DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20210310

·论　著·

制何首乌肝损伤的化学物质及中药多糖或寡糖配伍干预研究

任红微[1#]，蒲位凌[1#]，魏静[1]，韩立峰[1]，付志飞[1]，
苏艳芳[2]，常艳旭[1]，胡利民[1]，樊官伟[1]，高秀梅[1*]

（1. 天津中医药大学教育部方剂学重点实验室，天津 301617；
2. 天津大学药物科学与技术学院，天津 300072）

【摘要】目的 制何首乌（Polygoni Multiflori Radix Praeparata, PM）是常用的补益肝肾中药，近年来由何首乌及其制剂引起的肝损伤受到广泛关注。本研究旨在探索制何首乌造成免疫特异质肝损伤的化学物质和配伍减毒机制。**方法** 本研究以脂多糖（Lipopolisaccharide，LPS）诱导免疫特异质体质，利用中药组分敲除技术，筛选制何首乌特异质肝脏损伤的化学物质；选择多种具有免疫调节作用的中药多/寡糖，探究其与制何首乌配伍后的减毒作用。**结果** 在LPS诱导的免疫应激动物模型中，PM醇提物造成免疫特异质肝损伤。PM提取物中敲除蒽醌类成分后，其肝损伤作用明显降低；而PM中分离的蒽醌类成分能引起动物免疫特异质肝损伤。肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖与制何首乌配伍，均能减轻制何首乌造成的免疫特异质肝损伤，抑制多种炎症因子表达。**结论** 免疫特异质体质是导致制何首乌肝毒性的重要因素，蒽醌类成分是造成其肝损伤的主要物质基础，肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖能减轻PM造成的特异质肝损伤。

【关键词】制何首乌；特异质肝损伤；物质基础；蒽醌；减毒机制

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-8965（2021）03-0062-12

Hepatotoxic components and attenuation of polygoni multiflori radix praeparata induced idiosyncratic liver injury

Ren Hongwei[1#], Pu Weiling[1#], Wei Jing[1], Han Lifeng[1], Fu Zhifei[1],
Su Yanfang[2], Chang Yanxu[1], Hu Limin[1], Fan Guanwei[1], Gao Xiumei[1*]

(1. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;
2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

【Abstract】Objective Polygoni Multiflori Radix (PM, He-Shou-Wu), is used as a reputable tonifying traditional Chinese medicine for a long time. However, in recent years, the liver injury caused by PM or its preparations attracted wide attention. This research was to investigate the mechanism, material basis and attenuation of PM induced idiosyncratic liver injury. **Methods** In this study, we investigated the molecular basis of PM-induced liver injury based on a non-hepatotoxic dose of LPS. A component "knock-out" strategy with TSG (2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-D-glucopyranoside) or AN (anthraquinone) eliminated was used to study the material basis for PM-induced liver injury. Finally, some polysaccharides and oligosaccharides were selected to explore their toxicity attenuated effects when used compatible with PM. **Results** In LPS-induced immune stress mice or

基金项目：国家科技重大专项项目（2015ZX09501004-003-004）

通讯作者：高秀梅（1966-），女，内蒙古包头人，博士生导师，主要从事中医方药药理学研究。E-mail：gaoxiumei@tjutcm.edu.cn
#为共同第一作者

rats, PM caused immune-idiosyncratic liver injury. After knockout anthraquinones (AN) from PM (PM-AN), the liver injury was significantly reduced and the AN isolated from PM also caused immune-idiosyncratic liver injury. Pretreatment with Cistanchedeserticola polysaccharide (CDP), Alginate oligosaccharide (AO), Chitosan oligosaccharide (CO) could attenuate the PM-induced liver injury and inhibit the expression of various cytokines. **Conclusion** The immune-idiosyncratic constitution is an important factor leading to the liver injury of PM. Anthraquinone is a major material basis of PM-induced liver injury. Polysaccharides or oligosaccharides could attenuate PM-induced liver injury, which was related with immune-modulatory effects.

【Keywords】 Polygoni multiflori radix; Immune-idiosyncratic liver injury; Material basis; Anthraquinone; Attenuation

前言

中药及其复方的临床应用已有千年的历史，其有效性在长期临床实践中得到证实，然而近年来中药引起的不良反应报道成为热点。制何首乌（Polygoni Multiflori Radix Praeparata, PM）是常用补益肝肾中药[1]。近年来由何首乌及含何首乌的制剂引起的肝损伤，引起广泛关注。

药物性肝损伤（Drug-induced Liver Injury, DILI）是指药物或其代谢产物对肝脏产生直接或间接的损伤。特异质肝损伤（Idiosyncratic DILI）指损伤仅在小部分易感体质人群中出现，与药物剂量无明确相关性[2]。何首乌致肝损伤首先是从临床报道的，通过对何首乌致肝损伤病例的回顾性分析发现，何首乌致肝损伤与剂量及疗程缺少对应关系，而与服药人群有关，且何首乌致肝损伤临床样本中IL-1、IL-6、TNFα等细胞因子表达显著上调[3]，表明何首乌所致肝损伤可能与免疫应激特异质体质有关。在基础研究中，制何首乌不同类型的提取物并未出现与临床病例特征符合的肝损伤[4]，但引起了免疫应激大鼠炎症因子过度表达。研究表明，何首乌会导致免疫特异质肝损伤[5,6]。

蒽醌类和二苯乙烯苷类成分（见图1）是何首乌的主要成分[7]。何首乌致肝损伤成分的研究报道较多，多数研究显示蒽醌类化合物是致肝毒性的物质基础，也有报道称二苯乙烯类化合物在紫外光照条件下的构象改变可能是引起肝损伤的原因[8]。课题组前期研究及文献报道的结果表明，制何首乌的毒性作用可能是多种成分共同作用造成的。二苯乙烯苷可影响制何首乌提取物中蒽醌类成分（大黄素）的代谢，导致大黄素体内暴露量升高[9-11]。

综上，何首乌致肝损伤作用与特异质体质有关，但其加重特异质肝损伤的机制尚不完全清楚、毒性物质基础报道结论不一。因此，本研究从制何

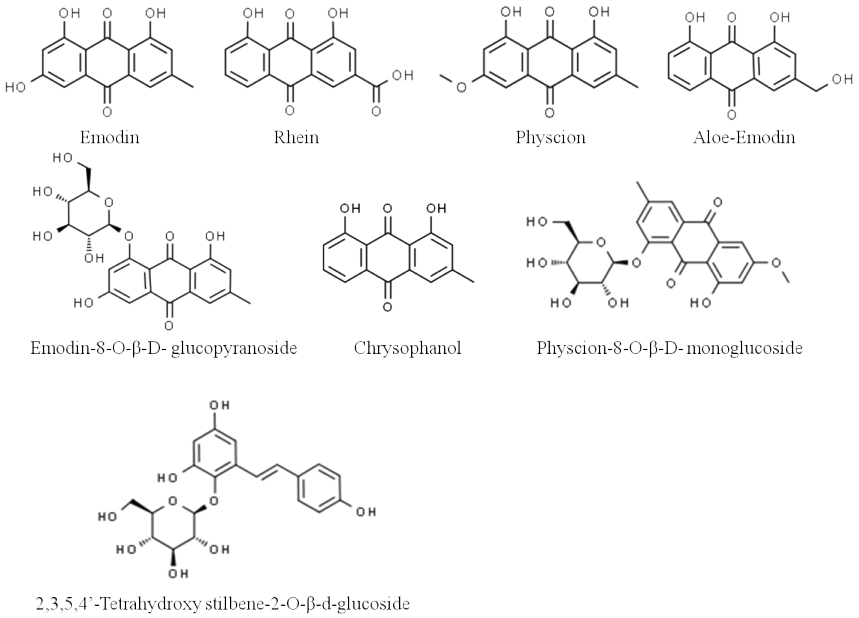


图1 制何首乌主要活性成分化学结构

首乌加重免疫特异质肝损伤的效应出发，探究其作用机制；利用中药组分敲除技术，筛选制何首乌加重特异质肝脏损伤的物质基础；最后选择多种具有免疫调节作用的中药多（寡）糖，探究其与制何首乌配伍后是否能减轻特异质肝损伤，并初步探究这种减毒作用机制。

1 实验材料与方法

1.1 主要试剂及药物来源和制备

制何首乌购于安国圣安药业有限公司（No. PMR-20160432），女贞子购自安国市安兴中药饮片有限公司（No.170801），肉苁蓉购自内蒙古曼德拉沙产业开发有限公司，执行标准为2015年版《中国药典》。制何首乌提取物及女贞子、肉苁蓉多糖按以下方法提取：制何首乌提取物：100 g制何首乌用60%乙醇依次以1∶10、1∶8、1∶6回流提取三次，合并提取液，经旋转蒸发，真空干燥后得提取物17 g[12]。肉苁蓉多糖、女贞子多糖（分子量6 000以下的粗多糖）提取[13]：肉苁蓉/女贞子药材烘干、粉碎后，85%乙醇依次以1∶12、1∶10提取两次，再以100℃水提取2次，合并药液并浓缩，80%乙醇沉淀、静置、8 000 rpm离心后，冷冻干燥得总多糖。总多糖用去离子水溶解后，以100 kDa、6 kDa超滤膜过滤，得分子量6 kDa以下的肉苁蓉/女贞子多糖。

制何首乌提取物不同部位制备：制何首乌醇提取物粉末以3.3倍体积的蒸馏水混悬，先用等体积二氯甲烷萃取，二氯甲烷部位含有绝大部分游离蒽醌（Anthraquinones，AN），水部位再以等体积的石油醚∶乙酸乙酯（4∶6）萃取，石油醚乙酸乙酯部位主要含有二苯乙烯苷类成分（Tetrahydroxystilbene Glucoside，TSG）。以此方法获得制何首乌总游离蒽醌提取物（AN）、制何首乌除去50%以上二苯乙烯苷（PM-TSG）、制何首乌除去游离蒽醌（PM-AN）、制何首乌除去游离蒽醌及50%以上二苯乙烯苷类（PM-AN-TSG）。

脂多糖（Lipopolisaccharide，LPS）（L2880，#406M4045V）购于Sigma公司。抗体p-p65（Ab76302）、p-65 (Ab32536)、IκBα (Ab32518)、TLR (Ab217274)均购自Abcam公司。病理染色液（D006-1-4，Lot.20200905）购自南京建成生物科技有限公司。炎症因子ELISA试剂盒：TNFα（DY410，Lot. P229719），IL-6（DY406，Lot，P227109），IL-10（DY417，Lot. P233049），MCP-1（DY479，Lot. P229114），IP-10（DY466，Lot.P253290）购自R&D Systems；IL-1β（88-7013-88，Lot. 218006-003），MIP-1α（88-56013-22，Lot. 235396-001）购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司。大黄素（110756-201613，含量96.0%）、大黄酸（110757-201607，含量99.3%）、芦荟大黄素（110795-201609，含量98.3%）均购自中国食品药品检定研究院。褐藻寡糖（2018011201AYF，平均分子量≤4 000 Da）、壳寡糖（2020072401CWF，平均分子量340~1 630 Da）购自青岛博智汇力科技有限公司。

1.2 造模、分组及给药

实验动物（雄性C57BL/6J小鼠及SD大鼠，SPF级）均购自北京市维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2014-0004（SD大鼠），SCXK（京）2019-0008（C57BL/6J小鼠）。自由饮水进食，饲养于中国医学科学院放射所（天津）动物房，12 h照明和黑暗交替室温20℃~25℃，湿度40%~60%，适应性喂养一周后用于实验。

PM加重免疫应激大鼠急性肝损伤（PM给药一次）：无毒剂量的LPS可以用来诱导动物处于免疫应激状态，本研究中采用LPS静脉给药造成大鼠的免疫应激。将32只SD大鼠随机分为四组，即Control组、LPS组、PM组、LPS+PM组，每组8只，PM组、LPS+PM组分别灌胃10 g/kg（生药量）PM醇提物，Control组、LPS组灌胃相同体积双蒸水；2 h后，LPS组、LPS+PM组尾静脉注射25 μg/kg LPS溶液，Control组、PM组尾静脉注射同等体积生理盐水；5 h后，麻醉后腹主动脉取血，离心取血清，肝脏于福尔马林中固定或液氮中冻存，进行下一步检测。

PM加重免疫应激小鼠肝损伤（PM给药两周）：将48只C57小鼠随机分为4组，即空白（Control）组、LPS组、PM组、LPS+PM组，每组12只，PM组、LPS+PM组分别灌胃22.5 g/kg（生药量）PM醇提物，Control组、LPS组灌胃等体积双蒸水；2 h后，LPS组、LPS+PM组腹腔注射0.5 mg/kg LPS溶液，Control组、PM组注射等体积生理盐水；24 h后，摘眼球取血，离心取血清，肝脏于福尔马林中固定或液氮中冻存，进行下一步检测。

PM提取物不同部位对免疫应激大鼠急性肝损伤的影响：将80只大鼠随机分为8组，Control组，LPS组，PM-AN组，LPS+PM-AN组，PM-AN-TSG组，LPS+PM-AN-TSG组，PM-TSG组，LPS+PM-

TSG组，即正常大鼠和免疫应激大鼠分别给予PM不同提取部位。按分组灌胃不同提取部位（10 g/kg生药量），空白组灌胃等体积蒸馏水；2 h后，LPS组，LPS+PM-AN组，LPS+PM-AN-TSG组，LPS+PM-TSG组尾静脉注射25 μg/kg LPS；Control组、PM-AN组、PM-AN-TSG组、PM-TSG组分别尾静脉注射同等体积生理盐水。5 h后收集血清，肝脏于福尔马林中固定或液氮中冻存，进行下一步检测。

PM蒽醌类成分加重免疫应激特异质肝损伤：28只SD大鼠随机分为四组，即Control组、LPS组、AN组、LPS+AN组。AN组、LPS+AN组分别灌胃AN 10 g/kg生药量，Control组、LPS组分别灌胃同等体积生理盐水。2 h后，LPS组、LPS+AN组分别尾静脉注射LPS溶液25 μg/kg，Control组与AN组分别尾静脉注射同等体积生理盐水。5 h后收集血清，肝脏于福尔马林中固定或液氮中冻存，进行下一步检测。

多糖或寡糖在体抗炎作用研究：将80只C57小鼠随机分为10组，即Control组、女贞子多糖组、肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖、LPS组、LPS+女贞子多糖组（L+女）、LPS+肉苁蓉多糖组（L+肉）、LPS+褐藻寡糖组（L+褐）、LPS+壳寡糖组（L+壳），每组8只。按分组灌胃相应寡糖或多糖两周（剂量：褐藻寡糖600 mg/kg/天；女贞子多糖、肉苁蓉多糖、壳寡糖均为400 mg/kg/天），空白组和LPS组灌胃体积双蒸水，最后一天灌胃后2 h，LPS及LPS+多糖/寡糖组腹腔注射LPS溶液（0.5 mg/kg），其它组注射等体积生理盐水。24 h后，摘眼球取血，离心取血清，肝脏于福尔马林中固定或液氮中冻存。

PM与多糖或寡糖配伍减毒研究：在多糖或寡糖的减毒研究中，分为空白组、制何首乌损伤组（LPS+PM）、褐藻寡糖/壳寡糖/肉苁蓉多糖配伍组（LPS+PM+AO/CO/CDP）。除空白组及制何首乌损伤组外，其余组均提前灌胃相应多糖/寡糖两周（空白组及首乌损伤组灌胃相应体积的蒸馏水）。从第三周开始，在多糖/寡糖中添加制何首乌提取物后灌胃，制何首乌损伤组灌胃制何首乌醇提物，持续两周，于末次灌胃后2 h，除空白组外，各组均腹腔注射LPS溶液（0.5 mg/kg），其它组注射等体积生理盐水。24 h后，摘眼球取血，离心取血清，肝脏于福尔马林中固定或液氮中冻存。

1.3 组织形态学

苏木素-伊红染色（Hematoxylin-Eosin Staining，H&E）：将肝组织浸泡于4%多聚甲醛固定液中48 h以上，经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后，进行石蜡包埋、切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后分别进行伊红染色、分色、苏木素复染，最后中性树胶封片后在光镜显微镜下观察并拍照。

免疫组织化学染色（Immunohistochemistry，IHC）：石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后，于3% H_2O_2中灭活内源性过氧化物酶；经抗原热修复（0.01 M枸橼酸钠缓冲液）、非特异性抗体封闭（10%山羊血清）后，一抗4℃孵育12 h，二抗37℃孵育30 min。最后DAB显色、苏木素复染、封片，光学显微镜下拍照。

1.4 Western Blot

肝脏组织剪碎，于玻璃匀浆器内加入适量裂解液，冰上研磨后，12 000 g/min离心取上清即为总蛋白，BCA（Bicinchoninic Acid）法进行定量后，加入SDS（Sodium Dodecyl Sulfate）上样缓冲液，煮沸变性。总蛋白进行电泳、转膜、封闭后，于相应的一抗溶液（稀释比1∶1 000或1∶2 000）中，4℃孵育过夜。洗涤后相应二抗溶液中室温孵育2 h。最后采用化学发光法进行显影、拍照与分析。

1.5 血清肝功能指标检测

血清中ALT、AST和LDH均采用全自动生化仪（日立7020）测定，试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司。

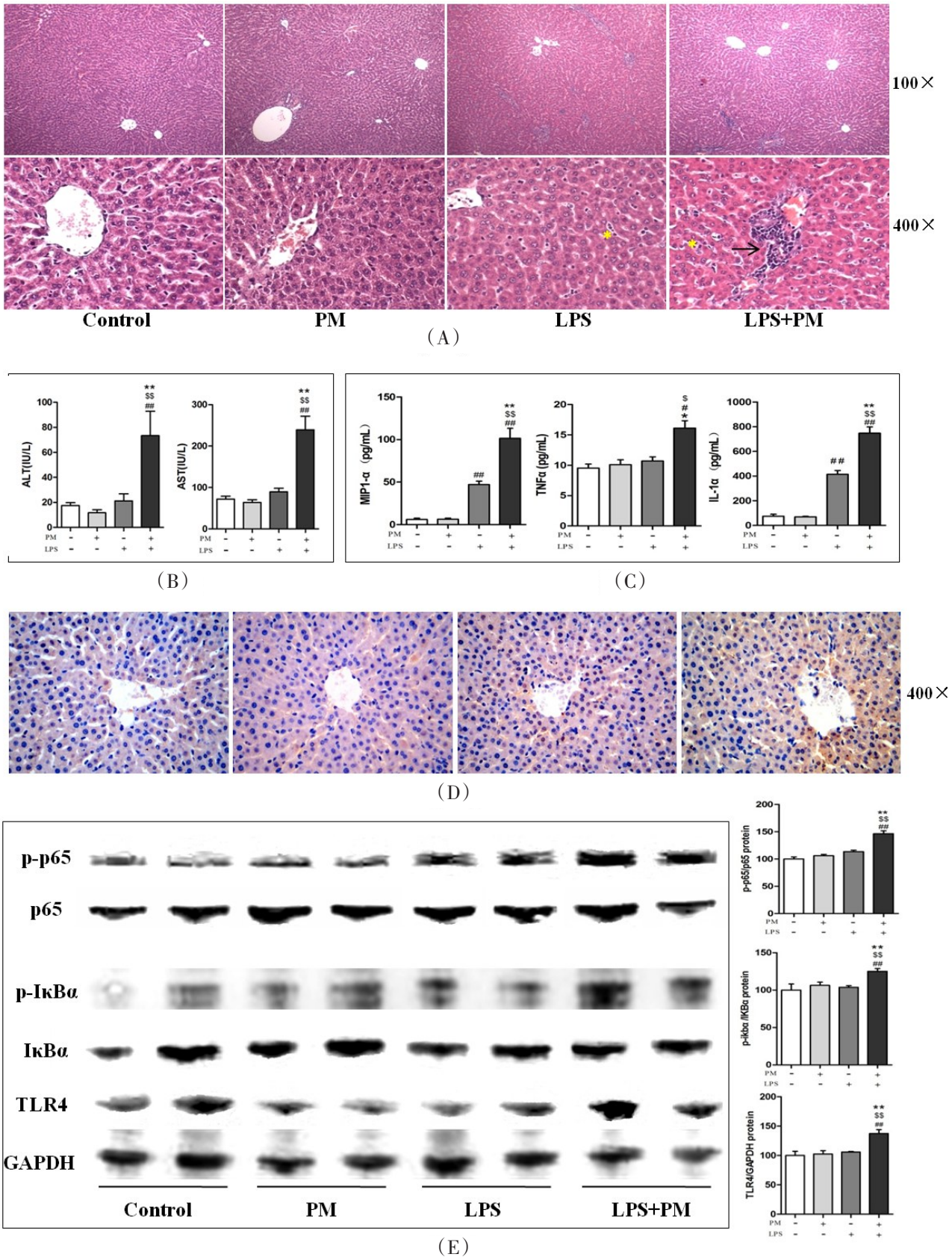
1.6 统计学方法

实验数据以均数±标准差表示，采用SPSS 17.0统计软件进行数据统计分析。采用单因素方差分析（one-way ANOVA）分别进行两两比较，当方差齐时选用LSD检验方法，当方差不齐时则选择Dunnett′s T3检验方法。当P<0.05认为检验结果有统计学差异。

2 实验结果

2.1 制何首乌加重免疫特质性肝损伤

肝脏形态学（见图2A）结果显示：空白组（Control）、制何首乌提取物组（PM）均无显著病理学改变；LPS组可见部分区域轻度肝细胞变性，轻度炎细胞浸润；LPS+PM组出现大部分区域肝细胞变性，（小灶状）炎细胞浸润，点状坏死。与空白组相比，血清中ALT、AST在PM组与LPS组均未见明显改变；而LPS+PM组明显升高（P<0.01 vs. Control）（见图2B），即PM单独灌胃未引起大鼠



（A）制首乌（PM）对免疫应激大鼠肝脏组织形态的影响（H&E染色）。→：炎细胞浸润，*：点状坏死；（B）PM对免疫应激大鼠肝功能（血清ALT、AST）的影响（n=8）；（C）PM对免疫应激大鼠炎症因子（TNFα，IL-1α，MIP-1α）表达的影响(n=8) (ELISA)；（D）PM对免疫应激大鼠肝脏TNFα表达的影响（IHC）；（E）PM对免疫应激大鼠肝脏TLR4-NF-κB通路的影响（Western Blot）（n=4）。$^{\#\#}P$<0.01 vs. Control组；$^{\$\$}P$<0.01 vs.PM组；$^{**}P$<0.01 vs. LPS组。

图2　制何首乌加重免疫特异质肝损伤

明显肝损伤，但可加重LPS诱导的免疫应激大鼠的肝损伤。肝脏组织中炎症介质（TNFα，IL-1α，MIP-1α）水平如图2C所示，与Control相比，PM组TNFα，IL-1α，MIP-1α表达无明显变化，LPS组IL-1α，MIP-1α表达升高（P<0.01 vs. Control），LPS+PM组各炎症介质水平高于LPS单独处理组（P<0.01或P<0.05）。TNFα免疫组化染色结果显示（见图2D），与Control组比，LPS组TNFα蛋白散在分布，表达上调，同时LPS+PM组TNFα蛋白表达量明显高于LPS组，且TNFα蛋白集中分布于中心静脉周围，与肝脏HE染色所见发生肝坏死区域一致。TLR4-NF-κB信号通路在炎症反应中起重要作用，因此本研究初步探究了PM造成免疫应激大鼠肝损伤的分子机制。结果显示（见图2E），与Control组相比，LPS组p-p65蛋白表达有上调趋势，但无显著性差异，LPS+PM组p-p65、p-IκBα、TLR4蛋白表达均上调（P<0.01 vs. Control）。

以上研究结果表明，大鼠尾静脉注射LPS后，对血清ALT、AST表达无影响，但机体处于免疫应激状态，PM加重免疫应激大鼠的肝损伤，血清ALT、AST升高，促炎因子和趋化因子表达上调，NF-κB信号通路激活。

2.2 制何首乌加重免疫特异质肝损伤的物质基础

肝脏组织形态学结果表明（见图3A），空白组、制何首乌敲除蒽醌组（PM-AN）、及同时敲除蒽醌和二苯乙烯苷（PM-AN-TSG）组均无显著病理学改变；制何首乌敲除二苯乙烯苷组PM-TSG组肝窦排列整齐但偶见微小脂肪滴；LPS处理组大鼠肝细胞结构较不规则，有轻度炎性细胞浸润；LPS+PM-AN组肝细胞结构不规则；LPS+PM-TSG组肝组织结构紊乱，中度炎性细胞浸润，部分血管充血，有轻微脂肪变性，肝细胞坏死，细胞核消失；LPS+PM-AN-TSG组无显著病理学改变，部分肝细胞变性。肝功能指标（ALT, AST）结果（见图3B）显示，与Control组相比，LPS并不引起ALT和AST显著性升高，同样首乌提取物及各敲除成分组也并未造成ALT、AST升高；但与Control组、PM-TSG组和LPS组相比，LPS+PM-TSG组ALT、AST显著升高（P<0.01或P<0.05）。上述结果表明，PM-TSG能够加重LPS免疫应激大鼠的肝损伤；而PM-AN组和PM-AN-TSG组无此作用，即蒽醌类成分是造成何首乌的免疫特异质肝损伤的重要原因。

我们进一步考察了PM敲除不同成分后各组肝脏的炎症反应。结果显示（见图3C），与Control组相比，PM-AN组、PM-AN-TSG组、PM-TSG组均未见MIP-1α、TNFα上调，而LPS组MIP-1α蛋白表达上调（P<0.05），且LPS+PM-TSG组MIP-1α、TNFα表达升高更显著。同时，TNFα免疫组化结果（见图3D）也显示，LPS组TNFα阳性高于Control组，表达区域呈弥散性，而LPS+PM-TSG组表达量更高，且集中分布于中心静脉周围，与肝脏HE染色所见发生肝坏死区域一致。免疫结果表明PM-TSG引起肝脏炎症反应加重，且TNFα在PM-TSG加重免疫应激大鼠肝损伤的过程中可能发挥着重要作用。

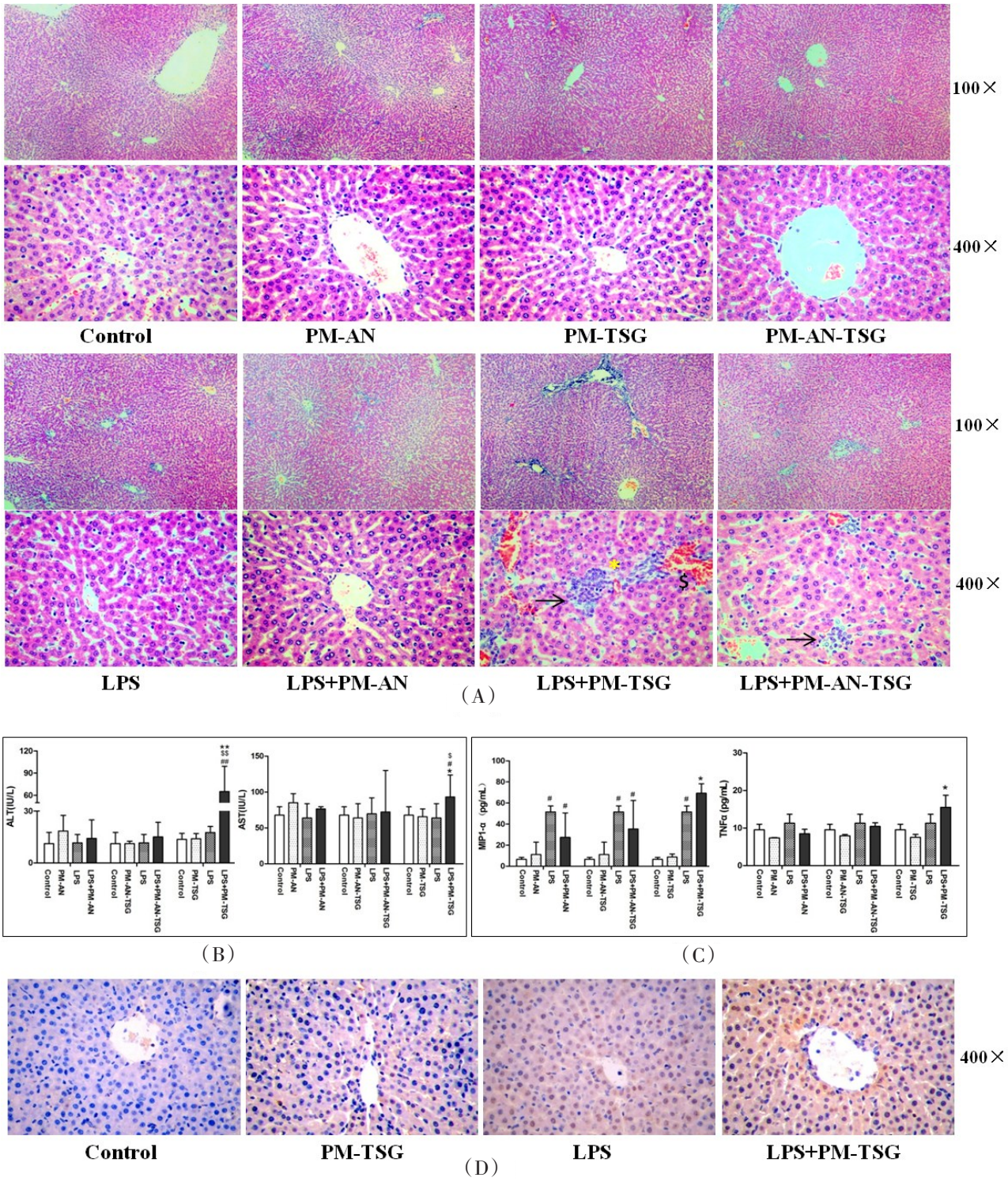
上述利用“组分敲除”技术，显示了蒽醌类成分是造成首乌的免疫特异质肝损伤的主要因素，因此后续实验采用“正证”的思路验证蒽醌类成分是否会造成特异质肝损伤。在体实验选择PM等生药量的制何首乌总蒽醌提取物（AN）灌胃大鼠，并给予LPS刺激。病理结果（见图4A）显示，空白组和AN组无显著病理学改变；LPS组中可见散在炎细胞浸润，肝细胞疏松化；LPS+AN组可见肝组织疏松化，肝细胞水肿，炎细胞浸润，肝细胞坏死。且肝功能指标ALT和AST在AN组和LPS组均未见升高，但LPS+AN组显著升高，有统计学意义（P<0.05）（见图4B）。类似的，实验进一步研究了炎症因子（TNFα和MIP-1α）在AN加重免疫应激大鼠肝损伤中的作用。结果显示（见图4C），LPS组IL-1α、MIP-1α蛋白表达上调（P<0.01 vs. Control），且LPS+AN组加重LPS引起的炎症因子TNFα、IL-1α、MIP-1α上调（P<0.01或P<0.05 vs. LPS）。上述结果证明：AN同样加重免疫应激大鼠肝损伤，且与TNFα、IL-1α、MIP-1α有关，与PM加重免疫应激肝损伤结果一致，进一步验证PM中加重免疫应激特异质肝损伤的物质为蒽醌类成分。

文献报道，LPS作用于单一肝细胞不能模拟动物或人体的免疫应激状态，而TNFα在免疫应激肝损伤中起着不可替代的作用。本实验前期研究结果显示：PM及AN加重免疫应激肝损伤过程中伴随TNFα表达上调，且在肝脏坏死区域聚集。因此我们采用TNFα作用于HepG2细胞体外模拟炎症应激体质，初步考察PM加重免疫应激肝损伤的蒽醌类单体（大黄素、大黄酸、芦荟大黄素）。前期预实验确定了TNFα的无毒剂量（10 ng/mL），同时，在TNFα处理的HepG2细胞中，大黄素和大黄酸10 μM并不引起HepG2细胞活力下降，但芦荟大黄素

（AE）1 μM即会明显抑制HepG2细胞活力（见图4D），且当浓度达到10 μM时，会造成TNFα预处理的HepG2细胞LDH释放明显增加（P<0.01 vs. TNFα）。因此，在考察的三种蒽醌单体中，芦荟大黄素可能是造成制何首乌免疫应激肝损伤的物质之一。

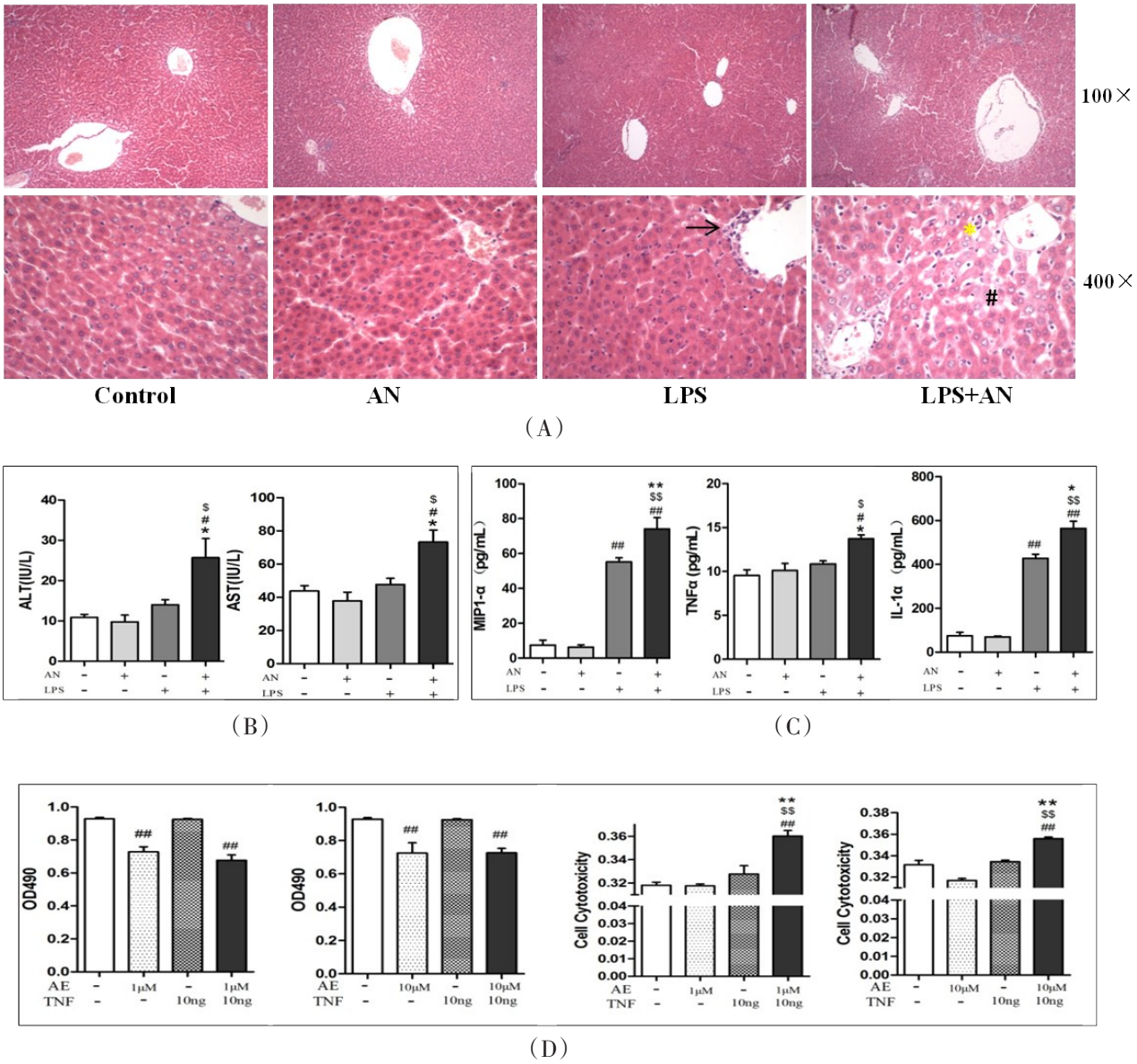
2.3 制何首乌加重免疫应激特异质肝损伤的减毒研究

近年来发现多种植物多糖可有效改善免疫细胞的行为及相关因子的表达，保持免疫系统的正常运



（A）制首乌（PM）祛除不同成分后对免疫应激大鼠肝脏组织形态的影响（H&E染色）。→：炎细胞浸润，*：点状坏死；$：充血；（B）PM祛除不同成分后对免疫应激大鼠肝功能（血清ALT、AST）的影响（n=8）；（C）PM祛除不同成分后对免疫应激大鼠炎症因子（TNFα，MIP-1α）表达的影响（n=8）（ELISA）；（D）PM祛除TSG对免疫应激大鼠肝脏TNFα表达的影响（IHC）。#P<0.05，##P<0.01 vs. Control组；$$P$<0.05，$$$P$<0.01 vs.PM组；*$P$<0.05，**$P$<0.01 vs. LPS组。

图3 制何首乌加重免疫特异质肝损伤的物质基础（组分敲除）



（A）蒽醌类成分（AN）对免疫应激大鼠肝脏组织形态的影响（H&E染色）。→：炎细胞浸润，*：点状坏死；#：水肿；（B）AN对免疫应激大鼠肝功能（血清ALT、AST）的影响（n=7）；（C）PM祛除不同成分后对免疫应激大鼠炎症因子（TNFα，MIP-1α，IL-1α）表达的影响（n=7）（ELISA）；（D） rTNFα及芦荟大黄素（AE）对HepG2细胞LDH释放及细胞活力的影响（n=6）。$^{\#\#}P$<0.01 vs. Control组；$^{\$\$}P$<0.01 vs.PM组；$^{**}P$<0.01 vs. LPS组。

图4　制何首乌蒽醌类成分加重免疫特异质肝损伤

行。本研究选择了四种多/寡糖（女贞子多糖、肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖）进行在体抗炎活性研究，并与制何首乌进行配伍使用，考察其是否可以通过免疫调节作用减轻制何首乌的免疫特异质肝损伤。

在LPS刺激的免疫应激小鼠中，肉苁蓉多糖（CDP）、褐藻寡糖（AO）、壳寡糖（CO）能不同程度的降低炎症因子的含量（见图5）。三种多糖与制何首乌配伍使用，结果显示：在LPS+PM造成的免疫特质性肝损伤小鼠（C57）中，肝组织疏松化，见轻度炎细胞浸润，散在肝细胞坏死，而肉苁蓉多糖、壳寡糖预给药两周能明显改善组织病理学改变（见图6A）。肝脏指数（见图6B）及肝功能指标（AST，ALT，LDH）在模型组（LPS+PM）均明显升高（见图6C），预给药能不同程度的降低各指标，表明二者能缓解PM造成的特异质肝损伤。同时CDP能抑制LPS+PM造成的脾脏指数升高，更说明这种减毒作用与免疫调节相关。因此，我们考察了肝脏中多种促炎因子和趋化因子的表达。如图6D所示，LPS+PM造成多种炎症因子（TNFα, IL-1β, IL-6, MCP-1, MIP-1α, IP-10）表达升高（P< 0.001 vs. Control），CDP和CO对促炎因子TNFα，

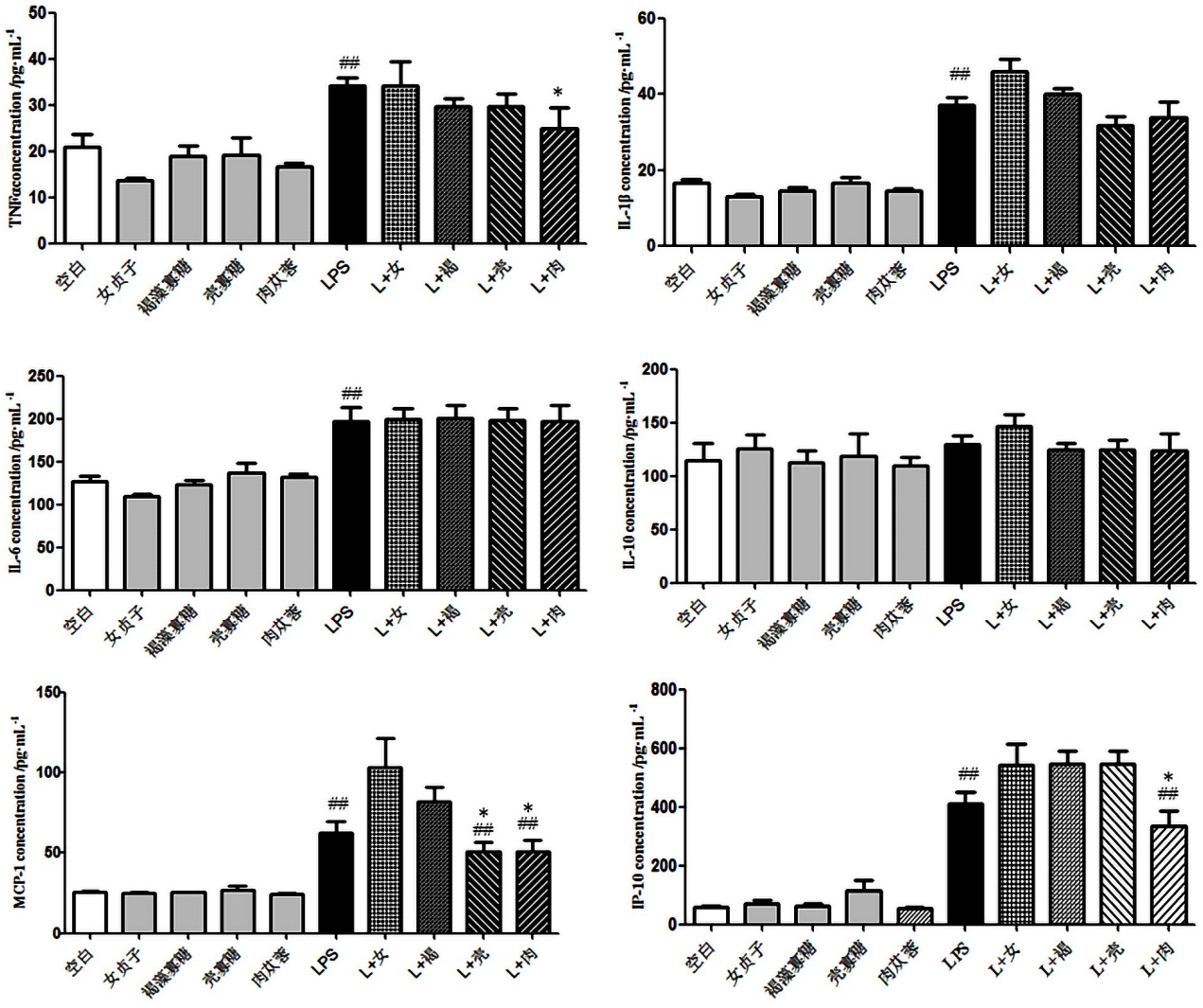
IL-1β及趋化因子MCP-1、MIP-1α有不同程度的抑制作用，表明二者能通过调节炎症应答缓解PM造成的特异质肝损伤。

同样在SD大鼠中，AO灌胃两周后，肝脏无显著病理学改变，LPS+PM组（模型组）见轻度炎细胞浸润，散在肝细胞坏死，而给予AO能明显减轻LPS+PM组的肝损伤（LPS+PM+AO）（见图6E）。肝功能指标与病理改变一致，即LPS+PM造成大鼠血清ALT和AST明显升高，而AO预给药（LPS+PM+AO）两周能使二者显著降低（P<0.05）（见图6F）。本实验同样考察了肝脏多种炎症因子的表达情况（见图6G），LPS+PM造成肝脏MIP-1α、TNFα、IL-1α明显上调（P<0.05或P<0.01 vs. Control），而AO预干预能明显抑制三种炎症因子的表达（LPS+PM+AO vs. LPS+PM, P<0.05）。以上结果说明，AO干预能减轻PM加重的免疫应激大鼠的肝损伤，且调节免疫应激大鼠炎症因子分泌，从而避免肝脏发生急性炎症。

本部分实验结果表明，肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖能缓解PM造成的免疫特异质肝损伤，且与调节炎症反应相关。

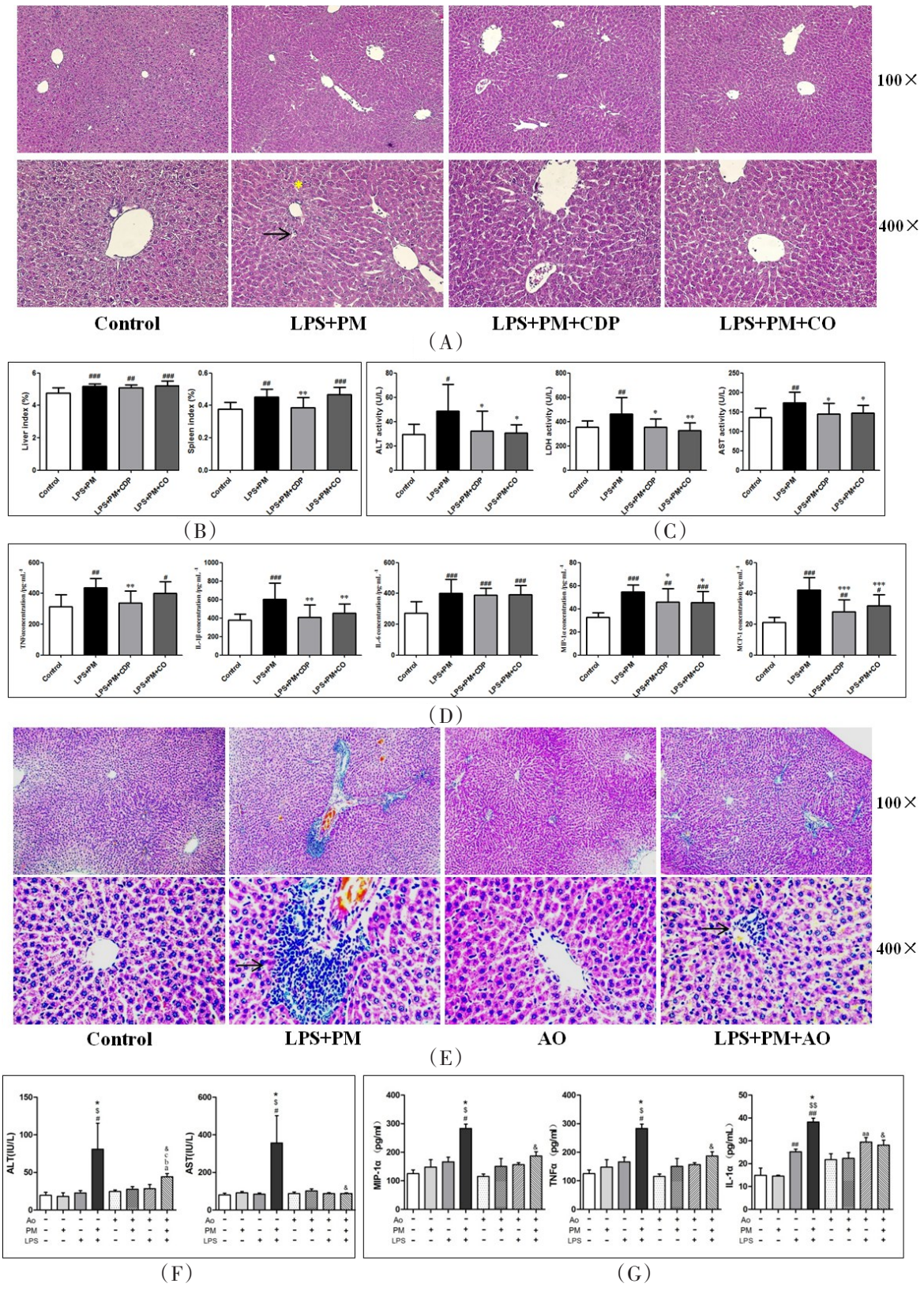
3 讨论

随着中药及其制剂的广泛应用，中药药源性肝损伤的问题日益突出，已成为亟需解决的问题[14,15]。制何首乌是常用补益肝肾的中药，但临床病例报道数据显示制何首乌可致肝脏损伤[16,17]。关于制何首乌造成肝损伤的机制研究有两种，即固有型和特异质型。有研究显示，小鼠灌胃制何首乌28 d、60 d、90 d，均不会引起小鼠血清肝脏病理性改变及ALT



女贞子多糖、肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖对免疫应激大鼠多种炎症因子表达的影响（ELISA）。n=8，##P<0.01 vs. 空白组；*P<0.05 vs. LPS组。

图5 多糖/寡糖的抗炎作用



（A） PM对肉苁蓉多糖（COP）和壳寡糖（CO）干预的免疫应激大鼠肝脏组织形态的影响（H&E染色）。→：炎细胞浸润，*：点状坏死；（B）PM对COP和CO干预的免疫应激小鼠脏器指数的影响（n=12）（ELISA）；（C）PM对COP和CO干预的免疫应激小鼠肝功能（血清ALT、AST）的影响（n=12）（ELISA）；（D）PM对COP和CO干预的免疫应激小鼠多种炎症因子（TNFα，IL-1β，IL-6，MIP-1α，MCP-1）表达的影响（n=12）(ELISA)；（E）PM对褐藻寡糖（AO）干预的免疫应激大鼠肝脏组织形态的影响（H&E染色）。→：炎细胞浸润；（F）PM对AO干预的免疫应激大鼠肝功能（血清ALT、AST）的影响（n=6）；（G） PM对AO干预的免疫应激大鼠炎症因子（TNFα，IL-1α，MIP-1α）表达的影响（n=6） (ELISA)。$^{\#\#}P$<0.01 vs. Control组；$^{\$\$}P$<0.01 vs. PM组；$^{**}P$<0.01 vs. LPS组。

图6 制何首乌加重免疫应激特异质肝损伤的减毒研究

异常升高，但会不同程度的影响肝细胞色素P450酶活性、肝微粒体蛋白含量等，停药后恢复正常[19-21]。本研究及课题组前期研究也表明，大鼠及小鼠单独给予制何首乌或制何首乌提取物中的蒽醌类及二苯乙烯苷类成分，并不引起肝脏病理性改变及ALT和AST的异常升高，但制何首乌及蒽醌类成分会升高回肠非结合型胆酸和鹅去氧胆酸的含量，干扰胆汁酸稳态[22]。另一方面，基于炎症特异质模型的何首乌特异质肝损伤研究较深入。本研究中，经无毒剂量的LPS激活免疫系统后，再灌胃何首乌后大鼠/小鼠肝脏均见不同程度小叶结构改变及局部炎性灶等，且机体多种促炎因子和趋化因子表达升高，炎症通路TLR4-NF-κB激活，证实制何首乌造成免疫应激大鼠的肝损伤。另有研究表明，LPS诱导的何首乌IDILI与PPAR-γ通路异常抑制和相关炎症因子过表达有关[23,24]。最近研究表明，何首乌诱导的肝损伤与机体免疫相关基因HLA-B*35:01等位基因有关，认为其是何首乌特异质肝损伤发生的潜在风险基因[25]。本研究及多项报道均证实，制何首乌的IDILI的发生是免疫相关的。

中药化学成分复杂，制何首乌的化学成分与其致毒成分之间的相关性是研究的重点和难点，中药组分特异性敲除可以用来反证某类成分的作用效果。本研究应用萃取的方法特异性敲除制何首乌中二苯乙烯苷类、蒽醌类成分，并在免疫应激大鼠中进行效果验证，结果显示敲除蒽醌类成分后首乌的肝损伤作用明显减轻，且萃取出的蒽醌类组分使免疫应激大鼠肝脏中炎症因子表达上调，肝脏病理改变，为制何首乌加重免疫应激大鼠肝损伤的物质。另外，前期研究及文献报道显示：蒽醌的代谢受二苯乙烯苷的影响，Xing、Yu等研究发现，二苯乙烯苷上调CYP1A2、抑制UGT1A8和UGT1A2，使大黄素体内暴露量明显升高，即二苯乙烯苷本身并不造成明显肝损伤，但可通过改变蒽醌类物质的代谢加重蒽醌的毒性[10,11]。也有研究发现，顺式二苯乙烯苷与无毒剂量的LPS合用，大鼠肝脏病理改变明显，且与PPAR-γ明显相关，而反式二苯乙烯苷不存在这种效应[23]。因此，何首乌致肝损伤的物质基础仍需要更全面和深入的论证。

中药多糖普遍存在于菌类、藻类等药材中，其具有增强机体免疫力、降低血糖、调节血脂等生物活性[28]。中药对肝损伤的改善作用大多是通过抗氧化、抗炎、抑制凋亡等途径实现[29]。多项研究表明，中药多糖能通过调节机体免疫应答达到保护肝脏的作用[30,31]，在初筛的四种中药多糖（女贞子多糖、肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖）中，肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖均能不同程度的抑制LPS造成的机体炎症因子升高，提示三种多/寡糖有调节炎症反应的作用。在制何首乌造成的免疫特异质肝损伤动物模型中，三者均能减轻肝脏病理改变，并抑制多种炎症因子的升高，其中以肉苁蓉多糖的效果更显著。说明通过与多糖配伍，可有效缓解制何首乌造成的免疫特异质肝损伤。同时，越来越多的研究表明一些多糖和寡糖添加剂对动物肠道菌群起调节作用，可以促进肠道有益菌生长，抑制有害菌生长[32-35]。例如，课题组前期研究表明，肉苁蓉多糖能调节肠道菌群的多样性，增加有益菌群，尤其是促进普氏菌的生长，提高短链脂肪酸的产量[13]。肉苁蓉多糖与首乌配伍的减毒作用机制是否与此相关，有待进一步研究。

本研究显示制何首乌60%醇提取物可加重免疫特异质肝损伤，与炎症因子表达上调、NF-κB通路活化相关；导致其肝损伤的主要物质为蒽醌类物质，二苯乙烯苷影响制何首乌提取物中蒽醌类成分（大黄素）的代谢，导致其体内暴露量升高；而肉苁蓉多糖、褐藻寡糖、壳寡糖与制何首乌配伍，能通过调节炎症反应，缓解制何首乌造成的免疫特异质肝损伤。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 175-176.

[2] KUNA L, BOZIC I, KIZIVAT T, et al. Models of drug induced liver injury (DILI)-current issues and future perspectives[J]. Curr Drug Metab, 2018, 19(10): 830-838.

[3] 涂灿, 葛斐林, 郭玉明, 等. 何首乌相关肝损伤临床特征及用药合理性分析[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(5): 270-276.

[4] XUE X Y, QUAN Y Y, GONG L H, et al. A review of the processed Polygonum multiflorum (Thunb.) for hepatoprotection: clinical use, pharmacology and toxicology[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 261: 113121.

[5] 谢丽华. 何首乌醇提液对LPS诱导致大鼠肝损伤机制研究[D]. 广东药科大学, 2016: 80.

[6] RAO T, LIU Y T, ZENG X C, et al. The hepatotoxicity of Polygonum multiflorum: the emerging role of the immune-mediated liver injury[J]. Acta Pharmacol Sin,

2021, 42(1): 27-35.

[7] LIU Y, WANG Q, YANG J B, et al. Polygonum multiflorum thunb.: a review on chemical analysis, processing mechanism, quality evaluation, and hepatotoxicity[J]. Front Pharmacol, 2018, 9:364.

[8] LIN L, NI B, LIN H, et al. Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of Polygonum multiflorum Thunb.: a review[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 159: 158-183.

[9] ZHANG L, LIU X Y, TU C, et al. Components synergy between stilbenes and emodin derivatives contributes to hepatotoxicity induced by Polygonum multiflorum[J]. Xenobiotica, 2020, 50(5): 515-525.

[10] XING Y C, WANG L L, WANG C X, et al. Pharmacokinetic studies unveiled the drug-drug interaction between trans-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -d-glucopyranoside and emodin that may contribute to the idiosyncratic hepatotoxicity of Polygoni Multiflori Radix[J]. J Pharmaceut Biomed, 2019, 164: 672-680.

[11] YU Q, JIANG L, LUO N, et al. Enhanced absorption and inhibited metabolism of emodin by 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucopyranoside: possible mechanisms for Polygoni Multiflori Radix-induced liver injury[J]. Chin J Nat Medicines, 2017, 15(6): 451-457.

[12] WANG L, SANG M, LIU E, et al. Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from Polygonum multiflorum by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC–MS/MS[J]. J Pharmaceut Biomed, 2017, 140: 45-61.

[13] FU Z F, HAN L F, ZHANG P, et al. Cistanche polysaccharides enhance echinacoside absorption in vivo and affect the gut microbiota[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 149: 732-740.

[14] 景婧, 何婷婷, 王睿林, 等. 药物性肝损伤临床风险信号发现: 挑战与进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(3): 491-496.

[15] 肖小河. 中药安全性风险防控: 从被动走向主动[A]. 中国中西医结合学会临床药理与毒理专业委员会. 2019中国中西医结合学会临床药理与毒理专业委员会第三届学术研讨会论文摘要集[C]. 中国中西医结合学会临床药理与毒理专业委员会: 中国中西医结合学会, 2019: 1.

[16] 王婉茹, 洪滨, 单国顺. 何首乌肝毒性作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 378-382.

[17] LEI X, CHEN J, REN J T, 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, 2015: 459749.

[18] KATAREY D, VERMA S. Drug-induced liver injury[J]. Clin Med (Lond), 2016, 16 (Suppl 6): s104-s109.

[19] 胡锡琴, 杨红莲, 张晓琴, 等. 制何首乌对大鼠肝脏毒理的实验研究[J]. 陕西中医学院学报, 2006, 29(3): 40-41.

[20] 王文静, 李娅琳. 生何首乌、制何首乌对大鼠肝微粒体CYP450的影响[J]. 现代中医药, 2014, 34(2): 76-79.

[21] 李浩, 杨红莉, 李登科, 等. 何首乌水提物对大鼠肝脏CYP1A2,CYP2E1酶活性及mRNA表达抑制作用研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1370-1375.

[22] WEI J, CHEN J R, FU L L, et al. Polygonum multiflorum Thunb suppress bile acid synthesis by activating Fxr-Fgf15 signaling in the intestine[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 235: 472-480.

[23] MENG Y K, LI C Y, LI R Y, et al. Cis-stilbene glucoside in Polygonum multiflorum induces immunological idiosyncratic hepatotoxicity in LPS-treated rats by suppressing PPAR-γ[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(10): 1340-1352.

[24] 张乐, 柏兆方, 李春雨, 等. 制何首乌中顺式二苯乙烯苷转化量与特异质肝损伤的相关性研究[J]. 药学学报, 2017, 52(7): 1041-1047.

[25] LI C P, RAO T, CHEN X P, et al. HLA-B*35:01 allele is a potential biomarker for predicting polygonum multiflorum-induced liver injury in humans[J]. Hepatology, 2019, 70 (1): 346-357.

[26] REN X, WANG G, WANG M, et al. Kinetics and mechanism of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -d-glycoside (THSG) degradation in aqueous solutions[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55(1): 211-215.

[27] 董立华, 郭盼盼, 闫文英, 等. 顺、反式二苯乙烯苷在小鼠体内药动学及组织分布的对比研究[J]. 中药材, 2014, 37(9): 1627-1632.

[28] YU Y, SHEN M Y, SONG Q Q, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review[J]. Carbohydr Polym, 2018, 183: 91-101.

[29] 李军民, 高秉红, 李平. 中药对肝损伤的干预作用研究进展[J]. 中国药业, 2021, 30(4): 96-101.

[30] XU Q M, XU J, ZHANG K F, et al. Study on the protective effect and mechanism of Dicliptera chinensis (L.) Juss (Acanthaceae) polysaccharide on immune liver injury induced by LPS[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111159.

[31] WU T, SHEN M Y, GUO X M, et al. Cyclocarya paliurus polysaccharide alleviates liver inflammation in mice via beneficial regulation of gut microbiota and TLR4/MAPK signaling pathways[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 160:

（下转第82页）