

• 药理与临床 •

醋制商陆正丁醇部位降低肝肾毒性作用机制研究

丁 锐¹, 王奎龙¹, 沈梦丹¹, 吴 鑫¹, 吴国清^{2,3,4*}, 曹 岗^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007

3. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012

4. 浙江省中药新药研发重点实验室, 浙江 杭州 310063

摘要:目的 采用代谢组学的方法探究商陆 *Phytolacca acinosa* 醋制前后正丁醇部位肝肾毒性的差异及减毒作用机制。方法 采用 UPLC-Q-TOF/MS 的方法对商陆醋制前后正丁醇部位的成分变化进行研究。小鼠 ig 商陆生品正丁醇部位低、高剂量 (27、54 mg/kg) 28 d 后, 通过血清生化指标和病理切片评价商陆醋制前后的肝肾毒性差异; 采用 UPLC-Q-TOF/MS 对血清进行数据采集; 通过 QI、HMDB 及 MetaboAnalyst 5.0 寻找与商陆炮制减毒相关的差异代谢物及代谢通路。结果 商陆醋制后部分皂苷类成分含量下降显著, 并能够明显降低生品导致的肝肾毒性指标的异常升高。病理切片结果显示, 与对照组比较, 生品组的肝、肾组织病变明显; 醋制后病变程度显著减轻。通路富集分析发现胆汁酸代谢可能与商陆醋制减毒密切相关; 进一步对胆汁酸进行半定量分析发现, 商陆醋制后能够改善生品导致的结合型胆汁酸含量的下降及次级胆汁酸含量的升高, 从而改善胆汁酸代谢紊乱。结论 商陆生品具有肝肾毒性, 醋制后皂苷类成分含量下降, 毒性显著降低, 其作用机制可能与改善胆汁酸代谢紊乱密切相关。

关键词: 商陆; 代谢组学; 肝肾毒性; 醋制; 商陆皂苷 I; 商陆皂苷 R; 商陆皂苷 F; 商陆皂苷 E; 商陆皂苷 A; 商陆皂苷 M; 胆汁酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)03-0798-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.013

Mechanism of *n*-butanol position of vinegar-processed *Phytolacca acinosa* on reducing hepatorenal toxicity

DING Rui¹, WANG Kui-long¹, SHEN Meng-dan¹, WU Xin¹, WU Guo-qing^{2,3,4}, CAO Gang¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China

3. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China

4. Key Laboratory of Research and Development of New Chinese Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou 310063, China

Abstract: Objective To investigate the differences of hepatorenal toxicity and mechanism of detoxification before and after vinegar of *n*-butanol fraction of *Phytolacca acinosa* based on metabolomics. **Methods** UPLC-Q-TOF/MS was used to study the composition changes of *n*-butanol fraction of *P. acinosa* before and after vinegar preparation. After 28 d of mice ig *n*-butanol fraction of raw or vinegar-processed *P. acinosa* (27, 54 mg/kg), the difference of hepatorenal toxicity was assessed by serum biochemical indexes and pathological sections; The data of serum were collected by UPLC-Q-TOF/MS; Through QI, HMDB and MetaboAnalyst 5.0, the

收稿日期: 2022-09-24

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (2021ZZ009); 浙江省中医药科技计划项目 (2021ZB086); 浙江省中医药科技计划项目 (2018ZY004); 国家自然科学基金青年基金项目 (82003947); 浙江中医药大学中青年科研创新基金项目 (KC201913); 浙江省基础公益研究计划青山湖联合基金资助项目 (LQY19H280001)

作者简介: 丁 锐, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制学。E-mail: dingrui253841@163.com

***通信作者:** 吴国清, 副主任药师, 研究方向为中药学。E-mail: paipai@126.com

曹 岗, 研究员, 研究方向为中药炮制学。E-mail: caogang33@163.com

differential metabolites and metabolic pathways related to the processing and detoxification of *P. acinosa* were searched. **Results** The content of some saponins in vinegar-processed *P. acinosa* was significantly decreased, and abnormal increase of liver and kidney function indexes caused by raw product could be significantly reduced. The results of pathological section showed that pathological changes of liver and kidney tissues in raw product group were more obvious than those in control group; The degree of pathological changes was significantly reduced after vinegar-processed. The pathway enrichment analysis showed that metabolism of bile acid may be closely related to the detoxification of vinegar-processed *P. acinosa*; Further semi-quantitative analysis of bile acid showed that vinegar-processed *P. acinosa* could improve the decrease of conjugated bile acid content and increase of secondary bile acid content caused by raw products, thereby improving the metabolic disorder of bile acid. **Conclusion** The raw *P. acinosa* has hepatorenal toxicity. The content of saponins and toxicity were significantly decreased after vinegar-processed. Its mechanism may be closely related to the improvement of bile acid metabolism disorder.

Key words: *Phytolacca acinosa* Roxb.; metabolomics; hepatorenal toxicity; vinegar-processed; phytolaccagenin I; phytolaccagenin R; phytolaccagenin F; phytolaccagenin E; phytolaccagenin A; phytolaccagenin M; bile acid

药物在发挥药效的同时,可能会产生一些不良反应,引起机体损伤,这种损伤称之为药物毒副作用,其中以药物的肝肾毒性最为常见。中草药肝肾毒性事件近几年来也引起越来越多的关注,如马兜铃酸引起的肾毒性^[1]及何首乌引起的肝毒性事件^[2],给患者带来痛苦的同时也把中药的安全性问题推向了风口浪尖。在全球范围内,药源性肝损伤^[3]是肝病学家面临的最具挑战性的肝脏疾病之一,中草药的肝肾毒性问题同样严重^[4],随着中药及其制剂在国内外广泛的应用,其安全性问题不容忽视^[5],否则将阻碍中药的现代化及国际化进程。中药炮制是一门传统的制药技术,可以达到增效减毒的作用^[6-8]。峻下逐水类中药是一类临床常用的毒性中药,大多采用醋制法炮制减毒,如芫花二氯甲烷部位醋制后可降低其对大鼠肝肾细胞的氧化损伤^[9],商陆也是其中的代表之一。商陆为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb.或垂序商陆 *P. amerrcana* L. 的干燥根,具有逐水消肿、通利二便的作用^[10]。商陆成分复杂,其毒性成分主要为商陆皂苷类成分^[11],该类成分具有肠道^[12-13]、肝脏^[14-15]及肾脏^[16-17]毒性。目前对于商陆醋制减毒的研究大多集中在商陆的胃肠道刺激性方面,但对于醋制是否能够降低商陆的肝肾毒性却鲜有报道,本研究通过整体动物模型,对血清生化指标及组织病理切片的观察,明确醋制能否降低商陆的肝肾毒性,并进一步通过代谢组学的方法探究其醋制减毒的作用机制。

代谢组学是继蛋白质组学、转录组学后发展起来的围绕机体代谢的新兴组学^[18]。目前代谢组学在中药以及药物毒性研究方面已有较多报道^[19-21], Dong 等^[22]运用代谢组学方法评价天南星对大鼠的肾毒性,为中药毒性的动态和整体研究提供了一个

有前景的工具。Luo 等^[23]通过代谢组学的方法探讨栀子诱导的肝毒性的作用机制,发现胆汁酸代谢和氨基酸代谢紊乱与栀子产生肝毒性密切相关。代谢组学已发展成为中药研究领域一种常规的研究手段。本研究采用代谢组学的方法来研究商陆醋制降低肝肾毒性的作用机制,将为商陆醋制减毒机制的探索提供参考,为中药炮制减毒机制研究提供借鉴。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,3~5 周龄,体质量 18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号 SCXK(沪)2022-0004。动物饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心,恒定温度湿度。动物实验经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准(批准号 IACUC-20221017-14)。

1.2 药材

商陆购自安徽亳州市市场,经南京中医药大学蔡宝昌教授鉴定为商陆 *P. acinosa* Roxb.干燥根。

1.3 药品与试剂

小鼠营养饲料由浙江中医药大学实验动物中心提供;宁化府名特醋购自太原市宁化府益源庆醋业有限公司;羧甲基纤维素钠溶液(批号 190710)购自上海展云化工有限公司;舒泰 50(规格 50 g/L,批号 191123)购自法国维克贸易(上海)有限公司;盐酸赛拉嗪注射液(规格 2 mL/支,批号 200112)购自吉林省华牧动物保健品有限公司;10%福尔马林固定液(批号 20210623)购自北京金克隆生物技术有限公司;石蜡(批号 C12221754)购自上海麦克林生化科技有限公司;包埋盒购自江苏世泰实验器材有限公司;无水乙醇(批号 20200831)购自广东光华科技股份有限公司;黏附载玻片(批号 20082)、盖玻片购自江苏世

泰实验器材有限公司;二甲苯购自上海凇恩科技发展有限公司;甲醇(批号 211218)、乙腈(批号 207025)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;甲酸(批号 J1908039)、熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)对照品(批号 128-13-2, 质量分数 $\geq 98\%$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;硬脂酸(批号 S27A11X122357)、胆酸(cholic acid, CA)对照品(批号 81-25-4)、鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)对照品(批号 474-25-9)、石胆酸(lithocholic acid, LCA)对照品(批号 434-13-9)、甘氨酸鹅脱氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid, GCDCA)对照品(批号 640-79-9)、甘氨酸熊去氧胆酸(glycodeoxycholic acid hydrate, GDCA)对照品(批号 360-65-6)、牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)对照品(批号 516-35-8)、牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)对照品(批号 35807-85-3),以上均购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;中性树胶(批号 20230407)、去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)对照品(批号 83-44-3, 质量分数 $\geq 98\%$)购自北京索莱宝科技有限公司;牛磺脱氧胆酸(taurodeoxycholic acid, TDCA)对照品(批号 516-50-7, 质量分数 $\geq 98\%$)购自成都德思特生物技术有限公司。

1.4 仪器

Spring-S20 型纯水机(厦门锐思捷水纯化技术有限公司);Arcadia H 型石蜡包埋机、RM2255 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);E200MV 型生物显微镜(南京尼康江南光学仪器有限公司);Xevo TQ-S 质谱仪(美国 Waters 公司);真空离心浓缩器(德国 Eppendorf 公司);3100 型全自动生化分析仪(日本日立公司)。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 生品商陆正丁醇部位的制备 取生商陆 10 kg, 放置到提取罐中, 加入 8 倍量的 70%乙醇回流提取 2 h, 残渣加入 6 倍量 70%乙醇回流提取 1 h, 重复上述操作, 合并 3 次提取液, 减压浓缩, 得醇浸膏。将商陆 70%乙醇浸膏用适量水溶解, 采用石油醚、二氯甲烷梯度萃取, 最后加入 4 倍量的水饱和正丁醇, 多次萃取后, 合并萃取液, 回收溶剂, 减压干燥得到正丁醇浸膏, 则为生品商陆正丁醇部位。

2.1.2 醋制商陆正丁醇部位制备 取生品商陆片, 加入米醋拌匀, 闷润至透, 置于炒锅内文火加热, 炒干, 即得醋制商陆(每 100 kg 商陆, 用醋 30 kg^[4])。

取醋制商陆, 按“2.1.1”项下方法制备醋制商陆正丁醇部位, 生品及醋制商陆正丁醇部位得率均为 20%。

2.2 成分分析

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取生醋品商陆正丁醇部位提取物各 1 mg, 甲醇定容至 1 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清待测。

2.2.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈(B), 梯度洗脱: 0~8 min, 18%~33%B; 8~13 min, 33%~90%B; 13~20 min, 90%B。柱温 40 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 1 μ L。

2.2.3 质谱条件 采用 ESI 离子源, 数据全信息串联质谱(MS^E)模式, 正、负离子模式扫描采集, 通过 LockSpray 技术确保每个保留时间采集到准确的碎片信息。正、负离子模式毛细管电压 3.5 kV; 离子源温度 150 $^{\circ}$ C; 去溶剂温度 350 $^{\circ}$ C; 碰撞能量 30~60 eV; MS_1 扫描时间为 0.1 s, MS_2 扫描时间为 0.01 s, 采集离子范围为 m/z 50~2000。

2.3 动物分组及给药

小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组及生品商陆低、高剂量(27、54 mg/kg)^[24]组和醋品商陆低、高剂量(27、54 mg/kg)组, 每组 10 只。各给药组 ig 相应药物, 对照组 ig 5% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 28 d。

2.4 血清生化指标检测

末次给药后, 使用舒泰 50 (70 mg/kg) 联合盐酸赛拉嗪注射液(5 mg/kg)麻醉小鼠后取血, 采集到的血液待低温静置并分层后, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 20 min, 取上层血清, 采用全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性及血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)水平。

2.5 肝、肾组织病理切片观察

小鼠脱颈椎处死后, 用手术剪剪开小鼠的腹腔, 取出两侧肾脏和肝脏, 生理盐水清洗, 吸除多余水分, 浸泡于福尔马林溶液中。自来水清洗, 肾脏组织用刀片对半切开后取一半, 肝脏组织切取大叶上约 3 mm 厚度, 分别放入包埋盒中, 自来水流水冲洗过夜, 次日梯度乙醇脱水, 浸于硬脂酸-石蜡(1:1, 56~58 $^{\circ}$ C) 30 min, 然后浸于石蜡中 40 min, 使用包埋机包埋, 待石蜡冷却后, 去掉包埋槽, 蜡

块室温放置过夜。组织切片前，将蜡块放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 40 min 以上，使用切片机切取病理切片约 4 μm 厚度置于载玻片上，60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱熔蜡 1 h，进行苏木素-伊红 (HE) 染色，中性树胶封片，通风橱中挥发尽二甲苯，于显微镜下观察肝、肾组织病理变化。

2.6 血清代谢组学分析

2.6.1 样品处理 精密移取 100 μL 血清于 1.5 mL 离心管中，加入 300 μL 冰甲醇，涡旋 15 s 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，在真空离心浓缩器中蒸发至近干，然后加入 100 μL 含有同位素标记的胆酸 (2 $\mu\text{g/mL}$) 的 70% 甲醇溶液进行重新溶解，离心，收集上清液于 200 μL 小瓶中，进行 UPLC-Q-TOF/MS 分析。

2.6.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm)；流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B)，梯度洗脱：0~2 min, 20% B；2~12 min, 20%~52% B；12~18 min, 52%~65% B；18~22 min, 65%~90% B；22~26 min, 90%~20% B；26~30 min, 20% B。体积流量 0.3 mL/min；进样量 2 μL 。

2.6.3 质谱条件 带有负离子模式下的电喷雾电离 (ESI) 源，数据范围为 50~2000。毛细管电压 2.5 kV；取样锥电压 40 V；离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$ ；去溶剂温度 500 $^{\circ}\text{C}$ ；锥形气流量 100 L/h；MS₁ 扫描时间为 0.25 s，MS₂ 扫描时间为 0.10 s，仅采集前 7 强母离子。

2.6.4 数据分析 UPLC-MS 原始数据在 Waters MassLynx 软件上进行分析。通过 Progenesis QI 软件导出 CSV 格式文件，利用预测中的变量重要性投

影 (variable importance in projection, VIP) 和单向方差分析的 P 值来识别潜在的生物标志物。通过将 m/z 和 MS/MS 片段离子与人类代谢组数据库 (HMDB, <http://www.HMDB.ca>) 进行比较，确定潜在的代谢标记物。使用 MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.MetaboAnalyst.ca>) 对原始数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)，将整理好的潜在生物标记物导入 MetaboAnalyst 进行通路分析，寻找与商陆醋制减毒相关的代谢通路。

2.6.5 9 种胆汁酸的半定量分析 精密称量 9 种胆汁酸对照品，用含有同位素标记的胆酸 (2 $\mu\text{g/mL}$) 的 70% 甲醇溶液梯度稀释各胆汁酸对照品，配制 9 种胆汁酸。按“2.6.2”“2.6.3”项下条件进样，统计不同浓度下各胆汁酸的响应强度，以内标为参照，按照各胆汁酸响应强度/内标响应强度的比值进行响应强度归一化处理，构建胆汁酸浓度与归一化后的响应强度比值的标准曲线。统计各样本中 9 种胆汁酸与内标的比值，根据标准曲线计算样本种各胆汁酸的相对含量。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据进行正态分布及方差齐性分析之后，采用单因素方差分析对差异的显著性进行检验。

3 结果

3.1 炮制前后商陆正丁醇部位皂苷类成分的鉴定及半定量分析

如图 1 所示，采用 Masslynx 对炮制前后商陆正

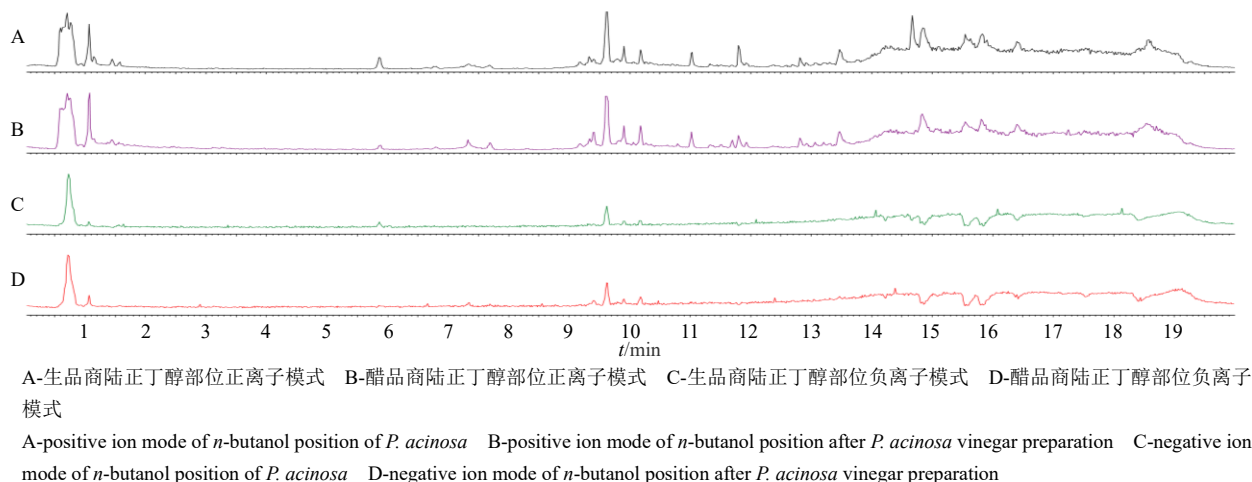


图 1 商陆醋制前后正丁醇部位总离子流图

Fig. 1 Total ion current diagram of *n*-butanol position before and after *P. acinosa* vinegar preparation

丁醇部位的保留时间及分子离子峰进行统计, 结合保留时间和特征碎片等信息, 从生醋品商陆正丁醇部位中共推测鉴定出 6 种皂苷类成分, 见表 1、2。

3.2 血清生化分析

如图 2 所示, 与对照组比较, 商陆生品能够呈剂量相关性地升高血清中 ALT、AST 活性及 BUN、Scr 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明商陆生品导致肝肾功能损伤, 商陆醋品显著降低了生品所导致的肝肾功能指标的升高 ($P < 0.05$), 并呈剂量相关性。

3.3 肝、肾组织病理分析

如图 3 所示, 对照组小鼠肝细胞排列整齐有序, 肝组织结构整体完好, 中央静脉以中心向周围放射状排列, 附近无炎症发生; 生品商陆低剂量组肝组织细胞排列较乱, 胞体较大, 细胞变性明显, 中央静脉周围炎症细胞浸润, 部分细胞坏死; 生品商陆高剂量组肝组织细胞排列混乱, 肝细胞变性严重, 胞体大, 胞质疏松化, 中央静脉周围炎症细胞浸润, 脂肪空泡多, 细胞坏死程度严重, 肝损伤严重; 醋

表 1 正离子模式商陆醋制前后正丁醇部位成分分析

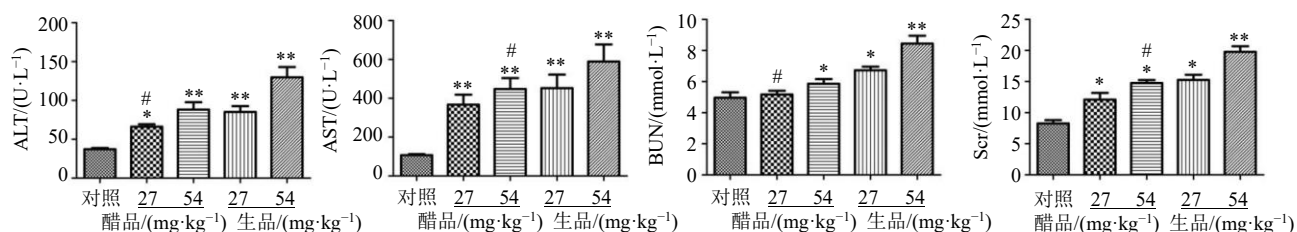
Table 1 Analysis of components in *n*-butanol position before and after *P. acinosa* vinegar preparation in positive ion mode

编号	t_R/min	分子式	相对分子质量 (m/z)	m/z		碎片离子 (m/z)	化合物	峰面积	
				理论值	实测值			生品	醋品
1	10.18	$\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{O}_{22}$	1 018.498 5	1 019.506 3	1 019.561 8	1 020.060 5, 997.563 7, 857.255 8	商陆皂苷 I	1027	541
2	8.95	$\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{O}_{24}$	1 118.550 9	1 119.558 7	1 119.561 3	957.526 7, 795.439 0	商陆皂苷 R	594	527
3	7.33	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$	812.419 4	813.427 3	813.426 1	836.412 5, 651.361 0	商陆皂苷 F	3745	1613
4	7.35	$\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_{11}$	650.366 6	651.374 4	651.361 0	605.331 1	商陆皂苷 E	50 362	48 620
5	9.61	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{16}$	826.435 1	827.442 9	827.441 3	850.426 6, 665.389 1	商陆皂苷 A	41 320	38 715
6	3.96	$\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{22}$	1 002.467 1	1 003.475 0	1 003.473 4	841.418 6	商陆皂苷 M	540	491

表 2 负离子模式商陆醋制前后正丁醇部位成分分析

Table 2 Analysis of components in *n*-butanol position before and after *P. acinosa* vinegar preparation in negative ion mode

编号	t_R/min	分子式	相对分子质量 (m/z)	m/z		碎片离子 (m/z)	化合物	峰面积	
				理论值	实测值			生品	醋品
1	9.34	$\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{O}_{22}$	1 018.498 5	1 017.490 6	1 017.498 1	1 017.493 5, 971.489 3	商陆皂苷 I	2261	1974
2	8.95	$\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{O}_{24}$	1 118.550 9	1 163.543 1	1 163.553 1	1 117.752 8	商陆皂苷 R	333	301
3	7.32	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$	812.419 4	811.411 6	811.413 5	857.419 9	商陆皂苷 F	3795	1334
4	8.31	$\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_{11}$	650.366 6	695.358 8	695.366 6	649.353 9	商陆皂苷 E	441	100
5	9.62	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{16}$	826.435 1	825.427 3	825.426 5	871.433 6	商陆皂苷 A	1622	1355
6	9.79	$\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{22}$	1 002.467 1	1 001.459 3	1 001.500 1	808.824 2	商陆皂苷 M	1675	1356



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与相同剂量的生品组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs raw product group with same dose group

图 2 商陆醋制前后对小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effect of *P. acinosa* before and after vinegar preparation on serum biochemical indexes in mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

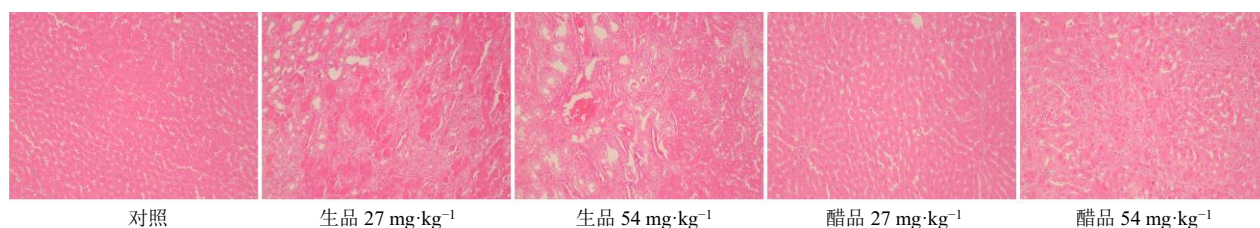


图 3 各组小鼠肝脏病理变化 (HE, $\times 100$)

Fig. 3 Pathological changes in liver of mice in each group (HE, $\times 100$)

品商陆高剂量组肝细胞排列略微紧凑，中央静脉周围炎症缓和，部分可见脂肪空泡和坏死细胞；醋品商陆低剂量组肝细胞排布整齐，中央静脉周围炎症反应少见，坏死细胞和脂肪空泡数量明显减少。

如图 4 所示，对照组小鼠肾小球形态、大小正常，边界清晰，肾小管排列紧密整齐，内部刷状缘结构完整；生品低剂量组部分肾小球萎缩，肾小管上皮细胞空泡化，一些肾小管内部刷状缘结构较不完整，肾间质少量炎性细胞浸润；生品高剂量组肾小球萎缩，内皮和系膜细胞弥漫性增生，近曲小管结构消失，远曲小管继续扩张，肾小管上皮细胞坏

死脱落到管腔中，内部刷状缘结构消失，肾间质炎性细胞浸润严重，部分肾间质纤维化；醋品高剂量组肾小球大小、形态较为正常，肾小管内部刷状缘结构较完整，部分肾小管呈现上皮细胞空泡化，存在轻微炎性细胞浸润；醋品低剂量组肾小球形态、大小正常，肾小管排列整齐紧密，内部刷状缘结构基本完整。

3.4 血清代谢组学的差异性分析

如图 5、6 所示，与生品组比较，醋制组的血清代谢组与对照组更接近，说明商陆醋制后改善了生品导致的代谢紊乱。

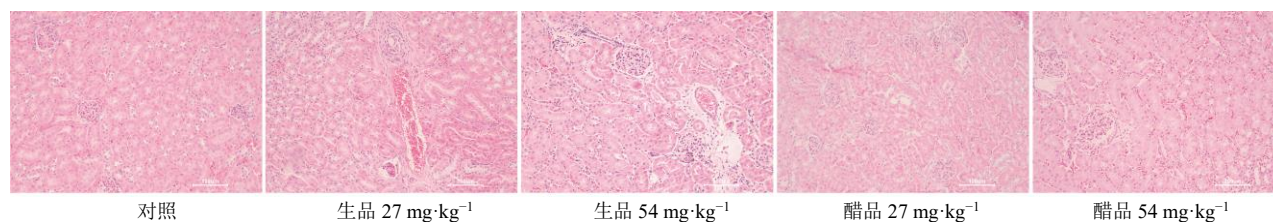


图 4 各组小鼠肾脏病理变化 (HE, $\times 100$)

Fig. 4 Pathological changes in kidney of mice in each group (HE, $\times 100$)

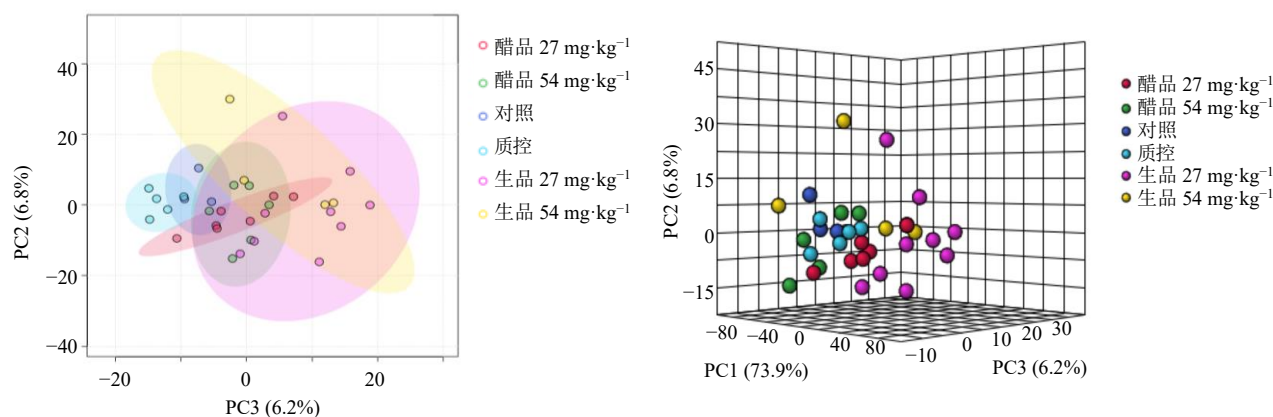


图 5 商陆醋制前后的 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score of *P. acinosa* before and after vinegar preparation

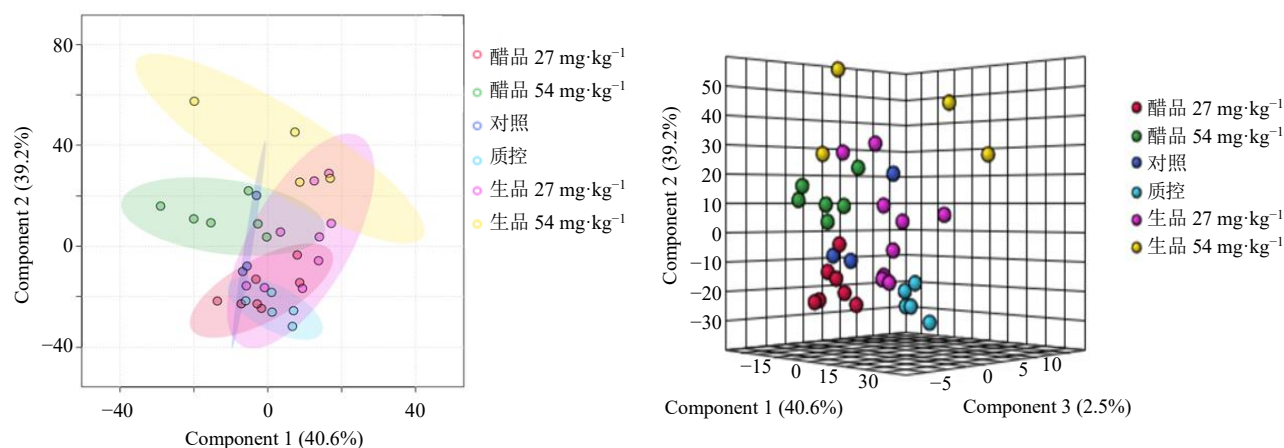


图 6 商陆醋制前后的 PLS-DA 得分图

Fig. 6 PLS-DA score of *P. acinosa* before and after vinegar preparation

3.5 血清代谢物鉴定

根据 Progenesis QI 软件分析结果, 筛选 VIP > 1 的代谢物, 进一步将筛选的代谢物通过 m/z 和

MS/MS 片段离子与 HMDB 数据库 (<http://www.HMDB.ca>) 进行比对, 确定潜在的代谢物。共鉴定出 50 种潜在代谢物 (表 3), 其中 11 种为胆汁酸。

表 3 潜在生物代谢标记物的识别

Table 3 Identification of potential biomarkers

编号	t_R/min	相对分子质量 (m/z)	分子式	代谢物	ID	碎片离子 (m/z)	VIP
1	11.93	391.284 3	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	UDCA	HMDB0000946	353.201 1	1.213 694
2	15.05	391.283 1	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	DCA	HMDB0000626	397.226 6	1.131 208
3	11.56	407.279 3	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	CA	HMDB0000619	411.304 3	1.398 561
4	9.57	407.279 2	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	α -鼠胆酸	HMDB0000506	407.282 9	1.375 725
5	10.23	407.279 6	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	β -鼠胆酸	HMDB0000415	407.290 2, 407.270 9	1.051 671
6	12.04	448.615 4	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	GCDCA	HMDB0002579	449.148 3	1.524 311
7	13.23	448.615 4	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	GDCA	HMDB0242414	447.134 5	1.460 057
8	11.36	498.289 8	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	TCDCa	HMDB0000951	498.288 4	1.751 828
9	11.98	498.289 1	C ₂₆ H ₄₄ NO ₆ S ^{Na}	TDCA	HMDB0000896	498.259 4	1.622 557
10	9.12	514.284 4	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	TCA	HMDB0000036	514.283 4	1.541 934
11	8.91	498.289 4	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S ₂ H ₂ O	TUDCA	HMDB0000874	498.289 7, 499.294 6	1.426 311
12	1.83	173.234 3	C ₁₁ H ₁₄ N ₂	3-二甲氨基甲基吡啶	HMDB0035762	172.990 5, 173.762 1, 93.034 4	1.065 732
13	0.61	145.181 2	C ₉ H ₁₀ N ₂	吡啶-3-甲胺	HMDB0029740	145.097 5	1.379 137
14	1.26	231.227 3	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	吡啶-3-乙酰甘氨酸	HMDB0240661	143.951 5, 151.040 8, 230.997 3	1.118 717
15	4.30	144.150 0	C ₉ H ₇ NO	3-吡啶甲胺	HMDB0029737	144.898 1	1.230 908
16	5.27	201.022 4	C ₈ H ₁₀ O ₄ S	4-ethylphenylsulfate	HMDB0062551	201.022 1, 121.065 9	3.734 253
17	0.99	96.959 9	H ₂ O ₄ S	硫酸盐	HMDB0001448	96.952 6, 97.087 9, 251.032 6	2.469 673
18	3.01	187.006 2	C ₇ H ₈ O ₄ S	对甲酚硫酸盐	HMDB0011635	107.049 9, 187.005 7	3.536 691
19	1.75	189.164 0	C ₁₄ H ₂₂	2-methyl-2-phenyl-undecane	HMDB0013820	109.028 8, 188.985 5, 189.982 2	1.471 172
20	3.43	206.081 6	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	N-乙酰-L-苯丙氨酸	HMDB0000512	206.081 9	1.867 215
21	25.01	248.972 3	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₄	3,5-dichloro-4-hydroxy-2-methoxy-6-methylbenzoic acid	HMDB0033822	248.973 0	1.113 981
22	1.22	261.008 4	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	酸式硫酸盐	HMDB0011719	137.059 7, 181.052 3, 261.010 2	1.383 158
23	21.81	301.216 9	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	二十碳五烯酸	HMDB0001999	301.217 1, 257.227 0, 203.179 2	1.883 494
24	22.50	327.255 4	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	MG[0:0/16:1(9Z)/0:0]	HMDB0011534	327.232 7, 395.224 1	3.026 637
25	10.44	335.059 8	C ₁₆ H ₁₆ O ₆ S	3-hydroxy-2-(3-methoxyphenyl)-5-sulfinyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-7-olate	HMDB0127797	335.059 2, 255.102 0, 121.028 9	1.780 826
26	22.42	353.233 3	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	prostaglandin F2a	HMDB0001139	353.142 8	2.422 881
27	13.71	378.241 1	C ₁₈ H ₃₈ NO ₅ P	磷酸鞘氨醇-1	HMDB0000277	78.958 9	3.039 077
28	22.90	379.157 9	C ₂₀ H ₂₈ O ₅ S	脱氢松香酸	HMDB0015613	379.153 9, 335.167 5, 333.154 3	3.541 157
29	22.52	395.427 8	C ₂₇ H ₅₀ O	25-甲基-1-二十六烷醇	HMDB0029994	327.232 8, 283.243 3	1.924 151
30	11.59	453.266 4	C ₂₈ H ₃₈ O ₅	withanolide B	HMDB0030020	407.280 3, 411.304 7	3.197 343
31	17.22	480.309 2	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	lysoPC(15:0)	HMDB0010381	224.068 8, 255.232 3, 480.309 2	7.375 754
32	8.99	497.168 9	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₂	eucaglobulin	HMDB0036742	497.288 9, 117.930 0	1.999 479
33	16.33	504.309 4	C ₂₅ H ₄₈ NO ₇ P	lysoPE[0:0/20:2(11Z,14Z)]	HMDB0011483	504.309 6	5.468 718
34	19.25	746.471 5	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	克拉霉素	HMDB0015342	747.586 4, 687.545 7	1.367 933
35	23.96	802.559 6	C ₄₃ H ₈₂ NO ₁₀ P	PS[15:0/22:1(13Z)]	HMDB0112335	802.560 3	17.905 71
36	13.64	873.788 9	C ₅₆ H ₁₀₆ O ₆	TG[14:0/15:0/24:1(15Z)]	HMDB0042105	459.201 2, 365.342 5	3.783 932
37	0.92	89.024 0	C ₃ H ₈ O ₄	2,2-二氢过氧丙烷	HMDB0034260	89.025 4, 92.930 7	1.233 738
38	1.59	159.066 1	C ₇ H ₁₄ O ₅	2-O-methyl-L-fucose	HMDB0033789	161.897 8, 74.024 7, 75.025 2, 89.025 2	1.182 015
39	4.03	163.060 8	C ₆ H ₁₄ O ₆	半乳糖醇	HMDB0000107	162.893 0, 161.894 6, 164.893 0	1.514 657
40	1.74	178.050 0	C ₉ H ₁₁ NO ₄	左旋多巴	HMDB0000181	134.067 3, 178.051 3, 132.046 4	1.205 982
41	1.81	189.164 4	C ₁₄ H ₂₄ O	2-癸基呋喃	HMDB0032215	109.028 1, 191.066 1, 109.028 1	1.471 171
42	3.20	204.065 8	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	N-乙酰-L-酪氨酸	HMDB0000866	205.071 4, 158.060 7	1.891 541
43	3.42	206.081 6	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄	(2S)-2-amino-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-methylpropanoic acid	HMDB0142154	206.081 9, 207.088 2, 187.848 6	1.867 215
44	1.70	245.011 9	C ₉ H ₁₂ O ₇ S	3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸盐	HMDB0000559	245.012 1, 183.065 9, 165.054 8	1.113 516
45	0.70	248.959 6	C ₁₂ H ₉ ClO ₅ S ₂	5-(4-chloro-3-hydroxy-1-butynyl)-2,2'-bithiophene	HMDB0033269	112.984 8, 248.962 0, 316.948 0	2.230 621
46	10.35	249.114 1	C ₁₄ H ₂₀ O ₅	kamahine C	HMDB0038935	248.972 8, 112.987 8	1.241 713
47	21.81	301.216 9	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	5,6-epoxy-8,11,14-eicosatrienoic acid	HMDB0002190	301.217 1, 203.179 2, 257.227 0	1.999 045
48	5.61	321.043 2	C ₁₅ H ₁₆ O ₇ S	{3-[2-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)ethyl]phenyl} oxidanesulfonic acid	HMDB0129929	321.043 8, 241.086 5, 121.028 9	6.337 793
49	23.06	329.248 3	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	2-羟基-6-十五烷基苯甲酸	HMDB0029683	328.248 5, 397.232 9	1.850 637
50	4.04	333.112 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	黄腐酚 C	HMDB0030234	333.012 3, 253.051 0	1.468 792

3.6 通路富集分析

使用 MetaboAnalyst 5.0 对鉴定的代谢物进行通路富集分析, 阐述商陆醋制后调节何种代谢通路从而降低肝肾毒性作用, 共发现 11 条富集通路, 其中初级胆汁酸代谢为最主要的代谢通路 (图 7)。

进一步使用 Masslynx 软件结合同位素胆酸内标, 对初步鉴定的 9 种胆汁酸进行半定量分析, 比较各组血清中不同胆汁酸的含量差异, 如图 8 所示, 部分次级胆汁酸 (DCA、LCA) 在商陆给药后含量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 醋制后能够减少次级胆汁酸的含量。而结合型胆汁酸 (GCDCA、GDCA、TCDCA、TDCA) 在生品给药后含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 醋制后能够提高结合型胆汁酸的含量 ($P < 0.05$ 、 0.01)。但商陆醋制前后初级胆汁酸 (CA、CDCA) 的含量变化并不显著, 并且醋制前后与对

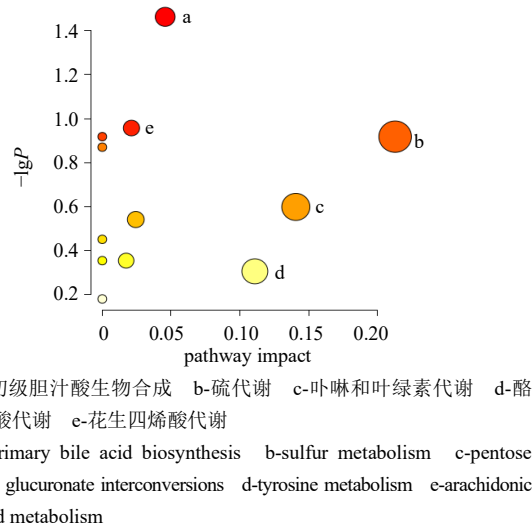


图 7 通路富集分析

Fig. 7 Pathway enrichment analysis

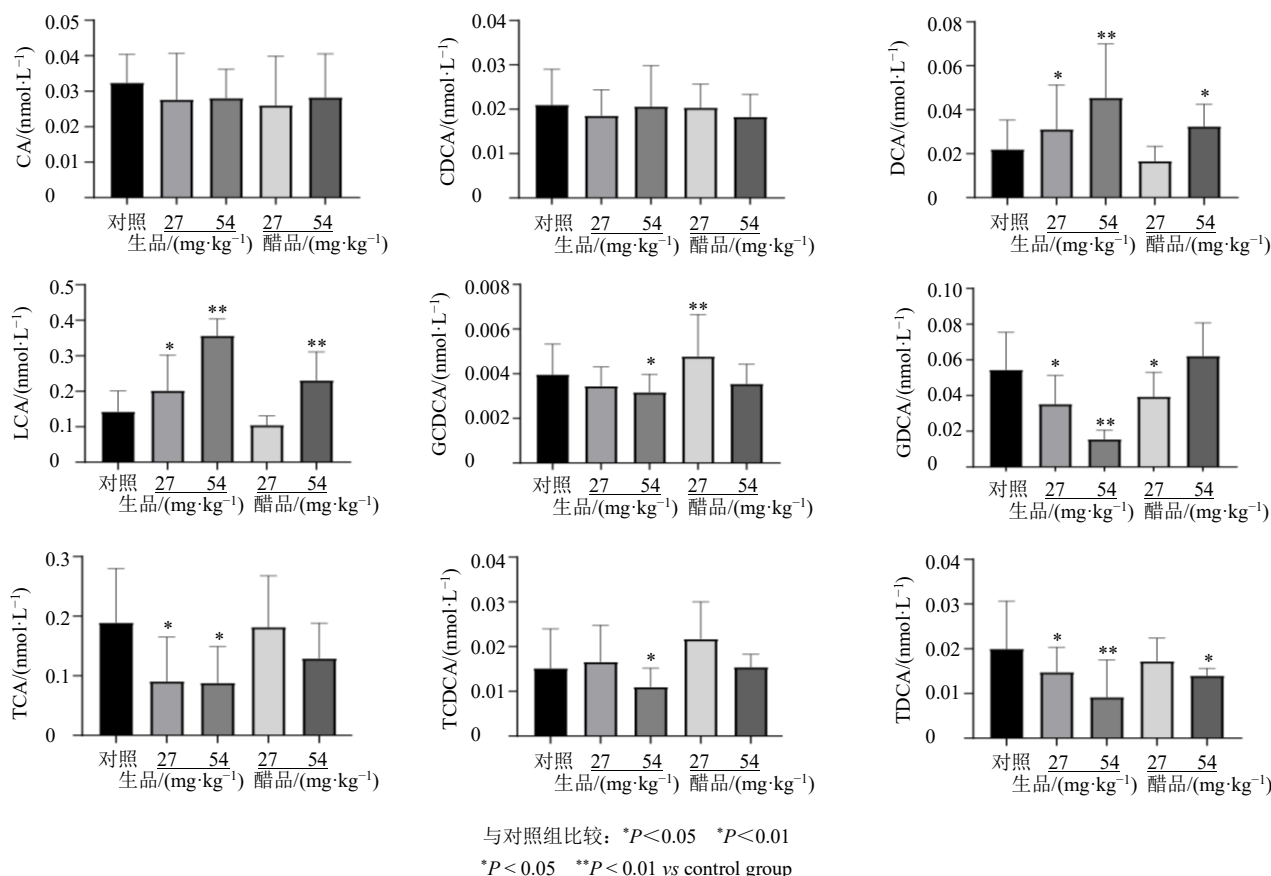


图 8 9 种胆汁酸相对含量统计分析 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 8 Statistical analysis of relative content of nine bile acids ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

照组比较均无显著性差异。表明商陆醋制后可以通过减少次级胆汁酸的含量并增高结合型胆汁酸的含量改善生品诱导的胆汁酸代谢谱的改变, 可能是其减毒的作用机制。

4 讨论

商陆为商陆科植物商陆 *P. acinosa* Roxb.或垂序商陆 *P. americana* L.的干燥根, 味苦、性寒; 归肺、脾、肾、大肠经; 具有逐水消肿、通利二便的

功效^[25]。商陆生品有毒，常采用醋制法炮制减毒，目前对商陆醋制减毒的研究主要集中在胃肠道方面，但胃肠道毒性反应仅仅是商陆毒性作用的一个方面。文献报道及课题组前期研究均显示商陆具有肝肾毒性作用^[14-17,26-27]，并发现商陆主要毒性部位为正丁醇部位^[12]，主要毒性成分为皂苷类成分^[11]。基于此，本研究拟通过对商陆醋制前后肝肾毒性的比较并结合代谢组学的研究手段探索商陆醋制降低肝肾毒性的作用机制。

通过对醋制前后商陆正丁醇部位成分的分析发现，6 种皂苷类成分的含量在醋制后显著降低，推测可能是由于此类成分中的糖苷键结构不稳定，在醋制酸性以及加热的条件下发生水解生成苷元导致含量下降，但苷元及皂苷的毒性差异仍需进一步的实验研究。通过整体动物模型发现生品商陆会导致 ALT、AST、BUN、Scr 等肾功能指标表达增高，醋制后能够显著降低这些指标，并呈剂量相关性。进一步通过肝、肾的组织病理切片证实商陆正丁醇部位会导致肝肾组织损伤，醋制后一方面肝脏炎症反应、脂肪空泡和坏死细胞明显减少；另一方面肾脏中肾小球形态接近正常组织、肾小管组织亦恢复正常，说明醋制确实能够减缓生品商陆的肝肾毒性作用。为了进一步阐明商陆醋制减毒的作用机制，进一步采用非靶向代谢组学对各组小鼠血清样本进行分析。PCA 及 PLS-DA 的分析结果显示，生品商陆会导致小鼠代谢的紊乱，而醋制后能够改善代谢紊乱。进一步通过 Progenesis QI 软件筛选 VIP 值大于 1 的代谢物，结合 HMDB 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 等公共数据库对代谢物的二级质谱图进行比对，初步筛选鉴定出 50 种可能与商陆醋制减毒相关代谢物。对鉴定出的代谢物进行通路富集分析发现，10 种代谢途径可能与商陆醋制减毒相关，主要涉及初级胆汁酸合成、硫代谢、卟啉和叶绿素、酪氨酸和花生四烯酸的代谢等，而其中最显著的是初级胆汁酸生物合成代谢通路。

肝脏在胆汁酸代谢中占重要地位，与胆汁酸的合成、分泌、转化等密切相关，一些研究显示胆汁酸的变化可以作为肝损伤的代谢组学标志物，如槲子中京尼平苷可通过调节甘胆酸等多种胆汁酸代谢，尤其是初级胆汁酸的生物合成从而诱导肝损伤^[23,28]。初级胆汁酸是一种重要的内源性代谢物，它们在肝脏中由胆固醇合成，并形成结合性胆

汁酸后经由胆管分泌至肠道，在肠道菌群的作用下进一步代谢为次级胆汁酸，在空肠末端或回肠，通过门静脉系统再回流入肝脏，形成肝肠循环^[29]。本研究发现胆汁酸代谢异常可能与商陆醋制减毒相关，为进一步探索商陆醋制前后如何影响胆汁酸代谢降低肝肾毒性的作用机制，本研究进一步对差异胆汁酸进行半定量分析，发现商陆能够增加血清中去氧胆酸、石胆酸等次级胆汁酸的含量并减少结合型胆汁酸的含量，醋制后能够提高结合型胆汁酸含量并降低次级胆汁酸含量，改善胆汁酸代谢谱的紊乱，说明商陆醋制后可以改善胆汁酸代谢失衡。研究显示，胆汁酸代谢谱的改变会造成肝脏炎症反应，导致肝脏的损伤，且次级胆汁酸的肝细胞毒性作用明显强于结合型胆汁酸^[30-31]。另一方面，次级胆汁酸进入肾脏后，也会诱发肾小管上皮细胞的损伤，导致肾脏功能的受损^[32]。基于此，本研究推测商陆导致的肝肾毒性可能与其导致的胆汁酸代谢紊乱密切相关，商陆醋制后可能会通过改善胆汁酸代谢失衡从而降低肝肾毒性作用。

此外，酪氨酸代谢及花生四烯酸代谢可能也与商陆醋制减毒相关^[33-34]。酪氨酸代谢通路的产物甲状腺激素可以导致肝脏脂质代谢发生紊乱，进而使肝功能的进一步恶化^[35]。花生四烯酸是生物体内分布最广泛且具有重要生物活性的一种 omega-6 多不饱和脂肪酸^[36]。花生四烯酸及其代谢产物可以影响环氧化酶 P450 途径，参与各种组织的炎症反应，在肝脏功能损伤中具有重要作用^[33]。硫代谢及卟啉和叶绿素代谢也是商陆醋制降低肝肾毒性的重要代谢通路。

本研究表明，商陆正丁醇部位可能是其导致肝肾毒性的主要部位，醋制后能够降低商陆正丁醇部位的肝肾毒性。商陆诱导的肝肾毒性与胆汁酸代谢紊乱相关，醋制能够显著改善胆汁酸代谢紊乱，从而降低肝肾毒性。但本研究也存在一些不足之处，如对胆汁酸代谢失衡缺乏深入的探索，研究显示胆汁酸代谢特别是结合型胆汁酸转化为次级胆汁酸需要肠道菌群参与，因此，本研究推测商陆醋制改善胆汁酸代谢失衡降低肝肾毒性作用可能与肠道菌群紊乱密切相关。后续研究中本研究将通过对肠道菌群的研究探索商陆醋制调节肠道菌群改善胆汁酸代谢紊乱的具体作用机制，推进商陆醋制减毒作用机制研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘斯, 郭旭, 姜晓文, 等. 马兜铃酸 A 致大鼠肾病的肾毒性作用机理研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2021, 40(1): 5-11.
- [2] 杨建波, 高博闻, 孙华, 等. 何首乌肝毒性物质基础研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2022, 19(6): 610-614.
- [3] 杜敏, 江振洲, 张陆勇. 常用免疫抑制剂致肝损伤的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 982-988.
- [4] Andrade R J, Aithal G P, Björnsson E S, et al. EASL clinical practice guidelines: Drug-induced liver injury [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(6): 1222-1261.
- [5] Andrade R J, Chalasani N, Björnsson E S, et al. Drug-induced liver injury [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 58.
- [6] Li C N, Gao X, Gao X C, et al. Effects of medicine food *Fructus Gardeniae* on liver and kidney functions after oral administration to rats for 12 weeks [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(7): e13752.
- [7] 胡俊明, 蒋孟良. 中药炮制对药物治疗效果及不良反应的影响 [J]. 光明中医, 2022, 37(4): 568-570.
- [8] 丁靖. 中药炮制对药物性能功效及理化性质的影响研究 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(12): 117.
- [9] 周琴蓉, 孙盼盼, 肖林焱, 等. 醋炙降低芫花二氯甲烷部位对大鼠肝肾细胞毒性的分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 35-39.
- [10] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 338.
- [11] 黄宏威, 刘传鑫, 颜昌钰, 等. 商陆的化学成分与药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(3): 188-198.
- [12] 张程超, 郁红礼, 吴皓, 等. 商陆正丁醇部位醋制前后肠道毒性变化研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 216-219.
- [13] 张程超. 商陆肠道毒性及炮制解毒机理的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [14] Cao D, Zhao C J, Li Z Q, et al. Combined metabolomics and network toxicology to explore the molecular mechanism of *Phytolacca acinose* Roxb.-induced hepatotoxicity in zebrafish larvae *in vivo* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 3303014.
- [15] 孙红想. 商陆醋炙前后成分变化及对 CCl₄ 诱导鸡肝损伤的保护作用研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2019.
- [16] 孙文学, 盛云华, 黄坚, 等. 商陆利尿作用与肾毒性研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(23): 3586-3592.
- [17] 周倩, 姚广涛, 金若敏, 等. 商陆皂苷甲致肾细胞毒性的研究 [J]. 世界中医药, 2014, 9(2): 151-154.
- [18] 叶竹标, 张伟刚, 李春英, 等. 代谢组学及其在慢性炎症性皮肤病中的研究进展 [J]. 临床皮肤科杂志, 2021, 50(7): 441-443.
- [19] 郑海生, 蒋健. 基于代谢组学慢性心力衰竭肾阳虚证代谢模式的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(5): 645-647.
- [20] 邵渊, 吴波, 王东文. 基于代谢组学的肾细胞癌生物标志物研究进展 [J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2020, 12(4): 249-252.
- [21] 高继宁, 任云城, 沈丽萍, 等. 慢性肾衰竭早中期脾肾气虚证患者尿液代谢组学研究 [J]. 山西中医, 2017, 33(11): 42-46.
- [22] Dong G, Wang J S, Guo P P, et al. Toxicity assessment of *Arisaematis Rhizoma* in rats by a ¹H-NMR-based metabolomics approach [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(2): 407-417.
- [23] Luo Y S, Gao F Y, Chang R R, et al. Metabolomics based comprehensive investigation of *Gardeniae Fructus* induced hepatotoxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112250.
- [24] 张程超. 商陆肠道毒性及炮制解毒机理的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [25] 吕瑞华, 冯昭, 马添翼, 等. 商陆的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4798-4808.
- [26] 张茜, 姚广涛, 金若敏, 等. 商陆皂苷甲对肝肾毒性的初步研究 [A] // 首届中国药物毒理学年会 (2011 年) 暨国际药物非临床安全性评价研究论坛论文集 [C]. 北京: 中国毒理学会, 2011: 232.
- [27] 周倩, 姚广涛, 金若敏, 等. 商陆皂苷甲致肝毒性的研究 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 14-18.
- [28] Nunes de Paiva M J, Pereira Bastos de Siqueira M E. Increased serum bile acids as a possible biomarker of hepatotoxicity in Brazilian workers exposed to solvents in car repainting shops [J]. *Biomarkers*, 2005, 10(6): 456-463.
- [29] 马荣, 谢倩, 王建, 等. 基于代谢组学研究厚朴远志配伍醇提物对尿液代谢物的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(6): 870-877.
- [30] 沈斐斐, 陆伦根. 胆汁淤积性肝病的病因 [J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(6): 644-646.
- [31] Beuers U, Trauner M, Jansen P, et al. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: From UDCA to FXR, PXR and beyond [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1 Suppl): S25-S37.
- [32] Kronen E, Wagner M, Eller K, et al. Bile acid-induced cholemic nephropathy [J]. *Dig Dis*, 2015, 33(3): 367-375.
- [33] 倪安妮, 梁清洋, 姚鸿飞, 等. 花生四烯酸代谢基因对小鼠肝细胞癌中环氧化酶 P450 途径的影响 [J]. 基础医学与临床, 2020, 40(8): 1053-1058.
- [34] Jia W, Xie G X, Jia W P. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(2): 111-128.
- [35] 赵建存, 宋英杰, 王振圣, 等. 苯丙氨酸/酪氨酸代谢途径及其相关产物与非酒精性脂肪肝的关系 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2022, 29(3): 404-409.
- [36] 杨婍, 王彦, 闫超. 花生四烯酸代谢物定量方法的建立及在目标代谢组学中的应用 [A] // 第二十届全国色谱学术报告会及仪器展览会论文集 (第四分册) [C]. 北京: 中国化学会、中国色谱学会, 2015: 22.

[责任编辑 李亚楠]