

五味子醇甲对千里光碱致小鼠肝损伤的改善作用

陈 岩¹, 贾夏丽¹, 熊爱珍^{1,2*}, 王长虹^{1,2}, 杨 莉^{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: 菊三七含千里光碱 (senecionine, SEN) 等大量吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs), 其所导致的肝毒性问题成为最受关注的中药药源性肝损伤之一, 但尚无有效的临床治疗药物。本课题组前期研究表明 CYP3A4 抑制剂利托那韦可有效抑制 SEN 代谢活化并降低其肝毒性。保肝中药五味子含大量木脂素类活性成分, 可通过影响药物代谢酶改善药源性肝损伤。因此, 本研究探讨了五味子主要木脂素类化合物五味子醇甲 (schisandrol A, SoA) 对 SEN 致小鼠肝损伤的改善作用, 并初步探讨其对千里光碱代谢的影响。所有动物实验经上海中医药大学实验动物伦理委员会审查 (PZSHUTCM210604002), 符合实验动物伦理相关规范。小鼠单次灌胃 SEN (150 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 造成肝损伤模型, 并设 SoA (116 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 干预组、溶剂对照组和 SoA 对照组。结果表明, SoA 可明显降低 SEN 致肝损伤小鼠血清转氨酶活性, 缓解肝细胞坏死、肝窦淤血等病理状态。进一步测定小鼠血清中 SEN 代谢产物的含量, 结合体外肝微粒体代谢研究, 发现 SoA 可抑制 SEN 代谢活化关键酶 CYP3A4 酶活性, 降低千里光碱代谢产物的含量。本研究表明, SoA 可明显改善 SEN 致小鼠肝损伤, 与抑制 SEN 代谢活化密切相关。研究结果为基于药物代谢探讨 SEN 的减毒策略, 以及菊三七等含 PAs 中草药的临床合理应用提供理论依据。

关键词: 吡咯里西啶生物碱; 千里光碱; 木脂素; 五味子醇甲; 中药药源性肝损伤; CYP3A4

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)12-3626-08

The protective effect of schisandrol A against senecionine-induced hepatotoxicity in mice

CHEN Yan¹, JIA Xia-li¹, XIONG Ai-zhen^{1,2*}, WANG Chang-hong^{1,2},
YANG Li^{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: Hepatotoxicity induced by herbal medicines such as *Gynura japonica*, which contains large amount of pyrrolizidine alkaloids (PAs) such as senecionine (SEN), is among the most serious problems of herbal drug-induced liver injury, yet there is no effective treatment in clinic. We have previously reported that ritonavir (the well-known CYP3A4 inhibitor) protected rats against *Gynura japonica*-induced liver injury in rats, which was closely related to the inhibition of the metabolic activation of PAs. A large number of lignans have been identified in *Schisandrae Chinensis Fructis* and are reported to attenuate drug-induced liver injuries by modulating the drug metabolism enzymes. Therefore, the present study investigated the protective effect and potential mechanism of

收稿日期: 2022-07-12; 修回日期: 2022-09-12.

基金项目: 上海市自然科学基金 (20ZR1473300); 上海市人才发展资金 (2020099); 上海中医药大学“杏林学者”计划 (B1-GY21-409-04-06).

*通讯作者 Tel: 86-21-51322506, Fax: 86-21-51322519, E-mail: a.z.xiong@hotmail.com; ztwang@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0858

schisandrol A (SoA, a representative lignan identified in *Schisandrae Chinensis Fructis*) against SEN-induced hepatotoxicity in mice. All experiments were approved by the Animal Research Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (PZSHUTCM210604002). Animal welfare and the animal experimental protocols were strictly consistent with related ethics regulations of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Liver injury was induced by a single gavage of SEN ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$); mice in the protection group were gavaged with SoA ($116 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 7 days before SEN treatment. The results show that SoA dramatically alleviated SEN-induced liver injury in mice. Mice in the protection group showed decreased serum activities for alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase; in addition, the hepatic necrosis and sinusoidal hemorrhage in SEN-treated mice were markedly attenuated in the protection group. The serum contents of SEN metabolites in mice were decreased. *In vitro* studies were performed by using human liver microsomes and proved that SoA inhibits CYP3A4 to decrease the metabolism of SEN. These studies indicate that SoA attenuated SEN-induced liver injury in mice, which was closely related to the inhibition of the metabolic activation of SEN. These results provide a better understanding of the relationship between CYP3A4 and PA-induced toxicity. This work also will be helpful in developing effective treatments for SEN-induced liver injury based on inhibition of its metabolic activation, and in making reasonable evaluations of the safety of herbal medicines containing PAs such as *G. japonica*.

Key words: pyrrolizidine alkaloid; senecionine; lignan; schisandrol A; herbal-induced liver injury; CYP3A4

吡咯里西啉生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 是一类天然的毒性生物碱, 是导致临床肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) 的主要原因之一^[1]。PAs 是一大类结构相似的化合物, 由双稠吡咯环 (次碱) 和植物中的有机酸 (次酸) 酯化形成; 其中次碱结构上 C1 和 C2 位的不饱和双键为 PAs 致毒的关键结构。已发现 600 多种 PAs (含氮氧化物) 存在于菊科、紫草科、豆科等 6 000 多种植物中^[2,3], 我国有 50 多种中草药含有 PAs。大量研究表明, PAs 致毒与其代谢过程密切相关。PAs 经细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450 enzyme, CYP450) 代谢活化生成脱氢吡咯酯, 其不稳定、亲电性强, 与体内多种物质结合进一步诱发毒性^[4-6]: 与蛋白结合生成吡咯-蛋白加合物 (pyrrole-protein adducts, PPAs), 进一步诱发 HSOS; 与 DNA 结合生成吡咯-DNA 加合物, 可导致基因毒性并致癌。近年来, 因误服误用菊科植物菊三七 *Gynura japonica* 等含 PAs 的中草药导致 HSOS 的报道在我国逐年增多^[7,8]; 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 PAs 致临床 HSOS 的诊断和治疗指南^[8], 进一步明确了该疾病的发病特征, 然而目前临床上尚无有效的预防和治疗药物。

中药五味子始载于《神农本草经》, 具有敛肺滋肾、生津敛汗、涩精止泻、宁心安神的功效, 是传统的保肝中药。药典收录的五味子药材为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 主产于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等地, 故又称北五味子。五味子临床应用极为广泛, 五味子单味或与其他中药配伍用于急、慢性肝损伤的治疗^[9-11], 在保肝经典方剂扶正化癥方以及中成药护肝片中均含有五味子。

木脂素类化合物是五味子的主要活性成分 (约占 8%), 这类成分多具有抑制神经中枢、抵抗药源性肝损伤、促进肝再生等多方面的药理作用^[12-14], 引起研究者的广泛关注。《中华人民共和国药典》2020 版以五味子醇甲 (schisandrol A, SoA) 作为中药五味子的指标成分, 并规定五味子中含 SoA 不得少于 0.40%^[15]。现代药理研究证实 SoA 可改善四氯化碳^[16]、对乙酰氨基酚^[17]所致药源性肝损伤。

本课题组前期研究已表明 CYP3A4 抑制剂可明显改善菊三七中 PAs 诱导的大鼠肝毒性^[18]。近年来, 国内外学者从诸多中草药中发现了多种代谢酶的强效抑制剂^[19], 极大地丰富了中药肝毒性、配伍禁忌及解毒研究的内涵。因此, 本研究以菊三七中最主要的、毒性最强的 PAs 千里光碱 (senecionine, SEN)^[20-22] 诱导小鼠肝损伤, 探讨 SoA 对千里光碱致肝毒性的影响, 并探讨其可能的作用机制, 为 PAs 减毒策略的开发及含 PAs 中药及制剂的临床应用提供理论依据。

材料与方法

药品与试剂 千里光碱 (批号: PRF8101624) 购自成都普瑞法科技开发有限公司, 纯度大于 98%。五味子醇甲 (批号: RFS-W00211812007) 购自成都瑞思芬生物科技有限公司, 纯度大于 98%。称取千里光碱粉末适量, 用 5% 盐酸水溶液溶解, 加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 6~7, 以生理盐水稀释至 $15.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。称取五味子醇甲粉末适量, 加入 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液制得浓度为 $11.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混悬液。色谱级乙腈、甲酸以及分析级丙酮均购自国药控股化学试剂有限公司; 睾酮 (testosterone, 纯度大于 98%, 批号: J0805AS)

购自大连美仑生物技术有限公司; 6 β -羟基睾酮 (6 β -OH-testosterone, 纯度大于97%, 批号: 0536084-5) 购自加拿大Cayman Chemical公司; 混合人肝微粒体 (human liver microsomes, HLM) 购自上海瑞德肝脏疾病有限公司。

实验动物 SPF级雄性C57 BL/6J小鼠(8周龄, 体重20 \pm 2 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司(合格证号: 20210824Ab220619000223), 饲养于上海中医药大学实验动物中心(饲养条件: 温度20 \pm 2 $^{\circ}$ C, 相对湿度55% \pm 5%, 室内空气交换每小时12~18次, 12 h昼/夜循环, 自由摄取食物和水)。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(PZSHUTCM210604002)。

实验动物适应性喂养7天, 将小鼠随机分为4组, 每组8只, 分别为溶剂对照组(VEH组)、模型组(SEN组)、五味子醇甲干预组(SoA+SEN组)、五味子醇甲对照组(SoA组)。SEN组单次灌胃SEN 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$; SoA+SEN组每日给药SoA 116 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, 连续7天, 于末次给药后灌胃千里光碱(150 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)造模; VEH和SoA组分别灌胃空白溶剂和五味子醇甲(116 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)。各组小鼠分别于千里光碱造模1 h后异氟烷麻醉眼眶静脉丛取血, 千里光碱造模24 h后异氟烷麻醉摘眼球取血, 收集肝脏。全血于室温下静置2 h, 4 $^{\circ}$ C、4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 分离血清; 取小鼠肝脏最大叶中1 cm \times 1 cm置4%多聚甲醛中, 其余肝脏以液氮速冻后保存于-80 $^{\circ}$ C。

肝损伤评价 血清肝功能指标, 包括谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)活力、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)活力, 根据试剂盒(江苏南京建成生物工程研究所)说明书进行测定, 多功能酶标仪(Thermo Scientific, 型号: Varioskan Flash)于波长510 nm处读取各吸光度(A)值, 根据标准曲线计算ALT、AST活力。

肝脏组织以4%多聚甲醛固定24 h后, 依次进行脱水、包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色、乙醇脱水、二甲苯透明、树脂封固, 于光学显微镜下观察组织病理变化并采集图片。

千里光碱及代谢物含量测定 利用液相色谱-质谱联用系统(配备日本Shimadzu CBM-30 A高效液相色谱系统, 连接美国ABSCIEX QTRAP6500质谱系统)进行, 采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行检测。色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm); 流动相为0.1%甲酸水-乙腈。取各组小鼠血清适量, 加5倍体积4 $^{\circ}$ C预冷的丙酮沉淀蛋白。取上清液, 根据本课题组前期报道方法^[23,24], 利用LC-MS/MS测定上清液中千里光

碱代谢物千里光碱氮氧化物(SEN N-oxide, SENNO)、羟化产物(hydroxylated SEN, SENOH)的含量; 梯度洗脱: 0~0.5 min, 2%乙腈; 0.5~3 min, 2%~20%乙腈; 3~5 min, 20%乙腈; 5~5.5 min, 20%~95%乙腈; 5.5~7 min, 95%乙腈。蛋白以无水乙醇洗涤, 参考前期课题组建立方法以Ehrlich试剂和2%硝酸银溶液进行衍生化^[25,26], 得上清液利用LC-MS/MS测定PPAs含量, 梯度洗脱: 0~0.5 min, 2%乙腈; 0.5~3 min, 2%~20%乙腈; 3~5 min, 20%乙腈; 5~5.5 min, 20%~95%乙腈; 5.5~7 min, 95%乙腈。各化合物的检测离子通道分别为: 千里光碱, 336.2 > 120.2 (定量离子对), 336.2 > 138.2 (定性离子对); 千里光碱氮氧化物或羟化产物, 352.2 > 120.2 (定量离子对), 352.2 > 138.2 (定性离子对); 野百合碱(内标), 326.2 > 120.2 (定量分析), 326.2 > 138.2 (定性离子对); PPAs, 341.2 > 252.2 (定量离子对), 341.2 > 296.2 (定性离子对)。

人肝微粒体I相代谢反应 肝微粒体反应总体系包含: 混合人肝微粒体(0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、NADPH(G-6-P, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; G-6-PDH, 1 $\text{unit}\cdot\text{mL}^{-1}$; NADPN₂, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、MgCl₂(4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Tris-HCl(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4); 总体积100 μL 。

以上肝微粒体反应体系加入除启动子NADPH以外的各试剂, 加入不同浓度的千里光碱溶液(母液: 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 甲醇溶解; 工作液终浓度为0、1、10、20、50、100、200、500、1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 于37 $^{\circ}$ C预孵育5 min; 加入启动子NADPH, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 加入5%冰丙酮终止反应, 取上清液利用LC-MS/MS测定千里光碱含量, 根据千里光碱剩余量计算不同底物浓度下千里光碱在人肝微粒体发生I相代谢反应速率。

以上肝微粒体反应体系加入除启动子NADPH以外的各试剂, 加入千里光碱溶液(200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和不同浓度的五味子醇甲溶液(母液: 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 甲醇溶解; 工作液终浓度为0、1、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 于37 $^{\circ}$ C预孵育5 min; 加入启动子NADPH, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 加入冰丙酮终止反应并沉淀蛋白, 蛋白用于PPAs含量测定, 上清液用于千里光碱代谢物SENNO、SENOH含量测定, 测定五味子醇甲对千里光碱在人肝微粒体中I相代谢的影响。

CYP3A4酶活性测定 参考文献^[27]报道, 采用底物探针法以睾酮为CYP3A4特异性底物, 测定产物6 β -羟基睾酮含量, 以此表征CYP3A4酶活性。肝微粒体反应总体系包含: 混合人肝微粒体(0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、NADPH(G-6-P, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; G-6-PDH, 1 $\text{unit}\cdot\text{mL}^{-1}$; NADPN₂, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、MgCl₂(4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Tris-HCl(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4)、反应底物睾酮(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 总体积100 μL 。

以上肝微粒体反应体系加入除启动子NADPH以外的各试剂,加入不同浓度的五味子醇甲溶液(终浓度0、1、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),于37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育5 min;加入启动子NADPH,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,加入冰甲醇100 mL(含内标伪麻黄碱30 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)终止反应并沉淀蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液用于LC-MS/MS分析,色谱柱为Acquity UPLC HSS T3柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm),流动相为0.1%甲酸水-乙腈;梯度洗脱方式如下:0~1 min, 8%乙腈;1~2 min, 8%~40%乙腈;2~4 min, 40%~95%乙腈;4~4.5 min, 95%乙腈。采用MRM模式测定产物6 β -OH鞣酮的含量(离子通道分别为:6 β -OH鞣酮, 305.2 > 269.2;内标伪麻黄碱, 166.1 > 148.1),测定五味子醇甲对CYP3A4酶活性的影响。

RT-PCR分析 称取小鼠肝脏约10 mg,以总RNA极速抽提试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司,货号:220011)提取总RNA,取1 μg 总RNA以逆转录试剂盒(日本Takara公司,货号:RF420A)逆转录为cDNA,以美国ABI ViiA7实时荧光定量基因扩增荧光检测系统(RT-PCR)测定肝脏中相关基因的mRNA表达水平。以*Gapdh*为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相关基因的相对表达量,VEH组设为1,引物(上海捷瑞生物工程有限公司合成)序列见表1。

统计学分析 实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,GraphPad Prism 8.0(GraphPad Software, San Diego, CA)软件用于统计分析,两组间比较满足正态分布采用参数检验进行差异分析,若 $P < 0.05$ 则表示差异有统计学意义。

Table 1 The primer sequences for RT-PCR. *Gapdh*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Cyp3a11*: Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11; *Pxr*: Pregnane X receptor; *Car*: Constitutive androstane receptor

Gene name	Primer	Sequence (5' to 3')
<i>Gapdh</i>	Forward	GGCCGAGAATGGGAAGCTTGT
	Reverse	ACATACTCAGCACCGGCCTCA
<i>Cyp3a11</i>	Forward	GAAGCATTGAGGAGGATCACAC
	Reverse	TTACGAGTCCCATATCGGTAGAG
<i>Pxr</i>	Forward	GATCATGTCCGATGCCGCT
	Reverse	TGGGAGAAAGTTGTGTCAAAGGT
<i>Car</i>	Forward	TTGGTCCCATCTGTCCGTTT
	Reverse	TGCTTCTCTGCCCGCC

结果

1 五味子醇甲降低千里光碱致小鼠肝损伤

如图1所示,与VEH组比较,SEN模型组肝脏组织切片可见明显肝细胞坏死和肝窦瘀血,血清转氨酶ALT、AST活力明显升高($P < 0.001$),与本课题组前期报道^[23,28]一致;116 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 五味子醇甲干预组(SoA+SEN)小鼠肝脏损伤情况较模型组显著改善,未见明显损伤,血清ALT、AST活力也明显降低(分别降低约57.8%、34.7%),以上结果均表明五味子醇甲对千里光碱致小鼠肝毒性具有明显的保护作用。此外,与VEH组比较,SoA对照组小鼠行为、肝脏病理及血清转氨酶均未表现出明显异常。

2 五味子醇甲降低千里光碱在小鼠体内的代谢活化

本课题组前期研究^[23,24]表明,千里光碱在血清中的主要代谢物为SENNO和SENOH。本研究测定千里光碱造模1 h后血清中千里光碱主要代谢物的含量,结果表明,SoA干预组血清SENNO、SENOH含量均明显

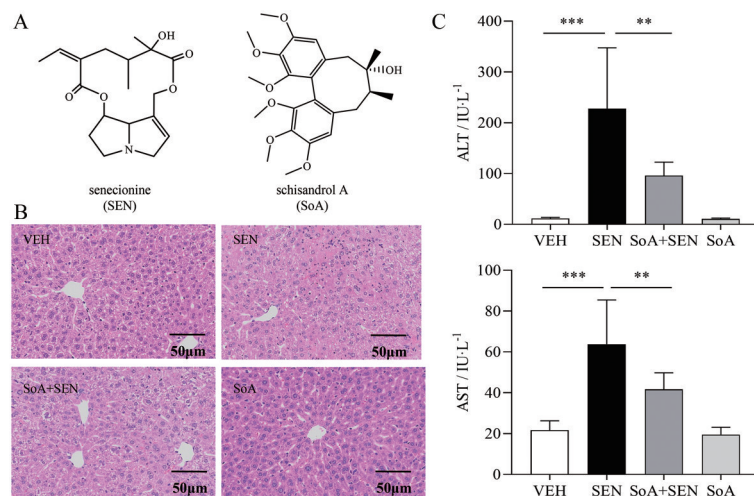


Figure 1 Schisandrol A (SoA) treatment attenuates senecionine (SEN)-induced hepatotoxicity in mice. Mice were orally treated with SoA (116 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 7 days before SEN treatment (150 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), and sacrificed 24 h after SEN administration. A: Chemical structures of SEN and SoA; B: Hematoxylin and eosin (HE) staining of the liver; C: Serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). VEH: Vehicle group. $n = 8$, $\bar{x}\pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

低于模型 SEN 组 (图 2A)。此外, PPAs 为 PAs 致肝毒性的代谢标志物, 与肝损伤程度相关^[25,26]。由图 2B 可见, 千里光碱造模 24 h 后, SoA 干预组血清中 PPAs 含量较模型组明显降低 ($P < 0.01$)。以上结果提示, 五味子醇甲可抑制千里光碱代谢活化, 降低千里光碱代谢物含量。

3 五味子醇甲抑制千里光碱在肝微粒体的 I 相代谢

利用人肝微粒体进行体外孵育, 根据千里光碱剩余量计算不同底物浓度下千里光碱在人肝微粒体的 I 相代谢反应速率。将底物浓度和反应速度作图 (图 3A、B) 可知, 千里光碱在人肝微粒体中发生 I 相代谢符合典型酶促反应动力学 Michaelis-Menten 方程 (米氏方程: $V = V_{max} \times [S] / K_m + [S]$, V_{max} 为酶反应最大速度, K_m 为米氏常数, $[S]$ 为底物浓度), 相关系数为 0.999, K_m 为 $714.6 \pm 157.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, V_{max} 为 $1.21 \pm 0.17 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ pro}\cdot\text{min}^{-1}$, 内在清除率 (CL_m) 为 $1.7 \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ pro}\cdot\text{min}^{-1}$ 。进一步研究五味子醇甲对千里光碱在人肝微粒体种 I 相代谢的影响, 以不同浓度五味子醇甲 ($0 \sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与千里光碱共孵育, 千里光碱 I 相代谢物 SENNO、SENOH 及 PPAs 的生成量均呈剂量依赖性降低 (图 3C)。以上结果提示, 五味子醇甲对千里光碱 I 相代谢具有明显的抑制作用。

4 五味子醇甲抑制人肝微粒 CYP3A4 酶活性

千里光碱主要经 CYP3A4 酶代谢发生 I 相代谢, 生成 SENNO、SENOH 以及脱氢吡咯, 脱氢吡咯进一步与

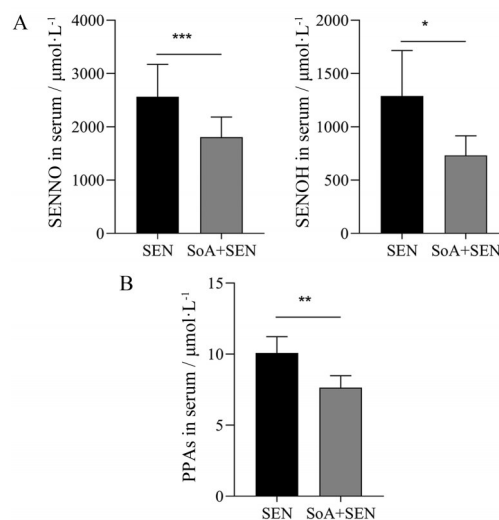


Figure 2 SoA treatment decreases the serum concentration of SEN metabolites in mice. Mice were orally treated with SoA ($116 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 7 days before SEN treatment ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), and blood samples were collected at 1 h and 24 h, respectively. A: Serum concentration of SEN N-oxide (SENNO) and hydroxylated SEN (SENOH) at 1 h after SEN exposure; B: Serum concentration of pyrrole-protein adducts (PPAs) at 24 h after SEN exposure. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

蛋白结合生成 PPAs^[6]。因此, CYP3A4 是催化千里光碱代谢物 SENNO、SENOH 及 PPAs 生成的主要酶。本研究进一步利用人肝微粒体测定了五味子醇甲对 CYP3A4 酶活性的影响。结果表明, 五味子醇甲可抑



Figure 3 SoA treatment inhibits phase I metabolism of SEN in human liver microsomes. Michaelis-Menten (A) and Eadie-Hofstee (B) plots of SEN metabolism in human liver microsomes. SEN ($0 \sim 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was incubated with human liver microsomes ($0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) at 37°C for 30 min with NADPH. C: SoA decreases the velocity of formation of SEN phase I metabolites dose-dependently. SoA ($0 \sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was incubated with SEN ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in human liver microsomes ($0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) at 37°C for 30 min with NADPH. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs SEN

制 CYP3A4 酶活性, 半数抑制率 (IC_{50}) 为 $52.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 4)。该部分结果与五味子醇甲降低千里光碱在肝微粒体的 I 相代谢产物生成的结果相符, 由此推测: 五味子醇甲通过抑制 CYP3A4 酶活性, 从而抑制千里光碱的 I 相代谢。

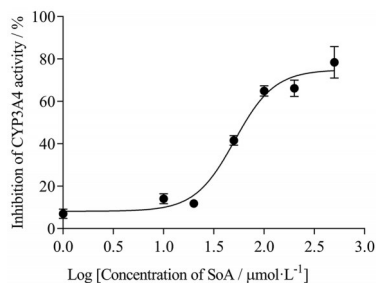


Figure 4 SoA inhibits CYP3A4 enzyme activity in human liver microsomes. SoA ($0\text{--}500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was incubated with testosterone ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in human liver microsomes ($0.5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) at 37°C for 30 min with NADPH. Enzyme activity of CYP3A4 was measured by the LC-MS/MS cocktail assay by using testosterone as the specific CYP3A4 probe substrate. $n = 3, \bar{x} \pm s$

5 五味子醇甲影响小鼠体内千里光碱代谢关键基因的 mRNA 表达水平

进一步测定小鼠肝脏中千里光碱代谢关键基因 *Cyp3a11* 及相关核受体 *Pxr*、*Car* 的 mRNA 表达水平 (图 5)。造模 24 h 后, SEN 组肝脏 *Cyp3a11*、*Pxr*、*Car* 的 mRNA 表达均较溶剂对照组显著降低, 与文献^[28]报道一致; 而 SoA 干预组中此基因的 mRNA 表达均较模型组显著升高, 与溶剂对照组趋近一致, 表明五味子醇甲可通过调节代谢酶缓解千里光碱造成的小鼠肝损伤。

讨论

含千里光碱等 PAs 的中草药及膳食补充剂导致肝毒性的问题引起国际社会的广泛关注^[29,30], 成为最严重的中药药源性肝损伤问题之一。PAs 本身无毒性, 主要由细胞色素 P450 酶 (主要是 CYP3A4) 代谢生成活化吡咯并与蛋白等生命大分子物质结合从而诱导毒

性^[4-6]。本研究以菊三七中最具代表性的肝毒性 PAs 千里光碱构建肝损伤模型, 探讨保肝中药五味子木脂素类活性成分五味子醇甲对其毒性的改善作用。结果表明, 五味子醇甲对千里光碱致小鼠肝损伤具有显著的保护作用, 减轻肝脏细胞坏死及瘀血, 降低血清转氨酶活性。

药物代谢酶在药物发挥作用过程起到重要的作用, 药物-药物相互作用可能会影响药物代谢酶促使药物产生药效或增加毒性^[31-33]。中药配伍是我国传统中医药的核心理论之一, 也是中药减毒增/存效的有效方式, 对于中药临床合理用药尤其重要。PAs 致肝毒性与代谢密切相关, 对 PAs 代谢的调节将严重影响其毒性。五味子中含有的木脂素类成分是一类由两分子苯丙素衍生物聚合而成的天然化合物, 五味子醇乙、五味子酯乙、五味子酯甲、五味子乙素等木脂素类化合物均对 CYP3A4 酶活性具有不同程度的抑制作用^[34-36], 并且已有研究证实此类成分对药物代谢酶的调控是其发挥保肝药效的重要机制^[17,36,37]。本研究进一步利用人肝微粒体测定五味子醇甲对 CYP3A4 酶活性的影响, 结果表明五味子醇甲可抑制 CYP3A4 的酶活性从而改善肝损伤, 并在体内外抑制千里光碱经 CYP3A4 催化的代谢产物的含量。以上研究均证实五味子醇甲发挥药效与其抑制 CYP3A4 酶活性进而抑制千里光碱代谢活化密切相关。CYP3A4 是催化千里光碱代谢活化致毒的关键代谢酶, 而上游核受体孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR) 和组成型雄甾烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR) 对其具有显著的调节作用^[38]。已有报道证明核受体对 PAs 致肝毒性的调控作用^[39]。本研究发现五味子醇甲可以回调千里光碱致肝损伤小鼠肝脏中 *Cyp3a11* 及核受体 *Pxr*、*Car* 的 mRNA 表达水平, 使其趋于溶剂对照组, 进一步证实五味子醇甲可通过调节药物代谢酶发挥其对千里光碱致肝损伤的保护作用。以本研究为基础, 后续将进一步深入探讨五味子醇甲对千里光碱体内吸收、分布、代谢及排泄的动力学特征及相关代谢机制, 为菊三七等含千里

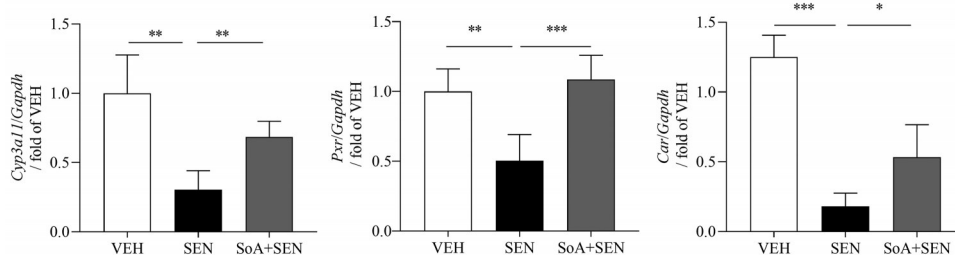


Figure 5 SoA treatment modulates hepatic mRNA expression of genes involved in the metabolism of SEN. Mice were orally treated with SoA ($116 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) 7 days before SEN treatment ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), and sacrificed at 24 h after SEN administration. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

光碱的中草药及其制剂的减毒策略的开发及临床合理应用提供参考。

作者贡献: 陈岩、熊爱珍设计实验、撰写及修改论文; 陈岩、贾夏丽负责实验样本及数据的采集与分析; 杨莉、王峥涛、王长虹提供学术指导; 熊爱珍提供基金支持。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Valla DC, Cazals-Hatem D. Sinusoidal obstruction syndrome [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2020, 44: 480-485.
- [2] Schrenk D, Gao L, Lin G, et al. Pyrrolizidine alkaloids in food and phytomedicine: occurrence, exposure, toxicity, mechanisms, and risk assessment—a review [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 136: 111107.
- [3] Tamariz J, Burgueño-Tapia E, Vázquez MA, et al. Pyrrolizidine alkaloids [J]. *Alkaloids Chem Biol*, 2018, 80: 1-314.
- [4] Moreira R, Pereira DM, Valentão P, et al. Pyrrolizidine alkaloids: chemistry, pharmacology, toxicology and food safety [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1668.
- [5] 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.
- [6] Fu PP, Xia Q, Lin G, et al. Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms [J]. *Drug Metab Rev*, 2004, 36: 1-55.
- [7] Wang XX, Qi XS, Guo XZ. Tusanqi-related sinusoidal obstruction syndrome in China [J]. *Medicine*, 2015, 94: 1-11.
- [8] 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.
- [9] Zhang JX, Yin J, Qu XL, et al. Effects of compatibility of *Schisandra chinensis* on *Psoralea corylifolia*-induced oxidative damage and endoplasmic reticulum stress in hepatocytes [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2022, 33: 1088-1093.
- [10] Li Y, Xia T, Kang CY, et al. Protective effect of medicine vinegar extract of *Panax ginseng*, *Glycyrrhiza* and *Schisandra chinensis* on acute liver injury in mice [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2022, 43: 366-372.
- [11] Bai HG, Yue YY, Dong SG, et al. Effects of *Schisandrae* and *Ganoderma* tablet on chronic liver damage induced by alcohol in rats [J]. *Ginseng Res (人参研究)*, 2019, 31: 2-4.
- [12] Fan XM, Jiang YM, Wang Y, et al. Wuzhi tablet (*Schisandra Sphenanthera* extract) protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of NRF2-ARE and p53/p21 pathways [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42: 1982-1990.
- [13] Zeng H, Jiang YM, Chen P, et al. Schisandrol B protects against cholestatic liver injury through pregnane X receptors [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174: 672-688.
- [14] Zhang W, Zhu YD, Zhang QY, et al. Research progress in application and mechanism of *Schisandrae Chinensis Fructis* for prevention and treatment of liver diseases [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 3759-3770.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol I. Beijing: China Medicinal Science and Technology Press, 2020: 68.
- [16] Wang CP, Xuan D, Chen X, et al. Protective effects of schisandrin and deoxyschisandrin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice and its mechanism [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2019, 35: 791-794.
- [17] Jiang Y, Fan X, Wang Y, et al. Hepatoprotective effects of six schisandra lignans on acetaminophen-induced liver injury are partially associated with the inhibition of CYP-mediated bioactivation [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 231: 83-88.
- [18] Chen Y, Ye XL, Wang XJ, et al. The protective effect of ritonavir against *Gynura japonica*-induced liver injury in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 392-398.
- [19] Zhang F, Zhang TT, Tu DZ, et al. Research progress on the CYP3A4 inhibitors in herbal medicine [J]. *J Zunyi Med Univ (遵义医科大学学报)*, 2021, 44: 559-574.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Chen Y, Wang WQ, Jia XL, et al. Firm evidence for the detoxification of senecionine-induced hepatotoxicity *via* *N*-glucuronidation in UGT1A4-humanized transgenic mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 165: 113185.
- [24] Xiong AZ, Yang L, Zhang F, et al. Identification of metabolites of senecionine, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid, by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2012, 47: 54-60.
- [25] Chen Y, Xiong F, Wang WQ, et al. The long persistence of pyrrolizidine alkaloid-derived pyrrole-protein adducts *in vivo*: kinetic study following multiple exposures of a pyrrolizidine alkaloid containing extract of *Gynura japonica* [J]. *Toxicol Lett*, 2020, 323: 41-47.
- [26] Chen Y, Wang XJ, Xiong F, et al. Kinetic study of pyrrolizidine

- alkaloid-derived pyrrole-protein adducts in rats after intragastric administration of *Gynura japonica* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 473-477.
- [27] Zhang N, Liu J, Chen ZX, et al. *In vitro* inhibitory effects of kaempferitrin on human liver cytochrome P450 enzymes [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57: 571-576.
- [28] Jiang KY, Ye XL, Xiong F, et al. The protective effects and mechanism of *Alismatis Rhizoma* extracts against senecionine-induced acute liver injury in mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 823-830.
- [29] Luo Q, Yang T, Liu CH. Research difficulties of Chinese herbal medicine induced liver injury [J]. *Chin J Integr Tradit Western Med Liver Dis* (中西医结合肝病杂志), 2020, 30: 17-23.
- [30] EASL. EASL Clinical Practice Guidelines: drug-induced liver injury [J]. *J Hepatol*, 2019, 70: 1222-1261.
- [31] Tian ZH, Ai ZA, Wei XH. Research progress of drug interaction mechanism and evaluation methods *in vivo* [J]. *Drugs Clin* (现代药物与临床), 2021, 36: 2192-2199.
- [32] Benet LZ, Bowman CM, Koleske ML, et al. Understanding drug-drug interaction and pharmacogenomic changes in pharmacokinetics for metabolized drugs [J]. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2019, 46: 155-163.
- [33] Sun B, Fu SJ, Chen GL, et al. Application of drug interaction studies in drug development and evaluation decisions [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2021, 26: 1095-1102.
- [34] Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, et al. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in *Schisandra* fruit extract [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32: 1351-1358.
- [35] Seo HJ, Ji SB, Kim SE, et al. Inhibitory effects of *Schisandra* lignans on cytochrome P450s and uridine 5'-diphosphoglucuronosyl transferases in human liver microsomes [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 371.
- [36] Jiang Y, Fan X, Wang Y, et al. Schisandrol B protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of liver regeneration [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 143: 107-115.
- [37] Li B, Li D, Wang Y, et al. Schisantherin A alleviated alcohol-induced liver injury by the regulation of alcohol metabolism and NF- κ B pathway [J]. *Exp Anim*, 2018, 67: 451-461.
- [38] Xu C, Li YT, Kong ANT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28: 249-268.
- [39] Luckert C, Braeuning A, Lampen A, et al. PXR: structure-specific activation by hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 288: 38-48.