

基于代谢组学研究姜制对黄连药性的影响

钟凌云, 廖智慧, 龚千锋, 席环环

江西中医学院药学院, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 探讨黄连姜制前后寒热药性的差异。 **方法** 分别制备生黄连、姜黄连水煎液, 每天 ig 给予大鼠 1 次, 连续给药 29 d, 于给药后不同时间点采集血样, 进行 HPLC-MS/MS 分析, 主成分分析 (PCA) 法处理实验数据, 分析生黄连和姜制黄连在血浆中的代谢物的差异。 **结果** 给药第 29 天生黄连组和姜黄连组大鼠血样中内源性物质的代谢状态差异最大。通过查找内源性生物标记物发现, 与生黄连组相比, 姜黄连组大鼠血样中代谢物中涉及到氨基酸能量代谢的标记物的量增加, 提示姜制黄连组氨基酸能量代谢强于生黄连, 二者寒热药性存在差异。 **结论** 通过大鼠代谢物生物效应可以考察生黄连与姜黄连药性的差异, 且结果与传统的“姜制黄连以热制寒, 缓和黄连苦寒之性”的炮制理论相一致。代谢组学可用于探讨炮制对药物药性影响的研究。

关键词: 黄连; 姜制; 药性; 代谢组学; HPLC-MS/MS

中图分类号: R283.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)22-3177-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.015

Effect of *Coptidis Rhizoma* processed with ginger juice on its property based on metabonomics

ZHONG Ling-yun, LIAO Zhi-hui, GONG Qian-feng, XI Huan-huan

Pharmacy School, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To explore the difference of hot and cold property of *Coptidis Rhizoma* (CR) before and after being processed with ginger juice. **Methods** To feed rats for 29 d with the decoction of un-processed CR (UPCR) and ginger juice-processed CR (GPCR), the rats' blood was collected at different administration time, the data by HPLC-MS/MS analysis were processed with PCA to determine the metabolites difference between the treatment groups. **Results** On the day 29, the metabolic status of endogenous substances in rats' blood showed the biggest difference between the UPCR and GPCR groups. Through checking the endogenous biomarkers of the rats in each group, the content of markers related to amino acid energy metabolism of rats in the GPCR group was higher than that in the UPCR group, indicating the energy metabolism of the GPCR was stronger than that of the UPCR, which showed the differences in cold and hot property between the two drugs. **Conclusion** The results show that the differences in potency of the UPCR and GPCR can be reflected by rats' different biological effects. The results are consistent with the traditional processing theory in Chinese materia medica that the cold property of CR could be moderated to be colder by processing with assistant materials with hot property (ginger juice). The work indicates that the metabonomic method is a valuable tool in the research of processing effect on properties of Chinese medicinal substances. The results are helpful to clarify the mechanism of processing CR with ginger juice in the future.

Key words: *Coptidis Rhizoma*; ginger juice-processed; property; metabonomic; HPLC-MS/MS

代谢组学是关于生物体内源性代谢物质的整体及其变化规律的科学。通过研究外源物质对体内代谢所产生的整体效应, 探讨药物对机体所形成的生化物质的总体代谢的调控作用, 具有不破坏内环境、整体性、灵敏度高的特点^[1]。

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎^[2]。黄连生品药性寒凉, 经性热的黄酒、性温的姜汁或吴茱萸汁制后, 能够降低其苦寒之性, 此以热制寒称为“反

收稿日期: 2013-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260643); 江西省科技支撑计划 (2009BSB09401)

作者简介: 钟凌云 (1971—), 女, 博士, 教授, 主要从事中药炮制作用机制及饮片工艺质量标准化研究。E-mail: ly1638163@163.com

制”；经苦寒的胆汁或盐制后，则更增强了黄连的苦寒之性，此寒者益寒，称为“从制”。

本课题组曾对酒制和胆汁制对黄连药性的影响进行研究，发现酒制黄连与胆汁制黄连药性的差异可通过大鼠代谢物生物效应的不同得以反映^[3]。姜汁为辛温之物，用其炮制苦寒的黄连与酒和吴茱萸炙黄连均属于“反制”范畴，萸黄连为“以热制寒”的经典药物，对其寒热药性进行过探索^[3]。因此本实验以姜汁作为炮制辅料，利用基于高效液相色谱-质谱联用（HPLC-MS/MS）技术的代谢物组学分析方法观察大鼠血样中代谢物的变化，并寻找能量代谢的生物标记物，考察黄连姜制前后的药性差异，以探讨姜汁对黄连药性的影响。

1 材料

1.1 药材与试剂

黄连，产地四川，购于江西樟树天齐堂中药饮片有限公司，经江西中医学院中药鉴定教研室付小梅副教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 干燥根茎。乙腈、甲醇，均为 HPLC 级，美国 Dima Technology Inc. 公司；甲酸，美国 Sigma-aldrich 公司；水为娃哈哈纯净水。

1.2 动物

SD 大鼠，雄性，清洁级，体质量 180~220 g，江西中医学院实验动物中心提供，许可证号 SCXK（赣）2011-0001。

1.3 仪器

台式低温高速冷冻离心机，德国 Sartorius 公司；Agilent 200 6410 TripleQuadrupole 质谱仪，美国 Agilent Technologies 公司。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 生黄连及姜黄连的制备 生黄连：取黄连原药材，除去杂质，抢水洗净，润透，切薄片，干燥，筛去碎屑，将药材置于粉碎机中粉碎，过 50 目筛，即得。姜黄连：取黄连饮片 100 g，加入姜汁 10 g 拌匀，稍闷润，待姜汁被吸尽后，置炒制容器内，使药材表面温度保持在 120 ℃左右，炒制 15 min 后取出晒凉，筛去碎屑，将药材置于粉碎机中粉碎，过 50 目筛，即得。

2.1.2 生黄连及姜黄连水煎液的制备 取适量的生黄连或姜黄连，加 10 倍量水，浸泡 60 min，煮沸 30 min，滤过，药渣再加 6 倍量水煎煮，煮沸 30 min，合并两次滤液，浓缩至生药 1 g/mL，4 ℃保存。

2.2 分组与给药

实验分成生黄连组、姜黄连组，每组 10 只。给药组大鼠给药前 3 d 正常给水、喂饲。黄连各组按 3 mL（约含生药 3 g）ig 给药 1 次，连续给药 29 d，期间常规喂饲、给水。

2.3 大鼠血样采集与处理

于给药第 1、8、15、22、29 天的给药后 3 h 眼眶采血，3 500 r/min 离心 15 min，取上清液，加 4 倍体积甲醇去蛋白，16 000 r/min 离心 10 min，0.22 μm 滤膜滤过，置于-4 ℃冰箱中，备用。

2.4 HPLC-MS/MS 分析

2.4.1 色谱条件^[5] 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse SB-C₁₈ 柱（416 mm×150 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）、0.1%甲酸（B），梯度洗脱（1.75~6.0 min，25%A；6.0~8.0 min，60%A；8.0~12.0 min，70%A；12.0~14.0 min，90%A；14.0~14.1 min，90%A；14.1 min，25%A），体积流量 0.4 mL/min，进样量 15 μL，柱温 35 ℃，运行 20 min。

2.4.2 质谱条件 离子源模式为 ESI 正离子模式；毛细管电压为 4 000 V；雾化器压力 17.9 kPa；干燥气体流量 8 L/min，干燥气温度 350 ℃；扫描方式为全扫描，质谱扫描范围为 *m/z*：100~1 000。

2.4.3 数据分析 血样母离子 *m/z* 及 abund 值以 Agilent Masshunter 软件进行峰识别，以 SQL Server 进行峰匹配，匹配后数据转化为 Excel 格式，进行模式识别。继而经匹配和归一化等计算过程，得到矩阵，将其导入 SMCA-P11.0 软件中进行主成分分析（PCA）和偏最小二乘法判别分析（PLS-DA）。

3 结果

3.1 PCA 分析给药时间对大鼠血样中内源性代谢物的影响

由图 1 可见，生黄连组和姜黄连组大鼠血样中内源性代谢物的浓度随给药时间的延长而发生变化。给药第 1 天，生黄连、姜黄连组大鼠血样中代谢物无明显差异，两组的点没有分开；给药第 8、15、22 天，2 组大鼠血样中代谢物出现距离差异。给药第 29 天，2 组大鼠血样中代谢物的点明显分开，距离最大，表明此时 2 组大鼠血液中内源性代谢物质的差异最大（图 2）。

3.2 大鼠血样中生物标记物的确定

利用 PLS-DA 计算重要性系数（VIP）。VIP 是反映变量对模型重要性的系数，VIP 值越大，变量对模型越重要，VIP>1 的变量被视为模型的重要变

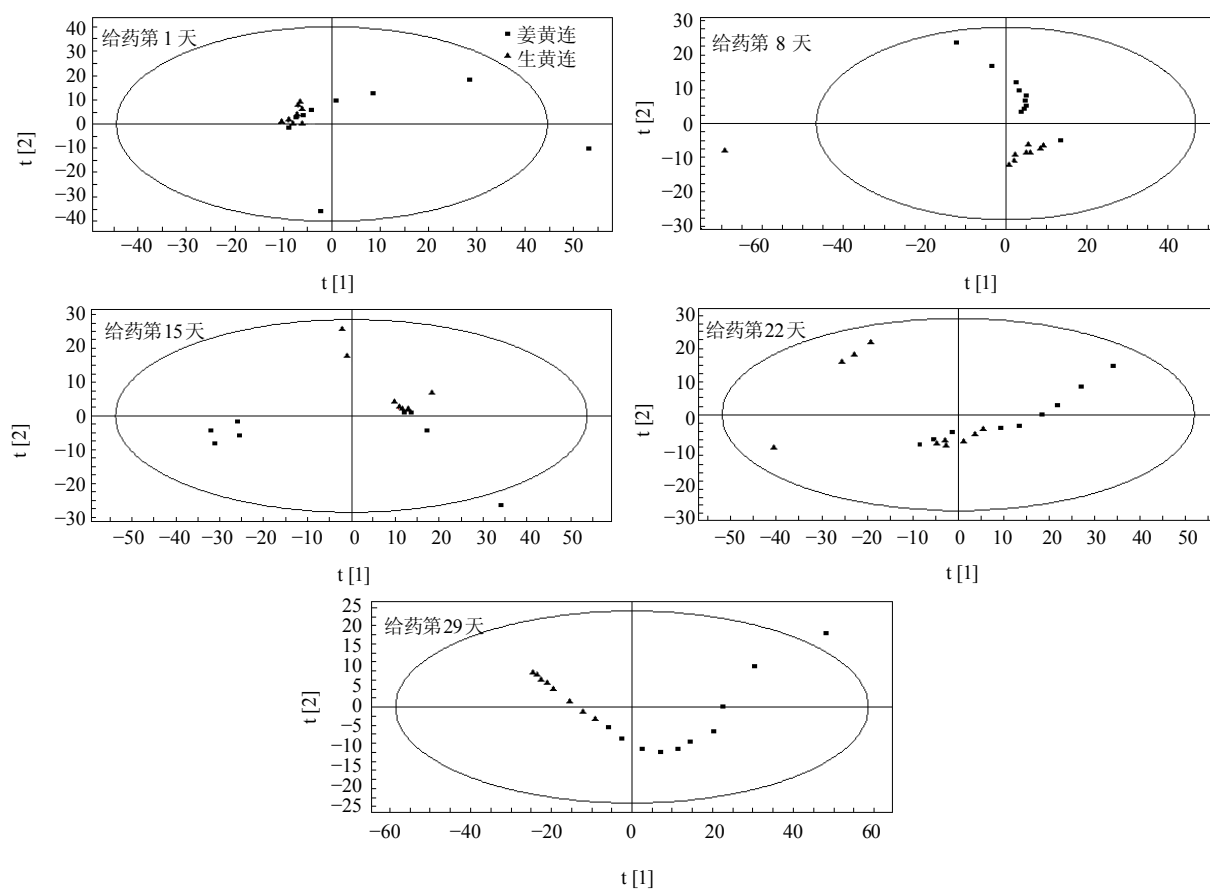


图 1 给药时间对大鼠血样中内源性代谢产物影响的 PCA 时间轨迹分析图

Fig. 1 PCA temporal trajectory analysis chart for effect of administration time on endogenous metabolites in blood of rats

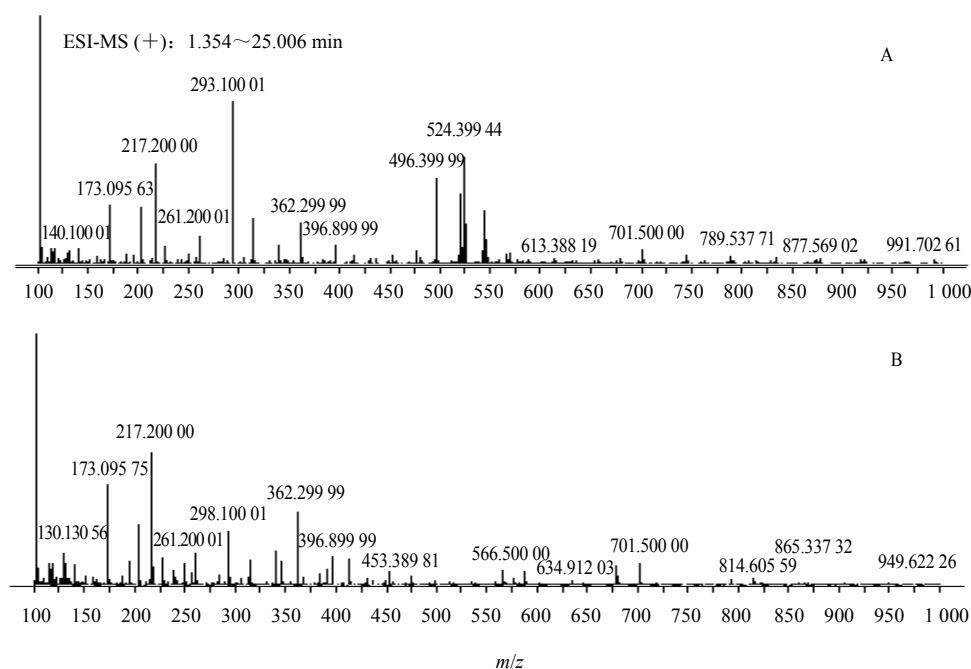


图 2 生黄连 (A) 和姜黄连 (B) 给药第 29 天大鼠血样中代谢产物质谱图

Fig. 2 MS-MS spectra of metabolites of UPCR (A) and GPCR (B) in blood of rats on day 29 after medication

量。生物标记物是能够代表性地反映生物体的生理病理变化或外界环境刺激的内源性物质,在PLS-DA模型上即是具有较好相关性的重要变量,根据VIP>1的变量为引起2组代谢物差异的生物标记物变量(m/z 值)的标准,通过计算VIP值,找出50个生物标记物。依据质量数,结合The Human Metabolome Database数据库检索,对照标准谱,比对出部分生物标记物(表1);其他生物标记物对应的化合物暂不确定,且这些生物标记物的结构确认有待进一步研究。

表1 大鼠给予生黄连和姜黄连后血样中部分生物标记物
Table 1 Some markers in blood of rats treated by UPCR and GPCR

m/z	标记物	标记物生化功能
116.10	L-脯氨酸	参与氨基酸代谢
118.20	L-缬氨酸	参与氨基酸代谢
120.20	L-苏氨酸	参与氨基酸代谢
135.36	苹果酸	参与三羧酸循环
175.40	顺乌头酸	参与三羧酸循环
217.20	N- α -乙酰基-L-精氨酸	参与氨基酸代谢
266.71	1,3-二磷酸甘油酸	参与糖酵解
301.20	13-顺维生素A酸	预防肿瘤
341.30	3-羟基喹啉	抗菌
385.30	S-腺苷高半胱氨酸	参与氨基酸代谢
473.30	山楂酸	抗炎、抗菌
525.50	2-脱氧葡萄糖	抗病毒、抗菌、抗癌

4 讨论

寒性中药经性味相反的热性辅料炮制后,自身的药性会发生变化。中药药性的变化又与其化学成分存在密切联系,但中药化学成分复杂多样,很难以其直接阐明中药的药性^[6]。代谢组学可以从有限的进入体内的药物化学成分经体内代谢过程和药效作用后的生物标记物入手,通过分析不同状态下生物标记物的变化规律,探讨中药药性。刘树明等^[7]的研究结果表明,代谢组学既可用于中药药效的研究,也可表征中药的寒热药性。

本实验运用代谢组学和现代药效学的方法,通过对生黄连和姜黄连给药后不同时间点大鼠血液样品进行HPLC-MS/MS分析,PCA处理数据,找出内源性标记物,探讨不同药性辅料炮制对同一药材药性产生的影响。

有研究表明,寒证时,机体中枢特别是丘脑下部兴奋性降低,交感神经紧张性低下或副交感神经偏亢,能量代谢及耗氧量降低。而热证时,交感-肾上腺髓质系统功能偏亢,而副交感神经紧张性低下,能量代谢及耗氧量增加^[8]。机体与能量有关的代谢主要是糖代谢过程和氨基酸代谢等。糖代谢中,产生三磷酸腺苷(ATP)的主要环节包括糖酵解和三羧酸循环。本实验结果表明,参与糖酵解的内源性物质为1,3-二磷酸甘油酸,参与三羧酸循环的内源性物质有顺乌头酸、延胡索酸、苹果酸,与生黄连组相比,这3种成分在姜黄连组呈增加趋势,提示相对于寒性较弱的姜黄连组,寒性较强的生黄连使大鼠能量代谢降低。在氨基酸代谢中,可通过脱氨作用、转氨作用、联合脱氨或脱羧作用,分解成 α -酮酸、胺类及二氧化碳,氨基酸分解所生成的 α -酮酸可以转变成糖、脂类或再合成某些非必需氨基酸,也可以经过三羧酸循环氧化成二氧化碳和水,并放出能量^[9-10]。本实验结果显示,在姜黄连组大鼠血样中,L-脯氨酸、L-缬氨酸、L-苏氨酸、N- α -乙酰基-L-精氨酸和S-腺苷高半胱氨酸较生黄连组呈增值趋势,也提示相对于寒性较弱的姜黄连,寒性较强的生黄连使大鼠能量代谢降低。这些结果与传统炮制理论中“姜制缓和黄连寒性”相一致。此外,黄连具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗溃疡、预防肿瘤和抑制中枢神经等多种药理作用,姜黄连组大鼠血样中山楂酸和2-脱氧葡萄糖等的量高于生黄连组,提示姜黄连的抗菌、抗病毒、抗炎作用可能更强。黄连姜制后中药药性和药效学改变的机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Nicholson J K, Connolly J, Lindon J C, *et al.* Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene-function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, (2): 153-161.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] Zhong L Y, Khan I A, Zhao J P, *et al.* Study on properties of processed *Rhizoma Coptidis* based on metabonomics [J]. *Adv Biomed Eng*, 2011, 3: 95-100.
- [4] 蒋俊, 高成林, 贾晓斌, 等. 黄黄连寒热药性研究概况及其研究思路与方法 [J]. *中草药*, 2009, 40(9): 1492-1495.
- [5] 徐国良, 马晓雪, 张启云, 等. 代谢组学评价黄连对大鼠药理作用的初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(14): 1845-1847.

- [6] 肖小河. 中药药性研究概况 [J]. 中草药, 2008, 39 (4): 481-484.
- [7] 刘树明, 卢 芳, 董培亮, 等. 基于代谢组学整体表征中药药性及性效关系 [J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(6): 1-5.
- [8] Marinova E K, Nikolova D B, Popova D N, *et al.* Suppression of experimental autoimmune tubulointerstitial nephritis in BALB/c mice by hetherine [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 48(1): 9-16.
- [9] Horikawa Y, Horikawa Y, Cox N J, *et al.* β -Cell transcription factors and diabetes no evidence for diabetes-associated mutations in the gene encoding the basic helix-loop-helix transcription factor neurogenin 4 (neurod 4) in Japanese patients with MODY [J]. *Diabetes*, 2000, 49(11): 1955-1957.
- [10] 赵稳兴, 王先远, 许志勤, 等. 运动小鼠心肌和骨骼肌对 BCAA 的摄取及对蛋白质合成的作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(2): 127-130.