

免疫应激介导的赤芍缓解补骨脂肝脏毒性作用评价及其调控代谢网络分析

武文星¹, 郭盛^{1*}, 吴励萍¹, 夏玲¹, 赵明¹, 李全², 王恒斌², 段金廉^{1*}

(1. 南京中医药大学, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏南京 210023; 2. 雷允上药业集团有限公司, 江苏苏州 215003)

摘要: 本研究基于免疫应激大鼠模型, 研究补骨脂与赤芍配伍前后对其特异质肝损伤作用的影响及其代谢网络调控机制。采用低剂量脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 注射致免疫应激SD大鼠模型, 分别比较补骨脂单用及补骨脂-赤芍配伍给药后, 模型动物肝脏谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 的活性及肝脏病理变化; 通过UHPLC-QTOF/MS分析不同组别大鼠血清代谢轮廓特征, 结合主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析法 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 研究补骨脂与赤芍配伍后对特异质肝损伤大鼠血清中内源性代谢产物的影响, 并应用HMDB数据库及MetaboAnalyst在线通路富集工具进行生物标志物的鉴定和代谢通路富集分析。结果显示, 对于LPS致免疫应激大鼠模型, 补骨脂组AST、ALT均显著升高 ($P < 0.01$), 肝脏切片可见明显的病理损伤, 而其配伍赤芍后肝损伤作用显著降低。代谢组学分析显示赤芍主要通过调节花生四烯酸代谢和甘油磷脂代谢等信号通路改善补骨脂致肝毒性大鼠体内的血清代谢异常。

关键词: 补骨脂; 赤芍; 特异质肝损伤; 代谢组学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)07-1789-08

Paeoniae Rubra Radix decreases the hepatotoxicity of Psoraleae Fructus in an immunologically stressed rat model: a metabolic network analysis

WU Wen-xing¹, GUO Sheng^{1*}, WU Li-ping¹, XIA Ling¹, ZHAO Ming¹, LI Quan²,
WANG Heng-bin², DUAN Jin-ao^{1*}

(1. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Leiyunshang Pharmaceutical Co. Limited, Suzhou 215003, China)

Abstract: An immunologically stressed rat model was used in a metabolomics study on the ability of Paeoniae Rubra Radix to reduce the liver toxicity of Psoraleae Fructus. Different groups of rats were given the extracts of Psoraleae Fructus and Psoraleae Fructus together with Paeoniae Rubra Radix or combined with a non-toxic dose of lipopolysaccharide (LPS). The biochemical indices of liver function and pathological changes in liver tissue were used to evaluate histopathological changes. UHPLC-QTOF/MS was used to analyze the metabolic profile of serum

收稿日期: 2021-02-23; 修回日期: 2021-04-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873189, 81673532); 江苏省高校自然科学研究重大项目 (18KJA360006).

*通讯作者 Tel: 86-25-85811917, E-mail: guosheng@njucm.edu.cn;

Tel: 86-25-85811291, E-mail: dja@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0255

samples, combined with principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) methods. The HMDB database and Metabo Analyst online tool were used for biomarker identification and metabolic pathway-enrichment analysis. The results show that the co-treatment *Psoraleae Fructus* and LPS resulted in significant liver injury, indicated by the elevation of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, as well as obvious pathological changes. Liver injury was significantly decreased by treatment with *Paeoniae Rubra Radix*. Metabolomic analysis showed that the addition of *Paeoniae Rubra Radix* ameliorated the abnormal serum metabolism in rats mainly through regulation of arachidonic acid metabolism and glycerophospholipid metabolism pathways.

Key words: *Psoraleae Fructus*; *Paeoniae Rubra Radix*; idiosyncratic hepatotoxicity; metabolomics

补骨脂为豆科植物补骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.) 的干燥成熟果实, 其味辛、苦, 性温, 归肾、脾经, 具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻, 外用消风祛斑的功效。现代研究表明, 补骨脂具有抗肿瘤^[1]、抗骨质疏松^[2]、抗抑郁^[3]以及类雌激素^[4]等广泛药理活性。近年来, 多项研究显示补骨脂大剂量、长期应用可引起多种不良反应, 如肝毒性、光毒性、过敏反应、肾毒性和生殖毒性等^[5]。其中, 肝毒性为补骨脂引发的主要毒性反应, 国家药监局已通报多例含补骨脂复方制剂出现肝损害的案例^[6]。

中药配伍减毒是中医方剂理论的重要组成部分之一, 是基于《神农本草经》所创立的“七情合和”理论中的“有毒宜制, 可用相畏相杀者”的论述逐渐形成的一种临床用药思想, 也是有毒中药用于临床的常见减毒方法^[7]。赤芍性微寒, 味苦, 研究表明赤芍对急性肝损伤^[8]、胆汁淤积性肝炎^[9]、肝纤维化^[10]等肝疾病均有一定的防治作用, 且已有报道其在配伍运用时可降低乌头类等药物的肝毒性^[11], 据此推测赤芍与补骨脂配伍可在一定程度上降低补骨脂的肝脏毒性。

特异质肝毒性是一种在临床剂量范围内, 仅发生于少数病人、与药物的药理效应无关、无明显临床剂量一效应关系的药物不良反应^[12,13]。其发生机制主要分为代谢特异质和炎症特异质, 其中炎症特异质主要与人的免疫应激状态相关。Roth 等^[14]最早提出“免疫应激状态下更容易出现药源性特异质肝损伤”, 即脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 特异质模型。目前已有研究表明, 补骨脂引发的肝损伤与机体的免疫应激状态相关^[15]。因此, 本研究通过腹腔注射 LPS 复制免疫应激动物模型, 研究补骨脂与赤芍配伍对其肝脏毒性的影响, 并采用代谢组学研究方法分析其调控代谢网络机制, 以期补骨脂临床安全用药提供借鉴和参考。

材料与方法

仪器 Waters ACQUITY UHPLC 系统 (包括四元泵溶剂系统, 在线脱气机和自动进样器; 英国 Waters 公

司)、Waters SYNAPT G2-Si 质谱仪 (英国 Waters 公司)、MassLynx™ 质谱工作站 (英国 Waters 公司)、Millipore Direct-Q3 Advantage 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)、BX43 生物倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

药材与试剂 LPS (批号: 20001)、赤芍 (批号: 20001) 均购于亳州紫锐药业有限公司; 脂多糖 (批号: 12190801) 购自 Sigma 公司; 乙腈、甲酸均为色谱纯 (德国 Merck 公司); 超纯水由 Milli-Q 系统产生 (美国 Millipore 公司); 谷丙转氨酶测试盒 (alanine aminotransferase, ALT; 批号: 20200721)、谷草转氨酶测试盒 (aspartate aminotransferase, AST; 批号: 20200730)、肿瘤坏死因子- α 测试盒 (tumor necrosis factor- α , TNF- α ; 批号: 20200803)、白介素-1 β 测试盒 (interleukin-1 β , IL-1 β ; 批号: 20200803)、白介素-6 测试盒 (interleukin-6, IL-6; 批号: 20200817)、干扰素- γ 测试盒 (interferon- γ , IFN- γ ; 批号: 20200817) 均购自南京建成生物有限公司。

实验样品制备 取补骨脂药材粗粉 1 kg, 经 8 倍量、6 倍量纯水回流提取各 1 次, 每次 1 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至 1 L, 放至室温, 加乙醇至含醇量达 60%, 充分搅拌, 静置 24 h, 滤取上清液, 回收乙醇至无醇味, 继续浓缩至 1 g·mL⁻¹ (以补骨脂生药浓度计算), 备用。另取补骨脂、赤芍药材, 按 1:2 配比同法制备。临用时用生理盐水配制成 250 mg·mL⁻¹ 的溶液, 给药剂量 (以补骨脂生药量计) 为 3.75 g·kg⁻¹。

动物实验与样本采集 所有实验方案均经南京中医药大学动物实验伦理委员会审查批准 (许可号: 202006A020)。雄性 SPF 级 SD 大鼠 (体重 200 ± 20 g) 购自上海市杰思捷实验动物有限公司 (许可证号: SCXK 沪 2018-0004)。常规饲养于南京中医药大学实验动物中心, 温度保持在 (22 ± 2) °C, 相对湿度为 (60 ± 2) %, 光照周期为 12 h。适应性饲养 3 天后, 根据体重将 36 只大鼠随机分为 6 组, 每组 6 只, 包括空白组 (C)、LPS 组 (L)、补骨脂组 (P, 剂量为 3.75 g·kg⁻¹)、补骨脂与 LPS 联用组 (PL, 剂量为 3.75 g·kg⁻¹)、补骨脂配伍赤芍组 (PP,

剂量为 $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、补骨脂配伍赤芍与 LPS 联用组 (PPL, 剂量为 $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 实验前禁食不禁水 12 h, 称重并计算给药剂量, 实验当天各组分别灌胃给予对应药物, 其中 C 组和 L 组给予同等体积的生理盐水; 2 h 后参考文献^[16]方法对各组进行尾静脉注射, L、PL、PPL 组分别给予剂量为 $2.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 LPS, C、P、PP 组给予同等体积的生理盐水; 9 h 后使用 1% 戊巴比妥钠 (剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 将所有大鼠麻醉, 腹主动脉取血, 离心, 并采集血浆样本和肝组织样本。

肝功能指标、炎症因子测定及肝组织病理学检查 采集大鼠血浆, 采用血生化试剂盒按照其说明书要求测定 AST、ALT 活力, 采用 ELISA 试剂盒按照说明书要求测定血浆中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 水平。采集大鼠肝脏组织并固定在 4% 多聚甲醛组织固定液中, 将固定好的肝脏组织常规石蜡包埋, 用常规方法进行脱蜡和水合后, 按照 HE 染色试剂盒的说明进行 HE 染色, 并对肝脏组织的形态进行病理分级和评分, 共分为 I、II、III、IV 4 级, 评分标准^[17]如下: I 级: 肝小叶结构正常, 肝索排列整齐, 无明显变性、坏死及炎症细胞浸润, 记 1 分; II 级: 肝小叶结构尚正常, 肝索排列整齐, 肝细胞偶见肿胀、气球样变或脂肪变性, 并伴有轻度炎症细胞浸润, 记 2 分; III 级: 肝索排列出现紊乱, 肝细胞部分肿胀、气球样变或脂肪变性, 并伴有炎症细胞浸润, 记 3 分; IV 级: 肝索排列紊乱, 肝细胞肿胀、气球样变或脂肪变性, 并伴有大量炎症细胞浸润, 记 4 分。

数据处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 各项指标结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

代谢组学血清样品制备 将冻存的血清样本置冰上解冻, 各组分别取 100 μL 用于分析, 每份血清样本加入冷乙腈 300 μL 沉淀蛋白, 涡旋混匀 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液注入 UHPLC-QTOF MS 分析。所有样品在代谢组学分析期间均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

代谢组学色谱条件 ACQUITYTM UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱条件: 0~6 min, 95%~55% A; 6~13 min, 55%~5% A; 13~14 min, 5% A。采用 ESI 离子源正、负离子模式 (ESI⁺/ESI⁻), 质量扫描范围 m/z 100~1 000; 毛细管电压、锥孔电压分别为 3.0 kV 和 30 V; 萃取电压: 2.0 V; 离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气温度为 350 $^{\circ}\text{C}$; 锥孔气流量: 50 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$; 碰撞能量: 20~50 eV; 准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽 (ESI⁺: 556.277 1 m/z , ESI⁻: 554.261 5 m/z) 溶液为锁定

质量溶液。

代谢组学数据分析 参考文献方法^[18], 采用 MasslynxTM v4.2 工作站对色谱峰数据进行噪声去除、重叠峰解析、峰对齐、峰匹配、标准化、归一化等处理, 分别输出正、负离子模式下由保留时间、质荷比值和每个峰值区域的归一化峰面积的数据列表, 导入 SIMCA P 14.1 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 选取 $\text{VIP} > 1$ 和 $|P| \geq 0.05$ 的变量作为潜在生物标志物^[19], 采用 SPSS 22.0 软件利用 t 检验分析方法检验生物标志物的相对峰面积在两组间是否具有显著性差异, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 具有统计学意义筛选得到差异代谢物。使用 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 数据库及 Metabo Analyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 进行生物标志物的鉴定和代谢通路分析。

结果

1 肝功能指标

各实验组大鼠肝功能指标分析结果 (图 1A) 显示, 与 C 组相比, L 组与 P 组血浆 AST 和 ALT 活力显著升高 ($P < 0.05$), 提示补骨脂对正常大鼠已表现出一定的肝毒性, 而 PP 组血浆 AST 和 ALT 活力未见显著升高 ($P > 0.05$), 提示赤芍具有一定的缓减补骨脂肝脏毒性的作用; 与 L 组比较, PL 组血浆 AST、ALT 活力均显著升高 ($P < 0.01$), 表明补骨脂具有引起 LPS 致免疫应激模型大鼠肝脏损伤的趋势。PPL 组仅 AST 活力显著升高 ($P < 0.05$), 但其升高程度显著低于 PL 组 ($P < 0.05$), 提示补骨脂与赤芍配伍后对大鼠的肝毒性具有降低趋势。

2 炎症因子水平

血浆炎症因子水平分析结果显示 (图 1B), 与 C 组比较, P 组、PP 组血浆炎症因子水平均未见显著变化, PL 组的 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 水平较 C 组和 L 组显著升高 ($P < 0.05$); PPL 组与 PL 组相比各炎症因子水平均显著下调 ($P < 0.05$), 提示补骨脂与赤芍配伍可减轻体内的炎症反应。

3 大鼠肝脏组织病理学观察

肝脏组织病理切片结果以及肝组织病变评分结果 (图 2) 显示, C 组肝小叶边界清楚, 肝索清晰可见, 肝细胞无肿胀、无泡沫状变性, 无坏死, 肝实质内偶见炎细胞浸润; 与 C 组相比, L 组肝窦有淤血, 肝实质内有轻度炎细胞浸润, 各给药组同样出现轻微的病理损伤, 但除 P 组外与 C 组均无显著性差异。此外, LPS 造模后的各给药组病理损伤程度均显著加重, 其中 PL 组

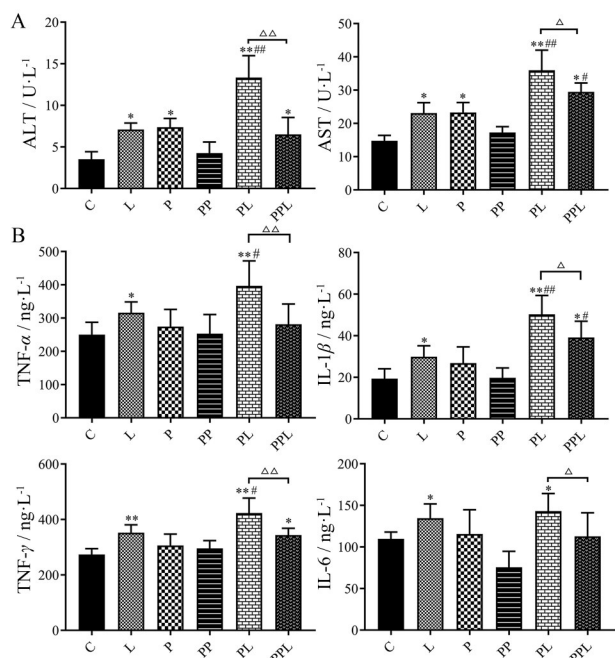


Figure 1 Influence of co-treatment with LPS and Psoraleae Fructus or compatible with Paeoniae Rubra Radix on levels of related biochemical indicators (A) and inflammatory cytokines (B) in plasma of rats. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs LPS group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$. C: Control group; L: LPS group; P: Psoraleae Fructus group; PP: Compatibility group of Psoraleae Fructus and Paeoniae Rubra Radix; PL: Psoraleae Fructus group combined with LPS; PPL: compatibility group combined with LPS

最为严重,肝索排列紊乱,肝细胞肿胀并且伴有泡沫状变性,肝实质内出现大量炎细胞浸润,而PPL组肝损伤程度显著减轻。

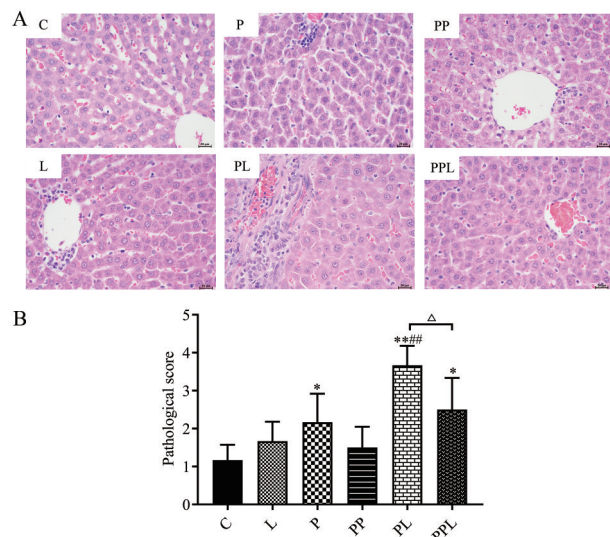


Figure 2 Pathological changes of liver tissue (A, $\times 400$); Pathological score of liver tissue (B). $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs LPS group; $\Delta P < 0.05$

4 血清代谢组学分析

4.1 PCA分析 将数据导入SIMCA P 14.1软件进行PCA分析,并绘制样品得分散点图。如图3A1、B1所示,在正离子和负离子模式下,QC组样品均紧密聚集,表明UHPLC-MS系统在整个分析过程中稳定性较好。C组、L组、PL组、PPL组可观察到明显的分离趋势,表明4个组之间存在明显的代谢差异。其中,PL组表现出明显偏离C组和L组的趋势,而与赤芍配伍后的PPL组呈现出向C组回调趋势。该研究结果与肝功能指标分析结果呈现相似的趋势,提示低剂量LPS已导致大鼠体内代谢发生紊乱,并在受到补骨脂毒性影响后,大鼠体内的小分子代谢物水平进一步发生显著变化,从而在PCA图中表现出明显偏离C组的趋势,而与赤芍配伍后的PPL组对大鼠的肝损伤程度减小而呈现出回调趋势。

4.2 差异代谢物鉴定 OPLS-DA分析方法作为一种有监督的模式识别方法可显著提高分类判别能力,且可减小干扰因素对相似性聚类分析的影响^[20]。因此,为了进一步突出组间差异,挖掘补骨脂致免疫应激动物模型肝损伤潜在生物标志物,首先采用OPLS-DA对L组和PL组进行分析,并通过S-plot分析指标筛选两组之间的差异性变量,作为潜在的生物标志物。如图3A2、B2显示,在正、负离子模式下,L组和PL组均可明显区分,分别位于纵坐标两侧,说明在LPS致免疫应激动物模型上,补骨脂引起了大鼠体内代谢水平显著变化。在S-Plot图中,代谢物的点与主要离子簇距离越远表明对样品类别的区分贡献越大。提取VIP > 1和|P| ≥ 0.05变异变量作为潜在候选标志物,进一步采用t检验选出具有显著性差异($P < 0.05$)的化合物导入HMDB数据库进行检索,最终筛选出L组和PL组的差异代谢物共22个,如图3A3、B3所示(其中红色标记为已鉴定得到的22个差异代谢物,黄色标记为符合筛选要求但未鉴定出的生物标志物,蓝色标记为满足VIP和|P|值要求但经t检验未见显著性差异的化合物),详细信息如表1所示。进一步将潜在差异代谢产物在各组的相对含量进行统计学分析,结果发现PL组与C组、L组相比均引起代谢产物相对含量的显著升高,而赤芍与补骨脂配伍后可显著回调其中的9个代谢物趋于C组(图4),包括花生四烯酸、二氢鞘氨醇、甘胆酸、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二十碳三烯酸。

4.3 代谢通路分析 将上述差异代谢物分别输入MetaboAnalyst 4.0在线分析数据库进行通路富集分析,分别得到补骨脂引起特异性肝毒性的代谢通路共9条以及补骨脂-赤芍配伍减毒的代谢通路共6条,结果如图5所示。以pathway impact > 0.1为标准筛选出

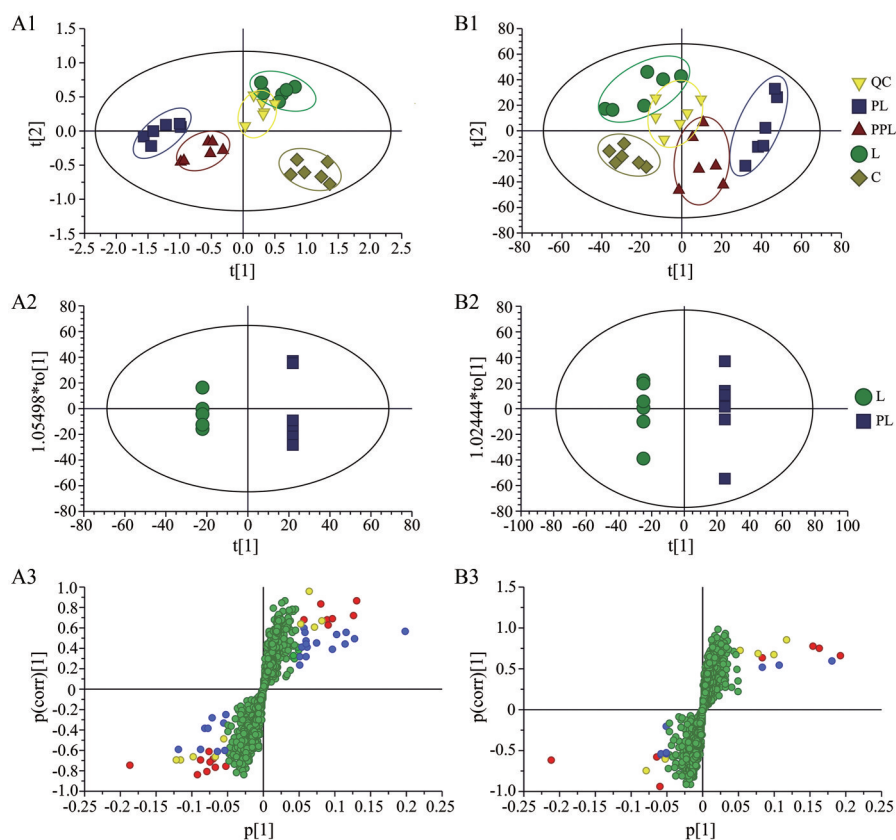


Figure 3 PCA score plot (1), OPLS-DA score plot (2) and S-plot (3) of the plasma samples. A: Negative mode, B: Positive mode. In the S-plot, the red dots are potential biomarkers that have been identified, the yellow dots are the biomarkers that meet the screening requirements but has not been identified, and the blue dots are the metabolites that meet the requirements of VIP and $|P|$ but have no significant difference

Table 1 Identification and trends of change for potential biomarkers. \uparrow means increase, \downarrow means decrease, $-$ means no significant difference. $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$, $\#\#\#P < 0.001$; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

t_R /min	Biomarker	ESI	m/z	Formula	Content variance	
					PL vs L	PPL vs PL
2.92	1,2-Dihydronaphthalene-1,2-diol	-	162.068 1	$C_{10}H_{10}O_2$	\uparrow #	-
5.81	Sphingosine 1-phosphate	-	379.248 8	$C_{18}H_{38}NO_3P$	\downarrow ###	-
6.15	Sphinganine 1-phosphate	-	381.264 4	$C_{18}H_{40}NO_3P$	\downarrow ###	\uparrow Δ
6.78	LysoPE (22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	-	525.285 5	$C_{27}H_{44}NO_7P$	\uparrow ###	\downarrow $\Delta\Delta$
6.81	LysoPE (0:0/18:2 (9Z,12Z))	-	477.285 5	$C_{23}H_{44}NO_7P$	\uparrow #	\downarrow Δ
6.83	Glycocholic acid	-	465.309	$C_{26}H_{43}NO_6$	\uparrow ###	\downarrow Δ
7.47	LysoPE (0:0/16:0)	-	453.285 5	$C_{21}H_{44}NO_7P$	\uparrow #	-
7.65	5-HETE	-	320.235 1	$C_{20}H_{32}O_3$	\downarrow #	-
7.93	LysoPE (P-16:0/0:0)	-	437.290 6	$C_{21}H_{44}NO_6P$	\downarrow ###	\uparrow Δ
8.31	LysoPC (15:0/0:0)	-	481.316 8	$C_{23}H_{48}NO_7P$	\downarrow #	-
8.93	Stearic acid	-	284.271 5	$C_{18}H_{36}O_2$	\downarrow #	-
9.29	LysoPC (17:0/0:0)	-	509.348 1	$C_{25}H_{52}NO_7P$	\downarrow #	-
9.71	LysoPE (P-18:0/0:0)	-	465.321 9	$C_{23}H_{48}NO_6P$	\downarrow #	-
12.23	Arachidonic acid	-	304.240 2	$C_{20}H_{32}O_2$	\uparrow ###	\downarrow $\Delta\Delta$
12.35	PC (20:1 (11Z)/18:3 (6Z,9Z,12Z))	-	809.593 5	$C_{46}H_{84}NO_8P$	\uparrow #	-
7.75	5,6-Epoxy-8,11,14-eicosatrienoic acid	+	320.235 1	$C_{20}H_{32}O_3$	\downarrow ###	\uparrow Δ
9.39	LysoPC (18:0/0:0)	+	523.363 8	$C_{26}H_{54}NO_7P$	\downarrow ###	\uparrow Δ
11.65	PA (20:0/8:0)	+	592.410 4	$C_{31}H_{61}O_8P$	\downarrow ###	-
12.01	PE (22:5 (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/P-18:0)	+	777.567 2	$C_{45}H_{80}NO_7P$	\uparrow #	\downarrow Δ
13.04	PC (16:1 (9Z)/18:0)	+	759.577 8	$C_{42}H_{82}NO_8P$	\uparrow ###	-
14.56	PC (16:0/20:4 (5Z,8Z,11Z,14Z))	+	781.562 2	$C_{44}H_{80}NO_8P$	\uparrow ###	-
14.76	PC (16:1 (9Z)/22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	+	803.546 5	$C_{46}H_{78}NO_8P$	\uparrow #	-

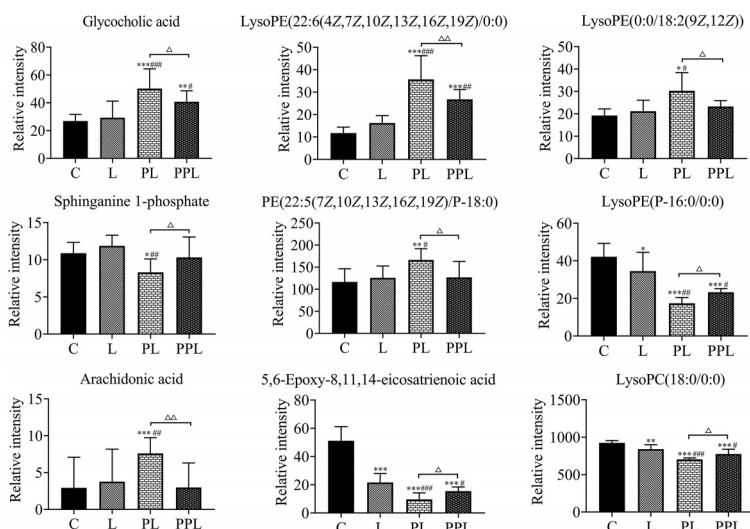


Figure 4 Relative peak area of different metabolites in each group. $n = 6, \bar{x} \pm s$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs LPS group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

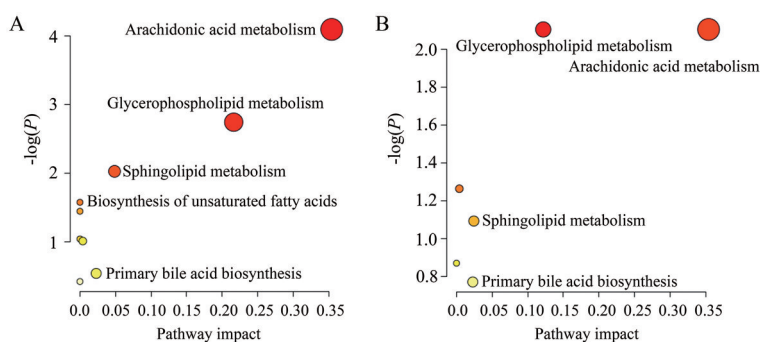


Figure 5 Metabolic pathways associated with idiosyncratic hepatotoxicity of Psoraleae Fructus (A) and detoxification of compatibility with Paeoniae Rubra Radix (B)

关键代谢通路^[21], 即潜在的靶标代谢路径, 主要涉及花生四烯酸代谢和甘油磷脂代谢信号通路。

讨论

药物特异质肝损伤是近年来国内外毒理学研究的热点和难点, 目前关于特异质肝损伤发生机制的研究主要集中在药物代谢酶基因多态性造成相关代谢酶缺失或活力低下、个体免疫应答异常、与免疫应激反应相关等方面。其中免疫应激是特异质肝损伤的重要诱因, 免疫应激状态下的个体更容易出现特异质肝损伤, 轻度的炎症刺激可以增加机体组织对毒性化合物的敏感性, 降低机体对药物产生肝毒性的应答阈值, 即药物在一个较低的剂量范围内便可以产生毒性^[14]。目前, 免疫应激相关的特异质肝损伤评价模型主要通过LPS诱导刺激来建立^[22,23], 本研究通过大鼠尾静脉注射LPS使其处于轻度免疫应激状态, 然后给予受试药物, 进一步探究赤芍缓解补骨脂特异质肝损伤的作用

机制。

在免疫应激模型的基础上, 本研究采用代谢组学的方法探究补骨脂与赤芍配伍对其特异质肝毒性的影响及其作用机制, 从生化指标和肝脏病理切片结果上看, 补骨脂在免疫应激状态下表现出明显的肝毒性, 与赤芍配伍后, 肝毒性显著降低, 进一步通过代谢组学的方法筛选出了补骨脂-赤芍配伍降低肝损伤的相关的差异代谢标志物和代谢通路。通过多元统计分析, 共筛选并鉴定了与补骨脂致特异质肝毒性相关的差异代谢物22个, 补骨脂与赤芍配伍后可显著回调其中9个代谢物。

花生四烯酸作为一类重要的调控炎症介质, 可经多条途径加重机体氧化应激和炎症反应^[24]。溶血磷脂酰胆碱等甘油磷脂类代谢产物, 是机体细胞和组织代谢方面关键信号分子, 主要参与质膜形成^[25]、细胞生长及死亡^[26]和炎症反应^[27], 此类化合物具有较强的生物学效应, 能促使红细胞质壁分离, 并破坏细胞膜和线粒体, 且具有直接激活T细胞、B细胞和巨噬细胞并影响

其与其他类型细胞的相互作用而引起炎症反应的能力。给予补骨脂后的免疫应激大鼠血清中花生四烯酸的水平显著增加,反映了体内炎症反应的激发;而溶血磷脂类代谢物的蓄积,则提示补骨脂可能破坏细胞生物膜^[28],并进一步加重炎症反应^[29]。给予补骨脂-赤芍配伍提取物后,大鼠血清中花生四烯酸、磷脂类代谢物水平显著降低,表明赤芍与补骨脂配伍可以抑制炎症反应,改善大鼠体内脂质代谢紊乱。二氢鞘氨醇属于磷酸鞘脂化合物,在鞘脂代谢、钙信号通路和神经活性配体-受体相互作用等通路中均表现出强大的生物活性,主要参与鞘脂代谢通路,通常由鞘氨醇激酶和神经酰胺激酶生成,参与调控细胞生理、细胞生存、炎症反应等多个方面^[30],还参与体内COX-2的诱导以及花生四烯酸的生成^[31]。甘胆酸是由胆酸和甘氨酸结合而成的结合型胆酸,是胆汁酸的主要成分之一,主要参与初级胆汁酸生物合成,可促进脂肪和胆固醇在肝和肠中的排泄、吸收和转运^[32,33],当人体肝细胞受损或胆汁淤滞时,就会引起胆汁酸代谢和循环紊乱,使肝细胞摄取胆汁酸的能力下降,导致血液中胆汁酸含量升高,且胆汁酸值高低与肝细胞损害及胆汁酸代谢障碍的严重程度相关^[34]。补骨脂给药后可引起大鼠体内甘胆酸含量的显著增加,而与赤芍配伍给药后,其含量显著回调,提示赤芍可以改善补骨脂造成的胆汁酸代谢紊乱,以此降低补骨脂引起的肝毒性。

赤芍药用最早记录于《神农本草经》,有清热凉血、活血祛瘀的功效,常用于治疗多种肝脏相关疾病,其对胆汁淤积性肝炎有较好的治疗作用,Meta分析发现在中药复方配伍中使用大剂量的赤芍可以增强该复方对胆汁淤积性肝炎的疗效^[35],并经实验研究发现其作用机制可能与调节胆汁酸分泌相关^[36]。其主要活性成分芍药苷能够降低肝组织MDA、ROS、NO、NOX4等氧化应激相关物质的含量,并增加机体的抗氧化体系如GSH活性,进而避免肝脏受到氧化损伤^[37]。Chen等^[38]进一步研究发现芍药苷干预 α -萘异硫氰酸酯诱导的肝损伤的机制可能与调节甘油磷脂代谢、初级胆汁酸生物合成、花生四烯酸代谢的功能障碍有关。由此得知赤芍具有良好的抗炎和调节胆汁酸分泌等活性,这也进一步为本文的研究结果提供了参考依据。

综上,本研究通过LPS致免疫应激大鼠模型证实补骨脂可导致特异质肝毒性,其于赤芍配伍后肝毒性显著降低,其中花生四烯酸代谢和甘油磷脂代谢通路可能是赤芍缓解补骨脂特异质肝毒性的重要通路,为后续深入探讨其作用机制提供了研究基础。

作者贡献: 武文星负责实验操作和论文撰写; 郭盛负责

研究课题总体设计、实验指导、论文修改; 吴励萍、夏玲参与动物实验工作; 赵明参与数据分析; 李全负责药材提供及样品制备; 王恒斌参与研究课题总体设计; 段金殿负责论文选题及论文终稿审查。

利益冲突: 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Jung B, Jang EH, Hong D, et al. Aqueous extract of *Psoralea corylifolia* L. inhibits lipopolysaccharide-induced endothelial-mesenchymal transition via downregulation of the NF- κ B-SNAIL signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34: 2040-2046.
- [2] Don MJ, Lin LC, Chiou WF. Neobavaisoflavone stimulates osteogenesis via p38-mediated up-regulation of transcription factors and osteoid genes expression in MC3T3-E1 cells [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19: 551-561.
- [3] Mao H, Wang H, Ma S, et al. Bidirectional regulation of bakuchiol, an estrogenic-like compound, on catecholamine secretion [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 274: 180-189.
- [4] Xin D, Wang H, Yang J, et al. Phytoestrogens from *Psoralea corylifolia* reveal estrogen receptor-subtype selectivity [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17: 126-131.
- [5] Tian WY, Lan S, Zhang L, et al. Safety evaluation and risk control measures of *Psoralea corylifolia* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2017, 42: 4059-4066.
- [6] Adverse Drug Reaction Information Bulletin (Issue 16) Be alert to liver damage caused by Zhuanggu Joint Pill [EB/OL]. Beijing: National Medical Products Administration, 2008-08-09 [2021-02-23]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/yjjsh/ypb1fytb/20080809162301345.html>.
- [7] Guo S, Tang YP, Su SL, et al. Progress in studies on reducing the toxicity of Chinese medicines by using compatibility in the last ten years [J]. *Chin J Exp Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2008, 14: 74-79.
- [8] Li R, Guo W, Fu Z, et al. Hepatoprotective action of Radix *Paeoniae Rubra* aqueous extract against CCl₄-induced hepatic damage [J]. *Molecules*, 2011, 16: 8684-8694.
- [9] Zhao Y, Ma X, Wang J, et al. Paeoniflorin alleviates liver fibrosis by inhibiting HIF-1 α through mTOR-dependent pathway [J]. *Fitoterapia*, 2014, 99: 318-327.
- [10] Zhao Y, Ma X, Wang J, et al. Large dose means significant effect-dose and effect relationship of Chi-Dan-Tui-Huang decoction on alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic hepatitis in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 104.
- [11] Fan YF, Xie Y, Liu L, et al. Paeoniflorin reduced acute toxicity of aconitine in rats is associated with the pharmacokinetic alteration of aconitine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141: 701-708.
- [12] Su YJ, Jiang ZZ, Zhang Y, et al. Advances in researches on idiosyncratic drug induced liver injury and its occurrence mechanism [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2012, 36: 546-551.

- [13] Wang JB, Cui HR, Bai ZF, et al. Precision medicine-oriented safety assessment strategy for traditional Chinese medicines: disease-syndrome-based toxicology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 1681-1688.
- [14] Roth RA, Luyendyk JP, Maddox JF, et al. Inflammation and drug idiosyncrasy-is there a connection? [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 307: 1-8.
- [15] Gao Y, Wang Z, Tang J, et al. New incompatible pair of TCM: Epimedii Folium combined with Psoraleae Fructus induces idiosyncratic hepatotoxicity under immunological stress conditions [J]. Front Med. 2020, 14: 68-80.
- [16] Li CY, He Q, Tang JF, et al. Metabolomic study on immunological stress-mediated hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum* and its processed products of nine times steaming and nine times sunning [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1069-1076.
- [17] Wen P, Chen SD, Zheng B, et al. Protective effect and mechanism of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* on acute liver injury induced by *D-GlaN* in mice [J]. Chin J Exp Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 108-113.
- [18] Liu P, Shang EX, Zhu Y, et al. Comparative analysis of compatibility effects on invigorating blood circulation for *Cyperus Rhizoma* Series of herb pairs using untargeted metabolomics [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 677.
- [19] Chen CC, Yin QC, Tian JS, et al. The mechanism of the antidepressive effect of the *Radix Bupleuri-Radix Paeoniae Alba* herb pair determined by liver metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 941-949.
- [20] Wang P, Wang Q, Yang B, et al. The progress of metabolomics study in traditional Chinese medicine research [J]. Am J Chin Med, 2015, 43: 1281-1310.
- [21] Feng X, Zhou YZ, Chai JX, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi leaf and tea extracts prolong lifespan and alter the metabolomic aging profile in a *Drosophila melanogaster* aging model [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1214-1221.
- [22] Xiao XH, Tang JY, Mao YM, et al. Technical guidelines for clinical evaluation of Chinese medicine-induced liver injury [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1931-1942.
- [23] Bai ZF, Gao Y, Zuo XB, et al. Progress in research on the pathogenesis of immune regulation and idiosyncratic drug-induced liver idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1019-1026.
- [24] Leuti A, Maccarrone M, Chiurchiù V. Proresolving lipid mediators: Endogenous modulators of oxidative stress [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 8107265.
- [25] Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, et al. Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases [J]. J Biochem, 2013, 154: 21-28.
- [26] Makide K, Kitamura H, Sato Y, et al. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009, 89: 135-139.
- [27] Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, et al. Lysoglycero-phospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA (2)/LPC and ATX / LPA axes [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831: 42-60.
- [28] Ma W, Paik DC, Barile GR. Bioactive lysophospholipids generated by hepatic lipase degradation of lipoproteins lead to complement activation via the classical pathway [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55: 6187-6193.
- [29] Gräler MH, Goetzl EJ. Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1582: 168-174.
- [30] Kihara A, Mitsutake S, Mizutani Y, et al. Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate [J]. Prog Lipid Res, 2007, 46: 126-144.
- [31] Chalfant CE, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling [J]. J Cell Sci, 2005, 118: 4605-4612.
- [32] St-Pierre MV, Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, et al. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues [J]. J Exp Biol, 2001, 204: 1673-1686.
- [33] Claudel T, Staels B, Kuipers F. The farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 2020-2030.
- [34] Li T, Chiang JY. Bile acid signaling in liver metabolism and diseases [J]. J Lipids, 2012, 2012: 754067.
- [35] Ma X, Wang J, He X, et al. Large dosage of chishao in formulae for cholestatic hepatitis: a systematic review and meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 328152.
- [36] Ma X, Chi YH, Niu M, et al. Metabolomics coupled with multivariate data and pathway analysis on potential biomarkers in cholestasis and intervention effect of *Paeonia lactiflora* Pall [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 14.
- [37] Zhao Y, Zhao G, Wang J, et al. Paeoniflorin protects against ANIT-induced cholestasis by ameliorating oxidative stress in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 58: 242-248.
- [38] Chen Z, Zhu Y, Zhao Y, et al. Serum metabolomic profiling in a rat model reveals protective function of paeoniflorin against ANIT induced cholestasis [J]. Phytother Res, 2016, 30: 654-662.