

## 五酯片不同给药间隔抵抗扑热息痛所致肝损伤的作用及机制研究

徐乐千<sup>#</sup>, 周艳莹<sup>#</sup>, 姜伊鸣, 邢云惠, 黄 民, 毕惠嫦<sup>\*</sup>

(中山大学药学院, 药物代谢与药动学实验室, 广东 广州 510006)

**摘要:** 扑热息痛 (paracetamol) 又称对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP), 其导致的药源性肝损伤在世界范围内普遍存在。五酯片 (南五味子醇浸膏, Wuzhi Tablet, WZ) 是临床上常用的护肝药。作者前期研究表明, WZ 预处理三天后与 APAP 同时给药可抵抗 APAP 所致肝损伤, 但单次给予 WZ 与 APAP 不同给药间隔对肝损伤的作用及机制尚不清楚。本文研究了单次给予 WZ 与 APAP 不同间隔给药后的肝损伤指标变化、APAP 代谢物生成情况和细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 代谢酶活性, 考察了 WZ 单次不同给药间隔抵抗 APAP 所致肝损伤的作用及机制。动物实验经中山大学动物伦理委员会审核通过。结果表明, 单次给予 WZ 0、0.5 及 2 h 后再给予 APAP, 均可显著减轻 APAP 所致肝损伤, 其机制为抑制 CYP450 酶介导的 APAP 代谢激活, 减少 APAP 毒性代谢物的生成。本研究进一步确证了 WZ 与 APAP 间隔 0、0.5 及 2 h 给药具有显著抵抗 APAP 所致肝损伤的作用, WZ 通过抑制 APAP 代谢激活相关的 CYP450 酶活性, 从而抵抗 APAP 所致肝损伤, 为五酯片防治 APAP 所致肝损伤提供新数据。

**关键词:** 五酯片; 对乙酰氨基酚; 药源性肝损伤; 给药间隔; CYP450 代谢酶

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)04-1147-08

## Wuzhi Tablet protects against APAP-induced liver injury at different pretreated intervals in mice

XU Le-qian<sup>#</sup>, ZHOU Yan-ying<sup>#</sup>, JIANG Yi-ming, XING Yun-hui, HUANG Min, BI Hui-chang<sup>\*</sup>

(Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Acetaminophen (APAP, also known as paracetamol)-induced liver injury is the leading cause of drug-induced liver injury in the world. Wuzhi Tablet (WZ, an ethanol extract of *Schisandra sphenanthera*) is widely used in clinical practice to protect liver function. Our previous studies have shown that pretreatment with WZ for 3 days can significantly protect against APAP-induced liver injury; however, the effect of different intervals between APAP and WZ treatment on APAP-induced liver injury remains unclear. In this study, the change in liver injury indexes, APAP metabolites, and the activity of cytochrome P450 (CYP450) enzymes after treatment with WZ and APAP at different intervals were determined. The animal experiment was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of Sun Yat-sen University. The results show that 0 h, 0.5 h, and 2 h pretreatment with WZ significantly protected against APAP-induced liver injury in mice, as evidenced by a significant decrease in biochemical parameters such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and malonaldehyde (MDA). WZ inhibited the metabolic activation of APAP mediated by CYP450 enzymes and reduced the formation of APAP metabolites. This study further demonstrates that pretreatment with WZ at different intervals (0 h, 0.5 h, and 2 h before APAP dosing) exerts a significant hepatoprotective effect against APAP-induced liver injury, and a single-dose

收稿日期: 2021-03-11; 修回日期: 2021-03-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973392, 82025034).

<sup>#</sup>共同第一作者.

<sup>\*</sup>通讯作者 Tel: 86-20-39943470, Fax: 86-20-39943000, E-mail: bihchang@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0361

of WZ inhibits the activity of CYP450 enzymes related to APAP metabolic activation, thereby protecting against APAP-induced hepatotoxicity.

**Key words:** Wuzhi Tablet; acetaminophen; drug-induced liver injury; dosing interval; CYP450 enzyme

扑热息痛 (paracetamol) 又称对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP), 是世界范围内广泛使用的解热镇痛药, 在常规剂量 ( $< 4 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 内安全有效, 但过量服用可能导致严重肝损伤, 甚至死亡<sup>[1]</sup>。APAP所致肝损伤是药源性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI)<sup>[2]</sup>和急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF)<sup>[3]</sup>的主要来源。其导致肝损伤的作用机制为细胞色素 P450 酶 [cytochrome P450, CYP450, 主要为 CYP2E1 和 CYP3A4 (小鼠 CYP3A11)] 介导 APAP 代谢激活, 生成毒性中间体 *N*-乙酰对苯醌亚胺 (*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine, NAPQI), 与肝脏内源性谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 结合生成 APAP-GSH 复合物, 使 GSH 耗竭, 最终导致肝细胞坏死<sup>[4]</sup>。APAP-GSH 复合物最终代谢为 APAP-半胱氨酸复合物 (APAP-cysteiny, APAP-CYS) 和 APAP-*N*-乙酰半胱氨酸复合物 (APAP-*N*-acetylcysteiny, APAP-NAC)<sup>[5]</sup>。抑制 APAP 的代谢激活是抵抗 APAP 所致肝损伤的主要防治策略之一。研究表明, 敲除 APAP 代谢相关 CYP450 酶<sup>[6]</sup>或给予 CYP450 酶抑制剂<sup>[7,8]</sup>均可减少 APAP 代谢激活, 从而抵抗 APAP 所致肝损伤。

五酯片 (Wuzhi Tablet, WZ) 是传统中药南五味子的醇浸膏制剂, 主要活性成分为联苯环辛烯类木脂素<sup>[9]</sup>, 临床上作为护肝中药用于肝炎及各种肝损伤的治疗。作者前期研究<sup>[10-14]</sup>显示, WZ 及五味子醇乙等木脂素类活性单体均可显著预防和治疗 APAP 所致肝损伤。相关机制包括: 抑制 CYP450 酶活性从而抑制 APAP 代谢激活、调控核因子红细胞系相关因子-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 通路从而抗氧化应激、促进肝再生等。由于代谢酶抑制作用与抑制剂浓度密切相关, 因此, WZ 与代谢酶底物药物的不同给药时间间隔对 CYP3A4 等代谢酶活性的抑制作用可能会有差异, 从而导致对底物药物代谢过程产生不同的影响。前期研究<sup>[15]</sup>发现, 单次灌胃给予 WZ ( $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 0、0.5、2 h 后再灌胃给予他克莫司 (CYP3A4 底物药物), 可分别使他克莫司的 AUC 升高 1.76、1.26、2.48 倍, 表明 WZ 与底物药物给药间隔的不同造成对代谢酶活性抑制程度不同, 因而对他克莫司的代谢和血药浓度产生不同程度的影响。基于此, 作者推测 WZ 与 APAP 的不同给药间隔, 也可能由于 WZ 对代谢酶抑制作用程度的差异, 从而对 APAP 代谢激活及其所致肝损伤产生不同程度的影响。

本研究采用 APAP 所致小鼠肝损伤模型, 通过考察 WZ 与 APAP 不同间隔给药后, 其肝损伤指标变化、APAP 代谢物生成情况和 APAP 代谢激活相关 CYP450 酶活性, 研究 WZ 不同预处理时间抵抗 APAP 所致肝损伤的作用及机制, 为临床应用 WZ 防治 APAP 所致肝损伤提供更多数据。

## 材料与方法

**药品和试剂** APAP (美国 Sigma 公司); 五酯片 (广西方略药业集团有限公司); 通用型组织固定液 (武汉塞维尔生物科技有限公司); 氢氧化钠 (上海阿拉丁公司); 丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 测定试剂盒、微量 GSH 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 甲醇、甲酸 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司); APAP-NAC、APAP-CYS、6-羟基氯唑沙宗 (6-OH-chlorzoxazone, 6-OH-CHL)、氧化硝苯地平 (oxidized nifedipine-*d*<sub>6</sub>, DNIF)、酮康唑 (ketoconazole, KET) (加拿大 Toronto Research Chemicals 公司); 对氨基苯甲酸 (4-aminobenzoic acid, PABA)、4-甲基吡唑 (4-methylpyrazole, 4-ME)、氯唑沙宗 (chlorzoxazone, CHL)、硝苯地平 (nifedipine, NIF)、还原型辅酶 II 四钠盐 (NADPH) (上海源叶生物有限公司); 氯雷他定 (loratadine, LOR) (大连美仑生物有限公司); RIPA 裂解液 (上海博彩生物科技有限公司); Anti-CYP3A11 (武汉爱博泰克生物科技有限公司); Anti-CYP2E1 (上海生工生物工程有限公司); Anti-GAPDH、Anti-rabbit IgG-HRP (美国 Cell Signaling Technology 公司); 组织线粒体分离试剂盒、loading buffer (上海碧云天生物技术有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒、预染蛋白 marker (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ECL 显影试剂盒 (北京恩格英生物技术有限公司)。

**仪器** Ultimate 3000 UPLC 系统、TSQ Quantum Access 系统、Multiskan Go 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); Pre-cellys24 多功能样本均质仪 (法国 Bertin 公司); 5417R 低温高速离心机、微量移液器 (德国 Eppendorf 公司); 低温超高速离心机 (美国 Beckman 公司); AE260 电子天平 (美国 Mettler Toledo 公司); RM2016 切片机 (德国 Leica 公司); CX48 生物显微镜 (日本 Olympus 公司); Mini-Protein3 电泳系统、Mini Trans-Blot 转移系统 (美国 Bio Rad 公司); Image Quantity LAS 4000 成像仪 (美

国 General Electric 公司)。

**实验动物** C57BL/6 雄性小鼠, 6~8 周龄, 由广东省医学实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK (粤) 2018-0002, 使用许可证号: SYXK (粤) 2018-0002; 饲养于中山大学 (东校园) 实验动物中心 SPF 级环境, 温度 22~24 °C, 湿度 55%~60%, 光照循环 12 h, 自由摄取水和食物, 实验前 12 h 禁食, 不禁水。动物实验经中山大学动物伦理委员会审核通过 (批准号: 东-C2020-000035XS)。

**动物分组与给药** 小鼠随机分为 4 组, 即 APAP 对照组 (saline + APAP)、WZ 间隔 0 h 组 (WZ + APAP 0 h)、WZ 间隔 0.5 h 组 (WZ + APAP 0.5 h) 及 WZ 间隔 2 h 组 (WZ + APAP 2 h)。

取 WZ 研细, 精密称取适量粉末, 加入生理盐水溶解, 超声处理 10 min, 制得 35 mg·mL<sup>-1</sup> WZ 灌胃混悬液 (灌胃体积为 0.02 mL·g<sup>-1</sup>, 剂量为 700 mg·kg<sup>-1</sup>)。取 APAP 粉末适量于温水中溶解, 加入适量氢氧化钠溶液 (2 mol·L<sup>-1</sup>) 调节至 pH 10 左右, 制得 40 mg·mL<sup>-1</sup> APAP 溶液 (腹腔注射体积为 0.01 mL·g<sup>-1</sup>, 剂量为 400 mg·kg<sup>-1</sup>)。各 WZ 间隔组 (WZ + APAP 0、0.5、2 h) 分别在单次灌胃 WZ 混悬液 0、0.5 和 2 h 后, 腹腔注射 APAP 溶液。APAP 对照组 (生理盐水 + APAP) 单次灌胃生理盐水后, 腹腔注射 APAP 溶液。各组小鼠在给予 APAP 6 h 后, 摘眼球取血, 颈椎脱臼处死, 解剖并收取肝脏。

**组织切片染色及观察** 肝脏组织于固定液中固定 24 h 以上, 脱水后石蜡包埋, 厚度约 3 μm, 60 °C 烘片后脱蜡, 0.5% 伊红-苏木素染色, 梯度酒精脱水, 树脂封片。显微镜观察及拍照。

**测定血清转氨酶水平** 血液室温静置 30 min, 于 3 500 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 10 min, 取得血清。送样广东省医学实验动物中心生化检测室检测丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 及天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平。

**测定肝脏组织总 MDA、总 GSH 和线粒体 GSH 水平** 称取肝组织约 50 mg 于匀浆管中, 加入生理盐水 500 μL 匀浆, 然后 3 500 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 10 min。按线粒体分离试剂盒操作, 制得肝脏组织线粒体裂解液。按 MDA 和 GSH 试剂盒说明书, 使用硫代巴比妥酸法和二硫代二硝基苯甲酸法, 测定肝脏组织总 MDA、总 GSH 水平和线粒体 GSH 水平。

**血清样品处理** 取血清 5 μL, 加入内标 PABA 溶液 (2 μg·mL<sup>-1</sup>) 10 μL 和甲醇 85 μL, 涡旋 10 min, 置于 -20 °C 冰箱冷冻静置 20 min, 15 000 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 15 min, 取上清 20 μL, 加入 0.1% 甲酸水溶液 980 μL 稀释, 充分涡旋混匀, 15 000 r·min<sup>-1</sup>、4 °C 离心 10 min, 取

上清待测。

**HPLC-MS/MS 方法测定血清 APAP 代谢物水平** 建立血清中 APAP 代谢物 APAP-CYS 和 APAP-NAC 的 HPLC-MS/MS 检测分析方法。色谱条件: 选用 Thermo Fisher Scientific 的 Hypurity C18 (150 mm×2.1 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温为 40 °C; 流动相为甲醇: 0.1% 甲酸-水 (80:20), 等梯度洗脱; 流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 扫描时间为 5 min; 进样量为 10 μL, 进样器温度为 15 °C。质谱条件: 离子源为电喷雾离子源, 喷雾正电压为 2 500 V, 毛细管温度为 350 °C; 离子检测方式为选择反应监测, 定量监测分析的离子对分别为 APAP-NAC, [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 312.90→207.80; APAP-CYS, [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* 271.00→139.90; PABA, [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 138.10→120.00。配制系列浓度范围的 APAP-CYS (30 000、15 000、7 500、3 750、1 875、937.5、468.75 和 234.375 ng·mL<sup>-1</sup>) 和 APAP-NAC (2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 ng·mL<sup>-1</sup>) 标准曲线样品, 加入内标 PABA 溶液 (2 μg·mL<sup>-1</sup>) 10 μL, 于 HPLC-MS/MS 系统测得 APAP-CYS 和 APAP-NAC 的标准曲线。待测样品按上述血清样品处理方法处理, 于 HPLC-MS/MS 系统测定 APAP 代谢物水平。

**肝微粒体提取** 小鼠断头处死, 摘取肝脏, 使用 4 °C 预冷蔗糖溶液漂洗, 加入肝重 2 倍体积蔗糖溶液, 冰上手动匀浆, 16 000 ×g、4 °C 离心 20 min, 上清置于超高速离心管中, 100 000 ×g、4 °C 离心 60 min。弃上清, 焦磷酸钾溶液清洗沉淀, 100 000 ×g、4 °C 离心 60 min。弃上清, Tris-HCl 缓冲液重悬后进行蛋白定量, 制得小鼠肝微粒体蛋白。

**WZ 提取物溶液制备** 按已建立方法<sup>[10]</sup>制备 WZ 提取物溶液, 取 WZ 研细, 精密称取适量粉末, 加 100 倍体积无水乙醇混匀后超声 60 min, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液; 残渣重复上述过程, 合并 2 次上清并挥干溶剂, 加入适量 DMSO 溶解, 制得 0.125、0.25 和 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 WZ 提取物溶液。

**肝微粒体孵育及样品处理** 按已建立方法<sup>[10]</sup>制备肝微粒体孵育体系, 含小鼠肝微粒体蛋白和混合探针底物 (CHL 和 NIF), 阳性对照组加入 KET 及 4-ME, 空白组加入甲醇, 给药组加入 WZ 提取物溶液 (0.125、0.25 和 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>)。体系于 37 °C 水浴预孵育, 加入 NADPH 启动反应, 37 °C 水浴孵育 20 min, 加入冰乙酸乙酯终止反应。加入内标 LOR 溶液 (2 μg·mL<sup>-1</sup>) 10 μL, 旋涡振荡 2 min, 静置 10 min, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 转移上清并挥干有机溶剂。进样前, 加入 80% 甲醇水溶液 200 μL 复溶, 加入内标 LOR 溶液 (2 μg·mL<sup>-1</sup>) 10 μL, 涡旋振荡 1 min, 16 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 制得进样样品。

**HPLC-MS/MS 方法测定 CYP450 酶活性** 建立肝微粒体孵育体系中探针底物代谢物 6-OH-CHL 和 DNIF 的 HPLC-MS/MS 检测分析方法。色谱条件: 选用 Waters 的 Xetra C18 (100 mm×2.1 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温为 40 °C; 流动相为甲醇: 0.1% 甲酸-水 (70:30), 等梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 分析时间为 3.5 min; 进样量为 10 μL, 进样器温度为 15 °C。质谱条件: 离子源为电喷雾离子源, 喷雾正电压为 3 500 V, 喷雾负电压为 2 500 V, 毛细管温度为 350 °C; 离子检测方式为选择反应监测, 定量监测分析的离子对分别为 6-OH-CHL, [M-H]<sup>-</sup>, *m/z* 184.107→120.20; DNIF, [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 345.132→284.107; LOR, [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 382.00→266.00。配制系列浓度范围的 6-OH-CHL (6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 和 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 DNIF (4、2、1、0.5、0.25、0.125 和 0.062 5 μmol·L<sup>-1</sup>) 标准曲线样品, 加入内标 LOR 溶液 (2 μg·mL<sup>-1</sup>) 10 μL, 于 HPLC-MS/MS 系统测得 6-OH-CHL 和 DNIF 的标准曲线。进样样品于 HPLC-MS/MS 系统测定肝微粒体孵育样品中探针代谢物含量, 计算 CYP450 酶活性。

**Western blot 测定 CYP450 蛋白水平** 按文献<sup>[16]</sup>方法, 取小鼠肝组织加入 RIPA 裂解液 (含苯甲基磺酰氟) 匀浆, 用 BCA 试剂盒测定并调整各组匀浆蛋白浓度, 加入 loading buffer, 95 °C 水浴使蛋白变性。进行 SDS-PAGE 电泳和转膜, 5% 脱脂牛奶封闭后孵育一抗 (Anti-CYP2E1 1:1 000、Anti-CYP3A11 1:1 000、Anti-GAPDH 1:2 000) 4 °C 过夜, 次日孵育二抗 (Anti-rabbit IgG-HRP 1:2 000) 后显影。使用 ImageJ 软件扫描条带灰度值, 计算相对蛋白表达水平。

**统计学方法** 本实验各项数据以 mean ± S.E.M. 表示, 使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析, 采用 unpaired Student's *t*-test 检验比较各间隔组与对照组的组间差异。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 结果

### 1 WZ 不同给药间隔抵抗 APAP 所致肝损伤的作用

小鼠肝脏切片 H&E 染色结果如图 1A 所示。APAP 对照组各中央静脉区出现肝细胞融合性坏死, 肝小叶间出现肝细胞桥接样坏死, 表明 APAP 造模导致小鼠肝组织严重损伤; WZ 间隔给药各组肝细胞坏死区域显著缩小, 肝组织损伤程度较 APAP 对照组均显著减轻。血清转氨酶水平变化如图 1B 所示。与 APAP 对照组相比, WZ 间隔给药各组血清转氨酶水平均显著下降 (P < 0.01); 其中间隔 0.5 h 组转氨酶水平下降最显著, ALT 和 AST 水平分别降低至 1 400 ± 337.9 U·L<sup>-1</sup> (-60.25%, P < 0.001) 及 968.4 ± 134.3 U·L<sup>-1</sup> (-60.97%,

P < 0.001)。肝脏总 MDA 水平变化如图 1C 变化所示。相较 APAP 对照组, WZ 间隔给药各组肝脏总 MDA 水平均显著下降 (P < 0.05); 其中间隔 0.5 h 组降低 MDA 水平最显著, 相较对照组下降了 39.07% (P < 0.01)。肝脏总 GSH 和线粒体 GSH 水平变化如图 1D 所示。除 WZ 间隔 0 h 组的总 GSH 无显著变化外, 其他 WZ 间隔给药各组总 GSH 和线粒体 GSH 水平相较 APAP 对照组均显著上升 (P < 0.05); 其中间隔 0.5 h 组减轻 GSH 耗竭最显著, 其总 GSH 和线粒体 GSH 水平相较对照组上升至 16.10 ± 0.91 μmol·g<sup>-1</sup> (+63.85%, P < 0.01) 及 9.30 ± 0.65 μmol·g<sup>-1</sup> (+37.92%, P < 0.01)。结果表明, WZ 不同给药间隔均起到保护 APAP 所致肝损伤的作用, 其中间隔 0.5 h (即 APAP 给药前 0.5 h 给予 WZ) 的保护效果最显著。

### 2 WZ 不同给药间隔对 APAP 代谢物的影响

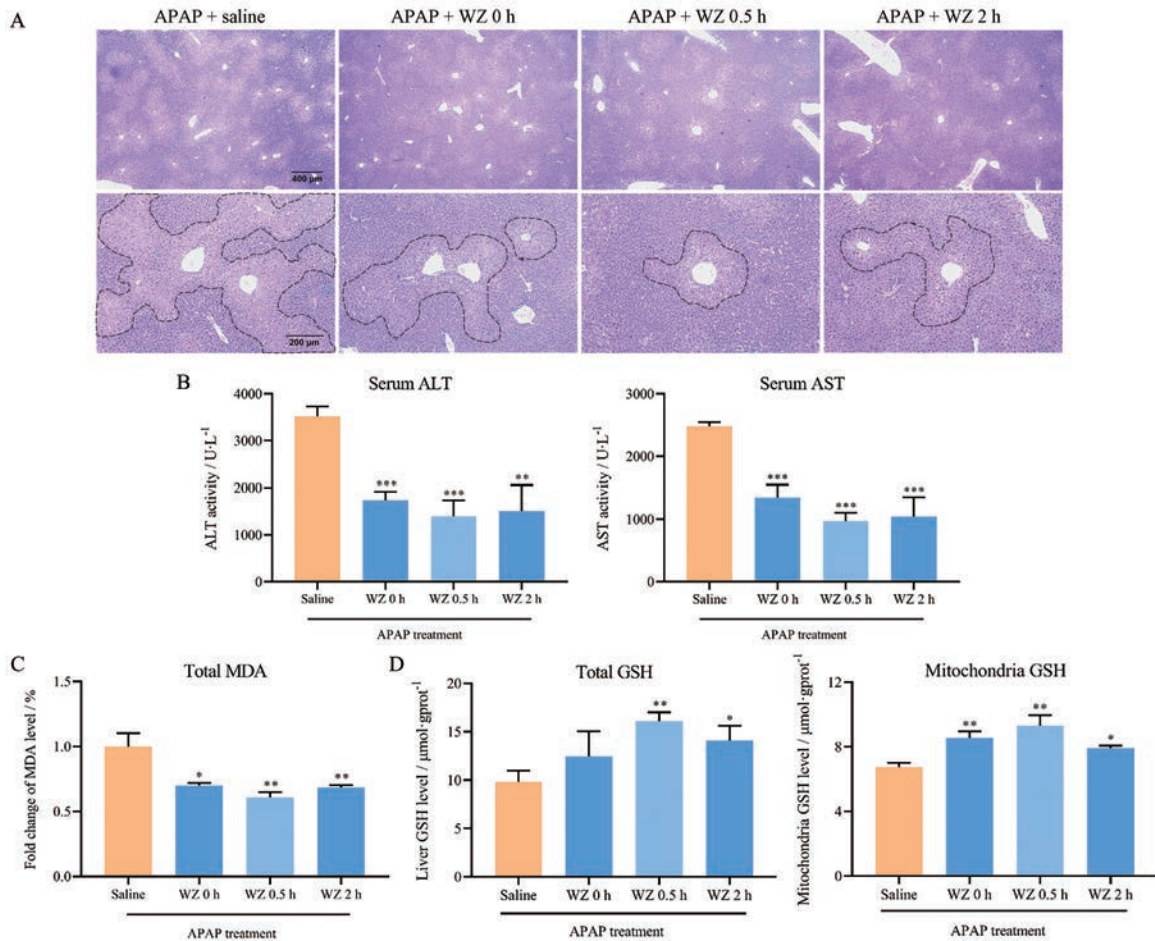
小鼠血清 APAP 代谢物 APAP-CYS 和 APAP-NAC 水平变化分别如图 2A 和 2B 所示。除间隔 0 h 组 APAP-CYS 外, WZ 预处理间隔给药各组血清 APAP-CYS、APAP-NAC 水平相较 APAP 对照组均显著降低 (P < 0.05); 其中间隔 2 h 组的 APAP 代谢物水平降低最显著, APAP-CYS 和 APAP-NAC 水平分别降低至 5 588 ± 552.4 ng·mL<sup>-1</sup> (-47.80%, P < 0.01) 及 186.3 ± 18.41 ng·mL<sup>-1</sup> (-62.30%, P < 0.01)。结果表明, WZ 不同预处理给药间隔均显著降低了 APAP 代谢物水平, 其中 WZ 预处理 2 h 后 APAP 造模的代谢物水平降低最显著。

### 3 WZ 抑制 CYP450 酶活性

WZ 提取物溶液与小鼠肝微粒体共孵育后, APAP 代谢相关 CYP450 酶 CYP2E1 及 CYP3A11 活性变化如图 3 所示。CYP2E1 及 CYP3A11 阳性抑制剂 4-ME 及 KET 均显著降低了探针底物代谢物水平, 表明 4-ME 和 KET 显著抑制了 CYP2E1 和 CYP3A11 活性 (P < 0.001)。WZ 各浓度组均显著降低 CYP2E1 和 CYP3A11 探针底物代谢物水平, 表明 WZ 显著抑制 CYP2E1 和 CYP3A11 活性, 且呈明显的浓度依赖性, WZ 高浓度 (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) (P < 0.001) 的抑制效果相较于低浓度 (0.125 和 0.25 mg·mL<sup>-1</sup>) (P < 0.05) 更为显著。结果表明, WZ 对 APAP 代谢酶 CYP2E1 和 CYP3A11 有显著抑制作用, 且呈明显的浓度依赖性。

### 4 WZ 不同给药间隔下调 CYP450 酶蛋白水平

小鼠肝脏 APAP 代谢酶 CYP2E1 和 CYP3A11 的蛋白水平变化如图 4 所示。WZ 间隔给药各组小鼠肝脏 CYP2E1 和 CYP3A11 蛋白水平较 APAP 对照组均显著下调 (P < 0.05); 其中 WZ 间隔 0.5 h 组下调最显著 (P < 0.01), CYP2E1 和 CYP3A11 蛋白水平分别为对照组的 54.62% 和 54.63%。结果表明, WZ 不同预处理给药间



**Figure 1** Pretreatment with WZ protects against APAP-induced hepatotoxicity in mice. Mice were pretreated with WZ at 0, 0.5, and 2 h before APAP exposure. A: Morphological photographs of liver section; B: Serum biochemical indexes; C: Liver total MDA level; D: Liver total GSH level and mitochondria GSH level. APAP: Acetaminophen; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; MDA: Malonaldehyde; GSH: Glutathione.  $n = 5$  or  $6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs the saline + APAP group

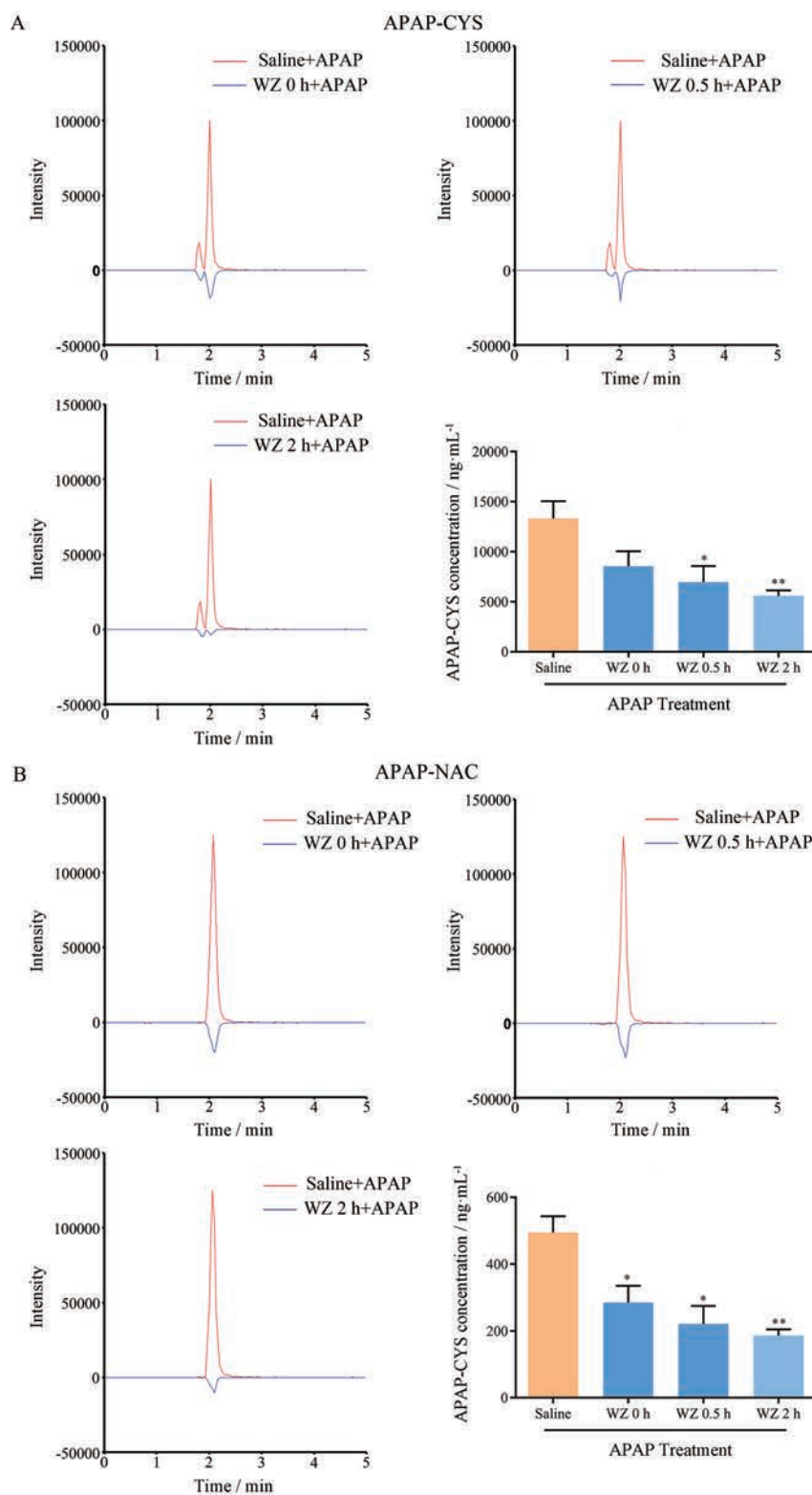
隔均显著下调了CYP450酶蛋白水平,且0.5 h时下调最显著。

## 讨论

作者此前在WZ抵抗APAP所致肝损伤的保护作用研究中,采用的给药方案是连续给予WZ三天,最后一次给药后间隔15 min给予APAP造模,阐明了WZ通过抑制代谢激活、抗氧化应激、促进肝修复等多种机制对APAP所致肝损伤的显著预防作用<sup>[10-13]</sup>。本研究重点考察单次不同间隔时间给予WZ进行预处理抵抗APAP所致肝损伤的作用,发现WZ预处理(0、0.5和2 h)均可以显著减轻APAP所致肝组织病理损伤,降低血清转氨酶、肝组织MDA的升高,减轻肝总GSH和线粒体GSH耗竭,从而发挥抵抗APAP所致肝损伤的作用。WZ上述给药方案均能发挥显著抵抗APAP肝损伤的作用,提示WZ抗APAP肝损伤是一个涉及多重作用机制协同发挥作用的复杂过程。

APAP过量后,经CYP450酶代谢激活生成毒性代谢产物NAPQI。因此抑制CYP450酶活性,进而抑制APAP代谢激活,是抵抗APAP所致肝损伤的重要策略之一。作者前期研究<sup>[17]</sup>显示,WZ可抑制CYP450酶,其机制包括竞争性抑制(与目标底物竞争CYP450酶,具有浓度依赖性)和不可逆抑制(与CYP450酶形成复合物,不可逆地抑制CYP450酶活性)。本研究确证了WZ可浓度依赖性抑制APAP代谢激活相关CYP450酶活性,从而减少APAP代谢物APAP-CYS、APAP-NAC的生成,抵抗APAP所致肝损伤。由于代谢酶抑制作用与抑制剂浓度密切相关,因此,WZ给药后不同时间其血药浓度不同从而抑制代谢酶活性的程度也不同,导致WZ对代谢酶底物药物的体内代谢和处置过程产生不同的影响<sup>[15]</sup>。

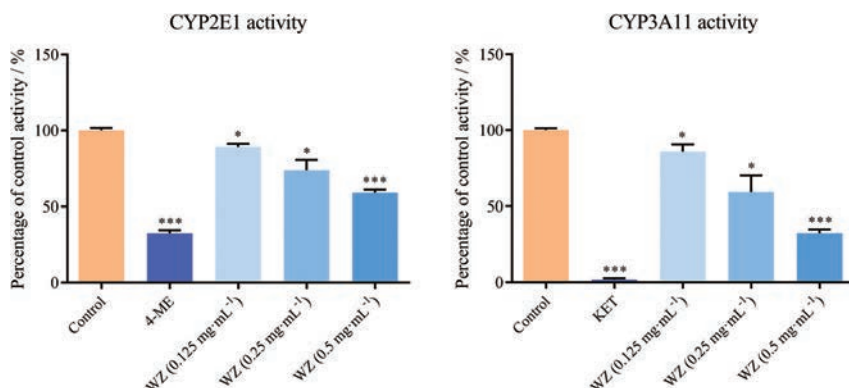
作者前期研究WZ与他克莫司(CYP3A4底物药物)相互作用时也发现不同给药间隔的类似影响。WZ中含量最高的三种成分五味子酯甲、五味子甲素



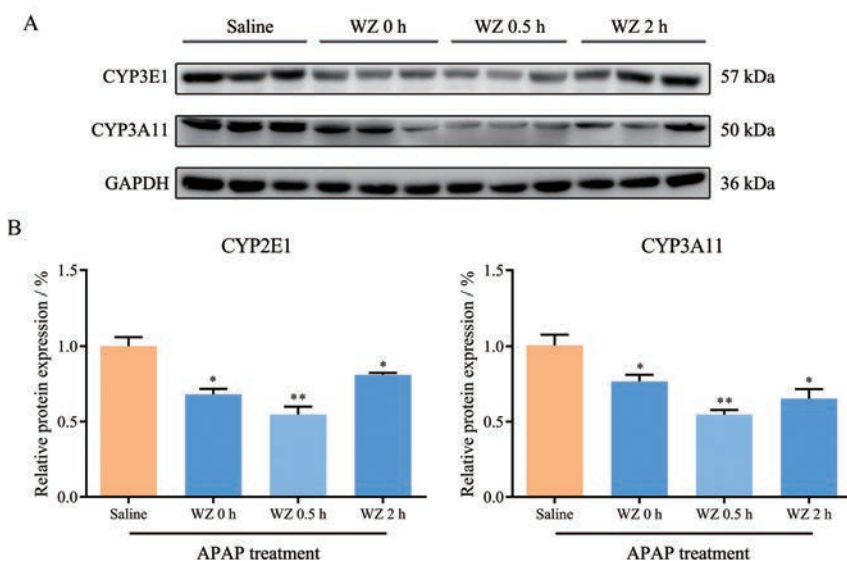
**Figure 2** Pretreatment with WZ reduces the production of APAP metabolites. Mice were pretreated with WZ at 0, 0.5, and 2 h before APAP exposure. A: APAP-CYS level; B: Serum APAP-NAC level. APAP-CYS: APAP-cysteiny; APAP-NAC: APAP-N-acetylcysteiny.  $n = 5$  or  $6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs the saline + APAP group

及五味子醇乙在大鼠体内的半衰期分别为  $2.79 \pm 1.51$ 、 $3.65 \pm 0.94$  及  $4.51 \pm 1.75$  h, 整体代谢消除较快<sup>[18]</sup>。进一步研究显示, WZ 与他克莫司的不同给药间隔, 会

不同程度影响 WZ 升高他克莫司血药浓度: 单次灌胃给予 WZ ( $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 0、0.5 和 2 h 后再灌胃给予他克莫司, 可使他克莫司的 AUC 分别升高 1.76、1.26 和



**Figure 3** WZ significantly inhibits the activities of CYP2E1 and CYP3A11 in mouse liver microsomes. CYPs: Cytochrome P450.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs the control group



**Figure 4** Pretreatment with WZ reduces CYPs protein expression. Mice were pretreated with WZ at 0, 0.5, and 2 h before APAP exposure. A: Western blots of target proteins; B: Grey scanning analysis of CYP2E1 and CYP3A11 blots.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs the saline + APAP group

2.48倍,表明WZ预处理时间的长短对代谢酶有不同影响,从而显著影响了他克莫司血药浓度<sup>[15]</sup>。基于不同给药间隔对WZ-他克莫司药物相互作用的影响,作者推测不同给药间隔对WZ-APAP相互作用有类似作用,从而影响WZ对APAP肝损伤的作用,因此,本研究着重考察了预处理给药间隔对WZ抵抗APAP肝损伤作用的影响。

本研究发现WZ与APPA间隔0、0.5和2 h给药均具有显著抵抗APAP所致肝损伤的作用,其中WZ预处理0.5 h组(即APAP造模0.5 h前给予WZ)逆转各项指标效果最为显著。作者此前曾考察了大鼠单次灌胃给予WZ(250 mg·kg<sup>-1</sup>)后,WZ中木脂素单体在各组织的分布,发现给药后0.25 h大鼠肝脏中可检测到五味子甲素、醇甲、醇乙、酯甲,且均为峰值,表明五味子甲素、醇甲、醇乙、酯甲灌胃后可以被迅速吸收至肝脏;给

药后0.25 h到1.5 h期间,这些木脂素单体在大鼠肝脏的浓度下降较快<sup>[19]</sup>。基于代谢激活在APAP所致肝损伤的重要作用及WZ对代谢激活相关代谢酶的抑制作用,作者推测可能是由于相较于同时给药或预处理后2 h,APAP造模前0.5 h给予WZ,此时WZ在肝脏的浓度较高,能充分抑制CYP450酶活性及其介导的代谢激活;相比之下,0 h(同时)给药时,WZ可能未完全到达肝脏,而2 h时肝脏中WZ木脂素单体浓度已开始下降,其肝药浓度低于0.5 h时,因此,WZ预处理0.5 h组(即APAP造模0.5 h前给予WZ)抵抗APAP所致肝损伤的效果稍优于同时给药组及预处理2 h组。但总体而言,由于WZ灌胃后迅速到达肝脏,且在2 h内血药及肝药浓度均较高,所以,无论是APAP与WZ同时给药,还是APAP造模前0.5 h或2 h给予WZ,均发挥抵抗APAP肝损伤的显著作用。

本研究还观察到, WZ 单次预处理给药显著下调了 CYP2E1 和 CYP3A11 的蛋白表达水平。作者此前研究发现, WZ 预处理三天后可逆转 APAP 所致的 CYP2E1 及 CYP3A11 蛋白水平下调<sup>[13]</sup>, 且 WZ 长期给药可诱导大鼠肝脏 CYP3A 蛋白表达<sup>[16]</sup>, 亦证明了 WZ 对 CYP3A 瞬时抑制、长期诱导的复杂作用。但本次研究仅为 WZ 单次给药, 故其对 CYP450 的诱导作用未能体现。因此, 本研究 WZ 单次预处理给药可下调 APAP 代谢激活相关 CYP2E1 和 CYP3A11 的蛋白水平和活性, 抑制 APAP 代谢激活, 从而抵抗 APAP 所致肝损伤。

综上所述, 本研究采用 APAP 所致小鼠急性肝损伤模型, 进一步确证了 WZ 通过抑制 CYP2E1 和 CYP3A11 等代谢酶活性、抑制 APAP 代谢激活, 从而抵抗 APAP 所致肝损伤的作用, 证明了 WZ 不同预处理给药间隔均显著抵抗 APAP 所致肝损伤, 但作用程度稍有差异。本研究结果为应用 WZ 预防和治疗 APAP 所致肝损伤提供更多数据和参考。

**作者贡献:** 徐乐千负责部分实验设计与实施、统计分析结果、撰写论文; 周艳莹负责部分实验设计与实施、统计分析结果、部分修订; 姜伊鸣负责部分指导实验; 邢云惠负责实验部分实验; 黄民与毕惠嫦负责研究思路的提出及实验设计、统筹指导实验、修订论文。

**利益冲突:** 本文所有作者之间不存在利益冲突。

## References

- [1] Schilling A, Corey R, Leonard M, et al. Acetaminophen: old drug, new warnings [J]. *Cleve Clin J Med*, 2010, 77: 19-27.
- [2] Katarey D, Verma S. Drug-induced liver injury [J]. *Clin Med (Lond)*, 2016, 16: 104-109.
- [3] Bernal W, Lee WM, Wendon J, et al. Acute liver failure: a curable disease by 2024? [J]. *J Hepatol*, 2015, 62: 112-120.
- [4] McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis [J]. *Pharm Res*, 2013, 30: 2174-2187.
- [5] Athersuch TJ, Antoine DJ, Boobis AR, et al. Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective [J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2018, 7: 347-357.
- [6] Gonzalez FJ. The use of gene knockout mice to unravel the mechanisms of toxicity and chemical carcinogenesis [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 120: 199-208.
- [7] Luo DD, Chen JF, Liu JJ, et al. Tetrahydrocurcumin and octahydrocurcumin, the primary and final hydrogenated metabolites of curcumin, possess superior hepatic-protective effect against acetaminophen-induced liver injury: role of CYP2E1 and Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 123: 349-362.
- [8] Wang YX, Du Y, Liu XF, et al. A hepatoprotection study of Radix Bupleuri on acetaminophen-induced liver injury based on CYP450 inhibition [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17: 517-524.
- [9] Szopa A, Ekiert R, Ekiert H. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies [J]. *Phytochem Rev*, 2017, 16: 195-218.
- [10] Jiang Y, Fan X, Wang Y, et al. Hepato-protective 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: 83-89.
- [11] 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.
- [12] Fan X, Chen P, Jiang Y, et al. Therapeutic efficacy of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on acetaminophen-induced hepatotoxicity through a mechanism distinct from *N*-acetylcysteine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43: 317-324.
- [13] Fan X, Jiang Y, 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.
- [14] Zhou Y, Fan X, Jiao T, et al. SIRT6 as a key event linking P53 and NRF2 counteracts APAP-induced hepatotoxicity through inhibiting oxidative stress and promoting hepatocyte proliferation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 89-99.
- [15] Qin XL, Li JL, Wang SH, et al. Co-administration of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) alters tacrolimus pharmacokinetics in a dose- and time-dependent manner in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113233.
- [16] Qin X, Duan W, Li L, et al. Effect of long-term treatment of Wuzhi tablet on the expression and activity of cytochrome P450 3A in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1407-1411.
- [17] Qin XL, Chen X, Wang Y, et al. *In vivo* to *in vitro* effects of six bioactive lignans of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on the CYP3A/P-glycoprotein-mediated absorption and metabolism of tacrolimus [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42: 193-199.
- [18] Qin XL, Chen X, Zhong GP, et al. Effect of Tacrolimus on the pharmacokinetics of bioactive lignans of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) and the potential roles of CYP3A and P-gp [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 766-772.
- [19] Qin XL, Bi HC, Wang CX, et al. Study of the effect of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on tacrolimus tissue distribution in rat by liquid chromatography tandem mass spectrometry method [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24: 399-405.