

蒺藜茎、叶、果中呋甾皂苷 26-*O*- β -葡萄糖苷酶活性-呋甾皂苷-螺甾皂苷变化相关性分析及其肝肾毒性比较

宿慧敏¹, 韩冰¹, 郭菲², 宫晓萌¹, 王一凡¹, 陈智¹, 张超^{1*}, 高延甲^{3*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250014

3. 山东省食品药品审评查验中心, 山东 济南 250014

摘要: 目的 探究蒺藜茎、叶、果中呋甾皂苷 26-*O*- β -葡萄糖苷酶 (furostanolglycoside 26-*O*- β -glucosidase, F26G) 活性-呋甾皂苷-螺甾皂苷变化的相关性, 明确 4 种皂苷类成分分布规律, 并比较茎、叶、果的肝肾毒性。方法 采用对硝基苯- β -D-葡萄糖 (4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, pNPG) 法测定 7~11 月的蒺藜茎、叶、果中 F26G 活性, 采用 UHPLC-MS/MS 法测定其中 4 种皂苷类成分 26-*O*- β -D-glucopyranosyl-(25*R*)-5 α -furostan-12-one-3 β ,22 α ,26-triol-3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopyranoside (FOT)、蒺藜皂苷 D (terrestrosin D)、tribuluside A 和 25*R*-tribulosin 的含量, 将 F26G 活性与 4 种皂苷类成分的含量变化进行相关性分析。通过小鼠长期毒性实验, 观察肝肾组织病理损伤情况, 应用主成分分析比较茎、叶、果的肝肾毒性。结果 茎、叶、果中 F26G 活性随采集时间均呈先升后降的趋势, 且为叶>果>茎。含量测定结果显示, FOT 含量呈茎>叶>果的规律, 蒺藜皂苷 D 含量在叶中最高, 茎、果中接近, tribuluside A 和 25*R*-tribulosin 含量均表现为叶>茎>果。相关性结果表明茎、叶、果中螺甾皂苷含量变化与 F26G 活性及呋甾皂苷的含量变化相关性均较强, 提示 F26G 参与了螺甾皂苷的生成; 茎、果中 4 种皂苷类成分含量变化的相关性强于叶、果中成分含量变化的相关性。小鼠长期毒性实验发现, 与空白组比较, 蒺藜茎、叶组小鼠肝功能指标显著升高, 肝组织受损, 伴有不同程度的炎性细胞浸润, 肾组织可见肾小球肿大, 而蒺藜果组肝肾组织受损程度较小。聚类结果显示叶肝毒性较大, 茎肾毒性较大。结论 蒺藜茎、叶中螺甾皂苷成分含量高, 肝肾毒性大; 蒺藜果中螺甾皂苷成分含量低, 肝肾毒性小, 中医临床多以蒺藜果入药与其肝肾毒性较小有关。

关键词: 蒺藜; 呋甾皂苷 26-*O*- β -葡萄糖苷酶活性; 呋甾皂苷; 螺甾皂苷; 肝肾毒性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)16-5869-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.16.016

Correlation analysis of furostanolglycoside 26-*O*- β -glucosidase activity-furostanol saponins-spirostanol saponins in stems, leaves and fruits of *Tribulus terrestris* and comparison of hepatic-renal toxicity

SU Huimin¹, HAN Bing¹, GUO Fei², GONG Xiaomeng¹, WANG Yifan¹, CHEN Zhi¹, ZHANG Chao¹, GAO Yanjia³

1. College of Pharmacy, Shangdong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

3. Shandong Center for Food and Drug Evaluation and Inspection, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To explore the correlation between furostanolglycoside 26-*O*- β -glucosidase (F26G) activity-furostanol saponins-spirostanol saponins in the stems, leaves and fruits of *Tribulus terrestris*, and clarify the distribution of four saponins, and compare the hepatic-renal toxicity of the stems, leaves and fruits. **Methods** F26G activity in the stems, leaves and fruits of *T. terrestris*

收稿日期: 2025-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274102); 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地项目 (国中医药科技中药[2022]59 号); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2024MH318); 山东省 2023 年中医药高层次人才培养项目 (鲁卫函[2023]143 号)

作者简介: 宿慧敏 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药与中药炮制原理。E-mail: 3043283774@qq.com

*通信作者: 张超 (1982—), 男, 教授, 研究方向为中药新药与中药炮制原理。Tel: (0531)89628200 E-mail: tougaotcm@163.com

高延甲 (1980—), 男, 副主任中药师, 研究方向为中药质量与资源。Tel: (0531)51795643 E-mail: gaoyj80@163.com

from July to November was determined by 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) method. The contents of 26-O- β -D-glucopyranosyl-(25R)-5 α -furostan-12-one-3 β ,22 α ,26-triol-3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopyranoside (FOT), terrestrosin D, tribuluside A and 25R-tribulosin were determined by UHPLC-MS/MS. The correlation between F26G activity and the contents of four saponins was analyzed. Long-term toxicity tests of mice were carried out to observe the pathological damage of liver and kidney tissues. Principal component analysis was used to compare the hepatic-renal toxicity of stems, leaves and fruits. **Results** The activity of F26G in stems, leaves and fruits all showed a tendency of increasing and then decreasing with the collection time, and the order was leaves > fruits > stems. The results of content determination showed that FOT content was stems > leaves > fruits. The content of terrestrosin D was the highest in leaves, which was close to that in stems and fruits. The contents of tribuluside A and 25R-tribulosin was leaves > fruits > stems. The correlation results showed that changes in spirostanol saponins contents in stems, leaves and fruits correlated strongly with changes in both the activity of F26G and the contents of furostanol saponins, suggesting that F26G was involved in the production of furostanol saponins. The correlation between changes in the contents of the four saponins in stems and fruits was stronger than that between changes in the contents of the components in leaves and fruits. Long-term toxicity tests in mice showed that compared with blank group, the liver and kidney function indexes of *T. terrestris* stems and leaves group were significantly elevated, liver tissue was damaged with different degrees of inflammatory cell infiltration, and glomerulomegaly was seen in renal tissue, while the liver and kidney tissues were less damaged in the *T. terrestris* fruits group. The clustering results indicated greater hepatotoxicity for leaves and greater nephrotoxicity for stems. **Conclusion** The content of spirostanol saponins in the stem and leaves of *T. terrestris* is high, and it has high liver and kidney toxicity; The content of saponins in the fruit of *T. terrestris* is low, and its liver and kidney toxicity is small. In traditional Chinese medicine clinical practice, *T. terrestris* fruit is often used as a medicine due to its low liver and kidney toxicity.

Key words: *Tribulus terrestris* L.; furostanolglycoside 26-O- β -glucosidase activity; furostanol saponin; spirostanol saponin; hepatic-renal toxicity

蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 为蒺藜科草本植物, 其茎、叶、果均可入药, 但《中国药典》2025 年版仅收载蒺藜果^[1-2], 且古人及现代临床多以蒺藜果入药。蒺藜在国外亦有应用, 多用其全草, 且有临床肝肾毒性的报道^[3-4]。蒺藜果“有山羊头状的刺”^[5], 入药前需碾去刺, 相比较蒺藜全草, 蒺藜果采集入药工序更为繁琐, 而蒺藜茎、叶采集入药工序相对简单。中医临床为何多以蒺藜果入药, 以及是否与蒺藜茎、叶、果的肝肾毒性大小有关未见报道。

蒺藜果有小毒, 研究发现其中的螺甾皂苷成分蒺藜皂苷 D (terrestrosin D) 和 25R-tribulosin 具有肝肾毒性^[6], 其共存酶呋甾皂苷 26-O- β -葡萄糖苷酶 (furostanolglycoside 26-O- β -glucosidase, F26G) 可将无肝肾毒性的呋甾皂苷[如 26-O- β -D-glucopyranosyl-(25R)-5 α -furostan-12-one-3 β ,22 α ,26-triol-3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopyranoside (FOT) 和 tribuluside A] 转化成具有肝肾毒性的螺甾皂苷(如蒺藜皂苷 D 和 25R-tribulosin)^[7]。F26G 是一种特殊的 β -葡萄糖苷酶, 可使呋甾皂苷酶解失去 C₂₆ 位的葡萄糖, 同时 F 环重新环和, 转化生成相应的螺甾皂苷^[8], 如 FOT 转化生成蒺藜皂苷 D、tribuluside A 转化生成 25R-tribulosin 均是由 F26G

所催化的(图 1)。因此, 研究蒺藜茎、叶、果中 F26G 活性-呋甾皂苷-螺甾皂苷变化规律并进行相关性分析, 有助于明确呋甾皂苷和螺甾皂苷在蒺藜茎、叶、果中的分布规律。

本研究采用对硝基苯- β -D-葡萄糖 (4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, pNPG) 法测定 7~11 月蒺藜茎、叶、果中 F26G 活性, 采用 UHPLC-MS/MS 法测定其中 4 种皂苷类成分 FOT、蒺藜皂苷 D、tribuluside A 和 25R-tribulosin 含量, 再采用 Origin 2024 软件对 F26G 活性-呋甾皂苷-螺甾皂苷的变化进行相关性分析, 最后应用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 比较蒺藜茎、叶、果的肝肾毒性, 从而为蒺藜茎、叶、果的开发利用提供科学依据, 指导蒺藜资源合理利用及中医临床用药。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明小鼠 32 只, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证号 SCKY (鲁) 20220006。动物实验经山东中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 SDUTCM20230628003)。

1.2 药材

蒺藜地上部分采自山东中医药大学长清校区

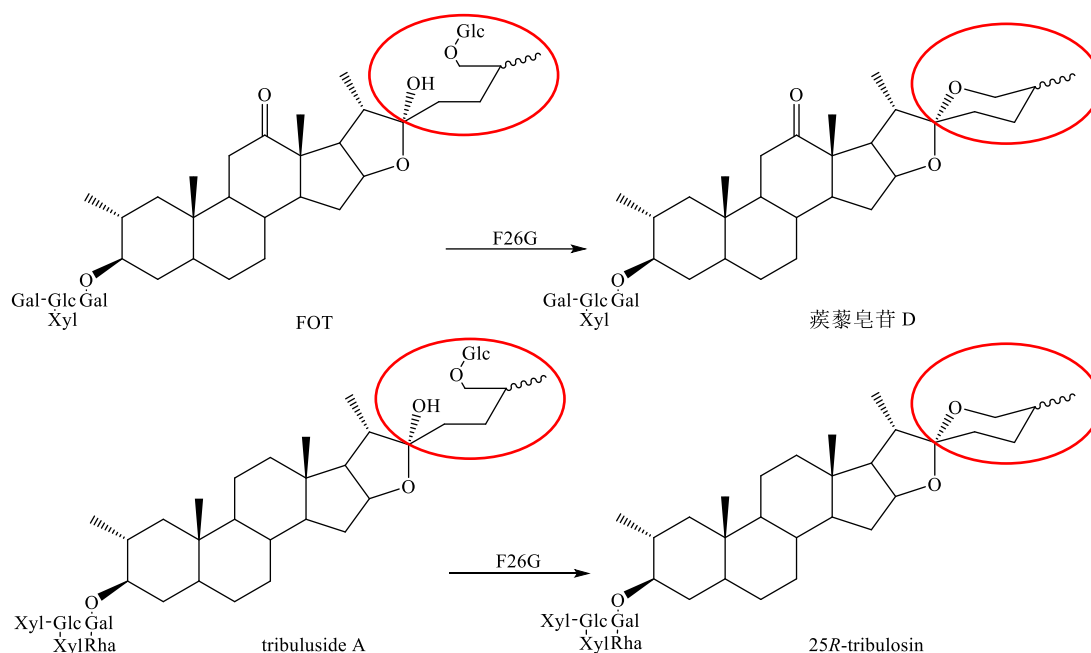


图 1 F26G 作用机制

Fig. 1 Mechanism of F26G

校园（东经 116°47'33"，北纬 36°33'28"），自 7 月 21 日起每隔 10 d 于 8:00~9:00 时采集 1 次，经山东省食品药品审评查验中心高延甲副主任中药师鉴定为蒺藜科植物蒺藜 *T. terrestris* L.。趁鲜分离茎、叶、果后，分别冷冻干燥。

1.3 药品与试剂

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）、肌酐（creatinine, CREA）、血尿素氮（blood urea nitrogen, BUN）测定试剂盒（批号分别为 20230706、20230707、20230615、20230613、20230614）购自深圳雷杜生命科学股份有限公司；总胆红素（total bilirubin, TBIL）测定试剂盒（批号 2023003）购自长春汇力生物技术有限公司；肾损伤分子-1（kidney injury molecule-1, KIM-1）检测试剂盒（批号 L231005075）购自武汉云克隆科技股份有限公司； β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶（ β -N-acetylglucosaminidase, NAG）试剂盒（批号 20230812）购自南京建成生物工程研究所；蒺藜皂苷 D 对照品（批号 112022-202202，质量分数 $\geq$ 98%）购自中国食品药品检定研究院；对照品 FOT、tribuluside A、25R-tribulosin 均由军事医学科学院放射与辐射医学研究所马百平研究员赠送，质量分数均 $\geq$ 98%。

1.4 仪器

Agilent 1290-6470 型液相-质谱联用仪（美国 Agilent 公司）；FA1204B 型电子天平（上海天美天平仪器有限公司）；WD-9415E 型超声波清洗器（北京六一生物科技有限公司）；Epoch 酶标检测仪（美国伯腾仪器有限公司）；X-5 型紫外可见分光光度计（上海元析仪器有限公司）；BJ-150 型高速多功能粉碎机（德清拜杰电器有限公司）；SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机（宁波新芝生物科技股份有限公司）。

2 方法

2.1 pNPG 法检测不同采集时间蒺藜茎、叶、果中的 F26G 活性

参考文献方法^[9]测定 F26G 活性。制备蒺藜茎、叶、果粗酶提取液，测定时取粗酶提取液 2 份，1 份加入 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液作为空白组，另 1 份加入 25 mmol/L pNPG 溶液作为实验组，45 °C 恒温水浴反应 45 min 后，向反应体系中加入 2.5 mL 碳酸钠溶液（1 mol/L）终止反应，并继续加入适量碳酸钠溶液稀释，采用酶标仪测定 402 nm 处的吸光度（A）值，计算各实验组 F26G 活力指数。

2.2 蒺藜茎、叶、果中 4 种皂苷类成分含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品 FOT、蒺藜皂苷 D、tribuluside A 和 25R-tribulosin 适量，加 70%乙醇制成质量浓度分别为 18.92、5.00、1.12、

0.93 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 蒺藜茎、叶、果冻干粉末各取 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70%乙醇 50 mL，称定质量，超声处理 30 min，放冷，再称定质量，用 70%乙醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 检测条件

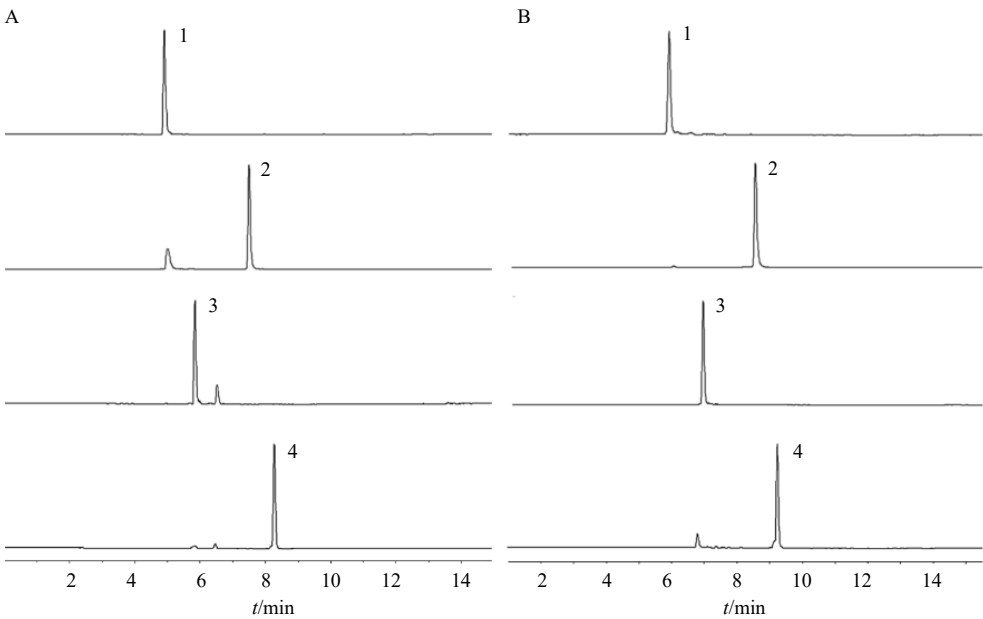
(1) 色谱条件：Halo® C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm)；流动相为 0.05%甲酸乙腈溶液 (A) - 0.05%甲酸水溶液 (B)，梯度洗脱：0~0.5 min，

15%~20% A；0.5~2 min，20%~35% A；2~4 min，35%~50% A；4~6 min，50%~90% A；6~7 min，90%~100% A；7~20 min，100% A。柱温 30 ℃；体积流量 0.3 mL/min；进样量 5 μL。

(2) 质谱条件：电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI)；正离子模式下扫描；毛细管电压 4 000 V；干燥器温度 325 ℃；体积流量 10 L/min；采用多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式进行定量分析。4 种皂苷类成分的质谱参数信息见表 1，提取离子流图见图 2。

表 1 4 种皂苷类成分的质谱参数
Table 1 MS parameters of four saponins

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	碎裂电压/V	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能量/V	探测离子
FOT	1 211.5	175	1 049.5	20	[M+H-H ₂ O] ⁺
蒺藜皂苷D	1 071.5	255	939.6	80	[M+Na] ⁺
tribuloside A	1 313.6	320	887.4	30	[M+H-H ₂ O] ⁺
25 <i>R</i> -tribulosin	1 173.6	310	1 027.6	85	[M+Na] ⁺



A-对照品溶液；B-供试品溶液；1-FOT；2-蒺藜皂苷 D；3-tribuloside A；4-25*R*-tribulosin。
A-reference solution；B-test solution；1-FOT；2-terrestrosin D；3-tribuloside A；4-25*R*-tribulosin.

图 2 4 种皂苷类成分的提取离子流图
Fig. 2 Extract ion chromatograms of four saponins

2.2.4 方法学考察

(1) 线性关系考察：精密移取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量，用 70%乙醇制成系列质量浓度的对照品溶液，按“2.2.3”项下条件测定，以质量浓度对峰面积作标准曲线，计算回归方程，并考察检测限 (limit of detection, LOD) 和定量限 (limit of quantitation, LOQ)。

(2) 精密度试验：精密吸取混合对照品溶液适量，按“2.2.3”项下条件连续测定 6 次，计算 4 种皂苷类成分峰面积的 RSD。

(3) 重复性试验：取同一采集时间蒺藜果 1.0 g，共 6 份，精密称定，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.3”项下条件测定，计算 4 种皂苷类成分含量的 RSD。

(4) 稳定性试验: 取同一采集时间的供试品溶液适量, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“2.2.3”项下条件测定, 计算 4 种皂苷类成分含量的 RSD。

(5) 加样回收率试验: 取已知含量的蒺藜果粉末 0.5 g, 精密称定, 共 6 份, 分别加入对应量的对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下条件测定, 计算平均加样回收率和 RSD。

2.2.5 样品含量测定 按“2.2.2”项下方法制备不同采集时间的蒺藜茎、叶、果供试品溶液, 按“2.2.3”项下条件测定, 计算各样品中 FOT、蒺藜皂苷 D、tribuluside A 和 25R-tribulosin 的含量。

2.3 蒺藜茎、叶、果对小鼠肝肾毒性的比较

2.3.1 给药溶液的制备 取同一采集时间(10 月 5 日)的蒺藜茎、叶、果冻干粉末, 分别加入 5 倍量石油醚回流提取 2 次, 每次 2 h, 弃去石油醚液, 药渣挥干石油醚后, 加 8 倍量 70%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 抽滤, 合并滤液, 回收乙醇, 减压浓缩, 冷冻干燥。取蒺藜茎、叶、果提取物冻干粉末适量, 用蒸馏水配制成质量浓度分别为 0.65、0.84、0.66 g/mL 的混悬液, 即得。

2.3.2 动物分组及给药 按随机数字表法将小鼠分为空白组、蒺藜茎组、蒺藜叶组、蒺藜果组, 每组 8 只。蒺藜茎、叶、果组分别 ig 相应提取物, 给药剂量为 52 g/kg (成人常用剂量的 50 倍) [10-11], 空白组 ig 等体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 56 d。

2.3.3 样本采集与处理 实验期间, 每天观察小鼠的一般体征, 包括体质量、精神状态、毛色变化、饮食饮水量、排尿排便情况等。给药结束后, 收集小鼠 24 h 尿液, 4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min, 取上清, -80 ℃保存备用; 通过摘眼球法取血, 室温静置 1 h, 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清即得血清, -80 ℃保存备用。采用颈椎脱臼法处死小鼠, 迅速取出肝肾组织, 用预冷的生理盐水清洗血迹, 吸干表面水分, 准确称量各脏器质量, 计算脏器指数; 在同一部位切取肝肾组织, 于多聚甲醛溶液中固定备用。

2.3.4 肝肾功能指标检测及组织病理学观察 利用全自动生化分析仪检测血清中 ALT、AST、ALP、TBIL、BUN、CREA 和尿液中 NAG、KIM-1 水平; 固定的肝脏、肾脏组织进行石蜡包埋切片, 经苏木素-伊红(HE)染色后, 脱水封片, 在显微镜下观察

肝肾组织的病理变化。

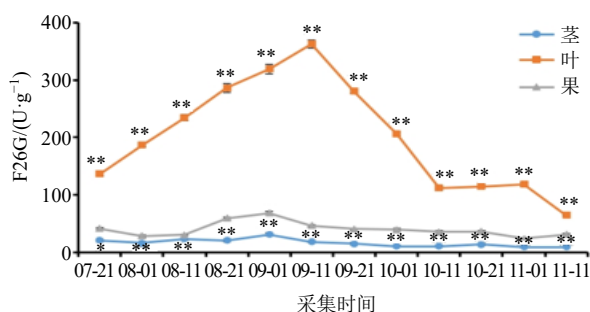
2.4 统计学分析

运用 Origin 2024 软件对 F26G 活性与蒺藜茎、叶、果中 4 种皂苷类成分的含量进行 Spearman 相关性分析并绘制热图; 运用 SIMCA 14.1 软件对小鼠肝肾功能指标进行 PCA, 并绘制 PCA 图; 采用 SPSS Statistics 21 软件对数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 蒺藜茎、叶、果中 F26G 的活性测定结果

不同采集时间蒺藜茎、叶、果中 F26G 活性的测定结果见图 3。茎、叶、果中 F26G 活力指数均随采集时间呈先上升后下降的趋势, 茎、果中的 F26G 活性于 9 月 1 日达到最大值, 叶中的 F26G 活性于 9 月 11 日达到最大值; 同一采集时间下, F26G 活性呈现叶>果>茎的规律, 叶的平均 F26G 活性约为果的 5 倍, 茎的平均 F26G 活性约为果中的 1/3。



与相同采集时间的蒺藜果组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 4 同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs *T. terrestris* fruits group at same collection time, same as Fig. 4.

图 3 不同采集时间蒺藜茎、叶、果中 F26G 活力指数变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Changes of F26G activity indexes in stems, leaves and fruits of *T. terrestris* at different collection times ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 4 种皂苷类成分 UHPLC-MS/MS 定量分析的方法学考察结果

线性回归参数、LOQ 及 LOD 见表 2, 表明 4 种皂苷类成分在相应质量浓度范围内线性关系良好; 精密度试验中 FOT、蒺藜皂苷 D、tribuluside A、25R-tribulosin 峰面积的 RSD 分别为 2.18%、1.47%、2.88%、2.56%, 表明仪器精密度良好; 稳定性试验中 FOT、蒺藜皂苷 D、tribuluside A、25R-tribulosin 含量的 RSD 分别为 1.04%、2.01%、1.49%、2.52%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好; 重复性试验

表 2 4 种皂苷类成分的线性关系考察结果

Table 2 Investigation of linear relationship of four saponins

化合物	回归方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
FOT	$Y=0.058\ 5\ X-4.965\ 8$	0.999 9	530.36~58 477.84	178.49	309.38
蒺藜皂苷D	$Y=0.624\ 9\ X+4.315\ 7$	0.999 9	4 143.59~27 449.72	5.58	17.15
tribuluside A	$Y=0.167\ 1\ X+8.038\ 2$	0.999 7	309.62~18 748.82	3.55	12.07
25R-tribulosin	$Y=0.345\ 3\ X-1.256\ 9$	0.999 8	98.04~1 197.51	10.92	27.38

中 FOT、蒺藜皂苷 D、tribuluside A、25R-tribulosin 含量的 RSD 分别为 1.12%、2.01%、1.49%、2.62%，表明该方法重复性良好；FOT、蒺藜皂苷 D、tribuluside A、25R-tribulosin 的平均加样回收率分别为 100.59%、100.52%、99.45%、100.82%，RSD 分别为 2.15%、3.02%、2.71%、2.48%。

3.3 蒺藜茎、叶、果中 4 种皂苷类成分的含量测定结果

4 种皂苷类成分的含量随采集时间的变化规律见图 4。茎、叶、果中 FOT 含量随采集时间的变化趋势基本一致，7~10 月每月下旬含量升高，月初含量达到峰值，茎、叶、果中 FOT 含量均于 9 月 1 日达到峰值（2 931.69、693.45、228.86 μg/g）；茎、叶、果中蒺藜皂苷 D 含量随采集时间呈先升后降的趋势，于 9 月 1 日达峰后逐渐降低，且 10 月 21 日

之后含量趋于稳定，可能与 10 月下旬叶、茎萎蔫，F26G 活性降低，蒺藜皂苷 D 合成量减少有关；tribuluside A 与 FOT 同属于呋甾皂苷成分，含量随采集时间的变化趋势相似；叶、果中 25R-tribulosin 含量随采收时间波动较小，分别维持在 40~60 μg/g 和 5~20 μg/g，茎中 25R-tribulosin 含量在 9 月 1 日前比较稳定，之后急剧下降，并在 9 月 11 日之后保持相对稳定。

分析 4 种成分在茎、叶、果中的含量平均值，发现 FOT 在茎中含量最高，分别是叶和果中的 4 倍和 11 倍；蒺藜皂苷 D 在茎、果中含量接近，约是叶中含量的 2/3；tribuluside A 在叶中含量最高，茎中次之，果中最低，叶中含量分别是茎、果中的 2.3 和 6.3 倍，茎中含量是果中的 2.8 倍；25R-tribulosin 含量同样呈现出叶>茎>果的规律，叶中的含量分

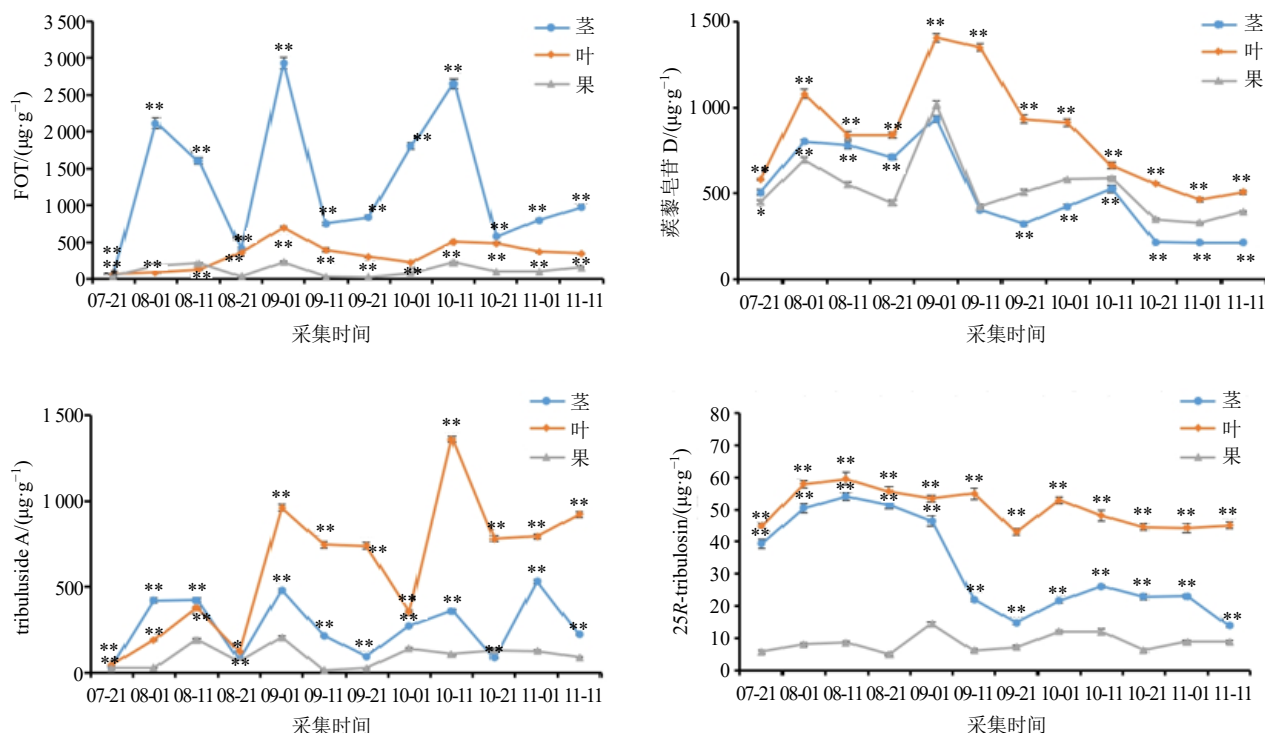
图 4 不同采集时间蒺藜茎、叶、果中各成分含量变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Changes of contents of each component in stems, leaves and fruits of *T. terrestris* at different collection times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

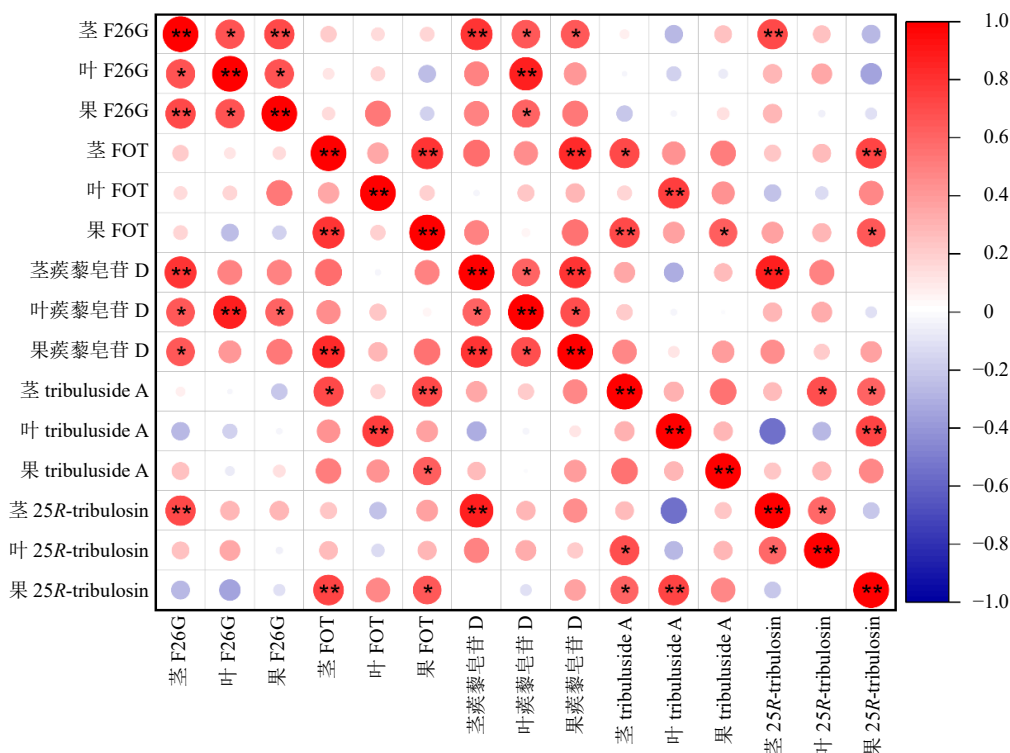
别是茎、果中的 1.6 倍和 5.8 倍，茎中的含量约为果中的 4 倍。此外，发现呋甾皂苷含量随采集时间的延后而增加，螺甾皂苷含量随采集时间的延后而减少，且 F26G 活性自 9 月中下旬开始降低，螺甾皂苷含量随之减少，这一现象提示 F26G 参与了呋甾皂苷向螺甾皂苷的转化。

3.4 F26G 活性-呋甾皂苷-螺甾皂苷变化相关性分析结果

蒺藜茎、叶、果中 F26G 活性与 4 种皂苷类成分的相关性分析结果见图 5。红色与蓝色分别代表正、负相关，图 5 中相关性较强的均为正相关，即表示二者变化趋势一致；圆圈大小及颜色深浅代表相关性的强弱，颜色越深，圆圈越大，代表相关性越显著。分析茎、叶、果中 F26G 活性的相关性，发现 F26G 活性高度相关，说明茎、叶、果中 7~11 月 F26G 活性变化趋势一致，与图 3 中 F26G 活力指数测定结果一致。分析茎、叶、果中 F26G 活性与 4 种皂苷类成分含量变化的相关性，茎中 F26G 活性与叶、果中蒺藜皂苷 D 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)，与茎中蒺藜皂苷 D 和 25R-tribulosin 含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；叶中 F26G 活性与叶中

蒺藜皂苷 D 含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；果中 F26G 活性与叶中蒺藜皂苷 D 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)。以上结果表明，茎、叶、果中 F26G 活性与螺甾皂苷（蒺藜皂苷 D、25R-tribulosin）相关性较强，说明 F26G 参与了茎、叶、果中螺甾皂苷的生成。

分析茎、叶、果中 4 种皂苷类成分含量变化的相关性，茎中 FOT 含量与茎中 tribuluside A 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)，与果中 FOT、蒺藜皂苷 D 和 25R-tribulosin 含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；叶中 FOT 含量与叶中 tribuluside A 含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；果中 FOT 含量与果中 tribuluside A、25R-tribulosin 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)，与茎中 tribuluside A 含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；茎中蒺藜皂苷 D 含量与叶中蒺藜皂苷 D 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)，与果中蒺藜皂苷 D、茎中 25R-tribulosin 含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)；叶中蒺藜皂苷 D 含量与果中蒺藜皂苷 D 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)；茎中 tribuluside A 含量与果、叶中 25R-tribulosin 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)；叶中 tribuluside A 含量与果中 25R-tribulosin 含量呈极显



* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

图 5 F26G 活性及各成分含量的相关性分析热图

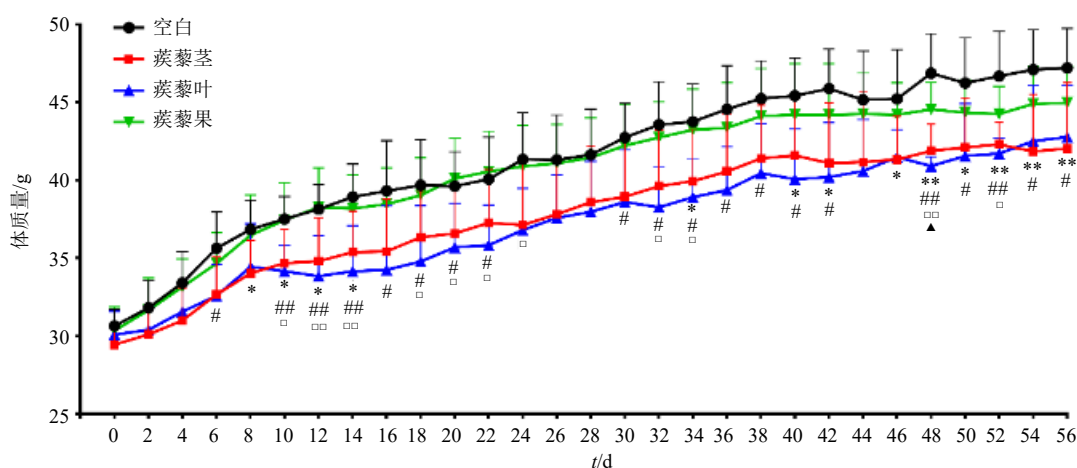
Fig. 5 Correlation analysis heat map of F26G activity and contents of each component

著正相关 ($P < 0.01$); 茎中 25R-tribulosin 与叶中 25R-tribulosin 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 同类呋甾皂苷 FOT 与 tribuluside A 之间、同类螺甾皂苷蒺藜皂苷 D 与 25R-tribulosin 之间的含量变化相关性较强, 说明同类皂苷含量变化趋势一致; 茎、叶、果中呋甾皂苷 (FOT、tribuluside A) 与螺甾皂苷 (蒺藜皂苷 D、25R-tribulosin) 含量变化有较强的相关性, 因呋甾皂苷在 F26G 的参与下, 能转化成对应的螺甾皂苷, 故其相关性较强, 含量变化趋势一致。从不同部位来看, 茎、果中 4 种皂苷类成分含量变化的相关性强于叶、果中成分含量变化的相关性, 且茎、叶中呈相关性的成分在叶、果中同样存在显著相关性, 说明茎、果中相关

成分含量变化趋势的一致性较高, 且叶、果之间可能通过茎进行物质输送。

3.5 蒺藜茎、叶、果对小鼠的肝肾毒性比较

3.5.1 小鼠一般体征 给药期间, 空白组、蒺藜果组小鼠进食、饮水、排尿、排便均正常, 精神活跃, 毛色光亮; 蒺藜茎、叶组小鼠精神萎靡, 行动迟缓, 活动量减少。统计分析各组小鼠体质量, 结果见图 6。与空白组比较, 蒺藜茎、叶组小鼠体质量分别于给药第 8 天和第 6 天出现统计学差异, 而蒺藜果组小鼠体质量在给药期间未出现统计学差异。可见, 蒺藜茎、叶组小鼠均出现体质量增长缓慢, 与其精神萎靡、行动迟缓之症相对应, 提示蒺藜茎、叶的肝肾毒性较大。



与空白组比较: 蒺藜茎组* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 蒺藜叶组# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与蒺藜果组比较: 蒺藜茎组▲ $P < 0.05$; 蒺藜叶组□ $P < 0.05$ □□ $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ in *T. terrestris* stems group, # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ in *T. terrestris* leaves group vs blank group; ▲ $P < 0.05$ in *T. terrestris* stems group, □ $P < 0.05$ □□ $P < 0.01$ in *T. terrestris* leaves group vs *T. terrestris* fruits group.

图 6 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Changes in body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.5.2 脏器指数测定结果 如图 7 所示, 与空白组比较, 蒺藜茎组小鼠的肝脏指数显著增大 ($P < 0.05$), 肾脏指数显著减小 ($P < 0.01$), 蒺藜叶组小鼠的肝脏指数显著增大 ($P < 0.01$), 肾脏指数显著减小 ($P < 0.05$), 蒺藜果组小鼠的肝、肾指数均无显著性差异; 与蒺藜果组比较, 蒺藜叶组小鼠的肝脏指数和蒺藜茎组小鼠的肾脏指数存在显著性差异 ($P < 0.05$), 表明蒺藜茎、叶的肝肾毒性较大, 且叶的肝毒性较大, 茎的肾毒性较大。

3.5.3 肝肾功能指标测定结果 如图 7 所示, 与空白组比较, 蒺藜茎、叶组小鼠的 ALT、AST、ALP、

TBIL 值均显著升高 ($P < 0.01$), 蒺藜果组 AST、ALP 和 TBIL 值显著升高 ($P < 0.01$), ALT 无显著性差异, 可见蒺藜茎、叶、果均对小鼠有一定的肝毒性; 蒺藜叶组小鼠的 ALT、AST、ALP 值和蒺藜茎组小鼠的 ALT 值均与蒺藜果组的相应指标值有显著差异 ($P < 0.01$)。对小鼠肝功能指标进行 PCA, 结果见图 8-A, $R^2_X = 0.952$, $Q^2 = 0.729$, 蒺藜果组与空白组的距离相较于其他组更近, 蒺藜叶组距空白组最远, 说明果的肝毒性最小, 叶的肝毒性最大。

与空白组比较, 蒺藜茎组小鼠的 BUN、CREA、NAG、KIM-1 值显著升高 ($P < 0.01$), 蒺藜叶组小

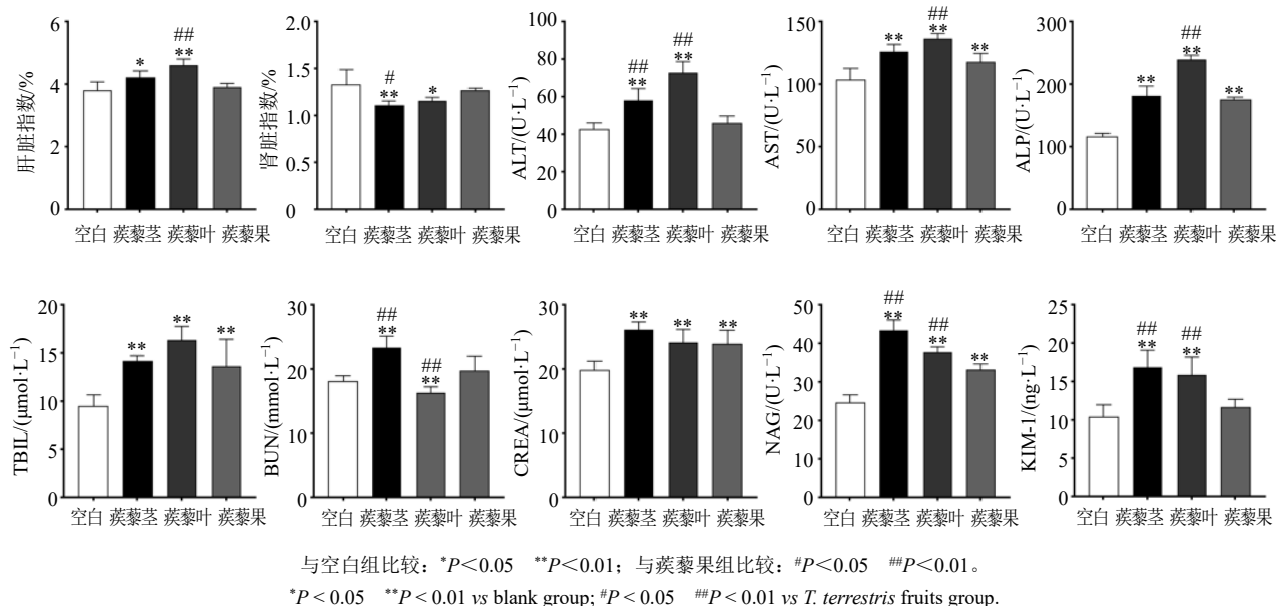


图 7 蒺藜茎、叶、果对小鼠脏器指数及肝肾功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effects of stems, leaves and fruits of *T. terrestris* on organ indexes, liver and kidney function indexes in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

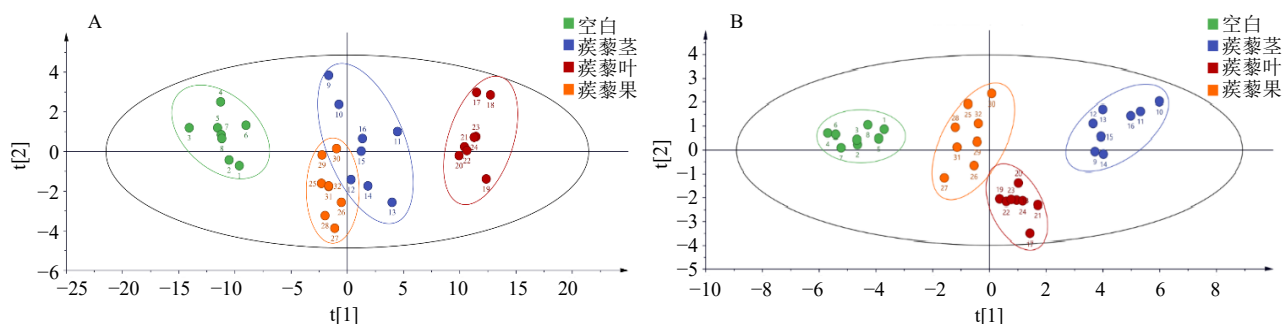


图 8 小鼠肝 (A)、肾 (B) 功能指标 PCA 图

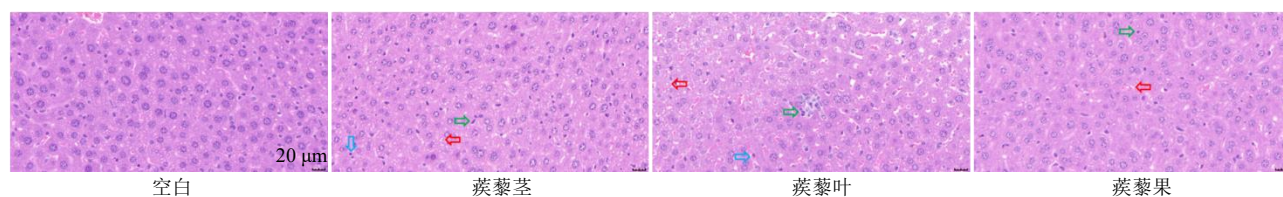
Fig. 8 PCA diagram of liver (A) and kidney (B) function indexes in mice

鼠的 BUN 值显著降低, 其他指标值均显著升高 ($P < 0.01$), 蒺藜果组小鼠的 CREA、NAG 值有显著差异 ($P < 0.01$), BUN、KIM-1 值无显著性差异; 与蒺藜果组比较, 蒺藜茎、叶组小鼠的 BUN、NAG、KIM-1 值均有显著差异 ($P < 0.01$)。以上结果表明蒺藜茎、叶肾毒性较大, 蒺藜果肾毒性较小。对小鼠肾功能指标进行 PCA, 结果见图 8-B, $R^2_X = 0.854$, $Q^2 = 0.429$, 蒺藜茎、叶、果组聚类趋势明显, 且蒺藜果组距空白组较近, 蒺藜茎组距空白组较远, 说明茎、叶、果的肾毒性有差异, 呈现茎 > 叶 > 果的规律。

3.5.4 肝肾组织病理学结果 各组小鼠肝脏 HE 染色结果见图 9。空白组小鼠肝小叶清晰完整, 肝细胞形态规则, 排列整齐, 中央静脉未见扩张, 未见

明显炎性细胞浸润、脂肪变性及坏死现象。蒺藜茎组小鼠肝小叶结构清晰, 蒺藜叶组小鼠肝小叶结构紊乱, 肝窦轻微扩张, 2 组小鼠肝细胞均出现脂肪变性, 伴有不同程度的炎性细胞浸润, 胞质中可见微小的圆形空泡, 裸核可见。蒺藜果组小鼠肝小叶清晰完整, 肝细胞大小一致, 偶见肝细胞脂肪变性及炎性细胞浸润。

各组小鼠肾脏 HE 染色结果见图 10。各组小鼠肾小管结构均未见明显改变, 空白组小鼠肾小球结构清晰, 肾小球囊无扩张或闭合, 无黏连狭窄, 肾小管上皮细胞无变形、坏死; 蒺藜茎组和蒺藜叶组小鼠肾小球均出现肿大现象, 并伴有不同程度的炎性细胞浸润; 蒺藜果组小鼠肾小球轻微肿大, 偶见炎性细胞浸润。

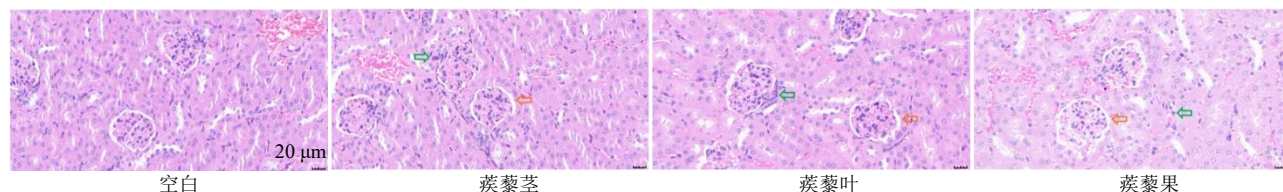


红色箭头指示肝细胞脂肪变性；绿色箭头指示炎性细胞浸润；蓝色箭头指示裸核。

Red arrows indicate hepatic steatosis; Green arrows indicate inflammatory cell infiltration; Blue arrows indicate naked core.

图 9 各组小鼠肝脏 HE 染色病理切片 (×400)

Fig. 9 HE staining pathological section of liver of mice in each group (×400)



橙色箭头指示肾小球肿大；绿色箭头指示炎性细胞浸润。

Orange arrows indicate glomerular enlargement; Green arrows indicate inflammatory cell infiltration.

图 10 各组小鼠肾脏 HE 染色病理切片 (×400)

Fig. 10 HE staining pathological section of kidney of mice in each group (×400)

4 讨论

本研究含量测定结果表明具有肝肾毒性的螺甾皂苷含量在叶中最多，茎中次之，果中最少；小鼠长期毒性实验结果表明茎、叶肝肾毒性较大，果肝肾毒性较小，因此，中医临床多以蒺藜果入药与其肝肾毒性较小有关。为保证结果的可比性，茎、叶、果均采自同一时间（10 月 5 日），但《中华本草》所载蒺藜苗（蒺藜科植物蒺藜的茎叶）为夏季采收^[5]，蒺藜苗夏季采收是否肝肾毒性较小，有待进一步探究，从而更好地指导蒺藜资源的合理利用及中医临床用药。

韩大勇等^[12]通过对蒺藜生长发育规律的研究，发现蒺藜茎的生物量在 8 月 25 日达到最大，果生物量在 8 月 10 日以后急剧增加，并在 8 月 25 日达到积累高峰。上述发现与蒺藜茎在 9 月 1 日酶活性最大，果酶活性从 8 月 1 日至 9 月 1 日不断增大，并于 9 月 1 日达到最大的规律相似，推测蒺藜酶活性与其生长量和物质积累相关。蒺藜果中螺甾皂苷蒺藜皂苷 D 含量随采集时间呈先升后降的趋势，9 月 1 日达峰后逐渐降低，10 月 11 日之后趋于稳定；25R-tribulosin 含量受采集时间影响较小，7~11 月均比较稳定，结合文献研究发现 10 月份蒺藜果中总皂苷含量最高^[13]，故蒺藜果 10 月中旬后采收为最佳，此时毒性较小，但应避免过晚采摘，11 月进入冬季，蒺藜果开裂，种子散落，影响药效和品质。

因此，从肝肾毒性成分蒺藜皂苷 D 和 25R-tribulosin 含量角度考虑，建议 10 月中下旬采摘蒺藜果。

韩梅团队^[14]通过探究蒺藜茎、叶、果中总皂苷含量的分布发现，叶片是蒺藜皂苷的主要积累场所，本研究通过对 4 种皂苷类成分的含量测定证实了这一观点，且茎、叶、果中 F26G 活性-呋甾皂苷-螺甾皂苷变化的相关性分析结果表明，蒺藜茎、果中 4 种皂苷类成分含量变化的相关性强于叶、果中成分含量变化的相关性，茎、叶中呈相关性的成分在叶、果中同样存在相关性，结合文献报道^[15]，盾叶薯蓣中的薯蓣皂苷元（甾体皂苷元）在叶片中合成，经韧皮部运输到主要药用部位地下根茎，而根茎不是甾体皂苷元的合成部位，推测蒺藜皂苷类成分可能在茎、叶中合成，经茎运输到主要药用部位果，果不参与皂苷类成分的合成。

小鼠肝肾功能指标聚类结果及组织病理学观察结果均显示，蒺藜叶肝毒性较大，蒺藜茎肾毒性较大，但含量测定结果表明肝肾毒性成分蒺藜皂苷 D 和 25R-tribulosin 均在叶中含量最高，推测茎中可能含有其他含量较高的螺甾皂苷或其他肾毒性较大的成分。Hagiwara 等^[16]通过 ig 给予大鼠相应的哈尔满和去甲哈尔满提取物，测定尿液中肾毒性指标，发现给药组大鼠的 NAG 和乳酸脱氢酶含量显著降低，证实蒺藜中的生物碱类成分哈尔满或去甲哈尔满具有肾毒性，由此推测，蒺藜茎可能比叶、

果中含有更多的生物碱类成分哈尔满、去甲哈尔满或其他肾毒性成分,由于本研究仅测定蒺藜皂苷 D 和 25R-tribulosin 2 种肝肾毒性成分的含量,茎中所含哈尔满、去甲哈尔满及其他肾毒性成分的含量有待进一步研究。

蒺藜皂苷 D 的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀) 低于 5 μmol/L,对多种细胞均表现出毒性作用,但其母核化合物海柯皂苷元几乎不具毒性,其浓度大于 100 μmol/L 时才会表现出细胞毒性^[17-18];另有研究发现,蒺藜皂苷 D 在加热炒制过程中,发生逐级脱糖反应,生成海柯皂苷元^[19],此为蒺藜炒制降低肝肾毒性的原因之一,以上研究结果表明蒺藜中螺甾皂苷的肝肾毒性主要与其 C₃ 位糖链有关。此外, Meng 等^[20]合成一系列具有 2,4-支链寡糖结构的薯蓣皂苷(螺甾皂苷),通过研究构效关系发现鼠李糖基团的数目和连接方式会影响薯蓣皂苷对 HepG2 细胞的毒性,由此推测,蒺藜皂苷 D 和 25R-tribulosin 的肝肾毒性大小与其 C₃ 位糖链所含糖的种类、数量和连接方式有关。可见,研究蒺藜螺甾皂苷 C₃ 位糖链与肝肾毒性的构效关系对进一步阐明其肝肾毒性的作用机制具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘晓敏,赵佳敏,兰嘉豪,等. 蒺藜果实化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4774-4779.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 377.
- [3] Talasz A H, Abbasi M R, Abkhiz S, et al. *Tribulus terrestris*-induced severe nephrotoxicity in a young healthy male [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(11): 3792-3793.
- [4] Ryan M, Lazar I, Nadasdy G M, et al. Acute kidney injury and hyperbilirubinemia in a young male after ingestion of *Tribulus terrestris* [J]. *Clin Nephrol*, 2015, 83(3): 177-183.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-9 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 741-745.
- [6] Sun X C, Song X, Guo F, et al. Terrestrosin D, a spirostanol saponin from *Tribulus terrestris* L. with potential hepatorenal toxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114716.
- [7] Nakayasu M, Kawasaki T, Lee H J, et al. Identification of furostanol glycoside 26-O-β-glucosidase involved in steroidal saponin biosynthesis from *Dioscorea esculenta* [J]. *Plant Biotechnol*, 2015, 32(4): 299-308.
- [8] 谭晓敏. 华重楼的呋甾皂苷及其在干燥过程的转化机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- [9] Yuan Y H, Liu K L, Wang S, et al. The stir-frying can reduce hepatorenal toxicity of *Fructus Tribuli* by inactivating β-glucosidase and inhibiting the conversion of furostanol saponins to spirostanol saponins [J]. *Arab J Chem*, 2022, 15(7): 103892.
- [10] 曲福舟,李欢欢,王运浩,等. 蒺藜炒制对长期给药大鼠肝肾毒性的影响 [J]. 山东中医杂志, 2016, 35(4): 347-349.
- [11] 向丽华,陈燕萍,张智,等. 24 味有毒中药长期毒性实验对大鼠脏器指数的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(1): 35-36.
- [12] 韩大勇,韩梅,杨利民,等. 蒺藜生长发育动态研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(5): 525-529.
- [13] 张素军. 蒺藜果实、茎叶不同采收期总皂苷含量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 80-81.
- [14] 杨莉,王国栋,韩梅. 蒺藜的活性成分积累和动态分布的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1186-1189.
- [15] Li Y, Tan C, Li Z H, et al. The genome of *Dioscorea zingiberensis* sheds light on the biosynthesis, origin and evolution of the medicinally important diosgenin saponins [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhac165.
- [16] Hagiwara A, Asakawa E, Kurata Y, et al. Dose-dependent renal tubular toxicity of harman and norharman in male F344 rats [J]. *Toxicol Pathol*, 1992, 20(2): 197-204.
- [17] Cruz M S, Cabral Barroso S, Navoni J A, et al. Effect of hecogenin on DNA instability [J]. *Toxicol Rep*, 2016, 3: 539-543.
- [18] Kim H J, Kim J C, Min J S, et al. Aqueous extract of *Tribulus terrestris* Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF-κB signaling in liver cancer cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136(1): 197-203.
- [19] 袁芮,苏彤,张超,等. 基于模拟炮制技术的蒺藜炒制过程中蒺藜皂苷 D 转化规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(14): 3049-3054.
- [20] Meng X, Pan Y W, Liu T, et al. Synthesis of novel diosgenyl saponin analogs and evaluation effects of rhamnose moiety on their cytotoxic activity [J]. *Carbohydr Res*, 2021, 506: 108359.

[责任编辑 李亚楠]