·实验研究·

基于热证模型大鼠的知母寒热药性研究

管伟[1],王雨[1],杨炳友[1],匡海学[1],陈庆山[2],张丽莉[2],隋垚鑫[1],刘思佟[1],刘艳[1]*
(1.黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040;
2.东北农业大学农学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要　目的:采用转录组学、蛋白质组学技术考察知母及其拆分组分对热证模型大鼠肝脏中与物质能量代谢相关的关键差异基因、蛋白及所涉及通路表达的影响,明确其对机体物质能量代谢的调控作用,阐明知母及其拆分组分的药性归属以及中药对应药性的内部精细结构。方法:70只雄性SD大鼠,随机分为空白组、热证模型组、水煎液组、多糖组、皂苷组、乙酸乙酯组和其余组分组,每组10只。以优甲乐混悬液灌胃建立热证模型,各给药组连续灌胃15 d。通过转录组学及蛋白质组学考察知母及其拆分组分对热证大鼠基因及蛋白表达谱的影响,运用生物信息学分析方法,考察各组分涉及的机体能量代谢相关通路,并采用qPCR及Western blotting技术对其关键差异基因及蛋白进行实验验证。结果:知母水煎液、多糖、皂苷、其余组分均能显著或极显著下调热证模型大鼠线粒体三功能酶 亚基(Hadhb)、磷酸烯醇式丙酮酸激酶1(Pck1)、长链脂肪酸辅酶A连接酶1(Acsl1)蛋白($P<0.01$)及过氧化物双功能酶(Ehhadh)基因表达水平($P<0.05$),显著或极显著上调硬酯酰辅酶A去饱和酶(Scd4)及脂肪酸去饱和酶(Fads2)基因表达水平($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$),抑制糖脂代谢,从而抑制机体能量代谢,乙酸乙酯组分呈相反趋势,显著上调热证模型大鼠Hadhb、Pck1蛋白表达($P<0.05$),促进机体糖脂代谢,从而促进能量代谢。结论:知母水煎液、多糖、皂苷及其余组分抑制能量代谢,具有寒(凉)性;乙酸乙酯组分能促进能量代谢,具有热(温)性。

关键词　寒热药性;知母;热证模型;能量代谢;蛋白质组学;转录组学
中图分类号:R285　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1002-2392(2025)11-0010-13
DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.250224

中药药性理论是联系中医临床辨证论治、遣方用药与基础研究的重要枢纽,也是解释中药对人体的作用和中药临床安全使用的重要支撑[1-2]。借助现代科学技术手段,诸多学者从药理学的角度对中药寒热药性对于生物体的作用及作用机制进行广泛的研究[3-5]。研究方向主要是围绕机体中枢神经系统、周围神经系统、内分泌系统及物质能量代谢展开的。其中,匡海学教授基于中药"一味一性"的传统理论,深化总结前期研究基础,提出了中药性(气)味科学内涵新假说[6-7],认为药性是可以拆分的,中药药性与机体物质能量代谢相关,促进机体能量代谢、物质代谢的中药具有热(或温)性,抑制机体能量代谢、物质代谢的中药具有寒(或凉)性。药性(气)可以通过动物实验以及系统生物学等方法予以评价归属。

在系统生物学方法中,蛋白质组学及转录组学技术具有整体性、时空性等特点,能够从整体角度分析细胞内蛋白质组成和基因调控的动态变化[8-9],与中药的"整体观"和"动态观"不谋而合,有利于从转录、蛋白水平解释中医辨证论治理论和中医药作用机制等问题[10-12]。知母为百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge.)的地下根茎,性寒味苦甘,具有清

收稿日期:2024-09-27　　**修回日期**:2025-06-16
基金项目:国家自然科学基金青年项目(82104378);黑龙江省自然科学基金联合引导项目(H2023H068);黑龙江省中医药科研项目(ZYW2023-104);黑龙江省"双一流"学科协同创新成果建设项目(LJGXCG2022-096);黑龙江中医药大学科研基金项目(2024XJJ-QNCX004);黑龙江中医药大学青年科技创新能力培养项目(2024-KYYWF-1373);黑龙江省"春雁"团队计划(CYQN24014);国家重点研究发计划"中医药现代化"重点专项资助(2024YFC3506600)
作者简介:管伟(1990-),男,博士,助理研究员,研究方向:中药药性理论研究。
*通信作者:刘艳(1987-),女,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中药药性理论研究。

热泻火、滋阴润燥之功效[13]。目前有关知母性味及其物质基础的研究较少，本实验室前期已将知母拆分为成分互不交叉的多糖、皂苷、乙酸乙酯及其余组分[14]，其中知母多糖组分、皂苷组分及其余组分为知母苦味的物质基础，乙酸乙酯组分为其甘味的物质基础。在药性归属方面，已有研究报道知母多糖可逆转典型热证模型大鼠的物质能量代谢，初步判定其为寒性的物质基础[15]。为进一步明确拆分组分的寒热药性归属，本研究基于匡海学教授提出的中药性味科学内涵新假说，综合运用转录组学、蛋白质组学技术，考察知母及其拆分组分对热证模型大鼠能量代谢相关基因、蛋白表达谱的影响，判定知母及其拆分组分的寒热药性归属，为进一步阐明中药知母复杂体系的研究提供详实的科学依据。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠，购于黑龙江中医药大学实验动物中心，合格证号：SCXK 黑 2016004。体质量 180 ~ 220 g，饲养环境温度 22 ~ 25 ℃，相对湿度 40% ~ 70%，昼夜交替照明 12 h，本研究严格遵循实验动物伦理保护规定执行，通过黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准(2017050801)。

1.2 药物

知母药材采购于河北省，经黑龙江中医药大学药用植物学教研室苏连杰教授鉴定为百合科知母属植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.)的干燥根茎(20160901)，符合 2020 版《中国药典》规定。药材标本保存于黑龙江中医药大学药学院。按本课题组前期方法进行知母及各个拆分组分的制备，包括知母水煎液、多糖拆分组分(多糖组)、皂苷拆分组分(皂苷组)、乙酸乙酯萃取组分(乙酸乙酯组)以及除上述组分外的其余拆分组分(其余组分组)[14]。将知母水煎液及各拆分组分浓缩、冻干后，得到干燥固体，低温保存，灌胃给药前以蒸馏水溶解，配制成相应浓度备用。

1.3 试剂与仪器

mirVana™ RNA Isolation Kit 总 RNA 提取试剂盒(美国 Applied Biosystem，批号：AM1561)；LowInput Quick - Amp Labeling Kit，one - color(24 ×，美国 Agilent，批号：5190 - 2305)；Gene Expression Wash Pack(美国 Agilent，批号：5188 - 5327)；SDS - PAGE 凝胶试剂盒(康为世纪，批号：CW0022M)；蛋白抽提试剂盒(康为世纪，批号：CW0891)；SDS - PAGE 蛋白上样缓冲液(5 ×，上海碧云天生物技术有限公司，批号：P0015L)；10K 超滤管(德国 Sartorious 公司，批号：VN01H02)；硬酯酰辅酶 A 去饱和酶 4(Scd4，Forward：AGC TGG AGT ACG TCT GGA GGA AC；Reverse：CGA TGG CTC CAC AGG CGA TG，批号：499358)、脂肪酸去饱和酶 2(Fads2，Forward：TCT CAG ATC ACC GAG GAC TTC AGG；Reverse：GCC ATT GCC GAA GTA CGA GAG G，批号：SAB1303849)、过氧化物双功能酶(Ehhadh，Forward：CTC GTG TCG GCT TGC CAG AAG；Reverse：TCA AGA GCA ACA GGA ACT CCA ACG，批号：SAB1401124)等反转录试剂盒均产自美国 Roche 公司)；优甲乐片(德国默克公司，批号：602019)；线粒体三功能酶 亚基(Hadhb，批号：bs - 5065R)、磷酸烯醇式丙酮酸激酶(Pck1，批号：bs - 5001R)、长链脂肪酸辅酶 A 连接酶 1(Acsl1，批号：bs - 5022R)一抗均购自北京博奥森公司。

紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司，型号：Evolution 260 BIO)；超高效液相(美国 AB Sciex 集团公司，型号：Eksigent NANO LC - ultra 2D plus)；质谱分析系统(美国 AB Sciex 集团公司，型号：Triple TOF 5600⁺)；PCR 仪(美国 Bio - Rad，型号：IQTM5)；高效液相(美国 Waters 公司，型号：Waters 2695)；电泳仪(美国 BIO - RAD 生化科技有限公司，型号：Universal Hood Ⅱ)；凝胶成像仪(美国 LI - COR 公司，型号：Odyssey© CLx)；芯片扫描仪(美国 Agilent G2505C，型号：G2505C)；杂交炉(美国 Agilent，型号：G2545A)。

2 方法

2.1 动物的分组及给药

动物适应性喂养 1 周后，按照随机分配原则分为空白组、热证模型组、水煎液组、多糖组、皂苷组、乙酸乙酯组、其余组分组，每组 10 只。采用课题组前期建立的模型方法，大鼠每日 9:00 灌胃优甲乐120 μg/kg。空白组给予相同体积生理盐水灌胃，其余各组按照相应药物体积灌胃，连续给药 15 d[16]。按拆分组分得率给药，剂量为水煎液组(2.16 g/kg)、多糖组(0.26 g/kg)、皂苷组(0.13 g/kg)、乙酸乙酯组(0.026 g/kg)、其余组分组(0.09 g/kg)。给药结束后，留取肝脏组织，放入液氮中速冻，然后转移至 - 80 ℃冰箱保存备用。

2.2 转录组学研究

采用 mirVana™ RNA Isolation Kit 提取肝脏组织中的总 RNA，并进行纯度及完整性检测。采用 Agilent Rat Gene Expression(8 ×60K)大鼠基因芯片对所提取 RNA 进行杂交，运用 Feature Extraction 对所得芯片扫描图进行标准化处理。按照筛选的标准(上调或者下调倍数变化值≥2.0，或≤0.5)进行差异基因筛选，导入在线分析数据库 DAVID Bioinformatics Resources

6.8(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID)对差异基因进行基因本体论(Gene Ontology, GO)的富集,分析相关信号通路,并验证差异基因。

2.3 蛋白质组学研究

2.3.1 蛋白样本提取、酶解、标记

采用蛋白试剂盒抽提方法提取肝组织总蛋白,并利用 BCA 法对其定量,SDS - PAGE 法检测其完整性。采用 iTRAQ 试剂对各组总蛋白进行标记。

采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪对样品进行高 pH 反相分级,流动相 A:20 mmol/L 甲酸胺(pH 10) + 100% 水;流动相 B:20 mmol/L 甲酸胺(pH 10) + 80% 乙腈 + 20% 水。120 μL流动相 A 复溶抽干后的样品,涡旋振荡,12 000 r/min离心 20 min,取上清进行检测,进样量 100 μL;1.5 mL 离心管依次标记 1 ~ 50,收集分离组分;分离梯度为 0 ~ 5 min,5% B;5 ~ 30 min,5% ~ 15% B;30 ~ 45 min,15% ~ 38% B;45 ~ 46 min,38% ~ 90% B;46 ~ 54.5 min,90% B;54.5 ~ 55 min,90% ~ 5% B;55 ~ 65 min,5% B,流速 0.8 mL/min,洗脱物采用真空冷冻离心机抽干及冷冻保存待用。

2.3.2 质谱分析

纳升级反相色谱 - TripleTOF™5600 进行蛋白质分析,流动相 A(2% 乙腈 + 98% 水 + 0.1% 甲酸),流动相 B(98% 乙腈 + 2% 水 + 0.1% 甲酸),Loading Pump 流速 2 μL/min,15 min。梯度为 0 ~ 0.1 min,5% ~ 7% B;0.1 ~ 60 min,7% ~ 22% B;60 ~ 70 min,22% ~ 30% B;70 ~ 74.9 min,30% ~ 50% B;74.9 ~ 75 min,50% ~ 80% B;75 ~ 80 min,80% B;80 ~ 80.5 min,80% ~ 5% B,80.5 ~ 90 min,5% B。

质谱相关参数设置如下:Ion spray voltage 设置为 2.3 kV;GS1 设置为 4;Curtain gas 设置为 30 或 35;DP 为 100 或 80;TOF MS 为 m/z:350 ~ 1 250;accumulation time 为 0.25 s; product ion scan 为 IDA,number 为 30;m/z 为 100 ~ 1 500;accumulation time 为 0.1 s;Dynamic exclusion time 为 25 s;Rolling CE 设置为 enabled;Adjust CE when using iTRAQ® reagent 为 enabled;CES 设置为 5。

2.3.3 数据分析

采用 ProteinPilot™4.5 鉴定差异蛋白,利用 Fold Change 的倍数变化值(上调或者下调倍数变化值≥1.2 或≤0.83,且 $P < 0.05$)进行各组间差异蛋白筛选。采用 DAVID Bioinformatics Resources 6.8(https://david.ncifcrf.gov/)分析对差异蛋白的功能进行注释,利用 KEGG(https://www.kegg.jp/)在线分析软件对差异蛋白的通路进行富集分析,同时利用 STRING(https://string - db.org/)软件对差异蛋白相互作用进行分析。

2.4 多组学整合分析及共同差异基因蛋白验证

整合转录与蛋白质组学结果,选取各组间转录及蛋白水平共有通路进行深入验证并分析。

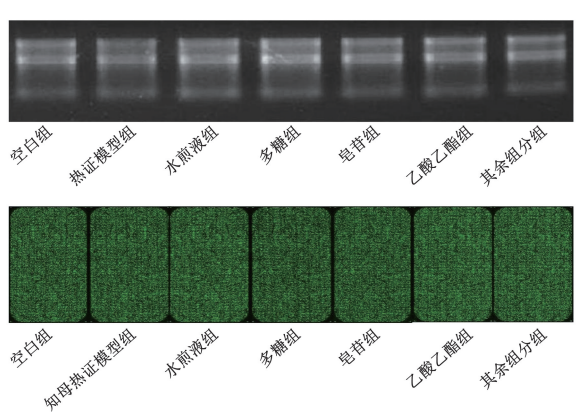
2.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件,数据结果以($\bar{x} \pm s$)表示,One - way ANOVA 检验方法进行组间比较,$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 差异基因的筛选及代谢功能与途径分析

采用标准变性凝胶电泳检测提取得到的总 RNA 的完整性,条带清晰,无拖尾现象,说明所得总 RNA 质量合格且可用于后续基因芯片杂交检测(图 1A);利用 Agilent Scanner G2505C 扫描杂交后的基因,图像亮度较高,斑点清晰,密度均匀,杂交状态良好,用于进一步分析(图 1B)。



注:A. 总 RNA 凝胶电泳;B. 基因芯片扫描。

图 1 转录组学实验结果

研究结果显示,与空白组相比,热证模型组筛选得差异基因共 291 条(上调基因 149 条,下调基因 142 条)。与热证模型组相比,水煎液组筛选得差异基因共 248 条(上调基因 118 条,下调基因 130 条);多糖组分共筛选得差异基因 432 条(上调基因 185 条,下调基因 247 条);皂苷组筛选得差异基因共 336 条(上调基因 170 条,下调基因 166 条);乙酸乙酯组筛选得差异基因共 643 条(上调基因 282 条,下调基因 361 条);其余组分组筛选得差异基因共 969 条(上调基因 409 条,下调基因 560 条)。

生物信息学结果显示,与空白组相比,热证模型组差异基因主要参与的生物学过程(BP)包括胆固醇的生物合成过程(GO:0006695)等,所参与的分子功能(MF)主要有 G 蛋白偶联受体结合(GO:0001664)等,

涉及的细胞组成(CC)主要包括内质网膜(GO:0005789)等;与热证模型组相比,水煎液组筛选出的差异基因主要参与的 BP 包括昼夜节律(GO:0007623)等,CC 主要包括细胞外空间(GO:0005615)等,MF 主要包括糖醇:NADP$^+$ 1 - 氧化还原酶活性(GO:0004032)等;其余各组涉及的 BP、CC、MF 见表 1。

表 1 差异基因涉及的生物学信息(top 5)

组别	生物学过程		细胞组成		分子功能	
	名称	*P* 值	名称	*P* 值	名称	*P* 值
热证模型组	GO:0006695 ~ 胆固醇生物合成过程	7.56E - 07	GO:0005789 ~ 内质网膜	0.001 6	GO:0001664 ~ G 蛋白偶联受体结合	0.001 0
	GO:0071300 ~ 视黄酸细胞应答	0.002 4	GO:0031514 ~ 运动纤毛	0.001 8	GO:0043621 ~ 蛋白质自缔合	0.004 5
	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	0.004 2	GO:0005576 ~ 细胞外区域	0.003 6	GO:0004032 ~ 糖醇:NADP$^+$ 1 - 氧化还原酶活性	0.005 8
	GO:0032869 ~ 胰岛素刺激的细胞应答	0.005 0	GO:0031090 ~ 细胞器膜	0.005 2	GO:0045236 ~ 趋化因子受体结合	0.005 8
	GO:0031100 ~ 器官再生	0.006 2	GO:0005737 ~ 细胞质	0.005 5	GO:0008009 ~ 趋化因子活力	0.008 6
水煎液组	GO:0007623 ~ 昼夜节律	5.37E - 04	GO:0005615 ~ 细胞间隙	8.75E - 04	GO:0004032 ~ 糖醇:NADP$^+$ 1 - 氧化还原酶活性	1.63E - 04
	GO:0016042 ~ 脂类分解代谢过程	0.001 3	GO:0043025 ~ 神经元胞体	0.005 1	GO:0016491 ~ 氧化还原酶活性	0.003 2
	GO:0009612 ~ 机械刺激应答	0.001 3	GO:0005783 ~ 内质网	0.018 1	GO:0031995 ~ 胰岛素样生长因子Ⅱ结合	0.003 4
	GO:0051726 ~ 细胞周期调控	0.002 9	GO:0070062 ~ 外泌体	0.040 3	GO:0031994 ~ 胰岛素样生长因子 I 结合	0.007 8
	GO:0060087 ~ 血管平滑肌松弛	0.003 6	GO:0005576 ~ 细胞外区域	0.045 2	GO:0042803 ~ 蛋白质同源二聚化活性	0.010 3
多糖组	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	4.63E - 05	GO:0005615 ~ 细胞间隙	8.60E - 05	GO:0031995 ~ 胰岛素样生长因子Ⅱ结合	4.05E - 04
	GO:0042981 ~ 凋亡过程调控	9.56E - 05	GO:0031234 ~ 细胞膜胞质侧外源成分	0.009 3	GO:0016491 ~ 氧化还原酶活性	9.89E - 04
	GO:0014070 ~ 对有机环状化合物的应答	6.91E - 04	GO:0009986 ~ 细胞表面	0.013 1	GO:0031994 ~ 胰岛素样生长因子 I 结合	0.001 4
	GO:0048545 ~ 类固醇激素应答	0.001 0	GO:0008076 ~ 电压门控钾通道复合体	0.014 6	GO:0008083 ~ 生长因子活性	0.002 1
	GO:0006629 ~ 脂质代谢过程	0.001 4	GO:0030141 ~ 分泌颗粒	0.015 5	GO:0005520 ~ 胰岛素样生长因子结合	0.009 0
皂苷组	GO:0035556 ~ 细胞内信号转导	0.001 1	GO:0005622 ~ 细胞内部	0.003 4	GO:0005516 ~ 钙调蛋白结合	0.002 1
	GO:0044320 ~ 瘦素刺激的细胞应答	0.008 3	GO:0042383 ~ 肌膜	0.039 2	GO:0051015 ~ 肌动蛋白丝结合	0.004 2
	GO:0051412 ~ 皮质酮应答	0.023 0	GO:0005615 ~ 细胞间隙	0.049 8	GO:0046872 ~ 金属离子结合	0.009 7
	GO:0006171 ~ cAMP 生物合成过程	0.023 7	/	/	GO:0032029 ~ 肌球蛋白尾结合	0.028 8
	GO:0001678 ~ 细胞葡萄糖稳态	0.023 7	/	/	GO:0000287 ~ 镁离子结合	0.034 4

续表 1

组别	生物学过程		细胞组成		分子功能	
	名称	*P* 值	名称	*P* 值	名称	*P* 值
乙酸乙酯组	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	3.75E - 04	GO:0016324 ~ 顶端质膜	1.20E - 04	GO:0005506 ~ 铁离子结合	1.82E - 06
	GO:0001768 ~ T 细胞极性建立	4.58E - 04	GO:0005615 ~ 细胞间隙	2.95E - 04	GO:0005516 ~ 钙调蛋白结合	1.96E - 04
	GO:0007623 ~ 昼夜节律	8.10E - 04	GO:0005833 ~ 血红蛋白复合物	7.29E - 04	GO:0005344 ~ 氧转运体活力	0.001 5
	GO:0006637 ~ 酰基辅酶 A 代谢过程	0.001 1	GO:0005777 ~ 过氧物酶体	0.008 9	GO:0016790 ~ 硫酯水解酶活性	0.001 7
	GO:0015671 ~ 氧气运输	0.001 5	GO:0045202 ~ 突触	0.011 8	GO:0008146 ~ 磺基转移酶活性	0.003 1
其余组分组	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	4.55E - 07	GO:0005615 ~ 细胞间隙	5.21E - 07	GO:0005506 ~ 铁离子结合	5.21E - 07
	GO:0006955 ~ 免疫应答	1.20E - 06	GO:0005789 ~ 内质网膜	1.90E - 06	GO:0003707 ~ 类固醇激素受体活性	1.02E - 06
	GO:0043401 ~ 类固醇激素介导的信号通路	1.28E - 06	GO:0009897 ~ 细胞膜外侧	2.41E - 05	GO:0019825 ~ 氧结合	4.30E - 05
	GO:0051384 ~ 糖皮质激素应答	1.90E - 06	GO:0031090 ~ 细胞器膜	4.15E - 05	GO:0004497 ~ 单加氧酶活力	1.55E - 04
	GO:0032496 ~ 脂多糖应答	9.13E - 06	GO:0005833 ~ 血红蛋白复合物	3.56E - 04	GO:0005344 ~ 氧转运体活力	0.001 0

KEGG 分析结果显示，模型组主要涉及与能量代谢相关通路为 PPAR 信号通路、脂肪酸代谢、脂肪酸降解、甘油酯代谢通路，通路中涉及的差异基因包括脂肪酸结合蛋白 2（Fabp2）、载脂蛋白 A - 2（Apoa2）、硬酯酰辅酶 A 去饱和酶 4（Scd4）、脂肪酸合酶（Fasn）等；与热证模型组相比，水煎液组涉及与能量代谢相关通路为视黄醇代谢、甘油酯代谢通路及 PPAR 信号通路，通路中涉及的差异基因包括脂蛋白脂肪酶（Lpl）、脂肪酸去饱和酶 2（Fads2）、肝三酰基甘油脂肪酶（Lipc）、硬酯酰辅酶 A 去饱和酶 4（Scd4）等；多糖组参与能量代谢相关且影响显著的通路包括不饱和脂肪酸生物合成、视黄醇代谢及脂肪酸代谢，其中涉及的差异基因主要包括脂肪酸去饱和酶 1（Fads1）、脂肪酸去饱和酶 2（Fads2）、硬酯酰辅酶 A 去饱和酶 4（Scd4）等；皂苷组与能量代谢相关的通路包括脂肪酸代谢通路、糖酵解/糖异生，其中涉及的差异基因主要包括葡萄糖激酶（Gck）、己糖激酶 2（Hk2）、脂肪酸去饱和酶 2（Fads2）等；乙酸乙酯组与能量代谢相关且影响较显著的通路包括 PPAR 信号通路、视黄醇代谢、不饱和脂肪酸生物合成、花生四烯酸代谢、脂肪酸代谢、AMPK 信号通路，通路中涉及的差异基因包括肉毒碱棕榈酰转移酶 1（Cpt1a）、过氧化物双功能酶（Ehhadh）、脂蛋白脂肪酶（Lpl）等；其余组分组与能量代谢关系密切且存在显著影响的通路包括 PPAR 信号通路、甘油酯代谢、不饱和脂肪酸生物合成、脂肪酸代谢及缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸代谢，其中涉及的差异基因主要包括甘油激酶（Gk）、单甘油酯脂肪酶（Mgll）、线粒体甘油三磷酸酰基转移酶 2（Gpat2）、线粒体三功能酶 亚基（Hadhb）等，见表 2。

表 2 差异基因涉及的信号通路

组别	信号通路	基因数	*P* 值	富集倍数
热证模型组	rno03320:PPAR 信号通路	6	0.004 2	5.539
	rno01212:脂肪酸代谢	5	0.006 6	6.582
	rno04975:脂肪消化吸收	4	0.015 5	7.483
	rno00071:脂肪酸降解	4	0.027 4	6.050
	rno00561:甘油脂代谢	4	0.046 7	4.819
水煎液组	rno00830:视黄醇代谢	6	0.004 6	5.438
	rno00561:甘油脂代谢	4	0.034 2	5.100
	rno03320:PPAR 信号通路	4	0.048 0	3.908
	rno00040:戊糖和葡萄糖醛酸相互转化	3	0.046 9	6.839
	rno04020:钙信号传导通路	6	0.049 6	2.439

续表 2

组别	信号通路	基因数	*P* 值	富集倍数
多糖组	rno01040:不饱和脂肪酸的生物合成	4	0.020 9	6.680
	rno00830:视黄醇代谢	6	0.027 5	3.501
	rno01212:脂肪酸代谢	4	0.049 8	3.587
	rno04151:PI3K - Akt 信号通路	15	0.009 6	2.142
	rno04010:MAPK 信号通路	10	0.047 1	1.884
皂苷组	rno01212:脂肪酸代谢	2	0.036 1	3.552
	rno00010:糖酵解/糖异生	4	0.044 3	4.025
	rno04919:甲状腺激素信号传导通路	5	0.049 3	3.036
	rno04713:昼夜节律同步	5	0.036 4	3.631
	rno04723:逆行内源性大麻素信号传导	5	0.039 8	3.419
乙酸乙酯组	rno03320:PPAR 信号通路	12	2.76E - 05	4.889
	rno00830:视黄醇代谢	12	5.64E - 05	4.535
	rno01040:不饱和脂肪酸的生物合成	7	2.47E - 04	7.572
	rno00590:花生四烯酸代谢	9	0.004 0	3.485
	rno01212:脂肪酸代谢	7	0.006 9	4.066
其余组分组	rno03320:PPAR 信号通路	16	7.03E - 06	4.015
	rno00561:甘油脂代谢	9	0.010 3	2.947
	rno01040:不饱和脂肪酸的生物合成	6	0.015 2	3.998
	rno01212:脂肪酸代谢	8	0.020 1	2.862
	rno00280:缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	7	0.048 6	2.459

3.2 差异蛋白分析结果

SDS - PAGE 对各组蛋白进行检测,发现条带清晰,无拖尾现象,分离度较好,蛋白并未降解(图 2)。

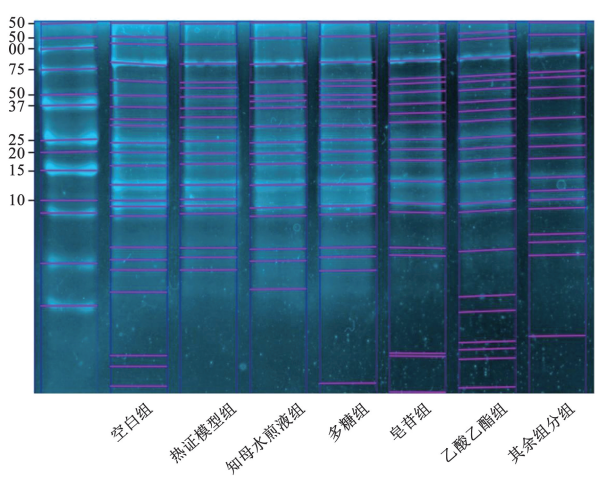


图 2 大鼠肝脏蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳

差异蛋白研究结果显示,与空白组相比,热证模型组大鼠肝脏共筛选出 130 个差异蛋白(上调 114 个,下调 16 个)。与热证模型组相比,水煎液组共筛选出 89 个差异蛋白(上调 36 个,下调 53 个);多糖组共筛选出差异蛋白 91 个(上调 22 个,下调 69 个);皂苷组共筛选出差异蛋白 89 个(上调 26 个,下调 63 个);乙酸乙酯组共筛选出差异蛋白 82 个(上调 54 个,下调 28 个);其余组分组共筛选出差异蛋白 94 个(上调 27 个,下调 67 个)。

生物学信息结果显示,与空白组相比,热证模型组差异蛋白参与的 BP 主要为氧化还原过程(GO:005514)、脂肪酸 氧化(GO:0006635)等,所涉及的 CC 包括细胞外泌体(GO:0070062)、线粒体(GO:0005739)等,涉及的 MF 为 NAD 结合(GO:0051287)、氧化还原反应(GO:0016491)等;与热证模型组相比,水煎液组参与的 BP 主要为氧化还原过程(GO:005514)等,涉及的 CC 包括细胞外泌体(GO:0070062)、髓鞘(GO:0043209)、线粒体(GO:0005739)等,涉及的 MF 为酯酰辅酶 A 结合(GO:0000062)、酶结合(GO:0019899)、NAD 结合(GO:0051287)等;其余各组涉及的 BP、CC、MF 见表 3。

表 3　差异蛋白涉及的生物学信息(top 5)

组别	生物学过程		细胞组成		分子功能	
	名称	*P* 值	名称	*P* 值	名称	*P* 值
热证模型组	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	8.82E - 15	GO:0070062 ~ 外泌体	9.50E - 38	GO:0051287 ~ NAD 结合	8.93E - 12
	GO:0006635 ~ 脂肪酸 - 氧化	8.23E - 07	GO:0005739 ~ 线粒体	1.87E - 36	GO:0016491 ~ 氧化还原酶活性	3.38E - 08
	GO:0006107 ~ 草酰乙酸代谢过程	2.26E - 06	GO:0043209 ~ 髓鞘	2.06E - 28	GO:0019899 ~ 酶结合	1.82E - 07
	GO:0006412 ~ 翻译	2.80E - 06	GO:0005743 ~ 线粒体内膜	1.44E - 22	GO:0004029 ~ 乙醛脱氢酶(NAD)活性	2.88E - 07
	GO:0006103 ~ 2 - 氧代戊二酸代谢过程	5.28E - 06	GO:0005759 ~ 线粒体基质	9.34E - 19	GO:0042803 ~ 蛋白质同二聚活性	1.74E - 06
知母水煎液组	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	1.50E - 06	GO:0070062 ~ 外泌体	2.47E - 28	GO:0000062 ~ 脂肪酰辅酶 A 结合	3.55E - 05
	GO:0006412 ~ 翻译	6.07E - 05	GO:0043209 ~ 髓鞘	8.92E - 18	GO:0019899 ~ 酶结合	1.23E - 04
	GO:0006629 ~ 脂质代谢过程	7.66E - 04	GO:0005739 ~ 线粒体	5.87E - 13	GO:0051287 ~ NAD 结合	1.65E - 04
	GO:0006635 ~ 脂肪酸 - 氧化	0.001 2	GO:0016020 ~ 细胞膜	1.68E - 11	GO:0004300 ~ 烯酰辅酶 A 水合酶活性	4.95E - 04
	GO:0006749 ~ 谷胱甘肽代谢过程	0.001 8	GO:0005829 ~ 细胞液	6.87E - 08	GO:0005515 ~ 蛋白结合	6.06E - 04
多糖组	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	1.68E - 09	GO:0070062 ~ 外泌体	3.42E - 21	GO:0051287 ~ NAD 结合	1.57E - 08
	GO:0006635 ~ 脂肪酸 - 氧化	2.25E - 09	GO:0005739 ~ 线粒体	1.78E - 20	GO:0004075 ~ 生物素羧化酶活性	1.37E - 06
	GO:0006099 ~ 三羧酸循环	1.11E - 05	GO:0005743 ~ 线粒体内膜	4.18E - 15	GO:0003857 ~ 3 - 羟酰基辅酶 A 脱氢酶活性	7.57E - 06
	GO:0009725 ~ 对激素的反应	0.001 4	GO:0005759 ~ 线粒体基质	9.33E - 12	GO:0003988 ~ 乙酰辅酶 AC - 酰基转移酶活性	3.99E - 04
	GO:0006412 ~ 翻译	0.002 4	GO:0016020 ~ 细胞膜	9.12E - 08	GO:0004300 ~ 烯酰辅酶 A 水合酶活性	5.57E - 04
皂苷组	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	1.33E - 11	GO:0005739 ~ 线粒体	1.50E - 29	GO:0000062 ~ 脂肪酰辅酶 A 结合	3.10E - 08
	GO:0006635 ~ 脂肪酸 - 氧化	1.74E - 09	GO:0070062 ~ 外泌体	9.07E - 24	GO:0051287 ~ NAD 结合	3.40E - 07
	GO:0006103 ~ 2 - 氧代戊二酸代谢过程	6.39E - 05	GO:0005759 ~ 线粒体基质	3.66E - 22	GO:0009055 ~ 电子载体活性	8.53E - 06
	GO:0006084 ~ 乙酰辅酶 A 代谢过程	4.47E - 04	GO:0005743 ~ 线粒体内膜	2.66E - 15	GO:0019899 ~ 酶结合	2.30E - 05
	GO:0042542 ~ 对过氧化氢的反应	4.87E - 04	GO:0043209 ~ 髓鞘	1.01E - 09	GO:0003988 ~ 乙酰辅酶 AC - 酰基转移酶活性	3.64E - 04
乙酸乙酯组	GO:0006635 ~ 脂肪酸 - 氧化	2.20E - 13	GO:0005739 ~ 线粒体	5.72E - 17	GO:0000062 ~ 脂肪酰辅酶 A 结合	7.74E - 07
	GO:0055114 ~ 氧化还原过程	4.01E - 07	GO:0070062 ~ 外泌体	5.70E - 16	GO:0003988 ~ 乙酰辅酶 AC - 酰基转移酶活性	1.81E - 06
	GO:0007584 ~ 对营养素的反应	1.62E - 06	GO:0005777 ~ 过氧化物酶体	8.36E - 14	GO:0003857 ~ 3 - 羟酰基辅酶 A 脱氢酶活性	5.03E - 06
	GO:0006695 ~ 胆固醇生物合成过程	1.68E - 04	GO:0005743 ~ 线粒体内膜	3.11E - 11	GO:0043531 ~ ADP 结合	2.63E - 05
	GO:0006084 ~ 乙酰辅酶 A 代谢过程	3.54E - 04	GO:0005829 ~ 细胞液	1.94E - 09	GO:0016508 ~ 长链烯酰辅酶 A 水合酶活性	6.15E - 05

续表 3

组别	生物学过程		细胞组成		分子功能	
	名称	*P* 值	名称	*P* 值	名称	*P* 值
其余组分组	GO:0055114～氧化还原过程	1.43E－08	GO:0070062～外泌体	1.68E－21	GO:0051287～NAD 结合	2.08E－04
	GO:0007584～对营养素的反应	5.74E－05	GO:0043209～髓鞘	1.69E－09	GO:0005198～结构分子活性	4.66E－04
	GO:0006635～脂肪酸 －氧化	7.52E－05	GO:0005739～线粒体	2.97E－09	GO:0000062～脂肪酰辅酶 A 结合	0.001 0
	GO:0098609～细胞间黏附	0.003 8	GO:0016020～细胞膜	5.92E－07	GO:0005515～蛋白结合	0.001 3
	GO:0009725～对激素的反应	0.012 7	GO:0005743～线粒体内膜	2.32E－06	GO:0008144～药物结合	0.002 9

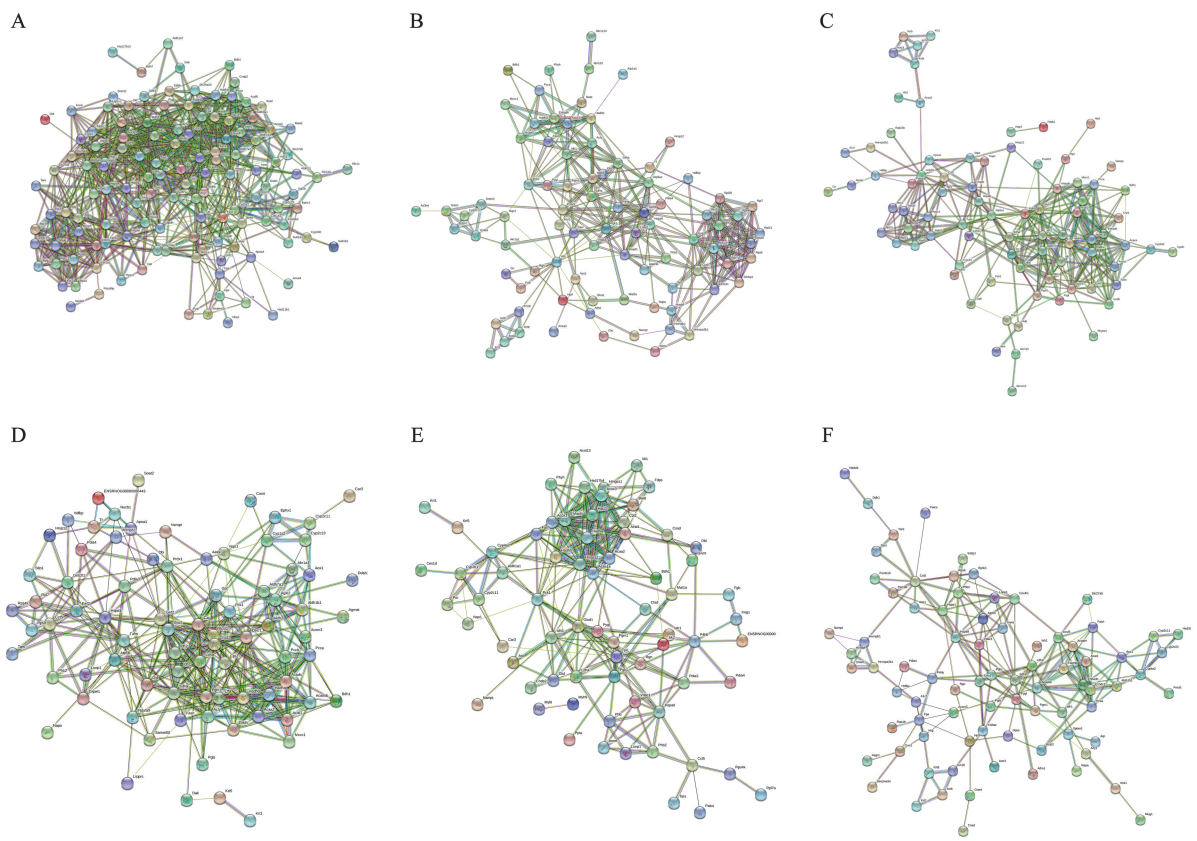
KEGG 通路分析结果发现，与空白组相比，热证模型组与能量代谢相关通路有脂肪酸降解、三羧酸循环、糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、PPAR 信号通路及甘油酯代谢，通路中所涉及的差异蛋白主要包括乳酸脱氢酶 A 链（Ldha）、长链脂肪酸辅酶 A 连接酶（Acsl1）、过氧化物双功能酶（Ehhadh）、线粒体酰基辅酶 A 水合酶（Echs1）等；与热证模型组相比，水煎液组与能量代谢相关的通路主要有三羧酸循环、脂肪酸降解、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸降解、PPAR 信号通路以及丙酮酸代谢，涉及的差异蛋白包括线粒体三功能酶 亚基（Hadhb）、线粒体□链丙酰辅酶 A（Pcca）、乳酸脱氢酶 A 链（Ldha）、细胞质磷酸烯醇丙酮酸羧激酶（Pck1）等；多糖组与能量代谢相关通路包括脂肪酸降解、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸降解、丙酮酸代谢、三羧酸循环、PPAR 信号通路以及糖酵解/糖异生，能量代谢通路相关的差异蛋白包括过氧化物双功能酶（Ehhadh）、线粒体三功能酶□亚基（Hadha）、线粒体三功能酶 亚基（Hadhb）等；皂苷组与能量代谢联系较为密切的通路有脂肪酸降解、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生、三羧酸循环、甘油酯代谢及 PPAR 信号通路，涉及的相关差异蛋白包括线粒体三功能酶 亚基（Hadhb）、线粒体琥珀酸盐脱氢酶黄素蛋白 A 亚基（Sdha）、长链脂肪酸辅酶 A 连接酶 1（Acsl1）及细胞质磷酸烯醇丙酮酸羧激酶（Pck1）等；乙酸乙酯组能量代谢相关的通路包括脂肪酸降解、PPAR 信号通路、糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢，涉及的差异蛋白包括乳酸脱氢酶 A 链（Ldha）、线粒体三功能酶 亚基（Hadhb）、过氧化物双功能酶（Ehhadh）、细胞质磷酸烯醇丙酮酸羧激酶（Pck1）以及线粒体酮脂酰辅酶 A 硫解酶（Acaa2）等；其余组分组与能量代谢相关的通路包括脂肪酸降解、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸降解、脂肪酸代谢、PPAR 信号通路以及丙酮酸代谢，相关通路涉及的差异蛋白包括线粒体三功能酶 亚基（Hadhb）、过氧化物双功能酶（Ehhadh）、长链脂肪酸辅酶 A 连接酶 5（Acsl5）及线粒体乙酰辅酶 A 酰基转移酶（Acat1）。相关信号通路见表 4，差异蛋白互作分析见图 3。

表 4 差异蛋白涉及的信号通路

组别	信号通路	蛋白数	*P* 值	富集倍数
热证模型组	rno00071：脂肪酸降解	12	2.63E－11	18.151
	rno00020：三羧酸循环（TCA 循环）	8	2.12E－07	17.772
	rno00010：糖酵解/糖异生	10	4.54E－07	10.155
	rno00620：丙酮酸代谢	8	1.07E－06	14.218
	rno03320：PPAR 信号通路	6	0.004 2	5.539
	rno00561：甘油脂代谢	5	0.009 0	6.024
水煎液组	rno00020：三羧酸循环（TCA 循环）	5	1.20E－04	18.918
	rno00071：脂肪酸降解	5	5.45E－04	12.880
	rno00280：缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	5	9.92E－04	11.007
	rno03320：PPAR 信号通路	5	0.003 4	7.862
	rno00620：丙酮酸代谢	3	0.041 6	9.080

续表 4

组别	信号通路	蛋白数	*P* 值	富集倍数
多糖组	rno00071:脂肪酸降解	10	1.06E－10	25.364
	rno00280:缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	9	1.24E－08	19.507
	rno00620:丙酮酸代谢	7	7.70E－07	20.862
	rno00020:三羧酸循环（TCA 循环）	6	5.56E－06	22.352
	rno03320:PPAR 信号通路	7	3.75E－05	10.837
	rno00010:糖酵解/糖异生	4	0.019 8	6.812
皂苷组	rno00071:脂肪酸降解	11	4.68E－12	26.670
	rno00620:丙酮酸代谢	7	1.01E－06	19.942
	rno00010:糖酵解/糖异生	8	2.05E－06	13.023
	rno00020:三羧酸循环（TCA 循环）	6	6.98E－06	21.366
	rno00561:甘油脂代谢	5	0.001 6	9.657
	rno03320:PPAR 信号通路	5	0.004 3	7.399
乙酸乙酯组	rno00071:脂肪酸降解	10	7.91E－11	26.170
	rno03320:PPAR 信号通路	8	2.30E－06	12.779
	rno00010:糖酵解/糖异生	5	0.002 2	8.785
	rno00620:丙酮酸代谢	4	0.003 9	12.300
其余组分组	rno00071:脂肪酸降解	8	9.09E－08	20.291
	rno00280:缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	8	2.78E－07	17.340
	rno01212:脂肪酸代谢	7	4.74E－06	15.453
	rno03320:PPAR 信号通路	5	0.003 6	7.741
	rno00620:丙酮酸代谢	3	0.042 8	8.941



注：A. 热证组 *vs* 空白组；B. 水煎液组 *vs* 热证组；C. 多糖组 *vs* 热证组；D. 皂苷组 *vs* 热证组；E. 乙酸乙酯组 *vs* 热证组；F. 其余组分组 *vs* 热证组。

图 3　差异蛋白互作分析图

3.3 联合分析结果及验证

转录组学及蛋白质组学联合分析研究发现，水煎液能够从基因及蛋白水平显著影响热证模型大鼠 PPAR 信号通路；多糖组分显著影响热证大鼠脂肪酸代谢通路；皂苷组分能够显著影响热证大鼠糖酵解/糖异生通路；乙酸乙酯组分能够显著影响热证大鼠肝脏脂肪酸代谢及 PPAR 信号通路。其余组分能够显著影响热证大鼠肝脏脂肪酸代谢、PPAR 信号通路及缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸降解通路，如表 5 所示。

对关键差异基因进行验证，结果显示热证大鼠硬酯酰辅酶 A 去饱和酶（Scd4）及脂肪酸去饱和酶（Fads2）显著下调（$P<0.01$，$P<0.001$）、过氧化物双功能酶（Ehhadh）表达显著上升（$P<0.01$）。知母水煎液、多糖、皂苷及其余组分显著上调热证模型大鼠 Scd4 及 Fads2 的表达（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$）。知母水煎液、皂苷及其余组分显著下调 Ehhadh 的表达（$P<0.05$），见表 6。

表 5 转录组学及蛋白质组学联合分析

组别	信号通路	差异基因	差异蛋白
水煎液组	PPAR 信号通路	Lpl，Fads2，Scd4	Acox1，Ehhadh，Acadl，Dbi，Pck1
多糖组	脂肪酸代谢	Fads1，Fads2，Scd4	Acox1，Cpt2，Ehhadh，Acaca，Acaa1A，Acat1，Hadha，Acsl5，Hadhb
皂苷组	糖酵解/糖异生	Gck，Hk2，Adh7	Aldh7A1，Ldha，Aldh1B1，Pgm1，Dld，Aldh2，Pck1
乙酸乙酯组	PPAR 信号通路	Lpl，Cpt1B，Ehhadh，Fads2，Fabp4，Scd4，Fabp5	Acox1，Cyp4A2，Cpt2，Ehhadh，Acaa1A，Dbi，Acox3，Pck1
其余组分组	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	Hmgcs2，Ehhadh，Hadh，Hadhb	Acadsb，Acadm，Aldh1B1，Ehhadh，Acat1，Pcca，Hadhb
	脂肪酸代谢	Acsl1，Ehhadh，Fads1，Fads2，Hadh，Hadhb	Acadsb，Acadm，Ehhadh，Acat1，Acsl5，Hadhb
	PPAR 信号通路	Lpl，Ehhadh，Fads2，Apoa2，Acsl1，Fabp3，Fabp1，Gk，Fabp7，Fabp5	Cyp4A2，Acadm，Ehhadh，Slc27A5，Acsl5

表 6 各给药组对热证大鼠肝脏基因的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Scd4	Fads2	Ehhadh
空白组	1.00±0.09	1.00±0.07	1.00±0.28
热证模型组	0.49±0.13$^{\#\#}$	0.26±0.08$^{\#\#\#}$	4.56±1.20$^{\#\#}$
水煎液组	0.78±0.11*	0.63±0.17**	2.86±0.54*
多糖组	0.97±0.28**	0.53±0.15*	3.45±0.67
皂苷组	1.32±0.12***	0.70±0.14**	2.71±1.39*
乙酸乙酯组	0.36±0.10	0.19±0.03	5.31±1.05
其余组分组	0.87±0.09**	0.84±0.19***	2.84±0.45*

注：与空白组相比，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

差异蛋白验证结果（图 4）显示，与空白组相比，热证模型组大鼠 Hadhb、Pck1、Acsl1 表达显著升高（$P<0.01$）。与热证模型组相比，知母水煎液、多糖、皂苷及其余组分对上述 3 个蛋白均有抑制作用（$P<0.01$）。知母乙酸乙酯组分对 Hadhb 及 Pck1 在热证模型大鼠中的促进作用较为明显，而对 Acsl1 的表达具有抑制作用（$P<0.05$），见表 7。

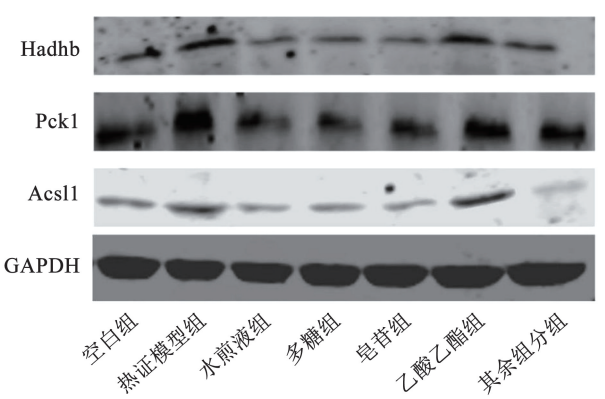


图 4 各组 Hadhb、Pck1、Acsl1 蛋白表达水平印迹图

表 7 各给药组对热证大鼠肝脏蛋白的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Hadhb	Pck1	Acsl1
空白组	0.45±0.03	0.41±0.04	0.35±0.03
热证模型组	0.64±0.05$^{\#\#}$	0.62±0.04$^{\#\#}$	0.64±0.04$^{\#\#}$
水煎液组	0.37±0.03**	0.43±0.04**	0.24±0.02**
多糖组	0.36±0.04**	0.37±0.03**	0.25±0.03**
皂苷组	0.31±0.03**	0.40±0.04**	0.20±0.01**
乙酸乙酯组	0.69±0.05*	0.69±0.03*	0.63±0.06*
其余组分组	0.42±0.03**	0.45±0.03**	0.16±0.01**

注：与空白组相比，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

4 讨论

中药药性理论是中医药理论体系的重要组成部分,阐明中药性(气)理论的科学内涵,对于丰富中医药理论内容,促进中医药学科发展,指导临床安全用药等方面具有十分重要的意义[17-18]。知母为现代中医临床中常用的寒性药物,有关其寒热药性相关物质基础研究较为鲜见。基于中药性(气)味科学内涵新假说的中药性味可拆分性[19],本研究应用转录组学及蛋白质组学的研究方法分析了知母及其拆分组分对热证模型大鼠肝脏基因及蛋白表达的影响。本研究结果显示,知母及各拆分组分能够显著影响热证模型大鼠肝脏组织 PPAR、脂肪酸降解、糖酵解/糖异生等多条糖脂代谢相关通路中蛋白及基因的表达,从而引起机体能量代谢的改变。

PPAR 信号通路对脂肪酸的氧化和分解、脂质运输等均有调节作用,通过调节其下游基因和蛋白表达,在葡萄糖和脂质代谢中起到关键作用[20]。Scd4 是通路中的一种脂肪生成酶,可催化饱和脂肪酸碳链中第一个双键的形成,是脂质储存的关键底物,能够促进脂肪酸的合成,抑制脂细胞分化,从而抑制能量代谢[21]。Fads2 基因参与碳水化合物和脂质代谢,可催化多不饱和脂肪酸的产生,其表达上调会抑制脂蛋白水解,抑制机体能量代谢[22]。此通路中 Pck1 编码的蛋白质为通路中的关键蛋白,能够催化草酰乙酸向磷酸烯醇式丙酮酸的转化,此过程伴有能量的消耗,促进机体的能量代谢过程[23],Hadhb 蛋白在诱导过氧化物酶体和线粒体 氧化活性方面起着至关重要的作用,该蛋白表达下调,能够抑制乙酰辅酶 A 的生成,从而影响三羧酸循环[24]。与空白组相比,热证模型组显著下调 Scd4、Fads2 基因的表达水平,上调 Pck1、Hadhb 蛋白及 Ehhadh 基因表达,激活 PPAR 信号通路,促进脂蛋白水解,促进机体的能量代谢。与热证模型组相比,知母水煎液、多糖、皂苷及其余组分能够上调 Scd4、Fads2 基因的表达水平,下调 Ehhadh 基因、Pck1 蛋白及 Hadhb 蛋白表达,其通过抑制 PPAR 信号通路,抑制其下游基因和蛋白的表达,从而抑制热证模型大鼠的能量代谢,乙酸乙酯组分促进 Pck1 蛋白及 Hadhb 蛋白在热证模型大鼠中的表达,激活 PPAR 信号通路,促进其能量代谢。

脂肪酸是生物体重要的能源物质,其不仅是机体重要的燃料分子,同时由脂肪酸合成或代谢产生的衍生物同样具有多种多样的生物学功能。脂肪酸氧化产生的能量是生物体重要的能源物质。在脂肪酸氧化过程中电子的转移通过线粒体呼吸链产生 ATP 及乙酰辅酶 A,ATP 为机体的重要能源[25]。该通路中 Acsl1 蛋白在脂肪酸代谢和脂肪沉积中起重要作用,其通过将脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶转化为脂肪酸酰基辅酶 A 酯,该过程参与细胞脂质的合成和氧化途径[26],Acsl1 蛋白表达下调,其下游蛋白 Ehhadh、Acaa2、线粒体羟基辅酶 A 脱氢酶(Hadh)表达下调,会抑制该通路从而抑制能量代谢[27],Scd4、Fads2 关键基因在该通路中上调,能够抑制脂肪酸的氧化,从而抑制能量代谢。热证模型组能够上调 Acsl1 蛋白表达,促进细胞脂质的氧化途径,下调该途径中 Scd4、Fads2、Ehhadh 基因的表达水平,促进机体的能量代谢过程。知母水煎液、多糖、皂苷及其余组分能够下调该通路中的 Acsl1、Ehhadh 蛋白表达,上调 Scd4、Fads2、Ehhadh 基因的表达水平,抑制脂肪酸 -氧化从而抑制脂肪酸的降解,减少能量的生成,抑制能量代谢。乙酸乙酯组分促进 Ehhadh、Hadhb 蛋白表达水平,促进脂肪酸氧化过程,促进其能量代谢。

机体中氨基酸分解所生成的□-酮酸可以转变成糖、脂类或再合成某些非必需氨基酸,从而调节机体的糖代谢及脂质代谢,也可以经过三羧酸循环氧化成二氧化碳和水,并放出能量[28]。知母其余组分下调 Ehhadh 基因及 Ehhadh、Hadhb 蛋白表达水平,抑制缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸降解,抑制能量代谢。

糖酵解/糖异生途径中葡萄糖在细胞液中分解成丙酮酸,丙酮酸进一步还原成乳酸,同时伴有 ATP 的生成及代谢,此过程为葡萄糖在有氧和无氧代谢过程中共有的途径。糖酵解通路的激活能够催化乳酸的生成,从而加速机体能量代谢[29]。葡萄糖激酶(Gck)在维持葡萄糖稳态中起关键作用,其将葡萄糖磷酸化形成葡萄糖 6-磷酸,此过程促进机体的能量代谢[30],磷酸甘油酸变位酶 1(Pgam1)为糖酵解过程中一关键蛋白,能够催化 3-磷酸甘油酸转化为 2-磷酸甘油酸,同时该蛋白的表达能够促进细胞的增殖及生存率的提升,促进机体能量代谢[31],二氢硫辛酸脱氢酶(Dld)蛋白能够促进体内 NADH 的生成[32],己糖激酶 2(Hk2)及乳酸脱氢酶 A(Ldha)是糖酵解过程中的限速酶,在糖酵解的过程中催化丙酮酸向乳酸的转化,以上蛋白表达下调,能够抑制糖酵解通路的激活,从而抑制能量的产生与代谢[33]。热证大鼠通过促进 Gck、Hk2 基因和 Pck1、Pgam1、Dld、Ldha 蛋白表达,催化糖酵解/糖异生途径,加快机体能量的生成,促进其能量代谢过程。与热证模型组相比,知母多糖组分下调 Gck、Hk2 基因,下调 Pgam1、Dld、Ldha 蛋白表达水平,知母水煎液、皂苷及其余组分下调 Pck1 蛋白,从而抑

制糖酵解/糖异生途径,抑制能量代谢,乙酸乙酯组分促进 Pck1 蛋白表达,促进能量代谢。

根据转录组学和蛋白质组学的分析结果,知母水煎液组分、多糖组分、皂苷组分、其余组分抑制热证模型大鼠的能量代谢,初步判定其药性为寒(凉)性,知母乙酸乙酯组分促进其机体能量代谢,初步判定药性为热(温)性。综上所述,通过知母及其拆分组分对热证模型大鼠的研究,发现符合药性作用表达规律的差异基因和蛋白质,这些差异基因和蛋白质对相关代谢通路产生影响,提示知母可能是通过调控热证机体的过高能量代谢来调节人体寒热之证。这项研究基于转录组学和蛋白质组学的方法,不仅拓展了寒性中药知母药性功效的认识,同时进一步验证了"促进机体能量代谢、物质代谢的中药具有热(或温)性,抑制机体能量代谢、物质代谢的中药具有寒(或凉)性"这一理论的客观性。

参考文献:

[1] 林林,李丽,赵鹏程,等. 中药四性研究进展及方法回顾[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(15):267 - 272.
[2] 王洋洋,匡海学,苏发智,等. 中药四性的临床应用价值及与五味的关系[J]. 中草药,2023,54(4):1329 - 1341.
[3] 夏元枢,魏国辉,王振国,等. 中药寒热药性研究方法综述[J]. 中华中医药杂志,2021,36(2):990 - 992.
[4] 李佳珊,杜寒倩,徐盼瑜,等. 基于药性组合的雌激素样作用中药"性 - 效 - 理 - 病"关系研究[J]. 中草药,2023,54(20):6753 - 6762.
[5] 彭亚倩,唐辉,韩彦琪,等. 中药五味药性理论的现代研究进展[J]. 药物评价研究,2023,46(9):2014 - 2023.
[6] 匡海学,王艳宏,王秋红,等. 基于中药性味可拆分性和可组合性的中药性味理论研究新模式[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2011,13(1):25 - 29.
[7] 宋振光,颜冬梅,黄璐琦,等. 中药药性——四气、五味、归经研究的方法学进展[J]. 江西中医药大学学报,2023,35(3):110 - 114.
[8] 杨祝歆,唐成林,赵鸿娣,等. 转录组测序结合 TMT 蛋白质组学技术对脊髓损伤小鼠关键基因预测及相关病理机制研究[J]. 重庆医科大学学报,2023,48(10):1149 - 1158.
[9] 贾国香,董亚倩,杨娜,等. 蛋白质组学策略助力中药现代化的研究进展[J]. 天津中医药大学学报,2021,40(3):277 - 285.
[10] 陈欣,张海山,王立雅,等. 从中医药证关系论全国名中医朴炳奎治疗大肠癌中药性味归经特点[J]. 中医药学报,2021,49(6):68 - 71.
[11] 孙珍珍,李家劼,朋汤义. 基于中药"望闻问切"理论探析"切"法与中药药性的关系[J]. 中医药学报,2020,48(1):41 - 44.
[12] 丁子禾,杨燕妮,王毅,等. 枳壳化学拆分组分的性味药理学评价及药味归属研究[J]. 中华中医药学刊,2020,38(9):161 - 165.
[13] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:222.
[14] 笔雪艳. 知母性味的物质基础研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2014.
[15] 赵金椽,南洋,陈平平,等. 知母多糖对甲亢热证大鼠肝脏代谢的影响[J]. 中医药信息,2022,39(4):31 - 35.
[16] 杨欣. 基于蛋白质组学中药寒热药性的研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2016.
[17] 张喜武,刘美欣,李秋晗,等. 以有效相态为视角探讨中药复方药性传递规律[J]. 中医药学报,2018,46(2):1 - 4.
[18] 匡海学,程伟. 中药性味的可拆分性、可组合性研究——中药性味理论新假说与研究方法的探索[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化,2009,11(6):768 - 771.
[19] 王秋红,杨欣,李雪磊,等. 基于蛋白质组学的附子、干姜和花椒的性味研究[J]. 世界中医药,2015,10(12):1824 - 1836.
[20] RANEA - ROBLES P, VIOLANTE S, ARGMANN C, et al. Murine deficiency of peroxisomal L - bifunctional protein (EHHADH) causes medium - chain 3 - hydroxydicarboxylic aciduria and perturbs hepatic cholesterol homeostasis[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(14): 5631 - 5646.
[21] ZHOU X, ZHU X X, LI C F, et al. Stearoyl - CoA desaturase - mediated monounsaturated fatty acid availability supports humoral immunity[J]. Cell Rep, 2021, 34(1): 108601.
[22] MAGUOLO A, ZUSI C, GIONTELLA A, et al. Influence of genetic variants in FADS2 and ELOVL2 genes on BMI and PUFAs homeostasis in children and adolescents with obesity[J]. Int J Obes (Lond), 2021, 45(1): 56 - 65.
[23] CHEN A, YANG Q Y, YE W, et al. Polymorphisms of *CYP7A1* and *HADHB* genes and their effects on milk production traits in Chinese Holstein cows[J]. Animals (Basel), 2024, 14(9): 1276.
[24] JIANG H F, ZHU L, XU D Q, et al. A newly discovered role of metabolic enzyme PCK1 as a protein kinase to promote cancer lipogenesis[J]. Cancer Commun (Lond), 2020, 40(9): 389 - 394.
[25] DAGHER R, MASSIE R, GENTIL B J. MTP deficiency caused by HADHB mutations: Pathophysiology and clinical manifestations[J]. Mol Genet Metab, 2021, 133(1): 1 - 7.
[26] BAI Y B, LI J S, WEI Y L, et al. Proteome analysis related to unsaturated fatty acid synthesis by interfering with bovine adipocyte*ACSL1* gene[J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(6): 641.
[27] KORONOWSKI K B, GRECO C M, HUANG H, et al. Ketogenesis impact on liver metabolism revealed by proteomics of lysine β - hydroxybutyrylation[J]. Cell Rep, 2021, 36(5): 109487.
[28] BOGIE J F J, HAIDAR M, KOOIJ G, et al. Fatty acid metabolism in the progression and resolution of CNS disorders[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 159: 198 - 213.
[29] LUÍS C, FERNANDES R, SOARES R. Exploring variations in glycolytic and gluconeogenic enzymes and isoforms across breast cancer cell lines and tissues[J]. Carbohydr Res, 2024, 541: 109169.
[30] WENG Y P, DUAN W H, YU X C, et al. MicroRNA - 324 - 3p inhibits osteosarcoma progression by suppressing PGAM1 - mediated aerobic glycolysis[J]. Cancer Sci, 2023, 114(6): 2345 - 2359.
[31] XIE Z Y, LIU J Y, XIE T, et al. Integration of proteomics and metabolomics reveals energy and metabolic alterations induced by glucokinase (GCK) partial inactivation in hepatocytes[J]. Cell Signal, 2024, 114: 111009.
[32] WANG Y Q, ZHANG L, ZHOU F F. Cuproptosis: a new form of programmed cell death[J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(8): 867 - 868.
[33] ZHANG Z H, LUO W, CHEN G H, et al. Chicken muscle antibody array reveals the regulations of LDHA on myoblast differentiation through energy metabolism[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 254(Pt 1): 127629.

Study on the Cold/Hot Nature of Anemarrhena Asphodeloides Bunge Based on Heat Syndrome Model Rats

GUAN Wei[1], WANG Yu[1], YANG Bingyou[1], KUANG Haixue[1], CHEN Qingshan[2], ZHANG Lili[2], SUI Yaoxin[1], LIU Sitong[1], LIU Yan[1]

(1. *Key Laboratory of Basic and Application Research of Northern Medicine of Ministry of Education, and Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin* 150040, *China*;
2. *College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin* 150030, *China*)

Abstract Objective: To investigate the effects of Anemarrhena asphodeloides bunge and its separated components on key differentially expressed genes and proteins related to material and energy metabolism in the liver of heat syndrome model rats using transcriptomics and proteomics technologies, clarify their regulatory roles in material and energy metabolism, and elucidate the nature attribution and internal refined structure of Anemarrhena asphodeloides bunge and its components. Methods: Seventy male SD rats were randomly divided into blank group, heat syndrome model group, decoction group, polysaccharide group, saponin group, ethyl acetate group, and remaining components group, with 10 rats in each group. The heat syndrome model was established by intragastric administration of Euthyrox suspension, and each treatment group was continuously administered for 15 days. Transcriptomics and proteomics were used to examine the effects of Anemarrhena asphodeloides bunge and its components on gene and protein expression profiles in heat syndrome rats. Bioinformatics analysis was employed to investigate the energy metabolism – related pathways involved by each component, and qPCR and Western blotting were used to experimentally validate key differentially expressed genes and proteins. Results: The decoction, polysaccharide, saponin, and remaining components of Anemarrhena asphodeloides bunge significantly or extremely significantly downregulated the protein expression levels of mitochondrial trifunctional enzyme subunit (Hadhb), phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pck1), long – chain fatty acid – CoA ligase 1 (Acsl1), and the gene expression level of enoyl – CoA hydratase/3 – hydroxyacyl – CoA dehydrogenase (Ehhadh) in heat syndrome model rats ($P<0.05$, $P<0.01$), while significantly or extremely significantly upregulated the gene expression levels of stearoyl – CoA desaturase (Scd4) and fatty acid desaturase (Fads2) ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), inhibiting glucose and lipid metabolism and thereby suppressing energy metabolism. The ethyl acetate component showed the opposite trend, significantly upregulating the protein expression levels of Hadhb and Pck1 in heat syndrome model rats ($P<0.05$), promoting glucose and lipid metabolism and thereby enhancing energy metabolism. Conclusion: The decoction, polysaccharide, saponin, and remaining components inhibit energy metabolism and exhibit cold (cool) nature; the ethyl acetate component promotes energy metabolism and exhibits hot (warm) nature.

Key words Cold/hot nature of medicinal; Anemarrhena asphodeloides bunge; Heat syndrome model; Energy metabolism; Proteomics; Transcriptomics