

护肝清脂方饮片汤剂与配方颗粒的化学成分、药效一致性及机制研究^Δ

张振华^{1,2*}, 龙昌锐², 吴辉星¹, 乡世健^{1,2}, 周本杰^{1,2#}[1. 中山大学药学院(深圳), 广东深圳 518107; 2. 中山大学附属第七医院(深圳)药学部, 广东深圳 518107]

中图分类号 R917; R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)12-1442-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.12.05



摘要 目的 研究护肝清脂方(HGQZ)饮片汤剂与配方颗粒的特征成分含量及对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)模型小鼠药效的一致性,并探讨其潜在作用机制。方法 运用液相色谱-串联三重四极杆质谱技术,分析、比较HGQZ饮片汤剂与配方颗粒中6种特征成分的含量。将雄性C57BL/6小鼠分为正常对照组、模型组、HGQZ饮片汤剂低/高剂量组(13、26 g/kg,以生药量计)、HGQZ配方颗粒低/高剂量组(13、26 g/kg,以生药量计),每组6只。除正常对照组小鼠给予普通维持饲料外,其余各组小鼠均给予高脂饲料20周以建立NAFLD模型;造模同时,各组小鼠灌胃相应药液或等体积水1次。检测其空腹血糖(FBG)水平和葡萄糖、胰岛素耐量,体重和肝指数、白色脂肪指数和棕色脂肪指数,以及脂质指标(总胆固醇、甘油三酯)和肝功能指标(天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶)水平,观察其肝组织病理学形态和脂质堆积情况。取模型组、HGQZ饮片汤剂高剂量组、HGQZ配方颗粒高剂量组小鼠血清样品,进行代谢组学分析,并针对潜在机制进行验证。结果 HGQZ饮片汤剂与配方颗粒中,人参皂苷Rb₁、香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷、金丝桃苷、荷叶碱、23-乙酰泽泻醇B含量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,HGQZ饮片汤剂组与配方颗粒各剂量组小鼠的肝组织病理改变均有所缓解,炎症细胞浸润和脂肪空泡均有所减少,其FBG水平、葡萄糖耐量、胰岛素耐量、体重、肝指数、白色/棕色脂肪指数、脂质和肝功能指标水平均普遍改善($P<0.05$),但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。模型组与HGQZ饮片汤剂高剂量组、模型组与HGQZ配方颗粒高剂量组分别有234、136个血清差异代谢物,取交集后得共同差异代谢物65种,富集于嘌呤代谢、三羧酸代谢等代谢通路;其中,模型组柠檬酸的含量均显著低于HGQZ饮片汤剂和配方颗粒的高剂量组($P<0.05$);高剂量的HGQZ饮片汤剂与配方颗粒均可显著升高腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(AMPK)的磷酸化水平($P<0.05$)。结论 HGQZ饮片汤剂和配方颗粒的特征成分含量相当,对NAFLD模型小鼠的改善作用相似,且其抗NAFLD作用发挥均与激活AMPK能量代谢通路有关。

关键词 护肝清脂方;非酒精性脂肪性肝病;饮片汤剂;配方颗粒;一致性研究;含量;药效

Study on chemical composition, pharmacodynamic consistency and mechanism between Hupan qingzhi formula decoction and its formulated granules

ZHANG Zhenhua^{1,2}, LONG Changrui², WU Huixing¹, XIANG Shijian^{1,2}, ZHOU Benjie^{1,2}[1. School of Pharmacy (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Guangdong Shenzhen 518107, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University(Shenzhen), Guangdong Shenzhen 518107, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To evaluate the contents of characteristic components in Hupan qingzhi formula (HGQZ) decoction and formulated granules and the pharmacodynamic consistency of them on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) model mice, and explore their potential underlying mechanisms of action. **METHODS** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry was used to analyze and compare the contents of six characteristic components in HGQZ decoction and formulated granules. Male C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, model group, HGQZ decoction low-dose and high-dose groups (13, 26 g/kg, calculated by crude drugs), and HGQZ formulated granules low-dose and high-dose groups (13, 26 g/kg, calculated by crude drugs), with 6 mice in each group. Except for the normal control group, which was fed a regular diet, the mice in the other groups were fed a high-fat diet for 20 weeks to establish the NAFLD model; at the same time, the mice in each group were gavaged with the corresponding drugs/water once. The fasting blood glucose (FBG) levels, glucose

^Δ **基金项目** 国家自然科学基金项目(No.82074078);广东省基础与应用基础研究基金委员会省企联合基金面上项目(No.2022A1515-220027);深圳市科技计划项目(No.ZDSYS20220606100801003)。

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向:中药药理。E-mail: zhangzh225@mail2.sysu.edu.cn

通信作者 主任药师,博士生导师,博士。研究方向:中药活性物质筛选与药理机制。E-mail: zhoubj23@mail.sysu.edu.cn

and insulin tolerance, body weight, liver index, white adipose tissue index, brown adipose tissue index, as well as lipid levels (total cholesterol, triglycerides) and liver function indicators (aspartate transaminase, alanine transaminase) were measured. Additionally, histopathological changes and lipid accumulation in liver tissues were observed. The serum samples of mice in the model group, HGQZ decoction high-

dose group and HGQZ formulated granules high-dose group were taken for metabolomics analysis, and validation of the underlying mechanisms was conducted. **RESULTS** There were no statistically significant differences in the contents of ginsenoside Rb₁, typhaneoside, isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside, hyperoside, nuciferine, and 23-acetylalisol B between HGQZ decoction and HGQZ formulated granules ($P>0.05$). Compared with the model group, the hepatic histopathological changes in mice were alleviated in both the HGQZ decoction group and all dose groups of HGQZ formulated granules. Inflammatory cell infiltration and lipid vacuoles were reduced. Additionally, there was a general improvement in FBG levels, glucose tolerance, insulin tolerance, body weight, liver index, white/brown adipose tissue index, lipid levels, and liver function indicators ($P<0.05$). However, no statistically significant differences were observed between these treatment groups ($P>0.05$). There were 234 and 136 differentially expressed serum metabolites identified in the model group versus HGQZ decoction high-dose group, and model group versus HGQZ formulated granules high-dose group, respectively. After taking the intersection, 65 common differentially expressed metabolites were obtained, which were enriched in metabolic pathways such as purine metabolism and tricarboxylic acid cycle metabolism. Among these, the content of citrate in the model group was significantly lower than that in both the HGQZ decoction group and HGQZ formulated granules high-dose group ($P<0.05$). Both high-dose HGQZ decoction and formulated granules could significantly elevate the phosphorylation levels of AMP-activated protein kinase (AMPK) ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** HGQZ decoction and formulated granules contain comparable amounts of characteristic components, and both exhibit equivalent efficacy on NAFLD model mice. The anti-NAFLD effects of HGQZ are associated with the activation of the AMPK energy metabolism pathway.

KEYWORDS Huguang qingzhi formula; non-alcoholic fatty liver disease; decoction; formulated granules; consistency study; content; pharmacodynamics

中药配方颗粒是以传统中医药理论为指导,采用现代工艺技术将中药饮片加工制成的可供临床直接配方使用的颗粒剂^[1]。该剂型具有免煎易服、便于调剂、剂量准确、患者依从性好等优点,是对传统中药饮片行业的补充和创新,有助于推动中医药行业的进一步发展,故备受学界关注^[2]。然而,中药配方颗粒与饮片汤剂的疗效差异是制约配方颗粒发展的关键因素^[3],因此开展一致性研究具有重要的临床意义。

护肝清脂方(Huguang qingzhi formula,以下简称“HGQZ”)是源自名老中医臧堃堂的经验方,由泽泻、山楂、荷叶、三七、蒲黄5味中药组成^[4]。本课题组前期研究结果显示,对于非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)等代谢性疾病, HGQZ 饮片汤剂具有良好的抗脂质过氧化、调节血脂的作用,能显著增强机体抗氧化应激的能力^[5-8],但有关HGQZ配方颗粒的研究尚少。为此,本研究根据2020年版《中国药典》(一部)^[9],对HGQZ饮片汤剂与配方颗粒中6种特征成分(人参皂苷Rb₁、香蒲新苷、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、金丝桃苷、荷叶碱、23-乙酰泽泻醇B)的含量进行比较;同时,以高脂饮食喂养构建NAFLD小鼠模型,探究HGQZ饮片汤剂与配方颗粒的药效是否具有-致性,并基于代谢组学分析其潜在作用机制,以期为HGQZ配方颗粒替代饮片汤剂提供理论基础和科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括SCIEX Triple Quad™ 5500型液相色谱-串联三重四极杆质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)

系统(美国AB SCIEX公司)、安稳+血糖仪(三诺生物传感股份有限公司)、Tanon 5200型全自动化学发光图像分析系统(上海天能生命科学生物有限公司)、Mini-PROTEAN® Tetra型电泳系统(美国Bio-Rad公司)、K5800/C/H/T型微量分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

泽泻、山楂、荷叶、蒲黄、三七配方颗粒(批号分别为A2015213、A307L333、A304853、A305A093、A3040933,规格均为200 g/袋)均购自广东一方制药有限公司,其制备过程均遵循《广东省中药配方颗粒质量标准》;泽泻、山楂、荷叶、蒲黄、三七饮片(批号分别为231001、220601、220101、231001、220601)均购自广州至信药业股份有限公司,经中山大学附属第七医院药学部副研究员乡世健鉴定均为真品;人参皂苷Rb₁、香蒲新苷、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、金丝桃苷、荷叶碱、23-乙酰泽泻醇B对照品(批号分别为41753-43-9、104472-68-6、55033-90-4、482-36-0、26575-95-1、475-83-2,纯度均为95%)均购自成都克洛玛生物技术有限公司;胰岛素(批号R22024030202)购自通化东宝药业股份有限公司;葡萄糖(批号G116303)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)试剂盒(批号分别为20240416、20240417、20240612、20240612)均购自南京建成生物工程研究所;甲醇、乙腈(批号分别为11176407147、JB127130)为分析纯,均购自美国Supelco公司;兔源腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(AMP-activated

protein kinase, AMPK) 抗体、兔源磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, p-AMPK) 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 二抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号分别为 A00994-6、BM4718、BA1054、BA1050) 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单克隆抗体 (批号 62u0922) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司。

1.3 实验动物与饲料

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 36 只, 7 周龄, 体重 (20 ± 2) g, 购自珠海百试通生物科技有限公司, 生产许可证号为 SCXK (粤) 2020-0051。所有小鼠饲养于深圳华腾生物医药科技有限公司动物房内, 温度为 (22 ± 1) °C, 相对湿度为 40%~70%, 每 12 h 光照/黑暗循环。所有小鼠均自由摄食、饮水。本研究饲养环境符合实验动物环境设施要求, 实验方案经深圳华腾生物医药科技有限公司实验动物伦理委员会批准 (编号 B202312-1)。

高脂饲料 (批号 20230826) 购自戴茨生物科技 (无锡) 有限公司; 普通维持饲料 (批号 2024010101) 购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司。

2 方法

2.1 HGQZ 饮片汤剂与配方颗粒的特征成分含量比较

2.1.1 溶液的制备

(1) 对照品溶液: 精密称取人参皂苷 Rb₁、香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷、金丝桃苷、荷叶碱、23-乙酰泽泻醇 B 对照品各 10 mg, 置于同一 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 得质量浓度均为 1 mg/mL 的混合对照品储备液。(2) HGQZ 饮片汤剂供试品溶液: 取处方量药材 50 g (其中蒲黄 7.5 g、三七 2.5 g、荷叶 10 g、山楂 15 g、泽泻 15 g), 加 8 倍量水, 加热回流提取 1 h × 3 次, 过滤, 合并滤液。将滤液于 60 °C 下减压浓缩至 50 mL, 即得质量浓度为 1 g/mL (以生药量计) 的 HGQZ 饮片汤剂提取液。精密吸取上述提取液适量, 用 50% 甲醇稀释 100 倍后经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得 HGQZ 饮片汤剂供试品溶液。(3) HGQZ 配方颗粒供试品溶液: 根据配方颗粒包装袋内容可知, 配方颗粒与饮片的换算比例分别为泽泻 1:4、山楂 1:2、荷叶 1:5、三七 1:1.5、蒲黄 1:3.8, 故按处方量称取配方颗粒适量 (相当于饮片 50 g), 加水 50 mL, 涡旋振荡均匀, 于 60 °C 水浴中加热 10 min 后冷却至室温, 即得质量浓度为 1 g/mL (以生药量计) 的 HGQZ 配方颗粒提取液。精密吸取该提取液适量, 用 50% 甲醇稀释 100 倍后经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得 HGQZ 配方颗粒供试品溶液。

2.1.2 色谱与质谱条件

以 Phenomenex Kinetex[®] C₁₈ (3.0 mm × 100 mm, 2.6 μm) 为色谱柱, 以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A、乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱 (0~0.8 min, 15%B; 0.8~2.5 min, 15%B→85%B; 2.5~3.5 min, 85%B; 3.5~4.0 min, 85%B→

15%B; 4.0~5.0 min, 15%B); 柱温为 40 °C; 流速为 0.4 mL/min; 进样量为 1 μL。

采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行正离子检测; 喷雾电压为 5 500 V; 离子化温度为 550 °C; 雾化气压力为 50 psi; 辅助气压力为 55 psi; 气帘气压力为 25 psi; 碰撞气压力为 9 psi。HGQZ 各特征成分的多反应监测质谱信息见表 1。

表 1 HGQZ 各特征成分的多反应监测质谱信息

特征成分	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	去簇电压/V	碰撞电压/V
人参皂苷 Rb ₁	1 131.7	365.5	234.0	78.6
香蒲新苷	771.4	316.9	118.7	38.8
异鼠李素-3-O-新橙皮苷	625.1	316.8	93.8	28.7
金丝桃苷	465.0	303.0	103.1	20.7
荷叶碱	296.3	265.2	104.6	12.8
23-乙酰泽泻醇 B	515.2	437.3	30.4	22.5

2.1.3 方法学考察

(1) 取“2.1.1”项下配制的混合对照品储备液适量, 用 50% 甲醇逐级稀释, 制成各成分质量浓度均为 285.74、142.87、71.44、35.72、7.14、1.43、0.72 μg/mL 的标准曲线溶液。取上述标准曲线溶液, 按“2.1.2”项下色谱与质谱条件进样分析, 记录峰面积。以各对照品峰面积为纵坐标 (*y*)、质量浓度为横坐标 (*x*), 使用最小加权二乘法进行线性回归。(2) 按照 2020 年版《中国药典》(四部) 的相关要求, 进行方法学考察^[10]。

2.1.4 特征成分含量的测定及比较

按“2.1.1”项下 HGQZ 饮片汤剂、配方颗粒供试品溶液, 按“2.1.2”项下色谱与质谱条件进样分析, 记录峰面积并代入回归方程, 计算样品中各成分的含量并进行比较。每样品平行检测 3 次。

2.2 HGQZ 饮片汤剂与配方颗粒的药效比较

2.2.1 分组、造模与给药

将小鼠随机分为正常对照组 (NC 组)、模型组 (HFD 组)、HGQZ 饮片汤剂低剂量组 (HGQZ-YP-L 组)、HGQZ 饮片汤剂高剂量组 (HGQZ-YP-H 组)、HGQZ 配方颗粒低剂量组 (HGQZ-KL-L 组)、HGQZ 配方颗粒高剂量组 (HGQZ-KL-H 组), 每组 6 只。根据本课题组前期研究, 本实验将 HGQZ 饮片汤剂/配方颗粒的低、高剂量设置为 13、26 g/kg (以生药量计)。除 NC 组小鼠给予普通维持饲料外, 其余各组小鼠均给予高脂饲料 20 周以建立 NAFLD 模型^[11]。造模同时, 各药物组小鼠灌胃相应剂量药液, 其余各组小鼠灌胃等体积水, 每天 1 次, 共 20 周。实验期间, 每周记录各组小鼠的体重。

2.2.2 小鼠空腹血糖的检测和葡萄糖、胰岛素耐量实验

于给药的 18 周末, 各组小鼠禁食 12 h 后进行葡萄糖耐量试验, 具体操作如下: 各组小鼠灌胃 10% 葡萄糖溶液 (每 40 g 体重灌胃 200 μL), 并于灌胃后 0、15、30、60、90、120 min 时采集尾静脉血; 使用血糖仪检测上述时间点的血糖值 [其中, 0 min 时的血糖值即为空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 值], 绘制血糖浓度-时间曲

线并计算曲线下面积(area under the curve, AUC)以反映葡萄糖耐量(两者成正比)。于给药的第19周末,各组小鼠禁食12 h后进行胰岛素耐量试验,具体操作如下:各组小鼠腹腔注射0.15 IU/mL胰岛素溶液(以生理盐水为溶剂,每40 g体重注射200 μ L),并于注射后0、15、30、60、90、120 min时采集尾静脉血;使用血糖仪检测上述时间点的血糖值,绘制血糖浓度-时间曲线并计算AUC以反映胰岛素耐量(两者成正比)。末次给药后,使用血糖仪检测各组小鼠的FBG水平。

2.2.3 样本采集及器官指数的计算

末次给药后,各组小鼠禁食、不禁水16 h后称重,随后以戊巴比妥钠麻醉后经眼球取血。血样于室温下静置30 min后,于4 $^{\circ}$ C下以3 000 r/min离心15 min,分离上层血清并于-80 $^{\circ}$ C下冻存,备用。取血后,各组小鼠以颈椎脱臼法处死,分离肝脏、白色脂肪、棕色脂肪并称重,并计算器官或脂肪指数——肝指数、白色脂肪指数和棕色脂肪指数。器官或脂肪指数=器官或脂肪质量/体重。随后,取肝组织样品适量,经液氮速冻后于-80 $^{\circ}$ C冻存,剩余组织样品则以4%多聚甲醛溶液固定,备用。

2.2.4 小鼠脂质与肝功能指标的检测

取“2.2.3”项下各组小鼠肝组织样品适量,匀浆后,检测其TC、TG水平;取“2.2.3”项下各组小鼠的血清样品适量,检测其AST、ALT水平。严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.2.5 小鼠肝组织病理形态学和脂质堆积情况观察

取“2.2.3”项下各组小鼠经4%多聚甲醛溶液固定24 h的肝组织,取一部分经脱水、石蜡包埋后切片,再进行苏木精-伊红(HE)染色,以甘油封片后,使用显微镜观察其肝组织病理损伤状况;取另一部分肝组织用OCT包埋剂包埋后行冷冻切片,再进行油红O染色,使用显微镜观察其脂质堆积情况(脂质经染色后呈红色)。

2.3 HGQZ 饮片汤剂与配方颗粒潜在作用机制分析

2.3.1 小鼠血清代谢组学研究

取HFD组、HGQZ-YP-H组、HGQZ-KL-H组(参考“2.2”项下药效学实验结果)小鼠血清样品适量,置于1.5 mL离心管中,加入400 μ L乙腈-甲醇混合溶液(1:1, V/V),涡旋30 s,于-20 $^{\circ}$ C下静置1 h后,再于4 $^{\circ}$ C下以12 000 r/min离心15 min,取上清液,真空浓缩至干。残渣以50%乙腈100 μ L复溶,涡旋30 s,于4 $^{\circ}$ C下以12 000 r/min离心15 min,取上清液5 μ L进行LC-MS/MS分析(检测仪器和条件均由美国AB SCIEX公司提供)。使用Analyst 1.6.3软件进行色谱、质谱数据采集,MultiQuant 3.0.3软件用于代谢物分析。将所得数据导入MetaboAnalyst 6.0平台(<https://www.metaboanalyst.ca>),采用正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),以 R^2Y (表示模型解释率,数值越接近于1表示差异性越大)和 Q^2 (表示模型预测能力,数值越接近于1表示模型的可靠性越高)

作为指标进行组间比较;绘制火山图,以表达量差异倍数(fold change, FC) ≥ 1.5 、 $P < 0.05$ 为标准筛选血清差异代谢物,并通过韦恩图筛选共同差异代谢物。以上述差异代谢物通过京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>)进行通路富集分析。

2.3.2 小鼠肝组织中 AMPK 信号通路相关蛋白表达的检测

取NC组、HFD组、HGQZ-YP-H组、HGQZ-KL-H组小鼠肝组织适量,匀浆,于4 $^{\circ}$ C下以12 000 r/min离心15 min;取上清液,用BCA法测定蛋白浓度后加热变性。取变性蛋白适量,经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上,以5%牛血清白蛋白于室温下封闭1.5 h;加入AMPK、p-AMPK、GAPDH一抗(稀释度分别为1:1 000、1:1 000、1:5 000),于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;用TBST洗膜后,加入相应二抗(稀释度为1:5 000),于室温下孵育1 h;用TBST洗膜后,滴加显色液后显影、成像。使用Image J软件分析各蛋白的条带灰度值,以AMPK、p-AMPK与内参蛋白(GAPDH)的条带灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量,并以p-AMPK与AMPK蛋白的相对表达量比值表示AMPK蛋白的磷酸化水平。

2.4 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行数据统计分析,采用GraphPad Prism 8软件绘制图表。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD- t 检验(方差齐性时)或Tamhane's T_2 检验(方差不齐时)。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 HGQZ 饮片汤剂与配方颗粒的特征成分含量比较结果

3.1.1 方法学考察结果

人参皂苷Rb₁、香蒲新苷、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、金丝桃苷、荷叶碱、23-乙酰泽泻醇B检测质量浓度的线性范围均为0.72~285.74 μ g/mL(相关系数均大于0.99)。结果见表2。该方法的专属性、精密度、加样回收率、稳定性均符合2020年版《中国药典》(四部)的相关规定(具体结果略)。

表2 HGQZ 中6个特征成分定量分析的线性关系考察结果

特征成分	标准曲线方程	相关系数
人参皂苷Rb ₁	$y = 2.0 \times 10^4 x + 0.2 \times 10^3$	0.993 6
香蒲新苷	$y = 4.1 \times 10^4 x + 1.3 \times 10^3$	0.999 1
异鼠李素-3- <i>O</i> -新橙皮苷	$y = 6.0 \times 10^4 x + 4.0 \times 10^3$	0.995 4
金丝桃苷	$y = 5.1 \times 10^4 x + 0.9 \times 10^3$	0.997 1
荷叶碱	$y = 2.2 \times 10^4 x + 8.4 \times 10^4$	0.992 4
23-乙酰泽泻醇B	$y = 3.0 \times 10^4 x - 0.7 \times 10^3$	0.995 5

3.1.2 含量测定结果

HGQZ 饮片汤剂和配方颗粒中6种特征成分的含量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),表明两者特征成分的含量相当。结果见表3。

表3 HGQZ 中6种特征成分的含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{g/g}$)

特征成分	饮片汤剂	配方颗粒
人参皂苷Rb ₁	46.4±18.3	40.5±4.0
香蒲新苷	16.5±3.9	19.7±3.6
异鼠李素-3-O-新橙皮苷	13.0±3.2	12.6±2.8
金丝桃苷	60.3±5.5	57.6±6.6
荷叶碱	48.8±5.1	40.0±3.8
23-乙酰泻泻醇B	0.30±0.02	0.40±0.06

3.2 HGQZ 饮片汤剂与配方颗粒的药效比较结果

3.2.1 小鼠FBG和葡萄糖、胰岛素耐量比较

与NC组比较,HFD组小鼠的FBG水平、葡萄糖耐量AUC、胰岛素耐量AUC均显著升高($P<0.05$)。与HFD组比较,各药物组小鼠的FBG水平、葡萄糖耐量AUC(HGQZ-YP-L组除外)、胰岛素耐量AUC(HGQZ-YP-L组除外)均显著降低($P<0.05$)。与同质量浓度HGQZ 饮片汤剂组比较,HGQZ 配方颗粒组小鼠上述指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表4、图1。

表4 各组小鼠FBG水平和葡萄糖、胰岛素耐量AUC比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	FBG/(mmol/L)	葡萄糖耐量AUC	胰岛素耐量AUC
NC组	5.15±0.55	1 037.7±99.8	658.8±50.1
HFD组	10.17±0.78 ^a	1 409.7±90.1 ^a	908.5±103.8 ^a
HGQZ-YP-L组	6.80±0.59 ^b	1 155.2±187.5	821.5±115.5
HGQZ-KL-L组	8.38±0.96 ^a	1 052.5±358.2 ^b	563.4±60.7 ^b
HGQZ-YP-H组	7.00±0.71 ^b	995.2±199.9 ^b	614.0±75.8 ^b
HGQZ-KL-H组	8.03±1.03 ^b	878.7±99.1 ^b	683.4±101.8 ^b

a:与NC组比较, $P<0.05$;b:与HFD组比较, $P<0.05$ 。

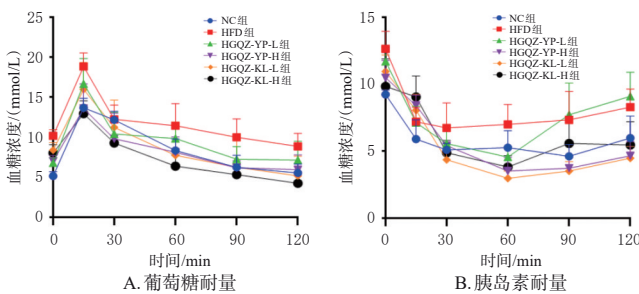


图1 各组小鼠葡萄糖耐量、胰岛素耐量实验的血糖浓度-时间曲线

3.2.2 小鼠体重、肝指数、脂肪指数比较

与NC组比较,HFD组小鼠的体重、肝指数、白色脂肪指数均显著升高,棕色脂肪指数显著降低($P<0.05$)。与HFD组比较,各药物组小鼠的体重(仅HGQZ-KL-H组)、肝指数、白色脂肪指数(HGQZ-KL-L组除外)均显著降低,棕色脂肪指数(HGQZ-YP-L组、HGQZ-KL-L组除外)均显著升高($P<0.05$)。与同质量浓度HGQZ 饮片汤剂组比较,HGQZ 配方颗粒组小鼠上述指标的差异

均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表5。

表5 各组小鼠体重、肝指数、白色脂肪指数、棕色脂肪指数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体重/g	肝指数	白色脂肪指数	棕色脂肪指数
NC组	34.9±3.8	0.032±0.005	0.016±0.006	0.0063±0.0011
HFD组	48.5±5.0 ^a	0.038±0.005 ^a	0.049±0.009 ^a	0.0035±0.0005 ^a
HGQZ-YP-L组	43.1±6.4	0.031±0.004 ^b	0.036±0.003 ^b	0.0047±0.0012
HGQZ-KL-L组	42.1±2.6	0.030±0.004 ^b	0.038±0.005	0.0046±0.0007
HGQZ-YP-H组	43.9±3.1	0.026±0.003 ^b	0.034±0.006 ^b	0.0055±0.0008 ^b
HGQZ-KL-H组	39.3±4.5 ^b	0.028±0.001 ^b	0.030±0.008 ^b	0.0055±0.0006 ^b

a:与NC组比较, $P<0.05$;b:与HFD组比较, $P<0.05$ 。

3.2.3 小鼠脂质与肝功能指标比较

与NC组比较,HFD组小鼠肝组织中TC、TG水平以及血清中AST、ALT水平均显著升高($P<0.05$)。与HFD组比较,各药物组上述指标(HGQZ-YP-L组TG水平除外)均显著降低($P<0.05$)。与同质量浓度HGQZ 饮片汤剂组比较,HGQZ 配方颗粒组小鼠上述指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表6。

表6 各组小鼠肝组织中TC、TG水平和血清中AST、ALT水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TC/(mmol/g)	TG/(mmol/g)	AST/(U/L)	ALT/(U/L)
NC组	0.022±0.009	0.036±0.021	8.64±1.54	7.52±1.17
HFD组	0.083±0.046 ^a	0.248±0.223 ^a	24.72±11.35 ^a	33.40±21.76 ^a
HGQZ-YP-L组	0.038±0.011 ^b	0.086±0.034	11.36±5.99 ^b	10.06±4.88 ^b
HGQZ-KL-L组	0.028±0.012 ^b	0.066±0.013 ^b	10.33±5.42 ^b	7.76±3.07 ^b
HGQZ-YP-H组	0.029±0.010 ^b	0.028±0.044 ^b	8.48±3.53 ^b	7.48±2.04 ^b
HGQZ-KL-H组	0.024±0.014 ^b	0.053±0.031 ^b	9.26±4.99 ^b	10.41±3.85 ^b

a:与NC组比较, $P<0.05$;b:与HFD组比较, $P<0.05$ 。

3.2.4 小鼠肝组织病理改变及脂质堆积情况比较

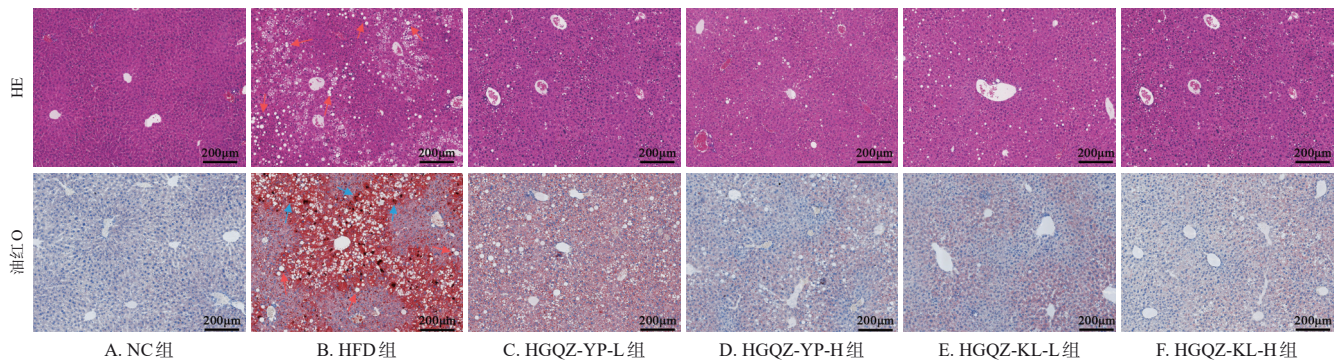
NC组小鼠肝组织细胞排列整齐,肝小叶结构完整且处于正常状态。与NC组比较,HFD组小鼠肝细胞呈现肥大特征,且可见明显炎症细胞浸润和脂肪空泡。与HFD组比较,各药物组小鼠的肝脏病理改变均有所缓解,炎症细胞浸润和脂肪空泡均有所减少。结果见图2。

3.3 HGQZ 饮片汤剂与配方颗粒潜在作用机制比较

3.3.1 小鼠血清代谢组学分析结果

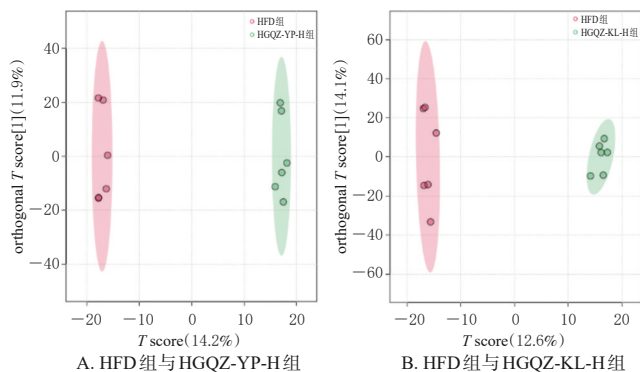
OPLS-DA结果(图3)显示,HFD组与HGQZ-YP-H组的 R^2Y 和 Q^2 分别为0.927、0.517,HFD组与HGQZ-KL-H组的 R^2Y 和 Q^2 分别为0.952、0.440,提示各组样本可明显区分,模型未见过度拟合。火山图结果(图4)显示,HFD组与HGQZ-YP-H组之间有234个血清差异代谢物,其中59个上调、175个下调;HFD组与HGQZ-KL-H组之间有136个血清差异代谢物,其中52个上调、84个下调。

韦恩图分析显示(图略),HFD组与HGQZ-YP-H组、HFD组与HGQZ-KL-H组的共同差异代谢物共65种。这65种差异代谢物的KEGG通路富集分析结果(图5)显示,其涉及的主要代谢通路包括嘌呤代谢(purine metabolism)、三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环等。



红色箭头:脂肪空泡;蓝色箭头:脂滴。

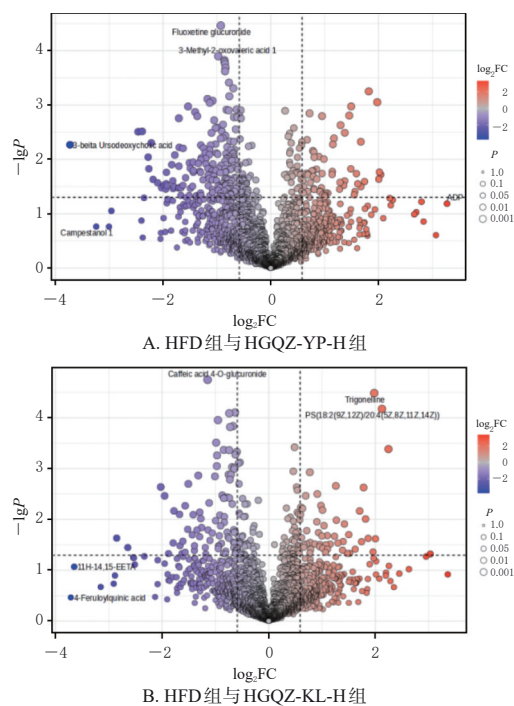
图2 各组小鼠肝组织病理形态学及脂质堆积观察显微图



A. HFD组与HGQZ-YP-H组

B. HFD组与HGQZ-KL-H组

图3 小鼠血清代谢组学分析的OPLS-DA图



A. HFD组与HGQZ-YP-H组

B. HFD组与HGQZ-KL-H组

图4 小鼠血清代谢组学分析的火山图

根据既往研究,TCA循环可影响能量代谢利用,与肥胖相关代谢性疾病密切相关^[12-13]。进一步分析TCA循环通路中相关代谢产物的变化,发现HGQZ干预后可显著上调小鼠血清中柠檬酸水平,具体表现为HFD组柠檬酸的平均响应强度为 5.20×10^7 ,显著低于HGQZ-YP-H组的 9.77×10^7 和HGQZ-KL-H组的 9.37×10^7 ($P < 0.05$)。

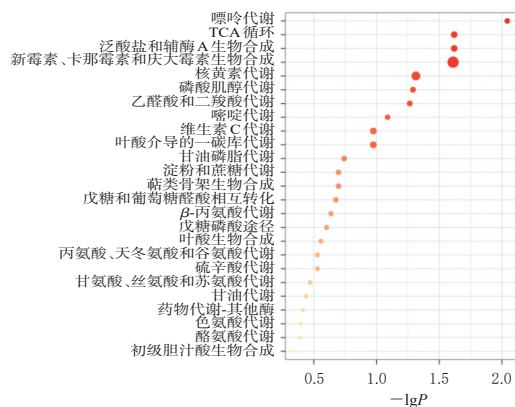


图5 小鼠共同差异血清代谢物KEGG通路富集分析气泡图(根据P值排名前25位)

3.3.2 小鼠肝组织中AMPK信号通路相关蛋白表达比较

与NC组(0.56 ± 0.07)比较,HFD组小鼠肝组织中AMPK蛋白的磷酸化水平(0.26 ± 0.16)显著降低($P < 0.05$)。与HFD组比较,HGQZ-YP-H组、HGQZ-KL-H组小鼠肝组织中AMPK蛋白的磷酸化水平(0.73 ± 0.18 、 0.75 ± 0.21)均显著升高($P < 0.05$)。与HGQZ-YP-H比较,HGQZ-KL-H组小鼠肝组织中AMPK蛋白磷酸化水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图6。

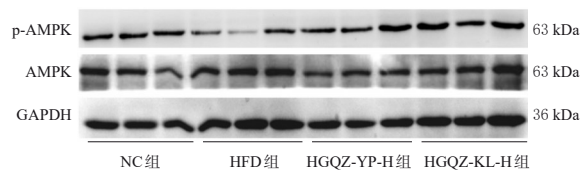


图6 各组小鼠肝组织中AMPK信号通路相关蛋白表达的电泳图

4 讨论

本课题组在HGQZ饮片汤剂和配方颗粒特征成分的含量比较中,首先比较了水-甲醇、水-乙腈、0.1%甲酸溶液-甲醇、0.1%甲酸溶液-乙腈4种流动相的分离效果。结果显示,当以0.1%甲酸溶液-乙腈作为流动相时,各特征成分的色谱峰峰形和分离度均较好,故选择0.1%甲酸溶液-乙腈作为最终的流动相进行梯度洗脱程序优

化。同时,本课题组还比较了不同色谱柱[Waters ACQUITY HSS C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、Phenomenex Kinetex[®] C₁₈ (3.0 mm×100 mm, 2.6 μm)]的分离效果,最终优选了Phenomenex Kinetex[®] C₁₈。

根据本课题组前期HGQZ相关质量标准的研 究^[14-15],本研究测定并比较了HGQZ饮片汤剂和配方颗粒中人参皂苷Rb₁、香蒲新苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷、金丝桃苷、荷叶碱、23-乙酰泽泻醇B的含量,结果显示,这6个特征成分的含量无明显差异,表明配方颗粒在制备过程中保留了饮片的主要活性成分,为进一步开展药效一致性研究提供了物质基础。

HGQZ饮片汤剂和配方颗粒的药效比较结果显示,对于高脂饮食喂养诱导的NAFLD模型小鼠,HGQZ饮片汤剂和配方颗粒均可改善其肥胖症状、肝组织病理损伤及脂质堆积情况,并可回调其FBG水平、脂质和肝功能指标水平,以及葡萄糖、胰岛素耐量;且与同质量浓度HGQZ饮片汤剂组比较,HGQZ配方颗粒组上述指标均无显著差异,表明二者的改善作用相当,即配方颗粒的功效与原方具有一致性。

为进一步探究HGQZ饮片汤剂和配方颗粒是否通过相同的作用机制发挥药效,本实验进行血清代谢组学分析,结果表明,HGQZ饮片汤剂和配方颗粒干预对NAFLD模型小鼠血清代谢物具有相似的影响(65种共同差异代谢物)。KEGG富集通路分析显示,TCA循环代谢在NAFLD模型小鼠体内发生了显著变化,且代谢物柠檬酸在小鼠血清中亦发生了显著变化。根据相关文献研究,柠檬酸可通过介导AMPK信号通路调节代谢来平衡TCA循环中间产物,调节糖代谢和脂代谢以改善TCA循环,从而发挥对NAFLD的改善作用^[16-17]。基于此,本研究对各组小鼠AMPK信号通路相关蛋白的表达情况进行了分析,结果显示,HGQZ饮片汤剂和配方颗粒均可显著上调AMPK蛋白的磷酸化水平,提示二者抗NAFLD作用的发挥均与激活AMPK信号通路有关。

综上所述,HGQZ饮片汤剂和配方颗粒的特征成分含量相当,对NAFLD模型小鼠的改善作用相似,且其抗NAFLD作用的发挥均与激活AMPK能量代谢通路有关。后续本课题组将进一步进行临床验证,以明确两种剂型在人体内的代谢及疗效差异,助力中药产业的发展。

参考文献

[1] 何军,朱旭江,杨平荣,等. 中药配方颗粒的现状与发展新思路[J]. 中草药,2018,49(20):4717-4725.
[2] 李远辉,李慧婷,李延年,等. 高品质中药配方颗粒与关键制造要素[J]. 中草药,2017,48(16):3259-3266.
[3] 杨鹤年,张津铨,吴宿慧,等. 中药配方颗粒制备工艺、质量评价、与传统汤剂一致性的研究现状分析[J]. 中国实

验方剂学杂志,2023,29(8):266-274.

[4] 周本杰,严愉妙,黄淑贤,等. 护肝清脂片质量标准研究[J]. 中药材,2012,35(4):644-647.
[5] 唐外姣,周本杰,周华. 护肝清脂片对非酒精性脂肪肝大鼠的药效学研究[J]. 中药药理与临床,2013,29(2):169-172.
[6] 殷锦锦,唐外姣,曾璐,等. 护肝清脂片对脂肪变性肝细胞甘油三酯代谢及氧化应激水平的影响[J]. 时珍国医国药,2015,26(3):553-555.
[7] YANG M T, YAO X R, XIA F, et al. Hugaan qingzhi tablets attenuates endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease rats by regulating PERK and ATF6 pathways[J]. BMC Complement Med Ther, 2024, 24(1):36.
[8] TANG W J, YAO X R, XIA F, et al. Modulation of the gut microbiota in rats by Hugaan qingzhi tablets during the treatment of high-fat-diet-induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:7261619.
[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:12-13,33,239-240,268-269,287-288.
[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.
[11] HANSEN H H, FEIGH M, VEIDAL S S, et al. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development[J]. Drug Discov Today, 2017;22(11):1707-1718.
[12] YU S Y, LI L L, LIU T T, et al. The effects of different hormone combinations on the growth of *Panax notoginseng* anther callus based on metabolome analysis[J]. Front Plant Sci, 2024, 15:1503931.
[13] AKRAM M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68(3):475-478.
[14] HE F, XIAO C X, WANG C J, et al. Discovery of quality markers in Hugaan qingzhi formula by integrating a lipid-lowering bioassay with UHPLC-QQQ-MS/MS[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:1594350.
[15] 肖淳欣,杨妙婷,陈芝娟,等. 护肝清脂颗粒的质控研究[J]. 中药材,2018,41(6):1408-1414.
[16] VOSS C M, ANDERSEN J V, JAKOBSEN E, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates astrocyte oxidative metabolism by balancing TCA cycle dynamics[J]. Glia, 2020, 68(9):1824-1839.
[17] VERRELLI D, DALLERA L, STENDARDO M, et al. Hydroxycitric acid inhibits chronic myelogenous leukemia growth through activation of AMPK and mTOR pathway[J]. Nutrients, 2022, 14(13):2669.

(收稿日期:2025-02-27 修回日期:2025-05-28)

(编辑:舒安琴)