

• 药理与临床 •

基于“部位扣除”的黄芪温热效应导致“上火”反应的物质基础及机制研究

曹丽琰¹, 裴科^{1*}, 刘瑞¹, 宁燕², 赵婷婷¹, 于子涵¹, 吴陈成¹, 邵翔宇¹, 张朔生¹, 王颖莉¹, 胡美变¹, 蔡皓^{3*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西省现代中药工程实验室, 山西 晋中 030619

2. 浙江中医药大学药学院, 中药炮制研究中心, 浙江 杭州 310053

3. 南京中医药大学药学院, 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要:目的 探讨黄芪温热效应引起“上火”反应的物质基础及机制。方法 对黄芪水煎液中黄酮和皂苷部位进行分离, 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱对已分离部位进行成分鉴别; 将 SD 大鼠随机分为 8 组, 分别给予蒸馏水及相应药物。以《中国药典》规定的口服剂量的 4 倍进行 ig 给药, 连续 30 d。观察大鼠状态, 测定肛温、摄食量、粪便量、粪便含水量和唾液量; 测定炎症因子、甲状腺功能、肾上腺功能与能量代谢的相关指标; 检测各组肝脏中单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、过氧化物酶体增殖激活受体辅助活化因子-1 α (peroxisome proliferator-activated-receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)、核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, NRF1)、线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 的 mRNA 和蛋白表达量。结果 多糖、黄酮和皂苷部位的分离度良好, 多糖质量分数大于 50%, 皂苷、黄酮部位质量分数均大于 80%, 共鉴别出 21 种黄酮类成分和 6 种皂苷类成分。给药后与对照组相比, 各组别大鼠体质量无显著差异; 全成分组肛温明显升高 ($P < 0.05$); 全成分组、多糖组粪便含水量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 缺皂苷组粪便含水量显著升高 ($P < 0.001$); 第 28 天唾液量多糖组、皂苷组、缺黄酮组显著降低 ($P < 0.001$); 全成分组、多糖组、皂苷组和缺多糖组肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 多糖组白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平显著升高 ($P < 0.01$), 全成分组 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$); 各组 17-羟皮质类固醇 (17-hydroxycorticosteroid, 17-OHCS) 含量均有上调趋势, 其中全成分组、多糖组、皂苷组、缺多糖组和缺黄酮组有显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01); 全成分组、缺皂苷组与缺黄酮组的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活力与 Na^{+} 、 K^{+} -ATP 酶活力升高, 全成分组和多糖组琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 活力显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。各组对 AMPK、PGC-1 α 、NRF1、TFAM 的 mRNA 和蛋白表达水平均有上调趋势, 其中全成分组和多糖组的上调趋势优于其余各组。结论 过量食用黄芪导致“上火”可能与多糖及皂苷部位引起的炎症反应、能量代谢增强有关, 其机制与 AMPK 介导的 PGC-1 α /NRF1 通路相关, 其中多糖的影响较大。

关键词: 黄芪; “上火”反应; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 能量代谢; 单磷酸腺苷活化蛋白激酶通路
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4350-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.015

Material basis and mechanism of “Shanghuo” response caused by warm nature of *Astragali Radix* based on “fraction deduction”

CAO Li-long¹, PEI Ke¹, LIU Rui¹, NING Yan², ZHAO Ting-ting¹, YU Zi-han¹, WU Chen-cheng¹, SHAO Xiang-yu¹, ZHANG Shuo-sheng¹, WANG Ying-li¹, HU Mei-bian¹, CAI Hao³

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82074022); 国家自然科学基金联合基金重点项目 (U21A20410); 科技部“中医药现代化研究”重点研发计划项目子课题 (2019YFC1710800); 山西省应用基础研究项目 (201801D221436); 山西省教育厅科技创新计划项目 (2019L0720); 山西省中医药管理局项目 (2019ZYCY016); 山西省重点研发计划项目 (201903D421018); 山西省重点研发计划项目 (201903D421018); 山西药茶的研制和开发项目 (2020PY-YC-20)

作者简介: 曹丽琰 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制与物质基础研究。E-mail: C178798032@126.com

***通信作者:** 裴科 (1986—), 女, 硕士生导师, 研究方向为中药炮制与物质基础研究。E-mail: peike_pk@126.com

蔡皓 (1966—), 男, 副教授, 研究方向为中药炮制机制及炮制配伍。E-mail: haocai_98@njucm.edu.cn

1. Shanxi Modern Chinese Medicine Engineering Laboratory, School of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China
2. Chinese Medicine Processing Research Center, School of Pharmacy, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China
3. Engineering Research Center for Standardization and Standardization of Chinese Medicine Processing, Ministry of Education, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore the material basis and mechanism of “Shanghuo” caused by warm nature of Huangqi (*Astragali Radix*). **Methods** The flavonoids and saponins in *Astragali Radix* decoction were isolated and identified by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS firstly. Then SD rats were randomly divided into eight groups, administrated with distilled water and corresponding drugs, respectively. The daily dose was administered at four times dosage prescribed by *Chinese Pharmacopoeia* for 30 d. The state of rats was observed, rectal temperature, food intake, fecal output, feces moisture and saliva volume were measured. The related indexes including inflammatory factors, thyroid function, adrenal function and energy metabolism were determined. Finally, mRNA and protein expressions of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), peroxisome proliferator-activated-receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor 1 (NRF1) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) in each group were detected. **Results** There was a good separation for polysaccharides, flavonoids and saponins, at the same time the purity of total polysaccharides, saponins and flavonoids was more than 50%, 80% and 80% respectively. A total of 21 flavonoids and six saponins were identified. There was no significant difference in body weight among all groups, while the rectal temperature of *Astragali Radix* group was significantly increased ($P < 0.05$) by comparing to control group. The feces moisture of *Astragali Radix* and polysaccharides group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), however polysaccharides plus flavonoids group was significantly increased ($P < 0.001$) by comparing to control group. For saliva volume, compared with control group, polysaccharides, saponins and polysaccharides plus saponins group were significantly decreased on 28th day ($P < 0.001$). The level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in *Astragali Radix*, polysaccharides, saponins and saponins plus flavonoids groups were all significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while only interleukin-6 (IL-6) level in polysaccharides group was significantly increased ($P < 0.01$), IL-1 β level in *Astragali Radix* group was increased ($P < 0.05$) by comparing to control group. The contents of 17-hydroxycorticosteroid (17-OHCS) in all groups were increased by comparing with control group, while *Astragali Radix*, polysaccharides, saponins, saponins plus flavonoids group and saponins plus polysaccharides groups had significantly difference ($P < 0.05, 0.01$). Compared with control group, activities of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase and Na^{+} , K^{+} -ATPase in *Astragali Radix*, polysaccharides plus flavonoids and polysaccharides plus saponins were increased, activity of succinate dehydrogenase (SDH) in *Astragali Radix* and polysaccharides group were also significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with control group, mRNA and protein expressions of AMPK, PGC-1 α , NRF1 and TFAM were upregulated in all groups, and the trends of *Astragali Radix* and polysaccharides group were better than that of other groups. **Conclusion** “Shanghuo” induced by excessive consumption of *Astragali Radix* may be related to the inflammatory reaction and enhanced energy metabolism caused by polysaccharides and saponins of *Astragali Radix*. The mechanism may be related to AMPK mediated PGC-1 α /NRF1 pathway, and polysaccharides played a major role.

Key words: *Astragali Radix*; “Shanghuo” response; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; energy metabolism; adenosine monophosphate activated protein kinase pathway

“上火”是中医学的一种俗称，其基本病机为阴阳失调，阳胜则热。中医学认为“上火”是在机体受到“邪气”侵袭后，引起机体出现一系列以“热证”为表现的症状。咽喉肿痛、目赤干涩、牙龈发炎、口腔溃疡、小便短赤、大便秘结等为“上火”的典型症状^[1]。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根，其味甘，性温，归肺、脾经。黄芪作为一

种大宗药材和人们经常以各种方式食用的保健品，具有广泛的应用前景和药理活性^[2-3]，但长期过量食用黄芪产生的不良反应少被讨论。由于黄芪性温热，过量进补黄芪可能会导致“上火”症状，且黄芪常用来构建“上火”或实热动物模型^[4]。由于“上火”缺乏客观量化的诊断指标，因此应用现代技术揭示“上火”的生物学标志及导致“上火”的物质基础具有重要意义^[5]。本研究在中医对“上火”认识的基础上，运用现代生物学技术，开展对过量食用黄芪引发“上火”的机制研究，拟为黄芪保健品的开发提

供参考依据。

中药中化学成分复杂,同类的不同成分之间在体内也可能存在相互转化的现象,因此通过成分“敲除”的方法来进行功效的验证难以达到理想的效果。基于此,本研究以黄芪为例,进行了某个“部位”即某类成分的“扣除”,目的是排除“成分敲除”时结构相近的成分在体内转化造成的影响,通过“部位扣除”并结合单个部位给药进行黄芪温热效应引起“上火”的物质基础验证。黄芪主要含有多糖类、皂苷类、黄酮类等成分^[6]。本研究首先对黄芪水煎液进行了部位分离,运用醇沉法分离多糖。由于黄酮类成分含量相对较低,且黄酮部位和皂苷部位极性非常相近,加大了分离的难度^[7]。本研究根据文献报道的树脂分离技术^[8-9],比较了 2 种方法对黄芪水煎液中黄酮类和皂苷类成分的富集和分离程度,建立了 1 种快速有效的部位分离方法,并且采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)对所分离的 2 个部位中化学成分进行鉴别。最后将分离所得各个部位 ig 给药,从大鼠的一般状态、炎症、甲状腺和肾上腺功能、能量代谢和单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)通路等方面进行指标检测,为揭示黄芪导致“上火”的物质基础和通路机制提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(150±10)g,4 周龄,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物许可证编号 SCXK(京)2019-0010,合格证号 No.110324210103867371。环境温度保持在(23±2)℃,相对湿度保持在 40%~70%。动物实验经山西中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 AWE202103001)。

1.2 药材

黄芪药材(批号 200802)购自山西维康堂中药饮片有限公司,经山西中医药大学中药与食品工程学院山西省现代中药工程实验室张朔生教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。

1.3 药品与试剂

对照品黄芪甲苷(批号 ST00160120,质量分数 98%)、芒柄花苷(批号 ST08800120,质量分数 98%)、芒柄花素(批号 ST00260120,质量分数

98%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 ST08820120,质量分数 98%)均购自上海诗丹德标准服务技术有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 202108)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号 202108)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 202108)、三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3) ELISA 试剂盒(批号 202108)、四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T4) ELISA 试剂盒(批号 202108)、大鼠血清促甲状腺素(thyroid stimulating hormone, TSH) ELISA 试剂盒、大鼠血清促甲状腺激素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, TRH) ELISA 试剂盒(批号 202108)、17-羟皮质类固醇(17-hydroxycorticosteroid, 17-OHCS) ELISA 试剂盒(批号 202108)均购自上海泛柯实业有限公司;超微量 Na⁺, K⁺-三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)酶测试盒(批号 20210830)、超微量 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶测试盒(批号 20210830)、糖原测定试剂盒(批号 20210827)、丙酮酸测试盒(批号 20210826)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)试剂盒(批号 20210830)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(批号 20210827)均购自南京建成生物工程研究所;AMPK 抗体(批号 ab32047)、磷酸化 AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)抗体(批号 ab133448)、过氧化物酶体增殖激活受体辅助活化因子-1 α (peroxisome proliferator-activated-receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)抗体(批号 ab188102)、核呼吸因子 1(nuclear respiratory factor 1, NRF1)抗体(批号 ab175932)、 β -actin 抗体(批号 ab8227)均购自英国 Abcam 公司;线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)抗体(批号 8076)购自美国 CST 公司;HRP 标记的羊抗兔二抗(批号 A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司;乙腈、甲醇均为质谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.4 仪器

UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪和 Q-Exactive 型四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SpectraMax 190 型全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);RIGOL Ultra-3660 型紫外分光光度计(北京普源科技有限公司);ABI-7300 型 qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司);TG-16M 型低温冷冻离心机(上海卢湘仪离

心机仪器有限公司); Mini Protean 3 Cell 电泳仪、TE77XP 型电转仪(美国 Bio-Rad 公司); Tanon 5200 型发光成像系统(上海天能科技有限公司); EX225D 型十万分之一电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司]; HC-2518 型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); XW-80A 型旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); KQ2200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 部位拆分工艺研究

2.1.1 黄芪提取液的制备 称取黄芪药材 50 g, 加 8 倍量水煎煮, 4 层纱布滤过, 滤渣加 6 倍量水煎煮, 合并 2 次滤液。减压浓缩至生药质量浓度为 0.5 g/mL, 用于 2 种方法的分离效果比较。称取一定量黄芪药材, 按照比较所得的最优方法进行提取分离制得各个部位, 用于 *ig* 给药。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量于 10 mL 量瓶中, 加质谱级甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 0.26、0.22、0.23、0.18 mg/mL 的储备液, 将各储备液稀释 100 倍后经 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即得对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈(A)-0.05% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~0.5 min, 5% A; 0.5~1.5 min, 5%~15% A; 1.5~4.5 min, 15%~30% A; 4.5~7.0 min, 30%~60% A; 7.0~11.0 min, 60%~70% A; 11.0~12.0 min, 70%~100% A; 12.0~13.0 min, 100% A; 13.0~13.5 min, 100%~5% A; 13.5~16.0 min, 5% A; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样量为 1 μL; 柱温为 40 °C。

2.1.4 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 正、负离子同时采集。正离子模式下喷雾电压 3.2 kV, 鞘气流速为 40 arb, 辅助气流速为 5 arb, 辅助气加热温度 350 °C; 负离子模式下喷雾电压 2.5 kV, 鞘气流速为 38 arb, 辅助气流速为 10 arb, 辅助气加热温度 300 °C。毛细管温度 320 °C, 高压环形离子导入装置电压(S-Lens RF Level) 为 50。检测模式采用全扫描/数据依赖二级扫描(Full MS/dd-MS²), 扫描范围为 *m/z* 100~1000, 一级质量分辨率为 70 000 FWHM, 二级分辨率 17 500 FWHM, 碰撞能量为 30 eV。

2.1.5 树脂的筛选与部位的拆分 首先通过醇沉得到多糖。将提取液减压浓缩后加入乙醇, 依据参考文献方法^[10-11]及后续分离实验中多糖、黄酮和皂苷的含量比较, 最终调节乙醇体积分数至 70%, 于 4 °C 静置 12 h, 分离上清液备用, 沉淀恒温干燥后待测。比较聚酰胺树脂结合 D101 树脂法(方法 1)和 D101 大孔树脂结合溶剂萃取法(方法 2)对成分富集和分离的效果。

(1) 方法 1: 将上清液采用聚酰胺树脂进行上样, 上样后依次采用 5 倍和 2 倍柱体积的蒸馏水和 5%乙醇进行洗脱, 收集洗脱液备用(用于 D101 树脂上样), 之后采用 5 倍柱体积的 80%乙醇进行洗脱, 收集洗脱液, 浓缩干燥后得粉末, 作为聚酰胺树脂的黄酮富集部位, 即黄酮部位 A。将备用洗脱液浓缩后采用 D101 树脂上样, 上样后先用 4 倍柱体积蒸馏水进行除杂, 继以 80%乙醇进行洗脱, 收集洗脱液, 浓缩干燥后得到皂苷部位 A。

(2) 方法 2: 将上清液经 D101 大孔树脂上样后, 依次用 10 倍柱体积蒸馏水洗脱糖类成分, 再以 5 倍柱体积 0.1% NaOH 洗脱, 继以 5 倍柱体积 20% 乙醇除色素, 最后以 5 倍柱体积 80%乙醇洗脱, 收集洗脱液, 经浓缩干燥后得粉末, 作为大孔树脂的富集部位。精密称定 100 mg 该富集部位的粉末, 蒸馏水溶解, 按照体积比 1:5 分别用醋酸乙酯、正丁醇萃取, 萃取液浓缩蒸干后, 分别得到黄酮部位 B 和皂苷部位 B。

2.2 黄芪各部位纯度的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定干燥至恒定质量的葡萄糖对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用蒸馏水溶解并稀释至刻度, 定容, 得质量浓度为 0.115 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液。

精密称定干燥至恒定质量的黄芪甲苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 定容, 得质量浓度为 0.70 mg/mL 的黄芪甲苷对照品溶液。

精密称定干燥至恒定质量的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 定容, 得质量浓度为 0.14 mg/mL 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液。

2.2.2 标准曲线的制备 精密量取葡萄糖对照品溶液 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于刻度试管中, 每管加入蒸馏水使其体积成为 1 mL, 滴加浓硫酸 5 mL 和 5%苯酚溶液 1 mL, 充分振荡摇匀, 待冷却至室

温后于 490 nm 处测定吸光度 (A), 以对照品质量浓度为横坐标 (X), A 为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。

精密量取黄芪甲苷对照品溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL, 分别置于具塞玻璃试管中, 水浴蒸干溶剂, 加入 0.2 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸溶液, 摇匀, 置 60 °C 水浴加热 20 min, 取出立即至冰水浴中冷却, 加入 5 mL 冰醋酸溶液。以相应试剂空白随行测定, 在 560 nm 处进行测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), A 为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。

精密量取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 以甲醇为空白, 在 260 nm 处进行测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), A 为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。

2.2.3 总多糖、总皂苷和总黄酮的含量测定 称取“2.1.5”项下得到的多糖部位、黄酮部位 A、皂苷部位 A、黄酮部位 B、皂苷部位 B 粉末适量, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度。分别按照“2.2.2”项下的方法, 测定总多糖、总皂苷、总黄酮的质量浓度, 并计算含量。

含量 = 浓度 × 稀释倍数 / 称样量

2.2.4 总黄酮部位和总皂苷部位成分的鉴别 通过 TCMSP 数据库以及 CNKI、PubMed 等网站查询国内外文献, 根据 XCalibur 4.0 软件的精确相对分子质量、保留时间 (t_R)、准分子离子峰及二级碎片离子信息进行鉴定, 实际测得的相对分子质量与理论相对分子质量偏差应小于 5×10^{-6} 。

按照上述最优方法拆分得到的黄酮部位和皂苷部位, 称各部位取粉末适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用质谱级甲醇溶解并定容, 得到质量浓度分别为 2.86、2.31 mg/mL 的总黄酮和总皂苷样品储备液, 将储备液各稀释 100 倍后于 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于进样小瓶中按照“2.1.3”和“2.1.4”项下方法进行测定。

2.3 动物实验

2.3.1 动物分组及给药 大鼠随机分为 8 组, 每组 12 只。分别为对照组、黄芪水煎液全成分组、黄芪多糖组、黄芪皂苷组、黄芪黄酮组、缺多糖组、缺皂苷组和缺黄酮组。各组大鼠自由饮水及进食。黄芪水煎液全成分组按照《中国药典》2020 年版规定的成人日服最高剂量的 4 倍量进行给药 (即生药量为 120 g/70 kg); 黄芪水煎液全成分组按照“2.1.1”项中的方法提取, 减压浓缩至生药质量浓度为 1

g/mL。按照等效剂量系数折算, 给药剂量如下: 黄芪水煎液全成分组为按照黄芪生药量计算得 10.8 g/(kg·d), 黄芪多糖组为按照黄芪多糖获得量和得率计算得 1.08 g/(kg·d), 黄芪皂苷组为按照黄芪总皂苷量获得量和得率计算得 0.11 g/(kg·d), 黄芪黄酮组按照黄芪总黄酮量获得量和得率计算得 0.05 g/(kg·d), 缺多糖组 (黄芪皂苷 + 黄芪黄酮) 给予黄芪黄酮与黄芪皂苷共 0.16 g/(kg·d), 以此类推, 缺皂苷组给予黄芪黄酮与黄芪多糖共 1.13 g/(kg·d), 缺黄酮组给予黄芪皂苷与黄芪多糖共 1.19 g/(kg·d)。各组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组给予等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 30 d。

2.3.2 指标测定 给药期间, 每日观察大鼠精神状态、进食饮水、毛色、大便等一般状态。定时记录大鼠摄食量。给药 1 h 后测定肛温, 记录给药第 14 天与给药第 28 天的肛温情况。给药 1 h 后测定大鼠的唾液量, 将已称定质量的干棉球放入大鼠口腔内计时 3 min 后取出并称定质量, 记录大鼠唾液量情况, 每周测定 1 次, 连续 3 周 (分别于第 14、21、28 天)。末次给药后, 更换垫料并收集粪便, 记录 24 h 各组大鼠的粪便量并测定粪便含水量。给药结束后, 大鼠 ip 2% 戊巴比妥钠 (2 mL/kg) 麻醉后腹主动脉取血, 3000 r/min 离心 10 min 后, 收集上清, 分装后于 -80 °C 冻存。分离肝脏, 分装后于液氮速冻。按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、T3、T4、TSH、TRH 和 17-OHCS 水平。按照试剂盒说明书测定肝组织中 Na⁺、K⁺-ATP 酶、Ca²⁺、Mg²⁺-ATP 酶、SDH、LDH 活性以及糖原、丙酮酸含量。

2.3.3 黄芪各给药组对大鼠肝组织 AMPK、PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM mRNA 表达的影响 提取各组肝组织的总 RNA, 合成 DNA 并进行 qRT-PCR 分析。引物序列: AMPK 上游引物 5'-GTGGCTTATCA-TCTCATCATTG-3', 下游引物 5'-ATTTGGGCTT-AGTTGTGTTG-3', 引物长度 217 bp; PGC-1 α 上游引物 5'-GGGCACATCTGTTCTTCC-3', 下游引物 5'-TCCCGTAGTTCACTGGTC-3', 引物长度 197 bp; NRF1 上游引物 5'-AGACGACGCAAGCATC-AGAGG-3', 下游引物 5'-GCGGCAGCTTCACTGT-TAAGG-3', 引物长度 124 bp; TFAM 上游引物 5'-GGGATTGGGCACAAGAAG-3', 下游引物 5'-GCATTCAGTGGGCAGAAG-3', 引物长度 127 bp; β -actin 上游引物 5'-CGGTCAGGTCATCACTATC-3', 下游引物 5'-CAGGGCAGTAATCTCCTTC-3',

引物长度 229 bp。

2.3.4 黄芪各给药组对大鼠肝组织 AMPK、PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM 蛋白表达的影响 将各组肝组织剪成细小的碎片,按 20 mg 组织加入 150~250 μ L 裂解液提取蛋白,并用 BCA 法进行蛋白浓度测定。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂奶粉,室温封闭 1 h,分别加入 AMPK、PGC-1 α 、NRF1、TFAM 和 β -actin 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,每次 5 min;按照 1:1000 稀释 HRP 标记的羊抗兔二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤后,加入 ECL 发光

液,将其放入成像系统中进行扫描。

2.3.5 数据处理 各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 6 软件对实验数据进行方差分析。

3 结果

3.1 拆分工艺研究

3.1.1 色谱条件 按“2.1.3”及“2.1.4”项下的色谱条件和质谱条件经 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 进行测定,对照品黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的色谱图见图 1, t_R 分别为 8.05、6.68、8.17、5.05 min。

3.1.2 2 种方法的拆分效果比较 精密称取“2.1.5”

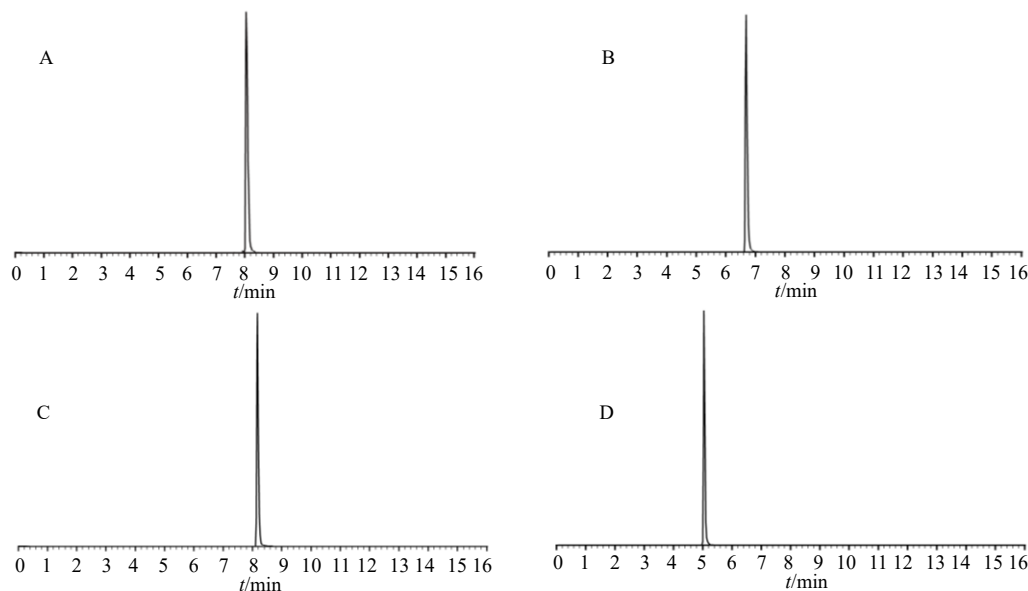


图 1 黄芪甲苷 (A)、芒柄花苷 (B)、芒柄花素 (C) 和毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (D) 的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of astragaloside IV (A), ononin (B), formononetin (C) and calycosin-7-glucoside (D)

项下 2 种方法富集的部位各 3 mg,对黄酮部位 A、B 和皂苷部位 A、B 中主要的黄酮类和皂苷类化合物进行寻找和鉴别,并对峰面积进行比较,对 2 个部位的分离程度进行可视化分析,结果见图 2。结果表明,方法 1 黄酮类成分和皂苷类成分有交叉,皂苷部位 A 未得到有效富集,依旧留在黄酮部位 A,分离效果较差。方法 2 各部位相应成分含量差异较大,黄酮和皂苷分离结果较好。因此后续纯度测定,以及部位成分分析均选择方法 2 所得到的黄酮部位和皂苷部位。

3.1.3 总黄酮部位和总皂苷部位的纯度测定 葡萄糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的标准曲线的见图 3。标准曲线的回归方程、相关系数 (R^2) 分别为 $Y=0.0827X-0.0386$ 、 $R^2=0.9992$, $Y=0.0118X+0.1146$ 、 $R^2=0.9992$, $Y=0.0559X+0.1053$ 、 $R^2=$

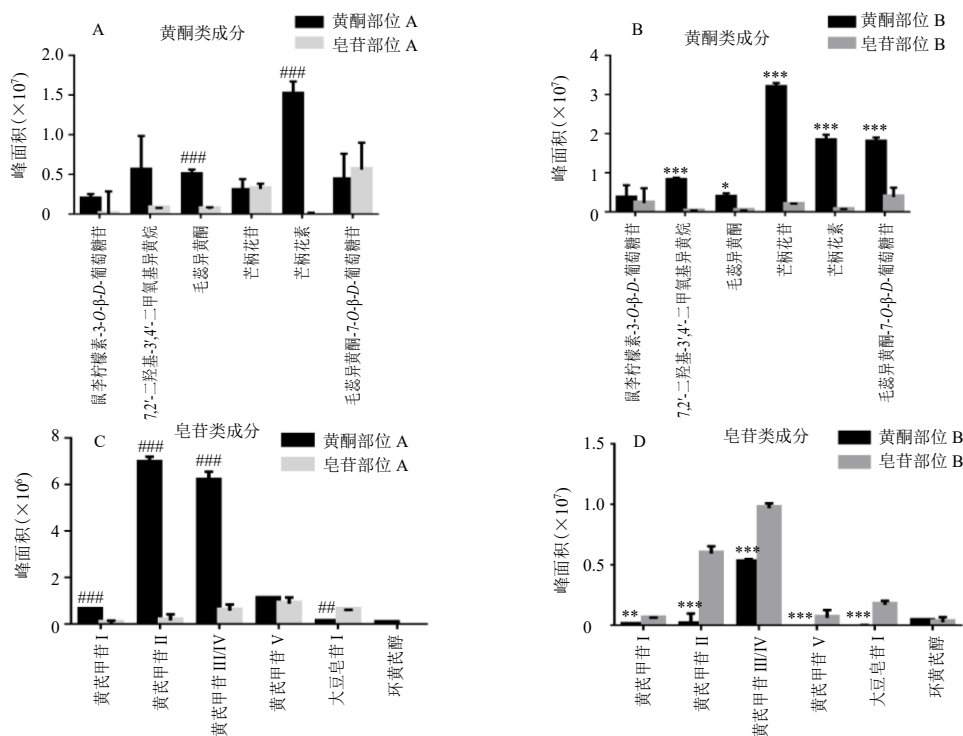
0.9994。

经计算得总多糖质量浓度为 7.3710 μ g/mL,质量分数为 51%;总皂苷质量浓度为 4.0836 μ g/mL,质量分数为 83%;总黄酮质量浓度为 3.9852 μ g/mL,质量分数为 81%。该提取纯化工艺操作简单、易行,大孔树脂具有选择性好、性能稳定、可循环利用的优势,可为黄芪部位的富集纯化提供依据。

3.2 成分鉴别

分离得到的黄酮部位与皂苷部位的总离子流图见图 4。

3.2.1 黄酮类成分鉴别 通过 XCalibur 软件对黄酮部位进行分析鉴别,结果见表 1 (F1~F21)。通过与对照品 t_R 及二级碎片对比,成分 F4~F6 分别被鉴定为芒柄花苷、芒柄花素和毛蕊异黄酮葡萄糖苷。以部分黄酮类化合物为代表说明化合物的裂解规律,



A、C-采用方法 1 获得的黄酮类成分和皂苷类成分比较；B、D-采用方法 2 获得的黄酮类成分和皂苷类成分比较 与皂苷部位 A 比较：### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ ；与皂苷部位 B 比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

A、C-comparison of flavonoids and saponins obtained by method 1；B、D-comparison of flavonoids and saponins obtained by method 2 ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs saponin fraction A；* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs saponin fraction B

图 2 2 种方法分别获得的黄酮部位成分和皂苷部位成分的比较

Fig. 2 Comparison of flavonoid and saponin fractions obtained by two methods

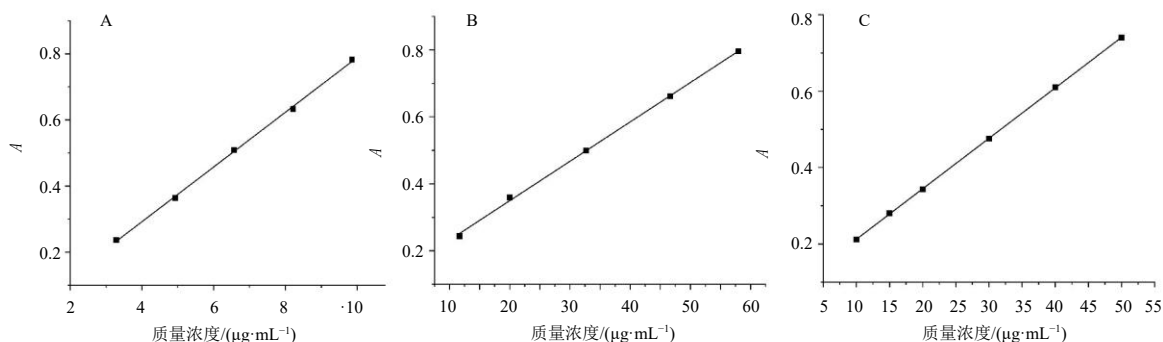


图 3 葡萄糖 (A)、黄芪甲苷(B) 和毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (C) 的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of glucose (A), astragaloside IV (B) and calycosin-7-glucoside (C)

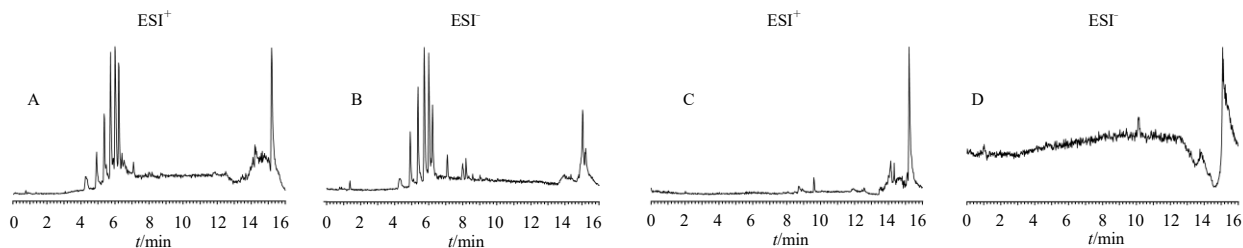


图 4 正、负离子模式下黄酮部位 (A、B) 与皂苷部位 (C、D) 的总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram between flavonoid fraction (A, B) and saponin fraction (C, D) under positive and negative ion modes

表 1 黄芪黄酮和皂苷的 UHPLC-MS/MS 分析结果

Table 1 UHPLC-MS/MS analysis of flavonoids and saponins in *Astragali Radix*

编号	t_R/min	化合物	m/z		误差/($\times 10^{-6}$)	碎片离子 m/z (R.A.%)	分子式	离子模式
			理论值	实际值				
F1	13.81	鼠李柠檬素-3-O- β -D-葡萄糖苷 ^[12]	463.123 5	463.123 1	-0.86	463.123 2, 230.987 1 (12.16), 301.141 3 (100)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+H] ⁺
F2	7.12	7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷 ^[13-15]	303.122 7	303.122 9	0.66	302.690 9, 149.023 5 (4.63), 123.044 3 (100)	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	[M+H] ⁺
F3	5.11	毛蕊异黄酮 ^[13-15]	285.075 8	285.075 9	0.35	253.144 8 (3.33), 269.080 8 (13.89), 285.075 7 (100)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺
F4	6.67	芒柄花苷 ^[13-15]	431.133 7	431.134 0	0.70	431.134 2, 269.080 8 (100)	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺
F5	8.18	芒柄花素 ^[13-15]	269.080 8	269.080 9	0.37	253.144 8 (2.35), 213.014 6 (2.38), 269.080 8 (100)	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺
F6	5.05	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 ^[13-15]	447.128 6	447.129 0	0.89	447.128 8, 270.052 6 (1.41), 285.075 7 (100)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺
F7	7.12	黄芪异黄酮苷 ^[16]	463.161 0	463.161 0	0.00	463.161 0, 286.085 0 (17.26), 301.108 3 (100)	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	[M-H] ⁻
F8	5.88	鼠李柠檬素 ^[17]	301.070 7	301.070 4	-1.00	301.105 7 (5.09), 167.070 5 (100)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺
F9	13.83	afromosin ^[17]	299.091 4	299.091 8	1.34	263.147 8 (17.56), 299.056 0 (100)	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺
F10	7.00	5,7-dimethoxy-4'-hydroxyflavanone ^[17]	299.092 5	299.092 5	0.00	213.962 7 (1.45), 299.056 3 (41.46)	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M-H] ⁻
F11	9.85	槲皮素 ^[16]	303.049 9	303.048 9	-3.30	303.122 7	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺
F12	7.56	黄芩素 ^[16]	269.045 5	269.045 7	0.74	223.069 8 (14.05), 251.191 8 (78.64), 269.080 7 (100)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻
F13	7.12	鹰嘴豆牙素 A ^[17]	283.061 2	283.061 3	0.35	269.041 2 (18.39), 283.061 3 (31.91)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻
F14	7.78	华良姜素 ^[17]	315.086 3	315.085 9	-1.27	315.087 8, 313.238 6 (91.72), 300.107 1 (1000)	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺
F15	11.85	山柰酚 ^[16-17]	331.045 9	331.048 9	9.06	331.048 8, 301.107 1 (100)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+HCOO] ⁻
F16	15.25	山柰酚-3-O-葡萄糖苷 ^[16-17]	449.107 8	449.107 4	-0.89	449.276 0, 287.161 4 (100)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺
F17	0.87	染料木苷 ^[14-16]	433.112 9	433.113 6	1.62	433.122 9, 253.144 7 (8.02), 217.066 3 (100)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺
F18	12.53	异鼠李素 ^[15-17]	317.065 6	317.065 7	0.32	317.065 2, 299.041 3 (0.43)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻
F19	8.98	异甘草素 ^[16]	257.080 8	257.080 9	0.39	257.080 6, 211.154 2 (100)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺
F20	8.52	红车轴草素 ^[16-17]	301.070 7	301.070 2	-1.66	301.070 6, 269.080 6 (2.82)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺
F21	7.32	美迪紫檀素 ^[17]	271.096 5	271.096 8	1.11	271.096 5, 150.885 5 (100)	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M+H] ⁺
S1	9.01	黄芪甲苷 I ^[17]	913.480 2	913.482 4	2.41	807.449 6 (0.93)	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+HCOO] ⁻
S2	8.37	黄芪甲苷 II ^[18]	871.469 7	871.468 6	-1.26	677.499 8 (3.46)	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻
S3	8.04	黄芪甲苷 ^[18-20]	829.459 1	829.460 3	1.45	829.459 8, 699.435 5 (11.70), 782.568 3 (96.22)	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	[M+HCOO] ⁻
S4	7.34	黄芪甲苷 VII ^[18]	991.511 9	991.510 9	-1.01	991.413 2, 945.116 7 (46.78)	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₉	[M+HCOO] ⁻
S5	5.71	大豆皂苷 I ^[19]	987.517 0	987.519 5	2.53	986.507 8, 204.669 7 (20.11)	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	[M+HCOO] ⁻
S6	14.82	环黄芪醇 ^[20]	491.373 1	491.373 1	0.00	491.120 0, 143.103 0 (2.08)	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	[M+H] ⁺

*代表通过对照品鉴定; R.A.%代表离子的相对强度

*stands for identification by reference; R.A.% stands for the relative abundance of ion

黄酮类化合物是常见的发生 Retro-Diels-Alder (RDA 裂解) 的一类化合物。芒柄花苷的二级碎片检测到有主要碎片离子峰 m/z 269、253。根据裂解规律能够推测出, 芒柄花苷失去 1 分子葡萄糖 (m/z 162) 形成了芒柄花素 (m/z 269), 苷元通过脱羟基产生了 m/z 253 的碎片离子^[14]。成分 F6 的二级碎片离子 m/z 270、253 比母离子少 15 和 32, 推测是由母离子失去 1 个 CH₃ 和 CH₃OH 形成。

3.2.2 皂苷类成分鉴别 通过 XCalibur 软件对皂苷部位进行分析鉴别, 结果见表 1 (S1~S6)。通过与对照品 t_R 及二级碎片比较, 成分 S3 被鉴定为黄芪甲苷。根据文献报道^[17-20], S1~S6 分别被鉴定为黄芪甲苷 I、黄芪甲苷 II、黄芪甲苷、黄芪甲苷 VII、大豆皂苷 I 和环黄芪醇。

3.3 黄芪各给药组对大鼠一般状态的影响

3.3.1 对大鼠体质量的影响

如表 2 所示, 在给药过程中, 各组大鼠体质量均逐渐升高, 而与对照组相比, 各组大鼠体质量无显著性差异。说明各给药组对大鼠体质量的增长影响较小。

3.3.2 对大鼠肛温的影响 如表 3 所示, 与对照组相比, 给药第 14、28 天各给药组大鼠肛温均有所升高, 其中全成分组大鼠肛温升高有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 可以体现黄芪的温热效应, 全成分组温热效应最强。分别“扣除”各个部位后, 只有缺多糖组在第 14 天肛温升高有显著差异 ($P < 0.05$), 而这种显著性在第 28 天测定时又消失, 其余均无显著性差异, 说明对于体温的升高, 不是某个部位的单独作用, 而是黄芪 3 个部位以及其余成分的综合作用, 符合中医理论的整体观念。

给药第 14 天, 与对照组相比, 缺皂苷组与缺黄酮组大鼠唾液量显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 给药第 21 天, 与对照组相比, 全成分组、缺多糖组与缺

表 2 黄芪及各组分对大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 2 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on body weight in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g				
		第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照	—	151.58 ± 3.90	227.67 ± 12.41	271.58 ± 15.03	319.42 ± 25.63	339.25 ± 34.56
全成分	10.80	153.08 ± 5.32	219.56 ± 12.97	266.73 ± 22.70	305.75 ± 27.75	332.13 ± 28.47
多糖	1.08	146.58 ± 5.62	218.43 ± 14.52	272.20 ± 16.99	313.27 ± 30.25	343.00 ± 36.40
皂苷	0.11	150.71 ± 7.48	226.86 ± 14.19	276.18 ± 18.81	317.50 ± 23.12	352.38 ± 27.12
黄酮	0.05	148.42 ± 4.96	229.49 ± 8.53	281.13 ± 8.82	330.50 ± 16.87	356.42 ± 17.67
缺多糖	0.16	150.67 ± 6.91	227.16 ± 13.64	282.50 ± 27.84	320.08 ± 31.76	352.00 ± 33.78
缺皂苷	1.13	149.25 ± 6.69	222.85 ± 15.04	274.00 ± 19.46	322.08 ± 25.20	342.92 ± 29.04
缺黄酮	1.19	148.00 ± 7.66	224.54 ± 12.07	269.92 ± 19.65	306.42 ± 20.14	333.33 ± 24.17

表 3 黄芪及各组分对大鼠肛温和唾液量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 3 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on rectal temperature and saliva volume in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肛温/℃		唾液量/mg		
		第 14 天	第 28 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照	—	37.49 ± 0.52	36.93 ± 0.45	7.39 ± 5.02	10.27 ± 3.38	14.42 ± 6.48
全成分	10.80	37.88 ± 0.21*	37.39 ± 0.33**	7.72 ± 6.61	4.25 ± 2.51***	10.28 ± 7.13
多糖	1.08	37.83 ± 0.42	37.24 ± 0.50	7.41 ± 3.51	20.34 ± 20.53	3.18 ± 2.05***
皂苷	0.11	37.72 ± 0.34	37.07 ± 0.40	6.87 ± 5.67	8.41 ± 6.37	5.05 ± 3.84***
黄酮	0.05	37.79 ± 0.33	36.97 ± 0.44	7.36 ± 5.18	15.93 ± 6.47*	14.08 ± 7.78
缺多糖	0.16	37.95 ± 0.45*	37.21 ± 0.32	8.03 ± 8.46	3.35 ± 3.38***	11.95 ± 4.54
缺皂苷	1.13	37.81 ± 0.41	37.23 ± 0.25	22.22 ± 7.26***	15.13 ± 4.99*	12.94 ± 3.38
缺黄酮	1.19	37.79 ± 0.19	37.17 ± 0.24	44.88 ± 40.27**	4.47 ± 3.43***	4.41 ± 2.83***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下表同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below table

黄酮大鼠唾液量显著降低 ($P < 0.001$), 黄酮组与缺皂苷组大鼠唾液量显著升高 ($P < 0.05$)。给药第 28 天, 与对照组相比, 多糖组、皂苷组与缺黄酮组大鼠唾液量显著降低 ($P < 0.001$)。全成分组在第 21、28 天唾液量均减少, 可能为“上火”症状的体现。多糖组、皂苷组在第 28 天唾液量显著降低, 而缺多糖组、缺皂苷组唾液量并没有降低, 黄酮组唾液量没有显著降低, 而缺黄酮组即多糖和皂苷配伍组唾液量显著降低, 说明长时间大剂量服用黄芪导致唾液量减少的“上火”症状来源于黄芪组分中的多糖部位和皂苷部位。

3.3.3 对大鼠摄食量、粪便量及粪便含水量的影响 如表 4 所示, 给药第 14 天, 与对照组相比, 多糖组大鼠摄食量显著减少 ($P < 0.05$), 黄酮组大鼠摄食量显著升高 ($P < 0.001$); 给药第 21 天, 与对照组相比, 缺皂苷组和缺黄酮组大鼠摄食量显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 给药第 28 天, 与对照组相比, 缺黄酮组大鼠摄食量显著减少 ($P < 0.001$)。

与对照组相比, 除全成分组大鼠粪便量有所减少外, 其余组别大鼠粪便量均升高, 其中黄酮组具有统计学意义 ($P < 0.01$)。对于粪便含水量而言,

与对照组相比, 全成分组与多糖组大鼠粪便含水量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 缺皂苷组大鼠粪便含水量显著升高 ($P < 0.001$)。

联合摄食量和粪便量可知, 黄酮组粪便量显著增加的原因可能为摄食量的增加, 而全成分组以及多糖组粪便含水量显著降低则可能为“上火”症状的体现。结合全成分组、多糖组以及缺多糖组的粪便含水量, 说明对于粪便量干燥的“上火症状”可能主要源于多糖类组分。

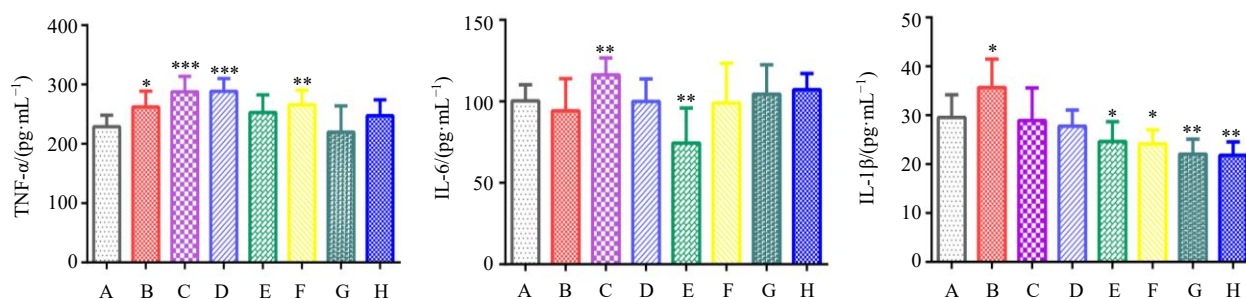
3.4 黄芪各给药组对大鼠血清炎症因子的影响

如图 5 所示, 与对照组相比, 全成分组、多糖组、皂苷组大鼠血清中 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), 缺皂苷组大鼠血清中 TNF- α 水平没有升高, 而缺多糖组依然显著性升高 ($P < 0.01$), 说明黄芪全成分升高 TNF- α 的作用可能来自于皂苷部位、多糖部位, 且皂苷部位的影响可能较大。此外, 与对照组相比, 全成分组血清中 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$), 多糖组 IL-6 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。表明过量食用黄芪时, 其多糖和皂苷可能通过升高促炎因子水平诱发炎症反应, 导致“上火”症状。

表 4 黄芪及各组分对大鼠摄食量、粪便量及粪便含水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on food intake, fecal output and feces moisture in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	摄食量/g			24 h 粪便量/g	粪便含水量/g
		第 14 天	第 21 天	第 28 天		
对照	—	130.73 ± 2.60	117.85 ± 0.75	127.17 ± 3.06	6.53 ± 1.48	2.85 ± 1.18
全成分	10.80	128.48 ± 3.75	108.29 ± 33.13	119.25 ± 13.32	6.28 ± 1.41	1.03 ± 1.43**
多糖	1.08	118.33 ± 20.03*	127.17 ± 30.41	124.85 ± 30.20	7.28 ± 2.62	0.92 ± 2.67*
皂苷	0.11	134.20 ± 8.06	127.55 ± 26.80	127.12 ± 2.00	7.22 ± 2.40	3.62 ± 1.01
黄酮	0.05	138.33 ± 3.11***	120.08 ± 11.86	131.92 ± 8.60	7.90 ± 0.28**	3.45 ± 2.44
缺多糖	0.16	132.23 ± 3.10	113.28 ± 7.51	126.42 ± 11.43	7.18 ± 8.63	3.59 ± 3.12
缺皂苷	1.13	131.83 ± 0.82	99.42 ± 17.44**	127.67 ± 9.19	8.73 ± 6.15	4.91 ± 1.32***
缺黄酮	1.19	128.82 ± 1.49	101.22 ± 4.71***	115.46 ± 3.41***	6.68 ± 3.18	1.99 ± 3.47



A-对照组 B-全成分组 C-多糖组 D-皂苷组 E-黄酮组 F-缺多糖组 G-缺皂苷组 H-缺黄酮组 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同

A-control group B-full component group C-polysaccharide group D-saponin group E-flavonoid group F-polysaccharide deficiency group G-saponin deficiency group H-flavonoid deficiency group * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures

图 5 黄芪及各组分对大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.5 黄芪各给药组对大鼠血清甲状腺功能的影响

如图 6 所示,与对照组相比,多糖组、皂苷组和黄酮组大鼠血清中 T3 水平显著降低 ($P < 0.05$),缺黄酮组大鼠 T4 水平显著升高 ($P < 0.05$),各组大鼠 TRH 水平无显著差异,黄酮组大鼠 TSH 水平显著降低 ($P < 0.05$)。说明黄芪的温热效应可能不是通过促进甲状腺功能产生。

3.6 黄芪各给药组对大鼠肾上腺功能的影响

如图 7 所示,与对照组相比,全成分组、多糖组、皂苷组、缺多糖组和缺黄酮组大鼠血清中 17-

OHCS 水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$),而黄酮组没有升高,说明黄芪温热效应可能还来自于多糖、皂苷部位对肾上腺功能的促进。

3.7 黄芪各给药组对大鼠能量代谢的影响

如图 8 所示,与对照组相比,全成分组、多糖组、皂苷组、缺皂苷组、缺黄酮组大鼠肝组织中 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力都有升高的趋势,其中全成分组和缺黄酮组有显著性差异 ($P < 0.05$)。与对照组相比,全成分组、缺皂苷组、缺黄酮组 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活力都有升高的趋势,其中全成分组和缺皂苷组

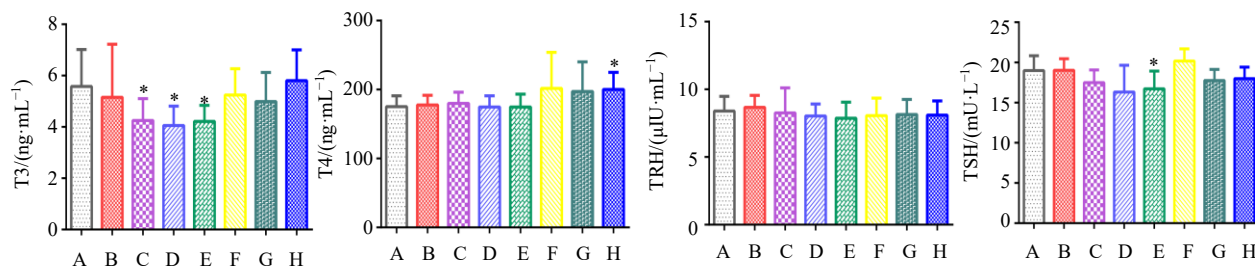


图 6 黄芪及各组分对大鼠血清中 T3、T4、TRH 和 TSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on levels of T3, T4, TRH and TSH in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

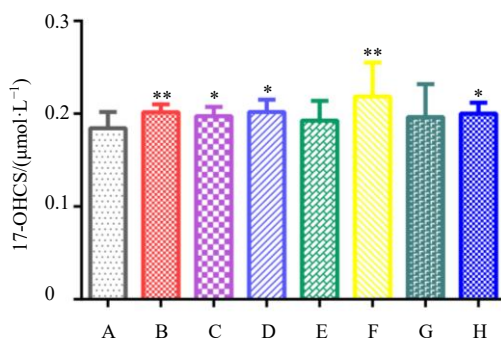


图 7 黄芪及各组对大鼠血清中 17-OHCS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on 17-OHCS level in serum of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

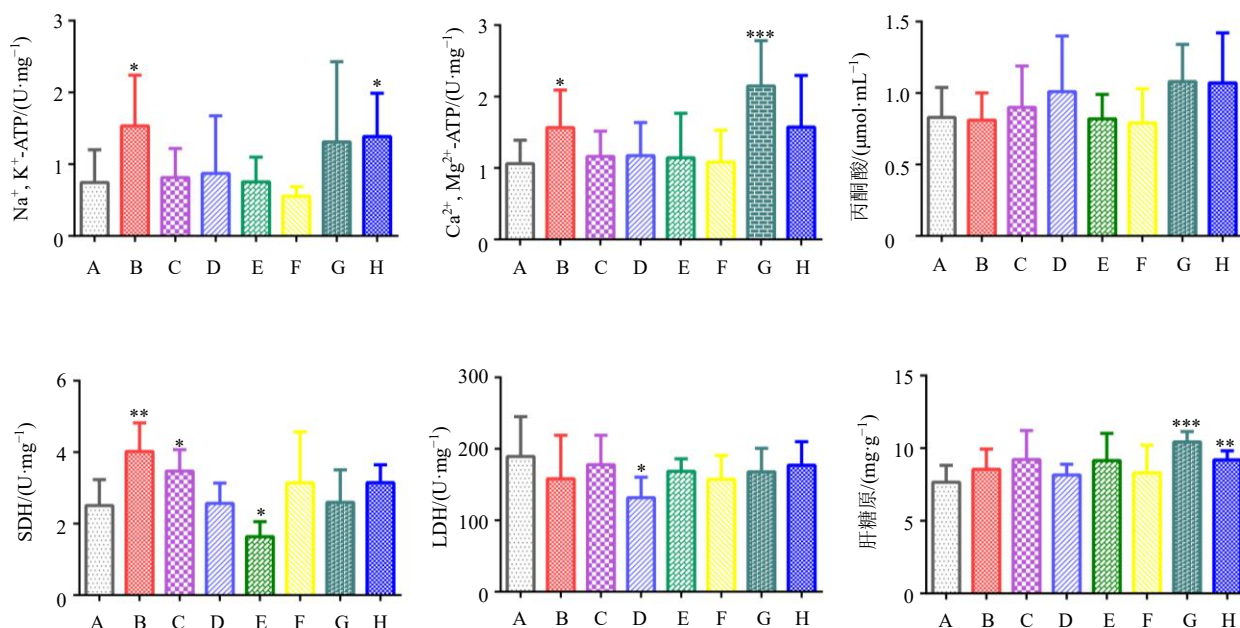


图 8 黄芪各给药组对大鼠肝组织中 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活力、丙酮酸含量、SDH 活力、LDH 活力和肝糖原含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 8 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on Na^+ , K^+ -ATPase activity, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity, content of pyruvate, SDH activity, LDH activity and content of glycogen in liver of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

加。与对照组相比,皂苷组肝组织 LDH 活力显著降低 ($P < 0.05$),其余各组无显著性差异,说明皂苷组可以降低机体无氧代谢的水平。与对照组相比,全成分组、多糖组、黄酮组、缺皂苷组以及缺黄酮组肝糖原含量都有上升的趋势,其中缺皂苷组与缺黄酮组有显著差异 ($P < 0.01, 0.001$),说明含有多糖的配伍组会增加机体的储能。

3.8 黄芪各给药组对 AMPK 介导的 PGC-1 α /NRF1 通路的影响

如图 9 所示,与对照组相比,全成分组、多糖

有显著性差异 ($P < 0.05, 0.001$)。 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活力增加,耗能和产热增加,说明全成分组可以增加机体产热,而多糖与黄酮或皂苷部位配伍之后对产热影响较大。

丙酮酸可氧化脱羧生成乙酰辅酶 A,然后进入三羧酸循环,最终完全被氧化成 CO_2 、 H_2O 和大量的 ATP。与对照组相比,多糖组、皂苷组以及缺皂苷组、缺黄酮组丙酮酸含量有增加的趋势,但无显著性差异。与对照组相比,全成分组、多糖组、缺多糖组和缺黄酮组 SDH 活力有所升高,其中全成分组和多糖组有显著差异 ($P < 0.05, 0.01$),而黄酮组 SDH 活力显著降低 ($P < 0.05$)。说明全成分组、多糖组可促进三羧酸循环加速,促进 ATP 的生成增

组均可上调大鼠肝组织 AMPK mRNA 表达水平,其中全成分组有显著性差异 ($P < 0.05$);全成分组、多糖组均可显著性增加 PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM mRNA 表达水平 ($P < 0.05, 0.01$);此外,缺多糖组可显著上调 NRF1 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$),缺皂苷组和缺黄酮组可显著上调 TFAM mRNA 表达水平 ($P < 0.01, 0.001$)。

如图 10 所示,与对照组相比,各组均可显著上调 p-AMPK、PGC-1 α 和 TFAM 蛋白表达水平 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),各组均上调 NRF1 蛋白表达水

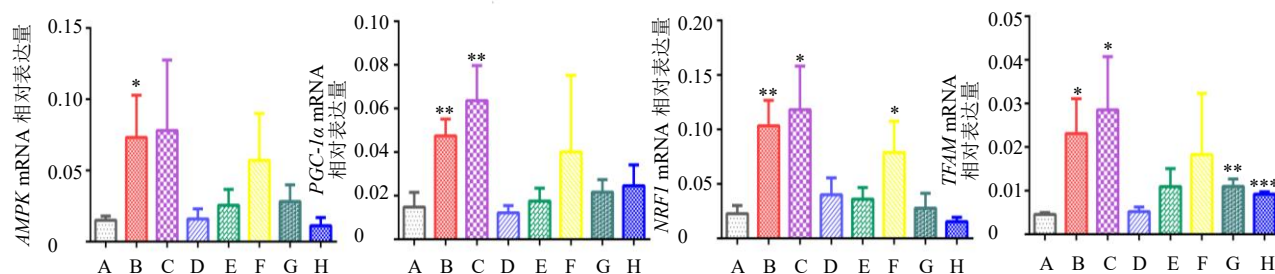


图 9 黄芪及各组分对大鼠肝组织 *AMPK*、*PGC-1α*、*NRF1* 和 *TFAM* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on *AMPK*, *PGC-1α*, *NRF1* and *TFAM* mRNA expressions in liver of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

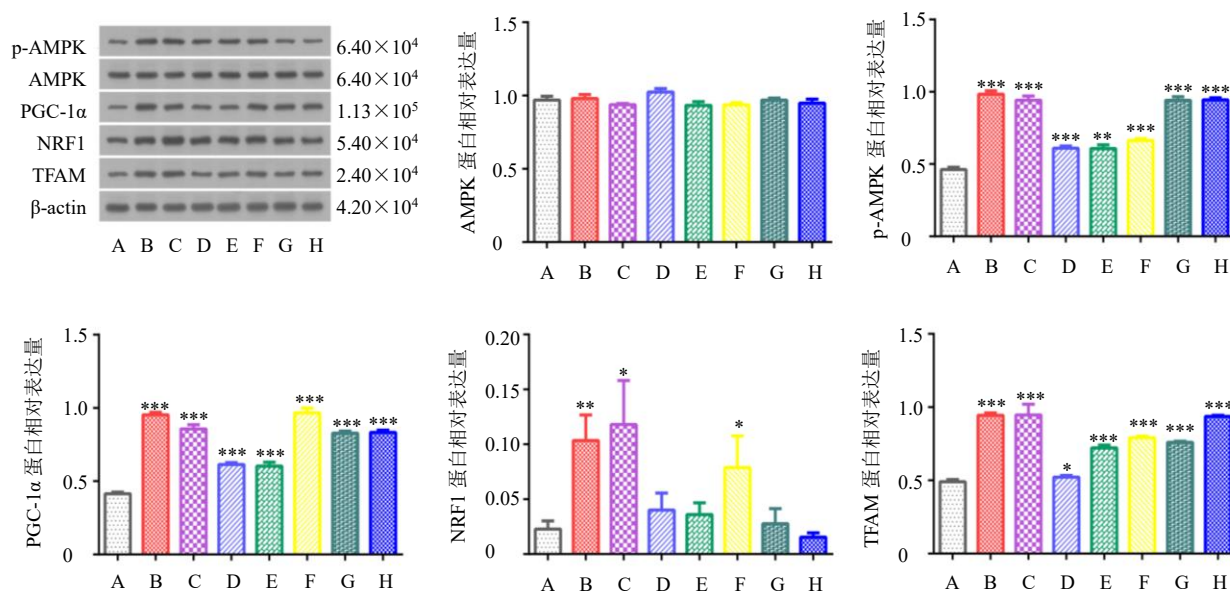


图 10 黄芪及各组分对大鼠肝组织 *AMPK*、*PGC-1α*、*NRF1* 和 *TFAM* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of *Astragali Radix* and its fractions on *AMPK*, *PGC-1α*, *NRF1* and *TFAM* protein expressions in liver of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

平, 其中全成分组、多糖组和缺多糖组有显著性差异 ($P < 0.05, 0.01$)。因此, 黄芪全成分组可以促进 *AMPK* 功能活化, 并作用于下游 *PGC-1α*、*NRF1* 等因子, 从图中可以看出多糖部位对 *AMPK*、*PGC-1α*、*NRF1* 和 *TFAM* 的 mRNA 表达水平影响较大, 同时对 p-*AMPK*、*PGC-1α*、*NRF1* 和 *TFAM* 的蛋白表达水平的影响也较大。

4 讨论

4.1 有效部位拆分工艺

在黄芪的部位拆分工艺研究中, 考察了 AB-8 树脂、D101 树脂、聚酰胺树脂、溶剂萃取法的分离效果, 结果表明成分交叉且得到的部位纯度不高。本研究中方法 A、B 的相关参数包括上样量、是否加碱洗脱、乙醇浓度、洗脱体积、洗脱体积流量等洗

脱条件在预实验阶段均进行了考察和优化, 最终确定以 D101 树脂结合溶剂萃取法效果较好, 0.5 g/mL 生药量上样, 0.1% NaOH、20% 乙醇除杂, 80% 乙醇收集富集部位效果最佳。此方法, 简便、易行、环保, 可为黄芪部位的分离提供参考依据。在测定总黄酮的纯度时, 由于黄芪中大多黄酮为异黄酮, 不具有亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色条件, 故没有采用经典的以芦丁为对照品溶液的硝酸铝比色法。

4.2 黄芪温热效应引起“上火”的物质基础及机制分析

《黄帝内经》有载: “气有余便是火”, 而黄芪作为“补气圣药”, 长期过量食用可能引发“上火”反应。体温升高、大便干燥为“上火”的症候。对大鼠的肛温研究结果表明, 黄芪全成分组最为显著,

是黄芪温热药性的体现,而体温升高可能是多方面综合作用的体现,如对肾上腺功能的作用,对炎症因子的作用,对能量代谢的作用等,因此虽然各个部位对各个指标的作用有差异,但最终体温的升高来源于几个部位的综合作用,而非单个部位的作用,因此全成分组体温升高最为显著。结合第 28 天,从各个部位对体温升高的贡献来看,多糖部位贡献最大。全成分组、多糖组粪便含水量降低显著,体现出大便干燥的症状,而缺多糖组粪便含水量有所升高,因此多糖部位对粪便干燥的“上火”症状影响较大,结合缺皂苷组粪便含水量显著增高,而缺黄酮组粪便含水量降低,表明皂苷对粪便干燥的“上火”症状也有一定的贡献。《尚书》有言:“火曰炎上”,“上火”常出现的症状集中在头面部,如口舌生疮、嗓子干痛、流鼻血等,因此对大鼠的唾液量进行研究,研究结果表明,全成分组、皂苷组、多糖组或含有多糖与皂苷的配伍组大鼠唾液量显著降低,因此多糖部位和皂苷部位对唾液量减少的影响较大,其中多糖部位的影响大于皂苷部位。

Huang 等^[21]认为过量食用龙眼导致的“上火”与炎症相关,因此本研究对炎症因子进行了测定。从实验结果可知,黄芪多糖可显著上调 TNF- α 与 IL-6 水平,黄芪皂苷可显著上调 TNF- α 水平,黄酮组的 IL-6 和 IL-1 β 水平显著降低。由此推测,长期超剂量服用黄芪引发的“上火”可能是由黄芪多糖部位或皂苷部位导致。黄酮部位则体现一定的抗炎活性,也有研究表明黄酮类成分可以通过下调 IL-6、IL-1 β 的水平来改善炎症反应^[22-23]。说明黄芪的“上火”反应是各部位成分综合的效应,因此在机体本身有一定“阴虚阳亢”症状时,“上火”反应会更加明显。

研究表明,患有“热证”大鼠能量代谢紊乱,尤其是与甲状腺功能和钠泵的活性变化相关^[24],因此对甲状腺功能进行了测定。在对大鼠甲状腺功能的研究中发现,除缺黄酮组的 T4 含量有一定的升高外,其余组别均无显著性升高,这说明黄芪导致“上火”可能不通过甲状腺功能轴实现调节。而相关研究^[25-26]认为“上火”与交感肾上腺系统相关,17-OHCS 可以反映交感神经-肾上腺系统功能,肾上腺功能的亢进与其分泌呈正相关,因此本研究对血清中的 17-OHCS 进行了测定,结果表明,与对照组相比,全成分组、多糖组、皂苷组等 17-OHCS 含量显著增加,表明以上部位对肾上腺功能有一定的促进

作用。能量代谢包括能量的产生与消耗,在这个过程中 ATP 能直接反映生物体能量代谢水平的高低,是能量的“通用货币”,ATP 酶主要存在于细胞膜与细胞器膜上,其功能是将 ATP 水解并释放出能量,因此对 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶的活力进行了测定。在黄芪及各组分对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力的影响中发现全成分组、缺黄酮组增强显著,全成分组、缺皂苷组 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活力增强显著,可以推测全成分组与含有多糖的配伍组可以促进大鼠 ATP 的分解和产热。SDH 是反映线粒体功能的标志酶,其活性的上调代表三羧酸循环的加速与 ATP 的增加^[27],LDH 广泛分布在组织中,其活力代表了肝脏的厌氧代谢水平,全成分组、多糖组对 SDH 具有促进作用,皂苷组对 LDH 有抑制作用,且多糖部位对于黄芪促进 ATP 增加作用的贡献最大。肝糖原是由大量葡萄糖分子聚合而成的多糖,以糖原的形式储存在肝脏中,它可以在需要的时候分解成葡萄糖,同时产生能量,多糖组、缺皂苷组和缺黄酮组的肝糖原含量较高,推测因有多糖的存在导致糖原储存较多。

有专家认为,“上火”表现出的皮肤黏膜的红肿热痛、溃疡等症状,与能量代谢密切相关^[28-29]。AMPK 能够灵敏地感应细胞内二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)/ATP 和单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)/ATP 的比值变化,被视为“能量传感器”和“能量代谢的总开关”。PGC-1 α 主要存在于含有线粒体的组织中,它可以在 AMPK 的调节下辅助激活 NFR1 与 TFAM,促进线粒体的合成^[30]。赵婷等^[31]通过建立实热“上火”动物模型对 AMPK 能量代谢方面进行研究,表明红参引发的“上火”与 AMPK 等上调相关。张喜召等^[4]通过建立“上火”模型研究表明对“上火”动物模型中 AMPK-PGC-1 α 信号通路受到抑制。本研究结果表明,黄芪及各部位对 AMPK 介导的通路中的关键蛋白 AMPK、PGC-1 α 、NFR1、TFAM 有上调作用,各组分均可促进能量代谢,增强能量储备(图 11)。因此黄芪引发的“上火”反应机制可能与 AMPK 介导 AMPK-PGC-1 α 通路相关。比较各组的作用大小发现,多糖组作用较强,与全成分组相当或者高于全成分组。

综上所述,通过“部位扣除”结合单个部位给药,对黄芪引起的“上火”反应从炎症反应、肾上腺功能、ATP 酶活力、SDH 活力以及 AMPK 介导

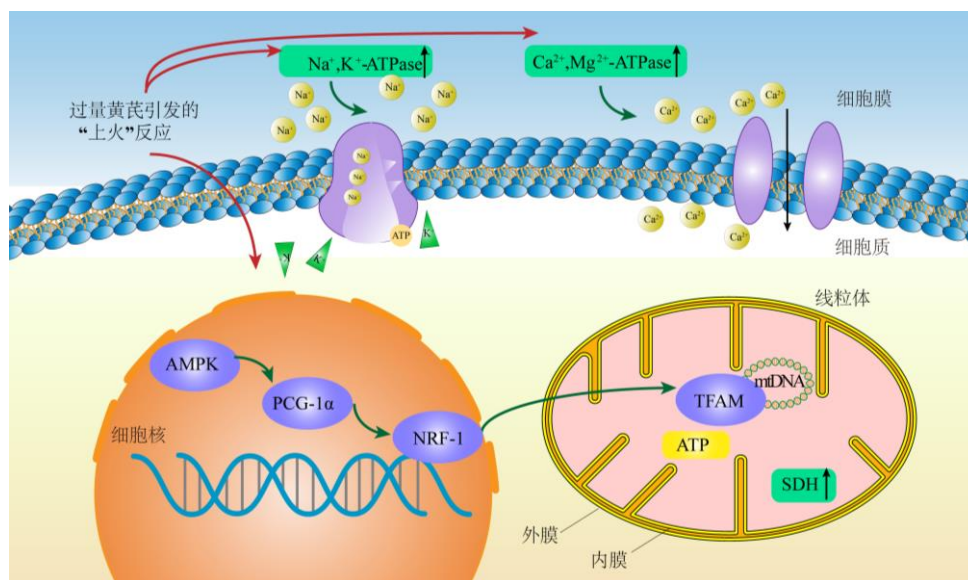


图 11 基于能量代谢及 AMPK 通路作用示意图

Fig. 11 Schematic diagram based on energy metabolism and AMPK pathway

的 AMPK-PGC-1 α 通路等方面进行探讨,发现黄芪的 3 类成分中多糖类成分可能对“上火”的影响较大,在黄芪相关保健品开发时,可以采用一定的方法控制黄芪多糖的含量,以达到减少“上火”反应的目的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴德鸿,刘佳佳,谢冠群,等. “实火”与“虚火”牙龈炎患者的血浆代谢特征研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(8): 3842-3845.
- [2] 朱燕丽,李池川,陈洁,等. 基于网络药理学探究黄芪辅助治疗肺结核的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(1): 42-49.
- [3] 赵鑫,吕文良,刘爽,等. 基于网络药理学探讨黄芪治疗代谢相关脂肪性肝病作用机制 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(1): 89-97.
- [4] 张喜召,包洁,窦晓兵,等. 基于 AMPK-PGC-1 α 信号通路探讨“上火”动物模型的发病机制 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 2002-2006.
- [5] 甘霖. 阴虚“上火”的生物组学分析及“上火”的中药干预研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [6] 谢静,龚易昕悦,丁立生,等. 黄芪及其活性成分对脓毒症临床和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2502-2510.
- [7] 谭雪霞,朱宏明,唐铖,等. HPLC-MS 鉴定黄芪水煎液中黄酮类成分 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(2): 231-235.
- [8] 杨敏,张天锡,史磊,等. 大孔吸附树脂分离纯化中药成分影响因素探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4050-

4058.

- [9] 贾刚. 黄芪有效组分的提取分离及结构鉴定 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2008.
- [10] 马秀,刘少静,张婉莹,等. 黄芪多糖的分离纯化及药理作用研究进展 [J]. 化学工程师, 2019, 33(8): 50-53.
- [11] 王瑞海,叶迎,许京,等. 甘肃红芪和黄芪总多糖含量测定对比 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 77-83.
- [12] Zhang J, Xu X J, Xu W, et al. Rapid characterization and identification of flavonoids in *Radix Astragali* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(6): 945-952.
- [13] Huang X, Liu Y, Song F R, et al. Studies on principal components and antioxidant activity of different *Radix Astragali* samples using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2009, 78(3): 1090-1101.
- [14] 张蔚,江曙,钱大玮,等. 芒柄花苷与人体肠道细菌的相互作用研究 [J]. 药学学报, 2014, 49(8): 1162-1168.
- [15] 施怀生,毕小凤,史宪海. UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用分析黄芪根及其茎叶中黄酮和皂苷类成分 [J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(3): 357-361.
- [16] 许如玲,范君婷,董惠敏,等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的上PLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5614-5630.
- [17] Duan Y, Pei K, Cai H, et al. Bioactivity evaluation-based ultra high-performance liquid chromatography coupled

- with electrospray ionization tandem quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and novel distinction of multi-subchemome compatibility recognition strategy with *Astragali Radix-Fructus Corni* herb-pair as a case study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 129: 514-534.
- [18] 吴红根, 钟淑梅, 彭璐, 等. HPLC-ESI-MS/MS 分析黄芪蜜炙前后活性成分差异 [J]. 质谱学报, 2020, 41(6): 637-647.
- [19] Li Y, Guo S, Zhu Y, *et al.* Comparative analysis of twenty-five compounds in different parts of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Astragalus membranaceus* by UPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Anal*, 2019, 9(6): 392-399.
- [20] Liu Y, Liu J, Wu K X, *et al.* A rapid method for sensitive profiling of bioactive triterpene and flavonoid from *Astragalus mongholicus* and *Astragalus membranaceus* by ultra-pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1085: 110-118.
- [21] Huang H M, Li M X, Wang Y, *et al.* Excessive intake of longan arillus alters gut homeostasis and aggravates colitis in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 640417.
- [22] Cheng S C, Huang W C, Pang J H S, *et al.* Quercetin inhibits the production of IL-1 β -induced inflammatory cytokines and chemokines in ARPE-19 cells via the MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2957.
- [23] 张娟, 毛文静, 白庆云. 槲皮素及其衍生物防治肝损伤作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7348-7357.
- [24] Luo K K, Zhao H Y, Bian B L, *et al.* Huanglian Jiedu Decoction in the treatment of the traditional Chinese medicine syndrome “Shanghuo”—an intervention study [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 616318.
- [25] Zhao T, Yang Z, Mei X X, *et al.* Metabolic disturbance in Korean red ginseng-induced “Shanghuo” (excessive heat) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253: 112604.
- [26] 苏鑫, 孙大中. “上火”与应激反应相关性探析 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 32-34.
- [27] Xu X, Dou D Q. The ginseng’s fireness is associated with the lowering activity of liver Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 190: 241-250.
- [28] 谢冠群, 钱俊华, 范永升. 上火的由来、定义及其研究思路 [J]. 世界中医药, 2017, 12(12): 2869-2871.
- [29] Pan M H, Zhu S R, Duan W J, *et al.* “Shanghuo” increases disease susceptibility: Modern significance of an old TCM theory [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112491.
- [30] 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.
- [31] 赵婷, 谢冠群, 徐莉, 等. 从 AMPK 能量调节功能探讨红参上火机制 [J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(10): 797-803.

[责任编辑 李亚楠]