

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.012

五味子甲素研究进展*

李 静, 张 培, 李文尧, 宋 毅[△]

(四川大学华西医院药剂科, 四川 成都 610041)

摘要:五味子甲素为五味子木脂素类有效成分。该文对近年来关于五味子甲素的研究情况作一系统综述,包括其药理作用、提取工艺、测定方法,为进一步研究、开发和合理应用五味子甲素提供参考。

关键词:五味子甲素;药理作用;提取工艺;测定方法;进展

中图分类号:R932;R285;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)05-0053-04

Research Progress of Deoxyschizandrin

LI Jing, ZHANG Pei, LI Wenyao, SONG Yi

(Department of Pharmacy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China 610041)

Abstract: deoxyschizandrin is one of the active constituents of Schisandra lignans. In this paper, a systematic review of the research on deoxyschizandrin in recent years, including its pharmacological action, extraction process, and determination methods was conducted, in order to provide a reference for further research, development, and rational application of deoxyschizandrin.

Key words: deoxyschizandrin; pharmacological effects; extraction process; determination method; progress

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* Turcz. Baill 或华中五味子 *Schisandra sphenanthea* Rend. et Wils. 的干燥成熟果实,前者称为“北五味子”,后者称为“南五味子”^[1],《神农本草经》载其有益气滋肾、生津敛汗、涩精止泻、宁心安神等功效^[2]。五味子的主要化学成分为木脂素类,其中五味子甲素为主要活性成分,五味子甲素也称去氧五味子素、五味子素 A,临床对其药理作用的研究相对较多,其涉及生殖系统^[3]、心血管系统^[4]、呼吸系统^[5]、消化系统^[6-7]、中枢神经系统^[8]等,不仅具有保肝、抗病毒、抗炎、舒张血管、抗癌等作用,在精神病的治疗中也具有重要意义。在此,对五味子甲素的药理作用、提取工艺、测定方法等进行综述,旨在后续研究提供参考。

1 药理作用

1.1 保肝作用

肝病包括外源性和内源性的肝损伤,五味子甲素具有诱导肝微粒体细胞色素 P450 酶活性,从而可增强肝脏的解毒功能、降低血清转氨酶、阻断多种毒性物质对肝细胞膜的损伤作用^[9]。王菊平等^[10]的研究显示,五味子甲素对急性胆汁淤积造成的肝损伤具有很好的改善作用,主要通过降低血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)的活性和血清总胆红素(TBil)的含量,增加 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性以改善肝功能。王陈萍等^[11]将五味子类木脂素成分对肝损伤细胞的保护作用进行了比较,结果显示,五味子甲素对体外损伤肝细胞无保护作用。而 LU 等^[12]的

研究证实,五味子甲素体内对损伤肝细胞具有很好的药理活性。曹媛等^[5]采用不同浓度的五味子甲素在不同孵育时间时刺激肝星状细胞 LX-2,四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色(MTT)法检测五味子甲素对细胞的抑制作用,RT-PCR 法和 Western blot 法测定纤维化指标 Collagen I 和 α -SMA 的表达量,并检测五味子甲素对凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达量的影响,结果显示,五味子甲素在不同浓度及孵育时间时可抑制人肝星状细胞系 LX-2 细胞的增殖,可显著降低 Collagen I 和 α -SMA 的 mRNA 水平和蛋白表达量,并能显著降低 Bcl-2 的 mRNA 水平和蛋白表达量,以及 Bcl-2/Bax,因此五味子甲素可通过抑制细胞增殖、降低纤维化指标的表达式,从而发挥抗肝纤维化作用。沈芳仪等^[13]研究表明,五味子甲素有降低肝炎的 ALT 的作用,且临床应用广泛。

1.2 抗炎作用

白细胞介素 1 β (IL-1 β)为单核细胞因子,具有很高的活性,从细胞中释放出来后表现为全身性激素样作用,在 1 ng/L 质量浓度时即可表现出非常强的生物学活性。IL-1 β 不仅能促进白细胞聚集,还能直接诱发其他促炎因子生成,并激活中性粒细胞参与炎症反应。杨德峰等^[14]通过实验证实,五味子甲素能有效抑制单核巨噬细胞中 IL-1 β mRNA 的表达。同时,邱宏涛等^[15]通过网络药理学方法分析得出,五味子甲素对 4 个炎症因子[肿瘤坏死因子- α (TNF- α), IL-1 β , 白细胞介素 6 (IL-6), 前列腺素 E₂(PGE₂)]的分泌均有抑制作用,并

*基金项目:四川省科技计划项目[2015SZ0039]。

第一作者:李静,女,大学本科,初级药师,主要从事药剂学及药物制剂质量提升研究工作,(电子信箱)455521502@qq.com。

[△]通信作者:宋毅,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为药剂学及药效学,(电子信箱)512747810@qq.com。

能同时减少诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及COX-2蛋白的表达,并证实了五味子甲素的抗炎作用最强。崔鹤蓉等^[16]通过免疫荧光和Western blot试验证实,五味子甲素在浓度范围内(25~200 μmol/L)对NLRP3炎性小体活性的抑制作用不依赖于核因子κB(NF-κB)通路活性及其诱导的NLRP3,ASC,pro-IL-1β等炎性小体蛋白的表达,而是通过阻断caspase-1活化,抑制caspase-1对pro-IL-1β的剪切活化,进而抑制NLRP3炎性小体的活性,减轻免疫炎症反应。在抗炎作用上,有文献表明,五味子甲素在体外能有效抑制脂多糖诱导的炎症反应^[17]。

1.3 抗凝血作用

罗旭灵^[4]采用生物学分析发现,五味子甲素与APJ受体的3个氨基形成4个位点,通过比浊法、体外血栓检测仪分析、线粒体荧光针标记法及透射电镜分析方法表明,五味子甲素可通过抑制线粒体自噬从而抑制elabela32,apelin12、17、36诱导的兔血小板聚集及体外血栓形成。徐志立等^[7]考察了五味子甲素对溃疡性结肠炎(UC)小鼠血液流变性 & 凝血功能的影响,结果显示,五味子甲素可改善UC小鼠血液流变性 & 凝血功能,此作用有利于UC溃疡黏膜的修复与疾病的治疗。同时,五味子甲素对UC小鼠血液流变性 & 凝血功能的改善作用有利于预防UC并发的血栓形成,以及进而导致的肠黏膜血灌注降低,细胞缺血、缺氧,从而减轻肠黏膜组织损伤,抑制溃疡的形成与发展。可见,五味子甲素可明显降低UC小鼠全血黏度,改善UC小鼠血液流变性,显著延长出血时间(BT),凝血时间(CT),降低UC小鼠血液高凝状态,此作用有利于防止UC小鼠血栓形成,促进结肠黏膜的修复,缓解UC临床症状,提高临床疗效。

1.4 抗癌作用

曾智锐等^[18]分析了五味子甲素对人胰腺癌细胞株AsPc-1增殖、凋亡的影响,结果显示,随着五味子甲素浓度的增加,AsPc-1细胞Bcl-2蛋白的相对表达量、全长β-catenin蛋白及78kD的β-catenin蛋白的相对表达量均逐渐下调,而Bax蛋白的相对表达量逐渐增加;五味子甲素组β-catenin蛋白在细胞核的聚集明显减少。提示五味子甲素可抑制人胰腺癌细胞AsPc-1细胞的增殖、克隆形成能力,从而达到促进细胞凋亡的效果;而其作用机制则可能是五味子甲素能在一定程度上降低β-catenin蛋白的表达及水解,从而减少β-catenin蛋白在细胞核内的定位,进而发挥调控功效,表明五味子甲素具有抑制胰腺癌细胞生长和促进其凋亡的潜在药用价值。LEE等^[19]发现,五味子甲素可引起卵巢癌细胞周期阻滞从而抑制卵巢癌细胞的增殖,还可通过抑制肿瘤相关巨噬细胞的活性,减少微环境中的

炎症因子。陈雪等^[20]的研究表明,五味子甲素通过下调CyclinD1蛋白表达水平、上调促凋亡因子Bax和Bcl-2表达水平抑制胶质瘤C6细胞的生长。魏子龙等^[21]证实,五味子甲素通过抑制胶质瘤干/祖细胞表面已存在的ABCBI基因编码的P-糖蛋白泵出药物能力并降低ABCBI基因转录和翻译能力,逆转胶质瘤干/祖细胞耐药性。

1.5 防护肾损伤

甘永雄等^[22]通过大鼠实验分析了五味子甲素对失血性休克大鼠肾脏损伤的作用,通过复制失血性休克大鼠模型并采用不同质量浓度的五味子甲素进行处理,同时比较相应炎症因子的表达情况。结果显示,40 mg/kg和80 mg/kg的五味子甲素可促使大鼠血清血尿素氮(BUN)及血清肌酐(SCr)含量明显下降;80 mg/kg的五味子甲素能促使线粒体中琥珀酸脱氢酶(SDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)逐渐升高,同时降低IL-1β及TNF-α的mRNA及蛋白表达水平。提示五味子甲素能对NLRP3炎性小体活化情况进行抑制,从而可达到减轻失血性休克大鼠肾损伤的效果。

1.6 抗抑郁

李国樑等^[8]探讨了五味子甲素对慢性不可预知性温和刺激(CUMS)诱导大鼠抑郁行为的影响及其作用机制,大鼠在经过CUMS应激后,海马内炎症因子IL-1β,TNF-α,PGE₂和IL-10表达增加,表明海马出现了明显的炎症反应损伤。而在给予五味子甲素及氟西汀干预之后,可改善由应激导致的炎症反应损伤,进一步表明五味子甲素的抗抑郁作用可能与其抗炎作用相关。五味子甲素可通过抑制caspase-3蛋白活化和激活ERK信号传导,从而抑制1-甲基-4-苯基吡啶离子引起的SH-SY5Y细胞凋亡^[23-24]。

1.7 抑制胃肠平滑肌收缩

五味子甲素对肠平滑肌收缩功能的调节作用机制为Ca²⁺参与可引起平滑肌收缩,在肌球蛋白轻链激酶(MLCK)能催化20 kD的肌球蛋白轻链(MLC20)的磷酸化,磷酸化肌球蛋白Mg²⁺-ATPase活性增强,能有效分解三磷酸腺苷(ATP),将化学能力转化为机械能,在肌动蛋白与肌球蛋白相互作用下产生收缩。MLCK属于平滑肌细胞收缩的重要调节蛋白,五味子甲素可有效抑制MLCK的过度表达,从而对肠平滑肌收缩有积极作用^[6]。

1.8 抗帕金森病

五味子甲素可通过有效抑制PD细胞模型的凋亡作用而发挥对多巴胺神经细胞的保护作用^[23-24]。

2 提取研究

木脂素、多糖、挥发油等均为五味子的主要有效成

分,目前,临床对木脂素的研究相对较多,五味子甲素为木脂素的有效成分之一。提取五味子甲素的方法较多,常用方法包括超声酶解法^[25]、高压脉冲电场法^[26]、超声波-微波协同萃取^[27]、乳化剂萃取^[28]、超临界CO₂萃取^[29]。

采用超声酶解法^[25]提取五味子甲素,以五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素3种有效成分的提取量作为考察指标,采用单因素试验确定其最佳提取工艺。研究结果显示,工艺条件为果胶酶、浓度为1.0%、酸水液pH为4.0、酸水液体积为25 mL、水解温度为50℃、酶解时间为5 h,五味子甲素的提取量为1.268 mg/g。

采用高压脉冲电场对五味子木脂素的提取进行研究,以料液比、电场强度及脉冲数为自变量,在单因素试验结果的基础上,通过响应曲面法进行优化研究,结果显示,以80%乙醇为提取溶剂,电场强度为25KV/cm,脉冲数为8,料液比为1:30(g/mL)为最佳提取工艺条件。

在五味子甲素的提取研究中,各种传统技术、现代提取技术及新型辅助提取技术报道较多^[30],不同提取方法均有自身的特点与不足。与传统技术乙醇回流相比,超临界流体萃取法的操作方法更简单,且无有机溶剂残留,故可避免长时间加热导致的损失,同时还具有操作简单、设备简单、杂质少、有效成分提取率高等多种优点,故应用广泛。与传统技术比较,现代新型技术更适应社会发展,适用范围广、适应性好、回收率高、分离量大、分离率高等特点,值得在现代研究中推广。

3 测定方法

3.1 高效液相色谱(HPLC)法

五味子甲素的含量测定多采用HPLC法、反相高效液相色谱法(RP-HPLC)、超高效液相色谱法(UPLC),主要是通过对样品进行提纯、定容等处理,然后以HPLC法对流动相甲醇-水(77:23)测定^[31],以明确五味子甲素含量。姜鑫等^[32]用HPLC法测定五味子甲素的线性范围为0~295 μg/mL, $RSD \leq 3.9\%$ ($n=6$)。孙琳等^[33]采用UPLC测定五味子甲素,进样量线性范围是0.0013~0.05 μg ($r=0.9999$),平均回收率为101.73%, RSD 为2.29%。刘宏胜等^[34]采用RP-HPLC法测定五味子甲素。以上研究结论均提示,HPLC法简单,线性范围佳,准确度和稳定性好,是现代常用五味子甲素的测定方法。

3.2 液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法

HPLC-MS以液相色谱作为分离系统,质谱为检测系统。样品在质谱部分和流动相分离,被离子化后,经质谱的质量分析器将离子碎片按质量数分开,经检测器得到的质谱图具有高选择性和高灵敏度,常用于成分复杂、不稳定成分的分析。关皎等^[35]采用超快速液相色谱-串联质谱法(UFLC-MS/MS)测定五味子甲素,质谱采

用3200 QTRAP三重四极杆串联质谱仪,离子源为电喷雾电离源(ESI源),检测方式为正离子检测,扫描模式为多重反应检测(MRM),结果五味子甲素质量浓度在0.1~5 μg/mL ($r=0.9992$)范围内与峰面积线性关系良好,平均回收率为96.9% ($n=9$)。此方法适用性、重复性、准确度均较高^[36-37]。

3.3 薄层扫描(TLCS)法

TLCS是指用一定波长的光照射在薄层板上,对薄层色谱(TLC)中有紫外或可见吸收的斑点或经照射能激发产生荧光的斑点进行扫描,将扫描得到的图谱及积分值用于药品的质量检查的方法。但随着现代科技越来越发达,新型技术的运用,该法更多用于定性分析,少用于定量。陈素英^[38]采用TLC法对五味子甲素进行定性和定量分析,结果表明,五味子甲素最佳测量条件为荧光扫描模式,分离条件为甲苯-乙酸乙酯(8:1)单次展开;通过考察样品贮备液的稳定性,证明五味子甲素在薄层板上展开后具有较好的稳定性和较高的精密度。TLC法操作简便易行,准确灵敏,且重现性与专属性好,较符合定量分析的要求,可为药物的质量控制提供客观的定量评价。

3.4 毛细管电泳法

毛细管电泳法属于微分离分析技术,高效毛细管电泳主要是以高压电场作为驱动力,将毛细管作为分离通道,以样品中各组分间分配行为、淌度等的差异情况为依据达到分离效果。但国内相关研究报道较少,仅有文献^[39-40]分别采用胶束电泳和毛细管电泳法测定五味子甲素的含量。与HPLC法及TLC法比较,高效毛细管电泳的起步较晚,但该测定方式因具有回收率高、分析速度快、费用低、进样体积小、仪器维护方便、水溶液消耗量少等优点,临床应用广泛。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京: 中国医药出版社, 2015: 66, 244.
- [2] 王佳丽, 杨洪涛. 五味子主要化学成分的药理研究[J]. 河南中医, 2014, 34(2): 357-359.
- [3] 李博博. 五味子甲素通过SCF/c-kit信号通路调控少、弱精子症大鼠模型精子凋亡作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [4] 罗旭灵. APJ受体拮抗剂五味子甲素对elabela, apelin亚型诱导兔血小板聚集及血栓形成的影响[D]. 衡阳: 南华大学, 2018.
- [5] 曹媛, 夏延哲, 陈杰, 等. 五味子甲素在人肝星状细胞中的抗纤维化作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(8): 878-883.
- [6] 徐志立, 陶小军, 张莹, 等. 五味子甲素对大鼠及小鼠肠平滑肌功能的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 126-129.

- [7] 徐志立,梁晗业,胡丽萍,等. 五味子甲素对溃疡性结肠炎小鼠血液流变性及凝血功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2017,17(24):4631-4634.
- [8] 李国梁,曾丽海,郑杰蔚,等. 五味子甲素对慢性不可预知温和刺激大鼠抑郁行为的影响及其机制[J]. 中国药理学杂志, 2018,53(15):1273-1279.
- [9] 诸明娜,徐瑞鑫. 基于血液微透析技术探究五味子甲素的体内代谢过程[J]. 中国中医药信息杂志,2016,23(6):99-102.
- [10] 王菊平,李小芹,李永春. 五味子甲素对急性肝内胆胆汁淤积大鼠肝功能的保护作用研究[J]. 亚太传统医药,2018,14(6):32-33.
- [11] 王陈萍,许波,蔡向明,等. 不同五味子类木脂素成分对损伤肝细胞的保护作用比较[J]. 中国医药导报,2017,14(19):35-38.
- [12] LU Y, WANG WJ, SONG YZ, et al. The protective mechanism of schisandrin A in d-galactosamine-induced acute liver injury through activation of autophagy[J]. Pharm Biol, 2014, 52(10): 1302-1307.
- [13] 沈芳仪,葛海英,曾嵘. 异型南五味子醇提取物对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(6):232-235.
- [14] 杨德峰,刘志辉,陈一夫,等. 五味子甲素对单核巨噬细胞炎症相关介质表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2013,33(23):5911-5913.
- [15] 邱宏涛,赵筱萍,李正,等. 基于网络药理学的五味子木脂素类主要药效作用研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(3): 522-527.
- [16] 崔鹤蓉,李朋彦,李雨萌,等. 五味子甲素对NLRP3炎症小体活性的抑制作用及机制初步研究[J]. 药科学报,2017,52(1):80-85.
- [17] YANG D, LIU Z, CHEN Y, et al. Effect of deoxyschizandrin on inflammatory factors in mononuclear phagocyte[J]. Chin J Gerontol, 2013, 23:5911-5913.
- [18] 曾智锐,雷珊,张金娟,等. 五味子甲素对人胰腺癌细胞株 AsPc-1 增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 山东医药, 2019,59(12):1-4.
- [19] LEE K, AHN JH, LEE KT, et al. Deoxyschizandrin, isolated from schisandra berries, induces cell cycle arrest in ovarian cancer cells and inhibits the protumoural activation of tumour-associated macrophages[J]. Nutrients, 2018, 10(1):91.
- [20] 陈雪,张玉影,邵玉,等. 五味子甲素对脑胶质瘤 C6 细胞生长的抑制作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2016,42(4):711-715.
- [21] 魏子龙,狄冲,楼美清,等. 五味子甲素通过 ATP 结合盒转运子 B1 逆转胶质瘤干/祖细胞耐药性研究[J]. 中国现代神经疾病杂志,2017,17(6):439-445.
- [22] 甘永雄,俞凤. 五味子甲素通过抑制 NLRP3 炎症小体活化减轻失血性休克大鼠的肾脏损伤[J]. 中国免疫学杂志, 2018,34(12):112-115.
- [23] 李妍,赵园园,童章隆,等. 五味子甲素对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响[J]. 毒理学杂志,2017,31(2):98-101.
- [24] 李妍,张巍,蔡同建,等. 五味子甲素对 MPP⁺ 致 SH-SY5Y 细胞 ERK 信号转导通路的影响[J]. 中国兽医杂志, 2017,53(8):50-52.
- [25] 梁瑞雪,张新军,袁敏,等. 超声酶解法提取五味子中有效成分的最佳工艺研究[J]. 药学研究,2018,37(8):453-456.
- [26] 李艳姿,张伟哲,汤立民,等. 响应曲面法结合高压脉冲电场快速提取五味子藤茎中木脂素[J]. 吉林农业大学学报, 2018,40(5):589-595.
- [27] CHENG ZY, YANG YJ, LIU Y, et al. Two-steps extraction of essential oil, polysaccharides and biphenyl cyclooctene lignans from *Schisandra chinensis* Baill fruits[J]. J Pharmaceu Biomed Anal, 2014, 96:162-169.
- [28] 王东,徐茜,赵镇离,等. 同时提取五味子色素、多糖和木脂素的研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2014,27(2):152-156.
- [29] 程敏,赵艳艳,贾朝,等. 超临界 CO₂ 萃取南五味子木脂素的工艺研究[J]. 现代中医药,2016,36(5):86-89.
- [30] 程振玉,宋海燕,杨英杰,等. 五味子木脂素提取方法的最研究进展[J]. 中成药,2015,37(11):2485-2491.
- [31] 杨立志,姜雪敏. 高效液相色谱法测定利肺片中五味子醇甲、五味子甲素及五味子乙素含量[J]. 中国药业,2017,26(2):38-40.
- [32] 姜鑫,董宇,曲绪楷,等. 高效液相色谱法同时测定保健食品软胶囊剂型中五味子甲素、五味子乙素和五味子醇甲[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(18):199-203.
- [33] 孙琳,梁锐,严维花,等. 超高效液相色谱法测定五子衍宗丸中五味子甲素的含量[J]. 山西医科大学学报,2017,48(6):543-546.
- [34] 刘宏胜,张雅敏,王树森,等. RP-HPLC 法测定保肝丸中五味子甲、乙、丙素及熊果酸[J]. 中草药,2015,46(24): 3691-3694.
- [35] 关皎,马莹慧,刘娇,等. UFLC-MS/MS 法同时测定五味子中 5 个活性成分的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2018,29(6):785-789.
- [36] 李秀明,徐建. 超高效液相色谱-质谱联用法测定柏子养心丸中 6 种成分的含量[J]. 中南药学,2019,17(5): 710-713.
- [37] 黄翌磊,黄忠平,王丽丽. 闪蒸-气相色谱/质谱法同时测定四神丸中 8 个有效成分[J]. 药物分析杂志,2019,39(3): 510-517.
- [38] 陈素英. 中药五味子荧光分析方法研究[D]. 石家庄:河北师范大学,2011.
- [39] 谢青,林清英. 胶束电泳法测定五味子中的 3 种有效成分[J]. 光谱实验室,2013,30(4):1972-1975.
- [40] 刘海兴,刘凤芹,韩立坤,等. 毛细管电泳法测定五味子中五味子甲素[J]. 理化检验:化学分册,2007(9):749-750.

(收稿日期:2019-07-31)