

利托那韦对菊三七致大鼠肝毒性的保护作用

陈 岩¹, 叶铨玲¹, 王汛江¹, 杨 莉^{1,2*}, 熊爱珍^{1,2*}, 王长虹¹, 王峰涛^{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: 大量体外研究表明, 吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 肝毒性与细胞色素酶 P450 (cytochrome P450, CYP) 3A4 密切相关, 但尚未在整体水平得到证实。因此, 本研究利用大鼠探讨 CYP3A4 化学抑制剂利托那韦对菊三七致肝损伤的影响。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。大鼠单次灌胃菊三七提取物 (8 g·kg⁻¹) 造成肝损伤模型, 并设利托那韦 (30 mg·kg⁻¹) 干预组、溶剂对照组和利托那韦对照组。结果表明, 利托那韦对菊三七致大鼠肝损伤有明显的保护作用: 利托那韦可明显降低肝损伤大鼠血清转氨酶活性及总胆汁酸水平, 肝窦淤血、肝组织坏死等病理状态均有所缓解。进一步测定菊三七提取物给药后 10 min~24 h 内 PAs 致肝毒性生物标识物吡咯-蛋白结合物含量及主要胆汁酸的含量, 发现利托那韦可明显降低血清吡咯-蛋白结合物含量, 修复胆汁酸代谢紊乱。本研究表明, 利托那韦可明显改善菊三七致大鼠肝损伤的情况, 与抑制 PAs 代谢活化及调节胆汁酸代谢密切相关。研究结果加强了对 CYP3A4 酶与 PAs 毒性的相关性的理解, 对于 PAs 临床疾病干预策略的开发以及含 PAs 药物临床用药安全的合理评估均具有重要意义。

关键词: 吡咯里西啶生物碱; 代谢活化; 胆汁酸; CYP3A4; 利托那韦; 肝毒性

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0392-07

The protective effect of ritonavir against *Gynura japonica*-induced liver injury in rats

CHEN Yan¹, YE Xuan-ling¹, WANG Xun-jiang¹, YANG Li^{1,2*}, XIONG Ai-zhen^{1,2*},
WANG Chang-hong¹, 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: Numerous *in vitro* studies have shown that most pyrrolizidine alkaloids (PAs) are hepatotoxic after being metabolically activated by cytochrome P450 (CYP) 3A4. However, the key role of CYP3A4 has not been confirmed *in vivo*. Therefore, the CYP3A4 chemical inhibitor ritonavir was employed in this work and the effect of ritonavir on *Gynura japonica*-induced liver injury in rats was investigated. 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 gavage of *Gynura japonica* extracts (GJE, 8 g·kg⁻¹); rats in the protection group were gavaged with ritonavir (RIT, 30 mg·kg⁻¹) 1 h before GJE treatment.

收稿日期: 2021-06-21; 修回日期: 2021-07-19.

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 (20ZR1473300); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划 (ZY (2018-2020)-CCX-5002); 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; yangli7951@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0902

The results show that RIT could significantly attenuate GJE-induced liver injury in rats. Rats in the protection group showed decreased serum activities for alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, as well as lower total bile acids. In addition, the infiltration of inflammatory cells, sinusoidal hemorrhage, and hepatic necrosis in GJE-treated rats were markedly attenuated in the protection group. The content of pyrrole-protein adducts (PPAs), a recommended biomarker for PA-induced hepatotoxicity in clinics, was determined at 10 min to 24 h after GJE treatment. The content of 13 bile acids was also quantified. RIT treatment reduced the content of PPAs in serum dramatically and restored the impaired bile acid homeostasis caused by GJE. These studies indicate that RIT attenuated *Gynura japonica*-induced liver injury in rats, which was closely related to the inhibition of the metabolic activation of PAs and the regulation of bile acid metabolism. These results provide a better understanding of the relationship between CYP3A4 and PA-induced toxicity. This work will also be helpful in developing effective treatments for PA-induced liver injury and making a reasonable evaluation of the safety of drugs containing PAs in clinic.

Key words: pyrrolizidine alkaloid; metabolic activation; bile acid; CYP3A4; ritonavir; hepatotoxicity

吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 是一种天然的毒性成分, 目前已发现 600 多种 PAs 及氮氧化物存在于 6 000 多种高等有花植物中^[1,2], 以菊科、豆科、紫草科和兰科等最为广泛。PAs 是毒性最强的植物性肝毒物质之一, 世界各地均有因误服误用含 PAs 的中草药、药茶或被 PAs 污染的食物导致肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) 的报道^[3-5]。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”)^[6], 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。

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。肝脏中包含丰富的药物代谢酶, 是 PAs 代谢的主要场所。大部分 PAs 本身无毒性, 其致毒与代谢过程密切相关。PAs 在体内经过细胞色素酶 P450 (cytochrome P450, CYP) 3A4 代谢活化生成中间体脱氢吡咯, 其不稳定、亲电性强, 与体内大分子物质如蛋白等结合生成吡咯-蛋白加合物 (pyrrole-protein adducts, PPAs), 从而导致蛋白结构、功能的异常, 进一步诱导肝损伤^[7,8]。早期大量体外实验证实, CYP3A4 是人体内 PAs 致肝毒性的关键酶^[9], 如利用人重组单酶体系进行了研究^[10], 只有重组的 CYP3A4 表现出对 PAs 代谢活化产物生成的严重抑制, 而其他重组单酶的抑制活性极为微弱。然而, 这一点在体内试验尚未得到证实。

菊科植物菊三七 (*Gynura japonica*) 为我国传统中草药, 又称“土三七”, 常用于活血化痰、跌打损伤^[11], 其根茎与药用三七 (五加科植物三七 *Panax notoginseng*) 相似, 极易与三七混淆。然而菊三七中含有大量的 PAs^[12,13], 超量服用可导致严重的肝毒性, 是我国临床 HSOS 的主要原因^[14]。因此, 本研究以菊三七单次灌

胃大鼠构建 PAs 肝损伤模型, 利用 CYP3A4 化学抑制剂利托那韦从整体动物水平探讨 CYP3A4 酶对于 PAs 肝毒性的关键作用, 为含 PAs 药物的临床应用安全提供理论依据。

材料与方法

药品与试剂 分析纯三氟化硼乙醚、无水乙醇、硝酸银、丙酮均购自国药控股化学试剂有限公司; 分析纯 4-二甲氨基苯甲醛购自 Sigma 公司。称取 4-二甲氨基苯甲醛 20 mg, 加入无水乙醇 1 mL 和三氟化硼乙醚 20 μ L 溶解, 得到 Ehrlich 试剂。称取硝酸银 20 mg, 加入无水乙醇 1 mL, 得 2% 硝酸银溶液。

利托那韦 (ritonavir, RIT) 购自大连美仑生物技术有限公司。称取利托那韦粉末适量, 溶解于适量吐温 80: 无水乙醇 = 1:1 的混合溶剂中, 以超纯水稀释至 3 mg·mL⁻¹。

菊三七提取物 (*Gynura japonica* extracts, GJE) 为课题组前期制备^[12,15], 菊三七 (采自江苏省扬州市) 粗粉以 95% 乙醇回流提取 3 次制备, 所含 PAs 主要为千里光碱 (senecionine)、千里光菲林碱 (seneciphylline)、千里光碱氮氧化物 (senecionine *N*-oxide) 和千里光菲林碱氮氧化物 (seneciphylline *N*-oxide) (图 1), 每克总提物含 PAs 50 mg。称取菊三七提取物适量, 溶解于 5% 盐酸水溶液中, 加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 调至 pH 6~7, 以生理盐水稀释至 0.8 g·mL⁻¹。

动物实验 雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 体重 200 \pm 20 g, SPF 级, 购自上海斯莱克实验动物有限公司 [合格证号: SCXK (沪) 2017-0005]。饲养条件: 温度 20 \pm 2 $^{\circ}$ C, 相对湿度 55% \pm 5%, 室内空气每小时交换 12~18 次, 12 h 昼/夜循环, 自由摄取食物和水。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

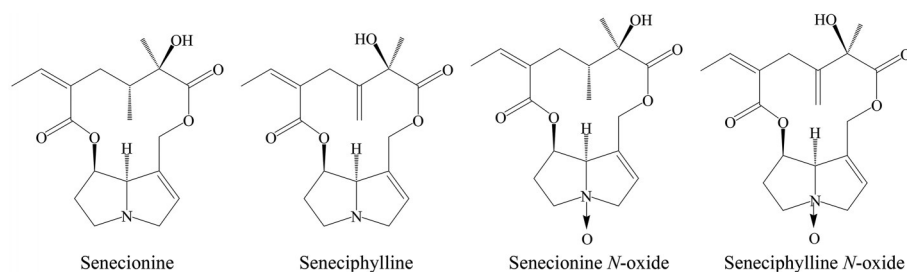


Figure 1 Chemical structures of main pyrrolizidine alkaloids (PAs) in *Gynura japonica* extracts (GJE)

用和护理的伦理原则进行。

实验动物适应性喂养3天,随机分为4组,每组6只,分别为溶剂对照组(VEH组)、模型组(GJE组)、利托那韦干预组(RIT + GJE组)、利托那韦对照组(RIT组)。给药前及取材前各禁食8 h,自由饮水。GJE组单次灌胃菊三七提取物 $8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; RIT + GJE组单次灌胃利托那韦 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1 h后,单次灌胃菊三七提取物 $8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; VEH和RIT组分别灌胃空白溶剂和利托那韦 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各组大鼠分别于菊三七提取物给药后10 min、1、2、4、6、12、24 h异氟烷麻醉,眼眶静脉丛取血;24 h后异氟烷麻醉,腹主动脉取血,收集肝脏。全血于室温下静置2 h, 4°C 、 $4\ 000 \times g$ 离心15 min,分离血清;取大鼠肝脏最大叶中心 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 置4%多聚甲醛中,其余肝脏以液氮速冻后保存于 -80°C 。

肝损伤评价 肝组织以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(hematoxylin-eosin, HE)染色、乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封固,于光学显微镜下观察组织病理变化并采集图片。

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、总胆汁酸(total bile acids, TBA)含量,均以日立7080全自动生化分析仪(Hitachi Co., Tokyo, Japan)测定。

血清PPAs含量测定 取不同时间点大鼠血清适量,加入5倍体积 4°C 预冷的丙酮提取蛋白,蛋白以Ehrlich试剂和2%硝酸银溶液进行衍生化^[12,15],所得上清液利用LC-MS/MS进行检测。采用多反应监测模式进行PPAs含量测定^[12,15],离子通道为: $341 > 252$ (定量离子对), $341 > 296$ (定性离子对)。

胆汁酸含量测定 取大鼠血清和肝组织适量,加入3倍体积 4°C 预冷的甲醇沉淀蛋白,离心后取上清氮气吹干,残渣以含 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4-氘代胆酸(*d4*-cholic acid)内标的5%乙腈水溶液复溶,参考课题组前期报道方法^[13,16]以LC-MS测定大鼠血清中13种主要胆汁酸的含量,包括胆酸(cholic acid, CA)、鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)、熊脱氧胆酸

(ursodeoxycholic acid, UDCA)、石胆酸(lithocholic acid, LCA)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)、牛磺石胆酸(tauroolithocholic acid, TLCA)、牛磺鹅脱氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)、牛磺熊脱氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)、牛磺脱氧胆酸(taurodeoxycholic acid, TDCA)、牛磺猪脱氧胆酸(taurohyodeoxycholic acid, THDCA)、甘氨酸熊脱氧胆酸(glycoursodeoxycholic acid, GUDCA)、甘氨酸脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GDCA)、甘氨酸鹅脱氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid, GCDCA)。

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,组间比较用单因素方差分析,若 $P < 0.05$ 则表示差异有统计学意义。

结果

1 利托那韦对菊三七致大鼠肝损伤的影响

大鼠单次灌胃菊三七提取物($8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 24 h后, GJE模型组出现状态萎靡、体温凉等不良状态; RIT + GJE组大鼠状态正常。如图2A所示, GJE模型组肝窦扩张显著增大,并且伴随着严重的肝窦出血、肝细胞点状坏死、脂肪空泡化,与前期研究报道^[12]相符; RIT + GJE组仅可见少量不均匀的淤血,无明显的细胞坏死; RIT对照组与VEH溶剂对照组无明显差异。由图2B可知, GJE组血清肝功能检测指标血清ALT ($P < 0.01$)、AST ($P < 0.05$)、TBA ($P < 0.001$)均显著升高;而RIT + GJE组ALT ($P < 0.001$)、AST ($P < 0.01$)、TBA ($P < 0.001$)均较模型组显著降低。以上结果提示, CYP3A4抑制剂利托那韦对菊三七致大鼠肝损伤有明显的保护作用。此外, RIT组TBA值($6.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)较VEH组($23.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)有下降趋势。

2 利托那韦对大鼠给药菊三七后生成PPAs含量的影响

检测GJE组和RIT + GJE组大鼠血清中PPAs的含量。如表1所示,单次灌胃GJE后0.17 h (10 min)~6 h内血清PPAs含量逐渐升高,在6~24 h PPAs含量相对

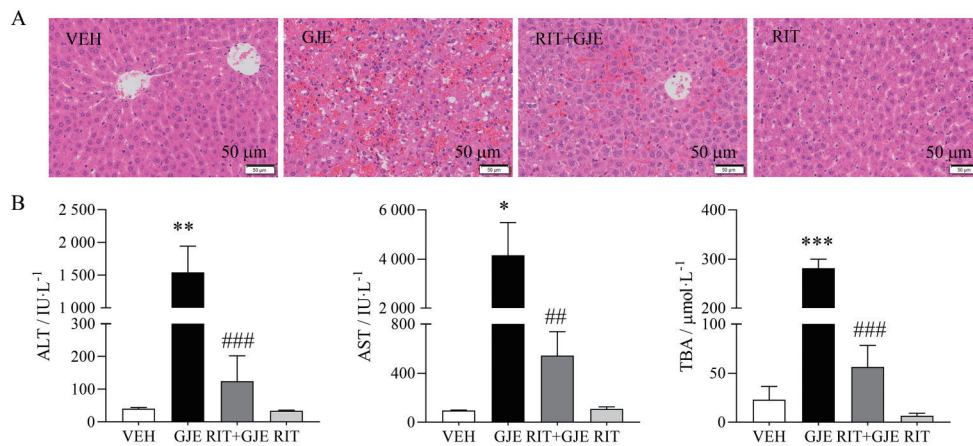


Figure 2 The protection effect of ritonavir (RIT) against GJE-induced liver injury in rats. Rats were treated with RIT (30 mg·kg⁻¹) 1 h before the treatment of GJE (8 mg·kg⁻¹), and sacrificed 24 h after GJE administration. A: Hematoxylin-eosin (HE) staining of liver tissue; B: Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total bile acids (TBA). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs VEH; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs GJE. VEH: Vehicle group

稳定; RIT + GJE 组 PPAs 血清含量在 0.17~12 h 内逐渐升高, 在 12~24 h PPAs 含量有所下降 (24 h 时 RIT + GJE 组 PPAs 含量较 12 h 下降 13.3%)。相比 GJE 组, RIT + GJE 组大鼠在给药菊三七提取物 10 min 后生成的 PPAs 含量就显著降低 ($P < 0.01$); 此后 1~24 h 内各时间点 RIT + GJE 组大鼠 PPAs 含量较 GJE 组均显著降低。以上结果提示, CYP3A4 抑制剂利托那韦可显著降低大鼠给药菊三七后生成 PPAs 的含量, 并在一定程度上加速了血清 PPAs 的清除。

Table 1 The pyrrole-protein adducts (PPAs) contents in serum of rats. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs GJE

Time/h	PPAs content in serum/μmol·L ⁻¹	
	GJE group	RIT + GJE group
0.17	0.92 ± 0.62	0.12 ± 0.06###
1	1.65 ± 1.17	0.34 ± 0.13###
2	2.96 ± 1.28	0.60 ± 0.20###
4	3.89 ± 1.20	1.48 ± 0.34###
6	4.49 ± 1.53	1.99 ± 0.39###
12	4.39 ± 1.12	2.70 ± 0.40##
24	4.30 ± 2.18	2.34 ± 0.34#

3 利托那韦对菊三七致大鼠胆汁酸代谢紊乱的调节作用

对大鼠中 13 种主要胆汁酸进行了含量测定。给药菊三七总提取物后, 血清胆汁酸含量发生显著变化 (图 3), 含量最高的 CA、TCA 分别升高 8.8、76.1 倍, 含量相对较低的 TUDCA、THDCA、TDCA、TLCA、GUDCA、GDCA、LCA 含量也显著升高, 由此导致初级胆汁酸 (CA、CDCA、UDCA、TCA、TCDC、TUDCA、GCDCA、GUDCA) 总含量、次级胆汁酸 (LCA、TLCA、TDCA、THDCA、GDCA) 总含量显著升高 (表 2), 游离型胆汁酸 (CA、

CDCA、UDCA、LCA) 总含量和结合型胆汁酸 (TCA、TCDC、TUDCA、TDCA、THDCA、TLCA、GCDCA、GUDCA、GDCA) 总含量也显著升高。此外, 各胆汁酸的相对百分含量也发生了明显变化 (图 3C), 游离型胆汁酸 CA、CDCA、UDCA、LCA 的相对百分含量均有下降, 而结合型胆汁酸 TCA、TUDCA、THDCA、TLCA、GUDCA 的相对百分含量均升高 3~24 倍。相比 GJE 组, RIT + GJE 组血清中大部分胆汁酸的含量均显著下降, 各类型胆汁酸总含量均显著下降 ($P < 0.05$), 相对百分含量也有所下降。相比 VEH 组, GJE 组血清初级胆汁酸总含量与次级胆汁酸总含量的比值明显下降 (4.9 vs 25.2), 游离型胆汁酸总含量与结合型胆汁酸总含量的比值也降低 (0.6 vs 3.8); 但 RIT + GJE 组中二者均无向 VEH 组回调趋势。进一步测定肝脏中胆汁酸的含量 (图 4), 总的来说, 肝脏中胆汁酸的变化趋势与血清中相似; 与 VEH 组比较, 模型组肝脏中主要的胆汁酸 CA、TCA 分别升高 6.0、10.5 倍, TUDCA、THDCA、TDCA 也升高 3.1~3.5 倍, 且以上 5 种胆汁酸在 RIT + GJE 组中均有不同程度的下降 (为 GJE 组的 40%~60%); 肝脏中各类型胆汁酸总含量在 GJE 组均有所升高 (总胆汁酸含量较 VEH 组升高 4.8 倍), 而在 RIT + GJE 组中下降 (RIT + GJE 组总胆汁酸下降为 GJE 组的 34%)。值得注意的是, 与空白组比较, RIT 组血清中 CA、CDCA、TCDC、GCDCA 均显著下降, 造成初级胆汁酸总含量及游离型胆汁酸含量的显著降低 (表 2); 而由于 CA 和 CDCA 在 RIT 组肝脏中显著下降, 导致 RIT 组肝脏总游离型胆汁酸含量较 VEH 组显著降低 (21.0 ng·g⁻¹ vs 112.1 ng·g⁻¹, $P < 0.05$), 尽管 RIT 组部分含量较高的初级胆汁酸 (CA、CDCA、GUDCA 和 GCDCA) 较 VEH

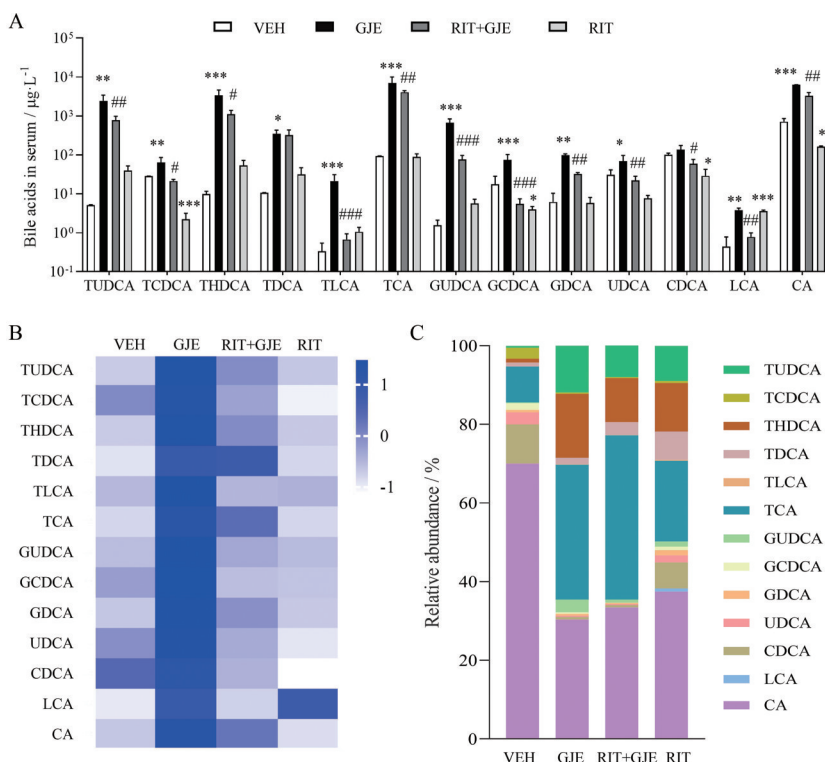


Figure 3 The changes of bile acids (BAs) profiling in serum samples of rats. A: The contents of individual bile acids; B: The heatmap of individual bile acids contents; C: Relative abundance of individual bile acids. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs VEH; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs GJE. CA: Cholic acid; CDCA: Chenodeoxycholic acid; UDCA: Ursodeoxycholic acid; LCA: Lithocholic acid; TCA: Taurocholic acid; TLCA: Taurothiocholic acid; TCDCA: Taurochenodeoxycholic acid; TUDCA: Tauroursodeoxycholic acid; TDCA: Taurodeoxycholic acid; THDCA: Taurohydoxycholic acid; GUDCA: Glycoursodeoxycholic acid; GDCA: Glycodeoxycholic acid; GCDCA: Glycochenodeoxycholic acid

Table 2 The contents of different types of BA in serum of rats. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs VEH; # $P < 0.05$ vs GJE. Primary bile acids: CA, CDCA, UDCA, TCA, TCDCA, TUDCA, GCDCA, and GUDCA; Secondary bile acids: LCA, TLCA, TDCA, THDCA, and GDCA; Free bile acids: CA, CDCA, UDCA, and LCA; Conjugated bile acids: TCA, TCDCA, TUDCA, TDCA, THDCA, TLCA, GCDCA, GUDCA, and GDCA

Group	BA contents/mg·L ⁻¹			
	Primary bile acid	Secondary bile acid	Free bile acid	Conjugated bile acid
VEH	0.92 ± 0.08	0.04 ± 0.00	0.85 ± 0.17	0.22 ± 0.09
GJE	13.94 ± 7.94*	2.85 ± 2.79*	6.46 ± 0.22***	10.33 ± 10.95*
RIT + GJE	5.66 ± 2.14#	1.50 ± 0.38#	3.33 ± 0.75#	4.13 ± 2.93#
RIT	0.23 ± 0.10**	0.12 ± 0.05*	0.16 ± 0.08*	0.27 ± 0.07

组有显著下降,但初级胆汁酸总含量无明显变化。以上结果提示,CYP3A4抑制剂利托那韦可显著改善菊三七致大鼠胆汁酸代谢紊乱,与降低损伤大鼠胆汁酸特别是CA等初级胆汁酸的含量有关。

讨论

PPAs 安全性问题已引起世界范围的关注。肝脏含有

丰富的代谢酶,是药物代谢的主要场所,也是 PAs 毒性的主要靶器官^[2]。大量研究表明,CYP3A4 是人体内 PAs 致毒的关键酶^[5,7,8],而其同工酶 CYP3A1 和 CYP3A2 是致大鼠肝毒性的关键酶。

酮康唑是美国食品药品监督管理局和欧洲药品管理局共同认定的强效 CYP3A4 抑制剂,被广泛应用于临床研究 and 科学研究中^[17,18]。人肝微粒体实验表明,CYP3A4 抑制剂酮康唑可显著抑制 PAs 的代谢活化。酮康唑还可抑制野百合碱代谢活化从而降低野百合碱诱导的小鼠肝肾损伤^[19]。然而酮康唑存在潜在的肝毒性^[20],利托那韦对 CYP3A4 的抑制效果与酮康唑类似,是其最优的替代品^[21]。故本研究利用利托那韦从整体动物水平探讨 CYP3A4 对菊三七肝毒性的影响。肝脏病理及血清生化指标分析表明,单独给药利托那韦对正常大鼠的肝脏功能和结构未造成明显影响,但对菊三七提取物致大鼠肝损伤有显著的保护作用,可修复菊三七致大鼠肝窦出血、肝细胞坏死和脂肪空泡化,并降低血清转氨酶活性。

PPAs 为 PAs 经 CYP3A4 代谢活化生成,已作为临

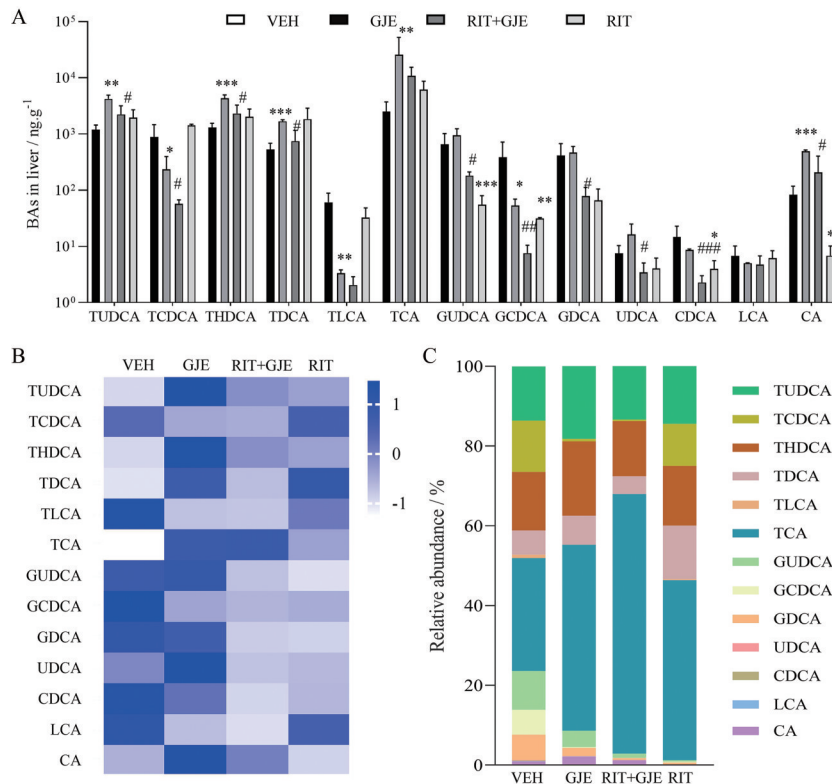


Figure 4 The changes of BAs profiling in liver samples of rats. A: The contents of individual bile acids; B: The heatmap of individual bile acids contents; C: Relative abundance of individual bile acids. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs VEH; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs GJE

床诊断 PAs 诱导 HSOS 的指标^[6]。利托那韦干预组大鼠不同时间点血清 PPAs 的含量明显低于模型组, 由此推断, 利托那韦可抑制 PAs 代谢活化, 从而导致 PPAs 的含量降低。课题组^[12]前期研究表明, 大鼠给药菊三七后生成 PPAs 的动力学呈现一定的剂量依赖性, AUC_{0-r} 、 MRT 、 V_d 、 $t_{1/2c}$ 均随剂量而明显增大, PPAs 在体内的消除率随着给药剂量的增加明显减慢, 与肝损伤严重程度有一定的关联。在本研究中, 大鼠给药菊三七提取物 ($8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 折合 PAs $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 直至 24 h 实验结束未观察到 PPAs 快速清除阶段; 但与菊三七肝损伤组比较, 利托那韦干预组血清 PPAs 含量在 10 min~24 h 内均显著降低, 且在 24 h 时 PPAs 含量较 12 h 已有所降低, 提示利托那韦降低了 PPAs 的生成并加速其清除。在后续实验中, 可以不同剂量菊三七给药, 进一步明确 CYP3A4 抑制剂利托那韦对 PAs 代谢活化和 PPAs 代谢动力学的影响, 为含 PAs 药物临床用药安全的合理评估提供参考。

课题组^[13,16,22]前期研究已经发现, PAs 致肝毒性与胆汁酸代谢紊乱密切相关; Hessel-Pras 等^[23]的最新研究也表明, PAs 致胆汁酸代谢紊乱具有 CYP 依赖性。本研究发现, 利托那韦干预组大鼠血清 TBA 含量明显低于菊三七模型组, 不同类型胆汁酸总含量 (包括初

级胆汁酸、次级胆汁酸、游离型胆汁酸以及结合型胆汁酸) 也显著降低, 提示抑制 CYP3A4 酶可影响胆汁酸代谢。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, 不仅调控胆固醇代谢、排泄、溶解和食物脂类的消化、吸收, 也是重要的信号分子, 是临床肝脏疾病诊断、治疗、预后的重要生物标志物。在胆汁淤积等肝损伤病理状态下, 毒性胆汁酸 (特别是疏水性胆汁酸如 CA、CDCA、LCA) 将对肝脏造成“二次打击”, 加剧肝损伤。本研究表明 CYP3A4 抑制剂利托那韦可缓解菊三七致大鼠胆汁酸代谢紊乱, 与其对菊三七肝损伤的保护作用有一定的关联性, 但无法阐明二者的因果关系及深层的作用机制, 后续还需要进一步探讨。

综上所述, 本研究表明利托那韦可明显改善菊三七致大鼠肝损伤的情况, 与抑制 PAs 代谢活化及调控胆汁酸代谢密切相关。本研究利用 CYP3A4 化学抑制剂利托那韦从大鼠水平证明了 CYP3A4 对菊三七致肝毒性的影响, 加强了 CYP3A4 酶与 PAs 毒性的相关性的理解, 对于 PAs 临床疾病干预策略的开发以及菊三七等含 PAs 药物临床用药安全的合理评估均具有重要意义。

作者贡献: 陈岩、熊爱珍设计实验、撰写及修改论文; 陈岩、叶铨玲、王汛江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、王峥涛提供基金的支持。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Chen L, Mulder PPJ, Peijnenburg A, et al. Risk assessment of intake of pyrrolizidine alkaloids from herbal teas and medicines following realistic exposure scenarios [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 130: 142-153.
- [2] Neuman MG, Cohen L, Opris M, et al. Hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2015, 18: 825-843.
- [3] Jank B, Rath J. The risk of pyrrolizidine alkaloids in human food and animal feed [J]. *Trends Plant Sci*, 2017, 22: 191-193.
- [4] Zhang Y, Ma SQ, Yang FF, et al. Status of content analysis of pyrrolizidine alkaloids in food and herbs [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 5421-5428.
- [5] Moreira R, Pereira DM, Valentão P, et al. Pyrrolizidine alkaloids: chemistry, pharmacology, toxicology and food safety [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1688.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Fu PP, Xia Q, Lin G, et al. Pyrrolizidine alkaloids--genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms [J]. *Drug Metab Rev*, 2014, 36: 1-55.
- [9] Ruan J, Liao C, Ye Y, et al. Lack of metabolic activation and predominant formation of an excreted metabolite of nontoxic platynecine-type pyrrolizidine alkaloids [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27: 7-16.
- [10] Ruan JQ, Yang MB, Fu P, et al. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids: insights into the structural and enzymatic basis [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27: 1030-1039.
- [11] 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.
- [12] 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 Sci (药学报)*, 2020, 55: 473-477.
- [13] 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]. *Phytomed*, 2019, 54: 77-88.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Xu Y, Zhang YF, Chen XY, et al. CYP3A4 inducer and inhibitor strongly affect the pharmacokinetics of triptolide and its derivative in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39: 1386-1392.
- [18] Shayeganpour A, EI-Kadi AOS, Brocks DR. Determination of the enzyme(s) involved in the metabolism of amiodarone in liver and intestine of rat: the contribution of cytochrome P450 3A isoforms [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 43-50.
- [19] Yao J, Li CG, Gong LK, et al. Hepatic cytochrome P450s play a major role in monocrotaline-induced renal toxicity in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35: 292-300.
- [20] Shehu AI, Lu J, Wang P, et al. Pregnane X receptor activation potentiates ritonavir hepatotoxicity [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129: 2898-2903.
- [21] Greenblatt DJ, Harmatz JS. Ritonavir is the best alternative to ketoconazole as an index inhibitor of cytochrome P450-3A in drug-drug interaction studies [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2015, 80: 342-350.
- [22] 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 Sci (药学报)*, 2021, 56: 823-830.
- [23] Hessel-Pras S, Braeuning A, Guenther G, et al. The pyrrolizidine alkaloid senecionine induces CYP-dependent destruction of sinusoidal endothelial cells and cholestasis in mice [J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94: 219-229.