

## · 研究论文 ·

## 五味子乙素对氯氮平致小鼠肝损伤的保护作用

白慧媛, 俸 珊\*

(西南大学药学院, 重庆 400716)

**摘要:** 本文旨在研究五味子乙素 (schizandrin B, Sch B) 能否缓解氯氮平 (clozapine, CLZ) 引起的肝损伤, 并探讨其保护作用机制, 为减轻氯氮平临床使用中的不良反应提供新的研究思路。CLZ 连续给药 3 周造小鼠肝损伤模型, 同时观察不同剂量 Sch B 对 CLZ 肝损伤保护作用: 检测小鼠血清中谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和肝组织中过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malonic dialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的变化, 肝组织病理切片观察损伤情况。免疫组化和 Western blotting 观察 Nrf2 蛋白在肝细胞中的表达。实时定量 PCR 检测醌氧化还原酶 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1] 和血红素氧合酶 (heme oxygenase 1, HO-1) mRNA 表达水平。结果表明, 较低剂量 (25 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>) 的 Sch B 可使小鼠 ALT、AST 和 ALP 水平降低, SOD 和 GSH 含量升高, 且 MDA 含量降低。此外, Sch B 各剂量均能上调 Nrf2 蛋白表达, 同时诱导其核转位, 其下游的 NQO1 和 HO-1 基因 mRNA 表达水平显著增加。本研究表明, Sch B 能通过激活 Nrf2/ARE 通路, 在一定剂量范围 (25~50 mg·kg<sup>-1</sup>) 内减轻 CLZ 所致小鼠肝损伤, 而高剂量 (100 mg·kg<sup>-1</sup>) Sch B 未显示出肝保护作用。

**关键词:** 五味子乙素; 氯氮平; Nrf2/ARE 信号通路; 肝损伤

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0390-07

## Protection effects of schizandrin B against liver injury induced by clozapine in mice

BAI Hui-yuan, FENG Shan\*

*(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China)*

**Abstract:** This study was conducted to test the effects of schizandrin B (Sch B) on clozapine (CLZ) induced chronic liver injury in mice and the mechanism of action, and this may provide a new approach for clinical prevention of CLZ-induced side effects. The CLZ was given to mice for three weeks alone or co-administration with Sch B. The changes of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and antioxidation indexes superoxide dismutase (SOD), malonic dialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and liver histological evaluation were determined. Expression of Nrf2 was assayed in hepatic cells by immunohistochemical staining and Western blotting. The changes of relative gene expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase I (NQO1) and heme oxygenase 1 (HO-1) were assayed by real-time Q-PCR. The results showed that pretreatment with a lower dosage of Sch B (25, 50 mg·kg<sup>-1</sup>) prevented CLZ-induced liver injury as indicated by the reduced levels of ALT, AST and ALP, and the preserved activities of SOD, GSH and inhibiting MDA. It

收稿日期: 2016-08-31; 修回日期: 2016-09-28.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81572678); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81402393); 西南大学基本科研业务费 (XDJK2015C155); 西南大学博士基金资助项目 (SWU114055).

\*通讯作者 Tel: 86-23-68251225, E-mail: fsjever123@163.com

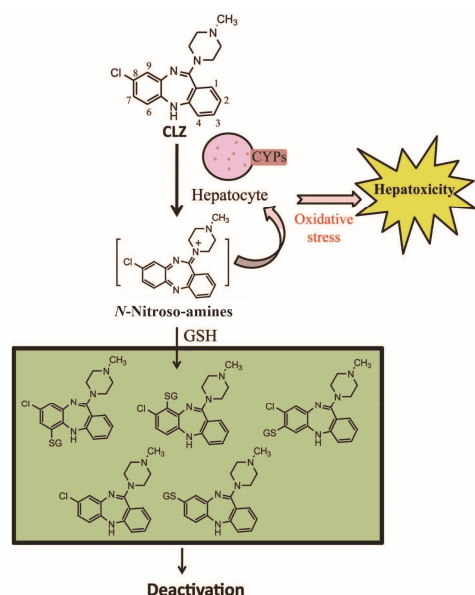
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0861

was shown that Sch B could up-regulate Nrf2 expression leading to nuclear accumulation of Nrf2 to induce oxidative response genes such as NQO1 and HO-1. These results suggest that Sch B could protect against liver injury induced by CLZ *via* the activation of the Nrf2/ARE signal pathway in a dose-dependent manner.

**Key words:** schizandrin B; clozapine; Nrf2/ARE pathway; liver injury

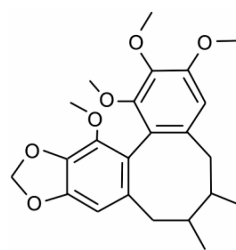
氯氮平 (clozapine, CLZ) 属于苯二氮类药物, 是第一个非典型的抗精神病药物, 于 1958 年在瑞典首先被发现, 1972 年在奥地利和瑞典上市<sup>[1, 2]</sup>。此后我国引进该药, 因其抗精神病作用强、作用谱广、起效快, 尤其是锥体外系不良反应少、价格便宜而在精神科广泛使用<sup>[3]</sup>。但其风险和疗效并存, 临床观察发现其诱发肝脏损伤的发生率高达 37%, 主要临床表现为转氨酶水平升高<sup>[4, 5]</sup>。因此, 有效防治氯氮平的肝毒性是其临床使用亟需解决的问题。大量研究表明, 氯氮平主要通过活性代谢产物 (reactive metabolites, RMs) 引发肝脏毒性 (图 1)。氯氮平可在细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 作用下, 产生活性代谢产物胺正离子<sup>[6, 7]</sup>: ① 其具有自由基特征, 可致细胞内氧化还原水平失衡, 发生氧化应激损伤, 继而诱发不良反应<sup>[6]</sup>; ② 该胺正离子还可与内源性蛋白质结合形成具有免疫原性的自身抗原, 导致特异质不良反应<sup>[7]</sup>。值得注意的是, 该胺正离子可在谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 作用下与谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 结合, 发生代谢解毒。因此, 增加胺正离子的清除能力和提高机体抗氧化应激损伤能力是减轻氯氮平肝毒性不良反应的途径之一。

转录因子 NF-E2 相关因子 (NF-E2-related factor2,



**Figure 1** The mechanism of adverse reactions of clozapine (CLZ)

Nrf2) 是细胞抗氧化反应的中枢调节者, 通过与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 相互作用上调抗氧化酶 [如过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物歧化酶 (SOD)] 和 II 相代谢酶 (如 GST) 的表达, 增强细胞清除氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的能力, 使细胞维持氧化还原平衡状态, 降低氧化损伤<sup>[8]</sup>。因此, Nrf2/ARE 抗氧化系统传导通路可能是极具临床意义的氯氮平肝毒性防护靶点。五味子乙素 (schizandrin B, Sch B, 图 2) 是从中药五味子中分离出的主要保肝活性成分之一。研究显示其可通过激活 Nrf2/ARE 信号通路<sup>[9, 10]</sup>, 上调 GST、醌氧化还原酶 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1] 和血红素氧合酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 等抗氧化酶的表达, 起到清除 ROS 和抑制脂质过氧化, 进而发挥肝保护作用<sup>[11]</sup>。本文建立了氯氮平诱导小鼠慢性肝损伤模型, 旨在研究 Sch B 能否缓解 CLZ 引起的肝损伤, 并探讨其保护作用机制是否与 Nrf2/ARE 信号通路相关, 为减轻氯氮平临床使用中的不良反应提供新的研究思路。



**Figure 2** Chemical structure of schizandrin B (Sch B)

## 材料与方法

**实验材料** 五味子乙素购自中国食品药品检定研究院, 纯度 > 99%。氯氮平购自江苏云阳集团药业有限公司, 纯度 > 99%。谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、SOD、GSH 及丙二醛 (MDA) 测定试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司; Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; PrimeScript<sup>®</sup> RT Reagent Kit 和 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 购于大连宝生物工程有限公司; Real-time PCR 引物由上海生工生物工程公司合成; Nrf2 抗体和山羊抗兔 IgG 二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公

司, 其他试剂为分析纯。

**实验动物与饲养条件** SPF级雄性昆明小鼠, 体重 (20±2) g, 50只, 购自重庆中药研究院, 生产许可证号: SCXD(渝)2013-0006。在恒温 (21~23) °C、恒湿 (45%~65%), 各12 h明暗周期的饲养室, 普通饲料喂养, 自由进食和饮水。

**实验设计** 动物随机分组, 分别为 control 组 (0.9%生理盐水)、CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>)、CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>) + Sch B (25 mg·kg<sup>-1</sup>)、CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>) + Sch B (50 mg·kg<sup>-1</sup>)、CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>) + Sch B (100 mg·kg<sup>-1</sup>) 组。各组连续灌胃 (ig) 给药3周, 于末次给药晚上动物禁食不禁水, 24 h后摘眼球取血, 供测定血清生化指标。另外取肝组织固定于福尔马林液, 用于做病理切片和免疫组织化学染色。其余的肝组织用锡箔纸包好后, 液氮速冻, 转移到-80 °C冰箱保存, 备用。

**血清生化指标的检测** 使用全自动生化分析仪及配套检测试剂测定各组动物的血液生化指标: ALT、AST和ALP。

**肝组织生化指标的检测** 称取适量的肝组织, 按重量体积比 (组织: 生理盐水=1:9) 加入冰冷的生理盐水, 剪碎, 冰上匀浆, 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心10 min, 制成10%肝组织匀浆。SOD、GSH、MDA及蛋白定量按照试剂盒说明书操作。

**组织病理检查** 将固定于福尔马林的部分肝大叶先用石蜡包埋, 然后进行切片, 通过常规苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色后, 在光学显微镜下观察组织病理变化。

**免疫组织化学染色检测 Nrf2 蛋白表达** 采用免疫组化 S-P 法, 将肝组织石蜡切片加入稀释后的 Nrf2 一抗 4 °C 孵育 24 h, 过氧化物酶 (HRP) 酶标二抗室温孵育 2 h, 二氨基联苯胺显色 15 min, 显微镜下观察肝组织中 Nrf2 表达情况。

**Western blotting 检测 Nrf2 蛋白表达** 将药物处理后的细胞置于冰上, 采用蛋白提取试剂盒提取蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度, 每孔上样 100 μg 蛋白。12% SDS-PAGE 分离样品, 转膜, 封闭。将膜溶于 5% BSA 中的一抗 (兔抗 Nrf2 单克隆抗体), 4 °C 过夜。洗膜, 将膜浸入以 1:10 000 稀释的二抗稀释液中, 室温孵育 1 h。加入 ECL 试剂, 曝光、显影、定影、分析。

**实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达** 称取适量肝组织, 剪碎, 加入 Trizol 1 mL, 冰上匀浆, 提取总 RNA。按逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应, 制成 cDNA。所得 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 反应, 检

测 HO-1 和 NQO1 mRNA 水平的表达。引物序列均由上海生工生物工程公司合成 (表 1)。

**Table 1** The primer sequence of real-time PCR

Gene	Primer sequence
GAPDH	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'
	R: 5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'
NQO1	F: 5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3'
	R: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
HO-1	F: 5'-TGAAGGAGCCACCAAGGAGG-3'
	R: 5'-AGAGGTCACCCAGGTAGCGGG-3'

**统计学分析** 数据统计分析采用统计软件 SPSS 19.0。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组内两两比较采用 LSD 法。

## 结果

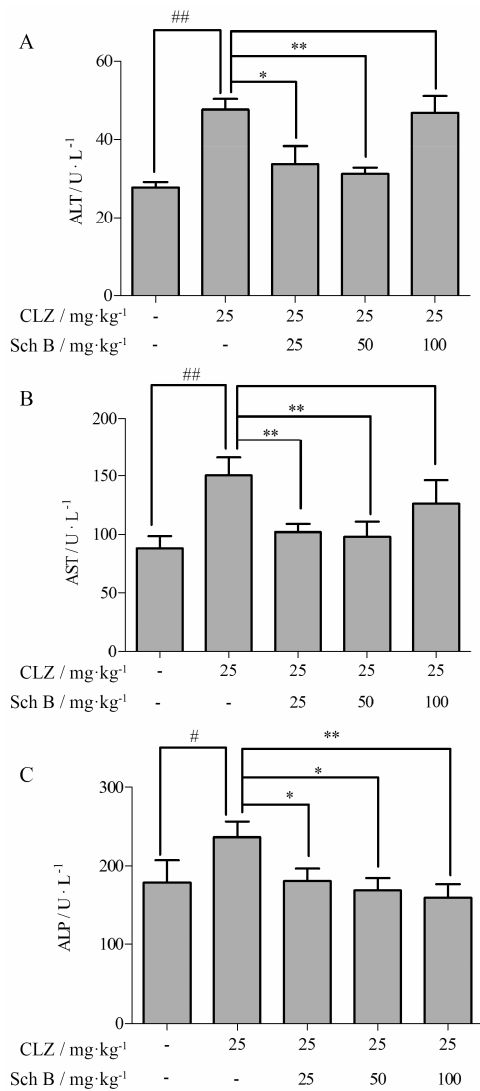
### 1 Sch B 对慢性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 和 ALP 的影响

如图 3 所示, 与 control 组相比, CLZ 组小鼠的血清中 ALT、AST、ALP 浓度均明显升高约 1.5 倍。与 CLZ 组相比, Sch B (25 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗组实验小鼠血清中的 ALT、AST 和 ALP 浓度均有所降低。其中, 在 Sch B (25 mg·kg<sup>-1</sup>) 组小鼠中, ALT 浓度降低至 (33.67±4.68) U·L<sup>-1</sup> ( $P<0.05$ ), AST 浓度降低至 (102.00±17.50) U·L<sup>-1</sup> ( $P<0.01$ ), ALP 浓度降低至 (180.00±16.79) U·L<sup>-1</sup> ( $P<0.05$ ); 在 Sch B (50 mg·kg<sup>-1</sup>) 组中, ALT、AST 和 ALP 浓度持续降低, 且与 control 组相当。此外, 与 CLZ 组相比, Sch B (100 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗组小鼠血清中的 ALT 浓度无显著性变化, AST 浓度略有降低但无显著性差异, 仅 ALP 浓度 [(158.60±17.28) U·L<sup>-1</sup>,  $P<0.01$ ] 呈极显著性降低。

上述结果提示, CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>) 连续给药 3 周后, 可引起小鼠肝脏转氨酶水平升高, 显示出肝脏毒性, 低 (25 mg·kg<sup>-1</sup>)、中剂量 (50 mg·kg<sup>-1</sup>) Sch B 对 CLZ 导致的小鼠肝损伤具有保护作用, 而高剂量 (100 mg·kg<sup>-1</sup>) Sch B 对 CLZ 导致的小鼠肝损伤未显示出保护作用。

### 2 Sch B 对慢性肝损伤小鼠肝组织氧化应激指标的影响

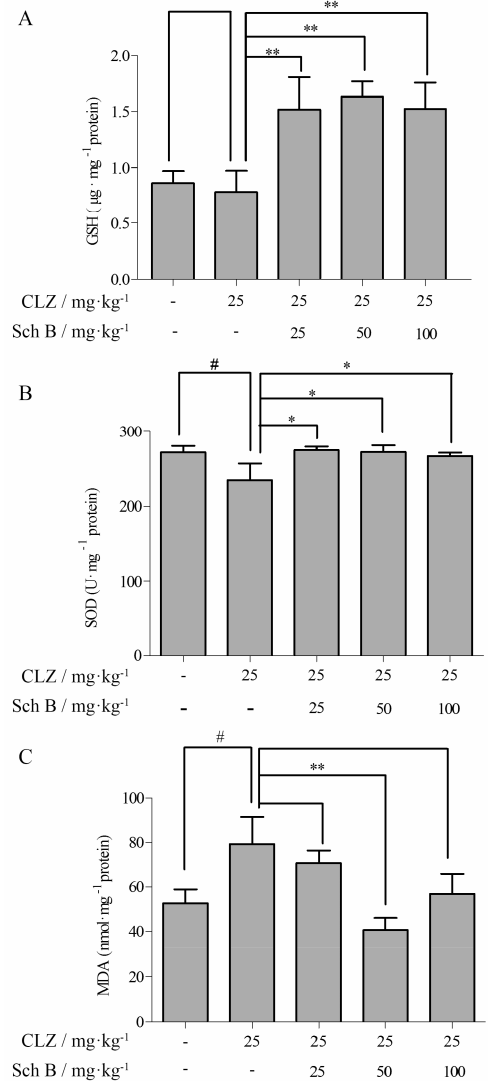
如图 4 所示, 与 control 组相比, CLZ 组小鼠的肝脏中 GSH、SOD 浓度均降低, 而 MDA 浓度升高。与 CLZ 组相比, 25 和 50 mg·kg<sup>-1</sup> Sch B 治疗组小鼠肝脏中的 GSH、SOD 浓度均有所升高, MDA 浓度下降。其中, 在 25 mg·kg<sup>-1</sup> Sch B 组实验小鼠中, GSH 浓度



**Figure 3** Effects of Sch B on the activity of ALT, AST and ALP induced by CLZ in mice serum. A: Serum ALT activity; B: Serum AST activity; C: Serum ALP activity.  $n=8-10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ ; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . ALP: Alkaline phosphatase; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; CLZ: Clozapine

升高至  $(1.52 \pm 0.10) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $P<0.01$ ), SOD 浓度升高至  $(275.48 \pm 4.53) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $P<0.05$ ), MDA 浓度降低至  $(70.78 \pm 5.65) \text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $P>0.05$ ); 在  $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Sch B 组实验小鼠中, GSH 浓度持续升高至  $(1.63 \pm 0.05) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $P<0.01$ ), MDA 浓度持续降低至  $(40.56 \pm 5.49) \text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$  ( $P<0.01$ ), 而 SOD 浓度并未出现持续升高。在  $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Sch B 组实验小鼠中, GSH 和 SOD 均未出现剂量依赖性升高, MDA 浓度也并未出现剂量依赖性降低。

上述结果提示, CLZ ( $25 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 连续给药 3 周后, 可引起小鼠肝脏中 MDA 水平升高, GSH 和 SOD 水平下降, 表现出氧化应激损伤。低 ( $25 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、

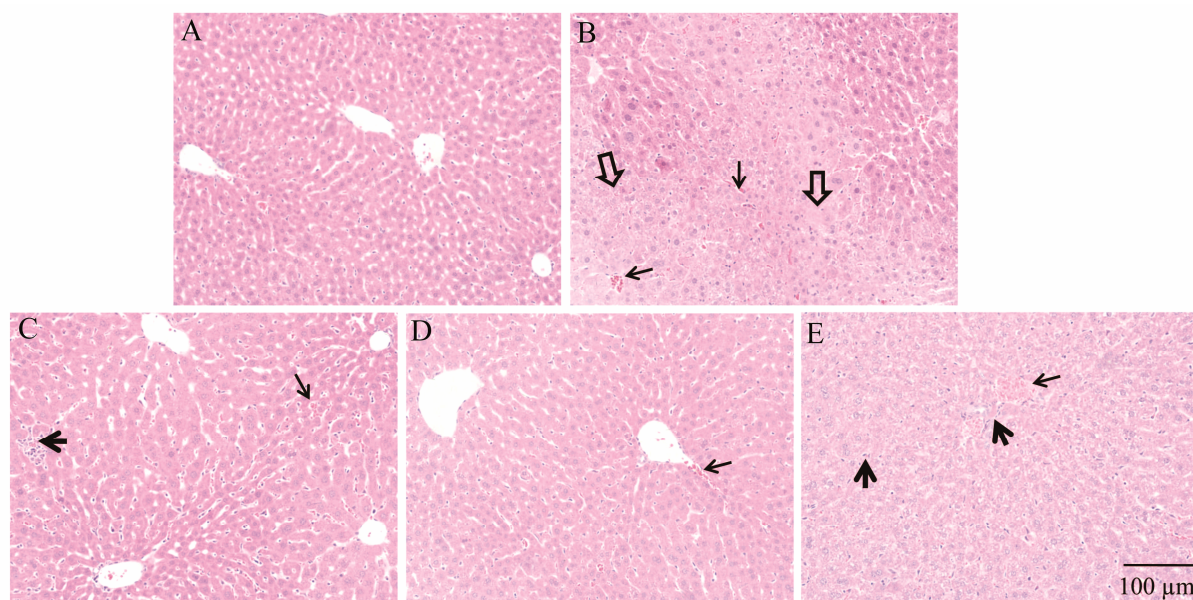


**Figure 4** Effects of Sch B on GSH, SOD and MDA in liver tissue of mice caused by CLZ. A: GSH activity; B: SOD activity; C: MDA activity.  $n=8-10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . GSH: Glutathione; MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase

中剂量 ( $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) Sch B 可改善 CLZ 所引起的氧化应激水平变化, 而高剂量 ( $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) Sch B 虽也能改善氧化应激水平, 但无明显剂量依赖性。

### 3 肝组织病理观察

如图 5 所示, 在 control 组中 (5A), 可见肝小叶结构清晰, 小叶内肝细胞基本正常, 门管区结构清晰, 门管区及其周围未见小胆管及纤维组织增生; 在 CLZ 组中 (5B), 可见肝小叶结构模糊, 小叶内肝细胞水肿, 小叶内肝细胞呈片状坏死, 并伴有炎细胞浸润和充血; 在  $25 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Sch B 组中 (5C), 可见肝小叶结构较清晰, 小叶内局部有充血, 并伴有少量炎细胞浸润; 在  $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Sch B 组中 (5D), 可见肝小叶结构基本清晰, 肝细胞形态正常; 在  $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Sch



**Figure 5** Liver histological evaluation of CLZ-treated mice. A: Control; B: CLZ ( $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); C: CLZ ( $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + Sch B ( $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); D: CLZ ( $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + Sch B ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); E: CLZ ( $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + Sch B ( $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).  $\blacktriangledown$ : The infiltration of lymphocytes;  $\downarrow$ : Intrahepatic hemorrhage;  $\blacktriangledown$ : Necrocytosis

B 组中 (5E) 可见肝小叶结构基本清晰, 门管区充血且伴有少量炎细胞浸润, 小叶内炎细胞浸润明显。

上述结果提示,  $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  CLZ 连续给药 3 周后, 可引起小鼠肝细胞坏死和肝小叶充血等损伤。低 ( $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、中 ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 剂量 Sch B 可改善 CLZ 所引起的损伤, 恢复肝细胞基本结构。而高剂量 ( $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Sch B 并未显示出更好的肝细胞保护功能, 反而出现门管区充血及炎细胞浸润等损伤。

#### 4 Nrf2 免疫组化染色与 Western blotting 结果

免疫组化结果显示, 在 control 组中 (图 6A) 可见 Nrf2 在肝细胞浆中有少量表达; 在 CLZ 组中 (图 6B), Nrf2 在小鼠肝门管区表达量增加, 胞浆呈浅黄, 同时可见部分细胞核呈浅黄, 为 Nrf2 阳性表达; 在 Sch B ( $25$ 、 $50$  和  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 组中 (图 6C~E), Nrf2 在小鼠肝细胞中表达量呈递增趋势, 且主要集中在门管区, 同时可见部分肝细胞核中呈阳性表达。

Western blotting 法进一步检测 Nrf2 在肝组织中的蛋白表达 (图 6F), 与 control 组相比, CLZ 组中的 Nrf2 蛋白相对表达量增加了 1.82 倍 ( $P < 0.01$ )。与 CLZ 组相比,  $25$  和  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Sch B 治疗组中的 Nrf2 蛋白相对表达量持续增加到 2.62 倍 ( $P < 0.01$ ) 和 3.47 倍 ( $P < 0.01$ )。 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Sch B 治疗组中的 Nrf2 蛋白相对表达量虽未呈剂量依赖性增加, 但与 CLZ 组相比也存在显著性差异 (3.33 倍,  $P < 0.01$ )。

#### 5 Sch B 对肝组织 NQO1 和 HO-1 mRNA 表达的影响

由图 7 可知, 各实验组中 NQO1 和 HO-1 基因相

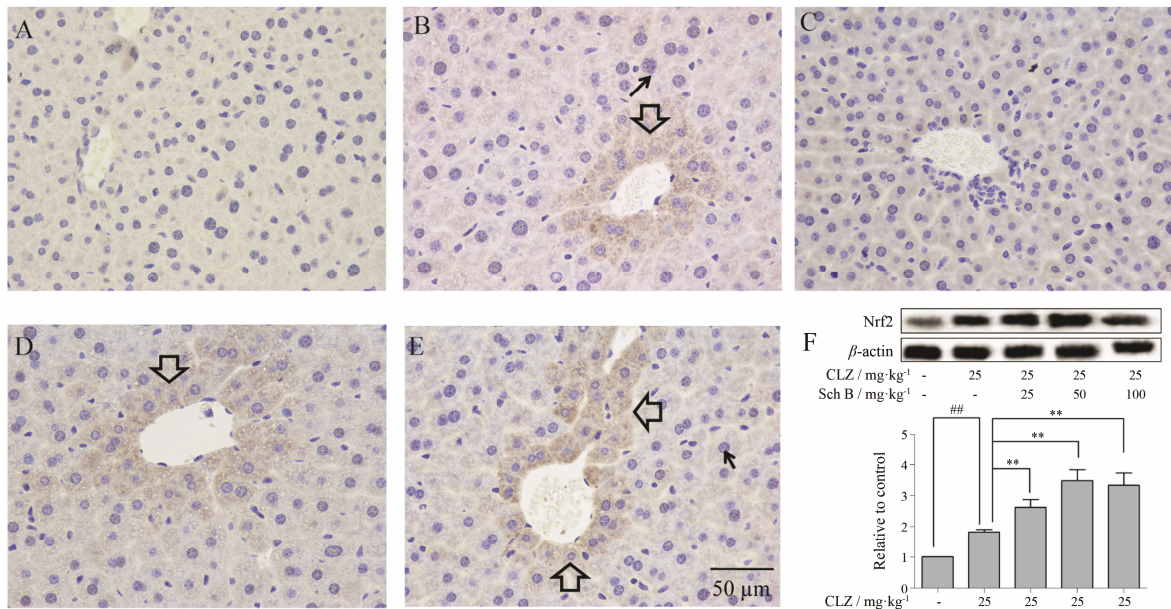
对表达量的变化为: 与 control 组相比, CLZ 组中的 NQO1、HO-1 基因相对表达量分别为 1.63 倍 ( $P < 0.05$ ) 和 4.40 倍 ( $P < 0.01$ )。Sch B  $25$  和  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  治疗组中的 NQO1 基因相对表达量持续增加, 并显著高于 CLZ 组 (5.28 倍,  $P < 0.05$ ; 6.33 倍,  $P < 0.01$ )。而 HO-1 基因相对表达量仅在 Sch B 剂量为  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时极显著高于 CLZ 组 (7.65 倍,  $P < 0.01$ )。 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Sch B 治疗组中的 NQO1、HO-1 基因相对表达量未呈剂量依赖性增加。

上述结果提示, CLZ 在诱发肝损伤的同时可反馈上调 Nrf2 信号通路下游的 NQO1 和 HO-1 基因,  $25$  和  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Sch B 治疗组均可进一步上调 NQO1 和 HO-1 基因的表达, 发挥肝脏保护作用。而  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Sch B 治疗组虽能上调 NQO1 和 HO-1 基因, 但无明显剂量依赖性。

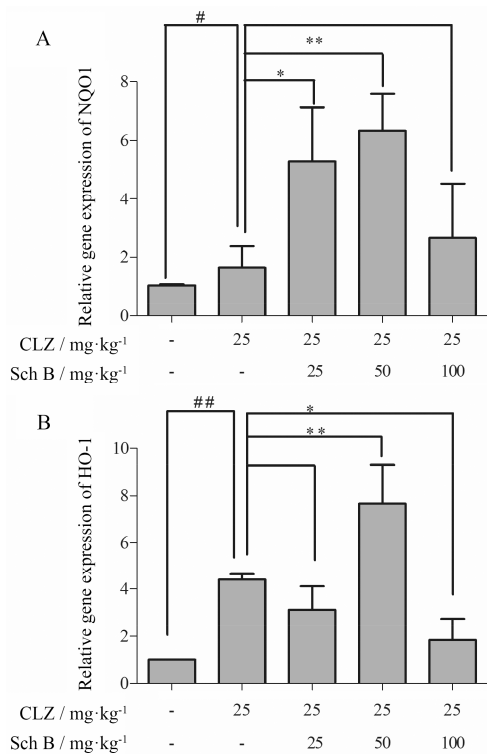
#### 讨论

氯氮平通过选择性阻断中脑边缘系统的多巴胺受体发挥抗精神病作用。大量研究表明, 氯氮平主要通过 RMs 引发肝脏毒性。药物经代谢酶产生亲电性 RMs, 其具有自由基特征, 可通过与细胞膜磷脂质的不饱和脂肪酸结合发生脂质过氧化反应, 造成细胞器膜功能损害, 致使线粒体损伤、细胞坏死<sup>[12]</sup>。RMs 还可作为半抗原, 与内源性蛋白质结合形成具有免疫原性的自身抗原, 诱导产生特异质药物不良反应<sup>[12,13]</sup>。

血清中转氨酶、肝匀浆中 GSH、SOD 等抗氧化



**Figure 6** Nrf2 immunohistochemical staining analysis of the liver of mice. A: Control; B: CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>); C: CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>) + Sch B (25 mg·kg<sup>-1</sup>); D: CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>) + Sch B (50 mg·kg<sup>-1</sup>); E: CLZ (25 mg·kg<sup>-1</sup>) + Sch B (100 mg·kg<sup>-1</sup>); F: The results of Western blotting. ↗: Positive expression in portal area; ↓: Positive expression in nucleus.  $n=8-10$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{##}P<0.01$ ;  $^{**}P<0.01$



**Figure 7** Analysis of the relative gene expression of NQO1 and HO-1.  $n=8-10$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{#}P<0.05$ ,  $^{##}P<0.01$ ;  $^{*}P<0.05$ ,  $^{**}P<0.01$

酶活性及脂质过氧化产物 MDA 含量是反映肝细胞氧化损伤的重要检测指标。本实验 CLZ 组中, 小鼠肝组织匀浆中脂质过氧化终产物 MDA 含量升高的同时, RMs 清除剂如 SOD 和 GSH 有所减少, 说明 CLZ 诱

导的肝损伤存在自由基代谢紊乱。此外, CLZ 组小鼠的血清中 ALT、AST、ALP 含量较正常组均明显升高约 1.5 倍。而 25 和 50 mg·kg<sup>-1</sup> Sch B 组的小鼠肝组织匀浆中 ALT、AST 和 ALP 含量均比 CLZ 组低, MDA 含量较 CLZ 组有所降低, 且 SOD 和 GSH 活性有所升高。此结果表明, 较低剂量 (25 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>) Sch B 能保护肝细胞, 减少肝细胞损伤后酶的逸出, 提高机体抗氧化酶的活性, 在一定程度上起到了保护肝脏的作用。

氧化和化学应激的防御性转导通路—Nrf2/ARE 是近年新发现的机体抵抗内外界氧化和化学等刺激的防御性转导通路。生理条件下, Nrf2 在细胞质中与 Keap1 结合处于非活性、易降解的状态。在内外界自由基和化学物质刺激时, Keap1 的构象改变或者 Nrf2 直接被磷酸化, 导致 Nrf2 与 Keap1 解离而活化。活化的 Nrf2 进入细胞核, 与 ARE 结合, 启动 ARE 下游基因 [包括 II 相解毒酶 (如 GST)、抗氧化蛋白 (如 CAT 和 SOD)、抗炎因子 (如 HO-1)] 等的转录和表达, 以抵抗内外界的有害刺激<sup>[14]</sup>。研究显示, 五味子乙素能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路上调各种抗氧化酶的表达, 清除大量的自由基, 进而保护肝脏细胞免受自由基损伤<sup>[15-17]</sup>。

Nrf2 核转位考察结果显示, 25 和 50 mg·kg<sup>-1</sup> Sch B 治疗组中 Nrf2 在小鼠肝细胞浆和细胞核中表达量呈递增趋势, NQO1 和 HO-1 基因相对表达量分

别呈递增趋势。这两组实验小鼠肝组织匀浆中 MDA 含量较 CLZ 组有所降低, SOD 和 GSH 活性水平有所升高。该结果表明 Sch B 对 CLZ 诱导的小鼠肝损伤的防治机制与其提高机体抗脂质过氧化能力有关, 其通过激活 Nrf2/ARE 信号通路, 上调抗氧化酶 (如 CAT 和 SOD), 起到清除自由基和抑制脂质过氧化的作用, 进而发挥保护肝脏的作用, 与文献<sup>[15–17]</sup>中的报道结果一致。

本研究还发现, 与 control 组相比, 100 mg·kg<sup>-1</sup> Sch B 治疗组小鼠血清中的 ALT、AST 浓度有所升高, ALP 浓度降低。与 Sch B (25 mg·kg<sup>-1</sup> 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗组相比, 100 mg·kg<sup>-1</sup> Sch B 治疗组中的 NQO1 和 HO-1 基因相对表达量略有减少。此现象提示高剂量 (100 mg·kg<sup>-1</sup>) Sch B 对 CLZ 导致小鼠肝损伤的保护作用不佳。经检索文献发现, Zhang 等<sup>[18]</sup>证实五味子提取物和 Sch B 长期给药可诱导小鼠产生肝损伤作用, 而这是否与高浓度 Sch B 较差的肝保护作用相关, 还有待进一步研究。

综上所述, Sch B 可以通过激活 Nrf2/ARE 信号通路, 提高机体抗氧化应激损伤能力, 发挥对 CLZ 肝毒性的保护作用。Sch B 在一定剂量范围内 (25~50 mg·kg<sup>-1</sup>) 对 CLZ 引起小鼠肝损伤具有保护作用, 而较高剂量 (100 mg·kg<sup>-1</sup>) Sch B 对 CLZ 引起小鼠肝损伤的肝保护作用不佳。本研究结果为减轻 CLZ 临床使用中的不良反应提供了新的研究思路。

## References

- [1] Freedman R. Schizophrenia [J]. N Engl J Med, 2003, 349: 1738–1749.
- [2] Kohlrausch FB. Pharmacogenetics in schizophrenia: a review of clozapine studies [J]. Rev Bras Psiquiatr, 2013, 35: 305–317.
- [3] Song LS, Chen MJ, Jiang KD. Clozapine 50 years [J]. Shanghai Arch Psychiatry (上海精神医学), 2010, 22: 376–378.
- [4] Dragovic S, Boerma JS, van Bergen L, et al. Role of human glutathione S-transferases in the inactivation of reactive metabolites of clozapine [J]. Chem Res Toxicol, 2010, 23: 1467–1476.
- [5] Wu Chou AI, Lu ML, Shen WW. Hepatotoxicity induced by clozapine: a case report and review of literature [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2014, 10: 1585–1587.
- [6] Pereira A, Dean B. Clozapine bioactivation induces dose-dependent, drug-specific toxicity of human bone marrow stromal cells: a potential *in vitro* system for the study of agranulocytosis [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72: 783–793.
- [7] Lobach AR, Utrecht J. Involvement of myeloperoxidase and NADPH oxidase in the covalent binding of amodiaquine and clozapine to neutrophils: implications for drug-induced agranulocytosis [J]. Chem Res Toxicol, 2014, 27: 699–709.
- [8] Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury [J]. FEBS Lett, 2005, 579: 3029–3036.
- [9] Li M, Jin J, Li J, et al. Schisandrin B protects against nephrotoxicity induced by cisplatin in HK-2 cells via Nrf2-ARE activation [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1434–1439.
- [10] Chiu PY, Chen N, Leong PK, et al. Schisandrin B elicits a glutathione antioxidant response and protects against apoptosis via the redox-sensitive ERK/Nrf2 pathway in H9c2 cells [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 350: 237–250.
- [11] Leong PK, Chiu PY, Leung HY, et al. Cytochrome P450-catalysed reactive oxygen species production mediates the (-) schisandrin B-induced glutathione and heat shock responses in AML12 hepatocytes [J]. Cell Biol Int, 2012, 36: 321–326.
- [12] Feng S, He X. Mechanism-based inhibition of CYP450: an indicator of drug-induced hepatotoxicity [J]. Curr Drug Metab, 2013, 14: 921–945.
- [13] Amacher DE. The primary role of hepatic metabolism in idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012, 8: 335–347.
- [14] Subramaniam SR, Ellis EM. Esculetin-induced protection of human hepatoma HepG2 cells against hydrogen peroxide is associated with the Nrf2-dependent induction of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 250: 130–136.
- [15] Chiu PY, Leung HY, Ko KM. Schisandrin B enhances renal mitochondrial antioxidant status, functional and structural integrity, and protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31: 602–605.
- [16] Li L, Pan Q, Han W, et al. Schisandrin B prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing glutathione redox cycling [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13: 6753–6760.
- [17] Chiu PY, Lam PY, Yan CW, et al. Schisandrin B protects against solar irradiation-induced oxidative injury in BJ human fibroblasts [J]. Fitoterapia, 2011, 82: 682–691.
- [18] Zhang Y, Pan SY, Zhou SF, et al. Time and dose relationships between schisandrin B- and schisandrae fructus oil-induced hepatotoxicity and the associated elevations in hepatic and serum triglyceride levels in mice [J]. Drug Des Devel Ther, 2014, 8: 1429–1439.