

· 药理研究 ·

DOI: 10.26946/j.cnki.1000-3649.sczy.2509270002

新型抗纤维化药物五脂酮 A 的合成及药效验证

乔龙巴图·茜吉尔^{1,2}, 杨欣萍^{1,3}, 汪雨婷^{1,3}, 武正华^{1,Δ}

(1. 上海交通大学医学院附属第一人民医院临床药学部, 上海 200080; 2. 新疆维吾尔自治区药品审评检验中心, 新疆乌鲁木齐 830002; 3. 上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要: 目的 设计并合成抗肾纤维化有效成分五脂酮 A (五味子醇甲的特异性代谢产物), 并评价与验证其毒性及体内外抗肾纤维化活性。方法 通过设计 10 步反应合成目标代谢产物五脂酮 A, 并进行结构表征, 利用斑马鱼急性肾损伤模型和 NIH/3T3 细胞分别评价其体内外抗肾纤维化活性。结果 CCK8 法测定细胞活力结果表明, 五脂酮 A 对 TGF-β1 诱导的 NIH/3T3 细胞活力的影响小于五味子醇甲, 说明五脂酮 A 具有低毒性作用。RT-qPCR 在细胞实验结果表明, 与模型组相比, 五味子醇甲和五脂酮 A 都能够抑制纤维化相关基因如 CDH2、COL1A2、α-SMA 的表达。在斑马鱼模型验证结果中, 五味子醇甲和五脂酮 A 也同样抑制了 COL1A1A 的表达, 并且五脂酮 A 的抑制程度要优于五味子醇甲, 两种药物在一定程度上提高斑马鱼肾损伤建模后的存活率和组织修复能力。结论 设计合成的化合物五脂酮 A 是一种潜在、低毒的抗肾纤维化药物, 且毒性和疗效优于其原型药物五味子醇甲。

关键词: 五味子醇甲; 代谢产物; 五脂酮 A; 肾纤维化; 斑马鱼

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1000-3649(2026)04-0032-10

Synthesis of a novel anti-fibrotic drug pentalipone A and its efficacy verification

QIAO Longbatū Qianjier^{1,2}, YANG Xiping^{1,3}, WANG Yuting^{1,3}, WU Zhenghua^{1,Δ}

(1. Department of Clinical Pharmacy, The First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China; 2. Drug Evaluation and Inspection Center of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830002, China; 3. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: **Objective** To design and synthesize the specific metabolite of schisandrin A, an anti-renal fibrosis active ingredient of Schisandrae Chinensis Fructus, schisanlignone A, and evaluate its toxicity and anti-renal fibrosis activity in vitro and in vivo. **Methods** The target metabolite schisanlignone A was synthesized via a 10-step synthetic route and characterized the structures of the synthesized compounds. Zebrafish model of acute kidney injury and NIH/3T3 cells were used to evaluate its anti-renal fibrosis activity in vitro and in vivo. **Results** The results of CCK8 assay showed that the effect of schisanlignone A on the viability of NIH/3T3 cells induced by TGF-β1 was less than that of schisandrin A, and schisanlignone A had low toxicity. RT-qPCR analysis in NIH/3T3 cells demonstrated that both schisandrin A and schisanlignone A significantly suppressed the expression of fibrosis-associated genes, including CDH2, COL1A2, and α-SMA, compared to the model group. Consistent with these findings, in vivo experiments using a zebrafish model revealed that both compounds also downregulated the expression of COL1A1A. Notably, schisanlignone A exhibited a more pronounced inhibitory effect on COL1A1A expression than schisandrin A. Furthermore, both compounds moderately improved the survival rate and enhanced tissue repair capacity in zebrafish following kidney injury induction. **Conclusion** Compound schisanlignone A is a potential, low-toxic anti-renal fibrosis drug, and demonstrated superior efficacy and reduced toxicity compared to its parent drug, schisandrin A.

Keywords: Schisandrin A; Metabolite; Schisanlignone A; Renal fibrosis; Zebrafish

根据全球疾病负担研究 (Global Burden of Disease, GBD) 网站在 2024 年发布的最新数据表明^[1], 慢性肾病 (Chronic kidney disease, CKD)

年龄标准化死亡率可达 18.5%, 并预测 2050 年, CKD 将在全球主要疾病死因中位居第十。CKD 与肾纤维化 (Renal fibrosis, RF) 之间存在密切的因

基金项目: 国家自然科学基金预研基金项目 (YY2024G022)。

第一作者: 乔龙巴图·茜吉尔, 硕士, 研究方向: 临床药学, 药物审评检验工作, E-mail: 962689538@qq.com。

Δ 通讯作者: 武正华, 副主任药师, 硕士研究生导师, 研究方向: 临床药学, E-mail: wuzhenghua@sjtu.edu.cn。

引用格式: 乔龙巴图·茜吉尔, 杨欣萍, 汪雨婷, 等. 新型抗纤维化药物五脂酮 A 的合成及药效验证[J]. 四川中医, 2026, 44(4): 32-41.

果关系和病理生理联系, RF 既是 CKD 发展的核心病理特征, 也是其进展至终末期肾病的关键驱动因素^[2]。为弥补传统治疗慢性肾病的方法, 如肾移植与透析, 价格高且副作用多的缺陷, 新型治疗 RF 的药物不断被开发。纵观近年来关于 RF 药物开发策略的研究, 中医药在治疗纤维化方面具有广阔的前景^[3-6]。中药有效成分可以通过干预纤维化过程中的细胞因子和信号通路来延缓纤维化。然而, 由于中药的多成分特点, 确定中药的有效成分对于开发治疗 RF 的低毒高效药物具有重要意义。因此, 基于中药多成分及其血液代谢特点, 确定中药活性成分及其活性代谢产物对于开发低毒高效的抗 RF 药物至关重要。

五脂酮 A (Schisanlignone A, M5) 是中药五味子成分——五味子醇甲 (Schisandrin A, SchA) 的代谢产物, 分子式为 $C_{24}H_{30}O_7$, 最早在 1991 年结构被鉴定为 9-oxo-(+)-deoxyschizandrin^[7]。目前, 已有研究证明五味子能够通过抑制 TGF- β /Smad 通路^[8]、调控氧化应激和炎症^[9]、靶向特定受体^[10]和调节细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 代谢^[11]等机制发挥治疗纤维化的作用, 是一种在长期临床应用中很有前景的抗 RF 药物, 而在前期研究中, 已经对五味子的抗纤维化成分进行了筛选和验证。通过大鼠来鉴定进入血液的成分^[12], 以及分子对接结果表明, 五味子中木脂素成分 SchA 被吸收入血, 以代谢产物 M5 的形式发挥抗纤维化作用^[12,13]。因此, 基于以上研究结果, 进一步设计了 M5 的合成路线, 通过体内外实验对 M5 的毒性和有效性进行了评价和验证。尽管 SchA 的疗效已被确认, 但其活性代谢产物 M5 抗纤维化的作用尚未被充分阐明。本研究旨在直接比较 SchA 与其主要活性代谢产物 M5 的体外和体内药效, 以评估 M5 的疗效作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 NIH/3T3 细胞系由中国科学院细胞库提供。实验采用野生型 AB 品系斑马鱼, 养殖水体 (5.00mmol/L NaCl, 0.17mmol/L KCl, 0.33mmol/L $CaCl_2$, 0.33mmol/L $MgSO_4$, 0.10% 甲基蓝), 水温为 28.0°C, pH 值为 6.5~7.5, 14h 光照和 10h 黑暗交替循环。本研究经上海交通大学动物伦理和使用委员会审查通过 (审批号: B2025001)。

1.1.2 药物与试剂 所用化学试剂及起始原料购

于英国 Alfa Aesar 公司和美国 Sigma 公司; 五味子醇甲购于上海源叶生物科技有限公司 (批号: J10GB151241, 纯度 98%); TGF- β 1 购于苏州近岸蛋白质科技股份有限公司 (批号: 0333587QG09); 尼达尼布购于武汉天植生物技术有限公司 (批号: CFS202401)。

1.1.3 仪器 安捷伦液相色谱-飞行时间质谱联用仪, 美国 Agilent Technologies 公司 (型号: 6230); 酶标仪, 美国 Bio Tek 公司 (型号: Synergy LX); 核磁共振波谱仪, 美国 Agilent Technologies 公司 (型号: 400MHz); 六通道荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司 (型号: FX Opus96); 研究级倒置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司 (型号: IX73)。

1.2 M5 的合成与鉴定

1.2.1 M5 的合成 合成路线图如图 1 所示, 具体合成方法如下:

步骤 1: 在氩气保护下, 将 3, 4, 5-三甲氧基苯甲醛与丁二酸二甲酯的甲醇 (CH_3OH) 溶液缓慢加入预先配置的回流体系中 (回流体系由金属钠溶于甲醇制备)^[14]。维持回流反应 5h 后, 减压浓缩去除溶剂。残留物用去离子水与甲基叔丁基醚 (MTBE) 分液萃取, 收集水相并于冰浴条件下用 10% 稀盐酸酸化。析出的油状物经乙酸乙酯 (EA) 萃取后, 依次用去离子水、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠 (Na_2SO_4) 干燥。减压旋蒸除去溶剂, 所得粗品经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚 (PE) / EA/ 甲酸 = 50:50:0.1), 最终获得化合物 2。

步骤 2: 将化合物 2 与钯碳催化剂 (Pd/C) 溶于 100mL 甲醇中^[15], 在 1atm 氢气下室温搅拌反应 6h。反应完成后, 过滤除去催化剂, 减压旋蒸除去溶剂, 得到化合物 3。

步骤 3: 将化合物 3 溶于 150mL 无水乙醇中并搅拌, 缓慢加入氢氧化钾 (KOH)。待其完全溶解后, 加入粉末状氯化钙 ($CaCl_2$)。随后, 在 20°C 下逐滴加入溶于 30mL 1M KOH 溶液中的硼氢化钠 ($NaBH_4$) 溶液^[16]。所得白色悬浮液于室温搅拌 5h, 冷却至 0°C 后用 10% 稀盐酸酸化至 pH 酸性。加水至溶液澄清, 减压旋蒸除去乙醇。水相用 EA 萃取, 合并有机相后依次用饱和食盐水洗涤、无水 Na_2SO_4 干燥, 并减压浓缩。粗产物经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: PE/EA=4:1), 最终得到化合物 4。

步骤 4: 在氩气保护下, 向预先冷却至 -78°C 的二异丙基氨基锂 (LDA) 溶液 (1 M 于四氢呋

喃₂ (THF) 中, 25.0mL, 25.0mmol) 中缓慢加入化合物 4 (5.50g, 20.7mmol) 的 THF 溶液 (20mL)。混合物于 -78℃ 搅拌 30min 后, 加入 3, 4, 5-三甲氧基苯甲醛 (TMB, 4.86g, 25.0mmol) 的 THF 溶液 (20mL), 继续搅拌 15min。随后加入饱和氯化铵 (NH₄Cl) 水溶液终止反应, 用 EA 萃取。合并有机相后, 依次用 2N HCl、水、饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤, 并用无水 Na₂SO₄ 干燥。减压蒸发溶剂后, 将残留物溶解于 100mL 二氯甲烷 (DCM) 中, 依次加入三乙胺 (TEA, 8.0mL, 58mmol)、乙酸酐 (Ac₂O, 5.0mL, 53mmol) 及 4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 200mg, 1.6mmol), 室温搅拌 1h。反应液依次用 2N HCl、水、饱和 NaHCO₃ 溶液和盐水洗涤, 干燥后减压蒸去溶剂。残留物溶于甲苯中, 加入 DBU (10mL, 64.5mmol), 于 80℃ 搅拌反应 1.5h^[17]。反应混合物用乙酸乙酯萃取, 依次用 2N HCl、水、饱和 NaHCO₃ 溶液和盐水洗涤, 干燥后减压浓缩。粗产物经硅胶柱层析纯化 (PE/EA=1:1, v/v), 最终得到化合物 5。

步骤 5: 将化合物 5 (6.82g, 15.3mmol)、高

氯酸铁六水合物 (Fe (ClO₄)₃·6H₂O, 20.70g, 46.0mmol) 和三氟乙酸 (TFA, 5mL) 溶于 50mL DCM 中, 室温搅拌反应 2h^[18]。反应液依次用饱和 NH₄Cl 水溶液、水、饱和 NaHCO₃ 溶液和盐水洗涤, 并用无水 Na₂SO₄ 干燥。减压蒸去溶剂后, 残留物经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: PE/EA=1:1, v/v), 得到化合物 6。

步骤 6: 将二异丁基氢化铝 (DIBALH, 1.5M 甲苯溶液, 27mL, 40.7mmol) 缓慢加入到化合物 6 (4.50g, 10.2mmol) 的 10mL THF 溶液中, 混合物于 0℃ 搅拌 30min^[19]。随后加入十水合硫酸钠 (Na₂SO₄·10H₂O) 淬灭反应, 室温继续搅拌 1h 后过滤。滤液经减压浓缩, 得到化合物 7。

步骤 7: 将化合物 7 (2.45g, 5.4mmol)、乙酰丙酮氧钒 (VO (acac)₂, 10mg) 和过氧化叔丁醇 (t-BuOOH, 3.0M 于 2, 2, 4-三甲基戊烷中, 5.0mL, 15.0mmol) 溶于 20mL DCM 中, 室温搅拌 45min^[19]。随后依次用 10% 硫代硫酸钠 (Na₂S₂O₃) 水溶液、饱和 NaHCO₃ 溶液和盐水洗涤, 并用无水 Na₂SO₄ 干燥。减压蒸去溶剂后, 将残留物溶解

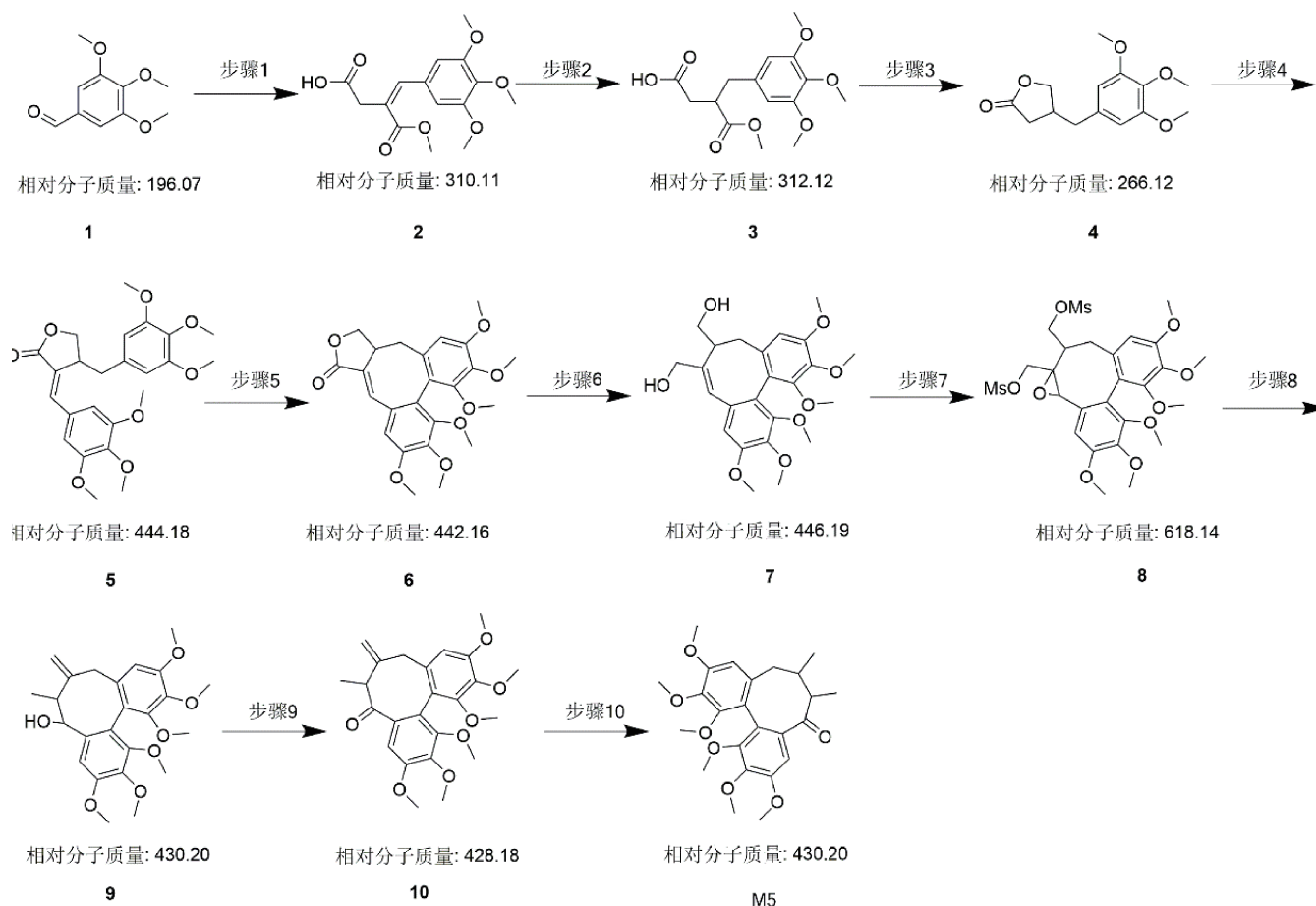


图 1 M5 的合成路线图

于 20mL 二氯甲烷 (CHCl_2) 中, 加入 10mL TEA 和 20mL 甲磺酰氯 (MsCl), 于 0°C (冰浴) 搅拌 1h^[20]。反应液依次用 2N HCl、水、饱和 NaHCO_3 溶液和盐水洗涤, 干燥后减压浓缩。粗产物经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂 PE/EA=2:1, v/v), 最终得到化合物 8。

步骤 8: 将化合物 8 (2.61g, 4.22mmol) 和碘化钠 (NaI , 20.0g, 133.6mmol) 混合于甲基异丁基酮 (MIBK, 120mL) 中, 加热回流 46h。将反应混合物加入 EA 中, 依次用水、饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液和盐水洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 蒸干。残渣用甲醇 (50mL) 溶解, 加入 Zn (3.0g) 和乙酸 (AcOH , 1.5mL), 室温搅拌 48h。加入 EA, 依次用 2N HCl、饱和 NaHCO_3 溶液、盐水洗涤, Na_2SO_4 干燥, 蒸干。粗品经硅胶柱层析 (洗脱剂 PE/EA = 1:1, v/v) 纯化, 得化合物 9。

步骤 9: 将化合物 9 (89g, 0.2mmol) 和氯铬酸吡啶盐 (PCC, 150mg) 溶于 10mL DCM 中^[21], 室温搅拌 5h。将反应液倒入 20mL DCM 中, 依次用水、2N HCl、饱和 NaHCO_3 溶液、盐水洗涤, Na_2SO_4 干燥, 蒸干。粗品经硅胶柱层析 (洗脱剂 PE/EA=2:1, v/v) 纯化, 得到化合物 10。

步骤 10: 将化合物 10 (53mg, 1.2mmol) 和 Pd/C (10wt%, 15mg) 混合于 20mL 的 EA 中, 在室温和 1atm 的氢气条件下搅拌 4h。过滤除去催化剂, 减压蒸除溶剂。粗品经硅胶柱层析 (洗脱剂 PE/EA=1:1) 纯化, 得 M5。

1.2.2 M5 的鉴定 此产物经 LC / MS 鉴定, 注射 $2\mu\text{L}$ 五脂酮 A, 目标物质量为 430.00。质谱条件设置如下。流动相: a: 水 (0.01 % Tfa) b: 乙腈 (0.01 % Tfa); 梯度: 1.0min 内 5 % 升至 95 % b; 流速: 1.6mL/min; 色谱柱: Agilent 实心薄壳填料, $30*3.0\text{mm}$, $2.7\mu\text{m}$; 柱温: 50°C 。采用 UV (214nm) 和 MS (ESI, Pos 模式, $110\sim 1000\text{amu}$) 进行检测。

1.3 细胞培养

NIH/3T3 细胞培养于含 10 % 胎牛血清 (FBS) 的杜尔贝科's 改良 Eagle's 培养基 (DMEM) 中。置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中, 根据生长状况进行传代和换液。

1.4 CCK-8 法检测细胞活力

将对数生长期的 NIH/3T3 细胞悬液以每孔约 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 并在 37°C 、5% CO_2 环境中预培养 24h。设置对照组和用药组,

用药组分别在每孔 (以五倍的孔为每个浓度) 中加入 $10\mu\text{L}$ 不同浓度 ($2.5\mu\text{mol/L}$ 、 $5\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$) 的 M5 或 Sch A。然后将细胞孵育 24 或 48h。孵育结束后, 每孔加入 $10\mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 继续孵育 2h。使用酶标仪测量 450nm 处的吸光度以评估细胞活力。采用细胞存活率 (%) = $[(\text{As}-\text{Ab}) / (\text{Ac}-\text{Ab})] \times 100$ 计算。As= 实验孔吸光度 (含有细胞, 培养基, CCK-8 和待测化合物的孔的吸光度), Ab= 空白孔吸光度 (含有培养基和 CCK-8 的孔的吸光度), Ac= 对照孔吸光度 (含有细胞, 培养基和 CCK-8 的孔的吸光度)。

1.5 分组与建模

1.5.1 细胞的分组与干预 取对数生长期细胞, 分为对照组、模型组、阳性对照组 ($5\mu\text{mol/L}$ 尼达尼布)、低 ($3\mu\text{mol/L}$)、中 ($10\mu\text{mol/L}$)、高 ($30\mu\text{mol/L}$) 浓度的 SchA 给药组和低 ($3\mu\text{mol/L}$)、中 ($10\mu\text{mol/L}$)、高 ($30\mu\text{mol/L}$) 浓度的 M5 给药组, 药物预处理 1h 后, 除对照组以外, 所有组均以 TGF- β 1 (10ng/mL) 处理诱导纤维化, 在六孔板中进行培养, 处理 24h 后用于 RNA 提取和 qRT-PCR 分析, 每组设置三个生物样本重复均设置三个生物学重复。

1.5.2 斑马鱼的分组与建模 将条斑马鱼随机分为对照组、模型组、低 ($6.25\mu\text{mol/L}$)、中 ($12.5\mu\text{mol/L}$)、高 ($25\mu\text{mol/L}$) 浓度 SchA 给药组和 M5 给药组, 每组 15 只。通过向受精后三天 (3 days post fertilization, 3dpf) 斑马鱼主静脉微量注射 $8\text{ng}/\mu\text{L}$ 庆大霉素建立肾纤维化模型。

1.6 检测指标与方法

1.6.1 显微镜下观察斑马鱼死亡率以评估 SchA 和 M5 的毒性 在建模后分别将各组在受精后 5 天 (5 days post fertilization, 5dpf) 给药前和受精后 6 天 (6 days post fertilization, 6dpf) 给药后显微镜观察斑马鱼的死亡率以测量计算各组斑马鱼的存活率。

1.6.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 检测 α -SMA、COL1A2、CDH2 和 COL1A1A 的 mRNA 水平 取各组 NIH/3T3 细胞和斑马鱼组织分别置于研钵, 加入 $500\mu\text{L}$ Trizol 和 $100\mu\text{L}$ 氯仿提取 RNA, 用 Hifair & II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 逆转录试剂盒进行逆转录制备 cDNA, 反转录反应条件为 42°C , 孵育 2min, 25°C 冷却 5min, 42°C 30min, 85°C 5min, 最后加入 supermix plus 冷却至 4°C 。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (GAPDH) 为内参, 使用 Quant Studio 6 Flex 系统

检测荧光信号, 使用 Yeasen Bio (中国上海) 公司的 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 作为荧光定量试剂, 进行荧光。

定量 PCR 扩增以检测各组 NIH/3T3 细胞组织中 α -平滑肌肌动蛋白基因 (α -SMA)、 α 2-I 型胶原基因 (COL1A2)、神经钙黏蛋白基因 (CDH2) 的 mRNA 的表达水平和斑马鱼组织中的 α 1-I 型胶原基因 (COL1A1A) 的 mRNA 的表达水平。反应条件: 95°C 预变性 10s, 60°C 复性 30s。然后在 95°C 下 5min 进行一个循环, 在 95°C 下 10s 和 60°C 下 30s 进行 40 个循环。扩增引物由合成。引物序列由上海赛恒生物科技有限公司合成, 如表 1 所示, 各组均 3 个复孔。使用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算 α -SMA、COL1A2 和 CDH2 的 mRNA 的相对表达水平。

表 1 PCR 所用引物序列

基因	引物序列
GAPDH	5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' 3'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-5'
α -SMA	5'-TCCGACACTGCTGACAGAGG-3' 3'-CACCATCTCCAGAGTCCAGC-5'
COL1A2	5'-CCTGGTCAAACGGTGAGAAC-3' 3'-CACTTACATCCTCACCAGCC-5'
CDH2	5'-CTCGCGGATAACCAGAAC-3' 3'-GAGGATGGCAGGAACTTG-5'
COL1A1A	5'-ACCTGATGGAAAGACCGGAC-3' 3'-GCACCAATAGCACCCATCAC-5'

注: GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因, α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白基因, COL1A2 为 α 2-I 型胶原基因, CDH2 为神经钙黏蛋白基因, COL1A1A 为 α 1-I 型胶原基因。

1.6.3 苏木精-伊红染色法 (Hematoxylin-eosin staining, HE) 观察病理学变化 显微注射庆大霉素 (即在药物治疗后 1d) 3d 后, 各组斑马鱼用 4% 多聚甲醛固定 24h, 石蜡包埋, 切片厚度为 5 μ m, HE 染色后光学显微镜下观察斑马鱼肾脏组织病理学变化。

1.7 统计学方法

研究采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行数据分析、处理及统计图绘制。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验, 两组数据之间比较采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 M5 的合成

实验以 3, 4, 5-三甲氧基苯甲醛为起始原料,

合成 Sch A 在体内的代谢产物形式 M5, 合成主要涉及亲核加成反应和醛酯缩合反应。所有产品质量与产率如表 2 所示, 且均与计算值相符。

表 2 M5 和化合物 2-10 的纯化后产量与产率结果

化合物	产量	产率
化合物 2	9.95g	63%
化合物 3	10.22g	约 100%
化合物 4	5.50g	63%
化合物 5	6.82g	75%
化合物 6	4.50g	66%
化合物 7	2.45g	54%
化合物 8	2.61g	77%
化合物 9	9.89mg	5%
化合物 10	53mg	59%
M5	10mg	19%

2.2 M5 的鉴定

在低分辨质谱中观察到一个准分子离子峰 m/z 430.9 [M+H]⁺ ($C_{24}H_{30}O_7$ 的计算值为 431.2) 如图 2 所示, 确认其分子式为 $C_{24}H_{30}O_7$, 不饱和度为 10。

M5 的质谱图和 ¹H-NMR 图见附件 1。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.44 (s, 1H, H-9), 6.41 (s, 1H, H-16), 3.90 (s, 6H, 12-OMe & 13-OMe), 3.88 (s, 3H, 10-OMe), 3.84 (s, 3H, 15-OMe), 3.73 (s, 3H, 11-OMe), 3.55 (s, 3H, 14-OMe), 2.99-2.92 (m, 1H, H-7), 2.85 (dd, J=4.5, 3.5Hz, 1H, H-5), 2.61 (dd, J=14.5, 8.4Hz, 1H, H-5), 2.35-2.26 (m, 1H, H-6), 1.08 (d, J=6.9Hz, 3H, H-18), 0.83 (d,

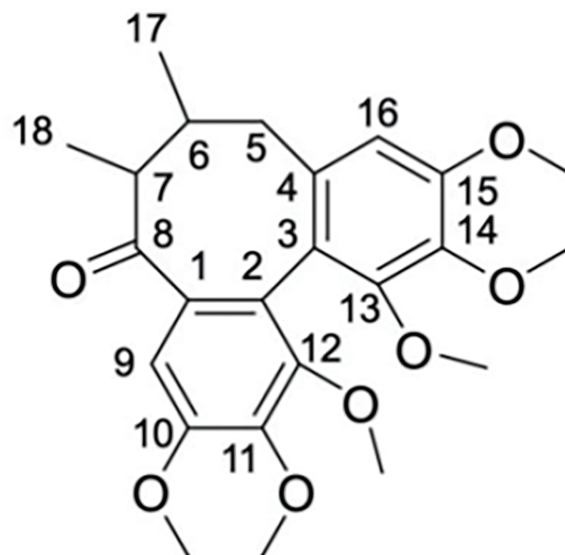


图 2 化合物 M5-H1 的平面结构

J=7.0Hz, 3H, H-17)。

2.3 对细胞活力的影响

为了研究 M5 对细胞活力的影响, 并比较其与 SchA 的差异, 用不同浓度的 M5/SchA 分别处理 NIH/3T3 细胞 24h 或 48h, 用 CCK-8 试剂测定。将细胞活力检测结果导入 Graph Pad Prism 10.1.2 软件绘制细胞活力柱状图 (图 3)。

结果表明, M5 和 SchA 在给药 24h 内对细胞活力无明显抑制作用, 但当给药时间延长至 48h 时, 两种药物在 80 μ mol/L 的浓度有一定的抑制作用, 且 M5 对细胞活力的影响小于 SchA。因此, 在后续的给药梯度中, 设置低、中、高三个梯度, 浓度分别为 3 μ mol/L、10 μ mol/L 和 30 μ mol/L。此外, 我们利用 ProTox 3.0 在线工具 (ProTox-3.0 - Prediction of TOXicity of chemicals), 对化合物 SchA

和 M5 的预测性半数致死剂量 (LD50) 进行了分析。结果显示, 两者的 LD50 值均为 1000mg/kg (图 4)。值得注意的是, M5 预测的毒性靶点数量少于 SchA, 表明 M5 的毒性比 SchA 小, 与我们 CCK-8 实验中观察到的细胞活力抑制数据是一致的。

2.4 对细胞的肾纤维化程度的影响

进一步通过 qRT-PCR 检测 M5 及其原型成分 SchA 对 NIH/3T3 细胞中纤维化相关基因转录水平的影响 (图 5), 其中 CDH2、 α -SMA 以及 COL1A2 与纤维化进展呈正相关。过度纤维化的典型特征是胶原沉积的增加。I 型胶原蛋白是伤口愈合中纤维细胞合成的主要纤维性胶原蛋白, 在伤口愈合中发挥核心作用。因此, 抑制 I 型胶原蛋白的沉积是预防 RF 和过度瘢痕形成的重要方法之一。

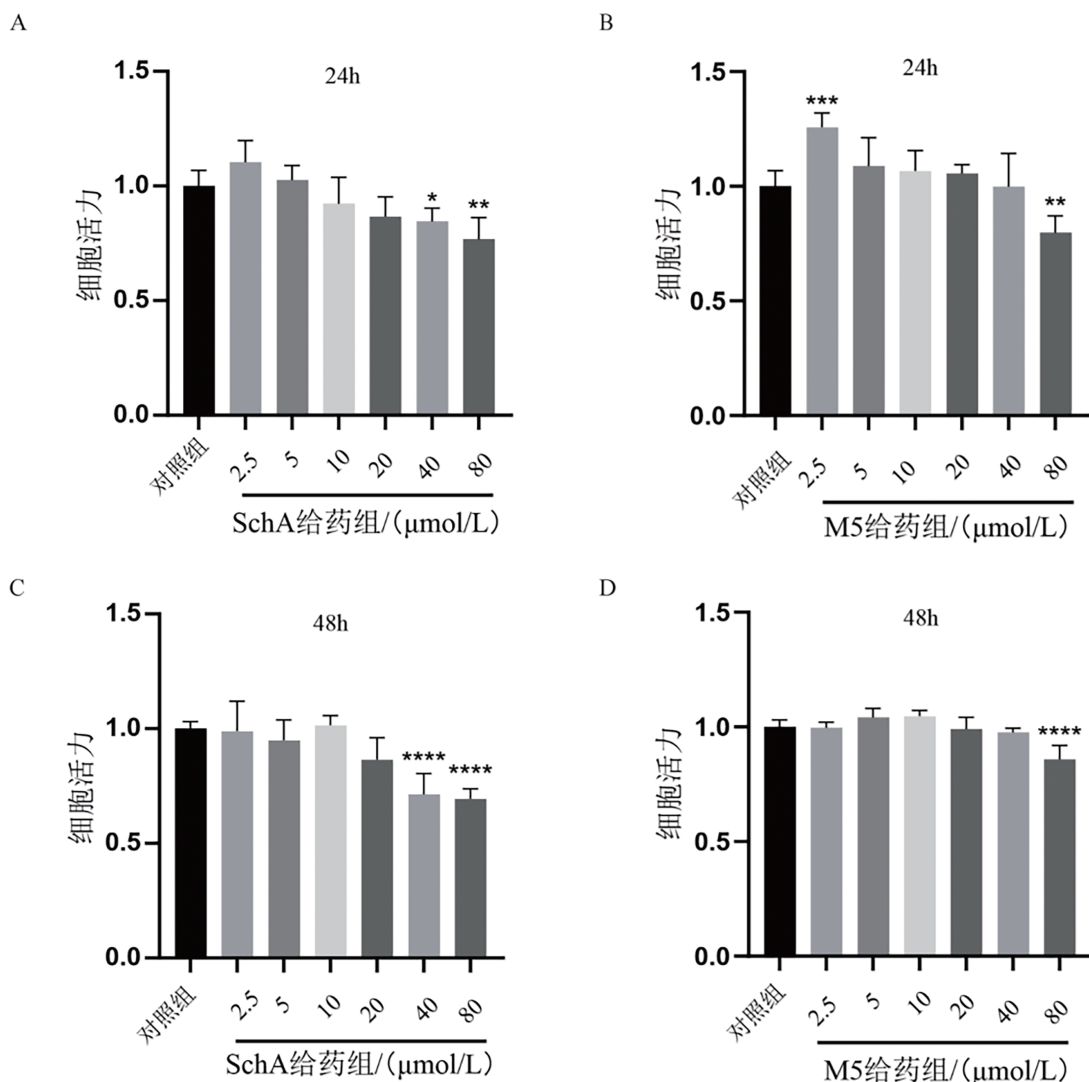
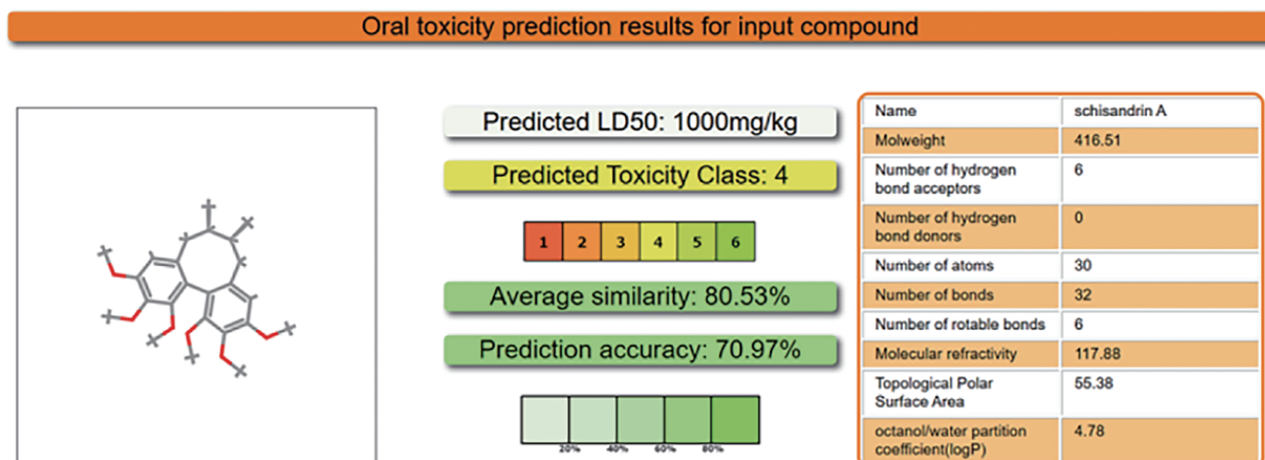


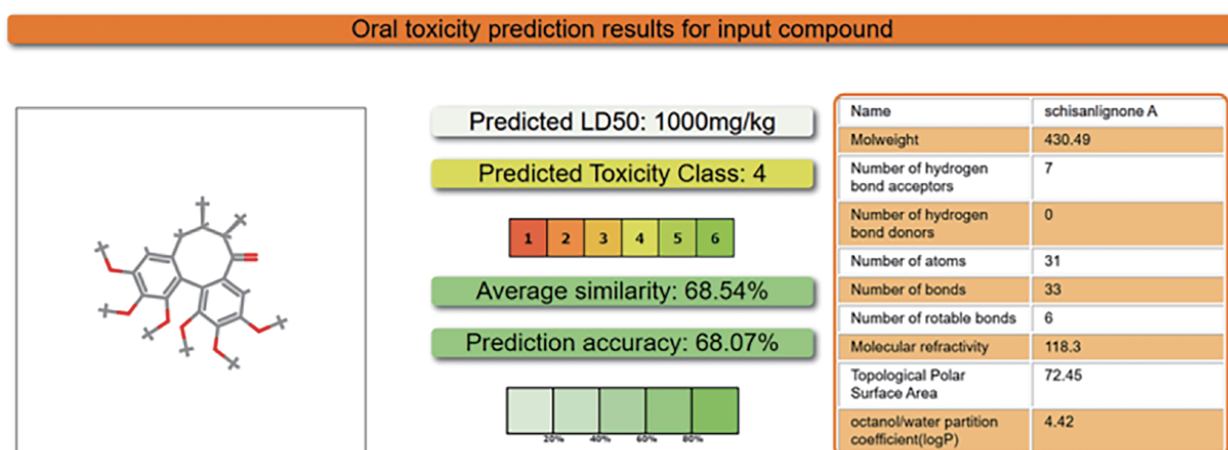
图 3 SchA 和 M5 对 NIH/3T3 细胞活力影响图

注: A: 24h SchA 对 NIH/3T3 细胞活力影响; B: 24h M5 对 NIH/3T3 细胞活力影响; C: 48h SchA 对 NIH/3T3 细胞活力影响; D: 48h M5 对 NIH/3T3 细胞活力影响。

A



B



C

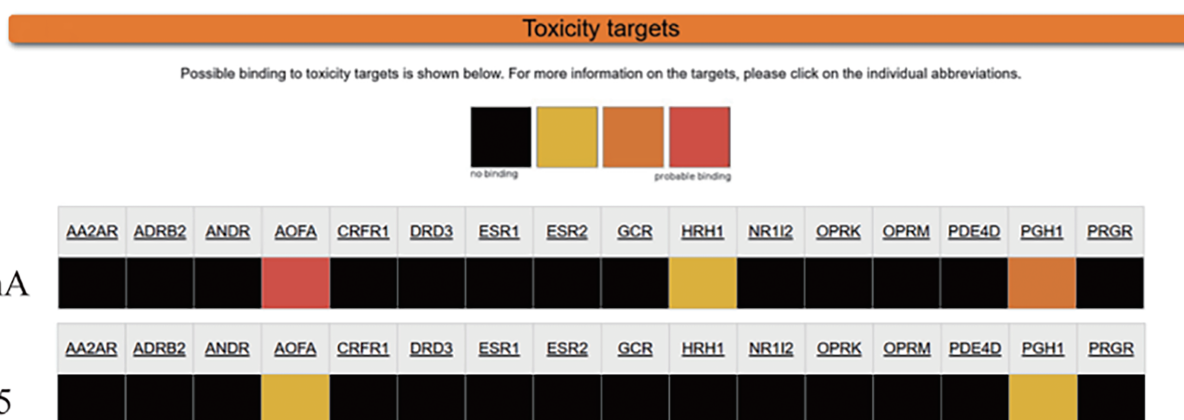


图4 SchA 和 M5 的毒性预测图

注：A：SchA 的毒性等级预测图；B：M5 的毒性等级预测图；C：SchA 和 M5 的毒性靶点预测图。

上述基因在 TGF-β1 诱导后均显著上调，与空白对照组比较差异明显。尼达尼布（阳性对照）、SchA 和 M5 处理均表现出胶原蛋白 COL1A2、纤维化标志物 CDH2 和 α-SMA 等相关基因的下调，调控表达回到与对照组相似的水平。M5 和 SchA 对

纤维化相关基因表现出剂量依赖性的抑制作用。其中，M5 在调控 I 型胶原蛋白上游基因 COL1A2 方面表现出明显的优势。由于 I 型胶原蛋白上游编码基因的转录是由 TGF-β 激活蛋白与远端 TGF-β 启动子元件结合介导的，因此初步推测 M5 和 SchA

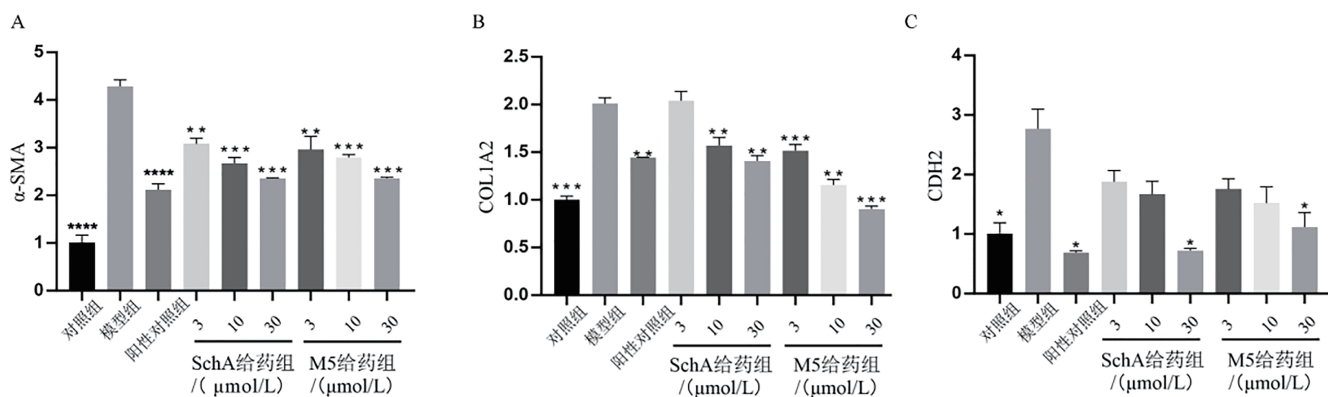


图5 M5和SchA对NIH/3T3细胞纤维化相关基因转录的影响

注: A: α -SMA 基因; B: COL1A2 基因; C: CDH2 基因。 α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白基因, COL1A2 为 α 2-I 型胶原基因, CDH2 为神经钙黏蛋白基因。* P <0.05, ** P <0.01; 对照组: 空白, 模型组: TGF- β 诱导无用药, 阳性对照组: TGF- β 诱导 +5 μ mol/L 尼达尼布, 3、10、30 组分别代表 TGF- β 诱导 +3 μ mol/L、10 μ mol/L、30 μ mol/L 用药。

在 TGF- β 1 刺激后诱导的 COL1A2 表达的显著抑制可能是由于它们作用于上游 TGF- β 信号通路。已有研究表明, RF 与 TGF- β 1 的持续表达有关, 成纤维细胞通过过表达 TGF- β 1 促进间质肾纤维化的发展。

2.5 对斑马鱼体内的肾纤维化的影响

为了在体内水平验证 M5 的抗肾纤维化活性, 对庆大霉素微量注射诱导的斑马鱼急性肾损伤 (Acute kidney injury, AKI) 模型进行验证, 造模方案如图 6A 所示。图 6B 所示, 与模型组相比, M5 和 SchA 给药显著提高了斑马鱼肾损伤建模后的存活率。

RT-qPCR 测定给药对纤维化相关基因转录水平的影响, 结果如图 6C 所示。与模型组相比, 低 (6.25 μ g/mL)、中 (12.5 μ g/mL)、高 (25 μ g/mL) 浓度的 M5 和 SchA 显著抑制胶原调节上游基因 COL1A1A 的表达, 且呈剂量依赖性。并且在相同剂量下, M5 的调控作用比 SchA 更显著。HE 染色结果显示 (图 6D), 空白对照组斑马鱼肾小管形态基本正常。庆大霉素诱导的 AKI 模型组肾小管管腔部分扩张, 上皮刷状缘变薄, 肾小管上皮细胞部分空泡化, 而在给药浓度为 6 μ g/mL, 12 μ g/mL 的 M5 和 SchA 给药组中, 肾小管管腔扩张和空泡化程度显著减小, 斑马鱼肾小管病变形态显著得到好转。以上数据表明, M5 通过抑制体内胶原蛋白相关基因的表达, 改善了急性肾损伤斑马鱼的组织病理学变化, 对庆大霉素诱导的急性肾损伤斑马鱼纤维化有一定的治疗作用。

3 讨论

在前期对 SchA 抗肺纤维化的治疗机制研究

中发现, SchA 的代谢产物 M5 被确定为最具可能性的活性代谢物, 为验证前期研究的猜想, 在 SchA 的抗纤维化作用基础上, 研究通过采用 10 步反应合成代谢产物 M5, 鉴定产物的结构后, 进一步考察了 M5 在抗肾纤维化方向的作用。与 SchA 进行比较, M5 对细胞活力的影响更小, 同样降低了与纤维化相关的基因 α -SMA、COL1A2 和 CDH2 的表达, 尤其是抑制 COL1A2 基因的表达上表现出更好的效果, 两种药物都提高了以诱导肾损伤的斑马鱼作为疾病模型的存活率, 不仅改善斑马鱼肾组织的病理学变化, 且通过在抑制 COL1A1A 基因的表达上 M5 更具优势。

上述结果表明, SchA 的代谢产物 M5 具有预期的抗肾纤维化活性。在对 SchA 的研究中, Wang^[22] 等人基于网络药理学和实验验证的五味子素 A 通过 EGFR/AKT/GSK3 β 信号通路减轻糖尿病和肾病, Zhang^[8] 等人又发现 SchA 可以通过抑制 PKC β 和氧化应激来缓解肾纤维化。说明作为中药五味子生物活性成分之一的 SchA, 除了在治疗肝损伤、肺损伤及其抗炎作用以外, 现在已被证实具有治疗糖尿病和肾纤维化的药理学作用, 这与研究所呈现结果一致。另外, 我们发现活性代谢产物 M5 表现出更好的肾纤维化治疗作用。

尽管成功合成了目标分子, 但多步反应过程限制了大规模应用的潜力。尤其在合成过程中我们通过大量投料的方法合成化合物 9, 而化合物 9 的产率依然较低, 原因可能是热力学不利因素 (如 Δ G 计算) 或高位阻过渡态或化合物 9 其在反应条件下的稳定性较差。同时多步反应的中间体纯化也大大降低效率, 通过计算发现合成产物 M5 的总收率也

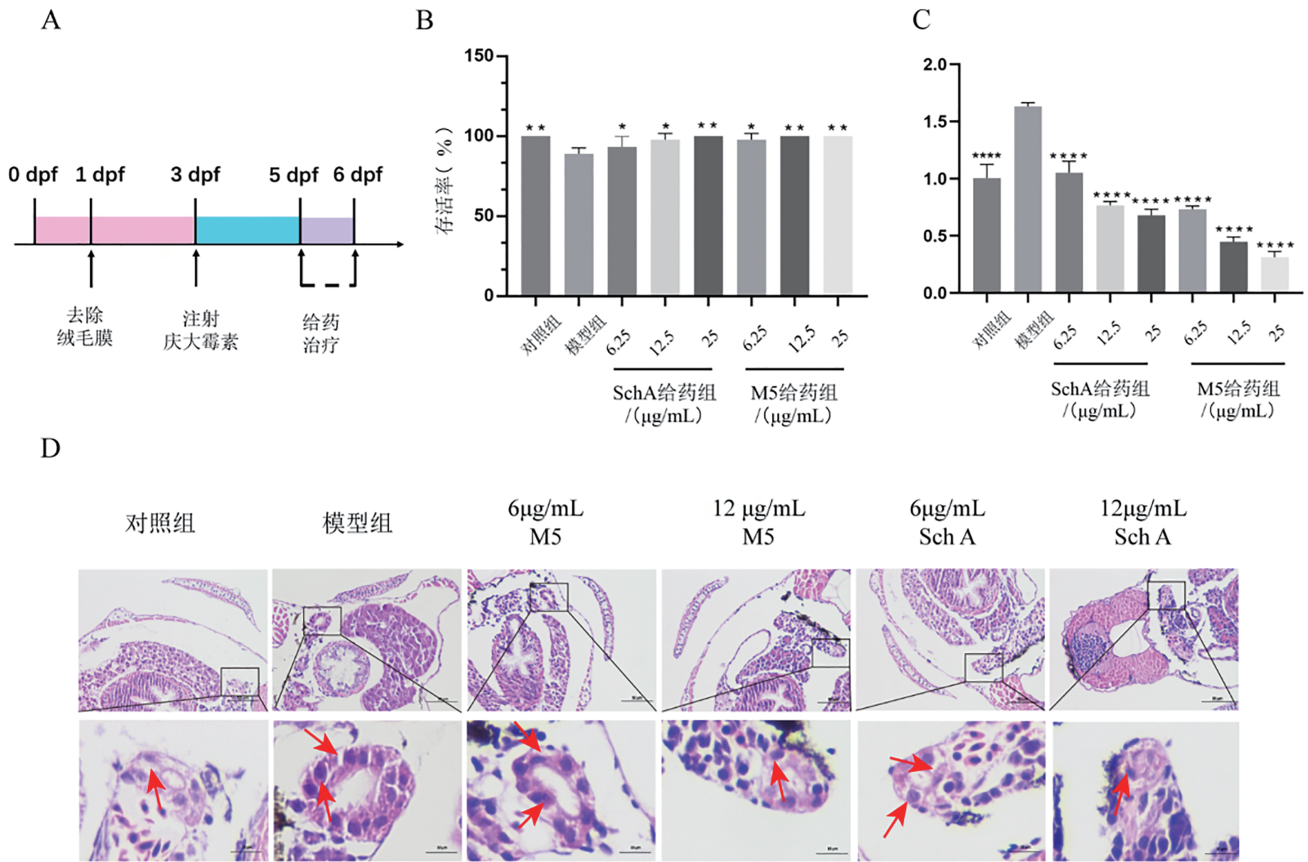


图6 斑马鱼急性肾损伤模型验证图

注：A：庆大霉素诱导RF模型及给药方案的建立；B：各组给药后1d存活率（ $n=15$ ）；C：给药后各组斑马鱼COL1A1A基因qRT-PCR结果；D：给药后各组斑马鱼肾脏组织HE切片。红色箭头表示斑马鱼肾小管细胞的空泡化与细胞核体积变化，每组 $n=15$ ，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，COL1A1A为 $\alpha 1$ -I型胶原基因。

较小，采用连续流化学技术可能更好地控制关键步骤的反应参数，提高反应的选择性和产率。后续我们将针对合成步骤复杂且最终合成的产物M5总收率较低的问题作进一步研究。尽管存在产率问题，合成的目标产物M5确实验证了一定的抗肾纤维化作用，这与前期在SchA代谢活性产物的研究上相一致。综上所述，设计合成的M5具有良好的抗肾纤维化活性，但其具体机制还需继续研究且合成步骤有待进一步优化。

参考文献

[1] Zhu S, Gao J, Zhang L, *et al.* Global, regional, and national cardiovascular disease burden attributable to smoking from 1990 to 2021: Findings from the GBD 2021 Study[J]. *Tobacco Induced Disease*, 2025(1), 23.
 [2] Panizo S, Martínez AL, Alonso MC, *et al.* Fibrosis in chronic kidney disease: Pathogenesis and consequences[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(1): 408.
 [3] Yu X, Pu X, Yu X, *et al.* Integrating network analysis and experimental validation to reveal the mechanism of si-jun-

zi decoction in the treatment of renal fibrosis[J]. *Heliyon*, 2024, 10(16): e35489.

[4] Zhou SS, Ai ZZ, Li WN, *et al.* Deciphering the pharmacological mechanisms of Taohe-Chengqi Decoction extract against renal fibrosis through integrating network pharmacology and experimental validation in vitro and in vivo[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 425.
 [5] Wang J, Guo XZ, Zou ZY, *et al.* Ootheca mantidis mitigates renal fibrosis in mice by the suppression of apoptosis via increasing the gut microbe Akkermansia muciniphila and modulating glutamine metabolism[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 166: 115434.
 [6] 王世卫, 马民凯, 韩佳, 等. 加味真武汤对慢性肾衰竭大鼠ASK1/MAPK/NF- κ B信号通路及肾纤维化的影响[J]. *四川中医*, 2023, 41(4): 38-42.
 [7] Liu JS, Zhou HX. Isolation and structures of schisanlignone-a, schisanlignone-B and butyryl binankadsurin-A[J]. *Acta Chim Sinica*, 1991, 49(4): 412-416.
 [8] 郑海洲, 张杰, 肖程程, 等. 五味子乙素抗肾纤维化作用及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(27): 1-6.
 [9] Liu HL, Zhou H, Li QZ, *et al.* Schisandrin A alleviates

- renal fibrosis by inhibiting PKC β and oxidative stress[J]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155372.
- [10] Liang Y, Fang J, Zhou XX, *et al.* Schisantherin A protects hepatocyte via upregulating DDAH1 to ameliorate liver fibrosis in mice[J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155330.
- [11] 左晓彬. 南北五味子保肝作用评价及其主要活性成分五味子醇乙抗肝纤维化作用研究[D]. 承德: 承德医学院, 2019.
- [12] Wu ZH, Jia MQ, Zhao WJ, *et al.* Schisandrol A, the main active ingredient of *Schisandrae Chinensis Fructus*, inhibits pulmonary fibrosis through suppression of the TGF- β signaling pathway as revealed by UPLC-Q-TOF/MS, network pharmacology and experimental verification[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 289: 115031.
- [13] Xijier Q, Zhao WJ, Huang XC, *et al.* The therapeutic mechanism of schisandrol A and its metabolites on pulmonary fibrosis based on plasma metabonomics and network analysis[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2023, 17: 477-496.
- [14] Jabbar S, Banerjee S. Synthesis of anhydrides from Stobbe condensation products[J]. *Oriental Journal of Chemistry*, 2002, 14(3-4): 1655-9.
- [15] Feng JH, Ding HX, Xiong Y, *et al.* Synthesis of novel unsaturated alkyl ethers of racemic deoxyisopodophyllotoxin as cytotoxic agents[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2006, 17(7): 863-6.
- [16] Ohshima T, Tanaka M, Mitsunashi H, *et al.* Total synthesis of homochiral kadsurin having the natural configuration[J]. *Tetrahedron: Asymmetr*, 1995, 6(1): 139-46.
- [17] Moritani Y, Fukushima C, Miyagishima T, *et al.* Simple synthesis of trans-alpha, beta-dibenzyl-gamma-butyrolactone lignans by diastereoselective reduction of alpha-benzylidene-beta-benzyl-gamma-butyrolactones using NaBH₄-NiCl₂[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1996, 69(8): 2281-6.
- [18] Taafrout M, Landais Y, Robin JP. Isolation, stereochemical study and biomimetic synthesis of steganolide-a, a new bisbenzocyclooctadiene lignane from *steganotaenia-araliacea*[J]. *Tetrahedron Letters*, 1986, 27(16): 1781-4.
- [19] Tanaka M, Mukaiyama C, Mitsunashi H, *et al.* Synthesis of optically pure gomisi lignans - the total synthesis of (+)-schizandrin, (+)-gomisin-a, and (+)-isoschizandrin in naturally-occurring forms[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1995, 60(14): 4339-52.
- [20] Chevrier C, Defoin A, Tarnus C. Synthesis and evaluation of amino-threoses in d- and l-series: Are five membered ring amino-sugars more potent glycosidase inhibitors than the six membered ones?[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15(12): 4125-4135.
- [21] Felpin FX, Bertrand MJ, Lebreton J. Enantioselective reduction of heteroaromatic β, γ -unsaturated ketones as an alternative to allylboration of aldehydes. Application: asymmetric synthesis of SIB-1508Y[J]. *Tetrahedron*, 2002, 58(37): 7381-7389.
- [22] Wang PY, Lan Q, Huang Q, *et al.* Schisandrin A attenuates diabetic nephropathy via EGFR/AKT/GSK3 β signaling pathway based on network pharmacology and experimental validation[J]. *Biology*, 2024, 13(8): 597.

(收稿日期: 2025-09-27; 本文编辑: 叶世英)