

• 药理与临床 •

基于谱毒关系和肝毒网络整合模式的柴胡水煎液肝毒物质基础研究

侯磊¹, 王亮⁴, 刘闰平⁵, 孙蓉^{2,3*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

3. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

4. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

5. 北京中医药大学, 北京 100029

摘要:目的 研究柴胡水煎液 HPLC 指纹图谱及体外肝毒性的谱毒关系, 构建柴胡水煎液致肝毒性的作用网络, 整合谱毒关系和网络毒理学预测柴胡水煎液致肝毒性的物质基础。方法 采用 HPLC 法建立 10 批次柴胡水煎液的指纹图谱; 测定柴胡水煎液对正常人肝细胞 L02 中丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 的含量; 采用灰色关联分析法进行谱毒关联分析, 初步确定肝毒性成分。结合网络毒理学, 预测肝毒性候选成分。整合分析探究柴胡水煎液致肝毒性的成分。结果 建立了柴胡水煎液指纹图谱, 共标定 29 个共有峰; 根据灰色关联度大小排序, 13、12、8、26、10、14、27、11 号共有峰与 L02 细胞 ALT 含量有较高关联度; 12、13、26、8、10、14、27、11 号共有峰与 L02 细胞 AST 含量有较高关联度。网络毒理学推测柴胡致肝毒性的成分为豆甾醇、黄芩苷等 17 个; 整合分析确定柴胡致肝毒性的成分为共有峰 13、12、8、26、10、14、27、11 代表的成分及豆甾醇、黄芩苷、柴胡皂苷 D 等。结论 柴胡水煎液致肝毒性是多种成分共同作用的结果, 本研究可对下一步柴胡水煎液致肝毒性的物质基础研究提供数据支持。

关键词: 柴胡; 肝毒性; 谱毒关系; 作用网络; 网络毒理学; 物质基础; HPLC; 指纹图谱; L02 细胞; 丙氨酸转氨酶; 天冬氨酸转氨酶; 灰色关联分析法; 整合分析; 豆甾醇; 黄芩苷; 柴胡皂苷 D

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2798-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.022

Study on basis of liver toxicity of decoction *Bupleurum chinense* based on integrated model of spectrum toxicity relationship and liver toxicity networkHOU Lei¹, WANG Liang⁴, LIU Run-ping⁵, SUN Rong^{2,3}

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Institute of Advanced Medical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

3. The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

4. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

5. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To study the HPLC fingerprint of *Bupleurum chinense* and the relationship between the spectrum and the toxicity *in vitro*, construct the network of the liver toxicity induced by *B. chinense*, and integrate the spectrum and the network toxicology to predict the material basis of the liver toxicity induced by *B. chinense*. **Methods** The fingerprints of 10 batches of decoction of *B. chinense* were established by HPLC, the contents of ALT and AST in L02 cells were determined by decoction of *B. chinense*, and the toxic components of liver were preliminarily determined by the method of grey correlation analysis. Combined with

收稿日期: 2020-02-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773997); 山东省重点研发计划 (重大关键技术) 项目 (2016ZDJS07A21); 山东省重点研发计划项目 (2017CXGC1301); 泰山学者工程专项经费资助 (ts201511107)

作者简介: 侯磊, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。Tel: 13356742915 E-mail: houlei1211@163.com

*通信作者 孙蓉, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药理与毒理研究。Tel: 13605311799 E-mail: sunrong107@163.com

network toxicology, the candidate components of hepatotoxicity were predicted. Integrated analysis on the components of liver toxicity induced by decoction of *B. chinense*. **Results** The established fingerprint of *B. chinense* was calibrated with 29 common peaks. The results of grey correlation analysis showed that common peaks 13, 12, 8, 26, 10, 14, 27 and 11 had a high correlation degree with the ALT content of L02 cells. The common peaks of 12, 13, 26, 8, 10, 14, 27 and 11 had a high correlation degree with the AST content of L02 cells. According to the network toxicology, 17 components of *B. chinense*, stigmasterol, baicalin, etc were speculated to be the hepatotoxicity components of *B. chinense*. The integrated analysis initially determined that the hepatotoxicity components of *B. chinense* were 13, 12, 8, 26, 10, 14, 27 and 11 peaks in total, and stigmasterol, baicalin, saikosaponin D, etc. **Conclusion** The hepatotoxicity of *B. chinense* is the result of the interaction of various components. This study can provide data support for the further research on the material basis of *B. chinense* hepatotoxicity.

Key Word: *Bupleurum chinense* DC.; hepatotoxicity; spectrum toxicity relationship; interaction network; network toxicology; material basis; HPLC; fingerprint; L02 cell; ALT; AST; gray relational analyses; integrated analysis; stigmasterol; baicalin; saikosaponin D

柴胡系伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. 的干燥根, 性味苦凉、微寒, 归肝胆经, 具有解表退热、疏肝解郁、升举清气之功效^[1]。柴胡在《神农本草经》中列为上品, 但在应用过程中, 医家逐渐认识到柴胡亦有一定的毒副作用, 尤以叶天士在《幼科要略》中提出了“柴胡劫肝阴”之说, 为后世所重视。近年来, 柴胡在临床应用中的不良反应报道也日益增多^[2], 特别是日本小柴胡汤事件, 导致柴胡的毒性引起了人们的广泛关注^[3]。

本课题组前期研究显示, 柴胡不同组分对大鼠均有一定的毒性, 柴胡皂苷和挥发油使细胞发生损伤而导致毒性^[4-6]; 由于中药毒性受基原、产地、采收、加工等中药固有因素的影响, 需对柴胡水煎液致肝毒性物质基础进行科学发现, 以利于临床安全用药。指纹图谱技术与毒性评价相结合有助于提高毒性物质基础发现的准确率和均一性。

网络药理学技术适宜于中药功效作用网络的预测, 有效指导活性成分发现与确认, 刘昌孝院士等^[7-8]首次确立了网络毒理学 (network toxicology) 的概念, 为中药的毒性评价提供了新的思路。为深入探讨柴胡水煎液致肝毒性的物质基础, 本研究开展基于 10 个批次的柴胡水煎液的指纹图谱研究和体外正常人肝细胞 L02 细胞模型的肝毒性评价; 将指纹图谱和肝毒性指标进行谱毒相关的灰色关联分析, 初步锁定肝毒性的物质基础群; 然后利用毒理数据库预测中药的化学成分, 构建柴胡水煎液致肝毒性的作用网络, 推测柴胡水煎液致肝毒性的相关成分^[9]。将研究结果进行整合分析与预测柴胡水煎液致肝毒性的潜在物质基础^[10], 技术路线见图 1。以期探索一种相对快捷、准确的中药毒性物质基础

的研究策略。

1 材料

1.1 试剂与药材

RPMI 1640 完全培养基、胎牛血清, Gibco 公司; 胰蛋白酶、磷酸缓冲盐溶液 (PBS), 美国 Amresco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), Sigma 公司; 注射用青霉素钠, 华北制药股份有限公司; 注射用硫酸链霉素, 大连美罗大药厂; Cell Counting Kit-8 (CCK-8)、Boradford 蛋白定量试剂盒 (批号 042419190821) 购自杭州碧云天生物有限公司; 丙氨酸转氨酶 (ALT) 测试盒 (批号 20180908)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 测试盒 (批号 20180908) 为微板法, 购于南京建成生物工程研究所; 乙腈, 色谱纯; 水为超纯水; 磷酸等其他试剂均为分析纯。柴胡样品共 10 份, 购自山东百味堂中药饮片有限公司, 基原经山东大学高等医学研究院孙蓉教授鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根, 按《中国药典》2015 年版柴胡项下检查, 符合各项规定, 样品信息见表 1。

1.2 仪器

1200 型高效液相色谱系统, ChemStation 工作站, DAD3100 型二极管阵列检测器, 7693A 型自动进样器, 美国安捷伦公司; AL104 型电子天平, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司; KDM 型控温电热套, 鄞城华鲁电热仪器有限公司; BB-16 型二氧化碳培养箱, 德国贺利氏集团; XSP-15CE 型倒置显微镜, 上海长方光学仪器有限公司; Multiskan Go 型酶标仪, 芬兰雷勃公司; DW-86L626 型超低温保存箱, 青岛海尔特种电器有限公司; 3894 型 96 孔培养板, 美国康宁公司; TDZ5-WS 型台式低速离心机, 上海安亭科学仪器厂; Simplicity 型纯水仪,

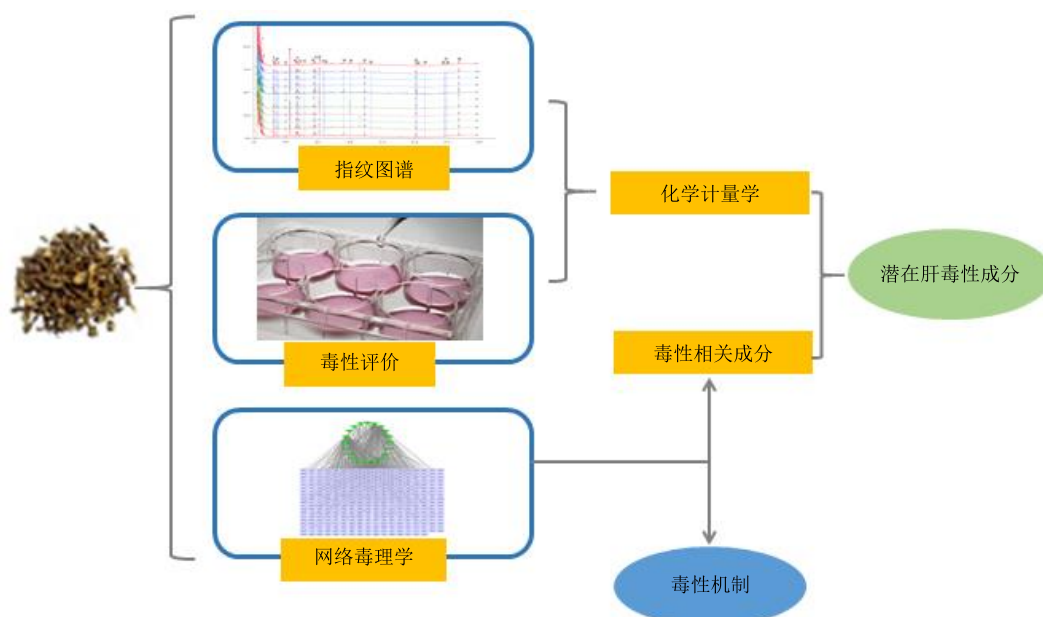


图 1 柴胡水煎液致肝毒性的物质基础发现与预测研究路线图

Fig. 1 Basic discovery and prediction of hepatotoxic substances caused by decoction of *B. chinense*

表 1 柴胡样品信息

Table 1 Sample information of *B. chinense*

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	160101	山东	S6	20160903	甘肃
S2	160701	山东	S7	170809	山东
S3	171007	山西	S8	171102	山东
S4	171227	山西	S9	160811004	陕西
S5	20160712	甘肃	S10	181201	山东

美国密理博公司；1300A2 型生物安全柜，上海博讯仪器有限公司；DK-98-IIA 型电热恒温水浴锅，天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 细胞系

人正常肝细胞 L02 细胞系，购自中国科学院上海细胞生物研究所，分别用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基，37 °C、5% CO₂ 进行常规培养，实验均在细胞生长对数期进行。

2 方法与结果

2.1 柴胡 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 供试品溶液制备 取柴胡供试品粉末 5 g，精密称定，加入 50 mL 水，回流提取 1.5 h，冷却至室温，摇匀，3 000 r/min 离心 20 min，取上清，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

2.1.2 色谱条件 色谱柱 Agilent SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为 0.3% 磷酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0~5 min，4% 乙腈；5~45 min，4%~17% 乙腈；45~85 min，17%~30% 乙腈；85~100

min，30%~40% 乙腈；100~130 min，40%~100% 乙腈；130~140 min，100% 乙腈；柱温 30 °C；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 210 nm；进样量 10 μL。

2.1.3 相似度评价 将按照“2.1.2”项中方法所得 10 批柴胡指纹图谱数据依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件。以 S1 号样品色谱图作为参照图谱，过多点校正、自动匹配，以中位数法生成对照图谱，标定了 29 个共有峰，指纹图谱叠加图见图 2。计算相似度，10 批柴胡样品指纹图谱相似度为 0.482~0.978，表明不同产地批次的柴胡质量存在一定差异，结果见表 2。

2.2 10 批次柴胡水煎液对 L02 细胞存活率的影响

2.2.1 10 批次的柴胡水煎液对 L02 细胞存活率的影响 前期实验发现，L02 细胞在加入柴胡水煎液 16 h 之后呈现对数增长，24 h 时达到峰值，一般选择在 L02 细胞的对数生长期进行药物干预，因此 24 h 为最佳给药时间^[11]。将 L02 细胞以 7 000 个/孔接种于 96 孔细胞板上，于 37 °C、5% CO₂ 培养，24 h 后对照组继续以 RPMI 1640 培养基进行培养，其余各组分别加入 10 批次的柴胡水煎液（见“2.1.1”项）培养。培养 24 h 后移除细胞上清液，加入 5% 的 CCK-8 溶液 100 μL，于培养箱中培养 30 min，用酶标仪测定吸光度 (A) 值，计算细胞存活率，对照组状态良好，存活率为 100%，10 批次的柴胡水煎液作用后 L02 细胞的存活率见表 3。

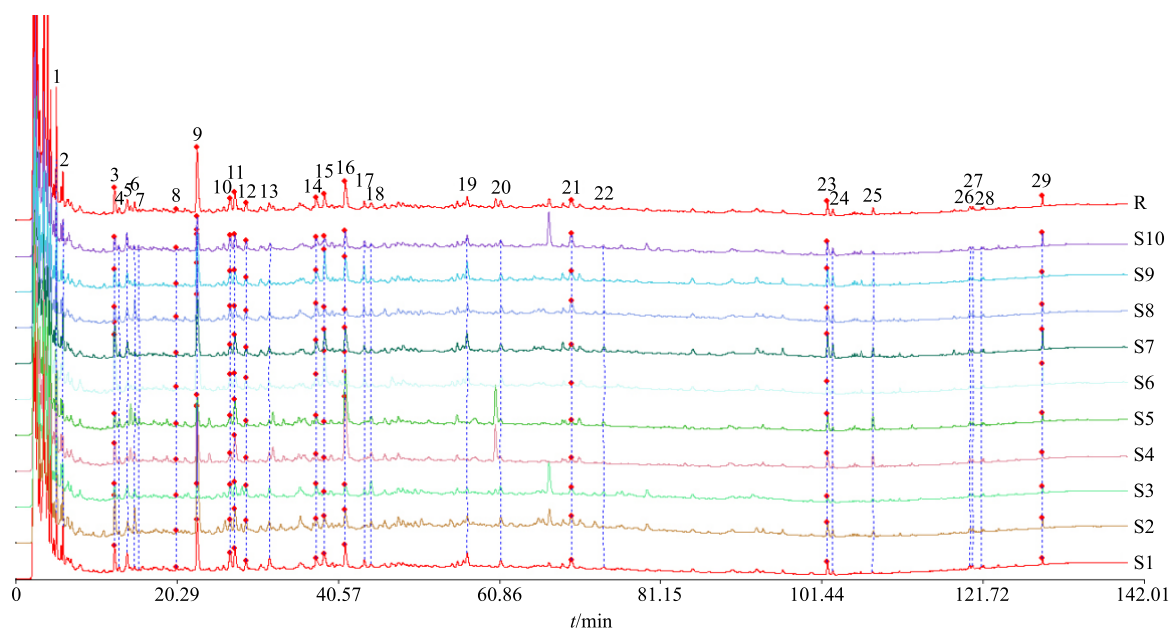


图 2 10 批柴胡水煎液 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of 10 batches of *B. chinense* samples

表 2 指纹图谱相似度结果

Table 2 Similarity results of fingerprint

样品	相似度										对照
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
S1	1.000	0.935	0.821	0.875	0.836	0.912	0.961	0.945	0.940	0.631	0.970
S2	0.935	1.000	0.809	0.840	0.799	0.942	0.939	0.955	0.919	0.600	0.965
S3	0.821	0.809	1.000	0.807	0.829	0.657	0.815	0.849	0.813	0.516	0.858
S4	0.875	0.840	0.807	1.000	0.978	0.800	0.866	0.850	0.855	0.482	0.926
S5	0.836	0.799	0.829	0.978	1.000	0.733	0.848	0.832	0.848	0.515	0.903
S6	0.912	0.942	0.657	0.800	0.733	1.000	0.915	0.887	0.894	0.629	0.928
S7	0.961	0.939	0.815	0.866	0.848	0.915	1.000	0.942	0.969	0.685	0.976
S8	0.945	0.955	0.849	0.850	0.832	0.887	0.942	1.000	0.937	0.626	0.965
S9	0.940	0.919	0.813	0.855	0.848	0.894	0.969	0.937	1.000	0.733	0.967
S10	0.631	0.600	0.516	0.482	0.515	0.629	0.685	0.626	0.733	1.000	0.663
对照	0.970	0.965	0.858	0.926	0.903	0.928	0.976	0.965	0.967	0.663	1.000

2.2.2 10 批柴胡水煎液对 L02 细胞上清液中 ALT、AST 指标的影响 取上述培养的细胞上清液 10 μ L, 按照 ALT、AST 试剂盒说明书进行操作, 检测 L02 细胞上清液中 ALT 和 AST 的含量, 结果见表 4。与对照组相比, 给药组 ALT 和 AST 含量有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明不同批次柴胡水煎液具有一定的肝毒性。

2.3 谱毒相关性研究

以 L02 细胞上清液 ALT、AST 的指标值为确定的参考序列, 指纹图谱共有峰峰面积为比较系列,

根据灰色关联度大小确定各共有峰对各指标的贡献度大小, 灰色关联分析结果见表 5。

由表 5 可见, 对于 L02 细胞上清液 ALT 的指标值与指纹图谱关联分析结果显示, 13、12、8、26、10、14、27、11 号共有峰高度相关, 关联度均大于 0.79; L02 细胞上清液 AST 的指标值与指纹图谱关联分析结果显示, 12、13、26、8、10、14、27、11 号共有峰高度相关, 关联度均大于 0.79。ALT 和 AST 的谱毒分析结果呈现较高的一致性, 说明共有峰 13、12、8、26、10、14、27、11 对应的成分可

表 3 10 批柴胡水煎液对 L02 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 3 Effect of 10 batches of *B. chinense* water extract on L02 cells viability ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

批次	细胞存活率/%				
	6.25 mg·mL ⁻¹	12.5 mg·mL ⁻¹	25 mg·mL ⁻¹	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹
S1	99.68 ± 7.48	98.90 ± 5.28	65.13 ± 5.75***	0.12 ± 0.92***	0.02 ± 0.48***
S2	122.35 ± 1.11***	112.74 ± 2.55***	60.73 ± 14.70***	10.44 ± 1.89***	1.91 ± 2.03***
S3	109.01 ± 3.39**	106.33 ± 2.44*	45.05 ± 1.10***	6.63 ± 0.84***	5.26 ± 1.02***
S4	90.79 ± 3.60**	76.13 ± 3.86***	16.19 ± 2.30***	2.61 ± 0.48***	2.40 ± 0.67***
S5	97.64 ± 7.12	82.02 ± 3.52***	55.65 ± 3.19***	16.63 ± 4.78***	7.88 ± 1.61***
S6	95.78 ± 2.81	95.05 ± 2.05*	74.43 ± 0.75***	10.52 ± 3.81***	10.27 ± 1.06***
S7	101.42 ± 2.19	89.31 ± 6.29*	63.82 ± 4.51***	14.29 ± 7.21***	16.26 ± 2.42***
S8	96.19 ± 11.08	92.77 ± 13.47	77.13 ± 16.61*	6.30 ± 2.24***	1.79 ± 2.36***
S9	96.45 ± 1.25	86.55 ± 3.75**	69.89 ± 4.10***	16.89 ± 5.54***	1.93 ± 3.64***
S10	95.00 ± 4.11	90.16 ± 2.96	79.71 ± 0.94***	10.01 ± 2.54***	0.11 ± 1.14***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group表 4 10 批柴胡水煎液对 L02 细胞上清液 ALT、AST 指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 4 Effect of 10 batches of *B. chinense* water extract samples on ALT and AST of L02 cell supernatant ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	—	21.30 ± 0.17	10.60 ± 1.93
S1	25	30.00 ± 6.93	24.50 ± 5.57*
S2	25	36.20 ± 3.93**	25.90 ± 2.26***
S3	25	42.30 ± 5.72**	30.70 ± 2.11***
S4	25	51.60 ± 6.47**	34.60 ± 1.57***
S5	25	37.60 ± 2.92***	27.20 ± 2.28***
S6	25	30.00 ± 2.04**	21.60 ± 1.12**
S7	25	37.30 ± 8.55*	23.50 ± 0.67***
S8	25	27.20 ± 4.83*	18.80 ± 0.68**
S9	25	27.70 ± 3.23*	21.20 ± 4.62*
S10	25	25.20 ± 0.57***	19.10 ± 1.52**

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

能是柴胡水煎液的肝毒性成分。

2.4 网络毒理学研究

2.4.1 柴胡化学成分收集及毒性成分的筛选 在 TCMSP 平台中药材数据库对柴胡进行化学成分信息收集, 口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 作为成分的筛选标准^[12]。将从 TCMSP 数据库中筛选出的化合物直接输入比较基因组学毒理数据库 (The Com Parative Toxicogenomics

表 5 柴胡水煎液肝毒性谱毒灰色关联分析结果

Table 5 Spectrum-toxicity results of grey correlation analysis

排名	峰号	ALT 关联度	峰号	AST 关联度
1	13	0.850 8	12	0.851 0
2	12	0.838 2	13	0.838 9
3	8	0.821 8	26	0.835 6
4	26	0.817 1	8	0.809 8
5	10	0.796 4	10	0.801 7
6	14	0.796 0	14	0.801 7
7	27	0.795 2	27	0.799 4
8	11	0.794 3	11	0.795 0
9	4	0.787 2	28	0.794 0
10	20	0.779 2	4	0.790 5

Database, CTD, <http://ctdbase.org/>) 中进行毒性查询, 筛选到柴胡中有毒的化合物成分^[13-15], 另结合文献对未纳入筛选标准, 研究报道具有毒理作用的化学成分也纳入候选成分。

综合数据库查询及文献研究, 筛选后有 17 个可能为肝毒性相关成分, 见表 6。

2.4.2 柴胡潜在肝毒性成分靶点的确定 使用 TCMSP 数据库进行化合物的蛋白靶点预测, 利用 UniProt 数据库中 Uni ProKBt 的检索功能, 通过输入蛋白名称并限定物种为“人”, 将所有靶基因名称校正为官方名称 (official gene symbol), 获得成分与相关靶点信息。利用 Cytoscape3.2.1 软件将 17 个

表 6 柴胡毒性代表性成分信息

Table 6 Information on representative toxicity components of *B. chinense*

编号	化学成分名称	编号	化学成分名称
1	豆甾醇 (stigmasterol)	10	2-(2-羟基-4-甲氧基苯基)-6-甲氧基-1-苯并呋喃-5-醇 [2-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-6-methoxy-1-benzofuran-5-ol]
2	α -菠菜甾醇 (α -spinasterol)	11	槲皮素 (quercetin)
3	黄芩苷 (baicalin) [16-17]	12	曲克芦丁 (troxerutin)
4	(+)-安诺马林 [(+)-anomalin]	13	山柰酚 (kaempferol)
5	萆澄茄素 (cubebin)	14	醋酸亚油醇酯 (linoleyl acetate)
6	叶含长管贝壳杉素 A (longikaurin A)	15	羟基羽扇豆烷宁 (octalupine)
7	茵陈黄酮 (areapillin)	16	柴胡皂苷 A (saikosaponin A)
8	异鼠李素 (isorhamnetin)	17	柴胡皂苷 D (saikosaponin D)
9	牵牛花色素 (petunidin)		

成分与其靶点建立相互作用网络, 互作网络共包括 17 个成分节点和 225 个靶点, 成分-预测靶点网络, 结果见图 3。其中有 9 个成分的作用靶点 ≥ 10 个; 在 225 个潜在靶点中, 42 个靶点与 3 个以上化学成

分连接, 体现了柴胡多成分、多靶点共同作用的机制, 符合中药的作用特点。

2.4.3 网络构建和分析 成分靶点及已收集到的肝毒性靶点通过 STRING 数据库 (<http://STRING-db>).

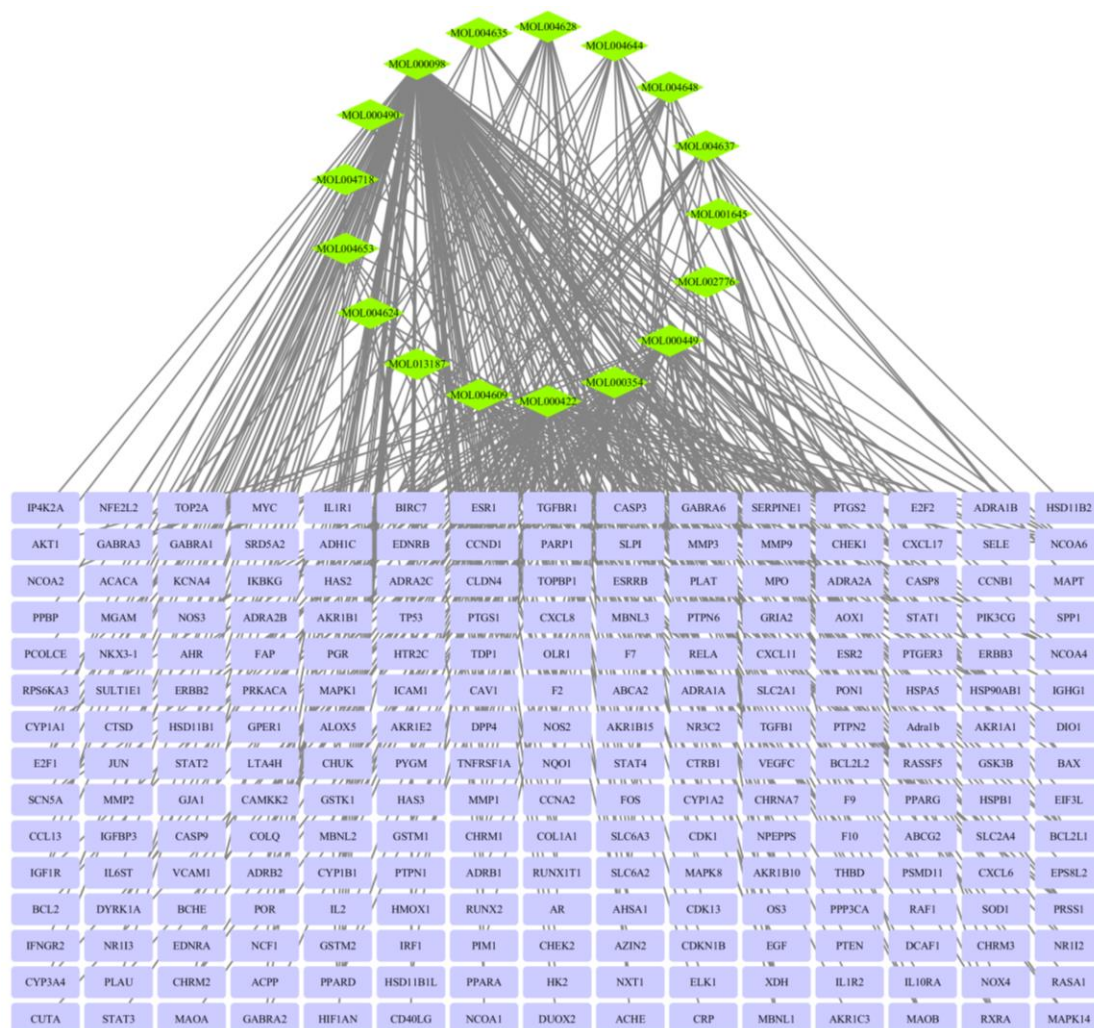


图 3 柴胡成分-预测靶点网络

Fig. 3 Component prediction target network of *B. chinense*

org/) 分析得蛋白相互作用网络,通过 Cytoscape 的 Merge 功能对上述构建的 2 个网络中的交集靶点进行关联分析^[18-19],得到柴胡导致肝毒性的关键靶点 36 个。

2.4.4 通路富集分析 对柴胡成分-靶点网络涉及的 36 个靶点进行通路富集分析,以 $P \leq 0.05$ 筛选得到 7 条柴胡导致肝毒性的作用通路,说明柴胡的成

分可能通过作用于这些信号通路导致肝毒性,富集程度较高的通路是外来物异生物素的信号通路(xenobiotics)。柴胡致肝毒性靶点通路富集分析结果见图 4。富集基因数较多的通路是生物氧化作用的信号通路(biological oxidations),靶点通路富集结果见表 7。本课题组前期研究表明,氧化损伤是柴胡致肝毒性的重要机制之一^[20]。

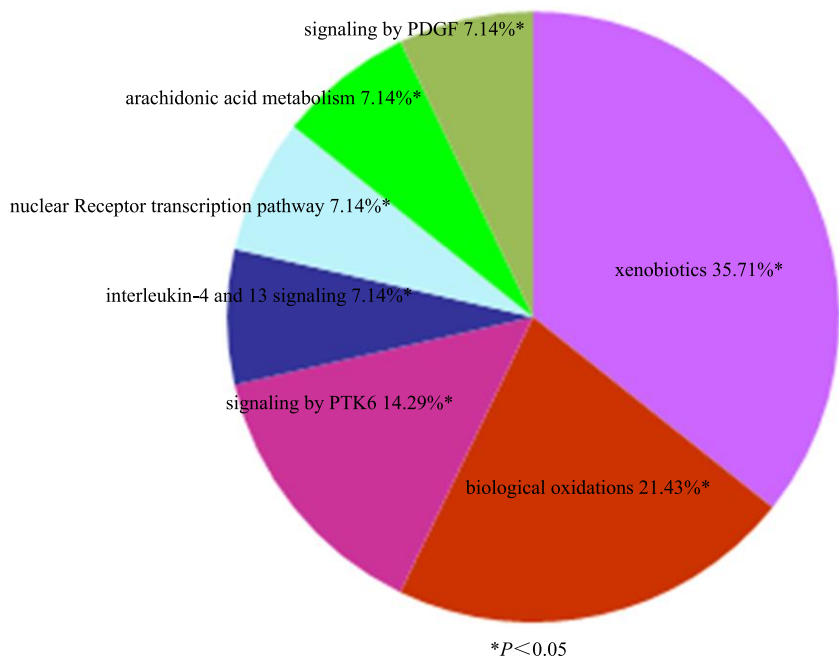


图 4 柴胡致肝毒性靶点通路富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of target pathway of *B. chinense* liver toxicity

表 7 靶点通路富集结果

Table 7 Enrichment of target pathways

编号	通路	基因
1	生物氧化	ADH1C、AHR、AKR1A1、CYP1A1、CYP1A2、CYP3A4、GSTM1、GSTM2、SULT1E1
2	白细胞介素-4 和 13 信号转导	CCND1、HMOX1、MMP2、MMP9、PTGS2
3	生物异源物质	AHR、CYP1A1、CYP1A2、CYP3A4
4	花生四烯酸代谢	CYP1A1、CYP1A2、PON1、PTGS2
5	核受体转录途径	ESR1、NR1I2、NR1I3、PPARA

2.5 整合分析

通过建立柴胡指纹图谱和 ALT、AST 指标之间的谱毒关系,ALT 和 AST 的谱毒分析结果呈现出较高的一致性,说明 8 个共有峰 13、12、8、26、10、14、27、11 所代表的成分,可能是柴胡水煎液的肝毒性成分,这些成分是柴胡的固有成分且可以用现代分析技术进行测定。网络毒理学确定了豆甾醇、黄芩苷、柴胡皂苷 D 等 17 个肝毒性潜在成分,这

些成分与肝毒性的靶点关联性强,同时也是柴胡的固有成分。整合 2 类实验,共预测 25 个柴胡导致肝毒性相关成分。

3 讨论

L02 细胞为人正常肝细胞,适宜于肝毒性的发现和评价,且与临床体内毒副作用相关性强^[11],故将 L02 细胞作为毒性评价模型。中药指纹图谱是一种综合、可量化的色谱鉴定手段,具有整体和宏观

的特点,能全面反映中药质量,进而评价其质量稳定性及一致性^[21-23]。

谱效或谱毒关系是运用关联分析的方法,将指纹图谱表征的物质基础与药效和毒性进行关联,解析成分与药效或毒性之间的关系,阐明中药效应物质基础的研究方法^[11,24-25]。灰色关联分析法已较多用于中药谱效或谱毒关系研究^[26-28],灰色关联分析法需要的数据相对较少,原理简单,样本量小,易于理解和掌握^[29],对传统分析方法的不足有所克服和弥补^[30]。故本研究采用灰色关联分析法对柴胡水煎液物质基础和体外肝毒性结果进行谱毒关联分析。根据灰色关联度大小排序,13、12、8、26、10、14、27、11 号共有峰与柴胡肝毒性有较高关联度。说明柴胡的肝毒性与该组成分均有关联,为多种成分共同作用的结果。由于柴胡所含皂苷类等成分紫外吸收较低,接近流动相截止波长,且质谱响应较弱,柴胡指纹图谱中共有峰的定性仍需进一步研究。

网络毒理学是指通过构建网络模型来研究药物的毒理学性质,认识药物对机体的毒副作用并探讨其毒性机制等^[7]。网络毒理学通过毒性数据库,整合信息之间的相互关系,构建网络模型来分析、预测中药的毒性成分,为进行有毒中药的毒性成分筛查、致毒机制等研究提供了新的方法。运用网络毒理学确定豆甾醇、黄芩苷、柴胡皂苷 D 等 17 个肝毒性潜在成分,为提高中药的安全性和合理用药提供了新技术支持,也将进一步推进中药现代化的进程^[31-32]。通过谱毒关系模型和网络毒理学的相关成分的验证,综合分析初步预测柴胡水煎液致肝毒性的潜在成分为共有峰 13、12、8、26、10、14、27、11 代表的成分及豆甾醇、黄芩苷、柴胡皂苷 D 等。为下一步柴胡水煎液致肝毒性的成分验证研究提供直接证据。同时,本研究通过整合分析和信息挖掘,不仅探索了一种相对快捷、实用、准确的中药毒性物质基础挖掘的研究策略,而且为基于安全的中药安全质量标准构建提供直接依据,对提升柴胡的安全用药、合理质控水平起到促进作用。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 马洋洋. 柴胡桂枝汤预防消化道肿瘤化疗后不良反应研究 [J]. 中国社区医师, 2019, 35(33): 111-114.
- [3] 孙 蓉, 杨 倩. 柴胡挥发油大鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(3): 49-51.
- [4] 宋登鹏, 王雪芹, 王永慧, 等. 柴胡皂苷类化合物体内代谢途径及其代谢产物的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(7): 1460-1466.
- [5] 黄 伟, 孙 蓉, 尹建伟, 等. 南、北柴胡不同组分对大鼠急性毒性试验比较研究 [J]. 中国药物警戒, 2010, 7(8): 454-457.
- [6] 李晓宇, 李晓骄阳, 孙 蓉. 柴胡皂苷 d 对人肝细胞 L-02 “量-时-毒”关系及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 87-90.
- [7] 范晓辉, 赵筱萍, 金烨成, 等. 论建立网络毒理学及中药网络毒理学研究思路 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(21): 2920-2922.
- [8] Liu C X, Liu R, Fan H R, *et al.* Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 3-17.
- [9] 刘 静, 李晓宇, 吴恺悻, 等. 小柴胡汤治疗肝炎时出现肝损伤的“效-毒”作用网络分析与机制预测 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5135-5144.
- [10] 刘肖雁, 姜文文, 蒋海强, 等. 基于“谱-效-代”关联的参枝苓口服液质量标志物的初步研究 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4603-4612.
- [11] 王 亮, 窦立雯, 郭 威, 等. 基于中药传统用法的毒性 Q-Marker 发现: 以吴茱萸为例 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1159-1166.
- [12] 张 潇, 高 耀, 向 欢, 等. 基于网络药理学的交泰丸治疗抑郁症作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1584-1590.
- [13] 郝俊霞, 高梓森, 高 皓, 等. 基于网络药理学的雷公藤肾毒性机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 142-151.
- [14] 孙 蓉, 王 丽, 任海勇, 等. 基原对柴胡急性毒性和皂苷类物质含量影响的实验研究 [J]. 中国药物警戒, 2009, 6(12): 705-708.
- [15] 李晓宇, 李晓骄阳, 孙 蓉. 柴胡皂苷 d 对人肝细胞 L-02 “量-时-毒”关系及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 87-90.
- [16] 王梦迪, 靳光乾. 柴胡中药资源研究进展 [J]. 山东林业科技, 2019, 49(3): 107-110.
- [17] 颜美玲, 杨 柳, 侯阿娇, 等. 柴胡化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35(5): 103-109.
- [18] 刘 静, 郭 欣, 黄娜娜, 等. 柴胡桂枝干姜汤治疗失眠的功效网络研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5145-5153.
- [19] 张新雨, 黄娜娜, 孙凯滨, 等. 柴胡龙骨牡蛎汤治疗原发性高血压作用网络与机制预测 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5162-5169.
- [20] 杨 倩, 孙 蓉. 柴胡挥发油致大鼠肝毒性氧化损伤

- 机制的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 59-61.
- [21] 吴亚超, 刘佩文, 李德坤, 等. 不同产地栀子的 UPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 74-78.
- [22] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [23] 申 鸽, 景大山, 杨 飞, 等. 珍珠透骨草 HPLC 指纹图谱及抗炎活性的谱效关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 174-180.
- [24] 李凌艳, 李认书, 孙 鹤. 数据挖掘技术在中药研究中的应用 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 852-854.
- [25] 柳慧芸, 吴巧凤. 苏叶黄连汤抗流感作用的谱效关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2049-2053.
- [26] 林梦雅, 张玉萍, 李 雅, 等. 基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3447-3452.
- [27] 杨 莹, 康显杰, 杜伟锋, 等. 续断“发汗”前后 HPLC 指纹图谱与细胞增殖分化药效的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3909-3916.
- [28] 梁健钦, 王 剑, 熊万娜, 等. 基于灰色关联分析的芒果叶提取物抗炎作用的谱效关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 121-125.
- [29] 李 力, 潘倩雯, 刘 宏. 灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用 [J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1581-1584.
- [30] 张小艺, 刘久石, 高石曼, 等. 中药谱效关系的研究方法及应用进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20): 4405-4411.
- [31] 刘 睿, 赵新宇, 李亚卓, 等. 网络毒理学及其在中药毒性成分预测中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 709-715.
- [32] 宋 捷, 钟荣玲, 夏 智, 等. 中药肝毒性研究方法技术的新进展及其应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 41-48.