

## 黄独素B致小鼠急性肝损伤的代谢组学研究<sup>△</sup>

巫圣乾<sup>1,2,3\*</sup>, 张璐<sup>1,2,3</sup>, 龚梦鹃<sup>1,2,3</sup>, 王淑美<sup>1,2,3</sup>, 梁生旺<sup>1,2,3</sup>, 邹忠杰<sup>1,2,3#</sup>(1.广东药科大学中药学院, 广州 510006; 2.国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室, 广州 510006; 3.广东高校中药质量工程技术研究中心, 广州 510006)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3046-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.05

**摘要** 目的:从代谢层面探索黄独素B致小鼠急性肝损伤的潜在生物标志物,研究其肝毒性作用机制。方法:将24只小鼠随机分成正常组(0.5%羧甲基纤维素钠溶液)和黄独素B组(200 mg/kg),每组12只。一次性灌胃给予相应药物24 h后,检测小鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平和肝组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;采用苏木精-伊红染色法观察肝组织病理学变化;采用核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)检测尿液和肝组织中的代谢产物水平,并采用正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)筛选黄独素B肝毒性的潜在生物标志物。结果:与正常组比较,黄独素B组小鼠血清中ALT、AST水平均显著上升,肝组织中MDA水平显著上升、SOD水平显著下降( $P<0.05$ );肝组织细胞受损,出现明显病理性改变;尿液和肝组织中代谢产物水平发生显著改变,各筛选得到3种和6种与肝损伤相关的潜在生物标志物( $P<0.05$ ),分别为 $\alpha$ -酮戊二酸、二甲胺、氧化三甲胺(尿液)和谷胱甘肽、牛磺酸、肌苷、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸(肝组织)。结论:黄独素B主要是通过自由基氧化作用损伤肝细胞,其对机体三羧酸循环、氨基酸代谢、肠道菌群产生影响可能是其肝毒性的作用机制。

**关键词** 黄独素B;急性肝损伤;肝毒性;代谢组学;核磁共振氢谱;小鼠

### Metabonomic Study on Acute Hepatic Injury Induced by Diosbulbin B in Mice

WU Shengqian<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Lu<sup>1,2,3</sup>, GONG Mengjuan<sup>1,2,3</sup>, WANG Shumei<sup>1,2,3</sup>, LIANG Shengwang<sup>1,2,3</sup>, ZOU Zhongjie<sup>1,2,3</sup>(1. School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Key Lab of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica, State Administration of TCM, Guangzhou 510006, China; 3. Engineering & Technology Research Center for TCM Quality of the Universities of Guangdong Province, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To explore potential biomarkers of acute hepatic injury induced by diosbulbin B and study its hepatotoxicity mechanism from metabolic aspect. METHODS: Totally 24 mice were randomly divided into normal group (0.5% sodium carboxymethylcellulose solution) and diosbulbin B group (200 mg/kg), with 12 mice in each group. They were given relevant medicine intragastrically. 24 h later, the levels of ALT, AST in serum and MDA, SOD in liver tissue were determined. HE staining was used to observe the histopathological changes of liver tissue. The levels of metabolism products in urine and liver tissue were determined by <sup>1</sup>H-NMR. The potential biomarkers of diosbulbin B hepatotoxicity were screened by OPLS-DA. RESULTS: Compared with normal group, the levels of ALT and AST in serum, the level of MDA in liver tissue were increased significantly in diosbulbin B group, while the level of SOD in liver tissue was decreased ( $P<0.05$ ). The liver cells were damaged, with marked pathological changes. The levels of metabolic products were significantly changed in urine and liver tissue. Three and six potential biomarkers related to acute hepatic injury were obtained ( $P<0.05$ ), i.e.  $\alpha$ -ketoglutaric acid, dimethylamine, trimethylamine oxide (urine) and glutathione, taurine, inosine, tyrosine, phenylalanine, histidine (liver tissue). CONCLUSIONS: The hepatic injury induced by diosbulbin B are caused by free radical oxidation. The mechanism of hepatotoxicity may be the effect of diosbulbin B on tricarboxylic acid cycle, amino acid metabolism and intestinal flora.

**KEYWORDS** Diosbulbin B; Acute hepatic injury; Hepatotoxicity; Metabonomics; <sup>1</sup>H-NMR; Mice

黄药子为薯蓣科薯蓣属植物黄独(*Dioscorea bul-*

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81403075、81603397)

\* 硕士研究生。研究方向:中药提取分离技术与应用。E-mail: wushengqian55@126.com

# 通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药效物质基础及代谢组学。电话:020-39353240。E-mail: Zouzongjie@139.com

*bifera* L.)的干燥块茎,其药性苦寒,归脾、肝经,具有消痰散结、清热解毒之功效<sup>[1]</sup>。研究表明,黄药子具有抗癌、抗菌、止痛、抗炎等药理作用<sup>[2]</sup>,但同时具有肝毒性,可引起小鼠肝损伤<sup>[3]</sup>。黄独素B(Diosbulbin B)属于二萜内酯类化合物,为黄药子的主要毒性成分<sup>[4-5]</sup>,深入研究其肝毒性对黄药子的开发和临床应用具有重要意义。

代谢组学是20世纪90年代中期发展起来的一门新兴学科,其是通过分析生物体因病理、生理刺激或基因改变所致的代谢产物的变化来研究生物体系代谢途径的一种技术<sup>[6]</sup>。核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)代谢组学技术是代谢组学研究中常用的一种技术,具有不破坏样本、分辨率高及重现性佳等的优点<sup>[7]</sup>,适用于中药等复杂成分的分析。已有研究采用代谢组学技术分析了黄药子乙醇提取物致大鼠肝损伤的生物标志物<sup>[8]</sup>,并通过胆汁酸代谢网络分析发现黄药子和黄独素B诱导肝损伤的作用机制可能与胆汁酸及脂肪酸代谢密切相关<sup>[9-10]</sup>。本研究利用<sup>1</sup>H-NMR技术对黄独素B致小鼠急性肝损伤后尿液和肝组织的代谢产物变化进行研究,鉴定相关潜在的生物标志物,以明确黄独素B肝损伤作用的代谢通路,为揭示其肝毒性的分子机制奠定实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

AVANCE III 500 MHz型全数字化超导核磁共振谱仪(瑞士Bruker公司);ELX-808型酶标仪(美国BioTek公司);1-14型低温离心机(德国Sigma公司);Vectra智能切片分析系统(美国PerkinElmer公司)。

### 1.2 药品与试剂

黄独素B单体化合物(广东隼沐生物科技有限公司,批号:wkq16120204,纯度:99.47%);丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20171022、20171021、20171024、2017102);叠氮化钠(NaN<sub>3</sub>,天津市福晨化学试剂厂);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,上海沪试实验器材股份有限公司);氘水(D<sub>2</sub>O)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)、3-(三甲基硅烷基)氘代丙酸钠(TSP-d<sub>4</sub>)(美国Sigma公司);乙腈为色谱纯,水为蒸馏水。

### 1.3 动物

SPF级昆明种小鼠,雄性,体质量20~24 g,购于南方医科大学实验动物中心,动物生产许可证号:SYXK(粤)2016-0167。动物均在室温(20±2)℃、相对湿度50%的屏障环境中适应性饲养3 d后再进行后续实验。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

取24只小鼠,按体质量随机分为正常组和黄独素B组,每组12只。参照文献[4]方法并结合预实验结果,黄独素B组小鼠一次性灌胃黄独素B混悬液(200 mg/kg,给药前以0.5% CMC-Na溶液制成10 mg/mL的混悬液);正常组小鼠灌胃等体积0.5% CMC-Na溶液。

### 2.2 生物样本的取样

给药24 h后,选取正常组和黄独素B组小鼠各6只,于眼眶后静脉丛取血并置于离心管,室温下凝固后,在4℃条件下以4 000 r/min离心10 min,取上层血清,进行血清实验室指标检测;然后颈椎脱臼处死小鼠,剖取肝脏,进行肝组织实验室指标检测和病理组织学检查。两组其余6只小鼠于给药后分别放置于代谢笼内,收集24

h尿液(集尿器置于冰上,并加入1% NaN<sub>3</sub>溶液作为防腐剂),然后颈椎脱臼处死小鼠并剖取肝脏,进行尿液和肝组织代谢组学分析。

### 2.3 血清和肝组织实验室指标检测

取“2.2”项下小鼠血清,检测ALT、AST水平;取“2.2”项下小鼠部分肝组织制成匀浆,在4℃条件下以3 500 r/min离心10 min,取上清,检测MDA、SOD水平。试验严格按照相应试剂盒说明书进行操作。

### 2.4 肝组织病理学观察

取“2.2”项下小鼠另外部分肝组织,以10%福尔马林溶液固定12 h以上,依次进行乙醇梯度脱水、透明、浸蜡包埋,切片(5 μm)并脱蜡后进行苏木精-伊红染色法(HE)染色。置于光学显微镜下观察小鼠肝组织的病理学变化情况。

### 2.5 尿液和肝组织代谢组学分析

2.5.1 尿液样本处理 取“2.2”项下小鼠尿液样本400 μL,加入PBS 200 μL后静置20 min,在4℃条件下以3 500 r/min离心10 min。取上清液500 μL加至NMR样品管中,再加入含0.05% TSP-d<sub>4</sub>的D<sub>2</sub>O 50 μL,振荡混匀,转移至核磁管中待测。

2.5.2 肝脏样本处理 取“2.2”项下小鼠肝脏小叶样本,称质量后按5 mL/g的量加入50%乙腈制成匀浆,在4℃条件下以12 000 r/min离心10 min。取上清液750 μL冻干后,加入PBS 450 μL和含0.05% TSP-d<sub>4</sub>的D<sub>2</sub>O 450 μL溶解,在4℃条件下以12 000 r/min离心10 min,取上清液550 μL转移至核磁管中待测。

2.5.3 <sup>1</sup>H-NMR数据采集及分析 设置实验温度为298 K,采用预饱和的1D NOESY脉冲序列压制水峰,采样时间为3.28 s,弛豫延迟时间为3.0 s;设置样本谱宽为10 kHz,采样点数为64 K,采集次数为128次;采用线宽为0.3 Hz的指数窗函数进行傅里叶变换。采用MestReNova 6.1软件对所获<sup>1</sup>H-NMR图谱进行手动相位和基线校正后,参照TSP-d<sub>4</sub>(δ0)对图谱的化学位移进行定标。在δ0.5~9.5区域按δ0.01等间隔分段积分,对于尿液和肝组织样本,分别将区域δ4.47~6.01和δ4.68~5.20设为0积分段,然后采用Excel 2010软件对图谱各分段积分值进行归一化处理。将所得数据乘以10 000后导入SIMCA-P 12.0软件,经Pareto标度化预处理后,进行正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。

2.5.4 模型可靠性验证及代谢物鉴定 采用7倍交叉验证法对OPLS-DA模型的可靠性进行验证<sup>[11]</sup>,得到OPLS-DA模型的主要参数。尿液:R2X(cum)=0.70, R2Y(cum)=0.90, Q2(cum)=0.81;肝组织:R2X(cum)=0.87, R2Y(cum)=0.83, Q2(cum)=0.89。从上述参数可以看出本模型具有较高的可靠性。然后,根据化学位移值、峰的裂分、耦合常数及相关文献报道<sup>[12-13]</sup>对代谢物谱峰进行鉴定。

### 2.6 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两

比较采用Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 小鼠血清和肝组织实验室指标检测结果

与正常组比较,黄独素B组小鼠血清中ALT、AST水平和肝组织中MDA水平均显著上升,肝组织中SOD水平显著下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明黄独素B可造成小鼠肝组织损伤。两组小鼠血清中ALT、AST和肝组织中MDA、SOD水平检测结果见表1。

表1 两组小鼠血清中ALT、AST和肝组织中MDA、SOD水平检测结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Results of levels of ALT, AST in serum and MDA, SOD in liver tissue of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

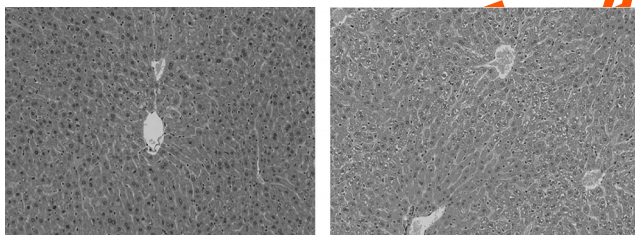
组别	血清		肝组织	
	ALT, U/L	AST, U/L	MDA, nmol/mg prot	SOD, U/mg prot
正常组	18.33 ± 2.33	32.14 ± 2.98	7.20 ± 1.01	131.47 ± 12.38
黄独素B组	154.49 ± 23.52*	73.19 ± 7.25*	9.39 ± 1.63*	98.48 ± 9.09*

注:与正常组比较, \* $P < 0.05$

Note: vs. normal group, \* $P < 0.05$

#### 3.2 小鼠肝组织病理学观察结果

正常组小鼠肝组织细胞边界清晰、排列整齐、形态正常,未见组织病理学异常;黄独素B组小鼠肝组织细胞出现少量脂肪样变性,部分细胞出现水肿,表明黄独素B对小鼠肝组织细胞造成了损伤,引起了明显的肝组织病理性改变。两组小鼠肝组织病理学显微图见图1。



A. 正常组 B. 黄独素B组

图1 两组小鼠肝组织病理学显微图(HE染色, ×200)

Fig 1 Micrographs of liver tissue pathology of mice in each group (HE staining, ×200)

#### 3.3 小鼠尿液和肝组织代谢组学分析结果

小鼠尿液和肝组织的<sup>1</sup>H-NMR图谱见图2、图3;正常组与黄独素B组小鼠代谢物差异的OPLS-DA分析结果见图4。由图4可见,黄独素B组与正常组样本点在PC1维上可以完全分开,表明黄独素B引起小鼠肝损伤后使机体的代谢表型发生了明显变化。

选取OPLS-DA模型中变量重要性投影参数VIP > 1的差异变量,再用t检验对筛选到的差异变量在黄独素B组与正常组之间进行验证,以变量差异的 $P < 0.05$ 判定其为潜在的生物标志物<sup>[14]</sup>。按照上述原则,最终在尿液和肝组织中分别筛选得到 $\alpha$ -酮戊二酸等3种和谷胱甘肽等6种代谢物的峰面积差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),判定其为黄独素B肝毒性相关的潜在生物标志物,详见表2。

### 4 讨论

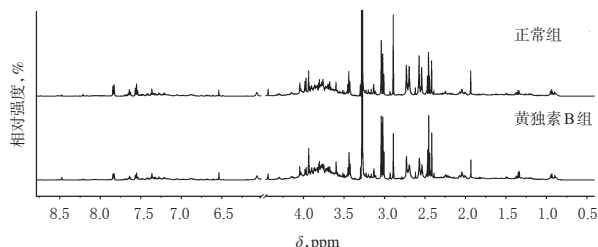


图2 两组小鼠尿液<sup>1</sup>H-NMR图谱

Fig 2 <sup>1</sup>H-NMR spectra of urine of mice in each group

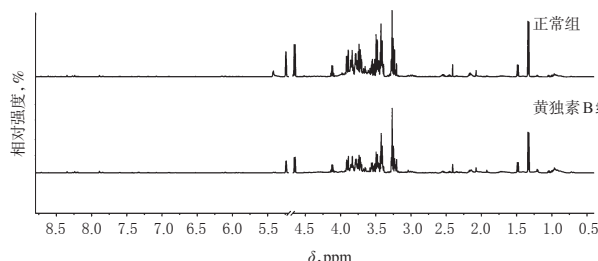


图3 两组小鼠肝组织<sup>1</sup>H-NMR图谱

Fig 3 <sup>1</sup>H-NMR spectra of liver tissue of mice in each group



注: ■为正常组; ▲为黄独素B组

Note: ■ means normal group; ▲ means diosbulbin B group

图4 两组小鼠尿液和肝组织代谢物差异的OPLS-DA分析图

Fig 4 OPLS-DA analysis diagram of metabolite difference in urine and liver tissue of mice in each group

#### 4.1 黄独素B造成肝损伤的作用机制

ALT、AST在正常状态时即存在于肝细胞中,两者水平明显上升则表明肝细胞受到了损伤<sup>[15]</sup>;MDA为机体内脂质过氧化反应的重要产物,其水平的高低可间接反映机体细胞受自由基攻击后的损伤程度;SOD是生物体内重要的抗氧化酶,是生物体内清除自由基的主要物质,其可对抗与阻断自由基对细胞造成的损害并及时修复受损细胞<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,与正常组比较,黄独素B组小鼠血清中ALT、AST水平和肝组织中MDA水平均显著上升,肝组织中SOD水平显著下降,表明黄独素B可通过自由基氧化作用而损伤肝细胞。

肝细胞脂肪样变性的主要原因为脂质蛋白合成障碍、中性脂肪合成过多、细胞发生水肿<sup>[17-18]</sup>。本研究结果显示,黄独素B组小鼠肝组织细胞发生了脂肪样变性及水肿。其原因可能是黄独素B引起小鼠肝细胞脂质代谢异常,并通过自由基氧化作用损伤细胞膜,造成细胞膜通透性增加,从而使其发生水肿。

表2 小鼠尿液和肝组织中与黄独素B肝毒性相关的潜在生物标志物( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Potential biomarkers related to diosbulbin B hepatotoxicity in urine and liver tissue of mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

生物样本	代谢产物	$\delta H$	VIP	归一化后峰面积	
				正常组	黄独素B组
尿液	$\alpha$ -酮戊二酸	2.45(t)	4.7	81.89 $\pm$ 43.05	137.64 $\pm$ 28.05*
		3.01(t)	5.0	34.64 $\pm$ 14.71	92.50 $\pm$ 40.35*
	二甲胺	2.73(s)	4.3	49.02 $\pm$ 8.27	90.42 $\pm$ 27.88*
肝组织	氧化三甲胺	3.27(s)	10.4	337.42 $\pm$ 81.43	131.85 $\pm$ 34.20*
	谷胱甘肽	2.55(m)	1.9	19.53 $\pm$ 1.63	15.77 $\pm$ 3.29*
	牛磺酸	3.26(t)	2.4	201.42 $\pm$ 13.31	172.48 $\pm$ 11.54*
	肌苷	6.10(d)	1.8	4.74 $\pm$ 1.36	2.96 $\pm$ 1.22*
	酪氨酸	6.91(d)	1.9	1.38 $\pm$ 0.47	2.03 $\pm$ 0.45*
	苯丙氨酸	7.38(m)	2.1	0.96 $\pm$ 0.37	1.53 $\pm$ 0.25*
	组氨酸	7.89(s)	2.8	2.04 $\pm$ 1.48	6.92 $\pm$ 0.86*

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;"s"为单峰,"d"为双重峰,"t"为三重峰,"m"为多重峰

Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ ; "s" was single peak, "d" was double peak, "t" was triple peak, "m" was multiple peak

#### 4.2 黄独素B引发肝损伤后机体的多参数代谢应答

谷胱甘肽能激活各种酶,在三羧酸循环中起到重要作用,能促进脂肪、蛋白质、糖代谢,使机体获得高能量,进而影响细胞的代谢过程<sup>[19]</sup>,改善中毒性肝炎、感染性肝炎的症状。肌苷为腺嘌呤的前体,能活化丙酮酸氧化酶系,提高辅酶A的活性,而辅酶A与人体能量代谢、物质合成、免疫系统的激活都密切相关,其可使组织细胞在低能量、缺氧状态下继续顺利进行代谢<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,黄独素B组小鼠肝组织中谷胱甘肽和肌苷水平均显著下降,说明其体内糖、蛋白质等的代谢受到影响,能量代谢减少,提示小鼠发生肝损伤使得肝组织能量代谢水平下降。

牛磺酸具有渗透调节、抗氧化、稳定细胞膜等生理作用<sup>[21]</sup>,可通过减弱氧化应激和抑制脂质过氧化来缓解长期饮酒造成的肝损伤<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,黄独素B组小鼠肝组织中牛磺酸水平显著降低,表明黄独素B可能通过氧化应激与脂质过氧化两方面造成肝损伤。另外,牛磺酸可与游离胆汁酸结合形成结合型胆汁酸,饮食中的脂肪酸又能改变胆汁酸成分<sup>[8]</sup>,而胆汁酸又可对肠道菌群产生影响。因此,牛磺酸和胆汁酸均与肠道菌群有较密切关系,其水平变化提示黄独素B的肝毒性可能与肠道菌群改变有关。

$\alpha$ -酮戊二酸是三羧酸循环的重要中间产物,连接着细胞内的碳-氮代谢,参与体内多种物质的合成代谢<sup>[23]</sup>;酪氨酸、苯丙氨酸代谢通路主要在肝组织中进行,其水平的变化与肝功能密切相关<sup>[24]</sup>;氧化三甲胺与二甲胺为肠道菌群代谢活动的产物,胆碱在肠道内经由肠道微生物作用生成三甲胺,进而被代谢成氧化三甲胺与二甲胺<sup>[25]</sup>。本研究结果显示,黄独素B组小鼠体内酪氨酸、苯丙氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸水平均异常升高,提示肝细胞内线粒体活性下降,相关代谢物堆积,最终导致能量合成减少、细

胞受损;同时,氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸)水平显著上升,提示氧化应激可能造成了肝组织氨基酸代谢紊乱及蛋白质变性降解<sup>[26]</sup>;而氧化三甲胺与二甲胺水平的异常变化则说明黄独素B可能引起小鼠肠道菌群生态的破坏,导致肠道菌群功能失常。本研究结果显示,黄独素B能分别使小鼠尿液中3种和肝组织中6种与急性肝损伤相关的潜在生物标志物水平发生显著改变,表明其造成小鼠肝损伤可能与机体能量和物质代谢、氨基酸代谢及氧化应激有关。

综上所述,黄独素B主要是通过自由基氧化作用损伤肝细胞,其肝毒性的可能机制为其对机体三羧酸循环、氨基酸代谢、肠道菌群等产生影响。

#### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:226.
- [2] 张骥鹏,高旺,高慧媛. 中药黄独的研究进展[J]. 中国现代中药,2008,10(2):34-37.
- [3] 宋聿明,苏钰文,江振洲,等. 黄药子肝脏毒性研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2016,21(2):237-240.
- [4] 牛成伟,陆宾,季莉莉,等. 黄独素B诱导小鼠急性肝损伤及其机制[J]. 中国中药杂志,2014,39(7):1290-1292.
- [5] 曲晓宇,周利婷,张四喜,等. 黄独素B致小鼠肝损伤过程中对肝外排型转运体Mrp2表达的影响[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(19):1633-1636.
- [6] NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living system to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11):1181-1189.
- [7] 杨中良,杨秀云,李剑,等. 代谢组学分析技术在中药毒理研究中的应用[J]. 中国现代中药,2014,16(8):681-684.
- [8] 盛云华,乔靖怡,金若敏,等. 基于<sup>1</sup>H-核磁共振代谢组学研究黄药子乙醇提取物致肝损伤的潜在生物标志物[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(4):306-316.
- [9] 徐英,陈崇崇,杨莉,等. 基于胆汁酸代谢网络分析中药黄药子的肝毒性[J]. 药学学报,2011,46(1):39-44.
- [10] 熊印华,徐英,杨莉,等. 黄药子诱导肝损伤大鼠血清脂肪酸的代谢轮廓[J]. 药学学报,2017,52(5):753-759.
- [11] 邹忠杰,施旭光,龚梦鹃. 利血平所致大鼠脾虚证代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(3):291-294.
- [12] DING L, HAO F, SHI Z, et al. Systems biological responses to chronic perfluorododecanoic acid exposure by integrated metabonomic and transcriptomic studies[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(6):2882-2891.
- [13] WEI L, LIAO P, WU H, et al. Metabolic profiling studies on the toxicological effects of realgar in rats by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 234(3):314-325.
- [14] 龚梦鹃,岳贺,王淑美,等. 基于血清和肝代谢组学研究护肝片的保肝作用[J]. 中国药房,2017,28(34):4776-4780.
- [15] 张晓鸣,杜国有. ALT、AST、ALP、 $\gamma$ -GT、LDH联合检测

# 白及药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析<sup>Δ</sup>

刘刚<sup>1,2\*</sup>, 丁志山<sup>3</sup>, 刘育辰<sup>1,2#</sup>, 张永萍<sup>1,2</sup>, 万超<sup>1</sup>, 罗成凯<sup>1</sup>(1. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550025; 3. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

中图分类号 R927.2; R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3050-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.06

**摘要** 目的: 建立白及药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并对样品进行聚类。方法: 采用HPLC法, 色谱柱为Diamondsil C<sub>18</sub>, 流动相为0.1%磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为270 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μL。以1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯为参照, 绘制10批药材样品的HPLC图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)进行相似度评价, 确定共有峰, 并采用SPSS 23.0统计软件对其进行聚类分析。结果: 10批药材样品的HPLC图谱有15个共有峰, 其中9批相似度均大于0.90; 经验证, 10批药材样品HPLC图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。10批药材样品可聚为3类, S1、S2、S3、S4、S6、S8、S9、S10聚为第1类, S7聚为第2类, S5为第3类。结论: 所建HPLC指纹图谱和聚类分析结果可为白及药材的质量控制提供参考。

**关键词** 白及; 高效液相色谱法; 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯; 指纹图谱; 聚类分析

## Establishment on HPLC Fingerprint of *Bletilla striata* and Their Cluster Analysis

LIU Gang<sup>1,2</sup>, DING Zhishan<sup>3</sup>, LIU Yuchen<sup>1,2</sup>, ZHANG Yongping<sup>1,2</sup>, WAN Chao<sup>1</sup>, LUO Chengkai<sup>1</sup>(1. College of Pharmacy, Guiyang University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. National Engineering Research Center for Miao's Medicine, Guiyang 550025, China; 3. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of *Bletilla striata* and conduct cluster analysis. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamondsil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 270 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. Using 1, 4-two [4-(glucose oxy) benzyl]-2-isobutyl malate as reference, HPLC chromatograms of 10 batches of medicinal samples were determined. Similarity evaluation was conducted by using *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* (2004 A edition). Common peaks were determined, and cluster analysis was also conducted for it by using SPSS 23.0 statistic software. RESULTS: There were 15 common peaks in 10 batches of samples, and the similarities of 9 batches were more than 0.90. After validation, HPLC chromatograms of 10 batches of

在肝病诊断中的意义[J]. 右江民族医学院学报, 1996, 12(1): 50-52.

[16] 斯琴, 布日额. 苦瓜提取物影响II型糖尿病小鼠血清SOD、MDA的Meta分析[J]. 中医药信息, 2015, 32(1): 17-20.

[17] 丁晓东, 范建高. 非酒精性脂肪肝变性和脂肪性肝炎的发生机制[J]. 现代消化及介入诊疗, 2009, 14(4): 237-242.

[18] 李妍, 刘玉莲, 纪朋艳, 等. 五味子水提物对微波辐射引起大鼠肝细胞氧化应激损伤的预防作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2013, 39(6): 1173-1176.

[19] 贾浩, 孙吉康, 王平, 等. 单面针根和叶的代谢组比较研

究[J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(10): 60-65.

[20] 钱程江. 六大类常见护肝药的功效[J]. 肝博士, 2010(4): 52.

[21] IBÁÑEZ-SAMANIEGO L, SALCEDO M, VAQUERO J, et al. De novo autoimmune hepatitis after liver transplantation: a focus on glutathione S-transferase theta 1[J]. *Liver Transpl*, 2017, 23(1): 75-85.

[22] 王永成, 陈涛, 石婷, 等. 嘌呤核苷及其衍生物的代谢工程[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(5): 87-95.

[23] 付莹, 王红权, 赵玉蓉. α-酮戊二酸及其生理作用[J]. 湖南饲料, 2017(5): 31-33.

[24] 仇守蓓. 基于代谢组学的中药菊三七致肝毒性机理研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.

[25] 姜东京, 张丽, 曹雨诞, 等. 肠道菌群在中药研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(17): 3218-3225.

[26] 周宁. 酒精性肝病发生发展的基因组学和蛋白质组学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.

(收稿日期: 2018-05-06 修回日期: 2018-09-30)

(编辑: 段思怡)

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81673672); 国家公益性行业科研专项经费项目(No.201507002); 贵州省教育厅一流学科项目(No.黔教科研发[2017]85-8)

\* 实验师, 硕士。研究方向: 中药资源学和中药鉴定学。E-mail: liugang888\_2000@163.com

# 通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中药及民族药资源分类鉴定与质量控制。电话: 0851-88233089