

• 药理与临床 •

基于代谢组学的黄芩配伍栀子降低肝毒性的作用机制研究

晋志楠¹, 刘宝月¹, 时昆¹, 吴怡锦², 刘海鑫¹, 李会芳^{1*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

摘要: 目的 探究黄芩配伍栀子后对正常大鼠肝毒性的影响及其潜在作用机制。方法 采用高效液相色谱法检测栀子单煎、栀子黄芩合煎对栀子苷溶出率的影响。SD 大鼠随机分为对照组、栀子 (5.6 g/kg) 组和栀子黄芩组, ig 栀子单煎液、栀子黄芩 (1:1) 合煎液 5 d 后, 检测大鼠肝功能指标并观察大鼠肝组织病理变化; 采用液质联用技术结合代谢组学方法, 对各组间筛选出的差异代谢物进行富集通路, 并对各组大鼠血清胆汁酸进行定量分析。结果 相较于栀子单煎, 栀子黄芩合煎后栀子苷溶出率降低。与对照组比较, 栀子组大鼠肝组织损伤严重, 血清肝功能指标水平显著升高 ($P < 0.01$)。配伍黄芩后, 大鼠肝组织病理损伤明显减轻, 肝功能指标水平显著降低 ($P < 0.01$), 表明黄芩配伍栀子能够有效改善肝脏病理损伤。共筛选出包括一磷酸腺苷、 α -酮戊二酸、牛磺鹅去氧胆酸、甘氨鹅去氧胆酸等 490 个潜在的差异代谢物, 主要涉及 FoxO 信号通路、胆固醇代谢等 9 条关键代谢通路。血清胆汁酸定量分析结果表明, 栀子组各初级胆汁酸、次级胆汁酸含量发生不同程度的变化, 结合型胆汁酸比例降低, 游离型胆汁酸比例升高。而配伍黄芩后, 胆汁酸比例失调得到明显改善, 胆汁酸稳态恢复。结论 黄芩配伍栀子能够通过降低毒性物质栀子苷的溶出, 影响 FoxO 信号通路、胆固醇代谢等胆汁酸代谢相关通路, 改善栀子导致的胆汁酸淤积, 恢复胆汁酸稳态, 发挥降低肝毒性的作用。

关键词: 栀子; 黄芩; 肝毒性; 代谢组学; 配伍减毒; 栀子苷; 胆汁酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)24-8988-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.24.012

Mechanism of *Scutellariae Radix* compatible with *Gardeniae Fructus* on reducing hepatotoxicity based on metabolomics

JIN Zhinan¹, LIU Baoyue¹, SHI Kun¹, WU Yijin², LIU Haixin¹, LI Huifang¹

1. College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To explore the effect and potential mechanisms of Huangqin (*Scutellariae Radix*, SR) combined with Zhizi (*Gardeniae Fructus*, GF) on liver toxicity in normal rats. **Methods** High performance liquid chromatography was used to detect the effect of GF single decoction and combined decoction of GF and SR on the dissolution rate of geniposide. SD rats were randomly divided into control group, GF (5.6 g/kg) group and GF-SR group. After 5 d of treatment with GF single decoction or GF-SR (1:1) decoction, liver function indicators were measured and pathological changes in liver tissue of rats were observed. Liquid chromatography-mass spectrometry technology combined with metabolomics methods were performed, the differential metabolites screened between groups were enriched in pathways, and the serum bile acids of rats in each group were quantitatively analyzed. **Results** Compared with GF single decoction, the dissolution rate of geniposide was decreased after the combined decoction of GF and SR. Compared with control group, rats in GF group had severe liver tissue damage and significantly increased serum liver function indicators ($P < 0.01$). After compatibility with SR, the pathological damage to liver tissue was significantly reduced, and the levels of

收稿日期: 2025-07-15

基金项目: 山西省基础研究计划基金资助项目 (202403021221197); 山西中医药大学科技创新团队基金资助项目 (2022TD1016); 山西中医药大学学科建设项目 (中药药理与毒理学)

作者简介: 晋志楠 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: jinzhinan@stu.sxtcm.edu.cn

*通信作者: 李会芳, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药药理及毒理学研究。Tel: 13453453836 E-mail: lihufangzy@sxtcm.edu.cn

liver function indicators were significantly decreased ($P < 0.01$), indicating that the combination of SR and GF could effectively improve liver pathological damage. A total of 490 potential differential metabolites were screened among the three groups, including adenosine monophosphate, α -ketoglutaric acid, taurochenodeoxycholic acid, glycine chenodeoxycholate, etc., mainly involving nine key metabolic pathways related to FoxO signaling pathway and cholesterol metabolism. The quantitative analysis of serum bile acids showed that the contents of primary and secondary bile acids in GF group changed to varying degrees, with a decrease in the proportion of bound bile acids and an increase in the proportion of free bile acids. After compatibility with SR, the imbalance of bile acid ratio was significantly improved, and the bile acid homeostasis was restored. **Conclusion** The combination of SR and GF can reduce the dissolution of toxic substances geniposide, and affecting bile acid metabolic-related pathways such as the FoxO signaling pathway and cholesterol metabolism, improve bile acid accumulation caused by GF, restore bile acid homeostasis, and play a role in reducing liver toxicity.

Key words: *Gardeniae Fructus; Scutellariae Radix; hepatotoxicity; metabolomics; compatibility attenuation; geniposide; bile acids*

梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides*

Ellis 的干燥成熟果实, 具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒的功效, 主治湿热黄疸、热病心烦及淋证涩痛等证^[1], 被国家卫生健康委员会列入第一批药食两用资源, 临床应用广泛。作为一味传统的保肝利胆中药, 梔子中的环烯醚萜类成分(以梔子苷为首)被证实在发挥肝保护作用、降血糖、抗抑郁等生物活性方面效果显著^[2-4]。然而, 越来越多的研究表明, 梔子苷是梔子导致肝损伤的主要物质基础, 梔子苷的体内代谢产物京尼平则是梔子苷发挥体内毒性的直接物质基础^[5-6], 极大地影响了梔子的临床应用及开发。有研究表明, 梔子苷在 28~100 mg/kg 剂量下显现出良好的肝脏保护作用, 当剂量超过 180 mg/kg(折合梔子生药量约 55 g/d)连续给药 14 d 会对大鼠造成明显的肝损伤^[7-8]。提示梔子对肝脏既具有保护作用, 同时也会导致肝毒性的双向作用。

目前关于梔子肝毒性的机制研究已经十分广泛, 主要包括胆汁酸稳态失衡、肝药酶代谢异常、氧化应激、细胞凋亡及京尼平二醛的共价结合反应^[9-13]。其中, 胆汁酸稳态失衡会导致胆汁酸及其结合胆汁盐在肝细胞和血中聚集, 高水平的胆汁酸可直接干扰线粒体功能或导致细胞死亡, 进而诱导细胞凋亡, 造成严重的肝损伤^[14]。刘毓等^[15]研究表明, 400 mg/kg 梔子苷会导致血清总胆汁酸(total bile acid, TBA)含量显著上升。Tian 等^[16]研究表明, 300 mg/kg 梔子苷给药后, 可显著升高胆汁酸合成限速酶胆固醇 7 α -羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1) mRNA 的表达, 下调胆汁酸转运蛋白法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)、胆盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)的表达, 阻碍胆汁酸排泄。而胆汁酸在肝脏中淤积会进一步导致线粒体发生损伤, 激活活性氧、活性

氮物质以诱导肝脏损伤。

中药配伍是中医药临床用药的特色, 通过合理的配伍, 调其偏性, 纠其毒性, 保障中药临床用药的有效性及安全性^[17]。梔子-黄芩为临床常用的药对, 在黄连解毒汤、龙胆泻肝汤等传统方剂中均有配伍体现。《中国药典》2020 年版中收录的 109 种含梔子的中成药中, 联用频率最高的药味便是黄芩(82 次), 并且其中的 52% 采用 1:1 的配伍比例^[18]。现代药理学研究多围绕梔子-黄芩配伍增效为主开展^[19], 但对于两药合用减毒的研究却鲜有报道。近年来, 代谢组学在探究中药配伍减毒机制方面发挥着重要作用^[20]。因此, 本研究通过比较大鼠给药梔子、梔子-黄芩后的肝毒性, 评价梔子配伍黄芩的减毒效果; 采用代谢组学分析血清中胆汁酸谱, 初步阐明黄芩调控胆汁酸代谢减轻梔子肝毒性的机制, 为临床合理应用梔子提供理论依据, 并丰富中药配伍减毒的科学内涵。

1 材料

1.1 动物

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 180~200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2021-0011。动物于实验前适应性饲养 7 d, 12 h 光照/12 h 黑暗, 温度(22±2)℃, 相对湿度(55±2)℃, 自由进饮水。动物实验符合实验动物饲料和使用指导原则, 并经山西中医药大学伦理委员会批准(批准号 AWE202407372)。

1.2 药材

梔子(批号 230201)、黄芩(批号 230202)购自山西元和堂中药有限公司, 经山西中医药大学裴香萍教授鉴定分别为茜草科植物梔子 *G. jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

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)、TBA 试剂盒 (批号分别为 C009-2-1、C010-2-1、E003-2-1) 均购自南京建成生物工程研究所; 对照品胆酸 (cholic acid, CA, 批号 T16J8Q28663, 质量分数 $\geq 98\%$)、鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA, 批号 M22IB209864, 质量分数 $\geq 98\%$)、甘氨鹅脱氧胆酸钠盐 (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA, 批号 D31GS173027, 97%)、甘氨胆酸 (glycocholic acid, GCA, 批号 JB250354, 质量分数 $\geq 98\%$)、牛磺胆酸钠盐 (taurocholic acid, TCA, 批号 KT35106A, 质量分数为 98%)、石胆酸 (lithocholic acid, LCA, 批号 O12HB197383, 质量分数 $\geq 98\%$)、熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA, 批号 KB373700, 质量分数 $\geq 98\%$)、甘氨脱氧胆酸 (glycodeoxycholic acid, GDCA, 批号 J28HB186197, 质量分数 $\geq 98\%$)、牛磺猪去氧胆酸 (taurohyodeoxycholic acid, THDCA, 批号 B16A10K94146, 质量分数 $\geq 98\%$) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品 α -鼠胆酸 (α -muricholic acid, α -MCA, 批号 23B519-A1, 质量分数为 98.59%)、 β -鼠胆酸 (β -muricholic acid, β -MCA, 批号 23B421-A1, 质量分数为 99.7%)、异鹅去氧胆酸 (isochenodeoxycholic acid, isoCDCA, 批号 24F054-U6, 质量分数 $\geq 95\%$)、牛磺- α -鼠胆酸 (tauro- α -muricholic acid, T- α -MCA, 批号 22B376-A1, 质量分数 99.79%)、牛磺- β -鼠胆酸 (tauro- β -muricholic acid, T- β -MCA, 批号 23F027-W1, 质量分数 $\geq 95\%$)、牛磺- ω -鼠胆酸 (tauro- ω -muricholic acid, T- ω -MCA, 批号 23F027-V1, 质量分数 $\geq 95\%$)、3 β -熊去氧胆酸 (3 β -ursodeoxycholic acid, β -UDCA, 批号 21A011-L3, 质量分数为 98.14%)、猪去氧胆酸 (hyodeoxycholic acid, HDCA, 批号 24B854-H1, 质量分数为 96%)、6,7-二酮石胆酸 (6,7-diketolithocholic acid, 6,7-diketo LCA, 批号 25B931-A1, 质量分数 $> 99\%$)、牛磺猪胆酸 (taurohyocholic acid, THCA, 批号 24F106-D4, 质量分数 $\geq 95\%$)、7,12-二酮石胆酸 (7,12-diketolithocholic acid, 7,12-diketo LCA, 批号 22B353-A1, 质量分数 $\geq 95\%$) 均购自上海甄准生物科技有限公司; 对照品别胆酸 (allocholic acid, ACA, 批号 1-GAC-52-1, 质量分数 $> 95\%$)、熊果胆酸 (ursocholic acid, UCA, 批号

11-JOB-76-1, 质量分数 $> 95\%$) 均购自加拿大 TRC 公司; 对照品牛磺鹅去氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid, TCDCA, 批号 T860645, 质量分数为 99.5%)、牛磺脱氧胆酸 (taurodeoxycholic acid, TDCA, 批号 T835753, 质量分数为 97%) 均购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 去氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA) 对照品 (批号 D2510, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自美国 Sigma 公司; 牛磺熊去氧胆酸 (tauoursodeoxycholic acid, TUDCA) 对照品 (批号 110816-202110, 质量分数为 92.8%) 购自中国食品药品检定研究院; 猪胆酸 (hyocholic acid, HCA) 对照品 (批号 CCAD303456, 质量分数 $> 95\%$) 购自 CATO 公司; 甘氨酸- β -鼠胆酸 (glycine- β -muricholic acid, Gly-MCA) 对照品 (批号 HY-114392, 质量分数为 99.95%) 购自美国 MCE 公司; 桔子苷对照品 (批号 JB264069, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司; 色谱级甲醇 (批号 W30K936) 购自美国 Thermo 公司; 色谱级乙腈 (批号 250218001) 购自美国 GRACE 公司。

1.4 仪器

Epoch 型酶标检测仪 (美国伯腾仪器有限公司); AK-RO-C2 型实验室超纯水机 (美国艾肯公司); HY-2508III 型石蜡切片机 (金华市惠友仪器设备有限公司); JY-BMB 型石蜡包埋机、JY-TSF 型组织脱水机 (湖北锦源医疗科技有限公司); JA1003 型电子天平 (上海浦春计量仪器有限公司); OSB-2200 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); Vanquish 型液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120 型质谱仪 (美国 Thermo 公司); H1850-R 型高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 桔子单煎液的制备 称量桔子饮片 200 g, 加 10 倍量水浸泡 30 min 后, 煎煮 30 min, 药渣再加 8 倍量水煎煮 30 min; 合并 2 次煎煮液, 滤过, 浓缩至生药质量浓度为 0.56 g/mL 即得桔子单煎液。

2.1.2 桔子黄芩合煎液的制备 称量桔子饮片 200 g 及黄芩饮片 200 g, 提取工艺同 “2.1.1” 项, 滤过, 浓缩至桔子、黄芩质量浓度分别为 0.56 g/mL 即得桔子黄芩合煎液。

2.2 桔子单煎、桔子黄芩合煎对桔子苷溶出率的测定

2.2.1 色谱条件 Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱

柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流动相为乙腈-水 (15:85), 等度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长 238 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定栀子苷对照品适量, 加甲醇制成 30 μ g/mL 的溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.1”项下栀子单煎液、栀子黄芩合煎液 100 mL, 置于冷冻盘中, -80 $^{\circ}$ C 预冻过夜。次日置于冻干机冷冻干燥 24 h, 精密称定冻干粉质量, 计算得率。取冻干粉 50 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶, 加入甲醇 20 mL, 超声 30 min 后放至常温, 加甲醇定容至刻度, 摆匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 作为供试品溶液。

2.2.4 方法学考察

(1) 线性关系考察: 将栀子苷对照品溶液稀释 10 倍, 得到质量浓度为 3 μ g/mL 的对照品溶液。精密吸取 1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μ L, 按照“2.2.1”项下方法进行测定, 重复 3 次, 记录出峰时间以及峰面积积分值。

(2) 精密度试验: 精密吸取稀释后的栀子苷对照品溶液 10.0 μ L, 按照“2.2.1”项下方法连续进样 6 次, 记录峰面积积分值并计算 RSD 值。

(3) 稳定性试验: 精密吸取供试品溶液, 分别在制备后的第 0、2、4、8、12、24 小时, 按照“2.2.1”项下方法测定峰面积积分值并计算 RSD 值。

(4) 重复性试验: 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份栀子单煎液供试品, 按照“2.2.1”项下方法分别进行测定, 记录峰面积积分值并计算 RSD 值。

(5) 加样回收率试验: 精密称定已知含量的供试品粉末 6 份, 每份 5 mg。分别精密加入与栀子苷含量相等的对照品粉末, 按照“2.2.3”项下方法制备, 按照“2.2.1”项下方法测定, 计算加样回收率和平均 RSD 值。

2.3 动物分组与给药

将 30 只大鼠随机分为对照组、栀子 (5.6 g/kg) 组和栀子黄芩组 (栀子-黄芩 1:1 配伍), 每组 10 只。对照组给予等体积的纯水, 栀子组给予栀子单煎液, 栀子黄芩组给予栀子黄芩合煎液。每天 ig 给药 1 次, 连续给药 5 d。

2.4 取材

2.4.1 血清样本收集与处理 末次给药后, 禁食不禁水 16 h, ip 戊巴比妥钠生理盐水溶液麻醉, 腹主动脉取血, 静置 2 h 后于 4 $^{\circ}$ C、3 500 r/min 离心 20 min, 取上清, 置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

2.4.2 肝组织收集与处理 取肝脏组织, 部分于 4% 多聚甲醛固定, 剩余肝脏组织液氮速冻后转移至-80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存, 备用。

2.5 检测指标

2.5.1 生化指标检测 按照试剂盒说明书测定各组大鼠血清肝功能指标 (ALT、AST、TBA)。

2.5.2 肝脏组织病理学检测 肝脏组织置于 4% 多聚甲醛固定后脱水, 石蜡包埋, 冷却后切片, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.6 血清非靶向代谢组学分析

2.6.1 代谢物提取 将实验样本于 4 $^{\circ}$ C 解冻, 解冻后样本涡旋 1 min, 混合均匀; 精确移取适量样本于 2 mL 离心管中, 加 400 μ L 甲醇溶液, 涡旋 1 min; 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 转移至新的 2 mL 离心管中, 浓缩干燥; 准确加入 150 μ L 80% 甲醇水溶液配制的 2-氯-L-苯丙氨酸 (4 mg/L) 溶液复溶样品, 取上清液, 经 0.22 μ m 滤膜滤过, 滤液加入到检测瓶中, 用于 LC-MS 检测。

2.6.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC[®] HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 体积流量为 0.3 mL/min, 进样量为 2 μ L。正离子模式, 流动相为 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B1) -0.1% 甲酸水溶液 (A1), 梯度洗脱: 0~1 min, 8% B1; 1~8 min, 8%~98% B1; 8~10 min, 98% B1; 10~10.1 min, 98%~8% B1; 10.1~12 min, 8% B1。负离子模式, 流动相为乙腈 (B2) -5 mmol/L 甲酸铵水溶液 (A2), 梯度洗脱: 0~1 min, 8% B2; 1~8 min, 8%~98% B2; 8~10 min, 98% B2; 10~10.1 min, 98%~8% B2; 10.1~12 min, 8% B2。

2.6.3 质谱条件 电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 源, 检测模式分别为 ESI⁺、ESI⁻; 离子源电压分别为 +3.5 kV、-2.5 kV; 扫描范围 *m/z* 100~1 000; 鞘气压力为 40 arb, 辅助气压力为 10 arb; 毛细管温度 325 $^{\circ}$ C。一级全扫描的分辨率为 60 000, 以 *m/z* 100~1 000 作为一级离子扫描范围。二级裂解使用高能碰撞解离 (high-energy collision dissociation, HCD), 碰撞能量为 30%, 二级分辨率为 15 000。

2.7 血清胆汁酸代谢组学分析

2.7.1 色谱条件 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为 0.01% 甲酸水溶液 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~

4 min, 25% B; 4~9 min, 25%~30% B; 9~14 min, 30%~36% B; 14~18 min, 36%~38% B; 18~24 min, 38%~50% B; 24~32 min, 50%~75% B; 32~33 min, 75%~90% B; 33~35.5 min, 90%~25% B。体积流量为 0.25 mL/min, 进样量为 5 μ L, 柱温为 40 $^{\circ}$ C。

2.7.2 质谱条件 ESI 离子源, 负离子检测模式, 离子源温度 500 $^{\circ}$ C, 离子源电压-4 500 V, 碰撞气压力 6 psi (1 psi=6.895 kPa), 气帘气压力 30 psi, 雾化器和辅助气压力均为 50 psi, 采用多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 进行扫描。

2.7.3 溶液配制

(1) 对照品溶液配制: 准确称取各胆汁酸对照

品, 加甲醇配制成终质量浓度为 1 000 μ g/mL 的混合对照品母液, 用 30% 甲醇稀释到 10 个标准曲线点。各储备液及工作标准溶液均保存于-20 $^{\circ}$ C。

(2) 代谢物提取: 取适量样本于 2 mL 离心管中, 精确加入 600 μ L 甲醇, 漩涡振荡 60 s; 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取 400 μ L 上清液用真空浓缩仪浓缩至尽干。加入 100 μ L 30% 甲醇复溶样品, 取适量上清液, 加入 30% 甲醇稀释 20 倍, 上清液过 0.22 μ m 滤膜, 滤液加入到检测瓶中。

(3) 标准曲线绘制: 标准液的浓度系列经检测后, 以胆汁酸对照品质量浓度为横坐标, 对照品峰面积或对照品与内标的峰面积比值为纵坐标, 构建标准曲线, 得到各胆汁酸的线性回归方程 (表 1)。

表 1 28 种胆汁酸线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of 28 bile acids

胆汁酸	线性回归方程	胆汁酸	线性回归方程
CA	$y=8.727 \times 10^5 x + 1.594 \times 10^4$	T- α -MCA	$y=5.866 \times 10^4 x + 5.595$
CDCA	$y=5.188 \times 10^6 x + 1.798 \times 10^5$	β -UDCA	$y=3.360 \times 10^5 x + 396.4$
GCDCA	$y=3.274 \times 10^4 x - 760.8$	HDCA	$y=3.768 \times 10^5 x + 6.561$
GCA	$y=2.163 \times 10^4 x + 868.4$	6,7-diketo LCA	$y=2.985 \times 10^5 x - 1.242 \times 10^4$
TCA	$y=1.899 \times 10^4 x - 400.8$	THCA	$y=3.921 \times 10^4 x - 969.4$
LCA	$y=3.253 \times 10^5 x - 4.754 \times 10^4$	7,12-diketo LCA	$y=5.705 \times 10^4 x + 4.511$
UDCA	$y=2.462 \times 10^4 x + 246.3$	ACA	$y=1.631 \times 10^6 x + 2.091 \times 10^4$
GDCA	$y=2.694 \times 10^4 x - 583.5$	UCA	$y=7.331 \times 10^5 x + 1.964$
THDCA	$y=7.773 x - 1.327$	TCDCA	$y=2.539 \times 10^4 x - 3.593$
α -MCA	$y=5.069 \times 10^5 x + 5.208 \times 10^4$	TDCA	$y=1.746 \times 10^4 x - 648.5$
β -MCA	$y=5.062 \times 10^5 x + 5.182 \times 10^4$	DCA	$y=8.062 \times 10^5 x - 7.521 \times 10^4$
isoCDCA	$y=5.084 \times 10^5 x - 1.225 \times 10^4$	TUDCA	$y=7.773 x - 1.327$
T- α -MCA	$y=7.440 x - 1.842$	HCA	$y=1.113 \times 10^6 x + 8.293 \times 10^4$
T- β -MCA	$y=1.660 \times 10^4 x + 1.847$	Gly-MCA	$y=3.458 \times 10^4 x + 1.009 \times 10^4$

(4) 定量计算: 根据胆汁酸线性回归方程, 对各组样品进行定量计算。

2.8 数据处理

采用 Proteowizard 软件包 (v3.0.8789) 中 MSConvert 工具将原始质谱下机文件转换为 mzXML 文件格式。采用 R XCMS (v3.12.0) 软件包进行峰检测、峰过滤、峰对齐处理, 得到代谢物定量列表。采用 R 软件包 Ropls, 分别对样本数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 降维分析。用置换检验方法对模型进行过拟合检验。OPLS-DA 模型用于分析对照组、栀子组、栀子黄芩组间的差异, 从而寻找潜在的生物标志物。计算 *P* 值、变量投影重要度 (variable importance in projection, VIP) 和组间差异倍数 (fold change, FC), 筛选差异代谢物。当 *P*<0.05 和 VIP>1 时, 认为代

谢物具有统计学显著差异。采用 MetaboAnalyst 软件包对筛选出来的差异代谢物进行功能通路富集和拓扑学分析。采用 KEGG Mapper 可视化工具对富集到的通路进行差异代谢物与通路图的可视化。

2.9 统计学分析

数据使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 栀子单煎、栀子黄芩合煎对栀子苷溶出率的影响

3.1.1 方法学考察

(1) 线性关系考察: 按照“2.2.1”项下方法进行测定, 以栀子苷进样量为横坐标 (*x*), 峰面积积分值为纵坐标 (*y*) 绘制标准曲线, 计算线性方程为 $y=1.294 x - 22.641$, 相关系数 (R^2) 为 1, 线性范围为 0.03~0.60 μ g, 表明其具有良好的线性关系。

(2) 精密度试验: 结果显示, 栀子苷峰面积的

RSD 值为 0.39%，小于 3%，表明该仪器具有良好的精密度。

(3) 稳定性试验：结果显示，栀子苷峰面积的 RSD 值为 0.25%，表明供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

(4) 重复性试验：结果显示，栀子苷峰面积的 RSD 值为 0.82%，表明该方法具有良好的重复性。

(5) 加样回收率试验：结果显示，6 份栀子苷样品的加样回收率分别为 98.8%、96.6%、96.1%、97.6%、97.7%、98.7%，平均加样回收率为 97.58%，RSD 值为 0.14%，表明回收率良好。

3.1.2 栀子苷溶出率测定 分别平行制备 3 份供试品溶液（栀子单煎液、栀子黄芩合煎液），按“2.2.1”项下色谱条件进行检测，色谱图见图 1，将测得峰面积代入标准曲线计算栀子苷溶出率，结果见表 2。

3.2 栀子与黄芩配伍对大鼠肝功能指标的影响

如图 2 所示，与对照组比较，栀子组大鼠血清中 ALT、AST 活性及 TBA 水平均显著升高 ($P < 0.01$)，表明栀子会导致大鼠体内明显的肝损伤；与栀子组比较，栀子黄芩组大鼠血清中 ALT、AST 活性及 TBA 水平显著降低 ($P < 0.01$)，表明黄芩的配伍能够明显改善栀子导致的肝功能指标异常升高。

3.3 栀子与黄芩配伍对大鼠肝脏组织病理变化的影响

如图 3 所示，对照组大鼠肝细胞结构正常，肝窦未见明显挤压或扩张，汇管区未见明显异常，未见明显炎性细胞浸润。栀子组肝脏组织肝小叶结构不清，肝细胞排列不规则，可见较多灶性坏死。肝

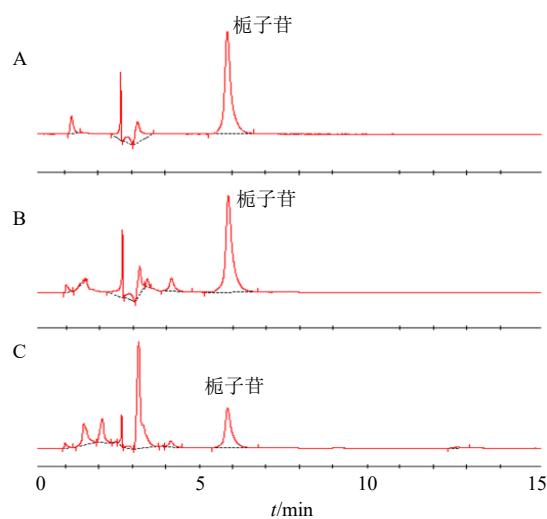


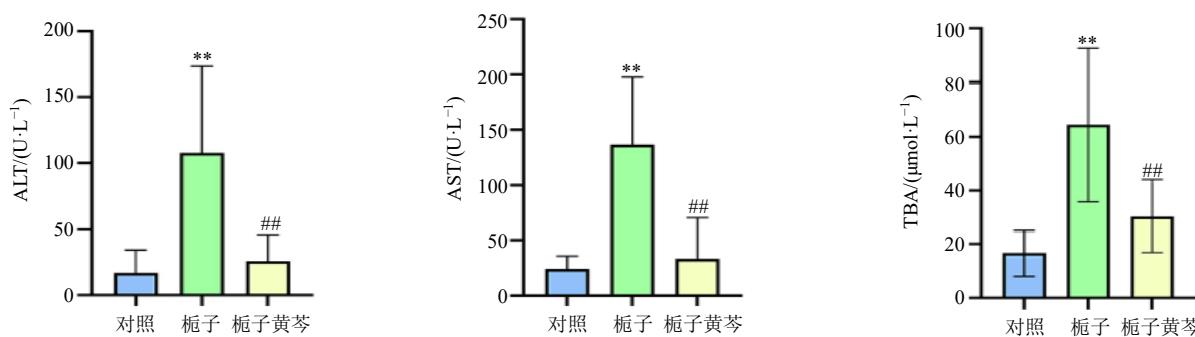
图 1 栀子苷对照品 (A) 与栀子单煎液 (B)、栀子黄芩合煎液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of geniposide reference standard (A), *Gardeniae Fructus* single decoction (B) and *Gardeniae Fructus-Scutellariae Radix* combined decoction(C)

表 2 栀子单煎、栀子黄芩合煎对栀子苷溶出率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of *Gardeniae Fructus* single decoction and *Gardeniae Fructus-Scutellariae Radix* combined decoction on dissolution rate of geniposide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	栀子苷溶出率/%	平均值/%	RSD/%
单煎1	2.60	2.670 ± 0.148	0.82
单煎2	2.84		
单煎3	2.57		
合煎1	2.05	2.110 ± 0.060	2.04
合煎2	2.17		
合煎3	2.11		



与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与栀子组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ，图 9~11 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs *Gardeniae Fructus* group, same as Figs. 9—11.

图 2 栀子与黄芩配伍对大鼠血清中 ALT、AST 活性及 TBA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of combination of *Gardeniae Fructus* and *Scutellariae Radix* on activities of ALT, AST and level of TBA in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

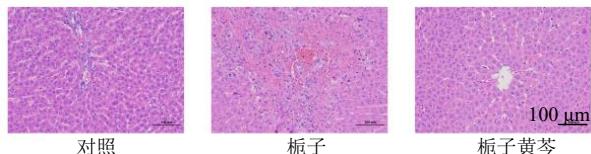


图3 梔子与黄芩配伍对大鼠肝脏组织病理变化的影响
(HE, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of combination of *Gardeniae Fructus* and *Scutellariae Radix* on pathological changes in liver tissue of rats (HE, $\times 100$)

细胞结构不清,胞核碎裂或溶解、胞质崩解嗜酸性增强,周围可见少量散在出血,出现较多胆管增生及较多血管于瘀血。梔子黄芩组肝细胞偶见轻度水

肿,胞质疏松淡染,其中偶见肝窦轻度扩张,胞体内圆形空泡减少,未见明显炎性细胞浸润。表明黄芩能够明显改善梔子导致的肝脏病理组织形态。

3.4 血清代谢组学分析

3.4.1 PCA PCA 得分图能够直观地观察样本之间的总体分布趋势。样本分布点越靠近,说明这些样本的组成与浓度越接近;反之,样本点越远离,其差异越大。如图 4 所示,在正、负离子模式下,对照组、梔子组与梔子黄芩组间可观察到较为明显的分离趋势,表明 PCA 模型可靠。为了观察各组大鼠血清代谢样本的分布趋势,进一步通过 OPLS-DA 模型进行验证。

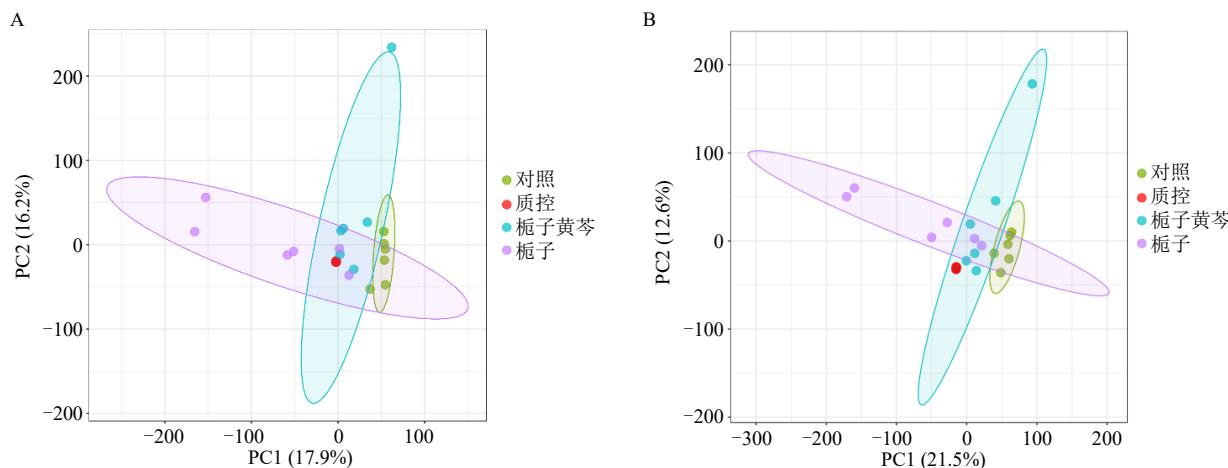


图4 正 (A)、负 (B) 离子模式下各组血清样本 PCA 得分图
Fig. 4 PCA plots of serum samples in each group under positive (A) and negative (B) ion modes

3.4.2 OPLS-DA 为突出组间差异,更好地寻找其差异代谢物,采用 OPLS-DA 对数据进行分析。VIP 值反映代谢物对分组的贡献大小,当某个变量的 VIP 值 > 1 时,通常将该变量作为潜在生物标记物。为降低假阳性风险,将 $|P(\text{corr})| \geq 0.5$ 作为与 OPLS-DA 模型判别分数最相关的变量。横坐标表示第 1 主成分解释度,纵坐标表示第 2 主成分解释度,每个散点代表 1 个样本,不同散点形状与颜色代表不同分组。样本间横向距离越远代表各组间差异越明显,纵向距离越近代表组内样本差异越小,结果越好。如图 5-A、B 所示,对照组与梔子组、梔子组与梔子黄芩组均完全分开,表明 OPLS-DA 模型具有良好的解释能力。对各组样本进行 200 次置换检验分析,结果见图 5-C、D,所有 R^2 和 Q^2 点均低于右上方原始 R^2 、 Q^2 点, Q^2 的回归线与纵轴相交于原点以下,说明该模型可靠,预测性较好,可进行

下一步差异代谢物的筛选。

3.4.3 潜在差异代谢物的筛选与鉴定 在 OPLS-DA 模型基础上,以 VIP 值 > 1 且 $P < 0.05$ 作为筛选条件进一步进行差异代谢物的筛选,将 ESI⁺与 ESI⁻模式下分析出的代谢物进一步分析鉴定其结构式,以探究梔子及梔子黄芩配伍对大鼠血清内源性代谢物的影响。如图 6 所示,与对照组相比,梔子组有 961 个上调的差异代谢物与 378 个下调的差异代谢物;而与梔子组相比,梔子黄芩组有 245 个上调的差异代谢物与 596 个下调的差异代谢物;3 组间筛选出 490 个共同的差异代谢物(表 3 仅展示通路富集所涉及的 30 个共同差异代谢物信息)。

3.4.4 差异代谢物的层次聚类分析 对筛选出的差异代谢物进行聚类分析,并以热图形式展示(图 7)。每行代表同一差异代谢物在不同组别样本中的表达情况,每列表示单个样本中所有差异代谢物的

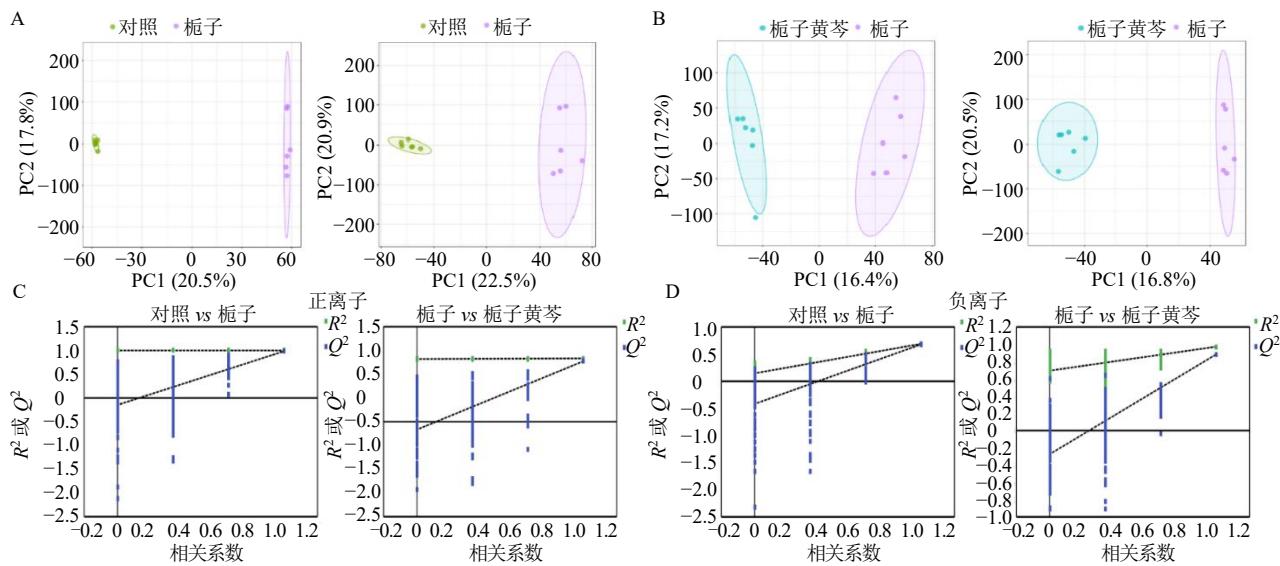


图5 正、负离子模式下各组 OPLS-DA 得分图 (A、B) 及 200 次置换检验图 (C、D)

Fig. 5 OPLS-DA score plots (A, B) and 200-time permutation test plots (C, D) for each group in positive and negative ion modes

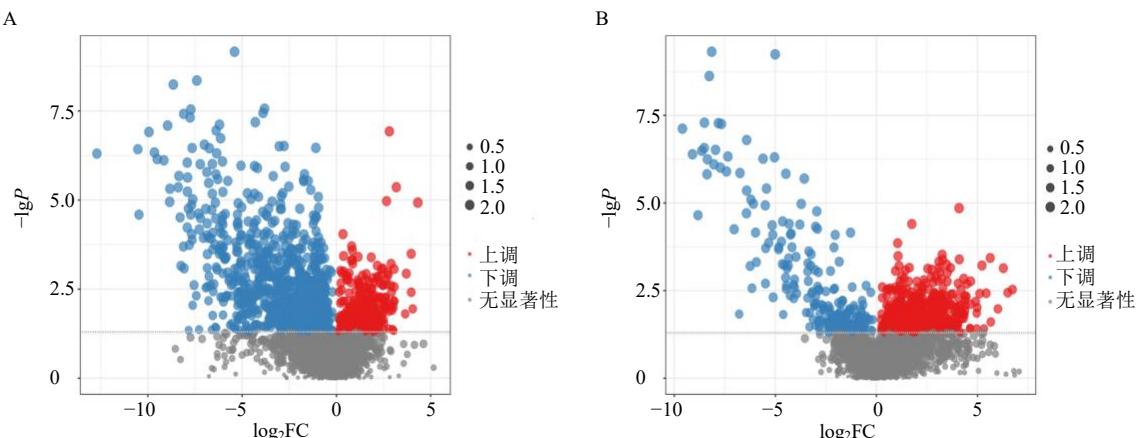


图6 对照组 vs. 桔子组 (A)、桔子组 vs. 桔子黄芩组 (B) 的火山图

Fig. 6 Volcano plots of control group vs. *Gardeniae Fructus* group (A) and *Gardeniae Fructus* group vs. *Gardeniae Fructus-Scutellariae Radix* group (B)

表达情况。差异代谢物含量大小通过颜色的不同来显示,颜色越红表达量越高,越蓝表达量越低。结果表明,对照组、桔子组与桔子黄芩组3组间不同差异代谢物表达情况有显著区别($P<0.05$)。

3.4.5 差差异代谢物的通路分析 将获得的差异代谢物输入 MetaboAnalyst 5.0 在线数据库,依次查看差异代谢物在 KEGG 数据库中所对应的靶点。如图 8 所示,对照组与桔子组、桔子组与桔子黄芩组之间共有的代谢通路有 9 条,主要涉及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、精氨酸生物合成、胆固醇代谢、癌症中的胆碱代谢、免疫球蛋白 E 高亲和力受体 (IgE high affinity receptor, FcεRI) 信号通路、叉头

框蛋白 O (forkhead box protein O, FoxO) 信号通路、GABA 能突触 (gamma-aminobutyric acid, GABA)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路、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。提示黄芩可能主要通过影响以上 9 条关键代谢通路发挥减轻桔子的肝毒性作用。其中,胆固醇代谢、FoxO 信号通路途径的差异及代谢通路影响值在组间两两比较中均较大,结合现有文献研究表明桔子肝毒性机制与胆汁酸代谢紊乱有关,提示黄芩的配伍可能通过干预胆汁酸代谢相关途径减轻桔子导致的肝损伤。

表3 对照组 vs 桔子组、桔子组 vs 桔子黄芩组的差异代谢物

Table 3 Different metabolites in control group vs *Gardeniae Fructus* group and *Gardeniae Fructus* group vs *Gardeniae Fructus-Scutellariae Radix* group

编号	tr/s	代谢物	对照组vs桔子组			桔子组vs桔子黄芩组			分子式	m/z	桔子组vs 对照组		离子 模式	
			VIP	P	FC	VIP	P	FC			桔子组vs 桔子组	桔子黄芩 组vs桔子组		
1	43.0	一磷酸腺苷	1.78	0.002	0.07	1.62	0.019	6.65	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	406.072	2	↑	↓	负离子
2	71.7	O-乙酰-L-丝氨酸	1.92	<0.001	0.51	1.59	0.024	1.39	$C_5H_9NO_4$	128.035	8	↑	↓	负离子
3	42.8	α -酮戊二酸	1.73	0.003	0.47	2.00	0.001	2.37	$C_5H_6O_5$	145.015	0	↑	↓	负离子
4	252.3	氨甲酰磷酸	1.26	0.034	0.07	1.43	0.045	13.60	CH_4NO_5P	199.996	9	↑	↓	负离子
5	73.0	1-吡咯啉-5-羧酸	1.33	0.037	3.94	1.34	0.038	0.45	$C_5H_7NO_2$	114.055	5	↓	↑	正离子
6	398.5	TCDC	1.38	0.030	0.21	1.75	0.016	7.22	$C_{26}H_{45}NO_5S$	517.336	9	↑	↓	正离子
7	427.7	GCDCA	1.74	0.002	0.03	1.64	0.028	8.97	$C_{26}H_{43}NO_5$	432.311	0	↑	↓	正离子
8	47.6	瓜氨酸	2.03	<0.001	7.04	2.03	0.007	0.12	$C_6H_{13}N_3O_3$	174.089	1	↓	↑	负离子
9	322.0	白三烯E ₄	1.84	<0.001	0.05	1.93	0.004	7.25	$C_{23}H_{37}NO_5S$	484.232	8	↑	↓	负离子
10	454.9	磷脂酰胆碱[16:1(9Z)/18:1(9Z)]	1.49	0.017	5.27	1.52	0.046	0.27	$C_{42}H_{80}NO_8P$	758.562	6	↓	↑	正离子
11	417.0	C17-鞘氨醇	1.89	<0.001	0.65	1.61	0.028	1.30	$C_{17}H_{37}NO_2$	288.291	1	↑	↓	正离子
12	188.3	邻羟基苯乙酸	1.34	0.022	0.69	1.49	0.043	1.53	$C_8H_8O_3$	151.040	9	↑	↓	负离子
13	54.2	尿嘧啶	1.87	<0.001	0.63	1.89	0.005	1.43	$C_4H_4N_2O_2$	111.020	5	↑	↓	负离子
14	229.3	泛硫醇	1.33	0.037	0.76	1.55	0.045	1.58	$C_{11}H_{22}N_2O_4S$	259.109	7	↑	↓	负离子
15	87.9	D-4'-磷酸泛酸盐	1.98	<0.001	0.04	1.85	0.006	6.10	$C_9H_{18}NO_8P$	280.060	9	↑	↓	负离子
16	77.4	二甲基砜	2.07	<0.001	0.14	1.75	0.013	2.19	$C_2H_6O_2S$	133.105	8	↑	↓	正离子
17	52.4	S-硫烷基谷胱甘肽	2.03	<0.001	0.01	1.64	0.015	4.09	$C_{10}H_{17}N_3O_6S_2$	320.034	2	↑	↓	负离子
18	261.0	5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖核苷酸	1.54	0.009	0.12	1.77	0.012	7.31	$C_9H_{15}N_4O_8P$	675.124	2	↑	↓	负离子
19	214.5	3-脱氢奎尼酸	2.16	<0.001	0.01	1.64	0.024	5.43	$C_7H_{10}O_6$	191.053	9	↑	↓	正离子
20	110.6	L-高苯丙氨酸	1.45	0.021	0.14	1.93	0.004	12.84	$C_{10}H_{13}NO_2$	180.102	6	↑	↓	正离子
21	506.6	13-酮-9Z,11E-十八碳二烯酸	1.32	0.038	0.22	1.60	0.046	4.87	$C_{18}H_{30}O_3$	295.227	3	↑	↓	正离子
22	179.2	消旋甲硫氨酸	1.89	<0.001	0.34	1.64	0.013	2.32	$C_5H_{11}NO_2S$	150.057	6	↑	↓	正离子
23	343.8	3,4-二羟基苯基乙二醇	2.14	<0.001	0.01	1.68	0.020	5.32	$C_8H_{10}O_4$	171.064	2	↑	↓	正离子
24	45.5	2-氨基己二酸	1.42	0.013	0.56	1.41	0.046	1.54	$C_6H_{11}NO_4$	160.062	2	↑	↓	负离子
25	48.6	尿酸	1.42	0.009	1.59	1.47	0.031	0.22	$C_5H_4N_4O_3$	167.022	0	↓	↑	负离子
26	526.4	硬脂二烯酸	1.53	0.024	0.53	1.58	0.037	1.70	$C_{18}H_{28}O_2$	277.217	0	↑	↓	正离子
27	42.0	(R)-5-二磷酸甲羟戊酸	1.81	<0.001	0.07	2.03	<0.001	8.56	$C_6H_{14}O_{10}P_2$	306.998	4	↑	↓	负离子
28	374.4	硫酸孕烯醇酮	1.38	0.022	0.45	1.54	0.041	2.04	$C_{21}H_{32}O_5S$	395.190	7	↑	↓	负离子
29	362.5	十四酸	1.76	0.002	0.44	1.54	0.040	1.64	$C_{14}H_{28}O_2$	246.243	9	↑	↓	正离子
30	376.6	胆红素	1.66	0.004	0.13	1.63	0.024	4.82	$C_{33}H_{36}N_4O_6$	583.253	0	↑	↓	负离子

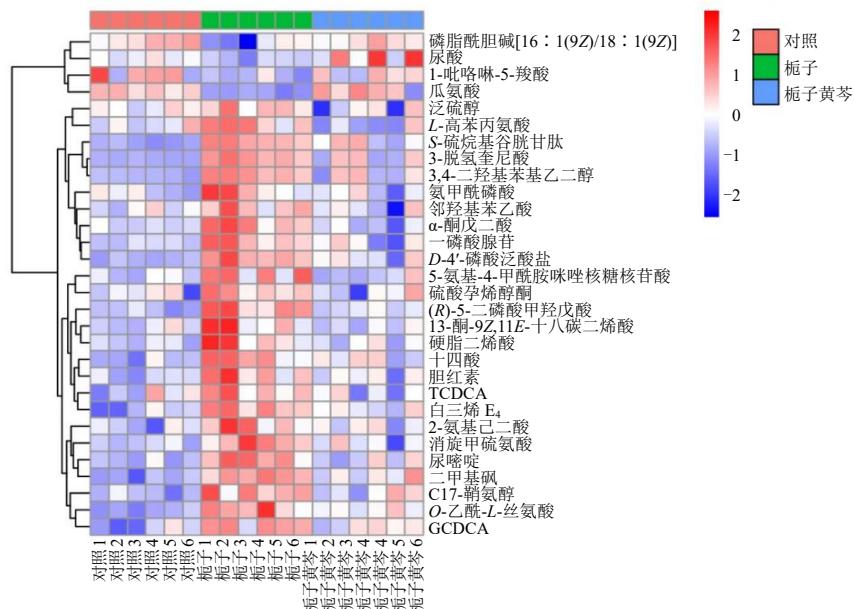


图7 对照组、桔子组和桔子黄芩组的聚类热图

Fig. 7 Clustering heatmap of control group, *Gardeniae Fructus* group and *Gardeniae Fructus-Scutellariae Radix* group

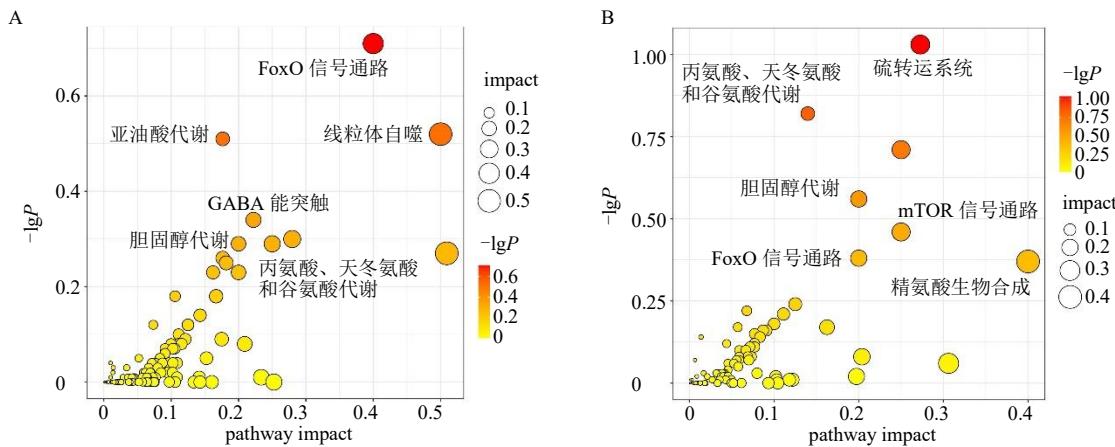


图8 对照组 vs 桔子组 (A)、桔子组 vs 桔子黄芩组 (B) 差异代谢物相关代谢通路富集分析图

Fig. 8 Enrichment analysis plots of differential metabolite-related metabolic pathways in control group vs *Gardeniae Fructus* group (A) and *Gardeniae Fructus* group vs *Gardeniae Fructus-Scutellariae Radix* group (B)

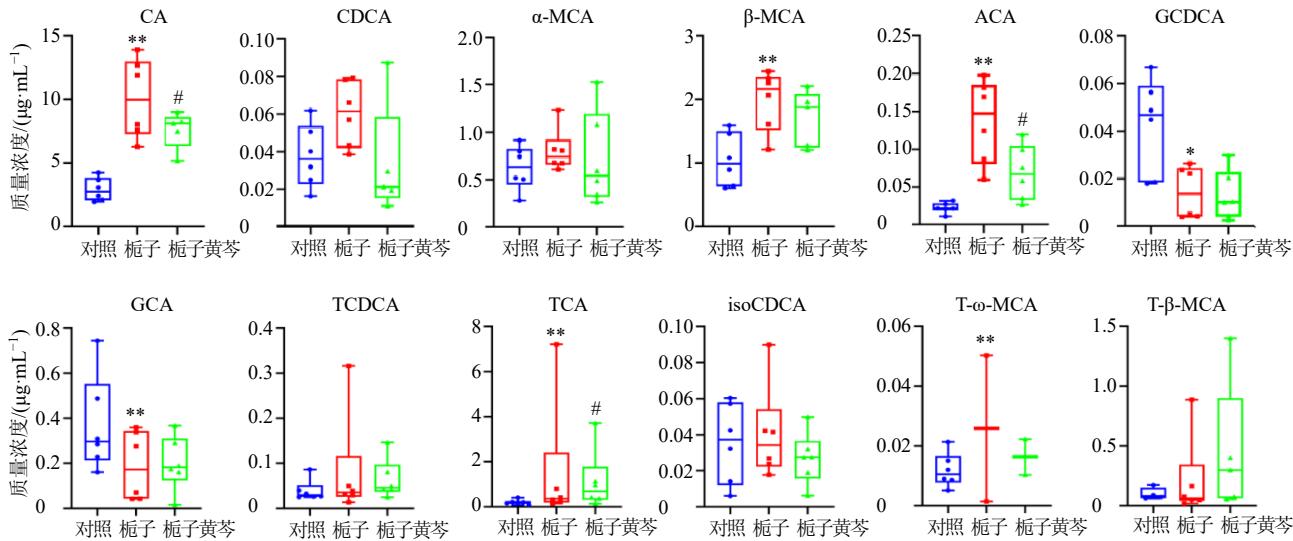
3.5 血清中初级胆汁酸与次级胆汁酸的定量分析

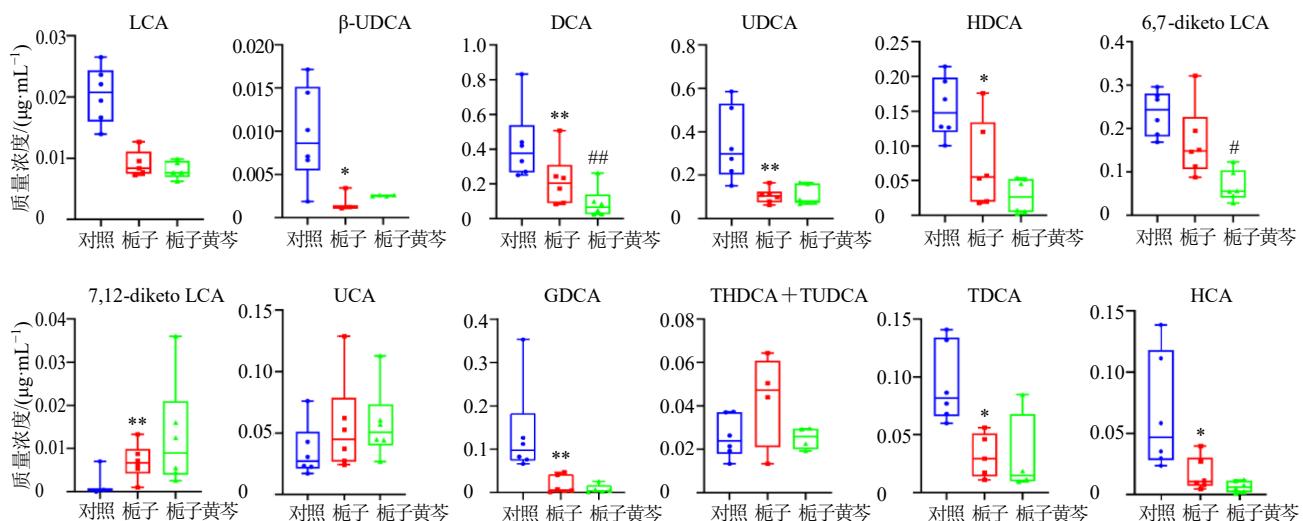
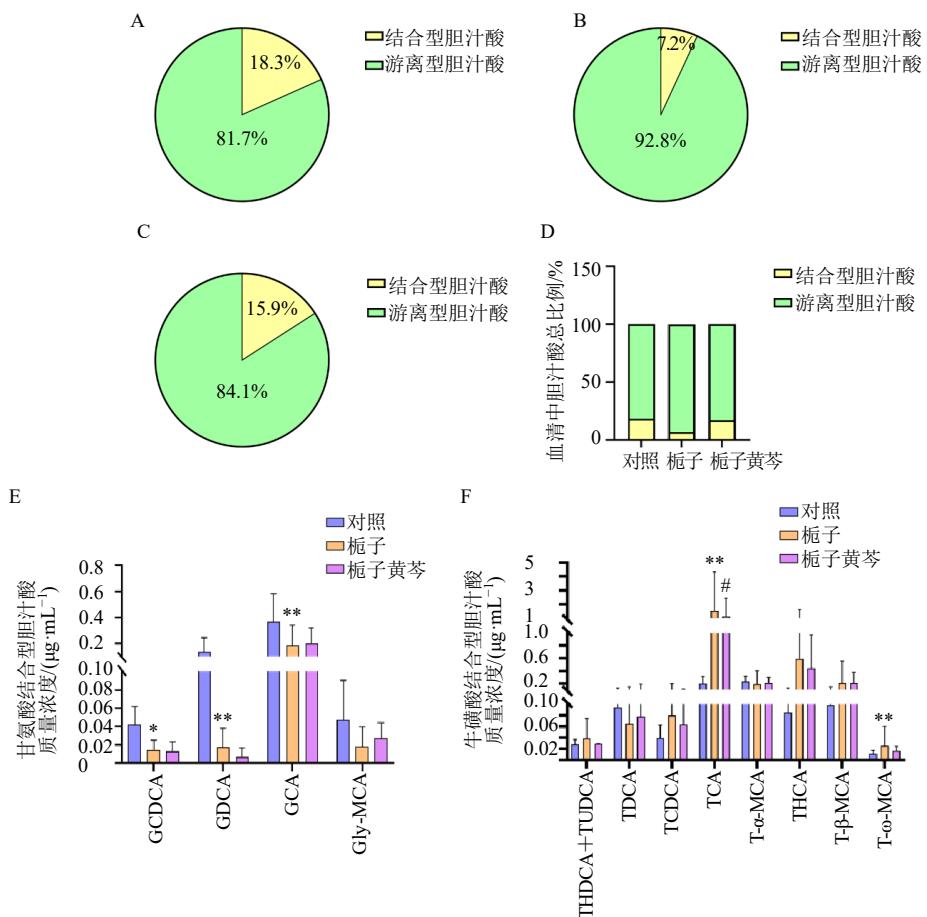
对胆汁酸代谢途径的生物标志物进行聚类热图分析表明, 生物标志物(包括初级胆汁酸 CA、ACA、 β -MCA、GCDCA 及次级胆汁酸 DCA、UDCA、HCA 等)出现明显的聚类。对初级胆汁酸、次级胆汁酸的相对含量进行组间比较。如图 9、10 所示, 与对照组比较, 桔子组初级胆汁酸 CA、 β -MCA、ACA、TCA、T- ω -MCA 含量显著升高($P<0.01$), GCDCA、GCA 含量显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 而次级胆汁酸 7,12-diketo LCA 含量显著升高($P<0.01$), β -UDCA、DCA、UDCA、HDCA、GDCA、TDCA、HCA 含量显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 与桔子组比较, 桔子黄芩组初级胆汁酸 CA、ACA、TCA

含量显著降低($P<0.05$), 次级胆汁酸 DCA、6,7-diketo LCA 含量显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。

3.6 血清中游离型胆汁酸与结合型胆汁酸的定量分析

对各组大鼠血清中游离型胆汁酸及结合型胆汁酸比例进行统计分析, 发现与对照组比较, 桔子组游离型胆汁酸比例明显上升, 结合型胆汁酸比例明显下降; 而配伍黄芩后游离型胆汁酸与结合型胆汁酸比例趋于对照组(图 11-A~D)。对结合型胆汁酸中不同结合形式进行研究, 发现桔子组各甘氨酸结合型胆汁酸比例明显下调, 其中 GCDCA、GDCA、GCA 下降最为显著($P<0.05$ 、 0.01 , 图 11-E); 而配伍黄芩后, 除 GCDCA、GDCA 外, 其余

图9 各组大鼠血清中初级胆汁酸含量变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 9 Changes of primary bile acids levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

图 10 各组大鼠血清中次级胆汁酸含量变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 10 Changes of secondary bile acids levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A~D-对照组、栀子组、栀子黄芩组大鼠血清中游离型胆汁酸与结合型胆汁酸比例；E-各组大鼠血清中甘氨酸结合型胆汁酸含量变化；F-各组大鼠血清中牛磺酸结合型胆汁酸含量变化。

A-D-ratios of unconjugated to conjugated bile acids in serum of control group, *Gardeniae Fructus* group and *Gardeniae Fructus-Scutellariae Radix* group; E-changes in serum glycine-conjugated bile acid levels of rats in each group; F-changes in serum taurine-conjugated bile acid levels of rats in each group.

图 11 各组大鼠血清中胆汁酸含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 11 Changes of bile acid levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

甘氨酸结合型胆汁酸含量均上调。除 TDCA、T- α -MCA 外, 桉子组牛磺酸结合型胆汁酸含量均上调, 其中 TCA 与 T- ω -MCA 上调最为显著 ($P<0.01$, 图 11-F); 而配伍黄芩后, 除 TDCA、T- α -MCA、T- β -MCA 外, 其余牛磺酸结合型胆汁酸含量均下调, 以 TCA 下降最为显著 ($P<0.05$), 这与王晓慧等^[21]的研究结果相吻合。

上述结果表明, 黄芩配伍梔子可通过恢复初级胆汁酸/次级胆汁酸、游离型胆汁酸/结合型胆汁酸比例, 有效改善梔子导致的胆汁酸代谢紊乱现象, 改善肝损伤。

4 讨论

近年来, 有关梔子导致的肝毒性日益受到关注。中药古籍中就曾记载梔子“苦寒伤胃”的特殊药性, 许多研究也表明, 长期大剂量 ig 梔子提取物会导致大鼠出现明显的肝脏损伤^[22], 这使得梔子的临床使用受到了极大的限制。临幊上黄芩常与梔子配伍, 但有关黄芩配伍梔子减轻肝脏毒性的研究尚属空白。本研究基于代谢组学、高效液相色谱法、胆汁酸定量分析等多角度, 揭示了黄芩配伍梔子减轻肝毒性的作用机制。

梔子苷作为梔子中环烯醚萜类化合物的代表成分, 体内外实验表明, 其具有明显的肝毒性, 包括肝脏指数增加、肝功能指标异常升高及肝细胞损伤, 具体表现为炎症细胞浸润、肝细胞肿胀甚至坏死^[23]。本研究结果表明, 梔子组大鼠肝功能指标 ALT、AST 活性及 TBA 水平显著升高, 并且会导致肝细胞坏死、胆管增生、血管瘀血等; 而黄芩配伍梔子可以显著降低肝功能指标, 有效改善梔子导致的肝组织病理损伤。同时, 本研究通过高效液相色谱法检测表明, 梔子黄芩合煎能够有效降低梔子苷的溶出, 一定程度上减轻了梔子导致的肝损伤。

根据 LC-MS 代谢组学结果提示, C17-鞘氨醇、TCDCA、GCDCA 等 490 种代谢物为 3 组间共有的差异代谢物。值得注意的是, C17-鞘氨醇作为鞘氨醇信号通路中最核心的信号分子之一, 也是通路的中间代谢物。鞘氨醇激酶 (sphingosine kinase, SphK) -1-磷酸鞘氨醇 (sphingosine-1-phosphate, S1P)-S1PRs (1-磷酸鞘氨醇受体) 信号通路通过多种形式调节细胞凋亡、代谢及炎症反应等过程^[24]; 同时, 有研究表明, 鞘氨醇信号通路参与了包括肝纤维化在内的多种疾病的病理过程^[25]。TCDCA、GCDCA 作为人体内重要的初级胆汁酸, 在机体胆汁酸代谢过程中

发挥着重要作用。研究表明, TCDCA 与 GCDCA 可作为药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 早期诊断与严重程度的潜在生物标志物, 已被证实 在 DILI 发病过程、肝损伤及胆汁淤积中起重要作用, 其含量会随着肝损伤严重程度的增加而增加^[26]。而 GCDCA 呈剂量相关性地诱导 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 表达, 诱导炎症因子的释放, 导致严重的肝损伤^[27]。同时, TCDCA 还会通过诱导肝细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-11 (cystein-asparate protease-11, Caspase-11) 表达, 并刺激 Kupffer 细胞分泌肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- β 蛋白, 加重肝损伤^[28]。

通路富集结果表明, 包括 FoxO 信号通路、胆固醇代谢通路等在内的 9 条通路可能是黄芩发挥减毒作用的关键通路。FoxO 信号通路已被证实 在 胆汁酸合成过程中发挥着重要的作用^[29]。有研究表明, FoxO 信号通路是参与 CYP7A1 基因转录的关键通路^[30]。在胰岛素抵抗和脂肪肝疾病中, FoxO1 因子的表达异常可能导致胆汁酸合成下调, 进而影响机体胆汁酸代谢。而王永鑫^[31]的研究则发现, 在胆汁淤积性肝纤维化模型中, FoxO1 的表达下调会促进肝星状细胞的增殖, 抑制肝细胞凋亡, 通过激活多条信号通路, 促进肝纤维化过程。

胆汁酸是由胆固醇经肝脏转化、合成后得到的终产物, 参与日常膳食脂肪的消化与吸收。同时, 胆汁酸也是调节胆固醇代谢的关键信号分子, 对于维持机体胆固醇稳态具有重要意义。然而, 当胆汁酸的分泌或排泄发生障碍, 会导致大量胆汁酸在肝内过度堆积, 进而介导炎症因子的表达, 激活 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, c-JNK) 途径引发炎症反应, 胆汁酸平衡遭到破坏, 最终导致肝细胞的损伤^[32]。而当肝细胞受损时, 又会影响胆汁酸的生物合成及转运过程, 进而破坏各级胆管管道, 引发肝内外胆管阻塞, 进一步加重胆汁的淤积, 最终导致胆汁酸含量的升高^[33-34]。目前的研究表明, 梔子导致的肝损伤机制与胆汁酸代谢紊乱、影响胆汁酸的合成与转运密切相关^[35]。罗羽莎^[36]通过代谢组学表明, 梔子导致的肝损伤可能与初级胆汁酸的生物合成通路密切相关。这与本研究结果相符, 进一步对大鼠血清胆汁酸进行定量分析。

血清胆汁酸含量的变化很大程度上能够反映胆汁淤积型肝损伤的发展过程。研究表明, 高剂量

梔子苷 (>300 mg/kg) 会导致大鼠肝组织中 TCA、TCDCA 水平显著升高^[37]；临幊上对胆汁淤积性肝病患者的血清胆汁酸谱研究发现，血清中初级胆汁酸含量显著升高，次级胆汁酸如 DCA、LCA 等含量明显降低^[38]。在一项关于梔子苷导致大鼠血清胆汁酸变化的研究中发现，随着梔子苷剂量的不断增加，初级胆汁酸 CA、CDCA 含量不断升高，且以 CA 含量升高最为显著。而 CA 与 CDCA 的异常升高会引起肝损伤与炎症反应，细胞死亡增加，导致肝脏毒性^[39]。

本研究结果显示，梔子组大鼠体内初级胆汁酸含量出现了不同程度的升高，而次级胆汁酸含量则明显降低；而配伍黄芩后，初级胆汁酸含量得到了一定的下调，而次级胆汁酸除 UDCA、7,12-diketo LCA、THDCA+TUDCA、TDCA 含量上调之外，其余均明显下调。这可能是由于梔子组大鼠体内发生了胆汁酸代谢紊乱，致使初级胆汁酸在肝脏合成后大量蓄积，无法正常进入肠道进行肝肠循环，进而导致次级胆汁酸的合成减少；而在配伍黄芩后，胆汁酸代谢紊乱得以改善，初级胆汁酸能够在肠道菌群作用下分解为次级胆汁酸，使得次级胆汁酸含量得到了一定的回调。

本研究进一步对 3 组大鼠血清中游离型胆汁酸与结合型胆汁酸进行定量分析。结果表明，与对照组相比，梔子组大鼠血清中游离型胆汁酸、结合型胆汁酸比例明显改变。各甘氨酸结合型胆汁酸、牛磺酸结合型胆汁酸含量发生了显著变化；配伍黄芩后，游离型胆汁酸与结合型胆汁酸的比例趋近于对照组，甘氨酸与牛磺酸结合型胆汁酸的含量也得到了一定的回调。这可能是由于梔子导致大鼠发生肝内胆汁淤积，致使肠道菌群结构变化，甘氨酸相关水解酶菌群数量增加，从而导致游离型胆汁酸比例上升，结合型胆汁酸比例下调^[40]；而配伍黄芩会使上述变化得到明显改善。值的注意的是，有研究表明游离型胆汁酸通过一系列酶促反应形成结合型胆汁酸后，疏水性显著降低。而疏水性更强的游离型胆汁酸诱导的肝细胞膜结构功能损伤已被证实在胆汁淤积型肝损伤中发挥着重要作用。而结合型胆汁酸由于其结构更亲水，通常不具有细胞毒性^[41]。一项关于妊娠期肝内胆汁淤积患者的研究中发现，血清中 TCA 与 TCDCA 浓度显著升高，甘氨酸/牛磺酸结合胆汁酸比例降低^[42]。有研究表明，在肝纤维化与肝硬化患者体内牛磺酸结合胆汁酸水平较

高，而甘氨酸结合胆汁酸水平较低，并且 GCDCA 与 TCDCA 的比值随着疾病严重程度逐渐降低^[43]。这与本研究中梔子组大鼠血清胆汁酸比例变化结果相符合。以上结果揭示了胆汁酸代谢相关通路是黄芩配伍梔子减轻梔子肝毒性的关键代谢通路，同时提示黄芩配伍减毒的关键机制在于调控初级胆汁酸/次级胆汁酸、游离型胆汁酸/结合型胆汁酸的比例，改善梔子导致的胆汁酸代谢失调，维持机体胆汁酸稳态。

综上，本研究采用 6 倍临床剂量的梔子 (5.6 g/kg) 诱导大鼠肝损伤，并通过黄芩配伍梔子 (1:1) 探究其减毒效果及机制，发现黄芩通过维持机体胆汁酸稳态，改善梔子导致的胆汁酸淤积，缓解肝损伤。本研究为黄芩配伍梔子减轻肝毒性提供了理论基础，为临床梔子的合理与安全用药提供参考依据。本研究也存在一定的不足之处，如并未对胆汁酸代谢相关通路的蛋白、mRNA 的表达进行验证，并未对肠道菌群的变化进行探究，以明确梔子苷在体内的具体代谢过程以及胆汁酸在肠道中的转化情况。后期的实验会针对胆汁酸转运通路进行验证，并结合肠道菌群的实验分析进一步完善黄芩配伍梔子减轻肝毒性的具体机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 1 中国药典 [S]. 一部. 2020: 259-260.
- 2 Kim S J, Kim J K, Lee D U, et al. Genipin protects lipopolysaccharide-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 635(1/2/3): 188-193.
- 3 Zhao Y H, Li H Y, Fang F, et al. Geniposide improves repeated restraint stress-induced depression-like behavior in mice by ameliorating neuronal apoptosis via regulating GLP-1R/AKT signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 676: 19-26.
- 4 卜妍红, 陆婷, 吴虹, 等. 梔子化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(6): 89-93.
- 5 杨洪军, 付梅红, 吴子伦, 等. 梔子对大鼠肝毒性的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 1091-1093.
- 6 卫璐戈, 张海虹, 李会芳. 梔子苷、京尼平、梔子蓝的体内外肝毒性对比研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(2): 311-314.
- 7 王荣慧, 吴虹, 王梦蝶, 等. 梔子苷保肝利胆和肝毒性双重作用的研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(3): 88-91.

- [8] 张海虹, 卫璐戈, 李会芳. 桔子苷对正常和黄疸模型大鼠的亚急性肝、肾毒性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20): 140-144.
- [9] Jaeschke H, Gores G J, Cederbaum A I, et al. Mechanisms of hepatotoxicity [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 65(2): 166-176.
- [10] Gao L N, Zhang Y, Cui Y L, et al. Evaluation of genipin on human cytochrome P450 isoenzymes and P-glycoprotein *in vitro* [J]. *Fitoterapia*, 2014, 98: 130-136.
- [11] Ding Y, Zhang T, Tao J S, et al. Potential hepatotoxicity of geniposide, the major iridoid glycoside in dried ripe fruits of *Gardenia jasminoides* (Zhi-zi) [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(10): 929-933.
- [12] 李晓静, 严东明, 冯琴, 等. 桔子苷及京尼平的动物肝毒性机制研究进展 [J]. 世界中医药, 2021, 16(17): 2652-2656.
- [13] Li Y, Pan H, Li X B, et al. Role of intestinal microbiota-mediated genipin dialdehyde intermediate formation in geniposide-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 377: 114624.
- [14] Chung B K, Karlsen T H, Folseraas T. Cholangiocytes in the pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and development of cholangiocarcinoma [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(4 Pt B): 1390-1400.
- [15] 刘毓, 张聪聪, 胡永红, 等. 桔子苷对大鼠肝损伤及血清、肝脏、粪便中胆汁酸的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 63-75.
- [16] Tian J Z, Zhu J J, Yi Y, et al. Dose-related liver injury of geniposide associated with the alteration in bile acid synthesis and transportation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8938.
- [17] 郑雁雪, 王圆圆, 王琳, 等. 中药配伍减毒增效的现代研究及思考 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 386-395.
- [18] 李会芳, 宋海波, 王伽伯, 等. 2020年版《中国药典》一部中含桔子中成药的不良反应回顾性分析 [J]. 中成药, 2022, 44(7): 2391-2395.
- [19] 徐甜, 马重阳, 邵奇, 等. 黄芩-桔子药对治疗上焦病探析 [J]. 现代中医临床, 2023, 30(3): 47-50.
- [20] Jiang T, Liu L S, Zhang M, et al. Metabolomics reveals the mechanisms for the pulmonary toxicity of *Siegesbeckia orientalis* L. and the toxicity-reducing effect of processing [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 630319.
- [21] 王晓慧, 张帆, 席莉莉, 等. 桔子的药效与毒性及其作用机制研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18(1): 94-99.
- [22] 王清然, 周斌, 张泽安, 等. 桔子水提物致大鼠肝脏毒性的时效与量效关系 [J]. 中成药, 2017, 39(4): 689-694.
- [23] 高爱, 张文生, 冯成强. 桔子苷体内吸收、分布、代谢和排泄过程及其肝毒性研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2022, 36(7): 552-558.
- [24] 孙跃, 兰天, 郭姣. 鞣氨酸激酶信号通路在肝纤维化中的作用机制 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(9): 1798-1801.
- [25] Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, et al. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3 [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(24): 9247-9261.
- [26] Ma Z H, Wang X M, Yin P Y, et al. Serum metabolome and targeted bile acid profiling reveals potential novel biomarkers for drug-induced liver injury [J]. *Medicine*, 2019, 98(31): e16717.
- [27] Feng S, Xie X M, Li J C, et al. Bile acids induce liver fibrosis through the NLRP3 inflammasome pathway and the mechanism of FXR inhibition of NLRP3 activation [J]. *Hepatol Int*, 2024, 18(3): 1040-1052.
- [28] Zhao Q, Dai M Y, Huang R Y, et al. *Parabacteroides distasonis* ameliorates hepatic fibrosis potentially via modulating intestinal bile acid metabolism and hepatocyte pyroptosis in male mice [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1829.
- [29] Li T G, Kong X Y, Owsley E, et al. Insulin regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase expression in human hepatocytes: Roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(39): 28745-28754.
- [30] Li T G, Ma H Y, Park Y J, et al. Forkhead box transcription factor O1 inhibits cholesterol 7alpha-hydroxylase in human hepatocytes and in high fat diet-fed mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(10): 991-996.
- [31] 王永鑫. 胆道梗阻所致纤维化肝脏中miRNA的差异性表达及机制研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- [32] 陈楚颖, 代曼云, 徐港铭, 等. 两种胆汁淤积模型肝毒性及胆汁酸代谢调控模式研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2018, 28(4): 230-233.
- [33] Trauner M, Fuchs C D, Halilbasic E, et al. New therapeutic concepts in bile acid transport and signaling for management of cholestasis [J]. *Hepatology*, 2017, 65(4): 1393-1404.
- [34] 段银环. 血清胆汁酸代谢轮廓分析在肝胆疾病诊断中的意义 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.

- [35] 高雨, 朱琦, 陈蕾蕾, 等. 桔子主要有效成分的代谢及毒性研究进展 [J]. 中南药学, 2021, 19(2): 254-260.
- [36] 罗羽莎. 基于代谢组学技术的肠道菌群介导的桔子肝毒性及桔子豉汤配伍减毒机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
- [37] 田婧卓. 桔子苷诱导的肝损伤与胆汁酸相关的作用机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.
- [38] Chen W H, Wei Y R, Xiong A Z, et al. Comprehensive analysis of serum and fecal bile acid profiles and interaction with gut microbiota in primary biliary cholangitis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020, 58(1): 25-38.
- [39] Kim S, Han S Y, Yu K S, et al. Impaired autophagy promotes bile acid-induced hepatic injury and accumulation of ubiquitinated proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1541-1547.
- [40] Hartmann P, Hochrath K, Horvath A, et al. Modulation of the intestinal bile acid/farnesoid X receptor/fibroblast growth factor 15 axis improves alcoholic liver disease in mice [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2150-2166.
- [41] Perez M J, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(14): 1677-1689.
- [42] Tribe R M, Dann A T, Kenyon A P, et al. Longitudinal profiles of 15 serum bile acids in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(3): 585-595.
- [43] Chen T L, Zhou K J, Sun T, et al. Altered bile acid glycine: Taurine ratio in the progression of chronic liver disease [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2022, 37(1): 208-215.

[责任编辑 李亚楠]