

基于转录组学研究半夏中生物碱致大鼠肝脏损伤的毒理机制研究

陈兴婷, 金迪, 田洪芳, 张雪, 冉升艳, 王华斌*

贵州中医药大学药学院, 贵州贵阳

摘要: 目的: 基于转录组学研究半夏生物碱致大鼠肝脏损伤的毒理机制。方法: 通过毒理实验对半夏中不同生物碱肝毒性机制进行验证, 将胆碱、鸟苷、胸苷、次黄嘌呤核苷给予大鼠灌胃给药后, 测定大鼠血清中肝功能相关指标 (ALT、AST) 的水平、观察大鼠肝脏的病理改变和关键基因的变化。结果: 动物实验结果表明, 胆碱、鸟苷、胸苷、次黄嘌呤核苷对正常大鼠可造成不同程度的肝毒性, 血清中 AST、ALT 含量明显升高, 肝组织出现损伤, 通过网络药理学和转录组学研究获得致肝损伤的4个关键靶基因 NR1I3、AHR、FABP3、FAAH。结论: 揭示半夏致大鼠肝毒性的毒理机制, 对临床上半夏的毒理学和安全性用药提供理论基础。

关键词: 半夏; 生物碱; 肝毒性; 转录组学

Toxicological Mechanism Research on Liver Injury in Rat Caused by Alkaloids in *Pinellia ternata* based on Transcriptomics

Xingting Chen, Di Jin, Hongfang Tian, Xue Zhang, Shengyan Ran, Huabin Wang *

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou

Abstract: Objective To investigate the toxicological mechanism of liver injury in rats caused by *Pinellia ternata* alkaloids based on transcriptomics. Methods The hepatotoxicity mechanisms of various alkaloids in *Pinellia ternata* were verified through toxicological experiments. After choline, guanosine, thymidine, and inosine were administered to rat via gavage, the levels of liver function-related indicators (ALT and AST) in the mouse serum were measured. Additionally, the pathological alterations of the mouse liver and the changes in key genes were observed. Results Animal experiments have shown that choline, guanosine, thymidine and hypoxanthine ribonucleoside can cause varying degrees of liver toxicity in normal mice, with significantly increased levels of AST and ALT in the serum and liver tissue damage. Through network pharmacology and transcriptomics studies, four key target genes NR1I3, AHR, FABP3 and FAAH causing liver injury were obtained. Conclusion To reveal the toxicological mechanism of

* 基金项目: 贵州中医药大学2024年大学生创新创业训练计划省级项目“基于转录组学研究半夏中生物碱致大鼠肝脏损伤的毒理机制研究”(S2020106621519)。

第一作者简介: 陈兴婷, 女, 布依, 贵州黔南, 贵州中医药大学, 本科在读, 研究方向为中药的药效物质及新药开发

通讯作者简介: 王华斌, 男, 汉, 四川南充, 贵州中医药大学, 博士学位, 研究方向为中药的药效物质作用机制及新药开发。

hepatotoxicity caused by *Pinellia ternata* in mice and provide a theoretical basis for the toxicology and safe use of *Pinellia ternata* in clinical practice.

Keywords: *Pinellia*; Alkaloid; Hepatotoxicity; Transcriptomics

中药是我国的宝贵资源，已有数千年历史，广泛用于预防和治疗疾病，中药含多种成分，发挥药效的同时也对机体自身产生毒性，其安全性是中医药学家关注的重点，也是临床安全用药的基础[1]。目前，中医药传承创新发展已经上升为国家战略，迎来了前所未有的大好发展机遇。当前社会各界对中药安全重视程度越来越高，但其在发挥强大的治疗作用的同时，安全性问题也不容忽视[2]，近现代以来，中药在发挥良好药理活性时，频繁发生的中药毒性事件、中药的毒性问题越来越受到人们的关注，不仅影响临床安全性用药，也牵制中医药事业和产业健康发展及国际化进程，中药毒性的作用机制研究迫在眉睫。肝脏是药物代谢的重要器官，其发挥着解毒、排泄、酸碱平衡、细胞稳态等作用，外来的或体内代谢产生的有毒物质，均要在肝脏解毒变为无毒的或溶解度大的物质，随胆汁或尿液排出体外[3,4]。但药物性肝脏损伤的发生率逐年升高，大多数中药与复方制剂都是在肝脏内进行代谢、解毒和排泄过程。所以，研究、探讨中药的肝脏毒性，对深入开展中药肝脏损害研究与防治，对于保证用药安全、减少和杜绝药源性肝病的发生及规范临床安全用药具有重要意义。

中药材半夏为天南星科植物半夏(*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.)的干燥块茎，在夏秋两季采挖，并除去外皮和须根，洗净后晒干制成，分布范围广，在我国多个地区均有分布[5]。半夏具有毒性早有记载，主要为内脏毒性和黏膜刺激性，毒性机制和毒性物质在古代典籍中并未阐明[6]。通过查阅文献发现半夏具有肝脏损伤毒性，毒性物质主要为左旋麻黄碱、胆碱、鸟苷、胸苷、次黄嘌呤核苷，其中胆碱为生物碱，鸟苷、胸苷、次黄嘌呤核苷为

核苷类成分，均为半夏中具有潜在肝毒性的成分[7, 8]。但是，半夏生物碱致肝脏损伤的作用机制还不明确，对半夏临床用药的安全性造成严重影响。所以研究和探讨半夏主要成分生物碱的肝脏毒性，为进一步开展半夏的毒性机理研究提供建设性的思路，对深入开展半夏肝脏损害研究与防治，对于保证安全用药、减少和杜绝药源性肝病的发生有重要意义。本项目主要研究半夏生物碱中毒性化合物胆碱、鸟苷、胸苷、次黄嘌呤核苷对大鼠肝脏毒性的作用机制，重点关注生物碱对大鼠肝脏血清生化指标和生物组织病理的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级SD大鼠39只，体质量(200±20)g，购自长沙市天勤生物技术有限公司，许可证号：SCXK(湘)2024-0021。饲养环境：室温(27±1)℃，相对湿度(55±5)%，自由饮水、摄食。经贵州中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(20240607)。

1.2 药物

鸟苷，由上海麦克林生化科技有限公司提供；胆碱，由安耐吉(上海)医药化学有限公司提供；胸苷，由上海皓鸿生物医药科技有限公司提供；次黄嘌呤核苷，由天津希恩思奥普德科技有限公司提供；生理盐水，由辰欣药业股份有限公司提供。

1.3 试剂与仪器

通用型组织固定液(中性)；AST试剂盒(批号WLA117)、ALT试剂盒(批号WLA113)，购自沈阳万类生物科技有限公司；冷冻离心机，由长沙高

新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司提供；超微量全波长酶标仪，由Multiskan Go提供。

1.4 半夏生物碱致大鼠肝毒性作用机制

1.4.1 动物给药，取材

根据PubChem数据库得到胆碱对鼠的LD50为450mg/kg、鸟苷对鼠的LD50为500mg/kg、胸苷对鼠的LD50为2512mg/kg、次黄嘌呤核苷对鼠的LD50为20g/kg。低、中、高剂量组均按各药物的LD50的1/30、1/10、1/5给药，大鼠灌胃等体积生理盐水[9]。39只SPF级SD大鼠，适应性喂养3d，随机将其分为13组，每组3只，分别是空白组(生理盐水，10mL/kg)、胆碱低剂量组(SD1，15mg/kg)、胆碱中剂量组(SZ1，45mg/kg)、胆碱高剂量组(SG1，90mg/kg)、鸟苷低剂量组(SD2，16.67mg/kg)、鸟苷中剂量组(SZ2，50mg/kg)、鸟苷高剂量组(SG2，100mg/kg)、胸苷低剂量组(SD3，83.73mg/kg)、

胸苷中剂量组(SZ3，251.2mg/kg)、胸苷高剂量组(SG3，502.4mg/kg)、次黄嘌呤核苷低剂量组(SD4，666.67mg/kg)、次黄嘌呤核苷中剂量组(SZ4，2000mg/kg)、次黄嘌呤核苷高剂量组(SG4，4000mg/kg)。

1.4.2 一般状态观察

按照所算剂量连续灌胃给药5d，每日1次，空白组给予等体积生理盐水，密切观察大鼠情况，包括对大鼠形体、毛发、精神状态、行为反应等一般状态观察，解剖取材后观察肝脏肿胀情况[10]。

1.4.3 血清检测及组织病理学

于d6处死取材，大鼠取血前要禁食不禁水12h，取材前禁食、称体质量并记录。取血清、肝脏组织测定各项指标，从大鼠眼眶取血，静置2h后，以转速2500r·min⁻¹，离心15min，分离血清，分取血清放置-80℃冰箱保存，其他组织于-80℃条件下保存备用。取血后摘除大鼠肝脏组织，进行病理学检查，超微量全波长酶标仪检测血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的含量。

1.4.4 大鼠肝组织病理切片制备及观察

摘除肝脏组织，用0.9%生理盐水清洗后，滤纸吸干，记录编号，放在4%多聚甲醛溶液中保存固定至少48h。肝脏组织固定好之后，开始制作组织病理切片，HE染色，样品切片在荧光显微成像系统下观察分析肝病理变化。

1.4.5 数据统计分析

利用SPSS27.0统计软件处理分析，采用x±s表示数据，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD-t检验。

1.4.6 半夏致大鼠肝毒性的网络毒理学研究

利用TCMSP(<http://tcmospw.com/tcmosp.php>)数据库，筛选得到半夏活性成分，将其输入比较毒物遗传学数据库(CTD)中，检索其毒理学信息，筛选得到半夏潜在致毒成分，基于PubChem数据库(<https://pubchem.org/>)，检索半夏毒性成分，上传SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)，得到半夏毒性成分靶点。再以“Hepatotoxicity”和“Liver injury”为关键词，通过OMIM数据库(<https://www.omim.org/>)进行检索，筛选、去重后获得肝毒性靶点。最后利用韦恩作图平台得到二者交集靶点，将其导入STRING平台(<https://string-db.org/>)，获取靶点互作情况。通过BioGPS数据库(<http://biogps.org/>)，进一步筛选在肝组织中有表达的基因，结合STRING平台PPI网络拓扑分析结果，筛选肝组织高表达且拓扑重要性高的基因作为关键靶基因。

1.4.7 荧光定量PCR法检测大鼠肝组织关键基因表达

选取半夏关键靶基因进行验证，获取纯度高、完整性好的大鼠肝组织总RNA，将其逆转录为稳定的cDNA，用于后续靶基因的PCR验证。由Primer5.0软件设计引物，利用Talent荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)配制反应液，以内参基因(如GAPDH、 β -actin)引物为对照，每个样

本设置3次生物学重复，利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对含量。

2 结果

2.1 一般状态观察

大鼠给药24h后，胆碱高剂量组大鼠出现体重减轻、动作迟缓、进食欲望低、毛发减少以及呼吸频率加快的现象；其余给药组未出现明显异常。给药48h后，胆碱高剂量组中出现蜷缩成团，全身发灰，腹部肿胀的情况；其余各组均出现体重减轻的状态。给药第三天，胆碱中剂量组也出现体重显著减轻，个别大鼠出现快速而轻微的抖动和眼球发暗的情况。给药三天后胆碱高剂量组出现死亡情况，大鼠体质量变化如图1所示。由图可知，空白组随着天数的增加，体质量逐渐上升；胆碱组，随着灌胃天数的增加，体质量极速下降；胸苷组在灌胃24h出现轻微体重下降情况，灌胃48h后也出现体质量下降情况；鸟苷组与次黄嘌呤核苷组灌胃后出现体质量呈稳定下降的态势。结果说明胆碱会使大鼠食欲减退，体质量下降，甚至有个体出现死亡现象；次黄嘌呤核苷对大鼠体质量影响程度有所降低。

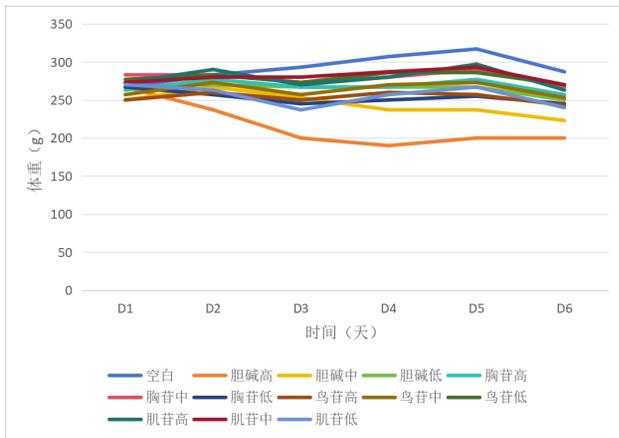


图1. 不同生物碱对大鼠体质量的影响

2.2 各生物碱致大鼠体内ALT、AST含量的影响

由表1可知，对大鼠血清中ALT、AST测定结果显示，与空白组比较，血清ALT、AST水平多有升高。结果说明，胆碱与胸苷对大鼠体内的肝脏指数ALT、AST含量影响较大，鸟苷和次黄嘌呤核苷

对大鼠的肝脏指数影响较小。

表1. 不同生物碱对大鼠体内ALT、AST含量的影响

组别	ALT/U · L ⁻¹	AST/U · L ⁻¹
胆碱高	76.60	101.90
胆碱中	70.35 ± 7.73	78.45 ± 33.87
胆碱低	71.52 ± 11.31	214.40 ± 112.91
胸苷高	128.19	102.4
胸苷中	65.67 ± 9.63	211.17 ± 6.56
胸苷低	113.74	183.23
鸟苷高	81.07 ± 34.75	165.44 ± 56.23
鸟苷中	65.02 ± 17.27	106.49 ± 7.90
鸟苷低	85.46 ± 26.34	102.15 ± 1.06
次黄嘌呤核苷高	65.11 ± 15.84	136.50 ± 37.29
次黄嘌呤核苷中	71.61 ± 20.28	138.33 ± 29.07
次黄嘌呤核苷低	90.71 ± 16.60	198.45 ± 33.83
空白	77.08 ± 2.46	190.70 ± 78.75

2.3 肝组织病理组织学观察

肝脏组织病理切片结果所示(图2)。

空白组大鼠肝组织HE染色下，细胞大小、形态正常，组织结构清晰完整；肝小叶结构正常，中央静脉周围的肝细胞呈规则的放射状排列，细胞之间呈现紧密且规整的排列态势。肝细胞内染色为蓝色的是细胞核，细胞核圆居中，且能清楚看到核仁，异染色质少而着色浅；与空白组比较，胆碱高剂量组细胞肿胀排列异常，部分细胞核以及核仁模糊，异染色质变多而着色变深，部分视野下肝血窦出现扩张，血窦内红细胞积聚相对增多；胆碱中剂量组大部分肝细胞形态正常，个别区域肝细胞之间的间隙略有变化，异染色质变多而着色变深，部分区域肝血窦稍显扩张；胆碱低剂量组肝细胞形态与排列与空白组较为相似，整体上肝细胞排列有序，细胞核形态正常核仁清晰，肝血窦形态基本正常，管径相对均一；胸苷高剂量组部分肝细胞形态欠规则，出现肿胀，中央静脉周围结构有一定紊乱，可见肝血窦内红细胞淤积；胸苷中剂量组排列不如空白组规整，肝血窦有轻度狭窄不均，部分肝细胞染色略深，有轻度水肿；胸苷低剂量组肝组织形态较接近空白组，但细微处有差异，肝血窦偶见局部轻度扩张，个别肝细胞形态稍显不规则；鸟苷组和次黄嘌呤核苷组肝细胞排列规整无肿胀，细胞核大

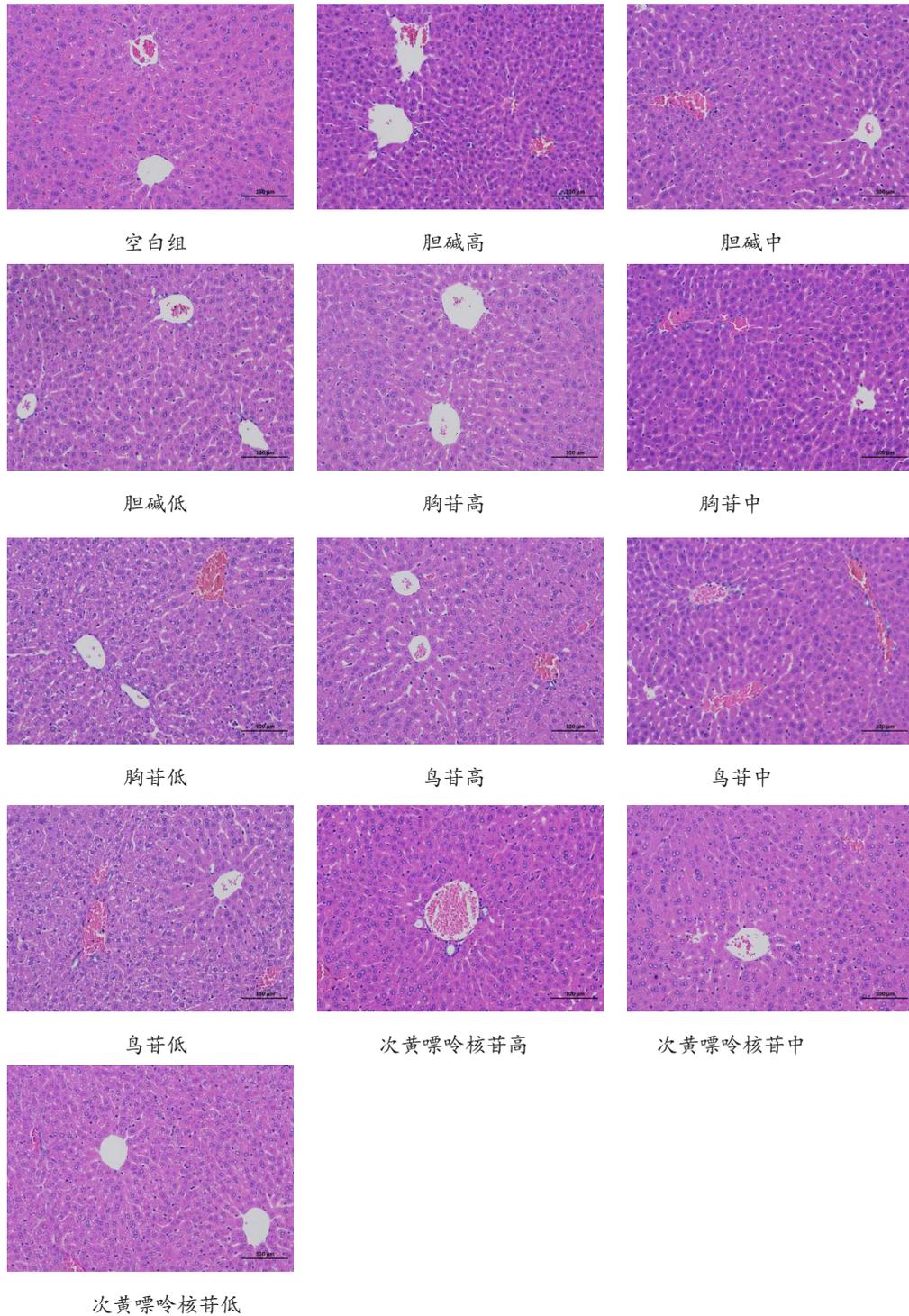


图2. 大鼠肝脏组织病理切片

小均一，仅个别细胞出现异染色质变多而着色变深，无明显损伤性改变，细胞核大小均一，异染色质变多而着色变深，局部肝血窦稍显扩张，个别细胞胞质不均。

2.4 大鼠肝组织中相关基因筛选和mRNA表达水平

通过网络药理学和荧光定量PCR法得出，与正常组进行比较，半夏生物碱能使大鼠肝组织中

NR1I3、FABP3基因的mRNA表达水平上调,使AHR、FAAH基因的mRNA表达水平下调,进而导致大鼠肝脏损伤。

3 讨论

本实验通过给大鼠灌胃给药5 d,观察半夏不同生物碱对正常大鼠的肝毒性,结果表明,胆碱、鸟苷、胸苷、次黄嘌呤核苷对正常大鼠均能造成不同程度的肝损伤(损伤程度:胆碱>胸苷>鸟苷>次黄嘌呤核苷)。从肝脏相关生化指标结果看出,胆碱组和胸苷组大鼠血清ALT、AST水平显著升高,ALT、AST是反映肝脏损伤的敏感性指标,大鼠肝功能受损时,肝细胞内的ALT、AST释放入血,导致血清中二者水平显著高于正常对照组。各生物碱不同剂量组病理切片中均发现肝脏组织呈不同程度损伤,与空白组比较,其中胆碱高剂量组和胸苷高剂量组对大鼠肝脏组织的影响程度较高,其余各组大鼠的肝损伤情况差异并不显著,推测肝损伤程度可能与给药剂量有一定关联。根据网络药理学和荧光定量PCR法得出半夏对肝毒性的基因靶点,共筛选出NR1I3、AHR、FABP3、FAAH等4个基因,提示了由半夏引起的肝毒性可能通过这4个基因表达,从而导致大鼠肝损伤,但其具体机制还有待探究。

综上所述,基于转录组学、网络毒理学、动物实验和肝脏组织切片验证,结果表明半夏生物碱成分能够导致大鼠体内血清ALT、AST水平升高,肝组织出现明显损伤可能与NR1I3、AHR、FABP3、FAAH的

表达水平有关。本研究为半夏安全合理用药提供参考依据。

参考文献

- [1]郑丽.基于精准用药的中药安全性因素分析与对策[J].中医药管理杂志,2023,31(14):211-213.
- [2]聂嘉璇,钱文秀,王曼姝,等.中药毒性相关数据库的研究现状及对比研究[J].中草药,2023,54(22):7588-7596.
- [3]左佳昕,戴鑫,何伟,等.铁皮石斛保肝活性成分与作用机制研究进展[J].中草药,2024,55(04):1365-1376.
- [4]王婉怡,朱志军,李航飞,等.半夏化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物预测分析[J].辽宁中医药大学学报,2024,26(03):203-215.
- [5]寸竹,董益,张广辉,等.云南省野生半夏资源调查及种质评价[J].南方农业学报,2021,52(08):2069-2077.
- [6]申成松.半夏毒性成分及其减毒炮制[J].光明中医,2021,36(22):3909-3911.
- [7]张国玉,熊继东,魏家艳,等.半夏化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物预测分析[J].华西药学杂志,2024,39(01):110-115.
- [8]龚道锋,王甫成,纪东汉,等.中药半夏化学成分及其药理、毒理活性研究进展[J].长江大学学报(自科版),2015,12(18):77-79.
- [9]唐小杭,陈平,朱娴丹,等.苍耳子水提液中苍术苷含量测定及其肝毒性研究[J].中成药,2024,46(12):4180-4187.
- [10]吕悦,张良,张颖慧,等.基于多元统计分析法分析半夏不同炮制品8种潜在毒性成分与肝毒性相关性[J].中医药学报,2023,51(01):43-49.

