

基于 GC-MS 代谢组学的牛黄解毒片配伍减毒机制研究

马袁静¹, 许伟辰², 单进军², 李永明¹, 吴骁¹

(1. 南京中医药大学医学院, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏省方剂研究重点实验室/江苏省方剂高技术研究重点实验室/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 的代谢组学技术探讨牛黄解毒片复方配伍的减毒作用及机制。**方法** 将 24 只小鼠随机分为空白组、雄黄组 ($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和牛黄解毒片组 ($7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 8 只, 连续口服给药 14 d, 采集各组小鼠的肝脏和肾脏, 观察病理形态学变化; 测定肝脏中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和肾脏中肌酐 (Cr)、尿酸 (UA) 的含量; GC-MS 代谢组学分析肝脏和肾脏中内源性代谢物的差异。**结果** 与雄黄组比较, 牛黄解毒片组小鼠肝脏中 ALT、AST 和肾脏中 Cr、UA 含量发生显著变化 ($P < 0.05$), 肝脏和肾脏病理损伤减轻; 筛选出柠檬酸、抗坏血酸、天冬酰胺、左旋多巴、苯丙氨酸等 17 种与减毒相关的生物标志物, 涉及谷氨酰胺和谷氨酸代谢、精氨酸的生物合成、色氨酸代谢、酪氨酸和色氨酸的生物合成、苯丙氨酸代谢等通路。**结论** 牛黄解毒片复方配伍降低了雄黄的肝肾毒性, 减毒作用可能与回调氨基酸代谢有关。

关键词: 雄黄; 牛黄解毒片; 配伍减毒; 代谢组学; 气相色谱-质谱联用; 氨基酸代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2024)08-0823-08

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2024.0823

引文格式: 马袁静, 许伟辰, 单进军, 等. 基于 GC-MS 代谢组学的牛黄解毒片配伍减毒机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(8): 823-830.

Study on the Detoxification Mechanism of Niu Huang Jie Du Tablets Based on GC-MS Metabolomics

MA Yuanjing¹, XU Weichen², SHAN Jinjun², LI Yongming¹, WU Xiao¹

(1. School of Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. School of Pharmacy, Jiangsu Key Laboratory of Formula Research, Jiangsu Key Laboratory of High-Tech Research of Formula, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the toxicity-reducing effects and mechanisms of Niu Huang Jie Du Tablets (NHJDT) by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) metabolomics. **METHODS** 24 mice were randomly divided into control, realgar ($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and NHJDT ($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups with 8 mice in each group. The liver and kidney of mice were collected for pathologic examination after 14 d oral administration to mice. The content of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in liver and creatinine (Cr) and uric acid (UA) in kidney was also determined. The differences of endogenous metabolites in liver and kidney were further analyzed by GC-MS metabolomics. **RESULTS** The contents of ALT and AST in the liver as well as the Cr and UA in kidney of mice were significantly changed after NHJDT intervention ($P < 0.05$). NHJDT alleviated the pathological damage of liver and kidney in mice. A total of 17 biomarkers related to detoxification were screened, including citric acid, ascorbic acid, asparagine, levodopa and phenylalanine. The changes of metabolites mainly involved in glutamine and glutamate metabolism, arginine biosynthesis, tryptophan metabolism, tyrosine and tryptophan biosynthesis, and phenylalanine metabolism. **CONCLUSION** NHJDT with compound compatibility could reduce the hepatorenal toxicity of realgar. The detoxification mechanism may be related to the regulation of amino acid metabolism.

KEYWORDS: realgar; Niu Huang Jie Du Tablets; detoxification by compatibility; metabolomics; gas chromatography-mass spectrometry; amino acid metabolism

矿物药因其显著的治疗效果在我国已有 2 000 余年的应用历史。雄黄 (As_2S_2) 是一种含砷矿物药,

收稿日期: 2023-03-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82104523); 江苏省自然科学基金项目 (BK20200843, BK20211296); 南京中医药大学国家自然科学基金青年科学基金配套经费项目 (XPT82104523); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (中西医结合)

第一作者: 马袁静, 女, 硕士研究生, E-mail: 18900297731@163.com

通信作者: 吴骁, 女, 副教授, 主要从事中药学研究, E-mail: xwu@njucm.edu.cn;

李永明, 男, 教授, 主要从事分子生物学研究, E-mail: lym-569@njucm.edu.cn

自古以来就被认为对痈疽、牛皮癣、疟疾、惊风、癫痫和寄生虫感染有显著疗效^[1]。2020 年版《中国药典》收载含有雄黄的复方制剂多达 37 种,其中不乏多种小儿用药^[2]。其中,牛黄解毒片是临床应用最为广泛的清热解毒经典名方,由雄黄(6.4%)、人工牛黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、冰片和甘草配伍而成,用于治疗急性扁桃体炎、咽炎、牙周炎和口腔溃疡等疾病^[3]。

众所周知,雄黄因含砷具有急性和慢性毒性^[4]。随着临床砷中毒案例的时有发生^[5-6],含雄黄复方制剂的健康风险问题一直令人担忧。但是雄黄中砷的生物利用度极低,只有 4% 的砷可被吸收入血^[7],其毒性不能与无机砷相提并论,并且我们前期研究表明,牛黄解毒片复方配伍后砷毒性降低^[8-9],但其潜在减毒机制仍有待探索。因此,阐明牛黄解毒片的配伍减毒机制对其临床合理应用具有重要意义。

药物代谢和毒性效应与小分子代谢物密切相关,尤其是通过口服给药^[10]。近年来,代谢组学在中药减毒机理的探究中发挥重要作用^[11-13]。通过代谢组学分析方法,可以直观找到影响药物毒性的差异代谢物及其代谢通路,以便更加高效地探索毒性发生机制。本研究通过比较小鼠分别单方雄黄和复方牛黄解毒片给药后的砷毒性,评价牛黄解毒片复方配伍的减毒作用;采用 GC-MS 代谢组学分析肝脏和肾脏中与减毒相关的生物标志物及代谢通路,阐明牛黄解毒片的配伍减毒机制,为临床含雄黄复方制剂的合理应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

24 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠,体质量 18~22 g,购于青龙山生物有限公司,许可证号:SCXK(苏)2019-0002。实验前饲养 7 d 适应环境,光照/黑暗:12 h/12 h,温度(22±2)℃,相对湿度(55±2)%,自由摄食饮水。所有动物实验符合实验动物饲料和使用指导原则,并通过南京中医药大学伦理委员会批准(批号:202203A001)。

1.2 药品与试剂

牛黄解毒片(每片雄黄含量 0.05 g,批号:18121292,北京同仁堂科技发展股份有限公司);雄黄(批号:20321323,河南三门峡玉皇山制药有限公司);4%多聚甲醛溶液(批号:21321635,兰杰柯科技有限公司);0.9%生理盐水(批号:11B21072405,山

东齐都药业有限公司);甲醇(批号:I880707710,德国 Merck 公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);甲氧基胺盐酸盐(批号:21323143)、吡啶(批号:22425213)、*N*-*O*-双(三甲硅基)三氟乙酰胺(BSTFA)(批号:2324357)、1,2-¹³C 肉豆蔻酸(批号:19057321、正己烷(批号:21324381)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(批号:20231107)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(20231108)、肌酐(Cr)试剂盒(批号:20231107)、尿酸(UA)试剂盒(批号:20231108)均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

Trace 1310-TSQ 8000 Evo 三重四级杆气质联用仪(美国 Thermo 公司);TG-5MS 毛细管色谱柱(0.25 mm×30 m,0.25 μm,美国 Thermo Fisher 公司);Allegra 64 R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(美国 Scientific industries 公司);TY92-IIIDN 超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);SPD1010-230 型离心浓缩仪(美国 Thermo Fisher 公司);ME230 电子天平(美国 Mettler Toledo 公司);SW-CJ-2FD 通风工作台(苏州净化有限公司);AMR-100 型全自动酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

2 方法

2.1 灌胃溶液的制备

0.5% CMC-Na 溶液:称取 5 g CMC-Na 于 1 000 mL 纯水中加热搅拌至溶解,冷却后将溶液体积补足至 1 000 mL,即得。

雄黄灌胃溶液:精密称定水飞雄黄适量,研磨成极细粉,加入 0.5% CMC-Na 溶液,配制成质量浓度为 70 mg·mL⁻¹ 的混悬液。

牛黄解毒片灌胃溶液:精密称定牛黄解毒片适量,充分研磨至极细粉,加入 0.5% CMC-Na 溶液,配制成质量浓度为 500 mg·mL⁻¹ 的混悬液。

2.2 动物分组及给药

24 只雄性 ICR 小鼠随机分为空白组、雄黄组及牛黄解毒片组,每组 8 只。根据文献报道^[14-17]进行预实验,小鼠雄黄给药剂量最终设置为 1.0 g·kg⁻¹,根据雄黄给药剂量等砷含量折算出牛黄解毒片给药剂量为 7.8 g·kg⁻¹。空白组、雄黄组和牛黄解毒片组小鼠分别灌胃 0.5% CMC-Na 溶液、1.0 g·kg⁻¹ 雄黄 0.5% CMC-Na 混悬液和

7.8 g · kg⁻¹ 牛黄解毒片 0.5% CMC-Na 混悬液,每日给药 1 次,给药间隔 24 h,连续给药 14 d。

2.3 生物样本的采集

于末次给药 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠,采集小鼠肝脏和肾脏。取部分肝脏和肾脏样本置于 4% 多聚甲醛中固定,剩余部分于 -80 ℃ 冰箱中冻存,待测。

2.4 检测指标

2.4.1 肝肾组织生化指标检测 分别取 20 mg 肝脏和肾脏组织于离心管中,加入 0.2 mL 0.9% 生理盐水研磨成组织匀浆液,照试剂盒说明书分别测定小鼠肝脏 AST、AST 及肾脏 Cr、UA 含量。

2.4.2 肝肾组织 HE 染色 分别取 4% 多聚甲醛固定的肝肾组织,石蜡包埋并切片,常规 HE 染色后,光镜下观察肝脏和肾脏组织形态学变化。

2.5 肝肾代谢组学研究

2.5.1 样品前处理 取 -80 ℃ 冻存的肝脏、肾脏样本,冰上解冻后,精密称定约 20 mg,加入 200 μL 超纯水低温高速匀浆,取 50 μL 组织匀浆液,加入 200 μL 甲醇溶液(含 12.5 μg · mL⁻¹ 的 1,2-¹³C 肉豆蔻酸),涡旋混匀后于 4 ℃、18 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取 100 μL 上清液于离心浓缩仪中挥干。加入 10 mg · mL⁻¹ 甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液 30 μL,涡旋混匀后于恒温振荡仪中室温 300 r · min⁻¹ 振荡 1.5 h。加入 BSTFA 30 μL,继续振荡 0.5 h 后 18 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取 50 μL 上清液进样。

2.5.2 质控(QC)样本制备 精密量取各组织匀浆液 10 μL,均匀混合后作为 QC 样本,照 2.5.1 项同法操作。分析过程中每间隔 8 个样本插入 1 个 QC 样本。

2.5.3 GC-MS 分析条件 色谱条件:色谱柱为 TG-5MS 毛细管色谱柱(0.25 mm × 30 m,

0.25 μm),载气为高纯氦气(纯度>99.99%),流速为 1.2 mL · min⁻¹,采用分流模式,分流流速为 24.0 mL · min⁻¹,分流比为 20:1。进样口温度为 250 ℃,程序升温:起始温度 60 ℃,保持 1 min 后,以 20 ℃ · min⁻¹ 速率升至 320 ℃ 后,保持 15 min。进样体积为 1 μL。

质谱条件:采用 EI 电离源,电离能量 70 eV,传输线温度 250 ℃,离子源温度 280 ℃。全扫描方式,扫描范围 *m/z* 50~500,采集时间 3.5~19.0 min。

2.5.4 数据处理与分析 将 GC-MS 采集的图谱信息进行峰提取和物质鉴定,得到数据矩阵。将经过前处理后的数据矩阵使用 Metaboanalyst 网站(<https://www.metaboanalyst.ca>)进行主成分分析(PCA)及偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),根据差异倍数(Fold change, *FC*)>1.2 及 *P*<0.05 筛选差异代谢物。将代谢物名称、峰值等信息导入 MetaboAnalyst 数据库进行聚类分析,经 Pareto scaling 归一化后采用 Ward 聚类算法绘制热图,Hypergeometric test 进行通路富集分析,根据 Impact>0.1 及 *P*<0.05 筛选代谢通路。

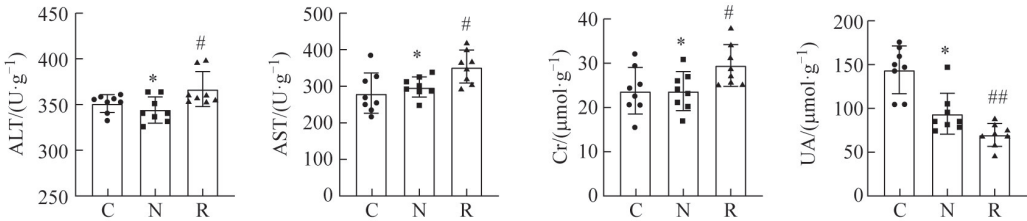
2.6 统计学方法

用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 生化指标分析

结果见图 1,牛黄解毒片组各指标含量与空白组比较未见显著性差异,雄黄组小鼠肝脏中的 AST、ALT 和肾脏中的 Cr、UA 含量较空白组差异显著(*P*<0.05, *P*<0.01),提示雄黄导致的肝脏和肾脏损伤明显。与雄黄组相比,牛黄解毒片给药后显著改善了上述各指标的紊乱(*P*<0.05),表明牛黄解毒片缓解了肝肾损伤程度,发挥了有效的保护作用。



注:C. 空白组;N. 牛黄解毒片组;R. 雄黄组;与 C 组比较, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01;与 R 组比较, ^{*}*P*<0.05。 $\bar{x} \pm s$, *n*=8。

图 1 小鼠肝脏 ALT、AST 和肾脏 Cr、UA 含量

Fig. 1 ALT, AST content in liver and Cr, UA content in kidney of mice

3.2 组织形态病理学分析

小鼠肝脏和肾脏的 HE 染色结果如图 2 所示,

空白组肝脏组织结构正常,汇管区可见小叶间胆管、小叶间静脉和小叶间动脉,肝细胞排列紧密,沿中央静脉形成肝索,未见变性、坏死,肝窦未见扩张、淤血。雄黄组小鼠肝脏可见较多肝细胞空泡变性,此外部分肝细胞核发生固缩、碎裂,肝细胞发生坏死。空白组肾组织结构较规则,肾小管腔、肾小球和囊腔

完整,未见囊肿坏死等损伤现象。雄黄组小鼠有肾小管扩张、肾脏囊肿、肾组织坏死等肾脏严重损伤。与雄黄组比较,牛黄解毒片组小鼠肝脏及肾脏组织均未见显著病理学改变,提示牛黄解毒片复方配伍后毒性显著降低。

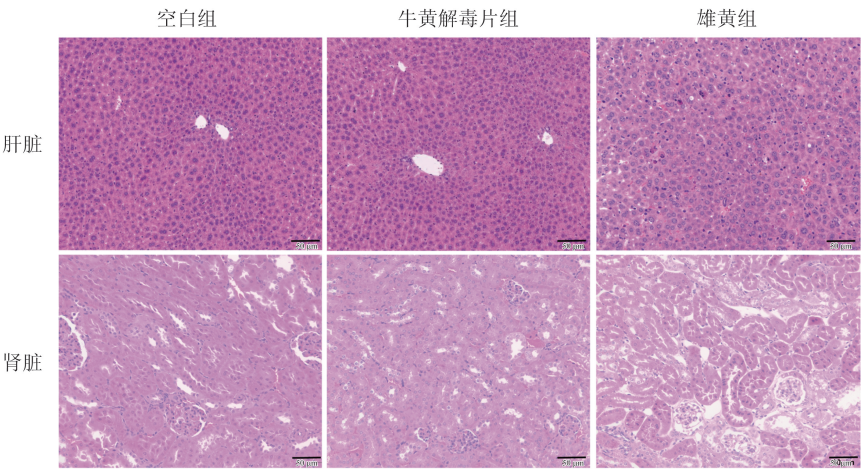


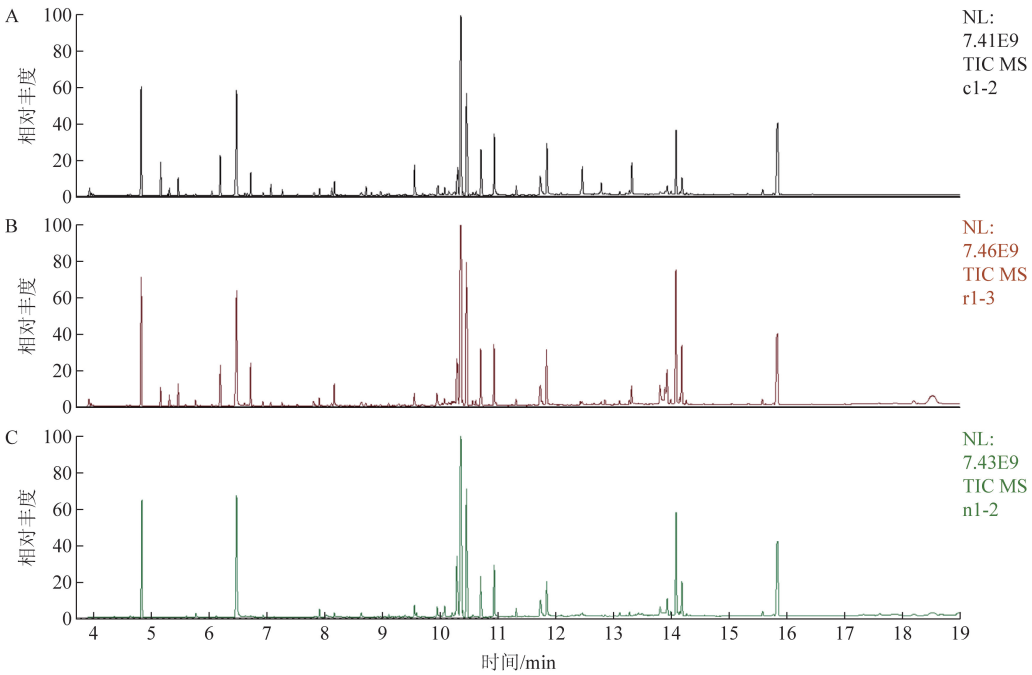
图 2 小鼠肝肾组织代表性 HE 染色图(×200,标尺=50 μm)

Fig. 2 Representative HE staining of liver and kidney of mice (×200,bar=50 μm)

3.3 代谢组学分析

3.3.1 模型判别分析 图 3~4 分别为小鼠肝脏和肾脏样本的 GC-MS 总离子流色谱图。对谱图输出的数据进行标准化后,导入 MetaboAnalyst 软件进行

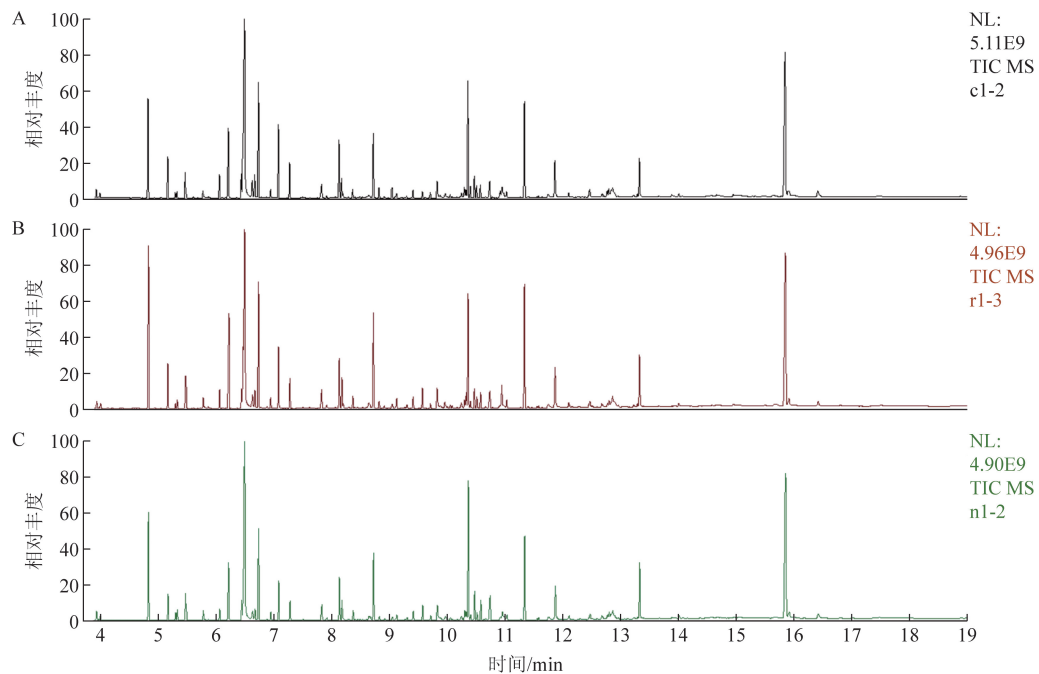
分析,构建 PCA 模型和 PLS-DA 模型。如图 5 所示,每组样本集中分布,紧密聚集,表明方法稳定性和重复性好。各组间区分良好,代谢物差异显著。



注:A. 空白组;B. 牛黄解毒片组;C. 雄黄组

图 3 小鼠肝脏样本 GC-MS 总离子流图

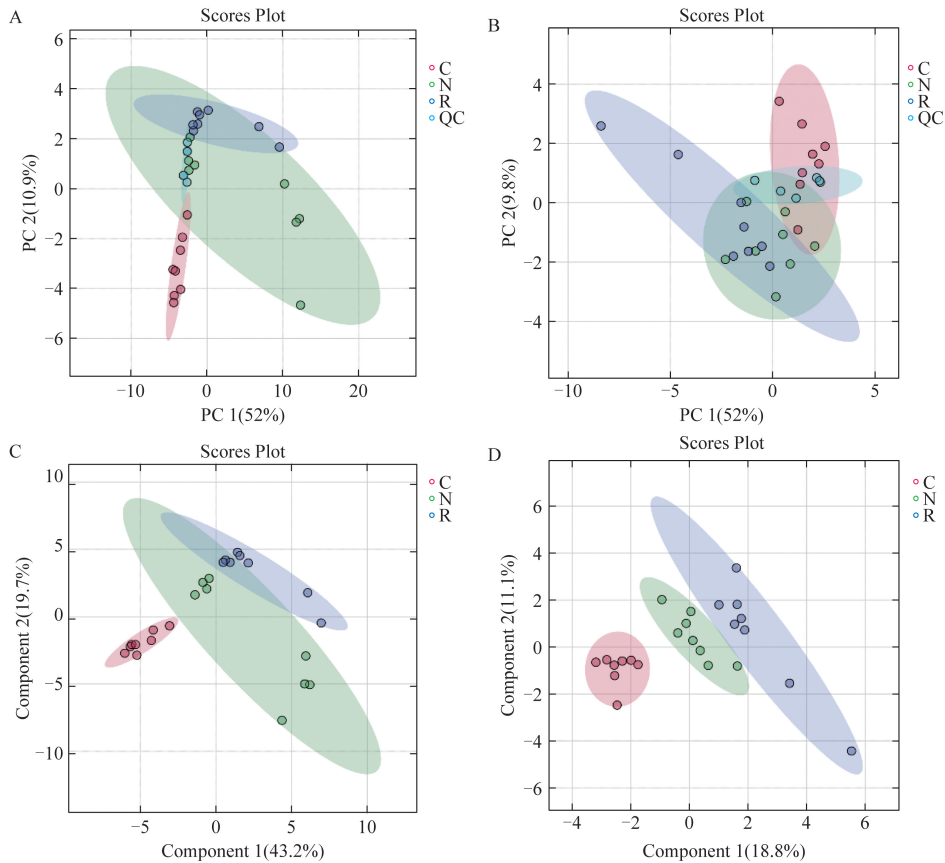
Fig. 3 GC-MS total ion chromatograms of mice liver samples



注: A. 空白组; B. 牛黄解毒片组; C. 雄黄组

图 4 小鼠肾脏样本 GC-MS 总离子流图

Fig. 4 GC-MS total ion chromatograms of mice kidney samples



注: A. 肝脏 PCA 图; B. 肾脏 PCA 图; C. 肝脏 PLS-DA 图; D. 肾脏 PLS-DA 图

C. 空白组; N. 牛黄解毒片组; R. 雄黄组; QC. 质控组

图 5 代谢组学聚类分析结果图

Fig. 5 Metabolomics cluster analysis results

3.3.2 差异代谢物鉴定 依据 $P<0.05$ 且至少 1 组 $FC>1.2$ 筛选差异变量,寻找雄黄组、牛黄解毒片组和空白组小鼠肝脏和肾脏中贡献最大的差异代谢物,将这些差异变量的质谱数据在 KEGG 和 MET-LIN 数据库中检索并确认,得到对应代谢物。

小鼠肝脏中共鉴定出 7 个差异代谢物。与雄黄组相比,牛黄解毒片组柠檬酸、单棕榈素、3,5-二羟基苯乙醇、2,3-二羟基吡啶和抗坏血酸水平显著升高,肌醇半乳糖苷、谷氨酸水平显著降低。此外,小

鼠肾脏中筛选出 10 个差异代谢物,与雄黄组相比,牛黄解毒片给药后小鼠肾脏中天冬酰胺、左旋多巴、*D*-来苏糖酸-1,4-内酯、苯丙氨酸和香草扁桃酸含量升高,阿糖醇、甘露甘油酯、乙醇酸、棕榈酸、核糖醇含量降低。肝肾差异代谢物分别见表 1~2。为直观表示肝肾中差异代谢物在雄黄组、牛黄解毒片组和空白对照组中的变化水平,通过聚类分析方法以热图展示(图 6)。

表 1 小鼠肝脏中的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites in mouse liver

序号	代谢物名称	保留时间/min	R/C			N/R		
			<i>P</i> 值	<i>FC</i>	趋势	<i>P</i> 值	<i>FC</i>	趋势
1	柠檬酸	9.31	0.013 4	1.25	↓	0.004 0	0.72	↑
2	单棕榈素	9.75	0.007 8	0.33	↓	0.036 4	2.18	↑
3	3,5-二羟基苯乙醇	10.49	0.000 5	1.34	↓	0.000 1	0.76	↑
4	2,3-二羟基吡啶	5.94	0.000 1	2.35	↓	0.000 8	0.55	↑
5	抗坏血酸	8.89	0.000 1	0.56	↓	0.034 2	1.35	↑
6	肌醇半乳糖苷	8.57	0.000 1	1.45	↑	0.013 1	0.69	↓
7	谷氨酸	10.83	0.004 3	1.61	↑	0.013 1	0.66	↓

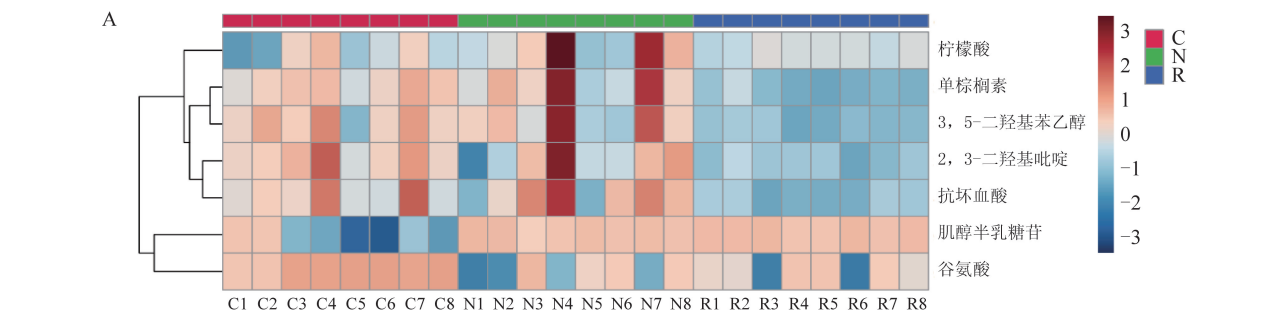
注:C.空白组;N.牛黄解毒片组;R.雄黄组。

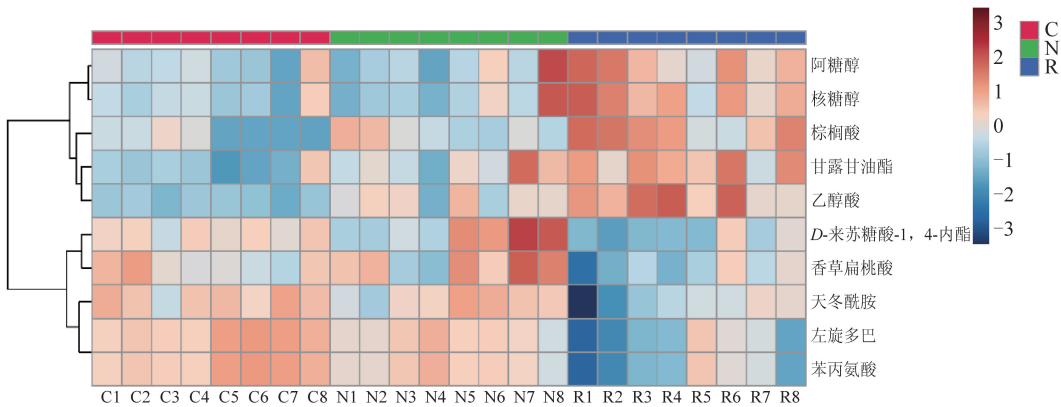
表 2 小鼠肾脏中的差异代谢物

Table 2 Differential metabolites in mouse kidney

序号	代谢物名称	保留时间/min	R/C			N/R		
			<i>P</i> 值	<i>FC</i>	趋势	<i>P</i> 值	<i>FC</i>	趋势
1	阿糖醇	9.41	0.012 5	1.55	↑	0.004 0	1.42	↓
2	核糖醇	9.41	0.005 3	1.52	↑	0.002 4	1.41	↓
3	棕榈酸	10.95	0.004 7	1.21	↑	0.013 1	1.26	↓
4	甘露甘油酯	10.09	0.000 2	1.24	↑	0.000 1	1.22	↓
5	乙醇酸	4.94	0.000 1	1.35	↑	0.000 8	1.28	↓
6	<i>D</i> -来苏糖酸-1,4-内酯	8.87	0.000 1	1.26	↓	0.013 1	1.30	↑
7	香草扁桃酸	18.72	0.001 1	1.23	↓	0.025 4	1.20	↑
8	天冬酰胺	9.05	0.006 2	1.33	↓	0.036 4	1.28	↑
9	左旋多巴	8.82	0.000 1	1.56	↓	0.034 2	1.65	↑
10	苯丙氨酸	8.82	0.000 1	1.56	↓	0.034 2	1.55	↑

注:C.空白组;N.牛黄解毒片组;R.雄黄组。





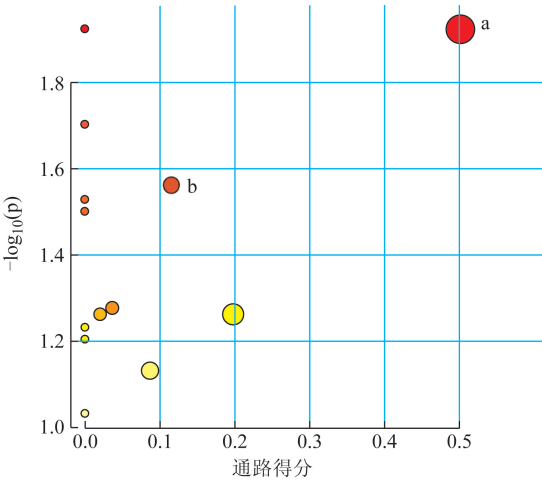
注:A. 肝脏;B. 肾脏;C. 空白组;N. 牛黄解毒片组;R. 雄黄组

图 6 差异代谢物热图

Fig. 6 Heatmap of differential metabolites

3.3.3 代谢通路分析 将筛选出的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 软件中进行差异代谢通路分析,选择 $P<0.05$ 且 $\text{Impact}>0.1$ 的代谢通路作为潜在的靶标代谢通路,差异代谢物通路分析图见图 7~8。牛黄解毒片通过影响谷氨酰胺和谷氨酸代谢、精氨酸的生物合成通路改善雄黄所致的肝损伤,同时调节苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、色氨酸代谢和苯丙氨酸代谢的紊乱减轻肾毒性。代谢通路分析结果显示,牛黄解毒片主要通过恢复雄黄引起的氨基酸代谢紊乱发挥减毒作用。

酸可通过刺激肠上皮细胞的生长促进重要蛋白质基因的表达,从而维持肠道紧密连接屏障的完整性、增强肠道免疫功能^[18]。牛黄解毒片可能通过上调柠檬酸含量,恢复 TCA 稳定,调节能量代谢失衡,维持肠道稳态。



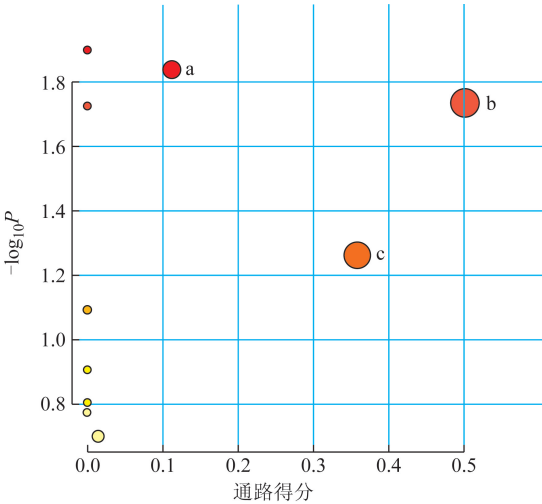
注:a. 谷氨酰胺和谷氨酸代谢;b. 精氨酸的生物合成

图 7 肝脏差异代谢物通路富集分析气泡图

Fig. 7 Bubble chart of enrichment analysis of liver differential metabolite pathways

4 讨论

柠檬酸作为三羧酸循环(TCA)中的重要中间产物,雄黄给药后小鼠肝脏柠檬酸含量显著降低,提示 TCA 紊乱,能量合成与供应受阻。有研究发现柠檬



注:a. 色氨酸代谢;b. 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成;c. 苯丙氨酸代谢

图 8 肾脏差异代谢物通路富集分析气泡图

Fig. 8 Bubble chart of enrichment analysis of kidney differential metabolite pathways

抗坏血酸是机体必需的营养素和抗氧化剂^[19],对防御氧化应激至关重要^[20]。雄黄组中抗坏血酸显著下调,提示损伤可能与氧化应激相关。AKR1A1 基因敲除小鼠由于抗坏血酸合成减少而容易发生肝毒性^[21]。抗坏血酸在中枢神经系统中起着至关重要的作用,作为谷氨酸、胆碱、多巴胺和 γ -氨基丁酸神经递质的调节剂,为神经元提供支持和结构,并参与神经元的分化、成熟和存活等过程^[22]。

牛黄解毒片上调抗坏血酸含量,降低重金属砷所致的肝毒性,可能通过调节肝-脑轴维持中枢神经系统平衡。

氨基酸在体内参与蛋白质的合成,是组成人体组织细胞的主要成分,影响肾脏的正常生理功能。雄黄引起小鼠肾脏中的苯丙氨酸和天冬酰胺下调,牛黄解毒片通过回调氨基酸水平恢复相关代谢的紊乱。苯丙氨酸是酪氨酸的主要供体,正常肾脏参与氨基酸代谢,将苯丙氨酸转化为酪氨酸,酪氨酸代谢障碍会导致脑、肝、肾、骨骼等出现多脏器损伤^[23]。天冬酰胺是至关重要的营养素,参与体内氨基酸代谢,为免疫细胞提供能量^[24]。天冬酰胺能降低肾损伤小鼠的尿素氮、Cr、尿蛋白水平,增强抗氧化防御系统保护小鼠肾损伤^[25]。左旋多巴作为氨基酸前体介导氨基酸代谢异常,与肾细胞病变密切相关^[26]。牛黄解毒片通过上调苯丙氨酸、天冬酰胺和左旋多巴的含量,改善砷引起的代谢通路异常,保护肾脏损伤。

本研究中牛黄解毒片可改善 ALT、AST、Cr、UA 紊乱,减轻肝脏和肾脏的病理损伤;还可通过上调柠檬酸、抗坏血酸、天冬酰胺、左旋多巴、苯丙氨酸等代谢物含量,恢复雄黄引起的氨基酸代谢失调。牛黄解毒片方中雄黄性温,大黄、黄芩、冰片、石膏、人工牛黄性寒凉,桔梗和甘草性平。温性雄黄与性反寒凉药物配伍,通过药性相制去雄黄之温性、制约其毒性而尽其功用,是中医配伍的“去性取用”之法^[27],配伍后有“寒药减温毒”之妙。本研究为临床含雄黄中成药的合理应用提供科学依据。

参考文献:

- [1] LUO L, LI C F, HUANG N X, et al. Traditional mineral medicine realgar and Realgar-Indigo naturalis formula potentially exerted therapeutic effects by altering the gut microbiota[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1143173.
- [2] LIU H W, YAN Y, PANG P F, et al. Angong Niu Huang Pill as adjuvant therapy for treating acute cerebral infarction and intracerebral hemorrhage: A meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 237: 307-313.
- [3] XU W F, WANG H F, CHEN G, et al. A metabolic profiling analysis of the acute toxicological effects of the realgar (As₂S₂) combined with other herbs in Niu Huang Jie Du Tablet using ¹H NMR spectroscopy[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 771-781.
- [4] WYSOCKI R, RODRIGUES J I, LITWIN I, et al. Mechanisms of genotoxicity and proteotoxicity induced by the metalloids arsenic and antimony[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(11): 342.
- [5] 何溶溶, 吕翔, 周婧, 等. 雄黄的安全性评价和配伍减毒研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2018, 34(6): 645-648.
- [6] HE R R, LYU X, ZHOU J, et al. Evaluation on realgar safety and reducing toxicity[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2018, 34(6): 645-648.
- [7] WANG J J, DING L F, ZHOU J, et al. Target lipidomics approach to reveal the resolution of inflammation induced by Chinese medicine combination in Liu-Shen-Wan against realgar overexposure to rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112171.

- [7] KOCH I, SYLVESTER S, LAI V W M, et al. Bioaccessibility and excretion of arsenic in Niu Huang Jie Du Pian pills[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 222(3): 357-364.
- [8] WU X, WU S H, LIU Y X, et al. Health risk assessment of arsenic in Realgar and Niu Huang Jie Du Tablets based on pharmacokinetic study[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2018, 48: 81-86.
- [9] WU X, GUAN R, LIU Y X, et al. Comparative health risk assessment of realgar and Niu Huang Jie Du Tablets based on tissue arsenic levels after multiple oral administration to rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112370.
- [10] VICH VILA A, COLLIJ V, SANNA S, et al. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 362.
- [11] 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.
- [12] SU T, TAN Y, TSUI M S, et al. Metabolomics reveals the mechanisms for the cardiotoxicity of *Pinelliae Rhizoma* and the toxicity-reducing effect of processing[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34692.
- [13] WANG M, YANG N, WU X, et al. Insight into nephrotoxicity and processing mechanism of *Arisaema erubescens* (wall.) schott by metabolomics and network analysis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 1831-1846.
- [14] ZHANG S, LI C, FENG T T, et al. A metabolic profiling study of realgar-induced acute kidney injury in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 706249.
- [15] HUO T G, ZHANG W W, YANG J, et al. Effects of chronic realgar exposure on liver lipidome in mice and identification sensitive lipid biomarker model for realgar-induced liver damage[J]. *Toxicol Lett*, 2023, 372: 1-13.
- [16] ZHANG S, LI C, FENG T T, et al. Proteomics analysis in the kidney of mice following oral feeding realgar[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114118.
- [17] ZHANG S, CAO S, ZHOU H, et al. Realgar-induced nephrotoxicity via ferroptosis in mice[J]. *J Appl Toxicol*, 2022, 42(11): 1843-1853.
- [18] HU P C, YUAN M, GUO B L, et al. Citric acid promotes immune function by modulating the intestinal barrier[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1239.
- [19] CHENG L L. Pharmacologic ascorbate treatment of influenza A *in vitro* and *in vivo* in mice[J]. *Chest*, 2016, 149(4): A83.
- [20] YOUNG D R, BODRA N, ROSADO L, et al. The enzymatic nature of ascorbate recycling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: S21.
- [21] KIMURA S, OSAKI T, HOMMA T, et al. The concerted elevation of conjugation reactions is associated with the aggravation of acetaminophen toxicity in Akr1a-knockout mice with an ascorbate insufficiency[J]. *Life Sci*, 2022, 304: 120694.
- [22] MORETTI M, FRAGA D B, RODRIGUES A L S. Ascorbic acid to manage psychiatric disorders[J]. *CNS Drugs*, 2017, 31(7): 571-583.
- [23] MOLLER N, MEEK S, BIGELOW M, et al. The kidney is an important site for *in vivo* phenylalanine-to-tyrosine conversion in adult humans: A metabolic role of the kidney[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(3): 1242-1246.
- [24] RAYNOR J L, CHI H B. LCK senses asparagine for T cell activation[J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(1): 7-8.
- [25] YANG S M, LEE C H, LEE B S, et al. Renal protective effects of aspalathin and nothofagin from rooibos (*Aspalathus linearis*) in a mouse model of sepsis[J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(6): 1195-1201.
- [26] CHANG K, SU J Q, LI C Y, et al. Multi-omics profiles refine L-dopa decarboxylase (DDC) as a reliable biomarker for prognosis and immune microenvironment of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1079446.
- [27] 鲁军, 黄桢, 杨东升, 等. 浅谈人体调节作用在“反佐”和“去性留用”配伍中的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3501-3503.
- LU J, HUANG Y, YANG D S, et al. Effects of body regulation on medical combination called as "contrary" and "quxingliuyong"[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 34(8): 3501-3503.

(编辑:杨蕊政)