

## 大鼠灌胃菊三七生成吡咯蛋白加合物的药代动力学研究

陈岩<sup>1</sup>, 王汛江<sup>1</sup>, 熊芬<sup>1</sup>, 王蔚倩<sup>1</sup>, 杨莉<sup>1,2\*</sup>, 熊爱珍<sup>1\*</sup>, 王长虹<sup>1</sup>, 王峥涛<sup>1,2</sup>

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上海市复方中药重点实验室, 上海 201203;
2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

**摘要:** 近年来, 误服菊三七引起肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) 的案例逐年增多, 引起国内外的广泛关注。菊三七含大量吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs), 经肝脏代谢活化生成吡咯-蛋白加合物 (pyrrole-protein adducts, PPAs)。本文首先利用 SD 雄性大鼠单次灌胃不同剂量的菊三七醇提物 (0.062 5、0.25、0.5、2.0 和 4.0 g·kg<sup>-1</sup>) 后, 于 2、12、24 和 48 h 眼眶静脉丛取血, 并 48 h 后异氟烷麻醉取肝, 用于苏木精-伊红染色, 进行肝组织病理分析, 考察不同剂量菊三七醇提物与 PPAs 生成量及菊三七肝毒性的关系。此外, 利用 SD 雄性大鼠单次灌胃 0.25 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 菊三七醇提物后, 于不同的时间点 (10、20 和 30 min、1、2、4、6、12、24 和 48 h) 眼眶静脉丛取血, 进行了不同剂量的 PPAs 的药代动力学研究。实验方案经上海中医药大学动物实验伦理委员会批准 (PZSHUTCM190912019)。采用液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 检测血清中 PPAs 含量, 并用 PK Solutions 2™ 软件的非房室模型进行拟合求算药代动力学参数。结果表明, PPAs 含量随菊三七给药剂量增加呈剂量依赖性, 且与肝损伤程度相关; PPAs 在大鼠体内的消除率随着给药剂量的增加明显减慢。PPAs 可作为 PAs 毒性标志物, 其含量的高低及清除的快慢可为 PAs 减毒策略的开发提供参考。

**关键词:** 菊三七; 吡咯里西啶生物碱; 肝窦阻塞综合征; 吡咯蛋白加合物; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)03-0473-05

## Kinetic study of pyrrolizidine alkaloid-derived pyrrole-protein adducts in rats after intragastric administration of *Gynura japonica*

CHEN Yan<sup>1</sup>, WANG Xun-jiang<sup>1</sup>, XIONG Fen<sup>1</sup>, WANG Wei-qian<sup>1</sup>, YANG Li<sup>1,2\*</sup>, XIONG Ai-zhen<sup>1\*</sup>,  
WANG Chang-hong<sup>1</sup>, WANG Zheng-tao<sup>1,2</sup>

1. The Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the State Administration of Traditional Chinese Medicine 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:** Recently, hepatic sinusoidal obstruction syndrome (HSOS) induced by misuse of *Gynura japonica* has increased and gained global attention. Large amounts of pyrrolizidine alkaloids (PAs) are present in *G. japonica*; these PAs are metabolically activated to generate pyrrole-protein adducts (PPAs). In this study, male SD rats were treated orally with a single dose of *G. japonica* extract (GJE) at 0.062 5, 0.25, 0.5, 1, and 2 g·kg<sup>-1</sup>. Blood was collected from the orbital venous plexus at 2, 12, 24 and 48 h, and at 48 h after treatment the rats were anesthetized with isoflurane and livers were collected for hematoxylin & eosin staining. The kinetics of PPAs at different doses were studied at 10, 20, 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h, and 48 h, after a single gavage of GJE. The experimental

收稿日期: 2019-09-23; 修回日期: 2019-11-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603384); 上海市自然科学基金资助项目 (16ZR1434200); 上海市青年科技启明星计划 (17QA1403600); 上海市优秀学科带头人计划 (17XD1403500); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划 (2018年-2020年, ZY(2018-2020)-CCCX-5002).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322506, Fax: 86-21-51322519, E-mail: a.z.xiong@hotmail.com; yangli7951@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0772

scheme was approved by the ethics committee of animal experiments of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (PZSHUTCM190912019). The concentration of PPAs in serum was determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Kinetic data were processed by using the non-compartmental pharmacokinetics data analysis software program PK solutions 2™. The results demonstrate that the concentration of PPAs increased with the dose of GJE and positively correlated with the severity of liver injury. The elimination rate of PPAs in rats was significantly prolonged at higher doses. The level of PPAs and their clearance rate may serve as useful references for the detoxification of PAs-induced injuries.

**Key words:** *Gynura japonica*; pyrrolizidine alkaloid; hepatic sinusoidal obstruction syndrome; pyrrole-protein adduct; kinetic study

菊三七 (*Gynura japonica*) 又称土三七, 是一种来源于菊科的民间植物药, 用于治疗跌打损伤及外伤出血症<sup>[1,2]</sup>。然而, 大量研究表明菊三七中含有多种吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs), 主要包括千里光碱 (senecionine)、千里光菲林碱 (seneciphylline)、千里光碱氮氧化物 (senecionine *N*-oxide)、千里光菲林碱氮氧化物 (seneciphylline *N*-oxide)<sup>[1,3,4]</sup>。PAs 是一种天然的毒性成分, 大部分 PAs 经细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 代谢活化产生活性中间体脱氢吡咯 (dehydropyrrolizidine alkaloids, DHPAs)。DHPAs 不稳定, 具有高度亲电活性, 可与体内大分子物质如蛋白结合产生吡咯蛋白加合物 (pyrrole-protein adducts, PPAs), 进一步诱导肝毒性、肺毒性、基因毒性等<sup>[5-8]</sup>。PAs 毒性最典型的为肝毒性, 急性肝毒性引起肝肿大、腹水、肝细胞坏死, 临床上表现为肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS); 慢性毒性表现为肝纤维化和肝巨红细胞血症<sup>[9,10]</sup>。

近年来, 因服用菊三七所导致 HSOS 的临床报道逐渐增多<sup>[11,12]</sup>, 已成为目前我国 HSOS 发病的主要原因<sup>[13-15]</sup>。然而, 临床尚无有效的治疗方法<sup>[16]</sup>。为更有效的诊断及治疗该疾病, 中华医学会消化病学分会肝胆疾病协作组建议将血液 PPAs 作为 PAs 致 HSOS 的诊断依据<sup>[17]</sup>, 并已有研究初步证实了其用于临床 PAs 所致 HSOS 诊断的可行性<sup>[18-21]</sup>。课题组前期初步研究表明 PPAs 含量高低与菊三七 PAs 服用量有关, 但其动力学特征尚未有报道。因此, 本研究采用大鼠单次给药不同剂量的菊三七生成 PPAs 的药代动力学特征, 为其减毒/解毒策略的开发提供实验基础和理论依据。

## 材料与方法

**仪器与试剂** Shimadzu CBM-30A 高效液相色谱系统 (Shimadzu Co, Kyoto, Japan), 连接 ABSCIEX QTRAP6500 质谱系统 (AB SCIEX Co, CA, USA)。化学纯三氟化硼乙醚、氯仿、无水乙醇、硝酸银、丙酮均购自国药控股化学试剂有限公司 (中国, 上海)。分析纯

邻四氯苯醌、4-二甲氨基苯甲醛、野百合碱均购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。色谱纯甲醇、乙腈、甲酸均购自 Fisher 公司 (Santa Clara, CA, USA)。千里光碱购自成都普瑞法科技开发有限公司 (纯度 >98%)。Ehrlich 试剂根据课题组前期报道方法配制<sup>[22]</sup>。菊三七采集自江苏省扬州市, 经作者鉴定为菊科菊三七属植物菊三七 [*Gynura japonica* (Thunb.) Juel.], 去除泥沙等异物晾干, 临用前 60 °C 烘干打粗粉。参考文献方法<sup>[4]</sup>, 以 95% 乙醇回流提取 3 次, 得到菊三七提取物 (GJE), 提取率为 6.0%, 并根据课题组前期报道的含量测定方法<sup>[14]</sup>采用 LC-MS 分析 GJE 中主要 PAs 的含量。

**动物实验** 实验方案经上海中医药大学动物实验伦理委员会批准 (PZSHUTCM190912019), 所有程序均严格按照动物使用和护理的伦理原则进行。雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 (200 ± 20 g) 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 (合格证号: SCXK (沪) 2017-0005)。

**单次灌胃不同剂量 GJE 与 PPAs 生成量及菊三七肝毒性的关系** 实验动物适应性喂养 3 天后随机分为 6 组, 即空白对照组和不同剂量 GJE 给药组 (0.062 5、0.25、0.5、2.0 和 4.0 g·kg<sup>-1</sup>), 每组 8 只。给药前禁食 8 h, 自由饮水。大鼠单次灌胃给药后, 分别于 2、12、24 和 48 h 异氟烷麻醉, 眼眶静脉丛取血 0.25 mL 于 1.5 mL 离心管中, 室温静置 2 h 后 800 ×g 离心 15 min 分离血清并保存于 -80 °C。给药 48 h 后异氟烷麻醉大鼠, 并取肝脏置于组织固定液中, 用于苏木精-伊红染色 (HE staining)。

**单次灌胃不同剂量 GJE 生成 PPAs 的药代动力学研究** 实验动物适应性喂养 3 天后随机分为 2 组, 即不同剂量 GJE 给药组 (0.25 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup>), 每组 8 只。大鼠单次灌胃给药后, 分别于 10、20、30 min、1、2、4、6、12、24 和 48 h 异氟烷麻醉, 眼眶静脉丛取血 0.25 mL 于 1.5 mL 离心管中, 室温静置 2 h 后 800 ×g 离心 15 min 分离血清并保存于 -80 °C。

**样本制备** PPAs 测定参考文献方法进行<sup>[15,22]</sup>。取

血清 50  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中, 加冰丙酮 250  $\mu\text{L}$  涡旋, 1 000  $\times g$  离心 5 min, 沉淀蛋白; 残渣 (蛋白) 用无水乙醇洗涤两次后加 2%  $\text{AgNO}_3$  的无水乙醇溶液 200  $\mu\text{L}$ , 室温振摇 30 min, 4  $^\circ\text{C}$  下、1 000  $\times g$  离心 5 min, 取上清与 Ehrlich 试剂 (上清液: 试剂 = 4:1, v/v) 于 55  $^\circ\text{C}$  反应 10 min, 置冰上中止反应。反应混合物于 4  $^\circ\text{C}$  下、15 000  $\times g$  离心 15 min, 取上清液进样分析。

**LC-MS 分析条件** 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 流动相为 0.1% 甲酸水-乙腈, 采用梯度洗脱: 0~1 min, 10% 乙腈; 1~6 min, 40% 乙腈; 6~7 min, 95% 乙腈; 7~10 min, 10% 乙腈; 流速: 0.4 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ; 柱温: 45  $^\circ\text{C}$ ; 进样体积: 2  $\mu\text{L}$ 。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式采集, 喷雾电压 5 500 V, 离子源温度 550  $^\circ\text{C}$ ; 气帘气 35 psi; 去簇电压 160 V; 碰撞能 46 V。以多反应检测 (MRM) 检测, 离子通道为: 341>252 (定量离子对), 341>296 (定性离子对)。

**数据分析** 所有药代动力学参数由 PK Solutions 2<sup>TM</sup> 软件的非房室模型进行拟合求算, 吸收速率常数 ( $k_a$ )、吸收半衰期 ( $t_{1/2ka}$ )、消除速率常数 ( $k_e$ )、消除半衰期 ( $t_{1/2ke}$ )、表观分布容积 ( $V_d$ )、清除率 (CL)、平均滞留时间 (MRT)、达峰值浓度 ( $C_{\text{max}}$ )、达峰时间 ( $t_{\text{max}}$ )。实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 结果

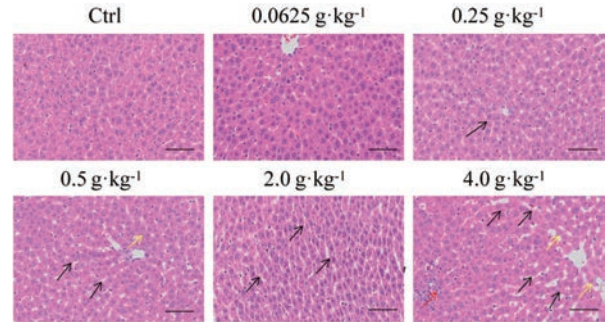
### 1 菊三七提取物中主要 PAs 含量分析

参考课题组前期报道的菊三七中 PAs 含量测定方法<sup>[14]</sup>, 对本研究制备 GJE 中主要 PAs 进行含量分析。结果表明, GJE 中主要含千里光碱、千里光菲林碱及其氮氧化物 (表 1), 总含量为 50.8 mg $\cdot$ g $^{-1}$ 。

### 2 菊三七致大鼠肝损伤评价

大鼠单次灌胃不同剂量 GJE (0.062 5~4.0 g $\cdot$ kg $^{-1}$ ),

折合药材 1.04~66.7 g $\cdot$ kg $^{-1}$ , PAs 3.18~203.2 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ), 随着剂量的升高, 引起不同程度的损伤。如图 1 所示, 与空白组相比, 给药 0.062 5 g $\cdot$ kg $^{-1}$  剂量组大鼠无明显肝损伤, 0.25 g $\cdot$ kg $^{-1}$  开始出现肝窦扩张; 给药 4.0 g $\cdot$ kg $^{-1}$  后, 肝窦扩张显著增大, 并且伴随着严重的肝窦出血、肝细胞点状坏死、脂肪空泡化及炎症。



**Figure 1** Histological changes in livers of rats. Rats were treated with a single administration of vehicle or 0.062 5, 0.25, 0.5, 2.0, and 4.0 g $\cdot$ kg $^{-1}$  of GJE and sacrificed at 48 h for HE staining. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$

### 3 大鼠给药菊三七生成 PAs 的剂量关系

大鼠单次给药不同剂量 GJE 后 2、12、24 和 48 h, 分别测定血清中 PAs 的含量。由表 2 可知, 同一时间点 PAs 含量随着给药 GJE 剂量的升高而升高, 且呈剂量依赖性 ( $r = 0.994 0 \sim 0.999 6$ )。给药后 2~48 h, PAs 含量随采样时间而降低。

### 4 大鼠给药菊三七生成 PAs 的血清药代动力学研究

大鼠分别单次灌胃给药 GJE 0.25 和 0.5 g $\cdot$ kg $^{-1}$ , 测定给药后 10 min~48 h 内不同时间点血清 PAs 含量, 绘制血药浓度-时间曲线 (图 2) 并计算其药代动力学参数 (表 3)。可知大鼠灌胃 GJE 后 PAs 符合非房室模型, 进行拟合求算药动学参数。结果 PAs 在体内的消除率随着给药剂量的增加明显减慢 ( $t_{1/2e}$  为 591.3  $\pm$  361.0 min, 约 9.9 h;  $t_{1/2e}$  为 1 441.5  $\pm$  422.2 min, 约 24.0 h), 表明 PAs 在大鼠体内的药代动力学受剂量的影响。

## 讨论

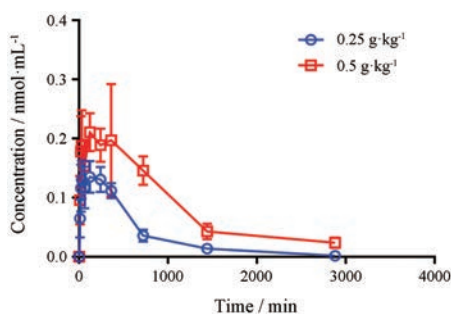
菊三七又名土三七, 为民间常用药, 因其名与五加科药用三七 (*Panax notoginseng*) 相似, 也同样具有止血、活血化瘀的功效<sup>[23]</sup>, 被当作三七混淆使用, 是我国

**Table 1** The contents of main pyrrolizidine alkaloids (PAs) in *Gynura japonica* extract (GJE)

No.	$t_R$ /min	$m/z$ ([M+H] $^+$ )	PAs	Content /mg $\cdot$ g $^{-1}$
1	4.4	336.2	Senecionine	21.6
2	5.3	334.2	Seneciophylline	27.8
3	7.8	352.2	Senecionine <i>N</i> -oxide	1.3
4	8.6	350.2	Seneciophylline <i>N</i> -oxide	0.1

**Table 2** The PPA contents in the serum after a single treatment of GJE.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

Dose of GJE /g $\cdot$ kg $^{-1}$	PPA contents at different time points after treatment / nmol $\cdot$ mL $^{-1}$			
	2 h	12 h	24 h	48 h
0.25	0.135 $\pm$ 0.027	0.036 $\pm$ 0.010	0.014 $\pm$ 0.006	0.002 $\pm$ 0.005
0.5	0.211 $\pm$ 0.032	0.146 $\pm$ 0.024	0.043 $\pm$ 0.013	0.024 $\pm$ 0.009
2	0.749 $\pm$ 0.215	0.626 $\pm$ 0.094	0.346 $\pm$ 0.101	0.263 $\pm$ 0.060
4	1.212 $\pm$ 0.318	1.283 $\pm$ 0.113	0.827 $\pm$ 0.111	0.660 $\pm$ 0.088



**Figure 2** The concentration versus time curves of PPAs in serum after a single exposure to different doses of GJE

**Table 3** Kinetic parameters of PPAs in serum after a single exposure to different doses of GJE.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

Parameter	Value at different doses	
	0.25 g·kg <sup>-1</sup>	0.5 g·kg <sup>-1</sup>
$t_{\max}$ /min	153.8 ± 77.6	141.5 ± 102.1
$C_{\max}$ /nmol·mL <sup>-1</sup>	0.136 ± 0.033	0.245 ± 0.083
$AUC_{0-t}$ /min·nmol·mL <sup>-1</sup>	99.6 ± 19.0	244.0 ± 54.5
MRT /min	795.2 ± 347.0	1 470.6 ± 383.1
$V_d$ /mL·kg <sup>-1</sup>	1 962.3 ± 737.0	3 649.3 ± 927.2
CL /mL·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	2.5 ± 0.7	1.8 ± 0.4
$t_{1/2a}$ /min	79.3 ± 32.6	108.5 ± 63.8
$k_a$ /min <sup>-1</sup>	0.010 0 ± 0.003 3	0.009 4 ± 0.009 0
$t_{1/2e}$ /min	591.3 ± 361.0	1 441.5 ± 422.2
$k_e$ /min <sup>-1</sup>	0.001 6 ± 0.000 7	0.000 6 ± 0.000 2

造成临床 HSOS 的主要原因。目前, 吡咯蛋白加合物 (pyrrole-protein adducts, PPAs) 已作为临床诊断 PAs 诱导 HSOS 的指标<sup>[15,17-22,24]</sup>, 然而 PPAs 的含量受药物的用量、服药时间及采血时间的影响较大<sup>[20]</sup>。本研究利用大鼠研究不同剂量菊三七灌胃后生成 PPAs 的药代动力学特征。

药用三七的推荐服用量为每日不超过 9 g<sup>[25]</sup>, 折合大鼠等效剂量为 1.05 g·kg<sup>-1</sup>。本研究中大鼠单次灌胃 GJE 提取物 0.062 5~4.0 g·kg<sup>-1</sup>, 折合菊三七药材 1.04~66.7 g·kg<sup>-1</sup>, 相当于临床等效剂量的 1~64 倍。在等效剂量, 菊三七未对大鼠造成明显肝损伤, 但 4 倍人临床等效剂量下可见显著的肝窦损伤 (图 1), 且损伤程度随剂量增加而严重, 然而在最高剂量即 64 倍人临床等效剂量下未见大鼠死亡。患者服用菊三七的时间、剂量均会对其是否发病及发病的严重程度有所影响, 服用菊三七的剂量越大、时间越长, 其发病的几率及严重程度都更高<sup>[11]</sup>。本实验的结果也证明, 大鼠单次灌胃小剂量 (即人等效剂量) 的菊三七不会造成肝损伤, 与临床相符。此外, 血清 PPAs 生成量也随给药 GJE 剂量的升高而升高, 且呈剂量依赖性 ( $r > 0.99$ )。进一步研究了大鼠给药 0.25 和 0.5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量 GJE 后生成 PPAs 的药代动力学特征。结果表明, 不同给药剂量下  $AUC_{0-t}$ 、MRT、 $V_d$  随剂量而明显增大, 而  $t_{\max}$  和 CL 未见

明显剂量依赖性。此外, 不同给药剂量  $t_{1/2a}$  无明显差异, 但  $t_{1/2e}$  随剂量而明显增大, 即 PPAs 在体内的消除率随着给药剂量的增加明显减慢 ( $t_{1/2e0.25} \sim 591.3$  min, 约 9.9 h;  $t_{1/2e0.5} \sim 1441.5$  min, 约 24.0 h)。高剂量下肝损伤较为严重, 可能与 PPAs 清除较慢相关。

本研究也存在一定的缺陷。首先, PAs 经 CYP450 酶代谢活化生成 DHPAs, 并进一步与蛋白结合生成 PPAs 从而导致肝毒性<sup>[8]</sup>。然而目前明确报道可与 DHPAs 结合的蛋白结构仅有氢离子转运 ATP 酶线粒体 F1 复合体 B 肽 (ATP5B)<sup>[26]</sup> 和血红素蛋白 (hemoglobin)<sup>[27]</sup>, 是否有其他蛋白以及其具体种类仍未明确。然而, 目前已有文献均采用 AgNO<sub>3</sub> 水解蛋白再与 Ehrlich 试剂进行衍生化反应, 以生成的衍生化产物来表征总 PPAs 的含量<sup>[15,18-21,26,27]</sup>。采用本方法来测定大鼠灌胃菊三七提取物后生成 PPAs 的含量仍具有一定的代表性。其次, 根据菊三七致 HSOS 流行病学研究表明, 患者服用菊三七的方式多样, 包括水煮、泡酒、打粉吞服、切片泡茶等。由于提取方法的不同, 可能会影响提取物中 PAs 的种类和含量及其他非 PAs 成分如有机酸、黄酮类成分的含量, 不同成分之间亦可能产生代谢性相互作用, 从而影响到其各自及 PPAs 的药代动力学, 这将是本课题组后续工作的重点之一。因此, 本研究参考 Lin 等<sup>[15]</sup> 报道, 以醇提取物初步考察并了解大鼠灌胃菊三七生成 PPAs 的动力学特征。以本研究为基础, 进一步开展深入研究, 一方面丰富以 PPAs 含量作为 PAs 毒性的标识物, 另一方面将其作为药物干预是否有效的依据, 为 PAs 减毒及解毒策略的开发提供方法和理论参考, 以期有利于临床 HSOS 患者的预后和治疗。

## References

- [1] Cheng M, Tang J. Research progress in pyrrolizidine alkaloids and their pharmacological and toxicological effects from *Gynura japonica* rhizoma seu herba [J]. China Pharm (中国药师), 2018, 21: 2206-2210.
- [2] Zhu BR, Pu SB, Xu DR, et al. Advances in studies on chemical constituents and bioactivities of the genus *Gynura* Cass [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2012, 31: 1-4.
- [3] Lu LH, Zhang F, Zhang CS, et al. The protective effect of Danning tablet against hepatic sinusoidal obstruction syndrome induced by *Gynura* Rhizoma [J]. Acta Pharm Sci (药理学报), 2019, 54: 494-501.
- [4] Fang LX, Xiong AZ, Yang X, et al. Mass-spectrometry-directed analysis and purification of pyrrolizidine alkaloid cis/trans isomers in *Gynura japonica* [J]. J Sep Sci, 2014, 37: 2032-2038.
- [5] Cooper RA, Huxtable RJ. The relationship between reactivity of

- metabolites of pyrrolizidine alkaloids and extrahepatic toxicity [J]. Proc West Pharmacol Soc, 1999, 42: 13-16.
- [6] Li N, Xia QS, Ruan JQ, et al. Hepatotoxicity and tumorigenicity induced by metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids in herbs [J]. Curr Drug Metab, 2011, 12: 823-834.
- [7] Xia QS, He XB, Ma L, et al. Pyrrolizidine alkaloid secondary pyrrolic metabolites construct multiple activation pathways leading to DNA adduct formation and potential liver tumor initiation [J]. Chem Res Toxicol, 2018, 31: 619-628.
- [8] Fu PP, Xia QS, Lin G, et al. Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms [J]. Drug Metab Rev, 2004, 36: 1-55.
- [9] Neuman MG, Cohen L, Opris M, et al. Hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids [J]. J Pharm Pharm Sci, 2015, 18: 825-843.
- [10] Moreira R, Pereira DM, Valentão P, et al. Pyrrolizidine alkaloids: chemistry, pharmacology, toxicology and food safety [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 1668.
- [11] Wang XX, Qi XS, Guo XZ. Tusantqi-related sinusoidal obstruction syndrome in China [J]. Medicine, 2015, 94: 1-11.
- [12] Zhan LZ, Bian JJ, Li YM, et al. An analysis of 35 cases with *Gynura segetum*-induced hepatic veno-occlusive disease [J]. Anhui Med Pharm (安徽医药), 2019, 23: 1057-1060.
- [13] Zhang F, Zhou Y, Yang X, et al. *Gynura Rhizoma* containing pyrrolizidine alkaloids induces the hepatic sinusoidal obstruction syndrome in mice *via* upregulating fibrosis-related factors [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40: 781-789.
- [14] Xiong AZ, Shao YL, Fang LX, et al. Comparative analysis of toxic components in different medicinal parts of *Gynura japonica* and its toxicity assessment on mice [J]. Phytomedicine, 2019, 54: 77-88.
- [15] 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.
- [16] Hu Y, Mu YX. Research and prospect of sinusoidal obstruction syndrome caused by *Gynura segetum* [J]. J Syst Med (系统医学), 2019, 4: 196-198.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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 Des Devel Ther, 2015, 9: 4861-4868.
- [20] Ma J, Xia QS, Fu PP, et al. Pyrrole-protein adducts: a biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity [J]. J Food Drug Anal, 2018, 26: 965-972.
- [21] Ruan JQ, Gao H, Li N, et al. Blood pyrrole-protein adducts-a biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced liver injury in humans [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2015, 33: 404-421.
- [22] Zhang F, Wang CC, Xiong AZ, et al. Quantitative analysis of total retronecine esters-type pyrrolizidine alkaloids in plant by high performance liquid chromatography [J]. Anal Chim Acta, 2007, 605: 94-101.
- [23] Yang PF, Song XY, Chen NH. Advances in pharmacological studies of *Panax notoginseng* saponins on brain ischemia-reperfusion injury [J]. Acta Pharm Sci (药学报), 2016, 51: 1039-1046.
- [24] Gao H, Wang JY. Evidence-based clinical study of pyrrolizidine alkaloids associated with hepatic sinusoidal obstruction syndrome [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol (胃肠病学和肝病杂志), 2018, 27: 979-980.
- [25] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 Ed. Vol I. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 11.
- [26] Lu Y, Ma J, Song Z, et al. The role of formation of pyrrole-ATP synthase subunit beta adduct in pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity [J]. Arch Toxicol, 2018, 92: 3403-3414.
- [27] Ma J, Ruan J, Chen X, et al. Pyrrole-hemoglobin adducts, a more feasible potential biomarker of pyrrolizidine alkaloid exposure [J]. Chem Res Toxicol, 2019, 2: 1027-1039.