

蓼衣莲酮硫酸酯对对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤的保护作用

蔺良才^{1,2}, 赵菲菲^{1,2}, 王敏^{1,2}, 陈海东^{1,2}, 徐国波^{1,2}, 廖尚高^{1,2*}

¹贵州医科大学药学院 药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550025;

²贵州医科大学教育部民族药与中药开发应用工程研究中心, 贵阳 550004

摘要: 蓼衣莲酮硫酸酯(Auriculatone sulphate, AS)是天然保肝活性化合物蓼衣莲酮的前药。为评估 AS 的保肝作用,课题采用小鼠腹腔注射 300 mg/kg 的对乙酰氨基酚(APAP)复制小鼠急性肝损伤模型,通过静脉注射给予 25 mg/kg 的 AS,测定给药后小鼠血清中的谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)和乳酸脱氢酶(LDH)的含量变化,从肝损伤水平初步了解 AS 对肝脏的保护作用;通过测定肝组织中丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)的水平以及超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化,了解 AS 对氧化损伤的保护作用;通过小鼠肝组织的病理学检查,直观评价 AS 通过静脉注射给药后对肝脏的保护作用。研究结果显示,静脉注射 AS 能够显著降低血清中 ALT、AST 和 LDH 的水平,使其趋近于正常水平($P < 0.001$)。与模型组相比,AS 不但可以显著降低肝脏中 MDA 的水平($P < 0.001$),而且显著增加 GSH 水平和 SOD 的活性($P < 0.001$)。病理学检查显示,AS 能显著改善 APAP 对肝组织的破坏,使肝组织的结构趋近于正常。综上,静脉注射 AS 可有效保护小鼠免受 APAP 诱导小鼠急性肝损伤,其保护作用可能与抑制肝脏氧化损伤有关。

关键词: 蓼衣莲酮硫酸酯;静脉注射;对乙酰氨基酚肝损伤;保肝作用

中图分类号: R285; R965

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.5.006

Protection of Auriculatone Sulphate Against APAP-induced Acute Liver Injury in Mice

LIN Liang-cai^{1,2}, ZHAO Fei-fei^{1,2}, WANG Min^{1,2}, CHEN Hai-dong^{1,2}, XU Guo-bo^{1,2}, LIAO Shang-gao^{1,2*}

¹School of Pharmacy & State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants,

Guizhou Medical University, Guizhou 550025, China; ²Engineering Research Center for

the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guiyang 550004, China

Abstract: Auriculatone sulphate (AS) was a prodrug of auriculatone that is a natural hepatoprotective compound. In order to evaluate the hepatoprotective effect of AS, an acetaminophen (APAP)-induced acute liver injury model of mice was established by intraperitoneal administration of 300 mg/kg APAP. The hepatoprotective effect of AS (25 mg/kg) was initially evaluated by determining its inhibitory effect on the increases of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) induced by APAP. The protective effect of AS against oxidative damage was assessed by measuring the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) and testing the activity of superoxide dismutase (SOD) in the liver tissue. Histochemical analysis of liver tissue was also conducted to evaluate the hepatoprotective effect of AS. The results showed that intravenous pretreatment with AS significantly prevented the liver tissue from APAP-induced injury, and retained the serum ALT, AST and LDH levels close to those of the control group ($P < 0.001$). When compared with the APAP group, AS pretreatment significantly decreased the hepatic level of MDA ($P < 0.001$), and increased the hepatic level of GSH as well as the activity of SOD ($P < 0.001$). Histochemical examinations showed that AS treatment significantly improved the pathological changes of liver tissues. In conclusion, intravenous administration of AS effectively protected mouse against APAP-induced liver injury and the protection might

收稿日期: 2018-02-01 接受日期: 2018-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(81260506); 贵州省优秀青年科技人才项目(2015-32)

* 通信作者 Tel: 86-851-6908468-8712; E-mail: lshangg@163.com

involve its inhibition of liver tissue oxidative damage.

Key words: auriculatone sulfate; intravenous injection; acetaminophen-induced liver injury; hepatoprotection

对乙酰氨基酚(APAP)是临床上常用的解热药和镇痛药,大剂量使用会导致人和实验动物肝损伤^[1]。APAP肝损伤是药物性肝损伤最常见的病因^[2]。目前临床上APAP肝损伤主要通过静脉注射*N*-乙酰半胱氨酸(NAC)进行治疗^[3]。但NAC只有在血清中ALT的水平显著增加之前及时用药才表现出良好的保肝作用^[4],且NAC使用时可能会产生过敏反应和恶心等副作用^[5,6]。现有的一些保肝药物对APAP的肝损伤有一些保护作用,但均难以有效阻止大剂量APAP对肝的损伤,开发安全、更加有效的保肝药物至为重要^[7]。天然产物是保肝药物的主要来源,以水飞蓟素、甘草酸、齐墩果酸等为代表的天然产物已获得广泛的临床应用,这些药物在APAP肝损伤中也或多或少表现出了肝保护作用,但肝损伤仍然广泛存在^[8]。

蓑衣莲酮是蓑衣莲的根部中的一种降五环三萜^[9]。本课题组从上市保肝药物齐墩果酸片中以杂质单体的形式分离纯化得到^[10]。体外研究表明,蓑衣莲酮在500 μmol/L内对正常肝细胞HL-7702(即L02)细胞没有表现出毒性^[10],对APAP诱导急性肝损伤具有极强的保肝作用^[11]。但是,由于亲脂性强、水溶性差,难以通过注射给药,口服给予蓑衣莲酮后生物利用度也很低,严重制约了其开发应用。在对其结构进行修饰以提高水溶性过程中,我们发现,通过引入具有高离解能力的硫酸基团获得蓑衣莲酮硫酸酯(AS),蓑衣莲酮的水溶性获得明显改善。本研究通过评价静脉注射AS对APAP诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用,为AS的开发利用提供依据。

1 实验材料

1.1 药物和试剂

蓑衣莲酮硫酸酯(由实验室合成),对乙酰氨基酚和*N*-乙酰半胱氨酸(上海源叶生物科技有限公司),ALT,AST,LDH,SOD,MDA和GSH试剂盒(南京建成生物研究所),BCA蛋白测试盒(北京索莱宝生物科技有限公司),吐温80(天津市恒兴化学试剂制造有限公司),其他试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

UV-2401 PC 紫外-可见分光光度计(日本岛津

公司);680 酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司);Allegra 64R 台式高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司);DK-98-II A 恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司);超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司);Q-250A-ST 超声波清洗机(上海跃进医用光学机械厂);EL204 万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.3 实验动物

昆明种雄性小鼠50只,清洁级,6~8周,体重18~20 g,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2014-0011。

2 实验方法

2.1 AS的制备

参照课题组前期方法,通过在蓑衣莲酮结构中引入硫酸基团得到AS^[12]。制备过程如下:取1280 μL乙酸酐和640 μL浓硫酸置于50 mL的茄形瓶中在室温下搅拌混合。14 mL经KOH干燥的吡啶溶液加入上述混合溶液中,并在55 °C油浴下搅拌5 min。200 mg的蓑衣莲酮溶解于6 mL的吡啶溶液后加入反应体系中,在55 °C油浴下搅拌反应30 min。将油浴中的反应体系取出后置于冰水浴下冷却后加入4 mL的25%氨水,在冰浴下搅拌反应3 h后,当瓶底有白色固体析出时终止反应。抽滤,滤液用1N HCl调节pH至2后用氯仿萃取,合并氯仿层,用饱和食盐水洗涤后收集有机层,有机层用无水硫酸钠干燥后经硅胶柱分离纯化(洗脱剂:氯仿:甲醇=10:1),浓缩得到黄白色固体目标产物AS,产率约为80%。mp. 142~144 °C. ESI-HRMS (*m/z*): 505.2988 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 0.84(s,3H),0.85(s,3H),0.92(s,3H),0.98(s,3H),0.99(s,3H),1.04(s,3H),1.17(s,3H),2.63(s,1H),2.96(m,1H),3.95(dd,*J* = 12.0,4.0 Hz,1H),5.49(s,1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 14.6,15.7,16.8,18.1,20.6,22.5,23.1,23.9,26.1,27.5,29.5,30.5,32.6,34.2,36.7,38.1,38.2,39.4,44.7,46.4,46.5,46.7,47.0,47.1,55.8,86.4(C-3),122.7(C-12),142.3(C-13),216.0(C-16)。

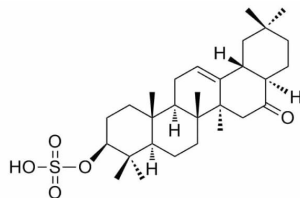


图1 AS的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of AS

2.2 动物的分组和给药

将50只小鼠随机分为5个组,每组10只:空白组,AS(50 mg/kg)处理组,APAP(300 mg/kg)处理组,AS(50 mg/kg) + APAP(300 mg/kg)处理组和NAC(1000 mg/kg) + APAP(300 mg/kg)处理组。AS组和AS + APAP组小鼠分别静脉注射给予25 mg/kg的AS(溶解于2%吐温80溶液),空白组和APAP组给予2%的吐温80溶液,NAC + APAP组给予生理盐水,一天一次连续3天。小鼠在给予APAP前先禁食15 h。末次给药2 h后除空白组和AS组外全部腹腔注射给予300 mg/kg的APAP造模。NAC + APAP组在给予APAP造模1 h后静脉注射给予1000 mg/kg的NAC处理。给予APAP造模后小鼠禁食不禁水。在给予APAP造模24 h后处死小鼠,取血和肝脏用于后续实验。

2.3 肝指数测定

处死小鼠后立即分离肝脏,用冰生理盐水漂洗,滤纸擦干后称重。肝指数计算公式:肝指数 = 肝脏重量(g) / 体重(g) × 100

2.4 血清中生化指标测定

将小鼠血液于3000 rpm,4℃下离心10 min,分离血清备用。按照试剂盒说明书测定血清中ALT,AST和LDH的活性。

2.5 肝组织中MDA,SOD和GSH的测定

将小鼠肝组织用生理盐水制备成10%的肝匀浆,用BAC蛋白测试盒测定蛋白浓度,采用MDA,SOD和GSH试剂盒测定肝组织中MDA,SOD和GSH的水平。

2.6 HE染色切片观察

将小鼠肝脏左侧肝小叶置于4%多聚甲醛溶液中固定,经过HE染色后观察肝组织的损伤程度。

2.7 统计学处理

采用SPSS软件16.0进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的比较采用单因素方差分析,两组之间的比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$

说明数据有统计学差异。

3 结果与分析

3.1 AS对肝指数的影响

在APAP诱导小鼠急性肝损伤过程中AS对肝指数变化的影响如表1所示。实验结果表明,与空白组比较,APAP组小鼠肝指数显著增加($P < 0.001$)。单独给予AS处理不会对肝指数产生显著影响(与空白组比较, $P > 0.05$),但与APAP组比较,AS + APAP组与NAC + APAP组肝指数显著降低($P < 0.001$),并与空白组相近($P > 0.05$)。

表1 AS对APAP所致肝损伤小鼠肝指数的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)Table 1 Effects of AS on the liver index of mice with APAP-induced liver injury ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	Group	肝指数 Liver index (%)
空白组	Control group	4.18 ± 0.13
AS组	AS group	4.13 ± 0.21
APAP组	APAP group	5.47 ± 0.17 ^{###}
NAC + APAP组	NAC + APAP group	4.09 ± 0.17 ^{***}
AS + APAP组	AS + APAP group	4.16 ± 0.18 ^{***}

注:空白组比较,^{###} $P < 0.001$;与APAP组比较,^{***} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group,^{###} $P < 0.001$; compared with APAP group,^{***} $P < 0.001$ 。

3.2 AS对血清中ALT,AST和LDH的影响

ALT,AST和LDH是评价APAP肝损伤常见的血清生化指标。为了评估静脉注射AS的保肝作用,我们检测了AS对上述三个生化指标的影响。如表2所示,与空白组比较,APAP组血清中ALT,AST和LDH的水平显著增加($P < 0.001$),表明小鼠急性肝损伤模型已成功复制。与APAP给药1h后给予1000 mg/kg NAC的效果相似,APAP给药前静脉注射25 mg/kg的AS能显著降低大剂量APAP引起的ALT,AST和LDH水平的增加($P < 0.001$)且基本恢复至正常水平(与空白组相比, $P > 0.05$)。同时,单独给予AS不会对ALT,AST和LDH产生显著影响($P > 0.05$)。这些结果表明,AS对APAP诱导的肝损伤具有显著保护作用。

3.3 AS对肝组织中MDA,SOD和GSH的影响

为进一步了解AS对APAP诱导的肝损伤的保护作用,我们我们通过考察AS对肝组织中MDA,SOD和GSH的影响,进一步评估了AS对肝组织氧化损伤的保护作用。如表3所示,与空白组比较,APAP组小鼠肝组织中MDA的水平显著增加($P <$

0.001),且SOD的活性和GSH的含量显著降低($P < 0.001$)。而APAP给药前静脉注射25 mg/kg的AS和APAP给药后1 h给予1000 mg/kg的NAC均可显著抑制由大剂量APAP引起的MDA增加和

SOD活性与GSH水平的降低($P < 0.001$),并使肝组织中MDA、GSH以及SOD维持在正常水平(与空白组相比, $P > 0.05$)。单独给予AS对肝组织中MDA、GSH和SOD没有显著影响($P > 0.05$)。

表2 AS对血清中ALT、AST和LDH的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of AS on levels of serum ALT, AST and LDH ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	谷丙转氨酶 ALT (IU/L)	谷草转氨酶 AST (IU/L)	乳酸脱氢酶 LDH (U/L)
空白组 Control group	14.39 ± 3.92	16.59 ± 6.51	513.63 ± 35.14
AS组 AS group	15.89 ± 7.12	15.54 ± 3.92	499.78 ± 22.53
APAP组 APAP group	319.56 ± 19.09 ^{###}	161.72 ± 14.04 ^{###}	30357.54 ± 2018.69 ^{###}
NAC + APAP组 NAC + APAP group	17.82 ± 4.83 ^{***}	15.97 ± 4.04 ^{***}	510.95 ± 19.99 ^{***}
AS + APAP组 AS + APAP group	17.61 ± 3.32 ^{***}	15.36 ± 5.68 ^{***}	536.54 ± 35.27 ^{***}

注:空白组比较,^{###} $P < 0.001$;与APAP组比较,^{***} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group,^{###} $P < 0.001$; compared with APAP group,^{***} $P < 0.001$.

表3 AS对肝组织中MDA、SOD和GSH的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of AS on hepatic MDA, SOD and GSH ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)	谷胱甘肽 GSH (mg/g prot)
空白组 Control group	1.67 ± 0.05	328.45 ± 12.29	10.40 ± 0.43
AS组 AS group	1.71 ± 0.05	337.22 ± 15.12	10.89 ± 0.28
APAP组 APAP group	2.53 ± 0.06 ^{###}	181.81 ± 6.33 ^{###}	7.90 ± 0.10 ^{###}
NAC + APAP组 NAC + APAP group	1.68 ± 0.07 ^{***}	326.06 ± 11.88 ^{***}	9.90 ± 0.48 ^{***}
AS + APAP组 AS + APAP group	1.62 ± 0.06 ^{***}	323.48 ± 11.80 ^{***}	10.23 ± 0.48 ^{***}

注:空白组比较,^{###} $P < 0.001$;与APAP组比较,^{***} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group,^{###} $P < 0.001$; compared with APAP group,^{***} $P < 0.001$.

3.4 AS对肝组织病理的影响

AS对肝组织病理变化的影响如图2所示。在空白组和AS组中小鼠肝组织结构正常,肝小叶清晰,肝细胞形态正常。而APAP组小鼠给予300 mg/kg的APAP处理后肝组织结构破坏,肝小叶不清晰,可见大面积的肝细胞液化性坏死,大量的炎症浸润。而给予25 mg/kg的AS静脉注射和给予NAC治疗一样,都能显著改善APAP对肝组织的破坏,使肝组织的结构趋近于正常水平。

4 结论

据世界卫生组织统计,药物性肝损伤已上升至全球死亡原因的第五位,已成为急性肝损伤的主要诱因。而由于使用广泛,APAP肝毒性已成为导致药物性肝损伤的最主要原因^[13],保护肝脏不受APAP毒性损害在保肝药物的研发中具有重要意义。APAP在体内主要通过葡萄糖醛酸化和硫酸化

作用生成无毒的代谢物排出体外^[14]。小部分在细胞色素P450酶的作用下生成毒性中间体NAPQI,在肝细胞内NAPQI通过与GSH结合后解毒^[15]。然而,当服用大剂量的APAP后,葡萄糖醛酸化和硫酸化通路饱和,多余的APAP通过细胞色素P450酶不断转化为NAPQI,迅速耗尽肝细胞内的GSH^[16]。当GSH耗尽后NAPQI与肝细胞内蛋白质结合并最终导致肝细胞的氧化损伤^[17]。

ALT、AST和LDH是评估肝功能常用的血清生化指标。当肝细胞病变或损伤后细胞膜的通透性增加,上述三个生化指标迅速释放进入血液,导致血清中的水平急剧上升^[18]。实验结果表明,小鼠给予APAP造模后血清中ALT、AST和LDH的水平显著增加,且组织学研究表明肝组织结构被严重破坏,说明APAP诱导小鼠急性肝损伤模型已成功复制。而静脉注射给予25 mg/kg的AS与给予NAC治疗一样都可以使ALT、AST和LDH的水平降低至正常水

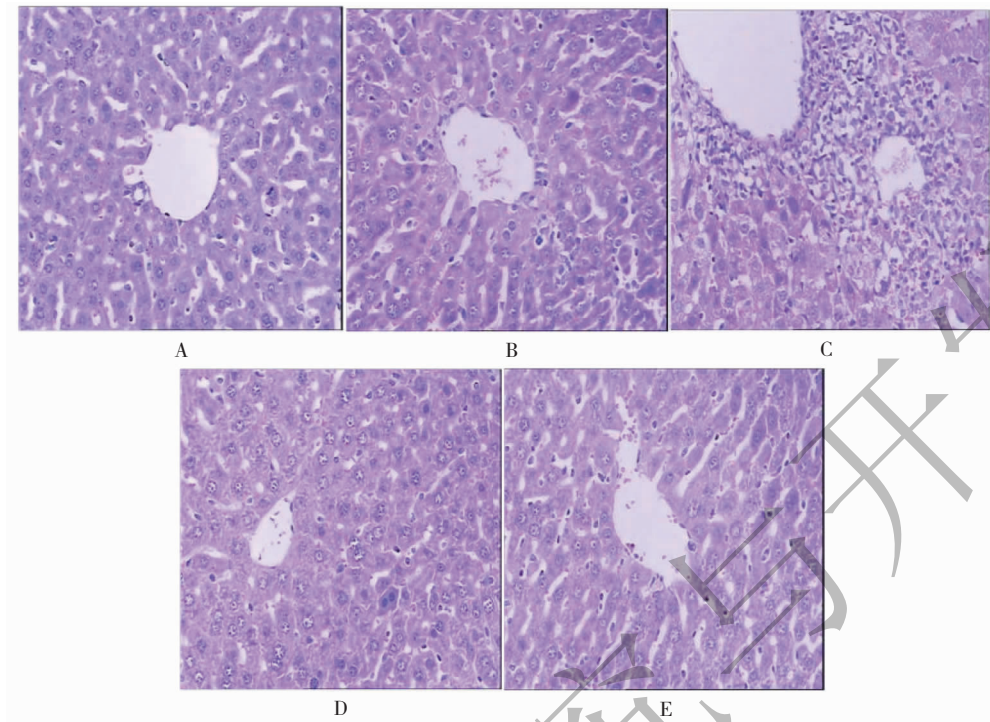


图2 AS对小鼠肝组织病理形态影响(HE, (400))

Fig. 2 Effect of AS on the histopathology of liver tissue(HE, (400))

注:A:空白组;B:AS组;C:APAP组;D:NAC + APAP组;E:AS + APAP组

Note: A: Control group; B: AS group; C: APAP group; D: NAC + APAP group; E: AS + APAP group

平,肝指数的增加得到有效抑制,APAP对肝组织结构的破坏得到控制。这些结果表明,静脉注射AS可以完全预防APAP导致的小鼠急性肝损伤。

在APAP肝毒性过程中,APAP在肝细胞内经CYP450酶转化为NAPQI后迅速消耗GSH^[19]。我们研究发现,AS单独给药对肝组织中的GSH的含量没有影响,但AS预处理可以完全阻止APAP肝毒性导致的肝组织GSH水平的降低,这表明AS的保肝作用可能与其阻止肝组织内GSH水平的下降有关。当然,这种阻止作用是否与NAC一样,通过增加供给以弥补消耗掉的GSH维持其正常水平,或者通过抑制CYP450酶的作用,减少NAPQI的生成,从而减少GSH的消耗,尚需深入研究。氧化损伤在APAP肝毒性机制中扮演着关键角色。NAPQI与肝细胞中的蛋白质等大分子(主要位于线粒体)共价结合后引起肝细胞的氧化损伤,最终导致肝脏的坏死和衰竭^[18]。MDA是一个广泛应用于评价组织氧化损伤的生物标志物^[20]。MDA的增加表明组织氧化损伤的加强和抗氧化防御系统的破坏^[21]。SOD是机体抗氧化防御系统中的关键酶,清除体内的超氧化物,维持氧化还原系统的平衡^[22]。我们的实验

结果表明,小鼠给予大剂量的APAP后肝组织中MDA的水平显著增加,SOD的活性显著降低,表明小鼠给予300 mg/kg的APAP后机体抗氧化防御系统被破坏,肝组织发生明显的氧化损伤。静脉注射25 mg/kg的AS预处理后,肝组织中MDA的水平和SOD活性并不会因为APAP的大剂量服用而发生明显变化,表明AS对APAP导致小鼠急性肝损伤的保护作用与其抑制APAP对肝脏的氧化损伤有关。

综上所述,静脉注射25 mg/kg的AS可以完全抑制APAP对肝脏的损伤,提示AS可能是一种具有明显保肝作用,极具开发价值的候选药物。同时,AS的保肝作用可能与抑制APAP对肝脏的氧化损伤有关。但是,作为保肝药物,AS尚需在其它模型上开展广泛评价,全面的成药性评价也是必要的。另一方面,AS的作用是否与抑制CYP450酶活化APAP、降低毒性中间体NAPQI的生成有关,或者还有哪些分子机制,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Ghosh J, Das J, Manna P, *et al*. Acetaminophen induced renal injury via oxidative stress and TNF-alpha production; thera-

- peutic potential of arjunolic acid[J]. *Toxicology*, 2010, 268: 8-18.
- 2 Ghosh J, Das J, Manna P, *et al.* Arjunolic acid, a triterpenoid saponin, prevents acetaminophen (APAP)-induced liver and hepatocyte injury via the inhibition of APAP bioactivation and JNK-mediated mitochondrial protection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48: 535-553.
 - 3 Terneus MV, Kiningham KK, Carpenter AB, *et al.* Comparison of S-Adenosyl-L-methionine and N-acetylcysteine protective effects on acetaminophen hepatic toxicity[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320: 99-107.
 - 4 Latchoumycandane C, Goh CW, Ong MM, *et al.* Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 412-421.
 - 5 Mullins ME, Schmidt RU, Jand TB, *et al.* What is the rate of adverse events with intravenous versus oral N-acetylcysteine in pediatric patients [J]. *Ann Emerg Med*, 2004, 44: 547-548.
 - 6 Schmidt LE, Dalhoff K, Risk factors in the development of adverse reactions to N-acetylcysteine in patients with paracetamol poisoning [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2001, 51: 87-91.
 - 7 Adewusi EA, Afolayan AJ. A review of natural products with hepatoprotective activity [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4: 1318-1334.
 - 8 Bansal J, Kumar N, Malviya R, *et al.* Hepatoprotective models and various natural product used in hepatoprotective agents: a review [J]. *Pharmacog Commun*, 2014, 4: 1-30.
 - 9 Gao CW (高诚伟), Chen YS (陈于澍), Zhao SN (赵树年), *et al.* A study of auriculatone- a norpentacyclic triterpenoid compound [J]. *Chem J Chin U* (高等学校化学学报), 1994, 15: 521-523.
 - 10 Liao SG, Wang Z, Wu LL, *et al.* structures and hepatocytotoxicity of co-occurring substances in oleanolic acid tablets [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27: 601-605.
 - 11 Zhou M, Wang M, Zhong RF, *et al.* Discovery and structure-activity relationship of auriculatone: a potent hepatoprotective agent against acetaminophen-induced liver injury [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 3636-3642.
 - 12 Wang M (王敏). Design, synthesis, water solubility and stability study of the prodrug of auriculatone; a natural hepatoprotective agent [D]. Guiyang: Guizhou Medical University (贵州医科大学), 2017.
 - 13 Shehu AI, Ma XC, Venkataramanan R. Mechanisms of drug-induced hepatotoxicity [J]. *Clin Liver Dis*, 2017, 21 (1): 35-54.
 - 14 Xie W, Jiang Z, Wang J, *et al.* Protective effect of hyperoside against acetaminophen (APAP) induced liver injury through enhancement of APAP clearance [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 246: 11-19.
 - 15 Beger RD, Bhattacharyya S, Yang X, *et al.* Translational biomarkers of acetaminophen-induced acute liver injury [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89: 1497-1522.
 - 16 Shin BY, Jin SH, Cho IJ, *et al.* Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53: 834-841.
 - 17 Jiang Y, Fan X, Wang Y, *et al.* Schisandrol B protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of liver regeneration [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 143: 107-115.
 - 18 Zhang Y, Zhang F, Wang K, *et al.* Protective effect of allyl methyl disulfide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 249: 71-77.
 - 19 Fan X, Jiang Y, Wang Y, *et al.* Wuzhi tablet (Schisandra Sphenanthera extract) protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of NRF2-ARE and p53/p21 pathways [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42: 1982-1990.
 - 20 Chen T (陈彤), Li LH (李丽洪), Chen XH (陈小河), *et al.* Extraction of purple sweet potato leaves and its protective effects on CCl4-induced acute liver injury of mice [J]. *Nat Prod Res Dew* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 1212-1218.
 - 21 Hsu YW, Tsai CF, Chen WK, *et al.* Protective effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47: 2281-2288.
 - 22 Yang ZG (杨志刚), Pan LY (潘龙银), Wang XR (王心睿). protective effect of phytosterol from *Momordica charantia* on paracetamol-induced hepatic damage in mice [J]. *Nat Prod Res Dew* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 2031-2034.