

整合 16S rRNA 测序技术和代谢组学探究白鲜皮对斑马鱼幼鱼的肝毒性机制

沃佳美雪¹, 徐晓敏¹, 贾素霞¹, 胡文凯¹, 卢芳², 刘树民^{2*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 基于 16S rRNA 测序技术和非靶向代谢组学技术初步探讨白鲜皮 *Dictamni Cortex* 对斑马鱼幼鱼中的肝毒性机制。**方法** 将斑马鱼幼鱼置于 0、100、200、300、400、500、600、700、800、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 白鲜皮药液中 24 h, 统计死亡个数及致死率, 计算 10%致死浓度 (sublethal concentration, LC_{10}), 据此设置白鲜皮低、中、高给药剂量; LC_{10} 下暴露 24 h, 检测斑马鱼幼鱼中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、白蛋白 (albumin, ALB)、超氧化物歧化酶 (superoxide Dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、层黏连蛋白 (laminin, LN)、谷胱甘肽 (glutamate, GLU) 活性, 采用 16S rRNA 测序技术分析白鲜皮对斑马鱼幼鱼肠道菌群的分布影响; 基于非靶向代谢组学技术探讨其生物标志物的变化和影响的代谢通路, 结合 Spearman 分析法对肠道门属水平优势菌群和差异代谢物进行相关性分析。**结果** 白鲜皮在斑马鱼幼鱼中 LC_{10} 为 572.43 $\mu\text{g/mL}$ 。与对照组比较, 白鲜皮 100、300、500 $\mu\text{g/mL}$ 均能升高斑马鱼幼鱼的 ALT、AST、MDA、LN、GLU 活性 ($P < 0.05$ 、0.01), 降低 SOD、ALB 活性 ($P < 0.05$ 、0.01); 16S rRNA 测序结果表明白鲜皮能升高变形菌门、衣原体门等菌群的丰度 ($P < 0.05$ 、0.001), 降低拟杆菌门等菌群的丰度 ($P < 0.01$); 代谢组学分析鉴定出 32 个关键差异代谢物, 通路分析表明白鲜皮可通过参与鞘脂代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、药物代谢-细胞色素 P450、半乳糖代谢、甘油磷脂代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢产生肝毒性。**结论** 白鲜皮可以导致斑马鱼幼鱼肝毒性, 其机制可能是调节肠道菌群结构和鞘脂代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸等代谢途径进而促进炎症反应、氧化应激、细胞凋亡和代谢激活。

关键词: 白鲜皮; 斑马鱼幼鱼; 肝毒性; 代谢组学; 肠道菌群

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0177-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.018

Integrated 16S rRNA sequencing technology and metabolomics to explore mechanism of hepatotoxicity of *Dictamni Cortex* on larvae zebrafish

WO Jiameixue¹, XU Xiaomin¹, JIA Suxia¹, HU Wenkai¹, LU Fang², LIU Shumin²

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of hepatotoxicity of Baixianpi (*Dictamni Cortex*) in larvae zebrafish using 16S rRNA sequencing technology combined with non-targeted metabolomics techniques. **Methods** The zebrafish were placed in 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1 000 $\mu\text{g/mL}$ concentration gradients for 24 h, the number of deaths and the lethality rate were counted, and the sublethal concentration (LC_{10}) was calculated, and the low-, medium- and high-doses of *Dictamni Cortex* were set according to this, and the exposure was 24h under LC_{10} . The activities of ALT, AST, ALB, SOD, MDA, LN and GLU in larvae zebrafish were detected. To analyze the effect of *Dictamni Cortex* on the distribution of larvae zebrafish by 16S rRNA sequencing, to explore the metabolic pathways of the biomarkers based on non-targeted metabolomics technology. Combining Spearman analysis for correlation between differential intestinal flora and differential metabolites. **Results** The LC_{10} of *Dictamni Cortex* on larvae zebrafish is 572.43 $\mu\text{g/mL}$. Compared with the control group, 100, 300, 500 $\mu\text{g/mL}$ groups of *Dictamni Cortex* can increase the content of ALT, AST, MDA, LN and GLU ($P < 0.05$, 0.01), and decreased the content of SOD and ALB ($P < 0.05$, 0.01). Results of 16S rRNA

收稿日期: 2024-10-29

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC3502104)

作者简介: 沃佳美雪, 硕士研究生, 研究方向为中药药性理论与药物功效研究。E-mail: 1976966484@qq.com

*通信作者: 刘树民, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药性理论与药物功效研究。E-mail: keji-liu@163.com

sequencing revealed that *Dictamni Cortex* can increase the abundance of Proteobacteria, Chlamydiae, Deinococcota, Verrucomicrobiota ($P < 0.05$, 0.001), decreasing the abundance of Bacteroidota ($P < 0.01$). Metabolomic analysis identified 32 key differential metabolites, and pathway analysis showed that *Dictamni Cortex* could produce toxicity by participating in sphingolipid metabolism, purine metabolism, arachidonic acid metabolism, galactose metabolism, glutathione metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, drug metabolism-cytochrome P450. **Conclusion** *Dictamni Cortex* can cause hepatotoxicity in larval zebrafish and change intestinal flora structure and influence sphingolipid metabolism, purine metabolism, arachidonic acid metabolism and then promote inflammatory response, oxidative stress, apoptosis and metabolic activation.

Key words: *Dictamni Cortex*; larvae zebrafish; hepatotoxicity; metabolomics; intestinal flora

白鲜皮为芸香科植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮，又称羊鲜草，主产于我国辽宁、河北等地区，其味苦，性寒，归脾、胃、膀胱经，具有清热燥湿、祛风解毒的功效，可用于治疗湿热疮毒、湿疹疥癣、黄疸及湿热引起的痹痛等证^[1]。白鲜皮中含有生物碱、柠檬苦素、黄酮及苯丙素类化学成分，具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用，临床主要用于治疗皮肤炎症、湿疹、风疹、风湿、妇科炎症等，具有丰富的药用价值^[2-7]。然而，查阅白鲜皮毒性研究方面的文献发现^[8]，白鲜皮相关制剂复方如克银丸、痔血胶囊、青黛丸等会导致肝损伤。研究发现，小鼠 ig 白鲜皮醇提物（60 g/kg）可导致肝细胞严重坏死，且具有剂量和时间相关性^[9]。给予小鼠白鲜皮水煎剂后发现小鼠血清中丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量大幅度上升且肝脏组织出现大面积损伤^[10]；通过网络药理学实验和动物体内实验探究白鲜皮的肝毒性，小鼠 ig 白鲜皮（92.7 g/kg）7 d 后，肝组织病理出现重度出血，大量肝细胞出现坏死，且出现肝纤维化，同时小鼠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）等指标水平显著上升^[11]；免疫特异肝损伤评价模型结果显示，在免疫应激状态下白鲜皮水提物和醇提物会诱导免疫炎症反应的发生，且白鲜皮水提物能显著促进白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）和白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）等炎症因子的表达^[12]；通过斑马鱼幼鱼探究白鲜皮中有效成分白鲜碱的肝毒性，结果显示，给予斑马鱼幼鱼 10%致死浓度（sublethal concentration, LC₁₀）后，斑马鱼幼鱼肝功能指标 AST、ALT 等受到影响，苏木素-伊红（hematoxylin-eosin, HE）、油红 O 及吖啶橙（acridine orange, OA）染色实验显示斑马鱼幼鱼肝组织出现

损伤^[13]。以上研究均表明白鲜皮可对肝脏产生一定的损伤和毒性。

肠道菌群对健康有广泛的影响，从预防疾病、改善免疫系统到肠道健康，它在维持整体健康方面发挥着重要作用^[14]。药物经口服后与肠道中的微生物相互作用，已有研究表明，肝脏是暴露于肠道微生物代谢物的主要器官，肠道菌群与肝脏健康密切相关，通过肠-肝轴，肠道菌群的变化会引起肝脏炎症、氧化应激等损伤^[15]，因此可以利用肠道微生物来研究药物产生的肝毒性。代谢组学是通过代谢物分析了解生物系统和预测其行为的重要科学，代谢组学不仅可以用来解释物种之间的相互作用机制，还可以探索具有生物活性的代谢物。因此，代谢组学技术已被广泛应用于肝毒性研究^[16-17]。

本研究基于 16S rRNA 测序技术和非靶向代谢组学方法，基于斑马鱼幼鱼模型，多层次、多角度、多指标探讨白鲜皮在斑马鱼幼鱼中的肝毒性机制，寻找与肝毒性相关的微生物菌群和生物标志物及代谢通路，探究白鲜皮肝毒性机制，为斑马鱼在中药肝毒性评价中的适用性提供支持，为白鲜皮诱导肝毒性的分子机制提供了科学依据，同时，为白鲜皮在临床用药安全有效提供参考。

1 材料

1.1 动物

受精 4 d 后（4 days after fertilization, 4dpf）野生型 AB 品系斑马鱼购于杭州环特生物科技股份有限公司，动物许可证号 SCXK（浙）2022-0003，饲养于（28.0 $\pm$ 0.5） $^{\circ}$ C、pH 为（7.0 $\pm$ 0.5）的培养水（1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐，电导率为 450~550 s/cm；pH 为 6.5~8.5；硬度为 50~100 mg/L CaCO₃）中，每日更换培养水，采用自然光照/黑暗 14 h/10 h 的周期，每日按时投喂斑马鱼幼鱼饲料 2 次。本研究动物实验已通过杭州环特

生物科技股份有限公司实验动物管理与使用委员会审查(伦理号 IACUC-2024-8718-01)。

1.2 药品与试剂

白鲜皮药材(批号 230425001)购自于河北全泰药业有限公司,经黑龙江中医药大学药学院中药植物教研室南洋教授鉴定为芸香科植物白鲜 *D. dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮。取白鲜皮生药 300 g 放入水中浸泡 30 min,加入 8 倍水回流提取 2 次,每次 30 min,滤过 2~3 次,合并滤液,将浓缩后的浸膏冻干成粉末,4 °C 保存备用,通过 HPLC 进行含量测定。

甲醇(批号 50102)购自北京迪马欧泰科技发展有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、超氧化物歧化酶(superoxide Dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、层黏连蛋白(laminin, LN)、谷胱甘肽(glutamate, GLU)试剂盒(批号均为 202308)均购自江苏晶美生物科技有限公司;斑马鱼培养液(批号 2303005)购自上海费曦生物科技有限公司;OA 染液(批号 0327A23)购自深圳希宝生物科技有限公司;对照品白鲜碱(质量分数 98%,批号 111654-200602)购自中国食品药品检定研究院;黄柏酮(质量分数 98%,批号 111923-202105)、枳酮(质量分数 98%,批号 111700-202004)均购自中国食品药品检定研究院;4%多聚甲醛组织固定液(批号 P0099)购自上海碧云天生物技术有限公司;HE 染色液(批号 BA4025)购自珠海贝索生物技术有限公司。

1.3 仪器

Waters 2695-2489 型 HPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、Acquity THUPLC 型超高效液相色谱与 Q-TOF-MS 质谱仪(美国 Waters 公司);Waters BEH C₁₈ 柱(美国 Waters 公司);FRESCO17 型低温高速离心机、超低温冰箱、M2000Pro 型酶标分析仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);FA2004 型电子天平(中国天马股份有限公司);Gamma1-16 型冻干机(德国 marinchrist 公司)。

2 方法

2.1 白鲜皮中指标成分含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取白鲜碱、枳酮、黄柏酮对照品适量,精密称定,加甲醇制成含白鲜碱 15 μg/mL、枳酮 60 μg/mL、黄柏酮 0.1 mg/mL 质量浓度的混合对照品溶液,按照外标法计算白鲜碱、枳酮和黄柏

酮的含量^[18]。

2.1.2 供试品溶液的制备 取白鲜皮粗粉(过 4 号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(60:40),等度洗脱 30 min;检测波长 236 nm;进样体积 10 μL;体积流量 1 mL/min;柱温 35 °C。

2.2 LC₁₀ 的测定

随机选取受精后 4 dpf 的斑马鱼幼鱼置于 6 孔板中,20 尾/孔,分别给予白鲜皮的质量浓度为 100、200、300、400、500、600、700、800、1 000 μg/mL 的培养水,以斑马鱼培养水为对照组,每组 4 个复孔。28 °C 处理 24 h,其间每日统计各质量浓度白鲜皮组斑马鱼死亡的数量,24 h 后统计每组的死亡率,并计算 LC₁₀。

死亡率=斑马鱼死亡个数/斑马鱼总数

2.3 斑马鱼幼鱼肝脏组织结构评价

随机选取 4 dpf 斑马鱼幼鱼暴露于亚致死浓度(<LC₁₀, 100、300、500 μg/mL)的白鲜皮药液中,同时设置对照组(斑马鱼培养水),24 h 后用斑马鱼培养水清洗 3 次,将斑马鱼幼鱼置于离心管内,加入 4%多聚甲醛固定 24 h,进行 HE 染色,切片,在显微镜下观察拍照。

2.4 斑马鱼幼鱼体内细胞凋亡评价

给药、分组同“2.3”项下方法,24 h 后,用斑马鱼培养水清洗 3 次,使用 5 μg/mL 吖啶橙染液对各组的幼鱼进行避光染色 20 min,用斑马鱼培养水清洗幼鱼 3 次,于荧光显微镜下观并拍照。

2.5 斑马鱼肝脏生化指标检测

给药、分组同“2.3”项下方法,24 h 后,用斑马鱼培养水清洗 3 次,每组收集 100 尾幼鱼样本,于 PBS(1:9)中匀浆,2 500 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定 ALT、AST、LN、ALB、GLU、MDA 和 SOD 的活性。

2.6 16S rRNA 高通量测序

2.6.1 样本采集和 DNA 提取 各组选取 3 条斑马鱼幼鱼样本,采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)提取样本 DNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,选取所需的区域为测序序列,等量混样后使

用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 RT-qPCR 定量, 文库合格后, 使用 NovaSeq6000 进行上机测序。

2.6.2 测序数据分析处理 使用 fastp 软件对原始碱基序列进行过滤得到高质量 reads, Tags 序列通过 vsearch 与物种注释数据库进行比对检测嵌合体序列, 并最终去除其中的嵌合体序列, 得到最终的有效数据, 接着对各样本的有效数据根据 97% 序列相似性原则, 进行操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 聚类, 并对 OTU 的序列进行物种注释。

2.7 代谢组学分析

2.7.1 样品处理 随机选取 4 dpf 斑马鱼幼鱼暴露于白鲜皮高剂量药液中作为白鲜皮组, 同时设置对照组 (斑马鱼培养水), 24 h 后将各组幼鱼在预冷的甲醇溶液中匀浆, 4 °C、13 500 r/min 离心 20 min, 取上清, 进样检测。

2.7.2 色谱条件 采用 C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.05% 甲酸乙腈溶液 (A)-0.05% 甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱程序为 0~8 min, 98%~60% B; 8~10 min, 60%~2% B; 10~13 min, 2%~0% B; 13~14 min, 0%~98% B; 14~17 min, 98%~98% B; 体积流量 0.40 mL/min, 进样体积 2 μL, 柱温为 0 °C, 样品仓温度 5 °C。

2.7.3 质谱条件 样品经 UHPLC 分离后, 使用 AB·SCIEX 质谱仪电喷雾电离 (ESI) 正、负离子模式进行分析。ESI 源参数 Gas1 和 Gas2 均 60 psi (1 psi=6.895 kPa), 气帘气 (CUR) 30 psi, 离子源温度 110 °C, 喷雾电压 (ISVF) ±5 500 V。一级质荷比检测范围 m/z 60~1 000, 二级质荷比检测范围 m/z 25~1 000, 一级质谱扫描累积时间 0.20 s, 二级质谱扫描累积时间 0.05 s。二级质谱采用数据依赖型采集 (IDA), 并通过峰强度筛选。去簇电压 (DP) ±60 V, 碰撞能量设置为 (35±15) eV, IDA 动态排除同位素离子范围 m/z 4, 每次扫描采集 10 个碎片图谱。

2.7.4 数据分析 质谱数据通过 UNIFI 软件自动输出到 Progenesis QI 软件中, 进行数据基线过滤和校准、峰提取、峰校准、峰识别和归一化等一系列预处理采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 进行无监督的统计分析, 再采用有监督的偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 将待测样品进行分

组分析, 得出相应的得分图。为了避免 PLS-DA 模型出现过拟合的情况, 应使用 SIMCA-P 12.0 软件进行默认的交叉验证, 并使用 200 次的随机排列对数据进行测试。绘制反映组间离散度的 S-plot 和变量重要性投射 VIP-plot, 结合各离子聚集点的各组之间的偏离变化趋势, 根据得分图筛选特征性代谢产物, 在同一标准下鉴定出具有明显差异性的表达代谢物。

2.7.5 差异代谢物筛选及代谢通路富集分析 以变量投影重要性 (importance of variable projection, VIP) >1、 $P<0.05$ 筛选潜在的生物标志物。通过标志物的精确相对分子质量, 在人类代谢物数据库 (human metabolome database, HMDB) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库中检索, 确定差异性代谢物。导入 MetaboAnalyst 5.0 网站对鉴别的差异代谢物进行代谢通路富集和分析, 研究分析其生物标志物的代谢途径, 进行代谢通路分析。

2.8 统计学分析

采用 Graphpad Pism9.5 软件进行统计学处理, 各项指标结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对定量数据进行正态性检验, $P>0.05$ 为正态分布, 反之为偏态分布。正态分布采用 t 检验, 偏态分布采用秩和检验, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 白鲜皮中指标成分的含量测定

混合对照品溶液及白鲜皮供试品溶液的 HPLC 色谱图, 见图 1。白鲜碱质量分数为 0.43 mg/g, 黄

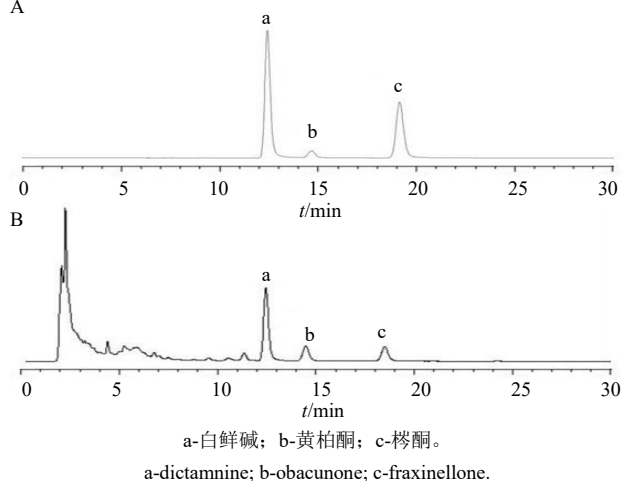


图 1 混合对照品溶液 (A) 和白鲜皮供试品溶液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed control solution (A) and *Dictamnini Cortex* test solution (B)

柏酮质量分数为4.12 mg/g, 桉酮质量分数为1.36 mg/g。

3.2 白鲜皮对斑马鱼幼鱼的 LC₁₀

经 SPSS 25.0 中的回归分析计算, 白鲜皮对斑马鱼幼鱼的 LC₁₀ 为 572.43 μg/mL。

3.3 对斑马鱼幼鱼肝脏组织结构的影响

通过观察斑马鱼病理切片(图2), 结果表明, 对照组斑马鱼肝脏组织细胞完整、细胞质均匀, 细胞核呈规则圆形; 而经白鲜皮暴露处理后的斑马鱼肝脏组织明显损伤, 可见组织结构紊乱、细胞质减少、排列松散、空泡化严重。

3.4 对斑马鱼幼鱼体内细胞凋亡的影响

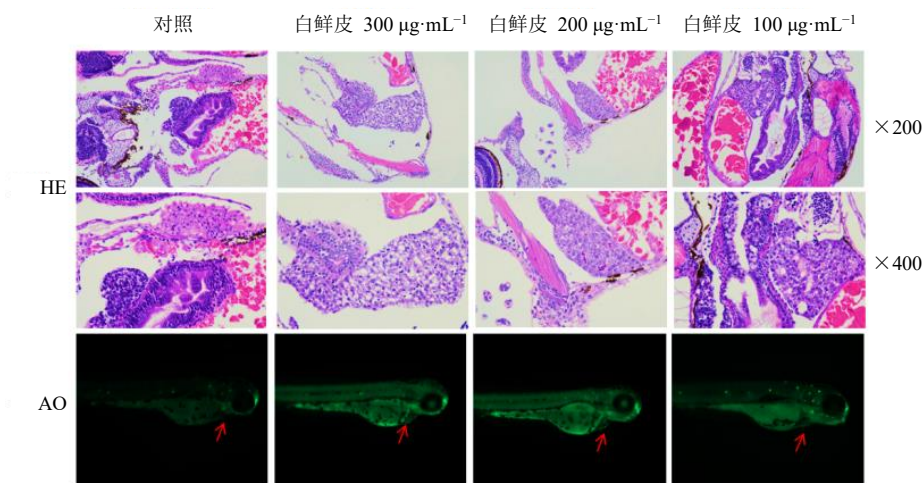
吖啶橙可以透过细胞膜与凋亡细胞内的 DNA 结合, 在荧光显微镜下发出绿色荧光^[19]。与对照组比较, 白鲜皮 LC₁₀ 下暴露处理后斑马鱼肝脏区域荧光明显增强、细胞凋亡增多, 表明白鲜皮能够诱导斑马鱼肝脏损伤, 显著引起肝细胞凋亡, 并呈剂量相关, 见图2。

3.5 对斑马鱼肝脏生化指标的影响

如表1所示, 与对照组比较, 白鲜皮给药24 h后, ALB、SOD 含量随给药浓度增加显著下降($P < 0.05$ 、 0.01), AST、ALT、LN、GLU、MDA 含量随给药浓度增加显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6 对斑马鱼幼鱼肠道菌群的影响

3.6.1 α 多样性分析 α 多样性分析用于分析样本内的微生物群落多样性, 可以反映样本内的微生物群落的丰富度和多样性^[20]。如图3-A所示, 与对照组比较, 白鲜皮组扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)、Shannon、Chao1、Simpson 指数均显著下降($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。稀释曲线可直接反映测序数据量的合理性, 并间接反映样本中物种的丰富程度, 当曲线趋向平坦时, 说明测序数据量渐进合理。图3-B表明, 2组样本的稀释曲线呈现相似的趋势, 即急速上升然后趋于平缓, 表明测序深度较好, 所得测序结果可以反映当前样本



箭头代表斑马鱼肝脏区域。
Arrows represent Zebrafish liver area.

图2 白鲜皮对斑马鱼肝毒性评价

Fig. 2 Evaluation of hepatotoxicity of *Dictamnii Cortex* on larvae zebrafish

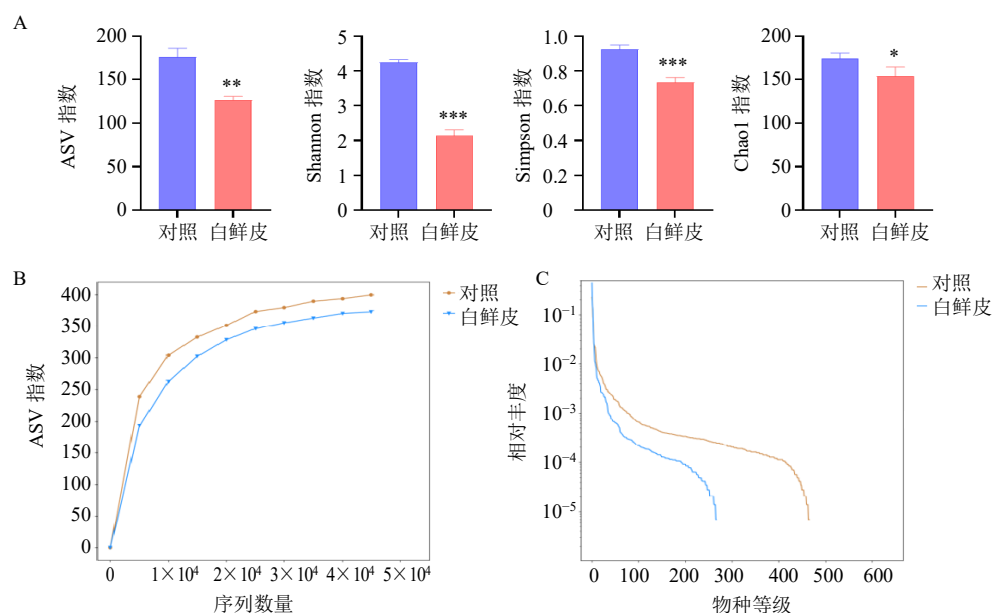
表1 白鲜皮对斑马鱼生化指标的影响

Table 1 Effect of *Dictamnii Cortex* on biochemical indexes of zebrafish

组别	剂量/ (μg·mL ⁻¹)	AST/ (ng·L ⁻¹)	ALT/ (ng·L ⁻¹)	LN/ (μg·L ⁻¹)	ALB/ (μg·mL ⁻¹)	GLU/ (μmol·L ⁻¹)	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)	SOD/ (pg·mL ⁻¹)
对照	—	7.17 ± 1.60	6.94 ± 3.25	19.56 ± 1.02	30.47 ± 1.68	1.43 ± 0.16	0.66 ± 0.11	10.44 ± 1.25
	500	10.61 ± 0.95**	9.61 ± 1.59*	25.44 ± 1.81**	26.14 ± 1.89*	2.64 ± 0.63**	0.91 ± 0.14**	7.63 ± 0.54**
白鲜皮	300	9.95 ± 3.00*	7.85 ± 1.40	24.20 ± 4.48*	28.26 ± 1.65	2.42 ± 0.98**	0.84 ± 0.19*	7.90 ± 1.17**
	100	9.40 ± 1.70	7.72 ± 1.06	22.52 ± 2.78	29.30 ± 0.62	2.05 ± 0.37	0.79 ± 0.12	8.60 ± 1.27**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

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



A-肠道菌群 α 多样性的 boxplot 图; B-稀释曲线; C-等级聚类曲线; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-boxplot plot of intestinal flora α diversity; B-rarefaction curve; C-rank abundance; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 3 α 多样性分析

Fig. 3 α Diversity analysis

中所包含物种的多样性。物种的丰富度由曲线的宽度来反映,物种的丰富度越高,曲线在横轴上的跨度越大^[21]。图 3-C 表明,对照组曲线宽度明显大于白鲜皮组,进一步说明白鲜皮能降低肠道菌群的丰富度和均匀度。

3.6.2 β 多样性分析 β 多样性分析是对不同样本的微生物群落构成进行比较分析,本研究基于 Weighted Unifrac 距离和 Bray-Curtis 距离结合 PCoA 分析,一般来说群落差异很大的样本距离越远。结果发现对照组内数据集中,与白鲜皮暴露组距离较远,分散性良好。与对照组比较,白鲜皮暴露组菌群结构发生变化,表明白鲜皮改变了斑马鱼幼鱼肠道菌群的结构,见图 4-A、B。

3.6.3 物种差异与标志物种分析 对斑马鱼幼鱼肠道组织的 16S rRNA 基因测序结果进行物种组成分析,结果如图 4-C 所示,对照组和白鲜皮组在门水平和属水平上的群落结构和相对丰度。斑马鱼幼鱼肠道组织中的肠道菌群主要分属变形菌门,其次是拟杆菌门和厚壁菌门,广古菌门和蓝藻门所占比例较低;在属水平上,斑马鱼幼鱼肠道组织中的肠道菌群主要分布于丛毛单胞菌属,其次是金黄杆菌属和鞘氨醇杆菌属,普拉梭菌属占比较低。

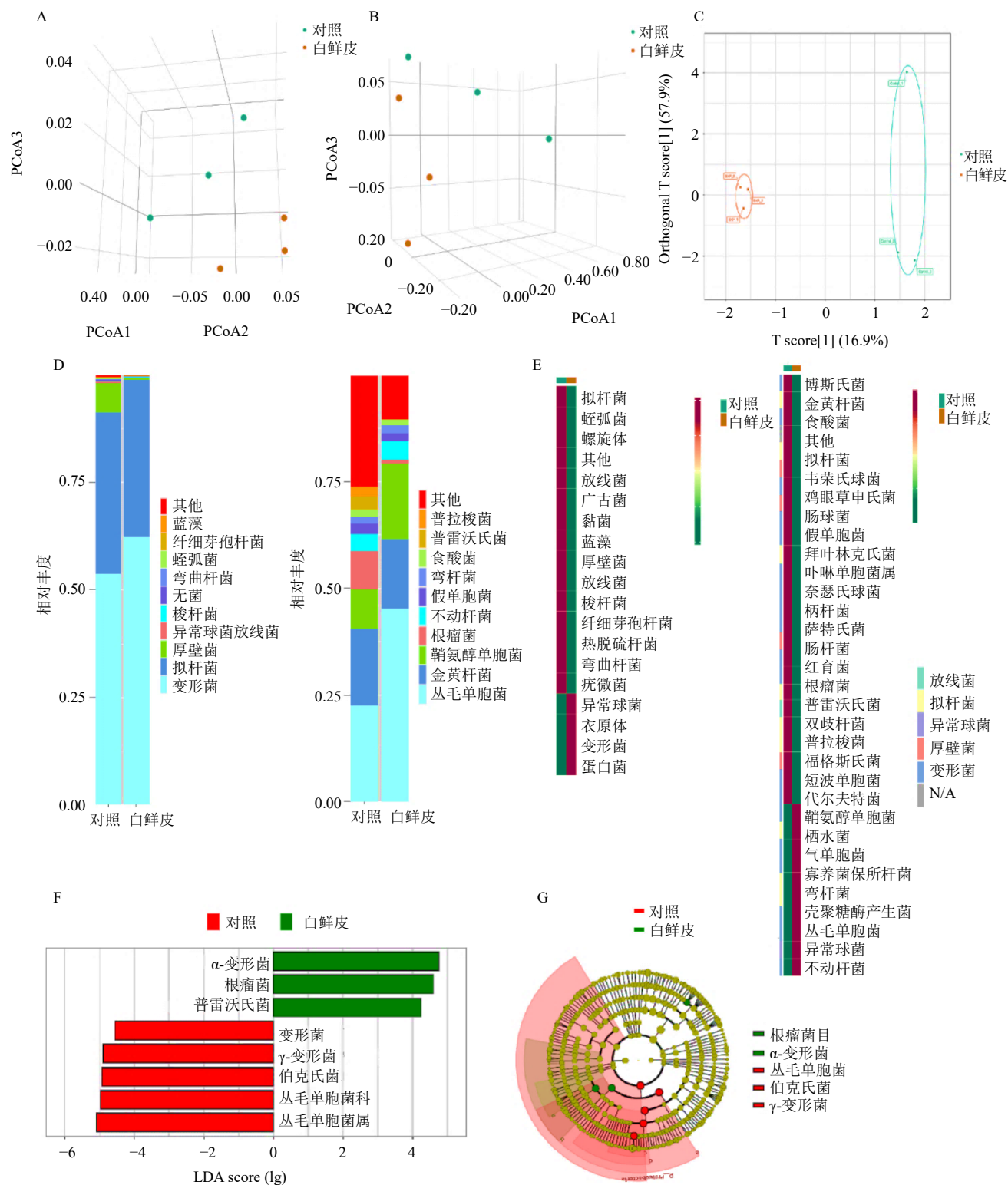
选取所有样本中定量值之和排名前 35 的微生

物分类,根据其在每个样本中的定量信息,从物种和样本 2 个层面进行聚类,绘制成热图(图 4-D);通过 OPLS-DA 分析结果展示了 2 组之间的差异(图 4-E)。

线性判别分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)可以用于进行 2 个或多个分组的比较,能够在组与组之间寻找具有统计学差异的生物标志物,展示了白鲜皮暴露处理后肠道菌群中主要的显著差异标志物,见图 4-F、G。

在门水平上,与对照组比较,白鲜皮组变形菌门、衣原体门、异常球菌-栖热菌门和疣微菌门含量显著升高($P < 0.05$ 、 0.001),而拟杆菌门含量显著降低($P < 0.01$);在属水平上,不动杆菌属、异常球菌属、丛毛单胞菌属以及埃希氏菌属含量明显上升($P < 0.001$),而普拉梭菌属含量显著降低($P < 0.05$),结果见图 5。

3.6.4 代谢通路差异分析 利用 PICRUST2 生物信息软件包预测 16S rRNA 基因序列在 KEGG 数据库的功能预测,共发现 43 条 KEGG 二级通路,如图 6 所示,其中位于最显著富集前 5 位分别为氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢、辅因子和维生素的代谢和膜运输。结果表明,白鲜皮干预斑马鱼幼鱼能够改变斑马鱼肠道菌群,其作用机制可能涉及氨基酸代谢途径。



A-基于 Unweighted UniFrac 距离 PCoA 分析 3D 图; B-基于 Bray-Curtis 距离 PCoA 分析 3D 图; C-OPLS-DA 图; D-门水平和属水平上的物种相对丰度堆叠条形图; E-门水平和属水平物种丰度热图; F-LefSe 图; G-进化分支图。

A-based on Unweighted UniFrac distance PCoA analysis; B-based on Bray-Curtis distance PCoA analysis; C-OPLS-DA; D-stacked bars of species relative abundances at phylum and genus level; E-heatmap of phylum and genus level species abundance; F-LefSe; G-cladogram.

图 4 β 多样性分析与物种差异与标志物种分析

Fig. 4 β Diversity analysis and species divergence and marker species analysis

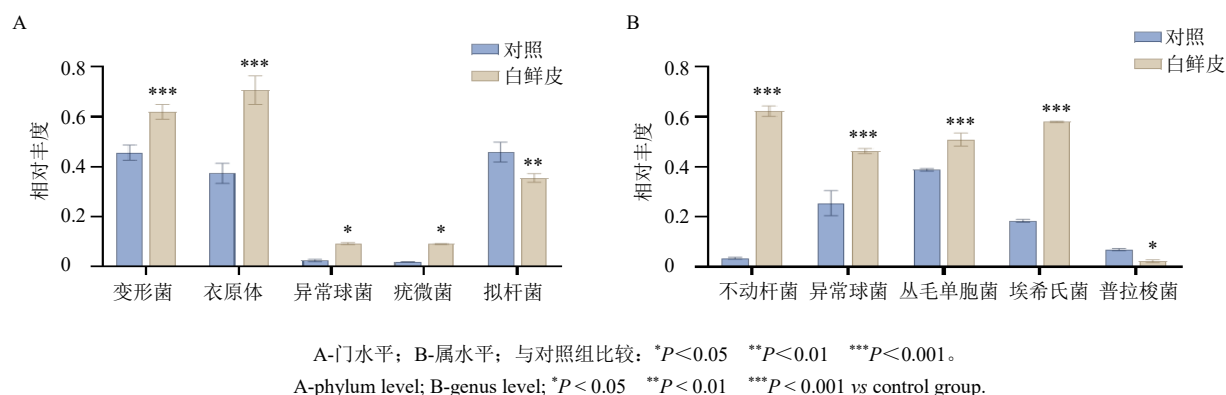
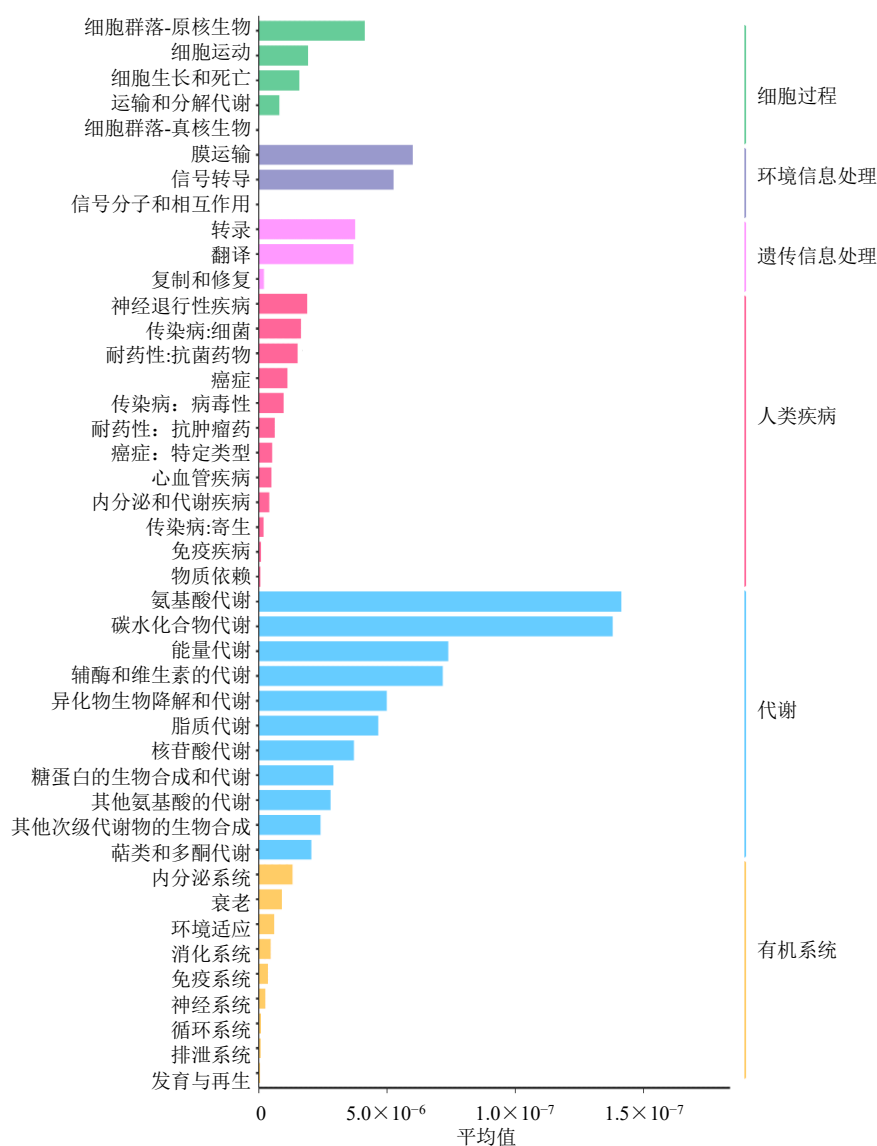
图 5 白鲜皮对斑马鱼幼鱼菌群丰度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of *Dictamnini Cortex* on bacterial abundance of larval zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 6 代谢通路

Fig. 6 Metabolic pathways

3.7 代谢组学分析

3.7.1 代谢组学轮廓分析 PCA 结果表明,在正负离子模式扫描下,2 组样本显著分离,说明白鲜皮使斑马鱼幼鱼的机体代谢产生了变化,见图 7-A、B。采用 OPLS-DA 寻找组间差别,斑马鱼体内代谢谱呈现出各自聚类,它们位于散点评分的 3 个不同区域,各组代谢轨迹相似性好、重叠少、彼此相距较远,表明白鲜皮处理后斑马鱼体内发生了显著的生物学变化。通过 200 次置换检验对模型进行验证,如图 7-C、D 所示,正负离子模式下, R^2 和 Q^2 分别低于最右的原值,且 Q^2 与 Y 轴相交于负半轴,表明该模型没有过拟合且预测能力良好。观察 S-plot 图可知,大多数代谢产物离子在 origin 周围聚集,偏离原点的离子占少数,这些偏离原点的离子说明 2 组之间存在差异,见图 7-E、F。

3.7.2 潜在生物标志物的筛选 共筛选鉴定出 32 个可能的差异代谢物,有 21 种代谢物表达上调,有 11 种代谢物表达下调。其中,与对照组比较花生四烯酸、二十碳五烯酸、烟酸、鸟嘌呤等代谢水平上调;磷酸盐、果聚糖、肌苷酸、GLU 等代谢水平下调;溶血磷脂酰胆碱种类较多,既有上调趋势也有下调趋势。在层次聚类分析得到标志物热图中,不同位置的色块表示相应位置标志物的相对表达量。从热图中能够直观看出各组之间潜在生物标志物的含量变化,也可以清楚地区分对照组和白鲜皮组的潜在生物标志物含量,差异代谢物层次聚类热图显示对照组、白鲜皮组代谢物在负离子模式和正离子模式下的改变见图 8。

3.7.3 代谢通路分析 将差异代谢物 HMDB 号导入 MetaboAnalyst 5.0 数据库进行代谢通路分析,通过 $P < 0.05$ 或 $\text{Impact} > 0$ 筛选出潜在的代谢通路,分别为鞘脂代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢、半乳糖代谢、GLU 代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、药物代谢-细胞色素 P450 以及不饱和脂肪酸的生物合成,见图 9。其中,嘌呤代谢在白鲜皮给药产生毒性的过程中 $-\log P$ 值最大,即相关性最强;花生四烯酸代谢 Impact 值最大,说明显著影响性最大。

3.8 肠道菌群和代谢组学的相关性分析

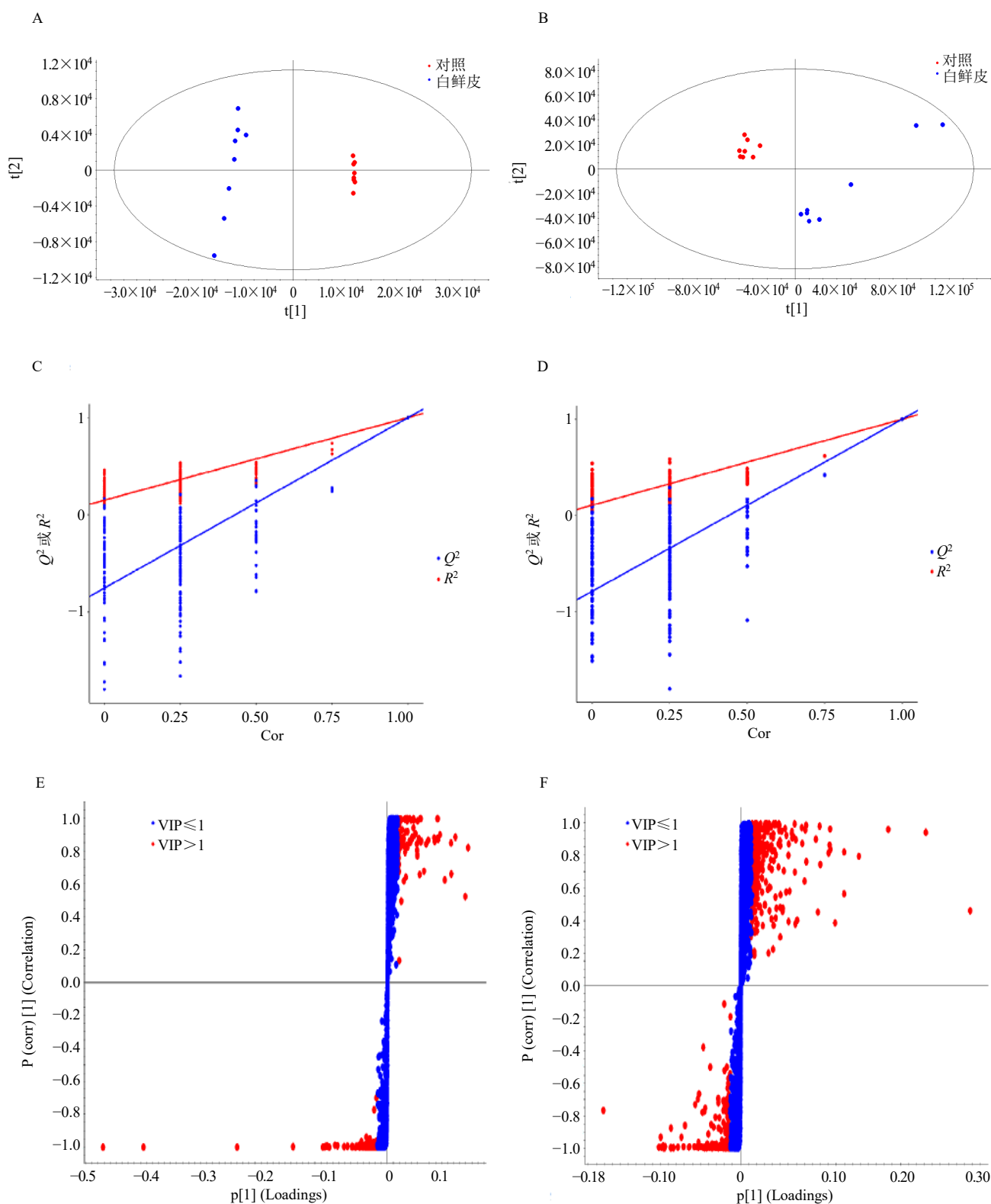
为进一步探究肠道菌群与差异代谢产物的复杂关系,对门和属水平的优势菌群与差异代谢产物进行了相关性分析。拟杆菌与肝脏花生四烯酸代谢物呈负相关,肝脏花生四烯酸代谢物的增加与肠道菌群拟杆菌丰度的减少有关;变形菌与肝脏花生四

烯酸代谢物呈正相关,肝脏花生四烯酸代谢物的增加与变形菌丰度的增加有关。拟杆菌与 GLU 代谢呈正相关,与细胞色素 P450 酶代谢呈负相关,变形菌与不动杆菌与 GLU 代谢呈负相关,与细胞色素 P450 酶代谢呈正相关,给予白鲜皮处理后,白鲜皮组的花生四烯酸代谢物显示拟杆菌显著减少,变形菌显著增加,GLU 代谢物显示拟杆菌显著减少,变形菌与不动杆菌显著增加,细胞色素 P450 酶代谢物显示拟杆菌显著减少,变形菌与不动杆菌显著增加,见图 10。

4 讨论

近年来,临床上使用中药治疗疾病的频率越来越高,中医药的疗效逐步获得广泛认可,但一些中草药在临床使用或研究中发现具有肝毒性的报道越来越多^[22-24]。白鲜皮一直被用于治疗皮肤性疾病,具有抗炎、抗过敏、抗菌等多种药理作用。现代药理学研究发现,白鲜皮会导致不同程度的肝损伤的出现。白鲜碱、梣酮、黄柏酮为白鲜皮主要药效成分,白鲜碱可能通过致小鼠肝脏 DNA 高甲基化上调肝分解的外源性药物等导致肝损伤^[25]。研究表明,ALT 和 AST 可用于评价肝脏功能和肝损伤,当肝细胞损伤时细胞内的转氨酶将释放到血浆中,使其含量升高^[26];ALB 主要由肝脏合成,当其含量降低时可能说明肝脏合成功能障碍^[27];LN 能反映肝脏病变程度,正常情况下 LN 含量较低,如果肝脏发生损伤如肝纤维化则 LN 含量会明显上升^[28];MDA、SOD 为评价氧化应激的指标^[29];肝细胞线粒体损伤时 GLU 活性显著升高,是肝实质损害的敏感指标^[30]。本研究结果显示,白鲜皮显著上调斑马鱼幼鱼的 ALT、AST、GLU、LN、MDA 水平,下调 ALB 和 SOD 水平。

宿主微生物群的紊乱与疾病有紧密联系,肠道菌群的紊乱会导致组织损伤和免疫反应加剧,因此肠道菌群的丰度和构成比例变化与机体生理病理状态密切相关。研究表明,肝损伤动物肠道中拟杆菌、梭状菌的丰度降低,普雷沃氏菌、肠埃希菌等的丰度增加^[31]。拟杆菌是肠道菌群稳定的标志之一,拟杆菌能增加抗炎细胞因子 IL-10 的表达并抑制促炎相关的 TNF- α 和 IL-6 的表达来抑制炎症进程^[32]。普雷沃氏菌丰度的增加会促进炎症物质在肠道中的转移^[33]。衣原体门是一类原核细胞型微生物,机体被衣原体感染后会释放炎症因子产生炎症反应加重肝组织损伤^[34]。普拉梭菌是人类肠道菌群

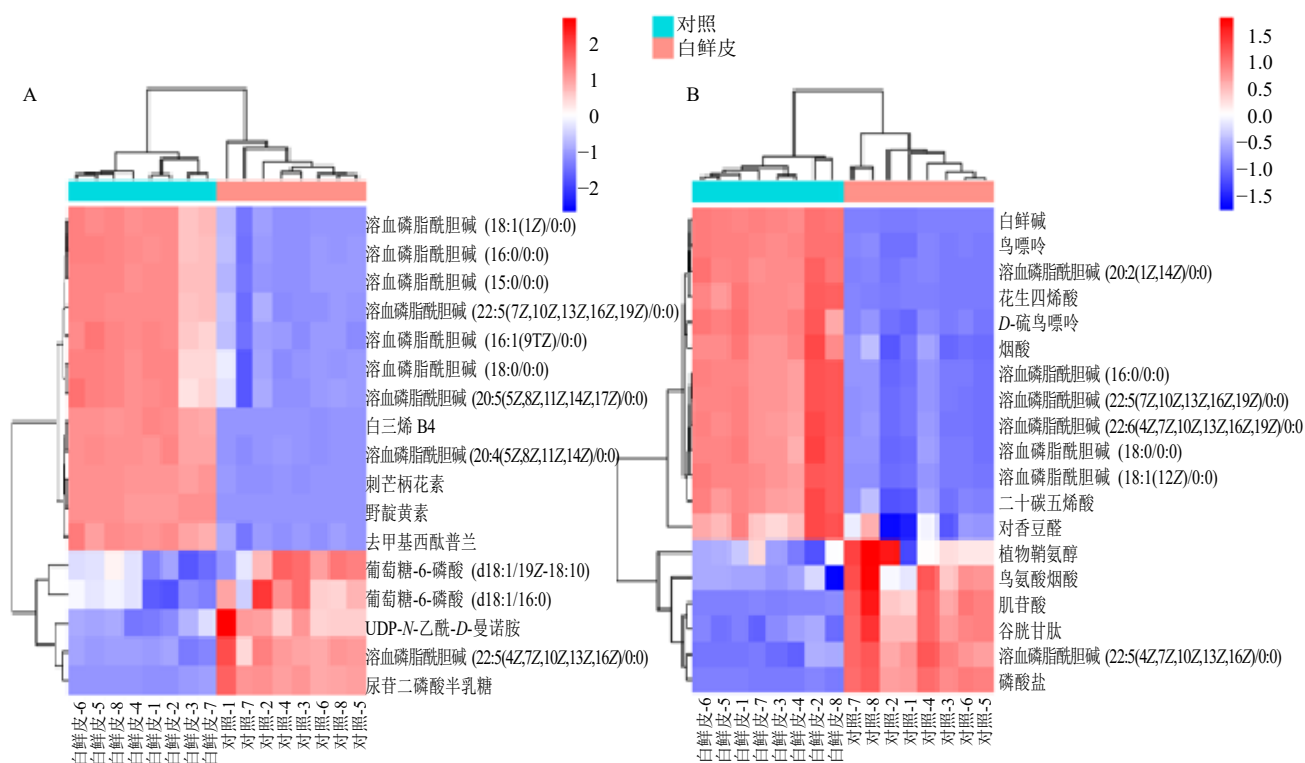


A-负离子模式 PCA 图; B-正离子模式 PCA 图; C-负离子置换检验图; D-正离子置换检验图; E-负离子 S-plot 图; F-正离子 S-plot 图。

A-negative mode PCA graph; B-positive mode PCA graph; C-negative displacement test plot; D-positive displacement test plot; E-negative S-plot; F-positive S-plot.

图 7 白鲜皮对斑马鱼体内代谢的影响

Fig. 7 Effect of *Dictamni Cortex* on metabolism in zebrafish



A-负离子聚类热图；B-正离子聚类热图。

A-negative ion clustering heat map; B-positive ion clustering heat map.

图 8 差异代谢物 KEGG 分类图

Fig. 8 KEGG classification diagram of differential metabolites

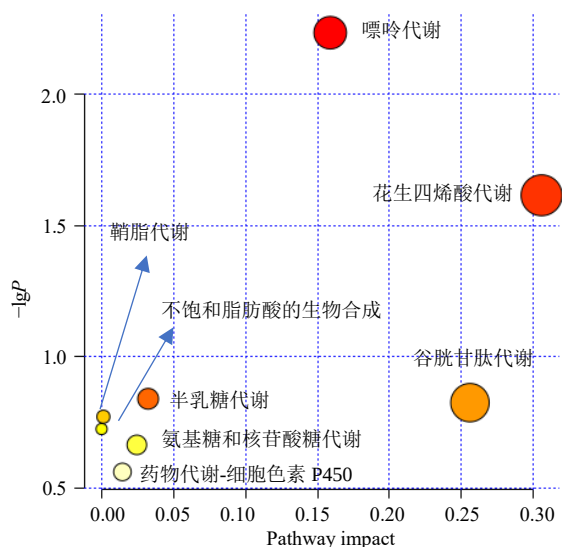


图 9 Pathway 显著性分析

Fig. 9 Pathway significance analysis

中最重要的细菌之一，具有抗炎作用，维持细菌酶的活性，保护消化系统免受肠道病原体的侵害，属于有益菌^[35]。有研究表明，将普拉梭菌给予患类风

湿性关节炎小鼠模型 7 周，可明显改善关节炎损伤，抑制促炎因子的分泌^[36]。此外，普拉梭菌还能通过调节肠黏膜屏障功能和免疫学特征来抑制炎症反应^[37]，因此，肠道微生物群在肝损伤的发生发展中起着关键作用。近年来，肠道菌群广泛用于研究肝损伤中。研究表明，经白鲜皮-苦参给药后大鼠的肠道菌群紊乱，厚壁菌门/拟杆菌门的值下降，普雷沃氏菌属比例上升，白鲜皮-苦参通过脂质代谢造成肝损伤是其潜在机制^[38]。本研究结果表明，白鲜皮诱导变形菌门、衣原体门的相对丰度增加，拟杆菌门丰度降低。在属水平上，与空白组相比不动杆菌属、埃希氏菌属普雷沃氏菌属的丰度上升，普拉梭菌丰度下降。结合本研究中斑马鱼生化指标 ALT、AST 含量升高，推测白鲜皮促进炎症反应是致肝毒性机制之一。

本研究基于代谢组学技术筛选出白鲜皮可能导致斑马鱼幼鱼肝毒性代谢通路可能与鞘脂代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢、细胞色素 P450 酶代谢和 GLU 代谢等途径相关。花生四烯酸 (arachidonic

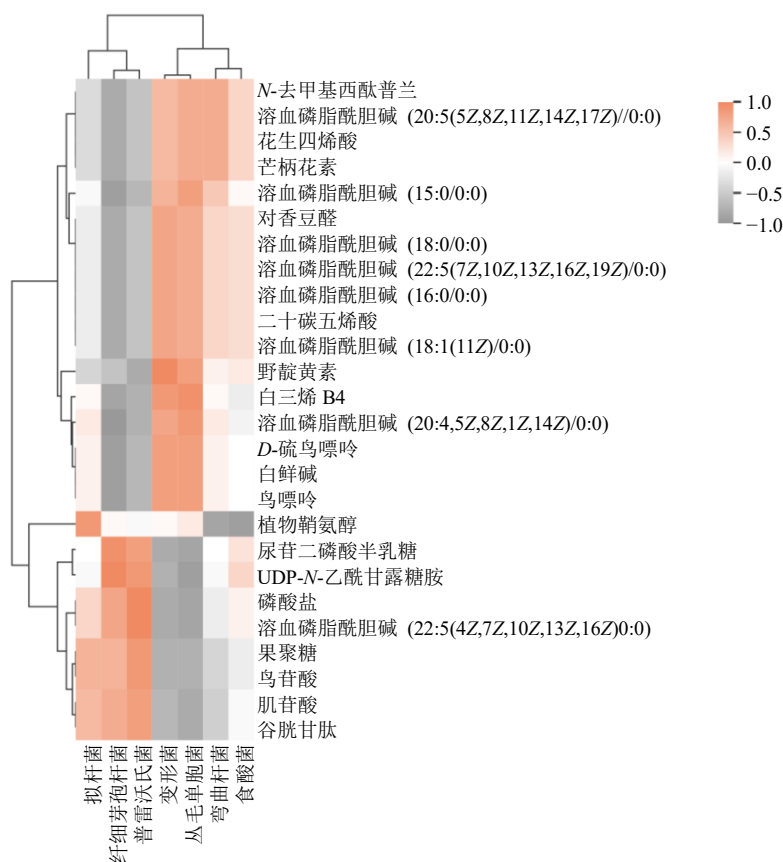


图 10 关联性分析热图

Fig. 10 Heat map of association analysis

acid, AA) 通常指全顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸, 为 1 种 ω -6 多不饱和脂肪酸, 由 20 个碳链和 4 个顺式双链组成。研究发现, AA 代谢物产生的主要部位以及作用的靶器官均为肝脏组织, AA 代谢与炎症反应密切相关, AA 主要通过环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 和脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 途径代谢, 这 2 条途径都会促进炎症细胞因子的表达。正常情况下, AA 会以磷脂的形式存在, 在受到外来刺激时, AA 被 COX 催化激活, 代谢产生大量炎症介质如前列腺素、白三烯、血栓素等; 也会通过 5-LOX 的催化氧化等一系列反应生成白三烯 A₄ (leukotriene A₄, LTA₄), LTA₄ 在其水解酶的作用下最终生成 LTB₄。此外, IL-6、IL-12 以及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的含量也会随 AA 代谢产生^[39-42], 其中 TNF- α 由巨噬细胞产生, 具有促炎作用, 持续大量的 TNF- α 会加速肝脏细胞凋亡^[43]。实验结果显示白鲜皮给药使斑马鱼幼鱼体内的花生四烯酸及 LTB₄ 含量增多, 它们是花生四烯酸代谢通路的重要组成, 与

生化指标检测结果结合表明白鲜皮可能通过促进 AA 代谢导致炎症因子的释放或促进细胞凋亡致肝毒性。

嘌呤作为生物体内的重要碱基能为生物合成提供能量, 嘌呤代谢的全过程主要在肝脏中进行, 次黄嘌呤氧化生成黄嘌呤。次黄嘌呤可以通过腺嘌呤脱氨酶或亚硝酸的作用由腺嘌呤脱氨生成, 也能通过核苷磷酸化酶使肌苷发生磷酸解而生成, 通过黄嘌呤氧化酶可被氧化成尿酸后排出体外。次黄嘌呤在氧化过程中除了产生黄嘌呤外还能释放活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 而 ROS 是氧化应激反应的基础, 并且肝脏是一个特别暴露于活性氧的器官, 因此嘌呤代谢的异常与肝损伤有密切联系^[44-47]。研究结果显示与空白组相比, 白鲜皮给药后斑马鱼幼鱼代谢产物次黄嘌呤含量下降, 再结合生化指标 MDA 与 SOD 检测结果, 说明斑马鱼幼鱼体内的次黄嘌呤大部分都经氧化应激反应同时释放了 ROS, 次黄嘌呤被大量氧化释放氧自由基, 这一结果表明白鲜皮通过嘌呤代谢促进氧化应激反

应可能是其肝毒性机制之一。

细胞色素 P450 酶代谢大量外源性物质,这可能导致肝毒性化合物的形成。药物经细胞色素 P450 酶代谢过程中产生的亲电性代谢产物能迅速与肝脏功能性蛋白质上富含电子的亲核性基团发生共价结合能破坏肝脏的正常生理功能致肝毒性^[48],并消耗 GLU,结合代谢组学结果,白鲜皮下调斑马鱼幼鱼体内 GLU 水平,上调细胞色素 P450 中的 N-去甲基西酞普兰,说明白鲜皮肝毒性的机制与代谢激活产生的亲电性反应代谢物有关。

此外,对肠道菌群与差异标志物之间关系的分析表明,变形菌、拟杆菌、不动杆菌水平与 AA、GLU、细胞色素 P450 代谢直接相关。同时,白鲜皮紊乱肠道菌群组成的稳定性进而促进炎症反应、氧化应激反应和代谢激活过程可能是白鲜皮干造成肝毒性的潜在机制。本研究后续会对斑马鱼幼鱼体内炎症因子、氧化应激指标和细胞色素 P450 进行定量分析及相关研究,进一步确定肠道菌群与差异代谢物之间的关系,以期丰富白鲜皮的毒性机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李旭,孙文松,沈宝宇. 中药白鲜皮的本草考证 [J]. 园艺与种苗, 2023, 43(3): 48-53.
- [2] 陈佳骏,杨妞妞. 白鲜皮及其活性成分抗炎止痒机制研究进展 [J]. 江西中医药, 2020, 51(5): 77-80.
- [3] 周晓鹰,陈洁,金柳,等. 白鲜皮的药理作用及抗炎活性成分研究进展 [J]. 常州大学学报: 自然科学版, 2018, 30(1): 82-86.
- [4] 杨妞妞,邵海峰,邓嘉林,等. 白鲜皮主要药效成分白鲜碱、黄柏酮、梣酮的抗皮炎作用比较及机制研究 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2023, 43(12): 1636-1642.
- [5] 邓嘉林,钱亚云,杨妞妞. 白鲜皮“异病同治”皮炎、湿疹和银屑病的作用机制预测 [J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(15): 108-114.
- [6] 刘新月,陈乐乐,孙鹏,等. 白鲜皮化学成分、药理作用和毒性研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(8): 799-805.
- [7] 陈禹竹,徐晓敏,刘树民,等. 白鲜皮及其有效成分的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(2): 409-418.
- [8] 贾旭晨,许妍妍,李遇伯. 复方青黛制剂及单味药的毒性研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8282-8289.
- [9] 黄琳艳. 白鲜皮肝损伤化学机制研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
- [10] 战奕巍,徐子茜,郭新慧,等. 二月兰籽水煎剂对白鲜皮所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016(2): 101-106.
- [11] 胡文凯,徐晓敏,蒋鑫,等. 基于网络药理学和体内实验探究白鲜皮致急性肝损伤的机制 [J]. 中国药师, 2024, 27(7): 1089-1098.
- [12] 石伟. 基于免疫应激的白鲜皮致特异质肝损伤评价及机制研究 [D]. 江西: 江西中医药大学, 2020.
- [13] Xu X M, Lu F, Wang Y, *et al.* Investigation on the mechanism of hepatotoxicity of dictamnine on juvenile zebrafish by integrating metabolomics and transcriptomics [J]. *Gene*, 2024, 930: 148826.
- [14] 刘彦哲,徐备,雷光华. 肠道菌群对肌骨健康的影响 [J]. 实用医院临床杂志, 2024, 21(3): 5-9.
- [15] Li Q W, Guo P, Wang S F, *et al.* Gut microbiota disorders aggravate terbuthylazine-induced mitochondrial quality control disturbance and PANoptosis in chicken hepatocyte through gut-liver axis [J]. *Sci Total Environ*, 2024, 913: 169642.
- [16] 刘慧敏,张悦,王佳艺,等. 代谢组学前沿技术进展及在中药现代研究中的应用 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 969-977.
- [17] 谢菁琛,刘倩倩,李兰,等. 基于代谢组学技术、TOSIS 法评价玉竹质量 [J]. 中成药, 2023, 45(7): 2265-2274.
- [18] 朱泽兵,牟腊梅,张华. 一测多评法联合聚类分析评价不同产地白鲜皮的质量 [J]. 华西药理学杂志, 2021, 36(1): 81-84.
- [19] 曹雨诞,张楷承,姚芳,等. 京大戟醋制前后对斑马鱼胚胎心脏的毒性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 73-77.
- [20] 尚家起,刘婧,李佳颖,等. 菌群 16S rRNA 基因测序的聚类分析方法研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(7): 864-869.
- [21] 宋国庆,曹禹,李辉,等. 16S rRNA 基因测序在法医学中的研究进展 [J]. 法医学杂志, 2018, 34(5): 542-548.
- [22] Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress and acute hepatic injury [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2018, 7: 17-21.
- [23] Shao S, Zhang Y, Zhou F, *et al.* LncRNA-Airm alleviates acute liver injury by inhibiting hepatocyte apoptosis via the NF- κ B signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2022, 54(11): 1619-1629.
- [24] Wen C C, Zhuang Z S, Song H C, *et al.* Metabolism of liver CYP450 and ultrastructural changes after long-term administration of aspirin and ibuprofen [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 108: 208-215.
- [25] 于子惠,徐子瑛,李龙朝,等. 基于转录组和 DNA 甲基化组的白鲜碱致小鼠肝损伤的性别差异研究 [J].

- 解放军医学院学报, 2024, 45(8): 861-867.
- [26] 吕东霞, 张帆, 秦佳琪, 等. 中草药相关肝损伤诊断的现状与进展 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1761-1769.
- [27] 胡晓婷. 慢性乙型肝炎诊断中生化指标检验的诊断价值 [J]. 中国城乡企业卫生, 2024, 39(12): 155-157.
- [28] 赵思妍. 肝功能检测联合凝血检测对乙肝后肝硬化的应用研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2023.
- [29] 邹仁海, 谢艳玲, 田二云. 炎症因子及氧化应激指标在肝移植术后肺部感染预后预测中的价值 [J]. 川北医学院学报, 2022, 37(4): 486-489.
- [30] 魏书堂, 徐梦阳, 董勇. 还原型谷胱甘肽辅助治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床疗效观察 [J]. 中国医药导刊, 2023, 25(11): 1176-1180.
- [31] Zhao Z Y, Guo Z C, Yin Z L, *et al.* Gut microbiota was involved in the process of liver injury during intra-abdominal hypertension [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 790182.
- [32] Zheng Y, Wang J H, Wang J R, *et al.* Gut microbiota combined with metabolomics reveal the mechanism of curcumol on liver fibrosis in mice [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2022, 152: 113204.
- [33] Zhang S Y, Zhao Y H, Lalsiamthara J, *et al.* Current research progress on *Prevotella intermedia* and associated diseases [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2024: 1-18.
- [34] Chang Y C, Ching Y H, Chiu C C, *et al.* TLR2 and interleukin-10 are involved in *Bacteroides fragilis*-mediated prevention of DSS-induced colitis in gnotobiotic mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180025.
- [35] Björkqvist O, Rangel I, Serrander L, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* increases following fecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridioides difficile* infection [J]. *PLoS One*, 2021, 16(4): e0249861.
- [36] 陈虹亮, 文雅婷, 李忠玉. 衣原体逃逸宿主免疫反应机制研究进展 [J]. 生命科学, 2019, 31(2): 121-127.
- [37] Bear T, Roy N, Dalziel J, *et al.* Anxiety-like behavior in female sprague dawley rats associated with cecal clostridiales [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(7): 1773.
- [38] 牛露娜, 王春国, 荆鲁. 白鲜皮-苦参致 Wistar 大鼠肝损伤的微生物-脂代谢机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(11): 34-42.
- [39] 孙军, 娄雅昕, 苏凡, 等. 花生四烯酸氨基乙醇对人成牙本质细胞样细胞 MMP-9 表达的影响 [J]. 北京口腔医学, 2023, 31(6): 385-390.
- [40] 李晓华, 万芪. 花生四烯酸对大鼠缺血性脑损伤的作用及机制 [J]. 青岛大学学报: 医学版, 2023, 59(6): 808-813.
- [41] 李冰心, 龚淑影, 许丹宁, 等. 白术多糖通过花生四烯酸代谢通路缓解环磷酸腺苷诱导的小鼠肾损伤 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 325-334.
- [42] 蔡亚玮, 刘建宏, 马宁. 花生四烯酸靶向代谢组学在炎症中的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(19): 2721-2723.
- [43] 王挺帅, 王娜, 张荣臻, 等. 免疫反应与炎症损伤在肝衰竭发病机制中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(6): 1415-1419.
- [44] 王琢文, 黄婷, 吴宇陪, 等. 蒺藜皂苷对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用研究 [J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2023, 37(5): 379-384.
- [45] Dewulf J P, Marie S, Nassogne M C. Disorders of purine biosynthesis metabolism [J]. *Mol Genet Metab*, 2022, 136(3): 190-198.
- [46] Mishima E, Ichijo M, Kawabe T, *et al.* Germ-free conditions modulate host purine metabolism, exacerbating adenine-induced kidney damage [J]. *Toxins*, 2020, 12(9): 547.
- [47] Tang Z W, Ye W R, Chen H T, *et al.* Role of purines in regulation of metabolic reprogramming [J]. *Purinergic Signal*, 2019, 15(4): 423-438.
- [48] 石子叶, 张妍, 徐旭, 等. 中药致肝损伤的研究进展 [J]. 抗感染药学, 2024, 21(3): 228-231.

[责任编辑 罗 曦]