基于UDP-葡萄糖醛酸转移酶1A1抑制探讨二蒽酮的潜在肝毒性

汪 祺#，杨建波#，文海若*，马双成*
中国食品药品检定研究院，北京 100050

摘 要：目的 基于胆红素代谢酶UDP-葡萄糖醛酸转移酶1A1（UGT1A1）靶点评价何首乌中二蒽酮类成分的潜在肝毒性。**方法** 采用Discovery Studio 2.5软件的From Receptor Cavities模块对UGT1A1酶蛋白空腔进行自动识别，将反式-大黄素-大黄素二蒽酮（*trans*-EMD）、顺式-大黄素-大黄素二蒽酮（*cis*-EMD）与UGT1A1酶蛋白进行对接，确定待测单体与酶蛋白的作用方式以及连接的紧密程度；应用大鼠肝微粒体孵育体系，加入底物胆红素对照品溶液，评价*trans*-EMD、*cis*-EMD（0.037、0.110、0.330、0.990、2.970 μg·mL^{-1}）对UGT1A1酶的作用，同时启动I、II相代谢，以表观抑制常数（K_i）为评价指标；CCK-8法检测*trans*-EMD、*cis*-EMD（0.04、0.10、0.30、1.00、3.00 μg·mL^{-1}）作用24 h对HepaRG细胞的毒性作用；实时荧光定量PCR（qRT-PCR）实验检测*trans*-EMD、*cis*-EMD（0.04、0.30、3.00 μg·mL^{-1}）作用24 h对HepaRG细胞*UGT1A1* mRNA水平的影响。**结果** 分子对接实验显示*trans*-EMD、*cis*-EMD可与UGT1A1结合于site F，2个化合物10或10'位不同氢键构型可引起化合物空间构型的改变，影响其与UGT1A1的结合强弱；体外酶抑制实验表明*trans*-EMD、*cis*-EMD对UGT1A1酶均表现出竞争型抑制作用，抑制作用较强；细胞毒性实验表明*trans*-EMD（IC_{50}为1.333 μg·mL^{-1}）和*cis*-EMD（IC_{50}为1.715 μg·mL^{-1}）均表现出较明显的HepaRG细胞毒性，IC_{50}值较小；与对照组比较，*trans*-EMD和*cis*-EMD 0.30、3.00 μg·mL^{-1}均可显著下调*UGT1A1* mRNA表达水平（$P<0.05$），且作用存在浓度相关性。**结论** 具有大黄素（10→10'）大黄素或大黄素（10→10'）大黄素母核结构的二蒽酮化合物是一类具有潜在肝毒性的化合物，其毒性作用可能与抑制胆红素代谢酶UGT1A1相关。

关键词：分子对接；胆红素代谢酶；UDP-葡萄糖醛酸转移酶1A1（UGT1A1）；何首乌；二蒽酮；肝毒性
中图分类号：R991 **文献标志码：**A **文章编号：**1674-6376（2022）09-1779-07
DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.011

Hepatotoxicity mechanism of dianthrones based on UDP-glucuronosyltransferase 1A1 inhibition

WANG Qi, YANG Jianbo, WEN Hairuo, MA Shuangcheng
National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objectives To evaluate the potential hepatotoxicity of dianthrones in *Polygonum multiflorum* based on the target of bilirubin metabolizing enzyme UDP-glucuronyltransferase 1A1 (UGT1A1). **Methods** The Discovery Studio 2.5 software From Receptor Cavities module to automatic identification of UGT1A1 enzyme protein cavity, *Trans*-emodin-emodin dianthrone (*trans*-EMD) and *Cis*-emodin-emodin dianthrone (*cis*-EMD) were docked with UGT1A1 enzyme protein to determine the action mode and the closeness of the monomer to be tested and the enzyme protein. To evaluate the effects of *trans*-EMD and *cis*-EMD (0.037, 0.110, 0.330, 0.990, 2.970 μg·mL^{-1}) on UGT1A1 enzyme and initiate phase I and phase II metabolism in the incubation system of rat liver microsomes with substrate bilirubin reference solution. The apparent inhibition constant (K_i) was used as the evaluation index. CCK-8 assay was used to detect the toxicity of *trans*-EMD and *cis*-EMD (0.04, 0.10, 0.30, 1.00, 3.00 μg·mL^{-1}) for 24 h on HepaRG cells. The effects of *trans*-EMD and *cis*-EMD (0.04, 0.30, 3.00 μg·mL^{-1}) on UGT1A1 mRNA levels in HepaRG cells for 24 h were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** Molecular docking experiments showed that *trans*-EMD and *cis*-EMD could bind UGT1A1 to Site F. Different hydrogen bond configurations at 10 or 10' positions of the two compounds could cause changes in the spatial configuration of the compounds and affect their binding strength to UGT1A1. *In vitro* enzyme inhibition

收稿日期：2022-02-28
基金项目：国家自然科学基金资助项目（81973476）
#共同第一作者：汪 祺，研究员，研究方向为中药毒理。Tel：（010）67095282 E-mail：sansan8251@sina.com
杨建波，副研究员，研究方向为中药化学。E-mail：yangjianbo@nifdc.org.cn
***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。E-mail：msc@nifdc.org.cn

experiments showed that both *trans*-EMD and *cis*-EMD exhibited competitive inhibitory effects on UGT1A1 enzyme, with strong inhibitory effects. The cytotoxicity test showed that *trans*-EMD (IC_{50} = 1.333 μg·mL^{-1}) and *cis*-EMD (IC_{50} = 1.715 μg·mL^{-1}) showed obvious HepaRG cytotoxicity, and the IC_{50} value was smaller. Compared with control group, *trans*-EMD and *cis*-EMD 0.30 and 3.00 μg·mL^{-1} could significantly down-regulate *UGT1A1* mRNA expression level ($P < 0.05$), and the effect was concentration dependent. **Conclusion** Dianthrone compounds with emodin (10→10') emodin or emodin (10→10') emodin nucleus structure are a class of compounds with potential hepatotoxicity, and their targets are bilirubin metabolizing enzymes UGT1A enzyme.

Key words: molecular docking; bilirubin metabolizing enzyme; UDP-glucuronyltransferase 1A1 (UGT1A1); *Polygonum multiflorum*; dianthrone; hepatotoxicity

近年来补益良药何首乌及其制剂引发的不良反应时有报道，尤其是何首乌致肝损伤的临床报道较多[1-5]，因此在发挥其药效作用的同时，明确其毒性成分，避免不良反应的发生成为目前的研究热点。本课题组发现[6]，何首乌中的二蒽酮类成分具有预防和治疗心肌缺血等病症的作用，为何首乌中药效成分。截止目前，何首乌中已经鉴定出近 30 个蒽酮及蒽酮糖苷成分，其基本母核结构均为大黄素（10→10'）大黄素或大黄素甲醚（10→10'）大黄素甲醚，因此研究这类成分有效性的同时明确其是否为潜在毒性成分具有重要意义[7]。

本课题组前期研究发现[8-12]，人体内源性物质胆红素的唯一代谢酶 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 1A1（UGT1A1）被抑制时，可导致胆红素代谢异常，造成胆红素体内堆积引起肝损伤。本课题组[13-14]以此为切入点分别针对何首乌中的二苯乙烯苷、蒽醌、蒽醌糖苷类成分开展了研究，初步证实何首乌引发的肝损伤与上述成分如大黄素甲醚、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸等对 UGT1A1 的抑制相关，UGT1A1 酶是何首乌致肝损伤的毒性靶点之一；此外，本课题组还发现特定母核结构的一类成分均可对 UGT1A1 产生抑制，表现出毒性作用[13-14]。

针对何首乌中的蒽酮类成分，本研究拟选取反式 - 大黄素 - 大黄素二蒽酮（*trans*-emodin dianthrones，*trans*-EMD）及顺式-大黄素-大黄素二蒽酮（*cis*-emodin dianthrones，*cis*-EMD）为研究对象，以 UGT1A1 为作用靶点，结合分子对接、体外酶动力学实验及 UGT1A1 酶基因变化结果，探究其是否为潜在毒性成分，并从构效关系的角度对这类成分进行初步评价。

1 材料

1.1 主要仪器

Waters Acquity™ Ultra Performance LC 超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；FQD-96A 荧光定量 PCR 仪（杭州博日 Line Gene 9620）；VICTOR X5 多功能酶标仪（PerkinElmer 公司）；Nano-100 分光光度计（杭州奥盛仪器有限公司）；Thermo 17R 型高速低温离心机（日本 Thermo 公司）；节能型职能恒温槽 SDC-6（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Vortex-Genie 2 涡旋振荡器（美国 Scientific Industries 公司）；悬滴 GravityPlus™板、GravityTRAP™板（Insphero 公司）。

1.2 肝微粒体、细胞及主要试剂

大鼠肝微粒体（rat liver microsomes，RLM，美国 BD Gentest 公司）；人源肝细胞 HepaRG（美国 ATCC 公司）。

trans-EMD、*cis*-EMD，均由中国食品药品检定研究院杨建波博士分离，质量分数均大于 98%；磷酸钾（质量分数≥98%）、氯化镁（质量分数≥98%）、三羟甲基氨基甲烷（Tris，质量分数≥98%）、抗坏血酸（质量分数≥98%）、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 V（G-6-PDH）（质量分数≥98%）、氧化型辅酶 II（$NADPNa_2$）（质量分数≥98%）及 *D*-葡萄糖-6-磷酸二钠（G-6-P）（质量分数≥98%），均购自百灵威科技；丙甲菌素（质量分数≥98%）、葡萄糖二酸单内酯（质量分数≥98%）、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸（UDPGA，质量分数≥98%）、二甲基亚砜（DMSO，质量分数≥98%），均购自 Sigma Aldrich 公司；胆红素（批号 100077-201206，质量分数 99.3%）购自中国食品药品检定研究院；乙腈、甲醇均为色谱纯（德国默克公司）；其他试剂均为分析纯（北京化学试剂厂）。

胎牛血清（FBS，货号 10099-141）及 0.25% 胰蛋白酶 -EDTA 均购自 gibco 公司；琼脂糖（货号 111860）购自 Spain Biowest 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；总 RNA 提取试剂盒（货号 HS0402）、cDNA 第一链合成试剂盒（货号 HS0611）、Real SYBR Mixture（货号 HS0613）、D2000 DNA Marker（货号 HS0713）及 2×Taq PCR Mastermix（货号 HS0602）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

本课题组前期应用 Discovery Studio 2.5 软件的

BLAST Search功能通过同源模建的方法构建了UGT1A1酶蛋白结构[14]。具体步骤为：从Uniprot数据库（http://www.rcsb.org）中下载UGT1A1蛋白序列，采用同源模建方法构建UGT1A1的蛋白结构，包括对蛋白结构进行预处理、结构优化、质子化等操作。并应用拉氏图和Verify-3D方法对所建立的UGT1A1酶蛋白进行结构评价。前期共识别出UGT1A1上的9个活性口袋区（site A～I）。在此基础上开展本研究内容，采用该软件的From Receptor Cavities模块对UGT1A1酶蛋白空腔进行自动识别，将*trans*-EMD和*cis*-EMD与UGT1A1酶蛋白进行对接，并以活性值与打分值的相关性系数对活性口袋对接结果进行评价，确定待测单体与酶蛋白的作用方式以及连接的紧密程度[13]。

2.2 UGT1A1酶体外抑制实验

应用已建立的RLM孵育体系[15-16]，评价二蒽酮单体对UGT1A1酶的作用，同时启动I、II相代谢，以表观抑制常数（K_i）为评价指标。取30 μL蛋白浓度为0.5 mg·L^{-1}的RLM，加入系列质量浓度的底物胆红素对照品溶液（0.21、0.84、1.26、1.68、2.10 μg·mL^{-1}）及*trans*-EMD或*cis*-EMD溶液（0.037、0.110、0.330、0.990、2.970 μg·mL^{-1}），体系置37 ℃恒温水浴预孵育3 min后，同时加入UDPGA和NADPH再生系统（使含UDPGA终浓度为5 mmol·L^{-1}）。于反应15 min后加入600 μL含200 μmol·L^{-1}维生素C的冰乙腈-甲醇（2∶1）终止反应，沉淀蛋白，涡旋1 min后，13 000 r·min^{-1}（r＝5 cm）离心25 min，取上清液1 μL测定，测定方法见文献报道[15-16]。每个样本重复3次。

以胆红素代谢产物生成量对应其底物浓度作图，横坐标为胆红素浓度的倒数（*1/S*），纵坐标为加入二蒽酮后胆红素代谢速率的倒数（*1/V*），采用米氏方程双倒数法作图；加入不同浓度二蒽酮对应不同曲线，以不同曲线斜率对胆红素底物浓度绘制Slop图，求得K_i。

2.3 HepaRG细胞毒性考察

取对数生长期的HepaRG细胞，消化后调整为5×10^4·mL^{-1}，每孔100 μL接种于96孔板，24 h后给予二蒽酮单体。分别设置空白对照组（不含HepaRG细胞）、对照组（0.5% DMSO）、*trans*-EMD（0.04、0.10、0.30、1.00、3.00 μg·mL^{-1}）组和*cis*-EMD（0.04、0.10、0.30、1.00、3.00 μg·mL^{-1}）组。

细胞体系置于37 ℃、5% CO_2条件下孵育24 h，每孔加入CCK-8细胞活力检测试剂10 μL后于37 ℃避光孵育2 h，采用酶标仪于450 nm处检测各孔吸光度（*A*）值，按如下公式计算细胞存活率[17]，及二蒽酮的半数抑制浓度（IC_{50}）。

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

2.4 实时荧光定量PCR（qRT-PCR）实验

细胞培养及给药条件同上述“2.3”项下操作，分别设置对照组（0.5%DMSO）、*trans*-EMD（0.04、0.30、3.00 μg·mL^{-1}）和*cis*-EMD（0.04、0.30、3.00 μg·mL^{-1}）组。药物处理24 h后，PBS缓冲液洗涤2次，加入0.25%胰蛋白酶-EDTA消化，离心收集细胞。

引物序列见表1，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。采用通用型总RNA提取试剂盒提取RNA，经Nano-100测定RNA浓度和纯度（测量前先用溶解RNA的DEPC水调零）。采用cDNA第一链合成试剂盒反转录cDNA，然后进行qRT-PCR检测[18]。反应步骤见表2。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因		序列（5’-3’）
UGT1A1	正向	CTCCCCTGGATTCTCAGACC
	反向	CCGTGCCACCCACAAAAC
β-actin	正向	AGCCATGTACGTAGCCATCC
	反向	ACCCTCATAGATGGGCACAG

表2 qRT-PCR反应步骤

Table 2 Reaction steps of qRT-PCR

步骤	温度/℃	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	

2.5 统计学分析

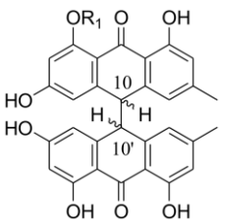
数据采用SPSS 13.0软件处理，实验数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 UGT1A1酶蛋白分子对接

采用Discovery Studio 2.5软件中的CDOCKER打分功能，在确定*trans*-EMD和*cis*-EMD的对接位点后，对其与UGT1A1酶蛋白的结合位点进行结合自由能（IE）分析，IE绝对值大代表体系能量稳定，与UGT1A1酶的结合力强。由于UGT1A1酶为胆红素唯一代谢酶，因此本研究采用胆红素为阳性对照。*trans*-EMD和*cis*-EMD为消旋体异构体（图1），4个不同构型的化合物与UGT1A1酶的对接位点同胆红素一致，均为site F。IE结果见表3。

分析对接模式发现（图2），*trans*-EMD和*cis*-



化合物	C_{10}	$C_{10'}$	R_1
trans-EMD	αH/βH	βH/αH	H
cis-EMD	αH/βH	αH/βH	H

图 1 *trans*-EMD 和 *cis*-EMD 结构

Fig. 1 Stucture of *trans*-EMD and *cis*-EMD

表 3 IE 结果

Table 3 IE results

化合物	结合口袋区	IE/(kJ·mol^{-1})
胆红素	Site F	−205.806 5
trans-EMD(βαH)	Site F	−177.338 2
trans-EMD(αβH)	Site F	−106.553 2
cis-EMD(ααH)	Site F	−166.402 0
cis-EMD(ββ)	Site F	−117.971 3

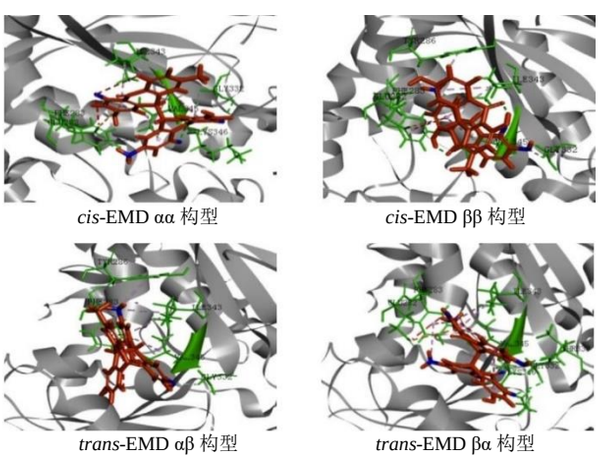


图 2 对接模式图

Fig. 2 Docking mode diagram

EMD 分子体积较大，刚性强，由于共轭体系的存在，4 个不同构型的化合物分别与 UGT1A1 中的氨基酸残基 PHE283、VAL345、ILE343 形成了多个 Pi-Alkyl 键和更为稳定的 Pi-Pi T shape 键，增大了化合物与 UGT1A1 酶的疏水结合作用。由于这 2 个化合物分别为消旋体的混合物，因此 10 和 10'位的构型使得分子空间构型不同，对其在 F 区的停靠产生了影响。*trans*-EMD（βα）进入 F 区后，分别与 GLY332、THR333、LYS346、VAL345 形成了 6 个氢键作用，*cis*-EMD（αα）分别与 GLY332、LYS346、VAL345 形成了 5 个氢键作用，使得这 2 个构型的化合物与 UGT1A1 结合更加紧密。相反，*cis*-EMD（ββ）和 *trans*-EMD（βα）仅与 GLY332 形成了 1 个氢键作用，因此获得了绝对值较低的 IE。

由于 *trans*-EMD 和 *cis*-EMD 与胆红素结合位点为同一位点，存在竞争结合的可能，因此提示 *trans*-EMD 和 *cis*-EMD 对于 UGT1A1 酶结合胆红素均可产生影响，使胆红素代谢受阻，存在引发毒性风险。

3.2 UGT1A1 酶体外抑制实验

由于 *trans*-EMD 和 *cis*-EMD 为消旋体的混合物，因此所得结果为 2 个消旋体的综合作用。*trans*-EMD 和 *cis*-EMD 在 RLM 中对 UGT1A1 酶的抑制情况见表 4、图 3。二者对 UGT1A1 酶均表现出竞争型抑制作用，通过 K_i 可知[19]，*trans*-EMD 和 *cis*-EMD 对 UGT1A1 酶具有较强抑制作用，与分子对接所得结果相一致。

表 4 UGT1A1 酶 K_i

Table 4 K_i of UGT1A1 enzyme

单体	抑制类型	K_i/(μmol·L^{-1})
trans-EMD	竞争型	1.95
cis-EMD	竞争型	11.48

K_i<1 μmol·L^{-1}，强抑制；K_i>50 μmol·L^{-1}，弱抑制

K_i<1 μmol·L^{-1}, strong inhibition; K_i>50 μmol·L^{-1}, weak inhibition

3.3 HepaRG 细胞毒性结果

如图 4 所示，*trans*-EMD（IC_{50} 为 1.333 μg·mL^{-1}）和 *cis*-EMD（IC_{50} 为 1.715 μg·mL^{-1}）均表现出较明显的 HepaRG 细胞毒性，IC_{50} 值较小。体外毒性实验数据与对接筛选结果相一致。

3.4 UGT1A1 酶 mRNA 表达变化

与对照组比较，*trans*-EMD 和 *cis*-EMD 0.30、3.00 μg·mL^{-1} 均可显著下调 *UGT1A1* 的 mRNA 表达水平（P<0.05），且作用存在浓度相关性。结合体外 UGT1A1 酶抑制实验和细胞毒性数据，初步推测 *trans*-EMD 和 *cis*-EMD 产生的肝毒性作用可能与其对 UGT1A1 酶的抑制相关，由于 *trans*-EMD 和 *cis*-EMD 对 UGT1A1 酶的抑制作用可不同程度地影响胆红素代谢循环，继而存在引发肝毒性的可能。结果见图 5。

4 讨论

本研究在前期实验的基础上，以 UGT1A1 酶靶点为切入点，针对何首乌中的二蒽酮类成分开展了毒性研究。通过分子对接手段，首先证明具有消旋结构的 *trans*-EMD 和 *cis*-EMD 均与 UGT1A1 酶结合于位点 site F，该位点同时也为胆红素结合位点。此外本研究发现，在 4 个结构中，*trans*-EMD（βαH）和

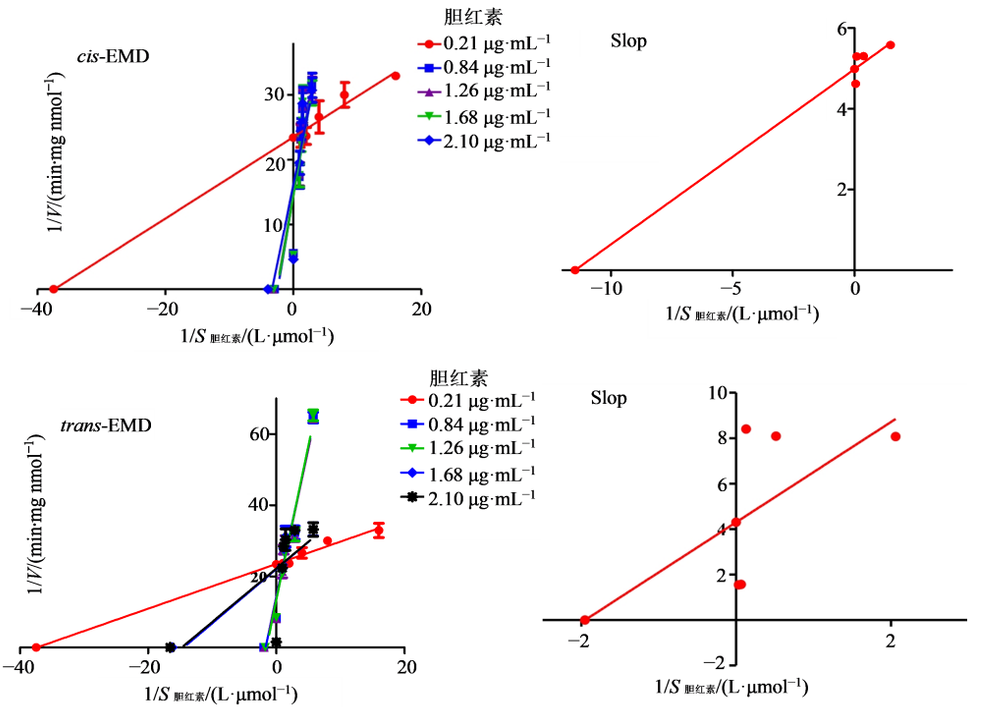


图3 *trans*-EMD和*cis*-EMD对UGT1A1酶的影响

Fig. 3 Effects of *trans*-EMD and *cis*-EMD on UGT1A1 enzyme

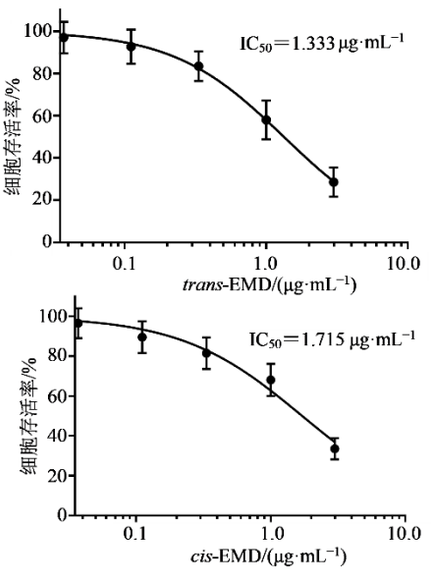


图4 *trans*-EMD和*cis*-EMD对HepaRG细胞活性的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

Fig. 4 Effects of *trans*-EMD and *cis*-EMD on HepaRG cell activity ($\bar{x}\pm s$, n=3)

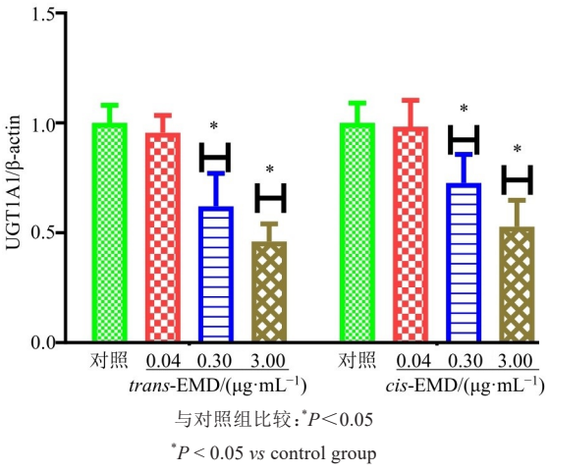


图5 UGT1A1酶mRNA变化($\bar{x}\pm s$, n=3)

Fig. 5 expression level of UGT1A1 mRNA ($\bar{x}\pm s$, n=3)

cis-EMD(ααH)与UGT1A1酶的IE绝对值较大,体系稳定,而*trans*-EMD(αβH)和*cis*-EMD(ββ)次之。分析对接模式发现二蒽酮类化合物共轭体系较大,与氨基酸残基的疏水结合作用强,但分子结构增大的同时刚性增强,当分子直径与活性口袋直径相当或大于口袋直径时,化合物的空间构型,特别是10或10'引起空间构型改变,影响其在活性口袋区的停靠位置,继而可影响其与酶蛋白间的疏水结合。

体外UGT1A1酶抑制实验发现*trans*-EMD和*cis*-EMD的消旋混合物均对UGT1A1酶有较强的抑制作用,且均表现为竞争型抑制。分子对接部分显示单体与UGT1A1酶的底物胆红素同时对接进入相同位点sit F,因此体外实验部分验证了酶蛋白的受体配体间的锁钥理论,与分子对接部分的研究结果相一致。通过测定UGT1A1酶蛋白基因表达,进一步证明0.30、3.00 μg·mL⁻¹ *trans*-EMD和*cis*-EMD

均可对UGT1A1酶产生显著抑制作用，并且存在明显的剂量相关关系。

通过体外细胞毒性实验证实*trans*-EMD（IC_{50}：1.333 μg·mL^{-1}）和*cis*-EMD（IC_{50}：1.715 μg·mL^{-1}）均表现出明显的HepaRG细胞毒性。前期针对何首乌中另一重要成分大黄素-8-*O*-葡萄糖苷（EG）开展了体内、外毒性研究[18,20-22]，研究发现EG可显著抑制UGT1A1酶，同时表现出明显的细胞毒作用，在HepaRG细胞系中，给药24 h IC_{50}为205.4 μg·mL^{-1}，48 h IC_{50}为139.3 μg·mL^{-1}，而在3D培养的人源肝细胞模型中24、72、168 h时IC_{50}分别为165.28、149.24、51.87 μg·mL^{-1}，与2D细胞给药相比随给药时间延长可见毒性作用叠加，同时EG体内毒性实验也表现出明显的肝毒性及遗传毒性。本研究中体外细胞毒性结果显示*trans*-EMD和*cis*-EMD具有远低于EG的IC_{50}值，提示*trans*-EMD和*cis*-EMD存在潜在的肝毒性风险，应进一步关注并开展体内研究。

本研究初步证实了何首乌中的二蒽酮成分可作用于胆红素代谢酶UGT1A1，同时产生肝毒性作用，推测肝毒性作用可能与抑制UGT1A酶相关，此外提出这类成分的母核结构具有一定的结构选择性，实验结果将为探讨二蒽酮类成分的临床肝毒性提供数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 刘 芳, 李 波. 药物引起肝脏损伤的评价与检测 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1981-1984.
Liu F, Li B. Evaluation and detection of drug-induced hepatotoxicity [J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(10): 1981-1984.

[2] Vítek L, Ostrow J D. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(25): 2869-2883.

[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] 马双成, 孙 华, 魏 锋, 等. 二蒽酮类化合物在制备预防和/或治疗心肌缺血性疾病及其相关病症的药物中的应用: 中国, CN113662930B [P]. 2022-08-09.
Ma S C, Sun H, Wei F, et al. Application of dianthrone compounds in the preparation of drugs for the prevention and/or treatment of myocardial ischemic diseases and related diseases: China, CN113662930B [P]. 2022-08-09.

[7] 徐 文. 液质联用技术在两种中药成分分析中的应用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
Xu W. The applicaiton of liqud chromatography coupled with high resolution mass spectrometry technology on chemical study of two Chinese herbs [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.

[8] 汪 祺, 王亚丹, 杨建波, 等. 基于II相代谢酶探讨大黄中大黄酸潜在肝毒性 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 412-417.
Wang Q, Wang Y D, Yang J B, et al. Study on potential hepatotoxicity of Rhein in *Rhei Radix* et *Rhizoma* based on liver metabolism [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(2): 412-417.

[9] 汪 祺, 杨建波, 刘 越, 等. 基于UGTIA1抑制作用考察大黄素肝毒性作用 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(7): 1177-1184.
Wang Q, Yang J B, Liu Y, et al. Study on the hepatotoxicity of emodin based on the inhibition of UGT1A1 enzyme [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(7): 1177-1184.

[10] 汪 祺, 王亚丹, 杨建波, 等. 基于体外肝代谢考察大黄素甲醚肝毒性作用 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2367-2372.
Wang Q, Wang Y D, Yang J B, et al. Study on hepatotoxicity of physcion based on liver metabolism *in vitro* [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(11): 2367-2372.

[11] 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.
Wang Q, Wang Y D, Wen H R, et al. Study on toxic effects of *Cis* (*trans*)-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*-β -*D*-glucoside in *Polygonum multiflorum* based on inhibition of UGT1A1 enzyme in rat liver microsomes [J]. Mod Chin Med, 2019, 21(3): 291-295, 302.

[12] 汪 祺, 戴 忠, 王亚丹, 等. 何首乌中8种成分在大鼠肝微粒体体系中的肝毒性研究 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(8): 589-593.
Wang Q, Dai Z, Wang Y D, et al. Hepatotoxicity of eight components of *Radix Polygonum multiflorum* Thunb. in rat liver microsome system *in vitro* [J]. Chin Pharm J, 2018, 53(8): 589-593.

[13] 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.
Wang Q, Li Y, Wang Y D, et al. Investigation of potential hepatotoxic components in *Polygonum multiflorum* based on molecular docking and rat liver microsome inhibition test [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(4): 635-640.

[14] Wang Q, Wang Y D, Li Y, et al. Identification and characterization of the structure-activity relationships involved in UGT1A1 inhibition by anthraquinone and dianthrone constituents of *Polygonum multiflorum* [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17952.

[15] 汪 祺, 张玉杰, 戴 忠, 等. 微粒体体系中胆红素及其代谢产物测定方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1544-1550.
Wang Q, Zhang Y J, Dai Z, et al. Establishment of a method to determine the bilirubin and bilirubin glucuronidations in different systems [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(9): 1544-1550.

[16] 汪 祺, 戴 忠, 张玉杰, 等. 基于二相代谢酶介导胆红素代谢考察不同体系UGT1A1酶动力学参数 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(19): 1709-1714.
Wang Q, Dai Z, Zhang Y J, et al. The investigation of kenitics of UGT1A1 enzyme in different system on the basic of bilirubin metabolites [J]. Chin Pharm J, 2015, 50(19): 1709-1714.

[17] 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.

[18] 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.

[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] 汪 祺, 张茜蕙, 文海若, 等. 基于肝微组织考察何首乌主要单体潜在肝毒性 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2954-2959.
Wang Q, Zhang Q H, Wen H R, et al. Study on potential hepatotoxicity of main monomers of *Polygonum multiflorum* based on liver micro-tissue [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(12): 2954-2959.

[21] 文海若, 颜玉静, 宋 捷, 等. 大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷的体内外遗传毒性评价 [J]. 中国药房, 2020, 31(1): 18-23.
Wen H R, Yan Y J, Song J, et al. Study on *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of emodin-8-*O*-β-*D*-glucoside [J]. China Pharm, 2020, 31(1): 18-23.

[22] 霍桂桃, 王亚楠, 吕建军, 等. 大黄素ig昆明小鼠长期毒性研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1425-1433.
Huo G T, Wang Y N, Lü J J, et al. Chronic toxicity study of emodin monomer in Kunming mice by ig administration [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(7): 1425-1433.

[责任编辑 兰新新]