

基于胆汁酸代谢网络分析中药黄药子的肝毒性

徐 英¹, 陈崇崇¹, 杨 莉^{1,2*}, 王君明¹, 季莉莉^{1,2}, 王峰涛^{1,2*}, 胡之璧¹

(1. 上海中医药大学中药研究所 中药标准化教育部重点实验室暨中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201210; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201210)

摘要: 本文采用超高效液相色谱质谱联用 (UPLC-MS) 胆汁酸代谢网络分析方法评价黄药子乙醇提取物 (ethanol extraction, ET) 和单体化合物黄独素 B (diosbulbin B, DB) 致小鼠的肝毒性。通过小鼠毒性实验, ET 和 DB 给药组小鼠都可见明显的肝脏毒性。血清胆汁酸含量测定结果经主成分分析后, 空白组和给药组区分明显, ET 和 DB 给药组矢量方向一致, 但两者之间也有一定距离, 提示 DB 是黄药子致肝毒性的主要毒性成分之一。经偏最小二乘法-判别分析后, 结果表明牛磺酸结合型胆汁酸对表征 ET 和 DB 致小鼠肝毒性具有重要的贡献, 且以牛磺酸结合型为主的胆汁酸与 ALT 和 AST 具有很好的相关性, 因此以牛磺酸结合型为主的胆汁酸可作为评价黄药子致小鼠肝毒性的生物标识物。本研究为进一步深入评价黄药子致肝毒性及致毒机制研究奠定了基础。

关键词: 胆汁酸; 黄药子; 黄独素 B; 主成分分析; 偏最小二乘法-判别分析; 相关分析

中图分类号: R991

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 01-0039-06

Evaluation on hepatotoxicity caused by *Dioscorea bulbifera* based on analysis of bile acids

XU Ying¹, CHEN Chong-chong¹, YANG Li^{1,2*}, WANG Jun-ming¹, JI Li-li^{1,2},
WANG Zheng-tao^{1,2*}, HU Zhi-bi¹

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and The SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China; 2. Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201210, China)

Abstract: Metabolic profile of bile acids was used to evaluate hepatotoxicity of mice caused by ethanol extraction of *Dioscorea bulbifera* L. (ethanol extraction, ET) and diosbulbin B (DB), separately. Ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS) was applied to determine the contents of all kinds of endogenous bile acids including free bile acids, taurine conjugates and glycine conjugates. Obvious liver injuries could be observed in mice after administrated with ET and DB. Based on the analysis using principle components analysis (PCA), toxic groups could be distinguished from their control groups, which suggested that the variance of the contents of bile acids could evaluate hepatotoxicity caused by ET and DB. Meanwhile, ET and DB toxic groups were classified in the same trends comparing to control groups in the loading plot, and difference between the two toxic groups could also be observed. DB proved to be one of the toxic components in *Dioscorea bulbifera* L. Bile acids of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), taurocholic acid (TCA), taurodeoxycholic acid (TDCA), cholic acid (CA) and others proved to be important corresponds to ET and DB induced liver injury according to analysis of partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) and the statistical analysis showed that there were significant differences between the control groups and toxic groups ($P < 0.01$). Furthermore, good correlation

收稿日期: 2010-08-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30701104, 81073027); 上海市教育委员会科研创新项目 (09YZ125); 上海市青年科技启明星计划项目 (09QA1405500).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-51322506, 86-21-51322519, E-mail: cpuyul@126.com, wangzht@hotmail.com

could be revealed between the foregoing bile acids and ALT, AST. It indicated that taurine conjugated bile acids as TUDCA, TCDCA, TCA and TDCA along with CA could be considered as sensitive biomarkers of ET and DB induced liver injury. This work can provide the base for the further research on the evaluation and mechanism of hepatotoxicity caused by *Dioscorea bulbifera* L.

Key words: bile acid; *Dioscorea bulbifera* L.; diosbulbin B; principle components analysis; partial least square-discriminant analysis; correlation analysis

黄药子为薯蓣科属植物黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 的块茎, 其性寒凉, 味苦, 具有凉血、消癭、降火、解毒的作用^[1]。长期服用黄药子后可使肝内转氨酶活性增高, 产生类似中毒性肝炎的临床体征。研究表明, 黄药子的毒性成分主要是薯蓣皂苷类和以黄独素 B (diosbulbin B, DB) 为代表的二萜内酯类。据报道黄独素 B 可引起小鼠急性中毒, 且毒性与给药剂量和时间密切相关^[2]。现代药理研究表明, 黄药子除对肝细胞的直接损害外, 胆汁淤积、胆盐的刺激可能是造成肝损伤的原因之一^[3, 4]。胆汁酸是胆汁的主要成分, 胆汁酸的合成和排泄过程, 经过了肝脏的生物化学和生物物理两大屏障, 机体内整个胆汁酸代谢谱与肝、肠及胆道系统密切相关。因此, 胆汁酸代谢网络变化对于研究肝损伤机制, 肝毒性中药的毒性研究及其防治药物的筛选和评价等具有重要意义。目前对黄药子和黄独素 B 致肝毒性的研究仅限于一些常规的药理 (毒理) 实验, 对于中毒前后生物体内的内源性物质的影响未见报道, 因此黄药子及其主要成分黄独素 B 所致肝毒性是否与内源性胆汁酸代谢网络变化相关值得进一步深入研究。

本研究在黄药子和黄独素 B 致小鼠肝毒性药理实验基础上, 采用超高效液相色谱-质谱的分析技术 (UPLC-MS) 对小鼠血清中的胆汁酸进行准确定量分析并结合相关的统计分析方法, 揭示胆汁酸代谢网络与肝毒性效应之间的关系, 为进一步研究黄药子肝毒性机制奠定基础, 对于其他肝毒性中药的毒性研究、化学性肝损伤的评价等也具有借鉴意义。

材料与方法

材料及仪器 黄药子采于安徽青阳县, 经安徽中医学院药学院刘守金教授鉴定为薯蓣科属植物黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 的块茎。黄独素 B 单体 (diosbulbin B, DB) 自制, 纯度为 97.7%。谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 购于上海荣盛生物药业有限公司。分析纯羧甲基纤维素钠购于上海国药集团化学试剂有限公司。胆酸 (CA)、去氧胆酸 (DCA)、鹅去氧胆酸 (CDCA)、石胆酸 (LCA)、熊去氧胆酸

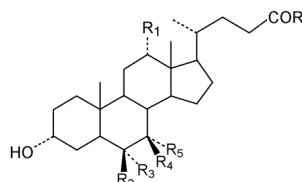
(UDCA)、猪去氧胆酸 (HDCA)、甘氨胆酸 (GCA)、牛磺胆酸 (TCA)、甘氨去氧胆酸 (GDCA)、牛磺去氧胆酸 (TDCA)、甘氨鹅去氧胆酸 (GCDCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA)、甘氨熊去氧胆酸 (GUDCA)、牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA)、牛磺猪去氧胆酸 (THDCA)、甘氨石胆酸 (GLCA) 和牛磺石胆酸 (TLCA) 均购于 Sigma-Aldrich 公司, 化合物结构见图 1。色谱级甲醇购于 Tedia 公司, 超纯水由 Milli-Q 纯化系统制备, 色谱级醋酸铵和甲酸购于 Fisher 公司。

雄性 ICR 小鼠, 清洁级, 体重 18~22 g, 共 32 只, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物合格证号: SCXK (沪 2007-0005), 饲养于上海中医药大学实验动物中心屏障动物房, 室温 (20 ± 2) °C, 相对湿度 60%~70%。

Waters Acquity UPLC-ZQ 2000 超高效液相色谱质谱联用仪 (Waters, 美国); 酶标仪 (Power Wave XS, Bio-Tek Instruments); 离心机 (Beckman Coulter Avanti J-25I centrifuge); KQ-500B 型超声波清洗器 (江苏省昆山市超声仪器有限公司); VDRTEX-5 旋涡振荡器 (江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

黄药子醇提取物和黄独素 B 的毒性实验^[5] 黄药子醇提取物 (ethanol extraction, ET) 的提取方法: 取黄药子粗粉 1 000 g, 用 10 倍体积 80% 乙醇提取 3 次, 每次 3 h, 合并 3 次滤液, 离心 10 min (4 000 × g), 取上清液减压浓缩至浸膏, 减压干燥并放于 4 °C 冰箱保存备用, 给药前提取物和黄独素 B 单体用适量的 0.5% CMC-Na 混悬。

将实验动物分为 4 组 ($n=8$), 分别为黄药子醇提取物空白对照组 (ET vehicle control)、黄药子醇提取物给药组 (ET toxic group)、黄独素 B 空白对照组 (DB vehicle control) 和黄独素 B 给药组 (DB toxic group)。乙醇提取物给药组的给药剂量为 2 400 mg·kg⁻¹, 黄独素 B 给药组的给药剂量为 64 mg·kg⁻¹ (相当于 2 400 mg·kg⁻¹ 醇提取物中黄独素 B 含量), 灌胃 (ig) 给药, 空白组分别给予相同体积的 0.5% CMC-Na, 每天灌胃 1 次, 黄药子醇提取物连续给药 14 天, 黄独素 B 连续



Bile acid	Abbreviation	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Cholic acid	CA	OH	H	H	H	OH	OH
Deoxycholic acid	DCA	OH	H	H	H	H	OH
Chenodeoxycholic acid	CDCA	H	H	H	H	OH	OH
Ursodeoxycholic acid	UDCA	H	H	H	OH	H	OH
Hyodeoxycholic acid	HDCA	H	H	OH	H	H	OH
Lithocholic acid	LCA	H	H	H	H	H	OH
Taurocholic acid	TCA	OH	H	H	H	OH	NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H
Taurodeoxycholic acid	TDCA	OH	H	H	H	H	NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H
Taurochenodeoxycholic acid	TCDCa	H	H	H	H	OH	NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H
Tauroursodeoxycholic acid	TUDCA	H	H	H	OH	H	NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H
Taurohyodeoxycholic acid	THDCA	H	H	OH	H	H	NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H
Taurolithocholic acid	TLCA	H	H	H	H	H	NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H
Glycocholic acid	GCA	OH	H	H	H	OH	NHCH ₂ COOH
Glycodeoxycholic acid	GDCA	OH	H	H	H	H	NHCH ₂ COOH
Glychenodeoxycholic acid	GCDCA	H	H	H	H	OH	NHCH ₂ COOH
Glycoursodeoxycholic acid	GUDCA	H	H	H	OH	H	NHCH ₂ COOH
Glycolithocholic acid	GLCA	H	H	H	H	H	NHCH ₂ COOH

Figure 1 Chemical structures of bile acids (BAs)^[6]

给药 12 天。给药期间动物自由饮食, 于末次给药后 12 h 动物禁食不禁水, 24 h 后小鼠摘眼球取血, 分离血清, 检测谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 活性。

样品制备方法^[6] 精密称定相应的胆汁酸标准品, 用甲醇溶解制成质量浓度约 2 mg·mL⁻¹。分别吸取各胆汁酸标准品 50 μL 制成 100 μg·mL⁻¹ 的混合标准品溶液, 再用甲醇逐级稀释制成 10、5、3、1、0.8、0.5、0.2、0.1、0.05 和 0.01 μg·mL⁻¹, 用于标准曲线的绘制。

取血清 100 μL, 加甲醇溶液 300 μL, 涡旋振荡 1 min, 4 ℃ 离心 10 min (20 000 × g)。转移上清液 300 μL 并氮气吹干 (35 ℃)。残渣用 100 μL 的初始流动相复溶, 涡旋振荡 1 min, 4 ℃ 再离心 10 min (20 000 × g), 吸取上清液进行分析。

液相色谱和质谱条件^[6] 色谱条件: 色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (1.0 mm × 100 mm, 1.7 μm), 柱温 45 ℃, 流动相甲醇 (A) 和 5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵 (0.1% 甲酸溶液, B), 梯度洗脱程序为 55% A (0~1.0 min), 55%~62% A (1.0~2.6 min) 和 62%~80% A (2.6~11.4 min), 进样量 2 μL, 流速 0.3 mL·min⁻¹。

质谱条件: 负离子模式下的电喷雾电离 (ESI) 方式, 选择离子检测模式 (SIM) 定量方法, 毛细管

电压 3.0 kV, 锥孔电压 55 V, 离子源温度 120 ℃, 去溶剂化温度 300 ℃, 去溶剂化气流 700 L·h⁻¹, 锥孔气流 50 L·h⁻¹。通过 MassLynx 4.1 软件采集数据和输出数据。

数据处理方式 数据处理采用 SIMCA-P 12.0 (Umetrics, Umea, 瑞典) 软件进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA), 并用 SPSS 11.5 统计软件进行转氨酶活性和胆汁酸的相关分析, 相关关系的检验用 Pearson 相关分析。转氨酶测试结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结果

1 黄药子醇提取物和黄独素 B 毒性实验的结果

ALT 和 AST 是目前临床常用诊断肝脏异常的转氨酶, 本研究通过这两个酶的活性检测来评价黄药子醇提取物和黄独素 B 致肝毒性模型。黄药子醇提取物和黄独素 B 毒性实验结果表明, ALT 和 AST 酶活性变化明显 (表 1)。

2 胆汁酸分析结果

空白组和给药组比较后胆汁酸浓度变化如表 2 所示。黄药子醇提取物毒性组中, TUDCA 比空白组的浓度升高了 8 倍, THDCA 升高 9 倍, TCDCA 升高 25 倍; 而黄独素 B 毒性组中 TUDCA、TCA、TCDCA、

Table 1 Hepatotoxicity induced by ethanol extraction of *Dioscorea bulbifera* L. (ET) and diosbulbin B (DB) in mice serum. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs ET vehicle control group; ## $P < 0.01$ vs DB vehicle control group

Group	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
ET vehicle control	26.9 ± 2.8	94.6 ± 9.4
ET (2 400 mg·kg ⁻¹)	56.4 ± 13.9**	131.7 ± 20.0**
DB vehicle control	32.1 ± 1.5	98.9 ± 3.8
DB (64 mg·kg ⁻¹)	54.5 ± 5.3##	127.9 ± 5.9##

TDCA 等均比空白组升高 4 倍以上。由此可见, 黄药子醇提取物和黄独素 B 致肝毒性损害后能引起血中牛磺酸结合型胆汁酸的急剧升高, 提示中药所致的肝毒性与血中牛磺酸结合型的胆汁酸浓度具有一定的相关性。

3 主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA)

将黄药子醇提取物和黄独素 B 的空白组和给药组分别作 PCA 分析, 以胆汁酸浓度作为 X 变量, 得到如图 2 所示的结果 (图 2a 为正常组和 ET 给药组, 1~8 分别代表空白组的 8 个样本, 9~16 代表给药组的 8 个样本; 图 2b 为正常组和 DB 给药组, 17~24 分别代表空白组的 8 个样本, 25~32 代表给药组的 8 个样

本)。在 PCA 模型中, 两组空白组样本和给药组样本都能够区分, 模型分别解释了 59.8% 和 55.6% 的原始数据, 说明中毒前后小鼠体内的胆汁酸浓度发生了显著的变化。将上述的 4 个组同时进行 PCA 分析 (模型解释度为 49.2%), 结果如图 3 所示。在散点图中两个空白组的数据集中符合分组要求, ET 给药组和 DB 给药组虽然数据较为离散, 但都跟空白组分开, 而且两个给药组与空白组相比其矢量方向一致 (空白组分布在二维空间左侧, 两个给药组均分布在右侧), 表明 ET 和 DB 对胆汁酸的影响模式相似, 均可造成小鼠肝毒性; 同时发现 ET 和 DB 给药组之间存在一定的距离, 提示两者所致毒性存在差异, 可能是由于 ET 为黄药子的总提取物, 尚有其他成分对毒性造成影响。

PCA 分析对模型的解释能力较弱, 进一步利用 PLS-DA 分析来表征评价黄药子的肝毒性。以空白组和 ET 给药组作 PLS-DA 分析, 分别以胆汁酸浓度作为 X 变量和以组别作为 Y 变量, 全部样本分析得到的两个主成分模型, 模型的解释度 (R^2Y) 是 96.1%, 预测度 (Q^2Y) 是 89.9%, 可以解释胆汁酸变量 (R^2X) 的 58.2%。通过变量 VIP 评估分析, 可以得知 TUDCA、

Table 2 Contents of BAs (ng·mL⁻¹) measured by UPLC-MS in the ET-/DB-treated mice serum. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ET control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs DB control group

BA	ET control	ET-treated	DB control	DB-treated
TUDCA	0.68 ± 0.39	5.69 ± 1.56**	0.41 ± 0.35	3.59 ± 1.65##
THDCA	0.81 ± 0.29	7.86 ± 6.82*	1.35 ± 0.91	1.70 ± 0.64
TCA	22.18 ± 14.20	289.94 ± 168.06**	17.15 ± 0.06	111.25 ± 42.39##
TCDC	1.20 ± 0.67	30.40 ± 13.04**	1.99 ± 0.68	7.84 ± 5.72#
TDCA	2.57 ± 1.83	10.25 ± 5.20**	2.96 ± 2.10	15.25 ± 8.84##
CA	18.99 ± 8.47	100.79 ± 62.30**	32.06 ± 41.48	381.07 ± 287.31#
GCDCA	3.69 ± 1.47	2.68 ± 2.08	3.73 ± 0.29	4.48 ± 3.54
GDCA	1.53 ± 0.45	2.36 ± 1.30	1.69 ± 1.29	1.33 ± 0.69
TLCA	1.00 ± 0.55	0.80 ± 0.56	0.68 ± 0.37	0.97 ± 0.64
GLCA	3.24 ± 2.57	2.53 ± 3.70	1.66 ± 1.52	2.31 ± 1.65
DCA	13.19 ± 6.11	24.62 ± 13.28*	17.28 ± 17.77	224.38 ± 273.41

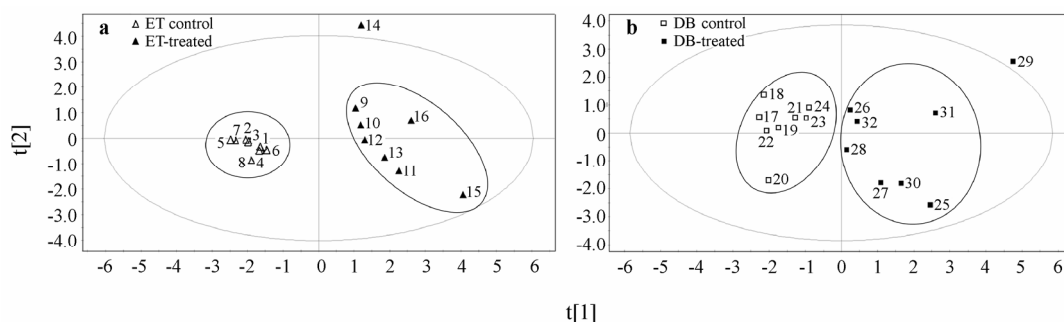


Figure 2 Results of PCA analysis between control mice groups and toxic mice groups. a: Control and ET-treated; b: Control and DB-treated. $t[1]$ and $t[2]$ are the first two eigenvectors of original data

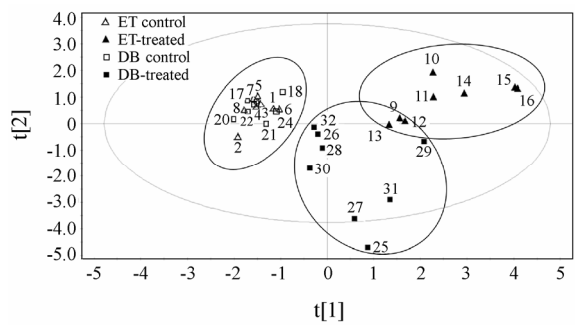


Figure 3 Results of PCA analysis between control mice groups and toxic mice groups. t[1] and t[2] are the first two eigenvectors of original data

TCDCA、TCA、TDCA、CA、THDCA (variable importance, VIP > 1) 受到 ET 给药后造成的毒性影响较大。选择这 6 个变量重新进行分析, 得知 R2Y、Q2Y 和 R2X 分别为 97.5%、91.9%和 73.5%, 明显提高了模型的解释能力。而以空白组和 DB 给药组作 PLS-DA 分析, 得到两个主成分模型, R2Y、Q2Y 和 R2X 分别为 89.9%、71.2%和 51.4%; 对 VIP 分析后得到的 TCA、TDCA、TUDCA、CA、TCDCA (VIP > 1) 5 个影响较大的变量重新作 PLS-DA 分析, R2Y、Q2Y 和 R2X 分别为 90.1%、83.9%和 86.6%, 变量的解释能力也大大增强。进一步对 ET 和 DB 给药组中变化明显的胆汁酸进行 *t* 检验, 以验证这些变量在空白组和给药组中的统计差异, 排除检验结果中 *P* 值大于 0.05 的变量 (表 2)。上述分析提示了 TUDCA、TCDCA、TCA、TDCA、CA 等胆汁酸可能为表征 ET 和 DB 致小鼠肝毒性的潜在生物标识物。

4 胆汁酸与肝毒性的相关分析

TUDCA、TCDCA、TCA、TDCA、THDCA、CA 等胆汁酸经 PLS-DA 分析表明, 可以解释黄药子致肝毒模型信息, 故以这几个胆汁酸和临床肝损伤指标 ALT、AST 活力值进行 Pearson 相关分析 (表 3)。表中的相关系数 (*r*) 均为正值, 表示胆汁酸含量与生化指标值呈正相关, 即胆汁酸含量越高两个酶活性

就越高 (毒性越大), 进一步说明这些胆汁酸为可能的生物标识物, 可以用来反映肝脏毒性。且从变化结果看, 给药组与空白组相比其 ALT 和 AST 升高 1.2~2.1 倍, 但以牛磺酸结合型胆汁酸指标升高更为显著, 约为 4~25 倍, 这对于预测、评估肝毒性及机制具有重要的意义。

讨论

本文从内源性物质胆汁酸代谢网络分析的角度研究中药黄药子及其所含主要成分黄独素 B 的肝毒性。胆汁酸是由胆固醇在肝脏合成的一系列胆甾烷类内源性物质, 正常情况下, 胆汁酸的代谢处于平衡状态, 但由于胆汁酸的代谢、排泄受到阻断造成胆汁淤积可以造成肝脏的功能性损伤, 引起线粒体损伤, 进而造成肝细胞的凋亡和衰竭^[7], 实验研究表明胆汁酸可以作为生物标识物用来表征肝脏毒性^[8-10]。根据 PCA、PLS-DA 及相关分析结果可以得出, 黄药子乙醇提取物和黄独素 B 给药后致小鼠肝毒性可能与胆汁淤积有关, 其肝毒性和血清中胆汁酸浓度呈正相关, 尤其是牛磺酸结合型胆汁酸。牛磺酸结合型胆汁酸在体内主要在肝脏中由牛磺酸与胆汁酸结合形成, 因牛磺酸对各种因素致肝细胞损伤及凋亡均有保护 (抑制) 作用, 当肝损伤发生时机体会发生代偿性的牛磺酸升高, 进一步使牛磺酸结合型胆汁酸升高, 本研究中给黄药子后血清牛磺酸结合型胆汁酸含量升高可能是肝内胆汁淤积后表现的胆汁酸代偿作用。同时因牛磺酸结合型胆汁酸带负电荷且高度离子化, 容易造成细胞膜非渗透, 细胞旁通透性增加, 阻碍牛磺酸胆汁酸向胆管分泌, 反而使胆汁反流入血。而且结合型胆汁酸盐分子较大, 不易透过胆管和小肠细胞旁紧密连接点, 胆道和小肠上皮细胞膜的非渗透性也可能是导致牛磺酸结合型胆汁酸浓度升高的主要原因^[11]。因此, 牛磺氨酸结合型胆汁酸如 TUDCA、TCDCA、TCA、TDCA 等胆汁酸可以作为表征 ET

Table 3 Results of correlation analysis containing correlation coefficient. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* ≤ 0.001 vs ET/DB control. *r*: Pearson correlation coefficient; ET: ET-treated; DB: DB-treated

BA	ET (ALT)		ET (AST)		DB (ALT)		DB (AST)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
TUDCA	0.853	0.000***	0.720	0.002**	0.638	0.008**	0.715	0.002**
TCDCA	0.781	0.000***	0.723	0.002**	0.459	0.073	0.572	0.021*
TDCA	0.642	0.007**	0.814	0.000***	0.400	0.125	0.367	0.162
THDCA	0.464	0.070	0.403	0.121	—	—	—	—
TCA	0.862	0.000***	0.763	0.001***	0.732	0.001***	0.793	0.000***
CA	0.316	0.233	0.353	0.180	0.662	0.005**	0.648	0.007**

和 DB 致小鼠肝毒性的主要生物标识物。

中药黄药子中主要含糖类、甾体皂苷、二萜内酯类 (黄独素 A、B、C、D、E、F、G、H) 等多种化学成分。作者在前期实验证明, 黄药子的乙醇提取物及乙酸乙酯提取物为黄药子的急性肝毒性部分。黄独素 B 为呋喃型去甲基二萜类化合物, 含量约 0.05%, 为二萜类中含量较高的化合物^[12]。本研究结合黄独素 B 对内源性胆汁酸代谢网络变化及肝脏功能的影响表明黄独素 B 可致小鼠肝毒性, 是黄药子致肝毒性的主要毒性成分之一。

由于中药化学成分及作用机制的复杂性, 其毒性效应物质基础一直是有毒中药研究的“瓶颈”^[13, 14]。本文以与肝毒性相关的胆汁酸为切入点, 研究黄药子及其化学成分对体内内源性物质变化的影响, 探讨与黄药子毒性相关的化学标识物和生物标识物, 为中药黄药子毒性物质基础及肝毒性机制的阐明奠定基础。

References

- [1] Shi JM. Pharmacognostical study of *Rhizoma Dioscoreae bulbifera* [J]. Guiding J Tradit Chin Med Pharm (中医药导报), 2008, 14: 78–81.
- [2] Li YJ, Liu SM, Luo MM, et al. The express and principle study of liver toxicity of *Dioscorea bulbifera* L. [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2005, 11: 40–42.
- [3] Zhu FL, Jia L. Research progress of *Rhizoma dioscoreae bulbiferae* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2006, 1: 851–853.
- [4] Du LX, Luo MM, Liu SM. Current toxicological research progress of *Rhizoma Dioscorea bulbifera* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2007, 9: 71–72.
- [5] Wang JM, Ji LL, Liu H, et al. Study of the hepatotoxicity induced by *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in mice [J]. Biosci Trends, 2010, 4: 79–85.
- [6] Yang L, Xiong AZ, He YQ, et al. Bile acids metabonomic study on the CCl₄- and r-naphthylisothiocyanate-induced animal models: quantitative analysis of 22 bile acids by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chem Res Toxicol, 2008, 21: 2280–2288.
- [7] Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease [J]. Arch Intern Med, 1999, 159: 2647–2658.
- [8] Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, et al. Mechanisms of hepatotoxicity [J]. Toxicol Sci, 2002, 65: 166–176.
- [9] Nunes de Paiva MJ, Pereira Bastos de Siqueira ME. Increased serum bile acids as a possible biomarker of hepatotoxicity in Brazilian workers exposed to solvents in car repainting shops [J]. Biomarkers, 2005, 10: 456–463.
- [10] Zhang XY, Yang J, Yin XF, et al. Hepatobiliary transport of glutathione and its role in cholestasis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 327–332.
- [11] Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology and therapeutics [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65: 2461–2483.
- [12] Tan XQ, Ruan JL, Chen HS, et al. Study on anti-inflammatory constituents of *Dioscorea bulbifera* L. [J]. Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2003, 24: 677–679.
- [13] Luo X, Bi KS, Wang X, et al. Quality assessment of the Chinese traditional medicine by chemical pattern recognition [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1993, 28: 936–940.
- [14] Liu CX. Difficulty and hot-points on pharmacokinetics studies of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 395–401.