

• 药理与临床 •

整合代谢组学和网络药理学探究蕪艾的安全性及毒理学机制

陈 乐^{1,3}, 汪喻巧¹, 朱芸芸¹, 徐文丽¹, 杜鸿志^{1,2*}, 刘大会^{1,2*}

1. 湖北中医药大学 中药资源中心, 湖北 武汉 430065

2. 湖北中医药大学 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

3. 南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 基于代谢组学和网络药理学分析相结合的方法探究蕪艾 *Artemisia argyi* 的安全性及毒理学机制。方法 采用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(ultra performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)技术分析蕪艾挥发油组分(essential oil from *A. argyi*, AAEO)、石油醚组分、醋酸乙酯组分、正丁醇组分和水组分的化学组成; 利用 KM 小鼠连续 7 d 给药评价 AAEO 和 4 个非挥发性组分的安全性; 代谢组学技术检测 AAEO 干预前后肝脏内源性代谢物的变化; 网络药理学分析 AAEO 肝毒性的潜在成分和作用靶点; 整合代谢组学和网络药理学并构建“代谢物-反应-酶-基因”相互作用网络揭示 AAEO 肝毒性的毒理学机制。结果 共鉴定出 AAEO 中 39 个成分, 占挥发油含量的 89.30%; 从 4 个非挥发性组分中共鉴定出 34 个成分。与对照组比较, AAEO 显著增加小鼠肝脏指数 ($P < 0.05, 0.01$), 上调肝脏丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)的活性 ($P < 0.01$), 并损伤肝脏组织病理结构呈现出明显肝毒性。代谢组学结果显示给予 AAEO 后肝脏的 17 个代谢物水平发生显著变化, 包含 9 种氨基酸, 主要涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等途径; 网络药理学分析提示樟脑、侧柏酮、石竹素、(-)-宁酮等 10 个成分是 AAEO 中潜在的肝毒性物质; 整合代谢组学和网络药理学分析筛选出苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)为 AAEO 肝毒性的关键靶点, 且 PAH mRNA 和蛋白表达在 AAEO 高、低剂量组均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 揭示 AAEO 通过下调 PAH 表达抑制酪氨酸生物合成产生肝毒性。分子对接结果显示 10 个潜在毒性物质与 PAH 结合能均小于 -20.00 kJ/mol。结论 结合代谢组学和网络药理学阐明了蕪艾的毒性组分、可能的毒性物质及毒理学机制, 为蕪艾产业的发展和临床应用提供了依据。

关键词: 蕪艾; 安全性; 代谢组学; 网络药理学; 苯丙氨酸羟化酶; 挥发油; 樟脑; 侧柏酮; 石竹素; (-)-宁酮

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3331-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.012

Safety and toxicological mechanism of *Artemisia argyi* based on integrated metabolomics and network pharmacology

CHEN Le^{1,3}, WANG Yuqiao¹, ZHU Yunyun¹, XU Wenli¹, DU Hongzhi^{1,2}, LIU Dahui^{1,2}

1. Resource Center for Chinese Materia Medica, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

收稿日期: 2023-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32270391); 湖北省自然科学基金资助项目(2023AFA032, 2022CFB391); 湖北省中医药管理局重点项目(ZY2023Z023)

作者简介: 陈 乐, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: chenle9169@163.com

*通信作者: 刘大会, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源研究。E-mail: liudahui@hbtcm.edu.cn

杜鸿志, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: dhz3163@hbtcm.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the safety and toxicological mechanism of *Artemisia argyi* based on combination of metabolomics and network pharmacological analysis. **Method** The chemical compositions of essential oil from *A. argyi* (AAEO), petroleum ether fraction, ethyl acetate fraction, *n*-butanol fraction and water fraction of *A. argyi* were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and ultra performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). The safety of AAEO and four non-volatile fractions of *A. argyi* was evaluated in KM mice for 7 d. Metabonomics technique was used to detect the changes of endogenous metabolites in liver before and after AAEO intervention. The potential components and targets of hepatotoxicity of AAEO were analyzed by network pharmacology. The toxicological mechanism of AAEO hepatotoxicity was revealed by integrating metabolomics and network pharmacology and constructing a “metabolite-reaction-enzyme-gene” interaction network. **Results** A total of 39 components were identified in AAEO, accounting for 89.30% of the essential oil content, and 34 components were identified from four non-volatile fractions. Compared with control group, AAEO significantly increased the liver coefficient ($P < 0.05, 0.01$), up-regulated the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in liver ($P < 0.01$), and damaged the pathological structure of the liver showing obvious hepatotoxicity. Metabonomics revealed significant changes in the levels of 17 metabolites in the liver after AAEO intervention, including nine amino acids, mainly involved in phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism. The network pharmacological analysis suggested that 10 components of AAEO, including (+)-camphor, thujone, caryophyllene oxide and (+)-3-thujone were potential hepatotoxic substances. Integrated metabonomics and network pharmacology analysis identified phenylalanine hydroxylase (PAH) as the key target of AAEO hepatotoxicity, and *PAH* mRNA and protein expressions were significantly decreased in both high and low dose groups of AAEO ($P < 0.05, 0.01$), revealing that AAEO produced hepatotoxicity by down-regulating PAH expression and inhibiting tyrosine biosynthesis. The results of molecular docking showed that the binding energies of 10 potentially toxic substances to PAH were all less than -20.00 kJ/mol. **Conclusion** The toxic fraction, possible toxic substances and toxicological mechanism of *A. argyi* were clarified by combining with metabonomics and network pharmacology, which provides a basis for the development and clinical application of *A. argyi* industry.

Key words: *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. var. *argyi* 'Qiai'; safety; metabolomics; network pharmacology; phenylalanine hydroxylase; essential oil; (+)-camphor; thujone; caryophyllene oxide; (+)-3-thujone

中药被公认为是绿色、安全、高效的药物来源，近年来随着中医药在世界范围内的认可度不断提高，其安全性越来越受到重视。艾叶作为我国大宗中药材，具有温经通络、止血、抗过敏、抗肿瘤、抗炎、抗菌等诸多功效，在食品领域作为茶饮和小吃也极为常见^[1-3]。然而，临床上曾有艾叶使用不当导致中毒、引起黄疸性肝炎及急性肝损伤等案例，导致艾叶安全性饱受争议^[4]。实际上，历代本草著作中对艾叶安全性均有记载，追溯至最早的《名医别录》，到《新修本草》《食疗本草》《食物本草》《本草纲目》等多部典籍均直接注明无毒^[5]；《图经本草》载其“有毒，其毒发则热气冲上，狂躁不能禁”^[6]；《中国药典》自 1963 年版收载艾叶未注明有毒，1977 年版及其后将其列为“小毒”。虽然，已有部分实验研究在使用剂量远高于《中国药典》规定人等效剂量下探究了艾叶挥发油的急性肝毒性，但由于不太符合应用实际情况，参考价值有限，而且具体毒性成分尚未解析^[7-8]。此外，艾叶水溶性、醇溶性成分的毒性仍不明确。重要的是，之前研究均未对历代医家推崇的“蕪艾”进行安全性评价，蕪艾是否和

其他艾叶毒性有区别，亟待考察。

代谢组学可从整体代谢的角度详尽而具体地概述生物体涉及病理或毒理学事件的内源性代谢状态，从而为识别药物的毒理学机制提供有价值的证据，这与中医药的整体思维较一致^[9]。网络药理学通过构建疾病-靶点-药物相互作用网络，可以其全局性和系统性的研究优势为中药毒理学机制的研究提供新的概念^[10]。基于此，本研究以湖北道地药材蕪艾为研究对象，采用气相色谱-质谱（gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）和超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱（ultra performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS）全面解析蕪艾挥发性和非挥发性组分的化学成分，利用 KM 小鼠连续 7 d ig 给予蕪艾挥发性和非挥发性组分评价各组分的安全性，并以 ¹H-NMR 代谢组学技术阐明毒性组分对内源性代谢物的影响机制。最后，整合网络药理学建立药物-成分-疾病-靶点网络和代谢-反应-酶-基因相互作用网络，系统阐述蕪艾毒性物质和作用机制，以期为蕪

艾的临床安全应用提供理论基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 KM 小鼠 132 只, 雌雄各半, 体质量 18~20 g, 购自湖北省疾病预防控制中心, 许可证号 SCXK (鄂) 2020-0018。动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心, 温度 23~25 °C, 相对湿度 45%~55%, 光照 12 h, 自由进食饮水。动物实验经湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 HUCMS44453574)。

1.2 药材

蕲艾采自湖北省黄冈市蕲春县, 经湖北中医药大学刘大会教授鉴定为蕲艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. var. *Qiai*'。

1.3 药品与试剂

乙醇、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇购自中国医药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯; 色谱级甲醇、乙腈、甲酸购自德国默克公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 20211128)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 20211128)、尿素氮 (urea nitrogen, BUN) 试剂盒 (批号 20211205)、肌酐 (creatinine, CRE) 试剂盒 (批号 20211205) 购自南京建成生物科技有限公司; 实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒 (批号 U8227) 购自天根生化科技有限公司; 苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, PAH) 抗体 (批号 A20949) 购自 Abclonal 公司。

1.4 仪器

Trace 1310 型气相质谱联用仪、TG-1701MS 型毛细管柱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Waters Acquity I-Class UPLC 超高效液相色谱仪串联 Waters Xevo G2-S 飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司); BC-5000VET 型全自动动物血液细胞分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); Avance III 500 MHz 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); 5804 R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); Synergy 2 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 蕲艾挥发油 (essential oil from *A. argyi*, AAEO) 及非挥发性组分的制备

参照《中国药典》2020 年版四部通则 2204 “挥发油测定法”提取 AAEO^[11]。取 200 g 干燥蕲艾,

分别用 8、6、6 倍体积的 60%乙醇室温超声提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液后减压浓缩至无醇味, 并依次用等体积的石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取 3 次, 真空干燥得到蕲艾石油醚组分 (petroleum ether fraction from *A. argyi*, AAPE)、醋酸乙酯组分 (ethyl acetate fraction from *A. argyi*, AAEA)、正丁醇组分 (*n*-butanol fraction from *A. argyi*, AABU) 和水组分 (water fraction from *A. argyi* AAWE) 的固体粉末 1.28、6.57、2.48、5.55 g。

2.2 AAEO 及蕲艾非挥发性组分的化学组成分析

参考陈昌婕等^[12]GC-MS 方法进行挥发油组分测定, 并运用 Mainlib 谱库对 GC-MS 分析得到的挥发油总离子流图中的各个色谱峰进行检索。蕲艾不同组分提取物的化学组成分析采用本课题组优化的 UPLC-Q-TOF-MS 方法^[13]。

2.3 动物分组与给药

按照《中国药典》2020 年版规定剂量计算, 小鼠适应性喂养 7 d 后, 按体质量随机分为对照组, AAEO 低、高剂量 (0.20、0.40 g/kg) 组, AAWE 低、高剂量 (1.17、4.68 g/kg) 组, AABU 低、高剂量 (1.17、4.68 g/kg) 组和 AAPE 低、高剂量 (1.17、4.68 g/kg) 组, 各给药组剂量均以相同生药量计, 每组 12 只。小鼠连续给药 7 d, 给药期间每日记录各组小鼠体质量并观察小鼠形态变化, 解剖后称定小鼠心、肝、脾、肺、肾的质量, 计算其脏器指数。

2.4 肝、肾毒性生化指标及血常规检测与组织病理学观察

眼眶取血后, 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 取血浆样品备用。根据试剂盒说明书采用酶标仪检测血浆 ALT、AST 活性和 CRE、BUN 含量, 采用全自动动物血液细胞分析仪检测血常规。取 4%多聚甲醛中固定好的肝、心、脾、肺、肾组织, 经包埋、切片、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色后置于光学显微镜下观察。

2.5 代谢组样品制备及核磁共振 (NMR) 检测

取对照组和 AAEO 高剂量组肝组织进行 ¹H-NMR 检测, 用 50%乙腈 (5 mL/g 组织) 匀浆, 4 °C、12 000×g 涡旋离心 10 min, 收集上清液, 真空冷冻干燥浓缩。用 0.55 mL D₂O 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 含 0.05% TSP, 用于零点校准) 复溶干燥的组织提取物, 4 °C、12 000×g 涡旋离心 10 min, 取上清液, 移入 5 mm NMR 管中上机测试。

使用 Bruker Avance 500 MHz 核磁谱仪, 采用横向松弛编辑的 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列 (RD-90°-(τ -180°- τ)n-ACQ), 自旋回波延迟 (2n τ) 为 40 ms。在 64 K 数据点采集 64 个自由感应衰减曲线 (FIDs), 谱宽 20, 弛缓延迟为 3.0 s。

2.6 多元统计分析 with 代谢物鉴定

使用 Topspin 3.0 软件 (德国 Bruker 公司) 对原始光谱进行相位、基线校正, 并以 TSP 的峰作为参照 (δ 0.00) 对齐零点。用 MestReNova 14.0 软件 (Mestrelab, India) 对核磁共振谱进行去噪、归一化处理后, 用 Simca-P 14.0 软件 (Umetrics, Sweden) 导出到 ACSII 文件中进行主成分分析 (principal components analysis, PCA) 和偏最小二乘-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)。

使用 Chenomx NMR 软件和查询公共数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 鉴定代谢物。根据积分面积计算代谢物的差异倍数 (fold change, FC) 和 *P* 值, 使用 MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) 进行代谢通路富集分析。

2.7 网络药理学分析 AAEO 肝毒性

以 GC-MS 解析的 AAEO 化学成分为基础, 根据 SwissADME 平台 (<http://www.swissadme.ch/index.php>) 中肠胃吸收为 “High” 和类药性 2 项及以上为 “Yes” 筛选潜在的肝毒性成分。将符合条件的化合物 “SDF” 格式结构文件上传至 Pharmmapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 获取化学成分靶点 (Norm Fit ≥ 0.5), 以 “Hepatotoxicity” 为关键词检索 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 获取肝毒性相关靶点, 将二者取交集即得潜在的毒性靶标。采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建 “药物-成分-疾病-靶点” 多层次网络并进行拓扑学分析确定 AAEO 毒性成分。最后, 利用 David

数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 对交集靶点进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.8 分子对接

以 ChemOffice 2019 绘制毒性成分的 3D 结构, 关键靶点的晶体结构从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取, 并经 Pymol 软件去水、加氢。采用 Autodock vina 1.1.2 对毒性成分和关键靶点进行分子对接, 通过 Pymol 对结合能低的对接结果进行可视化。

2.9 关键靶点验证

取对照组和 AAEO 高、低剂量组肝组织, 按照试剂盒说明书提取组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列由擎科生物合成, PAH 引物序列为 F: 5'-CCGTTCGCTATGACCCCTAC-3', R: 5'-CAGGGCATGGCAAAGGATTC-3'; β -actin 引物序列为 F: 5'-GCTGACAGGATGCAGAAGG-3', R: 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAGG-3'。基因表达水平采用 β -actin 进行归一化。取 4% 多聚甲醛固定的对照组和 AAEO 高、低剂量组肝组织, 经脱水、包埋、切片、免疫组化染色后检测肝脏组织中 PAH 的表达^[14]。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析, 所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 GC-MS 分析 AAEO 的化学组成

采用 GC-MS 对 AAEO 的化学组成进行分析, 通过谱库检索并结合相关文献对色谱峰进行定性分析 (图 1)^[12,15], 采用峰面积归一化法得到各成分的相对含量 (表 1)。结果显示, 共鉴定出 39 个化合物, 包含 16 个单萜类化合物、9 个醇类化合物、

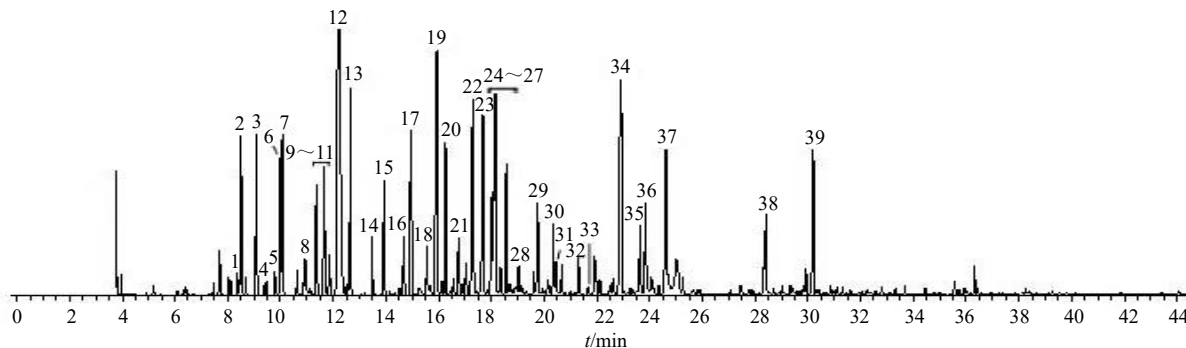


图 1 AAEO 的 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of AAEO by GC-MS

表 1 AAEO 的 GC-MS 鉴定结果
Table 1 Identification result of AAEO by GC-MS

峰号	<i>t</i> _R /min	化合物	分子式	相对质量分数/%	类别
1	8.37	(-)- α -侧柏烯	C ₁₀ H ₁₆	0.24	单萜类
2	8.50	α -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	2.52	单萜类
3	9.08	莰烯	C ₁₀ H ₁₆	2.51	单萜类
4	9.47	2,4-thujadiene	C ₁₀ H ₁₄	0.15	单萜类
5	9.78	环己醇	C ₆ H ₁₂ O	0.49	醇类
6	9.98	β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	1.97	单萜类
7	10.07	桉烯	C ₁₀ H ₁₆	2.34	单萜类
8	10.94	β -侧柏烯	C ₁₀ H ₁₆	0.74	单萜类
9	11.36	α -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	1.77	单萜类
10	11.66	(+)-柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	2.37	单萜类
11	11.86	α -水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	0.68	单萜类
12	12.21	1,8-桉叶素	C ₁₀ H ₁₈ O	13.35	单萜类
13	12.65	γ -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	3.48	单萜类
14	13.48	萜品油烯	C ₁₀ H ₁₆	0.73	单萜类
15	13.92	蒿酮	C ₁₀ H ₁₆ O	1.48	酮类
16	14.67	4-侧柏醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.88	醇类
17	14.96	蒿醇	C ₁₀ H ₁₈ O	3.77	醇类
18	15.55	2,6,6-trimethylbicyclo[3.2.0]hept-2-en-7-one	C ₁₀ H ₁₄ O	0.73	酮类
19	15.94	侧柏酮	C ₁₀ H ₁₆ O	8.30	酮类
20	16.26	(-)-宁酮	C ₁₀ H ₁₆ O	2.37	酮类
21	16.75	菊油环酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0.84	酮类
22	17.29	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	4.35	单萜类
23	17.67	4-萜烯醇	C ₁₀ H ₁₈ O	3.65	醇类
24	18.02	<i>cis</i> -chrysanthenol	C ₁₀ H ₁₆ O	1.98	醇类
25	18.15	龙脑	C ₁₀ H ₁₈ O	5.12	单萜类
26	18.35	龙脑烯醛	C ₁₀ H ₁₆ O	0.44	醛类
27	18.56	α -松油	C ₁₀ H ₁₈ O	2.14	醇类
28	19.03	<i>trans</i> -piperitol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.33	醇类
29	19.76	(-)-香芹酚	C ₁₀ H ₁₆ O	1.39	醇类
30	20.35	龙脑乙酸酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.99	酯类
31	20.44	(+)-香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0.43	酮类
32	21.30	(-)- α -蒎烯	C ₁₅ H ₂₄	0.54	单萜类
33	21.67	α -波旁烯	C ₁₅ H ₂₄	0.10	倍半萜类
34	22.92	β -石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	6.64	倍半萜类
35	23.63	反式- β -金合欢烯	C ₁₅ H ₂₄	1.03	倍半萜类
36	23.84	律草烯	C ₁₅ H ₂₄	1.66	倍半萜类
37	24.62	大牛儿烯 D	C ₁₅ H ₂₄	2.79	倍半萜类
38	28.41	石竹素	C ₁₅ H ₂₄ O	1.35	倍半萜类
39	30.21	neointermedeol	C ₁₅ H ₂₆ O	2.75	醇类

6 个倍半萜类化合物、6 个酮类化合物、1 个醛类化合物以及 1 个酯类化合物, 占 AAEO 含量的 89.30%。其中含量最高的为 1,8-桉叶素 (13.35%), 其次主要为侧柏酮 (8.30%)、 β -石竹烯 (6.64%)、龙脑 (5.12%)、樟脑 (4.35%)、蒿醇 (3.77%)、4-萜烯醇 (3.65%)、 γ -松油烯 (3.48%) 等。

3.2 UPLC-Q-TOF-MS 分析蕲艾非挥发性组分的化学组成

采用 UPLC-Q-TOF-MS 在负离子模式下分析 AAPE、AAEA、AABU 和 AAWE 4 个非挥发性组

分的化学组成, 总离子流图如图 2 所示。根据保留时间、准分子离子峰 ([M-H]⁻)、主要碎片离子并参考文献数据^[16-17], 初步鉴定了 34 个化合物 (表 2)。结果显示, 在 AAPE 中鉴定出 11 个化合物, 分别为木犀草素、咖啡酸乙酯、3-*O*-甲基槲皮素、茵陈色原酮、芹菜素、高车前素、矢车菊黄素、泽兰黄醇、黄酮素、异泽兰黄素、紫花牡荆素, 主要为黄酮类成分; 在 AAEA 中共鉴定出 26 个化合物, 包括绿原酸、咖啡酸、异绿原酸同分异构体等酚酸类成分和夏佛塔苷、木犀草素、甲基槲皮素、芹菜

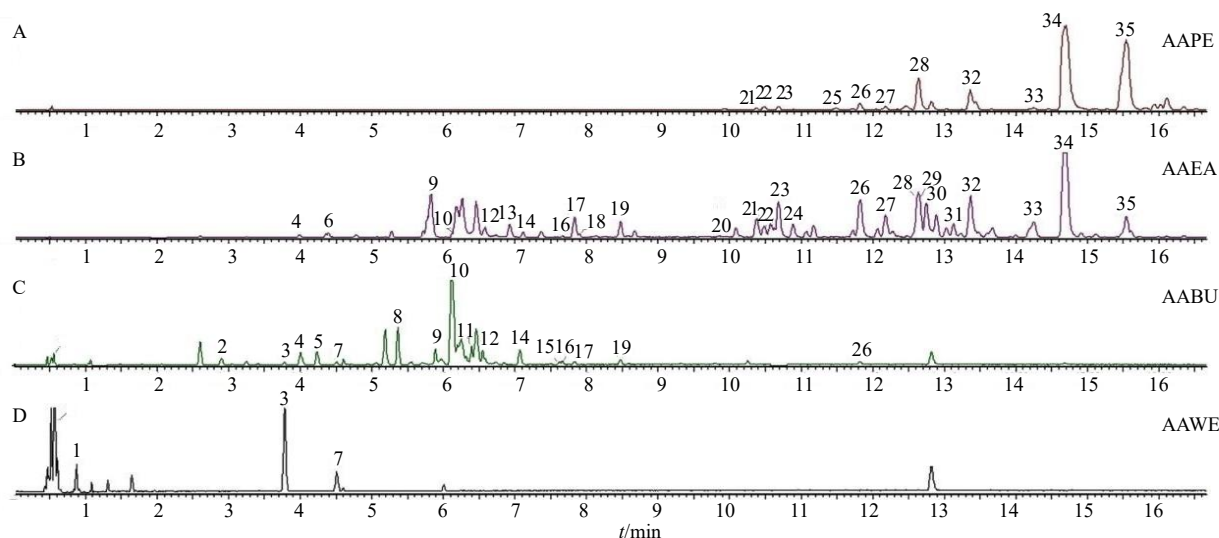


图 2 AAPE、AAEA、AABU 和 AAWE 的 UPLC-Q-TOF-MS 基峰离子流图

Fig. 2 UPLC-Q-TOF-MS base peak ion chromatographs of AAPE, AAEA, AABU and AAWE

表 2 蕲艾非挥发性组分中主要化学成分的鉴定

Table 2 Identification of main chemical components in non-volatile fractions of *A. argyi*

编号	t_R/min	m/z	分子式	MS/MS 特征离子	鉴定结果
1	0.56	191.056 2	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$	173.047 0, 93.033 2, 87.007 5, 85.028 6, 59.014 2	奎宁酸 ^{c, d}
2	2.90	353.086 2	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	191.056 2, 179.035 8, 173.042 3, 161.021 7, 135.043 4	新绿原酸 ^c
3	3.78	255.089 3	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_6$	211.096 1	未鉴定 ^{c, d}
4	4.02	353.086 2	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	191.056 2, 179.031 1, 173.047 0, 161.021 7, 135.043 4	绿原酸 ^{b, c}
5	4.24	353.086 2	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	191.056 2, 179.035 8, 173.047 0, 161.021 7, 135.043 4	隐绿原酸 ^c
6	4.40	179.035 8	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	135.043 4, 134.038 7	咖啡酸 ^b
7	4.51	305.067 1	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{S}$	225.113 2, 96.958 9, 59.011 5	hydroxyjasmonic acid- <i>O</i> -sulphate ^{c, d}
8	5.36	593.147 3	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	533.126 3, 503.115 0, 473.107 2, 383.079 7, 353.066 3, 117.033 7	芹菜素-6,8-二- <i>C</i> -葡萄糖苷 ^c
9	5.89	563.137 7	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	503.122 9, 473.107 2, 443.095 1, 383.079 7, 353.066 3	芹菜素-6- <i>C</i> - α - <i>L</i> -阿拉伯糖苷-8- <i>C</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷 ^{b, c}
10	6.13	563.146 1	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	503.122 9, 473.107 2, 443.095 1, 383.079 7, 353.066 3	夏佛塔苷 ^{b, c}
11	6.39	563.137 7	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	473.107 2, 443.095 1, 383.072 8, 353.066 3	异夏佛塔苷 ^c
12	6.55	563.137 7	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	473.107 2, 443.095 1, 383.079 7, 353.066 3	芹菜素-8- <i>C</i> - α - <i>L</i> -阿拉伯糖苷-6- <i>C</i> - β - <i>D</i> -半乳糖苷 ^{b, c}
13	6.93	609.143 6	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	301.027 9, 300.026 9	芦丁 ^b
14	7.07	533.126 3	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	473.107 2, 443.095 1, 383.079 7, 353.066 3, 325.070 2, 297.076 2	芹菜素-6,8-二- <i>C</i> -戊糖苷 ^{b, c}
15	7.61	533.126 3	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	473.107 2, 383.079 7, 353.066 3	芹菜素-6,8-二- <i>C</i> -吡喃木糖苷 ^c
16	7.67	515.119 0	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	353.086 2, 335.074 6, 191.056 2, 179.031 1, 173.042 3, 161.021 7, 135.043 4	异绿原酸 B ^{b, c}
17	7.84	515.119 0	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	353.086 2, 335.074 6, 191.056 2, 179.035 8, 173.047 0, 161.021 7, 135.043 4	异绿原酸 A ^{b, c}
18	7.90	515.119 0	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	353.086 2, 335.074 6	异绿原酸 A 异构体 ^b
19	8.48	515.119 0	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	353.086 2, 335.074 6, 191.056 2	异绿原酸 C ^{b, c}
20	9.85	287.057 7	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$	151.004 6, 135.043 4	圣草素查耳酮 ^b
21	10.38	285.039 0	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	175.039 7, 151.004 6, 133.029 7	木犀草素 ^{a, b}
22	10.48	207.063 9	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$	179.035 8, 135.043 4	咖啡酸乙酯 ^{a, b}
23	10.68	315.048 6	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	300.026 9, 243.026 7, 228.038 8, 136.985 7, 65.001 3	3- <i>O</i> -甲基槲皮素 ^{a, b}
24	10.89	345.060 6	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_8$	315.011 2, 287.021 9, 259.024 0	5,7,4',5'-四羟基-6,3'-二甲氧基黄酮 ^b
25	11.48	315.048 6	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	300.026 9	茵陈色原酮 ^a
26	11.83	269.047 2	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	225.055 1, 201.053 6, 159.044 1, 151.004 6, 149.025 2, 117.033 7	芹菜素 ^{a, b, c}
27	12.18	299.051 8	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	285.033 0, 284.029 3, 256.034 9, 227.035 0, 212.043 5, 186.028 3	高车前素 ^{a, b}

表 2 (续)

峰号	t_R/min	m/z	分子式	MS/MS 特征离子	鉴定结果
28	12.64	359.072 5	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	344.054 1, 329.030 8, 314.005 8, 301.034 0, 286.008 7, 242.017 8	矢车菊黄素 ^{a, b}
29	12.66	329.026 7	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	314.043 3, 299.021 4, 271.026 0, 243.026 7	棕矢车菊素 ^b
30	12.78	359.079 1	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	344.054 1, 329.030 8, 314.005 8	3,6,7-三甲基槲皮万寿菊素 ^b
31	13.23	359.079 1	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	344.054 1, 329.030 8, 314.005 8, 301.034 0, 133.025 6	5,6,4'-三羟基-7,8,3'-三甲氧黄酮 ^b
32	13.37	359.079 1	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	344.054 1	泽兰黄醇 ^{a, b}
33	14.24	313.070 6	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	298.048 0, 283.021 4, 152.066 5, 117.033 7	菊黄素 ^{a, b}
34	14.69	343.081 7	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	328.054 4, 313.033 3, 298.011 5, 132.020 4	异泽兰黄素 ^{a, b}
35	15.54	373.091 1	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$	358.065 7, 343.042 6, 328.022 5, 315.048 6, 285.003 3, 257.010 5, 229.012 8	紫花牡荆素 ^{a, b}

a、b、c、d 分别代表从 AAPE、AAEA、AABU 和 AAWE 中鉴定的化合物。

a, b, c and d represent compounds identified from AAPE, AAEA, AABU and AAWE, respectively.

素、异泽兰黄素等黄酮类成分；在 AABU 中共鉴定出 16 个化合物，包括奎宁酸、绿原酸、芹菜素-6,8-二-C-葡萄糖苷、夏佛塔苷、芹菜素-6,8-二-C-吡喃木糖苷、异绿原酸 A、B、C 等，主要为酚酸类和黄酮苷类化合物；AAWE 中成分较少。

3.3 AAEO 及蕲艾非挥发性组分对小鼠体质量和脏器指数的影响

在实验期间，近距离观察给予各蕲艾提取组分

组和对照组小鼠的一般外观和身体状况，包括运动、警觉度，以及毛发、鼻子、眼睛和四肢的外观，未见明显差异。如图 3 所示，与对照组比较，各给药组小鼠体质量无明显变化；AAEO 低、高剂量组小鼠的肝脏指数相较于对照组均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，其余组别无明显差异；各组小鼠心、脾、肺、肾脏指数无明显差异，上述结果提示 AAEO 可能造成了肝脏损伤。

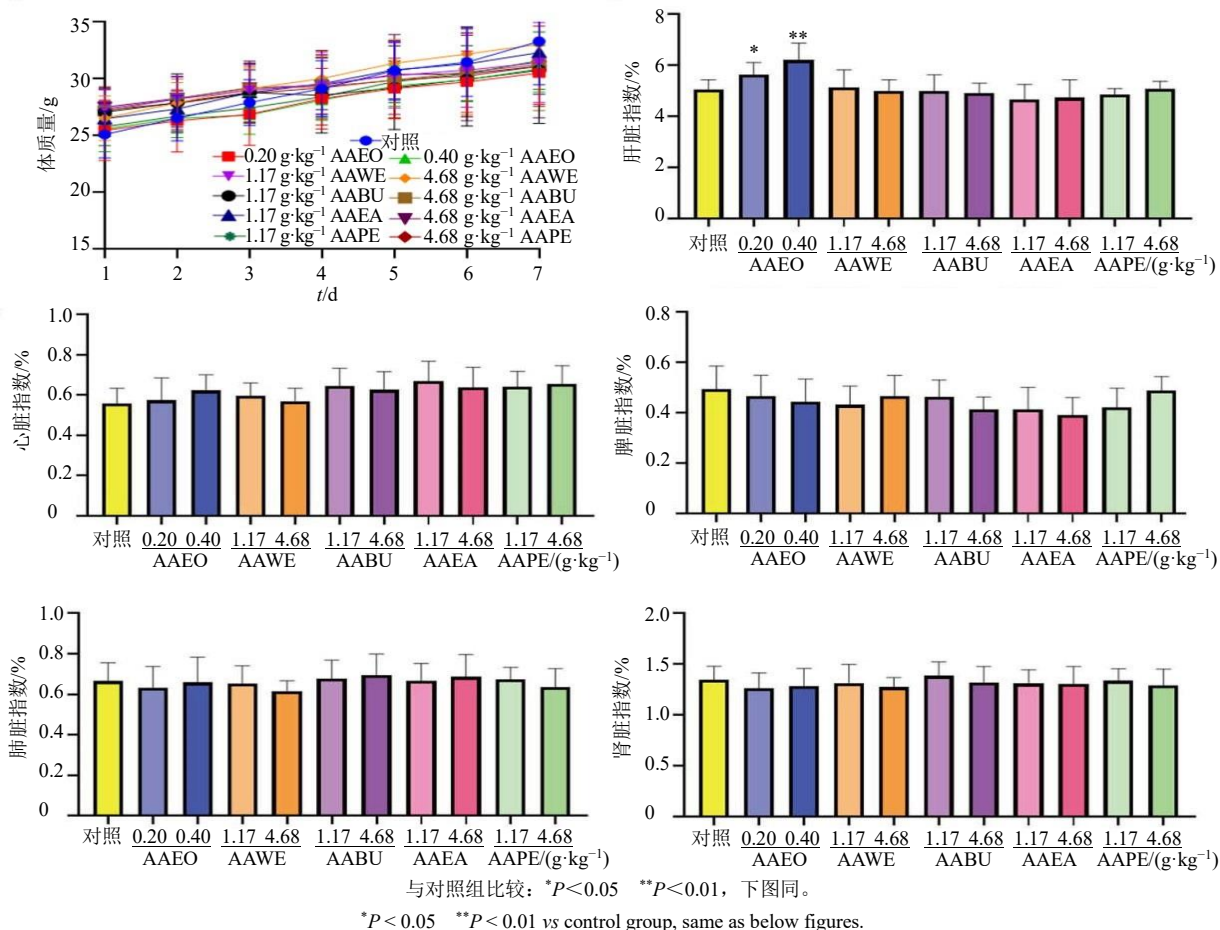


图 3 AAEO 及蕲艾非挥发性组分对小鼠体质量和脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Effects of AAEO and non-volatile fractions of *A. argyi* on body weight and organ coefficient of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.4 AAEO 对小鼠肝、肾毒性生化指标及血常规和组织病理学的影响

ALT、AST 活性是检测肝功能正常与否的关键评价指标^[18]。如图 4-A、B 所示,与对照组比较,给予 AAEO 的小鼠肝组织中 ALT 和 AST 活性呈剂量相关性升高,在 0.4 g/kg 剂量下具有统计学差异 ($P<0.01$),而蕲艾 4 个非挥发性组分均无显著变化。此外,进一步检测 CRE、BUN 水平评价药物对肾功能的影响。如图 4-C、D 所示,对照组与蕲艾各给药组间均无显著差异。综上,蕲艾提取组分中挥发油可造成明显的肝损伤,肝功能发生紊乱,非挥发性组分均无明显肝、肾毒性。进一步采用血常规检测考察了口服 AAEO 后的血液学变化。如表 3 所示,血常规各项指标均在本实验室正常值范围内,AAEO 处理组小鼠的白细胞数、中性粒细胞数和淋

巴细胞较对照组显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。该结果表明口服 AAEO 引起了小鼠血液学改变。

将对照组与 AAEO 高、低剂量组小鼠肝、心、脾、肺、肾组织进行 HE 染色观察对组织病理学的影响(图 5),结果显示对照组小鼠肝细胞索排列规则,肝小叶结构正常,肝窦无扩张、淤血。AAEO 高、低剂量组肝组织严重损伤,细胞质溶解、疏松,肝细胞变形、间隙增大;而心、脾、肺和肾组织与对照组相比均无明显变化。该结果从组织病理学角度证实了 AAEO 的肝毒性损伤。

3.5 小鼠肝组织 $^1\text{H-NMR}$ 图谱及差异代谢物分析

AAEO 高剂量组和对照组肝组织的 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ 谱图见图 6-A,根据化学位移、耦合常数等信息并结合数据库共指认了 34 个内源性代谢物。使用 R 软件对归一化后的峰面积数据进行 PCA 和

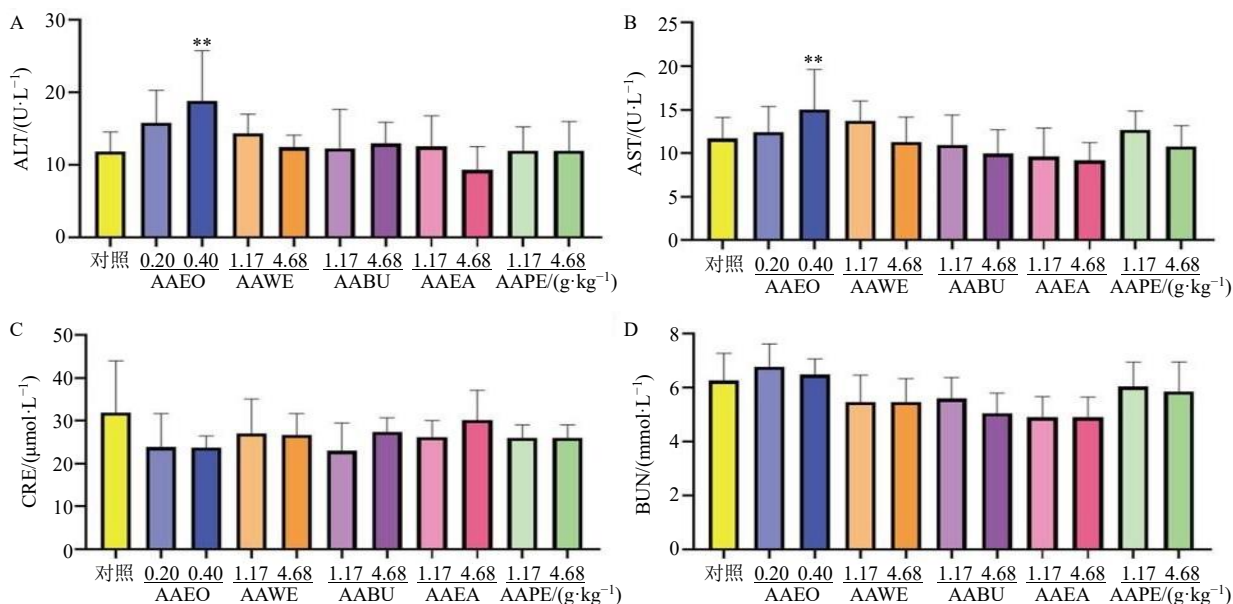


图 4 AAEO 及蕲艾非挥发性组分对小鼠肝功能 (A、B) 以及肾功能 (C、D) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effects of AAEO and non-volatile fractions of *A. argyi* on liver function (A, B) and kidney function (C, D) in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 3 AAEO 对小鼠血常规的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of AAEO on blood routine of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	红细胞/($\times 10^{12}$ 个·L ⁻¹)	血红蛋白/(g·L ⁻¹)	红细胞压积/%	白细胞/($\times 10^9$ 个·L ⁻¹)
对照	—	7.61±0.75	131.17±14.69	43.08±4.46	3.20±0.79
AAEO	0.20	7.76±0.58	129.17±10.48	43.70±2.53	5.28±0.54**
	0.40	7.55±1.05	127.50±12.72	42.15±3.89	4.43±0.59*
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	中性粒细胞/($\times 10^9$ 个·L ⁻¹)	淋巴细胞/($\times 10^9$ 个·L ⁻¹)	单核细胞/($\times 10^9$ 个·L ⁻¹)	血小板/($\times 10^9$ 个·L ⁻¹)
对照	—	0.28±0.08	3.11±1.06	0.12±0.05	1 019.83±117.02
AAEO	0.20	0.57±0.15**	4.46±0.46*	0.17±0.05	975.00±153.58
	0.40	0.49±0.16*	3.47±0.71	0.15±0.03	1 161.20±222.69

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

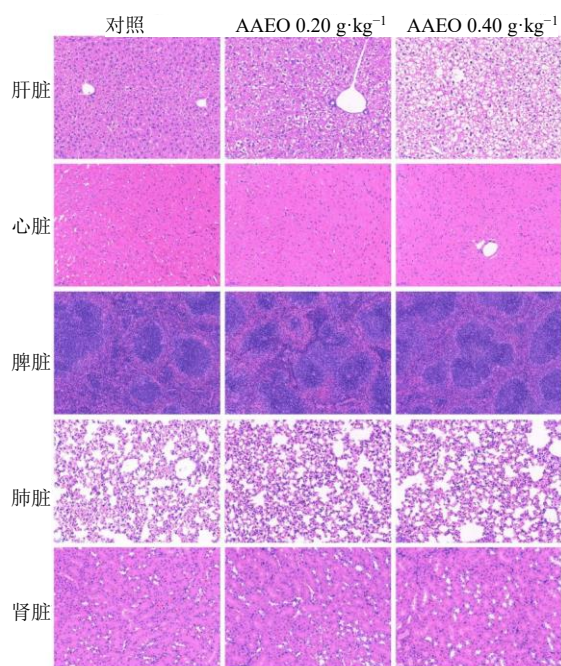
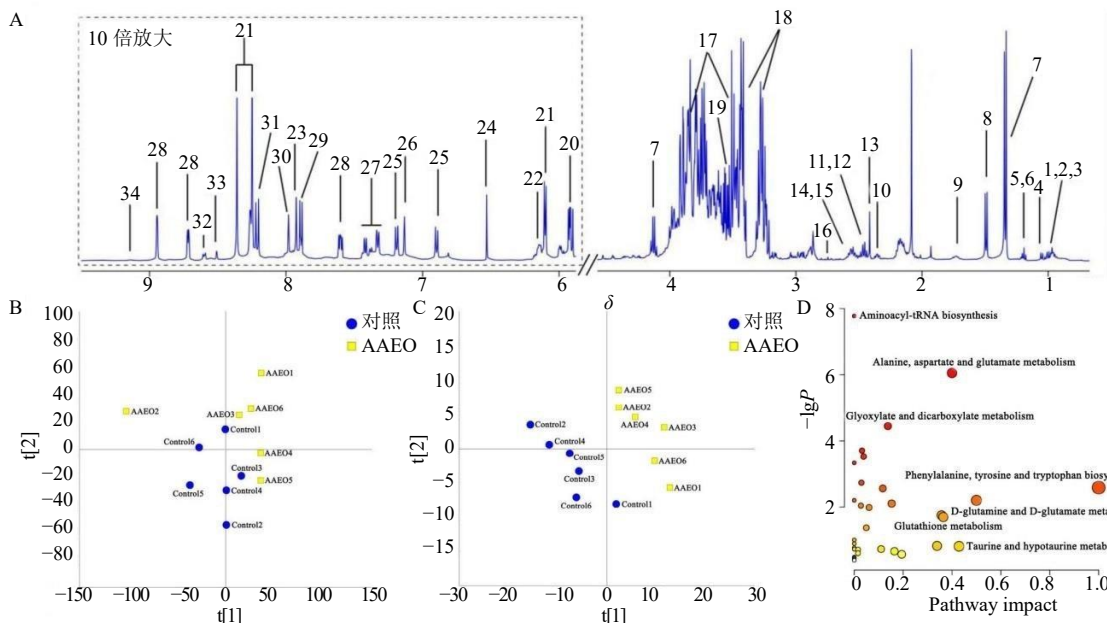


图 5 AAEO 对小鼠肝、心、脾、肺、肾组织病理形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 5 Effect of AAEO on pathomorphology of liver, heart, spleen, lung and kidney of mice (HE, × 200)

PLS-DA。PCA 得分图显示 AAEO 高剂量组与对照组有明显的分离趋势 (图 6-B), 表明 AAEO 引起了小鼠肝组织的代谢紊乱。

为进一步明确代谢物的差异, 采用有监督的 PLS-DA 筛选差异代谢物, 运用 2 折交叉验证法检验模型有效 (图 6-C)。计算各化合物的积分面积, 进行组间比较得出 FC 值, 结合 t 检验明确差异表达代谢物。肝组织代谢物 FC 及 P 值见表 4, 与对照组相比, AAEO 组肝脏中共有 17 个代谢物发生了显著改变, 主要以氨基酸为主, 其中亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸、肌氨酸、酪氨酸在 AAEO 处理后含量显著下调, 苯丙氨酸含量显著上调。MetaboAnalyst 通路富集显示 AAEO 显著影响苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 ($-\lg P=2.59$, impact factor=1.00); 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 ($-\lg P=6.06$, impact factor=0.40); D -谷氨酰胺和 D -谷氨酸代谢 ($-\lg P=2.20$, impact factor=0.50); 乙醛酸和二羧酸代谢 ($-\lg P=4.45$, impact factor=0.14) 及谷胱甘肽代谢 ($-\lg P=1.70$, impact factor=0.36) 等代谢通路 (图 6-D)。



1-亮氨酸; 2-异亮氨酸; 3-缬氨酸; 4-3-羟基异丁酸; 5-乙醇; 6-3-羟基丁酸; 7-乳酸; 8-丙氨酸; 9-赖氨酸; 10-4-氨基丁酸酯; 11-谷氨酸; 12-谷氨酰胺; 13-琥珀酸; 14-谷胱甘肽; 15-柠檬酸; 16-肌氨酸; 17-葡萄糖; 18-牛磺酸; 19-甘氨酸; 20-尿苷; 21-肌苷; 22-二磷酸腺苷; 23-黄嘌呤; 24-富马酸; 25-酪氨酸; 26-鹅肌肽; 27-苯丙氨酸; 28-烟酰胺; 29-尿苷; 30-鸟苷; 31-腺嘌呤; 32-三磷酸腺苷; 33-甲酸盐; 34-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP⁺)。

1-leucine; 2-isoleucine; 3-valine; 4-3-hydroxyisobutyrate; 5-ethanol; 6-3-hydroxybutyrate; 7-lactate; 8-alanine; 9-lysine; 10-4-aminobutyrate; 11-glutamate; 12-glutamine; 13-succinate; 14-glutathione; 15-citrate; 16-sarcosine; 17-glucose; 18-taurine; 19-glycine; 20-uridine; 21-inosine; 22-adenosine diphosphate; 23-xanthine; 24-fumarate; 25-tyrosine; 26-anserine; 27-phenylalanine; 28-niacinamide; 29-uridine; 30-guanosine; 31-adenine; 32-adenosine triphosphate; 33-formate; 34-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺)。

图 6 肝脏组织的 ¹H-NMR 图谱 (A)、PCA (B) 和 PLS-DA (C) 得分图及通路富集分析 (D)

Fig. 6 ¹H-NMR spectra of liver tissue (A), PCA (B), PLS-DA (C) scores plots and pathway enrichment analysis (D)

表 4 肝组织中差异代谢物鉴定

Table 4 Identification of differential metabolites in liver tissue

代谢物	FC	-lgP	显著性分析	代谢物	FC	-lgP	显著性分析
亮氨酸	0.804	3.06	***	谷胱甘肽	1.111	1.49	*
异亮氨酸	0.873	1.62	*	柠檬酸	0.792	2.26	**
缬氨酸	0.825	2.05	**	肌氨酸	0.737	2.10	**
3-羟基异丁酸	0.876	1.49	*	黄嘌呤	0.744	3.19	***
乳酸	1.258	1.39	*	延胡索酸	0.686	3.23	***
丙氨酸	0.956	1.33	*	酪氨酸	0.836	2.27	**
赖氨酸	0.798	3.16	***	鹅肌肽	0.806	2.43	**
4-氨基丁酸酯	0.840	4.24	***	苯丙氨酸	1.137	1.55	*
谷氨酸	0.856	2.39	**	腺嘌呤	0.817	1.31	*

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

3.6 AAEO 肝毒性的网络药理学分析

采用网络药理学分析 AAEO 引起肝损伤的作用机制,经 SwisAMDE 筛选肠胃吸收和类药性后保留 20 个成分。通过 Phrammapper 数据库获取成分靶点共计 150 个,利用 Genecards 和 OMIM 数据库筛选出肝毒性相关靶点 912 个,将二者取交集得 AAEO 产生肝毒性的潜在靶点 49 个。利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“药物-成分-疾病-靶点”网络(图 7),网络中共包含 71 个节点(1 个药物节点、1 个疾病

节点、20 个活性成分节点、49 个潜在靶点)和 414 条边。利用“Network analyze”工具对网络进行拓扑分析,筛选出前 10 位成分度值均大于 15,为潜在的毒性成分,分别是龙脑乙酸酯(度值=40)、*cis*-chrysanthenol(度值=34)、龙脑(度值=34)、1,8-桉叶素(度值=32)、石竹烯(度值=28)、菊油环酮(度值=25)、樟脑(度值=23)、侧柏酮(度值=18)、(-)-宁酮(度值=18)、4-侧柏醇(度值=17),上述结果表明 AAEO 由多成分、多靶点引起肝毒性。

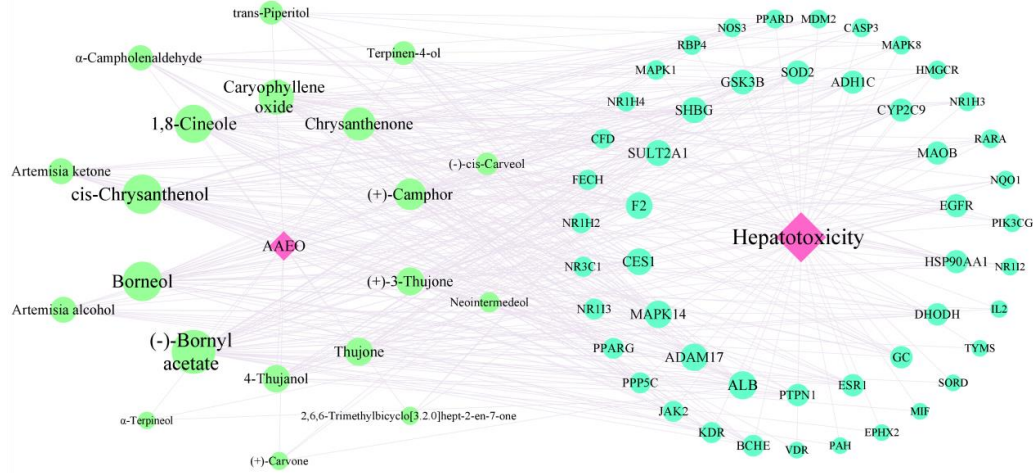


图 7 AAEO 肝毒性的“药物-成分-疾病-靶点”网络

Fig. 7 “Drug-component-disease-target” network of hepatotoxicity of AAEO

3.7 代谢组学与网络药理学整合分析

通过将代谢组学筛选的 17 种差异代谢物导入 Cytoscape 3.9.1 软件,利用 Metscape 插件构建“代谢物-反应-酶-基因”网络共获得差异代谢物相关靶点 194 个。随后,将网络药理学确定的 49 个潜在靶点与 194 个差异代谢物相关靶点相交,确定了 1 个关键靶点,即 PAH(图 8)。PAH 又称苯丙氨酸-4-单加氧酶,为催化苯丙氨酸生成酪氨酸的关键酶^[19],结合代谢组学结果中 AAEO 处理后小鼠肝脏中苯丙

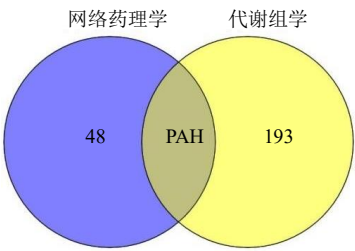


图 8 整合代谢组学和网络药理学分析的共同基因

Fig. 8 Common gene of integrated metabolomics and network pharmacology analysis

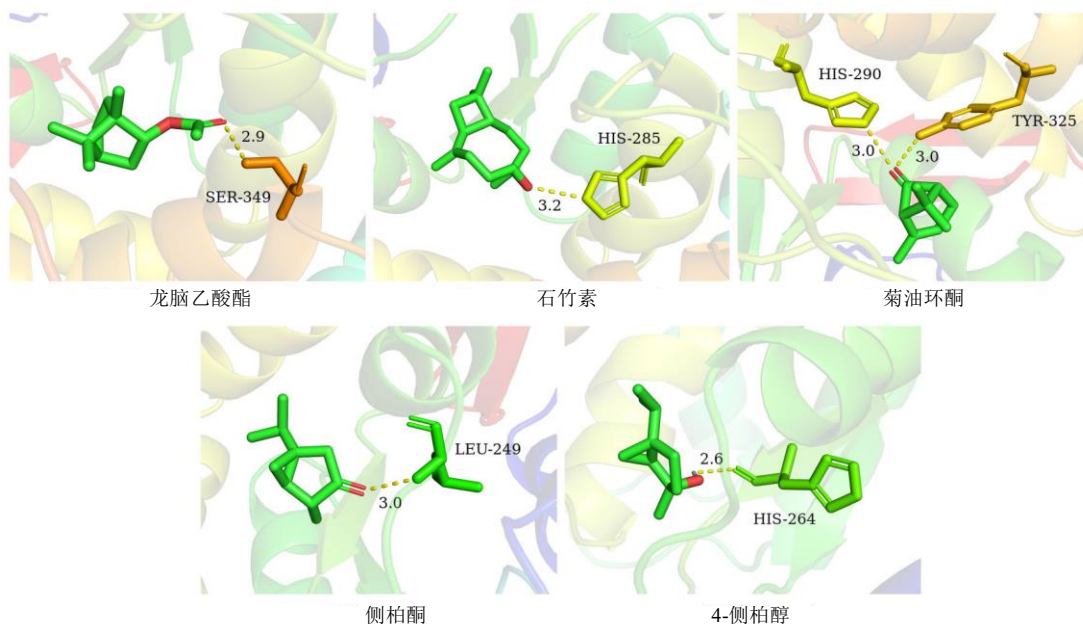
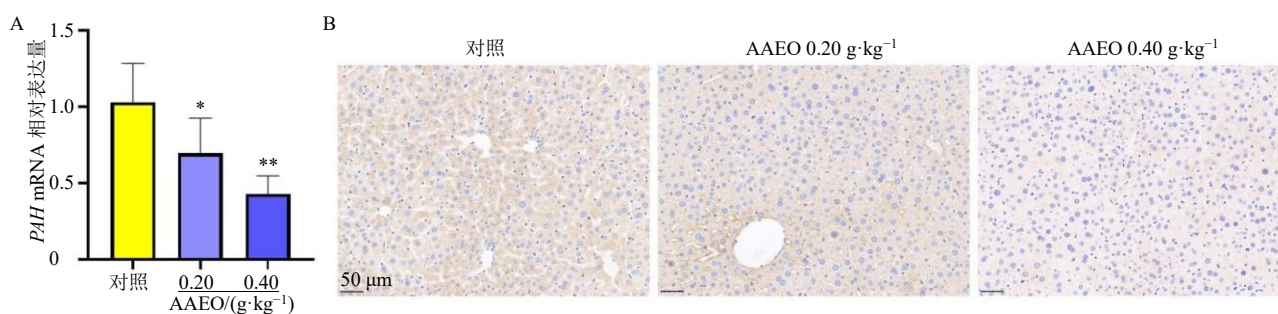


图 11 AAEO 毒性成分与关键靶点 PAH 的分子对接

Fig. 11 Molecular docking of toxic components of AAEO with key target PAH

图 12 AAEO 对小鼠肝组织中 PAH mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 12 Effect of AAEO on PAH mRNA (A) and protein (B) expressions in liver tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

艾叶为我国传统民俗植物和著名中药材,应用历史悠久,蕲艾被誉为“四大名艾”之一。现存最早医书《五十二病方》就载有使用艾叶治病的方子,现代药理学研究表明艾叶口服使用具有抗菌、止血、抗炎、止痛、止咳平喘、抗肿瘤、降血糖、免疫调节等多种药理作用,可见艾叶是保障人类生命健康的重要药物^[20]。然而,由于部分本草著作和一些文献报道其毒性,严重阻碍了其开发利用。因此,本研究以蕲艾为研究对象,为弄清其毒性组分、毒性成分及毒性机制,采用 GC-MS 和 UPLC-Q-TOF-MS 解析了 AAEO 和蕲艾 4 个非挥发性组分的化学组成,研究了各化学组分对小鼠的毒性,并利用代谢组学、网络药理学、分子对接等方法阐明了 AAEO

肝毒性的潜在成分和机制。

AAEO 和蕲艾非挥发性组分的化学组成与前人报道基本一致^[12,21],证实该材料用于艾叶毒性评价的可靠性。本研究结果显示,AAEO 可显著增加肝脏指数,上调肝脏 ALT 和 AST 的活性并损伤肝脏组织病理结构,4 个非挥发性组分则未表现出明显异常,表明 AAEO 是蕲艾的毒性组分且主要引起肝毒性。利用网络药理学构建“药物-成分-疾病-靶点”网络和分子对接技术筛选毒性或活性成分已成为阐明中药毒/药效物质基础的重要策略。通过构建蕲艾挥发油中经 SwissADME 检验的 20 个化合物肝毒性的“药物-成分-疾病-靶点”网络,筛选出 10 个度值大于 15 的成分作为 AAEO 潜在的毒性物质,并利用分子对接进行了验证,分别为龙脑乙酸酯、*cis*-

chrysanthanol、龙脑、1,8-桉叶素、石竹烯、菊油环酮、樟脑、侧柏酮、(-)-宁酮、4-侧柏醇。其中，樟脑、侧柏酮是目前艾叶中公认且经研究证实具有肝毒性的 2 种成分，且还可引起中枢神经毒性、胚胎毒性^[22]；PubChem 数据库将(-)-宁酮归属为刺激性物质，石竹素为刺激性且具环境危害类物质；此外，Daniyan 等^[23]将 *Dennettia tripetala* 精油的肝毒性部分归因于石竹素。然而，上述物质与 AAEO 肝毒性的“量-时-毒”关系仍需进一步深入探究。

本研究利用代谢组学结合网络药理学的方法，旨在从整体水平上以中药“多成分、多靶点、多途径”的角度详尽阐述 AAEO 的肝毒性机制（图 13）。肝脏是氨基酸代谢的重要器官，代谢组学研究结果显示给予 AAEO 后肝脏组织中 17 个内源性代谢物水平发生显著变化，其中包含 9 种氨基酸。苯丙氨酸是人体必需的芳香族氨基酸之一，由 PAH 催化合成酪氨酸^[19]。AAEO 上调苯丙氨酸水平，下调酪氨

酸水平，且 PAH 为代谢组学与网络药理学分析筛选出的关键靶点，PAH mRNA 和蛋白表达水平经实验证实在 AAEO 高、低剂量组均显著降低，揭示 AAEO 可通过下调 PAH 表达抑制酪氨酸生物合成途径引起肝毒性。重要的是，PAH 缺乏会导致体内苯丙氨酸大量积累，引起一系列疾病，如不可逆的智力障碍、癫痫等^[24]。另一方面，三羧酸循环的关键中间产物延胡索酸由酪氨酸代谢产生，在 AAEO 处理后含量显著降低；支链氨基酸由亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸 3 种必需氨基酸组成，经支链 α -酮酸脱氢酶复合物催化生成酰基辅酶 A（包括乙酰辅酶 A、琥珀酰辅酶 A 和 HMG 辅酶 A）进入三羧酸循环^[25]，而 3 种氨基酸及乙酰辅酶 A 的下游产物柠檬酸均在给予 AAEO 后含量降低；赖氨酸可加速乙酰辅酶 A 的合成进而促进三羧酸循环^[26]，谷氨酸代谢同样与三羧酸循环相互连接，代谢组学显示二者在 AAEO 组下调。表明 AAEO 可以导致机体代谢紊乱而产生毒性。

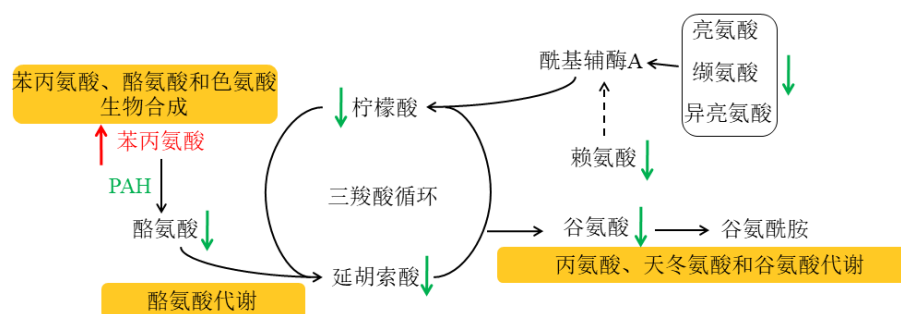


图 13 AAEO 肝毒性作用机制

Fig. 13 Hepatotoxicity mechanism of AAEO

综上，AAEO 为蕲艾主要的毒性组分，其毒理学机制归纳为通过抑制 PAH 表达遏制酪氨酸生物合成，进而干扰三羧酸循环能量代谢及相关氨基酸代谢。本研究利用代谢组学与网络药理学整合分析明确了蕲艾引起肝毒性的化学组分及作用机制，为解决艾叶产业的发展瓶颈提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曹玲, 于丹, 崔磊, 等. 艾叶的化学成分、药理作用及产品开发生研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 918-923.
- [2] 朱芸芸, 陈乐, 魏晓晴, 等. 蕲艾治疗溃疡性结肠炎的活性筛选与作用评价 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4882-4891.
- [3] 曾维艳, 陈肖, 王洋, 等. 基于指纹图谱及非挥发性成分定量结合化学模式识别法评价不同产地艾叶质量

[J]. 中草药, 2023, 54(18): 6084-6091.

- [4] 杨仓良. 毒药本草 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1993: 694.
- [5] 梁·陶弘景集, 尚志钧辑校. 名医别录 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 155.
- [6] 宋·苏颂撰, 胡乃长, 王致谱辑注. 图经本草: 辑复本 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1988: 195.
- [7] 刘红杰, 李天昊, 詹莎, 等. 艾叶挥发油致小鼠急性肝毒性作用及其机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(3): 248-252.
- [8] 黄伟, 张亚因, 王会, 等. 艾叶不同组分单次给药对小鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究 [J]. 中国药物警戒, 2011, 8(7): 392-396.
- [9] Jiang H Y, Gao H Y, Li J, *et al.* Integrated spatially resolved metabolomics and network toxicology to investigate the hepatotoxicity mechanisms of component D of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *J. Ethnopharmacol*, 2022, 298:

- 115630.
- [10] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [11] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 233.
- [12] 陈昌婕, 罗丹丹, 苗玉焕, 等. 艾种质资源挥发性成分分析与评价 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(15): 3814-3823.
- [13] 陈乐, 朱芸芸, 康利平, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 联合网络药理学及分子对接研究宽叶山蒿抗炎药效物质基础和作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(14): 3701-3714.
- [14] Chen L, Zhu Y Y, Wang Y Q, *et al.* The water-soluble subfraction from *Artemisia argyi* alleviates LPS-induced inflammatory responses via multiple pathways and targets *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt3): 117364.
- [15] 刘天琪, 江汉美, 卢金清, 等. HS-SPME-GC-MS 分析不同年份陈艾的挥发性成分 [J]. 中国药师, 2022, 25(9): 1642-1646.
- [16] Han B S, Xin Z Q, Ma S S, *et al.* Comprehensive characterization and identification of antioxidants in *Folium Artemisiae Argyi* using high-resolution tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1063: 84-92.
- [17] Chen L, Li J X, Zhu Y Y, *et al.* Caffeic acid, an allelochemical in *Artemisia argyi*, inhibits weed growth via suppression of mitogen-activated protein kinase signaling pathway and the biosynthesis of gibberellin and phytoalexin [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 802198.
- [18] Chen S, Liu L, Jiang H X, *et al.* UPLC-Q-TOF-MS/MS-based urine metabolomics studies on the toxicity and detoxication of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. after roasting [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 234: 115573.
- [19] Cannet C, Bayat A, Frauendienst-Egger G, *et al.* Phenylketonuria (PKU) urinary metabolomic phenotype is defined by genotype and metabolite imbalance: Results in 51 early treated patients using *ex vivo* ¹H-NMR analysis [J]. *Molecules*, 2023, 28(13): 4916.
- [20] 朱芸芸, 郭璐娟, 陈乐, 等. 艾叶在医药领域的应用概况 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(6): 1358-1365.
- [21] 兰晓燕, 朱龙波, 黄显章, 等. 艾叶中主要化学成分的鉴定及其含量测定研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7630-7637.
- [22] 张元, 康利平, 郭兰萍, 等. 艾叶的本草考证和应用研究进展 [J]. 上海针灸杂志, 2017, 36(3): 245-255.
- [23] Daniyan M O, Adeyipo T F, Oyemitan I A, *et al.* *In vivo* and *in silico* studies of *Dennettia tripetala* essential oil reveal the potential harmful effects of habitual consumption of the plant seed [J]. *Toxicol Rep*, 2021, 8: 1488-1497.
- [24] 张璋, 张立琴, 杜玮, 等. 苯丙氨酸羟化酶缺乏症患者基因型和表型关系及其临床应用的研究 [J]. 临床儿科杂志, 2020, 38(9): 671-678.
- [25] Solon-Biet S M, Cogger V C, Pulpitel T, *et al.* Branched chain amino acids impact health and lifespan indirectly via amino acid balance and appetite control [J]. *Nat Metab*, 2019, 1(5): 532-545.
- [26] Yang Q Q, Zhao D S, Liu Q Q. Connections between amino acid metabolisms in plants: Lysine as an example [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 928.

[责任编辑 李亚楠]