

18 β -甘草次酸通过 PGK1 糖酵解途径抑制 oxLDL 诱导的血管内皮细胞凋亡研究

韩维维¹, 王博², 钟晴², 张蓉², 徐驰^{1*}

¹ 黑龙江中医药大学临床医学院; ² 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040

摘要: 基于磷酸甘油酸激酶 1 (phosphoglycerate kinase 1, PGK1) 介导糖酵解途径研究 18 β -甘草次酸 (18 β -glycyrrhetic acid, GA) 抑制氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 诱导的血管内皮细胞凋亡的分子机制。采用 oxLDL (100 mg/L) 损伤建立体外人主动脉内皮细胞损伤模型, 并给予不同浓度的 GA (10、20 和 40 μ mol/L) 及 PGK1 激动剂进行干预, Western blot 法检测糖酵解关键酶 PGK1、葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1)、己糖激酶 (hexokinase 2, HK2) 和丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase M2, PKM2) 表达水平以及凋亡相关 Bax、Bcl2、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达水平, 比色法检测细胞内乳酸和葡萄糖含量。结果表明, 与对照组相比, oxLDL 组内皮细胞葡萄糖消耗减少、乳酸分泌量增加, PGK1、GLUT1、HK2、PKM2、Bax、cleaved Caspase-3 及 cleaved Caspase-9 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$); 与 oxLDL 组相比, GA 治疗组 (10、20 和 40 μ mol/L) 内皮细胞葡萄糖消耗增加、乳酸分泌量减少, PGK1、GLUT1、HK2、PKM2、Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 加入 PGK1 激动剂后可以逆转 GA 对 oxLDL 诱导的血管内皮细胞凋亡的作用。以上结果表明, GA 通过抑制 PGK1 介导的糖酵解途径进而抑制 oxLDL 诱导的血管内皮细胞凋亡。

关键词: 18 β -甘草次酸; PGK1; 人主动脉内皮细胞; Bax; Bcl2

中图分类号: R285.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)3-0478-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.3.011

18 β -Glycyrrhetic acid inhibits oxLDL-induced apoptosis of vascular endothelial cells through PGK1 glycolysis pathway

HAN Wei-wei¹, WANG Bo², ZHONG Qing², ZHANG Rong², XU Chi^{1*}

¹ School of Clinical Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine;

² School of Basic Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: The molecular mechanism of 18 β -glycyrrhetic acid (GA) inhibiting oxidative low-density lipoprotein-induced apoptosis of vascular endothelial cells was studied based on the phosphoglycerate kinase-1-mediated glycolysis pathway. oxLDL (100 mg/L) injury was used to establish the human aortic endothelial cell injury model in vitro, and GA (10, 20 and 40 μ mol/L) and PGK1 agonists were given different concentrations to intervene. The key glycolytic enzyme PGK1, glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase 2 (HK2) and pyruvate kinase M2 were detected by Western blot. PKM2 and apoptosis-related Bax, Bcl2, Caspase-3 and Caspase-9 protein expression levels were detected by colorimetric assay. The results showed that compared with the control group, glucose consumption and lactate secretion of endothelial cells in oxLDL group were decreased, and protein expression levels of PGK1, GLUT1, HK2, PKM2, Bax, cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 were increased ($P < 0.05$). Compared with oxLDL group, glucose consumption and lactate secretion of endothelial cells in GA treatment group (10, 20 and 40 μ mol/L) were increased, and protein expression levels of PGK1, GLUT1, HK2, PKM2, Bax, Caspase-3 and Caspase-9 were decreased ($P < 0.05$). The effect of GA on oxLDL-induced apoptosis of vascular endothelial cells was reversed after addition of PGK1 agonist. These results indicated that GA inhibited oxLDL-induced apoptosis of vas-

cular endothelial cells by inhibiting PGK1-mediated glycolysis pathway.

Key words: 18 β -glycyrrhetic acid; PGK1; human aortic endothelial cells; Bax; Bcl2

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的主要危险因素之一。人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECS)与AS病变的产生有关^[1]。此外,既往研究表明,HAECS的异常迁移、增殖和凋亡与AS的进展密切相关^[2]。氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)会损害人主动脉内皮细胞功能并且是促进AS进展的关键危险因素^[3]。研究发现糖酵解是参与动脉粥样硬化形成最重要的代谢途径之一^[4]。Sarrazy等^[5]研究发现动脉粥样硬化小鼠敲低葡萄糖转运蛋白1的表达水平,可提高小鼠对葡萄糖的摄取从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。Matsui等^[6]研究发现通过抑制葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性减少糖酵解可降低血管中超氧化物的水平,进而减轻动脉粥样硬化小鼠的损伤,另一研究发现糖酵解途径关键基因PGK1参与ox-LDL诱导的人主动脉内皮细胞凋亡^[7]。以上研究结果说明糖酵解途径在动脉粥样硬化病理进程中扮演重要角色。

18 β -甘草次酸(18 β -glycyrrhetic acid, GA)是甘草中关键的生物活性成分,具有抗炎症、抗氧化、抗病毒及抗癌等多种药理作用,其中抗氧化的作用尤其显著,与此同时还可以通过生物转化等过程更大限度地发挥积极作用^[8]。Wang等^[9]研究发现GA可以抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的脐静脉内皮细胞的白介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎性细胞因子的分泌及凋亡的发生,提示GA可以抑制内皮细胞的炎症和凋亡。那么GA能否通过糖酵解途径抑制内皮细胞的凋亡进而防治动脉粥样硬化,目前尚未报道。因此本研究基于PGK1介导的糖酵解途径来探讨GA抑制内皮细胞凋亡的分子机制,为AS的防治提供新的思路和科学依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

原代人主动脉内皮细胞(武汉普诺赛生物技术公司);GA(货号DG0172,质量分数≥98%,成都德思特生物技术有限公司);oxLDL(货号CB82737214,广州奕元生物有限公司);乳酸检测试剂盒(货号A019-2-1,南京建成公司);葡萄糖检测试剂盒(货号S0201S)、CCK8试剂盒(货号C0038)、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(货号C1090)购于碧

云公司;PGK1(货号E9R70)、GLUT1(货号E4S6I)、HK2(货号C64G5)、PKM2(货号D78A4)Rabbit mAb抗体购于美国Cell-Signaling公司;Bax(货号14-6999-82)Mouse mAb、Bcl2(货号13-8800)Mouse mAb、Caspase-3(货号700182)Rabbit mAb及Caspase-9(货号MA1-12562)Mouse mAb抗体购于美国Thermo Fisher公司。

1.2 主要仪器

CO₂恒温孵育箱(MCO-15AC,SANYO公司,日本);多功能酶标仪(FlexStation 3,Molecular Devices,美国)。

1.3 原代人主动脉内皮细胞培养

使用原代人主动脉内皮细胞专用培养基常规培养,包含1%青链霉素、1%原代内皮细胞添加剂及2%胎牛血清作为完全培养基,不含胎牛血清添加的培养基作为同步化培养基,同步化6 h后进行给药处理。

1.4 实验细胞分组

实验分为空白对照组(control, Con)、oxLDL模型组(model, Mod, 100 mg/L)、GA治疗组(oxLDL + 10 μ mol/L, GA-10; oxLDL + 20 μ mol/L, GA-20; oxLDL + 40 μ mol/L, GA-40),其中oxLDL处理细胞24 h后,不同浓度的GA再处理24 h。给予PKG1激动剂后分组为空白对照组(control, Con),oxLDL模型组(model, Mod, 100 mg/L),GA治疗组(oxLDL + 40 μ mol/L, GA-40),PKG1激动剂(特拉唑嗪)+GA+oxLDL组(GA+TZ),其中特拉唑嗪和GA共同作用于细胞24 h。

1.5 Western blot法检测蛋白表达

用预冷的PBS清洗用药处理后的主动脉内皮细胞3次,每孔加入60 μ L RIPA强裂解液,置于冰上裂解30 min,12 000 r/min收集细胞上清,加入细胞上样缓冲液,100℃煮沸5 min。SDS-PAGE分离蛋白,将蛋白转移至NC膜上,脱脂奶粉封闭1 h,TPBS洗膜3次,分别加入一抗PGK1(1:500)、GLUT1(1:1 000)、HK2(1:1 000)、PKM2(1:500)、Bax(1:500)、Bcl2(1:300)、Caspase-3(1:500)、Caspase-9(1:200)及 β -actin(1:2 000),4℃孵育过夜,洗膜后室温孵育二抗(1:5 000)1 h,洗膜后用成像仪发光拍照。

1.6 TUNEL法检测主动脉内皮细胞凋亡

弃掉细胞上清后,用PBS轻轻冲洗细胞,4%多

聚甲醛固定 15 min。然后,用 TUNEL 试剂在 37 °C 避光条件下孵育 1 h,使其渗透 30 min。最后,用 DAPI 染料标记细胞核。荧光图像采用共聚焦激光扫描显微镜(奥林巴斯,日本)拍摄。红色荧光代表 TUNEL 标记的标记凋亡细胞的信号。TUNEL 标记核的数量(红色)占总 DAPI 标记核的数量(蓝色)的百分比为凋亡指数。

1.7 CCK-8 法检测人主动脉内皮细胞活性

将原代人主动脉内皮细胞接种在 96 孔板,每孔 200 μL 培养基并根据不同的 GA 浓度进行给药,每组设置 6 个平行复孔,作用 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在培养箱中培养 1 h,待明显显色后用多功能酶标仪检测在 450 nm 波长的各组 OD 值。

1.8 比色法检测内皮细胞葡萄糖和乳酸浓度

去除人主动脉内皮细胞培养液,用 PBS 清洗三次。加入裂解液充分裂解后,离心取上清作为待测样品,按照试剂盒说明书进行操作,96 孔板每孔加 200 μL 上清液,于 630 nm 和 530 nm 波长处分别检测葡萄糖和乳酸吸光度值。

1.9 统计方法

本研究采用 SPSS 20.0 进行数据统计学分析,结果用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组数据之间的比较采用 T 检验;若多组之间的比较,数据呈正态

分布时,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GA 对人主动脉内皮细胞活性的影响

CCK-8 结果显示 GA 浓度 0、10、20、40、160 μmol/L 处理内皮细胞时,细胞活性(OD 值)分别为 0.89 ± 0.07 、 0.87 ± 0.03 、 0.83 ± 0.05 、 0.85 ± 0.04 、 0.61 ± 0.04 、 0.52 ± 0.12 ,其中大于 GA 浓度大于 80 μmol/L 时细胞的活性降低($P < 0.01$),而浓度在 10 ~ 40 μmol/L 时对细胞的活性无影响($P > 0.05$),因此选用 10、20、40 μmol/L 分别为低剂量组,中剂量组和高剂量组进行实验。

2.2 GA 对 oxLDL 诱导的血管内皮细胞凋亡的影响

与 Con 相比,Mod 人主动脉内皮细胞 Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平及 TUNEL 凋亡指数明显增加,Bcl2 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与 Mod 相比,GA 治疗组(GA-10、GA-20、GA-40)内皮细胞 Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平及 TUNEL 凋亡指数明显降低,Bcl2 蛋白表达水平明显增加($P < 0.01$) (见图 1、2)。以上结果说明 GA 可以抑制 oxLDL 诱导的人主动脉内皮细胞凋亡。

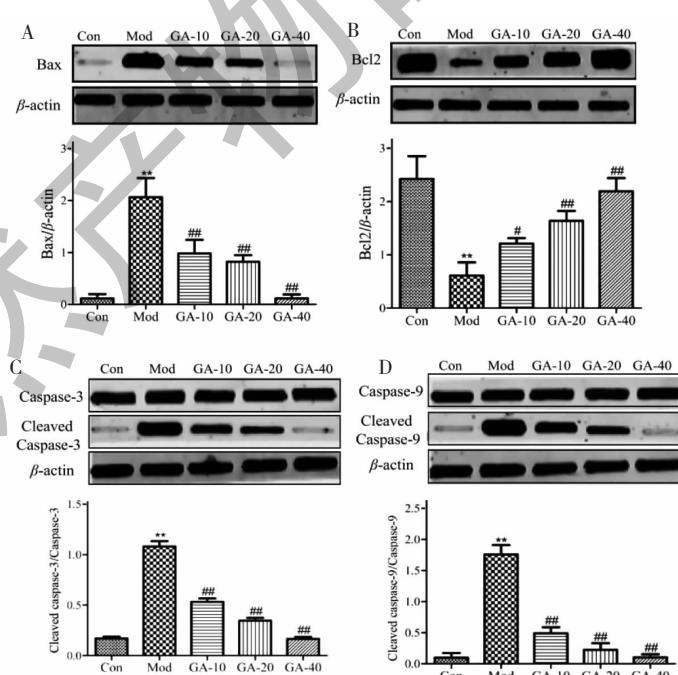


图 1 GA 对各组细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of GA on cell apoptosis in each group

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con, ** $P < 0.01$; Compared with Mod, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

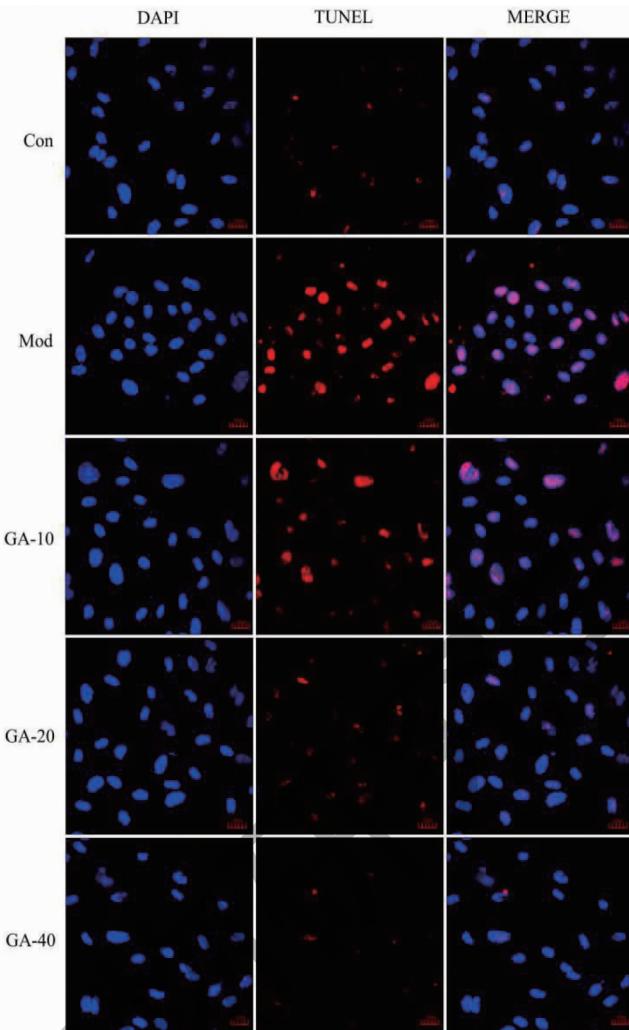


图2 TUNEL法检测凋亡水平

Fig. 2 Apoptosis level was measured by TUNEL method

注:蓝色荧光代表细胞核,红色荧光代表TUNEL。Note:Blue fluorescence represents cell nucleus,red fluorescence represents TUNEL.

2.3 GA 对 oxLDL 诱导的人主动脉内皮细胞糖酵解关键基因 PGK1、GLUT1、HK2、PKM 蛋白水平的影响

与 Con 相比, Mod 人主动脉内皮细胞 PGK1 蛋白表达水平明显增加 ($P < 0.01$); 与 Mod 相比, GA 治疗组 (GA-10、GA-20、GA-40) 内皮细胞 PGK1 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.01$), 并且呈剂量依赖性 (见图 3)。

2.4 GA 对 oxLDL 诱导的人主动脉内皮细胞葡萄糖消耗和乳酸生成的影响

比色法结果显示, 与 Con 相比, Mod 人主动脉内皮细胞葡萄糖消耗量明显降低, 乳酸分泌量明显增加 ($P < 0.01$); 与 Mod 相比, GA 治疗组 (GA-10、GA-20、GA-40) 内皮细胞葡萄糖消耗量明显上升, 乳酸

分泌量显著减少 ($P < 0.01$), 并且呈剂量依赖性 ($P < 0.01$) (见图 4)。

2.5 PGK1 蛋白激动剂特拉唑嗪对 GA 抑制 oxLDL 诱导的血管内皮细胞凋亡作用的影响

与 Con 相比, Mod 人主动脉内皮细胞 Bax、cleaved Caspase-3 及 cleaved Caspase-9 蛋白表达水平明显增加, Bcl2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 Mod 相比, GA 治疗组 (GA-40) 内皮细胞 Bax、cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平明显降低, Bcl2 蛋白表达水平明显增加 ($P < 0.01$) (见图 5), 然而加入 PGK1 蛋白激动剂特拉唑嗪后可以逆转 GA 的上述作用, 提示 GA 通过抑制 PGK1 介导的糖酵解通路进而抑制 oxLDL 诱导的血管内皮细胞凋亡。

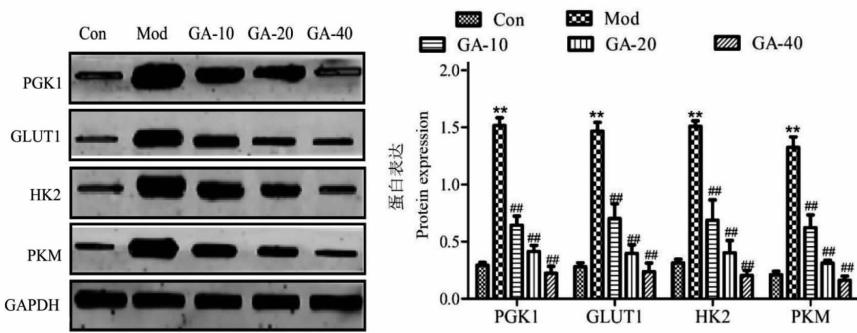


图 3 GA 对 oxLDL 诱导的人主动脉内皮细胞糖酵解关键基因 PGK1、GLUT1、HK2、PKM 蛋白水平的影响

Fig. 3 Effect of GA on the protein levels of PGK1, GLUT 1, HK2, and PKM, the key glycolysis genes induced by oxLDL in human aortic endothelial cells

注:与 Con 相比, ** $P < 0.01$; 与 Mod 相比, ## $P < 0.01$ 。Note: ** $P < 0.01$ vs Con, ## $P < 0.01$ vs Mod.

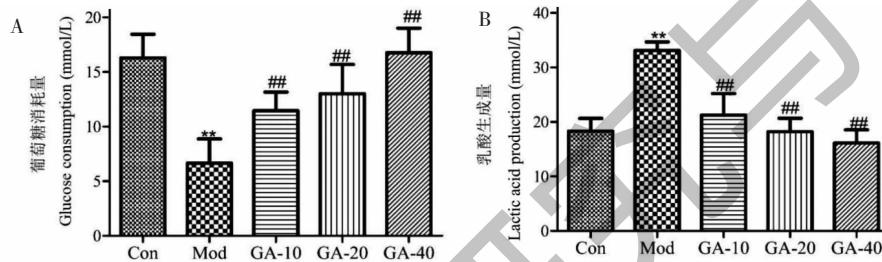


图 4 GA 对 oxLDL 诱导的人主动脉内皮细胞葡萄糖消耗和乳酸生成的影响

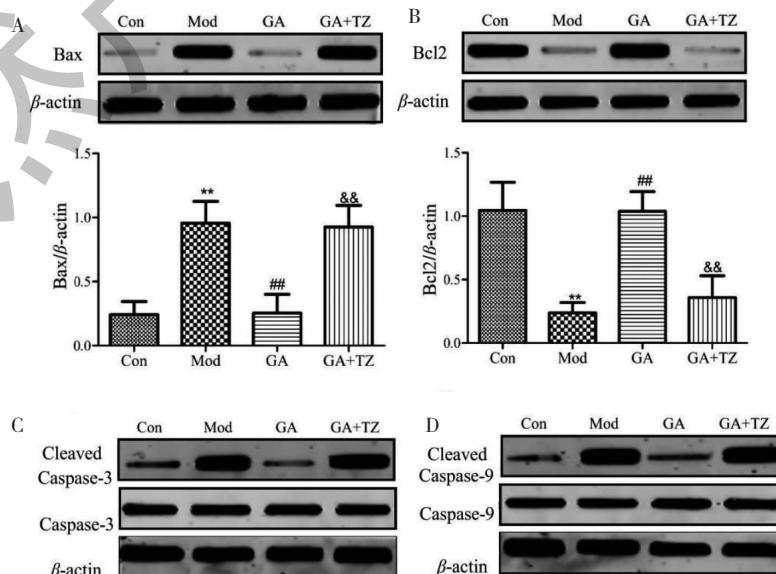
Fig. 4 Effect of GA on glucose consumption and lactate production in human aortic endothelial cells induced by oxLDL

注:与 Con 相比, ** $P < 0.01$; 与 Mod 相比, ## $P < 0.01$ 。Note: ** $P < 0.01$ vs Con, ## $P < 0.01$ vs Mod.

3 讨论与结论

近年来研究发现,作为甘草的关键生物活性成分 GA 对多种心血管疾病具有一定的防治作用。GA 通过调控 RhoA/Rho 激酶通路抑制肺动脉平滑

肌细胞增殖进而防治肺动脉高压^[10]。Yang 等^[11]通过代谢组学分析发现 GA 可通过抗氧化和抗炎作用缓解肺动脉高压大鼠代谢紊乱,提高机体抗缺氧能力,恢复各种代谢途径(能量代谢、氨基酸代谢、脂



续图 5(Continued Fig.5)

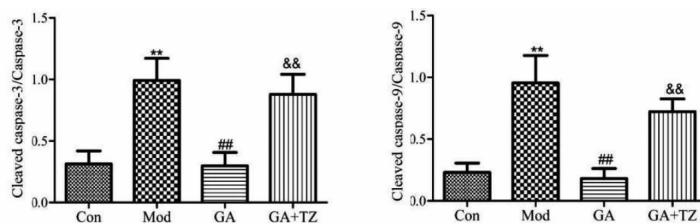


图5 特拉唑嗪对每组凋亡蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of terrazosin on apoptotic protein expression in each group

注:与Con相比, **P<0.01;与Mod相比, ##P<0.01;与GA-40相比, &&P<0.01。

Note: A: **P<0.01 vs Con, ##P<0.01 vs Mod, &&P<0.01 vs GA-40.

质代谢)。另外GA还可以通过抑制IP3介导的内皮细胞钙离子信号通路进而调控多种心血管的功能。比如其可以通过减弱细胞内钙过载改善心脏舒张功能,并可以通过调控钙内流介导的p38 MAPK通路进而抑制缺血性心肌细胞凋亡^[12,13]。然而GA对AS的防治机制目前尚不清楚。

本研究利用oxLDL处理人主动脉内皮细胞模拟AS体外细胞模型。发现在oxLDL诱导的内皮细胞损伤模型中,促进凋亡指标cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Bax及TUNEL水平显著增加,抑制凋亡因子Bcl2的水平显著下调,加入低中高剂量的GA均可以有效抑制促凋亡指标Caspase-3、Caspase-9、Bax及TUNEL的水平,并促进抑制凋亡因子Bcl2的表达,提示GA可以抑制oxLDL诱导的内皮细胞凋亡。进一步研究发现另外,在oxLDL诱导的内皮细胞凋亡模型中,糖酵解关键基因PGK1、GLUT1、HK2及PKM表达水平显著增加,提示在oxLDL诱导内皮细胞凋亡过程中激活了细胞的糖酵解代谢。而加入低中高剂量的GA均可以有效抑制上述糖酵解关键基因的表达水平,说明GA可以抑制oxLDL诱导的内皮细胞的糖酵解途径。多项研究已证实糖酵解是参与动脉粥样硬化形成最重要的代谢途径之一^[14-16],而本研究结果也证实了糖酵解参与了oxLDL诱导内皮细胞凋亡过程,并且GA可以抑制oxLDL诱导的内皮细胞的糖酵解途径。本研究进一步还发现加入PGK1激动剂特拉唑嗪后,可以显著逆转GA对oxLDL诱导内皮细胞凋亡的抑制作用,上述研究说明GA通过PGK1介导的糖酵解途径抑制内皮细胞的凋亡。而PGK1是催化糖酵解途径中第一个产生ATP的酶,是介导糖酵解途径的关键基因。Zhang等^[7]研究发现oxLDL处理的人主动脉内皮细胞模型中PGK1蛋白表达显著增加,而本研究结果与上述一致,说明PGK1介导的糖酵解途

径是动脉粥样硬化发生发展的重要病理机制。

综上所述,本研究发现GA通过抑制PGK1介导的糖酵解通路进而抑制oxLDL诱导的内皮细胞凋亡,为动脉粥样硬化的治疗提供新的思路和靶点。

参考文献

- 1 Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges [J]. Circ Res, 2016, 118: 531-534.
- 2 Li Y, Yang C, Zhang L, et al. MicroRNA-210 induces endothelial cell apoptosis by directly targeting PDK1 in the setting of atherosclerosis[J]. Cell Mol Biol Lett, 2017, 22:3.
- 3 Chen M, Ren L, Meng Y, et al. The protease inhibitor E64d improves ox-LDL-induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2018, 96:120-127.
- 4 O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists[J]. Nat Rev Immunol, 2016, 16: 553-565.
- 5 Sarrazy V, Viaud M, Westerterp M, et al. Disruption of glut1 in hematopoietic stem cells prevents myelopoiesis and enhanced glucose flux in atheromatous plaques of ApoE (-/-) mice[J]. Circ Res, 2016, 118:1062-1077.
- 6 Matsui R, Xu S, Maitland KA, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases vascular superoxide and atherosclerotic lesions in apolipoprotein E (-/-) mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26:910-916.
- 7 Zhang X, Guan MX, Jiang QH, et al. NEAT1 knockdown suppresses endothelial cell proliferation and induces apoptosis by regulating miR638/AKT/mTOR signaling in atherosclerosis [J]. Oncol Rep, 2020, 44:115-125.
- 8 Zhao ZX, Li CF, Yang HW, et al. Progress in microbial transformation of pentacyclic triterpenoids[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:1415-1426.
- 9 Wang XY, Wang L, Chen XL, et al. Effect of inhibition of

- 11 β -HSD2 on GC-protected vascular endothelial cell inflammatory injury [J]. J Med Res (医学研究杂志), 2012, 41: 93-96.
- 10 Zhang M, Chang Z, Zhang P, et al. Protective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on pulmonary arterial hypertension via regulation of Rho A/Rho kinase pathway [J]. Chem Biol Interact, 2019, 311: 108749.
- 11 Yang T, Zhou J, Fang L, et al. Protection function of 18 β -glycyrrhetic acid on rats with high-altitude pulmonary hypertension based on ^1H NMR metabonomics technology [J]. Anal Biochem, 2021, 631: 114342.
- 12 Han J, Su GH, Wang YH, et al. 18 β -glycyrrhetic acid improves cardiac diastolic function by attenuating intracellular calcium overload [J]. Curr Med Sci, 2020, 40: 654-661.

(上接第 422 页)

- 23 Cao YG, Ren YJ, Liu YL, et al. Chemical constituents of *Gardenia jasminoides* var. *grandiflora* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2023, 46: 1167-1171.
- 24 Tao YW, Tian Y, Xu WD, et al. Terpenoids from *Euphorbia micractina* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2016, 51: 411-419.
- 25 Lin RJ, Cheng MJ, Chen WY, et al. Phytochemical investigation and cytotoxic evaluation of components of leaves and stems of *Machilus zuihoensis* var. *mushaensis* [J]. Chem Nat Compd, 2014, 50: 978-981.
- 26 Lu XT, Shao L, Zhao BQ, et al. Chemical constituents from

- 13 Buckley C, Zhang X, Wilson C, et al. Carbenoxolone and 18 β -glycyrrhetic acid inhibit inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated endothelial cell calcium signalling and depolarise mitochondria [J]. Br J Pharmacol, 2021, 178: 896-912.
- 14 Yang Q, Xu J, Ma Q, et al. PRKAA1/AMPK α 1-driven glycolysis in endothelial cells exposed to disturbed flow protects against atherosclerosis [J]. Nat Commun, 2018, 9: 4667.
- 15 Li L, Wang M, Ma Q, et al. Role of glycolysis in the development of atherosclerosis [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 323: C617-C629.
- 16 Xu R, Yuan W, Wang Z. Advances in glycolysis metabolism of atherosclerosis [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2023, 16: 476-490.

(上接第 511 页)

- 18 Wang YM, Li JN, Yin HP, et al. Optimization of natural extraction process of limonins from citrus seeds in deep eutectic solvents [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2024, 50: 174-181.
- 19 Si YY, Sun SW, Liu K, et al. Novel deep eutectic solvent based on levulinic acid and 1,4-butanediol as an extraction media for bioactive alkaloid rutaecarpine [J]. Processes, 2019, 7: 171.
- 20 Fu LY, Liu X. Separation of antioxidant activity components from black cumin seed oil by deep eutectic solvents [J]. Chi-

- Pleioblastus amarus* and their anti-inflammatory activity [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2019, 41: 2663-2667.
- 27 Fan QL, Huang WH, Guo BL, et al. Chemical constituents of Semen Lepidii Sativi [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科学), 2014, 42: 3533-3534.
- 28 Xu Q, Qiao YB, Zhang ZJ, et al. New polyketides with anti-inflammatory activity from the fungus *Aspergillus rugulosa* [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 700573.
- 29 Numazawa M, Handa W. Reduction of 1,4-dien-3-one steroids with LiAl₂H₄ or NaB₂H₄: stereospecific deuterium-labelling at the c-1alpha position of a 4-en-3-one steroid [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54: 554-556.

na Oils Fats (中国油脂), 2021, 46: 44-49.

- 21 Long JY. Study on the extraction technology of synephrine and naringin from citrus rotten fruits [D]. Xiangtan: Xiangtan University (湘潭大学), 2020.
- 22 Gu LY, Luo ZW, Wang CM, et al. Optimization of extraction process and kinetic analysis of polysaccharides from *Panax notoginseng* residues [J/OL]. J East China Univ Sci Technol; Nat Sci (华东理工大学学报: 自科版): 1-7 [2023-09-22]. <https://doi.org/10.14135/j.cnki.1006-3080.20230104001>.