

- hypoxia-induced injury by targeting miR-214-5p in H9c2 cells
[J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 142(2): 69-78.
- [19] 邵正斌, 戴小华, 夏铭蔚, 等. 益气养阴、化痰通络法干预冠心病合并 2 型糖尿病 PCI 术后病人的临床研究[J].
中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(18): 2088-2091.
- [20] 倪子婷, 邵正斌. 益气养阴、化痰通络方治疗冠心病合并 2 型糖尿病 PCI 术后心绞痛临床研究[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(6): 439-443.

大黄水提物对正常大鼠干预机制的代谢组学研究

刘 振¹, 周 宁^{1,2}, 刘 通¹, 刘振辉¹, 张雅文¹, 冯卫生^{1,2}, 郑晓珂^{1,2*}
(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 河南省中药开发工程技术研究中心, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 基于 HPLC-Q/TOF-MS 代谢组学技术研究大黄水提物对正常大鼠的干预作用及相关机制。**方法** 将大鼠分为正常组和大黄水提物组, 给药 2 周后收集各组大鼠尿液、血清样本, 处理后进样分析, 并对采集的数据进行多元统计分析、代谢网络富集、生物学功能解析。**结果** 尿液和血清样本的主成分分析得分图显示, 大黄组与正常组均显著分离。经正交偏最小二乘判别分析, 分别鉴定出生物标志物 52 个(尿液)、38(血清)个。代谢网络富集和生物学功能解析显示, 这些生物标志物主要涉及酮体的合成与降解、谷氨酸和谷氨酰胺代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酰胺代谢、咖啡因代谢、三羧酸循环等代谢途径。**结论** 大黄可影响机体的脂质代谢、氨基酸代谢、神经递质以及肠道微生物等代谢途径, 从而发挥其泻下通便、降血脂、改善胃肠道疾病等作用。
关键词: 大黄水提物; 代谢组学; UPLC-Q/TOF-MS
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)04-1331-08
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.053

大黄为蓼科大黄属多年生高大草本植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎, 是我国传统中药之一^[1], 始载于《神农本草经》, 云“味苦寒, 主下淤血, 血闭, 寒热, 破症瘕积聚, 留饮宿食, 荡涤肠胃, 推陈致新, 通利水谷”。现代药理学研究发现大黄具有调节胃肠功能、心脑血管保护、抗炎、抗肿瘤及免疫调节等药理作用^[2-4], 但其泻下之性峻烈, 不可长期大量服用^[5]。

代谢组学是继基因组学、蛋白组学之后发展起来的一门新兴系统生物学方法, 是对机体内源性小分子代谢物的定性定量分析, 具有整体性、系统性的特点^[6-7], 在医药领域中的各个方面得到广泛应用, 包括疾病诊断、药理毒理研究、新药研发以及药物筛选等。

大黄成分复杂, 临床功效众多, 目前对其研究多为单个疾病的机制阐释, 缺乏整体性、系统性的研究。因此, 本实验利用代谢组学技术研究大黄水提物对正常大鼠整体代谢的干预作用, 全面系统地分析其对正常机体的影响, 以期从多方面、多角度阐释大黄的现代临床药理功效机制。

1 材料

- 1.1 动物 SD 雄性大鼠 16 只, SPF 级, 体质量 180 ~ 220 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2016-0006。大鼠分为正常组和大黄水提物组, 每组 8 只, 饲养于 18~22 ℃ 清洁级动物实验室内, 自由进食饮水, 适应性喂养 1 周。
- 1.2 药材 大黄购自河南中药材市场, 加 10 倍量蒸馏水煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并 2 次煎煮滤液, 浓缩。
- 1.3 试剂 甲醇、乙腈、甲酸(分析纯, 美国 Thermo Scientific 公司); 水为超纯水。
- 1.4 仪器 Advantage A10 型超纯水仪、BT25S 型十万分之一精密分析天平(德国 Sartorius 公司); 5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); SK-1 型快速混匀器(常州国宇仪器制造有限公司); 移液器(法国 Gilson 公司); Genesys 10 型分光光度计、Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪(美国 Thermo Scientific 公司); BCD-206TAS 型低温冰箱(青岛海尔股份有限公司); maXis HD Q-TOF 四极杆-飞行时间质谱(德国 Bruker 公司)。

2 方法

- 2.1 样本处理 大黄水提物组按 10.5 g/kg 剂量灌胃给药,

收稿日期: 2021-11-08

基金项目: 国家重点研发计划—中药现代化研究专项(2019YFC1708802); 国家自然科学基金项目(81903805)

作者简介: 刘 振, 男, 硕士, 从事中药活性成分及作用机制研究。Tel: 15538155471, E-mail: 1115171023@qq.com

* 通信作者: 郑晓珂, 女, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及作用机制研究。Tel: (0371) 60190296, E-mail: zhengxk.2006@163.com

正常组给予等量蒸馏水，给药 2 周后，大鼠置于代谢笼中收集 24 h 尿液，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液于离心管中，做好标记。收集尿液，10% 水合氯醛麻醉大鼠，腹主动脉取血，离心收集血清，置于-80 ℃超低温冰箱中冷冻保存。

实验前，将尿液在室温下解冻，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 500 μL，按 1：3 比例加入乙腈，涡旋沉淀蛋白，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，取上清至自动进样瓶中，然后等量吸取 50 μL 制备质控样品。血清室温解冻，取 200 μL，按 1：5 比例加入乙腈，涡旋沉淀蛋白，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，取上清至自动进样瓶中，同样制备质控样品。

2.2 色谱条件 RSLC 120 C₁₈ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，2.2 μm）；流动相 0.1% 甲酸（A）-乙腈（B），尿液梯度洗脱（0~5 min，5%~16% B；5~13 min，16%~18% B；13~16 min，18%~75% B；16~19 min，75%~85% B；19~20 min，85%~95% B），血清梯度洗脱（0~3 min，10%~65% B；3~6 min，65%~70% B；6~10 min，70%~75% B；10~13 min，75%~80% B；13~15 min，80%~90% B）；体积流量 0.3 mL/min；柱温 40 ℃；进样量 2 μL。

2.3 质谱条件 电喷雾离子源（ESI 源），正、负离子模式；脱溶剂氮气，体积流量 8 L/min，温度 230 ℃；雾化气压力 2.0 Bar；离子源能量 3.0 eV；毛细管电压正源 3.5 kV，

负源 3.2 kV；孔电压 45 V；碰撞能量 8.0 eV；锁定质量溶液 Tune mix（甲酸钠校正液），体积流量 60 μL/h；每 120 μs 采集 1 次谱图，中间间隔 10 μs。

2.4 数据分析 采集 UPLC-Q/TOF-MS 数据，利用仪器自带的 Profile Analysis 软件进行校正、归一化、滤噪、峰提取等预处理，得到 Bucket Table 预处理数据。将预处理数据导入到 SIMCA 软件中进行多元统计分析，主要包括主成分分析（PCA）、正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）等寻找潜在生物标志物。利用 HMDB、KEGG 等在线数据库对潜在生物标志物进行鉴定，并对鉴定的内源性标志物进行代谢通路图构建和生物学功能分析。

3 结果

3.1 大鼠一般体征 大黄水提物组大鼠大便便溏，尿液呈现红褐色，自主活动减少，喜欢扎堆；正常组大鼠大便呈颗粒状，尿液为淡黄色，活动较多。

3.2 代谢轮廓分析

3.2.1 主成分分析 将预处理的数据导入到 SIMCA 14.0 软件进行多元统计分析，由 PCA 得分图（图 1）可知，正常组与大黄水提物组样本点各自聚集，并且具有很好的分离趋势，说明两组大鼠的尿液、血清代谢轮廓特征具有明显的组间差异，正常大鼠在给予大黄水提物后体内代谢发生了明显改变。

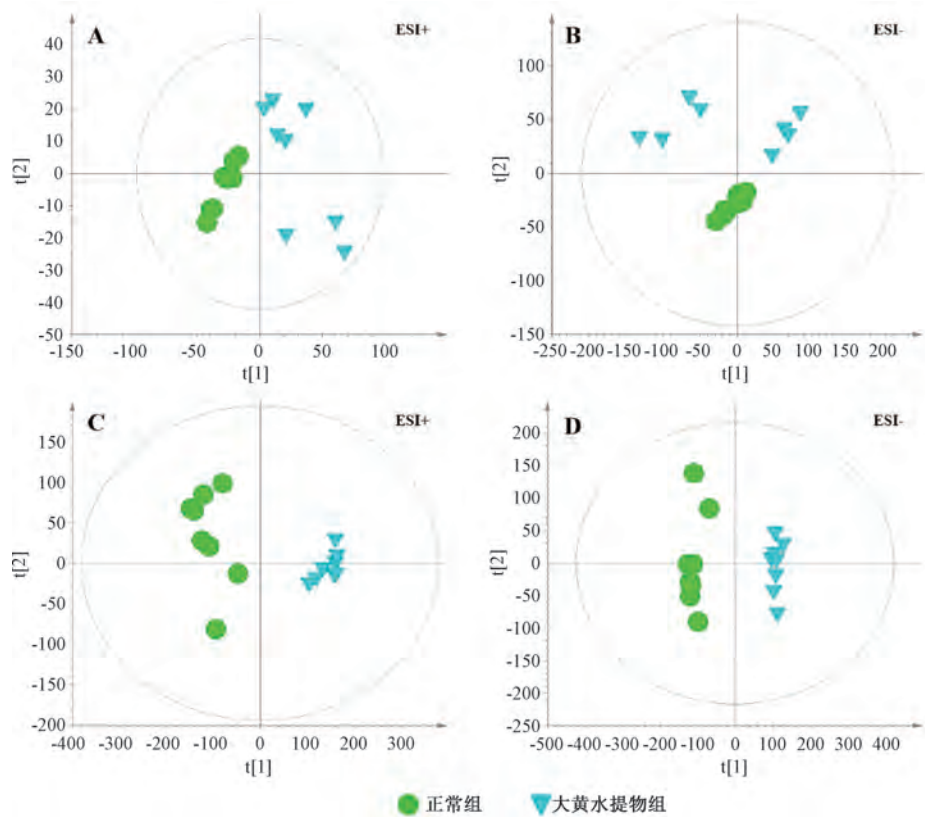


图 1 尿液正源（A）、负源（B）模式及血清正源（C）、负源（D）模式 PCA 得分图

3.2.2 潜在生物标志物筛选 对正常组和大黄水提物组大鼠尿液、血清数据分别进行 OPLS-DA 分析，结果见图 2。

由此可知，2 组样本点明显分离，说明大鼠体内代谢产物具有显著差异。结合 S-plot 载荷图（图 3），选择远离原点的

红色代谢物点 (VIP>3, $P<0.05$, VIP 表示代谢物对组间差异的贡献度) 作为潜在标志物, 并将其相对分子质量导入在线数据库 HMDB、KEGG 等进行比对, 筛选其中内源性的

生物标志物。最终, 尿液在正、负源模式下分别鉴定出生物标志物 33、19 个, 而血清分别鉴定出 26、12 个, 具体见表 1~2, 定量结果热图见图 4。

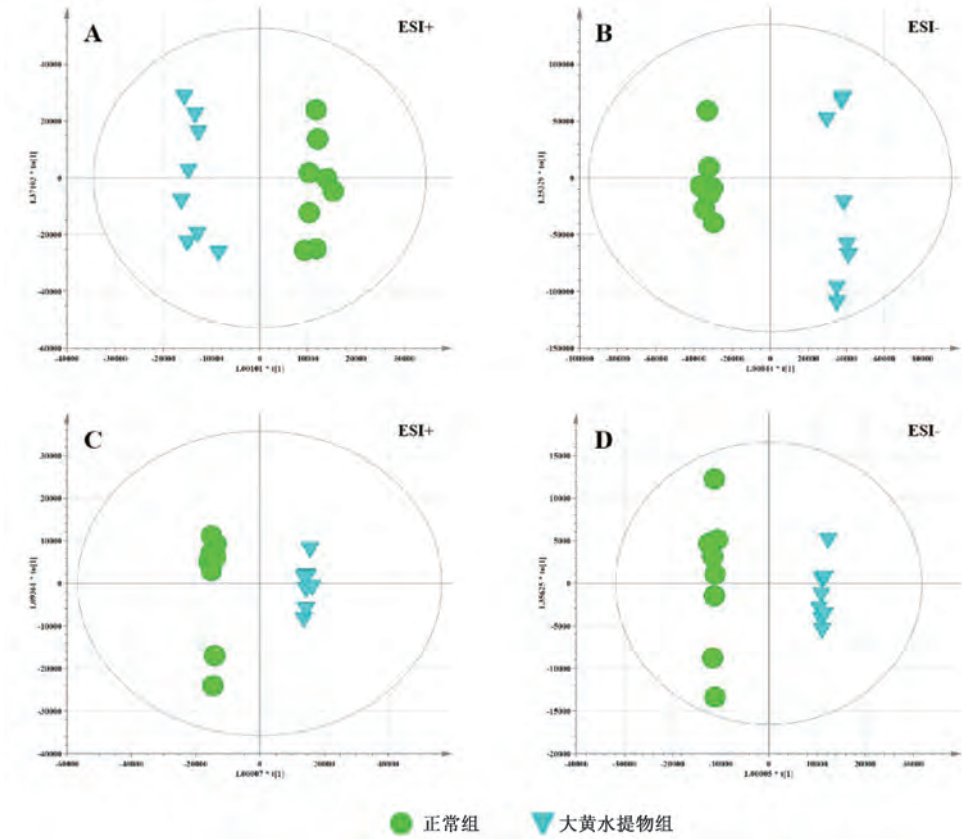


图 2 尿液正源 (A)、负源 (B) 模式及血清正源 (C)、负源 (D) 模式 OPLS-DA 得分图

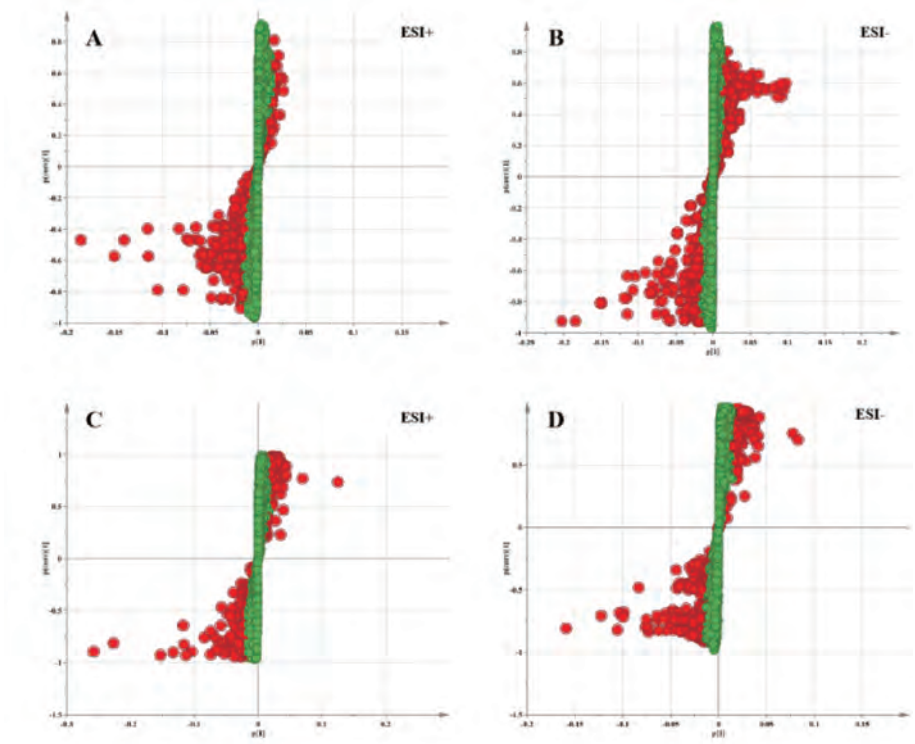


图 3 尿液正源 (A)、负源 (B) 模式及血清正源 (C)、负源 (D) 模式 S-plot 载荷图

表 1 尿液生物标志物信息

检测模式	<i>m/z</i>	标志物	中文名称	分子式	VIP	<i>P</i> 值	趋势
ESI+	104. 107 2	choline	胆碱	C ₅ H ₁₄ NO	7. 4	0. 012	↑
	114. 066 4	creatinine	肌酐	C ₄ H ₇ N ₃ O	14. 0	0. 024	↑
	115. 050 3	asparagine	天冬酰胺	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	4. 0	0. 014	↑
	116. 070 6	proline	脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	26. 2	0. 018	↑
	118. 086 5	valine	缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	4. 5	0. 013	↑
	120. 065 6	acetoacetic acid	乙酰乙酸	C ₄ H ₆ O ₃	8. 8	0. 006	↑
	121. 071 9	urea	尿素	CH ₄ N ₂ O	3. 1	0. 014	↑
	126. 022 1	taurine	牛磺酸	C ₂ H ₇ NO ₃ S	7. 0	0. 005	↓
	130. 086 4	ketoleucine	酮亮氨酸	C ₆ H ₁₀ O ₃	9. 1	0. 032	↑
	132. 101 9	leucine	亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	3. 5	0. 012	↑
	134. 059 9	indoxyl	吲哚酚	C ₈ H ₇ NO	3. 2	0. 004	↓
	146. 092 5	glutamine	谷氨酰胺	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	14. 0	0. 009	↑
	148. 133 1	heptanoic acid	庚酸	C ₇ H ₁₄ O ₂	3. 2	0. 005	↓
	151. 144 3	trimethylamine <i>N</i> -oxide	<i>N</i> -氧化三甲胺	C ₃ H ₉ NO	9. 8	0. 010	↑
	160. 096 6	pimelate	庚二酸	C ₇ H ₁₂ O ₄	5. 2	0. 007	↑
	162. 054 8	2-indolecarboxylic acid	2-吲哚羧酸	C ₉ H ₇ NO ₂	4. 3	0. 003	↑
	166. 072 0	1-methylxanthine	1-甲基黄嘌呤	C ₆ H ₆ N ₄ O ₂	8. 5	0. 007	↑
	172. 060 4	glutarylglucine	谷氨酰甘氨酸	C ₇ H ₁₁ NO ₅	5. 7	0. 008	↑
	174. 087 5	<i>N</i> -acetylaspargine	<i>N</i> -乙酰天冬酰胺	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₄	13. 2	0. 011	↑
	180. 065 6	hippuric acid	马尿酸	C ₉ H ₉ NO ₃	52. 3	0. 036	↑
	189. 086 8	<i>N</i> -acetylglutamine	<i>N</i> -乙酰谷氨酰胺	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	5. 4	0. 004	↑
	190. 049 8	kynurenic acid	犬尿喹啉酸	C ₁₀ H ₇ NO ₃	9. 7	0. 001	↑
	194. 081 4	phenylacetylglucine	苯乙酰甘氨酸	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	36. 5	0. 026	↑
	202. 047 4	adrenochrome	肾上腺素红	C ₉ H ₉ NO ₃	7. 6	0. 001	↑
	203. 127 8	sebacic acid	癸二酸	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	6. 4	0. 004	↓
	212. 103 0	4-aminohippuric acid	4-氨基马尿酸	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₃	7. 0	0. 009	↑
	216. 063 0	methyl hippurate	甲基马尿酸	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	7. 0	0. 005	↑
	220. 117 9	pantothenate	泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	5. 0	0. 003	↑
	232. 036 7	pyridoxine 5'-phosphate	5'-磷酸吡哆醇	C ₈ H ₁₂ NO ₆ P	6. 5	0. 006	↑
	242. 113 4	hydroxykynurenine	羟基犬尿氨酸	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄	4. 1	0. 003	↑
	261. 132 7	3-oxohexanoate	3-氧代己酸	C ₆ H ₁₀ O ₃	3. 4	0. 008	↓
	268. 103 8	inosine	肌苷	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	3. 2	0. 007	↑
	274. 274 2	palmitic acid	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	9. 3	0. 007	↑
ESI-	117. 019 4	succinate	琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	6. 3	0. 001	↑
	124. 991 4	isethionate	2-羧乙基磺酸	C ₂ H ₆ O ₄ S	3. 9	0. 001	↓
	133. 014 3	malate	苹果酸	C ₄ H ₆ O ₅	3. 6	0. 003	↑
	135. 029 9	hypoxanthine	次黄嘌呤	C ₅ H ₄ N ₄ O	3. 6	0. 003	↑
	142. 051 0	aminoadipic acid	氨基己二酸	C ₆ H ₁₁ NO ₄	10. 1	0. 003	↓
	145. 014 4	2-oxoglutarate	酮戊二酸	C ₅ H ₆ O ₅	10. 5	0. 007	↓
	157. 036 9	allantoin	尿囊素	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	7. 0	0. 006	↑
	158. 082 4	<i>N</i> -acetylvaline	<i>N</i> -乙酰缬氨酸	C ₇ H ₁₃ NO ₃	4. 6	0. 002	↓
	165. 055 8	homovanillin	高香草酸	C ₉ H ₁₀ O ₃	6. 6	0. 003	↑
	167. 021 1	uric acid	尿酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	7. 2	0. 033	↓
	173. 009 3	cis-aconitic acid	顺乌头酸	C ₆ H ₆ O ₆	8. 3	0. 019	↓
	189. 003 4	oxalosuccinate	草酰琥珀酸	C ₆ H ₆ O ₇	5. 2	0. 006	↓
	191. 019 9	citric acid	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	12. 5	0. 018	↓
	192. 067 0	3-methoxytyrosine	3-甲氧基酪氨酸	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄	19. 1	0. 022	↓
	201. 023 2	4-ethylphenylsulfate	4-乙基苯基硫酸	C ₈ H ₁₀ O ₄ S	45. 9	0. 045	↓
	212. 002 6	indoxyl sulfate	硫酸吲哚酚	C ₈ H ₇ NO ₄ S	34. 1	0. 025	↓
	242. 012 6	<i>O</i> -sulfotyrosine	邻磺基酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₆ S	4. 8	0. 024	↓
	254. 981 7	ascorbic acid 3-sulfate	抗坏血酸 3-硫酸盐	C ₆ H ₈ O ₉ S	16. 4	0. 006	↓
	261. 007 5	homovanillic acid sulfate	硫酸高香草酸	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	5. 7	0. 005	↑

注：↑表示标志物在大黄水提物组中上升，↓表示标志物在大黄水提物组中下降。

表 2 血清生物标志物信息

检测模式	<i>m/z</i>	标志物	中文名称	分子式	VIP	<i>P</i> 值	趋势
ESI+	104. 107 6	choline	胆碱	C ₅ H ₁₄ NO	10. 7	0. 010	↓
	118. 086 8	valine	缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	9. 2	0. 013	↓
	132. 102 5	leucine	亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	5. 0	0. 019	↓
	166. 086 9	epinephrine	肾上腺素	C ₉ H ₁₃ NO ₃	5. 8	0. 024	↓
	188. 071 0	indolelactic acid	吲哚乳酸	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	5. 3	0. 027	↓
	203. 053 1	glucose	葡萄糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	7. 7	0. 006	↓
	204. 123 5	<i>L</i> -acetylcarnitine	<i>L</i> -乙酰肉碱	C ₉ H ₁₈ NO ₄	5. 4	0. 009	↓
	205. 097 9	tryptophan	色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	10. 0	0. 049	↓
	274. 274 9	palmitic acid	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	10. 8	0. 013	↓
	300. 290 2	sphingosine	鞘氨醇	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	4. 9	0. 028	↓
	302. 305 9	stearic acid	硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	4. 2	0. 005	↓
	303. 231 8	linoleaidate	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	4. 0	0. 002	↓
	318. 300 9	phytosphingosine	植物鞘氨醇	317. 2930	9. 3	0. 013	↓
	330. 337 1	arachidic acid	花生四烯酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	4. 4	0. 013	↑
	358. 368 6	butyl octadecanoate	十八烷酸丁酯	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	3. 0	0. 008	↑
	375. 289 7	deoxycholic acid	脱氧胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	4. 2	0. 013	↓
	396. 269 3	3-hydroxytridecanoyl carnitine	3-羟基十三烷酰基肉碱	C ₂₀ H ₃₉ NO ₅	3. 8	0. 000	↑
	424. 342 7	linoleyl carnitine	亚油基肉碱	C ₂₅ H ₄₆ NO ₄	5. 2	0. 003	↑
	426. 322 1	cholic acid	胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	3. 8	0. 004	↓
	482. 322 7	LysoPE(18 : 0/0 : 0)	LysoPE(18 : 0/0 : 0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	3. 4	0. 001	↓
	496. 339 9	LysoPC(16 : 0/0 : 0)	LysoPC(16 : 0/0 : 0)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	25. 8	0. 058	↓
	502. 293 6	LysoPE[18 : 1(9Z)/0 : 0]	LysoPE[18 : 1(9Z)/0 : 0]	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	5. 2	0. 004	↑
	510. 353 5	LysoPE(0 : 0/20 : 0)	LysoPE(0 : 0/20 : 0)	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	3. 9	0. 002	↓
	522. 356 6	LysoPC[18 : 1(9Z)/0 : 0]	LysoPC[18 : 1(9Z)/0 : 0]	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	9. 5	0. 019	↓
	524. 369 7	LysoPC(0 : 0/18 : 0)	LysoPC(0 : 0/18 : 0)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	24. 6	0. 003	↓
	543. 342 4	LysoPS(18 : 0/0 : 0)	LysoPS(18 : 0/0 : 0)	C ₂₄ H ₄₈ NO ₉ P	7. 2	0. 004	↓
ESI-	124. 007 3	taurine	牛磺酸	C ₂ H ₇ NO ₃ S	3. 0	0. 012	↓
	128. 035 2	glutamate	谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	6. 8	0. 031	↓
	129. 055 6	ketoleucine	酮亮氨酸	C ₆ H ₁₀ O ₃	6. 4	0. 008	↓
	212. 002 1	indoxyl sulfate	硫酸吲哚酚	C ₈ H ₇ NO ₄ S	3. 1	0. 006	↓
	281. 248 3	octadecadienoate	十八碳二烯酸酯	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	5. 1	0. 006	↑
	436. 282 9	LysoPE(P-16 : 0/0 : 0)	LysoPE(P-16 : 0/0 : 0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	4. 5	0. 003	↓
	464. 313 8	LysoPE(P-18 : 0/0 : 0)	LysoPE(P-18 : 0/0 : 0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₆ P	4. 1	0. 003	↓
	476. 277 8	LysoPE[0 : 0/18 : 2(9Z,12Z)]	LysoPE[0 : 0/18 : 2(9Z,12Z)]	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	4. 6	0. 003	↑
	480. 309 1	LysoPC(15 : 0/0 : 0)	LysoPC(15 : 0/0 : 0)	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	3. 2	0. 003	↓
	496. 273 1	taurocholic acid	牛磺胆酸	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	5. 7	0. 014	↓
	498. 288 8	taurodeoxycholic acid	牛磺脱氧胆酸	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	7. 9	0. 024	↓
	640. 291 4	S-(PGJ2)-glutathione	S-(PGJ2)-谷胱甘肽	C ₃₀ H ₄₇ N ₃ O ₁₀ S	4. 3	0. 021	↓

注：↑表示标志物在大黄水提取物组中上升，↓表示标志物在大黄水提取物组中下降。

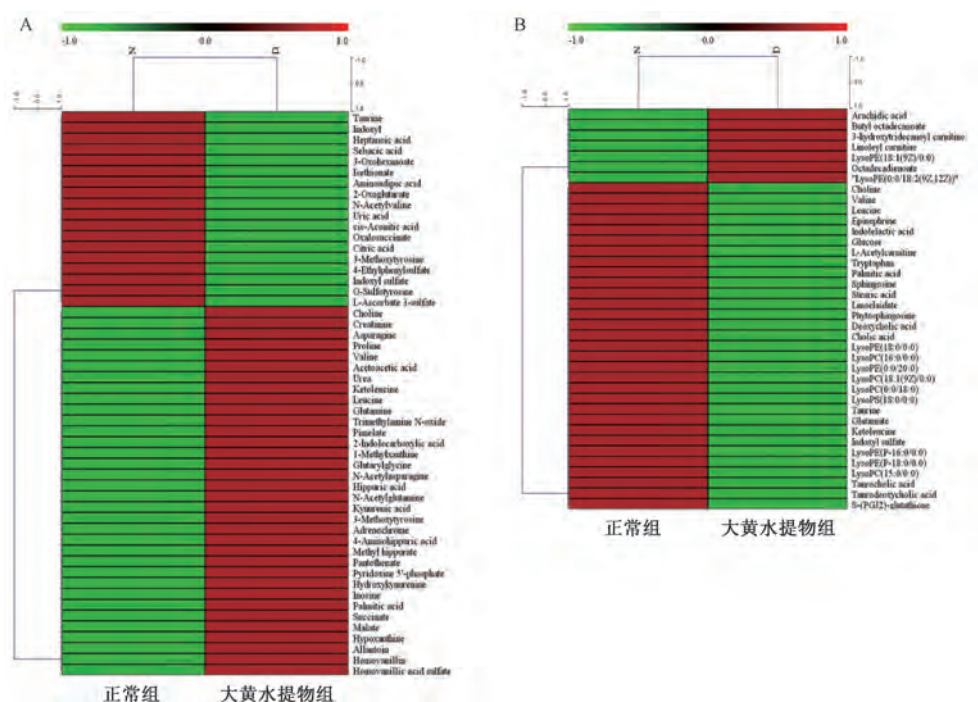
3.3 生物标志物代谢通路分析 将鉴定的生物标志物导入到 MetaboAnalyst 14.1 在线数据库进行通路富集分析，发现主要涉及到酮体的合成与降解、谷氨酸和谷氨酰胺代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酰胺代谢、咖啡因代谢、三羧酸循环等代谢途径，见图 5。再结合 KEGG 数据库中生物标志物的生物学功能信息，构建各生物标志物的代谢网络图，发现这些标志物主要涉及到能量代谢、氨基酸代谢、神经递质代谢、脂质代谢等，见图 6。

4 讨论

4.1 脂质代谢 研究表明，高脂饮食诱导的血脂异常仓鼠血清中溶血磷脂（LysoPC、LysoPE 等）及相关酶水平紊乱，其中溶血磷脂胆碱等水平升高，学者认为部分溶血磷

脂成分可作为血脂异常的生物标志物^[8]。本实验结果显示，大黄水提取物大鼠血清样品中脂肪酸及次级产物水平变化紊乱，而溶血磷脂（LysoPE，LysoPC，LysoPS）等水平主要呈下降趋势，说明大黄可以改变正常大鼠血清脂质水平，以降低血脂为主。

胆汁酸由胆固醇在肝脏中代谢产生，可促进脂质的消化吸收，在脂质代谢与胆固醇平衡的调节中发挥重要作用^[9]。牛磺酸是一种在哺乳动物血浆和细胞中高表达的半必需氨基酸，具有调节离子通量和控制细胞体积的作用，并作为共轭胆汁酸的底物形成牛磺胆酸盐类物质^[10]。本实验结果显示，大黄水提取物大鼠血清中牛磺酸、胆酸及其衍生物脱氧胆酸、牛磺胆酸、脱氧牛磺胆酸水平均下降，而尿液中牛磺酸及其衍生物 2-羟乙基磺酸水平增加，提示



注：红色表示标志物在大黄水提物组中上调，绿色表示标志物在大黄水提物组中下调。

图 4 尿液 (A)、血清 (B) 中生物标志物聚类热图

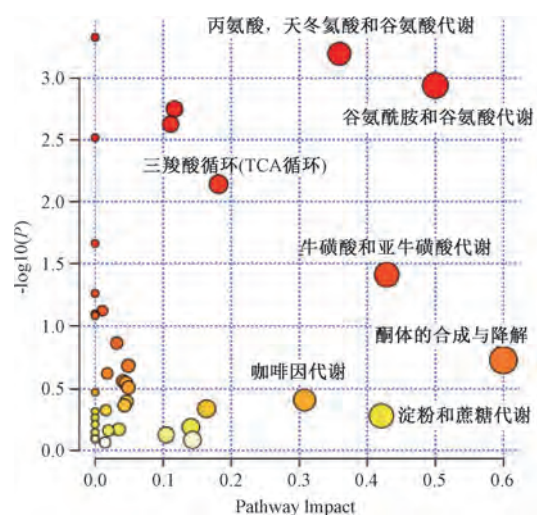


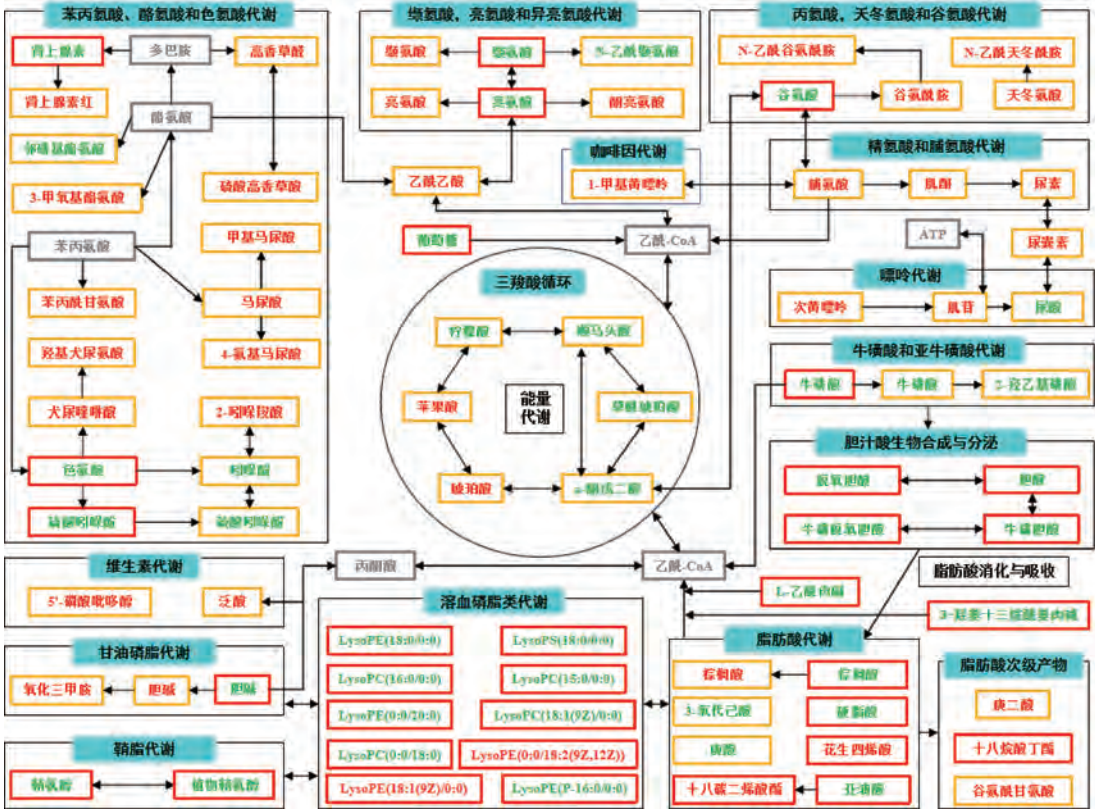
图 5 差异生物标志物的通路富集分析

大黄提取物可降低机体胆汁酸类物质的合成与分泌，并加速其排泄。涂灿等^[11]研究表明，大黄可以通过影响初级胆汁酸合成、牛磺酸和亚牛磺酸代谢途径对正常大鼠和肝纤维化大鼠起到双向调节作用。因此，推测大黄提取物可能通过降低机体胆汁酸及其衍生物代谢水平从而影响体内脂质类物质的消化与吸收以及血脂水平。

乙酰胆碱可以兴奋胃肠平滑肌，诱导胃肠平滑肌收缩，从而促进胃肠运动^[12]。本实验结果显示，大黄作用于正常大鼠后其血清胆碱水平降低，尿液胆碱水平升高，提示大黄提取物可能通过抑制乙酰胆碱酯酶活性降低血清中胆碱水平，提高乙酰胆碱水平，从而促使发挥其促进胃肠道蠕动、泻下通便的功效。

4.2 氨基酸类代谢 谷氨酸是脑组织中最丰富的兴奋性神经递质，过量的谷氨酸会产生神经毒性，谷氨酰胺-谷氨酸循环在星形胶质细胞中进行并对两者在机体内的水平变化起到关键调节作用^[13-14]。N-乙酰天冬氨酸是哺乳动物中枢神经中浓度较高的大分子物质，其前体物质 N-乙酰天冬酰谷氨酸可以抑制谷氨酸的释放^[15]。本实验结果显示，大黄水提物组大鼠血清中谷氨酸水平降低，尿液样本中谷氨酰胺、N-乙酰谷氨酰胺、天冬氨酸和 N-乙酰天冬氨酸水平增加，提示大黄提取物可能通过加速排泄兴奋性氨基酸类神经递质而降低其血清水平，从而减少神经毒性，发挥对神经系统的保护作用。

色氨酸是合成 5-羟色胺的前体^[14]，苯丙氨酸在苯丙氨酸羟化酶的作用下可以合成酪氨酸^[16]，酪氨酸是儿茶酚胺类神经递质多巴胺、肾上腺素等合成的前体物质^[17]。研究表明，多巴胺和 5-羟色胺可以通过其相应受体协同调节、控制肠道节律性收缩和放松等功能^[18]；脑出血应激状态下交感-肾上腺髓质系统为维持内环境的稳定会激活交感-肾上腺髓质系统，儿茶酚胺（肾上腺素、去甲肾上腺素等）水平升高会引起肠黏膜缺血、氧化应激进而改变肠黏膜组织形态学^[19]。本实验结果显示，大黄水提物组大鼠血清中色氨酸水平降低而尿液中其代谢产物犬尿喹啉酸、羟基犬尿氨酸、2-吲哚羧酸水平升高；血清中酪氨酸衍生物肾上腺素、邻磺基酪氨酸水平降低，而尿液中苯丙氨酸代谢产物马尿酸、甲基马尿酸等水平上升。因此，推测大黄提取物可能通过增加芳香族氨基酸代谢产物排泄，从而减少机体血清中相关神经递质肾上腺素、5-羟色胺和多巴胺的水平，进而干预肠道功能。



注：红色字体表示标志物在大黄水提物组中上调，绿色字体表示标志物在大黄水提物组中下调，灰色字体表示未检测到但起联接作用的标志物。红色边框表示血清中检测的标志物，黄色边框表示尿液中检测的标志物。

图 6 生物标志物代谢网络图

4.3 能量代谢 糖类、脂肪、蛋白质是人和动物体的三大营养物质，并参与机体的物质、能量代谢过程，是维持生命生理活动的物质基础。本实验结果显示，大黄水提物组血清葡萄糖水平降低，脂肪酸、氨基酸及其相关产物水平也呈降低趋势，而尿液中的相关产物水平以上升趋势为主，说明大黄水提物可抑制正常大鼠体内的物质代谢。与此同时，大黄水提物组尿液样本中三羧酸循环相关标志物柠檬酸、顺乌头酸、α-酮戊二酸、草酰琥珀酸水平降低，推测其体内能量代谢亦受到抑制。提示大黄提取物可能通过降低血清葡萄糖、脂肪酸和氨基酸水平，影响机体三羧酸循环物质基础水平，进而抑制机体能量代谢。这与本课题组前期研究结果相一致，即寒凉性中药具有抑制机体物质能量代谢的作用^[20]。

4.4 其他代谢途径 肾上腺素具有收缩血管、升高血压、兴奋心脏以及兴奋交感神经系统的作用^[21]，肾上腺素红是肾上腺素的一种红色氧化产物^[22-23]。本实验结果显示，大黄水提物组大鼠血清中肾上腺素水平降低，尿液中肾上腺素红水平升高，说明大黄提取物可以加速肾上腺素氧化物的尿液排泄，降低其血清水平来发挥改善高血压的功效。

4.5 大黄药性评价 大黄味苦，性寒，主沉降泻下，归胃、肝、大肠经。本实验结果与大黄的药性记载高度吻合，即①大黄水提物可通过影响正常机体胆汁的合成、分泌与排泄，抑制脂质吸收，减少血糖水平，干扰体内三羧酸循

环等途径抑制能量代谢，印证了大黄寒凉之性；②大黄中的活性成分可以通过影响体内胆碱、色氨酸、酪氨酸等相关神经递质产物来促进肠道平滑肌蠕动，发挥其泻下功效，印证了大黄沉降之性；③给予大黄干预后，肝胆、肠道代谢相关的胆酸、牛磺胆酸、马尿酸、氧化三甲胺等生物标志物也受到了一定影响，印证了大黄归经于胃、肝、大肠。

5 结论

本实验基于代谢组学技术研究了大黄提取物对正常大鼠的干预作用及相关机制。在尿液、血清中分别鉴定出生物标志物 52、38 个，涉及到糖类、氨基酸类以及脂质类等生命活动基础物质，可通过影响脂肪酸代谢、磷脂代谢、三羧酸循环、氨基酸代谢、神经递质等代谢途径，而发挥其降血脂、降血压、改善胃肠道疾病等作用。

参考文献：

[1] 王 玉, 杨 雪, 夏鹏飞, 等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50 (19): 4821-4837.

[2] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 121-126.

[3] 吴晓青, 胡昌江, 赵 玲, 等. 生、熟大黄泻下作用及其机制研究[J]. 中药材, 2014, 37(9): 1562-1565.

[4] 杜怡雯, 冯江毅, 胡黎文, 等. 大黄的药理活性研究及临床

应用[J]. 中医临床研究, 2018, 10(25): 24-27.

[5] 徐忠云. 浅析大黄安全用药[J]. 中国医药指南, 2012, 10(9): 524-525.

[6] 杨倩春, 李思宁, 陈 硕, 等. 代谢组学的运用及其研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(2): 176-178.

[7] 杜铁帅, 孟西麦蒙, 叶 星, 等. 代谢组学技术在法医病理学中的研究进展[J]. 法医学杂志, 2020, 36(3): 347-353.

[8] Suárez-García S, Caimari A, Del Bas J M, *et al.* Serum lysophospholipid levels are altered in dyslipidemic hamsters[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10431.

[9] Wahlström A, Sayin S I, Marschall H U, *et al.* Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1): 41-50.

[10] Guizoni D M, Vettorazzi J F, Carneiro E M, *et al.* Modulation of endothelium-derived nitric oxide production and activity by taurine and taurine-conjugated bile acids [J]. *Nitric Oxide*, 2020, 94: 48-53.

[11] 涂 灿, 何 琴, 周元园, 等. 基于代谢组学的大黄对正常和肝纤维化大鼠双向作用对比研究[J]. 药学报, 2018, 53(7): 1139-1147.

[12] Carron M, Toniolo A, Ori C. Prolonged cholinergic effects after the reversal of neuromuscular blockade with neostigmine [J]. *J Clin Anesth*, 2016, 28: 85.

[13] Zhang Y Q, Yuan S, Pu J C, *et al.* Integrated metabolomics and proteomics analysis of hippocampus in a rat model of depression [J]. *Neuroscience*, 2018, 371: 207-220.

[14] Zheng S N, Zhang S S, Yu M Y, *et al.* An ¹H-NMR and UPLC-MS-based plasma metabonomic study to investigate the biochemical changes in chronic unpredictable mild stress model of depression[J]. *Metabolomics*, 2011, 7(3): 413-423.

[15] Chen G H, Yang D Y, Yang Y T, *et al.* Amino acid metabolic dysfunction revealed in the prefrontal cortex of a rat model of depression[J]. *Behav Brain Res*, 2015, 278: 286-292.

[16] Li Z Y, Zheng X Y, Gao X X, *et al.* Study of plasma metabolic profiling and biomarkers of chronic unpredictable mild stress rats based on gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(24): 3539-3546.

[17] Liu Y S, Yieh L, Yang T, *et al.* Metabolomic biosignature differentiates melancholic depressive patients from healthy controls[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 669.

[18] Liu H N, Hirata H, Okuno Y, *et al.* Dopamine and serotonin receptors cooperatively modulate pacemaker activity of intestinal cells of Cajal[J]. *Chin J Physiol*, 2018, 61(5): 302-312.

[19] 邱 月, 宁显忠. 脑出血大鼠肠黏膜组织形态学变化与血浆儿茶酚胺水平的关系[J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(2): 129-132.

[20] Zhou N, Yang Y Y, Li K, *et al.* Integrating strategies of chemistry, biochemistry and metabolomics for characterization of the medication principle of “treating cold/heat syndrome with hot/cold herbs” [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 239: 111899.

[21] 冯卫生, 刘 通, 周 宁, 等. 水栀子对原发性高血压大鼠血压影响的代谢组学研究[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(6): 670-676.

[22] Green D E, Richter D. Adrenaline and adrenochrome [J]. *Biochem J*, 1937, 31(4): 596-616.

[23] Sirota T V. A new approach to studying the autoxidation of adrenaline: Possibility of the determination of superoxide dismutase activity and the antioxidant properties of various preparations by polarography[J]. *Biomed Khim*, 2012, 58(1): 77-87.