

• 药理与临床 •

黄芩素干预快速老化小鼠 SAMP8 肝脏组织的代谢组学研究

周 峰^{1,2}, 李佳琪^{1,2}, 王珂欣^{1,2}, 周玉枝¹, 秦雪梅^{1*}, 高 丽^{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

摘 要: 目的 基于 ¹H-NMR 代谢组学技术, 研究黄芩素对快速老化小鼠 SAMP8 肝脏的保护作用并探索其作用机制。方法 采用 SAMP8 小鼠作为快速老化模型, 考察黄芩素 (ig) 对 SAMP8 小鼠肝脏的保护作用。小鼠随机分 3 组, 对照组为 SAMR1 小鼠、模型组为 SAMP8 小鼠、给药组为 SAMP8 小鼠+黄芩素。对照组和模型组给予等量生理盐水, 给药组给予 200 mg/kg 黄芩素。分别取各组小鼠肝脏组织, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察其肝组织损伤程度, 并对肝脏组织进行 ¹H-NMR 检测, 结合多元统计分析探讨黄芩素抗衰老小鼠肝损伤的作用。结果 肝脏指数以及 HE 染色结果显示, 黄芩素能明显改善 SAMP8 小鼠的肝损伤情况。代谢组学分析共找到 8 个潜在生物标志物, 主要涉及 3 条代谢通路, 分别是丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢和肌醇磷酸代谢。结论 黄芩素对 SAMP8 小鼠的肝损伤具有保护作用, 其机制涉及多靶点、多途径。

关键词: 黄芩素; SAMP8; 衰老; 肝损伤; 代谢组学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2604-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.015

Metabolomics-based study of metabolic changes in liver tissues of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) treated with baicalein

ZHOU Feng^{1,2}, LI Jia-qi^{1,2}, WANG Ke-xin^{1,2}, ZHOU Yu-zhi¹, QIN Xue-mei¹, GAO Li¹

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

Abstract: Objective To study the protective effect and explore the mechanism of baicalein on the liver of senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) based on ¹H-NMR metabolomics. **Methods** The protective effect of baicalein (ig) on the liver of SAMP8 mice was investigated in the present study. The mice in control group was SAMR1, the mice in model group was SAMP8, the drug treatment group was SAMP8 + baicalein. The mice in control and model group were administrated with equal amount of normal saline, and the mice in drug treatment group were administrated with 200 mg/kg baicalein. The liver tissues of mice in each group were isolated, and the damage degree of liver tissue was determined by hematoxylin-eosin (HE) staining. ¹H-NMR combined with multivariate statistical analysis was used to investigate the mechanism of baicalein on liver damage in aging mice. **Results** Organ index and HE staining results showed that baicalein can significantly improve liver damage in SAMP8 mice. Eight potential biomarkers were found in hepatic metabolomics analysis, mainly involving three metabolic pathways: Alanine, aspartic acid and glutamate metabolism; Glycine, serine, threonine metabolism, and inositol phosphate metabolism. **Conclusion** The study of metabolites alterations in the liver tissue of SAMP8 mice would provide experimental evidence for anti-aging drug research.

Key words: baicalein; SAMP8; aging; liver damage; metabolomics

收稿日期: 2019-01-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81603319); 山西省高等学校科技创新项目 (2015118); 山西省科技创新重点团队 (201605D131045-18); 地产中药药效物质研究与利用山西省重点实验室 (201705D111008-21)

作者简介: 周 峰, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究。E-mail: zf_smart@163.com

*通信作者 高 丽 E-mail: gaoli87@sxu.edu.cn

秦雪梅 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

衰老是生命过程的必然规律,是机体各组织、器官功能随年龄增长而发生退行性变化的过程^[1]。深入探索衰老的机制,研发抗衰老药物,不仅有助于延缓机体衰老,而且对于防治衰老相关疾病具有重要的意义。近年来具有代表性的衰老学说^[2-3]包括:自由基学说、线粒体 DNA 损伤学说、免疫功能学说、端粒酶学说等,它们之间相互补充,共同阐释衰老机制。衰老是不可避免的,但是延缓衰老却是可能的,因此研究抗衰老机制及其防治药物具有重要意义。

肝脏是机体内最大的器官,参与多种物质的合成、代谢、分解、排泄等。然而,随着年龄的增长,肝脏的结构和功能发生变化,常伴随着肝脏合成与分解代谢等功能的降低^[4]。在形态学上,衰老肝脏表现为褐色萎缩、体积和容积变小以及质量减轻^[5]。此外,衰老的肝脏中白蛋白、球蛋白等物质的合成减少,细胞 ATP 生成减少,同时,肝脏细胞内线粒体的老化造成氧化物生成增多,导致氧化与抗氧化之间的失衡,从而引发 DNA、蛋白质和脂质的氧化损伤,最终导致肝脏功能减退^[6]。因此,通过研究肝脏组织的代谢变化可以从侧面反映肝脏的健康程度。

快速老化小鼠^[7-8] (senescence accelerated mouse, SAM) 属于非转基因小鼠,由日本京都大学竹田俊男教授在 AKR/J 小鼠的基础上研发而来,主要包括快速老化的 P 系和正常老化的 R 系。P 系具有寿命短、衰老快以及和衰老相关病理变化的特点,R 系具有正常的老化特征,因此,常用 R 系作为 P 系的对照。此外,SAMP8 小鼠也可作为衰老性肝损伤模型^[9]。研究^[10-11]发现,与 SAMR1 小鼠相比,老化的 SAMP8 小鼠肝脏在 mRNA 和蛋白水平上均显示出明显的氧化损伤,并伴随炎症水平的升高。另外,与 SAMR1 小鼠相比,年轻的 SAMP8 小鼠还表现出肝脏脂肪变性,肝脏胆固醇含量增加^[12]。这些均表明与 SAMR1 小鼠相比,SAMP8 小鼠出现肝功能异常。

黄芩素是黄芩的主要活性成分^[13],具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎、清除自由基、心脑血管保护等作用。本课题组前期结合网络药理学的方法从黄芩中筛选出抗衰老活性化合物黄芩素,并在模式生物果蝇上进行验证,结果发现 0.2 mg/mL 的黄芩素使雄性果蝇的平均寿命和中位寿命分别延长 19.80% 和 25.64%,具有显著的延长寿命的作用^[14-15]。

同时,本课题组发现黄芩素在 D-半乳糖致大鼠衰老模型中显示出一定的抗衰老作用^[16-17]。此外,本课题组应用 SAMP8 小鼠考察黄芩素的抗衰老作用,结果显示与 SAMR1 小鼠相比,SAMP8 小鼠的衰老评分较高,而黄芩素 (200 mg/kg) 处理 SAMP8 小鼠 4 周后,SAMP8 小鼠的衰老评分显著降低,这些结果提示黄芩素可以延缓 SAMP8 小鼠的衰老^[18]。然而,黄芩素对 SAMP8 小鼠肝损伤的影响及作用机制尚不明确。

代谢组学是继基因组学、蛋白组学和转录组学之后出现的一门新兴的“组学”技术,目前已在生命科学领域得到了广泛的应用,并展现出良好的前景^[19]。代谢组学具有快速、灵敏、可定量、系统性的特点^[20],与多元统计分析相结合可以进一步解析被研究对象的生理、病理状态以及在不同环境下代谢物的变化规律^[21-24]。本研究通过肝脏指数以及病理切片考察黄芩素对 SAMP8 小鼠肝脏的作用,并应用代谢组学与多元统计相结合的方法分析 SAMR1、SAMP8、SAMP8+黄芩素 (200 mg/kg) 组小鼠肝组织代谢物的变化,找出黄芩素抗肝损伤的潜在生物标志物,并探讨其抗衰老的机制。

1 材料与方法

1.1 药物、仪器及试剂

黄芩素 (批号 JZ20150711,质量分数 >98%),购自南京景竹生物科技有限公司; Bruker 600 MHz Avance III NMR Spectrometer (600.13 MHz,德国 Bruker 公司); Sartorius BSA 分析天平 (德国 Sartorius 公司); TGL-16 型高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); 核磁试剂重水 (Norell 公司,美国); 2,3,3-三甲基甲硅烷基丙酸 (TSP) 购自美 Norell 公司。

1.2 动物与分组

8 月龄的雄性 SAMP8 和 SAMR1 小鼠由天津中医药大学第一附属医院提供,所有动物在清洁环境下饲养,自由饮食和饮水,饲养温度为 (22±2)℃,相对湿度为 (50±10)%,12 h 的光照/黑暗周期。正常老化 SAMR1 小鼠作为对照组,其余的 SAMP8 小鼠随机分为模型组和给药组,每组各 8 只。给药组 (SAMP8+黄芩素) 每天 ig 200 mg/kg 黄芩素,对照组 (SAMR1) 和模型组 (SAMP8) 小鼠每天 ig 等量的生理盐水,连续饲养 8 周。

1.3 组织收集和处理

实验 8 周后,将小鼠隔夜禁食,次日称体质量,

颈椎脱臼处死,迅速取出小鼠完整肝脏组织,称质量(湿质量)后计算肝脏指数(肝脏质量/体质量),并取部分肝组织用 4% 的多聚甲醛固定进行病理学检查。核磁代谢组学的备样方法参考文献报道方法^[25],称取肝脏组织 200 mg 于 2 mL EP 管中,加入 4 °C 预冷的乙腈水溶液(乙腈-水 1:1) 1 mL,置于冰上匀浆 5 min,然后 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min;收集上清液于 2 mL EP 管中,冻干,向冻干粉中加入含 0.15% 的 TSP 的磷酸盐缓冲液,4 °C、13 000 r/min 离心 15 min。取上清液 600 μ L,转移至 5 mm 核磁管中测试。

1.4 ^1H -NMR 测定及谱图处理

样品于 Bruker 600 MHz Avance III NMR 仪上测定(25 °C),采用 noesygppr1d 脉冲序列,扫描次数为 64,谱宽 12 345.7 Hz,脉冲时间 14 μ s,采样时间 2.654 s,延迟时间 1.0 s,采样数据点 65 536, FID 分辨率 0.188 Hz,采样间隔 40.5 μ s,内标为 TSP。

采用 MestReNova(Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙)核磁图谱专业处理软件对肝脏 ^1H -NMR 图谱进行傅里叶转换,并进行手动相位、基线调整。肝脏图谱以 TSP 的 δ 0 为标准进行定标,以 δ 0.01 对化学位移区间 δ 0.7~9.0 进行分段积分,排除 δ 4.7~4.9 区域的水峰不进行积分,并将积分数据进行归一化。将上述处理的积分数据导入 SIMCA-P 14.0(Umetrics 公司,瑞典)软件进行多元统计分析,根据 $P < 0.05$,VIP(variable importance for projection)值 > 1 筛选出差异代谢物,再将差异代谢物导入 MetaboAnalyst 3.0(<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst>)进行通路富集分析^[26-27]。

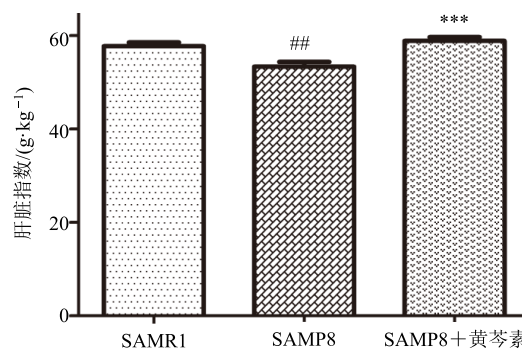
1.5 统计学方法

采用统计学软件 Graphpad Prism 6.0 进行统计分析,通过 t 检验对肝脏质量差异进行分析;采用 SPSS 19.0 软件对差异代谢物进行统计学分析和处理。

2 结果

2.1 肝脏指数

肝脏指数可以反映肝脏的病变情况,若肝脏发生损伤,肝脏指数会出现明显的下降^[28]。与 SAMR1 组相比,SAMP8 组小鼠肝脏指数显著降低($P < 0.01$);当给予黄芩素后,肝脏指数趋于恢复($P < 0.001$),说明黄芩素对 SAMP8 小鼠的肝损伤具有一定的保护作用(图 1)。



与 SAMR1 组比较: ## $P < 0.01$; 与 SAMP8 组比较: *** $P < 0.001$
$P < 0.01$ vs SAMR1 group; *** $P < 0.001$ vs SAMP8 group

图 1 黄芩素对 SAMP8 小鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 1 Effect of baicalin on liver index of SAMP8 mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.2 肝脏组织病理学观察

肝脏 HE 染色结果显示,SAMR1 组小鼠肝组织肝小叶清晰、肝细胞大小均匀、细胞核清晰可见。与 SAMR1 组相比,SAMP8 小鼠的肝细胞局部结构损伤、变形和坏死,而给予黄芩素后,SAMP8 小鼠的肝脏组织病理学具有显著的改善作用。以上结果说明,黄芩素对 SAMP8 小鼠的肝损伤具有保护作用(图 2)。

2.3 肝脏图谱指认与分析

参照文献报道^[29-30]并结合公共数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、BMRB (<http://www.bmrbl.wisc.edu/>)及软件 Chenomx NMR Suite (ChenomxInc,

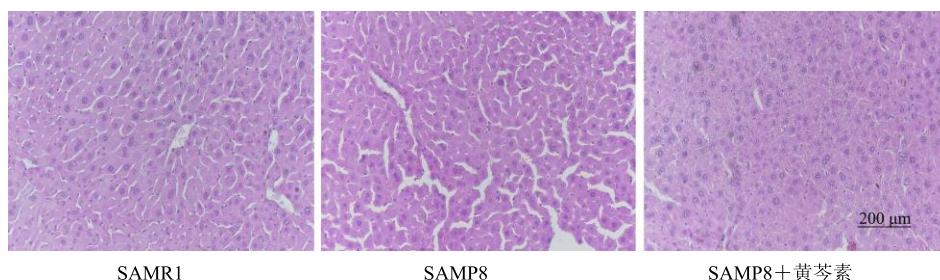


图 2 黄芩素对 SAMP8 小鼠肝组织损伤的保护作用 (HE 染色)

Fig. 2 Protective effect of baicalin on liver injury in SAMP8 mice (HE staining)

加拿大), 对图谱中的主要化合物进行指认, 在小鼠肝脏中共指认出 32 种内源性代谢产物, 见图 3 和表 1。

2.4 多元统计分析

由偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 3D 散点图 (图 4-A) 可以看出, SAMR1 和 SAMP8 组能明显分开, 表明 SAMP8 快速老化小鼠模型成功; 且 SAMP8+黄芩素组样本位于 SAMR1 组和 SAMP8

组之间, 说明黄芩素对 SAMP8 小鼠肝损伤具有一定的回调作用, 与肝脏指数以及病理学结果一致。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, 设定检验次数为 200, 得到模型验证结果如图 4-B 所示, 左侧所有 R^2 和 Q^2 值低于右侧原始点或 Q^2 的回归线与纵轴相交数值小于零, 表明模型验证有效。

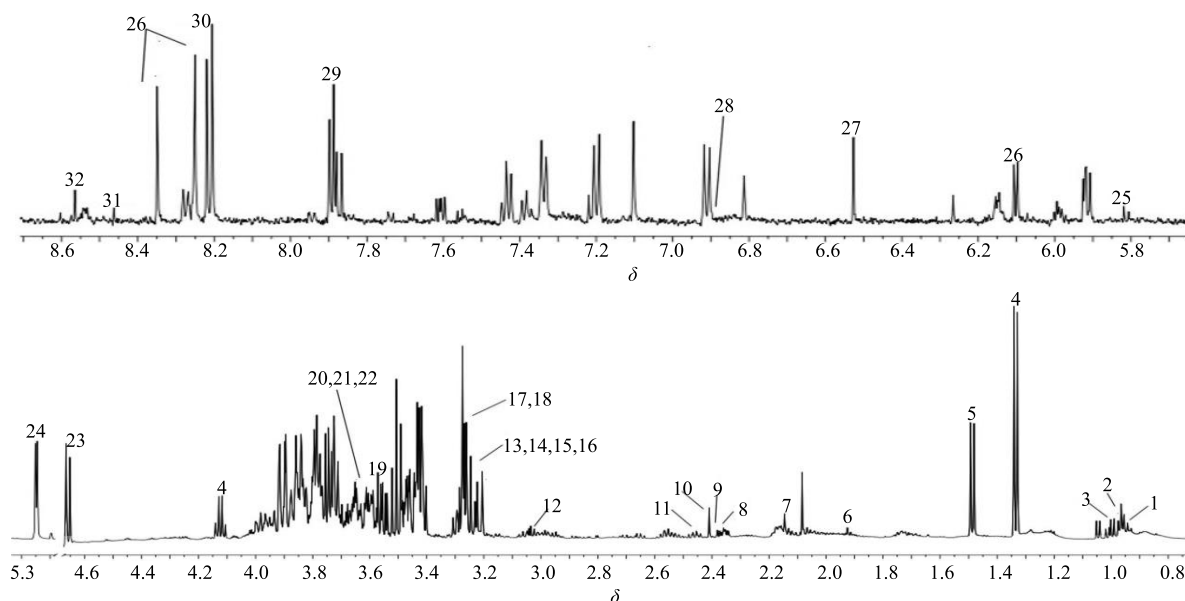


图 3 对照组小鼠肝脏样本 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 3 Representative $^1\text{H-NMR}$ spectra of liver samples obtained from control group mice

表 1 小鼠肝组织主要代谢物 $^1\text{H-NMR}$ 核磁图谱数据归属

Table 1 $^1\text{H-NMR}$ assignments of major metabolites in liver of mice

峰号	代谢物	δ_{H}	峰号	代谢物	δ_{H}
1	异亮氨酸	0.94 (t, $J=7.4$ Hz), 1.01 (d, $J=7.0$ Hz), 1.27 (m)	17	牛磺酸	3.25 (t, $J=6.6$ Hz), 3.43 (t, $J=6.6$ Hz)
2	亮氨酸	0.96 (d, $J=7.1$ Hz), 0.97 (d, $J=6.6$ Hz)	18	甜菜碱	3.26 (s), 3.91 (s)
3	缬氨酸	0.99 (d, $J=6.6$ Hz), 1.04 (d, $J=7.2$ Hz)	19	甘氨酸	3.56 (s)
4	乳酸	1.33 (d, $J=8.4$ Hz), 4.12 (q, $J=8.3$ Hz)	20	苏氨酸	3.60 (d, $J=7.2$ Hz), 4.24 (m)
5	丙氨酸	1.48 (d, $J=8.6$ Hz)	21	糖原	3.60 (m), 5.41 (m)
6	醋酸	1.92 (s)	22	肌醇	3.63 (s)
7	α -乙酰糖蛋白	2.14 (s)	23	β -葡萄糖	4.65 (d, $J=7.8$ Hz)
8	丙酮酸	2.37 (s)	24	α -葡萄糖	5.23 (d, $J=4.2$ Hz), 3.90 (dd, $J=6.0, 6.0$ Hz)
9	谷氨酸	2.08 (m), 2.35 (m), 3.75 (m)	25	尿嘧啶	5.81 (d, $J=9.0$ Hz)
10	琥珀酸	2.41 (s)	26	腺苷	8.24 (s), 8.35 (s)
11	谷氨酰胺	2.15 (m), 2.46 (m), 3.77 (m)	27	富马酸	6.52 (s)
12	肌酐	3.04 (s), 3.93 (s)	28	酪氨酸	6.90 (m), 7.19 (m)
13	胆碱	3.20 (s)	29	黄嘌呤	7.88 (s)
14	磷酸胆碱	3.21 (s)	30	次黄嘌呤	8.20 (s), 8.22 (s)
15	甘氨酸胆碱	3.22 (s)	31	甲酸	8.45 (s)
16	氧化三甲胺	3.24 (s)	32	三磷酸腺苷	8.56 (s)

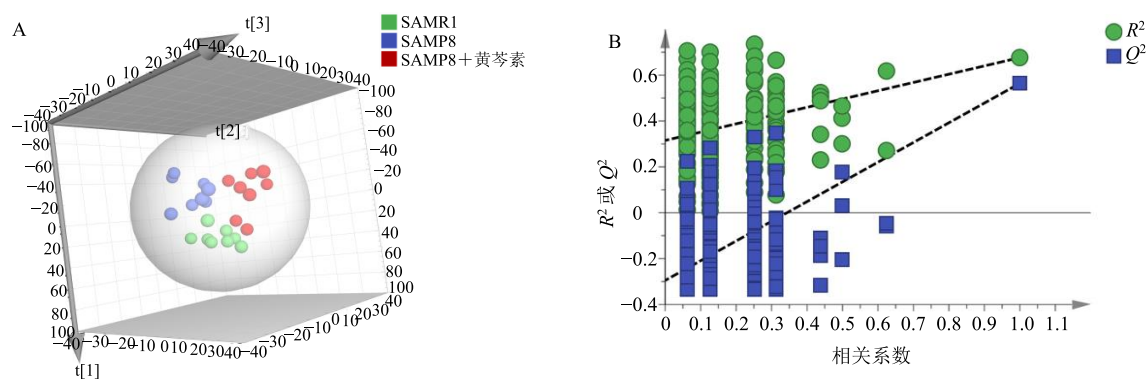


图 4 小鼠肝脏样本 PLS-DA 散点图 (A) 和相应的模型验证图 (B)

Fig. 4 PLS-DA scatter plot (A) and corresponding model validation plot (B) of mouse liver samples

2.5 肝脏差异代谢物的筛选

为进一步确定 SAMP8 小鼠肝脏中内源性代谢产物的差异, 最大化组间分离, 寻找 SAMR1 和 SAMP8 组肝脏样本差异代谢物, 对 SAMR1 和 SAMP8 组进行正交校正的偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 得到 OPLS-DA 得分图 (图 5-A) 和 S-plot 图 (图 5-B)。通过 S-plot 图结合 VIP 值 (>1), 独立样本 t 检验 $P < 0.05$ 寻找差异代谢物, 从而得

到 8 个峰面积具有显著性差异的潜在生物标志物。与 SAMR1 组相比, SAMP8 组小鼠肝脏中氧化三甲胺、胆碱、苏氨酸、肌醇、甜菜碱、肌酐、糖原水平降低, 而谷氨酰胺水平升高。对于这 8 种潜在的生物标志物, 黄芩素干预后能显著回调其中的 6 个, 包括谷氨酰胺、氧化三甲胺、胆碱、苏氨酸、甜菜碱、糖原 (表 2), 表明黄芩素对 SAMP8 小鼠肝脏潜在生物标志物有显著的干预作用。

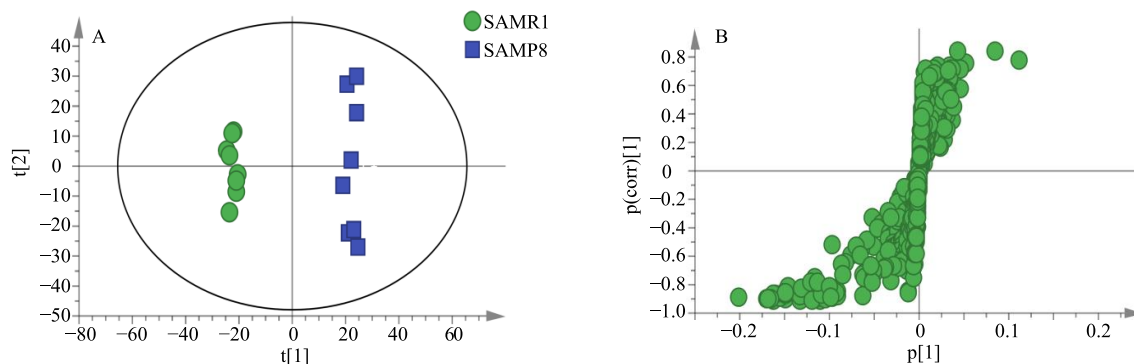


图 5 SAMR1 与 SAMP8 组小鼠肝脏样本 OPLS-DA 散点图 (A) 和相对应的 S-plot 图 (B)

Fig. 5 OPLS-DA scatter plot (A) and corresponding S-plot plot (B) of liver samples from SAMR1 and SAMP8 mice

表 2 小鼠肝脏 ^1H -NMR 谱潜在生物标志物的相对峰面积Table 2 Relative peak area of potential biomarkers in mouse liver ^1H -NMR spectrum

组别	相对峰面积			
	谷氨酰胺	氧化三甲胺	胆碱	苏氨酸
SAMR1	$0.143 \pm 0.006^*$	$0.163 \pm 0.011^{**}$	$0.527 \pm 0.022^{**}$	$0.471 \pm 0.029^{***}$
SAMP8	0.181 ± 0.013	0.109 ± 0.006	0.412 ± 0.029	0.187 ± 0.026
SAMP8+黄芩素	$0.148 \pm 0.006^*$	$0.149 \pm 0.008^{**}$	$0.509 \pm 0.019^*$	$0.394 \pm 0.029^{***}$
组别	相对峰面积			
	肌醇	甜菜碱	肌酐	糖原
SAMR1	$0.227 \pm 0.015^{***}$	$0.284 \pm 0.008^{**}$	$0.169 \pm 0.010^{**}$	$0.371 \pm 0.036^{***}$
SAMP8	0.098 ± 0.008	0.229 ± 0.011	0.114 ± 0.008	0.056 ± 0.016
SAMP8+黄芩素	0.114 ± 0.019	$0.262 \pm 0.005^*$	0.125 ± 0.007	$0.222 \pm 0.044^{**}$

与 SAMP8 组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs SAMP8 group

2.6 差异代谢物相关性分析

肝脏中差异性代谢物相关性分析结果如图 6 所示, 根据此图可看出各差异代谢物之间的相关性。从横轴看, 在同一小分支下的物质它们的正相关性最强, 即某一个物质的量升高或者降低, 则与之相关性强的物质会随之升高或降低。图 6 可以看出肌醇、肌酐之间正相关性较强, 而与谷氨酰胺负相关性较强; 苏氨酸和谷氨酰胺负相关性较强。以上结果提示, 黄芩素可能通过多条代谢途径抗肝脏损伤, 并延缓衰老, 且通路之间相互影响, 共同发挥作用。

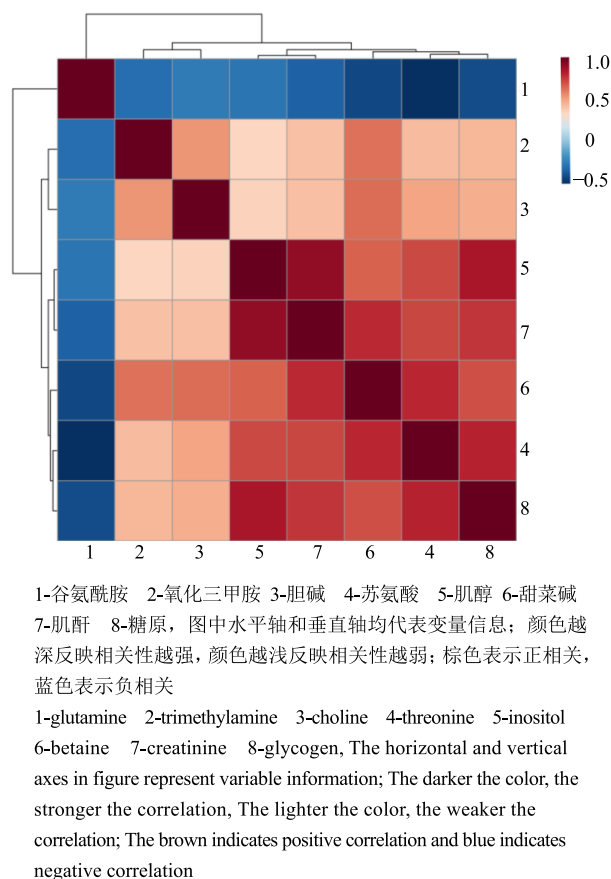


图 6 差异代谢物相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis results of differential metabolites

2.7 代谢通路分析

采用 $^1\text{H-NMR}$ 分析手段检测出 32 种肝脏代谢产物, 从中筛选出 8 种差异代谢物。将这些差异代谢物输入 MetaboAnalyst 中进行 MetPA 通路富集分析, 结果如图 7 所示。其中横坐标 pathway impact 表示其代谢通路的重要性值, 纵坐标 $-\lg P$ 表示代谢通路富集分析的显著性水平。本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 0.10 时,

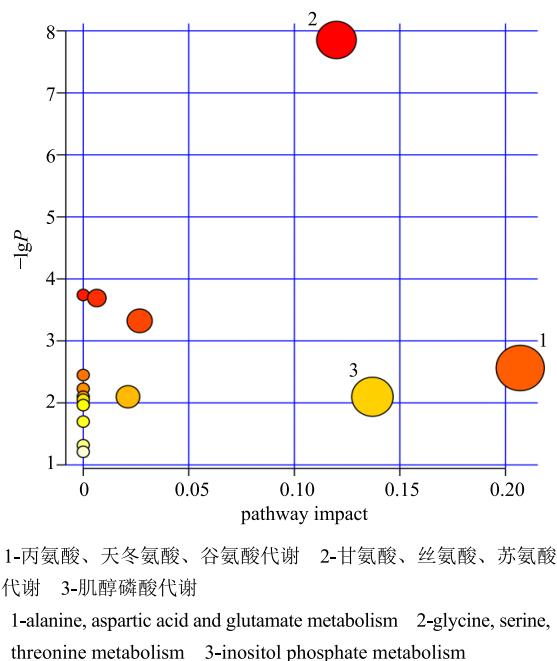


图 7 通路 MetPA 分析

Fig. 7 MetPA analysis of metabolic pathway

该通路可被视为潜在的靶标代谢路径。MetPA 共给出 15 条通路分析的结果, 综合 Holm P 值、FDR (false discovery rate) 和 impact 值共发现 3 条黄芩素干预 SAMP8 小鼠的代谢通路: (1) 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; (2) 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; (3) 肌醇磷酸代谢。

3 讨论

随着年龄的增长, 机体各功能会逐渐发生退化。肝脏是机体重要的代谢器官, 肝损伤也是机体衰老的重要表现。通过对 SAMP8 小鼠肝脏代谢物进行分析, 发现胆碱、甜菜碱、苏氨酸以及氧化三甲胺等代谢物的含量呈现降低趋势, 而谷氨酰胺的含量呈现升高的趋势。肝脏不仅是机体的生化反应器, 也是胆碱代谢的主要场所^[31]。胆碱是水溶性 B 族维生素, 它的缺乏不仅包括线粒体功能紊乱导致的氧化损伤^[32], 还包括肠道微生物导致的胆碱代谢异常^[33-34]。与 SAMR1 组小鼠相比, SAMP8 组小鼠胆碱和甜菜碱的含量显著降低, 可能是因为 SAMP8 组小鼠胆碱代谢紊乱。肠道微生物可以将食物中的胆碱、甜菜碱等代谢产物在肝脏中氧化成氧化三甲胺, 最后通过肾脏来清除^[35], 实验中也发现 SAMP8 组小鼠氧化三甲胺的含量显著降低, 可能是与胆碱代谢异常有关。此外, 甜菜碱也能降低大鼠肝纤维中 ROS 和丙二醛的含量, 表明甜菜碱具有一定的抗

氧化应激功能^[36]。当给予黄芩素后,胆碱和甜菜碱以及氧化三甲胺的量显著上调,表明黄芩素可能是通过胆碱代谢等途径调节肝组织代谢紊乱。本课题组前期在 *D*-半乳糖致大鼠衰老模型中发现黄芩素能显著增加胆碱的水平^[17],与本研究的結果一致。

此外,实验中也发现 SAMP8 小鼠的行动敏捷度明显降低,且按压背部逃避反应消失。与 SAMR1 组小鼠相比,SAMP8 组小鼠糖原含量下降导致糖代谢异常,而糖代谢的主要场所是线粒体^[37]。另外,研究发现 SAMP8 小鼠肝线粒体中二硝基苯酚依赖的非偶联呼吸作用随着衰老而显著降低,表明老年 SAMP8 小鼠线粒体中的能量转移机制功能失调^[38-39]。这也刚好解释了 SAMP8 组小鼠活动能力减弱的现象。这些都提示线粒体在能量代谢中具有重要的作用,而黄芩素则可能是通过保护线粒体来达到抗肝脏损伤的作用。

本研究通过对 SAMP8 小鼠肝脏代谢物和代谢途径进行分析,发现黄芩素抗肝损伤涉及代谢路径有甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢和丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢。前期研究发现^[16-17],在 *D*-半乳糖致大鼠衰老模型中,大脑皮层和血清中甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路均发生变化,并且 Duan 等^[17]发现黄芩素可能通过提高甘氨酸、胆碱和肌酸水平调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径。苏氨酸是动物体内的一种必需氨基酸,在生长发育中不可缺少,目前的研究也已经证实,苏氨酸是动物的第 2 或第 3 限制性氨基酸^[40]。实验过程中发现 SAMP8 组较 SAMR1 组小鼠摄食量少且生长迟缓,体质量也较 SAMR1 组轻,可能与苏氨酸的缺乏有关。谷氨酰胺是非必需氨基酸,在体内可以由葡萄糖转变而来,正常机体内谷氨酰胺处于动态平衡,本实验发现 SAMP8 组小鼠谷氨酰胺呈现上升趋势,且给予黄芩素后有明显回调现象。在另外一项研究中,Cho 等^[41]推测老化的 SAMP8 小鼠组织中谷氨酰胺和谷氨酸的积累可能是由于鸟氨酸氨基转移酶或谷氨酸脱氢酶的过度表达。在给予黄芩素干预后,苏氨酸和谷氨酰胺水平均恢复到正常水平,说明黄芩素可以调节苏氨酸和谷氨酰胺水平,使其维持动态平衡,利于机体健康。

本研究表明黄芩素对 SAMP8 小鼠具有肝保护、抗氧化和抗衰老作用,其抗衰老小鼠肝损伤的机制具有多通路、多靶点的特点。其次,本研究只观察了肝脏的代谢组学特征,应进一步开展血浆、

尿液、血清和脾脏样本的研究,以准确反映黄芩素延缓机体衰老的作用机制。黄芩素在其他衰老模型上是否有同样的效果还有待进一步的验证。

参考文献

- [1] 宋朝春,魏冉磊,樊晓兰,等.衰老及抗衰老药物的研究进展[J].中国生化药物杂志,2015,35(1):163-170.
- [2] 卢春雪,杨绍杰,陶荟竹,等.衰老机制研究进展[J].中国老年学杂志,2018,38(1):248-250.
- [3] 游庭活,温露,刘凡.衰老机制及延缓衰老活性物质研究进展[J].天然产物研究与开发,2015,27(11):1985-1990.
- [4] 胡绍杰,蒋莎莎,张瑾,等.细胞凋亡在肝脏衰老中的作用[J].生命科学研究,2018,22(5):397-405.
- [5] Höhn A, Grune T. Lipofuscin: Formation, effects and role of macroautophagy[J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 140-144.
- [6] Egnatchik R A, Leamy A K, Noguchi Y, et al. Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes[J]. *Metabolism*, 2014, 63(2): 283-295.
- [7] Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, et al. A new murine model of accelerated senescence[J]. *Mech Ageing Dev*, 1981, 17(2): 183-194.
- [8] 周伟勤,毕明刚,杜冠华.快速老化小鼠 SAMP8 研究进展[J].中国药理学通报,2009,25(5):565-568.
- [9] Ye X, Meeker H C, Kozlowski P B, et al. Pathological changes in the liver of a senescence accelerated mouse strain (SAMP8): A mouse model for the study of liver diseases[J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(4): 1141-1151.
- [10] Fernandez-Garcia C, Rancan L, Paredes S D, et al. Xanthohumol exerts protective effects in liver alterations associated with aging[J]. *Eur J Nutr*, 2019, 58(2): 653-663.
- [11] Cuesta S, Kireev R, Forman K, et al. Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8)[J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(12): 950-956.
- [12] Kuhla A, Blei T, Jaster R, et al. Aging is associated with a shift of fatty metabolism toward lipogenesis[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2011, 66(11): 1192-1200.
- [13] 辛文好,宋俊科,何国荣,等.黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(6):647-653.
- [14] Gao L, Duan D D, Zhang J Q, et al. A bioinformatic approach for the discovery of antiaging effects of baicalein from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. *Rejuvenation Res*, 2016, 19(5): 414-422.

- [15] 段丹丹, 高 丽, 王珂欣, 等. 黄芩素通过抗氧化应激延长果蝇寿命的机制 [J]. 药学学报, 2016, 51(9): 1401-1406.
- [16] 王珂欣, 高 丽, 段丹丹, 等. 基于 ^1H -NMR 代谢组学的黄芩素干预 D-半乳糖致衰老大鼠作用研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 511-518.
- [17] Duan D D, Wang K X, Zhou Y Z, *et al.* Baicalein exerts beneficial effects in D-galactose-induced aging rats through attenuation of inflammation and metabolic dysfunction [J]. *Rejuvenation Res*, 2017, 20(6): 506-516.
- [18] Gao L, Li J, Zhou Y, *et al.* Effects of baicalein on cortical proinflammatory cytokines and the intestinal microbiome in senescence accelerated mouse prone 8 [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9(7): 1714-1724.
- [19] 赵 珊, 王鹏程, 冯 健, 等. 代谢组学技术及其在中医药研究中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 756-765.
- [20] 夏天一, 张 凤, 陈万生. 代谢组学在肾毒性药物评价中的应用 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2018, 27(1): 69-73.
- [21] Lao Y M, Jiang J G, Yan L. Application of metabonomic analytical techniques in the modernization and toxicology research of traditional Chinese medicine [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(7): 1128-1141.
- [22] Liu X J, Zhou Y Z, Li Z F, *et al.* Anti-depressant effects of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress: A plasma metabonomics study based on NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(4): 578-588.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 韩晓静, 范玛莉, 秦雪梅, 等. 基于代谢组学技术研究黄芩对小鼠代谢的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 85-91.
- [26] 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.
- [27] 赵剑宇, 颜贤忠. 基于核磁共振的代谢组学研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2004, 31(5): 308-312.
- [28] 高尚龙. 三种姬松茸多糖的抗氧化、抗衰老活性与结构研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [29] Gey C, Seeger K. Metabolic changes during cellular senescence investigated by proton NMR-spectroscopy [J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134(3/4): 130-138.
- [30] He P, Li Z Y, Xing J, *et al.* ^1H -NMR based metabolic profiling of the processing effect on *Rehmanniae Radix* [J]. *Anal Methods-UK*, 2014, 6(8): 2736-2744.
- [31] Mehedint M G, Zeisel S H. Choline's role in maintaining liver function: New evidence for epigenetic mechanisms [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013, 16(3): 339-345.
- [32] Hensley K, Kotake Y, Sang H, *et al.* Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H_2O_2 generation in liver mitochondria [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(5): 983-989.
- [33] Corbin K D, Zeisel S H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, 28(2): 159-165.
- [34] Corbin K D, Zeisel S H. The nutrigenetics and nutrigenomics of the dietary requirement for choline [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012, 108: 159-177.
- [35] 程俊俊, 吴 霞. 肠道微生物代谢产物氧化三甲胺与非酒精性脂肪性肝病研究进展 [J]. 肝脏, 2017, 22(11): 1056-1058.
- [36] Bingul I, Basaran-Kucukgergin C, Aydin A F, *et al.* Betaine treatment decreased oxidative stress, inflammation, and stellate cell activation in rats with alcoholic liver fibrosis [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 45: 170-178.
- [37] Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: Impaired mitochondrial translation in human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 48(100): 77-84.
- [38] Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, *et al.* Acutely administered melatonin restores hepatic mitochondrial physiology in old mice [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(3): 367-375.
- [39] Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter R J, *et al.* Hepatic mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice: correction by long-term, orally administered physiological levels of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2002, 33(3): 127-133.
- [40] 李仁德, 李光玉, 王凯英. 苏氨酸对动物的生物学作用研究进展 [J]. 饲料工业, 2017, 38(8): 36-39.
- [41] Cho Y M, Bae S H, Choi B K, *et al.* Differential expression of the liver proteome in senescence accelerated mice [J]. *Proteomics*, 2003, 3(10): 1883-1894.