

## 黄芩醇提物干预 *D*-半乳糖致衰老大鼠的尿液代谢组学研究

常艳芬<sup>1,2</sup>, 宫文霞<sup>1,2</sup>, 郑艳红<sup>1,2</sup>, 李建伟<sup>1,3</sup>, 周玉枝<sup>1\*</sup>, 秦雪梅<sup>1</sup>, 杜冠华<sup>1,4\*</sup>

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化学化工学院, 山西 太原 030006;  
3. 山西振东制药股份有限公司, 山西 长治 047100; 4. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 研究黄芩对 *D*-半乳糖致衰老模型大鼠的影响, 初步探讨黄芩的抗衰老作用机制。将 SD 大鼠随机分为 5 组, 即空白组、模型组、黄芩低、中、高剂量 (分别为 50、100 和 200 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, 采用皮下注射 *D*-半乳糖 (100 mg·kg<sup>-1</sup>) 法, 建立亚急性衰老大鼠模型, 并分别评价衰老大鼠的空间学习记忆能力 (Morris water maze) 和自主活动 (open-field test)。采用代谢组学技术对模型大鼠尿液进行 NMR 数据采集并结合多元统计分析, 探讨抗衰老机制。结果表明, 黄芩 3 个剂量均能改善衰老大鼠的行为能力。多元统计分析结果显示, 黄芩低中高剂量组能使衰老大鼠尿液中柠檬酸、丙酮酸、乳酸、泛酸、三甲胺和  $\beta$ -羟基丁酸等 6 个标志物发生不同程度的回调, 主要涉及能量代谢、糖代谢和肠菌代谢等代谢途径的调节, 表明黄芩发挥抗衰老作用与这些途径相关。

**关键词:** 黄芩; 抗衰老; 行为学研究; 代谢组学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2016) 01-0086-07

## Urinary metabolomics study of the effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi ethanol extract on *D*-galactose-induced rats

CHANG Yan-fen<sup>1,2</sup>, GONG Wen-xia<sup>1,2</sup>, ZHENG Yan-hong<sup>1,2</sup>, LI Jian-wei<sup>1,3</sup>,  
ZHOU Yu-zhi<sup>1\*</sup>, QIN Xue-mei<sup>1</sup>, DU Guan-hua<sup>1,4\*</sup>

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Shanxi Zhendong Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhi 047100, China; 4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The purpose of this study is to evaluate the anti-aging effects and reveal the underlying mechanism of *Scutellaria baicalensis* Georgi ethanol extract (SBG) in *D*-galactose-induced rats. Fifty rats were randomly divided into five groups: vehicle control group, *D*-galactose group, and *D*-galactose combined with 50, 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup> SBG. A rat aging model was induced by injecting subcutaneously *D*-galactose (100 mg·kg<sup>-1</sup>) for ten weeks. At the tenth week, the locomotor activity (in open-field test) and the learning and memory abilities (in Morris water maze test) were examined respectively. The urine was collected using metabolic cages and analyzed by high-resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analyses. The SBG at doses of 50, 100 and 200 mg·kg<sup>-1</sup> treatments groups could significantly ameliorate aging process in rats' cognitive performance. The 50, 100, 200 mg·kg<sup>-1</sup> SBG regulated citrate, pyruvate, lactate, trimethylamine (TMA), pantothenate,  $\beta$ -hydroxybutyrate in urine favorably toward the control group. These biochemical changes are related to the disturbance in energy metabolism, glycometabolism and microbiome metabolism, which is helpful

收稿日期: 2015-08-07; 修回日期: 2015-10-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901960); 山西省科技基础条件平台建设项目 (2014091022); 山西省科技攻关项目 (20140313008-14); 山西省重点技术创新项目 [晋财建-(2013)99号].

\*通讯作者 Tel: 86-351-7019178, Fax: 86-351-7011202, E-mail: zhouyuzhi@sxu.edu.cn;  
Tel / Fax: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0597

to further understanding the D-galactose induced aging rats and the therapeutic mechanism of SBG.

**Key words:** *Scutellaria baicalensis*; anti-aging; behavior research; metabolomics

黄芩是唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血和安胎的功效。现代学者对其药理活性的研究主要集中在抗菌、抗病毒、抗炎、抗癌、抗氧化、清除自由基和对缺血再灌注损伤的保护作用<sup>[1-3]</sup>等方面。近年来研究<sup>[4, 5]</sup>表明, 黄芩水提物可以提高快速老化模型小鼠的胸腺指数, 同时可升高小鼠体内抗氧化酶的活性, 黄芩醇提物能改善老年痴呆小鼠体内的氧化损伤、神经炎症和记忆损伤, 但黄芩对 D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究则未见报道。

衰老是机体组织、器官功能随年龄增长而发生的退行性变化<sup>[6]</sup>, 是基因、环境和生活方式等多种因素共同作用的结果。随着年龄增长, 一些疾病例如阿尔茨海默症<sup>[7]</sup>、心血管疾病、2型糖尿病和癌症等发生的风险会明显增加。具有抗衰老活性的天然产物如中药和植物药的应用日益广泛, 这对于抗衰老知识的积累具有重要意义。

代谢组学是研究机体代谢产物谱变化的一种新的系统方法, 可通过揭示新陈代谢动态进程中代谢产物的变化规律, 全面理解病理变化过程及机体内物质的代谢途径。目前, 基于核磁共振 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) 的代谢组学技术已经成为一种强有力的工具, 广泛应用于基础生物学、分子病理学、临床诊断、生物医药和环境科学等领域。由于衰老过程的复杂性, 目前对于衰老的发生机制尚未完全清楚。近年来, 包括代谢组学技术在内的高通量技术的应用, 为衰老的病理生理学机制提供了新的解释, 并且可以在不同物种中鉴定与衰老相关的特异标志物<sup>[8, 9]</sup>。

D-半乳糖致衰老模型目前应用最多, 该模型具有寿命缩短、学习记忆障碍、神经系统退行性改变、免疫力和繁殖力低下等多种衰老表现<sup>[10, 11]</sup>, 在多种器官组织形态及生理生化的许多指标上呈现出与自然衰老相似的改变, 广泛用于衰老机制研究及抗氧化剂、延缓衰老药物的药效学评价。许多研究<sup>[12, 13]</sup>表明, D-半乳糖致衰老大鼠的自发行行为 (旷场实验) 会减少, 空间记忆能力也会有损伤 (水迷宫实验)。

本文拟采用 D-半乳糖致衰老大鼠模型, 通过行为学考察, 验证黄芩的抗衰老作用, 采用基于 <sup>1</sup>H NMR 的代谢组学方法对大鼠尿液代谢物的变化进行测定

分析, 初步阐明黄芩延缓衰老的作用机制, 为黄芩的开发利用提供一定的理论基础。

## 材料与方法

**药材** 黄芩药材购自山西陵川县六泉中药材合作社, 由山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根, 样品保存于山西大学中医药现代研究中心。

**动物** SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (180±20) g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号 SCXK (京) 2012-0001; 动物饲养室保持温度 (23±1.5) °C, 相对湿度 (45±15)%。动物适应 1 周后开始实验。

**仪器与试剂** Bruker 600-MHz AVANCE III 核磁共振检测仪 (德国布鲁克公司); Sartorius BSA124S 分析天平 (德国 Sartorius 公司); Morris 水迷宫 (北京众实迪创公司)。HPLC 分析用甲醇为色谱纯 (Fisher 公司); D-半乳糖 (Amresco 公司), 三甲基硅烷丙酸钠盐 (TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA), NMR 试剂重水 (Norell, Landisville, USA), 娃哈哈纯净水。

**黄芩提取物制备方法** 取黄芩粉末 20 g, 分别用 10 倍量的 60%乙醇和蒸馏水作溶剂回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并两次提取液, 减压回收溶剂, 冷冻干燥得粉末。分别取黄芩水提物和醇提物适量, 按照药典方法测定黄芩苷的含量, 以其含量的高低作为溶剂选择的依据。

**动物实验** 雄性 SD 大鼠 50 只, 随机分为空白组, 模型组, 黄芩低、中、高剂量组, 每组 10 只。模型组与黄芩低、中、高剂量组每天皮下注射 D-半乳糖 100 mg·kg<sup>-1</sup>, 连续 10 周, 空白组注射等体积的生理盐水。黄芩低、中、高剂量组每天分别按剂量 50、100 和 200 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃给药, 空白组与模型组每天灌胃等体积的蒸馏水, 连续 10 周。

## 行为学考察

**旷场实验** 旷场实验于造模第 10 周进行, 参照文献<sup>[14]</sup>, 将大鼠放入自制旷场行为测试箱的中心位置, 适应 2 min 后, 观察 4 min 内大鼠的直立次数、静止时间和穿越格数。

Morris 水迷宫实验 旷场实验结束后, 开始 Morris 水迷宫实验。采用 MT-200 Morris 水迷宫视频跟踪分析系统进行测试, 实验器材由圆形水池和自动录像分析系统两部分组成。圆形水池由不锈钢制成, 直径 120 cm, 高 50 cm。水池被等分为 4 个象限: SW、NW、SE、NE, 水深 30 cm, 平台位于任一象限的中间, 且表面低于水面 1~2 cm。水温保持在 25 左右。池上方的摄像机同步记录大鼠的运动轨迹。经软件分析处理, 得到实验数据。水迷宫实验环境要求安静, 避免一切外界干扰, 保持房间安静, 温度适宜, 光线柔和, 实验期间迷宫外的参照物始终保持不变以供大鼠定位。

实验程序参照 Morris<sup>[15]</sup> 的方法进行, 测试包括: 定位航行实验, 用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力, 即记录其潜伏期。历时 5 天, 训练时随机选择一个象限将大鼠面向池壁放入水中, 迫使大鼠学习寻找设于水面以下的平台。电脑中记录 60 s 内寻找平台所需时间即潜伏期。如果 60 s 内未能找到平台, 可将其引导至平台并在平台停留 20 s, 潜伏期记录为 60 s。每天训练 4 次, 每次训练间隔 10 min。系统自动记录多项参数; 空间探索实验, 用于测量大鼠学会寻找平台后, 对平台空间位置记忆的保持能力。定位航行实验结束后撤去平台, 将大鼠面向池壁任选一个入水点放入水中, 可以记录 60 s 内穿越原平台位置的次数及在目标象限的活动路程和活动时间并进行比较分析。数据收集和处理由 Morris 水迷宫系统软件完成。

样品采集与制备及测定条件 尿样采集与储存: 所有大鼠于第 10 周末晚上 18:00 至第二天早上 8:00 放入代谢笼, 冰上收集尿液, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心, 取上清液, 于 -80 储存。

样品前处理: 解冻样品, 摇匀, 在 4 下 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取尿液 0.4 mL, 置于核磁管, 加 PBS (pH 7.0) 0.2 mL, 再加入 D<sub>2</sub>O 0.1 mL, 放置 10 min, 进行核磁测定。

样品于 600 MHz NMR (25 ) 仪上测定, 采用 NOE-2D Spectroscopy (NOSEY) 脉冲序列。测定频率为 600.13 MHz, 扫描次数为 64, 谱宽 12 345.7 Hz, 脉冲时间 14 s, 采样时间 2.654 s, 延迟时间 1.0 s, 采样数据点 65 536, FID 分辨率 0.188 Hz, 采样间隔 40.5 s, 内标为 TSP。

<sup>1</sup>H NMR 谱图数据处理与分析 核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 进行处理。所有光谱进行手

动相位、基线调整。图谱中, 以 TSP 的化学位移  $\delta$  0.00 为标准进行定标, 以  $\delta$  0.04 对化学位移区间  $\delta$  0.00 ~ 9.40 进行分段积分, 其中  $\delta$  4.60 ~ 5.00 (残余水峰, 尿素峰) 不进行积分, 并将积分数据进行归一化, 导入 Excel 软件中进行下一步多元统计分析。将上述处理的积分数据导入 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Sweden) 软件中进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 再用偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (Orthogonal PLS-DA, OPLS-DA) 找出样品间差异代谢产物。

统计学处理 数据采用 SPSS 17.0 软件处理, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析及  $t$  检验对行为学指标及差异代谢产物进行统计学分析和比较, 以  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  为差异具有显著性。

## 结果

### 1 黄芩提取物提取方法的确定

黄芩提取方法考察结果见表 1, 由表 1 可知, 黄芩醇提物中黄芩苷的含量高于黄芩水提物, 故选择 60%乙醇为提取溶剂。

**Table 1** Comparison of different extraction methods of *Scutellaria baicalensis* Georgi. The content of baicalin was compared with raw material

Extract	Yield ratio/%	Content of baicalin/%
Water	52.17	8.89
Ethanol	50.05	11.46

## 2 动物实验

### 2.1 外表观察

造模 10 周后, 大鼠出现毛色枯槁无光泽、皮肤弹性差、精神萎靡、倦怠嗜睡、进食明显减少、形体瘦弱、行动迟缓等衰老体征。

### 2.2 旷场实验

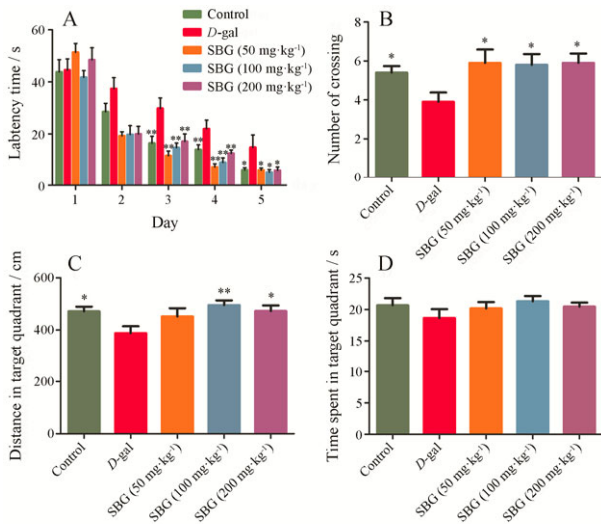
旷场反映了大鼠在新环境中的探索能力和自主行为以及紧张恐惧状态<sup>[16,17]</sup>。与空白组相比, 模型组大鼠穿越格数和直立次数明显偏少 ( $P < 0.05$ ), 表明 D-半乳糖致衰老大鼠的运动能力和探索能力下降, 模型复制成功。连续给予黄芩干预后, 与模型组相比, 黄芩中、高剂量组大鼠的穿越格数与直立次数明显增强 ( $P < 0.05$ ), 表明黄芩能明显改善衰老大鼠的自发行为。

### 2.3 Morris 水迷宫

水迷宫实验主要通过定位航行和空间探索两部

分实验考察大鼠的空间学习记忆能力<sup>[18,19]</sup>。图 1A 反映了定位航行实验第 1~5 天各组大鼠的潜伏期变化,从实验第 3 天开始,模型组与正常对照组比较显示,潜伏期明显延长 ( $P<0.05$ ),黄芩各剂量治疗组潜伏期较模型组缩短,其差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

对空间探索实验中大鼠穿越站台的次数(图 1B),目标象限内的活动距离(图 1C)和活动时间(图 1D)进行了分析。模型组与空白组相比,穿越站台次数与目标象限活动路程都明显缩短 ( $P<0.05$ ),表明造模成功。黄芩各剂量组的穿越站台次数与模型组相比都明显增加 ( $P<0.05$ ),对于目标象限活动路程,黄芩中、高剂量组与模型组相比均显著增加,其中黄芩中剂量组与模型组有极显著差异 ( $P<0.01$ )。模型组与空白组及各给药组相比,目标象限内的活动时间无显著性差异,但有降低的趋势。



**Figure 1** Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi ethanol extract (SBG) on the spatial learning and memory of rats in the Morris water maze test. Mean latency in the hidden platform test during five consecutive days of training (A). The number of crossings over the exact location of the former platform on probe test (B), the swimming distance in the target quadrant on probe test (C), the time spent in the target quadrant on probe test (D).  $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs model group

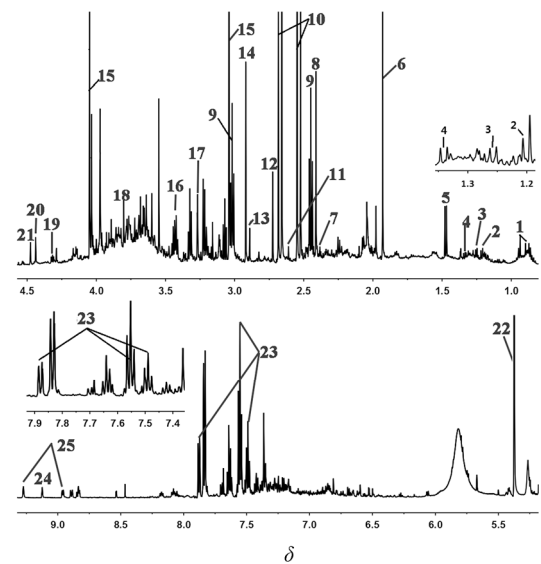
## 2.4 尿液代谢组学

**2.4.1 尿液核磁图谱分析** 参照文献报道、结合公共数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、BMRB (<http://www.bmrbl.wisc.edu/>),对图谱中的主要化合物进行归属,结果在大鼠尿液中共指认出 25 种内源性代谢产物,包括氨基酸、脂质以及有机酸等,如表 2 所示。代谢产物化学信号归属如图 2 所示。

**2.4.2 多元统计分析** 为了分析各组间代谢产物的差异,对实验所得的复杂数据通过降维处理进行多

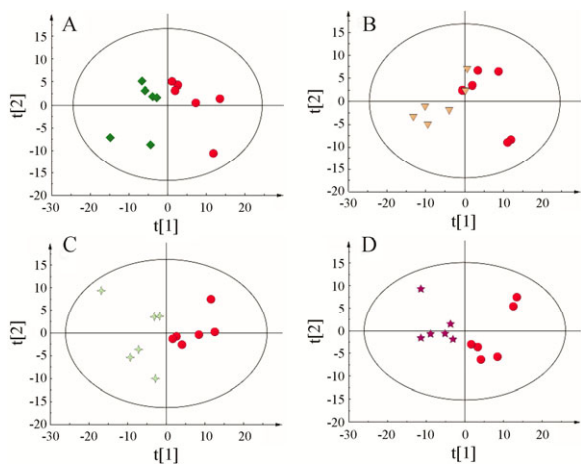
**Table 2**  $^1\text{H}$  NMR assignments of major metabolites from rat urine. TMA: Trimethylamine

No.	Metabolite	Moiety	$\delta$ $^1\text{H}$ (multiplicity)
1	Pantothenate	$\text{CH}_3, \text{CH}_3$	0.94 (s), 0.90 (s)
2	<i>B</i> -Hydroxyisovalerate	$\text{CH}_3$	1.21 (s)
3	<i>B</i> -Hydroxybutyrate	$\text{CH}_3$	1.24 (d) ( $J=6.6$ )
4	Lactate	$\beta\text{CH}_3$	1.33 (d) ( $J=7.2$ )
5	Alanine	$\beta\text{CH}_3$	1.48 (d) ( $J=7.2$ )
6	Acetate	$\text{CH}_3$	1.92 (s)
7	Pyruvate	$\text{CH}_3$	2.37 (s)
8	Succinate	$\text{CH}_2$	2.41 (s)
9	$\alpha$ -Ketoglutarate	$\alpha\text{CH}_2, \beta\text{CH}_2$	2.44 (t), 3.01 (t)
10	Citrate	half $\text{CH}_2$ , half $\text{CH}_2$	2.54 (d), 2.70 (d)
11	Methylamine	$\text{CH}_3$	2.61 (s)
12	Dimethylamine	$\text{CH}_3$	2.73 (s)
13	TMA	$\text{CH}_3$	2.88 (s)
14	Dimethylglycine	$\text{N-CH}_3$	2.92 (s)
15	Creatinine	$\text{CH}_3, \text{CH}_2$	3.04 (s), 4.06 (s)
16	Taurine	$\text{N-CH}_2$	3.42 (t)
17	Betaine	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.27 (s)
18	Guanidinoacetate	$\text{CH}_2$	3.80 (s)
19	Malate	$\text{CH}$	4.31 (dd)
20	<i>N</i> -Methylnicotinate	$\text{N-CH}_3$	4.44 (s)
21	1-Methylnicotinamide	$\text{CH}_3$	4.48 (s)
22	Allantoin	$\text{CH}$	5.38 (s)
23	Hippurate	$\text{CH}, \text{CH}, \text{CH}$	7.56 (t), 7.49 (t), 7.87 (d)
24	Trigonelline	1- $\text{CH}$	9.13 (s)
25	<i>N</i> -Methylnicotinamide	2- $\text{CH}, 4\text{-CH}$	9.29 (s), 8.97 (d)



**Figure 2** Typical  $^1\text{H}$  NMR spectrum of control rat urine

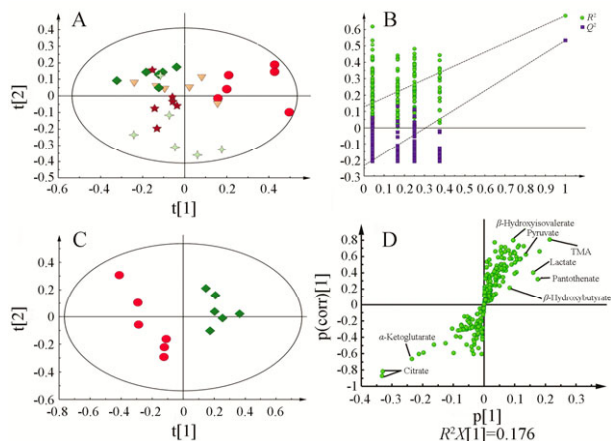
元统计分析。首先应用 PCA 分别对模型组与空白组、黄芩(低、中、高剂量)组进行单独分析,结果如图 3 所示。由图 3 可知,模型组与空白组明显分开,说明造模成功。模型组与黄芩低剂量组有部分重叠,而黄芩中、高剂量组与模型组明显区分,说明黄芩中、高



**Figure 3** PCA scores plot (A) of control group (◆) and model group (●), PCA scores plot (B) of model group and SBG (50 mg·kg<sup>-1</sup>) group (▽), PCA scores plot (C) of model group and SBG (100 mg·kg<sup>-1</sup>) group (☆), PCA scores plot (D) of model group and SBG (200 mg·kg<sup>-1</sup>) group (★)

剂量比黄芩低剂量对 *D*-半乳糖致衰老大鼠代谢轮廓的影响更明显。PCA 作为无监督的分析方法，只反映了数据的原始状态，但在实验过程中，环境、饮食等因素，以及实验的一些系统误差都会影响实验结果。为了过滤与实验目的不相关因素所引起的代谢变化，获得更为准确的结果，本研究采用有监督的 PLS-DA 分析和 OPLS-DA 分析对数据进行进一步处理。

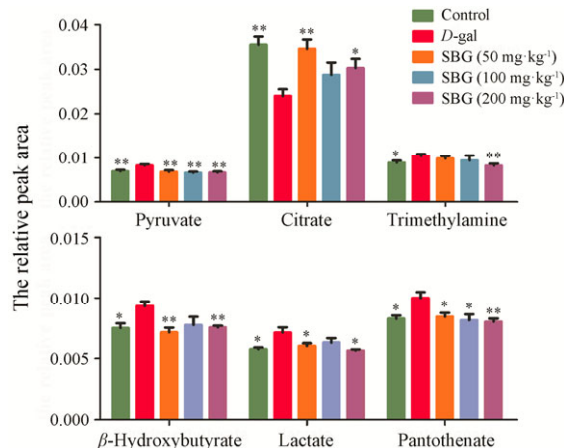
应用 PLS-DA 方法对所有尿液样本数据矩阵进行统计分析，结果如图 4A 所示，模型组与空白组明显区分，黄芩低剂量组与模型组有部分重叠，黄芩中、高剂量组均与模型组明显区分，但黄芩中剂量组内差异较大，黄芩高剂量组与空白组更为接近。外部模型验证



**Figure 4** PLS-DA (A) and corresponding validation plot (B) derived from <sup>1</sup>H NMR spectra of urine from rats in control group (◆), model group (●), SBG (50 mg·kg<sup>-1</sup>) group (▽), SBG (100 mg·kg<sup>-1</sup>) group (☆) and SBG (200 mg·kg<sup>-1</sup>) group (★). OPLS scores plot (C) and corresponding S-plot (D) of the control group and model group

方法 (排列实验) 常用于模型有效性判定。由图 4B 可见，两条回归线斜率较大，左端任何一次随机排列产生的 R<sup>2</sup> 和 Q<sup>2</sup> 均小于右端，且最右端的两个值差距较小，说明原始模型的预测能力大于任何一次随机排列 y 变量的预测能力，证明模型有效，可进一步分析。

为了最大程度确定造模前后大鼠尿液中内源性代谢产物发生的差异，采用 OPLS-DA 分析对模型组与空白组分析，得到 OPLS-DA 得分图 (4C) 和 S-plot 图 (4D)。通过 S-plot 结合 VIP 值 (>1) 寻找差异代谢物，并对这些代谢物所属的相对峰面积进行独立 t 检验，从而得到 8 个峰面积具有显著性差异的潜在生物标志物。与空白组比较，模型组大鼠尿液中乳酸、三甲胺、泛酸、丙酮酸、β-羟基丁酸和 β-羟基戊酸升高，而柠檬酸和 α-酮戊二酸下降。给予黄芩干预后，黄芩低、中、高剂量组大鼠尿液中丙酮酸、柠檬酸、三甲胺、β-羟基丁酸、乳酸和泛酸等 6 种潜在的生物标志物均得到了不同程度的回调，黄芩中剂量组对柠檬酸、乳酸和 β-羟基丁酸等生物标志物的回调程度低于黄芩低剂量组，可能与黄芩中剂量组的组内差异大有关，黄芩高剂量组干预后，生物标志物的水平更接近正常组，结果如图 5 所示。



**Figure 5** The relative peak area of potential biomarkers in urine of rats. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs model group

### 讨论

本研究复制了衰老模型，使大鼠明显出现了以学习记忆能力下降为主要表现的认知功能障碍。

尿液是机体整体代谢终产物输出的主要途径之一，尿液中代谢物的变化不仅能够反映机体整体代谢的特征，还可能是局部组织或器官功能异常的外在表现。本研究采用 <sup>1</sup>H NMR 分析手段检测出 20 多种尿液中代谢产物，主要包括脂肪酸类、氨基酸类和



有机酸类等代谢产物。

本研究进行组间两两比较发现, 柠檬酸、乳酸、泛酸、三甲胺、 $\alpha$ -酮戊二酸、丙酮酸、 $\beta$ -羟基异戊酸和  $\beta$ -羟基丁酸受 D-半乳糖影响较大, 可能为 D-半乳糖致衰老模型的潜在生物标志物。给予黄芩干预后, 柠檬酸、乳酸、泛酸、丙酮酸、三甲胺和  $\beta$ -羟基丁酸有不同程度的回调, 其中以黄芩高剂量效果最为显著。

通过对潜在生物标志物分析, 发现黄芩延缓衰老主要涉及两条代谢路径: 三羧酸 (TCA) 循环和丙酮酸代谢。TCA 循环产生的 ATP 是组织细胞能利用的主要能源来源, 在这一过程中产生的 ATP 都是经由呼吸链产生的, 模型组中 TCA 循环的中间体柠檬酸和  $\alpha$ -酮戊二酸均降低, 说明机体衰老也使得 TCA 能量代谢水平降低, 其中间代谢物水平也相应降低。研究<sup>[20-23]</sup>表明, 如果与能量代谢相关的基因下调会造成能量产生减少, 损伤 ATP 依赖的下游过程, 如突触结构和功能的完整, 泛素依赖的蛋白降解途径, 而这两者都在阿尔茨海默症 (AD) 中受影响。

丙酮酸是体内产生的三碳酮酸, 在三大营养物质的代谢联系中起着重要的枢纽作用<sup>[24]</sup>。丙酮酸的变化对于评价体内炎症发生有重要的作用。在炎症时, 即使有氧条件下机体优先进行丙酮酸转化为乳酸的代谢, 这种现象被称为有氧糖酵解或 Warburg 效应<sup>[25]</sup>。丙酮酸的变化与糖酵解及 TCA 循环等密切相关。D-半乳糖刺激时, 丙酮酸明显增加, 其原因是糖酵解和 TCA 循环发生障碍。黄芩可以降低尿液中丙酮酸的含量, 使糖酵解和 TCA 循环代谢恢复。

丙酮酸代谢和 TCA 循环都发生在线粒体内, 这就提示黄芩可能通过代谢路径的调节促进线粒体呼吸, 保护线粒体功能, 最终与延缓衰老有关。线粒体广泛分布于各种真核细胞内, 是进行氧化代谢的部位, 是糖类、脂肪和氨基酸代谢释放能量的场所。除为细胞活动提供能量外, 线粒体还参与一些重要代谢通路, 参与细胞凋亡、信号转导调控等生化功能, 大量实验研究表明线粒体在衰老进程中发挥着至关重要的作用。

与空白组相比, 模型组中乳酸含量升高。在认知严重损伤的犬和早发性 AD 患者中也出现类似的结果, 乳酸含量是正常组的 4 倍<sup>[26]</sup>。乳酸水平的升高不仅说明糖异生、碳水化合物和能量代谢发生变化, 还说明脑中糖代谢损伤, 这是造成认知损伤的一部分原因。此结果与行为学结果吻合。

三甲胺是由胆碱和肉碱在肠道细菌酶作用下的

降解产物, 肠道菌群代谢的改变与衰老相关的疾病有关<sup>[27-29]</sup>。模型组三甲胺含量升高, 表明随着年龄的增长, 肠道菌群代谢会发生紊乱。而黄芩高剂量可以降低三甲胺含量, 说明黄芩发挥抗衰老作用与调节肠道菌群的正常代谢有关。

本研究结果表明, 黄芩对衰老大鼠的记忆损伤及自发行为的下降均有改善, 黄芩延缓衰老的作用机制可能与调节能量代谢、糖代谢和肠菌代谢等代谢途径有关。

## References

- [1] Huang WH, Lee AR, Yang CH. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxy flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70: 2371-2380.
- [2] Zhang Y, Wang X, Xu Z, et al. Protective effect of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi on cerebral ischemia injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108: 355-360.
- [3] Yoon SB, Lee YJ, Park SK, et al. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125: 286-290.
- [4] Wang L, Liang RX, Yang B, et al. Research on anti-senile action of aqueous extract of *Scutellaria* and *Carthamus tinctorius* in senescence accelerated mouse [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 159-161.
- [5] Jeong K, Shin YC, Park S, et al. Ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi prevents oxidative damage and neuroinflammation and memorial impairments in artificial senescence mice [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 14-25.
- [6] Tumhe IM, Klau S. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly [J]. *Exp Gerontol*, 2003, 38: 843-853.
- [7] Cole GM, Lim GP, Yang F, et al. Prevention of Alzheimer's disease: omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions [J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26: 133-136.
- [8] Cevenini E, Bellavista E, Tieri P, et al. Systems biology and longevity: an emerging approach to identify innovative anti-aging targets and strategies [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 802-813.
- [9] Mishur RJ, Rea SL. Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: detection of biomarkers of aging and of age-related diseases [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2012, 31: 70-95.
- [10] Kumar A, Dogra S, Prakash A. Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage

- against *D*-galactose induced senescence in mice [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009, 380: 431–441.
- [11] Wei H, Li L, Song Q, et al. Behavioural study of the *D*-galactose induced aging model in C57BL/6J mice [J]. Behav Brain Res, 2005, 157: 245–251.
- [12] Wang C, He L, Yan M, et al. Effects of polyphenols from pine needles of *Pinus massoniana* on ameliorating cognitive impairment in a *D*-galactose-induced mouse model [J]. Age, 2014, 36: 1–11.
- [13] Sun SW, Yu HQ, Zhang H, et al. Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in *D*-galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity [J]. Nutr Res, 2007, 27: 169–175.
- [14] Jia GC, Zheng XY, Zhou YZ, et al. Effect of Xiaoyaosan on chronic unpredictable mild stress model in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2011, 17: 136–140.
- [15] Fotuhi M, Do D, Jack C. Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing [J]. Nat Rev Neurol, 2012, 8: 189–202.
- [16] Marchei P, Diverio S, Falocci NC. Breed differences in behavioural development in kittens [J]. Physiol Behav, 2009, 96: 522–531.
- [17] Lei M, Zhu Z, Wen Z, et al. Impairments of tight junctions are involved in *D*-galactose-induced brain aging [J]. Neuroreport, 2013, 24: 671–676.
- [18] Yamaguchi Y, Miyashita H, Tsunekawa H, et al. Effects of a novel cognitive enhancer, spiro[imidazo-[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3*H*)-one (ZSET1446), on learning impairments induced by amyloid- $\beta_{1-40}$  in the rat [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317: 1079–1087.
- [19] Lee CL, Kuo TF, Wang JJ, et al. Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroven-tricular amyloid  $\beta$ -infused rat by repressing amyloid  $\beta$  accumulation [J]. J Neurosci Res, 2007, 85: 3171–3182.
- [20] DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity [J]. Ann Neurol, 1990, 27: 457–464.
- [21] Masliah E, Mallory M, Alford M, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease [J]. Neurology, 2001, 56: 127–129.
- [22] Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease [J]. Science, 1987, 235: 1641–1644.
- [23] Yao PJ, Zhu M, Pyun EI, et al. Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Dis, 2003, 12: 97–109.
- [24] Zierhut ML, Yen YF, Chen AP, et al. Kinetic modeling of hyperpolarized 13-pyruvate metabolism in normal rats and TRAMP mice [J]. J Magn Reson, 2010, 202: 85–92.
- [25] Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 23111–23115.
- [26] Hoyer S, Oesterreich K, Wagner O. Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type? [J]. J Neurol, 1988, 235: 143–148.
- [27] Liu XJ, Zhou YZ, Li ZF, et al. Anti-depressant effects of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress: a plasma metabolomics study based on NMR spectroscopy [J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64: 578–588.
- [28] Biagi E, Nylund L, Candela M, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians [J]. PLoS One, 2010, 5: e10667.
- [29] Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing [J]. J Appl Microbiol, 2007, 102: 1178–1186.