

基于 UPLC-QqQ-MS/MS 探究人参属中药对甲亢大鼠胆汁酸成分代谢影响

刘琳琳, 金墨竹, 窦德强

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 本文建立了超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-QqQ-MS/MS)法测定甲亢大鼠血清中胆汁酸各成分含量,并探讨不同药性人参属中药对甲亢高代谢的作用及其生物标志物,以及胆汁酸含量与甲状腺功能的相关性。首先,采用 UPLC-QqQ-MS/MS 检测甲亢及各给药组大鼠血清中去氧胆酸、鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸、胆酸、甘氨胆酸、牛磺猪去氧胆酸、牛磺猪胆酸、牛磺胆酸的含量,然后采用多元分析法(PCA)分析各组胆汁酸成分,归属人参属中药药性及不同药性中药调节胆汁酸的生物标志物,并利用 Spearman 检验进行胆汁酸水平与甲状腺功能的相关性分析。结果表明,与空白组相比,甲亢大鼠血清中去氧胆酸、鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸、胆酸含量均降低,给予黄柏、人参叶后胆酸含量升高。胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸可作为寒、凉性中药(黄柏、人参叶)调节胆汁酸的生物标志物;甘氨胆酸、去氧胆酸、牛磺胆酸可作为温性中药(人参、红参、黑参)调节胆汁酸的生物标志物。甲状腺素(T₄)水平与去氧胆酸呈显著负相关;三碘甲状腺原氨酸(T₃)水平与猪去氧胆酸、甘氨胆酸、牛磺猪去氧胆酸、牛磺猪胆酸和牛磺胆酸均呈显著负相关。该方法准确、灵敏、高效,可用于血清中胆汁酸水平的测定,胆汁酸水平异常与甲状腺激素有关,不同药性中药通过不同胆汁酸代谢作用于甲亢大鼠。

关键词: 甲亢;胆汁酸;超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-QqQ-MS/MS);人参;定量分析;Spearman 检验

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2023)04-0567-09

doi:10.7538/zpxb.2022.0188

UPLC-QqQ-MS/MS-based Quantitative Analysis on Bile Acid in Hyperthyroidism Rats to Explore the Effects of Ginseng Herbs

LIU Lin-lin, JIN Mo-zhu, DOU De-qiang

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract: A method of ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS) was developed to determine the contents of deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, hyodeoxycholic acid, cholic acid, glycinecholic acid, taurocholic acid, tauroporic deoxycholic acid, taurocholic acid in the serum of rats with hyperthyroidism and each administration group. The separation of

compounds was carried out on an Agilent zorbax SB-C18 column (100 mm×2.1 mm×1.8 μm). The mobile phase was 0.1% formic acid in acetonitrile and 0.1% formic acid in the water, the flow rate was 0.4 mL/min, the injection volume was 5 μL. The mass spectrometry was determined by electrospray ionization in negative ion mode, and was scanned by multiple response monitoring mode. The ion scanning range was m/z 50-1 000, with a capillary voltage of 3.5 kV, ion source temperature of 150 °C, atomization gas flow rate of 50 L/h, desolvation gas flow rate of 800 L/h, desolvation temperature of 250 °C. Multivariate analysis method of principal component analysis (PCA) was used to analyze the content of bile acids in each group, which identified the nature of ginseng and biomarkers of bile acids that regulated the cold and hot nature of ginseng. Spearman was used to analyze the correlation between bile acid level and thyroid function. The results showed that the calibration curves of 8 bile acids were linear in the quantitative range. The average recoveries of bile acid isotopes ranged from 82.71% to 104.05% and the coefficients of variation were all less than 15%. Compared with the blank control group, the contents of deoxycholic acid, goose deoxycholic acid, porcine deoxycholic acid, and cholic acid in the serum of hyperthyroidism rats decreased, and the content of primary bile acid-cholic acid increased after administration of *Phellodendrina chinense* and ginseng leaves. The cholic acid, deoxycholic acid, and goose deoxycholic acid can be used as the biomarkers for regulating bile acids in cold and cool nature herbs, and glycine cholic acid, deoxycholic acid, and taurocholic acid can be used as the biomarkers for regulating bile acids in warm nature herbs. The level of thyroxine (T4) was negatively correlated with deoxycholic acid. The level of *tri*-iodothyronine (T3) was negatively correlated with porcine deoxycholic acid, glycine cholic acid, taurocholic acid, taurocholic acid, and taurocholic acid. The UPLC-QqQ-MS/MS method has the advantages of simple operation, high sensitivity, and strong multiplexing detection capability, which can be used to determine the content of serum bile acid. The abnormal level of bile acid is associated with thyroid hormone to a certain extent.

Key words: hyperthyroidism; bile acids; ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS); ginseng; quantitative analysis; spearman analysis

甲状腺功能亢进症(简称“甲亢”)是由多种原因导致机体内甲状腺处于高功能状态,其特征为能量和物质代谢增强,属于中医热证范畴^[1]。胆汁酸是胆固醇代谢的主要产物之一,其主要作用是消化脂肪^[2]。脂肪分为白色脂肪和褐色脂肪,白色脂肪是以脂肪形式贮存能量,褐色脂肪则通过生热作用增加产热以消耗能量。胆汁酸能够激活 G 蛋白偶联受体 TGR5,从而通过环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)依赖的甲状腺激素来激活 II 型碘化甲状腺氨酸脱碘酶(type 2 iodothyronine deiodinase, D2),最终增加 D2 在褐色脂

肪和骨骼肌等产热组织中的表达,促使甲状腺素(T4)转变为三碘甲状腺原氨酸(T3),进而 T3 诱导产热蛋白表达以增加产热,同时, D2 受促甲状腺激素(TSH)受体 cAMP 的调节^[3]。因此,通过激活胆汁酸(Bas)-TGR5-cAMP-D2-T3-解偶联蛋白(UCP)信号通路,可降低三磷酸腺苷(ATP)合成,保持能量代谢的动态平衡^[4]。有研究表明,人体产生过量的甲状腺激素会抑制 CYP8B1 的表达,进而导致胆酸合成减少^[5]。甲状腺功能亢进患者血清中初级胆汁酸浓度均降低^[6]。TSH 由腺垂体促甲状腺激素细胞分泌,与甲状腺滤泡细胞质膜上的 TSH

受体结合调节甲状腺功能^[7]。TSH 的产生和释放受血液中甲状腺激素水平的控制,它是通过垂体-下丘脑-甲状腺轴的负反馈机制实现的。作为胆酸经肠道细菌作用的产物,去氧胆酸浓度与 TSH 浓度呈正相关。

本课题组前期研究表明^[8],促进机体能量、物质代谢的中药具有热或温性,抑制机体能量、物质代谢的中药具有寒或凉性。《中国药典》中收录的人参属中药红参、人参、西洋参、人参叶等 4 味中药的主要有效成分均为人参皂苷,但皂苷的种类和比例有差别,它们的药味、归经、功能和主治相似,主要区别是药性(气)不同。目前,尚未阐明在甲状腺功能亢进状态下,甲状腺激素和不同药性人参属中药对胆汁酸的调节作用。已建立的胆汁酸测定方法有酶测定法、酶联免疫吸附测定法、薄层色谱法、高效液相色谱(HPLC)法、气相色谱-质谱(GC-MS)法和液相色谱-质谱(LC-MS)法等^[9-10]。其中,酶测定法和酶联免疫吸附测定法(ELISA)具有快速、方便、简单等特点,但特异性低、检出限高;薄层色谱法仅适用于定性分析,不能准确检测胆汁酸的含量;HPLC、GC-MS 和 LC-MS 具有较高的灵敏度和特异性,但 HPLC 和 GC-MS 的样品制备过程复杂,有时需要衍生化。

本研究以典型寒性药物黄柏为参照,建立 UPLC-QqQ-MS/MS 法分析比较正常大鼠、甲亢大鼠血清和不同药性人参属中药给药甲亢大鼠的不同胆汁酸成分含量差异,进一步探讨胆汁酸代谢产物与甲状腺功能的相关性及不同药性人参属中药对甲亢高代谢的改善作用。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

ACQUITY I-CLASS 型 UPLC 仪、XEVO G2-XS 型 UPLC-MS 仪:均为美国 Waters 公司产品;AE240 型十万分之一分析天平:瑞士 Mettler-Toledo 公司产品。

1.2 样品与试剂

牛血清白蛋白(CR2101013):赛维尔生物科技有限公司产品;甲酸、甲醇、乙腈:美国 TEDIA 公司产品;去氧胆酸(J06022AS)、鹅去氧胆酸(A0221AS)、猪去氧胆酸(D1017AS)、胆酸(J0622AS)、甘氨酸(J0115AS)标准品:大连美仑

生物公司产品;牛磺猪去氧胆酸(B16A10K94146)标准品:上海源叶生物科技有限公司产品;牛磺胆酸、牛磺猪胆酸标准品:由本实验室提供;地塞米松(N81476-250 mg):麦克林生物科技有限公司产品;水为超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制 混标中各胆汁酸浓度:去氧胆酸 40.29 mg/L、鹅去氧胆酸 47.94 mg/L、猪去氧胆酸 38.53 mg/L、胆酸 50.29 mg/L、牛磺猪去氧胆酸 36.18 mg/L、甘氨酸胆酸 27.64 mg/L、牛磺猪胆酸 29.41 mg/L、牛磺胆酸 33.53 mg/L。精密量取混标,并将其逐级稀释 5、20、80、160、320、640、1 280、2 560 倍。

标准内标溶液:取适量内标物地塞米松,用甲醇定容至 1.38 mg/L。

质控样品溶液:将 2 g 牛血清白蛋白(BSA)溶于 50 mL 磷酸盐缓冲液中,制备 BSA 溶液,即空白血清。

1.3.2 动物分组及给药方法 选取 63 只雄性 SD 大鼠,随机分成空白组(CON)、甲亢模型组(MOD)、人参 8 倍水煎液组(GS)、红参 8 倍水煎液组(RG)、黑参 8 倍水煎液组(BG)、人参叶 8 倍水煎液组(GL)、黄柏 8 倍水煎液组(HB)共 7 组,每组 9 只。实验前,将大鼠在实验室条件下适应 3 天,除空白组外,各组大鼠每日灌胃生理盐水配制的 12 mg/L 优甲乐混悬液(给药量 240 μ g/kg)。造模第 8 天给予造模药物 4 h 后,给予对应药物(人参组、红参组、黑参组、人参叶组、黄柏组折合生药量分别为 6.64、6.64、6.64、6.64、6.64 g/kg)灌胃,连续 28 天。空白对照组和甲亢模型组给予等量蒸馏水,给药量 10 mL/kg,持续 21 天。

1.3.3 样品处理 精密吸取 300 μ L 大鼠血清于 2 mL EP 管,加入 10 μ L 标准内标溶液,按体积比 1 : 4 加入预冷的甲醇-乙腈溶液(1 : 1,V/V),在 4 $^{\circ}$ C 高速冷冻机中以 8 000 r/min 离心 15 min。取 1 300 μ L 上清液,用氮气吹干,再用 75 μ L 乙腈-水溶液(1 : 1,V/V)重构,在 4 $^{\circ}$ C 冷冻离心机中离心 15 min,取上清液直接进样。

精密吸取 300 μ L 标准工作溶液于 300 μ L 空白血清中,其余步骤同 1.3.3 节,制备标准曲线工作溶液。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 ZORBAX SB-C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm × 1.8 μm); 进样量 5 μL; 流速 0.4 mL/min; 柱温 35 °C; 流动相: A 为 0.1% 甲酸乙腈溶液, B 为 0.1% 甲酸水溶液; 梯度洗脱程序: 0~6 min (65%~45% B), 6~9 min (45%~20% B), 9~11 min (20%~0% B), 11~11.01 min (0%~65% B), 11.01~14 min (65% B)。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式; 质量扫描范围 m/z 50~1 000; 源温度 150 °C; 毛细管电离电压 3.5 kV; 脱溶剂温度 250 °C; 脱溶剂气流速 800 L/h; 锥孔气体流速 50 L/h; 多反应监测 (MRM) 模式。

1.5 方法学考察

1.5.1 检出限与定量限 精密吸取适量的 1.3.1 节配制的混合对照品溶液, 按 1.3.3 节方法处理后进样分析, 重复进样 6 次。分别以 3 倍和 10 倍信噪比确定检出限和定量限。

1.5.2 线性关系 将胆汁酸混合标准储备液逐级稀释成 9 种浓度, 分别精密吸取 300 μL 各标准工作溶液于 300 μL 空白血清中, 按 1.3.3 节方法处理后进样分析。以标准品浓度为横坐标, 以不同浓度标准品的峰面积与对应内标峰面积的比值为纵坐标, 绘制标准曲线, 拟合得到回归方程。

1.5.3 精密度、稳定性、加样回收率和基质效应 精密吸取适量的标准工作液, 按 1.3.3 节方法处理后, 对同一标准工作液连续进样 6 次, 分别计算各目标峰面积与内标峰面积比值的相对标准偏差。

精密吸取同一供试品溶液, 在室温下放置 0、4、8、12、24 h 后, 按 1.3.3 节方法处理后进样分析。将同一供试品溶液于 -80 °C 冰箱中存放 1、2、4、7 天后, 按 1.3.3 节方法处理后进样分析, 记录各目标物与内标物的峰面积比值, 根据当日工作曲线, 计算各胆汁酸浓度, 以浓度的相对标准偏差来评价稳定性。

取 300 μL 已知各胆汁酸含量的血清样品, 按照该样品中各胆汁酸含量的 80%、100%、120% 分别加入适量的对照品储备液和内标, 按 1.3.3 节方法处理后进样分析, 计算各胆汁酸的含量, 按照回收率 (%) = (对照品检出量 - 已

知对照品量) / 加入对照品量 × 100%, 计算回收率和相对标准偏差。

取覆盖标准曲线范围的低、中、高 3 种浓度的标准工作液, 按 1.3.3 节方法处理后进样分析, 得到峰面积 (A); 将低、中、高浓度的标准溶液 (以乙腈-水溶液 (1:1, V/V) 为溶剂) 直接进样分析, 得到峰面积 (B)。A 与 B 的比值为基质效应。

1.6 大鼠血清中胆汁酸含量的测定

取各组大鼠血清, 按 1.3.3 节方法处理后进样分析, 根据随行工作曲线计算胆汁酸浓度。

2 不同药性人参属中药在胆汁酸代谢中生物标志物的识别

利用 PCA 分析软件 SIMCA-P 对各组胆汁酸含量数据进行整体趋向分析, 以空白组、模型组、黄柏组 (阳性药) 为基准组, 各给药组与基准组之间的距离为主要因素, 各给药组图形离散程度为次要因素, 探究不同药性人参属中药的差异。在 OPLS-DA 模型下, 计算相应主成分的 VIP 值, 一般选取阈值大于 1 的物质作为经模式识别分析后的生物标志物。

3 统计学分析

实验结果使用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示, 并使用 SPSS 17.0 软件统计分析。对于满足正态性及方差齐性的组别, 采用最小显著差异 (LSD) 法比较多组之间的差异; 对于方差不齐的组别, 采用 Dunnett T3 方法进行多组之间的两两差异比较, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。采用 Spearman 检验分析差异胆汁酸代谢物浓度与甲状腺功能的相关性, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

4 结果与讨论

4.1 UPLC-QqQ-MS/MS 检测结果

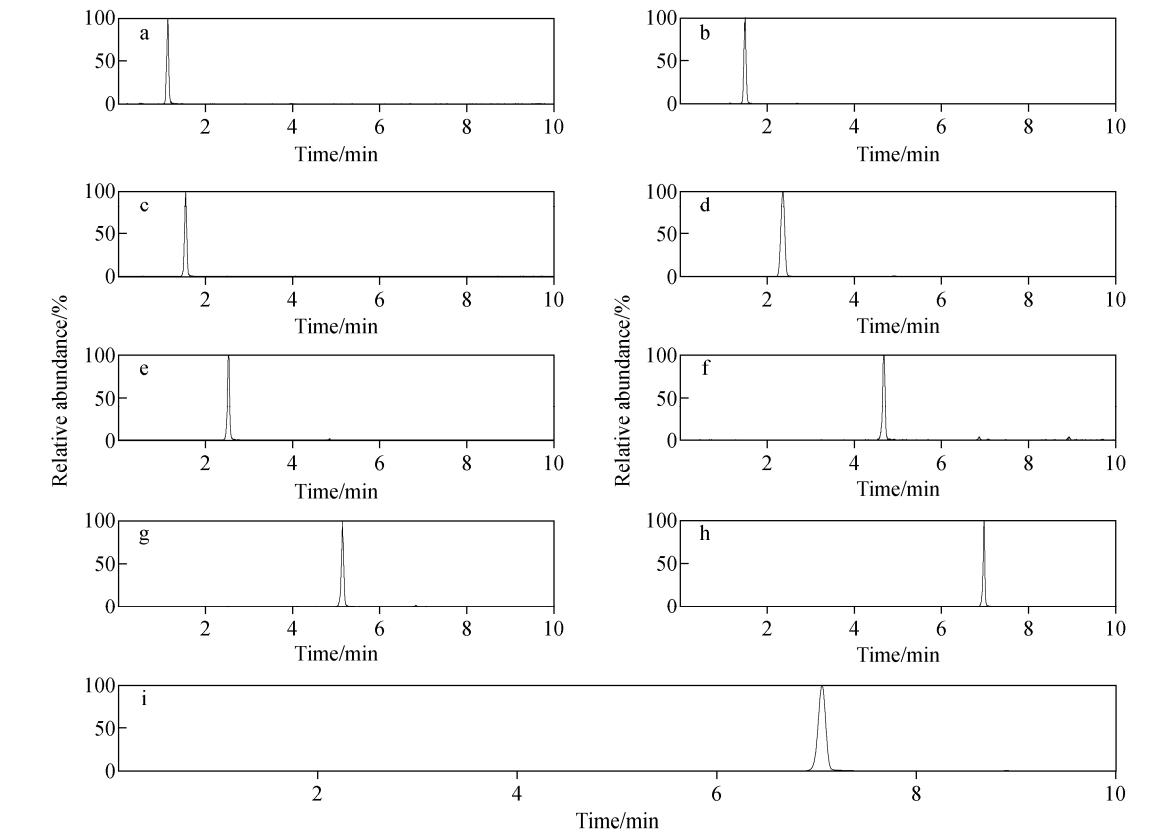
针对每种目标化合物优化的 UPLC-QqQ-MS/MS 检测条件列于表 1。MRM 模式下胆汁酸混标溶液的色谱图示于图 1。

4.2 方法学考察

4.2.1 检出限与定量限 实验考察方法的检出限和定量限分别为 1.00~1.91 μg/L 和 3.36~6.55 μg/L, 结果列于表 2。

表 1 8 种胆汁酸的监测离子对优化参数
Table 1 Parameters of 8 kinds of bile acids

化合物 Compound	分子式 Formula	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	子离子 Daughter ion (<i>m/z</i>)	碰撞电压 Collision energy/eV	锥孔电压 Cone voltage/V	保留时间 Retention time/min
牛磺猪胆酸	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	514.28	80.10	74	100	1.15
牛磺猪去氧胆酸	C ₂₆ H ₄₄ NO ₆ S	498.28	80.10	64	100	1.49
牛磺胆酸	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	514.40	80.10	74	100	1.55
内标(地塞米松)	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	437.20	361.0	27	75	2.37
甘氨酸胆酸	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	464.40	74.00	42	72	2.54
胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	407.28	343.30	36	78	4.68
猪去氧胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	391.40	391.40	30	80	5.15
鹅去氧胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	391.40	391.40	30	80	6.97
去氧胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	391.28	345.80	34	78	7.06



注:a. 牛磺猪胆酸;b. 牛磺猪去氧胆酸;c. 牛磺胆酸;d. 内标(地塞米松);e. 甘氨酸胆酸;
f. 胆酸;g. 猪去氧胆酸;h. 鹅去氧胆酸;i. 去氧胆酸

图 1 各胆汁酸成分多反应监测色谱图

Fig. 1 Multiple reaction monitoring chromatograms of various constituents of bile acids

表 2 8 种胆汁酸的定量限、检出限

Table 2 Limit of quantitation and limit of detection of 8 kinds of bile acids

化合物	定量限	检出限
Compound	LOQ/(μg/L)	LOD/(μg/L)
去氧胆酸	5.25	1.57
鹅去氧胆酸	6.24	1.87
猪去氧胆酸	5.02	1.51
胆酸	6.55	1.91
甘氨胆酸	3.79	1.14
牛磺胆酸	3.36	1.00
牛磺猪去氧胆酸	5.38	1.61
牛磺猪胆酸	3.45	1.04

4.2.2 线性关系 以 8 种胆汁酸的浓度为横坐标,各浓度点对应的峰面积与内标成分峰面积比值为纵坐标,绘制各对照品的标准曲线,拟合回归方程。结果表明,各成分在一定浓度范围内呈现良好的线性关系,线性回归方程、相关系数(R^2)及线性范围列于表 3。

4.2.3 精密度、稳定性、加样回收率及基质效应 体内样品分析精密度相对标准偏差(RSD)不得高于 15%^[11],本实验各胆汁酸测定的精密度和稳定性均小于 15%,列于表 4。各胆汁酸成分的加样回收率在 80.45%~104.05%之间,各物质的基质效应在 82.71%~119.13%之间。

以上结果表明,该方法分析速度快、灵敏度高、准确性好、基质效应小,能够满足对大鼠血清胆汁酸代谢谱准确定量的分析需求。

表 3 8 种胆汁酸的线性回归方程、相关系数和线性范围

Table 3 Linear regression equation, linear correlation coefficient, and linear range of 8 kinds of bile acids

化合物	线性回归方程	线性系数	线性范围
Compound	Linear regression equation	Linear correlation coefficient (R^2)	Linear range/(mg/L)
去氧胆酸	$y=40.19x+3.88$	0.9908	40.29~0.015
鹅去氧胆酸	$y=3629.26x+914.79$	0.9909	47.94~0.018
猪去氧胆酸	$y=942.54x+192.69$	0.9950	38.52~0.015
胆酸	$y=268.42x+75.65$	0.9993	50.29~0.019
甘氨胆酸	$y=291.34x+42.91$	0.9908	27.64~0.010
牛磺胆酸	$y=192.83x+14.52$	0.9927	33.52~0.013
牛磺猪去氧胆酸	$y=300.79x+27.18$	0.9975	36.17~0.014
牛磺猪胆酸	$y=468.60x+67.91$	0.9990	29.41~0.011

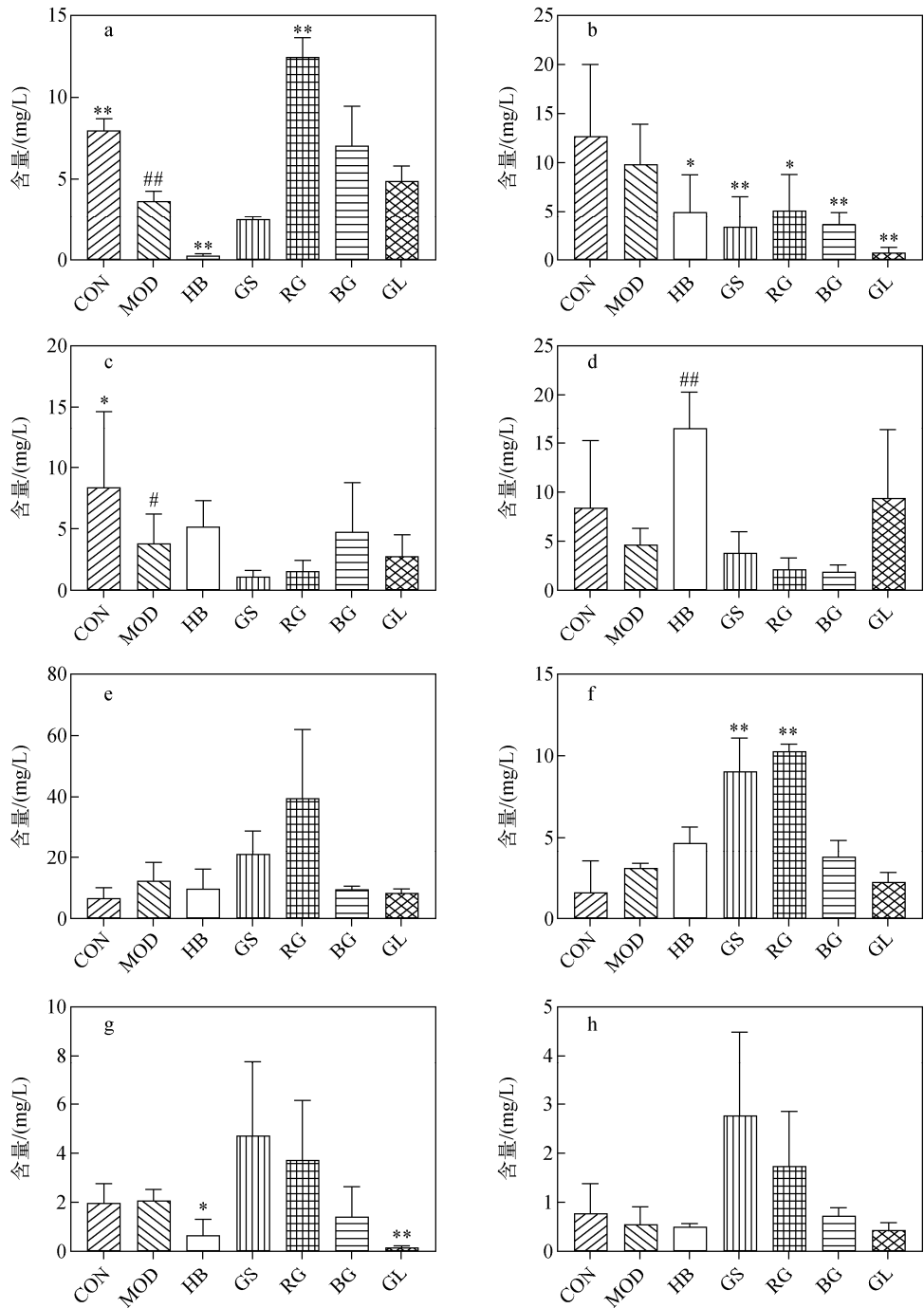
表 4 8 种胆汁酸的精密度、稳定性及基质效应

Table 4 Precision and stability of 8 bile acids

化合物	加样回收率	精密度	稳定性 Stability/%		基质效应
			−80 ℃	室温	
Compound	Average recovery/%	Accuracy/%			Matrix effect/%
去氧胆酸	101.03±3.91	9.19	8.32	8.84	82.71±7.35
鹅去氧胆酸	95.81±3.28	9.81	7.41	7.28	116.13±8.67
猪去氧胆酸	98.05±4.76	11.40	6.50	8.96	97.20±8.82
胆酸	80.45±4.80	5.92	7.51	8.69	103.79±5.87
甘氨胆酸	99.67±1.60	13.45	8.73	8.42	99.63±7.93
牛磺胆酸	100.84±4.63	11.96	4.19	7.78	119.13±11.60
牛磺猪去氧胆酸	104.05±4.60	13.59	7.96	9.03	98.01±10.54
牛磺猪胆酸	102.78±4.81	10.97	8.12	8.71	88.42±11.24

4.2.4 各组大鼠血清中胆汁酸含量的测定 各组大鼠血清中的胆汁酸含量结果示于图 2。与空白组相比,模型组的去氧胆酸、猪去氧胆酸含

量降低且有统计学差异;与模型组相比,黄柏组的去氧胆酸含量显著降低,红参组的去氧胆酸含量显著升高;与空白组相比,模型组的胆酸含



注:a. 去氧胆酸;b. 鹅去氧胆酸;c. 猪去氧胆酸;d. 胆酸;e. 甘氨猪胆酸;f. 牛磺胆酸;g. 牛磺猪去氧胆酸;h. 牛磺猪胆酸;#表示与空白组相比 $P<0.05$;##表示与空白组相比 $P<0.01$;
*表示与模型组相比 $P<0.05$;**表示与模型组相比 $P<0.01$;

如数据同时满足正态性和方差齐性,采用 LSD 检验;若满足正态性,不满足方差齐性,采用 Dunnett's T3 检验

图 2 胆汁酸成分测定结果
Fig. 2 Results of bile acid composition

量有降低趋势,但无统计学差异;与模型组相比,黄柏组和人参叶组的胆酸有升高趋势,且黄柏组有统计学差异;与空白组相比,模型组牛磺猪去氧胆酸有升高趋势但无统计学差异;与模型组相比,黄柏组和人参叶组的牛磺猪去氧胆酸显著降低。

4.3 不同药性中药生物标志物分析

经 PCA 分析,人参叶组和黄柏组位于同一象限且交合度较大,表明人参叶与黄柏的药性接近,示于图 3。寒、凉性中药(黄柏、人参叶)以及温性中药(人参、红参、黑参)给药后大鼠的各胆汁酸成分 VIP 值分别示于图 4、图 5。结果表明,寒、凉性中药(黄柏、人参叶)对胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸影响较大,温性中药(人参、红参、黑参)对甘氨酸胆酸、去氧胆酸、牛磺胆酸影响较大。以上 VIP 值所呈现指标可分别作为不同药性中药调节胆汁酸代谢的关键指标。

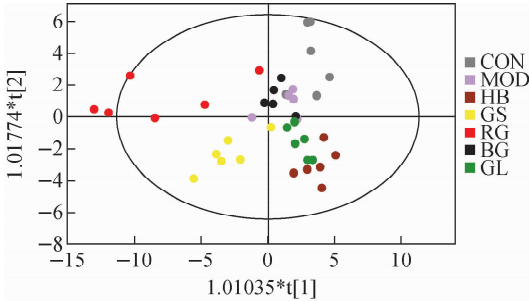


图 3 PCA 法分析各组胆汁酸含量
Fig.3 Analysis of bile acid content in each group using PCA

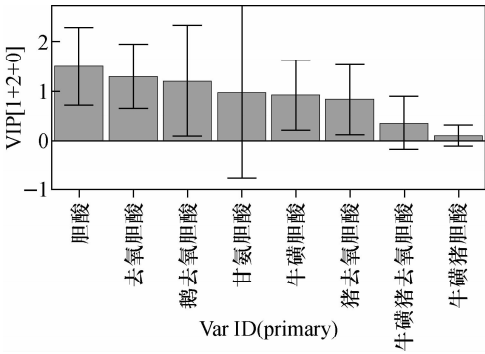


图 4 寒、凉性中药给药后大鼠血清中各胆汁酸成分 VIP 值

Fig.4 VIP values of each bile acid component in the serum of rats given cold and cool herbs

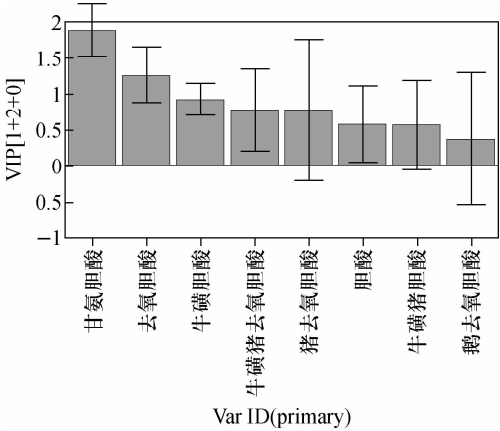
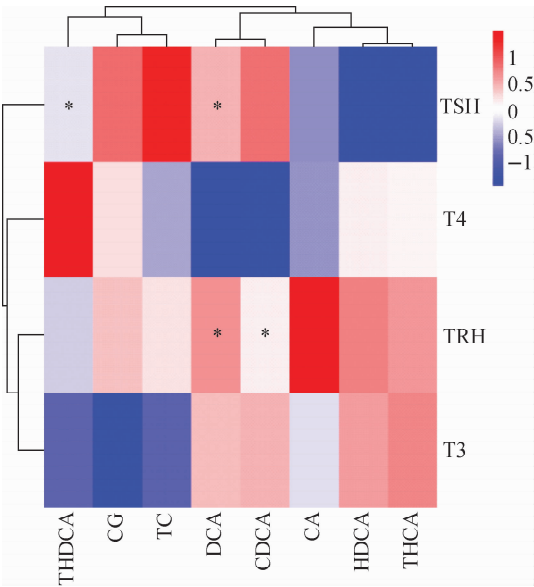


图 5 温性中药给药后大鼠血清中各胆汁酸成分 VIP 值

Fig.5 VIP values of each bile acid component in the serum of rats given warm herbs

4.4 血清中胆汁酸浓度与甲状腺功能的相关性分析

Spearman 相关性分析结果示于图 6。结果表明,促甲状腺素释放激素(TRH)水平与去氧胆酸($r = -0.702, P = 0.011$)、鹅去氧胆酸



注:THCA. 牛磺猪胆酸;TC. 牛磺胆酸; THDCA. 牛磺猪去氧胆酸;CG. 甘氨酸胆酸;CA. 胆酸; CDCA. 鹅去氧胆酸;HDCA. 猪去氧胆酸;DCA. 去氧胆酸

图 6 8 种胆汁酸代谢物与 T3、T4、TSH 和 TRH 的 Spearman 相关性分析热图

Fig.6 Heat map of Spearman correlation analysis of eight bile acid metabolites with T3, T4, TSH and TRH

($r = -0.592, P = 0.043$)呈显著负相关;TSH 水平与去氧胆酸($r = 0.604, P = 0.038$)、猪去氧胆酸($r = 0.633, P = 0.027$)呈显著正相关,与牛磺猪去氧胆酸($r = -0.638, P = 0.026$)呈显著负相关。

5 结论

本研究建立了 UPLC-QqQ-MS/MS 法测定正常大鼠、甲亢大鼠血清和不同药性人参属中药给药甲亢大鼠的不同胆汁酸成分含量差异,并探讨了 8 种胆汁酸成分在甲亢大鼠体内的变化趋势。胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸可作为寒、凉性中药(黄柏、人参叶)调节胆汁酸的生物标志物;甘氨胆酸、去氧胆酸、牛磺胆酸可作为温性中药(人参、红参、黑参)调节胆汁酸的生物标志物。通过 Spearman 相关性分析发现,T4 水平与去氧胆酸呈显著负相关;T3 水平与猪去氧胆酸、甘氨胆酸、牛磺猪去氧胆酸、牛磺猪胆酸和牛磺胆酸均呈显著负相关。以上结果表明,胆汁酸各成分的浓度异常与甲状腺激素异常有关。

参考文献:

[1] 倪青. 甲状腺功能亢进症病证结合诊疗指南(2021-01-20)[J]. 世界中医药,2021,16(2):193-196.
NI Qing. Guidelines for the diagnosis and treatment of hyperthyroidism[J]. World Chinese Medicine, 2021, 16(2): 193-196(in Chinese).

[2] 张久聪,聂青和. 胆汁酸代谢及相关进展[J]. 胃肠病学和肝病学志,2008(11):953-956.
ZHANG Jiucong, NIE Qinghe. Bile acid metabolism and related advances[J]. Annals of Gastroenterology and Hepatology, 2008(11): 953-956 (in Chinese).

[3] MURAKAMI M, KAMIYA Y, MORIMURA T, ARAKI O, IMAMURA M, OGIWARA T, MIZUMA H, MORI M. Thyrotropin receptors in brown adipose tissue: thyrotropin stimulates type II iodothyronine deiodinase and uncoupling protein-1 in brown adipocytes[J]. Endocrinology,

2001(3): 1 195-1 201.

[4] WATANABE M, HOUTEN S M, MATAKI C, CHRISTOFFOLETE M A, KIM B W, SATO H, MESSADDEQ N, HARNEY J W, EZAKI O, KODAMA T, SCHOONJANS K, BIANCO A C, AUWERX J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation[J]. Nature, 2006, 439(7 075): 484-489.

[5] BONDE Y, BREUER O, LÜTJOHANN D, SJÖBERG S, ANGELIN B, RUDLING M. Thyroid hormone reduces PCSK9 and stimulates bile acid synthesis in humans[J]. Journal of Lipid Research, 2014, 55(11): 2 408-2 415.

[6] 毕叶. 甲状腺功能异常对人血清胆汁酸谱的影响[D]. 济南:山东大学,2012.

[7] VASSART G, DUMONT J E. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth[J]. Endocrine Reviews, 1992, 13 (3): 596-611.

[8] 肖航,谭成,窦德强. 3 种寒性中药对优甲乐所致甲亢模型动物的影响[J]. 中华中医药学刊, 2016,34(9):2 122-2 125.
XIAO Hang, TAN Cheng, DOU Deqiang. Effects of three kinds of cold traditional Chinese medicine on rats of hyperthyroidism induced by Euthyrol[J]. Chin J Traditional Chinese Medicine, 2016, 34(9): 2 122-2 125(in Chinese).

[9] 胡佩丰,卢涌泉. 血清中胆汁酸的气-质联用定量多离子检测法[J]. 质谱学报,1987,8(2):1-7.
HU Peifeng, LU Yongquan. Determination of bile acids in serum by GS-MS[J]. Chinese Journal of Mass Spectrometry Society, 1987, 8(2): 1-7(in Chinese).

[10] 罗灿. 基于血清胆汁酸代谢轮廓分析对乳腺良恶性病变鉴别诊断的研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2021.

[11] BRODIE R R, HILL H M. Validation issues arising from the new FDA guidance for industry on bioanalytical method validation[J]. Chromatographia, 2002, 55(Suppl 1): S91-S94.

(收稿日期:2022-11-28;修回日期:2023-02-22)