

· 药物代谢 ·

基于尿液代谢组学比较厚朴温中汤合煎与单煎对脾胃虚寒大鼠的影响

闫君¹, 邬思芳², 刘莉¹, 蒋红霞¹, 齐珂璇¹, 冯秀文¹, 刘建群^{1*}

(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 萍乡市安源区东大街社区卫生服务中心, 江西萍乡 337000)

[摘要] 目的:从代谢组学角度研究合煎与单煎厚朴温中汤对脾胃虚寒大鼠的影响,寻找相关潜在生物标志物及其代谢通路,探讨两者异同点,为该经典名方单味药配方颗粒临床替代传统汤剂的可行性分析提供参考。方法:将32只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、厚朴温中汤合煎组和单煎组。正常组灌胃蒸馏水,其他3组每天上午按10 mL·kg⁻¹灌胃给予4℃冷食醋,下午按10 mL·kg⁻¹给予精炼猪油,持续10 d。造模成功后,厚朴温中汤合煎组和单煎组分别按1.8 g·kg⁻¹(按生药量计)给予煎液,每天给药1次,持续7 d。利用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术分析尿液中的小分子内源代谢物,通过主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)比较正常组、模型组、厚朴温中汤合煎组与单煎组之间差异性代谢物的变化情况,将差异代谢物导入京都基因与基因组百科全书(KEGG)进行代谢通路的分析。结果:与模型组相比,厚朴温中汤合煎组与单煎组共同调节13个潜在生物标志物,包括磷脂酰胆碱(PC),溶血磷脂酸(LysoPA)和胆酸等,通过影响甘油磷脂代谢、甘油酯代谢、磷脂酰肌醇信号系统、酪氨酸代谢和甾体激素生物合成等代谢通路起到治疗脾胃虚寒的作用。厚朴温中汤合煎组与单煎组均能够使脾胃虚寒大鼠的体质量、胃动素和胃泌素含量基本恢复至正常水平。结论:从生化指标来看,厚朴温中汤合煎与单煎效果没有明显差异,但从代谢组学结果来看,合煎比单煎效果稍优,提示厚朴温中汤单煎配方颗粒代替传统汤剂临床应用具有一定的可行性。

[关键词] 厚朴温中汤; 合煎; 单煎; 代谢组学; 生物标志物; 脾胃虚寒; 配方颗粒

[中图分类号] R22;R969.1;R28;R932 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0117-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201751

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200610.1732.008.html>

[网络出版日期] 2020-6-11 11:30

Comparative Analysis of Effect of Houpu Wenzhongtang Combined Decoction and Simple Decoction on Urine Metabonomics of Rats with Deficiency-cold of Spleen and Stomach

YAN Jun¹, WU Si-fang², LIU Li¹, JIANG Hong-xia¹, QI Ke-xuan¹, FENG Xiu-wen¹, LIU Jian-qun^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. Dongdajie Community Health Service Center in Anyuan District, Pingxiang 337000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of combined decoction and single decoction of Houpu Wenzhongtang on rats with deficiency-cold of spleen and stomach from the perspective of metabonomics, to find out the relevant potential biomarkers and metabolic pathways, and to explore the similarities and differences between the combined decoction and single decoction, so as to provide reference for the feasibility analysis of replacing traditional decoction with single dispensing granule of this formula. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group, model group, Houpu Wenzhongtang combined decoction group and single decoction

[收稿日期] 20200228(030)

[基金项目] 江西中医药大学研究生创新基金项目(JZYC19S04)

[第一作者] 闫君, 硕士, 从事中药药效物质基础及质量评价研究, E-mail: 1610337514@qq.com

[通信作者] *刘建群, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及质量评价研究, Tel: 0791-87118786, E-mail: liu5308@sina.com

group. Rats in the normal group were given distilled water by intragastric administration, rats in the other three groups were given cold vinegar at 4 °C in the morning and refined lard in the afternoon for 10 days (the dosage of 10 mL·kg⁻¹). After the model was successfully established, rats in the combined decoction group and the single decoction group were given corresponding decoction with dosage of 1.8 g·kg⁻¹ (according to the amount of crude drugs), once a day for 7 days. Ultra-high liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technique was used to analyze the small molecular endogenous metabolites in urine. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) and principal component analysis (PCA) were used to compare the changes of differential metabolites among the normal group, model group, Houpu Wenzhongtang combined decoction group and single decoction group, and the differential metabolites were introduced into Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) for metabolic pathway analysis. **Result:** Compared with the model group, the Houpu Wenzhongtang combined decoction group and single decoction group jointly regulated 13 potential biomarkers, including phosphatidylcholine(PC), lysophosphatidic acid(LysoPA) and cholic acid, etc. They played a role in treating deficiency-cold of spleen and stomach by influencing metabolic pathways such as glycerophospholipid metabolism, glycerolipid metabolism, phosphatidylinositol signaling system and so on. The combined decoction and single decoction of Houpu Wenzhongtang could obviously restore the body weight, motilin and gastrin contents of rats with deficiency-cold of spleen and stomach to normal levels. **Conclusion:** According to biochemical indexes, there is no obvious difference between combined decoction and single decoction of Houpu Wenzhongtang, but according to metabonomics, the combined decoction may be slightly better than the single decoction. The research shows that it is feasible to replace traditional decoction with single dispensing granule of Houpu Wenzhongtang in clinical application.

[**Key words**] Houpu Wenzhongtang; combined decoction; simple decoction; metabonomics; biomarkers; deficiency-cold of spleen and stomach; dispensing granules

厚朴温中汤源自李东垣的《内外伤辨惑论》，是治疗脾胃虚寒、心腹胀满及秋冬客寒犯胃、时作疼痛的经典名方，临床常用于治疗急慢性胃炎、慢性肠炎、胃溃疡、胃肠功能紊乱等疾病，疗效显著^[1]。该方已收录于国家中医药管理局2018年发布的《古代经典名方目录(第一批)》。随着社会经济的快速发展，胃肠类疾病的患病率呈逐年上升的趋势，且致病因素较为复杂，病情反复，严重影响了患者的生活质量^[2]。相关研究表明，厚朴温中汤治疗脾胃寒湿、气滞类胃肠疾病效果显著，临床应用价值很高^[3]。中药传统汤剂煎煮、服用、携带均不方便，难以适应现代快节奏的生活方式。中药配方颗粒具有免煎煮，携带及使用方便，可灵活配伍、随证加减等优势，在临床上得到了广泛应用^[4-5]。但中药配方颗粒临床上代替传统汤剂是否可行，尚需进行相关研究进一步探索。

目前，研究人员多通过比较化学成分或某些药效学指标的差异来评价中药配方颗粒代替传统汤剂的可行性。例如，王卓^[6]以玉屏风散为研究对象，通过比较传统汤剂与配方颗粒剂中化学成分种类、

含量以及入血成分的差异来探究两者的异同。林伟雄等^[7]采用HPLC比较了吴茱萸汤颗粒剂、配方颗粒剂与传统汤剂中指标成分的含量差异，以考察三者异同。刘斯琪等^[8]通过检测丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶和总蛋白等药效指标比较了茵陈蒿汤复方配方颗粒、单味配方颗粒和传统汤剂对四氯化碳致小鼠肝损伤模型的影响。代谢组学通过分析外界刺激后生物体内相对分子质量较低的代谢物的全面变化，来认识生物体的生理和病理状态。其强调整体性，与中药治病整体性、动态性原则极其相似，为传统中医药研究提供了强有力的技术手段^[9]。基于此，本研究拟采用代谢组学技术研究合煎与单煎厚朴温中汤治疗脾胃虚寒证的作用机制，并分析二者的异同点，为该方单味药配方颗粒临床替代传统汤剂的可行性分析提供参考。

1 材料

Milli-Q型纯水仪(美国Millipore公司), 5804R型高速离心机(德国Eppendorf公司), Triple TOF™ 5600+型质谱仪(美国AB SCIEX公司), QGC-12T型

氮吹仪(上海泉岛公司)。姜厚朴、陈皮、炙甘草、草豆蔻仁、茯苓、木香、干姜和生姜均购自江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学药学院付小梅教授鉴定,分别为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* 的干燥干皮的姜制品、芸香科植物橘 *Citrus reticulata* 的干燥成熟果皮、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根茎的蜜炙品、姜科植物草豆蔻 *Alpinia katsumadai* 的干燥近成熟种子、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核、菊科植物木香 *Aucklandia lappa* 的干燥根、姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎、姜科植物姜 *Z. officinale* 的新鲜根茎;5%食醋(山西紫林醋业股份有限公司),精炼猪油(自制),大鼠胃动素(MTL)和胃泌素(GAS)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号均为20190317),水为自制蒸馏水和超纯水,甲醇为色谱纯,乙腈、甲酸为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF级雄性SD大鼠32只,体质量200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SCXK(湘)2016-0002,适应性饲养7 d后用于实验,饲养温度23~26 °C,相对湿度50%~70%。本文所涉及的动物实验经江西中医药大学动物伦理委员会批准,批准号JZLLSC2019-0112。

2 方法与结果

2.1 药液的制备

2.1.1 厚朴温中汤合煎汤剂 《内外伤辨惑论》原方中记载的用量为厚朴(姜制)和橘皮(去白)各一两,甘草(炙),草豆蔻仁,茯苓(去皮)和木香各五钱,干姜七分。根据文献[10]和本课题组考证,通过度量衡换算,金代一两约为现代40 g,1两=10钱=4分。据此折算为现代剂量进行制备,取厚朴(姜制)和陈皮(去白)各40 g,甘草(炙),草豆蔻仁,茯苓(去皮)和木香各20 g,干姜70 g,混合后粉碎成粗粉,称取20 g,加生姜3片,加水400 mL,煮至体积为200 mL,去渣,即得生药质量浓度为0.1 g·mL⁻¹的厚朴温中汤合煎汤剂。

2.1.2 厚朴温中汤单煎汤剂 称取厚朴(姜制)和陈皮(去白)各40 g,甘草(炙),草豆蔻仁,茯苓(去皮)和木香各20 g,干姜70 g,单独粉碎成粗粉,各加20倍量水单独煎煮至体积减半(其中干姜70 g与生姜3片同煎),得各药材单煎液,将所有单煎液全部混合(总体积2.3 L),得生药质量浓度为0.1 g·mL⁻¹的厚朴温中汤单煎汤剂。

2.2 动物实验与样品收集 将32只雄性SD大鼠

适应性喂养7 d后随机分为正常组、模型组、厚朴温中汤合煎组和厚朴温中汤单煎组,每组8只。正常组每天上午、下午各灌胃蒸馏水1次,灌胃体积设定10 mL·kg⁻¹。其他3组每天上午按10 mL·kg⁻¹灌胃给予4 °C冷食醋,下午按10 mL·kg⁻¹给予精炼猪油,持续造模10 d,期间自由饮食和饮水,并每天记录实验动物的体质量、饮食量和饮水量。10 d后观察到除正常组外,其他3组大鼠均出现了进食减少、大便稀溏、倦卧少动、肢体温度较低、体质量较正常组大鼠轻等现象,提示造模成功^[11-12]。同时,根据文献[13]中记载,造模成功后模型组大鼠血清中MTL和GAS含量比正常组降低。

按照《内外伤辨惑论》所载厚朴温中汤的用量,根据大鼠与人的体表面积计算给药量为1.8 g·kg⁻¹。正常组、模型组按18 mL·kg⁻¹给予蒸馏水,厚朴温中汤合煎组和单煎组分别给予1.8 g·kg⁻¹的煎液(给药体积18 mL·kg⁻¹),每日给药1次,持续给予7 d。最后1次给药后禁食不禁水,12 h后眼眶静脉丛采血约1.5 mL,静置30 min后于4 °C,3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm,下同),取上层血清保存于-80 °C冰箱中,备用。取血后将大鼠置于代谢笼内,收集大鼠12~24 h尿液,于4 °C,3 500 r·min⁻¹离心10 min,取上清液置-80 °C冰箱中保存备用。

2.3 尿液代谢组学UPLC-Q-TOF-MS分析

2.3.1 尿液样品的制备 将冻存的尿液上清液于4 °C解冻,从所有样品中各取500 μL合并于干燥离心管中,涡旋60 s混合均匀,标记为QC样品。另外,所有样品各取500 μL,分别置于干燥的离心管中,于4 °C,4 000 r·min⁻¹离心10 min,加甲醇3 mL,涡旋3 min,离心(4 °C,13 000 r·min⁻¹,15 min,离心半径10 cm,下同),取上清液3 mL,氮气吹干后加甲醇200 μL复溶。复溶液涡旋3 min后离心,取上清液转移至自动进样瓶中进行UPLC-Q-TOF-MS分析。

2.3.2 检测条件 色谱条件为Hypersil GOLD C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.9 μm),柱温40 °C,流速0.25 mL·min⁻¹,进样量3 μL,流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~25 min,5%~25%B;25~35 min,25%~60%B;35~40 min,60%~85%B;40~45 min,85%~95%B;45~47 min,95%~5%B)。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正离子模式,离子源温度500 °C,离子源电压5.5 kV,裂解电压100 V,碰撞能量10 eV,以氮气为雾化气体,数据采集范围选择m/z 100~1 000,采用全扫描方式。

2.3.3 多元数据分析及潜在标志物鉴定 运用 UPLC-Q-TOF-MS 对尿液样品进行检测,将所得数据导入 MarkerView 1.2.1 软件进行初步处理,包括数据的读取、色谱峰的识别、峰对齐、峰过滤、归一化、主成分分析(PCA)等步骤。利用 SIMCA-P 14.1 软件通过正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对处理后的数据进行统计分析,筛选出变量重要性投影(VIP)值>1且 $P \leq 0.05$ 的离子作为潜在的特征性生物标志物。先确定生物标志物的精确相对分子质量和二级碎片的信息,利用二级碎片的信息及裂解规律,通过 PeakView 1.2 和人类代谢组数据库(HMDB)确定生物标志物的名称和 HMDB 编号等信息,再利用 MetaboAnalyst 3.0 和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析参与的体内代谢通路和生物标志物的生物学意义。

2.4 实验动物的一般表现 正常组大鼠饮食和饮水正常,行动灵敏,毛色正常,粪便正常,体质量稳定上升,无死亡。模型组、合煎组和单煎组大鼠造模后均出现了进食减少、大便稀溏、倦卧少动、肢体温度较低、体质量较正常组大鼠轻等现象。正常组大鼠每只每天的平均食量一般>23 g,造模后大鼠每只每天的平均食量一般6~10 g,且手触感觉身体较凉。厚朴温中汤合煎组和单煎组给药后大鼠状态均有不同程度的恢复,与模型组比较,体质量显著增加,活动能力逐渐恢复,毛色和粪便的情况都有不同程度的恢复,每只大鼠平均每天的进食量一般均>20 g。模型组有2只大鼠死亡,死亡当天体质量分别为203.47,205.60 g,明显低于模型组大鼠平均体质量,这可能是由于体质虚弱、脾胃虚寒营养不良导致的死亡。

2.5 厚朴温中汤合煎与单煎对 MTL 和 GAS 的影响 采用 ELISA 检测各组大鼠血清中 MTL 和 GAS 的含量,结果发现模型组大鼠的体质量、血清中 MTL 和 GAS 含量较正常组大鼠均降低。与模型组相比,厚朴温中汤合煎组和单煎组大鼠体质量、MTL 和 GAS 水平均有不同程度的回升,见表1,说明厚朴温中汤对脾胃虚寒具有较好的治疗效果。但从给药大鼠体质量以及 MTL, GAS 含量的变化上来看,厚朴温中汤合煎组和单煎组的治疗效果没有显著差异。

2.6 尿液代谢组学分析

2.6.1 尿液代谢谱分析 4组大鼠尿液的总离子流图见图1,结果发现4组大鼠的代谢轮廓出现明显差异。利用 MarkerView 1.2.1 软件对处理后的4组

表1 各组大鼠体质量,MTL 和 GAS 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Body weight, MTL and GAS contents of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 体质量/g | MTL/ng·L ⁻¹ | GAS/ng·L ⁻¹ |
|---------|---|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 正常 | 8 | 298.55±10.69 | 115.94±9.33 | 20.60±4.42 |
| 模型 | 6 | 232.05±22.56 ²⁾ | 108.96±9.42 | 15.50±1.53 ¹⁾ |
| 厚朴温中汤合煎 | 8 | 287.64±15.43 ⁴⁾ | 135.63±14.71 ⁴⁾ | 16.73±2.42 |
| 厚朴温中汤单煎 | 8 | 292.48±21.52 ⁴⁾ | 122.00±12.56 ³⁾ | 16.84±1.99 |

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。合煎组与单煎组剂量均为1.8 g·kg⁻¹。

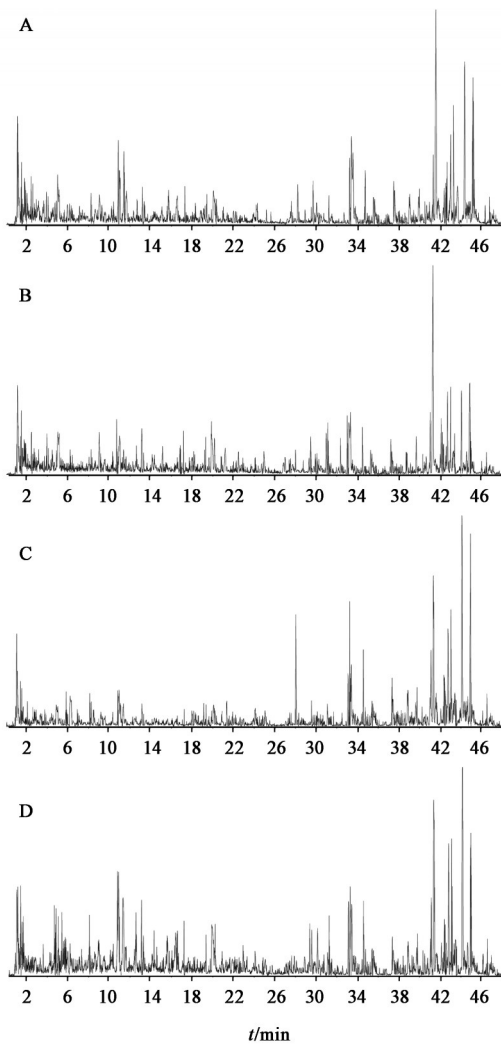
大鼠尿液质谱数据进行 PCA 处理,结果显示4组大鼠的样本分布区域完全分开,正常组和模型组大鼠样品距离较远,见图2,进一步说明造模成功。4组样品代谢轮廓完全没有重叠,说明各组样品的代谢产物存在显著性差异。正常组有1个样本出现偏离,可能是由于大鼠个体差异导致的。

2.6.2 潜在生物标志物的筛选 为发现脾胃虚寒大鼠潜在生物标志物,将正常组与模型组进行 OPLS-DA 处理,结果 R^2Y (模型解释率)=1, Q^2 (模型预测率)=0.475,见图3。OPLS-DA 是基于偏最小二乘法的降噪方法,可以消除与变量相关的正交成分,提高模型的准确度和有效性,很好地揭示组间差异。结合 VIP-plot 和 S-plot 的结果,选定 VIP 值>1且 $P \leq 0.05$ 的离子为潜在生物标志物,利用二级碎片的信息及裂解规律,通过 HMDB 和 KEGG 分析筛选出17个有 KEGG 号的潜在生物标记物,其中厚朴温中汤合煎组与单煎组共同调节13个,见表2。

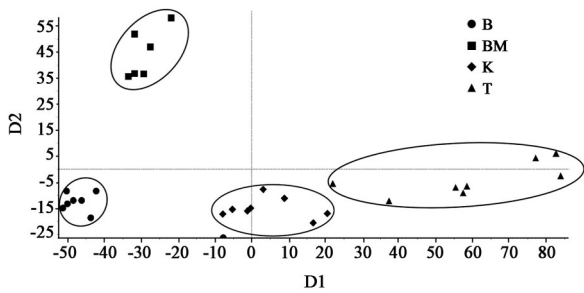
2.6.3 代谢通路分析 为了进一步探索厚朴温中汤治疗脾胃虚寒证的机制以及合煎和单煎的差异,将上述分析得到差异代谢物导入 MetaboAnalyst 3.0 并应用 KEGG 数据库对鉴定出的生物标志物进行代谢通路的归属,将通路影响值>0的代谢通路作为目标代谢通路。结果发现厚朴温中汤合煎组和单煎组共同参与的代谢通路有甘油磷脂代谢、甘油酯代谢、磷脂酰肌醇信号系统、酪氨酸代谢和甾体激素生物合成等,其中影响值最大的是甘油磷脂代谢,见表3和图4。

3 讨论

3.1 脾胃虚寒模型的选择 中医认为饮食过酸伤脾胃,早在《黄帝内经》中就有论述,《黄帝内经·素问·生气通天论》记载:“味过于酸,肝气以津,脾气乃绝”。本文选择的造模方法是用长时间灌胃给予大量的冷食醋和精炼猪油,共同造成了客寒犯胃所致脾胃虚寒模型^[12]。胃肠激素改变也与脾胃虚寒



A. 正常组; B. 模型组; C. 厚朴温中汤合煎组; D. 厚朴温中汤单煎组
图1 不同组别大鼠尿液的UPLC-Q-TOF-MS总离子流
Fig. 1 UPLC-Q-TOF-MS total ion current chromatograms of urine of rats from different groups under positive ion mode



B. 正常组; BM. 模型组; K. 厚朴温中汤单煎组; T. 厚朴温中汤合煎组 (图3同)
图2 各组大鼠尿液UPLC-Q-TOF-MS的PCA得分
Fig. 2 PCA score plot derived from UPLC-Q-TOF-MS of urine of rats from each group

证有着非常密切的联系,有研究表明脾虚大鼠的MTL和GAS明显降低,与本实验研究结果相符^[13]。有研究显示,胃肠损害是过度食酸导致脾虚的基本

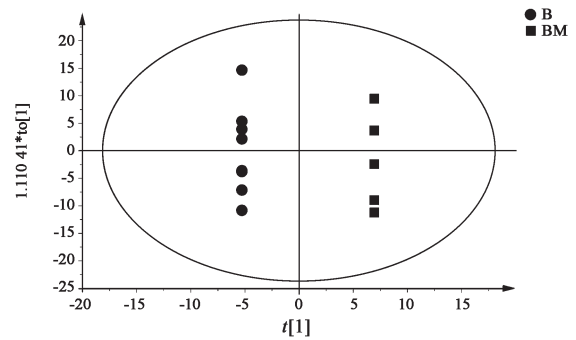


图3 正常组和模型组大鼠尿液UPLC-Q-TOF-MS的OPLS-DA得分WW
Fig. 3 OPLS-DA score plot derived from UPLC-Q-TOF-MS of urine of rats in normal and model groups

表现,酸能够刺激小肠吸收细胞,进而影响营养物质的吸收。然后会进一步发展为免疫-内分泌功能障碍,使细胞免疫功能低下,功能代谢受到损伤,机体的产热、糖的吸收、脂质的代谢和细胞线粒体功能都会受到影响。脾胃虚寒最严重表现有生殖系统病变,脾为后天之本,肾为先天之本,脾胃虚寒会导致气血精生化不足、性激素降低等一系列的生殖系统病变^[14]。

3.2 脂质代谢分析 通过代谢通路分析,发现厚朴温中汤治疗脾胃虚寒的作用机制大多与脂质代谢有关。差异性代谢物中的PC[15:0/18:2(9Z,12Z)],LysoPA(0:0/18:0)和PC[14:0/22:2(13Z,16Z)]参与了亚油酸代谢、甘油磷脂代谢、 α -亚麻酸代谢和花生四烯酸(AA)代谢。PC又称卵磷脂或磷脂酰胆碱,由脂肪酸、磷脂、甘油和胆碱等构成,是乙酰胆碱的前体,能在体内水解成胆碱,LysoPA和脂肪酸后随着血液循环进入大脑。其具有较好的亲油性和亲水性,能够降低体内胆固醇沉积,改善脂肪的吸收和利用^[15]。

亚油酸在人和哺乳类动物体内能转变为 γ -亚麻酸,并继而延长为AA。亚油酸在调节血脂水平、促进细胞生长、抵抗癌症、免疫调节等方面起到了重要作用。进一步研究表明,含有C20:4碳链的PC类是AA的主要来源,当炎症反应发生时,炎症介质主要由AA代谢产生,其在磷脂酶A₂的作用下从磷脂中释放,小部分发生联级反应,产生大量前列腺素类炎症介质,大部分在酰基转移酶作用下重新与溶血磷脂生成磷脂,且AA下游的多种代谢产物与胃黏膜的损伤和修复有关^[16]。此外,有研究通过病理和药理潜在标志物对比分析发现,炎症模型组中含16-C和18-C的甘油磷脂类,如PC(16:0/20:3),PC(18:1/20:3),PC(18:0/20:2)的含量增加,给药

表2 厚朴温中汤对脾胃虚寒大鼠尿液中内源性代谢产物信息的影响

Table 2 Effect of Houpu Wenzhongtang on endogenous metabolites in urine of rats with deficiency-cold of spleen and stomach

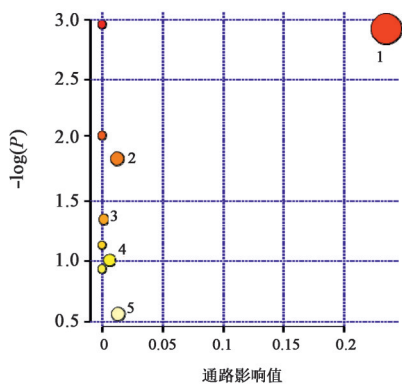
| No. | <i>m/z</i> | <i>t_R</i> /min | 代谢物 | 分子式 | HMDB ID | δ /ppm | 加合离子 | 模型组 /空白组 | 合煎组 /模型组 | 单煎组 /模型组 |
|-----|------------|---------------------------|--|---|-------------|------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 744.561 1 | 43.18 | 磷脂酰胆碱[15:0/18:2(9Z, 12Z)] PC[15:0/18:2(9Z, 12Z)] | C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P | HMDB07940 | 9.8 | [M+H] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |
| 2 | 569.288 5 | 29.14 | 白三烯F4 leukotriene F4 | C ₂₈ H ₄₄ N ₂ O ₈ S | HMDB0006465 | -1.0 | [M+H] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |
| 3 | 268.245 3 | 39.23 | <i>N</i> -甲基丁二胺 <i>N</i> -methylputrescine | C ₅ H ₁₄ N ₂ | HMDB0003661 | -7.1 | [2M+ACN+Na] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |
| 4 | 210.102 0 | 3.98 | 3,6-二氨基吡啶 proflavine | C ₁₃ H ₁₁ N ₃ | HMDB0015255 | -2.8 | [M+H] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |
| 5 | 407.277 4 | 31.22 | 脱氧可的松 cortexolone | C ₂₁ H ₃₀ O ₄ | HMDB0000015 | -4.4 | [M+isopropanol+H] ⁺ | ↑ | ↓ | ↓↓ |
| 6 | 430.229 8 | 5.85 | 三甲氧苯酰胺 trimethobenzamide | C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅ | HMDB0014800 | -8.8 | [M+ACN+H] ⁺ | ↑ | ↓ | - |
| 7 | 389.268 4 | 31.26 | 甲地孕酮 megestrol | C ₂₂ H ₃₀ O ₃ | HMDB0014495 | -0.5 | [M+ethanol+H] ⁺ | ↑ | ↓ | ↓↓ |
| 8 | 245.185 7 | 9.91 | 氨基己酸 aminocaproic acid | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | HMDB0001901 | -1.2 | [2M+H-H ₂ O] ⁺ | ↑ | ↓ | ↓↓ |
| 9 | 405.261 2 | 31.13 | 7 α ,12 α -二羟基-3-氧代-4-胆酸 7 α ,12 α -dihydroxy-3-oxo-4- cholenic acid | C ₂₄ H ₃₆ O ₅ | HMDB0000447 | -5.9 | [M+H] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |
| 10 | 355.263 4 | 32.46 | (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-二 十二碳六烯酸2-羟乙酯2- hydroxyethyl (4Z,7Z,10Z,13Z, 16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16, 19-hexaenoate | C ₂₄ H ₃₆ O ₃ | HMDB0013627 | 0.6 | [M+H-H ₂ O] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |
| 11 | 281.247 6 | 39.61 | (9Z,11E)-十八碳-9,11-二烯酸 (9Z,11E)-octadeca-9,11-dienoic acid | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | HMDB0003797 | 0.4 | [M+H] ⁺ | ↑ | ↓ | ↓↓ |
| 12 | 426.321 4 | 31.28 | 胆酸 cholic acid | C ₂₄ H ₄₀ O ₅ | HMDB0000619 | 0 | [M+NH ₄] ⁺ | ↑ | - | ↓↓ |
| 13 | 403.259 3 | 22.83 | 溶血磷脂酸(0:0/18:0)lysoPA (0:0/18:0) | C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P | HMDB0007850 | -3.7 | [M+H-2H ₂ O] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |
| 14 | 623.324 4 | 41.30 | 2-己烯基-6-甲氧基-1,4-苯醌2- hexaprenyl-6-methoxy-1,4- benzoquinone | C ₃₇ H ₅₄ O ₃ | HMDB0006818 | -3.0 | [M+2K-H] ⁺ | ↑ | - | ↓ |
| 15 | 786.600 3 | 43.22 | PC[14:0/22:2(13Z,16Z)] | C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P | HMDB0007888 | -0.5 | [M+H] ⁺ | ↑ | ↓↓ | - |
| 16 | 199.095 6 | 10.91 | 高香草醛 homovanillin | C ₉ H ₁₀ O ₃ | HMDB0005175 | -4.5 | [M+CH ₃ OH+H] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |
| 17 | 336.111 3 | 9.83 | 苯丁酸氮芥 chlorambucil | C ₁₄ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂ | HMDB0014436 | -4.5 | [M+CH ₃ OH+H] ⁺ | ↑ | ↓↓ | ↓ |

注: ↑.含量上调; ↓.含量下调; ↓↓.回调作用更强;- .无调节作用; ACN.乙腈; isopropanol.异丙醇; ethanol.乙醇。

表3 厚朴温中汤调节脾胃虚寒大鼠尿液潜在生物标志物的代谢通路

Table 3 Metabolic pathways of Houpu Wenzhongtang regulated potential biomarkers in urine of rats with deficiency-cold of spleen and stomach

| 代谢通路 | 化合物 总数/个 | 匹配 数/个 | 匹配化合物 | 原始P值 | 通路影 响值 |
|---|-------------|-----------|--|---------|-----------|
| 亚油酸代谢 linoleic acid metabolism | 5 | 1 | PC[15:0/18:2(9Z, 12Z)] | 0.052 0 | 0 |
| 甘油磷脂代谢 glycerophospholipid metabolism | 36 | 2 | PC[15:0/18:2(9Z, 12Z)], LysoPA(0:0/18:0) | 0.053 9 | 0.234 3 |
| α -亚麻酸代谢 α -linolenic acid metabolism | 13 | 1 | PC[15:0/18:2(9Z, 12Z)] | 0.129 9 | 0 |
| 甘油酯代谢 glycerolipid metabolism | 16 | 1 | LysoPA(0:0/18:0) | 0.157 5 | 0.012 5 |
| 磷脂酰肌醇信号系统 phosphatidylinositol signaling system | 28 | 1 | LysoPA(0:0/18:0) | 0.260 1 | 0.001 5 |
| 花生四烯酸代谢 arachidonic acid metabolism | 36 | 1 | PC[15:0/18:2(9Z, 12Z)] | 0.321 8 | 0 |
| 酪氨酸代谢 tyrosine metabolism | 42 | 1 | homovanillin | 0.364 9 | 0.006 4 |
| 初级胆汁酸的生物合成 primary bile acid biosynthesis | 46 | 1 | cholic acid | 0.392 2 | 0 |
| 甾体激素生物合成 steroid hormone biosynthesis | 77 | 1 | cortexolone | 0.569 3 | 0.013 2 |



1. 甘油磷脂代谢; 2. 甘油酯代谢; 3. 磷脂酰肌醇信号系统; 4. 酪氨酸代谢; 5. 甾体激素生物合成

图4 脾胃虚寒大鼠尿液中潜在生物标志物的代谢通路分析
Fig. 4 Metabolic pathway analysis of potential biomarkers in urine of rats with deficiency-cold of spleen and stomach

干预之后,其含量减少^[17]。 α -亚麻酸是人体必需的不饱和脂肪酸之一,具有抗炎、抗氧化、降血脂、抗癌等功效,其可能通过剂量依赖性地抑制一氧化氮合成酶和环氧合酶2的蛋白和mRNA的表达来实现抗炎作用,也有可能通过增加核转录因子E2相关因子2(Nrf2)的表达水平来发挥抗炎、抗氧化作用^[18]。

造模后,大鼠尿液中PC[15:0/18:2(9Z, 12Z)], LysoPA(0:0/18:0)和PC[14:0/22:2(13Z, 16Z)]的水平显著上升,冷食醋和精炼猪油灌胃后可能激活了大鼠与PC相关的代谢通路。使大量PC聚集在脑中并代谢进入尿液中排出体外。给予厚朴温中汤能够不同程度回调PC[15:0/18:2(9Z, 12Z)]和PC[14:0/22:2(13Z, 16Z)]以及其他潜在生物标志物的水平。提示厚朴温中汤可能通过调节PC, LysoPA(0:0/18:0), α -亚麻酸,胆酸等潜在生物标志物的代谢与生成,干预机体对脂质、糖和甾体激素的代谢,达到了治疗脾胃虚寒型急慢性胃炎的作用。

4 结论

总体来看,厚朴温中汤合煎组回调作用比单煎组稍强,且治疗作用与脂质、氨基酸与甾体激素的代谢有关,可用于治疗由脘腹胀满、客寒犯胃引起的脾胃虚寒型慢性胃炎、胃溃疡等疾病。通过本文研究发现,厚朴温中汤合煎与单煎均能够使脾胃虚寒大鼠的体质量, MTL和GAS含量基本恢复至正常水平,对大鼠尿液中的脾胃虚寒生物标志物也具有显著的回调作用,且合煎组回调作用比单煎组稍强。从生化指标来看,厚朴温中汤合煎与单煎效果无显著差异,但从代谢组学结果来看,合煎可能比单煎效果稍优,提示厚朴温中汤单煎配方颗粒代替传统汤剂应用具有一定的可行性。

[参考文献]

[1] 刘建群,闫君,舒积成,等.经典名方厚朴温中汤的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(17):209-218.

[2] 崔立红,杨云生.功能性胃肠疾病研究现状与展望[J].山东医药,2009,49(28):109-110.

[3] 王亢,史培锋.厚朴温中汤加减治疗脾胃虚寒性胃痛60例[J].河南中医,2014,34(12):2425.

[4] 陈淑群.中药免煎颗粒优劣研究[J].心理医生,2017,23(34):12-13.

[5] 王爽,王智,侯立强.免煎中药配方颗粒在临床应用中的优势与不足[J].中国现代药物应用,2013,7(14):142-143.

[6] 王卓.玉屏风散汤剂、复方及配方颗粒剂化学成分比较及其血清药化的研究[D].太原:山西省中医药研究院,2016.

[7] 林伟雄,乐智勇,车海燕,等.吴茱萸汤颗粒剂、配方颗粒剂及传统汤剂中指标成分的含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(13):30-34.

[8] 刘斯琪,赵永峰,高明阳,等.茵陈蒿汤复方配方颗粒、单味配方颗粒和传统汤剂对四氯化碳致小鼠肝损伤模型的比较[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(5):124-129.

[9] 王光基,查伟斌,郝海平,等.代谢组学技术在中医药关键科学问题研究中的应用前景分析[J].中国天然药物,2008,6(2):89-97.

[10] 王晓静.金代度量衡研究[D].长春:吉林大学,2016.

[11] 陈建章,尹健康,侯春久,等.黄连黄柏对脾胃虚寒实验大鼠模型的影响[J].中国中医药现代远程教育,2015,13(10):134-136.

[12] 邱赛红,李飞艳,尹健康,等.两种大鼠脾胃虚寒模型制备方法的比较研究[J].湖南中医学院学报,2004,24(6):30-33.

[13] 姚永莉,张万岱,宋于刚.脾虚证与胃肠激素关系的研究[J].新消化病学杂志,1997,5(11):728-729.

[14] 彭成,罗亮.过食酸味所致脾虚机理的实验研究[J].山东中医学院学报,1989,13(6):13-14.

[15] 胡小中.磷脂酰胆碱的生理功能和作用机理[J].粮油食品技,2011,19(4):42-44.

[16] 马宏峰.亚油酸对高脂小鼠脂质代谢的影响及其机制研究[D].合肥:合肥工业大学,2007.

[17] 肖雪蓉,余玉奇,张国改,等.二苯基庚烷A干预RAW264.7细胞炎症模型甘油磷脂的UPLC-Q/TOF MS分析[J].分析测试学报,2016,35(10):1225-1232.

[18] 吴俏瑾,杜冰,蔡尤,等. α -亚麻酸的生理功能及开发研究进展[J].食品工业科技,2016,37(10):386-390.

[责任编辑 刘德文]