

基于血清代谢组学比较马钱子不同炮制品肝肾毒性及作用机制研究

郑海连, 张娜, 张娴, 徐城, 孟令邦, 卢美琪, 李翼林, 石淇乐, 于欢*

(江西中医药大学 药学院, 江西 南昌 330004)

[摘要] 该研究基于血清代谢组学比较马钱子不同炮制品毒性, 对其毒性机制进行探究。将 72 只雌性 KM 小鼠随机分为 6 组, 分别为空白组、生品马钱子组、醋制马钱子组、尿泡马钱子组、砂烫马钱子组、油炸马钱子组, 每组 12 只, 各炮制品组给予相同浓度原药材水煎液 7 d, 考察各组肝肾系数, 运用全自动生化分析仪测定肝肾损伤指标谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、尿素氮 (BUN) 和肌酐 (CRE) 的表达水平; 使用苏木素-伊红 (HE) 染色法对肝肾进行组织病理学检查; 利用液相色谱-质谱 (LC-MS/MS) 技术结合多元统计分析筛选各组血清差异代谢物, 基于人类代谢组数据库 (HMDB) 数据库结合 MetaboAnalyst 6.0 对筛选出的差异标志物进行代谢通路富集分析。马钱子不同炮制品均能使小鼠肝肾系数上升, 并使肝肾损伤指标 AST、ALT 和 BUN、CRE 表达水平上升, 但各炮制品相比生品均有不同程度降低, 综合来看醋制品的减毒效果更好, 其次是油炸组>砂烫组≈尿泡组>生品组; 各组小鼠血清通过代谢组学分析共鉴定出 14 种差异代谢物, 主要为鞘脂类、甘油磷脂类、维生素类等化合物, 筛选出具有显著性影响的代谢通路共 5 条, 包括鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、 α -亚麻酸代谢、硫辛酸代谢和亚油酸代谢, 其中鞘脂代谢和甘油磷脂代谢为各组共有代谢通路。综上所述, 马钱子经过炮制后对肝肾损伤程度均有不同程度的降低, 其毒性机制可能主要与鞘脂代谢和甘油磷脂代谢紊乱有关。

[关键词] 马钱子; 不同炮制品; 血清代谢组学; 肝肾毒性

Hepatotoxicity and renotoxicity of different processed products of *Strychnos nux-vomica* seeds based on serum metabolomics and their mechanisms of action

ZHENG Hai-lian, ZHANG Na, ZHANG Xian, XU Cheng, MENG Ling-bang, LU Mei-qi, LI Yi-lin,

SHI Qi-yue, YU Huan*

(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] This study investigated the toxicological mechanisms of different processed products of *Strychnos nux-vomica* seeds using serum metabolomics analysis. Seventy-two female KM mice were randomly divided into six groups ($n = 12$ per group): control, raw seeds, vinegar-processed seeds, urine-soaked seeds, sand-roasted seeds, and oil-fried seeds. Each processed preparation group received an aqueous decoction of the original herb at the same concentration for 7 days. Hepatic and renal coefficients were measured in each group, and the levels of hepatic and renal injury markers, including aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), and creatinine (CRE) were determined using a fully automated biochemical analyzer. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used for histopathological examination of the liver and kidney. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) combined with multivariate statistical analysis was employed to screen for differential serum metabolites.

[收稿日期] 2025-05-06

[基金项目] 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ170752); 2023 年全国中药特色技术传承人才培养项目 (国中医药人教函 [2023] 96 号); 国家中医药管理局第二届全国名中医 (龚千锋) 传承工作室项目 (国中医药办人教函 [2022] 245 号); 江西省中医药中青年骨干人才项目 (赣中医药科教字 [2022] 7 号)

[通信作者] * 于欢 教授, 博士生导师, 主要从事中药饮片标准化与炮制机制研究, E-mail: 416931863@qq.com

[作者简介] 郑海连 硕士研究生, 主要从事中药饮片标准化与炮制机制研究, E-mail: 3331908809@qq.com

across groups. Metabolic pathway enrichment analysis of the selected differential markers was performed using the Human Metabolome Database (HMDB) and MetaboAnalyst 6.0. All processed *S. nux-vomica* seed products increased hepatic and renal coefficients and elevated hepatic and renal injury markers (AST, ALT, BUN, CRE), although these effects were reduced to varying degrees compared to the raw product. Overall, vinegar processing exhibited the most significant detoxification effect, followed by oil-fried>sand-roasted≈urine-soaked>raw seeds. Metabolomic analysis identified 14 differential metabolites across the groups, primarily including sphingolipids, glycerophospholipids, and vitamin-related compounds. Five significantly perturbed metabolic pathways were identified: sphingolipid metabolism, glycerophospholipid metabolism, α -linolenic acid metabolism, lipoic acid metabolism, and linoleic acid metabolism, with sphingolipid and glycerophospholipid metabolism common to all groups. In conclusion, processing of *S. nux-vomica* seeds reduced hepatorenal toxicity to varying degrees, and its toxic mechanisms may primarily involve disturbances in sphingolipid and glycerophospholipid metabolism.

[Key words] *Strychnos nux-vomica* seeds; different processed products; serum metabolomics; hepatorenal toxicity

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250916.301

马钱子为马钱科植物马钱的干燥成熟种子,始载于《本草纲目》,是中医常用“有毒”中药,味苦性温、有大毒,归肝脾经,具通络止痛、散结消肿功效^[1]。《本草纲目》载其“治一百二十种病,每证各有汤引”^[2],《医学衷中参西录》称其“开通经络透达关节之力远胜它药”^[3]。现代研究表明,马钱子有镇痛、抗炎、兴奋神经中枢、神经保护、抗肿瘤等广泛药理作用^[4-5],药用价值较高。但马钱子生用大毒,《本草原始》言其“味苦寒、有大毒”“乌中其毒则麻木抽急而毙,狗中其毒则苦痛断肠而毙,人误服之令人四肢拘挛”^[6]。其主要成分土的宁与马钱子碱既是药效成分也是毒性成分,治疗剂量与毒性剂量相近,存在安全剂量范围窄、吸收快、中毒潜伏期短、病情急重、预后差等特点^[7-8],故临床常用炮制或配伍降毒^[9]。古时马钱子有净制、切制、炒制等多种炮制方法,部分因工艺繁琐或效果不佳停用,现代以净制、油制、砂烫、炒制为主^[10]。其中尿泡法是江西传统制法(地方标准)^[11],因卫生问题,龚腊根等^[12]提出用醋制法替代,且醋制马钱子比生品、砂烫品毒性更低,适于素体虚弱者^[13]。

马钱子具靶器官毒性,含肾脏、肝脏、心脏、神经毒性等,神经毒性最显著^[14]。药代动力学研究发现,马钱子碱和土的宁在脑中分布少,在脏器组织中分布高(尤以肝肾为主),呈吸收快、排泄慢特点^[15];肝肾作为药物代谢和排泄主要场所,也是反映药物毒性的主要器官,中药肝肾毒性问题不容忽视^[16]。

代谢组学是评估中药毒性、探索毒性机制的有效非侵入性方法^[17-18],广泛应用于中药单体、提取物及复方制剂的肾毒性、肝毒性等评价^[19]。本研究借助代谢组学,分析马钱子不同炮制品对小鼠内源性代谢物的调控,聚焦显著影响的代谢通路与肝肾

损伤的关联性,初步阐释其肝肾毒性内在作用机制。

本研究立足于课题组项目,除樟帮特色尿泡马钱子及其替代品醋制马钱子外,还选取砂烫、油炸马钱子 2 种主流炮制品。前期已分析 4 种炮制品化学成分^[20],并开展类风湿性关节炎药效研究^[21],但不同炮制品肝肾毒性大小及作用机制尚不明确,故基于血清代谢组学开展相关研究。

1 材料

1.1 动物

72 只雌性 KM 小鼠,SPF 级,体质量 18~22 g,购自江西中医药大学实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK(赣)2023-0001。饲养条件:温度(24±2)℃,湿度 55%±10%,自由饮水、进食。本动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审批,伦理审核申请备案编号 20240407003。

1.2 药物与试剂

马钱子(江西古汉精制中药饮片有限公司,批号 19042613)经江西中医药大学龚千锋鉴定为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子,米醋(北京龙门醋业有限公司,批号 20220120, pH 5),麻油(批号 20230513)购自山东鲁花集团股份有限公司。L-2-氯苯丙氨酸(批号 C804740,质量分数 98.5%)购于上海麦克林生化科技股份有限公司,甲醇、乙腈(质谱级)购自德国默克公司,水为屈臣氏蒸馏水。樟帮尿泡马钱子、醋制马钱子、砂烫马钱子、油炸马钱子均由课题组自行制备。谷草转氨酶(AST)测试盒(批号 SC20C0100)、谷丙转氨酶(ALT)测试盒(批号 SC19C0100)、尿素氮(BUN)测试盒(批号 SC28C0100)、肌酐(CRE)测试盒(批号 SC27C0080)购于武汉生之源生物科技股份有限公司。

1.3 仪器

Agilent 1290-6545 液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司,配置 MassHunter 质谱工作站、Agilent Masshunter Qualitative Analysis 数据处理系统);SCI-VS 可调式混匀仪(美国 SCILOGEX 公司);5430R 离心机(德国 Eppendorf 公司);YF-4118 型高速中药研磨机(瑞安市永历制药机械有限公司);GZX-9076MBE 型高温鼓风烘箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);TY2001 型精密电子天平(上海衡平仪器仪表有限公司);RE-52 系列旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D III 型台式循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);AU480 全自动生化分析仪(美国 BeckmanCoulter 公司)。

2 方法

2.1 样品制备

本研究中生品马钱子、醋制马钱子、尿泡马钱子、砂烫马钱子、油炸马钱子的制备方法均同课题组前期的研究^[20]。

2.2 给药剂量的确定

鉴于生品马钱子毒性较强,为保障后续正式实验的安全性及有效性,正式实验前需先确定其适宜给药剂量。该剂量需满足特定条件:使小鼠在给药后 10 min 内出现明显中毒症状,具体表现为尾巴僵直、怕光、对声音敏感、惊厥抽搐,甚至出现强直性收缩,且症状在药效消退后可自行缓解,同时需避免小鼠死亡。经前期探索,最终确定生品马钱子的给药剂量为 $182 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。为保证实验条件的一致性,后续其他马钱子炮制品组的给药剂量均与该生品组保持一致,即在原药材浓度等量的前提下,开展不同马钱子炮制品对小鼠肝肾功能影响的比较研究。

2.3 马钱子不同炮制品水煎液的制备

参照 2.2 项预实验结果制备马钱子不同炮制品水煎液质量浓度应为 $9.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,即:取 1.82 g 药材,加 364 mL 水,武火煮沸转文火煮 30 min,过滤,药渣再加 182 mL 水武火煮沸转文火煮 20 min,过滤,合并滤液,加纯净水至 200 mL,配制成 $9.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水煎液,备用。

2.4 动物分组与给药

雌性 KM 小鼠分为空白组、生品马钱子组、尿泡马钱子组、醋制马钱子组、砂烫马钱子组、油炸马钱子组,每组 12 只。按 $0.2 \text{ mL} \cdot (10 \text{ g})^{-1}$ 灌胃,每日给

药 1 次,连续给药 7 d。

2.5 样本收集

小鼠于第 7 天给药结束后开始禁食不禁水 12 h。第 2 天称重后进行解剖取材。腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉。摘眼球取血,静置 2 h 后 4°C , $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清液。采血结束后,随即颈椎脱臼处死小鼠,迅速解剖取小鼠肝、肾组织,滤纸吸水后称质量并记录,取部分肝脏、肾脏以 4% 多聚甲醛进行组织固定,剩余肝肾样本置于 -80°C 冰箱保存备用。

2.6 脏器系数的计算

小鼠肝脏、肾脏组织脏器系数按公式(脏器系数 = 脏器质量 / 小鼠体质量 $\times 100\%$) 计算。

2.7 指标检测

取 0.1 g 肝组织,按 1(g) : 9(mL) 的比例加预冷生理盐水在研磨机中制备成 10% 肝组织匀浆,置于 4°C , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒使用说明书,使用全自动生化分析仪分别进行 AST、ALT 的检测。10% 肾组织匀浆制备方法同上,取上清液进行 BUN、CRE 的检测。

2.8 肝、肾病理组织学检查

取以 4% 多聚甲醛固定的肝、肾组织,剪切大小约为 $0.2 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$,装进包埋盒,流水冲洗,脱水、石蜡包埋、切片,按说明书提示进行苏木素-伊红(HE)染色,并用中性树脂封片,于光学显微镜下观察肝、肾的组织形态变化。

2.9 血清代谢组学分析

2.9.1 血清样本处理 取 -80°C 保存的血清于 4°C 解冻,取 100 μL 血清置于离心管中,加 250 μL 甲醇,再加 50 μL 质量浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 L-2-氯苯丙氨酸内标溶液,涡旋振荡 1 min, 4°C , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,过 0.22 μm 滤膜于液相小瓶中待检测。

2.9.2 血清样品 LC-MS/MS 分析条件 色谱条件: Titank C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm),柱温 45°C ;流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样体积 1 μL ;流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~18 min, 5%~98% B; 18~20 min, 98% B)。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,一级质谱扫描范围 m/z 100~1 200,二级质谱扫描范围 m/z 50~1 200,气体温度 325°C ,气体流量 $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,雾化器压力 35 psi(1 psi $\approx 6.895 \text{ kPa}$),喷嘴电压 1 000 V,数据采集时间 20 min。

2.9.3 差异化合物筛选及通路富集 将各组血清和 QC 样品的液质数据导入 Agilent MassHunter Profinder 软件,通过扣除背景、峰提取、峰匹配等处理提取离子峰信息,获得 CSV 表格文件,完成预处理的数据导入 SIMCA-P 14.1 软件(瑞典 Umetrics 公司)进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。筛选变量重要性投影值(VIP) > 1, $P < 0.05$ 与差异倍数(FC) < 0.5 或 FC > 1 的差异代谢物。利用 HMDB(<https://hmdb.ca/>) 数据库和 KEGG 库鉴定差异代谢物。通过 MetaboAnalyst 5.0(<https://www.metaboanalyst.ca>) 对筛选的差异代谢物进行代谢通路富集分析,选取 $P < 0.05$ 或通路影响值(pathway impact) > 0.1 的代谢通路作为关键代谢通路。

2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行分析,计量资料以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间差异比较,空白组与不同炮制品组采用双样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。Spearman 相关分析用于检验肝肾损伤指标与代谢物强度的相关性,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 马钱子不同炮制品对小鼠肝肾脏器系数的影响

与空白组脏器系数相比,生品组肝肾脏器系数均有极显著性提高($P < 0.001$),尿泡组均有显著性提高($P < 0.05$),且尿泡组与生品组差异无统计学意义,提示生品马钱子和尿泡马钱子可能造成小鼠肝肾脏器充血、水肿或增生肥大等损伤情况,且尿泡马钱子损伤程度低于生品马钱子。与生品组相比,醋制组、砂烫组、油炸组肝肾脏器系数均有显著降低($P < 0.05$),且醋制组、砂烫组肾肾脏器系数有极显著性降低($P < 0.001$),但同时砂烫组肝肾脏器系数和油炸组肾肾脏器系数相比空白组有显著性提高($P < 0.05$),见表 1,提示马钱子经过不同方法炮制后,毒性均有所降低,对肝肾损伤程度降低,且不同炮制方法减毒效果不同,综合比较醋制组减毒效果更好,其次是油炸组 > 砂烫组 > 尿泡组 > 生品组。

3.2 马钱子不同炮制品对小鼠肝肾功能指标的影响

与空白组相比,生品组 ALT、AST 均显著性升高

表 1 各组小鼠肝肾脏器系数($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Liver and kidney organ coefficients of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	肝肾脏器系数	肾肾脏器系数
K	4.36±0.29	0.96±0.04
S	4.89±0.18 ²⁾	1.09±0.03 ²⁾
C	4.39±0.20 ³⁾	0.98±0.04 ⁴⁾
T	4.66±0.15 ^{1,3)}	1.02±0.02 ⁴⁾
N	4.85±0.20 ¹⁾	1.07±0.05 ¹⁾
Y	4.56±0.22 ³⁾	1.02±0.04 ^{1,3)}

注: K.空白组; S.生品组; C.醋制组; T.砂烫组; N.尿泡组; Y.油炸组(表 2、3 图 1~6 同)。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$; 与生品组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.001$ (表 2、3 同)。

($P < 0.05$), CRE、BUN 均极显著性升高($P < 0.001$),其他炮制品除各组 BUN 均显著性升高($P < 0.05$),砂烫组 AST、油炸组 CRE 显著性升高($P < 0.05$)外,其他组别各指标均无显著性变化;与生品组相比,醋制组 ALT、AST 显著性降低($P < 0.05$),CRE、BUN 均极显著性降低($P < 0.001$),砂烫组 ALT 显著性降低($P < 0.05$),CRE 极显著性降低($P < 0.001$),尿泡组 ALT、AST、CRE 显著性降低($P < 0.05$),油炸组 ALT、AST、CRE、BUN 均显著性降低($P < 0.05$),见表 2。提示马钱子经过不同方法炮制后,对肝肾损伤指标的影响程度有所降低,综合比较减毒效果排序为醋制组 > 油炸组 > 尿泡组 > 砂烫组 > 生品组。

3.3 马钱子不同炮制品对小鼠肝肾组织的影响

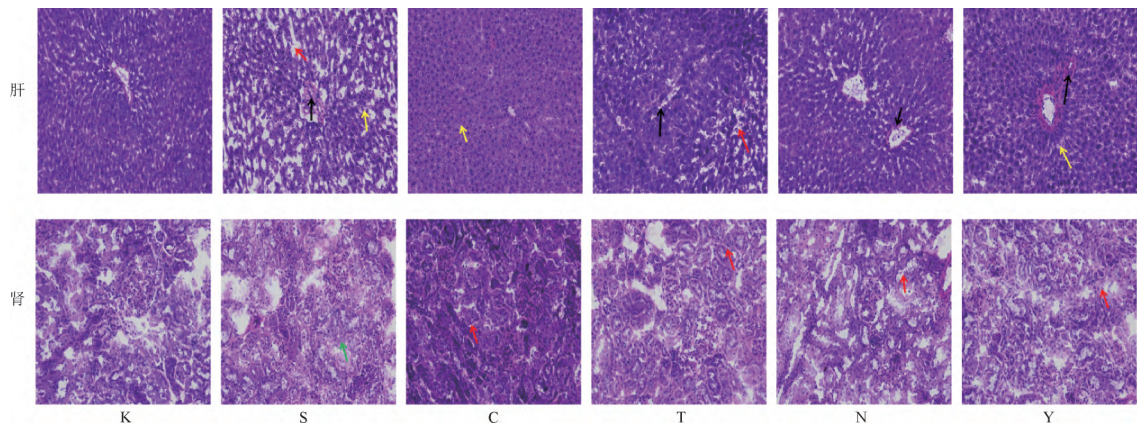
小鼠肝组织 HE 染色结果显示,空白组小鼠肝组织整体结构基本正常,肝细胞结构饱满、排列规则;在给药后,生品组小鼠肝组织整体结构中重度异常,可见较多肝细胞疏松水肿;醋制组结构轻度异常,肝细胞结构疏松;砂烫组结构轻度异常,组织可见部分肝窦扩张和少量炎症细胞浸润;尿泡组结构轻度异常,可见少量炎症细胞浸润;油炸组结构轻度异常,肝细胞结构疏松,可见少量肝细胞轻微水肿及炎症细胞浸润,见图 1。空白组小鼠肾组织整体结构基本正常,肾小球结构清晰。生品组肾组织整体结构异常,可见较多肾小管上皮细胞坏死,细胞核溶解消失;醋制组和砂烫组结构基本正常;尿泡组和油炸组结构轻度异常,可见少量上皮细胞疏松水肿脱落,见图 1。马钱子不同炮制品对小鼠肝肾组织结构均造成了不同程度的损伤,且生品组最为严重,其

表 2 各组小鼠肝肾匀浆 ALT、AST、CRE、BUN 指标比较($\bar{x}\pm s$ $n=6$)

Table 2 Comparison of ALT , AST , CRE and BUN indexes in liver and kidney homogenates of mice in each group($\bar{x}\pm s$ $n=6$)

组别	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	CRE/μmol·L ⁻¹	BUN/μmol·L ⁻¹
K	129.28±16.61	584.40±56.85	18.05±4.49	2.77±0.50
S	172.82±17.85 ¹⁾	653.27±26.34 ¹⁾	37.83±4.32 ²⁾	4.18±0.04 ²⁾
C	134.18±12.69 ³⁾	600.57±14.62 ³⁾	20.48±1.24 ⁴⁾	3.55±0.08 ^{1 4)}
T	137.90±10.67 ³⁾	648.68±31.15 ¹⁾	19.20±1.66 ⁴⁾	3.97±0.48 ¹⁾
N	137.00±12.73 ³⁾	592.32±16.16 ³⁾	21.90±1.80 ³⁾	3.63±0.67 ¹⁾
Y	134.00±7.85 ³⁾	592.32±36.46 ³⁾	25.15±4.33 ^{1 3)}	3.72±0.18 ^{1 3)}

他炮制品均有不同程度降低,提示马钱子经过炮制后毒性降低,对肝肾组织损伤程度降低。按肝肾组织结构异常程度其减毒效果综合比较排序为醋制组≈砂烫组>尿泡组≈油炸组>生品组。



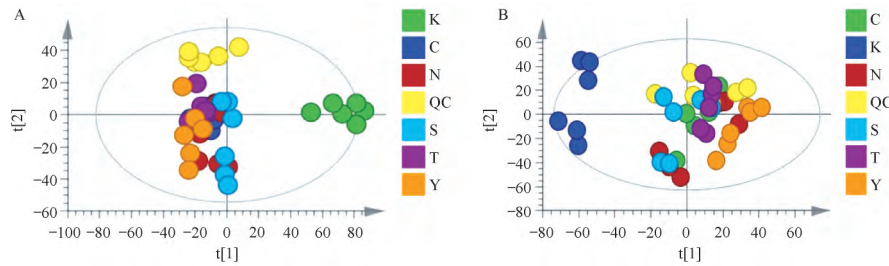
肝脏切片中黄色箭头代表细胞疏松水肿,黑色箭头代表少量炎症细胞浸润,红色箭头代表部分肝窦极度扩张;肾脏切片中绿色箭头代表肾小管上皮细胞坏死,细胞核溶解消失,红色箭头代表上皮细胞疏松水肿脱落。

图 1 肝肾损伤 HE 染色切片(×200)

Fig.1 HE staining for liver and kidney injury(×200)

3.4 马钱子不同炮制品对小鼠血清代谢组学的影响

3.4.1 代谢轮廓分析 代谢组学分析按质谱数据采集模式分别进行。对空白组、生品组、醋制组、砂烫组、尿泡组、油炸组数据进行无监督主成分分析,见图 2。在正、负离子模式下,各组小鼠的血清代谢轮廓有区分的趋势,且质量控制(QC)样本聚集良好,检测系统稳定可靠。



QC.质量控制。

图 2 正离子模式(A)和负离子模式(B)下不同组别小鼠血清代谢 PCA 图

Fig.2 Serum metabolic PCA plots of mice in different groups in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

在此基础上,采用有监督的 OPLS-DA 对变量进行加载分析,见图 3。结果表明,在正、负离子模式下各炮制品组与空白组均可得到很好的区分,同时各组内样品点均可在一定范围内聚集。模型 R^2Y (表示模型的拟合度) 和 Q^2 (表示当前模型的预测能力) 正离子模式下 R^2Y 分别为 1、0.999、0.998、1、0.999, Q^2 分别为 0.943、0.954、0.954、0.952、

0.967; 负离子模式下 R^2Y 分别为 0.998、0.999、0.998、0.998、1, Q^2 分别为 0.855、0.906、0.893、0.87、0.932; 正负离子模式下 R^2Y 、 Q^2 均接近 1, 表明模型具有较高的解释率及预测率。200 次模型验证结果表明, R^2 和 Q^2 左侧均低于右侧, Q^2 点的回归线与纵轴相交于原点以下, 表明未产生过分拟合, 模型可靠, 见图 4。

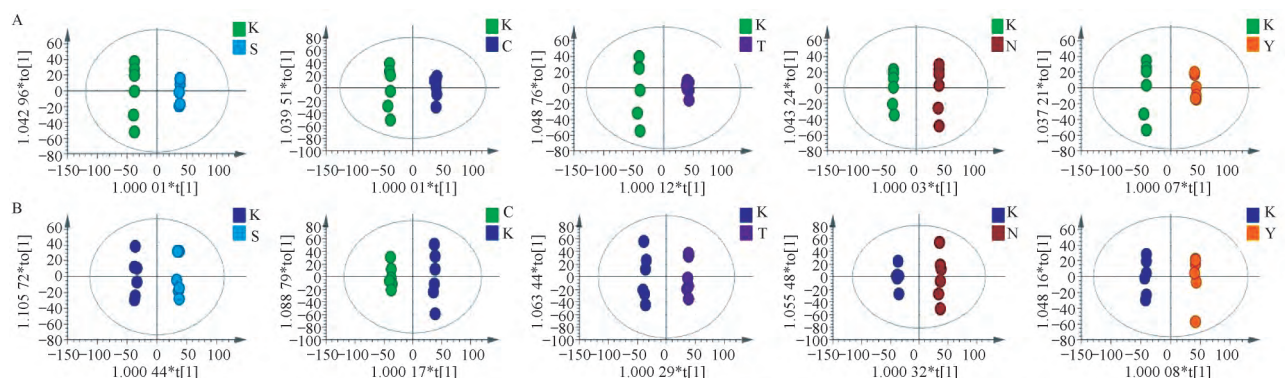


图 3 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下各组与空白组比较 OPLS-DA 得分图

Fig.3 OPLS-DA score plots of different groups in positive (A) and negative (B) ion modes compared with blank group

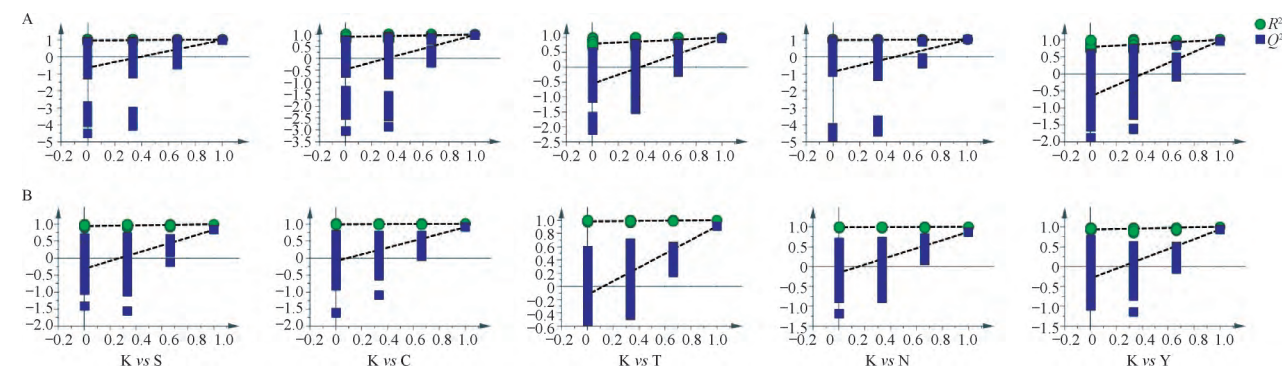


图 4 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下各组与空白组比较置换检验图

Fig.4 Permutation test plots for comparison of groups with blank group in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

3.4.2 差异代谢物的筛选与鉴定 利用 OPLS-DA 模型筛选了空白组与不同炮制品组间的差异代谢物。与空白组比较,各组差异代谢物个数总和为 104, 其中生品组 81 个, 醋制组 67 个, 砂烫组 61 个, 油炸组 61 个, 尿泡组 57 个, 选取参与代谢途径以及通路具显著性影响 ($P < 0.05$) 或通路影响值 > 0.1 的差异代谢物作为关键差异代谢物, 空白组与各炮制品组间共鉴定出 14 种关键差异代谢物, 其中 9 个含量在各组均下调, 2 个均上调, 3 个上下调情况均有, 见表 3。这些关键差异代谢物主要为鞘脂类、甘油

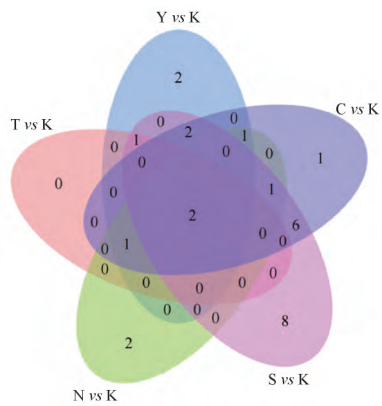
磷脂类、维生素类等化合物。

3.4.3 代谢通路分析 与空白组相比, 各组代谢通路共计 27 条, 其中生品组 20 条、醋制组 14 条、砂烫组 4 条、油炸组 9 条、尿泡组 7 条, 各组均涉及鞘脂代谢和甘油磷脂代谢通路, 见图 5; 各组中具有显著性影响的代谢通路共计 5 条 ($P < 0.05$), 包括鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、 α -亚麻酸代谢、硫辛酸代谢和亚油酸代谢, 其中鞘脂代谢在各组代谢途径中均具有显著性影响 ($P < 0.05$), 通路权重分析见图 6。

表 3 各组小鼠血清差异代谢物分析
Table 3 Analysis of serum differential metabolites in each group of mice

No.	代谢物 (中文名)	代谢物 (英文名)	化学式	实测值 <i>m/z</i>	VIP	误差 / $\times 10^{-6}$	KEGG	变化趋势									
								S	T	C	N	Y	K	S	T	C	N
1	磷脂酰胆碱	PC (24: 0/24: 0)	C ₅₆ H ₁₁₂ NO ₈ P	270. 218 4	1. 262 28	2	C00157	↓ ¹⁾		↓		↓ ¹⁾	↓ ²⁾	↓			
2	磷脂酰乙醇胺	PE [22: 2 (13Z , C ₄₉ H ₈₄ NO ₈ P 16Z) /22: 5(4Z ,7Z , 10Z ,13Z ,16Z)]		863. 631 6	1. 327 50	5	C00350	↓		↓ ¹⁾		↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾			
3	溶血磷脂酰胆碱	LysoPC (P-18: 0/ C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P 0: 0)		488. 349 3	1. 191 52	2	C04230	↑		↓ ¹⁾		↑	↑	↓ ¹⁾			
4	鞘磷脂	SM [d18: 0/22: 3 C ₄₅ H ₈₅ N ₂ O ₆ P (10Z ,13Z ,16Z)]		798. 656 0	1. 222 49	10	C00550	↓ ²⁾		↑		↓ ¹⁾	↓ ²⁾	↓			
5	半乳糖神经酰胺	galactosylceramide (d18: 1/14: 0)	C ₃₈ H ₇₃ NO ₈	652. 509 2	1. 364 05	9	C02686	↓		↓		↓ ¹⁾	↓ ²⁾	↑			
6	四己糖神经酰胺	tetrahexosylcera- mide(d18: 1/16: 0)	C ₆₀ H ₁₁₀ N ₂ O ₂₃	612. 373 6	2. 007 59	10	C03272	↓ ²⁾		↓ ²⁾		↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾			
7	三己糖神经酰胺	trihexosylceramide (d18: 1/24: 1)	C ₆₀ H ₁₁₁ NO ₁₈	1 151. 807 4	1. 122 46	6	C04737	↑ ¹⁾		↑ ¹⁾		↑	↑ ¹⁾	↑ ¹⁾			
8	神经节苷脂 GM3	ganglioside GM3 (d18: 1/16: 0)	C ₅₇ H ₁₀₄ N ₂ O ₂₁	575. 353 8	1. 979 36	8	C04730	↓		↓ ²⁾		↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓			
9	神经节苷脂 GA2	ganglioside GA2 (d18: 1/24: 0)	C ₆₂ H ₁₁₆ N ₂ O ₁₈	1 157. 812 9	1. 435 24	8	C06135	↑ ²⁾		↑ ²⁾		↑	↑ ²⁾	↑ ²⁾			
10	神经节苷脂 GA1	Ganglioside GA1 (d18: 1/16: 0)	C ₆₀ H ₁₁₀ N ₂ O ₂₃	678. 585 3	1. 586 74	10	C06136	↓ ²⁾		↓ ²⁾		↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾			
11	胆甾烷-3, 7, 12, 25-四醇-3-葡萄糖醛酸苷	cholestane-3, 7, 12, 25-tetrol-3-glucur- onide	C ₃₃ H ₅₆ O ₁₀	611. 375 1	1. 644 77	8	C03033	↓ ²⁾		↓ ²⁾		↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾			
12	四氢叶酸	tetrahydrofolicacid	C ₁₉ H ₂₃ N ₇ O ₆	426. 153 1	1. 696 16	5	C00101	↓ ²⁾		↓ ¹⁾		↓ ¹⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾			
13	S-乙酰二氢硫辛酰胺-E	S-acetyldihydroli- poamide-E	C ₁₀ H ₁₉ NO ₂ S ₂	250. 094 6	1. 429 23	6	C16255	↓ ²⁾		↓ ¹⁾		↓	↓	↓			
14	3-氧代-OPC6-辅酶 A	3-oxo-OPC6-CoA	C ₃₇ H ₅₈ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	1 010. 253 6	1. 556 18	4	C16334	↓ ²⁾		↓ ²⁾		↓ ¹⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾			

注: ↑.上升; ↓.下降。



各组共有代谢通路为 2 条,分别为鞘脂代谢、甘油磷脂代谢通路。

图 5 各组代谢通路 Venn 图

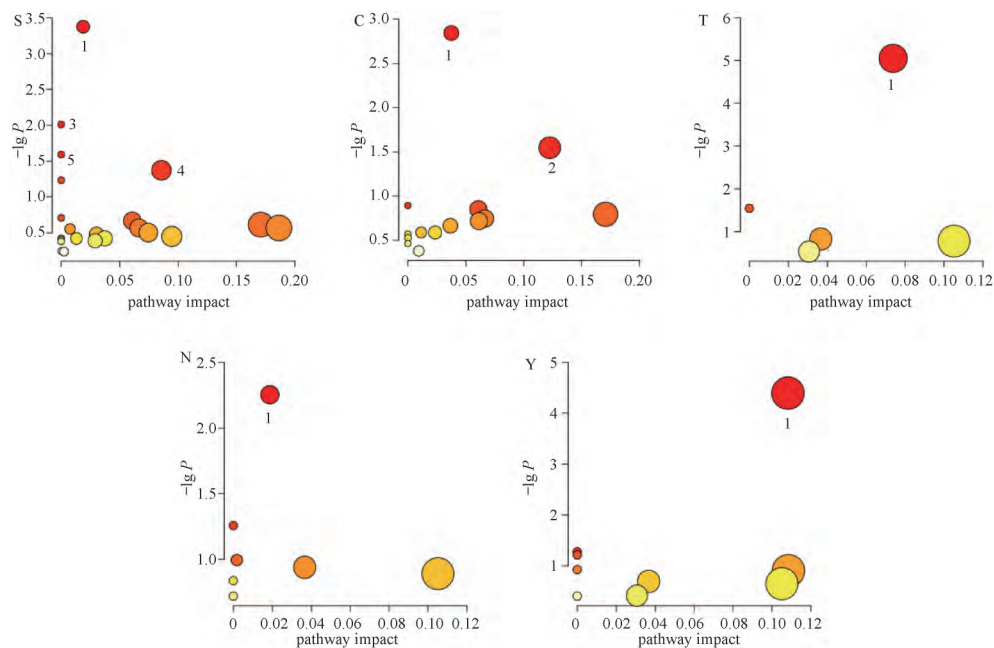
Fig.5 Venn diagram of metabolic pathways for each group

3.5 马钱子不同炮制品差异代谢物与小鼠肝肾损伤指标的相关性分析

对鞘脂代谢与甘油磷脂代谢通路上的 10 种差异代谢物与肝肾损伤指标进行相关分析,结果表明 ALT、BUN 水平与甘油磷脂代谢中的磷脂酰胆碱 (C00157) 相对强度正相关 ($r=0.738$, $P=0.094$; $r=0.753$, $P=0.084$) ,CRE 水平与鞘脂代谢中的四己糖神经酰胺(C03272) 、甘油磷脂代谢中的溶血磷脂酰胆碱(C04230) 相对强度负相关 ($r=-0.937$, $P=0.006$; $r=-0.814$, $P=0.049$) ,见图 7。

4 讨论

马钱子作为常用的有毒中药之一,对类风湿关



1.鞘脂代谢; 2.甘油磷脂代谢; 3.α-亚麻酸代谢; 4.硫辛酸代谢; 5.亚油酸代谢。

图 6 各组小鼠代谢通路权重分析

Fig.6 Metabolic pathway weighting analysis diagrams in each group of mice

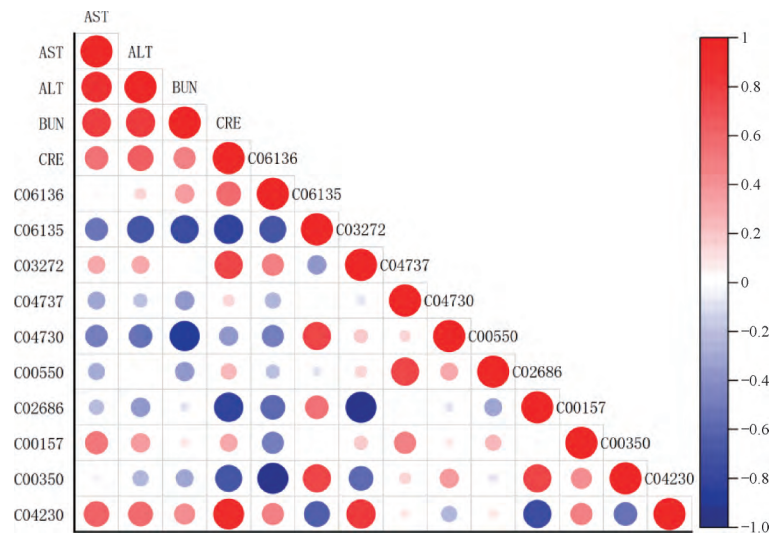


图 7 各组小鼠差异代谢物与肝肾损伤指标相关性分析

Fig.7 Correlation analysis between differential metabolites and liver and kidney injury indicators in each group of mice

节炎等风湿痹痛类疾病有着显著的治疗效果,但其剧毒的特性又严重影响其在临床上的应用,所谓“毒药猛剂善起沉疴”^[22]。历代医家为解决这一难题,留下许多炮制与配伍的方法,其中炮制最早可以追溯到明朝《外科大成》中的净制法“括去壳”^[23],

后面又逐渐发展出切制、炒制、油制等其他炮制方法,目的都是为了通过炮制降低马钱子的毒性。近代以来,马钱子的炮制方法也在不断更新,出现了烘烤法、砂烫法、醋制法和奶制法等炮制方法^[10],这些方法大多通过毒性成分的转化和降低来实现马钱子

减毒增效效果,但目前仍缺乏对不同炮制品之间毒性的综合比较,本研究通过肝肾脏器系数、肝肾损伤指标及血清代谢组学对生品马钱子、砂烫马钱子、油炸马钱子、尿泡马钱子和醋制马钱子的肝肾毒性进行探讨。

脏器系数是毒性评价中常用的指标之一,当脏器出现水肿、出血、充血、积水、增生、肥大等病变时,脏器质量可能会增加^[24]。本研究中,相对空白组,生品组肝肾系数均极显著性上升,其他炮制品也有不同程度上升,但相比生品组低,同时HE染色结果显示,各炮制组肝肾组织出现了不同程度的疏松水肿及炎症细胞浸润情况,这可能是导致小鼠脏器系数上升的原因,且马钱子经炮制后毒性降低,对肝肾组织影响也随之减低。ALT和AST是催化氨基酸转氨基反应的酶,当肝细胞受损或肝细胞膜通透性增加时,血清ALT、AST水平可明显升高,是反映肝损伤程度的敏感指标^[25]。BUN、CRE是传统的肾脏评价指标,能够对机体的实质性肾毒性进行评估^[26]。由指标结果可知,各炮制品组指标结果均呈上升趋势,这与脏器系数和染色的结果相验证,肝细胞出现水肿,增大了细胞通透性,使损伤指标扩散至细胞外,而炎症加剧了细胞的损伤情况,从而进一步加剧扩散。另外,生品马钱子对肝肾的损伤程度不同,尤其对肾损伤更大,相比生品马钱子,经过炮制后的马钱子对肝肾的损伤均有不同程度的降低,这与马钱子炮制减毒的目的相一致,其中醋制组对肝功能指标有显著性降低效果,且对肾功能指标有极显著性的降低效果,表明醋制法对马钱子的减毒效果较好。

由代谢通路分析和关联性分析结果可知,鞘脂代谢与甘油磷脂代谢为各组共有代谢通路,且马钱子造成的肝毒性可能主要与甘油磷脂代谢紊乱相关,肾毒性与甘油磷脂代谢、鞘脂代谢紊乱均相关。筛选出关键差异代谢物,即肝肾毒性标志物14个,包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱、鞘磷脂、半乳糖神经酰胺、四己糖神经酰胺、三己糖神经酰胺、神经节苷脂GM3、神经节苷脂GA2、神经节苷脂GA1、胆甾烷-3,7,12,25-四醇-3-葡萄糖醛酸苷、四氢叶酸、S-乙酰二氢硫辛酰胺-E、3-氧代-OPC6-辅酶A。现代研究表明,鞘脂代谢与甘油磷脂代谢均为药物性肝肾损伤的相关代谢途径^[26-28]。在甘油磷脂代谢通路中,磷脂酰胆碱(PC)是细胞膜

脂质的主要成分,在肝细胞中,高达30%的PC来自磷脂酰乙醇胺(PE)向PC的转化,低PC/PE比率干扰可能会影响细胞膜磷脂双层的结构,导致膜完整性丧失和对促炎分子(如细胞因子)的通透性增加^[29]。同时具有抗炎和抗氧化作用,可通过增强抗氧化酶的活性降低药物诱导的氧化应激,并对药物诱导的肝、肾毒性具有保护作用。溶血磷脂酰胆碱是磷脂酰胆碱的产物或代谢物,分布于肝外组织的血浆库中,能诱发多种促炎反应,被认为是肝脏脂毒性的重要介质^[30]。溶血磷脂酰胆碱已在体外被证明可能通过破坏线粒体完整性触发肝细胞凋亡,并通过增强肝细胞释放促炎和促纤维化分子或溶血磷脂酰胆碱向促纤维化溶血磷脂酸的转换来介导其诱导的脂毒性^[31-32]。而在肾损伤中通常也会出现甘油磷脂相关代谢物的代谢紊乱,比如溶血甘油磷脂(Lyso-GPs)、磷脂酸(PA)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)和溶血磷脂酰胆碱(LPC)等的显著下调^[33-34]。本研究结果显示,马钱子生品组小鼠代谢物磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的表达下降,溶血磷脂酰胆碱的表达上升,结合指标与染色结果,提示生品马钱子可能通过对肝细胞膜及肾小管上皮细胞膜的破坏和促炎因子的释放介导肝肾损伤,而其他炮制品则通过对代谢物不同程度的回调与影响减少对肝肾组织的损伤。

研究表明,鞘脂代谢异常与由化学物质对肾小管上皮细胞引起的ER应激脂毒性相关^[35]。在本研究结果中,三己糖神经酰胺和神经节苷脂GA2在各组中均呈上调趋势,鞘脂、四己糖神经酰胺表达呈下降趋势。三己糖神经酰胺和神经节苷脂GA2是细胞表面的组成成分,过表达均会引起溶酶体功能异常,导致细胞溶酶体肿胀、破裂,释放出的水解酶等物质会对细胞内的各种细胞器和生物大分子造成损伤,且神经节苷脂GA2能促进巨噬细胞焦亡,并释放炎症因子IL-1 α ,从而进一步加剧细胞损伤情况,引起肝脏、肾脏、心脏、皮肤等器官功能障碍^[36-37]。同时在鞘脂代谢通路中四己糖神经酰胺与三己糖神经酰胺处于上下游合成转化关系,三己糖神经酰胺的过度表达与四己糖神经酰胺的表达抑制,提示出马钱子可能通过对其转化途径的抑制,使三己糖神经酰胺过度积累,造成脂毒性。鞘脂被认为是细胞膜的重要结构成分,其表达的抑制可能会影响细胞膜的稳定性、通透性等功能^[38]。据报道,

足细胞中鞘脂减少会损害肾小球基底膜的正常功能,导致蛋白尿、肾小球纤维化和肾小球硬化^[39]。马钱子生品及其不同炮制品可能通过对三己糖神经酰胺和神经节苷脂 GA2 表达的上调,及鞘脂表达的不同抑制介导不同程度肝肾损伤,醋制品组对鞘脂表达上调可能是其肝肾损伤指标较低的原因之一。

鞘脂代谢与甘油磷脂代谢通路中代谢物的变化情况密切相关,鞘磷脂可通过酸性鞘磷脂酶水解生成神经酰胺和磷酸胆碱,而磷酸胆碱可通过 CDP-胆碱途径生成磷脂酰胆碱^[40]。本研究中鞘磷脂和磷脂酰胆碱在各组基本均呈下降趋势,可能是由于各组对上游鞘磷脂表达的抑制,使磷酸胆碱生成减少,从而导致下游产物磷脂酰胆碱的减少,使鞘脂代谢与甘油磷脂代谢两条通路紊乱,引起机体损伤。

以上 2 种代谢通路的紊乱,最终导致脂质代谢失调,促使小鼠肝肾细胞出现凋亡或炎症浸润现象,进而造成不同程度的肝肾损伤。各组代谢物表达程度的不同可能与其炮制后化学成分含量的变化和种类的转化有关,前期化学研究结果显示,生品马钱子、油炸马钱子、砂烫马钱子、醋制马钱子化学成分具有较大差异,筛选到 13 个差异性化合物,多为生物碱类和有机酸类^[20],这些化学成分的差异可能是对血清差异代谢物发挥不同调控效果的物质基础。

综上所述,马钱子不同炮制品对小鼠肝肾均有不同程度的损伤,但炮制品相比生品损伤程度降低,从肝肾脏器系数与肝肾指标结果来看,醋制品的减毒效果更好,其次是油炸组>砂烫组≈尿泡组>生品组;代谢组学结果显示,鞘脂代谢与甘油磷脂代谢紊乱可能是马钱子不同炮制品致使肝肾损伤的主要影响途径。本文为马钱子不同炮制品毒性比较提供了参考依据,有利于马钱子临床应用的推广,但本研究依然存在不足之处,后续课题组将对马钱子不同炮制品进行多角度、多维度的毒性评价,并对其毒性作用机制进行进一步验证。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 李时珍.本草纲目[M].南京:江苏科学技术出版社,2016.
- [3] 张锡纯.医学衷中参西录[M].石家庄:河北人民出版社,1957.
- [4] GUO R X, WANG T, ZHOU G H, et al. Botany, phytochemistry, pharmacology and toxicity of *Strychnos nux-vomica* L.: a review[J]. Am J Chin Med, 2018, 46(1): 1.
- [5] 秦贝贝,贾泽菲,王佳莉,等.马钱子化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].中草药,2022,53(18):5920.
- [6] 王玠,谢宗万,章国镇.《本草原始》研究概述[J].中药材,1989(10):43.
- [7] TESKE J, WELLER J P, ALBRECHT U V, et al. Fatal intoxication due to brucine[J]. J Anal Toxicol, 2011, 35(4): 248.
- [8] 宋海波,杜晓曦.马钱子不良反应的文献研究及其风险因素分析[J].中国药物警戒,2015,12(7):411.
- [9] 吴攀峰,方居正.马钱子药理毒理作用及减毒机理研究进展[J].江苏中医药,2024,56(3):81.
- [10] 秦聪聪,杜沁圆,张义敏,等.马钱子炮制历史沿革及现代研究进展[J].中华中医药杂志,2024,39(1):319.
- [11] 江西省卫生厅药政管理局.江西省中药炮制规范[M].上海:上海科技出版社,1991.
- [12] 龚腊根,余选民,闵贵春.马钱子炮制工艺研究[J].中药通报,1984,9(2):19.
- [13] 王娜,许海江,孙同文,等.生品、沙烫品及醋煮品马钱子的急性毒性试验[J].中医临床研究,2013,5(4):25.
- [14] 陈思越,马宁,许妍妍,等.马钱子靶器官毒性和减毒增效机制的研究进展[J].现代药物与临床,2023,38(3):725.
- [15] LU L, HUANG R, WU Y, et al. Brucine: a review of phytochemistry, pharmacology, and toxicology [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 377.
- [16] 崔芙蓉,杨佳颖,王志刚,等.代谢组学在中医药领域的应用与展望[J].中草药,2022,53(14):4512.
- [17] SHI J, CAO B, WANG X W, et al. Metabolomics and its application to the evaluation of the efficacy and toxicity of traditional Chinese herb medicine [J]. J Chromatogr B, 2016, 1026: 204.
- [18] LAO Y M, JIANG J G, YAN L. Application of metabonomic analytical techniques in the modernization and toxicology research of traditional Chinese medicine [J]. Br J Pharmacol, 2009, 157: 1128.
- [19] 陈宵,孙承业.代谢组学在天然产物毒性评价和毒理学研究中的应用进展[J].中草药,2019,50(5):1244.
- [20] 张娴,郑海连,张娜,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析马钱子不同炮制品的化学成分[J].中国中药杂志,2024,49(22):6138.
- [21] 张娜,张娴,郑海连,等.基于血清代谢组学探讨马钱子不同炮制品对类风湿性关节炎大鼠的干预机制[J].中国中药杂志,2025,50(17):4825.
- [22] 陈谢谢,刘丽丽,朱卫丰,等.中药马钱子减毒增效方法研究进展[J].江西中医药,2018,49(8):63.
- [23] 祁坤.外科大成[M].上海:科技卫生出版社,1958.
- [24] 王辉,刘彦兵,黄恩霞,等.小鼠亚急性乌头碱中毒的脏器系数和血液生化指标分析[J].中国兽医杂志,2019,55(8):108.
- [25] LIM J Y, LEE J H, YUN D H, et al. Inhibitory effects of nodakenin on inflammation and cell death in lipopolysaccharide-induced liver injury mice [J]. Phytomedicine, 2021, 81:

- 153411.
- [26] 秦伟瀚, 魏江平, 张小梅, 等. 基于炎症大鼠代谢组学的马钱子炮制减毒存效机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(5): 825.
- [27] 陈殊. 基于代谢组学与琥珀酸/VEGF 信号通路的赅制雷公藤减毒增效机制研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2023.
- [28] 张宁, 李自辉, 赵洪伟, 等. 玄参提取物对甲亢模型大鼠肝脏代谢组学的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(1): 21.
- [29] LI Z, AGELLON L B, ALLEN T M, et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis[J]. Cell Metab, 2006, 3(5): 321.
- [30] HAN M S, PARK S Y, SHINZAWA K, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipopoptosis of hepatocytes[J]. J Lipid Res, 2008, 49(1): 84.
- [31] KAKISAKA K, CAZANAVE S C, FINGAS C D, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipopoptosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 302(1): G77.
- [32] HIRSOVA P, IBRAHIM S H, KRISHNAN A, et al. Lipid-induced signaling causes release of inflammatory extracellular vesicles from hepatocytes[J]. Gastroenterology, 2016, 150(4): 956.
- [33] CHEN Y, JIANG L, ZHANG R, et al. Spatially revealed perfluorooctane sulfonate-induced nephrotoxicity in mouse kidney using atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging[J]. Sci Total Environ, 2022, 838(Pt 3): 156380.
- [34] DU Y, WANG Q, ZHANG X, et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 upregulation and concomitant phospholipid alterations in clear cell renal cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 66.
- [35] ÇEKER T, YILMAZ Ç, KIRIMLIOĞLU E, et al. Endoplasmic-reticulum-stress-induced lipotoxicity in human kidney epithelial cells[J]. Toxicol Res, 2022, 11(4): 683.
- [36] AMÉLIE B, KRAOUA I, MARCELINO C, et al. Plasma GM2 ganglioside potential biomarker for diagnosis, prognosis and disease monitoring of GM2-gangliosidosis[J]. Mol Genet Metab, 2023, 138(2): 106983.
- [37] 石云敏. 神经节苷脂 GA2 加重动脉损伤后内膜增生的机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2023.
- [38] LI L H, WANG H B, JACE-W J. Sphingolipid metabolism as a marker of hepatotoxicity in drug-induced liver injury[J]. Prostag Oth Lipid M, 2020, 151: 106484.
- [39] YAGHOBIAN D, DON A S, YAGHOBIAN S, et al. Increased sphingosine 1-phosphate mediates inflammation and fibrosis in tubular injury in diabetic nephropathy[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(1): 56.
- [40] ZHOU Y F, METCALF M, GARMAN S, et al. Human acid sphingomyelinase structures provide insight to molecular basis of Niemann-Pick disease[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13082.

[责任编辑 孔晶晶]