

基于蛋白组学探讨细辛水提物诱发肝损伤的作用机制

聂安政¹, 边 猛¹, 朱春胜¹, 高梅梅^{2*}

1. 郑州大学第一附属医院 中药科, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

摘要: **目的** 基于蛋白组学探讨细辛水提物诱发肝损伤的作用机制。**方法** 30 只大鼠随机分为对照组和细辛高、低剂量 (12、6 g/kg) 组, 每组 10 只, 每日 ig 给药 1 次, 连续 28 d。末次给药后采取血清样本和肝脏样本, 检测血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法观察肝脏病理组织形态; 串联质谱标签定量蛋白质组学方法检测肝组织差异表达蛋白; 免疫组化法测定大鼠肝脏组织细胞色素 P450 1A1 (cytochrome P450 1A1, CYP1A1)、金属硫蛋白-1 (metallothionein-1, MT-1)、肌肉特异性烯醇化酶 3 (recombinant enolase 3, ENO3)、抗原转运蛋白 (transporter associated with antigen processing 1, TAP1) 蛋白表达。CCK-8 法考察细辛水提物对小鼠肝实质 AML-12 细胞活力的影响, 并采用 qRT-PCR 与 Western blotting 检测 AML-12 细胞中 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 蛋白及 mRNA 表达。**结果** 与对照组比较, 细辛组大鼠血清 AST、ALT 活性均显著升高 ($P < 0.01$); 肝组织出现明显炎性改变; 肝组织中存在 179 个差异蛋白, 主要富集于次级代谢产物的生物合成途径、视黄醇代谢途径、吞噬体等; 肝组织 CYP1A1、MT-1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), ENO3、TAP1 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$)。体外实验结果显示, 细辛组 AML-12 细胞 CYP1A1、MT-1 mRNA 与蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), ENO3、TAP1 mRNA 与蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 细辛水提物可诱发大鼠肝损伤, 引起肝功能异常和肝组织病理改变, 肝损伤机制与上调 CYP1A1、MT-1 mRNA 及蛋白表达及下调 ENO3、TAP1 mRNA 及蛋白表达有关。

关键词: 细辛; 蛋白组学; 肝损伤; 细胞色素 P450 1A1; 金属硫蛋白-1; 肌肉特异性烯醇化酶 3; 抗原转运蛋白 1; 甲基丁香酚; 马兜铃酸; 黄樟醚; 细辛脂素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5145-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.014

Mechanism of *Asari Radix et Rhizoma* water extract induced liver injury based on proteomics

NIE Anzheng¹, BIAN Meng¹, ZHU Chunsheng¹, GAO Meimei²

1. Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of liver injury induced by Xixin (*Asari Radix et Rhizoma*) water extract based on proteomics. **Methods** A total of 30 rats were randomly divided into control group, *Asari Radix et Rhizoma* high- and low-dose (12, 6 g/kg) groups, with 10 rats in each group, and rats were given intragastrically once a day for 28 d. Serum samples and liver samples were taken after the last administration to detect serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological morphology of liver tissue; Tandem mass spectrometry label quantitative proteomics method was used to detect differentially expressed proteins in liver tissue; Immunohistochemical method was used to determine the expressions of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), metallothionein-1 (MT-1), muscle specific enolase 3 (ENO3), and transporter associated with antigen processing 1 (TAP1) proteins in liver tissue of rats. The CCK-8 method was used to investigate the effect of *Asari Radix et Rhizoma* water extract on viability of AML-12 cells, qRT-PCR and Western blotting were used to detect the

收稿日期: 2024-04-07

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82204701); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20190274); 中华医学会临床药学会吴阶平基金会专项科研基金课题 (LCYX-Q025)

作者简介: 聂安政 (1989—), 男, 主管药师, 研究方向为中药药物警戒。E-mail: nieanzheng@163.com

*通信作者: 高梅梅 (1991—), 女, 主管药师, 研究方向为药理学。E-mail: gaomeizdyf@126.com

protein and mRNA expressions of CYP1A1, MT-1, ENO3, TAP1 in AML-12 cells. **Results** Compared with control group, AST and ALT activities in serum of rats in *Asari Radix* et *Rhizoma* group were significantly increased ($P < 0.01$). There were obvious inflammatory changes in liver tissue. There were 179 differential expressed proteins in liver tissues, mainly enriched in the biosynthesis pathway of secondary metabolites, retinol metabolic pathway, phagosomes, etc. The expressions of CYP1A1 and MT-1 proteins in liver tissue were significantly increased ($P < 0.01$), while the expressions of ENO3 and TAP1 proteins were significantly decreased ($P < 0.01$). The *in vitro* experimental results showed that the expression levels of CYP1A1 and MT-1 mRNA and protein in AML-12 cells treated with *Asari Radix* et *Rhizoma* were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), while the expression levels of ENO3 and TAP1 mRNA and protein were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *Asari Radix* et *Rhizoma* water extract can induce liver injury in rats, leading to abnormal liver function and pathological changes in liver tissue. The mechanism of liver injury is related to the up-regulation of CYP1A1, MT-1 mRNA and protein expressions, as well as the down-regulation of ENO3, TAP1 mRNA and protein expressions.

Key words: *Asari Radix* et *Rhizoma*; proteomics; liver injury; cytochrome P450 1A1; metallothionein-1; recombinant enolase 3; transporter associated with antigen processing 1; methyleugenol; aristolochic acid; saffrole; asarinin

细辛 *Asari Radix* et *Rhizoma* 最早记载于《神农本草经》，具有解表散寒、祛风止痛、温肺化饮之功，主治风寒头痛、牙痛、痹痛等症，至今有近 2 000 年的临床应用史^[1-2]。直到《本草纲目》提及“细辛不过钱，过钱命相连”，细辛的毒性便开始受到关注，历版《中国药典》将细辛用量限制在 1~3 g^[3]。然而，为了达到特定疗效，细辛临床常常超剂量使用，如国家中医药管理局推荐的新冠肺炎防疫通用方清肺排毒汤细辛用量 6 g，前期发现细辛煎剂的中毒剂量为 6~15 g^[4]，有报道^[5]超剂量细辛散剂可诱导肝损伤，课题组前期研究发现 6、12 g/kg 细辛水提物均可诱导肝损伤^[6]，本研究拟进一步探讨细辛水提物致肝损伤作用机制，旨在为细辛毒性研究提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只，体质量 (180±20) g，由北京华阜康生物科技股份有限公司提供，动物生产许可证号 SCXK (京) 2020-0004。动物于室温 (23±1) °C、相对湿度 (45±5) %、12 h 光照/12 h 黑暗节律的环境下饲养，给予普通清洁剂鼠饲料与饮水。动物实验经郑州大学第一附属医院伦理委员会批准 (批准号 2024-KY-0015)。

1.2 细胞

小鼠肝实质 AML-12 细胞购自中科院上海细胞库。

1.3 药材

细辛购自郑州大学第一附属医院，由郑州大学第一附属医院中医药学部王娟教授鉴定为马兜铃科植物华细辛 *Asarum sieboldii* Miq. 的根及根茎。

1.4 药品与试剂

对照品细辛脂素 (质量分数为 98%，批号

MUST-20062003)、甲基丁香酚 (质量分数为 98%，批号 MUST-20080701)、黄樟醚 (质量分数为 98%，批号 wkq20090701)、马兜铃酸 (质量分数为 98%，批号 MUST-20062605) 购自成都曼思特生物科技有限公司；RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司；胰蛋白酶购自北京拜尔迪生物技术有效公司；96 孔板购自 Costar 公司；Eppendorf 管购自 Axygen 公司；丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒 (批号 C009-2-1)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒 (批号 C010-2-1) 均购自南京建成生物工程技术有限公司；TRIpure (批号 RP1001)、Super M-MLV 反转录酶 (批号 PR6502)、RNase inhibitor (批号 RP5602)、2×Power Taq PCR MasterMix (批号 PR1702)、SYBR Green (批号 SY1020) 购自北京百泰克生物技术有限公司；细胞色素 P450 1A1 (cytochrome P450 1A1, CYP1A1) 抗体 (批号 00103744)、金属硫蛋白-1 (metallothionein-1, MT-1) 抗体 (批号 00003617)、肌肉特异性烯醇化酶 3 (recombinant enolase 3, ENO3) 抗体 (批号 00079114)、抗原转运蛋白 1 (transporter associated with antigen processing 1, TAP1) 抗体 (批号 00083475) 均购自美国 Protenintech 公司；兔多甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 引物设计由苏州金唯智有限公司完成；β-actin 抗体 (批号 00062315)、鼠二抗 (批号 20000427)、兔二抗 (批号 20000768) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.5 仪器

CTK132C 型离心机、H-2050R 型超速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);MR-96A 型酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);EASY-nLC 1200 型质谱系统、Orbitrap Exploris 480 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);LC-20A 型液相色谱仪、SPD-M20A 型二极管阵列检测器(日本岛津公司);CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司);超净台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);ChemiDoc XRS+成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细辛水提物的制备

取细辛 1 kg,加水 5 L 煮沸 1 h,去渣取汁,将残渣加水 5 L 再煎煮 1 h,滤过,合并 2 次药液,冷冻干燥,备用。

2.2 细辛水提物化学成分的含量测定

Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液, B 为乙腈-甲醇(3:1),柱温 38 °C,检测波长 240 nm,进样体积 10 μL,洗脱梯度:0~10 min, 35%~40% B, 1.0 mL/min; 10~40 min, 40%~45% B, 1.0~0.8 mL/min; 40~45 min, 45%~50% B, 0.8 mL/min; 45~60 min, 50%~52% B, 0.8 mL/min; 60~70 min, 52%~100% B, 0.8~1.0 mL/min。方法学考察中精密密度试验、重复性试验、稳定性试验、加样回收试验 RSD 值均不大于 5%,各对照品的标准曲线线性良好($r>0.999$)。

2.3 动物分组、给药及取材

大鼠适应性饲养 7 d 后随机分为分别为对照组和细辛高、低剂量(12、6 g/kg)组,每组 10 只。细辛高、低剂量组大鼠 ig 给予细辛水提物(15 mL/kg),连续给药 28 d,每天 1 次,对照组 ig 给予等体积生理盐水。分别于实验第 7、14、21、28 天尾静脉取血,离心,取上清液,检测血清 ALT、AST 活性。于实验第 28 天处死动物,取肝脏组织进行苏木素-伊红(HE)染色观察病理组织形态,取肝脏组织检测蛋白表达变化。

2.4 蛋白组学分析

2.4.1 蛋白提取、酶解 向样品中加入裂解液(1.5% SDS、100 mmol/L Tris-HCl),充分混合均匀,组织匀浆后,离心取上清。用丙酮沉淀法对溶液中的蛋白质进行沉淀,向得到的蛋白沉淀中加入复溶

液(8 mol/L 尿素、100 mmol/L Tris-HCl)复溶后,加入二硫苏糖醇 37 °C 孵育 1 h;加入碘乙酰胺,于室温避光进行烷基化反应以封闭巯基。采用 Bradford 法测定蛋白浓度。蛋白质定量后取 50 μg 样本用于 SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝染色后观察蛋白条带。向还原、烷基化后的样品中加入 100 mmol/L Tris-HCl 溶液,将尿素浓度稀释至 2 mol/L 以下,按照酶与蛋白 1:50 的比例加入胰蛋白酶,37 °C 振荡孵育过夜进行酶切。第 2 天加入三氟乙酸终止酶切,取上清进行 Sep-Pak C₁₈ 脱盐。抽干后-20 °C 冻存待用。

2.4.2 TMT/iTRAQ 标记 取等量的样品进行 TMT 标记。标记后的样品等量混合后,使用 Sep-Pak C₁₈ 脱盐。真空抽干后,利用 high pH 反向色谱分离法对混合样品进行分级分离,最终合并为 15 个组分。真空抽干后,存于-80 °C 冰箱,准备上机检测。

2.4.3 LC-MS/MS 条件 采用 Orbitrap Exploris 480 质谱仪串联 EASY-nLC 1200 液相的液质联用系统进行分析,C₁₈ 色谱柱(250 mm×7.5 mm, 1.9 μm),流动相 A 为 1%甲酸水溶液, B 为含 1%甲酸的乙腈,梯度洗脱:0~42 min, 6%~25% B; 42~53 min, 25%~45% B; 53~53.5 min, 45%~80% B; 53.5~60 min, 80% B。柱温 50 °C;体积流量 300 nL/min;进样量 10 μL。

2.4.4 数据处理与分析 质谱数据通过 MaxQuant (V1.6.6) 软件进行检索,采用 Andromeda 数据库检索算法。对差异蛋白进行生物信息学分析,依次使用 BLAST 工具进行基因本体(gene ontology, GO)功能、分类和富集分析;通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库进行代谢通路注释和富集分析。

2.5 免疫组化法测定肝组织 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 的表达

肝组织脱水后,包埋,切片,继而脱蜡复水,PBS 洗涤 2 次,每次 5 min,之后再放入蒸馏水中冲洗 1 次。高温修复抗原后,冷却至室温,切片用缓冲液中洗涤 3 次,每次 5 min,然后放入盛有 3% H₂O₂ 罐子中封闭 15 min。将切片取出,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,吸去 PBS,滴加血清封闭 30 min,弃封闭液。滴加稀释好的一抗,4 °C 孵育过夜,次日,抖掉一抗,使用 PBS 清洗 3 次,每次 10 min。滴加 HRP 标记的二抗(1:8 000),37 °C 孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,每次 10 min。滴加 DAB 显色液到

各个切片上，并在室温条件下显色，显色完成后放入苏木精中复染 5 min。分化，蓝化，脱水透明，封片，采集切片图像，测定所采集全部图像的吸光度 (A) 和面积，分析各靶蛋白的表达情况。

2.6 细胞活力测定

AML-12 细胞以 $(4 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4)$ 个/mL 接种于 96 孔板中，每孔 100 μ L，在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培养箱培养 24 h。每孔分别加入 10 μ L 不同质量浓度 (150、75、50、37.5、30、25、21.43、18.75、16.67 mg/mL，以生药量计) 的细辛水提物，孵育 24 h。另设置不含药物的对照组，以及不含药物不含细胞的空白孔。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液，于培养箱孵育 4 h。采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值，计算细胞活力和半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 值。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.7 Western blotting 检测 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 蛋白表达

取处于对数生长期的 AML-12 细胞，以 1.8×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。设置对照组和细辛水提物高、低剂量 (29.0、14.5 mg/mL) 组，待细胞贴壁后，加入含药培养基孵育 24 h。收集细胞，加入裂解液提取总蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度，加入 $5 \times$ Loading Buffer 煮沸 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭 1 h 后，分别孵育一抗和二抗，加入 ECL 发光液进行显影，采用 Image J 软件分析目的蛋白灰度值。

2.8 qRT-PCR 检测 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 mRNA 表达

按“2.7”项下方法分组和给药，按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')	长度/bp
CYP1A1	F: CAAGGGGCGTTGTGTCTTTG	115
	R: GTCGATAGCACCATCAGGGG	
MT-1	F: GAGTGGCCAAGGGTCTGTCTG	136
	R: GAAAACTCGGGGCCCAACTG	
ENO3	F: AGACTCGGAGCTCCATCCAA	96
	R: GGCCTTTACTACCTCCACCC	
TAP1	F: CCGCTTTCGATTTCGCTTTCC	127
	R: CTCGGAAAGTCCCAGGAACA	
GAPDH	F: AACTCCCATTCTTCCACCT	112
	R: TTGTCATACCAGGAAATGAGC	

2.9 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析，计量资料服从正态分布时以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法 (方差齐时) 或 Dunnett' T3 检验 (方差不齐时)。

3 结果

3.1 细辛水提物主要成分的含量测定

按照色谱条件测定细辛水提物中细辛脂素、黄樟醚、马兜铃酸、甲基丁香酚的含量 (图 1、表 2)，符合《中国药典》2020 年版一部规定，与文献报道基本一致^[6]。

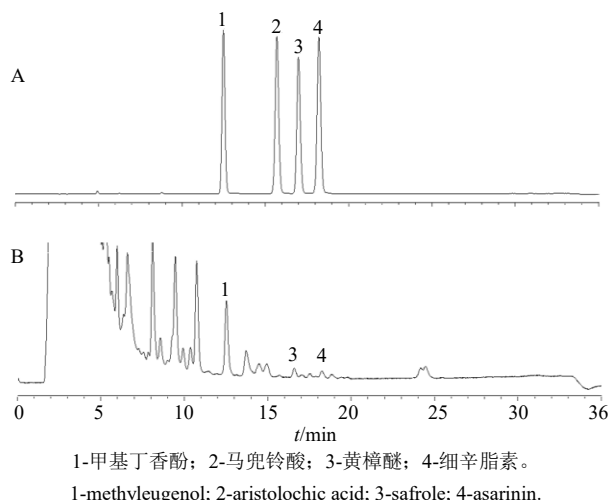


图 1 混合对照品溶液 (A) 和细辛水提物 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference solution (A) and Asari Radix et Rhizoma water extract (B)

表 2 细辛水提物主要化学成分含量

Table 2 Contents of main chemical components in Asari Radix et Rhizoma water extract

成分	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
细辛脂素	0.548
黄樟醚	0.513
甲基丁香酚	4.304
马兜铃酸	未检测到

3.2 细辛水提物对大鼠肝功能与肝组织病理变化的影响

如表 3 所示，与对照组比较，实验第 14 天细辛高剂量组大鼠血清中 AST 活性显著升高 ($P < 0.05$)；第 21、28 天细辛高、低剂量组大鼠血清中 AST、ALT 活性均显著升高 ($P < 0.01$)。

如图 2 所示，对照组大鼠肝组织细胞的边界清晰，形态完好、整齐，细胞核明显；细辛低剂量组

表 3 细辛水提物对大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)				AST/(U·L ⁻¹)			
		第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照	—	31 ± 11	35 ± 6	31 ± 5	35 ± 9	35 ± 13	32 ± 6	34 ± 7	34 ± 10
细辛	12	38 ± 9	42 ± 12	72 ± 12**	73 ± 13**	45 ± 8	49 ± 19*	106 ± 31**	108 ± 30**
	6	36 ± 6	41 ± 8	59 ± 17**	61 ± 10**	44 ± 18	45 ± 20	76 ± 18**	77 ± 14**

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

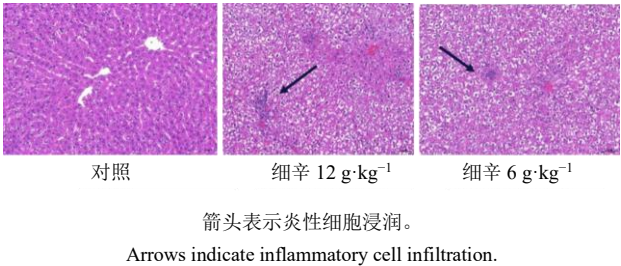


图 2 细辛水提物对大鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of *Asari Radix et Rhizoma* water extract on pathological changes in liver tissue of rats (HE, × 200)

肝索排列稍显紊乱, 偶见炎性细胞浸润; 细辛高剂量组肝细胞出现轻微水肿, 胞质疏松化, 炎性细胞浸润加重, 出现少量嗜酸性变。

3.3 细辛水提物对大鼠肝组织蛋白组学的影响

上述结果发现 12 g/kg 细辛水煎液对肝脏损伤更为明显, 故选择对照组与细辛高剂量组进行蛋白组学分析。从肝脏组织中鉴定出 5 324 个蛋白, 以差异倍数 (fold change, FC) >1.2 或 FC <0.833 且 $P < 0.05$ 为筛选条件, 对照组与细辛高剂量组肝脏组织中有 179 个差异蛋白, 其中上调蛋白有 90 个, 下调蛋白有 89 个, 蛋白差异火山图与热图见图 3、4, FC 较大的 20 种蛋白见表 4、5。

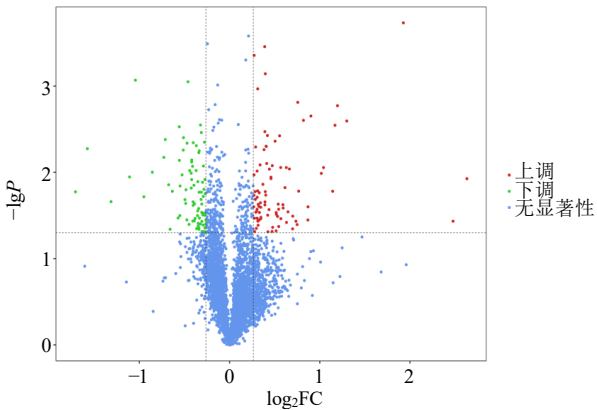


图 3 差异蛋白火山图
Fig. 3 Volcano map of differential proteins

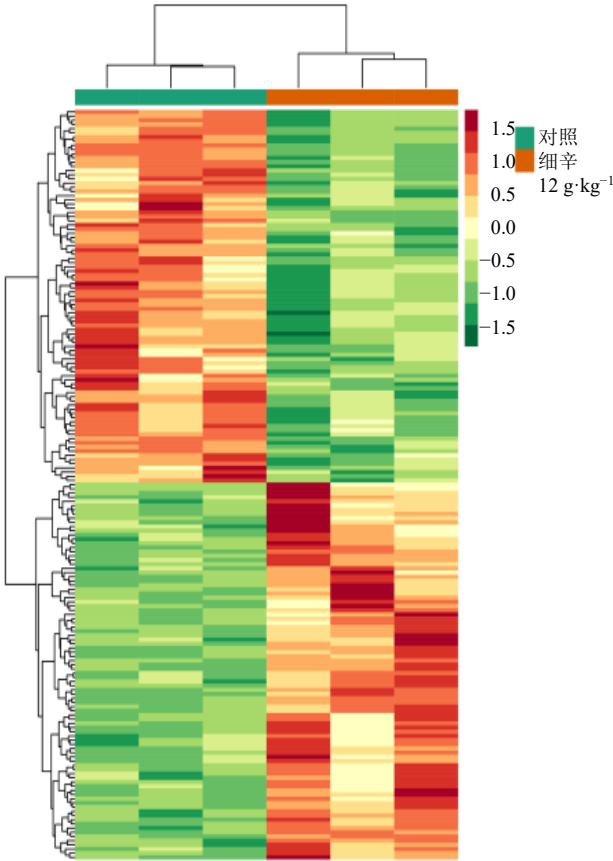


图 4 差异蛋白热图
Fig. 4 Heat map of differential proteins

表 4 细辛水提物上调大鼠肝脏组织中的蛋白 (前 10)

Table 4 *Asari Radix et Rhizoma* water extract up-regulates proteins in liver tissue of rats (Top 10)

蛋白	ID	FC
MT-1	MT1_RAT	6.19
MT-1m	D3ZHV3_RAT	5.57
ITM2b	ITM2B_RAT	3.80
KNT2	KNT2_RAT	2.46
KNT1	KNT1_RAT	2.29
CYP1a-2	CP1A2_RAT	2.25
CYP1a-1	CP1A1_RAT	2.21
NGP	D3ZY96_RAT	2.06
MPO	D3ZGE2_RAT	1.87
Aldh1a7	AL1A7_RAT	1.83

表 5 细辛水提取物下调大鼠肝脏组织中的蛋白(前 10)

Table 5 *Asari Radix et Rhizoma* water extract down-regulates proteins in liver tissue of rats (Top 10)

蛋白	ID	FC
GPX4	M0RAM5_RAT	0.63
TAP1	P97949_RAT	0.61
RT1-Bb	HB2B_RAT	0.60
ENO3	ENOB_RAT	0.55
ALDH	G3V7I5_RAT	0.52
AOX2	A0A096P6M6_RAT	0.48
Ftl1	FRIL1_RAT	0.46
RT1-A	A0A0G2K1E1_RAT	0.40
AOX3	A0A0G2K1Z5_RAT	0.34
AOX3	AOXC_RAT	0.31

GO 富集分析发现,在生物过程分类中,细辛诱导肝损伤的差异蛋白主要涉及细胞过程、代谢过程、应激反应、生物调节等生物过程,在细胞组分分类中,这些差异蛋白主要存在于细胞结构体、蛋白体,在分子功能分类中,这些差异蛋白与催化活性、结合、分子功能调节等功能相关,见图 5。

KEGG 富集分析发现,细辛诱导肝损伤所涉及信号通路有代谢通路、次级代谢产物的生物合成途径、视黄醇代谢途径、吞噬体等,见图 6 和表 6。

3.4 细辛水提取物对大鼠肝脏 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 蛋白表达的影响

如图 7 所示,与对照组比较,细辛高、低剂量

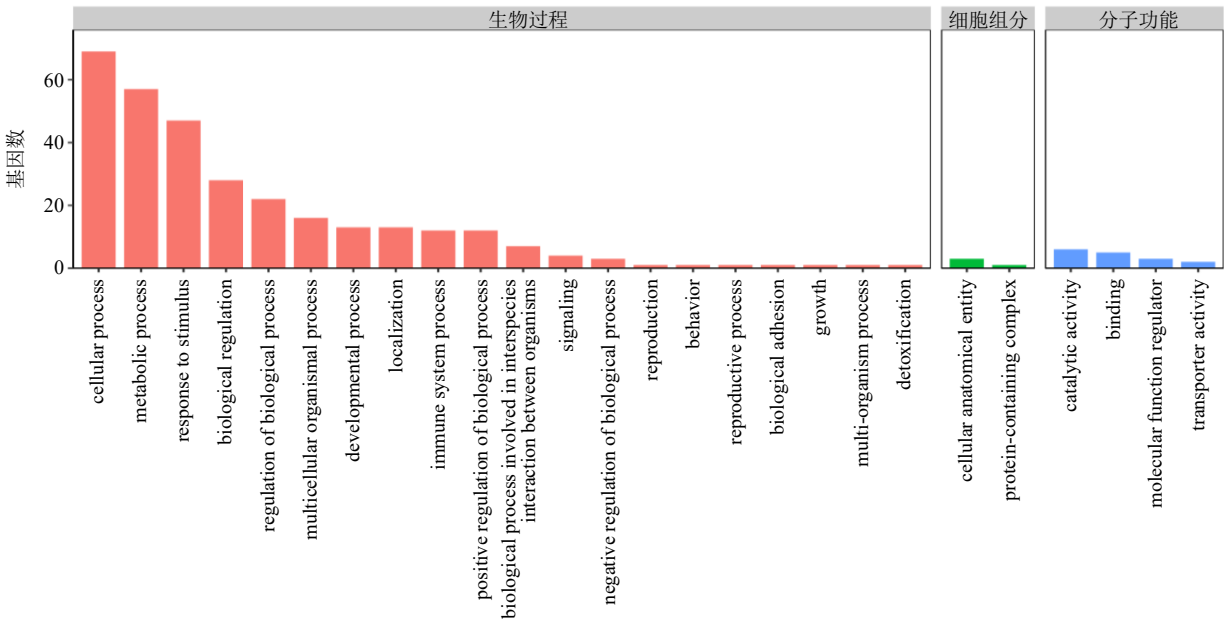


图 5 差异蛋白的 GO 富集分析
Fig. 5 GO enrichment analysis of differential proteins

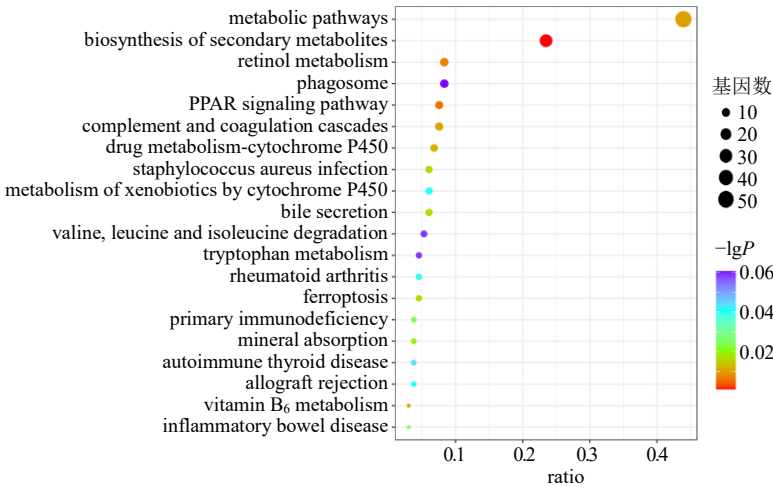
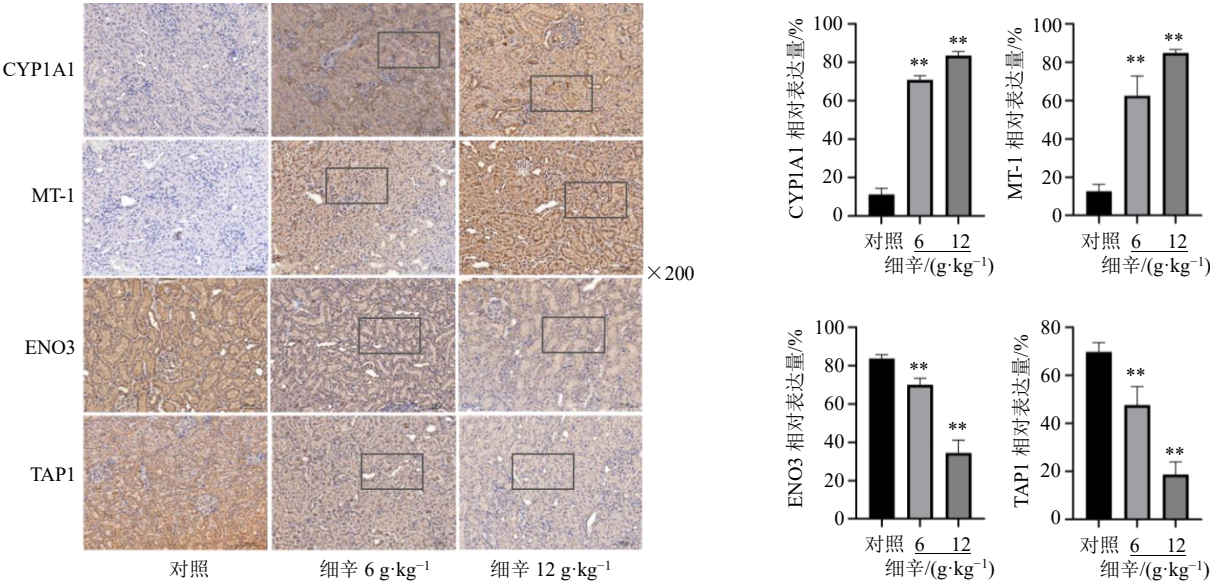


图 6 差异蛋白的 KEGG 富集分析
Fig. 6 KEGG enrichment analysis of differential proteins

表 6 差异蛋白的 KEGG 信号通路 (前 10)
Table 6 KEGG signaling pathways of differential proteins (Top 10)

ID	KEGG 条目	P 值	差异表达蛋白
ko01110	biosynthesis of secondary metabolites	<0.001	Msmo1、Idi1、Cyp1a2、Nqo1、Hmox1、Pccb、Hmgcs1、Ak1、Asns、Sqle
ko01100	metabolic pathways	<0.001	Msmo1、Cyp1a1、Aldh1a7、Atp6v1f、Acsm5、Psat1
ko00830	retinol metabolism	<0.001	Cyp1a1、Cyp1a2、Aldh1a7、Ugt1a1、Ugt1a7c
ko04145	phagosome	0.005 3	RT1-Ba、Atp6v1f、Mpo、Ighm、Tap1
ko03320	PPAR signaling pathway	<0.001	Hmgcs1、Pck2、Acsl5、Fabp2、Scd1
ko04610	complement and coagulation cascades	<0.001	Map1、C4bpa、Cfi、Cfhr4、C8a、Mug2
ko00982	drug metabolism-cytochrome P450	<0.001	Cyp1a1、Gsta5、Ugt1a1、Fmo5、Ugt1a7c、Hpgds
ko05150	staphylococcus aureus infection	<0.001	RT1-Ba、Cfi、Cfhr4、Ngp、Ighm、Camp
ko00980	metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0.002 5	Cyp1a1、Cyp1a2、Gsta5、Ugt1a1、Ugt1a7c
ko04976	bile secretion	<0.001	Ugt1a1、Ugt1a7c、St2a2、Slc10a1



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 9、10 同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as Figs. 9, 10.

图 7 细辛水提取物对大鼠肝脏 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 7 Effect of *Asari Radix et Rhizoma* water extract on CYP1A1, MT-1, ENO3 and TAP1 protein expressions in liver of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组大鼠肝脏组织 CYP1A1、MT-1 阳性细胞数显著增加 ($P < 0.01$), 着色加深, 细辛高、低剂量组 ENO3、TAP1 阳性细胞数明显减少 ($P < 0.01$), 着色变浅。

3.5 细辛水提取物对 AML-12 细胞活力的影响
如图 8 所示, 细辛水提取物作用于 AML-12 细胞 24 h, 对细胞活力的抑制作用呈剂量相关性, IC_{50} 值为 51.8 mg/mL。后续实验选择对 AML-12 细胞活力影响较小的质量浓度, 按照 IC_{50} 值的 1/2 和 1/4 取整数, 即细辛水提取物 26、13 mg/mL。

3.6 细辛水提取物对 AML-12 细胞 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 蛋白与 mRNA 表达的影响
如图 9 所示, 与对照组比较, 细辛各剂量组

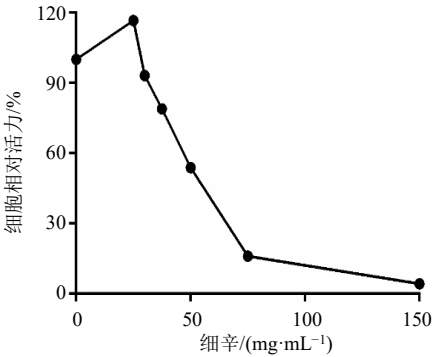


图 8 细辛水提取物对 AML-12 细胞活力的影响
Fig. 8 Effect of *Asari Radix et Rhizoma* water extract on viability of AML-12 cells

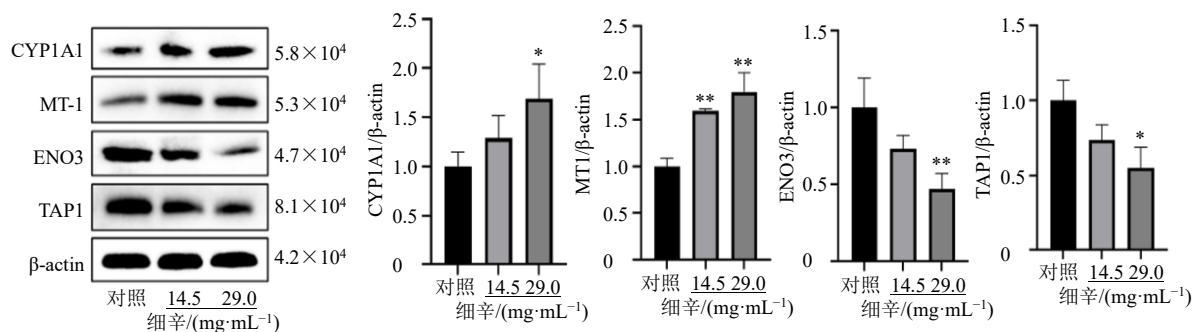


图 9 细辛水提取物对 AML-12 细胞 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of *Asari Radix et Rhizoma* water extract on protein expressions of CYP1A1, MT-1, ENO3 and TAP1 in AML-12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

AML-12 细胞 MT-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 细辛高剂量组 CYP1A1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), ENO3、TAP1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 10 所示, 与对照组比较,

细辛高剂量组 AML-12 细胞 CYP1A1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 细辛各剂量组 MT-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), ENO3、TAP1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

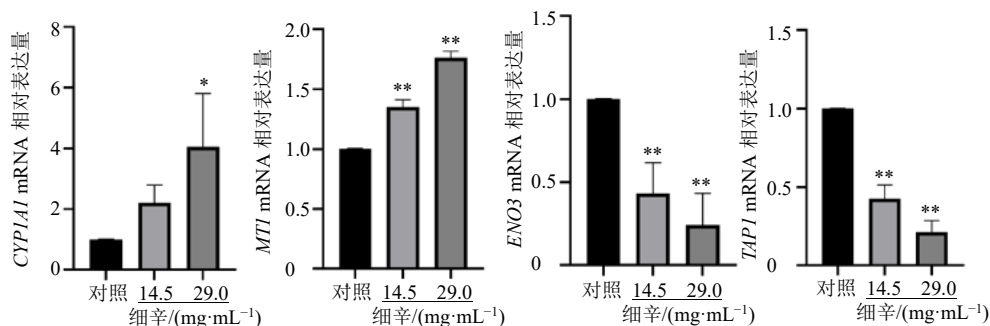


图 10 细辛水提取物对 AML-12 细胞 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effect of *Asari Radix et Rhizoma* water extract on mRNA expressions of CYP1A1, MT-1, ENO3 and TAP1 in AML-12 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

细辛为马兜铃科植物北细辛 *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.、汉城细辛 *A. sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai 或华细辛 *A. sieboldii* Miq. 的干燥根和根茎^[7]。课题组前期研究明确了细辛小鼠急性毒性的半数致死剂量 (median lethal dose, LD₅₀) 为 50 g/kg, 探讨了细辛的“量-毒-效”关系, 发现 12 g/kg 细辛水煎液在发挥抗炎、镇痛作用的同时存在肝毒性, 本研究结果显示, 大鼠 ig 细辛 28 d 后, 血清 AST、ALT 活性升高, 肝组织细胞出现轻微水肿, 胞质疏松化, 炎性细胞浸润加重, 出现少量嗜酸性变, 提示肝脏功能异常, 并出现病理损伤, 与鲍慧中等^[8]研究结果基本一致。

本研究从大鼠肝脏中检测出蛋白共 5 324 个, 细辛组较对照组差异蛋白共 179 个, 其中, 上调蛋

白有 90 个, 下调蛋白有 89 个, 主要富集于次级代谢产物的生物合成途径、视黄醇代谢途径、吞噬体等, 这些代谢途径与 CYP1A1、TAP1 等蛋白密切相关, 提示细辛所致肝损伤可能与 CYP1A1、TAP1 等蛋白的异常表达有关。CYP1A1 是重要的活化多环芳烃类致癌物的主要酶类, 活化 CYP1A1 可诱导肝损伤, 因为被激活的 CYP1A1 能将多种环境中的有机物质如多环芳烃转化为细胞毒素或其他致癌物质, 从而诱发肝损伤甚至肝癌^[9-11]。MT 是一类富含半胱氨酸的低相对分子质量蛋白, MT 包含 MT-1、MT-2、MT-3、MT-4 共 4 种亚型, MT-1 在肝脏中高表达, 参与金属代谢、解毒以及清除羟基自由基等过程^[12-14]。ENO 在糖酵解代谢途径中发挥催化作用, ENO3 是 ENO 3 种同工酶之一, 与糖原代谢、脂质代谢密切相关, ENO3 在肝癌与激活的肝星状

细胞中低表达,与早期肝癌的发生发展有关^[15-17]。TAP1 是一种分布于内质网膜及高尔基体顺面膜、属于三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)结合匣超家族的转运蛋白, TAP1 的异常可能是肿瘤细胞、病毒得以免疫逃避的关键机制之一^[18-21]。本研究根据蛋白组学结果,选取 FC 较大且与肝损伤密切相关的蛋白 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 进行免疫组化实验,发现大鼠肝脏 CYP1A1、MT-1 蛋白表达显著增加, ENO3、TAP1 蛋白表达显著降低。

为了进一步验证细辛水提物对肝脏的影响,本研究观察了细辛水提物对 AML-12 细胞的影响,发现细辛高剂量组细胞 CYP1A1、MT-1 mRNA 与蛋白表达显著增加, ENO3、TAP1 mRNA 与蛋白表达水平显著降低,提示细辛水提物可能通过调节 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 的转录,进而影响它们的表达来诱导肝损伤;细辛低剂量组 MT-1 mRNA 与蛋白表达显著增加,其余蛋白表达未见变化,表明细辛诱导肝损伤与剂量关系较大。

综上,本研究利用蛋白组学发现 12 g/kg 细辛水提物可诱发肝脏功能异常,组织发生炎性损伤,蛋白水平发生变化,可能与生物合成途径、视黄醇代谢途径等过程中 CYP1A1、MT-1、ENO3、TAP1 mRNA 与蛋白水平变化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 华新振,刘丛颖,贺梦媛,等.细辛化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].中草药,2023,54(12):4019-4035.
- [2] Fang Z E, Guo Y M, Wang Z L, et al. *Asari Radix* et *Rhizoma* consumption lacks relevance for hepatocellular carcinoma in patients: A retrospective cohort study [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(3): 470-475.
- [3] 中国药典[S].一部.2020:240.
- [4] 聂安政,赵雪睿,朱春胜,等.细辛用药沿革与合理用药思考[J].中草药,2018,49(23):5719-5723.
- [5] Cao S, Han L T, Li Y M, et al. Integrative transcriptomics and metabolomics analyses provide hepatotoxicity mechanisms of *Asarum* [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1359-1370.
- [6] 聂安政,边猛,朱春胜.不同剂量细辛水煎液对大鼠肝、肾、肺毒性的影响[J].中医药信息,2023,40(7):53-57.
- [7] 李妍,何文媛,王康宇,等.基于HPLC多指标成分测定及指纹图谱多模式识别方法的北细辛质量分析[J].中草药,2022,53(1):238-243.
- [8] 鲍慧中,朱丽娟,刘雪枫,等.细辛通过上调 p53 介导铁死亡致大鼠肝损伤的作用机制研究[J].中草药,2023,54(2):593-600.
- [9] 张祖奇.何首乌中大黄素经 CYP1A 代谢活化致肝毒性增强机理研究[D].南昌:江西中医药大学,2022.
- [10] Wang M X, Zhang Z Q, Ruan P P, et al. Emodin-induced hepatotoxicity is enhanced by 3-methylcholanthrene through activating aryl hydrocarbon receptor and inducing CYP1A1 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 365: 110089.
- [11] 何庆,陈萍萍,李昊,等.黄酮类化合物对 CYP1A1 酶抑制活性的 3D-定量构效关系研究[J].中草药,2021,52(5):1343-1350.
- [12] 孙路虹,张锡然,孔亚慧,等.MT1M 基因对肝癌细胞株 HepG2 细胞周期及信号通路的影响[J].中华男科学杂志,2004,10(12):932-934.
- [13] 孙路虹.人肝癌低表达基因 MT1M 的克隆和功能研究[D].南京:南京师范大学,2003.
- [14] 张琪,程显好,郭文娟,等.九州虫草 Zn²⁺胁迫下金属硫蛋白的诱导产生规律及性质研究[J].中草药,2013,44(21):2997-3003.
- [15] Liu Z K, Zhang R Y, Yong Y L, et al. Identification of crucial genes based on expression profiles of hepatocellular carcinomas by bioinformatics analysis [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7436.
- [16] Zhong Y G, Zhang J, Yu H J, et al. Characterization and sub-cellular localization of GalNAc-binding proteins isolated from human hepatic stellate cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4): 906-912.
- [17] Peshavaria M, Day I N. Methylation patterns in the human muscle-specific enolase gene (ENO3) [J]. *Biochem J*, 1993, 292(Pt 3): 701-704.
- [18] 叶先仁,郭永建,郑天荣,等.抗原处理相关转运蛋白基因多态性与原发性肝细胞癌的相关性研究[J].福建医药杂志,2007,29(2):1-2.
- [19] 杨朔.肝癌细胞 p53 突变通过自噬途径降解 MHC-I 类分子促进免疫逃逸的机制研究[D].沈阳:中国医科大学,2023.
- [20] Zin Aung K, Hlaing S T M, Damayanti P, et al. Transporter associated with antigen processing (TAP) 1 gene polymorphisms and risks of urothelial cell carcinoma among the Japanese population [J]. *Cureus*, 2024, 16(1): e52310.
- [21] Zhu R, Chen Y T, Wang B W, et al. TAP1, a potential immune-related prognosis biomarker with functional significance in uveal melanoma [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 146.

[责任编辑 李亚楠]