

葛根芩连汤及其发酵产物干预 2 型糖尿病大鼠的 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学研究

杜晨晖¹, 李 津¹, 闫 艳², 张 敏², 李爱平², 秦雪梅², 宋 强^{1*}

1. 山西中医药大学中药学院, 山西 太原 030619

2. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: 目的 采用氢核磁共振 ($^1\text{H-NMR}$) 代谢组学技术分析 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠血清中内源性代谢物的变化, 比较葛根芩连汤 (GQD) 与发酵 GQD 对其干预作用。方法 采用高糖高脂饲料联合链脲佐菌素 (STZ) 复制 T2DM 大鼠模型, 分别 ig 给予 GOD 与发酵 GOD, 共给药 8 周。观察大鼠一般情况并测定其体质量及空腹血糖 (FBG); 收集大鼠血清样品, 对血清 $^1\text{H-NMR}$ 图谱进行归属; 结合多元统计分析方法, 筛选可能的潜在生物标志物。结果 与对照组比较, 模型组大鼠体质量减小、FBG 升高; GQD 与发酵 GQD 均能改善 T2DM 大鼠一般情况、体质量和 FBG。主成分分析结果显示, 对照组、模型组与给药组的代谢轮廓明显区分, 并鉴定了 15 个与 T2DM 相关的潜在生物标志物。与对照组比较, 模型组大鼠血清中 3-羟基丁酸、胆碱、甘氨酸、甘油、 β -葡萄糖和 α -葡萄糖的含量升高, 乳酸、极低密度脂蛋白、氧化三甲胺、醋酸、谷氨酸、蛋氨酸、谷氨酰胺、丙酮酸和肌酸的含量降低。GQD 和发酵 GQD 干预后均能不同程度地回调已鉴定的所有标志物。结论 GQD 和发酵 GQD 均可通过调节能量代谢、脂质代谢和氨基酸代谢等途径而发挥治疗 T2DM 作用, 未表现出显著差异, 从代谢组学的角度为发酵 GQD 的临床应用提供了实验数据和理论基础。

关键词: 葛根芩连汤; 发酵; 2 型糖尿病; 核磁共振; 代谢组学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)10-2302-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.010

Study on raw and fermented Gegen Qinlian Decoction for treatment of diabetes based on $^1\text{H-NMR}$ metabolomics in T2DM rats

DU Chen-hui¹, LI Jin¹, YAN Yan², ZHANG Min², LI Ai-ping², QIN Xue-mei², SONG Qiang¹

1. College of Chinese Material Medicine, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

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

Abstract: Objective To compare the antidiabetic effects between raw and fermented Gegen Qinlian Decoction (GQD) containing different endogenous metabolites by $^1\text{H NMR}$ technology based on metabolomics. **Methods** The antidiabetic effects were evaluated using high glucose and high fat diet combined with streptozotocin (STZ). The treatment groups were fed with GQD and fermented GQD every day, respectively for 8 weeks. The general condition, body weight and fasting blood glucose (FBG) of rats were observed. The chemical compositions of serum were assigned by $^1\text{H NMR}$ spectroscopy. Using the multivariate statistical analysis as the main data analysis methods, potential biomarkers were screened in the model. **Results** The body weight of the diabetic rats decreased significantly compared to the normal control group after injection of STZ. In addition, the FBG level was significantly increased in the diabetic rats than that in the normal control group. GQD and fermented GQD all can improve the general condition, body mass, and FBG level of T2DM rats. The results of the principal component analysis showed that the metabolic profile of the normal control group, the model group and drug treatment group was significantly differentiated. In total, 15 potential biomarkers associated with T2DM were identified by OPLS-DA binding univariate analysis. The corresponding S-plot combined with $\text{VIP} > 1$ revealed that the major variations in diabetic rats were the elevation of 3-hydroxybutyrate (3-HB), choline, glycine, glycerol, β -glucose, and α -glucose, as well as the decline levels of lactate, very low-density lipoprotein (VLDL), trimethylamine-N-oxide (TMAO), acetate, glutamate, methionine, glutamine, pyruvate, and creatine. Both raw and fermented GQD displayed antidiabetic effects against STZ-induced diabetes by restoring 15 of biomarkers. **Conclusion** Detailed analysis of the altered metabolite levels indicated that raw and fermented

收稿日期: 2018-01-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273659)

作者简介: 杜晨晖 (1981—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0351)3179979 E-mail: 13653412562@163.com

*通信作者 宋 强 (1967—), 男, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药资源开发与利用。

Tel: (0351)3179978 E-mail: 13834648844@163.com

GQD significantly ameliorated the disturbance in glucose metabolism, lipid metabolism, and amino acid metabolism in the therapeutic process of T2DM, while no significant difference was observed between them. The results of this study provide experimental data and theoretical basis for the clinical application of GQD fermentation from the perspective of metabolomics.

Key words: Gegen Qinlian Decoction; fermentation; type 2 diabetes mellitus; $^1\text{H-NMR}$; metabolomics

糖尿病是一种具有血糖和血脂代谢紊乱症状的慢性代谢型疾病^[1]。2013 年国际糖尿病联盟 (IDF) 统计全球糖尿病人约为 4.15 亿人, 据 IDF 预测到 2040 年将达到 6.42 亿人^[2]。2 型糖尿病 (T2DM) 患者占糖尿病发病人口的 90% 左右, T2DM 会给病人造成严重的生理和心理伤害, 并且为各国医疗保障体系增添了巨大的经济负担^[3]。中医药用于治疗糖尿病已经有数千年的历史, 许多中医经典方剂被广泛应用于糖尿病的治疗并具有明显的疗效^[4]。葛根芩连汤 (GQD) 始载于汉代张仲景所著《伤寒论》, 由葛根 (8 g)、黄芩 (3 g)、黄连 (3 g) 和甘草 (2 g) 4 味药组成, 是中药治疗急性腹泻的经典方剂。近年来, 中医临床及药理学研究关于 GQD 治疗 T2DM 作用的报道日益增多^[5-8]。课题组前期研究也表明葛根芩连汤通过调节能量代谢、脂质代谢和氨基酸代谢等途径, 从而显著降低 T2DM 大鼠高血糖水平, 并改善其高脂血症^[9-11]。

中药发酵能提高中药有效成分的含量, 增强疗效, 降低毒副作用, 已有数千年的应用历史^[12-13]。大量的研究结果显示人参、家蚕、淡豆豉等中药经过微生物发酵后可显著增强其抗糖尿病作用^[14-16]。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (SC) 被广泛用于微生物发酵工业^[17], 同时 SC 也是制备传统微生物发酵中药六神曲、红曲的重要菌种^[18-19], 利用 SC 发酵制备的中药复方制剂栓通灵对缺血性卒中显示出较好的治疗作用^[20]。受上述研究启示, 本课题组前期利用正交试验优选了 GQD 的 SC 发酵工艺^[21]; 并且发现经 SC 发酵后 GQD 中总黄酮和总生物碱含量显著升高^[22]。发酵 GQD 中总黄酮和总生物碱含量的变化是否会影响其治疗糖尿病的作用尚待深入研究。

T2DM 的发生主要与代谢紊乱和内分泌失调密切相关, 并伴随着糖、脂、蛋白质等诸多物质代谢异常。现有单一研究方法难以整体表征 T2DM 各个发展阶段内源性代谢物的变化^[23]。代谢组学技术以组群指标分析为基础, 借助高通量检测 and 数据处理手段, 具有整体观的研究思路, 特别适合中医药多成分、复杂作用体系的研究^[24]。基于核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 的代谢组学分析技术重现性好、分析时

间短、备样方法简单、可以获得几乎全部含氢化合物的信息, 在 T2DM 研究方面已经有了大量成功应用^[25-26]。本研究采用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术, 以 T2DM 大鼠血液内源性代谢物的变化规律为切入点, 结合生化指标对传统 GQD 和发酵 GQD 干预 T2DM 大鼠的生物学机制差异进行比较, 为发酵 GQD 的临床应用提供整体动物水平的理论和方法依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

葛根 (批号 1403090191) 购自安国市祁澳中药饮片有限公司; 黄芩 (批号 140323)、黄连 (批号 131214) 购自亳州蜀中药业有限公司; 甘草 (批号 1204037) 购自安国市药兴药材有限公司饮片加工厂。以上饮片经山西中医药大学中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 毛茛科植物黄连的 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。2,2,3,3-三甲基硅烷基丙酸 (TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc. 公司); 重水 (Landisville 公司, 美国); 其余试剂均为分析纯; 格列美脲片 (批号 20141202) 购自上海天赐福生物工程有限公司; 链脲佐菌素 (STZ, 批号 1126C0314) 购自 Sigma 公司; 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CICC 1205 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 仪器

Bruker 600-MHz AVANCE III NMR Spectrometer (600.13 MHz 质子频率, 德国布鲁克公司); YXQ-LS-50A 压力蒸汽灭菌器、SW-CJ-2FD 洁净工作台 (上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); HYL-C 组合式摇床 (太仓市强乐实验设备有限公司); AE240 分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 55 只, 体质量 (200 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号为 SCXK (京) 2014-0013。动物饲养室保持温度 $22 \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45% 左右, 自然昼夜节律

光照, 动物自由摄食、饮水。

2 方法

2.1 GQD 提取液的制备

按 8:3:3:2 称取葛根、黄芩、黄连和甘草饮片共 3.2 kg, 加入 10 倍量水, 浸泡 30 min, 加热至沸, 煎煮 40 min, 滤过; 滤渣再加 10 倍量的水, 加热至沸, 煎煮 30 min, 滤过。合并 2 次滤液, 减压浓缩至 1.6 L (相当于原生药量 2 g/mL), 其中 0.8 L 用于发酵 GQD 的制备, 另外 0.8 L 直接用于糖尿病模型大鼠给药。利用 HPLC-DAD 法测定 GQD 提取液中主要化学成分含量如下: 葛根素 20.30 mg/g、大豆苷 3.67 mg/g、大豆苷元 0.50 mg/g、甘草苷 0.80 mg/g、甘草素 0.17 mg/g、巴马汀 2.36 mg/g、黄芩苷 10.80 mg/g、黄芩素 1.50 mg/g。

2.2 发酵 GQD 的制备

量取 5 mL GQD 提取液 (2 g/mL) 与 45 mL 蒸馏水转移至 250 mL 三角锥形瓶, 混合均匀, 于 121 °C 蒸汽灭菌 20 min, 摇匀自然冷却, 即为 GQD 培养基, 共制备 160 瓶。将保藏在斜面培养基 (-4 °C) 的 SC 接种于马铃薯液体 (PD) 培养基, 置于 28 °C、180 r/min 的摇床中复苏培养 24 h, 即为 SC 种子液。吸取 1 mL 酿酒酵母种子液, 转移至装有 GQD 培养基的三角锥形瓶中 (共 160 瓶)。将已接种 SC 的 GQD 培养基在 28 °C、180 r/min 的摇床中培养 48 h。取出 GQD 发酵液, 合并, 离心, 滤过, 浓缩至 0.8 L (相当于原生药量 2 g/mL), 备用。利用 HPLC-DAD 法测定发酵 GQD 提取液中主要化学成分含量如下: 葛根素 23.57 mg/g、大豆苷元 3.80 mg/g、甘草苷 0.48 mg/g、甘草素 0.50 mg/g、巴马汀 2.01 mg/g、黄芩苷 11.85 mg/g、黄芩素 1.27 mg/g。

2.3 糖尿病大鼠模型的制备、分组及给药

大鼠适应性喂饲 1 周后, 随机选取 10 只喂养普通饲料; 另外 45 只喂饲高糖高脂饲料, 4 周后分别按 35 mg/kg 空腹 ip 新鲜配制的柠檬酸缓冲液 (STZ)。普通饲料喂饲的大鼠同时 ip 等体积的 STZ。大鼠 ip STZ 溶液 1 周后, 尾尖取血测定空腹血糖 (FBG) 浓度, FBG ≥ 11.1 mmol/L 表明造模成功。将造模成功的 T2DM 大鼠 (39 只) 随机分为 3 组, 每组 13 只, 分别为模型组 (生理盐水)、GQD 组 (2 g/mL) 和发酵 GQD 组 (2 g/mL), 均喂饲高糖高脂饲料, 按 10 mL/kg 剂量 ig 给药, 持续 8 周。喂饲普通饲料的 10 只大鼠为对照组, 喂饲常规饲料, ig 给予等体积生理盐水, 持续 8 周。

2.4 大鼠体质量与 FBG 测定

分别于 ip STZ 前 1 d、造模成功后第 0、7、14、21、28、35、42、49、56 天 (禁食 12 h) 称量大鼠体质量。于注射 STZ 前 1 d 及造模成功后第 0、14、28、42、56 天 (禁食 12 h) 尾尖采血, 血液滴于安装在血糖仪的试纸上测定 FBG。

2.5 血清样本收集及处理

末次给药后, 各组动物禁食 12 h, ip 5% 水合氯醛麻醉, 开腹, 腹主动脉采血, 静置 30 min, 2 500 r/min 离心 10 min, 分离血清并分装, -20 °C 冰箱保存。

2.6 ¹H-NMR 测定

血清样本室温解冻后, 精密吸取 450 μ L 加入 300 μ L 重水, 涡旋 30 s, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取 600 μ L 上清液转移至 5 mm 的核磁管中。样品在 25 °C 下于 600 MHz NMR 仪上测定, 测定频率为 600.13 MHz, 采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列, 扫描次数为 64, 谱宽 12 019.2 Hz, 脉冲时间为 14 μ s, 采样时间为 2.72 s, 延迟时间为 1.0 s, 采样数据点为 65 536, 采样间隔为 40.5 μ s。

2.7 ¹H-NMR 图谱处理及统计学分析

NMR 数据导入软件 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain) 进行处理。NMR 谱图中, 手动进行相位、基线调整, 以乳酸的化学位移 δ 1.33 为标准进行化学位移校正, 以 0.01 积分段对化学位移区间 δ 0.82~8.49 进行分段积分, 其中 δ 4.69~5.18 (残余水峰) 不进行积分, 积分数据进行归一化, 导入 Excel 中进行预处理。处理后的数据采用 SIMCA-P 13.0 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 再用正交偏最小二乘判别分析法 (orthogonal PLS-DA, OPLS-DA) 的 S-plot 图结合 VIP > 1 及 SPSS 22.0 软件进行 *t* 检验, 确定潜在生物标志物, 各组实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用生物学数据库, 如 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、KEGG (<http://www.kegg.com/>)、MetPA (<http://metpa.metabolomics.ca/>) 进行生物标记物的鉴定和代谢通路分析。显著性标准界定值为 VIP > 1 及 *P* < 0.05。

3 结果

3.1 大鼠体质量与 FBG 分析

注射 STZ 前, 模型组大鼠体质量明显高于对照组 (*P* < 0.05); 注射 STZ 后, 模型组大鼠体质量迅速降低, 显著低于对照组 (*P* < 0.01), 说明 STZ 对大鼠胰腺造成化学性损伤, 出现了体质量减轻症状。与

模型组比较, GQD 和发酵 GQD 组大鼠体质量均有上升趋势, 从第 7 周开始, 发酵 GQD 组大鼠体质量显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 , 表 1)。注射 STZ 后, 各组大鼠 FBG 均显著高于对照组 ($P<0.01$), 且 FBG 均值 >11.1 mmol/L, 符合 T2DM 的诊断标准, 表明造模成功。分别给予 GQD 和发酵 GQD 后, 大鼠 FBG 呈现下降趋势, 且具有显著性改变 ($P<$

0.05 、 0.01), 说明 GQD 及发酵 GQD 均具有降低血糖作用 (表 2)。

3.2 大鼠血清 ^1H -NMR 图谱归属

结合每个代谢物的化学位移、裂峰情况及偶合常数等信息, 并参照 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 数据库及结合文献报道, 对本实验图谱进行指认 (图 1), 共鉴定 37 种化合物, 其化学位移及谱峰归属见表 3。

表 1 GQD 和发酵 GQD 对 T2DM 大鼠体质量的影响

Table 1 Effects of GQD and fermented GQD on body weight of T2DM rats

组别	ig STZ 前 1 d 体质量/g	造模后体质量/g			
		0 d	7 d	14 d	21 d
对照	382.20 $\pm$ 31.03	414.67 $\pm$ 19.18	430.00 $\pm$ 23.48	452.33 $\pm$ 22.97	458.11 $\pm$ 27.22
模型	409.09 $\pm$ 29.23 $^{\Delta}$	373.84 $\pm$ 28.34 $^{\Delta\Delta}$	365.08 $\pm$ 26.66 $^{\Delta\Delta}$	366.33 $\pm$ 33.40 $^{\Delta\Delta}$	352.42 $\pm$ 33.63 $^{\Delta\Delta}$
GQD	409.94 $\pm$ 37.00 $^{\Delta}$	377.90 $\pm$ 36.94	358.47 $\pm$ 38.84	355.21 $\pm$ 43.88	359.54 $\pm$ 39.84
发酵 GQD	404.46 $\pm$ 24.42 $^{\Delta}$	369.01 $\pm$ 33.65	357.81 $\pm$ 28.92	353.89 $\pm$ 29.17	358.25 $\pm$ 23.56

组别	造模后体质量/g				
	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d
对照	469.22 $\pm$ 27.15	478.67 $\pm$ 25.48	471.22 $\pm$ 23.85	483.00 $\pm$ 27.89	483.11 $\pm$ 24.38
模型	342.33 $\pm$ 29.74 $^{\Delta\Delta}$	342.55 $\pm$ 33.79 $^{\Delta\Delta}$	340.27 $\pm$ 34.21 $^{\Delta\Delta}$	336.75 $\pm$ 42.59 $^{\Delta\Delta}$	335.38 $\pm$ 33.46 $^{\Delta\Delta}$
GQD	362.58 $\pm$ 36.05	361.40 $\pm$ 35.78	368.75 $\pm$ 40.90	364.86 $\pm$ 27.51	364.86 $\pm$ 36.00
发酵 GQD	360.25 $\pm$ 22.64	362.77 $\pm$ 26.12	363.00 $\pm$ 27.51	373.18 $\pm$ 55.83 $^{\Delta}$	374.63 $\pm$ 33.48 $^{\Delta\Delta}$

与对照组比较: $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$; 与模型组比较: $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$, 表 2 同

$^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$ vs control group; $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$ vs model group, same as table 2

表 2 GQD 和发酵 GQD 对 T2DM 大鼠 FBG 的影响

Table 2 Effects of GQD and fermented GQD on FBG level in T2DM rats

组别	ig STZ 前 1 d FBG/ (mmol·L $^{-1}$)	造模后 FBG/(mmol·L $^{-1}$)				
		0 d	14 d	28 d	42 d	56 d
对照	5.57 $\pm$ 2.31	5.34 $\pm$ 0.66	5.43 $\pm$ 0.92	4.99 $\pm$ 0.83	5.47 $\pm$ 0.98	6.12 $\pm$ 1.06
模型	5.19 $\pm$ 1.37	13.45 $\pm$ 1.68 $^{\Delta\Delta}$	15.00 $\pm$ 3.41 $^{\Delta\Delta}$	16.98 $\pm$ 3.40 $^{\Delta\Delta}$	18.33 $\pm$ 3.16 $^{\Delta\Delta}$	19.48 $\pm$ 3.42 $^{\Delta\Delta}$
GQD	5.77 $\pm$ 2.86	13.74 $\pm$ 1.67	14.08 $\pm$ 3.36	13.61 $\pm$ 4.23 $^{\Delta}$	14.44 $\pm$ 5.39 $^{\Delta}$	13.97 $\pm$ 3.59 $^{\Delta\Delta}$
发酵 GQD	6.41 $\pm$ 2.51	14.07 $\pm$ 2.03	13.93 $\pm$ 2.15	13.68 $\pm$ 3.47 $^{\Delta}$	13.95 $\pm$ 2.86 $^{\Delta}$	12.23 $\pm$ 1.66 $^{\Delta\Delta}$

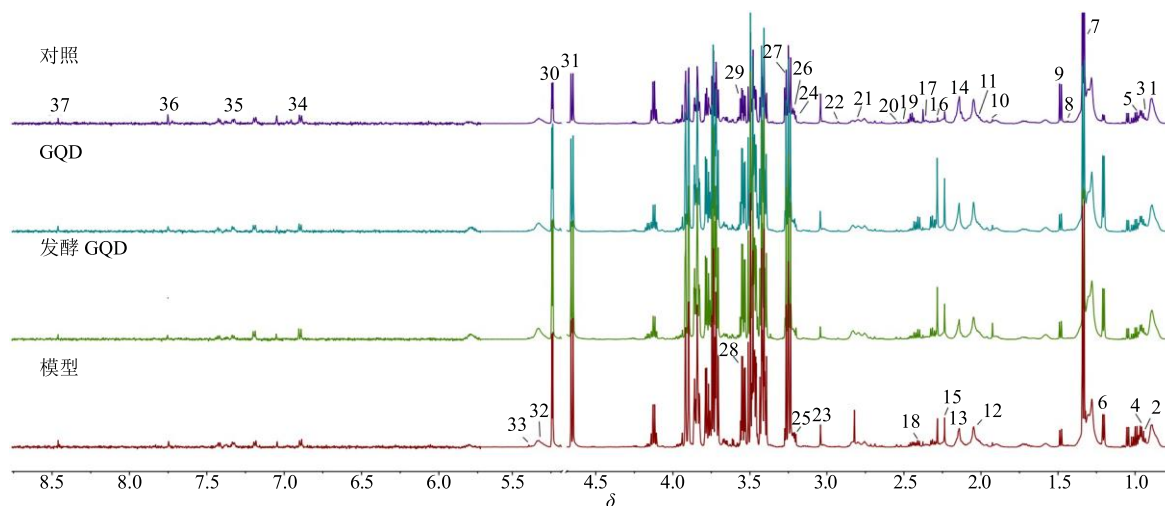


图 1 大鼠血清 ^1H -NMR 图

Fig. 1 Typical ^1H -NMR spectra of rat serum

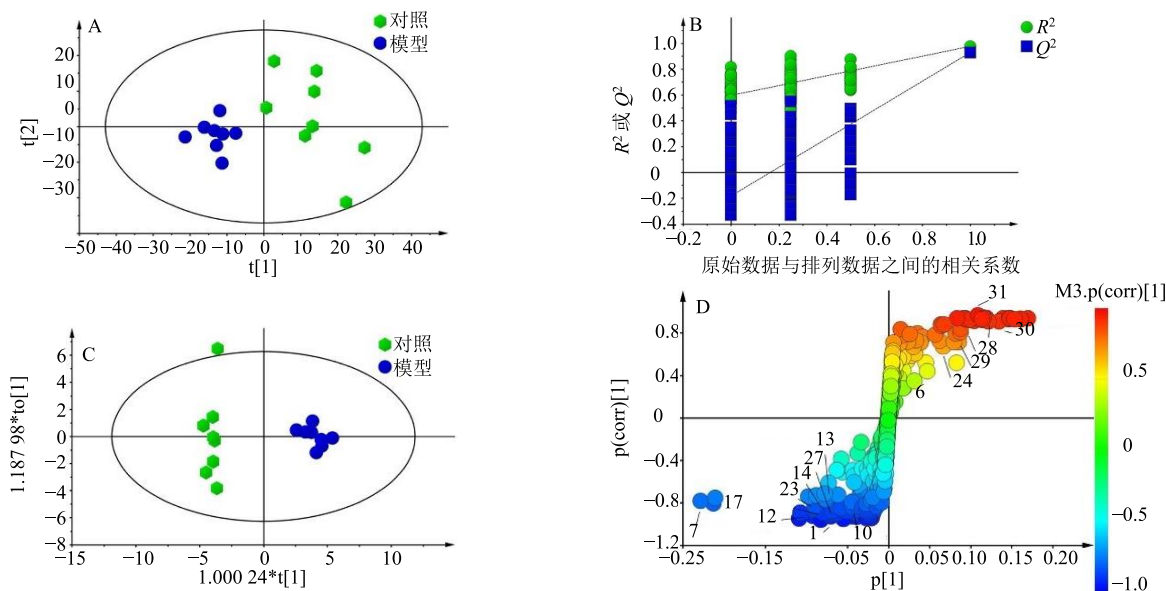
3.3 多元统计分析

$^1\text{H-NMR}$ 图谱虽然提供了血清中丰富的内源性代谢物信息, 但很难直观地显示不同样品之间的整

体差异。为了进一步确定各组间代谢物的差异, 首先采用无监督的 PCA 方法, 对对照组和模型组血清中的代谢物进行分析, 从得分散点图 (图 2-A, PC1:

表 3 大鼠血清中内源性代谢物 $^1\text{H-NMR}$ 图谱归属Table 3 Peak assignment of $^1\text{H-NMR}$ spectra for endogenous metabolites in rat serum

峰号	代谢物	δ_{H}	峰号	代谢物	δ_{H}
1	极低密度脂蛋白	0.89 (m), 1.20~1.30 (m)	21	精氨酸	2.75 (t, $J = 8.4$ Hz), 3.84 (t, $J = 7.2$ Hz)
2	2-氧化异己酸乙酯	0.94 (d, $J = 6.6$ Hz), 2.62 (d, $J = 7.2$ Hz)	22	丁二酮肟	2.93 (s)
3	异亮氨酸	0.96 (t, $J = 7.2$ Hz), 1.01 (d, $J = 7.2$ Hz)	23	肌酸	3.04 (s)
4	亮氨酸	0.97 (t, $J = 7.2$ Hz)	24	胆碱	3.21 (s)
5	缬氨酸	0.99 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.05 (d, $J = 7.2$ Hz)	25	肉毒碱	3.22 (s)
6	3-羟基丁酸	1.20 (d, $J = 6.0$ Hz), 2.31 (dd, $J = 6.6, 13.8$ Hz), 2.41 (dd, $J = 6.6, 13.8$ Hz)	26	磷酸胆碱	3.22 (s), 3.61 (t), 4.25 (t)
7	乳酸	1.33 (d, $J = 7.2$ Hz), 4.12 (q, $J = 7.2$ Hz)	27	氧化三甲胺	3.26 (s)
8	赖氨酸	1.45 (m), 1.70~1.77 (m), 1.90 (m)	28	甘油	3.54 (dd, $J = 3.6, 9.6$ Hz), 3.66 (dd, $J = 4.2, 11.4$ Hz)
9	丙氨酸	1.48 (d, $J = 7.2$ Hz)	29	甘氨酸	3.57 (s)
10	醋酸	1.93 (s)	30	α -葡萄糖	3.90 (dd, $J = 1.8, 12.0$ Hz), 5.24 (d, $J = 7.8$ Hz)
11	<i>N</i> -acetyl groups	2.02 (s)	31	β -葡萄糖	4.65 (d, $J = 7.8$ Hz)
12	谷氨酸	2.05 (m)	32	不饱和脂肪酸	5.32 (m)
13	谷氨酰胺	2.14 (m), 2.45 (m)	33	尿囊素	5.39 (s)
14	蛋氨酸	2.14 (s), 2.65 (t, $J = 7.8$ Hz)	34	酪氨酸	6.90 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz)
15	甘氨酸胆碱	2.23 (s)	35	苯丙氨酸	7.33 (m), 7.38 (m), 7.43 (m)
16	乙酰乙酸	2.28 (s)	36	黄嘌呤	7.75 (s)
17	丙酮酸	2.38 (s)	37	甲酸	8.46 (s)
18	琥珀酸	2.40 (s)			
19	二甲胺	2.49 (s)			
20	柠檬酸	2.54 (d, $J = 16.2$ Hz), 2.70 (d, $J = 16.2$ Hz)			



A、B、C、D-分别表示对照组与模型组大鼠血清 $^1\text{H-NMR}$ 的 PCA 散点图、模型验证图、OPLS-DA 得分图、S-plot 图; D 图中的代谢物编号与表 3 中代谢物编号相对应

A, B, C, D-PCA score plot, permutation test model validation plot, OPLS-DA score plot and S-plot analyses between control and model groups from $^1\text{H-NMR}$ spectra of rat serum, respectively; Number of metabolites in Fig. D corresponding to number of metabolites in table 3

图 2 对照组和模型组大鼠血清代谢物 $^1\text{H-NMR}$ 多元统计分析Fig. 2 Multiple statistical analysis on $^1\text{H-NMR}$ spectra of rat serum in control and model groups

0.32, PC2: 0.128) 可以看出, 2 组可明显分开, 表明 T2DM 大鼠模型复制成功。

为了发现能够表征 T2DM 大鼠的潜在生物标志物, 对对照组与模型组进行有监督的 OPLS-DA, 继而确定 STZ 诱导的 T2DM 模型内源性代谢物的差异。OPLS-DA 必须以 PLS-DA 模型通过验证为基础, 模型评价指标(图 2-B)为 $R^2_X=0.833$ 、 $R^2_Y=0.976$ 、 $Q^2=0.929$, 说明模型质量良好, 可进行下一步差异物的寻找。进而采用有监督的 OPLS-DA 确定注射 STZ 后引起的内源性代谢物差异(图 2-C)。S-plot 图(图 2-D)中变量对分类的重要程度由 VIP(variable importance in the projection) 值的大小来衡量, 变量离原点越远, VIP 值越大。将 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 作为筛选潜在生物标志物的判定标准, 对可能的潜在标记物进行初步鉴定。通过对模型组和对照组进行 OPLS-DA, 筛选出 15 个峰面积具有显著差异 ($P<0.05$) 的潜在生物标志物。与对照组相比, STZ 造模成功后 T2DM 大鼠血清中 3-羟基丁酸、胆碱、甘氨酸、甘油、 β -葡萄糖和 α -葡萄糖 6 个代谢产物含量升高; 乳酸、极低密度脂蛋白、醋酸、谷氨酸、蛋氨酸、谷氨酰胺、丙酮酸、肌酸和氧化三甲胺 9 个代谢产物含量降低。

对模型组、GQD 组、发酵 GQD 组及对照组进行 OPLS-DA(图 3), 结果显示 GQD 组和发酵 GQD 组均位于对照组和模型组之间, 表明给予 2 种药物后均能回调 T2DM 的代谢紊乱。进一步对差异代谢物采用峰面积归一化法进行相对定量分析, 结果见图 4。与模型组比较, GQD 和发酵 GQD 均能不同程度地回调 15 种潜在生物标志物, 其中 GQD 和发酵 GQD 均能够显著回调极低密度脂蛋白、乳酸、谷氨酸、蛋氨酸、丙酮酸、胆碱、氧化三甲胺、甘

氨酸、甘油、 β -葡萄糖等 10 种潜在生物标志物 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。此外, GQD 对谷氨酰胺、肌酸和 α -葡萄糖具有显著回调作用 ($P<0.01$ 、 0.001), 而发酵 GQD 对醋酸有显著回调作用 ($P<0.001$)。

3.4 代谢通路分析

采用 MetPA (<http://metpa.metabolomics.ca/>) 分析生物代谢通路, 显示 15 个代谢产物主要参与了 10 条代谢路径, 见表 4。通过通路拓扑分析计算其影响值, 选出了 8 条 $P<0.05$ 的代谢通路作为高糖高脂饲料联合 STZ 诱导的 T2DM 大鼠模型的代谢通路, 分别为谷氨酰胺和谷氨酸代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 丙酮酸代谢, 糖酵解和糖异生代谢, 柠檬酸循环, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢。通常情况下, $Impact>0.1$ 表明代谢通路发生显著变化, 筛选得到 8 条代谢通路。

4 讨论

糖尿病是严重危害人类健康的主要疾病之一, 是人类致死、致残的主要原因。中药由于其较好地降糖效果和较低的副作用, 目前已经成为防治糖尿病的热点研究领域之一。GQD 是临床上已报道的具有抗 T2DM 作用的中药复方。课题组前期研究表明发酵 GQD 相对 GQD 黄酮类和生物碱类化学成分含量明显升高。那么发酵引起的化学成分含量变化是否会影响 GQD 治疗 T2DM 的作用需深入研究。

发酵 GQD 在改善 T2DM 大鼠的一般状况、增加体质量、减少死亡率等方面作用优于 GQD, 且对改善糖尿病大鼠的生存质量有较好效果。检测 FBG 是诊断糖尿病的依据, 也是判断病情和治疗效果的重要指标。本实验给予 T2DM 大鼠 GQD 和发酵 GQD, 经过 8 周的治疗后, GQD 和发酵 GQD 组大鼠 FBG 均显著低于模型组, 发酵 GQD 组更接近于对照组, 表明 GQD 和发酵 GQD 均能降低血糖, 且发酵 GQD 优于 GQD。

代谢组学从一个总“谱”的宏观角度, 对疾病病理过程或者药物干预过程中的总代谢产物进行分析。代谢组学研究中常用的生物样本包括体液、组织和细胞等, 每种样本所含有的代谢物信息都能映射出研究对象的生理状况。血液中含有多种代谢物, 能够较为全面反映生物体的代谢状况^[27]。

T2DM 患者普遍存在糖代谢紊乱及胰岛素抵抗情况。课题组前期研究表明, GQD 和发酵 GQD 均能改善 T2DM 大鼠胰岛素抵抗指数和敏感指数^[9]。

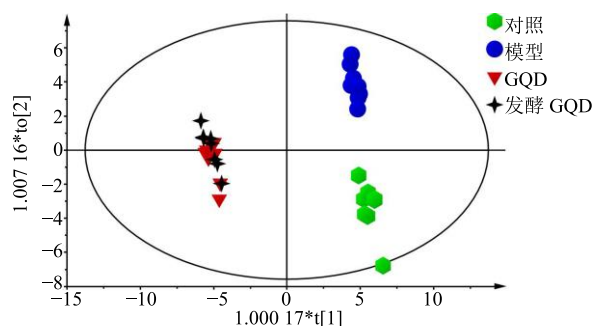
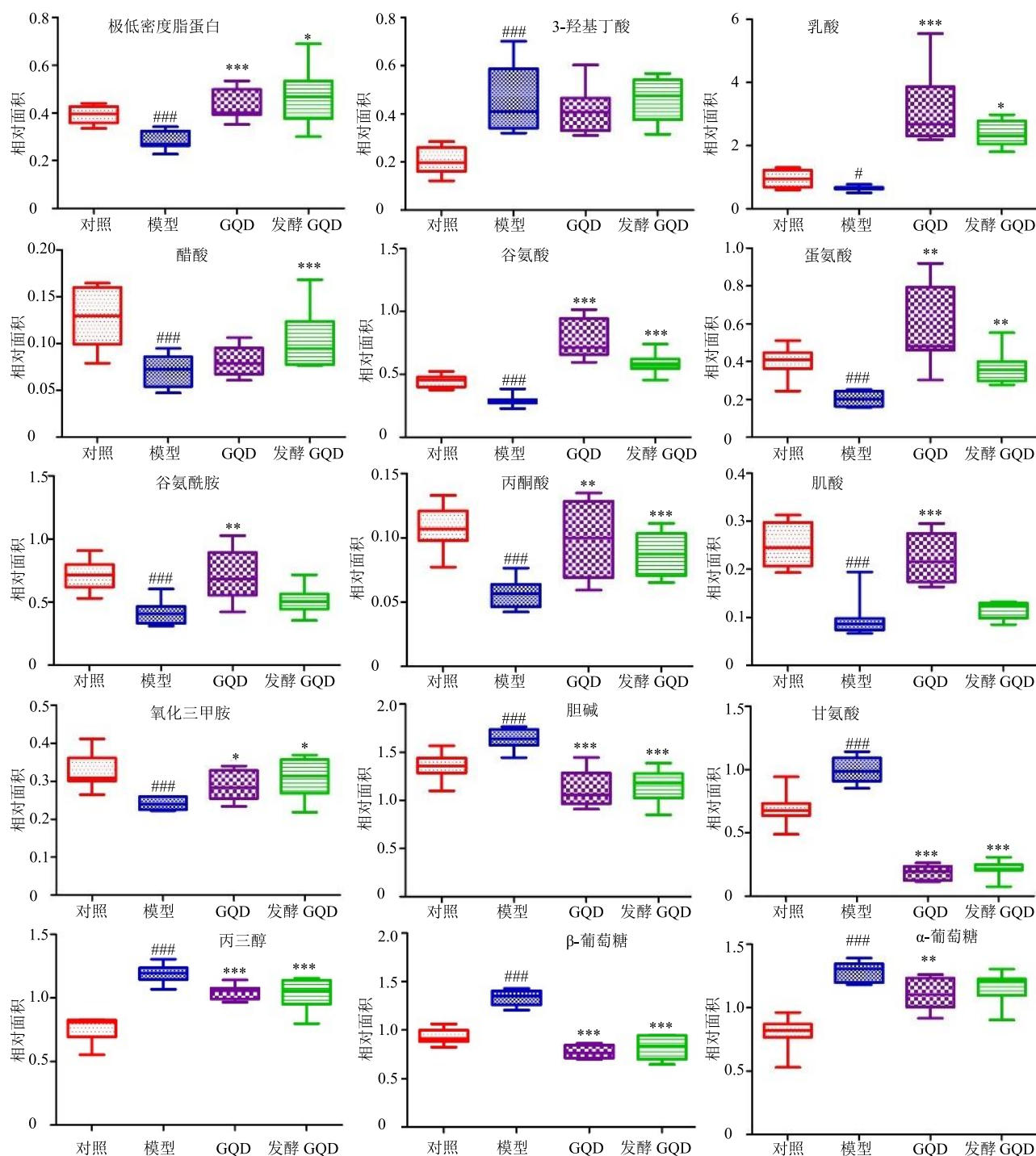


图 3 各组大鼠血清代谢物 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 Score plot of OPLS-DA of rat serum in each group



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

$P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图4 各组大鼠血清中差异性代谢物的变化

Fig. 4 Changes of endogenous metabolites in each group

发生胰岛素抵抗的肝脏会降低对葡萄糖的摄取利用,促进肝糖异生,降低肝糖合成,降低外周组织对血糖的利用^[28]。当机体对葡萄糖利用不足而导致能量缺乏时,乳酸会被氧化成丙酮酸而进入三羧酸

循环,从而提供大量的能源,乳酸和丙酮酸都通过糖异生途径参与糖代谢。本研究中高糖高脂饲料联合STZ所致T2DM模型大鼠血清中乳酸和丙酮酸含量均降低,与相关报道一致^[29]。因此,乳酸和丙酮

表 4 MetPA 代谢通路分析结果
Table 4 Results of MetPA metabolic pathway analysis

代谢通路	化合物	P 值	Impact 值
D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	谷氨酰胺、谷氨酸	0.000 78	1.000 00
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	丙酮酸、谷氨酸、谷氨酰胺	0.001 13	0.409 28
乙醛酸和二羧酸代谢	α -葡萄糖	0.139 17	0.296 30
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	胆碱、甘氨酸、肌酸、丙酮酸	0.000 14	0.291 97
甘油酯代谢	甘油	0.155 25	0.280 98
丙酮酸代谢	乳酸、丙酮酸、醋酸盐	0.000 87	0.243 37
糖酵解或糖异生	乳酸、乙酸、丙酮酸	0.001 43	0.127 53
三羧酸循环	丙酮酸、 α -葡萄糖	0.013 73	0.125 40
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	蛋氨酸、丙酮酸	0.026 20	0.115 67
精氨酸和脯氨酸代谢	谷氨酰胺、谷氨酸	0.006 62	0.105 45

酸含量降低进一步表明糖异生增强。给予 GQD 和发酵 GQD 后,大鼠血清中乳酸和丙酮酸含量明显升高,提示 GQD 和发酵 GQD 均可减少糖异生,并促进外周组织对糖的利用,改善胰岛素抵抗。本研究显示 T2DM 大鼠血清中 α -葡萄糖和 β -葡萄糖含量升高,这符合 T2DM 的生物化学特征,与传统诊断方法的结果一致。

肌酸可以经肝脏、肾脏和胰腺自行合成,进入血液被外周组织利用。本研究中 T2DM 模型大鼠血清中肌酸含量降低。提高肌酸含量可以增强胰岛素敏感性,促进胰岛素释放,提高血糖利用率^[7]。本研究中 GQD 可显著回调肌酸含量,而发酵 GQD 对肌酸含量无影响。丙三醇(甘油)是葡萄糖合成的重要前体,同时也是脂质的分解产物。当机体对血糖的利用不足时,脂肪分解加速,大量的脂肪酸和甘油进入肝脏^[30],本研究中 T2DM 大鼠血清中甘油含量显著升高,提示机体脂质代谢发生紊乱。GQD 和发酵 GQD 干预后均能显著下调甘油含量,提示 GQD 和发酵 GQD 可能通过调节甘油酯代谢而发挥作用。胆碱是脂质代谢的产物,其浓度升高被认为是肾髓质受损害的典型标志物^[31]。在肠道菌的作用下,胆碱可以降解为甲胺、三甲胺和氧化三甲胺^[32]。本研究中 T2DM 模型大鼠血清中胆碱含量升高,氧化三甲胺含量显著降低。说明胆碱降解为氧化三甲胺路径受阻,可能是由于 T2DM 模型大鼠肠道菌群的破坏及胆碱代谢的紊乱造成的。GQD 和发酵 GQD 干预后,胆碱含量与模型组大鼠相比显著降低,氧化三甲胺含量显著升高。表明 GQD 和发酵 GQD 可以改善大鼠肾髓质受损情况,促进胆碱向氧

化三甲胺的转化,改善脂质代谢的紊乱。另外,T2DM 大鼠血清中极低密度脂蛋白含量显著降低,但是也有相关报道表明低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白含量在 T2DM 发病过程中是升高的^[7],这可能是由于其检测的样品是尿液或者动物处于不同的糖尿病时期所致。GQD 和发酵 GQD 均能显著回调低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白含量。

谷氨酰胺和谷氨酸这 2 种氨基酸是生糖氨基酸,可通过糖异生代谢途径转化成葡萄糖。由于胰岛素抵抗,胰岛素靶向组织对葡萄糖摄取能力降低,大量葡萄糖通过尿液排泄,机体不能获得所需的能量,糖异生作用增强,血中生糖氨基酸通过糖异生途径转化成葡萄糖,故血浆中的生糖氨基酸浓度会降低。本研究中 T2DM 大鼠血清中谷氨酰胺和谷氨酸含量降低,GQD 和发酵 GQD 干预后谷氨酸的含量明显升高。仅有 GQD 对谷氨酰胺有显著回调作用。蛋氨酸又称甲硫氨酸,是人体一种必须氨基酸,参与蛋白质合成。如果甲硫氨酸缺乏就会导致体内蛋白质合成受阻,造成机体损害。蛋氨酸为半胱氨酸的代谢前体,半胱氨酸其可降低糖尿病的氧化应激和过氧化物水平,降低糖尿病胰岛素抵抗,从而改善胰岛功能、协助降糖^[33]。本研究中 T2DM 大鼠血清中蛋氨酸含量显著降低,GQD 和发酵 GQD 均能显著升高蛋氨酸含量而协助降糖。甘氨酸为体内非必需氨基酸,由葡萄糖转变而来,其含量升高可能是由于高血糖引起某些细胞或器官存在一定程度的损伤,增高了糖异生途径水平^[7]。本研究中 T2DM 模型大鼠血清中甘氨酸含量显著升高,给与 GQD 和发酵 GQD 均能显著降低甘氨酸含量,减少糖异生。

本研究以 T2DM 大鼠血液内源性代谢物的变化规律为切入点, 结合生化指标对传统 GQD 和发酵 GQD 干预 T2DM 大鼠的药效差异进行比较。结果显示 GQD 和发酵 GQD 均能通过增加体质量, 降低 FBG 等途径发挥抗 T2DM 作用。代谢组学从微观角度初步分析了 T2DM 大鼠血清代谢表型谱, 从代谢谱图中寻找到具有生物学意义的, 并且与 T2DM 相关的 15 种生物标志物和 8 条代谢通路。GQD 和发酵 GQD 均能调节参与葡萄糖代谢、脂肪酸代谢和氨基酸代谢途径的 10 个代谢物。本研究从宏观和微观 2 个角度证明发酵方(发酵 GQD)和原方(GQD)均能抗 T2DM。

结合课题组前期研究结果, GQD 经过发酵后可减少非药用成分含量, 提高有效成分浓度, 从而降低药物服用剂量, 提示发酵 GQD 具有一定的临床应用优势。本研究结果从代谢组学的角度为发酵 GQD 的临床应用提供了实验数据和理论基础, 也为中药发酵技术在中药复方研究中的应用提供了新的探索。

参考文献

- [1] Ginter E, Simko V. *Type 2 Diabetes Mellitus, Pandemic in 21st Century* [M]. Arlington: American Diabetes Association, 2013.
- [2] Ogurtsova K, da Rocha Fernandes J D, Huang Y, *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.
- [3] Chatterjee S, Khunti K, Davies M J. Type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 2017, 389(100785): 2239-2251.
- [4] Lee A L, Chen B C, Mou C H, *et al.* Association of traditional Chinese medicine therapy and the risk of vascular complications in patients with type II diabetes mellitus: a nationwide, retrospective, Taiwanese-registry, cohort study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(3): e2536.
- [5] Tong X L, Zhao L H, Lian F M, *et al.* Clinical observations on the dose-effect relationship of Gegen Qinlian Decoction on 54 out-patients with type 2 diabetes [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 31(1): 56-59.
- [6] Zhang C H, Xu G L, Liu Y H, *et al.* Anti-diabetic activities of Gegen Qinlian Decoction in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic rats and in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(3): 221-229.
- [7] Tian N, Wang J S, Wang P G, *et al.* NMR-based metabonomic study of Chinese medicine Gegen Qinlian Decoction as an effective treatment for type 2 diabetes in rats [J]. *Metabolomics*, 2013, 9(6): 1228-1242.
- [8] Chen H, Guo J, Pang B, *et al.* Application of herbal medicines with bitter flavor and cold property on treating diabetes mellitus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, doi: 10.1155/2015/529491.
- [9] 李 津, 高铁祥, 宋 强, 等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病大鼠降糖降脂作用机理初探 [J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(3): 7-9.
- [10] 张 敏, 杜晨晖, 李 津, 等. 基于血清代谢组学比较葛根芩连汤饮片与煮散对 2 型糖尿病大鼠的干预作用 [J]. 药学学报, 2017, 52(9): 444-451.
- [11] Guo P, Wu C. Gut microbiota brings a novel way to illuminate mechanisms of natural products *in vivo* [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(4): 301-306.
- [12] 王兴红, 李祺德, 曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容 [J]. 中草药, 2001, 32(3): 267-268.
- [13] Hussain A, Bose S, Wang J H, *et al.* Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines [J]. *Food Res Int*, 2016, 81: 1-16.
- [14] Jeon W J, Oh J S, Park M S, *et al.* Anti-hyperglycemic effect of fermented ginseng in type 2 diabetes mellitus mouse model [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(2): 166-172.
- [15] Zhang L, Zhang L, Li Y, *et al.* Biotransformation effect of *Bombyx mori* L. may play an important role in treating diabetic nephropathy [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(11): 872-879.
- [16] Chen J, Cheng Y Q, Yamaki K, *et al.* Anti- α -glucosidase activity of Chinese traditionally fermented soybean (Douchi) [J]. *Food Chem*, 2007, 103(4): 1091-1096.
- [17] Lim S H, Ryu J M, Lee H, *et al.* Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 50549 without pretreatment for inulin hydrolysis [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 2109-2111.
- [18] 吕旭聪, 翁 星, 黄若兰, 等. 红曲黄酒酿造用曲及传统酿造过程中酵母菌的多样性研究 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(1): 182-190.
- [19] 张丽霞, 高文远, 王海洋. 六神曲中酵母菌的鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1928-1931.
- [20] Tan L J, Zhang X, Mei Z G, *et al.* Fermented Chinese formula Shuan-Tong-Ling protects brain microvascular endothelial cells against oxidative stress injury [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, doi: 10.1155/2016/5154290.
- [21] 李 津, 高铁祥, 宋 强, 等. 正交试验优选葛根芩连汤固态发酵制备工艺 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(9): 3272-3274.

- [22] 杜晨晖, 闫 艳, 冯前进, 等. 葛根芩连汤发酵前后总黄酮和总生物碱含量变化研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4850-4853.
- [23] Zhang X Y, Wang Y L, Hao F H, *et al.* Human serum metabonomic analysis reveals progression axes for glucose intolerance and insulin resistance statuses [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(11): 5188-5195.
- [24] 李震宇, 李爱平, 张福生, 等. 植物代谢组学技术在山西道地药材研究中的应用 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 785-789.
- [25] Lanza I R, Zhang S C, Ward L E, *et al.* Quantitative metabolomics by ¹H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10538.
- [26] Maher A D, Crockford D, Toft H, *et al.* Optimization of human plasma ¹H NMR spectroscopic data processing for high-throughput metabolic phenotyping studies and detection of insulin resistance related to type 2 diabetes [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(19): 7354-7362.
- [27] 陈 磊, 向 欢, 邢 婕, 等. 补中益气汤干预脾虚证模型大鼠脾脏 ¹H-NMR 代谢组学机制研究 [J]. 药理学报, 2014, 49(9): 1320-1325.
- [28] 朱小花. 香蕉粉对 II 型糖尿病胰岛素抵抗的改善作用及其机制研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [29] Diao C F, Zhao L C, Guan M 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 Bio Syst*, 2014, 10(3): 686-693.
- [30] McCabe C F, Perng W. Metabolomics of diabetes in pregnancy [J]. *Curr Diab Rep*, 2017, doi: 10.1007/s11892-017-0890-3.
- [31] Weijers R N M. Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2012, 8(5): 390-400.
- [32] Tang W H W, Wang Z, Kennedy D J, *et al.* Gut microbiota-dependent trimethylamine n-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease [J]. *Circ Res*, 2015, 116(3): 448-455.
- [33] 吴小秋. 基于代谢组学的生脉注射液干预 2 型糖尿病气阴两虚证的临床研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.