

• 药理与临床 •

甘草水提取物干预 *D*-半乳糖致衰老大鼠的肝脏代谢组学研究赵凡凡^{1,2}, 李肖^{1,2}, 高丽¹, 秦雪梅¹, 杜冠华^{1,3}, 周玉枝^{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. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 研究甘草水提取物对 *D*-半乳糖致衰老大鼠的影响, 并初探其作用机制。**方法** 实验分为5组, 即对照组、模型组和甘草水提取物低、中、高剂量(1、5、10 g/kg)组; 模型组连续 ip 给予 *D*-半乳糖溶液(300 mg/kg) 5周, 对照组 ip 等量生理盐水, 甘草水提取物各组在造模同时 ig 给予相应剂量药物。实验结束后取各组大鼠肝脏组织, 采用苏木精-伊红(HE)染色观察其肝组织损伤程度, 测定血清天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)水平; 并测定肝组织中丙二醛(MDA)水平, 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)以及乙酰胆碱酯酶(AChE)活性。为了探究其作用机制, 对肝脏组织进行代谢组学分析。**结果** HE染色结果以及血清AST和ALT水平显示, 甘草水提取物(1 g/kg)能明显改善 *D*-半乳糖导致的大鼠肝损伤情况, 同时也能够显著降低衰老大鼠肝组织MDA ($P < 0.05$) 的量和AChE活性, 提高SOD和GSH-Px活性, 表明甘草水提取物(1 g/kg)具有明显的抗氧化和调节胆碱能系统的作用。肝脏组织代谢组学分析结果共找到13个潜在的生物标志物, 主要涉及4个代谢通路。**结论** 代谢组学方法为进一步研究 *D*-半乳糖致大鼠衰老和甘草水提取物延缓衰老的作用机制提供了科学的依据。

关键词: 甘草; *D*-半乳糖; 衰老; 代谢组学; 抗氧化; 胆碱能系统

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)17-3545-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.015

Liver metabolomics study of effects of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* extracts on *D*-galactose-induced rats

ZHAO Fan-fan^{1,2}, LI Xiao^{1,2}, GAO Li¹, QIN Xue-mei¹, DU Guan-hua^{1,3}, ZHOU Yu-zhi¹

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. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To study the effects of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* extracts on aging rats induced by *D*-galactose and explore its mechanism. **Methods** The rats were randomly divided into five groups, including control group, *D*-galactose group, and *D*-galactose combined with licorice extract of low, medium, and high dose group (respectively 1, 5, and 10 g/kg). The model rats were induced by injecting intraperitoneal *D*-galactose (300 mg/kg) for five weeks and the control group was received analogous saline. In the final week, the rats were executed and the liver tissue of each rat was used hematoxylin-eosin staining (HE staining) to observe the damage. The AST and ALT of serum were used to quantify the damage degree of liver. And then the MDA content, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and acetylcholinesterase activity in liver tissue were determined. **Results** The result of HE staining and the activity of AST and ALT showed that *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* extracts (1 g/kg) can significantly improve the damage of liver induced by *D*-galactose. Licorice extracts also can significantly reduce liver tissue of aged rats with MDA ($P < 0.05$) content and AChE activity, and increase SOD and GSH-Px activity. These results showed that *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* extracts (1 g/kg) with significant antioxidant and regulation of cholinergic system function. In order to further explore the mechanism of action of its effects, the liver tissue was analyzed by NMR metabolomics technique. A total of 13 potential biomarkers were found, which mainly involved in four metabolic pathways. **Conclusion** Metabolomics provides a scientific method for the further study on the mechanism of aging induced by *D*-galactose and the delayed aging of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* extracts.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; *D*-galactose; aging; metabolomics; anti-oxidant; cholinergic system

收稿日期: 2017-02-14

基金项目: 山西省科技基础条件平台建设项目(2014091022); 山西省科技攻关项目(20140313008-14); 山西省应用基础研究项目(201601D021164); 山西省高校科技创新项目(2016120)

作者简介: 赵凡凡, 硕士研究生, 主要从事中药药理及神经退行性疾病研究。E-mail: zhaoxiaofan1991@163.com

*通信作者 周玉枝 Tel: (0351)7019178 E-mail: zhouyuzhi@sxu.edu.cn

甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根茎，是一种补益中药，具有补脾益气、润肺止咳的功效。近年来，有研究表明甘草具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抗衰老等药理作用^[1]。也有研究表明在 *D*-半乳糖 (*D*-galactose, *D*-gal) 致大鼠衰老模型上甘草水提物和甘草总黄酮能够显著提高超氧化物歧化酶 (SOD) 活力，降低丙二醛 (MDA) 水平和清除自由基，具有显著的抗氧化作用^[2]。

衰老是由器官特异性的细胞蛋白质退化引起的。实验研究表明在年轻大鼠和衰老大鼠肝脏中的蛋白丰度有显著性差异，机体无法处理有害蛋白质是机体随着年龄衰老的主要原因，自由基损伤和抗氧化与衰老也有密切的关系。近年来甘草抗衰老研究已有文献报道^[3-5]，但其抗氧化、抗衰老的具体作用机制尚不清楚。在衰老模型中，使用较为广泛的是 *D*-gal 致衰老模型^[6]。*D*-gal 在高剂量时会被氧化成醛糖和过氧化氢，进一步形成氧自由基、超氧阴离子，可以与蛋白质和多肽在无酶参与的作用下形成稳定的共价加成化合物晚期糖基化终末产物 (AGEs)，使蛋白质和多肽的空间结构发生变化，从而导致其生理活性和生理功能发生变化^[7-8]。因此长时间给予大鼠 *D*-gal 能够使其产生类自然衰老特征，机体功能衰退^[9]。而肝脏是物质代谢的主要器官，在物质代谢中发挥重要作用。其中肝细胞数量随年龄增长而锐减，肝脏趋向硬变，肝脏质量明显下降。研究表明，随着年龄的增长，肝脏功能及其结构都会发生一系列的变化，使其对外界各种应激的反应能力和功能都会显著下降，加速肝脏病变的发生，降低机体抵抗力，从而使得多种肝脏疾病及其相关疾病在老年人中都具有高发病率。因此研究肝脏的生理功能和物质代谢对于探究衰老机制和进行药效评价有着极重要的作用和意义^[10]。

代谢组学是研究机体受到外界刺激时所引起的内源性代谢物的变化，是研究小分子代谢物在体内代谢过程中动态变化的一种新方法，是生物体系整体功能或状态的最终结果表现^[11-13]。通过利用其高通量、高灵敏度并与精确的现代分析技术相结合来动态跟踪有机体代谢物的整体组成，借助多元统计分析来辨识和解析被研究对象的生理、病理状态及其受环境影响等因素与代谢物变化之间的关系^[13-17]。本研究采用代谢组学方法分析甘草抗衰老的作用机制，通过分

析对照组、模型组和甘草水提物 (1、5、10 g/kg) 给药组大鼠肝组织核磁代谢谱的变化，探讨甘草水提物的抗衰老作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 甘草药材及其水提物的制备

称取整个实验所需甘草饮片 (产地内蒙古，批号 140201，经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎) 4.5 kg，粉碎，分别用 12 倍量的蒸馏水回流提取 2 次，每次 2 h，滤过，混合 2 次滤液，减压浓缩，冷冻干燥得粉末 (含甘草苷不少于 0.45%，含甘草酸不少于 1.8%)，保存于 4 °C 冰箱备用。

1.2 仪器与试剂

BRUKER AVANCEIII 600 MHz NMR spectrometer (600.13 MHz 质子共振频率，布鲁克核磁谱仪总部 600 MHz 核磁共振波谱仪，瑞士)；T-1000 电子天平 (常熟双杰测试仪器厂)；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)。三甲基硅烷丙酸钠盐 (TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc. 公司)；NMR 试剂重水 (Landisville 公司)；磷酸氢二钠/磷酸二氢钠 (分析纯，天津光复精细化工研究所)；MDA、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、乙酰胆碱酯酶 (AChE)、丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 (180±20) g，60 只随机分配到 12 个笼子里，并且可随意摄取食物和自来水。大鼠放置在一个通风良好，光照周期为 12 h 昼夜交替，温度为 (25±1) °C 和相对湿度 (50±10) % 的恒定环境中。

1.4 模型制备及给药

实验动物适应环境 1 周后，将大鼠随机分为 5 组，每组 12 只，分别为对照组、模型组和甘草水提物 (1、5、10 g/kg) 组。通过连续 ip *D*-gal 溶液 (300 mg/kg) 5 周造模，对照组 ip 等体积生理盐水，实验期间动物自由摄取水和食物。造模同时各给药组均 ig 给予相应剂量的甘草水提物，对照组和模型组 ig 给予相应剂量的自来水，每天 1 次，连续 5 周。在末次给药 24 h 后，用 4% 水合氯醛 (8 mL/kg) 麻醉大鼠，取出肝脏并称质量。每组取出 4 只大鼠的肝脏组织保存于 4% 多聚甲醛中固定，用于切片分析；其他的肝脏组织取

出后立刻用液氮猝灭, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.5 肝组织形态学观察

取出大鼠肝组织后立刻浸入 10% 中性福尔马林液中固定至少 48 h。取肝组织用自来水冲洗固定液, 用乙醇梯度脱水后, 对组织进行透明, 浸蜡后包埋。制成 $4\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ 切片, 经 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤片后采用常规的苏木精-伊红 (HE) 染色, 对切片进行光镜检查。

1.6 大鼠肝组织中 SOD、GSH-Px、AChE 活性及 MDA 水平测定

准确称取一定质量的大鼠肝组织, 按照质量体积比 1:9 加入生理盐水, 用玻璃匀浆器在冰浴条件下匀浆, 制成 10% 匀浆液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000\text{ r/min}$ 离心 20 min, 取上清液, 用 BCA 试剂盒测定其蛋白浓度, 按照相关试剂盒说明进行测定。

1.7 血清 ALT 和 AST 水平测定

在末次给药 24 h 后, 用 4% 水合氯醛 (8 mL/kg) 麻醉大鼠, 采用股动脉取血, 并将血液样本于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 500\text{ r/min}$ 离心 15 min, 取上清, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。测定时, 将血清样本在冰浴上复溶, 并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 定量取上清, 按照试剂盒说明操作。

1.8 代谢组学样品制备及测定

在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下解冻大鼠肝组织样本, 称取肝组织样本 200 mg 于 5 mL EP 管中, 加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇和 $300\text{ }\mu\text{L}$ 蒸馏水, 在冰浴条件下使用匀浆器匀浆 2 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $13\ 000\text{ r/min}$ 离心 20 min, 取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 上清液于 1.5 mL EP 管中, 空吹吹干。将吹干的样品溶解在 $600\text{ }\mu\text{L}$ 的混合磷酸盐缓冲液中 (0.2 mol/L 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠, $\text{pH}\ 7.4$, 含 0.01% 的 TSP), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $14\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 取上清 $550\text{ }\mu\text{L}$ 移进 5 mm 的核磁管中用于核磁共振分析。

1.9 $^1\text{H-NMR}$ 谱图数据处理与分析

肝核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 进行数据处理与采集。所有图谱相位和基线调整均采用手动进行调整。在核磁图谱处理过程中, 以 TSP 化学位移 $\delta\ 0.00$ 进行定标, 以 $\delta\ 0.01$ 对化学位移区间 $\delta\ 0.00\sim 9.00$ 进行分段积分, 其中 $\delta\ 4.60\sim 5.07$ 区间为残余水峰和尿素峰, 对此区间不进行积分; 将积分数据进行归一化处理后导入 Excel 中进行下一步多元统计分析。多元统计分析采用 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, 瑞士) 软件, 首先采用主成分分析 (PCA), 再用正交偏最小二乘法判别分析

(OPLS-DA), 和 S-plot 找出组间差异代谢物。

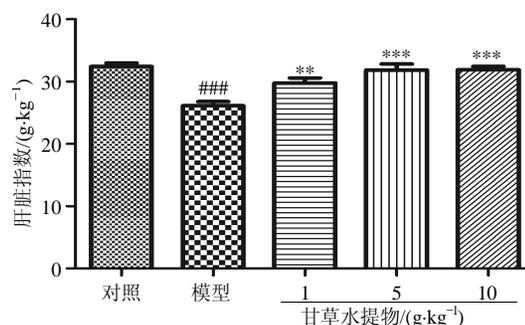
1.10 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理, 采用单因素方差分析及 t 检验对差异代谢产物进行统计学分析和比较。

2 结果

2.1 肝脏指数

模型组大鼠肝脏指数较对照组显著降低 ($P<0.001$), 表明长时间给予大鼠 $D\text{-gal}$ 溶液后造成其肝脏功能显著性异常; 当给予甘草水提取物后, 脏器指数趋于恢复 ($P<0.01$ 、 0.001), 说明甘草对于 $D\text{-gal}$ 造成的肝功能异常有保护作用。结果见图 1。



与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$
$P<0.001$ vs control group; ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

图 1 甘草水提取物对 $D\text{-gal}$ 致衰大鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Fig. 1 Effect of licorice extracts on liver index of rats with $D\text{-gal}$ induced aging ($\bar{x}\pm s, n=12$)

2.2 肝脏组织病理学观察

肝脏 HE 染色结果显示甘草水提取物对 $D\text{-gal}$ 导致的肝损伤具有保护作用 (图 2)。与对照组比较, $D\text{-gal}$ 导致了肝细胞结构损伤、变性和坏死。当给予甘草水提取物后, 对 $D\text{-gal}$ 导致的肝脏组织病理学改变具有显著的改善作用。

2.3 肝脏 SOD、GSH-Px、AChE 活性和 MDA 水平变化

与对照组相比, 模型组大鼠肝组织 SOD、GSH-Px 活性显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), AChE 活性和 MDA 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。当给予甘草水提取物后, 与模型组相比较 SOD 和 GSH-Px 活性显著升高 ($P<0.05$), AChE 活性显著降低 ($P<0.05$), MDA 水平显著性降低 ($P<0.01$)。结果表明甘草水提取物具有抗氧化作用, 并对胆碱能系统有显著性调节作用。结果见图 3。

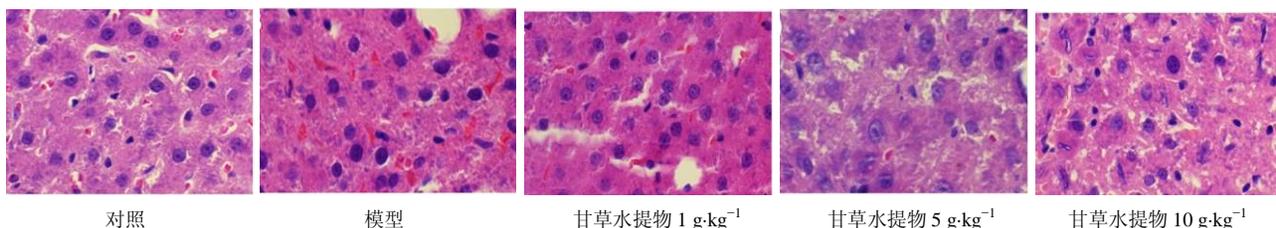
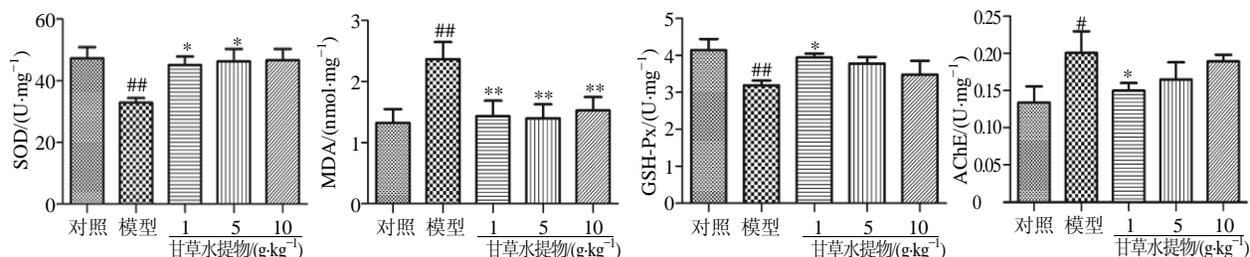


图 2 甘草水提取物对 *D*-gal 致衰老大鼠肝组织损伤的保护作用 (HE 染色, ×200)

Fig. 2 Protection of licorice extracts on liver tissue injury of rats with *D*-gal induced aging (HE staining, ×200)



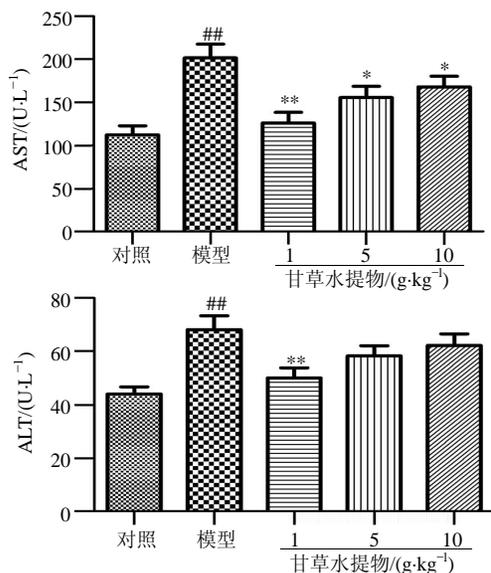
与对照组比较: [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01
[#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group

图 3 甘草水提取物对 *D*-gal 致衰老大鼠肝组织 SOD、GSH-Px、AChE 活力和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of licorice extracts on SOD, GSH-Px, AChE activities, and MDA level in liver tissue of rats with *D*-gal induced aging ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.4 血清 ALT 和 AST 水平变化

血清 ALT 和 AST 活性测定结果 (图 4) 显示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清 AST 与 ALT 水平显著性升高 (*P*<0.01), 表明 *D*-gal 诱导的衰老大鼠伴



与对照组比较: ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01
^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05 ^{**}*P*<0.01 vs model group

图 4 甘草水提取物对 *D*-gal 致衰老大鼠血清 AST 和 ALT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of licorice extracts on AST and ALT activities in serum of rats with *D*-gal induced aging ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

随着肝功能异常。当给予甘草水提取物后, 与模型组相比较 AST 和 ALT 水平显著降低 (*P*<0.05, 0.01); 表明甘草水提取物具有一定的肝保护作用。

2.5 肝脏代谢组学

2.5.1 肝脏核磁图谱分析 在 ¹H-NMR 图谱解析过程中, 依据化学位移、偶合常数和裂峰情况, 并且结合数据库 the Human Metabolome Database (HMDB, <http://www.hmdb.ca/>), Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB, <http://www.bmrwisc.edu/>) 和参考文献报道中的各代谢物数据对大鼠肝脏组织代谢产物进行指认, 结果见图 5 和表 1。

2.5.2 多元统计分析 为了探究 *D*-gal 是否对大鼠代谢产生影响, 首先选用 PCA 对核磁数据进行降维和简化数据结构, 结果显示 *D*-gal 导致模型组大鼠内源性代谢物发生了改变, 对照组与模型组 PCA 散点图能够明显分开 (图 6-A)。由于 PCA 是一种无监督的分析方法, 只是对数据主要模式和变化趋势有一个初步认识。因此为了探究对照组与模型组差异因素最相关的变量和寻找其潜在差异代谢物, 采用 OPLS-DA (图 6-B) 来寻找其分组的主要因素; 结果显示对照组与模型组能够明显分开。

为了进一步探究甘草水提取物是否对 *D*-gal 导致的代谢紊乱具有调节作用, 对所有组别进行 OPLS-DA (图 6-C), 结果显示对照组、模型组和各给药

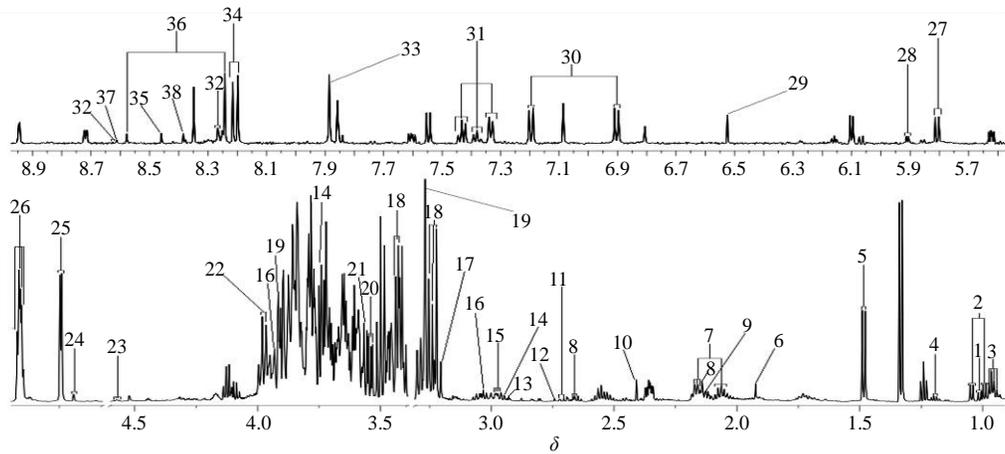


图5 对照组大鼠肝组织¹H-NMR 指认

Fig. 5 Representative ¹H-NMR spectra of liver samples obtained from control group rats

表1 大鼠肝组织主要代谢物¹H-NMR 核磁图谱数据归属

Table 1 ¹H-NMR assignments of major metabolites in liver of rats

峰号	代谢物	δ _H	官能团
1	异亮氨酸	1.02 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	δCH ₃ , γCH ₃ , γ'CH ₂
2	缬氨酸	1.00 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.05 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	γCH ₃ , γ'CH ₃
3	亮氨酸	0.96 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 0.97 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz)	δCH ₃ , δCH ₃
4	3-羟丁酸	1.20 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz)	γCH ₃ , αCH ₂ , βCH
5	丙氨酸	1.49 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	βCH ₃ , αCH
6	醋酸	1.93 (s)	CH ₃
7	谷氨酸	2.08 (m), 2.17 (m)	βCH ₂ , γCH ₂
8	蛋氨酸	2.14 (s), 2.64 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz)	CH ₃ , CH
9	丙酮	2.23 (s)	CH ₃
10	琥珀酸	2.41 (s)	CH ₂
11	柠檬酸	2.69 (d, <i>J</i> = 16.2 Hz)	CH ₂
12	二甲胺	2.74 (s)	CH ₃
13	三甲胺	2.88 (s)	CH ₃
14	二甲基甘氨酸	2.92 (s), 3.71 (s)	CH ₃
15	氧化型谷胱甘肽	2.98 (dd, <i>J</i> = 10.8, 6.6 Hz), 3.32 (dd, <i>J</i> = 10.8, 6.6 Hz)	12-CH ₂ , 12-CH ₂
16	肌酸	3.04 (s), 3.93 (s)	CH ₃ , CH ₂
17	磷脂酰胆碱	3.21 (s)	<i>N</i> (CH ₃) ₃ , OCH ₂ , <i>N</i> CH ₂
18	牛磺酸	3.25 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz), 3.43 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz)	-CH ₂ -S-, -CH ₂ -NH ₂
19	甜菜碱	3.27 (s), 3.91 (s)	<i>N</i> (CH ₃) ₃ , CH ₂
20	胆碱	3.53 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz), 4.07 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz)	OCH ₂ , NCH ₂ , <i>N</i> (CH ₃) ₃
21	甘氨酸	3.57 (s)	CH ₂
22	磷脂酰乙醇胺	3.99 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz)	
23	β-葡萄糖	4.66 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz)	1-CH
24	α-甘露糖	5.19 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz)	2-CH
25	α-葡萄糖	5.24 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz)	
26	糖原	3.60 (m), 5.41 (m)	2-CH, CH(OH)
27	尿嘧啶	5.81 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	5-CH
28	尿苷二磷酸	5.92 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	2-CH
29	富马酸	6.52 (s)	CH, CH ₃
30	酪氨酸	6.91 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.20 (d, <i>J</i> = 4.2 Hz)	3 or 5-CH, 2 or 6-CH
31	苯丙氨酸	7.33 (m), 7.38 (m), 7.43 (m)	2 or 6-CH, 3 or 5-CH
32	烟酸	7.50 (dd, <i>J</i> = 12.0, 7.2 Hz), 8.25 (d, <i>J</i> = 12 Hz), 8.62 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	2, 6-CH, 4-CH, 5-CH
33	黄嘌呤	7.89 (s)	CH
34	次黄嘌呤	8.20 (s), 8.22 (s)	7-CH, 2-CH
35	甲酸	8.46 (s)	CH
36	次黄嘌呤核苷酸	8.24 (s), 8.58 (s)	7-CH, 2-CH
37	二磷酸腺苷	8.27 (s)	7-CH
38	磷酸腺苷	8.61 (s)	2-CH, 7-CH

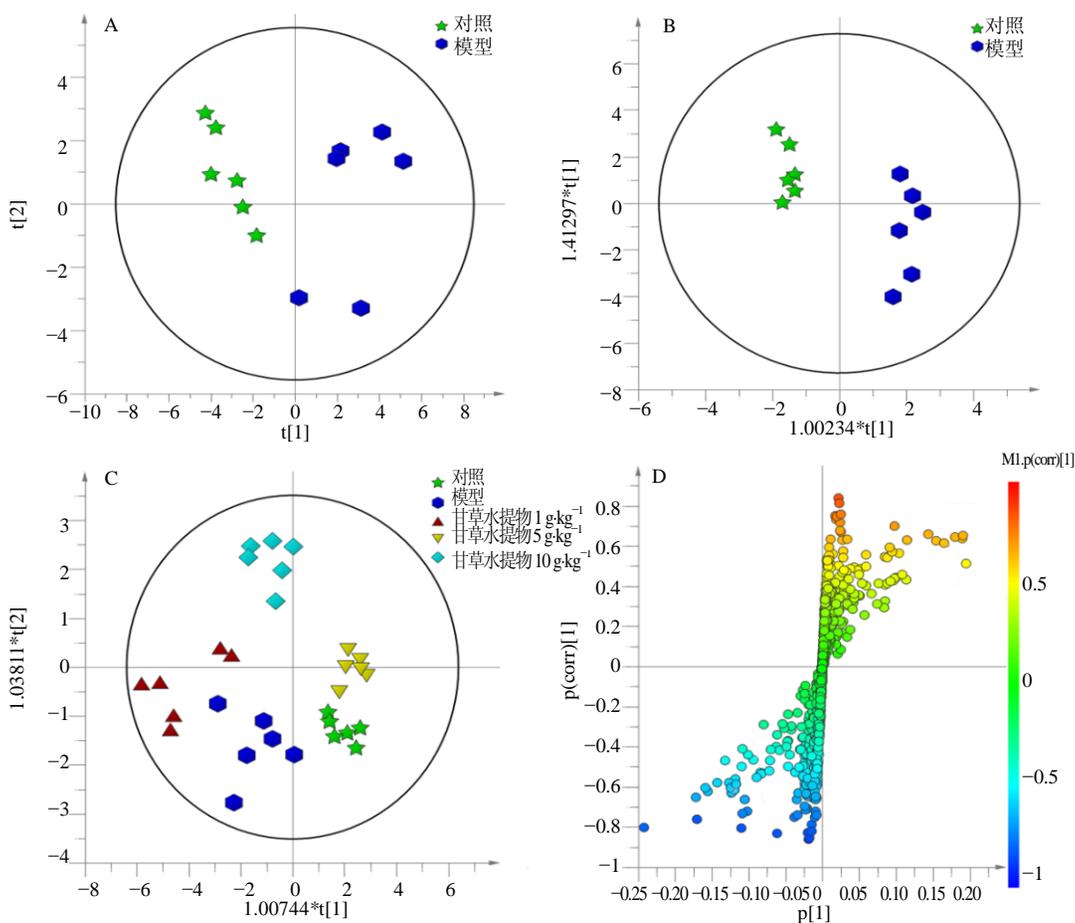


图 6 对照组和模型组大鼠肝组织 PCA 散点图 (A)、OPLS-DA 散点图 (B)、所有组 OPLS-DA 散点图 (C) 和 S-plots 得分图 (D)
 Fig. 6 PCA scores plots from liver: scores plots for model group vs control group (A), OPLS-DA scores plots for model group vs control group (B), OPLS-DA scores plots for all over group (C), and S-plots (D) respectively

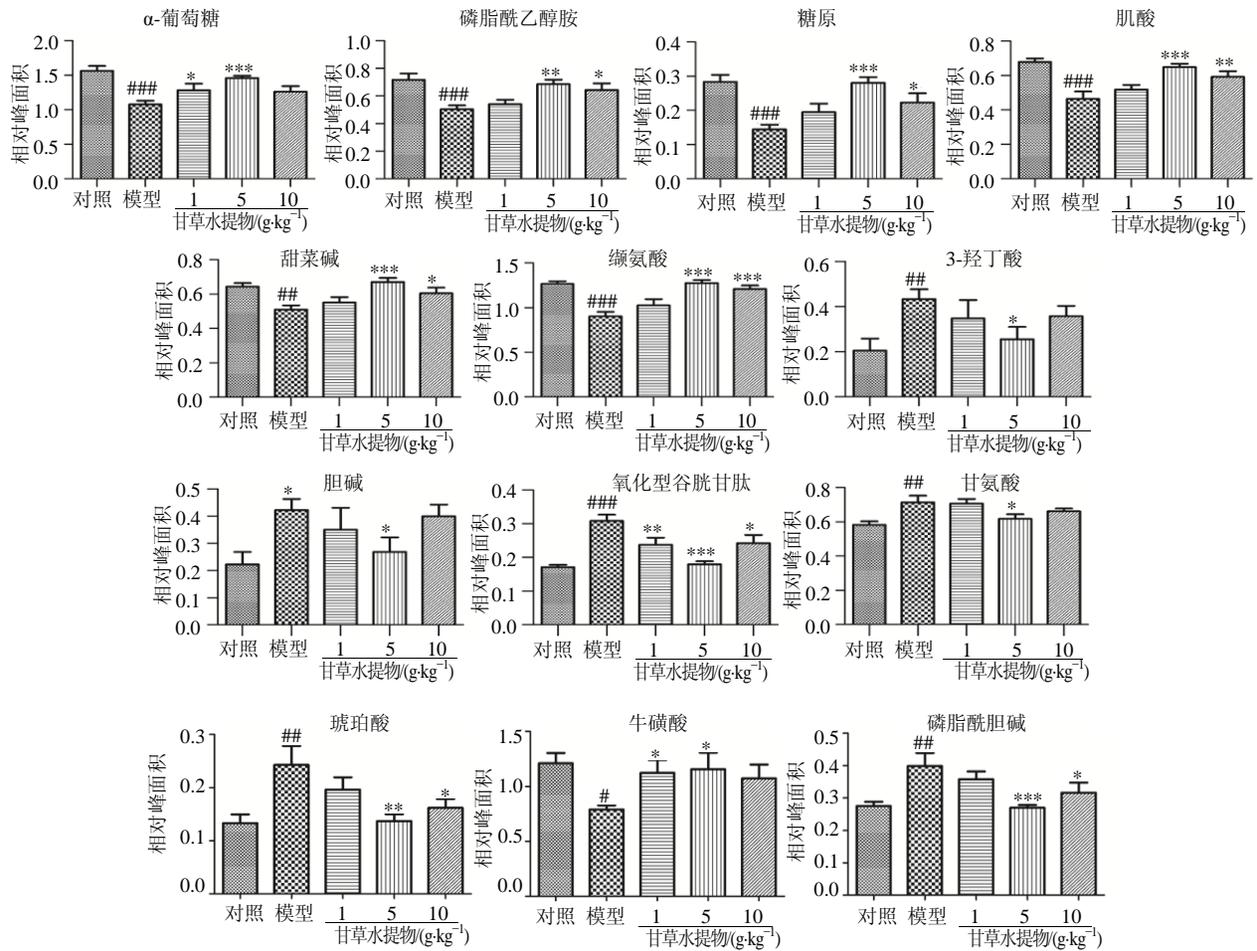
组之间都能最大程度分开，有效降低组内个体差异。为了寻找其潜在差异代谢物，本实验通过 S-plot (图 6-D) 和 VIP 值 (VIP>1) 寻找差异代谢物并对其进行 *t* 检验分析，共确定 13 个潜在生物标志物 (图 7)。

2.5.3 代谢通路分析 为研究 *D-gal* 导致大鼠衰老相关生物标志物所涉及的代谢途径和代谢物之间的关联性，对 13 个具有显著性差异的代谢物进行 MetPA 通路富集分析。将所有差异代谢物导入 MetPA (Metabo Analyst 3.0, <http://www.Metaboanalyst.ca>) 进行整合，寻找其关联性并筛选出和 *D-gal* 导致大鼠衰老最相关的代谢途径^[18-19]，结果如图 8 所示。其中横坐标 Pathway impact 表示其代谢通路的重要性值，纵坐标 $-\log P$ 表示代谢通路富集分析的显著性水平。本次分析中设定代谢通路的阈值为 0.10，当代谢通路影响值高于 0.1 时，该通路可被视为潜在的靶标代谢路径。分析结果表

明 *D-gal* 导致的肝组织代谢紊乱主要与以下代谢通路相关性最高 (impact>0.1): (1) 牛磺酸代谢; (2) 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成; (3) 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; (4) 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。

3 讨论

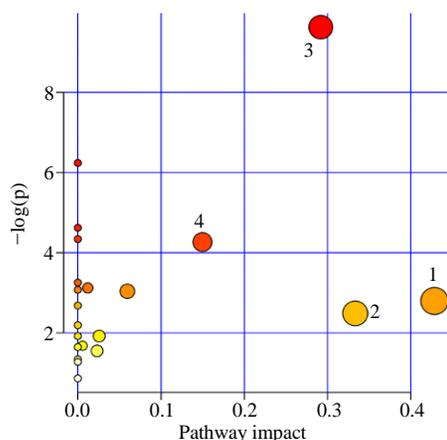
随着年龄的增长，机体功能会退行性退化和衰退，其中最主要的病理变化是学习记忆功能衰退和认知功能障碍，各种衰老相关的退行性疾病患病风险也会随着年龄的增长而增加^[20-22]。肝脏是机体最主要的代谢器官，其老化和萎缩导致其质量减少；有研究表明肝脏萎缩的主要原因是其功能退化进而导致器官被废用，长期的废用又进一步导致其质量减少。在本研究中，模型组脏器指数较对照组显著降低，而 AST 和 ALT 活性较对照组显著升高，表明肝脏功能降低。当给予甘草水提取物后脏器指数、AST 和 ALT 水平显著回调。晚期糖基化终末



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
 # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图7 各组肝组织中潜在差异代谢物相对峰面积比较

Fig. 7 Mean peak area of representative metabolites in liver of rats



1-牛磺酸代谢 2-缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成 3-甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 4-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢
 1-taurine and hypotaurine metabolism 2-biosynthesis of valine, leucine and isoleucine 3-glycine, serine and threonine metabolism 4-alanine, aspartic acid, and glutamic acid metabolism

图8 通路 MetPA 分析

Fig. 8 Summary diagram of pathway analysis with MetPA

产物是评价衰老的重要指标之一。有研究表明在 *D-gal* 致衰老大鼠肝组织中发现晚期糖基化终产物的量显著升高, 表明 *D-gal* 可加速肝细胞损伤与衰老。因此本实验采用 HE 染色来观察 *D-gal* 致衰老大鼠的肝组织形态学, 结果显示与对照组相比, 模型组大鼠肝组织呈现明显结构损伤、变性和肝细胞坏死^[13,23-24]。当给予甘草水提物后可以明显缓解 *D-gal* 导致的大鼠肝脏损伤。HE 染色从肝组织形态学分析表明给予甘草水提物 (1 g/kg) 确实具有保护作用。

有研究表明机体正常情况下处于一种氧化与抗氧化的动态平衡当中, 当机体处于氧化应激状态时就会引起机体损伤, 加速机体衰老^[25-26]。因此测定了肝组织的抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性以及 MDA 量的变化, 结果显示 *D-gal* 导致了 SOD 和 GSH-Px 活性下降以及 MDA 量升高, 机体处于氧

化应激状态,当给予甘草水提物后 SOD 和 GSH-Px 活性升高,MDA 量下降,结果表明甘草水提物具有显著的抗氧化效果。为了探究 *D-gal* 对胆碱能系统的影响,本实验测定了 AChE 活性,结果显示 *D-gal* 导致 AChE 活性显著升高,给予甘草水提物后 AChE 活性显著降低,表明甘草水提物对胆碱能系统紊乱也具有一定的调节作用。

为了进一步探究 *D-gal* 致衰老的作用机制,采用 $^1\text{H-NMR}$ 分析技术对肝组织进行了代谢组学分析,共找到 13 个差异代谢物,主要包括氨基酸类和有机酸类代谢物。与对照组相比,当给予 *D-gal* 后 α -葡萄糖、磷脂酰乙醇胺、糖原、牛磺酸、肌酸、甜菜碱和缬氨酸的量均显著降低,3-羟基丁酸、胆碱、谷氨酰胺、甘氨酸、琥珀酸和磷脂酰胆碱的量则较对照组显著升高,表明 *D-gal* 导致了肝组织代谢紊乱。给予甘草水提物后,各差异代谢物的量均被显著回调,表明甘草水提物对于肝组织代谢紊乱具有调节作用。

通过对差异代谢物进行通路分析发现,其主要涉及 4 条代谢通路:牛磺酸代谢;缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成;甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。牛磺酸不参与蛋白质组成和代谢,但是在肝脏和中枢神经系统等都具有极其重要的生理作用。牛磺酸对神经系统发育、学习记忆、脂质代谢和免疫功能以及维持细胞渗透压等都具有显著影响^[27]。与对照组相比较,当给予 *D-gal* 后模型组牛磺酸的量显著降低。结果表明长时间给予 *D-gal* 有可能会引起牛磺酸代谢紊乱,其病理原因可能是导致细胞渗透压失调,减少能量供给,加速细胞凋亡,进行使机体产生生理功能障碍,加速机体老化,其具体作用机制仍需进一步研究。

缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸为机体必需氨基酸,当给予大鼠 *D-gal* 溶液后,肝组织中缬氨酸的量与对照组相比显著下降,表明缬氨酸的生物利用率下降,模型组大鼠肝组织中缺乏缬氨酸,肝组织功能异常^[28]。给予甘草水提物后,肝组织中缬氨酸的量升高,表明甘草水提物能够提高机体对缬氨酸的吸收与利用。甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢与丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等在机体内也发挥着重要作用,主要是通过代谢合成自身需要的氨基酸和以及代谢产生能量和自身需要的物质^[10,29-30]。与对照组相比较,当长期给予 *D-gal* 后甘氨酸、苏氨酸

等的量显著升高,*D-gal* 对氨基酸代谢产生显著性影响。给予甘草水提物后氨基酸代谢趋于恢复到正常水平。

本研究表明甘草水提物(1 g/kg)对 *D-gal* 致大鼠衰老具有肝保护、抗氧化和抗衰老作用,其具体作用机制可能是通过牛磺酸代谢以及其他氨基酸的吸收与利用来发挥其作用。

参考文献

- [1] Kao T C, Wu C H, Yen G C. Bioactivity and potential health benefits of licorice [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(3): 542-553.
- [2] Ji S, Li Z, Song W, et al. Bioactive constituents of *Glycyrrhiza uralensis* (Licorice): Discovery of the effective components of a traditional herbal medicine [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(2): 281-292.
- [3] Lin Z, Gu J, Xiu J, et al. Traditional chinese medicine for senile dementia [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, doi: 10.1155/2012/692621.
- [4] Liu H, Wang J, Zhou W, et al. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: An example using licorice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(3): 773-793.
- [5] Huo H Z, Wang B, Liang Y K, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl_4 -induced oxidative damage in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(10): 6529-6543.
- [6] Kou X, Liu X, Chen X, et al. Ampelopsin attenuates brain aging of *D-gal*-induced rats through miR-34a-mediated SIRT1/mTOR signal pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(46): 74484-74495.
- [7] Haider S, Liaquat L, Shahzad S, et al. A high dose of short term exogenous *D-galactose* administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process [J]. *Life Sci*, 2015, 124(1): 110-119.
- [8] Gong Y S, Guo J, Hu K, et al. Ameliorative effect of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive impairment and brain aging induced by *D-galactose* [J]. *Exp Gerontol*, 2016, 74(2): 21-28.
- [9] Lu J, Zheng Y L, Wu D M, et al. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by *D-galactose* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(7): 1078-1090.
- [10] Saravanan R, Viswanathan P, Pugalendi K V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats [J]. *Life Sci*, 2006, 78(7): 713-718.
- [11] 常艳芬, 宫文霞, 郑艳红, 等. 黄芩醇提物干预 *D*-半乳

- 糖致衰老大鼠的尿液代谢组学研究 [J]. 药学学报, 2016, 51(1): 86-92.
- [12] Liu G, Fang T, Yan T, *et al.* Metabolomic strategy for the detection of metabolic effects of spermine supplementation in weaned rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(36): 9035-9042.
- [13] Chu H, Zhang A, Han Y, *et al.* Metabolomics approach to explore the effects of Kai-Xin-San on Alzheimer's disease using UPLC/ESI-Q-TOF mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 2016, 1015/1016(15): 50-61.
- [14] Lin X, Zhao L, Tang S, *et al.* Metabolic effects of basic fibroblast growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats: A ^1H NMR-based metabolomics investigation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36474.
- [15] Emwas A H, Roy R, Mckay R T, *et al.* Recommendations and standardization of biomarker quantification using NMR-based metabolomics with particular focus on urinary analysis [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(2): 360-373.
- [16] 陈佳佳, 李爱平, 张晓琴, 等. 基于核磁共振代谢组学的成分数据分析在中药评价中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3522-3526.
- [17] 郭慧, 崔扬, 王秋红, 等. 代谢组学技术在中药药性理论研究中的应用概述 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 363-368.
- [18] 闫明亮, 周玉枝, 李明花, 等. 基于 ^1H -NMR 代谢组学的黄芩醇提物延长果蝇寿命研究 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1714-1722.
- [19] 牛倩芸, 刘月涛, 李震宇, 等. 基于核磁代谢组学技术的阿霉素肝毒性研究 [J]. 药学学报, 2015, 50(6): 708-713.
- [20] Ntsapi C, Loos B. Caloric restriction and the precision-control of autophagy: A strategy for delaying neurodegenerative disease progression [J]. *Exp Gerontol*, 2016, 83: 97-111.
- [21] Zhu J, Mu X, Zeng J, *et al.* Ginsenoside Rg₁ prevents cognitive impairment and hippocampus senescence in a rat model of *D*-galactose-induced aging [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101291.
- [22] Gao J, Zhou R, You X, *et al.* Salidroside suppresses inflammation in a *D*-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease via SIRT1/NF- κ B pathway [J]. *Metabolic Brain Dis*, 2016, 31(4): 771-778.
- [23] Feng Y, Yu Y H, Wang S T, *et al.* Chlorogenic acid protects *D*-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(6): 1027-1034.
- [24] Sun C, Teng Y, Li G, *et al.* Metabonomics study of the protective effects of *Lonicera japonica* extract on acute liver injury in dimethylnitrosamine treated rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(1): 98-102.
- [25] Li W J, Nie S P, Peng X P, *et al.* Ganoderma atrum polysaccharide improves age-related oxidative stress and immune impairment in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(6): 1413-1418.
- [26] Li X, Chen Y, Shao S, *et al.* Oxidative stress induces the decline of brain EPO expression in aging rats [J]. *Exp Gerontol*, 2016, 83: 89-93.
- [27] Aydin A F, Coban J, Dogan-Ekici I, *et al.* Carnosine and taurine treatments diminished brain oxidative stress and apoptosis in *D*-galactose aging model [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(2): 337-345.
- [28] Lin T, Gu J, Huang C, *et al.* ^1H NMR-Based Analysis of Serum Metabolites in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertensive Rats [J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 5803031.
- [29] Benuck M, Banay-Schwartz M, Deguzman T, *et al.* Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats [J]. *Brain Res*, 1995, 678(1/2): 259-264.
- [30] Timmerman K L, Volpi E. Amino acid metabolism and regulatory effects in aging [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2008, 11(1): 45-49.