

基于绝对生长年限野生与移栽黄芪质量比较研究

高四云^{1,2,3}, 李科^{1,2,3*}, 秦雪梅^{1,2,3*}, 李震宇^{1,2,3}, 李爱平^{1,2,3}, 刘月涛^{1,2,3}, 杜冠华⁴, 张翔⁵

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

3. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

4. 中国医学科学院 北京协和医科大学药物研究所, 北京 100050

5. 美国路易斯维尔大学医学院, 路易斯维尔 40292

摘要: **目的** 比较野生与移栽黄芪化学成分及抗心衰药效差异。 **方法** 利用 HPLC-UV-ELSD 联用技术测定黄芪样本中黄酮及皂苷成分的含量; 采用 ip 阿霉素方法复制心衰大鼠模型, 比较野生芪与移栽芪对心衰大鼠传统药效指标及代谢组学指标的干预作用。 **结果** 野生芪中总黄酮、黄芪皂苷 I 及黄芪皂苷 III 含量显著高于移栽芪, 但总皂苷含量相当。药效学实验结果表明野生芪与移栽芪均能改善大鼠一般情况、组织病理学、心功能参数、血清生化指标及 B 型脑钠肽 (BNP) 水平; 但与模型组相比, 野生芪对心功能参数 [射血分数 (EF)、左室短轴缩短率 (FS) 和左室收缩末期内径 (LVIDs)]、生化指标肌酸激酶 (CK) 和血清 BNP 含量的干预作用优于移栽芪, 且表现出显著差异。主成分分析结果显示, 对照组和模型组的代谢轮廓明显区分, 并鉴定了 14 个与心衰相关的潜在生物标志物, 野生芪与移栽芪均能不同程度地回调其中 14 个标志物, 2-羟基异丁酸、谷氨酸、丙酮酸盐、甲酸盐代谢物在野生芪组中变化率较大。 **结论** 野生芪对心力衰竭大鼠的干预作用显著优于移栽芪, 可为黄芪精细化商品等级规格标准的建立、临床合理用药和制药企业分类选择黄芪原料提供科学依据。

关键词: 黄芪; 野生芪; 移栽芪; HPLC-UV-ELSD; ¹H-NMR; 质量评价; 心衰

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)10-2248-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.004

Quality comparison study between wild and cultivated *Astragali Radix* based on absolute growth years

GAO Si-yun^{1, 2, 3}, LI Ke^{1, 2, 3}, QIN Xue-mei^{1, 2, 3}, LI Zhen-yu^{1, 2, 3}, LI Ai-ping^{1, 2, 3}, LIU Yue-tao^{1, 2, 3}, DU Guan-hua⁴, ZHANG Xiang⁵

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

2. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Shanxi Province, Taiyuan 030006, China

3. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

5. Medical College, University of Louisville, Louisville 40201, USA

Abstract: Objective To compare the chemical composition and the pharmaceutical effect of anti-heart failure of wild commodity *Astragali Radix* (WAR) and cultivated *Astragali Radix* (CAR). **Methods** The contents of flavonoids and saponins in *Astragali Radix* samples were determined by HPLC-UV-ELSD. The intervention effects of wild commodity and cultivated *Astragali Radix* on traditional efficacy index and metabolomics were compared in rat model with heart failure induced by adriamycin. **Results** The contents of total flavonoids, saponin I, and saponin III in WAR were significantly higher than those in CAR, but the content of total saponins was the equivalent. Pharmacodynamics experimental results showed that both WAR and CAR could improve the general situation in rats, histopathology, cardiac function parameters, serum biochemical indicators, and BNP. However, compared with the model group, the intervention effects of the WAR on cardiac function parameters (EF, FS, and LVIDs), biochemical markers (CK) and

收稿日期: 2018-01-14

基金项目: 山西省优秀人才培养计划项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目 (2014ZD0401)

***通信作者** 李科 Tel/Fax: (0351)7011202 E-mail: like@sxu.edu.cn

秦雪梅 Tel/Fax: (0351)7011505 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

serum BNP content were superior to the CAR, and showed significant differences. The principal component analysis showed that the metabolic profiles of the normal control group and the model group were clearly distinguished. A total of 14 potential biomarkers associated with heart failure were identified, which could be adjusted to varying degrees in WAR and CAR, of which 2-hydroxyisobutyric acid, acetone, pyruvate, and formate were significantly changed in the WAR group. **Conclusion** In this study, the intervention of WAR in heart failure rats was significantly better than that of CAR, which provided a scientific basis for the establishment of specification grading, the clinical rational drugs use, and the classification of *Astragali Radix* by pharmaceutical companies for *Astragali Radix*.

Key words: *Astragali Radix*; wild *Astragali Radix*; cultivated *Astragali Radix*; HPLC-UV-ELSD; $^1\text{H-NMR}$; quality evaluation; heart failure

《中国药典》规定黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1-2]。目前蒙古黄芪的商品存在两种生长模式,一种为分布在恒山山脉及其周边地区的野生或仿野生黄芪(以下简称野生芪),另一种为以甘肃、内蒙古为主,而甘肃产量最大的栽培黄芪^[3](以下简称移栽芪)。

文献调研^[4-8]及实验室前期研究^[9]结果表明目前商品规格等级标准(直径)和质量评控指标并不能体现黄芪药材的质量优劣。移栽芪的化学成分组成与野生芪相似,但含量有较大差异^[10]。目前研究均未将准确生长年限野生芪与移栽芪化学成分含量差异和药效差异及差异程度进行比较,课题组前期建立以生长轮数目为依据的黄芪根分段方法^[11]。研究结果表明不同年限黄芪根去掉空心部分处生长轮数目与黄芪实际种植年限一致,同一黄芪根从顶端无空心部分开始至根尖生长轮数目逐渐递减,且横切面直径差为 0.3 cm 左右,生长轮数目相差 1。以此为依据,获得绝对生长年限为 4 年的野生芪根段,利用 HPLC-UV-ELSD 同时测定方法,阐明野生芪和移栽芪中 12 种指标成分的对对应关系,找到黄酮类和皂苷类成分在 2 种黄芪中的积累规律。

临床药效是药材的根本属性,药效是药材质量评价的“金指标”。众多研究者提出建立以药效为核心的药材评价模式更为可靠。移栽芪的药效是否能与野生芪相当,一直是中医药行业关注的问题^[12]。抗疲劳^[13]与免疫药效^[14]实验结果显示移栽芪的药效强度不如野生芪。根据已有研究报道^[15]黄芪黄酮类、皂苷类物质具有心血管保护、抗心衰等功效,因此以直观反映药材品质的生物效应抗心力衰竭为药效指标来评价野生芪和移栽芪。本研究采用阿霉素致大鼠心力衰竭模型,对野生芪与移栽芪在抗心衰方面的药效强度进行比较。以药效学的经典指标

超声心动图、心脏组织病理切片、心衰定量标志物脑钠肽(BNP)水平、生化指标血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)并结合核磁代谢组学技术来评价野生芪和移栽芪抗心衰的药效差异及差异程度。基于药效的黄芪药材质量评价,将药材外观数量特征与化学和生物学效应关联分析,是提高用药有效性和准确性,保存和促进优质道地黄芪种质资源的根本。

1 材料

1.1 药材

野生芪由课题小组于 2016 年 9 月底前往山西浑源县泽青芪业公司规范化种植基地亲自采挖,经年限鉴别后获得野生芪根段;移栽芪购自甘肃陇西,二者均经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 的干燥根,样品均保存于山西大学中医药现代研究中心中药材冷库。

1.2 仪器与试剂

Vivid-7Pro 超声诊断扫描仪(GE 挪威威曼公司); R1002B 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司); Sartorius BSA124S 分析天平(德国 Sartorius 公司); DQ-103/104 台式方形中药切片机(温岭市林大机械有限公司); Prime30 全自动生化分析仪(Thermo scientific 公司); DNM-9602 酶标仪(北京普朗新技术有限公司); BNP 酶联免疫吸附剂盒(批号 201706, Andydene 公司); Bruker 600 MHz Avance III NMR 谱仪(德国布鲁克公司); 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); 漩涡混合器 XW-80A(上海精科实业有限公司); TGL-16 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)。乙腈、氯化钠注射液、NMR 试剂重水(Norell, Landisville, 美国); $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (天津市光复精

细化工研究所); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (天津市致远化学试剂有限公司); 三甲基硅烷丙酸钠盐 (TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA)。阿霉素 (注射用盐酸多柔比星, 山西普德药业股份有限公司, 批号 02160904); 地高辛片 (上海信谊药厂有限公司, 批号 02160102)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 由北京维多利亚实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号 SCXK (京) 2017-0012。动物在 (23.0 ± 1.5) $^{\circ}\text{C}$, (45 ± 15) %湿度条件下适应 1 周后进行实验。

2 方法

2.1 黄芪中 12 种成分的定量测定

精密称取每批样品各 6 份, 黄芪中 12 种成分含量测定方法参照本课题组前期建立的方法^[10]。

2.2 黄芪水提物制备

取野生芪和移栽芪经切片机切片后浸泡 4 h, 加 10 倍量的水回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 滤过, 合并上清, 浓缩, 将浓缩后的浸膏用蒸馏水稀释至生药质量浓度 1 g/mL, 置于 -20°C 冰箱保存备用。野生芪水提物中含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 7.71%、黄芪甲苷 9.44%; 移栽芪水提物中含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 4.99%、黄芪甲苷 9.20%。

2.3 心衰大鼠模型的制备及实验分组

大鼠适应 1 周后进行模型制备。50 只大鼠称体质量, 随机分为 5 组, 分别为对照组、模型组、地高辛组、移栽芪组、野生芪组, 每组 10 只大鼠。从实验第 1 天起, 模型组和各药物干预组 ip 阿霉素, 给药方案为第 1、3 天 1 mg/kg, 第 5、7 天 2 mg/kg, 第 9、11 天 3 mg/kg, 阿霉素累积给药量为 12 mg/kg。对照组 ip 给予等体积氯化钠注射液。造模同时各药物干预组分别 ig 给药, 地高辛组剂量为 0.03 mg/kg、黄芪药物干预组剂量为生药量 7.5 g/kg^[16]。对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续给药 11 d。

2.4 超声心动图检测

阿霉素末次给药 48 h 后, 4% 水合氯醛 (8 mL/kg) 麻醉大鼠, 大鼠胸部备皮, 行超声心动图检查。在取得清晰的二维图像后, 将取样线垂直于室间隔及左室后壁, 行 M 型超声心动图测定, 测量收缩末期室间隔厚度 (IVSs)、舒张末期室间隔厚度 (IVSd)、左室收缩末期内径 (LVIDs)、左室舒张末期内径 (LVIDd)、收缩末期左室后壁厚度

(LVPWs) 和舒张末期左室后壁厚度 (LVPWd) 的数据, 并利用心功能计算软件, 获得射血分数 (EF) 及左室短轴缩短率 (FS) 的报告单。

2.5 血清样本收集及处理

超声心动图检查后, 大鼠股动脉采血, 离心 (4°C 、3 500 r/min、15 min), 取上清液 (血清) 分装, 置于 -80°C 保存备用。

2.6 血清生化指标的测定

各组随机取 8 只动物的血清采用全自动生化分析仪检测 CK、LDH, 同样取 8 只动物的血清采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测试剂盒测定血清 BNP 的值。

2.7 ^1H -NMR 样品的制备

用移液枪 (1 000 μL) 吸取血清样品 450 μL 置于 1.5 mL EP 管中, 加入 350 μL D_2O , 涡旋 30 s, 使其充分混匀, 离心 (4°C 、13 000 r/min、20 min), 取上清液 600 μL 转移至内径 5 mm 的核磁管中待测。

2.8 ^1H -NMR 测定条件

样品在 25°C 下于 600 MHz NMR 仪采集数据, 采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列, 扫描次数为 64, 谱宽 12 345.7 Hz, 脉冲时间 14 s, 采样时间 2.654 s, 弛豫时间 1.0 s, 采样数据点 65 536, FID 分辨率 0.188 Hz, 采样间隔 40.5 s。于 600 MHz NMR 仪上进行 ^1H -NMR 测定。

2.9 ^1H -NMR 图谱处理

核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 进行手动相位、基线调整, 以肌酐的化学位移 δ 3.04 为标准, 以 δ 0.01 对化学位移区间 δ 0.50~8.50 进行分段积分, 去除图谱的残余水峰 (δ 4.66~5.10), 以峰面积进行归一化。

2.10 统计学分析

将 NMR 的分段积分数据及 HPLC-UV-ELSD 测定结果导入 SIMCA-P13.0 (Umetrics, umea, 瑞典) 软件偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)。S-plot 对核磁峰进行指认, 根据 VIP 值 >1 筛选差异化合物; 将 NMR 中指认的初级代谢物峰面积与 HPLC 检测的次级代谢物量导入 SPSS 16.0 中进行相关分析; 对 NMR 和 HPLC-UV-ELSD 寻找出来的差异代谢物用 SPSS 16.0 进行数据统计分析。野生芪与移栽芪间显著性差异比较采用独立样本 t 检验。

3 结果与分析

3.1 野生芪与移栽芪 12 种成分分析

定量测定结果(图 1)显示,野生芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、紫檀烷和异黄烷这 4 种黄酮类成分含量明显高于移栽芪;皂苷类成分黄芪皂苷 I、III 的含量均高于移栽芪;差异显著($P<0.05$ 、 0.01)。移栽芪中黄芪皂苷 IV 的含量较野生芪高,但由于组内差异的存在导致组间差异无统计学意义。

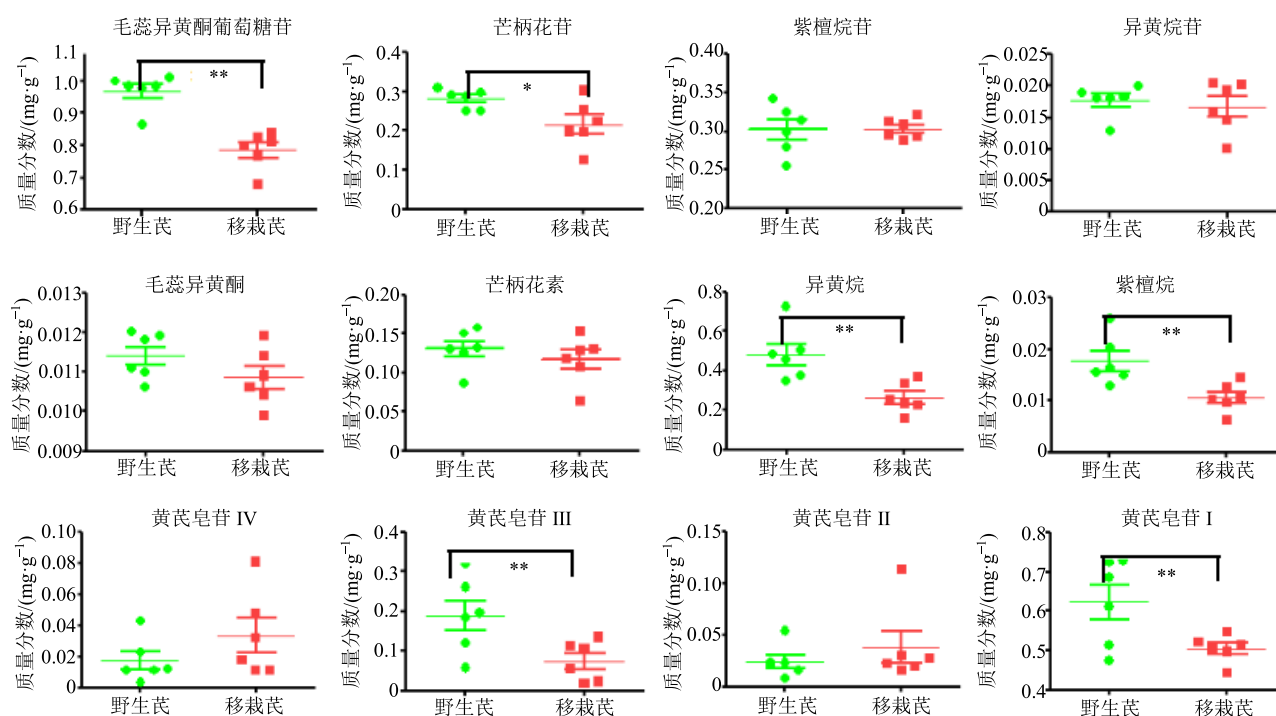
分别将 8 种黄酮和 4 种皂苷进行加和得到总

黄酮和总皂苷含量(图 2),野生芪的总黄酮含量显著高于移栽芪($P<0.01$),而总皂苷含量无显著差异。

以 12 种成分的含量进行主成分分析(PCA),结果显示两种生长模式的黄芪可明显区分,且 PLS-DA 排列实验模型有效(图 3),说明两种生长模式黄芪的次级代谢产物组成存在显著差异。

3.2 药效学考察结果

3.2.1 大鼠一般情况观测及体质量变化分析 对照



与野生芪比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 图 2 同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs WAR, same as Fig. 2

图 1 野生芪和移栽芪 12 种次级代谢物定量散点图 ($n=6$)

Fig. 1 Quantitative comparison of 12 secondary metabolites in WAR and CAR ($n=6$)

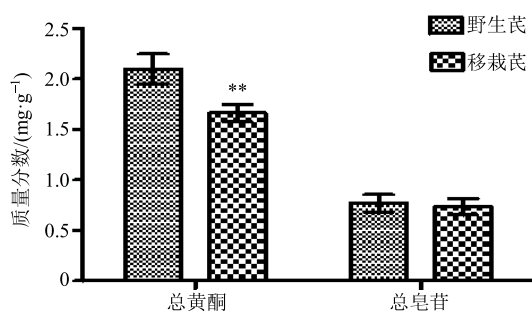


图 2 野生芪和移栽芪总黄酮和总皂苷比较

Fig. 2 Result of total flavonoids and total saponins of WAR and CAR

组大鼠精神状态良好,毛色有光泽,饮食、饮水、大便正常。模型组大鼠倦怠懒动,毛色干枯易脱落,进食减少,部分动物伴有腹泻和瞳孔缩小。各药物干预组大鼠上述表现较模型组减轻。

实验期间对照组大鼠体质量持续增长,模型组大鼠体质量呈先升高后降低的趋势,第 9 天达到最大值。从第 9 天起,对照组和模型对模型组大鼠体质量差异显著($P<0.05$)。各药物干预组对阿霉素造成的大鼠体质量减轻有显著的抑制作用,且在实验第 13 天,野生芪组大鼠体质量与模型组相比显著回调($P<0.05$)。结果见表 1。

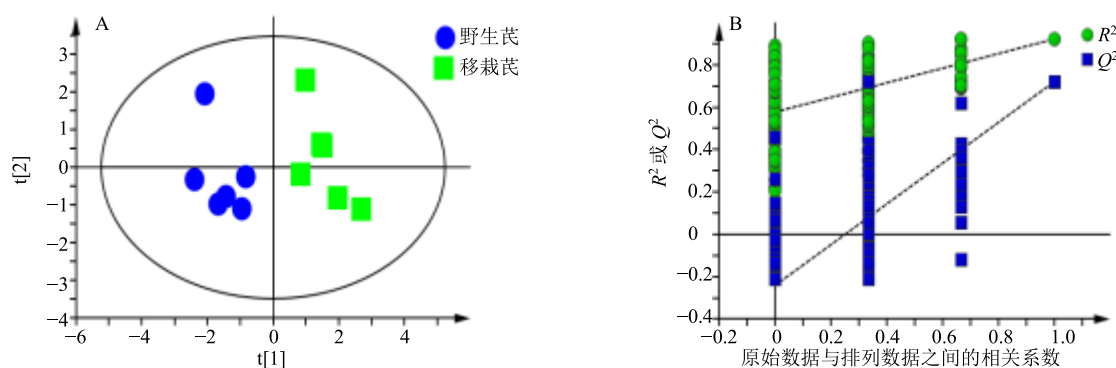


图 3 HPLC-UV-ELSD 测定结果 PLS-DA 散点图 (A) 和模型验证结果 (B)

Fig. 3 PLS-DA score plot (A) and permutation test model validation plot (B) based on HPLC-UV-ELSD

表 1 各组大鼠体重质量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 1 Comparison on body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g						
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天	第 11 天	第 13 天
对照	—	281.0±10.5	301.9±13.9	315.7±17.1	323.8±19.7	340.5±21.5	355.6±23.8	365.7±24.7
模型	—	280.6±12.3	295.5±13.1	300.2±10.9	300.6±17.8	296.4±16.1 [#]	284.4±16.2 ^{###}	263.0±23.4 ^{####}
地高辛	0.000 03	281.4±12.3	300.2±18.2	306.0±19.3	310.1±14.4	311.3±23.3	308.2±17.9	293.4±20.9 [*]
野生芪	7.5	281.5±10.4	294.4±14.7	302.2±15.7	305.6±17.3	315.2±20.1	311.9±21.0	296.8±21.3 [*]
移栽芪	7.5	281.0± 6.8	291.0±14.0	298.2±16.0	302.5±15.6	304.7±19.9	302.2±18.9	281.9±18.9

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

3.2.2 超声心动图检查结果 各组大鼠左心室超声心动图的 M 型曲线和二维图如图 4 所示, 由表 2 可知, 与对照组相比, 模型组大鼠 FS、EF、LVPWs、LVPWd、IVSs、IVSd 降低, LVIDd、LVIDs 升高, 差异均显著 ($P < 0.05$ 、 0.001), 表明心衰模型复制成功。与模型组比较, 野生芪组与移栽芪组大鼠 FS、EF、LVIDs、IVSs、LVPWs 均有显著回调; 与移栽芪组比较, 野生芪对大鼠 FS、EF、LVIDs 的回调作用较好, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果表明对阿霉素

造成的心脏结构和功能异常, 野生芪较移栽芪表现出更好的保护作用。

3.2.3 组织病理学检查结果 对照组大鼠心肌细胞形态正常, 心肌纤维呈粉红色, 胞浆纹理清晰; 模型组心肌纤维溶解、断裂、轮廓不清晰, 部分心肌细胞肌浆凝聚、核固缩、间质出血; 各治疗组心肌病变均明显轻于模型组, 以野生芪组改善最为明显, 心肌纤维呈束排列, 仅见少数列仍有肌间充血, 移栽芪组肌浆仅有少量溶解, 心肌组织结构基本正常 (图 5)。

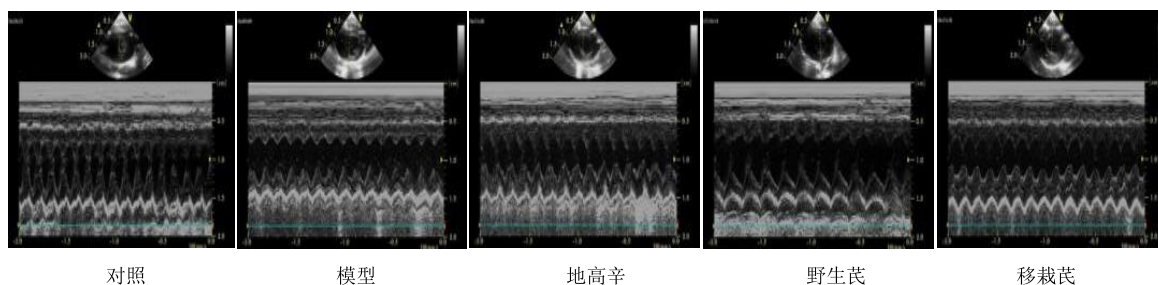


图 4 各组大鼠超声心动 M 型曲线和二维图

Fig. 4 Two-dimensional and M-mode short-axis of left ventricle obtained from each group

表 2 野生芪和移栽芪对大鼠心功能参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of *Astragali Radix* treatment on echocardiography parameters ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FS/%	EF/%	LVPWs/mm	LVPWd/mm	LVIDd/mm	LVIDs/mm	IVSs/mm	IVSd/mm
对照	—	0.54±0.06	0.88±0.04	3.18±0.32	2.14±0.41	5.94±0.52	3.03±0.35	2.99±0.43	1.65±0.22
模型	—	0.33±0.04 ^{###}	0.68±0.05 ^{###}	2.26±0.19 ^{###}	1.49±0.19 ^{###}	6.53±0.36 [#]	4.30±0.33 ^{###}	2.12±0.33 ^{###}	1.30±0.33 [#]
地高辛	0.000 03	0.44±0.07 ^{**}	0.80±0.07 ^{***}	2.73±0.26 ^{**}	1.88±0.35 [*]	6.06±0.36 [*]	3.40±0.41 ^{**}	2.50±0.29	1.38±0.23
野生芪	7.5	0.48±0.07 ^{***}	0.84±0.06 ^{***}	2.93±0.24 ^{***}	1.84±0.36	6.12±0.57	3.06±0.62 ^{***}	2.84±0.29 ^{***}	1.54±0.12 [*]
移栽芪	7.5	0.43±0.07 ^{*△}	0.79±0.08 ^{**△}	2.82±0.42 ^{**}	1.85±0.31	6.31±0.46	3.46±0.65 ^{**△}	2.68±0.29 ^{***}	1.48±0.29

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$; 与野生芪组比较: [△] $P < 0.05$, 下同
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs WAR group, same as below

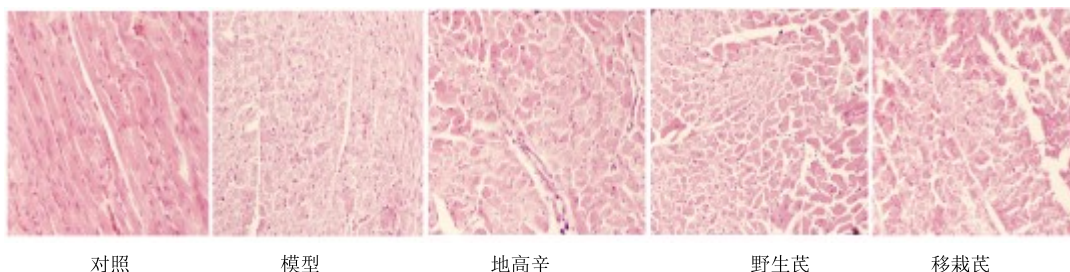


图 5 各组大鼠心肌病理学观察

Fig. 5 Histopathological analysis of mice hearts in each group

3.2.4 血清生化指标 (CK、LDH) 及 BNP 检测结果
 由心功能参数和病理切片的结果均显示心脏发生明显病变, 因此对血清中与心脏功能相关的指标进行测定, 结果见表 3。与对照组比较, 模型组大鼠血清 CK、BNP 及 LDH 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 与模型组相比, 野生芪能显著降低血清 CK、BNP 及 LDH 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.3 大鼠 ¹H-NMR 核磁图谱归属

通过化学位移、偶合常数及峰形等核磁数据分析, 结合文献报道^[17-18]和数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 及 BMRB (<http://www.bmrblib.org/>) 对其中的化合物进行归属, 共指认出 33 种化合物, 如图 6 所示, 包括氨基酸、有机酸、糖类等, 其化学位移及谱峰归属见表 4。

表 3 各组大鼠血清生化指标及 BNP 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Biochemical parameters and BNP level in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	BNP/(U·L ⁻¹)
对照	—	2 642.1 ± 746.9	487.9 ± 114.1	87.99 ± 12.74
模型	—	4 506.6 ± 1 211.1 ^{##}	959.2 ± 193.7 ^{###}	106.51 ± 22.56 [#]
地高辛	0.000 03	2 429.6 ± 614.3 ^{**}	503.6 ± 53.1 ^{**}	91.01 ± 13.87 ^{**}
野生芪	7.5	2 123.4 ± 574.7 ^{**}	593.1 ± 125.6 [*]	98.17 ± 12.18 [*]
移栽芪	7.5	3 879.9 ± 820.1 [△]	652.1 ± 148.2	102.15 ± 12.45 [△]

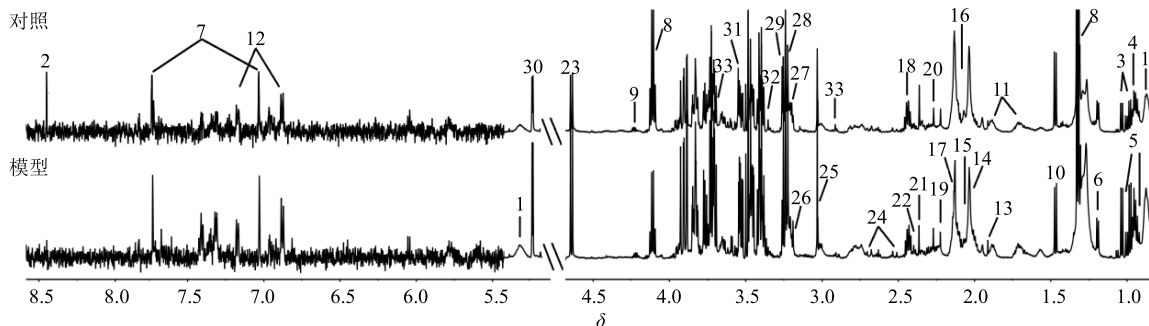


图 6 大鼠血清的核磁图谱

Fig. 6 Typical ¹H NMR spectra of rat serum

表 4 大鼠血清中主要化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 数据归属Table 4 $^1\text{H-NMR}$ assignments of major metabolites in rat serum

序号	代谢物	基团	δ_{H}
1	脂质	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}=\text{CH}$, $\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$, $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$, $-\text{CH}=\text{CH}-$	0.87 (m), 1.27 (m), 1.57 (m), 2.76 (m), 5.31 (m)
2	甲酸盐	CH	8.45 (s)
3	缬氨酸	γCH_3 , $\gamma'\text{CH}_3$	0.98 (d, $J = 6.6$ Hz), 1.04 (d, $J = 7.2$ Hz)
4	亮氨酸	δCH_3 , $\delta'\text{CH}_3$, αCH	0.95 (d, $J = 7.1$ Hz), 0.96 (d, $J = 6.6$ Hz), 3.71 (t, $J = 6.8$ Hz)
5	异亮氨酸	δCH_3 , $\beta'\text{CH}_3$, βCH	0.93 (t, $J = 7.4$ Hz), 1.00 (d, $J = 7.0$ Hz), 1.99 (m)
6	3-羟基丁酸	γCH_3	1.20 (d, $J = 6.6$ Hz)
7	组氨酸	2-CH, 4-CH	7.10 (s), 7.89 (s)
8	乳酸	αCH , βCH_3	1.32 (d, $J = 8.4$ Hz), 4.10 (q)
9	苏氨酸	αCH , βCH	1.33 (d, $J = 8.4$ Hz), 3.59 (d, $J = 6.4$ Hz), 4.26 (m)
10	丙氨酸	βCH_3	1.48 (d, $J = 8.6$ Hz)
11	赖氨酸	γCH_2 , βCH_2 , δCH_2	1.46 (m), 1.72 (m), 1.89 (m)
12	络氨酸	3,5-CH, 2,6-CH	6.90 (d, $J = 2.6$ Hz), 7.19 (d, $J = 3.5$ Hz)
13	乙酸盐	CH_3	1.91 (s)
14	<i>N</i> -乙酰糖蛋白	CH_3	2.04 (s)
15	谷氨酰胺	βCH_2 , γCH_2	2.07 (m), 2.35 (m)
16	甲硫氨酸	γCH_2 , <i>S</i> - CH_3	2.10 (s), 2.63 (t, $J = 8.4$ Hz)
17	<i>O</i> -乙酰糖蛋白	CH_3	2.13 (s)
18	谷氨酰胺	βCH_2 , γCH_2	2.15 (m), 2.44 (m)
19	丙酮	CH_3	2.22 (s)
20	乙酰乙酸	CH_3	2.27 (s)
21	丙酮酸盐	CH_3	2.36 (s)
22	琥珀酸盐	CH_2	2.41 (s)
23	β -葡萄糖	1-CH, 6-CH', 5-CH	3.47 (m), 3.90 (dd, $J = 8.4, 4.2$ Hz), 4.64 (d, $J = 7.8$ Hz)
24	柠檬酸盐	CH_2 , CH_2'	2.52 (d, $J = 7.2$ Hz), 2.69 (d, $J = 6.8$ Hz)
25	肌酸酐	CH_3 , CH_2	3.04 (s), 4.05 (s)
26	胆碱	βCH_2 , <i>N</i> - CH_3	3.19 (s), 3.54 (t, $J = 6.6$ Hz)
27	胆碱磷酸	<i>N</i> - CH_3	3.20 (s)
28	甘油磷酸胆碱	<i>N</i> - CH_3 , βCH_2	3.22 (s), 3.68 (t, $J = 7.2$ Hz)
28	氧化三甲胺	CH_3	3.26 (s)
30	α -葡萄糖	1-CH, 6'-CH	3.53 (dd, $J = 6.7, 7.6$ Hz), 3.76 (m), 3.84 (m), 5.22 (d, $J = 4.2$ Hz)
31	甘氨酸	CH_2	3.56 (s)
32	肌醇	CH	3.35 (s)
33	二甲基甘氨酸	CH_3 , CH_2	2.91 (s), 3.69 (s)

3.4 多元统计分析

为全面寻找引起两组差异的主要内源性代谢物, 采用多元统计分析方法对对照组和模型组的核磁共振谱进一步分析。采用 PLS-DA 方法对对照组与模型组血清样本 $^1\text{H-NMR}$ 代谢轮廓进行分析, 结果见图 7。

结果显示对照组与模型组明显分开 (图 7-A), 表明心衰模型复制成功; 有监督的模式识别方法需用外部模型验证方法排列实验来证明模型的有效性, 由图 7-B 可知左端任何一次随机排列产生的 R^2 、

Q^2 均小于右端, 最右端的两个数值均大于 0.05, 且差值较小, 下方回归线与纵轴截距较小, 表明模型验证有效。

为进一步确定造模前后大鼠血清中内源性代谢物的差异, 最大化组间分离, 找到模型组与对照组差异代谢物, 对对照组和模型组进行 OPLS-DA 分析, OPLS-DA 得分图及 S-plot 图见图 7-C、D。通过 S-plot 图结合 VIP 值 (>1)、 $p(\text{corr})$ 值的绝对值大于 0.5、独立样本 t 检验 $P < 0.05$ 得到 14 个峰

面积具有显著差异的潜在生物标志物。

3.5 单变量分析

以肌酐为内标, 选取血清中潜在生物标志物中特征峰明显且与其他物质无重叠的成分进行积分, 结果如表 5 所示, 模型组大鼠血清中柠檬酸、肌酸酐、异亮氨酸、葡萄糖、甘油磷酸胆碱的含量升高, 亮氨酸、脂质、2-羟基异丁酸、*N*-乙酰化糖蛋白、

谷氨酸、丙酮、*O*-乙酰化糖蛋白、丙酮酸、甲酸盐的含量降低。与模型组比较, 野生芪组与移栽芪组均能不同程度地回调这 14 个代谢物。

分别计算野生芪组与移栽芪组各代谢物相对于模型组的变化率, 并以热图表示 (图 8), 可见血清中 2-羟基异丁酸、谷氨酸、丙酮酸盐、甲酸盐等代谢物在野生芪组中变化率较大。

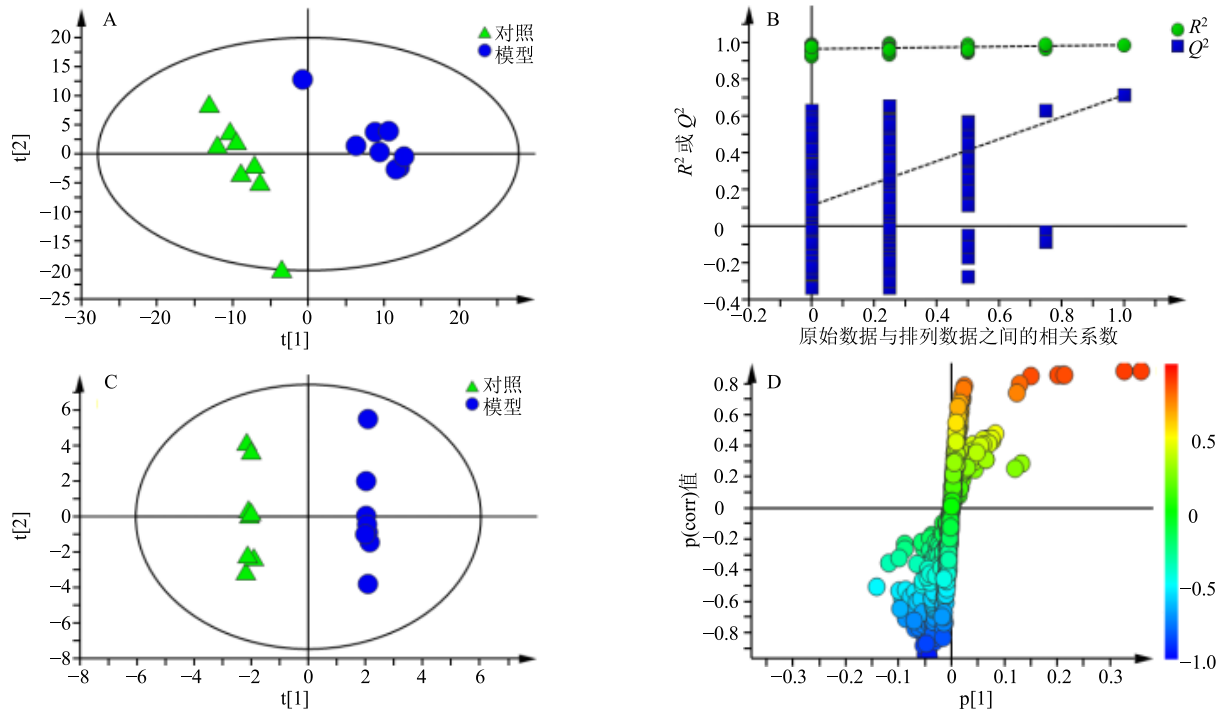


图 7 对照组与模型组 $^1\text{H-NMR}$ 图谱的 PLS-DA 散点图 (A)、模型验证结果 (B)、OPLS-DA 散点图 (C) 和 S-plot 图 (D)
Fig. 7 PLS-DA score plot (A), permutation test model validation plot (B), OPLS-DA score plot (C), and corresponding S-plot (D) between control group and model group

表 5 各组大鼠血清代谢差异物积分峰面积单变量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Single variable analysis of integral peak area of metabolites in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	亮氨酸	脂质	2-羟基异丁酸	<i>N</i> -乙酰糖蛋白	谷氨酸	乙酸盐	<i>O</i> -乙酰糖蛋白
对照	0.378±0.038	0.776±0.082	0.408±0.129	0.635±0.031	0.329±0.043	0.072±0.005	0.141±0.027
模型	0.334±0.036 ↓ #	0.613±0.123 ↓ ##	0.256±0.109 ↓ ##	0.591±0.047 ↓ #	0.264±0.037 ↓ ##	0.055±0.007 ↓ ###	0.094±0.023 ↓ ##
地高辛	0.375±0.047 ↑ *	0.668±0.015 ↑ *	0.383±0.053 ↑ *	0.694±0.103 ↑ **	0.297±0.026 ↑ *	0.066±0.001 ↑ **	0.109±0.023 ↑ *
野生芪	0.379±0.035 ↑ *	0.698±0.163 ↑ *	0.312±0.081 ↑ *	0.616±0.061 ↑ *	0.297±0.022 ↑ *	0.067±0.008 ↑ *	0.102±0.022 ↑ *
移栽芪	0.348±0.025 ↑	0.616±0.123 ↑	0.267±0.050 ↑ △	0.619±0.096 ↑ *	0.250±0.029 ↑ △	0.065±0.007 ↑ *	0.095±0.015 ↑
组别	丙酮酸盐	柠檬酸盐	肌酸酐	异亮氨酸	甘油磷酸胆碱	葡萄糖	甲酸盐
对照	0.130±0.021	0.094±0.013	0.173±0.023	0.317±0.098	0.309±0.052	1.740±0.195	0.043±0.010
模型	0.106±0.013 ↓ #	0.072±0.013 ↓ ##	0.236±0.074 ↑ #	0.801±0.242 ↑ ###	0.500±0.118 ↑ ##	3.092±0.640 ↑ ###	0.020±0.005 ↓ ###
地高辛	0.111±0.015 ↑	0.074±0.013 ↑	0.243±0.052 ↓	0.626±0.133 ↓ *	0.381±0.064 ↓ *	2.033±0.368 ↓ **	0.036±0.009 ↑
野生芪	0.119±0.024 ↑ *	0.074±0.012 ↑ *	0.213±0.064 ↓	0.540±0.087 ↓ *	0.388±0.045 ↓ *	2.632±0.300 ↓ *	0.037±0.012 ↑ *

↑ -上调; ↓ -下调

↑ -up-regulation; ↓ -down-regulation

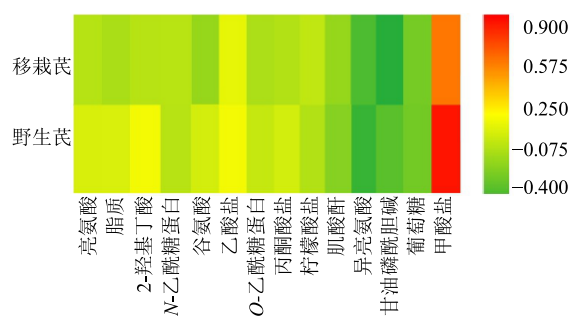


图 8 野生芪组、移栽芪组较模型组血清中代谢差异物差异程度

Fig. 8 Difference degree map of metabolites in serum of rat in WAR and CAR groups compared with model group

4 讨论

本研究是对基于绝对生长年限野生芪与移栽芪化学成分的内在关系及抗心衰药效差异的比较。黄酮和皂苷类成分是黄芪的主要指标性化学成分，对于黄芪而言 HPLC-ELSD 指纹图谱能够同时检测到黄芪黄酮和皂苷类成分，实验前处理和实验条件也相对简单，是黄芪质量控制和评价的有效手段^[19]。12 种成分同时测定结果显示野生芪中总黄酮以及毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、紫檀烷、异黄酮、黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 III 含量显著高于移栽芪；但总皂苷含量与移栽芪无显著性差异。

中药质量评价的“金标准”是药效，化学成分是着手点。ip 阿霉素是一种操作简便、死亡率低、成功率高的建立心衰模型的造模方法，故本研究采用阿霉素致大鼠心力衰竭模型评价野生芪和移栽芪。诸多临床试验^[20]和药理学实验^[21]研究证实 BNP 水平与左心室功能呈负相关，是临床上用于诊断心衰的重要依据。本研究实验结果表明，模型组大鼠血清 BNP 水平显著高于对照组，野生芪组的回调效果明显优于移栽芪组。心脏是整个机体的动力泵，心衰发生时往往引起心脏病理生理及形态学的变化，从而导致心脏功能和结构的异常^[22]。EF 和 FS 指标可以反映心脏的损伤程度，实验结果表明，野生芪组能够显著降低 EF 和 FS 水平，且与移栽芪组相比，有显著性差异 ($P < 0.05$)，说明两种黄芪对改善心功能的作用有所不同。代谢组学结果显示血清中 2-羟基异丁酸、丙酮、丙酮酸、甲酸盐等代谢物在野生芪组中变化率较大。

本研究结果表明野生芪中总黄酮含量显著高于移栽芪，而且野生芪的抗心衰效果显著优于移栽芪，

说明黄酮类成分对抗心衰的贡献较大。赵明等^[23]研究发现黄芪总黄酮能改善实验性心衰大鼠心室重塑和心功能指标对心脏疾病有确切的保护作用，进一步佐证了该结果。孙成文等^[24]研究发现黄芪皂苷可改善心肌收缩功能，有正性肌力作用。本研究结果表明野生芪中黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 III 含量显著高于移栽芪，表明黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 III 对心力衰竭的贡献作用较大。说明利用心衰模型大鼠研究不同生长方式黄芪的功效差异具有一定的可行性。

本研究是基于药效指标评价黄芪药材质量，利用传统药理指标和代谢组学指标比较两类黄芪药效强度。明确各类黄芪的药效优势，最终采用多种数据分析手段进行化学型与药效的关联分析，阐释不同优势药效的化学基础。建立基于药效的黄芪药材质量评价技术，明确野生芪与移栽芪的药效异同性，为保护优质黄芪药材资源以及保障其科学合理应用提供研究依据。

参考文献

- [1] 顾观光. 神农本草经 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1955.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 杜国军. 恒山黄芪道地药材质量标准研究 [D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [4] 石子仪, 鲍忠, 姜勇, 等. 不同来源黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 779-783.
- [5] 田圣志, 杨玉涛, 张振凌, 等. 不同商品等级黄芪中黄酮类成分含量比较 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(16): 189-190.
- [6] 辛博, 马生军, 谢景, 等. 生长年限对黄芪药材中黄酮及皂苷类成分含量积累的影响 [J]. 中药材, 2015, 7(7): 1366-1369.
- [7] 胡明勋, 郭宝林, 周然, 等. 山西浑源仿野生栽培蒙古黄芪的质量研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1829-1834.
- [8] 张善玉, 朴惠顺, 宋成岩, 等. 不同生长年限黄芪中总皂苷、黄芪甲苷、总黄酮及多糖含量比较 [J]. 延边大学医学学报, 2005, 28(2): 87-89.
- [9] 牛倩芸, 万燕晴, 李震宇, 等. 不同商品等级黄芪质量评价研究 [J]. 中药材, 2015, 38(6): 1186-1190.
- [10] 熊一峰, 万燕晴, 李科, 等. 山西恒山地区蒙古传统黄芪和移栽黄芪的质量差异研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1635-1643.
- [11] 高四云, 李科, 秦雪梅, 等. 恒山仿野生黄芪绝对生长年限鉴别及黄酮和皂苷积累规律研究 [J]. 药理学

- 报, 2018, 53(1): 14-16.
- [12] 秦雪梅, 李震宇, 孙海峰, 等. 我国黄芪药材资源现状与分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3234-3238.
- [13] Li Z Y, He P, Sun H F, *et al.* ^1H -NMR based metabolomic study of the antifatigue effect of *Astragali Radix* [J]. *Mol Biol Syst*, 2014, 10(11): 3022-3030.
- [14] 谢道生. 黄芪药材豆腥味与品质关联性研究 [D]. 太原: 山西大学, 2010.
- [15] 王玉敏, 马炎岩, 高俊红, 等. 黄芪总提物及其有效成分改善阿霉素致心衰的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 208-211.
- [16] 牛倩云. 基于代谢组学技术的黄芪抗心衰作用机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [17] Li A P, Li Z Y, Qin X M, *et al.* Comparison of two different *Astragali Radix* by a ^1H NMR-based metabolomic approach [J]. *J Proteom Res*, 2015, 14(5): 2005-2016.
- [18] Niu Q Y, Li Z Y, Qin X M, *et al.* ^1H NMR based metabolomic profiling revealed doxorubicin-induced systematic alterations in a rat model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 118(11): 338-348.
- [19] 陈俊, 黄玉凤, 王彬, 等. HPLC-ELSD 在中药分析及指纹图谱中的应用 [J]. 药学实践杂志, 2009, 27(4): 251-253.
- [20] 孙静. 脑利钠肽测定在心力衰竭中的临床应用 [J]. 实用医技杂志, 2012, 19(7): 733-734.
- [21] 杨波, 张道亮, 周琍珍, 等. 保心合剂对实验性心衰大鼠血浆 BNP 水平的影响 [J]. 实用医技杂志, 2006, 15(10): 1123-1124.
- [22] 臧益民, 臧伟进, 王晓明, 等. 心力衰竭的病理生理机制及治疗概述 [J]. 心脏杂志, 2002, 14(5): 417-419.
- [23] 赵明, 于影, 邵慧杰, 等. 黄芪总黄酮对大鼠实验性心率失常的保护作用 [J]. 中国心血管病研究, 2007, 5(12): 918-919.
- [24] 孙成文, 雷春丽, 吕文伟, 等. 黄芪总皂苷对实验性心力衰竭的作用 [J]. 白求恩医科大学学报, 1994, 20(2): 125-127.