

· 研究论文 ·

23-乙酰泽泻醇 B 对千里光碱致急性肝损伤小鼠水液失衡的影响

唐莹莹¹, 贾夏丽¹, 王金圆¹, 董 跨¹, 陈 岩¹, 丁丽丽^{1,2}, 熊爱珍^{1,2*},
杨 莉^{1,2*}, 王峥涛^{1,2}

(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: 误服用含吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloid, PA) 的中草药是导致我国临床肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) 的主要原因, 利尿剂是目前临床上治疗 PA 致 HSOS 的常用药物之一。泽泻作为传统利尿中药, 但其利尿机制仍未完全明确, 且尚未有从利尿角度阐释泽泻改善 PA 致 HSOS 的报道。基于课题组前期研究, 本研究以泽泻三萜 23-乙酰泽泻醇 B (alisol B 23-acetate, AB23A) 为代表性药物, 评价其对毒性 PA 千里光碱致小鼠急性肝损伤的保护作用, 并进一步考察 AB23A 对模型小鼠水液失衡的影响。所有动物实验经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 PZSHUTCM220808017), 符合实验动物伦理相关规范。小鼠单次灌胃千里光碱 (50 mg·kg⁻¹) 造模 (SEN 组), 并设 AB23A (40 mg·kg⁻¹) 干预组 (AB23A+SEN 组)、溶剂对照组 (Ctrl 组) 和 AB23A 对照组 (AB23A 组)。结果表明, AB23A 可明显降低千里光碱致急性肝损伤小鼠血清肝功能生化指标水平, 缓解肝细胞凝固性坏死、肝窦淤血等病理状态; 此外, AB23A 还可改善小鼠血清肾功能指标, 改善千里光碱造成的尿液排泄减少、机体电解质紊乱, 并降低千里光碱及其代谢产物的含量。进一步测定小鼠水液平衡通路相关蛋白和 mRNA 的表达, AB23A 可明显下调千里光碱模型组小鼠水通路蛋白 2 (aquaporin-2, AQP2)、血管紧张素 II 1 型受体的蛋白和 mRNA 表达水平, 抑制 AQP2 向顶端质膜运输, 并降低血清血管紧张素 II 含量。体外研究进一步证实 AB23A 可调节肾脏内髓集合管细胞 AQP2 的表达。本研究表明, AB23A 可调节千里光碱致急性肝损伤小鼠肾脏髓质 AQP2, 影响其对水的重吸收, 改善水液平衡。研究结果进一步加深了对泽泻传统利尿活性的认识, 为临床利用泽泻治疗 PA 致 HSOS 提供实验基础和理论依据。

关键词: 23-乙酰泽泻醇 B; 吡咯里西啶生物碱; 水通路蛋白 2; 利尿; 水液平衡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-1982-11

Effects of alisol B 23-acetate on water-liquid balance in mice with senecionine-induced acute liver injury

TANG Ying-ying¹, JIA Xia-li¹, WANG Jin-yuan¹, DONG Kua¹, CHEN Yan¹, DING Li-li^{1,2},
XIONG Ai-zhen^{1,2*}, YANG Li^{1,2*}, WANG Zheng-tao^{1,2}

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R & D Center for Standardization of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

Abstract: Misuse of pyrrolizidine alkaloid (PA)-containing herbs is the major cause of hepatic sinusoidal obstruction syndrome (HSOS) in China. And diuretics are among the most commonly used medications for the

收稿日期: 2024-01-24; 修回日期: 2024-04-05.

基金项目: 上海市自然科学基金资助项目 (20ZR1473300); 上海市人才发展资金 (2020099); 上海中医药大学“杏林学者”计划 (B1-GY21-409-04-06).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322506, Fax: 86-21-51322519, E-mail: aizhenxiong@shutcm.edu.cn; yl7@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0077

treatment of PA-induced HSOS in clinical practice. As a traditional diuretic in traditional Chinese medicine, the diuretic mechanism of *Alismatis Rhizoma* (AR) has not been fully clarified, and there is no report on AR ameliorating PA-induced HSOS from a diuretic point of view. Therefore, this study aims to investigate the therapeutic potential of alisol B 23-acetate (AB23A) against acute liver injury induced by senecionine (a representative toxic PA) in mice, and to further elucidate its effect on impaired water-liquid balance in mice exposed to PA. All experiments were approved by the Animal Research Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (Registration number: PZSHUTCM220808017). Animal welfare and the animal experimental protocols were strictly consistent with related ethics regulations of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Model of mice was induced by a single oral exposure of senecioine (50 mg·kg⁻¹) (SEN group), and AB23A (40 mg·kg⁻¹) intervention group (AB23A+SEN group), solvent control group (Ctrl group) and AB23A control group (AB23A group) were set up. The results showed that AB23A could significantly attenuate the levels of serum biochemical indices of liver functions in senecioine-induced acute liver injury mice, as evident by alleviated hepatocyte necrosis and hepatic sinusoidal stasis. AB23A also improved kidney function of mice exposed to senecionine, fascinated urinary excretion and repaired electrolyte disorders, as well as decreased content of senecioine metabolites. Further, the protein and mRNA expression of genes related to the water balance pathway were measured. AB23A could significantly down-regulate the elevated protein and mRNA expression levels of aquaporin 2 (AQP2) and angiotensin II type 1 receptor, and inhibit the transport of AQP2 to the apical plasma membrane induced by senecionine exposure. AB23A also significantly decreased serum levels of angiotensin II. *In vitro* studies further confirmed that AB23A regulates AQP2 expression in renal inner medullary collecting duct cells 3 (IMCD3). These data indicate that AB23A regulates the expression of AQP2 in renal medulla, thereby affecting its water reabsorption in mice with senecionine-induced acute liver injury. This work achieves a better understanding of the diuretic effect of AR, and provides experimental foundation and theoretical basis for the treatment of PA-induced acute liver injury by AR in clinics.

Key words: alisol B 23-acetate; pyrrolizidine alkaloid; aquaporin 2; diuretic; water-liquid balance

误服误用含吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloid, PA) 的中草药如菊科植物菊三七 *Gynura japonica* 是导致临床肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) 的主要原因之一, 其重症患者死亡率高达 90%, 成为目前受关注的中药药源性肝损伤之一^[1]。据报道, 菊三七含 20 多种毒性 PA 及 PA 氮氧化物^[2-5], 是导致我国临床 HSOS 的主要原因^[4,6,7]。千里光碱是菊三七中含量最高、毒性最强的 PA 成分^[5], 是常用的 HSOS 造模药物^[4,8,9]。千里光碱经肝脏代谢活化后生成中间代谢物脱氢吡咯, 其亲电性强, 不稳定, 与体内重要的生命大分子物质如蛋白结合生成吡咯-蛋白加合物 (pyrrole-protein adducts, PPAs), 影响正常生理功能, 进一步诱发毒性^[10,11]。目前, 临床上尚无有效的 PA 致 HSOS 的治疗药物。2017 年, 我国发布《吡咯里西啶生物碱相关肝窦阻塞综合征诊断和治疗共识》^[12], 提出目前治疗策略主要是通过去除病因, 采取利尿、抗凝、补充白蛋白等对症支持治疗, 严重者需行经颈静脉门体分流术或肝脏移植, 因此迫切需要开发新的治疗药物。

泽泻始载于《神农本草经》, 列为上品, 味甘、淡, 寒, 归肾、膀胱经, 具有利水渗湿、泄热、化浊降脂的功效, 是我国有名的利尿中药之一。《中华人民共和国药

典》(2020 年版) 记录泽泻为泽泻科植物东方泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 或泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn. 的干燥块茎。泽泻含多种活性成分, 泽泻三萜类化合物是其特征性成分, 也是目前研究最多、活性最强的成分。目前已在泽泻中发现 90 余种三萜类成分, 是泽泻属等少数植物类群中所特有的活性成分, 也是泽泻发挥保肝^[13,14]、抗炎^[15,16]、利尿^[17]、降脂^[18,19]等的药效物质基础。其中, 23-乙酰泽泻醇 B (alisol B 23-acetate, AB23A) 是最早发现的泽泻三萜类成分, 也是含量最高的三萜, 是泽泻药材和饮片含量测定的指标成分^[20]。作为传统的利尿中药, 泽泻的利尿活性和药效物质一直是研究者们重点关注的内容之一。已有研究发现, 泽泻提取物及多种泽泻三萜^[21,22]均具有利尿活性。尽管如此, 关于泽泻利尿的机制仍未完全明确。本课题组前期研究发现泽泻提取物能够改善千里光碱致小鼠急性肝损伤^[23], 提示泽泻可能成为临床 PA 致 HSOS 的潜在治疗药物, 但尚未有从利尿角度阐释泽泻改善 PA 致 HSOS 的报道。

因此, 本研究以泽泻中三萜类成分 AB23A 为代表性药物, 评价泽泻三萜对千里光碱致小鼠急性肝损伤的保护作用, 并进一步考察 AB23A 对模型小鼠水液失衡的影响, 为基于泽泻利尿活性开发其作为临床 PA 损

伤相关疾病的治疗药物提供实验基础和理论依据。

材料与amp;方法

药品与试剂 千里光碱 (senecionine, SEN) (批号: PRF8101624) 购自成都普瑞法科技开发有限公司, 纯度大于 98%。AB23A (批号: MUST-21030408) 购自成都曼思特生物科技有限公司, 纯度大于 98%。谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活力测试试剂盒 (货号: C009-2-1)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活力测试试剂盒 (货号: C010-2-1)、总胆汁酸 (total bile acids, TBA) 含量测试试剂盒 (货号: E003-2-1)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活力测试试剂盒 (货号: A059-2-2)、肌酐 (creatinine, CREA) 含量测试试剂盒 (货号: C011-2-1)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 含量测试试剂盒 (货号: C013-2-1) 均购自南京建成生物工程研究所。

实验动物 SPF 级雄性 C57 BL/6J 小鼠 (8 周龄, 体重 20 ± 2 g) 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [合格证号: SCXK (沪) 2022-0004], 饲养于上海中医药大学实验动物中心 [合格证号: SCXK (沪) 2020-0009], 饲养条件: 温度 20 ± 2 °C, 相对湿度 $55\% \pm 5\%$, 室内每小时空气交换 12~18 次, 12 h 昼/夜循环, 自由摄取食物和水。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: PZSHUTCM220808017), 所有实验均严格按照动物使用和伦理原则进行。

药物配制 称取适量的千里光碱, 溶解于 5% 盐酸溶液中, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6~7, 再用生理盐水补足至 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 给药剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。称取适量的 AB23A, 研磨之后, 用 0.5% CMC-Na 混悬成 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 给药剂量为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

动物实验 实验动物适应性喂养 7 天, 随机分为 4 组, 每组 8 只, 分别为溶剂对照组 (Ctrl 组)、模型组 (SEN 组)、AB23A 干预组 (AB23A+SEN 组)、AB23A 对照组 (AB23A 组)。给药前及取材前各禁食 8 h, 自由饮水。根据课题组前期研究^[23], SEN 组单次灌胃 SEN $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; AB23A+SEN 组每日给药 AB23A ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续 5 天, 于末次给药后灌胃 SEN ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 造模; Ctrl 和 AB23A 组分别灌胃空白溶剂和 AB23A ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。各组小鼠分别于 SEN 造模后分置于独立代谢笼中, 收集造模后 24 h 内的尿液并记录尿液体积。小鼠以异氟烷麻醉摘眼球取血, 收集肝脏、肾脏。全血于室温下静置 2 h, 4 °C、 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血清; 取小鼠肝脏最大叶中 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 置 4% 多聚甲醛中, 其余肝脏以液氮速冻后保存于 -80 °C; 取小鼠同侧肾脏组织置于 4% 多聚甲醛中, 其余肾脏以液氮速冻后保存

于 -80 °C。

细胞实验 小鼠肾脏内髓集合管 3 上皮细胞 (inner medullary collecting duct 3, IMCD3) 购自合肥万物生物科技有限公司, 培养基为含 10% 胎牛血清 (10099-141C, 美国 Gibco 公司) 及 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基 (PWL005, 大连美仑生物技术有限公司), 培养条件为含 5% CO_2 的 37 °C 培养箱常规培养。每两天换液一次, 当细胞密度达到 80%~90% 时传代, 选择对数生长期的细胞进行实验。实验分成 Ctrl 组、SEN 组 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、AB23A ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + SEN ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、AB23A ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + SEN ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、AB23A ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 每组 3 个复孔。将 IMCD3 细胞悬液以每毫升 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中。给药 24 h 后, 收集细胞。

肝肾功能评价 根据试剂盒说明书测定血清肝功能指标 (ALT 活力、AST 活力、TBA 含量、ALP 活力) 及血清肾功能指标 (CREA 含量、BUN 含量)。采用多功能酶标仪 (VARIOSKAN FLASH, 美国 Thermo Scientific 公司) 读取各吸光度 (optical density, OD) 值, 根据标准曲线计算 ALT、AST、TBA、ALP、BUN、CREA 的水平。取尿液以自动生化仪检测尿 Na^+ 、尿 K^+ 、尿 Cl^- 水平。

肝脏、肾脏组织以 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 依次进行脱水、包埋、切片、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封固, 于光学显微镜下观察组织病理变化并采集图片。

千里光碱及代谢物含量测定 参考文献方法^[4,24,25], 采用 LC-MS 检测小鼠血清、肝脏、尿液中千里光碱及主要代谢物的含量。仪器为日本 Shimadzu CBM-30 A 高效液相色谱系统, 连接美国 ABSCIEX QTRAP6500 质谱系统, 采用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式进行检测。色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$); 流动相为 0.1% 甲酸水-乙腈。各化合物的检测离子通道分别为: SEN: $336.2 > 120.2$ (定量离子对), $336.2 > 138.2$ (定性离子对); 千里光碱氮氧化物 (SENNO): $352.2 > 120.2$ (定量离子对), $352.2 > 138.2$ (定性离子对); 千里光碱羟化产物 (SENOH): $352.2 > 120.2$ (定量离子对), $352.2 > 138.2$ (定性离子对); 野百合碱 (内标): $326.2 > 120.2$ (定量分析), $326.2 > 138.2$ (定性离子对); 吡咯-蛋白加合物 (PPAs): $341.2 > 252.2$ (定量离子对), $341.2 > 296.2$ (定性离子对)。

血管紧张素 II 含量测定 参考课题组已建立的方法^[26], 采用 LC-MS 法检测血清中血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 的含量。以 Waters Acquity

HSS T3 柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱分离, 流动相为含 0.1% 甲酸水溶液 (含 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵)-乙腈。采用 MRM 测定样本中 Ang II 含量, 检测离子通道为: 523.9 > 263.1。

逆转录-聚合酶链式反应分析 取 10 mg 小鼠肾组织样本或细胞样本, 以 RNAfast 2000 总 RNA 极速抽提试剂盒 (220011, 上海飞捷生物技术有限公司) 提取总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 用 Prime Script RT Master Mix 试剂盒 (AG11706, 湖南艾科瑞生物科技有限公司) 转录为 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (AG11718, 湖南艾科瑞生物科技有限公司) 进行实时荧光 PCR 检测目的基因的 mRNA 表达水平。以内参基因 *Gapdh* 为参照, 通过 2^{-ΔΔCt} 方法分析目标基因的相对表达量, Ctrl 组设为 1, 引物序列见表 1。

Table 1 The primer sequences for RT-PCR. *Gapdh*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Aqp2*: Aquaporin 2; *Angpt1*: Angiopoietin 1; *Angpt2*: Angiopoietin 2; *Agtr1a*: Angiotensin II receptor, type 1a

Gene name	Primer	Sequence (5' to 3')
<i>Gapdh</i>	Forward	GGC CGA GAA TGG GAA GCT TGT
	Reverse	ACA TAC TCA GCA CCG GCC TCA
<i>Aqp2</i>	Forward	ATG TGG GAA CTC CGG TCC ATA
	Reverse	ACG GCA ATC TGG AGC ACA G
<i>Angpt1</i>	Forward	GGT GCT CTG CCA GTA TTA GAA
	Reverse	TGA CAT AAC CAC TTG CTG CT
<i>Angpt2</i>	Forward	GCT GTG ATG ATA GAG ATT GGA
	Reverse	GAG TCT TGT CGT CTG GTT TAG T
<i>Agtr1a</i>	Forward	AAC AGC TTG GTG GTG ATC GTC
	Reverse	CAT AGC GGT ATA GAC AGC CCA

蛋白免疫印痕分析 取 10 mg 小鼠肾组织样本或细胞样本, 加入含有蛋白酶抑制剂 (64155900, 美国 Roche 公司) 的 RIPA 裂解液 (89901, 美国 Thermo Scientific 公司), 4 °C 充分碾磨, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液。用 BCA 蛋白测定试剂盒 (ZJ102, 上海翌圣生物科技有限公司) 测定蛋白浓度。蛋白变性后, 取 20 μg 蛋白进行蛋白免疫印痕分析检测目标蛋白。以内参蛋白 β-actin 为参照, 计算目的蛋白的相对表达量。目标及内参蛋白一抗信息如下: 血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 抗体 (批号: ab9391, 英国 Abcam 公司); 水通路蛋白 2 (aquaporin-2, AQP2) 抗体 (批号: A16209, 武汉爱博泰克生物科技有限公司); Ang I 抗体 (批号: ab95230, 英国 Abcam 公司); β-actin 抗体 (批号: 4970s, 美国 Cell Signaling Technology 公司)。

免疫组织化学染色 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法进行免疫组织化学染色。一抗为 AQP2 兔多克隆抗体 (批号: A16209, 武汉爱博泰克生

物科技有限公司), 稀释比例 1:200; 二抗为生物素标记的羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物 (批号: k5007, 丹麦 Dako 公司)。

统计学分析 实验数据采用均数 ± 标准 ($\bar{x} \pm s$) 表示, GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) 软件用于统计分析, 两组间比较满足正态分布采用参数检验进行差异分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 若 $P < 0.05$ 则表示差异有统计学意义。

结果

1 泽泻三萜 AB23A 降低千里光碱致小鼠急性肝损伤

SEN 和 AB23A 化学结构如图 1A 所示。Ctrl 组小鼠肝脏肝细胞排列整齐, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状单行排列; SEN 模型组 (50 mg·kg⁻¹) 小鼠肝窦周围有明显的淤血, 肝细胞凝固性坏死, 与前期临床及实验报道相符^[12,23]。与模型组比较, AB23A 干预组 (AB23A+SEN) 小鼠肝窦淤血、肝细胞坏死等损伤均得到明显缓解 (图 1B)。SEN 模型组 ALT、AST、TBA、ALP 均较空白组明显升高; 与模型组比较, AB23A 干预组 ALT、AST、TBA、ALP 均显著降低 (分别降低约 70.6%、50.2%、51.4%、37.2%) (图 1C)。

PPAs 是 PAs 致肝损伤的特异性代谢标志物^[2,12]。模型组小鼠血清和肝脏中检测到大量 PPAs, AB23A 干预组血清、肝脏中 PPAs 含量较模型组均显著下降 (分别降低约 25.7%、21.8%) (图 1D)。以上结果均表明泽泻三萜 AB23A 可缓解千里光碱致小鼠肝损伤。与空白组比较, AB23A 对照组小鼠行为、肝脏病理及血清 ALT、AST、TBA、ALP 均未表现出明显异常。

2 泽泻三萜 AB23A 改善千里光碱模型小鼠尿液排放量减少及电解质紊乱

与空白组小鼠比较, SEN 模型组小鼠肾脏组织形态学未见明显异常 (图 2A), 但其尿液排放量明显减少 (降低 50.6%) (图 2B)。此外, SEN 模型组血清中的 BUN、CREA 水平均显著增加 (分别增加 27.7%、25.0%) (图 2C), 且尿液中的 Na⁺、Cl⁻ 浓度显著下降 (图 2D), 表明 SEN 可造成小鼠尿液排泄紊乱, 引起 Na⁺ 在小鼠体内贮留、电解质紊乱。而 AB23A 干预组小鼠尿液排泄量较模型组显著增加, 血清 BUN、CREA 水平恢复趋向空白组水平, 且尿液中 Na⁺、Cl⁻ 浓度也显著回调。与空白组比较, AB23A 对照组小鼠未见肾组织和尿液排泄量的明显变化, 血清 BUN、CREA 及尿电解质浓度均未见明显差异。利尿剂被用作临床 PA 致 HSOS 的常用治疗药物之一^[12,27]。泽泻三萜被认为是泽泻利尿的重要药效物质^[28,29]。以上数据提示, AB23A 可以改善 SEN 造成的小鼠尿液排泄减少、机体

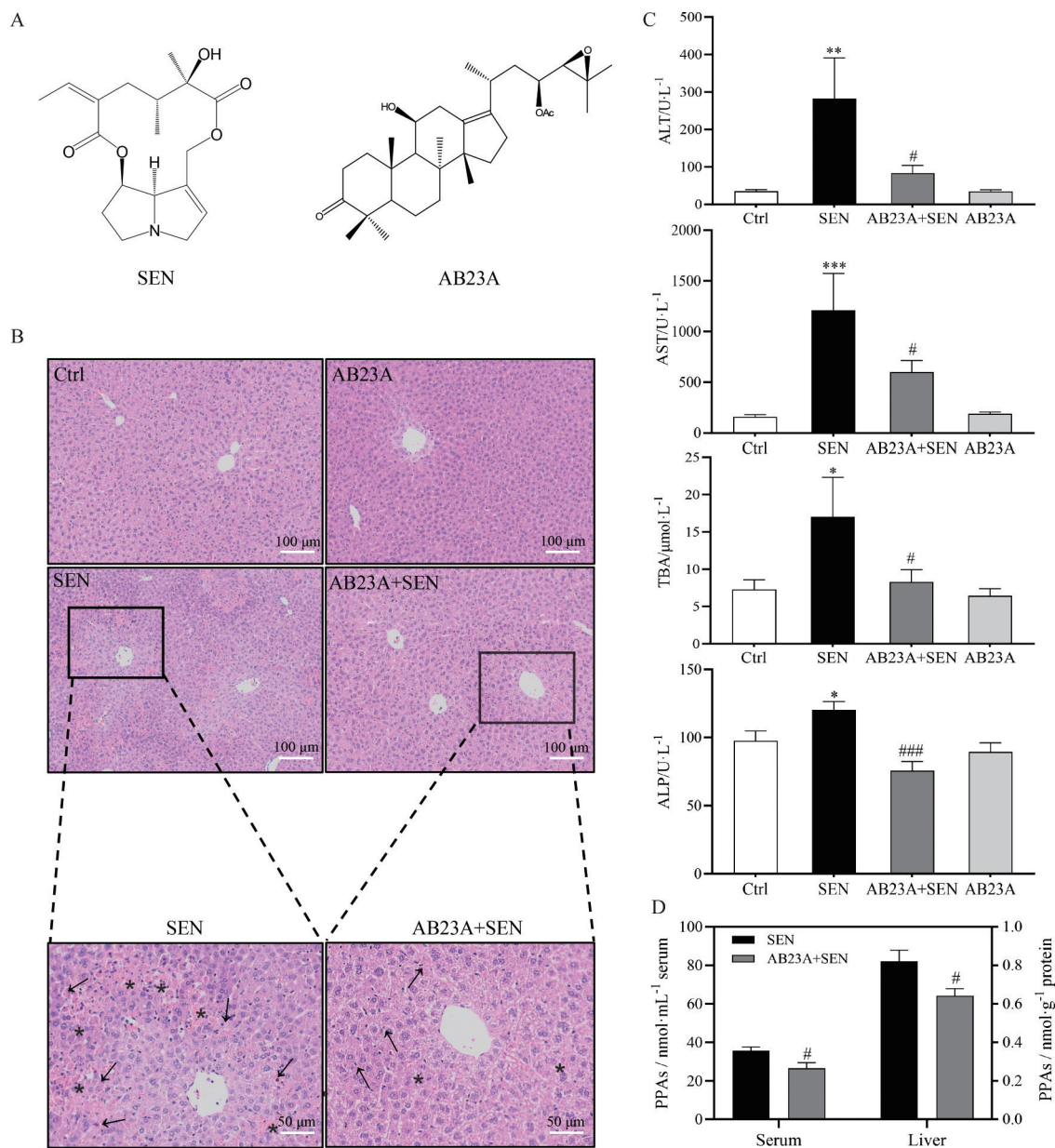


Figure 1 Alisol B 23-acetate (AB23A) treatment attenuates senecionine (SEN)-induced liver injury in mice. Mice were orally treated with AB23A (40 mg·kg⁻¹) 5 days before SEN treatment (50 mg·kg⁻¹), and sacrificed 24 h after SEN administration. A: Chemical structures of SEN and AB23A; B: HE staining of the liver tissues. Black star indicates hepatic sinusoidal stasis and black arrow indicates hepatocyte necrosis. The bar is 100 μm and the magnifying bar is 50 μm; C: Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bile acids (TBA) and alkaline phosphatase (ALP); D: Concentration of pyrrole-protein adducts (PPAs) in serum and liver tissues. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs Ctrl group; #*P* < 0.05, ###*P* < 0.001 vs SEN group

电解质紊乱。

3 泽泻三萜 AB23A 降低千里光碱模型小鼠肾脏及尿液中千里光碱代谢物含量

PPAs 主要在肝脏代谢, 生成 PPAs 进而诱发毒性。课题组前期研究表明除了血液和肝组织外, 肾、肺、脑等肝外组织也存在一定的 PPAs^[30]。本研究检测小鼠肾脏组织中 PPAs 含量, 发现 AB23A 干预组小鼠肾脏组织中 PPAs 的含量较模型组显著降低 (降低 42.3%) (图

3A)。此外, 在尿液中检测到 SEN 原型及其主要代谢物 SENNO 和 SENOH (图 3B), 对三者进行定量分析, 发现与模型组比较, AB23A 干预组小鼠尿液中 SEN 及 SENOH 的排出量均显著降低 (分别降低 60.1%、37.8%), 三者总排出量降为模型组的 60.9% (*P* < 0.01)。

4 泽泻三萜 AB23A 调节千里光碱模型小鼠肾组织 AQP2 蛋白的定位及表达

AQP2 是肾脏集合管中表达的一种水通道蛋白,

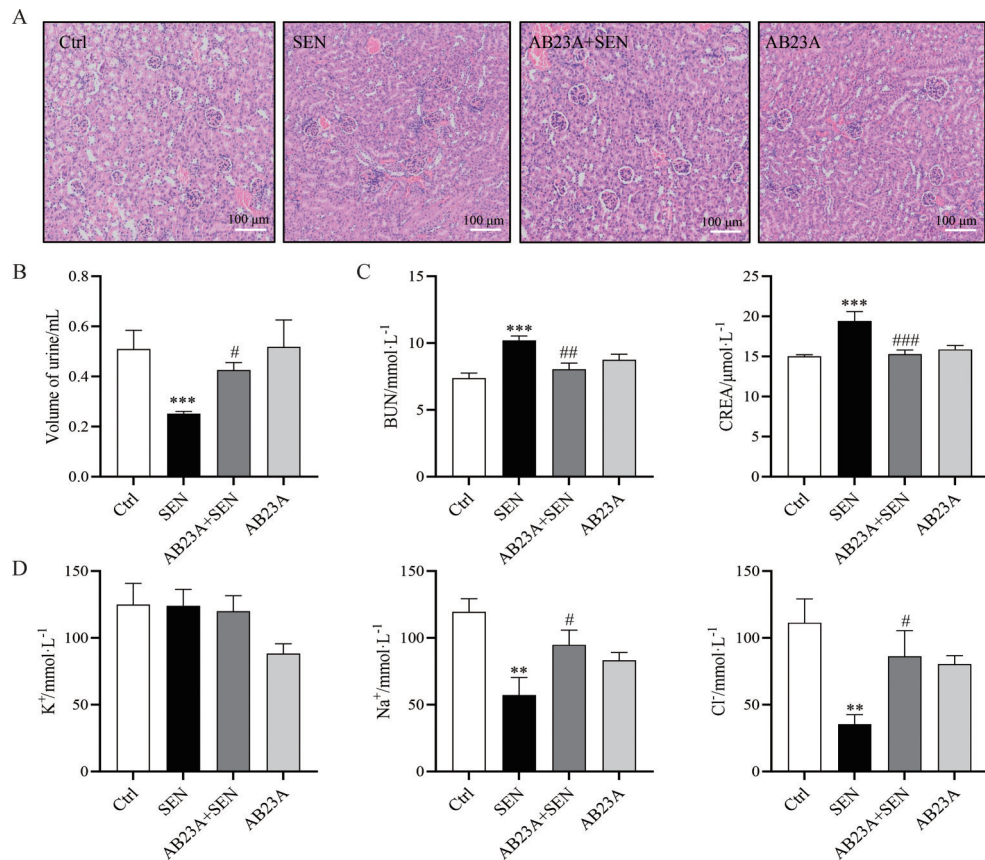


Figure 2 AB23A treatment promotes the excretion of urinary and impairs the electrolyte balance in mice exposed to SEN. A: HE staining of the kidney tissues. The bar is 100 μm ; B: Total volume of urine; C: Serum activities of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CREA); D: Urine concentration of K^+ , Na^+ , and Cl^- . $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs SEN group

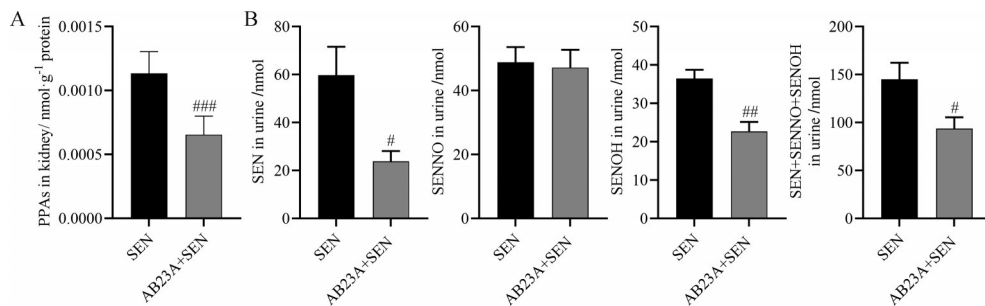


Figure 3 AB23A treatment decreases the concentration of SEN and its metabolites in kidney and urine of mice. A: Concentration of PPAs in kidney tissues; B: Urine secretion of SEN and its metabolites. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs SEN group. SENNO: Senecionine *N*-oxide; SENOH: Senecionine hydroxylate

它能够有选择性地调节水分子的通过,同时阻止离子和其他小分子的渗透^[31],在调节尿液浓度^[32]和控制体液和电解质稳态^[33]方面扮演着关键角色。毒性PA野百合碱可导致大鼠肾脏髓质中AQP2的蛋白和mRNA表达显著升高及尿液中AQP2浓度增加^[34]。因此,本研究检测小鼠肾脏中AQP2的蛋白和mRNA表达水平。结果表明,SEN模型组小鼠肾组织中AQP2的蛋白表达较空白对照组显著升高,AB23A干预组小鼠其

表达下调趋向空白组水平(图4A);肾脏中Aqp2 mRNA表达水平的变化与蛋白表达水平变化一致(图4B)。进一步对小鼠肾组织进行AQP2免疫组化标记,发现与空白组小鼠比较,模型组小鼠肾脏中AQP2的亚细胞定位存在显著差异(图4C):空白组小鼠肾脏中AQP2存在于整个细胞质囊泡中,质膜中分布较少;而模型组小鼠中,AQP2主要定位于顶端质膜结构域,而细胞质囊泡只有边缘标记。AB23A干预组小鼠中

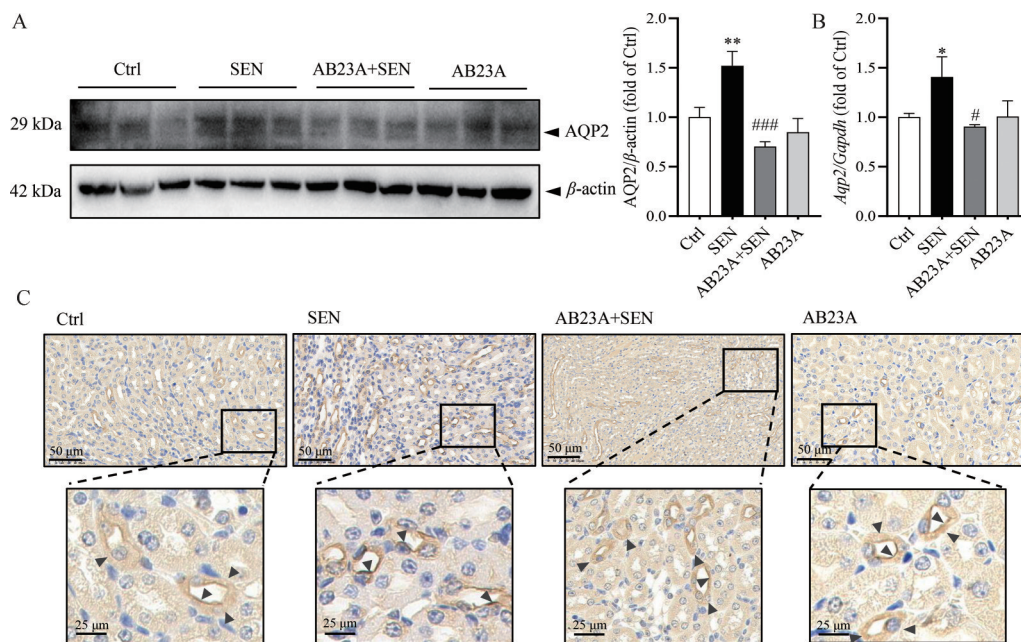


Figure 4 AB23A treatment influences the expression and localization of AQP2 protein in mice exposed to SEN. A: The protein expressions of AQP2 in kidney tissues ($n = 6$); B: The relative mRNA expression of *Aqp2* gene in kidney tissues ($n = 8$); C: Immunohistochemical staining of AQP2 in kidney tissues. The bar is 50 μm and the magnifying bar is 25 μm . Black arrow indicates the AQP2 protein positive cells. AQP2 expression was detected in principal cells in the collecting ducts, and labeling was much stronger in SEN-induced hepatotoxicity mice; labeling was much weaker in AB23A+SEN. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs SEN group

AQP2在质膜中的分布较模型组减少而囊泡中分布更为广泛,且整体表达降低,提示AB23A可降低SEN导致的小鼠肾脏髓质AQP2表达升高且促进AQP2向顶端质膜运输,抑制集合管主细胞对水的重吸收。

5 泽泻三萜AB23A调节肾脏AQP2水平平衡通路

AQP2的丰度增加及靶向顶膜运输,都能够提高集合管细胞的透水性,从而促进肾小管对水的重吸收^[35]。目前研究发现AQP2的表达和转运的信号通路可用于治疗与水平衡紊乱相关的疾病^[36,37]。最近的一些研究表明,Ang II能通过诱导AT1R^[38]的表达,改变细胞内AQP2的靶向性和AQP2的丰度,从而调节肾脏水重吸收。因此,进一步检测小鼠中AT1R、Ang I和Ang II的表达水平(图5A~C)。与空白组比较,模型组小鼠血清Ang II水平显著增加;AB23A干预组小鼠血清Ang II水平显著降低,肾脏髓质中AT1R的蛋白和mRNA表达水平也明显降低,这与文献报道中野百合碱可增加Ang II/AT1R表达一致^[39]。

进一步利用小鼠肾脏内髓集合管3上皮细胞IMCD3进行体外实验。SEN增加了IMCD3细胞中AQP2和AT1R的mRNA表达水平;与SEN组相比,AB23A+SEN联合给药组中二者的表达水平均有所降低,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AB23A可显著降低二者的表达(图5D)。进一步检测IMCD3细胞中AQP2蛋白表达水

平,SEN组细胞AQP2蛋白表达水平较溶剂对照组显著升高;与SEN组比较,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AB23A与SEN联合给药组AQP2的蛋白表达水平显著降低(图5E)。以上结果与体内数据相符,提示AB23A调节肾脏内髓集合管细胞AQP2是其缓解千里光碱模型小鼠水液失衡的重要原因。

讨论

误服用含千里光碱等PA的中草药是引发我国HSOS的主要原因,但临床缺乏有效的治疗药物。课题组前期发现泽泻提取物可改善千里光碱致急性肝损伤^[23],与其调节胆汁酸代谢稳态有关。大量研究表明,泽泻三萜是泽泻中重要的药效物质,AB23A作为泽泻的指标性成分已被发现能够改善多种原因引起的肝损伤,如 α -茶基异硫氰酸盐^[40]和雌激素^[41]诱导的胆汁淤积性肝损伤、四氯化碳诱导的肝毒性^[42]和肝纤维化^[43]、蛋氨酸胆碱缺乏症饮食诱导的非酒精性脂肪肝炎^[44]等。泽泻为传统利尿中药,《本草新编》赞誉其“长于利水,利小便如神”^[45],具有利尿渗湿、利尿通淋、化浊降脂的功效,常用于各种原因导致的水肿、水液失衡疾病。有研究发现泽泻水提物可降低肾脏髓质AQP2调节水液重吸收^[22]。另有研究指出泽泻三萜如24-乙酰

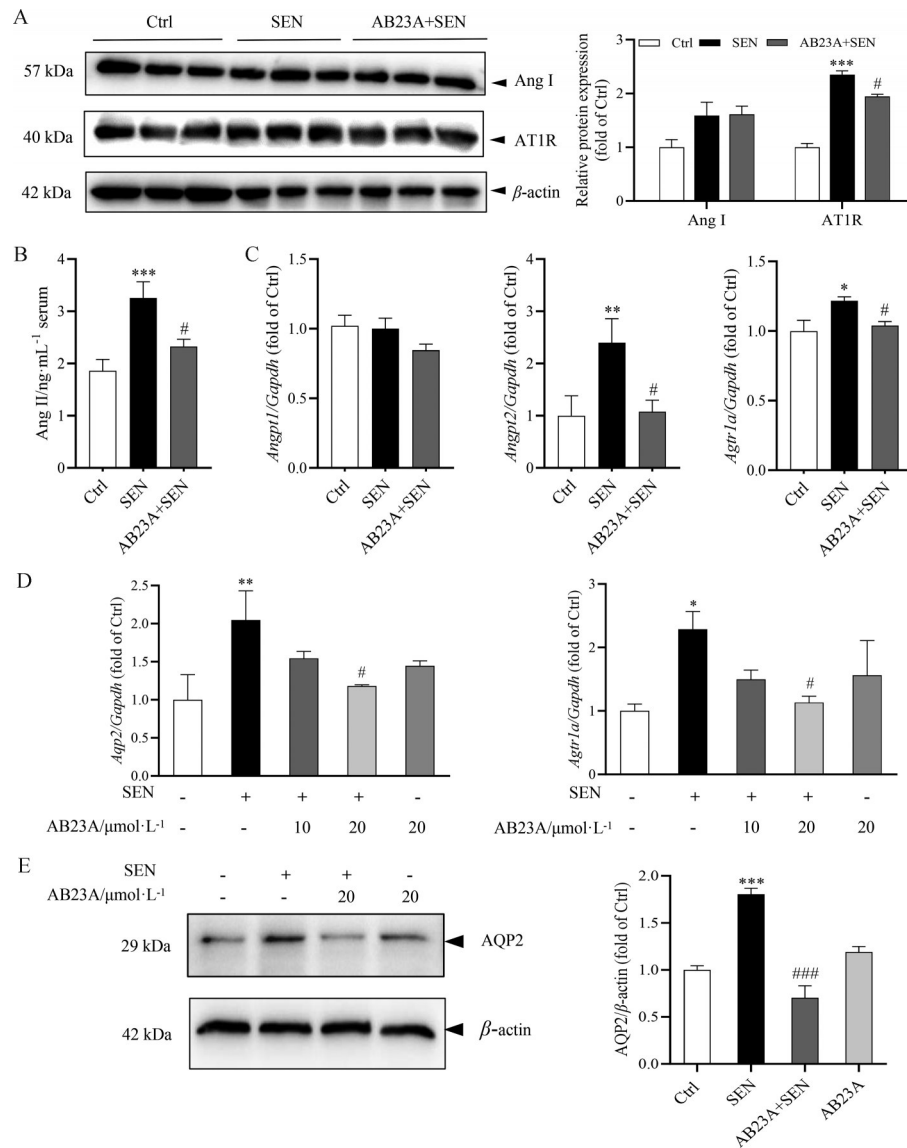


Figure 5 AB23A treatment regulates the water balance pathway modulated by AQP2 in mice and IMCD3 cells. A: The protein expression levels of angiotensin I (Ang I) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) in kidney tissues ($n = 6$); B: Serum concentration of angiotensin II (Ang II) ($n = 8$); C: The mRNA expression levels of *Angpt1*, *Angpt2*, and *Agr1a* in kidney tissues ($n = 8$); D: The mRNA expression levels of *Aqp2* and *Agr1a* in IMCD3 cells; E: The protein expression levels of AQP2 in IMCD3 cells. IMCD3 cells were incubated with SEN ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) or co-treated with AB23A (10 and $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and SEN ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. Three independent experiments were performed. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs SEN group

泽泻醇A和泽泻醇B与醛固酮结构相似,可以通过竞争醛固酮受体抑制水重吸收、增加排尿量,从而治疗肝硬化引起的水肿^[46]。利尿剂是目前临床HSOS的常用治疗药物之一^[12]。泽泻对千里光碱致急性肝损伤小鼠的水液失衡是否有改善作用尚未见报道。鉴于此,本研究以泽泻三萜AB23A为代表成分,探讨其对千里光碱致急性肝损伤小鼠水液失衡的影响。

本研究发现,AB23A可减轻千里光碱致急性肝损伤小鼠肝细胞坏死及淤血,降低血清肝功能指标ALT、AST、TBA、ALP的水平,这与前期泽泻提取物的药效

一致。此外,结果显示AB23A可降低千里光碱模型小鼠血清BUN、CREA水平,增加尿液排泄。AB23A干预组小鼠血清、肝脏、肾脏中千里光碱毒性代谢标志物PPAs含量较模型组显著降低,也进一步证实了AB23A可缓解千里光碱对小鼠的毒性。本研究还发现千里光碱模型小鼠尿液中 Na^+ 、 Cl^- 浓度显著下降,导致体内电解质紊乱,而AB23A干预能够修复这种失衡。

泽泻改善水液平衡紊乱的机制尚不完全明确。AQP2作为肾脏集合管对水通透性的主要水通道蛋白,在调节水液平衡紊乱相关的疾病方面有重要作用。

亦有研究表明毒性 PA 野百合碱可诱导大鼠肾脏髓质中 AQP2 的表达升高^[35]。本研究发现, 千里光碱可诱导小鼠肾脏 AQP2 的表达增加, 并增加 AQP2 在顶端质膜结构域的分布。最新研究表明, Ang II 可诱导 AT1R 的表达, 从而改变细胞内 AQP2 的靶向性和 AQP2 的丰度, 进一步促进肾脏水重吸收^[47]; 阻断 AT1R 能够降低由人工合成去氨加压素和 Ang II 诱导的大鼠水重吸收作用及 AQP2 水平^[48]。这可能是由于 AT1R 阻断剂与组织的 Ang II 结合, 抑制了醛固酮的分泌, 从而导致肾小管的水钠重吸收减少^[49]。在本研究中, 千里光碱模型组小鼠 Ang II 和 AT1R 的表达均较生理水平显著增加, 而 AB23A 干预则降低了千里光碱模型小鼠血清中 Ang II 水平并下调 AT1R 表达, 且降低了肾脏中 AQP2 表达、抑制 AQP2 向顶端质膜运输。体外研究证实千里光碱诱导了肾脏内髓集合管细胞 IMCD3 中 AQP2 的表达, 而 AB23A 则可抑制该变化, 进一步提示 AB23A 可调节肾脏内髓集合管细胞对水的重吸收作用。因此, 泽泻三萜 AB23A 可改善千里光碱致小鼠水液失衡, 与其调控 AT1R 调节肾脏髓质 AQP2 表达和转位, 从而促进尿液排泄有关。

目前, 国际国内研究者进行了大量 PA 毒性的研究, 以明确其毒性机制、发掘有效的治疗药物。研究者们发现了数个在动物模型上有效的中药提取物及活性成分^[50,51], 但主要通过对肝脏损伤的保护作用, 尚无从改善水液失衡方面进行探讨的研究。本研究发现, 泽泻三萜 AB23A 可改善千里光碱致小鼠肝损伤, 亦能改善小鼠肾功能、影响水通路蛋白、修复损伤小鼠水液失衡状态, 为泽泻治疗临床 PA 致 HSOS 提供进一步的数据支撑。以本研究为基础, 后续将进一步探讨泽泻改善 PA 致 HSOS 的量-效关系及泽泻三萜类成分改善 PA 致 HSOS 的构-效关系, 并深入探讨其作用机制, 为泽泻治疗临床 HSOS 提供实验基础和理论依据。

作者贡献: 唐莹莹、熊爱珍设计实验、撰写及修改论文; 唐莹莹、贾夏丽、陈岩、王金圆、董跨负责实验样本及数据的采集与分析; 丁丽丽、杨莉、王峥涛提供学术指导; 熊爱珍提供基金支持。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Tang J, Hattori M. Pyrrolizidine alkaloids-containing Chinese medicines in the Chinese Pharmacopoeia and related safety concerns [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 762-772.
- [2] Gao H, Ruan JQ, Chen J, et al. Blood pyrrole-protein adducts as a diagnostic and prognostic index in pyrrolizidine alkaloid-hepatic sinusoidal obstruction syndrome [J]. Drug Desi Devel Ther, 2015, 9: 4861-4868.
- [3] Lin G, Yang M, Ruan J, et al. First evidence of pyrrolizidine alkaloid *N*-oxide-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in humans [J]. Arch Toxicol, 2017, 91: 3913-3925.
- [4] Lin G, Wang JY, Li N, et al. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome associated with consumption of *Gynura segetum* [J]. J Hepatol, 2011, 54: 666-673.
- [5] Yuan SQ, Gu GM. Studies on the alkaloidal components of *Gynura japonica* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1990, 25: 191-197.
- [6] Gao H, Li N, Wang JY, et al. Definitive diagnosis of hepatic sinusoidal obstruction syndrome induced by pyrrolizidine alkaloids [J]. J Dig Dis, 2012, 13: 33-39.
- [7] Zhu L, Zhang CY, Li DP. Tu-San-Qi (*Gynura japonica*): the culprit behind pyrrolizidine alkaloid-induced liver injury in China [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42: 1212-1222.
- [8] Yang X, Wang H, Ni HM, et al. Inhibition of Drp1 protects against senecionine-induced mitochondria-mediated apoptosis in primary hepatocytes and in mice [J]. Redox Biol, 2017, 12: 264-273.
- [9] Hessel-Pras S, Braeuning A, Guenther G, et al. The pyrrolizidine alkaloid senecionine induces CYP-dependent destruction of sinusoidal endothelial cells and cholestasis in mice [J]. Arch Toxicol, 2020, 94: 219-229.
- [10] Ma J, Xia Q, Fu PP, et al. Pyrrole-protein adducts-a biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity [J]. J Food Drug Anal, 2018, 26: 965-972.
- [11] Chen Y, Wang XJ, Xiong F, et al. Kinetic study of pyrrolizidine alkaloid-derived pyrrole-protein adducts in rats after intragastric administration of *Gynura japonica* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 473-477.
- [12] Cooperative Group for Hepatic and Gall Diseases, Chinese Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association. Expert consensus on diagnosis and treatment of pyrrolizidine alkaloids-related sinusoidal obstruction syndrome (2017, Nanjing) [J]. J Clin Hepatol (临床肝胆病杂志), 2017, 33: 1627-1637.
- [13] Huang XQ, Li XX, Wu SS, et al. Protective effects of *Alisma* triterpenes on acute lung injury in mice [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2022, 44: 2979-2984.
- [14] Jiang W, Ye C, Hu M, et al. Mechanism of *Alisma orientale* triterpenes on anti-liver fibrosis effect based on network pharmacology and molecular docking [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 1100-1111.
- [15] Jiang ZY, Zhang XM, Zhang FX, et al. A new triterpene and anti-hepatitis B virus active compounds from *Alisma orientalis* [J]. Planta Med, 2006, 72: 951-954.
- [16] Lin N, Huang JF, Zhang X, et al. Anti-inflammatory activity of total triterpenes from *Alisma orientale* [J]. Fujian J Tradit Chin Med (福建中医药), 2018, 49: 68-69, 71.
- [17] Tian T, Chen H, Zhao YY. Traditional uses, phytochemistry,

- pharmacology, toxicology and quality control of *Alisma orientale* (Sam.) Juzep: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158: 373-387.
- [18] Zhao L. Overview of the study on reducing blood lipid in *Alisma orientalis* [J]. *J Pract Tradit Chin Int Med (实用中医内科杂志)*, 2019, 33: 71-73, 77.
- [19] Han LL, Zhang X, Zhang H, et al. Alisol B 23-acetate promotes white adipose tissue browning to mitigate high-fat diet-induced obesity by regulating mTOR-SREBP1 signaling [J]. *J Integr Med*, 2024, 22: 83-92.
- [20] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol I. Beijing: China Medicinal Science and Technology Press, 2020: 68.
- [21] Wang LX, Wu QN, Zhang Q, et al. Basic study of diuretic active compounds in *Rhizoma Alismatis* [J]. *West China J Pharm Sci (华西药理学杂志)*, 2008, 23: 670-672.
- [22] Wu XY, Chen C, Zhang GW. Effects of aqueous extract of *Rhizoma Alismatis* on diuretic activity and kidney medulla AQP2 expression in normal rats [J]. *J Clin Med Pract (实用临床医药杂志)*, 2010, 14: 5-7, 10.
- [23] Jiang KY, Ye XL, Xiong F, et al. The protective effects and mechanism of *Alismatis Rhizoma* extracts against senecionine-induced acute liver injury in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 823-830.
- [24] Chen Y, Wang WQ, Jia XL, et al. Firm evidence for the detoxification of senecionine-induced hepatotoxicity via N-glucuronidation in UGT1A4-humanized transgenic mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 165: 113185.
- [25] Xiong AZ, Yang L, Zhang F, et al. Identification of metabolites of senecionine, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid, by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2012, 47: 54-60.
- [26] Liu Y, Li L, Wang Z, et al. A comprehensive profiling of renin-angiotensin system in mouse and human plasma by a rapid quantitative analysis of 14 angiotensin peptides using ultrahigh-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2023, 37: e9637.
- [27] Tu L, Thuillet R, Perrot J, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism by finerenone attenuates established pulmonary hypertension in rats [J]. *Hypertension*, 2022, 79: 2262-2273.
- [28] Huang XQ, Zhang X, Li XY, et al. Diuretic effect of different extract parts of *Alisma orientale* on rats [J]. *Fujian J Tradit Chin Med (福建中医药)*, 2016, 47: 21-23.
- [29] Zhang X, Li XY, Lin N, et al. Diuretic activity of compatible triterpene components of *Alismatis rhizoma* [J]. *Molecules*, 2017, 22: 1459.
- [30] Chen Y, Xiong F, Wang W, et al. The long persistence of pyrrolizidine alkaloid-derived pyrrole-protein adducts *in vivo*: kinetic study following multiple exposures of a pyrrolizidine alkaloid containing extract of *Gynura japonica* [J]. *Toxicol Lett*, 2020, 323: 41-47.
- [31] Fushimi K, Uchida S, Hara Y, et al. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule [J]. *Nature*, 1993, 361: 549-552.
- [32] Rojek A, Füchtbauer EM, Kwon TH, et al. Severe urinary concentrating defect in renal collecting duct-selective AQP2 conditional-knockout mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 6037-6042.
- [33] Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, et al. Collecting duct principal cell transport processes and their regulation [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10: 135-146.
- [34] Ouyang S, Chen W, Zeng G, et al. Aquaporin-2 expression in the kidney and urine is elevated in rats with monocrotaline-induced pulmonary heart disease [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48: 300060519894448.
- [35] Nielsen S, Terris J, Andersen D, et al. Congestive heart failure in rats is associated with increased expression and targeting of aquaporin-2 water channel in collecting duct [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94: 5450-5455.
- [36] Zhang BL, Yang BJ, Liu WH. Research progress of AQP2 in diseases related to abnormal water and fluid metabolism [J]. *Smart Healthcare (智慧健康)*, 2021, 7: 36-39.
- [37] Fenton RA, Murali SK, Moeller HB. Advances in aquaporin-2 trafficking mechanisms and their implications for treatment of water balance disorders [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020. DOI: 10.1152/ajpcell.00150.2020.
- [38] Wang W, Li C, Summer S, et al. Interaction between vasopressin and angiotensin II *in vivo* and *in vitro*: effect on aquaporins and urine concentration [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299: F577-F584.
- [39] Chang H, Chang CY, Lee HJ, et al. Magnolol ameliorates pneumectomy and monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats through inhibition of angiotensin II and endothelin-1 expression [J]. *Phytomedicine*, 2018, 51: 205-213.
- [40] Meng Q, Chen XL, Wang CY, et al. Alisol B 23-acetate protects against ANIT-induced hepatotoxicity and cholestasis, due to FXR-mediated regulation of transporters and enzymes involved in bile acid homeostasis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 283: 178-186.
- [41] Meng Q, Chen X, Wang C, et al. Protective effects of alisol B 23-acetate via farnesoid X receptor-mediated regulation of transporters and enzymes in estrogen-induced cholestatic liver injury in mice [J]. *Pharm Res*, 2015, 32: 3688-3698.
- [42] Meng Q, Chen X, Wang C, et al. Protective effects of alisol B 23-acetate from edible botanical *Rhizoma alismatis* against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice [J]. *Food Funct*, 2015, 6: 1241-1250.
- [43] Zhang L, Lin W, Cai Y, et al. Farnesoid X receptor activation is required for the anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects of alisol B 23-acetate in carbon tetrachloride-induced

- liver fibrosis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110768.
- [44] Meng Q, Duan XP, Wang CY, et al. Alisol B 23-acetate protects against non-alcoholic steatohepatitis in mice *via* farnesoid X receptor activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38: 69-79.
- [45] Wu BD, Ye PL. An analysis of the application of *Alisma orientale* in the treatise on typhoid miscellaneous diseases [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med* (云南中医中药杂志), 2018, 39: 38-40.
- [46] Gu YL, Li ZJ. Progress of herbal examination and modern research on the functions of *Alisma orientale* [J]. *Guiding J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2021, 27: 137-141.
- [47] Törnroth-Horsefield S. Phosphorylation of human AQP2 and its role in trafficking [J]. *Vitam Horm*, 2020, 112: 95-117.
- [48] Kwon TH, Nielsen J, Knepper MA, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases vasopressin-induced water reabsorption and AQP2 levels in NaCl-restricted rats [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288: F673-F684.
- [49] Mazzocchi G, Gottardo G, Macchi V, et al. The AT2 receptor-mediated stimulation of adrenal catecholamine release may potentiate the AT1 receptor-mediated aldosterone secretagogue action of angiotensin-II in rats [J]. *Endocr Res*, 1998, 24: 17-28.
- [50] Huang Z, Jing X, Sheng Y, et al. (-)-Epicatechin attenuates hepatic sinusoidal obstruction syndrome by inhibiting liver oxidative and inflammatory injury [J]. *Redox Biol*, 2019, 22: 101117.
- [51] Wang Z, Ma J, He Y, et al. Nrf2-mediated liver protection by 18 β -glycyrrhetic acid against pyrrolizidine alkaloid-induced toxicity through PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154162.