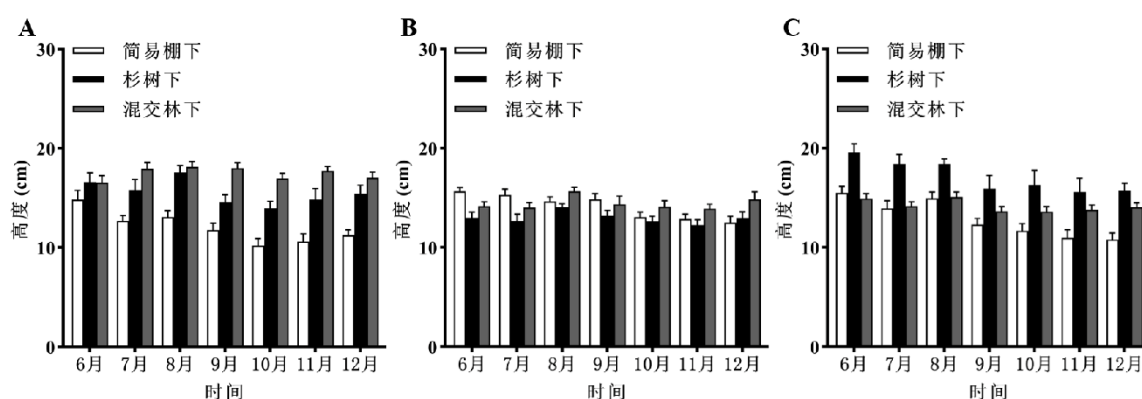


图 1 三种栽培模式对三种生长年限黄连株高的影响。（A）三年生黄连；（B）四年生黄连；（C）五年生黄连。

Fig. 1 Effects of three cultivation modes on the plant height of *Coptis chinensis* in three growth years. (A) Three years of birth of *Coptis chinensis*; (B) Four years of birth of *Coptis chinensis*; (C) Five years of birth of *Coptis chinensis*.

2.2 三种栽培模式对三种生长年限黄连分蘖数的影响

对每种栽培模式分蘖数平均值的计算，简易棚下黄连：5 年生（10 个）>4 年生（9 个）>3 年生（8 个）；杉树下黄连：5 年生（11 个）>4 年生（9 个）>3 年生（6 个）；混交林下黄连：4 年生（10 个）>5 年生（9 个）>3 年生（5 个）。

根据图 2 以及对三种生长年限黄连每种栽培模式分蘖数平均值的计算，3 年生黄连分蘖数：简易棚>杉树下>混交林；4 年生黄连分蘖数：混交林>杉树下=简易棚；5 年生黄连分蘖数：杉树下>简易棚>混交林。

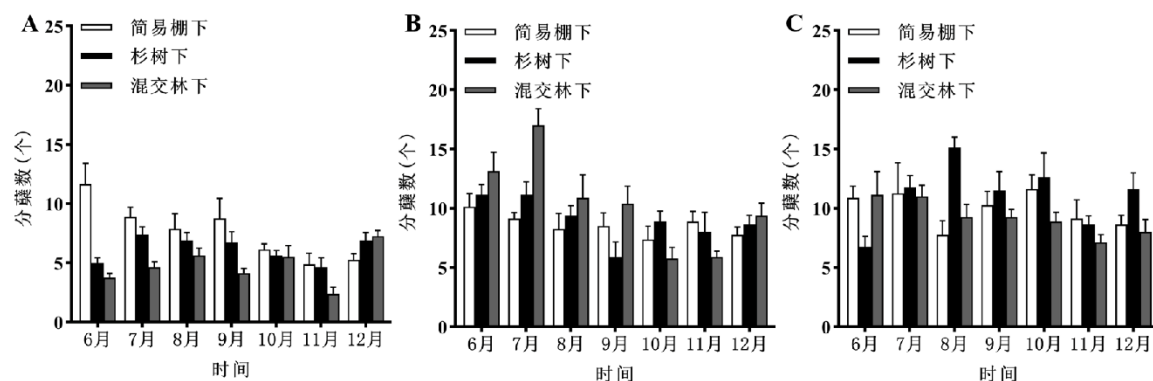


图 2 三种栽培模式对三种生长年限黄连分蘖数的影响。(A) 三年生黄连；(B) 四年生黄连；(C) 五年生黄连。

Fig. 2 Effects of three cultivation modes on the tillering number of *Coptis chinensis* in three growth years. (A) Three years of birth of *Coptis chinensis*; (B) Four years of birth of *Coptis chinensis*; (C) Five years of birth of *Coptis chinensis*.

2.3 三种栽培模式对三种生长年限黄连鲜重的影响

由图 3 以及对每种栽培模式的三种生长年限黄连植株鲜重平均值计算，简易棚下黄连鲜重：5 年生 > 4 年生 > 3 年生；杉树下黄连鲜重：5 年生 > 4 年生 > 3 年生；混交林下黄连鲜重：4 年生 > 5 年生 > 3 年生。

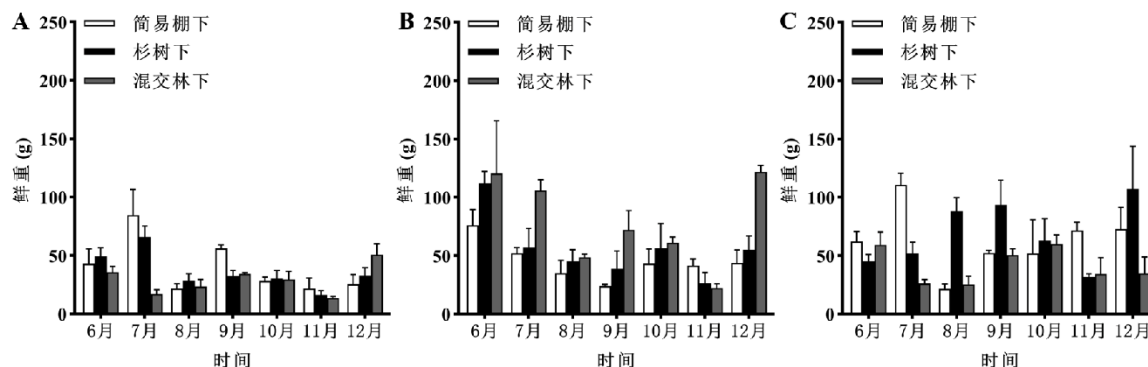


图 3 三种栽培模式对三种生长年限黄连鲜重的影响。(A) 三年生黄连；(B) 四年生黄连；(C) 五年生黄连。

Fig. 3 Effects of three cultivation modes on the biomass of *Coptis chinensis* in three growth years. (A) Three years of birth of *Coptis chinensis*; (B) Four years of birth of *Coptis chinensis*; (C) Five years of birth of *Coptis chinensis*.

3 年生黄连平均鲜重：简易棚(40.20 g) > 杉树下(36.49 g) > 混交林(29.13 g)；
4 年生黄连平均鲜重：混交林(78.93 g) > 杉树下(55.81 g) > 简易棚(45.10 g)；
5 年生黄连平均鲜重：杉树下(68.69 g) > 简易棚(63.36 g) > 混交林(41.46 g)。

2.4 三种栽培模式对三种生长年限黄连土壤含水量的影响

对每种栽培模式的三种生长年限黄连土壤含水量的平均值计算, 简易棚下黄连土壤含水量: 5 年生 > 3 年生 > 4 年生; 杉树下黄连土壤含水量: 5 年生 > 3 年生 > 4 年生; 混交林黄连土壤含水量: 4 年生 > 5 年生 > 3 年生。

由图 4 以及对三种生长年限黄连每种栽培模式的土壤含水量平均计算, 3 年生的黄连土壤含水量: 混交林 > 简易棚 > 杉树下, 混交林土壤含水量平均值为 20.68 %; 4 年生黄连土壤含水量: 混交林 > 杉树下 > 简易棚, 混交林土壤含水量平均值为 23.13 %; 5 年生黄连土壤含水量: 混交林 > 杉树下 > 简易棚, 混交林土壤含水量平均值为 21.33 %。

整体来说, 5 年生黄连生长环境中土壤含水量更丰富, 混交林下种植可以充分提供黄连生长过程中所需的水分。

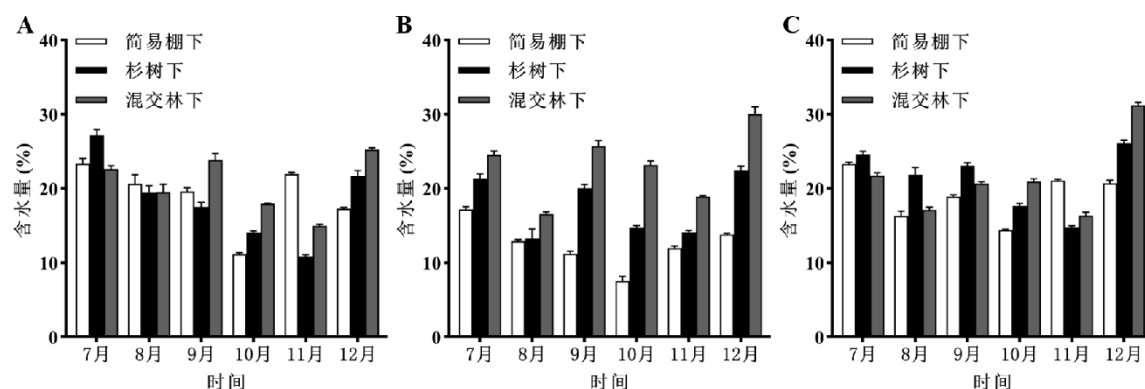


图 4 三种栽培模式对三种生长年限黄连土壤含水量的影响。(A) 三年生黄连; (B) 四年生黄连; (C) 五年生黄连。

Fig. 4 Effects of three cultivation modes on the soil water content of *Coptis chinensis* in three growth years. (A) Three years of birth of *Coptis chinensis*; (B) Four years of birth of *Coptis chinensis*; (C) Five years of birth of *Coptis chinensis*.

2.5 三种栽培模式和三种生长年限对黄连叶绿素含量的影响

对每种栽培模式的三种生长年限黄连叶绿素含量的平均值计算, 简易棚黄连叶绿素含量: 5 年生 > 3 年生 > 4 年生; 杉树下黄连叶绿素含量: 4 年生 > 5 年生 > 3 年生; 混交林下黄连叶绿素含量: 3 年生 > 4 年生 > 5 年生。

由图 5 以及对三种生长年限黄连每种栽培模式叶绿素含量平均值计算, 3 年生黄连叶绿素含量: 混交林 > 杉树下 > 简易棚, 混交林下黄连叶绿素含量为 $1.952 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 4 年生黄连叶绿素含量: 杉树下 > 混交林 > 简易棚, 杉树下黄连叶绿素含量为 $1.864 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 5 年生黄连叶绿素含量: 杉树下 > 混交林 > 简易棚, 杉树下黄连叶绿素含量为 $1.780 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

在简易棚下种植的黄连叶绿素含量明显低于其他两种栽培模式,且 3 年生黄连在混交林下可更高效的合成叶绿素。

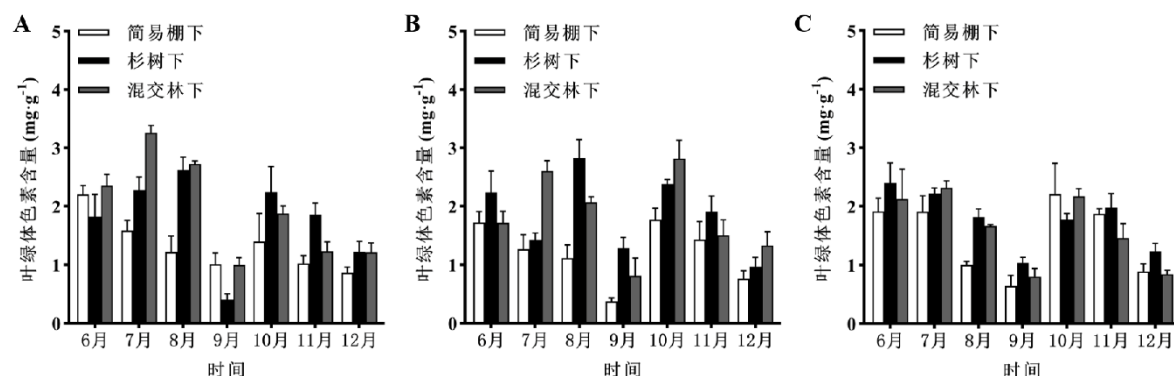


图 5 三种栽培模式对三种生长年限黄连叶绿素含量的影响。(A) 三年生黄连; (B) 四年生黄连; (C) 五年生黄连。

Fig. 5 Effects of three cultivation modes on the chlorophyll content of *Coptis chinensis* in three growth years. (A) Three years of birth of *Coptis chinensis*; (B) Four years of birth of *Coptis chinensis*; (C) Five years of birth of *Coptis chinensis*.

2.6 三种栽培模式和三种生长年限对黄连根系活力的影响

根据图 6, 随着月份的增长, 三种栽培模式的三种生长年限的黄连根系活力均在 8 月份后有增大的趋势, 并在 12 月份达到最大值。对每种栽培模式的三种生长年限黄连根系活力的平均值计算, 简易棚下黄连根系活力: 4 年生 > 3 年生 > 5 年生; 杉树下黄连根系活力: 4 年生 > 3 年生 > 5 年生; 混交林下黄连根系活力: 3 年生 > 4 年生 > 5 年生。

对三种生长年限黄连每种栽培模式根系活力平均值的计算, 3 年生黄连根系活力: 混交林 > 简易棚 > 杉树下, 混交林下黄连根系活力为 $0.435 \text{ (mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$; 4 年生黄连根系活力: 混交林 > 杉树下 > 简易棚, 混交林下黄连根系活力为 $0.327 \text{ (mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$; 5 年生黄连根系活力: 杉树下 > 混交林 > 简易棚, 杉树下黄连根系活力为 $0.250 \text{ (mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ 。

由此可知, 3 年生和 4 年生黄连植株根系活力优于 5 年生黄连, 三种生长年限的黄连在混交林下根系可得到更好的发育。

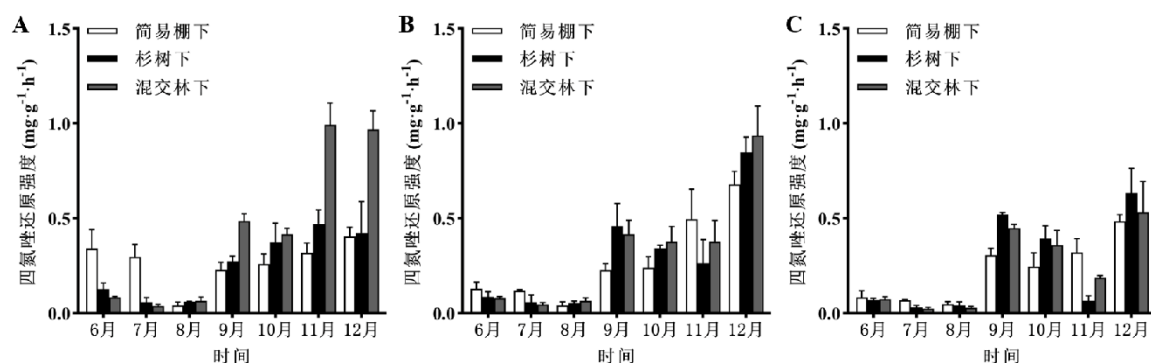


图 6 三种栽培模式对三种生长年限黄连根系活力的影响。(A) 三年生黄连；(B) 四年生黄连；(C) 五年生黄连。

Fig. 6 Effects of three cultivation modes on the root viability of *Coptis chinensis* in three growth years. (A) Three years of birth of *Coptis chinensis*; (B) Four years of birth of *Coptis chinensis*; (C) Five years of birth of *Coptis chinensis*.

3 讨论

3.1 三种栽培模式对黄连生长发育和产量形成的影响

栽培模式是影响黄连生长发育的重要因子之一，其主要通过控制荫蔽度和土壤水分调节其生长指标。黄连喜阴，尤其是幼苗时期要减少阳光直射，且因其叶面积大，需要充足的水分生长^[9]。本研究通过比较三种栽培模式对黄连株高、鲜重、分蘖数和土壤含水量的影响发现，杉树下和混交林中栽培的黄连总体生长趋势优于简易棚。且两者栽培的黄连中叶绿素含量和根系活力值也远远大于简易棚。叶绿素作为植物光合作用的催化剂，是植物进行光合作用的主要色素，其含量的高低决定植物的光合速率，直接影响植株的生长^[10]。根是植物的六大器官之一，主要功能是吸收土壤中的水分和矿物质以及合成少量活性物质，促进地上部分的生长^[11]。根系活力即根部吸收代谢的能力，其大小对黄连营养吸收和生长有着重要影响，并决定黄连的最终产量。相比较于杉树下，混交林中黄连的土壤水分和根系活力值较高，利于黄连的后期生长光合作用和营养的汲取，形成较高产量。因此在黄连的栽培模式选择中，优先选择混交林下栽培。

3.2 三种生长年限对黄连生长发育和产量形成的影响

本研究表明，随着生长年限的增长，5年生黄连各种生长指标明显减小，叶绿素含量也逐渐降低，根系活力较3年生和4年生较弱，可推测其生长速率相对缓慢。根据前人研究也可知，5年生黄连已进入生长后期，代谢缓慢，其中发挥药理作用的主要生物碱含量增长幅度也小于前两者，且此时期生物碱含量达到最大值^[12]，应该在5年生黄连生长期结束后采收。这与本研究结果一致。

4 结论

综上,黄连更适合在混交林下栽培,在植株生长至第三年时搭建简易棚增加遮荫度,促进植株进一步生长发育,并在第五年生长期结束后收获。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志.第 27 卷 [M].北京:科学出版社, 2004:596.
- [2] 张莹,杨艳芳,吴和珍.黄连的本草考证[J].中国药房,2021,32(13):1634-1638.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020 年版.北京:中国医药科学出版社,2020:316-318
- [4] Wang J, Wang L, Lou G H, et al. Coptidis Rhizoma: a comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. Pharmaceutical biology, 2019, 57(1): 193-225.
- [5] 伍晓丽,陈义嘉,王钰,等. 黄连研究进展综述 [J]. 安徽农学通报, 2023, 29 (07): 37-41.
- [6] 柳鑫,黄河,黄璐琦,等. 黄连药材原植物资源和市场品种调查[J].中国药师,2014,17(10):1691-1695.
- [7] 王安琪,袁庆军,郭宁,等.黄连属药用资源及其异喹啉生物碱的研究进展[J].中国中药杂志,2021,46(14):3504-3513.
- [8] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].高等教育出版社,2000.
- [9] 刘丹,吴田泽,孟祥霄,等.无公害黄连栽培技术体系探讨[J].中国现代中药,2018,20(11):1396-1403.
- [10] 石凯,李泽,张伟建,等.不同光照对油桐幼苗生长、光合日变化及叶绿素荧光参数的影响[J].中南林业科技大学学报,2018,38(08):35-42+50.
- [11] 刘国屏.谈谈根的功能以及根系吸附面积和根系活力的测定[J].江西农业科技,1979(11):25-26.
- [12] 刘三波,司海倩,王学奎,等.不同生长期利川黄连的成分分析[J].湖北农业科学,2015,54(23):5949-5951.

中药毒代动力学研究进展

张 洵¹, 闫赋琴¹, 徐风华*¹

(1. 解放军总医院 药剂科, 北京 100017)

[摘要] 中药作为中国传统医学的重要组成部分, 其安全性一直是研究的热点。毒代动力学作为评估药物安全性的重要工具, 在中药领域的应用逐渐受到关注。本文旨在综述中药成分的毒代动力学研究方法及其进展, 为中药的合理使用与安全性提供科学依据。

[关键词] 中药; 毒代动力学; 安全性; 模型构建; 影响因素

Research Progress on Toxicokinetics of traditional Chinese Medicine

Zhang Xun, Yan Fuqin, Xu Fenghua

(1. PLA General Hospital Department of pharmacy, Beijing 100017)

[Abstract] As an important part of traditional Chinese medicine, the safety and effectiveness of traditional Chinese medicine has always been a research hot spot. As an important tool to evaluate the safety of drugs, toxicokinetics has gradually attracted attention in the field of traditional Chinese medicine. This paper aims to review the research methods and progress of toxicokinetics of traditional Chinese medicine components, and provide a scientific basis for the rational use and safety of traditional Chinese medicine.

[Key words] Traditional Chinese medicine; Toxicokinetics; Safety; Model building; influence factor

[第一作者] 张洵, 主管药师, 研究方向为纳米药物靶向递送系统, E-mail: 616634277@qq.com

[通信作者] 徐风华, 研究员, 博士生导师; 研究方向为基因药物递送系统, Tel: 18210655299, E-mail: xufh@301hospital.com.cn

前言

中药作为中国传统医学的重要组成部分，拥有数千年的历史。随着现代医学的发展，中药的安全性越来越受到关注。毒代动力学是一门新兴的毒理学分支，它将药物代谢动力学原理和方法应用在毒理学中，定量地研究毒性剂量下药物在动物体内的吸收、分布、代谢、排泄过程和特点，进而探讨药物毒性发生和发展的规律^[1]。毒代动力学一般在毒性试验条件下进行，侧重阐明药物的致毒机理和毒性发生、发展的动态变化规律^[2]。毒代动力学与药代动力学试验原理和方法是相同的，技术可以共享或相互借鉴。已获取的药代动力学参数可以为毒代和毒性试验给药方案的设计提供参考。本文将综述中药毒代动力学研究内容、多组分研究思路、分析方法开发策略与模型构建方法，以期中药临床安全用药提供依据，为深入发展中药毒理学奠定基础。

2 毒代动力学研究内容

毒代动力学研究可以单独进行，也可以结合于其它毒性评价中进行，通常称为伴随毒代动力学。其研究方案大致分为以下几种：

2.1 安全药理学评价

该阶段通过动物实验评价中药对神经系统、心血管系统以及肝、肾等的毒性。该阶段获得早期毒代动力学数据能够让研究者提前获知候选化合物系统暴露量与毒性之间的关系^[3]，可为减轻毒性进行调整。例如中药通常配伍使用，临床上可通过调整中药配伍以减轻毒性。GU 等^[4]采用毒性实验和毒代动力学实验研究发现甘草和川芎能够协同降低马钱子肾损伤，甘草和川芎促进消除马钱子的毒性成分士的宁和马钱子碱，同时甘草减慢了生物碱的吸收有关。GUO 等^[5]同样证实甘草能加速马钱子毒性成分的清除。翟兴英等^[6]通过毒代动力学研究产生新发现，生半夏和法半夏对草乌吸收作用相反，生半夏可使草乌中双酯型生物碱的吸收程度与速率增加，而法半夏反之。从毒代动力学角度重新注释传统中药方剂十八反药对使用方法。

2.2 单次剂量毒性评价

单次剂量毒性试验通常在啮齿类实验动物中进行，一般仅采集血浆样本。在进行某些安全窗口较窄的中药研究时，可以考虑提前进行详细的毒代动力学研究，有利于后续实验选择合适的毒性剂量，并有助于剂型选择^[7]。例如唐硕文等^[8]根

据急性毒性的试验结果,将中药单体臭椿酮毒代动力学的给药剂量设置在 LD₅ 值附近,让小鼠处于轻微中度状态,发现臭椿酮主要毒性靶器官为肝脏、脾脏、胃肠道以及生殖系统,由于臭椿酮治疗剂量与毒性剂量接近,确定其不能通过注射给药,应选择口服给药的剂型。

2.3 剂量递增毒性评价

剂量递增试验通常用于帮助研究者判断药物是否在动物体内维持一定的暴露量水平^[9]。Lan Tang 等^[10]发现乌头类有毒中药生物碱总量在 20 min 内快速上升,然后快速下降,提示动物出现的中毒反应与乌头类有毒中药生物碱总量的血药浓度快速上升有关。同时,乌头类生物碱总量的血药浓度出现多峰现象,并在一定范围内相对平稳,使动物在一段时间内保持轻度中毒的状态^[11]。

2.4 重复剂量毒性评价

在重复剂量下的毒代动力学研究能够发现重要结果,比如中药在全身的暴露水平、量效反应关系、性别及种属的差异性、组织蓄积或毒性作用等,为后续的临床试验提供剂量选择^[12]。该研究一般对实验动物进行为期 4 周的重复给药试验,在实验过程中的首日及最后一天进行血样采集,取样时间点可以参考药代动力学试验的时间分布。牛海军等^[13]通过比格犬连续静脉滴注不同剂量的牡荆素数天后,其血药浓度呈线性方式代谢,暴露量随给药时间的延长而减小,但在高剂量下体内会产生蓄积现象,上述结果为临床用药的安全性提供了实验依据。

2.5 组织分布评价

药物分布是指药物从给药部位吸收进入血液后,由循环系统运送至体内各脏器、组织、体液和细胞的过程。药物的分布类型主要取决于生理因素和药物的理化性质,包括组织/器官血流速率、膜扩散速率、血浆蛋白结合等。某些药物对机体特定组织具有特殊亲和力,导致药物在这些组织中浓度蓄积,很容易引起毒副作用。如果单次剂量下的组织分布出现了明显的药物组织蓄积现象或在毒性靶器官的分布浓度高,则需进行重复剂量下的组织分布评价。殷行行等^[14]将斑马鱼暴露在不同浓度的麻黄碱中 14 天后,麻黄碱在斑马鱼器官脑、卵巢、肝、肠器官特异性蓄积,与其易引起中枢、肝脏、消化道等毒性相吻合,且卵巢的蓄积数据引起对麻黄素生殖毒性的关注。唐硕文^[8]在亚急性毒性实验中发现,给与臭椿酮高剂量组小鼠胃肠道整体呈淡黄色且中度肿胀,肝脏脏器系数显著增加,整

体呈棕红色，表面有明显黄色颗粒，边缘部分伴有白色坏死点，脾脏系数均有肿大，生殖系统呈萎缩，结合后续的生化指标、血液学以及显微镜病理分析，得出臭椿酮引起的靶器官毒性主要包括肝脏、消化系统、生殖系统、神经系统和血液系统的结论。

2.6 生殖毒性评价

可根据已有的研究资料（药理、急性毒性和长期毒性、药代动力学研究）或预试验以及受试物的理化性质和给药途径来进行剂量设计。为观察量效关系，至少应设三个剂量组，必要时可增加剂量组。高剂量应出现一些轻微的母体毒性反应，或为最大给药量/最大耐受量。低剂量应为生殖毒性方面的“未观察到不良反应的剂量水平（NOAEL）”^[15]。

2.7 遗传毒性评价

遗传毒性试验是指通过不同机制直接或间接诱导受试对象遗传学损伤的体外和体内试验。毒代动力学研究应当选用与遗传毒性试验相同的实验动物种类、品系和剂量水平。由药物暴露量提高所引起的毒性症状，可通过观察未成熟的红细胞比例是否显著来判断^[16]。

3 复杂成分中药毒代动力学研究思路

3.1 单一成分研究

以某一成分为代表研究中药毒代动力学，在标志物的选取上，可遵循以下 3 个方面：(a)安全窗较窄的成分及其高暴露的代谢产物，应尽量评估该类成分在体内的暴露；(b)主要活性成分及其高暴露的活性代谢产物；(c)典型可测/易测的成分^[17]。

如 FDA 批准的 VeregenTM 是多种儿茶素类成分以及其他有关物质的混合物，在其大部分毒理学研究中以测定 PolyphenonE 血药浓度伴随开展了毒代动力学；天士力公司研究者团队发现复方丹参滴丸很多成分在血浆中浓度很低，无法获得完整的药时曲线，为更好进行毒代动力学分析，将丹参素、间位甲基丹参素、原儿茶酸、人参皂苷 Rg1 及人参皂苷 Rb1 作为检测标志物^[18]。

3.2 多组分研究

中药多组分毒代动力学研究是根据王广基等提出的“中药多组分整合药代动力学研究”的研究思路^[19]，综合评价不同成分的毒代代动力学特性与活性作用，

在建立高灵敏度、同步定量分析技术的基础上,开展多个活性组分的毒代动力学研究,在获得各组分的 ADME 数据后,根据各组分对整体毒理学表现的权重贡献,选择合适的建模方法,对各成分血药浓度曲线进行模型整合,以期获得最大程度表征中药整体毒代动力学特征的参数^[20]。

3.3 多组分分析方法开发思路

当需同时测定血浆中的多个标志物的时候,特别是当多个标志物之间理化性质相差较大时,其达峰时间不一致,半衰期不同,按照常规的采血点的设计可能很难满足对所有标志物的暴露的评估^[21],此时适当的增加采血点或结合群体药动学方法进行采血点设计将是必要的;此外,由于中药成分种类多且含量较低,各成分进入体循环的量也很小,多为纳克级,不宜均使用液质联用方法。复方丹参滴丸毒代动力学研究^[18]利用酚酸类及皂苷类成分分析方法相似的性质,建立了 2 类血浆分析方法,即一套同时检测酚酸类标志物的液质联用分析方法和一套同时检测皂苷类标志物的液质联用分析方法。同时适当增加采血点,在一定程度上避免了卫星组的动物数的增加,减少了方法学验证的复杂性,也降低了高额的研发费用。

5 模型构建

5.1 暴露-反应 (exposure-response, E-R) 模型

E-R 模型主要阐明药物在体内的代谢过程,是对药物成分暴露与药效关系、到达靶器官的成分、药效与毒性关系的探索,在一定程度上也可以对药临床剂量进行指导。E-R 模型一般采用回归分析,对于数据要求比 PKPD 模型低,使用范围更广,可测量出暴露参数。例如,汪沉等^[22]通过 E-R 模型研究青蛾丸的给药方案,选择青蛾丸中的有效药物补骨脂的 14 种成分,24 h 潮热次数相对基线的下降率,建立模型并将体质量、疗程、剂量等因素作为模型的协变量。通过模型得出青蛾丸疗效和体质量负相关,与每日给药次数以及疗程正相关;青蛾丸给药 12 周以上才能达到与雌激素相同疗效。

5.2 定量构效关系模型 (QSAR) 与定量结构-毒性关系模型 (QSTR)

QSAR、QSTR 模型是使用数学模型来描述分子结构、化合物的生理活性以及毒性关系,对已知活性的化合物建立模型,找到分子结构与活性或毒性之间的定量关系,由此可以预测结构类似的其他化合物的生物活性和潜在毒性^[23-26]。广

泛应用于药物开发、毒理学研究等领域^[27-28]。建立模型需要注意的是生物活性参数的选择以及生物活性数据的可靠性等问题。化合物的生物活性除了物理化学参数,如 log p 值、沸点、水解速率常数,还包括化合物对生物产生的毒性,如急性毒性、亚急性毒性等。

李雅秋^[29]等构建了用于预测心脏毒性的 QSAR 模型,针对中药化学成分潜在心脏毒性进行预测,并用已知 29 种毒性成分验证模型准确度,准确率高达 83%。高雅等^[30]建立了中药成分 QSAR 预测数据库,预测了中药成分的多个毒性终点。目前用于中药成分毒性预测的 QSAR/QSTR 模型是基于现有药物数据库构建,相信随着中药毒性的研究越来越多,未来中药 QSAR/QSTR 模型会不断完善。

小结与展望

毒代动力学通过对中药不同给药剂量、不同给药方式、不同靶器官损伤的研究,全方位评价中药临床前与临床应用的毒性风险。结合液质联用的分析方法,解析毒性成分药时曲线,并依据综述寻找合适标志物,以替代复杂微量成分分析,对多组分数据进行模型拟合,用于外推整体中药成分的体内代谢规律。模型构建可推测药物在体内的过程,不同模型对于临床指导侧重点不同,暴露-反应模型可解释药物成分暴露与药效等关系,定量构效关系模型与定量结构-毒性关系模型通过活性成分的化学结构预测中药毒性。

开展中药毒代动力学研究,可以了解中药成分毒性发生和发展的动态变化规律,发现毒性剂量与时程的关系,深入阐明药物全身暴露与毒性的关系,为中药的安全性研究提供重要的线索与依据,为药物的临床使用的安全剂量提供可靠的依据。

参考文献

- [1] 刘昌孝. 药物评价学[M]. 化学工业出版社, 2006, 287~290.
- [2] Welling PC, Differences between pharmacokinetics and toxicokinetics[J]. ToxicolPathol, 1995, 23(2): 143~147.
- [3] International Council for Harmonisation. Guideline topic S7A: Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals[S], 2000, 9.
- [4] GU L, WANG X, LIU Z, et al. A study of SemenStrychni-induced renal injury and herb-herb interaction of Radix glycyrrhizae extract and/orRhizomaligustici extract on the comparative toxicokinetics of strychnine and brucine in rats[J]. Food Chem Toxicol , 2014 , 68:226-233.
- [5] GUO Y, GAO T, LI C, et al. Detoxification mechanisms of a combination of Semenstrychni and RadixGlycyrrhizae : a comparative analyses of differences in toxicokinetics and tissue distribution after oral administration of SemenStrychni-RadixGly-cyrrhizae decoction[J]. Biomed Chromatogr, 2022 , 36(5): e5321 .
- [6] 翟兴英,徐国良,张 凌,等. 草乌与(生、法)半夏配伍 3 个毒性成分毒代动力学变化研究[J]. 中药药理与临床,2018 , 34(4): 139-144.
- [7] China Food and Drug Administration. 药物毒代动力学研究技术指导原则[S], 2014, 12.
- [8] 唐朔文. 中药单体臭椿酮的一般毒性及毒代动力学研究[D]. 华东师范大学, 2018.
- [9] BALDRICK P. Toxicokinetics in preclinical evaluation [J]. Drug Discov Today, 2003, 8(3): 127-33.
- [10] Tang L, Gong Y, Lv C, et al. Pharmacokinetics of aconitine as the targeted marker of Fuzi (Aconitum carmichaeli) following single and multiple oral administrations of Fuzi extracts in rat by UPLC/MS /MS[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(2): 736.
- [11] 陶长戈, 李文军, 彭 成. 附子总生物碱中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱在大鼠体内的药动学研究[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(3):49.
- [12] International Council for Harmonisation. Guideline topic S3A: Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies [S], 1994, 11.
- [13] 牛海军, 李晓亮, 李光辉. 注射用牡荆素比格犬毒代动力学研究[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(18): 1524-1529.
- [14] 殷行行, 郭昌胜, 邓洋慧, 等. 麻黄碱在斑马鱼体内的器官特异性蓄积及毒代动力[J]. 环境科学, 2021, 42(3): 1496-1502.
- [15] International Council for Harmonisation Guideline S5(R3): Detection Of Reproductive And Developmental Toxicity For Human Pharmacerticals S5(R3) [S], 2020.2.18
- [16] International Council for Harmonisation. Guideline S2(R1): Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use [S], 2011, 25.
- [17] 马晓慧,闫凯境,郝瑞家,王根辈,郭治昕.浅析复杂成分中药毒代动力学的研发难点和策略[C]. 2016 年第六届全国药物毒理学年会论文集, 2016:167-168.
- [18] 天士力医药集团股份有限公司. 一种复方丹参滴丸多组分在大鼠体内群体药代动力学模型的构建方法[P], 申请公布号: CN111972353B. 2020.11.24
- [19] 郝海平,郑超滴,王广基. 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索[J]. 药学报, 2009(3): 6.
- [20] 辛艳飞, 顾利强, 周国亮, 等. 中药注射剂多组分毒代动力学研究[C]. 2010 年全国药物毒理学学术会议, 2024-10-16.

- [21] Cao LuJing, Zhan ShuYu, Ji XiangYu, Zheng BoHong, Ye ChunYing, Chen ZiYi, Liu GuoQiang, Ding BaoYue. Research advance in multi-component pharmacokinetics of Chinese herbal extracts in recent five years.China journal of Chinese materia medica[J], 2021(13).
- [22]汪沉, 郑青山. 青蛾丸在更年期综合征患者中的暴露反应模型[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(4):428-433.
- [23] Bloomingdale P, Housand C, Apgar J F, et al. Quantitative systems toxicology [J]. Curr Opin Toxicol, 2017, 4: 79-87.
- [24] 朱永亮, 叶祖光. 计算毒理学与中药毒性预测的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(24): 2424-2429.
- [25] Deeb O, Goodarzi M. In silico quantitative structure toxicity relationship of chemical compounds: Some case studies [J]. Curr Drug Saf, 2012, 7(4): 289-297.
- [26] Funar-Timofei S, Ionescu D, Suzuki T. A tentative quantitative structure-toxicity relationship study of benzodiazepine drugs [J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24(1): 184-200.
- [27] Vilar S, Cozza G, Moro S. Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE) : Application of QSAR and molecular docking to drug discovery [J]. CurrTop Med Chem, 2008, 8(18): 1555-1572.
- [28] 郑子廷, 闫赛红, 查金苗. 有机磷类化合物大鼠急性毒性 QSAR 模型构建与毒性机制研究[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(1): 150-159.
- [29] 李雅秋, 王旗. 构建用于预测中药化学成分心脏毒性的定量构效关系模型[J]. 北京大学学报: 医学版, 2017, 49(3): 551-556.
- [30] 高雅, 姚碧云, 周宗灿. QSAR 方法预测中草药重要成分毒性的初步评价[J]. 毒理学杂志, 2016, 30(5): 342-345.

云南土沉香不同部位提取物中多酚类成分含量测定

宋娜丽^{1*}, 夏海梅¹, 何婧², 张菊¹, 李婧怡¹, 赵霞^{1*}

(1.云南省中医中药研究院 中心实验室, 云南 昆明 650223; 2.襄阳市公共检验检测中心
湖北 襄阳 441000)

[摘要] 本研究采用紫外可见分光光度法测定云南土沉香乙醇提取液中不同萃取部位的多酚类含量, 检测结果发现, 云南土沉香乙醇提取液中总多酚含量为 $(6.230 \pm 0.06)\%$ 。不同萃取部位多酚含量不同, 其中正丁醇部位含量为 $(26.732 \pm 0.336)\%$, 乙酸乙酯部位含量为 $(3.348 \pm 0.151)\%$, 石油醚部位含量为 $(2.706 \pm 0.053)\%$ 。加样回收率范围是 $(100.56 \pm 3.25)\%$, 其 RSD 为 3.24%。实验结果表明, 云南土沉香中含有丰富的多酚成分, 不同萃取部位多酚含量的顺序为: 正丁醇部位>乙酸乙酯部位>石油醚部位。方法学考察表明, 本方法简便、准确、精密度高, 可作为云南土沉香中多酚类化合物含量的测定参考。

[关键词] 云南土沉香; 多酚; 含量测定; 紫外分光光度法

[基金项目] 云南省高层次中医药后备人才培养对象(宋娜丽); 云南省科技计划项目(编号: 202301AZ070001-109)

[第一作者] 宋娜丽, 兼通讯作者, Tel: (0871) 65156742, E-mail: kmsongnl@126.com.女, 博士, 副主任药师, 主要从事中药、民族药药理、药效研究

[通信作者] 赵霞, Tel: (0871) 63985632, E-mail: 85261563@qq.com. 主要从事中医药研究

[Abstract] The contents of different components were determined by ultraviolet spectrophotometry in different extraction fractions of *Excoecaria acerifolia* ethanol extract. The results showed that the total polyphenol content in the ethanol extract of *Excoecaria acerifolia* ethanol extract is $(6.230 \pm 0.06)\%$, the content of polyphenol in different extraction parts was different, and the content of n-butanol part was $(2.706 \pm 0.053)\%$, the content of ethyl acetate part was $(3.348 \pm 0.151)\%$, and the content of petroleum ether part was $(2.706 \pm 0.053)\%$. The range of sample recovery rate was $(100.56 \pm 3.25)\%$, and the RSD was 3.24%. The results showed that *Excoecaria acerifolia* contains rich polyphenol components, The order of polyphenol content in different extraction parts is: n-butanol part > ethyl acetate part > petroleum ether part. The method is simple, accurate and precise, and it can be used as a reference for the determination of polyphenols in *Excoecaria acerifolia*.

[Key words] *Excoecaria acerifolia*, Polyphenol, Content determination, Ultraviolet spectrophotometry

云南土沉香 (*Excoecaria acerifolia* F. Didr) 别名草沉香、走马胎、小霸王、岩石榴、水银茶、刮筋板、红人太岁、红刮筋板, 为大戟科 Euphorbiaceae 海漆属 *Excoecaria* L. 植物。云南土沉香为常绿小乔木, 高 30~60 cm。生于海拔 800~2700 m 的山坡、河谷沿岸或坡地灌丛中、大山竹丛之间, 喜温暖, 多栽培在房屋前后, 以土层深厚、肥沃者为佳, 广泛分布于云南、贵州、四川和湖北等地。云南土沉香以全株入药, 性味苦、辛, 微温。文献^[1]记载该药有祛风散寒、健脾利湿、解毒之功效。用于风寒咳嗽, 疟疾, 黄疸型肝炎, 消化不良, 小儿疳积, 风湿骨痛, 闭经, 狂犬病; 解草乌、毒蕈、食物中毒。另有文献记载^[2]云南土沉香具有行气、破血、消积的功效, 用于治疗症瘕、积聚、腹胀、食积、黄疸、吐血、疟疾等病症。在彝族、傣族、拉祜族、藏族等云南少数民族中, 该药用植物被用于治疗中毒、炎症、风湿骨痛、便秘和风寒等多种疾病。

云南土沉香具有广泛的生物活性及药理作用。实验发现, 从中分离到的单体化合物具有抗 HIV 病毒、抗肿瘤、抑制乙酰胆碱酯酶、抗病毒与抗寄生虫等活性^[3-6], 云南土沉香中的黄酮、多酚、萜类和多糖类等化合物是具有以上生物活性的物质基础。药用植物中多酚类成分通常具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗炎等作用^[7-9]。文献调研暂未发现对云南土沉香中成分含量进行测定, 本研究对云南土沉香药材及药材不同提取部位中多酚类的成分进行含量测定, 为进一步了解云南土沉香中多酚类化学成分提供实验数据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

电子天平 (SQP, 赛多利斯科学仪器有限公司), 电子分析天平 (ISO9001, 赛多利斯科学仪器有限公司), 电热鼓风干燥箱 (101-0B 上海秋佐科学仪器有限公司), 恒温水浴锅 (HHS-11-4, 博迅实业有限公司医疗设备厂), 双光束紫外可见分光光度计 (TU-1900, 北京普析通用仪器公司), 粉碎机 (DFT-200A 温岭市林大机械有限公司), 电子调温电热套 (DZTW 北京市光明医疗仪器有限公司)。

1.2 药材和试剂

云南土沉香嫩枝和叶于 2018 年 10 月采集于云南省丽江市玉龙县龙蟠乡。结合样品的形态学特征, 由遵义医科大学陈阳讲授鉴定为云南土沉香 (*Excoecaria*

acerifolia Didr)。芦丁标准品（四川精萃天成药物科技有限公司，纯度 $\geq 96\%$ ），没食子酸标准品（四川精萃天成药物科技有限公司，纯度 $\geq 98\%$ ），D-葡萄糖标准品（中国食品药品检定研究院，纯度 $\geq 96\%$ ），氢氧化钠（北京索莱宝科技有限公司），亚硝酸钠（天津市科密欧化学试剂有限公司），硝酸铝（上海振兴试剂厂），福林酚试剂（北京索莱宝科技有限公司），碳酸钠（云南云钟工贸有限公司），苯酚（上海源叶生物科技公司），浓硫酸（上海源叶生物科技公司）。

1.3 试剂制备

芦丁对照品:精密称取标准品芦丁 20.0 mg，放入 50 mL 的容量瓶，用 60% 乙醇溶解后定容得到浓度为 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准品溶液。

没食子酸对照品:称取 5.0 mg 的标准品没食子酸，放入 50 mL 的容量瓶，用热水溶解后定容得到浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准品溶液。

葡萄糖对照品：称取 5.0 mg 的标准品 D-无水葡萄糖，放入 50 mL 的容量瓶，用 60%乙醇溶解后定容得到浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准品溶液。

5%亚硝酸钠溶液：称取亚硝酸钠 2.50 g，放入 50 mL 的烧杯中加蒸馏水用玻璃棒搅拌溶解并定容至容积为 50 mL 的棕色容量瓶内，贴好标签,于冰箱 4℃ 密封保存备用。

10%硝酸铝溶液：称取 10.0 mg 硝酸铝，放入烧杯中加蒸馏水用玻璃棒搅拌并定容至 100 mL 的棕色容量瓶内，贴好标签密封保存备用。

4%氢氧化钠溶液：称取碎片状氢氧化钠 4.30 g，放入 50 mL 的烧杯中，加自制的蒸馏水，用玻璃棒搅拌至彻底溶解，定容至 100 mL 的棕色容量瓶内，贴好标签密封保存备用。

10%福林酚试剂：将 10 mL 福林酚试剂转移到 100 mL 容量瓶中用蒸馏水定容并摇匀。

7.5% Na_2CO_3 溶液：称取 7.50 g 无水 Na_2CO_3 于 100 mL 容量瓶,用蒸馏水定容并摇匀。

5%苯酚溶液的制备：取 5.00 g 苯酚于 25 mL 的烧杯中，加蒸馏水融化后，将其移置 100 mL 棕色容量瓶中，加蒸馏水洗涤烧杯内壁 4 次（每次 5 mL），将洗涤液移置棕色容量瓶中，与原液混合，摇匀，定容。

2 实验方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 云南土沉香药材溶液的制备

将云南土沉香药材清洗后晾干, 将其放入微型植物粉碎机中粉碎, 即得到相应的药材粉末。用电子天平称取云南土沉香粉末 50.00 g 于 1000 mL 圆底烧瓶中, 加入 500 mL 浓度 95% 乙醇加热回流 4 h, 抽滤, 滤渣再加 500 mL 浓度 95% 乙醇再回流 3 h, 抽滤; 将 2 次滤液合并后, 乙醇定容至 1000 mL, 即得待测试样。

2.1.2 云南土沉香不同提取部位含量测定

2.1.2.1 样品提取

云南土沉香地上部位 16.0 kg, 经粉碎(80 目), 用 95% 工业乙醇加热回流提取 3 次, 依次提取 4 h、3 h、3 h 合并提取液, 减压除去溶剂, 得醇提物 3.6 kg。将醇提物均匀溶散于温水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得到石油醚部位、乙酸乙酯萃取部位、正丁醇部位, 旋转蒸发仪减压浓缩至浸膏。

2.1.2.2 云南土沉香不同提取部位供试品的制备

(1) 精密称取云南土沉香正丁醇部位 1.0789 g, 于 50 mL 容量瓶中加入 75% 乙醇溶解并定容。

(2) 精密称取云南土沉香乙酸乙酯部位 0.1003 g, 于 10 mL 容量瓶中加入 75% 乙醇溶解并定容。

(3) 精密称取云南土沉香石油醚部位 1.0022 g, 于 50 mL 容量瓶中加入 75% 乙醇溶解并定容。

2.3 最大吸收波长的选择

取对照品溶液和样品溶液适量, 分别加入 5.0 mL 10% 福林酚试剂, 摇匀, 反应 6 min。加入 4.0 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液, 摇匀, 用水稀释至 10 mL。置于暗处 2 h。使用紫外分光光度仪进行 400~800 nm 波长扫描, 二者均在 758 nm 附近有最大吸收, 因此选择 758 nm 为测定波长。

2.4 没食子酸标准曲线的绘制

以没食子酸为标准品, 用移液管精密量取浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液于试管中, 使终浓度分别为 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, $0.010 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 向各试管中加入 5.0 mL 10% 福林酚试剂, 摇匀, 反应 6 min。加入 4.0 mL 7.5% Na_2CO_3

溶液，摇匀，双蒸水稀释至 10 mL，置于暗处 2 h。在波长 758 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标，没食子酸浓度（mg·mL⁻¹）为横坐标，绘制标准曲线，计算线性回归方程。得到线性回归方程 $Y=123.45X+0.0447$ ， $R^2=0.9992$ ，结果表明浓度在（0.002-0.01）mg·mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好。

2.5 样品多酚含量测定

取 3 份各供试品适量于试管，精密称定，分别置于试管中，操作同上述 2.4，加入 5.0 mL 10% 福林酚试剂，摇匀，反应 6 min。加入 4.0 mL 7.5% Na₂CO₃ 溶液，摇匀。置于暗处 2 h。在波长 758 nm 处测定吸光度，得出数据及结果。每份样品平行做 3 次。云南土沉香正丁醇部位、乙酸乙酯部位及石油醚部位供试品处理方法相同。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验

精密吸取适量供试品溶液于试管，按上述 2.4 操作，在 758 nm 处测吸光度，连测 6 次，得出数据及结果。

2.6.2 稳定性试验

精密吸取适量供试品溶液于试管，按上述 2.4 操作，分别在 0，10，20，30，40，50 min 时于 758 nm 处测吸光度，连测 6 次，得出数据及结果。

2.6.3 重复性试验

精密吸取适量供试品溶液于试管，按上述 2.4 操作，在 758 nm 处测吸光度，连测 6 次，得出数据及结果。

2.6.4 加样回收率试验

取 9 份已知多酚含量的云南土沉香，分别加入浓度为 0.02、0.03、0.04 mg·mL⁻¹ 对照品溶液各 0.1 mL，每个加样浓度重复 3 次，按 2.4 实验方法操作，测定其在 758 nm 处吸光度值，计算其回收率，求平均值。

2.7 实验结果

2.7.1 云南土沉香药材中多酚成分含量测定

表 1 云南土沉香中多酚含量测定结果

样品编号	吸光度	浓度（mg·mL ⁻¹ ）	多酚含量（%）	多酚平均含量（%）
1	0.805	0.0062	6.200	6.230±0.060
2	0.811	0.0062	6.200	
3	0.817	0.0063	6.300	

2.7.2 精密度实验测定

根据溶液吸光度，计算得本次实验 RSD 为 0.68%，说明该方法仪器精密度良好，结果见表 2。

表 2 精密度实验测定

编号	1	2	3	4	5	6	RSD/%
吸光度	0.770	0.784	0.772	0.770	0.773	0.773	0.680

2.7.3 稳定性实验测定

根据溶液吸光度，计算得本次实验 RSD 为 0.17%，表明药品溶液显色后在 50 min 内性质稳定。

表 3 稳定性实验测定

编号	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	RSD/%
吸光度	0.805	0.802	0.805	0.803	0.804	0.802	0.170

2.7.4 重复性实验测定

根据溶液吸光度，计算得本次实验 RSD 为 0.55%，表明实验方法的重复性良好。

表 4 重复性实验测定

编号	1	2	3	4	5	6	RSD/%
吸光度	0.804	0.807	0.811	0.811	0.812	0.817	0.550

2.7.5 加样回收率实验测定

根据所测数据，计算测得平均回收率(100.56 ± 3.25)%，RSD 为 3.24%，提示该方法的准确度好，实验结果见表 5。

表 5 云南土沉香中多酚加样回收率测定

样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.0032	0.0020	0.0053	105.0		
0.0032	0.0020	0.0052	100.0		
0.0032	0.0020	0.0053	105.0		
0.0032	0.0030	0.0062	100.0		
0.0032	0.0030	0.0062	100.0	100.560±3.250	3.240
0.0032	0.0030	0.0062	100.0		
0.0032	0.0040	0.0073	102.5		
0.0032	0.0040	0.0071	97.5		
0.0032	0.0040	0.0070	95.0		

2.7.6 云南土沉香正丁醇部位多酚含量测定

根据样品溶液吸光度及溶液浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)，计算正丁醇部位 3 个样品中多酚平均含量分别为(26.427 ± 0.020)%、(26.605 ± 0.022)%、(27.165 ± 0.057)%，3 个样品总多酚含量为(26.732 ± 0.336)%，所得数据如下表 6。

表 6 云南土沉香正丁醇部位多酚含量测定

样品编号	吸光度	浓度(mg/mL)	多酚含量%	多酚平均含量%
样品 1	0.749	0.0057	26.440	26.427±0.022
	0.749	0.0057	26.440	
	0.748	0.0057	26.402	
样品 2	0.753	0.0057	26.590	26.605±0.022
	0.753	0.0057	26.5898	
	0.754	0.0057	26.6273	
样品 3	0.770	0.0059	27.2280	27.165±0.057
	0.768	0.0059	27.1529	
	0.767	0.0059	27.1154	

2.7.7 云南土沉香乙酸乙酯部位多酚含量测定

根据样品溶液吸光度及溶液浓度(mg·mL⁻¹), 计算乙酸乙酯部位 3 个样品多酚含量分别为(3.158 ± 0.026)%、(3.392 ± 0.023)%、(3.494 ± 0.012)%, 3 个样品总多酚含量为(3.348 ± 0.151)%, 所得数据如下表 7。

表 7 云南土沉香乙酸乙酯部位多酚含量测定

样品编号	吸光度	浓度 (mg·mL ⁻¹)	多酚含量(%)	多酚平均含量(%)
Sample number	Absorbance	Concentration (mg·mL ⁻¹)	polyphenol content (%)	Average polyphenol content(%)
样品 1 Sample 1	0.432	0.0031	3.128	3.158±0.026
	0.437	0.0032	3.169	
	0.438	0.0032	3.176	
样品 2 Sample 2	0.463	0.0034	3.378	3.392±0.023
	0.463	0.0034	3.378	
	0.468	0.0034	3.419	
样品 3 Sample 3	0.477	0.0035	3.491	3.494±0.012
	0.476	0.0035	3.483	
	0.479	0.0035	3.508	

2.7.8 云南土沉香石油醚部位多酚含量测定

根据样品溶液吸光度及溶液浓度(mg·mL⁻¹), 计算测得石油醚部位 3 个样品多酚含量分别为(2.671 ± 0.006)%、(2.670 ± 0.005)%、(2.776 ± 0.010)%, 3 个样品总多酚含量为(2.706 ± 0.053)%, 所得数据如下表 8。

表 8 云南土沉石油醚部位多酚含量测定

Table 8 Determination of polyphenol content of petroleum ether fraction in *Excoecaria acerifolia*.

样品编号 Sample number	吸光度 Absorbance	浓度 (mg·mL ⁻¹) Concentration (mg·mL ⁻¹)	多酚含量(%) polyphenol content(%)	多酚平均含量(%) Average polyphenol content(%)
样品 1 Sample 1	0.706	0.0054	2.673	2.671±0.006
	0.704	0.0053	2.665	
	0.707	0.0054	2.677	
样品 2 Sample 2	0.704	0.0053	2.665	2.670±0.005
	0.706	0.0054	2.673	
	0.706	0.0054	2.673	
样品 3 Sample 3	0.729	0.0055	2.766	2.776±0.010
	0.732	0.0056	2.778	
	0.734	0.0056	2.786	

3 讨论

本实验对云南土沉香中具有潜在生物活性的多酚类成分进行了含量测定，将为云南土沉香的质量控制、临床应用及资源开发研究提供科学依据。

实验选取云南土沉香地上部分为研究对象，应用紫外分光光度法对云南土沉香地上部分乙醇提取液中多酚含量进行测定，采用福林酚—碳酸钠显色法测定多酚含量。总多酚含量检测以没食子酸为标准品，溶液浓度在 0.002 - 0.01 mg·mL⁻¹ 范围内，呈良好线性关系。多酚平均加样回收率为(100.56 ± 3.250)%；总多酚含量为(6.23 ± 0.06)%。经方法学考察，发现本方法简便、准确，精密度、重复性和稳定性好，可作为云南土沉香中多酚含量的测定方法。

实验结果显示，正丁醇部位多酚含量为(26.732 ± 0.336)%，乙酸乙酯部位多酚含量为(3.348 ± 0.151)%，石油醚部位多酚含量为(2.706 ± 0.053)%。通过极性划段、含量测定，为今后精确分离、分析云南土沉香中化学成分提供方法和有效数据支撑。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组编,《全国中草药汇编》(第二版)(上册) [M].人民卫生出版社:北京, 1996.
- [2] 《四川中药志》协作编写组, 四川中药志 . 第一卷 [M].四川中药志 . 第一卷: 1979.
- [3] 黄圣卓. 两种瑞香和刮筋板的化学成分、生物活性和化学分类学研究[D]. 中国科学院, 昆明, 2012.
- [4] Huang, S. Z., Luo, H. R., Ma, Q. Y., Peng, H., Zhao, Y. X. Chemical Constituents from the Stems of *Excoecaria acertifolia* [J]. Chemistry & Biodiversity **2014**, *11* (9): 1406-1416.
- [5] Huang, S. Z., Zhang, X., Ma, Q. Y., Peng, H., Zheng, Y. T., Hu, J. M., Dai, H. F., Zhou, J., Zhao, Y. X. Anti-HIV-1 tigliane diterpenoids from *Excoecaria acertifolia* Didr [J]. Fitoterapia **2014**, *95* 34-41.
- [6] Li, Y., Ma, C., Huang, J. Chemical constituents from *Excoecaria acerifolia* F. Didr. and their antitumor activities [J]. Zhongguo Yaoxue Zazhi **2009**, *44* (17): 1294-1297.
- [7] 陈 倩. 蒲公英不同部位多酚类物质的变化及其抑菌作用研究. 硕士, 2023.
- [8] 李晶晶. 玫瑰多酚的质量分析与体外活性研究. 硕士, 2021.
- [9] 刘昕皓, 魏粉菊, 王学顺, 展 鹏, 刘新泳 多酚类化合物的生物活性研究进展[J]. 中国医药工业杂志.**2021**, *52* (04): 471-483.

基于数据挖掘的白鲜皮毒性特点分析

胡珂璇¹, 宋亚刚², 齐玉璞², 武香香, 苗明三*

(1.河南中医药大学, 郑州, 450046)

[摘要] **目的:** 通过考证白鲜皮古籍毒性记载、现代文献研究为白鲜皮的合理用药提供依据。**方法:** 通过数据挖掘的方法, 筛选自汉代至清代历代代表性本草及方书类著作共 39 部, 检索分析白鲜皮相关信息; 现代研究通过检索“白鲜皮”、“毒”、“毒性”、“毒理学”, 归纳总结 2003—2024 年之间白鲜皮用药安全文献 1372 篇。从本草研究、方书研究、现代药理作用研究、白鲜皮毒性研究四个方面对结果进行分析。**结果:** 本草研究: 产地和采收时间可能会影响白鲜皮毒性, 白鲜皮性寒味苦, 入小肠、胃、膀胱经。毒性记载多为无或无毒。方书研究: 白鲜皮常以汤剂入药, 剂量多为 4g-10g, 常用的减毒增效配伍药为黄芩、甘草。现代药理作用研究表明白鲜皮具有抗菌、心血管保护、抗炎、等药理作用。白鲜皮毒性研究表明其主要副作用为胃肠道反应, 该反应可能与白鲜皮的性味和归经相关, 我们分析发现甘草等甘味中药可以缓解该不良反应。此外我们通过古籍文献和现代研究比较分析发现白鲜皮产生肝损伤的主要原因与药证不符、用药剂量和时间相关。现代实验室研究发现白鲜皮毒性成分为白鲜皮碱、柠檬苦素, 文献挖掘发现二月兰籽水煎剂、巯基试剂谷胱甘肽和 N-乙酰半胱氨酸能明显缓解白鲜皮引起的急性肝损伤。**结论:** 通过古籍与现代文献对比发现白鲜皮毒性出现多因配伍不当、使用剂量过大、使用时间过久所致; 通过适宜配伍、给药剂量和方式适当的情况下可避免其不良反应的发生。

[关键词] 白鲜皮; 毒性; 解毒; 数据挖掘

[基金项目] 豫药全产业链研发河南省协同创新中心(豫科技(2023)175号); 国家重点研发计划(2022 YFC3502101-01); 河南省国际合作重点项目(231111521200)

[第一作者] 胡珂璇 硕士研究生, 主要从事中药学研究。E-mail:1806905507@qq.com。手机: 17639541709
[通信作者] 苗明三, 男, 博士, 教授, 主要从事中药药理教学与研究, Email: miaomingsan @163.com

Analysis of toxicity characteristics of dichotomous skin based on data mining

Hu kexuan¹, Song yagang², Qi yupu², Wu xiangxiang, Miao mingsan*

(1.Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046)

[Abstract] **Objective:** To provide a basis for the rational use of white fresh skin by verifying the toxicity records of ancient books and modern literature. **Methods:** Through data mining, a total of 39 representative works of materia medica and prescription books from the Han Dynasty to the Qing Dynasty were screened, and the relevant information of Baixian Pi was retrieved and analyzed. Modern research summarized 1372 articles on the drug safety of white fresh skin from 2003 to 2024 by searching for "white fresh skin", "toxicity", "toxicity" and "toxicology". The results were analyzed from four aspects: materia medica research, prescription book research, modern pharmacological effect research, and white fresh peel toxicity study. **Results:** Materia Medica: The origin of white fresh skin is of high quality from Sichuan, which is cold and bitter in taste, and enters the small intestine, stomach and bladder meridians. Toxicity is mostly non-toxic or non-toxic. Fangshu research: Baixian peel is often used as a decoction, the dosage is mostly 4g-10g, and the commonly used drugs for reducing toxicity and increasing efficiency are skullcap and licorice. Modern pharmacological studies have shown that white fresh skin has antibacterial, cardiovascular protection, anti-inflammatory, and other pharmacological effects. The toxicity studies of white fresh peel showed that the main adverse reactions were gastrointestinal reactions caused by gastrointestinal tissue damage, and these adverse reactions were often related to the sexual taste and meridian return of white fresh skin, and the detoxification measures were summarized through prescription compatibility, and it was concluded that sweet Chinese medicines such as licorice could alleviate gastrointestinal adverse reactions. In addition to gastrointestinal adverse reactions, white fresh skin will also cause liver damage due to dosage and medication time, clinical data mining found that in the process of clinical use, the daily dose is greater

than the ancient book induction dose of 4~10g for about a week, liver damage may occur, taking the prescribed dose is more than 17 days after it is easy to cause liver damage, or the use of toxic measurement of white fresh skin within one day may cause acute liver injury, In addition to taking Baixianpi single medicine, excessive dosage and long-term use of Baixianpi compound will still cause liver toxicity to patients. Modern laboratory studies have found that the toxic components of white fresh peel are white fresh peel and limonin, and basic experiments show that white fresh peel can cause acute liver injury when used in large doses in a short period of time, and the degree of liver damage will become more serious with the increase of dose, but the decoction of plant February orchid seeds can significantly alleviate the acute liver injury caused by white fresh peel, and the sulfhydryl reagents glutathione and N-acetylcysteine can also effectively alleviate the liver damage caused by white fresh peel to mice. **Conclusion:** Baixian peel contains toxic components, and the modern toxicity is mostly caused by improper compatibility, excessive dosage and long use time, under the condition of ensuring the accuracy of the drug base, the administration dose within the normal use range, the shortening of the administration time and the appropriate administration mode, the combination of compatibility can appropriately increase the dose and improve the efficacy. However, during use, attention should be paid to the patient's gastrointestinal reactions and regular liver function tests, and if adverse reactions occur, sweet Chinese medicine and hepatoprotective drugs can be given for treatment.

[Key words] Densefruit Pittany Root-bark ;detoxification; ; Dose; Data mining

前言

白鲜皮(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)首载于《神农本草经》列为中品,为芸香科植物白鲜属植物白鲜的干燥根皮,常用“味苦,寒。主头风,黄疸,咳逆,淋沥,女子阴中肿痛,湿痹死肌,不可屈伸起止行步”。《中华人民共和国药典》2020 年版^[1]记载白鲜皮具有清热燥湿、祛风解毒之功,可用于湿热疮毒、黄水淋漓、湿疹、风疹、疥癣疮癞、风湿热痹、黄疸尿赤等。现代研究表明,白鲜皮中含有生物碱类、柠檬苦素类、黄酮类等化学成分,具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等作用。虽白鲜皮应用广泛,但其仍被报道存在潜在毒性风险等问题,严重影响其临床的正常应用^[2]。目前白鲜皮临床报道主要有致肝毒性风险,相关制剂复方青黛丸、消银片、克银丸等也可导致肝损伤^[3]。石伟等^[4]发现免疫应激状态下白鲜皮可导致特异质肝损伤,在白鲜皮的成分含量研究中发现可能的有毒成分为白鲜碱和梣酮,且在醇提液中含量更高更容易造成肝损伤。但目前的研究仍缺乏对该中药导致肝毒性的数据归纳整理,缺少基于毒性机制的解毒措施研究等。

本研究针对上述存在问题,拟通过数据发掘的方法,搜集历代代表性古籍和近 10 年来的白鲜皮致肝毒性的相关文献报道,通过归纳药物来源、毒性报道、主要症状、用法用量、证候、毒性成分、毒性产生机制等方面信息,并通过其致毒机制,提出中医药的解毒措施,为临床用药解毒提供参考,为科研工作人员提供白鲜皮毒性研究思路。

一. 数据整理

1.1 数据来源

万方数据库,中国知网,维普中文期刊服务平台,Web of Science,从汉至清代表性古籍。

1.2 数据纳入和剔除标准

现代研究在中国知网以“白鲜皮”、“毒”、“毒性”、“毒理学”等关键词进行检索,其中共 49 篇符合要求,搜集白鲜皮毒性实验与临床应用数据,从症状、机制、特点、防毒措施四个方面对结果进行归纳分析整理。

古籍文献共收集自东晋以来历代本草类著作 23 本,如汉代《神农本草经》、魏晋《名医别录》、唐代《新修本草》、宋代《证类本草》、元代《本草品汇精

要》、明代《本草纲目》、清代《本草备要》等，分析 28 本著作中白鲜皮本草信息，主要分析其产地、采收时间、性味、归经、毒性、禁忌等；其中记载明确白鲜皮的 15 本，如唐代《千金翼方》、宋代《本草图经》、明代《本草纲目》、清代《本草从新》等。历代方书类著作 16 本，如汉代《金匱要略》、《伤寒论》、魏晋《肘后备急方》、唐代《备急千金要方》、宋代《圣济总录》、元代《黄帝素问宣明论方》、明代《普济方》、清代《汤头歌诀》等，其中记载明确白鲜皮的 9 本，如唐代《千金翼方》、宋代《太平圣惠方》、明代《普济方》、清代《验方新编》分析 9 本著作中白鲜皮方类信息，只纳入以白鲜皮为主的方剂或含有白鲜皮名的方剂，删除重复信息，使用 Microsoft office Excel 2019 软件录入数据，再使用 SPSS17.0 对数据进行分析。

二. 白鲜皮的本草研究

2.1 产地、采收时间

明确古籍中白鲜皮的产地和采收时间对于其毒性的考证具有重要价值，如文献对比不同地区白鲜皮有效成分含量发现，不同地区所产白鲜皮有效成分含量不同^[5,6]，更有甚者部分有效成分未达到当今药典规定最低含量^[7]。本研究共收集白鲜皮产地信息 6 本，随着历史时代的变化这些产地的名称现代称呼与古籍记载稍有出入。提到较多的为“滁州”和“润州”，这两地分别为滁州，简称滁，是安徽省辖市和江苏省镇江和南京、丹阳、句容、金坛、江宁等市县地。蜀中则为现今四川省中部地区。详见图 1，通过分析归纳，可认为白鲜皮原产地为现滁州和润州两地为主，但在古籍记载中提到蜀中次数为 2 且均认为为优质，所以可总结蜀中白鲜皮质地为优，是否蜀中（今四川省）疗效好，毒性与其他地区存在差异尚待进一步的研究证实。

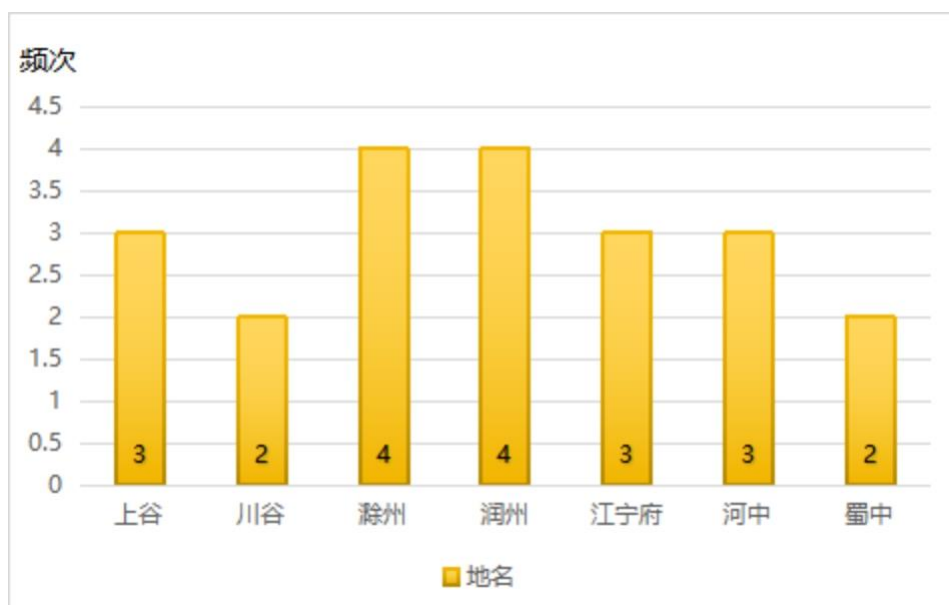


图 1 地名

本文共收集白鲜皮采集时间^[8]词条 28 条，其中“无”最为多见，共计出现 23 次，占比 82.1%，即大多数著作未记录白鲜皮采集时间，将白鲜皮记载采集时间汇总后发现其中四次记载宜二月采根实，晚则虚恶也。三次记载四五月采则阴干用。通过古籍记载与现代研究分析发现采收时间可能是白鲜皮毒性产生的主要因素，估计显示白鲜皮的采收最好是在二月采收，文献证实二月采收白鲜皮有效成分含量较高^[9]，但晚于 2 月份采收白鲜皮是否毒性更强有待实验确证。

2.2 性味归经

本文共收集白鲜皮性味类词条 28 条，大多数为“无”占比为 57.1%。有明确记载的古籍之中“苦、寒”次数最高，首次记载与《千金翼方》。“苦”出现频次为 12 次，占比 42.8%；“寒”出现频率为 13，占比 46.4%。“咸”首次记载于《千金翼方》，在其之后中也有引用，共计出现频次 7 次，占比 25%；“甘”只出现于《药性切用》，占比 3.5%，详见图 2，通过分析归纳，白鲜皮性味为苦、寒，这也与《药典》中记载相同。

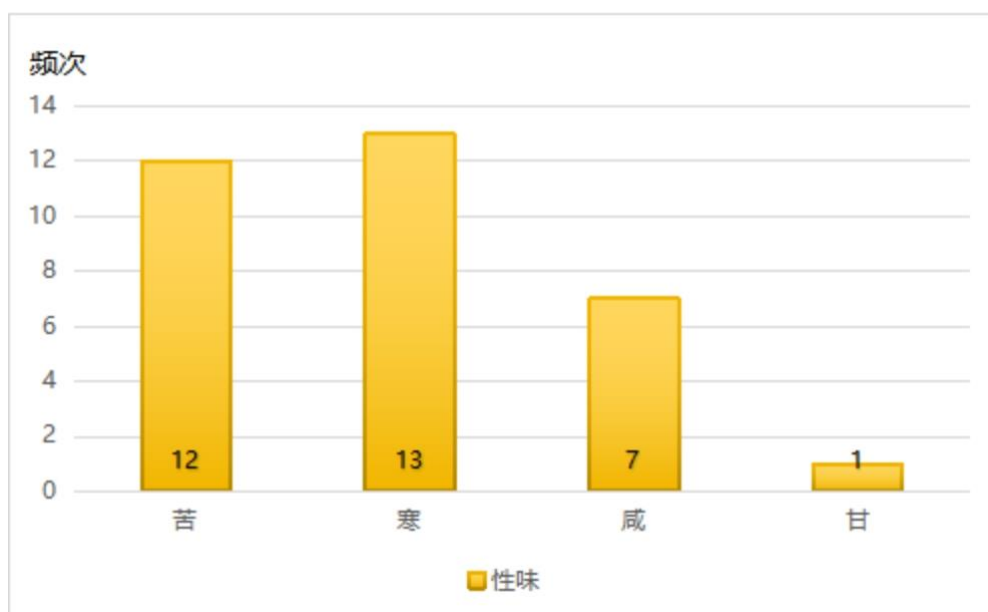


图 2 性味

本文共收集归经类词条 28 条，其中“无”占比最高，共计出现 24 次，占比 82.7%；其次为“小肠”，出现频次 5 次，占比 17.8%；再次为“胃、膀胱”，出现频次 4 次，占比 14.2%，详见图 3，通过分析归纳，白鲜皮多入小肠、胃、膀胱经。

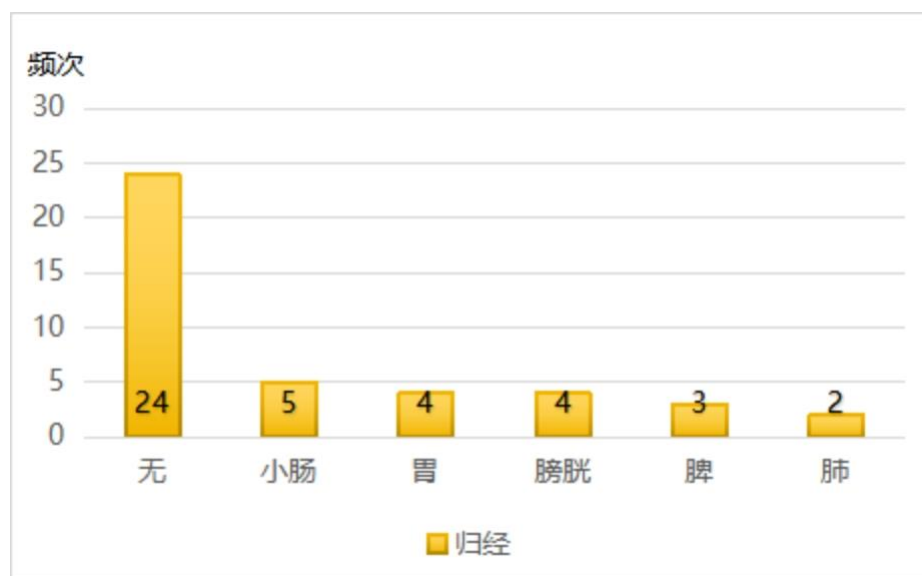


图 3 归经

白鲜皮性味为苦、寒，多入小肠、胃、膀胱经。现代中药数据挖掘与成分机制研究发现，味苦中药多为寒凉，这多因中药中所含柠檬苦素与黄酮类化合物所致^[10]，而这也与前文中文白鲜皮现在成分研究相对应，提示我们白鲜皮所产生的不良反应多于此相关，现代研究显示苦寒类药物不良反应对产生与古时的胃

（古时包含小肠），多为胃肠组织损伤^[11]，对应白鲜皮归经，因此，在白鲜皮使用中脾胃虚寒、小肠火不足的患者应尽量避免使用，防止要不对证患者出现药源性胃肠组织损伤。

2.3 白鲜皮毒性

本文共收集白鲜皮毒性相关词条，其中 23 本本草毒性记载全为“无毒”，因此，古人认为白鲜皮为无毒。白鲜皮在方剂中首载于《千金翼方》，但在不同书中记载有禁忌症状共涉及 8 本，根据《本草易读》中的“产后中风，人虚不可服他药，一味白鲜皮，新水煎服”的说法，后代多在其药用关系后补充说明“不可与他药合用”，详见表 1。

表 1 禁忌内容

书名	朝代	禁忌内容
神农本草经疏卷八	明	下部虚寒之人虽有湿证勿用。
本草从新	清	一味白鲜皮汤、治产后风。
本草求真	清	若使素属虚寒，切勿妄用。
本草易读	清	产后中风，人虚不可服他药，一味白鲜皮，新水煎服。
药性切用	清	下部虚寒，虽有湿症，勿用。
本草述钩元	清	下部虚寒之人，虽有湿证，弗用。
要药分剂	清	下部虚寒之人，虽有湿症，勿用。
本草衍句	清	产后中风人虚，不可服他药者，一物白鲜皮汤，新汲水煎服。

综上所述，通过对本草类古籍记载分析发现白鲜皮为无毒，其性味为苦、寒，其胃肠道的不良反应可能与其苦寒之性相关，因此，古籍一再强调“下部虚寒之人虽有湿证勿用”。另外，白鲜皮的产地和采收时间不当也可能是其毒性产生的又一因素，但仍需进一步的研究证实。

三. 白鲜皮方书研究

所选方书为《备急千金药方》、《黄帝素问宣明论方》、《金匱要略方论》、

《普济方》、《奇效良方》、《千金翼方》、《伤寒论》、《圣济总录》、《太平惠民和剂局方》、《太平圣惠方》、《汤头歌诀》、《外台秘要》、《严氏济生方》、《验方新编》、《证治准绳·类方》、《肘后备急方》。

3.1 白鲜皮剂型及给药方式分析

本文共收录白鲜皮剂型相关词条 64 条，其中汤剂剂出现频次最高，共计出现 61 次，占比 95.3%，散剂 2 次占比为 3.1%，丸剂一次，占比为 1.5%；详见图 4。汤剂给药方式完全以内服为主，共计出现 56 次，均为去渣后服，其中不拘时温服出现 18 次，临卧温服出现 6 次；其次只为不计时候，未出现是否温服，出现 4 次，食后温服出现 4 次；分作三服出现 3 次，量儿大小，分减温服 3 次；其余 18 次未提及服用方法。外用共计出现 3 次，其中用洗面手出现 2 次，为细锉，以水三斗，煎至一斗五升，去滓，投朴硝一两半，搅热洗头，余滓重煎，入朴硝，如此三度洗之。散剂用法为，用纸卷成条，点火烧烟出现 1 次，剩余 1 次为先服如意汤毕，上此药神效，未明确表明外用方法。丸剂给药方式为内服，共计出现 1 次，为上六味，捣为细末，面糊和丸，如绿豆大，每服十丸，煎使君子汤下，不拘时。通过归类分析，白鲜皮复方常以汤剂内服为主，主治湿热之证，这也与前文中所得出白鲜皮药性相通，唯湿热证适宜，其他证候使用可能会出现毒性反应。这提示我们正确辨证用药，是防止白鲜皮药源性毒性的主要措施。

3.2 剂量分析

因古代各朝代所用度量单位不同，故将各朝代度量单位折算为克，宋代一钱约合现代 4.14g^[12-14]，明代一钱约合现代 3.73^[15, 16]，本文共收集剂量类相关类词条 64 条，白鲜皮复方多出自宋、明两代，作为主要参考，宋代《太平圣惠方》中提到用量汤剂常为一钱到两钱换算到现代约合 4.14g-8.28g；丸剂为十丸。在明代《普济方》用量常在三钱，换算到现代约合 10.19g，东晋《肘后备急方》、唐代《千金翼方》清代《验方新编》均未明确具体用量。通过归类分析，白鲜皮复方常用剂量在古籍记载之中为一钱到三钱折算之现代用药剂量应在 4g-10g 之间，与现代药典规定剂量相近。剂量时药物产生毒性的主要因素，本文通过古籍分析得出的白鲜皮古籍用量可为其不良反应的规避提供参考。

3.3 白鲜皮常用配伍药分析

本文共收集白鲜皮常用配伍药词条 390 条，白鲜皮复方常用配伍药以黄芩为最多，出现 22 次，占比 5.6%；甘草其次，出现 21 次，占比 5.3%；杏仁、防风、麦门冬再次，各出现 18、14、14 次，占比分别为 4.6%，3.5%，3.5%，详见表 2，通过分析归纳，白鲜皮常见配伍药为黄芩、甘草、杏仁、防风、麦门冬等。

表 2 白鲜皮常见配伍药统计表

出现频次	配伍药
20 次以上	黄芩（22）、甘草（21）
15 次以上	杏仁（18）
10 次	防风（14）、麦门冬（14）、大青（13）、川大黄（12）、栀子仁（12）、犀角屑（11）
5-10 次	川升麻（10）、玄参（10）、白芷（9）、麻黄（8）、细辛（8）、白术（7）、百合（6）、芍药（6）、柴胡（6）、石膏（6）、知母（6）
3-5 次	白茯苓（5）、当归（5）、葛根（5）、大黄（4）、独活（4）、附子（4）、钩藤（4）、款冬花（4）、羚羊角屑（4）、人参（4）、肉桂（4）、桑白皮（4）、升麻（4）、芎（4）
3 次及以下	车前子（3）、地骨皮（3）、菊花（3）、茯苓（3）、龙齿（3）、沙参（3）、茵陈（3）、蚱蝉（3）、枳壳（3）、子衿（3）、白附子（2）、白僵蚕（2）、白檀香（2）、白前（2）、鳖甲（2）、赤芍药（2）、川朴硝（2）、川芎（2）、荆芥穗（2）、蔓荆紫（2）、木通（2）、铅霜（2）、秦艽（2）、郁金（2）、白矾（1）、白芍（1）等

综上所述，通过对方书的挖掘得出，白鲜皮常以汤剂内服使用，使用剂量常在 4-10g 之间与现代药典相一致，并且常与黄芩、甘草、杏仁、防风、麦门冬配伍使用。在现代使用过程中常与古籍有所出入，仝小林院士在使用过程中结合自己多年用药经验灵活变化用药剂型剂量，在治疗红皮病的银屑病的时候使用白鲜皮的用量一度达到 30g，但通常未见毒性反应的发生^[17]。仝小林院士也曾指出，

脾虚便溏者不宜用；使用大剂量白鲜皮时可能导致肝损伤，应用时应注意监测患者肝功能。在对一位 70 岁女性患者用汤剂治病时因配伍用与白鲜皮一致多为苦寒类中药二诊时发现患者出现胃部不适，好在全小林院士用药经验丰富通过加入生姜等甘味中药对方中寒性中药加以佐制，最终达到了临床患者症状缓和的效果^[18]。所以通过古籍与现代名家对白鲜皮的用药研究分析发现，虽汤剂较多但也应灵活运用剂型来防治不同的疾病，在防治的同时加强对剂量的把控，防止因白鲜皮使用剂量过大导致其肝毒性的发生，而且白鲜皮的配伍用药古籍反应黄芩、甘草最多，这两味药的性味与院士使用时产生毒副作用与解毒过程应用的中药相似，这也提示我们在使用时应注意不同配伍与白鲜皮使用时的相互作用，合理使用配伍才能达到减毒增效的效果，达到避免毒副作用产生的目的。

四. 白鲜皮药理作用研究

白鲜皮因其多样的治疗作用和其复杂的化学成分吸引了众多国内外学者对其药理作用的研究与探明。目前通过对白鲜皮有效成分的提取实验发现其对须癣毛癣菌、犬小孢子菌、和红色毛癣菌、白念珠菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌和大肠杆菌等多种细菌具有良好的抑菌作用^[19-22]。对白鲜皮的醇提物进行实验发现，提取物具有良好的促凝血效果^[23]和心血管保护效果^[24, 25]。在对白鲜皮的其他药理作用研究过程还发现其具有抗炎作用^[26-28]、红细胞的氧化损伤的保护抑制作用^[29]、抑制脾淋巴细胞活力^[30]、调节机体的免疫平衡的作用^[31]、抑制前列腺癌 PC-3 细胞的增殖及迁移^[32]。这么多的药理作用体现着白鲜皮的研究价值，同时也反映了其在使用过程中可能因其多样的药理作用而带来药物副作用，所以分析其毒性来源与机制将成为未来研究的重点。

五. 白鲜皮毒性研究

5.1 白鲜皮现代毒性报道

白鲜皮目前研究最多的为白鲜皮的肝毒性，在白鲜皮临床用药报道中出现最多的也是肝毒性。黄奕雪发现患者每日服用白鲜皮粉末 15g 五天后出现不良反应，经检查确诊为肝损伤，刘宇翰^[33]对临床使用白鲜皮的 140 位患者用白鲜皮治疗的其中 100 位出现肝损伤的患者进行临床研究，发现连续使用白鲜皮 10-30 天，患者出现肝损伤平均时间为 17 天，而且部分患者在一天连续服用白鲜皮水煎液 5-6

次后也会出现急性肝损伤。所以笔者认为在临床使用过程中大剂量、长时间服用白鲜皮具有出现急性肝损伤的风险。除服用白鲜皮单味药会出现肝损伤之外，不当的使用白鲜皮的复方制剂如：痔血胶囊^[34]、复方青黛丸^[35]、消银片^[36]、白癜风胶囊^[37]和克银丸^[38]等也有出现肝损伤的风险。国家药品不良反应监测中心就曾指出，痔血胶囊具有引起肝损伤的风险。痔血胶囊由白鲜皮和苦参组成，但是苦参及其所含生物碱如氧化苦参碱等在临床上还可用于慢性肝炎等疾病的治疗，提示苦参可能不是痔血胶囊导致肝损伤的主要原因，所以白鲜皮就可能是引起肝损伤的主要原因。据临床病例报道，患者每天服用复方青黛胶囊 18g，分别在服用 15 和 20 天后出现肝毒性反应，虽然白鲜皮和复方青黛胶囊均记载为无毒，但是每天 18g 的服用远大于古籍与当今药典规定的 4~10g，结合服用时间均大于 15 天后出现肝毒性的结果，所以笔者认为白鲜皮复方的服用剂量过大以及长时间的服用依然会对患者造成肝毒性^[39]。贾旭晨等^[3]在通过对临床使用的复方青黛胶囊所报道的临床不良反应进行归纳总结之后，又对其主要成分以及主要成分可能的致毒机制进行分析之后发现，复方青黛胶囊中所含的白鲜皮为用药之后造成肝毒性的主要原因之一。结合前文痔血胶囊的主要成分，复方造成的肝毒性的可能更加锁定白鲜皮。在实验室研究中，战奕巍^[40]等对小鼠使用超大剂量的白鲜皮之后，小鼠的血清中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和乳酸脱氢酶(LDH)水平分别升高 500、140 和 40 倍，这些指标更是直接证明超大剂量的白鲜皮对肝脏容易引起急性肝损伤。本实验室之前的类似研究也曾指出白鲜皮联合其他药物同时使用会加大肝损伤^[41]出现概率。所以我们在使用的时候就要思考白鲜皮的过度使用所造成的副作用是否可以为人所接受。后续应深入研究白鲜皮作用的量-时-毒-效关系，从而更加安全、有效、精准地发挥其药效^[42]。白鲜皮除了可能造成肝损伤之外还能引起胃肠道损伤^[18, 43]，这种不良反应的发生大多与前文中得出的白鲜皮苦寒的药性和其常与同为寒凉药性的黄芩配伍用药相关，并且前文中挖掘的白鲜皮胃肠归经也为不良反应发生部位提供强有力的参考依据。

5.2 制毒机制

白鲜皮为芸香科植物白鲜属植物白鲜(*Dictamnus dasycarpus* Turcz.)的干燥根皮，现代研究表明，白鲜皮主要包括生物碱类、柠檬苦素类、倍半萜及其苷类、三萜类、苯丙素类、黄酮类、甾醇类、挥发油类等化学成分^[2]。其中主要造成肝

损伤的主要化合物为白鲜皮碱，白鲜皮碱主要通过代谢反应性，环氧化物中间体与含有半胱氨酸残基的蛋白质共价结合引起的蛋白质结构和功能改变。除此之外，白鲜皮碱还具有细胞毒性可诱导产生严重的细胞变性，增加肝脏过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、超氧化物歧化酶（SOD）和丙二醛MDA水平，改变异柠檬酸脱氢酶(IDH2)和神经前体细胞表达发育，下调 NEDD9 的表达以及与胆汁酸转运相关的 MRP3、MRP4 和 NTCP 基因的表达^[44]。白鲜皮的另一种活性物质柠檬苦素也被证实具有一定的肝毒性，其主要的作用部位为线粒体作用的肝细胞中的线粒体，通过肝细胞线粒体的氧化损伤最终诱导细胞死亡致使肝损伤的造成，详见图 4。

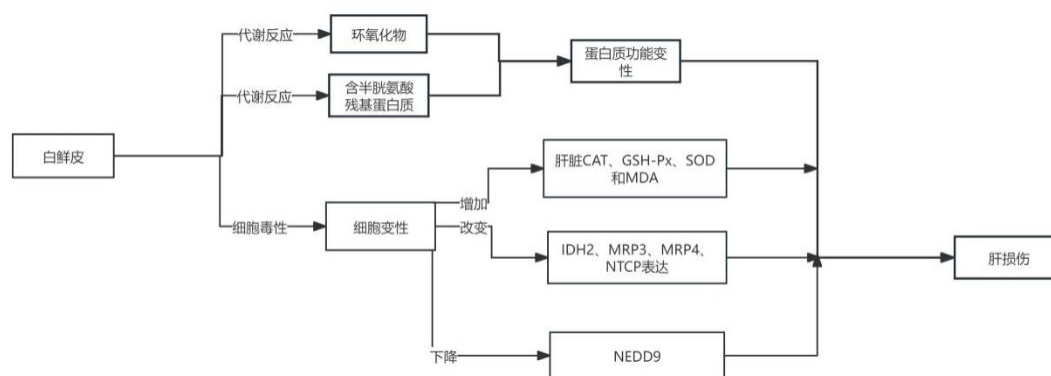


图 4 损伤机制

5.3 防毒、解毒措施

白鲜皮的用药关系在古籍记载之中多为白鲜皮的相恶药品的记载，本文一共收录白鲜皮相恶词条 8 条，其中多为恶桑螵蛸、桔梗、茯苓、萆，最早记录与《本草蒙筌》，尽量去避免白鲜皮与相恶药物配伍，避免毒性作用增强。在古籍挖掘的过程中有 8 本提到白鲜皮使用禁忌症，我们在现代用药以及合理用药研究中也应注意规避，现代临床使用中白鲜皮的剂型相对多变，古籍记载汤剂占比高达 95.3%，所以汤剂使用剂量应遵循古籍记载，若超计量使用或长时间使用会对患者出现肝损伤的风险，但现代白鲜皮也常做外敷药使用，使用时计量相对灵活多变，部分用药剂量可能远超古籍记载，此时应对患者进行不良反应监测和肝功能检查，这些可以归为用药时的防毒措施，但是古籍之中关于白鲜皮中毒之后的主要解毒方式，以及中毒之后的对应解药却鲜有提及。

本文通过对古籍和现代临床用药加以挖掘分析提出对白鲜皮解毒可以针对其苦寒药性加以用药解毒，不论是古籍最常用甘草配伍还是现在临床全小林院士

使用生姜佐制都显示出甘味中药对其毒性的化解。对于白鲜皮肝损伤的现代用药研究中, 战奕巍等^[40]通过对白鲜皮造成的急性肝损伤小鼠给与二月兰籽水煎剂, 发现二月兰 (*Orychophragmus violaceus*, OV) 籽水煎剂能明显缓解白鲜皮引起的急性肝损伤, 这属于其他植物作为药物缓解白鲜皮造成的肝损伤。在给药剂量为 60、75g·kg⁻¹ 时小鼠会出现急性肝损伤, 但是在给药过程中同时给与巯基试剂谷胱甘肽和 N-乙酰半胱氨酸可以有效缓解白鲜皮对小鼠造成的肝损伤^[45], 这属于现代化药对于白鲜皮所造成的肝损伤的修复。

六. 讨论

本文通过古籍数据挖掘和现代研究对比认为白鲜皮在使用过程中常认为无毒, 但是都是在古今规定使用剂量 4~10g 之内, 超出此剂量之后古籍虽未记载不良反应的发生但是现代临床用药时发现每天服用剂量大于古籍归纳剂量可能出现肝损伤。此外, 即使是在规定剂量之内服用时间过长也存在出现肝损伤的风险。除服用白鲜皮单味药之外白鲜皮复方的服用剂量过大以及长时间的服用依然会对患者造成肝毒性。所以本文通过本草类古籍数据挖掘提出, 使用四川两年生二月采摘的白鲜皮入药, 此时药物有效成分含量最高达到减少白鲜皮用药剂量减少不良反应发生的目的。文中还通过挖掘与白鲜皮相恶的中药以及白鲜皮应用过程中的禁忌症, 来提供更加全面的防毒措施。若使用过程中依然出现不良反应或毒性反应, 本文先通过对古籍数据挖掘加以分析得出不良反应的原因多是因白鲜皮性味苦寒, 又归于胃、小肠、膀胱经, 所以好发胃肠组织损伤引起的胃肠道反应, 之后又对现代实验室研究加以分析得出白鲜皮造成肝毒性的主要成分为白鲜皮碱和柠檬苦素。所以针对以上不良反应和毒性反应本文提出的解毒措施为针对白鲜皮苦寒药性加以甘味中药佐制, 而肝毒性则可以在使用时辅助以保肝类药物和定期进行肝功能检查。

本文在研究白鲜皮毒性减毒措施时发现, 在古籍《得配本草》、《本草述钩元》《要药分剂》中记载白鲜皮炮制方法为去根去皮后, 再以水洗去粗皮, 终以水煎煮后温服。但后人并未基于此对白鲜皮的炮制工艺进行改良, 笔者认为这与白鲜皮多被历代本草列为无毒之品有一定联系, 毕竟炮制的主要意义为减少毒性。所以笔者认为可以对白鲜皮的炮制方法通过现代研究加以改良, 使白鲜皮的现代炮制方法更加贴合现代临床使用。除此之外, 现代临床证候研究方面还是比较缺

少，对于临床的中毒事件和不良反应的发生情况的统计也尚不完全，这可能也会成为未来一个可以研究的方向，不论是古籍分析还是现代实验研究，主要还是为了我们临床的合理用药提供服务。

综上，白鲜皮确有一定毒性，主要毒性成分为白鲜皮碱和柠檬苦素，口服容易造成肝功能损伤，且其毒性的产生会随着剂量的增加而显著，在外用过程中鲜见药物毒性的产生^[46]。我们在临床使用过程中做到保证药物基源、谨慎选择配伍药、使用剂量和使用时间合理，炮制方法，做好相应的不良反应的临床统计，学习了解相应的中毒解救措施，一样可以放心大胆的使用白鲜皮，避免因担心毒性作用导致使用剂量过低而不能发挥治疗作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部 M 北京 中国医药科技出版社. [M].
- [2] 刘新月, 陈乐乐, 孙鹏, 等. 白鲜皮化学成分、药理作用和毒性研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中国新药杂志, 2023,32(08): 799-805.
- [3] 贾旭晨, 许妍妍, 李遇伯. 复方青黛制剂及单味药的毒性研究进展[J]. 中草药, 2023,54(24): 8282-8289.
- [4] 石伟, 高源, 郭玉明, 等. 基于免疫应激的白鲜皮致特异质肝损伤评价研究[J]. 药学报, 2019,54(4): 678-686.
- [5] 王子刚, 于海娇, 秦梦, 等. 东北地区野生白鲜皮 3 种药用成分含量分析[J]. 河北农业科学, 2014,18(03): 79-81.
- [6] 赵琳琳, 温博, 温立义, 等. 吉林省流通白鲜皮饮片对白鲜碱的含量分析[J]. 检验检疫学刊, 2019,29(4): 31-33.
- [7] 鲍忠杨晓娟刘艳芳. RP-HPL 同时测定白鲜皮中 3 种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2010,2(35): 187-190.
- [8] 安一珂, 彭孟凡, 杨卉妍, 等. 中药鲜药发展史、鲜药理论及未来展望[J]. 中草药, 2024,55(03): 1046-1052.
- [9] 刘丽娟, 张国鸿, 孙文艺, 等. 不同生长阶段白鲜皮中黄柏酮和梣酮累积量的变化规律[J]. 东北林业大学学报, 2015,43(04): 131-133.
- [10] 孟子晗, 孙伟宁, 付晓芸, 等. 中药“苦味”产生机制及评价方法研究进展[J]. 广东药学院学报, 2016,32(04): 537-540.
- [11] 白亚亚, 张桥, 程鸿俊, 等. 酒制对“寒性”中药影响的研究进展[J]. 中草药, 2023,54(17): 5773-5785.
- [12] 张莉莉, 温志歌, 于同月, 等. 白鲜皮的临床应用及其用量探讨[J]. 吉林中医药, 2021,41(02): 252-255.
- [13] 席泽宗. 中国科学技术史(物理卷、度量衡卷、陶瓷卷、科学思想卷)[Z].
- [14] 傅延龄, 宋佳, 张林. 经方本原剂量问题源流[J]. 北京中医药大学学报, 2013,36(05): 293-296.
- [15] 傅延龄, 陈传蓉, 倪胜楼, 等. 论方寸匕、钱匕及其量值[J]. 中医杂志, 2014,55(07): 624-625.
- [16] 吴城落. 中国度量衡史 M 北京 商务印书馆. [M].
- [17] 段娟, 刘莱莱. 全小林教授临床辨治红皮病型银屑病经验介绍[J]. 新中医, 2013,45(12): 185-187.
- [18] 薛崇祥, 陈颖, 鲍婷婷, 等. 全小林应用桑白皮、地骨皮、白鲜皮治疗老年皮肤瘙痒症经验[J]. 吉林中医药, 2024,44(08): 902-904.
- [19] 杨晓伟. 抗皮癣菌中药有效成分的提取、组方筛选及药效学研究[D]. 山西农业大学, 2015.
- [20] 黄柳云, 龙致科, 周传检, 等. 4 种中药提取物抑菌作用及在肌肤洗涤剂中的应用[J]. 香料香精化妆品, 2020(4): 36-40, 45.
- [21] 丛欢, 郭丽娜, 杨莹. 白鲜皮化学成分分离及其抑菌活性实验[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013,34(06): 853-854.
- [22] 谈潘莉, 曹毅, 夏永良. 白鲜皮提取物体外抗白念珠菌生物膜作用及相关基因的研究[J]. 中华中医药学刊, 2015,33(5): 1089-1092.
- [23] 郭静. 白鲜皮提取物止血作用及其机理研究[D]. 成都中医药大学, 2006.

- [24] 兰玉艳, 李岩. 白鲜皮提取物对辐射损伤小鼠造血功能的保护作用[J]. 北华大学学报 (自然科学版), 2018,19(2): 201-204.
- [25] 韩淑慧. 瑞格列奈和白鲜碱舒张小鼠气道平滑肌的作用机理[D]. 中南民族大学发育生物学, 2020.
- [26] 陈佳骏, 杨妞妞. 白鲜皮及其活性成分抗炎止痒机制研究进展[J]. 江西中医药, 2020,51(05): 77-80.
- [27] 张春华, 马欣, 丁佩军, 等. 白鲜碱对特异性皮炎小鼠 PKC α /NF- κ B 通路及肥大细胞浸润的影响[J]. 热带医学杂志, 2021,21(06): 711-716.
- [28] 赵夏, 马晓晨. 白鲜皮提取物抗过敏反应研究[J]. 中医学报, 2019,34(3): 568-571.
- [29] 兰玉艳, 李岩. 白鲜皮提取物对红细胞氧化损伤的抑制作用[J]. 中国老年学杂志, 2019,39(23): 5810-5813.
- [30] 丛欢, 杨莹, 包亚男, 等. 白鲜碱对小鼠脾淋巴细胞体外增殖与分化的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019,35(17): 1890-1892.
- [31] 丛欢, 杨莹, 包亚男, 等. 白鲜碱对小鼠脾淋巴细胞活力的体外抑制作用及机制研究[J]. 中国药房, 2019,30(21): 2963-2967.
- [32] 廖壮文, 梁采宇, 陈灿伟, 等. 白鲜碱通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制前列腺癌骨转移 PC-3 细胞的作用[J]. 实用医学杂志, 2021,37(03): 298-303.
- [33] 刘宇翰, 周雨燕, 孙慧敏, 等. 白鲜皮导致药物性肝损伤的病理学及血清酶学改变[J]. 中国当代医药, 2017,24(26): 7-11.
- [34] 程宏吴淑云. 痔血胶囊致严重肝损害[J]. 药物不良反应杂志, 2009(4): 298.
- [35] 王秀娟, 许利平, 王敏. 常用中药及复方制剂的肝毒性[J]. 首都医科大学学报, 2007,28(2): 220-224.
- [36] 吴玉荣, 张跃萍. 消银片致肝损害[J]. 药物不良反应杂志, 2007,9(2): 143.
- [37] 王学勤, 李丰林, 张维国. 中药药物性肝损害研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015,11(5): 35-36.
- [38] 金翠萍, 杨书彦. 服克银丸致严重肝损害 1 例[J]. 中国中药杂志, 2001,26(6): 365.
- [39] 韦诗云. 复方青黛丸致药物性肝炎 2 例[J]. 中国中西医结合杂志, 1994(09): 539.
- [40] 战奕巍, 徐子茜, 郭新慧, 等. 二月兰籽水煎剂对白鲜皮所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016,30(02): 101-106.
- [41] 胡毅龙, 赵怡楠, 张双丽, 等. 基于数据挖掘的急性肝损伤动物模型应用分析[J]. 中国比较医学杂志, 2024,34(02): 89-100.
- [42] 陈禹竹, 徐晓敏, 刘树民, 等. 白鲜皮及其有效成分的药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2024,47(2): 409-418.
- [43] 李心宽. 复方白鲜皮汤治疗风热型荨麻疹的临床体会研究[J]. 中医临床研究, 2023,15(12): 125-127.
- [44] LI Z, WANG L, ZHOU J, et al. Integration of transcriptomics and metabolomics profiling reveals the metabolic pathways affected in dictamnine-induced hepatotoxicity in mice[J]. Journal of proteomics, 2020,213: 103603.
- [45] 黄琳艳. 白鲜皮肝损伤化学机制研究[D]. 遵义医科大学, 2020.
- [46] 宋金平, 田硕, 苗明三. 2020 年版《中华人民共和国药典》(一部)可外用中药药性特点分析[J]. 中医学报, 2023,38(10): 2254-2260.

大数据视域下的方剂中药功效统一分类体系构建研究

李可千¹，张美微¹，朱彦²，姚克宇^{2*}

(1. 长春中医药大学医药信息学院，吉林长春 130117；2. 中国中医科学院中医药信息研究所，北京 100700)

[摘要] 目前，方剂、中药相关的大数据分析处理存在数据传递整合困难、不同体系沟通不对等等问题。本文通过对国家医保目录中成药部分、《中药方剂编码规则及编码》、《方剂学》教材、《药品采购使用管理分类代码与标识码》及《中药学》教材的方剂中药分类体系进行映射、对比，保留功效分类去除其他分类，统一分类层级（三级分类）、术语表述，进而尝试构建一个面向大数据分析处理的方剂中药统一功效分类体系。以期能够为信息深度共享利用提供支持，打通基础研究、新药研发和临床应用等领域之间的壁垒，助力方剂中药相关领域大数据研究。

[关键词] 功效；分类体系；中药；方剂；中成药；大数据

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目：广义中医经典名方智能辅助遴选系统关键技术研究 (82174534)

中国中医科学院科技创新工程项目资助：顶层本体指导下的证候构建研究及应用(CI2021A05306)

中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助：中医药语义信息标准化探索研究(ZZ13-YQ-126)

中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目：基于深度学习的中成药自动分类研究(ZZ160311)

[第一作者] 李可千，硕士研究生，E-mail: lkqjynl6666@163.com

[通信作者] 姚克宇，博士，副研究员，主要从事中医药信息学研究，Tel: 010-64089639，E-mail:

yao_keyu@163.com

Research on the Construction of a Unified Classification System for the Efficacy of Traditional Chinese Medicine Formulas under the Perspective of Big Data

LI Ke-Qian¹, ZHANG Mei-Wei¹, ZHU Yan², YAO Ke-Yu^{2*}

*(School of Medical Information, Changchun University of Traditional Chinese Medicine,
JilinChangchun130117; Institute of Traditional Chinese Medicine Information, Chinese Academy
of Traditional Chinese Medicine, Beijing100700)*

[Abstract] Currently, there are difficulties in data transmission and integration, as well as unequal communication between different systems in the big data analysis and processing of prescriptions and traditional Chinese medicine. This paper attempts to map and compare the classification systems of prescriptions and traditional Chinese medicine in the national medical insurance directory for traditional Chinese medicines, the “Coding Rules and Codes for Traditional Chinese Medicine Prescriptions”, the “Pharmacopoeia” textbook, the “Drug Procurement, Use, and Management Classification Codes and Identification Codes”, and the “Traditional Chinese Medicine” textbook. By retaining the efficacy classification and removing other classifications, unifying the classification levels (3-level classification), and terminology expressions, the paper aims to construct a unified efficacy classification system for prescription and traditional Chinese medicine oriented towards big data analysis and processing. It is expected that this will provide support for the deep sharing and utilization of information, break down barriers between basic research, new drug development, and clinical applications, and facilitate big data research in the field of prescription and traditional Chinese medicine.

[Key words] Efficacy; Classification System; Traditional Chinese Medicine; Prescription; Chinese Patent Medicine; Big Data.

1. 引言

国家“十四五”规划中明确提出健全中医药信息标准体系,优先制修订中医药分类编码、系统共享、数据治理、数据安全等信息标准及中医药统计指标元、中医医疗服务统计数据标准,加强与医疗健康信息标准协同对接,培育发展团体标准^[1]。术语标准是信息化建设的基础,只有在统一概念和术语的基础上,才能实现信息的规范化表达和有效传播,进而实现信息的深度共享和综合利用^[2]。中药及方剂作为中医学理法方药知识体系中最重要的重要组成部分,对其进行系统规范分类,对于教学、临床及科研等具有重要的意义。

功效,指在中医药理论指导下,中药用于防治疾病的作用或疗效的高度概括。功效分类法的优点是便于掌握同一类药物在药性、功效、主治病证、禁忌等方面的共性和个性,更好地指导临床应用,它是现代中药学最普遍采用的分类方法^[3]。方剂功效分类是清代汪昂在《医方集解》中提出的一种以功效分类为主的综合分类法^[4]。此方法完善了方剂学分类体系,指导着近现代方剂分类并推动方剂学发展^[5]。在现有的教学、临床及科研等不同领域中,历版《方剂学》教材及现有国家标准均为沿用汪昂《医方集解》以功效为主的综合分类法;功效分类法也是现代《中药学》教材最普遍采用的分类方法;现行的医保目录、药品采购等分类中,则采用科室、功效等混合分类方法,加入了科室等临床属性^[6],以便为临床服务^[7]。

然而在如今大数据研究中,不同领域的不同分类体系,会带来如数据储存传递不便、沟通困难等多方面的问题^[8];本团队此前也通过大语言模型^[9]、机器学习^[10]等大数据应用方法对自动化方剂功效分类进行探索研究,在研究过程中发现非功效分类与功效分类的冲突导致方剂分类困难,如不同来源的表述和层级结构不一致、不同体系的方剂中药数据整合困难等,进而影响机器学习、大语言模型分类的准确率等。现有学者也对方剂中药分类方式进行研究,探索更为合适的分类体系。葛忠琪等^[11]根据现有医保分类,探索功效为主的中成药分类,且调查显示满意率更高;丁彬彬等^[12]对中成药的各种分类方法及其优缺点进行综合分析,且于后续提出基于病证方理论的中成药分类法^[13];李学林等^[14]提出“以功效为主,科别为辅,病证为补充”的分类模式。功效作为各个分类体系中的重要概念,可以相互贯通,彼此融合,但目前尚无面向中药、方剂等统一的功效分类体系来满足统一体系应用场景的需求。

随着中医药信息化的全面推进及不断发展,建立统一的分类体系可以解决方剂中药等庞大的数据传递整合困难、不同体系沟通不对等等问题,能够对方剂、中医、中成药及饮片等多类别数据综合分析,有利于中医药的教学、临床和科研,实现信息的共享交换与利用。故本研究从功效出发,对现代五种不同场景的功效分类内容进行对比映射,将不同体系内容之间的差异进行梳理,把功效内容加以整合,对建立方剂中药功效统一分类体系进行探索研究。

2. 资料与方法

2.1. 数据来源

选取国家标准《中药方剂编码规则及编码》^[15](GB/T 31773-2015)(以下简称国标)、国家医保目录中成药部分《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录(2020 年)》^[16](以下简称医保)、《方剂学》教材(全国中医药行业高等教育“十四五”规划教材全国高等中医药院校规划教材,第十一版,主编李冀、左铮云)^[17]、《药品采购使用管理分类代码与标识码》(WS/T 778-2021)(以下简称药品采购)及《中药学》教材(全国中医药行业高等教育“十四五”规划教材全国高等中医药院校规划教材,第十一版,主编钟赣生、杨柏灿)^[3]的分类体系。

2.2. 方法

本研究将 5 个来源的方剂分类标准的相关数据导入 Excel 软件中形成数据表,编制相互映射的关系表,通过文本比对、数据统计、文献分析等方法相互映射,从分类方法、分类层级等,分析和比较不同标准的差异,将内容梳理整合提出统一的功效分类。

3. 现有分类体系映射对比

对 5 个来源的方剂分类表进行对比及相互映射研究,完整映射结果见映射表。

3.1. 分类情况对比

各来源分类术语总计、分类方法和对应数量、分类层级,如表格 1 所示。统计的术语为该分类包含分类标题内的全部术语数量;分类方法根据不同的分类层级分为一至四级分类,如内科用药(一级)-清热剂(二级)-清脏腑热剂(三级)-清热理肺剂(四级);分类数量为在此层级内不同种类术语的数量,经对比研究,种类有功效、科室(如内科用药、外科用药)、民族(如藏药、蒙药)、

疾病名（如肿瘤用药）、身体部位（如眼病、耳病）、给药途径（如内服、外用）；

表格 1 五个来源分类情况比较
Table 1 Comparison of Classification Situations from Five Sources

来源	分类术语总计数 (含类目标题)	分类方法 (括号中为此分类数量)	层级
医保目录	149	一级分类（9）：科室（8）、民族（1） 二级分类（39）：功效（29）、疾病名（2）、 身体部位（5）、民族（3） 三级分类（83）：功效（77）、给药途径（6） 四级分类（18）：功效	四级
国家标准	79	一级分类（20）：功效（19）、疾病名（1） 二级分类（59）：功效（57）、给药途径（2）	二级
方剂学教材	88	一级分类（21）：功效（20）、疾病名（1） 二级分类（67）：功效	二级
药品采购	124	一级分类（23）：功效（18）、科室（1）、身 体部位（1）、给药途径（1）、民族（1）、其 他（1） 二级分类（101）：功效（77）、身体部位（5）、 民族（6）、其他（23）	二级
中药学教材	59	一级分类（21）：功效 二级分类（38）：功效	二级
总计	499	一级分类（医保为二级）：124 二级三级分类：366 功效分类：441 功效分类占比：88.4%（保留小数点后一位）	

3.2. 一级分类对比

《医保》的二级分类以功效为主，与其他三个来源的一级分类内容相近，故将医保二级分类与其他来源分类一级分类相映射，药品采购中所有“其他”类型的分类不计入下文对比及讨论。

在一级分类中，相同或相近的分类共有 14 种，均为功效分类，如表格 2 所示，功效术语分别为解表、泻下、清热、温里、祛痰（或化痰止咳平喘）、开窍、固涩（或收涩）、补益（或扶正、补虚）、安神、理血（或止血）、理气、消食（或消导）、治风（或疏风、平肝息风）及祛湿（或祛风湿）。

表格 2 相同或相近一级分类
Table 2 First-level Classifications that are the Same or Similar

医保	国标	《方剂学》	药品采购	中药学
解表剂	解表方	解表剂	解表剂	解表药
泻下剂	泻下方	泻下剂	泻下剂	泻下药
清热剂	清热方	清热剂	清热剂	清热药
温里剂	温里方	温里剂	温里剂	温里药
化痰止咳平喘剂	祛痰方	祛痰剂	祛痰剂	化痰止咳平喘药
开窍剂	开窍方	开窍剂	开窍剂	开窍药
固涩剂	固涩方	固涩剂	固涩剂	收涩药
扶正剂	补益剂	补益剂	补益剂	补虚药
安神剂	安神方	安神剂	安神剂	安神药
止血剂	理血方	理血剂	理血剂	止血药
理气剂	理气方	理气剂	理气剂	理气药
消导剂	消食方	消食剂	消食剂	消食药
治风剂	治风方	治风剂	疏风剂	平肝息风药
祛湿剂	祛湿方	祛湿剂	祛湿剂	祛风湿药

存在差异的分类共有 25 种，如表格 3 所示，其中功效分类 12 种，分别为驱虫、涌吐、治燥、祛暑、和解、祛瘀（或活血化瘀）、化湿、利水渗湿、化浊降脂、表里双解、攻毒杀虫止痒、拔毒化腐生肌及消肿散结；疾病名分类 2 种，为国标痈疡方及《方剂学》治痈疡剂；现代疾病命名分类 2 种，抗肿瘤药及肿瘤辅助用药，来源为医保；科室及民族分类 4 种，分别为妇科用药、五官用药、民族药及外用药，来源为药品采购；身体部位命名 5 种，分别为耳病、鼻病、咽喉病、牙病及口腔病，来源为医保。

表格 3 存在差异的一级分类

Table 3 First-level Classifications with Differences

医保	国标	《方剂学》	药品采购	中药学
	驱虫方	驱虫剂	驱虫剂	驱虫药
	涌吐方	涌吐剂	涌吐药	涌吐药
	治燥方	治燥剂	治燥剂	
祛暑剂	祛暑方	祛暑剂		
	和解方	和解剂		
祛瘀剂				活血化瘀药
				化湿药
				利水渗湿药
化浊降脂剂				
	痈疡方	治痈疡剂		
		表里双解剂		
				攻毒杀虫止痒药

拔毒化腐生肌药	
抗肿瘤药	
肿瘤辅助用药	
消肿散结剂	
	妇科用药
	五官用药
	民族药
	外用药
耳病	
鼻病	
咽喉病	
牙病	
口腔病	

3.3. 二级及三级分类对比

5 个来源的二级分类及三级分类共计 338 个术语，其中功效术语共计出现 318 个，非功效术语共出现 20 次，具体内容如表格 4 所示。二级三级分类去除非功效术语后，医保共有 95 个功效术语，国标共有 58 个，方剂学共有 61 个，药品采购共有 90 个，中药学共有 38 个；五个来源均出现的功效有 14 个，医保单独出现功效 68 个，国标单独出现功效 1 个（驱虫），方剂学单独出现功效 7 个；药品采购去除“其他”相关内容，单独功效术语共 18 个；中药学单独功效术语 13 个；未五个来源全部出现且非单独出现的功效术语共 50 个。

表格 4 二级三级分类中非功效术语
Table 4 Non-efficacy Terms in the Secondary and Tertiary Classifications

来源	一级分类	二级分类	三级分类
医保	妇科用药	清热剂	内服药/外用药
医保	骨伤科用药	活血化瘀剂	内服药/外用药
医保	骨伤科用药	活血通络剂	内服药/外用药
国标	痈疡方	内服/外用	
药品采购	五官用药	咽喉病/口腔、牙病/ 眼病/鼻病/耳病	
药品采购	民族药	藏药/猛药/苗药/维药/ 傣药/壮药	
药品采购	外用药	烧烫冻伤	

3.4. 现有分类体系彼此存在的差异

在上文研究中如表格 1 所示，功效分类在所有分类中占比 88.4%，其余非功

效分类为科室、民族、身体部位、现代疾病及给药途径等分类方式，分类维度过多。现有的分类层级，《医保》最高至四级其他来源为二级。

现有一级分类如表格 2 所示，功效术语完全相同的有，解表、泻下、清热、温里、开窍、安神及理气七种功效；相近功效中，存在不同来源分类命名不同、功效术语表述不一致、分类颗粒度不同等现象，同一来源存在功效内容重复的现象。如表格 5 所示。

表格 5 现有分类对比差异梳理

Table 5 Sorting out the Problems in the Comparison of Existing Classifications

问题	内容	举例
分类维度不同	不同体系存在功效、科室、民族、身体部位、现代疾病及给药途径等多个分类维度	如表格 1 的分类方法所示
分类层级不同	医保目录最高至四级分类，其余为二级	医保：内科用药-清热剂-清脏腑热剂-清热理肺剂
不同来源功效术语表述不一致	方、剂、药结尾各自不同，功效表述也存在差异。	医保&方剂学：治风剂；国标：治风方；药品采购：疏风剂；中药学：平肝息风药
分类命名不同	医保中的化痰止咳平喘剂，与其他来源功效命名方式不同，是对下属分类三种类型的概括，为方便临床用药所使用	医保：化痰止咳平喘剂 其他来源：祛痰剂（方）
分类颗粒度不同	存在不同来源相同分类，下属分类数量差距大的情况	国标：理气方-行气/降气 药品采购：理气剂-理气行滞/理气宽胸/理气疏肝/理气调中/其他理气

4. 统一功效分类体系构建

4.1. 构建原则

方剂中药分类体系各有差别，如何将分类体系融合，构建统一的功效分类体系是解决问题的关键^[18]。故本研究提出建立统一的功效分类，构建原则如下：

原则一 功效作为主体

去除各分类中非功效的术语内容，将“剂”、“方”、“药”等尾缀、科室、给药途径、身体部位、民族等非功效的术语内容，作为功效分类下辖方剂的属性。

原则二 继承原有内容

保留各个分类的功效术语内容，完全相同内容无需处理、相近内容以国标为准进行统一、各体系独有特色术语保留；

原则三 规范层级术语

统一功效分类体系应全面、层次清晰、名词规范、避免交叉重复

原则四 适用于多场景

新的功效分类体系可以涵盖所有方剂、中药等内容，可以适应取药、查询、数据互通等各个大数据应用场景。

分类体系构建整体框架如图 1 所示

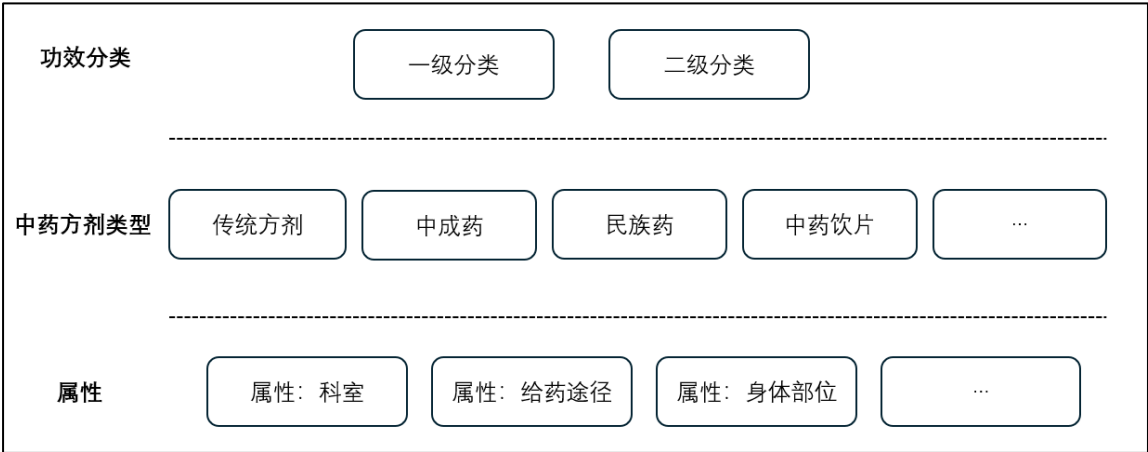


图 1 统一功效分类体系构建框架图

Figure 1. Unified Efficacy Classification System Construction Framework Diagram

4.2. 一级功效分类构建

在如表格 2 所示的现有一级分类中，按照构建原则进行处理。医保化痰止咳平喘，向国标靠拢统一为祛痰，止咳平喘部分方剂可归属到其他对应分类中（如解表）；中药学中的功效收涩统一为固涩；扶正及补虚统一为补益；止血及表格 3 中的祛瘀、活血化瘀功效统一为理血；医保消导、方剂学消散化积统一归为消食；功效疏风、平肝息风归为治风；功效祛湿精准且只有《中药学》存在不同，故将《中药学》中祛风湿、化湿、利水渗湿统一归为祛湿。

在表格 3 存在差异的一级分类中，去除上文涉及的祛瘀、化湿等，进行处理。分别为驱虫、涌吐、治燥、祛暑、和解；《方剂学》表里双解的内容在其他来源中多为功效解表下属，故归为解表；国标独有的痈疡方，是以疾病命名，其二级分类为外服及内用，均为非功效，故做去除处理；抗肿瘤药、肿瘤辅助用药为现代疾病名衍生，为非功效，做去除处理；医保化浊降脂作为现代疾病延申，便于医保使用，做去除处理；医保消肿散结，作为妇科专科分类用药，做去除处理，将其设为对应方剂的属性—科室，如图 1 所示；《中药学》独有的攻毒杀

虫止痒、拔毒化腐生肌，分别作为一类功效分类。

4.3. 二级三级功效分类构建

二三级分类构建遵循构建原则，与一级分类构建流程一致。对相近的内容进行统一，如医保中一级分类理血、止血、活血化瘀、活血通络统一归为理血，非理血的一级分类转为理血下属二级分类；功效表述有差异向国标靠拢，如开窍的二级分类，医保分类为清热开窍、芳香化痰开窍，国标为温开、凉开，开窍剂多有芳香化痰的功效，难以作为二级分类，且其所包含方剂（如礞石滚痰丸、苏合香丸等），其功效向国标的凉开、温开靠拢更为合适，故将其统一为国标分类。对一级分类相同、来源不同，且非相近或冲突的二三级分类，进行整合，术语保持不变。如一级分类清热，国标二级分类包含清热解毒、清脏腑热、清气分热、清营凉血、清虚热五种分类，医保二级分类与之不同的有清热泻火、清热镇惊、清脏腑热，其下属三种完全不同的三级分类及外科一级清热的二级清热利湿，《方剂学》教材中的二级分类气血两清，药品采购中的二级分类清热生津，《中药学》教材中的二级分类清热燥湿，全部整合在清热下属。综上所述，建立的统一功效分类，完整内容见附表 2。部分统一分类示例如表格 6 所示。

表格 6 统一功效分类示例
Table 6 Examples of Unified Efficacy Classification

一级分类	二级分类	三级分类
解表	辛温解表	
	辛凉解表	
	表里双解	解表清里
		解表温里
		解表攻里
	扶正解表	
清热	清热泻火	
	清热解毒	
	清脏腑热	清热理肺
		清肝解毒
		清肝胆湿热
		清利肠胃湿热
	清热镇惊	
	清气分热	
	清营凉血	
	清虚热	
	气血两清	

	清热利湿
	清热燥湿
	清热生津
开窍	凉开
	温开
驱虫	驱虫
涌吐	涌吐
攻毒杀虫止痒	
拔毒化腐生肌	

5. 讨论

统一的功效分类体系能够以功效为抓手，贯通中药、方剂以及中成药，使其彼此不再相互独立，以期能够满足需要统一体系的大数据应用场景：

- 1) 面向基础研究。统一的功效分类体系便于高效的、整合的、系统的知识获取，从而避免信息沟通储存传递困难等问题。可以应用于探索药物相互作用、语义网络构建、便于信息抽取等研究。
- 2) 面向新药研发。统一的功效分类体系可以与现代药理作用相映射，中药成分和现代化学成分在同一个大体系下，有利于实现中西医药各种场景下的语义互操作，进而促进中药质量控制、基于功效的方剂配伍研究、探索新药新配方研发、经典名方转化等；
- 3) 面向临床应用。统一的功效分类体系可以面向临床的药品合理分类及管理监督、药品采购、智能开方、探索中医推理思维及大语言模型垂直领域应用等多领域发展。

总之，方剂中药统一功效分类体系有利于消除基础研究、新药研发和临床应用间的壁垒，发挥彼此紧密相连的特性，更好的为科研、临床及教学服务。

本研究提出的统一功效分类体系，还有待实践验证，具有一定的局限性。后续课题组将从科研、医保监管、临床、教学等多个领域对分类体系进行验证、完善，以期能够为相关领域研究提供助力。

参考文献

[1] 国家中医药管理局. 国家中医药管理局关于印发“十四五”中医药信息化发展规划的通知 [M/OL]. 2022.12.05[<http://www.natcm.gov.cn/guicaisi/zhengcewenjian/2022-12-05/28427.html>].

- [2] 董燕, 于彤, 朱玲, et al. 中医药信息标准化研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(01): 124-129.
- [3] 钟赣生 杨. 中药学 [M]. 5 版 ed. 北京: 中国中医药出版社, 2021.
- [4] 赵黎. 《医方集解》在方剂学理论构建中的作用及地位 [D]; 北京中医药大学, 2021.
- [5] 赵则阔, 李春晖, 杨具洁, et al. 论方剂的分类 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(5): 6.
- [6] 蒋辉, 贾波. 浅述方剂分类法 [J]. 河南中医, 2018, 38(11): 4.
- [7] 赵文光, 詹若挺, 杨昱, et al. 基于临床用药的中成药分类探究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2012, 14(2): 6.
- [8] 方国栋, 商能欣. 基于药品分类的急诊科中成药使用管理策略研究 [J]. 中医药管理杂志, 2023, 31(24): 58-60.
- [9] Wang Z, Li K, Ren Q, et al. Traditional Chinese Medicine Formula Classification Using Large Language Models; proceedings of the 2023 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM), F, 2023 [C]. IEEE.
- [10] Ren Q, Li K, Yang D, et al. TCM Function Multi-classification Approach Using Deep Learning Models; proceedings of the International Conference on Web Information Systems and Applications, F, 2023 [C]. Springer.
- [11] 葛忠琪, 王文杨, 赵飞龙. 基于功效为主的中成药分类模式对处方合格率与满意度的影响 [J]. 中医药管理杂志, 2023, 31(06): 138-140.
- [12] 丁彬彬, 张军平. 中成药的分类方法浅析及思考 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(02): 511-512.
- [13] 丁彬彬. 基于病证方理论探讨中成药分类法 [J]. 河南中医, 2016, 36(09): 1659-1661.
- [14] 李学林, 孟菲, 唐进法, et al. 基于功效为主的中成药分类模式与方法的构建 [J]. 中成药, 2015, 37(03): 656-659.
- [15] 深圳市卫生和计划生育委员会, 深圳市罗湖区中医院, 广州中医药大学, et al. 中药方剂编码规则及编码 [M]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局;中国国家标准化管理委员会. 2015: 204.
- [16] 国家医疗保障局、人力资源和社会保障部. 国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录(2020 年) [M]. 2020-12-28[2022-03-02].
- [17] 李冀 左. 方剂学 [M]. 5 版 ed. 北京: 中国中医药出版社, 2021.
- [18] 程凌, 任雨芳. 中成药的分类模式与科学分类的优势 [J]. 中医药管理杂志, 2021.

附件 1 映射表

医保		国标		《方剂学》教材		药品采购使用管理 分类代码与标识码		中药学	
代码	分类	代码	分类	代码	分类	代码	分类	代码	分类
ZA	内科用 药								
ZA01	解表剂	1	解表方	第一章	解表剂	1	解表剂	第八章	解表药
ZA01A	辛温解 表剂	11	辛温解 表	第一节	辛温解 表剂	1	辛温解 表	第一节	发散风 寒
ZA01B	辛凉解 表剂	12	辛凉解 表	第二节	辛凉解 表剂	2	辛凉解 表	第二节	发散风 热
ZA01C	表里双 解剂	14	表里双 解						
ZA01D	扶正解 表剂	13	扶正解 表	第三节	扶正解 表剂	3	扶正解 表		
						99	其他解 表		
ZA02	祛暑剂	5	祛暑方	第五章	祛暑剂				
ZA02A	解表祛 暑剂	51	祛暑方	第一节	祛暑解 表剂				
ZA02B	清热祛 暑剂			第二节	祛暑清 热剂				
ZA02C	健胃祛 暑剂								
				第三节	祛暑利 湿剂				
				第四节	祛暑益 气剂				
ZA03	泻下剂	2	泻下方	第二章	泻下剂	2	泻下剂	第十章	泻下药
ZA03A	泻火通 便剂	21	寒下	第一节	寒下剂	1	寒下		
		23	润下	第三节	润下剂	2	温下		
ZA03B	润肠通 便剂					3	润下	第二节	润下药
ZA03C	除满通 便剂								
		22	温下	第二节	温下剂	5	逐水	第三节	峻下逐 水药
		24	逐水	第四节	逐水剂			第一节	攻下药
		25	攻补兼 施	第五节	攻补兼 施剂	4	攻补兼 施		
						99	其他泻 下		

ZA04	清热剂	4	清热方	第四章	清热剂	4	清热剂	第九章	清热药
ZA04A	清热泻火剂					1	清热泻火	第一节	清热泻火药
ZA04B	清热解毒剂	43	清热解毒	第三节	清热解毒剂	3	清热解毒	第三节	清热解毒药
ZA04C	清脏腑热剂	44	清脏腑热	第五节	清脏腑热剂	5	清脏腑热		
ZA04CA	清热理肺剂								
ZA04CB	清肝解毒剂								
ZA04CC	清肝胆湿热剂								
ZA04CD	清利肠胃湿热								
ZA04D	清热镇惊剂								
		41	清气分热	第一节	清气分热剂				
		42	清营凉血	第二节	清营凉血剂	2	清热凉血	第四节	清热凉血药
		45	清虚热	第六节	清虚热剂	7	清散虚热	第五节	清虚热药
				第四节	气血两清剂				
						4	清热生津		
						6	祛暑剂		
						99	其他清热		
								第二节	清热燥湿药
ZA05	温里剂	6	温里方	第六章	温里剂	5	温里剂	第十四章	温里药
ZA05A	温中散寒剂	61	温中祛寒	第一节	温中祛寒剂	1	温中祛寒		
ZA05B	温中除湿剂								
ZA05C	回阳救逆剂	62	回阳救逆	第二节	回阳救逆剂	2	回阳救逆		
		63	温经散寒	第三节	温经散寒剂	3	温经散寒		
						99	其他温		

							里		
ZA06	化痰、止咳、平喘剂	16	祛痰方	第十七章	祛痰剂	15	祛痰剂	第二十章	化痰止咳平喘药
ZA06A	温化寒痰剂	164	温化寒痰	第四节	温化寒痰剂	4	温化寒(燥湿化)痰	第一节	温化寒痰药
ZA06B	理肺止咳剂								
ZA06BA	补肺止咳剂								
ZA06BB	祛痰止咳剂					1	祛痰止咳		
ZA06BC	宣肺止咳剂								
ZA06C	清热化痰剂	162	清热化痰	第二节	清热化痰剂	2	清热化痰	第二节	清化热痰药
ZA06CA	清热化痰止咳								
ZA06CB	清热化痰平喘								
ZA06CC	清热化痰止惊								
ZA06D	润肺化痰剂	163	润燥化痰	第三节	润燥化痰剂	3	润燥化痰		
ZA06E	平喘剂					6	补益止咳平喘	第三节	止咳平喘药
ZA06F	消积化痰								
		161	燥湿化痰	第一节	燥湿化痰剂				
		165	化痰熄风	第五节	治风化痰剂				
						5	化痰散结		
						99	其他祛痰		
ZA07	开窍剂	10	开窍方	第十一章	开窍剂	9	开窍剂	第二十三章	开窍药
ZA07A	清热开窍剂	101	凉开	第一节	凉开剂	1	凉开		
ZA07B	芳香、化痰开窍剂								

		102	温开	第二节	温开剂	2	温开		
						99	其他开 窍		
ZA08	固涩剂	8	固涩方	第九章	固涩剂	7	固涩剂	第二十五 章	收涩药
ZA08A	固精止 遗剂	84	涩精止 遗	第四节	涩精止 遗剂	3	固肾止 遗		
ZA08B	固涩止 泻剂	83	涩肠固 脱	第三节	涩肠固 脱剂	2	涩肠固 脱		
ZA08C	补肾缩 尿剂								
		81	固表止 汗	第一节	固表止 汗剂	1	固表止 汗	第一节	固表止 汗药
		82	敛肺止 咳	第二节	敛肺止 咳剂			第二节	敛肺涩 肠药
		85	固崩止 带	第五节	固崩止 带剂			第三节	固精缩 尿止带 药
						99	其他固 涩		
ZA09	扶正剂	7	补益剂	第八章	补益剂	6	补益剂	第二十 四章	补虚药
ZA09A	补气剂	71	补气	第一节	补气剂	1	补气	第一节	补气药
ZA09AA	健脾益 气剂								
ZA09AB	健脾和 胃剂								
ZA09B	养血剂	72	补血	第二节	补血剂	2	补血	第三节	补血药
ZA09C	滋阴剂	74	补阴	第四节	补阴剂	4	补阴	第四节	补阴药
ZA09CA	滋补肾 阴剂								
ZA09CB	滋补心 肺剂								
ZA09CC	滋补肝 肾剂					7	补肝肾 强筋骨		
ZA09C D	养阴清 热、和胃 剂								
ZA09D	温阳剂	75	补阳	第五节	补阳剂	5	补阳	第二节	补阳药
ZA09E	阴阳双 补剂	76	阴阳双 补	第六节	阴阳并 补剂	6	阴阳双 补		
ZA09F	气血双 补剂	73	气血双 补	第三节	气血双 补剂	3	气血双 补		

ZA09FA	补气养 血剂								
ZA09FB	补肾养 血剂								
ZA09G	益气养 阴剂								
ZA09H	益气复 脉剂								
						99	其他补 益		
ZA10	安神剂	9	安神方	第十章	安神剂	8	安神剂	第二十一 章	安神药
ZA10A	养心安 神剂	92	滋养安 神	第二节	补养安 神剂	1	补养安 神	第二节	养心安 神药
ZA10B	益气养 血安神 剂								
ZA10C	清肝安 神剂								
ZA10D	补肾安 神剂			第三节	交通心 肾剂				
ZA10E	重镇安 神剂	91	重镇安 神	第一节	重镇安 神剂	2	重镇安 神	第一节	重镇安 神药
						99	其他安 神药(含 解表,清 热祛风 除痰镇 惊;清热 安神)		
ZA11	止血剂	12	理血方	第十三 章	理血剂	11	理血剂	第十八 章	止血药
		121	活血祛 瘀	第一节	活血祛 瘀剂	1	活血		
		122	止血	第二节	止血剂	2	止血		
						3	活血养 血		
						99	其他理 血		
								第一节	凉血止 血药
								第二节	化瘀止 血药
								第三节	收敛止

									血药
								第四节	温经止血药
ZA12	祛瘀剂							第十九章	活血化瘀药
ZA12A	益气活血剂								
ZA12B	行气活血剂								
ZA12C	养血活血剂								
ZA12D	温阳活血剂								
ZA12E	滋阴活血剂								
ZA12F	补肾活血剂								
ZA12G	化瘀宽胸剂								
ZA12H	化瘀通脉剂								
ZA12I	活血消癥剂							第四节	破血消癥药
ZA12J	祛瘀化痰剂								
								第一节	活血止痛药
								第二节	活血调经药
								第三节	活血疗伤药
ZA13	理气剂	11	理气方	第十二章	理气剂	10	理气剂	第十五章	理气药
ZA13A	疏肝解郁剂								
ZA13B	疏肝和胃剂								
		111	行气	第一节	行气剂				
		112	降气	第二节	降气剂				
						1	理气行滞		
						2	理气宽胸		

						3	理气疏肝		
						4	理气调中		
						99	其他理气		
ZA14	消导剂	17	消食方	17	消食剂	16	消食剂	第十六章	消食药
ZA14A	健脾消食	172	健脾消食	第二节	健脾消食剂				
ZA14B	消食导滞	171	消食化滞	第一节	消食化滞剂				
						1	解表消食		
						2	补益止泻（痢）		
						3	解痉止胃痛		
						4	其他消食		
ZA15	治风剂	13	治风方	第十四章	治风剂	12	疏风剂	第二十二章	平肝息风药
ZA15A	疏散外风剂	131	疏散外风	第一节	疏散外风剂	1	疏散外风		
ZA15B	平肝熄风剂	132	平熄内风	第二节	平息内风剂	2	平熄内风		
ZA15C	平肝潜阳剂							第一节	平抑肝阳药
ZA15D	化痰熄风剂								
ZA15E	化瘀祛风剂								
ZA15F	养血祛风剂								
ZA15G	祛风通络剂								
								第二节	息风止痉药
						99	其他疏风		
ZA16	祛湿剂	15	祛湿方	第十六章	祛湿剂	14	祛湿剂	第十一章	祛风湿药
ZA16A	散寒除湿剂	154	温化寒湿	第四节	温化寒湿剂	4	温化水湿		

ZA16B	清热除湿剂	152	清热祛湿	第二节	清热祛湿剂	2	清热祛湿	第二节	祛风湿热药
ZA16C	祛风除湿剂	155	祛风胜湿	第六节	祛风胜湿剂	5	祛风除湿	第一节	祛风寒湿药
ZA16D	化瘀祛湿剂								
ZA16E	消肿利水剂	153	利水渗湿	第三节	利水渗湿剂	3	利水渗湿化浊		
ZA16F	清热通淋剂								
ZA16G	化瘀通淋剂								
ZA16H	扶正祛湿剂								
		151	燥湿和胃	第一节	化湿和胃剂	1	化湿和胃		
				第五节	祛湿化浊剂	5	祛湿化浊		
						99	其他祛湿		
								第三节	祛风湿强筋骨药
								第十二章	化湿药
								第十三章	利水渗湿药
								第一节	利水消肿药
								第二节	利尿通淋药
								第三节	利湿退黄药
ZA17	化浊降脂剂								
		3	和解方	第三章	和解剂				
		31	和解少阳	第一节	和解少阳剂				
		32	调和肝脾	第二节	调和肝脾剂				
		33	调和肠胃						
				第三节	调和寒热剂				

		14	治燥方	第十五章	治燥剂	13	治燥剂		
		141	轻宣外燥	第一节	轻宣外燥剂	1	清宣润燥		
		142	滋阴润燥	第二节	滋润内燥剂	2	滋阴润燥		
						99	其他治燥		
		18	驱虫方	第十九章	驱虫剂	23	驱虫剂	第十七章	驱虫药
		181	驱虫						
						1	健脾驱(杀)虫		
						2	清热燥湿(杀虫)止痒		
						3	祛风除湿(杀虫)止痒		
						99	其他驱虫剂		
		19	涌吐方	第二十章	涌吐剂	24	涌吐药	第二十六章	涌吐药
		191	涌吐			1	涌吐药		
						99	其他涌吐药		
		20	痈疡方	第二十一章	治痈疡剂				
		201	内服						
		202	外用						
				第一节	散结消痈剂				
				第二节	托里透脓剂				
				第三节	补虚敛疮剂				
				第七章	表里双解剂				
				第一节	解表清里剂				
				第二节	解表温里剂				
				第三节	解表攻				

					里剂				
								第二十七 章	攻毒杀 虫止痒 药
								第二十八 章	拔毒化 腐生肌 药
ZB	外科用 药								
ZB01	清热剂								
ZB01A	清利肝 胆剂								
ZB01B	清热解 毒剂								
ZB01C	清热利 湿剂								
ZB01D	通淋消 石剂								
ZB02	温经理 气活血 散结剂								
ZC	肿瘤用 药								
ZC01	抗肿瘤 药								
ZC02	肿瘤辅 助用药								
ZD	妇科用 药					21	妇科用 药		
ZD01	理血剂								
ZD01A	理气养 血剂								
ZD01B	活血化 瘀剂								
ZD01C	止血剂								
ZD02	清热剂								
ZD02A	内服药								
ZD02B	外用药								
ZD03	扶正剂								
ZD04	消肿散 结剂								
						1	补益调 经(止		

							带)		
						2	补益安胎		
						3	治产后病		
						99	其他妇科用药		
ZE	眼科用药					22	五官用药		
ZE01	清热剂								
ZE02	扶正剂								
ZE03	祛瘀剂								
						3	眼病		
ZF	耳鼻喉科用药								
ZF01	耳病					5	耳病		
ZF02	鼻病					4	鼻病		
ZF03	咽喉病					1	咽喉病		
ZF04	牙病					2	口腔、牙病		
ZF05	口腔病								
						99	其他五官用药		
ZG	骨伤科用药								
ZG01	活血化瘀剂								
ZG01A	内服药								
ZG01B	外用药								
ZG02	活血通络剂								
ZG02A	内服药								
ZG02B	外用药								
ZG03	补肾壮骨剂								
ZH	皮肤科用药								
ZI	民族药					60	民族药		
ZI01	藏药					1	藏药		
ZI02	蒙药					2	猛药		
ZI03	维药					4	维药		
						3	苗药		
						5	傣药		

						6	壮药		
						99	其他民族药		
						27	外用药		
						1	凉血止血治疡		
						2	治痔疮剂		
						3	烧烫伤		
						99	其他外用药		
						99	其他功用		
						99	其他功用		

附表 2 统一功效分类

一级分类	二级分类	三级分类
解表	辛温解表	
	辛凉解表	
	表里双解	解表清里
		解表温里
		解表攻里
	扶正解表	
祛暑	解表祛暑	
	清热祛暑	
	健胃祛暑	
	祛暑利湿	
	祛暑益气	
泻下	寒下	
	温下	
	润下	
	逐水	
	除满通便	
	攻补兼施	
清热	清热泻火	
	清热解毒	
	清脏腑热	清热理肺
		清肝解毒
		清肝胆湿热
		清利肠胃湿热

	清热镇惊	
	清气分热	
	清营凉血	
	清虚热	
	气血两清	
	清热利湿	
	清热燥湿	
	清热生津	
温里	温中祛寒	
	温中除湿	
	回阳救逆	
	温经散寒	
祛痰	温化寒痰	
	清热化痰	清热化痰止咳
		清热化痰平喘
		清热化痰止惊
	润燥化痰	
	平喘	
	消积化痰	
	燥湿化痰	
	化痰熄风	
	化痰散结	
开窍	凉开	
	温开	
固涩	固精止遗	
	涩肠固脱	
	补肾缩尿	
	固表止汗	
	敛肺止咳	
	固崩止带	
补益	补气	健脾益气
		健脾和胃
	补血	
	补阴	滋补肾阴
		滋补心肺
		滋补肝肾
		养阴清热、和胃
	补阳	
	阴阳双补	
	气血双补	补气养血
		补肾养血
	益气养阴	

	益气复脉	
	补肾壮骨	
	补益调经	
	补益安胎	
	养心安神	
	益气养血安神	
安神	清肝安神	
	补肾安神	
	重镇安神	
理血		活血化瘀
		益气活血
		行气活血
		养血活血
		温阳活血
	活血祛瘀	滋阴活血
		补肾活血
		化瘀宽胸
		化瘀通脉
		活血消癥
		祛瘀化痰
	止血	
	活血通络	
理气	理气养血	
	行气	
	降气	
消食	健脾消食	
	消食化滞	
	解表消食	
治风	疏散外风	
	平肝熄风	
	平肝潜阳	
	化痰熄风	
	化瘀祛风	
	养血祛风	
	祛风通络	
	息风止痉	
祛湿	温化寒湿	
	清热祛湿	
	祛风胜湿	
	化瘀祛湿	
	利水渗湿	利水消肿
		利尿通淋

	利湿退黄
	清热通淋
	化瘀通淋
	扶正祛湿
	燥湿和胃
和解	和解少阳
	调和肝脾
	调和肠胃
	调和寒热
治燥	轻宣外燥
	滋阴润燥
驱虫	驱虫
涌吐	涌吐
攻毒杀虫止痒	
拔毒化腐生肌	

基于费式弧菌快速检测吴茱萸配伍减毒趋势及成分结构相识性和虚拟筛选机制研究

张程¹, 李伊娜², 黄颖³, 于文润³, 王晓强³, 孔澳⁴, 王宇光^{5*}, 高月^{1,5*}

(1.广东药科大学, 广州 510006; 2.河北大学, 保定 071002; 3.天津中医药大学, 天津 301617;

4.河南大学, 开封 475004; 5.军事医学研究院, 北京 100850)

[摘要] **目的:** 以吴茱萸(EF)及其配伍左金丸(ZJW)和吴茱萸汤(ED)为例, 通过费式弧菌发光抑制浓度 (IC_{50}) 检测、MACSS 毒性成分虚拟筛选、分子对接及分子动力学模拟构建配伍中药毒性变化趋势快速检测方法。**方法:** 费式弧菌毒性测试, 通过对菌液复苏与中药吴茱萸及其配伍左金丸和吴茱萸汤混合, 进行发光抑制率检测。通过获取费式弧菌毒性成分数据集, 构建毒性分子 MACCS 相似性模型。基于费式弧菌发光机制, 获取荧光酶结构并进行毒性分子对接, 通过分子动力学模拟评估分子对接结合稳定性。**结果:** EF 的 IC_{50} 为 3.922×10^{-4} , ZJW 的 IC_{50} 为 4.451×10^{-5} , ED 的 IC_{50} 为 4.420×10^{-4} 。从公开数据集中挖掘出费式弧菌毒性成分 1277 个。对 1277 个费式弧菌毒性化合物进行 MACCS 分子相似性比较, 得到 7 万 3710 个相互作用点, 导入 CytoNCA 中, 进行 Degree 值分析, 筛选出来 304 个化合物, 构建出毒性化合物相似性数据集。通过 TCMSP 数据库获得 EF 成分 176 种, ZJW 中的黄连成分 48 种, ED 中的大枣成分 133 种, 生姜成分 265 种, 人参成分 190 种。将以上成分分别与 304 个化合物进行相似性匹配, 筛选得到 EF 有 7 种, ZJW 有 13 种, ED 有 20 种。通过对接分析, 毒性分子与荧光酶结合主要方式是氢键相互作用, 主要结合氨基酸残基为 THR, TYH, GLY, SER, HIP, LYS, ARG, PHE, HIS, TYR, VAL。选取吴茱萸中选择 W-8655_LuxC(-5.54), 左金丸中选择 Z-8468_LuxG(-7.115), 吴茱萸汤中选择为 T-88944_LuxG(-7.161) 进行分子动力模拟分析。发现 W-8655_LuxC 和 T-88944_LuxG 自由能形貌图几乎呈单一且平滑的最小能簇, Z-8468_LuxG 是一个狭窄、粗糙、有分散的能量簇。**结论:** 相同 EF 剂量下配伍形成的 ZJW 和 ED,

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (No. 82192910、82192911)

[第一作者] 张程, 硕士研究生在读, 从事中药毒性物质发现研究, E-mail:cadendengdengdeng@163.com

[通信作者] 王宇光(共同通讯), 博士, 副研究员, 从事中药药理与毒理研究, E-mail:wangyg@bmi.ac.cn

高月, 博士, 研究员, 从事中药药理与毒理研究, E-mail:gaoyue@bmi.ac.cn

其中 ED 对费式弧菌的潜在毒性最小, ZJW 最大, 其 ED 毒性呈配伍减毒趋势, 主要毒性成分 EF 有 7 种, ZJW 有 13 种, ED 有 20 种, 其中 W-8655 对 LuxC 和 T-88944 对 LuxG 的作用稳定, Z-8468 对 LuxG 作用稳定性较差。

[关键词] 费式弧菌; MACSS 相识性筛选; 分子对接; 分子动力学模拟; 吴茱萸; 配伍减毒

Study on the Trend of Reduced Toxicity through Compatibility of Evodiae Fructus Based on Rapid Detection of *Vibrio fischeri*, and the Mechanism of Structural Similarity of Components and Virtual Screening

ZHANG Cheng¹, LI Yi-na², HUANG Ying³, YU Wen-run³, WANG

Xiao-qiang³, KONG Ao⁴, WANG Yu-wang⁵, GAO Yue^{1,5}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guang zhou, 510006, China; 2. Hebei University, Baoding, 071002, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 301617, China; 4. Henan University, Henan University, Kai feng, 475004, China; 5. Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a rapid method for detecting toxicity changes in herbal formulations using Evodiae Fructus (EF) and its combinations Zuojin Wan (ZJW) and Evodiae Decoction (ED). This method involves *Vibrio fischeri* luminescence inhibition concentration (IC₅₀) detection, MACCS toxicity component virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics simulation. **Methods:** The toxicity test was conducted using *Vibrio fischeri*. The bacterial suspension was revived and mixed with EF and its combinations ZJW and ED to measure the luminescence inhibition rate. Toxic components of *Vibrio fischeri* were identified, and a MACCS similarity model for toxic molecules was constructed. Based on the luminescence mechanism of *Vibrio fischeri*, the structure of luciferase was obtained, and toxic molecules were docked to it. The binding stability of the docked complexes

was evaluated through molecular dynamics simulations. **Result:** IC₅₀ Values: EF had an IC₅₀ of 3.922×10^{-4} , ZJW had an IC₅₀ of 4.451×10^{-5} , and ED had an IC₅₀ of 4.420×10^{-4} . Toxic Components: 1277 toxic compounds from *Vibrio fischeri* were identified from public databases. MACCS molecular similarity comparison of these compounds resulted in 73,710 interaction points. Degree value analysis in CytoNCA filtered out 304 compounds to construct a toxicity compound similarity dataset. Herbal Components: From the TCMSP database, EF had 176 components, ZJW's Coptis had 48 components, ED's jujube had 133 components, ginger had 265 components, and ginseng had 190 components. These components were matched with the 304 toxic compounds, resulting in 7 matches for EF, 13 for ZJW, and 20 for ED. Molecular Docking and Dynamics: The docking analysis showed that toxic molecules primarily interacted with luciferase via hydrogen bonds, involving amino acid residues THR, TYR, GLY, SER, HIS, LYS, ARG, PHE, HIS, TYR, and VAL. Molecular dynamics simulations were performed for W-8655_LuxC (-5.54) from EF, Z-8468_LuxG (-7.115) from ZJW, and T-88944_LuxG (-7.161) from ED. The free energy landscapes indicated that W-8655_LuxC and T-88944_LuxG formed smooth and singular minimum energy clusters, whereas Z-8468_LuxG formed a narrow, rough, and dispersed energy cluster. **Conclusion:** With the same EF dosage, the formulation ED exhibited the least potential toxicity to *Vibrio fischeri*, while ZJW exhibited the most. This suggests a detoxification trend in ED. EF had 7 major toxic components, ZJW had 13, and ED had 20. The interactions between W-8655 and LuxC, and T-88944 and LuxG were stable, while the interaction between Z-8468 and LuxG was less stable.

[Key words] *Vibrio fischeri*; MACCS similarity screening; Molecular docking; Molecular dynamics simulation; Evodiae Fructus; detoxifying formulation.

在合理使用“有毒”的中医药物中，面临两个主要的科学挑战。一是，当前的毒性评估模型是否能够准确地反映出在临床中使用这类中医药的现实情况。二是，如何有效地探索并识别含有毒性的成分。“有毒”的中医药来源繁多，煎煮方法各异，炮制标准不一。对于微量的毒性成分或与毒性相关的物质，难以明确定义，而且长期摄入可能导致在体内的积累。这些情况均是影响科学和合理使用中医药的主要原因之一^[1-3]。“有毒”中药的毒性性质具有双重性，科学地理解有毒中药是合理应用它们的前提。对此，以临床常见中药“有毒”吴茱萸及其配伍左金丸、吴茱萸汤为研究对象，构建中药微毒检测方法及中药减毒配伍新评价方式。

发光细菌独特的生理特性与现代光电检测技术相结合可以用来检测毒性物质，利用发光细菌的发光强度对中药毒性进行研究，国内研究团队建立了基于 MicroTox 技术的生物测试方法，该技术已成功应用于鱼腥草注射液、生脉注射液等中药注射剂以及苍耳子、山金银花、金银花、汤剂等药材的综合毒性检测^[4-9]；但 MicroTox 技术检测中存以下缺点：第一：所需的毒性检测仪器，例如生物毒性分析仪 Microtox Model 500 价格昂贵，导致毒性检测成本较高；第二：改方法基于水质毒性检测的检测管为待测液的载体去做毒性评定，需要用到大量发光菌液，造成浪费；第三，部分水质毒性检测仪无法在短时间内做到多个样本批量检测，难以控制样品于发光菌作用时间的统一性。同时，该仪器主要是用于水质的毒性检测，在中药毒性中的应用较少且未见在配伍中药中研究毒性变化趋势。

基于费氏弧菌的发光原理，使用多功能酶标仪作为毒性检测仪器，通过改进实验方法及样品和发光菌液用量，实现在多功能酶标仪上进行发光抑制率的检测，以便扩大研究范围，降低使用成本，其次，对待测液的载体替换为 96 孔板，降低了发光菌液的消耗，可进行多次批量检测和重复实验，提高毒性检测效率。此外，在毒性物质的筛选方面，费氏弧菌毒性数据结合定量构效关系（Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR）构建的模型被广泛使用。然而，基于常规 QSAR 构建的模型仍存在问题，如在构建训练集和测试集时，数据未能全部包含，在模型构建完之后，对模型的评估和选取也存在差异等，这些情况会使得部分数据损失。此外，构建训练集、测试集及模型构建后的评估筛选需要花费大量时间，极大的降低了药物成分筛选的效率。基于以上问题，以费氏弧菌毒性数

据构建费氏弧菌的 MACCS 结构相似性模型,并将该模型应用于中药毒性成分筛选中,解决数据损失和筛选效率低的问题。此外,中药配伍如何作用费氏弧菌,如何呈现减毒配伍趋势并通过分子对接及分子动力学模拟对毒性分子作用与费氏弧菌进行机制探究。

1 材料

1.1 试剂及仪器 制吴茱萸(北京同仁堂股份有限公司,批号:2022060702),黄连(北京同仁堂股份有限公司,批号:2022060703),生姜(北京同仁堂股份有限公司,批号:2022070311),人参(北京同仁堂股份有限公司,批号:2022060904),大枣(北京同仁堂股份有限公司,批号:2022060712),费氏弧菌试剂盒(NRRL B-11177)(湖南碧晓环保科技有限公司,货号:TOX-kit-100F),Biotek Cytation5(安捷伦科技(中国)有限公司)。

1.2 提取物制备 吴茱萸(Evodiae Fructus, EF)的配伍左金丸(Zuojin Wan, ZJW)由制吴茱萸和黄连(6:1)组成,吴茱萸汤(Evodia Decoction, ED)由制吴茱萸、生姜、人参、大枣(3:6:3:4)组成^[10]。将以上中药配方浸泡在 10 倍体积的超纯水中制备。浸泡过程持续 8 小时,以确保充分水合。浸泡后,对配方进行加热。将它们煮沸两次,每次煮沸过程持续 1 小时。将溶液过滤后制成冻干粉,计算提取物得率,在-20℃下储存。吴茱萸提取物得率:29.2%,左金丸提取物得率:23.3%,吴茱萸提取物得率:33.1%

2 方法

2.1 费氏弧菌毒性试验 费氏弧菌试剂盒(NRRL B-11177)符合 ISO 11348 标准,并根据《急性毒性测定-发光细菌试验》(GB/T15441-1995)的指导原则进行急性毒性试验。用 Biotek Cytation5 通过发光强度检测毒性。根据费氏弧菌的发光原理,在 TOX-kit-100F 说明书的基础上构建出新实验方案。为了测试中药微量毒性,设定极小的样品浓度梯度(表 1),使用 GraphPad prism 9 分析半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。以 96 微孔板(Costar 3599)为实验载体。首先从费氏弧菌试剂盒中取 1 管发光菌,加入 3ml 菌体复活液,轻轻振摇至混合均匀,静置 5 分钟。其次分别取 180μl 测试样品和 Control(超纯

水)加入 96 孔板中,再加入 18ul 渗透压调节液(10:1 比例)混匀(每个浓度重复 4 次)。然后取 20ul 菌体复活液加入测试孔中。最后加样 15 分钟后,测量发光强度,并计算抑制率及绘制图形,公式如下:

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{\bar{X}_{\text{ctrl lum}} - \bar{X}_{\text{sample lum}}}{\bar{X}_{\text{ctrl lum}}} \times 100\%$$

表 1 毒性测试的样品浓度

TCM	1 (g/ml)	2 (g/ml)	3 (g/ml)	4 (g/ml)	5 (g/ml)	6 (g/ml)
EF	0.000342466	0.000856164	0.001712329	0.003424658	0.005136986	0.006849315
ZJW	0.0000071531	0.0000178827	0.0000357654	0.0000536481	0.0000715308	0.000178827
ED	0.000152139	0.000304277	0.000608554	0.000912831	0.001217108	0.001521386

2.2 基于费式弧菌毒性成分构建构建毒性分子 MACCS 相似性模型对中药毒性成分筛选 从已发表的费式弧菌毒性成分公开数据集(<https://github.com/hhaootian/toxicity/blob/main/src/clean.py>)中挖掘出 1277 个毒性分子。在调用 MACCS 时,需要先安装 OpenBabel(<https://github.com/openbabel/openbabel/releases>),其次,格式化 1277 个毒性数据集后,使用 Python 3.12.3 运行 MACCS 特征化脚本(<https://github.com/ZhangChengCADEN/MACCS-Model>)进行分子间相似性匹配,若 Tanimoto 系数大于或等于 0.5,则为毒性较强的分子;最后,使用 Cytoscape(<https://cytoscape.org/>)中的 CytoNCA 对相关系数强的分子的 Degree 值进行分析。进一步筛选出 Degree 值大于等于 90 的分子,将最终得到的分子用于构建毒性分子相似度模型,从 TCMSP 数据库(<https://www.tcmsp-e.com/>)中获取 EF、ZJW、ED 等成分,并转化为 SMILES 格式,利用预先构建的相似度模型对中药成分与毒性成分进行相似度分析,在满足 Tanimoto 系数大于等于 0.5、Degree 大于等于最大值的一半等条件下,成功筛选出中药毒性成分。

2.3 基于费式弧菌荧光酶结构获取及与毒性分子对接 费氏弧菌荧光酶 LuxA、LuxB、LuxC、LuxD、LuxE、LuxG 共同参与费氏弧菌的发光调控。LuxA 和 LuxB 分别编码发光酶的 α 和 β 亚基,它们形成的异二聚体称为 LuxAB,具有在细菌中发光的能力。根据已发表的文章、费氏弧菌的种类和蛋白质结构的解析,选择

最佳 LuxAB (3FGC)和 LuxG (1BKJ) (<https://www.rcsb.org/pages/about-us/index>) (RCSB PDB), 而 LuxC (A0A510UCI8)、LuxD (A7MAR5) 和 LuxE (P24272) 通过 AlphaFold 蛋白质结构数据库 (<https://alphafold.com/>)获取。使用 Schrodinger Maestro 2021 软件 (<https://www.schrodinger.com/release-download/>) 进行对接。首先, 使用 LigPrep 对分子进行 OPLS4 场处理, 将配体大小限制在 500 个原子以下, 并使用 Epik 进行电离处理。然后使用 Protein Preparation Wizard 进行蛋白质对接前的预处理。在 H-bond 分配时, 使用 PROPKA 进行优化, 并选择 OPLS4 场以最小化所有原子。然后构建对接框, 使用 Receptor Grid Generation 以“picking to identify the ligand”的方式为 LuxA, LuxB, LuxG 构建对接框。同时, 对 LuxC, LuxD, LuxE 使用盲性对接。最后, 在配体对接中, 使用标准精度 (SP) 进行分子与蛋白质对接。对接完成后, 导出分子和蛋白质结合的分值。使用微生信平台对分子和对接分值进行可视化聚类分析 (聚类方法: complete, 距离方法: Euclidean, 回调函数: pheatmap)。

2.4 分子动力学分析 分子动力学模拟采用 GROMACS2020 (<https://manual.gromacs.org/>), 使用前需要编译。首先, 使用 Pymol(<https://pymol.org/>)分离蛋白质与分子复合物。利用 ATB (<https://atb.uq.edu.au/index.py>)给分子添加力场, 并将相应的力场包安装到 GROMACS 中。处理蛋白质时, 确保配体分子力场与蛋白质力场一致, 给分子添加力场后, 检查是否添加了氢, 若没有, 则需要添加。然后, 调用 GROMACS 命令将配体的分子格式转换为 gro 格式, 构建蛋白质的拓扑结构, 确保蛋白质中已经预先去除水分子, 然后构建配体与蛋白质的复合物拓扑文件。根据复合物的大小确定分子动力学模拟盒的大小, 并向盒中加入溶剂水。下一步对生物体系建模, 向复合物中加入离子, 能量最小化, NVT 热平衡, NPT 压力平衡, 密度分析步骤, 并用 DuIvyTools (<https://github.com/CharlesHahn/DuIvyTools/tree/dev/DuIvyTools>) 进行数据可视化。最后, 调用 GPU 进行计算, 对构建好的生物体系进行分子动力学模拟。模拟结果分析主要集中在稳态均方根偏差 (RMSD)、均方根涨落 (RMSF) 的计算, 以及回转半径 (Rg) 的计算和基于 RMSD 和 Rg 用 Origin 2021 绘制自由能景观 3D 图。

3 结果

3.1 ED 潜在毒性最小，呈配伍减毒趋势 通过计算 EF 的 IC_{50} 为 3.922×10^{-4} ，ZJW 的 IC_{50} 为 4.451×10^{-5} ，ED 的 IC_{50} 为 4.420×10^{-4} 。见图 1。相同 EF 剂量下配伍形成的 ZJW 和 ED，其中 ED 对费式弧菌的潜在毒性最小，ZJW 最大，其 ED 毒性呈降低趋势。

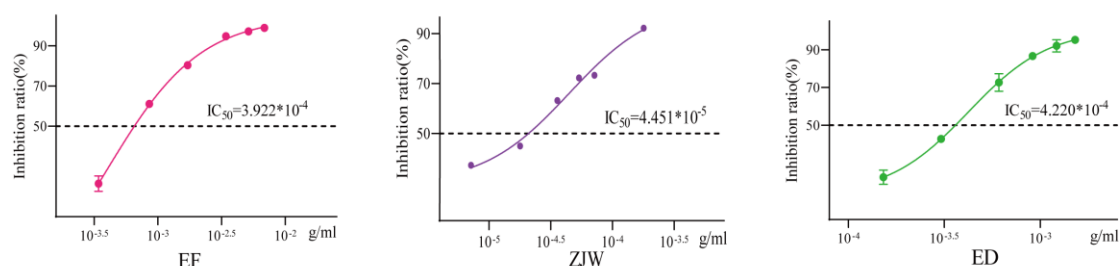


图 1 抑制率-浓度曲线 横轴为浓度，纵轴为发光抑制率，曲线中间线为 IC_{50} 值对应的浓度

Fig. 1 Inhibition rate-concentration curve The horizontal axis represents concentration, and the vertical axis represents the luminescence inhibition rate. The middle line in the curve represents the concentration corresponding to the IC_{50} value

3.2 MACCS 相似性模型对中药毒性成分筛选 EF 有 7 种，ZJW 有 13 种，ED 有 20 种 对 1277 个费式弧菌毒性化合物进行 MACCS 分子相似性比较，筛选 Tanimoto 系数 ≥ 0.5 的相互匹配的化合物，得到 7 万 3710 个相互作用点，将这些相互作用点，导入 CytoNCA 中，进行 Degree 值分析，取 Degree 最大值 180 的半数 90 为筛选阈值，最终将 Degree 值大于 90 的 304 个化合物筛选出来，作为一个毒性化合物相似性数据集。TCM 成分获取，PF 从文献中获得 102 种成分，随后通过 TCMSP 数据库获得 EF 成分 176 种，ZJW 中的黄连成分 48 种，ED 中的大枣成分 133 种，生姜成分 265 种，人参成分 190 种，ESP 中的肉豆蔻成分 64，SSP 中的五味子成分 50 种。将以上成分分别与之前的 304 种成分进行相似性匹配，Tanimoto 系数 ≥ 0.5 ，Degree 值取最大值的中间值为阈值，筛选得到 EF 有 7 种，ZJW 有 13 种，ED 有 20 种（见补充 1）。

3.3 EF, ZJW, ED 主要结合氨基酸残基为 THR, TYH, GLY, SER, HIP, LYS, ARG, PHE, HIS, TYR, VAL 由于在使用对接软件对分子结构进行力场处理和批量分子与蛋白对接，即使是不同中药中相同的分子与同一蛋白，对接出来的结果也不一定

相同，因此，对所有的对接结果进行聚类分析，看是否不同中药中相同分子与蛋白结合是不是聚类到一起。LuxAB 是很大的复合物，在对接过程中，无法完成分子对蛋白的对接操作，我们基于蛋白结构，将蛋白拆分为 LuxA_A, LuxA_C, LuxB_B, LuxB_D，分子能充分对蛋白进行计算对接匹配，避免了分子作用与蛋白的局部的影响，也考虑到分子与蛋白的结合的多样性。聚类分析发现，相同编号的成分大部分都归为一类，说明不同中药中相同成分与同一蛋白结合差异不大。见图 2 a b。通过聚类图和对接结果进行分析，根据对接分数最低，选取可视化的成分与蛋白结合体和进行分子与蛋白作用分析。分子主要结合方式是氢键相互作用，吴茱萸及其配伍左金丸，吴茱萸汤主要结合氨基酸残基为 THR,TYH,GLY, SER,HIP,LYS,ARG,PHE,HIS,TYR,VAL。见图 3。

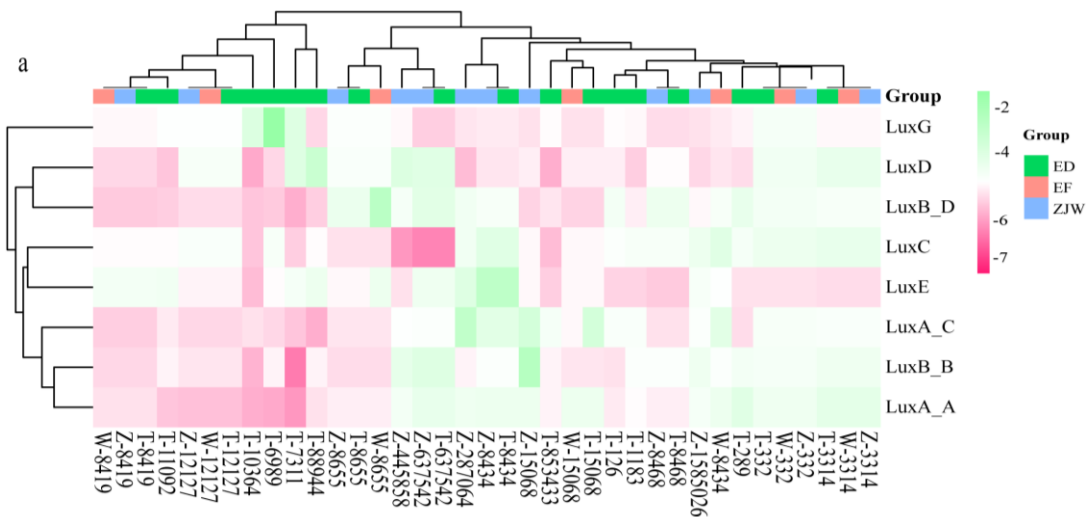


图 2 a EF,ZJW,ED 组中成分与蛋白 LuxA_A, LuxA_C, LuxB_B, LuxB_D, LuxC, LuxD, LuxE, LuxG 对接聚类。(W 属于 EF 的成分，Z 属于 ZJW 的成分，T 属于 ED 的成分。成分的数字编号相同，代表他们是相同的成分)。

Fig.2 Clustering analysis for proteins with ligands a Clustering of components in EF, ZJW, ED groups with proteins LuxA_A, LuxA_C, LuxB_B, LuxB_D, LuxC, LuxD, LuxE, LuxG. (W belongs to the components of EF, Z belongs to the components of ZJW, T belongs to the components of ED. If the numerical identifiers of the components are the same, it indicates that they are the same component.)

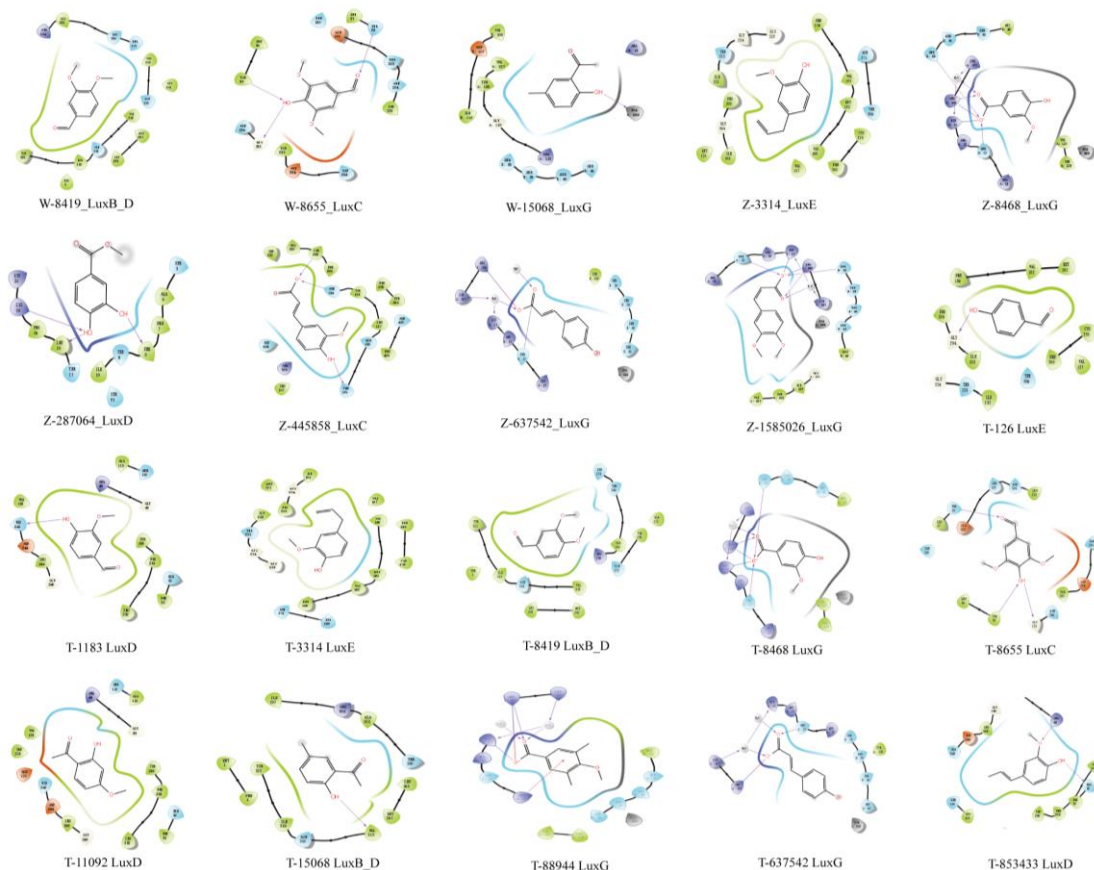


图3 分子对接分析 在聚类分析中将 EF、ZJW、ED 等成分与蛋白质对接结果进行对比。
Fig.3 Molecular docking analysis in clustering includes components of EF, ZJW, ED with protein docking results.

3.4 毒性分子与荧光酶结合为 W-8655_LuxC, Z-8468_LuxG, T-88944_LuxG
由于对接数量较多, 根据对接分数最低, 对接结合的键数最多, 在每个中药中, 选取配体与受体结合最好的进一步分析 (见补充 2), 吴茱萸中选择 W-8655_LuxC (-5.54), 结合位点是 THR28, TYR92, GLY153, 见图 4 a, 左金丸中选择 Z-8468_LuxG(-7.115), 结合位点是 SER_A:13, HIP_A:11, ARG_A169, LYS_A:167, SER_B:38, 见图 4, 吴茱萸汤中选择为 T-88944_LuxG(-7.161), 结合位点是 LYS_A:167, ARG_A:169, HIP_A:11, ARG_A:15, 见图 5 c。(B-101:3-hydroxybenzaldehyde, R-637542:(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid, W-8655:4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde, Z-8468:4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, T-88944:1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)245thenone)

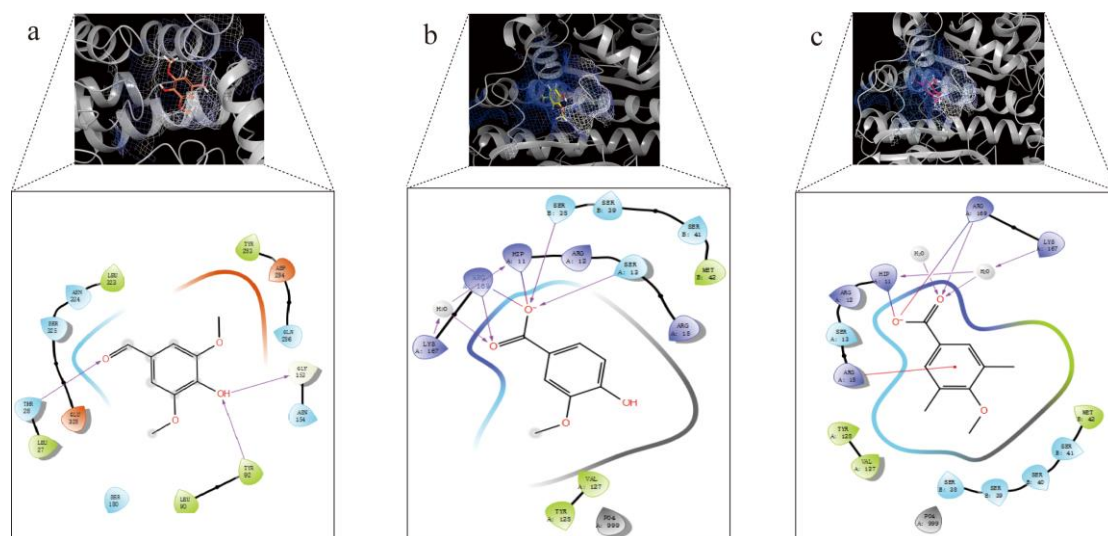


图 4 对每个 TCM 中表现最佳的成分与蛋白质结合位点进行对接分析和可视化。A. W-8655_LuxC。B. Z-8468_LuxG。C. T-88944_LuxG

Fig.4 Docking analysis and visualization of the best-performing components in each TCM with protein binding pockets. A W-8655_LuxC. B Z-8468_LuxG. C T-88944_LuxG.

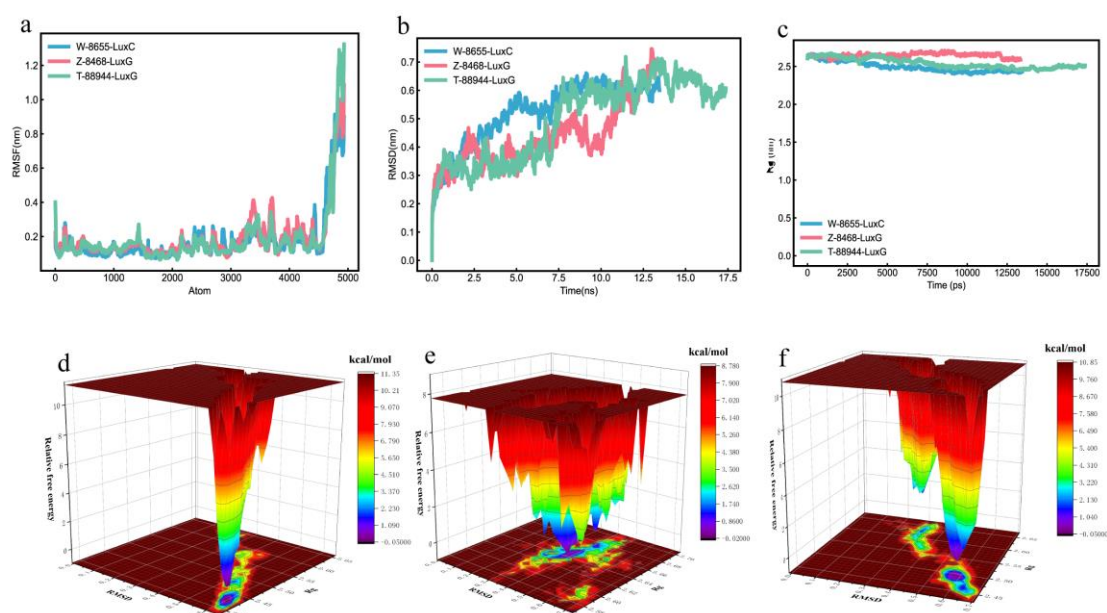


图 5 分子动力学模拟结果 a. RMSD。B. RMSF。C. Rg。D. Z-8468_LuxG 自由能形貌图。E. W-8655_LuxC 自由能形貌图。F. T-88944_LuxG 自由能形貌图。

Fig. 5 MD Molecular Dynamics Simulation Results a RMSD. B RMSF. C Rg. D. Free energy landscape of W-8655_LuxC. E. Free energy landscape of Z-8468_LuxG. F. Free energy landscape of T-88944_LuxG.

3.5 W-8655_LuxC, Z-8468_LuxG 结合稳定, Z-8468_LuxG 较差 通过制作自由能形貌图, 以 RMSD、Rg 和 Gibbs 相对自由能作为 X、Y 和 Z 轴绘制, 模拟的受体与分子结合整个过程中能量最低的构象, 评判配体和蛋白之间的相互作用强弱。如果配体与蛋白作用强, 自由能形貌图的峰呈现明显和光滑, 表面起伏的多个的最小能量簇较少。W-8655_LuxC,T-88944_LuxG 自由能形貌图几乎呈单一且平滑的最小能簇(图 5 d,f), 表明配体与受体结合稳定。Z-8468_LuxG 是一个狭窄、粗糙、有分散的能量簇(图 5 e), 表明配体与受体结合稳定性较差。综上分子动力学模拟各种指标的结果分析, W-8655 对 LuxC 和 T-88944 对 LuxG 的作用稳定, Z-8468 对 LuxG 作用较为稳定。

4 讨论

4.1 费式弧菌生物发光抑制实验其它影响因素 费式弧菌生物发光抑制实验是一种快速、敏感且成本效益高的方法, 用于评估生物效应, 能够提供关于生态毒性的具体信息^[11, 12]。其次, 多种因素可能会影响检测过程, 例如, 当水样颜色或浊度较高时, 可能会因为光吸收或散射而导致光损失^[13]。此外, pH 值超出 6.0~8.5 范围的样品也会影响细菌的生物发光^[14]。在检测过程中, ZJW 没有表现出降低毒性的趋势。结合我们之前的分析(占比高的黄连增加了 ZJW 的整体毒性), 还观察到 ZJW 的潜在颜色干扰(其在水中溶解时呈黄色)可能会影响费式弧菌的生物发光信号检测。

4.2 MACCS 相识性模型缺点 基于传统 QSAR 模型的构建存在一些问题^[15-17], 通过已建立的有毒成分的结构相似性, 直接将筛选出的成分与这些有毒成分进行匹配, 从而减少模型构建和数据转换中的数据丢失。这种方法的一个亮点是速度快, 操作性强, 并且能够利用化合物结构之间的多种相似性。然而, 也存在一些问题。例如, 当在有毒成分之间进行相似性匹配并以高相似性作为模型构建标准时, 可能会过滤掉一些虽然相似性不高但表现出相当毒性的成分。这是一个缺点。此外, 这种情况可能出现在设定的程度值过滤阈值中。对此, 我们只能确保数据模型构建条件的一致性, 以尽可能减少数据丢失, 提高筛选效率和质量。

4.3 分子对接结果分析 在 EF 中, W-8655 (4-羟基-3,5-二甲氧基苯甲醛) 的羰基氧通过氢键与 THR28 结合, 其羟基通过氢键与 TYR92 结合, 还通过氢键与

GLY153 相互作用。在 ZJW 中, Z-8468 (4-羟基-3-甲氧基苯甲酸) 的酯氧阴离子与 HIP_A:11 和 SRG_A:169 形成盐桥, 并通过氢键与 SER_B:23 和 SER_A:13 结合。LYS_A:167 与 H₂O 形成氢键, H₂O 又与 Z-8468 酯中的羰基氧和 HIP_A:11 形成氢键。ARG_A:169 与 Z-8468 酯中的羰基氧形成氢键。在 ED 中, T-88944 (4-甲氧基-3,5-二甲基苯甲酸) 的酯氧阴离子与 HIP_A:11 和 SRG_A:169 形成盐桥。LYS_A:167 与 H₂O 形成氢键, H₂O 又与 T-88944 酯中的羰基氧和 HIP_A:11 形成氢键。T-88944 酯中的羰基氧还通过氢键与 H₂O 和 LYS_A:167 结合。ARG_A:15 中的碳与 T-88944 的苯环形成 Pi-C 共轭。这些中药成分与蛋白质残基的结合是抑制费式弧菌发光的关键机制。

在我们的对接研究中, 我们发现最低的对接得分并不一定证明配体和受体之间的结合是有利的, 也不意味着分子和蛋白质之间形成了更多的键。还需要根据所形成的键的类型和数量进行综合评估^[18, 19]。在对 EF 中的 W-8655 进行进一步分析时, 虽然它的对接得分不是 EF 成分中最低的, 但它与氨基酸残基的结合最多。同时, ZJW 中的 Z-8468 和 ED 中的 T-88944 具有第二低对接得分, 但它们与蛋白质残基形成了最多的键。我们对这些与蛋白质复合物结合的成分进行了综合判断和选择。通过对上述对接结果的分析 (图 3), 我们发现苯环上的羟基和酯基化合物与 Lux 蛋白形成更多的结合键, 并具有较低的结合能。据此可以推断, 酚类和芳香酯类化合物与费式弧菌有较强的相互作用。

4.4 分子动力学模拟时间设定评判 如使用 10 ns 的模拟来评估蛋白质在恒定 pH 下的折叠和结构稳定性, 表明分子动力学模拟的持续时间也会影响配体-受体结合的评估^[20]。此外, 100 ns 的模拟已被用于研究蛋白质内部的构象变化^[21], 并且在分子动力学模拟的不同模块中应用了不同的模拟持续时间^[22]。虽然模拟中使用的力场存在一些差异, 但这些差异在足够长的模拟过程中趋于减小。基于上述研究, 选择大于 10 ns 的模拟持续时间可以评估分子与蛋白质结合的稳定性以及蛋白质的折叠状态。

5 结论

通过费式弧菌的发光抑制率实验, 我们可以快速完成对中药配伍毒性趋势变化的评估。比较 IC₅₀, 结果显示在 EF、ZJW、ED 中, ED > EF, ED > ZJW, 表明 ED 显示出减毒趋势。在进一步的机制探索中, 使用 MACSS 相识性筛选, 识

别出的有毒成分为 EF 的 7 种, ZJW 的 13 种, ED 的 20 种。EF 主要靶向费氏弧菌萤光酶 LuxB、LuxC、LuxG; ZJW 靶向 LuxC、LuxD、LuxE、LuxG; ED 靶向 LuxC、LuxD、LuxE、LuxG。进一步评估显示, W-8655 对 LuxC 有稳定作用, T-88944 对 LuxG 有稳定作用, 而 Z-8468 对 LuxG 的作用稳定性较差。利用费氏弧菌毒性检测结合费氏弧菌毒性数据构建的 MACSS 相识性模型, 能快速评判吴茱萸及其配伍毒性变化趋势及毒性分子作用机制。

参考文献

- [1] ZHU H, WANG X, WANG X, et al. The toxicity and safety of Chinese medicine from the bench to the bedside [J]. Journal of Herbal Medicine, 2021, 28: 100450.
- [2] CAI P, QIU H, QI F, et al. The toxicity and safety of traditional Chinese medicines: Please treat with rationality [J]. Bioscience trends, 2019, 13(5): 367-73.
- [3] IZZO A A, ERNST E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: an updated systematic review [J]. Drugs, 2009, 69(13): 1777-98.
- [4] 熊静悦, 李孝容, 鄢良春, 等. 基于 Microtox 技术的中药注射剂微毒快速测试体系反应条件的优化与方法学的考察 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9): 5.
- [5] 罗荔敏, 鄢良春, 卫天喜, 等. Microtox(微毒)技术应用于红花注射液综合毒性检测 [J]. 世界科学技术:中医药现代化, 2016, 18(11):7.
- [6] 赵炳祥, 罗荔敏, 鄢良春, 等. Microtox 技术应用于参麦注射液综合毒性检测 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 018(011): 1942-7.
- [7] 华桦, 鄢良春, 吴诗惠, 等. 山银花,金银花微毒测试(Microtox)与安全性研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 219-24.
- [8] 郑晓秋. 中药注射剂的生物毒性评价及质量控制研究 [D], 2013.
- [9] 鄢良春, 华桦, 罗茜, 等. 基于微小毒性检测的中药注射剂质量波动及安全风险预警研究进展 [J]. 药学学报, 2019, 54(12): 2189-94.
- [10] 李冀, 左铮云. 方剂学 [M]. 中国中医药出版社, 2021.
- [11] ABBAS M, ADIL M, EHTISHAM-UL-HAQUE S, et al. Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: a review [J]. Science of the Total Environment, 2018, 626: 1295-309.
- [12] PARVEZ S, VENKATARAMAN C, MUKHERJI S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (Vibrio fischeri) for acute toxicity prediction of chemicals [J]. Environment international, 2006, 32(2): 265-8.
- [13] STANDARDIZATION I O F. Water Quality: Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of Vibrio Fischeri (Luminescent Bacteria Test). Method Suring Liquid-dried Bacteria [M]. ISO, 1998.
- [14] POSTMA J, DE VALK S, DUBBELDAM M, et al. Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 53(2): 226-37.

- [15] SABANDO M V, PONZONI I, MILIOS E E, et al. Using molecular embeddings in QSAR modeling: does it make a difference? [J]. *Briefings in bioinformatics*, 2022, 23(1): bbab365.
- [16] BUREŠ M S, UKIĆ Š, CVETNIĆ M, et al. Toxicity of binary mixtures of pesticides and pharmaceuticals toward *Vibrio fischeri*: Assessment by quantitative structure-activity relationships [J]. *Environmental pollution*, 2021, 275: 115885.
- [17] WUNSCH F M, WÜNSCH B, BERNAL F A, et al. Quantitative structure-activity relationships of natural-product-inspired, aminoalkyl-substituted 1-benzopyrans as novel antiparasitic agents [J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5249.
- [18] GUEDES I, DE MAGALHÃES C, DARDENNE L. Receptor-ligand molecular docking. [J]. *Biophys Rev* 2014, 6: 75–87.
- [19] KIM R, SKOLNICK J. Assessment of programs for ligand binding affinity prediction [J]. *Journal of computational chemistry*, 2008, 29(8): 1316-31.
- [20] JANSEN A, AHO N, GROENHOF G, et al. phbuilder: a tool for efficiently setting up constant pH molecular dynamics simulations in GROMACS [J]. *Journal of Chemical Information Modeling*, 2024, 64(3): 567-74.
- [21] KOSHY C, PARTHIBAN M, SOWDHAMINI R. 100 ns molecular dynamics simulations to study intramolecular conformational changes in Bax [J]. *Journal of Biomolecular Structure Dynamics*, 2010, 28(1): 71-83.
- [22] JANOWSKI P A, LIU C, DECKMAN J, et al. Molecular dynamics simulation of triclinic lysozyme in a crystal lattice [J]. *Protein science*, 2016, 25(1): 87-102.

补充 1

Table1

Ingredients	MW(g/mol)	SMILES	No.
3,4-dimethoxybenzaldehyde	166.17	<chem>c1(ccc(c(c1)OC)OC)C=O</chem>	1
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	182.17	<chem>c1(c(c(cc(c1)C=O)OC)O)OC</chem>	2
ethyl 4-hydroxybenzoate	166.17	<chem>C(=O)(c1ccc(cc1)O)OCC</chem>	3
3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde	152.15	<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C=O)O</chem>	4
4-ethenyl-2-methoxyphenol	150.17	<chem>c1(cc(ccc1O)C=C)OC</chem>	5
1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)ethanone	150.17	<chem>c1(c(cc(cc1)C)C(=O)C)O</chem>	6
2-methoxy-4-prop-2-enylphenol	164.2	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)CC=C)O</chem>	7
(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	164.16	<chem>C1=CC(=CC=C1/C=C/C(=O)O)O</chem>	8
benzene-1,2-diol	110.11	<chem>c1(O)c(O)cccc1</chem>	9
4-methoxy-3,5-dimethylbenzoic acid	180.2	<chem>c1c(c(c(cc1C(=O)O)C)OC)C</chem>	10
1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone	166.17	<chem>C(=O)(C)c1c(cc(cc1)OC)O</chem>	11
2,4-ditert-butylphenol	206.32	<chem>c1(cc(ccc1O)C(C)(C)C)C(C)(C)C</chem>	12
5-methyl-2-propan-2-ylphenol	150.22	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(C)C)O</chem>	13
3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde	152.15	<chem>Oc1cc(C=O)ccc1OC</chem>	14
4-hydroxybenzaldehyde	122.12	<chem>c1(ccc(cc1)O)C=O</chem>	15
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	152.15	<chem>C(=O)c1cc(c(cc1)O)OC</chem>	16
2-methyl-5-propan-2-ylphenol	150.22	<chem>c1(c(ccc(c1)C(C)C)C)O</chem>	17
2-methoxy-4-prop-2-enylphenol	164.2	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)CC=C)O</chem>	18
2-methoxy-4-[(E)-prop-1-enyl]phenol	164.2	<chem>C/C=C/C1=CC(=C(C=C1)O)OC</chem>	19
4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	168.15	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C(=O)O)O</chem>	20

EF

	1	ligprep_W (7)
1	<input type="radio"/>	8419
2	<input type="radio"/>	8655
3	<input type="radio"/>	8434
4	<input checked="" type="radio"/>	12127
5	<input type="radio"/>	332
6	<input type="radio"/>	15068
7	<input type="radio"/>	3314

(1-7) corresponds to the components of No1-7 in table1, which corresponds to W-8419,W-8655....W-3314.

ED

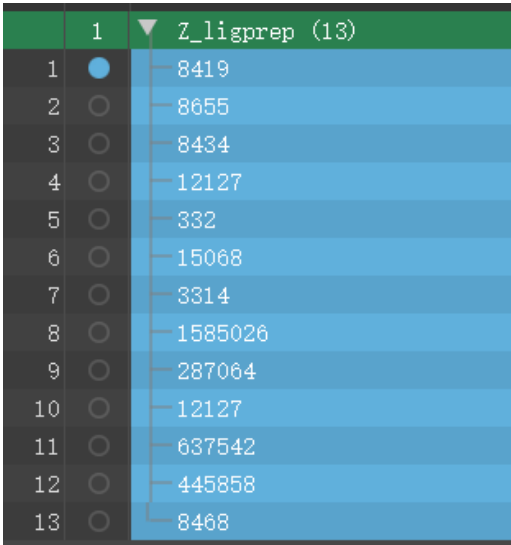
	1	T_ligprep (20)
1	●	8419
2	○	8655
3	○	8434
4	○	12127
5	○	332
6	○	15068
7	○	3314
8	○	637542
9	○	289
10	○	88944
11	○	11092
12	○	7311
13	○	6989
14	○	12127
15	○	126
16	○	1183
17	○	10364
18	○	3314
19	○	853433
20	○	8468

(1-20) corresponds to the components of No1-20 in table1, which corresponds to T-8419,T-8655...T-8468.

Stable2

Ingredients	MW(g/mol)	SMILES	No.
3,4-dimethoxybenzaldehyde	166.17	<chem>c1(ccc(c(c1)OC)OC)C=O</chem>	1
4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	182.17	<chem>c1(c(c(cc(c1)C=O)OC)O)OC</chem>	2
ethyl 4-hydroxybenzoate	166.17	<chem>C(=O)(c1ccc(cc1)O)OCC</chem>	3
3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde	152.15	<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C=O)O</chem>	4
4-ethenyl-2-methoxyphenol	150.17	<chem>c1(cc(ccc1O)C=C)OC</chem>	5
1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)ethanone	150.17	<chem>c1(c(cc(cc1)C)C(=O)C)O</chem>	6
2-methoxy-4-prop-2-enylphenol	164.2	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)CC=C)O</chem>	7
(Z)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid	208.21	<chem>C(=C\c1cc(c(cc1)OC)OC)\C(=O)O</chem>	8
methyl 3,4-dihydroxybenzoate	168.15	<chem>C(=O)(c1cc(c(cc1)O)O)OC</chem>	9
3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde	152.15	<chem>Oc1cc(C=O)ccc1OC</chem>	10
(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	164.16	<chem>C(=O)/C=C/c1ccc(cc1)O</chem>	11
(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid	194.18	<chem>c1(cc(c(cc1)O)OC)/C=C/C(=O)O</chem>	12
4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	168.15	<chem>c1(cc(c(cc1)O)OC)C(=O)O</chem>	13

ZJW



(1-13) corresponds to the components of No1-13 in table2, which corresponds to Z-8419,Z-8655...Z-8468.

补充 2

group	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
compounds	T-7311	T-6989	T-10364	T-12127	T-11092	T-88944	T-8419	T-126	T-8468	T-8655	T-853433	T-1183	T-289	T-15068	T-637542	T-8434	T-3314	T-332
LuxA_A	-6.677	-6.49	-6.476	-6.302	-6.232	-5.984	-5.96	-5.895	-5.855	-5.843	-5.82	-5.733	-5.032	-5.328	-5.222	-5.334	-5.125	-5.364
LuxA_C	-5.887	-5.619	-5.474	-5.621	-5.312	-6.275	-5.769	-4.85	-5.481	-5.386	-4.723	-4.833	-5.571	-3.563	-4.925	-4.036	-4.83	-4.8
LuxB_B	-6.76	-5.25	-6.054	-5.441	-5.254	-5.251	-5.596	-5.492	-5.027	-5.539	-5.256	-5.026	-4.835	-5.471	-4.229	-5.023	-4.727	-4.879
LuxB_D	-6.542	-6.17	-6.234	-5.931	-6.089	-6.091	-6.156	-5.087	-4.908	-4.797	-5.76	-5.637	-4.772	-6.057	-4.542	-5.191	-5.218	-5.093
LuxC	-5.878	-4.847	-6.015	-4.896	-5.118	-5.117	-5.138	-4.996	-4.827	-5.540	-6.181	-4.844	-4.737	-5.189	-7.052	-4.017	-4.28	-4.462
LuxD	-4.911	-5.97	-6.437	-5.449	-6.157	-4.484	-5.980	-5.771	-5.612	-5.494	-6.354	-6.059	-5.945	-5.778	-4.985	-5.827	-5.138	-5.311
LuxE	-4.5	-4.968	-6.291	-5.200	-4.332	-4.199	-4.461	-5.774	-6.012	-5.044	-5.875	-5.832	-5.545	-5.055	-4.25	-2.105	-5.642	-5.561
LuxG	-4.215	0	-4.159	-6.069	-6.049	-7.161	-6.320	-6.196	-7.115	-5.977	-6.213	-6.288	-6.447	-6.896	-7.487	-6.647	-6.307	-5.542

group	W	W	W	W	W	W	W	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
compounds	W-12127	W-8419	W-8655	W-15068	W-8434	W-3314	W-332	Z-12127	Z-8419	Z-8468	Z-8655	Z-15068	Z-1585026	Z-637542	Z-445858	Z-287064	Z-8434	Z-3314
LuxA_A	-6.302	-5.96	-5.843	-5.328	-5.334	-5.125	-5.364	-6.302	-5.96	-5.855	-5.843	-5.328	-5.499	-5.222	-5.443	-5.342	-5.334	-5.125
LuxA_C	-5.621	-5.769	-5.386	-5.132	-4.036	-4.83	-4.8	-5.621	-5.769	-5.481	-5.386	-3.563	-4.894	-4.925	-5.001	-2.961	-4.036	-4.83
LuxB_B	-5.441	-5.596	-5.539	-5.471	-5.023	-4.727	-4.879	-5.441	-5.596	-5.027	-5.539	-3.164	-4.689	-4.229	-4.477	-5.254	-5.023	-4.727
LuxB_D	-5.931	-6.156	-3.364	-6.057	-5.191	-5.218	-5.093	-5.931	-6.156	-4.908	-4.797	-6.057	-5.556	-4.542	-5.14	-5.008	-5.191	-5.218
LuxC	-4.896	-5.138	-5.54	-5.189	-4.017	-4.28	-4.462	-4.896	-5.138	-4.827	-5.54	-5.189	-4.469	-7.052	-6.758	-4.575	-4.017	-4.28
LuxD	-5.449	-5.98	-5.494	-5.778	-5.827	-5.138	-5.311	-5.449	-5.98	-5.612	-5.494	-5.778	-5.975	-4.985	-4.868	-6.245	-5.827	-5.138
LuxE	-5.2	-4.461	-4.188	-5.055	-4.846	-5.642	-5.561	-5.2	-4.461	-6.012	-5.044	-5.055	-4.657	-4.25	-5.491	-3.546	-2.105	-5.642
LuxG	-6.069	-6.32	-5.977	-6.896	-6.647	-6.307	-5.542	-6.069	-6.32	-7.115	-5.977	-6.896	-6.917	-7.487	-6.332	-6.81	-6.647	-6.307

Toxicological safety evaluation of diallyl trisulfide through acute and subacute toxicity studies in ICR mice

Zhenhui Wu^{1,2,†}, Bodan Tu^{1,2,†}, Shubei Li^{2,3}, Junru Chen^{2,3}, Pan Shen², Wei Zhou²,
Chunyu Cao⁴, Zengchun Ma², Xianglin Tang², Chengrong Xiao², Yihao Wang^{2*},
Yue Gao^{1,2,3,5*}

(¹School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000, China.;

²Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China; ³School of Pharmacy, Guangdong pharmaceutical university, Guang Zhou 510006, China. ⁴Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China; ⁵Department of Nephrology, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Nephrology Institute of the Chinese People's Liberation Army, National Key Laboratory of Kidney Diseases, National Clinical Research Center for Kidney Diseases, Beijing Key Laboratory of Kidney Disease Research, Beijing 100853, China.)

[Abstract] Objective: Diallyl trisulfide (DATS) is one of the main sulfide-containing compounds in garlic oil and has been shown to have a variety of biological activities such as anti-tumor, inhibition of inflammation, and immune regulation. However, there is very little information available regarding its toxicological safety. This study evaluated the oral acute and subacute toxicity of DATS in ICR mice and identified its mechanism of toxicity. **Materials and methods:** This study conducted acute and subacute toxicity experiments according to the organization for economic cooperation and development (OECD) guidelines. For acute toxicity (14 days), ICR mice were divided into seven groups and received a single oral dose. The control group received blended oil, while the other groups received DATS at doses of 83.1, 111, 148, 197, 263, and 350 mg/kg. For subacute toxicity (28 days), four groups of rats received doses of 0, 18.67 (DATS-L), 29.51 (DATS-M), and 46.67 mg/kg (DATS-H) of DATS and blended oil daily. Clinical observations including behavioral and mortality were performed daily. Hematological, biochemical, and Histopathological examination (HE) assessments were performed at

[基金项目] The Major science and technology projects of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022A03016 and sub-program 2022A03016-3).

[第一作者] 伍振辉, 江西中医药大学, 330006, 15715172017, wz77580@163.com

[通信作者] E-mail addresses: gaoyue@bmi.ac.cn (Y. Gao); hao_1216@126.com (Y. Wang).

the end of each experiment. Predict the toxicity mechanism of DATS through toxicity prediction software. Use proteomics technology to analyze the toxic mechanism of DATS and determine DATS early warning biomarkers. Binding energy analysis of DATS and key proteins through molecular docking. **Results:** The LD₅₀ of DATS was calculated using the Bliss method to be 186.669 mg/kg, with 95% confidence limits of 171.972-202.372 mg/kg and a maximum tolerated dose of 111.0 mg/kg. The body weights of mice in the DATS 197, 263, and 350 mg/kg dosage groups were significantly lower on day 1 of the observation period after gavage compared to the control group. In subacute toxicity, water consumption and food intake were reduced in both male and female mice. The organ coefficients of spleen and small intestine of male mice in the DATS-H group were significantly higher than those of the control group ($p<0.01$, $p<0.05$) in a dose-dependent manner. the remaining tissue (heart, brain, lung, liver, kidney, stomach, large intestine, epididymis, uterus, and ovary) organ coefficients of female and male mice at the three doses of DATS were not significantly different compared with those of the control group. The level of ALB was higher in the female DATS H-dose group than in the control group ($P<0.001$); TP levels were higher in both female and male DATS H-dose groups than in the control group ($P<0.01$, $P<0.001$). The level of CHO was higher in the male DATS H-dose group than in the control group ($P<0.05$). In addition, the level of ALB was higher in the male DATS M and H-dose groups than in the control group ($P<0.001$). HE staining results showed significant damage to the spleen, liver, small intestine, and kidney of mice at high doses of DATS. And HE staining results of the hearts, brains, lungs, stomachs, large intestines, testes, and uteri revealed a normal architecture of the tissues in all the treated animals. The results of toxicity prediction analysis indicate that there may be a toxicity warning structure in DATS. The analysis of spleen and serum proteomics revealed that long-term administration of DATS, on the one hand, promotes the expression of Tec proteins, which might be a biomarker and could cause the elevation of PLT, and induce hepatic injury; on the other hand, low doses of DATS show a protective effect on the immune system, and when the dosage is excessive, DATS exerts a certain degree of immunotoxicity, leading to splenomegaly and injury.

Conclusions: This study provides the maximum safe dose of DATS, which provides valuable toxicological data for the efficient evaluation of the long-term toxicity of DATS and also provides more experimental basis for the development of DATS as a health food or drug.

[Key words] Diallyl trisulfide; Toxicological safety; Serum biochemistry; Histopathology; Proteomic; Mechanism

A characterized ethanol extract of *Rosa rugosa* inhibits hepatic stellate cell activation through elevating Hint1 and subsequent upregulation of Smad7

Zhiyong Zheng, Yecheng Lei, Tiantian Zhang, Hui Sun, Chuo Wang, Anning Song, Xukun Deng[#], Guangwen Shu[#]

(School of Pharmaceutical Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** Our study aimed to explore effects of a characterized ethanol extract of *Rosa rugosa* (ERS) on hepatic stellate cells (HSCs) activation and mouse liver fibrosis and their molecular mechanisms. **Method:** ERS suppressed TGF- β 1-induced activation of LX-2 HSCs. Moreover, ERS boosted Smad7 and inhibited TGF- β 1-induced phosphorylation of Smad2/3. Knockdown of Smad7 eliminated protective effects of ERS. Furthermore, ERS elevated Hint1 whose expression was positively related with that of Smad7. Knockdown of Hint1 abolished ERS-mediated upregulation of Smad7 and subsequent suppression of LX-2 HSC activation. Suppressive effects of ERS on Smad2/3 signaling were also eliminated. In primary mouse HSCs, ERS potentiated Hint1/Smad7 axis and suppressed their spontaneous activation. Finally, it was unveiled that gavage of ERS dramatically mitigated mouse liver fibrosis provoked by CCl₄. **Result:** Our findings collectively indicated that ERS inhibits HSC activation and alleviates liver fibrosis. **Conclusion:** Mechanically, ERS elevates expression of Hint1 which suppresses TGF- β 1 pathway via upregulating Smad7 in HSCs.

[Key words] *Rosa rugosa*; Hepatic stellate cell activation; TGF- β 1; Smad7 ; Hint1

[基金项目] 中南民族大学科学发展院中南民族大学 2019 中央科研业务费（自然科学）（CZD19007）；巴东县中医药产业发展调研与精准扶贫；国家民委高等教育教学改革研究项目（21008）；横向合作项目：①HZY22045；②HZY22115

[通信作者] 邓旭坤（1972—）男，中南民族大学教授，研究生导师。研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: dengxukun@mail.scuec.edu.cn, Tel: 13407100639
舒广文（1984—），男，副教授，博士，研究方向：传统药物治疗肝脏疾病的活性物质与作用机理，E-mail: shuguangwen@whu.edu.cn

Ellagic acid protect against the cytotoxic effects of aristolochic acid I on human renal tubular epithelial cells

Shanshan Zheng, Xiao Lei, Qian Fu, Arslan Yusufu, Hui Sui, Xukun Deng[#],

Guangwen Shu[#]

(College of Pharmacy, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **objective:** The protective activities of ellagic acid(EA) against the cytotoxic effects of aristolochic acid I(AAI) on human HK-2 renal tubular epithelia cells were explored, and the potential molecular mechanisms were dicussed. **Method:** Cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) colorimetric assay and lactic acid dehydrogenase (LDH) activity assay. Hoechst 33258 fluorescent staining and flow cytometry analysis (FITC-Annexin V/PI double staining) performed to detect cell apoptosis.Levels of factors related with NF- κ B and NLRP3 pathways were determined by immunoblotting and quantitative real-time PCR. **Result:**The results revealed that AAI-induced decline of cell viability and apoptosis were considerably reduced by EA.Further studies revealed that AAI elevated the transcription of encoding genes of NLRP3 inflammasome components via potentiating NF- κ B in HK-2 cells.Moreover, EA inhibited AAI-mediated activation of NF- κ B/NLRP3 cascade. **Conclusion:** Collectively, EA dramatically alleviated AAI-induced cytotoxicity in HK-2 cells. Suppression of AAI-mediated activation of intracellular NF- κ B/NLRP3 cascade is implicated in its renal protective effect.

[Key words] aristolochic acid I; ellagic acid; HK-2 renal tubular epithelial cells; NF- κ B/NLRP3 cascade

[基金项目] 中南民族大学科学发展院中南民族大学 2019 中央科研业务费（自然科学）（CZD19007）；巴东县中医药产业发展调研与精准扶贫；国家民委高等教育教学改革研究项目（21008）；横向合作项目：①HZY22045；②HZY22115

[通信作者] 邓旭坤（1972—）男，中南民族大学教授，研究生导师。研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: dengxukun@mail.scuec.edu.cn, Tel: 13407100639

舒广文（1984—），男，副教授，博士，研究方向：传统药物治疗肝脏疾病的活性物质与作用机理，E-mail: shuguangwen@whu.edu.cn

To explore the mechanism of action of Sishen Pill in the treatment of colitis-associated colorectal cancer based on intestinal flora

Zhao Lina, Li Jing, Liu Mingyu, Xu Zhili

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** Inflammatory bowel disease (IBD) is a precancerous lesion of colorectal cancer, and Sishen Pill (SSP) has good therapeutic effects on inflammatory bowel disease. This study explores the alleviating effect of SSP on intestinal inflammation related colorectal cancer and its possible mechanism. **Methods:** The colitis associated colorectal cancer (CAC) mice were prepared through AOM/DSS and mesalazine (Mesa) was administered as the positive control medication. Different doses of SSP (4 g/kg, 2 g/kg and 1 g/kg) were given by gavage daily. The study evaluates its anticancer effects by detecting adenoma number, adenoma burden, histopathological lesions, and tumor-associated protein expression. Anti-inflammatory and repairing effects were assessed by body weight, disease activity index (DAI), spleen index, inflammation-associated proteins, and oxidative stress indicator expression. The effects on intestinal microbiota were detected by 16S rRNA sequencing and targeted short-chain fatty acid (SCFA) metabolomics. Western blotting was used to detect PI3K/AKT signaling pathway and apoptosis-related proteins. SW480 cells were treated with different concentrations of SSP-containing serum. CCK8 was used to detect cell proliferation. The scratch assay was used to detect cell migration. Hoechst33342 was used to detect apoptosis levels. Immunofluorescence and western blotting were used to detect PI3K/AKT signaling pathway and apoptosis-related proteins in cells. **Results:** SSP significantly reduced the number of adenomas, adenoma burden, tumor-related lesions, histopathological

[基金项目] 辽宁省教育厅高校基本科研项目 (JYTMS20231833)

[第一作者] 赵李娜 (2000-), 女, 辽宁中医药大学硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。

E-mail: 1697650230@qq.com。电话: 13546624958

[通信作者] 徐志立 (1972-), 男, 博士, 辽宁中医药大学副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药药理学。

E-mail: xu_zhili@126.com。电话: 13940902631

damage and tumor-associated protein expression in AOM/DSS-induced mice, thereby hindering the progression of colitis-related carcinogenesis. SSP can also reduce DAI score, spleen index, expression of inflammation-related proteins, and alleviate intestinal oxidative stress damage. In addition, SSP can regulate the structure of the intestinal microbiota and increase the production of SCFAs. SSP also improved the proliferation ability and apoptosis level of colon cancer cell line SW480, and inhibited migration. Western blotting and immunofluorescence assays showed that SSP regulates the PI3K/AKT pathway and promotes apoptosis in cancer cells.

Conclusion: Our study showed that SSP has a significant therapeutic effect on enteritis-related colorectal cancer. The mechanism may be achieved by reshaping the structure of intestinal microbiota, promoting the production of SCFA, and regulating the PI3K/AKT signaling pathway.

[Key words] colorectal cancer; Inflammation; intestinal flora; Sishen Pills; PI3K/AKT signaling pathway; SW480

Limonin relieves TGF- β -induced hepatocyte EMT and hepatic stellate cell activation *in vitro* and CCl₄-induced liver fibrosis in mice via upregulating Smad7 and subsequent suppression of TGF- β /Smad cascade

Zhili Yao, Chenxi Dai, Arslan Yusuf, Hui Sun, Xiao Lei, Tiantian Zhang, Xukun

Deng[#], Guangwen Shu[#]

(School of Pharmaceutical Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** Liver fibrosis is a pathological process as a result of intrahepatic deposition of excessive ECM. EMT of hepatocytes and activation of HSCs both play important roles in the etiology of liver fibrosis. **Methods:** Here, we found that limonin repressed TGF- β -induced EMT in AML-12 hepatocytes and activation of LX-2 HSCs. Limonin suppressed TGF- β -provoked Smad2/3 C-terminal phosphorylation and subsequent nuclear translocation. However, limonin exerted few effects on Smad2/3 phosphorylation at linker region. Mechanistically, limonin increased Smad7 in both AML-12 and LX-2 cells. Knockdown of Smad7 abrogated inhibitory effects of limonin on TGF- β -induced changes in both two cells. Further studies revealed that limonin upregulated Smad7 and declined C-terminal phosphorylation and nuclear translocation of Smad2/3 to alleviate mouse CCl₄-induced liver fibrosis. **Conclusion:** Our findings indicated that limonin inhibits TGF- β -induced EMT of hepatocytes and activation of HSCs *in vitro* and CCl₄-induced liver fibrosis in mice. Upregulated Smad7 which suppresses Smad2/3-dependent gene transcription is implicated in the hepatoprotective activity of limonin.

[Key words] Liver fibrosis; Limonin; TGF- β ; Smad; Epithelial-mesenchymal transition.

[基金项目] 中南民族大学科学发展院中南民族大学 2019 中央科研业务费（自然科学）（CZD19007）；巴东县中医药产业发展调研与精准扶贫；国家民委高等教育教学改革研究项目（21008）；横向合作项目：①HZY22045；②HZY22115

[通信作者] 邓旭坤（1972—）男，中南民族大学教授，研究生导师。研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: dengxukun@mail.scuec.edu.cn, Tel: 13407100639

舒广文（1984—），男，副教授，博士，研究方向：传统药物治疗肝脏疾病的活性物质与作用机理，E-mail: shuguangwen@whu.edu.cn

Protective Effect of Ellagic Acid on Aristolochic Acid I-Induced Acute Kidney Injury in Mice

Yanglu Song, Hui Sun, Qian Fu, Chenxi Dai, Arslan Yusufu, Guangwen Shu[#]

Xukun Deng[#]

(College of Pharmacy, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of ellagic acid (EA) on acute kidney injury induced by aristolochic acid I (AAI). **Methods:** Totally 40 Kunming mice, half male and half female, were randomly divided into four groups: healthy. model (AAI at 10 mg/(kg m_b·d)), low-dosage EA (AAI at 10 mg/(kg m_b·d)+EA 10 mg/(kg m_b·d); and high-dosage EA (AAI at 10 mg/(kg m_b·d)+EA 30 mg/(kg m_b·d)). Different dosages of EA were given to mice by gavage daily for 12 days. The acute kidney injury model was established by intraperitoneal injection of AAI starting from day 7. On day 12, all the mice were sacrificed for measurement of renal function indicators such as renal index, urine protein, urea nitrogen, and creatinine. Hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining were performed to examine renal histopathological changes. Biochemical assay kits were used to determine oxidative stress indicators in the kidney including glutathione (GSH), total superoxide dismutase (T-SOD) and malondialdehyde (MDA). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were used to detect the levels of inflammatory factors in mice. Western blot and qPCR were used to detect the expression levels of nuclear factor (NF)- κ B and NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)-related factors in the kidney. **Results:** EA significantly improved renal function indexes and renal histopathological changes in mice with AAI-induced acute kidney injury, and restored oxidative stress indexes in the kidney to nearly normal levels. In addition, EA significantly down-regulated the levels of inflammatory factors including tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β in the serum of the mouse model and reduced the transcription of the genes encoding TNF- α and IL-1 β in the kidney. Further experiments revealed that EA considerably decreased the phosphorylation levels of inhibitor of NF- κ B (I κ B) α and NF- κ B p65 proteins in the

kidney of the mouse model ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and inhibited the transcription and translation of NLRP3 inflammasome components including NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), caspase-1 and IL-1 β .

Conclusion: EA ameliorates AAI-induced acute kidney injury in mice possibly through a mechanism related to blocking of AAI-induced renal inflammation by interfering with the NF- κ B/NLRP3 pathway.

[Key words] aristolochic acid I; ellagic acid; acute kidney injury; inflammation; NF- κ B/NLRP3 pathway;

[基金项目] 中南民族大学科学发展院中南民族大学 2019 中央科研业务费（自然科学）（CZD19007）；巴东县中医药产业发展调研与精准扶贫；国家民委高等教育教学改革研究项目（21008）；横向合作项目：①HZY22045；②HZY22115

[通信作者] 邓旭坤（1972—）男，中南民族大学教授，研究生导师。研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: dengxukun@mail.scuec.edu.cn, Tel: 13407100639

舒广文（1984—），男，副教授，博士，研究方向：传统药物治疗肝脏疾病的活性物质与作用机理，E-mail: shuguangwen@whu.edu.cn

Ellagic acid affects TGF- β -induced EMT in AML-12 cells by regulating Nrf2 and NLRP3 pathways

Anning Song, Tiantian Zhang, Jing Liu, Xiao Lei, Chuo Wang, Xukun Deng[#],

Guangwen Shu[#]

(College of Pharmacy, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **objective:** In this study, we investigated the effect of ellagic acid (EA) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of normal hepatocytes of AML-12 in mice induced by TGF- β and its possible mechanism. **Method:** The effect of EA on EMT in AML-12 cells induced by TGF- β was evaluated by cell viability, cell morphology observation and intracellular ROS level detection. The expression of intracellular EMT marker proteins cadherin E and vimentin was detected by immunofluorescence and western blotting. Immunoprinting The expression levels of Nrf2 and NLRP3 pathway-related factors were detected in cells. **Result:** The results showed that EA significantly inhibited EMT in AML-12 cells induced by TGF- β . Further one results showed that EA could induce the entry of Nrf2 into the nucleus and up-regulate the expression of its downstream antioxidant genes. EA can also downregulate NLRP3 inflammatory pathway-related proteins Expression. **Conclusion:** EA has an inhibitory effect on TGF- β -induced EMT in AML-12 mouse hepatocytes, and its mechanism may be related to the regulation of Nrf2 antioxidant pathway NLRP3 is related to the inflammatory pathway.

[Key words] Ellagic acid; EMT; liver fibrosis; anti-oxidation; inflammatory pathway

[基金项目] 中南民族大学科学发展院中南民族大学 2019 中央科研业务费（自然科学）（CZD19007）；巴东县中医药产业发展调研与精准扶贫；国家民委高等教育教学改革研究项目（21008）；横向合作项目：①HZY22045；②HZY22115

[通信作者] 邓旭坤（1972—）男，中南民族大学教授，研究生导师。研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: dengxukun@mail.scuec.edu.cn, Tel: 13407100639

舒广文（1984—），男，副教授，博士，研究方向：传统药物治疗肝脏疾病的活性物质与作用机理，E-mail: shuguangwen@whu.edu.cn

The effect of novel angiotensin II receptor antagonist TSST on arterial blood pressure and tension of the isolated thoracic aortic ring in rabbits

李晶¹, 赵李娜¹, 刘铭雨¹, 徐志立^{1*}

(1.辽宁中医药大学药学院, 辽宁省大连市 116600)

[Abstract] **Abstract: Objective:** The purpose of the study is to investigate the effect of angiotensin II (Ang II) receptor antagonist TSST on arterial blood pressure and isolated thoracic aorta in rabbits, and to explore its molecular mechanism of actions. **Methods:** The hypertension in rabbits was induced by Ang II, and then, the effects of TSST at different concentrations through ear vein injection using the cumulative concentration method. Utilize an isolated rabbit thoracic aortic perfusion model to measure the tension of arterial rings under various conditions. Assess the expression levels of Angiotensin II type-1 receptor (AT₁R) and MLCK protein in isolated rabbit arterial rings by Western blot analysis. Employ AutoDock software to perform molecular docking between TSST and AT₁R protein. **Results:** TSST has no effect on normal blood pressure in rabbits but can reduce hypertension induced by Angiotensin II. TSST does not influence the tension of vascular rings at rest nor does it induce relaxation in vascular rings precontracted with KCl. TSST exhibits a concentration-dependent relaxation effect on vascular rings precontracted with noradrenalin (NA) and Angiotensin II, reaching maximum relaxation at 4×10^{-4} M ($P < 0.01$). In aortic rings stimulated by Angiotensin II, pretreatment with 4×10^{-4} M TSST for 1 hour significantly decreases MLCK and AT₁R protein levels ($P < 0.01$). TSST can stably bind to AT₁R. **Conclusion:** TSST can inhibit hypertension induced by Ang II in rabbits and significantly relax isolated rabbit thoracic aortic rings.

[Key words] Angiotensin II receptor antagonist, TSST, AT₁R, MLCK

[基金项目] 辽宁省教育厅高校基本科研项目 (JYTMS20231833)

[第一作者] 李晶 (1999-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理学, E-mail: lijingli0224@163.com

[通信作者] 徐志立 (1972-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药药理学, E-mail: xu_zhili@126.com

Theaflavine inhibits hepatic stellate cell activation through modulating PKA/LKB1/AMPK/GSK3 β cascade and subsequent enhancement of Nrf2 signaling

Qi Deng, Hui Sun, Tiantian Zhang, Anqi Zhu, Xiao Lei, Chuo Wang,

Xukun Deng[#], Guangwen Shu[#]

(School of Pharmaceutical Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** Activation of hepatic stellate cells (HSCs) constitutes a crucial etiological factor leading to liver fibrosis. Theaflavine (TF) is a characteristic bioactive compound in fermented tea. It is still unclear whether TF suppresses HSC activation. **Methods:** Here, we found that TF attenuated TGF- β 1-induced activation of LX-2 HSCs. TF potentiated Nrf2 signaling in LX-2 HSCs. Knockdown of Nrf2 abrogated TF-mediated resistance to TGF- β 1. In addition, TF modulated LKB1/AMPK/GSK3 β axis upstream of Nrf2. Inhibition of AMPK or knockdown of LKB1 crippled TF-mediated potentiation of Nrf2. PKA promotes LKB1 phosphorylation. **Results:** In LX-2 cells, TF increased LKB1/PKA interaction without affecting their contents. Inhibition of PKA abolished TF-mediated potentiation of LKB1/Nrf2 and crippled inhibitory effects of TF on their activation. TF also enhanced direct binding between purified PKA-C α and LKB1 proteins in vitro. Molecular docking indicated that TF showed binding activity with both LKB1 and PKA-C α proteins. In mouse primary HSCs, TF elevated LKB1/PKA-C α interaction, boosted LKB1 phosphorylation, potentiated Nrf2 signaling and suppressed their spontaneous activation. Inhibition of PKA or knockdown of LKB1 eliminated TF-mediated induction of Nrf2 signaling and suppression of spontaneous activation of primary HSCs. Furthermore, TF considerably alleviated CCl₄-induced liver fibrosis in mice. In

[基金项目] 中南民族大学科学发展院中南民族大学 2019 中央科研业务费（自然科学）（CZD19007）；巴东县中医药产业发展调研与精准扶贫；国家民委高等教育教学改革研究项目（21008）；横向合作项目：①HZY22045；②HZY22115

[通信作者] 邓旭坤（1972—）男，中南民族大学教授，研究生导师。研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: dengxukun@mail.scuec.edu.cn, Tel: 13407100639

舒广文（1984—），男，副教授，博士，研究方向：传统药物治疗肝脏疾病的活性物质与作用机理，E-mail: shuguangwen@whu.edu.cn

mouse livers, TF increased LKB1/PKA-C α interaction, upregulated LKB1 phosphorylation and modulated its downstream AMPK/GSK3 β /Nrf2 axis.

Conclusion: Our findings collectively indicated that TF suppresses HSC activation. Mechanically, TF elevated LKB1/PKA interaction in HSCs which in turn upregulated LKB1 phosphorylation and subsequently modulated downstream AMPK/GSK3 β /Nrf2 axis.

[Key words] Activation of hepatic stellate cells; Theaflavine; PKA; LKB1; Nrf2

**Pharmacokinetic studies of alkamides, a pair of cis-trans isomers
N-isobutyl-2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*/*Z*-dodecatetraenamide, from *Asari Radix* et
Rhizoma by UHPLC-MS/MS**

Fujie Cai¹, Hanxue Wang^{1,2}, Qi Xie¹, Zhejun Xie¹, Zedong Xiang¹, Rui Dang¹,

Wenkang Liu¹, Huida Guan¹, Xuemei Cheng¹, Changhong Wang^{1*}

(1 Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, 1200 Cailun Road, Shanghai 201203, China; 2 Shanghai TCM-Integrated Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 230 Baoding Road, Shanghai 200082, China.)

[Abstract] Objective: *Asari Radix* et *Rhizoma* (ARR), the dried root and rhizome of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag., *A. sieboldii* Miq. f. *sieboldii* and *A. sieboldii* Miq. f. *seoulense* (Nakai) C. Y. Cheng et C. S. Yang, has been widely used as medicine for thousands of years in China, Korea, and Japan for resolving the exterior and dissipating cold, dispelling wind and relieving pain, and warming the lung and transforming rheum. Alkamides refer to a type of natural product with a unique structure that connects fatty acids (mostly unsaturated fatty acid chains) and various amines through an amide linkage. Numerous studies have indicated that these alkamides have anti-inflammatory, antitumor, antidiabetic, and neuroprotective effects, especially anti-inflammatory and analgesic properties. It has been demonstrated that alkamides isolated from ARR have good pharmacokinetic characteristics and pharmacological activities related to the efficacy of *Asarum* L. In recent years, more than 9 alkamides have been found in *Asarum*. Among these, *N*-isobutyl-2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*-dodecatetraenamide (DDA-E) and *N*-isobutyl-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*-dodecatetraenamide (DDA-Z), a pair of cis-trans isomers with considerable content, were representative components. Nevertheless, there is a scarcity of independent research on these two components, with the majority of the

[基金项目] The National Natural Science Foundation of China (Grant No. 82003927).

[通信作者] Changhong Wang, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. Tel: 86-21-51322511, Fax: 86-21-51322519. E-mail address: wchcxm@shutcm.edu.cn; wchcxm@hotmail.com

study centering on the pharmacokinetic profiles of DDA-E/Z mixtures, as well as an initial assessment of their anti-inflammatory and analgesic properties. The pharmacodynamic effects of DDA-E and DDA-Z are directly related to the bioavailability and exposure characteristics of DDA-E, DDA-Z, and its metabolites, which are affected by the absorption, distribution, metabolism, and elimination of DDA-E and DDA-Z. To thoroughly analyze the differences in pharmacological effects between the two substances and understand the underlying causes, it is imperative to examine the absorption and metabolic excretion of the two *in vivo*.

Method: A rapid and simple method of ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was established for the quantification of DDA-E/Z in rat plasma. The method was validated for selectivity, linearity, matrix effects, extraction recovery, accuracy, precision, and stability. Twenty-four male SD rats were randomly divided into four groups ($n = 6$). DDA-E and DDA-Z (40 mg/kg) were suspended in 0.5% CMC-Na solution, and then orally administrated to two groups of rats respectively at a volume of 2 mL/100 g body weight. Other groups of rats were treated with DDA-E or DDA-Z injection (1 mg/kg) intravenously by dissolving in 10% dimethyl sulfoxide-normal saline. Approximately 300 μ L of each blood sample were collected into heparinized Eppendorf tubes from the posterior orbital vein at 0, 0.03, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after administration. The treated samples were injected into UHPLC-MS/MS for determination. Pharmacokinetic parameters such as the area under the concentration-time curve (AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$), mean resident time (MRT_{0-t}), elimination half-time ($T_{1/2}$), apparent distribution volume (V_d/F), clearance rate (CL/F), maximum plasma drug concentration (C_{max}), and peak time (T_{max}) were processed using the non-compartmental pharmacokinetic data analysis software program of PK solution 2.0™. Finally, the results were described as arithmetic mean \pm SD. **Results:** The calibration curves were constructed by plotting the ratio of the peak areas of DDA-E/Z to IS versus the concentration of DDA-E/Z by using least-squares linear regression weighted by $1/x^2$. An excellent linearity was observed over the range of 1–2500 ng/mL ($y = 0.17947x + 0.11342$, $R^2 = 0.9984$). The

intra-day precision (CV%) ranged from 4.41% to 7.98%, and the inter-day precision (CV%) ranged from 6.23% to 9.64%. The mean extraction recovery rate was in the range of 101.54–107.64%. Short-term, post-processed, and freeze-thaw stabilities were determined using the QC samples at LLOQ, LQC, MQC, and HQC concentration levels. All data met the relevant acceptance criteria (low, medium, and high concentration levels), that is, $\pm 15\%$ of the nominal value, except for the LLOQ, which must be within $\pm 20\%$ of the nominal value. Thus, DDA-E/Z was stable under predetermined storage conditions. The plasma drug concentrations declined with a $T_{1/2}$ of 2.30 ± 0.82 h for DDA-E and 1.94 ± 1.67 h for DDA-Z. DDA-E reached the peak at 4.33 ± 3.51 h with a C_{max} value of 589.60 ± 147.38 ng/mL after intragastric administration, by contrast, DDA-Z reached the peak at 0.70 ± 1.12 h with a C_{max} value of 471.84 ± 113.76 ng/mL. There were significant differences in the pharmacokinetic behavior of DDA-E and DDA-Z, with the AUC of DDA-E being much higher than that of DDA-Z. Following peak concentrations, both blood drug concentrations decreased, but the decline in E-type drug concentration was slow, while Z-type drug concentration decreased rapidly and remained relatively low for a long time. In addition, the $T_{1/2}$ value of DDA-E was approximately 1.8 times that of DDA-Z, indicating a rapid metabolism of DDA-Z *in vivo*. The significant difference in MRT in intravenous injection results also confirmed this point. For the oral group of DDA-E, the Vd/F value was 5.18 ± 0.67 L/kg and the CL/F value was 0.026 ± 0.000 L/min/kg; for the oral group of DDA-Z, the Vd/F value was 2.35 ± 0.42 L/kg and the CL/F value was 0.033 ± 0.002 L/min/kg. For the intravenous administration group, the value of Vd and CL were 4.44 ± 0.41 L/kg and 0.037 ± 0.012 L/min/kg for DDA-E, and 1.56 ± 1.66 L/kg and 0.035 ± 0.002 L/min/kg for DDA-Z, respectively. No statistically significant differences were observed between the two administration ways, suggesting the Vd/F and CL/F were related to the inherent properties of DDA-E and DDA-Z, not to the ways of administrations. It is worth noting that differences in T_{max} and Vd (Vd/F) between the DDA-E and DDA-Z groups were not statistically significant due to inter-individual differences in the experimental animals, but numerically, both indicators showed large differences. **Conclusion:** In the present

study, a UHPLC-MS/MS method was established for the determination of DDA-E/Z in rat plasma. The pharmacokinetic results indicated significant differences in the *in vivo* disposal processes of DDA-E and DDA-Z, specifically regarding clearance rates and bioavailability. It was evident that structural differences could affect the absorption, distribution, metabolism, and excretion of DDA-E and DDA-Z. Whether the differences in these *in vivo* processes are directly related to the differences in their pharmacological activity and safety is a topic that needs to be investigated further. Overall, this study conducted a first comparative analysis pharmacokinetic properties of DDA-E/Z, providing a reference for the clinical applications.

Human UDP-glucuronosyltransferase 1As catalyze Aristolochic acid

D O-glucuronidation to form a lesser nephrotoxic glucuronide

Dong-Zhu Tu^a, Guang-Bo Ge^{a,*}

(^a Shanghai Frontiers Science Center of TCM Chemical Biology, Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.)

[Abstract] **Aim of the study:** Aristolochic acids are naturally occurring nitro phenanthrene carboxylic acids primarily found in plants of the Aristolochiaceae family. Aristolochic acid D is a major constituent in the roots and rhizomes of the Chinese herb Xixin (the roots and rhizomes of *Asarum heterotropoides* F. Schmidt), which is a key material for preparing a suite of marketed Chinese medicines. For example, the contents of aristolochic acid D in the roots and rhizomes of 15 batches of Xixin are very high (ranged from 66.50 µg/g to 121.03 µg/g, but aristolochic acid I is hardly detected in these samples. Meanwhile, it should be noted that aristolochic acid D could be detected in 86.6% of 44 marketed Chinese medicines that contain the plants of Aristolochia species. The relatively high contents of aristolochic acid D in herbal products have raised safety concerns about aristolochic acid D, especially to its nephrotoxic potentials. Structurally, aristolochic acid D is nearly identical to the nephrotoxic aristolochic acid I, with an additional phenolic group at the C-6 site. Although the nephrotoxicity and metabolic pathways of aristolochic acid I have been well-investigated, the metabolic pathway(s) of aristolochic acid D in humans and the influence of aristolochic acid D metabolism on its nephrotoxicity has not been investigated yet. Thus, this study aimed to investigate aristolochic acid D O-glucuronidation pathway(s) in humans and to characterize the glucuronidation kinetics of aristolochic acid D in different enzyme sources, as well as to investigate the implication of aristolochic acid D O-glucuronidation on its nephrotoxicity. **Methods:** The O-glucuronide of aristolochic acid D was biosynthesized and its chemical structure was fully characterized by both ¹H-NMR and ¹³C-NMR. Reaction

[通讯作者] Guang-Bo Ge, E-mail: geguangbo@shutcm.edu.cn

phenotyping assays, chemical inhibition assays, and enzyme kinetics analyses were conducted to assess the crucial enzymes involved in aristolochic acid D *O*-glucuronidation in humans. Docking simulations were performed to mimic the catalytic conformations of aristolochic acid D in human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), while the predicted binding energies and distances between the deprotonated C-6 phenolic group of aristolochic acid D and the glucuronyl moiety of UDPGA in each tested human UGT isoenzyme were measured. The mitochondrial membrane potentials (MMP) and reactive oxygen species (ROS) levels in HK-2 cells treated with either aristolochic acid I, or aristolochic acid D, or aristolochic acid D *O*-glucuronide were tested, to elucidate the impact of *O*-glucuronidation on the nephrotoxicity of aristolochic acid D. **Results:** aristolochic acid D could be rapidly metabolized in human liver and intestinal microsomes (human liver microsomes and human intestine microsomes, respectively) to form a mono-glucuronide, which was purified and fully characterized as aristolochic acid D-6-*O*- β -D-glucuronide by NMR. aristolochic acid D-6-*O*-glucuronidation in human liver microsomes, human intestine microsomes, UGT1A1 and UGT1A9 followed Michaelis-Menten kinetics, with the K_m values of 4.27 μ M, 9.05 μ M, 3.87 μ M, and 7.00 μ M, respectively. As a result, the intrinsic clearance of UGT1A1-catalyzed aristolochic acid D-6-*O*-glucuronidation was estimated to be 302.8 μ L/min/mg protein, which was almost 14-fold higher than that of UGT1A9-catalyzed aristolochic acid D-6-*O*-glucuronidation (20.86 μ L/min/mg protein). These results demonstrate that UGT1A1 was a predominant enzyme responsible for the metabolic clearance of aristolochic acid D in humans. Docking simulations suggested that aristolochic acid D could be properly bound into the catalytic domains of UGT1A1 and UGT1A9, with the binding energy were -7.073 kcal/mol and -7.576 kcal/mol, respectively. Meanwhile, it was discovered that aristolochic acid D could form attractive catalytic conformations with UGT1A1, as evidenced that the glucuronyl moiety of UDPGA was positioned at a distance of less than 5.0 Å from the deprotonated C-6 phenolic group of aristolochic acid D. By contrast, aristolochic acid D was far from UDPGA in the top two docking poses and created non-catalytic conformations in UGT1A3 with

the binding energy of -8.39 and -8.35 kcal/mol, implying that aristolochic acid D acted as a poor substrate but might be a good inhibitor for this enzyme. Actually, aristolochic acid D exhibited moderate inhibition on the activity of UGT1A3, with the IC_{50} value of $6.45 \pm 0.90 \mu\text{M}$. Further investigations showed that both aristolochic acid I and aristolochic acid D could trigger the elevated intracellular ROS levels and induce mitochondrial dysfunction and in HK-2 cells, but aristolochic acid D *O*-glucuronide was hardly to trigger ROS accumulation and mitochondrial dysfunction. **Conclusion:** Collectively, aristolochic acid D could be rapidly metabolized in human hepatic and intestinal microsomes to form a mono-glucuronide, which is fully characterized as aristolochic acid D-6-*O*- β -D-glucuronide. Reaction phenotyping assays, chemical inhibition assays, and kinetics analyses suggest that UGT1A1 is the predominate contributing enzyme for aristolochic acid D-6-*O*-glucuronidation in HLMs, while UGT1A9 contributes to a lesser extent. Further investigations showed that both AAI and high-dose aristolochic acid D could impair mitochondrial function, but aristolochic acid D *O*-glucuronide could not trigger significant changes in mitochondrial function even at high-dose. Collectively, our findings demonstrate that aristolochic acid D can be rapidly converted by UGT1As to a non-nephrotoxic glucuronide and then eliminated in the human body, suggesting that aristolochic acid D has an important detoxification pathway in mammals. These findings also suggest that aristolochic acid D is hard to trigger severe nephrotoxicity, which is much different from the metabolic pathways of the previously reported known nephrotoxin AAI.

[Key words] Aristolochic acid D (AAD); *O*-glucuronidation; UGT1A1; AAD 6-*O*-glucuronide.

Characterization of alkaloids and metabolites in rat plasma and tissues after oral administration of Zuojin Pill using UHPLC-Q-TOF-MS

Ze-dong Xiang, Chang-hong Wang*

(Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, The MOE Laboratory of Standardization of Chinese Medicines, Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, 1200 Cailun Road, 201203, China)

[Abstract] **Purpose:** Zuojin Pill (ZJP), a well-known herbal prescription for the treatment of gastric disorders, consists of Rhizoma Coptidis (RC) and Euodiae Fructus (EF) in the ratio of 6:1 (w/w). ZJP has been officially listed in the Chinese Pharmacopoeia to treat liver fire invading stomach syndrome. The chemically active substances in ZJP are comprised mainly of alkaloids, specifically protoberberine alkaloids (PBAs) derived from RC, such as berberine (BBR), epiberberine (EPI), coptisine (COP), and palmatine (PAL), and indole alkaloids (IDAs) derived from EF, such as dehydroevodiamine (DEH), evodiamine (EVO), and rutaecarpine (RUT). Modern pharmacological studies and clinical practice have identified ZJP as an effective agent against gastric disorders by antibacterial, anti-inflammatory, and regulation of gastrointestinal dysfunction effects, making it in high demand. However, an in-depth understanding of *in vivo* metabolism and distribution profiles of protoberberine alkaloids (PBAs) and indole alkaloids (IDAs) in ZJP is lacking. The aim of this study was to reveal the distribution profile of the major alkaloidal components and their metabolites in ZJP *in vivo* to avoid potential organ toxicity due to accumulation after massive intake. **Method:** In this study, a method using ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadruple time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS) was developed to systematically screen the alkaloids and their metabolites in rat plasma and various tissues, including the heart, liver, spleen, kidney, lung, brain, stomach, large intestine, and small intestine, after

[通讯作者] Chang-hong Wang, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. Tel: 86-21-51322511, Fax: 86-21-51322519. E-mail address: wchcxm@shutcm.edu.cn

oral administration of ZJP. For animal experiment, after one week of acclimatization, the rats were randomly divided into seven groups ($n = 3$), including one blank group and six ZJP-treated groups. The ZJP was suspended by normal saline and then given to rats at a dose of 2.7 g/kg (equivalent to 30 g of crude drug/day for a 70 kg human body weight) via oral gavage, and the rats of the blank group received an equal volume of normal saline. The rats were anesthetized with 3% isoflurane, and about 3 mL of blood was collected via aortaventralis into vacuum blood collection tubes with heparin sodium at 0.167, 0.5, 1, 2, 4, and 8 h after administration. The plasma was obtained by centrifugation at 4000 rpm for 15 min at 4 °C, then stored at -80 °C until analysis. The various tissue samples, including the heart, liver, spleen, kidney, lung, brain, stomach, large intestine, and small intestine, were dissected and then rinsed with normal saline. All the tissue samples were blotted dry with filter paper and then stored at -80 °C until analysis. The blank plasma and tissue samples were collected using the same method from the rats in the blank group. Firstly, rat plasma and tissue samples were pretreated by methanol precipitation. Secondly, data acquisition was performed by UHPLC-Q-TOF-MS. Then, the Analyst workstation (AB Sciex, CA, USA) was used for the data acquiring and processing. A compound information database was constructed by Peakview software and the molecular formulas of the compounds corresponding to the quasi-molecular ions were fitted to identify the alkaloids in ZJP and their distribution *in vivo* by comparing their retention times, precursor ions, and fragment patterns with reference standards and previous literature. **Results:** A total of 33 compounds, including 7 prototype alkaloids and 26 metabolites, were chemically defined or tentatively identified in this work. The metabolic pathways of PBAs (hydroxylation, oxidation, reduction, demethylation, demethylenation, glucuronide conjugation, sulfate conjugation) and IDAs (hydroxylation, glucuronide conjugation) were revealed. 6 prototype alkaloids, BBR, EPI, COP, PAL, DEH, and RUT, were detected in plasma and nine tissues. Due to rapid metabolism, EVO was detected only in the heart, liver, kidneys, stomach, small intestine, and large intestine. Only 7 compounds were found in the brain due to the limited permeability of the blood-brain barrier. Abundant amounts of alkaloids and

metabolites were found in the stomach, small intestine, liver, plasma, and large intestine with numbers of 25, 25, 23, 21, and 21, respectively. The digestive tract, including the stomach, small intestine, and large intestine, direct contact with the drug after oral administration, and the compounds can penetrate the barriers and accumulate in tissues. The liver, with abundant blood flow, was the primary tissue for drug metabolism, which provides natural conditions for drug accumulation in the tissues.

16 metabolites, including 5-hydroxy-coptisine, 10-hydroxy-dehydroevodiamine-glucuronide, demethyleneberberine-2-O-glucuronide, columbamine-2-O-glucuronide or jatrorrhizine-3-O-glucuronide, thalifendine-10-O-glucuronide or berberrubine-9-O-glucuronide, 10-hydroxy-dehydroevodiamine, demethyleneberberine, thalifendine, columbamine-2-O-sulfite or jatrorrhizine-3-O-sulfite, demethyleneberberine-2-O-sulfite, columbamine or jatrorrhizine, 10-hydroxy-evodiamine-glucuronide, berberrubine, 10-hydroxy-evodiamine, 8-oxypalmatine, 8-oxyberberine or 8-oxyepiberberine, were found in the liver, indicating a propensity for their hepatic distribution. Their liver toxicity should receive further attention to avoid potential side effects. **Conclusion:** The present study clarified the tendency of hepatic distribution of PBAs and IDAs and their metabolites in ZJP, providing important data to further ensure the safe use of ZJP.

Cigarette smoke up-regulates thromboxane A₂ receptor in rat mesenteric artery via AMPK/SIRT1 and MAPK/NF- κ B pathways

Qian Li, Yumeng Chen, Xuyan Wang, Xinya Xu Jiping Liu, Bin Wang, Chuan Wang*

(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China.)

[Abstract] As is commonly known, smoking cigarettes increases the risk of cardiovascular disorders. It is unclear how cigarette smoke causes cardiovascular illnesses and the underlying biological pathways. The present study attempted to answer this question by rat mesenteric organ culture artery segments with DMSO-soluble smoking particles (DSP) *in vitro* and exposure of whole rats to cigarette smoke *in vivo*. We hypothesized that cigarette smoke upregulates thromboxane A₂ receptors, which are involved in the pathogenesis of vasospasm, via the AMPK-SIRT1 and MAPK/NF- κ B. The *in vitro* results showed that DSP increased the protein expression of thromboxane A₂ receptors, and DSP also dose- and time-dependently enhanced thromboxane A₂ receptor-mediated vasoconstriction. Furthermore, DSP-induced increased production of the protein and vasoconstriction of thromboxane A₂ (TP) receptor were markedly attenuated by the activation of AMPK-SIRT1 or the inhibition of MAPKs/NF- κ B. The results showed that cigarette smoke exposure (CSE) for eight weeks increased both blood pressure and TP receptor agonist-mediated vasoconstriction. CSE also enhanced the expression levels of TP receptor, p-ERK1/2, p-JNK, and p-P65 proteins, but decreased p-AMPK α and SIRT1 protein expression. The SIRT1 activator resveratrol could reverse the cigarette smoke exposure's effects on blood pressure and vasoconstrictions *in vivo*. The study concludes that cigarette smoke up-regulates TP receptor via AMPK/SIRT1 and MAPK/NF- κ B pathways, It could lead to vasospasm and the emergence of cardiovascular illnesses linked to cigarette smoke.

[Key words] Cigarette smoke, Vasoconstriction, Thromboxane A₂ receptor, AMPK/SIRT1, MAPK/NF- κ B

[基金项目] The National Natural Science Foundation of China (82374077)

[通讯作者] Chuan Wang, Department of Pharmacology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, 712046, China. E-mail: wangchuan@sntcm.edu.cn

Hepatocyte oncosis induced by Sophoraflavanone G through calcium overload and its preventive strategies

Jing Liu, Congwei Wang, Yuruo Gong, Han Li, Mingzhong Jiang, Xinzhou Yang,

Xiaojun Li*

(School of Pharmacy, South-Central Minzu University, Wuhan, Hubei Province, 430074)

[Abstract] **Aims:** Prenylated flavonoids are common constituents of traditional Chinese medicines in the *Leguminosae* and *Moraceae* families, such as *Sophora flavescens* and *Artocarpus heterophyllus* Lam. These compounds have been associated with liver injury. However, the underlying mechanism of this hepatotoxicity remains elusive. This study aims to investigate the mechanism of liver injury and to identify the corresponding therapeutic strategies. **Methods:** The effects of *Sophora flavescens* extracts, and monomer compounds on the viability of HepG2 cells were determined by the CCK-8 method. The morphological changes of HepG2 cells were observed by optical microscopy and transmission electron microscopy (TEM). The impact of Sophoraflavanone G (SFG, a prenylated flavonoid) on the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells was assessed through JC-1 flow cytometry. Porimin expression was determined via Western blot analysis. The oncosis inhibitors were used to determine how SFG leads to the death of HepG2 cells. Due to the high content of prenylated flavonoids in *Sophora flavescens* extracts, liver injury was induced by it in BALB/c mice. The mice were treated with the CYP2E1 inhibitor 4-MP and the membrane protector PEG3350 individually and in combination. The treatment effect was judged according to the survival status, survival rate, serum indexes (ALT, AST, TG), and liver HE staining sections of mice. **Results:** Prenylated flavonoids, represented by SFG, mainly cause HepG2 cell oncosis characterized by the volume of cells increased, intracellular vacuole formed, plasma membrane bubbling and loss of cell viability. TEM results showed that the HepG2 cell membrane ruptured and the endoplasmic reticulum vesiculated after SFG administration. It was found that after the administration of SFG, the release of lactate

dehydrogenase increased, calcium levels and the mitochondrial membrane potential decreased, which was consistent with the related indexes of oncosis. The Ca^{2+} chelator, 4-MP, as well as 4-PBA and PEG3350, inhibited the cellular morphological changes and increased cell survival. An administration of 100 mg/kg of *Sophora flavescens* extracts resulted in hepatic injury in mice. The survival rate was 11.1%. Serum ALT and AST increased significantly. HE staining of liver sections showed that there were interconnected bridging necrosis bands formed between the portal areas and a disordered arrangement of hepatic cell cords. After treatment with 4-MP or PEG3350, the condition of the mice was improved to varying degrees. 4-MP and PEG3350 increased the survival rate to 87.5 % and 50 %, respectively, and the combination treatment increased the survival rate to 75 %. The levels of xzyang@mail.scuec.edu.cn serum ALT and AST showed a decreasing trend. The liver morphology was restored to normal. **Conclusions:** The mode of hepatocyte death induced by prenylated flavonoids represented by SFG is oncosis. The metabolism of these compounds by CYP2E1 induces endoplasmic reticulum stress and calcium overload, which further leads to cell death. Importantly, 4-MP and PEG3350 have shown promising therapeutic effects, indicating their potential for clinical application.

Resveratrol restores palmitic acid induced lipid accumulation in HepG2 by acetylation-mediated lipophagy

Kaihong Zhao^{1, #}, Bai Xue^{2, #, *}, Qiuyue Liao¹, Haiyang Zhao¹, Liangwei Li¹,

Xinrui He¹, Xiaojun Li^{1, *}

(¹School of Pharmaceutical Sciences, South-Central MinZu University, Wuhan, Hubei Province, 430074; ²School of Nursing, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province, 430030)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study is to explore the mechanism of acetylation-mediated lipophagy on the clearance of lipid droplets in hepatocytes after resveratrol treatment. **Methods:** Palmitic acid (PA) was used to induce lipid droplets in HepG2 cells to simulate non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) caused by a high-energy diet. The deacetylase agonist resveratrol (RSE) was administered. Deacetylase inhibitor (EX-527) was used to antagonize the effect of RES. Oil red O staining was used to evaluate the effect of RES on lipid droplets in the cell fatty liver model. Adenovirus expressing mCherry-GFP-LC3B fusion protein and 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene ((DPH) were utilized respectively to label the autophagosome membrane protein LC3B and lipid droplets, with the aim of evaluating the effect of RES on autophagy and lipophagy. Western Blot (WB) and Immunoprecipitation (IP) were used to explore the mechanism of the protective effect of RES on high-energy diet-induced fatty liver. **Results:** Lipid droplets accumulated in cells induced by PA for 8 hours. Notably, the number of lipid droplets in RES-treated cells was significantly reduced. Fluorescent protein labeling results demonstrated that after 24 hours of RSE treatment, the number of autophagosomes in cells increased, and the co-localization of lipid droplets and autophagolysosomes was markedly enhanced, thereby strengthening the lipophagy effect of cells. However, under the impact of chloroquine (CQ) and 3-methyladenine (3-MA), this potent effect of resveratrol in diminishing lipid droplets disappears. The autophagy-promoting and lipophagy-inducing effects of resveratrol were both suppressed, following the

administration of EX-527. Subsequent investigations demonstrated that, RSE conspicuously enhanced the expression of autophagosome membrane protein LC3-II, and the degree of acetylation of autophagy-related proteins ATG7 and LC3B was notably decreased. **Conclusion:** RES can significantly reduce the content of lipid droplets in hepatocytes and improve fatty liver caused by high-energy diet. The lipid-lowering effect of RES is achieved by promoting lipophagy through the autophagy pathway. Acetylation is an important factor affecting hepatocyte lipophagy and improving fatty liver.

基于双疾病联合生信分析的黄独素 B 毒效双重作用及机制研究

赵金全, 李会军*

(中国药科大学多靶标天然药物全国重点实验室, 江苏南京 210009)

[摘要] **目的:** 中药不良反应事件偶有发生, 国际上对中药安全性和有效性一直质疑不断, 亟需科学认识中药毒效作用内涵, 阐释毒效关联分子机制。黄药子临床上常用于治疗肺癌, 但肝损伤案例屡见报道。黄独素 B(DIOB)是黄药子中的主要毒性和药效成分, 但毒效作用靶点和机制尚不明确。本研究基于双疾病生信分析筛选 DIOB 毒效作用共同靶点, 揭示 DIOB 毒效作用机制, 为黄药子的临床安全应用提供依据。**方法:** 首先, 在 ICR 小鼠以及 HepG2、HL-7702 细胞水平通过组织学检查、生化检测、细胞毒检测评价 DIOB 肝毒性, 建立体内外“量-时-毒”关系, 确定体内外安全剂量, 同时在肺癌裸鼠移植瘤模型和 A549、PC-9 细胞上, 通过监测皮下瘤生长、细胞周期检测、细胞凋亡检测等方法评价安全剂量的 DIOB 的抗非小细胞肺癌 (NSCLC) 作用。其次, 对 DIOB 诱导的肝损伤小鼠进行肝脏转录组测序, 从 GEO 数据库获取 NSCLC 临床数据集, 并参考比较毒理学数据库和 GeneCards 中 NSCLC 及药物性肝损伤的相关基因, 通过双疾病联合生信分析筛选 NSCLC 和 DIOB 诱导肝损伤的共有关键基因 Yin Yang1 (YY1)。然后, 通过 KEGG 分析探索 DIOB 诱导肝损伤和抗 NSCLC 的机制, 使用 RT-qPCR、Western Blotting、免疫组化、免疫荧光等方法考察体内外 YY1 调控的相关基因表达变化, 并在体外构建敲低和过表达体系验证 DIOB 毒效作用机制。接着, 构建原位肺癌小鼠模型, 在同一机体上评价 DIOB 肝毒性和抗 NSCLC 活性, 构建“量-毒-效”关系, 并表征 YY1 介导的 DIOB 毒效双重作用机制。最后, 在正常小鼠上, 给予毒效剂量的 DIOB, 检测 48 小时内的不同时间点 DIOB 在各组织中的浓度, 从药物分布的角度解释 DIOB 毒效作用特点。**结果:** DIOB 具有肝脏和肺脏靶向性, 长时间口服 DIOB 可造成肝脏和肺损伤, 肝损伤较肺损伤易发, 原因可能归咎于肝脏极其迅速的代谢速率。YY1 是介导 DIOB 诱导胆汁淤积性肝损伤和抗 NSCLC 毒效双重作用的共同靶点。高剂量 DIOB 靶向上调肝脏 YY1 表达, 抑制胆汁酸分泌诱导肝脏胆汁淤积, 从肝损伤早期开始并持续驱动肝损伤

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174070)

[通讯作者] 李会军, Email: cpuli@163.com, Tel: 025-83271382

进展。安全剂量的DIOB抑制NSCLC中上调的YY1,在体内外可通过诱导NSCLC细胞周期阻滞和凋亡发挥抗NSCLC作用。**结论:** 该研究科学阐释了DIOB的毒效作用共同靶点和关联机制,为黄药子的临床合理应用提供依据。

Study on the dual effects and mechanisms of toxicity and efficacy of Diosbulbin B based on combined bioinformatics analysis of double diseases

Zhao Jin-Quan, Li Hui-Jun*

(State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

[Abstract] Objective: Adverse events from traditional Chinese medicine (TCM) sometimes happen, raising ongoing concerns about the safety and efficacy of TCM in the global arena. It is crucial to comprehensively grasp the implications of TCM toxicity and efficacy from a scientific perspective, and elucidate the molecular mechanisms underpinning the relationship between toxicity and efficacy. The tuber of *Dioscorea bulbifera* (DBT) is commonly utilized in managing lung cancer, with recurring instances of liver damage reported. Diosbulbin B (DIOB) serves as the primary hepatotoxic and anti-tumor element of DBT, with unclear targets and mechanism of toxicity and efficacy. Based on combined bioinformatics analysis of double diseases, this study identified the shared targets of DIOB toxicity and efficacy, elucidated the mechanisms behind DIOB toxicity and efficacy, and offered valuable insights for the safe clinical use of DBT. **Method:** First, the hepatotoxic effect of DIOB were evaluated in ICR mice *in vivo* and HepG2 HL-7702 cells *in vitro* through histological examination, biochemical assessments, and cytotoxicity experiments, establishing a 'dose-time-toxicity' relationship both *in vivo* and *in vitro*. After assessing the safe dosage both *in vivo* and *in vitro*, the effectiveness of DIOB against non-small cell lung cancer (NSCLC) at the established safe dosage was investigated through observation of subcutaneous tumor progression, cell cycle analysis, and apoptosis assessment using a xenograft tumor model in nude mice as well as A549

and PC-9 cell lines. Secondly, mice with DIOB-induced liver injury underwent liver transcriptome sequencing, NSCLC clinical data was acquired from the GEO database, and genes associated with NSCLC and drug-induced liver injury were cross-referenced with the Comparative Toxicology Database and GeneCards. And Yin Yang1 (YY1), identified as a common key gene in liver injury induced by DIOB and NSCLC, was selected through integrated bioinformatic analysis. Then, KEGG analysis was employed to scrutinize the pathway of hepatotoxicity and anti-NSCLC of DIOB, whereas RT-qPCR, Western Blotting, immunohistochemistry, immunofluorescence, and other techniques were utilized to explore the alterations in expression of pertinent genes modulated by YY1 both in *vitro* and in *vivo*. Furthermore, knockdown and overexpression systems were established in *vitro* to validate the toxicity and efficacy mechanism of DIOB. Subsequently, mice model of in situ lung cancer was created to evaluate the hepatotoxicity and anti-NSCLC effectiveness of DIOB in the same organism, the 'dose-toxicity-efficacy' relationship was identified, outlining the mechanism of toxicity and effectiveness of DIOB mediated by YY1. Finally, in normal mice, both toxic and therapeutic doses of DIOB were given to track the levels of DIOB in different tissues at various time intervals over a 48 h, elucidating the toxic and effective properties of DIOB through the lens of drug distribution. **Results:** DIOB had specificity for the liver and lungs, prolonged oral administration could lead to hepatotoxicity and pulmonary toxicity and hepatotoxicity occurred more frequently than pulmonary toxicity, possibly due to the liver's exceptionally rapid metabolic rate. YY1 is a shared target of DIOB-triggered cholestatic liver damage and DIOB anti-NSCLC. High-dose DIOB targeted to increase YY1 expression in the liver, suppressed bile acid secretion, and promoted liver cholestasis, initiating in the early phases of liver damage and perpetuating the advancement of liver injury. A safe dose of DIOB that inhibited the upregulation of YY1 in NSCLC could exert an anti-NSCLC effect by triggering cell cycle arrest and apoptosis in NSCLC both in *vivo* and in *vitro*. **Conclusion:** This study scientifically elucidates the common target and correlation mechanism of the toxicity and effect of DIOB, and provides the exact basis for the clinical rational application of DBT.

基于分子自组装理论探讨中药药效及毒性物质基础的研究进展

郑宝鑫, 梁爱华 *

(中国中医科学院 中药研究所 中药鉴定与安全性检测评估北京市重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 纳米技术在中药领域的研究和应用兴起, 促进了中药药效或毒性物质基础的阐释。分子自组装是一种分子间通过非共价键力相互作用自发排列形成的规律而复杂的有序结构体系的过程。中药无论单方或复方形式的应用都面临成分复杂, 机制不清的问题。自组装可以发生在中药成分之间或中药成分与体内成分之间, 从而引起药效或毒性成分结构和含量的变化, 充分研究和利用中药成分自组装行为不仅可以对中药成分实现增效减毒, 也进一步完善对中药药效或毒性物质基础的深入理解。本文主要综述目前已报道的中药分子发生自组装行为的研究现状包括自组装前体物质类型, 形成的自组装结构类型和相关疾病治疗应用情况。其次, 探讨了自组装成分的筛选、设计策略和应用, 以及对自组装与其它技术联合应用的展望。最后, 我们分析了中药纳米自组装药物用于治疗疾病的挑战和未来方向, 为中药现代化研究和应用提供了参考。

[关键词] 自组装; 中药; 设计策略; 增效减毒; 物质基础

Advances in exploring the material basis of the efficacy and toxicity of traditional Chinese medicine based on molecular self-assembly theory

Baoxin Zheng, Aihua Liang *

(Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82192913, 82174073); 中国中医科学院科技创新工程基金项目 (CI2021B016, CI2021A04801); 岐黄学者计划支持项目; 中国中医科学院基金项目 (ZZ13-035-10); 中国博士后科学基金项目 (2023M733913)

[第一作者] 郑宝鑫, 男, 在读博士, 主要从事中药药理、毒理学研究及药物递送系统开发。

E-mail: zbx19970323@163.com

[通讯作者] 梁爱华, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药理学与毒理学研究。Email: ahliang@icmm.ac.cn

[Abstract] The rise of nanotechnology research and application in the field of traditional Chinese medicine(TCM) has facilitated the elucidation of the material basis of the efficacy or toxicity of TCM. Molecular self-assembly is a process in which regular and complex ordered structural systems are formed by spontaneous arrangement of molecules through non-covalent bonding force interactions. The application of Chinese medicines, whether in single or compound form, faces the problem of complex composition and unclear mechanism. Self-assembly can occur between TCM components or between TCM components and in vivo components, thus causing changes in the structure and content of pharmacodynamic or toxic components. Comprehensive investigating and utilizing the self-assembly behavior of TCM components can not only enhance the efficacy and reduce the toxicity of TCM components, but also further improve the in-depth understanding of the material basis of the efficacy or toxicity of TCMs. In this review, we conclude the current status of self-assembling behavior of TCM molecules, including the types of self-assembled precursors, the types of self-assembled structures formed and the therapeutic applications in related diseases. Secondly, we discuss the screening, design strategy and application of self-assembled components, as well as the outlook on the joint application of self-assembly with other technologies. Finally, we analyze the challenges and future directions of nano-self-assembled drugs of traditional Chinese medicine for the treatment of diseases, which provides a reference for the modernization research and application of traditional Chinese medicine.

[Key words] Self-assembly; Traditional Chinese medicine; Design strategy; Potentiation and toxicity reduction; Material basis

分子印迹聚合物在中药减毒/安全性方面的研究进展

郑宝鑫, 梁爱华*

(中国中医科学院 中药研究所 中药鉴定与安全性检测评估北京市重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 在中医药理论指导下, 传统的中药减毒措施主要是通过对药材种植, 炮制工艺, 煎煮方式和配伍用量等环节把控, 而中药毒性成分往往存在低含量、隐匿性、富集分离困难等特点。随着近些年中药相关的交叉科学技术的发展, 中药毒性相关物质的富集分离新技术将可能进一步推动中药安全性研究。分子印迹聚合物凭借对小分子的特异性识别和可调性结合的能力, 因而在中药微量或痕量物质分析及毒性成分分离方面具有明确优势和广阔的应用前景。分子印迹聚合物是在引发剂的作用下, 模板分子通过与中药单体之间进行自组装, 洗掉单体分子后, 再经过共聚合过程形成具有特殊结合位点的聚合物, 可引入不同种类的响应性基团使其功能化从而满足不同研究或应用需求。本文主要介绍了分子印迹聚合物的制备原理和方法, 总结了近五年中药毒性物质研究相关的功能化分子印迹聚合物分类及应用模式, 并对分子印迹聚合物在中药减毒方面的研究难点提出展望, 以期为促进中药毒性物质基础解析和开发减毒措施的应用研究提供参考。

[关键词] 分子印迹聚合物; 中药; 毒性物质; 富集分离; 减毒措施

Advances in molecularly imprinted polymers for toxicity reduction/safety of traditional Chinese medicine

Baoxin Zheng, Aihua Liang*

(Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82192913, 82174073); 中国中医科学院科技创新工程基金项目 (CI2021B016, CI2021A04801); 岐黄学者计划支持项目; 中国中医科学院基金项目 (ZZ13-035-10); 中国博士后科学基金项目 (2023M733913)

[第一作者] 郑宝鑫, 男, 在读博士, 主要从事中药药理、毒理学研究及药物递送系统开发。

E-mail: zbx19970323@163.com

[通讯作者] 梁爱华, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药理学与毒理学研究。Email: ahliang@icmm.ac.cn

[Abstract] Under the guidance of Chinese medicine theory, the traditional measures to reduce the toxicity of traditional Chinese medicines (TCM) are mainly controlled by the cultivation of medicinal herbs, concoctions, decoctions and dosage, etc., while the toxic components of TCM are often characterized by their low content, invisibility, and difficulties in enrichment and isolation. With the development of cross-cutting science and technology related to traditional Chinese medicine in recent years, new techniques for the enrichment and separation of toxicity-related substances in traditional Chinese medicine may further promote the safety research of traditional Chinese medicine. Molecularly imprinted polymers have clear advantages and broad application prospects in the analysis of trace or micro-volume substances and the separation of toxic components in traditional Chinese medicines due to their specific recognition of small molecules and tunable binding ability. Molecularly imprinted polymers are formed by self-assembly of template molecules with monomers of traditional Chinese medicines under the action of an initiator, washing out the monomer molecules, and then forming polymers with special binding sites through a co-polymerization process, which can be functionalized by introducing different kinds of responsive groups. This paper mainly introduces the preparation principles and methods of molecularly imprinted polymers, summarizes the classification and application modes of functionalized molecularly imprinted polymers related to the study of toxic substances in traditional Chinese medicine in the past five years, and provides an outlook on the research difficulties of molecularly imprinted polymers in the reduction of toxicity in traditional Chinese medicine with a view to providing a reference to facilitate the fundamental analysis of the toxic substances in traditional Chinese medicine and the development of applied research on toxicity reduction measures.

[Key words] Molecularly imprinted polymers; Traditional Chinese medicine; Toxic substances; Enrichment and separation; Toxicity reduction measures

补肾活血颗粒对帕金森病小胶质细胞免疫调节的作用机制研究

王鹏^{1,2}, 耿小涵^{1,2}, 陈琦¹, 李绍旦¹, 杨明会¹

(1.中国人民解放军总医院中医医学部, 北京 100048;

2.解放军总医院研究生院, 北京 100853)

[摘要] **目的:** 探讨补肾活血颗粒(BSHXG)对帕金森病小胶质细胞免疫调节的可能作用机制。**方法:** 建立 MPP⁺诱导的 PC12 细胞模型, 采用 CCK8 法探讨 BSHXG 含药血清对炎症因子表达的影响, 以及 α -syn、CDK5 和 MMP9 蛋白表达。建立 MPTP 诱导的亚急性 PD 小鼠模型, 随机分为空白组、MPTP 组、Madopar 组和 BSHXG 低、中、高剂量组。连续灌胃给药 14 天, 取出小鼠大脑黑质, 免疫荧光法定位检测 α -syn、TH、Iba1 荧光强度, 蛋白印迹法检测 CD147、MMP9、CDK5 和 GFAP 蛋白表达。**结果:** 细胞实验结果表明, 1.0mM 浓度 MPP⁺细胞活力在 50%左右, 提示其为最佳造模浓度。与 MPP⁺造模组比较, 20%浓度 BSHX 含药血清细胞活力最强($P<0.05$); 与 MPP⁺造模组比较, 30%浓度 BSHX 含药血清细胞活力降低($P>0.05$), 因此将 20%BSHX 含药血清作为高浓度组, 5%含药血清为低浓度组, 10%含药血清为中浓度组。与 MPP⁺造模组比较, 30%浓度的美多芭含药血清细胞活力显著升高($P<0.05$), 将该浓度作为美多芭阳性药物组浓度。与 Control 组比较, MPP⁺组 IL-10 和 TNF- α 表达水平均升高($P<0.01$); 与 MPP⁺组比较, BSHX-L 浓度含药血清 IL-10 表达水平升高、TNF- α 表达水平降低($P<0.01$); 与 BSHX-L 组比较, BSHX-H 组 IL-10 表达水平升高、TNF- α 表达水平降低($P<0.01$)。与 Control 组比较, MPP⁺组 α -syn、CDK5、MMP9 蛋白表达均升高($P<0.01$); 与 MPP⁺组比较, BSHX-L 浓度含药血清 α -syn、CDK5、MMP9 蛋白表达均降低($P<0.01$); 与 BSHX-L 组比较, BSHX-H 组 α -syn、CDK5、MMP9 蛋白表达均降低($P<0.05$)。动物实验免疫荧光结果表明, 与 Control 组比较, MPTP 组 α -syn、Iba1 表达含量增加、TH 表达含量降低($P<0.01$); 与 MPTP 组比较, BSHXG 低剂量组 α -syn、Iba1 表达含量降低、TH 表达含量升高($P<0.01$); 与

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(No:82130117); 中组部“万人计划”科技创新领军人才基金(No: 组厅字[2014]12 号); 中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)——国家中医药领军人才支持计划((2018)12)

[第一作者] 王鹏, 男, 博士研究生, E-mail: wp_2021@163.com

[通讯作者] 杨明会, E-mail: ymh9651@sina.com; 陈琦, E-mail: jackyqi788@163.com

BSHXG 低剂量组比较, BSHXG 高剂量组 α -syn、Iba1 表达含量降低、TH 表达含量升高($P<0.01$)。蛋白印迹法结果表明, 与 Control 组比较, MPTP 组炎症相关蛋白 CD147、MMP9、CDK5 和 GFAP 表达均升高($P<0.01$); 与 MPTP 组比较, BSHXG 低、中、高剂量组 CD147、MMP9、CDK5 和 GFAP 表达均降低($P<0.05$)。

结论: 补肾活血颗粒能够靶向小胶质细胞免疫调节, 降低炎症因子和炎症相关蛋白表达, 加快 α -syn PD 病理产物清除, 从而发挥 DA 能神经元保护作用。

[关键词] 帕金森病; 补肾活血颗粒; 小胶质细胞; 免疫调节

Study on the mechanism of Bushen Huoxue Granules on immune regulation of microglia in Parkinson's disease

[Abstract] **Objective:** To explore possible mechanism of Bushen Huoxue Granules (BSHXG) on the immune regulation of microglia in Parkinson's disease. **Methods:** An MPP⁺- induced PC12 cell model was established, and the CCK8 method was used to investigate the effect of BSHXG containing serum on the expression of inflammatory factors, as well as the expression of α -syn, CDK5, and MMP9 proteins. Establish PD mouse model induced by MPTP and randomly divide it into control group, MPTP group, Madopar group, and BSHXG low, medium, and high dose groups. After continuous gavage for 14 days, the substantia nigra of the mouse brain was removed, and the fluorescence intensity of α -syn, TH, and Iba1 was detected by immunofluorescence. The protein expression of CD147, MMP9, CDK5, and GFAP was detected by Western blotting. **Results:** The results of the cell experiment showed that the MPP⁺ cell viability at a concentration of 1.0mM was around 50%, indicating that it was the optimal modeling concentration. Compared with the MPP⁺ module, the serum containing 20% BSHX showed the strongest cell viability($P<0.05$); Compared with the MPP⁺ module, the cell viability of BSHX containing serum at 30% concentration decreased($P>0.05$). Therefore, 20% BSHX containing serum was used as the high concentration group, 5% containing serum as the low concentration group, and 10% containing serum as medium. Compared with

the MPP+ group, cell viability significantly increased($P<0.05$) at a concentration of 30% Medopa, which was used as the concentration for the Medopa positive drug group. Compared with the Control group, the MPP+ group showed increased expression levels of IL-10 and TNF- α ($P<0.01$). Compared with the MPP+ group, BSHX-L group showed an increase in IL-10 expression level and a decrease in TNF- α expression level($P<0.01$). Compared with the BSHX-L group, the expression level of IL-10 increased and the expression level of TNF- α decreased in the BSHX-H group($P<0.01$). Compared with the Control group, the MPP+ group showed increased expression of α -syn, CDK5, and MMP9 proteins($P<0.01$). Compared with the MPP+ group, the protein expression of α -syn, CDK5, and MMP9 in BSHX-L was significantly reduced($P<0.01$). Compared with the BSHX-L group, the expression of α -syn, CDK5, and MMP9 proteins in BSHX-H group was reduced($P<0.05$). The immunofluorescence results of animal experiments showed that compared with the Control group, the MPTP group showed an increase in the expression levels of α -syn and Iba1, and a decrease in the expression level of TH($P<0.01$). Compared with the MPTP group, the low-dose BSHXG group showed a decrease in the expression levels of α -syn and Iba1, and an increase in the expression level of TH($P<0.01$). Compared with the low-dose BSHXG group, the high-dose BSHXG group showed a decrease in α -syn and Iba1 expression levels and an increase in TH expression levels($P<0.01$). The results of Western blot showed that compared with the Control group, the expression of inflammation related proteins CD147, MMP9, CDK5, and GFAP was increased in the MPTP group($P<0.01$); Compared with the MPTP group, the expression of CD147, MMP9, CDK5, and GFAP was reduced in the low, medium, and high dose groups of BSHXG($P<0.05$). **Conclusion:** Bushen Huoxue Granules can target the immune regulation of microglia, reduce the expression of inflammatory factors and inflammation related proteins, accelerate the clearance of PD pathological products α -syn, and thus exert a protective effect on DA neurons.

[Key words] Parkinson's disease; Bushen Huoxue Granules; Microglia; Immune regulation

喜炎平注射液安全性实验研究

易艳, 李春英, 张宇实, 赵雍, 王连媚, 潘辰, 田婧卓, 韩佳寅, 刘素彦,

梁爱华*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 确定喜炎平注射液(Xiyanping Injection, XYPI)是否可诱发啮齿类动物急性毒性、体内溶血、血管刺激及类过敏等不良反应。**方法:** 给小鼠一次性静脉注射 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XYPI, 密切观察 14 天, 确定 XYPI 是否有诱发小鼠急性毒性的风险。此外, 将 1/2 原液和 1 倍原液的 XYPI 静脉注射入 Wistar 大鼠体内, 1h 和 5h 后分别取血, 测量血液中的红细胞计数和血红蛋白, 另外分离血清, 测定血清中的微量游离血红蛋白含量。另外, 将 1/4 原液、1/2 原液和原液 XYPI 通过一侧耳缘静脉注射入大耳白兔体内, 另一侧耳缘静脉注射生理盐水作为对照, 每日给药 1 次, 连续给药 3 天后, 检测注射血管及其周围组织病理变化。最后, 运用小鼠类过敏反应模型, 检测临床 3.5 倍和 7 倍剂量的 XYPI 是否诱发小鼠发生类过敏反应, 并检测小鼠体内组胺含量和耳、肺、小肠的病理变化。**结果:** 临床最大剂量 7 倍的 XYPI 不诱发小鼠发生急性毒性反应, 体重和肝肾组织均没有明显异常。不同浓度的 XYPI 也不诱发大鼠体内发生溶血反应和大耳白兔发生血管刺激反应。此外, 不同剂量的 XYPI 不诱发小鼠发生明显耳廓蓝染反应, 体内组胺含量没有明显升高, 耳、肺、肠组织结构正常。**结论:** 随着剂量和浓度地增加, XYPI 在临床前研究中也未诱发明显急性毒性、溶血、血管刺激和类过敏反应等不良反应。

[关键词] 喜炎平注射液; 溶血反应; 血管刺激性; 类过敏反应

Experimental study on the safety of Xiyanping injection

Yan YI, Chunying LI, Yushi ZHANG, Yong ZHAO, Lianmei WANG, Chen PAN,

Jingzhuo TIAN, Jiayin HAN, Suyan LIU, Aihua LIANG*

(Institute of Chinese Materia Medica China Academy of Chinese Medical Science, China, Beijing, 100700)

[第一作者] 易艳, 副研究员, 专业: 中药药理毒理, Email: yyi@icmm.ac.cn

[通讯作者] 梁爱华, 研究员, 专业: 中药药理毒理, Email: ahliang@icmm.ac.cn

[Abstract] **Objective:** To determine whether Xiyanping Injection (XYPI) induces acute toxicity, in vivo haemolysis, vascular irritation and pseudoallergy reactions in rodents animals. **Methods:** Mice were given a single intravenous injection of 500 mg·kg⁻¹ XYPI and closely observed for 14 days to determine whether XYPI had a risk of inducing acute toxicity in mice. In addition, 1/2 stock solution and 1x stock solution of XYPI were injected intravenously into Wistar rats, and blood was collected after 1 and 5 hours to measure the red blood cell count and haemoglobin in the blood, and serum was additionally separated to determine the amount of trace free haemoglobin in the serum. In addition, 1/4 stock solution, 1/2 stock solution and XYPI stock solution were injected into one marginal ear vein on one side and saline into the other marginal ear vein as a control in rabbits, and the drugs were administered once a day for 3 consecutive days to detect pathological changes in the injected blood vessels and their surrounding tissues. Finally, the mouse pseudoallergy reactions model was used to determine whether the clinical 3.5-fold and 7-fold doses of XYPI induced pseudoallergy reactions in mice, and to determine histamine levels and pathological changes in the ears, lungs and small intestine of mice. **Results:** Seven times the maximum clinical dose of XYPI did not induce acute toxicity in mice and there were no significant abnormalities in body weight or liver and kidney tissues. Various concentrations of XYPI did not induce haemolytic reactions in rats or vascular irritation in white rabbits. In addition, different doses of XYPI did not induce a significant auricular blue staining reaction in mice, there was no significant increase in histamine levels in vivo and the structure of ear, lung and intestinal tissues was normal. **Conclusions:** In preclinical studies, increasing doses and concentrations of XYPI did not result in notable acute toxicity, hemolysis, vascular irritation, or pseudoallergy reactions.

[Key words] Xiyanping Injection; Hemolytic reaction; Vascular irritation; Pseudoallergy reaction

综合 Meta 分析、网络药理学和分子对接的百蕊颗粒治疗肺炎

分子机制研究

彭静^{*}，刘林慧，高萍，余学钊，李巧玲

(华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院 武汉市妇幼保健院 药学部，湖北 武汉 430016)

[摘要] **目的：**肺炎多由细菌、病毒或支原体等病原体感染导致肺部发生炎症，其临床表现常见发热、咳嗽、喘息等症状。西医治疗肺炎以控制感染为主，同时针对病情采用祛痰或平喘药物以及物理疗法对症治疗，但是在长期治疗过程中，患者易对抗生素产生耐药性，使得抗生素的疗效不理想。有着“植物抗生素”之称的檀香科百蕊草属植物百蕊草 *Thesium chinense* Turcz. 具有抗炎、抗菌、抗氧化、抑制肿瘤细胞增殖等多种药理作用。百蕊颗粒是由百蕊草经提取制成的制剂，具有较好的清热消炎、止咳化痰的功效，用于急慢性咽喉炎、气管炎、鼻炎、感冒发热、肺炎。最近，周思倩等对百蕊颗粒的入血成分和代谢过程进行了分析，鉴定出 20 种原型成分，包括 6 种生物碱、4 种黄酮、3 种有机酸以及其他化合物，但这些成分的具体作用机制和靶点尚未得到深入探讨。基于此，本研究团队在周思倩等人的研究基础上，综合运用 Meta 分析、网络药理学和分子对接技术，针对百蕊颗粒入血成分与肺炎之间的潜在作用机制进行深入分析。**方法：**通过计算机检索多个数据库，结合手工检索和文献追溯法，收集了关于百蕊颗粒的文献。纳入标准包括随机对照实验，排除了结果不明确或无法获取全文的研究。使用 RevMan 5.3.5 软件进行数据分析，评估了炎症因子的变化。通过 PubChem 和 SwissTargetPrediction 数据库预测了百蕊颗粒入血成分的靶点，结合 STRING 数据库构建蛋白-蛋白相互作用网络，并通过 OmicShare 工具进行 GO 和 KEGG 富集分析。此外，运用 WeMol Cloud 平台进行分子对接评估。**结果：**纳入的 8 项研究共涉及 922 名参与者，结果显示百蕊颗粒联合常规治疗能显著降低血清中的

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(82104300);武汉市卫生健康委中医类科研重点项目(WZ21A07);武汉市卫生健康委中医药科研项目(WZ22Q07)

[第一作者] 彭静(1982-)，女，湖北武汉，副主任药师，硕士，中华中医药学会中药毒理学与安全性研究分会第三届委员会委员，主要从事临床药学和中药药理研究，E-mail: pengjing@zgwhfe.com, Tel: 15387000471

IL-6、IL-1 β 、CRP、TNF- α 和 PCT 水平。通过生物信息学分析，我们鉴定了 283 个百蕊颗粒和肺炎治疗相关的潜在靶点，并构建了成分-靶点网络。GO 和 KEGG 分析揭示了这些靶点在免疫反应、炎症过程、细胞应激反应、细胞死亡和病毒防御等生物过程中的作用。分子对接进一步验证了活性成分与靶点之间的相互作用。**结论：**百蕊颗粒通过调节炎症因子和影响关键生物学过程发挥其抗炎和免疫调节作用，其活性成分与预测靶点的相互作用为临床应用提供了分子层面的证据。本研究为百蕊颗粒在肺炎治疗中的应用提供了科学依据，并为中药的现代化研究和药物开发指明了方向。

[关键词] 百蕊颗粒；肺炎；Meta 分析；网络药理学；抗炎作用；分子对接

中药毒性认知创新与安全精准用药

柏兆方^{1*}, 湛小燕¹, 王伽伯², 肖小河^{1*}

(1.解放军总医院第五医学中心, 北京 100039; 2.首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 中医药是我国医药卫生体系独具特色的重要组成部分, 在中华民族防病治病及繁衍生息中做出了卓越贡献。然而, 近年来中药不良反应/事件频发, 尤其针对新发现“有毒”中药的安全性问题, 往往难以做出科学的回答并制定有效解决方案, 面对国际舆论和社会公众质疑时, 常陷入“被动应对”的窘迫局面。破解中药安全性难题亟需在中药毒性认知及安全风险防控方面实现突破。笔者团队既往在新发现“有毒”中药安全性评价及风险防控方面取得的原创性成果, 提出了中药固有毒性、特异质毒性和间接毒性三种毒性认知模式和理论, 由此开辟了中药特异质毒性和间接毒性研究新领域; 结合免疫、代谢、病证等机体因素对中药毒性影响及传变规律, 创建了病证结合的中药安全性评价模式和方法—病证毒理学, 基于病证毒理学研究揭示了何首乌、补骨脂、淫羊藿等中药致肝损伤的客观性、特异质属性以及成因机制, 提出并证实了中药免疫特异质肝损伤“三因致毒”机制假说; 结合中药毒性现代科学认知提出了基于成分效应靶标互作的中药配伍控毒策略和方法, 创建了中药安全风险“人-药-用”三维防控体系, 为建立科学有效的风险防控对策提供了基础。笔者团队构建的中药毒性认知理论和技术突破, 将为科学评价与精准防控中药安全风险提供理论指导和技术支撑。

[关键词] 中药毒性; 病证毒理学; 毒性相关物质; 配伍减毒; 成分效应靶标互作

[第一作者] 柏兆方, 副研究员, 主要从事中药免疫药理与毒理研究, E-mail: baizf2008@126.com

[通讯作者] 肖小河, 研究员, 主要从事临床中药学与安全用药研究, E-mail: pharmacy302@126.com

整合表观遗传学、蛋白质组学和代谢组学揭示冬凌草甲素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导的生殖毒性

高昕月¹, 林溢凡¹, 张健¹, 陈梦婷¹, 温嘉欣¹, 吴亚娇¹, 吴齐斌², 朱安^{1*}

(1.福建医科大学基础医学院消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福建 福州 350108;

2. 福建省妇幼保健院、福建医科大学妇儿临床医学院, 福建 福州 350001)

[摘要] **目的:** 冬凌草甲素是传统中药冬凌草的主要活性成分, 具有抗炎、抗肿瘤和抗菌作用, 临床用于治疗咽炎、扁桃体炎、支气管炎等。然而, 冬凌草甲素的临床应用受到其生殖毒性的限制, 但其毒效应和毒性机制不明。本研究拟综合采用人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo 细胞、计算毒理学、多组学技术等, 系统揭示冬凌草甲素所致的生殖毒效应及其分子机制。**方法:** (1) 使用 0、12.5、25、37.5 μ M 冬凌草甲素分别处理 HTR-8/SVneo 细胞 24 h 后检测细胞活力和 LDH 释放水平。(2) 0 和 25 μ M 冬凌草甲素处理 HTR-8/SVneo 细胞 24 h 后进行 MeRIP-seq, 筛选差异 m6A 修饰基因及鉴定潜在的 m6A 调控因子, 并通过分子对接和分子动力学模拟冬凌草甲素与 m6A 调控因子的相互作用。(3) 0 和 25 μ M 冬凌草甲素处理 HTR-8/SVneo 细胞 24 h 后进行蛋白质组和代谢组测序, 分别筛选与对照组的差异表达蛋白和代谢物。(4) 通过检测细胞内 ROS 含量和 γ -H2AX 水平评价氧化应激和 DNA 损伤状况, 检测细胞内 Ca^{2+} 含量、线粒体膜电位水平和线粒体通透性转换孔开放程度以评估线粒体功能。(5) RT-qPCR 和 Western Blot 检测 Wnt 信号通路、细胞周期和紧密连接相关基因和蛋白表达水平。**结果:** (1) 冬凌草甲素处理 HTR-8/SVneo 细胞后显著抑制细胞活力, 并增加 LDH 释放水平。(2) MeRIP-seq 筛选出 4039 个差异 m6A 修饰基因, GO 和 KEGG 富集条目包含 Wnt 活化受体活性、Wnt 蛋白结合、紧密连接等, 并鉴定出 FMR1 是 HTR-8/SVneo 细胞中 m6A 甲基化的潜在调控因子。(3) 蛋白质组学和代谢组学分别鉴定出 62 个差异表达蛋白和 476 个差异表达代谢物, 主要涉及 Wnt 信号通路、紧密连接和硫胺素代谢。(4) 冬凌草甲素处理致细胞内 ROS 含量和 γ -H2AX 水平增加, 诱发 Ca^{2+} 超载, 导致线粒体通透性转换孔开放增加, 膜电位下降, 线粒体功能障碍。(5) 冬凌草甲素处理细胞后, 与 Wnt 信号通路、细胞周期和紧密连接相关的 mRNA 和蛋白表达水平发生改变。**结论:** 冬凌草甲素可诱导

[基金项目] 国家自然科学基金 (82104520); 福建省自然科学基金 (2021J05045)

[通讯作者] 朱安, E-mail: zhuan@fjmu.edu.cn

HTR-8/SVneo 细胞的生殖毒效应，毒效应氧化应激、DNA 损伤和线粒体功能障碍。基于多组学方法揭示 Wnt/ β -catenin 信号通路和紧密连接参与冬凌草甲素对 HTR-8/SVneo 细胞的损害。

[关键词] 冬凌草甲素；生殖毒性；Wnt/ β -catenin 信号通路；紧密连接；线粒体功能障碍

五味子甲素调控 PI3K/AKT 信号通路对结直肠癌的治疗作用

刘铭雨, 赵李娜, 李晶, 李子悦, 许晴, 徐志立*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁省大连市 116600)

[摘要] **目的:** 探讨五味子甲素对结直肠癌的治疗作用及可能的机制。**方法:** 将 120 只小鼠随机分为正常组、模型组、五味子甲素高、中、低剂量组与美沙拉嗪组。除正常组外, 其余组均用 1,2-二甲肼 (1,2-dimethylhydrazine, DMH)/葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)联合诱导建立结肠癌小鼠模型。正常组和模型组小鼠分别给予等体积蒸馏水, 高、中、低剂量组分别灌胃给予 160、80、40 mg/kg 的五味子甲素; 美沙拉嗪给予 300 mg/kg, 每日 1 次, 连续给药 10 周。观察并记录小鼠体质量, 疾病活动指数(disease activity index, DA), 玻璃小球排出时间, 粪便含水量, 结肠长度及结肠指数; 采用 HE 染色法观察小鼠结直肠组织病理变化; 免疫组化法检测结肠组织中增殖细胞蛋白 67 (Ki67) 蛋白表达水平。Western blotting 法检测肿瘤蛋白 PI3K 和 AKT 的蛋白表达情况。**结果:** DAI 结果显示, 与正常组相比, 模型组小鼠 DAI 评分升高($P<0.05$); 与模型组相比, 五味子甲素组($P<0.05$)与美沙拉嗪组($P<0.01$)小鼠 DAI 评分降低。玻璃小球排出时间结果显示, 与正常组相比, 模型组的玻璃小球排出时间明显缩短; 与模型组相比, 五味子甲素组与美沙拉嗪组小鼠的排出时间明显延长 ($P<0.05$)。结肠长度结果显示, 与正常组相比, 模型组小鼠结肠长度缩短; 与模型组相比, 五味子甲素组与美沙拉嗪组小鼠结直肠长度增长($P<0.05$); 病理检测结果显示, 正常组小鼠结肠内腺体结构正常, 细胞排列整齐; 模型组结肠细胞出现非典型增生, 细胞排列不规则, 其中可见炎性异常浸润; 与模型组相比, 五味子甲素组情况有明显改善。免疫组化结果显示, 与正常组相比, 模型组细胞排列紊乱、炎性细胞增多、Ki67 的表达水平显著升高; 与模型组相比, 五味子甲素组细胞排列规则、Ki67 的表达水平明显降低。Western blot 结果显示, 与模型组相比, 五味子甲素组结肠组织 PI3K、AKT 蛋白表达量明显下降($P<0.01$)。**结论:** 五味子甲素对结直肠癌小鼠模型具有显著的治疗作用。

[基金项目] 辽宁省教育厅高校基本科研项目 (JYTMS20231833)

[第一作者] 刘铭雨 (2001-), 男, 辽宁中医药大学硕士研究生, 研究方向: 中药药理学,
E-mail:1404213561@qq.com。电话: 15690135530

[通讯作者] 徐志立(1972-), 男, 博士, 辽宁中医药大学副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药药理学

基于网络毒理学及分子垂钓技术的天山假狼毒肝毒性物质基础及 机制研究

蒙湘, 黄先菊*

(中南民族大学, 武汉 430074)

[摘要] **目的:** 探究天山假狼毒产生肝毒性的毒性部位、物质基础及相关机制, 为天山假狼毒的实际应用提供安全性参考。**方法:** 采用回流提取法, 分别对天山假狼毒地上、地下部分进行提取。通过 MTT 法检测不同提取物对小鼠 AML-12 肝细胞活力的影响, 并计算 IC_{50} 值, 筛选出毒性较大的部位。通过液相色谱-质谱联用技术对毒性较大的部位进行成分分析。基于成分分析结果, 使用网络毒理学分析、分子对接技术初步探究产生毒性的毒性物质基础、关键靶蛋白及可能的分子机制, 并采用分子垂钓技术进一步探究天山假狼毒地下部分提取物中的小分子成分与关键靶蛋白的结合情况。收集分子垂钓解离液, 通过液相色谱-质谱联用技术进行成分分析, 获取与关键靶蛋白结合的小分子成分信息。以 MTT 法检测与关键靶蛋白结合的不同小分子对小鼠 AML-12 肝细胞活力的影响。采用 ROS 荧光探针检测法及 Hoechst 33258 染料分别检测细胞 ROS 水平及凋亡情况。通过 qRT-PCR 法检测 EGFR、PI3K、AKT、mTOR 的 mRNA 表达水平。**结果:** 天山假狼毒地下部分提取物在剂量大于或等于 $100\ \mu\text{g/mL}$ 时对小鼠 AML-12 肝细胞活力表现出明显的抑制作用, 其 IC_{50} 值为 $103.1\ \mu\text{g/mL}$, 地上部分提取物在设定剂量下未对 AML-12 肝细胞活力产生明显影响; 成分分析得天山假狼毒地下部分提取物成分 33 个; 网络毒理学分析筛选得药物成分靶点与肝毒性靶点的交集靶点 499 个, 构建 PPI 网络筛选出核心靶点 106 个, 以度值排序得到关键靶点 EGFR 和 AKT1, 在天山假狼毒-成分-核心靶点-肝毒性网络中共得到 14 个成分与 EGFR 和 AKT1 有网络关联。KEGG 富集分析共涉及 165 条信号通路, 前 20 个条目中包含 PI3K-AKT 信号通路、ErbB 信号通路; GO 基因本体论生物富集分析共得到生物过程 547 条, 分子功能 143 条, 细胞组分 75 条 (其中包含线粒体)。分子对接结果显示 14 个关联成分与 EGFR 和 AKT1 两个关键靶点均具有较好的对接结合能; 分子垂钓验证了 EGFR 蛋白能够与天山假狼毒地下部分提取物中的小分

[第一作者] 蒙湘, 女, 硕士研究生, E-mail: 1250818647@qq.com, Tel: 15827603441

[通讯作者] 黄先菊, 女, 博士, 教授, E-mail: xianju@mail.scuec.edu.cn

子物质结合；对解离液进行成分分析发现西瑞香素、芒柄花黄素、伞形花内酯、瑞香新素 4 种小分子成分与 EGFR 蛋白结合。将 4 种成分进行体外细胞毒性检测发现，对小鼠 AML-12 肝细胞的细胞活力的影响西瑞香素>芒柄花黄素>伞形花内酯>瑞香新素。与正常组相比，西瑞香素、天山假狼毒地下部分提取物均可使细胞 ROS 水平升高，凋亡增多。qRT-PCR 检测相关基因 mRNA 表达水平发现，与正常组相比，西瑞香素、天山假狼毒地下部分提取物均可使 EGFR、PI3K、AKT、mTOR 的 mRNA 表达水平下降。**结论：**天山假狼毒地下部分毒性大于地上部分；产生毒性的毒性物质基础可能为西瑞香素、芒柄花黄素、伞形花内酯、瑞香新素等；天山假狼毒地下部分毒性物质可能通过影响跨膜蛋白 EGFR 的功能，从而调控下游 PI3K-AKT 信号通路，进而影响肝细胞线粒体功能，造成线粒体功能障碍，引起细胞凋亡，最终导致肝损伤。

[关键词] 天山假狼毒；肝毒性；分子垂钓；毒性机制

马兜铃酸与肝癌相关性及其低丰度马兜铃酸 I 相关中药的安全性研究

李承贤^{1,2}, 方志娥^{1,3}, 王寅康¹, 赵旭¹, 王伽伯⁴, 柏兆方^{1*}, 肖小河^{1*}

(1.中国人民解放军总医院第五医学中心, 北京, 10039; 2.天津中医药大学, 天津 301617, 400021; 3.重庆市中医院, 重庆, 400021; 4.首都医科大学中医药学院, 北京, 100069)

[摘要] 马兜铃酸有明显肾毒性, 可导致肾小管功能损害, 且对肾脏及泌尿系统具有一定的致癌性。2012 年, 世界卫生组织国际癌症研究机构宣布将马兜铃酸列为 I 类致癌物。2017 年 10 月 18 日, 美国《科学·转化医学》杂志封面使用《一种中草药的阴暗面》标题, 首次提出马兜铃酸与肝癌存在相关性, 引发社会广泛关注。马兜铃类中药是否致肝癌, 我国是否应全面禁止马兜铃类药材的使用等问题亟待解决。**目的:** 探究马兜铃酸与肝癌相关性及其低丰度马兜铃酸 I 相关中药, 如细辛在临床诊疗环境下的安全性。**方法:** 利用马兜铃酸肾病队列及超百万人口的社区健康大数据进行真实世界回顾性分析, 探讨马兜铃酸暴露人群的肝癌患病率及相关风险因素进而评价马兜铃酸与肝癌发生的相关性。基于病证毒理学评价体系, 比较不同状态下 C57 小鼠对马兜铃酸 I 肾损害作用的应答差异并对其机制进行探究。进一步基于配伍减毒理论筛选细辛临床常用配伍药材中具有减轻马兜铃酸 I 肾损害作用的中药。**结果:** 临床回顾性研究表明, 在整个随访期间未观察到确诊为肝癌的患者。基于浙江省宁波市鄞州区百万人群大健康数据的真实世界研究表明是否服用马兜铃酸相关中药对肝癌发生率并无明显影响。动物实验证实马兜铃酸 I 对成鼠主要造成肾损害而对乳鼠主要造成肝损害。进一步对低丰度马兜铃酸相关中药细辛的安全性研究表明: 肺炎状态下, 马兜铃酸 I 对小鼠肾脏损伤较轻, 这一现象可能与调节氧化应激的相关机制有关。同时, 我们发现炒苦杏仁可有效减少马兜铃酸 I 造成的肾损害。**结论:** 马兜铃酸致肝癌之说难以成立, 同时动物实验结果表明马兜铃酸致肝肾损害存在时空异质性现象。对细辛的安全性研究表明, 针对肺炎疾病治疗时, 细辛在临床常用剂量和疗程下, 是相对安全的且配伍炒苦杏仁使用可进一步增加其安全性。

[关键词] 马兜铃酸; 马兜铃酸 I; 肝癌; 病证毒理学; 配伍减毒

[基金项目] 国家科技重大专项“重大新药创制计划”(2018ZX09101002-001-002); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(编号 ZYYCXTD-C-202005)

[通讯作者] 柏兆方, 男, 博士, 副研究员, 临床中药学与安全用药研究。E-mail: baizf2008@hotmail.com; 肖小河, 男, 博士, 研究员, 临床中药学与安全用药研究。E-mail: pharmacy302xxh@126.com

金丝桃苷通过调节 TBK1 逆转肾透明细胞癌舒尼替尼耐药的分子机制及临床应用潜力研究

宋铮^{1*}, 罗维²

(1.北京大学第一医院泌尿外科研究所, 北京, 100034; 2.湖南中医药大学中医药精准用药研究中心, 长沙, 410208)

[摘要] **目的:** 舒尼替尼是晚期肾透明细胞癌(clear cell renal carcinoma, ccRCC)的一线治疗药物, 但其耐药性是一个亟待解决的重要问题。TBK1 作为一种关键信号分子, 在 ccRCC 中高表达且在肿瘤细胞增殖、凋亡等过程中也发挥重要作用, TBK1 已成为抗癌和逆转耐药的潜在分子靶标。金丝桃苷作为一种具有生物活性的天然产物在多种类型的肿瘤中可发挥抑癌作用, 探索金丝桃苷在 ccRCC 舒尼替尼耐药中的潜在价值具有重要意义。**方法:** 在体内构建舒尼替尼耐药细胞衍生异种移植模型, 获取体内舒尼替尼耐药细胞系。利用 CCK8 检测、流式细胞术、Western blot 和 qRT-PCR 等技术手段, 全面评估金丝桃苷调控 TBK1 在舒尼替尼耐药细胞系中的作用。同时, 我们还将构建敲低和过表达 TBK1 的慢病毒载体, 通过病毒包装并感染舒尼替尼耐药细胞系, 以获取稳定敲低和过表达 TBK1 的舒尼替尼耐药细胞株。通过划痕实验和 Transwell 实验等手段, 分析金丝桃苷处理后耐药细胞系的增殖和迁移能力的变化, 明确金丝桃苷在调控 TBK1 影响舒尼替尼耐药细胞系增殖过程中的具体作用。通过分子对接、表面等离子共振检测、热蛋白质组分析以及溶剂诱导的蛋白质沉淀等多蛋白组学进一步分析金丝桃苷与 TBK1 的作用机制, 更全面地探索和验证金丝桃苷如何调控 TBK1 以及 TBK1 在 ccRCC 舒尼替尼耐药中的作用, 从而明确金丝桃苷调控 TBK1 在 ccRCC 舒尼替尼耐药中的详细分子机制。**结果:** 通过细胞学和生物信息学分析发现 TBK1 在 ccRCC 组织中高表达, 且与不良预后密切相关。体外实验进一步证实, TBK1 在舒尼替尼耐药细胞系中同样呈现高表达状态。同时, 我们通过分子对接的方法, 发现金丝桃苷与 TBK1 存在稳定结合位点。金丝桃苷能够与 TBK1 蛋白上部的 ATP 结合口袋稳定结合, 并与 TBK1 蛋白上的多个关键氨基酸残基形成氢键作用, 表明了金丝桃苷与 TBK1 蛋白的稳定结合能力。此外, 我们通过细胞生物学实验也证明了金丝桃苷能与 TBK1 结合并显著降低 TBK1 的磷酸化

[通讯作者] 宋铮, Email: 15172963319@163.com, Tel: 13832513228

水平;同时金丝桃苷还能抑制舒尼替尼耐药细胞的增殖和体内肿瘤的生长。**结论:** 靶向 TBK1 可能是克服 ccRCC 对舒尼替尼耐药的新策略,而金丝桃苷作为一种具有调控 TBK1 活性的天然化合物,有望逆转 ccRCC 对舒尼替尼的耐药性,为 ccRCC 舒尼替尼耐药的治疗提供新的候选药物或联合治疗方案。

[关键词] 肾透明细胞癌;舒尼替尼;TBK1;金丝桃苷

基于转录组学、蛋白质组学和 m6A 表观转录组学揭示自噬在新乌头碱诱导神经毒性中的作用

张健^{1,2}, 陈梦婷¹, 高昕月¹, 李佳琪^{1,2}, 朱安^{1*}

(1.福建医科大学基础医学院消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福建 福州 350108;

2.福建医科大学公共卫生学院, 福建 福州 350122)

[摘要] 目的: 新乌头碱是药用植物乌头的主要活性成分之一, 具有镇痛、抗炎等药理作用。然而, 它同时也是一种剧毒成分, 因其中毒剂量与治疗剂量接近, 致使临床中毒事件时有发生, 其中以神经系统症状最为常见, 但其神经毒效应及毒性机制尚未阐明。本研究拟综合运用小鼠海马神经元HT22 细胞、模式生物斑马鱼、计算毒理学和多组学技术等, 系统揭示新乌头碱所致的神经毒效应及分子机制。**方法:** (1) 利用PharmMapper数据库钩钓新乌头碱可能作用的毒性靶标。

(2) 使用 0、400、800、1600 μM 新乌头碱处理HT22 细胞 72 h后检测细胞活力、LDH、ROS、SOD和MDA含量。(3) 0 和 800 μM 新乌头碱处理HT22 细胞 72 h后进行转录组和蛋白组测序, 筛选差异表达基因和蛋白。(4) 检测细胞内 Ca^{2+} 含量, 线粒体质量和活性。(5) TEM观察线粒体结构和自噬小体生成情况并通过RT-qPCR和Western Blot检测自噬相关基因和蛋白表达水平。(6) 0 和 800 μM 新乌头碱处理HT22 细胞 72 h后进行MeRIP-seq, 筛选差异m6A修饰基因并鉴定潜在的m6A调控因子。(7) 分子对接和分子动力学模拟新乌头碱与m6A调控因子的相互作用, 并通过细胞热迁移实验进行验证。(8) 检测新乌头碱处理斑马鱼后的孵化率、存活率和体长。(9) 检测斑马鱼的运动距离、持续时间和速度。

(10) RT-qPCR检测斑马鱼神经发育相关基因的表达。**结果:** (1) PharmMapper数据库钩钓出 302 个新乌头碱的毒性蛋白靶点。(2) 新乌头碱处理HT22 细胞后显著抑制细胞活力, LDH、ROS和MDA含量增加, SOD酶活性下降。(3) 转录组和蛋白组测序分别鉴定出 2291 个差异表达基因和 113 个差异表达蛋白, 主要涉及线粒体、溶酶体和自噬。(4) 新乌头碱处理诱发细胞内 Ca^{2+} 超载、导致线粒体通透性转换孔开放增加, 膜电位下降, 活性降低。(5) TEM可见线粒体结构异常、自噬小体生成增加并伴随与自噬和溶酶体途径相关的mRNA和蛋白表达上调。(6) MeRIP-seq显示, 自噬相关基因的表达与m6A修饰之间存在相关性。

[基金项目] 国家自然科学基金(82104520); 福建省自然科学基金(2021J05045)

[通讯作者] 朱安, E-mail: zhuan@fjmu.edu.cn

此外。我们鉴定出METTL14 是HT22 细胞中m6A甲基化的潜在调控因子。(7) 分子对接和分子动力学结果表明新乌头碱与METTL14 具有稳定的相互作用并通过细胞热迁移实验验证了该预测结果。(8) 新乌头碱处理斑马鱼后孵化率、存活率、体长和运动行为能力均被显著抑制,并伴随神经发育相关mRNA表达显著下调。**结论:** 新乌头碱可诱导HT22 细胞和斑马鱼的神经毒效应,毒性机制涉及氧化应激、线粒体损伤和自噬等。此外,新乌头碱通过与METTL14 直接相互作用,调节自噬相关基因的m6A修饰,诱导神经毒性。

[关键词] 新乌头碱; 氧化应激; 自噬; 多组学; 神经毒性

基于效应靶标互作的中药配伍减毒新策略—

以白芍配伍补骨脂为例

许颖杰

(南京中医药大学, 南京, 210023)

[摘要] **目的:** 药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是指由药物或其代谢产物导致的肝损伤, 根据药物肝毒性机制可将 DILI 分为三类: 固有型药物性肝损伤、间接性肝损伤和特异质药物性肝损伤(Idiosyncratic DILI, IDILI), IDILI 特点是具有高度的个体差异和不可预测性。然而, 近年来, “壮骨关节丸” “仙灵骨葆胶囊”等含有补骨脂的中药复方因诱导肝损伤的不良反应已被国家不良反应中心多次报道, 这受到了各界的广泛关注。因此, 探究补骨脂导致 IDILI 的确切机制并建立科学有效的风险防控策略显得尤为重要。配伍减毒是中医预防和治疗疾病的一种基本临床用药形式。白芍在肝脏疾病中发挥重要作用, 白芍的微寒性质有助于滋养肝阴, 补骨脂的温性则有助于强化肾阳。两者配伍使用, 有助于维持体内的阴阳平衡。基于此, 我们科学先导性构建基于效应靶标互作的中药配伍减毒新策略—以白芍配伍补骨脂为例。本研究旨在评价白芍能否减弱补骨脂导致的 IDILI, 并探讨其作用机制。**方法:** 建立脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的大鼠免疫应激活化模型, 初步明确白芍是否可以减弱补骨脂引起的特异质肝毒性。运用网络药理学手段, 进一步明确白芍减弱补骨脂引起的特异质肝毒性的作用机制。在小鼠骨髓源性巨噬细胞(Bone marrow-derived macrophages, BMDMs)细胞上建立炎症小体活化模型, 明确白芍抑制补骨脂引起的炎症小体激活的作用靶点及机制。**结果:** 在大鼠 IDILI 模型中, 与 LPS 组相比, 模型组肝实质细胞内有大量炎症浸润, 肝损伤相关指标显著上升; 与模型组相比, LPS+补骨脂+白芍组肝损伤程度和凋亡程度显著减轻, 肝损伤指标显著下调。网络药理学结果显示通路-靶点图显示 NOD 样受体信号通路是 degree 值最高的通路。体外实验显示补骨脂可直接触发 BMDMs 中炎症小体活化, 进而导致 caspase-1 的成熟和下游效应细胞因子 IL-1 β 的释放。值得注意的是, 白芍预处理抑制了补骨脂诱导的炎症小体活化。线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)的累积

是补骨脂诱导的炎症小体活化的关键上游事件，而白芍可以显著抑制 mtROS 的积累。**结论：**本研究首先利用 LPS 诱导的体内特异质肝损伤评价模型，明确了保肝药物白芍可以减弱大鼠体内补骨脂导致的特异质肝损伤；运用网络药理学手段，预测了白芍减弱补骨脂导致的 IDILI 可能是通过影响 NOD 样受体信号通路实现的；采用基于 NLRP3 炎症小体活化的体外评价模型，揭示了白芍可以通过抑制 mtROS 的累积抑制补骨脂引起的 NLRP3 炎症小体活化，系统阐释了白芍减弱补骨脂导致的 IDILI 的作用机制；该研究提示白芍与补骨脂可配伍使用以减轻补骨脂导致的 IDILI，不仅为补骨脂的临床应用提供了思路，也为中药配伍的科学研究和临床应用提供了宝贵的经验和启示。

基于网络药理学、分子对接以及体内外实验探究清肺除湿颗粒 治疗痤疮机制

孟煜^{1, 2}, 台宗光², 陈中建², 朱全刚^{2*}

(1.安徽医科大学药学院, 安徽合肥, 230000; 2.上海市皮肤病医院工程中心, 上海, 200040)

[摘要] **目的:** 运用网络药理学、分子对接及细胞实验、动物实验探究清肺除湿颗粒(QFCS)治疗痤疮(Acne)的作用机制。**方法:** 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库获取清肺除湿方的化学成分和作用靶点。通过在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)等筛选痤疮的靶点, 并进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。在 Cytoscape3.10.0 中构建“成分-靶点-通路”网络、蛋白相互作用网络(PPI)。通过高效液相(HPLC)探索出清肺除湿颗粒的指纹图谱验证网络药理学对成分预测的有效性, 并用分子对接验证其合理性。最后开展体内外实验, 首先建立小鼠单核巨噬细胞痤疮模型, 并分为空白组、模型组、槲皮素组(0.024 $\mu\text{g/mL}$)、山奈酚组(0.0462 $\mu\text{g/mL}$)、槲皮素+山奈酚组(0.0702 $\mu\text{g/mL}$)、清肺除湿组(50 $\mu\text{g/mL}$), 利用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)的变化, 定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 CD80、CD86 的表达情况。在动物实验中, 将小鼠分为空白组、痤疮模型组、清肺除湿颗粒低剂量组(1.5 g/kg)、中剂量组(4.5 g/kg)、高剂量组(13.5 g/kg)。利用 ELISA、qRT-PCR 检测 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 在小鼠外周血及皮肤中的变化, 苏木精-伊红染色(HE)染色观察角质层厚度、炎性浸润的变化, 免疫荧光检测小鼠皮肤中 CD206 表达的变化, 免疫组化实验(IHC)和蛋白质印迹法(WB)检测小鼠皮肤中胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)、胰岛素样生长因子(IGF-1)的蛋白表达。**结果:** 通过网络药理学得知清肺除湿方的核心成分主要有槲皮素、泽泻醇、去甲汉黄芩素、山奈酚等, 以及核心靶点 30 个。清肺除湿方治疗痤疮主要涉及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、PI3K 信号通路、癌症信号通路等, 在后续对清肺除湿颗粒指纹图谱的探索中也检测出槲皮素(40 $\mu\text{g/g}$)与山奈酚(77 $\mu\text{g/g}$), 基于上述结果, 本研究通过分子对接发现槲皮素与山奈酚可以通过作用于 PI3K、AKT、

[第一作者] 孟煜, Email: 18326114727@163.com, Tel: 18326114727

[通讯作者] 陈中建, Email: aajian818@163.com; 朱全刚, Email: qgzhu@126.com

IGF-1 以及 TNF 发挥作用。在细胞实验中显示清肺除湿能够降低 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 的释放，且其降低炎性因子释放的作用比单独应用槲皮素和山奈酚要显著，并且能够降低 CD80 与 CD86 的表达。动物实验中的 Elisa 和 qRT-PCR 的结果都说明给药后的小鼠体内 TNF- α 、IL1 β 、IL-6、IL-8 的释放明显的下调，小鼠皮肤 HE 染色切片中也能明显观察到给药组的角质层的厚度与炎性浸润相较于模型组均有改善，并且通过免疫荧光实验发现清肺除湿颗粒能够显著增加 CD206 的表达。免疫组化与蛋白印迹实验中发现 PI3K、AKT、IGF-1 的蛋白表达量均有不同程度的下调。**结论：**清肺除湿方能够通过多成分、多靶点减少炎性因子的释放，还能够通过阻断 IGF-1 激活 PI3K-AKT 信号通路达到缓解炎症、抑制痤疮的作用。

基于毒性测试新技术方法的中药“客观识毒-科学控毒-精准用毒” 安全性研究

李遇伯*, 许妍妍, 魏金霞, 王玉明, 范思邈

(天津中医药大学 中药学院, 天津 300617)

[摘要] 《“十四五”国家药品安全及促进高质量发展规划》提出, 需逐步探索建立符合中药特点的安全性评价方法和标准体系, 促进中药传承创新发展。目前, 中药安全性评价与精准用药存在三个关键问题: 一是如何明晰有毒中药成分; 二是有毒中药“控多少、如何控”; 三是如何辨“证”用药、辨“病”用药。随着中药配伍禁忌的逐步明确、毒性成分限量标准的制定, 以及中药说明书的日益完善, 中药安全性研究变得更加规范化, 并逐步向国际标准看齐。传统的毒性测试方法已难以全面反映中药复杂成分的毒性特征, 而毒性测试新技术方法的引入为中药安全性评价提供了新的方向和思路。美国国家研究院发布的《21 世纪毒性测试: 愿景与策略》报告首次提出了包含有害结局路径、毒理“组学”技术、模式动物、QSAR、体外-体内数据库外推等毒理测试新技术方法, 并已被欧美管理部门纳入到药品/化学品危害评估、风险评估和管理决策中, 并有望成为毒理研究中的关键方法。为此, 本研究构建了基于毒性测试新技术方法的中药“客观识毒-科学控毒-精准用毒”安全性研究体系, 为有毒中药的系统研发提供一条可借鉴、可转化的研究思路, 亦为制定有毒中药的质量监管标准、临床安全用药策略及预警机制提供方法与途径。

[关键词] 中药安全性; 毒性测试新技术; 风险防控

基于“肝病血致”探索吡咯里西啶生物碱致肝窦阻塞 综合征的发病机制

贺益盛^{1*}, 宋子敬², 马江³, 林鸽²

(1.香港中文大学(深圳), 医学院, 广东省深圳市, 518172; 2.香港中文大学, 生物医学
院, 香港特别行政区, 999077; 3.广东药科大学, 中药学院, 广东省广州市, 510006)

[摘要] **研究背景和目的:** 我国中药使用广泛且自我用药情况普遍, 而中药相关肝损伤往往发病隐蔽, 难于诊断和干预。吡咯里西啶生物碱(PA)是一类分布广泛的肝毒性天然产物, 《中国药典》收录含 PA 的中药品种 9 种, 涉及数十种成方制剂, 而其他地方标准收录含 PA 品种 40 余种。PA 特征性损伤肝血窦内皮细胞(LSEC)而引发高致死率的肝窦阻塞综合征(HSOS), 但其发病机制不明因而缺乏有效干预手段, 病死率达 40%以上, 是中药毒理和肝病领域亟待解决的重要问题。我们前期阐明了 PA 致毒的生化机制: PA 经肝代谢激活的产物具有强反应性, 可共价结合生物蛋白形成蛋白加合物, 从而构成 PA 致毒的物质基础。我们已将 PA 致蛋白加合物首次应用于临床确诊 PA 致肝损伤, 为及时终止 PA 暴露从而遏制 HSOS 重症发展提供了直接依据, 而本研究进一步鉴定 PA 致毒靶蛋白及其引发的特征细胞(LSEC)毒性, 以阐明 PA-HSOS 的发病机制。**研究方法和结果:** 利用我们开发的 PA 蛋白加合物作为诊断标志物, 我们明确筛选出 PA 暴露引起的 HSOS 患者, 并首次发现 PA 活性代谢物高度亲和红细胞蛋白, 可共价结合形成红细胞蛋白加合物(甚至比相同蛋白水平下的肝组织蛋白加合物水平更高), 并导致红细胞损伤和溶血。结合溶血产物直接损伤血管内皮的既定事实, 我们将红细胞蛋白加合物作为切入点, 利用多种动物模型、细胞模型、及计算模型, 探索 PA 特征肝毒机制: 首先, 利用自研靶蛋白识别技术鉴定 PA 在血细胞和血浆中的靶蛋白加合物, 揭开由其驱动的红细胞损伤、溶血产物回收障碍、肝窦内皮激活和破损、以及肝组织出血性坏死的 HSOS 序贯式病理毒理事件, 阐明了溶血介导的肝窦内皮铁稳态失衡是 PA-HSOS 的特异性发病机制, 即“肝病血致”; 进一步, 基于鉴定的 PA 靶蛋白, 综合考虑其可用药性, 通过重构溶血产物清除体

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 82474179), 广东省基础与应用基础研究基金项目(No. 2024A1515011705, 2023A1515110677), 深圳市科技创新委员会 2022 年高等院校稳定资助项目

[通讯作者] 贺益盛, Email: heyisheng@cuhk.edu.cn, Tel: 15651666271

系开发 HSOS 的高效低毒治疗方案，即“肝病血治”。**研究结论及意义：**针对含 PA-HSOS 发病机制不明及治疗手段有限的核心难题，我们以前期发现的高丰度 PA-红细胞蛋白加合物为切入点，探索 PA 特异性引发肝窦内皮损伤的起始毒理事件及 HSOS 发病机制，首先阐明 PA 介导溶血及肝窦内皮铁稳态失衡而引起 HSOS 发生发展，并鉴定驱动该病理模式的 PA 致毒靶蛋白，从而桥接 PA-HSOS 序贯式发病机制；继而基于鉴定的 PA 致毒靶蛋白，从消除致病因子和缓解症状双维度提升 PA-HSOS 的治疗效率，为突破含 PA 中药中毒的治疗瓶颈提供新思路 and 潜在临床可行性。

CYP1A2 在补骨脂致肝损伤中的作用及机制研究

张彩, 魏渊

(江苏大学药学院, 江苏镇江, 212013)

[摘要] **目的:** 补骨脂是一种临床常用的补益类中药。近年来, 含补骨脂的中药方剂或中成药导致的肝损伤现象屡见报端, 亟需引起重视。前期研究发现, 补骨脂的主要肝毒性成分为呋喃香豆素类补骨脂素和异补骨脂素, 但其发挥肝毒性的作用机制尚不明确。本研究拟揭示补骨脂素/异补骨脂素诱导肝毒性的潜在机制, 为补骨脂的临床安全应用提供一定参考依据。**方法:** 首先, 采用转录组学与代谢组学关联分析, 挖掘补骨脂素和异补骨脂素致小鼠肝损伤的相关通路, 发现细胞色素 P450(CYP450)的外源性代谢是一种潜在致肝毒途径。其次, 通过 qRT-PCR 和 Western Blot 验证差异 CYP450 酶基因表达水平, 通过分子对接验证两化合物与 CYP450 酶亲和力, 以及通过重组人 CYP450 和小鼠肝微粒体验证代谢贡献, 筛选出 CYP1A2 作为补骨脂素和异补骨脂素代谢和致毒的关键代谢酶。随后, 在 HepG2 细胞和小鼠中建立 CYP1A2 诱导和抑制模型, 以验证 CYP1A2 的作用, 证明 CYP1A2 的诱导加重了肝毒性, 反之抑制减轻了肝毒性作用。此外, 使用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 在重组人 CYP1A2 和小鼠肝脏微粒体、CYP1A2 过表达的 HepG2 细胞、小鼠肝脏和化学反应系统的生物系统中, 检测到 CYP1A2 代谢产生的补骨脂素和异补骨脂素反应性中间体的谷胱甘肽加合物。最终, 利用生化指标测定和高内涵细胞成像呈现了由于反应性中间体消耗谷胱甘肽而导致的细胞氧化应激和相关肝毒性。**结果:** 研究揭示了补骨脂素和异补骨脂素致肝毒性的潜在机制与 CYP450 代谢密切相关, 且 CYP1A2 为调节补骨脂素和异补骨脂素肝毒性的主要代谢酶。进一步研究发现, 补骨脂素和异补骨脂素经 CYP1A2 代谢活化产生反应性中间体, 进而引发细胞内氧化应激损伤, 这可能是补骨脂素和异补骨脂素诱导肝毒性的潜在机制之一。**结论:** 该研究借助转录组学与代谢组学整合分析及 CYP1A2 代谢活化致毒机理, 阐明了补骨脂肝毒性成分补骨脂素和异补骨脂素致肝损伤的作用机制, 为补骨脂的肝毒性风险评估及临床安全应用提供一定的参考依据。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174070)

[通讯作者] 张彩, Email: caizhang@ujs.edu.cn

基于血清毒理学的箭叶淫羊藿致肝毒性研究

董雨桐¹, 邱丽珍¹, 龙姜洁¹, 呼延皓冉¹, 周昆^{1,2*}

(1.天津中医药大学药物安全评价中心, 2.天津中医药大学新校区, 301617)

[摘要] **目的:** 观察箭叶淫羊藿的大鼠含药血清在体外对 HepRG 正常肝细胞的毒性作用及其作用机制。**方法:** 根据血清药理学的理论思维, 增大淫羊藿的灌胃剂量达到毒性剂量时, 其进入血液的药物成分即可能是导致肝损伤的主体, 将这些含药血清处理体外细胞来观察细胞毒性效果, 进行毒性研究, 我们称之为“血清毒理学”。部分 SD 大鼠灌胃给予 10g 生药/kg 的箭叶淫羊藿, 给药半小时后麻醉动物、腹主动脉取血, 全血置于无特殊处理离心管中, 室温静置 30min, 分层后 3000rpm 离心 15min, 吸取上层血清, 56℃水浴灭活 30min, 过 0.22μm 的滤膜后, -80℃条件下保存, 另取大鼠制备空白血清。通过 MTT 法检测细胞存活率, 观察不同浓度空白血清和淫羊藿含药血清对 HepRG 肝细胞的毒性作用, 并采用 IncuCyte S3 实时活细胞成像分析系统长时程观察细胞生长状态并拍照记录。采用 Western Blot 方法检测内质网应激和细胞焦亡相关蛋白, 如 GPR78、PERK、ATF4、NLRP1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 等, 进一步验证淫羊藿含药血清导致肝细胞焦亡的机制。**结果:** MTT 结果显示, HepRG 细胞培养基中含有 5%、10%、15%、20% 的空白血清时, 48 小时对细胞增殖无明显影响, 而淫羊藿含药血清 10%、15%、20% 浓度下不同程度降低 HepaRG 细胞活性, 20% 含药血清使细胞活性降低 46%, 对 20% 空白血清有极其显著差异 ($P < 0.001$)。从 IncuCyte S3 拍摄的照片可见, 常规培养的对照组和空白血清组细胞生长和形态正常, 含药血清组的细胞可见细胞膜外气泡状突出物, 与文献中焦亡细胞形态相似。蛋白表达检测结果显示, 淫羊藿含药血清诱导内质网应激相关的蛋白质 GRP78、PERK、ATF4、CHOP 表达显著上调 ($P < 0.05$); 而焦亡相关 Caspase-1 Cleaved、NLRP1、GSDMD、GSDMD-N、GSDME、GSDME-N 等蛋白也显著上调 ($P < 0.05$)。**结论:** 淫羊藿含药血清对 HepaRG 细胞有显著毒性, 其作用可能是通过引起内质网应激激活 NLRP1 炎症小体和激活 Caspase-1 焦亡通路而引起细胞焦亡。

[基金项目] 天津市教委科研项目 (2023KJ135), 天津市自然科学基金 (18JCYBJC28700)

[通讯作者] 周昆, Email: z.k.ken@263.net

脑-肝相互作用在中药肝毒性的研究进展

杨春启^{1, 2}, 王宇光^{2*}, 高月^{1, 2*}

(1 北京工业大学, 北京 100124; 2 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850)

[摘要] 中药在传统医学中占据重要地位, 并逐渐走向全球。然而, 随着中药使用的日益广泛, 关于其潜在毒副作用, 尤其是肝损伤的安全性问题逐渐引发关注。中药引发的肝损伤(Herb-Induced Liver Injury, HILI)已成为一个研究重点, 肝损伤不仅限于肝脏, 还可能通过肝脑轴影响大脑功能, 导致神经系统疾病, 如肝性脑病(Hepatic Encephalopathy, HE)。HE 作为肝脏功能障碍引起的中枢神经系统病变, 揭示了肝脑相互作用的复杂性。此外, 神经系统炎症(如阿尔茨海默病、帕金森病)也会通过炎症反应引发肝脏代谢紊乱, 进一步加剧肝损伤。中药的肝毒性成为广泛讨论的焦点。多种中药成分, 如雷公藤、何首乌和黄药子, 被证实在特定条件下具有潜在的肝损伤风险。这些中药成分的毒性机制包括代谢异常、氧化应激和免疫系统紊乱等, 这些因素会加剧肝脏损伤, 进而通过肝脑相互作用, 诱发肝性脑病和其他神经系统疾病。肝脏作为主要的代谢和解毒器官, 其功能损伤不仅导致代谢废物的积累, 还可能通过全身炎症反应加剧神经系统的病变, 表现为认知功能障碍等神经系统症状。神经炎症性疾病(如阿尔茨海默病和帕金森病)不仅仅是局部的中枢神经系统问题, 它们通过脑肝轴的调控机制还可能引发肝脏代谢异常, 导致脂肪肝等代谢性疾病, 反过来加重神经系统炎症。脑肝和肝脑之间的相互作用在这些病理过程中尤为关键, 研究表明, 炎症介质和代谢废物的传递是这一相互作用的重要环节, 尤其是在神经系统退行性疾病与肝脏疾病之间的共病中更为明显。未来的研究应进一步探索中药成分的代谢机制, 尤其是它们在不同剂量和长期使用下对肝脏的影响。此外, 个体化差异也需要更多关注。不同个体对中药的代谢耐受性存在显著差异, 遗传背景、肠道微生物群落的差异等均可能影响中药引发的肝脑相互作用。针对这些个体差异的研究将有助于中药在临床中的合理使用。肠道-脑-肝轴的研究也应深入探讨, 特别是肠道微生物如何在中药引发的肝毒性和肝性脑病中的作用。这一领域的研究不仅有助于理解中药的肝毒性, 还能为肠道微生物在中枢神经系统疾病中的调节作用提供新见解。中药

[基金项目] 国家自然科学基金重大项目(82193291015)

[第一作者] 杨春启, 北京工业大学环境与生命学部博士在读, E-mail: ycqlqaz@outlook.com

[通讯作者] 高月, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药药理学, E-mail: gaoyue@bmi.ac.cn

引发的肝损伤及其对神经系统的影响，是一个涉及多系统、多学科的复杂问题。未来的研究应集中在以下几个方面：评估中药成分的安全性、分析个体差异、研究肠道微生物的调控作用，以及开发相关的治疗干预措施。这些研究将为中药的安全使用提供更加科学的依据，并推动中药在全球范围内的健康与安全发展。

[关键词] 脑肝相互作用；中药；肝毒性

细辛水煎液及其主要马兜铃酸类成分对小鼠的长期毒性研究

王连娉, 刘美婷, 赵雍, 易艳, 李春英, 田婧卓, 柳辰玥, 梁爱华*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100070)

[摘要] **目的:** 研究细辛水煎液单次灌胃给药, 以及细辛水煎液与其主要马兜铃酸类成分(AAs)连续 24 周反复灌胃给药对小鼠主要脏器的影响, 为临床安全用药提供参考。**方法:** 细辛水煎液中主要马兜铃酸类成分含量分析: 采用超高效液相色谱串联质谱技术(UPLC-MS/MS)定量分析细辛水煎液中的马兜铃酸类成分: 马兜铃酸I(AA-I)、马兜铃酸II(AA-II)、马兜铃酸IIIa(AA-IIIa)、马兜铃酸IVa(AA-IVa)、马兜铃酸内酰胺I(AL-I)的含量。急性毒性实验: 以北细辛水煎剂(500 倍临床剂量, 25 g/kg; 1 000 倍临床剂量, 50 g/kg)单次灌胃给予 C57BL/6J 小鼠, 观察给药后 14 天内小鼠的毒性反应。长期毒性实验: 平行设计 8 个实验组别: 空白对照组、溶剂对照组、AA-I阳性对照组(27.2 $\mu\text{g/kg}$)、AA-IVa 组(27.2 $\mu\text{g/kg}$)、AL-I 组(13.5 $\mu\text{g/kg}$)、细辛水煎液低剂量组(10 倍临床剂量, 0.5 g/kg)、细辛水煎液中剂量组(31.6 倍临床剂量, 1.6 g/kg)、细辛水煎液高剂量组(100 倍临床剂量, 5 g/kg)。AA-IVa 组以及 AL-I组的马兜铃酸的含量分别与细辛水煎液高剂量组中相应的马兜铃酸成分的含量一致, 以 2020 版《中国药典》中细辛项下限量成分马兜铃酸I作为阳性对照组, 其剂量与细辛中所含较高的 AA-IVa 成分组相一致。所有试剂采用灌胃给药的方式给予 C57BL/6J 小鼠, 给药体积 0.1 ml/10g, 连续给药 12 周(时间点一)、24 周(时间点二), 每日一次, 随后停药观察 8 周(时间点三)。在给药期及停药观察期观察动物的一般行为状态并记录它们的每周体重及进食量变化情况。将上述三个时间点的动物进行解剖、取其血清进行生化分析、取其主要脏器(心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、性腺等)观察脏器外观、称重而后进行组织病理学分析以评估药物的毒性。**结果:** 细辛水煎液中主要马兜铃酸类成分含量分析: 在细辛水煎剂中测得 AA-IVa 合 AL-I的含量分别为 5.45 $\mu\text{g/g}$ 和 2.71 $\mu\text{g/g}$, 而未检测到 AA-I、AA-II和 AA-IIIa。急性毒性实验: 细辛水煎液单次给药后 14 天内, 未见小鼠死亡及异常情况。长期毒性实验: 在三个时间点

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82174073, 82192913); 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021B016, CI2021A04801); 岐黄学者支持项目; 中国中医科学院中医药防治流感技术体系项目(ZZ13-035-10)

[第一作者] 王连娉, 女, 博士, 副研究员, 中药安全性评价、中药药效及代谢机制研究

[通讯作者] 梁爱华, 女, 博士, 研究员, 中药安全性评价、中药药效及代谢机制研究。E-mail: ahliang@icmm.ac.cn

中各组小鼠均未观察到摄食量、生长曲线、血清中生化指标(AST、ALT、ALP、BUN、CRE)、脏器外观及系数等有具有毒理学意义的差异。除 AA-I组在 24 周的时间点时观察到与对照组相比微量的肾间质增生和肾小管萎缩,并且在停药 8 周后有所缓解以外,其余各组均未观察到明显的因毒性导致的病理改变。**结论:**细辛水煎液对小鼠没有明显的毒性,因此细辛水煎液形式是相对安全的,AA-IVa 和 AL-I在与细辛水煎液高剂量组对应所含马兜铃酸的量相一致的情况下,对小鼠没有明显毒性。但考虑到我们的毒理研究数据仍然有限,我们仍建议服用细辛不宜过量,服药时间不宜过长。

黄连素联合光动力学疗法对红色毛癣菌抑制作用研究

吴晓梅, 陈春林*

(宜春学院, 江西省宜春市, 336000)

[摘要] **目的:** 研究黄连素联合光动力学疗法(BBR-PDT)对红色毛癣菌的抗菌作用及作用机制,以豚鼠皮肤感染模型为基础评价 BBR-PDT 的体内治疗效果。**方法:** 参考 CLSI M38-A2 方案测定 BBR-PDT 对红色毛癣菌的最小抑菌浓度(MIC);采用 MTT 法测定不同浓度黄连素(BBR)和不同光照能量密度联合的光动力学疗法(PDT)对红色毛癣菌生物活性的影响,筛选最佳抑菌实验参数;通过测量菌丝径向生长直径和孢子萌发数目,验证该最佳抑菌实验参数。利用 DCFH-DA 探针,检测红色毛癣菌孢子内活性氧(ROS)的产生,通过 PI 染色,检测 BBR-PDT 对红色毛癣菌细胞膜的破坏作用。构建豚鼠皮肤感染模型,通过豚鼠皮屑菌落培养和豚鼠皮肤组织病理分析,评估光动力学治疗效果。**结果:** 在光照能量密度为 96 J/cm² 条件下,测得 BBR-PDT 对红色毛癣菌的 MIC 为 12μg/mL。在 BBR 浓度 0~64μg/mL 范围内,随着 BBR 浓度升高,BBR-PDT 对红色毛癣菌杀伤作用越强,当 BBR 浓度达到 32μg/mL 时,其对两株红色毛癣菌抑制作用达到最大;BBR 在光能量密度为 0~144J/cm² 范围内,光照剂量越大,BBR-PDT 对红色毛癣菌抑制作用越强,12μg/mL BBR 联合光照能量密度为 24J/cm² 即能对红色毛癣菌的有抑制作用。对于标准菌株,光照能量密度达到 72J/cm² 时,BBR-PDT 对红色毛癣菌的抑制作用最大,对于临床菌株,光照能量密度达到 96J/cm² 时,BBR-PDT 对红色毛癣菌的抑制作用最大。单纯光照和只加 BBR 无光照均对红色毛癣菌无抑制作用。12μg/mL BBR 联合 72J/cm² 蓝光处理后,菌落径向生长和孢子萌发均受到抑制。PI 染色实验数据显示,BBR-PDT 对红色毛癣菌细胞膜有破坏作用,经过 BBR-PDT 处理的真菌细胞产生大量 ROS。成功构建红色毛癣菌豚鼠皮肤感染模型,经 BBR-PDT 治疗后,实验组豚鼠皮屑明显减少,开始有毛发生长,皮肤损伤恢复正常;菌落培养结果显示,经 BBR-PDT 治疗后的豚鼠皮肤菌落密度较疏松,菌落计数显著减小。HE 染色结果显示,实验组豚鼠皮肤切片表皮层与真皮层之间的结构分布均匀,表皮层角化程度正常,棘层厚度均匀,毛囊无扩张

[基金项目] 江西省研究生创新专项资金项目(No.YC2023-S979)

[第一作者] 吴晓梅, E-mail: 1415150771@qq.com, Tel: 17750252704

[通讯作者] 陈春林, 副教授, E-mail: chenchunlinycxy@163.com, Tel: 18979539940

和融合现象，皮肤基本得到恢复。**结论：**BBR-PDT 可以有效抑制红色毛癣菌的生物活性；在一定范围内，BBR-PDT 对红色毛癣菌的抑制作用与 BBR 浓度和光照能量密度呈正相关。BBR-PDT 可能是通过产生 ROS 引起红色毛癣菌细胞膜破损，从而抑制红色毛癣菌的活性。BBR-PDT 对皮肤感染红色毛癣菌豚鼠有良好的治疗效果，这一结果为治疗皮肤癣菌病提供理论思路和依据。

[关键词] 黄连素；光动力学疗法；红色毛癣菌；活性氧。

阿魏酸脂质体纳米颗粒的非临床急性毒性研究 及阿魏酸的网络药理学分析

黄浩^{1, 2*}, 轩艳³, 马增春^{4*}

(1.内江市第一人民医院, 内江, 四川, 614006; 2.成都市青白江区第一人民医院, 成都, 四川, 610399; 3.北京大学口腔医院, 北京, 100081; 4.军事医学研究院, 北京, 100850)

[摘要] **背景:** 阿魏酸(FA)对多种疾病展现出治疗潜力, 但其临床应用受到生物利用度低和溶解度差的限制。本研究旨在开发和评估阿魏酸载脂质纳米粒(FA-LNPs)作为一种安全有效的药物递送系统。**方法:** 通过 Morris 水迷宫实验确定了 FA 对脂多糖(LPS)诱导的 Sprague-Dawley 大鼠认知障碍的有效浓度。采用主动载药法制备 FA-LNPs, 并通过超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)、动态光散射(DLS)和透射电子显微镜(TEM)进行表征。对 FA-LNPs 进行了急性毒性和药代动力学评估。我们对三个关键脑区进行了全面评估: 纹状体、海马和小脑-脑干。选用不同的染色对神经元、轴索、髓鞘、星形胶质细胞、小胶质细胞进行进一步分析; Luxol fast blue staining 染色用于髓鞘病变评价, GFAP 染色用于星形胶质细胞增生评价, IBA-1 染色用于小胶质细胞活化评价, Fluor-Jade(FJ)染色用于检测神经退行性病变评价。实施了短期给药方案以评估短期药效。进行网络药理学分析和反向药靶, 以阐明 FA 在多种疾病和靶点上的潜在作用机制。**结果:** 成功制备了具有高包封效率(>80%)和均匀粒径(<200 nm)的 FA-LNPs, 并实现了工艺扩大。Morris 水迷宫实验验证 FA 的有效浓度为 50 mg/kg 左右, FA-LNPs 通过主动载药法达到 46.5 mg/kg。毒理学研究表明安全性良好。体内平均驻留时间 MRT_{0-t} 为 2.83 ± 0.792 h, 但消除半衰期 $t_{1/2}$ 为 12.8 ± 1.88 h, 体内清除率 $CL_{L/F}$ 为 0.535 ± 0.0851 L/h/kg。短期给药未引起显著的神经保护作用。网络药理学分析在阿尔茨海默病、慢性阻塞性肺病(COPD)和动脉粥样硬化中识别出 141 个潜在靶点和 118 条显著富集的通路。关键靶点包括 EGFR、ESR1、PTGS2、CTNNB1 和 STAT3 等, 分子对接确认了中等到强的结合亲和力。**结论:** FA-LNPs 提高了 FA 的生物利用度, 无明显的系统毒性或神经毒性。虽然短期使用安全, 但可能需要更长的治疗时间才能观察到潜在的神经保护益处和毒性。本研究为全面评估阿 FA-LNPs 的生物安全性, 特别是其在神经系统中的长期效应, 为其潜在的临床应用提供重要科学依据。

[基金项目] 四川省医学会 (编号: S22025)

[通讯作者] 黄浩, E-mail: happyhh758@163.com; 马增春, E-mail: mazchun@139.com

用于高通量筛选潜在肺纤维化毒性药物的

PPAR γ 响应荧光素酶报告系统的构建与应用

林学洋, 杨屹, 王永安*, 骆媛*

(军事医学研究院, 北京, 100850)

[摘要] **目的:** 肺纤维化(Pulmonary Fibrosis, PF)是一种潜在致命的呼吸系统疾病,其特征为肺间质中瘢痕组织的过度积累。过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ)是一种 II 型核受体,它通过与位于靶基因启动子上游的 PPAR γ 反应元件(PPRE)结合,调控下游靶基因的转录,进而调节多种生理活动。本研究旨在基于 PPAR γ 反应荧光素酶报告系统构建一个高通量筛选模型,用于鉴定潜在诱导肺纤维化的药物。我们对该细胞模型的可靠性进行了严格验证,以确保其在识别潜在肺纤维化毒性药物方面的有效性。**方法:** 本研究构建了一个包含 PPAR γ -luciferase 报告基因的慢病毒载体,将 PPAR γ 和其反应元件 PPRE 克隆于荧光素酶基因上游区域。该慢病毒载体被转染至人肺泡上皮 A549 细胞中,以建立一个稳定表达的 PPAR γ 报告系统。我们使用已知具有肺纤维化毒性的药物对该细胞模型进行了测试,并通过分子操作环境(MOE)和表面等离子体共振(SPR)技术,进一步验证这些药物与 PPAR γ 受体的结合特性。**结果:** 本研究成功构建了携带 PPAR γ 和 PPRE 的荧光素酶报告基因质粒,并通过双荧光素酶报告实验验证了 PPAR γ 和 PPRE 启动子的转录激活能力。我们创建了携带该报告基因的慢病毒载体,并成功建立了稳定表达 PPAR γ 的 A549 细胞系(A549-PPAR γ)。测试显示,四种已知肺纤维化毒性药物(博来霉素、白消安、胺碘酮和顺铂)显著抑制了荧光素酶的活性。此外,SPR 分析结果表明,这些药物与 PPAR γ 的结合具有浓度依赖性,MOE 分子对接实验进一步确认了它们与 PPAR γ 之间的高结合亲和力。**结论:** 本研究成功开发了一个基于 PPAR γ 反应荧光素酶报告系统的高通量筛选模型,并建立了稳定表达该报告基因的 A549-PPAR γ 细胞系。通过对该模型的验证,证明其能够有效筛选并鉴定具有肺纤维化毒性的药物。借助计算机模拟和体外实验,我们进一步揭示了这些药物与 PPAR γ 的相互作用机制。本研究为肺纤维化相关信号通路的探索和潜在药物靶点的发现提供了新的思路。未来,这一模型有望在更多细胞筛选体系中得到应用,帮助筛选肺纤维化毒性药物,并为开发治疗肺纤维化的新型药物奠定基础。

基于生物活性的法半夏品质评价

龙熠, 邓军, 丑凌芸, 蒙湘, 雷雨晨, 黄先菊*

(中南民族大学药学院, 武汉, 430074)

[摘要] **目的:** 本研究以法半夏(*Rhizoma Pinelliae*)肺保护的传统功效和现代药理学研究为基础, 观察法半夏对体外慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)细胞模型和正常肺上皮细胞(Beas-2B)的影响, 拟通过体外构建 COPD 细胞模型, 基于毒效应指数、TOPSIS 法等综合评价六批不同法半夏活性品质, 结合 TOPSIS 分析方法, 综合评价各指标并进行排序, 得到不同法半夏抗 COPD 的优势批次, 旨在为该炮制品的质量评控提供新思路。**方法:** 不同批次法半夏抗 COPD 优效性评价: 以正常肺上皮细胞(Beas-2B)为研究对象, 使用香烟烟雾提取物(Cigarette Smoke Extract, CSE)和脂多糖(Lipopoly Saccharide, LPS)建立 COPD 模型, 以生半夏为对照, 使用 MTT 法测定六种不同批次法半夏(①湖北法半夏-2020912100; ②甘肃法半夏-20200901; ③湖北法半夏-2020010100; ④四川法半夏-191101; ⑤湖北法半夏-2221110108; ⑥湖北法半夏-2019910100)醇提取物的细胞毒性和药效。计算 EC_{50} 、 IC_{50} 及毒效应指数, 并采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)试剂盒测定相关指标, 最后通过离散型逼近理想解排序法(Technique for Order Preference by Similarity to an ideal Solution, TOPSIS)对六批法半夏抗 COPD 的优效性进行排序。**结果:** 在给予 LPS 和 CSE 后, 细胞活力下降、SOD 含量增加, 说明细胞受到损伤并有氧化应激的发生; qRT-PCR 结果显示 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 的水平显著上调, 说明细胞产生了严重的炎症反应。而经不同批次半夏/法半夏醇提物干预后, 上述反应皆有不同程度的逆转, 即细胞活力升高, SOD 含量下降, 炎症因子表达下调, 说明半夏/法半夏醇提物具有不同程度的抗炎、抗氧化应激能力。根据不同半夏的毒效应指数值, 得出如下细胞毒性排序: 生半夏>法半夏④>法半夏①>法半夏⑤>法半夏③>法半夏⑥>法半夏②。将所有数据进行归一化处理, 通过 TOPSIS 分析得到效价综合排序, 结果如下: 法半夏⑥>法半夏⑤>法半夏②>法半夏①>法半夏③>生半夏>法半夏④。

[基金项目] 中南民族大学学术创新团队经费项目资助(项目号: XTZ24025)

[第一作者] 龙熠(2001-), 女, 硕士, 研究方向: 民族药物药理学与毒理学研究, E-mail: 1941209762@qq.com

[通讯作者] 黄先菊(1972-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 民族药物药理学与毒理学研究, E-mail: xianju@mail.scuec.edu.cn

结论：不同批次法半夏对 COPD 细胞模型均有一定治疗效果，经过 TOPSISI 法可比较不同批次法半夏的活性品质。

[关键词] 法半夏；肺上皮细胞；慢性阻塞性肺疾病

基于网络药理学及实验验证探讨马鞭草治疗

药物性肝损伤的作用机制

陈金香¹, 李汉伟¹, 宋亚刚¹, 朱平生¹, 苗明三^{1, 2*}, 乔靖怡^{1, 2*}

(1.河南中医药大学中医药科学院, 河南 郑州 450046; 2.豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046)

[摘要] **目的:** 药物性肝损伤是指因不当使用各类化学药物、中草药、生物制剂等引起的肝细胞受损或功能异常, 严重时可能会导致急性肝衰竭。马鞭草具有抗炎、镇痛、镇咳、抑制生育、促进乳汁分泌以及抗肿瘤等药理作用, 在全球资源丰富, 有广阔的应用前景。本试验利用网络药理学方法研究马鞭草抗肝损伤的主要活性成分、靶点和通路, 分析其抗肝损伤作用机制, 并通过动物实验验证。**方法:** 利用 TCMSP 数据平台, 挖掘马鞭草和肝损伤相关的活性成分和作用靶点, 并进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。最终, 通过体内实验验证马鞭草发挥保肝作用的机制。将 60 只小鼠随机分为空白对照组, 模型组, 阳性药组 (联苯双酯, 7.5mg/kg), 马鞭草提取物高、中、低(200, 100, 50 mg·kg⁻¹)剂量组, 每组 10 只。给药组按 10 ml /kg 体积分别 ig 不同剂量马鞭草提取物和联苯双酯滴丸, 正常对照组和模型组每日 ig 给予相同体积的蒸馏水。每天给药 1 次, 连续给药 7d。除空白组外, 其余组均于末次给药后 6h 给予对乙酰氨基酚 500mg/kg 灌胃, 造成急性肝损伤, 空白组灌胃给予同体积的蒸馏水。禁食不禁水, 于末次给药 12h 后取结果。试验期间检查指标包括小鼠一般状况、体重、血生化、大体解剖观察、脏器指数、组织病理学检查。**结果:** 网络药理学分析发现 AKT1、TP53、TNF、IL6、VEGFA、CASP3 等蛋白活性较高, 可能是蛋白互相作用网络中的核心靶点。动物实验结果显示, 与模型组相比, 马鞭草高剂量组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、ALT、AST 含量显著降低($P<0.01$), 肝脏中的 SOD 含量显著增高($P<0.01$); HE 染色结果显示模型组小鼠肝索排列紊乱, 胞质出现空泡, 细胞核碎裂, 可见大量炎症细胞浸润, 有明显的纤维组织增生和胶原沉积, 而给药组均有不同程度

[基金项目] 岐黄学者支持项目(国中医药人教函2022-6); 国家自然科学基金面上项目(82074340) ; 河南省博士后科研资助项目(284330) ; 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(242102310534) ; 河南省中医学“双一流”创建科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-7-25)

[第一作者] 陈金香, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理, E-mail: cjx13298154130@163.com

[通讯作者] 乔靖怡, E-mail: qiaojingyi618@126.com; 苗明三, E-mail: miaomingsan@163.com

改善；RT-qPCR 结果可见，模型组小鼠的 JUN、FOS mRNA 相对表达量显著提升($P<0.01$)，给药组表达量显著抑制($P<0.01$)；免疫组化结果显示模型组 AKT1、NF κ B 表达显著增加($P<0.01$)，给药组均有所改善($P<0.01$)。**结论：**马鞭草作为民族药材，有很高的药用价值，通过本次实验发现，马鞭草中的香叶木素、 β -谷甾醇、山奈酚、木犀草素、 β -胡萝卜素、槲皮素成分可作用于 TNF、IL6、AKT1 等靶点发挥保肝作用，可能与下调 PI3K/AKT1/NF κ B 调控的炎症通路有关。

[关键词] 中药、肝损伤、马鞭草，PI3K/AKT1/NF κ B

亚油酸纳米乳的口服吸收及其对急性肺损伤的作用机制研究

廖秋月¹, 朱红霞¹, 刘雅楠¹, 赵凯洪¹, 张志姗¹, 张炜², 李小军^{1*}

(1.中南民族大学药学院, 湖北武汉, 430074; 2.广州国家实验室, 广东广州, 510006)

[摘要] **目的:** 制备一种亚油酸或含亚油酸食用油纳米制剂, 用以治疗急性肺损伤(ALI), 实现有效提高亚油酸的口服吸收利用度, 并探究其对 PPAR γ 信号通路的影响。**方法:** 将亚油酸或亚油酸含量较高的食用油, 如红花籽油和核桃油, 通过高压均质法制备纳米制剂, 利用马尔文粒度仪测量其粒径、电位及 PDI, 用扫描透射电镜对制剂粒度分析。以脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症及小鼠 ALI 为模型进行体内外研究。细胞水平, CCK-8 法检测不同浓度的纳米亚油酸对细胞的毒性作用; 运用 Griess 和 qPCR 法检测其对细胞上清液中 NO、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2 含量的影响。动物水平, 采用气道滴入脂多糖的方法建立小鼠 ALI 模型, 以腹腔注射和灌胃的方法给予药物, 通过对肺组织 H&E 染色、肺湿干重比、BALF 中蛋白浓度、总细胞数、髓过氧化物酶活性等指标进行检测, 评估药物对 LPS 所致小鼠 ALI 的保护作用。基于网络药理学预测亚油酸治疗急性肺损伤的关键靶标和信号通路, 通过检测 PPAR γ 抑制剂 GW9662 和纳米亚油酸联合使用对 LPS 诱导小鼠肺损伤各项指标变化的影响, 验证 PPAR γ 通路在纳米亚油酸抗炎中的作用。以香豆素-6 和尼罗红示踪纳米乳在体内外的吸收情况, 采用肠结扎模型评估纳米乳的肠吸收水平, 免疫荧光检测肠道紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达, 通过检测血液中的亚油酸含量、肠组织 H&E 染色等方法进一步探究纳米乳的肠吸收机制, 建立 Caco-2 细胞模型分析纳米乳的细胞摄取情况。**结果:** 本研究制备得到乳白纳米制剂, 测定亚油酸、红花籽油和核桃油纳米制剂的平均粒径分别 210 ± 5.4 nm、 211.8 ± 0.96 nm、 211.5 ± 1.75 nm, Zeta 电位分别为 -28.4 ± 4.3 mV、 -34.5 ± 0.49 mV、 -31.9 ± 0.69 mV, PDI 分别为 0.116、0.128、0.105。在 LPS 诱导的细胞炎症模型中, 亚油酸纳米制剂能够降低细胞 NO 的分泌, 减少炎症因子(包括 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2)表达; 在 LPS 诱导的小鼠 ALI 模型中, 灌胃纳米亚油酸可降低肺组织湿干重比、BALF 蛋白含量、总细胞数和 MPO 活性; 网络药理学显示亚油酸可能通过作用于 PPAR γ 改善 ALI, 动物实验发现亚油酸的抗炎作用可以被 PPAR- γ 拮抗剂 GW9662 逆转。此外, 在肺损伤条

[通讯作者] 李小军, E-mail: lxj@mail.scuec.edu.cn, Tel: 18971395100

件下，小鼠肠组织通透性增加，进入血液的药物增多。但在该进程中，肠组织不发生器质性病变，肠上皮对药物的吸收或与紧密连接蛋白的表达有关。**结论：**本研究通过高压均质法制得稳定的亚油酸和含亚油酸的食用油纳米制剂；灌胃和腹腔注射纳米亚油酸均对 LPS 诱导的 ALI 有明显的治疗作用，且灌胃给药优于腹腔注射；纳米亚油酸对 ALI 小鼠发挥保护作用的机制可能与激活 PPAR γ 信号通路有关；纳米亚油酸可在体内促进肠道吸收，提高跨膜转运。

泽泻改善胆管结扎致小鼠肝纤维化的药效与机制研究

董跨[#], 张祎[#], 唐莹莹, 王汛江, 余婷, 丁丽丽, 熊爱珍^{*}, 谷丽华,
杨莉^{*}, 王峥涛

(1.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暨国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海, 201203; 2.上海中药标准化研究中心, 上海, 201203)

[摘要] **目的:** 泽泻(*Alismatis Rhizoma*)有悠久的药用历史, 近年来泽泻及其复方在治疗胆汁淤积性肝损伤、药源性肝损伤、非酒精性脂肪肝等肝脏疾病方面的报道逐渐增多。肝纤维化(Liver fibrosis)是由多种致病因素导致的慢性肝损伤, 迄今尚无特异有效的药物用于临床治疗。本研究通过胆管结扎(Bile duct ligation, BDL)构建肝纤维化模型, 来评价泽泻改善肝纤维化的药效作用, 发掘药效物质基础, 并利用基因敲除小鼠探讨其作用机制, 为泽泻的临床应用提供理论依据, 为临床肝纤维化治疗提供新的候选药物和数据支撑。**方法:** 利用总胆管结扎术(Bile duct ligation, BDL)建立小鼠肝纤维化模型, 设立假手术组、模型组、不同剂量泽泻醇提取物治疗组、奥贝胆酸治疗组; 手术后分别给予相应药物, 通过观察小鼠状态、血清生化指标、肝组织病理切片等评价泽泻提取物对 BDL 小鼠肝纤维化的治疗作用, 利用 LC-MS 检测肝脏和血清中胆汁酸的含量, 采用 Western blot 和 RT-qPCR 法检测纤维化及胆汁酸代谢相关蛋白和基因的表达。进一步根据泽泻醇提取物中泽泻三萜含量, 考察主要泽泻三萜 23-乙酰泽泻醇 B(AB23A)治疗 BDL 致小鼠肝纤维化的量-效关系, 并利用基因敲除小鼠对 AB23A 改善 BDL 小鼠肝纤维化的关键靶点进行验证。**结果:** 血清转氨酶活力和肝组织切片检查表明, 相比于 BDL 组, 泽泻醇提取物小组的肝脏损伤明显减轻; 肝组织内的 HYP 含量和 α -SMA 相对表达水平降低, 这表明泽泻具有改善 BDL 小鼠肝纤维化的作用; 此外, 在显著改善 BDL 小鼠肝损伤和纤维化的同时显著改善了胆汁酸的代谢紊乱, 肝脏和血清内的胆汁酸水平大幅降低, 胆汁酸代谢相关基因 *Fxr*, *Cyp7a1* 等的表达水平趋向正常组小鼠。进一步研究发现, 泽泻 AB23A(20, 40 mg/kg)能显著提高 BDL 小鼠的生存质量, 显著改善 BDL 小鼠胆汁淤积、肝损伤与肝纤维化, 回调 *Fxr* 及其下游基因的表达, 且具有一定的剂量依赖性。分子对接技术发现 AB23A 可与 FXR 稳定结合, 具有较好的 *Fxr* 激动活性; 利用 *Fxr* 敲除

小鼠进行试验，发现 AB23A 不能改善 FXR 敲除小鼠 BDL 后的肝纤维化，证实 FXR 是 AB23A 改善 BDL 肝纤维化的关键靶点。**结论：**泽泻可以显著改善 BDL 诱导的小鼠肝损伤、胆汁淤积与肝纤维化，泽泻三萜类化合物 AB23A 是其主要药效成分，可通过激动 FXR 发挥药效。

基于人源化 UGT1A4 小鼠模型的泽泻三萜 AB23A 降低 千里光碱肝毒性的研究

王金圆[#], 张兆兰[#], 贾夏丽, 陈岩, 丁丽丽, 董跨, 熊爱珍*, 王长虹,
杨莉*, 王峥涛

(1.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暨国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海, 201203; 2.上海中药标准化研究中心, 上海, 201203)

[摘要] **目的:** 人 UGT1A4 是催化季胺生物碱发生 *N*-葡萄糖醛酸化代谢的主要代谢酶之一, 但在常用的毒性评价模式动物如小鼠中为不表达的假基因, 可能会导致对季胺生物碱如吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs) 临床前代谢研究与临床数据的差异。PAs 是目前已知肝毒性最强的植物毒素, 误服误用菊三七等含 PA 的中草药等是导致我国临床肝窦阻塞综合征的主要原因, 至今缺乏有效的治疗药物。课题组前期研究发现泽泻可显著改善肝毒性 PA 千里光碱诱导的肝损伤, 本研究以代表性泽泻三萜 AB23A 为研究对象, 结合体内外研究探讨其对千里光碱毒代动力学行为的影响, 探讨泽泻三萜 AB23A 降低 PA 毒性的代谢机制。**方法:** 人源化 UGT1A4 小鼠单次灌胃千里光碱 (50 mg/kg) 造成急性肝损伤模型, 灌胃给药 AB23A (20 mg/kg) 后收集给药后 24 小时内不同时间点的血液, 并于给药 24 小时后收集肝脏样本, 利用液相色谱-质谱联用技术进行原型及主要代谢物的含量分析, 计算其毒代动力学参数; 并检测血清转氨酶活力和肝组织切片, 分析其毒性差异。利用肝微粒体、原代肝细胞进行体外代谢及细胞毒性实验, 进一步明确 AB23A 对千里光碱代谢的影响。**结果:** AB23A 可降低千里光碱对人源化 UGT1A4 小鼠的肝毒性、降低毒性代谢标志物含量, 影响千里光碱在人源化 UGT1A4 小鼠体内的毒代动力学行为 (降低千里光碱代谢致毒产物的系统暴露量并增加代谢减毒产物的系统暴露量); AB23A 可抑制千里光碱代谢活化关键酶 CYP3A4 减少毒性代谢产物的生成, 但并不能促进千里光碱在人肝微粒体中代谢解毒产物的生成。以上研究提示 AB23A 主要通过抑制千里光碱代谢活化, 未发生代谢活化的千里光碱进行 *N*-葡萄糖醛酸化代谢而加速排出体外解毒, 最终影响千里光碱在人源化 UGT1A4 小鼠体内代谢致毒-解毒过程平衡而发挥药效。**结论:** 本研究首次基于人源化 UGT1A4 小鼠研究了 PA 的减毒策略, 发现泽泻三萜 AB23A 可调节千里光碱代谢关键酶和药物转运体, 影响千里光碱代谢平衡从而降低其肝毒性, 为探讨基于代谢性相互作用的含千里光碱等 PA 中草药的减毒策略及临床合理用药提供参考。

[基金项目] 国家自然科学基金(81603384); 上海市自然科学基金(20ZR1473300, 23ZR1463200)
[通讯作者] 熊爱珍, E-mail: aizhenxiong@shutcm.edu.cn; 杨莉, E-mail: yl17@shutcm.edu.cn

葡萄糖醛酸化胆汁酸分析方法的建立及其在吡咯里西啶生物碱毒性评价中的应用

王金圆[#], 黄幼媚[#], 张兆兰, 唐莹莹, 丁丽丽, 熊爱珍^{*}, 杨莉^{*}, 王峥涛

(1.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暨国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海, 201203; 2.上海中药标准化研究中心, 上海, 201203)

[摘要] **目的:** 胆汁酸葡萄糖醛酸化代谢是胆汁酸重要的二相代谢解毒途径, 与肝损伤的发生发展密切相关, 已被报道作为临床胆汁淤积性肝病的潜在生物标记物。然而, 该类胆汁酸在生物样本中含量低, 且存在多种同分异构体, 亟需建立灵敏、准确的分析方法。本研究利用 LC-MS 建立生物样本中葡萄糖醛酸化胆汁酸的定性定量分析方法, 并以肝毒性吡咯里西啶生物碱(PA)致肝窦阻塞综合征(HSOS)为代表性模型, 发掘 PA 致 HSOS 的特异性胆汁酸生物标记物。**方法:** 采用“特征诊断离子-能量分辨质谱-定量结构保留关系”的多策略集成方法建立葡萄糖醛酸化胆汁酸同分异构体的分析方法, 基于 OCE 值分辨不同位点的胆汁酸葡萄糖醛酸苷; 基于 LC-QTRAP-MS 建立人体主要胆汁酸葡萄糖醛酸化代谢产物及原型胆汁酸在血浆、粪便中的含量测定方法。收集临床菊三七致 PA-HSOS 患者及健康志愿者的血清和粪便, 进行胆汁酸靶向代谢组分析, 发掘潜在的生物标志物。**结果:** 基于能量分辨质谱和保留时间相结合的鉴定策略, 对人体主要胆汁酸(CA、CDCA、LCA、DCA 和 HDCA)的葡萄糖醛酸化代谢产物进行鉴定, 发现其主要结合位点为 3-OH 和 24-OH, 同一胆汁酸 3-OH 葡萄糖醛酸化的产物 OCE 值更大, 色谱保留更弱。以 CA-d4 为内标, 以 SPE 小柱进行样品预处理, C18 色谱柱进行分离 ESI-模式下采用 MRM 监测, 建立 12 种主要胆汁酸及其葡萄糖醛酸化产物的定量分析方法, 方法灵敏(LLOQ 达 0.03 ng/mL)、准确(回收率 86%-118%), 对临床样本进行分析, 结合多元统计分析发掘出 CDCA-3G, CDCA-24G, CA-24G 为潜在的生物标志物, 并建立诊断模型($Y = -29.923 + 0.284 \text{ CDCA-3G} + 47.777 \text{ CDCA-24G} + 7.434 \text{ CA-24G}$)用于 PA-HSOS 的诊断。**结论:** 本研究对胆汁酸葡萄糖醛酸苷异构体进行了有效的辨识鉴定, 并建立了人体微量胆汁酸葡萄糖醛酸苷的定量分析方法, 筛选出区分健康人类和 PA-HSOS 患者 BA-G 生物标志物, 建立了基于胆汁酸葡萄糖醛酸苷生物标志物 HSOS 疾病预测诊断模型。研究为利用胆汁酸代谢组进行“有毒”中药安全性评估提供方法学支持和数据参考。

[基金项目] 国家自然科学基金(81603384); 上海市自然科学基金(20ZR1473300, 23ZR1463200)

[通讯作者] 熊爱珍, E-mail: aizhenxiong@shutcm.edu.cn; 杨莉, E-mail: yl17@shutcm.edu.cn

高原气虚血瘀证动物模型研究进展

王智星^{1, 2}, 黄丽郡^{2, 3}, 沈宝英^{2, 4}, 赖成材^{2*}, 高月^{1, 2, 3, 4*}

(1.青海大学, 青海, 810016; 2.军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京, 100850;
3.广东药科大学, 广东, 510006; 4.天津中医药大学, 天津, 301617)

[摘要] **目的:** 中医学说认为高原病主要由外环境清气缺乏、人体宗气不足导致肺部及其他脏腑出现气虚血瘀等损伤所导致, 即高原病主要以高原气虚血瘀证为主。为了规范和系统化高原气虚血瘀证的动物模型研究, 确保研究结果的可重复性和可比性, 通过总结归纳近年平原和高原气虚血瘀证动物模型制备和反证药物的相关研究, 制定统一的高原气虚血瘀证动物模型构建标准, 为研究中医理论指导下的高原病发生机制及中医药干预理论提供参考。**方法:** 检索近20年中国知网、万方数据、维普网中已发表的平原和高原气虚血瘀证动物模型制备和治疗药物文献, 对其进行比较和总结。**结果:** 不管平原和高原, 气虚血瘀证绝不等于气虚证加血瘀证的特点, 气虚与血瘀既有因果关系, 更有权重之不同。高原地区清气稀薄, 寒冷的气候特点易导致气虚证, 外环境低氧是导致高原气虚证发生的根本原因, 气虚无力血运失常, 从而形成血瘀, 同时高原气候寒冷可使血流缓慢, 进一步加重缺氧, 使气虚血瘀证更加严重, 从而形成具有高原特点的气虚血瘀证, 即高原气虚血瘀证。高原气虚血瘀证相关性研究较少, 需要统一其动物模型制备方法, 完善其诊断和评价体系, 开发能够评价其治疗药物的反证方剂。**结论:** 目前高原气虚血瘀证的治疗药物在临床研究上存在不足, 因此开展高原病有效防治药物的研究非常必要。而这些研究的基础就是建立复现性好、评价体系健全的高原气虚血瘀证动物模型。临床疾病诊疗正逐渐走向规范化, 而动物模型的研究也离不开规范化。理想的动物模型应是规范化的, 相关模型不但能体现中医证候“但见一症便是”的本质特征, 同时又能够准确地重复再现。这就要求我们要有规范、科学的评价标准。模型研究设计遵循“因、脉、证、治”的思路。其中“脉”应是证候模型评价的较直接、较直观、较重要的指标, 只有在模型表征符合中医证候的基础上, 才能确认这种模型的证候性质和部位, 而“治”的重点在方, 以方测证则是证候模型验证的一个重要的环节, 以期建立更好的高原气虚血瘀证动物模型, 为深入研究高原病的防治药物及发病机制的提供基础。

[关键词] 高原气虚血瘀证; 动物模型; 多因素复合造模; 反证中药

[第一作者] 王智星, E-mail: wzx98748@163.com

[通讯作者] 赖成材, E-mail: asa2057516@163.com; 高月, E-mail: gaoyue@bmi.ac.cn

仙茅的化学成分、药理及毒理研究进展

孟晶, 梁爱华*

(中国中医科学院中药研究所 北京 100700)

[摘要] 摘要: 仙茅为石蒜科多年生草本植物仙茅 *Curculigo orchioides* Gaertn. 的干燥根茎, 又名地棕、婆罗门参、独茅根、茅爪子等。仙茅的药用历史悠久, 为我国传统药用植物。2020 版《中国药典》收载其味辛, 性热, 有毒, 归肾、肝、脾经。具有补肾阳, 强筋骨, 祛寒湿的药效作用。常用于阳痿精冷, 筋骨痿软, 腰膝冷痛, 阳虚冷泻。本文通过查阅历代本草及医学典籍, 对仙茅药材基原、产地、炮制、毒性、功效主治及禁忌等方面进行系统的梳理与本草考证, 在此基础上, 通过近现代文献的整理, 对仙茅的化学成分进行归类探讨, 明确其药理活性作用及毒性作用, 以期在临床应用中对其毒性进行科学控制并驾驭, 为后续含有仙茅的经典名方的开发利用提供参考依据。通过历代本草考证发现, 仙茅始载于南北朝时期炮制专著《雷公炮炙论》, 首次在《海药本草》中对其形状和名称做出解释, 叶似茅, 故名仙茅。其虽别名众多, 但一直沿用“仙茅”为正名。其药材来源主要为仙茅 *Curculigo orchioides* 和大叶仙茅 *Curculigo capitulata* (Lour.) Kuntze 的干燥根茎, 现以前者为主要品种来源, 主要产自我国西南地区、东南亚各国及日本等地。其炮制历史悠久, 历代有药汁制、米泔水制、酒浸、酒浸焙干、酒蒸等多种方法, 现以酒炙为主。历代本草和现行药典均记载其为补益类中药中唯一一味有毒中药。长久以来, 虽对仙茅毒性的认识有“有毒”、“小毒”、“微毒”等差异, 但其一直都在有毒的概念下使用。其性味归经与功能主治古今基本一致, 记载其为补肾壮阳的代表药物, 主治阳痿精寒、腰膝风冷、筋骨痿痹、肾阳虚衰、阳痿不举、宫冷不孕及风寒湿痹、肢体麻木、腰膝酸软诸症。在禁忌方面, 主要是结合对其辛热特性的认识, 凡大热证候忌同用。饮食方面禁与牛乳、牛肉同食。通过查阅梳理大量文献发现仙茅的化学成分主要分为: 酚及酚苷类、木脂素及其苷类、三萜及其苷类、黄酮类、生物碱、脂肪族化合物、多糖和其他类化合物。其现代药理作用主要为: 抗氧化、清除自由基、抗炎、调节免疫、抗

[第一作者] 孟晶, 博士后, 通信地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, E-mail: icmmmj@163.com, Tel: 13651307663

[通讯作者] 梁爱华, 研究员, 博士生导师, 通信地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, E-mail: ahliang@icmm.ac.cn, Tel: 13901014419

骨质疏松、抗高血糖、调节生殖系统、调节中枢神经系统等作用。仙茅在临床推荐剂量下并无明显毒性反应，用药相对安全。但长期大量使用可能造成肝脏、肾脏、生殖器官的靶器官毒性。仙茅的化学成分复杂，缺乏可开发利用的科学技术支撑，同时针对其引起毒性作用的成分分析未见明确，仅可推测仙茅的毒性主要由于其辛热之性而引起。有必要进一步采用现代技术表征仙茅辛热之性，阐明毒性物质基础及作用机制，为临床安全有效的应用有毒中药仙茅提供科学依据。

[关键词] 仙茅；基原；化学成分；药理作用；毒性

高原气虚证动物模型研究进展

黄丽郡^{1, 4#}, 王智星^{2, 4#}, 沈宝英^{3, 4}, 赖成材^{4*}, 高月^{1, 2, 3, 4*}

(1. 广东药科大学, 广东, 510006; 2. 青海大学, 青海, 810016; 3. 天津中医药大学, 天津, 301617; 4. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京, 100850)

[摘要] 健康人由平原进入高原后, 会不同程度地出现胸闷气短、神疲乏力、少气或懒言等典型的气虚症状, 具有“动则益甚”的特点。外环境低氧引发的气虚证是其根本病因。自然之气稀薄, 宗气生源匮乏, 导致机体能量代谢及能量物质的缺乏是其基本病机和病理基础。高原气虚证发病率、病情严重程度与海拔高度及移居高海拔地区年限呈正相关, 海拔愈高与心、肺的关系愈密切, 且多具有兼夹血瘀证, 并可夹痰、湿或阴津不足, 一般可分为急性和慢性, 具有个体差异性和可逆性。高原气虚证动物模型相关性研究较少, 且动物模型的制备方法不统一, 骆亚莉等采用了单因素模型的制备, 将KM小鼠置低压氧舱内进行减压低氧暴露, 连续21d, 末次低氧暴露后与对照组小鼠(常氧环境)一起测定相关指标。高原气虚证动物模型虽然大多采用单纯低压低氧寒冷的复合方式制备, 仍存在很多缺陷, 如现代医学及病理学的模型制备方式不符合中医理论的病因病机学说发展规律, 缺乏客观量化指标和中医特色评价体系, 其治疗方案多借鉴了平原气虚证, 同时缺乏反证方剂。对此, 亟需统一高原气虚证动物模型制备方法, 完善其诊断和评价体系, 开发能够评价其治疗药物的反证方剂。同时, 期望能够推动以高原气虚证为基础的高原病及其药物研发的进展。随着高海拔地区的低气压、低氧、低温、强辐射等严重影响了生物的生存与发展, 高海拔缺氧环境相关疾病的研究越来越受到学者关注。其中, 低氧作为主要影响因素可对人体心、肺组织产生较大影响, 使其功能及代谢水平等发生相应变化。在高原环境, 人体容易发生高原气虚证。目前, 对于高原病发病的分子机制已有一定的认识, 但关于高原低氧环境下肺功能及肺缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)表达检测的相关报道较少, 且对肺组织水通道蛋白-5(AQP-5)功能研究尚存在争议。对于高原气虚证动物模型应该采取低压低氧复合模型, 比较化学药物、疲劳以及疲劳+限食等建立气虚证模型

[基金项目] 中国国家自然科学基金(编号: 82204751), 国家中医药管理局创新团队和人才培养计划(编号: ZYYCXTD-D-202207)

[第一作者] 黄丽郡, E-mail: 18054201131@163.com, Tel: 18054201131

[通讯作者] 高月, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药理方向, E-mail: gaoyue@bmi.ac.cn

方法的差异，以期寻找更佳的高原气虚证动物模型造模方法，为高原气虚证动物模型的建立提供实验依据。

[关键词] 高原气虚证；低氧；动物模型；机制

獐芽菜对皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护效应

丑凌芸, 盛望龙, 龙熠, 蒙湘, 雷雨晨, 黄先菊*

(中南民族大学药学院, 武汉, 430074)

[摘要] **目的:** 本研究通过构建 PC12 细胞损伤模型, 评价湖北产獐芽菜(*Swertia bimaculata* (Siebold & Zucc.) Hook. f. & Thomson ex C. B. Clarke, SBH)对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤的保护作用。探究獐芽菜水提物对神经细胞的保护作用及潜在分子作用机制, 旨在为獐芽菜的开发与利用提供理论依据, 充分发挥该药材的临床价值与优势。**方法:** 使用皮质酮(CORT)诱导 PC12 细胞损伤模型, 将处于对数生长期的 PC12 细胞消化离心、稀释到相应的浓度后用于后续实验, 各组按照相应的药物种类和浓度同时给药, 作用 24h 后测定相应的指标。MTT 法检测细胞活力, 以丁螺环酮(BUS)为阳性对照, 探究獐芽菜对 PC12 细胞损伤的保护效应, 收集 PC12 细胞上清液用 ELISA 试剂盒测定各组细胞内环磷酸腺苷(cAMP)水平。使用 TRNzol 试剂提取细胞总 RNA, 以 GAPDH 为参照基因, 采用 qRT-PCR 检测依赖 cAMP 的蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase, PKA)、环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、BDNF 和 5-HT_{1A}R 的 mRNA 水平。**结果:** 皮质酮干预可显著损伤 PC12 细胞, 25 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 獐芽菜对 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 皮质酮诱导的 PC12 细胞具有保护和增殖作用, 且与皮质酮组比较有明显差异。其作用与阳性对照药丁螺环酮一致。与正常组相比, 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 皮质酮诱导的 PC12 细胞内 cAMP 水平显著下降, 獐芽菜低剂量和高剂量干预能不同程度的提高细胞内 cAMP 水平。0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 皮质酮组 PC12 细胞中的 PKA、CREB、BDNF 和 5-HT_{1A}R 的 mRNA 水平较正常组显著上调。与模型组相比, 獐芽菜低剂量和高剂量都能对上述基因组的 mRNA 水平失衡有一定的调节作用。表明獐芽菜能够有效保护 PC12 细胞免受皮质酮诱导的损伤, 其作用机制与调节 cAMP/PKA/CREB/BDNF 通路有关。獐芽菜能够一定程度上促进 5-HT_{1A}R 的转录水平, 发挥神经保护作用。**结论:** 獐芽菜具有良好的神经保护作用。獐芽菜能够有效保护皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤, 其途径

[基金项目] 中南民族大学学术创新团队经费项目资助(项目号: XTZ24025); 湖北省国际合作项目; 中巴共用草药的有效性与安全性研究(2022EHB053)

[第一作者] 丑凌芸(2001-), 女, 硕士, 研究方向: 民族药物药理学与毒理学研究, E-mail: cly010421@163.com

[通讯作者] 黄先菊(1972-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 民族药物药理学与毒理学研究, E-mail: xianju@mail.scuec.edu.cn

可能与作用 cAMP/PKA/CREB/BDNF 通路有关。獐芽菜能够促进 5-HT_{1A}R 的转录水平，其作用与阳性对照药丁螺环酮一致，进而发挥缓解焦虑障碍作用。

[关键词] 獐牙菜；神经细胞；焦虑障碍；神经炎症

微流控精密肝切片体系与静态精密肝切片体系在肝细胞功能、 形态和代谢能力的比较研究

杨云*, 林嘉伟*, 夏冰, 宫平, 齐莹, 刘婷#, 杨依霏#

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100029)

[摘要] **目的:** 基于已建立的微流控精密肝切片培养体系(简称微流控体系)与静态培养精密肝切片体系(简称静态体系), 对体系中的肝细胞功能、形态和代谢能力进行比较, 筛选出更适用于中药毒理学研究的体外培养技术体系。**方法:** 通过对微流控和静态体系的精密肝切片中肝细胞功能相关生化指标、mi-122R 基因和 CYP450 基因转录水平的检测及组织学和超微结构观察, 比较微流控和静态体系中肝细胞的功能、形态和代谢能力, 以期筛选出更适用于中药毒理学研究的体外培养体系。**结果:** 生化结果显示, 微流控体系培养液中的碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)、谷丙转氨酶(Alanine Aminotransferase, ALT)、乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)等肝细胞损伤指标水平显著低于静态体系, 且微流控与静态体系组间差异显著($P < 0.01$, $P < 0.001$)。微流控体系培养液中肝脏合成能力相关指标: 甘油三酯(Triglycerides, TG)、总蛋白(Total Protein, TP)、胆固醇(Cholesterol, CHO)和总胆汁酸(Total Bile Acids, TBA)的含量显著高于静态体系, 且组间差异显著($P < 0.001$)。组织学观察发现, 微流控体系中, 精密肝切片的组织结构在培养 24 h 后, 肝组织结构未见显著异常; 培养 3 天后, 肝细胞肿胀, 肝窦扩张, 局灶性细胞核消失; 培养 5 天后, 肝小叶结构尚存, 但大面积细胞核消失。静态体系中, 精密肝切片的组织结构在培养 6 h 后, 肝组织结构未见显著异常; 培养 24 h 后, 肝窦扩张, 局灶性细胞核消失; 培养 3 天后, 大面积细胞核消失, 肝细胞坏死。电镜观察发现, 微流控体系中, 培养 6 h 后, 精密肝切片中肝细胞超微结构未见明显异常; 培养 24 h 后, 肝细胞线粒体嵴减少, 双层膜结构模糊; 培养 3 天后, 肝细胞大部分线粒体嵴消失, 内质网排列紊乱。静态培

[第一作者] 杨云, 硕士, 从事毒理学研究, Tel: 010-84252832-2231, E-mail: leyla20000219@163.com;

林嘉伟, 硕士, 从事毒理学研究, Tel: 010-84252832-2231, E-mail: Jwlin730@163.com

[通讯作者] 杨依霏, 博士, 副研究员, 从事中药药理毒理学研究, Tel: 010-84252832-2231, E-mail:

yfyang@icmm.ac.com;

刘婷, 硕士, 研究员, 从事中药药理毒理学研究, Tel: 010-84252832-2209, E-mail:

tliu@icmm.ac.cn

养体系中,培养 2 h 后,精密肝切片肝细胞超微结构未见显著异常;培养 6 h 后,线粒体肿胀,嵴减少,细胞质电子密度不均匀;培养 12 h 后,线粒体嵴明显减少或消失,双层膜结构模糊,内质网扩张,形成空洞。Real-time qPCR 结果显示,微流控体系培养的肝切片在 6 小时后 mi-122R 基因转录水平开始下降,下降幅度达到 91.33%,而静态体系中的肝切片在 2 小时后 mi-122R 基因转录水平即出现了显著下降,且微流控和静态体系组间分析差异显著($P<0.001$)。对不同培养体系中精密肝切片的 CYP3A4、CYP1A2、CYP2E1 基因 mRNA 水平检测发现,随着培养时间的延长,CYP3A4、CYP1A2、CYP2E1 mRNA 水平均呈现下降趋势。微流控体系精密肝切片的 CYP3A4、CYP1A2、CYP2E1 mRNA 水平普遍高于静态培养体系,其中,CYP1A2 mRNA 水平在微流控和静态体系组间分析具有显著差异($P<0.01$)。结论:经过对不同体系培养的精密肝切片肝细胞功能、形态与代谢能力的综合评价,与静态体系相比,微流控体系中肝细胞的功能损伤更小、结构相对完整、代谢能力更强。微流控体系更利于精密肝切片的培养。

[关键词] 微流控肝芯片;精密肝切片;中药毒理学;培养体系评价

三种胆红素检测方法在中药色素干扰下的血清样本中的准确性评价

张海静, 夏冰, 赵春晖, 张国壮, 吴哲, 刘婷*

(中国中医科学院中药研究所, 北京, 100007)

[摘要] **目的:** 本研究旨在探讨中药中天然色素对血清样本颜色的影响及其对胆红素检测的潜在干扰。由于这些色素可能导致胆红素水平的假性升高, 我们对比了重氮试剂法、钒酸盐氧化法和胆红素氧化酶法三种不同胆红素检测方法的准确性, 以期为临床检验提供参考。**方法:** 本试验采用安全评价中心收集的重复给药毒性试验血清样本。将 128 只SD大鼠通过分层随机法分为四组, 包括对照组和三个不同剂量的实验组。对照组给予等体积超纯水, 而实验组则给予不同浓度的含栀子方剂, 持续给药 4 周。随后, 我们采用上述三种方法检测血清总胆红素含量, 并按性别进行统计分析。**结果:** 随着给药剂量的增加, 血清样本颜色出现剂量依赖性的黄色加深。重氮试剂法检测结果显示, 与对照组相比, 实验组大鼠血清总胆红素含量呈现剂量依赖性升高。低、中、高剂量组雄鼠总胆红素升高幅度分别为+46%、+117%、+254%, 雌鼠总胆红素升高幅度分别为+45%、+126%、+252%, 在统计学上均具有显著性差异。钒酸盐氧化法也显示了类似的趋势, 但在低剂量组未发现显著性差异。相比之下, 胆红素氧化酶法的检测结果与对照组相比未见明显差异。**结论:** 在处理受色素干扰的血清样本时, 胆红素氧化酶法能够有效排除干扰, 确保胆红素检测结果的准确性, 为临床实验室提供了一种可靠的检测方法。

养胃安神方对高原失眠大鼠的催眠作用及机制研究

李芳^{1,2}, 张娴颢², 叶岸平², 马增春^{1,2*}, 高月^{1,2*}

(1 广东药科大学, 广东广州 510006; 2 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850)

[摘要] **目的:** 高原低压低氧环境会引起人体入睡困难、睡眠连续性遭到破坏和醒来后自觉身体疲惫等症状, 从而诱发高原睡眠障碍, 中医药治疗睡眠障碍具有不良反应小、依赖性低、标本兼治等优点, 在治疗高原睡眠障碍中具有独特优势。基于“胃不和则卧不安”这一中医理论, 对《三因极一病证方论》中温胆汤化裁, 形成以“养其胃, 安其神”为特点的养胃安神方, 具有安神、补气、活血功效, 契合高原低压低氧环境诱发失眠的治疗原则。本文旨在基于睡眠稳态和昼夜节律调控评价养胃安神方的药效作用与机制, 以推动抗高原失眠药物的研发。**方法:** 12 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、YWASD 组, 以模拟高原低压低氧(5500 m 海拔) 3 d 为造模条件, 连续口服给药 7 天(25 g/kg, 相当于成人临床剂量的 9 倍) 后, 考察药物对低压低氧环境下失眠大鼠的药效作用与机制。1. 利用无线脑电遥测系统(DSI), 通过信号采集和脑电、肌电和活动度等睡眠数据分析, 评价养胃安神方对低压低氧环境下大鼠睡眠结构的改善作用; 2. 利用血常规血生化, ELISA 考察血液中氧化应激, HPA 轴激素水平, 炎症因子变化, 利用病理、免疫组化实验, 观察下丘脑组织损伤变化; 3. 通过 RNA-Seq、Western 印迹法检测 5-羟色胺受体 1A(5-HTR1A), 食欲素 2 受体(OX2R)等及转录-翻译反馈环路相关蛋白, 包括时钟节律调节蛋白(Clock), 隐花色素节律调节蛋白 2(Cry2)、脑-肌肉 Arnt 样蛋白(Bmal1)表达水平, 验证相关通路和蛋白, 阐释分子机制。**结果:** ①正常对照组比较, 模型组大鼠睡眠总时间显著减少, 觉醒时间增加, 慢波睡眠减少, 片段平均持续时间缩短。与模型组比较, YWASF 组睡眠总时间增加 0.3 倍($P<0.01$), 觉醒时间减少 0.3 倍($P<0.01$), 慢波睡眠显著增加, 具有统计学差异, 提示 YWASF 能延长低氧环境中大鼠睡眠时间, 有效抑制觉醒; ②与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 ACTH, CRH 和 CORT 水平升高, MLT 水平降低; IL-1 β 、IL-6 等炎症因子水平显著升高, 氧化应激相关指标 SOD、CAT、GSH 显著降低; MDA 水平明显升高, 与模型组相比较, YWASF 组 CORT, ACTH,

[第一作者] 李芳, E-mail: 3156782638@qq.com

[通讯作者] 马增春, E-mail: mazchun@139.com; 高月, E-mail: gaoyue@nic.bmi.ac.cn

CRH 含量降低而 MLT 水平升高, IL-1 β 、IL-6 等炎症因子水平有所降低, 氧化应激相关指标 SOD、CAT、GSH 显著升高; MDA 水平明显下降。③与正常对照组比较, 模型组大鼠下丘脑 5-HT_{1A} 表达下调, OX₂R 表达上调, Per2, Cry2, GSK-3 β 和 NR1D1 表达水平均下调, Bmal1 和 Clock 表达水平上调, 与模型组相比较, YWASF 组大鼠下丘脑 5-HT_{1A} 表达上调, OX₂R 显著下调, Per2, Cry2, GSK-3 β 和 NR1D1 表达水平均上调而 Bmal1 和 Clock 表达水平下调。**结论:** 养胃安神方通过改善睡眠-觉醒总时长、各时相中慢波睡眠时间和觉醒时间、慢波睡眠片段平均持续时间、大鼠整体睡眠节律, 从而提高低压低氧环境下大鼠的睡眠质量和改善大鼠的睡眠结构。通过抑制 HPA 轴增加睡眠深度并减轻促觉醒状态, 可能与氧化应激、炎症因子水平升高, 5-HT_{1A}、OX₂R、Clock、GSK-3 β 表达失调有关。本研究为养胃安神方用于高原失眠的治疗提供了实验依据。

[关键词] 养胃安神方; 睡眠节律与稳态; 高原睡眠障碍; 高原环境

从 PKM2 调控自噬探讨“金钱草杀雷公藤毒”的相杀减毒作用

宋玲玲¹, 王君明^{1,2,3*}, 纪丽婕¹, 张月月¹, 巫晓慧¹, 张天柱¹, 杜晨杰¹,

何庆文¹

(1 河南中医药大学 药学院, 河南郑州 450046; 2 河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治
省部共建协同创新中心, 河南郑州 450046; 3 豫药全产业链研发河南省协同创新中心,
河南郑州 450046)

[摘要] **目的:** 基于 M2-型丙酮酸激酶(PKM2)调控自噬探讨“金钱草杀雷公藤毒”的相杀减毒作用。**方法:** 在前期基于体内实验初步验证“金钱草杀雷公藤毒”可能通过 PKM2 信号调控自噬发挥相杀减毒作用的基础上, 本研究进一步施加了 PKM2 抑制剂进行确证。**方法:** 通过对小鼠肝损伤敏感指标血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、微小核糖核酸 122(miR-122)以及肝组织病理的检测分析, 评价“金钱草杀雷公藤毒”的相杀减毒作用; 随后, 采用实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹法等检测自噬关键性指标微管相关蛋白轻链 3-II(LC3B)、Sequestosome1(P62/SQSTM1)、Bcl-2 相互作用蛋白(Beclin 1)的基因及蛋白表达水平, 确证 PKM2 参与“金钱草杀雷公藤毒”的相杀减毒作用。此外, 进一步采用实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹法等检测 PKM2 分子的基因及蛋白表达水平, 确证金钱草通过激活 PKM2 抑制自噬降低雷公藤诱导的肝毒性。**结果:** 雷公藤给药致使小鼠血清 ALT、AST、miR-122 水平均显著升高($P<0.01$), 并致使肝细胞肿胀, 并伴有肝细胞变性炎症浸润; 而配伍金钱草不仅显著降低了小鼠血清 ALT、AST、miR-122 水平($P<0.01$), 还改善了雷公藤诱导的组织病理损伤情况, 表明在施加 PKM2 抑制剂前, “金钱草杀雷公藤毒”减毒表型成立; 进一步施加 PKM2 抑制剂后, “金钱草杀雷公藤毒”的减毒作用被取消, 具体表现在肝组织病理及显著升高的转氨酶水平。通过对比 PKM2 诊断前后, 明确表明“金钱草杀雷公藤毒”与 PKM2 信号密切相关。此外, 雷公藤给药还致使小鼠肝 LC3B、Beclin 1 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高、P62 水平显著降低($P<0.01$), 而配伍金钱草均在不同程度上显著逆转上述指标的异常($P<0.01$), 表明在施加 PKM2 抑制剂前, “金钱草杀雷公藤毒”抑制肝脏过度自噬表型成立; 进一步施加 PKM2 抑制剂后, “金钱草杀雷公藤毒”抑制肝脏过度自噬表

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (编号 82074037)

[通讯作者] 王君明, 男, 博士, 博士后, 教授, 博士生导师, 博士后合作导师, 研究方向: 中药性能机理与安全性评价, E-mail: mjw98_2010@163.com

型被取消，表现在 LC3B、Beclin 1 mRNA 及蛋白表达水平又显著升高、P62 水平显著降低。通过对比 PKM2 诊断前后，进一步说明 PKM2 在“金钱草杀雷公藤毒”的相杀减毒过程中起关键作用。此外，雷公藤还显著下调了小鼠肝 PKM2 mRNA 及蛋白表达水平，而配伍金钱草显著上调了 PKM2 的水平($P<0.01$)，表明在施加 PKM2 抑制剂前，金钱草通过上调 PKM2 水平降低雷公藤诱导的肝毒性；进一步施加 PKM2 抑制剂后，被上调的 PKM2 水平又显著下调。通过对比 PKM2 诊断前后，明确表明 PKM2 在“金钱草杀雷公藤毒”的相杀减毒过程中起关键作用。**结论：**“金钱草杀雷公藤毒”的相杀减毒作用涉及抑制肝细胞过度自噬，这种抑制作用与激活 PKM2 靶点有关。

[关键词] PKM2；过度自噬；“金钱草杀雷公藤毒”；相杀减毒；肝毒

西洋参提取物对多柔比星所致心脏损伤的作用机制研究

鲍会云, 张浩, 丁小云, 王虎, 李婷婷, 黄思, 徐立雯, 汤喜兰*

(江西科技师范大学药学院, 南昌, 330013)

[摘要] **目的** 探讨西洋参提取物(north American ginseng extract, GS)对多柔比星(doxorubicin, DOX)所致心脏损伤的保护作用及作用机制。**方法:** (1) 体外培养大鼠乳鼠心肌细胞, 分别采用 MTT 法确定 GS 和 DOX 作用于心肌细胞的浓度。实验分为正常组、模型组、GS 干预组以及 GS 单独组, 药物作用 24 h, 观察 GS 对 DOX 诱导的心肌细胞活力和 LDH 释放的影响。进一步采用 Western blotting 和 RT-qPCR 检测各组心肌细胞 NLRP3 炎症小体相关蛋白和基因表达。(2) 42 只 SD 雄性大鼠随机分为 5 组, 分别为正常组, 模型组, GS 0.45 g/kg 干预组, GS 0.9 g/kg 干预组以及 GS 0.9 g/kg 单独组。采用每周 2 次腹腔注射 DOX 1.25 mg/kg, 持续 6 周, 建立大鼠心肌损伤模型。造模前 3 天开始灌胃 GS, 每日给药直至实验结束。给药结束后, 大鼠禁食 12 h, 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 取心脏并称重。采用 HE 染色和 Masson 染色观察心肌组织病理状态。采用试剂盒检测各组大鼠血清 CK-MB、AST、LDH、IL-1 β 以及 IL-18 含量。检测各组大鼠心肌组织 NLRP3 炎症小体相关蛋白和基因表达。**结果:** (1) 体外实验结果显示, GS 12.5~200 μ g/mL 对心肌细胞活力没有影响($P>0.05$), DOX 1~10 μ g/mL 诱导心肌细胞出现不同程度损伤, 呈浓度依赖性($P<0.05$)。本研究选择 DOX 1 μ g/mL 诱导心肌细胞损伤模型, 观察 GS 100 μ g/mL 对 DOX 所致心肌细胞损伤的影响。结果显示, GS 抑制 DOX 诱导的心肌细胞存活率下降和 LDH 释放增加($P<0.05$)。DOX 诱导心肌细胞 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1(p20)、GSDMD-FL、GSDMD-N、pro-IL-1 β 蛋白表达以及 NLRP3、ASC、CASP1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达上调($P<0.05$), GS 抑制 DOX 诱导的 NLRP3 炎症小体相关蛋白和基因的表达上调($P<0.05$)。(2) 体内实验结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠体重增长缓慢, 心脏重量降低, 心肌组织排列紊乱, 间隙增大, 胶原纤维增多, 心肌纤维出现断裂, 血清 LDH、CK-MB、AST 含量升高($P<0.05$), GS 干预可抑制上述变化($P<0.05$)。另外, 与正常组比较, 模型组大鼠左心室

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81960732, 82360787); 江西省自然科学基金项目(20242BAB25573)

[通讯作者] 汤喜兰, 博士, 副教授, 从事中药心血管药理研究, E-mail: tangxilan1983@163.com

NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1(p20)、GSDMD-FL、GSDMD-N、pro-IL-1 β 、IL-1 β 蛋白表达增加($P<0.05$), NLRP3、ASC、GSDMD、CASP1、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达上调($P<0.05$), 血清 IL-1 β 和 IL-18 含量增加($P<0.05$), GS 抑制 DOX 诱导的上述指标改变($P<0.05$)。结论: GS 通过抑制 NLRP3 炎症小体表达, 减轻 DOX 诱导的大鼠心脏损伤。

小鼠不同肺炎模型的建立及比较研究

岳星男, 韩佳寅, 潘辰, 张宇实, 赵雍, 张晓萌, 吴静雯, 唐璇, 梁爱华

(中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700)

[摘要] **目的:** 细菌感染及多因素诱发过敏样反应是临床急性肺炎发生的重要诱因。本研究通过脂多糖(LPS)、卵清蛋白(OVA)、Compound 48/80 三种药物给药, 建立模拟临床细菌感染及过敏样反应发生条件下的肺炎模型, 比较三种小鼠肺炎模型的特征及特异性指标, 为不同机制介导下肺炎的研究提供实验基础。**方法:** 分别采用 LPS 和 OVA、Compound 48/80 构建小鼠细菌感染和过敏样反应条件下的肺炎模型。LPS 组小鼠采用滴鼻法分别滴入高、中、低剂量(100 mg/kg、50 mg/kg 和 25 mg/kg) 的 LPS 50 μ L; OVA 组小鼠在第 1、3、5 天腹腔注射 OVA, 高、中、低剂量分别为 10 mg/kg、5 mg/kg 和 2.5 mg/kg, 随后在第 14 至 18 天每日向其鼻腔内滴入 20 mg/kg、10 mg/kg 和 5 mg/kg 的 OVA 进行激发; Compound 48/80 组小鼠通过静脉注射给药 C48/80 高、中、低剂量为 5mg/kg、2.5mg/kg、1.25mg/kg。三种模型组小鼠在 LPS 滴鼻 24 h 后、OVA 末次滴鼻 24 h 后、Compound 48/80 注射 30 min 后检测小鼠外周血血细胞数量及分类, 取肺组织测试肺组织干重/湿重比并进行组织病理学检查, 定量测定血浆及肺组织中 IL-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、IgE、IgG、IgG1 及组胺等的含量。**结果:** 与空白对照组比较, 三种肺炎模型小鼠的肺组织含水量均有一定程度增加, 反应呈现剂量相关性; 其中, LPS 不同剂量组小鼠肺组织含水量变化最明显($P<0.05$)。三种肺炎模型小鼠外周血中白细胞计数(WBC)均显著增加($P<0.05$), 其中 LPS 模型组小鼠和 OVA 模型组小鼠的中性粒细胞均剂量相关地显著升高($P<0.05$), LPS 模型组小鼠和 Compound 48/80 模型组小鼠淋巴细胞比例呈剂量相关性显著增加($P<0.05$); 此外, Compound 48/80 模型各剂量组小鼠外周血中嗜酸性粒细胞急剧升高。LPS 模型组小鼠肺组织匀浆中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著升高($P<0.05$), IL-10 水平显著降低($P<0.05$); OVA 模型组小鼠血浆中 OVA-IgE 和 OVA-IgG 水平显著升高($P<0.05$); Compound 48/80 模型组小鼠肺组织匀浆中组胺水平显著升高($P<0.05$)。肺组织病理检查结果显示, LPS 模型组肺组织病变主要表现为肺泡腔内炎症细胞聚集、支气管周围及肺间质浆液性渗出。OVA 和 Compound 48/80 模型组小鼠肺组织中有明显的支气管浆液性渗出、小管上皮细胞脱落、管腔狭窄或闭塞,

以及肺泡间隔增宽。**结论：**LPS 滴鼻、OVA 致敏后滴鼻、Compound 48/80 注射均可以诱导小鼠肺炎模型，这些模型均可以为不同类型肺炎的药效及相关机制研究提供支持。

植物精油干预肥胖作用研究进展

吴凤玲¹, 李清², 周姗姗¹, 黄小英¹, 梁新丽¹, 杨明¹, 董伟^{1*}

(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌, 330004

2. 江西中医药大学岐黄国医书院, 江西 南昌, 330025)

[摘要] 肥胖是一种由遗传、心理和社会环境因素导致的身体脂肪组织异常或过度堆积的疾病。肥胖的患病率持续上升, 已经成为重大公共卫生问题之一。肥胖成为多种肿瘤、心血管疾病、2 型糖尿病以及肝脏疾病的重要风险因素。过多能量摄入导致脂肪在脂肪组织中积累, 促进脂肪细胞的肥大和增生, 促进脂肪组织扩张。当脂肪积累超过脂肪细胞的存储能力时, 其通过血液循环在其他器官异位沉积, 形成内脏脂肪。因此控制体重和平衡饮食对肥胖的控制非常重要。植物精油可抑制脂肪细胞肥大、调节血脂异常、抑制白色脂肪异常积累、调节脂肪因子、抑制脂肪组织炎症、调节肠道菌群, 显示出对健康有益的抗肥胖作用。在人们难以维持较低的食物摄入量和较高的运动水平的背景下, 理解肥胖与肥胖相关性疾病之间的联系, 研究植物精油干预肥胖的潜力, 从而更有效的防治肥胖, 从而为开展相应的临床研究及安全性评价, 开发健康产品提供参考。

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20224BAB206111); 国家自然科学基金项目(82060733); 江西省卫生健康委员会项目(202311141); 中药改良创新江西省重点实验室(2024SSY07131); 大学生校级创新创业项目(X202310412252); 校级研究生创新专项基金(JZYC23S77, JZYC23S71)

[通讯作者] 董伟, Tel: (0791)87118658, E-mail: sober96@foxmail.com

淫羊藿苷对肿瘤微环境巨噬细胞极化表型的影响及抗乳腺癌

转移作用研究

申培博, 倪英倩, 柳荷, 韩秀珍*

(山东大学药学院新药药理研究所 济南 250012)

[摘要] 三阴性乳腺癌(Triple-negative breast cancer, TNBC)严重威胁女性的健康, 其恶性发展与肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)的改变, 尤其是肿瘤相关巨噬细胞(Tumor-associated macrophages, TAMs)的极化密切相关。TAMs 不仅可以促进不同肿瘤类型的生长, 还可以通过 M1 和 M2 两种极化表型在抑制肿瘤细胞生长方面发挥关键作用。研究表明, 一些天然产物可以通过影响 TME 来治疗和预防癌症, 这为更好的癌症治疗策略提供新的理论基础。淫羊藿苷(Icariin, ICA)是从淫羊藿中提取的类黄酮苷类化合物, 具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫等药理和生物学功能。然而, ICA 对 TNBC 的影响及其是否与 TAMs 极化有关尚不清楚。本课题通过体内、外实验进行了淫羊藿苷对肿瘤微环境巨噬细胞极化表型的影响及抗乳腺癌转移作用研究。结果发现: 1.淫羊藿苷可以通过升高 MDA-MB-231 细胞中 Bax 的表达和降低 Bcl-2 与 PARP 的表达促进乳腺癌细胞的凋亡, 并且通过下调 VEGF 和上调 E-cadherin 来抑制细胞的血管拟态和侵袭转移。2.淫羊藿苷可以通过促进 M2 细胞向 M1 极化表型转变来 MDA-MB-231 细胞的血管拟态形成和转移。3.淫羊藿苷促进 M2 细胞向 M1 转变的作用可能是通过抑制 M2 细胞中 P13K、AKT、mTOR 蛋白的磷酸化实现的。

[关键词] 三阴性乳腺癌; 侵袭转移; 淫羊藿苷; 肿瘤微环境; 巨噬细胞极化

栀子引起肝脏毒性的生物标志物研究

田婧卓, 崔爽, 赵雍, 王连媚, 柳辰玥, 梁爱华*

(中国中医科学院中药研究所, 北京市中药鉴定与安全性检测评估重点实验室, 创新天然药物与中药注射剂国家重点实验室, 北京 100700, 中国)

[摘要] 栀子为茜草科植物栀子的果实, 药用历史悠久, 属于卫生部颁布的第I批药食两用资源, 临床应用广泛, 仅 2020 年版《中国药典》收载的含栀子的中成药就多达 116 种。栀子具有明显的保肝利胆作用, 对各类肝脏疾病包括胆汁淤积性肝病、黄疸型肝炎、非酒精性脂肪性肝病、肝纤维化和肝癌均有明显的治疗效果。但是近些年来越来越多的研究表明栀子及其有效成分可能会引起肝损伤, 长期或过高剂量都可能会造成以胆汁淤积为主的肝毒性, 最主要的是临床缺乏灵敏度高、特异性强的用于监测栀子诱发肝毒性的生物标志物, 这也增加了临床应用栀子相关制剂的风险。本文拟结合课题组前期关于栀子肝毒性研究的基础, 与临床用于诊断肝损伤的生物标志物进行对比, 筛选出灵敏度高、特异性好的用于评价栀子肝毒性的生物标志物, 为临床栀子用药安全性提供监测手段, 同时也为临床胆汁淤积性肝病的早期诊断和具有潜在肝毒性的中药安全性监管提供预测方法。

[关键词] 栀子, 肝毒性, 生物标志物, 胆汁酸

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(82304814), 中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项(ZZ17-YQ-022), 中国中医科学院创新工程基金(CI2021B016, CI2021A04801), 岐黄学者项目

[第一作者] 田婧卓, 中国中医科学院中药研究所, 100700, 18810524315, E-mail: jztian@icmm.ac.cn

[通讯作者] 梁爱华, 中国中医科学院中药研究所, 100700, Tel: (010)84252805, E-mail: ahliang@icmm.ac.cn

基于家兔模型的华蟾素注射液及其四种成分的血管刺激性研究

张晓萌, 韩佳寅, 潘辰, 唐璇, 岳星男, 李春英, 易艳, 赵雍,

刘素彦, 张宇实^{*1}

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100029)

[摘要] **目的:** 本研究旨在探讨华蟾素注射液及其四种成分(多肽、核酸、色胺、毒配基)所诱发的类过敏反应症状、病理特征及其炎症机制,以揭示中药注射剂的过敏反应特点及相关机制;**方法:** 选取健康雄性大耳白兔,按体重将大耳白兔随机分成6组,每组3只,包括空白对照组、注射液组 0.16ml 临床用原液/ml(临床4倍)、多肽组 0.232 mg/ml(临床4倍浓度)、核酸组 0.232 mg/ml(临床4倍浓度)、色胺组 0.0224mg/ml(临床4倍浓度)、毒配基组 0.0168 mg/ml(临床4倍浓度);采取同体对照方式给药,右侧耳缘静脉注射给予供试品,左侧给予同体积生理盐水作为对照,对照组双侧给予生理盐水,给药体积为 0.5 ml/kg 体重;肉眼观察各组动物,给药前及给药后 24 h 及末次给药后 24 h 注射部位及血管周围是否有红肿、充血等刺激现象。从血管入针处远心端 1cm 处开始,向着近心端的方向,连续切成 6 块长 1cm 的组织块,按照常规进行脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色,显微镜下观察血管及其周围组织病理变化;所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析,所有统计分析均以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。**结果:** 在华蟾素注射液组,24 小时内观察到 2 只动物出现轻度充血反应,经过多次给药后,部分动物出现不同程度的充血,评定为可疑或弱阳性。多肽组中,仅 1 只动物在部分给药后见轻度充血,其他无异常。核酸组有 1 只动物在多次给药后观察到轻度充血,但由于挣扎引起的机械损伤无法明确判断。色胺组表现类似,未见显著血管刺激。毒配基组有 1 只动物出现明显充血和组织变化,判定为弱阳性。病理分析显示,毒配基组的淋巴细胞或嗜酸性细胞浸润与血栓形成,提示毒配基可能是华蟾素注射液的主要刺激成分。**结论:** 本次研究表明,华蟾素注射液具有血管刺激性,且毒配基可能在其血管刺激反应中发挥主要作用,而其他成分的刺激性相对较弱。此研究为进一步理解中药注射剂的安全性及其过敏反应机制提供了重要的实验依据。

[关键词] 华蟾素注射液;类过敏反应;血管刺激性反应;中药毒理学

[第一作者] 张晓萌, 硕士, 从事毒理学研究, E-mail:1131711824@qq.com

[通讯作者] 张宇实, 助理研究员, 主要从事中药药理毒理研究, E-mail:yszhang@icmm.ac.cn

补骨脂孕期给药肾毒性研究

柳辰玥, 田婧卓, 刘素彦, 韩佳寅, 张宇实, 潘辰, 王连媚, 孟晶, 王星文,

马琳, 梁爱华

(中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700)

目的: 补骨脂气香, 味辛、微苦, 归肾、脾经, 具有温肾助阳、固精缩尿、纳气平喘等功效, 临床上常用于治疗腰膝冷痛、肾虚作喘、五更泄泻及孕期保胎等。然而, 近年来因服用补骨脂致肝损伤等不良反应的病例频出, 把药典中无毒中药补骨脂卷入舆论风暴, 引起大众及研究人员的广泛关注。基础研究也表明补骨脂具有一定程度的肝毒性, 但关于孕期服用补骨脂对母鼠及子代对肝、肾的影响未见报道。本实验将对妊娠期小鼠服用补骨脂的肝毒性进行研究。**方法:** SPF 级 ICR 小鼠, 适应性饲养后, 以雌雄比为 2:1 比例合笼繁殖。第一天下午 5 点合笼, 第二天上午 8 点, 观察雌性小鼠有无阴栓。有阴栓的小鼠选入实验组, 随机分为对照组、补骨脂高剂量组(10 g/kg, 人临床 60 倍剂量)、补骨脂低剂量组(2.5 g/kg, 人临床 15 倍剂量)。小鼠阴道见栓当天, 灌胃给药, 每天一次, 持续整个孕期, 直到仔鼠出生。在仔鼠出生的 0 天, 10 天, 每组母鼠每窝随机取仔鼠, 处死后取肝、肾组织。21 天哺乳期结束, 母鼠及 21 天龄仔鼠摘眼球取血后处死, 并取肝、肾组织。分离血清, 检测肝、肾功能指标。取肝大叶和一侧肾组织于中性福尔马林中固定后, 制作石蜡切片进行 HE 染色。**结果:** 生化检测结果显示: 各组母鼠体重及脏器指数无显著差异; 血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、血清碱性磷酸酶(ALP)、甘油三酯(TG)、血清总胆固醇(TCHO)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(CRE)均无显著差异或无生理学意义。与对照组相比, 补骨脂高、低剂量组母鼠血清总胆汁酸(TBA)显著升高, 有统计学差异($P<0.05$); 与对照组相比, 补骨脂低剂量组母鼠血清总胆红素(TBil)含量升高, 有统计学差异($P<0.05$)。21 天龄仔鼠血清生化结果显示: 与对照组相比, 补骨脂孕期连续给药后仔鼠血清 TBA 含量显著升高($P<0.05$); 其余指标无统计学差异或无生理学意义。**HE 染色结果显示:** 补骨脂给药后, 母鼠肝组织偶见细胞坏死, 个别出现空泡样变性及嗜酸变性等损伤。0 天, 10 天, 21 天各组仔鼠肝脏组织中造血造数目无统计学差异; 补骨脂给药组个别仔鼠肝脏枯否细胞增多, 少数出现脂肪样或空泡样变性等损伤。**结论:** ICR 小鼠从妊娠初期开始, 给予大剂量的

补骨脂水提液,可见少数母鼠出现轻微程度肝损伤,血清 TBiL、TBA 含量升高,对母鼠及仔鼠肾脏无显著影响。孕期全程给药可升高仔鼠血清 TBA 含量,个别小鼠肝脏出现轻微损伤。提示妊娠期连续大剂量服用补骨脂可能存在一定程度的安全风险,临床使用时应注意实时监控及合理用药。



【扫码查看会议信息】

主办单位：
中华中医药学会

承办单位：
中华中医药学会中药毒理学与安全性研究分会
中国中医科学院中药研究所
中南民族大学

