

## 药物代谢酶抑制剂对反式二苯乙烯苷所致肝损伤易感性的影响

李娜<sup>1,2</sup>, 宋捷<sup>1</sup>, 李晓菲<sup>2</sup>, 王亚<sup>2</sup>, 孟雅坤<sup>2</sup>, 涂灿<sup>2</sup>, 李春雨<sup>3</sup>,  
马致洁<sup>2</sup>, 庞晶瑶<sup>2</sup>, 李瑞煜<sup>2</sup>, 肖小河<sup>4</sup>, 康廷国<sup>1\*</sup>, 王伽伯<sup>2\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 解放军 302 医院, 全军中医药研究所, 北京 100039; 3. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 4. 解放军 302 医院, 中西医结合肝病诊疗与研究, 北京 100039)

**摘要:** 采用药物代谢酶抑制剂, 考察代谢因素对何首乌中主要成分反式二苯乙烯苷潜在肝损伤作用的影响, 并筛查反式二苯乙烯苷的主要代谢酶亚型。结果表明, 在内毒素 (LPS) 复制的大鼠肝损伤易感性模型内, 反式二苯乙烯苷 (*trans*-SG, 31 mg·kg<sup>-1</sup>) 未引起肝损伤作用, 进一步联合 I 相代谢酶抑制剂苯基咪唑 (10 mg·kg<sup>-1</sup>) 未改变 *trans*-SG 的肝损伤程度 (与 LPS+*trans*-SG 组相比  $P>0.05$ ); 而联合 II 相代谢酶抑制剂酮康唑 (35 mg·kg<sup>-1</sup>) 显著增加了 *trans*-SG 的肝损伤程度 (与 LPS+*trans*-SG 组相比  $P<0.05$ )。在人肝微粒体 I 相代谢酶体系中, 未检测到 *trans*-SG 代谢产物; 在人重组 UGT 同工酶 II 相代谢酶体系中, 检测到 *trans*-SG 的葡糖醛酸代谢物, 6 个尿苷二磷酸葡糖醛酸转移酶 (UGT) 亚型的代谢能力依次为: UGT1A1 > UGT1A9 > UGT1A7 > UGT1A10 > UGT2B7 > UGT1A8。结果提示: *trans*-SG 主要经由 UGT 介导的 II 相代谢, 抑制药物 II 相代谢酶可增加 *trans*-SG 潜在的肝损伤风险。这为何首乌易感因素评价和药物配伍禁忌研究提供了参考依据。

**关键词:** 何首乌; 反式二苯乙烯苷; 肝损伤; 代谢因素; I 相代谢; II 相代谢

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 07-1063-06

## Influence of drug metabolizing enzyme inhibitors on liver injury susceptibility to *trans*-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside

LI Na<sup>1,2</sup>, SONG Jie<sup>1</sup>, LI Xiao-fei<sup>2</sup>, WANG Ya<sup>2</sup>, MENG Ya-kun<sup>2</sup>, TU Can<sup>2</sup>, LI Chun-yu<sup>3</sup>,  
MA Zhi-jie<sup>2</sup>, PANG Jing-yao<sup>2</sup>, LI Rui-yu<sup>2</sup>, XIAO Xiao-he<sup>4</sup>, KANG Ting-guo<sup>1\*</sup>, WANG Jia-bo<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 4. Integrative Medical Center for Liver Diseases, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China)

**Abstract:** By using the drug metabolizing enzyme inhibitors, the effects of metabolic factors on potential liver injury induced by the main component, *trans*-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside (*trans*-SG), in *Polygonum multiflorum* was investigated. The main metabolic enzyme isoforms involved in *trans*-SG metabolism were also screened. The results showed that *trans*-SG at the dosage 31 mg·kg<sup>-1</sup> did not cause liver injury; and the combination of *trans*-SG with the phase I metabolic enzyme inhibitor, 1-benzylimidazole (10 mg·kg<sup>-1</sup>), did not change the degree of liver injury (compared with LPS + *trans*-SG group,  $P>0.05$ ). However, the combination of *trans*-SG with phase II metabolic enzyme inhibitor, ketoconazole (35 mg·kg<sup>-1</sup>),

收稿日期: 2017-04-20; 修回日期: 2017-06-13.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81503350); 国家“重大新药创制”科技重大专项课题 (2015ZX09501-004-001-008); 国家公益性行业科研专项课题 (201507004-04); 全军医学科技“十二五”科研项目 (BWS11J049).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66933323, E-mail: wjb0128@126.com; ting\_guo\_kang@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0392

significantly increased the degree of liver injury (compared with LPS + *trans*-SG group,  $P < 0.05$ ). The phase I metabolites of *trans*-SG were not detected in human liver microsomes phase I metabolism system, while the phase II *trans*-SG metabolites were detected in recombinant human UGT isozymes phase II metabolism system. Six isoforms of uridine diphosphate glucuronate transferase (UGT) exhibited abilities to metabolize *trans*-SG and the order of metabolic ability was: UGT1A1 > UGT1A9 > UGT1A7 > UGT1A10 > UGT2B7 > UGT1A8. The results showed that *trans*-SG was mainly metabolized by UGT in phase II metabolism. The inhibition of drug metabolizing enzymes of phase II can increase the liver injury susceptibility of *trans*-SG, which provides a reference to the evaluation of susceptible factors and drug incompatibility research of *Polygonum multiflorum*.

**Key words:** *Polygonum multiflorum*; *trans*-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glucoside; liver injury; metabolic factors; phase I metabolism; phase II metabolism

何首乌是临床常用中药,其炮制品具有补肝肾、乌发、降脂等功效,为百姓广泛服用的补益类中药。然而近年来国内外有关何首乌肝损伤病例的报道逐渐增多<sup>[1-5]</sup>,这引起药监部门高度重视。前期研究发现,何首乌在临床上引起肝损伤存在显著的个体差异<sup>[6-8]</sup>,可能存在易感因素。课题组前期研究发现,肝脏免疫异常活化或应激态是何首乌肝损伤的重要易感因素之一,并建立了基于内毒素诱导免疫应激的何首乌肝损伤易感性评价模型<sup>[9,10]</sup>。然而,代谢差异也可能是导致药物肝损伤的重要易感因素,如对乙酰氨基酚<sup>[11]</sup>。前期实验提示何首乌中的二苯乙烯苷类化合物对大鼠肝脏呈现一定的损伤作用<sup>[12]</sup>,而反式二苯乙烯苷 (*trans*-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*- $\beta$ -D-glucoside, *trans*-SG) 是该类化合物中的主要成分之一,在何首乌药材中约占 1%~7%,且其在较高浓度时对肝细胞具有一定的毒性作用<sup>[13]</sup>。有研究报道 *trans*-SG 在体内经肝脏 II 相代谢,代谢产物为葡糖醛酸结合物<sup>[14]</sup>。I 相代谢是否影响 *trans*-SG 的代谢,以及肝脏 I 相和 II 相代谢功能的差异是否影响 *trans*-SG 的潜在肝毒性,尚未见研究报道。为此,本文采用药物代谢酶抑制剂改变肝脏代谢能力,考察 *trans*-SG 对易感性模型肝损伤的影响,并在体外考察 I 相和 II 相代谢酶对 *trans*-SG 代谢转化的影响,从代谢角度探讨引起何首乌肝损伤的相关因素。

## 材料与amp;方法

**动物** 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, SPF 级, 6~8 月龄, 160~180 g, 购于军事医学科学院实验动物中心 [合格证号 SCXK-(军) 2012-0004]。分笼饲养, 自由饮水及进食。室温 (25 ± 2) °C, 环境安静、通风良好, 室内保持 12 h 照明, 12 h 黑暗, 并定期用紫外灯光消毒。所有对动物的处理和操作均通过解放军第 302 医院伦理委员会的批准。

**药物与试剂** 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (简称二苯乙烯苷, *trans*-SG, C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>, M.W. 406.39, HPLC 纯度 > 98%) 购于成都普菲德生物科技有限公司 (141101; 中国成都); 苜基咪唑 (BI) 购自 Sigma 公司; 酮康唑 (KT) 购于武汉丰竹林化工科技有限公司; 人肝微粒体、人重组 UGT 同工酶 UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9、UGT1A10、UGT2B4、UGT2B7、UGT2B15 和 UGT2B17 均购于 BD gentest 公司; 多聚甲醛固定液等购于谷歌生物; 甲醇 (色谱级)、乙腈 (色谱级) 均购于 Merck 公司; 去离子水经 (18.2 M $\Omega$ ) Millipore Milli-Q 系统 (Millipore Co., 美国) 超纯水器净化, 其他试剂均为市售分析纯。

**仪器** 超高效液相色谱-质谱联用仪 (Agilent Technologies 6550 iFunnelQ-TOF LC/MS, 美国); 酶联免疫检测仪 (Synergy H1, BioTek, 美国); 微量分析天平 (AL204, Mettler Toledo); 涡旋混匀器 (HYQ 2121A); 爱华 KPJ-1A 生物组织摊片烤片机 (天津天利航空有限公司); Leica 2016 石蜡切片机 (上海莱卡仪器有限公司); Nikon E200 光学显微镜 (日本 Nikon 公司)。

**苜基咪唑联合 *trans*-SG 对 LPS 大鼠易感性模型的肝损伤评价** 将 SD 大鼠随机分为 7 组 ( $n = 10$ ): 对照组、LPS 组 (给药剂量为 2.8 mg·kg<sup>-1</sup>)、苜基咪唑组 (BI, 给药剂量为 10 mg·kg<sup>-1</sup>)、*trans*-SG 组 (给药剂量为 31 mg·kg<sup>-1</sup>)、*trans*-SG+LPS 组、BI+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+BI 组。将大鼠称重, 记录, 苜基咪唑组、BI+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+BI 组连续 4 天腹腔注射苜基咪唑, 禁食不禁水 12 h 后, 第 5 天 *trans*-SG 组、*trans*-SG+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+BI 组灌胃给予 *trans*-SG, 3 h 后 LPS 组、*trans*-SG+LPS 组、BI+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+BI 组尾静脉注射 LPS, 7 h 后, 使用 1% 戊巴比妥钠 (给药剂量为 50 mg·kg<sup>-1</sup>) 将所有

大鼠麻醉, 下腔静脉取血, 离心并采集血浆样本<sup>[7, 8]</sup>。

**酮康唑联合 *trans*-SG 对 LPS 大鼠易感性模型的肝损伤评价** 将 SD 大鼠随机分为 7 组 ( $n=10$ ); 对照组、LPS 组 (给药剂量为  $2.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、*trans*-SG 组 (给药剂量为  $31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、酮康唑组 (KT, 给药剂量为  $35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[15]</sup>)、*trans*-SG+LPS 组、KT+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+KT 组。将大鼠称重, 记录, 酮康唑组、KT+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+KT 组连续 4 天腹腔注射酮康唑, 禁食不禁水 12 h 后, 第 5 天 *trans*-SG 组、*trans*-SG+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+KT 组灌胃给予 *trans*-SG, 3 h 后 LPS 组、*trans*-SG+LPS 组、KT+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+KT 组腹腔注射 LPS, 7 h 后, 使用 1% 戊巴比妥钠 (给药剂量为  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 将所有大鼠麻醉, 下腔静脉取血, 离心并采集血浆样本<sup>[7, 8]</sup>。

**肝功能指标检测** 采集大鼠血浆, 采用试剂盒 (酶标仪法) 检测肝功能指标 ALT、AST 活力。

**人肝微粒体 I 相代谢孵育** 将人肝微粒体与底物共同孵育, 总体积为  $250 \mu\text{L}$ , 孵育体系为  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, EDTA  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 肝微粒体终质量浓度为  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。底物为: *trans*-SG ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对乙酰氨基酚 ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。分为 6 组: *trans*-SG 组、对乙酰氨基酚组、*trans*-SG+NADPH+肝微粒体组、对乙酰氨基酚+NADPH+肝微粒体组、NADPH+肝微粒体组和 *trans*-SG+对乙酰氨基酚+NADPH+肝微粒体组。每组分别加入适量相应的试剂, 放入水浴摇床中于  $37^\circ\text{C}$  下温孵 5 min 后, 再加入辅助因子 NADPH 以启动反应, NADPH 的终浓度为  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。反应体系中的有机溶剂浓度  $\leq 5\%$ 。混匀后, 于 60 min 取温孵液  $100 \mu\text{L}$ , 分别加入  $100 \mu\text{L}$  冰甲醇终止反应, 终止后的混合液充分涡旋。  $4^\circ\text{C}$  条件下  $16000 \times g$  离心 30 min, 取上清液保存在  $-80^\circ\text{C}$  冰箱, 备用。

**人重组 UGT 同工酶 II 相代谢孵育** 选取体系总体积为  $100 \mu\text{L}$ , 含人重组 UGT 同 I 酶亚型 (UGT1A1、1A3、1A4、1A6、1A7、1A8、1A9、1A10、2B4、2B7、2B15 和 2B17) 中的一种 (终质量浓度为  $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、UDPGA (终浓度  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (终浓度  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Tris-HCl 缓冲液 ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.4) 和 *trans*-SG 溶液 (终浓度为  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。 *trans*-SG 溶液、 $\text{MgCl}_2$ 、Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 和 UGT 单酶加入 EP 管于  $37^\circ\text{C}$  恒温振荡水浴箱中预孵 3 min, 再加入辅因子 UDPGA 启动反应,  $37^\circ\text{C}$  恒温振荡水浴箱中孵育 60 min 后, 分别加入冰甲醇  $100 \mu\text{L}$  终止反

应, 终止后的混合液充分涡旋。  $4^\circ\text{C}$  条件下  $16000 \times g$  离心 30 min, 取上清液保存在  $-80^\circ\text{C}$  冰箱, 备用。

**色谱条件** 色谱柱: Acquity UPLC HSS T3 C18 column ( $2.1 \text{ mm}\times 100 \text{ mm}$ ,  $1.8 \mu\text{m}$ , 美国)。检测波长: 245、360、420、225 和  $280 \text{ nm}$ , 柱温:  $30^\circ\text{C}$ ; 样品温度:  $4^\circ\text{C}$ ; 流动相: A 乙腈 (0.1% 甲酸), B 水 (0.1% 甲酸); 流速:  $0.30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 进样量:  $4 \mu\text{L}$ 。色谱梯度洗脱条件如表 1。精密吸取上清液  $100 \mu\text{L}$ , 氮气吹干, 90% 甲醇溶解残留物, 离心过膜后注入 UPLC-ESI-MS 系统分析。

**Table 1** High performance gradient elution conditions

Time/min	Acetonitrile (A%)	Water (B%)
Initial	95	5
1	95	5
9	60	40
19	10	90
21	0	100
25	0	100

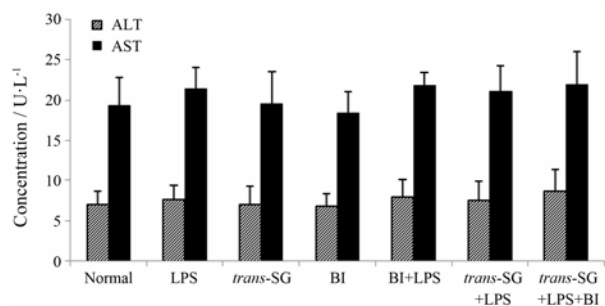
**质谱条件** 采用电喷雾电离 (ESI) 离子源, 在负离子模式下数据采集范围  $m/z$ :  $50\sim 1\ 200$ , 采集模式: ESI Continuum 模式。毛细管电压  $2.2 \text{ kV}$  (正离子  $2.5 \text{ kV}$ ); 锥孔电压  $40 \text{ V}$ ; 源温  $130^\circ\text{C}$ ; 脱溶剂气温度  $350^\circ\text{C}$ ; 锥孔气流量  $50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ; 脱溶剂气流量  $800 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ; 碰撞气为氮气和氩气; 碎片碰撞能量: 低能量  $4 \text{ V}$ , 高能量  $10\sim 55 \text{ V}$ ; 采集频率  $0.2 \text{ s}$ 。校正: 质量数校正: 亮氨酸脑啡肽 ( $m/z$  554.261 5, 负离子模式;  $m/z$  556.277 1, 正离子模式), 质量浓度  $100 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 流速  $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 采样频率每次  $10 \text{ s}$ 。质量轴校正: 甲酸钠溶液 (误差  $< 5 \text{ ppm}$ )。

**统计学分析** 用 SPSS 20.0 软件进行分析, 所有数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用 one-way ANOVA 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义,  $P < 0.01$  表示差异有显著的统计学意义。

## 结果

### 1 苄基咪唑不影响 *trans*-SG 在 LPS 易感性模型大鼠的肝损伤风险

实验结果显示, 与对照组比较, LPS 组、*trans*-SG 组、苄基咪唑 (BI) 组、BI+LPS 组、*trans*-SG+LPS 组和 *trans*-SG+LPS+BI 组 ALT 和 AST 均无明显变化 ( $P > 0.05$ ); *trans*-SG+LPS+BI 组与 *trans*-SG+LPS 组相比, ALT 和 AST 无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 说明苄基咪唑对 *trans*-SG 的肝损伤风险无明显影响。结果见图 1。



**Figure 1** Influence of co-treatment with lipopolysaccharide (LPS), *trans*-SG and benzyl imidazole (BI) on plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities. LPS represents lipopolysaccharide-treated group (model group); *trans*-SG represents *trans*-SG-treated group; BI represents benzyl imidazole-treated group; BI+LPS represents co-treatment with BI and LPS; *trans*-SG+LPS represents co-treatment with *trans*-SG and LPS; *trans*-SG+LPS+BI represents co-treatment with *trans*-SG, LPS and BI.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

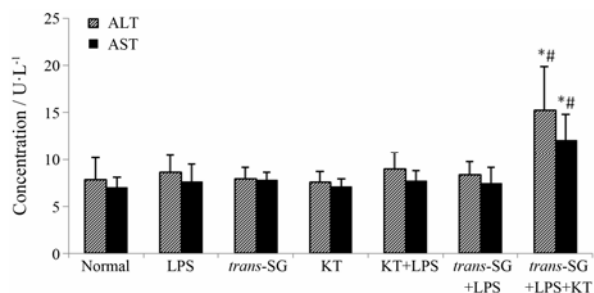
## 2 酮康唑增加 *trans*-SG 在 LPS 易感性模型大鼠的肝损伤风险

从图2可以看出,与对照组比较,LPS组、*trans*-SG组、酮康唑(KT)组、KT+LPS组、*trans*-SG+LPS组 ALT 和 AST 均无明显变化 ( $P > 0.05$ ); *trans*-SG+LPS+KT 组与对照组比较,ALT 和 AST 显著升高 ( $P < 0.05$ ); *trans*-SG+LPS+KT 组与 *trans*-SG+LPS 组相比,ALT 和 AST 均明显升高 ( $P < 0.05$ ),说明酮康唑可增加 *trans*-SG 的肝损伤风险。

## 3 *trans*-SG 主要通过 UGT 发生 II 相代谢

在 *trans*-SG 与人肝微粒体共同孵育进行体外微粒体 I 相代谢实验中,未见 *trans*-SG 量减少,没有检测到 I 相代谢产物,这提示 *trans*-SG 在体外肝微粒体环境中可能未发生 I 相代谢。

在 *trans*-SG 与人重组 UGT 同工酶孵育体系进行 II 相代谢实验中,在 UGT1A1 组、UGT1A7 组、UGT1A8 组、UGT1A9 组、UGT1A10 组和 UGT2B7 组均检测到 *trans*-SG 的葡糖醛酸结合产物 ( $m/z$  581.151 2) (图 3),并检测到 *trans*-SG 含量相对于对照组有所减少 (图 4A)。其中,UGT1A1 组检测到 3 个葡糖醛酸结合产物;UGT1A7 组、UGT1A9 组和 UGT1A10 组均检测到 2 个葡糖醛酸结合产物;UGT1A8 和 UGT2B7 组均检测到 1 个葡糖醛酸结合产物,结果见图 3。根据生成代谢物的相对丰度,各 UGT 亚型所起的代谢作用比例为:UGT1A9 > UGT1A1 > UGT1A7 > UGT1A10 > UGT2B7 > UGT1A8,结果见图 4B。提示 *trans*-SG 可通过 UGT 酶发生 II 相代谢,主要参与代谢的亚型为 UGT1A9、UGT1A1 和 UGT1A7。

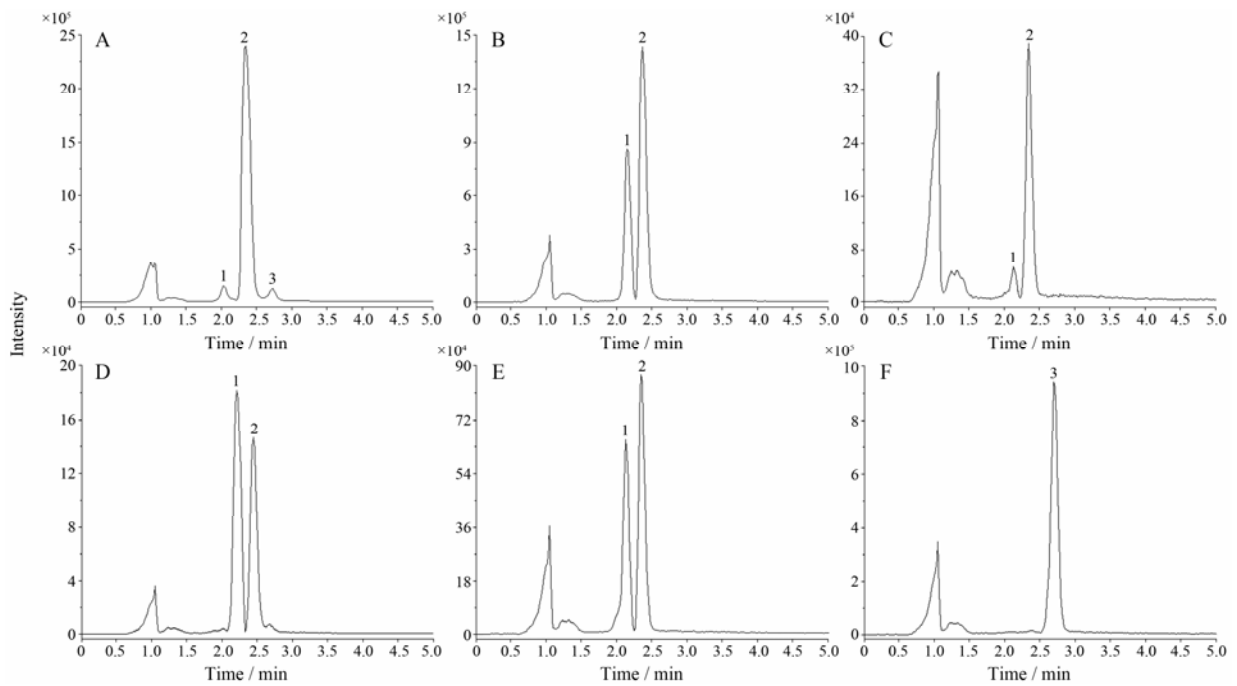


**Figure 2** Influence of co-treatment with lipopolysaccharide (LPS), *trans*-SG and ketoconazole (KT) on plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities. LPS represents lipopolysaccharide-treated group; *trans*-SG represents *trans*-SG-treated group; KT represents ketoconazole-treated group; KT+LPS represents co-treatment with KT and LPS; *trans*-SG+LPS represents co-treatment with *trans*-SG and LPS; *trans*-SG+LPS+KT represents co-treatment with *trans*-SG, LPS and KT. For LPS-treated groups, group served as a model group.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs *trans*-SG+LPS group

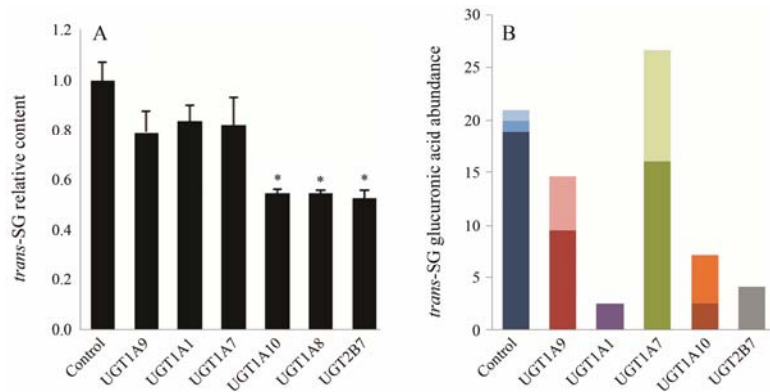
## 讨论

课题组前期研究发现,肝脏免疫异常活化或应激态是何首乌肝损伤的重要易感因素之一<sup>[6-8]</sup>。然而,代谢因素是否也影响何首乌肝损伤的发生风险,尚缺少评价研究。本文采用给药剂量为  $31 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  来评价 *trans*-SG 特异质肝损伤情况。中国药典规定,制何首乌临床用量不超过 12 g,其中 *trans*-SG 含量不少于 0.70%,大鼠给药剂量为  $31 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,按体表面积折算成体重为 70 kg 的人的等效剂量为 344 mg,以制何首乌药材中 *trans*-SG 含量为 0.70% 折算,相当于制何首乌药材 49 g,为药典规定最高剂量 (12 g) 的 4 倍。实验结果表明,在  $31 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量下,单独给 *trans*-SG 的正常动物和 LPS 易感模型大鼠均未引起肝损伤 ( $P > 0.05$ ),提示在没有改变代谢因素情况下,即使在 LPS 易感模型内,*trans*-SG 也不会引起肝损伤。然而,采用酮康唑抑制 II 相代谢酶后,  $31 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  *trans*-SG 在 LPS 易感模型内引起肝损伤 ( $P < 0.05$ ),提示抑制 II 相代谢可增加 *trans*-SG 的肝损伤风险。

代谢酶抑制剂苯基咪唑的剂量可能对肝损伤评价有影响,故预实验中参考文献剂量,考察了苯基咪唑高、低 2 个剂量 ( $20$  和  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),结果显示,与正常组相比,LPS 组、正常动物苯基咪唑低剂量组、正常动物苯基咪唑高剂量组、LPS+苯基咪唑  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组的 ALT、AST 水平均没有明显差异;而 LPS+苯基咪唑  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组的 ALT、AST 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ),提示苯基咪唑  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  对 LPS 模型动物肝损伤指标有影响,将可能影响后面与



**Figure 3** *trans*-SG metabolism in phase II of human uridine diphosphate glucuronate transferase (UGT) isoenzymes. A: Sample of *m/z* 581.15 in UGT1A1 group; B: Sample of *m/z* 581.15 in UGT1A7 group; C: Sample of *m/z* 581.15 in UGT1A8 group; D: Sample of *m/z* 581.15 in UGT1A9 group; E: Sample of *m/z* 581.15 in UGT1A10 group; F: Sample of *m/z* 581.15 in UGT2B7 group. Peak 1, 2, 3 respectively represent different *trans*-SG metabolites (glucuronic acid conjugates)



**Figure 4** *trans*-SG metabolism and the glucuronic acid conjugates in phase II of 6 human UGT isoenzymes groups. A: The relative content (%) of *trans*-SG in 6 human UGT isoenzymes groups after incubation vs control group; B: The abundance ratio of the glucuronic acid conjugates of *trans*-SG in 6 human UGT isoenzymes groups after incubation. Different colors represent different conjugates. Calculation method of relative ratio of metabolic capacity for 6 subtypes: take the minimum peak area of *m/z* 581.15 catalyzed by UGT 1A10 as 1, calculate the relative peak value of *m/z* 581.15 catalyzed by 6 subtypes comparing with the minimum peak area of *m/z* 581.15, then add the relative peak value of each subtypes separately

*trans*-SG 联用的肝损伤考察。因此, 本文选择苯基咪唑  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  作为正式实验的给药剂量。酮康唑的剂量选取是参考文献<sup>[15]</sup>, 并且对其进行浓度摸索, 最后锁定为  $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (文献为小鼠给药剂量  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 换算成大鼠为  $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。文献中提到酮康唑  $50$  和  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (换算成大鼠给药剂量分别为  $35$  和  $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 是安全的, 为了确定最佳给药浓度, 预实验中选取  $35$  和  $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  两个剂量对酮康唑的给药剂量进行摸索。结果发现各组 ALT 水平与

正常组相比没有明显差异; 但  $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组大鼠的 AST 水平与正常组相比显著升高 ( $P < 0.01$ ), 提示  $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  酮康唑对大鼠肝损伤指标有一定影响。因此, 最终选择酮康唑  $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  作为正式实验的给药剂量。

上述 I 相和 II 相代谢的不同影响规律, 可能与 *trans*-SG 的多羟基二苯乙烯结构特点和代谢途径有关。为此, 作者进一步考察了 I 相和 II 相代谢酶对 *trans*-SG 的代谢情况。体外肝微粒体 I 相代谢实验

结果表明, 孵育后 *trans*-SG 含量未下降, 未检测到 *trans*-SG 的代谢产物, 提示 *trans*-SG 可能不是主要通过 CYP450 酶代谢, 这一结果可以解释动物实验中 I 相代谢酶抑制剂苜蓿咪唑并未影响 *trans*-SG 的肝损伤作用。采用人重组 UGT 同工酶孵育体系进行 II 相代谢实验, 检测到多个 *trans*-SG 葡糖醛酸结合产物, 在所考察的 12 种 UGT 亚型中发现了 UGT1A1 等 6 种亚型具有 II 相代谢 *trans*-SG 的能力, 这一结果可以解释动物实验中 II 相代谢酶抑制剂酮康唑显著增加了 *trans*-SG 的肝损伤作用, 即酮康唑抑制 II 相代谢酶导致 *trans*-SG 代谢清除减慢, 故增加了 *trans*-SG 肝损伤作用。

上述结果提示, 何首乌中主要成分 *trans*-SG 主要通过 UGT 介导的 II 相代谢, 抑制药物 II 相代谢酶可增加 *trans*-SG 潜在的肝损伤风险。进一步提示何首乌如果与具有 II 相代谢酶抑制作用的药物配伍使用, 可能增加临床肝损伤发生风险; 而对于存在 II 相代谢酶基因多态性差异或功能低下的患者, 可能同样存在临床肝损伤风险增高的问题。因此, 何首乌临床应用时应综合考虑代谢相关的易感因素和药物配伍禁忌。

## References

- [1] Ma J, Zheng L, He YS, et al. Hepatotoxic assessment of Polygoni Multiflori Radix extract and toxicokinetic study of stilbene glucoside and anthraquinones in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 61–68.
- [2] Lei X, Chen J, Ren J, et al. Liver damage associated with *Polygonum multiflorum* Thunb.: a systematic review of case reports and case series [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. DOI: 10.1155/2015/459749.
- [3] Dong H, Slain D, Cheng J, et al. Eighteen cases of liver injury following ingestion of *Polygonum multiflorum* [J]. *Complement Ther Med*, 2014, 22: 70–74.
- [4] Banarova A, Koller T, Payer J. Toxic hepatitis induced by *Polygonum multiflorum* [J]. *Vnitr Lek*, 2012, 58: 958–962.
- [5] Jung KA, Min HJ, Yoo SS, et al. Drug-induced liver injury: twenty five cases of acute hepatitis following ingestion of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Gut Liver*, 2011, 5: 493–499.
- [6] Zhu Y, Liu SH, Wang JB, et al. Clinical analysis of drug-induced liver injury caused by *Polygonum multiflorum* and its preparations [J]. *Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志)*, 2015, 35: 1442–1447.
- [7] Li CY, Li XF, Tu C, et al. The idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum* based on endotoxin model [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 28–33.
- [8] Li XF, Li N, Tu C, et al. Comparison of crude and prepared *Polygonum multiflorum*-induced idiosyncratic hepatotoxicity based on lipopolysaccharide model [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2015, 46: 1481–1486.
- [9] Steven BY, Umesh MH, Bryan LC, et al. Endothelial cell injury and coagulation system activation during synergistic hepatotoxicity from monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide coexposure [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 74: 203–214.
- [10] Wang JB, Cui HR, Bai ZF, et al. Precision medicine-oriented safety assessment strategy for traditional Chinese medicines: disease-syndrome-based toxicology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1681–1688.
- [11] Tujios S, Fontana RJ. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8: 202–211.
- [12] Li CY, Niu M, Bai ZF, et al. Screening for main components associated with the idiosyncratic hepatotoxicity of a tonic herb *Polygonum multiflorum* [J]. *Front Med*, 2017. DOI: 10.1007/s11684-017-0508-9.
- [13] Li N, Ma ZJ, Meng YK, et al. Research of inhibition rate and influential factors on normal human liver cell line caused by 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-*O*-glucoside [J]. *Chin J Pharmacovigil (中国药物警戒)*, 2015, 12: 385–388.
- [14] Sun JH, Zhang LT, Wang CY, et al. Study on the metabolite of stilbene glucoside in mice by liquid chromatography tandem-mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2003, 38: 968–970.
- [15] Ding ZF, Jia FL, Ruan M, et al. Protective effects of ketoconazole against cocaine-induced hepatotoxicity in mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2006, 20: 399–404.