

人参皂苷 Rg1-丹参素保肝作用机制研究

那丽莎¹ 栗昭生^{2▲} 高月娟¹ 王加良¹

1. 牡丹江医学院附属红旗医院药学部, 黑龙江牡丹江 157011;

2. 牡丹江医学院附属红旗医院神经内科, 黑龙江牡丹江 157011

[摘要]目的 运用代谢组学及生物效应网络方法研究人参皂苷 Rg1-丹参素(GRg1-T)的保肝作用机制。**方法** 将 24 只大鼠作为研究对象,采用简单随机化法将其分为空白组、模型组、GRg1-T 组、联苯双酯(DDB)组,每组各 6 例。模型组给予 CCl₄ 油溶液。观察大鼠状态,测定生化指标;采用液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)结合偏最小二乘判别分析法,考察各组大鼠血清中的内源性代谢差异,筛选出肝损伤的生物标志物;将标志物代入到干预组中,寻找抗肝损伤潜在的生物标志物。**结果** 模型组的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平高于空白组,差异有统计学意义($P<0.001$);GRg1-T 和 DDB 组的 ALT、AST 水平低于模型组,差异有统计学意义($P<0.001$)。鉴定出 8 种肝损伤的生物标志物;4 种代谢物对肝损伤起到保护作用,分别为氨基丙酸、L-鸟氨酸、吡哆醛、卵磷脂。**结论** GRg1-T 可能通过影响氨基酸、胆固醇的代谢及醛氧化酶的表达发挥肝保护作用。

[关键词] 人参皂苷 Rg1-丹参素;肝损伤;代谢组学;联苯双酯

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

[文章编号] 1674-4721(2023)1(a)-0043-04

Study on the mechanism of Ginsenoside Rg1-Tanshinol protecting liver

NA Lisha¹ LI Zhaosheng^{2▲} GAO yuejuan¹ WANG Jialiang¹

1. Department of Pharmacy, Hongqi Hospital of Medical College, Heilongjiang Province, Mudanjiang 157011, China;

2. Department of Neurology, Hongqi Hospital of Medical College, Heilongjiang Province, Mudanjiang 157011, China

[Abstract] Objective To study the hepatoprotective mechanism of Ginsenoside Rg1-Tanshinol (GRg1-T) by metabonomics and bioeffect network. **Methods** A total of 24 rats were divided into blank group, model group, GRg1-T group and biphenyl diester (DDB) group by simple randomization, with 6 cases in each group. The model group was given CCl₄ oil solution. The state of rats was observed and biochemical indexes were determined. Liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) combined with partial least squares discrimination analysis was used to investigate the differences of endogenous metabolism in serum of each group of rats, and to screen out biomarkers of liver injury. The biomarkers were substituted into the intervention group to search for potential biomarkers against liver injury. **Results** The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in model group were higher than those in blank group, the differences were statistically significant ($P<0.001$). ALT and AST levels in GRg1-T and DDB groups were lower than those in model group, and the differences were statistically significant ($P<0.001$). Eight biomarkers of liver injury were identified. Four metabolites, amino-propionate, L-ornithine, pyridoxal and lecithin, have protective effects on liver injury. **Conclusion** GRg1-T plays a protective role in liver by affecting the metabolism of amino acids, cholesterol and the expression of aldehyde oxidase.

[Key words] Ginsenoside Rg1-Tanshinol; Liver injury; Metabonomics; Biphenyl diester

丹参和三七是传统的经典药对^[1],在肝损伤的防治方面有显著的药理学效应^[2]。但由于成分复杂,其药理研究还仅限于药效学阶段,未见从代谢组学及单体的角度在分子水平上探讨其整体药效的报道。在肝损伤疾病方面,研究者大多是以方剂或模型为研究对象,阐述模型及中药方剂的保护机制^[3-5],但方剂难以明确药物作用的靶点。网络药理学是将利用统计学及

[基金项目] 黑龙江省卫生健康委科研课题(2019-403)。

▲通讯作者

网络等手段,通过系统生物学方法进行研究,可以在分子水平上探讨其代谢酶、细胞等行为,能够为靶点的确认及发现新标志物提供新方法^[6-9]。本项目补充以上空白点,选取药对中的物质基础——人参皂苷 Rg1-丹参素(Ginsenoside Rg1-Tanshinol, GRg1-T),为丹参和三七的主要活性成分,具有抗氧化、改善供血、防治肝损伤的药理作用^[10-13],并结合肝损伤模型,通过网络药理学,阐明 GRg1-T 对肝损伤的保护作用机制。

1 资料与方法

1.1 实验动物

雄性大鼠 24 只,体重 200~220 g,购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,合格证号:CKK-(吉)2011-0004。本研究经医院医学伦理委员会批准(20190729)。

1.2 主要仪器与试剂

美国 Agilent1200/6300 型高效液相色谱-质谱联用仪;人参皂苷 Rg1 标准品(大连美仑生物技术有限公司,CAS:22427-39-0);丹参素标准品(大连美仑生物技术有限公司,CAS:76822-21-4);联苯双酯(biphenyl diester,DDB)片(北京太洋药业股份有限公司);谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)试剂盒、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所);CCl₄(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司,CAS:112-40-3);甲醇(色谱纯,科密欧化学试剂有限公司,CAS:540-69-2);甲酸(色谱纯,科密欧化学试剂有限公司,CAS:112-40-3);实验室用水为自制三蒸水。

1.3 实验分组及处理

①实验分组:采用简单随机化法,将 24 只大鼠分为空白组、模型组、GRg1-T 组、DDB 组。DDB 组给予 DDB 200 mg/kg,GRg1-T 组以 20(GRg1)~100(T)mg/kg 的剂量隔日灌胃给药,连续 7 d。空白组和模型组给予等体积生理盐水。于末次给药后 2 h,除空白组外,其余腹腔注射 20%CCl₄ 油溶液(3 mg/kg),空白组注射等体积油。②肝功能检测:造模 24 h 后下腔静脉取血,用含有乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)的抗凝管取血,立即放入冰盒中。以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,再以 10 000 r/min 离心 30 min,半径均为 10 cm,取上清液放入 -80℃ 的冰箱内保存,测定血清 ALT、AST 指标。③样品采集与处理:每只大鼠眼眶取空白血 0.5 ml,造模 24 h 后取血 0.5 ml,静置 30 min,于 3 500 r/min 离心 10 min,半径 10 cm,移取血清,-80℃ 保存。④样品预处理:向 100 μl 血清样品中加入 200 μl 甲醇,涡旋 30 s,以 10 000 r/min 离心 10 min,半径 10 cm,上清液 N₂ 吹干,100 μl 甲醇复溶,涡旋 30 s 后离心 5 min,移取 10 μl 上清液进样分析。

1.4 检测方法

色谱柱为 BC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 100 mm,2.7 μm),C₁₈ 保护柱(5.0 mm × 2.1 mm,1.7 μm);流动相:(A)0.1% 甲酸 +5% 水 + 甲醇,(B)0.1% 甲酸 +5% 甲醇 + 水,梯度洗脱(初始为 100%B,0~20 min 线性变化至 100% A,保持 5 min,25~30 min 线性回归至初始 100%B)。流速:0.6 ml/min;柱温:25℃。质谱条件:离子阱电喷

雾离子源(electron spray ionization,ESI);正离子模式自动二级在质荷比(*m/z*)50~1 000 内进行全扫描;毛细管电压为 13 V,温度 350℃;鞘气 N₂ 流量为 10 ml/min;辅助气 N₂ 流量为 0.15 ml/min;碰撞气为 He。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 LSD-*t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组大鼠状态及生化指标的比较

大鼠造模后,表现为反应迟钝,大便黄绿色、稀软,毛发粗糙。GRg1-T 组大鼠状态明显好转,DDB 组较模型组效果显著。模型组的 ALT、AST 水平高于空白组,差异有统计学意义(*P* < 0.001);GRg1-T 和 DDB 组的 ALT、AST 水平低于模型组,差异有统计学意义(*P* < 0.001)(表 1)。

表 1 四组大鼠生化指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	ALT(U/L)	AST(U/L)
空白组	6	36.70±7.00	16.63±6.82
模型组	6	90.62±6.42 ^b	67.05±7.44 ^b
GRg1-T	6	40.04±6.54 ^a	23.54±6.33 ^a
DDB	6	38.20±6.42 ^a	22.47±6.36 ^a
<i>F</i> 值		1 283.986	1 293.987
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注 与模型组比较,^a*P* < 0.001;与空白组比较,^b*P* < 0.001;ALT:谷丙转氨酶;AST:谷草转氨酶

2.2 肝损伤大鼠生物标志物的鉴定

根据大鼠血清总离子流图,对潜在的生物标志物提取分子离子峰,将得到的 *m/z* 带入人类代谢数据库(human metabolome database,HMDB)数据库,查询可能的化合物。然后对这些潜在生物标志物的二级质谱图的特征碎片离子进行解析,研究其主要的裂解规律,并与数据库、参考文献中的质谱图标准图谱进行比较。最后鉴定出 8 种可能的物质(表 2)。

表 2 肝损伤的生物标志物

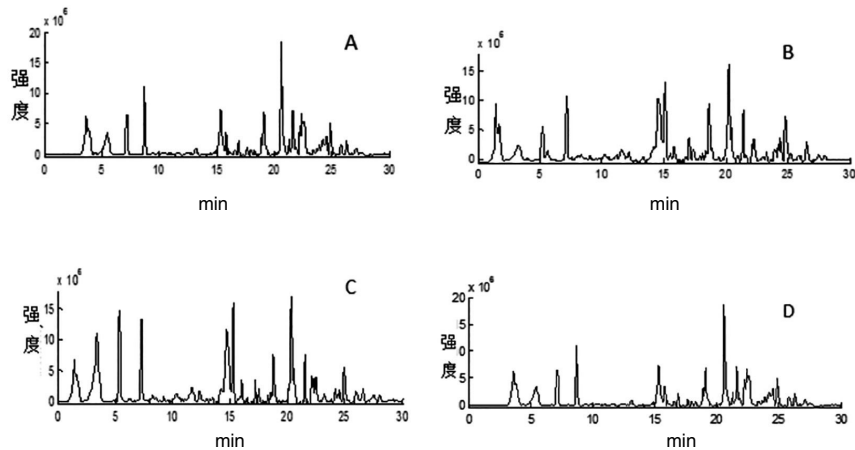
<i>m/z</i>	保留时间	代谢产物	代谢通路	变化趋势
119.1	16.0	氨基丙酸	氨基丙酸代谢	↓
132.0	4.9	L-鸟氨酸	鸟氨酸转氨甲酰酶	↓
237.2	6.9	四氢酰丙酮	苯丙酮尿症	↑
494.3	24.4	卵磷脂	卵磷脂胆固醇酰基转移酶缺乏	↓
205.0	13.7	L-色氨酸	色氨酸代谢	↓
132.1	18.8	吡哆醛	醛氧化酶代谢	↑
179.0	12.5	氨基葡萄糖	己糖激酶	↑
429.3	12.9	肌苷二磷酸	嘌呤代谢	↑

注 *m/z*:质荷比

2.3 GRg1-T 保护 CCl₄ 肝损伤代谢组学分析

2.3.1 血清总离子流图 全扫描监测的血清总离子流图见图 1，采用液相色谱 - 质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry,HPLC-MS)，直观

比较 CCl₄ 模型组与 GRg1-T 组的总离子流图，同一保留时间色谱峰强度有差异，表明 GRg1-T 干预 CCl₄ 急性肝损伤大鼠，并且其内源性代谢物发生了明显改变。



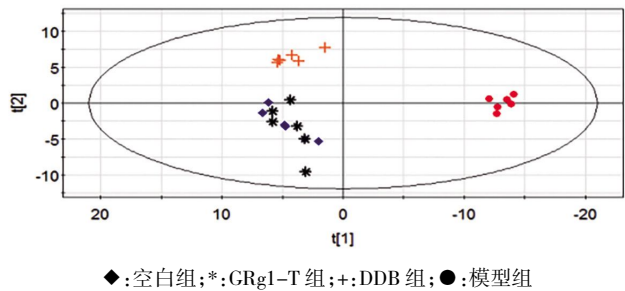
A:空白组;B:模型组;C:GRg1-T 组;D:DDB 组
图 1 采用 HPLC-MS 获取的典型大鼠血清总离子流图

表 3 肝保护作用的生物标志物及其代谢通路

m/z	VIP	t _R (min)	分子式	生物标志物	代谢通路	模型组	GRg1-T	DDB 组
119.1	1.21	16.0	C ₃ H ₅ NO ₄	氨基丙酸	氨基丙酸代谢	↓	↑	↑
132.0	1.80	4.9	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-鸟氨酸	鸟氨酸转氨甲酰酶	↓	↑	↑
132.1	1.82	6.9	C ₈ H ₉ NO ₃	吡哆醛	醛氧化酶代谢	↑	↓	↓
494.3	1.89	24.4	C ₁₀ H ₁₈ NO ₈ PR ₂	卵磷脂	卵磷脂胆固醇酰基转移酶缺乏	↓	↑	↑

注 m/z:质荷比;VIP:重要变量参数;t_R:保留参数;GRg1-T:人参皂苷 Rg1- 丹参素;DDB:联苯双酯

2.3.2 模式识别分析 采用偏最小二乘判别分析方法对各组大鼠进行分类比较，四组间的分布情况如图 2。右侧为模型组,与其他 3 组明显分开,与 DDB 组比较,GRg1-T 组与空白组更近似。



◆:空白组;*:GRg1-T 组;+:DDB 组;●:模型组
图 2 空白组、模型组、GRg1-T 组、DDB 组偏最小二乘回归分析得分图

2.3.3 肝保护作用的生物标志物及其代谢通路

将肝损伤大鼠 8 种目标物的 m/z 带入四组的总离子流图中,得到其提取图谱。比较四组的这 8 种目标物提取峰的强度,结果显示,m/z 为 119.1 的氨基丙酸、m/z 为 132.0 的 L- 鸟氨酸、m/z 为 132.1 的吡哆醛、m/z 为 494.3 的卵磷脂这 4 种目标物呈规律性变化。与模型组比较,GRg1-T 组对氨基丙酸、L- 鸟

氨酸与卵磷脂均有上调作用,对吡哆醛有下调作用(表3)。

3 讨论

本研究结果显示,模型组的 ALT、AST 水平高于空白组,差异有统计学意义(P<0.001);GRg1-T 和 DDB 组的 ALT、AST 水平低于模型组,差异有统计学意义(P<0.001)。大鼠急性肝损伤建模成功,在 GRg1-T 和 DDB 组中,ALT、AST 水平具有明显的回转趋势,说明 GRg1-T 在一定程度上可以预防 CCl₄ 诱导大鼠的急性肝损伤。通过全扫描监测的血清总离子流图,GRg1-T 干预 CCl₄ 急性肝损伤大鼠内源性代谢物发生了明显改变。通过模式识别,说明四组大鼠机体生理情况显著不同,机体代谢差异明显,灌胃给予该药物后对肝损伤大鼠有明显的调节作用与治疗效果。

利用网络药理学及相关文献分析生物标志物的相关代谢通路^[14-15],阐明了 3 条代谢通路及作用机制。首先,由醛氧化酶参与肝脏肿瘤疾病通路可知,吡哆醛的表达异常,导致在肝脏肿瘤疾病中醛氧化酶表达上调。醛氧化酶是一类高度保守的钼 - 黄素蛋白,可催化醛类及含氮、含氧杂环类化合物的氧化反应,该酶体内分布较广,主要在肝组织中有较高的表达,同

时在药物及外源物的 I 相代谢中发挥重要作用。研究证明^[16],在分化程度高的肝癌中醛氧化酶表达上调。此通路中,当 CCl₄ 导致大鼠肝损伤时,代谢物吡哆醛的含量上调,导致相关代谢酶醛氧化酶表达异常。醛氧化酶的相关疾病为肝脏癌症,说明吡哆醛的异常表达激活肝癌细胞。GRg1-T 组的代谢物吡哆醛的含量水平处于回转的趋势,DDB 组中吡哆醛同样下调,提示 GRg1-T 干预吡哆醛的代谢,使相关代谢酶醛氧化酶被抑制,导致肝癌细胞激活概率降低,表明 GRg1-T 可抑制醛氧化酶的表达,预防肝脏肿瘤的发生。

其次,本研究中 CCl₄ 肝损伤模型大鼠血清中的氨基丙酸和鸟氨酸浓度明显降低,提示 CCl₄ 所致肝损伤直接导致氨基酸代谢紊乱。CCl₄ 是具有趋肝性的化学毒性物质,当发生肝损伤或病变时,由于肝功能出现障碍,致使组织蛋白分解障碍,肝细胞中氨基酸代谢降低,直接导致血液中氨基丙酸和鸟氨酸浓度下降,同时机体自身对氨基酸的摄取能力同步降低^[17]。在此通路中,给予大鼠 CCl₄ 后诱导血液中的氨基丙酸和鸟氨酸浓度明显降低,而在 GRg1-T 干预组中氨基丙酸和鸟氨酸处于激活状态,诱导差异性代谢物上调,使氨基酸重新参与肝脏代谢,合成机体组织中各种蛋白,由此可知,GRg1-T 可干预氨基丙酸和鸟氨酸上调,明确了 GRg1-T 预防和治疗肝损伤的作用机制。

最后,在卵磷脂胆固醇酰基转移酶缺乏疾病通路中,卵磷脂通过血浆卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin-cholesterol acyltransferase,LCAT) 催化形成血浆胆固醇酯。肝脏合成 LCAT 后并释放入血,在血浆中被脂蛋白 A 激活。在 LCAT 酶催化下,游离卵磷脂转化为胆固醇酯和溶血卵磷脂。研究表明,肝脏疾病发作时,肝细胞损伤促使 LCAT 合成能力减弱,使血浆游离卵磷脂转化为胆固醇酯的含量降低,血浆 LCAT 活力高低在肝脏病变中具有重要临床意义^[18-19]。在此通路中,LCAT 与胆固醇酯缺乏症有关,进一步分析通路可知,卵磷脂下调直接导致 LCAT 的缺乏,由于药物对大鼠体内代谢有干预作用,使代谢物卵磷脂上调,可说明该药物是 LCAT 的激动剂,LCAT 激活可使血浆胆固醇酯增高,从而抑制肝脏疾病。

综上所述,本研究运用代谢组学方法探讨 GRg1-T 对 CCl₄ 急性肝损伤的保护作用机理。首先以空白组和 CCl₄ 模型组大鼠血清为研究对象,通过对空白组与模型组进行模式识别分析,两组得到很好地区分,并且鉴定出 8 种肝损伤生物标志物。通过对 GRg1-T 干预组的大鼠血清代谢分析,发现其对 4 种肝损伤标志物起到干预作用,回归正常水平。利用生物分子网络解释 GRg1-T 可调节氨基酸及胆固醇的代谢,并且通过醛氧化酶的抑制作用,发挥肝损伤保护作用,为进一步揭示丹参和三七药理作用机制提供了新方法。

[参考文献]

- [1]陈锐娥,申东艳.中药药对的系统研究-丹参三七药对研究[J].世界科学技术(中医药现代化),2012,14(2):1342-1347.
- [2]高明菊,王强,蒋洁云,等.七丹胶囊对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].华西药学杂志,2010,25(6):688-690.
- [3]王朔,李卫,白冰,等.黄芩苷镁盐对 CCl₄ 诱导 SD 大鼠急性肝损伤保护机制[J].中国老年学杂志,2022,42(9):2253-2256.
- [4]李爽,宋宏宇,刘丹丹,等.基于系统药理学探讨百合乌药汤对 I 型糖尿病并发肝损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2022,38(5):39-45.
- [5]刘尚智,张志强,李昇锦.丹栀逍遥散对 D-氨基半乳糖/脂多糖诱导的大鼠急性肝损伤保护作用机制研究[J].实用肝脏病杂志,2022,25(2):179-182.
- [6]毛丽斯,朱晓红.网络药理学在中药领域的应用进展[J].中医药管理杂志,2021,29(13):98-102.
- [7]任艳,邓燕君,马焱彬,等.网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战[J].中草药,2020,51(18):4789-4797.
- [8]解静,高杉,李琳,等.网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J].中草药,2019,50(10):2257-2265.
- [9]段贤春,黄石,彭代银,等.网络药理学在中药复方研究中的应用[J].中国药理学通报,2020,36(3):303-308.
- [10]罗飘,楚世峰,彭也,等.人参皂苷 Rg1 调节 NF- κ B/VCAM-1 减轻胆汁淤积性肝纤维化[J].药学学报,2019,54(2):321-328.
- [11]白羽,李傲寒,刘丽萍,等.人参皂苷治疗纤维化疾病的分子作用机制研究进展[J].中草药,2022,53(9):2902-2911.
- [12]Ren J,Fu L,Nile SH,et al.Salvia miltiorrhiza in treating cardiovascular diseases:a review on its pharmacological and clinical applications[J].Front Pharmacol,2019,10:753.
- [13]张超凡,曾锐,张海霞,等.药对三七-丹参对外伤血瘀证大鼠血浆和尿液代谢组的影响[J].中医药信息,2022,39(5):1-10.
- [14]师帅,胡元会,吴华芹,等.“丹参-三七”药对作用机制的网络药理学探讨[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(18):192-197.
- [15]陈硕,蒲翔,李娜,等.基于网络药理学探讨丹参、三七药对干预血管新生的分子机制[J].贵州中医药大学学报,2022,44(3):60-65.
- [16]赵霞霞,吴杰,王瑞玲.氨基酸代谢组学在药物性肝损伤中的研究进展[J].中国肝脏病杂志(电子版),2019,11(4):28-31.
- [17]胡迎青,顾君一.小鼠 CCl₄ 急性肝损伤体内氨基酸水平的改变[J].南通医学院学报,1995(3):372-374.
- [18]Cao B,Sun RB,Yan G,et al.Berberine reverses LPS-induced repression of CYP7A1 through anti-inflammatory effect[J].Chinese Herbal Medicines,2019,11(3):292-298.
- [19]初开秋,唐晓燕,田清武,等.缺血性脑血管病患者血浆卵磷脂-胆固醇酰基转移酶活性与其脂质代谢[J].中国临床康复,2005(17):243-245.

(收稿日期:2022-05-06)