

基于代谢组学研究补骨脂提取物致氨基酸代谢紊乱造成大鼠肝损伤

彭敏¹, 罗美美^{1,2}, 张慰³, 杨紫荆^{1,2}, 吴育^{1,2*}

1. 南京中医药大学南通附属医院 药剂科, 江苏 南通 226000

2. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023

3. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021

摘要: 目的 采用代谢组学技术探讨补骨脂提取物(PCE)造成肝损伤的作用机制。方法 将 18 只大鼠随机分为对照组和 PCE 低、高剂量(1.8、7.2 g·kg⁻¹, 分别为临床等效剂量和临床 4 倍等效剂量)组, 均连续 ig 给药 28 d。试剂盒法检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、髓过氧化物酶(MPO)水平; 苏木精-伊红(HE)染色后观察肝脏病理学变化。采集各组小鼠的肝脏, HPLC-MS 分析肝损伤成分—norbakuchinic acid、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂查尔酮、补骨脂甲素、补骨脂宁、补骨脂定、新补骨脂异黄酮含量变化; GC-MS 代谢组学分析肝脏中内源性代谢物的差异及含量。结果 与对照组相比, PCE 低、高剂量组肝生化指标 ALT、AST、ALP 水平显著升高($P < 0.001$); 促炎因子 IL-6、TNF- α 和 MPO 水平显著上升($P < 0.001$), 肝脏切片表现出肝细胞肿胀, 在局部区域观察到少量淋巴细胞呈灶性浸润, 甚至出现胞质疏松, 肝细胞损伤明显。与 PCE 低剂量组相比, PCE 高剂量组补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂定、补骨脂甲素、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂查尔酮、补骨脂宁、新补骨脂异黄酮的浓度显著升高, norbakuchinic acid 显著降低($P < 0.01$ 、 0.001)。代谢组学筛选出肌氨酸、丙酮酸、尿素、乳酸、苹果酸、苏氨酸、瓜氨酸、谷氨酸、富马酸、天冬氨酸、甘氨酸等差异代谢物, 主要涉及到精氨酸生物合成, 甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢, 丙酮酸代谢等通路。结论 PCE 造成肝损伤可能与肝损伤成分剂量相关性蓄积和氨基酸代谢紊乱相关。

关键词: 补骨脂; 肝损伤; 氨基酸代谢; 代谢组学; 精氨酸生物合成; 甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢; 丙酮酸代谢

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)05-1485-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.05.002

Study on mechanism of amino acid metabolism disorder and liver injury caused by *Psoralea corylifolia* extract based on metabolomics

PENG Min¹, LUO Meimei^{1,2}, ZHANG Wei³, YANG Zijing^{1,2}, WU Yu^{1,2}

1. Pharmacy Department, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong Hospital to Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong 226000, China

2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Psoralea corylifolia* extract (PCE)-induced liver injury by metabolomics.

Methods Totally 18 rats were randomly divided into the control group and the low-dose (1.8 g·kg⁻¹) and high-dose (7.2 g·kg⁻¹) PCE groups, and were ig administered for 28 days. The levels of serum ALT, AST, ALP, IL-6, TNF- α , and MPO were detected by kits. The pathological changes of the liver were observed after HE staining. The livers of each group were collected, and the contents of liver injury components - norbakuchinic acid, psoralen, isopsoralen, psoralen dihydroflavone methyl ether, psoralen chalcone, psoralen A,

收稿日期: 2025-12-17

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82304736); 江苏省中药骨干人才高级研修项目(苏中医科教[2025]11号); 南京中医药大学青年基金项目(XZR2021085)

作者简介: 彭敏, 女, 硕士, 副主任中药师, 研究方向为中药临床药学。E-mail: pengmin86@163.com

*通信作者: 吴育, 女, 博士, 副主任中药师, 研究方向为中药炮制理论及机制。E-mail: wylucky@njucm.edu.cn

psoralen B, psoralen C, and new psoralen isoflavone were analyzed by HPLC-MS. The differences and contents of endogenous metabolites in the liver were analyzed by GC-MS metabolomics. **Results** Compared with the control group, the levels of ALT, AST, and ALP in the low-dose and high-dose PCE groups were significantly increased ($P < 0.001$); the levels of pro-inflammatory factors IL-6, TNF- α , and MPO were significantly increased ($P < 0.001$), and the liver sections showed hepatocyte swelling, with a small number of lymphocytes presenting focal infiltration in some areas, and even cytoplasmic loosening, indicating obvious liver cell injury. Compared with the low-dose PCE group, the concentrations of psoralen, isopsoralen, psoralen C, psoralen A, psoralen dihydroflavone methyl ether, psoralen chalcone, psoralen B, and new psoralen isoflavone in the high-dose PCE group were significantly increased, while norbakuchinic acid was significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). Metabolomics identified differences in metabolites such as sarcosine, pyruvate, urea, lactic acid, malic acid, threonine, citrulline, glutamic acid, fumaric acid, aspartic acid, and glycine, mainly involving arginine biosynthesis, glycine, serine, and threonine metabolism, and pyruvate metabolism pathways. **Conclusion** Liver injury caused by PCE may be related to the increase of liver injury components and the disorder of amino acid metabolism.

Key words: *Psoralea corylifolia* L.; liver injury; amino acid metabolism; metabolomics; arginine biosynthesis; glycine, serine, threonine metabolism; pyruvate metabolism

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实^[1], 首载于《雷公炮炙论》: “性本大燥, 毒”, 历代医家也普遍认为补骨脂性“大温而燥”, 并指出“阴虚火旺者忌服”, 能够温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻, 外用消风祛斑^[2]。作为“主五劳七伤”的传统补益类中药, 补骨脂在治疗骨质疏松、增强机体免疫、抑制肿瘤生长以及调节雌激素水平等多个方面, 均展现出较为广泛的应用价值^[3]。随着人类体质、疾病类型及用药习惯的演变, 中药的不合理应用现象日益增多, 致使中药安全性问题屡屡出现^[4]。补骨脂引发的毒性反应也不断被报道。国家药品不良反应监测中心已多次发布关于含补骨脂的壮骨关节丸等制剂存在肝损害风险的通报, 这给补骨脂的临床安全、合理应用带来了严峻考验。

香豆素类(补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂定)与黄酮类成分(补骨脂二氢黄酮甲醚、新补骨脂异黄酮、补骨脂甲素、补骨脂查尔酮、补骨脂宁)是补骨脂致肝损伤的主要毒性成分, 其损伤机制主要体现为多通路、多靶点的协同作用, 可诱导肝脏胆汁淤积, 并通过调控 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (KEAP1) /核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 通路引发氧化应激、造成线粒体功能障碍^[5], 同时激活内质网未折叠蛋白反应 (UPR) 通路诱发内质网应激^[6]; 其中香豆素类还可抑制胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1) 通路干扰胆汁酸合成与胆固醇代谢、阻滞哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路抑制肝脏再生修复^[7], 同时该类成分还会扰乱肝脏氨基酸代谢通路, 进一步破坏肝细胞正常生理功能^[8-9]; 黄酮类则特异性抑制胆红素代谢消除的关键酶尿

苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (UGT1A1), 阻碍胆红素的结合与代谢消除, 导致胆红素在肝内蓄积^[10-11], 进而加重肝细胞损伤与胆汁淤积。本研究 ig 给予补骨脂提取物 (PCE) 高、低剂量后, 应用 HPLC-MS 分析肝组织中肝损伤成分——上述香豆素类与黄酮类成分的含量变化。

目前补骨脂毒性研究主要在单体化合物, 关于整体体内毒性的研究相对匮乏, 尤其是体内代谢过程对毒性效应的调控机制尚未得到充分阐释。仅关注单体化合物的毒性研究, 难以全面反映其在复杂机体环境中的真实毒性效应及代谢转化规律。随着“组学”科学的发展, 代谢组学已发展成为生物标志物发现和疾病诊断的有力方法。它基于对生物系统中低相对分子质量代谢物的综合分析, 揭示了生命系统响应疾病、药物治疗或毒理学损伤的整个代谢谱变化^[12]。代谢组学也与中医药的综合性和系统性特征相容, 即由多组分组成, 作为疾病治疗的整体系统。事实上, 代谢组学越来越多地被用于了解中医药的药效、毒性和机制。本研究利用代谢组学技术, 从内源性代谢物整体变化的角度, 揭示补骨脂导致肝损伤的作用机制。通过分析补骨脂引起的氨基酸代谢网络紊乱及其与肝损伤成分动态变化的相关性, 为阐明补骨脂的肝毒性机制及筛选早期毒性标志物提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 18 只, 5~8 周龄, 体质量 180~200 g, 由杭州医学院提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2019-0002。实验动物于 SPF 级恒温 (20~24 $^{\circ}\text{C}$)、恒湿 (45%~60%), 标准光照/

黑暗循环 (12 h/12 h) 的环境中饲养, 自由饮食、饮水。实验获得南京中医药大学动物伦理委员会的批准 (批准号 202010A021)。

1.2 药材与主要试剂

盐补骨脂购自南通三越中药饮片有限公司 (货号 230322), 经南京中医药大学李伟东研究员鉴定为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实。

甲氧基胺盐酸盐 (货号 593-56-6)、吡啶 (货号 110-86-1)、*N-O*-双 (三甲硅基) 三氟乙酰胺 (BSTFA) (货号 25561-30-2)、1, 2-¹³C₂ 肉豆蔻酸 (货号 287111-20-0) 均购买于美国 Sigma-Aldrich 公司; 丙酮酸 (货号 127-17-3)、谷氨酸 (货号 56-86-0)、天冬氨酸 (货号 6899-03-2)、尿素 (货号 58069-82-2)、乳酸 (货号 50-21-5)、富马酸 (货号 110-17-8)、苏氨酸 (货号 80-68-2)、谷氨酰胺 (货号 6899-04-3)、肌氨酸 (货号 107-97-1)、瓜氨酸 (货号 372-75-8)、苹果酸 (货号 6915-15-7) 均购自源叶生物科技有限公司, 质量分数均为 99%; 滨蒿内酯 (货号 SZ13009)、大黄酸 (货号 SZ241086)、补骨脂素 (货号 SZ23341)、异补骨脂素 (货号 SZ247211)、补骨脂甲素 (货号 SZ12807)、补骨脂二氢黄酮甲醚 (货号 SZ32712)、补骨脂查尔酮 (货号 SZ103418)、补骨脂宁 (货号 SZ24998)、新补骨脂异黄酮 (货号 SZ71224358)、ML385 对照品 (货号 SZ237710, 质量分数 ≥ 99.0%) 均购自南京世州生物有限公司; norbakuichinic acid 由南通大学李金龙老师提供。白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、髓过氧化物酶 (MPO) ELISA 试剂盒均购自南京拉普达生物科技有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒均购自浙江强盛生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

Trace 1310-TSQ 8000 Evo 三重四级杆气质联用仪、TG-5MS 毛细管色谱柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μ m) 均购自美国 Thermo Fisher 公司; AB 三重四级杆液质联用仪 (Agilent Technologies Inc, California, USA)、C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA); Genespeed 1536 高速微量离心机购自基因有限公司; Allegra 64 R 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); Vortex-Genie 2 涡旋振荡器 (美国 Scientific

industries 公司); ME230 电子天平 (美国 Mettler Toledo 公司); SW-CJ-2FD 通风工作台 (苏州净化有限公司)。

2 方法与结果

2.1 PCE 的制备

将盐补骨脂粉碎成粗粉备用, 称取粗粉 500 g, 依次加入 10 倍量的正己烷、醋酸乙酯、95%乙醇和超纯水回流提取, 每次 2 h, 用 16 层纱布滤过, 合并 4 次滤液 [含 4'-*O*-甲基补骨脂查尔酮、补骨脂甲素、corylifol A、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂宁、新补骨脂异黄酮、补骨脂定、补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素分别为 (5.77 ± 0.58)、(21.32 ± 3.48)、(69.11 ± 9.73)、(26.49 ± 3.70)、(9.89 ± 3.52)、(23.36 ± 6.07)、(17.23 ± 1.48)、(687.82 ± 82.55)、(398.91 ± 47.11)、(278.76 ± 39.00)、(262.50 ± 36.62) μ g · mL⁻¹], 旋蒸浓缩至干。换算成相应的给药剂量后, 将药物溶解于 0.5% CMC-Na 溶液中, 每次配制 1 周所需的 ig 剂量, 并于 4 °C 条件下保存。给药前, 需提前取出浓缩液, 使其恢复至室温并充分摇匀后使用。

2.2 动物分组及给药

将大鼠随机分成 3 组, 每组 6 只, 分别为对照组和 PCE 低、高剂量 (1.8、7.2 g · kg⁻¹, 分别为临床等效剂量和临床 4 倍等效剂量) 组, 给药组均连续 ig 28 d, 每周称量体质量 1 次。

2.3 样本采集

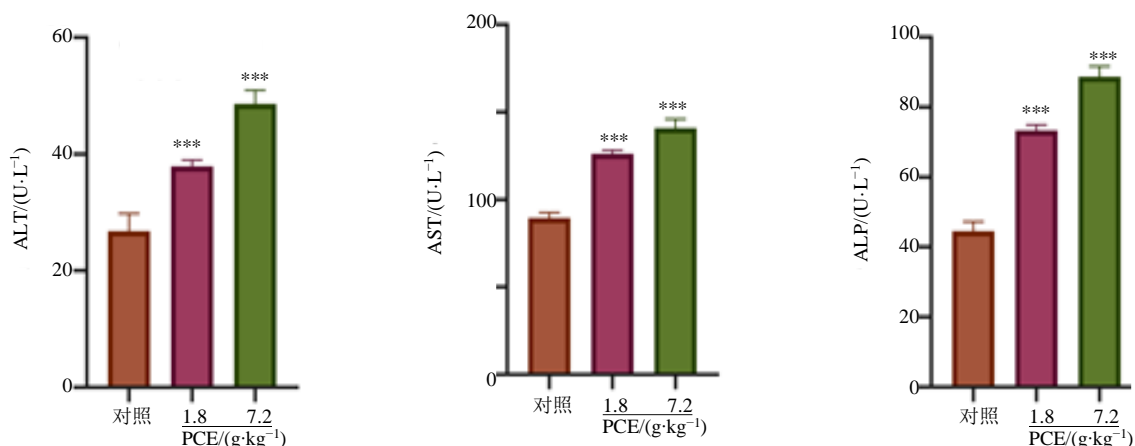
每组大鼠连续给药 4 周后, ip 3% 的戊巴比妥钠 1 mL · kg⁻¹ 行麻醉, 腹主动脉取血处死后, 迅速解剖肝脏, 取出用于后续实验, 置 -80 °C 保存。

2.4 血清肝功能生化指标的测定

各组大鼠腹主动脉取血, 血液室温静置 2 h 后, 于 4 °C 下 4 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清得到血清, 通过全自动生化分析仪检测肝功能相关指标 ALT、AST、ALP 水平。如图 1 所示, 对照组各项生化指标水平在正常范围内。与对照组相比, PCE 低、高剂量组肝生化指标 ALT、AST、ALP 水平显著升高 ($P < 0.001$), 这一实验结果表明, 补骨脂长期大量使用会造成肝损伤。

2.5 血清炎症因子的测定

收集大鼠血清的上清液, 按照制造商的说明, 用 ELISA 试剂盒分析大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、MPO 的水平。如图 2 所示, 与对照组相比, PCE 低、高剂量组的促炎因子 IL-6、TNF- α 和 MPO 水平显

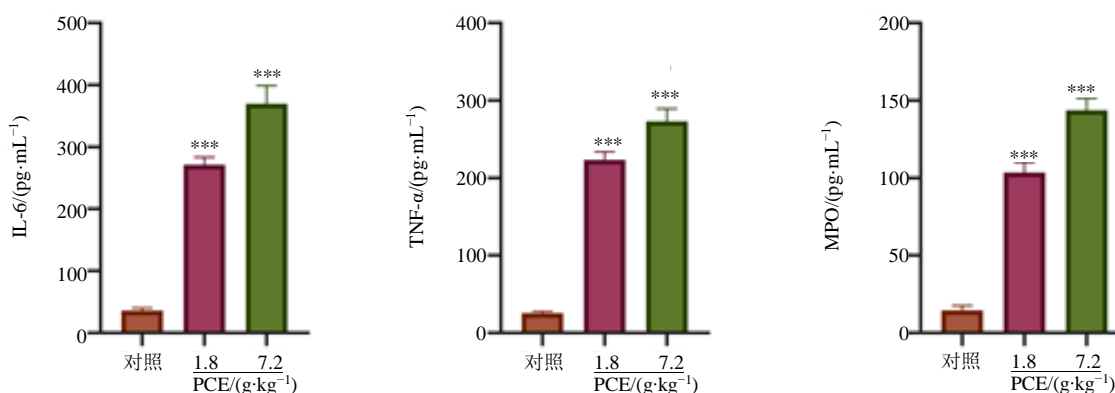


与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 1 各组大鼠血清肝功能生化指标水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Levels of biochemical liver function indicators in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 2 各组大鼠血清炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

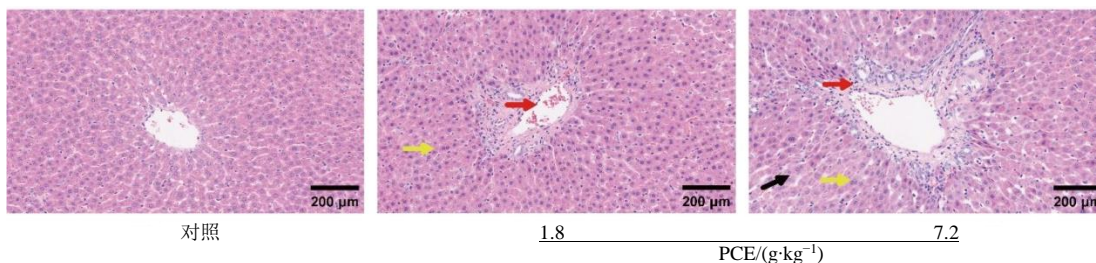
Fig. 2 Serum inflammatory factor levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

著上升 ($P < 0.001$), 表明补骨脂长期大量使用会造成肝损伤同时会引发炎症反应。

2.6 肝组织病理学检查

用 4%多聚甲醛将大鼠新鲜肝组织充分固定,

固定结束后, 取出组织, 脱水, 石蜡包埋, 并切成 4.0 μm 厚度。脱蜡和脱水后, 用于苏木精-伊红(HE)染色, 并在荧光显微镜下观察肝组织病理变化。如图 3 所示, 与对照组相比, PCE 低、高剂量组肝脏切片



黄色箭头-大鼠肝组织脂肪变性; 红色箭头-大鼠肝组织炎症浸润; 黑色箭头-大鼠肝细胞肿胀。

Yellow arrow-steatosis of rat liver tissue; red arrow-inflammatory infiltration of rat liver tissue; black arrow-swelling of rat hepatocytes.

图 3 各组大鼠肝脏 HE 染色

Fig. 3 HE staining of liver in each group of rats

表现出肝细胞肿胀，在局部区域观察到少量淋巴细胞呈灶性浸润（红色箭头），同时在细胞质中可看到体积较小的圆形空泡结构（黄色箭头），甚至出现胞质疏松（黑色箭头），肝细胞损伤严重，呈现广泛的病理改变。

2.7 肝组织中相关毒性成分含量检测

2.7.1 HPLC-MS/MS 条件 使用 AB 质谱仪与 C₁₈ 色谱柱（50 mm×2.1 mm，1.8 μm）联用液相色谱进行色谱分离，使用由洗脱液 A（0.1%的甲酸水溶液）和洗脱液 B（乙腈）组成的双流动相系统进行峰分离。体积流量为 0.3 mL·min⁻¹，梯度洗脱顺序设置如下：0~1 min，5%→34% B；1~3 min，34%→35% B；3~5 min，35%→50% B；5~6 min，50%→95% B；6~7 min，95% B；7~8 min，95%→5% B；8~

10 min，5% B。进样体积为 2 μL。所有处理过的样品均在自动进样器中保持 6 °C。选择正、负离子模式下的多反应监测(MRM)并用于检测和定量分析。ESI 离子源用于监测离子，包括母离子和子离子，负离子模式质谱条件：离子源为 ESI 源；气帘气 (CUR)：0.241 MPa；电离电压 (IS)：-4 500 N；离子源温度 (TEM)：550 °C；喷雾辅助气体：氮气；雾化器气体 (GS1)：0.379 MPa；GS2：0.379 MPa；正离子模式质谱条件：离子源为 ESI 源；CUR：0.241 MPa；喷雾辅助气体：氮气；IS：5 500 N；TEM：600 °C；喷雾辅助气体：氮气；GS1：0.345 MPa；GS2：0.414 MPa。用于化合物离子对优化的收集参数：母离子 Q₁、子离子 Q₃、解簇电压 (DP)、碰撞能量 (CE)，见表 1。

表 1 各化合物离子对优化的收集参数

Table 1 Optimized collection parameters for ion pairs of each compound

化合物英文名称	化合物中文名称	相对分子质量	Q ₁ (m/z)	Q ₃ (m/z)	DP	CE
norbakuchinic acid	诺芭苦基酸	245.11	245.20	173.00	-54.86	-20.85
bavachinin	补骨脂二氢黄酮甲醚	338.40	337.10	119.20	-180.15	-27.10
psoralidin	补骨脂定	336.34	335.10	280.10	-50.49	-34.25
neobavaisoflavone	新补骨脂异黄酮	322.35	321.10	265.00	-186.60	-38.89
bavachalcone	补骨脂查尔酮	324.37	325.00	149.20	68.99	30.20
bavachin	补骨脂甲素	324.37	325.00	149.10	19.59	31.36
Isopsoralen	异补骨脂素	186.16	187.10	130.90	134.58	30.21
psoralen	补骨脂素	186.16	187.00	131.10	115.40	33.87
corylin	补骨脂宁	320.34	319.10	303.00	-199.99	-39.73
rhein (IS)	大黄酸	284.22	283.10	299.10	-213.91	-36.93
scoparone (IS)	滨蒿内酯	206.19	207.20	150.90	115.83	28.16

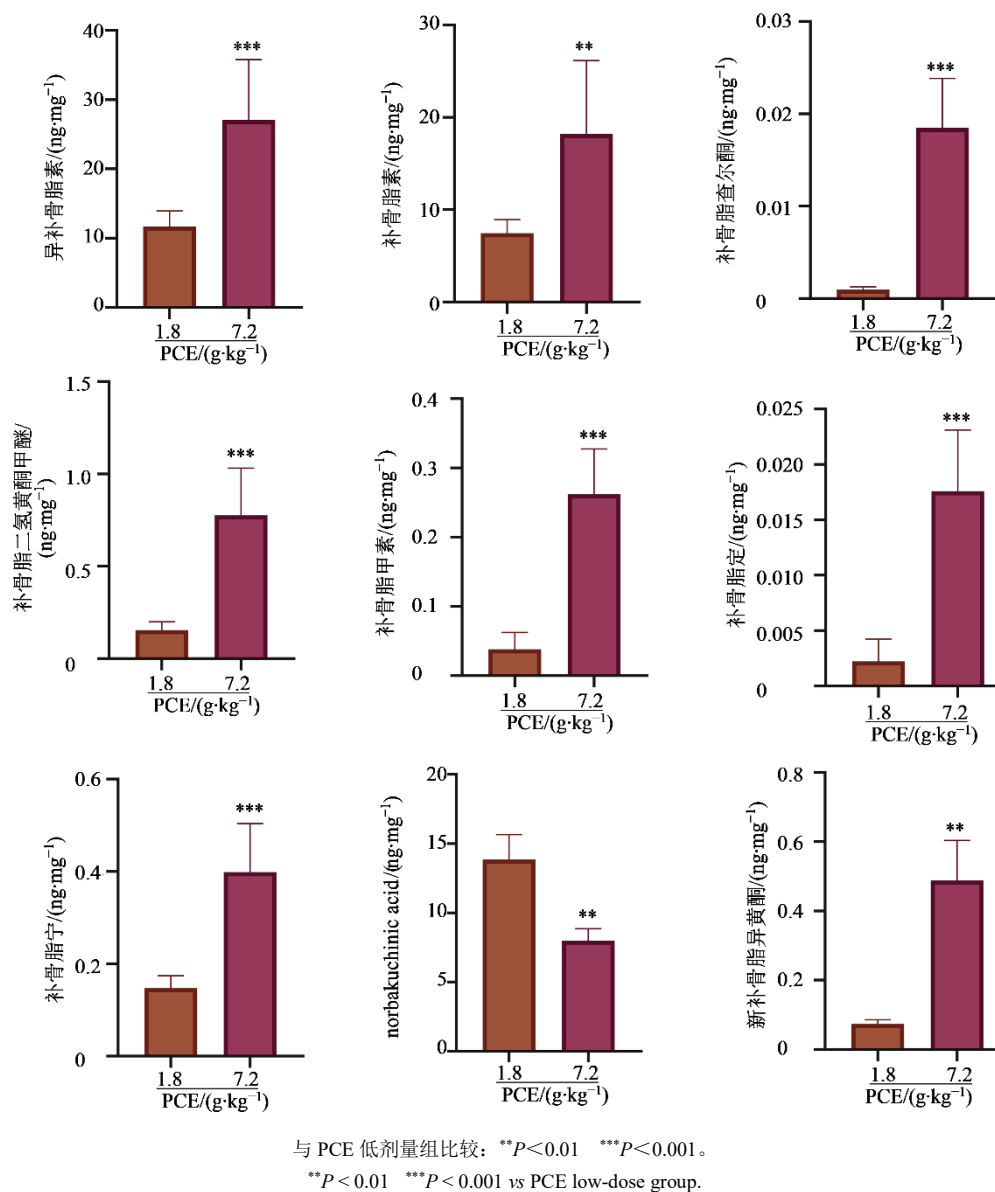
2.7.2 成分分析的肝组织样品制备 取冰冻于 -80 °C 的组织样本解冻后，加入冰 0.9%氯化钠溶液匀浆，取各组织匀浆液 90 μL，加入内标溶液大黄酸和滨蒿内酯 10 μL，再加入 300 μL 乙腈，12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上清用于 HPLC-MS/MS 分析。

2.7.3 专属性 由图 4 可以看到，取空白肝组织匀浆、空白肝组织匀浆加对照品及内标、ig 高剂量 PCE 后的肝组织匀浆加内标按照“2.7.2”项方法处理后，按照“2.7.1”项方法进样分析，各成分之间在此条件下测得的峰形互不影响，且大鼠肝组织中内源性物质不干扰各组分的出峰。

2.7.4 提取回收率及基质效应考察 提取回收率：空白组织中加入内标与对照品溶液，按“2.7.2”项方法处理后，配制成低、中、高 3 个质量浓度的样

品，进样检测，结果与同质量浓度的对照品进行比较。基质效应：将空白组织按“2.7.2”项方法处理后，加入内标与对照品溶液，配制成低、中、高 3 个质量浓度的样品，再进行测定，与同质量浓度的对照品进行比较。化合物在组织中的提取回收率在 85.80%~98.45%，RSD 均小于 15%。化合物的基质效应在 85%~115%，RSD 均小于 15%。结果表明基质效应是可以忽略的，提取回收率也符合相关规定，表明该方法适用于本实验组织样品的处理。

2.7.5 精密度与稳定性考察 将规定质量浓度的对照品溶液分别加入到空白肝组织中，按“2.7.2”项下操作，配制成低、中、高 3 个质量浓度的质控 (QC) 样品，HPLC-MS/MS 进样。每个质量浓度重复 6 份进样分析；连续 3 d 重复试验，计算 QC 样

图 5 补骨脂组大鼠肝损伤成分的含量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 5 Changes in content of liver injury components in psoralea group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

甲氧基胺盐酸盐 ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的吡啶溶液, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡 1.5 h。随后加入 BSTFA (1% TMS) $50 \text{ } \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡 0.5 h。最后将混合物 $18\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 取上清 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 用于代谢组学分析^[7]。

2.8.3 数据处理和统计分析 将原始 GC-MS 数据文件转换为分析基础文件 (ABF) 格式, 并导入质谱数据非依赖型分析软件 (MSDIAL) 软件, 进行峰值检测、去卷积、识别、归一化, 使用 FiehnLib 数据库得到数据矩阵。结合 MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 对数据进行标准化和分析。计算组间 Fold change 值, 设定 $\text{Fold change} > 1.2$ 或 < 0.833 、 $P < 0.05$ 对具有差异的化合

物进行筛选。将差异代谢物名称、峰值等信息导入 MetaboAnalyst 数据库进行聚类分析, 经 Pareto scaling 归一化后采用 Ward 聚类算法绘制热图, Hypergeometric test 进行通路富集分析, 根据 $\text{Impact} > 0.1$ 及 $P < 0.05$ 筛选代谢通路。

2.8.4 非靶向代谢组学分析结果 在肝组织中共得到 68 个代谢物, 见表 3。模式判别分析如图 6-A 所示, 结果表明给药 PCE 高剂量后大鼠肝脏代谢发生显著变化, 各组间区分良好, 代谢物差异显著。与对照组相比, PCE 高剂量组有 33 个代谢物发生改变, 见表 4。主要影响代谢物通路如图 6-B 所示: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 叶酸一碳库, 丙酮

表 3 大鼠肝脏代谢物
Table 3 Metabolites of rat liver

编号	代谢物名称	HMDB	编号	代谢物名称	HMDB
1	丙酮酸	HMDB0000243	35	来苏糖	HMDB0003402
2	乳酸	HMDB0000190	36	木糖醇	HMDB0242149
3	羟基乙酸	HMDB0000115	37	β-甘油磷酸酯	HMDB0002520
4	肌氨酸	HMDB0000271	38	阿糖醇	HMDB0000568
5	2-羟基丁酸	HMDB0341410	39	来苏糖酸-1, 4-内酯	—
6	β-羟丁酸	HMDB0000011	40	鸟氨酸	HMDB0000214
7	N-甲基丙氨酸	HMDB0094692	41	甘油-1-磷酸	HMDB0252849
8	甲醇磷酸盐	—	42	O-磷酸乙醇胺	HMDB0000224
9	缬氨酸	HMDB0000883	43	3-磷酸甘油酸	HMDB0000807
10	4-羟基丁酸	HMDB0000710	44	1, 5-脱水葡萄糖醇	—
11	尿素	HMDB0000294	45	塔格糖2	—
12	甘油	HMDB0000131	46	半乳糖	HMDB0000143
13	磷酸盐	HMDB0001429	47	塔罗糖	—
14	异亮氨酸	HMDB0000172	48	甘露糖	HMDB0000169
15	脯氨酸	HMDB0000162	49	酪氨酸	HMDB0000158
16	甘氨酸	HMDB0000123	50	甘露醇	HMDB0000765
17	琥珀酸	HMDB0000254	51	棕榈酸	HMDB0000220
18	延胡索酸	HMDB0000134	52	葡萄糖酸	HMDB0000625
19	丝氨酸	HMDB0000187	53	半乳糖二酸	HMDB0000639
20	苏氨酸	HMDB0000167	54	黄嘌呤	HMDB0000292
21	天冬氨酸	HMDB0000191	55	N-乙酰-D-半乳糖胺	—
22	β-丙氨酸	HMDB0000056	56	中肌醇	HMDB0000211
23	苹果酸	HMDB0000156	57	亚油酸	HMDB0000673
24	蔗糖醇	HMDB0004136	58	硬脂酸	HMDB0000827
25	蛋氨酸	HMDB0000696	59	果糖-6-磷酸	HMDB0000124
26	奥普洛林	HMDB0000267	60	尿苷	HMDB0000296
27	谷氨酸	HMDB0000148	61	1-单棕榈酸甘油酯	HMDB0011564
28	焦性没食子酸	HMDB0013674	62	肌苷	HMDB0000195
29	蔗糖酸	HMDB0000943	63	黄嘌呤核苷	HMDB0000299
30	1, 2, 4-苯三酚	—	64	乳糖2	—
31	2-羟基联苯	HMDB0032582	65	槐糖	—
32	谷氨酸盐	HMDB0000148	66	生育酚醋酸盐	HMDB0033685
33	苯丙氨酸	HMDB0000159	67	维生素E	HMDB0033685
34	焦磷酸盐	HMDB0000250	68	胆固醇	HMDB0000067

酸代谢，精氨酸生物合成，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，谷胱甘肽代谢，胱氨酸和蛋氨酸代谢通路。

2.9 肝组织靶向组学分析

2.9.1 GC-MS 条件

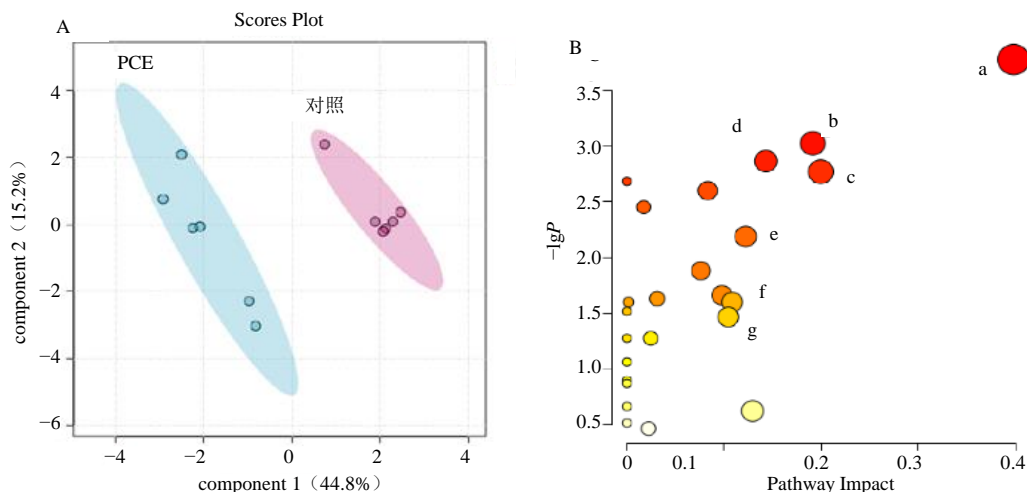
色谱分离条件同非靶向代谢组学条件。靶向分析时，气相色谱仪的温度最初设定为 60 °C，维持 1 min，然后以每分钟 30 °C 的速度升至 100 °C，最后以每分钟 20 °C 的速度升至 300 °C，持续 2 min。各代谢物及内标质谱采集参数

见表 5。

2.9.2 肝组织样品制备及对照品溶液配制

肝组织样品的衍生化方法同“2.8.2”项非靶向组学肝组织处理方法。

取适量的甘氨酸、苏氨酸、丙酮酸、肌氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、鸟氨酸、尿素、瓜氨酸、乳酸、苹果酸对照品，精密称定，溶于甲醇中，取各对照品溶液适量混合，涡旋混匀，即可得质量浓度为 400 mg·mL⁻¹ 混合对照品储备溶液。用甲醇将对照



A-sPLS-DA 得分图; B-差异代谢物代谢通路富集分析气泡图: a-甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, b-丙酮酸代谢, c-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, d-叶酸一碳库, e-精氨酸生物合成, f-谷胱甘肽代谢, g-半胱氨酸和蛋氨酸代谢。

A-sPLS-DA score plot; B-Bubble plot for differential metabolite metabolic pathway enrichment analysis: a-Glycine, serine and threonine metabolism, b-Pyruvate metabolism, c-Alanine, aspartate and glutamate metabolism, d-Folate one-carbon pool, e-Arginine biosynthesis, f-Glutathione metabolism, g-Cysteine and methionine metabolism.

图 6 非靶向代谢组学分析图

Fig. 6 Metabolites of rat liver

表 4 对照组与 PCE 高剂量组大鼠肝脏中差异代谢物

Table 4 Differential metabolites in livers of rats in control group and PCE high-dose group

编号	代谢物名称	PCE vs 对照			编号	代谢物名称	PCE vs 对照		
		P值	FC	趋势			P值	FC	趋势
1	1-2-4-苯三酚	0.002	2.970 0	↑	18	肌氨酸	0.016	0.039 0	↓
2	4-羟基丁酸	0.002	0.010 0	↓	19	苏糖醇	0.001	2.383 0	↑
3	阿糖醇	0.016	1.788 0	↑	20	苏氨酸	0.003	0.005 0	↓
4	富马酸	0.005	0.234 0	↓	21	生育酚醋酸盐	0.035	2.200 0	↑
5	谷氨酸	0.004	0.002 0	↓	22	黄嘌呤	0.001	0.001 0	↓
6	甘氨酸	0.044	0.279 0	↓	23	黄嘌呤核苷	0.006	0.095 0	↓
7	肌苷	0.006	0.068 0	↓	24	2-羟基丁酸	0.012	0.379 6	↓
8	异亮氨酸	0.001	0.024 0	↓	25	半乳糖	0.002	2.448 6	↑
9	乳酸	0.002	2.077 0	↑	26	乳糖2	0.019	95.922	↑
10	蛋氨酸	0.006	0.005 0	↓	27	苹果酸	0.035	0.290 2	↓
11	肌醇	0.030	1.377 0	↑	28	甲醇磷酸盐	0.005	2.080 9	↑
12	N-甲基丙氨酸	0.001	0.041 0	↓	29	鸟氨酸	0.016	0.293 1	↓
13	磷酸盐	0.039	1.330 0	↑	30	槐糖	0.001	9.755 6	↑
14	脯氨酸	0.001	0.005 0	↓	31	塔格糖	0.001	2.381 0	↑
15	焦性没食子酸	0.002	3.686 0	↑	32	塔罗糖	0.004	1.496 3	↑
16	焦磷酸盐	0.043	0.095 0	↓	33	缬氨酸	0.038	0.410 4	↓
17	丙酮酸	0.015	3.757 0	↑					

品溶液逐级稀释后, 18 000 r·min⁻¹、4 °C 离心 10 min, 取上清 50 μL 用于后续靶向代谢组学分析。

2.9.3 靶向代谢组学分析

(1) 各代谢物对照品线性关系考察: 将各对照

品按照“2.9.1”项进行测定, 以峰面积值作为纵坐标, 质量浓度值作为横坐标绘制标准曲线(表 6), *r* 均大于 0.99, 表明各成分在相应的定量范围内具有良好的线性关系。

表 5 各代谢物及内标质谱采集参数

Table 5 Parameters for mass spectrometry collection of each metabolite and internal standard

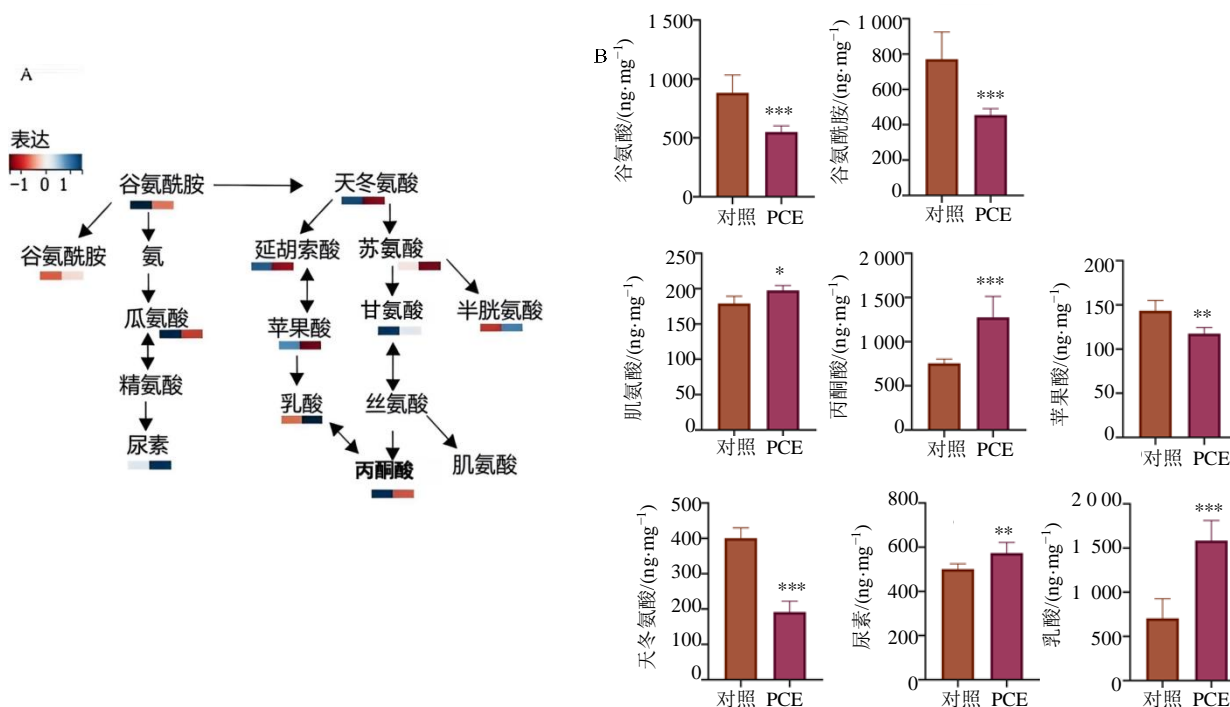
代谢物	<i>t_R</i> /min	Window/ min	Q ₁ (<i>m/z</i>)	Q ₃ (<i>m/z</i>)	CE/V
丙酮酸	4.30	0.8	174.1	74.1	14
乳酸	4.39	0.8	191.2	147.1	8
瓜氨酸	8.47	0.8	128.1	73.0	10
富马酸	6.73	0.8	147.1	73.1	14
苹果酸	7.74	0.8	233.1	73.1	10
谷氨酰胺	9.46	0.8	156.1	73.0	10
谷氨酸	8.54	0.8	246.1	73.0	20
苏氨酸	7.08	0.8	218.1	73.0	14
天冬氨酸	7.94	0.8	176.1	128.1	6
肌氨酸	5.21	0.8	116.1	73.0	10
尿素	6.01	0.8	147.1	73.0	15
1,2- ¹³ C ₂ - 豆蔻酸	9.81	0.8	119.1	75.0	10

表 6 各代谢物线性方程

Table 6 Linear equations of each metabolite

代谢物	线性方程	<i>r</i>
丙酮酸	$Y=0.098\ 9X-0.013$	0.998 3
乳酸	$Y=4.298\ 5X+4.526$	0.992 5
富马酸	$Y=3.430\ 7X-2.020\ 3$	0.997 0
苹果酸	$Y=3.228\ 3X-2.117\ 7$	0.995 6
谷氨酰胺	$Y=2.065\ 1X-11.286$	0.990 5
谷氨酸	$Y=5.073\ X-9.587\ 2$	0.990 2
苏氨酸	$Y=6.359\ 6X-9.033\ 9$	0.992 7
天冬氨酸	$Y=10.612\ X-6.493\ 7$	0.991 6
瓜氨酸	$Y=0.574\ 4X-0.282\ 6$	0.991 3
肌氨酸	$Y=4.911\ 1X-2.237\ 9$	0.999 2
尿素	$Y=5.192\ 6X-25.187$	0.995 7

(2) 各组代谢物含量变化: 对精氨酸生物合成和甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢, 丙酮酸代谢 3 个代谢通路 (图 7-A) 差异代谢物进行分析。与对照



A-甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢, 丙酮酸代谢, 精氨酸生物合成代谢通路中间代谢物含量变化图; B-肝脏组织中甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢, 丙酮酸代谢, 精氨酸生物合成代谢通路中间代谢物含量变化; 与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

A-Graph showing the changes in the contents of intermediate metabolites in the metabolism of glycine, serine, threonine, pyruvate metabolism, and the biosynthesis pathway of arginine; B-Changes in the contents of intermediate metabolites in the metabolism of glycine, serine, threonine, pyruvate metabolism, and the biosynthesis pathway of arginine in liver tissue; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group.

图 7 肝脏组织中靶向氨基酸代谢 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Metabolism of targeted amino acids in liver tissue ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组相比, PCE 高剂量组肌氨酸、丙酮酸、尿素、乳酸、谷氨酰胺、苹果酸、天冬氨酸显著下降 ($P<0.01, 0.001$), 见图 7-B。

4 讨论

本研究结果表明, PCE 长期大量给药可导致大鼠明显肝损伤, 表现为血清 ALT、AST、ALP 及炎症因子 IL-6、TNF- α 、MPO 显著升高, 肝组织出现细胞肿胀、炎症浸润等病理改变。

肝损伤可能与呋喃香豆素及黄酮类成分在肝脏的蓄积有关。补骨脂酚是补骨脂的公认毒性成分, 文献表明补骨脂酚存在吸收差, 首关代谢显著, 生物利用度低, 在其代谢物中 *norbakuchinic acid* 含量最高, 因此本研究中将补骨脂酚含量最高的代谢物进行定量^[14-15]。高剂量组补骨脂酚可能在体内还没完全代谢转化, 相对含量较高, 代谢物 *norbakuchinic acid* 相对较少, 或在体内生成了次级代谢物, 出现了 PCE 高剂量组 *norbakuchinic acid* 含量较低剂量的现象。与低剂量组相比, PCE 高剂量组中肝损伤成分补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂定、补骨脂甲素、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂查尔酮、补骨脂宁、新补骨脂异黄酮的浓度显著升高, 表明毒性成分的蓄积呈剂量相关性。

补骨脂给药后大鼠肝脏代谢谱发生显著变化, 共筛选出 33 个差异代谢物。通路富集分析表明, 这些差异代谢物主要涉及精氨酸生物合成, 甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢, 丙酮酸代谢等通路。苏氨酸是谷胱甘肽前体甘氨酸的代谢来源之一, 通过促进 GSH 合成增强肝脏解毒能力, 有文献报道苏氨酸通过激活 IL-10/信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 通路, 抑制核因子 (NF)- κ B 介导的促炎因子 TNF- α 释放, IL-10 可抑制 Kupffer 细胞的促炎反应, 减少 TNF- α 生成, 从而减轻酒精性肝损伤中的氧化应激^[16]。另一方面苏氨酸代谢生成的 α -酮丁酸可进入三羧酸 (TCA) 循环, 维持能量代谢稳态, 减少活性氧 (ROS) 生成。富马酸作为丙酮酸代谢的中间体, 可能通过补充琥珀酸 (激活 HIF-1 α) 增强缺氧耐受性, 并抑制 ROS 介导的线粒体膜通透性转换开放, 与炎症因子及氧化应激相关^[17]。机体发生氧化应激时, 导致糖酵解增强以及丙酮酸进入线粒体的途径受阻, 使得细胞内丙酮酸的生成增加而消耗减少, 最终导致丙酮酸水平升高。氧化应激状态下线粒体功能发生障碍, 丙酮酸无法正常进入 TCA, 转而生成乳酸, 导致乳酸增加^[18]。有研究表明, NLRP3 炎症小体的激活与氧化应激之间存在紧密联系, 而乳酸的堆积被认为是触发该通路的关键因素^[19]。TCA 循环中间产物包括苹果酸, 会因线粒体

功能障碍而减少。氧化应激时, NH₃ 的生成增加。氨对细胞有毒性, 需要通过尿素循环转化为无毒的尿素排出体外, 氧化应激下, 尿素含量增加以应对氨的毒性, 增强细胞的抗氧化能力^[20-21], 肌氨酸参与能量储存和转运, 氧化应激可能导致能量代谢紊乱, 肌氨酸的合成受到抑制^[22]。进一步靶向代谢组学分析显示, 与对照组相比, 补骨脂高剂量组肌氨酸、丙酮酸、尿素、乳酸、苹果酸含量升高, 而苏氨酸、瓜氨酸、谷氨酸、富马酸、天冬氨酸、甘氨酸含量下降。这一代谢紊乱模式提示, 补骨脂可能通过干扰氨基酸代谢及三羧酸循环, 影响线粒体功能及尿素循环, 破坏肝细胞能量代谢与氧化还原平衡, 从而诱发肝损伤。

本研究以补骨脂所致肝损伤大鼠为模型, HPLC-MS 分析肝损伤成分含量变化, 结合 GC-MS 代谢组学分析肝脏中内源性代谢物的差异及含量, 综合分析得出, 补骨脂致肝损伤的机制与其活性成分在肝脏的蓄积及其所引发的氨基酸代谢网络紊乱密切相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 夏亚楠. 补骨脂盐炙缓和燥毒之性的物质基础研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
Xia Y N. Research on the material basis of the soothing toxicity effect of *Cuscuta chinensis* salt-impregnated preparation [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2025.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2025.
- [3] 冯科冉, 吴娅丽, 李伟霞, 等. 补骨脂肝毒性及其减毒方法的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(7): 162-165.
Feng K R, Wu Y L, Li W X, et al. Research progress on hepatotoxicity of Buguzhi (*Psoraleae fructus*) and its attenuation methods [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(7): 162-165.
- [4] 许颖杰, 湛小燕, 柏兆方, 等. 从古今文献效/毒记载演变探讨补骨脂安全性与安全合理用药对策 [J]. 药学报, 2025, 60(2): 314-322.
Xu Y J, Zhan X Y, Bai Z F, et al. Exploring the safety and the countermeasures of rational use of *Psoraleae Fructus* based on the evolution of efficacy/toxicity records in ancient and modern literature [J]. Acta Pharm Sin, 2025,

- 60(2): 314-322.
- [5] Wu Y, Min L T, Xu Y, et al. Combination of molecular docking and liver transcription sequencing analysis for the evaluation of salt-processed *Psoraleae Fructus*-induced hepatotoxicity in ovariectomized mice [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 288: 114955.
- [6] 杨宇婷, 陈亮亮, 杨娟娟, 等. 补骨脂肝毒性及配伍减毒机制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(1): 84-90.
- Yang Y T, Chen L L, Yang J J, et al. Research progress on hepatotoxicity of Buguzhi (*Psoraleae Fructus*) and its mechanism of compatibility and attenuation [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2025, 27(1): 84-90.
- [7] Wang Y, Zhang H, Jiang J M, et al. Hepatotoxicity induced by psoralen and isopsoralen from *Fructus Psoraleae*: Wistar rats are more vulnerable than ICR mice [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 125: 133-140.
- [8] 杨阔, 高茸, 申宝德, 等. 异补骨脂素的药理作用和肝肾损伤机制研究进展 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(11): 1399-1403, 1408.
- Yang K, Gao R, Shen B D, et al. Progress of pharmacological effects and mechanism of hepatic and renal damage of isopsoralen [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2021, 21(11): 1399-1403, 1408.
- [9] 杨阔, 高茸, 马亚中, 等. 补骨脂素药理作用及肝毒性机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 289-298.
- Yang K, Gao R, Ma Y Z, et al. Research progress on mechanism of pharmacological effects and hepatotoxicity of psoralen [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(1): 289-298.
- [10] Yang Y, Tang X L, Hao F R, et al. Bavachin induces apoptosis through mitochondrial regulated ER stress pathway in HepG2 cells [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(2): 198-207.
- [11] Wang X X, Lv X, Li S Y, et al. Identification and characterization of naturally occurring inhibitors against UDP-glucuronosyltransferase 1A1 in *Fructus Psoraleae* (Bu-gu-Zhi) [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 289(1): 70-78.
- [12] 张琴, 王富江, 汪斌, 等. 基于代谢组学探讨蒲参胶囊对何首乌特异质肝损伤代谢物的影响 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(5): 63-69.
- Zhang Q, Wang F J, Wang B, et al. Effect of pushen (蒲参) capsules on metabolites of heterogeneous liver injury induced by *Polygonum multiflorum* based on metabolomics [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(5): 63-69.
- [13] Zhang W, Cai S H, Qin L H, et al. Alkaloids of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* inhibit growth of non-small cell lung cancer by regulating PI3K/Akt-mTOR signaling and glycolysis [J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 1118.
- [14] 马袁静, 许伟辰, 单进军, 等. 基于 GC-MS 代谢组学的牛黄解毒片配伍减毒机制研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(8): 823-830.
- Ma Y J, Xu W C, Shan J J, et al. Study on the detoxification mechanism of Niuhuang Jiedu Tablets based on GC-MS metabolomics [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2024, 40(8): 823-830.
- [15] 胡超. 基于代谢组学的补骨脂安全性评价及补骨脂酚的体内代谢研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2016.
- Hu C. Safety Evaluation of *Cinnamomum Cassia* and *in vivo* metabolism study of cinnamaldehyde phenol based on metabolomics [D]. Wuhan: Central South University of Technology, 2016.
- [16] Wang P L, Zhang F X, Qiu Z C, et al. Isolation and identification of metabolites of bakuchiol in rats [J]. Fitoterapia, 2016, 109: 31-38.
- [17] Lampson B L, Ramírez A S, Baro M, et al. Positive selection CRISPR screens reveal a druggable pocket in an oligosaccharyl transferase required for inflammatory signaling to NF- κ B [J]. Cell, 2024, 187(9): 2209-2223.e16.
- [18] Guo D, Yu Q J, Tong Y Y, et al. OXCT1 succinylation and activation by SUCLA2 promotes ketolysis and liver tumor growth [J]. Mol Cell, 2025, 85(4): 843-856.e6.
- [19] Zhang Q, Liu Y N, Thanapaisai S, et al. The effect of tube location on corneal endothelial cells in patients with Ahmed glaucoma valve [J]. Ophthalmology, 2021, 128(2): 218-226.
- [20] 王淼. NLRP3 炎症小体激活在高尿酸环境中介导肾小管上皮细胞损伤 [D]. 芜湖: 皖南医学院, 2022.
- Wang M. Activation of NLRP3 inflammasome mediates renal tubular epithelial cell injury in hyperuricemic environment [D]. Wuhu: Wannan Medical College, 2022.
- [21] 姬华祎. 谷氨酰胺通过 ERS 途径对新生大鼠高氧肺损伤的干预作用 [D]. 延边: 延边大学, 2021.
- Ji H Y. The intervention effect of glutamine via the ERS pathway on hyperoxic lung injury in neonatal rats [D]. Yanbian: Yanbian University, 2021.

[责任编辑 兰新新]