

基于正常大鼠物质能量代谢状况探讨怀菊花的寒热药性

米汪洋¹, 杨翠兰^{1,2}, 克迎迎¹, 王梦梦¹, 单增福¹, 李亚格¹, 冯卫生¹, 郑晓珂^{1*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008

2. 柘城县人民医院, 河南 商丘 476200

摘要: 目的 建立寒热药性对正常动物影响的评价系统, 通过探讨怀菊花 *Chrysanthemi Flos* 对正常大鼠物质、能量代谢的影响, 评价怀菊花的寒热药性。方法 SD 雄性大鼠适应性喂养 1 周, 随机分为对照组、黄柏组、黄连组、黄芩组、花椒组、干姜组、肉桂组及怀菊花组。每天上午 9:00 给药, 对照组给予矿泉水, 各给药组给予其水煎提取物, 不间断给药 9 d 后, 水合氯醛麻醉后处死动物, 摘取肝脏备用。检测各组大鼠体质量、肛温, 末次给药后检测大鼠 5 min 内的自主活动次数。ELISA 法检测物质能量代谢相关指标 GS、PEPCK、HK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC、ACC、malonyl-CoA、HSL、GK、HMGR、GDH、UCPs、CCR、COX、ADK、ATPs、ATP 的水平。Western blotting 法检测腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 信号通路关键蛋白的表达。结果 在正常动物实验中, 典型寒性中药黄柏、黄连、黄芩能够显著降低大鼠肛温、自主活动次数以及 PEPCK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC、HSL、GK、HMGR、GDH、UCPs、CCR、COX、ADK、ATPs 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著升高 malonyl-CoA 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著抑制磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 α (p-AMPK α) 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 而典型热性中药花椒、干姜、肉桂能够显著升高大鼠肛温、自主活动次数以及 PEPCK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC、HSL、GK、HMGR、GDH、UCPs、CCR、COX、ADK、ATPs 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低 ACC、malonyl-CoA 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 极显著促进 p-AMPK α 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。怀菊花能够显著降低大鼠肛温以及 PEPCK、HK、PFK-1、PYGL、ICD、PDHC、HSL、GK、GDH、CCR、ADK 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 极显著抑制 p-AMPK α 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 表现与典型寒性中药相同的趋势。结论 怀菊花能够显著降低正常大鼠物质能量代谢水平, 与典型寒性中药趋势相同, 这与《中国药典》记载的菊花药性“微寒”相符, 故基于正常动物物质能量代谢状况建立的评价系统用于评价中药药性是可行性的。

关键词: 寒热药性; 怀菊花; 物质能量代谢; 药性研究评价系统; 腺苷酸活化蛋白激酶信号通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)03-0799-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.023

Discussion on cold and heat properties of *Chrysanthemi Flos* in normal rats based on substance and energy metabolism

MI Wang-yang¹, YANG Cui-lan^{1,2}, KE Ying-ying¹, WANG Meng-meng¹, SHAN Zeng-fu¹, LI Ya-ge¹, FENG Wei-sheng¹, ZHENG Xiao-ke¹

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

2. People's Hospital of Zhecheng County, Shangqiu 476200, China

Abstract: Objective The present study aimed to evaluate the cold and heat properties of *Chrysanthemi Flos* by exploring the effects of *Chrysanthemi Flos* on substance and energy metabolism in normal rats. **Methods** SD male rats were fed adaptively for one week and were randomly divided into normal group, *Phellodendri Chinensis Cortex* group, *Coptidis Rhizoma* group, *Scutellariae Radix* group, *Zanthoxyli Pericarpium* group, *Zingiberis Rhizoma* group, *Cinnamomi Cortex* group and *Chrysanthemi Flos* group. Mineral water was given to the NC group at 9 am every day, and water decoction extract was given to each group. After 9 d of continuous administration, blood was taken from the abdominal aorta to keep the serum for use, and liver were taken for use. Body

收稿日期: 2020-07-11

基金项目: 中央引导地方科技发展专项 (14204349); 高层次人才科研能力培养工程-四大怀药及其炮制品的药性研究 (00104354-2018-18); 中医药现代化研究重点专项 (2019YFC1708802); 河南省高层次人才特殊支持计划“中原千人计划”-中原领军人才 (ZYQR201810080)

作者简介: 米汪洋, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制研究。Tel: 18614985915 E-mail: 1500185405@qq.com

*通信作者: 郑晓珂, 女, 教授。Tel: (0371)60190296 E-mail: zhengxk.2006@163.com

weight, anal temperature and number of voluntary activities within 5 min after the last administration were measured. The ELISA kit was used to detect the levels of GS, PEPCK, HK, PFK-1, PK, PYGL, ICD, PDHC, ACC, malonyl-CoA, HSL, GK, HMGR, GDH, UCPs, CCR, COX, ADK, ATPs and ATP. The expression of AMPK and p-AMPK, the key proteins of AMPK signaling pathway in rat liver tissue were detected by Western blotting method. **Results** In the normal animal experiment, the typical cold traditional Chinese medicine (*Phellodendri Chinensis Cortex*, *Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix*) group could reduce the anal temperature, the number of spontaneous activity and the levels of PEPCK, PFK-1, PK, PYGL, ICD, PDHC, HSL, GK, HMGR, GDH, UCPs, CCR, COX, ADK, ATPs ($P < 0.05, 0.01$), increase the level of malonyl-CoA ($P < 0.05, 0.01$) and inhibit the expression of p-AMPK α protein ($P < 0.05$), while the typical febrile traditional Chinese medicine (*Zanthoxyli Pericarpium*, *Zingiberis Rhizoma* and *Cinnamomi Cortex*) group could increase the anal temperature, the number of spontaneous activity and the levels of PEPCK, PFK-1, PK, PYGL, ICD, PDHC, HSL, GK, HMGR, GDH, UCPs, CCR, COX, ADK, ATPs ($P < 0.05, 0.01$), decrease the levels of ACC and malonyl-CoA ($P < 0.05, 0.01$), and stimulate the expression of p-AMPK α protein ($P < 0.01$). Compared with the normal group, *Chrysanthemi Flos* group could reduce the anal temperature, the number of spontaneous activities and the levels of PEPCK, HK, PFK-1, PYGL, ICD, PDHC, GK, GDH, CCR and ADK ($P < 0.05, 0.01$), and inhibit the expression of p-AMPK α protein ($P < 0.01$). The effect was the same as that of typical cold traditional Chinese medicine group, and it was inferred that *Chrysanthemi Flos* was cold (cool). **Conclusion** The effect of *Chrysanthemi Flos* group is the same as that of typical cold traditional Chinese medicine group, which is consistent with the "slight cold" of *Chrysanthemi Flos* recorded in Chinese Pharmacopoeia. It is feasible to use the evaluation system based on normal animals to the research of the property of Chinese herbal medicine.

Key words: cold and heat properties; *Chrysanthemi Flos*; substance and energy metabolism; evaluation system for drug property study; AMPK signal pathway

中药药性理论的主要内容有四气（性）、五味、升降浮沉、归经、毒性等。四气又称四性，即寒、热、温、凉，都是古人从药物作用于机体所发生的反应而做出的概括性归纳。中药的寒热药性反映了药物对人体阴阳盛衰、寒热变化的作用倾向^[1-2]，是中药药性理论的核心及指导中医临床用药的主要依据^[3]。

匡海学教授提出，促进机体能量、物质代谢的中药多具有热（或温）性，抑制机体能量、物质代谢的中药多具有寒（或凉）性^[4]。药性（气）的现代研究可以通过宏观的正常或寒、热动物模型实验以及系统生物学等方法予以评价归属^[5]。本实验室前期研究^[6-7]发现寒凉药桑白皮能抑制正常大鼠的物质、能量代谢，改善热症模型大鼠物质、能量代谢的高水平亢奋状态。有研究发现激活腺苷酸活化蛋白激酶（adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK）/雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）信号通路，能够促进能量代谢，增强细胞活性^[8]。王仁和^[9]发现益糖康改善糖尿病心肌病大鼠的糖脂代谢紊乱异常可能是通过促进大鼠心肌细胞 AMPK 蛋白的表达实现的。蒲鹏^[10]发现野黄芩苷可以抑制高糖诱导的野生型肝细胞炎症通路，这一效应是依赖 AMPK α 2 的激活而实现的。现代研究认为 AMPK 是机体维持各种代谢平衡所必需的，是葡萄糖水平

和能量代谢的感受器^[11]。

怀菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序，气清香，味甘、苦，性微寒，归肺、肝经，具有平肝明目、散风清热、清热解毒的功效^[12-13]。现代药理研究表明，菊花具有抗炎^[14]、降血糖^[15]、保护心血管^[16]、抗抑郁^[17]等药理作用。本研究选择黄柏、黄连、黄芩 3 味典型寒性中药和干姜、花椒、肉桂 3 味典型热性中药，通过分析典型寒、热中药对正常大鼠糖原合成酶（glycogen synthase, GS）、磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶（phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK）、己糖激酶（hexokinase, HK）、磷酸果糖激酶 1（phosphofructokinase-1, PFK-1）、丙酮酸激酶（pyruvate kinase, PK）、糖原磷酸化酶（glycogen phosphorylase, PYGL）、异柠檬酸脱氢酶（isocitrate dehydrogenase, ICD）、丙酮酸脱氢酶复合物（pyruvate dehydrogenase complex, PDHC）、乙酰辅酶 A 羧化酶（acetyl CoA carboxylase, ACC）、丙二酰辅酶 A（malonyl-CoA）、激素敏感性脂肪酶（hormone-sensitive triglyceride lipase, HSL）、甘油激酶（glycerokinase, GK）、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶（3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR）、谷氨酸脱氢酶（glutamate dehydrogenase, GDH）、解偶联蛋白（uncoupled protein, UCPs）、细胞色素 C 还原酶

(cytochrome C reductase, CCR)、细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome C oxidase, COX)、腺苷酸激酶 (adenosine kinase, ADK)、腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP)、ATP 合酶 (adenosine triphosphate synthase, ATPs) 以及 AMPK 信号通路关键蛋白的影响, 建立寒、热中药对正常大鼠物质能量代谢情况的评价系统, 进而探讨怀菊花的“微寒”药性, 为中药药性的评价提供研究方法。

1 材料

1.1 动物

由北京维通利华实验技术有限公司提供的 SPF 级 SD 雄性大鼠 64 只, 8 周龄, 体质量 (200±20) g, 动物许可证号: SCXK (京) 20160006。喂养在 18~25 °C, 湿度 40%~60%、黑暗/光亮周期为 12 h 的清洁级动物实验室内, 适应性喂养 5 d 后用于实验。所有动物实验均得到河南中医药大学机构动物护理和研究伦理委员会的批准 (批准号 DWLL201903061)。

1.2 药物

黄柏 (批号 140301)、黄连 (批号 140702)、黄芩 (批号 1407103)、花椒 (批号 140601)、干姜 (批号 140702) 购于张仲景大药房, 肉桂 (批号 140502)、怀菊花 (批号 140502) 购于河南省顺康医药有限责任公司, 由河南中医药大学董诚明教授鉴定黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Roscoe 的干燥根茎, 花椒为芸香科植物花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. 的干燥成熟果皮, 肉桂为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥树皮, 怀菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序。

1.3 试剂与仪器

GS、PEPCK、HK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC、ACC、malonyl-CoA、HSL、GK、HMGR、GDH、UCPs、CCR、COX、ADK、ATPs、ATP (苏州卡尔文生物科技有限公司, 批号 E20180101A); BCA 试剂盒 (北京索莱宝生物科技有限公司, 批号 20170815); AMPK (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 18167-1-AP); p-AMPK (Cell Signaling Technology 公司, 批号 #5562); β -actin、荧光兔源

非特异性抗体 (武汉爱博泰克生物科技有限公司, 批号分别为 AC026、AS003)。

Odyssey[®] CLX 近红外荧光成像仪 (美国 LI-COR 公司); 通用电泳仪、Trans-Blot[®] Plus 转印槽 (美国 BIO-RAD); Multiskan MK3 酶标仪、自动洗板机 (美国 Thermo 公司); Mills-Q 超纯水仪 (苏州赛恩斯仪器有限公司); DZF-6050B 真空干燥箱 (北京恒泰丰科试验设备有限公司); 十万分之一精密分析天平 (德国 Sartorius 公司); BCD-206TAS 低温冰箱 (海尔公司); YLS-IB 多功能大鼠自主活动记录仪 (济南益延科技发展有限公司); 5810R 高速冷冻离心机、移液器 (德国 Eppendorf 公司); SK-1 快速混匀器 (常州国宇仪器制造有限公司); BT25S 37 °C 恒温箱 (上海-恒科技有限公司); WD-9405B 型水平摇床 (北京市六一仪器厂); 医用电子体温计 (东阿阿胶阿华医疗器械有限公司); 常规手术器械。

2 方法

2.1 药物的制备

称取足够量的各药材饮片, 10 倍量的水浸泡 60 min 后开水煎煮 60 min, 多层纱布滤过, 药渣再加入 10 倍量水, 煎煮 60 min, 多层纱布滤过, 合并 2 次药液, 浓缩后冷冻干燥得到水煎提取物, 各药材的提取率分别为黄柏 16.4%、黄连 25%、黄芩 50%、花椒 13.0%、干姜 15.14%、肉桂 8.17%、怀菊花 28.0%, 给药前用蒸馏水稀释至所需浓度, 4 °C 储存备用。

2.2 动物分组及给药

动物适应性喂养后, 按照体质量均衡原则分为对照组、黄柏组、黄连组、黄芩组、花椒组、干姜组、肉桂组以及怀菊花组。每天上午 9:00 给药, 对照组给予矿泉水, 黄柏组 ig 8.4 g/kg 黄柏水煎提取物, 黄连组 ig 3.5 g/kg 黄连水煎提取物, 黄芩组 ig 7.0 g/kg 黄芩水煎提取物, 花椒组 ig 4.2 g/kg 花椒水煎提取物, 干姜组 ig 7.0 g/kg 干姜水煎提取物, 肉桂组 ig 3.5 g/kg 肉桂水煎提取物, 怀菊花组 ig 7.0 g/kg 怀菊花水煎提取物 (按照人临床用量以体表面积折算为小鼠等效剂量的 42 倍量给药^[6]), 不间断给药 9 d 后, 水合氯醛麻醉处死动物, 取大鼠肝脏于液氮中快速冷冻之后转移至 -80 °C 冰箱中备用。

2.3 大鼠体质量、肛温、自主活动次数的检测

每天检测各组大鼠的体质量及肛温, 末次给药后检测大鼠体质量、肛温以及 5 min 内的自主活动次数。

2.4 糖代谢相关酶 GS、PEPCK、HK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC 的检测

取各组大鼠肝脏制备组织匀浆, 4 °C、3500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液依照试剂盒说明书检测 GS、PEPCK、HK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC 酶的水平。

2.5 蛋白质代谢相关酶 ACC、malonyl-CoA、HSL、GK 的检测

取各组大鼠肝脏制备组织匀浆, 4 °C、3500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液依照试剂盒说明书检测 ACC、malonyl-CoA、HSL、GK 酶的水平。

2.6 脂代谢相关酶 HMGR、GDH、UCPs 的检测

取各组大鼠肝脏制备组织匀浆, 4 °C、3500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液依照试剂盒说明书检测 HMGR、GDH、UCPs 酶的水平。

2.7 能量代谢相关酶 CCR、COX、ADK、ATPs 及 ATP 含量的检测

取各组大鼠肝脏制备组织匀浆, 4 °C、3500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液依照试剂盒说明书检测 CCR、COX、ADK、ATPs 酶的水平及 ATP 的含量。

2.8 Western blotting 法检测 AMPK 信号通路关键蛋白 AMPK α 、p-AMPK α 的表达

取对照组、黄芩组、干姜组、怀菊花组大鼠肝脏, 依照组织总蛋白提取试剂盒说明书操作, 提取各组肝脏总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度, 以每泳道 60 μ g 蛋白上样, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转膜至 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 再分别加入 p-AMPK α (1:1000)、AMPK α (1:1000)、 β -actin (1:2000) 的一抗, 室温孵育 30 min 后 4 °C 过夜孵育, 用 PBST 洗涤 6 次, 每次 5 min, 加入荧光二抗 (1:20 000) 避光孵育 1 h 后, 避光用 PBST 洗膜 3 次, 再用 PBS 洗膜 5 min。最后用 Odyssey® CLX 近红外荧光成像仪显影。

2.9 统计分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 18.0 进行组间单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。通过 MeV 软件绘制各检测指标处理结果的热度图。

3 结果

3.1 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠一般状况的影响

如表 1 所示, 各药物对大鼠体质量无影响; 与对照组相比, 典型寒性中药均能显著降低大鼠肛

表 1 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠体质量、肛温、自主活动次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine on body weight, anal temperature and times of voluntary activity in normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g	肛温/°C	自主活动/ (次·5 min ⁻¹)
对照	—	273.30±25.68	36.73±0.37	128.90±15.07
黄柏	8.4	283.22±14.45	36.40±0.09*	114.44±7.20**
黄连	3.5	276.00±14.56	36.40±0.18*	115.20±14.41**
黄芩	7.0	287.71±9.23	36.33±0.22*	116.90±7.17*
花椒	4.2	274.20±8.85	37.43±0.23**	140.00±8.23*
干姜	7.0	277.40±14.46	37.13±0.16*	146.90±7.17**
肉桂	3.5	278.20±21.35	37.32±0.33**	137.10±13.76
怀菊花	7.0	273.20±11.62	36.33±0.19*	119.70±12.54

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

温、自主活动次数 ($P < 0.05$ 、0.01), 典型热性中药能够显著升高大鼠肛温及自主活动次数 ($P < 0.05$ 、0.01); 怀菊花与典型寒性中药作用相似, 能够显著降低正常大鼠的肛温 ($P < 0.05$)。

3.2 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 GS、PEPCK、HK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC 水平的影响

如表 2、3 所示, 与对照组相比, 寒性中药能显著降低 PEPCK、HK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC 的水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 热性中药能显著升高 PEPCK、HK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC 的水平 ($P < 0.05$ 、0.01); 怀菊花则与寒性中药作用相似, 能显著降低 PEPCK、HK、PFK-1、PYGL 的水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.3 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 ACC、malonyl-COA、HSL、GK 水平的影响

如表 4 所示, 与对照组相比, 寒性中药可显著升高 malonyl-COA 的水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 降低 HSL、GK 的水平 ($P < 0.05$ 、0.01); 热性中药可显著降低 ACC、malonyl-COA 的水平 ($P < 0.05$ 、0.01)、升高 HSL、GK 的水平 ($P < 0.05$ 、0.01); 怀菊花则与寒性中药作用相似, 极显著降低 GK 的水平 ($P < 0.01$)。

3.4 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 HMGR、GDH、UCPs 水平的影响

如表 5 所示, 与对照组相比, 寒性中药能显著

表2 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠GS、PEPCK、HK、PFK-1水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine on GS, PEPCK, HK and PFK-1 levels in normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	GS/(U·L ⁻¹)	PEPCK/(IU·L ⁻¹)	HK/(mU·L ⁻¹)	PFK-1/(U·L ⁻¹)
对照	—	730.95±95.33	41.68±6.56	708.05±33.19	1 444.15±204.53
黄柏	8.4	863.65±261.97	31.11±1.94**	593.99±98.38*	1 236.91±194.35
黄连	3.5	831.02±176.57	29.19±4.18**	600.03±58.18*	1 146.24±296.23*
黄芩	7.0	930.04±207.26	33.27±4.22*	588.26±105.72**	1 059.28±80.26**
花椒	4.2	662.69±184.60	53.05±8.8**	807.03±90.18*	1 507.06±236.73
干姜	7.0	652.47±176.87	54.00±5.13**	837.20±78.68**	1 700.42±271.43*
肉桂	3.5	629.78±194.75	50.82±8.59**	832.37±46.04**	1 666.19±170.91
怀菊花	7.0	844.39±238.10	31.23±3.59**	600.97±69.72*	1 102.36±167.42**

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01, 下同

*P<0.05 **P<0.01 vs control group, same as below

表3 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠PK、PYGL、ICD、PDHC水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine on PK, PYGL, ICD and PDHC levels in normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ICD/(U·L ⁻¹)	PDHC/(IU·L ⁻¹)	PK/(mU·L ⁻¹)	PYGL/(U·L ⁻¹)
对照	—	410.11±37.82	10.10±2.031	432.55±161.61	483.81±93.99
黄柏	8.4	328.43±83.50	7.34±1.93	281.56±73.71*	414.18±65.95
黄连	3.5	279.22±78.26**	6.97±1.63*	273.23±61.6**	368.81±75.27*
黄芩	7.0	319.79±72.67*	7.31±1.86*	271.95±74.12**	348.80±58.33**
花椒	4.2	498.72±100.36*	13.15±2.31*	564.63±50.23*	576.67±46.29*
干姜	7.0	508.67±79.38*	14.21±2.70**	605.02±95.69**	592.96±104.85*
肉桂	3.5	462.20±58.10	13.03±3.89*	568.48±83.19*	531.83±86.62
怀菊花	7.0	323.10±71.93	7.47±1.87	329.42±132.03	398.09±54.39*

表4 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠ACC、malonyl-CoA、HSL、GK水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine on levels of ACC, malonyl-CoA, HSL and GK in normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ACC/(pg·mL ⁻¹)	malonyl-CoA/(IU·L ⁻¹)	HSL/(U·L ⁻¹)	GK/(U·L ⁻¹)
对照	—	374.43±20.83	158.19±18.89	2317.67±443.77	206.13±23.98
黄柏	8.4	447.70±53.31	196.88±43.09*	1607.13±172.34**	154.90±18.39**
黄连	3.5	471.76±74.42	136.79±14.78	1631.35±264.91**	172.44±25.70*
黄芩	7.0	481.27±64.44	205.20±45.61**	1743.59±388.67**	171.69±42.93*
花椒	4.2	283.83±38.86*	125.46±19.69	2734.90±405.24*	238.31±8.11*
干姜	7.0	293.80±47.38*	117.81±26.8*	2812.41±385.21*	238.44±16.53*
肉桂	3.5	316.94±21.28	105.81±10.6**	2840.90±253.38*	243.01±12.29**
怀菊花	7.0	433.62±52.1	183.88±35.01	2227.59±416.03	161.45±14.46**

降低 HMGR、GDH、UCPs 的水平 ($P<0.05, 0.01$), 热性中药能显著升高 HMGR、GDH、UCPs 的水平 ($P<0.05, 0.01$); 怀菊花则与寒性中药作用相似, 能极显著降低 GDH 的水平 ($P<0.01$).

3.5 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 CCR、COX、ADK、ATPs 及 ATP 含量的影响

如表 6 所示, 与对照组相比, 寒性中药能显著降低 CCR、COX、ADK、ATPs 的水平 ($P<0.05,$

0.01), 热性中药能显著升高 CCR、COX、ADK、ATPs 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01); 怀菊花与寒性中药组作用相似, 能显著降低 CCR、ADK 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 AMPK 信号通路的影响

如表 7 和图 1 所示, 与对照组比较, 黄芩显著降低 p-AMPK α 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 干姜显著升高 p-AMPK α 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 怀菊花与寒性中药黄芩作用相似, 显著降低 p-AMPK α 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。

3.7 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠物质能量代谢热图聚类分析

如图 2 所示, 以怀菊花及典型寒热中药检测的物质能量代谢相关指标为变量, 采用 Mev 聚类分析

表 5 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 HMGR、GDH、UCPs 代谢相关酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effects of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine on metabolic enzymes related to HMGR, GDH and UCPs in normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	HMGR/(U·L ⁻¹)	GDH/(U·L ⁻¹)	UCPs/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	105.32±14.61	8.11±0.95	8.62±2.54
黄柏	8.4	95.39±23.45	6.43±1.01**	6.49±1.29
黄连	3.5	79.81±15.43*	5.96±1.25**	5.81±1.81*
黄芩	7.0	78.24±6.69*	6.03±0.91**	6.69±1.98
花椒	4.2	137.20±26.18**	9.11±0.98	12.17±2.44**
干姜	7.0	143.40±22.74**	9.77±0.80*	12.38±2.41**
肉桂	3.5	127.49±27.34**	9.52±2.19*	11.37±2.18*
怀菊花	7.0	84.77±8.41	6.31±0.69**	6.11±1.73

表 6 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 CCR、COX、ADK、ATPs 及 ATP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effects of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine on contents of CCR, COX, ADK, ATPs and ATP in normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CCR/(U·L ⁻¹)	COX/(U·L ⁻¹)	ADK/(U·L ⁻¹)	ATPs/(U·L ⁻¹)	ATP/(nmol·L ⁻¹)
对照	—	17.63±1.34	4.12±0.44	159.72±33.33	115.67±8.88	7 543.22±316.99
黄柏	8.4	13.85±1.26**	3.13±0.56*	101.53±16.88**	91.73±12.46*	7 320.45±873.30
黄连	3.5	13.93±2.63**	2.88±0.85**	93.40±17.62**	87.03±11.97*	7 673.62±656.44
黄芩	7.0	14.55±3.84**	3.42±0.65	108.35±25.34*	94.06±17.85	7 122.12±734.33
花椒	4.2	22.71±3.80*	5.21±0.74*	173.99±33.33	128.52±24.59	7 260.68±590.38
干姜	7.0	23.55±3.79*	5.41±1.10**	216.55±52.01**	140.87±28.51*	7 029.75±489.63
肉桂	3.5	24.24±1.79*	5.06±1.11*	211.35±48.72*	133.53±31.50	7 844.78±690.55
怀菊花	7.0	15.48±2.05*	3.76±0.30	99.56±22.62**	93.81±14.09	7 698.85±917.36

表 7 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 AMPK 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effects of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine on AMPK signaling pathway in normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	AMPK α / β -actin	p-AMPK α / β -actin
对照	—	1.000±0.000	1.000±0.000
黄芩	7.0	0.997±0.025	0.812±0.115*
干姜	7.0	0.975±0.016	1.207±0.044**
怀菊花	7.0	0.986±0.021	0.754±0.086**

软件分析。结果发现, 黄柏、黄连、黄芩 3 味典型寒性中药聚为一类, 干姜、花椒、肉桂 3 味典型热性中药聚为一类, 怀菊花和典型寒性中药的物质能量代谢指标趋势相似, 与其聚为一类。

4 讨论

中药四气理论反映了药物对人体阴阳盛衰、寒热变化的作用倾向, 是中药性味归经研究的核心和主体内容, 已成为当前药性研究的主要着眼点和切入点^[18-20]。药性(气)可通过不同途径以主要影响机体的能量和物质代谢, 进而影响药物疗效或副作用发生的一类生物学效应^[21]。有研究发现胰岛素能通过 AMPK 通路调控犊牛肝细胞脂代谢紊乱^[22]。降糖消渴颗粒能够通过调节 AMPK 信号通路, 改善糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素抵抗, 并能促进脂肪酸氧化, 调节脂肪代谢^[23]。亚甲蓝可以通过激活 AMPK 信号通路增强线粒体功能, 改善细胞能量水平^[24]。

AMPK 在真核生物中广泛存在, 是一种在真核细胞中高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。与机体

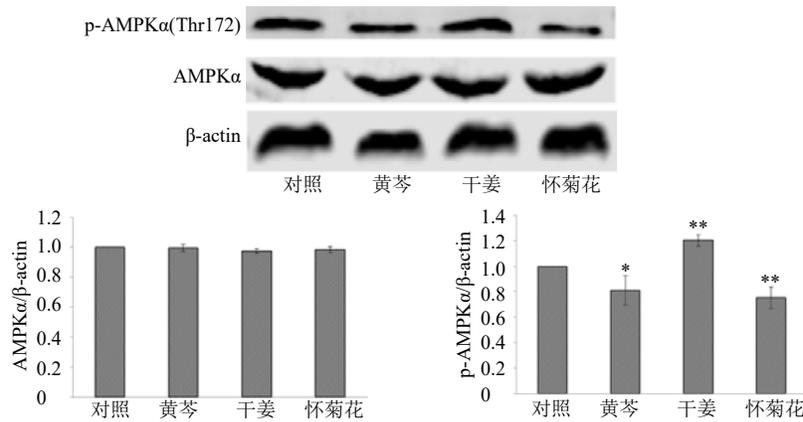


图 1 怀菊花及典型寒热中药对正常大鼠 AMPK 信号通路关键蛋白的影响

Fig. 1 Effects of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine on key proteins of AMPK signaling pathway in normal rats

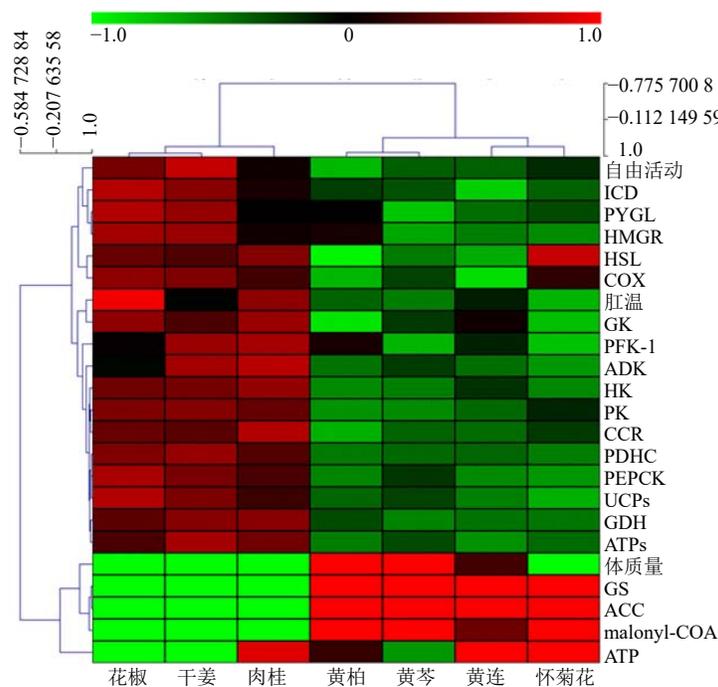


图 2 怀菊花及各典型寒热中药的热图

Fig. 2 Heat map of *Chrysanthemi Flos* and typical cold-heat traditional Chinese medicine

正常的细胞应激、运动、代谢等息息相关，AMPK 信号通路的激活主要与增加细胞 ATP 消耗和抑制 ATP 产生有关^[25]。激活的 AMPK 信号通路通过调节糖、蛋白质、脂肪代谢，来维持能量在体内的平衡^[26]。当细胞营养和能量缺乏时，活化的 AMPK 信号通路一方面能够抑制糖原、脂肪和胆固醇的合成，减少 ATP 的利用；另一方面，能够促进脂肪酸氧化、葡萄糖转运等，增加 ATP 的产生^[27-28]。通过提高细胞内 ATP 储备，应对营养或能量缺乏应激^[29]。本实验对 AMPK 信号通路的关键蛋白 AMPKα、

p-AMPKα 蛋白的表达进行检测，发现典型寒性中药黄芩能够抑制 p-AMPKα 蛋白的表达，典型热性中药干姜能够促进 p-AMPKα 蛋白的表达；怀菊花与寒性中药作用相似，表现出抑制 p-AMPKα 蛋白的表达的作用。说明怀菊花能够抑制 AMPK 信号通路的激活。

在动物体内，AMPK 信号通路的激活与否主要受机体能量状况的调节。当体内能量被耗竭，细胞内 ATP 水平降低、一磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 水平增加时，AMPK 信号

通路会被激活。研究也表明, AMP 是 AMPK 信号通路的特异性激活剂。AMPK 信号通路被激活后, 其作用主要是通过迅速调节一系列作用底物(包括 PFK、ACC、HSL、GS 等)的活性从而改变脂肪和碳水化合物代谢来实现的^[30]。

机体在健康状态下, 体内物质能量代谢处于动态平衡, 现代研究表明机体所需要的能量主要是通过糖代谢、脂肪代谢和蛋白质代谢提供。糖代谢是指葡萄糖的有氧氧化, 这是机体维持正常生命活动的基本条件, 大多细胞都通过此途径获取能量^[31]。根据糖氧化分解、释放能量的特点, 可将葡萄糖的有氧氧化过程划分为 3 个阶段。第 1 阶段: 葡萄糖氧化生成丙酮酸。HK、PFK-1、PK 是糖酵解途径中的 3 个调节位点和关键酶, 催化反应均不可逆, 这些酶的活性可直接影响糖酵解的速度。在体外纯化的 AMPK 可磷酸化 PFK, 进一步证明 AMPK 直接参与了糖酵解的调节。本实验典型寒性药组与怀菊花组 HK、PFK-1、PK 水平均降低, 说明葡萄糖磷酸化受阻, 糖酵解速度减慢, 同时由糖酵解产生的能量减少, 机体能量代谢被抑制。第 2 阶段: 丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)。丙酮酸需进入线粒体, 在 PDHC 催化下氧化脱羧, 与辅酶 A 结合生成乙酰辅酶 A^[32]。此阶段是糖类经丙酮酸进入三羧酸循环的必经途径。典型寒性药组和怀菊花组 PDHC 水平降低, 使丙酮酸氧化脱羧反应受阻, 乙酰辅酶 A 含量降低, 三羧酸循环减弱, 进而抑制机体能量代谢。第 3 阶段: 乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环, 氧化、脱羧生成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) + H⁺、黄素腺嘌呤二核苷酸递氢体 (flavin adenine dinucleotide, reduced, FADH₂) 和 CO₂, 以及少量的 ATP; 在此阶段中参与代谢的关键酶包括 CS、ICD。NADH+H⁺或 FADH₂ 携带的 H 通过线粒体内膜上的呼吸链依次传递, 最终与氧结合生成水, 并释放大量的能量, 此阶段中关键酶有 CCR、COX、ATPs、ADK。怀菊花组及典型寒性药组 CS、ICD、CCR、COX、ATPs、ADK 水平均降低, 说明三羧酸循环减弱。三羧酸循环是 3 大营养物质氧化分解的共同途径, 高效产能并逐步放能。因此, 怀菊花组与典型寒性药组均使三羧酸循环减弱, 抑制机体的物质能量代谢。

除从食物中得到的葡萄糖外, 体内的葡萄糖还可以通过糖原合成和糖异生产生, 糖原合成与分解

的关键酶是 GS、PYGL。能量缺乏时, AMPK 使 GS 磷酸化失活, 抑制糖原的储备。典型寒性药组与怀菊花组的 GS 水平相对于正常大鼠均有所上升, PYGL 水平显著下降, 说明糖原合成增加, 分解减弱, 不能产生 6-磷酸葡萄糖, 进而无法进入肌细胞糖酵解或葡萄糖的有氧氧化。糖异生是与糖酵解方向相反的代谢途径, 可在某些生理、病理情况下, 使非糖物质转变成葡萄糖, 与糖异生关系密切的酶有 PEPCK。实验结果显示, 典型寒性药能降低 PEPCK 的水平, 说明寒性药能抑制机体内非糖物质向葡萄糖的转化。

在机体正常状态下, 60%~80%的心肌能量都由脂肪酸氧化提供, 与脂肪代谢有关的重要酶有 ACC、malonyl-CoA、GK、HSL。肉碱脂酰转移酶-1 (carnitine acyl transferase-1, CPT-1) 是脂肪酸氧化过程中的一种限速酶, 丙二酰辅酶 A (malonyl CoA) 对其有抑制作用。ACC 催化乙酰辅酶 A 合成丙二酰单酰辅酶 A, 为长链脂肪酸合成提供二碳单位, 是脂肪酸合成过程中的限速酶^[33]。AMPK 可使 ACC 磷酸化失活, 减少了丙二酰辅酶 A 对肉碱脂酰转移酶 1 的抑制作用, 促进脂肪酸的氧化。本实验中怀菊花抑制 AMPK 信号通路的激活, ACC 水平升高, 丙二酰辅酶 A 的合成增加, 从而对 CPT-1 抑制增强, 脂肪酸氧化减弱。GK、HSL 是脂肪分解的关键酶。一般认为, 测定脂肪中的 HSL 活性和血液中脂肪酸的浓度, 可以反映脂肪分解的情况^[34]。本实验寒性药组与怀菊花组 GK、HSL 的水平均降低, 说明脂肪分解被抑制, 怀菊花能够抑制机体脂肪代谢。

与蛋白质代谢有关的重要酶有 GDH、HMGR、UCPs。当机体能量不足时, GDH 经变构激活, 可加速氨基酸氧化, 对机体的能量代谢起着重要的调节作用。本实验寒性药组与怀菊花组 GDH 水平降低, 蛋白质代谢被抑制。

黄柏、黄连、黄芩是 3 味典型寒性中药, 干姜、花椒、肉桂是 3 味典型热性中药。实验结果显示典型寒性中药能够不同程度地降低正常大鼠肛温、自主活动次数以及 PEPCK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC、HSL、GK、HMGR、GDH、UCPs、CCR、COX、ADK、ATPs 的水平, 升高 malonyl-CoA 的水平, 抑制 p-AMPK 蛋白的表达; 而典型热性中药能够不同程度地升高大鼠肛温、自主活动次数以及 PEPCK、PFK-1、PK、PYGL、ICD、PDHC、HSL、GK、HMGR、GDH、UCPs、CCR、COX、ADK、

ATPs的水平,降低ACC、malonyl-CoA的水平,促进p-AMPK蛋白的表达。

综上所述,典型寒性中药能够不同程度地抑制正常大鼠的物质能量代谢、抑制AMPK信号通路的激活;典型热性中药能够不同程度地促进正常大鼠的物质能量代谢、激活AMPK信号通路。同时,将怀菊花及各典型寒热中药对正常动物影响的结果通过归一化后所得热图发现,怀菊花明显与黄柏、黄连、黄芩寒性中药聚为一类,而干姜、花椒、肉桂热性中药聚为一类,说明怀菊花的作用与典型寒性中药组作用相似,提示怀菊花药性为寒性,这与《中国药典》记载相符。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李文兰,张秀丽,隋峰,等. 中药性味理论的现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 227-230.
- [2] 贾子尧,林瑞超,郑虎占,等. 中药四气现代研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(12): 216-219.
- [3] 肖小河. 中药药性研究概论 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 481-484.
- [4] 匡海学,王艳宏,王秋红,等. 基于中药性味可拆分性和可组合性的中药性味理论研究新模式 [J]. 世界科学技术: 中医现代化, 2011, 13(1): 25-29.
- [5] 匡海学,杨炳友,王秋红,等. 中药药性理论研究模式的构建及应用 [A] // “新成果·新进展·新突破” 中华中医药学会 2013 年学术年会、第三次中华中医药科技成果论坛论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会, 2013: 31.
- [6] 克迎迎,袁培培,王小兰,等. 桑白皮化学拆分组分对正常大鼠物质代谢与能量代谢的影响 [J]. 世界中医药, 2015, 10(12): 1847-1853.
- [7] 杨翠兰,克迎迎,李亚格,等. 桑白皮水煎液及各性味拆分组分对典型热证模型物质能量代谢的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(3): 323-326.
- [8] 张新颖. 雌激素通过 AMPK/mTOR 通路调节 PMNs 活性的机制研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2019.
- [9] 王仁和. 益糖康通过激活 AMPK/SIRT-1 信号通路对糖尿病心肌病的保护机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.
- [10] 蒲鹏. 野黄芩苷对代谢综合征的防治及作用机制 [D]. 武汉: 武汉大学, 2013.
- [11] Kahn B B, Alquier T, Carling D, et al. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism [J]. *Cell Metab*, 2005, 1(1): 15-25.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 311.
- [13] 王德胜,黄艳梅,石岩,等. 菊花化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(23): 9-11.
- [14] 冯卫生,樊慧,徐瑞豪,等. 圣草酚-7-O-β-D-葡萄糖苷改善血管内皮细胞损伤作用机制研究 [J]. 中药材, 2018, 41(5): 1176-1180.
- [15] 尚翔. 菊花提取物对小鼠的降血糖作用及其机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [16] 高添. 菊花提取物改善肾性高血压大鼠心肌肥厚及其作用机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [17] 周衡朴,任敏霞,管家齐,等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4785-4795.
- [18] 周珂,谭勇,刘忠第,等. 中药寒热药性及其毒副作用研究现状 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(4): 129-132.
- [19] 王艳艳,孙雪,裴晓蕾,等. 中药寒热药性与线粒体能量代谢关系研究 [J]. 中医药信息, 2013, 30(4): 48-50.
- [20] 王建,曾南,夏厚林,等. 中药药性理论研究模式的新思路 [J]. 中医杂志, 2013, 54(2): 99-102.
- [21] 阚东方. 黄芪及其拆分组分对大鼠肝细胞能量代谢的影响及机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [22] 丁红研. 胰岛素、胰高血糖素通过 AMPK 信号通路调控犍牛肝细胞脂代谢的机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [23] 赵丹丹. 降糖消渴颗粒对 DM 大鼠的作用及 AMPK 信号通路的影响研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [24] 滑晓莉. 基于 AMPK/PGC-1α 通路探讨亚甲蓝对脓毒症脑能量代谢调控作用 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [25] 蔡明春,黄庆愿,高钰琪. AMPK 与能量代谢 [J]. 重庆医学, 2005, 34(1): 120-122.
- [26] 宋康,白振忠,格日力. AMPK 调控能量代谢及线粒体稳态 [J]. 生理科学进展, 2019, 50(6): 447-451.
- [27] 陈标,满玉蓉,高柳玲,等. AMPK 调控能量代谢研究进展 [J]. 生物学杂志, 2017, 34(5): 78-82.
- [28] 李娟,周宜芳,尚颖. AMPK 调控机制的研究进展 [J]. 徐州医科大学学报, 2017(6): 413-416.
- [29] 熊延路,王明星,韩勇,等. AMPK: 细胞能量中枢 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(31): 6190-6196.
- [30] 徐晶,娄玉杰,张桂山. AMPK 对动物营养物质代谢调控的研究进展 [J]. 中国饲料, 2011(21): 25-27.
- [31] Nabuurs C I, Choe C U, Veltien A, et al. Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake [J]. *J Physiol*, 2013, 591(2): 571-592.
- [32] 王继峰. 生物化学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 119-120.
- [33] 岳颖,刘国华,郑爱娟,等. 生长动物脂肪代谢关键酶基因表达调控 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(2): 232-238.
- [34] 邵明丽,许梓荣. 猪脂肪代谢及其调控研究进展 [J]. 饲料博览, 2002(10): 12-15.

[责任编辑 潘明佳]