

基于能量代谢的姜黄连炮制机制初探

李听弦¹, 张 志¹, 傅 敏¹, 蓝君君¹, 肖 玲¹, 雷春光¹, 陈 雪¹, 王光忠^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北省中药炮制工程技术研究中心, 湖北 武汉 430065

摘 要: **目的** 探究姜黄连炮制前后对大鼠能量代谢的影响差异, 阐明姜制黄连药性的改变与能量代谢的关系。 **方法** 分别制备生黄连、姜黄连水煎液, 大鼠分别 ig 给予生黄连、姜黄连水煎液 15 g/kg, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 取大鼠血浆, 检测糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化 3 条能量代谢途径中关键酶的活性, 并采用主成分分析法对检测结果进行分析, 筛选出姜黄连炮制前后能量代谢发生主要变化的途径和关键酶。 **结果** 与对照组比较, 生黄连组己糖激酶 (HK)、磷酸果糖激酶 (PFK)、丙酮酸激酶 (PK) 及线粒体呼吸链复合体 I、II、III、IV 活性均显著下降, 柠檬酸合酶 (CS)、异柠檬酸脱氢酶 (ICD)、 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 水平均显著下降; 姜黄连组 PFK、PK 及线粒体呼吸链复合体 II、III、IV 的活性均显著降低, HK 和线粒体呼吸链复合体 I 有一定程度下降, 但差异不显著, α -KGDH 水平显著降低, CS 和 ICD 水平有一定程度降低, 但差异不显著; 与生黄连组比较, 姜黄连组 HK、PFK、PK 及线粒体呼吸链复合体 I、II、III 活性均显著升高, CS、ICD、 α -KGDH 水平均显著升高, 线粒体呼吸链复合体 IV 没有显著变化。通过主成分分析提取了 2 个主成分, 其中氧化磷酸化途径中复合体 II 和复合体 III 分别对主成分 2 和主成分 1 有最大贡献率 0.916、0.873。 **结论** 黄连经姜制后寒凉之性减弱, 可能是因为减弱了黄连对氧化磷酸化途径中线粒体呼吸链复合体 II 和 III 的抑制作用。

关键词: 黄连; 姜黄连; 炮制; 能量代谢; 主成分分析; 氧化磷酸化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)23-5785-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.020

Preliminary study on mechanism of ginger-processed *Coptidis Rhizoma* processing based on energy metabolism

LI Ting-xian¹, ZHANG Zhi¹, FU Min¹, LAN Jun-jun¹, XIAO Ling¹, LEI Chun-guang¹, CHEN Xue¹, WANG Guang-zhong^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hubei College of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Engineering Technology Research Center of Chinese Medicine Processing, Wuhan 430065, China

Abstract: **Objective** To investigate the changes of energy metabolism before and after ginger-processing of *Coptidis Rhizoma*, and elucidate the relationship between the changes of medicinal properties and the energy metabolism. **Methods** Crude *Coptidis Rhizoma* and ginger-processed *Coptidis Rhizoma* decoctions were prepared and administered to rats once a day for 7 d by gavage. Blood and liver were used to detect the content and activity of key enzymes in three pathways of energy metabolism. The composition analysis analyzed the detection results and screened out the key enzymes for the main changes in energy metabolism before and after processing. **Results** Compared with the control group, the activities of HK, PFK, PK and mitochondrial respiratory chain complex I, II, III and IV in crude *Coptidis Rhizoma* group were decreased significantly, and the content of CS, ICD and α -KGDH was decreased significantly. The activities of mitochondrial respiratory chain complexes II, III and IV and the activities of PFK and PK in the ginger-processed *Coptidis Rhizoma* group were significantly decreased. HK and mitochondrial respiratory chain complex I was decreased to some extent, but there was no significant difference. The content of α -KGDH was decreased significantly, and the content of CS and ICD was decreased in a certain degree. Compared with the crude *Coptidis Rhizoma* group, the activities of HK, PFK, PK and mitochondrial respiratory chain complex I, II, and III in the ginger-processed *Coptidis Rhizoma* group were increased significantly, and the content of CS, ICD and α -KGDH was increased significantly. There was no significant change in the mitochondrial respiratory

收稿日期: 2019-03-27

基金项目: 国家科技基础性工作专项 (2014FY111100-2)

作者简介: 李听弦, 研究方向为中药炮制工艺及质量标准研究。Tel: 18986084418 E-mail: 2240108812@qq.com

*通信作者 王光忠 Tel: (027)68890231 E-mail: wgzhong4067@sina.com

chain complex IV. Two principal components were extracted by principal component analysis. Among them, complex II and complex III had the maximum contribution rate of principal component 2 and principal component 1 of 0.916 and 0.873, respectively. **Conclusion** The weakening of cold in nature of *Coptis chinensis* after ginger-processed treatment may be due to the inhibition of the inhibitory effect of *C. chinensis* on mitochondria respiratory chain complex II and complex III in the oxidative phosphorylation pathway.

Key words: *Coptidis Rhizoma*; ginger-processed *Coptidis Rhizoma*; processing technology; energy metabolism; principal component analysis; oxidative phosphorylation

黄连为我国常用中药材, 黄连原植物有毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎^[1]。黄连性寒, 味苦, 归心、脾、胃、肝、胆、大肠经; 具有清热燥湿、泻火解毒的功效。生黄连苦寒之性较甚, 久服或过量服用均易导致脾胃损伤, 而经过辅料炮制后其药性会发生变化。其中用姜作为辅料, 制成姜黄连是常用的传统炮制方法之一, 姜制后其苦寒之性缓和, 并且可以引药入脾经, 止呕作用增强^[2]。现代药理学研究表明, 中药药性对调整机体能量代谢的平衡具有重要意义^[3-4]。一般认为寒凉药抑制机体的功能, 能量消耗减少或产热减少^[5-6]。给正常大鼠 ig 黄连水煎液后, 其三磷酸腺苷 (ATP) 酶、琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性以及肌糖原和肝糖原含量均有显著下降^[7], 因此, 本实验考察姜黄连炮制前后对 3 条能量代谢途径中关键酶的影响, 筛选出姜黄连炮制前后改变能量代谢变化的主要途径, 阐明姜制黄连药性的改变与能量代谢的关系。

1 材料

1.1 药材与试剂

黄连药材采自湖北省利川市忠路镇, 经湖北中医药大学鉴定教研室张秀桥教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎。柠檬酸合酶 (CS) 酶联免疫吸附测定试剂盒、异柠檬酸脱氢酶 (ICD)、 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 己糖激酶 (HK) 试剂盒、磷酸果糖激酶 (PFK) 活性测定试剂盒、丙酮酸激酶 (PK) 试剂盒、线粒体呼吸链复合体 II 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 线粒体呼吸链复合体 I、III、IV 试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司)。

1.2 动物

SD 大鼠, 雄性, 清洁级, 体质量 180~220 g, 湖北省疾病预防控制中心提供, 许可证号 SCXK (鄂) 2017-0012, 合格证号 42010200001362。

1.3 仪器

台式低温高速冷冻离心机, 德国 Sartorius 公司; 酶标仪, 美国 Agilent Technologies 公司。

2 方法

2.1 姜黄连饮片的制备

参照《中国药典》2015 年版规定方法炮制姜黄连饮片, 取黄连饮片, 加姜汁拌匀 (100 kg 黄连, 用生姜 12.5 kg), 闷润, 待姜汁被吸尽后, 置炒制容器内, 用文火加热炒干, 取出、晾凉, 筛去碎屑。

2.2 生黄连及姜黄连水煎液的制备

精密称取生黄连、姜黄连饮片各 150 g, 加 10 倍量水, 浸泡 30 min 后煎煮, 煮沸 30 min 后, 滤过, 药渣再加 8 倍量水煎煮, 煮沸 30 min 后滤过, 合并 2 次滤液, 浓缩至 1 g/mL, 即得生黄连水煎液和姜黄连水煎液, 4 °C 储存备用。生黄连水煎液含小檗碱 0.54 mg/mL, 姜黄连水煎液含小檗碱 0.42 mg/mL。

2.3 分组与给药

将大鼠随机分为 3 组, 分别为对照组、生黄连组、姜黄连组, 每组 8 只。取生黄连、姜黄连水煎液分别 ig 给药, 每次给药 15 g/kg^[8], 对照组给予相应体积的生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 第 7 天于手术前 30 min 给药。3 组均于第 7 天手术, 给药期间常规自由喂养。

2.4 取材及样品处理

各组大鼠术前 12 h 禁食, 自由饮水, 0.4% 戊巴比妥钠 10 mL/kg ip 麻醉后, 腹主动脉取血, 用 EDTA-Na₂ 采血管采集, 30 min 内于 1 000×g 离心 15 min, 取上清液待测。各项酶活指标的检测均按试剂盒说明书操作。

2.5 统计分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对各检测指标结果进行单因素方差分析和 *t* 检验, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并且用 SIMAC 14.1 对 10 个指标进行主成分分析。

3 结果

3.1 对大鼠糖酵解途径关键酶的影响

检测各组大鼠血浆中 HK、PFK 和 PK 的活性,

结果见图 1。与对照组比较,生黄连组大鼠血浆中 HK、PFK 和 PK 的活性均显著降低 ($P < 0.001$),姜黄连组大鼠血浆中 PFK 与 PK 的活性显著降低 ($P < 0.05$),HK 有一定程度的降低,但差异不显著 ($P > 0.05$);与生黄连组比较,姜黄连组大鼠血浆中 HK、PFK 和 PK 的活性均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

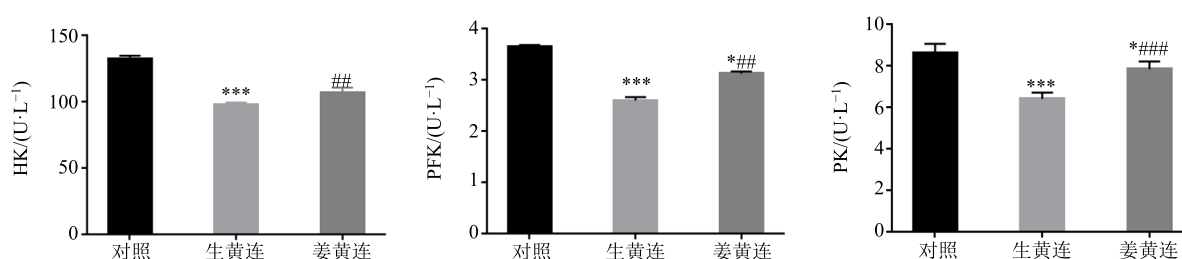
3.2 对大鼠三羧酸循环途径关键酶的影响

检测各组大鼠血浆中 CS、ICD、 α -KGDH 水平,结果见图 2。与对照组比较,生黄连组大鼠血浆中 CS、ICD、 α -KGDH 的水平均显著降低 ($P < 0.001$),姜黄连组大鼠血浆中 α -KGDH 水平显著降低 ($P < 0.001$),CS 和 ICD 水平有一定程度降低,但差异不显著 ($P > 0.05$)。与生黄连组比较,姜黄

连组大鼠血浆中 CS、ICD、 α -KGDH 水平均显著升高 ($P < 0.001$)。

3.3 对氧化磷酸化途径关键酶的影响

检测各组大鼠血浆中线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV 活性,结果见图 3。与对照组比较,生黄连组大鼠血浆中线粒体呼吸链复合体 I、II、III、IV 的活性均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001),姜黄连组大鼠血浆中线粒体呼吸链复合体 II、III、IV 的活性均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001),线粒体呼吸链复合体 I 有一定程度的降低,但差异不显著 ($P > 0.05$),与生黄连组比较,姜黄连组大鼠血浆中线粒体呼吸链复合体 I、II、III 的活性均显著升高,线粒体呼吸链复合体 IV 没有显著变化。



与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与生黄连组比较: ## $P < 0.01$ **** $P < 0.001$, 下同
* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ **** $P < 0.001$ vs *Coptidis Rhizoma* group, same as below

图 1 生黄连和姜黄连对大鼠血浆中 HK、PFK 和 PK 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of *Coptidis Rhizoma* and ginger-processed *Coptidis Rhizoma* on activities of HK, PFK, and, PK in plasm of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

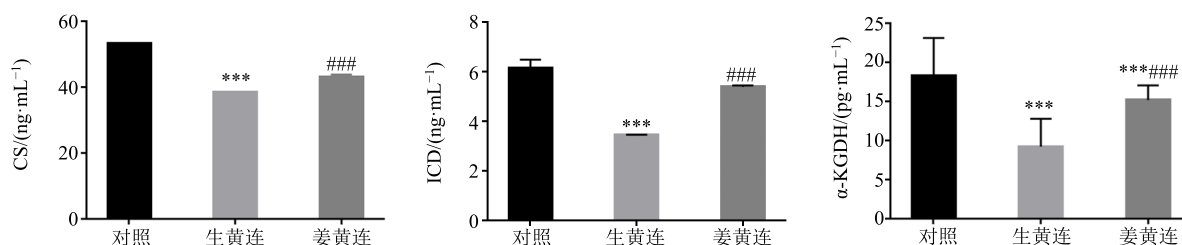


图 2 生黄连和姜黄连对大鼠血浆 CS、ICD、 α -KGDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of *Coptidis Rhizoma* and ginger-processed *Coptidis Rhizoma* on activities of CS, ICD, and, α -KGDH in plasm of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4 主成分分析

将 10 个指标的检测结果导入 SIMAC 14.1 进行主成分分析。分析结果 (图 4) 表明对照组、生黄连组和姜黄连组能量代谢过程具有显著差异,被分成 3 组。并且影响这种差异的主要是氧化磷酸化途径中线粒体呼吸链复合体 II 和复合体 III, 2 个主成分的总贡献值为 0.942 (表 1), 具有代表性。

4 讨论

黄连具有清热燥湿、泻火解毒的功效,临床上常用以治疗脾胃湿热,但是生黄连苦寒之性较甚,久服或过量服用均易导致脾胃损伤,因此在治疗中焦之火时,常用姜汁进行炮制抑制其苦寒之性。现代研究认为能量代谢与中药的药性存在密切联系,可以通过分析其能量代谢的变化规律探讨中药药

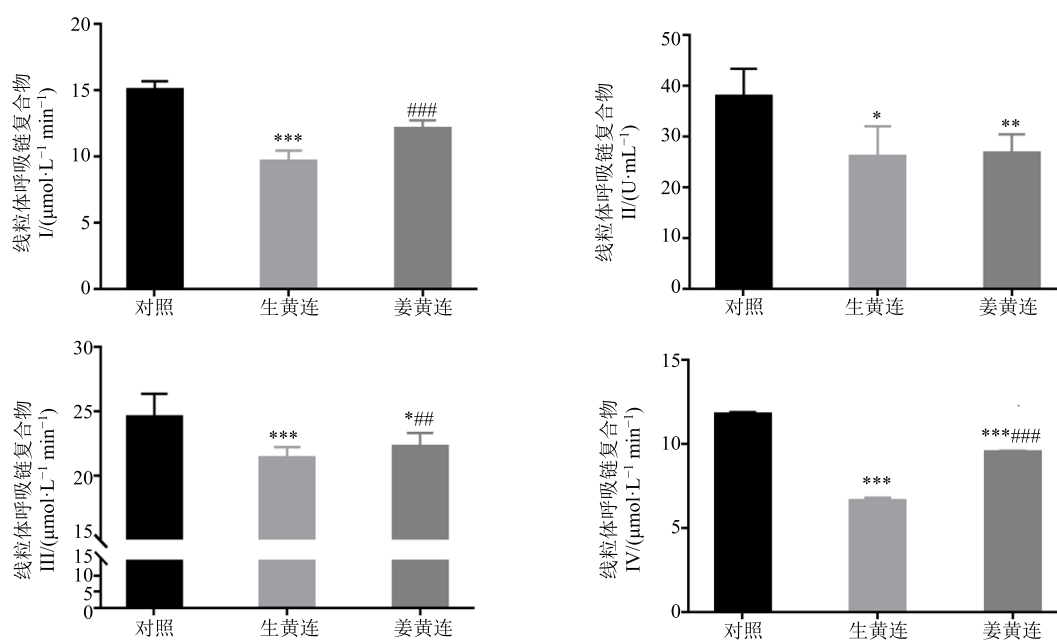


图 3 生黄连和姜黄连对大鼠血浆线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of *Coptidis Rhizoma* and ginger-processed *Coptidis Rhizoma* on activities of mitochondria respiratory chain complex I—IV in plasm of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

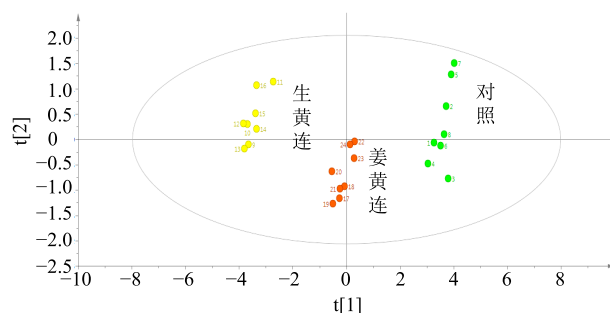


图 4 主成分分析得分图

Fig. 4 Principal component score scatter plot

表 1 主成分分析贡献值

Table 1 Principal component analysis contribution rate

指标	主成分得分	
	1	2
CS	0.702	0.676
HK	0.692	0.672
ICD	0.900	0.398
线粒体呼吸链复合体 I	0.731	0.642
线粒体呼吸链复合体 II	0.330	0.873
线粒体呼吸链复合体 III	0.916	0.326
线粒体呼吸链复合体 IV	0.849	0.518
PFK	0.817	0.568
PK	0.427	0.824
α -KGDH	0.846	0.509

性的变化。

有研究表明^[9], 寒证时, 机体中枢特别是丘脑下部兴奋性降低, 交感神经紧张性低下或副交感神经偏亢, 能量代谢及耗氧量降低。而热证时, 交感-肾上腺髓质系统功能偏亢, 而副交感神经紧张性低下, 能量代谢及耗氧量增加。机体与能量有关的代谢主要是糖代谢过程和氨基酸代谢等^[10]。且机体主要通过糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化 3 条途径进行能量代谢。

本实验通过对生黄连和姜黄连给药后 3 条能量代谢途径的关键酶检测和降维分析, 筛选出炮制前后对能量代谢具有主要影响作用的途径和关键酶, 探讨能量代谢对姜黄连炮制前后药性产生的影响。

糖酵解途径又称 EMP 途径, 是将葡萄糖和糖原降解为丙酮酸并伴随着 ATP 生成的一系列反应, 是一切生物有机体中普遍存在的葡萄糖降解的途径, 是葡萄糖进行有氧或无氧分解的共同代谢途径。影响糖酵解过程的 3 种关键酶分别是 HK、PFK 和 PK。HK 和 PFK 是糖酵解途径中最关键的 2 种限速酶, PK 是分布于肝脏、肌肉、肾髓质和红细胞中的一种同工酶。这 3 种酶的活性是调控糖酵解途径的关键。本实验结果表明, 生黄连和姜黄连均可以显著降低这 3 种酶的活性, 从而抑制机体通过糖酵

解途径进行能量代谢;而姜黄连的抑制作用显著弱于生黄连。

三羧酸循环是需氧生物体内普遍存在的代谢途径,分布在线粒体。因为在这个循环中几个主要的中间代谢物是含有 3 个羧基的有机酸,所以叫做三羧酸循环,又称为柠檬酸循环或者 TCA 循环。而调控三羧酸循环的 3 种关键酶是 CS、ICD、 α -KGDH,这 3 种酶的含量是调节三羧酸循环的关键。本实验结果表明,生黄连和姜黄连均可以显著降低这 3 种酶的活性,从而抑制机体通过三羧酸循环途径进行能量代谢;而姜黄连的抑制作用显著弱于生黄连。

氧化磷酸化是指有机物包括糖、脂、氨基酸等在分解过程中的氧化步骤所释放的能量,驱动 ATP 合成的过程,通常发生在线粒体中。该过程主要有线粒体呼吸链复合物 I~IV 进行调控。本实验结果表明,生黄连和姜黄连均可以显著降低这 4 种酶的活性,从而抑制机体通过氧化磷酸化途径进行能量代谢;而姜黄连的抑制作用显著弱于生黄连。

通过主成分分析对 3 条能量代谢途径中关键酶的活性进行降维分析,结果表明生黄连和姜黄连对能量代谢影响的差异主要在氧化磷酸化途径,其中线粒体呼吸链复合物 II 和 III 是其主要差异指标。提示生黄连和姜黄连药性的改变可能是由于对线粒体呼吸链复合物 II 和 III 含量影响的差异,从而调控机体通过氧化磷酸化途径进行不同程度的能量代谢。

姜黄连因其苦寒之性缓和,止呕作用增强。而本研究证明姜黄连药性的改变可能是由于对线粒体呼吸链复合物 II 和 III 含量影响的差异,从而调控

机体通过氧化磷酸化途径进行不同程度的能量代谢。因此可以推测,黄连姜制后通过调控机体氧化磷酸化从而增强其对胃肠运动的影响,达到良好的止呕效果。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王婷婷,钟凌云. 姜制黄连炮制近年来研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 427-429.
- [3] 程彬彬,张玉惠. 中药四气定性定量方法初探 [J]. 山西中医, 2000, 16(2): 46-47.
- [4] 王春燕. 中药四性的研究概况 [J]. 甘肃中医, 2007, 20(10): 13-14.
- [5] 彭淑红,黄丽萍,高小恒,等. 寒性中药对大鼠骨骼肌能量代谢相关因子的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3064-3067.
- [6] 孙振,彭淑红,嵇琴,等. 黄连药性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 221-223.
- [7] 黄丽萍,彭淑红,蒙晓芳,等. 6 种寒性中药对大鼠肝脏能量代谢的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3255-3258.
- [8] 钟凌云,邓玉芬,罗雅伦,等. 鲜、干姜汁及不同姜汁制黄连对大鼠 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力影响研究 [J]. 中药材, 2014, 37(12): 2186-2188.
- [9] Marinova E K, Nikolova D B, Popova D N, *et al.* Suppression of experimental autoimmune tubulointerstitial nephritis in BALB/c mice by hetherine [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 48(1): 9-16.
- [10] 钟凌云,廖智慧,龚千锋,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.