

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.05.016

钩藤干预下高血压病肝阳上亢证大鼠宏观表征与血清代谢组学标志物的相关性

于瑞雪¹, 杨雯晴², 刘阿娜¹, 王焕军¹, 蒋海强^{2*}, 李运伦³

(1. 山东中医药大学药学院, 山东省济南市长清大学科技园大学路 4655 号, 250355; 2. 山东中医药大学实验中心; 3. 山东中医药大学附属医院)

摘要 目的 探讨钩藤治疗高血压病肝阳上亢证的可能作用机制。方法 将 14 只 SHR 大鼠随机分为肝阳上亢组和钩藤组, 每组 7 只; 另选取 7 只 Wistar 大鼠作为正常组。肝阳上亢组和钩藤组灌服附子灌胃液 20 ml/(kg·d) 共 4 周复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型。造模成功后, 钩藤组灌服钩藤水煎液 22.9 ml/(kg·d), 肝阳上亢组和正常组给予等量生理盐水。各组均连续灌胃 4 周后采集收缩压、面温、痛阈、旋转时间宏观指标, 同时以超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱超高分辨质谱联用技术采集大鼠血清内源性代谢物信息, 并以偏最小二乘回归分析外在宏观指标和内在微观指标的关联。结果 模型组较正常组大鼠收缩压升高, 面温上升、痛阈降低、旋转时间缩短, 而钩藤组大鼠收缩压低于肝阳上亢组, 旋转时间长于肝阳上亢组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。经数据库查询共确定了 16 个生物标志物, 分别为亚油酸、多巴胺、脱氧皮质酮、4-羟脯氨酸、二氢睾酮、11b-羟孕酮、甘氨酸、甘氨酸、6-酮前列腺素、16a-羟基雄甾酮、L-色氨酸、白三烯 B₄、血栓素 B₂、磷脂酸、2-甲氧基雌酮、尿酸、溶血磷脂酰胆碱。与正常组比较, 肝阳上亢组二氢睾酮、11b-羟孕酮、脱氧皮质酮、2-甲氧基雌酮相对含量均下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其余各生物标志物相对含量均上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与肝阳上亢组比较, 钩藤组二氢睾酮、16a-羟基雄甾酮、脱氧皮质酮、2-甲氧基雌酮相对含量均上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其余各生物标志物相对含量均下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 钩藤干预高血压病肝阳上亢证的可能作用机制为调节体内甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢, 花生四烯酸、酪氨酸代谢等降低面部温度; 调节体内甘油磷脂代谢、固醇类生物合成代谢、亚油酸代谢, 从而改善头晕; 调节体内花生四烯酸代谢、酪氨酸代谢、嘌呤代谢等提高痛阈值。

关键词 高血压病; 肝阳上亢证; 钩藤; 代谢组学

中医学认为, 肝肾阴虚、肝阳上亢是高血压病的主要发病机理, 肝阳上亢证是高血压病最常见的证型之一^[1]。钩藤是临床治疗肝阳上亢证常用中药, 具有降低高血压病肝阳上亢证患者血压、改善临床症状及其中医证候的作用, 为治疗高血压病肝阳上亢证的有效药物^[2]。现代研究表明, 钩藤具有降血压、抗心律失常以及抗血小板聚集和抗血栓形成的作用^[3]。为进一步探讨钩藤干预高血压病肝阳上亢证的机制, 参照课题组前期研究成果^[4-5], 将模型大鼠的面温、痛阈值、旋转时间确定为肝阳上亢证大鼠的宏观体征表现, 采用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱超高分辨质谱联用 (UPLC-Q-Exactive) 技术开展高血压病肝阳上亢证

大鼠的代谢组学研究, 寻找钩藤治疗高血压病肝阳上亢证宏观指标和微观代谢物的关联, 从宏观、微观结合层面厘清钩藤的干预机制。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性自发性高血压 (SHR) 大鼠 14 只, 8 周龄, 体重 (186.74 ± 8.99) g, 清洁级雄性 Wistar 大鼠 7 只, 8 周龄, 体重 (190.34 ± 6.76) g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号均为: SCXK(京)2012-0001。

1.2 实验药物

附子为毛茛科植物乌头属乌头 (*Aconitum car-michaelii* Debx.) 子根的加工品。炮附片 8 倍量水回流 2 次, 每次 1 h, 提取液减压浓缩, 得浓度为

* 通讯作者: jhq12723@163.com

0.1 g/ml 的附子灌胃液, 4℃ 保存。钩藤为茜草科植物钩藤属钩藤 [*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. exHavil.] 的干燥茎枝, 采用 70% 乙醇回流提取两次, 每次 1 h, 提取液减压浓缩, 得浓度为 0.1 g/ml 钩藤提取液, 4℃ 保存。

1.3 主要试剂与仪器

乙腈、甲醇和甲酸 (批号: 156607、166817、155798), 色谱级, 美国 Fisher 公司; 超纯水, 屈臣氏 (中国) 有限公司; 10% 水合氯醛 (批号: 20160925), 天津市大茂化学试剂厂。UltiMate 3000 超高效液相色谱仪、四级杆-静电场轨道阱超高分辨质谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 高速台式离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Vortex-Genie2 型涡旋振荡器, 美国 SI 公司; YP20001 型电子天平, 上海光正医疗仪器有限公司; TMC-213 型动物恒温系统, 日本 Softron Biotechnology 公司; BP-98A 型大小鼠无创血压仪, 北京软隆技术有限公司; ZXC-A 型大鼠压痛仪, 山东省医学科学院设备站; GM550 型手持式红外测温仪, 深圳市聚茂源科技有限公司。

2 方法

2.1 动物造模及给药方法

大鼠适应性饲养 1 周, 采用抽签法将 14 只 SHR 大鼠分为肝阳上亢组和钩藤组, 每组 7 只; 7 只 Wistar 大鼠作为正常组。肝阳上亢组和钩藤组灌服附子灌胃液 20 ml/(kg·d) 复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型^[2,4], 正常组给予等量生理盐水, 各组均连续灌服 4 周。造模后, 肝阳上亢组和钩藤组大鼠血压均高于造模前 30 mmHg, 面温均高于造模前 0.5℃, 痛阈值均低于造模前 5 g, 旋转时间均低于造模前 10 s^[4]。推测其具有面部烘热、头痛、眩晕等与肝阳上亢证患者类似临床特征, 提示两组大鼠高血压病肝阳上亢证造模成功^[4]。造模成功后钩藤组大鼠灌服钩藤水煎液 22.9 ml/(kg·d), 剂量根据人与动物间体表面积折算的等效剂量换算得出^[4]。肝阳上亢组和正常组给予等量的生理盐水。各组均每日灌胃 1 次, 连续灌胃 4 周。

2.2 宏观指标测定

2.2.1 血压、面温、痛阈 分别以无创套尾法^[4]测量大鼠安静状态下尾动脉血压即收缩压, 以红外测温仪测量安静状态下大鼠面部温度, 以大鼠压痛仪测定安静状态下大鼠疼痛阈值, 于给药第 14、28 天进行测定。

2.2.2 旋转时间 采用自制旋转测量仪器测定, 将大鼠放置在自制旋转平台上, 待其安静后开启旋转, 转速 45 r/min, 记录大鼠从开始旋转到跌落下平台的时间, 如果转动 2 min 后仍不跌落, 则停止实验。分别于给药第 14、28 天进行测定。

2.3 微观代谢组学分析潜在生物标记物

给药结束后, 10% 水合氯醛 (40 mg/kg) 腹腔麻醉, 腹主动脉取血, 4000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 精密吸取血清 500 μl, 加入甲醇 1000 μl, 涡旋 2 min, 13000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, -20℃ 下保存, 备用。进行 UPLC-Q-Exactive 分析。色谱条件: 色谱分离选择 Thermo-C18 柱 (Hypersil GOLD aQ, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm); 流速 0.30 ml/min; 柱温 15℃, 进样量 2 μl。流动相 A 为水 (含 0.05% 甲酸); B 为乙腈 (含 0.05% 甲酸), 梯度洗脱: 0 ~ 3 min, 2% B; 3 ~ 5 min, 2% ~ 40% B; 5 ~ 20 min, 40% ~ 98% B。质谱条件: 采用正、负离子模式检测。正离子: 离子源 HESI; 毛细管电压 3500V; 毛细管温度 300℃; 鞘气 45 arb; 辅助气 10 arb; 源内温度 350℃; 质谱采集范围 80 ~ 800 m/z; 分辨率为 70000; S-LensRFLevel 为 55。负离子: 毛细管电压 3000V, 其余同正离子模式, 碰撞能量根据离子碎裂自动优化。

利用 R 语言 (新西兰奥克兰大学开发, 3.2.2 版) 进行数据校正^[14], 将对齐后的矩阵数据文件导入 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 软件中经数据标准化处理后, 对质控样本及其他样本数据矩阵进行 (PCA) 分析, 以聚类效果评估数据质量。再以 PCA 结合偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 方法来反映 3 组样本之间的分类趋势^[11]。以变量重要性投影 (VIP) 值 > 1^[12] 的变量为潜在生物标记物。根据标记物的精确分子量, 在代谢组学相关数据库检索, 参照文献^[13-14] 确定代谢物。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料满足正态分布者以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组数据采用重复测量方差分析; 不满足正态分布者以 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示, 采用秩和检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。通过偏最小二乘回归分析高血压病肝阳上亢证大鼠宏观表征与代谢学数据相关关系。采用 VIP > 1 (95% 置信区间) 及 coefficient 值的变量建立与面温、痛阈、旋转时间等宏观表征之间的关系。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠给药后不同时间收缩压、面温、痛阈、旋转时间比较

表 1 示, 给药 2 周, 与正常组比较, 肝阳上亢组和钩藤组收缩压、面温均升高, 痛阈、旋转时间均降低, 且钩藤组收缩压低于肝阳上亢组, 痛阈、旋转时间高于肝阳上亢组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药 4 周, 与正常组比较, 肝阳上亢组和钩藤组收缩压升高, 旋转时间缩短, 且钩藤组收缩压低于肝阳上亢组, 旋转时间长于肝阳上亢组, 肝阳上亢组面温高于正常组、痛阈低于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 钩藤组面温低于正常组 ($P < 0.05$), 痛

阈与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与本组给药 2 周比较, 正常组痛阈降低, 旋转时间延长 ($P < 0.05$); 钩藤组收缩压、面温降低, 痛阈升高、旋转时间延长 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠血清代谢轮廓分析

通过 UPLC-Q-Exactive 分析各组大鼠血清代谢物。正、负离子模式下总离子流图如图 1、图 2 所示, 正、负离子模式下, 各组大鼠总离子流图在峰高与保留时间有一定差异, 说明各组大鼠代谢模式存在差异。

3.3 各组大鼠血清质谱模式识别分析结果

将获得的检测数据矩阵进行数据预处理与

表 1 各组大鼠给药后不同时间收缩压、面温、痛阈、旋转时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	收缩压 (mmHg)	面温 (°C)	痛阈 (g)	旋转时间 (s)
正常组	给药 2 周	7	131.62 ± 5.09	26.45 ± 0.78	485.50 ± 28.63	101.75 ± 9.77
	给药 4 周	7	130.57 ± 2.84	27.68 ± 1.15	480.50 ± 39.67 [▲]	102.63 ± 10.21 [▲]
肝阳上亢组	给药 2 周	7	207.86 ± 1.88 ^{**}	29.49 ± 0.64 ^{**}	318.50 ± 33.46 ^{**}	51.63 ± 8.65 ^{**}
	给药 4 周	7	208.47 ± 3.10 ^{**}	30.08 ± 0.86 ^{**}	314.00 ± 31.18 ^{**}	51.38 ± 15.98 ^{**}
钩藤组	给药 2 周	7	188.00 ± 1.91 ^{**△△}	28.73 ± 0.99 ^{**}	357.00 ± 32.36 ^{**△}	67.88 ± 13.44 ^{**△}
	给药 4 周	7	178.05 ± 1.96 ^{**△△△▲}	26.41 ± 1.19 ^{*△△▲}	442.00 ± 26.23 ^{△△▲▲}	72.50 ± 5.93 ^{**△}

注: 与正常组同时时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与肝阳上亢组同时时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与本组给药 2 周比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

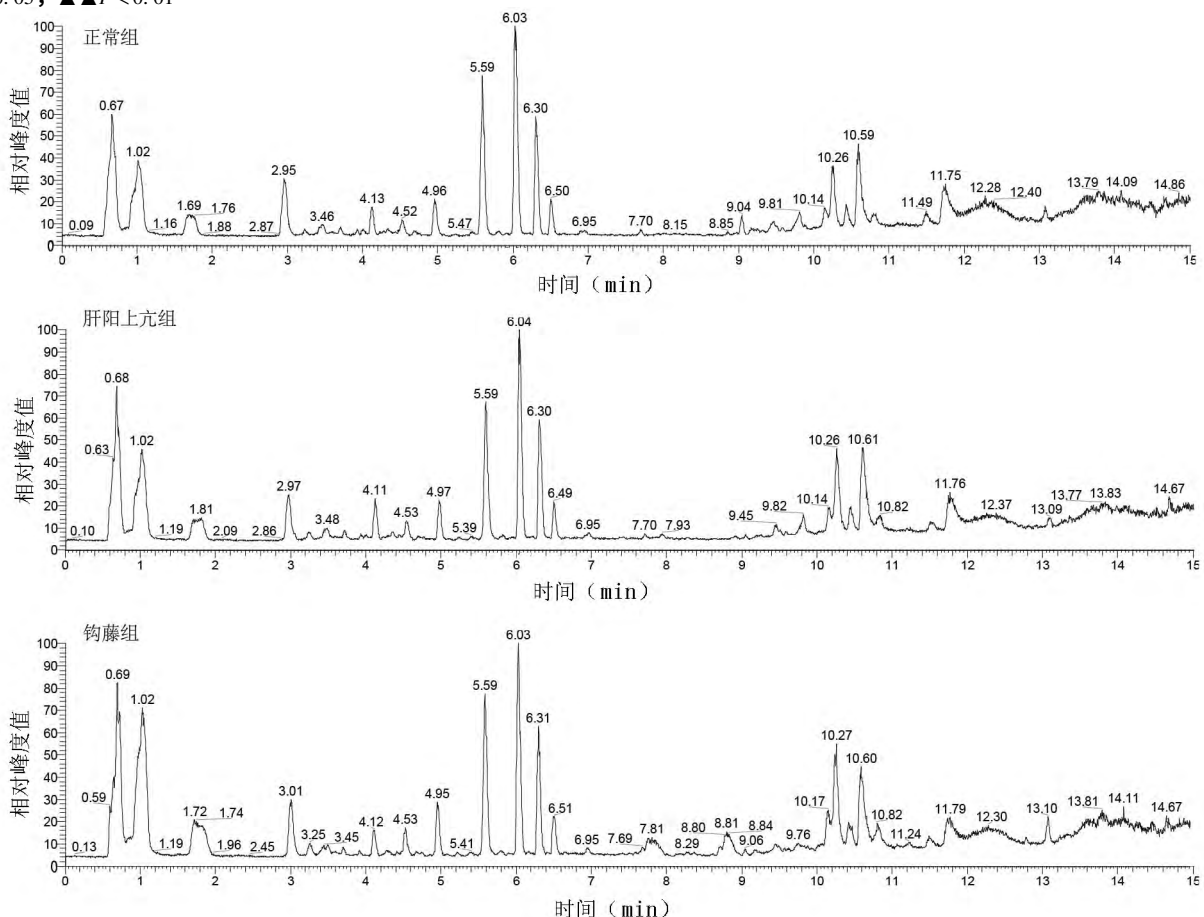


图 1 各组大鼠血清正离子模式下总离子流图

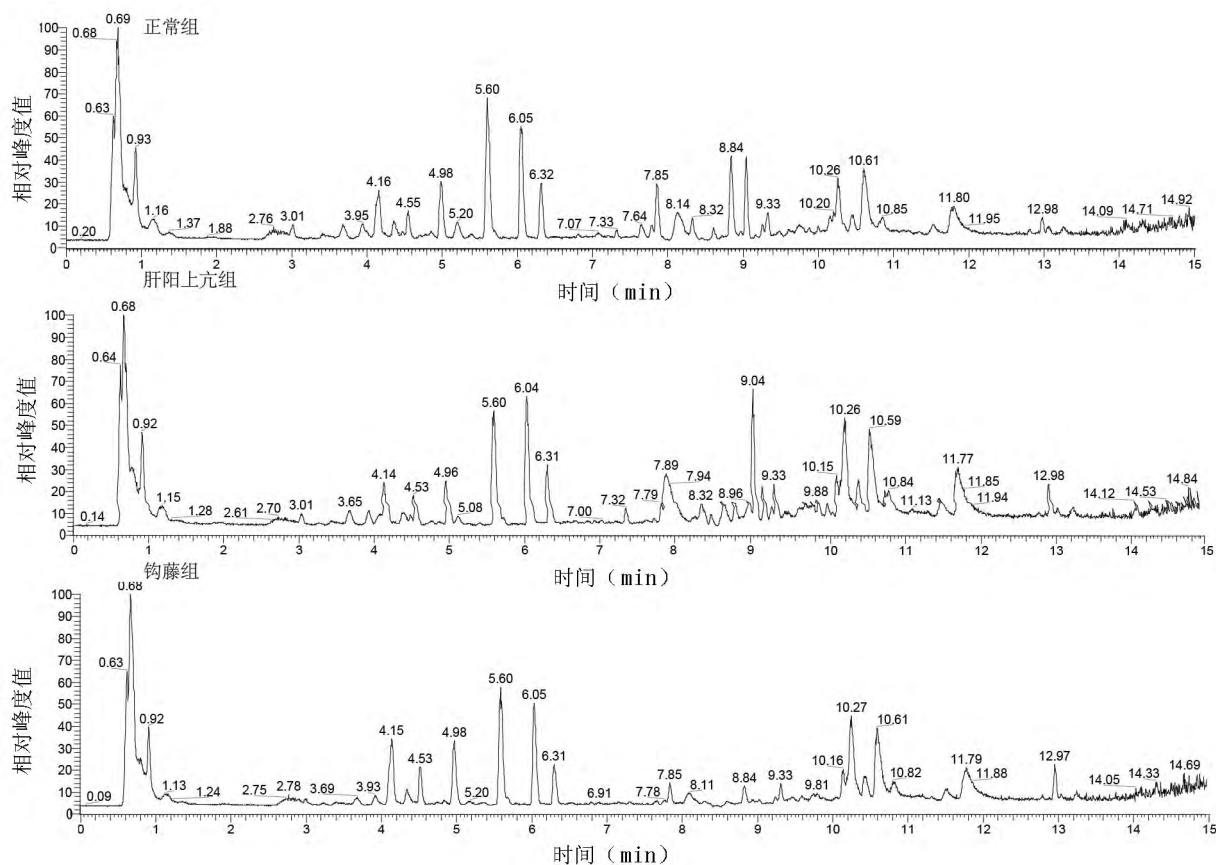


图 2 各组大鼠血清负离子模式下总离子流图

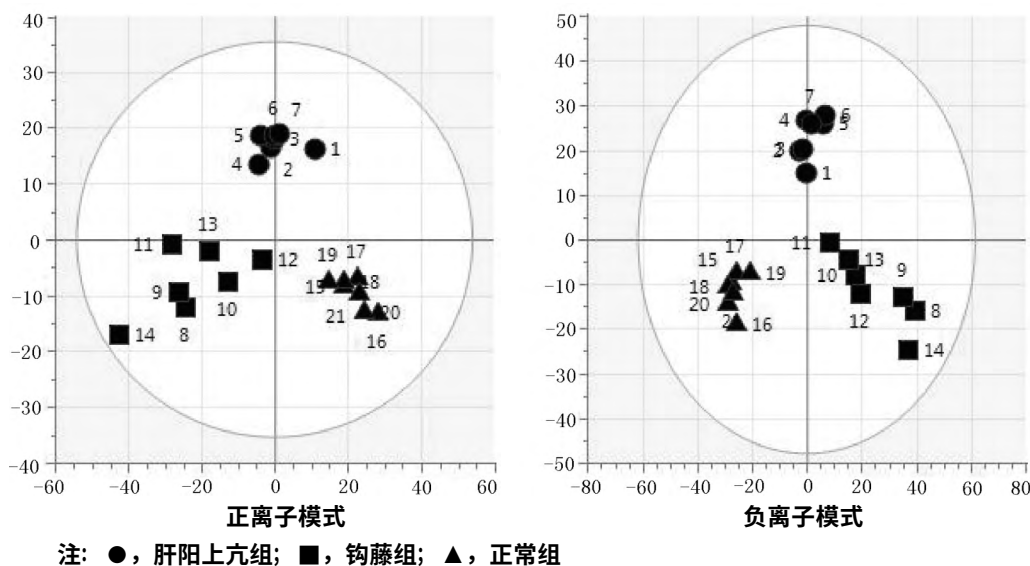


图 3 各组大鼠血清正、负离子模式下 PLS-DA 得分图

PCA 分析, 结果显示, 在正、负离子检测模式下, 质控样本明显聚集在一起, 而且集中分布于 95% 可信区间内, 表明仪器状态良好, 数据质量可靠。为观察各组的分组聚类效果, 将标准化后的数据进行 PCA 分析, 再做监督的 PLS-DA 模式识别, 得到 PLS-DA 二维得分如图 3 示, 各组样本呈现出良好

的分类效果。

3.4 各组大鼠血清潜在生物标记物相对含量比较
原始数据经 R 语言滤噪, 峰对齐之后得到包括 mass 值、保留时间、峰面积在内的三维数据矩阵, 再经一系列数据处理后所得分子量即为潜在生物标志物的精确分子量。正常组、肝阳上亢组根据

表 2 各组大鼠体内各生物标志物相对含量比较 相对峰度值, $\times 10^7$, $M(P_{25}, P_{75})$

组别	鼠数	白三烯 B4	血栓素 B2	尿酸	6-酮前列腺素
正常组	7	0.14 (0.10, 0.18)	1.03 (0.79, 1.35)	0.59 (0.36, 0.91)	1.03 (0.85, 1.68)
肝阳上亢组	7	5.77 (2.87, 9.62) **	3.67 (2.73, 4.78) **	3.77 (1.37, 6.19) **	5.71 (3.72, 28.96) **
钩藤组	7	0.17 (0.11, 0.21) $\Delta\Delta$	2.99 (1.75, 4.47) $\Delta\Delta$	2.29 (1.96, 2.61) $\Delta\Delta$	4.76 (2.66, 6.49) $\Delta\Delta$
组别	鼠数	溶血磷脂酰胆碱	脱氧皮质酮	亚油酸	L-色氨酸
正常组	7	0.05 (0.05, 0.11)	0.58 (0.39, 0.75)	0.16 (0.13, 0.21)	0.11 (0.09, 0.13)
肝阳上亢组	7	0.16 (0.11, 0.21) **	0.28 (0.12, 0.33) **	0.41 (0.40, 0.74) **	0.85 (0.49, 13.2) **
钩藤组	7	0.07 (0.05, 0.10) Δ	0.39 (0.12, 0.51) * Δ	0.17 (0.02, 0.75) Δ	0.41 (0.21, 0.54) * $\Delta\Delta$
组别	鼠数	4-羟脯氨酸	磷脂酸	2-甲氧基雌酮	11b-羟孕酮
正常组	7	10.51 (6.95, 16.76)	0.33 (0.24, 0.66)	3.55 (2.21, 5.58)	1.96 (1.07, 2.85)
肝阳上亢组	7	109.18 (35.74, 120.14) **	5.21 (0.91, 54.19) **	2.09 (1.58, 3.11) *	3.49 (2.37, 3.69) **
钩藤组	7	60.24 (34.55, 79.47) $\Delta\Delta$	1.82 (1.00, 2.50) $\Delta\Delta$	2.88 (1.91, 3.40) *	2.32 (1.35, 2.99) $\Delta\Delta$
组别	鼠数	多巴胺	甘氨酸甘氨酸	二氢睾酮	16a-羟基雄甾酮
正常组	7	0.39 (0.37, 0.42)	0.12 (0.10, 0.14)	0.58 (0.32, 0.67)	2.56 (1.74, 3.06)
肝阳上亢组	7	1.12 (1.00, 1.31) **	0.72 (0.59, 1.12) **	0.37 (0.27, 0.45) **	1.98 (0.75, 2.31) **
钩藤组	7	0.58 (0.25, 0.86) $\Delta\Delta$	0.38 (0.23, 0.61) $\Delta\Delta$	0.44 (0.10, 0.63) $\Delta\Delta$	2.01 (1.29, 3.10) $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与肝阳上亢组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

潜在生物标志物的精确分子量在 HMDB、METLIN、KEGG 等在线数据库中进行检索, 共鉴定出 16 个生物标志物: 亚油酸、多巴胺、脱氧皮质酮、4-羟脯氨酸、二氢睾酮、11b-羟孕酮、甘氨酸甘氨酸、6-酮前列腺素、16a-羟基雄甾酮、L-色氨酸、白三烯 B4、血栓素 B2、磷脂酸、2-甲氧基雌酮、尿酸、溶血磷脂酰胆碱。表 2 示, 与正常组比较, 肝阳上亢组二氢睾酮、11b-羟孕酮、脱氧皮质酮、2-甲氧基雌酮相对含量均下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其余各生物标志物相对含量均上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与肝阳上亢组比较, 钩藤组二氢睾酮、16a-羟基雄甾酮、脱氧皮质酮、2-甲氧基雌酮相对含量均上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其余各生物标志物相对含量均下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与正常组比较, 钩藤组 L-色氨酸上升, 脱氧皮质酮、2-甲氧基雌酮相对含量下降 ($P < 0.05$), 其余各生物标志物相对含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.5 宏观表征和微观代谢组学关联分析

经偏最小二乘回归分析可知, 微观代谢物与宏观表征关系密切。表 3 示, 面温与 L-色氨酸、多巴胺、6-酮前列腺素、甘氨酸甘氨酸呈正相关; 表 4 示, 痛阈与多巴胺、尿酸、6-酮前列腺素、白三烯 B4、血栓素 B2 呈正相关; 表 5 示, 旋转时间与白三烯 B4、尿酸、6-酮前列腺素、亚油酸、血栓素 B2、溶血磷脂酰胆碱呈正相关, 与二氢睾酮、16a-羟基雄甾酮、脱氧皮质酮呈负相关 (按 VIP 值大小依次排列各变量)。以上代谢物涉及甘油磷脂代谢、酪氨酸代谢、亚油酸代谢、类固醇激素生物

合成、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、嘌呤代谢、花生四烯酸代谢等代谢通路。

表 3 面温与微观代谢物关联系数

相关系数	多巴胺	甘氨酸甘氨酸	L-色氨酸	6-酮前列腺素
coefficient 值	0.00348	0.00298	0.00074	0.00447
VIP 值	1.74483	1.51868	1.17759	1.61421

表 4 痛阈与微观代谢物关联系数

相关系数	白三烯 B4	血栓素 B2	尿酸	6-酮前列腺素	多巴胺
coefficient 值	0.00175	0.00084	0.00153	0.00132	0.00178
VIP 值	1.23989	1.09584	1.70575	1.59609	1.79689

表 5 旋转时间与微观代谢物关联系数

相关系数	白三烯 B4	溶血磷脂酰胆碱	血栓素 B2	亚油酸	尿酸
coefficient 值	0.00343	0.00232	0.00119	0.00259	0.00198
VIP 值	2.06574	1.37709	1.37971	1.41523	1.95332
相关系数	二氢睾酮	6-酮前列腺素	16a-羟基雄甾酮	脱氧皮质酮	
coefficient 值	-0.00321	0.00194	-0.00190	-0.00264	
VIP 值	1.96282	1.85789	1.82599	1.41364	

4 讨论

肝阳上亢证是肝阴阳失去平衡协调, 肝阳相对偏盛, 浮动上亢。肝阴与肝阳相互依存, 相互为用, 对立统一, 保持相对平衡的协调稳定状态, 从而维持肝的正常生理功能^[3]。若情志不遂, 肝郁化火, 火灼肝阴, 或房劳过度损伤肝肾之阴, 或热病损伤肝阴, 则可能导致肝阴不足, 肝阴、肝阳平衡破坏, 肝阳相对偏盛而浮动上亢, 出现肝阳上亢证^[4]。故临床常用平肝潜阳法治疗该证, 平肝法

为主要治法。从肝的疏泄功能来看,平其肝以静其气,调畅气机,损有余而补不足,可以稳定患者情绪,制其焦躁亢奋^[17]。

coefficient 值表示宏观表征与微观代谢物之间线性相关程度^[18]。VIP 值表示自变量对因变量的解释能力,VIP 值越大,微观代谢对宏观表征的解释能力越强^[18]。经偏最小二乘分析显示,前列腺素、甘氨酸等代谢物对面温调节具有较强的解释,与之呈正相关。面温的相对稳定具有重要的生理意义。大鼠的面温由营养物质氧化时所释放的热量来维持,因而与能量代谢关系密切^[19]。肝阳上亢证与交感神经系统过度兴奋密切相关,通常该证能量代谢加快,在临床上表现为面部烘热^[20]。研究表明,静脉注射致热原后,脑脊液中的前列腺素升高 2.5~4.0 倍,表明前列腺素是强致热剂,它在脑内的作用是升高环磷酸腺苷的水平^[21]。环磷酸腺苷可促使溶酶体酶及其他炎性介质的释放^[22],加剧炎症反应,导致体温调节中枢调定点的升高^[23]。此外,大鼠体内甘氨酸、丝氨酸与甲烯四氢叶酸化合^[24],再由糖异生途径生成血糖,由此可能会造成大鼠体内血糖浓度上升,能量消耗增加,故大鼠面温有所上升。本研究检测到高血压病肝阳上亢证大鼠面温较正常大鼠升高,前列腺素、甘氨酸等代谢物水平增高,而经钩藤治疗后面温明显下降,代谢物含量显著降低,说明钩藤能够通过调节能量代谢及体温调定点以此调控面温,改善肝阳上亢证临床表现。

大鼠旋转时间的变化可提示眩晕症状。偏最小二乘分析表明,二氢睾酮与之呈负相关,亚油酸及其代谢产物能对眩晕调节具有较强的解释,与之呈正相关。眩晕是高血压病肝阳上亢证临床表现之一,主要由于血管狭窄及椎动脉管受压等原因而致脑供血不足诱发^[25]。亚油酸是一种体内必须的脂肪酸,花生四烯酸由它转化而成,在一系列代谢酶的作用下分解为前列腺素、血栓素、白三烯等^[26]。近年研究表明,血栓素及其受体(TP)能促使平滑肌细胞的迁移、血小板聚集,血管收缩^[27]。该物质会造成部分血液滞留在血管内,致使脑组织供血不足。白三烯在动脉粥样硬化形成中是一种强效的刺激炎症因子的介质,它能促进凝血及血栓形成,阻塞动脉腔,导致该动脉所供应的组织或器官缺血或坏死^[28]。二氢睾酮有激活脂蛋白脂酶的作用,脂蛋白脂酶活性的增加有助于游离脂肪酸向周围组织转运;同时二氢睾酮通过对三羧酸循环酶活

性的影响,使游离脂肪酸能够进入羧酸循环氧化,胆固醇合成减少^[29]。推测当血清二氢睾酮水平降低时,脂蛋白脂酶活性和三羧酸循环酶活性亦降低,体内游离脂肪酸增加。血管沉积物增加,致使动脉血管狭窄,亦可造成眩晕。本研究结果显示,高血压病肝阳上亢证大鼠旋转时间较正常大鼠缩短,二氢睾酮降低、亚油酸及其代谢产物水平较正常组增高,经钩藤治疗后旋转时间明显增加,代谢物含量显著降低,提示高血压病肝阳上亢证大鼠二氢睾酮、亚油酸及其代谢产物体内分解代谢增强,钩藤可能通过调节花生四烯酸、亚油酸和雄激素代谢来减少血管沉积物、减少炎症因子的数量以此来扩张血管,改善眩晕。痛阈通常指引起人体痛觉的刺激强度^[30]。经偏最小二乘分析显示,多巴胺能对痛阈值调节具有较强的解释,与之呈正相关。高血压病肝阳上亢证多因颅内血管痉挛收缩,局部血流量迅速减少,继而颅外动脉张力降低,导致充血高灌注^[31],产生头痛,痛敏反应增加。研究表明,痛阈与中枢神经系统关系密切,尤其是单胺类神经递质,其在中枢神经系统内参与疼痛的产生和疼痛调节过程^[32]。多巴胺是参与调节人类躯体运动、精神活动以及精神依赖的重要神经递质^[33]。脑内主要的多巴胺通路包括中脑黑质-纹状体通路、中脑腹侧背盖-边缘系统(包括伏隔核、杏仁体等结构)通路;中脑腹侧背盖-大脑皮层通路^[34]。这些通路中的多巴胺系统对外界伤害性信息均具有紧张性抑制作用,损毁中脑品质或中脑腹侧背盖的多巴胺能神经元可引起动物的痛敏反应^[35]。故推测大鼠痛阈值的上升可能是由多巴胺含量上升造成上述三条通路代谢紊乱导致痛敏反应增加。本研究检测到高血压病肝阳上亢证大鼠痛阈值较正常大鼠降低,存在多巴胺水平增高,而经钩藤治疗后痛阈值明显提高,代谢物含量显著降低,提示高血压病肝阳上亢证大鼠多巴胺体内分解代谢增强,钩藤可能通过调节多巴胺代谢来减少痛敏反应,降低痛阈值。

本研究结果显示,钩藤可能通过调节体内亚油酸代谢、酪氨酸代谢、固醇激素生物合成代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、嘌呤代谢等代谢通路等代谢通路中的相关代谢产物的表达,降低血压,从而降低高血压病肝阳上亢证大鼠面部温度,提高痛阈值,改善头晕,发挥钩藤平肝潜阳的药效机制。

参考文献

[1] 宁澄,阿基业,郝海平,等. 高血压病肝火亢盛证型代谢

- 组学的初步研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(6): 717-720.
- [2] 肖纯, 金益强, 胡随瑜, 等. 潜阳方对高血压肝阳上亢证大鼠模型的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 1999, 19(2): 8-10.
- [3] 宋纯清, 樊懿, 黄伟晖, 等. 钩藤中不同成分降压作用的差异 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 44-46.
- [4] 马雪玲. 高血压病证结合动物模型及其肝火亢盛证的生物学基础研究 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2013: 22-26.
- [5] 孟凡波, 李运伦, 杨传华. 原发性高血压肝阳上亢证诊断量表阈值的建立 [J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(1): 12-15.
- [6] 鄢东红, 金益强, 肖纯, 等. 自发性高血压大鼠肝阳上亢证模型的复制 [J]. 湖南中医药大学学报, 1999, 19(4): 35-38.
- [7] 梁清华, 张扬, 陈疆, 等. 肝阳上亢与肝阳化风证大鼠模型脾淋巴细胞的蛋白质组学分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(5): 44-56.
- [8] 李彬, 齐锦生, 曹丁. 养阴活血方药对糖尿病大鼠主动脉内皮损伤的保护作用 [J]. 中药材, 2009, 32(8): 1245-1248.
- [9] 董幸, 潘燕, 孟延, 等. 尾套法与颈动脉法测量大鼠血压的相关性研究 [J]. 实验室研究与探索, 2008, 27(5): 53-55.
- [10] 元云鹏, 胡杰伟, 柴逸峰, 等. 代谢组学数据处理研究的进展 [J]. 计算机与应用化学, 2008, 25(9): 1139-1142.
- [11] 阿基业. 代谢组学数据处理方法: 主成分分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 481-489.
- [12] CHONG IG, JUN CH. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present [J]. Chemometr Intell Lab Syst, 2005, 78(1-2): 103-112.
- [13] 杨雯晴, 蒋海强, 李运伦, 等. 卡托普利干预自发性高血压大鼠血清代谢组学研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(7): 998-1003.
- [14] 王玉龙, 吕光耀, 王娅妮, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 的丹七片对自发性高血压大鼠尿液代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 102-107.
- [15] 杨雯晴, 王晓冰, 李运伦. 原发性高血压肝阳上亢证动物模型的评价与思考 [J]. 山东中医杂志, 2015, 34(6): 403-405.
- [16] 孟凡波, 李运伦, 王苗苗, 等. 原发性高血压肝阳上亢证诊断量表信度与效度检验 [J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(5): 378-380.
- [17] 解君. 基于 HPLC-MS 技术的高血压病肝阳上亢证代谢模式及平肝方药的干预研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2012: 21-24.
- [18] 杜振华. 乙肝病毒性肝硬化的血清代谢轮廓分析 [D]. 天津: 天津医科大学, 2011: 6-8.
- [19] YAMAOKA I. Modulation of core body temperature and energy metabolism by amino acids [J]. J Phys Fitness Sports Med, 2013, 2(3): 351-353.
- [20] 邵华强, 邵晓慧, 管琳. 高血压病肝阳上亢证心率变异性变化特点 [J]. 中国中医急症, 2014, 23(11): 2049.
- [21] 李沧海, 周军, 霍海如, 等. 前列腺素 EP3 受体激动剂诱导发热及其机制初探 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(4): 664-665.
- [22] OKA T, OKA K, SAPER CB. Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats [J]. Brain Res, 2003, 968(2): 256-262.
- [23] 唐冀雪. 前列腺素等物质在炎症中的作用 [J]. 基础医学与临床, 1982, 2(7): 1-6.
- [24] 许建伟, 徐文仙, 童炎岳. 术前输注氨基酸对老年前列腺患者术中体温的影响 [J]. 护士进修杂志, 2016, 31(12): 1103-1105.
- [25] 廉全荣, 赵高峰. 天麻素联合苦碟子注射液治疗眩晕肝阳上亢证临床观察 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(12): 2023-2023.
- [26] 李林. 花生四烯酸代谢物的酶免疫分析法 [J]. 首都医科大学学报, 1988, 9(4): 305-308.
- [27] 郭歌, 祖凌云, 高炜. 花生四烯酸代谢产物与动脉粥样硬化 [J]. 心血管病学进展, 2014, 35(5): 526-530.
- [28] LEFEBVRE B, PÉPIN JL, BAGUET JP, et al. Leukotriene B₄: early mediator of atherosclerosis in obstructive sleep apnoea? [J]. Eur Respir J, 2008, 32(1): 113-120.
- [29] 代雪梅, 刘丹, 刘凤. 男性甲状腺功能亢进症患者治疗前后血清性激素水平变化及临床意义 [J]. 医学综述, 2013, 19(8): 1514-1516.
- [30] 毕海金, 吴国程, 陈红云, 等. 人体痛阈测定方法及其应用研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2015, 21(1): 60-63.
- [31] 李智, 李炜, 陈泽奇, 等. 天麻钩藤饮对偏头痛肝阳上亢证大鼠下丘脑蛋白质的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2006, 10(47): 45-48.
- [32] BÂ A, SERI BV. Functional development of central nervous system in the rat: Ontogeny of nociceptive thresholds [J]. Physiol Behav, 1993, 54(2): 403-405.
- [33] 韩济生. 神经科学原理 [M]. 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 481-482.
- [34] 汪海宏, 许绍芬. 多巴胺 D1 和 D2 受体拮抗剂对针刺镇痛的增强 [J]. 生理学报, 1993, 45(1): 61-68.
- [35] SAADÉ NE, ATWEH SF, BAHUTH NB, et al. Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. [J]. Brain Res,

1997, 751(1):1-12.

Relations between Macroscopic Characterization and Metabolomics of Rat with Hypertension of Ascendant Hyperactivity of Liver Yang Syndrome Intervened with Gouteng (*Uncariae Ramulus Cum Uncis*, 钩藤)

YU Ruixue¹, YANG Wenqing², LIU Ana¹, WANG Huanjun¹, JIANG Haiqiang², LI Yunlun³

(1. School of Pharmacy, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan, 250355; 2. Experimental Center, Shandong University of Chinese Medicine; 3. Affiliated Hospital to Shandong University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of Gouteng (*Uncariae Ramulus Cum Uncis*, 钩藤) in treating hypertension of ascendant hyperactivity of liver Yang syndrome. **Methods** Fourteen SHR rats were randomized into ascendant hyperactivity of liver Yang syndrome (AHLY) group and Gouteng group, with 7 rats in each group. Another seven Wistar rats were selected as control group. AHLY group and Gouteng group were given oral Fuzi (*Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, 附子) solution of 20 ml/kg to build the hypertension rat model of AHLY syndrome. After successful modeling, Gouteng group was given 22.9 ml/kg Gouteng decoction, while the AHLY group and the control group were respectively given the same amount of normal saline; the rats in each group were intervened for 4 weeks. Then the macro-indicators such as systolic blood pressure, facial temperature, and pain threshold and rotation time were collected. At the same time, the information of endogenous metabolites in serum of rats was collected by UHPLC-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass (UPLC-Q-Exactive) technology. Partial least-squares regression was used to analyze the relationship between external macro-indicators and internal micro-indicators. **Results** Compared with those in the control group, the systolic blood pressure increased, the facial temperature increased, the pain threshold decreased and the rotation time shortened in the model group, while the systolic blood pressure in Gouteng group was lower than that in the AHLY group, and the rotation time was longer ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). A total of 16 biomarkers were identified by database search, including linoleic acid, dopamine, deoxycorticosterone, 4-hydroxyproline, dihydrotestosterone, 11b-hydroxyprogesterone, glycylglycine, 6-ketone prostaglandin, 16a-hydroxyandrostane, L-tryptophan, leukotriene B4, thromboxane B2, phosphatidic acid, 2-methoxy estrone, uric acid, and lysophosphatidylcholine. Compared with those in the control group, the levels of dihydrotestosterone, 11b-hydroxyprogesterone, deoxycorticosterone, 2-methoxy estrone decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the rest of the biomarkers increased in the AHLY group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with those in the AHLY group, the levels of dihydrotestosterone, 16a-hydroxyandrostaglandin, deoxycorticosterone and 2-methoxy estrone in Gouteng group increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the rest of the biomarkers decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The possible mechanism of Gouteng in treating hypertension of the ascendant hyperactivity of liver Yang syndrome may include the following: regulating the metabolisms of glycine, serine and threonine, regulating the metabolisms of arachidonic acid and tyrosine to reduce facial temperature, regulating the metabolisms of glycerophospholipid and linoleic acid and the anabolism of sterol hormones to improve dizziness as well as regulating metabolisms of arachidonic acid, tyrosine and purine to improve the pain threshold.

Keywords hypertension; the ascendant hyperactivity of liver Yang syndrome; Gouteng [*Uncariae Ramulus Cum Uncis*]; metabolomics

(收稿日期: 2017-07-28; 修回日期: 2017-12-24)

编辑: 王利芬