

泽泻水醇提取物改善千里光碱致小鼠急性肝损伤的作用与机制研究

姜凯元¹, 叶铨玲¹, 熊芬¹, 张祎¹, 杨莉^{1,2*}, 熊爱珍^{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: 近年来, 含吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloid, PA) 的中草药所致药源性肝损伤引起了国内外的广泛关注, 但缺乏有效的临床治疗药物。因此, 本文研究中药泽泻对代表性 PA 千里光碱 (senecionine, SEN) 所致急性肝损伤的改善作用, 并初步探讨其潜在的药理作用机制。实验方案经上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会审查, 符合实验动物福利与伦理相关规范。小鼠单次灌胃 SEN (50 mg·kg⁻¹) 造成急性肝损伤模型, 并设泽泻水提取物 (18 g·kg⁻¹) 保护组、泽泻醇提取物 (18 g·kg⁻¹) 保护组和空白对照组。结果表明, 泽泻对 SEN 致小鼠急性肝损伤有明显的保护作用: 泽泻提取物可显著降低急性肝损伤小鼠血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶活性及总胆汁酸水平, 炎性细胞浸润、肝窦淤血、肝组织坏死等病理变化均有所缓解, 且醇提取物药效优于水提取物。进一步测定血清中主要胆汁酸的含量和肝脏胆汁酸代谢相关因子的 mRNA 和蛋白表达, 发现泽泻可调控胆汁外排转运体和肝脏代谢酶的表达, 维护胆汁酸代谢平衡, 修复受损的肝细胞。本研究为临床上应用泽泻防治 PA 致肝损伤提供了理论依据。

关键词: 泽泻; 胆汁酸; 吡咯里西啶生物碱; 千里光碱; 药源性肝损伤

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)03-0823-08

The protective effects and mechanism of Alismatis Rhizoma extracts against senecionine-induced acute liver injury in mice

JIANG Kai-yuan¹, YE Xuan-ling¹, XIONG Fen¹, ZHANG Yi¹, YANG Li^{1,2*},
XIONG Ai-zhen^{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: Drug-induced liver injury and herbal preparations containing pyrrolizidine alkaloid (PA) have gained global attention. The purpose of this research was to investigate the effects and mechanisms of Alismatis Rhizoma, a traditional Chinese medicine, to protect against acute liver injury in mice induced by senecionine (SEN), a representative toxic PA compound. All experiments were approved by the Animal Research Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Animal welfare and the animal experimental protocols were strictly consistent with related ethics regulations of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Acute liver injury was induced by a single intragastric administration of SEN (50 mg·kg⁻¹). Mice in the protection groups received intragastric administration of Alismatis Rhizoma water extract (WE, 18 g·kg⁻¹ per day) or ethanol extract

收稿日期: 2020-10-26; 修回日期: 2020-12-27.

基金项目: 上海市自然科学基金资助项目 (20ZR1473300); 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); 上海市人才发展资金; 上海中医药大学“杏林学者”计划; 上海中医药大学“研究生创新培养专项”科研项目 (Y2021089).

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

Tel: 86-21-51322506, Fax: 86-21-51322519, E-mail: a.z.xiong@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1659

(EE, 18 g·kg⁻¹ per day) 5 days before SEN treatment. The results show that *Alismatis Rhizoma* extracts can significantly attenuate acute liver injury in mice. Mice in the protection groups showed decreased serum activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, as well as decreased total bile acids. In addition, the infiltration of inflammatory cells, sinusoidal hemorrhage, and hepatic necrosis in SEN-treatment mice was clearly attenuated in the protection groups. Interestingly, EE showed a better effect than WE. The content of principal bile acids in serum and the mRNA and protein expression of key factors related to bile acid metabolism were also measured. *Alismatis Rhizoma* up-regulated the bile acid transporters and drug metabolism enzymes, consistent with the observed bile acid homeostasis and alleviation of SEN-induced injury to hepatocytes. The present study points to the possibility of utilizing *Alismatis Rhizoma* for protection against liver injury caused by drugs and preparations containing PA.

Key words: *Alismatis Rhizoma*; bile acid; pyrrolizidine alkaloid; senecionine; herbal drug-induced liver injury

吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloid, PA) 是一类天然毒性生物碱 (图 1), 广泛分布于约 3% 的有花植物中, 特别是菊科、豆科、紫草科以及兰科的多种药用植物中^[1]。目前发现了 660 多种 PA 及其氮氧化物, 其中一半以上均有毒性。PA 具有肝毒性、肺毒性、神经毒性及胚胎毒性等, 其中最受关注的是肝毒性, 可导致严重的急慢性肝损伤。含 PA 的中草药 (如菊三七) 是导致我国临床肝窦阻塞综合征的主要原因^[2, 3]。2017 年, 中华医学会消化病学分会肝胆疾病协作组发布了针对 PA 致临床肝损伤的诊断和治疗指南 (“南京标准”)^[2], 极大的有利于该疾病的临床治疗; 然而, 目前临床尚无有效的治疗药物。因此, 亟需寻找有效的 PA 肝损伤保护剂, 以用于临床疾病的治疗。

中药泽泻 (*Alismatis Rhizoma*) 收载于《中国药典》, 为泽泻科植物泽泻 (*Alisma orientale* (Sam.) Juzep.) 的干燥根茎。泽泻在《神农本草经》中被称为上品, 具有利尿、渗湿、泄热的功效。现代药理研究表明, 泽泻还具有降血脂、抗炎、降糖以及保肝等作用^[4]。近些年来, 泽泻在治疗胆汁淤积性肝损伤、非酒精性脂肪肝等肝脏疾病方面得到了越来越广泛的关注。泽泻水提物可有效缓解四氯化碳致肝损伤^[5]。泽泻甲醇提取物可有效缓解肝脏炎症反应, 并减轻内质网应激, 从

而预防肝脂肪变性的发生^[6-7]。泽泻三萜类化合物泽泻醇 B-23 醋酸酯 (alisol B 23-acetate, AB23A, 图 1)、泽泻醇 A-24 醋酸酯对四氯化碳、 α -萘异硫氰酸酯及雌激素所致小鼠试验性肝损伤、非酒精性脂肪肝等有显著的保护作用^[7-10]。

课题组前期研究^[11, 12]表明, PA 能够干扰体内胆汁酸代谢平衡, 从而导致严重的胆汁淤积和肝脏炎症。因此, 本研究以千里光碱 (senecionine, SEN) 为代表性 PA 构建小鼠急性肝损伤模型, 探讨泽泻对 PA 肝损伤的保护作用; 并从胆汁酸代谢调节方面探讨其作用机制, 为临床 PA 致肝损伤相关疾病的治疗提供实验基础和理论依据。

材料与方

药品 AB23A (批号: MUST-19031408)、SEN (批号: PRF8101624) 购自成都普瑞法科技开发有限公司, 纯度均大于 98%。泽泻购自上海康桥中药饮片有限公司 (批号: 190909)。

试药制备 泽泻粉碎为细粉后取粉末 0.5 g, 按《中国药典》泽泻含量测定项下测定饮片 AB23A 的含量。取泽泻粉末 1 kg, 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并水层并冷冻干燥, 得到泽泻水提物 (water extract,

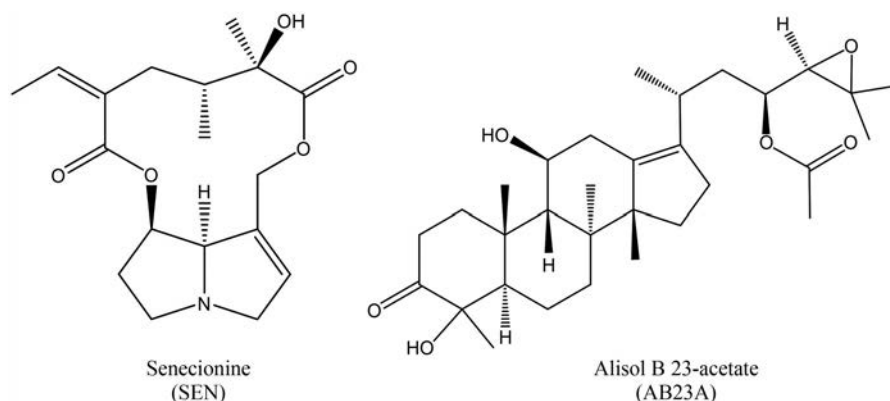


Figure 1 Chemical structures of alisol B 23-acetate and senecionine

WE); 另取泽泻粉末 1 kg, 加 10 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并醇提液层, 旋转蒸发回收溶剂至无醇味并冷冻干燥, 得到泽泻醇提取物 (ethanol extract, EE)。测定 WE 和 EE 中 AB23A 的含量, 用于后续小鼠体内药效实验。

动物实验 实验方案经上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会审查 (批准号: PZSHUTCM190628024), 符合实验动物福利与伦理相关规范。8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK (浙) 2019-0001。小鼠适应性喂养 3 天后, 随机分为空白组 (control)、模型组 (SEN)、WE 保护组 (WE+SEN) 和 EE 保护组 (EE+SEN), 每组 10 只。SEN 以 5% 盐酸水溶液溶解, 加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调节至 pH 6.5, 配制质量浓度为 2.5 mg·mL⁻¹ 的溶液; WE 和 EE 分别加入生理盐水溶解为质量浓度为 0.9 g·mL⁻¹ 的溶液。小鼠灌胃 SEN 的 LD₅₀ 57.3 mg·kg⁻¹^[13]; 课题组前期研究^[12]也表明 SEN 50 mg·kg⁻¹ 单次灌胃小鼠, 可造成显著的肝损伤, 故本研究模型组单次灌胃给药 SEN (50 mg·kg⁻¹)。根据文献^[5]报道, 本研究保护组泽泻提取物的剂量为 18 g·kg⁻¹, 即保护组分别每日一次灌胃 WE (18 g·kg⁻¹) 或 EE (18 g·kg⁻¹), 连续给药 5 天后, 于第 6 日单次灌胃给药 SEN (50 mg·kg⁻¹); 空白组每日灌胃等体积生理盐水。实验过程中, 小鼠自由饮水、饮食。末次给药 24 h 后, 以异氟烷麻醉小鼠, 取血和肝组织。

血清生化指标检测 全血室温静置 2 h 后 800 ×g 离心 15 min 分离血清, 采用试剂盒检测血清谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆汁酸 (total bile acids, TBA)。所有试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

肝脏病理学检查 取小鼠最大肝叶中心 0.5 cm×

0.5 cm×0.5 cm 肝脏固定于 4% 多聚甲醛, 脱水, 石蜡包埋, 进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色。切片置于光学显微镜下检查, 采集图像并进行分析。

血清主要胆汁酸含量分析 根据课题组前期建立的方法^[14], 利用高效液相色谱-质谱联用技术测定小鼠血清中主要胆汁酸含量, 包括胆酸 (cholic acid, CA)、 α -鼠胆酸 (α -muricholic acid, α -MCA)、 β -MCA、 ω -MCA、鹅脱氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA)、脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA)、猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid, HDCA)、熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) 及部分牛磺酸结合物 (taurine conjugated bile acids) 和甘氨酸结合物 (glycine conjugated bile acids) 共 17 种主要胆汁酸进行定量分析。

逆转录-聚合酶链式反应分析 取肝脏 10 mg, 加生理盐水 100 μ L 于低温下进行匀浆, 以总 RNA 极速抽提试剂盒 (购自上海飞捷生物技术有限公司) 提取总 RNA 并测定含量。取总 RNA 1 μ g, 以 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒 (购自 TaKaRa 公司) 逆转录合成 cDNA。参照 TB Green R Premix Ex TapTM 试剂盒方法 (购自 TaKaRa 公司) 检测小鼠肝脏中相关基因的 mRNA 的表达水平。以目的基因与内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*) 的比值作为基因的相对表达量, 空白组设为 1, 引物序列列表 1。

蛋白免疫印痕分析 取肝脏 50 mg, 加含有蛋白酶抑制剂 (购自 Roche 公司) 的 RIPA 裂解液 (购自 Thermo Scientific 公司) 500 μ L 于低温下进行匀浆, 离心取上清液, 以 BCA 蛋白分析试剂盒 (购自 YEASEN 公司) 测定含量。取蛋白提取液适量, 加入等量 2 倍以上样缓冲液, 95 °C 加热 15 min 使蛋白变性。取总蛋白

Table 1 Primer sequences. *Gapdh*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Fxr*: Farnesoid X receptor; *Shp*: Small heterodimer partner; *Cyp7a1*: Cholesterol 7 α -hydroxylase; *Cyp8b1*: Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1; *Cyp27a1*: Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1; *Mrp2*: Multidrug resistance-associated protein 2; *Bsep*: Bile salt export pump; *Cyp3a11*: Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11; *Cyp3a25*: Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 25; *Cyp2b10*: Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10

Gene name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Gapdh</i>	GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT	GGGGTCATTGATGGCAACA
<i>Fxr</i>	ATGTACCAGCCTGAGAACCC	CTCAGCGTGGTGATGGTTGA
<i>Shp</i>	AACATTCCAGGCACCCCTCT	GGTCACCTCAGCAAAAAGCAT
<i>Cyp7a1</i>	CAAGAACCCTGTACATGAGGGAC	CACTTCTTCAGAGGCTGCTTTC
<i>Cyp8b1</i>	CTGGACAAGGGTTTTGTGCC	CCCGCATCCCCTTCAAGAAT
<i>Cyp27a1</i>	TGAACGAGTACCACACCAGG	CATCAGACTATGGCGCAGGT
<i>Mrp2</i>	GGCTTTCTTTGGCTCTTGGC	GACACACAACGAACACCTGC
<i>Bsep</i>	TCTGACTCAGTGATTCTTCGCA	CCCATAAACATCAGCCAGTTGT
<i>Cyp3a11</i>	ACAAACAAGCAGGGATGGAC	CCCATATCGGTAGAGGAGCA
<i>Cyp3a25</i>	ACAAACAAGCAGGGATGGAC	CCCATATCGGTAGAGGAGCA
<i>Cyp2b10</i>	CTCTGGCCACCATGAGAGAC	TGGGATTTCCGCAGTTCTCTC

30 μg 进行蛋白免疫印痕分析, 检测小鼠肝脏中多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)、胆汁酸盐输出泵转运蛋白 (bile salt export pump, BSEP)、胆固醇 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1) 的蛋白表达水平。以Photoshop软件对蛋白条带图像进行灰度分析, 以目标蛋白与内参蛋白GAPDH的比值作为目标蛋白的相对表达量, 空白组设为1。一抗信息如下: MRP2抗体(批号: ab110740)购自Abcam公司; BSEP抗体(批号: ARG10598)购自Arigobio公司; CYP7A1抗体(批号: 2949965)购自EMD Millipore公司; GAPDH抗体(批号: 5174s)购自Cell Signaling Technology公司。

统计学分析 实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用Graphpad Prism 8.0软件进行分析。多组数据比较采用方差分析(one-way ANOVA), 两组数据比较采用学生 *t* 检验(student *t* test); $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。相关分析采用GraphPad Prism 8.0软件进行。

结果

1 泽泻及其提取物质量控制

《中国药典》(2015版)^[15]规定泽泻含AB23A不得少于0.050%。参照《中国药典》方法对本研究所用泽泻进行含量测定, 测得AB23A含量为0.158%, 符合药典标准。本研究制备了泽泻水醇提取物用于小鼠体内药效研究, 测定各提取物中AB23A的含量, WE含AB23A 0.07 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, EE含AB23A 1.09 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。根据文献报道^[5,7-10], 确定泽泻提取物给药小鼠的剂量为18 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 则WE和EE保护组中AB23A的给药剂量分别为1.26和19.62 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2 泽泻提取物对SEN致小鼠急性肝损伤的保护作用

2.1 泽泻提取物改善SEN致急性肝损伤小鼠血清生化指标 由图2A可知, SEN模型组血清肝功能检测指

标血清ALT、AST、TBA均显著升高; 而泽泻提取物保护组中ALT和AST均较模型组明显降低; 此外, EE保护组中TBA水平较模型组显著下降。相比WE保护组, EE保护组ALT、TBA显著降低, 提示EE药效比WE更为显著。

2.2 泽泻提取物改善SEN致急性肝损伤小鼠组织病理状况 由图2B所示, 空白组小鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状单行排列; SEN模型组明显的炎性细胞浸润, 肝窦扩张、严重淤血, 并出现肝组织大面积坏死, 与文献^[12]报道相符; 泽泻提取物保护组中炎性细胞浸润、肝窦扩张及淤血状况均得到明显缓解, WE保护组中肝脏坏死面积明显减小, EE保护组中未见明显坏死, 提示EE药效比WE更为显著, 与血清肝功能检测指标结果一致。

3 泽泻提取物对小鼠血清胆汁酸含量及胆汁池组成的影响

各组小鼠血清胆汁酸含量如图3所示, 血清中主要含游离型胆汁酸和牛磺结合型胆汁酸, 特别是CA、 β -MCA、 ω -MCA、DCA及其牛磺结合型; 甘氨酸结合型胆汁酸含量相对较低。SEN模型组血清胆汁酸代谢轮廓发生了显著的变化(图3A和B), 血清中17种主要胆汁酸的含量均出现了不同程度的升高, 导致血清总游离型胆汁酸和结合型胆汁酸均显著升高(图3C), 其中T- β -MCA、TCA、TUDCA是变化最为显著的胆汁酸, 分别升高6.8、6.0、5.0倍; 两种泽泻提取物保护组小鼠血清胆汁酸均有所降低, 其中 β -MCA、CDCA和DCA三种游离型胆汁酸显著下降; 此外, EE保护组中CA、 ω -MCA、TCA、T- β -MCA、T- α -MCA、THDCA、GCA较模型组亦显著下降。

此外, 分析各组小鼠血清胆汁酸组成的变化, SEN模型组中T- β -MCA、TCA、TUDCA相对百分含量也显著增加(图3D), 导致初级胆汁酸总量的相对比例增加(图3E); 相对模型组, 泽泻提取物保护组血清中 β -MCA

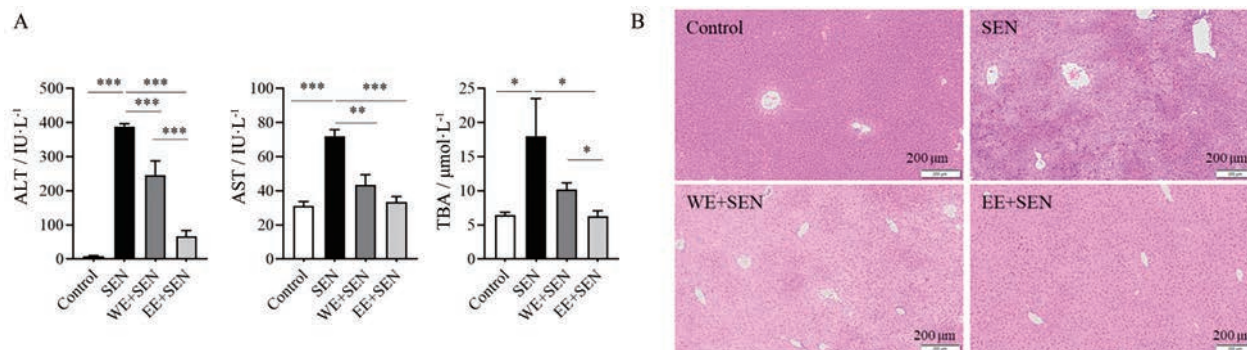


Figure 2 The protection effect of Alismatis Rhizoma water extract (WE) and ethanol extract (EE) against senecionine (SEN)-induced acute liver injury in mice. A: Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and total bile acids (TBA); B: Hematoxylin-eosin staining of liver tissue. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

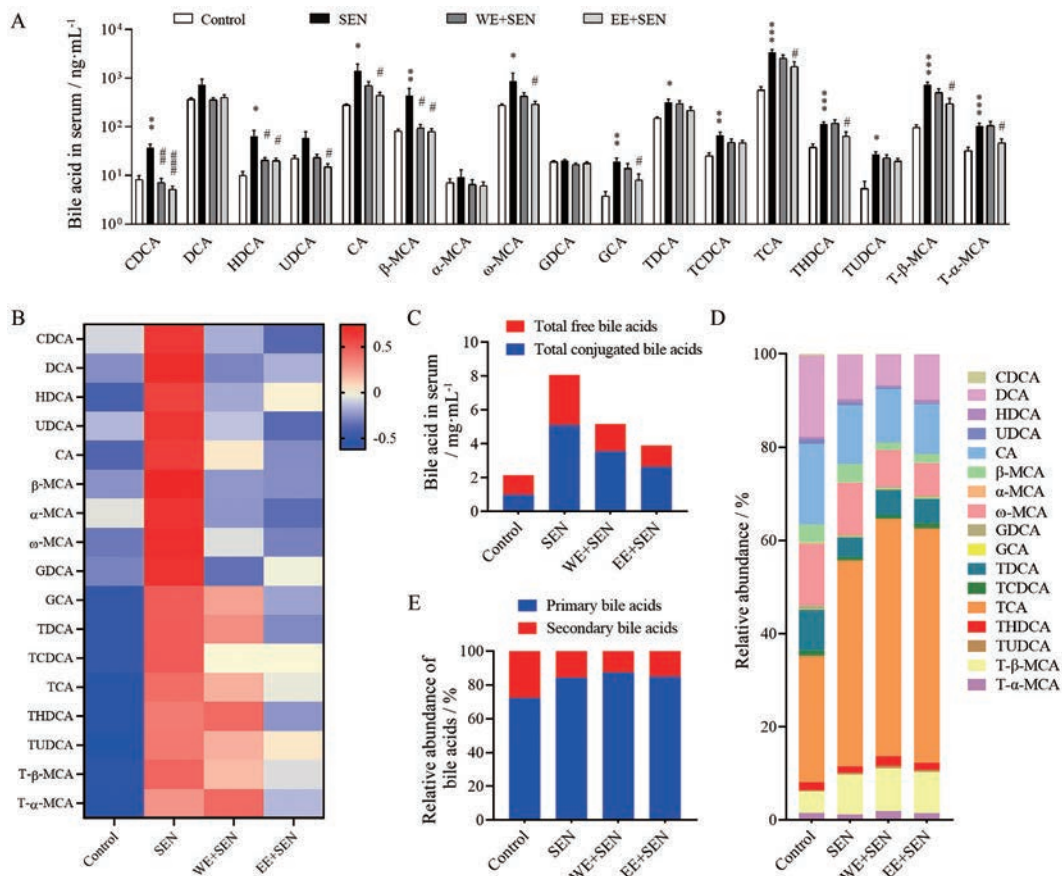


Figure 3 The changes of bile acids profiling in serum samples of mice. A: The contents of individual bile acids; B: The heatmap of individual bile acids contents. C: Relative abundance of primary bile acids and secondary of bile acids; D: Relative abundance of individual bile acids; E: Contents of total free bile acids and conjugated bile acids. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs SEN

相对百分含量显著下降。以上数据表明, 泽泻提取物通过降低血清中胆汁酸(特别是CA、MCA及其牛磺酸结合物)含量改善小鼠胆汁酸代谢, 从而缓解SEN致肝损伤; EE对胆汁酸代谢稳态的调控作用强于WE。

4 胆汁酸含量与肝功能生化指标的相关性

对各组小鼠血清中各胆汁酸含量和肝功能生化指标进行相关性分析。结果表明HDCA、GCA、TCA、T-β-MCA、T-α-MCA、TCDCA、THDCA、TUDCA与ALT活性正相关, 且HDCA和T-β-MCA与AST活性存在一定的正相关(表2)。结果表明, 这些胆汁酸可能作为评价泽泻提取物保护SEN致小鼠急性肝损伤的重要生物标志物。

5 泽泻提取物对胆汁酸代谢相关基因的影响

进一步测定肝脏胆汁酸代谢相关因子的mRNA和蛋白表达水平。如图4所示, SEN模型组*Fxr*、*Shp*的mRNA表达均有下降趋势, 与前期文献^[1]报道相符; 与胆汁酸合成相关的*Cyp7a1*显著下降($P < 0.01$), 提示除了*Fxr*外, 可能还有其他调控因子参与其调控过程。

Table 2 Correlation analysis of individual bile acid and serum biochemistry parameters

Bile acid	ALT		AST	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
HDCA	0.402 0	0.030 6	0.415 5	0.034 8
GCA	0.491 9	0.006 7	0.357 1	0.073 3
TCA	0.513 8	0.004 4	0.335 9	0.093 4
T-β-MCA	0.591 9	0.000 7	0.460 4	0.017 9
T-α-MCA	0.443 2	0.016 0	0.205 7	0.313 3
TCDCA	0.486 0	0.007 5	0.274 8	0.174 2
THDCA	0.469 0	0.010 3	0.359 5	0.071 3
TUDCA	0.446 8	0.015 1	0.270 5	0.181 4

此外, 参与胆汁酸转运及代谢解毒过程的相关基因, 包括*Mrp2*、*Bsep*、*Cyp3a11*、*Cyp3a25*、*Cyp2b10*的mRNA表达均显著降低, 而泽泻提取物保护组中这些基因均有回调趋势, EE保护组中大部分基因的回调趋势更为显著, 且EE保护组*Mrp2*显著高于WE保护组。另外, 检测了小鼠肝脏中MRP2、BSEP和CYP7A1的蛋白表达水平(图5), 与mRNA的结果一致。以上结果提示, SEN致急性肝损伤小鼠的胆汁酸代谢相关因子受到显

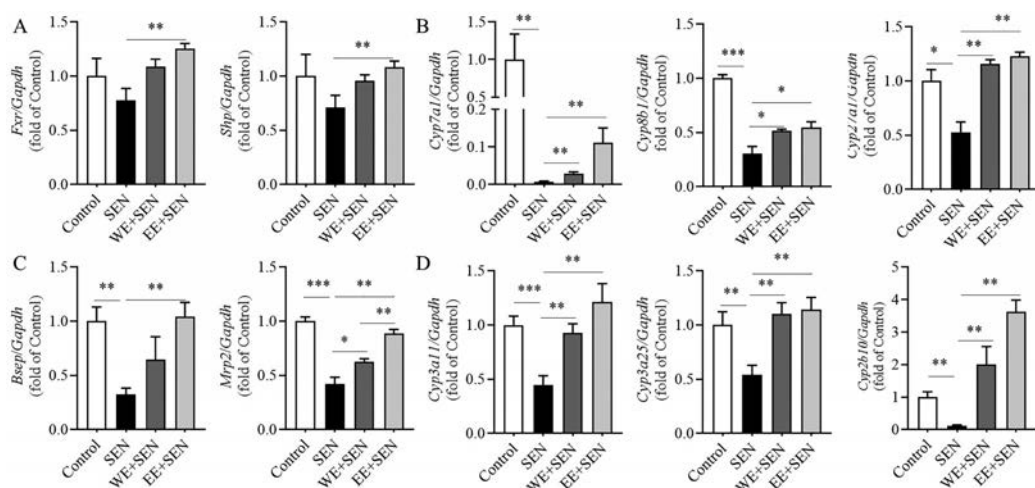


Figure 4 Hepatic mRNA expression levels of genes related to bile acids metabolism in mice. A: *Fxr* and *Shp*; B: *Cyp7a1*, *Cyp8b1*, and *Cyp27a1*; C: *Bsep* and *Mrp2*; D: *Cyp3a11*, *Cyp3a25*, and *Cyp2b10*. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

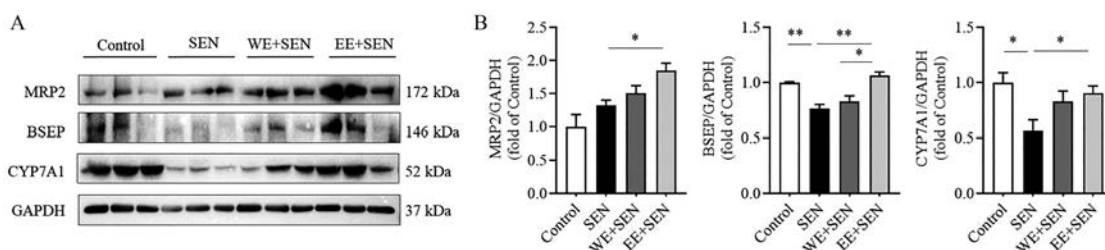


Figure 5 Hepatic protein expression levels of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), bile salt export pump (BSEP), and cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in mice. A: The representative images of Western blot assays; B: Statistical results of gray value of MRP2, BSEP, and CYP7A1 ($n = 3$ in control group; $n = 6$ in SEN, WE+SEN, and EE+SEN groups). $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

著影响,特别是外排受阻、解毒相关代谢过程受抑制,而泽泻提取物可增加相关基因的表达,从而恢复胆汁的外排、修复肝脏对胆汁酸的代谢解毒功能。

讨论

泽泻含三萜、多糖等多种活性成分。其中三萜类成分AB23A的相关药理活性报道最多,主要是作为法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR)的激动剂调节胆汁酸代谢,对 α -萘异硫氰酸酯^[9]及雌激素^[10]所致小鼠试验性胆汁淤积均有显著的保护作用。胆汁酸是由胆固醇在肝脏合成的一系列胆甾烷类的内源性化合物,通过肠肝循环,调控胆固醇代谢、排泌、溶解和食物脂类的消化、吸收等。正常生理状态下,机体胆汁酸代谢池保持含量及种类的平衡;而在病理状态,如长期或过量服用有肝毒性的药物,导致胆汁酸的肠肝循环任一过程发生障碍时,将致使胆汁酸在肝细胞和肝内胆管淤积。由于胆汁酸本身具有细胞毒性,特别是一些疏水性胆汁酸,将对肝脏造成“二次打击”,加剧肝损伤。因此,胆汁酸代谢异常与肝脏疾病的发生和发展密切相关,已成为临床肝脏疾病诊断、治疗、预后的重要生

物标识物。如生理情况下血清胆汁酸的含量较低,而发生胆汁淤积等肝脏相关疾病时,血中胆汁酸的含量将显著升高^[16]。

含PA的中草药,如含大量SEN的中草药菊三七等,导致临床肝损伤的报告日益增多,成为目前最受关注的中药安全性问题之一。为更好的治疗PA致临床肝损伤,研究者们对PA肝损伤机制进行了大量的研究,发现线粒体介导的凋亡、炎症、谷胱甘肽耗竭等均与PA肝损伤密切相关^[17,18]。本课题组前期研究发现,SEN^[11]及含PA的中草药菊三七^[12]、欧洲千里光^[19]能够调控胆汁酸代谢相关转运体,影响胆汁酸肝肠循环,导致胆汁排泄受阻、胆汁酸肝内淤积。本研究结果表明,泽泻提取物可调控胆汁外排转运体MRP2、BSEP恢复胆汁外排功能,维护胆汁酸代谢平衡,修复受损的肝细胞,从而保护SEN致小鼠肝损伤。

大量文献报道了中药、复方及活性单体成分对急性肝损伤的保护作用^[20-22]。本研究制备两种泽泻提取物,并探讨其对SEN肝损伤小鼠的保护作用。所使用剂量与文献中泽泻提取物对四氯化碳致急性肝损伤的保护剂量相近^[5]。水提取物和醇提取物均可改善SEN肝

损伤小鼠的炎性细胞浸润、肝窦扩张及淤血状况。相比而言, 泽泻醇提物的药效更佳, 对胆汁酸代谢的调控作用也更强。AB23A 为《中国药典》泽泻的含量测定指标成分, 根据文献报道 AB23A $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 可激动 FXR 并有效的保护 α -萘异硫氰酸酯所致胆汁淤积损伤, 恢复血清转氨酶、胆汁酸水平^[9]。根据提取物中 AB23A 含量测定结果, 泽泻醇提物所含 AB23A 的剂量约为 $19.62 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 与文献^[9]报道剂量相当, 且泽泻醇提物可显著增强肝脏 FXR 的表达并调控下游胆汁外排转运体及肝脏代谢相关酶, 恢复肝脏对胆汁酸的解毒功能, 推测泽泻对 SEN 致小鼠胆汁酸代谢的调控作用可能与 AB23A 对 FXR 的激动作用相关。然而, 本研究为单剂量、单时间点的研究, 证明了泽泻对 SEN 致肝损伤的保护药效, 并初步确定该药效与其对胆汁酸代谢调控的关联, 尚需要更加深入的研究。因此, 以本研究为基础, 在后续工作中将进一步深入开展相关活性单体的量-时-毒-效关系研究, 一方面丰富泽泻用于治疗临床胆汁淤积相关疾病的理论基础, 另一方面为 PA 减毒及解毒策略的开发提供新的思路。

作者贡献: 姜凯元、杨莉和熊爱珍设计实验; 姜凯元、叶铨玲、熊芬、张祎进行实验数据采集与分析; 姜凯元、熊爱珍和王峥涛撰写、修改论文。

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] Diseases HG, Gastroenterology CSO, Association CM. 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.
- [3] Lu LH, Zhang F, Zhan CS, et al. The protective effect of Danning tablet against hepatic sinusoidal obstruction syndrome induced by *Gynura Rhizoma* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 494-501.
- [4] Shu Z, Pu J, Chen L. *Alisma orientale*: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44: 227-251.
- [5] Chen XL, Li HY. The effects of raw and processed *Rhizoma Alismatis* against acute liver injury in mice [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2016, 29: 592-593.
- [6] Jang MK, Han YR, Nam JS, et al. Protective effects of *Alisma orientale* extract against hepatic steatosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 26151-26165.
- [7] Wu CQ, Jing MH, Yang LJ, et al. Alisol A 24-acetate ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting oxidative stress and stimulating autophagy through the AMPK/mTOR pathway [J]. *Chem-Biol Interact*, 2018, 291: 111-119.
- [8] Meng Q, Chen XL, Wang CY, 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.
- [9] 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 Pharm*, 2015, 283: 178-186.
- [10] 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.
- [11] Xiong AZ, Yang F, Fang LX, et al. Metabolomic and genomic evidence for compromised bile acid homeostasis by senecionine, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27: 775-786.
- [12] 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.
- [13] Xiong AZ, Yang L, Yang XJ, et al. UPLC-MS based metabolomics study on two *Senecio* herbs, *Senecio scandens* and *S. vulgaris*: an approach for the differentiation of genetically closed species with similar morphology but different toxicity [J]. *Metabolomics*, 2012, 8: 614-623.
- [14] Yang L, Xiong AZ, He YQ, et al. Bile acids metabonomic study on the CCl_4 - and alpha-naphthylisothiocyanate-induced animal models: quantitative analysis of 22 bile acids by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21: 2280-2288.
- [15] 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: 229.
- [16] Kuang JL, Zheng XJ, Zhao AH, et al. Alterations in bile acid levels in metabolic diseases and related treatment strategies [J]. *J Shanghai Jiao Tong Univ (Med Sci) (上海交通大学学报·医学版)*, 2019, 39: 678-683.
- [17] Xu J, Wang WQ, Yang X, et al. Pyrrolizidine alkaloids: an update on their metabolism and hepatotoxicity mechanism [J]. *Liver Res*, 2019, 3: 176-184.
- [18] Tang J, Cheng M. Recent progress in the research on pyrrolizidine alkaloids from Chinese medicinal herb "Zicao" and their metabolic toxicity [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 420-431.
- [19] Xiong AZ, Fang LX, Yang X, et al. An application of target profiling analyses in the hepatotoxicity assessment of herbal

- medicines: comparative characteristic fingerprint and bile acid profiling of *Senecio vulgaris* L. and *Senecio scandens* Buch.-Ham [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406: 7715-7727.
- [20] Bai HY, Feng S. Protection effects of schizandrin B against liver injury induced by clozapine in mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 390-396.
- [21] Tu C, He Q, Zhou YY, et al. Metabolomic study on the hepatotoxic or hepatoprotective effects of rhubarb to normal or hepatic fibrosis rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1139-1147.
- [22] Wang X, Luo X, Liang L, et al. Fuzheng Yanggan Formula alleviates liver injury through inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1627-1633.