

## 何首乌肝毒性作用机制的研究进展

王婉茹<sup>1</sup>, 洪 滨<sup>1</sup>, 单国顺<sup>2</sup>

1. 中国医科大学肿瘤医院 辽宁省肿瘤医院 药学部, 辽宁 沈阳 110042

2. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

**摘 要:** 何首乌几个世纪以来一直被用作补益良药, 在《中国药典》中有两种药物形式, 即生首乌和制首乌。但是, 在体内甚至临床使用中, 两种药物形式都可能导致药物诱导的肝损伤。何首乌相关的肝毒性正成为一个安全问题, 引起了学者的关注。何首乌引起的肝毒性具体表现在免疫应激反应、氧化应激与线粒体功能紊乱和影响代谢酶的功能和表达。对何首乌肝毒性的作用机制进行了总结和归纳, 为临床应用及研究提供理论依据。

**关键词:** 何首乌; 毒性成分; 肝毒性; 作用机制

**中图分类号:** R961      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674 - 5515(2020)02 - 0378 - 05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.02.039

## Research progress on mechanism of hepatotoxicity of *Polygonum Multiflori Radix*

WANG Wan-ru<sup>1</sup>, HONG Bin<sup>1</sup>, SHAN Guo-shun<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, Cancer Hospital of China Medical University, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110042, China

2. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

**Abstract:** *Polygonum multiflorum* Thunb. has been a tonic medicine for over a thousand years. There are two drug forms, *Polygonum Multiflori Radix* and *Polygonum Multiflori Radix Prapaerata* in the Chinese Pharmacopoeia. But both drug forms could lead to drug-induced liver injury and even death *in vitro*, *in vivo* and in clinical settings. Hepatotoxicity associated with *Polygonum Multiflori Radix* is becoming a safety issue, which has attracted the attention of scholars. Hepatotoxicity of *Polygonum Multiflori Radix* in this includes immune stress response, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and affecting the function and expression of metabolic enzymes and so on. The mechanism of hepatotoxicity of *Polygonum Multiflori Radix* is reviewed in this paper, in order to provide theoretical basis for clinical application and research.

**Key words:** *Polygonum Multiflori Radix*; toxic composition; hepatotoxicity; action of mechanism

何首乌来源于蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 因其强大的补益功效而享誉中外, 并出现在许多中药处方中。现代药理研究表明何首乌具有许多生物活性, 如免疫增强、抗高脂血症、神经保护、抗癌和抗炎作用<sup>[1]</sup>。随着公众健康意识的提高, 何首乌及其制剂被广泛用于非处方药、膳食补充剂, 甚至日常饮食中。2006 年, 英国药品和保健品监管机构网站上发布了 7 例食用何首乌制剂造成肝损伤的病例<sup>[2]</sup>, 何首乌引起的肝

损伤立即起全世界的关注。加拿大、英国和澳大利亚已经制定了限制措施, 以监督和管理含何首乌产品在临床应用中的使用<sup>[3]</sup>。我国食品药品监督管理局宣布了一系列关于何首乌及其制剂的药物警戒报告。2010 年后, 《中国药典》推荐何首乌的剂量从 6~12 g 减少到 3~6 g<sup>[4]</sup>。何首乌毒性成分目前主要集中在蒽醌类和二苯乙烯苷类<sup>[5-7]</sup>。二苯乙烯苷类具有增强肝脏对何首乌中大黄素类的易感性, 因此, 通过炮制方法, 可以减少二苯乙烯苷类的量, 从而

收稿日期: 2019-12-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803726)

作者简介: 王婉茹, 主任中药师, 2018 级全国中药特色技术传承人才, 研究方向为中药饮片的鉴定、炮制和中药的合理用药。

E-mail: wangwr2019@163.com

降低肝脏对何首乌毒性成分的敏感性, 实现降低毒副作用的目的<sup>[8]</sup>。何首乌肝毒性的作用机制依然不明确。本文对何首乌肝毒性的作用机制等进行总结和归纳, 为临床更好地应用何首乌提供参考。

### 1 免疫应激反应

炎症反应被认为是肝损伤病理生理机制之一, 过氧化物酶体增殖物活化受体- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 作为核受体超家族成员参与多种致炎/抗炎的信号传导途径。PPAR- $\gamma$  通过抑制 NF- $\kappa$ B、STAT 等信号通路, 从而延缓肝损伤的发生。JAK-STATs 信号的失调与多种肝损伤疾病的发生有关。贺兰芝等<sup>[9]</sup>研究基于脂多糖 (LPS) 复制的免疫性特异质肝损伤模型, 考察过 PPAR- $\gamma$  对何首乌肝损伤的影响及作用机制。结果显示肝组织 PPAR- $\gamma$  表达水平与何首乌免疫性特异质肝损伤程度呈负相关。PPAR- $\gamma$  激动剂可显著降低何首乌特异质肝损伤大鼠血浆中丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和门冬氨酸转氨酶 (AST) 水平, 减轻肝组织病理损伤和肝细胞凋亡, 显著促进肝组织 PPAR- $\gamma$  的表达水平并抑制 NF- $\kappa$ B p65 的表达, 同时显著降低血浆中 TNF- $\alpha$  等炎症因子水平。由此可见, PPAR- $\gamma$  通路异常抑制和相关炎症因子过表达影响着何首乌免疫性特异质肝损伤生, PPAR- $\gamma$  激动剂可抵抗何首乌特异质肝损伤<sup>[9]</sup>。

毛宏梅等<sup>[10]</sup>研究大鼠经革兰阴性菌外膜成分 LPS 诱导, 何首乌醇提物对大鼠的肝毒性影响。结果显示何首乌醇提物经 LPS 诱导能引起肝损伤, 引起的肝毒性与 TLR4/IRF-3 信号通路相关蛋白表达程度有关, 肝损伤程度与给药剂量无关, TLR4/IRF-3 信号通路的激活可能是 LPS 诱导何首乌醇提物致肝损伤的机制之一。

### 2 氧化应激与线粒体功能障碍

当发生氧化损伤时, 体内活性氧 (ROS) 和一氧化氮等堆积, 机体中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶、谷胱甘肽 (GSH) 和谷胱甘肽过氧化酶 (GSH-Px) 等抗氧化物活性降低, 超过了机体清除能力, 容易导致氧化应激状态, 激起自由基的级联增加反应, 与膜磷脂的多不饱和脂肪酸发生氧化反应, 形成一系列的过氧化物脂质。氧化应激被认为是肝脏毒性最主要的机制之一<sup>[11]</sup>。文献报道以生首乌和制首乌为研究对象, 采用不同的造模方法, 构建肾阴虚和肾阳虚证候动物病理模型, 对肾阴虚和肾阳虚证候模型大鼠灌胃给予不同的何首乌药液; 结果显示制首乌致肝损伤的程度与中医肾虚证

候具有直接关系, 其中制首乌对肾阳虚证候的肝毒性明显强于对肾阴虚证候, 即药不对证。但制首乌治疗肾阴虚证候时, 如果超过一定的用药剂量和用药时间, 依然会对肝脏造成损伤。何首乌致肝损伤的机制可能与肝细胞中有害物质丙二醛 (MDA) 代谢产物增多以及 GSH 活性下降, 清除氧自由基能力下降有关; 并且能通过降低肝线粒体琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活力和呼吸链复合物 I 活性, 影响还原型辅酶 I (NADH) 呼吸链功能而引起细胞代谢障碍; 通过调控 Fas/FasL 死亡受体通路, 上调 Fas、FasL 蛋白表达, 上调凋亡促进因子 Bax, 同时下调凋亡抑制因子 Bcl-2, 通过线粒体通路途径诱导肝细胞凋亡<sup>[12]</sup>。制首乌对证治疗肾阴虚证候, 当给药剂量超过 21.6 g/kg 时, 对肝细胞的毒性明显增强<sup>[13]</sup>。

线粒体是细胞内氧化磷酸化和 ATP 合成的主要部位, 不仅为细胞的活动提供能量, 而且参与细胞凋亡。研究表明肝细胞凋亡时最敏感和最早受到损伤的靶点是线粒体。马喆等<sup>[14]</sup>通过高通量的高内涵分析技术, 探讨何首乌致肝损伤的可能物质及作用机制。采用肝癌细胞 HepG2 分别经不同质量浓度的何首乌不同极性提取物、何首乌主要单体成分二苯乙烯苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚、儿茶素、大黄酚、大黄素、大黄酸、没食子酸孵育 24 h, 结果表明蒽醌类成分芦荟大黄素、大黄素、大黄酸和没食子酸可能是何首乌致肝毒性的主要成分, 由各单体对线粒体质量和线粒体膜电位的影响推测何首乌致肝毒性可能与线粒体介导的细胞凋亡有关<sup>[14-15]</sup>。

### 3 影响代谢酶

#### 3.1 细胞色素 P450 酶 (CYP450)

CYP450 是药物在肝脏内氧化代谢最主要的酶, 是临床前药物代谢研究的重要对象。许多中药可诱导或抑制 CYP450 酶, 并引起自身或其他药动学的改变, 使药物活性代谢成分积累导致毒性增强, 或导致药物的疗效降低, 不良反应增加<sup>[16]</sup>。汪美汐等<sup>[17]</sup>研究何首乌中大黄素对 L02 肝细胞 CYP450 酶主要亚型表达中发现, 随着大黄素浓度的增加, 呈现明显的细胞损伤效应, 细胞的存活率逐渐降低并呈现浓度和时间相关性; 同时, LDH 释放率在给药 48 h 时相比于空白组均明显增高。在基因水平上, 与空白组相比, 大黄素能明显提高 CYP450 各亚型 mRNA 表达, 并可剂量相关性诱导 CYP1A1、CYP1B1 的表达。何首乌中大黄素对人正常肝细胞具有明显损伤作用, 并能诱导 CYP450 酶 mRNA 表达。

Ma 等<sup>[18]</sup>考察制何首乌水提物对大鼠肝细胞色素 P450 酶亚型 CYP1A2 的酶活性及 mRNA 表达的影响中发现, 与空白对照组相比, 制何首乌水提物 (20 g/kg) 灌胃组大鼠肝 CYP1A2 酶活性和 mRNA 的表达均明显降低。最近临床研究表明, 何首乌所致的肝损伤患者, 其 CYP1A2 的遗传多态性表现不同于正常对照组人群, 表现在 CYP1A2\*1C 比例显著升高, 何首乌具有引起肝损伤患者的 CYP1A2 酶活性降低的作用。因此, 制何首乌引起的肝毒性也可能与人群中 CYP1A2 遗传多态性及制何首乌双重作用下的 CYP1A2 酶活性显著降低, 引起制何首乌中某些肝毒性成分在肝脏中积聚有关<sup>[19]</sup>。

王文静等<sup>[20]</sup>认为何首乌、制何首乌致大鼠肝物质代谢途径的作用机制不同。对 SD 大鼠 ig 生何首乌提取液 30 g/kg, 连续给药 90 d, 会导致大鼠肝损伤, CYP450 的明显升高。而制何首乌同样给药方式对 CYP450 无影响。生何首乌和制何首乌能够影响血液生化酶, 生何首乌降低 ALT、AST, 制何首乌升高 ALP, 二者同时降低总胆固醇 (TG)、血尿素氮 (BUN) 和肌酐 (CREA)。

谢丽华等<sup>[21]</sup>在 LPS 诱导大鼠肝脏损伤模型基础上, 给予 6 g/kg 何首乌乙醇提取液, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 发现何首乌乙醇提取液对 SD 大鼠产生明显的肝脏毒性, 毒性的发生及 LPS 诱发的免疫作用与 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1 的活性降低和 CYP1A2 蛋白表达下调有关。

采用 UHPLC/MS-MS 评估反式-2,3,5,4-四羟基二苯乙烯-2-O-D-吡喃葡萄糖苷 (TSG) 对大黄素在大鼠体内的药动学行为的影响。实验结果表明在给予何首乌提取物 7 d 后, 大鼠中的大黄素具有累积效应, 并且 TSG 能够加速大黄素的暴露和代谢。CYP450 酶系特别是 CYP1A2 同工酶活性上调可能引起大黄素的加速暴露和代谢<sup>[22]</sup>。

胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 (CYP7A1) 属肝脏 CYP450 酶系, 是胆汁酸经典合成路径中的限速酶, 其活性对体内胆汁酸的合成起制约作用。抑制 CYP7A1 的表达, 可以减少胆汁酸的合成, 维持胆汁酸的内平衡<sup>[23]</sup>。Jiang 等<sup>[24]</sup>采用 RNA-Seq 方法探索由何首乌诱导的胆汁淤积性肝损伤的分子机制, 其特征在于暴露于 1、20 g/kg 何首乌 90 d 大鼠的肝转录反应。在暴露于何首乌的大鼠肝脏中观察到的病理学变化包括门静脉区域的胆管增加和胆管上皮细胞增生, 同时伴随血清生物化学指标的升高。鉴定了编码参

与胆固醇生物合成途径的酶的 14 种转录物的表达的剂量相关性增加。何首乌上调胆固醇合成胆汁酸中的限速酶-CYP7A1。通过蛋白质印迹进行的蛋白质分析表明, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGCoA) 和 CYP7A1 的表达以剂量相关性方式增加。何首乌通过上调胆固醇和 BA 生物合成的关键酶, 从而引起胆汁淤积性肝损伤风险。

### 3.2 UGT1A1 酶

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGTs) 是人体中最重要的二相代谢酶, 在肝脏和小肠中含量较高。UGT1A1 是 UGTs 家族中的一员, 具有代谢内源性物质胆红素和炔雌醇作用<sup>[25]</sup>。胆红素是临床上判定黄疸的重要依据, 也是肝功能的指标和肝损害的重要生物标志物。如果 UGT1A1 酶受到外源性物质抑制, 胆红素代谢则出现障碍, 非结合胆红素在肝细胞和血液内蓄积, 引发肝毒性<sup>[26]</sup>。汪祺等<sup>[27]</sup>证明体内体外何首乌提取物均可抑制大鼠 UGT1A1 酶活性, 推断何首乌引发的肝毒性与其对胆红素代谢酶 UGT1A1 的抑制相关, 由于何首乌抑制酶活性, 导致胆红素代谢降低, 继而蓄积引发毒性。采用同源模建方法构建 UGT1A1 酶蛋白结构, 通过 UGT1A1 底物胆红素及何首乌中主要蒽醌类成分, 如大黄素、大黄酚、大黄酸、羟基大黄素以及大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷和大黄素甲醚与 UGT1A1 蛋白进行分子对接, 考察分子结合靶点及结合强弱。在结合体外抑制实验, 发现何首乌中主要蒽醌类成分大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素对 UGT1A1 酶具有较强的竞争型抑制作用, 而羟基大黄素呈现较强的混合型抑制作用, 顺式、反式二苯乙烯苷原型成分对 UGT1A1 存在抑制作用, 这些都是何首乌中潜在的肝毒性物质基础<sup>[28-30]</sup>。

## 4 结语

辨证论治是中医学的基本特点之一, 辨证准确, 药证相符, 即可通过药物的“偏性”, 纠正人体的阴阳偏性, 实现阴阳平衡, 才能达到治疗疾病的目的。何首乌不良反应的相关报道中, 相当一部分研究者仅阐述了何首乌治疗的西医疾病, 对其中医证候缺少详细的描述, 未在辨证的基础上用药论治。因此, 何首乌可能表现出不良反应与药不对证具有很大的关系<sup>[31]</sup>。

大多数研究集中在依赖于何首乌的纯化合物或提取物, 而不是配方引起的肝功能障碍。值得注意的是, 由多种中药配伍应用是中医治疗疾病的主要

形式,而非使用单一药草中的化合物或提取物。传统用药记载中,何首乌几乎很少单独入药,大多数在辩证基础上,配伍应用。通过合理的配伍,发挥增功减毒的作用,确保用药安全可靠。因此,应该加强常用的、公开的生、制何首乌所涉及的中药组方的肝毒性,更好的指导临床。

何首乌肝损伤病例客观存在,但总体比率显著低于常见具有肝损伤的化学药<sup>[32]</sup>。关于何首乌诱导的肝毒性的大多数研究仍处于实验阶段,在大规模临床试验中并不充分。中药的肝毒性作用由多种病理机制组成,不限于氧化应激、线粒体功能障碍、炎症和细胞凋亡、药物代谢酶相关的肝毒性机制。因此,不确定哪种病理学在肝毒性发展中起主导作用。因此,何首乌引起肝毒性机制并非是单一的,而是多途径机制、各种因素相互影响,共同作用的结果。

#### 参考文献

- [1] Lin L F, Ni B, 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.
- [2] 张 力, 杨晓晖, 邓媛媛. 何首乌及其制剂国外安全性信息的评价与思考 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 144-148.
- [3] Yu J, Xie J, Mao X J, *et al.* Hepatotoxicity of major constituents and extractions of *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Polygoni Multiflori Praeparata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1291-1299.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 杨 敏. 基于精密肝切片技术的何首乌致肝毒性物质基础研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- [6] Qiong Y U, Li-Long J, Na L, *et al.* Enhanced absorption and inhibited metabolism of emodin by 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucopyranoside: possible mechanisms for *Polygoni Multiflori Radix*-induced liver injury [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(6): 451-457.
- [7] 刘亚蕾, 郜 丹, 李晓菲, 等. 不同辅料对何首乌炮制减毒效果对比研究 [J]. 中草药, 2020, 50(2): 330-337.
- [8] Arumuggam N, Bhowmick N A, Rupasinghe H P. A review: phytochemicals targeting JAK/STAT signaling and IDO expression in cancer [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(6): 805-817.
- [9] 贺兰芝, 尹 萍, 孟雅坤, 等. PPAR- $\gamma$  依赖的何首乌免疫性特异质肝损伤机制研究 [J]. 药学报, 2017, 52(7): 1027-1032.
- [10] 毛宏梅, 谢丽华, 樊 星, 等. 何首乌醇提物对脂多糖诱导大鼠肝 TLR4/TRIF/IRF-3 信号通路的影响 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 496-503.
- [11] Wu Z R, Bai Z T, Sun Y, *et al.* Protective effects of the bioactive natural product *N-trans-caffeoyldopamine* on hepatotoxicity induced by isoniazid and rifampicin [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(22): 5424-5426.
- [12] 欧 莉. 基于不同肾虚证候的何首乌致肝损伤机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [13] 欧 莉, 卫培峰, 彭 成, 等. 制首乌含药血清对 L02 肝细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(18): 1634-1637.
- [14] 马 喆, 赵珺睿, 董冉冉, 等. 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4021-4029.
- [15] 徐虎军, 王丽平, 欧 莉, 等. “有故无陨”法则下基于线粒体能量代谢途径的制首乌肝毒性机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(3): 82-87.
- [16] 侯 健, 孙 娥, 宋 捷, 等. 肝脏药物代谢酶 CYP450 与中药肝毒性的关系 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2774-2780.
- [17] 汪美汐, 王宇光, 徐焕华, 等. 何首乌中大黄素对 L02 肝细胞 CYP 亚酶表达及细胞毒性的影响 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11): 1543-1548.
- [18] Ma K F, Zhang X G, Jia H Y. CYP1A2 polymorphism in Chinese patients with acute liver injury induced by *Polygonum multiflorum* [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 5637-5643.
- [19] 吴 双, 杨红莉, 李 浩, 等. 制何首乌对大鼠肝 CYP1A2 酶活性及 mRNA 表达的抑制作用 [J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 475-478, 482.
- [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] 谢丽华, 樊 星, 吴纯启, 等. 何首乌乙醇提取液对 LPS 诱导大鼠肝脏 CYP450 酶的影响 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 175-182.
- [22] 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- $\beta$ -d-glucopyranoside and emodin that may contribute to the idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygoni Multiflori Radix*. [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164: 672-680.
- [23] 李会涛, 林以宁. 胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶在胆汁淤积中的调节机制研究进展 [J]. 药学研究, 2019, 38(2): 91-94.
- [24] Jiang L L, Zhao D S, Fan Y X, *et al.* Transcriptome analysis to assess the cholestatic hepatotoxicity induced by *Polygoni Multiflori Radix*: up-regulation of key enzymes of cholesterol and bile acid biosynthesis [J]. *J Proteomics*, 2018, 177: 40-47.

- [25] 张 喆, 蔡卫民. UGT1A1 基因多态性对药物代谢和临床作用影响的进展 [J]. 药学实践杂志, 2018, 36(6): 488-492.
- [26] 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.
- [27] 汪 祺, 戴 忠, 张玉杰, 等. 基于二相代谢酶介导的胆红素代谢考察何首乌体内外肝毒性 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(22): 1929-1933.
- [28] 汪 祺, 李 勇, 王亚丹, 等. 基于分子对接和体外大鼠肝微粒体抑制实验综合考察何首乌中潜在肝毒性成分研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 635-640.
- [29] 汪 祺, 张玉杰, 戴 忠, 等. 基于二相代谢酶考察何首乌中主要单体肝毒性 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(12): 2120-2124.
- [30] 汪 祺, 王亚丹, 文海若, 等. 基于 UGT1A1 酶抑制探讨何首乌中顺(反)式二苯乙烯苷体外肝微粒体中潜在毒性作用 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 291-295, 302.
- [31] 吴成胜, 孙 蓉. 何首乌临床研究进展与安全应用思考 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 259-263.
- [32] 王伽伯, 李春雨, 朱 云, 等. 基于整合证据链的中草药肝毒性客观辨识与合理用药: 以何首乌为例 [J]. 科学通报, 2016, 61(9): 971-980.