基于 LC-MS 的甘草炮制雷公藤降低肝毒性的代谢组学研究

吴 昊，于小红，马光朝，马致洁*，章从恩*
首都医科大学附属北京友谊医院，北京 100050

摘 要：目的 观察甘草炮制雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 后对小鼠血清中代谢产物的影响，初步探讨其降低肝毒性的可能代谢通路。**方法** 将 C57BL/6 小鼠随机分为对照（Con）组、雷公藤（Raw）组、甘草炮制雷公藤（Pro）组，观察小鼠肝组织病理变化，检测小鼠肝功能生化指标、炎症因子水平；利用液质联用（LC-MS）技术结合代谢组学方法，对各组间的代谢差异进行表征。**结果** 与 Raw 组相比，Pro 组小鼠肝组织损伤显著改善，肝功能生化指标、炎症因子水平显著降低，表明甘草炮制雷公藤后可以降低小鼠肝毒性；共筛选出脂肪酸、磷脂酸、甘油酯、磷脂酰胆碱、胆酸等 12 个潜在生物标志物，主要涉及脂肪酸生物合成、甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢等 9 个代谢通路。**结论** 甘草炮制雷公藤可有效降低小鼠的肝毒性，其机制可能与调节脂肪酸代谢等通路相关，为其临床合理应用提供参考依据。

关键词：雷公藤；甘草；代谢组学；肝毒性；液质联用
中图分类号：R285.53 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2020)21 - 5501 -08
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.014

Metabolomics study on reduction of hepatotoxic of *Tripterygium wilfordii* processed by liquorice based on LC-MS

WU Hao, YU Xiao-hong, MA Guang-chao, MA Zhi-jie, ZHANG Cong-en
Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To observe the effect of *Tripterygium wilfordii* processed by liquorice on the metabolites in the serum of mice, and to explore its possible metabolic pathways to reduce hepatotoxicity. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into control (Con) group, raw *T. wilfordii* (Raw) group, and *T. wilfordii* processed by liquorice (Pro) group. Liver histopathological sections and biochemical indexes of liver function and inflammatory factors were detected. LC-MS technology combined with metabolomics methods were used to characterize the differences in metabolism between each group. **Results** Compared with Raw group, the liver injury of mice in Pro group was significantly improved, the levels of biochemical indicators and inflammatory factors were significantly decreased, which indicated that TwHF could reduce the hepatotoxicity of mice after processing by liquorice. Twelve potential biomarkers including hexadecanoic acid, phosphatidic acid, glyceride, lecithin and cholic acid were screened, mainly involved nine metabolic pathways including biosynthesis of unsaturated fatty acids, glycerophospholipid metabolism, arachidonic acid metabolism, etc. **Conclusion** TwHF processed by liquorice could reduce the hepatotoxicity of mice and the mechanism may be related to the regulation of fatty acid metabolism, which provides a reference for clinical rational application.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; liquorice; metabolomics; hepatotoxicity; LC-MS

雷公藤为卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.的干燥根，产于福建、河南、浙江、安徽等地。其味苦、辛，性寒，有大毒，归肝、肾经，有祛风湿、活血化瘀、通络止痛、消肿止痛、杀虫解毒等功效[1-2]。临床上治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病效果良好[3-4]，但其毒性较大，易损伤肝肾系统、生殖系统，且易引起中药药源性不良反应[5-6]，临床

收稿日期：2020-01-01
基金项目：首都卫生发展科研专项项目（首发 2016-4-2024）；北京市中医药科技项目（QN2014-18）；首都医科大学附属北京友谊医院“种子计划”项目（YYZZ2018A02）
作者简介：吴 昊（1996—）男，在读硕士研究生，E-mail: wuhao906991@163.com
***通信作者** 章从恩。Tel: (010)63138562 E-mail: zce820@163.com
马致洁。Tel: (010)63138520 E-mail: 13811647091@163.com

的广泛应用受到限制[7-8]。肝脏是雷公藤的主要毒性靶器官之一，雷公藤所致肝毒性与急性病毒性肝炎类似，临床表现为乏力、恶心呕吐、肝脏有压痛等，病理可见肝脏实质性改变、细胞排列紊乱、结构破坏等[9]。

甘草味甘、性平，可缓和药性，在 2 000 多年前，甘草的解毒功效已被《神农本草经》列为药之上品。雷公藤对肝脏毒副作用显著，甘草缓和峻烈其药性，可起到调和脾胃、护肝保肝之效[10-11]。炮制是中药减毒增效的重要途径之一，药物经炮制后，其性味、功效、归经、毒副作用等方面均会发生变化，从而最大限度地发挥疗效。课题组前期研究表明，甘草炮制雷公藤可以有效降低其肝毒性，同时具有较好疗效[12-13]，但甘草炮制雷公藤的减毒机制尚不清晰。本研究通过建立小鼠肝损伤模型，评价甘草炮制雷公藤的减毒效果，同时采用代谢组学对小鼠血清内源性代谢物的变化差异和生物标志物进行分析，初步探讨其可能的减毒作用机制，为甘草炮制雷公藤的临床合理应用提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

色谱级乙腈购自德国 Darmstadt 公司；纯净水购自杭州娃哈哈公司；小鼠肿瘤坏死因子-α（TNF-α）ELISA 试剂盒（批号 177958001）、小鼠白介素-6（IL-6）ELISA 试剂盒（批号 177962001）购自 Thermo Fisher Scientific 公司；天门冬氨酸氨基转氨酶（AST）检测试剂盒（批号 2019007）、丙氨酸氨基转氨酶（ALT）检测试剂盒（批号 2019013）购自长春汇力生物公司。

1.2 药材

雷公藤药材（批号 180221）购自福建三明，生甘草饮片（批号 SAA11）购自北京友谊医院中药房，经首都医科大学附属北京友谊医院赵奎君教授鉴定，分别为卫矛科雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根、豆科植物胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 的干燥根。

1.3 仪器

LC-MS/MS-IT-TOF、Inertsil ODS-SP C_{18} 色谱柱购自岛津公司；0.22 μm 微孔滤膜购自 Solarbio 公司；BSA224S-CW 微量分析天平购自 Sartorius 公司；KQ5200E 型超声仪购自昆山市超声仪器有限公司；YB-2500A 中药粉碎机购自永康市速锋工贸有限公司；LGJ-18 型冷冻干燥机购自北京西四环科学仪器厂；2016 石蜡切片机购自上海莱卡仪器有限公司；Gradient A10 Mill-Q 超纯水器购自美国 Millipore 公司；AISITE 水浴锅购自天津市泰斯特仪器有限公司；Forma-86 CULT Freezer 超低温冰箱购自 Thermo Electron 公司。

1.4 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 30 只，8 周龄，体质量 20～22 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物合格证号 SCXK（京）-2016-0002。小鼠饲养于首都医科大学附属北京友谊医院实验动物中心，实验室合格证号 SYXK（京）2017-0019，室温 20～22 ℃，通风较好，环境安静，室内保持 12 h 明暗交替。动物饲养使用的标准鼠饲料、水和所有动物实验均按照首都医科大学附属北京友谊医院动物伦理委员会相关规定进行，动物伦理委员会批准编号为 18-2031。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 生雷公藤提取物的制备 精密称定适量雷公藤样品，打粉机打碎成细颗粒状，过 24 目筛，以 8 倍体积的水充分润湿，浸泡 1 h 后加热煮沸，回流提取 45 min，趁热经 3 层纱布滤过，滤渣加 6 倍体积的水，回流提取 30 min，滤过，合并滤液，于旋转蒸发仪浓缩后冷冻干燥成粉末，得到生雷公藤提取物，临用前溶于生理盐水配制成 0.4 g/mL 的溶液，给药剂量（以生药量计）为 4 g/kg。

2.1.2 甘草炮制雷公藤提取物的制备 甘草饮片以 8 倍体积的水浸泡 1 h，煎煮 30 min，趁热滤过，重复煎煮 2 次后合并滤液，浓缩后浸泡雷公藤 30 min，于 100 ℃炒 10 min 至雷公藤药材表面不粘手，得到雷公藤炮制品。取雷公藤炮制品，按“2.1.1”项制备方法，得到甘草炮制雷公藤提取物，临用前溶于生理盐水配制成 0.4 g/mL 的溶液，给药剂量（以生药量计）为 4 g/kg[13-15]。

2.2 分组与给药

小鼠适应性饲养 1 周后，随机分为对照（Con）组、雷公藤（Raw，4 g/kg）组、甘草炮制雷公藤（Pro，4 g/kg）组，每组 10 只。对照组 ig 生理盐水，其余各组 ig 药物，1 次/d，连续 10 d。

2.3 小鼠样本收集与处理

2.3.1 血清样本收集与处理 实验第 10 天，各组小鼠眼眶取血，4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液。取血清按照 ELISA 试剂盒说明检测 TNF-α、

IL-6、AST、ALT 水平。取 100 μL 血清加入甲醇溶液，混匀静置，4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，进样检测。

2.3.2 肝组织收集与处理 实验第 10 天，取出肝组织，以生理盐水冲洗、4%多聚甲醛固定、乙醇溶液梯度脱水，包埋、切片、染色后，于光学显微镜下观察。

2.4 LC-MS/MS-IT-TOF 检测

2.4.1 色谱条件 Inertsil ODS-SP C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，柱温为 40 ℃，体积流量为 1.0 mL/min，进样量为 10 μL，流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈，梯度洗脱：0～3 min，16% B；3～8 min，16%～30% B；8～20 min，30%～50% B；20～45 min，50%～95% B。检测波长为 275 nm，洗脱液直接引入质谱仪。为确保系统的稳定性和重复性，将每个样品作为质量控制（QC）样品合并，每 5 个样品插入并分析。

2.4.2 质谱条件 离子源检测模式分别为 ESI^+、ESI^-；离子源电压分别为＋4.5 kV、−3.5 kV；扫描范围为 *m*/*z* 100～1 000；加热块温度为 200 ℃；雾化气为 N_2，体积流量为 1.5 L/min；N_2 压力为 100 kPa；脱溶剂管温度为 200 ℃。

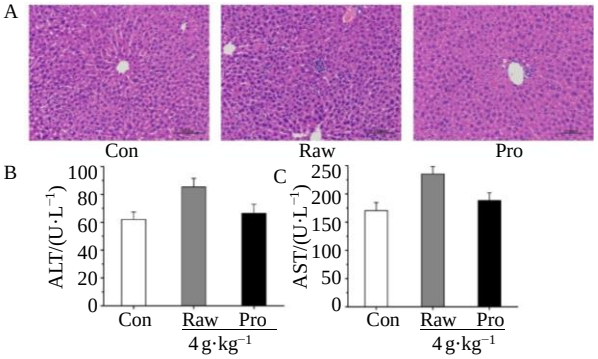
2.5 数据处理与统计

将数据导入 MetaboAlalyst 3.0（http://www.metaboanalyst.ca/），实现缺失值估计、数据过滤和数据归一化。将所得数据矩阵引入 SIMCA 14.0 软件，进行主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）的多元统计分析。从数据矩阵获得的所有变量均以均值为中心，并按比例缩放至方差。PCA 评分图用来观察结果间的相互关系。OPLS-DA 模型用于分析 Con 组、Raw 组、Pro 组间的差异，从而找到潜在的生物标志物。将 VIP≥1.0 和|*P*(corr)|≥0.5 的 OPLS-DA 模型选择变量作为潜在的生物标志物，在 HMDB 和 KEEG 数据库中进行匹配。使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 小鼠肝组织病理与血清 ALT、AST 水平变化

如图 1-A 所示，Con 组小鼠肝组织细胞排列紧密、形态完好，肝索排列整齐，肝小叶结构清晰；Raw 组小鼠肝索排列紊乱，肝细胞出现部分肿胀、浑浊，伴有水肿、结构破坏，局部区域出现炎性细胞浸润；Pro 组小鼠肝组织肝索结构清晰、形态完好，肝细胞可见轻度水肿变性、肿胀、胞质疏松淡染，未见明显炎症反应。如图 1-B、C 所示，与 Con 组比较，Raw 组小鼠血清 ALT、AST 水平均显著升高（$P<0.01$）；与 Raw 组比较，Pro 组小鼠血清 ALT、AST 水平均显著降低（$P<0.01$）。表明甘草炮制雷公藤后对小鼠的肝毒性显著降低。



与 Con 组比较：$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$；与 Raw 组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$，下图同

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ *vs* Con group; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P <$ 0.01 *vs* Raw group, same as belows

图 1 甘草炮制雷公藤对小鼠肝组织病理变化 (A)、血清 ALT (B) 和 AST (C) 水平的影响 (×200; $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 1 Effect of TwHF processed by licorice on pathological changes of liver tissue (A), levels of ALT (B), and AST(C) in serum of mice (× 200; $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

3.2 小鼠血清 TNF-α、IL-6 水平变化

如图 2 所示，与 Con 组相比，Raw 组小鼠血清中 TNF-α、IL-6 水平显著升高（$P<0.01$）；与 Raw 组相比，Pro 组小鼠血清中 TNF-α、IL-6 水平显著性降低（$P<0.05$、0.01）。

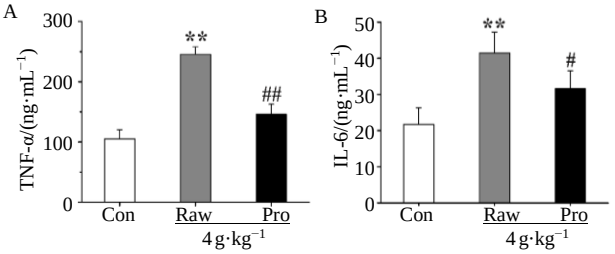


图 2 甘草炮制雷公藤对小鼠血清 TNF-α (A)、IL-6 (B) 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 2 Effect of TwHF processed by licorice on levels of TNF-α (A) and IL-6 (B) in serum of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

3.3 热图和 PCA 分析

图 3-A 为热图形式的聚类结果，每行表示每个代谢物在不同样本中的表达量情况，每列表示每个样品中所有代谢物的表达量情况。上方树形图表示对不同组别的不同样品的聚类分析结果，左侧树状图表示对来自不同样本的不同代谢物的聚类分析结

果，每个部分的颜色与代谢物变化的显着性呈正比，红色表示上调，绿色表示下调，结果表明 Con 组、Raw 组和 Pro 组之间存在明显差异（P＜0.05）。

图 3-B 为 PCA 分析得分图，在 PCA 模型中，QC 组样品紧密聚集，表明了 LC-MS 系统在整个分析过程中稳定性较好。Con 组、Raw 组和 Pro 组间可观察到明显的分离趋势，表明 3 组之间存在较大的代谢差异。由于受到雷公藤毒性的影响，Raw 组小鼠体内的小分子代谢物水平发生显著性改变，从而在图中显示出远离 Con 组的直观表现；甘草炮制雷公藤后，存在显著性变化的小分子代谢物趋向正常水平，整体趋向 Con 组区域。

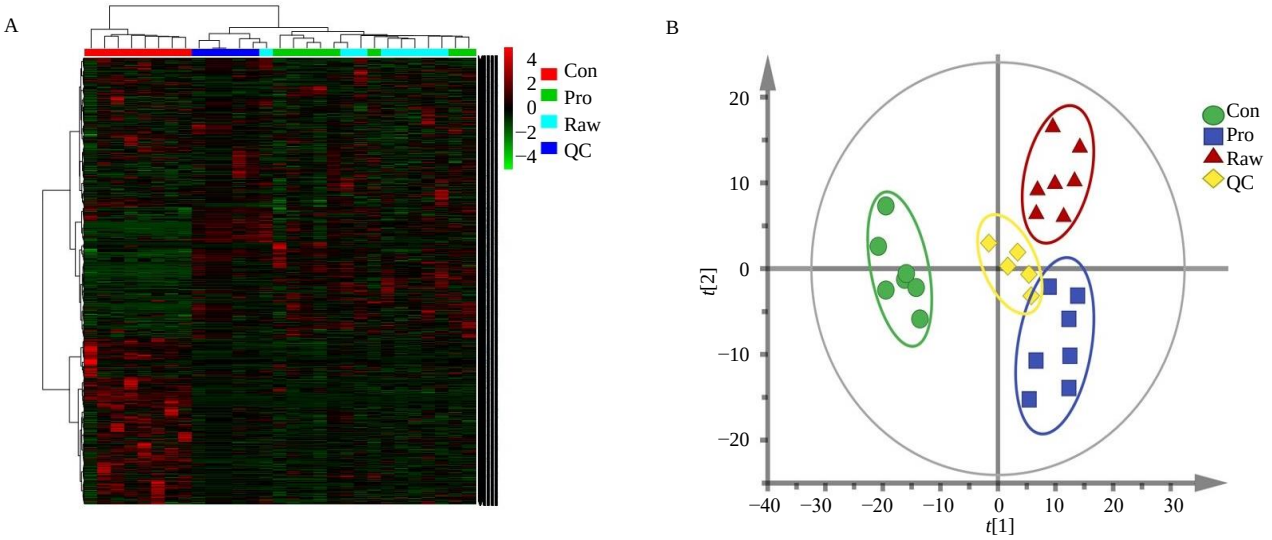


图 3　Con、Pro、Raw、QC 组的分层聚类热图 (A) 和主成分分析得分图 (B)

Fig. 3　Hierarchical clustering heatmap (A) and principal component analysis score plot (B) of Con, Pro, Raw, and QC group

3.4　血清代谢组学的 OPLS-DA 分析

为了突出组间差异，便于后续寻找潜在差异生物标志物，采用 OPLS-DA 对数据进行分析。VIP 反映代谢物对分组的贡献大小，S-Plot 中变量远离原点且 VIP≥1 的变量被认为对分组有显著性贡献，这些变量被优先选为潜在的生物标志物。为了降低假阳性风险，|P（corr）|≥0.5 作为与 OPLS-DA 判别分数最相关的变量。如图 4-A 所示，Con 组可以完全与 Raw 组分开，显示了良好的模型适应性。如图 4-B～C 所示，Pro 组、Raw 组和 Con 组、Pro 组均完全分离。图 4-D～I 中，每一个正方形的标识都代表一种差异性变量，变量离原点越远，说明其在分离状态的贡献越大，所代表的代谢物在各组中的差异越大，负责分组分离的变量被选为潜在的生物标志物候选者。

3.5　甘草炮制雷公藤的血清生物标志物的筛选

选择各组显著不同的代谢物（P＜0.05）作为候选生物标志物，将 ESI^+和 ESI^-模式分析中的代谢物组合并进一步鉴定其分子式。通过在线 Metlin 数据库（http://www.metlin.scipps.edu/）初步确定所有生物标志物的相对分子质量。如表 1 所示，共鉴定了 12 种潜在的生物标志物，包括来自 ESI^+分析的 4 种代谢物和来自 ESI^-分析的 8 种代谢物。

使用高分辨率 MS、MS/MS 片段、数据库分析来鉴定代谢物。如表 2 所示，共鉴定出脂肪酸、磷脂酸、甘油酯、磷脂酰胆碱、胆酸、反油酸等 12 个化合物。以 t_R 为 35.21 min，相对分子质量为 254.408 2 的离子为例，通过分析其元素组成和同位素丰度，推测分子式为 $C_{16}H_{30}O_2$。在正离子二级质谱中，通过 m/z 237.251 2、193.204 1、155.192 1、85.024 8 观察到了通过 MS/MS 分析筛选的主要碎片离子，这可能表示丢失的－OH_2、－$C_2H_5O_2$、－$C_5H_7O_2$、－$C_{12}H_{25}$。最后使用在线 Metlin 数据库定义其结构并将代谢物鉴定为羟基棕榈酸内酯。

将各组小鼠体内相同生物标志物的变化进行比较，如图 5 所示，给予甘草炮制雷公藤后，小鼠体内的小分子代谢物水平也在同步地发生变化，表现为甘草炮制改变了雷公藤肝毒性作用所引起的代谢物含量变化。而这些小分子代谢物的改变，可能就是甘草炮制雷公藤减毒作用的关键所在。

3.6　甘草炮制雷公藤生物标志物的通路分析

将 12 个生物标志物输入 MetaboAnalyst 3.0 在线数据库，依次查看标志物在 KEGG 数据库中所对

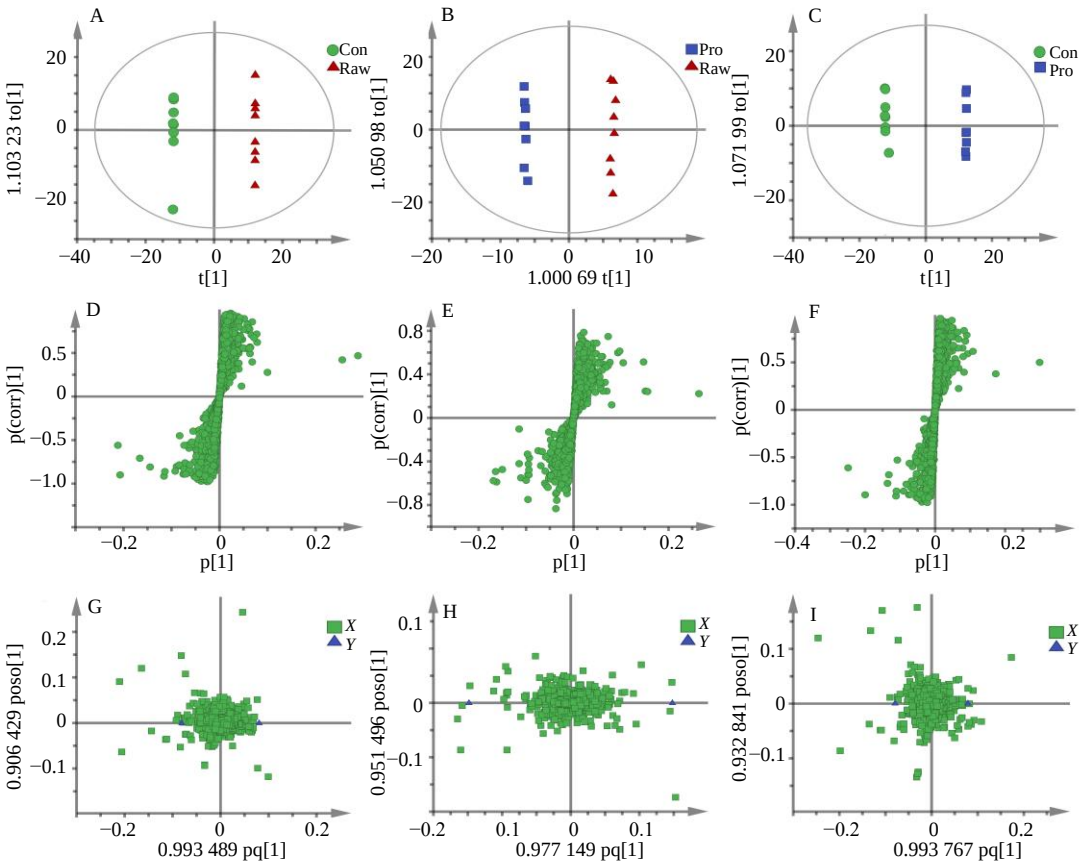


图 4 Con、Pro、Raw 组的 OPLS-DA 得分图 (A～C)、S 图 (D～F)、散点图 (G～I)

Fig. 4 OPLS-DA score map (A-C), S map (D-F) and spot map (G-I) of Con, Pro, Raw group

表 1 Con 组和 Raw 组、Raw 组和 Pro 组之间的差异代谢物

Table 1 Different metabolites among Con and Raw groups, Raw, and Pro groups

t_R/min	代谢物	Con 组 *vs* Raw 组			Raw 组 *vs* Pro 组		
		VIP	Fold	*P*	VIP	Fold	*P*
35.21	羟基棕榈酸内酯	1.57	1.65	0.003	1.16	0.82	0.008
35.41	磷脂酸	1.59	0.45	0.015	2.97	0.39	0.002
38.49	*L*-(−)-α-甘油棕榈酸酯	3.14	3.06	＜0.001	1.78	0.51	0.005
25.04	甘油酯	3.11	9.79	0.001	1.49	2.18	0.033
39.35	别鹅去氧胆酸	1.97	9.80	0.001	1.03	1.83	0.006
31.09	反油酸	1.39	2.76	＜0.001	1.10	0.95	0.002
30.71	棕榈酸	1.18	3.06	0.006	1.28	1.52	0.023
32.15	棕榈酸乙酯	1.13	3.29	0.004	1.53	1.86	0.045
24.84	胆酸	2.16	0.13	0.001	1.50	9.71	0.002
37.36	卵磷脂	1.33	0.68	0.012	1.26	2.18	0.021
39.95	刺桐硫品碱	1.39	0.40	＜0.001	1.24	0.54	0.002
36.65	二十一烷酸	1.68	2.98	0.002	1.46	1.72	0.003

表 2 基于 HPLC-MS/MS 的差异化合物鉴定

Table 2 Identification of differential compounds based on HPLC-MS/MS

t_R/min	化合物	相对分子质量	偏差(×10^{-6})	化学式	MS/MS 碎片离子(*m*/*z*)
35.21	羟基棕榈酸内酯	254.408 2	12.32	$C_{16}H_{30}O_2$	255.242 1 $[M+H]^+$, 237.251 2 $[M+H-H_2O]^+$, 193.204 1 $[M+H-C_2H_5O_2]^+$, 155.192 1 $[M+H-C_5H_7O_2]^+$, 85.024 8 $[M+H-C_{12}H_{25}]^+$
35.41	磷脂酸	700.975 2	10.62	$C_{39}H_{73}O_8P$	701.625 4 $[M+H]^+$, 683.521 4 $[M+H-H_2O]$, 603.548 2 $[M+H-H_2O_4P]^+$, 419.263 2 $[M+H-C_{18}H_{35}O_2]^+$
38.49	*L*-(−)-α-甘油棕榈酸酯	330.642 1	8.42	$C_{19}H_{38}O_4$	331.725 4 $[M+H]^+$, 313.658 7 $[M+H-H_2O]^+$, 229.542 1 $[M+H-C_5H_{10}O_2]^+$

续表 2

t_R/min	化合物	相对分子质量	偏差(×10^{-6})	化学式	MS/MS 碎片离子(*m*/*z*)
25.04	甘油酯	324.315 2	−5.36	$C_{13}H_{25}O_7P$	325.124 2 [M＋H]$^+$, 307.155 6 [M＋H－H_2O]$^+$, 152.983 2 [M＋H－$C_{10}H_{20}O_2$]$^+$, 113.145 4 [M＋H－$C_5H_8O_7P$]$^+$
39.35	别鹅去氧胆酸	392.568 2	8.76	$C_{24}H_{40}O_4$	291.452 [M－H]$^-$, 264.028 3 [M－H－C_2H_3]$^-$, 246.157 [M－H－CHO_2]$^-$
31.09	反油酸	282.465 0	−11.22	$C_{18}H_{34}O_2$	281.641 3 [M－H]$^-$, 265.457 [M－H－H_2O]$^-$, 184.431 2 [M－H－$C_5H_5O_2$]$^-$, 119.254 1 [M－H－$C_{10}H_{10}O_2$]$^-$
30.71	棕榈酸	256.428 7	−8.42	$C_{16}H_{32}O_2$	255.436 [M－H]$^-$, 237.404 9 [M－H－H_2O]$^-$
32.15	棕榈酸乙酯	284.482 0	7.62	$C_{18}H_{36}O_2$	283.512 4 [M－H]$^-$, 265.415 0 [M－H－H_2O]$^-$, 197.423 4 [M－H－$C_5H_{10}O$]$^-$
24.84	胆酸	408.577 4	14.73	$C_{24}H_{40}O_5$	407.652 1 [M－H]$^-$, 489.254 7 [M－H－H_2O]$^-$
37.36	卵磷脂	758.051 0	10.62	$C_{42}H_{80}NO_8P$	757.021 4 [M－H]$^-$, 739.124 7 [M－H－H_2O]$^-$, 575.279 6 [M－H－$C_5H_{10}O_7$]$^-$, 503.330 1 [M－H－$C_{12}H_{30}O_5$]$^-$, 190.217 2 [M－H－$C_{36}H_{55}O_5$]$^-$
39.95	刺桐硫品碱	407.285 1	8.86	$C_{19}H_{21}NO_7S$	406.254 7 [M－H]$^-$, 388.254 1 [M－H－H_2O]$^-$, 204.037 2 [M－H－$C_{12}H_{10}O_3$]$^-$
36.65	二十一烷酸	326.254 0	−17.68	$C_{21}H_{42}O_2$	325.294 2 [M－H]$^-$, 307.187 1 [M－H－H_2O]$^-$, 244.180 6 [M－H－C_5H_5O]$^-$, 98.211 3 [M－H－$C_{15}H_{15}O_2$]$^-$

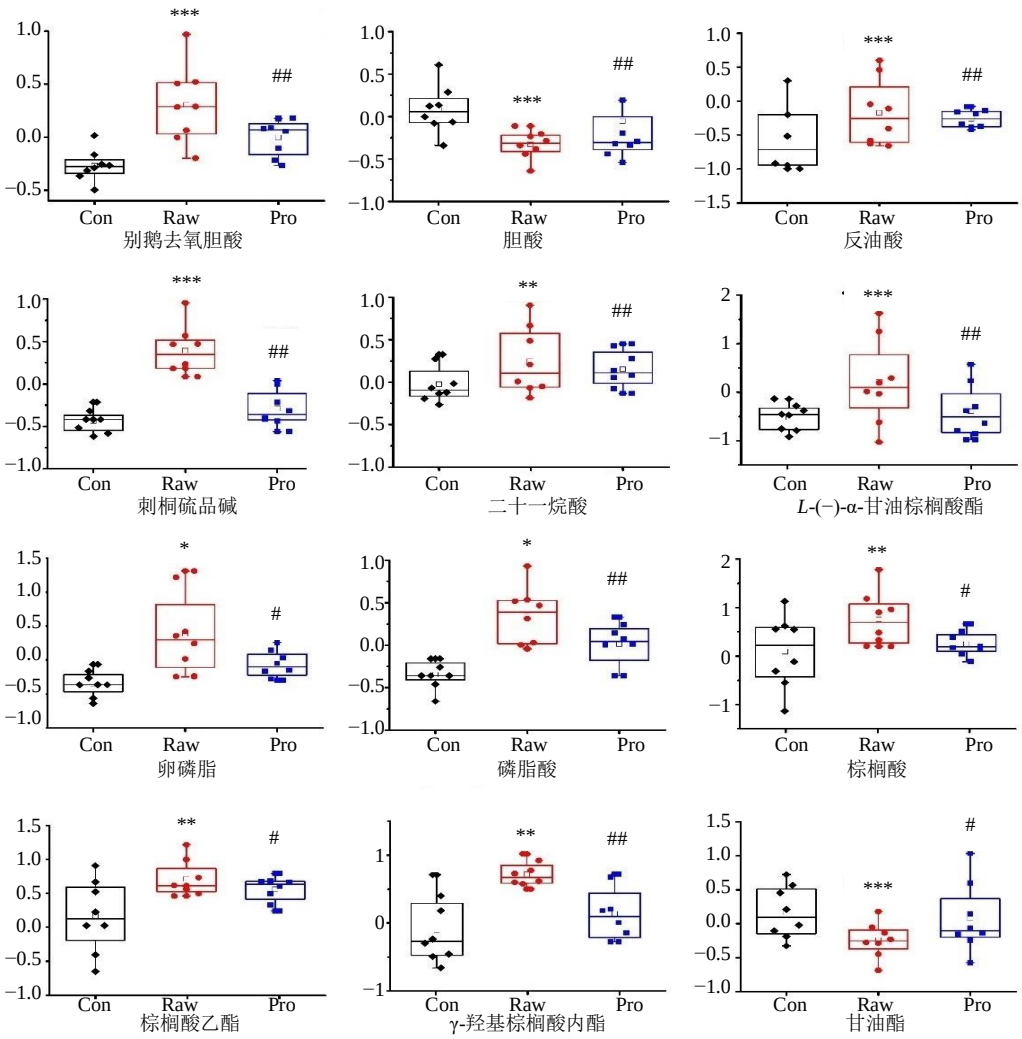


图 5 各组小鼠血清中代谢物趋势的变化

Fig. 5 Changes of metabolite trends in serum of mice in each group

应的作用靶点，如表 3 所示，代谢通路涉及不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸生物合成、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、脂肪酸代谢、原发性胆汁酸生物合成等。如图 6 所示，与标志物相关性最强的是脂肪酸代谢通路。脂肪酸是肝脏吸收、分解的重要来源，酮体是脂肪酸在肝脏进行正常分解代谢所生成的特殊中间产物，肝脏主要参与内源性脂肪的合成与转运。肝细胞主要摄取来自血

表 3　代谢通路分析

Table 3　Summary information of metabolic pathway analysis

代谢通路	匹配	*P*	−lg *P*	Holm *P*	FDR	影响力
biosynthesis of unsaturated fatty acids	3/42	0.004	5.310 0	0.40	0.20	0
fatty acid biosynthesis	2/43	0.005	5.260 0	0.42	0.21	0
linoleic acid metabolism	1/ 6	0.016	4.083 5	1	0.46	0
α-linolenic acid metabolism	1/ 9	0.025	3.681 3	1	0.51	0
fatty acid elongation in mitochondria	1/27	0.074	2.601 8	1	1	0
glycerophospholipid metabolism	1/30	0.082	2.499 6	1	1	0.14
arachidonic acid metabolism	1/36	0.097	2.323 7	1	1	0
fatty acid metabolism	1/39	0.105	2.246 8	1	1	0
primary bile acid biosynthesis	1/46	0.123	2.088 9	1	1	0

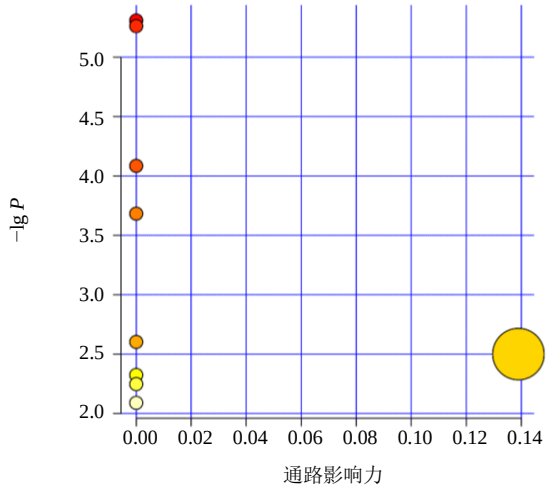


图 6　代谢通路分析

Fig. 6　Metabolic pathway analysis

液中的游离脂肪酸，也摄取血液中经糖代谢转化的游离脂肪酸，再合成甘油三酯、磷脂、胆固醇酯等。脂肪酸代谢途径对肝脏有着重要影响，其代谢产物的改变可能会引起肝脏组织的变化，这可能也是甘草炮制雷公藤可降低肝毒性的重要原因之一。

4　讨论

雷公藤最早收载于《神农本草经》，其性味苦寒有大毒，常外用，不予内服。临床应用中发现雷公藤具有较好的治疗自身免疫性疾病作用，但其毒性作用会导致患者多脏器损伤，临床推广受到极大限制[3-4]。雷公藤的有效剂量与毒性剂量范围重合，难以通过调整临床用量，使其发挥功效并避免毒性反应。甘草作为调和药性的常用中药，味甘，能缓急、解毒[10]，常与雷公藤共同使用来减轻其毒性。本研究结果显示，甘草炮制雷公藤可以有效降低小鼠的肝毒性。课题组前期研究发现雷公藤多苷的代谢水平变化与氨基酸代谢、糖代谢、磷脂代谢、激素代谢等途径相关[16]；常立娟等[17]研究表明雷公藤对肾脏的毒性作用机制可能与氨基酸代谢、磷脂代谢等有关。体内代谢物的变化可以对机体产生很大影响，对这些标志物及代谢通路的研究有利于进一步探讨甘草炮制雷公藤降低肝毒性的作用机制。

肝脏作为机体重要的脂质代谢器官，肝细胞中有参与脂质代谢调控的转录因子和关键酶。雷公藤对肝脏的损伤过程能够引起机体内的脂质代谢紊乱[18]。脂肪酸代谢途径对肝脏有重要影响。本研究结果显示，给予雷公藤后，小鼠体内大量蓄积棕榈酸、二十一烷酸、磷脂酸、磷脂酰胆碱等代谢物，指示雷公藤破坏细胞生物膜，使其无法及时修复或转运，导致部分脂类代谢物堆积，从而加重炎症反应。给予雷公藤的小鼠体内长链脂肪酸如棕榈酸、二十一烷酸等水平升高，给予甘草炮制雷公藤的小鼠体内长链脂肪酸显著降低，表明药物肝毒性使肝细胞内长链脂肪酸的代谢（如脂肪酸的氧化过程）紊乱。指示脂肪酸代谢通路是甘草炮制可降低肝毒性的关键代谢通路。

综上，本研究基于 LC-MS 结合代谢组学技术，表明雷公藤可致小鼠肝毒性，甘草炮制雷公藤后，其肝毒性显著降低，脂肪酸代谢可能是影响雷公藤肝毒性的重要代谢通路。本研究为甘草炮制雷公藤的临床合理应用提供参考依据。

参考文献

[1] Cao L J, Yan M, Ma Y X, *et al*. Isoliquiritigenin protects against triptolide-induced hepatotoxicity in mice through

Nrf2 activation [J]. *Pharmazie*, 2016, 71(7): 394-397.

[2] Bao J, Dai S M. A Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook f. in the treatment of rheumatoid arthritis: Mechanism, efficacy, and safety [J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(9): 1123-1129.

[3] 刘雪梅, 刘志宏, 张 晶, 等. 雷公藤临床应用及不良反应的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2015, 33(2): 110-113.

[4] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 192-195.

[5] 周 聪, 周玲玲, 柳璋璞, 等. 基于肝毒性的雷公藤复方配伍减毒作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(5): 106-109.

[6] Jiang M, Zha Q, Zhang C, *et al*. Predicting and verifying outcome of *Tripterygium wilfordii* Hook f. based therapy in rheumatoid arthritis: From open to double-blinded randomized trial [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9700.

[7] Xu X, Li Q J, Xia S, *et al*. Tripterygium glycosides for treating late-onset rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis [J]. *Altern Ther Health Med*, 2016, 22(6): 32-39.

[8] Landewe R B M, Van d H D. Comment on: 'comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): A randomised, controlled clinical trial' by Qian-Wen *et al* [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(10): e62.

[9] Li X X, Du F Y, Liu H X, *et al*. Investigation of the active components in *Tripterygium wilfordii* leading to its acute hepatotoxicty and nephrotoxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 238-243.

[10] Wang L, Yang R, Yuan B, *et al*. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(4): 310-315.

[11] Gong H, Zhang B K, Yan M, *et al*. A protective mechanism of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*): Isoliquiritigenin stimulates detoxification system via Nrf2 activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 134-139.

[12] 吴 昊, 章从恩, 于小红, 等. 甘草炮制雷公藤对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠的抗炎及免疫调节作用 [J]. 中国中药杂志, 2019, 50(16): 3435-3440.

[13] 赵小梅, 宫 嫚, 董捷鸣, 等. 甘草炮制雷公藤降低其肝毒性作用的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 119-124.

[14] 马致洁, 董捷鸣, 王伽伯, 等. 基于高内涵分析的甘草炮制雷公藤减毒作用研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(11): 1562-1565.

[15] 赵小梅, 浦仕彪, 赵庆国, 等. 基于谱-效相关分析的雷公藤致肝毒性物质基础的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2915-2921.

[16] 赵小梅, 刘歆颖, 续 畅, 等. 基于LC-MS代谢组学的雷公藤多苷致肝毒性生物标志物的初步筛查 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19): 3851-3858.

[17] 常立娟, 李佐静, 李 清, 等. 雷公藤致大鼠肾毒性血清代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 89-94.

[18] Xie T, Zhou X, Wang S, *et al*. Development and application of a comprehensive lipidomic analysis to investigate *Tripterygium wilfordii*-induced liver injury [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(16): 4341-4355.