

## 黄药子诱导肝损伤大鼠血清脂肪酸的代谢轮廓

熊印华<sup>1</sup>, 徐英<sup>2</sup>, 杨莉<sup>2\*</sup>, 王峥涛<sup>2\*</sup>

(1. 江西科技师范大学药学院, 江西 南昌 330013;

2. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室暨上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

**摘要:** 中药黄药子具有肝毒性, 黄药子诱导的肝损伤大鼠的血清脂肪酸代谢轮廓尚不清楚。本文采用气相-质谱联用技术定量分析空白组、黄药子醇提物 (ethanol extraction, ET) 组和黄独素 B (diosbulbin B, DB) 组大鼠血清中 16 种游离脂肪酸 (non-esterified fatty acids, NEFA) 和酯化脂肪酸 (esterified fatty acids, EFA), 借助化学计量学方法分析大鼠灌胃黄药子或黄独素 B 后血清中脂肪酸代谢轮廓的变化。NEFA 含量测定结果显示, DB 组棕榈酸、硬脂酸、棕榈油酸、油酸、异油酸、亚油酸、亚麻酸、二十碳三烯酸、花生四烯酸和二十二碳六烯酸含量显著降低; ET 组亚油酸和二十碳三烯酸含量显著升高, 花生四烯酸、二十二碳六烯酸含量显著降低。EFA 含量测定结果显示, ET 组和 DB 组棕榈酸、硬脂酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸含量显著降低。主成分分析表明, ET 组和 DB 组的大鼠血清脂肪酸代谢轮廓明显偏离正常水平, 且 ET 组偏离程度大于 DB 组。偏最小二乘法-判别分析表明, 花生四烯酸和二十二碳六烯酸对 ET 和 DB 的肝毒性具有重要贡献, 且与谷丙转氨酶、谷草转氨酶和总胆红素具有良好的相关性, 被鉴定为黄药子肝毒性的潜在生物标识物。本研究为深入研究黄药子的肝毒性的分子作用机制奠定基础。

**关键词:** 脂肪酸; 黄药子; 黄独素 B; 肝毒性

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0753-07

## The metabolic profile of serum fatty acids in rats with *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae*-induced liver injury

XIONG Yin-hua<sup>1</sup>, XU Ying<sup>2</sup>, YANG Li<sup>2\*</sup>, WANG Zheng-tao<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China; 2. The Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae* is a traditional Chinese medicine with hepatotoxicity, but the metabolic profile of fatty acids has not been identified in the rats with liver injury. In this project, a gas chromatography-mass spectrometry method was applied to simultaneous quantification of 16 non-esterified fatty acids (NEFA) and esterified fatty acids (EFA) in the serum of control, ethanol extraction of *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae* (ethanol extraction, ET) and diosbulbin B (DB)-treated rats. Meanwhile, the change of fatty acid metabolic profile of liver injured rats was analyzed by principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). The results of NEFA concentration indicated that the serum concentrations of palmitic acid (C16 : 0), stearic acid (C18 : 0), palmitoleic acid (C16 : 1n7), oleic acid (C18 : 1n9),

收稿日期: 2016-12-02; 修回日期: 2017-01-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660692); 江西省教育厅青年科学基金项目 (GJJ14598).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-51322506, E-mail: yangli7951@hotmail.com;

Tel: 86-21-51322507, Fax: 86-21-51322519, E-mail: wangzht@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1157

vaccenic acid (C18 : 1n7), linoleic acid (C18 : 2n6), linolenic acid (C18 : 3n3), eicosatrienoic acid (C20 : 3n6), arachidonic acid (C20 : 4n6) and docosahexaenoic acid (C22 : 6n3) in DB-treated rats decreased significantly, while that of C18 : 2n6 and C20 : 3n6 obviously increased and that of C20 : 4n6 and C22 : 6n3 noticeably dropped in ET-treated rats when compared with control. Furthermore, the results of EFA concentration illustrated that the serum concentrations of C16 : 0, C18 : 0, C20 : 4n6, C22 : 6n3 and eicosapentaenoic acid (C20 : 5n3) in two toxic groups were remarkably decreased when compared with control. The fatty acid metabolic profiles of the two toxic groups exhibited significant difference from the normal levels, and the degree of deviation of ET group was higher than that of DB group. More importantly, the results of PLS-DA showed that C20 : 4n6 and C22 : 6n3 were important indicators of the hepatotoxicity induced by ET and DB, and the serum concentrations of the two fatty acids had good correlation with the levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and total bilirubin using Pearson's correlation analysis and canonical correlation analysis (CCA). Therefore, C20 : 4n6 and C22 : 6n3 were identified as potential biomarkers of ET and DB-induced liver injury. The project can provide a foundation for future investigation of molecular mechanism of hepatotoxicity caused by *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae*

**Key words:** fatty acid; *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae*; diosbulbin B; hepatotoxicity

黄药子为薯蓣科植物黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 的块茎。在临床上主要用于治疗甲状腺腺瘤、恶性肿瘤、亚急性甲状腺炎、宫颈炎和银屑病等。研究表明黄药子可致小鼠肝损伤<sup>[1, 2]</sup>, 且呈一定的剂量依赖关系<sup>[3]</sup>。黄独素 B (diosbulbin B, DB) 既是黄药子的抗肿瘤、抗炎和抗菌等作用的物质基础, 又是其主要肝毒性成分<sup>[4, 5]</sup>。脂肪酸在生物体内存在两种形式: 游离脂肪酸 (non-esterified fatty acids, NEFA) 和酯化脂肪酸 (esterified fatty acids, EFA)。前者具有广泛的生物学意义, 后者在脂肪酶作用下降解生成 NEFA。药源性肝损伤可能引起肝细胞线粒体功能异常<sup>[6]</sup>, 肝脏在脂肪酸合成和代谢 ( $\beta$ -氧化) 及维持机体内脂肪酸水平发挥重要作用, 因此药源性肝损伤必然导致脂肪酸水平和代谢轮廓的变化。另部分游离脂肪酸具有细胞毒性, 可引发溶酶体膜和线粒体膜等微器官损坏, 加强肿瘤坏死因子和细胞介素等毒性, 导致肝实质变性和炎性细胞浸润等<sup>[7]</sup>。 $\omega$ -3 不饱和脂肪酸如二十二碳六烯酸通过调控炎症和细胞凋亡对肝脏具有保护作用<sup>[8]</sup>。体循环中  $\omega$ -6 不饱和脂肪酸与  $\omega$ -3 不饱和脂肪酸的比值降低能够显著抑制化学诱导急性肝损伤<sup>[9]</sup>。由此可见, 脂肪酸与肝损伤存在密切的关系。

目前黄药子的肝毒性研究仅限于一些常规的毒理实验, 黄药子的肝毒性与脂肪酸代谢的相关性研究尚未见报道。本研究在黄药子和 DB 诱导大鼠肝损伤的药理实验基础上, 采用气相-质谱联用技术对大鼠血清中 NEFA 和 EFA 进行定量分析, 结合多变量统计分析方法, 分析大鼠灌胃黄药子或 DB 后血清脂肪酸代谢轮廓的变化, 探究黄药子的肝毒性与脂肪

酸代谢轮廓的相关性, 为深入研究黄药子的肝毒性分子机制奠定基础, 也为中药肝毒性的研究提供新的思路和方法。

## 材料与方法

**材料** 黄药子采于安徽青阳县, 经安徽中医药大学刘守金教授鉴定为薯蓣科植物黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 块茎。黄独素 B (纯度 >98%) 购于上海同田生物技术有限公司。月桂酸 (C12 : 0)、肉豆蔻酸 (C14 : 0)、棕榈酸 (C16 : 0)、棕榈油酸 (C16 : 1n7)、十七烷酸 (C17 : 0)、硬脂酸 (C18 : 0)、油酸 (C18 : 1n9)、异油酸 (C18 : 1n7)、亚油酸 (C18 : 2n6)、亚麻酸 (C18 : 3n3)、二十烷酸 (C20 : 0)、花生四烯酸 (C20 : 4n6)、二十碳三烯酸 (C20 : 3n6)、二十碳五烯酸 (C20 : 5n3)、二十二碳六烯酸 (C22 : 6n3) 和二十四烷酸 (C24 : 0) 购于美国 Sigma 公司。十九碳二烯酸 (C19 : 2n10) 及甲酯购于美国 Nu-Chek 公司。谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL) 和白蛋白 (ALB) 等生化试剂盒购于上海荣盛生物药业有限公司。

**仪器** 6890 气相-5975 质谱联用仪 (Agilent Technologies, 美国), 7080 型全自动生化分析仪 (Hitachi, 日本), Avanti J-25 离心机 (Beckman Coulter, 德国), BP 211D 电子天平 (Sartorius, 德国)。

**毒性实验药物制备** 本实验室前期制备获得黄药子醇提取物 (ethanol extraction, ET), 方法见文献<sup>[10]</sup>。给药前 ET 和 DB 分别用适量 0.5% CMC-Na 溶液混悬。

**实验动物** 24 只 SD 大鼠, 雄性, 清洁级, 体重  $250 \pm 25$  g, 购于上海斯莱克实验动物有限公司, 动物合格证号: SCXK (沪 2007-0005), 饲养于上海中医药大学实验中心动物房, 室温  $20 \pm 2$  °C, 相对湿度 60%~70%。

**动物处理** 24 只雄性 SD 大鼠喂养 1 周后, 按体重随机分成 3 组, 分别为空白组、ET 组和 DB 组。ET 组给药剂量为  $5.28 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (含  $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  DB), DB 组给药剂量  $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 空白组给予相同剂量的生理盐水, 灌胃给药 (ig), 给药后 24 h 眼眶静脉丛取血, 供分析血清生化指标和脂肪酸。

**血清 ALT、AST、TBIL 和 ALB 测定** 全血室温静置 1.5 h, 于 4 °C、 $1000 \times g$  离心 10 min, 取上层血清于 eppendorf 离心管中,  $-80$  °C 保存。按试剂盒上规定的方法测定血清中 ALT、AST、TBIL 和 ALB 等生化指标的水平。

**血清脂肪酸甲酯化**<sup>[11]</sup> 取血清 100  $\mu\text{L}$ , 加入  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  内标 (C19: 2n10 和 C19: 2n10 甲酯) 20  $\mu\text{L}$ , 用  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KOH 甲醇溶液甲酯化, 用 1 mL 正己烷配制成酯化脂肪酸的供试溶液; 剩余血清部分用 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  甲醇溶液甲酯化, 用 1 mL 正己烷配制成游离脂肪酸的供试溶液。

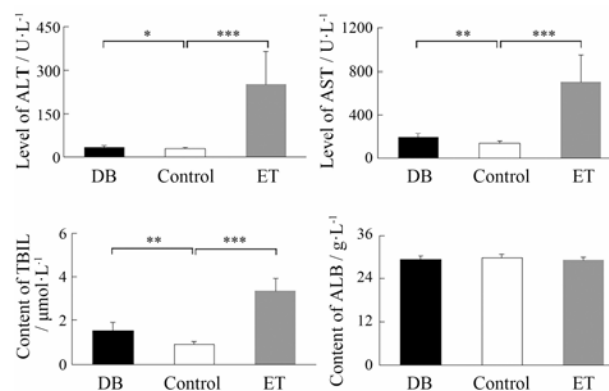
**脂肪酸含量测定** 气相-质谱条件<sup>[11]</sup>: Agilent DB-225MS 毛细管色谱柱 ( $0.25 \mu\text{m}$ ,  $60 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ ); 程序升温: 初始温度 70 °C, 保持 1 min, 以  $40 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  速度升至 200 °C, 保持 20 min, 再以  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  速度升至 230 °C, 保持 25 min。电离方式 EI, 选择离子扫描模式, 同时监测  $m/z$  55、67、74 和 79 的碎片离子。标准曲线制备: 精密称定 16 种游离脂肪酸标准品, 用甲醇或正己烷配制成质量浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  贮备液。取各脂肪酸标准品 200  $\mu\text{L}$  至 15 mL 螺口离心管,  $\text{N}_2$  吹干后用 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  甲醇溶液进行甲酯化, 用正己烷配制成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  混合标准品溶液, 再逐步稀释配置成内标 (C19: 2n10 甲酯) 质量浓度为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 0.5、1、2、5、10、15、25、50 和 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  9 种混合标准品溶液, 用于标准曲线的绘制。取游离脂肪酸供试溶液和酯化脂肪酸供试溶液各 0.2  $\mu\text{L}$ , 按内标法测定血清中脂肪酸的含量。

**统计学分析** 血清生化指标水平和脂肪酸含量均用“均值 $\pm$ 标准差”( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 SIMCA-P13.0 软件 (Umetrics, Umea, 瑞典) 进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA)。SPSS 19.0 统计软件进行 Pearson 相关分析和典型相关分析 (CCA)。

## 结果

### 1 ET 和 DB 对 ALT、AST 活性及 TBIL、ALB 含量的影响

ALT、AST、ALB 和 TBIL 是目前临床诊断肝损伤的常用血清生化指标, 本实验通过测定这些生化指标的活性或含量评价 ET 和 DB 对大鼠肝损伤的程度。如图 1 所示, 两毒性组的大鼠灌胃 ET ( $5.28 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和 DB ( $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 24 h 后, 血清的 ALT、AST、TBIL 的水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且 ET 组升高程度远大于 DB 组; 而 ALB 含量均没有显著变化 ( $P > 0.05$ ), 表明 ET 和 DB 均对大鼠造成肝损伤, 且 ET 肝毒性明显强于 DB。



**Figure 1** Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities, and albumin (ALB), total bilirubin (TBIL) amount in ethanol extraction of *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae* (ET)- and diosbulbin B (DB)-treated rats.  $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

### 2 ET 和 DB 对脂肪酸含量的影响

ET 组和 DB 组大鼠给药后 24 h 血清中游离脂肪酸和酯化脂肪酸的含量变化如表 1 所示。从整体结果分析, ET 组和 DB 组的游离脂肪酸水平变化趋势有差异, 而酯化脂肪酸水平变化趋势基本一致。游离脂肪酸含量变化: DB 组 C16: 0、C18: 0、C16: 1n7、C18: 1n9、C18: 2n6、C18: 1n7、C18: 3n3、C20: 3n6、C20: 4n6 和 C22: 6n3 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); ET 组 C18: 2n6 和 C20: 3n6 含量显著上升 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ ), C20: 4n6 和 C22: 6n3 含量显著下降 ( $P < 0.001$ )。酯化脂肪酸含量变化: DB 组和 ET 组 C16: 0、C18: 0、C20: 4n6、C20: 5n3 和 C22: 6n3 含量均显著降低 ( $P < 0.01$ )。结果提示, ET 和 DB 致大鼠肝损伤后血中部分脂肪酸含量发生显著变化。

### 3 ET 和 DB 对血清脂肪酸代谢轮廓的影响

**3.1 主成分分析** 以游离脂肪酸和酯化脂肪酸的含量值为 X 变量, 将空白组、ET 组和 DB 组共 24 个样

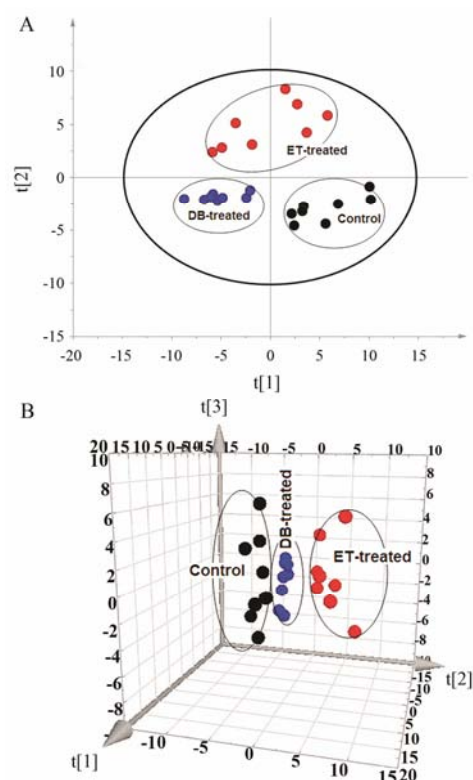
**Table 1** Serum concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of non-esterified fatty acids (NEFA) and esterified fatty acids (EFA) in rats dosed with ET ( $5.28\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and DB ( $180\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), respectively.  $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs control group

Fatty acid		Control	ET-treated	DB-treated
NEFA	C12 : 0	10.33 $\pm$ 1.33	11.32 $\pm$ 1.62	10.27 $\pm$ 2.30
	C14 : 0	25.28 $\pm$ 1.45	24.61 $\pm$ 3.40	25.55 $\pm$ 3.85
	C16 : 0	568.74 $\pm$ 63.36	534.92 $\pm$ 93.33	398.20 $\pm$ 21.55***
	C16 : 1n7	10.96 $\pm$ 2.08	8.56 $\pm$ 3.42	6.75 $\pm$ 1.57***
	C17 : 0	10.35 $\pm$ 0.76	10.04 $\pm$ 1.45	10.44 $\pm$ 1.58
	C18 : 0	432.30 $\pm$ 61.26	379.64 $\pm$ 36.13	336.83 $\pm$ 12.31**
	C18 : 1n9	48.99 $\pm$ 5.27	55.93 $\pm$ 13.41	34.33 $\pm$ 5.87***
	C18 : 1n7	8.54 $\pm$ 1.19	9.65 $\pm$ 1.82	6.74 $\pm$ 0.61**
	C18 : 2n6	122.57 $\pm$ 20.93	156.12 $\pm$ 31.79*	99.47 $\pm$ 14.08*
	C18 : 3n3	5.55 $\pm$ 0.59	6.26 $\pm$ 1.54	4.34 $\pm$ 0.63***
	C20 : 0	10.84 $\pm$ 0.90	10.47 $\pm$ 1.58	11.28 $\pm$ 1.71
	C20 : 3n6	2.67 $\pm$ 0.51	3.77 $\pm$ 0.50***	2.44 $\pm$ 0.46*
	C20 : 4n6	196.12 $\pm$ 20.14	142.76 $\pm$ 22.90***	140.29 $\pm$ 14.55***
	C20 : 5n3	5.79 $\pm$ 1.21	4.82 $\pm$ 0.85	4.76 $\pm$ 0.85
	C22 : 6n3	131.32 $\pm$ 15.76	99.40 $\pm$ 22.07***	92.41 $\pm$ 12.04***
	C24 : 0	2.35 $\pm$ 0.16	2.05 $\pm$ 0.18	2.13 $\pm$ 0.15
EFA	C12 : 0	14.10 $\pm$ 0.23	14.26 $\pm$ 0.09	14.28 $\pm$ 0.11
	C14 : 0	11.83 $\pm$ 0.33	12.54 $\pm$ 0.69	11.97 $\pm$ 0.38
	C16 : 0	304.40 $\pm$ 38.92	246.24 $\pm$ 26.59**	238.77 $\pm$ 34.31**
	C16 : 1n7	18.52 $\pm$ 8.13	17.18 $\pm$ 4.18	14.08 $\pm$ 0.94
	C17 : 0	11.14 $\pm$ 0.53	11.16 $\pm$ 0.91	10.71 $\pm$ 0.74
	C18 : 0	222.64 $\pm$ 26.64	149.51 $\pm$ 31.24***	159.46 $\pm$ 23.74***
	C18 : 1n9	113.47 $\pm$ 19.41	132.75 $\pm$ 33.24	90.68 $\pm$ 15.00
	C18 : 1n7	28.84 $\pm$ 3.60	30.34 $\pm$ 5.00	24.58 $\pm$ 2.12
	C18 : 2n6	456.50 $\pm$ 78.25	532.19 $\pm$ 96.15	380.06 $\pm$ 47.59
	C18 : 3n3	13.60 $\pm$ 1.79	15.29 $\pm$ 3.07	12.61 $\pm$ 0.74
	C20 : 0	7.79 $\pm$ 0.23	8.27 $\pm$ 0.44	7.99 $\pm$ 0.26
	C20 : 3n6	18.79 $\pm$ 2.45	19.15 $\pm$ 3.18	17.54 $\pm$ 2.25
	C20 : 4n6	222.32 $\pm$ 12.18	133.68 $\pm$ 25.10***	152.70 $\pm$ 21.20***
	C20 : 5n3	37.47 $\pm$ 5.52	25.90 $\pm$ 6.40**	28.58 $\pm$ 5.47**
	C22 : 6n3	264.35 $\pm$ 32.18	152.18 $\pm$ 23.50***	181.57 $\pm$ 21.60***
	C24 : 0	—	—	—

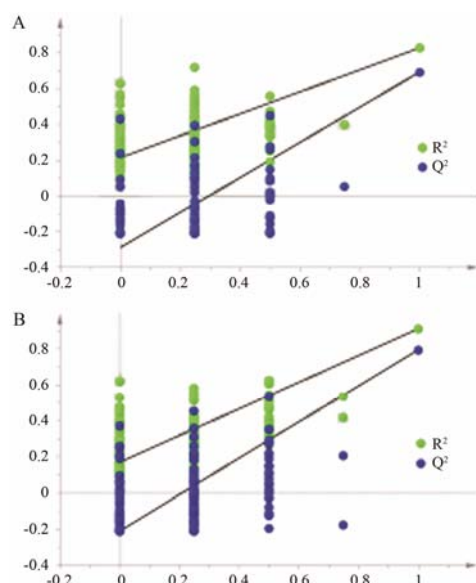
本进行 2 个主成分 PCA 分析, 该模型能解释 73.9% 原始数据。在二维空间的散点图上空白组、ET 组和 DB 组的样本离散度较小, 且能互相分开 (图 2A)。在此基础上进行 3 个主成分 PCA 分析, 该模型显著提高了对原始数据的解释能力 ( $R^2X=86.4\%$ )。在三维空间的散点图上能清晰地看到 ET 和 DB 两毒性组与空白组相比其矢量方向一致, 且 DB 组的样本分布在空白组和 ET 组样本之间 (图 2B)。PCA 分析表明 ET 和 DB 对脂肪酸影响模式基本相同, 但 ET 的影响比 DB 大。因此, 从脂肪酸的代谢轮廓层面上分析可推测 ET ( $5.28\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 对大鼠肝脏的毒性比 DB ( $180\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 大, ET 应还含有其他肝毒性成分。

**3.2 偏最小二乘法-判别分析** 为了发现能够表征黄药子肝毒性的生物标识物, 对空白组和 ET 组进行

PLS-DA 建模。以游离脂肪酸水平为 X 变量和组别为 Y 变量, 建立 2 个主成分的 PLS-DA 模型。对该模型的 variable importance in the projection (VIP) 大于 1.0 的变量进行  $t$  检验, 发现 C16 : 0 和 C18 : 0 的水平在这两组间没有显著差异 ( $P>0.05$ ) (表 1), 因此把这两个变量剔除后重新进行 PLS-DA 建模, 得到第 1 个 PLS-DA 模型 ( $R^2X=86.3\%$ ,  $R^2Y=82.6\%$ ,  $Q^2=69.2\%$ )。同理, 为了发现能够表征黄独素肝毒性的生物标识物, 对空白组和 DB 组进行 2 个主成分的 PLS-DA 分析, 得到第 2 个 PLS-DA 模型 ( $R^2X=82.4\%$ ,  $R^2Y=91.1\%$ ,  $Q^2=79.4\%$ )。对上述两个模型进行 200 次迭代的置换检验, 如图 3 所示, 图中的所有  $Q^2$  均低于原始值, 且  $Q^2$  的回归截距为负值, 表明这两个模型均未过度拟合。根据第 1 个 PLS-DA 模型的载荷图和 VIP



**Figure 2** The 2D score plot (A) and 3D score plot (B) from principle component analysis (PCA) based on the metabolic profiles of NEFA and EFA from control, ET and DB groups.  $t[1]$ ,  $t[2]$  and  $t[3]$  are the first three eigenvectors of original data. The score plot indicated a clear separation between the control, ET and DB groups

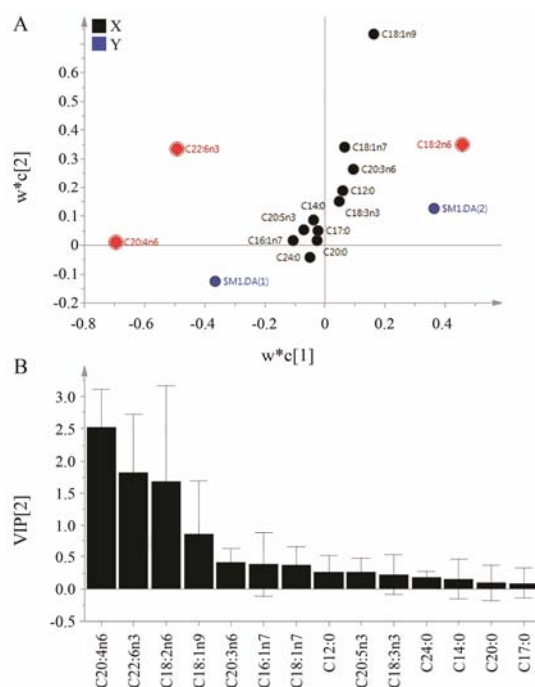


**Figure 3** The results of permutation test ( $n=200$ ) of partial least squares-discriminate analysis (PLS-DA) model from control and ET groups (A), and PLS-DA model from control and DB groups (B). All blue  $Q^2$ -values were lower than the original points to the right, and the blue regression line of the  $Q^2$ -points intersected the vertical axis below zero (A,  $-0.29$ ; B,  $-0.211$ ). It indicated that the two original PLS-DA models were valid

值 (图 4), 可知 C18 : 2n6、C20 : 4n6 和 C22 : 6n3 是受 ET 诱导的大鼠肝毒性影响较大的脂肪酸, 且  $t$  检验表明这 3 个脂肪酸水平在两组间均有显著性差异 ( $P<0.05$ ) (表 1)。第 2 个 PLS-DA 模型的载荷图和 VIP 值分析表明, C16 : 0、C18 : 0、C20 : 4n6 和 C22 : 6n3 是受 DB 给药后造成肝毒性影响较大的脂肪酸 (图 5), 且  $t$  检验表明这 4 个脂肪酸水平在两组间均有显著性差异 ( $P<0.01$ ) (表 1)。上述分析提示, C20 : 4n6 和 C22 : 6n3 是能够表征黄药子和 DB 诱导大鼠肝损伤的共同潜在的生物标识物。

#### 4 脂肪酸和肝毒性的相关分析

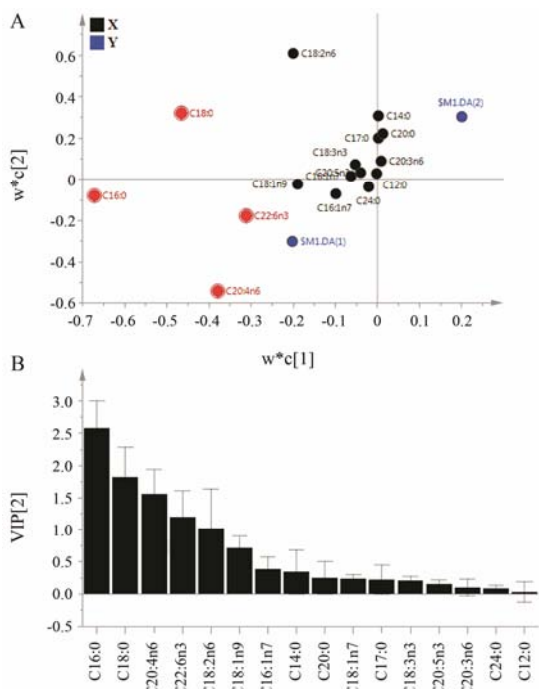
**4.1 Pearson 相关分析** 上述鉴定的游离脂肪酸生物标识物 (C20 : 4n6 和 C22 : 6n3) 及其对应的酯化脂肪酸与 ET 和 DB 肝损伤中有显著变化的 ALT、AST 和 TBIL 进行 Pearson 相关分析 (表 2)。表中的相关系数均为负值, 表明脂肪酸的含量与生化指标水平成负相关。ET 组游离脂肪酸 C20 : 4n6 与 TBIL 水平呈显著相关性 ( $P<0.05$ ), 酯化脂肪酸 C20 : 4n6 和 C22 : 6n3 与 ALT、AST、TBIL 呈显著相关性 ( $P<0.01$ )。



**Figure 4** Analysis of potential biomarkers of liver injury induced by ET using PLS-DA. The PLS-DA model ( $R^2X=86.3\%$ ,  $R^2Y=82.6\%$ ,  $Q^2=69.2\%$ ) was generated based on NEFA metabolic profile from control and ET groups. A: The PLS loading plot exhibited the correlation between ET-induced liver injury and individual fatty acid. ET-induced hepatic injury was strongly correlated with C20 : 4n6, C22 : 6n3 and C18 : 2n6, marked with ‘•’; B: Variable importance in the projection (VIP) plot confirmed the significance of these species in classification ( $VIP>1.0$ )

**Table 2** The results of Pearson correlation analysis between the serum levels of fatty acids and biochemical indicators in control, ET and DB-treated rats. Correlation significance was defined as \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .  $r$ : Pearson correlation coefficient

Fatty acid	ET			DB			
	$r$ (ALT)	$r$ (AST)	$r$ (TBIL)	$r$ (ALT)	$r$ (AST)	$r$ (TBIL)	
NEFA	C20 : 4n6	-0.499	-0.487	-0.647*	-0.732**	-0.665**	-0.780***
	C22 : 6n3	-0.246	-0.232	-0.457	-0.647**	-0.703**	-0.853***
EFA	C20 : 4n6	-0.735**	-0.770**	-0.825**	-0.664**	-0.624*	-0.675**
	C22 : 6n3	-0.711**	-0.715**	-0.829***	-0.577*	-0.651**	-0.793***



**Figure 5** Loading scatter plot (A) and VIP plot (B) in the PLS-DA model ( $R^2X = 82.4\%$ ,  $R^2Y = 91.1\%$ ,  $Q^2 = 79.4\%$ ) based on NEFA metabolic profile from control and DB groups

DB 组 C20 : 4n6 和 C22 : 6n3 与 ALT、AST、TBIL 呈显著相关性 ( $P < 0.05$ )。

**4.2 典型相关分析** 为进一步揭示脂肪酸与生化指标的相关性, 对空白组、ET 组和 DB 组的 24 个样本, 以 C20 : 4n6 和 C22 : 6n3 及其酯化脂肪酸为一组变量, ALT、AST 和 TBIL 为另一组变量进行 CCA。结果显示, 对原始数据提取出 3 对典型变量, 它们的典型相关系数依次为 0.818 ( $P < 0.01$ )、0.724 ( $P < 0.05$ ) 和 0.322 ( $P > 0.5$ ), 表明第 1 对典型变量和第 2 对典型变量均具有显著相关性。CCA 结果进一步表明 C20 : 4n6 和 C22 : 6n3 与黄药子肝毒性具有良好相关性。

**讨论**

ET 组大鼠给药剂量中约含  $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  DB, 是 DB 组的 1/2 给药剂量 ( $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。药理学评价可知 ET 组的肝毒性大于 DB 给药组, 未显示出 DB 肝

毒性的量效关系, 表明 ET 中除 DB 外应还有其他具有肝毒的化学成分。基于血清脂肪酸水平的 PCA 分析表明大鼠口服 ET 和 DB 24 h 后血清脂肪酸代谢轮廓明显偏离正常水平, 且 ET 组的偏离程度比 DB 组大, 从脂肪酸代谢层面分析也表明 ET 的肝毒性强于 DB, 与药理学评价结果基本一致。

本研究发现, DB 组大鼠血清中大部分游离不饱和脂肪酸以及两个主要饱和脂肪酸 (C16 : 0 和 C18 : 0) 的浓度显著低于对照组。氧化应激是 DB 肝毒性主要机制之一<sup>[12]</sup>, 当 DB 诱导大鼠肝损伤发生时, 大鼠机体内膜系统上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化作用被大量消耗, 导致血清脂肪酸水平降低。肝脏是 C20 : 4n6 代谢和失活的主要场所, 也是 C20 : 4n6 及其代谢产物的作用靶器官。当肝脏损伤时, 肝脏对 C20 : 4n6 及其代谢物的摄取、代谢灭活及排泄功能势必发生障碍, 从而影响血、尿和胆汁中的水平变化<sup>[13]</sup>。C20 : 4n6 可由必需脂肪酸 C18 : 2n6 转化而来。肝脏利用 C18 : 2n6 作为原料, 在肝脏内进行碳链的延长和去饱和后生成 C20 : 4n6。在本实验中, ET 组的 C18 : 2n6 水平显著升高, 而 C20 : 4n6 的表达则显著下降, 这两个游离脂肪酸的变化趋势可能是 ET 抑制了 C18 : 2n6 向 C20 : 4n6 转化通路的结果。有研究表明 ET 的氯仿萃取部位能显著升高肝细胞内钙离子浓度<sup>[14]</sup>, 而花生四烯酸代谢通路的关键限速酶 PLA<sub>2</sub> 的活性与钙离子有正相关性。由于 C20 : 4n6 的含量在两个给药组中均显著下调, 因此 ET 和 DB 均可能激活花生四烯酸的炎症级联代谢通路代谢大量炎症因子导致肝脏实质变性和炎症细胞浸润等。

本研究从脂肪酸代谢的层面上评价了中药黄药子及毒性成分 DB 诱导大鼠肝损伤, 并结合化学计量学方法分析脂肪酸的代谢轮廓与黄药子的肝毒性相关性, 为深入研究黄药子的肝毒性分子作用机制奠定基础。

**References**

[1] Ma YB, Ji LL, Wang SC, et al. Protection of *Grateloupia*

- filicina* polysaccharide against hepatotoxicity induced by *Dioscorea bulbifera* L [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2013, 48: 1253–1258.
- [2] Niu CW, Ji LL, Wang ZT. Protection of Herba Scutellariae Barbatae against hepatotoxicity induced by Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae and its mechanism [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2016, 51: 373–379.
- [3] Zhao LG, Liu RN, Shi L, et al. Study on the “dosage-time-toxicity” relationship of hepatotoxicity induced by the decoction of airpotato Yam Rhizome in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2013, 29: 96–98.
- [4] Wang JM, Cui DP, Cui Y. Research progress in chemical components, pharmacological actions and toxicity of diterpene lactones isolated from *Dioscoreae Bulbifera* L. Rhizome [J]. *China J Chin Med* (中医学报), 2011, 26: 1319–1321.
- [5] Niu CW, Lu B, Ji LL, et al. Study on diosbulbin B-induced acute liver injury in mice and its mechanism [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 1290–1292.
- [6] Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008, 22: 335–353.
- [7] Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002, 16: 663–678.
- [8] El-Mowafy AM, Katary MM, Pye C, et al. Novel molecular triggers underlie valproate-induced liver injury and its alleviation by the omega-3 fatty acid DHA: role of inflammation and apoptosis [J]. *Heliyon*, 2: e00130.
- [9] Schmöcker C, Weylandt KH, Kahlke L, et al.  $\omega$ -3 Fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 864–869.
- [10] Xu Y, Chen CC, Yang L, et al. Evaluation on hepatotoxicity caused by *Dioscorea bulbifera* based on analysis of bile acids [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2011, 46: 39–44.
- [11] Xiong YH, Xu Y, Yang L, et al. Gas chromatography-mass spectrometry-based profiling of serum fatty acids in acetaminophen-induced liver injured rats [J]. *J Appl Toxicol*, 2014, 34: 149–157.
- [12] Wang JM, Ji LL, Liu H, et al. Study of the hepatotoxicity induced by *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in mice [J]. *Biosci Trends*, 2010, 4: 79–85.
- [13] Chen L, Wang BY, Mao XZ. Changes of plasma levels of several arachidonic acid metabolites and hormones in  $\text{CCl}_4$ -induced liver injury [J]. *Chin J Pathophys* (中国病理生理杂志), 2000, 16: 858–860.
- [14] Wang JZ, Liu SM, Tang Q, et al. Toxic components of *Dioscorea bulbifera* L influence on the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in liver cells [J]. *Inform Tradit Chin Med* (中医药信息), 2012, 29: 15–16.