

• 药理与临床 •

基于脂肪酸代谢轮廓分析川楝子的肝毒性研究

熊印华¹, 刘晓杰¹, 王新堂², 杨莉^{2*}, 王峥涛^{2*}

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: **目的** 从脂肪酸代谢轮廓的角度评价川楝子(TF)水提醇沉物和川楝子+延胡索(TF+CR)水提醇沉物的小鼠肝毒性。**方法** 采用气相-质谱联用技术定量分析对照组、TF组和TF+CR组小鼠血清中15种游离脂肪酸和酯化脂肪酸,结合化学计量学方法分析小鼠给药后脂肪酸代谢轮廓的变化和生物标识物。**结果** 血清脂肪酸定量测定结果经主成分分析表明TF给药后小鼠的血清脂肪酸代谢轮廓明显偏离正常水平,而具有保肝作用的CR可逆转这种偏离;偏最小二乘法-判别分析表明棕榈油酸、十八碳烯酸和花生四烯酸对表征TF小鼠肝毒性具有重要贡献,可作为评价TF肝毒性的生物标识物。**结论** TF肝毒性与脂肪酸的代谢轮廓密切相关。**关键词:** 川楝子; 延胡索; 脂肪酸; 肝毒性; 代谢轮廓; 棕榈油酸; 十八碳烯酸; 花生四烯酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)15-3104-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.014

Evaluation of *Toosendan Fructus*-induced hepatotoxicity based on metabolic profile of fatty acidsXIONG Yin-hua¹, LIU Xiao-jie¹, WANG Xin-tang², YANG Li², WANG Zheng-tao²

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: Objective To evaluate the hepatotoxicity caused by water extract with alcohol precipitating of *Toosendan Fructus* (TF) and *Toosendan Fructus* + *Corydalis Rhizoma* (TF + CR) based on metabolic profiling of fatty acids in mice serum. **Methods** A gas chromatography-mass spectrometry method was applied for simultaneous quantification of 15 fatty acids, including both non-esterified and esterified fatty acids, in the serum of control, TF-treated, and TF + CR-treated mice. Meanwhile, the change of fatty acid metabolic profile in liver injured mice was analyzed by principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). **Results** The result of PCA showed that the metabolic profile of serum fatty acids in TF-treated mice significantly deviated from the normal level, and CR with hepatoprotective effect could obviously reverse the deviation. More importantly, the result of PLS-DA illustrated that palmitoleic acid, vaccenic acid, and arachidonic acid had important contribution on the hepatotoxicity induced by TF. Therefore, the three fatty acids were identified as potential biomarkers. **Conclusion** Hepatotoxicity caused by TF has a good correlation with the metabolic profiling of fatty acid. The project can provide foundation for further investigation on the evaluation and mechanism of TF-induced hepatotoxicity.

Key words: *Toosendan Fructus*; *Corydalis Rhizoma*; fatty acids; hepatotoxicity; metabolic profile; palmitoleic acid; vaccenic acid; arachidonic acid

川楝子为楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sied. 具有舒肝、行气止痛、驱虫的功效^[1]。长期服用川楝子后血清转氨酶活性增高,产生类似中毒性肝炎 Et Zucc. 的成熟果实。川楝子性寒、味苦、有小毒,

收稿日期: 2017-02-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81660692); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ14598); 江西科技师范大学研究生创新专项基金项目(YC2016-X17)

作者简介: 熊印华(1979—), 博士, 主要研究方向为代谢组学和中药毒性。Tel: (0791)83802393 E-mail: xiongyhfriend@126.com

*通信作者 杨莉 Tel/Fax: (021)51322506 E-mail: yangli7951@hotmail.com

王峥涛 Tel: (021)51322507 Fax: (021)51322519 E-mail: wangzht@hotmail.com

的临床症状。现代药理研究表明,川楝子能引起小鼠急性肝损伤甚至死亡,且具有毒性时效和量效的关系^[2]。川楝子的肝毒性成分川楝素的毒性机制与线粒体功能异常和 caspase 活化有关^[3]。延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎,具有活血、利气、止痛的功效^[1]。延胡索与川楝子的配伍在中医上称为金铃子散,是疏肝泄热、理气止痛的基础方剂。延胡索有效成分延胡索乙素对化学肝损伤具有显著的保护作用^[4],但延胡索对川楝子肝毒性的减毒作用及其机制的研究未见报道。研究表明药源性肝损伤可引起肝细胞线粒体功能紊乱^[5],肝脏在脂肪酸合成和 β -氧化代谢及维持机体内脂肪酸水平方面发挥重要作用,因此药源性肝损伤必然引起脂肪酸水平和代谢轮廓的变化。

目前川楝子肝毒性的研究仅限于常规的药理和毒理实验,川楝子给药后生物体内脂肪酸水平和代谢轮廓的变化未见报道,因此,川楝子对脂肪酸代谢通路的影响研究具有重要意义。本研究在川楝子致小鼠肝损伤的药理实验基础上,采用气相-质谱联用分析技术定量分析小鼠血清中 15 种游离脂肪酸和酯化脂肪酸,结合主成分分析(PCA)和偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)等多变量统计分析方法分析小鼠血清脂肪酸代谢轮廓的变化和川楝子肝毒性的生物标识物,为进一步研究川楝子的肝毒性机制奠定基础,为其他肝毒中药的毒性评价和毒性机制的研究提供新思路和方法。

1 材料

1.1 药材与试剂

川楝子(产地四川,批号 101102)和延胡索(产地浙江,批号 110808)购于上海康桥中药饮片有限公司,由上海中医药大学吴立宏研究员鉴定分别为楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sied. Et Zucc. 和罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang。天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)生化试剂盒购于上海荣盛生物药业有限公司。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)、十八碳烯酸(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)和二十二碳六烯酸(C22:6n3)购于美国 Sigma 公司。十九碳

二烯酸(C19:2n10)及其甲酯购于美国 Nu-Chek Prep 公司。色谱纯甲醇和正己烷购于美国 Tedia 公司。分析纯浓硫酸和氢氧化钾购于上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 动物

ICR 雄性小鼠,清洁级,体质量 20~25 g,共 24 只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2008-0016,饲养于上海中医药大学实验动物中心屏障动物房,室温(20±2)℃,相对湿度 60%~70%。

1.3 仪器

6890 气相-5975 质谱联用仪(Agilent Technologies, 美国);Power Wave XS 酶标仪(Bio-Tek Instruments, 美国);Avanti J-25 离心机(Beckman Coulter, 德国);Vortex-Genie2 涡旋仪(Scientific industries, 美国)。

2 方法

2.1 供试药物制备

2.1.1 川楝子(TF)提取物 TF粗粉,用 20 倍体积水煎煮 1 h, 5 000×g 离心,上清液浓缩至生药 1.5 g/mL 浸膏,再加 70%乙醇进行醇沉,离心,上清液浓缩至生药 4 g/mL 的浸膏,放置 4℃冰箱保存。

2.1.2 川楝子+延胡索(TF+CR)提取物 TF和 CR 粗粉(配比 1:1),按照 TF 的提取方法进行提取,最后浓缩至生药 8 g/mL 的浸膏,放置 4℃冰箱保存。

2.2 动物处理

24 只雄性 ICR 小鼠喂养 1 周后,放入代谢笼中,随机分为对照组、TF 组和 TF+CR 组。TF 组给药剂量为 90 g/kg,TF+CR 组给药剂量为 180 g/kg,对照组给予相同量的生理盐水,ig 给药。给药 24 h 后眼球静脉丛取全血,供分析 ALT、AST 活性和脂肪酸水平。

2.3 ALT、AST 活性测定

全血室温静置 1 h,4℃离心(1 000×g)10 min,取上层血清于 Eppendorf 离心管中,-80℃保存。血清中 ALT 和 AST 活性,按试剂盒说明方法测定。

2.4 脂肪酸定量分析

2.4.1 血清样品制备 参考文献方法^[6],100 μ L 血清和 20 μ L 内标溶液(C19:2n10 及其甲酯,1 mg/mL)置于离心管内混合,加入 0.4 mol/L KOH 甲醇溶液 1 mL,室温反应 10 min,用正己烷萃取 2 次,N₂

吹干, 用 1 mL 正己烷复溶得到酯化脂肪酸供试品溶液; 剩余部分加 5% H_2SO_4 甲醇溶液 1 mL, 70 °C 反应 30 min, 采用上述相同的方法处理得到游离脂肪酸供试品溶液。

2.4.2 色谱条件与质谱条件 DB-225MS 毛细管色谱柱 (60 m×0.25 mm, 0.25 μm); 升温程序: 初始温度 70 °C (保持 1 min), 首先以 40 °C/min 速度升至 200 °C (保持 20 min), 再以 5 °C/min 速度升至 230 °C (保持 25 min); 进样口和传输线温度均为 230 °C, 载气为高纯度氦气, 体积流量为 1.0 mL/min, 不分流进样。离子源为 EI, 离子源温度 200 °C, 四极杆温度 150 °C, 选择离子扫描模式^[7]。

2.4.3 对照品溶液的制备及标准曲线建立 精密称取每种脂肪酸对照品 (共 15 种), 用正己烷或甲醇配制成 5 mg/mL 对照品贮备液。取每种脂肪酸对照品贮备液 20 μL 至离心管, N_2 吹干, 用 5% H_2SO_4 甲醇溶液进行衍生化, 使游离脂肪酸转变为能用气相-质谱联用仪分析的脂肪酸甲酯。用正己烷配制成 1 mg/mL 脂肪酸甲酯贮备液, 再逐步稀释成含内标 (C19:2n10 甲酯, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 100、50、25、15、10、5、2、1、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的脂肪酸甲酯对照品校正溶液, 用于绘制 15 种脂肪酸的标准曲线, 求得回归方程。

2.4.4 样品测定 分别取“2.4.1”项酯化脂肪酸和游离脂肪酸供试品 0.2 μL , 按标准曲线法测定脂肪酸的量。

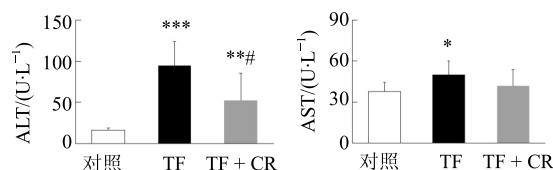
2.5 统计学处理

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 12.0 软件进行 t 检验; Simca-P13.0 软件 (Umetrics, Umea, 瑞典) 进行 PLS-DA 和 PCA。

3 结果

3.1 对小鼠 ALT 和 AST 的影响

ALT 和 AST 是目前临床诊断肝损伤的最常用的血清生化指标, 本实验通过这 2 个酶活性来评价 TF 提取物和 TF+CR 提取物致小鼠肝损伤的程度。结果见图 1, 与对照组比较, TF 组 AST 和 ALT 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001); TF+CR 组 ALT 活性显著升高 ($P < 0.01$), AST 活性没有显著变化 ($P > 0.05$)。与 TF 组比较, TF+CR 组 ALT 活性显著降低 ($P < 0.01$), AST 活性无显著差异 ($P > 0.05$)。实验结果表明, TF 提取物 (90 g/kg) 对小鼠具有明显的肝毒性, 而 TF+CR 提取物 (180 g/kg, 配比 1:1) 对小鼠的肝毒性较小。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 TF 组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs TF group

图 1 各组小鼠 ALT 和 AST 活性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 1 Comparison on activities of ALT and AST of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3.2 脂肪酸定量分析

TF 和 TF+CR 水提醇沉物给药 24 h 后小鼠血清中 15 种游离脂肪酸水平变化见表 1。与对照组比较, TF 组 C16:1n7、C18:1n7、C20:3n6 和 C20:5n3 的量显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001), 而 C20:4n6 的量显著降低 ($P < 0.05$); TF+CR 组的 C20:4n6 和 C22:6n3 的量显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 其他脂肪酸的量均没有显著的变化 ($P > 0.05$)。与 TF 组比较, TF+CR 组 C16:1n7 和 C18:1n7 的量显著下调 ($P < 0.01$) 并接近对照组水平, C20:4n6 和 C22:6n3 的量显著上调 ($P < 0.01$)。

TF 和 TF+CR 水提醇沉物给药 24 h 后小鼠血清中 15 种酯化脂肪酸水平变化见表 2。与对照组比较, TF 组 C16:1n7、C18:1n9、C18:1n7、C18:3n3、C20:3n6 和 C20:5n3 的水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.001), C20:4n6 和 C18:0 的水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001)。与 TF 组比较, TF+CR 组 C16:1n7、C18:1n7 和 C20:3n6 的水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001), 而 C20:4n6 和 C22:6n3 的水平则显著上调 ($P < 0.01$ 、0.001), 且在 TF 组中显著升高的 C16:1n7、C18:1n7、C20:3n6 和 C20:4n6 的量均回调至对照组水平。结果表明, TF 组小鼠血清脂肪酸代谢水平发生显著的变化, 而 TF+CR 组小鼠血清脂肪酸代谢水平接近正常水平。

3.3 多变量统计分析

3.3.1 PCA 以游离脂肪酸和酯化脂肪酸的量为 X 变量, 将对照组、TF 组和 TF+CR 组共 24 个样品做 2 主成分的 PCA 分析, 该模型能解释 60.7% 原始数据。如图 2-A 所示, 在二维散点图上对照组和 TF 组的样本比较集中, 而 TF+CR 组的样本离散度较大; 对照组与 TF+CR 组的样本交织在一起, 但均

表 1 TF 和 TF+CR 对小鼠血清中游离脂肪酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of TF and TF + CR on concentration of non-esterified fatty acids in mice serum ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	游离脂肪酸($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)							
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1n7	C17:0	C18:0	C18:1n9	C18:1n7
对照	12.98 $\pm$ 0.87	18.52 $\pm$ 1.99	492.55 $\pm$ 57.47	11.90 $\pm$ 3.31	9.44 $\pm$ 2.15	262.22 $\pm$ 64.08	85.29 $\pm$ 5.95	13.30 $\pm$ 1.77
TF	13.29 $\pm$ 0.80	19.41 $\pm$ 4.08	426.92 $\pm$ 89.85	16.11 $\pm$ 2.89*	9.89 $\pm$ 2.34	259.82 $\pm$ 63.61	92.10 $\pm$ 12.92	22.56 $\pm$ 3.68***
TF+CR	13.40 $\pm$ 1.41	19.81 $\pm$ 3.98	419.05 $\pm$ 55.63	9.40 $\pm$ 3.89###	11.19 $\pm$ 1.53	298.90 $\pm$ 88.81	77.75 $\pm$ 23.00	14.40 $\pm$ 4.57###

组别	游离脂肪酸($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
	C18:2n6	C18:3n3	C20:0	C20:3n6	C20:4n6	C20:5n3	C22:6n3
对照	160.02 $\pm$ 12.57	11.80 $\pm$ 1.57	12.15 $\pm$ 1.62	9.22 $\pm$ 1.67	35.82 $\pm$ 4.36	10.07 $\pm$ 1.82	64.06 $\pm$ 10.21
TF	150.26 $\pm$ 21.87	11.00 $\pm$ 2.26	12.62 $\pm$ 1.00	12.29 $\pm$ 1.43*	30.06 $\pm$ 3.66*	13.48 $\pm$ 2.57*	67.03 $\pm$ 9.11
TF+CR	160.93 $\pm$ 43.57	11.15 $\pm$ 2.57	11.83 $\pm$ 1.32	11.16 $\pm$ 2.67	47.83 $\pm$ 11.82*##	12.60 $\pm$ 2.38	90.29 $\pm$ 18.94***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 TF 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs TF group, same as below

表 2 TF 和 TF+CR 对小鼠血清中酯化脂肪酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of TF and TF+CR on concentration of esterified fatty acids in mice serum ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	酯化脂肪酸($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)							
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1n7	C17:0	C18:0	C18:1n9	C18:1n7
对照	13.09 $\pm$ 0.41	14.15 $\pm$ 0.55	376.95 $\pm$ 56.95	7.65 $\pm$ 0.82	9.79 $\pm$ 1.00	180.93 $\pm$ 14.25	134.53 $\pm$ 23.09	23.03 $\pm$ 3.97
TF	13.94 $\pm$ 0.87	13.86 $\pm$ 1.17	357.23 $\pm$ 49.11	21.69 $\pm$ 6.26***	9.09 $\pm$ 1.25	154.50 $\pm$ 24.17*	193.50 $\pm$ 21.39***	49.81 $\pm$ 8.84***
TF+CR	13.39 $\pm$ 0.63	13.83 $\pm$ 0.71	369.44 $\pm$ 107.94	9.35 $\pm$ 2.67####	9.18 $\pm$ 1.46	159.96 $\pm$ 60.05	161.25 $\pm$ 50.21	23.87 $\pm$ 6.02####

组别	酯化脂肪酸($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
	C18:2n6	C18:3n3	C20:0	C20:3n6	C20:4n6	C20:5n3	C22:6n3
对照	457.24 $\pm$ 44.22	9.52 $\pm$ 1.33	5.51 $\pm$ 1.05	26.65 $\pm$ 3.40	173.28 $\pm$ 23.04	20.06 $\pm$ 5.73	188.93 $\pm$ 32.80
TF	450.35 $\pm$ 39.70	11.78 $\pm$ 1.59*	5.99 $\pm$ 0.64	32.95 $\pm$ 4.86*	118.73 $\pm$ 16.48***	29.92 $\pm$ 7.86*	173.62 $\pm$ 31.23
TF+CR	477.17 $\pm$ 121.71	11.47 $\pm$ 2.94	5.37 $\pm$ 1.04	26.53 $\pm$ 5.49#	192.35 $\pm$ 28.92####	24.16 $\pm$ 5.50	252.17 $\pm$ 65.36*##

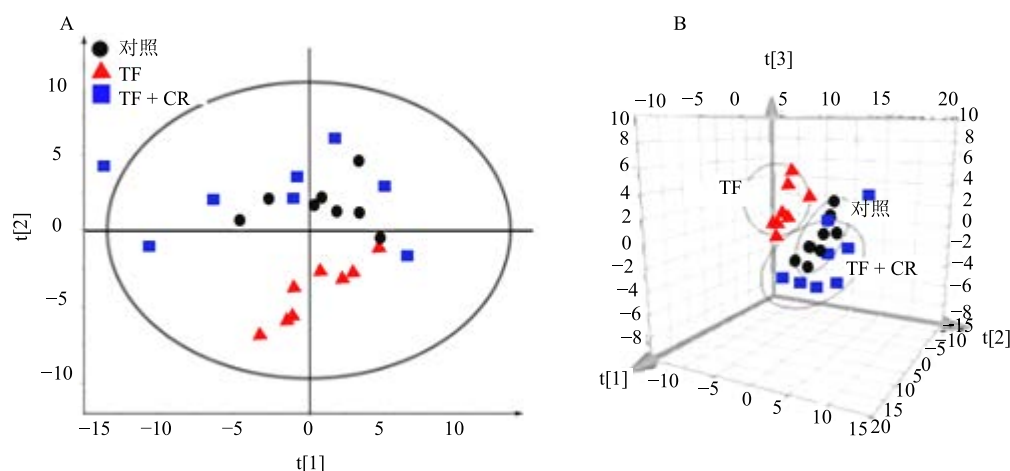


图 2 PCA 的二维散点图 (A) 和三维散点图 (B)

Fig. 2 2D score plot (A) and 3D score plot (B) of PCA

能与 TF 组的样本基本区分。在此基础上, 做 3 主成分的 PCA 分析, 该模型显著提高了对原始数据的解释能力 ($R^2_{\text{X}}=72.7\%$)。在三维散点图 (图 2-B)

上 TF 组的样本与对照组和 TF+CR 组的样本能完全区分, 且能明显地观察到 TF+CR 组的样本有向 TF 组相反矢量方向偏离正常水平的趋势。PCA 分

析表明 TF 与 TF+CR 对脂肪酸代谢的影响模式不同。因此从脂肪酸代谢轮廓层面上可以推测出 TF (90 g/kg) 对小鼠肝脏毒性要比 TF+CR (180 g/kg, 配比 1:1) 大。

3.3.2 PLS-DA 为了发现能够表征 TF 肝毒性的脂肪酸生物标识物, 对对照组和 TF 组进行 PLS-DA 建模。以游离脂肪酸的量为 X 变量和组别为 Y 变量建立 2 主成分的 PLS-DA 模型。对该模型的 VIP 值大于 1.0 的变量做 t 检验, 发现 C16:0、C18:0 和 C18:2n6 的量在 2 组间没有显著变化 ($P>0.05$), 因此把这 3 个脂肪酸从变量中剔除并重新建立一个 2 主成分的 PLS-DA 模型 ($R^2_X=51.6\%$, $R^2_Y=86.8\%$, $Q^2=55.2\%$)。对该模型进行置换检验 ($n=100$),

如图 3-A 所示, 图中两条回归直线斜率较大, 左端任何一次的随机排列产生的 Q^2 和 R^2 均小于最右端的原始值, 且 Q^2 的回归截距为负值 (-0.268), 说明原始模型的预测能力大于任何一次随机排列 Y 变量的预测能力, 证明该模型未过度拟合, 可进一步分析。根据该模型的载荷图和 VIP 值 (图 3-B、C), 可知 C18:1n7、C16:1n7、C20:4n6 是受到 TF 诱导小鼠肝毒性影响较大的游离脂肪酸, t 检验表明这 3 个脂肪酸在对照组和 TF 组之间均有显著差异 ($P<0.05$ 、 0.001), 且在 TF+CR 组中均有回调趋势 (表 1)。上述分析提示, C18:1n7、C16:1n7、C20:4n6 可能是表征 TF 肝毒性的潜在生物标识物。

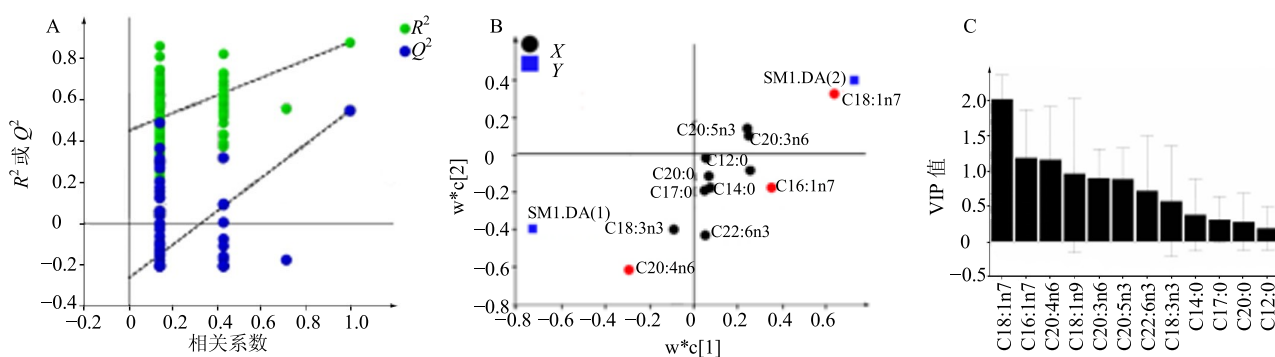


图 3 PLS-DA 模型的置换检验模型验证图 (A)、载荷图 (B) 和 VIP 图 (C)

Fig. 3 Permutation test model validation plot (A), loading plot (B) and VIP plot (C) of PLS-DA model between control and TF groups

4 讨论

脂肪酸是由乙酰辅酶 A 作为前体在肝脏中合成的内源性物质, 在正常情况下, 脂肪酸代谢是处于平衡状态, 但由于脂肪酸的代谢受到阻断造成某些具有细胞毒性的脂肪酸的淤积, 可以损伤细胞膜、线粒体膜和溶酶体膜等引起细胞内微器官的损坏, 导致肝实质变性、炎性细胞浸润和纤维化等改变^[7]。体循环中 ω -6/ ω -3 多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^[8]。由此可见, 体循环中脂肪酸的代谢轮廓与肝毒性存在密切的关系。根据 PCA 的结果, 肝毒性较大的 TF 组的小鼠的血清脂肪酸代谢轮廓发生较大的变化, 明显偏离正常水平; 而肝毒性很小的 TF+CR 组的小鼠的脂肪酸代谢轮廓更接近于正常水平, 甚至有向相反的矢量方向迁移的趋势。上述分析的结果表明脂肪酸代谢轮廓与 TF 肝毒性密切相关, 从脂肪酸的代谢层面上可以评价 TF 的肝毒性。

TF 肝毒性与氧自由基导致的氧化损伤与炎症因子有关^[9]。C20:4n6 属于 ω -6 多不饱和脂肪酸, 是前列腺素、白三烯和血栓素等炎症介质合成的前体。磷脂酶 A₂ 调控磷脂转化为溶血磷脂并释放出一个 C20:4n6 分子, 是 C20:4n6 代谢通路的关键限速酶。TF 组游离 C20:4n6 和酯化 C20:4n6 的量均显著降低, 表明毒性剂量的 TF 可能上调磷脂酶 A₂ 的活性, 释放出 C20:4n6, 激活 C20:4n6 的炎症级联代谢通路, 代谢产生大量炎症因子导致肝脏实质变性, 炎性细胞浸润等。C18:1n7 和 C16:1n7 属于 ω -7 单不饱和脂肪酸, TF 组 C18:1n7 和 C16:1n7 的量均显著性升高。C18:1n7 可以调节脂肪酸代谢, 影响 PPAR 代谢通路和炎症标记物, 对炎症具有一定治疗作用^[10-11]。C16:1n7 可以通过调节 dihydroceramide desaturase 1 (DES1) 活性抑制 caspase 9 激活信号通路来逆转肝细胞凋亡^[12]。有研究表明 TF 的肝毒性成分川楝素的毒性机制与

caspase 激活化有关^[3]。因此,推测 TF 给药后小鼠体内通过上调这 2 个脂肪酸水平对抗 TF 的肝毒性。基于以上的分析,C18:1n7、C16:1n7 和 C20:4n6 等脂肪酸可以作为表征 TF 致小鼠肝毒性的重要生物标识物。

C22:6n3 是属于 ω -3 多不饱和脂肪酸,C22:6n3 及其代谢产物均能够显著抑制 C20:4n6 级联炎症代谢通路上磷脂酶 A₂ 和环氧化酶 2 等关键酶的活性,具有很强抗炎效果^[13-15]。与 TF 组比较,TF+CR 组的 C22:6n3 和 C20:4n6 的量均显著升高,推测 CR 可以上调 C22:6n3 水平抑制 C20:4n6 级联的炎症代谢通路保护肝脏,这可能是 CR 减轻 TF 肝毒性的分子作用机制之一。

本研究以脂肪酸代谢为切入点,评价了 TF 和 TF+CR 对小鼠的肝毒性,探讨与 TF 肝毒性相关的脂肪酸代谢轮廓和生物标识物,为 TF 肝毒性机制的阐明奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 齐双岩,熊岩红,金若敏. 川楝子致小鼠肝毒性时效、量效关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2694-2696.
- [3] Zhang Y, Qi X, Gong L, *et al.* Roles of reactive oxygen species and MAP kinases in the primary rat hepatocytes death induced by toosendanin [J]. *Toxicology*, 2008, 249(1): 62-68.
- [4] 闵清,白育庭,舒思洁. 延胡索乙素对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(6): 483-484.
- [5] 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(4): 335-353.
- [6] Xiong Y H, 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(2): 149-157.
- [7] Day C P. Pathogenesis of steatohepatitis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002, 16(5): 663-678.
- [8] Schmöcker C, Weylandt K H, Kahlke L, *et al.* ω -3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines [J]. *Hepatology*, 2007, 45(4): 864-869.
- [9] 齐双岩,金若敏,刘红杰,等. 川楝子致大鼠肝毒性机制研究 [J]. 中国中医药杂志, 2008, 33(16): 2045-2046.
- [10] Zong G, Ye X, Sun L, *et al.* Associations of erythrocyte palmitoleic acid with adipokines, inflammatory markers, and the metabolic syndrome in middle-age and older Chinese [J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 96(5): 970-976.
- [11] Souza C O, Teixeira A A, Lima E A, *et al.* Palmitoleic acid (*n*-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPAR α [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 582197-582209.
- [12] Zhu Q, Yang J, Zhu R, *et al.* Dihydroceramide-desaturase-1-mediated caspase 9 activation through ceramide plays a pivotal role in palmitic acid-induced HepG2 cell apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(9): 1033-1044.
- [13] El-Mowafy A M, Katary M M, 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*, 2016, doi:10.1016/j.heliyon.2016.e00130.
- [14] Su K P, Huang S Y, Peng C Y, *et al.* Phospholipase A₂ and cyclooxygenase 2 genes influence the risk of interferon-alpha-induced depression by regulating polyunsaturated fatty acids levels [J]. *Biol Psych*, 2010, 67(6): 550-557.
- [15] 张俊杰,周克元,蔡春. ω -3 脂肪酸代谢产物抗炎作用的研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(1): 20-27.