

龙胆酒炙前后对四氯化碳诱导小鼠肝损伤保护作用的对比研究

王景媛¹, 张舒雯¹, 张 桥¹, 赵重博¹, 翟思程^{2*}, 史亚军^{1*}

1. 陕西中医药大学 陕西省中药炮制技术传承基地, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西科技大学镐京学院 咸阳地区道地药材炮制重点实验室, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 探讨龙胆 *Gentianae Radix et Rhizoma* 酒炙前后对四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导的急性肝损伤小鼠模型的保肝作用, 并通过代谢组学技术揭示其潜在作用机制。 **方法** 采用高效液相色谱及紫外分光光度计测定龙胆酒炙前后龙胆苦苷及多糖含量变化。将 KM 小鼠随机分为对照组、模型组、水飞蓟素 (150 mg/kg) 组及生龙胆低、中、高剂量 (2.5、5.0、10.0 g/kg) 组和酒龙胆低、中、高剂量 (2.5、5.0、10.0 g/kg) 组, 每组 6 只。小鼠连续 10 d 给予相应药物, 除对照组外其余小鼠 ip 含 0.12% CCl₄ 的花生油制备急性肝损伤模型。测定小鼠肝脏指数; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肝组织病理变化; 采用试剂盒测定血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平和肝组织中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; 采用免疫组化法检测肝组织中磷酸化核因子- κ B (phosphorylated nuclear factor- κ B, p-NF- κ B) 表达; 采用超高效液相色谱串联飞行时间质谱分析技术 (UPLC-Q-TOF-MS) 对各组小鼠血清代谢物进行分析。 **结果** 生、酒龙胆中龙胆苦苷质量分数分别为 3.84%、3.12%, 总多糖质量分数分别为 3.27%、5.03%。与模型组比较, 生、酒龙胆高剂量组小鼠肝损伤明显改善, 血清中 ALT、AST、ALP 活性和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$), 肝组织 MDA 水平和 p-NF- κ B 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝组织 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$); 与生龙胆高剂量组比较, 酒龙胆高剂量组 ALT、AST、ALP 活性和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$), 肝组织 MDA 水平和 p-NF- κ B 表达显著降低 ($P < 0.01$), 肝组织 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$)。代谢组学研究表明龙胆酒炙前后对肝损伤的保护作用主要涉及甘油磷脂代谢。 **结论** 龙胆酒炙后对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠的保肝效果优于生龙胆, 龙胆保肝的作用机制可能与甘油磷脂代谢有关。

关键词: 龙胆; 酒炙; 急性肝损伤; 代谢组学; 龙胆苦苷; 甘油磷脂代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)18-6226-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.012

Comparative study on protective effect of *Gentianae Radix et Rhizoma* before and after processing with wine against carbon tetrachloride induced liver damage in mice

WANG Jingyuan¹, ZHANG Shuwen¹, ZHANG Qiao¹, ZHAO Chongbo¹, ZHAI Sicheng², SHI Yajun¹

1. Shaanxi Traditional Chinese Medicine Processing Technology Inheritance Base, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Xianyang Key Laboratory for processing genuine medicinal materials, Haojing College of Shaanxi University of Science & Technology, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To explore the hepatoprotective effect of Longdan (*Gentianae Radix et Rhizoma*) before and after processing with wine in mice with acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄), and to reveal the potential mechanism through

收稿日期: 2024-05-17

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2024SF-YBXM-468); 咸阳市科学技术研究与发展计划项目 (2020k02-94); 咸阳市 2020 年重点实验室项目 (2020k04-02); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202210716021)

作者简介: 王景媛 (1989—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为中药炮制与制剂。E-mail: wangjingyuan@sntcm.edu.cn

*通信作者: 翟思程 (1990—), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为中药新剂型与新工艺。E-mail: sichengzhai0124@163.com

史亚军 (1976—), 男, 三级教授, 博士, 研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: 2051004@sntcm.edu.cn

metabolomics techniques. **Methods** The changes in contents of gentiopicroside and polysaccharides were determined by high-performance liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometer. KM mice were randomly divided into control group, model group, silymarin (150 mg/kg) group, *Gentianae Radix et Rhizoma* low-, medium-, and high-dose (2.5, 5.0, 10.0 g/kg) groups and *Gentianae Radix et Rhizoma* processed with wine low-, medium-, and high-dose (2.5, 5.0, 10.0 g/kg) groups, with six mice in each group. Mice were administered the corresponding drug for 10 consecutive days, and except for the control group, acute liver injury mice were prepared by administering peanut oil containing 0.12% CCl₄. The liver index of mice was measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in liver tissue. Kits were used to measure the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and malondialdehyde (MDA) level in liver tissue. Immunohistochemistry was used to detect the expression of phosphorylated nuclear factor- κ B (p-NF- κ B) in liver tissue. The serum metabolites of mice in each group were analyzed using ultra-high performance liquid chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). **Results** The content of gentiopicroside in *Gentianae Radix et Rhizoma* and *Gentianae Radix et Rhizoma* processed with wine was 3.84% and 3.12%, respectively, and the total polysaccharide content was 3.27% and 5.03%. Compared with model group, the liver injury of mice in gentiopicroside in *Gentianae Radix et Rhizoma* high-dose group and *Gentianae Radix et Rhizoma* processed with wine high-dose group was significantly improved, the activities of ALT, AST, ALP and levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in serum were significantly reduced ($P < 0.05$, 0.01), MDA level and p-NF- κ B expression in liver tissue were significantly reduced ($P < 0.05$, 0.01), while the activity of GSH-Px in liver tissue was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with *Gentianae Radix et Rhizoma* high-dose group, the activities of ALT, AST, ALP and levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in serum of mice in *Gentianae Radix et Rhizoma* processed with wine high-dose group were significantly reduced ($P < 0.01$), MDA level and p-NF- κ B expression in liver tissue were significantly reduced ($P < 0.01$), while the activity of GSH-Px in liver tissue was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The liver protective effect of *Gentianae Radix et Rhizoma* after processing with wine on CCl₄-induced acute liver injury mice is better than *Gentianae Radix et Rhizoma*. The mechanism of *Gentianae Radix et Rhizoma* on protecting liver may be related to glycerophospholipid metabolism.

Key words: *Gentianae Radix et Rhizoma*; processing with wine; acute liver injury; metabolomics; gentiopicroside; glycerophospholipid metabolism

肝脏是机体调节新陈代谢、祛除毒素以及存储糖原的主要器官, 免疫反应、病毒感染及药物中毒等均可诱发急性肝脏损伤^[1], 肝脏长期处于损伤状态将危害机体健康^[2-3]。根据肝损伤的症状特征, 可将其划为中医“胁痛”“肝着”等范畴^[4-5], 其病机为肝气郁结不能疏泻, 形成胁痛证, 中医辨证多为肝郁气滞证^[6]。急性肝损伤是多种肝脏疾病的诱因, 现有的抗肝损伤药物有甘草酸二铵、硫普罗宁、甘草酸苷等, 长期服用可能因药物耐受影响疗效^[7]。目前尚未发现治疗肝脏疾病的理想药物^[8], 因此对治疗肝损伤药物的研发十分迫切。

龙胆 *Gentianae Radix et Rhizoma* 为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.、龙胆 *G. scabra* Bge.、三花龙胆 *G. triflora* Pall.或坚龙胆 *G. rigescens* Franch.的干燥根和根茎^[9]。龙胆味苦, 性寒, 归肝、胆经, 具有清热燥湿、泻肝胆火的功效, 临床常用于治疗肝胆实热的疾病, 如带状疱疹、高血压、中耳炎、胆腑郁热型慢性鼻-鼻窦炎等^[10]。龙胆在治疗胁痛方面应用广泛。肝郁不疏是胁痛发病的重要病理基础, 故以疏泻肝胆为法。明代名医龚廷贤认为

“左右胁俱痛者, 肝火盛而木气实也”, 以当归龙荟丸、龙胆泻肝汤治疗内有湿热、肝郁气滞甚之左右胁痛^[11]。目前对龙胆保肝作用的研究主要集中在龙胆苦苷^[12-13]或以龙胆苦苷为指标的龙胆提取物^[14], 王俊紫等^[12]发现龙胆苦苷对四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 引起的急性肝损伤小鼠具有一定的保肝效果, 其作用机制可能与调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路及减弱氧化应激反应相关; 王丽娟^[14]以龙胆苦苷为指标对龙胆的关键药效组分进行提取分离, 发现龙胆关键药效组分对酒精和非酒精引起的小鼠肝损伤都具有一定的保护作用; 然而以龙胆水煎液或醇提物对 CCl₄ 诱导肝损伤的研究少有报道。

炮制是中医药理论在临床用药上的具体表现, 炮制具有增强药效、降低毒性、缓和药性等作用。酒炙是中药炮制常用的方法之一, 将净选或切制后的药物, 加入定量黄酒拌炒的方法称为酒炙法, 酒炙具有改变药性、降低不良反应、增强药效的作用^[15]。黄

酒为中药炮制辅料之一,作为医用最早见于《五十二病方》^[6],黄酒能升能散,宣行药势,龙胆酒炙后可升药力^[7],吴晓燕等^[18]发现龙胆酒制后能够促进龙胆苦苷在肝和肾等器官中的吸收利用,改变龙胆苦苷在大鼠主要器官组织中的浓度分布。然而,对于龙胆酒炙前后对肝脏的保护作用研究较少,因此,本研究采用 CCl₄ 诱导小鼠肝损伤模型,探讨龙胆酒炙前后对肝损伤保护作用的差异及可能的作用机制,为龙胆的临床应用提供参考依据。

1 材料

1.1 药材

生龙胆(批号 20230810)购自广州市华宇药业有限公司,由陕西中医药大学王昌利教授鉴定为龙胆科植物龙胆 *G. scabra* Bge. 的干燥根和根茎。取龙胆段,按 100:15 的比例加黄酒拌匀,闷润至透,用文火炒干,表面颜色加深,取出,放凉,即得酒龙胆^[9]。

1.2 动物

SPF 级雄性 KM 小鼠 54 只,体质量 (20±2) g,购自西安交通大学医学部实验动物中心,动物生产合格证号 SCXK(陕)2023-002-3788。动物饲养于陕西中医药大学动物实验室,温度 20~25 ℃,相对湿度 40%~70%,自由进食饮水。动物实验经陕西中医药大学医学伦理委员会批准(批准号 SUCMDL20231006001)。

1.3 药品与试剂

丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号 20230805)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号 20230325)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(批号 20230410)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(批号 20230725)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 20230820)购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) ELISA 试剂盒(批号 M230803-102a)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 M230811-004a)、IL-1β ELISA 试剂盒(批号 M231115-001a)购自上海欣博盛生物公司;p-NF-κB 抗体(批号 GB113882)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 G1202)、HRP 标记的二抗(批号 GP2403017)、DAB 显色试剂盒(批号 CR2403084-3)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;龙胆苦苷对照品(批号 GR-134-170520,质量

分数≥98%)购自南京广润生物制品有限公司;水飞蓟素(批号 M1120A,质量分数≥80%)购自苏州美仑生物科技有限公司;无水葡萄糖标准品(批号 110833-202309,质量分数≥98.0%)购自江苏永健医药科技有限公司;戊巴比妥钠(批号 20230125)购自天津市大茂化学试剂厂;CCl₄(批号 0710262)购自广东汕头市西陇化工厂;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,浓硫酸、苯酚、95%乙醇均为分析纯。

1.4 仪器

UV-2600 型紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];1260 型高效液相色谱仪(美国 Aglient 公司);Vanquish Horizon system UHPLC 液相色谱系统、Exploris240 型质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);5430R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);New Classic MS 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);Epoch 型全波长酶标仪(美国 BioTek 公司);E100 型显微镜(尼康仪器有限公司)。

2 方法

2.1 龙胆酒炙前后提取物的制备和龙胆苦苷、总多糖含量测定

2.1.1 生龙胆、酒龙胆提取物的制备 根据课题组前期实验结果,取生龙胆、酒龙胆饮片,分别用 10 倍量 70%乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,浓缩至相当于生药量 1 g/mL,即得。

2.1.2 龙胆苦苷含量测定 参照《中国药典》2020 年版^[9],采用高效液相色谱法测定龙胆苦苷含量。使用 Thermo C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇-水(25:75)为流动相,进样量 10 μL,在 270 nm 波长下进行检测,以色谱峰面积为纵坐标(y),进样量(μg)为横坐标(x),绘制标准曲线,得到回归方程 $y=2 \times 10^6 x + 561\,668$, $R^2=0.999\,9$,计算样品中龙胆苦苷含量。

2.1.3 总多糖含量测定 参照文献方法^[20]测定总多糖含量,采用紫外-可见分光光度计于 487 nm 处测定吸光度(A)值,以 A 值为纵坐标(y),葡萄糖质量浓度为横坐标(x),绘制标准曲线,得到回归方程 $y=4.231\,2 x + 0.132\,0$, $R^2=0.999\,7$,计算样品中多糖含量。

2.2 动物分组、给药与造模

将 54 只 SD 小鼠随机分为对照组、模型组、水飞蓟素(150 mg/kg)组及生龙胆低、中、高剂量(2.5、5.0、10.0 g/kg)组和酒龙胆低、中、高剂量(2.5、5.0、10.0 g/kg)组,每组 6 只。取相应体积的生龙

胆、酒龙胆提取物,用蒸馏水定容,给药剂量依据《中国药典》2020 年版推荐用量,依照体表面积折算低、中、高剂量相当于临床等效剂量的 0.5、1、2 倍,给药组 ig 相应药物 (20 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水,1 次/d,连续给药 10 d。末次给药后,除对照组外,其余小鼠 ip 含 0.12% CCl₄ 的花生油建立小鼠急性肝损伤模型^[21-22],对照组 ip 等体积的花生油。禁食,自由饮水,用 1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,称定质量,取眼球血及肝组织,用于后续实验。

2.3 肝脏指数测定

称定肝组织质量,计算小鼠肝脏指数。

肝脏指数=肝组织质量/体质量

2.4 HE 染色观察肝组织病理变化

取小鼠肝组织,于 4%中性甲醛中固定 24 h,包埋,冰冻切片,HE 染色,脱水,封片,于显微镜下观察并拍照。

2.5 生化指标检测

将收集的血液于 4 ℃、4 500 r/min 离心 15 min,分离血清,按照试剂盒说明书测定血清中 ALT、AST、ALP 活性;取各组小鼠同一部位肝组织,制备组织匀浆,按照试剂盒说明书检测肝组织中 GSH-Px 活性和 MDA 水平。

2.6 血清中炎症因子水平的检测

按照 ELISA 试剂盒说明书测定各组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.7 免疫组化法检测肝组织 p-NF- κ B 表达

取肝组织石蜡切片,脱蜡至水,乙二胺四乙酸高温修复,冷却后用 PBS 洗涤,3%双氧水避光孵育 25 min,用 PBS 洗涤 3 次,在切片上滴加 p-NF- κ B 抗体 (1:50) 孵育过夜;PBS 洗涤,滴加二抗,室温孵育 50 min;PBS 洗涤,滴加 DAB 显色液,苏木素复染,流水冲洗,切片依次放入 75%乙醇、85%乙醇、100%乙醇、二甲苯中脱水透明,封片,于显微镜下观察并拍照。

2.8 血清代谢组学分析

采用超高效液相色谱串联飞行时间质谱技术 (UPLC-Q-TOF-MS) 对对照组、模型组、生龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组小鼠血清代谢物进行分析。

2.8.1 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 A 为乙腈-水 (5:95, 含 0.1%甲酸),流动相 B 为乙腈-异丙醇-水 (47.5:47.5:5, 含 0.1%甲酸),梯度洗脱:

正离子模式下 0~3 min, 0~20% B; 3~4.5 min, 20%~35% B; 4.5~5 min, 35%~100% B; 5~6.3 min, 100% B; 6.3~6.4 min, 100%~0 B; 6.4~8 min, 100% A; 负离子模式下 0~1.5 min, 0~5% B; 1.5~2 min, 5%~10% B; 2~4.5 min, 10%~30% B; 4.5~5 min, 30%~100% B; 5~6.3 min, 100% B; 6.3~6.4 min, 100%~0 B; 6.4~8 min, 100% A。进样量 3 μ L, 体积流量 0.4 mL/min, 柱温 40 ℃。

2.8.2 质谱条件 样品经电喷雾电离,分别采用正、负离子扫描模式采集质谱信号。扫描模式 Full MS, 分辨率为 60 000;扫描模式 Dependent-MS², 分辨率为 15 000, 碰撞能为 20%、40%、60%;扫描范围 m/z 70~1 050;鞘气体积流量 60 arb;辅助气体体积流量 20 arb;加热温度 350 ℃;毛细管温度 320 ℃;正离子模式喷雾电压 3.4 kV;负离子模式喷雾电压-3.0 kV;S-Lens 电压 70 V。

2.8.3 数据处理 使用 Majorbio Cloud Platform 平台分别对样本数据进行主成分分析 (principal components analysis, PCA) 和偏最小二乘-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 判断各组样品的整体差异情况,再通过正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 得到代谢物的变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 值和单变量分析中的差异倍数 (fold change, FC)、 P 值,以 $P<0.05$ 及 $VIP>1$ 为条件进行差异代谢物的筛选。采用 Majorbio Cloud 平台对筛选的差异代谢物进行功能通路富集和拓扑学分析。

2.9 统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用 ANOVA 检验,方差齐采用 LSD 检验;方差不齐采用邓尼特检验。

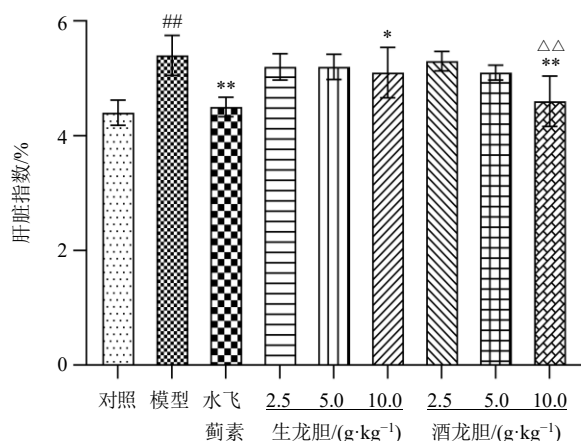
3 结果

3.1 龙胆酒炙前后的龙胆苦苷及总多糖含量

经检测,生龙胆中龙胆苦苷质量分数为 3.84%,总多糖质量分数为 3.27%;酒龙胆中龙胆苦苷质量分数为 3.12%,总多糖质量分数为 5.03%。

3.2 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠肝脏指数的影响

如图 1 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏指数显著升高 ($P<0.01$),提示 CCl₄ 使小鼠的肝脏形态发生病理性改变;与模型组比较,水飞蓟素组、生龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组小鼠肝脏指数显



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与生龙胆相同剂量组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, 图 3 同。
 $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group; $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs *Gentianae Radix et Rhizoma* group with same dose, same as Fig. 3.

图 1 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of *Gentianae Radix et Rhizoma* before and after processing with wine on liver index of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 提示生龙胆、酒龙胆可缓解 CCl_4 诱导的肝脏肿胀; 与生龙胆相同剂量组比较, 酒龙胆高剂量组小鼠肝脏指数显著降低 ($P < 0.01$), 提示酒龙胆对肝脏肿胀的缓解作用优于生龙胆。

3.3 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠肝组织病理变化的影响

如图 2 所示, 对照组小鼠肝细胞呈正常生理状态, 细胞索排列整齐, 结构清晰, 未见炎症细胞浸

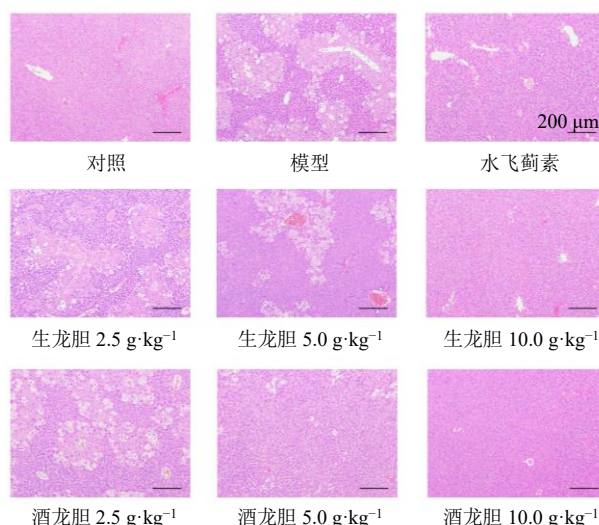


图 2 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠肝组织病理变化的影响 (HE, $\times 20$)

Fig. 2 Effect of *Gentianae Radix et Rhizoma* before and after processing with wine on pathological changes in liver tissue of mice with acute liver injury (HE, $\times 20$)

润、细胞坏死、变性等病理变化。模型组小鼠肝细胞索排列失序, 有大量炎症细胞浸润, 细胞坏死明显。与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织病理状态均有改善, 生龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组的改善作用尤为显著, 偶见炎症细胞浸润, 细胞坏死、变性明显减少。

3.4 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性和肝组织中 GSH-Px 活性、MDA 水平的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性显著升高 ($P < 0.01$); 与

表 1 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of *Gentianae Radix et Rhizoma* before and after processing with wine on activities of ALT, AST and ALP in serum of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)
对照	—	55.71 ± 4.09	92.66 ± 2.17	108.31 ± 4.24
模型	—	189.34 ± 1.86 ^{##}	160.88 ± 1.95 ^{##}	231.30 ± 2.34 ^{##}
水飞蓟素	0.15	150.05 ± 3.90 ^{**}	120.13 ± 5.38 ^{**}	190.00 ± 1.41 ^{**}
生龙胆	2.5	187.22 ± 2.52	161.19 ± 3.33	228.58 ± 2.16
	5.0	185.65 ± 2.91	163.11 ± 3.28	218.09 ± 2.19 ^{**}
	10.0	175.49 ± 2.93 ^{**}	138.75 ± 2.45 ^{**}	202.97 ± 3.03 ^{**}
酒龙胆	2.5	186.53 ± 2.77	159.88 ± 1.85	230.05 ± 2.36
	5.0	185.33 ± 3.29 [*]	157.55 ± 2.88 ^{ΔΔ}	207.35 ± 5.73 ^{**ΔΔ}
	10.0	139.08 ± 1.93 ^{**ΔΔ}	109.63 ± 3.30 ^{**ΔΔ}	185.72 ± 2.25 ^{**ΔΔ}

与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与生龙胆相同剂量组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, 下表同。

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group; $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs *Gentianae Radix et Rhizoma* group with same dose, same as below tables.

模型组比较,水飞蓟素组、生龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组血清中 ALT、AST、ALP 活性均显著降低 ($P<0.01$),生龙胆中剂量组 ALP 活性显著降低 ($P<0.01$),酒龙胆中剂量组 ALT、ALP 活性均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01);与生龙胆相同剂量组比较,酒龙胆高剂量组 ALT、AST、ALP 活性均显著降低 ($P<0.01$),酒龙胆中剂量组 AST、ALP 活性显著降低 ($P<0.01$)。

如表 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中 GSH-Px 活性显著降低 ($P<0.01$),MDA 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组、生龙胆高剂量组和酒龙胆中、高剂量组 GSH-Px 活性显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01),MDA 水平显著降低 ($P<0.01$);与生龙胆相同剂量组比较,酒龙胆高剂

量组 GSH-Px 活性显著升高 ($P<0.01$),MDA 水平显著降低 ($P<0.01$),酒龙胆中剂量组 MDA 水平显著降低 ($P<0.01$)。

3.5 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平的影响

如表 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组及生龙胆中、高剂量组和酒龙胆中、高剂量组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.01$),酒龙胆低剂量组 IL-6 水平显著降低 ($P<0.05$);与生龙胆相同剂量组比较,酒龙胆高剂量组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.01$),酒龙胆中剂量组 IL-1 β 、TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.01$)。

表 2 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠肝组织中 GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of *Gentianae Radix et Rhizoma* before and after processing with wine on GSH-Px activity and MDA level in liver tissue of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	GSH-Px/(KU·g ⁻¹)	MDA/(μ mol·g ⁻¹)
对照	—	65.04 $\pm$ 3.38	0.83 $\pm$ 0.04
模型	—	26.01 $\pm$ 1.59 ^{##}	1.61 $\pm$ 0.01 ^{##}
生龙胆	2.5	28.42 $\pm$ 1.64	1.62 $\pm$ 0.03
	5.0	29.25 $\pm$ 1.66	1.61 $\pm$ 0.01
	10.0	46.23 $\pm$ 1.69 ^{**}	1.13 $\pm$ 0.04 ^{**}
酒龙胆	2.5	34.35 $\pm$ 9.01	1.62 $\pm$ 0.04
	5.0	30.00 $\pm$ 1.32 [*]	1.41 $\pm$ 0.04 ^{**$\Delta$$\Delta$}
	10.0	50.97 $\pm$ 1.00 ^{**$\Delta$$\Delta$}	1.01 $\pm$ 0.06 ^{**$\Delta$$\Delta$}
水飞蓟素	0.15	38.67 $\pm$ 1.38 ^{**}	1.15 $\pm$ 0.03 ^{**}

表 3 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of *Gentianae Radix et Rhizoma* before and after processing with wine on levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(μ g·L ⁻¹)	IL-6/(μ g·L ⁻¹)	TNF- α /(μ g·L ⁻¹)
对照	—	6.20 $\pm$ 0.28	12.02 $\pm$ 0.59	42.96 $\pm$ 2.00
模型	—	70.15 $\pm$ 0.58 ^{##}	175.84 $\pm$ 1.90 ^{##}	183.96 $\pm$ 3.56 ^{##}
生龙胆	2.5	69.19 $\pm$ 0.89	172.48 $\pm$ 1.68	181.47 $\pm$ 2.92
	5.0	61.47 $\pm$ 0.81 ^{**}	155.14 $\pm$ 1.82 ^{**}	178.42 $\pm$ 1.78 ^{**}
	10.0	54.09 $\pm$ 0.79 ^{**}	132.53 $\pm$ 2.37 ^{**}	148.49 $\pm$ 2.69 ^{**}
酒龙胆	2.5	68.01 $\pm$ 2.15	172.04 $\pm$ 3.81 [*]	184.47 $\pm$ 2.00
	5.0	58.39 $\pm$ 0.87 ^{**$\Delta$$\Delta$}	152.15 $\pm$ 4.27 ^{**}	172.66 $\pm$ 1.55 ^{**$\Delta$$\Delta$}
	10.0	41.88 $\pm$ 1.24 ^{**$\Delta$$\Delta$}	120.00 $\pm$ 2.75 ^{**$\Delta$$\Delta$}	95.09 $\pm$ 2.16 ^{**$\Delta$$\Delta$}
水飞蓟素	0.15	45.88 $\pm$ 1.17 ^{**}	132.61 $\pm$ 5.02 ^{**}	130.31 $\pm$ 2.07 ^{**}

3.6 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠肝组织 p-NF- κ B 表达的影响

如图 3 所示,对照组小鼠肝组织内少见 p-NF- κ B 表达,与对照组比较,模型组小鼠肝组织 p-NF- κ B 阳性表达显著增加 ($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组、生龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组 p-

NF- κ B 阳性表达显著减少 ($P<0.05$ 、 0.01);与生龙胆相同剂量组比较,酒龙胆高剂量组 p-NF- κ B 阳性表达显著减少 ($P<0.01$)。

3.7 血清代谢组学研究

3.7.1 PCA 采用 PCA 来分析各组血清样本的聚类情况,如图 4 所示,对照组与模型组样本在 PCA

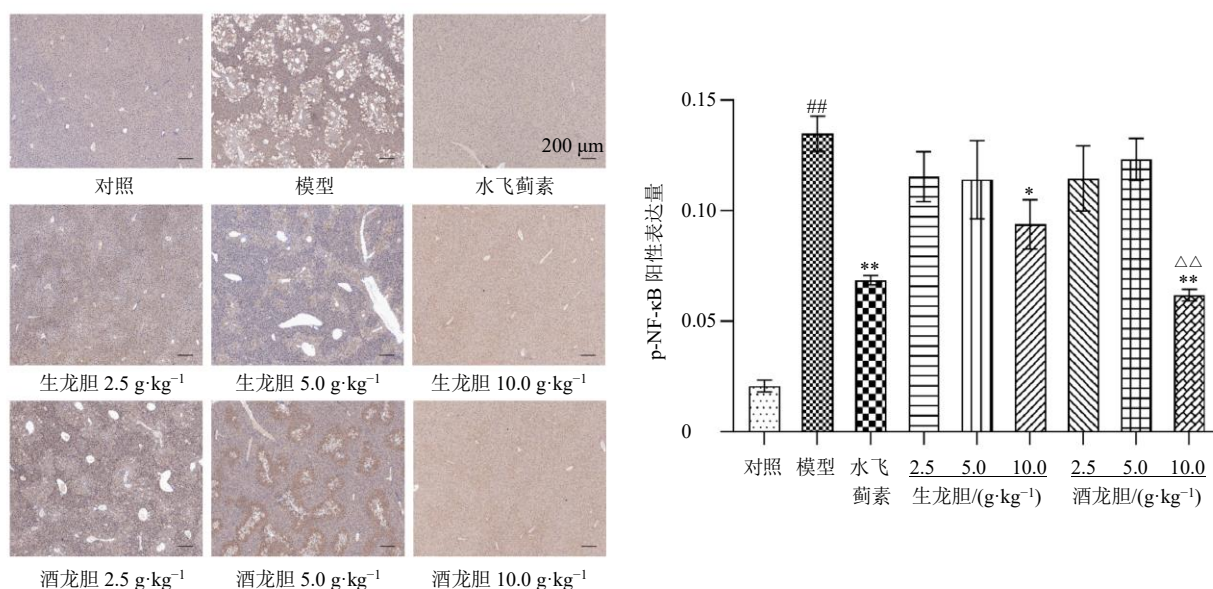


图 3 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠肝组织 p-NF-κB 表达的影响 (免疫组化, ×25)

Fig. 3 Effect of *Gentianae Radix* et *Rhizoma* before and after processing with wine on p-NF-κB expression in liver tissue of mice with acute liver injury (immunohistochemistry, ×25)

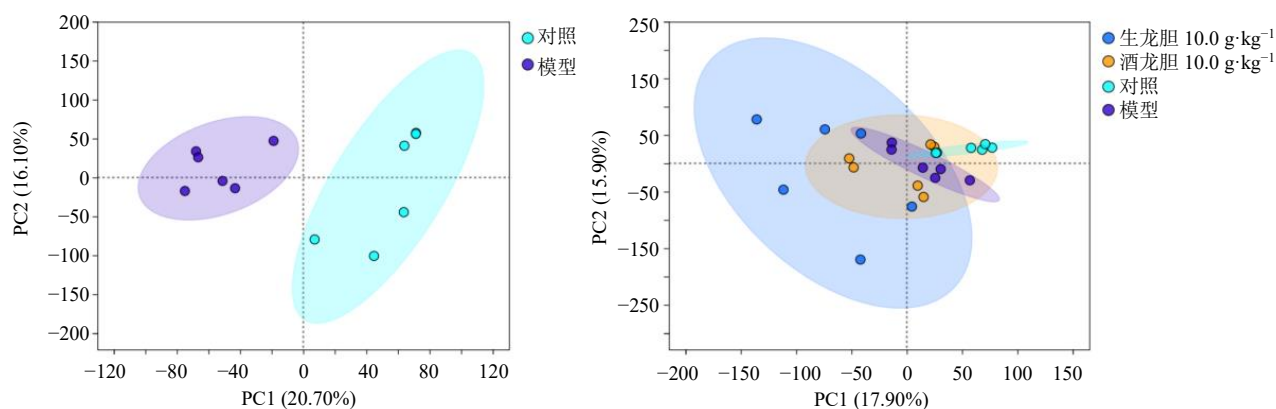


图 4 各组小鼠血清样本的 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of serum samples of mice in each group

得分图中明显分开,表明 CCl₄ 致小鼠血清代谢物水平发生明显改变;龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组样本与对照组有交集,提示给药后小鼠部分血清代谢物趋于正常水平。

3.7.2 PLS-DA 采用 PLS-DA 对各组血清样本进行分析,图中两组样本分离程度越大,说明分类效果越显著。如图 5 所示,对照组与模型组分离度良好,组内样本聚集度高,表明对照组与模型组之间存在明显的差异代谢物;给药组位于对照组与模型组的中间位置,表明给药后肝损伤小鼠部分血清代谢物水平被回调。

3.7.3 差异代谢物的筛选与鉴定 通过 OPLS-DA 中代谢物的 VIP 值和单变量分析中的 FC、P 值来进

行差异代谢物的筛选。对照组与模型组 OPLS-DA 中 VIP>1 且 *t* 检验 ($P<0.05$) 的代谢物即为与 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠模型相关的差异代谢物,以 log₂FC 为横坐标, -lg*P* 为纵坐标绘制火山图,见图 6。由图 6 可知,大多数代谢产物离子在 origin 周围聚集,偏离 origin 的离子占少数,这些偏离圆点的离子说明两组之间存在差异;CCl₄ 致急性肝损伤小鼠模型中差异性代谢产物既可被上调,也可被下调。

通过对小鼠血清样本代谢产物变化的预测,寻找符合 VIP>1、 $P<0.01$ 的代谢产物,如表 4 所示,与对照组比较,模型组磷脂酰胆碱 [14:1(9Z)/14:1(9Z)]、磷脂酰丝氨酸 (15:0/20:0)、磷脂酰丝氨酸 [24:1(15Z)/20:3(8Z,11Z,14Z)]、6-β-羟基甲羟

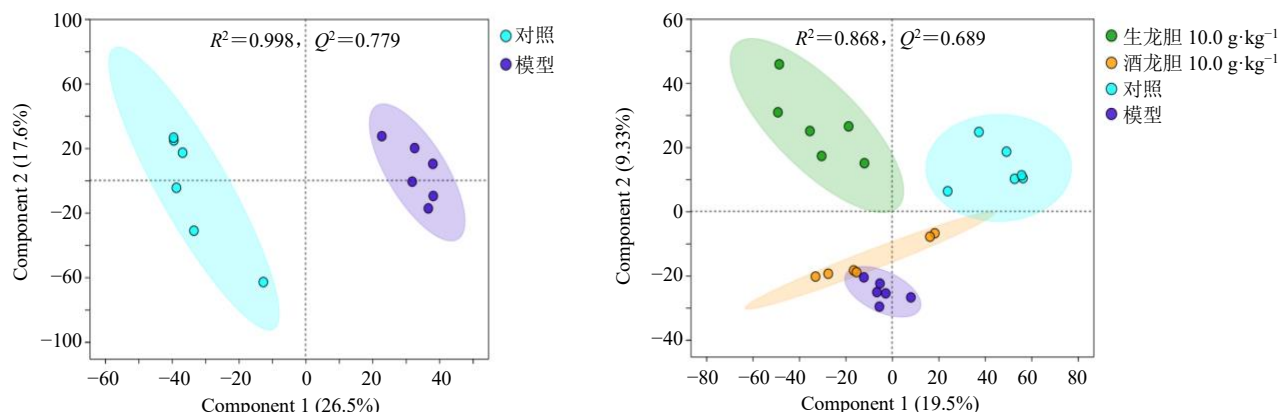


图 5 各组小鼠血清样本的 PLS-DA 得分图

Fig. 5 PLS-DA score plot of serum samples of mice in each group

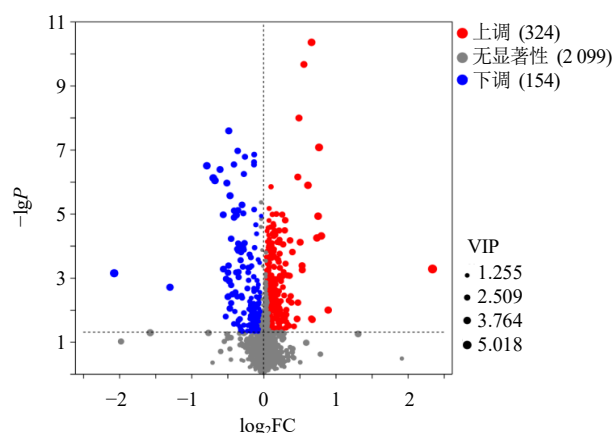


图 6 对照组与模型组差异代谢物火山图分析

Fig. 6 Volcano plot analysis of metabolic of differences in control group and model group

孕酮、二羟玉米素-*O*-葡萄糖苷、人参皂苷 A2、甘氨酸苯丙氨酸、吡啶羧酸硫酸盐和磷脂酰丝氨酸 (24 : 0/5-iso PGF2VI) 水平显著降低 ($P < 0.01$), 其余 19 个代谢物水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 生龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组磷脂酰胆碱 [14 : 1(9Z)/14 : 1(9Z)]、磷脂酰丝氨酸 (15 : 0/20 : 0)、磷脂酰丝氨酸 [24 : 1(15Z)/20 : 3 (8Z,11Z,14Z)]、6- β -羟基甲羟孕酮、二羟玉米素-*O*-葡萄糖苷、人参皂苷 A2、甘氨酸苯丙氨酸、吡啶羧酸硫酸盐和磷脂酰丝氨酸 (24 : 0/5-iso PGF2VI) 水平显著升高 ($P < 0.01$), 其余 19 种代谢物水平显著降低 ($P < 0.01$)。表明龙胆酒炙前后对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠血清代谢物的调节趋势一致。

表 4 龙胆酒炙前后对急性肝损伤模型小鼠血清差异代谢物的影响

Table 4 Effect of *Gentianae Radix et Rhizoma* before and after processing with wine on differential metabolites in serum of mice with acute liver injury

编号	代谢物	<i>t_R</i> /min	<i>m/z</i>	分子式	加合物	模型组 vs 对照组	生龙胆高剂量组 vs 模型组	酒龙胆高剂量组 vs 模型组
1	磷脂酰胆碱 [14 : 1(9Z)/14 : 1(9Z)]	7.483 3	673.468 2	C ₃₆ H ₆₈ NO ₈ P	M+H	↓ ##	↑ **	↑ **
2	磷脂酰丝氨酸 (15 : 0/20 : 0)	7.187 1	758.541 1	C ₄₁ H ₈₀ NO ₁₀ P	M-H ₂ O-H	↓ ##	↑ **	↑ **
3	磷脂酰丝氨酸 [24 : 1(15Z)/20 : 3 (8Z,11Z,14Z)]	5.514 6	470.800 4	C ₅₀ H ₉₀ NO ₁₀ P	M+2Na	↓ ##	↑ **	↑ **
4	(2 <i>S</i>)-2-氨基-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2-氨基-3-[(2 <i>S</i>)-2-氨基-3-(4-羟基苯基)丙酰基]氧丁酰基]氧丙酸	5.333 1	352.147 0	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₇	M+H-H ₂ O	↑ ##	↓ **	↓ **
5	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-5-乙酰氨基-4-羟基-2-(4-甲基-2-氧代-色烯-7-基)氧-6-[(2 <i>R</i>)-1,2,3-三羟丙基]四氢吡喃-2-羧酸	3.166 1	504.092 3	C ₂₁ H ₂₅ NO ₁₁	M+K-2H	↑ ##	↓ **	↓ **
6	1-[5-(噻吩-2-基甲氧基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基]丙烷-2-胺	5.171 6	331.087 7	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ OS	M+2Na-H	↑ ##	↓ **	↓ **
7	5-羟基吡啶噻唑羧酸酯	0.658 5	313.042 2	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	M+Cl	↑ ##	↓ **	↓ **
8	6- β -羟基甲羟孕酮	6.282 0	383.218 8	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	M+H-H ₂ O	↓ ##	↑ **	↑ **
9	当归素	3.229 7	461.141 4	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	M+Cl	↑ ##	↓ **	↓ **
10	天冬氨酸	0.816 0	318.165 9	C ₁₃ H ₂₃ N ₃ O ₆	M+H	↑ ##	↓ **	↓ **

表 4 (续)

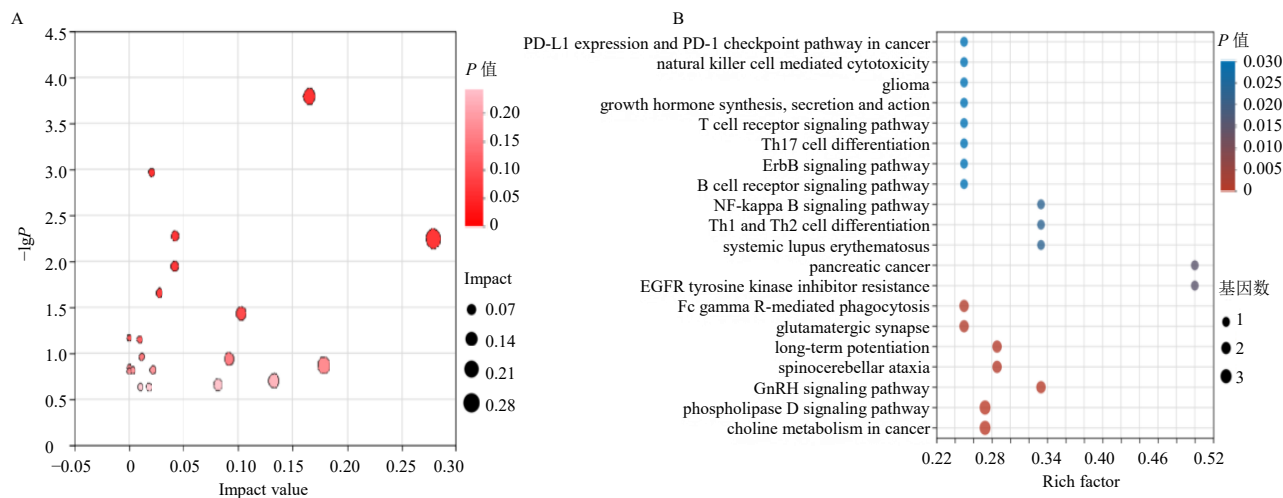
编号	代谢物	t_R/min	m/z	分子式	加合物	模型组 vs 对照组	生龙胆高剂量组 vs 模型组	酒龙胆高剂量组 vs 模型组
11	阿伐度胺	3.357 5	328.142 2	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$	$\text{M}+\text{ACN}+\text{H}$	↑##	↓**	↓**
12	眼睑素	4.266 3	328.105 8	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_8$	$\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$	↑##	↓**	↓**
13	氯莫克舍	3.639 6	305.036 4	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ClO}_3$	$\text{M}+\text{K}-2\text{H}$	↑##	↓**	↓**
14	二羟玉米素- <i>O</i> -葡萄糖苷	5.635 1	825.381 4	$\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_6$	$2\text{M}+\text{HAC}-\text{H}$	↓##	↑**	↑**
15	艾司洛尔	2.015 8	316.151 0	$\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_4$	$\text{M}+\text{Na}-2\text{H}$	↑##	↓**	↓**
16	氟啶酮	3.533 2	310.086 2	$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}$	$\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}$	↑##	↓**	↓**
17	人参皂苷 A2	4.189 0	837.446 3	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	$\text{M}+\text{K}-2\text{H}$	↓##	↑**	↑**
18	甘氨酸苯丙氨酸	3.506 5	221.092 9	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$	$\text{M}-\text{H}$	↓##	↑**	↑**
19	吡啶羧酸硫酸盐	3.896 0	286.002 3	$\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_5\text{S}$	$\text{M}+\text{FA}-\text{H}$	↓##	↑**	↑**
20	异亮氨酸	2.477 3	318.165 9	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$	$\text{M}+\text{ACN}+\text{H}$	↑##	↓**	↓**
21	丙氨酸	3.266 6	319.142 7	$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$	$\text{M}+\text{Na}$	↑##	↓**	↓**
22	甲氯芬酯	4.101 1	299.115 7	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ClNO}_3$	$\text{M}+\text{ACN}+\text{H}$	↑##	↓**	↓**
23	瓦班	3.639 6	619.256 9	$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_{12}$	$\text{M}+\text{Cl}$	↑##	↓**	↓**
24	磷脂酰丝氨酸 (24:0/5-iso PGF2VI)	5.517 5	938.578 0	$\text{C}_{48}\text{H}_{88}\text{NO}_{13}\text{P}$	$\text{M}+\text{Na}-2\text{H}$	↓##	↑**	↑**
25	雷尼替丁- <i>S</i> -氧化物	5.165 0	311.116 5	$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	$\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}$	↑##	↓**	↓**
26	箭藿苷 B	3.416 0	645.219 4	$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{14}$	$\text{M}-\text{H}$	↑##	↓**	↓**
27	丝氨酸甘氨酸	5.359 9	347.115 5	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$	$2\text{M}+\text{Na}$	↑##	↓**	↓**
28	替西他滨	4.841 7	299.115 7	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_4$	$\text{M}+\text{ACN}+\text{H}$	↑##	↓**	↓**

↑表示上调, ↓表示下调。

↑ indicates up-regulation, ↓ indicates down-regulation.

3.7.4 代谢通路分析 使用 Majorbio Cloud 平台对对照组、模型组与给药组的差异代谢物进行功能通路富集和拓扑学分析, 设置代谢物参与通路的富集

显著性 $P<0.01$ 。如图 7 和表 5 所示, 给药组的差异性代谢物主要集中于甘油磷脂代谢、核黄素代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、谷胱甘肽代谢 4 条代谢途径。



A-代谢物富集拓扑学分析气泡图; B-代谢通路分析图。

A-topology analysis bubble chart of metabolite enrichment; B-metabolic pathway analysis diagram.

图 7 差异代谢物通路富集分析

Fig. 7 Enrichment analysis of differential metabolite pathway

表 5 差异代谢物通路信息

通路	代谢物总数	匹配个数	影响值	P 值
甘油磷脂代谢	52	4	0.17	0
核黄素代谢	21	2	0.28	0.01
精氨酸和脯氨酸代谢	67	3	0.04	0.01
谷胱甘肽代谢	38	3	0.02	0

4 讨论

肝脏指数是反映肝脏状态的直观指标, HE 染色结果可以体现肝细胞形态及炎症浸润状态。CCl₄ 诱导的肝损伤模型被广泛用于肝脏病理研究, 其形态学和生化特征与人类肝脏疾病细胞病变相似^[21], ip 给予 CCl₄ 后, 小鼠肝细胞色素与肝细胞大分子发

生偶联,对肝细胞功能产生影响;产生的 CCl_4 攻击肝细胞膜上的磷脂双分子层,细胞膜完整性被破坏;同时,肝组织中 GSH-Px、MDA 等脂质过氧化指标水平发生改变,最终导致肝功能受损^[23]。肝细胞破裂后向血液中释放大量 ALT 和 AST,ALT 和 AST 是肝细胞损伤的标志物^[24],ALP 也是评估肝脏功能的常用指标。 CCl_4 会引起炎症^[25],促使炎症因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 大量释放^[26],这些炎症因子又会推动氧化应激发生,使肝损伤程度进一步加重^[27]。

研究表明 NF- κ B 可以促进多种炎症因子的合成和释放^[28],NF- κ B 通路是肝脏炎症反应的重要信号通路^[29],通过下调 NF- κ B 信号通路可改善炎症反应触发的肝损伤。TLR4 是细胞表面可与相关病原分子结合的识别受体,MyD88 是 TLR4 信号通路的下游信号配体,可对炎症信号进行传导,而 NF- κ B 是 TLR4 下游通路的衔接蛋白^[30]。由外界刺激导致的损伤可对 TLR4 信号进行触发,激活下游 MyD88 信号通路,通过信号转导快速激活 NF- κ B,导致促炎因子大量释放,加剧肝细胞的损伤^[31]。

本研究结果显示,生龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组能够改善急性肝损伤小鼠的肝细胞形态,显著降低肝损伤小鼠的肝脏指数及血清中 ALT、AST、ALP 活性和炎症因子水平,升高肝组织中 GSH-Px 活性,降低肝组织中 MDA 含量,降低肝组织中 p-NF- κ B p65 表达,提示龙胆提取物高剂量组对肝脏损伤具有保护作用。与生龙胆高剂量组比较,酒龙胆高剂量组各项检测指标均有显著性改善,提示酒龙胆对肝损伤的保护作用优于生龙胆。

目前对于龙胆的质量控制指标多为龙胆苦苷,一般认为龙胆对肝脏的保护效果与龙胆苦苷的含量有关,而本研究发现龙胆酒炙后龙胆苦苷含量下降,多糖含量上升,保肝作用增强。《神农本草经》中记载:“龙胆若复以酒炮制之,则酒性走窜,无所不至,可助龙胆清除游走之肝火”。研究表明龙胆酒炙后能够促进龙胆苦苷的吸收利用^[14],增加龙胆苦苷在大鼠在肝、肺和肾组织中的分布^[32-34];多糖具有调节机体免疫、抗病毒、抗炎等作用,且有研究证实黄芪多糖注射液可保护乙肝患者的肝功能^[35]。龙胆酒炙后多糖含量显著增加,研究表明龙胆多糖具有显著的抗炎、抗氧化活性^[36-37],且多糖可以下调 NF- κ B 蛋白表达,抑制 NF- κ B 通路^[38],这可能是龙胆酒炙后对肝脏保护作用增强的原因,课题组将在后续对其机制进行进一步研究。

代谢组学分析已被广泛用于肝损伤发展过程中的生物标志物和代谢通路的研究,为探寻龙胆酒炙前后改善肝损伤代谢失调的相关靶点提供了理论依据。本研究应用非靶向代谢组学技术,通过代谢角度来研究龙胆酒炙前后提取物对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤中代谢通路的改变。生龙胆高剂量组和酒龙胆高剂量组所致的差异代谢物主要匹配到甘油磷脂通路,提示肝损伤保护作用或与甘油磷脂通路密切相关。甘油磷脂是体内存在最广泛、含量最丰富的磷脂,在机体细胞活化、保持正常的新陈代谢方面起到重要作用,同时对增强脂肪及胆固醇代谢、促进血液循环等方面也有很大作用。近年来,关于肝脏疾病与脂质代谢关系的研究比较广泛,有研究表明,炎症会导致肝组织中的三酰甘油、磷脂酰胆碱和磷脂酰肌醇等表达异常^[39],肝损伤与甘油磷脂代谢途径密切相关^[40],甘油磷脂代谢被认为是表征肝损伤的重要代谢通路之一^[41]。代谢物注释信息显示,龙胆酒炙前后对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠差异代谢物中与甘油磷脂代谢通路相关的代谢物为磷脂酰胆碱 [14:1(9Z)/14:1(9Z)]、磷脂酰丝氨酸 (15:0/20:0) 和磷脂酰丝氨酸 [24:1(15Z)/20:3(8Z,11Z,14Z)]。与对照组比较,模型组磷脂酰胆碱 [14:1(9Z)/14:1(9Z)]、磷脂酰丝氨酸 (15:0/20:0) 和磷脂酰丝氨酸 [24:1(15Z)/20:3(8Z,11Z,14Z)] 含量显著降低;与模型组比较,给药组这 3 种代谢物含量显著升高,表明 CCl_4 可致小鼠肝脏脂质代谢紊乱,龙胆提取物可对小鼠肝脏起到保护作用。

磷脂酰胆碱是细胞膜的重要组成部分,是构成细胞信号通路的关键因子。磷脂酰丝氨酸是以磷脂酰胆碱为底物,在磷脂酰丝氨酸合酶的作用下与丝氨酸发生碱交换反应而生成的。肝是内源性代谢物溶血磷脂酰胆碱合成和代谢的主要场所,肝损伤必然会引起机体内磷脂酰胆碱水平和代谢轮廓的变化^[42],磷脂酰胆碱通过结合 TLR2 和 TLR4 受体激活 NF- κ B、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等信号通路,调控促炎细胞因子水平,诱导氧化应激,促进肝炎症的发展^[43];磷脂酰丝氨酸能通过结合肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1)/腺苷酸激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、Janus 激酶 (Janus kinase, JAK)/信号传导及转录激活蛋白 (signal transducer and activator of

transcription, STAT) 和磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路缓解小鼠肝脏脂质代谢紊乱, JAK/STAT 信号通路是调节许多细胞因子和激素的主要信号通路, 可以影响脂质代谢并介导炎症进程^[44]。宋丹丹^[45]使用 α -萘异硫氰酸酯诱导肝损伤模型, 发现模型组与空白组相比磷脂酰胆碱 [14:1(9Z)/14:1(9Z)] 表达下降, 与本研究的結果相契合。

综上, 龙胆酒炙前后均可对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠有一定的保肝作用, 其机制可能与调控甘油磷脂代谢有关, 且龙胆酒炙后的保肝效果优于生龙胆, 为龙胆炮制品的临床应用提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kumachev A, Wu P E. Drug-induced liver injury [J]. *Can Med Assoc J*, 2021, 193(9): E310.
- [2] 吕晓梅, 马丽杰. 中药治疗急性肝损伤的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(2): 170-174.
- [3] 王存萍, 罗秋林, 沙玉茹, 等. 中药抗药源性肝损伤评价模型及作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5796-5805.
- [4] 尹卫婷, 蒋明芹, 赵学印治疗药物性肝损伤临证经验 [J]. 中国民间疗法, 2024, 32(10): 38-41.
- [5] 王朝嘉, 周步高, 刘妙华, 等. 龚廷贤诊治肝病的思路与用药经验研究 [J]. 新中医, 2022, 54(24): 234-238.
- [6] 孟祥博. 龙胆泻肝汤加减治疗胆囊切除术后湿热郁结型胁痛的临床观察 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2023.
- [7] 杨必乾, 何慧明, 殷亭涓, 等. 中药调节肠道菌群缓解药物性肝损伤的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(3): 92-96.
- [8] 唐浪, 宋添力, 吴广阳, 等. 土家药竹节参多糖通过 Nrf2-ARE 信号通路对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的抗氧化保护作用 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4866-4873.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 99.
- [10] 叶繁庆, 孙雨颀, 范春雨, 等. 龙胆化学成分、生物活性及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6497-6510.
- [11] 李世华, 王育学. 龚廷贤医学全书 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 371.
- [12] 武俊紫, 杨斌, 宋波, 等. 龙胆苦苷对非酒精性脂肪肝病大鼠 AMPK 信号通路的调节作用 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5142-5148.
- [13] 李志芳, 贺晓云, 许孟霞, 等. 龙胆苦苷对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠肝损伤、肝纤维化、氧化应激和 Nrf2 通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(6): 1405-1410.
- [14] 王丽娟. 龙胆关键药效组分对酒精性和非酒精性肝胆系统损伤的保肝利胆作用及机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [15] 白亚亚, 张桥, 程鸿俊, 等. 酒制对“寒性”中药影响的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5773-5785.
- [16] 钮敏洁, 蔡皓, 曹岗. 中药酒制及其机理研究概述 [J]. 中药材, 2020, 43(11): 2838-2842.
- [17] 钟凌云. 中药炮制学 [M]. 第 5 版. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 192.
- [18] 吴晓燕, 孙紫薇, 侯晓琳, 等. 龙胆生品及龙胆酒制品给药后龙胆苦苷在大鼠主要器官组织中的浓度分布 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2020, 46(2): 254-259.
- [19] 吉林省中药饮片炮制规范 [S]. 2020: 46.
- [20] 孙建之. 龙胆酒制前后化学成分和药效学差异研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- [21] 李青青, 熊佳慧, 温玉清, 等. 丹参酮 II_A 对 CCl₄ 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2022, 40(6): 671-676.
- [22] Hu L H, Li L R, Xu D M, *et al.* Protective effects of neohesperidin dihydrochalcone against carbon tetrachloride-induced oxidative damage *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 213: 51-59.
- [23] Liu Y, Wen P H, Zhang X X, *et al.* Breviscapine ameliorates CCl₄-induced liver injury in mice through inhibiting inflammatory apoptotic response and ROS generation [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 755-768.
- [24] Elsadek A E, FathyBarseem N, Suliman H A, *et al.* Hepatic injury in neonates with perinatal asphyxia [J]. *Glob Pediatr Health*, 2021, 8: 2333794X20987781.
- [25] di Paola R, Modafferi S, Siracusa R, *et al.* S-Acetylglutathione attenuates carbon tetrachloride-induced liver injury by modulating oxidative imbalance and inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4429.
- [26] 李梓萌, 张可锋, 朱依淳, 等. 复方叶下珠汤对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 158-163.
- [27] Sheik Abdulazeez S, Thiruvengadam D. Effect of lycopene on oxidative stress induced during D-galactosamine/lipopolysaccharide-sensitized liver injury in rats [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(12): 1592-1599.
- [28] 张秀英, 王雪峰, 王思源, 等. 双表法对流感病毒感染小鼠肺组织 MyD88 及 NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(10): 1027-1029.
- [29] 李文燕, 韩晨阳, 杨毅, 等. 樟芝多糖通过下调 TLR4-MyD88-NF- κ B 信号的表达改善 LPS/D-GalN 诱导的肝细胞凋亡及小鼠肝损伤 [J]. 中药材, 2018, 41(11): 2671-2675.

- [30] Singh A, Koduru B, Carlisle C, *et al.* NADPH oxidase 4 modulates hepatic responses to lipopolysaccharide mediated by Toll-like receptor-4 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14346.
- [31] Liu M, Xu Y W, Han X, *et al.* Author Correction: Dioscin alleviates alcoholic liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18384.
- [32] 吕新, 孙建之, 徐士钊, 等. HPLC 法同时测定不同产地龙胆酒炙前后 3 种环烯醚萜苷 [J]. *中成药*, 2019, 41(5): 1106-1109.
- [33] 赵红岩. 龙胆酒炙前后整体化学成分变化研究 [J]. *陕西教育学院学报*, 2010, 26(1): 107-109.
- [34] 王彩君, 王智民, 王维皓, 等. 酒制龙胆的最佳炮制工艺研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(20): 2335-2338.
- [35] 陈靓. 黄芪注射液穴位注射联合干扰素治疗肝郁脾虚型慢乙肝患者的临床研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2019.
- [36] 许海燕, 王珊, 彭修娟, 等. 秦岭龙胆开花前后多糖含量的比较及其提取工艺优化与抗氧化活性 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2022, 30(5): 655-662.
- [37] 彭江丽, 王鹏, 彭求贤, 等. 五岭龙胆化学成分及其抗炎活性研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(10): 1716-1723.
- [38] 陈辰, 胡丽霞. 黄芪多糖通过减轻免疫炎症抑制病毒性肝炎小鼠肝损伤 [J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(3): 556-563.
- [39] Castoldi A, Monteiro L B, van Teijlingen Bakker N, *et al.* Triacylglycerol synthesis enhances macrophage inflammatory function [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4107.
- [40] 孙铭雨, 赵文静, 辛婧, 等. 2 型糖尿病 BTBR ob/ob 小鼠肝损伤的脂质代谢组学变化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(1): 77-85.
- [41] Quintás G, Martínez-Sena T, Conde I, *et al.* Metabolomic analysis to discriminate drug-induced liver injury (DILI) phenotypes [J]. *Arch Toxicol*, 2021, 95(9): 3049-3062.
- [42] Hu C, Li H W, Ke J Q, *et al.* Metabolic profiling of lysophosphatidylcholines in chlorpromazine hydrochloride- and *N*-acetyl-*p*-amino-phenoltriptolide-induced liver injured rats based on ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271221108320.
- [43] Liu P P, Zhu W, Chen C, *et al.* The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases [J]. *Life Sci*, 2020, 247: 117443.
- [44] 王靖雯. 苏氨酸缓解镉暴露小鼠肝脏脂质代谢紊乱的作用及机制研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2022.
- [45] 宋丹丹. 西红花苷 I 抗 IC 型肝损伤的作用机制研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2022.

[责任编辑 李亚楠]