

淫羊藿多糖对寒凝血瘀大鼠肝脏基因表达的影响

赵金椽¹, 王宇², 刘树民^{2*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要:目的 归纳大鼠寒凝血瘀模型在基因表达层面的肝脏功能变化和潜在的分子标记,并探讨淫羊藿多糖(EFPS)对基因表达的影响。方法 雄性SD大鼠随机分为3组:对照组、模型组和EFPS(38.7 mg/kg)组,将模型组和EFPS组大鼠连续15 d每天14:00时置于冰水浴1 h,造模的同时每天给药1次。取3组大鼠肝脏进行转录组测序,通过构建差异表达基因(DEGs)的基因本体(GO)中生物过程(BP)与京都基因和基因组百科全书(KEGG)网络,同时结合基因富集分析(GSEA),分别分析并对比各组大鼠的肝脏功能变化。结果 与对照组比较,模型组大鼠肝脏基因表达变化表现为脂质代谢下调、细胞生长受负向调控、产生免疫反应以及对于温度的自稳态调节;与模型组比较,EFPS组大鼠肝脏基因表达变化表现出免疫回调、激素调控和基因表达调控发生改变。通过二者DEGs的等量共表达模式初步确立EFPS干预寒凝血瘀模型的分子标记为*Ccl5*、*Cxcl13*、*Jund*。结论 长期冰冷导致的体寒通过大鼠肝脏表现出脂质代谢下调、细胞生长减缓、促进炎症反应,EFPS发挥免疫和激素调节作用。

关键词:寒凝血瘀;淫羊藿多糖;差异表达基因;GOBP;共表达;脂质代谢;细胞生长;免疫;激素

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1674-6376(2021)09-1862-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.09.007

Efficacy of *Epimedii Folium* polysaccharide on liver gene expression of rat cold accumulation-caused blood stasis model

ZHAO Jinchuan¹, WANG Yu², LIU Shumin²

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Institute of TCM, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To investigate the function variation and potential biomarkers of the cold accumulation-caused blood stasis model (CABS model) via differential gene expression of the liver, and explore the pharmacological mechanism of *Epimedii Folium* polysaccharide (EFPS) on the CABS model. **Methods** Totally 30 male SD rats were randomly divided into three groups: control group, model group and EFPS group. The rat in model group was induced by 15 d ice-water bath, 1 h/d; The rat in EFPS group were administered with dose of 38.7 mg/kg and volume of 10 mL/kg, meanwhile the rat in control group and model group were given the same amount of distilled water. After the liver RNA-seq of each group, GOBP and KEGG networks based on the differentially expressed genes (DEGs) were constructed to analyze the liver function variation among the three groups, combined with GSEA parallelly. **Results** Compared with the control group, liver of rats in model group mainly presented down regulation of lipid metabolism, negative regulation of cell growth, immunoreaction and temperature homeostasis; compared with model group, liver of rats in EFPS group presented immune call-back and regulation of hormone levels and gene transcription. Three biomarkers for EFPS intervening the CABS model were preliminarily established by recognition of equivalent DEGs co-expression (synchronized call-back of *Ccl5*, *Cxcl13* and *Jund*). **Conclusion** Rat CABS model presented depression of lipid metabolism and cellular growth along with immunoreaction at liver; EFPS performed potential regulating efficacy on the CABS model at the level of immune and hormone.

Key words: cold coagulation and blood stasis; *Epimedii Folium* polysaccharide; differentially expressed genes; GOBP; coexpression; lipid metabolism; cell growth; immune; hormone

收稿日期: 2021-02-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”计划课题(2013CB531804)

第一作者: 赵金椽(1990—),男,研究方向为中医药生物信息和系统生物学。E-mail: 706061583@qq.com

*通信作者: 刘树民(1963—),男,教授,研究方向为中药临床药效物质基础及药性理论。E-mail: keji-liu@163.com

寒凝血瘀是中医学证候中常见的病证,多由寒邪侵袭机体而引起体内血行不畅、血脉不通、血液瘀滞等病理变化^[1]。目前体寒模型的创建主要以生理指标为参照(如大鼠掌心温度、代谢激素水平等^[2]),而从基因水平探讨中医寒凝血瘀模型的生物学内涵研究较少。

多糖及其缀合物被认为是生物体内除核酸以外的又一类重要的信息分子。由于它们常是细胞表面信号识别、抗原抗体反应、细胞间信息的传递和感受的关键因子,因此具有生物活性的多糖研究日益受到重视^[3]。淫羊藿多糖(*Epimedium Folium polysaccharide*, EFPS)是小檗科植物淫羊藿的主要活性成分之一。药理学研究显示,EFPS具有抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、调节免疫、延缓衰老等多种作用^[4]。经本课题组前期研究^[5]发现,相较于淫羊藿其他拆分组分,EFPS对寒凝血瘀模型物质能量代谢的下降具有更显著的回调作用;而转录组学结果显示,作用于寒凝血瘀模型时EFPS与淫羊藿全成分共有差异表达基因(DEGs)相对其他组分最多,说明EFPS可能通过作用于共同靶基因发挥与淫羊藿相似的药效。为进一步深入研究寒凝血瘀的本质以及EFPS对于寒证的药效,本研究在基因表达层面归纳了大鼠寒凝血瘀模型肝脏功能变化,并探讨EFPS对此模型的药理作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

30只雄性SD大鼠,SPF级,体质量(220±20)g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(黑)2013-2014。保持饲养环境温度22℃,相对湿度40%左右,8:00到20:00人工灯光照明,标准大鼠饲料喂养,自由饮水,在代谢笼中适应1周后用于实验。本实验通过动物保护委员会的伦理批准,批准文号为20190921。

1.2 实验药物与主要试剂

淫羊藿药材购自世一堂中药材有限公司,批号130916,产地甘肃,经黑龙江中医药大学中药资源学教研室王振月教授鉴定为小檗科植物淫羊藿*Epimedium brevicornu* Maxim.的干燥叶,符合2020年版《中国药典》规定。EFPS的制备过程参照课题组前期研究^[5],淫羊藿生药材加15倍量蒸馏水回流提取2次,每次1h,合并2煎药液,减压浓缩至稠浸膏,加入2倍量体积95%乙醇,不断搅动,静置隔夜后抽滤,沉淀为EFPS,提取率为4.3%。参考文献^[6]方法测得EFPS含糖量为36.7%。

2100生物芯片分析系统检测试剂(批号5067-1511)、安捷伦高灵敏度DNA试剂盒(批号5067-4626),均购自安捷伦科技有限公司;Quant-iT PicoGreen dsDNA检测试剂盒(中国赛默飞世尔科技有限公司,批号P7589);microTUBE AFA fiber Snap-Cap(批号520045);TruSeq Nano DNA LT Sample Prep Kit-Set A/B(批号FC-121-4001/2);TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit-Set A/B(批号RS-122-2101/2);Agencourt AMPure XP Beads(批号A63881);NextSeq™500 High Output Kit(300 cycles)(批号FC-404-1004)。

1.3 主要仪器

Covaris™超声波DNA破碎仪、Pico17微量台式离心机(中国赛默飞世尔科技有限公司);RS232G紫外分光光度计(上海艾本德国际贸易有限公司);UV-1000台式紫外分析仪(上海汗诺仪器有限公司);凝胶成像系统(上海伯乐生命医学产品有限公司);二代测序平台NextSeq™500 High Output Kit(Illumina公司)。

2 方法

2.1 分组、造模和给药

30只大鼠随机分为3组:对照组、模型组和EFPS(38.7 mg/kg,根据人体等效剂量及组分出膏率确定)组,每组10只。参照已有建模方法^[7-8],将模型组和EFPS组大鼠每天14:00时置于冰水浴1h,连续15d。根据本课题组前期相关研究^[5,9-10],综合多方面评价确立此模型为有效造模。造模的同时每天给药1次,给药体积为10 mL/kg,对照组和模型组给予等体积蒸馏水。

2.2 RNA提取与含量测定

给药后每组随机取3个肝脏样品,将50~100 mg新鲜肝脏在液氮预冷研钵中磨碎,然后加入1 mL Trizol试剂制匀浆。再加入0.2 mL氯仿,剧烈振荡15s,室温放置3 min。4℃、10 000×g离心15 min,把水相移到新管中,加0.5 mL异丙醇,室温放置10 min。再次离心后移去上清,得胶状沉淀。用1 mL 75%乙醇洗涤沉淀,4℃、7 500×g离心5 min,弃上清。室温放至干燥后加50 μL无RNase水溶解,吸取1 μL,用紫外分光光度计在260、280、230 nm处检测样品吸光度(A)值,再各取RNA 300~500 ng,在135 V下进行1.2%的琼脂糖凝胶电泳。

2.3 cDNA文库构建与测序

经RNA含量测定确定符合建库标准后($A_{260}/A_{280} > 1.8$,样品质量浓度 ≥ 20 ng/μL,琼脂糖电泳条带清晰

单一),采用 Illumina 的 TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit 进行 RNA 纯化、片段化和 cDNA 文库构建。然后取 1 μ L 文库,在 Agilent Bioanalyzer 2100 机器上用 Agilent High Sensitivity DNA Kit 对文库做 2100 质检。对合格的文库(有单一峰、无接头),在 NextSeq 机器上利用 NextSeq™500 High Output Kit 进行 2×150 bp 的双端测序。

2.4 转录组测序数据分析

2.4.1 比对基因组 参照基因组: *Rattus norvegicus*. Rnor_6.0. dna. toplevel. fa (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-80/fasta/rattus_norvegicus/dna/);分析软件:bowtie2/tophat2(http://tophat.cbcb.umd.edu/)。

2.4.2 DEGs 分析 经计算获得 22 293 个有效序列的 RPKM(reads per kilo bases per million reads)值后,运用 R 语言处理分析数据。先取每组 RPKM 3 次重复结果的平均值,去除所有低表达(RPKM<1)基因,再利用 biomaRt^[11]将基因 ID 转换为对应的大鼠基因名,最后用 edgeR^[12]计算(fold change>2、adjust $P<0.05$)获得各组间 DEGs。同时,将未去除低表达基因的数据进行 GSEA^[13]分析(gene set enrichment analysis, v4.0.2),所有参数均设为默认值,其结果与 DEGs 互为参照。

2.4.3 基因功能网络分析 运用 Cytoscape(v3.5)中的 ClueGO^[14](v2.5.5)分析 DEGs 所显著参与的基因本体(GO)中生物过程(BP)与京都基因和基因组百科全书(KEGG)网络。设定参数时,数据库选择“without IEA”,统计方法选择“BH, $P<0.05$ ”。归纳 DEGs 功能并分析主要参与其中的基因,同时与 GSEA 所得功能分析结果比对。

3 结果

3.1 转录组分析结果

3.1.1 DEGs 分析结果 对照组、模型组和 EFPS 组 3 组间两两比对,共得对照/模型(C_M)组、模型/给 EFPS(M_E)组、对照/EFPS 组(C_E)3 组 DEGs。各组 DEGs 异同关系如图 1 所示,其中 C_M 与 M_E 组均为单变量,C_E 组为双变量。C_M 与 M_E 交集有 *Ccl5*、*Cxcl13*、*Jund* 3 个基因,在 C_M 中全部上调,在 M_E 中全部下调,且在 C_E 中均未差异表达,可见此 3 个基因在 C_M 与 M_E 中的等量共表达模式,即与对照组比较,*Ccl5*、*Cxcl13*、*Jund* 3 个基因在模型组中表达上调;与模型组比较,EFPS 给药后等量回调。

3.1.2 GSEA 分析结果 共 3 881 个基因通过富集

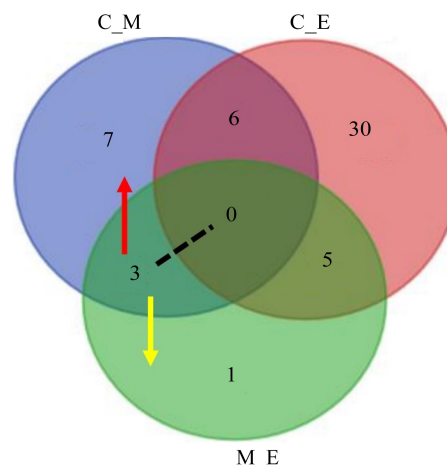


图1 3组 DEGs 韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of three DEGs groups

评分。C_M 组中 2 619 个基因表达上调,1 262 个基因表达下调,经校验统计共 543 个基因显著差异表达;M_E 组中 3 138 个基因表达上调,743 个基因表达下调,经校验统计只有 2 个基因显著差异表达。

根据 GOBP 显著性评分结果,分别归纳两组中表达上调与下调基因集的功能。取排名前 20 的 C_M 显著上调基因功能(表 1),其中 9 个与转录和调控相关,9 个与免疫应答相关;C_M 下调基因共显著参与 17 个功能(表 2),其中 14 个均与脂质代谢相关。M_E 组因只有 2 个显著 DEGs,无 GOBP 显著性评分结果,无法进行功能分析与归纳。

表1 C_M 组上调基因功能分析(排名前 20)

Table 1 Function of C_M up-regulated genes (top 20)

基因功能	FDR q 值
*regulation of cholesterol biosynthetic process	0.000
*regulation of alcohol biosynthetic process	0.001
#humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	0.002
#humoral immune response	0.001
*#regulation of humoral immune response	0.001
amyloid beta clearance	0.001
#complement activation	0.001
sterol biosynthetic process	0.006
*regulation of steroid biosynthetic process	0.006
*#regulation of myeloid leukocyte mediated immunity	0.007
*mRNA transcription	0.010
#response to interferon gamma	0.010
#toll like receptor signaling pathway	0.011
*mRNA transcription by RNA polymerase II	0.014
*#positive regulation of response to cytokine stimulus	0.015
isoprenoid biosynthetic process	0.014
*regulation of odontogenesis	0.015
vascular endothelial growth factor production	0.015
response to muscle stretch	0.015
#response to interferon beta	0.016

*与转录和调控相关;#与免疫应答相关

*related to transcription and regulation;#related to immune

表2 C_M组下调基因功能分析
Table 2 Function of C_M down-regulated genes

基因功能	FDR <i>q</i> 值
*fatty acid catabolic process	0.000
*monocarboxylic acid catabolic process	0.000
*cellular lipid catabolic process	0.000
*lipid oxidation	0.000
*fatty acid beta oxidation	0.000
synaptonemol complex organization	0.006
*peroxisomal transport	0.006
*glycerolipid catabolic process	0.006
*peroxisome organization	0.007
*neutral lipid catabolic process	0.006
*triglyceride catabolic process	0.008
regulation of response to food	0.013
*lipid catabolic process	0.017
*fatty acid metabolic process	0.025
*long chain fatty acid metabolic process	0.028
regulation of response to extracellular stimulus	0.037
*linoleic acid metabolic process	0.036

*与脂质相关

*related to lipid

3.2 DEGs 功能网络分析结果

3.2.1 C_M组 DEGs 功能 如图2-A所示, C_M组 DEGs 显著参与脂质代谢、细胞生长负向调控等功能。其中 *Acot1*、*Acot6*、*Oxsm*、*Socs6* 和 *Mid1p1* 主要参与脂质代谢过程 (cellular lipid metabolic process); *Ccl5*、*Cxcl13*、*Bmp3* 和 *Adipor2* 通过趋化因子与细胞因子介导的信号通路发挥趋化作用 (cytokine-mediated signaling pathway) 以及对于温度变化产生的自稳态调节作用 (temperature homeostasis), 并与 *Jund*、*Hrg*、*Rgs2*、*Socs6* 共同参与细胞生长调控 (negative regulation of cell growth)。

3.2.2 M_E组 DEGs 功能 如图2-B所示, M_E主要功能表现为对药物产生反应 (response to drug) 以及激素水平的调节 (regulation of hormone levels)。其中 *Ccl5*、*Cxcl13* 通过趋化因子与细胞因子介导的信号通路发挥趋化作用, 与 *Jund* 和 *Cyp1a2* 共同参与药物反应; 同时, *Jund* 和 *Hes3* 参与了基因表达调控 (negative regulation of transcription)。

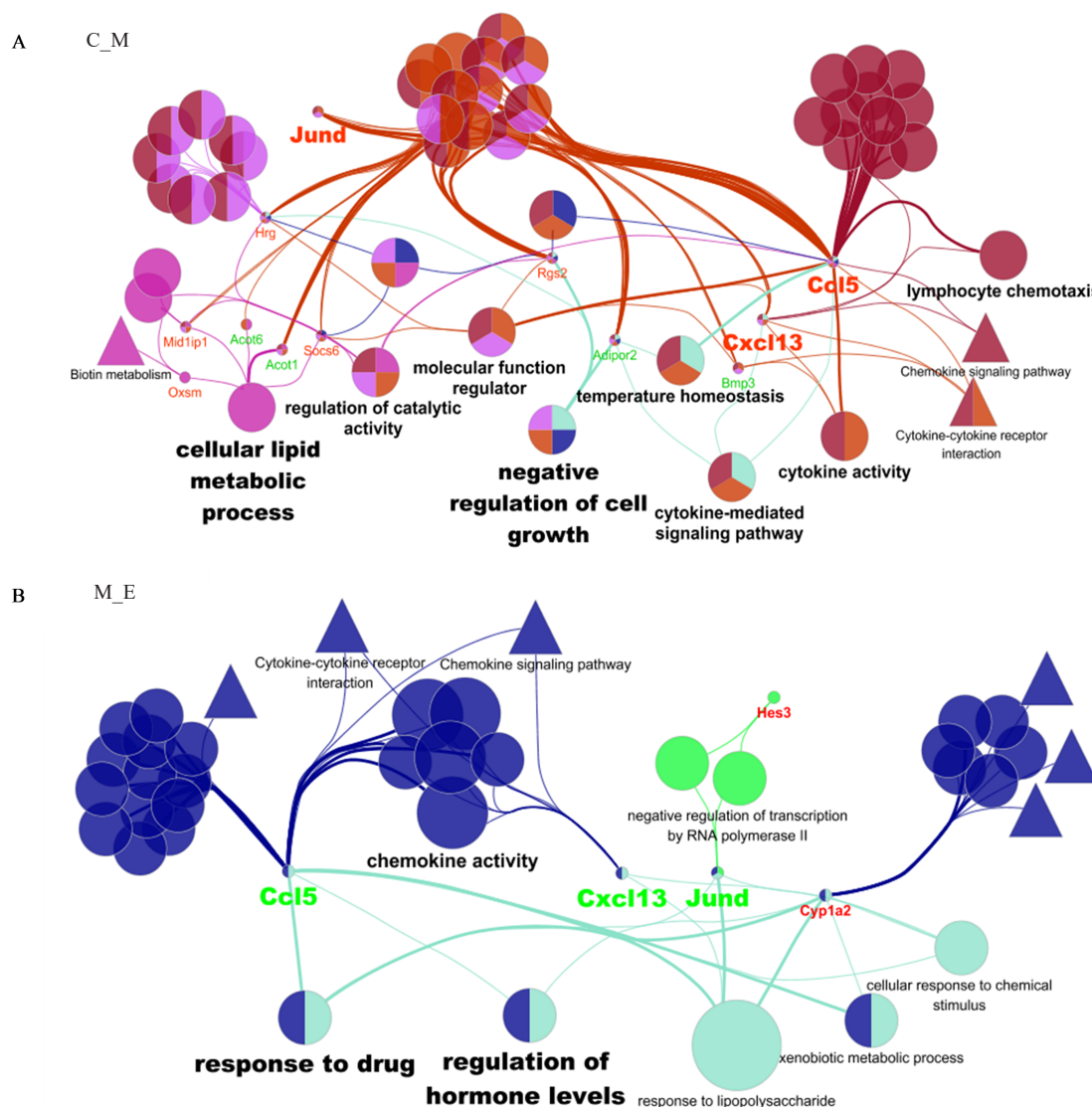
4 讨论

目前针对寒凝血瘀模型的创建和研究主要以生理指标为参照^[2,7-8,15-18], 而在基因水平探讨其生物学含义和发病机制的研究仍很欠缺^[19-21]。本研究在前期研究的基础之上, 分析了大鼠寒凝血瘀模型肝

脏的差异基因表达, 并同时运用 DEGs 提取和 GSEA 两种方法, 增强了分析的全面性和可信度。由功能网络分析结合 GSEA 分析结果, 总结各组 DEGs 功能如下。

C_M组 DEGs 功能网络分析与 GSEA 分析结果相吻合。C_M组表达下调的基因主要参与脂质代谢过程, 表明大鼠寒凝血瘀模型相对于正常大鼠在肝脏的内源性脂质代谢整体下调。脂质与能量代谢密切相关, 尤其在肝脏处, 因此肝脏基因表达层面引发的脂质代谢减弱可视为此模型在受寒冷环境影响下能量代谢内生性减弱的一个具体表征, 这与孟宪生等^[22]有关研究以及本课题组前期多组学研究结果 (模型的整体能量代谢减弱, 以糖类和脂质代谢的下调为主要特征)^[5]相符合, 从基因、蛋白、代谢多方位印证了此寒凝血瘀模型在能量代谢方面对全身性寒冷胁迫做出的生理反应; C_M组另一显著功能变化为细胞生长负向调控和免疫应答, 显示出大鼠寒凝血瘀模型较对照组生长减缓, 并产生炎症反应与免疫系统应激, 与王学江等^[23]实验观察相符; 其中 *Ccl5*、*Cxcl13* 表达的上调是此免疫应答的核心表现, *Ccl5* 与 *Cxcl13* 皆为趋化因子家族成员, 主要参与机体免疫应答过程, 其在肝脏处表达上调可作为炎症反应的标志^[24]。趋化因子家族数量庞大, 而结果显示仅其中的 *Ccl5* 与 *Cxcl13* 显著差异表达, 印证了二者是此模型肝脏处的免疫分子标记; 本研究经分析还发现模型组 DEGs 参与了对于温度的自稳态调节, 且未表现出激素调控的功能, 表明 15 d 间歇性寒冷造模导致大鼠已适应冰水浴环境, 与赵珊珊等^[15]的研究结果完全一致, 因此是基因表达层面稳定的大鼠寒凝血瘀模型, 可用于后续分析和实验。

M_E组中 *Ccl5*、*Cxcl13*、*Jund*、*Cyp1a2* 参与药物反应及激素调节。其中, *Ccl5*、*Cxcl13*、*Jund* 表达下调, 且相对于 C_M组等量回调, 表明 EFPS 对此寒凝血瘀模型产生药效, 起到免疫回调和激素水平调节的作用。以往研究^[4]多关注 EFPS 对机体的免疫增强作用, 而本课题组前期有关研究^[25-26]发现淫羊藿多糖组和水段组相比其他拆分组分具有显著且多方面的双向免疫调节作用, 本研究印证了 EFPS 的免疫回调保护作用; 而激素调节方面的研究多见于淫羊藿, 未见 EFPS 直接激素调节作用的报道, 本研究首次发现 EFPS 可通过基因表达调控发挥激素调节的作用。通过对大鼠寒凝血瘀模型给药后肝脏基因表达变化的分析, 本研究不仅印证了 EFPS 免



基因标注红色为表达上调,绿色为表达下调;圆形节点为基因参与的功能(GOBP),三角形为基因参与的通路(KEGG);节点越大则显著性越高
Red genes: up regulated, green genes: down regulated; Round nodes: GOBP, triangle nodes: KEGG pathway; Nodes: the bigger the more significant

图2 DEGs功能网络分析

Fig. 2 DEGs function network analysis

疫调节的功能,并进一步在基因表达层面解释了其对于寒凝血瘀模型的作用机理。同时,经功能网络分析及蛋白互作分析显示,*Ccl5*与*Cxcl13*有紧密关联,而*Jund*与二者无直接关联,表明此体寒特征的显现以及EFPS发挥作用经过了并非单一的分子通路。此外,对于脂多糖产生反应(response to lipopolysaccharide)是EFPS组DEGs功能中显著性最高的。虽有研究报道植物提取物中可含有脂多糖^[27],但EFPS中是否含有尚不明确。脂多糖可产生和释放各种促炎性细胞因子和介质,能够引起多种疾病^[28],在肝脏处可引起氧化应激及肝损伤^[29]。顾欢欢^[30]研究发现EFPS和脂多糖对于体外细胞具有相似的免疫刺激作用,而至今未见EFPS肝毒性

报道,可预测EFPS在大鼠肝脏引发的部分分子通路与外源脂多糖激活的通路类似。

本研究在基因表达层面研究并归纳了大鼠寒凝血瘀模型的肝脏功能变化以及EFPS对其干预作用,在能量代谢、生长调控、自稳态调节、免疫应答等多方面印证了前人或本课题组相关研究,并首次发现EFPS具有激素调节作用,充分表明寒凝血瘀体质不局限于生理表征而能够于基因层面表达,并可通过药物进行干预,有助于进一步在基因表达层面深入研究体质特征以及在基因靶点方向探索药物的体质干预。同时,本研究还根据给药前后模型组的基因表达变化分析归纳出EFPS干预大鼠寒凝血瘀模型肝脏处潜在的分子标记,即*Ccl5*、*Cxcl13*、

*Jund*表达同时上调。欲印证它们是否可独立作为此模型肝脏处的分子标记,还应与其他器官组织进行比较,其产生机制以及EFPS发挥作用的机制也有待进一步研究确认。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谷万里, 张 俏, 史载祥. 寒凝血瘀证动物模型的研究述评 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(6): 89-91.
Gu W L, Zhang Q, Shi Z X. Review on animal models of cold coagulation and blood stasis syndrome [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2007, 14(6): 89-91.
- [2] 叶福媛, 宋莉君, 孙爱贞. 中医体质的实验研究——寒体和热体大鼠多元素多因子分析 [J]. 广东微量元素科学, 2000, 7(2): 16-18.
Ye F Y, Song L J, Sun A Z. Experimental study on Chinese medical constitution -- multielement and multifactor analysis of cold and heat physique rats [J]. Guangdong Trace Elem Sci, 2000, 7(2): 16-18.
- [3] 马红樱, 张德禄, 胡春香, 等. 植物活性多糖的研究进展 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2004, 40(3): 112-117.
Ma H H, Zhang D L, Hu C X, et al. Progress on active polysaccharides from plants [J]. J Northwest Normal Univ: Nat Sci, 2004, 40(3): 112-117.
- [4] 付 亮, 袁 亚, 周永红, 等. 淫羊藿多糖的研究进展及开发前景 [J]. 食品科学, 2012, 33(3): 267-272.
Fu L, Yuan Y, Zhou Y H, et al. Research progress and development prospects of Epimedium polysaccharides [J]. Food Sci, 2012, 33(3): 267-272.
- [5] 杨晓旭. 基于系统生物学的淫羊藿对寒证模型大鼠物质能量代谢的干预作用及药性研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017: 29-102.
Yang X X. Effect of Epimedium brevicornu on material energy metabolism in cold syndrome rat model and its properties research based on systems biology [D]. Harbin: Heilongjiang Univ Chin Med, 2017: 29-102.
- [6] 刘宝岩. 胶陀螺寡糖的初步研究及淫羊藿多糖的分离提取 [D]. 长春: 东北师范大学, 2009: 24-29.
Liu B Y. Primary study on oligosaccharide from *Bulgaria inguinans* (Fries) and the extraction of water-soluble polysaccharide from *Epimedium brevicornum* Maxim. [D]. Changchun: Northeast Norm Univ, 2009: 24-29.
- [7] 成秀梅, 杜惠兰, 李 丹. 寒凝血瘀证动物模型的创建 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(8): 604-605.
Cheng X M, Du H L, Li D. Establishment of syndrome model of blood stasis due to cold accumulation in rats [J]. China J Basic Med Tradit Chin Med, 2005, 11(8): 604-605.
- [8] 杨佳敏, 沈小雨, 张 玲, 等. 寒凝血瘀证动物模型制备方法的评价与选择 [J]. 中医学报, 2014, 29(188): 53-54.
Yang J M, Shen X Y, Zhang L, et al. Evaluation and selection of animal model preparation in cold coagulating and blood stasis [J]. China J Chin Med, 2014, 29(188): 53-54.
- [9] 杨晓旭, 王 宇, 薛 迪, 等. 基于抗骨质疏松作用的淫羊藿拆分组分的筛选研究 [J]. 中药材, 2016, 39(8): 1860-1864.
Yang X X, Wang Y, Xue D, et al. Study on filtrating separate composition of Epimedium folium based on its anti-osteoporosis [J]. J Chin Med Mater, 2016, 39(8): 1860-1864.
- [10] 杨晓旭, 冯镇凯, 王 宇, 等. 基于代谢组学方法探讨淫羊藿多糖对尿液中内源性代谢物质的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 106-110.
Yang X X, Feng Z K, Wang Y, et al. Effect of Epimedium polysaccharide on endogenous metabolites in urine based on metabolomics [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2017, 33(1): 106-110.
- [11] Durinck S, Huber W. The biomaRt user's guide [EB/OL]. (2019-09-05)[2021-01-05]. <http://www.biomart.org>.
- [12] Chen Y S, McCarthy D, Ritchie M, et al. edgeR: Differential expression analysis of digital gene expression data User's Guide [DB/OL]. (2008-09-17)[2019-08-13]. <http://www.bioconductor.org>.
- [13] Subramanian A, Tamayo K V, Mootha K V, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. PNAS, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [14] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks [J]. Bioinformatics, 2009, 25(8): 1091-1093.
- [15] 赵珊珊, 郝艳玲, 袁凤刚, 等. 寒凝血瘀证动物模型的建立和优化筛选 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(8): 1048-1050.
Zhao S S, Hao Y L, Yuan F G, et al. Establishment and optimization of animal model of cold coagulation and blood stasis syndrome [J]. China J Basic Med Tradit Chin Med, 2016, 22(8): 1048-1050.
- [16] 郑小伟. 寒凝血瘀证动物模型的量化研究 [J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23(2): 43-45.
Zheng X W. Quantitative study on animal model of cold accumulated caused blood stasis [J]. J Zhejiang Col Chin Med, 1999, 23(2): 43-45.
- [17] 谢 波, 邓海山, 喻 斌, 等. 寒凝血瘀证大鼠模型的优化筛选研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(3):

- 262-265.
- Xie B, Deng H S, Yu B, et al. Study on optimal screening of rat model with blood stasis due to cold syndrome [J]. J Nanjing Univ Chin Med, 2013, 29(3): 262-265.
- [18] 朱成慧, 孟向文, 朴盛爱, 等. 近5年寒凝血瘀证动物模型实验研究进展 [J]. 吉林中医药杂志, 2014, 34(2): 211-213.
- Zhu C H, Meng X W, Piao S A, et al. Progress of experimental research on the animal model of blood stasis with the syndrome of cold accumulation in recent five years [J]. J Jilin Chin Med, 2014, 34(2): 211-213.
- [19] 魏蓓蓓, 张伟妃, 张瑞义, 等. 中医寒体与热体特征性基因筛选的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(7): 607-612.
- Wei B B, Zhang W F, Zhang R Y, et al. Characteristic genes screening of Chinese medical cold and heat physique [J]. China J Basic Med Tradit Chin Med, 2010, 16(7): 607-612.
- [20] 殷玉婷, 董 杨, 宋海燕, 等. 寒热体质大鼠 TRPV1 通道表达的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(8): 2019-2022.
- Yin Y T, Dong Y, Song H Y, et al. Study on the expression of TRPV1 in cold and heat constitution rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharma, 2012, 27(8): 2019-2022.
- [21] 成秀梅, 杜惠兰. 寒证动物模型及本质研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(11): 872-874.
- Cheng X M, Du H L. Research progress on animal model and essence of cold syndrome [J]. China J Basic Med Tradit Chin Med, 2006, 12(11): 872-874.
- [22] 孟宪生, 姜 民, 罗国安, 等. 基于代谢组学的中药川芎对寒凝血瘀证大鼠作用机制研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(2): 218-221.
- Meng X S, Jiang M, Luo G A, et al. Study on the mechanism of the effect of Rhizoma Chuanxiong on cold stasis syndrome rats based on metabolomics [J]. J Liaoning Chin Med, 2012, 39(2): 218-221.
- [23] 王学江, 丰 平. 寒凝血瘀证动物模型的实验观察 [J]. 北京中医, 2000, 5(21): 44-45.
- Wang X J, Feng P. Experimental observation on animal model of cold blood stasis syndrome [J]. J Beijing Chin Med, 2000, 5(21): 44-45.
- [24] 王舒婷. 趋化因子 CCL2、CCL4、CCL5、CXCL5 和 CXCL13 与肝细胞肝癌的相关性研究 [D]. 温州: 温州医科大学, 2016.
- Wang S T. Correlation of chemokines CCL2, CCL4, CCL5, CXCL5 and CXCL13 with hepatocellular carcinoma [D]. Wenzhou: Wenzhou Univ Med Sci, 2016.
- [25] 薛 迪. 淫羊藿化学拆分组分的药理作用及药味归属研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016: 22-59.
- Xue D. Studies on pharmacological effects of chemical separation compositions and flavours ownership of *Epimedium* [D]. Heilongjiang Univ Chin Med, 2016: 22-59.
- [26] 卢 芳, 冯镇凯, 杨晓旭, 等. 基于免疫调节作用的淫羊藿各拆分组分筛选研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1331-1335.
- Lu F, Feng Z K, Yang X X, et al. Study on screening of each component of herba *Epimedii* based on immunoregulation [J]. China Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(6): 1331-1335.
- [27] 陈正行. 植物脂多糖的开发利用——谷物类脂多糖的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 1996.
- Chen Z X. Development and utilization of plant lipopolysaccharide -- Study on cereal lipopolysaccharide [D]. Wuxi: Jiangnan University, 1996.
- [28] Westphal M, Stubbe H, Sielenkämper A, et al. Terlipressin dose response in healthy and endotoxemic sheep: impact on cardiopulmonary performance and global oxygen transport [J]. Intensive Care Med, 2003, 29(2): 301-308.
- [29] Sugino K, Dohi K, Yamada K, et al. The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants [J]. Surgery, 1987, 101(6): 746-752.
- [30] 顾欢欢. 酶法提取淫羊藿多糖及其对动物免疫功能的调节作用 [D]. 聊城: 聊城大学, 2018.
- Gu H H. The enzymatic extraction of *Epimedium* polysaccharide and its regulation on animal immune function [D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2018.

【责任编辑 兰新新】