

麻提取物在正常与类风湿性关节炎模型大鼠中的肠吸收特性差异[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 405-411.

[ 19 ] Zhang L, Fan Y, Su H W, *et al.* Chlorogenic acid methyl ester exerts strong anti-inflammatory effects via inhibiting the COX-2/NLRP3/NF-κB pathway [ J ]. *Food Funct*, 2018, 9 ( 12 ): 6155-6164.

[ 20 ] 杨 敏. 苦丁茶中异绿原酸的提取纯化工艺及其抗类风湿关节炎的药效学研究[ D ]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.

[ 21 ] 王 霞, 蒋 礼, 何燕玲, 等. 黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类化合物体外抗类风湿性关节炎机制研究[ J ]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1362-1367.

[ 22 ] 周德勇, 张 乐, 姜艳艳, 等. 薄荷酚类对照提取物 HPLC 含量测定研究及其在薄荷药材质量控制中的应用[ J ]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 582-589.

## 紫苏叶抗急性肝损伤活性组分筛选及机制研究

王琪瑶<sup>1,2</sup>, 张艳蕾<sup>3</sup>, 龚张斌<sup>3</sup>, 张 勇<sup>2,4\*</sup>, 贾 琦<sup>1\*</sup>, 李医明<sup>1</sup>, 朱维良<sup>2,4</sup>  
(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** **目的** 筛选紫苏叶发挥保肝活性的关键组分并探究其作用机制。**方法** 小鼠随机分为 8 组, 正常组和模型组灌胃 PBS, 给药组分别灌胃 30 mg/kg 奥贝胆酸阳性药和 120 mg/kg 紫苏叶水煎液、醇沉上清液、醇沉固体、总黄酮以及多糖, 每天 1 次, 连续 7 d。末次给药后 2 h, 各组小鼠 (除正常组外) 腹腔注射 0. 5% CCl<sub>4</sub> 花生油 (10 mL/kg) 进行造模。造模结束后, 收集血清和肝脏组织, 全自动生化分析仪检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性及总胆红素 (TBIL) 水平, HE 染色观察肝组织病理形态变化, 试剂盒检测肝组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平, ELISA 法检测肝组织中转化生长因子-β1 (TGF-β1)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白细胞介素-6 (IL-6) 及白细胞介素-1β (IL-1β) 水平, RT-qPCR 法检测肝组织 *NLRP3*、半胱氨酸蛋白酶-1 (*caspase-1*) 和 *IL-1β* mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 紫苏叶固体组和总黄酮组小鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL 水平均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 肝组织 SOD 活性和 TGF-β1 水平升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), MDA、TNF-α、IL-6、IL-1β 水平和 *NLRP3*、*caspase-1*、*IL-1β* mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 水溶性总黄酮是紫苏叶发挥保肝作用的关键活性组分, 抑制 NLRP3/*caspase-1* 炎性小体信号通路可能是其抗 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤的作用机制之一。

**关键词:** 紫苏叶; 水溶性总黄酮; CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤; NLRP3/*caspase-1*

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2023)12-4119-06

**doi:** 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2023. 12. 045

肝损伤是指由化学毒物、某些药物、酒精以及自身免疫问题导致的肝细胞受损<sup>[1]</sup>。目前, 由于化学添加剂的滥用以及食品安全问题, 化学性肝损伤已逐渐成为临床中最常见的肝损伤类型<sup>[2]</sup>, 其发病率呈逐年上升的趋势<sup>[3]</sup>, 严重危害着人体的健康。中医药在防治肝病方面积累了大量的临床经验, 具有其独特的优势, 已成为肝脏疾病的临床研究热点。

紫苏为唇形科紫苏属植物紫苏 *Perilla frutescens* 的带叶嫩枝, 属于药食同源中药, 味辛, 性温, 归肺、脾经<sup>[4]</sup>。紫苏叶、梗、果实可分别入药, 其中紫苏叶是其最常用入药部位, 《名医别录》始载其功效, 谓能“下气, 除寒

中”<sup>[5]</sup>, 具有解表散寒、行气和胃功效, 主治风寒感冒、恶心呕吐、鱼蟹中毒等症<sup>[6]</sup>。现代研究表明, 紫苏叶具有抗炎<sup>[7]</sup>、抗氧化<sup>[8]</sup>、抑菌<sup>[9]</sup>、抗肿瘤<sup>[10]</sup>和保肝等生理活性。现有文献报道, 紫苏叶水提物和多糖对急性化学性肝损伤有保护作用并且可以改善 2 型糖尿病大鼠肝损伤<sup>[11-13]</sup>。但上述研究并未系统比较紫苏叶水煎液各组分之间的保肝活性差异, 同时也未见紫苏叶水煎液中总黄酮的保肝活性相关报道。本研究旨在探讨紫苏叶传统水煎液不同组分对四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 诱导的小鼠急性化学性肝损伤的保护作用, 筛选最佳活性组分并探究其作用机制。

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773791); 国家自然科学基金青年项目 (81603270)

作者简介: 王琪瑶 (1996—), 女, 硕士, 研究方向为中药化学成分及生理活性。E-mail: 2420395283@qq.com

\* 通信作者: 张 勇 (1986—), 男, 博士, 助理研究员, 从事中药药效物质研究。E-mail: zhangyong109@simmm. ac. cn  
贾 琦 (1963—), 女, 副教授, 从事中药化学成分和活性成分研究。E-mail: q\_jia@126.com

1 材料

1.1 动物 SPF 级 C57BL 雄性小鼠，6 周龄，体质量 (20.0±2.0) g，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2018-0006]，饲养于上海中医药大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (沪) 2020-0009]，环境温度 25 ℃，相对湿度45%~55%，光暗周期 12 h/12 h，自由进食饮水。动物实验经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号 PZSHUTCM201218014)，符合 3R 原则。

1.2 药物与试剂 干燥紫苏叶 (批号 200111，安徽旭松中药饮片有限公司)。芦丁对照品 (批号 ST03950120，纯度>98%，上海诗丹德生物技术有限公司)；奥贝胆酸 (批号 20052315，纯度 98%，上海士锋生物科技有限公司)。95% 乙醇、CCl<sub>4</sub>、氯仿、异丙醇 (批号 20210514、20210901、20110419、20171121，国药集团化学试剂有限公司)；SOD、MDA 检测试剂盒 (批号 20211115、20211020，南京建成生物工程研究所有限公司)；TGF-β1、TNF-α、IL-6、IL-1β 检测试剂盒 (批号 A98110545、A28210852、A20610936、A201BH20133，杭州联科生物技术股份有限公司)；RNAiso Plus 试剂、PrimeScript® RT Master Mix 试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒 (批号 AA7102-1、RR036A、RR820A，日本 TaKaRa 公司)。

1.3 仪器 安捷伦 1260 型高效液相色谱仪、DAD 检测器 (美国 Agilent 公司)；FD-1000 冷冻干燥机 (东京理化器械株式会社)；旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司)；7020 型全自动生化分析仪 (日本日立公司)；Synergy2 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司)；5804R 型冷冻离心机增仪 (德国 Eppendorf 公司)；D3024R 型高速冷冻离心机 (美国 Scilogex 公司)；电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]；SCIENTZ-48 高通量组织研磨机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)；实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)；超微量紫外分光光度计 (美国赛默飞公司)；光学显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 紫苏叶各组样品制备 取干燥紫苏叶 150 g，加入 20 倍量去离子水，在 100 ℃下浸提 1 h，提取 2 次，用纱布粗滤，合并得到浸提液 2.5 L，将浸提液蒸发浓缩至 200 mL，向浓缩液中加入 600 mL 95%乙醇，静置过夜，将上清液和固体部分冷冻干燥，得到上清液干燥样品 (14.1 g) 与固体干燥样品 (25.0 g)。再取紫苏叶醇沉固体 20 g 通过大孔树脂 D101，依次以蒸馏水、10% 乙醇为洗脱液进行梯度洗脱，并按照不同体积分数乙醇浓缩合并得到多糖 (7.4 g) 和水溶性总黄酮 (2.5 g)。

2.2 紫苏叶上清液、固体及总黄酮组中黄酮含量测定  
2.2.1 标准曲线绘制 精确称取芦丁对照品 5.3 mg 于 25 mL 量瓶中，60% 乙醇稀释至刻度，摇匀，得到质量浓度为 0.212 mg/mL 的芦丁对照品溶液，再精密量取该芦丁对照溶液 0、1、1.5、2、3、4、5 mL，分别置于 25 mL 量瓶中，

加入 0.3 mol/L 三氯化铝溶液 3.0 mL，再加入 1.0 mol/L 醋酸钠 4.0 mL，用去离子水稀释并定容至 25 mL，摇匀，放置 16 min，在 344 nm 波长处测定吸光度，以质量浓度为横坐标 (X)，吸光度为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线<sup>[14]</sup>。

2.2.2 样品含量测定 精确称取固体、上清液干燥样品及水溶性总黄酮各 3.5 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，固体和总黄酮加去离子水定容至刻度，上清液加 60% 乙醇稀释至刻度，摇匀得到质量浓度为 0.35 mg/mL 的供试品，再各取 1 mL 供试品分别置于 25 mL 量瓶中，加入 0.3 mol/L 三氯化铝溶液 3.0 mL，再加入 1.0 mol/L 醋酸钠 4.0 mL，用去离子水稀释并定容至 25 mL，摇匀，得到质量浓度为 14 μg/mL 的供试品。按照“2.2.1”项下条件测定吸光度。根据标准曲线得出总黄酮含量。

2.3 动物分组、给药及造模 将小鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组 (30 mg/kg 奥贝胆酸)、紫苏叶水煎液组 (120 mg/kg)、紫苏叶水提醇沉上清液组 (120 mg/kg)、固体组 (120 mg/kg)、水溶性总黄酮组 (120 mg/kg) 及紫苏叶多糖组 (120 mg/kg)，每组 8 只。自造模前 1 周起，分别灌胃给予相应剂量药物 (20 mL/kg)，每天 1 次，连续 7 d；正常组和模型组灌胃给予等体积 PBS。末次给药 2 h 后，正常组腹腔注射花生油 (10 mL/kg)，其他各组小鼠腹腔注射 0.5% CCl<sub>4</sub> (10 mL/kg) 进行造模。

2.4 血清生化指标检测 造模完成后禁食不禁水 23 h，麻醉小鼠后摘除眼球取血，3 500 r/min 离心 15 min，分离得血清，全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性和总胆红素 (TBIL) 水平。

2.5 小鼠肝脏指数计算 将小鼠脱颈椎处死，迅速摘除肝脏置于生理盐水中清洗，滤纸吸干水分、称重，计算肝脏指数，公式为肝脏指数=肝脏质量/小鼠体质量。

2.6 肝组织病理学检查 迅速取出小鼠右叶肝脏组织，置于 4% 多聚甲醛溶液中固定，石蜡包埋，制备切片，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，苏木素-伊红 (HE) 染色，中性树胶封固，于光镜下观察肝组织病理变化。

2.7 肝组织脂质过氧化水平及炎性因子水平检测 称取肝组织 100 mg，加入 9 倍量 0.9% 氯化钠溶液，研磨，制备成 10% 肝组织匀浆，按照试剂盒说明书检测超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平，以及转化生长因子-β1 (TGF-β1)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白介素-1β (IL-1β) 水平。

2.8 RT-qPCR 法检测肝组织 *NLRP3*、*caspase-1*、*IL-1β* mRNA 表达 称取各组肝组织各 25 mg，抽提总 RNA，测定 RNA 浓度，定量，逆转录反应制备 cDNA。在 PCR 八连管中加入各样本，设置 2 个复孔，向各 cDNA 加样本中加入相关引物和检测试剂，上机反应。反应条件为 95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 35 s，70 ℃延伸 60 s，共循环 45 次。以 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算各目的基因 mRNA 相对表达。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成，序

列见表 1。

表 1 引物序列

| 基因             | 引物序列(5'→3')                   | 扩增长度/bp |
|----------------|-------------------------------|---------|
| $\beta$ -actin | 正向 CTACCTCATGAAGATCCTGACC     | 90      |
|                | 反向 CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC     |         |
| NLRP3          | 正向 GCCGTCTACGTCTTCTTCCTTTCC   | 106     |
|                | 反向 CATCCGCACGCCAGTGAACAGAG    |         |
| caspase-1      | 正向 AGAGGATTTCCTTAACGGATGCA    | 183     |
|                | 反向 TCACAAGACCAGGCATATTCTT     |         |
| IL-1 $\beta$   | 正向 CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC  | 145     |
|                | 反向 TGTCGTTGCTTGCTTCTCCTTGATAC |         |

2.9 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理,数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间均数比较采用  $t$  检验。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

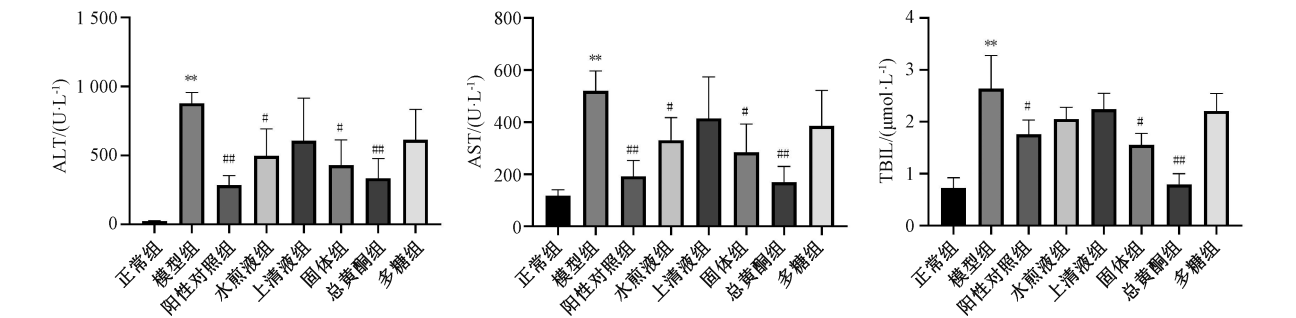
3 结果

3.1 紫苏叶上清液、固体和总黄酮中黄酮的含量 回归方程为  $Y=0.004\ 5X+0.244\ 9$  ( $R^2=0.999\ 2$ ),在 8.48~42.40  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好。

紫苏叶上清液、固体和水溶性总黄酮中的黄酮含量如表 2 所示,表明紫苏叶水提醇沉固体组分中不仅含有多糖,还含有部分水溶性总黄酮。通过该水提醇沉方法得到紫苏叶总黄酮的提取率为 6.26%,并且通过大孔吸附树脂分离能得到黄酮含量较高的水溶性总黄酮组分。

表 2 紫苏叶上清液、固体和总黄酮中黄酮的含量

| 组别   | 吸光度     | 质量浓度/<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 样品中黄酮<br>含量/% | 占药材中含量/<br>( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |
|------|---------|-----------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|
| 上清液组 | 0.262 0 | 3.788 9                                       | 27.06         | 25.53                                        |
| 固体组  | 0.258 9 | 3.111 1                                       | 22.22         | 37.07                                        |
| 总黄酮组 | 0.301 0 | 12.466 7                                      | 89.05         | 18.54                                        |



注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.01$ 。

图 1 紫苏叶各组分对急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

可见大量炎性细胞浸润;阳性对照组肝损伤程度降低,肝小叶结构基本完整,肝细胞排列较规则,肝组织内炎性浸润程度明显减轻;紫苏叶各组分组均可不同程度地减轻肝组织病变,以水溶性总黄酮的改善效果最明显,肝小叶清楚可见,肝细胞排列整齐,细胞肿胀、坏死、炎性细胞浸润等病理现象明显改善。以上结果表明,紫苏叶的水溶性总黄酮对肝脏的保护效果最为显著,其次为固体组,且效果与阳性对照组无明显差异。因此选用固体组和总黄酮组对保肝作用机制作进一步研究。

3.2 紫苏叶各组分对急性肝损伤小鼠肝脏指数的影响 如表 3 所示,与正常组比较,模型组小鼠肝脏指数升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,阳性对照组和各给药组小鼠肝脏指数降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),以总黄酮组效果最为显著。

表 3 紫苏叶各组分对急性肝损伤小鼠肝脏指数的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

| 组别    | 肝脏指数/%             |
|-------|--------------------|
| 正常组   | 4.55 $\pm$ 0.20    |
| 模型组   | 6.03 $\pm$ 0.11 ** |
| 阳性对照组 | 4.71 $\pm$ 0.23 ## |
| 水煎液组  | 5.33 $\pm$ 0.51 #  |
| 上清液组  | 5.55 $\pm$ 0.36 #  |
| 固体组   | 5.21 $\pm$ 0.49 #  |
| 总黄酮组  | 4.79 $\pm$ 0.32 ## |
| 多糖组   | 5.34 $\pm$ 0.47 #  |

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

3.3 紫苏叶各组分对急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL 水平的影响 如图 1 所示,与正常组比较,模型组小鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL 水平均升高 ( $P<0.01$ ),表明  $\text{CCl}_4$  致小鼠急性肝损伤模型建立成功;与模型组比较,阳性对照组、固体组和总黄酮组 ALT、AST 活性和 TBIL 水平均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),以总黄酮组效果最优,水煎液组 ALT、AST 活性均降低 ( $P<0.05$ )。

3.4 紫苏叶各组分对急性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 如图 2 所示,正常组肝小叶完整,轮廓清晰,肝细胞排列整齐,细胞核结构清晰,细胞无肿胀、炎性浸润,无坏死;模型组肝细胞显著变性,细胞索紊乱,肝细胞肿胀,胞浆疏松,可见多数细胞坏死,细胞核固缩消失,汇管区

3.5 紫苏叶固体和总黄酮对急性肝损伤小鼠肝组织氧化应激、炎症及转化生长因子水平的影响 如图 3 所示,与正常组比较,模型组小鼠肝组织  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 MDA 水平升高 ( $P<0.01$ ),SOD 活性和  $\text{TGF-}\beta 1$  水平降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,固体组和总黄酮组小鼠肝组织  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 MDA 水平均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),SOD 活性和  $\text{TGF-}\beta 1$  水平均升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),且总黄酮组效果更优,阳性对照组小鼠肝组织  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平降低 ( $P<0.05$ ),SOD 活性升高 ( $P<0.05$ )。



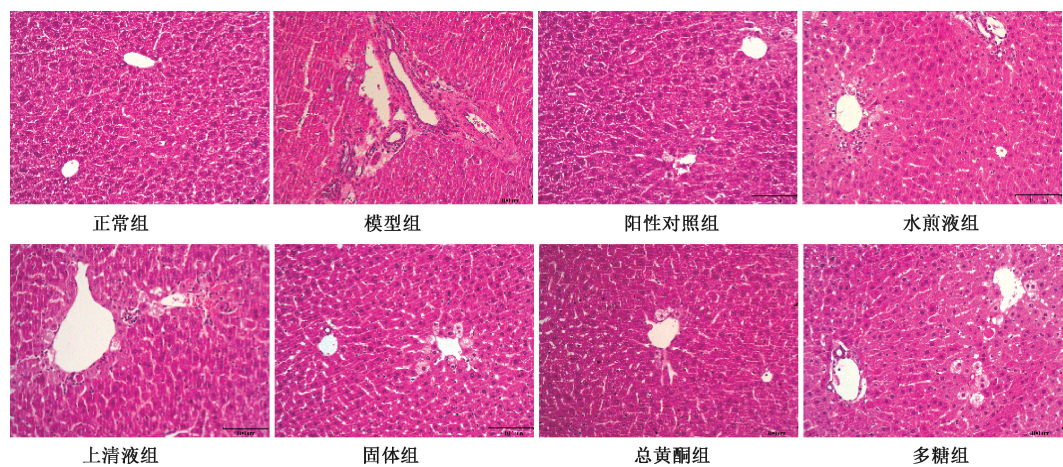
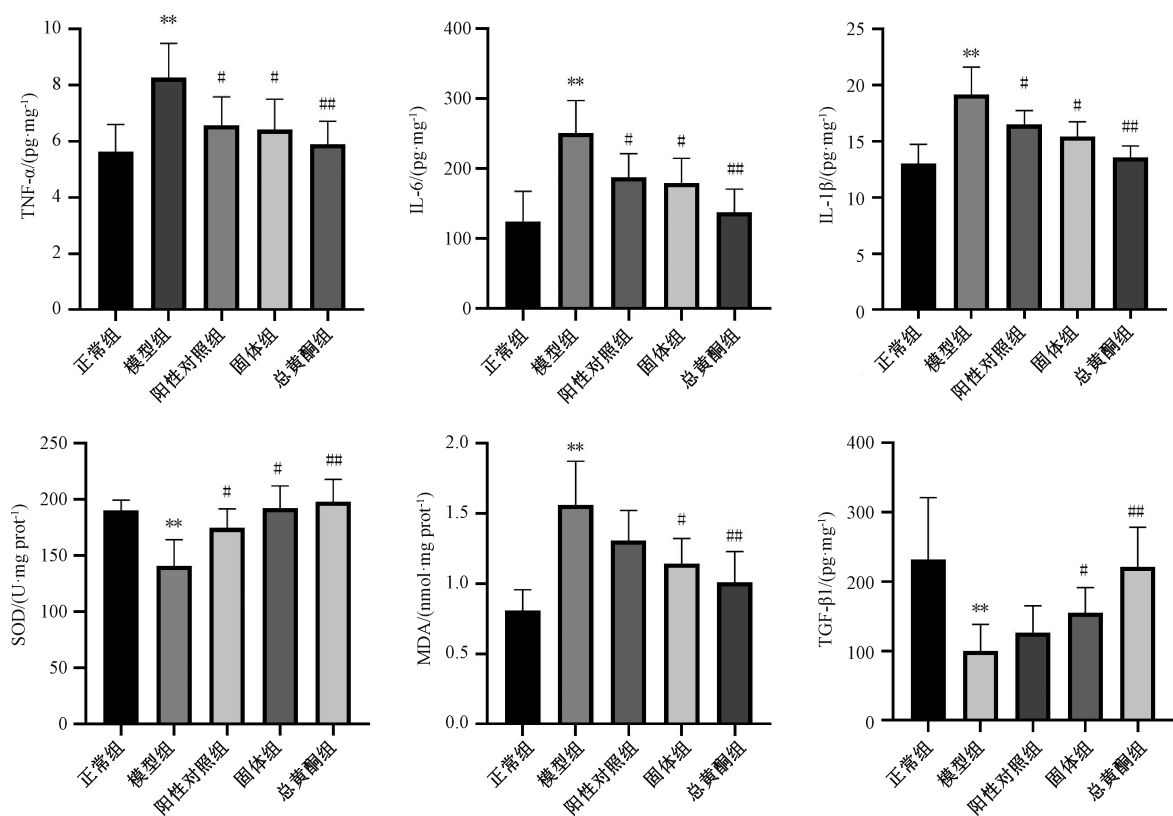


图 2 各组小鼠肝组织 HE 染色 (×200)



注：与正常组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，#  $P<0.05$ ，##  $P<0.01$ 。

图 3 紫苏叶固体和总黄酮对急性肝损伤小鼠肝组织氧化应激、炎症及转化生长因子水平的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

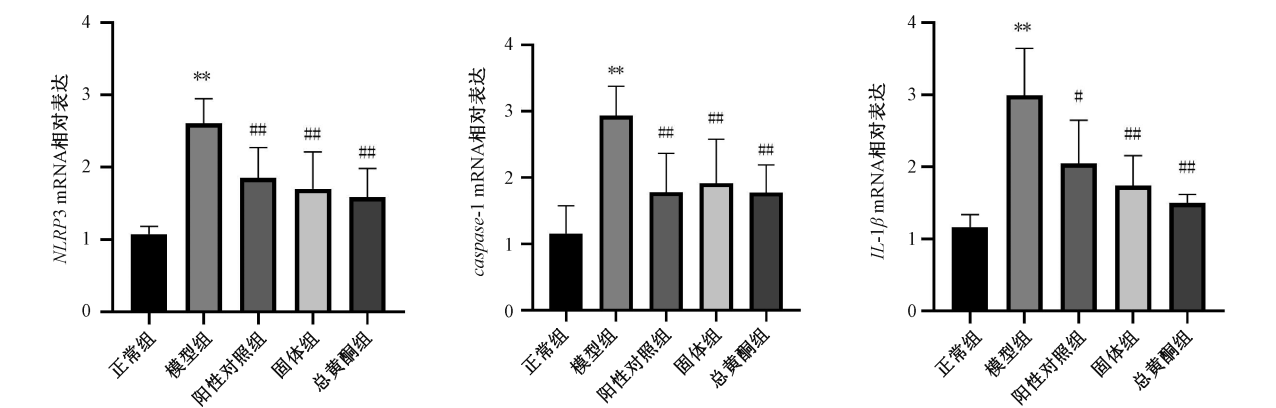
3.6 紫苏叶固体和总黄酮对急性肝损伤小鼠肝组织 *NLRP3*、*caspase-1* 和 *IL-1β* mRNA 表达的影响 如图 4 所示，与正常组比较，模型组小鼠肝组织 *NLRP3*、*caspase-1* 和 *IL-1β* mRNA 表达升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，阳性对照组、固体组和总黄酮组小鼠肝组织 *NLRP3*、*caspase-1* 和 *IL-1β* mRNA 表达均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，且三组效果基本相当。

4 讨论

$\text{CCl}_4$  诱导的小鼠急性肝损伤属于化学性肝损伤，是保肝药物筛选研究中的经典模型。目前认为  $\text{CCl}_4$  诱导肝损伤

的主要机制与其自由基代谢产物有关。当  $\text{CCl}_4$  进入机体后，在肝脏内通过 CYP450 酶代谢产生大量  $\text{CCl}_3\cdot$  电子自由基，再与氧结合生成  $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$  氧自由基，导致重要的抗氧化酶 SOD 活性降低<sup>[15]</sup>，氧化终产物 MDA 异常升高，引起肝细胞膜脂质过氧化，使细胞膜通透性增加，细胞质内的 ALT 和 AST 进入血液<sup>[16]</sup>。

炎性小体是由 *NLRP3*、凋亡相关微粒蛋白及 *caspase-1* 组成的多蛋白复合物，在炎症反应的调节中发挥关键作用，与肝脏疾病的发生密切相关<sup>[17]</sup>。当肝脏受到  $\text{CCl}_4$  刺激后，*NLRP3* 被激活，进而活化前体 *caspase-1* (pro-*caspase-1*) 转



注：与正常组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，#  $P<0.05$ ，##  $P<0.01$ 。

图 4 紫苏叶固体和总黄酮对急性肝损伤小鼠肝组织 *NLRP3*、*caspase-1* 和 *IL-1β* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

变成有活性的 caspase-1，在此基础上通过剪切前体 IL-1β (pro-IL-1β) 激活有炎性作用的 IL-1β 的成熟和分泌<sup>[18]</sup>，同时刺激 TNF-α 和 IL-6 等炎性因子的释放，产生炎症级联反应<sup>[19]</sup>。TNF-α 能与肝细胞膜上跨膜型 TNF (mTNF) 受体结合进而损伤肝细胞<sup>[20-21]</sup>，与肝细胞的脂质过氧化形成相互促进的恶性循环<sup>[22]</sup>；IL-1β 可以诱导肝细胞产生更多的炎性因子，进一步加重肝脏的炎性损伤<sup>[23]</sup>；随后 IL-6 在受到 TNF-α 和 IL-1β 刺激后会进一步对其他细胞因子进行调控从而扩大肝细胞的免疫病理反应<sup>[19]</sup>。而 TGF-β1 是一种多功能的细胞因子，它在肝脏长期受损的情况下可以促进纤维化的形成，但在早期炎性反应中它具有负性免疫调节的作用<sup>[24-25]</sup>，可抑制多种免疫细胞的分化及细胞因子如 TNF-α、IL-6 的分泌从而发挥抗炎的作用<sup>[26]</sup>。当机体发生细胞因子风暴时，多种促炎因子的释放会导致 TGF-β1 的大量损耗从而加重肝脏的炎症反应。因此，TNF-α、IL-6、IL-1β 以及 TGF-β1 的水平能反映肝脏早期炎性损伤的程度。

本研究对中药紫苏叶水煎液不同组分的黄酮含量进行了分析，发现紫苏叶水提醇沉固体中不仅含有多糖成分，还含有一定浓度的水溶性总黄酮组分，在紫苏叶药材中的含量为 37.07 mg/g，且用该水提醇沉工艺方法，可使紫苏叶总黄酮的提取率达到 6.26%。

本实验进一步采用了 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝损伤模型研究紫苏叶各组分对肝损伤的保护效应，初步探讨可能的分子机制。研究结果表明，紫苏叶各组分均能不同程度地降低小鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL 水平，其中以紫苏叶水溶性总黄酮的效果最佳，能增加肝组织 SOD 活性，降低 MDA 水平，同时升高 TGF-β1 水平，并抑制促炎性因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的释放。进一步研究发现，水溶性总黄酮还可以降低急性肝损伤小鼠肝组织 *NLRP3*、*caspase-1*、*IL-1β* mRNA 表达。结果提示紫苏叶水溶性总黄酮可能通过抑制 *NLRP3*/*caspase-1* 信号活化，减少炎性因子的释放，从而减轻 CCl<sub>4</sub> 急性肝组织炎性损伤，达到保肝的作用。

综上所述，紫苏叶中水溶性总黄酮是紫苏叶发挥保肝降酶作用的关键组分，抑制 *NLRP3*/*caspase-1* 炎性小体信号

通路可能是其抗 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤的作用机制之一。

参考文献：

[ 1 ] 张红阳, 李雪微, 姚雪莲, 等. 肝损伤的分子机制及其中草药研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 448-455.

[ 2 ] Qu H, Gao X, Wang Z Y, et al. Comparative study on hepatoprotection of pine nut (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) polysaccharide against different types of chemical-induced liver injury models in vivo[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155: 1050-1059.

[ 3 ] Asrani S K, Devarbhavi H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 151-171.

[ 4 ] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 277.

[ 5 ] 张运晖, 赵 瑛, 欧巧明. 紫苏叶化学成分及生物活性研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2020(12): 69-76.

[ 6 ] 李明伟, 金 华. 紫苏叶归肝经探析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 86-89.

[ 7 ] 郎玉英, 张 琦. 紫苏总黄酮的抗炎作用研究[J]. 中草药, 2010, 41(5): 791-794.

[ 8 ] Saita E, Kishimoto Y, Tani M, et al. Antioxidant activities of *Perilla frutescens* against low-density lipoprotein oxidation in vitro and in human subjects[J]. J Oleo Sci, 2012, 61(3): 113-120.

[ 9 ] 魏 磊, 李 晓, 王学方, 等. 紫苏叶总三萜超声提取工艺优化及对 10 种常见致病菌的抑菌作用研究[J]. 中国药房, 2018, 29(16): 2193-2197.

[ 10 ] 袁 芑, 牛晓涛, 宋梦薇, 等. 紫苏挥发油对人肺癌细胞的体外抑制作用研究[J]. 食品科技, 2017, 42(2): 235-238.

[ 11 ] Kim M K, Lee H S, Kim E J, et al. Protective effect of aqueous extract of *Perilla frutescens* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(9): 1738-1744.

[ 12 ] 李冲伟, 宋 永, 孙庆申. 微波辅助提取紫苏多糖及保肝降酶活性的研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(9): 285-290.

[ 13 ] 孙广平, 袁 丽, 方晓琳, 等. 紫苏叶多糖改善 2 型糖尿病大鼠肝损伤的作用及机制研究[J]. 中药材, 2020, 43(11): 2798-2801.

[14] 刘晓玲, 杨育儒, 蔡小辉, 等. 镰形棘豆总黄酮的含量测定方法研究[J]. 药学实践杂志, 2021, 39(5): 422-425; 459.

[15] 陈发菊, 彭 梅, 王 丽, 等. 藤茶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中成药, 2021, 43(1): 200-203.

[16] 尹连红, 于 浩, 彭金咏. 四氯化碳诱导肝损伤的分子机制及中药干预的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1147-1155.

[17] 周至品, 覃 乐, 农汝楠, 等. 三叶香茶菜对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化大鼠 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 96-101.

[18] Zahid A, Li B F, Kombe A J K, *et al.* Pharmacological inhibitors of the NLRP3 inflammasome [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2538.

[19] 黄力强, 曾 悦, 庄 倩, 等. 大黄游离蒽醌抑制 NLRP3/Caspase-1 通路改善大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 54-59.

[20] 郭悦荣, 陆伦根. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  在非酒精性脂肪性肝病

进展中的作用[J]. 胃肠病学, 2019, 24(10): 623-626.

[21] 邹 勇, 鲍俊杰. 暴发性肝炎小鼠血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  水平与肝损伤相关性分析[J]. 实用医技杂志, 2013, 20(5): 497.

[22] Ishida Y, Kondo T, Tsuneyama K, *et al.* The pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55 in acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75(1): 59-67.

[23] 刘胜新, 徐军辉, 蔡 涛, 等. IL-1 $\beta$  在急性胰腺炎时肝损伤中的作用[J]. 临床外科杂志, 2019, 27(9): 777-778.

[24] 李君蕊, 赵宝春, 商艳朝. 感染性与自身免疫性炎症中生长因子水平差异及其意义[J]. 河北医药, 2008, 30(10): 1509-1510.

[25] 刘建辉, 张帮建, 李定海. TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路在帕瑞昔布钠对 CCI 模型大鼠神经病理性疼痛影响中的作用[J]. 西部医学, 2021, 33(11): 1602-1607.

[26] 于丹丹, 阿 荣. CHD 发生发展中炎症因子 TGF- $\beta$ 1、IL-35 作用的研究进展[J]. 山东医药, 2021, 61(7): 92-95.

# 灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌株 CA23 的协同抑菌作用

廖一川<sup>1,2</sup>, 苏刘艳<sup>1</sup>, 李家生<sup>1,2</sup>, 王应仙<sup>1,2</sup>, 李 俊<sup>1</sup>, 张 祎<sup>1,2</sup>, 王睿睿<sup>1,2\*</sup>  
(1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500; 2. 云南省民族特色养生理理论与健康产品工程实验室, 云南 昆明 650500)

**摘要:** **目的** 探讨灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌 CA23 毒力因子的作用和潜在机制。**方法** 微量稀释法、棋盘法及时间-杀菌曲线测定灯台叶总碱与氟康唑联用效果; 荧光探针测定菌株外排泵功能, 实时荧光定量 PCR 法检测耐药相关基因表达; 倒置显微镜、扫描电镜观察菌丝诱导培养基中菌株形态转换, RT-qPCR 法检测菌丝相关基因表达, 添加外源性 cAMP 验证; 卵黄琼脂平板法检测菌株胞外磷脂酶活性。**结果** 灯台叶总碱与氟康唑对耐药白念珠菌具有较强的协同抑菌作用; 联用处理并不能显著抑制菌株的外排功能, 与耐药相关基因表达结果一致; 两药联用可以抑制在 SD 和 Spider 诱导培养基中菌丝生长, 且下调菌丝相关基因 *CYR1*、*ALS3*、*RAS1*、*BCR1*、*ALS2*、*TPK2* 表达, 添加外源性 cAMP 后, 能恢复部分药物联用引起的菌株形态变化; 两药联用能抑制胞外磷脂酶活性, 且对灯台叶总碱存在剂量依赖性。**结论** 灯台叶总碱与氟康唑联用对氟康唑耐药株表现为协同抑菌作用, 其机制与调节 Ras1-cAMP-PKA 信号通路抑制菌丝生长, 并降低胞外磷脂酶活性从而影响耐药白念珠菌毒力因子有关。

**关键词:** 灯台叶总碱; 白念珠菌; 协同作用; 菌丝; 磷脂酶; 毒力因子

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2023)12-4124-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.12.046

白念珠菌 *Candida albicans* 是一种分布广泛的条件致病菌, 好发于免疫低下及免疫缺陷人群, 易引起黏膜感染和全身感染。据研究报道, 全世界约 70% 的真菌感染由白念珠菌引起<sup>[1]</sup>, 且死亡率达 40%<sup>[2]</sup>。目前临床治疗药物种类稀缺, 一线药物频繁使用引起的耐药性使单一药物治疗效果较差。研究表明, 一些中药复方、中药提取物及中药来

源的天然化合物能有效抑制白念珠菌生长, 特别是与氟康唑联用时, 表现出良好的协同抗菌作用<sup>[3]</sup>。课题组长期从事中药及其活性成分抗真菌活性筛选, 发现灯台叶总碱与氟康唑联用仅对白念珠菌氟康唑耐药株发挥抑菌作用, 在此基础上, 进一步探讨灯台叶总碱与氟康唑联用对耐药白念珠菌的作用机制, 以期灯台叶总碱的抗真菌感染应用

收稿日期: 2022-02-21  
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81660737); 云南省科技计划中医联合重点项目 (2017FF117-003)  
作者简介: 廖一川 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为真菌感染免疫。Tel: 13099439166, E-mail: 1443698127@qq.com  
\* 通信作者: 王睿睿 (1980—), 女, 博士, 教授, 研究方向为真菌感染免疫。Tel: 15987106288, E-mail: wangryuucm@126.com