

• 药理与临床 •

黄柏和黄连对小鼠机体代谢影响的比较研究

范玛莉^{1,2}, 张争争^{1,2}, 张晓琴³, 李震宇^{1*}, 秦雪梅^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 山西大学数学科学学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 比较黄连、黄柏对正常小鼠机体代谢的影响, 探讨二者对小鼠内源性代谢产物的影响规律。方法 采用基于¹H-NMR代谢组学技术结合多元统计分析手段, 比较两者对正常小鼠血清和肝脏内源性代谢物干预作用的差异。结果 给药后黄连和黄柏组小鼠体内源性代谢物的变化既有相似性也有差异性。与对照组比较, 给药后小鼠血清中脂类物质、3-羟基丁酸(3-HB)、N-乙酰化糖蛋白(NAG)、甘油、胆碱、α-葡萄糖、β-葡萄糖等代谢物及肝脏中谷氨酸、糖原、腺苷、谷胱甘肽、甜菜碱等代谢物的量均发生变化, 但两组的变化幅度不同。内源性代谢物的改变涉及机体的糖代谢、脂肪代谢等途径。结论 黄连、黄柏功效、药性既有相似性, 又有差异性。

关键词: 黄柏; 黄连; 代谢组学; ¹H-NMR; 多元统计分析; 代谢差异

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)19-2892-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.013

Comparison on effect between *Phellodendri Chinensis Cortex* and *Coptis Rhizoma* on organism metabolism in mice

FAN Ma-li^{1,2}, ZHANG Zheng-zheng^{1,2}, ZHANG Xiao-qin³, LI Zhen-yu¹, QIN Xue-mei¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. College of Mathematical Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To compare the effect of *Phellodendri Chinensis Cortex* (HB) and *Coptis Rhizoma* (HL) on organism metabolism in mice and explore the regulation of both HB and HL on the endogenous metabolism in mice. **Methods** ¹H-NMR, based on metabolomic approach coupled with multivariate statistical analysis method, was used to investigate the intervention differences between HB and HL on endogenous metabolites in the serum and liver of normal mice after drug administration. **Results** The changes of organism endogenous metabolites in both HB and HL treated groups were similar, but the differences also existed. Compared with the control group, the levels of 3-HB, NAG, glycerin, choline, α-glucose, and β-glucose in serum and those of glutamate, glycogen, adenosine, GSSG, betaine, and other metabolites in liver were changed in the two drug treated groups in a different change range. These changes of endogenous metabolites involved in glycometabolism, lipid metabolism, and other pathways. **Conclusion** This study provides a scientific basis for the comparative analysis of drug function between HB and HL, which has both the similarities and differences.

Key words: *Phellodendri Chinensis Cortex*; *Coptis Rhizoma*; metabolomics; ¹H-NMR; multivariate statistical analysis; metabolic difference

黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex* 来源于芸香科(Rutaceae)植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 性苦、寒, 具有清热燥湿、

泻火除蒸和解毒疗疮的功效, 临床上常用于治疗湿热泻痢、黄疸、带下、热淋、骨蒸劳热等症^[1]。黄连 *Coptis Rhizoma* 为毛茛科(Ranunculaceae)植物

收稿日期: 2015-02-06

基金项目: 山西省高等学校创新人才支持计划资助; 山西省科技创新重点团队(2013131015)

作者简介: 范玛莉(1990—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药代谢组学研究。E-mail: fanmlsxu@163.com

*通信作者 李震宇(1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药代谢组学研究。Tel: (0351)7018379 E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

秦雪梅(1964—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药质量标准及代谢组学研究。E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎, 性苦、寒, 具有清热燥湿、泻火解毒之功效, 主要用于湿热痞满、呕吐吞酸、泻痢、高热神昏、黄疸等症的治疗^[2]。黄柏、黄连均属于清热燥湿类中药, 具有相似的功效, 但又有所不同。黄连归心经, 善泻心火, 并有止呕之效, 具有广谱抗菌作用, 并能抑制病毒及各种致病性真菌。黄柏入肾经, 长于泻肾火、清虚热及下焦湿热, 对血小板有保护作用, 促进皮下渗血吸收, 其抗菌谱及抗菌效力和黄连相似, 黄柏还有利尿、利胆、降压、解热作用, 但效果不及黄连^[3-4]。此外, 黄柏还具有降血糖作用, 且效果比黄连好^[5]。也有研究利用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱仪 (UPLC-Q-TOF-MS) 对两者的化学成分进行了比较, 确定两者共有成分及各自的差异成分^[6]。

代谢组学是近年来发展的新型组学技术, 是一种整体性化学分析技术, 与突出整体效应的中医药思想具有天然的相似性。代谢组学具有不破坏内环境、整体性、灵敏度高的特点^[7], 可以通过内源性代谢物的变化, 研究外源物质对机体产生的宏观影响。因此, 本研究拟采用基于 ¹H-NMR 的代谢组学技术对黄柏、黄连干预后小鼠的血清和肝脏进行分析, 通过给药后内源性物质的变化从机体代谢组学的角度分析黄柏、黄连对机体代谢的影响差异。

1 材料与方法

1.1 药材

黄柏与黄连购自山西省太原市同仁堂药店, 经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定, 黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 标本保存在山西大学中医药现代研究中心。取黄连、黄柏饮片各 10 g, 分别加 10、8 倍量水回流提取 2 h, 合并 2 次水煎液, 浓缩至 40 mL, 分别得到生药 0.25 g/mL 的水煎液, 备用。

1.2 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠, 体质量 18~22 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号 SCXK (京) 2011-0012。动物自然昼夜节律光照, 适应 1 周后进行实验。

1.3 仪器与试剂

Bruker 600-MHz Avance III NMR Spectrometer

(德国布鲁克公司); TGL-16 高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); SPT-24 氮空吹扫浓缩仪 (北京斯珀特科技有限公司); 电子超声组织匀浆器 (宁波心之生物科技股份有限公司)。乙腈、蒸馏水、NMR 试剂重水 (D₂O, Norell, Landisville, 美国), 三甲基硅烷丙酸钠盐 (TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA)。

1.4 动物实验

动物适应 1 周后, 24 只小鼠称体质量, 随机分为 3 组, 包括对照组、黄柏 (生药 2.5 g/kg^[8]) 组和黄连 (生药 2.5 g/kg^[8]) 组。从实验第 1 天起, 连续 ig 给药 7 d, 对照组给予等量的蒸馏水。第 7 天给药后 1 h 摘眼球取血, 在 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 移至 EP 管中, 于 -80 °C 冰箱保存, 备用。解剖取小鼠肝脏, 用生理盐水稍加冲洗后吸干脏器表面水分, 移至冻存管中, 放入液氮中速冻, 然后置于 -80 °C 冰箱保存, 备用。

1.5 血清、肝脏核磁备样及测定条件

将血清样品在冰水中解冻, 精密吸取 250 μL 置于 EP 管中, 加入 350 μL D₂O, 涡旋 30 s, 于 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 500 μL 转移至 5 mm 核磁管中待测。

取解冻后的肝脏组织样本 200 mg 置于 2 mL EP 管中, 加入乙腈 0.5 mL 和蒸馏水 0.5 mL, 电子超声匀浆器匀浆 5 min, 取上清液置于 5 mm EP 管中, 氮气吹干后, 加入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 750 μL (内含 0.01% 的 TSP 作为化学位移参照), 移至 1.5 mL EP 管中离心, 离心后取上清液 600 μL 转移至 5 mm 核磁管中待测。

样品在 600 MHz NMR 仪上测定, 测定频率为 600.13 MHz, 扫描次数为 64, 谱宽 12 345.679 Hz, 傅里叶变换 0.188 Hz, 脉冲间隔 D1 为 1 s, 延迟时间为 5.0 s。血清样品采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列, 以衰减蛋白质和脂蛋白的宽峰; 肝脏样品采用 noesygpplrd 序列压制残余水信号。

1.6 ¹H-NMR 图谱处理

核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain) 进行处理。所有光谱进行手动相位、基线调整。血清图谱以肌酐的化学位移 δ 3.04 为标准进行化学位移校正, 以 δ 0.01 对化学位移区间 δ 0.86~8.50 进行分段积分, 其中 δ 4.67~5.21 (残余水峰) 不进行积分, 并将积分数据进行归一化, 导入 Excel 中;

肝脏图谱以 TSP 的化学位移 δ 0.00 为标准进行定标, δ 0.01 步长对化学位移区间 δ 0.65~8.90 进行分段积分, 其中 δ 4.68~5.18 (残余水峰) 不进行积分, 将积分数据与各自肝脏质量的比值作为归一化数据, 导入 Excel 中进行下一步多元统计分析。

1.7 统计学分析

将上述处理的积分数据导入 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Sweden) 软件中进行主成分分析 (PCA), 再用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) 找出样品间差异

代谢产物, 并在 SPSS 16.0 软件中对差异成分进行 One-way ANOVA 分析。

2 结果

2.1 血清与肝脏样品的 $^1\text{H-NMR}$ 分析

通过化学位移、耦合常数及峰型等核磁数据分析, 结合对照品和文献数据^[9-10], 从小鼠血清 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (图 1-A) 中指认出 46 种化合物, 肝脏 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 (图 1-B) 中指认出 44 种化合物, 包括氨基酸、有机酸、糖类等, 具体化学信息指认结果见表 1。

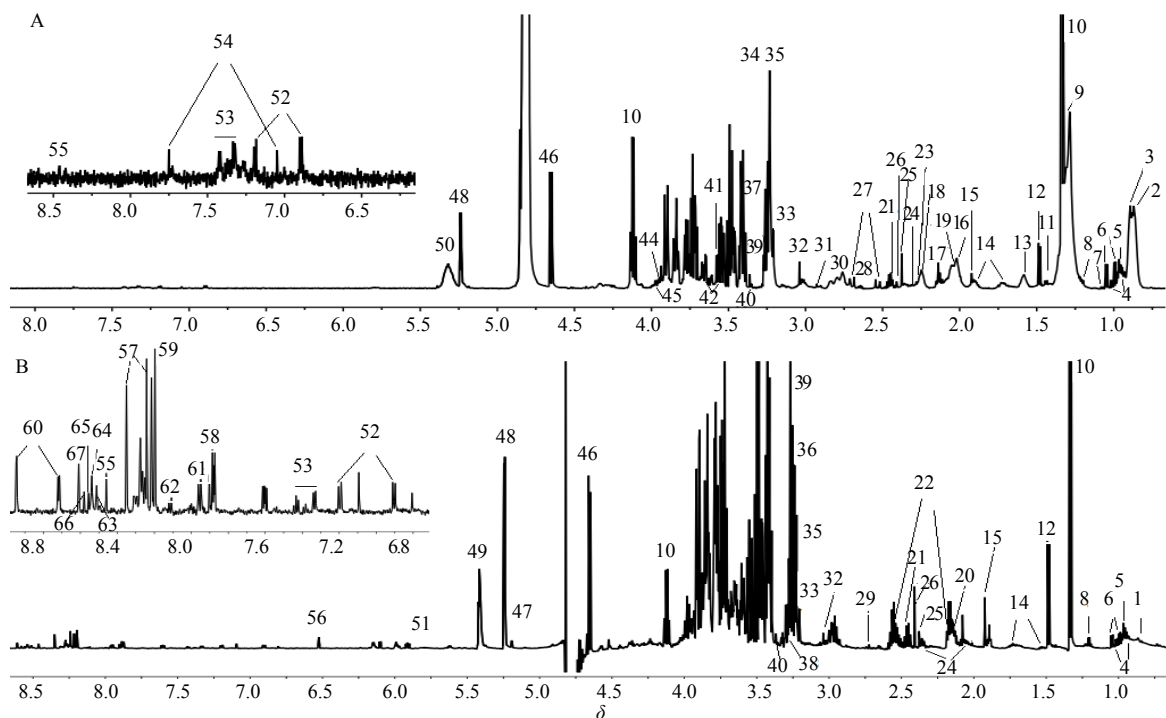


图 1 小鼠血清 (A) 与肝脏 (B) 样品的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 1 Typical $^1\text{H-NMR}$ spectra of serum (A) and liver (B) samples of mice

2.2 多元统计分析

2.2.1 PCA 分析 无监督的模式识别方法 PCA 分析可以反映数据的原始状态, 直观地显示不同样品之间的整体差异, 故先对 3 组样本进行 PCA 分析。以前 3 个主成分为坐标轴构建的 3D 得分散点图见图 2, 从血清的得分散点图 2-A (PC1: 58.9%, PC2: 16.2%, PC3: 8.8%) 和肝脏的得分散点图 2-B (PC1: 22.2%, PC2: 20.0%, PC3: 7.4%) 中可以看出, 对照组与给药组能明显分开, 说明药物对机体的血液和肝脏内源性代谢物的组成有明显影响; 黄连组和黄柏组样本部分重合, 但又有一定分离趋势, 这与黄柏与黄连具有相似但又不同的功效一致。PCA 分析不能忽略与研究目的无关的组内误差和随机

误差, 故进一步采用有监督的 OPLS-DA 分析确定黄柏与黄连给药后引起的内源性代谢物差异。

2.2.2 对照组与给药组的差异分析 黄柏与黄连具有相似的功效, 均为清热燥湿药, 故将其合为一组, 采用 OPLS-DA 分析比较给药组与对照组在内源性代谢产物上的差异。由于 OPLS-DA 分析必须以 PLS-DA 分析通过模型验证为基础, 排列实验结果显示模型有效可靠, 可进行下一步差异物的寻找。通过 S-plot 图 (图 3) 和 VIP 值 (大于 1) 相结合分析确定, 给药组小鼠血清中低密度脂蛋白 (LDL)、极低密度脂蛋白 (VLDL)、大部分脂类、3-羟基丁酸 (3-HB)、N-乙酰化糖蛋白 (NAG)、甘油磷脂酰胆碱 (GPC)、甘油、胆碱、 α -葡萄糖、 β -

表 1 小鼠血清与肝脏中主要化合物的 ¹H-NMR 数据归属

Table 1 ¹H-NMR assignments of major metabolites from serum and liver of mice

编号	名称	δ	样品	编号	名称	δ	样品
1	胆汁酸	0.74 (s)	L	36	磷酸乙醇胺	3.23 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz), 3.99 (m)	L
2	低密度脂蛋白	0.87 (m)	S	37	氧化三甲胺	3.26 (s)	S
3	极低密度脂蛋白	0.89 (m)	S	38	牛磺酸	3.27 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz)	L
4	异亮氨酸	0.94 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz), 1.02 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	S、L	39	甜菜碱	3.27 (s), 3.91 (s)	S、L
5	亮氨酸	0.96 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 0.97 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz)	S、L	40	鲨肌醇	3.36 (s)	S、L
6	缬氨酸	0.99 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.05 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 2.27 (m)	S、L	41	甘氨酸	3.56 (s)	S、L
7	异丁酸	1.08 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	S	42	甘油	3.56 (dd, <i>J</i> = 9.6, 3.6 Hz), 3.66 (dd, <i>J</i> = 11.4, 4.2 Hz)	S
8	3-羟基丁酸	1.20 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz), 2.31 (m), 2.41 (m)	S、L	43	肌醇	3.63 (s)	S
9	脂类物质 1	1.28 (m)	S	44	未知代谢物 2	3.95 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	S
10	乳酸	1.33 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 4.12 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz)	S、L	45	未知代谢物 3	3.97 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz)	S
11	未知代谢物 1	1.44 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	S	46	β-葡萄糖	4.65 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz)	S、L
12	丙氨酸	1.48 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 3.77 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz)	S、L	47	α-甘露糖	5.19 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz), 3.94 (m)	L
13	脂类物质 2	1.58 (m)	S	48	α-葡萄糖	5.24 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz)	S、L
14	赖氨酸	1.53 (m), 1.72 (m), 1.90 (m), 3.03 (t, <i>J</i> = 9.0 Hz), 3.77 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz)	S、L	49	糖原	5.41 (m)	L
15	乙酸	1.92 (s)	S、L	50	脂类物质 6	5.30 (m)	S
16	N-乙酰化糖蛋白	2.02 (s)	S	51	尿嘧啶	5.81 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz), 7.55 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	L
17	O-乙酰化糖蛋白	2.14 (s)	S	52	酪氨酸	6.90 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.19 (d, <i>J</i> = 4.2 Hz)	S、L
18	脂类物质 3	2.03 (m)	S	53	苯丙氨酸	7.32 (m), 7.42 (m)	S、L
19	脂类物质 4	2.23 (m)	S	54	组氨酸	7.04 (s), 7.75 (s)	S
20	蛋氨酸	2.14 (s), 2.64 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz), 3.85 (m)	L	55	甲酸	8.44 (s)	S、L
21	谷氨酰胺	2.15 (m), 2.44 (m), 3.77 (m)	S、L	56	富马酸	6.53 (s)	L
22	谷胱甘肽	2.17 (m), 2.54 (m), 2.95 (m), 3.25 (m), 2.98 (m)	L	57	腺苷	6.10 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 8.24(s), 8.35(s)	L
23	乙酰乙酸盐	2.28 (s)	S	58	黄嘌呤	7.88 (s)	L
24	谷氨酸	2.06 (m), 2.35 (m)	S、L	59	次黄嘌呤	8.20 (s), 8.22 (s)	L
25	丙酮酸	2.37 (s)	S、L	60	烟酰胺	7.60 (dd, <i>J</i> = 12.0, 7.2 Hz), 8.26 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz), 8.72 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 8.94 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz)	L
26	琥珀酸	2.41 (s)	S、L	61	尿苷一磷酸	7.96 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz), 5.96 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz), 5.97 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz)	L
27	柠檬酸	2.53 (d, <i>J</i> = 15.6 Hz), 2.70 (d, <i>J</i> = 16.2 Hz)	S	62	尿苷二磷酸	8.11 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz), 5.99 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	L
28	蛋氨酸	2.64 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz)	S	63	三磷酸肌苷	8.51 (d)	L
29	二甲胺	2.72 (s)	L	64	二磷酸腺苷	8.54 (s)	L
30	脂类物质 5	2.78 (m)	S	65	三磷酸腺苷	8.56 (s)	L
31	二甲基甘氨酸	2.93 (s)	S	66	肌酐一磷酸	8.58 (s)	L
32	肌酐	3.04 (s), 3.94 (s)	S、L	67	一磷酸腺苷	8.61 (s)	L
33	胆碱	3.21 (s), 3.51 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz), 4.05 (m)	S、L				
34	甘油磷脂酰胆碱	3.22 (s), 3.63 (m), 4.30 (m)	S、L				
35	磷酸胆碱	3.22(s), 3.61 (m), 4.21 (m)	S、L				

S-血清, L-肝脏

S-serum, L-liver

葡萄糖的量上升, 而乳酸、氧化三甲胺 (TMAO)、鲨肌醇的量下降。

采用相同方法对对照组与给药组肝脏提取物进行分析, 结果 (图 3-B) 显示给药组中谷氨酸、谷氨酰胺、糖原、腺苷的量升高, 而乳酸、谷胱甘肽 (GSSG)、GPC、甜菜碱、甘氨酸、鲨肌醇、β-葡萄糖、磷酸胆碱 (PC) 的量降低。

2.2.3 黄连组和黄柏组的差异分析 黄柏与黄连功效相似, 但仍有区别。黄柏、黄连组血清比较的

OPLS-DA 得分图 (图 4-A, $R^2=0.608$, $Q^2=0.849$, $P=0.002$ 7) 显示, 两者存在显著差异。通过 S-plot 图和 VIP 值分析, 可见黄柏组小鼠血清中 VLDL、乳酸、大部分脂质、甜菜碱、NAG 以及 α-葡萄糖的量较高, 而黄连组小鼠血清中 LDL、亮氨酸、乙酸、胆碱、甘氨酸、甘油、GPC 等物质的量较高。

黄柏组与黄连组小鼠肝脏的 OPLS-DA 得分散点图 (图 4-B, $R^2=0.691$, $Q^2=0.788$, $P=0.000$ 7) 显示, 两者同样具有明显差异。对相应的 S-plot 图

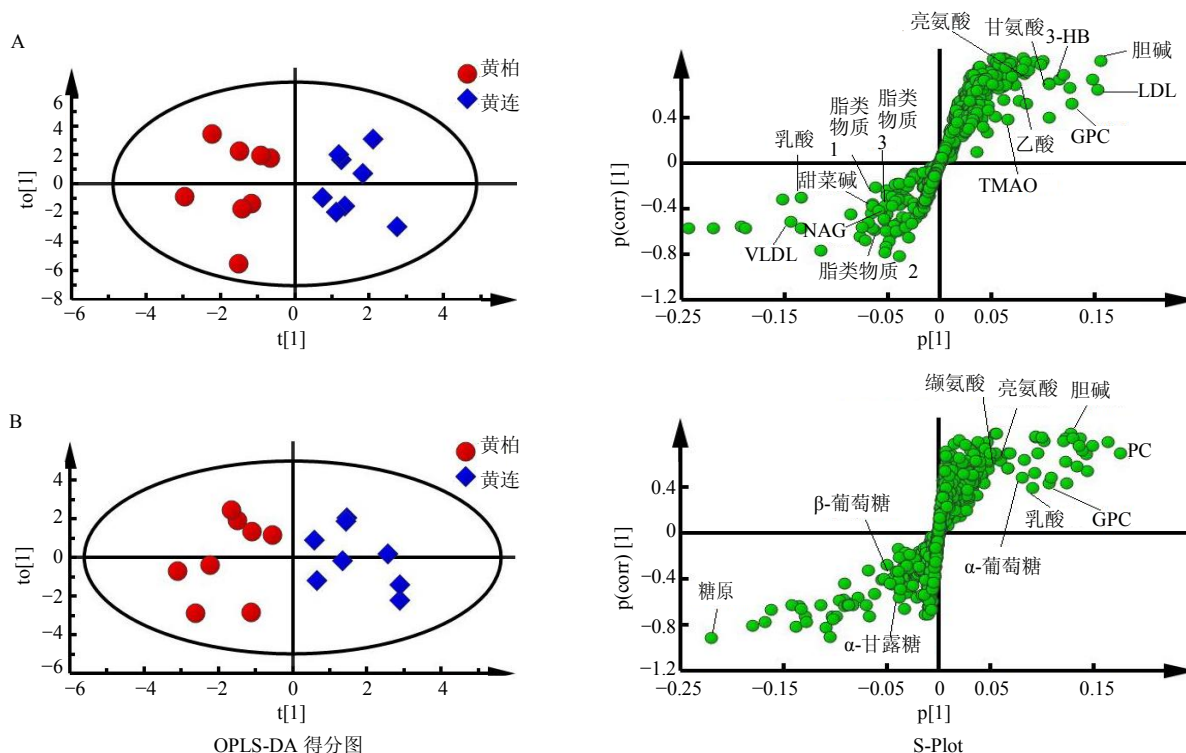


图4 黄柏组与黄连组的多元统计分析

Fig. 4 Multivariate statistical analysis in HB and HL groups

表2 对照组、黄柏组、黄连组小鼠血清代谢差异物积分面积单变量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Comparison on integral levels of metabolites from serum of mice among control, HB, and HL groups ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

编号	代谢物	δ_H	对照组	黄柏组	黄连组
1	LDL	0.87	1.05 ± 0.05	1.14 ± 0.06	$1.33 \pm 0.03^{*\Delta\Delta}$
2	VLDL	0.90	0.88 ± 0.06	1.10 ± 0.09	0.89 ± 0.05
3	亮氨酸	0.97	0.35 ± 0.01	0.32 ± 0.01	$0.37 \pm 0.01^{**}$
4	缬氨酸	0.99	0.23 ± 0.01	$0.18 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$	$0.22 \pm 0.01^{**}$
5	3-HB	1.21	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.01	$0.34 \pm 0.02^{**\Delta\Delta}$
6	脂类物质 1	1.28	1.17 ± 0.05	$1.72 \pm 0.11^{\Delta\Delta}$	$1.62 \pm 0.07^{\Delta\Delta}$
7	乳酸	1.34	4.70 ± 0.48	4.86 ± 0.13	4.55 ± 0.26
8	脂类物质 2	1.58	0.12 ± 0.01	$0.17 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$	$0.13 \pm 0.01^*$
9	乙酸	1.93	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	$0.20 \pm 0.01^{*\Delta\Delta}$
10	NAG	2.02	0.31 ± 0.01	$0.41 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$	$0.37 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$
11	脂类物质 3	2.03	0.33 ± 0.01	$0.40 \pm 0.03^{\Delta}$	$0.36 \pm 0.01^{\Delta}$
12	脂类物质 4	2.25	0.19 ± 0.01	$0.26 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$	$0.21 \pm 0.01^*$
13	胆碱	3.21	0.50 ± 0.03	0.49 ± 0.02	$0.64 \pm 0.02^{**\Delta\Delta}$
14	GPC	3.24	1.89 ± 0.18	2.13 ± 0.05	2.26 ± 0.07
15	TMAO	3.26	0.62 ± 0.05	$0.51 \pm 0.02^{\Delta}$	0.58 ± 0.03
16	甘氨酸	3.56	0.42 ± 0.02	0.38 ± 0.02	$0.46 \pm 0.02^*$
17	鲨肌醇	3.37	0.13 ± 0.01	$0.08 \pm 0.01^{\Delta}$	0.09 ± 0.01
18	甘油	3.67	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.01	$0.30 \pm 0.01^{**\Delta\Delta}$
19	α -葡萄糖	5.24	0.67 ± 0.07	0.76 ± 0.04	0.71 ± 0.03
20	β -葡萄糖	4.65	0.68 ± 0.05	0.76 ± 0.04	0.74 ± 0.04

与对照组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与黄柏组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$, 下同

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs HB group, same as below

表3 对照组、黄柏组、黄连组小鼠肝脏代谢差异物积分面积单变量分析 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Comparison on integral levels of metabolites from serum of mice among control, HB, and HL groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

编号	代谢物	δ_H	对照组	黄柏组	黄连组
1	亮氨酸	0.98	0.17±0.01	0.14±0.01 [△]	0.16±0.01
2	缬氨酸	0.99	0.14±0.01	0.11±0.01 [△]	0.13±0.01
3	乳酸	1.34	1.36±0.07	1.08±0.04 ^{△△}	1.22±0.09
4	丙氨酸	1.49	0.27±0.01	0.30±0.02	0.27±0.02
5	乙酸	1.93	0.17±0.01	0.15±0.01	0.19±0.01*
6	GSSG	2.17	0.43±0.02	0.39±0.03	0.37±0.01
7	谷氨酸	2.35	0.07±0.01	0.10±0.01 [△]	0.08±0.01*
8	谷氨酰胺	2.44	0.06±0.01	0.09±0.01	0.08±0.01
9	琥珀酸	2.41	0.17±0.02	0.15±0.02	0.12±0.02
10	肌酐	3.04	0.11±0.01	0.10±0.01 [△]	0.12±0.01*
11	胆碱	3.21	0.41±0.05	0.30±0.01	0.44±0.02**
12	GPC	3.23	1.43±0.13	0.94±0.03 ^{△△}	1.11±0.11
13	鲨肌醇	3.37	0.10±0.01	0.06±0.01 ^{△△}	0.07±0.01 ^{△△}
14	甘氨酸	3.57	0.53±0.01	0.46±0.01 ^{△△}	0.48±0.01 [△]
15	甜菜碱	3.27	2.54±0.18	2.13±0.08	2.12±0.13
16	β-葡萄糖	4.65	0.63±0.03	0.55±0.02	0.56±0.02
17	α-甘露糖	5.20	0.07±0.01	0.08±0.01	0.06±0.01**
18	α-葡萄糖	5.25	1.50±0.06	1.44±0.05	1.50±0.02
19	糖原	5.41	0.61±0.04	0.90±0.04 ^{△△}	0.56±0.06**
20	腺苷	8.36	0.03±0.01	0.05±0.01 ^{△△}	0.08±0.01 ^{**△△}
21	黄嘌呤	7.88	0.05±0.01	0.03±0.01 [△]	0.04±0.01
22	次黄嘌呤	8.20	0.11±0.01	0.07±0.01 ^{△△}	0.07±0.01 ^{△△}
23	AMP	8.61	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01

要储能物质,是血糖的重要来源。α-葡萄糖和 β-葡萄糖可在肝脏中合成糖原,糖原也可分解成葡萄糖,从而调节血糖浓度。本研究结果显示,给药后小鼠血清中乳酸的量降低,α-葡萄糖和 β-葡萄糖的量升高,而肝脏中 α-葡萄糖、β-葡萄糖的量降低,糖原的量升高,说明寒性药物对机体能量代谢具有抑制作用,因此机体发生反射性糖代谢增强,而无氧酵解途径减弱;黄柏组小鼠乳酸、α-葡萄糖、β-葡萄糖及糖原的量与黄连组小鼠相比虽无显著性差异,但黄柏组的量变化趋势大于黄连组,说明黄柏对小鼠机体糖代谢的影响可能大于黄连。

脂类物质是机体第二大能量提供物质,脂类物质分解为脂肪酸和甘油,脂肪酸通过 β-氧化生成乙酰辅酶 A,后者进入三羧酸循环最终成为水和二氧化碳,并在此过程中释放能量。胆碱是脂质代谢的重要产物之一,进一步的代谢涉及到 3 个不同的通路:一是胆碱被氧化为甜菜碱;二是胆碱通过肠道菌群转化为甲胺类(TMA、TMAO 和 DMA);三是胆碱被磷酸化生成 PC^[11]。其中,甜菜碱是一种机体必需的渗透压调节化合物,也是甲基蛋氨酸、半胱氨酸调节中的一个重要辅助因子^[12-13]。研究表明甜

菜碱还可以增加氮贮留促进脂肪动员和脂肪酸氧化^[14]。给予黄柏、黄连后,小鼠血清中脂类物质、胆碱的量升高,TMAO 的量下降,肝脏中胆碱的量上升、GPC、PC、甜菜碱的量下降,说明黄柏、黄连对脂质代谢、胆碱代谢均有影响。黄柏组小鼠血清中脂类物质、肝脏中胆碱、PC 的变化幅度大于黄连 ($P<0.05$),说明黄柏的对机体代谢的影响作用可能大于黄连。

谷胱甘肽是体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂,有还原型(GSH)和氧化型(GSSG)2 种形式,谷胱甘肽还原酶催化两型间的互变。本研究中,小鼠肝脏中 GSSG 的量降低,可能是 GSSG 在谷胱甘肽还原酶作用下,还原成 GSH, GSH 可促进体内自由基的清除,增强机体抗氧化能力,这与文献报道^[15]黄柏、黄连具有抗氧化作用结果一致。

黄嘌呤是次黄嘌呤被黄嘌呤氧化酶氧化的产物之一,机体内 90%次黄嘌呤通过补救途径再利用形成次黄嘌呤核苷酸(MP)^[16],而这些物质量的变化也引起了机体肝脏的变化^[17]。有研究报道,黄柏水提物和醇提物可清除次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统产生超阴离子和 Fenton 反应生成的羟自由基^[15],黄连

有一定的清除羟自由基的能力, 本研究中, 给予小鼠黄柏、黄连后, 肝脏中黄嘌呤与次黄嘌呤的量减少, 说明黄柏、黄连对黄嘌呤的代谢均有影响。

鲨肌醇是由肌醇异构产生, 肌醇和鲨肌醇水平在正常状态或某些病理条件下是平行的^[18], 这类胆碱类衍生物在肾功能紊乱的患者中常有异常变化^[19]。本研究中, 给药组小鼠血清和肝脏中鲨肌醇的量降低, 且黄柏组的变化程度大于黄连组, 这提示寒性药可能影响肾功能, 其作用机制需进一步研究。

3 讨论

本研究采用基于¹H-NMR的代谢组学技术对黄柏、黄连干预后的正常小鼠血清和肝脏进行了分析。结果显示, 与对照组相比, 黄柏、黄连干预后的小鼠血清和肝脏的代谢物发生明显变化, 内源性代谢物的改变涉及机体的糖代谢、脂肪代谢等途径。但两组小鼠血清和肝脏中内源性代谢物量的变化又有不同, 说明黄柏、黄连对体内代谢的影响存在区别。代谢组学结果与文献中报道两者功效的相似性和差异性是一致的。此外, 中医认为“黄连归心经、黄柏入肾经”, 将进一步对两者给药后小鼠的心脏和肾脏进行代谢组学分析, 进一步探讨分析探讨两者的功效差异。

代谢组学技术可以从机体整体代谢物组的角度反映外源性药物对机体代谢的宏观影响。很多中药材虽然化学成分不同, 但却具有相似的药性和功效, 本研究为这类中药的研究提供了一种新的方法。在代谢组学分析中, ¹H-NMR分析具有重现性好、备样简单、分析时间短、无破坏性等优点, 但其灵敏度低。而且, 体液和组织的化学成分非常复杂, 单一的核磁分析难以检测到体液和组织中的所有代谢产物, 因此后续的研究将进一步采用液质联用和气质联用等其他分析手段, 通过多种分析方法的集成联用, 达到全面表征的目的。

参考文献

- [1] 熊 敏. 黄柏化学成分分析及药理作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(14): 34-35.
- [2] 丁晓媚, 宁玉梅. 黄连的药理研究进展 [J]. 国际中医中药杂志, 2011, 33(2): 184-186.
- [3] 刘丽金. 试述黄芩, 黄连和黄柏的药效比较 [J]. 医学理论与实践, 2001, 14(7): 691-691.
- [4] 姜 云. 大黄, 黄芩, 黄连, 黄柏在现代临床医学中的运用 [J]. 天津中医药, 2008, 25(3): 215-216.

- [5] 王 萌. 常用中药川黄柏和黄连化学成分及生物活性比较研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [6] 李 媛. 黄柏, 黄连体内外成分对比研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2013.
- [7] 黄晓晨, 宿树兰, 郭建明, 等. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 147-153.
- [8] 陈 奇. 中药药效研究思路与方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [9] Shi X, Xiao C, Wang Y, *et al.* Gallic acid intake induces alterations to systems metabolism in rats [J]. *J Proteome Res*, 2012, 12(2): 991-1006.
- [10] Diao C, Zhao L, Guan M, *et al.* Systemic and characteristic metabolites in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats at different stages as revealed by a ¹H-NMR based metabonomic approach [J]. *Mol BioSyst*, 2014, 10(3): 686-693.
- [11] Dumas M E, Barton R H, Toye A, *et al.* Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(33): 12511-12516.
- [12] Kim H J, Kim J H, Noh S, *et al.* Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(2): 722-731.
- [13] Lever M, Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism [J]. *Clin biochem*, 2010, 43(9): 732-744.
- [14] Chao J, Huo T I, Cheng H Y, *et al.* Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet-induced NAFLD mice [J]. *PloS One*, 2014, 9(2): e96969.
- [15] 胡俊青, 胡 晓. 黄柏化学成分和药理作用的现代研究 [J]. 当代医学, 2009, 15(7): 139-141.
- [16] 陈 磊, 向 欢, 邢 婕, 等. 补中益气汤干预脾虚正模型大鼠脾脏¹H NMR代谢组学机制研究 [J]. 药学报, 2014, 49(9): 1320-1325.
- [17] 张友文, 张 丹, 孙 华. 次黄嘌呤脱氢酶的基本功能及作为药物靶点的应用 [J]. 药学报, 2014, 49(3): 285-292.
- [18] Viola A, Nicoli F, Denis B, *et al.* High cerebral scyllo-inositol: a new marker of brain metabolism disturbances induced by chronic alcoholism [J]. *Magn Reson Mater Phys Biol Med*, 2004, 17(1): 47-61.
- [19] Lin L, Huang Z Z, Gao Y, *et al.* LC-MS based serum metabonomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discover [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(3): 1396-1405.