

基于方证代谢组学的茵陈蒿汤治疗阳黄证的临床疗效及药效物质基础研究

孔 玲¹, 宋 琦², 孙 晖^{1*}, 张 宁¹, 闫广利¹, 方 衡¹, 王喜军^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心, 黑龙江哈尔滨 150040

2. 河北大学, 河北 保定 071000

摘要: 目的 评价茵陈蒿汤(Yinchenhao Decoction, YCHD)治疗阳黄证的临床疗效, 发现药效物质基础。方法 基于方证代谢组学方法, 揭示临床阳黄证的代谢轮廓及生物标记物, 评价 YCHD 治疗阳黄证的临床疗效; 在显效状态下, 利用中药血清药物化学技术探究 YCHD 体内成分, 与效应标记物进行相关性分析, 确定药效物质基础。结果 鉴定了阳黄证 34 个尿液生物标记物, 其中 24 个生物标记物在 YCHD 治疗后回调; 鉴定了显效状态下 26 个血中移行成分, 其中 3 个成分为 YCHD 治疗阳黄证的药效物质基础。结论 YCHD 通过下调苯丙酮酸、苯乙酸影响苯丙氨酸代谢通路治疗阳黄证, 其药效物质基础为 5-脱羟基-6-去甲氧基茵陈色原酮、蕨内酰胺及大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷。

关键词: 茵陈蒿汤; 阳黄证; 方证代谢组学; 药效物质基础; 5-脱羟基-6-去甲氧基茵陈色原酮; 蕨内酰胺; 大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 苯丙氨酸代谢通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)08-2649-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.08.003

Clinical efficacy and effective substance of Yinchenhao Decoction in treatment of Yanghuang syndrome based on chinmedomics

KONG Ling¹, SONG Qi², SUN Hui¹, ZHANG Ning¹, YAN Guangli¹, FANG Heng¹, WANG Xijun¹

1. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Chinmedomics Research Center of National Administration of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Hebei University, Baoding 071000, China

Abstract: Objective To evaluate the clinical efficacy of Yinchenhao Decoction (YCHD) in treating Yanghuang syndrome (YHS) and to discover the effective substance. **Methods** Chinmedomics reveals the metabolic profile and biomarkers of clinical YHS, and evaluates the clinical efficacy of YCHD in treating YHS. Under the condition of efficacy, the serum pharmacochimistry of traditional Chinese medicine was utilized to explore the components of YCHD *in vivo*, and a correlation analysis was conducted with the effect biomarkers to determine the effective substance. **Results** A total of 34 urinary biomarkers were identified in YHS, of which 24 biomarkers were adjusted after treatment with YCHD, the 26 constituents absorbed into blood were identified under the condition of efficacy, of which three constituents were analyzed as the effective substance of YCHD in treating YHS. **Conclusion** YCHD can affect phenylalanine metabolic pathway by down regulating phenylpyruvic acid and phenylacetic acid in the treatment of YHS. Its effective substances are 5-dehydroxy-6-demethylcapillarisin, pterolactam, and rhein-8-*O*- β -D-glucopyranoside.

Key words: Yinchenhao Decoction; Yanghuang syndrome; chinmedomics; effective substance; 5-dehydroxy-6-demethylcapillarisin; pterolactam; rhein-8-*O*- β -D-glucopyranoside; phenylalanine metabolic pathway

黄疸是以目黄、身黄、小便黄为主症的一种病证, 其中尤以目睛黄染为主要特征, 常伴见腹胀、纳呆、呕恶、乏力等症状。黄疸有阳黄、阴黄、急黄之不同, 其中阳黄以湿热为主^[1]。元代罗天益所

收稿日期: 2024-12-29

基金项目: 黑龙江省中医药管理局青年中医药科研课题(ZHY2023-211); 黑龙江中医药大学校科研基金项目(2024XJJ-QNCX007); 国家自然科学基金青年项目(82204798)

作者简介: 孔 玲, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: 15244624557@163.com

*通信作者: 王喜军, 博士, 教授, 研究方向为中药血清药物化学及方证代谢组学。E-mail: xijunw@sina.com

孙 晖, 博士, 教授, 研究方向为中药体内直接作用物质及中药质量标准研究。E-mail: sunhui7045@163.com

著《卫生宝鉴·发黄》中系统论述了阳黄与阴黄的辨治。《伤寒论·辨阳明病脉证并治》中首载了阳黄的辨证, 症状及方药: “阳明病, ……但头汗出, 身无汗, 剂颈而还, 小便不利, 渴引水浆者, 此为瘀热在里, 身必发黄, 茵陈蒿汤主之” “伤寒七八日, 身黄如橘子色, 小便不利, 腹微满者, 茵陈蒿汤主之”。茵陈蒿汤 (Yinchenhao Decoction, YCHD) 首见汉代张仲景《伤寒杂病论》, 由茵陈蒿、栀子、大黄组成, 具有清热、利湿、退黄之功效, 是中医临床治疗阳黄的经典传统方剂。YCHD 可治疗急性肝损伤^[2]、慢性乙型肝炎^[3]、自身免疫性肝炎^[4]、梗阻性黄疸^[5]、肝细胞癌^[6]、非酒精性脂肪肝^[7-8]、淤胆型肝炎^[9]、胆石症^[10]等肝病, 具有保肝利胆的作用。YCHD 临床上治疗阳黄证 (Yanghuang syndrome) 疗效显著, 但其药效物质基础尚未完全明确。

方证代谢组学整合了系统生物学与中药血清药物化学的理论及技术, 形成了鉴定病证生物标记物, 建立方剂有效性评价体系, 发现药效物质基础的应用科学^[11-15]。本研究基于方证代谢组学方法, 以临床阳黄证尿液代谢物探寻阳黄证实质, 表征阳黄证的代谢轮廓及生物标记物, 分析生物标志物的功能、代谢途径; 以代谢轮廓及生物标记物为参数评价 YCHD 的整体疗效; 关联分析阳黄证生物标记物与 YCHD 体内显效成分, 发现药效物质基础, 为 YCHD 的现代化研究和临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 研究对象

选取 2016—2018 年黑龙江中医药大学附属第一医院收治的阳黄证患者 110 例以及招募健康受试者 110 例。健康受试者男性 69 例, 女性 41 例, 年龄 25~80 岁, 平均 (48.1±9.2) 岁, 平均身体质量指数 (23.3±8.7) kg/m²; 阳黄证患者男性 94 例, 女性 16 例, 年龄 25~80 岁, 平均 (53.5±11.3) 岁, 平均身体质量指数 (20.8±9.2) kg/m²。二者上述基线资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。阳黄证纳入标准参照《黄疸诊疗指南》^[1]。诊断要点为主证目睛黄染, 身黄与尿黄, 可伴有恶寒发热, 或食欲不振、胃脘胀闷, 或右上腹或右肋胀痛等类似感冒、胃脘痛或胁痛的症状。理化检查血清肝功能: 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素 (total bilirubin,

TBIL)、间接胆红素 (indirect bilirubin, IBIL)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 与 γ -谷氨酰氨基转移酶 (glutamyl transferase, GGT) 等。中医证候: 面目发黄, 继之全身黄染, 颜色鲜明, 黄色如橘子色。湿重者, 头身困重, 大便溏薄, 腹胀脘闷, 口淡不渴, 苔薄白或白腻, 脉濡数; 热重者, 发热, 烦渴, 尿少, 便结, 苔黄腻, 脉弦数。排除妊娠妇女、哺乳期妇女、肾或造血系统等严重原发性疾病、精神病、正在参加其他药物试验者。

本研究最初获得黑龙江中医药大学附属第一医院伦理委员会批准 (批件号 HZYLLKYDX201600101), 批准范围为样本采集及非干预性数据收集。研究过程中, 为验证茵陈蒿汤有效性的相关临床研究, 额外实施了口服茵陈蒿汤, 150 mL/次、2 次/d, 连续治疗 2 周。该干预措施未包含在初始伦理申请中, 且未获得伦理委员会的事前批准。所有参与者均签署了知情同意书, 内容明确涵盖上述干预措施的风险与替代方案。

1.2 药品与试剂

药材饮片绵茵陈、栀子、大黄由黑龙江中医药大学第一附属医院提供, 经黑龙江中医药大学王喜军教授鉴定, 绵茵陈为菊科植物茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 的干燥地上部分、栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实、大黄为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎。

质谱级甲醇 (批号 191760)、乙腈 (批号 194036) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 甲酸 (批号 D1502086) 购自天津科密欧化学试剂有限公司; 磷酸 (批号 L704053) 购自阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.3 仪器

Oasis HLB 型固相萃取小柱、AcquityTM UPLC 超高效液相色谱系统、SYNAPT-G2/Si-HDMS 高分辨四极杆飞行时间质谱系统 (美国 Waters 公司); 3-18K 通用型台式高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); UNIQUE-R20 型多功能超纯水系统 (厦门锐思捷水纯化技术有限公司); BTP-3ES00X 型冷冻干燥机 (美国 SP Scientific 公司); XSE105 Dual Range 型分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); Labospect 008 α 全自动生化分析仪 (日立诊

断产品(上海)有限公司)。

2 方法

2.1 治疗方法、疗效评价标准及观察指标

本研究健康受试者 110 例、阳黄证患者 110 例,另设 YCHD 组(阳黄证患者中有 16 例口服 YCHD 治疗,150 mL/次、2 次/d,连续治疗 2 周)。YCHD 由黑龙江中医药大学附属第一医院熬制包装。疗效评价参照《黄疸中医诊疗指南》^[1]拟定疗效评价标准。显效:黄疸症状及体征消失,血清肝功能指标恢复正常;有效:黄疸症状及体征明显好转,血清肝功能指标下降;无效:黄疸症状及体征无明显改善,血清肝功能指标未下降或持续上升。治疗期间通过每天访视主动监测不良事件,采用不良事件常用术语标准(CTCAE)第 4.0 版评定不良事件的强度级别。分别于口服 YCHD 前及末次口服 YCHD 后 30 min 抽取患者空腹静脉血 5 mL,采用全自动生化分析仪检测 ALT、AST、TBIL、IBIL、DBIL、ALP、GGT 水平。

2.2 样品制备

2.2.1 代谢组学样品制备 收集尿液样本,4 ℃、13 000 r/min 离心 10 min,取上清液冻存于-80 ℃。仪器采集前将尿液样本解冻,4 ℃、13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,与蒸馏水 1:3 涡旋 30 s,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 YCHD 成分分析样品的制备 取绵茵陈饮片 18 g,置于 1 400 mL 水中浸泡 30 min,武火煎煮至 700 mL,分别加入栀子饮片 9 g 和大黄饮片 6 g,再保持沸腾煎煮 10 min,煎煮液经 6 层纱布滤过,浓缩,冷冻干燥制成 YCHD 冻干粉(出粉率 21.82%)。取 YCHD 冻干粉约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W、频率 20 kHz),放冷,再次称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。通过含量测定对 YCHD 冻干粉进行质量控制,结果显示,绿原酸质量分数为 0.39 μg/g。

2.2.3 YCHD 血中移行成分分析样品制备 取经 YCHD 治疗前后的患者血清样本各 200 μL,加入 4%磷酸溶液 200 μL,涡旋 30 s,混匀,取 400 μL 溶液上样至固相萃取柱(柱子经 1 mL 甲醇和 1 mL 水活化平衡),用 1 mL 水淋洗,弃去淋洗液,再以 1 mL 甲醇进行洗脱,收集洗脱液并于氮气下吹干,残渣用 100 μL 甲醇复溶,超声处理 1 min,涡旋混匀 30 s 后,4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min,

上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 UPLC-MS 分析条件

2.3.1 代谢组学样品分析条件

(1) 色谱条件:采用 Waters Acquity™ UPLC HSS T₃ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为 0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B);梯度洗脱程序为 0~5.0 min, 1%~25% A; 5.0~9.0 min, 25%~50% A; 9.0~9.1 min, 50%~99% A; 9.1~11.0 min, 99% A; 体积流量 0.4 mL/min;柱温 40 ℃;进样体积 3 μL;色谱仪流出液不经分流直接注入质谱仪进行正、负离子模式扫描分析。

(2) 质谱条件:正、负离子电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI);毛细管电压 3 kV;样品锥孔电压分别为 25 V (ESI⁺)、20 V (ESI⁻);锥孔提取电压 5.0 V;脱溶剂气温度 450 ℃;离子源温度 110 ℃;锥孔气流量 50 L/h;脱溶剂气流量分别为 500 L/h (ESI⁺)、700 L/h (ESI⁻);质量扫描范围 *m/z* 50~1 000。

2.3.2 YCHD 体外及血中移行成分分析条件

(1) 色谱条件:梯度洗脱程序为 0~1.0 min, 1% A; 1.0~1.5 min, 1%~3% A; 1.5~13.5 min, 3%~32% A; 13.5~18.5 min, 32%~60% A;柱温 45 ℃;其余同“2.3.1 (1)”项下方法。

(2) 质谱条件:ESI⁺、ESI⁻;毛细管电压分别为 3 kV (ESI⁺)、2.5 kV (ESI⁻);样品锥孔电压 30 V;锥孔提取电压 5.0 V;脱溶剂气温度 350 ℃;离子源温度 110 ℃;锥孔气流量 50 L/h;脱溶剂气流量 800 L/h;质量扫描范围 *m/z* 50~1 200。

2.4 数据处理

2.4.1 统计学分析 数据采用 SPSS 17.0 软件处理,统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 Bonferroni 检验。

2.4.2 代谢组学分析 将采集的质谱数据导入 Progenesis QI 软件,进行峰匹配、对齐、提取、标准化处理及数据降维。再利用 EZinfo 2.0 软件对降维的数据进行非监督的主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA),以 2 组间表达存在显著性差异($P < 0.05$)且变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) > 3 的代谢物作为候选离子。结合精确相对分子质量、二级碎片、人类代谢组数据库(Human Metabolome Database,

HMDB)、ChemSpider、Metlin 数据库对代谢物表征。应用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库及 Metaboanalyst 3.0 软件发现关键代谢通路。

2.4.3 YCHD 体外及血中移行成分分析 采集得到的 YCHD 一级质谱数据导入 Progenesis QI 软件, 进行峰匹配、对齐、提取, 得到保留时间、质量数、峰强度的矩阵数据。将二级质谱数据与网络数据库进行匹配分析, 表征化合物结构。筛选在给药前没有而在给药后峰强度高的离子作为 YCHD 血中移行成分, 通过与对照品的比对, 最终获得入血成分信息。

2.4.4 相关性分析 YCHD 入血成分以及效应标记物进行数据标准化后, 导入中药血清中移行成分与病证生物标记物相关性研究软件 (plotting of correlation between marker metabolites and serum constituents, PCMS), 设定相关系数 r_1 为 0.55,

r_2 为 0.6, 即 $0.55 < |r| \leq 0.6$ 呈高度相关, $0.6 < |r| \leq 1$ 呈极度相关, 筛选 YCHD 治疗阳黄证的潜在药效物质基础。

3 结果

3.1 YCHD 治疗阳黄证疗效评价

采用 YCHD 治疗 2 周后, 阳黄证患者身目俱黄、黄色鲜明、心中懊恼、发热口渴、小便短黄、脘腹胀满、恶心呕吐、纳呆少食、大便秘结、舌质红、舌苔黄腻、脉弦滑数等症状、体征消失或明显改善。与健康受试者比较, 阳黄证患者 TBIL、DBIL、IBIL、ALT、AST、GGT、ALP 含量显著升高 ($P < 0.01$); YCHD 治疗后, IBIL、TBIL、DBIL、ALT、AST 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), GGT、ALP 呈降低趋势 (表 1), 表明 YCHD 治疗阳黄证具有较好的疗效。在全部给药受试者中, 未观察到任何与干预相关的不良事件 (包括严重不良事件)。

表 1 肝功能主要指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on main indicators of liver function ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/例	TBIL/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	DBIL/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	IBIL/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ALT/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	AST/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	GGT/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	ALP/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
健康	110	14.7 $\pm$ 5.2	5.5 $\pm$ 1.9	9.2 $\pm$ 4.5	27.6 $\pm$ 11.6	23.2 $\pm$ 12.3	39.0 $\pm$ 17.4	120.5 $\pm$ 56.4
阳黄证	110	144.9 $\pm$ 96.0**	102.7 $\pm$ 71.6**	42.2 $\pm$ 25.3**	369.9 $\pm$ 358.2**	320.1 $\pm$ 307.6**	324.8 $\pm$ 300.0**	203.9 $\pm$ 140.3**
YCHD	16	71.7 $\pm$ 59.1 [#]	50.9 $\pm$ 47.9 [#]	20.8 $\pm$ 12.2 ^{##}	107.9 $\pm$ 130.9 [#]	85.6 $\pm$ 113.4 [#]	220.0 $\pm$ 276.1	145.2 $\pm$ 97.6

与健康受试者比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与阳黄证组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs healthy subjects; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs YHS group.

3.2 YCHD 对阳黄证患者代谢轮廓及生物标记物的影响

如图 1 所示, 阳黄证患者尿液代谢轮廓与健康受试者明显分离, 而经 YCHD 治疗后, 尿液代谢轮廓趋近于健康受试者, 表明 YCHD 调节阳黄证患者的异常代谢, 使其趋近于健康受试者代谢轮廓, 对

阳黄证有治疗作用。基于 UPLC-MS 技术的代谢组学分析表征了 34 个阳黄证尿液生物标记物, 其中 23 个生物标记物在阳黄证患者水平升高, 11 个生物标记物在阳黄证患者水平降低。经 YCHD 治疗后, 24 个生物标记物发生回调, 其中 11 个生物标记物存在显著差异 (表 2、图 2)。

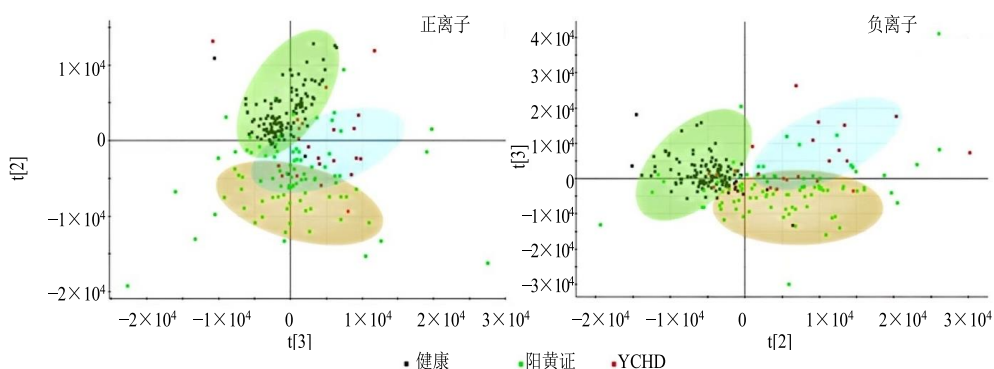


图 1 YCHD 治疗阳黄证各组尿液 PCA 得分

Fig. 1 Urine PCA score plot of YCHD in treatment of YHS in each group

表 2 YCHD 治疗阳黄证尿液生物标记物信息
Table 2 Information on urine biomarkers of YCHD in treatment of YHS

序号	离子模式	t _R /min	生物标记物	m/z	分子式	误差 (×10 ⁻⁶)	阳黄证 vs 健康	YCHD vs 阳黄证	主要通路
1	负离子	0.59	D-葡萄糖醛酸	193.034 2	C ₆ H ₁₀ O ₇	-6.2	↑	↓	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化
2	正离子	0.62	N-甲基烟酰胺	137.070 9	C ₇ H ₈ N ₂ O	-0.4	↑	↓	—
3	负离子	0.80	糠酸	111.008 0	C ₅ H ₄ O ₃	-6.8	↑	↓	—
4	负离子	0.80	柠檬酸	191.019 0	C ₆ H ₈ O ₇	-3.7	↑	↓	—
5	负离子	1.37	L-甘油酸	151.025 6	C ₃ H ₆ O ₄	7.2	↑	↓	—
6	负离子	1.45	3-羟基马尿酸	240.050 5	C ₉ H ₉ NO ₄	-4.2	↑	↓	—
7	正离子	2.22	胆色素原	227.102 7	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄	0.3	↓	↑	卟啉和叶绿素代谢
8	负离子	2.75	苯丙酮酸	163.038 5	C ₉ H ₈ O ₃	-9.5	↑	↓	苯丙氨酸代谢
9	负离子	2.75	苯乙酸	181.049 8	C ₈ H ₈ O ₂	-8.0	↑	↓	苯丙氨酸代谢
10	负离子	2.81	马尿酸	178.052 6	C ₉ H ₉ NO ₃	8.9	↑	↓	苯丙氨酸代谢
11	负离子	3.58	5'-(3',4'-二羟基苯基)-γ-戊内酯 硫酸盐	287.022 3	C ₁₁ H ₁₂ O ₇ S	-2.9	↓	↑	—
12	正离子	4.11	鹅去氧胆酸硫酸盐	495.237 4	C ₂₄ H ₄₀ O ₇ S	-2.7	↑	↑	—
13	正离子	5.97	异戊酰丙氨酸	347.220 9	C ₈ H ₁₅ NO ₃	9.3	↓	↓	—
14	负离子	5.99	四氢醛酮-3-葡萄糖醛酸	539.248 9	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₁	-1.7	↓	↓	—
15	正离子	6.15	L-尿胆素	595.343 5	C ₃₃ H ₄₆ N ₄ O ₆	-9.2	↑	↑	卟啉和叶绿素代谢
16	负离子	6.16	D-尿胆素原	589.301 7	C ₃₃ H ₄₂ N ₄ O ₆	-2.5	↑	↑	卟啉和叶绿素代谢
17	正离子	6.16	D-尿胆素	589.302 7	C ₃₃ H ₄₀ N ₄ O ₆	1.0	↑	↑	卟啉和叶绿素代谢
18	负离子	6.19	皮甾酮四醇-3-葡萄糖苷酸	541.264 2	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₁	-2.3	↓	↑	—
19	负离子	6.53	11-β-羟基雄甾酮-3-葡萄糖苷酸	481.242 1	C ₂₅ H ₃₈ O ₉	-4.4	↓	↑	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化
20	负离子	6.59	牛磺胆酸	514.280 7	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	-7.1	↑	↓	—
21	负离子	6.79	11-氧代-雄甾酮葡萄糖苷酸	479.226 5	C ₂₅ H ₃₆ O ₉	-4.4	↓	↑	—
22	负离子	6.85	N-[(3a,5b,7a,12a)-3,7-二羟基- 24-氧代-12-(磺氧基)胆烷-24- 基]-甘氨酸	544.258 4	C ₂₆ H ₄₃ NO ₉ S	-0.3	↑	↓	—
23	负离子	6.97	甘氨酸鹅去氧胆酸 3-葡萄糖醛酸	624.338 0	C ₃₂ H ₅₁ NO ₁₁	-1.5	↑	↑	—
24	负离子	7.44	胆酸葡萄糖苷酸	583.310 7	C ₃₀ H ₄₈ O ₁₁	-2.9	↑	↓	—
25	正离子	7.48	biotripyrin-b	466.197 5	C ₂₅ H ₂₇ N ₃ O ₆	0.5	↑	↑	—
26	负离子	7.81	鹅去氧胆酸	448.305 7	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	-2.5	↑	↓	—
27	负离子	8.09	甘胆酸钠	464.298 7	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	-6.5	↑	↓	—
28	负离子	8.16	雄甾酮葡萄糖醛酸	465.251 1	C ₂₅ H ₃₈ O ₈	3.6	↓	↑	—
29	负离子	8.46	4-氧代-丙酸	627.373 5	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	7.0	↑	↑	—
30	正离子	9.66	中胆红素原	593.333 5	C ₃₃ H ₄₄ N ₄ O ₆	0.2	↑	↓	卟啉和叶绿素代谢
31	正离子	9.68	L-尿胆素原	597.361 4	C ₃₃ H ₄₈ N ₄ O ₆	-5.3	↑	↑	卟啉和叶绿素代谢
32	正离子	10.49	1,3,3-三甲基-2-氧杂双环 [2.2.2]辛烷-6-醇	341.266 5	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	-6.2	↓	↑	—
33	正离子	10.55	3α,6β,7β,12α-四羟基-5β-胆酸	425.288 2	C ₂₄ H ₄₀ O ₆	-3.8	↓	↑	—
34	正离子	10.58	3α-羟基-7-氧代-5β-胆酸	413.269 8	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	9.2	↓	↑	—

“↑”表示上调，“↓”表示下调。

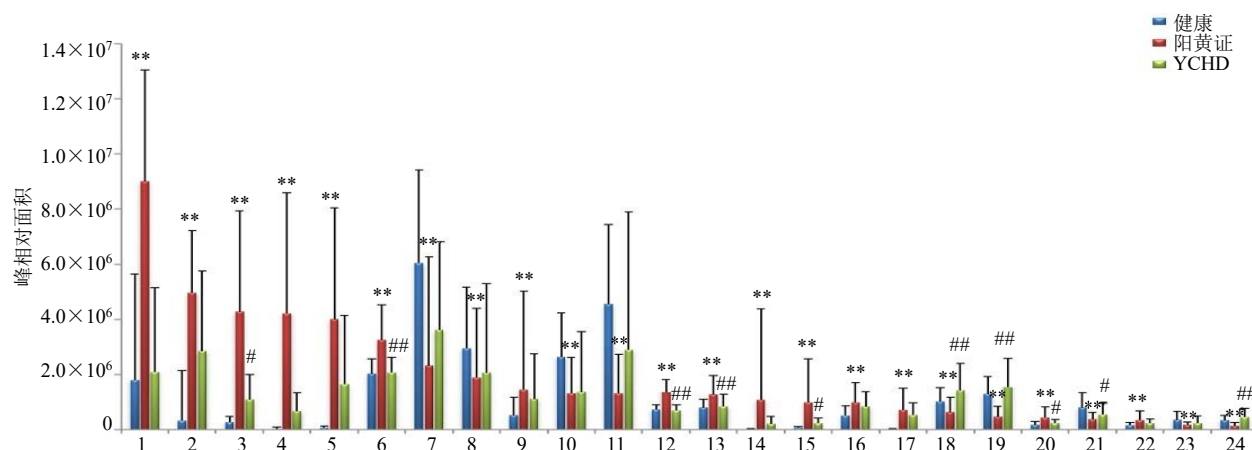
“↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation.

3.3 YCHD 对阳黄证代谢通路的影响

应用 KEGG 数据库以及 Metaboanalyst 3.0 软件对 YCHD 回调的生物标记物进行代谢通路富集分析(图 3、表 3),发现 YCHD 主要通过苯丙氨酸代谢、卟啉和叶绿素代谢治疗阳黄证。回调的核心生物标记物是苯丙氨酸代谢通路中的苯丙酮酸、苯乙酸、马尿酸;卟啉和叶绿素代谢通路中的中胆红

素原、胆色素原。

苯丙氨酸代谢异常产生的某些代谢产物如苯丙酮酸等,具有一定的毒性,肝脏作为重要的代谢器官需要对这些异常代谢产物进行处理,从而加重肝脏的代谢负担,长期的代谢紊乱导致肝脏细胞受损,影响肝脏的结构和功能,肝细胞对胆红素的摄取、结合和转化能力下降,导致血中胆红素水平升高。阳黄证

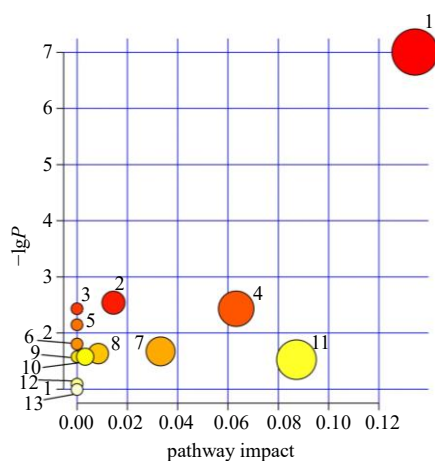


1-马尿酸; 2-中胆红素原; 3-苯乙酸; 4-*N*-(3a,5b,7a,12a)-3,7-二羟基-24-氧代-12-(磺氧基)胆烷-24-基]-甘氨酸; 5-甘胆酸钠; 6-柠檬酸; 7-5'-(3',4'-二羟基苯基)- γ -戊内酯硫酸盐; 8-皮甾酮四醇-3-葡萄糖苷; 9-胆酸葡萄糖苷; 10-11- β -羟基雄甾酮-3-葡萄糖苷; 11-雄酮葡萄糖醛酸; 12-糠酸; 13-3-羟基马尿酸; 14-牛磺胆酸; 15-苯丙酮酸; 16-*L*-甘油酸; 17-鹅去氧胆酸; 18-1,3,3-三甲基-2-氧杂双环[2.2.2]辛烷-6-醇; 19-3 α -羟基-7-氧代-5 β -胆酸; 20-*D*-葡萄糖醛酸; 21-11-氧代-雄酮葡萄糖苷; 22-*N*-甲基烟酰胺; 23-胆色素原; 24-3 α ,6 β ,7 β ,12 α -四羟基-5 β -胆酸; 与健康受试者比较: ** $P < 0.01$; 与阳黄证组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

1-hippuric acid; 2-mesobilirubinogen; 3-phenylacetic acid; 4-*N*-(3a,5b,7a,12a)-3,7-dihydroxy-24-oxo-12-(sulfoxy) cholan-24-yl]-glycine; 5-sodium glycocholate; 6-citric acid; 7-5'-(3',4'-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone sulfate; 8-cortolone-3-glucuronide; 9-choleic acid glucuronide; 10-11- β -hydroxyandrosterone-3-glucuronide; 11-etiocholanolone glucuronide; 12-furoic acid; 13-3-hydroxyhippuric acid; 14-taurocholic acid; 15-phenylpyruvic acid; 16-*L*-glyceric acid; 17-chenodeoxyglycocholic acid; 18-1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ol; 19-3 α -hydroxy-7-oxo-5 β -cholic acid; 20-*D*-glucuronic acid; 21-11-oxo-androsterone glucuronide; 22-*N*-methylnicotinamide; 23-porphobilinogen; 24-3 α ,6 β ,7 β ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholanoic acid; ** $P < 0.01$ vs healthy subjects; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs YHS group.

图 2 YCHD 治疗阳黄证回调的生物标记物

Fig. 2 Correction biomarker of YCHD in treatment of YHS



图中编号代表代谢通路名, 与表 3 一致。

Numbers in the figure represent metabolic pathway names, consistent with table 3.

图 3 基于 KEGG 的 YCHD 回调阳黄证尿液生物标记物代谢通路

Fig. 3 Metabolic pathway enrichment of correction urine biomarkers of YCHD in treatment of YHS based on KEGG

的发生与肝胆疏泄功能失调密切相关, 肝胆疏泄不利, 胆汁排泄受阻, 导致胆液外溢而发黄。本研究采用具有清热利湿功效的 YCHD 治疗阳黄证, 能够

回调苯丙氨酸代谢通路中的苯丙酮酸、苯乙酸、马尿酸, 改善肝脏的代谢功能, 减轻肝脏的负担。吡啶代谢通路中的胆色素原和中胆红素原是胆红素代谢过程中的重要中间产物, 在阳黄证中, 由于湿热蕴结导致肝胆疏泄功能失常, 胆汁排泄受阻, 血中胆红素水平升高, 胆色素原的代谢紊乱, 导致尿液中胆色素原变化。本研究结果显示, YCHD 治疗后 TBIL、DBIL、IBIL 水平均显著下降, 回调尿液中胆色素原、中胆红素原水平, 改善患者的临床症状。

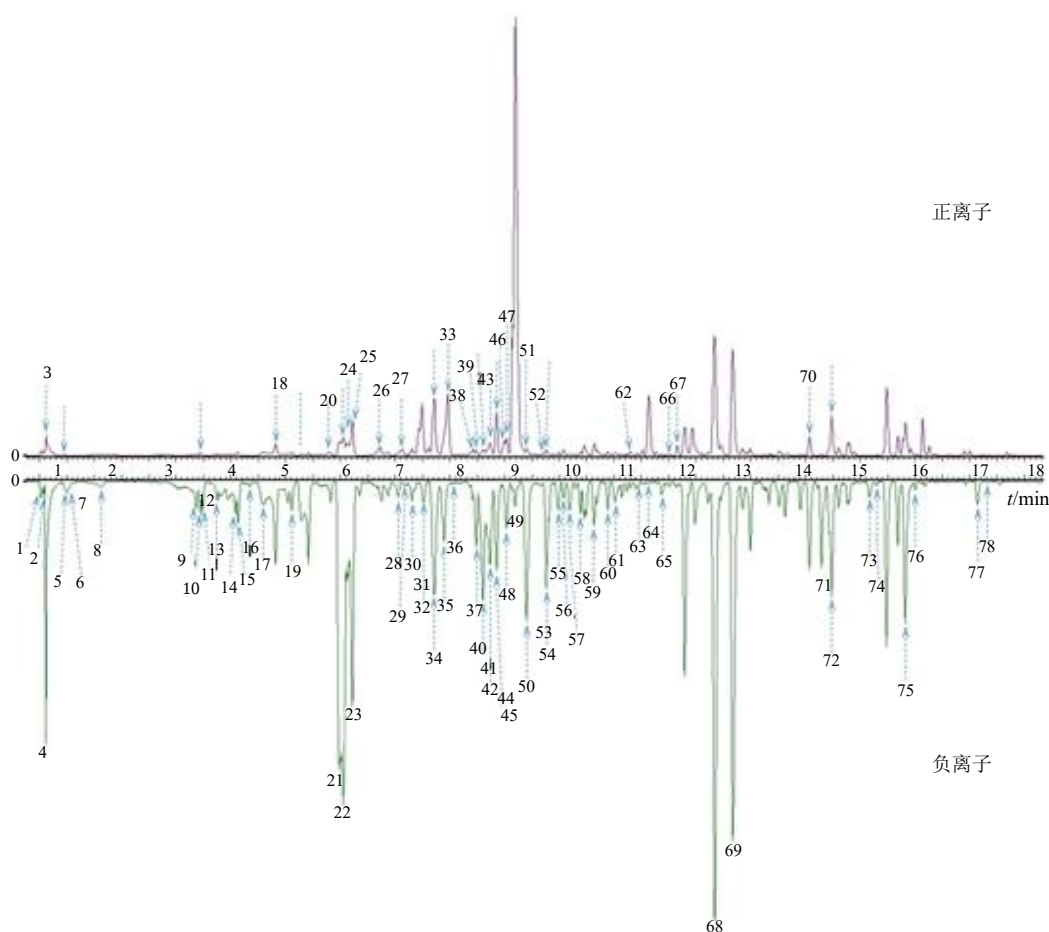
3.4 YCHD 体外及血中移行成分表征

基于 UPLC-MS 的正、负离子扫描模式下表征了 YCHD 78 个化学成分 (图 4、表 4), 其中 33 个成分来源于茵陈, 18 个成分来源于栀子, 22 个成分来源于大黄。通过 PCA 得分图可以看出 YCHD 治疗阳黄证前后血清轮廓发生明显变化, 利用 OPLS-DA 的 S-plot 图分析成分含量在 YCHD 治疗前血清样品中不存在而在治疗后血清样品中含量较高的离子 (图 5), 表征 YCHD 治疗阳黄证有效状态下入血成分 26 个 (表 5), 包括 23 个原型入血成分及 3 个代谢产物, 其中 11 个成分来源于茵陈, 9 个成分来源于栀子, 7 个成分来源于大黄。

表 3 YCHD 回调阳黄证尿液生物标记物代谢通路富集分析

Table 3 Analysis of metabolic pathway enrichment of correction urine biomarkers of YCHD in treatment of YHS

序号	通路	Hits	Raw <i>P</i>	$-\lg P$	Impact
1	苯丙氨酸代谢	3	0.000 908	7.004 50	0.134 37
2	卟啉与叶绿素代谢	2	0.078 867	2.540 00	0.014 49
3	牛磺酸和次牛磺酸代谢	1	0.087 871	2.431 90	0
4	柠檬酸循环	1	0.087 871	2.431 90	0.063 27
5	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	1	0.116 930	2.146 20	0
6	肌醇磷酸盐代谢	1	0.164 790	1.803 10	0
7	维生素 C 和醛固酮代谢	1	0.187 820	1.672 30	0.033 22
8	初级胆汁酸生物合成	1	0.195 370	1.632 90	0.008 46
9	淀粉和蔗糖代谢	1	0.206 570	1.577 10	0
10	乙醛酸盐和二羧酸盐代谢	1	0.206 570	1.577 10	0.003 26
11	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化	1	0.217 630	1.524 90	0.087 23
12	氨基糖和核苷酸糖代谢	1	0.336 730	1.088 50	0
13	类固醇激素生物合成	1	0.370 600	0.992 64	0



图中编号代表化学成分，与表 4 一致。

Numbers in figure represent chemical components, which are consistent with table 4.

图 4 正、负离子模式下 YCHD 化学成分 BPI 色谱图

Fig. 4 BPI chromatogram of chemical constituents of YCHD under positive and negative ion modes

3.5 YCHD 治疗阳黄证血中移行成分与效应标记物相关性研究

应用 PCMS 软件，对 26 个 YCHD 血中移行成

分与 24 个阳黄证尿液效应标记物进行相关性分析，见图 6。YCHD 入血成分 5-脱羟基-6-去甲氧基茵陈色原酮（C25）与 *N*-甲基烟酰胺（B22）、苯丙酮酸

表 4 正、负离子模式下 YCHD 化学成分

Table 4 Chemical composition of YCHD under positive and negative ion modes

序号	tr/min	成分名称	化学式	离子模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 (×10 ⁻⁶)	二级碎片	来源
1	0.55	楸木皂苷	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₃	负离子	1 087.532 5	1 087.523 0	-8.73	128.052 1, 212.223 1	栀子
2	0.60	azacridone A	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	负离子	307.108 3	307.110 9	8.46	129.312 4, 165.231 5, 195.132 4	茵陈
3	0.63	蕨内酰胺	C ₅ H ₉ NO ₂	正离子	116.071 2	116.071 7	4.30	85.102 5, 98.231 6	栀子
4	0.64	奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	负离子	191.055 6	191.055 7	0.52	85.231 5, 111.654 2, 127.102 3	茵陈/ 栀子
5	0.65	D-麦芽糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	负离子	341.108 4	341.107 3	-3.22	191.753 6, 195.235 4	大黄
6	0.65	蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	负离子	341.108 4	341.107 3	-3.22	191.754 1, 195.235 9	大黄
7	1.06	焦谷氨酸	C ₅ H ₇ NO ₃	负离子	128.034 8	128.034 3	-3.90	71.152 4, 85.236 5, 111.845 2	未知
8	1.65	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	负离子	169.013 7	169.013 6	-0.91	101.234 6, 125.753 6, 153.265 1	大黄
9	3.38	白花败酱醇苷	C ₁₆ H ₂₆ O ₉	负离子	361.149 9	361.150 3	1.10	137.361 4, 181.942 1	栀子
10	3.45	京尼平苷酸	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	负离子	373.113 5	373.112 3	-3.21	123.215 4, 167.756 4, 241.128 5	栀子
11	3.45	核苷酸	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	负离子	391.124 0	391.123 5	-1.27	121.328 4, 185.156 4, 229.103 5	未知
12	3.76	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	负离子	353.087 3	353.086 0	-3.68	191.743 6	茵陈/ 栀子
13	3.79	山栀子苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	负离子	403.124 0	403.123 4	-1.48	127.541 6, 241.263 5, 345.102 5	栀子
14	4.09	京尼平尼酸	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	负离子	241.071 2	241.070 8	-1.65	127.421 6, 161.541 3, 191.102 5	栀子
15	4.14	苦藏红花酸	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	负离子	345.154 9	345.154 7	-0.57	165.354 6, 179.124 3	栀子
16	4.35	原花青素	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	负离子	577.134 6	577.134 2	-0.69	289.126 5, 407.253 6	未知
17	4.68	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	负离子	289.071 2	289.070 9	-1.03	191.102 6	大黄
18	4.83	双花母草素	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	正离子	355.102 9	355.102 8	-0.28	117.102 6, 163.156 4	茵陈
19	5.07	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	负离子	179.034 4	179.034 3	-0.55	101.864 2, 147.926 3	茵陈
20	5.85	香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	正离子	147.044 6	147.045 3	4.76	105.126 5, 131.687 4	茵陈
21	6.08	京尼平苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	负离子	387.129 1	387.127 3	-4.64	207.214 5, 225.365 2	栀子
22	6.08	京尼平	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	负离子	225.076 3	225.076 1	-0.88	147.845 6, 207.246 3	栀子
23	6.19	1,3-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	负离子	515.119 0	515.118 8	-0.38	165.126 5, 297.254 1, 345.621 3	茵陈
24	6.23	红花黄色素A	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	正离子	593.150 6	593.150 3	-0.50	353.236 1, 473.156 4	茵陈
25	6.24	去甲氧基豆薯酮	C ₁₉ H ₁₂ O ₆	正离子	337.071 2	337.071 9	2.07	295.361 2, 325.154 3	大黄
26	6.69	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	正离子	303.050 5	303.052 0	4.94	229.236 5, 257.154 2	茵陈
27	7.22	佛手柑内酯	C ₁₂ H ₈ O ₄	正离子	217.050 1	217.049 4	-3.22	153.625 4, 191.125 4	茵陈
28	7.71	大黄酸苷A	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	负离子	609.145 6	609.145 9	0.49	151.265 4, 271.123 6, 300.924 5	大黄
29	7.72	芦荟大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	负离子	269.045 0	269.044 7	-1.11	239.951 2	大黄
30	7.73	6''-(4-羧基-3-羟基-3-甲基丁酰基)金丝桃苷	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₆	负离子	607.129 9	607.129 4	-0.82	271.128 7, 463.086 4	茵陈
31	7.74	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	负离子	463.087 7	463.087 0	-1.51	271.129 4, 300.324 5	茵陈
32	7.74	3-甲基鞣花酸 8-鼠李糖苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	负离子	461.072 0	461.072 2	0.43	271.654 1, 300.462 5	茵陈
33	7.91	杨梅苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	正离子	465.103 3	465.102 2	-2.36	303.321 5	大黄
34	7.97	番泻苷A	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	负离子	861.187 8	861.188 7	1.04	314.165 2, 477.217 3	大黄
35	7.98	番泻苷B	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	负离子	861.187 8	861.184 5	-3.83	243.512 3, 314.551 2	大黄
36	8.12	异莲花掌苷	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	负离子	477.139 7	477.139 6	-0.20	269.651 2	栀子

表 4 (续)

序号	t_R/min	成分名称	化学式	离子模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	来源
37	8.41	大黄素蒽酚	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	负离子	255.065 7	255.065 1	-2.35	166.267 4, 213.016 3	大黄
38	8.44	6-羟基木犀草素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	正离子	303.050 5	303.049 0	-4.94	153.665 2, 211.135 4	茵陈
39	8.55	山柰酚	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	正离子	287.055 6	287.054 5	-3.83	153.365 1, 195.254 3, 245.351 4	茵陈
40	8.71	芦荟大黄素乙酸酯	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$	负离子	311.055 6	311.053 3	-7.39	158.231 5, 201.351 2	大黄
41	8.76	3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	负离子	515.119 0	515.118 4	-1.16	179.421 3, 353.362 2	茵陈
42	8.76	新绿原酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	负离子	353.087 3	353.086 8	-1.41	135.123 6, 179.564 8	茵陈/ 梔子
43	8.79	2-(4-羟基肉桂酰基)-1-O-没食子酰基- β -D-吡喃葡萄糖苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	正离子	479.119 0	479.118 4	-1.25	163.231 5, 317.462 1	大黄
44	8.81	柚皮素	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	负离子	271.060 6	271.059 7	-3.32	119.841 5, 177.264 5	茵陈
45	8.81	茵陈色原酮	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	负离子	315.050 5	315.050 6	0.31	206.364 5, 300.841 5	茵陈
46	8.96	6,7-二甲氧基香豆素	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$	正离子	207.065 7	207.066 0	1.44	135.236 1, 191.154 2	茵陈
47	9.02	苯甲酸乙酯	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$	正离子	151.075 9	151.076 5	3.97	107.325 2, 135.216 6	茵陈
48	9.07	异鼠李素-3-葡萄糖苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	负离子	477.103 3	477.102 9	-0.83	116.991 2, 315.163 3, 435.214 2	茵陈
49	9.39	2,5-二甲氧基7-羟基色原酮	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$	负离子	189.055 2	189.055 5	1.58	135.332 5, 173.215 5	茵陈
50	9.43	4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	负离子	515.119 0	515.120 0	1.94	135.362 2, 179.512 4, 353.463 5	茵陈
51	9.49	2',3'-二乙酰基大波斯菊苷	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	正离子	517.134 6	517.133 5	-2.12	163.543 4, 499.553 0	茵陈
52	9.79	香豆酸	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	正离子	165.055 2	165.054 2	-6.05	121.365 4, 147.671 5	茵陈
53	9.80	6"-对香豆酰基尼平龙胆双糖苷	$\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$	负离子	695.218 7	695.220 5	2.58	174.877 4, 371.264 1, 433.236 6	梔子
54	9.80	芝麻林素酚	$\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$	负离子	695.218 7	695.220 1	2.01	367.123 6, 469.154 2	未知
55	9.92	α -鼠李糖苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	负离子	431.097 8	431.097 2	-1.39	225.365 4, 269.125 4	茵陈
56	10.01	薰衣草叶苷	$\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_{19}$	负离子	755.239 9	755.240 8	1.19	483.298 5, 659.362 0	茵陈
57	10.03	络石苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$	负离子	549.197 2	549.196 6	-1.09	161.244 5, 387.654 4	未知
58	10.41	prupaside	$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$	负离子	551.212 9	551.212 3	-1.08	295.654 1, 325.335 0, 533.661 4	未知
59	10.52	白皮杉醇4-没食子酰基葡萄糖苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	负离子	557.129 5	557.129 3	-0.35	173.365 4, 397.551 2	大黄
60	10.92	枸橼苷	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$	负离子	593.187 0	593.187 2	0.33	205.106 5, 223.411 2	梔子
61	11.03	桂皮酰基没食子酰葡萄糖苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	负离子	461.108 4	461.108 5	0.21	169.654 1, 313.125 5	未知
62	11.48	梅笠草醌	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$	正离子	187.075 9	187.076 8	4.81	131.225 4, 167.336 4	大黄
63	11.61	金圣草黄素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	负离子	299.055 6	299.057 0	4.68	165.669 4, 284.754 0	茵陈
64	11.61	6-羟基芦荟大黄素-8-甲醚	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	负离子	299.055 6	299.056 7	3.67	268.366 2, 283.105 5	大黄
65	11.93	芦荟大黄素-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	负离子	431.097 8	431.098 3	1.15	193.265 4, 268.220 1, 361.361 4	大黄
66	12.02	大黄酸蒽酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	正离子	271.060 6	271.060 5	-0.36	153.365 4	大黄
67	12.19	咖啡酸异戊烯酯	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$	正离子	249.112 7	249.112 1	-2.40	175.125 5, 207.612 0	茵陈
68	12.87	6-去甲氧基茵陈色原酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	负离子	285.039 9	285.038 9	-3.50	177.255 2, 192.165 4	茵陈
69	13.22	5-脱羟基-6-去甲氧基茵陈色原酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	负离子	285.039 9	285.038 9	-3.50	119.695 2, 165.254 6	茵陈
70	14.41	藏花素	$\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{24}$	正离子	977.386 6	977.386 5	-0.10	311.564 2, 675.244 5	梔子
71	14.89	茼蒿素	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	负离子	313.071 2	313.072 6	4.47	165.332 0, 255.254 4, 298.631 0	茵陈

表 4 (续)

序号	t_R/min	成分名称	化学式	离子模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	来源
72	14.95	芹菜素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	负离子	269.045 0	269.044 4	-2.23	201.654 2, 225.102 2	未知
73	15.69	二羟基醌	$\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_4$	负离子	239.034 4	239.034 2	-0.83	211.642 2	大黄
74	15.69	大黄酸	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_6$	负离子	283.024 3	283.024 8	1.76	183.654 2, 211.102 5, 255.664 2	大黄
75	16.36	西红花苷IV	$\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_{14}$	负离子	651.265 3	651.265 2	-0.15	283.265 4, 327.125 4	栀子
76	16.37	西红花苷III	$\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_{14}$	负离子	651.265 3	651.264 2	-1.68	283.265 4, 327.255 4, 549.103 6	栀子
77	17.66	大黄素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	负离子	269.045 0	269.044 9	-0.37	116.365 0, 241.564 2	大黄
78	17.66	染料木黄酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	负离子	269.045 0	269.045 4	1.48	225.236 0, 241.563 9	大黄

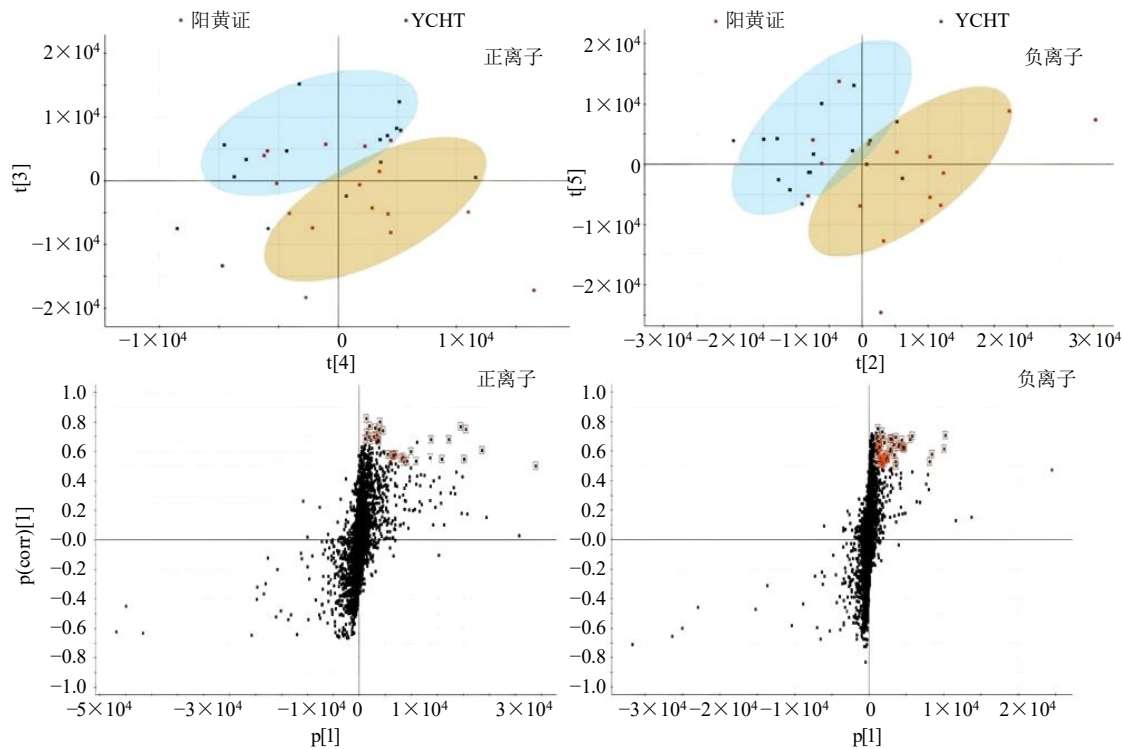


图 5 阳黄证患者口服 YCHD 前后 PCA 得分图和 S-plot 图

Fig. 5 PCA score plot and S-plot of subjects with YHS after oral administration of YCHD

表 5 阳黄证患者口服 YCHD 后血中移行成分

Table 5 Entry components in blood of patients with YHS after oral administration of YCHD

编号	t_R/min	成分名称	化学式	离子模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	来源
1	0.63	蕨内酰胺	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	正离子	116.071 2	116.071 7	4.30	85.102 1, 98.231 4	茵陈/ 栀子
2	0.63	奎宁酸	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$	负离子	191.055 6	191.055 7	0.52	111.653 9, 127.101 9	茵陈
3	3.40	京尼平苷酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	负离子	373.113 5	373.114 1	1.60	123.216 0, 167.756 9, 241.129 1	栀子
4	4.09	京尼平尼酸	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_6$	负离子	241.071 2	241.070 8	-1.65	127.421 4, 161.541 7, 191.103 0	栀子
5	4.24	苦藏红花酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_8$	负离子	345.154 9	345.153 4	-4.34	165.355 2, 179.124 9	栀子
6	4.71	山栀子苷	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	负离子	403.124 0	403.125 1	2.72	127.542 6, 241.263 9, 345.103 1	栀子
7	4.82	绿原酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	负离子	353.087 3	353.088 0	1.98	191.742 9	茵陈/ 栀子
8	5.84	对羟基苯乙酮	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$	正离子	137.060 3	137.061 1	5.83	77.325 4, 121.264 5	茵陈
9	5.90	京尼平苷	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	负离子	387.129 1	387.125 7	-8.78	207.215 5, 225.366 3	栀子
10	5.92	京尼平	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$	负离子	225.076 3	225.075 8	-2.22	147.845 2, 207.246 6	栀子
11	6.23	红花黄色素 A	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	正离子	593.150 6	593.151 6	1.68	353.232 3, 473.150 6	茵陈

表 5 (续)

编号	t_R/min	成分名称	化学式	离子模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	来源
12	6.69	槲皮素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	正离子	303.050 5	303.052 0	4.94	229.236 1, 257.154 4	茵陈
13	7.71	大黄酸苷 A	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	负离子	609.145 6	609.145 9	0.49	271.123 3, 300.924 9	大黄
14	7.74	3- <i>O</i> -甲基鞣花酸-3'- <i>O</i> -鼠李糖苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	负离子	461.072 0	461.072 2	0.43	271.653 8, 300.462 9	茵陈
15	7.84	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	负离子	463.087 7	463.089 3	3.45	271.129 7, 300.324 0	茵陈
16	9.07	异鼠李素-3-葡萄糖苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	负离子	477.103 3	477.102 9	-0.83	315.163 0, 435.214 7	茵陈
17	9.14	芦荟大黄素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	负离子	269.045 0	269.044 5	-1.85	239.951 6	大黄
18	9.33	大黄酸-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	正离子	447.092 7	447.092 1	-1.34	158.230 4, 273.564 2, 301.603 5	大黄
19	9.67	2,5-二甲基-7-羟基色酮	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$	正离子	191.070 8	191.070 0	-4.18	146.354 9, 189.466 8	大黄
20	9.72	6"-对香豆酰京尼平龙胆双糖苷	$\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$	负离子	695.218 7	695.218 3	-0.57	174.873 6, 371.262 2, 433.234 5	栀子
21	12.65	大黄酸蒽酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	正离子	271.060 6	271.062 0	5.16	153.364 8	大黄
22	12.91	山奈酚	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	正离子	287.055 6	287.057 1	5.22	153.364 6, 195.255 0, 245.352 1	茵陈
23	12.91	6-去甲氧基茵陈色原酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	负离子	285.039 9	285.041 1	4.20	177.254 7, 192.164 9	茵陈
24	15.58	大黄酸	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_6$	负离子	283.024 3	283.024 8	1.76	183.653 8, 211.102 0, 255.663 9	大黄
25	15.87	5-脱羟基-6-去甲氧基茵陈色原酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	负离子	285.039 9	285.041 2	4.56	119.694 1, 165.253 9	茵陈
26	17.57	大黄素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	负离子	269.045 0	269.045 5	1.85	116.364 6, 241.564 9	大黄

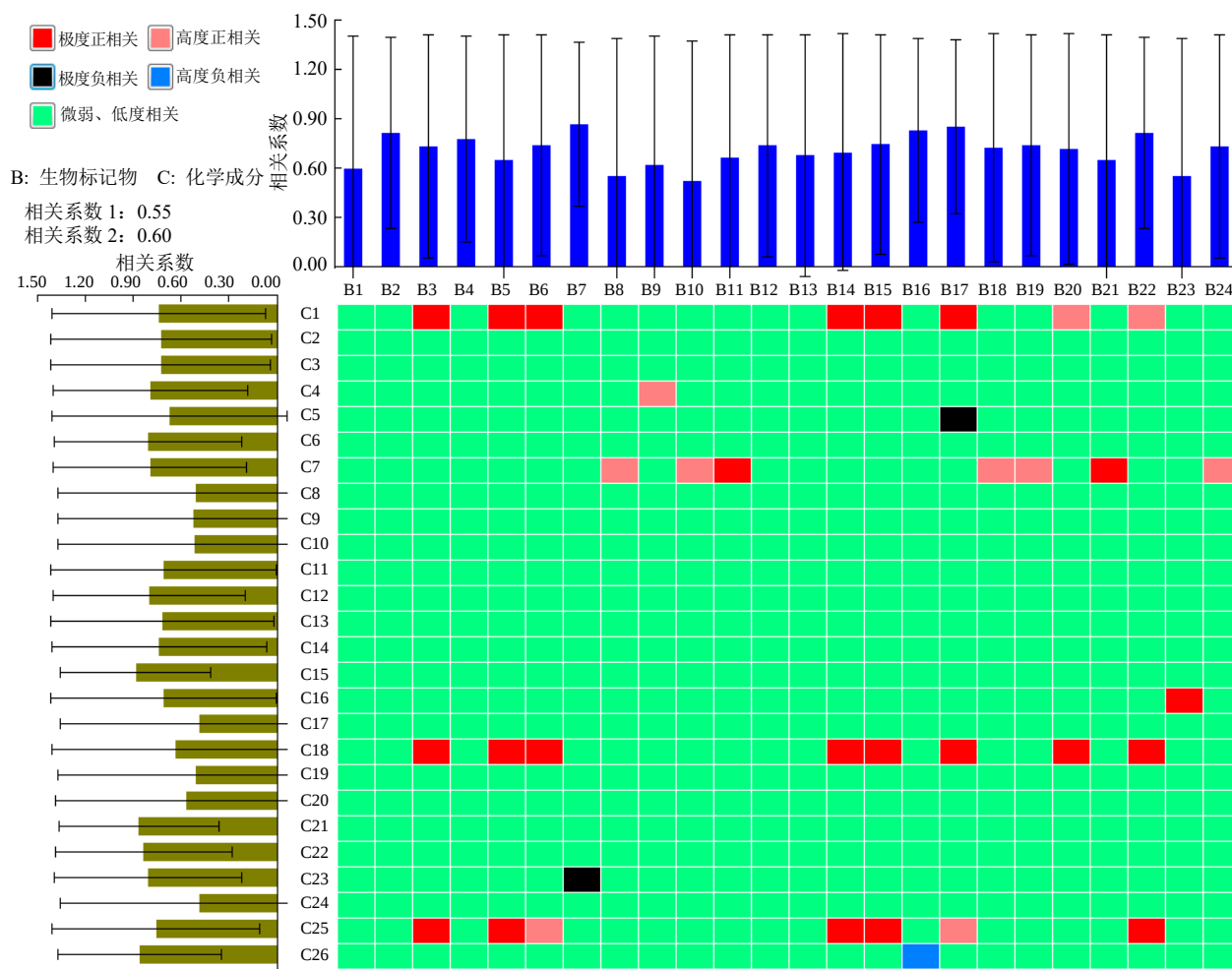
(B15)、苯乙酸(B3)、牛磺胆酸(B14)、甘胆酸钠(B5)极度正相关,与柠檬酸(B6)、鹅去氧胆酸(B17)高度正相关。大黄酸-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(C18)与*D*-葡萄糖醛酸(B20)、*N*-甲基烟酰胺(B22)、柠檬酸(B6)、苯丙酮酸(B15)、苯乙酸(B3)、牛磺胆酸(B14)、鹅去氧胆酸(B17)、甘胆酸钠(B5)极度正相关。蕨内酰胺(C1)与柠檬酸(B6)、苯丙酮酸(B15)、苯乙酸(B3)、牛磺胆酸(B14)、鹅去氧胆酸(B17)、甘胆酸钠(B5)极度正相关,与*D*-葡萄糖醛酸(B20)、*N*-甲基烟酰胺(B22)高度正相关。绿原酸(C7)与 11-氧代-雄酮葡萄糖苷酸(B21)、雄酮葡萄糖苷酸(B11)极度正相关,与 1,3,3-三甲基-2-氧杂双环[2.2.2]辛烷-6-醇(B18)、3 α ,6 β ,7 β ,12 α -四羟基-5 β -胆酸(B24)、3 α -羟基-7-氧代-5 β -胆酸(B19)、皮甾酮四醇-3-葡萄糖苷酸(B8)、11- β -羟基雄甾酮-3-葡萄糖苷酸(B10)高度正相关。异鼠李素-3-葡萄糖苷(C16)与胆色素原(B23)极度正相关。京尼平尼酸(C4)与胆酸葡萄糖苷酸(B9)高度正相关。

4 讨论

方证代谢组学作为整合中医药理论与现代分析技术的新兴交叉学科,在解析中药药效物质基础和评价临床疗效方面具有重要意义。其通过代谢组

学技术动态监测机体代谢物变化,精准捕捉从生物小分子到代谢网络的整体扰动特征,结合中医“方-证-效”理论,可系统揭示中药复方多成分、多靶点的整体调控机制,为揭示中药复方“多成分协同、多靶点调控”的作用本质提供了创新视角,构建了连接传统医学智慧与现代科学研究的桥梁。本研究应用方证代谢组学策略,揭示临床阳黄证的代谢轮廓及生物标记物,并以此为生物学参数,发现 YCHD 调节苯丙酮酸、苯乙酸、马尿酸、胆红素原、胆色素原等阳黄证生物标记物干预苯丙氨酸代谢通路、卟啉和叶绿素代谢通路治疗阳黄证。基于 UPLC-MS 技术的血清药物化学方法全面辨识 YCHD 血中移行成分。通过血中移行成分与效应标记物的相关性分析,挖掘 YCHD 治疗阳黄证的药效物质基础为 5-脱羟基-6-去甲氧基茵陈色原酮、蕨内酰胺、大黄酸-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。

苯丙酮酸主要是在苯丙氨酸代谢异常时产生,当苯丙氨酸羟化酶活性降低或缺乏时,苯丙氨酸无法转化为酪氨酸,经转氨酶催化转变为苯丙酮酸,苯丙酮酸再进一步被氧化脱羧产生苯乙酸。此外,当苯丙氨酸进入肠道后,部分会被肠道菌群分解为苯甲酸,苯甲酸随后在肝脏中与甘氨酸结合,形成马尿酸。经分析发现阳黄证模型小



图中 B1~B24 代表效应标记物, 编号顺序与图 2 编号顺序一致; C1~C26 代表血中移行成分, 编号顺序与表 5 一致。

B1—B24 represents effect markers, and numbering order is consistent with that of figure 2; C1—C26 represents constituents absorbed into blood, and numbering order is consistent with table 5.

图 6 基于 PCMS 软件的 YCHD 血中移行成分与阳黄证尿液效应标记物相关性分析热图

Fig. 6 Heat map of correlation analysis between constituents absorbed into blood of YCHD and urine effect markers of YHS based on PCMS software

鼠尿液和血液中苯丙酮酸水平均升高^[16-17]。本研究发现阳黄证患者尿液苯丙酮酸、苯乙酸、马尿酸升高, 提示肝胆代谢紊乱和解毒功能障碍的病理特征。苯丙酮酸蓄积可能反映酪氨酸代谢受阻, 苯乙酸升高或与肠道菌群失衡导致的芳香族氨基酸代谢异常相关, 而马尿酸作为肝脏甘氨酸结合解毒途径的标志物, 其浓度变化直接反映肝脏解毒能力。经 YCHD 治疗后, 苯丙酮酸、苯乙酸、马尿酸水平降低。胆红素原作为血红素分解代谢的中间产物, 其异常积累已成为识别肝硬化等肝病疾病的重要代谢标志物^[18], 在健康生理状态下, 胆红素原经肝脏酶催化结合后通过胆汁排泄, 而肝硬化患者因肝细胞功能损伤及胆道排泄受

阻, 导致血清胆红素原清除率显著下降, 并通过肾代谢在尿液中异常积聚^[19]。值得注意的是, 阳黄证患者尿液中不仅总胆红素原水平升高, 其亚型中胆红素原的异常富集更凸显肝脏功能障碍的病理特征。YCHD 干预后中胆红素原水平显著降低。不仅为阳黄证的代谢表型提供了客观生物标志物, 也从代谢组学角度验证了 YCHD 清热利湿、疏肝利胆的功效, 揭示了其通过 5-脱羟基-6-去甲氧基茵陈色原酮、蕨内酰胺及大黄酸-8-O- β -D-葡萄糖苷多成分干预多靶点协同恢复阳黄证代谢网络平衡的作用模式。

该发现不仅诠释了中药复方“多成分-多靶点-多通路”的系统调控优势, 更为基于代谢网络调控

的中药质量标志物筛选及组分中药研发提供了理论依据。未来研究需深化多组学整合分析,结合人工智能与大数据建立“成分-靶点-代谢网络”预测模型,提升药效物质辨识效率。同时应加强临床代谢表型与中医证候的关联研究,建立个体化疗效评价体系。方证代谢组学的发展将加速中医药从经验科学向精准医学的转型。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华中医药学会脾胃病分会, 迟莉丽, 唐旭东, 等. 黄疸中医诊疗专家共识 (2023) [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(10): 1959-1966.
- [2] Zhao X L, Wu X J, Hu Q, *et al.* Yinchenhao decoction protects against acute liver injury in mice with biliary acute pancreatitis by regulating the gut microflora-bile acids-liver axis [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2024, 2024: 8882667.
- [3] Song J R, Huang Y P, Liu L, *et al.* Integrated metabolomics and network pharmacology to explore the clinical efficacy and mechanism of Yinchenhao decoction combined with nucleoside analogues on chronic hepatitis B [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2025, 253: 116513.
- [4] Wu J W, Lyu S X, Guo D, *et al.* Protective effects of YCHD on the autoimmune hepatitis mice model induced by Ad-CYP2D6 through modulating the Th1/Treg ratio and intestinal flora [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1488125.
- [5] Liu J J, Xu Y, Chen S, *et al.* The mechanism of Yinchenhao decoction in treating obstructive-jaundice-induced liver injury based on Nrf2 signaling pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(32): 4635-4648.
- [6] Shi J, Zhu L, Tang B Y, *et al.* Regulatory effect of Yinchenhao decoction on bile acid metabolism to improve the inflammatory microenvironment of hepatocellular carcinoma in mice [J]. *J Nat Med*, 2024, 78(3): 633-643.
- [7] Xu L, Cui H L. Yinchenhao Tang alleviates high fat diet induced NAFLD by increasing NR1H4 and APOA1 expression [J]. *J Tradit Complement Med*, 2023, 13(4): 325-336.
- [8] Yang R, Jiang D S, Xu H L, *et al.* Network pharmacology and molecular docking integrated with molecular dynamics simulations investigate the pharmacological mechanism of Yinchenhao decoction in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2024, doi: 10.2174/0115734099305489240702075128.
- [9] Luo S M, Huang M L, Lu X H, *et al.* Optimized therapeutic potential of Yinchenhao decoction for cholestatic hepatitis by combined network meta-analysis and network pharmacology [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155573.
- [10] Wang J, Ouyang B C, Cao R, *et al.* An UHPLC-QTOF-MS-based strategy for systematic profiling of chemical constituents and associated *in vivo* metabolites of a famous traditional Chinese medicine formula, Yinchenhao Decoction [J]. *Biomed Chromatogr*, 2024, 38(2): e5784.
- [11] Han Y, Sun H, Zhang A H, *et al.* Chinmedomics, a new strategy for evaluating the therapeutic efficacy of herbal medicines [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 216: 107680.
- [12] Ren J L, Yang L, Qiu S, *et al.* Efficacy evaluation, active ingredients, and multitarget exploration of herbal medicine [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34(3): 146-157.
- [13] Wang M M, Yin F T, Kong L, *et al.* Chinmedomics: A potent tool for the evaluation of traditional Chinese medicine efficacy and identification of its active components [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 47.
- [14] 闫广利, 孙晖, 张爱华, 等. 基于中医方证代谢组学的中药质量标志物发现研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3729-3734.
- [15] 刘鸿达, 孙晖, 闫广利, 等. 中医理论视域下创新中药发现策略和实践 [J]. 中国科学基金, 2024, 38(3): 483-491.
- [16] Fang H, Zhang A H, Zhou X H, *et al.* High-throughput metabolomics reveals the perturbed metabolic pathways and biomarkers of Yang Huang syndrome as potential targets for evaluating the therapeutic effects and mechanism of geniposide [J]. *Front Med*, 2020, 14(5): 651-663.
- [17] Liu X Y, Zhang A H, Fang H, *et al.* Serum metabolomics strategy for understanding the therapeutic effects of Yin-Chen-Hao-Tang against Yanghuang syndrome [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(14): 7403-7413.
- [18] Li S S, Niu M, Jing J, *et al.* Metabolomic signatures of autoimmune hepatitis in the development of cirrhosis [J]. *Front Med*, 2021, 8: 644376.
- [19] Bernstein R B. Comparison of serum clearance and urinary excretion of mesobilirubinogen-H3 in control subjects and patients with liver disease [J]. *Gastroenterology*, 1971, 61(5): 733-737.

[责任编辑 潘明佳]