钩藤类方干预高血压肝阳上亢证大鼠的方证相关研究

刘月程[1,2], 左振宇[1], 杜晓蕾[2], 张会敏[2], 蒋海强[1], 苏本正[2*], 周洪雷[1*]

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

摘要: 应用代谢组学技术解读钩藤类方平肝潜阳−肝阳上亢的方证相应, 构建钩藤类方的功效评价方法。以自发性高血压大鼠灌服附子汤制备高血压肝阳上亢证大鼠模型, 分别给予天麻钩藤饮、羚角钩藤汤和清脑降压片, 观测大鼠血压、外观、痛阈、面温、易激惹程度以及24 h饮水量, 使用超高效液相色谱−四极杆−静电场轨道阱高分辨质谱和代谢组学技术分析钩藤类方大鼠血清中差异代谢标志物, 并进行代谢通路分析, 动物实验经山东中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理号: SDZYY20240304033); 同时根据差异代谢物离子强度变化结合宏观数据判断钩藤类方干预效果, 利用偏最小二乘 (partial least squares, PLS) 回归分析筛选出具有显著性差异的代谢标志物。以发现的共同差异代谢物作为肝阳上亢证的核心代谢表型, 整合宏观数据和代谢表型构建钩藤类方的证候功效评价方法。本实验筛选出35个共同差异代谢标志物, 24个差异代谢物在模型组中含量下降, 钩藤类方干预后上升, 11个差异代谢物趋势相反; 代谢通路富集分析表明, 钩藤类方干预通路主要涉及花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、初级胆汁酸生物合成、甘油磷脂代谢; PLS回归分析得到显著性差异代谢物14个, 主要涉及花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢三条代谢通路; 构建的功效评价方法显示, 天麻钩藤饮干预效果最为明显, 与中医药理论一致。本研究发现了钩藤类方干预肝阳上亢证的共性因子, 揭示了钩藤类方−肝阳上亢方证相关的代谢基础, 构建了钩藤类方的客观化功效评价方法, 为钩藤类方的临床研究提供证据。

关键词: 钩藤类方; 高血压; 肝阳上亢证; 代谢组学; 功效评价

中图分类号: R284 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)07-2271-12

Formula-syndrome correlation research on formulas containing *Uncaria rhynchophylla* intervene hypertension with liver Yang hyperactivity syndrome in rats

LIU Yue-cheng[1,2], ZUO Zhen-yu[1], DU Xiao-lei[2], ZHANG Hui-min[2], JIANG Hai-qiang[1], SU Ben-zheng[2*], ZHOU Hong-lei[1*]

(*1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China*)

Abstract: The study aims to interpret the formula-syndrome correspondence of pacifying liver-subduing Yang and liver Yang hyperactivity from formulas containing *Uncaria rhynchophylla* based on metabolomics technology, and establish an efficacy evaluation method for these formulas. The rat model of hypertension with liver Yang hyperactivity syndrome was established by intragastrically administering Fuzi Decoction to spontaneously hypertensive rats. Animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (Ethics No.: SDZYY20240304033). Tianma Gouteng Decoction, Lingjiao Gouteng

收稿日期: 2025-03-14; 修回日期: 2025-05-19.

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2022QH153); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (zyyzdxk-2023121); 济南市“新高校20条”(202228029); 山东省中医药科技项目 (M-2023025).

*通讯作者 E-mail: subenzheng@163.com; zhouhongleitcm@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0286

Decoction, and Qingnao Jiangya Tablets were respectively administered. The blood pressure, appearance, pain threshold, facial temperature, level of irritability, and 24-hour water intake of the rats were observed. Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-exactive orbitrap mass spectrometry and metabolomics were used to analyze differential metabolic markers in the serum of rats treated with formulas containing *Uncaria rhynchophylla*, and metabolic pathway analysis was carried out. Meanwhile the intervention effects of formulas containing *Uncaria rhynchophylla* were judged according to the changes in the ion intensity of differential metabolites combined with macroscopic data, and partial least squares (PLS) regression analysis was applied to screen significantly differential metabolites. The identified common differential metabolites were regarded as the core metabolic phenotypes of hypertension with liver Yang hyperactivity syndrome. By integrating macroscopic data and metabolic phenotypes, an evaluation method for the syndrome efficacy of Uncaria-based prescriptions was constructed. A total of 35 common differential metabolic markers were identified in this experiment. Among them, 24 differential metabolites decreased in the model group and increased after the intervention of formulas containing *Uncaria rhynchophylla*, while 11 differential metabolites showed the opposite trend. Metabolic pathway enrichment analysis showed that the intervention pathways were mainly associated with arachidonic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, primary bile acid biosynthesis, and glycerophospholipid metabolism. Through PLS regression analysis, 14 significant differential metabolites were obtained, mainly involving three metabolic pathways: arachidonic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids and glycerophospholipid metabolism. The established efficacy evaluation method indicated that Tianma Gouteng Decoction showed the most significant intervention effect, which was consistent with the theory of traditional Chinese medicine. This study discovered the common factors of formulas containing *Uncaria rhynchophylla* in intervening hypertension with liver Yang hyperactivity syndrome, and revealed the metabolic basis of the correspondence between these formulas and liver Yang hyperactivity syndrome. The efficacy evaluation method was built to objectively quantify formulas containing *Uncaria rhynchophylla*, and offers evidence for clinical research.

Key words: formulas containing *Uncaria rhynchophylla*; hypertension; liver Yang hyperactivity syndrome; metabolomics; efficacy evaluation

高血压病是最常见的心血管疾病, 长期高血压可导致心、脑、肾等重要靶器官损伤和衰竭[1,2], 并引发一系列并发症。据估算, 当前我国约有2.75亿以上高血压病患者[1]。中医学将高血压病临床表现及发病特点归属于“头痛”、“眩晕”、“脉胀”等范畴[1], 肝阳上亢证是高血压常见中医证候[2], 其核心病机是肝肾阴虚、水不涵木、阴不制阳、肝阳亢扰于上[3]。针对这一病机, 临床常选用天麻钩藤饮、羚角钩藤汤及清脑降压片等方剂, 分别通过平肝熄风、清热息风及潜阳镇逆等治法发挥调控作用。天麻钩藤饮[4-6]具有平肝熄风、清热活血、补益肝肾之功效, 适用于治疗高血压病肝阳上亢、肝风上扰证型; 羚角钩藤汤[7,8]为平息内风剂, 主治肝热生风证, 多用于高血压所致的头痛、眩晕、抽搐等属肝经热盛, 热极动风, 或阳亢风动者; 清脑降压片[9,10]具有平肝潜阳之功效, 其适应症涵盖肝阳上亢所致的头晕、头痛、项强、血压偏高等临床症状。以上三方剂均配伍钩藤, 取其降压之效, 其他药味起协同作用, 但肝阳上亢证作用机制复杂, 方剂作用环节多样, 方证相关难以一一对应, 主要原因为同效类方共性作用机制规律总结不够。

基于此, 本实验将自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 作为研究对象, 构建肝阳上亢证动物模型, 采用含钩藤的天麻钩藤饮、羚角钩藤汤、清脑降压片三个类方进行干预, 利用超高效液相色谱−四极杆−静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-exactive orbitrap MS) 和代谢组学技术探讨同效类方对高血压肝阳上亢证大鼠模型的影响及共性作用机制, 以发现的共同差异代谢物作为肝阳上亢证的核心代谢表型, 整合宏观数据和代谢表型构建钩藤类方的证候功效评价方法, 为钩藤类方临床应用提供实验依据。

材料与方法

实验动物 SPF级8周龄雄性SHR大鼠40只, 8周龄雄性WKY大鼠10只, 体重范围为220 ± 20 g, 均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物合格证号: 110011231109805354, 许可证号: SCXK (京) 2021-0006。实验在山东中医药大学实验动物中心进行。动物房温度为22 ± 2 ℃, 湿度为55% ± 5%, 自由光照, 定时通风换气, 食水自由摄入。本实验获得山东省中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号:

SDZYY20240304033)。

材料 色谱级甲醇 (货号: A454-4)、乙腈 (货号: A955-4)、甲酸 (货号: A117-50), 购于美国赛默飞世尔科技公司; 纯净水为屈臣氏蒸馏水 (货号: 01214), 购于广州屈臣氏食品饮料有限公司; 0.9% 氯化钠注射液 (批号: 2210082144) 购于辰欣药业股份有限公司; 附子 (批号: 220801) 购于四川兴盛源药业有限公司; 天麻钩藤饮 (天麻9 g, 川牛膝、钩藤各12 g, 石决明18 g, 栀子、杜仲、黄芩、益母草、桑寄生、夜交藤、朱茯神各9 g)、羚角钩藤汤 (羚角片4.5 g, 霜桑叶6 g, 京川贝12 g, 生地15 g, 双钩藤9 g, 滁菊花9 g, 茯神木9 g, 生白芍9 g, 生甘草3 g, 淡竹茹15 g) 购于北京同仁堂 (山东) 健康大药房连锁有限公司; 清脑降压片 (批号: 2016002、2201001) 购于葵花药业集团 (唐山) 生物制药有限公司; 缬沙坦胶囊 (批号: X3173, 80 mg/粒) 购于北京诺华制药有限公司。样本保存于本实验室。

仪器 Thermo Scientific™ Q Exactive plus 组合型四级杆−静电场轨道阱质谱仪、Vanquish 型超高效液相色谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); SK5210LHC 型数控超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); BP-2010A 大小鼠智能无创血压计 (北京软隆技术有限公司); SW-200 光热尾痛仪 (成都泰盟软件有限公司); GM550 手持式红外测温仪 (深圳市聚茂源科技有限公司); YH-3 百分之一电子天平 (惠州市英衡电子科技有限公司); JCS-1002C 百分之一电子天平 (上海然浩电子有限公司)。

药液制备

附子汤 生附子300 g, 加入8倍量水, 浸泡0.5 h, 煎煮4 h, 药渣再加8倍量水, 煎煮1 h, 将两次煎液合并, 过100目筛, 煮沸浓缩至1 500 mL, 即浓度为0.2 g·mL^{-1}, −20 ℃冰柜保存备用。

天麻钩藤饮 药材用8倍量水浸泡40 min, 其中石决明先煎煮1 h, 与其余药材合并, 煮沸后计时, 第一次60 min, 第二次40 min, 最后20 min将钩藤 (提前加水浸泡1 h, 泡透) 放入煎煮, 合并2次滤液, 旋转蒸发仪 (55 ℃) 浓缩至生药1 g·mL^{-1}, −20 ℃冰柜保存备用。

羚角钩藤汤 药材用8倍量水浸泡40 min, 其中淡竹茹先煎煮40 min, 与其余药材合并, 煮沸后计时, 第一次60 min, 第二次40 min, 最后20 min将钩藤 (提前加水浸泡1 h, 泡透) 放入煎煮, 合并2次滤液, 旋转蒸发仪 (55 ℃) 浓缩至生药0.8 g·mL^{-1}, −20 ℃冰柜保存备用。其中羚角片打成极细粉, 过100目筛, 等量撒入分装后的羚角钩藤汤。

清脑降压片 将片剂刮去包衣, 打成细粉, 加水溶解, 配置成0.04 g·mL^{-1}生药量的水溶液, −20 ℃冰柜保存备用。灌胃前, 水浴锅55 ℃温热完全溶解, 摇匀后灌胃。

缬沙坦胶囊 将胶囊掰开, 药物加水溶解, 配置成0.71 mg·mL^{-1}生药量的水溶液, −20 ℃冰柜保存备用。

动物分组、模型制备及给药 将SHR大鼠随机分为五组, 每组8只, 分别为模型组 (MX)、天麻钩藤饮组 (TM)、羚角钩藤汤组 (LJ)、清脑降压片组 (QN)、阳性药组 (YX)。五组动物均以每日2 g·kg^{-1}生药量给予附子汤4周, 出现肝阳上亢证行为学特征后, 根据《药理实验学方法》, 按照70 kg成人临床常规使用剂量与大鼠体表面积进行等效剂量换算, TM组、LJ组、QN组分别以每日10.2、8.2、0.4 g·kg^{-1}生药量给予天麻钩藤饮、羚角钩藤汤、清脑降压片提取液, 阳性药组以每日7.1 mg·kg^{-1}药量给予缬沙坦溶液, 给药8周, 每周给药6天, 定时给药, 根据体重调整给药量, 给药期间同时灌服附子汤, 模型组灌服附子汤8周。WKY大鼠为正常组 (ZC), 0.9% 氯化钠注射液灌胃12周。所有大鼠用2% 戊巴比妥钠 (0.005 mL·g^{-1}) 腹腔注射麻醉, 下腔静脉取血, 采集标本。

观测指标

一般行为学观察 观察大鼠外观、24 h饮水量、易激惹程度以及痛阈测定。易激惹程度评定标准: I级指捉持颈部时尖叫、惊跳; II级指捉持颈部时咬人; III级指提尾时尖叫、惊跳, 甚至咬人或同笼大鼠频繁打斗; 如无上述情况视为0级。痛阈测定时, 待大鼠稳定后, 将鼠尾部对准光源 (距鼠尾部1 cm处), 大鼠甩尾后, 计时, 重复3次, 每次间隔5 min, 取平均值即为痛阈值[11]。

大鼠尾部血压检测 测量前将大鼠尾部捂热, 在安静环境下, 将传感器放置于大鼠尾根部进行测量, 如超过30 min仍未测出, 将大鼠取出放置一段时间后再测量。收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP) 于造模前1天, 造模过程中每周、造模成功给药过程中每两周进行测量, 连续测量3次, 取平均值。

血清代谢组学检测

血清样品前处理 将血清室温解冻, 精密吸取血清100 μL, 加入预冻乙腈800 μL, 涡旋2 min; 然后将样品4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心15 min, 取上清液, 过0.22 μm微孔滤膜, 取续滤液即得。取每个样品血清约10 μL, 混合, 作为质控 (quality control, QC) 样品。

色谱条件 采用Thermo Fisher Scientific Hypersil GOLD C_{18} (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm) 色谱柱; 流动相A为乙腈, 流动相B为0.1% 甲酸水; 梯度洗脱 (0～3 min, 95% B; 3～4 min, 95%～79% B; 4～10 min, 79%～78% B; 10～11 min, 78%～33% B; 11～24 min, 33%～

25% B; 24～27 min, 25%～5% B); 流速: 0.3 mL·min^{-1}; 进样量: 3 μL; 柱温: 35 ℃。

质谱条件　加热电喷雾离子源 (heated electrospray ionization source, H-ESI), 正、负离子模式下全扫描, 鞘气为40 arb, 辅助气为10 arb, 喷雾电压为3.5 kV (+)、3.2 kV (−), 毛细管温度为350 ℃, S-lens RF level为50, 辅助器加热温度为320 ℃, 扫描模式为Full MS/dd-MS^2, Full MS分辨率70 000, dd-MS^{2}分辨率17 500, 扫描范围 m/z 80～1 200, 碰撞能: 20、40、60 eV。

统计学分析　采用SPSS 21.0进行统计分析, 各组数据结果采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 组间比较采用独立样本 t 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

数据处理　将质谱采集的原始数据导入Compound Discover 3.3软件 (美国赛默飞世尔科技公司), 设置代谢组学工作流程, 扣除背景、峰对齐、峰校正、峰滤噪等预处理后, 导出代谢物名称、分子式、保留时间、质荷比、峰面积等信息, 将峰面积导入SIMCA-P 14.1 (瑞典Umetrics公司) 中, 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘−判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 判别模型, 同时以VIP (variable importance in the projection, VIP) > 1、$P < 0.05$ 为标准筛选潜在代谢标志物, 根据差异代谢物精确分子量、二级质谱信息, 结合人类代谢组数据库 (human metabolome database, HMDB)、有机小分子生物活性数据 (Pubchem)、化学数据库与搜索引擎 (ChemSpider) 等数据库对代谢物进行分析鉴定, 筛选出共同差异代谢标志物; 根据差异代谢物离子强度变化及综合指标判断钩藤类方干预效果; 将筛选出的共同差异代谢物利用偏最小二乘 (partial least squares, PLS) 回归分析, 最终筛选出具有显著性差异的代谢物。随后采用Metaboanalyst 6.0 (https://www.metaboanalyst.ca/) 进行KEGG富集分析, 筛选符合 $P < 0.05$ 的代谢通路。

结果

1　各组大鼠造模前后各项指标比较

正常组大鼠被毛均匀致密, 有光泽, 双眼睑结合膜无充血水肿, 反应灵活, 抓取时反抗不明显, 易激惹程度为0、I级; 其余各组SHR大鼠造模前抓取时有尖叫或惊跳现象, 易激惹程度多为I、II级, 随着造模进行, SHR大鼠毛色逐渐失去光泽, 发黄发干, 掉毛严重, 双眼睑结合膜充血水肿, 造模4周后, 各组SHR大鼠抓取时反抗激烈, 尖叫、惊跳, 甚至攻击, 同笼大鼠之间打斗频繁, 易激惹程度逐渐上升, 多为III级。造模后, 除正常组外, 其余各组SHR大鼠SBP、DBP不断升高, 痛阈下降, 面温上升, 饮水量上升。造模前与造模后组内SBP、DBP、痛阈、面温、易激惹程度以及24 h饮水量各项指标比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 造模后, 与正常组大鼠比较, 除饮水量外, 其余各组SHR大鼠各项指标差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明造模成功[11] (图1)。

2　各组大鼠给药前后各项指标比较

给药8周后, TM组、LJ组、QN组、YX组大鼠毛色微黄, 掉毛减轻, 双眼睑结合膜充血消失, 易激惹程度多下降为0、I级。给药前, 各组SHR大鼠与正常组比较, 各项指标均有明显差异, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 给药2、4、6、8周后, TM组、LJ组、QN组、YX组血压、面温、饮水量、易激惹程度均明显降低, 痛阈升高, 与给药前组内比较以及给药后与模型组组间比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图2, 表明三个方剂均具有治疗效果。

3　血清代谢组学分析

3.1　多元统计分析　在进行血清代谢组学分析前, 对质谱采集的正、负离子模式下QC样本的总离子流图 (图3) 进行评估。结果表明, TIC曲线重叠, 说明UPLC-Q-exactive orbitrap MS分析的稳定性和重复性是可靠的。由PCA结果显示, QC样本聚集度高, 再次表明本实验方法重复性和稳定性较好, 在正、负离子模式下, ZC组与MX组、TM组、LJ组、YX组分离趋势明显, 证明MX组、TM组、LJ组、YX组是成功、稳定的 (图4)。由OPLS-DA结果显示, 正、负模式下 R^2Y 分别为0.961和0.982, Q^2 分别为0.761和0.849, 各组样本点明显分离, 同时经100次随机置换检验, R^2 在正、负离子模式下分别为0.786和0.848, Q^2 截距分别为−0.470和−0.429, R^2、Q^2 均小于右侧, 且 R^2 在 Q^2 之上, 表明预测能力较好, 未过拟合, 模型可靠, 可用于差异代谢物筛选 (图4)。

3.2　差异代谢物鉴定　结合OPLS-DA结果, 筛选并鉴定差异代谢物, MX组与ZC组正模式下鉴定出147个差异代谢物, 负模式下鉴定出86个差异代谢物; 给药后TM组与MX组正模式下筛选出87个差异代谢物, 负模式下筛选出52个差异代谢物, LJ组与MX组正模式下筛选出58个差异代谢物, 负模式下筛选出41个差异代谢物, QN组与MX组正模式下筛选出49个差异代谢物, 负模式下筛选出35个差异代谢物。通过给药组与ZC组筛选交集, 再筛选交集中干预后有回调的差异代谢物[12], 最终筛选出35个共同的潜在差异代谢物在干预后回调 ($P < 0.05$), 其中24个差异代谢物在MX组中下调, 钩藤类方干预后上升; 11个差异代谢物在MX组中上调, 钩藤类方干预后下降, 鉴定结果及变化趋势见表1。

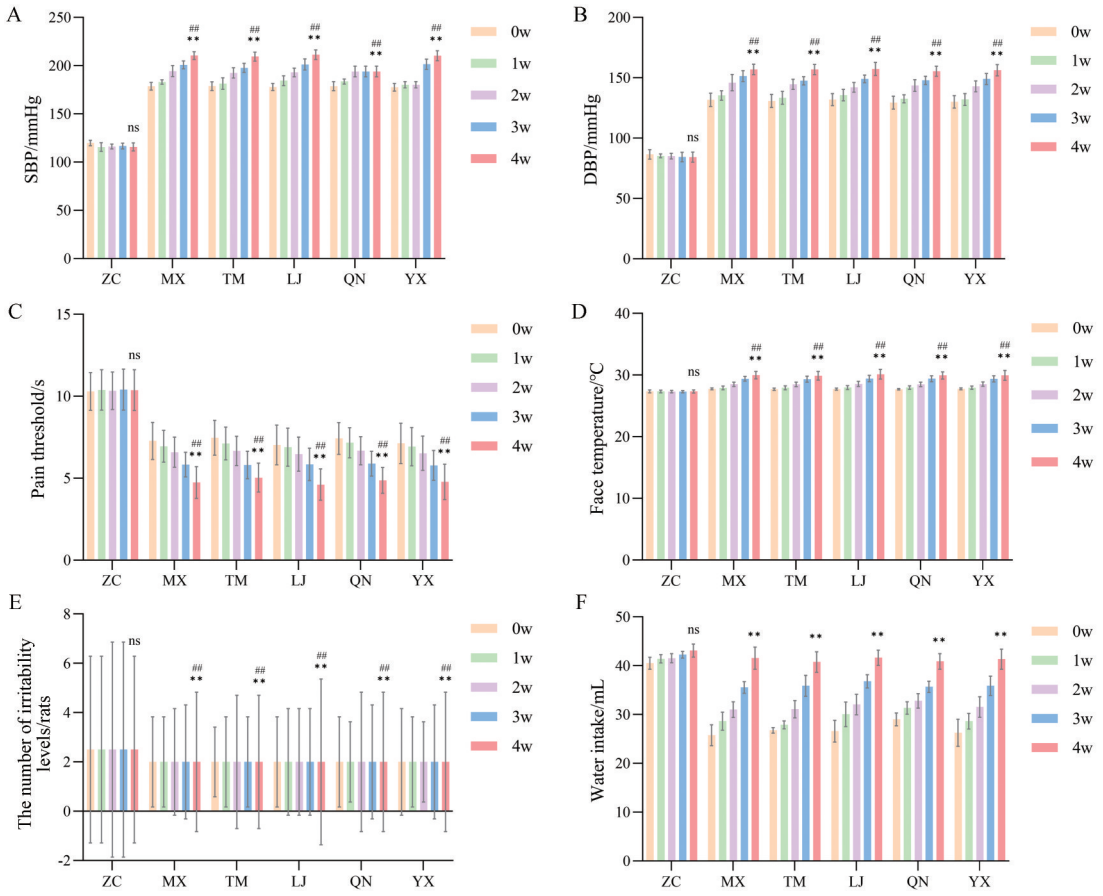


Figure 1 Comparison of various indicators before and after model induction. A: SBP; B: DBP; C: Pain threshold; D: Face temperature; E: Levels of irritability; F: Water intake. SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure. ZC: Control group; MX: Model group; TM: Tianma Gouteng decoction group; LJ: Lingjia Gouteng decoction group; QN: Qingnao Jiangya tablets group; YX: Valsartan group. $^{**}P < 0.01$ *vs* pre-model induction within the group; $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* ZC group. ns: No statistically significant difference within the group

3.3 代谢趋势分析 将以上最终筛选出的差异代谢物进行PLS回归分析, 得到回归方程$y = x-6.505e^{-9}$, 样本点均在回归线附近, $R^2 = 0.909$, 均方根误差 = 0.221, 表明模型的拟合效果和预测精度较高, 模型拟合能力好; $Q^2 = 0.846$, 均方根交叉验证误差 = 0.265, 表明模型预测能力和稳定性较好, 可用于筛选显著性相关代谢物。经 VIP > 1 筛选后, 得到3-oxohexanoic acid、3-ethylphenyl sulfate、5-羟基过氧化二十碳四烯酸 (5-hydroperoxyicosatetraenoic acid, 5-HPETE)、hymenin、8-hydroxytetradeca-10, 12-dienoic acid、*L*(−)-carnitine、oleamide、sphingosine、LysoPC(14:0/0:0)、LysoPC(20:3(8*Z*,11*Z*,14*Z*)/0:0)、LysoPC(18:1(9*Z*)/0:0)、LysoPC(20:2(11*Z*, 14*Z*)/0:0)、二十二碳五烯酸 (docosapentaenoic acid, DPA) 等显著性差异代谢物。

以3-oxohexanoic acid、5-HPETE、hymenin、二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA)、花生四烯酸 (arachidonic acid, AA)、sphingosine、phosphorylcholine、chenodeoxycholic acid、DPA、胆碱 (choline, Cho) 差异代谢物为例 (图5), 3-oxohexanoic acid、hymenin、Cho与ZC组比较, 在MX组中含量上升, 三个方剂干预后含量均下降, 3-oxohexanoic acid、hymenin经TM组干预含量下降最多, 其次为LJ组, QN组下降最少, Cho经QN组干预含量下降最多, 其次为LJ组, TM组下降最少; 其余差异代谢物与ZC组比较, 在MX组中含量均下降, 经三个方剂干预后含量均上升, 其中TM组干预后含量上升最多, 其次多数为QN组上升较多, LJ组上升最少。以上大部分差异代谢物三个方剂干预后, TM组含量变化最为显著, 其次为QN组, LJ组最小。结合宏观指标, TM组与QN组给药后血压下降多且相近, LJ组血压下降最少, 其余各项指标TM组更趋于ZC组, QN组与LJ组次之, 表明天麻钩藤饮干预效果最为明显, 清脑降压片次之, 羚角钩藤汤效果最小。

3.4 代谢通路分析 MX组与ZC组代谢通路富集得到5条代谢通路: AA代谢、初级胆汁酸生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成、牛磺酸和次牛磺酸代谢 ($P < 0.01$)、甘油磷脂代谢 ($P < 0.05$); TM组与MX组富集得

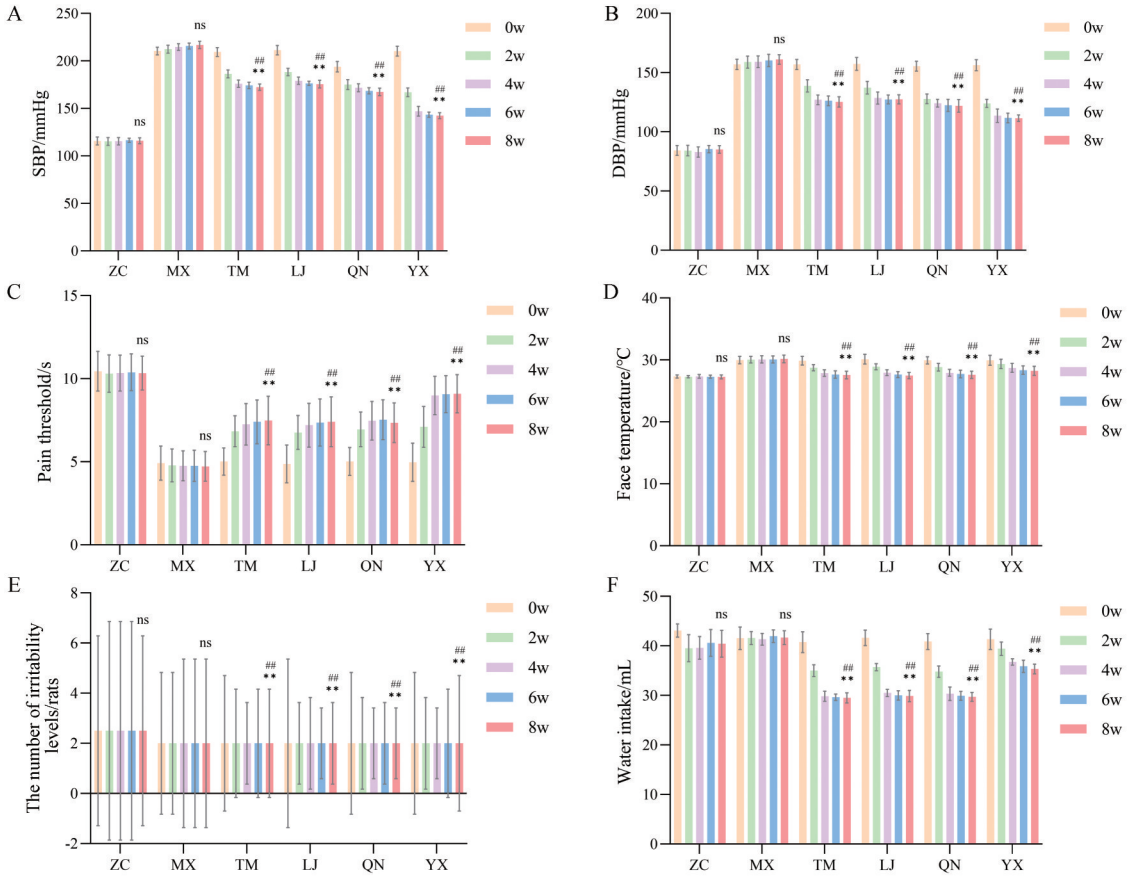


Figure 2 Comparison of various indicators before and after drug administration. A: SBP; B: DBP; C: Pain threshold; D: Face temperature; E: Levels of irritability; F: Water intake. $^{**}P < 0.01$ *vs* before drug administration within the group; $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* MX group at the same time point

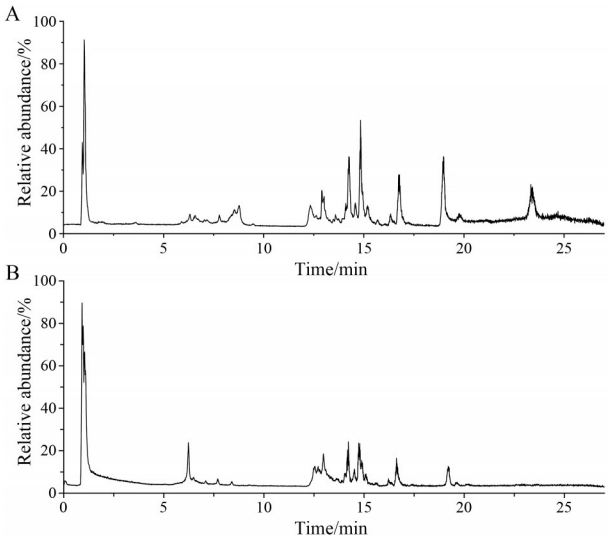


Figure 3 Total ion flow diagram of quality control sample under different ion modes. A: Positive ion mode; B: Negative ion mode

到4条代谢通路: AA代谢、初级胆汁酸生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢 ($P < 0.01$); LJ组与MX组富集得到5条代谢通路: 不饱和脂肪酸的生物合成, 初级胆汁酸生物合成 ($P < 0.01$), AA代谢, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,甘油磷脂代谢 ($P < 0.05$); QN组与MX组富集得到4条代谢通路: 甘油磷脂代谢, AA代谢, 初级胆汁酸生物合成, 不饱和脂肪酸的生物合成 ($P < 0.01$), 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 ($P < 0.05$)。以上结果显示高血压肝阳上亢证与AA、胆汁酸、不饱和脂肪酸、甘油磷脂、牛磺酸、酪氨酸等代谢有关, 且三个方剂均通过调节AA、胆汁酸、不饱和脂肪酸、甘油磷脂代谢来调节高血压肝阳上亢证。同时, 根据回归分析中得到的显著性相关代谢物结果, 结合富集得到的代谢通路, 显著性相关的代谢物主要涉及AA代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢。钩藤类方治疗高血压的潜在代谢途径分析结果见图6, 代谢网络图见图7。

讨论

高血压病为重大慢病, 中医把其证候可分为肝阳上亢证、肝肾阴虚证、痰湿雍盛证等[5], 肝阳上亢为其临床常见证候, 病机在于肝肾阴亏、肝阳上亢, 属上盛

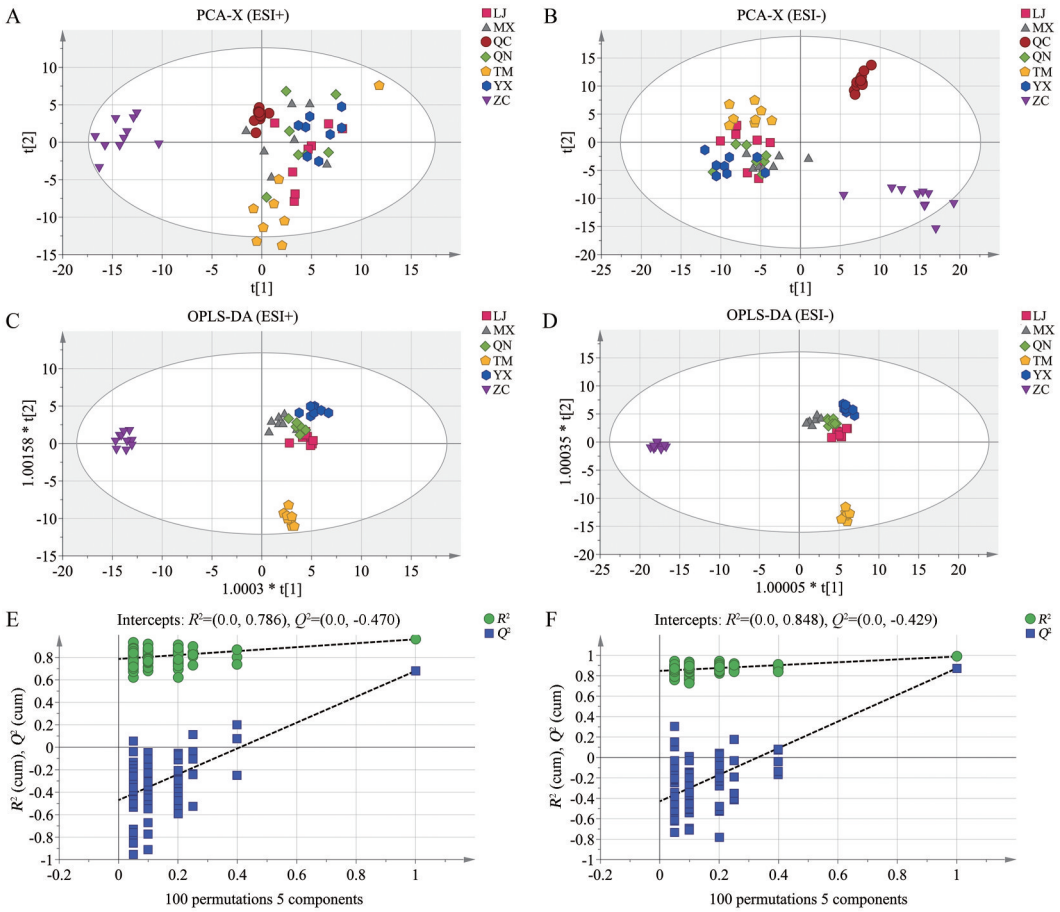


Figure 4 Principal component analysis (PCA) scores (A, B), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) scores (C, D), and permutation test plots (E, F). A, C, E: Positive ion mode; B, D, F: Negative ion mode. QC: Quality control sample

下虚、本虚标实, 其治疗多平肝潜阳、化痰熄风[7]、滋水涵木、补益肝肾、安神定志[6], 临床常用天麻钩藤饮、羚角钩藤汤、清脑降压片等方剂治疗肝阳上亢证。三个方剂均具有平肝潜阳的功效, 天麻钩藤饮侧重于平肝潜阳并清热活血补肾, 羚角钩藤汤侧重于平肝潜阳并凉血滋阴, 清脑降压片侧重于平肝潜阳并清脑安神, 以上以钩藤为主要药味的平肝潜阳类方, 其共性作用机制尚不明确, 故本实验应用代谢组学方法, 以高血压肝阳上亢证大鼠模型为研究对象, 聚焦钩藤类方共性差异代谢物的寻找, 探讨平肝潜阳作用机制。结果显示, 病证结合大鼠内源性物质相较于正常组含量发生显著变化, 出现代谢紊乱; 钩藤类方可通过调节AA代谢、初级胆汁酸生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢等多途径发挥治疗高血压肝阳上亢证的作用; PLS回归分析结果表明显著性差异代谢物主要涉及三条代谢通路: AA代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢, 通过潜在标志物代谢趋势与宏观指标比较显示天麻钩藤饮干预后治疗效果最佳, 清脑降压片次之, 羚角钩藤汤效果最差。

血小板中的源生长因子AA是一种必需脂肪酸, AA在一系列酶的作用下可以合成前列腺素、凝血酶和白三烯, 具有很强的生理活性, 与心血管疾病密切相关[12]。5-HPETE[13]是AA和白三烯A4 (leukotriene A4, LTA4) 之间的中间体, 它可以通过5-脂氧合酶 (5-lipoxygenase, 5-LOX) 与AA相互作用产生。不稳定环氧化物LTA4与GSH共轭形成LTC4, LTC4是引起痉挛的含半胱氨酸的LT的母体化合物 (Cys-LT = LTC4, LTD4, LTE4), 或LTA4通过LTA4水解酶水解为LTB4。半胱氨酸白三烯 (cysteine leukotrienes, CysLT) 在炎症脂质分子中功能强大, 具有血管舒张和增加微血管通透性的功能[13,14]。本研究中TM组、LJ组、QN组病证大鼠的血清5-HPETE含量均高于模型组, 表明三个方剂均参与AA代谢途径, 可能通过调控5-HPETE增强CysLT的血管舒张作用, 从而降低血压。

ω-3多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 代谢途径[15]中, α-亚麻酸 (α-linolenic acid, ALA) 和ω-6 PUFAs代谢途径中亚油酸 (linoleic acid, LA) 被相同的去饱和酶和延长酶代谢并相互竞争, 分别产生

Table 1 Common differential metabolites. ↑: Upregulated; ↓: Downregulated

Compound	*m*/*z*	*t*/min	Molecular formula	HMDB	Ion mode	MX group *vs* ZC group	TM group *vs* MX group	LJ group *vs* MX group	QN group *vs* MX group
3-Oxohexanoic acid	129.054 5	5.69	$C_6H_{10}O_3$	HMDB0010717	$[M-H]^-$	↑	↓	↓	↓
3-Ethylphenyl sulfate	201.022 0	8.36	$C_8H_{10}O_4S$	HMDB0062721	$[M-H]^-$	↑	↓	↓	↓
Chenodeoxycholic acid	437.291 2	13.08	$C_{24}H_{40}O_4$	HMDB0000518	$[M+FA-H]^-$	↑	↓	↓	↓
3-Oxododecanoic acid	213.149 0	13.34	$C_{12}H_{22}O_3$	HMDB0010727	$[M-H]^-$	↓	↑	↑	↑
5-Hydroperoxyicosatetraenoic acid (5-HPETE)	335.222 5	13.39	$C_{20}H_{32}O_4$	HMDB0011135	$[M-H]^-$	↓	↑	↑	↑
Hymenin	261.113 3	13.46	$C_{15}H_{18}O_4$	HMDB0253304	$[M-H]^-$	↑	↓	↓	↓
Haloxyfop-P	360.025 8	13.64	$C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$	HMDB0253047	$[M-H]^-$	↑	↓	↓	↓
8-Hydroxytetradeca-10,12-dienoic acid	239.165 0	13.75	$C_{14}H_{24}O_3$	HMDB0340811	$[M-H]^-$	↓	↑	↑	↑
Oleic acid	281.248 4	15.07	$C_{18}H_{34}O_2$	HMDB0000207	$[M-H]^-$	↓	↑	↑	↑
LysoPI(0:0/18:0)	599.320 9	17.98	$C_{27}H_{53}O_{12}P$	HMDB0061704	$[M-H]^-$	↓	↑	↑	↑
Docosahexaenoic acid	327.232 9	19.02	$C_{22}H_{32}O_2$	HMDB0002183	$[M-H]^-$	↓	↑	↑	↑
	329.247 3	19.15	$C_{22}H_{32}O_2$	HMDB0002183	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
Arachidonic acid	303.232 8	19.65	$C_{20}H_{32}O_2$	HMDB0001043	$[M-H]^-$	↓	↑	↑	↑
L(−)-Carnitine	162.112 5	0.96	$C_7H_{15}NO_3$	HMDB0000062	$[M+H]^+$	↑	↓	↓	↓
L-Tyrosine	182.081 4	1.04	$C_9H_{11}NO_3$	HMDB0000158	$[M+H]^+$	↑	↓	↓	↓
trans-2-Dodecenoylcarnitine	342.263 8	12.90	$C_{19}H_{35}NO_4$	HMDB0013326	$[M+H]^+$	↑	↓	↓	↓
Tetracosahexaenoic acid, n-3	357.278 7	13.10	$C_{24}H_{36}O_2$	HMDB0060117	$[M+H]^+$	↑	↓	↓	↓
Tetracosahexaenoic acid	357.278 9	13.77	$C_{24}H_{36}O_2$	HMDB0002007	$[M+H]^+$	↑	↓	↓	↓
Oleamide	282.279 3	13.51	$C_{18}H_{35}NO$	HMDB0002117	[M+H]+	↓	↑	↑	↑
Sphingosine	300.289 8	13.51	$C_{18}H_{37}NO_2$	HMDB0000252	[M+H]+	↓	↑	↑	↑
LysoPC(14:0/0:0)	468.308 9	13.73	$C_{22}H_{46}NO_7P$	HMDB0010379	[M+H]+	↓	↑	↑	↑
LysoPC(22:6(4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)/0:0)	568.339 8	14.15	$C_{30}H_{50}NO_7P$	HMDB0010404	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(15:0/0:0)	482.324 1	14.19	$C_{23}H_{48}NO_7P$	HMDB0010381	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
Phosphorylcholine	184.073 3	14.27	$C_5H_{15}NO_4P$	HMDB0001565	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(22:5(7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)/0:0)	570.355 5	14.46	$C_{30}H_{52}NO_7P$	HMDB0010403	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPE(16:0/0:0)	454.293 2	14.70	$C_{21}H_{44}NO_7P$	HMDB0011503	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(20:3(8*Z*,11*Z*,14*Z*)/0:0)	546.355 8	14.72	$C_{28}H_{52}NO_7P$	HMDB0010394	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(18:1(9*Z*)/0:0)	522.355 5	15.19	$C_{26}H_{52}NO_7P$	HMDB0002815	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(22:4(7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)/0:0)	572.370 8	15.29	$C_{30}H_{54}NO_7P$	HMDB0010401	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(14:0/0:0)	468.308 6	15.49	$C_{22}H_{46}NO_7P$	HMDB0010379	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(20:2(11*Z*,14*Z*)/0:0)	548.371 3	15.63	$C_{28}H_{54}NO_7P$	HMDB0010392	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(18:3(9*Z*,12*Z*,15*Z*)/0:0)	518.322 2	15.27	$C_{26}H_{48}NO_7P$	HMDB0010388	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
Phosphorylcholine	184.073 3	16.75	$C_5H_{15}NO_4P$	HMDB0001565	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
LysoPC(15:0/0:0)	482.324 2	16.52	$C_{23}H_{48}NO_7P$	HMDB0010381	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑
Choline	104.107 4	16.78	$C_5H_{14}NO$	HMDB0000097	$[M+H]^+$	↑	↓	↓	↓
Docosapentaenoic acid	331.263 0	21.61	$C_{22}H_{34}O_2$	HMDB0006528	$[M+H]^+$	↓	↑	↑	↑

二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 和 AA[16]。EPA 在去饱和酶和延长酶的作用下生成 DPA, DPA 再通过去饱和酶等的作用转化为 DHA。DPA、DHA 和 EPA 具有舒张血管、改善大脑功能、减轻炎症的作用, 对血压的升高具有良性调节作用[16]; AA 也可以通过 CYP450 转化为脂肪环氧化合物, 作为内皮衍生的超极化因子引起血管舒张, 达到降压效果[15]。本研究中病证大鼠的血清 DPA、DHA、AA 较正常组低, 三个方剂干预后上升回调, 表明三个方剂均参与不饱和脂肪酸生物合成的代谢途径来调节血压。

磷脂酰胆碱是一类重要的甘油磷脂, Cho 作为甘油磷脂代谢的关键前体物质, 在肠道菌群作用下可经磷脂酰胆碱等代谢途径转化为三甲胺 *N*-氧化物 (trimethylamine *N*-oxide, TMAO)[17], 临床数据表明, 血浆 TMAO 浓度与心血管疾病风险增加存在因果关系, 特别是与高血压进展呈正相关[18], 其作用机制为 TMAO 通过激活 PERK/ROS/CaMKII/PLCβ3 信号通路, 增强血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导的血管收缩效应, 从而促进高血压的发生发展, 因此, 高 Cho 水平下血压较高[19-21]。本实验中病证组大鼠 Cho 水平高, 经三种方剂干预后血清胆碱浓度显著降低, 表明钩藤类方可能通过调节甘油磷脂代谢通路, 有效抑制 Cho

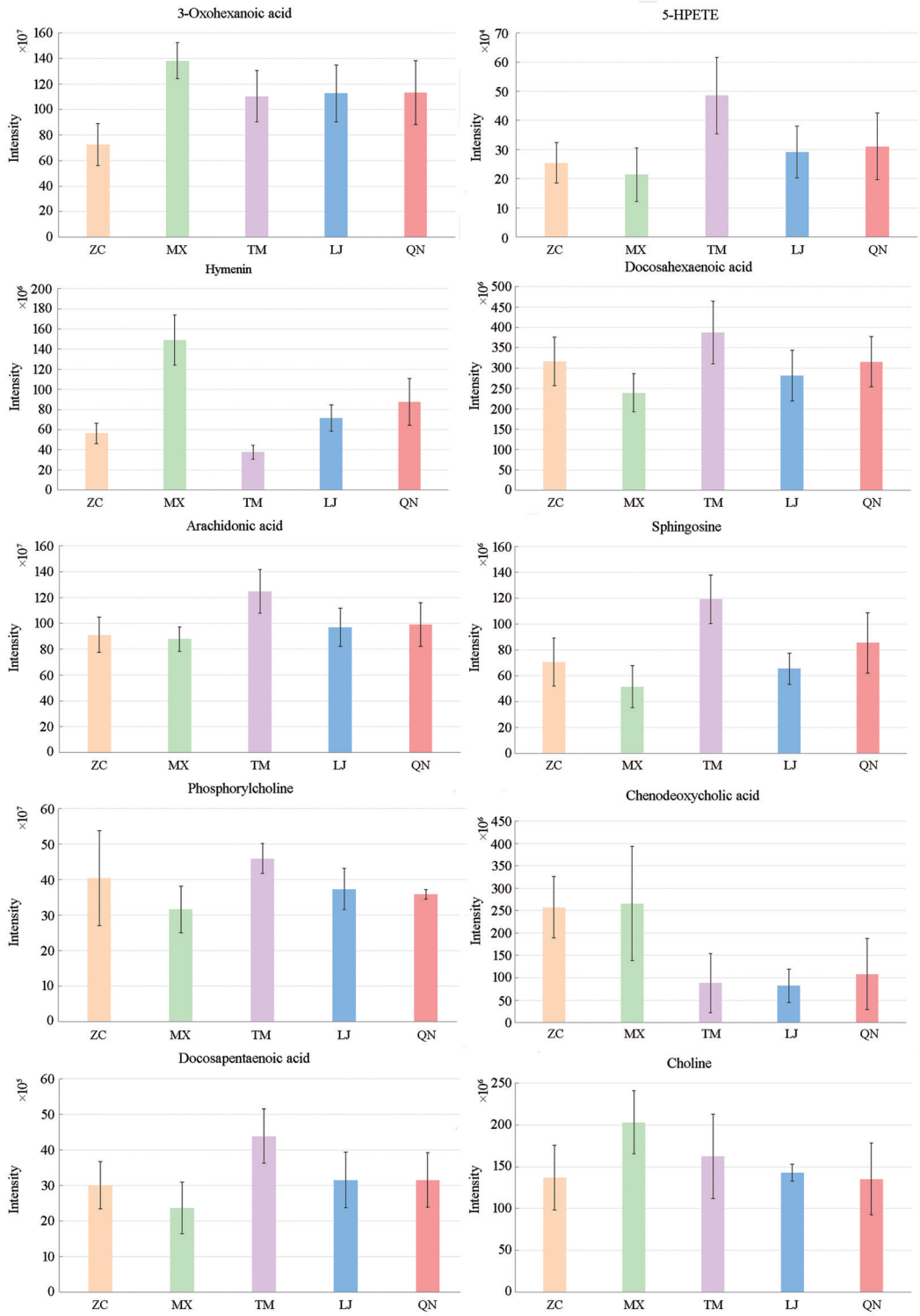


Figure 5 Changes in relative intensity of selected differential metabolites in the serum of rats in each group before and after drug administration

向TMAO的转化, 从而降低Ang II介导的血管收缩反应, 达到降血压效果。本研究揭示了钩藤类方通过干预甘油磷脂代谢关键节点, 调控Cho-TMAO代谢, 为高血压研究提供了新的思路。

AA是甘油磷脂的重要组成部分, 通常以酯键的形式结合在甘油磷脂的sn-2位上, 且甘油磷脂是细胞膜的重要组成部分[22]。当细胞受到刺激时, 甘油磷脂在磷脂酶A2等酶的作用下, 会释放出AA[23], 从而启动AA的代谢过程。AA代谢产生的前列腺素、白三烯等活性产物参与调节细胞的生理功能, 进而间接影响甘

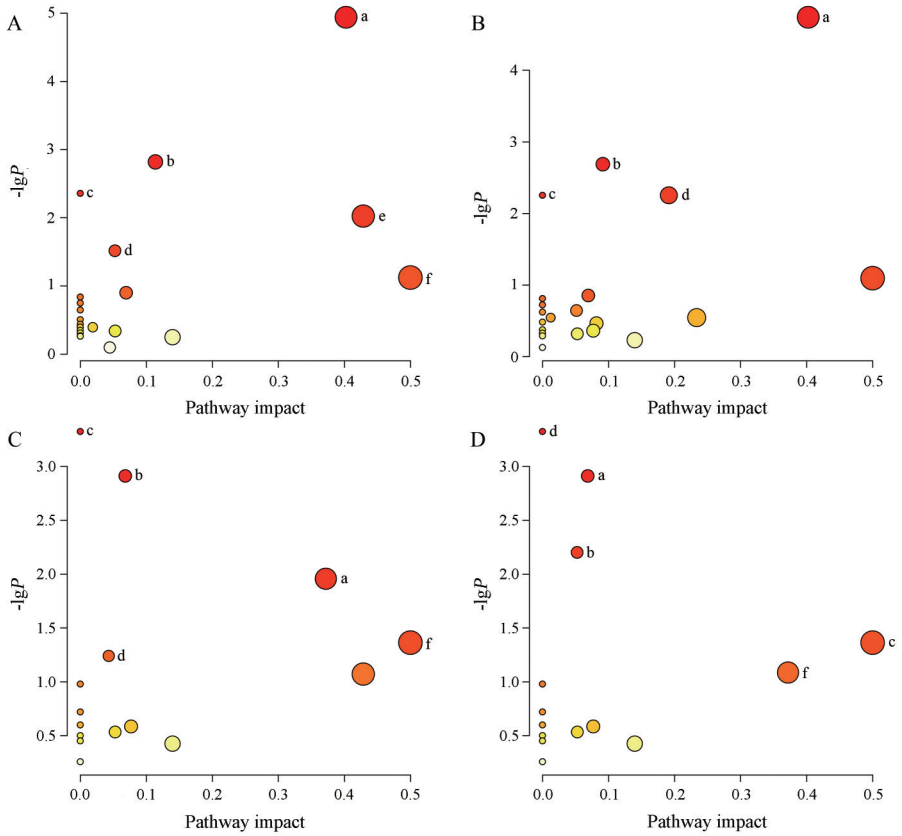


Figure 6 Analysis of differential metabolite pathways in the serum of rats. A: MX group *vs* ZC group; B: TM group *vs* MX group; C: LJ group *vs* MX group; D: QN group *vs* MX group. a: Arachidonic acid metabolism; b: Primary bile acid biosynthesis; c: Biosyntehesis of unsaturated fatty acids; d: Glycerophospholipid metabolism; e: Taurine and hypotaurine metabolism; f: Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis

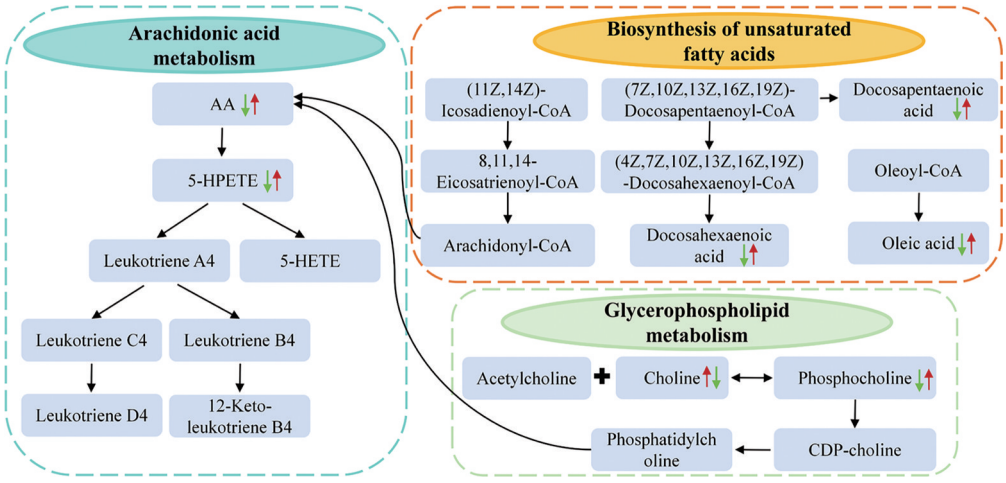


Figure 7 Potential metabolic pathways of network diagram related to common differential metabolites and its components. Red or green arrows: Potential biomarkers of upregulated or downregulated. Dotted frame: Metabolic pathway; solid black arrow: Metabolic directions

油磷脂代谢[23]; 同时AA代谢产生的某些产物可以作为信号分子, 调节不饱和脂肪酸的生物合成[23]。不饱和脂肪酸生物合成需要以饱和脂肪酸为前体, 通过去饱和酶等酶的作用引入双键形成不饱和脂肪酸[24], 而甘油磷脂的合成过程中, 也需要脂肪酸作为其组成成分之一, 不饱和脂肪酸的合成状态会影响甘油磷脂的组成和性质[24]。钩藤类方中君药钩藤的多种成分, 能够抑制AA诱导的血小板聚集以及抑制AA代谢中的环氧合酶和脂氧合酶活性来减少炎症介质前列腺素和白三烯的生成[25], 从而减轻炎症反应, 降低血管收缩

性; 同时可能通过调节细胞内脂肪酸去饱和酶的活性以及甘油磷脂的合成酶活性, 影响不饱和脂肪酸和甘油磷脂的合成[26], 从而达到抗炎、抗氧化、改善血管功能、降血压等方面的作用。因此, 本研究发现的钩藤类方干预高血压肝阳上亢证的三条代谢通路与钩藤干预高血压的代谢通路基本一致, 说明钩藤在类方中起到平肝潜阳的作用, 同时表明这三条代谢通路是平肝潜阳–肝阳上亢方证相应的代谢基础。

综上所述, 通过宏观数据、药效作用、差异代谢标志物筛选及血清代谢通路生物学意义分析, 构建了钩藤类方的证候功效评价方法, 系统筛选并鉴定了钩藤类方干预高血压肝阳上亢证的共性差异代谢物, 并以此作为肝阳上亢证的核心代谢表型, 同时其降压机制可能与AA代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、甘油磷脂代谢等关键代谢通路密切相关, 天麻钩藤饮对高血压肝阳上亢证大鼠降压效果最为明显。本研究筛选出了肝阳上亢证的共性因子及钩藤类方－肝阳上亢方证相关的代谢基础, 揭示了钩藤类方的共性作用机制, 为钩藤类方的临床研究提供了依据。

作者贡献: 刘月程负责实验操作、数据处理、文章撰写; 左振宇负责动物实验; 杜晓蕾负责仪器操作、数据获取; 张会敏、蒋海强负责指导代谢组学实验设计、文章设计及修改; 苏本正、周洪雷负责整体设计及文章修改。

利益冲突: 本文无利益冲突。

References

[1] Zhu YS, Wang Y, Chen BZ, et al. Tengfu Jiangya tablet for grade 1 hypertension patients with Gan-Yang hyperactivity syndrome: a randomized controlled trial [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2024, 44: 778-784.

[2] Fang YQ, Wang N, Song YM. Qualitative and quantitative analysis of the research status and trends of hypertension with liver Yang hyperactivity syndrome [J]. Mod Tradit Chin Med (现代中医药), 2022, 42: 6-11.

[3] Wang Y, Yang S, Gao MM, et al. Molecular mechanism of pacifying liver and subduing Yang in the treatment of hypertension with ascendant hyperactivity of liver Yang [J]. World Chin Med (世界中医药), 2023, 18: 2851-2856, 2863.

[4] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. 2020 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 268.

[5] Liu W, Deng LH, Zhao YQ. The clinical efficacy and mechanism of Tianma Gouteng Decoction in intervention of hypertension of liver-Yang hyperactivity [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med (天津中医药大学学报), 2021, 40: 51-54.

[6] Ding L, Zhang WD, Zhu T, et al. Clinical observation of Tianma Gouteng Decoction combined with ear-buried beans treating the essential hypertension patients of liver Yang hyperactivity [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2020, 35: 4238-4241.

[7] Zou ZN, Guo TF, Zu XH. The efficacy of modified Lingjiao Gouteng Decoction combined with amlodipine besylate in the treatment of essential hypertension with liver Yang hyperactivity syndrome [J]. Henan Med Res (河南医学研究), 2020, 29: 2426-2428.

[8] Zeng J, Chen JJ, Zeng LB, et al. Clinical efficacy of Lingjiao Gouteng decoction combined with conventional antihypertensive drugs in the treatment of essential hypertension: a meta-analysis [J]. J Mod Med Health (现代医药卫生), 2023, 39: 3872-3878.

[9] Xiao ML, Liu D, Li HS, et al. Effect of Qingnao Jiangya Tablet combined with telmisartan on the serum of NO, ET-1 levels and endothelial function of patients with liver Yang hypertension [J]. Med J West China (西部医学), 2019, 31: 1726-1729.

[10] Zhao L, Zhan XF. Study on influence of Qingnao Jiangya Tablets for biochemical indexes and humoral immune indexes of patients with primary hypertension [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2022, 49: 124-127.

[11] Li YL, Yang WQ, Qi DM, et al. Hypertensive rats with hyperactivity of liver disease determination method and its application: CN 201710530206 [P]. 2017.

[12] Liu XD, Fan XM, Wang YM, et al. Serum metabolomic study of Taikong Yangxin pills intervention in simulated weightless rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2025, 31: 147-153.

[13] Li HC, Wang LH, Zhang L, et al. Study on material basis and anti-hypertensive metabolomics of different extraction methods of the *Uncaria rhynchophylla Scrophularia* formula [J]. J Pharm Biomed Anal, 2023, 233: 115464.

[14] Li HC, Wang LH, Zhang H, et al. Study on material basis and anti-hypertensive metabolomics of Zhengan-Xifeng-Tang (ZXT): a comparison between ZXT decoction and granules [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2024, 1236: 124063.

[15] Bercea CI, Cottrell GS, Tamagnini F, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and hypertension: a review of vasodilatory mechanisms of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid [J]. Br J Pharmacol, 2021, 178: 860-877.

[16] Guo XQ, Li SM, Yu H, et al. Mechanism of Sanzi Yangqin decoction to prevent the development of prehypertension and excessive phlegm-dampness syndrome in rats based on hypothalamic metabonomics [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 3387-3395.

[17] Zhang H, Ding XY, Wang H, et al. Effects of Xinyue Capsules on the expression of glycerophospholipid metabolizing enzymes in a rat model of cardiac hypertrophy [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2024, 46: 3594-3602.

[18] Jiang S, Shui Y, Cui Y, et al. Gut microbiota dependent trimethylamine *N*-oxide aggravates angiotensin II-induced hypertension

[J]. Redox Biol, 2021, 46: 102115.

[19] Yang YC, Yang BL, Liu BY, et al. Circulating choline levels are associated with prognoses in patients with pulmonary hypertension: a cohort study [J]. BMC Pulm Med, 2023, 23: 313.

[20] Zhou SM, Xu SY, Lin JG, et al. Curative effect of Erzhu Tianma granules on gut microbiota and TMAO patients with prehypertension with phlegm-dampness syndrome [J]. Acta Chin Med (中医学报), 2024, 39: 2655-2666.

[21] Tate BN, Van Guilder GP, Aly M, et al. Changes in choline metabolites and ceramides in response to a DASH-style diet in older adults [J]. Nutrients, 2023, 15: 3687.

[22] Lai JS, Chen C. The roles of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of vascular function [J]. Acta Physiol Sin (生理学报), 2021, 73: 631-645.

[23] Li S, Su W, Zhang XY, et al. Arachidonic acid metabolism in liver glucose and lipid homeostasis [J]. Acta Physiol Sin (生理学报), 2021, 73: 657-664.

[24] Yu YH, Ma JR, Zhang YY, et al. Advances in synthesis of unsaturated fatty acids in bacteria [J]. Acta Microbiol Sin, 2024, 64: 14-29.

[25] Gao L, Kong X, Wu W, et al. Dissecting the regulation of arachidonic acid metabolites by *Uncaria rhynchophylla* (Miq). Miq. in spontaneously hypertensive rats and the predictive target sEH in the anti-hypertensive effect based on metabolomics and molecular docking [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 909631.

[26] Tian Z, Zhang S, Wang H, et al. Intervention of *Uncaria* and its components on liver lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 910.