

利胆软坚方降脂减肥作用及其对胆汁酸代谢轮廓谱的影响

高敏, 李德刚, 沙妙清, 李晓芸, 杨柏灿*

(上海中医药大学 中药学院, 上海 201203)

[摘要] 目的:基于肥胖“从胆论治”的学术观点,研究利胆软坚方对高脂饮食诱导肥胖大鼠的降脂减肥作用及其对血清胆汁酸轮廓谱的影响,探讨其作用机制。方法:42只大鼠高脂饲料喂养9周建立肥胖大鼠模型,取24只造模成功大鼠随机分为模型组、利胆软坚方高、低剂量组(30, 15 g·kg⁻¹),每组8只,另取8只正常大鼠作为正常组,模型组和正常组给予生理盐水,给药组给予相应剂量药物,灌胃4周。测定大鼠体质量、肝脏质量、脂肪质量等肥胖指标;胆管插管术引流监测2 h内胆汁流量;全自动生化仪测定血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平;超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)法测定大鼠血清胆汁酸代谢轮廓谱中各胆汁酸的含量。结果:与正常组比较,模型组体质量、肝脏质量、脂肪质量均显著升高($P<0.01$),血清TC, TG, LDL-C水平明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),2 h内胆汁总分泌量及各测试点胆汁流量均降低,初级胆汁酸占比明显下降($P<0.05$),血清总胆汁酸含量显著降低($P<0.01$),血清胆汁酸轮廓谱中胆酸(CA),脱氧胆酸(DCA),鹅去氧胆酸(CDCA),猪去氧胆酸(HDCA),牛磺胆酸(TCA),牛磺去氧胆酸(TDCA),牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA),牛磺猪去氧胆酸(THDCA),甘氨去氧胆酸(GDCA)含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,利胆软坚方高、低剂量组体质量、肝脏质量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),利胆软坚方高剂量组血清TC, TG, LDL-C水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),低剂量组TG水平明显下降($P<0.05$),高剂量组在给药后1~1.5 h胆汁流量明显增加($P<0.05$),高、低剂量组初级胆汁酸占比明显升高($P<0.05$),利胆软坚方高剂量组TCA, DCA, 甘氨胆酸(GCA), GDCA水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),低剂量组仅TCA, TCDCA水平明显升高($P<0.05$)。结论:利胆软坚方具有降脂减肥作用,其机制可能与其增加胆汁分泌量,增加初级胆汁酸合成及调节胆汁酸轮廓谱有关。

[关键词] 肥胖; 利胆软坚方; 降脂减肥; 超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS/MS); 胆汁酸代谢轮廓谱

[中图分类号] R2-0;R289;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0085-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201139

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200313.1713.003.html>

[网络出版日期] 2020-3-14 10:17

Effect of Lidan Ruanjian Prescription on Lipid-lowering and Antiobesity and Metabolic Profile of Bile Acid

GAO Min, LI De-gang, SHA Miao-qing, LI Xiao-yun, YANG Bai-can*

(School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pharmacodynamics effects of antiobesity, lipid-lowering and the regulations of serum bile acid profiles of Lidan Ruanjian prescription (LDRJ) in obesity rats induced by high-fat diet. **Method:** The 42 rats were fed high-fat diet for 9 weeks to establish model of obese rats, 24 rats were randomly divided into model group, high and low-dose LDRJ group (30, 15 g·kg⁻¹). Another 8 normal rats were selected as the normal group. The model group and normal group were given normal saline, and drug group was given the corresponding dose of drug for 4 weeks. Body weight, liver weight, white adipose tissue (WAT) weight were determined after administration medicine for 4 weeks. The bile flow of the rats was measured by

[收稿日期] 20191209(001)

[基金项目] 上海市博士学科点建设基金项目(1605);上海中医药大学研究生创新能力项目(B201721)

[第一作者] 高敏,博士,从事中医药与代谢疾病相关研究, E-mail: min-gao@139.com

[通信作者] *杨柏灿,硕士,教授,博士生导师,从事中药药效及中药药性研究, E-mail: bcy2002@sina.com

bile duct intubation and fasting serum lipid levels of total cholesterol (TC), total triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected by automatic biochemical analyzer. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) assay was used to test serum bile acid profile of each group rats. **Result:** Compared with the control group, the average body weight, liver weight, WAT weight of the model group were significantly increased ($P < 0.01$), while the fasting serum TC, TG and LDL-C levels were elevated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The total bile secretion and bile flow at each test point within 2 h were decreased and the proportion of primary bile acids was decreased ($P < 0.05$). The serum total bile acid content decreased significantly ($P < 0.01$), levels of cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA), chenodeoxycholic acid (CDCA), hyodeoxycholic acid (HDCA), taurocholic acid (TCA), taurodeoxycholic acid (TDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), taurohyodeoxycholic acid (THDCA) and glycodeoxycholic acid (GDCA) were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compare with model group, body weight, liver weight in high and low-dose LDRJ groups reduced significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Fasting serum TC, TG and LDL-C levels were decreased in high-dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), so did as TG levels in low-dose group ($P < 0.05$). The bile flow rate increased significantly in high-dose group 1~1.5 h after administration ($P < 0.05$). All dose treatment groups increased the proportion of primary bile acids ($P < 0.05$) and changed the bile acid profile, especially elevated the bile acid levels of TCA, DCA, glycocholic acid (GCA), GDCA in high-dose LDRJ group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while TCA and TCDCA in low-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** LDRJ has significant lipid-lowering and antiobesity effects and the mechanism might involve the increase of bile secretion, the stimulation of primary bile acid synthesis and the regulation of bile acid profile.

[Key words] diet-induced obesity; Lidan Ruanjian prescription; lipid-lowering and antiobesity; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); metabolic profile of bile acid

肥胖是指人体内热量摄入大于消耗,造成体内脂肪组织积聚过多,超过人体正常生理需要,且有害于身体健康和正常功能的状态,是最常见的营养失衡性疾病^[1]。在过去的50年里,世界范围内的肥胖发病率持续上升,且呈多龄化、低龄化趋势^[2]。肥胖严重威胁着人类的健康,与高血脂、冠心病、糖尿病、不孕、肿瘤等多种慢性疾病关系密切,同时也是导致心理障碍、致残的重要因素^[3-5]。有效干预肥胖越来越受到重视,近年来减肥药物层出不穷,但都因伴随不同程度的副作用未能广泛应用^[6-7]。中医药治疗肥胖多从痰湿、脾虚、血瘀等病因病机进行治疗,有一定的疗效,但至今仍未有疗效显著的成药上市^[8-10]。

本课题组前期对胆与肥胖的关系进行理论探讨^[11-14],提出肥胖“从胆论治”的学术观点,认为可以通过利胆之法调节胆汁的藏泻,影响饮食物在体内的代谢,阻止痰瘀水湿形成而达到控制体重的作用,同时将肥胖归属于一种特殊类型的“积聚”,治疗上应用软坚散结中药,软化已堆积的脂肪达到减脂的目的。由此以利胆软坚法为治则,组成自拟方

利胆软坚方(虎杖、鳖甲、旋覆花、莪术、炒白术),已获得国家发明专利。方中重用虎杖清肝利胆,亦可活血祛湿;炙鳖甲、旋覆花皆味咸,咸可软坚散结,《太平圣惠方》载有鳖甲丸主积聚,腹中胀满,炙鳖甲可用于多种类型的癥瘕积聚、痞块等有形病症,而旋覆花则下气消痰行水,在治疗肥胖上,既可除湿,又能软坚;莪术破血行气,消食化积;炒白术,益气健脾,又能燥湿利水,《本草汇言》云:“乃扶植脾胃,散湿除痹,消食除痞之要药。脾虚不健,术能补之,胃虚不纳,术能助之。”故方中配炒白术既能祛除水湿又绝痰湿之源,同时又能通过补益脾气助鳖甲、旋覆花软坚消积,所谓“破血行气药中,加补脾胃药,气旺方能磨积”。诸药合用,利胆软坚、化痰除湿、活血消食共奏降脂减肥之效。

胆汁酸是肝脏胆固醇代谢的重要终产物。现代研究发现胆汁酸除了影响胆汁形成与分泌,促进肠道脂肪乳化吸收等生理功能外,还作为信号分子参与机体的糖脂代谢以及能量代谢等,胆汁酸受体调节剂已成为治疗代谢性疾病的潜在治疗手段^[15-16]。胆汁酸代谢轮廓谱是代谢组学研究中的一

部分,通过液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)分析技术建立不同种类胆汁酸定量检测分析方法,构建胆汁酸轮廓谱,用于分析胆汁酸在各类疾病中的作用及探索药物作用机制^[17-18]。如HUANG等^[19]研究发现普洱茶可以调节胆汁酸轮廓谱中牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA),牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)浓度,抑制相关信号通路,激活肝脏内胆胆汁酸合成酶活性,促进胆固醇合成胆汁酸的代谢过程,从而达到降低胆固醇水平的作用。

本研究以高脂饮食诱导肥胖大鼠模型为研究对象,探讨利胆软坚方对肥胖大鼠体质量、血脂等影响,评价此复方降脂减肥作用,通过对大鼠胆汁流量及血清胆汁酸轮廓谱的研究,探讨利胆软坚方的潜在作用机制,为肥胖“从胆论治”的学术观点提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠50只,体质量(160±20)g,购自必凯实验动物有限责任公司,合格证号SCXK(沪)2008-2016,饲养于上海中医药大学动物房,饲养室内温度(22±2)℃,相对湿度控制于40%~70%,昼夜明暗交替。本实验通过上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会审查(编号PZSHUTCM190322005)。高脂饲料:40%碳水化合物+40%脂肪+20%粗蛋白,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供;正常饲料,由上海中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 利胆软坚方由虎杖15g,菖术15g,旋覆花15g,炙鳖甲30g,炒白术30g组成,均购自上海雷允上中药饮片厂,经上海中医药大学中药学院赵志礼教授鉴定为正品。按传统水煎法分2次煎煮成汤剂,50℃旋转减压蒸发浓缩,高剂量组(30g·kg⁻¹),质量浓度为3g·mL⁻¹,低剂量组(15g·kg⁻¹),质量浓度为1.5g·mL⁻¹,灭菌后低温保存。总胆固醇(TC)测定试剂盒,甘油三酯(TG)测定试剂盒,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(上海华臣生物试剂有限公司,批号分别是01CHOL181107, 02TG180514, 01LDL180108, 01HDL180412);胆酸(CA),脱氧胆酸(DCA),鹅去氧胆酸(CDCA),熊去氧胆酸(UDCA),猪去氧胆酸(HDCA),石胆酸(LCA),甘氨胆酸(GCA),甘氨去氧胆酸(GDCA),甘氨鹅去氧胆酸(GCDCA),甘氨熊去氧胆酸(GUDCA),牛磺胆酸(TCA),牛磺去氧胆酸(TDCA),TCDCA,TUDCA,牛磺猪去氧胆酸

(THDCA),牛磺石胆酸(TLCA)HPLC级胆汁酸对照品(美国Sigma-Aldrich公司,批号分别为031M781V, 038K0144V, 120M1744V, SLBB3885V, SLBB1583V, 071M1314V, 011M5300V, 039K0308V, 081M5209, BCBC5493V, BCBF3394V, 090M1880V, 067K5002V, 022M4110V, SLBC7807V, 110M5004V); HPLC级醋酸铵(上海麦克林生化科技有限公司,批号C10050552);甲醇(美国Fisher公司,批号A452-4)。

1.3 仪器 TBA-40FR型自动生化分析仪(日本Toshiba公司);2-16pk型冷冻离心机(德国Sigma公司);Centrifuge 5424R型低温离心机(德国Eppendorf公司);Milli-Q型超纯水装置(美国Millipore公司);Voertex-genix 2型涡旋混合器(美国Scientific Industries公司);TurboVap lv型氮吹仪(德国Biotage公司);Waters Acquity UPLC-ZQ 2000型超高效液相色谱-单极四极杆质量分析仪(美国Waters公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 雄性SD大鼠,适应性喂养7d,随机分为正常组(8只)和高脂模型组(42只),分别给予普通饲料和高脂饲料,自由摄食、饮水。每周称体质量2次。以高脂喂养后大鼠体质量超过普通饲料喂养大鼠体质量均值20%作为肥胖模型标准^[20],造模9周,体质量从大到小排序,取24只造模成功的肥胖大鼠并按照体质量随机区组分3组,每组8只,分为模型组、利胆软坚方高、低剂量组。给药剂量均按照人与大鼠体表面积法换算^[21],配制高、低剂量利胆软坚方(30, 15g·kg⁻¹,分别相当于70kg体质量成人每日剂量的20, 10倍),正常组与模型组大鼠以生理盐水灌胃,给药组以相应剂量药物灌胃,均每日按10mL·kg⁻¹灌胃1次,连续4周,每日称体质量。

2.2 胆管插管法监测2h胆汁流量 给药结束次日,大鼠禁食不禁水12h处理,测定体质量,给药后立刻以1%戊巴比妥钠(40mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,取仰卧位固定,于腹中线偏右腹壁切口进腹,在十二指肠处分离出胆总管,剪“V”字型切口,插入引流管后缝合固定,管口接1.5mL离心管,缝合腹腔,用生理盐水纱布覆盖,稳定10min后开始记录胆汁流量,2h内每隔0.5h收集并记录读数1次,共收集4次。

2.3 样本采集 胆汁流量收集结束,腹主动脉取血,4℃静置,3000r·min⁻¹离心15min分离血清,分

装并储存于-80℃冰箱,用于血清生化指标及胆汁酸轮廓谱测定。取肝脏、剥离附睾和肾周脂肪,吸干水分后称质量,-80℃冷冻保存。

2.4 生化法检测血清TC,TG,HDL-C,LDL-C水平
将血清从-80℃冰箱取出,冰上解冻,取血清200 μL进样,经全自动生化仪测定TC,TG,HDL-C,LDL-C的含量,实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.5 UPLC-MS/MS法检测血清胆汁酸含量 参照文献[22-24]胆汁酸测定方法处理血清样本并在该中心测定血清胆汁酸轮廓谱。

标准品制备:用色谱甲醇溶解胆汁酸标准品,制成质量浓度为2 g·L⁻¹的溶液。分别吸取16种胆汁酸标准品50 μL制作胆汁酸混合标准品溶液(100 mg·L⁻¹),再将胆汁酸混标后用甲醇逐级稀释并定容至10,5,2,1,0.5,0.2,0.1 mg·L⁻¹。绘制标准曲线。所有标品的标准曲线相关系数R²均大于0.998,说明线性良好。16种胆汁酸胆汁酸线性范围均为0.1~10 mg·L⁻¹。

血清样本制备:血清室温下融化后,取100 μL至1.5 mL离心管中,加色谱甲醇溶液300 μL沉淀蛋白,涡旋振荡1 min,4℃ 20 000×g离心10 min。取上清300 μL,用氮吹仪35℃吹干。残渣用初始流动相100 μL复溶,涡旋振荡1 min,4℃,20 000×g离心10 min,吸取上清100 μL进

样分析。

色谱和质谱条件:液相色谱柱ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);柱温45℃;流动相0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~1.0 min,55% B;1.0~2.6 min,55%~62% B;2.6~11.4 min,62%~80% B;11.4~13.4 min,80% B;13.4~15 min,80%~90% B;15~18 min,90% B);流速0.30 mL·min⁻¹;自动进样器温度10℃;进样量5 μL;电喷雾离子化(ESI)源;负离子检测定量;离子源温度120℃;脱溶剂温度350℃;脱溶剂气(N₂)流速600 L·h⁻¹;锥孔气(N₂)流速50 L·h⁻¹;毛细管电压2.8 kV;锥孔电压55 V;扫描模式为SIR。通过MassLynx 4.1软件采集数据和输出数据。

2.6 统计学方法 所有数据均采用SPSS 21.0软件进行统计,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,造模后两组间比较采用t检验,给药后各组间比较采用One-way ANOVA进行统计分析,P<0.05表示差异有统计学意义。肥胖相关指标与胆汁酸轮廓谱中不同种类胆汁酸的相关性采用Pearson检验进行分析。

3 结果

3.1 造模后大鼠体质量及血脂变化 与正常组比较,模型组大鼠行动呆缓、精神萎靡、毛发油亮甚至发黄、体态臃肿,体质量显著增加(P<0.01),血清TC,TG,LDL-C均显著升高(P<0.01)。见表1。

表1 高脂饮食9周对大鼠体质量及血脂水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of body weight and serum lipid levels induced by high-fat diet after 9 weeks($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量/g		造模后血脂/nmol·L ⁻¹			
		造模前	造模后	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常	8	207.50±4.68	446.33±37.01	1.59±0.27	0.73±0.08	0.49±0.04	0.37±0.06
模型	24	207.67±6.83	558.89±27.78 ²⁾	2.24±0.41 ²⁾	1.10±0.23 ²⁾	0.51±0.06	0.51±0.10 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

3.2 对肥胖大鼠体质量、肝脏质量、脂肪质量的影响 给药4周后,与正常组比较,模型组体质量持续增加,肝脏质量、脂肪质量显著增加(P<0.01);与模型

组比较,利胆软坚方高、低剂量组体质量、肝脏质量均明显降低(P<0.05,P<0.01),高剂量组脂肪质量显著降低(P<0.01)。见表2。

表2 利胆软坚方对肥胖大鼠体质量、肝脏质量、脂肪质量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of LDRJ prescription on body weight, liver weight and WAT weight in obesity rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量		体质量变化量	肝脏质量	脂肪质量
		给药前	给药后			
正常	-	446.33±37.01	471.17±55.09	24.83±27.13	10.96±2.73	16.21±4.17
模型	-	562.83±28.05 ²⁾	588.50±31.47 ²⁾	25.67±28.71	13.98±0.89 ²⁾	42.47±4.73 ²⁾
利胆软坚方	30	554.50±30.38	530.17±35.58 ³⁾	-24.33±8.76 ⁴⁾	11.95±0.81 ⁴⁾	28.83±4.07 ⁴⁾
	15	559.33±29.53	553.67±33.48	-5.67±11.52 ³⁾	12.44±0.86 ³⁾	36.65±6.76

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表3~8同)。

3.3 对肥胖大鼠血脂水平的影响 与正常组比较,模型组血清TC, TG, LDL-C水平明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,利胆软坚方给药4周后,高剂量组

TC, TG, LDL-C均明显降低($P<0.05, P<0.01$),低剂量组仅TG含量明显下降,其他指标下降不明显($P<0.05$)。见表3。

表3 利胆软坚方对肥胖大鼠血清血脂水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常	-	1.72±0.15	1.05±0.26	0.45±0.05	0.42±0.05
模型	-	2.41±0.26 ²⁾	1.54±0.33 ²⁾	0.46±0.05	0.57±0.10 ¹⁾
利胆软坚方	30	2.04±0.15 ³⁾	0.92±0.16 ⁴⁾	0.48±0.04	0.47±0.07 ³⁾
	15	2.18±0.26	1.14±0.22 ³⁾	0.47±0.05	0.52±0.12

3.4 对肥胖大鼠胆汁流量的影响 各组大鼠胆汁流量随时间延长均呈递减趋势,利胆软坚方高、低剂量组在给药后1.5 h内下降较为缓慢。与正常组比较,模型组在各时间段内的胆汁流量始终低于正常组,2 h内胆汁分泌总量明显减少($P<0.05$);与模型组

比较,利胆软坚方高、低剂量组在所监测的2 h内胆汁分泌总量分别增加了21.7%和20.3%,且在各时间段内的胆汁分泌量始终有高于模型组的趋势,高剂量组在给药后1~1.5 h明显增加($P<0.05$)。见表4。

表4 利胆软坚方对肥胖大鼠胆汁流量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药后0.5~1 h	给药后1~1.5 h	给药后1.5~2 h	给药后2~2.5 h	监测2 h总量
正常	-	0.52±0.05	0.42±0.07	0.41±0.02	0.32±0.12	1.68±0.21
模型	-	0.43±0.06	0.35±0.08	0.33±0.05	0.28±0.07	1.38±0.23 ¹⁾
利胆软坚方	30	0.53±0.11	0.49±0.10 ³⁾	0.34±0.15	0.32±0.11	1.68±0.42
	15	0.46±0.09	0.47±0.11	0.39±0.06	0.32±0.12	1.66±0.33

3.5 对肥胖大鼠血清总胆汁酸含量及初级胆汁酸占比的影响 通过UPLC-MS/MS对各组大鼠血清16种内源性胆汁酸含量进行测定,其中TLCA, GCDCA, GUDCA含量低于检测线,未能进行统计。对可测定的13种胆汁酸求和得血清总胆汁酸含量,并计算初级胆汁酸占比。与正常组比较,模型组血清总胆汁酸含量显著减少($P<0.01$),初级胆汁酸占比也明显降低($P<0.05$);与模型组比较,高剂量组血清总胆汁酸含量升高了11%,低剂量组血清总胆汁酸含量无明显变化,高、低剂量组初级胆汁酸占比均明显升高($P<0.05$)。见表5。

表5 利胆软坚方对肥胖大鼠血清总胆汁酸含量及初级胆汁酸占比的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

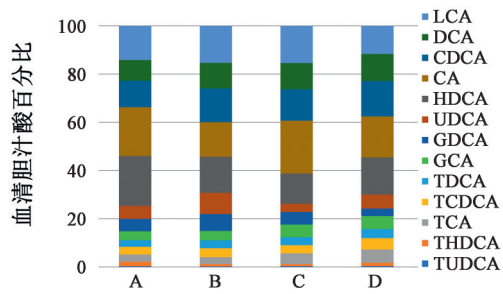
Table 5 Effect of LDRJ prescription on concentration of serum total bile acids and proportion of primary bile acids in obesity rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血清总胆汁酸含量/ μg·L ⁻¹	初级胆汁酸 占比/%
正常	-	6 952.57±597.80	44.88±6.13
模型	-	5 089.20±829.31 ²⁾	37.45±2.43 ¹⁾
利胆软坚方	30	5 652.95±1 982.11	50.76±10.78 ³⁾
	15	4 972.05±1 328.19	49.14±5.51 ³⁾

3.6 对肥胖大鼠血清胆汁酸轮廓谱的影响 通过血清胆汁酸百分比柱状图可看出各组不同胆汁酸成分比例存在差异,正常组血清中CA比例最高,占20.11%,模型组CA比例下降至14.30%,给药后高、低剂量给药组CA比例均有所回调,分别上升至21.89%和17.02%。见图1。

DCA, CDCA, HDCA含量明显降低($P<0.05$);与模型组比较,利胆软坚方高剂量组DCA含量明显升高($P<0.05$),低剂量组均无统计学差异,见表6。牛磺酸结合型胆汁酸类,与正常组比较,模型组TCA, TDCA, TCDCA, THDCA含量均明显降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,利胆软坚方高、低剂量组TCA含量明显升高($P<0.05$),低剂量组TCDCA含量亦显著升高($P<0.05$),见表7。甘氨酸结合型胆汁酸类,与正常组比较,模型组GDCA含量明显下降

进一步分析对比三类不同类型胆汁酸含量发现:游离型胆汁酸类,与正常组比较,模型组CA,



A. 正常组; B. 肥胖模型组; C. 利胆软坚方高剂量组; D. 利胆软坚方低剂量组

图1 利胆软坚方对肥胖大鼠血清各胆汁酸比例的影响

Fig. 1 Effect of LDRJ prescription on composition of serum bile acids in obesity rats

($P < 0.05$); 与模型组比较, 利胆软坚方高剂量组 GCA, GDCA 含量均增加明显 ($P < 0.05$)。见表 8。

3.7 肥胖相关指标与胆汁酸轮廓谱的关系 体质

量、脂肪质量、肝脏质量是肥胖最直观的指标, 同时机体发生肥胖时多伴随有血脂代谢异常, 如高胆固醇血症、高甘油三酯血症等, 因此将体质量、脂肪质量、肝脏质量以及血脂 TC, TG 作为肥胖相关指标, 与所测得的 13 种胆汁酸含量进行 Pearson 相关性分析。结果发现体质量与 HDCA ($r = -0.661$), TDCA ($r = -0.593$), THDCA ($r = -0.677$) 在 $P < 0.01$ 的水平上有显著的负相关性, 同时与 CDCA ($r = -0.453$), TUDCA ($r = -0.605$) 在 $P < 0.05$ 水平上有明显的负相关性。肝脏质量与 HDCA, TDCA, THDCA 呈负相关, 脂肪质量与 CDCA, DCA, HDCA, LCA, TDCA, THDCA 呈负相关。血脂指标仅有 TC 水平与 THDCA 呈负相关, TG 与胆汁酸水平关系不密切。见表 9。

表6 利胆软坚方对肥胖大鼠血清游离型胆汁酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 6 Effect of LDRJ prescription on concentration of unconjugated bile acids in obesity rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CA	DCA	CDCA	UDCA	HDCA	LCA
正常	-	1402.00±533.90	594.67±32.49	761.33±35.95	448.80±13.26	1461.01±551.2	982.72±2.03
模型	-	758.90±432.50 ¹⁾	529.13±22.18 ²⁾	696.12±26.89 ²⁾	437.30±3.29	745.60±71.87 ²⁾	980.74±0.13
利胆软坚方	30	871.50±643.71	592.60±61.19 ³⁾	688.15±33.52	445.57±17.05	658.67±34.96	980.84±0.31
	15	967.00±656.00	524.90±13.59	691.90±37.62	441.20±12.96	734.00±93.77	980.82±0.35

表7 利胆软坚方对肥胖大鼠血清牛磺结合型胆汁酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 7 Effect of LDRJ prescription on concentration of taurine conjugated bile acids in obesity rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TCA	TDCA	TCDCA	TUDCA	THDCA
正常	-	206.27±48.56	192.35±15.67	220.42±3.94	34.70±5.63	125.37±72.52
模型	-	145.60±19.09 ¹⁾	166.20±18.79 ²⁾	214.18±3.09 ²⁾	31.43±0.95	42.88±19.46 ¹⁾
利胆软坚方	30	248.11±6.50 ³⁾	172.90±12.08	215.90±0.79	33.85±0.89	41.98±10.18
	15	272.60±130.90 ³⁾	172.90±12.08	220.90±4.72 ³⁾	31.73±0.94	62.12±16.40

表8 利胆软坚方对肥胖大鼠血清甘氨酸结合型胆汁酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 8 Effect of LDRJ prescription on concentration of glycine conjugated bile acids in obesity rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	GCA	GDCA
正常	-	253.70±13.64	354.05±15.21
模型	-	250.22±7.73	339.81±2.40 ²⁾
利胆软坚方	30	282.30±32.09 ³⁾	352.72±9.60 ³⁾
	15	252.70±11.46	341.31±0.40

4 讨论

肥胖是一种全球流行的慢性疾病, 能引起多种并发症, 包括心血管疾病, 2型糖尿病, 癌症和精神

疾病, 且目前呈现低龄化、多龄化趋势, 对人类健康构成了威胁。因此研究有效、安全、无副作用(或副作用小)的减肥药物十分迫切。目前FDA批准的减肥西药, 减重效果明显, 但多伴有不同程度副作用, 如奥利司他的脂肪泻影响患者生活质量, 或考虑药物的安全性尚未验证, 很多患者不愿接受长期治疗^[7]。中医药在肥胖治疗中体现出一定的优势, 如刘威等^[25]研究平肥2号方对肥胖大鼠降脂减肥作用中发现, 在同样具有减重作用的情况下, 对比奥利司他引起的大鼠便溏、体毛枯黄等副作用, 平肥2号方组大便正常、毛色光泽。本研究中利胆软坚方治疗后, 大鼠体质量下降明显, 同样并未出现毛色失

表9 肥胖相关指标与胆汁酸轮廓谱中不同种类胆汁酸的相关性分析

Table 9 Pearson correlation between obesity-related data and levels of serum bile acids

指标	CA	CDCA	DCA	UDCA	HDCA	LCA	TCA	TCDC	TDCA	TUDCA	THDCA	GCA	GDCA
体质量	-0.092	-0.453 ¹⁾	-0.400	-0.132	-0.661 ²⁾	-0.220	-0.135	-0.315	-0.593 ²⁾	-0.605 ¹⁾	-0.677 ²⁾	0.213	-0.112
肝脏质量	-0.138	-0.234	-0.296	0.101	-0.426 ¹⁾	0.102	-0.164	-0.129	-0.538 ²⁾	-0.465	-0.570 ²⁾	0.034	-0.051
脂肪重	-0.206	-0.488 ¹⁾	-0.519 ²⁾	-0.448	-0.665 ²⁾	-0.481 ¹⁾	-0.141	-0.328	-0.508 ¹⁾	-0.493	-0.596 ²⁾	0.039	-0.026
TC	-0.186	-0.286	-0.351	0.001	-0.373	-0.151	0.271	0.108	-0.382	-0.268	-0.453 ¹⁾	0.101	-0.382
TG	-0.189	-0.004	-0.159	-0.364	-0.168	0.027	-0.056	0.100	-0.223	-0.082	-0.124	0.085	-0.415

注: Pearson相关性分析¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

泽, 倦怠乏力、腹泻等副作用。因此, 中医药治疗肥胖的研究现实意义重大。

本课题组通过前期较为系统的理论探讨^[12-14], 认为肥胖的发生涉及到多个脏器的功能失调, 而胆在肥胖的发病中占十分重要的地位。胆具有“既藏又泻”的特性, 通过调节胆汁的藏泻影响饮食在体内的代谢。如《难经正义》中记载胆汁“流入小肠汁中, 以融化食物, 而利传渣滓”。无论中医理论还是西医理论都认为胆汁含有促进消化、吸收、排泄的成分, 既能帮助脾胃消化运转食物, 又能帮助小肠乳化吸收饮食物的精微物质(脂肪及机体必需的维生素等), 还能帮助大肠排泄饮食物的糟粕(多余的脂肪、食物残渣等), 从而保证机体营养平衡。而胆道不利、胆汁排泄不畅则会影响饮食在体内的消化、吸收和排泄, 从而产生痰瘀水湿等病理产物, 形成肥胖。本研究通过高脂饮食诱导9周成功建立肥胖模型, 肥胖大鼠体质量、肝脏质量、脂肪质量均明显增加, 且伴随有血清TG, TC, LDL-C的改变, 同时结果发现模型组HDL-C的水平无明显变化, 可能与高脂饲料配比或造模时间有关, 目前高脂饮食诱导只能引起部分血脂指标改变。研究表明^[15]: 过多的脂肪摄入超过机体的代谢能力, 继而引发体内脂质堆积形成肥胖及血脂紊乱。脂质的分解与吸收有赖于肠道中胆汁酸的乳化作用, 胆汁酸的分泌不足, 可影响脂质代谢。

现代研究发现肥胖与胆汁的分泌及胆汁酸水平有关, PRINZ等^[26]通过对比体质量正常、消瘦、超重及肥胖患者血浆胆汁酸水平发现血浆胆汁酸水平与BMI呈正相关。胆汁酸的合成依赖于肝脏中的胆固醇分解, 胆固醇在相关酶的作用下分解生成初级胆汁酸CA, CDCA及其与牛磺酸或甘氨酸结合形成牛磺结合型或甘氨酸结合型胆汁酸, 即TCA, GCA, TCDCA, GCDCA, 随后胆汁通过胆管分泌进入肠道, 与肠道菌群相互作用, 水解成游离胆汁酸或生成次级胆汁酸, 即DCA,

LCA, UDCA, HDCA等, 参与肠道中脂肪的乳化解吸收。肠道中大部分的胆汁酸从门静脉回流至肝脏, 形成胆汁酸的肝肠循环^[27]。因此血液中胆汁酸的含量反映机体肝肠循环中胆汁酸的水平。体内胆汁酸水平低, 胆固醇分解合成胆汁酸受阻, 肝脏内胆固醇堆积, 易出现脂肪肝等病理改变。近年来大量研究发现药物干预或者减肥手术后, 均出现血清胆汁酸水平升高, 其机制可能是通过刺激体内胆固醇代谢增加胆汁酸合成有关。HAEUSLER等^[28]研究发现减重手术后患者的血清胆汁酸水平升高, 推测与胆汁酸肠肝循环中胆汁酸重吸收障碍后刺激肝脏胆固醇分解合成胆汁酸, 从而加快体内胆固醇代谢达到降脂减重的作用。本研究发现高脂饮食造模一段时间后, 肥胖大鼠的胆汁排泄量不足, 且初级胆汁酸的占比明显低于正常组。利胆软坚方干预后不仅能在一定给药时效内增加胆汁分泌量(主要起效时间为给药后1.5h), 又能显著提高初级胆汁酸占比及CA占比, 同时增加肥胖模型大鼠TCA, GCA, DCA, GDCA等胆汁酸含量, 改善肥胖大鼠胆汁酸轮廓谱。本研究不足在于利胆软坚方剂量设置梯度不够全面, 低剂量干预效果不显著, 今后实验设计进一步完善多梯度剂量设置。

综上所述, 由本研究可知利胆软坚方可有效降低肥胖模型大鼠体质量, 改善血脂代谢紊乱, 其作用可能与增加胆汁分泌, 刺激初级胆汁酸合成与分泌, 调节胆汁酸轮廓谱等方面有关。但对于利胆软坚方可能存在的调节分子机制及有效成分尚未明确, 今后将进一步开展利胆软坚方的分子机制研究, 为肥胖的治疗研究提供新的思路和方向。

[参考文献]

[1] BLÜHER M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(5): 288-298.

- [2] LEANDRA A, ZIAD A A, ZARGAR A H, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults[J]. *Lancet*, 2017, 390: 2627-2642.
- [3] BRAY G A, KIM K K, WILDING J P H, et al. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation[J]. *Obes Rev*, 2017, 18(7): 715-723.
- [4] BROUGHTON D E, MOLEY K H. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact[J]. *Fertil Steril*, 2017, 107(4): 840-847.
- [5] DENG T, LYON C J, BERGIN S, et al. Obesity, inflammation, and cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 33(12): 421-449.
- [6] SEMAN L, BURN A S, BURN P. Obesity: a chronic disease in need of drug targets and safe medicines[J]. *Discov Med*, 2005, 5(25): 94-103.
- [7] BESSESEN D H, VAN G L F. Progress and challenges in anti-obesity pharmacotherapy [J]. *Lancet Diabetes Endo*, 2018, 6(3): 237-248.
- [8] 林园园,熊义涛. 杜仲、山楂和陈皮混合汤剂对营养型肥胖大鼠减肥降脂的作用[J]. *中国当代医药*, 2018, 25(17): 20-23, 28.
- [9] 李相廷. “益气活血,化痰降浊”之调脂颗粒治疗高血脂症(痰浊血瘀证)临床疗效观察[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2010.
- [10] 桑婷婷,郭铨洁,郭丹丹,等. 中医药通过调节肠道菌群抑制肥胖和炎症相关疾病的进展研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(16): 3235-3242.
- [11] 顾思纯,杨柏灿. 癥瘕积聚的病证范围及治疗探析[J]. *江苏中医药杂志*, 2017, 49(9): 11-13.
- [12] 祝建龙,方瑜,杨柏灿. 肥胖的中医病证探析[J]. *上海中医药杂志*, 2011, 45(5): 17-19.
- [13] 乔思雨,高敏,杨熠文,等. “胆主决断”的再认识[J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(7): 37-39.
- [14] 方瑜,杨柏灿. 论胆在人体生命活动中的地位和作用——“凡十一脏取决于胆”探微[J]. *山东中医药大学学报*, 2010, 34(2): 110-113.
- [15] CHIANG J Y L, FERRELL J M. Bile acids as metabolic regulators and nutrient sensors [J]. *Annu Rev Nutr*, 2019, 39: 175-200.
- [16] CHÁVEZ-TALavera O, TAILLEUX A, LEFEBVRE P, et al. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(7): 1679-1694.
- [17] SARAFIAN M H, LEWIS M R, PECHLIVANIS A, et al. Bile acid profiling and quantification in biofluids using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(19): 9662-9670.
- [18] YANG T, SHU T, LIU G, et al. Quantitative profiling of 19 bile acids in rat plasma, liver, bile and different intestinal section contents to investigate bile acid homeostasis and the application of temporal variation of endogenous bile acids [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 172: 69-78.
- [19] HUANG F, ZHENG X, MA X, et al. Theabrownin from Pu-erh tea attenuates hypercholesterolemia via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4971.
- [20] 杨亚南,舒晴,陈丽,等. 电针调控肥胖大鼠肝脏 FoxO1 及其对脂质代谢的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(9): 2129-2133.
- [21] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993: 33-34.
- [22] 徐英. 基于氨基酸和胆汁酸代谢轮廓分析的药源性肝损伤及中药的保护作用机理初探[D]. 上海:上海中医药大学, 2011.
- [23] 徐英,陈崇崇,杨莉,等. 基于胆汁酸代谢网络分析中药黄药子的肝毒性[J]. *药学学报*, 2011, 46(1): 39-44.
- [24] XU Y, ZHONG P, TAO Y. Metabolic profiling of endogenous bile acids: a novel method to assess hepatoprotective effect of Tanreqing capsule on carbon-tetrachloride-induced liver injury in rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(4): 271-283.
- [25] 刘威,刘霞,何军锋,等. 高脂饮食诱导的肥胖大鼠脂肪细胞改变及平肥2号方干预的研究[J]. *中医药信息*, 2015, 32(6): 34-37.
- [26] PRINZ P, HOFMANN T, AHNIS A, et al. Plasma bile acids show a positive correlation with body mass index and are negatively associated with cognitive restraint of eating in obese patients [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 199.
- [27] CHIANG J Y L, FERRELL J M. Bile acid metabolism in liver pathobiology [J]. *Gene Expression*, 2018, 18(2): 71-87.
- [28] HAEUSLER R A, ASTIARRAGA B, CAMASTRA S, et al. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α -hydroxylated bile acids [J]. *Diabetes*, 2013, 62(12): 4184-4191.

[责任编辑 孙丛丛]