

【实验研究】

以OATP1B1/OATP1B3转运体为作用靶点的何首乌肝毒性成分筛选

汪 祺, 文海若*, 马双成*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 建立以有机阴离子转运多肽1B1 (OATP1B1) 和OATP1B3为作用靶点的何首乌肝毒性成分快速筛选方法。方法 使用Discovery Studio 2.5软件将何首乌主要单体成分(48个)与OATP1B1/OATP1B3蛋白进行分子对接,以OATP1B1和OATP1B3主要转运底物胆红素作为阳性对照,对目标化合物进行虚拟筛选;采用CCK-8法考察芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(AEG)、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(EG)、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(PG)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷(TSG)处理24 h后对人源肝永生细胞HepaRG的毒性强弱,并采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)技术测定4种化合物对HepaRG细胞的OATP1B1和OATP1B3 mRNA表达量的影响。结果 与OATP1B1对接结果显示,polygonumnolide B3、*cis*-emodin-phycionbianthrone、polygonumnolide B2、大黄素甲醚-8- β -D-(6'-*O*-乙酰基)-葡萄糖苷、*trans*-emodin-phycionbianthrone、大黄素-3-甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、polygonumnolide B4、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、EG、大黄素-1-*O*- β -D-葡萄糖苷、AEG、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷高于胆红素得分值的80%,可被初步认定为潜在毒性成分;与OATP1B3对接结果显示,*trans*-emodin-phycionbianthrone、PG、polygonumnolide A4及虎杖苷高于胆红素得分值的80%,可被初步认定为潜在毒性成分。CCK-8实验进一步证实AEG、EG及PG均具肝细胞毒性作用,半数抑制浓度分别为16.10、49.43、69.44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,与分子对接结果一致。与对照组比较,AEG、EG均可显著下调OATP1B1的mRNA表达水平($P<0.05$);PG可显著下调OATP1B3的mRNA表达水平($P<0.05$)。结论 以OATP1B1/OATP1B3分子对接技术为切入点,可有效预测何首乌潜在肝毒性成分,实现快速高效的高通量筛选,为中药安全性评价提供新思路。

关键词: 何首乌; 有机阴离子转运多肽1B1 (OATP1B1); 有机阴离子转运多肽1B3 (OATP1B3); 分子对接; 肝毒性; 安全评价; 芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 02-0227-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.02.004

Hepatotoxic components screening in *Polygonum multiflorum* by taking OATP1B1/OATP1B3 transporters as targets

WANG Qi, WEN Hairuo, MA Shuangcheng

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish a rapid screening method for hepatotoxic components in *Polygonum multiflorum* by taking the organic anion transporting polypeptide 1B1 and 1B3 transporters (OATP1B1, OATP1B3) as the target. **Methods** At first, computer molecular docking technology was adopted, and Discovery Studio 2.5 software was applied to molecularly dock the target compounds with the OATP1B1/OATP1B3, and the target compounds were screened virtually with bilirubin as the reference objects. Subsequently, the cell counting kit (CCK-8) method was used to investigate the toxicity of aloe-emodin-8-*O*-glucoside (AEG), emodin-8-*O*- β -D-glucoside (EG), physcion-8-*O*- β -D-glucoside (PG), and 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-*O*- β -D-glucoside (TSG) on human liver immortalized hepatocytes HepaRG after a 24 h treatment, and real-time PCR (qRT-PCR) was used to determine the effects of the target compounds on the relative expression level of the OATP1B1/OATP1B3 gene in HepaRG cells. **Results** Docking results with OATP1B1 showed that, polygonumnolide B3, *cis*-emodin-phycionbianthrone, polygonumnolide B2, emodin methyl ether-8- β -D-(6'-*O*-acetyl)-glucoside, *trans*-emodin-phycionbianthrone, emodin-3-methylether-8-*O*- β -D-glucoside, polygonumnolide

收稿日期: 2021-07-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973476)

第一作者: 汪 祺, 研究员, 研究方向为中药质量及安全性评价。Tel: (010)67095282 E-mail: sansan8251@sina.com

*共同通信作者: 文海若, 女, 研究员, 研究方向为药物遗传毒性评价。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

马双成, 研究员, 研究方向为中药民族药物物质基础与质量安全评价研究。E-mail: msc@nifdc.org.cn

B4, rhubarb phenol-8-*O*-glucoside, EG, emodin-1-*O*- β -*D*-glucoside, AEG, rhubarb phenol-8-*O*- β -*D*-glycosidase, rhein-8-*O*-glycosidase higher bilirubin score of 80%, can be initially identified as potential toxic ingredients. The results of docking with OATP1B3 showed that *trans*-emodin-phycionbianthrone, PG, polygonumolide A4 and polygonumolide were higher than 80% of the score of bilirubin, which could be initially identified as potential toxic ingredients. CCK-8 assay further confirmed that AEG, EG and PG had hepatocellular toxicity, and the median inhibitory concentrations (IC_{50}) were 16.10, 49.43 and 69.44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, which were consistent with the molecular docking results. Compared with control group, AEG and EG significantly down-regulated OATP1B1 mRNA expression levels ($P < 0.05$). PG significantly down-regulated OATP1B3 mRNA expression level ($P < 0.05$). **Conclusion** This study used the OATP1B1/OATP1B3 molecular docking technology as a starting point to effectively predict the potential hepatotoxic components of *Polygonum multiflorum*, and a rapid and efficient high-throughput hepatotoxicity screening is achieved. These provide new ideas for the safety evaluation of traditional Chinese medicine.

Key words: *Polygonum multiflorum*; organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1); organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3); molecular docking; hepatotoxicity; safety evaluation; aloe-emodin-8-*O*-glucoside; emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside; phycion-8-*O*- β -*D*-glucoside

何首乌是蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. P. M. 的干燥块根, 由于其具有补肝肾、益精血、乌须发的功效, 自古以来是历代医家广为推崇的补益药和抗衰老药, 因此临床应用非常广泛。然而近年来有关何首乌毒性问题逐渐引起关注^[1-5], 何首乌制剂(涉及1 000多种)的不良反应报告超过2万份, 肝功能损害是其主要不良反应。国家食品药品监督管理局于2014年正式发布何首乌及其相关制剂可引发肝损伤。何首乌引发的药物性肝损伤已经占到全部药物肝损害病例的前15位, 为全部中药肝损害病例排名第1位^[6]。毒性问题使何首乌的临床应用和开发受到了极大的限制。目前亟需揭示何首乌致肝毒性作用机制, 明确可能的毒性成分。

胆汁瘀积引发的肝损伤是由于各种原因导致的胆汁酸代谢障碍或胆红素代谢受阻产生的, 与体内胆汁酸、胆红素代谢通路中多种转运蛋白密切相关, 有机阴离子转运多肽(OATPs)是溶质运载体(solute carrier, SLC)超家族的重要成员之一, 可介导药物及内源性物质的跨膜转运。其中OATP1B1和OATP1B3在肝脏中高表达, 位于肝细胞的基底侧, 二者在药物和内源性物质的肝摄取过程中起着至关重要的作用^[7]。

研究表明OATP1B1和OATP1B3是摄取内源性物质胆红素进入肝细胞的转运体, 其中OATP1B1起主要转运作用^[8-11]。由于OATP1B1转运底物范围广, 有可能会竞争性地抑制OATP1B1介导的胆红素转运, 继而引发胆红素代谢异常等疾病^[12]。据文献报道, 何首乌引发的肝损伤临床表现多为不同程度的黄疸及胆汁淤积, 与OATP1B1/OATP1B3转运体抑制后的表现相似, 因此本研究以OATP1B1/OATP1B3转运体为切入点, 拟采用分子对接结合体

外细胞实验的方法, 筛选何首乌中潜在肝毒性成分。

1 材料

1.1 主要仪器

Nano-100分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司); EDC-810 PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司); FQD-96A实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪(杭州博日Line Gene 9620); VICTOR X5多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司); ETC811基因扩增仪(北京东胜创新生物科技有限公司); LEGEND MICRO17R台式高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific); Vortex-Genie 2涡旋振荡器(美国Scientific Industries公司); 悬滴GravityPlus™板、GravityTRAP™板均为瑞士Insphero公司。

1.2 细胞及主要试剂

人源肝细胞HepaRG系购自ATCC。

2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(TSG, 货号110844-201915, 质量分数90.7%)购自中国食品药品检定研究院; 大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(PG, 货号B24680, 质量分数>98.0%)、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(AEG, 货号B20773, 质量分数>98.0%)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(EG, 货号B20241, 质量分数>98.0%)均购自上海源叶生物科技有限公司; 0.25% Trypsin-EDTA、胎牛血清(FBS, 货号10099-141)购自Gibco公司; 二甲基亚砜(DMSO, 美国Sigma-Aldrich公司); 10 000×DuRed核酸染料(D009-500 μL)购自北京富百科生物技术有限公司; 琼脂糖(货号111860)购自Spain Biowest公司; 总RNA提取试剂盒(货号HS0402)、Real SYBR Mixture(货号HS0613)、cDNA第一链合成试剂盒(货号HS0611)、2×Taq PCR Mastermix(货号HS0602)及D2000 DNA Marker(货

号HS0713)均购自北京厚生博泰生物技术有限公司。

2 方法

2.1 分子对接

通过文献报道^[13-15]检索收集何首乌主要单体成分,初步选择48个单体(涵盖二苯乙烯苷类、蒽醌类、蒽酮类成分等)进行测定,采用Discovery Studio 2.5对这些分子进行预处理,预处理主要包括以下操作:三维结构生成、结构优化、删除重复结构,获得48个分子的化学结构,基于这些结构构建配体库并以此进行后续的虚拟筛选。

将OAT1B1/OATP1B3的蛋白序列从Uniprot数据库(<http://www.rcsb.org>)中下载,采用trRosetta构建OAT1B1/OATP1B3的同源模建结构,采用拉氏图和Verify-3D方法评价同源模建结构。对蛋白结构进行预处理操作,主要包括结构优化、质子化等操作。后续的分子对接将利用经过处理的蛋白结构。

在本研究中,定义的活性位点是文献报道^[16]中记录的关键氨基酸残基作为活性位点的初始位置。分子对接是利用DS 2.5中的LibDock方法。选取阳性化合物胆红素打分的80%为最低标准,将打分高于阈值且相互作用模式与原配体相似的筛选化合物定义为潜在的活性化合物^[17-19]。

2.2 HepaRG细胞毒性考察

取对数生长期的HepaRG细胞,消化后调整至 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,于96孔板中每孔接种细胞约5 000个,孵育24 h后给药。分别设置对照组(0.5%DMSO)、空白对照组(不含HepaRG细胞)、不同质量浓度的目标化合物给药组TSG(15、40、150、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、PG(15、40、150、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、AEG(1、3、10、30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、EG(15、30、150、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。体系置于37 °C、5% CO₂条件下孵育24 h,每孔加入细胞活力检测(CCK-8)试剂10 μL ,37 °C避光孵育2 h,采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的吸光度(A)值,按公式计算细胞存活率^[20],计算各单体的半数抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}})$$

2.3 qRT-PCR实验

细胞培养及给药条件同“2.2”项,组别设置为对照组(0.5%DMSO)、TSG组、PG组、AEG组、EG组,给药质量浓度均为0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。不同化合物处理24 h后,经PBS缓冲液洗涤2次,加入0.25%胰蛋白酶-EDTA消化并离心收集细胞。

引物序列见表1,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用通用型总RNA提取试剂盒进行RNA提取,再使用Nano-100测定RNA浓

度和纯度(测量前先用溶解RNA用的DEPC水调零)。采用cDNA第一链合成试剂盒进行cDNA反转录,然后进行qRT-PCR检测^[21]。以 β -actin作为内参,反应步骤见表2。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	引物序列(5'-3')
OATP1B1 正向	ATACCAATCCAAGCCTCTACCT
OATP1B1 反向	TGGAAAGTGCCACAGAGTATC
OATP1B3 正向	AAGCACTTGCAATGGGTTTC
OATP1B3 反向	AGCTGTTGGTGGACCACTTC
β -actin 正向	AGCCATGTACGTAGCCATCC
β -actin 反向	ACCCTCATAGATGGGCACAG

表2 qRT-PCR反应步骤

Table 2 Reaction steps of qRT-PCR

步骤	温度/°C	时间	循环
PCR 预变性	95	10 min	1
变性	95	20 s	40
退火	55	20 s	
延伸	72	30 s	

2.4 统计学分析

数据采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 分子对接实验结果

采用trRosetta构建OAT1B1/OAT1B3的同源模建结构,其结构及拉氏图见图1、2,Verify-3D评分见表3。结果提示该模型可以用于分子对接研究。

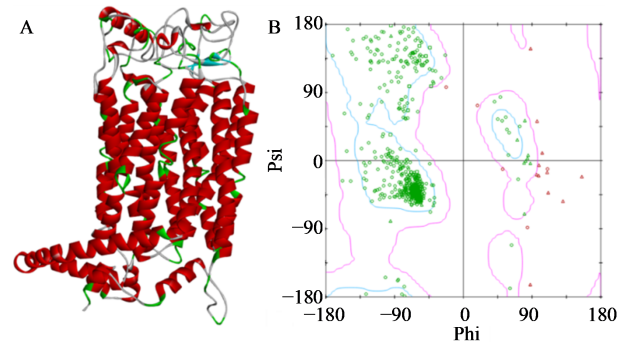


图1 OAT1B1同源模建结构(A)及拉氏图(B)

Fig. 1 Homology model structure (A) and Lagrange diagram (B) of OATP1B1

胆红素对接结果见表4,OATP1B1模型中胆红素对接打分为107.993,截断阈值为86.394;OATP1B3模型中胆红素对接打分为123.953,截断阈值为99.162。

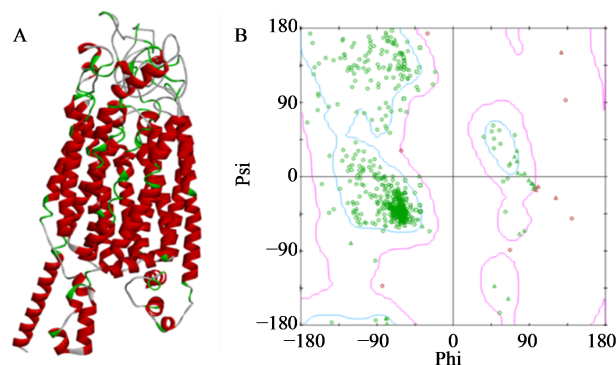


图2 OATP1B3同源模建结构(A)及拉氏图(B)

Fig. 2 Homology model structure (A) and Lagrange diagram (B) of OATP1B3

表3 Verify-3D评分

Table 3 Verify-3D score

名称	验证值	验证预期最高值	验证预期最低值
OAT1B1	215.04	316.539	142.442
OAT1B3	217.21	321.618	144.728

表4 胆红素对接打分结果

Table 4 Docking results of bilirubin

化合物	对接蛋白	对接打分
胆红素	OATP1B1	107.993
胆红素	OATP1B3	123.953

何首乌成分的对接结果见表5、6,其中30个目标成分无法与OATP1B1结合,32个目标成分无法与OATP1B3结合。参考阳性化合物的对接结果,以其打分值的80%为最低标准^[17-19],初步判断可与胆红素形成竞争的OATP1B1的底物为polygumnolide B3、*cis*-emodin-phycionbianthrone、polygumnolide B2、大黄素甲醚-8- β -D-(6'-O-乙酰基)-葡萄糖苷、*trans*-emodin-phycionbianthrone、大黄素-3-甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷、polygumnolide B4、大黄酚-8-O-葡萄糖苷、EG、大黄素-1-O- β -D-葡萄糖苷、AEG、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-O-葡萄糖苷;可与胆红素形成竞争的OATP1B3的底物为*trans*-emodin-phycionbianthrone、PG、polygumnolide A4及虎杖苷;可被初步认定为潜在毒性成分。

3.2 HepaRG细胞毒性考察

选择何首乌中含量较高,同时具有代表性的目标化合物EG、AEG、PG和TSG,对分子对接实验结果进行验证。如图3、表7所示,分子对接打分值较高的EG、AEG和PG表现出明显的HepaRG细胞毒性,IC₅₀值较小;而分子对接打分值均较低的TSG肝细胞毒性较小,IC₅₀值较大。体外毒性实验数据与分子对接筛选结果相一致。

表5 何首乌成分与OATP1B1对接结果

Table 5 OATP1B1 docking results with components in *Polygonum multiflorum*

化合物	对接打分
polygumnolide B3	122.649
<i>cis</i> -emodin-phycionbianthrone	121.671
polygumnolide B2	102.048
大黄素甲醚-8- β -D-(6'-O-乙酰基)-葡萄糖苷	99.761
<i>trans</i> -emodin-phycionbianthrone	95.259
大黄素-3-甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷	92.470
polygumnolide B4	91.439
大黄酚-8-O-葡萄糖苷	90.081
EG	90.081
大黄素-1-O- β -D-葡萄糖苷	88.315
AEG	87.842
大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷	87.602
大黄酸-8-O-葡萄糖苷	87.297
TSG	83.571
芦荟大黄素	81.920
PG	81.572
表儿茶素	73.219
大黄素-6-O- β -D-葡萄糖苷	71.724

表6 何首乌成分与OATP1B3对接结果

Table 6 OATP1B3 docking results with components in *Polygonum multiflorum*

化合物	对接打分
<i>trans</i> -emodin-phycionbianthrone	107.452
PG	104.263
polygumnolide A4	100.205
虎杖苷	98.198
大黄素甲醚-8- β -D-(6'-O-乙酰基)-葡萄糖苷	97.005
大黄酸-8-O-葡萄糖苷	96.204
大黄素-1-O- β -D-葡萄糖苷	90.974
顺式二苯乙烯苷	89.780
TSG	88.486
<i>cis</i> -emodin-phycionbianthrone	85.188
大黄素-3-甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷	84.245
大黄酚-8-O-葡萄糖苷	83.776
EG	83.776
大黄素-6-O- β -D-葡萄糖苷	81.127
大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷	80.299
AEG	79.763

3.3 EG、AEG、PG和TSG对OATP1B1/OATP1B3转运体表达的影响

与对照组比较, AEG、EG均可显著下调

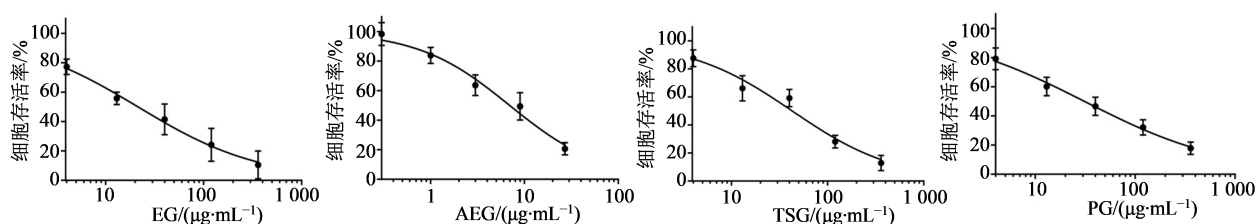
图3 TSG、PG、AEG和EG对HepaRG细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Effects of TSG, PG, AEG and EG on HepaRG cell activity ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表7 肝细胞毒性结果

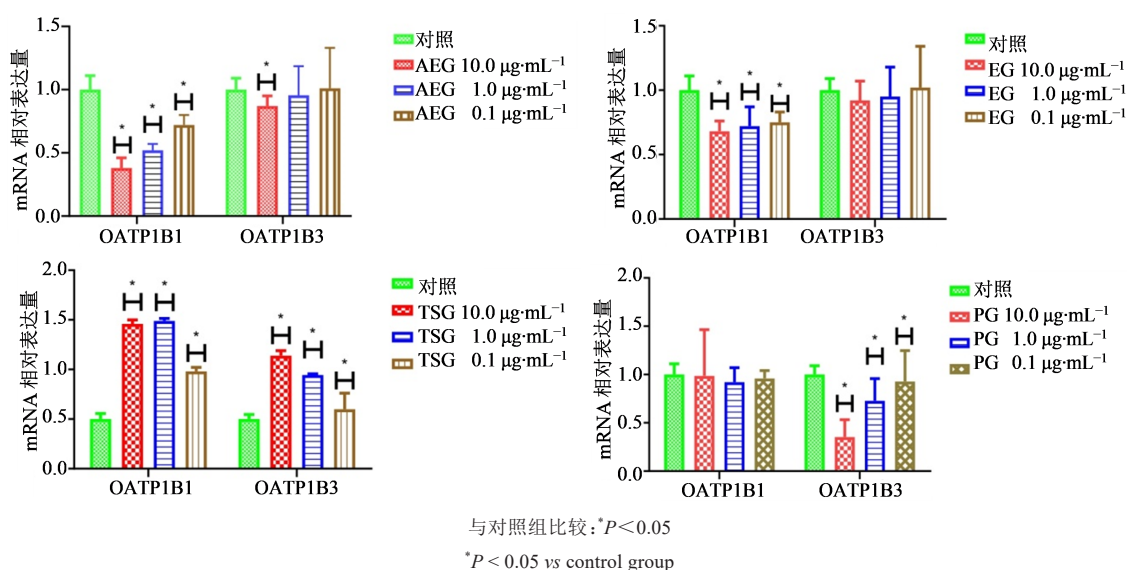
Table 7 Hepatotoxicity results

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
AEG	16.10
EG	49.43
PG	69.44
TSG	105.24

OATP1B1的mRNA表达水平($P < 0.05$),且作用存在剂量效应相关性,但二者对OATP1B3转运体无明显影响;TSG可同时显著上调OATP1B1、OATP1B3的mRNA表达水平,且存在剂量效应相关性;PG对OATP1B1 mRNA表达水平影响不大,但可显著下调OATP1B3的mRNA表达水平($P < 0.05$)。结合细胞毒性数据,初步推测认为AEG、EG主要作用于OATP1B1转运体,而PG主要影响OATP1B3,3个单体成分不同程度地可对胆红素、胆汁酸代谢循环产生影响,存在引发肝毒性的可能。结果见图4。

4 讨论

探寻何首乌中致肝损伤单体成分目前仍是众多学者的研究热点。已报道的何首乌中肝毒性成分的筛选方法主要采用体外细胞、微组织或动物实验。有研究采用制首乌、大黄酸、大黄素、大黄酚对大鼠ig给药3个月,检测出肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与制首乌不同成分引发大鼠肝脏细胞凋亡有相关性^[22]。此外,研究人员还运用MTT法检测何首乌中游离蒽醌、结合蒽醌及萘类共11个单体成分对Hep G2细胞的毒性,将有明确细胞毒的成分与大鼠肝切片共同培养后制备肝组织匀浆,通过BCA法测定匀浆液中蛋白含量对细胞毒成分进行验证,以考察这些成分对肝组织的毒性作用^[23]。然而采用体外细胞、微组织实验的筛选方法存在肝毒性成分靶点不明确的问题,此外采用动物实验的筛选方法存在耗时长、费用高等问题。分子对接技术是基于计算机科学,通过受体结构特征以及受体和药物分子之间的相互作用来进行药物设计的方法,主要应用

图4 TSG、PG、AEG和EG对HepaRG细胞OATP1B1、OATP1B3 mRNA表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Effects of TSG, PG, AEG and EG on expression level of OATP1B1 and OATP1B3 mRNA in HepaRG cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

于药物分子设计领域。该技术用于研究分子间(如配体和受体)相互作用,并预测其结合模式和亲和力,是一种快速且准确的高通量筛选手段。

在已知的11种有机阴离子转运体中,OATP1B1和OATP1B3扮演着重要的角色,也是备受关注的2种摄取转运体,它们同属OATP1B家族,具80%的同源性^[24-25],都特异性地表达于肝脏窦状隙膜上,参与它们底物的肝脏摄取,是内源性物质如胆汁酸、胆红素或外源性药物在肝脏代谢或胆汁排泄前至关重要的一步^[26-28]。由于胆汁酸、胆红素代谢异常引发的肝毒性为何首乌临床致肝损伤的主要原因,本课题组推测何首乌中的毒性成分可能作用于这2个靶点蛋白,引发肝损伤。在此假说下,本研究以OATP1B1、OATP1B3靶蛋白为切入点,首先通过分子对接手段对何首乌中48个代表性成分进行筛选;其次,将对接打分值高的单体进一步进行体外肝细胞毒性验证,同时测定单体对靶蛋白OATP1B1/OATP1B3 mRNA的影响,结果发现与分子对接结果相一致,初步证明了何首乌中EG、AEG可通过影响OATP1B1转运体,PG可通过影响OATP1B3转运体,继而干扰胆红素、胆汁酸代谢,引发肝毒性。本研究将分子对接技术应用于预测药物潜在肝毒性风险,实现了快速高效的高通量筛选,为中药安全性评价提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] Lin L F, Ni B R, Lin H M, et al. Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.: A review [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 159: 158-183.
- [3] Hinshaw L B. Sepsis/septic shock: Participation of the microcirculation: An abbreviated review [J]. Crit Care Med, 1996, 24(6): 1072-1078.
- [4] Panis B, Wong D R, Hooymans P M, et al. Recurrent toxic hepatitis in a Caucasian girl related to the use of Shou-wu-pian, a Chinese herbal preparation [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005, 41(2): 256-258.
- [5] Jung K A, Min H J, Yoo S S, et al. Drug-induced liver injury: Twenty five cases of acute hepatitis following ingestion of *Polygonum multiflorum* thunb [J]. Gut Liver, 2011, 5(4): 493-499.
- [6] 国家食品药品监督管理局药品评价中心. 英国 MHRA 警告何首乌的肝损害不良反应 [J]. 中国药物警戒, 2006, 3(5): 313-314.
- Center for Drug Reevaluation, NMPA. British MHRA warns *Polygonum multiflorum* of adverse reactions to liver damage [J]. Chin J Pharmacovigil, 2006, 3(5): 313-314.
- [7] Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, et al. The organic anion transporter (OATP) family [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2004, 19(3): 171-179.
- [8] Chang J H, Plise E, Cheong J, et al. Evaluating the in vitro inhibition of UGT1A1, OATP1B1, OATP1B3, MRP2, and BSEP in predicting drug-induced hyperbilirubinemia [J]. Mol Pharm, 2013, 10(8): 3067-3075.
- [9] Cui Y, König J, Leier I, et al. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6 [J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 9626-9630.
- [10] Hoekstra L T, de Graaf W, Nibourg G A, et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: A review [J]. Ann Surg, 2013, 257(1): 27-36.
- [11] König J, Cui Y, Nies A T, et al. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 278(1): G156-G164.
- [12] Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, et al. Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 27(4): 368-378.
- [13] Teka T, Wang L M, Gao J, et al. *Polygonum multiflorum*: recent updates on newly isolated compounds, potential hepatotoxic compounds and their mechanisms [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 271: 113864.
- [14] Yang J B, Yan Z, Ren J, et al. Polygonumolides A1-B3, minor dianthrone derivatives from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. Arch Pharm Res, 2018, 41 (6): 617-624.
- [15] Yang J B, Li L, Dai Z, et al. Polygonumolides C1-C4; minor dianthrone glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18 (9): 813-822.
- [16] Székely V, Patik I, Ungvári O, et al. Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions [J]. Eur J Pharm Sci, 2020, 151: 105395.
- [17] 边亚倩, 马 婧, 任 越, 等. 基于 VEGFR, FGFR 探讨中药方剂对 COVID-19 后遗症肺纤维化的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1481-1487.
- Bian Y Q, Ma J, Ren Y, et al. Discovery of intervention effect of Chinese herbal formulas on COVID-19

- pulmonary fibrosis treated by VEGFR and FGFR inhibitors [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(7): 1481-1487.
- [18] 谷 宇, 张 栩, 陈艳昆, 等. 基于分子模拟技术筛选大黄、羌活、秦艽的5-LOX、LTA4H抑制剂[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4494-4502.
- Gu Y, Zhang X, Chen Y K, et al. Discover potential inhibitors of 5-LOX and LTA4H from *Rhei Radix et Rhizoma*, *Notopterygii Rhizoma et Radix* and *Genitana Macrophyllae Radix* based on molecular simulation methods [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(23): 4494-4502.
- [19] 谷 宇, 雒银珍, 赵博文, 等. 基于分子模拟技术探讨豨莶通栓制剂的抗炎作用机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2572-2579.
- Gu Y, Luo Y Z, Zhao B W, et al. Anti-inflammatory mechanism of Xixian Tongshuan Preparation based on molecular simulation methods [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(12): 2572-2579.
- [20] 颜玉静, 淡 墨, 汪 祺, 等. 基于2D和3D肝细胞模型的何首乌体外肝毒性评价[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(7): 385-392.
- Yan Y J, Dan M, Wang Q, et al. Hepatotoxicity evaluation of *Polygonum multiflorum* based on 2D and 3D hepatocyte models *in vitro* [J]. Chin J Pharmacovigil, 2019, 16(7): 385-392.
- [21] 淡 墨, 刘 栋, 黄舒佳, 等. 3D肝细胞模型研究大黄素型单蒽酮肝细胞毒性[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(11): 1312-1317.
- Dan M, Liu D, Huang S J, et al. Study the hepatotoxicity of monoanthranone with emodin-type using *in vitro* 3D liver model [J]. Chin J New Drugs, 2019, 28(11): 1312-1317.
- [22] 卫培峰, 胡锡琴, 苗彦霞. 制首乌不同成分诱导肝细胞凋亡与肿瘤坏死因子 α 的相关性研究[J]. 四川中医, 2009, 27(10): 47-48.
- Wei P F, Hu X Q, Miao Y X, et al. Study on the correlation between different components of shouwu inducing hepatocyte apoptosis and tumor necrosis factor α [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2009, 27(10): 47-48.
- [23] 杨 敏, 刘 婷, 冯伟红, 等. 何首乌肝毒性物质基础探索研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1289-1296.
- Yang M, Liu T, Feng W H, et al. Exploration research on hepatotoxic constituents from *Polygonum multiflorum* root [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(7): 1289-1296.
- [24] König J. Uptake transporters of the human OATP family: Molecular characteristics, substrates, their role in drug-drug interactions, and functional consequences of polymorphisms [J]. Handb Exp Pharmacol, 2011(201): 1-28.
- [25] Zimmerman E I, Hu S Y, Roberts J L, et al. Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the disposition of sorafenib and sorafenib-glucuronide [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(6): 1458-1466.
- [26] Niemi M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs [J]. Pharmacogenomics, 2007, 8(7): 787-802.
- [27] Nakanishi T, Tamai I. Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 27(1): 106-121.
- [28] Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, et al. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: Their roles in hepatic clearance and intestinal absorption [J]. Biopharm Drug Dispos, 2013, 34(1): 45-78.

[责任编辑 兰新新]