

张艳,王爽,李永哲,等. 利用非靶向代谢组学方法研究龙胆泻肝汤治疗急性肝损伤的机制[J]. 江苏农业科学,2020,48(10):208-213.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.10.038

利用非靶向代谢组学方法研究龙胆泻肝汤 治疗急性肝损伤的机制

张艳¹,王爽²,李永哲³,宋爽²

(1. 吉林化工学院化学与制药工程学院,吉林吉林 132022; 2. 吉林化工学院研究生院,吉林吉林 132022; 3. 吉林石化电石厂,吉林吉林 132022)

摘要:以龙胆草、黄芩、山栀子、生地黄、泽泻、车前子、当归、木通、柴胡和甘草组成的龙胆泻肝汤为试材,采用气相色谱-质谱技术,并结合代谢组学的方法研究龙胆泻肝汤对大鼠急性肝损伤(ALI)的治疗作用及机制。结果表明,龙胆泻肝汤有明显的治疗ALI的作用,其机制与影响丙酮酸、肌氨酸、延胡索酸、琥珀酸、L-别苏氨酸、4-羟基脯氨酸、柠檬酸和吡啶乳酸8个具有特征性的内源性生物标志物有关,这些标志物属于三羧酸循环,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,乙醛酸和二羧酸代谢,丙酮酸代谢和糖酵解或糖异生5个代谢途径。龙胆泻肝汤能改善ALI大鼠的症状,调节ALI大鼠代谢通路异常,具有明显的保肝作用。

关键词:龙胆泻肝汤;急性肝损伤;标志物;代谢组学;气相色谱-质谱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)10-0208-06

龙胆泻肝汤是我国的传统中药复方方剂,由龙胆草、黄芩、山栀子、生地黄、泽泻、车前子、当归、木通、柴胡、甘草组成,最早由汪昂在《医方集解》中提出,主要用于治疗肝胆实火上炎症^[1]。现代药理学研究表明,龙胆泻肝汤具有调节免疫^[2-3]、抗炎^[4]、抗氧化^[5]、抗病毒^[6]、镇痛^[7],调节消化系统功能^[8]等作用。此外,黄芩、山栀子等中草药形态优美,花朵秀丽,将中草药种植用于园林绿化工程中,既节省了苗木投入,又可以从药材种植中获得一定的经济收益,具有较高的园林开发价值。

我国传统的中药方剂是以多味中药协同的形式组成的复方制剂,倡导联合用药以及整体性。根据传统中医理论,中药方剂以每味中药的有效成分协调发挥药理作用的形式治疗疾病,“整体大于部分之和”是方剂作用的基本特征^[9]。代谢组学是20世纪末发展起来的一门新兴技术,它借助于现代的分析手段,通过考察生物体系受疾病扰动后其代谢产物的变化,系统地揭示疾病的发展过程和分子机制^[10]。其整体性的特点与中医理论不谋而合,因此代谢组学可以为中药方剂复杂的作用机制研究提

供新方法,对于提高其临床疗效和安全性,促进中医药的进一步发展具有重要意义^[11]。

急性肝损伤(ALI)是一种源于病毒性肝炎、药物诱导、乙醇、毒物和肝脏局部缺血而导致的以肝细胞大量坏死为主要特征的急性肝功能障碍^[12]。ALI是多种严重肝病(如肝硬化、肝癌等)的诱因,严重或持续的损伤最终可导致肝衰竭^[13]。据估计在世界范围内,每100万ALI患者中有8位患者会最终导致肝衰竭,其发病率和死亡率逐年升高,给家庭和社会带来了沉重的负担^[14]。本研究借助高通量、高灵敏度、高分辨率的气相色谱-质谱(GC-MS)联用分析手段,利用代谢组学方法,研究筛选龙胆泻肝汤对ALI的治疗作用并探寻其代谢组学机制,为开发龙胆泻肝汤的新用途提供相关数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 SPF级SD大鼠,体质量为200~240g,雄性,购自吉林大学白求恩医学院动物试验中心,试验许可证号:SCXK(吉)2016-0002。

1.1.2 药物与试剂 龙胆草、黄芩、山栀子、生地黄、泽泻、车前子、当归、木通、柴胡、甘草,购自北京同仁堂药店;以6:9:9:12:9:9:8:20:16:6比例配伍(共784g),5倍水量煎煮3次,每次2h,合并滤液,浓缩至480mL(即相当于3mg/mL生药

收稿日期:2019-04-17

基金项目:吉林省教育厅科学技术项目(编号:JKKH20190825KJ);吉林市科技创新发展计划(编号:201831779)。

作者简介:张艳(1981—),吉林吉林人,博士,副教授,主要从事药理学和代谢组学研究。E-mail:zhangyan@jlct.edu.cn。

量的药液)备用。N,O-双三甲硅基三氟乙酰胺(BSTFA)和三甲基氯硅烷(TMCS),购自上海麦克林公司;乙腈,色谱纯,购自美国Fisher公司;吡啶、二十二烷、正庚烷、四氯化碳(CCl_4)均为分析纯,购自北京化学试剂厂;谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、谷草转氨酶(AST)试剂盒、碱性磷酸酶(ALP)试剂盒,购自深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.1.3 主要仪器 Chemray 24型全自动生化分析仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司;GCMS-QP2010型气相色谱-质谱联用仪(配备EI离子源,AOC-20i自动进样器),日本岛津公司;HP-5色谱柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm),美国Agilent公司;H2050R型低温高速冷冻离心机,湖南湘仪实验仪器开发有限公司;DY89-II型电动玻璃匀浆机,宁波新芝科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 动物分组、造模及给药 30只SD大鼠,适应性饲养7d后,随机分为3组:空白对照组,模型对照组、龙胆泻肝汤组。空白对照组、模型对照组给予水,龙胆泻肝汤组给予10 mL/kg的龙胆泻肝汤药液(即相当于30 mg/kg生药量),连续灌胃给药7d,末次给药后6h,除空白对照组给予花生油2 mL/kg腹腔注射外,模型对照组、龙胆泻肝汤组按2 mL/kg腹腔注射50% CCl_4 花生油(V/V)1次,建立ALI模型。造模后24h,腹主动脉取血,分离血清,取肝脏部分进行组织病理学检查,部分-80℃保存。

1.2.2 血清肝功能指标的测定 以全自动生化分析仪测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)水平。

1.2.3 肝组织样品前处理 取适量(约1.0 g)肝脏加2倍重生理盐水,以电动玻璃匀浆机研磨制成匀浆,放置于4 mL离心管中于4℃ 12 000 r/min离心15 min,移取上清液100 μL 于1.5 mL离心管中,加入250 μL 乙腈,混悬3 min,冰浴超声10 min,于4℃ 12 000 r/min离心10 min,吸取上清液200 μL

于1.5 mL离心管中冷冻干燥。冷冻干燥后,加入50 μL 衍生化试剂[V(BSTFA):V(TMCS) = 99:1]和50 μL 吡啶,于80℃水浴反应0.5 h,1 h后加含0.10 g/L二十二烷的正庚烷150 μL ,混匀后4℃ 12 000 r/min离心10 min,移取上清液到1.5 mL离心管,用于GC-MS分析。

1.2.4 GC-MS条件 参考文献方法^[15-16]设置GC-MS条件如下:进样口温度:280℃;分流比为10:1;载气:He;流速:1.88 mL/min;柱温程序:起始温度60℃,保持3 min后,以4℃/min的速度升温,升温到290℃,290℃保持10 min。进样量:0.2 μL 。离子源和接口温度分别为200℃和300℃;电子能量:0.85 eV;溶剂延迟:5.5 min;全扫描模式,扫描范围35~600 m/z 。

1.3 数据处理与分析

GC-MS工作站自动获取总离子流(TIC)图和离子片段谱。采用XCMS Online对得到的TIC图进行峰提取、峰对齐、峰匹配和峰强度校正等操作,采用SIMCA-P 13.0进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(O-PLS-DA)。筛选出VIP>1且 $P<0.05$ 的数据,利用NIST数据库、METLIN数据库、HMDB数据库进行标志物鉴定。利用MetaboAnalyst进行热图分析和代谢通路分析。

2 结果与分析

2.1 龙胆泻肝汤对ALI大鼠血清ALT、AST和ALP的影响

从表1可以看出,与空白对照组比较,模型对照组血清ALT、AST和ALP水平极显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,龙胆泻肝汤能显著降低ALI血清中的ALT、AST和ALP水平($P<0.05$),表明经龙胆泻肝汤治疗后ALI损伤有所减轻。

2.2 龙胆泻肝汤对ALI大鼠肝脏组织病理学的影响

从图1可以看出,空白对照组大鼠肝脏组织未见任何异常;模型对照组肝脏组织肝小叶结构紊乱

表1 不同处理对大鼠肝功能指标的影响

组别	肝功能指标(U/L)		
	ALT	AST	ALP
空白对照组	37.20 ± 13.27	54.46 ± 18.24	48.50 ± 15.93
模型对照组	180.45 ± 22.08**	239.31 ± 15.05**	229.08 ± 18.65**
龙胆泻肝汤组	88.78 ± 17.59*	95.29 ± 16.33*	95.47 ± 17.92*

注:与空白组比较,**表示差异极显著($P<0.01$);与模型组比较,*表示差异显著($P<0.05$)。n=10。

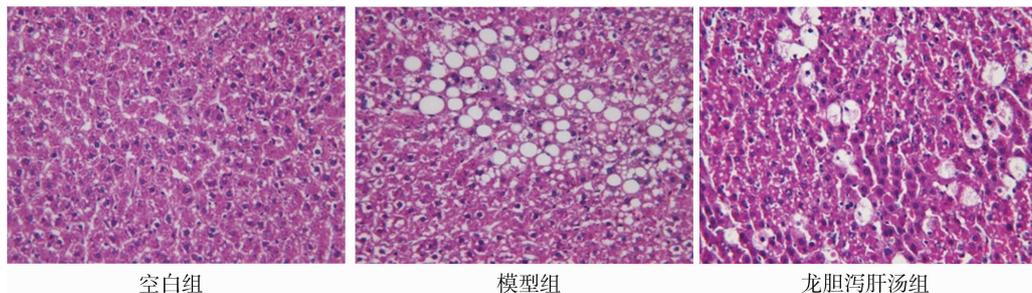


图1 不同处理对大鼠肝脏组织病理学的影响(HE, ×200)

不清,肝细胞明显变性及气球样变性,小区出现多量炎细胞浸润,汇管区大量炎细胞浸润及明显纤维结缔组织增生;经龙胆泻肝汤治疗后肝细胞坏死情况有明显改善,部分区域存在肝细胞稍有轻微水肿,但大部分肝细胞结构正常,偶见气球样变。

2.3 龙胆泻肝汤治疗 ALI 大鼠的代谢组学机制

2.3.1 代谢轮廓分析 通过 XCMS Online 软件构建完整的 TIC(图 2)。采用 SIMCA - P 13.0 对肝匀浆代谢物进行 PCA 分析,由 PCA(图 3)可以看出,空白对照组,模型对照组、龙胆泻肝汤组能够分开并且呈明显的聚类特征。空白对照组样本主要聚集在 PCA 图的下方,模型对照组样本主要聚集在 PCA 图的上方,给予龙胆泻肝汤治疗后,样本点的

分布逐渐向下方移动,与模型对照组分离且有向空白对照组趋近的趋势。

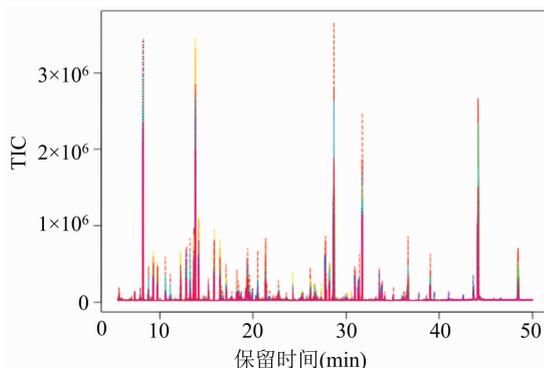
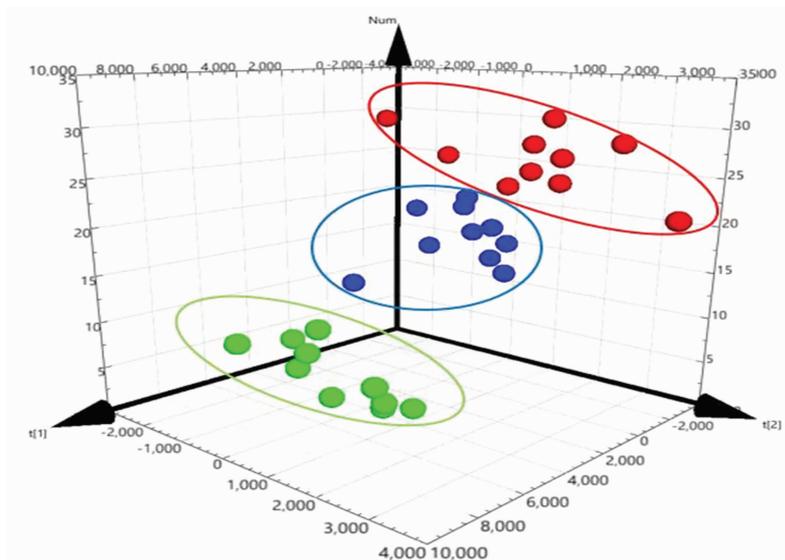


图2 不同处理组大鼠的 TIC



绿色为空白对照组; 红色为模型对照组; 蓝色为龙胆泻肝汤组

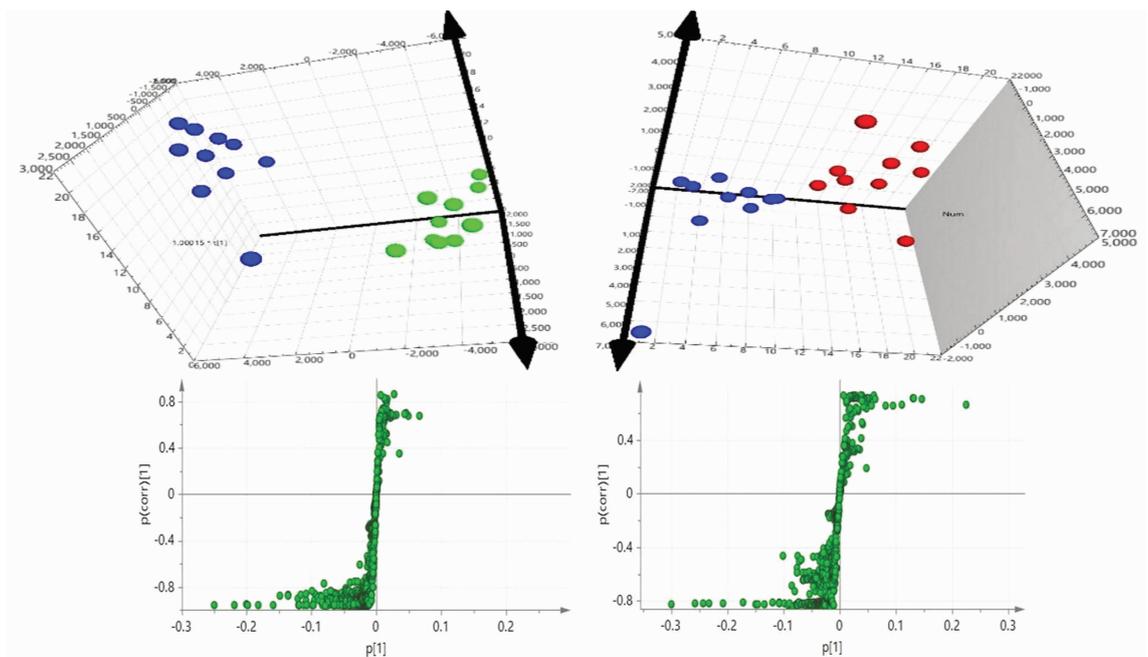
图3 3组处理大鼠的 PCA(3D)得分

2.3.2 标志物的鉴定 分别对空白对照组、模型对照组龙胆泻肝汤组和模型对照组进行 O - PLS - DA 分析,得出 O - PLS - DA、S - plot(图 4)。S - plot 图远离原点, VIP > 1.0 且 P < 0.05 的代谢物被认为是

潜在的生物标志物。经过筛选鉴定最终确定了 8 种化合物为生物标志物(表 2),分别为丙酮酸、肌氨酸、延胡索酸、琥珀酸、L - 别苏氨酸、4 - 羟基脯氨酸、柠檬酸和吡啶乳酸。其中与空白对照组比较,

模型对照组中丙酮酸、延胡索酸、琥珀酸、*L*-别苏氨酸和柠檬酸含量下降($P < 0.05$),肌氨酸、4-羟基脯氨酸和吡啶乳酸含量升高($P < 0.05$),而龙胆泻肝汤

组中丙酮酸、延胡索酸、琥珀酸、*L*-别苏氨酸和柠檬酸含量较模型组有显著升高($P < 0.05$),肌氨酸、4-羟基脯氨酸和吡啶乳酸含量降低($P < 0.05$)。



A—模型对照组与空白对照组 O-PLS-DA; B—S-plot; C—模型对照组与龙胆泻肝汤组 O-PLS-DA; D—S-plot;
绿色为空白对照组; 蓝色为模型对照组; 红色为龙胆泻肝汤组

图4 不同处理组代谢物的 OPLS-DA、S-plot

表2 鉴定的生物标志物

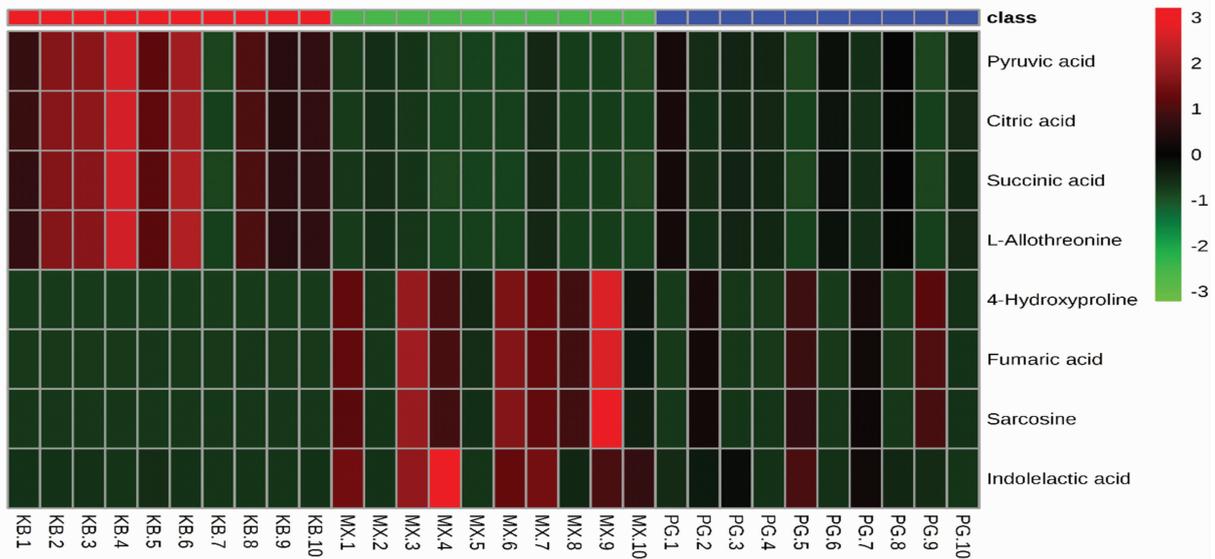
保留时间 (min)	分子量	分子式	<i>P</i> 值	倍数变化	标志物	变化趋势 a	变化趋势 b
8.173 2	88.062 1	C ₃ H ₄ O ₃	0.018 8	4.098	丙酮酸	↓*	↑*
11.650 9	89.093 2	C ₃ H ₇ NO ₂	0.020 3	3.045	肌氨酸	↑*	↓*
11.651 6	116.072 2	C ₄ H ₄ O ₄	0.019 2	2.940	延胡索酸	↓*	↑*
8.171 2	118.088 0	C ₄ H ₆ O ₄	0.018 6	3.950	琥珀酸	↓*	↑*
8.168 6	119.119 2	C ₄ H ₉ NO ₃	0.017 8	4.710	<i>L</i> -别苏氨酸	↓*	↑*
11.652 6	131.129 9	C ₅ H ₉ NO ₃	0.019 7	2.790	4-羟基脯氨酸	↑*	↓*
8.168 7	192.124 0	C ₆ H ₈ O ₇	0.022 1	5.000	柠檬酸	↓*	↑*
31.816 8	205.210 0	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	0.016 5	3.300	吡啶乳酸	↑*	↓*

注: a 表示与空白对照组比较, 模型对照组标志物变化趋势; b 表示与模型对照组比较, 龙胆泻肝汤组标志物变化趋势; * 表示显著($P < 0.05$); 上调↑, 下调↓。

2.3.3 热图分析 利用 MetaboAnalyst 生成可视化热图以概述空白对照组、模型对照组和龙胆泻肝汤组生物标志物的强度情况。从图 5 可以看出, 每列表示空白对照组、模型对照组和龙胆泻肝汤组, 增加的表达式值从绿色到红色编码。从热图中可以看出龙胆泻肝汤组中生物标志物有向空白对照组转移的趋势。

2.3.4 代谢通路分析 通过数据库的匹配和相关

文献的查阅, 利用 MetaboAnalyst 对鉴定的 8 种生物标志物进行相代谢通路分析(表 3)。选取影响因子 (pathway impact) > 0.05 的代谢通路为主要的通路, 即三羧酸(TCA)循环, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 乙醛酸和二羧酸代谢, 丙酮酸代谢和糖酵解或糖异生 5 个代谢途径是与 ALI 的最相关代谢途径(图 6)。



红色组为空白对照组；绿色组为模型对照组；蓝色组为龙胆泻肝汤组

图5 热图分析

表3 MetaboAnalyst 分析的8种主要代谢途径

通路名称	敲击次数	影响因子	$-\lg(p)$ 值
乙醛酸和二羧酸代谢	1/16	0.296 30	2.431 0
TCA 代谢	4/20	0.177 94	13.103 0
丙酮酸代谢	1/22	0.187 54	2.127 5
糖酵解或糖异生	1/26	0.098 91	1.970 4
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	3/32	0.060 83	7.486 8
精氨酸和脯氨酸代谢	2/44	0.044 14	3.733 6
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	3/24	0.003 16	8.361 5
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	1/28	0.021 03	1.901 2

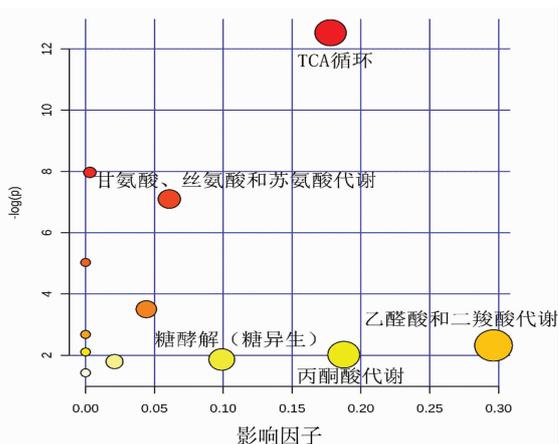


图6 代谢路径分析

3 结论与讨论

CCl_4 在体内经肝脏的细胞色素 P450 酶系统可生物转化成大量的活性氧自由基,进而引起细胞膜

的脂质过氧化^[17]。ALT 和 AST 是存在于肝细胞内的 2 种转氨酶,一旦肝细胞膜发生脂质过氧化,肝细胞膜损伤,ALT 和 AST 就会释放入血^[18]。因此,血液中 ALT 和 AST 水平异常升高是 ALI 的特征标志^[19]。此外,ALP 也是与 ALI 密不可分的判断指标^[20]。经龙胆泻肝汤治疗后,ALI 大鼠 ALT、AST 和 ALP 水平明显降低,表明龙胆泻肝汤有明显的治疗 ALI 的作用。

CCl_4 引起的 ALI 可以导致肝脏线粒体的氧化损伤^[21]。据相关研究,线粒体是肝脏能量代谢的主要场所,氧化损伤状态下,线粒体能量代谢受阻^[22]。丙酮酸、延胡索酸、琥珀酸和柠檬酸均参与丙酮酸代谢、TCA 循环和糖酵解途径。与空白对照组比较,模型对照组丙酮酸、延胡索酸、琥珀酸和柠檬酸水平均降低,表明 ALI 状态下,丙酮酸代谢、TCA 循环和糖酵解途径介导的能量代谢受阻。与模型对照组比较,龙胆泻肝汤组丙酮酸、延胡索酸、琥珀酸

和柠檬酸水平上升,表明龙胆泻肝汤通过调节丙酮酸代谢、TCA循环和糖酵解途径可以改善ALI能量代谢异常。

乙醛酸和二羧酸代谢与体内的氧化反应有关,扰动此代谢可间接导致TCA循环异常^[23]。柠檬酸是乙醛酸和二羧酸代谢与TCA循环的共同产物,模型对照组柠檬酸水平降低,表明经CCl₄刺激后,模型对照组大鼠出现了乙醛酸和二羧酸代谢的异常。龙胆泻肝汤可通过升高柠檬酸水平,调节此代谢通路而发挥保肝作用。

甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢与氧化损伤引起的炎症密切相关^[24]。炎症导致细胞氧化损伤加剧,进而引起机体对甘氨酸、色氨酸代谢的水平异常^[25]。肌氨酸和L-别苏氨酸属于甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,与空白对照组比较,模型对照组甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢异常升高,表明在ALI状态下,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢异常。经龙胆泻肝汤治疗后,肌氨酸和L-别苏氨酸降低,表明龙胆泻肝汤还可以通过调节抗甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢水平改善机体的氧化损伤,发挥保肝作用。

综上所述,龙胆泻肝汤有明显的治疗ALI作用,其机制与影响TCA循环,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,乙醛酸和二羧酸代谢,丙酮酸代谢和糖酵解或糖异生等通路有关。

参考文献:

[1] Wang A. Longdan Xiegan decoction [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 1999(3):230.

[2] 胡洪燕. 龙胆泻肝汤配合白班霜治疗外阴鳞状上皮增生患者疗效及对免疫功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(20):2238-2241.

[3] 尉瑞, 袁艳红, 陈璐璐, 等. 龙胆泻肝汤对分泌性中耳炎血清炎症因子、相关蛋白及免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019(8):14-19.

[4] 唐凯, 郭大东, 卢秀珍, 等. 龙胆泻肝汤对葡萄膜炎大鼠关键炎症细胞因子表达的影响[J]. 眼科新进展, 2017, 37(7):610-614, 618.

[5] 周春巧, 文君, 陈宇. 龙胆泻肝汤的药理作用及其临床应用研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(33):180-181.

[6] 吴伟莲, 黄昌锦, 曹桂娟. 龙胆泻肝汤治疗带状疱疹的效果及对p38 MAPK基因表达的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(12):144-147.

[7] 张泽鑫, 黄志凯, 曾慕煌, 等. 龙胆泻肝汤方的药理研究进展[J]. 国医论坛, 2018, 33(4):67-70.

[8] 焦恩虎, 李润东. 龙胆泻肝汤加减治疗药物性肝炎肝胆湿热证的

临床效果分析[J]. 中医临床研究, 2018, 10(8):57-58.

[9] Liang Q L, Luo G A, Zou J Q, et al. Strategy and technical support system for developing new TCM drugs [J]. World Science and Technology, 2008, 10(3):1-7.

[10] Zhu C, Liang Q L, Wang Y M, et al. Integrated development of metabolomics and its new progress [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(7):1060-1068.

[11] 赵群菊, 邱林, 李美红, 等. 代谢组学在中药方剂中的应用概况[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(5):222-224.

[12] Yu H, Zheng L, Yin L, et al. Protective effects of the total saponins from *Dioscorea nipponica* Makino against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through suppression of apoptosis and inflammation [J]. International Immunopharmacology, 2014, 19(2):233-244.

[13] Liu F, Lin Y, Li Z, et al. Glutathione S-transferase A1 (GSTA1) release, an early indicator of acute hepatic injury in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 71:225-230.

[14] Brown S A, Ellen A, Stonesifer E G, et al. Current and prospective therapies for acute liver failure [J]. Disease - a Month, 2018, 64(12):492.

[15] Liu A, Shen Y, Du Y, et al. Esculin prevents lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice [J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 125:418-422.

[16] 黄欣, 龚益飞, 虞科, 等. 基于气相质谱-质谱的代谢组学方法研究四氯化碳致小鼠急性肝损伤[J]. 分析化学, 2007(12):1736-1740.

[17] 柏冬, 宋剑南. 基于气相色谱-质谱联用和图模型分析的脂代谢异常患者血浆代谢组学研究[J]. 分析化学, 2012, 40(10):1482-1487.

[18] 王喜军, 孙文军, 孙晖, 等. CCl₄诱导大鼠肝损伤模型的代谢组学及茵陈蒿汤的干预作用研究[J]. 世界科学技术, 2006, 8(6):101-106.

[19] 陈宝芝, 李生, 吴金滢, 等. 北五味子粗多糖对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2014, 40(1):92-96, 221.

[20] 张玲莉, 彭燕. 急性肝损伤模型建立与血清生化指标相关性研究[J]. 中国药师, 2015, 18(9):1460-1463.

[21] 张艳, 李卉, 满成云, 等. 基于气相色谱质谱联用技术的平菇多糖治疗大鼠急性肝损伤的代谢组学研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20):303-307.

[22] Zhao X, Li R, Liu Y, et al. Polydatin protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017, 629:1-7.

[23] Murphy M P. How mitochondria produce reactive oxygen species? [J]. Biochemical Journal, 2009, 417(1):1-13.

[24] 张玲. 基于LC-Q/TOF-MS生当归及其不同炮制品挥发油干预LPS炎症大鼠的代谢组学研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2015.

[25] 李锦霞. 基于GC-MS生当归及其不同炮制品挥发油干预LPS炎症大鼠的代谢组学研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2015.