

基于¹H-NMR代谢组学的山楂不同炮制品对高脂血症大鼠模型的影响研究

聂春霞^{1,2}, 何盼², 郝艳艳², 刘聪², 倪艳², 郝旭亮^{2*}

1. 山西中医药大学, 山西 太原 030619

2. 山西省中医药研究院, 山西 太原 030045

摘要: 目的 探讨山楂炒制前后调脂作用的差异, 筛选山楂调脂最优炮制品。方法 采用高脂饲料法制备SD大鼠高脂血症模型, 应用¹H-NMR测定大鼠血清代谢物, 结合多元统计分析方法分析给予大鼠净山楂、炒山楂、焦山楂后血清代谢物的变化, 比较各炮制品对高脂血症大鼠模型的干预作用。结果 山楂不同炮制品均能显著降低高脂血症模型大鼠血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平, 其中净山楂降低血脂作用最佳。与对照组相比, 模型组大鼠血清中乳酸、丙酮酸、赖氨酸、肌酸、甘油酯、鸟氨酸、氧化三甲胺(TMAO)、 α -酮异戊酸、O-乙酰糖蛋白、N-乙酰糖蛋白、亮氨酸、异亮氨酸含量升高, 而胆碱、丙酮、苏氨酸、鲨肌醇、谷氨酰胺、谷氨酸、单不饱和脂肪酸(MUFA)、多不饱和脂肪酸(PUFA)、甘油磷脂酰胆碱(GPC)、葡萄糖含量降低。给药后山楂各炮制组大鼠血清中内源性物质的代谢状态差异明显, 与炒山楂、焦山楂组相比, 净山楂组调节高脂血症模型大鼠血清中差异代谢物的数量和程度更接近对照组。结论 山楂炮制后调脂作用存在差异, 且以净山楂效果最优, 可能是通过调节氧化应激、能量代谢、氨基酸代谢及肠道菌群等发挥作用。

关键词: 山楂; 炒山楂; 焦山楂; 炮制; 高脂血症; ¹H-NMR 代谢组学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)10-2362-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.016

Effects of different processed products of *Crataegi Fructus* on hyperlipidemia rat model by ¹H-NMR metabolomics

NIE Chun-xia^{1,2}, HE Pan², HAO Yan-yan², LIU Cong², NI Yan², HAO Xu-liang²

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

2. Shanxi Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030045, China

Abstract: **Objective** To investigate the difference of lipid-lowering effect of raw and processed *Crataegi Fructus*, and to select the optimal antihyperlipidemic product. **Methods** The hyperlipidemia model of SD rats was induced by high fat diet. After administration of *Crataegi Fructus* (1.5 g/kg), fried and coked *Crataegi Fructus* (1.5 g/kg), the changes of serum metabolites were analyzed by ¹H-NMR technique combined with multivariate statistical analysis. **Results** Different processing products of *Crataegi Fructus* can significantly reduce the levels of TC, TG, LDL-C in hyperlipidemia rats, among which *Crataegi Fructus* had best hypolipidemic effects. The serum contents of lactate, pyruvate, lysine, creatine, glycerol, ornithine, TMAO, α -ketoisovaleric acid, O-acetyl glycoprotein, N-acetyl glycoprotein, leucine and isoleucine were increased in model group, while choline, acetone, threonine, scyllitol, glutamine, glutamic acid, MUFA, PUFA, GPC, and glucose were decreased compared with control group. After administration of different processing products of *Crataegi Fructus*, endogenous metabolites were recovered significantly. The effect of *Crataegi Fructus* on hyperlipidemia was superior to those of fried and coked *Crataegi Fructus* according to the degree and number of the metabolites recovered. **Conclusion** There are differences between the raw and processed *Crataegi Fructus*, and raw *Crataegi Fructus* showed the best effect on hyperlipidemia, the effect may be achieved through regulating oxidative stress, energy metabolism, amino acid metabolism, and gut microbiota.

Key words: *Crataegi Fructus*; fried *Crataegi Fructus*; coked *Crataegi Fructus*; processing; hyperlipidemia; ¹H-NMR metabolomics

高脂血症是指血液循环中总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)异常升高, 打破机体胆固醇代谢平衡, 引起脂质代谢紊乱, 容易导致动脉粥样硬化、冠心病等心脑血管

收稿日期: 2018-12-04

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-JIN-34)

作者简介: 聂春霞(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分分析与质量控制。Tel: 18335165946 E-mail: 1191979532@qq.com

*通信作者 郝旭亮, 博士生导师, 主任药师, 主要从事中药作用物质基础及作用机制研究。

疾病。血脂代谢异常引起的心脑血管疾病是我国死亡率最高的病症之一,目前临床上多用他汀类、贝特类等药物治疗,但因存在耐药性及毒副作用限制了药物的使用。中药则由于毒副作用小的优势而备受关注,目前用于治疗高脂血症的有山楂、白术、栀子等单味药以及大柴胡汤、泽泻汤、血脂宁等复方^[1],且疗效显著。

山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实^[2]。《中国药典》2015 年版收载了净山楂、炒山楂和焦山楂。山楂除去杂质及脱落的核即为净山楂;净山楂用火加热,炒制颜色变深,取出放凉即为炒山楂;净山楂用中火加热,炒制表面焦褐色,内部黄褐色,取出放凉即为焦山楂^[3]。净山楂味酸、甘,性微温,归脾、胃、肝经,擅于活血化瘀,临床上净山楂与不同药物配伍可治疗高脂血症、高血压病和冠心病等,如脑得生丸和脑得生片;以及改善消食功能,如大山楂丸。炒山楂酸味减弱,可缓和对胃的刺激性,用于脾虚食滞、食欲不振、神倦乏力,在临床上用于脾胃虚弱、运化失常、纳谷不香、大便不实等。焦山楂不仅酸味减弱,且增加了苦味,长于消食止泻或导而不峻下^[4-5],如保和丸及小儿化食丸,临床上还用于治疗细菌性肠炎和小儿腹泻。

代谢组学研究生物体在内因或外因各因素影响下内源性小分子的变化。代谢产物是机体表型最基本成分,直接反映治疗效果及机体健康状况。利用 NMR 及 LC-MS 等技术可以系统地定性和定量内源性代谢物,监测机体内代谢产物的动态变化,阐释病因病机,探讨药物对机体产生的内源性物质的总体代谢的调控作用,得到潜在的生物标志物,具有灵敏度高、不破坏内环境、整体性的特点^[6-7],与中医治疗的整体观念不谋而合。

针对中药传统炮制理论中“生熟异用论”,本研究炮制对山楂调脂作用的影响,采用 ¹H-NMR 代谢组学技术分析高脂血症模型大鼠血清中内源性代谢物的变化,考察炮制前后山楂调脂作用的差异,初步探讨山楂的调脂机制,为中医用药提供理论依据。

1 材料

1.1 动物与饲料

SPF 级 SD 大鼠 40 只,雄性,体质量 70~90 g,购自北京市华阜康生物科技有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2014-0004,合格证号

11401300076616。高脂饲料(配方:猪油 10%、蔗糖 15%、酪蛋白 5%、蛋黄粉 15%、胆固醇 1.2%、胆酸钠 0.2%、碳酸氢钙 0.6%、石粉 0.4%、基础饲料 52.6%),购于北京市华阜康生物科技有限公司,许可证号 SCXK(京)2014-0008,合格证号 11003800014954。

1.2 药材、仪器与试剂

净山楂、炒山楂、焦山楂(批号 20180110),产地山西,由山西振东集团提供,经山西省中医药研究院方剂研究所倪艳教授鉴定为蔷薇科植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实。SE402F 奥豪斯电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司);SIGMA 1-14 高速离心机(SIGMA Laborzentrifugen Inc.,德国);Bruker 600 MHz Avance III NMR Spectrometer(德国 Bruker 公司,600 MHz 核磁仪,600.13 MHz 质子频率);Chemray 360 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。甲醇(分析纯,天津市申泰化学试剂有限公司);重水(D₂O, Sigma-Aldrich 公司,美国);TC、TG、LDL-C、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(中生北控生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 山楂炮制品水煎液的制备

取山楂各炮制品适量,加 10 倍量水,浸泡 30 min,微沸 30 min,滤过,药渣加 8 倍量水,微沸 30 min,滤过,药渣再加 6 倍量水,微沸 30 min,滤过,合并 3 次滤液,浓缩,60 ℃ 烘箱烘干,净山楂、炒山楂、焦山楂的出膏率分别为 40.20%、38.33%、41.52%,粉碎,干燥器中保存。

2.2 动物分组、造模及给药

40 只 SPF 级雄性大鼠,在实验环境[温度(23±2)℃,湿度(50±5)%]下适应性喂养 1 周后,称量体质量。根据体质量将实验动物随机分为 5 组,分别为对照组、模型组、净山楂组(生药 1.5 g/kg)、炒山楂组(生药 1.5 g/kg)、焦山楂组(生药 1.5 g/kg),药物剂量根据《中国药典》2015 年版设置,每组 8 只。对照组喂饲普通饲料连续 8 周,并于第 5 周开始 ig 给予纯化水。其余 4 组喂饲高脂饲料 4 周后,模型组 ig 给予相应体积纯化水,各给药组按剂量 ig 给予相应药物,连续 4 周,同时继续喂饲高脂饲料。于第 8 周周末,称量大鼠体质量,以 20% (0.2 g/mL) 乌拉坦 ip 麻醉大鼠,腹主动脉取血 6 mL,室温放置 2 h,4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,并分装,于-80 ℃ 保存,备用。

采用 ELISA 法测定各组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平（按试剂盒说明操作）。

2.3 血清核磁样品制备及测定条件

取上述血清 450 μL 于 1.5 mL EP 管中，再加入 350 μL D_2O ，涡旋 30 s，13 000 r/min 离心 15 min，取上清液 600 μL 于 5 mm 核磁管中，待测。采用 CPMG（Carr-Purcell-Meiboom-Gill）脉冲序列，谱宽为 12 019.2 Hz，扫描次数为 64 次。

2.4 ^1H -NMR 图谱处理

采用 MestReNova 核磁图谱专业处理软件对全部 ^1H -NMR 图谱以肌酸（ δ 3.04）为标准对图谱进行化学位移的校正，并进行相位、基线调整，以 δ 0.01 为单位，对 δ 0.70~9.00 区域的谱图进行等宽度分割，切除 δ 4.50~5.10 水峰以及 δ 1.21~1.26 和 δ 4.05~4.11 麻醉剂峰，对图谱进行分段积分，将积分数据归一化处理，用于多元统计分析。

2.5 统计学分析

采用 SIMCA-P 13.0 软件将 NMR 采集处理的积分数据中心化和规格化后，进行多元统计分析，包括主成分分析（PCA），进一步用偏最小二乘判别分析（PLS-DA）以及正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）优化组间差异，以 OPLS-DA 模型 VIP（variable importance in the projection）值大于 1 作为差异代谢成分。采用 SPSS 22.0 软件中 One-Way ANOVA 对差异代谢物进行显著性检验。

3 结果

3.1 对高脂血症大鼠血脂水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平明显升高（ $P < 0.05$ 、0.01），HDL-C 水平明显降低（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，各给药组均能显著下调大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平（ $P < 0.01$ ），对 HDL-C 水平无上调作用。山楂各炮制品组对高脂血症模型大鼠血脂水平均有不同程度的回调。结果见表 1。

表 1 山楂不同炮制品对高脂血症模型大鼠血脂水平的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 8$ ）

Table 1 Effects of different processed products of *Crataegi Fructus* on serum lipid level of rats（ $\bar{x} \pm s$, $n = 8$ ）

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.50 ± 0.05	0.55 ± 0.06	0.22 ± 0.02	0.80 ± 0.06
模型	—	1.69 ± 0.05*	0.67 ± 0.11*	0.51 ± 0.07**	0.51 ± 0.11**
净山楂	1.5	1.20 ± 0.09 ^{##}	0.45 ± 0.10 ^{##}	0.37 ± 0.06 ^{##}	0.24 ± 0.07
炒山楂	1.5	1.40 ± 0.11 ^{##}	0.48 ± 0.10 ^{##}	0.34 ± 0.12 ^{##}	0.25 ± 0.06
焦山楂	1.5	1.43 ± 0.10 ^{##}	0.53 ± 0.10 ^{##}	0.45 ± 0.12	0.29 ± 0.04

与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ，下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below

3.2 血清 ^1H -NMR 图谱指认及分析

大鼠血清的 ^1H -NMR 核磁谱图见图 1，通过分析谱图的化学位移、峰形、偶合常数，参考文献报道^[8]，结合数据库 biological magnetic resonance data bank（BMRB，<http://www.bmr.b.wisc.edu/>）、the human metabolome database（HMDB，<http://www.hmdb.ca/>），共指认出 37 种内源性代谢物质，结果见表 2。

3.3 多元统计分析

为了进一步寻找差异代谢物并对其可视化处理，对不同组别样本中检测到的代谢物进行代谢轮廓分析，将图谱数据降维处理后进行多元统计分析。无监督判别模式 PCA 可观察样本及不同组别之间的自然聚类趋势，反映机体受外界干预的整体变化。不同组别样本在 PCA Score plot 上即可分离是多维统

计结果可靠性的最有力证据。采用 PCA 方法对各组大鼠血清样本 ^1H -NMR 图谱进行数据矩阵统计分析，结果见图 2。模型组与对照组明显分开，血清中内源性代谢产物发生了变化，表明高脂血症模型复制成功。山楂各炮制品组与模型组明显分开并有向对照组接近的趋势，表明山楂各炮制品对高脂血症模型大鼠有一定的改善作用，山楂炮制品各组之间相比，净山楂组向对照组回调的趋势更大，炒山楂组次之，焦山楂组回调趋势稍弱，调脂作用强弱为净山楂 > 炒山楂 > 焦山楂，与血清生化指标结果基本一致。

有监督的 OPLS-DA 方法能够把预先设定的和分类无关的信息最大程度从原始数据矩阵分离，从而将最相关的因素集中到第一个主成分上，使组间样本分离效果更佳，组内差异弱化，组间差异最大化

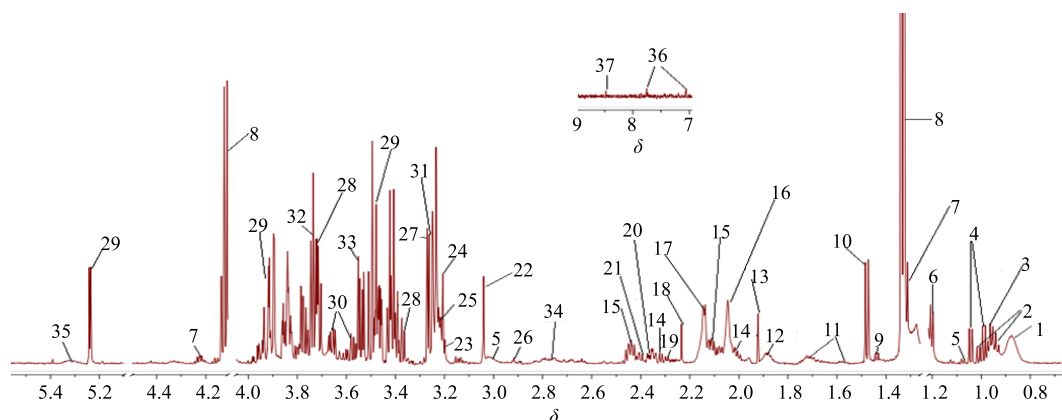


图 1 大鼠血清典型的 ^1H -NMR 图谱

Fig. 1 Typical ^1H -NMR spectrum of serum in rats

表 2 大鼠血清主要代谢物 ^1H -NMR 核磁图谱数据归属

Table 2 ^1H -NMR assignments of major metabolites in serum of rats

编号	代谢物	δ_{H}	编号	代谢物	δ_{H}
1	LDL/VLDL	0.88 (m), 1.28 (m)	20	丙酮酸盐	2.37 (s)
2	异亮氨酸	0.94 (t, $J = 7.2$ Hz), 1.01 (d, $J = 7.2$ Hz)	21	琥珀酸	2.41 (s)
3	亮氨酸	0.96 (t, $J = 6.6$ Hz)	22	肌酸	3.04 (s), 3.94 (s)
4	缬氨酸	0.99 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.04 (d, $J = 7.2$ Hz)	23	胆碱	3.20 (s)
5	α -酮异戊酸	1.07 (d, $J = 7.2$ Hz), 3.0 (m)	24	磷酸胆碱	3.21 (s)
6	3-羟基丁酸	1.20 (d, $J = 6.6$ Hz)	25	甘油磷酸胆碱	3.22 (s)
7	苏氨酸	1.31 (d, $J = 6.5$ Hz), 4.22 (m)	26	三甲胺	2.92 (s)
8	乳酸	1.33 (d, $J = 7.2$ Hz), 4.12 (q, $J = 7.2$ Hz)	27	TMAO	3.27 (s)
9	2-丙酸苯酯	1.44 (d, $J = 6.6$ Hz)	28	鲨肌醇	3.35 (s)
10	丙氨酸	1.48 (d, $J = 7.8$ Hz)	29	葡萄糖	3.45 (m), 3.74 (m), 3.82 (m), 3.90 (dd, $J = 1.8$, 12.0 Hz), 5.24 (d, $J = 3.6$ Hz)
11	赖氨酸	1.70 (m), 1.88 (m), 1.50 (m)	30	甘油酯	3.57 (dd, $J = 4.8$, 11.4 Hz), 3.66 (dd, $J = 4.2$, 12.0 Hz)
12	鸟氨酸	1.72 (m), 1.87 (m), 1.92 (m)	31	甜菜碱	3.26 (s), 3.93 (s)
13	醋酸	1.92 (s)	32	二甲基甘氨酸	3.70 (s)
14	谷氨酸	2.05 (m), 2.35 (m)	33	甘氨酸	3.55 (s)
15	谷氨酰胺	2.15 (m), 2.44 (m)	34	PUFA	2.78 (m)
16	N-乙酰糖蛋白	2.05 (s)	35	MUFA	5.30 (m)
17	O-乙酰糖蛋白	2.14 (s)	36	甲基组氨酸	7.04 (s), 7.74 (s)
18	丙酮	2.23 (s)	37	甲酸	8.46 (s)
19	乙酰乙酸	2.28 (s)			

LDL-低密度脂蛋白; VLDL-极低密度脂蛋白; TMAO-氧化三甲胺; PUFA-多不饱和脂肪酸; MUFA-单不饱和脂肪酸

LDL-low density lipoprotein; VLDL-very low density lipoprotein; TMAO-oxidation of trimethylamine; PUFA-polyunsaturated fatty acids; MUFA-monounsaturated fatty acids

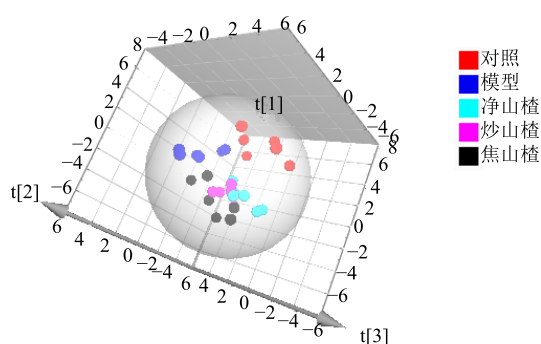


图 2 各组大鼠 PCA 3D 散点图

Fig. 2 PCA 3D-score plot of rats in each group

凸显。为了确定造模前后及山楂各炮制品干预后的差异代谢产物, 对模型组与对照组以及模型组与各给药组进行组间 OPLS-DA 分析, 分别得到 OPLS-DA 散点图和 S-plot 图, 结果见图 3。根据 S-plot 图及 VIP 值结合分析, 图中“S”曲线上离原点越远的点 VIP 值越大, 变量的 VIP 值越大, 对分组贡献越大, 筛选出 $\text{VIP} > 1$ 的代谢产物^[9]。应用 SPSS 22.0 软件对这些代谢产物的相对峰面积 (相对含量) 进行方差分析, 得到具有显著差异的潜在生物标志物, 结果见图 4。

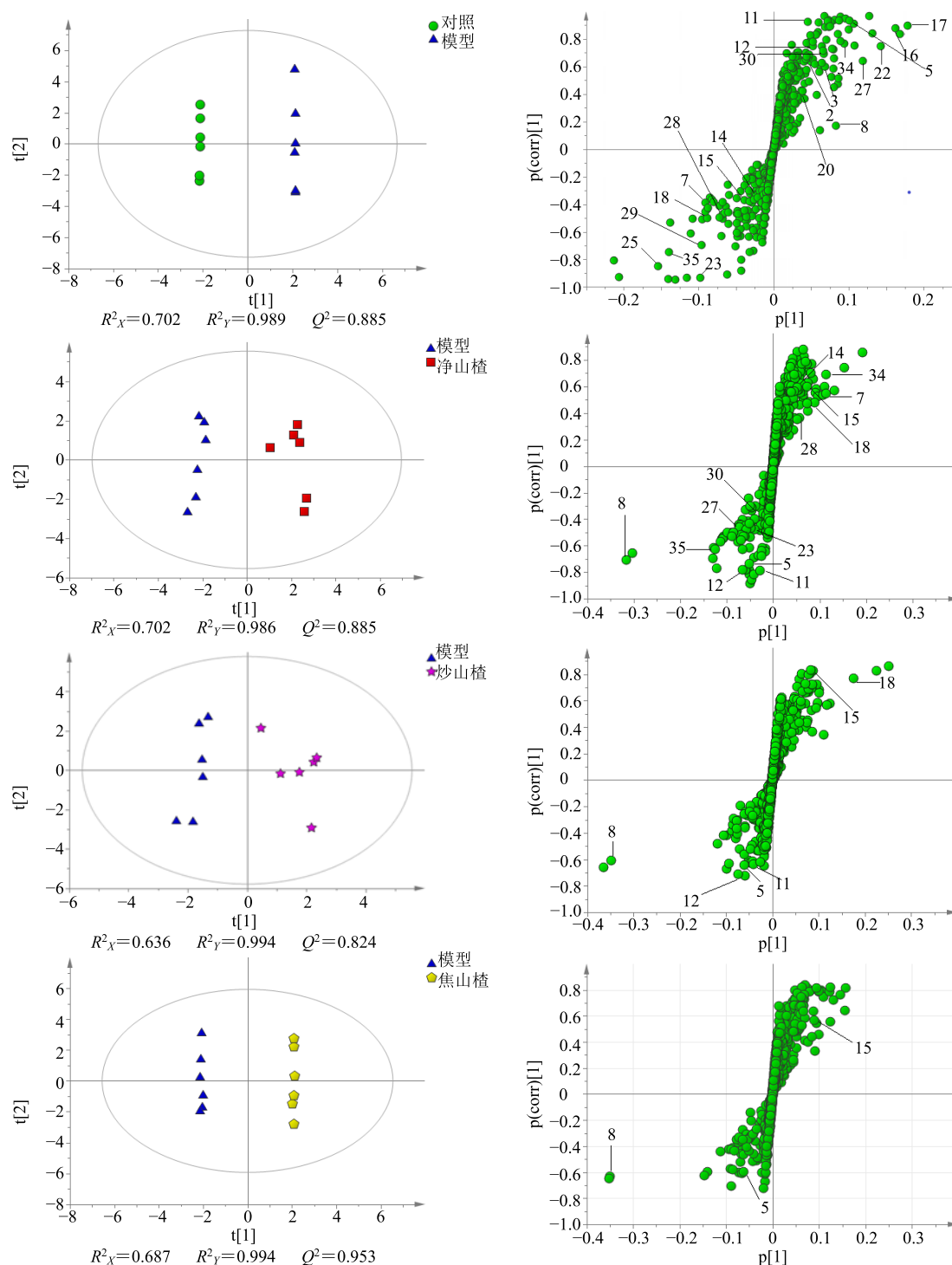


图 3 大鼠血清 OPLS-DA 散点图 (左) 和 S-plot 图 (右)

Fig. 3 OPLS-DA score plot (left) and S-plot (right) in serum of rats

对照组与模型组的 OPLS-DA 散点图结果显示两组明显分开,表明造模成功。由图 3 及图 4 可知,与对照组比较,模型组中有 22 个内源性代谢产物具有显著性差异 ($P<0.05$),其中乳酸、丙酮酸、赖氨酸、肌酸、甘油酯、鸟氨酸、氧化三甲胺(TMAO)、

α -酮异戊酸、*O*-乙酰糖蛋白、*N*-乙酰糖蛋白、亮氨酸、异亮氨酸含量升高,而胆碱、丙酮、苏氨酸、鲨肌醇、谷氨酰胺、谷氨酸、甘油磷脂酰胆碱(GPC)、葡萄糖、多不饱和脂肪酸(PUFA)、单不饱和脂肪酸(MUFA)含量降低。与模型组比较,净山楂可

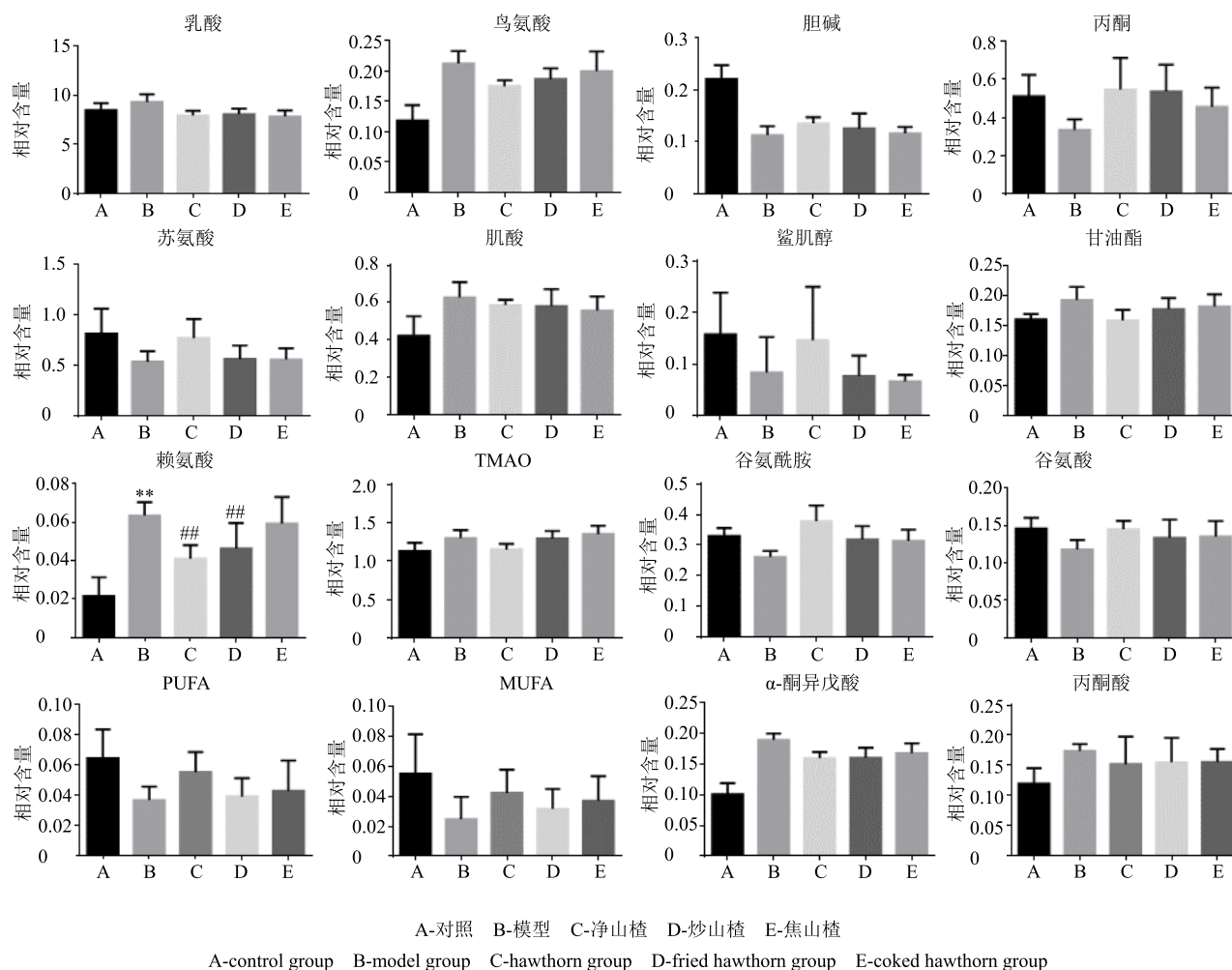


图 4 各组大鼠血清差异代谢物相对含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Relative content of different metabolites in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

显著回调乳酸、赖氨酸、甘油酯、鸟氨酸、TMAO、 α -酮异戊酸、胆碱、丙酮、苏氨酸、鲨肌醇、谷氨酰胺、谷氨酸、PUFA、MUFA 等 14 种潜在的内源性差异代谢产物,炒山楂可使模型大鼠血清中乳酸、赖氨酸、丙酮、鸟氨酸、谷氨酰胺、 α -酮异戊酸等 6 种代谢产物含量明显向对照组接近,使之趋向正常,而焦山楂仅可降低血清中乳酸、 α -酮异戊酸水平,升高谷氨酰胺含量。综上所述,与炒山楂、焦山楂组相比,净山楂组大鼠血清中涉及到的差异代谢物在量与代谢水平上均增加,表明净山楂组对高脂血症模型大鼠具有更好的回调作用。

为进一步探索造模前后以及各山楂炮制品组之间的代谢差异,聚类分析热点图对已确认的血清数据进行了分析。聚类热图直接显示了不同组别间各代谢物的变化,观察到各组大鼠差异代谢物的相对增加(红色)或降低(蓝色)显著(图 5),表明造

模成功以及各给药组对模型大鼠均有一定治疗作用。由图 5 可知,净山楂组与对照组归类为一组,表明净山楂疗效更为显著。

4 讨论

高脂饮食破坏了脂质形成和降解之间的平衡,导致肝细胞内脂质过度沉积,导致肝脏脂肪变性、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的发生,甚至包括纤维化或肝硬化等更严重的疾病^[10]。血清 TC 和 LDL-C 水平升高是动脉粥样硬化发生的重要危险因素^[11]。在本研究中,山楂能显著改善高脂血症大鼠血脂水平,对高脂血症有保护作用。为了研究高脂血症大鼠体内代谢产物变化以及山楂的治疗作用,采用核磁共振代谢组学方法,结合多元统计分析,探讨潜在的生物标志物以及相应的代谢途径,发现高脂血症引起体内脂质代谢障碍、氧化应激、能量及氨基酸代谢紊乱、肠道菌群异常等,山楂可

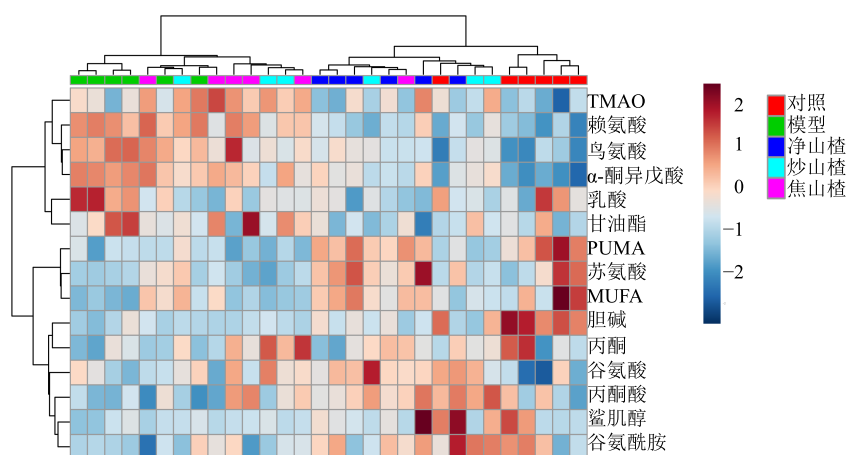


图 5 各组大鼠差异代谢物的热图

Fig. 5 Heat maps of different metabolites of rats in each group

不同程度缓解模型大鼠机体代谢紊乱状态。

4.1 氧化应激

氧化应激是指活性氧 (ROS) 产生和抗氧化防御之间的严重失衡, 是血管内皮功能障碍以及动脉粥样硬化发展的主要机制^[12]。高脂饮食引起的脂肪酸 β -氧化是 ROS 的重要来源^[13]。Jiang 等^[14]观察到高脂血症动物模型中 PUFA/MUFA 值下降, 可能与氧化应激以及脂质过氧化有关。本实验中, 模型组的 PUFA 及 MUFA 水平下降可能与氧化应激导致 PUFA 过氧化增加有关, PUFA 的减少是 NAFLD 发病的主要因素^[15]。Martin 等^[16]在关于乳制品对早期动脉粥样硬化影响的研究中发现, 高植物脂肪奶酪饮食可预防动脉粥样硬化, 可能缘于其含有丰富的多不饱和脂肪酸以及饱和脂肪酸含量的匮乏。此外, 本研究观察到高脂饮食诱导的模型组大鼠谷氨酰胺与谷氨酸水平下降。谷氨酰胺和谷氨酸是天然抗氧化剂谷胱甘肽 (GSH) 合成的前体, 可能在细胞的抗氧化防御中起着直接的作用。谷胱甘肽通过减少 H_2O_2 来对抗氧化损伤, 其耗竭导致 ROS 水平增加, 引起脂质过氧化, 如 LDL 氧化为氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL)。其可抑制内皮细胞释放一氧化氮 (NO), 促进内皮素 (ET) 的生成和释放, 从而促进血管收缩和平滑肌细胞增殖, 是动脉粥样硬化发病机制中的关键步骤。净山楂能有效提高 PUFA、MUFA 以及谷氨酰胺和谷氨酸的水平, 因此推测山楂可能对高脂饮食引起的脂质过氧化以及氧化应激有保护作用。

4.2 能量代谢

丙酮酸是糖代谢 (糖酵解与糖异生) 和三羧酸

循环 (TCA) 关键的代谢中间产物, 在有氧条件下, 丙酮酸可通过脱羧反应转化为乙酰辅酶 A, 进入 TCA 循环。然而, 高脂血症可导致血中溶解氧的减少, 减缓丙酮酸向乙酰辅酶 A 的转化, 导致丙酮酸水平升高^[17], 葡萄糖的有氧氧化减弱。此外, 在无氧条件下, 丙酮酸在乳酸脱氢酶 (LDH) 催化下转化为乳酸, 乳酸水平升高, 可加剧机体脂肪酸 β -氧化。与对照组比较, 模型组丙酮酸、乳酸水平显著升高, 表明高脂饮食导致大鼠能量代谢紊乱。此外, PUFA 过氧化引起其水平下降说明高脂血症模型大鼠可能通过脂质氧化为机体供能。饮食脂肪和胆固醇的高负荷可能导致能量代谢紊乱, 血管细胞可能通过将能量供应从葡萄糖转换为脂质而对动脉粥样硬化作出反应^[18]。因此, 脂质氧化成为主要的能量来源, 并最终导致氧化链式反应和细胞膜损伤^[19]。山楂干预后, 血清乳酸水平显著下降, 而 PUFA 水平显著上调, 丙酮酸水平回调但差异不显著, 表明山楂能缓解高脂血症引起的机体能量代谢紊乱。

4.3 氨基酸代谢

在苏氨酸脱氢酶 (TDH) 的催化下, 苏氨酸被氧化为 2-氨基-3-氧丁酸, 并快速代谢为甘氨酸和乙酰辅酶 A^[20]。乙酰辅酶 A 在脂肪酸分解、生物合成以及酮体形成中起着重要的生物学作用。本研究中高脂血症模型大鼠苏氨酸水平明显下降, 山楂治疗可引起苏氨酸水平显著升高, 可能是由于苏氨酸分解代谢水平下降。因此, 山楂可能通过抑制苏氨酸分解代谢来缓解高脂饮食引起的机体代谢紊乱。

鸟氨酸是尿素循环的重要中间代谢产物, 实验发现高脂饮食诱导的高脂血症大鼠血清鸟氨酸水平

显著升高。鸟氨酸通过刺激垂体促进生长激素的释放,而生长激素可促进脂质氧化,激活脂肪组织中游离脂肪酸和甘油的合成,在机体能量代谢中起着重要的作用^[21]。净山楂治疗 4 周后逆转了鸟氨酸水平升高的趋势,表明净山楂可调节高脂血症引起的脂质代谢障碍以及能量代谢紊乱,提示鸟氨酸可能是高脂血症病理发展和脂质调节的潜在生物标志物。

赖氨酸分解代谢的最终产物是乙酰辅酶 A^[22],高脂饮食引起脂肪酸 β 氧化产物乙酰辅酶 A 的蓄积,可能反馈性抑制赖氨酸代谢的相关酶活性,提示高脂血症引起大鼠血清中赖氨酸的代谢紊乱。此外,白蛋白和载脂蛋白 B100 (ApoB 100) 颗粒中的赖氨酸可产生糖基化终末产物或被进一步氧化^[10,17],模型组赖氨酸水平的异常升高可能表明高脂血症大鼠糖代谢以及脂质代谢异常。净山楂可显著升高大鼠血清中赖氨酸的水平,缓解高脂血症赖氨酸代谢紊乱引起的机体糖代谢和脂质代谢障碍。

4.4 肠道菌群代谢

TMAO 来源于肠道微生物群,在胆碱^[11]或肉碱^[23]代谢过程中产生二甲胺 (DMA) 和三甲胺 (TMA)。模型组大鼠血清中胆碱水平明显降低,伴随 TMAO 水平的升高。净山楂治疗后,胆碱、TMAO 水平均有向对照组回调的趋势。这表明在高脂血症的发病过程中,饮食介导的肠道微生物区系代谢活性的变化是可能的。最近的许多代谢研究表明肠道菌群与饮食诱导的肥胖密切相关,食用高脂肪饮食会导致肠道细菌总数减少,导致代谢物如 TMA 和 TMAO 的改变^[24-26]。TMAO 的代谢可能通过调节巨噬细胞表面清道夫受体表达,促进动脉粥样硬化过程^[25]。血清中胆碱的耗竭可能表明肠道代谢物发生变化,导致 TMAO 水平异常升高,从而加剧了高脂血症的危险性。本研究表明山楂能有效缓解肠道菌群异常引起的 TMAO 水平升高,减缓高脂血症及其动脉粥样硬化的发病进程。此外,模型组大鼠鲨肌醇水平急剧降低。鲨肌醇可能是由结肠肠道菌产生^[22],通过直接与淀粉样蛋白肽相互作用抑制 A β 42 纤维的形成^[27]。净山楂可能通过调节肠道菌群逆转性升高血清中鲨肌醇,使之恢复正常水平。但是关于鲨肌醇与心血管疾病的关系鲜有报道,因此需要进一步的实验验证并探索高脂饮食引起的鲨肌醇耗竭的机制。

本研究采用 ¹H-NMR 法结合多元统计分析和经

典药理学研究方法,揭示了山楂对高脂血症的防治作用。上述的几种潜在的生物标志物可能有助于解释高脂血症的代谢效应及山楂调节血脂异常的作用机制。山楂能有效降低高脂血症大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平,并且可通过干预不同代谢途径部分逆转能量和脂质代谢紊乱,使异常代谢状态恢复正常,降低高脂饮食引起的动脉粥样硬化和脂肪性肝病的发生风险。此外,血清生化指标和代谢组学同时表明净山楂的调脂作用更加显著,炒山楂次之,焦山楂较弱。研究表明^[28]山楂中的黄酮类化合物(金丝桃苷、槲皮素等)、三萜类化合物(熊果酸、齐墩果酸)有抗高脂血症活性,炮制后的山楂调脂活性减弱可能与黄酮类化合物含量降低有关^[29]。

山楂在调节血脂方面表现出强大的潜力,¹H-NMR 由于其检测限高导致检出代谢物种类较少,后续还需采用液质联用技术对其血清及组织进行进一步分析,全面探索山楂调脂作用机制,寻找更具特征性的潜在生物标志物,了解山楂中每一种活性成分是如何促进其综合药理作用的,为临床用药提供理论依据。

参考文献

- [1] 余一鸣,胡永慧,张莉野,等. 中药调血脂的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3636-3644.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 李化,杨滨. 山楂的炮制研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 12-15.
- [4] 马传江,王信,辛义周,等. 中药传统炮制理论的现代研究概述 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 512-520.
- [5] 龚千峰. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [6] 钟凌云,廖智慧,龚千峰,等. 基于代谢组学研究姜制对黄连药性的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3177-3181.
- [7] Nicholson J K, Connelly J, Lindon J C, et al. Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153-161.
- [8] 赵凡凡,李肖,高丽,等. 甘草水提物干预 D-半乳糖致衰老大鼠的肝脏代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3545-3553.
- [9] 刘彩春,刘欢,谷陟欣,等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的驴胶补血颗粒补血作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1142-1148.
- [10] Oorni K, Pentikainen M O, Annala A, et al. Oxidation of low density lipoprotein particles decreases their ability to

- bind to human aortic proteoglycans: Dependence on oxidative modification of the lysine residues [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(34): 21303-21311.
- [11] Al-Waiz M, Mikov M, Mitchell S C, *et al.* The exogenous origin of trimethylamine in the mouse [J]. *Metabolism*, 1992, 41(2): 135-136.
- [12] Khatri J J, Johnson C, Magid R, *et al.* Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma [J]. *Circulation*, 2004, 109(4): 520-525.
- [13] Browning J D, Horton J D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(2): 147-152.
- [14] Jiang C, Yang K, Yang L, *et al.* A ^1H NMR-based metabolomic investigation of time-related metabolic trajectories of the plasma, urine and liver extracts of hyperlipidemic hamsters [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66786.
- [15] Araya J, Rodrigo R, Videla L A, *et al.* Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Sci*, 2004, 106(6): 635-643.
- [16] Martin J C, Canlet C, Delplanque B, *et al.* ^1H NMR metabolomics can differentiate the early atherogenic effect of dairy products in hyperlipidemic hamsters [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 206(1): 127-133.
- [17] Ahmed N, Thornalley P J. Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated *in vitro* by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence [J]. *Biochem J*, 2002, 364(1): 15-24.
- [18] Guo W, Jiang C, Yang L, *et al.* Quantitative metabolomic profiling of plasma, urine and liver extracts by ^1H NMR spectroscopy characterizes different stages of atherosclerosis in hamsters [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(10): 3500-3510.
- [19] Catalá A. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2010, 399(3): 318-323.
- [20] Guerranti R, Pagani R, Neri S, *et al.* Inhibition and regulation of rat liver L-threonine dehydrogenase by different fatty acids and their derivatives [J]. *Biochim Et Biophys Acta Gen Subj*, 2001, 1568(1): 45-52.
- [21] Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, *et al.* L-Ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism [J]. *Nutr Res*, 2008, 28(11): 738-743.
- [22] 段怡譔. 菊粉影响肥胖发生发展的代谢组学研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [23] Rebouche C H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals [J]. *Ann Rev Nutr*, 1998, 18(1): 39-61.
- [24] Kim I Y, Jung J, Jang M, *et al.* ^1H NMR-based metabolomic study on resistance to diet-induced obesity in AHNK knock-out mice [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2010, 403(3): 428-434.
- [25] Holmes E, Li J V, Athanasiou T, *et al.* Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease [J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19(7): 349-359.
- [26] Jung J, Kim I Y, Kim Y N, *et al.* ^1H NMR-based metabolite profiling of diet-induced obesity in a mouse mode [J]. *Bmb Rep*, 2012, 45(7): 419-424.
- [27] Sun Y, Zhang G, Hawkes C A, *et al.* Synthesis of scyllo-inositol derivatives and their effects on amyloid beta peptide aggregation [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(15): 7177-7184.
- [28] 李贵海, 孙敬勇, 张希林, 等. 山楂降血脂有效成分的实验研究 [J]. 中草药, 2002, 33(1): 52-54.
- [29] 张 良, 姜思凡, 万 军, 等. 炮制对山楂主要化学成分的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(1): 31-34.