

基于网络药理学和 16S rDNA 测序的当归六黄汤合煎与单煎治疗阴虚甲亢作用的差异研究

寇柏鑫, 于 前, 闫 妍, 邱 野, 翁丽丽*, 肖春萍*

长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

摘要: **目的** 探讨当归六黄汤的抗阴虚甲亢作用, 阐释传统汤剂合煎和单煎的差异。 **方法** 运用网络药理学方法, 筛选当归六黄汤的主要活性成分和治疗阴虚甲亢疾病的相关靶点, 并对交集靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析、基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 构建药材-成分-靶点-通路网络; 进一步进行实验验证, 构建阴虚甲亢大鼠模型, 评价当归六黄汤合煎和单煎对阴虚甲亢大鼠体质量、粪便含水率及相关血清学指标的影响; 利用 16S rDNA 测序技术, 揭示合煎和单煎对大鼠肠道微生物群落多样性的影响。 **结果** 筛选获得当归六黄汤方中 102 个活性成分, 检索出与阴虚甲亢有关靶点 116 个。富集分析获得 871 条 GO 条目和 158 条 KEGG 相关条目 ($P < 0.05$), 其中生物过程 (biological process, BP) 675 条、细胞组分 (cellular component, CC) 77 条、分子功能 (molecular function, MF) 119 条, 与当归六黄汤相关度较高的通路主要包括炎症、感染、肠病、癌症等通路。抗阴虚甲亢药效作用结果表明, 与模型组比较, 合煎高剂量组大鼠的体质量净增值和粪便含水率均显著增加 ($P < 0.01$), 三碘甲状腺原氨酸 (three iodine thyroid, T3)、甲状腺素 (tetraiodothyronine, T4) 等激素水平显著降低 ($P < 0.01$), 且作用接近阳性药甲巯咪唑组。大鼠肠道菌群多样性结果显示, 合煎高剂量组大鼠肠道微生物的丰富度和多样性接近对照组, Lachnospiraceae_NK4A136_group 在模型组大鼠肠道显著富集, 合煎给药后阿克曼氏菌属 *Akkermansia* 相对丰度明显增加, 而单煎给药后普雷沃氏菌属 *Prevotella* 相对丰度明显增加。 **结论** 当归六黄汤合煎抗阴虚甲亢药效作用更好; 阴虚甲亢等内分泌紊乱性疾病极有可能致肠道微生物群紊乱, 当归六黄汤合煎可能通过调节肠道微生物群的方式治疗阴虚甲亢。

关键词: 当归六黄汤; 合煎; 单煎; 阴虚甲亢; 肠道微生物群; 16S rDNA; 黄芩苷; 表小檗碱; 黄连碱; 巴马汀; 盐酸小檗碱
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2023)08 - 2488 - 14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.016

Difference between all-herb decoction and single-herb decoction of Danggui Liuhuang Decoction in treating *yin*-deficiency-hyperthyroidism based on network pharmacology and 16S rDNA sequencing

KOU Bai-xin, YU Qian, YAN Yan, QIU Ye, WENG Li-li, XIAO Chun-ping

School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To investigate the anti-*yin*-deficiency-hyperthyroidism effect of Danggui Liuhuang Decoction (当归六黄汤), and explain the difference between all-herb decoction and single-herb decoction. **Methods** The network pharmacology method was used to screen the main active components of Danggui Liuhuang Decoction and related targets for the treatment of *yin*-deficiency-hyperthyroidism. The protein-protein interaction (PPI) network analysis, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed on the intersection targets to construct the herb-component-target-pathway network. Further experimental verification was performed, *yin*-deficiency-hyperthyroidism rat model was constructed, effect of all-herb decoction and single-herb decoction of Danggui Liuhuang Decoction on body weight, fecal water content and related serological indicators of *yin*-deficiency-hyperthyroidism rats were evaluated. The effects of all-herb decoction and single-herb

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20210204032YY)

作者简介: 寇柏鑫 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药品质鉴定、质量标准以及开发利用。E-mail: 1208722987@qq.com

*通信作者: 翁丽丽, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药品质评价与资源开发。E-mail: 735110462@qq.com

肖春萍, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药资源、栽培理论和技术。E-mail: btxnw@163.com

decoction on the diversity of intestinal microbial community in rats were revealed by 16S rDNA sequencing. **Results** A total of 94 active components in Danggui Liuhuang Decoction were screened and 116 targets related to *yin*-deficiency-hyperthyroidism were found. Enrichment analysis obtained 871 GO items and 158 KEGG related items ($P < 0.05$), including 675 biological processes (BP), 77 cellular components (CC), and 119 molecular functions (MF). The pathways with high correlation with Danggui Liuhuang Decoction mainly included inflammation, infection, intestinal disease, cancer and other pathways. The results of anti-*yin*-deficiency-hyperthyroidism efficacy showed that compared with model group, the net weight gain and fecal moisture content of rats in all-herb decoction high-dose group were significantly increased ($P < 0.01$), levels of triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) were significantly decreased ($P < 0.01$), and the effect was close to the positive drug methimazole group. The results of intestinal flora diversity in rats showed that the richness and diversity of intestinal microorganisms in all-herb decoction high-dose group were close to those in control group. Lachnospiraceae_NK4A136_group was significantly enriched in the intestinal tract of model rats. *Akkermansia* was significantly increased after administration of all-herb decoction, while *Prevotella* was significantly increased after administration of single-herb decoction. **Conclusion** The effect of Danggui Liuhuang Decoction for anti-*yin*-deficiency-hyperthyroidism is better. Endocrine disorders such as *yin*-deficiency-hyperthyroidism is likely to cause intestinal microflora disorders, Danggui Liuhuang Decoction may be through the regulation of intestinal microflora in the treatment of *yin*-deficiency-hyperthyroidism.

Key words: Danggui Liuhuang Decoction; all-herb decoction; single-herb decoction; *yin*-deficiency-hyperthyroidism; intestinal microbiota; 16S rDNA; baicalin; epiberberine; coptisine; palmatine; berberine hydrochloride

当归六黄汤是临床常用的滋阴降火方剂，最早记载于金代《兰室秘藏》^[1]。本方能够滋阴泻火，固表止汗，治疗阴虚火旺引起的盗汗，临床上常用于甲状腺功能亢进（甲亢）、围绝经期综合征等病症，是《古代经典名方目录（第一批）》之一^[2-4]。经典名方是历经千年仍然传承至今的精品制剂，现代研究不但要遵循其古代煎煮工艺，更要保证其质量、疗效的均一稳定^[5]。与传统汤剂（合煎）相比，单煎是由单味中药饮片经过提取、分离、浓缩、干燥等生产工艺，加工成一种规格一致、剂量一致、质量标准统一的新型用药配方^[6-7]。现阶段，从化学成分、药理作用及临床药效上考察传统汤剂单煎与合煎差异的研究不胜枚举^[8-14]。

近年来，随着生物信息学发展和多学科交叉态势，网络药理学、16S rDNA 测序技术和代谢组学等手段广泛应用于单味中药和中药复方研究中。网络药理学为中药治疗疾病提供基本方向和大致思路，进一步利用 16S rDNA 测序探究肠道微生物多样性更是诠释中药作用机制和保障中药材质量的有效方法之一。肠道微生物群是宿主肠道微生态的重要组成部分，其结构组成、能量代谢等均可影响多种代谢性疾病的发生与发展^[15]。鉴于此，提出一种基于网络药理学预测和验证及肠道微生态联合分析的方式，综合评价传统方剂合煎和单煎的潜在药效作用势在必行。

本课题组前期通过对当归六黄汤进行本草沿革调研、煎煮工艺考察和物质基准的制备，建立当归六黄汤 HPLC 指纹图谱评价模式^[16-17]，并测定了盐

酸小檗碱、黄芩苷等指标成分的含量，为当归六黄汤基准样品的质量控制奠定理论基础。在当归六黄汤煎煮过程中发现，合煎汤剂常出现絮状沉淀，而单煎后混合则不会出现这一现象，故推测合煎和单煎后因药效物质差异可能出现不同的药效。研究显示，黄芩苷和盐酸小檗碱共煎会形成疏水络合物，形成沉淀聚集于汤底^[18]。此外，黄连解毒汤、三黄泻心汤、葛根芩连汤中的黄芩-黄连药对在复方合煎的过程中也会产生大量絮状物沉淀^[19]。研究表明，中药复方合煎产生的沉淀具有减毒作用^[20-21]。综上，本研究构建当归六黄汤-甲亢-靶点网络，分析其主要靶点与药效成分关系；建立阴虚甲亢大鼠模型，对比当归六黄汤合煎与单煎的药效差异；利用 16S rDNA 测序技术和微生物多样性分析平台，比较合煎和单煎 *ig* 大鼠肠道菌群多样性差异，为阐明当归六黄汤单味药配方颗粒替代传统汤剂的可行性和合理性提供参考，也为揭示经典名方复方制剂和配方颗粒的差异性提供理论基础，为通过改善肠道微生物群调节甲亢等代谢紊乱疾病提供新思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 42 只，体质量 180~200 g，6~8 周龄，购自辽宁长生生物技术有限公司，许可证号 SCXK（辽）2020-0001，质量合格证号 210726210100208713。动物实验经长春中医药大学动物伦理委员会批准（批准号 2021358），符合《涉及人的生物医学研究国际伦理准则》和《赫尔辛基宣言》要求。

1.2 药材

3批当归六黄汤饮片均由吉林国安药业股份有限公司提供,中药饮片的详细信息见表1。经长春中医药大学翁丽丽教授鉴定,当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels.的干燥根、地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的干燥块根、黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、黄连为毛茛科植物黄

连 *Coptis chinensis* Franch.的干燥根茎、黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid.的干燥树皮、黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。熟地黄为生地黄的炮制加工品,符合《中国药典》2020年版相关规定。凭证样品存放于长春中医药大学中药鉴定学实验室。合煎和单煎样品均由本实验室自制。

表1 3批当归六黄汤组方药材信息

Table 1 Information of three batches of Danggui Liu Huang Decoction

药材	批号		
	S1	S2	S3
当归	GLC20180729-06	GLC20180729-05	GMM20181005-07
地黄	HWW20180824-05	HWX20180824-04	HMN20180824-07
熟地黄	HMN20180824-01	HMN20180824-06	HWX20180824-08
黄芩	SWX20180725-02	SJQ20180725-01	SWY20180725-05
黄连	SPT20181018-06	SAC20181018-03	SAC20181018-02
黄柏	SJZ20180710-05	SSH20180710-06	CLB20180712-04
黄芪	SXT-HQ-06	SXT-HQ-02	SXT-HQ-11

1.3 药品与试剂

环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、三碘甲状腺原氨酸 (three iodine thyroid, T3)、甲状腺素 (tetraiodothyronine, T4)、促肾上腺皮质激素 (corticotrophin, ACTH)、皮质醇 (cortisol, Cor)、促甲状腺激素 (thyroid-stimulating hormone, TSH) 检测试剂盒 (批号均为 202110) 购自江苏酶免实业有限公司; 左甲状腺素钠片 (50 μg/片, 国药准字 H20041605, 批号 210102) 购自扬子江药业集团四川海蓉药业有限公司; 利血平片 (0.25 mg/片, 国药准字 H11021315, 批号 1911091) 购自北京万辉双鹤药业有限责任公司; 甲巯咪唑片 (5 mg/片, 国药准字 H37020105, 批号 20190314) 购自德州德药制药有限公司; 乌来糖 (批号 BSF210509) 购自合肥巴斯夫生物科技有限公司。

1.4 仪器

AUW120D 型 1/10 万电子天平 (岛津制造所); ME104E 型 1/万电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); HC3012 型电子秤 (上海花潮实业有限公司); FST-III-20S 型普力菲尔超纯水机 (上海富诗特仪器设备有限公司); DHG-9070 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); ULTS1490 型 -80 °C 冰箱 (赛默飞世尔仪器有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 当归六黄汤的活性成分及作用靶点筛选 通

过中药系统药理学 (TCMSP, <https://old.tcmspe.com/tcmsp.php>)、ETCM (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php>) 及 TCMIP (<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/Login/login.html>) 数据库检索当归六黄汤组方中 7 味药的活性成分。其中, TCMSP 数据库采用口服生物利用度 (oral bioavailability, OB)、类药性 (drug-likeness, DL) 2 项指标评价当归六黄汤活性成分的成药性。设置 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 筛选活性成分, 并获取活性成分对应蛋白靶点。将蛋白靶点数据输入 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>), 选择物种为人, 进行统一名称和写法, 剔除无对应基因名称的蛋白。而 ETCM 及 TCMIP 数据库中以定量评估类药性 (quantitative estimate of drug-likeness, QED) 为评价方中成分的指标, 以 $QED > 0.67$ 为筛选条件, 获得活性成分对应的靶点基因。将上述数据库所得结果合并, 即为当归六黄汤活性成分相关靶点。

2.1.2 阴虚甲亢潜在靶点的获取 在 OMIM (<https://omim.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、Drugbank (<https://www.drugbank.com/>) 等数据库以 “hyperthyroidism” 为关键词检索, 将得到的基因进行整合。参照《中药新药临床研究指导原则 (试行)》^[22] 制定的阴虚型甲亢证标准: (1) 甲亢; (2) 腰膝酸软、头晕耳鸣; (3) 烦躁易怒、五心烦热、潮热盗

汗; (4) 舌红、少苔、脉弦细数。上述标准存在 (1) 和另外 2 个即可辨证。在 OMIM、GeneCards、TTD、DisGeNET、Drugbank 等数据库依次查找“soreness and weakness of waist and knees (腰膝酸软)”“dizziness and tinnitus (头晕耳鸣)”“anxiety and irritability (烦躁易怒)”“palms and soles (五心烦热)”“tidal fever and night sweating (潮热盗汗)”“red tongue (舌红)”“the tongue coating less (苔少)”“pulse string thin (脉弦细)”“rapid pulse (脉数)”各个症状对应的基因, 分别按照上述标准进行分组、去重、合并, 最后与在上述数据库中获得的甲亢基因取交集, 即为阴虚甲亢的疾病基因。

2.1.3 筛选共同靶点 将药物与疾病获得的相关靶点输入 Venny 2.0.1 (<https://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 平台, 绘制 Venn 图, 获得共同靶点。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将共同靶点数据上传至 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 物种选择设置为“Homo sapiens”, 将获得数据导入 Cytoscape 3.9.1, 获得 PPI 网络图。

2.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 通过 DAVID 数据库对靶点进行 GO 富集和 KEGG 通路分析, 依托于生物信息学云平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制气泡图。

2.2 当归六黄汤合煎和单煎样品的制备

2.2.1 当归六黄汤合煎样品的制备 按 10 倍处方量分别称取当归、地黄、熟地黄、黄芩、黄连、黄柏各 25.8 g, 黄芪 51.6 g。上述饮片首次加入 8 倍量的水, 煎煮 1 h, 用 100 目纱布滤过, 滤渣加入 6 倍量的水, 煎煮 1 h。将滤液合并, 冷却, 得到 3 批次合煎水煎样品, 减压浓缩, 冷冻干燥, 得当归六黄汤合煎冻干粉。3 批次合煎水煎样品含黄芩苷 (25.2 ± 1.8) mg/g、表小檗碱 (2.2 ± 0.4) mg/g、黄连碱 (3.1 ± 0.6) mg/g、巴马汀 (3.0 ± 0.2) mg/g、盐酸小檗碱 (14.6 ± 1.3) mg/g。

2.2.2 当归六黄汤单煎样品的制备 按 10 倍处方量称取上述饮片。每味饮片首次加入 8 倍量的水, 煎煮 1 h, 用 100 目纱布滤过, 滤渣加入 6 倍量的水煎煮 1 h。合并滤液并冷却, 将 7 味药材的煎液合并, 得到 3 批次单煎水煎样品, 减压浓缩, 冷冻干燥, 得当归六黄汤单煎冻干粉。3 批次单煎水煎样

品含黄芩苷 (46.7 ± 4.9) mg/g、表小檗碱 (1.6 ± 0.3) mg/g、黄连碱 (5.9 ± 0.7) mg/g、巴马汀 (3.7 ± 0.1) mg/g、盐酸小檗碱 (16.3 ± 3.6) mg/g。

2.3 当归六黄汤合煎与单煎对阴虚甲亢大鼠的药效作用比较

2.3.1 当归六黄汤合煎和单煎药液的制备 根据当归六黄汤处方量及前期考证结果 (一服 5 钱, 即 20.65 g, 食前服, 每日 2 服, 即 41.3 g) [16], 取“2.2”项下未冻干的合煎和单煎样品, 制备成质量浓度分别为 372、1488 mg/mL 的药液 (以生药量计, 1 g 上述样品分别相当于“2.2”项下合煎或单煎样品的 0.018、0.072 g) [23], 置于 4 °C 冰箱保存。

2.3.2 阳性对照药液的制备 甲巯咪唑片用纯净水制备成质量浓度为 2.1 μg/mL 的药液 [24], 置 4 °C 冰箱保存备用。

2.3.3 分组、造模与给药 大鼠适应性喂养 5 d 后, 随机分为对照组、模型组、甲巯咪唑 (10.5 μg/kg) 组及合煎低、高剂量 (1860、7440 mg/kg) 组和单煎低、高剂量 (1860、7440 mg/kg) 组, 每组 6 只。第 1~10 天, 模型组和各给药组大鼠每天 ig 1 次左甲状腺素钠片 (75 mg/kg) 和利血平片 (0.5 mg/kg) 的混悬液 [25-26]。第 10~20 天, 各给药组每天 8:00 时 ig 相应药液 (10 mL/kg), 模型组和对照组 ig 等体积生理盐水。此外, 造模成功与否标准参考文献所述并做出改动 [27], 观察指标为 (1) 大鼠一般状态: 造模阶段, 大鼠出现打斗、躁动不安及粪便干结等现象; (2) 体质量: 在每天上午供给食物前测量并记录, 造模一段时间后, 体质量增长速率明显高于未造模大鼠; (3) 激素水平: 预实验结束后, 对比造模与未造模大鼠激素水平, 相关激素指标相比于对照组明显异常。上述条件均符合则说明造模成功。

2.3.4 样品采集和预处理 第 1、10、20 天测定大鼠粪便含水率, 分别于上述节点收集大鼠排出的第一颗粪便, 称定质量并计算粪便含水率。

粪便含水率 = (粪便湿质量 - 粪便干质量) / 粪便湿质量

于处死前 1 h 取血清, 放入冻存管中, -80 °C 保存。第 20 天给药结束后, 采用无菌管收集对照组、模型组、合煎高剂量组和单煎高剂量组大鼠新鲜粪便, -80 °C 冻存, 用于后续肠道微生物群分析。

2.3.5 血清指标的检测 按照试剂盒说明书检测血清中 cAMP、T3、T4、ACTH、Cor、TSH 水平。

2.4 肠道微生物多样性研究

取 500 mg 的新鲜粪便样品至 20 mL 离心管中,

加入 500 μL 缓冲液 SA、100 mL 缓冲液 SC 和 0.25 g 研磨珠提取总 DNA，使用上游引物 5'-AGRGTGTTGATYNTGGCTCAG-3'、下游引物 5'-TASGGHTACCTTGTTASGACTT-3' 合成带有条形码的特异引物，进行细菌 16S rDNA 全长聚合酶链式反应 (polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增基因片段。对 PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其基因组 DNA 纯度后，用磁珠回收，根据电泳结果用 Image J 软件定量后，均一化形成测序文库，建好的文库先进行文库质检纯化后，依托北京百迈客生物科技有限公司使用 PacBio Sequel 测序平台，用单分子实时测序的方法进行高通量测序。

2.5 统计学分析

对体内药效学研究数据采用 IBM SPSS21.0 软件进行统计分析，数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间数据采用单因素方差分析。利用百迈客云 (<http://www.biocloud.net/>) 及生物信息学软件分析肠道微生物群数据。数据图利用 GraphPad Prism 8 软件绘制。

3 结果

3.1 当归六黄汤活性成分、靶点及阴虚甲亢靶点的筛选

通过 TCMSP、ETCM、TCMSP 等数据库共获

得 102 个当归六黄汤活性成分，分别筛选出 128、251、251 个当归六黄汤靶点，去重后共得到 336 个候选靶点。在 OMIM、GeneCards、TTD、DisGeNET、Drugbank 等数据库中去重后共获得 1117 个阴虚甲亢相关靶点，将当归六黄汤与阴虚甲亢共同靶点绘制 Venn 图 (图 1)，共获得 116 个交集靶点。《神农本草经疏》记载：“黄芩为苦寒清肃之药，功在除热邪，而非补益之品，当与黄连并列”^[28]，而黄柏虽苦寒，但有泻火补益之功，非阴中之火不可。黄芩、黄连、黄柏等苦味药和降清泻，专治阴虚生内热诸证^[29]。因此研究阴虚甲亢相关活性成分时，与上述 3 味药关系密切，其对应的活性成分信息见表 2。

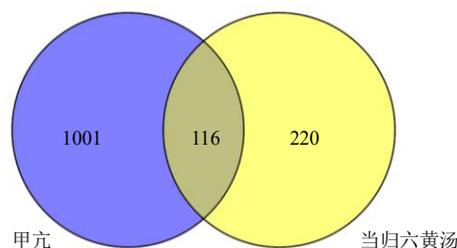


图 1 当归六黄汤-甲亢靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of targets shared by Danggui Liuhuang Decoction and hyperthyroidism

表 2 部分活性成分信息

Table 2 Part of active ingredient information

编号	化合物	中药	来源数据库	编号	化合物	中药	来源数据库
1	小檗碱	黄连、黄柏	TCMSP	22	二氢黄芩苷 qt	黄芩	TCMSP
2	奥巴吡酮	黄柏、黄连	TCMSP	23	二氢木蝴蝶素	黄芩	TCMSP
3	小檗红碱	黄柏、黄连	TCMSP	24	奥罗莫甲素	黄芩	TCMSP
4	表小檗碱	黄连、黄芩	TCMSP	25	汉黄芩素	黄芩	TCMSP
5	四氢黄连素	黄连	TCMSP	26	二氢木蝴蝶素 A	黄芩	TCMSP
6	小檗浸碱	黄连	TCMSP	27	韧黄芩素	黄芩	TCMSP
7	球茎苷 A qt	黄连	TCMSP	28	salvigenin	黄芩	TCMSP
8	广玉兰内酯	黄连、黄柏	TCMSP	29	金合欢素	黄芩	TCMSP
9	帕尔米丁 A	黄连、黄柏	TCMSP	30	黄芩素	黄芩	TCMSP
10	巴马汀	黄连、黄柏	TCMSP	31	5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavone	黄芩	TCMSP
11	槲皮素	黄连、黄柏、黄芪	TCMSP	32	黄芩黄酮 II	黄芩	TCMSP
12	黄连碱	黄连、黄柏、黄芪	TCMSP	33	5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	黄芩	TCMSP
13	甲基黄连碱	黄柏、黄连	TCMSP	34	半枝莲种素	黄芩	TCMSP
14	N-反式阿魏酰酰胺	黄连	TCMSP	35	去甲汉黄芩素	黄芩	TCMSP
15	超烯	黄芩	TCMSP	36	黄芩新素	黄芩	TCMSP
16	11,13-二十碳二烯酸甲酯	黄芩	TCMSP	37	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	黄芩	TCMSP
17	酞酸双(2-乙基己基)酯	黄芩	TCMSP	38	2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychalcone	黄芩	TCMSP
18	莫索黄酮	黄芩	TCMSP	39	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮	黄芩	TCMSP
19	圆锥花序素	黄芩	TCMSP	40	红花素	黄芩	TCMSP
20	(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	黄芩	TCMSP	41	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	黄芩	TCMSP
21	二异辛酯	黄芩	TCMSP	42	5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone	黄芩	TCMSP
				43	5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	黄芩	TCMSP

续表 2

编号	化合物	中药	来源数据库	编号	化合物	中药	来源数据库
44	(+)-表儿茶素	黄芩	TCMSP	58	坎得毒素 A	黄柏	TCMSP
45	黄烷酮	黄芩	TCMSP	59	猴头菌酮 H	黄柏	TCMSP
46	kihadalactone A	黄柏	TCMSP	60	鬃毛酮	黄柏	TCMSP
47	异黄柏苷	黄柏	TCMSP	61	蓝堇碱	黄柏	TCMSP
48	δ7-豆甾醇	黄柏	TCMSP	62	异紫堇碱	黄柏	TCMSP
49	珊瑚菜素	黄柏	TCMSP	63	黄柏苷 qt	黄柏	TCMSP
50	去氢丹参酮 II _A	黄柏	TCMSP	64	(S)-canadine	黄柏	TCMSP
51	δ7-脱氢槐胺	黄柏	TCMSP	65	poriferast-5-en-3β-ol	黄柏	TCMSP
52	kihadanin A	黄柏	TCMSP	66	菜油甾醇	黄柏	TCMSP
53	尼罗霉素	黄柏	TCMSP	67	二氢尼洛替星	黄柏	TCMSP
54	吴茱萸次碱	黄柏	TCMSP	68	苦楝子萜酮	黄柏	TCMSP
55	茵芋碱	黄柏	TCMSP	69	黄柏呈	黄柏	TCMSP
56	白屈菜赤碱	黄柏	TCMSP	70	唐松草酚定	黄柏	TCMSP
57	卡文定碱	黄柏	TCMSP	71	松柏苷	黄柏	TCMSP

3.2 当归六黄汤治疗甲亢潜在靶点的 PPI 网络

将所获得的 116 个靶点通过 STRING 数据库进行 PPI 网络分析，设置物种为“Homo sapiens”，选取置信度>0.9 的数据，构建当归六黄汤成分-阴虚甲亢靶点 PPI 网络，结果见图 2。以“度值>中位数(80)”筛选出核心靶点 30 个(表 3)，度值排名前 5 位分别是白蛋白(albumin, ALB)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine-threonine kinase 1, AKT1)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肌动蛋白(β-actin)及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)，推测以上靶点可能是治疗甲亢的重要靶点。

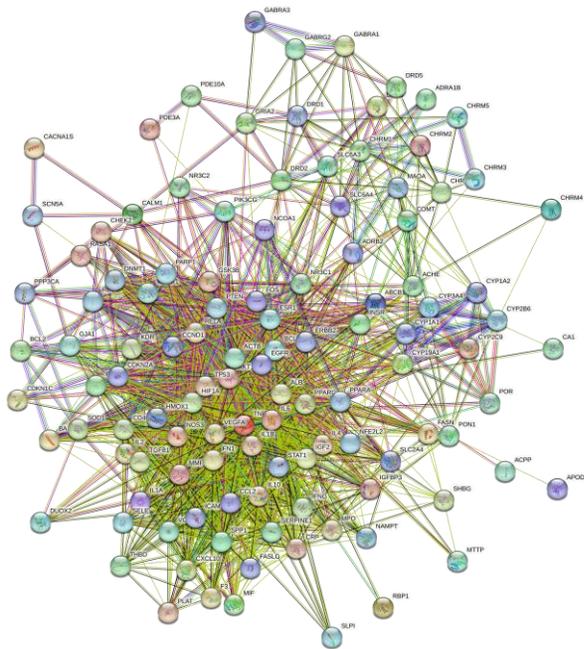


图 2 当归六黄汤治疗甲亢靶点的 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of targets of Danggui Liuhuang Decoction in treatment of hyperthyroidism

表 3 核心靶点和度值信息

Table 3 Core target and related information of degree value

序号	度值	靶点	序号	度值	靶点
1	162	ALB	16	108	FN1
2	156	AKT1	17	106	IL10
3	148	IL6	18	106	FOS
4	142	ACTB	19	104	CCND1
5	140	TNF	20	98	ERBB2
6	134	TP53	21	94	NOS3
7	132	VEGFA	22	94	IL4
8	130	IL1B	23	92	PPARA
9	122	EGFR	24	92	SERPINE1
10	118	PPARG	25	88	ICAM1
11	118	HIF1A	26	88	NR3C1
12	118	ESR1	27	86	CRP
13	110	MMP9	28	86	IFNG
14	110	CCL2	29	84	TGFB1
15	110	PTEN	30	84	HMOX1

3.3 当归六黄汤干预甲亢的 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 数据库对当归六黄汤治疗甲亢的 116 个靶点蛋白进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。以 P 值小于 0.05 为筛选条件，共得到 871 条 GO 条目和 158 条 KEGG 相关条目。GO 功能共富集生物过程 (biological process, BP) 675 条、细胞组分 (cellular component, CC) 77 条、分子功能 (molecular function, MF) 119 条，前 10 名条目见图 3。KEGG 通路富集分析共获得 158 条有显著意义的通路，与当归六黄汤相关度较高的前 20 条通路见图 4，主要包括炎症、感染、癌症等相关通路。

3.4 当归六黄汤合煎与单煎对阴虚甲亢大鼠的药效作用差异比较

3.4.1 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠一般

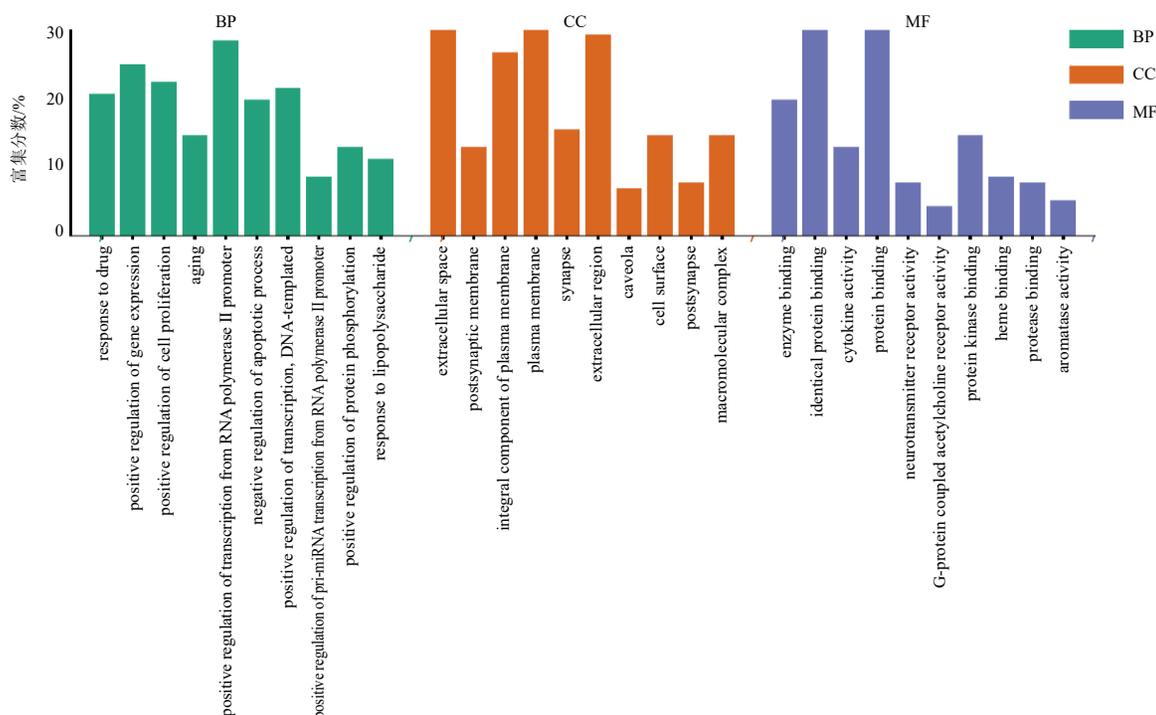


图 3 当归六黄汤治疗甲亢潜在作用靶点的 GO 功能富集分析 (前 10)

Fig. 3 GO function enrichment analysis of potential targets of Danggui Liuhuang Decoction in treatment of hyperthyroidism (top 10)

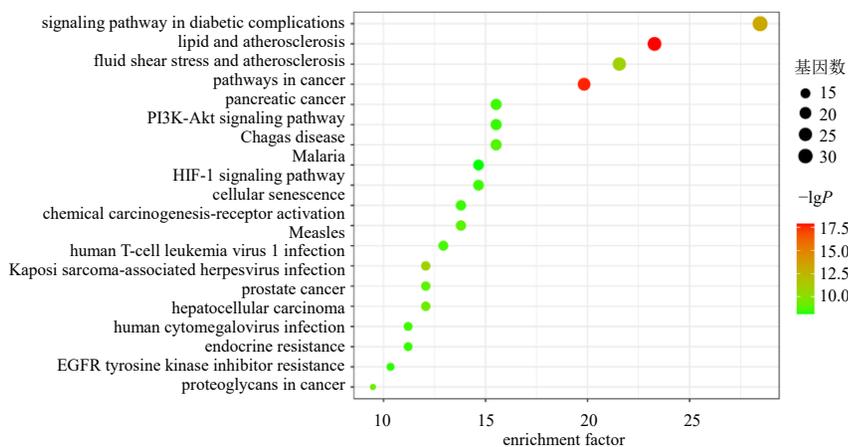


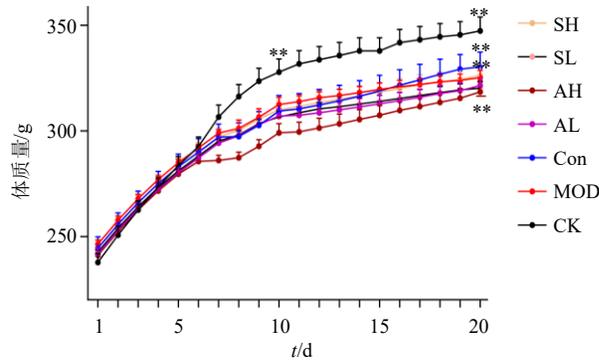
图 4 当归六黄汤治疗甲亢潜在作用靶点的 KEGG 通路富集分析 (前 20)

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of Danggui Liuhuang Decoction in treatment of hyperthyroidism (top 20)

情况的影响 与对照组比较,造模组大鼠陆续出现体型消瘦、躁动不安及粪便干结等甲亢阴虚症状,表明造模成功。与模型组比较,各给药组大鼠甲亢阴虚症状均有所改善,具体表现为打斗次数减少、粪便形状趋于正常。

3.4.2 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠体质量的影响 如图 5 所示,各组大鼠的体质量随饲养时间的延长而逐渐增加。第 1~10 天(造模阶段),与对照组比较,模型组体质量净增值显著减小 ($P <$

0.01),说明造模后大鼠体质量下降明显,这与甲亢日渐消瘦的症状相一致。第 10~20 天(给药阶段),与模型组比较,甲巯咪唑组体质量净增值显著增加 ($P < 0.01$),说明甲巯咪唑片对甲亢体型消瘦有显著改善作用;当归六黄汤合煎高剂量组和单煎高剂量体质量净增值分别显著增加了 53.75%和 28.81% ($P < 0.01$),且当归六黄汤合煎低剂量组与模型组差异显著 ($P < 0.05$)。表明低剂量当归六黄汤合煎液即可改善大鼠体质量减轻现象,效果明显优于单煎。



CK-对照组 MOD-模型组 Con-甲巯咪唑组 AL-合煎低剂量组 AH-为合煎高剂量组 SL-单煎低剂量组 SH-单煎高剂量组
与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同

CK-control group MOD-model group Con-methimazole group AL-all-herb decoction low-dose group AH-all-herb decoction high-dose group SL-single-herb decoction low-dose group SH-single-herb decoction high-dose group # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图5 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠体质量的影响
Fig. 5 Effect of all-herb decoction and single-herb decoction of Danggui Liu Huang Decoction on body weight of *yin*-deficiency-hyperthyroidism rats

3.4.3 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠粪便含水率的影响 如表4所示, 10 d时(造模结束), 与对照组比较, 模型组大鼠粪便含水率明显下降, 说明造模导致粪便含水率降低, 这与甲亢大便干结的体征相对应。20 d时(给药结束), 与模型组比较, 甲巯咪唑组粪便含水率极显著增加 ($P < 0.01$), 这说明甲巯咪唑片对大便干结有缓解作用; 合煎高剂量组粪便含水率极显著增加 13.10% ($P < 0.01$); 单煎高剂量组粪便含水率显著增加 6.32% ($P < 0.05$); 低剂量的当归六黄汤合煎与单煎对甲亢大鼠粪便含水率的影响无显著差异, 但合煎高剂量组对大鼠粪便含水率的影响接近阳性药水平。

表4 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠粪便含水率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of all-herb decoction and single-herb decoction of Danggui Liu Huang Decoction on fecal water content in *yin*-deficiency-hyperthyroidism rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	粪便含水率/%	
		第10天	第20天
对照	—	64.59 ± 2.55	63.41 ± 1.54
模型	—	40.82 ± 2.25 ^{##}	50.91 ± 2.29 ^{##}
甲巯咪唑	0.010 5	41.26 ± 3.41	62.44 ± 3.59 ^{**}
合煎	1860	39.43 ± 2.25	53.23 ± 2.00
	7440	40.96 ± 2.59	57.58 ± 1.83 ^{**}
单煎	1860	40.46 ± 2.87	52.02 ± 2.49
	7440	39.93 ± 3.20	54.13 ± 2.12 [*]

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

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

3.4.4 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠血清中 cAMP、T3、T4、ACTH、Cor 和 TSH 水平的影响 如表5所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 cAMP、T3、T4、ACTH 和 Cor 水平均显著升高 ($P < 0.01$), TSH 水平显著降低 ($P < 0.01$), 与甲亢患者血清学水平一致^[30]。与模型组比较, 甲巯咪唑组 cAMP、T3、T4、ACTH 和 Cor 水平均显著降低 ($P < 0.01$), TSH 水平显著升高 ($P < 0.01$), 说明甲巯咪唑片能够显著改善甲状腺和肾上腺皮质的功能异常; 合煎低、高剂量组和单煎高剂量组 cAMP、T3、T4、ACTH 和 Cor 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), TSH 水平显著升高 ($P < 0.01$); 单煎低剂量组 T3、T4、ACTH 和 Cor 水平均显著降低 ($P < 0.01$), TSH 水平显著升高 ($P < 0.01$)。综上可知, 当归六黄汤合煎和单煎均能调节甲亢所致血清学指标异常, 但合煎高剂量组作用更接近阳性对照组。

表5 当归六黄汤单煎、合煎对阴虚甲亢大鼠血清 cAMP、T3、T4、ACTH、Cor 和 TSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effects of all-herb decoction and single-herb decoction of Danggui Liu Huang Decoction on cAMP, T3, T4, ACTH, Cor and TSH levels in serum of *yin*-deficiency-hyperthyroidism rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	cAMP/(pg·mL ⁻¹)	T3/(pmol·L ⁻¹)	T4/(pmol·L ⁻¹)	ACTH/(pmol·L ⁻¹)	Cor/(pmol·L ⁻¹)	TSH/(pmol·L ⁻¹)
对照	—	287.18 ± 35.48	11.62 ± 3.77	1 355.02 ± 23.56	39.94 ± 3.04	43.23 ± 4.49	8.31 ± 1.07
模型	—	458.33 ± 16.58 ^{##}	46.65 ± 2.07 ^{##}	2 123.30 ± 23.56 ^{##}	97.80 ± 5.46 ^{##}	131.13 ± 5.29 ^{##}	1.68 ± 0.91 ^{##}
甲巯咪唑	0.010 5	258.97 ± 21.10 ^{**}	12.79 ± 2.99 ^{**}	1 308.13 ± 60.00 ^{**}	40.52 ± 6.22 ^{**}	51.29 ± 0.81 ^{**}	8.70 ± 0.30 ^{**}
合煎	1860	368.59 ± 35.06 [*]	18.65 ± 0.15 ^{**}	1 611.82 ± 44.33 ^{**}	51.44 ± 1.52 ^{**}	58.28 ± 5.72 ^{**}	6.87 ± 0.55 ^{**}
	7440	290.38 ± 19.52 ^{**}	16.90 ± 0.63 ^{**}	1 340.10 ± 61.19 ^{**}	45.31 ± 3.32 ^{**}	50.22 ± 8.62 ^{**}	8.18 ± 0.28 ^{**}
单煎	1860	421.15 ± 19.99	18.70 ± 0.30 ^{**}	1 665.10 ± 60.51 ^{**}	60.06 ± 3.04 ^{**}	75.22 ± 11.33 ^{**}	6.73 ± 0.35 ^{**}
	7440	311.54 ± 32.86 ^{**}	18.94 ± 2.64 ^{**}	1 459.45 ± 71.98 ^{**}	47.61 ± 4.65 ^{**}	58.82 ± 11.30 ^{**}	7.76 ± 0.90 ^{**}

3.5 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠肠道菌群的影响

3.5.1 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠肠道微生物多样性的影响 对 12 份粪便样品测序后获得 89 210 条循环共识排序 (circular consensus sequencing, CCS) 序列, 每个样品至少产生 7089 条 CCS 序列, 平均产生 7434 条 CCS 序列, 获得 1 023 个操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs)。如图 6-A、B 所示, 稀释曲线、Shannon 指

数曲线趋于平缓, 说明测序数据充分合理, 可以进行分析。由图 6-C、D 可知, 与对照组比较, 模型组 Chao1 指数和 Shannon 指数显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 合煎高剂量组 Chao1 指数和 Shannon 指数显著降低 ($P < 0.01$), 单煎高剂量组 Chao1 和 Shannon 指数无显著性差异。 α 多样性结果表明, 合煎高剂量组大鼠的肠道微生物丰富度和多样性显著下降, 推测当归六黄汤合煎可能通过调节肠道微生物群落多样性来治疗甲亢。

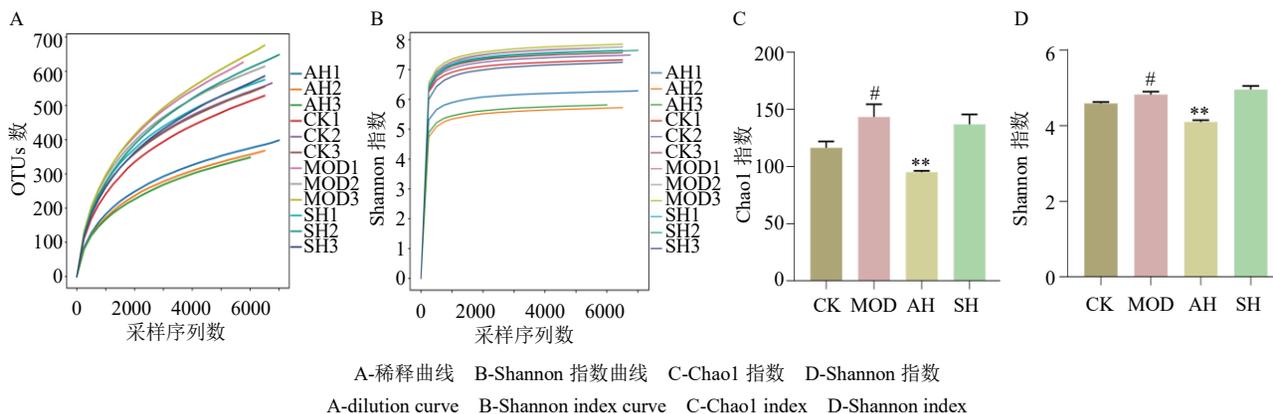


图 6 各组样本间的 α 多样性分析

Fig. 6 Analysis of α -diversity among each group of samples

主成分分析 (principal components analysis, PCA) 通过将样本距离矩阵经过投影后, 在低维度空间进行展开, 样本距离越接近, 表示物种组成结构越相似。由 β 多样性分析 (图 7) 可知, PC1 和 PC2 对样本差异的贡献率分别为 72.22% 和 15.37%, 且 4 组间差异明显。其中, 单煎高剂量组靠近模型组, 合煎高剂量组远离模型组, 且有接近对照组的趋势。由此可知, 当归六黄汤合煎能够显著调节甲亢大鼠肠道微生态, 这一过程可能与其改善甲亢导致的大便干结有关。

3.5.2 当归六黄汤合煎、单煎对阴虚甲亢大鼠肠道微生物物种组成的影响 如图 8-A 和图 9-A~D 所示, 在门水平上, 与对照组比较, 模型组厚壁菌门 (Firmicutes) 和脱硫杆菌门 (Desulfobacterota) 的相对丰度分别显著增加了 20.28% 和 75.33% ($P < 0.01$), 拟杆菌门 (Bacteroidota) 相对丰度显著减少了 32.04% ($P < 0.01$)。与模型组比较, 合煎高剂量组厚壁菌门和脱硫杆菌门的相对丰度分别显著减少了 43.71% 和 93.00% ($P < 0.01$), 而拟杆菌门和疣微菌门 (Verrucomicrobiota) 的相对丰度分别显著增加了 30.97% 和 99.96% ($P < 0.01$); 单煎高剂量组厚壁菌门的相对丰度显著减少了 10.64% ($P < 0.01$), 拟杆菌门、疣微菌门和脱硫杆菌门的相对丰度分别显著增加了 24.60%、86.11% 和 2.72% ($P < 0.01$)。

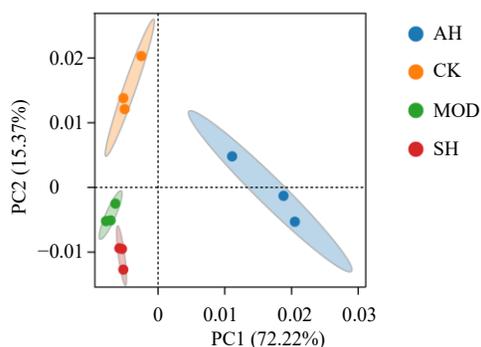


图 7 各组样品间的 β 多样性分析

Fig. 7 β -Diversity analysis between each group of samples

如图 8-B 和图 9-E~H 所示, 在属水平上, 与对照组比较, 模型组罗姆布茨菌属 *Romboutsia* 的相对丰度显著减少了 39.69% ($P < 0.01$), *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 的相对丰度显著增加了 54.39% ($P < 0.01$)。与模型组比较, 合煎高剂量组罗姆布茨菌属的相对丰度显著增加了 32.58% ($P < 0.01$), *Lachnospiraceae_NK4A136_group*

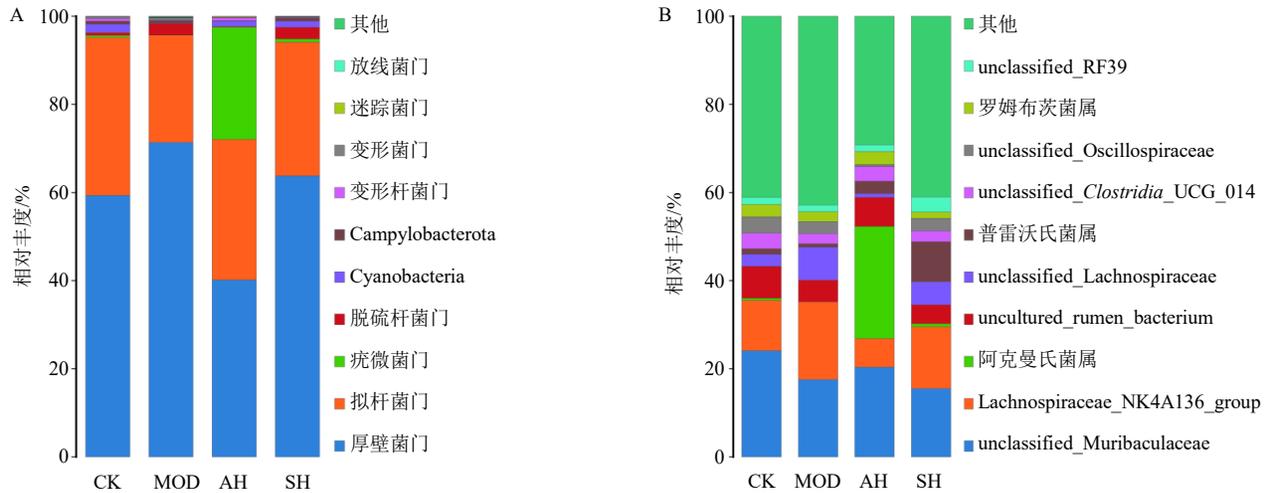


图 8 各组门水平 (A) 和属水平 (B) 的微生物物种分布差异

Fig. 8 Difference of microbial species distribution at phylum level (A) and genus level (B) in each group

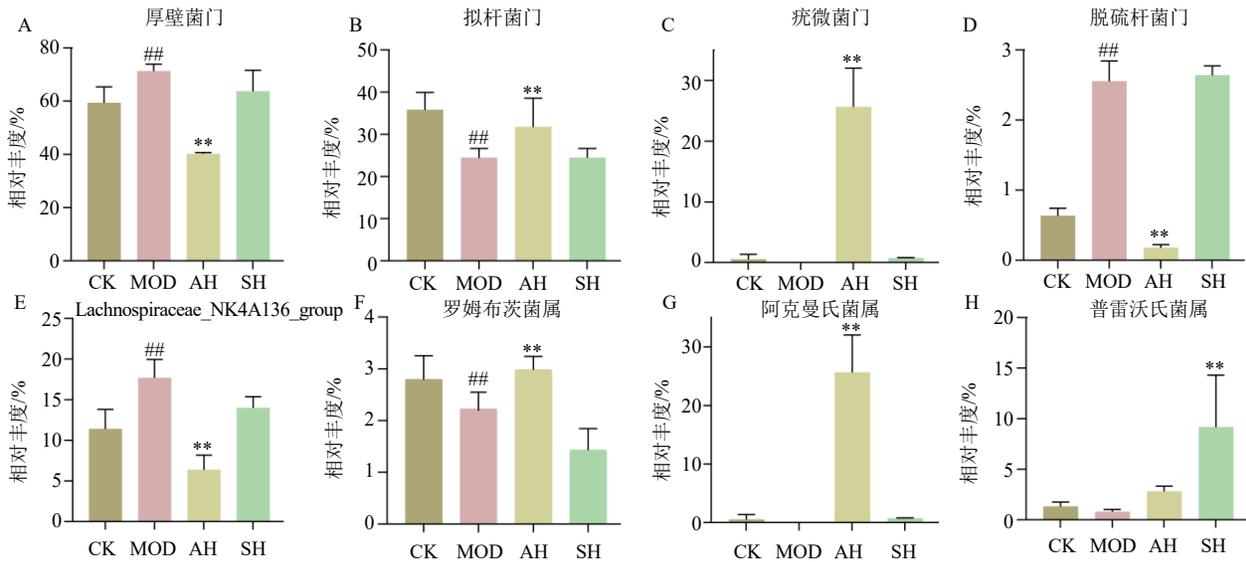


图 9 门水平 (A~D) 及属水平 (E~H) 具有显著差异的肠道菌群相对丰度比较

Fig. 9 Comparison of relative abundance of intestinal flora with significant differences at phylum (A—D) and genus (E—H) levels

的相对丰度显著减少了 43.42% ($P < 0.01$); 而单煎高剂量组罗姆布茨菌属的相对丰度显著减少了 11.52% ($P < 0.01$), 普雷沃氏菌属 *Prevotella* 和 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 的相对丰度分别增加了 85.59%和 32.58% ($P < 0.01$)。此外, 模型组中阿克曼氏菌属 *Akkermansia* 的相对丰度几乎为零, 而合煎高剂量组中其相对丰度是对照组和单煎高剂量组的数十倍。综上可知, 合煎高剂量组的细菌组成更接近于对照组, 其中差异较大的菌属可能为导致不同组药效作用差异的潜在因素。

如图 10 所示, 门水平线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 分析 (LDA \geq

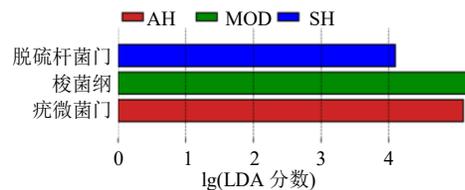


图 10 门水平上 LEfSe 分析

Fig. 10 LEfSe analysis at phylum level

4, $P < 0.05$) 结果表明, 模型组中梭菌纲 (Clostridia) 为优势菌门, 与模型组相比, 合煎高剂量组中疣微菌门为优势菌门, 单煎高剂量组中脱硫杆菌门为优势菌门。

如图 11 所示, 属水平 LEfSe 分析可知, 与对照

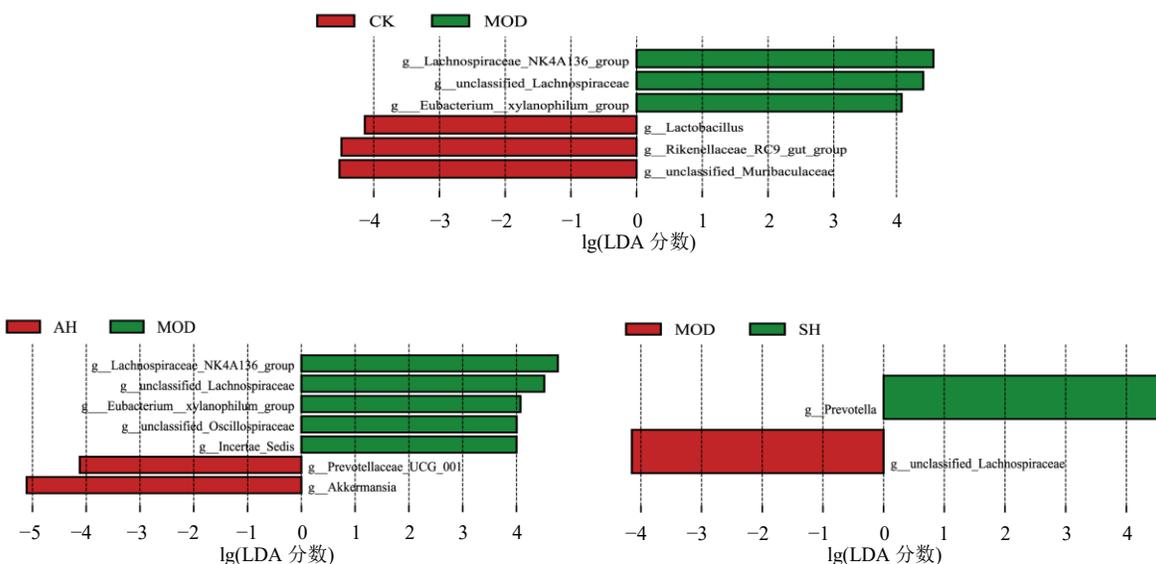


图 11 属水平组间样本 LefSe 分析结果

Fig. 11 LefSe analysis results of intergroup samples

组比较，模型组 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Unclassified_Lachnospiraceae* 及 *Eubacterium_xylanophilum_group* 的相对丰度增加，乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、*Rikenellaceae_RC9_gut_group* 及 *Unclassified_Muribaculaceae* 的相对丰度减少。与模型组比较，合煎高剂量组 *Prevotellaceae_UCG_001*、阿克曼氏菌属细菌丰度富集，*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Eubacterium_xylanophilum_group*、*Unclassified_Oscillospiraceae* 及 *Incertae_Sedis* 属细菌相对丰度减少；单煎高剂量组普雷沃氏菌属细菌相对丰度增加，*Unclassified_Lachnospiraceae* 细菌丰度减少。综上比较可知，造成 4 组样品肠道菌群差异的主要菌属为 *Lachnospiraceae_NK4A136_group*、普雷沃氏菌属和阿克曼氏菌属。

4 讨论

当归六黄汤是临床上常用的滋阴降火方剂，此方能滋阴泻火、固表止汗，主治阴虚火旺所致的盗汗等。现代研究显示，该方主要应用于围绝经期综合征、甲亢等。当归六黄汤中主要含有阿魏酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、表小檗碱、黄连碱、巴马汀等活性物质^[31]，这些有效成分具有抗菌、抗炎、抗肝纤维化、降血糖、免疫调节等作用。本研究通过网络药理学预测，发现当归六黄汤与甲亢的 116 个重合靶点，主要包括 ALB、AKT1、IL-6、TNF 等。ALB 为肝功能检查中的金指标之一，不仅对维持机体营养和渗透压

至关重要，还与甲亢等疾病的发生发展密切相关，如甲亢代谢状态会造成肝脏供氧和营养匮乏，导致肝细胞坏死，或高代谢状态蛋白质分解速率加快，产生负氮平衡^[32-33]。Akt 是胞内促进细胞生长分化的信号转导通路，其在 Graves 病中扮演着重要角色，由于机体的激素紊乱，产生一系列促增殖、抗凋亡效应，导致甲亢^[34]。甲亢患者体内 IL-6、IL-1 β 等细胞因子可以通过影响免疫应答反应来调节甲状腺功能^[35]。此外，过高的 TNF- α 、TNF- β 等炎症因子会促成炎症和组织损伤，与甲亢的形成、发展密不可分^[36]。这说明免疫、炎症等多个反应过程与对甲状腺功能的调控息息相关。通过 KEGG 通路富集分析，筛选到 158 条当归六黄汤抗阴虚甲亢作用的主要通路，主要富集在癌症、脂质和动脉粥样硬化、缺氧诱导因子-1 信号通路等。研究显示，甲亢患者群体比正常人群相比更易患甲状腺癌^[37]。此外，甲亢可以影响脂代谢，促进炎症因子分泌，导致动脉粥样硬化等炎症性疾病的发生^[38]。HIF-1 α 参与细胞的生长、繁殖及凋亡，与人的生命活动息息相关^[39]。研究显示，HIF-1 α 与直肠癌的发生正相关^[40]。基于上述论断，可以推测当归六黄汤治疗甲亢的过程可能与肠道炎症相关联，可能表现为对肠道菌群组成和多样性的影响。

本研究以甲亢大鼠为研究对象，研究结果表明当归六黄汤合煎和单煎均能改善甲亢导致的体质量减轻、大便干结，并通过降低 T3、T4，提升 TSH 等激素水平调节甲亢导致的激素水平紊乱。但相较于

单煎,合煎给药后作用更明显,在对甲亢大鼠机能改善方面,与张凡等^[41]研究相似。合煎优于单煎可能是由于合煎过程对有效成分溶出效果更佳,与彭平等^[12]研究类似。当归六黄汤治疗甲亢靶点对应活性成分多集中于黄芩、黄连、黄柏3味药材,这些药材恰好又是导致合煎和单煎样品成分差异的主要物质,故推测,合煎优于单煎与上述靶点归属于这些药材直接相关。

现代研究表明,甲状腺疾病多与肠道微生物群密切相关^[42-43]。厚壁菌门和拟杆菌门为哺乳动物优势菌群,其比值(F/B)与肠道健康程度关联密切^[44]。本研究发现,从门水平上,模型组厚壁菌门相对丰度增加,拟杆菌门相对丰度减少,F/B值呈现升高趋势,这表明阴虚甲亢大鼠肠道菌群门水平物种比例失衡,菌群紊乱态势明显,与文献所载相似^[45]。而当归六黄汤合煎高剂量组大鼠肠道厚壁菌门相对丰度减少,拟杆菌门相对丰度增加,F/B值出现回调趋势,肠道紊乱被纠正。此外,模型组梭菌纲细菌丰度显著增加,合煎高剂量组疣微菌门细菌丰度显著增加,单煎高剂量组脱硫杆菌门细菌丰度显著增加。梭菌纲为厚壁菌门中最大的纲之一,能够通过阻止机体吸收肠道脂肪导致体质量下降,这可能是造成甲亢大鼠体型消瘦的内在原因^[46]。疣微菌门和脱硫杆菌门分别作为溃疡性结肠炎等肠道疾病的有害菌门和有益菌门^[47],进一步说明当归六黄汤合煎给药后能够减轻肠道炎症,且这一过程可能与改善甲亢症状有关。从属水平上,模型组Lachnospiraceae_NK4A136_group细菌丰度显著增加,合煎高剂量组阿克曼氏菌属和罗姆布茨菌属细菌丰度显著增加,单煎高剂量组普雷沃氏菌属细菌丰度显著增加。Lachnospiraceae_NK4A136_group与肠道炎症程度呈正相关,还能够导致代谢紊乱、糖尿病和结肠癌的发生^[48];普雷沃氏菌属为Graves病患者肠道中的优势菌属^[49];阿克曼氏菌属的富集在改善肥胖、糖尿病等代谢性疾病等方面有显著作用^[50];罗姆布茨菌属能够将宿主难以消化的大分子碳水化合物转化为丁酸等短链脂肪酸,达到维持肠道微生物群稳定的效果^[51],对调节甲亢所致菌群紊乱有正向调节作用。此外,罗姆布茨菌属与餐后二小时血糖呈负相关,对2型糖尿病的诊断具有重要意义^[52]。上述内容进一步阐明,当归六黄汤合煎给药后,能够通过减少Lachnospiraceae_NK4A136_group等潜在有害细菌丰度,增加阿克曼

氏菌属和罗姆布茨菌属等潜在有益细菌丰度的方式,进而改善甲亢所致的体质量减轻、激素水平异常等症状;而当归六黄汤单煎干预后,普雷沃氏菌属等致病菌丰度增加,可能会导致甲亢症状加重。故推测当归六黄汤合煎可能通过调控菌群,进而改善机体代谢和调节激素分泌的方式治疗甲亢。本课题组前期已经肃正基源,确定煎煮工艺,为合煎、单煎样品的制备及药效作用研究提供依据,且依照前期含量测定方法发现,合煎后黄芩苷、黄连碱、巴马汀、盐酸小檗碱等成分降低,这与前期猜测黄连、黄芩、黄柏3味药共热后引起的成分变化相应。同时,这也是导致合煎、单煎药效作用差异及菌群组成结构不同的根本原因。

综上所述,当归六黄汤合煎在改善甲亢带来的异常症状和调节肠道菌群等方面的作用优于单煎。因此,当归六黄汤单煎无法完全替代合煎,对于当归六黄汤配方颗粒的开发,不应简单改变提取方式,而应在分析治疗甲亢等疾病的关键活性物质变化规律的基础上,进一步进行剂型改进。同时,本研究在性别适应研究上仍然存在一些局限性,通过查阅文献发现,左旋甲状腺素钠片和利血平片诱导的阴虚甲亢模型多用雄性,造模过程中更易成活^[53-55]。尽管临床上女性患病率高于男性,但由于成年雌性动物的代谢存在着明显的性周期的变化,这一因素或许会影响造模及给药结果。此外,本研究后续将着重关注本方治疗疾病过程中的关键作用物质,并利用代谢组学、蛋白组学等结合的方式对功效关联物质和作用机制进行深入研究,为经典名方的进一步开发利用提供方法借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cao H, Tuo L L, Tuo Y L, *et al.* Immune and metabolic regulation mechanism of Dangguiliuhuang Decoction against insulin resistance and hepatic steatosis [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 445.
- [2] Xue B B, Chen X P, Wang X L, *et al.* Application of multivariate statistical analysis and network pharmacology to explore the mechanism of Danggui Liu Huang Tang in treating perimenopausal syndrome [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114543.
- [3] Nguyen L T H, Ahn S H, Nguyen U T, *et al.* Dang-Gui-Liu-Huang Tang a traditional herbal formula, ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice by inhibiting IL-22 production [J]. *Phytomedicine*,

- 2018, 47: 48-57.
- [4] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录 (第一批)》的通知 [EB/OL]. [2018-04-17]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [5] 李鑫, 闫影, 孙志伟, 等. 基于经典名方中药复方颗粒剂的设计研究进展 [J]. 药学研究, 2020, 39(11): 666-669.
- [6] 邓轶渊, 高文远, 陈海霞, 等. 中药复方合煎与分煎的差异性研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1909-1911.
- [7] Xiang Z, Wang Y Z, Liu S D. The chemical and metabolite profiles of Gualou-Xiebai-Banxia Decoction, a classical traditional Chinese medicine formula, by using high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and in-house software [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 288: 114994.
- [8] Qiu R J, Zhang X Y, Zhao C, et al. Comparison of the efficacy of dispensing granules with traditional decoction: A systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6(3): 38.
- [9] Feng X, Bi Y L, Wang J Q, et al. Discovery of the potential novel pharmacodynamic substances from Zhi-zi-Hou-Po Decoction based on the concept of co-decoction reaction and analysis strategy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 830558.
- [10] Qin Y, Zhou R R, Huang J H, et al. Comprehensive comparison of the anti-inflammatory activity and chemical consistency of traditional Chinese medicine formula granules with Ge-Gen Decoction as a representative sample [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(12): e4689.
- [11] 何军, 朱旭江, 杨平荣, 等. 中药配方颗粒的现状与发展新思路 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4717-4725.
- [12] 彭平, 田瑞华, 杜菁, 等. 白虎加桂枝汤单煎与合煎提取物质量表征特性分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3263-3269.
- [13] 乔三洋, 王学勇, 李耿, 等. 基于化学全息研究四物汤煎煮溶出规律 [J]. 中草药, 2020, 51(19): 4960-4971.
- [14] 成颜芬, 杜克群, 吴亿晗, 等. 基于化学特征与核心功效分析经典名方桃红四物汤复方合煎与单煎差异研究 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5879-5890.
- [15] 殷琳, 夏文睿, 黄国鑫, 等. 中药-肠道菌群互作与宿主自身代谢免疫稳态相关性的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2526-2538.
- [16] 闫妍, 宿莹, 武艳雪, 等. 当归六黄汤本草考证及物质基准的制备工艺研究 [J]. 医药导报, 2021, 40(10): 1403-1407.
- [17] 宿莹. 当归六黄汤物质基准的研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [18] Yi L, Xu X. Study on the precipitation reaction between baicalin and berberine by HPLC [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 810(1): 165-168.
- [19] Chen M, Wang P L, Li T, et al. Comprehensive analysis of Huanglian Jiedu Decoction: Revealing the presence of a self-assembled phytochemical complex in its naturally-occurring precipitate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 195: 113820.
- [20] 田学浩, 张昊, 李桐, 等. 中药配伍理论科学内涵的外在表象: 复方水煎自沉淀 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4778-4783.
- [21] 陈哲杰, 李文, 林美斯, 等. 三黄泻心汤研究现状及其关键技术与核心问题分析 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4111-4117.
- [22] 中药新药临床研究指导原则 (试行) [S]. 2002: 227.
- [23] 杨雪晴, 徐伟, 肖春萍, 等. 米泔水制北苍术炮制工艺及其抗腹泻药效作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 78-86.
- [24] 王清清, 沈岚, 林晓, 等. 甲巯咪唑片干预大鼠甲亢模型的代谢组学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(7): 572-578.
- [25] Wang P, Sun H, Lv H, et al. Thyroxine and reserpine-induced changes in metabolic profiles of rat urine and the therapeutic effect of Liu Wei Di Huang Wan detected by UPLC-HDMS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 631-645.
- [26] 王赛, 白明, 苗明三. 阴虚证动物模型诊断指标及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 132-137.
- [27] 贺玉伟, 柴程芝, 寇俊萍, 等. 甲状腺素诱导小鼠模型表观指征变化与阴虚火旺证的相关性研究 [J]. 实验动物科学, 2013, 30(2): 1-6.
- [28] 明·缪希雍撰. 神农本草经疏 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2017: 272.
- [29] 焦烁颖, 付守强, 汤阳, 等. 从朱丹溪“心动则相火动”论治复发性甲状腺功能亢进症 [J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(7): 733-737.
- [30] 周宇清, 黄淑玲, 张慧芬, 等. 玄枢颗粒对甲状腺功能亢进症大鼠的药效学及急性毒性实验的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(11): 2188-2193.
- [31] 崔渺, 魏岩, 姜立娟, 等. 当归六黄汤异病同治临床应用现状及实验研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(4): 467-472.
- [32] 冯志伟, 孙利忠, 张志涛, 等. 甲状腺功能异常患者部分生化指标变化分析 [J]. 中国医学创新, 2018, 15(4): 22-26.
- [33] 臧允红. 血清前白蛋白评价甲状腺功能亢进患者营养状况的价值 [J]. 临床军医杂志, 2008, 36(4): 579-580.
- [34] 李青穆. 中药甲亢宁对 Graves 病小鼠甲状腺功能及 Akt 信号通路影响的实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.

- [35] Kunjumohamed F P, Al-Busaidi N B, Al-Musalhi H N, *et al.* The prevalence of thyroid cancer in patients with hyperthyroidism [J]. *Saudi Med J*, 2015, 36(7): 874-877.
- [36] 巩建萍, 郭雅卿, 尹娟, 等. 甲状腺功能亢进与动脉粥样硬化的相关性研究 [J]. 医学研究与教育, 2014, 31(6): 24-27.
- [37] 刘欣荣, 苏俊平, 陈云霞, 等. Graves 病骨质疏松患者免疫功能状况及引起骨质疏松的作用机制研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(6): 813-816.
- [38] 李玉, 常建英, 蒋铁建. Graves 病患者血清 chemerin 水平与骨密度的相关性 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2017, 42(8): 947-952.
- [39] 杨梦思, 周娜, 王志钢, 等. 转录因子 HIF-1 α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 8-13.
- [40] 王强, 郭德正, 刘焱伟, 等. HIF-1 α 及 STAT3 联合预测异时性结直肠癌肝转移 [J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(7): 692-695.
- [41] 张凡, 雷瑜, 邵一丹, 等. 梓醇对甲状腺功能亢进症大鼠的甲状腺相关指标和细胞因子的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(4): 81-85.
- [42] 冯雨, 袁慧娟. 肠道菌群与自身免疫性甲状腺疾病的研究进展 [J]. 医药论坛杂志, 2022, 43(15): 101-105.
- [43] 赫晓晴, 单忠艳. 肠道菌群与自身免疫性甲状腺疾病 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2020, 40(3): 179-183.
- [44] 牧亚峰, 向楠, 左新河, 等. 白芍总苷对自身免疫性甲状腺炎大鼠肠黏膜屏障及肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3269-3277.
- [45] 宋影春, 李丹, 吕中伟. 甲亢患者肠道微生态的特征 [J]. 复旦学报: 医学版, 2019, 46(2): 157-166.
- [46] Petersen C, Bell R, Klag K A, *et al.* T cell-mediated regulation of the microbiota protects against obesity [J]. *Science*, 2019, 365(6451): eaat9351.
- [47] 陈鹏, 马嘉泽, 张加敏, 等. 溃结灌肠液 II 改善溃疡性结肠炎菌群结构和炎症机制的网络药理学筛查及实验验证 [J]. 中医药导报, 2022, 28(9): 25-34.
- [48] Jia Y J, Li T Y, Han P, *et al.* Effects of different courses of moxibustion treatment on intestinal flora and inflammation of a rat model of knee osteoarthritis [J]. *J Integr Med*, 2022, 20(2): 173-181.
- [49] Ishaq H M, Mohammad I S, Shahzad M, *et al.* Molecular alteration analysis of human gut microbial composition in Graves' disease patients [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1558-1570.
- [50] Kumar R, Kane H, Wang Q, *et al.* Identification and characterization of a novel species of genus *Akkermansia* with metabolic health effects in a diet-induced obesity mouse model [J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2084.
- [51] 高仁, 田时祎, 汪晶, 等. 低聚半乳糖对脂多糖刺激哺乳仔猪盲肠微生物区系、肠道炎症和屏障功能的影响 [J]. 动物营养学报, 2022, 34(1): 177-189.
- [52] 鲁伟, 鲁一兵. 沙格列汀对新诊断 2 型糖尿病患者肠道菌群的影响 [J]. 中国临床研究, 2022, 35(7): 899-904.
- [53] 王翠平, 蔺新英, 刘丹, 等. 海带有机碘与无机碘对甲亢大鼠血清 FT₃ 和 FT₄ 及尿碘的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2016, 33(4): 296-299.
- [54] 黄江荣, 李祥华, 张家均, 等. 六味地黄丸对甲状腺功能亢进肾阴虚型小鼠基础代谢的影响 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(5): 1-3.
- [55] 张宁, 李自辉, 赵洪伟, 等. 基于 iTRAQ 技术的玄参对阴虚火旺甲状腺功能亢进大鼠蛋白质组学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4207-4211.

[责任编辑 李亚楠]