

牛胆汁的解热作用及作用机制研究

苏发智¹, 白晨曦¹, 张文森¹, 王 雨¹, 孙延平¹, 杨炳友¹, 匡海学^{1*}, 王秋红^{1,2*}

1. 黑龙江中医药大学, 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药天然药物药效物质基础重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 广东药科大学中药学院, 中药炮制学教研室, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 基于干酵母混悬液诱导的发热大鼠模型, 评价牛胆汁的解热效果, 并进一步通过基于 UPLC-MS/MS 的代谢组学方法探索其潜在的作用机制。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、对乙酰氨基酚 (200 mg/kg) 组、牛胆汁 (10 mL/kg) 组及猪胆汁 (10 mL/kg) 组, 以背部 sc 20%干酵母混悬液的方式构建发热大鼠模型, 分别于造模前 0.5 h 及造模后 3.5 h 对各给药组大鼠给予药物干预, 并于造模后第 0、4、5、6、7、8 小时测量大鼠肛温, 收集造模后 8 h 大鼠血清及脑组织, 采用 ELISA 法检测大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 及下丘脑中前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的含量; 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 对大鼠的血清及下丘脑进行代谢组学分析, 探究其潜在的生物标志物, 结合血清及下丘脑代谢组学的相关分析结果及 ELISA 指标, 共同阐释牛胆汁的解热作用机制。**结果** 造模 4 h 后模型组大鼠肛温显著升高 ($P < 0.01$), 牛胆汁组大鼠肛温显著低于模型组 ($P < 0.01$), 牛胆汁能够显著抑制发热导致的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂、cAMP 含量增加 ($P < 0.01$)。代谢组学结果表明干酵母致大鼠发热后血清及下丘脑的代谢轮廓发生了显著的变化, 分别从其中鉴定得到 24、18 种内源性代谢物, 给予牛胆汁干预后其含量均显著下调, 主要影响花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、丙酮酸代谢、柠檬酸循环、鞘脂代谢、嘧啶代谢、氨基酸代谢、糖代谢等途径。**结论** 牛胆汁对干酵母所致发热大鼠模型具有显著的解热作用, 其作用机制可能与抑制内源性致热源的释放及调节机体的脂质代谢、氨基酸代谢、糖代谢有关, 具有多靶点、多途径的特征。

关键词: 牛胆汁; 解热; 下丘脑; 血清; 代谢组学; 胆酸; 去氧胆酸; 鹅去氧胆酸; 猪去氧胆酸; 甘氨酸; 甘氨酸去氧胆酸; 甘氨酸猪去氧胆酸; 甘氨酸鹅去氧胆酸; 牛磺胆酸; 牛磺猪去氧胆酸; 牛磺鹅去氧胆酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3363-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.015

Antipyretic effect and mechanism of bovine bile

SU Fazhi¹, BAI Chenxi¹, ZHANG Wensen¹, WANG Yu¹, SUN Yanping¹, YANG Bingyou¹, KUANG Haixue¹, WANG Qihong^{1,2}

1. Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacodynamic Material Basis, Key Laboratory of Basic and Application Research of Beiyao, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China
2. Department of Chinese Materia Medica Processing, School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To evaluate the antipyretic effect of bovine bile through a fever rat model induced by dry yeast suspension and further explore its potential mechanism through metabolomics based on UPLC-MS/MS. **Methods** A total of 40 SD rats were

收稿日期: 2023-12-15

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1707100); 中药传承与创新“百千万”人才工程——岐黄工程首席科学家项目 (国中医药人教函[2021]7 号); 2022 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2022]75 号); 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (国中医药人教函[2022]76 号); 黑龙江省“头雁”团队支持项目 (黑龙江省头雁行动领导小组文件[2019]5 号)

作者简介: 苏发智 (1998—), 男, 博士研究生, 研究方向为中药炮制原理及中药药性理论研究。E-mail: sfz18406564303@163.com

***通信作者:** 匡海学 (1955—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药及复方药效物质基础、中药药性理论及中药炮制原理研究。

E-mail: hxkuang56@163.com

王秋红 (1969—), 女, 博士生导师, 研究方向为中药炮制原理及中药药效物质基础和作用机制研究。

E-mail: qhwang668@sina.com

randomly divided into control group, model group, acetaminophen (200 mg/kg) group, bovine bile (10 mL/kg) group and pig bile (10 mL/kg) group. Fever rat model was constructed by subcutaneous injection of 20% dry yeast suspension into the back. Drug was orally administrated to each treated group of rats 0.5 h before and 3.5 h after modeling, and the rectal temperature of rats were monitored at 0, 4, 5, 6, 7 and 8 h after modeling. The serum and brain tissue of rats were collected 8 h after modeling. The contents of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 in serum and prostaglandin E₂ (PGE₂), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in hypothalamus were detected using ELISA method. Metabolomics analysis was conducted on the serum and hypothalamus of rats through ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) to explore their potential biomarkers. Then, the antipyretic mechanism of bovine bile was elucidated combined with relevant analysis results of serum and hypothalamic metabolomics and ELISA indicators. **Results** The rectal temperature of rats in model group was significantly increased after 4 h of modeling compared with control rats ($P < 0.01$), while the temperature of bovine bile group was significantly lower than that in model group ($P < 0.01$). Besides, the increasing contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂, cAMP resulted from fever rats were reversed by oral administration of bovine bile ($P < 0.01$). The metabolomics results revealed the significant changes of metabolic profiles from serum and hypothalamus in fever rats, 24 and 18 endogenous metabolites were identified, respectively. Their contents were significantly reversed after intervention with bovine bile, mainly affecting pathways such as arachidonic acid metabolism, glycerophospholipid metabolism, pyruvate metabolism, citric acid cycle, sphingolipid metabolism, pyrimidine metabolism, amino acid metabolism and sugar metabolism. **Conclusion** The bovine bile exerts a significant antipyretic action on a dry yeast induced fever rat model, and its underlying mechanism may be related to inhibiting the release of endogenous heat sources and regulating the lipid metabolism, amino acid metabolism and sugar metabolism, with the characteristics of multiple targets and pathways.

Key words: bovine bile; antipyretic; hypothalamus; serum; metabolomics; cholic acid; deoxycholic acid; chenodeoxycholic acid; hyodeoxycholic acid; glycocholic acid; glycodeoxycholic acid; glycohyodeoxycholic acid; glycochenodeoxycholic acid; taurocholic acid; taurohyodeoxycholic acid; taurochenodeoxycholic acid

牛胆汁来源于牛科动物牛 *Bos taurus domesticus* Gmelin, 其药用历史最早记载于《神农本草经》^[1]。牛胆汁味苦、性寒, 归心、肝、胆经, 具有清热解毒、泻火消肿、清肝明目、利胆通肠的功效^[2]。临床上常以牛胆汁作为主药并辅以其他中药使用, 可治疗上呼吸道感染、黄疸型传染性肝炎以及消化不良等^[3], 牛胆还是蒙医常用的蒙药材之一, 在治疗协日和配毒以及蒙成药应用中具有重要的价值^[4]。其应用形式有新鲜液体或制作成牛胆粉, 以方便运输及储存^[5-6]。据市场调查发现, 当前市场以黄牛的牛胆为主, 因此国家和各地方标准只收录了黄牛的胆汁^[7]。

牛胆汁还是一种重要的炮制辅料, 例如胆南星为牛胆汁和天南星发酵而成, 早在宋代《小儿药证直诀》中就有“腊月酿牛胆中阴干百日”的记载, 明代贾所学在《药品化义》中记载:“胆星意不重南星, 而重胆汁, 借星以收取汁用, 非如他药监制也, 故必须九制则纯”, 由此可见古人对牛胆汁作为辅料应用的重视。有研究称, 发酵的胆汁种类是影响胆南星功效的直接因素^[8]。《中国药典》2020 年版中记载的胆南星发酵原料除了古代沿用的牛胆汁外, 又增加了猪胆汁。根据本课题组前期对市售胆南星的调查发现, 当前市场的胆南星多以猪胆汁作为炮制

辅料。有研究人员分别对比了猪、牛、羊胆汁发酵的胆南星在清热功效方面的差异性, 结果证实了以牛胆汁作为发酵原料制备的胆南星解热效果更优^[9]。另外, 本课题组发现牛胆汁制胆南星具有良好的抗高热惊厥作用, 其效果优于猪胆汁制胆南星^[10], 然而, 并未通过实验证明胆汁种类的不同是否对胆南星发挥抗高热惊厥作用产生了影响, 以及胆汁在其中发挥了什么作用。以此为契机, 本研究选择干酵母诱导的发热大鼠模型, 对比了牛胆汁及猪胆汁的解热效果, 并采用非靶向血清代谢组学及脑组织代谢组学^[11]探究其潜在的作用机制, 旨在阐明牛胆汁解热的作用机制, 并为优化胆南星的炮制工艺, 进一步探索牛胆汁制胆南星的解热作用机制及开发牛胆汁制胆南星提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 8 周龄, 体质量 180~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2021-0011。动物饲养于黑龙江中医药大学 SPF 级动物实验室中, 温度 25 ℃, 相对湿度 60%, 自由进饮食饮水, 光照/黑暗周期均为 12 h, 适应性喂养 7 d 后开展动物实验。动物实验经黑龙江中医药大学伦理委员会批准(批

准号 2023092207)。

1.2 药品与试剂

新鲜的牛胆汁、猪胆汁购自江西省宜春市袁州区葛仙饲养厂；干酵母粉(批号 20220102)购自安琪酵母股份有限公司；大鼠环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)试剂盒(批号 MM-0549R1)、大鼠前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)试剂盒(批号 MM-0068R1)、大鼠肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)试剂盒(批号 MM-0180R1)、大鼠白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)试剂盒(批号 MM-0047R1)、大鼠 IL-6 试剂盒(批号 MM-0190R1)购自江苏酶免实业有限公司；复方对乙酰氨基酚片(批号 H20056948)购自山东新华制药股份有限公司；甲醇、乙腈(HPLC 级别)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；甲酸(质谱级)购自德国 Merck 公司；对照品鹅去氧胆酸(批号 B20347)、猪去氧胆酸(批号 B21672)、去氧胆酸(批号 B21032)、胆酸(批号 B20247)、甘氨猪去氧胆酸(批号 B27133)、牛磺猪去氧胆酸(批号 B26449)、甘氨鹅去氧胆酸(批号 B24724)、甘氨酸(批号 B27078)、牛磺鹅去氧胆酸(批号 B20919)购自上海源叶科技有限公司；对照品甘氨去氧胆酸(批号 G113438)、牛磺胆酸(批号 T336942)购自阿拉丁试剂有限公司；牛磺熊去氧胆酸(批号 MED20588)对照品购自麦克林生化科技股份有限公司，以上对照品质量分数均≥98%。

1.3 仪器

Servicebio KZ-III-F 型冷冻组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)；Sartorius BSA224S 型分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)；TSE320V 型-80℃超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；GZX-9140 MBE 型恒温箱(东京理化仪器有限公司)；Vitor X3 型酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)；Waters Acquity UPLC 系统、Waters SYNAPT G2-Si QTOF 质谱仪(美国 Waters 公司)；AB SCIEX QTRAP 4000 型三重四极杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)。

2 方法

2.1 牛胆汁中胆汁酸类成分的含量测定

2.1.1 胆汁酸类成分对照品溶液的制备 分别精密称取胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸、甘氨酸、甘氨去氧胆酸、甘氨猪

去氧胆酸、甘氨鹅去氧胆酸对照品适量，加甲醇使其溶解，配制成质量浓度分别为 1 ng/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密量取牛胆汁 5 mL，置于 50 mL 量瓶中，加入适量 70% 甲醇，超声提取 40 min，冷却至室温后，补足甲醇至刻度，摇匀，即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)；流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈(B)，梯度洗脱：0~11 min, 25%~100% B；11~13 min, 100% B；13~13.1 min, 100%~25% B；13.1~15 min, 25% B；柱温 35℃；体积流量 0.2 mL/min；进样量 5 μL。

2.1.4 质谱条件 电喷雾离子源；离子源温度为 550℃；离子喷雾电压为-4 500 V；帘气(CUR)压力为 206.85 kPa；雾化气(Gas 1)压力为 344.75 kPa；加热气(Gas 2)压力为 344.75 kPa。

2.1.5 方法学考察

(1) 线性关系考察：精密吸取各胆汁酸类成分对照品溶液适量，进行 UPLC-MS 分析，记录对照品的峰面积。以色谱峰面积作为纵坐标(Y)，待测成分的质量浓度作为横坐标(X)，绘制标准曲线，见表 1。各胆汁酸成分的相关系数均大于 0.99，表明各胆汁酸类成分的质量浓度与峰面积呈现出良好的线性关系。

表 1 各胆汁酸类成分的线性方程和相关系数(R²)

Table 1 Linear equation and correlation coefficient (R²) of various bile acid components

成分	线性方程	R ²
去氧胆酸	$Y=1.011\ 9\times 10^5 X-3.829\ 0\times 10^4$	0.992 9
猪去氧胆酸	$Y=4.410\ 6\times 10^4 X-1.765\ 0\times 10^4$	0.991 3
鹅去氧胆酸	$Y=6.629\ 0\times 10^4 X-3.369\ 7\times 10^4$	0.995 0
胆酸	$Y=1.125\ 1\times 10^5 X-3.862\ 5\times 10^4$	0.996 5
甘氨猪去氧胆酸	$Y=1.060\ 7\times 10^4 X-3.457\ 8\times 10^3$	0.994 4
甘氨鹅去氧胆酸	$Y=1.312\ 9\times 10^4 X-4.759\ 0\times 10^3$	0.996 1
甘氨去氧胆酸	$Y=1.261\ 5\times 10^4 X-4.354\ 9\times 10^3$	0.992 9
甘氨酸	$Y=8.317\ 3\times 10^3 X-2.948\ 2\times 10^3$	0.992 2
牛磺猪去氧胆酸	$Y=6.408\ 6\times 10^3 X-2.135\ 5\times 10^3$	0.996 7
牛磺熊去氧胆酸	$Y=7.052\ 5\times 10^3 X-3.623\ 2\times 10^3$	0.997 5
牛磺鹅去氧胆酸	$Y=294.244\ 1 X+4.494\ 9$	0.997 3
牛磺胆酸	$Y=36.927\ 1 X+80.980\ 2$	0.999 9

(2) 精密度考察：精密吸取对照品溶液 5 μL，重复进样 6 次，计算各对照品色谱峰面积的 RSD 值。结果显示，胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、甘氨酸、甘氨去氧胆酸、甘氨猪去氧胆酸、甘氨鹅去氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺熊去氧胆

酸、牛磺鹅去氧胆酸和牛磺猪去氧胆酸的 RSD 分别为 1.12%、2.84%、0.97%、3.56%、0.52%、1.37%、1.83%、0.88%、1.24%、2.26%、1.08%、1.79%，表明仪器的精密度良好。

(3) 稳定性考察：取供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，计算各胆汁酸类成分质量分数的 RSD 值。结果显示，24 h 内供试品溶液中胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、甘氨酸、甘氨酸去氧胆酸、甘氨酸猪去氧胆酸、甘氨酸鹅去氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和牛磺猪去氧胆酸质量分数的 RSD 分别为 0.89%、0.94%、1.33%、1.15%、2.39%、2.04%、1.92%、0.80%、1.50%、1.59%、2.14%、2.43%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(4) 重复性考察：精密吸取同一批牛胆汁样品 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，进样分析，计算各胆汁酸类成分质量分数的 RSD 值。结果显示，牛胆汁中胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、甘氨酸、甘氨酸去氧胆酸、甘氨酸猪去氧胆酸、甘氨酸鹅去氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和牛磺猪去氧胆酸质量分数的 RSD 分别为 2.10%、0.93%、1.59%、2.61%、2.06%、1.64%、2.66%、0.80%、0.97%、1.26%、2.34%、1.95%，表明本方法重复性良好。

(5) 加样回收率考察：精密量取已测定质量分数的牛胆汁样品 1 mL，平行 6 份，分别精密加入各对照品溶液适量，制备供试品溶液，进样分析，计算加样回收率。结果见表 2，表明该方法的准确度良好。

2.1.6 含量测定 精密吸取牛胆汁供试品溶液 5 μ L，按照“2.1.3”“2.1.4”项下方法进行含量测定。

表 2 各胆汁酸类成分的加样回收率结果 ($n=6$)

Table 2 Results of average recovery of various bile acid components ($n=6$)

成分	加样回收率/%	RSD/%
胆酸	95.13	1.52
去氧胆酸	98.17	1.98
鹅去氧胆酸	97.58	5.08
猪去氧胆酸	98.50	3.95
甘氨酸	99.28	2.25
甘氨酸去氧胆酸	93.20	3.54
甘氨酸猪去氧胆酸	96.58	2.41
甘氨酸鹅去氧胆酸	95.00	2.09
牛磺胆酸	98.13	6.35
牛磺猪去氧胆酸	92.10	4.38
牛磺鹅去氧胆酸	97.33	3.80

2.2 动物造模及给药

动物适应性喂养 7 d，期间自由饮食、饮水。在实验开始前 3 d，每日上午、下午各 1 次对大鼠进行适应性体温检测，剔除不合格大鼠（基础体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 且体温波动 $>0.5^{\circ}\text{C}$ ）。正式实验前大鼠禁食不禁水 12 h，并于实验当天连续检测 3 次体温，取其均值作为初始体温。将体温稳定的 40 只大鼠随机分为对照组、模型组、对乙酰氨基酚（200 mg/kg）组、牛胆汁（10 mL/kg）组及猪胆汁（10 mL/kg）组，每组 8 只。对照组大鼠背部 sc 生理盐水（10 mL/kg），其余大鼠背部 sc 20% 干酵母混悬液构建发热模型，对乙酰氨基酚组、牛胆汁组及猪胆汁组大鼠分别于造模前 30 min 及造模后 3.5 h 分别给药 1 次^[12]，对照组和模型组 ig 等体积生理盐水（10 mL/kg）。从造模后第 4 小时开始，每隔 1 h 对大鼠进行 1 次体温检测，直至第 8 小时结束，计算各组大鼠在每个时间点的体温变化值（ ΔT ，即实时体温值—基础体温值），并绘制相应的体温变化曲线以评价其解热效果^[13]。

2.3 样本采集

各组大鼠末次测量肛温结束后，ip 20% 乌拉坦溶液进行麻醉，腹主动脉采血收集于真空采血管中，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h 后，4 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液保存于 -80°C 冰箱中。随后在冰上操作，迅速取出脑组织，于预冷的生理盐水中漂洗，冲去血迹，液氮将其速冻，后转移至 -80°C 冰箱中保存备用。

2.4 血清炎症因子水平测定

各组大鼠血清解冻后，按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及下丘脑组织中 PGE₂、cAMP 的含量，以阐明牛胆汁发挥解热作用的机制^[14-15]。

2.5 代谢组学分析

2.5.1 样本制备 将脑组织样本从冰箱取出后于室温解冻，精密称取 100 mg 脑组织置于 2 mL 离心管中，并在冰上操作，将其剪碎。向离心管中加入 -20°C 预冷的乙腈-甲醇-水（2：2：1）溶剂 900 μ L，将离心管置于组织研磨仪中进行高速匀浆以制备脑组织匀浆液。4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 10 min，取 200 μ L 上清液置于带有内衬管的进样瓶中，进行超高效液相-四极杆飞行时间质谱（ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass, UPLC-Q-TOF MS）分析。此外，将每个样本的待进样上清液分别吸取 10 μ L，涡旋混合，作为质控样

本。分别在进样前后及每组样品间均进样 1 针质控样本，以考察 UPLC-Q-TOF MS 仪器的稳定性。

同理，将血清样本解冻后，每个样本分别吸取 200 μL 置于 1.5 mL 离心管中，向其中加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的乙腈-甲醇-水 (2:2:1) 溶剂 600 μL ，4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 10 min，取 200 μL 上清液放置于带有内衬管的进样瓶中，进行 UPLC-Q-TOF MS 分析。此外，将每个样本的待进样上清液分别吸取 10 μL ，涡旋混合，作为质控样本。分别在进样前后及每组样品间均进样 1 针质控样本，以考察 UPLC-Q-TOF MS 仪器的稳定性。

2.5.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm)，流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B)，梯度洗脱：0~4 min, 5%~50% B；4~6 min, 50%~67% B；6~16 min, 67%~95% B；16~17 min, 95%~5% B；17~18 min, 5% B；柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ；体积流量 0.3 mL/min；进样量 3 μL 。

2.5.3 质谱条件 采用 ESI 离子源，正、负离子模式采集信号，采集范围 m/z 100~1 200，毛细管电压分别为 3.0 kV (ESI⁺)、2.5 kV (ESI⁻)；锥孔电压为 40 V；碰撞能量为 20~35 V；脱溶剂气温度为 400 $^{\circ}\text{C}$ ；脱溶剂气体积流量为 800 L/h；锥孔气体积流量为 50 L/h。质谱校正液为亮氨酸-脑啡肽 (ESI⁺: m/z 556.277 1, ESI⁻: m/z 554.261 5) 溶液，以确保化合物相对分子质量测定准确。

2.5.4 数据处理及多元统计分析 采集的原始数据经 Progenesis QI 软件进行预处理，即峰对齐、降噪、标准化、归一化等处理，分别得到正、负离子模式下包含保留时间、质荷比 (m/z) 及各峰值区域的归一化峰面积的数据表，导入 SIMCAP14.1 软件中作多元统计分析，构建主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant

analysis, OPLS-DA) 模型以分析各组大鼠脑代谢轮廓的变化情况。另外，构建 200 次置换检验验证模型评价 OPLS-DA 法是否可靠^[16]。根据多元统计分析结果，选择变量投影重要性 (variable importance in the projection, VIP) >1 且 $P<0.05$ 的变量作为潜在的差异代谢物。采用人类代谢组学数据库 (HMDB, <http://hmdb.ca/>) 鉴定筛选的代谢物，并通过 MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 网站及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行代谢通路分析^[17]。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 牛胆汁中胆汁酸类成分含量测定结果

采用外标法计算牛胆汁中各胆汁酸类成分的含量，结果见表 3。

3.2 牛胆汁对干酵母致发热大鼠体温的影响

各组大鼠不同时间点的体温变化见表 4，模型组大鼠在造模后 4 h 体温明显升高 ($P<0.01$)，表

表 3 牛胆汁中各胆汁酸类成分含量

Table 3 Contents of various bile acids in bovine bile

成分	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
胆酸	170.15
去氧胆酸	363.79
鹅去氧胆酸	331.54
猪去氧胆酸	5.62
甘氨酸胆酸	1 469.51
甘氨酸去氧胆酸	889.35
甘氨酸猪去氧胆酸	1.97
甘氨酸鹅去氧胆酸	224.90
牛磺胆酸	49 577.13
牛磺熊去氧胆酸	—
牛磺猪去氧胆酸	4 822.57
牛磺鹅去氧胆酸	6 098.73

表 4 各组大鼠肛温变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Changes of rectal temperature of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量	体温/ $^{\circ}\text{C}$					
		基础	造模后 4 h	造模后 5 h	造模后 6 h	造模后 7 h	造模后 8 h
对照	—	37.37 $\pm$ 0.30	37.38 $\pm$ 0.34	37.31 $\pm$ 0.25	37.26 $\pm$ 0.29	37.31 $\pm$ 0.36	37.31 $\pm$ 0.28
模型	—	37.29 $\pm$ 0.22	38.16 $\pm$ 0.44 ^{##}	38.78 $\pm$ 0.33 ^{##}	39.13 $\pm$ 0.22 ^{##}	39.15 $\pm$ 0.34 ^{##}	39.19 $\pm$ 0.25 ^{##}
对乙酰氨基酚	200 mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	37.36 $\pm$ 0.17	37.31 $\pm$ 0.40 ^{**}	37.46 $\pm$ 0.23 ^{**}	37.53 $\pm$ 0.32 ^{**}	38.13 $\pm$ 0.60 ^{**}	38.12 $\pm$ 0.49 ^{**}
牛胆汁	10 mL $\cdot\text{kg}^{-1}$	37.39 $\pm$ 0.09	37.47 $\pm$ 0.42 ^{**+}	37.83 $\pm$ 0.35 ^{***+}	38.39 $\pm$ 0.33 ^{**+}	38.61 $\pm$ 0.36 ^{**+}	38.57 $\pm$ 0.35 ^{**+}
猪胆汁	10 mL $\cdot\text{kg}^{-1}$	37.40 $\pm$ 0.39	37.90 $\pm$ 0.35	38.33 $\pm$ 0.33 ^{**}	38.78 $\pm$ 0.39	39.01 $\pm$ 0.39	39.25 $\pm$ 0.46

与对照组比较：^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较：^{**} $P<0.01$ ；与猪胆汁组比较：⁺ $P<0.05$ ⁺⁺ $P<0.01$ 。

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group; ⁺ $P<0.05$ ⁺⁺ $P<0.01$ vs pig bile group.

明本研究成功复制了干酵母导致的大鼠发热模型。与模型组比较, ig 牛胆汁后大鼠肛温显著降低 ($P < 0.01$), 表明牛胆汁能够缓解大鼠发热; 反观猪胆汁组大鼠, 其肛温仅仅在造模后 5 h (即给药后 1 h) 与模型组大鼠相比具有统计学意义 ($P < 0.01$), 且升温速度较牛胆汁组大鼠更快, 肛温显著高于牛胆汁组 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明猪胆汁抑制大鼠发热的效果较牛胆汁更加逊色, 在制备胆南星且用于治疗

发热时可优先考虑将牛胆汁作为炮制原料。

3.3 牛胆汁对干酵母致发热大鼠体内炎症因子水平的影响

如图 1 所示, 背部 sc 干酵母混悬液后, 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及下丘脑中 PGE₂、cAMP 含量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, ig 牛胆汁能显著降低大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及下丘脑中 PGE₂、cAMP 含量 ($P < 0.01$)。

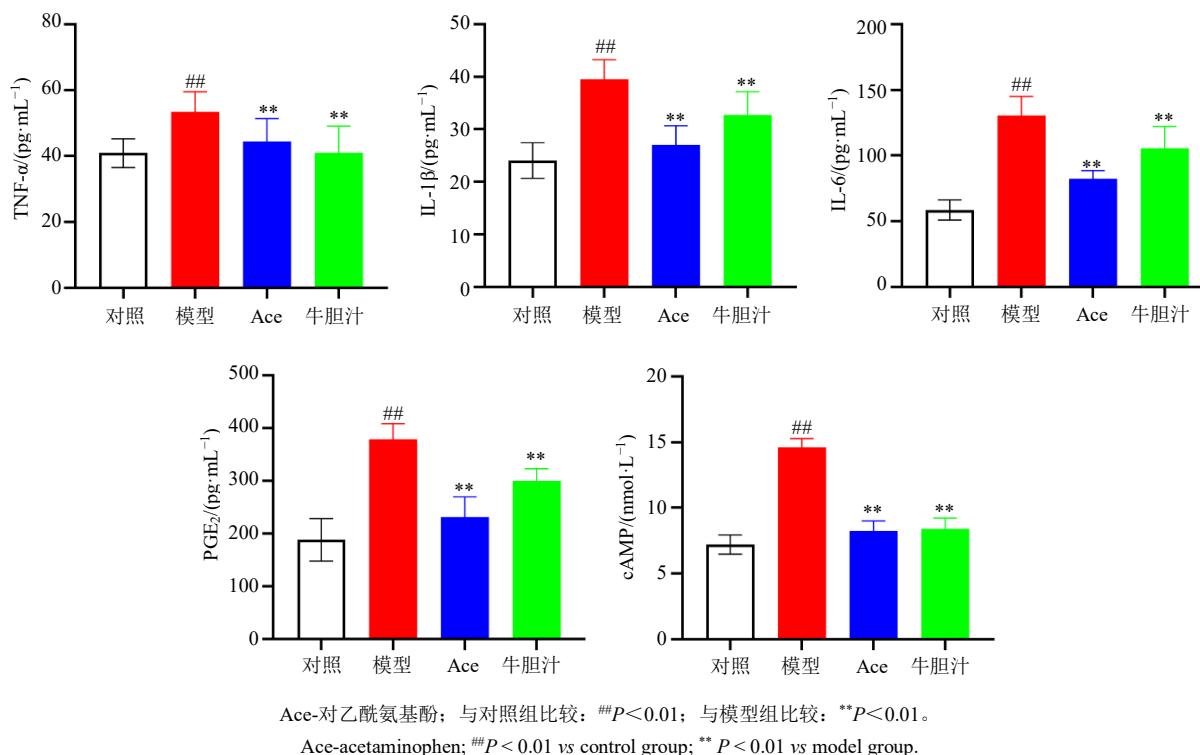


图 1 各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及下丘脑组织中 PGE₂、cAMP 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 1 Contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in serum and PGE₂, cAMP in hypothalamus of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3.4 代谢组学分析

对对照组、模型组及牛胆汁组大鼠血清、下丘脑样本进行正、负离子模式全扫描, 得到总离子流图 (图 2、3)。对照组、模型组及牛胆汁组大鼠血清、下丘脑组织的代谢谱变化信息多元统计学分析分别如图 4、5 所示, 首先采用 PCA 探索牛胆汁对发热大鼠血清及下丘脑代谢谱的影响, 如图 4-A、图 5-A 所示, 与对照组比较, 干酵母致大鼠发热后血清及下丘脑代谢谱发生了显著变化, 二者明显分离, 表明干酵母可使大鼠的血清及下丘脑代谢轮廓紊乱, 发热模型诱导成功; 给予牛胆汁干预后, 较模型组区分亦明显, 初步证明了牛胆汁可调节发热大鼠的血清及下丘脑代谢异常。进一步对正、负离子模式下血清及下丘脑代谢谱进行有监督的 OPLS-

DA 模式分析, 得到相应的 OPLS-DA 得分图, 如图 4-B、图 5-B 所示, 各组在正、负离子模式下的 R^2 、 Q^2 值如表 5 所示, 结果表明对照组与模型组、模型组与牛胆汁组样本间区分显著, 呈现出良好的分类效果。OPLS-DA 模型的置换检验结果如图 4-C、图 5-C 所示, 经 200 次置换检验后, Q^2 值均小于 0, 表明构建的 OPLS-DA 模型未过拟合, 是有效模型。

3.5 差异代谢物鉴定

根据多元统计结果, 分别筛选血清及下丘脑样本中 P 值小于 0.05 且 VIP 值大于 1 的变量作为潜在的生物标志物, 进一步结合 HMDB 数据库比对血清及下丘脑代谢物的质荷比、二级碎片离子及保留时间, 进而鉴定对照组与模型组、模型组与给药组之间变化显著的代谢物, 结果见表 6、7。通过上

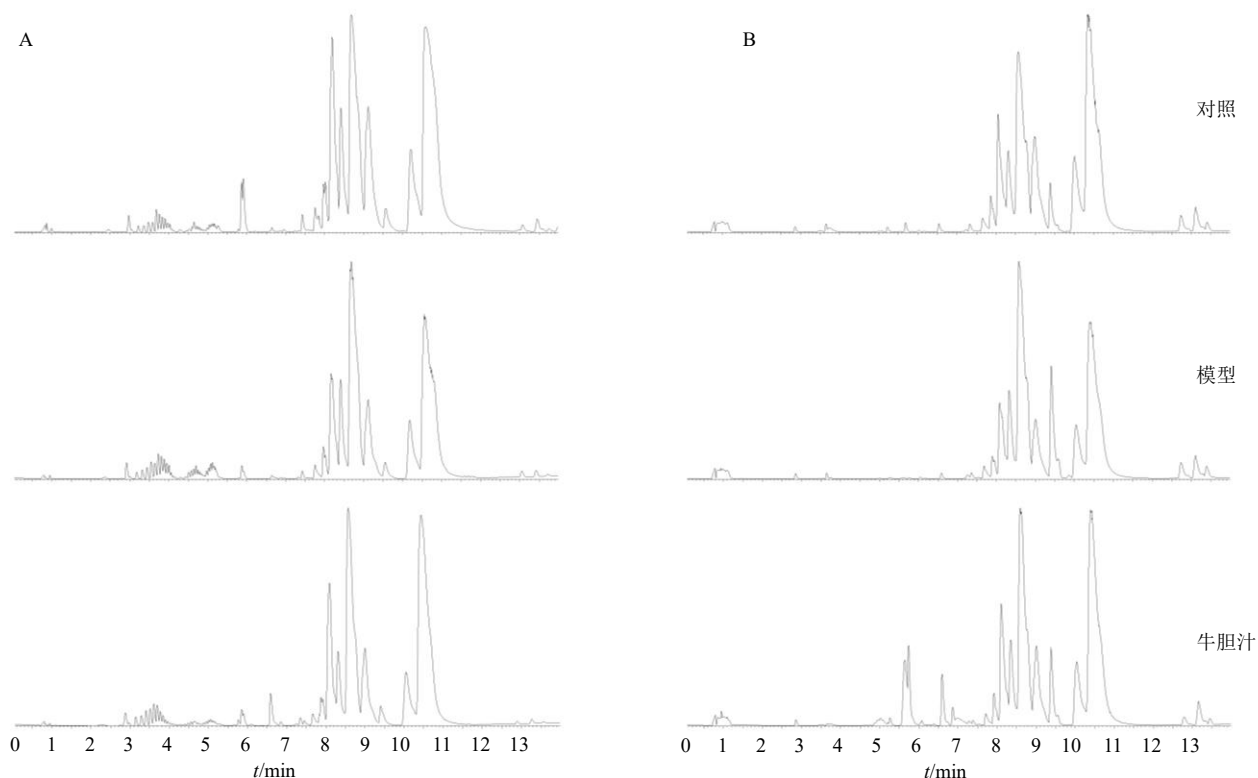


图 2 正 (A)、负 (B) 离子模式下牛胆汁影响发热大鼠血清代谢谱的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of bovine bile affecting metabolic profiling of serum in febrile rats under positive (A) and negative (B) ion modes

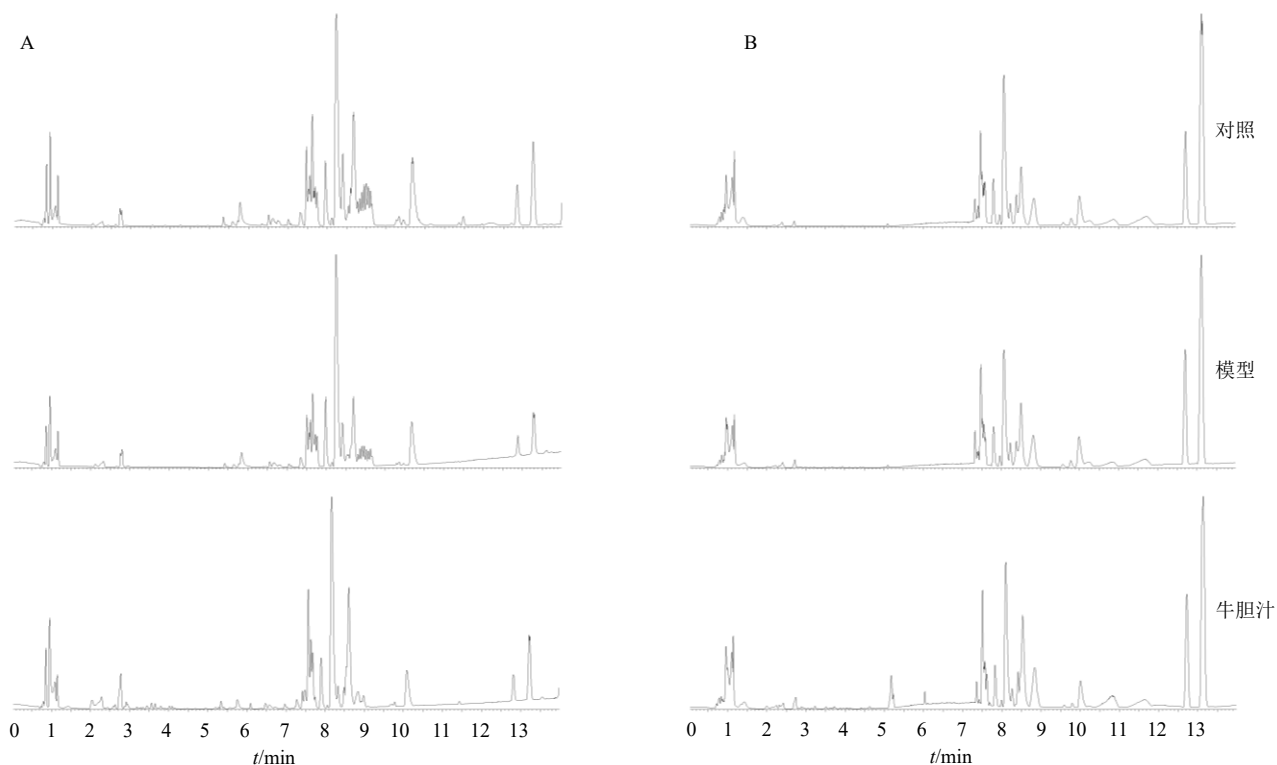


图 3 正 (A)、负 (B) 离子模式下牛胆汁影响发热大鼠下丘脑代谢谱的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms of bovine bile affecting hypothalamic metabolic profiling in febrile rats under positive (A) and negative (B) ion modes

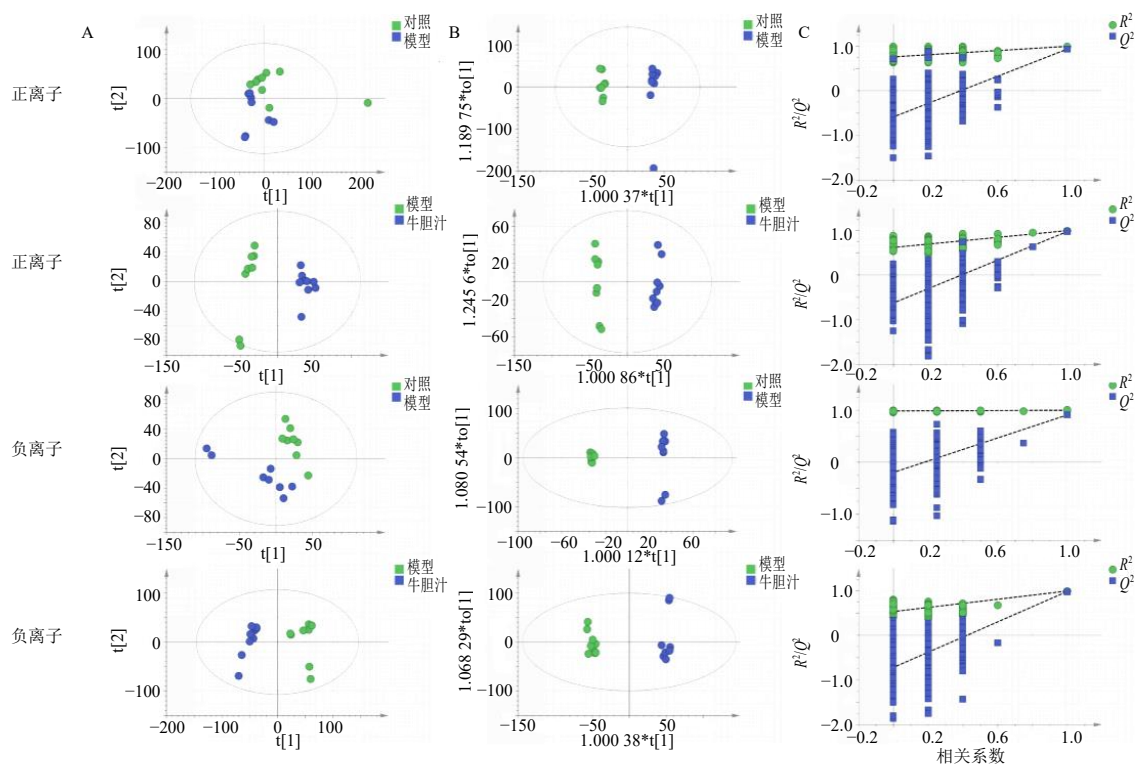


图 4 血清样本在正、负离子模式下 UPLC-QTOF-MS 数据的统计学分析
A-正、负离子模式下的 PCA 得分图; B-正、负离子模式下的 OPLS-DA 得分图; C-正、负离子模式下的 OPLS-DA 模型置换检验图, 图 5 同。
A-PCA score chart under positive and negative ion modes; B-OPLS-DA score chart under positive and negative ion modes; C-displacement test diagram of OPLS-DA model under positive and negative ion modes, same as fig. 5.

图 4 血清样本在正、负离子模式下 UPLC-QTOF-MS 数据的统计学分析

Fig. 4 Statistical analysis of UPLC-QTOF-MS data from serum samples in positive and negative ion modes

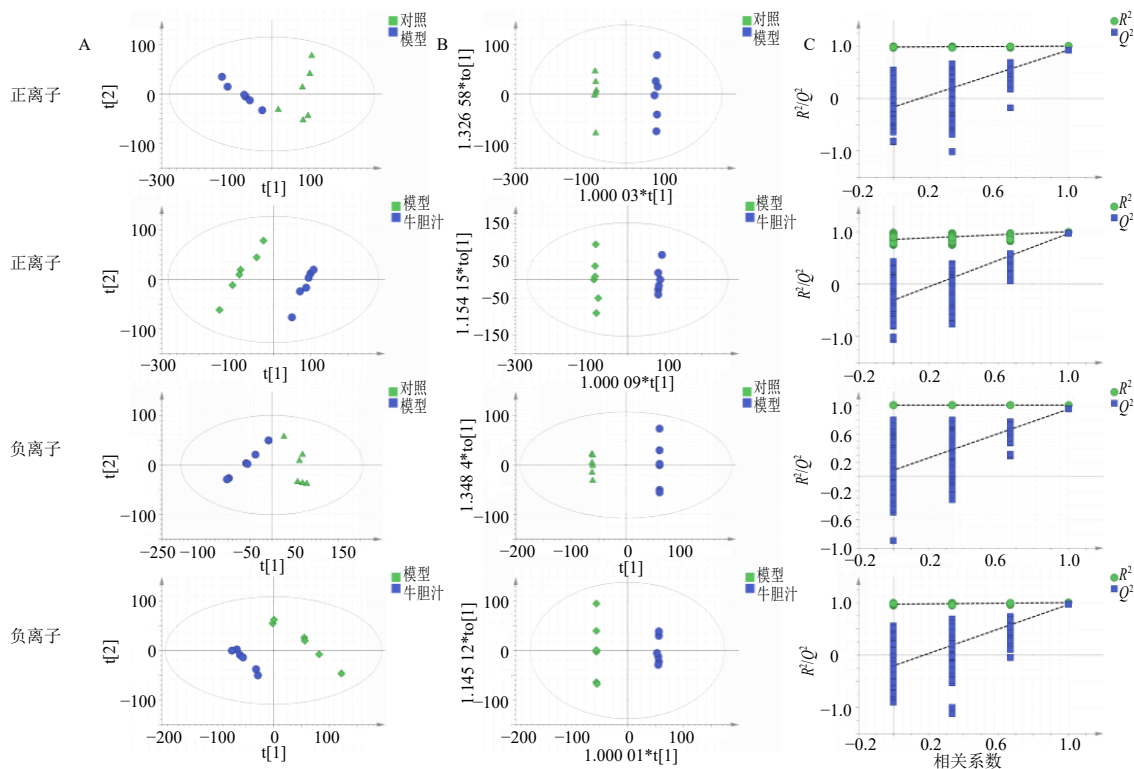


图 5 下丘脑样本在正、负离子模式下 UPLC-QTOF-MS 数据的统计学分析

Fig. 5 Statistical analysis of UPLC-QTOF-MS data from hypothalamus samples in positive and negative ion modes

表 5 OPLS-DA 模型的拟合参数
Table 5 Fitting parameters of OPLS-DA model

模式	组别	血清			下丘脑		
		R^2_X	R^2_Y	Q^2	R^2_X	R^2_Y	Q^2
正离子	对照 vs 模型	0.669	0.979	0.922	0.651	0.999	0.926
	模型 vs 牛胆汁	0.558	0.999	0.987	0.700	1.000	0.972
负离子	对照 vs 模型	0.502	0.993	0.885	0.673	0.999	0.911
	模型 vs 牛胆汁	0.496	0.999	0.978	0.664	0.999	0.964

表 6 各组大鼠血清中的内源性潜在生物标志物
Table 6 Endogenous potential biomarkers in serum of rats in each group

序号	t_R/min	m/z	化合物	分子式	离子模式	对照 vs 模型	模型 vs 牛胆汁
1	0.93	227.090 3	脱氧胞苷	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$	正离子	↓	↑
2	5.78	465.307 5	甘氨酸	$\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NO}_6$	正离子	↓	↑
3	12.14	686.536 2	tetrahydrocorticosterone	$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$	正离子	↑	↓
4	5.90	318.300 3	4-羟双氢鞘氨醇	$\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{NO}_3$	正离子	↓	↑
5	17.78	834.599 0	PC[18 : 3(9Z,12Z,15Z)/20 : 0]	$\text{C}_{46}\text{H}_{86}\text{NO}_8\text{P}$	正离子	↓	↑
6	17.82	834.597 5	PC[20 : 0/18 : 3(9Z,12Z,15Z)]	$\text{C}_{46}\text{H}_{86}\text{NO}_8\text{P}$	正离子	↓	↑
7	4.02	392.747 9	PE[18 : 4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22 : 6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	$\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{NO}_8\text{P}$	正离子	↓	↑
8	4.07	392.748 1	PE[22 : 6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)]	$\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{NO}_8\text{P}$	正离子	↓	↑
9	8.50	392.748 0	LysoPC(16 : 0)	$\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{NO}_7\text{P}$	正离子	↓	↑
10	8.13	519.331 8	LysoPC[16 : 1(9Z)/0 : 0]	$\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{NO}_7\text{P}$	正离子	↓	↑
11	7.42	494.323 8	LysoPC[18 : 2(9Z,12Z)]	$\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{NO}_7\text{P}$	正离子	↓	↑
12	8.82	546.353 9	LysoPC[20 : 3(5Z,8Z,11Z)]	$\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{NO}_7\text{P}$	正离子	↓	↑
13	9.63	508.374 6	LysoPC(P-18 : 0)	$\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{NO}_6\text{P}$	正离子	↓	↑
14	5.78	465.307 5	sodium glycocholate	$\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NO}_6$	正离子	↓	↑
15	5.23	256.060 2	N-乙酰-D-氨基葡萄糖	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$	负离子	↑	↓
16	2.28	147.046 1	丙酮酸	$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$	负离子	↑	↓
17	6.55	408.287 7	3 α ,7 β ,12 α -trihydroxy-5 α -cholanoic acid	$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$	负离子	↓	↑
18	8.11	303.233 5	花生四烯酸	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$	负离子	↓	↑
19	3.70	516.202 2	5,10-methylene-THF	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_6$	负离子	↑	↓
20	8.58	311.223 1	13-L-hydroperoxylinoleic acid	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_4$	负离子	↑	↓
21	7.92	467.301 1	LysoPC(14 : 0/0 : 0)	$\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{NO}_7\text{P}$	负离子	↓	↑
22	8.13	578.301 9	LysoPC[20 : 4(5Z,8Z,11Z,14Z)]	$\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{NO}_7\text{P}$	负离子	↓	↑
23	10.24	509.348 4	LysoPC(17 : 0)	$\text{C}_{25}\text{H}_{52}\text{NO}_7\text{P}$	负离子	↓	↑
24	11.34	297.242 8	蓖麻油酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_3$	负离子	↑	↓

“↑”表示上调，“↓”表示下调，表 7 同。

“↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation, same as table 7.

表 7 各组大鼠下丘脑中的内源性潜在生物标志物
Table 7 Endogenous potential biomarkers in hypothalamus of rats in each group

序号	t_R/min	m/z	化合物	分子式	离子模式	对照 vs 模型	模型 vs 牛胆汁
1	6.80	380.255 0	磷脂酸鞘氨醇	$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_5\text{P}$	正离子	↑	↓
2	8.10	125.000 0	γ -丁内酯	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$	正离子	↑	↓
3	8.21	163.016 1	4-methylcatechol	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	正离子	↑	↓
4	2.30	159.068 9	indoleacetaldehyde	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}$	正离子	↑	↓
5	17.84	504.342 3	LysoPC[18:1(9Z)]	$\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{NO}_7\text{P}$	正离子	↑	↓
6	5.47	346.213 0	21-脱氧皮质醇	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$	正离子	↑	↓
7	15.03	760.582 4	PC[14 : 0/20 : 1(11Z)]	$\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NO}_8\text{P}$	正离子	↑	↓
8	7.18	494.323 1	LysoPC[16 : 1(9Z)/0 : 0]	$\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{NO}_7\text{P}$	正离子	↑	↓
9	1.20	260.030 3	6-磷酸果糖	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P}$	负离子	↑	↓
10	5.26	209.081 5	L-精氨酸	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	负离子	↑	↓
11	6.17	498.298 7	牛磺去氧胆酸	$\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_6\text{S}$	负离子	-	↑
12	1.32	130.087 7	L-亮氨酸	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	负离子	↑	↓
13	10.45	310.287 3	11Z-二十烯酸	$\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$	负离子	↑	↓
14	7.50	279.233 2	9E,11E-十八碳二烯酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	负离子	↑	↓
15	10.96	490.329 6	LysoPC(17 : 0)	$\text{C}_{25}\text{H}_{52}\text{NO}_7\text{P}$	负离子	↑	↓
16	1.05	339.995 5	fructose 1,6-bisphosphate	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_{12}\text{P}_2$	负离子	↑	↓
17	3.15	376.138 2	核黄素	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$	负离子	↓	↓
18	15.46	427.179 2	法尼焦磷酸	$\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_7\text{P}_2$	负离子	↓	↓

述代谢物结构的鉴定标准,本研究从大鼠血清及下丘脑中分别鉴定出 24、18 个潜在的生物标志物,经牛胆汁干预后,发热大鼠血清及下丘脑生物标志物均被显著逆转,提示这些潜在的生物标志物对阐明牛胆汁的解热作用机制具有重要的生物功能。

3.6 代谢通路分析

将鉴定得到的血清及下丘脑中潜在的生物标志

物(对照组、模型组及牛胆汁组大鼠的共同差异标志物)导入 MetaboAnalyst 5.0 进行代谢通路富集分析,如图 6 所示,分别从血清及下丘脑中富集到 12、11 条代谢通路,主要涉及花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、糖代谢、柠檬酸循环、氨基酸代谢、鞘脂代谢、嘧啶代谢及核黄素代谢等途径,由此说明牛胆汁可通过回调上述代谢途径发挥解热的作用。

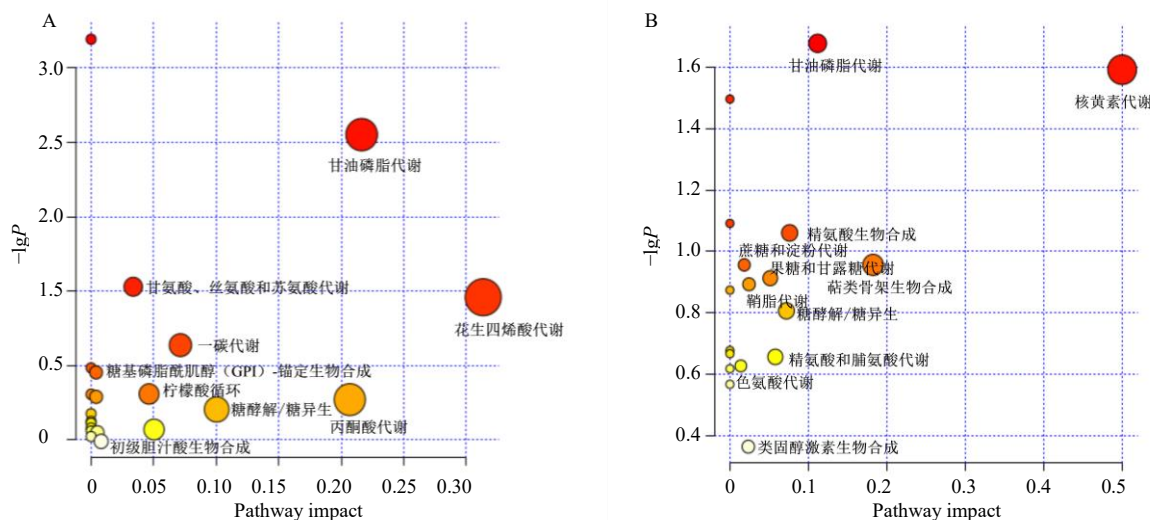


图 6 牛胆汁干预发热模型大鼠血清 (A) 和下丘脑组织 (B) 中的差异代谢物通路分析

Fig. 6 Analysis of differential metabolite pathways in serum (A) and hypothalamus tissue (B) of febrile model rats treated with bovine bile intervention

4 讨论

根据中医临床用药经验,牛胆汁常被用于治疗咽炎、气管炎、黄疸等,亦是蒙医常用的蒙药材之一。此外,牛胆汁被用作炮制天南星的辅料,其应用历史可追溯到 2 000 多年前,牛胆汁的加入不仅使天南星的药性由温变凉,而且较天南星善解风痰热滞。然而,经过前期考察发现,市售的胆南星品种多由猪胆汁炮制而来,鲜有牛胆汁发酵的品种,实验室前期的研究结果发现,牛胆汁发酵的胆南星具有显著的抗高热惊厥作用,其效果优于市售猪胆汁胆南星^[10]。为此,本研究选择牛胆汁和猪胆汁作为研究对象,比较了二者解热作用的差异。首先,建立了稳定性、重复性良好的基于液质联用技术的含量测定方法对牛胆汁中的胆汁酸类成分及其含量进行了初步探索,结果表明,牛胆汁中的牛磺酸结合型胆汁酸占有较大的比例,而游离型胆汁酸如胆酸、去氧胆酸及鹅去氧胆酸的含量相对较低,这一结果及含量测定方法为课题组后续进行牛胆汁相关炮制品的研究打下了良好的基础。

经过文献考察发现,常用于制备发热大鼠模型的诱导剂有干酵母、2,4-二硝基苯酚及脂多糖^[18],然而,2,4-二硝基苯酚制备发热模型虽然升温快、但是其持续时间较短,且购买较困难,脂多糖常常诱导为双相或三相发热,相比之下,干酵母诱导的发热模型更加稳定、热程长、重复性良好^[19-21],最终本研究选择干酵母作为诱导剂复制大鼠发热模型。结果发现,大鼠经过背部 sc 干酵母混悬液后,于第 4 小时开始肛温显著上升,给予牛胆汁干预后,大鼠在 4~8 h 的肛温均显著低于模型组,而给予猪胆汁干预后,大鼠仅仅在第 5 小时的肛温显著低于模型组,且牛胆汁组大鼠的肛温显著低于猪胆汁组,这表明牛胆汁相对于猪胆汁在发挥解热作用方面具有起效快、作用持久的优点,因此本研究重点探索了牛胆汁的解热作用机制。

sc 干酵母混悬液可刺激大鼠产生内热原(包括 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6)进入血液,并通过中枢发热介质(PGE_2 、cAMP)作用于体温调节中枢,从而使大鼠体温升高,机体产热^[22]。因此本研究采用 ELISA

法检测大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及下丘脑中 PGE₂、cAMP 的含量作为解热作用的生化标志物,以进行药效学评价。结果显示,采用干酵母混悬液造模后,大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的含量显著增加,同时下丘脑中 PGE₂、cAMP 的含量也显著增加,而经过牛胆汁干预后,上述炎症因子及发热介质的含量均有不同程度的下降,表明牛胆汁可通过抑制中枢发热介质及外周致热因子而达到解热的效果。

为进一步探索牛胆汁发挥解热作用的内在效应机制,本研究采用 UPLC-QTOF-MS/MS 技术展开了血清及下丘脑代谢组学研究。结果显示,牛胆汁主要以调节血清及下丘脑中的脂质代谢为主,据文献报道,炎症的发生可导致机体的脂质代谢发生紊乱,而脂质代谢的失衡亦可诱发炎症。磷脂酰胆碱(phosphatidyl cholines, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)作为细胞膜中含量最丰富的磷脂,其含量的变化能够反映机体在疾病状态下脂质代谢紊乱的情况,当合成增加时易诱发机体产生炎症反应^[23-24]。细胞膜中的磷脂类成分可产生花生四烯酸,在环氧化酶 2(cyclooxygenase 2, COX2)的进一步作用下产生内源性致热因子 PGE₂,鞘脂类代谢物能够促进 TNF- α 的合成,从而致使机体发热,诱发炎症反应^[25-26],因此,甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢及鞘脂代谢在发热过程中起到了重要作用,调节其代谢紊乱可有效发挥解热作用。本研究中,采用干酵母诱导大鼠发热后,PC、PE 类脂质的含量在血清中显著下降,而在下丘脑中的含量显著上升,这表明机体发热后,体内的脂质代谢水平明显紊乱,也意味着机体发生了明显的炎症反应。然而,脂质类成分的变化趋势在血清及下丘脑组织中表现出相反的趋势,这是由于该类脂质易通过血脑屏障导致,与相关文献报道^[11,15,27]的变化趋势一致。牛胆汁干预可显著回调血清及下丘脑中该类脂质的变化趋势,通路分析结果显示,牛胆汁主要影响甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、鞘脂代谢等脂质代谢相关通路,提示牛胆汁可通过调节机体脂质代谢的紊乱抑制炎症反应,进而产生解热效应。

本研究发现,牛胆汁干预较猪胆汁对于酵母导致的发热大鼠具有更好的解热效果,基于 UPLC-QTOF-MS/MS 的代谢组学研究发现牛胆汁主要通过调节脂质代谢,抑制炎症反应而发挥解热作用,此外还可能与氨基酸代谢、糖代谢等相关,说明牛

胆汁解热具有多靶点、多通路协同发挥作用的特点。本研究首次探索了牛胆汁的解热作用机制,为发掘、利用其解热作用提供了重要的实验依据,同时也为阐明牛胆汁作为炮制辅料的炮制目的及合理化应用提供了一定的指导意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 裴育莹. 牛胆汁发酵后有效成分变化及治疗缺血性中风作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.
- [2] 陈江宁. 胆南星原辅料优选及发酵工艺研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2017.
- [3] Begley M, Gahan C G M, Hill C. The interaction between bacteria and bile [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(4): 625-651.
- [4] 齐晓慧, 那生桑. 蒙成药乌力吉-18 的临床应用概况 [J]. 中国民族医药杂志, 1998, 4(3): 48-49.
- [5] 石岩. 胆汁类药材化学成分分析及质量控制方法研究 [D]. 辽宁: 沈阳药科大学, 2016.
- [6] 山东省中药材标准 [S]. 2002: 29-31.
- [7] 中华人民共和国卫生部药品标准维药分册 [S]. 1999: 15.
- [8] 马重阳. 基于网络药理学研究精制清开灵注射液抗缺血性脑卒中的作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [9] 崔亚晨, 单丽倩, 单国顺, 等. 猪牛羊胆汁及其制成的胆南星药效作用对比研究 [J]. 中药材, 2021, 44(3): 586-592.
- [10] Su F Z, Bai C X, Luo Y M, et al. Cattle bile *Arisaema* aqueous extracts protect against febrile seizures in rats through regulating neurotransmitters and suppressing neuroinflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 889055.
- [11] 孙岭, 沈存思, 廖颖钊, 等. 基于脑代谢组学研究羚珠散联合对乙酰氨基酚对发热幼龄大鼠的解热作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(5): 409-418.
- [12] 杨忻. 黄芩解热药效物质基础及其解热机制的实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2009.
- [13] 立新, 奥·乌力吉, 那仁满都拉. 基于血浆代谢组学的蒙药三臣小儿退热贴膏解热作用机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5581-5588.
- [14] 赵晶晶, 武文星, 朱昭颖, 等. 牦牛角对 LPS 诱导发热大鼠模型的解热活性评价及机制研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(10): 936-944.
- [15] Xie F F, Xu L B, Zhu H, et al. The potential antipyretic mechanism of ellagic acid with brain metabolomics using rats with yeast-induced fever [J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2465.

- [16] 黄德华, 王力文, 宫文霞, 等. 基于血浆代谢组学和网络分析研究柴归颗粒的抗抑郁作用机制 [J]. 药理学报, 2022, 57(5): 1420-1428.
- [17] Kwan K K L, Wong T Y, Wu Q Y, *et al.* Mass spectrometry-based multi-omics analysis reveals the thermogenetic regulation of herbal medicine in rat model of yeast-induced fever [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114382.
- [18] Trongsakul S, Panthong A, Kanjanapothi D, *et al.* The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 85(2/3): 221-225.
- [19] 张洪铭, 郭文军, 孙英莲, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 代谢组学技术的清肺化痰颗粒对发热大鼠的调控作用研究 [J]. 特产研究, 2022, 44(3): 51-57.
- [20] Zhang F S, Wang D Q, Li X W, *et al.* Metabolomic study of the fever model induced by baker's yeast and the antipyretic effects of aspirin in rats using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 81/82: 168-177.
- [21] Lennie T A, Hirvonen M D, McCarthy D O, *et al.* Fever and the acute elevation in whole-body thermogenesis induced by lateral hypothalamic lesions [J]. *Physiol Behav*, 1995, 58(2): 237-243.
- [22] Leon L R. Invited review: Cytokine regulation of fever: Studies using gene knockout mice [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92(6): 2648-2655.
- [23] van der Veen J N, Kennelly J P, Wan S, *et al.* The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859(9 Pt B): 1558-1572.
- [24] Wang X L, Xu Y Y, Song X, *et al.* Analysis of glycerophospholipid metabolism after exposure to PCB153 in PC12 cells through targeted lipidomics by UHPLC-MS/MS [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 169: 120-127.
- [25] Zhang X, Wang Y, Li S J, *et al.* The potential antipyretic mechanism of *Gardeniae Fructus* and its heat-processed products with plasma metabolomics using rats with yeast-induced fever [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 491.
- [26] Kolesnick R, Golde D W. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling [J]. *Cell*, 1994, 77(3): 325-328.
- [27] Qin L, Zhang Z, Guo M, *et al.* Plasma metabolomics combined with lipidomics profiling reveals the potential antipyretic mechanisms of Qingkailing Injection in a rat model [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 254: 24-33.

[责任编辑 李亚楠]