

基于¹H-NMR 代谢组学技术分析逍遥丸干预非酒精性脂肪肝病郁脾虚证大鼠的作用机制

关伟, 李若瑜, 郭继龙, 李明磊, 苗宇船*

(山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

[摘要] **目的:**研究逍遥丸对非酒精性脂肪肝(NAFLD)肝郁脾虚证大鼠尿液中内源性代谢产物的影响,探讨逍遥丸对该病证的作用机制。**方法:**将 SD 大鼠随机分为 3 组,即空白组、模型组、逍遥丸组(3.24 g·kg⁻¹·d⁻¹),采用高糖高脂饲料结合饥饿失常、慢性束缚应激刺激、夹尾法,共 10 周复制 NAFLD 模型,逍遥丸组给予逍遥丸治疗 4 周。采用酶联免疫吸附法检测模型大鼠血清丙氨酸氨基转移酶、肝组织总胆固醇、甘油三酯、脑组织 5-羟色胺和去甲肾上腺素的含量,运用苏木精-伊红染色观察肝组织形态学的变化。采用代谢组学技术对模型大鼠尿液进行核磁数据采集,结合多元统计分析探讨逍遥丸的治疗作用机制。**结果:**逍遥丸组能使 NAFLD 肝郁脾虚证大鼠尿液中乙酸,肌酐,甘氨酸,异亮氨酸,α-酮戊二酸,乳酸,亮氨酸,琥珀酸,牛磺酸,二甲胺,α-D-葡萄糖,甘油共 12 个标志物发生不同程度的回调;主要涉及能量代谢、糖代谢和胰岛素抵抗等代谢途径的调节。**结论:**逍遥丸可能通过调节脂质代谢、糖代谢和氨基酸代谢紊乱等来发挥治疗 NAFLD 的作用。

[关键词] 核磁共振氢谱(¹H-NMR); 逍遥丸; 非酒精性脂肪肝; 尿液; 代谢组学; 肝郁脾虚证; 能量代谢

[中图分类号] R22;R24;R28;C37;R945;R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0099-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181991

Analysis of Mechanism of Xiaoyaowan on Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Syndrome of Liver Depression and Spleen Deficiency by ¹H-NMR Metabolomics

GUAN Wei, LI Ruo-yu, GUO Ji-long, LI Ming-lei, MIAO Yu-chuan*

(Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the effect of Xiaoyaowan on the endogenous metabolites in the urine of rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and liver depression and spleen deficiency syndrome, and to explore the therapeutic mechanism of this compound. **Method:** SD rats were randomly divided into 3 groups, namely blank group, model group and Xiaoyaowan group (3.24 g·kg⁻¹·d⁻¹). The high-fat and high-fat diet combined with irregular diet, chronic restraint stress stimulation, and tail clipping method were employed to replicate the NAFLD model for 10 weeks. Xiaoyaowan was given for 4 weeks. The levels of serum alanine aminotransferase, total cholesterol and triglycerides in the hepatic tissue, 5-hydroxytryptamine and norepinephrine in brain tissue of model rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The morphology of liver tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The nucleus magnetic data of model rat urine was collected by metabolomics and combined with multivariate statistical analysis to explore the therapeutic mechanism of Xiaoyaowan. **Result:** Xiaoyaowan could make acetic acid, creatinine, glycine and other nine markers in the urine of rats with NAFLD and syndrome of liver depression and spleen deficiency have varying degrees of callback. It

[收稿日期] 20180425(018)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470190);山西省卫生厅科研课题项目(201301100);山西省研究生教育创新项目(2018SY095);山西中医药大学科技创新团队项目(2018MST006)

[第一作者] 关伟,讲师,从事中西医结合肝胆病症研究,E-mail:guanwei25648@163.com

[通信作者] *苗宇船,教授,博士,从事中西医结合肝胆病症研究,Tel:0351-2272365,E-mail:mych65@163.com

mainly involved the regulation of metabolic pathways, such as energy metabolism, glucose metabolism, insulin resistance, etc. **Conclusion:** Xiaoyaowan may play a role in the treatment of NAFLD by regulating lipid metabolism, glucose and amino acid metabolism disorders.

[Key words] nuclear magnetic resonance hydrogen spectrum ($^1\text{H-NMR}$); Xiaoyaowan; nonalcoholic fatty liver disease; urine; metabolomics; syndrome of liver depression and spleen deficiency; energy metabolism

逍遥丸出自宋代《太平惠民和剂局方》，作为调和肝脾的要方，具有疏肝解郁、健脾养血、调节脂肪代谢的作用，临床上被广泛用于治疗非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 肝郁脾虚证^[1]，且疗效显著。本课题组前期研究表明，逍遥丸可能通过影响肠源性内毒素血症 (IETM)，胰岛素抵抗 (IR)，Toll 样受体 (TLR)-4/TLR 相关的干扰素活化因子 (TRIF) 通路来达到减缓肝损伤及改善 NAFLD 肝郁脾虚证的作用^[2]。脂肪肝可归属于中医学“积聚”“胁痛”“痰浊”等范畴，临床上一般可分为肝郁脾虚、痰湿内阻、湿热内蕴、肝郁气滞、脾虚湿蕴、痰瘀互结、肝肾亏虚等证型，而肝郁脾虚在中医证候群中占比 46.79%，是其基本病机和主要证型^[3-4]。目前，国内外多采用高糖高脂饮食、四氯化碳 (CCl_4) 联合高脂饲料等方法制备单一的 NAFLD 病理模型，由于其未考虑中医证候特点，故无法与传统中医的辨证论治相结合^[3]，亟需建立符合人类发病特点的 NAFLD 肝郁脾虚证的病证结合动物模型。

5-羟色胺 (5-HT) 和去甲肾上腺素 (NE) 是调节机体情绪、行为状态、精神等生理活动重要的单胺类神经递质。肝失疏泄、气机郁滞可引起神经递质或受体功能失调，导致 NE 减少，继而使突触后膜 5-HT_{1A} 受体低敏，5-HT 的释放减少，影响了正常的神经传递功能，表现为情绪低落、精神抑郁不舒。5-HT 还是参与脑-肠轴的重要神经介质，说明其与肝郁脾虚证密切相关^[5]。木糖口服后主要被肠黏膜吸收，并迅速经肾脏从尿中排出，测定尿中排出量可以反映小肠的相对吸收量。而中医诠释“脾”的大部分功能主要属于现在解剖意义上的小肠^[6]。因此，海马中 5-HT、NE 含量变化和尿液中木糖排泄率是肝郁脾虚证的判断指标，结合肝脏组织病理学检查这一脂肪肝诊断的金标准，可作为 NAFLD 肝郁脾虚证病证结合模型的评价指标。

在中医整体观念、辨证论治和藏象理论的指导下，本课题组前期以高糖高脂饲料结合慢性情志刺激和饮食不节模拟人类发病的过程，建立了 NAFLD 肝郁脾虚证病证结合的模式^[7]。代谢组学作为一门定性和定量分析某一生物或细胞中所有小分子代

谢产物的学科，以生物体的体液或组织为研究对象，从整体代谢物的变化模式反映机体整体生理、病理状态，着重强调生物体的代谢物谱在疾病和药物等环境刺激下系统代谢网络的整体应激和变化^[8]，与中医系统观、整体观和辨证论治的理论体系相符合，已在中医药现代化研究领域中得到广泛应用^[9-13]。为了探讨逍遥丸如何通过代谢途径治疗 NAFLD 肝郁脾虚证，本实验采用核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 代谢组学技术研究逍遥丸对模型大鼠尿液代谢表型的影响，以揭示该复方的作用机制。

1 材料

RM2235 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司)，MK3 型酶标仪和 Nanodrop 2000 型紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)，AVANCE III 型 600MHz 液体核磁共振谱仪 (德国布鲁克公司)，DW-86L386 型低温冰箱 (青岛海尔)，TGL-6 型高速冷冻离心机 (长沙湘仪离心机有限公司)。逍遥丸 (由柴胡、当归、白芍、炒白术、茯苓、炙甘草、薄荷等组成，每丸 9 g；由山西天生制药有限责任公司提供，国药准字 Z14020457)，D-木糖排泄率测定试剂盒 (北京奥博星生物技术有限责任公司，批号 2014001)，重水 (D_2O ，美国 CIL 公司)，3-(三甲硅基) 氘代丙酸钠 (TSP，德国 Merck 公司)；丙氨酸氨基转移酶 (ALT)，总胆固醇 (TC)，甘油三酯 (TG)，5-羟色胺 (5-HT) 和去甲肾上腺素 (NE) 试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司，批号分别为 1007150, 141741, 146851, 1051573 和 105157)。

雄性 SD 大鼠 24 只，体质量 (210 ± 10) g，SPF 级，购自北京海淀兴旺实验动物养殖场，合格证号 SCKK(京)2014-003；所有实验均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。所有动物饲养条件在恒定室温 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 和相对湿度 (48 ± 4)% 的环境中，每天光照 12 h，常规适应性饲养 7 d 后进行实验。

2 方法

2.1 动物分组、造模和给药 所有动物饲养于山西中医药大学实验管理中心动物房，24 只大鼠随机分为空白组、模型组和逍遥丸组，每组各 8 只。空白组

给予基础饲料喂养,自由饮水;模型组和逍遥丸组给予高糖高脂饲料(68.6%基础饲料,20%猪油,10%蔗糖,1%胆固醇,0.2%胆酸钠,0.2%丙硫氧嘧啶)+饥饿失常+慢性束缚应激刺激+夹尾法,按照课题组前期建立的方法复制非酒精性脂肪肝(NAFLD)肝郁脾虚证模型^[7]。按照《中药药理实验方法学》中人与大鼠按体表面积转换系数0.018(大鼠等效剂量相当于人的6.3倍)及成人每日蜜丸量18g计算,将逍遥丸配制成 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,每只大鼠灌胃剂量^[14]为 $3.24\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。从10周末开始,逍遥丸组给予逍遥丸水溶液灌胃,空白组和模型组分别给予等量水灌胃,连续给药4周。

2.2 样本收集 每日观察并记录各组大鼠的活动情况、饮食、粪便、毛发、精神状态等情况。实验动物治疗结束后,在代谢笼中冰浴收集12h尿液,用移液枪采集上清液1.5mL置于离心管内,编号、记录,低温冰箱保存备用。每只大鼠灌胃3% D-木糖溶液4mL,收集5h尿液,记录尿量,检测各组大鼠尿液D-木糖排泄率。造模结束后,采用戊巴比妥钠注射法麻醉动物,取血常规制备血清;断头处死大鼠,低温分离海马组织,常规制备组织匀浆,取上清检测其5-HT和NE的含量。取肝左叶置于10%中性甲醛中固定,石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色,依据参考文献^[7]的方法评定各组大鼠肝脏脂肪变性程度。

2.3 样本处理 尿液样本室温解冻,精密吸取0.5mL于离心管中,加入磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)0.2mL,静置10min,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20min,取上清液0.55mL,转入5mm核磁管中进行核磁分析,每份尿液平行制备2份样品。

2.4 ¹H-NMR 测试及图谱处理 于室温下利用核磁共振谱仪采集数据,进行¹H-NMR测试,采用标准的预饱和和脉冲序列压制水峰信号,预饱和时间2s,采样累加数128次,采样点数64k,谱宽12.24kHz,采样时间2.66s,脉冲间隔时间D1=3.00s。采用MestReNova 6.0.1软件对所有¹H-NMR图谱进行傅立叶转换并进行相位、基线调整,以TSP的化学位移 δ 0为标准进行化学位移校正。以 δ 0.01为单位,对 δ 0.01~10.50的谱图进行等宽度分割,切除 δ 4.65~4.90水峰;对图谱进行分段积分,将所产生的积分数据进行归一化处理,使数据集中在0~1,以消除所收集尿液标本质量的影响。将上述处理的积分数据导入SIMCA-P 13.0软件中进行多变量统计分析,使用自动规格化(unit variance,UV)数据标

准化处理。主要包括主成分分析(PCA),偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),找出样品间的差异代谢物。

2.5 统计学处理 数据采用SPSS 22.0软件处理,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析及t检验对模型指标及差异代谢物进行统计学分析和比较,以 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。使用One-way ANOVA对各组差异代谢物进行显著性检验,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)-t检验。

3 结果

3.1 逍遥丸对模型大鼠的影响 研究期间模型组大鼠进食量明显减弱,体质量增长缓慢,皮毛无光泽,双目无神,行动迟缓、大便溏薄;肝脏体积明显增大,切面油腻,边缘较钝,表面粗糙,颜色发黄;石蜡切片HE染色显示,肝细胞出现明显脂肪变性,呈现以大泡性脂肪变性为主的混合性脂肪性病变,可见气球样病变,肝小叶边缘和门管区炎细胞浸润和散在的点状坏死,门管区胶原和肝窦出现少量胶原纤维沉积;与空白组比较,模型组血清ALT和肝组织中TG,TC含量显著增高($P<0.05$, $P<0.01$),海马组织5-HT,NE含量及尿液D-木糖排泄率均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),提示造模14周后,大鼠已出现了明显的NAFLD肝郁脾虚证的临床表现,说明病证结合的动物模型建立成功。逍遥丸组整体生化指标评价介于空白组和模型组之间;肝脏体积较模型组小,质地柔软,表面光滑,呈灰红色;肝细胞脂肪变性明显减轻,仅有少量脂肪空泡,门管区未见炎细胞浸润和胶原纤维沉积;与模型组比较,逍遥丸组血清ALT和肝组织中TG和TC含量显著下降($P<0.05$, $P<0.01$),海马组织5-HT,NE含量及尿液D-木糖排泄率均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见表1和图1。

3.2 尿液¹H-NMR图谱分析 根据化学位移值、峰型、耦合常数及人类代谢组数据库(HMDB,http://www.hmdb.ca/),进行代谢物谱峰的归属,结果共指认了26个代谢物,主要是与脂质代谢、氨基酸代谢和糖代谢有关的酮体、氨基酸、有机酸和糖等物质。代谢产物化学信号归属见图2。

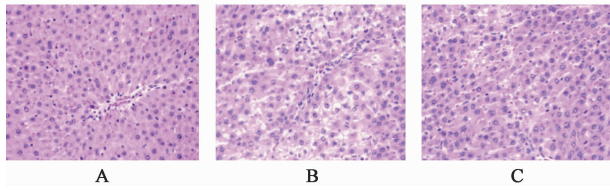
3.3 多元统计数据模型验证 PCA在最大程度提取原始信息的同时对数据进行降维处理,通过主成分来描述机体代谢的情况。而PLS-DA则可使组间差异最大化,采用有监督的PLS-DA对空白组、模型

表 1 逍遥丸对模型大鼠血清 ALT, 肝组织 TC, TG, 海马组织 5-HT, NE 含量及尿液 D-木糖排泄率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Xiaoyaowan on serum alanine aminotransferase, total cholesterol and triglycerides in hepatic tissue, 5-hydroxytryptamine and norepinephrine in hippocampal tissue, excretion rate of D-xylose in urine of model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	TC /mmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	5-HT /ng·L ⁻¹	NE /ng·L ⁻¹	D-木糖 排泄率/%
空白	-	44.14 ± 4.96	0.52 ± 0.12	0.71 ± 0.21	9.91 ± 1.84	14.40 ± 2.99	37.74 ± 4.18
模型	-	69.63 ± 2.20 ¹⁾	0.91 ± 0.24 ¹⁾	2.98 ± 0.73 ²⁾	3.31 ± 0.97 ¹⁾	8.76 ± 1.59 ²⁾	23.04 ± 4.52 ²⁾
逍遥丸	3.24	48.42 ± 5.01 ³⁾	0.65 ± 0.08 ³⁾	1.24 ± 0.46 ⁴⁾	5.75 ± 0.88 ³⁾	12.03 ± 2.77 ⁴⁾	32.70 ± 4.01 ⁴⁾

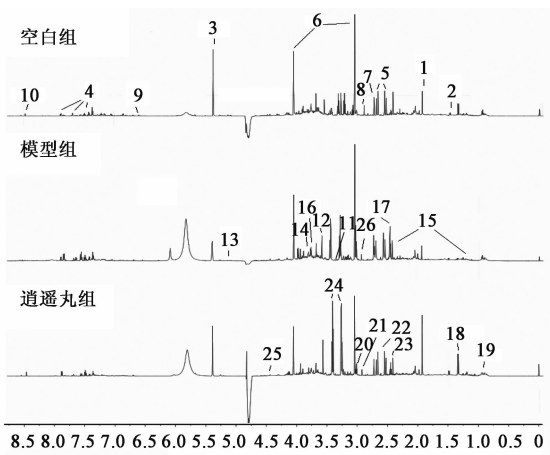
注:与空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(图 5 同)。



A. 空白组; B. 模型组; C. 逍遥丸组

图 1 逍遥丸对 NAFLD 肝郁脾虚证大鼠肝组织的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Xiaoyaowan on liver tissue of rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and liver depression and spleen deficiency syndrome(HE, ×400)



1. 乙酸; 2. 丙氨酸; 3. 尿素素; 4. 苯甲酸; 5. 柠檬酸; 6. 肌酐; 7. 二甲胺; 8. 二甲基甘氨酸; 9. 富马酸; 10. 甲酸; 11. 甘油; 12. 甘氨酸; 13. α-D-葡萄糖; 14. 胍基乙酸; 15. 3-羟基丁酸; 16. 异亮氨酸; 17. α-酮戊二酸; 18. 乳酸; 19. 亮氨酸; 20. 赖氨酸; 21. 甲基胍; 22. 甲胺; 23. 琥珀酸; 24. 牛磺酸; 25. 葫芦巴碱; 26. 三甲胺

图 2 大鼠尿液的¹H-NMR

Fig. 2 ¹H-NMR spectra of rat urine

组和逍遥丸组大鼠尿液的核磁数据进行代谢轮廓分析,见图 3。结果发现 3 组大鼠的尿液样本明显分离,矩阵解释率 $R^2 X = 0.607, R^2 Y = 0.955$ 和模型预测率(Q^2) = 0.816,表明 3 组样本的组间差异明显,进一步说明逍遥丸组相对于模型组有一定的回调作用,与行为学及生化指标结果一致。由图 4(A)

可知,左端 200 个置换检验产生的 R^2 和 Q^2 均小于右端,表明原始模型的预测能力大于任何一次随机排列 Y 变量的预测能力^[15],即模型有效。由图 4(B)可知,空白组与模型组基本沿 $t[1]$ 轴分别聚为两类,表明模型组大鼠尿液在代谢物组成上与空白组存在差异,提示 NAFLD 模型构建成功,其中 $R^2 X = 0.688, R^2 Y = 0.995, Q^2 = 0.907$,即其中 68.8% 的变量作为主要成分构造模型,模型的解释率 99.5%,模型的预测率 90.7%。OPLS-DA 可以消除组内误差及消除随机误差,且能够体现数据的整体特征与变化规律,有利于提高模型的有效性和解析能力。建立 OPLS-DA 模型相对应的 S-plot 图,见图 4(C),结合变量重要性投影(VIP)值分析,以 VIP 值 > 1 为标准,结合对代谢物峰面积进行两样本间 t 检验,以 $P < 0.05$ 为标准,找出了 12 个差异代谢物。

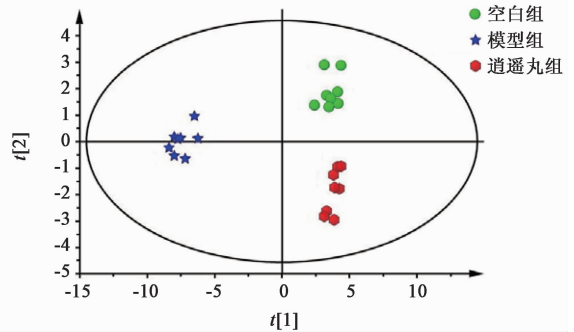
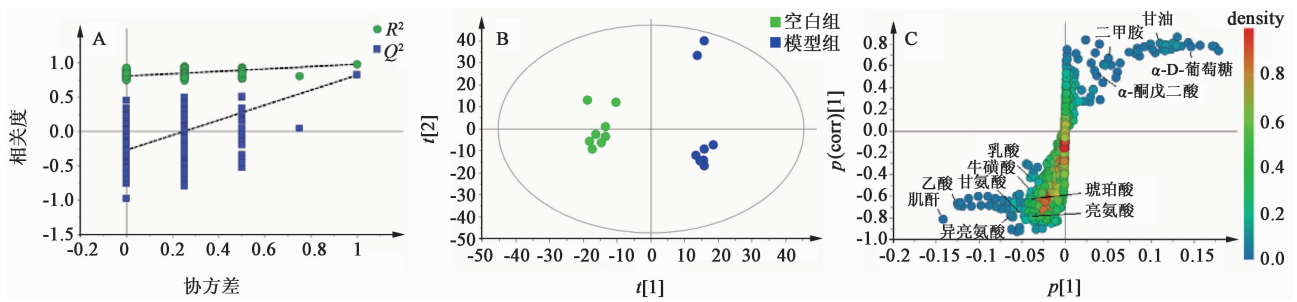


图 3 空白组、模型组与逍遥丸组大鼠尿液核磁数据的 PLS-DA 积分

Fig. 3 PLS-DA score of urine magnetic data of rats in blank group, model group, Xiaoyaowan group

3.4 差异代谢物相对含量的变化 为了能最大程度确定造模前后大鼠尿液中内源性代谢产物发生的差异,采用 OPLS-DA 分析空白组和模型组,得 12 个峰面积具有显著性差异的潜在生物标志物。与空白组相比,模型组中大鼠尿液中乙酸,肌酐,甘氨酸,异亮氨酸,乳酸,亮氨酸,琥珀酸,牛磺酸的含量减少;



A. 模型验证; B. PLS-DA 积分; C. S-plot

图 4 空白组与模型组大鼠尿液核磁数据的多元统计分析

Fig. 4 Multivariate statistical analysis of urine magnetic data of rats in blank group and model group

二甲胺, α -D-葡萄糖, 甘油, α -酮戊二酸含量增多。给予逍遥丸干预后, 乙酸, 肌酐, 甘氨酸等 12 种潜

在生物标志物均得到了不同程度的回调。见图 5。

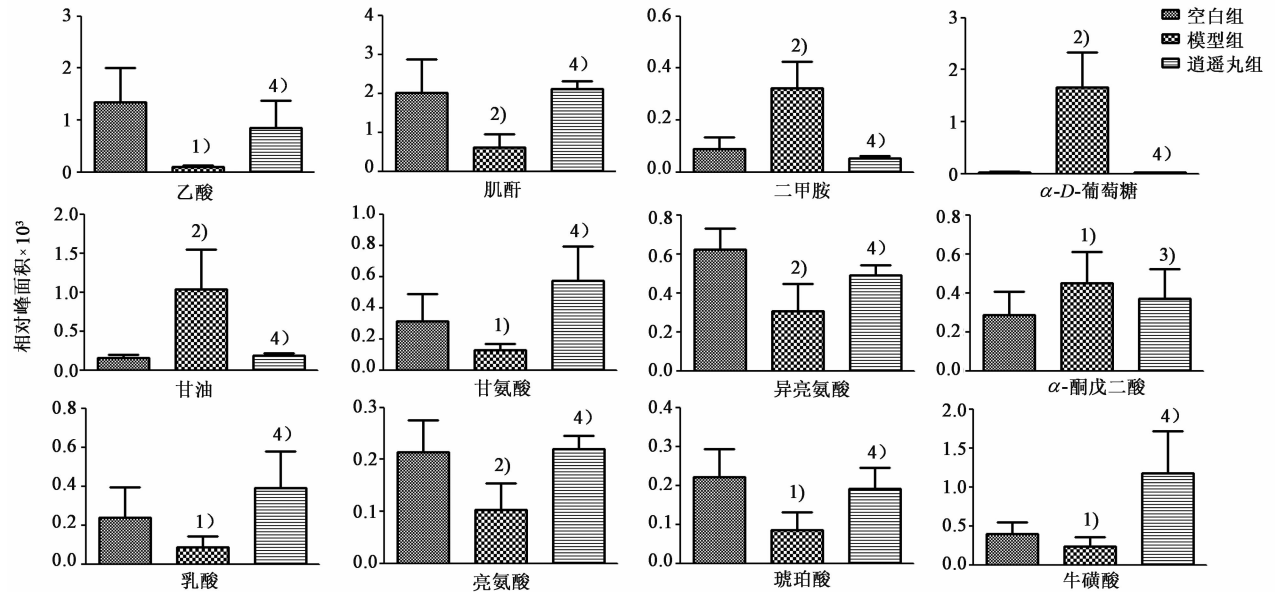


图 5 各组大鼠尿液中差异代谢产物的相对含量 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 Relative contents of different metabolites in urine of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

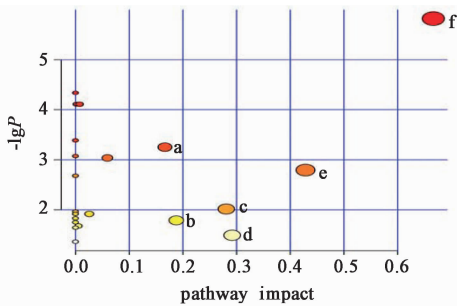
3.5 代谢通路分析 为研究逍遥丸干预 NAFLD 肝郁脾虚证大鼠相关生物标志物涉及的代谢途径, 以及标志物间可能的相互作用关系, 采用 MetPA 数据库进行分析, 见图 6。当通路影响值 (pathway impact) > 0.1 时, 模型组大鼠尿液代谢紊乱途径主要有生物素代谢, 淀粉与蔗糖代谢, 甘油酯代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 牛磺酸和亚牛磺酸代谢, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成。

4 讨论

NAFLD 是指除非酒精和其他明确损肝因素导致的, 以肝实质细胞内脂肪过度沉积、脂肪变性为主要病理特征的临床病理综合征, 疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、肝硬化和肝细胞癌^[16]。近年

来, 随着人们生活水平的提高及生活方式的改变, NAFLD 的发病率逐年攀升, 已成为全球危害人类健康的三大肝病之一^[17]。本文研究结果表明模型组大鼠肝内 TC 和 TG 的含量均显著高于空白组, 提示肝内大量脂肪蓄积; 而组织病理学显示 75% 以上肝细胞呈现大泡性脂肪变性, 伴有肝小叶周围炎细胞浸润, 提示非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 已形成。

清代医家吴鞠通认为积聚乃因“肝气之郁, 痰瘀阻络”。《张氏医通》则认为“得之湿热伤脾, 胃虽受谷, 脾不输运”。肝郁与脾虚可促进高糖高脂对肝细胞脂肪变性的作用, 高糖高脂膳食又加重了脾虚痰湿瘀的积聚, 二者互为因果, 加速了 NASH 形成的进程。本文研究结果显示, 模型组大鼠因慢性束



a. 生物素代谢; b. 淀粉和蔗糖代谢; c. 甘油酯代谢; d. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; e. 牛磺酸和亚牛磺酸代谢; f. 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成

图 6 逍遥丸干预 NAFLD 肝郁脾虚证大鼠相关生物标志物的代谢通路分析

Fig. 6 Metabolic pathway analysis of related biomarkers of Xiaoyaowan interfered NAFLD rats with liver depression and spleen deficiency syndrome

缚活动受限,造成情志不舒、所欲不遂而致肝郁;高糖高脂且饮食不节、饥饱失常,加之肝郁,均可致脾胃损伤,模型符合人类 NAFLD 肝郁脾虚证的发病过程。与空白组比较,模型组检测结果可见大鼠海马组织 5-HT、NE 含量和尿液 D-木糖排泄率显著降低,表现为明显的肝郁脾虚证候。以上指标与动物的一般行为学表现一致,结合组织病理学结果,提示 NAFLD 肝郁脾虚证病证结合的模型复制成功。

本研究利用核磁代谢组学技术共寻找出 12 个差异代谢物,采用 MetPA 数据库构建出模型大鼠涉及的 21 条代谢通路,其中 6 条代谢途径在逍遥丸改善 NAFLD 肝郁脾虚证病证结合模型大鼠内源性代谢中起到了较为重要的作用,可归纳为能量代谢障碍和胰岛素抵抗 2 个方面,可为进一步阐明 NAFLD 的发病机制及逍遥丸干预 NAFLD 的作用机制奠定基础。

4.1 能量代谢障碍 与模型组相比,逍遥丸组大鼠尿液中甘油,二甲胺,α-D-葡萄糖和 α-酮戊二酸水平得以下调,牛磺酸、乙酸、琥珀酸、乳酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和肌酐含量上调,提示逍遥丸分别从脂质代谢、糖代谢和氨基酸代谢等方面调节了模型大鼠体内的能量代谢紊乱。

4.1.1 脂质代谢障碍 肝细胞内的脂肪沉积是 NAFLD 的基本病理过程。与空白组比较,模型组大鼠尿液中甘油和二甲胺水平的升高,提示胆碱大量分解,脂质代谢紊乱导致大鼠肝脏甘油三酯蓄积过多。牛磺酸可促进脂类的吸收,乙酸可通过减少脂肪酸和胆固醇合成酶表达,最终降低肝脏脂肪合成;模型大鼠尿液中牛磺酸、乙酸含量降低,提示已有肝

损伤发生。

4.1.2 糖代谢障碍 琥珀酸和 α-酮戊二酸为三羧酸循环中重要的中间产物,乳酸是葡萄糖无氧代谢终产物,模型组大鼠尿液中 α-D-葡萄糖和 α-酮戊二酸明显高于空白组,提示模型大鼠葡萄糖利用率降低^[18];琥珀酸、乳酸含量下降提示大鼠三羧酸循环异常,以上均会造成能量代谢障碍。

4.1.3 氨基酸代谢障碍 甘氨酸具有抗炎、免疫调节和细胞保护作用,参与蛋白质和许多重要的代谢性生理分子的合成,可由葡萄糖转化而来。其合成途径主要包括丝氨酸合成途径、胆碱合成途径及苏氨酸合成途径,并在体内代谢为乳酸。肝脏作为氨基酸代谢的中心,由于 NAFLD 造成肝脏损伤进而干扰了氨基酸的代谢,表现为尿液中甘氨酸和异亮氨酸、亮氨酸等氨基酸含量的降低。而肌酐主要以磷酸肌酸的形式存在于肌肉中,肌酐是肌酸-磷酸自然代谢的产物,NAFLD 肝郁脾虚证引起能量代谢减弱,三磷酸腺苷(ATP)水平低下导致尿肌酐水平异常。

4.2 胰岛素抵抗(IR) IR 是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和效率下降,是 NAFLD, II 型糖尿病等代谢性疾病发展过程中重要的病理学基础^[19],贯穿于引起 NAFLD 发生与发展的“二次打击”始终。乙酸可通过抑制肝甘油三酯累积和肝糖异生对 IR 有不同程度的预防作用,甘氨酸则可有效减轻肝脏脂变程度和炎症反应,减轻 IR。本实验中模型大鼠尿液中乙酸和甘氨酸减少、糖代谢紊乱、葡萄糖利用率降低及三羧酸循环封闭等表现提示病证结合模型可能与 IR 有关。与模型组相比,逍遥丸组大鼠尿液中各代谢物水平均有一定程度的回调,使其趋近于空白组大鼠尿液中的代谢物水平,推测逍遥丸可能通过回调 6 条代谢通路中 12 种内源性代谢物水平来调节模型大鼠体内的能量代谢紊乱,减轻 IR,从而改善 NAFLD 肝郁脾虚证病证结合模型大鼠的肝损伤。

[参考文献]

[1] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 非酒精性脂肪性肝病的中西医结合诊疗共识意见[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 155-158.
[2] 贾飞, 苗宇船, 苏赵威, 等. 逍遥丸对肝郁脾虚证非酒精性脂肪肝病大鼠 TLR4 表达的影响[J]. 山西中医, 2016, 32(3): 48-50.
[3] 孙晓倩, 孙蓉. 大鼠脂肪肝病肝郁脾虚证的模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 92-98.

- [4] 中华中医药学会脾胃病分会. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中医杂志, 2017, 58(19):1706-1710.
- [5] 黄柳向, 李珍, 李玲, 等. 痛泻安脾汤联合马来酸曲美布汀片对腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚证患者血清5-HT和CGRP的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5):188-191.
- [6] 陈富丽, 窦志芳. 痛泻要方治疗肠易激综合征肝郁脾虚证5-羟色胺作用机制研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(12):1686-1690.
- [7] 苗宇船, 刘杨, 李若瑜, 等. 大鼠非酒精性脂肪肝炎肝郁脾虚证模型的建立[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(4):445-448, 461.
- [8] 苏赵威, 苗宇船, 何丽清, 等. 当归芍药散加味治疗非酒精性脂肪肝代谢组学研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(2):177-180.
- [9] 唐丹丹, 袁圣钧, 张男, 等. 基于尿样代谢组学的中药药效及毒性研究进展[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(1):1-8.
- [10] MIAO H, CHEN H, PEI S W, et al. Plasma lipidomics reveal profound perturbation of glycerophospholipids, fatty acids, and sphingolipids in diet-induced hyperlipidemia [J]. Chem Biol Interact, 2015, 228:79-87.
- [11] QI Y, LI S, LIU S, et al. Urinary metabonomics study of Wutou-tang and its co-decoction with *Pinelliae Rhizoma* in adjuvant-induced arthritis rats [J]. Chin Chem Lett, 2015, 26(3):387-392.
- [12] 王静, 陈悦, 袁子民, 等. 基于尿液代谢组学分析肉豆蔻麸煨炮制前后对大鼠长期毒性的作用差异[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4):8-13.
- [13] 郭慧, 崔扬, 王秋红, 等. 基于代谢组学技术的中药复方研究近况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1):213-219.
- [14] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:1063-1064.
- [15] 赵思俊, 赵晓喆, 向欢, 等. 基于代谢通路调控的沙棘籽油抗抑郁作用机制研究[J]. 中草药, 2017, 48(13):2682-2690.
- [16] Sweet P H, Khoo T, Nguyen S. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. Prim Care, 2017, 44(4):599-607.
- [17] Lindenmeyer C C, McCullough A J. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease-an evolving view[J]. Clin Liver Dis, 2018, 22(1):11-21.
- [18] WEI D D, WANG J S, WANG P R, et al. Toxic effects of chronic low-dose exposure of thioacetamide on rats based on NMR metabolic profiling[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 98:334-338.
- [19] Shalitin S, Battelino T, Moreno L A, et al. Obesity, metabolic syndrome and nutrition nonalcoholic fatty liver disease: lipids and insulin resistance [J]. World Rev Nutr Diet, 2016, 114(2):21-49.

[责任编辑 刘德文]