

· 药物代谢 ·

玄参对脾虚水湿不化大鼠模型的影响及其肝脏代谢组学分析

赵洪伟, 刘树民*, 张宁, 庞牧, 王宇

(黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江省高等院校中药药性理论创新团队,
药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**探索玄参对脾虚水湿不化大鼠模型的影响,并利用代谢组学方法对生物标志物和代谢通路进行分析。**方法:**高脂低蛋白饲料喂养加尾部负重游泳的方法建立脾虚水湿不化大鼠模型,玄参水煎液高、低剂量给药2周后检测各给药组肝脏指数、血清蛋白、血脂、胃肠功能和水负荷的变化情况,给药剂量分别为 $1.35, 5.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。利用UPLC-Q-TOF-MS检测肝组织中内源性小分子代谢物,电喷雾正离子模式(ESI^+)和负离子模式(ESI^-)对样品进行检测, m/z 100 ~ 1 500;利用主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)比较空白组、模型组,玄参高、低剂量组内源性小分子代谢物的变化情况;对差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路分析。**结果:**与模型组比较,玄参高剂量组的胃排空率和D-木糖排泄率显著升高;玄参低剂量组能升高血清白蛋白、总蛋白含量;玄参高剂量组能降低总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇含量和水负荷指数。代谢组学方法共鉴定出21个生物标志物,找到7条主要代谢通路,主要涉及胰岛素分泌、甘油磷脂代谢、嘌呤代谢、胆汁酸分泌、磷脂酶D信号通路、糖基磷脂酰肌醇锚的合成、内源性大麻素的生物合成等。**结论:**玄参对脾虚水湿不化模型大鼠的影响与改善消化功能、抑制糖代谢、改善血脂代谢等有关。

[关键词] 玄参;脾虚水湿不化;代谢组学;生物标志物;代谢通路;黄嘌呤;磷脂酰乙醇胺

[中图分类号] R969.1;R945;R284;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0082-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200082

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20170731.1054.080.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:54

Effect of Scrophulariae Radix on Rat Model with Dampness Stagnancy due to Spleen Deficiency and Analysis of Its Liver Metabonomics

ZHAO Hong-wei, LIU Shu-min*, ZHANG Ning, PANG Mu, WANG Yu

(Center for Drug Safety Evaluation, Traditional Chinese Medicine (TCM) Medicinal Theory Innovation Team of Higher Educational Institutions of Heilongjiang Province, Academy of TCM, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Scrophulariae Radix on rat model with dampness stagnancy due to spleen deficiency, and to analyze biomarkers and metabolic pathways based on liver metabonomics. **Method:** The high fat and low protein diet plus swimming for 8 weeks under weight bearing condition was adopted to establish rat model with dampness stagnancy due to spleen deficiency. Liver index, serum albumin, blood fat, gastrointestinal function and water load were measured at 2 weeks after administration of high ($5.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low ($1.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) dose of Scrophulariae Radix decoction. UPLC-Q-TOF-MS was

[收稿日期] 20170413(009)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531804)

[第一作者] 赵洪伟,在读硕士,从事中药性味理论研究,Tel:15704601440,E-mail:398626496@qq.com

[通讯作者] *刘树民,教授,博士生导师,博士,从事中药临床药效物质基础及中药药性理论研究,Tel:0451-82193278,E-mail:lsm@hljuem.net

employed to analyze metabolites in liver tissue under electrospray ionization positive and negative ion mode with m/z 100-1 500. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were adopted to compare the differential metabolites among the normal group, the model group, the high and low dose group of *Scrophulariae Radix* decoction; these different metabolites among four groups were analyzed by KEGG metabolic pathway method. **Result:** Compared with the model group, gastric emptying rate and *D*-xylose excretory rate in the high dose group were increased significantly; contents of serum albumin and total protein in the low dose group were increased; contents of low density lipoprotein-cholesterol, total cholesterol and water load index in the high dose group were decreased. A total of 21 biomarkers were identified and 7 major metabolic pathways were found, which mainly related to the insulin secretion, purine metabolism, bile acid secretion and so on. **Conclusion:** Treatment of *Scrophulariae Radix* on rat model with dampness stagnancy due to spleen deficiency is connected with improving the digestive function, inhibition of glucose metabolism, improving blood lipid metabolism and so on.

[**Key words**] *Scrophulariae Radix*; dampness stagnancy due to spleen deficiency; metabonomics; biomarkers; metabolic pathway; xanthine; phosphatidyl ethanolamine

中医所论述的“脾”是以消化系统为主的多系统、多器官的功能综合单位。“脾主运化”是脾的主要生理功能。脾气虚则气化不行,湿邪积滞,气不化湿,即水湿不化,临床上常表现为食少、腹胀、大便溏泄、肢体倦怠、舌淡脉弱^[1],甚至小便不利、水肿等症状。因此利水除湿、缓解湿邪困脾对于治疗脾虚水湿不化具有重要意义。

玄参为玄参科多年生草本植物的干燥根,具有清热解毒、滋阴凉血的功效,在临床上疗效确切,治疗疾病广泛。玄参在古典医籍中明确记载具有利湿功效,而现代书籍无此功效的记载,本实验基于国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目研究基础上,紧扣 2013 年国家重点基础研究发展计划重要支持方向——基于传统功用的中药药性理论关键科学问题,选取玄参为研究对象,考察玄参对脾虚水湿不化大鼠一般状况、水负荷指数、胃肠功能、血清蛋白和血脂的影响。该项目组前期已进行了关于补益脾气中药黄芪对脾虚水湿不化大鼠的代谢组学研究^[2],然而并未把代谢通路的调节与生理指标的改善进行关联和系统分析。本实验在考察脾虚水湿不化大鼠主要影响因子变化的基础上,利用代谢组学方法对其进行深入研究,试图寻找玄参改善脾虚水湿不化大鼠症状的生物标志物和代谢通路,同时将代谢通路进行药效归属研究,为开发玄参新的治疗作用、解决临床水肿疾病的治疗等方面提供实验依据。

1 材料

ACQUITY™ UPLC 型超高液相色谱仪和 Q-TOF 型飞行时间串质谱仪(美国 Waters 公司),KDC-

160HR 型台式高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),AU5400 型全自动生化分析仪(日本 Olympus),AL204 型电子天平[瑞士梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],RT-2100C 型多功能全自动酶标仪(深圳雷杜公司)。

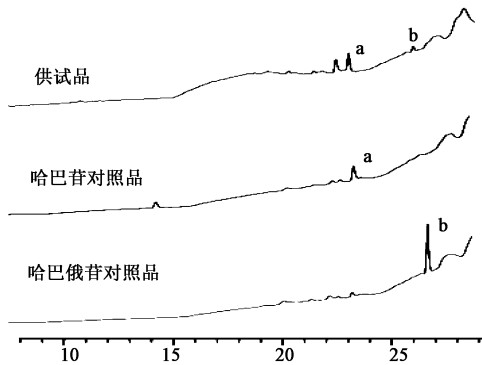
高脂低蛋白饲料(自制,在 AIN-76A 纯化饲料的基础上减少酪蛋白含量,增加猪油和胆固醇配制而成,成分为 0.2% 氯化胆碱,0.3% 蛋氨酸,15% 淀粉,47.5% 蔗糖,5% 纤维素,7% 酪蛋白,5% 玉米油,15% 猪油,0.5% 胆固醇,3.5% 多矿,1% 多维),玄参饮片(购自黑龙江省药材公司,批号 2012062301,经黑龙江中医药大学中药资源与开发教研室王振月教授鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* 的干燥根),大鼠胃泌素酶联免疫检测试剂盒(北京方程生物公司,批号 20130701),*D*-木糖测试盒(南京建成生物研究所,批号 20130702),蓝色葡聚糖 2000(DB-2000,法玛西亚公司),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级健康 SD 大鼠,雌雄各半,体重 140~160 g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(黑)2015-004。本动物实验经黑龙江中医药大学实验动物管理和使用委员会批准,批准编号 DWLL20151108001。

2 方法

2.1 药物的制备 玄参干燥根经适量粉碎,过 50 目筛,称取 600 g,分别加 10,8 倍量水回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并药液,于低温干燥机中冻干,得质地如羽毛状轻软、棕黄色的玄参冻干粉末(出膏率 49.76%)^[3],根据 2015 年版《中国药典》规定的

含量测定方法对玄参中哈巴苷、哈巴俄苷进行测定,结果哈巴苷、哈巴俄苷的质量分数分别为 0.486%, 0.075%, 总量 > 0.45%, 符合 2015 年版《中国药典》的标准,见图 1。



a. 哈巴苷; b. 哈巴俄苷

图 1 玄参水煎液的 UPLC (检测波长 190 ~ 600 nm)

Fig. 1 UPLC chromatograms of Scrophulariae Radix decoction (detection wavelength of 190-600 nm)

2.2 模型制备及给药 《黄帝内经》云“人饮食劳倦即伤脾”,故采用劳倦过度合并饮食失节法制备脾虚水湿不化大鼠模型^[4]。大鼠适应环境 7 d 后,随机分为模型组和空白组,模型组大鼠每日饲以高脂低蛋白饲料,下午以 10% 体重尾部负重,放入温度 25 °C,水深 50 cm 的圆筒中游泳,游泳到力竭为止,大鼠鼻尖没入水中 10 s 为力竭标志^[5]。连续诱导 8 周。空白组大鼠饲以 AIN-76A 纯化饲料。各组大鼠均自由进食、饮水。观察并记录大鼠一般状况。造模 6 周后,将造模大鼠随机分成模型组、玄参高剂量组、玄参低剂量组,玄参水煎液给药剂量按人大鼠等效剂量 1 倍和 4 倍折算,玄参高、低剂量组的给药剂量分别为 1.35, 5.40 g·kg⁻¹。灌胃给药,给药体积均为 10 mL·kg⁻¹,每天 1 次,连续 2 周。空白组和模型组给予同体积生理盐水。

2.3 血清蛋白、血脂的检测 腹主动脉取血室温静置 20 min,于 4 °C,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,于 -80 °C 冰箱储存。严格按照试剂盒说明操作,采用全自动生化分析仪检测总蛋白 (total cholesterol, TP),白蛋白 (albumin, ALB),总胆固醇 (cholesterol, CHOL),高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 的含量。

2.4 胃排空率的测定 末次给药后,大鼠禁食 12 h,每只大鼠灌胃 2% DB-2000 0.4 mL,30 min 后处死,将胃取出,沿着胃大弯剪开,将胃中全部残留

物溶于 4.0 mL 水中,于 12 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液于 620 nm 处测定吸光度 A,按 $1 - A_1/A_2$ 计算胃排空率,式中 A₁ 为胃内 DB-2000 的吸光度, A₂ 为基准 DB-2000 的吸光度。

2.5 胃泌素含量、尿 D-木糖排泄率的测定 采用酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测大鼠血清胃泌素的含量。实验前 12 h 禁食,自由饮水,试验时用灌胃给予 3% D-木糖 4 mL (试验期间禁食,自由饮水),收集 5 h 尿液,按 D-木糖试剂盒说明书进行测试。

2.6 水负荷指数的测定 实验控制在 25 °C 条件下进行,实验前禁食 12 h,称量体重,作为基本值,即水负荷前体重,每只大鼠用 10% 生理盐水腹腔注射,水负荷后分别称量 0, 1, 2, 4, 6 h 的体重。实验期间禁水禁食。按体重下降比 = (水负荷零时体重 - 水负荷前体重) / 水负荷前体重 × 100%, 分别以水负荷差值描记曲线,曲线下面积积分即为水负荷指数。由于试验观察期内禁水,故水负荷指数越大表明水液在体内留存时间越长,水滞留越严重。

2.7 组织样品处理和数据的采集

2.7.1 肝组织样品处理 取冷藏的肝脏 0.5 g,按质量比加入 9 倍量甲醇于研磨器中进行研磨,收集研磨好的匀浆于 5 mL 离心管中,离心处理 (10 min, 15 000 r·min⁻¹, 4 °C),取上清液备用。

2.7.2 检测条件 色谱条件为 ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,流动相含 0.05% 甲酸的乙腈溶液 (A)-0.05% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 2% ~ 100% A; 15 ~ 17 min, 100% A; 17 ~ 18 min, 100% ~ 2% A; 18 ~ 20 min, 2% A),进样量 2.0 μL。质谱条件为电喷雾离子源 (ESI),正离子采集模式,毛细管电压 1.3 kV,样本锥孔电压 60 V,分离锥孔电压 3.0 V,离子源温度 110 °C,脱溶剂温度 350 °C,脱溶剂气流量 750 L·h⁻¹,锥孔气流量 20 L·h⁻¹,扫描方式为全扫描,质量扫描范围 m/z 100 ~ 1 500。

2.7.3 数据处理 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对处理的样品进行检测,得总离子流色谱图,应用 Micromass MarkerLynx XS 软件对色谱图进行峰提取、峰对齐及峰匹配。将获得的数据筛除外源性的成分干扰后导入 EZinfo 2.0 软件进行统计分析,采用主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 对获得的多维复杂数据进行降维处理,使用人类代谢组数据库 (HMDB) 和京都基因与基因组

百科全书 (KEGG) 等进行生物标记物的鉴定和代谢通路分析。

3 结果

3.1 小鼠造模后一般表现 在造模 2 周后大鼠开始出现明显的体重下降、毛色枯槁、倦怠乏力、萎靡不振,且具有游泳时间明显缩短的脾虚证表现,符合脾虚水湿不化大鼠的一般症状。

3.2 玄参对脾虚水湿不化大鼠肝指数、血清蛋白和血脂的影响

3.2.1 玄参对脾虚水湿不化大鼠 ALB 和 TP 的影响 肝脏是机体蛋白合成和代谢的主要场所,TP 和 ALB 是检测蛋白含量的可靠指标,反映着肝脏蛋白的合成功能。由表 1 可知,与空白组比较,模型组的 ALB 和 TP 含量显著降低;说明体内水液停滞,存在水湿不化状况。与模型组比较,玄参高、低剂量组的 ALB 和 TP 含量均升高;玄参低剂量组的 ALB 和 TP 水平显著升高,说明玄参可改善肝脏蛋白的合成功能,改善体内水液停滞状况。

表 1 玄参对大鼠血清白蛋白、总蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Scrophulariae Radix on serum albumin and total protein in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	白蛋白	总蛋白
空白	-	31.80 \pm 3.02	59.36 \pm 5.89
模型	-	24.71 \pm 3.35 ¹⁾	44.32 \pm 4.91 ¹⁾
玄参低剂量	1.35	29.43 \pm 3.32 ²⁾	51.24 \pm 6.45 ²⁾
玄参高剂量	5.40	26.06 \pm 3.67	47.10 \pm 6.93

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

3.2.2 玄参对脾虚水湿不化大鼠血脂的影响 见表 2。结果与空白组比较,模型组 CHOL 和 LDL-C

显著性升高 ($P < 0.01$),HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比,玄参低、高剂量组可显著降低 CHOL 水平;玄参高剂量组可显著降低 LDL-C 水平 ($P < 0.05$);玄参高剂量组可显著升高 HDL-C 的水平 ($P < 0.05$)。说明玄参具有较好的降血脂作用,可改善血脂异常的状况,调节肝脏的功能。

表 2 各组大鼠 HDL-C、LDL-C 和 CHOL 的变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Content changes of HDL-C, LDL-C and CHOL in rats from each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	HDL-C/ $ng \cdot L^{-1}$	LDL-C/ $mmol \cdot L^{-1}$	CHOL/ $mmol \cdot L^{-1}$
空白	-	32.93 \pm 7.20	9.07 \pm 1.38	1.42 \pm 0.26
模型	-	22.63 \pm 8.30 ¹⁾	13.75 \pm 3.38 ¹⁾	2.60 \pm 0.39 ¹⁾
玄参低剂量	1.35	27.21 \pm 4.91	11.68 \pm 1.97	2.20 \pm 0.36 ²⁾
玄参高剂量	5.40	31.19 \pm 8.25 ²⁾	10.71 \pm 2.49 ²⁾	1.91 \pm 0.32 ³⁾

3.3 玄参对脾虚水湿不化大鼠消化功能及水负荷指数的影响 中医理论认为,脾胃共处中焦,为表里关系。脾主运化水谷,胃主受纳腐熟,脾主升,胃主降,共同完成饮食物的消化、吸收与输布,因此脾虚水湿不化常常与胃肠功能障碍密切相关。由表 3 可知,与空白组比较,模型组胃排空率、血清胃泌素质量浓度和 D-木糖排泄率均显著降低。与模型组相比较,玄参高剂量组可显著提高胃排空率和 D-木糖排泄率,提示高剂量玄参对脾虚水湿不化大鼠的胃肠消化吸收功能有一定的改善作用。水负荷指数可整体反映大鼠所负荷水液在体内的运化状况,与空白组相比较,模型组的水负荷指数显著升高;与模型组比较,玄参高剂量组的水负荷指数显著降低,提示玄参高剂量能促进水负荷大鼠脾运化水液的功能。

表 3 各组大鼠胃排空率,胃泌素含量,D-木糖排泄率和水负荷指数的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Changes of gastric emptying rate, content of gastrin, D-xylose excretory rate and water load index in rats from each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	胃排空率/%	胃泌素/ $ng \cdot L^{-1}$	D-木糖排泄率/%	水负荷指数/%
空白	-	71.49 \pm 7.51	50.12 \pm 4.83	29.06 \pm 6.12	70.49 \pm 12.00
模型	-	55.86 \pm 10.66 ¹⁾	39.10 \pm 6.65 ¹⁾	18.81 \pm 4.65 ¹⁾	112.75 \pm 20.87 ¹⁾
玄参低剂量	1.35	63.32 \pm 9.47	43.63 \pm 3.35	20.26 \pm 3.95	97.70 \pm 8.50
玄参高剂量	5.40	68.99 \pm 11.51 ²⁾	41.14 \pm 5.16	23.62 \pm 4.92 ²⁾	95.19 \pm 11.25 ²⁾

3.4 玄参对脾虚水湿不化大鼠的代谢组学研究

3.4.1 肝组织代谢总离子流色谱 采用 UPLC-Q-TOF-MS 进行肝组织样品的分离和数据采集,采用 Micromass MakerLynx XS 软件进行峰识别与匹配,得空白组、脾虚模型组、玄参高、低剂量组的总离子流

色谱 (TIC),见图 2。提示内源性代谢产物分离效果较好。

3.4.2 数据采集和处理 采用非监督型的 PCA 和 PLS-DA 进行多维数据的统计分析和降维处理,采用有监督的 PLS-DA 将待测样品进行强制分组分析,

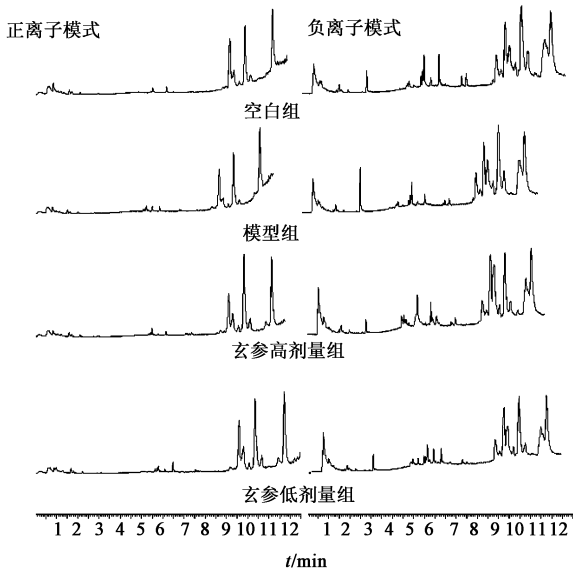


图 2 不同组别大鼠肝组织代谢的总离子流色谱
Fig. 2 Total ion chromatograms of liver tissue metabolism of rats from different group

弱化组内差异和个别异常值对分析结果的影响,见图 3。结果发现玄参高、低剂量组、模型组与空白组 4 组间存在明显差异,且模型组远离空白组,说明造模方法成功;玄参高、低剂量组处于空白组与模型组之间,且向空白组靠近,说明给药组有一定的回调趋势。

3.4.3 潜在生物标志物的鉴定 通过 Micromass MarkerLynx XS 软件和 HMDB 共鉴定出 21 个生物标志物,经玄参干预作用后与模型组比较存在显著性差异,提示玄参改善肝功能可能与这些标志物有关,这些标志物分别为甘氨酸熊去氧胆酸、甘胆酸、溶血磷脂酰乙醇胺类、溶血磷脂酰胆碱类、黄嘌呤、磷脂酰肌醇类、牛磺脱氧胆酸类、磷脂酰乙醇胺类、葡萄糖-6-磷酸和溶血磷脂酸等,其中甘氨酸熊去氧胆酸、甘胆酸、磷脂酰乙醇胺、黄嘌呤、葡萄糖-6-磷酸和溶血磷脂酸 6 个生物标志物有回调现象,且在 KEGG 上查找代谢通路,所关联的通路有嘌呤代谢、胆汁酸的分泌、甘油磷脂代谢、磷脂酶 D 信号通路、内源性大麻酚类信号肽的合成、糖基磷脂酰肌醇锚的生物合成和胰岛素分泌,见表 4 和图 4。

4 讨论

本实验通过对相关生理指标的考察后发现,玄参对脾虚水湿不化大鼠有一定的治疗作用。“脾”的生理功能涉及了现代医学的胃肠、肝胆、胰腺、脾脏等器官的生理功能,目前对脾虚水湿不化大鼠的代谢组学研究报道多是关于血糖和血脂的变化情况,不能完整阐述该类疾病的病变特征。本文

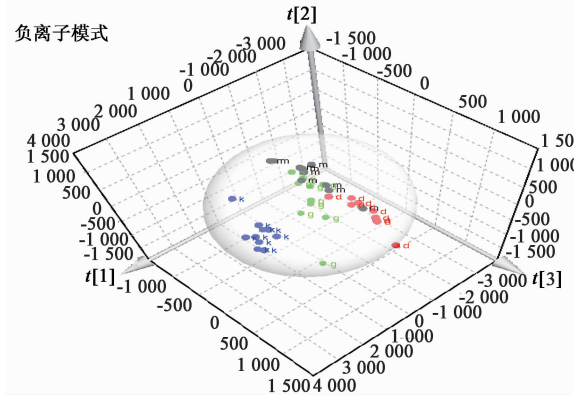
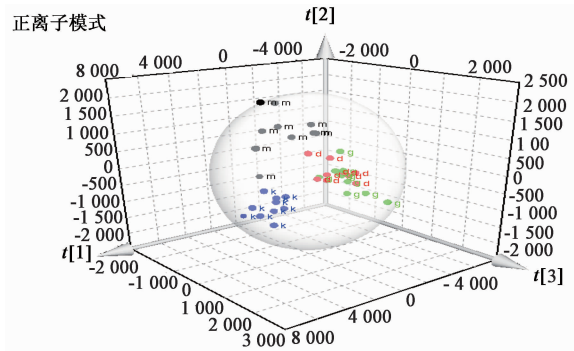


图 3 空白组(k),模型组(m),玄参高剂量组(g)和低剂量组(d) PLS-DA 得分
Fig. 3 PLS-DA score of blank group (k), model group (m), high (g) and low (d) dose group of Scrophulariae Radix

研究发现玄参不仅能调节模型大鼠的糖代谢和脂代谢,还与大鼠的尿酸代谢、抑制炎症反应、调节胆汁酸的合成和分泌、肝细胞的保护作用等密切相关。

4.1 对血脂的影响及代谢通路分析 结果显示造模大鼠的血脂含量显著升高,由于造模期间大鼠脂肪摄入过多,血液中饱和脂肪酸的含量也会增加,使胆固醇和甘油三酯在血管内沉积,给予玄参后,大鼠体内的 LDL-C 和 CHOL 含量降低,同时 HDL-C 含量增加,高密度脂蛋白可以将血液中胆固醇转移至肝脏,部分转化为胆汁排出体外,同时可以清除沉积在血管壁内的胆固醇,说明玄参通过促进血液中胆固醇的清除而表现出显著的降血脂作用。磷脂酰乙醇胺[18:2(9Z,12Z)/20:1(11Z)]是磷脂质的 1 种,其参与糖基磷脂酰肌醇锚(glycosyl phosphatidyl inositol anchor, GPI 锚)的生物合成,而 GPI 锚定蛋白与动脉粥样硬化的病变过程相关。GPI 锚定蛋白能调节白细胞的黏附和迁移,引起动脉硬化的早期病变^[6]。长期的高脂饮食使磷脂酰乙醇胺过度累积,GPI 锚定蛋白合成增加,机体发生动脉硬化的几率随之增高;另外,肝脏中磷脂酰乙醇胺的含量还与

表 4 玄参改善肝功能的 21 个潜在生物标志物的基本信息

Table 4 Basic informations of 21 potential biomarkers for improving liver function by Scrophulariae Radix

序号	HMDB ID	<i>m/z</i>	化合物名称	变量重要性 投影值 (VIP)	模式	趋势
1	HMDB00708	450.321 7	甘氨酸脱氧胆酸 glycooursodeoxycholic acid	2.168	ESI ⁺	↑
2	HMDB00138	466.316 4	甘胆酸 glycocholic acid	2.279	ESI ⁺	↑
3	HMDB11503	453.289 2	溶血磷脂酰乙醇胺 lysophosphatidylethanolamine(16:0/0:0)	6.196	ESI ⁺	↑
4	HMDB10381	482.323 6	溶血磷脂酰胆碱 lysophosphatidylcholine(15:0)	6.812	ESI ⁺	↑
5	HMDB10386	520.340 3	溶血磷脂酰胆碱 lysophosphatidylcholine[18:2(9Z,12Z)]	4.033	ESI ⁺	↑
6	HMDB00292	153.041 0	黄嘌呤 xanthine	1.114	ESI ⁺	↑
7	HMDB11475	480.309 4	溶血磷脂酰乙醇胺 lysophosphatidylethanolamine[0:0/18:1(11Z)]	3.288	ESI ⁺	↑
8	HMDB11526	526.293 2	溶血磷脂酰乙醇胺 lysophosphatidylethanolamine[22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0]	6.074	ESI ⁺	↑
9	HMDB09853	904.598 6	磷脂酰肌醇 phosphatidylinositol[18:2(9Z,12Z)/20:2(11Z,14Z)]	2.170	ESI ⁺	↓
10	HMDB10404	568.340 1	溶血磷脂酰胆碱 lysophosphatidylcholine[22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	3.415	ESI ⁺	↑
11	HMDB00874	500.304 0	牛磺脱氧胆酸 taurooursodeoxycholic acid	2.058	ESI ⁺	↑
12	HMDB09098	792.556 3	磷脂酰乙醇胺 phosphatidylethanolamine[18:2(9Z,12Z)/20:1(11Z)]	3.628	ESI ⁺	↓
13	HMDB01401	243.018 2	葡萄糖-6-磷酸 glucose-6-phosphate	1.174	ESI ⁺	↓
14	HMDB09057	746.576 7	磷脂酰乙醇胺 phosphatidylethanolamine[18:1(9Z)/18:0]	1.494	ESI ⁺	↓
15	HMDB10383	538.315 3	溶血磷脂酰胆碱 lyso-phosphatidylcholine[16:1(9Z)]	3.464	ESI ⁻	↑
16	HMDB11487	500.277 9	溶血磷脂酰乙醇胺 lysophosphatidylethanolamine[0:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)]	6.168	ESI ⁻	↑
17	HMDB10385	1 087.697 2	溶血磷脂酰胆碱 lysophosphatidylcholine[18:1(11Z)]	6.840	ESI ⁻	↑
18	HMDB10379	512.299 1	溶血磷脂酰胆碱 lysophosphatidylcholine(14:0)	1.932	ESI ⁻	↑
19	HMDB07854	483.274 0	溶血磷脂酸 lysophosphatidic acid(18:0/0:0)	2.310	ESI ⁻	↓
20	HMDB09786	861.545 4	磷脂酰肌醇 phosphatidylinositol[16:0/20:2(11Z,14Z)]	2.403	ESI ⁻	↓
21	HMDB09809	861.545 6	磷脂酰肌醇 phosphatidylinositol[18:0/18:2(9Z,12Z)]	2.813	ESI ⁻	↓

血浆脂蛋白分泌密切相关,磷脂酰乙醇胺 *N*-甲基转移酶可以催化磷脂酰乙醇胺甲基化生成磷脂酰胆碱(PC)^[7],PC的生物合成在肝脏向血浆分泌极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的过程中起重要作用^[8],由此可知模型大鼠肝脏中磷脂酰乙醇胺增多,促进肝脏向血浆分泌 LDL-C,增加胆固醇在血管内的沉积。溶血磷脂酸(18:0/0:0)通过磷脂酶 D 信号通路合成,对血小板有较强的聚集作用,在人动脉粥样硬化斑块中位于脂质中心^[9],模型组大鼠溶血磷脂酸(18:0/0:0)含量升高预示有血栓的形成,玄参通过抑制磷脂酰乙醇胺和溶血磷脂酸含量,抑制血液中低密度脂蛋白的含量,又可直接抑制血小板聚集,而发挥降血脂作用。

4.2 对肝功能的影响及代谢通路分析 生理指标

检测发现玄参可升高模型大鼠 TP 和 ALB 含量,提示对肝功能有明显的改善作用。磷脂酰乙醇胺[18:2(9Z,12Z)/20:1(11Z)]是一种磷脂酰乙醇胺,其参与了 *N*-酰基乙醇胺 (NAE) 类内源性大麻素 (eCBs) 的合成途径^[10],eCBs 是一种存在于人体内的具有大麻作用的化合物,通过介导特异性大麻素受体 CB1 和 CB2 发挥作用。eCBs 系统通过复杂的信号通路激活肝星状细胞,促进了肝脏细胞外间质的沉积,最终导致肝纤维化和肝硬化的发生^[11]。模型组由于高脂饮食使过多的磷脂酰乙醇胺沉积在肝脏中,外周组织中 eCBS 合成增加,高浓度的 eCBS 通过肝星状细胞的脂筏诱导肝细胞凋亡。玄参通过内源性大麻素系统(endocannabinoid system, ECS)表现出对肝细胞的保护作用,除此之外,ECS 代谢途径

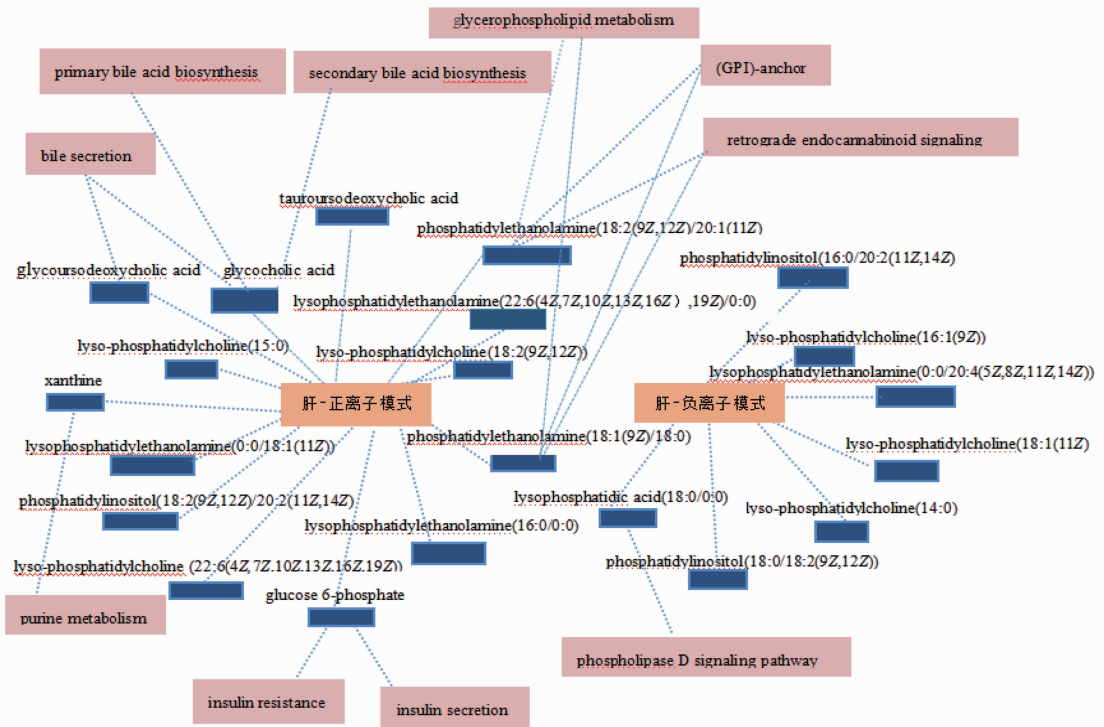


图 4 病理状态下玄参治疗组大鼠肝脏中潜在的生物标志物及代谢通路

Fig. 4 Potential biomarkers and metabolic pathways in liver of treatment group rats under pathological condition

还与免疫功能调节、神经功能紊乱等多种病理效应有关,但目前对此代谢途径的研究还不够深入,不能完整揭示 ECS 的生理、病理作用,因此玄参通过此通路的其他效应还应进一步挖掘。

4.3 对胃肠功能的影响及代谢通路分析 甘胆酸是由胆酸和甘氨酸结合而成的结合型胆酸,是胆汁酸的主要成分之一,健康状态的肝细胞可以摄取来自门静脉 99% 的甘胆酸重新泌入胆汁,而当肝细胞受损时,肝细胞不能有效摄取来自血液中的甘胆酸,使血中甘胆酸含量升高。脾虚水湿不化大鼠的高脂低蛋白饮食,一方面使肝脏中胆固醇含量增加,进一步使胆固醇代谢成胆酸的量增加^[12];另一方面由于肝细胞受损使胆汁酸的重吸收减少,因此使留在肠道中的胆汁酸总量升高,胆汁酸在结肠中有明显的促分泌和促运动功能^[13],致使模型大鼠出现脾虚泄泻、便溏的证状。玄参使甘胆酸的重吸收率升高,缓解腹泻症状,提高了小肠的吸收功能。

4.4 其他代谢通路及功能分析 葡萄糖-6-磷酸(G6P)在肝脏中主要被葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-Pase)水解释放葡萄糖入血,为人体补充血糖。本实验的模型组大鼠高脂饮食使肝脏脂肪沉积,脂肪酸氧化率提高,引起 G-6-Pase 活性提高,肝脏葡萄糖释放增加,从而易引起胰岛素抵抗^[14],玄参组肝脏中 G6P 含量降低,被 G-6-Pase 水

解释放的血糖亦降低,对提高胰岛素的敏感性有重要意义。黄嘌呤是磷酸腺苷分解成尿酸过程的中间产物,由黄嘌呤氧化酶催化生成尿酸,并伴有过氧化物自由基的生成。玄参组黄嘌呤含量增加,可能与抑制黄嘌呤氧化酶的活性有关,黄嘌呤氧化酶生成的过程中伴随超氧自由基的产生,超氧自由基是导致慢性炎症反应,最终导致器官功能性受损的关键因素之一^[15-16],因此玄参的抗炎作用可能与抑制超氧自由基的产生有关。

[参考文献]

[1] 国家技术监督局,中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准:中临床诊疗术语证候部分[M]. 北京:中国标准出版社,1997:23-24.
[2] 刘阿娜,崔宁,赵文晓,等. 黄芪皂苷干预脾虚水湿不化证大鼠的代谢组学研究[J]. 中草药,2016,47(24):4401-4407.
[3] 刘冠璋,董婉茹,于卉,等. 玄参水提物对 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤的保护作用研究[J]. 吉林中医药,2015,35(5):504-507.
[4] 吴天石,张会永,张哲,等. 脾虚证动物模型造模方法述评[J]. 中医杂志,2015,56(11):978-983.
[5] 崔宁,赵文晓,季旭明,等. 基于肝基因表达谱分析的黄芪及其拆分组对脾虚水湿不化大鼠脂质代谢影响的机制研究[J]. 世界中医药,2015,10(12):1819-1823,1836.

- [6] Sendo F, Araki Y. Regulation of leukocyte adherence and migration by glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins [J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 66(3) : 369-374.
- [7] Noga A A, ZHAO Y, Vance D E. An unexpected requirement for phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase in the secretion of very low density lipoproteins [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (44) : 42358-42365.
- [8] Kulinski A, Vance D E, Vance J E. A choline-deficient diet in mice inhibits neither the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine synthesis in hepatocytes nor apolipoprotein B secretion [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (23) : 23916-23924.
- [9] 潘颖, 苏作军. 溶血磷脂酸研究进展 [J]. *现代检验医学杂志*, 2006, 21(4) : 16-18.
- [10] 唐双奇, 陆阳. 内源性大麻素——生物合成、信号传导及生物降解 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(8) : 1037-1041.
- [11] YANG Q, LIU H Y, ZHANG Y W, et al. Anandamide induces cell death through lipid rafts in hepatic stellate cells [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25 (5) : 991-1001.
- [12] Tomkin G H, Owens D. Obesity diabetes and the role of bile acids in metabolism [J]. *J Transl Int Med*, 2016, 4 (2) : 73-80.
- [13] 李攀, 孙凤霞, 李晓玲, 等. 胆汁酸代谢异常与肠易激综合征相关性研究 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2017, 26(1) : 110-113.
- [14] Chatelain F, Pégrier J P, Minassian C, et al. Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney; *in vivo* and *in vitro* studies in cultured fetal hepatocytes [J]. *Diabetes*, 1998, 47(6) : 882-889.
- [15] 韩晓静, 范玛莉, 秦雪梅, 等. 基于代谢组学技术研究黄芩对小鼠代谢的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(15) : 85-91.
- [16] Kushiyama A, Nakatsu Y, Matsunaga Y, et al. Role of uric acid metabolism-related inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome components such as atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, doi:10.1155/2016/8603164.

[责任编辑 刘德文]