

· 组学研究 ·

葛根芩连汤干预 2 型糖尿病前期大鼠的代谢机制研究

周子妍¹, 曾国威¹, 盛译莹¹, 姚亮亮¹, 徐国良^{1,2,3}, 张启云^{1,2}, 李冰涛^{1,2}, 姜丽^{1,2}, 曾治君^{1,2} (1. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 江西 南昌 330004; 2. 江西省中医病因生物学重点实验室, 江西 南昌 330004; 3. 江西省中药药理重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 探讨葛根芩连汤对高脂诱导的 2 型糖尿病大鼠预防作用的代谢机制。**方法** 将 SD 大鼠随机分为正常组(8 只)和高脂造模组(40 只), 分别使用基础饲料和高脂饲料喂养 12 周。高脂造模组大鼠产生胰岛素抵抗(IR)后, 将高脂造模组大鼠再随机分为模型组及葛根芩连汤低、中、高剂量组(1.65、4.96、14.86 g·kg⁻¹), 每组 8 只。模型组及不同剂量给药组继续给予高脂饲料喂养, 给药组给予不同剂量的葛根芩连汤进行干预, 灌胃给药, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 16 周。检测大鼠空腹血糖值及空腹胰岛素含量, 计算 IR 指数; 使用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UHPLC/Q-TOF-MS)结合多元分析方法, 分析大鼠血清中的内源性代谢物及其变化差异, 寻找葛根芩连汤干预 IR 大鼠及预防 2 型糖尿病的潜在生物标记物。**结果** 高脂饲料喂养 12 周后, 与正常组比较, 造模组大鼠的 IR 指数明显升高($P < 0.05$), 血糖无明显变化($P > 0.05$)。给药 16 周后, 与正常组比较, 模型组大鼠的 IR 指数及血糖值均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 葛根芩连汤低、中剂量组大鼠的 IR 指数显著降低($P < 0.01$), 葛根芩连汤高剂量组的 IR 指数无明显变化($P > 0.05$); 葛根芩连汤低剂量组的空腹血糖值明显降低($P < 0.05$), 而葛根芩连汤中、高剂量组的空腹血糖值无明显变化($P > 0.05$)。大鼠血清代谢组分析鉴定共得到 4 种潜在代谢标志物, 分别是 Hippuric acid(马尿酸)、12-Ketodeoxycholic acid(12-去氧胆酸)、3-Oxo-4,6-choladienoic acid 和 LysoPC[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)](溶血磷脂酰胆碱, LPC)。**结论** 葛根芩连汤可以降低 IR 大鼠的胰岛素抵抗指数, 同时可预防血糖升高, 其机制可能与调节胆汁酸代谢、磷脂代谢以及肠道菌群代谢有关。

关键词: 葛根芩连汤; 胰岛素抵抗; 2 型糖尿病; 代谢组学; 超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱; 代谢机制; 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)02-0245-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.02.014

Study on the Mechanism of Gegen Qin Lian Decoction in Preventing Type 2 Diabetic Rats

ZHOU Ziyen¹, ZENG Guowei¹, SHENG Yixuan¹, YAO Liangliang¹, XU Guoliang^{1,2,3}, ZHANG Qiyun^{1,2}, LI Bingtao^{1,2}, JIANG Li^{1,2}, ZENG Zhijun^{1,2} (1. Research Center for Differentiation and Development of Traditional Chinese Medicine Basic Theory, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Jiangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Etiopathogenesis, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 3. Jiangxi Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the metabolic mechanism of Gegen Qin Lian Decoction(GQD) on prevention of type 2 diabete in rats induced by high-fat diet. **Methods** SD rats were randomly divided into normal group and

收稿日期: 2020-02-20

作者简介: 周子妍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药分析与代谢组学研究。Email: 310919454@qq.com。通信作者: 张启云, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 糖尿病前期的代谢组学研究。Email: zhangqiyun0923@163.com。徐国良, 男, 博士, 教授, 研究方向: 糖尿病相关研究。Email: xuguoliang6606@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560744); 江西省自然科学基金项目(20192BAB205094)。

high-fat group, fed with basic diet and high-fat diet respectively. After IR was produced in high-fat group, high-fat group rats were randomly divided into model group, low-dose group(GQD-L, $1.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium dose group(GQD-M, $4.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and high-dose group(GQD-H, $14.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The model group continued to be fed with high-fat diet, while the different dose groups were given different doses of GQD for intervention. After 16 weeks of GQD administration, the blood glucose and IR indexes of all rats were detected, and the endogenous metabolites and their differences in serum samples were analyzed by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry (UHPLC/Q-TOF-MS) and multivariate analysis, in order to find the potential biomarkers for GQD intervening IR rats and preventing obese type 2 diabetes. **Results** After 12 weeks of high fat diet, compared with the normal group, the IR index of the model group was significantly higher ($P < 0.05$), and there was no difference in blood glucose ($P > 0.05$). After 16 weeks of GQD administration, compared with the normal group, the IR index of the model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the blood glucose was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the IR indexes of the GQD-L group and the GQD-M group were significantly reduced ($P < 0.05$), and there was no difference between the model group and the GQD-H group ($P > 0.05$). The blood glucose of GQD-L group decreased significantly ($P < 0.05$), but there was no difference before and after treatment in GQD-M group and GQD-H group ($P > 0.05$). Four potential metabonomic biomarkers of treating IR in rats with GQD were identified by the metabonomic study of serum samples, including hippuric acid, 12 ketodeoxylic acid, 3-oxo-4,6-choledienoic acid, and lysoPC [20:4 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)]. **Conclusion** GQD can reduce the IR index of IR rats and prevent the increase of blood sugar simultaneously. The mechanism may be related to intestinal microecology metabolism, bile acid metabolism and phospholipid metabolism. **Keywords:** *Gegen Qin Lian* decoction; insulin resistance; type 2 diabetes mellitus; metabolomics; UHPLC/Q-TOF-MS; metabolic mechanism; rats

2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)是由于胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)等原因引起的以空腹血糖水平升高为主要特征的代谢类疾病。近年来随着人们生活水平提高及生活方式的改变, T2DM发病率逐年升高, 已成为危害人类健康的主要慢性疾病^[1]。当机体产生IR而空腹血糖维持正常时即为糖尿病前期状态, 此状态为糖尿病的必经阶段, 更为重要的是该阶段为可逆状态, 因此在这一阶段进行有效干预可以预防糖尿病的发生^[2]。

葛根芩连汤(GQD)出自张仲景的《伤寒论》, 全方由葛根、黄连、黄芩和甘草4味中药组成, 具有清热燥湿的功效, 常用于治疗各类腹泻、痢疾、胃溃疡等胃肠道疾病。现代药理研究^[3]表明, 葛根芩连汤主要有效成分为葛根素、黄芩苷等黄酮类和小檗碱、黄连碱、药根碱等生物碱类成分, 能够通过多种途径、多种信号通路作用于多种靶点发挥其药效, 起到抗炎、抗糖尿病的作用。全小林院士^[4]以“异病同治”为指导思想, 将其用于湿热蕴脾型糖尿病的治疗, 取得较好疗效。本课题组前期研究^[5-6]也表明, 葛根芩连汤能够有效降低高脂饮食诱导肥胖大鼠的血糖、血脂水平, 预防

IR大鼠向糖尿病发生发展, 但其预防机制值得进一步深入探讨。

代谢组学由于其整体性、动态性的方法特点与中药复方多组分、多靶点发挥药效的特征相符, 近年来多用于中药复方作用机制研究, 也逐渐成为探讨IR和T2DM发病与治疗机制的重要方法^[7]。故本研究拟采用代谢组学方法, 基于超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱(UHPLC/Q-TOF-MS)技术, 对T2DM前期大鼠血清中内源性代谢物进行分析鉴定, 从中药复方整体发挥药效角度分析葛根芩连汤对T2DM大鼠的预防机制。

1 材料与方法

1.1 动物 4~5周龄SD大鼠, 雄性, SPF级, 48只, 体质量(180 ± 20)g, 购自江西中医药大学实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK(赣)2018-0003, 动物质量合格证号: 201810085。动物饲养于江西中医药大学动物科技中心屏障系统。

1.2 药物、主要试剂及GQD制备 葛根(批号: 180124)、黄芩(产地: 辽宁, 号: 171215)、黄连(批号: 180131)、炙甘草(批号: 171214), 均购于

江西江中中药饮片有限公司,符合《中国药典》标准。基础饲料(GB14924)、高脂饲料(D12492,含脂肪 60%、蛋白质 20%、糖类 20%),购自上海帆泊生物技术有限公司。甲醇(批号:67-56-1)、乙腈(批号:75-05-8),均购自德国 Merck 公司;甲酸,美国 Dikma Pure 公司,批号:2119768。

GQD 制备:按照葛根:黄芩:黄连:炙甘草的质量比为 8:3:3:2 称取药材,混合后,用凉水(8 倍量水)浸泡 30 min 后,加热至沸腾,保持微沸 40 min;然后使用纱布过滤,滤液低温减压浓缩至 1.486 g·mL⁻¹(含生药量),取部分浓缩液稀释至 0.496、0.165 g·mL⁻¹后,分别装瓶保存于-20℃冰箱备用,给药前 1 d 于 4℃冰箱解冻。

1.3 主要仪器 罗氏 Modularp800 型生化仪,德国罗氏公司;1290-G6538 型安捷伦超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱仪,美国 Agilent 公司;SL 8R 型高速低温离心机、SPD131DDA-230 型真空离心浓缩仪,德国 Thermo Fisher 公司。

1.4 模型复制、分组及给药^[8] 将 48 只雄性大鼠适应性喂养 1 周后,按体质量随机分为正常组(8 只)和高脂造模组(40 只)。正常组给予普通饲料,高脂造模组给予高脂饲料,连续喂养 12 周以复制 IR 模型(成模率 80%)。模型复制成功后,将 IR 模型大鼠随机分为模型组、葛根芩连汤低剂量组(GQD-L)、葛根芩连汤中剂量组(GQD-M)、葛根芩连汤高剂量组(GQD-H),每组 8 只,并继续给予高脂饲料喂养。

GQD 给药剂量根据刘玉晖等^[9]研究设定,GQD 低、中、高剂量分别为 1.65、4.96、14.86 g·kg⁻¹,每天 1 次,灌胃给药,给药体积为 10 mL·kg⁻¹,连续给药干预 16 周。正常组、模型组灌胃等量蒸馏水。

1.5 IR 指数测定^[8] 造模后(分组前)及给药后,大鼠禁食 12 h 后眼眶采血 1 mL,于 4℃、3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清,检测空腹血糖(FPG)及空腹胰岛素(FINS)含量。计算:IR 指数=FPG×FINS/22.5。

1.6 血清样品收集、预处理 末次给药后大鼠禁食不禁水 12 h,眼眶取血 1.2 mL 至无抗凝剂的采血管中;于 4℃静置 3 h 后,以 3 500 r·min⁻¹离心 15 min,吸取上层血清 100 mL 置于 EP 管中;加入甲醇 300 μL,涡旋震荡 30 s,静置 3 h,以 15 000 r·min⁻¹离心 15 min;取上清液真空浓缩离心(15 000 r·min⁻¹,5 min),加水:甲醇(85:15)溶液 200 μL 复溶;涡旋震荡 30 s 后再次离心(15 000 r·min⁻¹,5 min);取上清液于进样瓶中,供 UHPLC/Q-TOF-MS 检测。

1.7 样品分析 采用 UHPLC/Q-TOF-MS 技术,建立血清代谢组学检测方法。色谱条件:色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm,3.5 μm),流动相为 0.1%甲酸水(A)-纯乙腈(B)。梯度洗脱程序:0~4 min,2%~12% B;4~14 min,12%~81% B;14~17 min,81%~91% B;17~18 min,91%~100% B;18~20 min,100%~2% B。流速:0.4 mL·min⁻¹;进样量:4 μL;柱温:35℃。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI);采用正、负离子扫描模式测定,毛细管电压(Capillary voltage)分别为 4 000 V、3 500 V;喷雾室压力:35 psig;碎片电压:120 V;锥孔电压:60 V;干燥气温度:350℃,流速:10 L·min⁻¹;扫描方式:Full Scan,范围:*m/z* 50~1 000。

1.8 统计学处理方法及代谢组学数据分析 采用 Graphpad prism 7.0 软件进行数据统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用 *t* 检验;以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

采用 Profinder(VER B.06.0)软件对所有采集数据进行非靶标分子特征提取,并将提取到的离子列表进行峰对齐和峰过滤,得到统一的候选列表;将含有化合物质荷比(*m/z*)、保留时间(RT)和峰面积(Area)的 csv 格式文件导入 MPP(Mass profiler professional)软件,对化合物进行主成分分析(PCA),并进行条件筛选(Fold change > 2, *P* < 0.05),得到具有潜在贡献的差异化化合物;结合相应的二级质谱(MS/MS)信息,利用 Metlin(metlin.scripps.edu)、HMDB(Human metabolome database, www.hmdb.ca)数据库对比匹配得到化合物的化学式及名称。

2 结果

2.1 分组前各组大鼠 IR 指数检测 结果见表 1。分组前与正常组比较,造模组大鼠的 IR 指数明显升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);空腹血糖值无明显变化,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。结果表明,高脂造模大鼠尚未出现空腹血糖异常情况,处于糖尿病前期 IR 阶段,IR 模型复制成功。

表 1 分组前各组大鼠胰岛素抵抗(IR)指数检测结果($\bar{x} \pm s$)
Table 1 IR index of each group of rats before grouping($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	FPG/(mmol·L ⁻¹)	IR 指数
正常组	8	5.22 ± 0.67	4.21 ± 0.90
造模组	32	5.92 ± 0.24	5.18 ± 0.51 [#]

注:与正常组比较,[#]*P* < 0.05

2.2 葛根芩连汤对 IR 大鼠血糖及 IR 指数的影响

结果见表 2。给药 16 周后,与正常组比较,模型组大鼠的空腹血糖与 IR 指数均明显上升,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,葛根芩连汤低剂量组大鼠的空腹血糖与 IR 指数下降,葛根芩连汤中剂量组的 IR 指数下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);葛根芩连汤高剂量组的空腹血糖、IR 指数以及葛根芩连汤中剂量组的空腹血糖值无明显变化,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明,葛根芩连汤低、中剂量能够干预糖尿病前期 IR,而低剂量的葛根芩连汤还能控制血糖升高,使糖尿病前期 IR 大鼠在长期高脂饮食状态下保持血糖稳定,促进 IR 情况好转。说明低剂量葛根芩连汤能够在干预 IR 的同时起到预防 T2DM 的作用。因此,依据本研究实验目的,后续实验选择葛根芩连汤低剂量组进行代谢组分析。

表 2 葛根芩连汤对胰岛素抵抗(IR)大鼠血糖及 IR 指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effects of *Gegen Qin Lian* decoction on blood glucose and IR index of IR rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FPG/(mmol·L ⁻¹)	IR 指数
正常组	—	4.58 ± 0.58	3.9 ± 0.42
模型组	—	6.04 ± 1.34 [*]	5.66 ± 1.01 ^{**}
葛根芩连汤低剂量组	1.65	4.50 ± 0.76 [*]	4.03 ± 0.79 ^{**}
葛根芩连汤中剂量组	4.96	4.94 ± 1.13	4.04 ± 0.98 ^{**}
葛根芩连汤高剂量组	14.86	6.23 ± 1.57	5.49 ± 1.54

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,

^{**} $P < 0.01$

2.3 葛根芩连汤干预糖尿病前期 IR 大鼠的血清代谢组分析

2.3.1 代谢组学分析方法稳定性考察 在所有质控样本质谱数据中随机选择 6 个峰,比较保留时间和峰面积,其相对标准偏差分别 $< 0.32\%$ 、 $< 3.9\%$,结果见表 3、表 4。结果表明,该分析方法的精确性和重现性适用于本实验的整个代谢组分析。

2.3.2 血清代谢轮廓分析 正、负离子模式下大鼠血清质控样本的 UHPLC-MS 总离子流图见图 1。结果表明,检测系统相对稳定,总离子流图轮廓总体相似,但峰响应值存在差异。各组大鼠血清样本 PCA 分析结果见图 2,可以看出正常组、模型组、葛根芩连汤低剂量组 3 组间差异明显,而组内聚集情况较好,同时葛根芩连汤低剂量组有向正常组靠近的趋

表 3 质控样本稳定性分析(正离子模式)

Table 3 Control sample stability(positive ion mode)

峰号	m/z 值	保留时间(RT)/min	RSD _{RT} /%	峰面积(Area)	RSD _{Area} /%
1	255.231	15.37	0.09	447 082	3.37
2	320.258	10.74	0.09	114 916	2.54
3	257.247	17.15	0.04	883 903	2.96
4	454.292	9.22	0.12	1 033 604	3.36
5	298.274	15.92	0.04	1 760 164	3.86
6	480.308	9.74	0.12	415 705	3.79

表 4 质控样本稳定性分析(负离子模式)

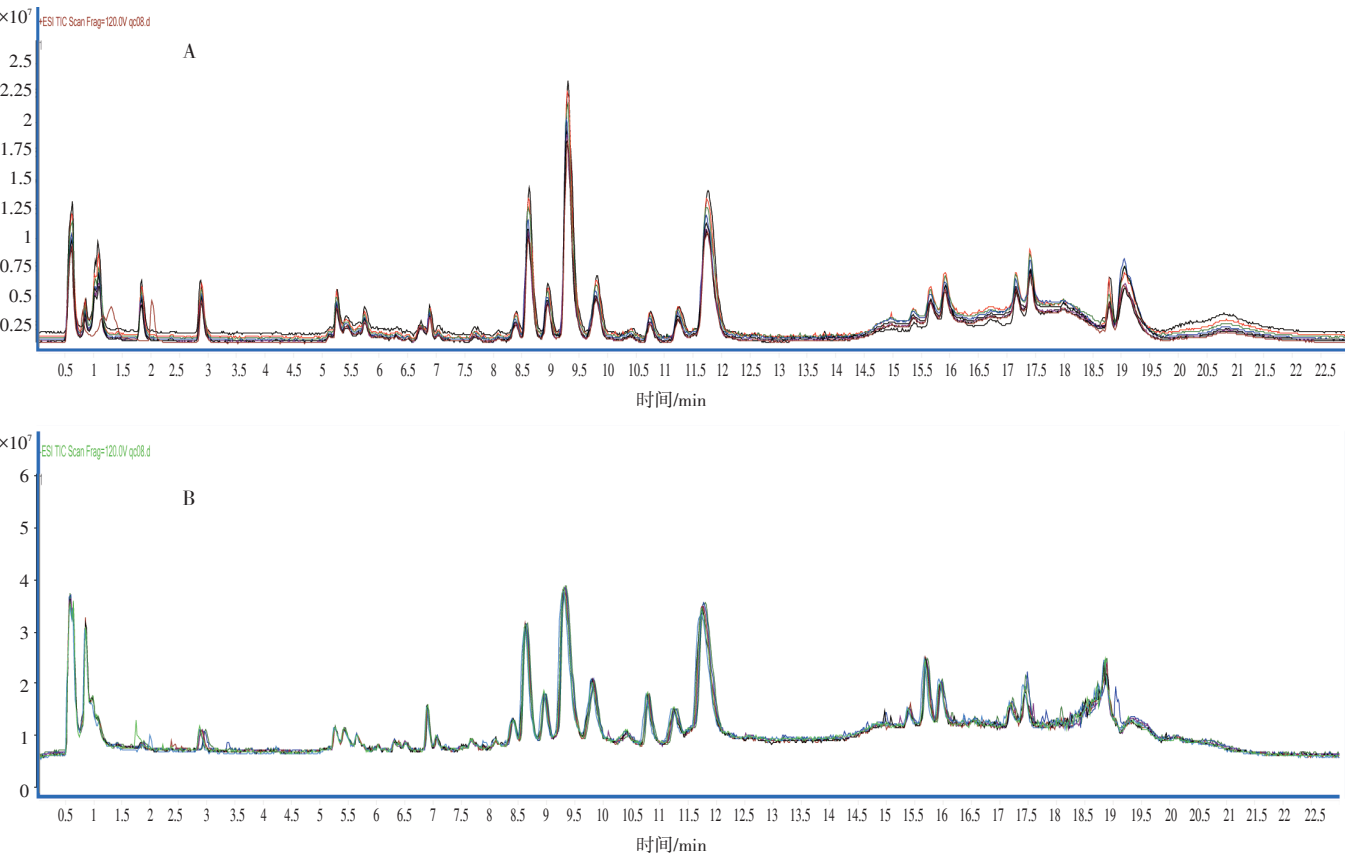
Table 4 Control sample stability(negative ion mode)

峰号	m/z 值	保留时间(RT)/min	RSD _{RT} /%	峰面积(Area)	RSD _{Area} /%
1	112.985 4	18.74	0.30	17 421 105	0.96
2	59.014 0	1.09	0.27	122 339	2.11
3	303.234 1	15.70	0.11	6 658 483	2.16
4	226.977 8	17.21	0.11	576 776	3.28
5	242.176 6	6.23	0.14	64 278	2.67
6	381.175 0	17.47	0.06	982 503	0.71

势。结果说明,模型组和正常组的血清代谢存在明显差异,而葛根芩连汤可促进糖尿病前期 IR 大鼠代谢逐渐恢复至正常状态。

2.3.3 潜在代谢标记物筛选及鉴定 通过 MPP 软件分析,筛选出 Fold-change > 2 及 $P < 0.05$ 的代谢物视为潜在的代谢标记物。根据其质荷比和串联质谱结果,与 HMDB、Metelin 等数据库进行质谱信息匹配,并根据仪器自带的 Mass Hunter 软件提供的二级质谱数据与数据库提供的相关数据进行比对。以保留时间为 5.178 min、 m/z 值为 180.065 5 的化合物为例:通过在软件中进行分子特征提取,分子式 $C_9H_9NO_3$ 得分值较高,二级图谱中的主要碎片离子为 m/z 51.940 3、 m/z 79.054 8、 m/z 108.044 9;通过与 HMDB 数据库信息匹配后,发现与 Hippuric acid(马尿酸)的标准图谱最符合,最终鉴定其为 Hippuric acid,见图 3。

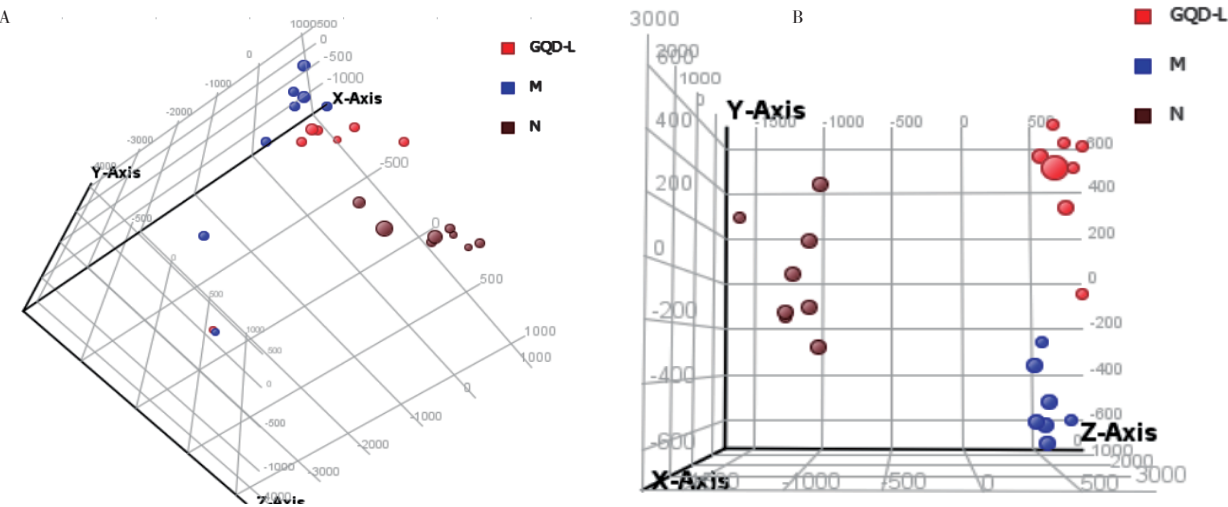
按照上述原则与方法,最终共筛选得到 7 个潜在代谢标记物,其中鉴定得到 4 个,结果见表 5。与模型组比较,葛根芩连汤低剂量组能使 T2DN 前期大鼠血清中与 IR 相关的潜在代谢标志物回调,其中 Hippuric acid(马尿酸)、12-Ketodeoxycholic acid(12-去氧胆酸)、3-Oxo-4,6-choladienoic acid 上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);LysoPC[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)](溶血磷脂酰胆碱,LPC)下调,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注：A. 正离子模式；B. 负离子模式

图 1 大鼠血清的正、负离子模式总离子流图

Figure 1 Total ion chromatograms of positive and negative ion modes of rat serum sample



注：A. 正离子模式；B. 负离子模式。N：正常组；M：模型组；GQD-L：葛根芩连汤低剂量组

图 2 各组大鼠血清样本的 PCA 分析结果

Figure 2 Results of PCA of rats' serum in different groups

3 讨论

2 型糖尿病(T2DM)患病率在我国逐年升高，目前中国糖尿病患者数量位居全球首位，糖尿病及其并发症对人们生活质量造成巨大影响^[1]。因此，预防糖尿病的发生发展具有重大意义。糖尿病前期作为

一个具有可逆性的 T2DM 的必经阶段，对其进行干预治疗是预防糖尿病发生的关键。中医药对 T2DM 的治疗以及预防均有良好效果，其中关于葛根芩连汤的相关研究^[10-12]表明，其主要通过调节氨基酸类、有机酸类与磷脂类物质，改善磷脂代谢、能量代

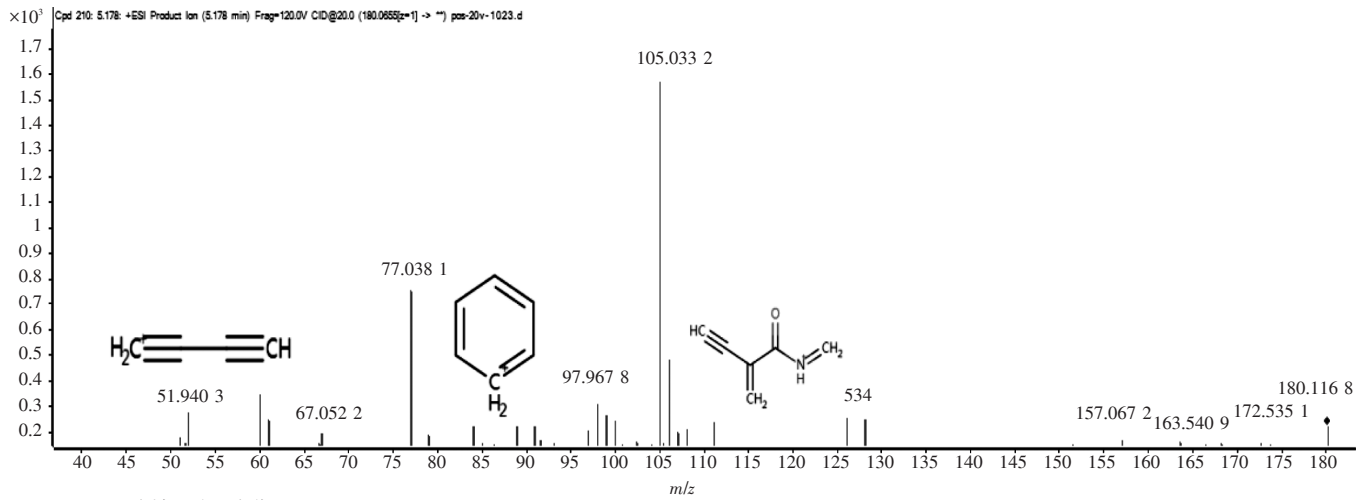


图3 马尿酸的二级质谱图

Figure 3 Secondary mass spectrometry of Hippuric acid

表5 葛根芩连汤对胰岛素抵抗大鼠代谢标记物的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 5 Effects of *Gegen Qin Lian* decoction on biomarkers of IR rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

序号	保留时间/min	m/z 值	分子式	生物标记物	峰面积/($\times 10^5$)		
					正常组	模型组	葛根芩连汤低剂量组
1	5.178	180.065	$C_9H_9NO_3$	Hippuric acid(马尿酸)	3.99 ± 0.56	$0.16 \pm 0.03^{##}$	$1.18 \pm 0.18^{**}$
2	8.791	544.338	$C_{28}H_{50}NO_7P$	LysoPC[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)](溶血磷脂酰胆碱,LPC)	3.13 ± 0.34	$3.72 \pm 0.44^{\#}$	3.47 ± 0.31
3	7.328	391.283	$C_{24}H_{38}O_4$	12-Ketodeoxycholic acid(12-去氧胆酸)	1.81 ± 0.51	$1.20 \pm 0.39^{\#}$	$1.85 \pm 0.17^*$
4	12.450	371.258	$C_{24}H_{34}O_3$	3-Oxo-4,6-choladienoic acid	1.06 ± 0.70	$0.47 \pm 0.24^{\#}$	$0.97 \pm 0.21^*$
5	6.589	288.289	$C_{17}H_{27}NO_2$		3.64 ± 1.50	$4.35 \pm 0.72^{\#}$	$3.16 \pm 0.52^*$
6	7.910	518.320	$C_{26}H_{41}NO_3P$		4.53 ± 1.61	$3.60 \pm 1.41^{\#}$	3.90 ± 0.89
7	7.710	361.230	$C_{22}H_{34}O_4$		0.22 ± 0.08	0.25 ± 0.09	0.29 ± 0.09

注:与正常组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$;与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

谢、氨基酸代谢过程及肠道菌群失调发挥相关药效。

本研究前期设置了高、中、低3个给药剂量,可能由于葛根芩连汤本身药性苦寒,中、高剂量给药浓度过高反而抑制了相关药效^[13]。结果显示,低剂量给药浓度能够起到干预胰岛素抵抗(IR)及预防糖尿病的效果。通过对其大鼠血清代谢组分析鉴定,共得到4种潜在代谢标志物,分别是Hippuric acid(马尿酸)、12-Ketodeoxycholic acid(12-去氧胆酸)、3-Oxo-4,6-choladienoic acid和LysoPC[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)](溶血磷脂酰胆碱,LPC)。

马尿酸在血液中的含量与肠道微生物群密切相关,而肠道微生物多样性下降会增加包括代谢综合征在内的多种疾病的患病风险^[14]。Vanessa等^[15]研究发现,随着马尿酸水平升高,代谢综合征患者空腹血糖浓度和胰岛素分泌得到改善。为探讨马尿酸水平升高究竟是由于肠道微生物群组成改变导致还是因为饮食摄入使其增加,Liu等^[16]研究表明,当肠道微生物群多样性降低时,其预防炎症、胰岛素抵抗、高血糖及体质量增加等已有的效果可被逆转。

因此可以确定马尿酸能够表征肠道微生物群的情况。本实验结果显示,模型组的马尿酸含量非常低,在葛根芩连汤的干预下,得到了明显的回升。提示改善肠道环境,恢复微生物群多样性可能是葛根芩连汤干预IR及改善血糖的机制之一。

12-去氧胆酸和3-Oxo-4,6-choladienoic acid均属于胆汁酸。胆汁酸与IR的密切关系主要与其2个特异性受体相关,分别为核受体(FXR)和G蛋白偶联受体5(TGR5)^[17]。研究^[18]表明,胆汁酸介导的FXR、TGR5的激活可以影响胰岛素、胰高血糖素以及胰高血糖素样肽(GLP-1)的分泌,影响肠道菌群的组成,进而对IR和血糖浓度产生影响。其中FXR对血糖的影响目前还存在争议,而对TGR5的研究^[18]表明,被胆汁酸激活后,能够使GLP-1水平上升。另外,Kumar等^[19]通过体外研究表明,TGR5能够激活胰岛B细胞,诱导胰岛素分泌的同时抑制胰高血糖素的分泌。除了对血糖的直接影响外,也有研究^[20]报道TGR5激活可以诱导骨骼肌和棕色脂肪组织中的2型碘甲状腺素脱碘酶(DIO2)来增加能量消耗,间

接使血糖浓度降低。因此,体内胆汁酸的平衡对于胰岛素与血糖维持正常水平非常重要,葛根芩连汤能够改善 IR 状态下的胆汁酸代谢异常,并进一步维持机体血糖稳定。

LPC 在体内参与诸多生理病理过程,如调节低密度脂蛋白的代谢,参与固醇引起的动脉粥样硬化病变等。相关研究^[21-23]发现,在心血管疾病、糖尿病、肝肾功能衰竭等疾病中,LPC 水平会升高,而在血液中积累的 LPC 会促进脂肪酸诱导的 IR,同时抑制内皮细胞活化。LPC 水平升高的主要机制有三方面,一是脂蛋白相关磷脂酶 A2(LP-PLA2)促进磷脂酰胆碱(PC)降解,PC 在肝脏中参与极低密度脂蛋白分泌和高密度脂蛋白代谢,分泌到血液中后被 LP-PLA2 水解,产生 LPC;二是软磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)加速 PC 的降解,LCAT 由肝脏分泌,会催化 PC 中的脂肪酸转移到血浆中,导致 HDL 和 LDL 表面形成胆固醇酯和 LPC;三是低氧条件调节糖酵解导致 LPC 过量生成,低氧条件下缺氧诱导因子-1(HIF-1)调节糖酵解的同时会激活 2 个甘油三酯和磷脂生物合成的关键调控基因甾醇调节元件结合蛋白-1 和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶,因此低氧刺激会导致 LPC 数量显著增加。葛根芩连汤可能通过调控相关关键酶影响 LPC 在体内的代谢生成,从而改善血糖、血脂以及 IR 情况。

综上所述,本研究基于 UHPLC/Q-TOF-MS 方法对葛根芩连汤干预 T2DM 前期大鼠进行了血清代谢组分析,结果表明葛根芩连汤可能通过调节马尿酸、12-去氧胆酸、3-Oxo-4,6-choladienoic acid 和溶血磷脂酰胆碱等关键靶点,干预胆汁酸代谢、磷脂代谢以及肠道菌群代谢等途径,达到预防 T2DM 的目的。本研究虽然仅鉴定得到 4 个潜在代谢标志物,但均涉及到关键代谢途径。本研究结果提示,高脂饮食是糖尿病发生的独立危险因素,葛根芩连汤能有效预防 T2DM 发生,但其代谢途径间的生化逻辑关系有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [2] MARATHE P H, GAO H X, CLOSEI K L. American diabetes association standards of medical care in diabetes 2017[J]. Diabetes, 2017, 9(4): 320-324.
- [3] 孙洪平, 范尧夫, 刘超. 葛根芩连汤治疗糖尿病的研究进展[J]. 临床医药实践, 2019, 28(12): 934-937.
- [4] 赵林华, 连凤梅, 姬航宇, 等. 全小林教授运用不同剂量葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病验案[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 249-251.
- [5] 盛译萱. 高脂饮食诱导血脂异常大鼠的代谢机制及葛根芩连汤干

- 预的作用机制[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [6] 曾国威. 肥胖型 2 型糖尿病前期胰岛素抵抗大鼠血气分析及葛根芩连汤干预研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [7] 贾奇卿, 高燕, 程晓, 等. 代谢组学技术在 2 型糖尿病治疗中的应用进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(24): 36-39.
- [8] 曾国威, 盛译萱, 李冰涛, 等. 葛根芩连汤对糖尿病前期预防研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(12): 1449-1453.
- [9] 刘玉晖, 王跃生, 王颖怡, 等. 葛根芩连汤剂量变化治疗糖尿病大鼠的剂量关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 258-261.
- [10] 王雷, 成华. 基于代谢组学方法探索葛根芩连汤方剂治疗 2 型糖尿病大鼠的效果研究[J]. 环球中医药, 2019, 12(1): 19-23.
- [11] 汪双红, 曾培, 潘思娜, 等. 葛根芩连汤对胰岛素抵抗模型大鼠尿液代谢组影响的¹H-NMR 代谢组学方法研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2373-2377.
- [12] 杜晨晖, 李津, 闫艳, 等. 葛根芩连汤及其发酵产物干预 2 型糖尿病大鼠的¹H-NMR 代谢组学研究[J]. 中草药, 2018, 49(10): 2302-2311.
- [13] 朴春丽, 于森, 全小林. 全小林教授治疗糖尿病的中药量效关系研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(4): 283-284.
- [14] PALLISTER T, JACKSON M A, MARTIN T C, et al. Hippurate as a metabolomic marker of gut microbiome diversity: modulation by diet and relationship to metabolic syndrome[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): e13670.
- [15] VANESSA D D M, LANKINEN M A, LINDSTROM J, et al. Fasting serum hippuric acid is elevated after bilberry (Vaccinium myrtillus) consumption and associates with improvement of fasting glucose levels and insulin secretion in persons at high risk of developing type 2 diabetes[J]. Mol Nutr Food Res, 2017, 61(9): e1700019.
- [16] LIU W, ZHAO S, WANG J, et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates inflammation and adiposity by modulating gut microbiota in high-fat diet mice[J]. Mol Nutr Food Res, 2017, 61(9): e1601082.
- [17] PARKS D J, BLANCHARD S G, BLEDSOE R K, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor[J]. Science, 1999, 284(5418): 1365-1368.
- [18] HANSEN M, SCHELTEMA M J, SONNE D P, et al. Effect of chenodeoxycholic acid and the bile acid sequestrant colesevelam on glucagon-like peptide-1 secretion[J]. Diabetes Obes Metab, 2016, 18(6): 571-580.
- [19] KUMAR D P, ASGHARPOUR A, MIRSHAHI F, et al. Activation of transmembrane bile acid receptor tgr5 modulates pancreatic islet α cells to promote glucose homeostasis[J]. Biol Chem, 2016, 291(13): 6626-6640.
- [20] BROEDERS E P, NASCIMENTO E B, HAVEKES B, et al. The bile acid chenodeoxycholic acid increases human brown adipose tissue activity[J]. Cell Metab, 2015, 22(3): 418-426.
- [21] RINELLA M E, ELIAS M S, SMOLAK R R, et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet[J]. Lipid Res, 2008, 49(5): 1068-1076.
- [22] HAN X, WANG T, ZHANG J, et al. Apolipoprotein CIII regulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression via the MAPK and NF κ B pathways[J]. Biol Open, 2015, 4(5): 661-665.
- [23] CALABRESI L, SIMONELLI S, GOMARASCHI M, et al. Genetic lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and cardiovascular disease[J]. Atherosclerosis, 2012, 222(2): 299-306.

(编辑: 邹元平)