

基于代谢组学和抗肿瘤活性的2种源自不同 中华大蟾蜍亚种蟾酥的系统比较研究

孙博¹, 李明利¹, 丁耀华², 张勇³, 夏波³, 郭胜亚³, 王世录², 边宝林¹,
司南^{1*}, 赵海誉^{1,4*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 西昌富华金蟾生物科技有限公司, 四川 西昌 615000;
3. 杭州环特生物科技有限公司, 浙江 杭州 310051;
4. 国家林业草原林下药用蟾蜍生态养殖工程技术研究中心, 北京 100700)

[摘要] 比较中华大蟾蜍指名亚种 *Bufo gargarizans gargarizans* 和中华大蟾蜍华西亚种 *B. gargarizans andrewsi* 所产蟾酥差异, 基于斑马鱼模型验证蟾酥市场价值导向的合理性。收集来自江苏、河北、辽宁、吉林、四川凉山等地包括指名亚种蟾酥和华西亚种蟾酥共 20 批, 通过 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 液质联用技术结合主成分分析等比较指名亚种和华西亚种的蟾酥差异。根据 VIP>1, FC<0.5 或 FC>2.0、峰面积占比>1%的限制条件确定了 9 个质量标志物, 分别为华蟾酥毒基、华蟾毒它灵、沙蟾毒精、脂蟾毒配基、海葱苷元 A、惹斯蟾蜍精、沙蟾毒精-3-辛二酰精氨酸酯、南美蟾毒精-3-辛二酰精氨酸酯、脂蟾毒配基-3-辛二酰精氨酸酯; 并按《中国药典》采用高效液相色谱法对 20 批蟾酥进行含量测定, 选择蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基 3 个药典质量控制指标总量差异最大的 2 批蟾酥 (CS7, 总量为 8.99%; CS9, 总量为 5.03%) 分别进行基于斑马鱼模型的抗肝肿瘤活性评价, 二者抑瘤率分别为 38.06%、45.29%。证明仅以药典质量控制指标高低作为蟾酥市场流通的价值导向是不合理的。该研究为蟾酥资源的有效利用, 蟾酥质量评价体系的合理建立提供了数据支撑。

[关键词] 蟾酥; 中华大蟾蜍指名亚种; 中华大蟾蜍华西亚种; 质量标志物; 活性评价

Systematic comparison of two kinds of Bufonis Venenum derived from different *Bufo gargarizans* subspecies based on metabolomics and antitumor activity

SUN Bo¹, LI Ming-li¹, DING Yao-hua², ZHANG Yong³, XIA Bo³, GUO Sheng-ya³, WANG Shi-lu², BIAN Bao-lin¹,
SI Nan^{1*}, ZHAO Hai-yu^{1,4*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Xichang Fuhua Jinchuan Biotechnology Co., Ltd., Xichang 615000, China;
3. Hunter Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310051, China;
4. Medicinal Toad Ecological Breeding Engineering Technology Research Center of National Forestry and Grassland, Beijing 100700, China)

[Abstract] This paper compared the differences between two kinds of Bufonis Venenum produced by *Bufo gargarizans gargarizans* and *B. gargarizans andrewsi*, and verified the rationality of the market value orientation of Bufonis Venenum based on the zebrafish model. Twenty batches of Bufonis Venenum from Jiangsu province, Hebei province, Liaoning province, Jilin province, and Liangshan, Sichuan province, including *B. gargarizans gargarizans* and *B. gargarizans andrewsi*, were collected. The UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS

[收稿日期] 2022-06-08

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04012); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZXKT22004); 杭州市钱江特聘专家项目 (2020); 中药毒理学创新团队项目 (Z2021180)

[通信作者] * 司南, 副研究员, 研究方向为中药质量标准, E-mail: nsi@icmm.ac.cn; * 赵海誉, 研究员, 研究方向为中药活性成分及生物学表征, E-mail: hyzhao@icmm.ac.cn

[作者简介] 孙博, 博士研究生, E-mail: sunysyx96777@qq.com

combined with principal component analysis was used to compare the differences between two kinds of *Bufois Venenum*. According to the limiting conditions of $VIP > 1$, $FC < 0.5$ or $FC > 2.0$, and peak total area ratio $> 1\%$, 9 differential markers were determined, which were cinobufagin, cinobufotalin, arenobufagin, resibufogenin, scillareadin A, resibufagin, 3-(*N*-suberoylargininyl)-arenobufagin, 3-(*N*-suberoylargininyl)-marinobufagin, and 3-(*N*-suberoylargininyl)-resibufogenin. The content of 20 batches of *Bufois Venenum* was determined according to the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 edition) by high-performance liquid chromatography, and the 2 batches of *Bufois Venenum*, CS7 (8.99% of total content) and CS9 (5.03% of total content), with the largest difference in the total content of the three quality control indexes of the *Chinese Pharmacopoeia* (bufalin, cinobufagin, and resibufogenin) were selected to evaluate their anti-liver tumor activity based on the zebrafish model. The tumor inhibition rates of the 2 batches were 38.06% and 45.29%, respectively, proving that only using the quality control indexes of the *Chinese Pharmacopoeia* as the value orientation of *Bufois Venenum* market circulation was unreasonable. This research provides data support for the effective utilization of *Bufois Venenum* resources and the establishment of a rational quality evaluation system of *Bufois Venenum*.

[Key words] *Bufois Venenum*; *Bufo gargarizans gargarizans*; *Bufo gargarizans andrewsi*; quality markers; active evaluation

DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20220627.202

蟾蜍的干燥分泌物称为蟾酥,最早见于唐·甄权所著的《药性论》,称“蟾蜍眉脂”,“蟾酥”之名则最早见于宋·寇宗奭著的《本草衍义》,可治“发背疔疮,一切恶肿”^[1]。2020 年版《中国药典》(以下简称“药典”)中所收录的蟾酥基原为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* 和黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* 的干燥分泌物。中华大蟾蜍又分为中华大蟾蜍指名亚种 *B. gargarizans gargarizans* 和中华大蟾蜍华西亚种 *B. gargarizans andrewsi*^[2]。目前市面上蟾酥多采自于中华大蟾蜍指名亚种,此种蟾酥多分布于东北、华北等平原地区^[3]。不同于指名亚种,中华大蟾蜍华西亚种则多分布在四川、贵州等山区或高海拔地区^[4-5]。目前对于中华大蟾蜍指名亚种和华西亚种所产蟾酥的差异研究相对较少。

现代临床资料表明,以蟾酥为原料药的中成药,治疗癌症、肝炎等恶性疾病效果显著^[6-7];并具有显著的强心^[8]、升高血压^[9]及兴奋呼吸、局部麻醉及抗炎等作用^[10]。目前药典对蟾酥的质量控制有明确质量控制标准,即蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基总量不得少于 7.0%,且蟾酥的价值导向也逐步发展成“唯含量论”。近年来蟾酥资源不断减少^[11-12],高效、合理利用蟾酥,释放蟾酥资源是缓解蟾酥困境的方法之一。目前,已有学者对蟾酥中各成分的药效进行深入研究,发现除药典质控指标外,沙蟾毒精、日蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒它灵等^[13-15]在抗肿瘤、抗血管生成、激动心脏等方面疗效显著^[16-17]。所以仅以蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基总含量作为蟾酥的质量评价标准仍有待商榷。

本研究收集来自于江苏、河北、辽宁、吉林、四川凉山等地的蟾酥共 20 批,涵盖 9 批指名亚种蟾酥(以下称“指名蟾酥”)和 11 批华西亚种蟾酥(以下称“华西蟾酥”)。通过 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 液质联用技术对 20 批蟾酥进行了检测,根据 $VIP > 1$ 、 $FC < 0.5$ 或 $FC > 2.0$ 、峰面积占比 $> 1\%$ 的限制条件确定潜在质量标志物,其中涉及到药典指控成分华蟾酥毒基和脂蟾毒配基。并通过对照品比对、参考前期研究结果和相关文献的离子信息,对筛选出的潜在差异物质进行有针对性的鉴定。根据药典检测方法对 20 批蟾酥进行含量测定,选择药典质控指标总含量差异最大的 2 批蟾酥分别进行基于斑马鱼模型的抗肝肿瘤活性评价。验证仅以药典质控指标高低作为蟾酥质量评价标准的导向是否合理。本研究旨在为蟾酥资源的有效利用、蟾酥质量评价体系的合理建立提供有效的数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(含自动进样器、柱温箱、在线真空脱气机、低压四元梯度泵、PDA 检测器)和双压线性离子阱串联高分辨质谱 LTQ Orbitrap Velos Pro 质谱仪(高分辨静电场轨道阱质谱,ESI 源)(美国 ThermoFisher 公司);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司);LC-2030C 3D 高效液相色谱仪(日本岛津公司);VertA1-CCD 相机(上海土森视觉科技有限公司);SZX7 体式显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司];6 孔板(无锡耐思生物科技有限公司)。

1.2 试剂

蟾毒灵(批号 HR21731S1)、脂蟾毒配基(批号 HR1572B1)、华蟾毒它灵(批号 HR14426S1)均购自宝鸡晨光生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;华蟾酥毒基(批号 470-37-1)、沙蟾毒精(批号 464-74-4)均购自北京赛百草科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司(批号 BCBV2983);顺铂购自阿拉丁生化科技(上海)股

份有限公司(批号 k1520124)。甲醇、乙腈(美国 Fisher 公司,色谱级);水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.3 样品

指名蟾酥和华西蟾酥样品均由西昌富华金蟾生物科技有限公司提供;CS1~CS9 为指名蟾酥,CS10~CS20 为华西蟾酥。20 批蟾酥的来源信息见表 1。

表 1 20 批蟾酥来源

Table 1 The source of 20 batches of Bufonis Venenum

No.	来源地点	No.	来源地点
CS1	河北省涞水县	CS11	四川省凉山彝族自治州越西县
CS2	北京市通州区	CS12	四川省凉山彝族自治州喜德县
CS3	北京市房山区	CS13	四川省凉山彝族自治州德昌县
CS4	江苏省连云港市	CS14	四川省凉山彝族自治州会东县南部
CS5	山东省莒县	CS15	四川省凉山彝族自治州会东县北部
CS6	吉林省吉林市昌邑区	CS16	四川省凉山彝族自治州普格县
CS7	河北省安国市	CS17	四川省凉山彝族自治州宁南县
CS8	安徽省亳州市	CS18	四川省西昌市
CS9	辽宁省沈阳市	CS19	四川省凉山彝族自治州会理县
CS10	四川省凉山彝族自治州冕宁县	CS20	四川省凉山彝族自治州木里藏族自治县

1.4 动物

斑马鱼来源于杭州环特生物科技股份有限公司,为野生型 AB 品系。每个实验组采用 30 尾斑马鱼,日龄为 2 dpf(day post-fertilization)。实验用斑马鱼饲养于 28℃ 水温的专门水族箱,饲养用水的水质:每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐,pH 为 6.9~7.2,电导率为 480~510 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$,硬度为 53.7~71.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCO}_3$ 。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

取在干燥器中干燥过的华蟾酥毒基适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 1.25 mg 的溶液。同法,分别精密称定蟾毒灵、脂蟾毒配基适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1.45 mg 和 1.00 mg 的蟾毒灵和脂蟾毒配基的溶液。沙蟾毒精、华蟾毒它灵等其余对照品精密称取适量($\geq 5\text{ mg}$),至于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取各批次蟾酥样品 25 mg,按照 2020 年版药典方法制备蟾酥供试品溶液。

2.3 含量测定方法

RESTEK 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5.0 μm);

色谱条件参照 2020 年版药典。

2.4 代谢组学分析

2.4.1 色谱条件 Thermo-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 150 mm,2.6 μm);流动相为 0.1% 甲酸-水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~6 min,3% B;6~8 min,3%~10% B;8~9 min,10%~20% B;9~22 min,20%~50% B;22~25 min,50%~95% B);流速 0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;柱温 35℃;取 2.2 项下供试品溶液并稀释 10 倍,进样体积 10 μL [18]。

2.4.2 质谱条件 电喷雾电离原(ESI),正离子扫描模式,毛细管温度 350℃,鞘气流速 35 arb,辅助气流速 10 arb,样品一级质谱在 FT 模式下进行全扫描(分辨率为 30 000,扫描范围 m/z 100~1 200),二级及三级质谱采用数据依赖性扫描(data dependent scan) [18-19]。

2.4.3 质谱数据处理 将采集到的数据导入 Progenesis QI 软件,进行峰对齐、峰提取及归一化处理,剔除空白对照样本中峰面积最大,以及 QC 样本中变异系数 $>30\%$ 的离子信息。预处理后的数据导入 SIMCA 14.1 分析软件中,并执行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)。通过 OPLS-DA 模型的 VIP(variable importance in the pro-

jection) 值 (阈值 > 1), 并结合峰面积的 FC (fold change) 值 (FC < 0. 5 或 FC > 2. 0) 来筛选质量标志物。为了使确定的差异分子可能与活性具有潜在关联, 还剔除了平均峰面积不足平均总峰面积 1% 的差异成分, 并根据与对照品比对、高分辨率质量数和离子碎片信息结合参考文献来鉴定质量标志物。

2.5 抗肝肿瘤活性评价研究

使用源于模式培养物集存库 (美国) 的肝癌 HepG2 细胞株通过 DMEM 完全培养基 (10% 胎牛血清) 复苏后在恒温 37 ℃、5% CO₂ 的条件下培养。用适量胰酶将培养至对数生长期的细胞消化下来, 收集后采用 CM-Dil 标记。对标记的细胞计数, 浓度调整为 8 × 10⁷ 个/mL, 显微注射仪精密吸取 10 nL (约 800 个细胞) 注射到 2 dpf 斑马鱼的卵黄囊内。造模完成后将其培养于 5 ℃ 的恒温生化培养箱中。等到 3 dpf, 借助荧光显微镜, 挑选出荧光量一样的模型斑马鱼, 并随机分为模型对照组、阳性药组、蟾酥组。以水溶给药方法分别给予所选择的含量差异最大的 2 批蟾酥, 质量浓度为 1. 25 μg · mL⁻¹; 阳性药顺铂质量浓度为 15. 0 μg · mL⁻¹。模型对照组的斑马鱼采用等体积的 6. 01% DMSO 进行培养。每组使用 10 尾斑马鱼, 于 35 ℃ 培养箱中培养 3 d。经过 3 d 药物孵育后, 随机捞出鱼体并固定, 荧光显微镜进行观察、拍照。使用尼康 NIS-Elements D 3. 10 高级图像处理软件对图像进行定量分析。计算 HepG2 细胞的相对荧光强度总和 (S), 比较蟾酥以及顺铂对 HepG2 细胞的抑制效果。

$$\text{抑瘤率} = \frac{S_{\text{模型对照组}} - S_{\text{顺铂或蟾酥组}}}{S_{\text{模型对照组}}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 含量测定

根据 2020 年版药典方法, 采用高效液相色谱法结合一测多评法对 20 批蟾酥进行含量测定。20 批蟾酥中蟾毒灵为 0. 77% ~ 2. 11%, 华蟾酥毒基为 0 ~ 4. 88%, 脂蟾毒配基为 0. 55% ~ 7. 60%, 药典质控指标总量为 5. 03% ~ 8. 99%, 结果见表 2。

3.2 20 批蟾酥代谢组学多元统计分析

指名蟾酥和华西蟾酥的总离子流图见图 1。本研究采用了质量控制 (QC) 样本检测了仪器在采集数据过程中的重复性和稳定性。QC 样本是所有检测样本取 50 μL 均匀混合后得到的。每采集 4 个样本插入 1 个 QC 样本。Progenesis QI 软件整理

表 2 20 批蟾酥含量测定

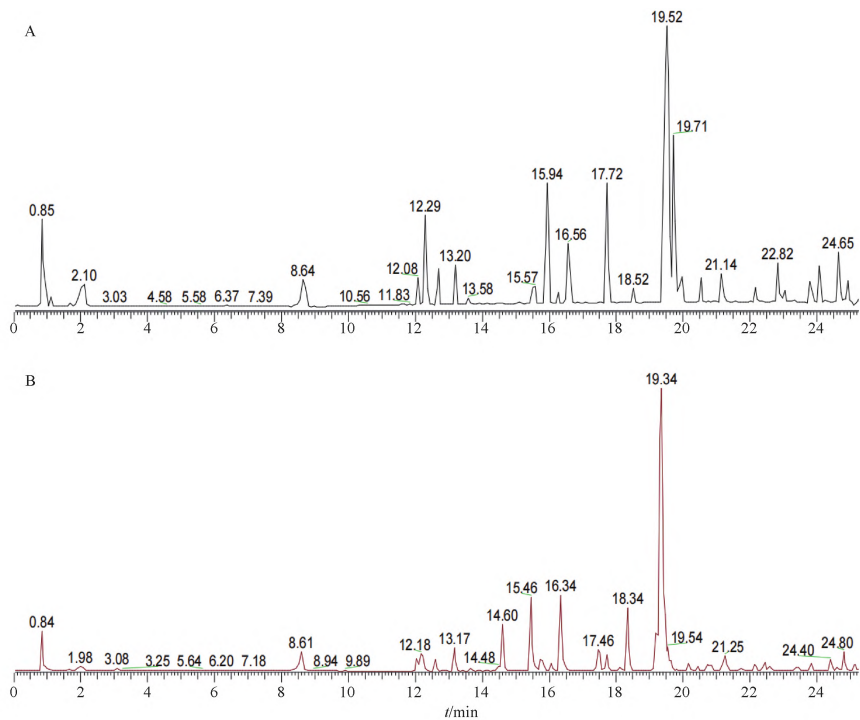
Table 2 Determination results of 20 batches of Bufonis Venenum

No.	蟾毒灵	华蟾酥毒基	脂蟾毒配基	总量
CS1	1. 86	4. 68	2. 34	8. 88
CS2	1. 61	4. 36	2. 21	8. 17
CS3	1. 00	2. 82	1. 47	5. 29
CS4	1. 87	4. 43	1. 15	7. 45
CS5	2. 00	4. 88	1. 17	8. 05
CS6	2. 01	3. 33	1. 72	7. 06
CS7	2. 11	4. 59	2. 29	8. 99
CS8	1. 03	0. 02	4. 18	5. 23
CS9	1. 90	2. 58	0. 55	5. 03
CS10	0. 80	0. 07	7. 21	8. 08
CS11	0. 85	0. 10	7. 60	8. 55
CS12	1. 02	0. 11	6. 88	8. 00
CS13	0. 90	0	5. 65	6. 55
CS14	1. 25	0. 69	5. 94	7. 88
CS15	0. 77	0. 23	4. 62	5. 62
CS16	1. 18	0. 66	4. 54	6. 38
CS17	0. 77	0. 17	5. 16	6. 10
CS18	0. 93	0	5. 98	6. 91
CS19	1. 19	0. 86	6. 49	8. 54
CS20	0. 89	0. 09	7. 48	8. 45

UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 平台收集 20 批蟾酥的 1 170 个离子信息, 包括保留时间、质荷比和峰面积。由于离子信息众多, 难以直接观察到各组之间的差异。在做差异分析前, 首先对华西蟾酥和指名蟾酥 2 组的样品进行主成分分析, 观察差异分组之间和组内样品之间的变异度大小, 见图 2。图 2 中 QC 样本明显聚集在一起, 表明仪器运转良好、稳定, 数据可信。华西蟾酥和指名蟾酥也区分良好, 表明该方法可以对 2 种蟾酥进行识别, 2 种蟾酥存在差异。其中指名蟾酥的蟾酥分布更分散, 这可能与样本采集的地点分布范围有关。

3.3 潜在质量标志物筛选

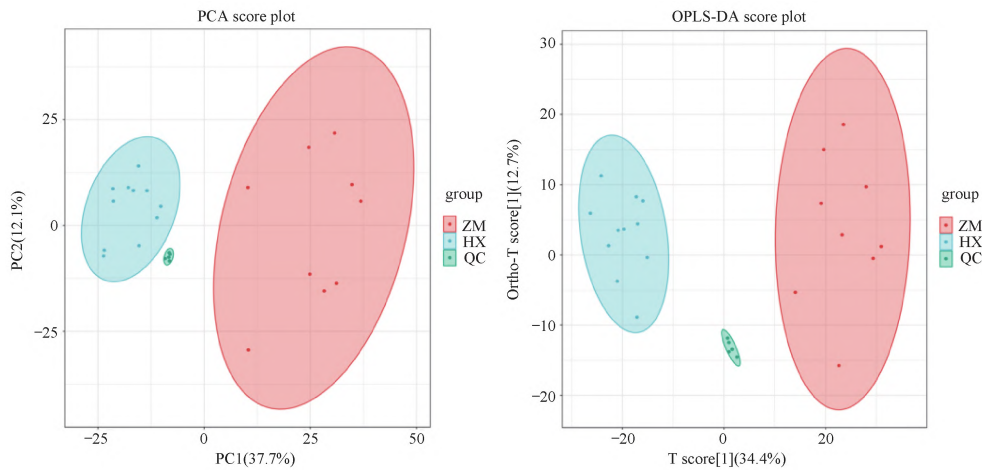
OPLS-DA 作为一种有监督模式识别的多元统计分析方法, 可以有效地去除与研究无关的影响, 从而筛选质量标志物。本研究建立的 OPLS-DA 模型中, 解释能力参数为 $R^2Y = 0. 997$, 预测能力参数为 $Q^2 = 0. 893$, 说明模型的预测能力和解释率均较为良好, 模型稳定可靠。按照 $VIP > 1$ 、 $FC < 0. 5$ 或 $FC > 2. 0$ (峰面积的差异倍数大于 2) 的条件来寻找质量标志物。为了使确定的差异分子可能与活性具有潜在关联, 还再次剔除了平均峰面积不足平均总峰面积 1% 的差异成分, 并根据与对照品比对、高分辨率质



A. ESI⁺ 模式下指名亚种蟾酥样品; B. ESI⁺ 模式下华西亚种蟾酥样品。

图 1 蟾酥样本的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of Bufonis Venenum samples



ZM. 指名亚种; HX. 华西亚种; QC. 质量控制样本(图 3 同)。

图 2 PCA、OPLS-DA 得分图

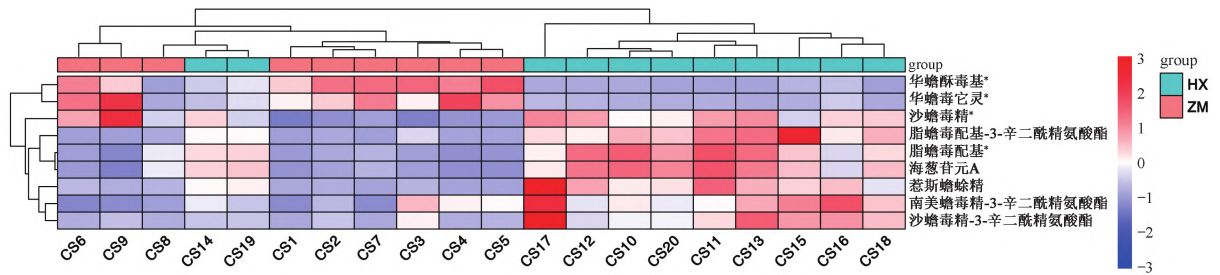
Fig. 2 Score plots of principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA)

量数和离子碎片信息结合参考文献,共鉴定 9 个质量标志物,包括 3 个蟾蜍毒素和 6 个配基类成分。根据筛选出的质量标志物对 20 批蟾酥进行聚类分析,成分聚类上,除华蟾酥毒基、华蟾毒它灵,其余质量标志物多在华西蟾酥中高表达。样品聚类上,华西蟾酥和指名蟾酥总体各聚为一类。其中,2 批华

西蟾酥被聚在指名蟾酥一类,但其差异物的表达模式仍然类似于华西蟾酥,聚类分析热图见图 3,离子信息见表 3。

3.4 蟾酥的抗肝肿瘤活性评价

根据 3.1 项下含量测定结果,选择含量最低与最高的 2 批蟾酥进行活性考察,见表 2、图 4,分别



*. 通过对照品比对鉴定的质量标志物。

图3 9个质量标志物在20批蟾酥中的差异表达聚类分析

Fig. 3 Differential expression cluster analysis of 9 quality markers in 20 batches of Bufo venenum

表3 9个质量标志物信息

Table 3 Information of 9 quality markers

No.	t_R /min	FC	VIP	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	分子式	误差 / $\times 10^{-6}$	质谱碎片 MS/MS (m/z)	名称
1	13.14	1.27	2.01	417.225 9	417.227 2	$C_{24}H_{33}O_6$	-3.12	399.216 6, 371.221 8, 335.200 7, 317.190 0	沙蟾毒精 ¹⁾
2	15.45	8.26	1.19	729.403 3	729.406 9	$C_{38}H_{57}O_{10}N_4$	-4.99	711.395 8, 683.400 8, 399.216 2, 331.197 3, 278.149 6, 250.154 8	沙蟾毒精-3-辛二酰精氨酸酯 ^[18,20-22]
3	16.50	3.48	1.04	713.408 9	713.412 0	$C_{38}H_{57}O_9N_4$	-4.29	278.149 6, 331.197 5, 695.400 7	南美蟾毒精-3-辛二酰精氨酸酯 ^[18,20-22]
4	16.61	0.13	1.38	459.235 7	459.237 7	$C_{26}H_{35}O_7$	-4.36	345.185 5, 363.196 2, 381.206 7, 417.227 4	华蟾毒它灵 ¹⁾
5	19.44	16.87	1.43	697.414 3	697.417 1	$C_{38}H_{57}O_8N_4$	-4.09	250.154 9, 278.149 7, 331.197 5, 546.377 1	脂蟾毒配基-3-辛二酰精氨酸酯 ^[18,20-22]
6	19.44	5.36	1.52	385.235 8	385.237 3	$C_{24}H_{33}O_4$	-3.89	321.223 3, 339.231 4, 349.225 7, 367.238 5	脂蟾毒配基 ¹⁾
7	19.44	5.51	1.56	367.225 3	367.226 8	$C_{24}H_{31}O_3$	-4.09	349.216 2, 321.221 3, 331.205 6, 307.205 5	海葱苷元 A ^[18,20-22]
8	19.55	0.16	1.49	443.240 6	443.242 8	$C_{26}H_{35}O_6$	-4.90	347.200 6, 365.211 0, 401.232 2	华蟾酥毒基 ¹⁾
9	20.75	13.62	1.38	399.214 9	399.216 6	$C_{24}H_{31}O_5$	-4.26	335.200 3, 353.210 9, 381.205 7	惹斯蟾蜍精 ^[18,20-22]

注:离子类型均为 $[M+H]^+$; ¹⁾ 通过对照品比对鉴定。

为CS7(总量为8.99%)和CS9(总量为5.03%)。

2种蟾酥对移植瘤的抑制作用结果见图5。结

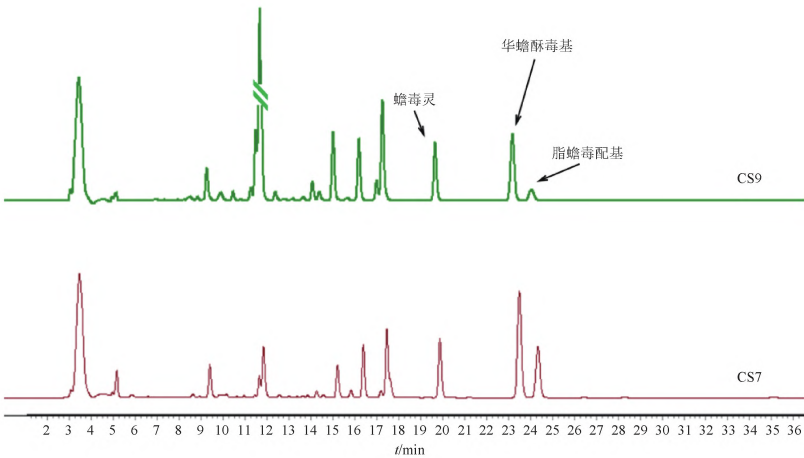
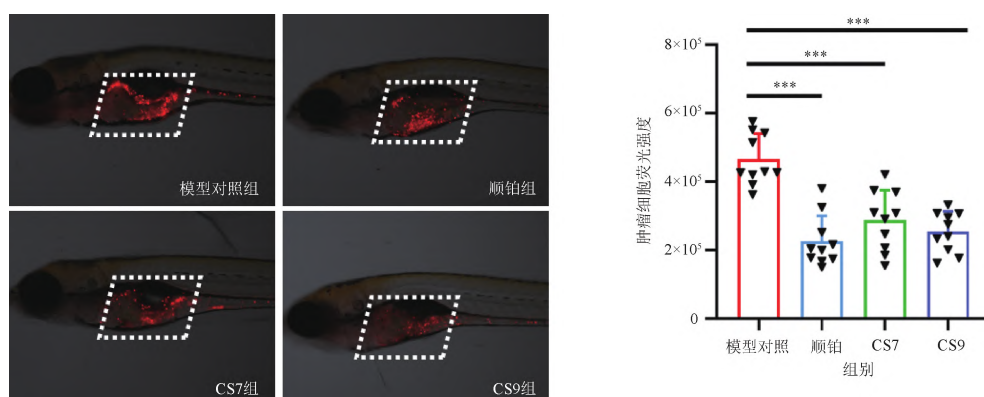


图4 CS7和CS9高效液相色谱图

Fig. 4 High-performance liquid chromatograms for CS7 and CS9

果表明顺铂的抑瘤率为 51.40%, CS7 号蟾酥的抑瘤率为 38.06%, CS9 号蟾酥的抑瘤率为 45.29%。虽然顺铂的抑瘤率高于蟾酥, 但 2 批蟾酥的给药浓度远远低于顺铂, 表明蟾酥抗肿瘤活性显著。尽管 CS7 号蟾酥的药典质控指标成分总量高于 CS9 号蟾

酥, 但在本次抗肿瘤实验却弱于 CS9 号蟾酥。此外, 结合图 3 可以看出, CS9 号蟾酥的沙蟾毒精、华蟾毒它灵的含量明显高于 CS7 号蟾酥, 存在沙蟾毒精和华蟾毒它灵是一种相对毒性弱、抗肿瘤活性强的成分可能。



与模型对照组比较 *** $P < 0.001$ 。

图 5 蟾酥对斑马鱼 HepG2 异种移植瘤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 5 Effects of Bufonis Venenum on zebrafish HepG2 xenograft tumors ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4 讨论

蟾酥作为一种传统动物类药材, 应用历史悠久。已被中国、日本和德国等国家开发并应用于临床。但随着蟾酥临床价值的不断上升, 蟾酥却因环境改变、城市化进程推进等原因而减少, 蟾酥产量逐步下降。树立正确蟾酥价值导向, 建立合理蟾酥价值评价体系, 有助于释放蟾酥资源, 缓解蟾酥资源短缺的问题。

本研究收集指名蟾酥和华西蟾酥共 20 批, 根据 2020 年版药典蟾酥含量测定方法, 高效液相色谱法结合一测多评法, 实现多个成分的同步测定。含量测定结果表明, 不同地域、品种的蟾酥, 蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的总量存在上下波动。并通过代谢组学方法比较 2 种蟾酥差异。代谢组学部分参照课题组前期研究基础, 通过液质联用技术对蟾酥化学成分进行分析。但不同的是, 前期研究旨在对蟾酥化学成分进行全面定性分析, 本研究则以寻找 2 种蟾酥的质量标志物为研究目的。通过以液质联用技术为基础的代谢组学平台可以定性/半定量检测中药蟾酥成分的情况变化。利用 Progenesis Q1 软件, 整理 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 平台收集到的 20 批蟾酥离子信息, 包括保留时间、质荷比和峰面积

等。通过主成分分析对获得的各组数据进行整体评价, 可以看出指名蟾酥和华西蟾酥有明显的分组趋势。为了找出 2 种蟾酥的潜在质量标志物, 本研究建立了预测能力较好且稳定可靠的 OPLS-DA 模型 ($R^2 Y = 0.997$, $Q^2 = 0.893$)。按照 $VIP > 1$ 、 $FC < 0.5$ 或 $FC > 2.0$ (峰面积的差异倍数大于 2) 的条件筛选潜在质量标志物, 并通过对照品比对、参考前期研究结果和相关文献的离子信息, 对筛选出的潜在差异物质进行有针对性的鉴定。研究结果表明, 确定的 9 个质量标志物多在华西蟾酥中高表达, 其中包括了 3 个蟾毒毒素 (沙蟾毒精-3-辛二酰精氨酸酯、南美蟾毒精-3-辛二酰精氨酸酯、脂蟾毒配基-3-辛二酰精氨酸酯) 和 4 个蟾毒配基类 (沙蟾毒精、脂蟾毒配基、海葱苷元 A、惹斯蟾蜍精)。但在华蟾酥毒基含量的比较上, 华西蟾酥存在劣势。

值得注意的是, 目前已有文献证明脂蟾毒配基的抗肿瘤活性强于华蟾酥毒基^[23]。9 个质量标志物涵盖了指标成分脂蟾毒配基、华蟾酥毒基和药效研究结果显著的沙蟾毒精、华蟾毒它灵^[24], 具有研究意义。温丽敏^[25]和高波等^[26]的急性毒性研究结果表明, 小鼠腹腔注射华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的半数致死量 (LD_{50}) 分别为 4.38、20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。而沙

蟾毒精同样与华蟾酥毒基、蟾毒灵、脂蟾毒配基具备纳摩尔级别的肿瘤细胞增殖抑制指数(IC_{50})^[27],但沙蟾毒精的毒性却约为蟾毒灵的1/8和华蟾酥毒基的1/4,仅略高于脂蟾毒配基^[27-29]。考虑到沙蟾毒精、脂蟾毒配基与蟾毒灵、华蟾酥毒基的毒活性比较,华西蟾酥临床价值潜力巨大。

本研究还选择了指标成分总含量差异最大的2批蟾酥CS7号和CS9号,分别进行了基于斑马鱼模型的抗肝肿瘤活性评价研究。近年来,斑马鱼已经成为重要的脊椎动物模型,并广泛应用于药物筛选和活性评价领域。结果显示2批蟾酥均具有明显的抗肝肿瘤活性($P<0.001$)。 $15.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的顺铂对斑马鱼HepG2移植瘤模型的抑瘤率为51.40%,虽然高于CS7号、CS9号蟾酥的抑瘤率,但蟾酥的用量远小于阳性药顺铂。抗肿瘤药物在杀死肿瘤细胞时多数也会对正常细胞产生杀伤作用,用药剂量越小则对肿瘤细胞的靶向作用越明显,这体现了蟾酥强抗肿瘤活性。同时,2批含量不同的蟾酥其抗肿瘤活性也存在差异。CS7号蟾酥含量测定结果为8.99%,抗肿瘤活性为38.06%,CS9号蟾酥含量测定结果为5.03%,抗肿瘤活性为45.29%。含量较低的CS9号抗肝肿瘤活性高于CS7号蟾酥,证明了单纯以药典质控指标总量高低来评价蟾酥价值的方式是不合理的。这会导致蟾酥资源无法合理利用,药效良好的蟾酥不能充分使用,蟾酥资源无法充分释放。建立合理的蟾酥质量评价体系是十分重要的。根据本研究的实验结果,以及文献中得到的提示,沙蟾毒精、华蟾毒它灵等蟾毒配基或许更适合纳入蟾酥质控指标的考察范围。但这仍需后续的实验进行筛选与验证。

综上所述,来源于指名亚种的蟾酥与华西亚种的蟾酥存在差异,通过液质联用技术确定9个质量标志物多在华西蟾酥中高表达。虽然华蟾酥毒基在华西蟾酥中含量较低,但同为药典质控指标的脂蟾毒配基以及毒性较弱、抗肿瘤活性强的沙蟾毒精却在华西蟾酥中高表达,华西蟾酥的临床价值潜力巨大。通过斑马鱼肝癌移植瘤模型对比2批含量差异明显的蟾酥抗肝肿瘤活性,指出了仅以蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基总含量高低作为蟾酥价值导向的不合理性。蟾酥评价体系的合理建立,仍需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 孙洋,李圣耀.“白兔捣药虾蟆丸”含义辨析[J].中华医史杂

志,2019,49(2):67.

- [2] 章旭日,王珺,侯楚,等.浙江省两栖动物物种现状及区系分析[J].野生动物学报,2020,41(3):10.
- [3] 邓耀辉.亲情和食物组成对中华大蟾蜍蝌蚪竞争机制影响的研究[D].信阳:信阳师范学院,2018:26.
- [4] 张英,邱鹰昆,刘珂,等.中华大蟾蜍的研究进展[J].中草药,2006,37(12):1905.
- [5] 詹常森.中华大蟾蜍养殖基地技术手册[M].上海:华东理工大学出版社,2018:99.
- [6] WU D, ZHOU W Y, LIN X T, et al. Bufalin induces apoptosis via mitochondrial ROS-mediated caspase-3 activation in HCT-116 and SW620 human colon cancer cells [J]. Drug Chem Toxicol, 2019, 42(4): 444.
- [7] XIANG R F, WANG Y, ZHANG N, et al. MK2206 enhances the cytotoxic effects of bufalin in multiple myeloma by inhibiting the AKT/mTOR pathway [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(5): e2776.
- [8] YU Z L, GUO W, MA X C, et al. Gamabufotalin, a bufadienolide compound from toad venom, suppresses COX-2 expression through targeting IKK beta/NF-kappa B signaling pathway in lung cancer cells [J]. Mol Cancer, 2014, 13(1): 203.
- [9] 孙璐璐,张璟,刘浩,等.华蟾酥毒基抗肿瘤作用机制研究进展[J].包头医学院学报,2017,33(5):133.
- [10] 唐信威,肖洁,宋健,等.酯蟾毒配基选择性杀伤肿瘤细胞的研究[J].中国癌症杂志,2012,22(3):196.
- [11] 房蕴歌,王鹏飞,朱厚达,等.蟾酥药材和饮片(蟾酥粉)的质量标准研究[J].中国中药杂志,2020,45(8):1726.
- [12] 赵曜.中华大蟾蜍不同海拔种群氧气运输功能的比较研究[D].兰州:兰州大学,2019.
- [13] KAN J, HUANG H, JIANG Z, et al. Arenobufagin promoted oxidative stress-associated mitochondrial pathway apoptosis in A549 non-small-cell lung cancer cell line [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 1.
- [14] LI M, WU S, LIU Z, et al. Arenobufagin, a bufadienolide compound from toad venom, inhibits VEGF-mediated angiogenesis through suppression of VEGFR-2 signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(9): 1251.
- [15] WEI X, YANG J, MAO Y, et al. Arenobufagin inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway and induces apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells [J]. Pancreas, 2020, 49(2): 261.
- [16] PAN Z, QU C, CHEN Y, et al. Bufotalin induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human malignant melanoma A375 cells [J]. Oncol Rep, 2019, 41(4): 2409.
- [17] LIN S, LV J, PENG P, et al. Bufadienolides induce p53-mediated apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncol Lett, 2018, 15(2): 1566.
- [18] REN W, HAN L, LUO M, et al. Multi-component identification and target cell-based screening of potential bioactive compounds in toad venom by UPLC coupled with high-resolution LTQ-Orbi-



- trap MS and high-sensitivity Qtrap MS [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(18): 4419.
- [19] 张瑜. 蟾皮中吡啶烷胺类生物碱化学成分及抗炎活性机制研究[D]. 北京:中国中医科学院,2020.
- [20] MENG Q, YAU L F, LU J G, et al. Chemical profiling and cytotoxicity assay of bufadienolides in toad venom and toad skin [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 187: 74.
- [21] SCHMEDA-HIRSCHMANN G, QUISPE C, THEODULOZ C, et al. Antiproliferative activity and new argininy l bufadienolide esters from the "cururú" toad *Rhinella* (*Bufo*) *schneideri* [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(2): 1076.
- [22] SCHMEDA-HIRSCHMANN G, GOMEZ C V, ANTONIETA R, et al. The Paraguayan *Rhinella* toad venom: implications in the traditional medicine and proliferation of breast cancer cells [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 199: 106.
- [23] 韩萍. 蟾皮抑制卵巢癌有效成分的筛选及其机制研究[D]. 上海:中国人民解放军海军军医大学,2018.
- [24] 潘越,胡思宏,王佳鑫,等. 华蟾毒它灵通过线粒体途径引起肝癌细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志,2021,37(4):646.
- [25] 温丽敏. 华蟾毒精诱导心肌细胞凋亡/自噬心脏毒性研究[D]. 广州:广州中医药大学,2018.
- [26] 高波,魏晓露,韩玲玉,等. 华蟾素注射液中酯蟾毒配基的分离及体内外抗肿瘤活性筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(16):78.
- [27] 袁贤达,王骏,金明吉,等. 华蟾素油剂对肝癌细胞的体内外抑制活性及肿瘤微环境中对免疫细胞的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2019,14(12):1629.
- [28] 乌日罕. 蟾毒灵对人肝癌细胞 HepG2 细胞放疗敏感性影响的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学,2021.
- [29] 刘吉华,王静蓉,余伯阳. 反相高效液相色谱法测定蟾酥中的 3 种蟾毒内酯[J]. 色谱,2008,26(2):186.

[责任编辑 张宁宁]