

基于血浆代谢组学的新生化颗粒对急性血瘀大鼠作用机制研究

吕 玥¹, 孙纯勇², 李美琴¹, 印琴琴¹, 颜培正², 赵东升^{2*}

1. 南通大学附属医院如皋分院, 江苏 南通 226500

2. 山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355

摘要: 目的 研究新生化颗粒对急性血瘀大鼠血浆中内源性代谢物的影响, 探讨新生化颗粒治疗急性血瘀证的可能机制。方法 将50只SD大鼠随机分为对照组、模型组、复方丹参滴丸(阳性药, 0.10 g·kg⁻¹)组和新生化颗粒低、高剂量(4.86、9.72 g·kg⁻¹)组, 给药体积10 mL·kg⁻¹, 对照组和模型组大鼠ig给予等体积0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 每天早晚各ig给药1次, 共7次。第5次给药后, 除对照组外, 采用sc盐酸肾上腺素和冰水浴制备大鼠急性血瘀模型。通过测定全血黏度(WBV)、血浆黏度(PV)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB)和凝血酶时间(TT), 观察不同剂量的新生化颗粒对急性血瘀大鼠血液流变学和凝血功能的影响; 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用(UHPLC-QTOF-MS)法检测各组大鼠血浆中的内源性代谢物, 通过多变量统计分析筛选潜在生物标志物, 结合质谱信息、数据库检索和标准品比对鉴定潜在生物标志物, 并将鉴定到的生物标志物导入MetaboAnalyst 5.0数据库推测其可能的代谢通路。结果 与模型组比较, 新生化颗粒显著降低急性血瘀大鼠WBV、PV和FIB, 显著延长APTT、PT和TT($P<0.05, 0.01$)。代谢组学结果显示, 从急性血瘀大鼠血浆中共鉴定出21个差异代谢物(准确鉴定7个), 与对照组比较, 模型组大鼠血浆中乳酸、肉碱和肌酐等10个内源性代谢物显著上调, 苹果酸、琥珀酸和色胺等11个内源性代谢物显著下调($P<0.05, 0.01$); 除了硫酸吡啶酚和脱氧胞苷外, 新生化颗粒对其他19个生物标志物均有显著回调作用($P<0.05, 0.01$)。这些标志物主要涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢、亚油酸代谢、三羧酸循环和色氨酸代谢。结论 新生化颗粒对急性血瘀大鼠体内紊乱代谢物有较好的回调作用, 其作用机制主要与调节苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 苯丙氨酸代谢, 亚油酸代谢, 三羧酸循环和色氨酸代谢通路有关。

关键词: 新生化颗粒; 活血化瘀; 急性血瘀; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用(UHPLC-QTOF-MS); 代谢组学
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)08-1574-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.015

Metabolomics analysis of Xinshenghua Granules for activating blood circulation on acute blood stasis rats

LÜ Yue¹, SUN Chunyong², LI Meiqin¹, YIN Qinqin¹, YAN Peizheng², ZHAO Dongsheng²

1. The Affiliated Rugao Hospital of Nantong University, Nantong 226500, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To explore the effects of Xinshenghua Granules on endogenous metabolites in rats with acute blood stasis syndrome, and to investigate the possible mechanism of Xinshenghua Granules for promoting blood circulation on acute blood stasis rats. **Methods** Totally 50 SD rats were randomly divided into control group, model group, compound Danshen Dripping Pills (positive drug, 0.10 g·kg⁻¹) group and Xinshenghua Granules low-dose and high-dose groups (4.86 and 9.72 g·kg⁻¹). The volume of administration was 10 mL·kg⁻¹. Intragastrically, once in the morning and evening, for seven times in total. After the fifth administration, except for the control group, the acute blood stasis model of rats were induced by ice water bath and subcutaneous injection of adrenaline. To evaluate the effects of promoting blood circulation, whole blood viscosity (WBV), plasma viscosity (PV), activated partial thrombin time (APTT), prothrombin time (PT), fibrinogen (FIB) and thrombin time (TT) in different groups were determined. UHPLC-QTOF-MS was applied to investigate the plasma metabolomics changes of acute blood stasis rats, and multivariate statistical analysis was used to screen the potential biomarkers, then the potential biomarkers were identified via

收稿日期: 2022-05-14

第一作者: 吕 玥(1992—), 本科, 初级护师, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: rgly920119@163.com

*通信作者: 赵东升(1983—), 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: dongshengpw2008@163.com

database querying and comparison of reference standards, and finally the related metabolic pathways were discovered via MetaboAnalyst 5.0 software. **Results** Xinshenghua Granules obviously decreased WBV, PV, and FIB, while promoted the APTT, PT and TT ($P < 0.05, 0.01$). Totally 21 potential biomarkers were identified from blood stasis rats. Compared with control group, the levels of 10 metabolites (such as lactic acid, carnitine and creatinine) increased in model group; while the levels of 11 metabolites (such as malic acid, succinic acid and tryptamine) inclined in model group ($P < 0.05, 0.01$). Except for indoxyl-sulfate and deoxycytidine, the disturbed levels of other 19 metabolites could be reversed to normal-like levels after the drug treatment of Xinshenghua Granules ($P < 0.05, 0.01$). The mainly metabolic pathways were involved with phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis, phenylalanine metabolism, linoleic acid metabolism, TCA cycle and tryptophan metabolism. **Conclusion** Xinshenghua Granules could exert the effects of promoting blood circulation on blood stasis rats by regulating the disturbed endogenous metabolites and the related metabolic pathways.

Key words: Xinshenghua Granules; promoting blood circulation; blood stasis rats; UHPLC-QTOF-MS; metabolomics

新生化颗粒由当归、川芎、姜炭、桃仁、炙甘草、益母草和红花组成^[1],源于“产后第一方”生化汤,生化汤由傅青山创于《傅青主女科》,在此基础上加入益母草和红花大大加强了原方祛瘀生新、调经止痛的功效^[2]。主要用来治疗妇女产后恶露不尽、胞衣不下等病,在临床上获得了广泛的盛誉,其治疗作用与活血化瘀功效密切相关^[3-5]。已有研究表明,新生化颗粒对急性血瘀大鼠的凝血功能和血液流变学等指标有明显改善作用^[6]。然而,新生化颗粒治疗血瘀的作用机制尚不明确。代谢组学从整体角度探讨生物体内源性代谢物的动态变化,与中医药的整体观制剂有异曲同工之处^[7]。近年来,代谢组学已被广泛用于中药复杂方剂的作用机制研究^[8]。

复方丹参滴丸由丹参、三七和冰片组成,具有活血化瘀和理气止痛的功效,现代研究表明复方丹参滴丸有扩张心脑血管、促进心脑血管供血、改善微循环、降低血液黏度、抑制血小板聚集等作用^[9-11],因此本实验选择复方丹参滴丸为阳性药。本研究拟采用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UHPLC-QTOF-MS)方法,探究新生化颗粒对急性血瘀证大鼠血浆中内源性代谢物的影响,从代谢组学角度阐明新生化颗粒“活血化瘀”的作用机制,为新生化颗粒治疗血瘀证提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

50只SPF级雌性SD大鼠,体质量180~220 g,购自上海杰思捷实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为SCKY(沪)2018-0004。于光暗循环各12 h、室温(22±2)℃、正常喂水喂食条件下适应性饲养7 d。所有动物实验均通过南通大学伦理委员会审核批准,批准文号S20200409-012。

1.2 药物及主要试剂

新生化颗粒购自广州白云山制药股份有限公

司,规格每袋6 g,批号为20191008;复方丹参滴丸购自天士力医药集团股份有限公司,规格每袋180粒、每粒27 mg,批号为Z10950111;盐酸肾上腺素注射液购自上海禾丰制药有限公司,批号为170808;氯代苯丙氨酸和酮络芬购自成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为MUST-181208和MUST-190406,质量分数皆大于98%;甲醇购自江苏汉邦科技有限公司,批号20190302,色谱纯;乙腈购自德国默克公司,批号SHBJ7502,色谱纯;甲酸购自德国默克公司,批号SHBJ0623,色谱纯;超纯水为Mill-Q去离子水系统(美国密理博公司)自制。活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)和凝血酶时间(thrombin time, TT)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器

安捷伦1290型UHPLC仪(美国Agilent公司);6530型四极杆-飞行时间串联质谱仪(美国Agilent公司);Centrifuge 5430R多功能微型台式高速离心机(德国Eppendorf公司);EZ2 Plus溶剂蒸发工作站(英国GeneVac公司);赛多利斯万分之一天平(德国赛多利斯公司);LG-R-80 B血液黏度分析仪(北京世帝科学仪器公司)。

2 方法

2.1 新生化颗粒溶液的制备

精密称取新生化颗粒适量,采用0.5%的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成质量浓度为1 g·mL⁻¹的母液,置于4℃冰箱保存,备用。

2.2 动物分组、给药和造模

将50只SD大鼠适应性喂养7 d后,随机分为对照组、模型组、复方丹参滴丸(阳性药,0.10 g·kg⁻¹)组和新生化颗粒低、高剂量(4.86、9.72 g·kg⁻¹)组,每组

10只。给药体积 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 对照组和模型组大鼠 ig 给予等体积 0.5% CMC-Na, 每天早晚各 ig 给药 1 次, 共 7 次。第 5 次给药后, 除对照组外, 参考文献报道方法^[12], 采用冰水浴和 sc 盐酸肾上腺素制备大鼠急性血瘀模型。造模方法: 大鼠 sc 盐酸肾上腺素注射液 $0.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 2 h 后, 将大鼠放于 $0\sim 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰水中持续游泳 5 min, 取出擦干后, 2 h 后再次 sc 盐酸肾上腺素 $0.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.3 样本采集与制备

2.3.1 血液样本采集及处理 末次给药 1 h 后, 所有大鼠 ip 10% 水合氯醛麻醉后, 采用含肝素钠的抗凝管从腹主动脉采血。取部分抗凝血用于血液流变学检测; 部分抗凝血于 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取部分血浆用于血液流变学和凝血功能检测, 部分血浆于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

2.3.2 代谢组学样品的制备 取出 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的血浆样本, 室温解冻, 涡旋 15 s。吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 血浆置于 1.5 mL 离心管中, 加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 色谱级乙腈, 涡旋 60 s, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 经 $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 $600\text{ }\mu\text{L}$ 上清置于新的 1.5 mL 离心管中。采用离心浓缩仪于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下浓缩至干, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含内标的初始流动相复溶[正离子内标: 氯代苯丙氨酸 ($50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 负离子内标: 酮络芬 ($2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)]。

2.3.3 质量控制(QC)样本的制备 每个血浆样本吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$, 混合均匀后作为 QC 样本, 以用于检测 UHPLC-QTOF-MS 的重复性和稳定性。QC 样本的制备方法同代谢组学样品的制备。

2.4 血液流变学和凝血因子检测

分别取 1 mL 肝素钠抗凝全血和血浆, 采用 LG-R-80 B 血液黏度分析仪记录不同切变率下 (1 、 5 、 30 、 200 s^{-1}) 的全血黏度 (whole blood viscosity, WBV) 和血浆黏度 (plasma viscosity, PV)。另取各组大鼠血浆样本根据 ELISA 试剂盒检测说明书分别进行 APTT、PT、FIB 和 TT 的测定。

2.5 UHPLC-QTOF-MS 分析条件

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ ($100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$); 柱温为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; 洗脱溶剂 A 为含 0.05% 的甲酸水溶液, 溶剂 B 为乙腈, 梯度洗脱程序: $0\sim 1.5\text{ min}$, 5% B; $1.5\sim 5.0\text{ min}$, 5%~60% B; $5\sim 7\text{ min}$, 60%~100% B; $7.0\sim 8.5\text{ min}$, 100% B; $8.5\sim 9.0\text{ min}$, 100%~5% B; $9\sim 12\text{ min}$, 5% B; 体积流量为 $0.35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积为 $1\text{ }\mu\text{L}$; 进样器温度为 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.5.2 质谱条件 安捷伦 6530 QTOF-MS 质谱仪采

用正、负离子模式进行数据采集, 正、负离子模式毛细管电压分别为 $3\,500\text{ V}$ 和 $4\,000\text{ V}$; 相对分子质量扫描范围 $m/z\ 50\sim 1\,000$; 干燥气温度 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$; 干燥气体积流量 $11\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 鞘气温度 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$; 鞘气体积流量 $10\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; Fragmentor 电压 120 V ; 雾化器压力 35 V ; Skimmer 电压 70 V ; 扫描频率: 每秒采集 2 张图谱; MS/MS 碰撞电压: 10 、 20 、 40 V 。样本检测前先对 QC 样本连续进样 6 次, 以检测仪器稳定性, 数据分析期间, 每检测 10 个样本检测 1 次 QC 样本, 以确保代谢组学检测结果的稳定可靠。

2.6 代谢组学数据处理

利用安捷伦自带的 MassHunter 5.0 软件将 UHPLC-QTOF-MS 数据转化成后缀为 cef 的数据。采用 Profinder 软件完成保留时间对齐、峰识别、归一化处理等操作。主要参数如下: 保留时间范围 $0.5\sim 12\text{ min}$; 质量数容忍范围 1×10^{-5} ; 峰高阈值 $1\,000$; 保留时间窗口 0.2 min ; 峰强度阈值 300 。采用 SIMCA-P 软件进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。采用 t 检验进行差异统计分析。将同时满足 $\text{VIP}>1$ 和 $P<0.05$ 的代谢离子定义为潜在生物标志物。

采用 MassHunter 5.0 软件获得各潜在生物标志物的保留时间、精确相对分子质量和二级质谱碎片信息, 通过 HMDB (<https://hmdb.ca/>)、Metlin 在线数据库 (<https://metlin.scripps.edu/>) 和对照品比对, 对差异代谢物进行鉴定。将差异代谢物导入 Metabo Analyst 5.0 平台中 Pathway Analysis 模块进行代谢通路富集分析。

2.7 统计分析

采用 SPSS 19 软件进行数据统计分析, 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 进行描述。各组间差异代谢物的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 新生化颗粒对急性血瘀大鼠的药效评价

3.1.1 新生化颗粒对急性血瘀大鼠的血液流变学的影响 结果如表 1 所示, 与对照组比较, 急性血瘀模型大鼠不同切变率下 WBV 和 PV 显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 新生化颗粒组在 30 、 5 、 1 s^{-1} 下的 WBV 和 PV 显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 作用呈剂量相关性, 且高剂量与阳性药作用强度无明显差异。

3.1.2 新生化颗粒对急性血瘀大鼠凝血功能的影响 如表 2 所示, 与对照组大鼠比较, 急性血瘀模型大鼠的 APTT、PT 和 TT 均显著缩短 ($P<0.01$), 而 FIB 水平显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 复方

表1 新生化颗粒对急性血瘀大鼠WBV和PV的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 1 Effects of Xinshenghua Granules on WBV and PV in acute blood stasis rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	WBV/(mPa·s)				PV/(mPa·s)
		200 s ⁻¹	30 s ⁻¹	5 s ⁻¹	1 s ⁻¹	200 s ⁻¹
对照	—	3.41±0.21	4.61±0.26	6.99±0.57	13.86±0.89	1.29±0.12
模型	—	3.99±0.18**	5.16±0.22**	8.96±0.94**	17.92±1.04**	2.35±0.47**
复方丹参滴丸	0.10	3.81±0.33	4.79±0.18 [#]	7.28±0.46 [#]	14.99±1.27 [#]	1.34±0.19 [#]
新生化颗粒	9.72	3.56±0.35	4.71±0.21 [#]	7.43±0.59 [#]	15.16±1.13 [#]	1.51±0.20 [#]
	4.86	3.73±0.39	4.83±0.19 [#]	7.89±0.48 [#]	15.67±0.76 [#]	1.69±0.32 [#]

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group表2 新生化颗粒对急性血瘀大鼠凝血功能的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 2 Effects of Xinshenghua Granules on coagulation function in acute blood stasis rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	APTT/s	PT/s	TT/s	FIB/(g·L ⁻¹)
对照	—	40.21±2.56	9.75±0.69	37.64±1.72	6.26±0.35
模型	—	28.35±1.36**	7.63±0.31**	26.21±0.94**	9.17±0.55**
复方丹参滴丸	0.10	38.16±3.79 [#]	8.89±0.57 [#]	35.16±2.93 [#]	6.87±0.64 [#]
新生化颗粒	9.72	38.58±3.16 [#]	8.63±0.62 [#]	37.01±3.61 [#]	7.99±0.43 [#]
	4.86	34.73±2.93 [#]	8.23±0.49	32.51±3.37 [#]	8.67±0.70

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

丹参滴丸组和新生化颗粒高剂量组的APTT、PT和TT均显著延长($P<0.05$ 、 0.01), 而FIB水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 新生化颗粒低剂量组的APTT和TT显著延长($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明, 新生化颗粒有明显的活血化瘀作用。

3.2 新生化颗粒对急性血瘀大鼠的血浆代谢组学影响

3.2.1 血浆代谢轮廓分析 采用UHPLC-QTOF-MS进行各组血浆样品的数据采集, 正、负离子模式

下对照组、模型组、复方丹参滴丸组和新生化颗粒高、低剂量组大鼠血浆的总离子流图见图1, 由图可知不同组别的血浆代谢轮廓较为相似。

3.2.2 多元统计分析 采用SMICA软件对各组代谢指纹图谱数据进行PCA分析, 如图2所示, QC样本聚为一簇, 表明所建立的代谢组学分析方法有较好的稳定性和重复性。正、负离子模式下, PCA图的 R^2_x 值均大于0.65, 且对照组和模型组均可以得到明显区分, 提示2组大鼠的血浆代谢物存在显著

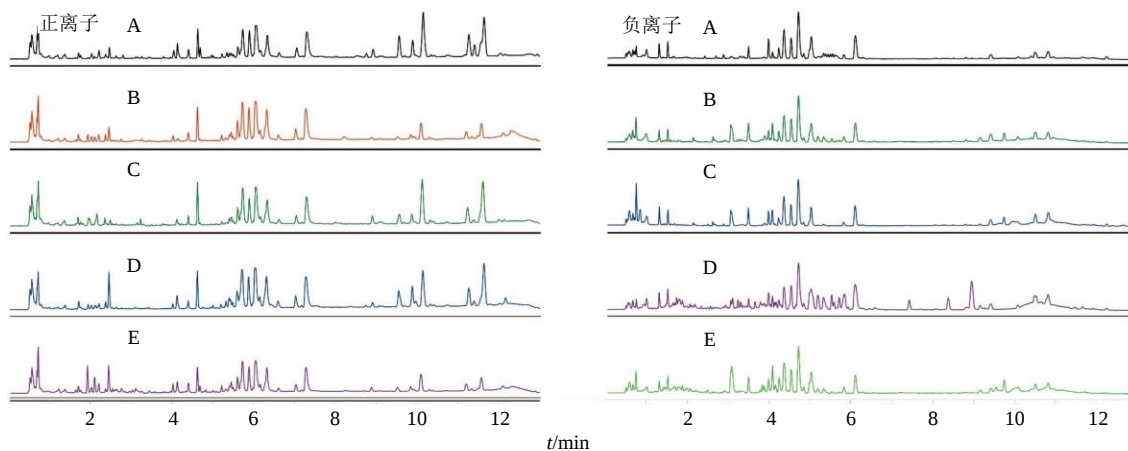
A-对照组; B-模型组; C-复方丹参滴丸组; D-新生化颗粒9.72 g·kg⁻¹组; E-新生化颗粒4.86 g·kg⁻¹组A-control group; B-model group; C-Compound Danshen Dripping Pills group; D-Xinshenghua Granules 9.72 g·kg⁻¹ group; E-Xinshenghua Granules 4.86 g·kg⁻¹ group

图1 血浆样本在正离子和负离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Typical total ion chromatogram of plasma samples in positive and negative modes

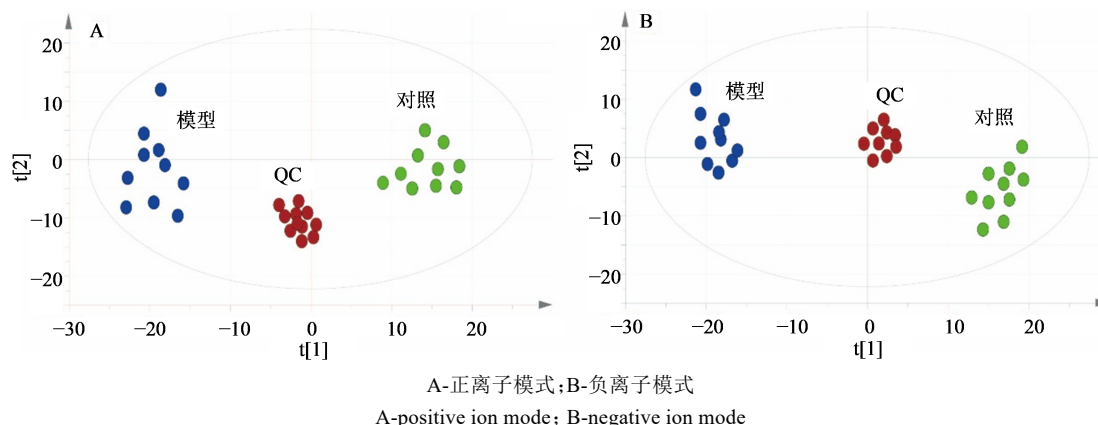


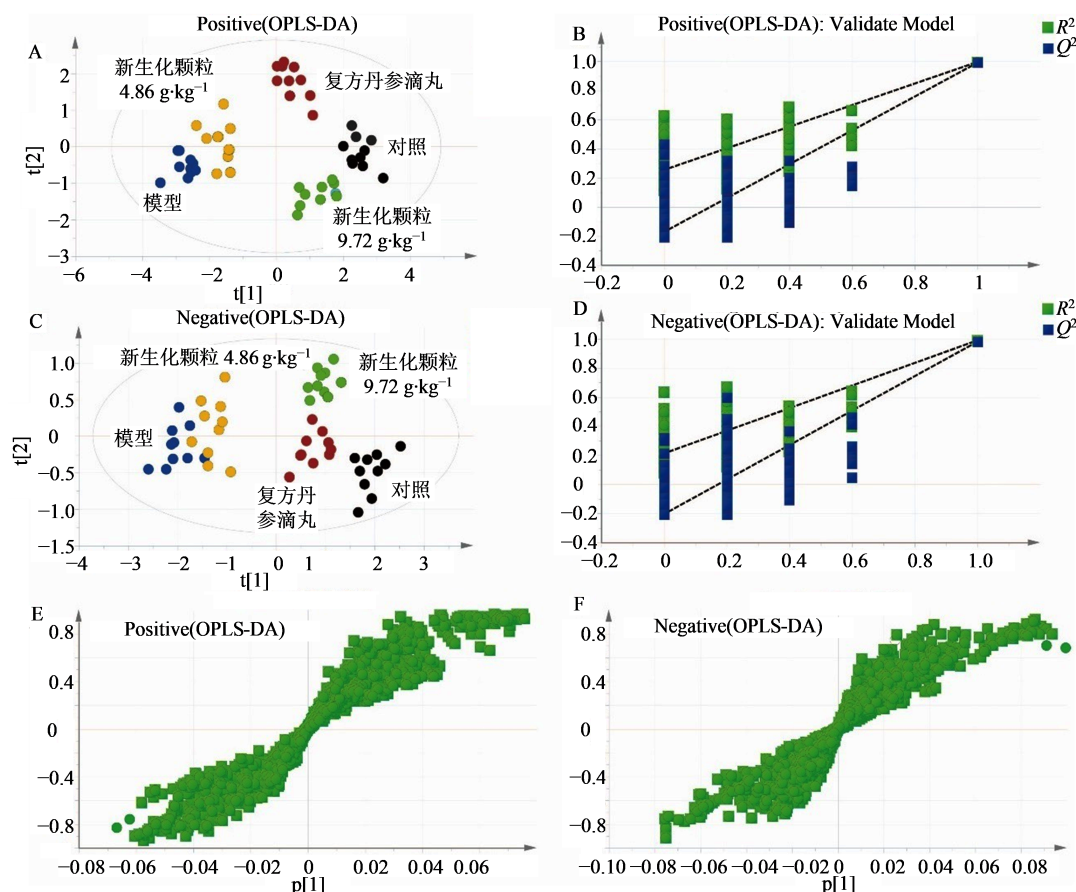
图2 对照组和模型组大鼠血浆样品的PCA得分图

Fig. 2 PCA score plot of plasma samples of rats in control group and model group

差异。

进一步采用OPLS-DA对各样本进行多元统计分析。正离子模式下,OPLS-DA模型的 $R^2_Y=0.856$, $Q^2=0.654$;负离子模式下,对应的 $R^2_Y=0.759$, $Q^2=0.601$,表明所建立的模型稳定可靠。如图3-A和3-C

所示,不同组别之间得到明显区分,对照组和模型组分别聚集在PLS-DA图两侧,表明成功复制急性血瘀模型。复方丹参滴丸组与模型组区分明显,并趋近对照组,与药效评价结果一致;新生化颗粒组散落在对照组和血瘀模型组中间,与低剂量组比



A-正离子模式下OPLS-DA得分图;B-正离子模式下置换检验图;C-负离子模式下OPLS-DA得分图;D-负离子模式下置换检验图;E-正离子模式下S-plot图;F-负离子模式下S-plot图

A-OPLS-DA score diagram in positive ion mode; B-substitution test diagram in positive ion mode; C-OPLS-DA score diagram in anion mode; D-displacement test diagram in anion mode; E-S-plot in positive ion mode; F-S-plot in negative ion mode

图3 各组OPLS-DA得分图、置换检验图和S-plot图

Fig. 3 OPLS-DA plots, permutation test plots and S-plots in positive and negative modes

较,新生化颗粒高剂量组明显靠近对照组。采用置换检验($n=200$)对所建立的OPLS-DA模型进行验证,正离子 R^2 和 Q^2 值分别为0.183和-0.052,负离子模式下 R^2 和 Q^2 值分别为0.215和-0.086,表明所建立的模型未出现过拟合,具有良好的预测能力(图3-B和3-D)。正、负离子模式下的S-plot图如图3-E和3-F所示,越远离中心的点对变量差异的贡献度越大,这些化合物可能是潜在的差异代谢物。

3.2.3 差异代谢物鉴定 将同时满足 $P<0.05$ 且VIP>1的离子定义为差异性离子。参照“2.7”项所述方法对血瘀证大鼠的生物标志物进行鉴定,最终鉴定出21个差异代谢物,其中准确鉴定7个,结果见表3。以肉碱为例说明其鉴定过程,正离子模式下 m/z 162.112 2为对照组和模型组的差异离子,将其精确相对分子质量输入HMDB数据库,共筛选到2个可能代谢物:*L*-carnitine和(*S*)-carnitinium,进一步将其MS/MS碎片144.10、126.15、116.05、100.10

和74.09导入HMDB数据库进行化合物匹配,该化合物被鉴定为肉碱,并经对照品比对,该化合物被准确鉴定为肉碱。这些化合物的含量热图如图4所示。与对照组大鼠比较,急性血瘀模型组大鼠血浆中乳酸、肉碱、肌酐、苯丙氨酸、精氨酸、酪氨酸、脱氧胞苷、乙酰肉碱、花生四烯酸和亚油酸的水平显著升高($P<0.01$);而苹果酸、琥珀酸、色胺、色氨酸、烟酰胺、硫酸吡啶酚、鞘氨醇、甘氨石胆酸、LysoPC(14:0)、LysoPC(16:0)和LysoPC(18:0)的水平显著降低($P<0.01$)。各差异代谢物在不同给药组中的相对含量如图5所示,与模型组比较,新生化颗粒高剂量组除了硫酸吡啶酚和脱氧胞苷外,其他19个差异代谢物均显著向正常状态变化($P<0.05$ 、 0.01);新生化颗粒低剂量组除了琥珀酸、*L*-精氨酸、脱氧胞苷、烟酰胺、硫酸吡啶酚、甘氨石胆酸外,其他15个代谢物均有显著回调($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明新生化颗粒对急性血瘀大鼠的紊乱代谢

表3 血瘀大鼠血浆中潜在生物标志物鉴定结果
Table 3 Results of potential markers in acute blood stasis rats

序号	t_R /min	m/z	ESI 模式	VIP	分子式	代谢物名称	模型组 vs 对照组	新生化颗粒 9.72 g·kg ⁻¹ 组 vs 模型组	新生化颗粒 4.86 g·kg ⁻¹ 组 vs 模型组	HMDB
1	0.721	89.024 2	—	3.09	C ₃ H ₆ O ₃	乳酸	↑**	↓**	↓*	00190
2	0.759	133.087 0	—	1.54	C ₄ H ₆ O ₅	<i>L</i> -苹果酸	↓**	↑**	↑*	00156
3	0.806	162.112 2	+	2.73	C ₇ H ₁₆ NO ₃	<i>L</i> -肉碱 ^a	↑**	↓**	↓*	00062
4	0.838	119.085 3	+	3.98	C ₄ H ₆ O ₄	琥珀酸	↓**	↑*	↑	00254
5	0.965	132.134 4	+	5.68	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	肌酐	↑**	↓**	↓*	00064
6	1.139	161.217 8	+	7.54	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	色胺	↓**	↑**	↑*	00303
7	1.525	164.068 6	+	5.18	C ₉ H ₁₁ NO ₂	<i>L</i> -苯丙氨酸 ^a	↑**	↓**	↓**	00159
8	1.925	201.342 6	—	4.59	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	<i>L</i> -精氨酸 ^a	↑**	↓**	↓	00517
9	2.563	180.063 2	+	3.67	C ₉ H ₁₁ NO ₃	<i>L</i> -酪氨酸 ^a	↑**	↓**	↓*	00158
10	2.924	205.226 6	+	4.01	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	<i>L</i> -色氨酸 ^a	↓**	↑**	↑*	00929
11	3.131	226.084 6	—	3.18	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	脱氧胞苷	↑**	↓	↓	00014
12	3.275	123.055 2	+	1.89	C ₆ H ₆ N ₂ O	烟酰胺	↓**	↑*	↑	01406
13	3.339	214.015 6	+	5.12	C ₈ H ₇ NO ₄ S	硫酸吡啶酚	↓**	↑	↑	00682
14	3.831	204.123 2	+	2.90	C ₉ H ₁₈ NO ₄	乙酰肉碱 ^a	↑**	↓**	↓*	00201
15	3.906	300.513 7	—	2.08	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	鞘氨醇	↓**	↑**	↑*	00269
16	4.284	464.302 3	—	2.55	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	甘氨石胆酸	↓**	↑*	↑	00138
17	4.930	482.296 9	+	3.20	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	LysoPC(14:0)	↓**	↑**	↑**	10379
18	5.366	303.227 1	—	5.28	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	花生四烯酸 ^a	↑**	↓**	↓*	01043
19	5.391	524.371 5	+	7.51	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	LysoPC(18:0)	↓**	↑**	↑**	10384
20	7.238	279.227 5	—	4.70	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	亚油酸	↑**	↓**	↓*	00673
21	7.335	496.339 4	+	3.75	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	LysoPC(16:0)	↓**	↑**	↑**	10382

+ - 正离子, — - 负离子; a - 准确鉴定的化合物; ↑ 为上调, ↓ 为下调; * $P<0.05$ ** $P<0.01$

+ - positive ion, — - negative ion; a - accurately identified compounds; ↑ indicates up, ↓ indicates down; * $P<0.05$ ** $P<0.01$

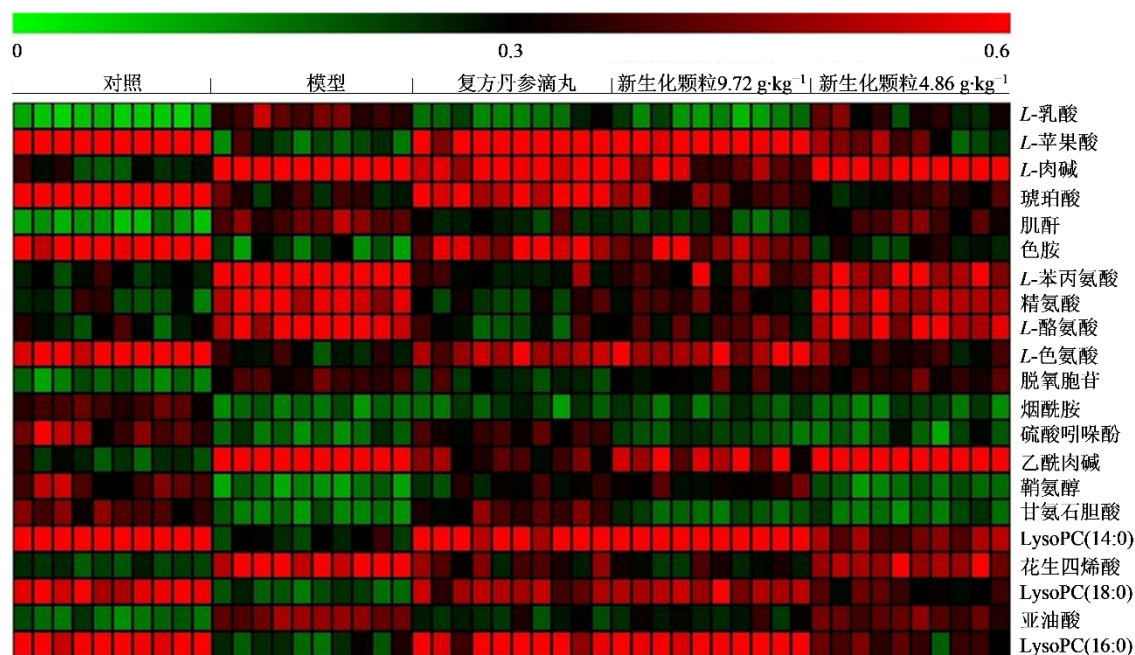


图4 不同组别中差异代谢物的热图分析

Fig. 4 Heatmap of potential markers among different groups

物有较好的调节作用。

3.2.4 代谢通路分析 将表3中的差异化合物导入MetaboAnalyst 5.0在线数据库(<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行代谢通路分析,共映射到23条信号通路。以 $P < 0.05$ 为标准,筛选到5条与急性血瘀证代谢紊乱相关的主要代谢通路,即苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢、亚油酸代谢、色氨酸代谢和三羧酸循环(图6-A)。此外,对差异代谢物进行代谢通路富集分析,差异代谢物主要富集到长链脂肪酸氧化、肉碱生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、苯丙氨酸代谢和酪氨酸代谢等生物过程上(图6-B)。在新生化颗粒给药组中,尤其是新生化颗粒高剂量给药组中,紊乱代谢物的含量皆得到回调,并改善了扰动的代谢通路,在代谢层面揭示新生化颗粒对急性血瘀大鼠有较好的治疗作用,表明新生化颗粒主要通过对上述代谢通路的调节防治血瘀证的发生。

4 讨论

本研究采用UHPLC-QTOF-MS代谢组学方法探讨了新生化颗粒对急性血瘀大鼠的干预作用机制,共筛选到21个差异代谢物,这些差异代谢物主要富集到苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢、亚油酸代谢和三羧酸循环等代谢途径上。这些代谢通路异常与血瘀证的发生发展密切相关。

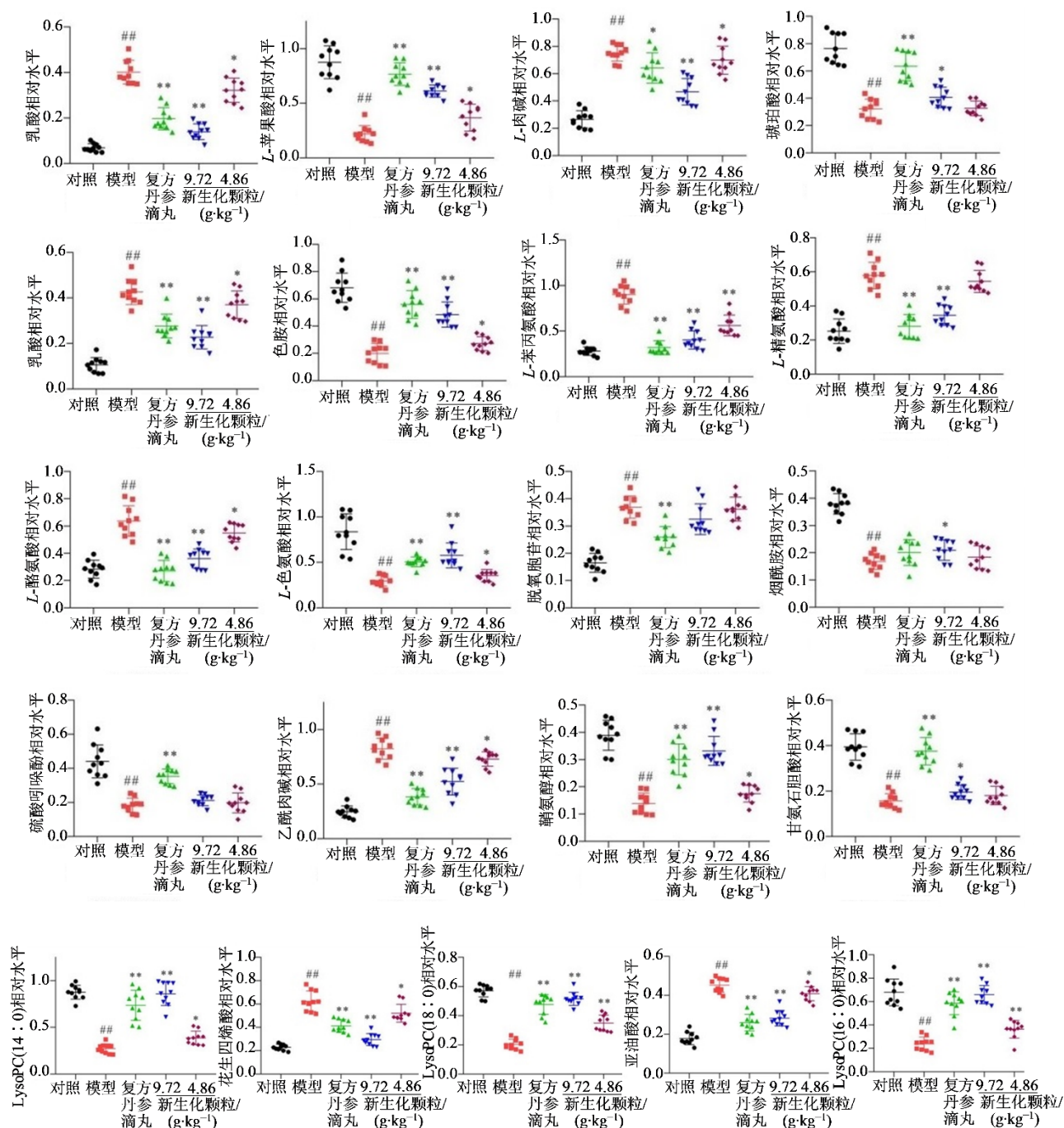
4.1 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢异常

与对照组比较,急性血虚模型大鼠血浆中的苯

丙氨酸和酪氨酸显著升高,而色氨酸明显降低($P < 0.01$),新生化颗粒可以明显调节这些紊乱的代谢物($P < 0.01$)。在急性血瘀状态下,会诱发多巴胺- β -羟化酶和酪氨酸羟化酶的大量表达,继而使得去甲肾上腺素和肾上腺素的表达增加,最终导致血管收缩造成血瘀^[13]。因此,血瘀会导致苯丙氨酸代谢受到抑制,导致血浆中苯丙氨酸和酪氨酸含量升高。色氨酸是合成5-羟色胺(5-HT)的前体化合物,而5-HT是体内重要的神经调节物质和血小板凝血因子,具有较强的收缩血管作用^[14-15]。因此,当血瘀形成时,会致使色氨酸和色胺等色氨酸代谢物在急性血瘀大鼠的血浆中显著降低。

4.2 亚油酸代谢异常

急性血瘀大鼠的另一主要代谢紊乱特征是亚油酸代谢异常。与对照组大鼠比较,急性血瘀大鼠血浆中花生四烯酸和亚油酸水平均显著升高($P < 0.01$),给予新生化颗粒后均得到显著回调($P < 0.01$)。亚油酸具有降低血压、软化血管、降低血脂和增加血液循环而抑制血栓形成的作用^[16-18]。亚油酸含量的明显升高可能是血瘀状态下机体通过代偿性增加亚油酸的生成继而抑制和缓解血瘀的形成。亚油酸的升高会导致花生四烯酸水平升高,进而使得前列腺素E2(PGE2)和血栓素A2(TXA2)的水平增加^[19]。PGE2和TXA2具有凝血、促进血管收缩和血小板聚集的作用,是血栓形成的关键诱导因子^[20]。血瘀大鼠模型血浆中的亚油酸和花生四烯



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图5 差异代谢物在不同组的相对含量的变化

Fig. 5 Relative contents of differential metabolites among different groups

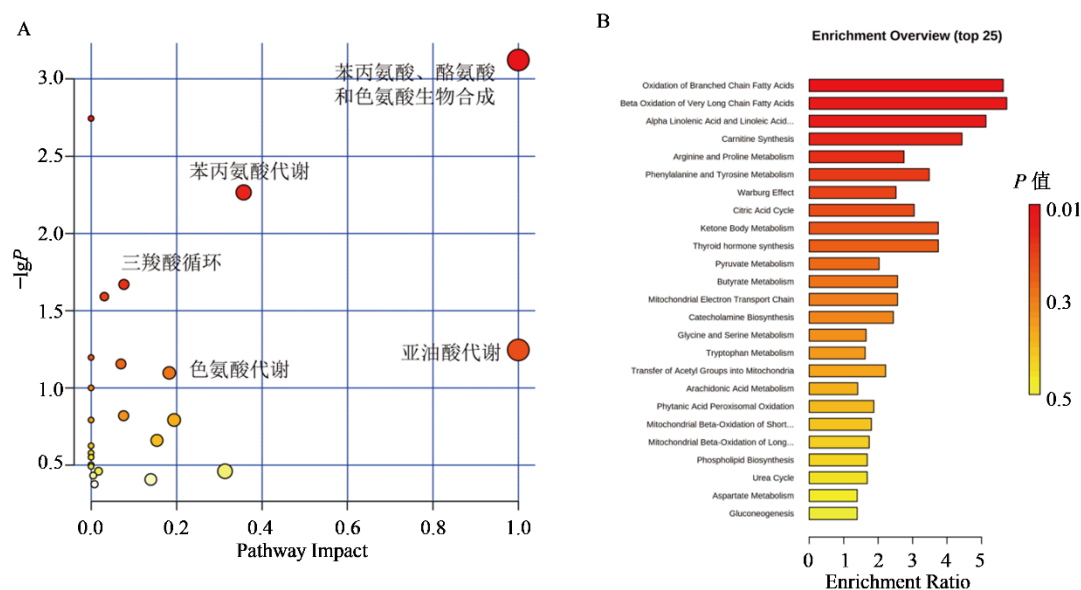
酸的水平增加与文献^[21]报道的结果相一致。

4.3 三羧酸循环代谢异常

三羧酸循环是脂肪代谢、葡萄糖代谢和氨基酸代谢的终端氧化步骤,对于维持生命活动有重要的作用^[19]。急性血瘀大鼠血浆中L-苹果酸和琥珀酸水平显著降低($P < 0.01$),而肌酐水平显著升高($P < 0.01$),表明急性血瘀大鼠已发生能量代谢异

常,相关文献亦报道血瘀模型和能量代谢异常密切相关^[22]。当急性血瘀模型大鼠给予新生化颗粒后,这些紊乱代谢物的水平皆得到回调,表明新生化颗粒通过改善急性血瘀大鼠的能量代谢异常而发挥较好的治疗作用。

本研究通过药效评价、差异代谢物鉴定和代谢通路富集分析,研究新生化颗粒对急性血瘀证的治



疗作用及其作用机制。结合血液流变学和凝血功能指标的变化,与急性血瘀模型组比较,新生化颗粒高、低剂量组的药效指标接近于对照组,综合来看,新生化颗粒高剂量组的作用更显著。除了硫酸吡啶酚和脱氧胞苷外,新生化颗粒高剂量组对其他19个紊乱的内源性代谢物均有明显回调作用,其主要通过调节苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢、亚油酸代谢和三羧酸循环等代谢通路发挥治疗急性血瘀证的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pang H Q, Wang J, Tang Y P, et al. Comparative analysis of the main bioactive components of Xin-Sheng-Hua granule and its single herbs by ultrahigh performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2016, 39(21): 4096-4106.
- [2] 左雯雯, 吴鑫, 黄胜良, 等. 新生化颗粒的HPLC指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(18): 3676-3682.
- [3] 庞汉青, 王军, 唐于平, 等. 基于撤药分析法的当归系列药对在新生化颗粒中的作用贡献研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 4006-4014.

- [4] 张琳, 张小娜, 彭小茹. 新生化颗粒药效学研究 [J]. 中国药师, 2008, 11(5): 515-518.
- [5] Zhang L, Zhang X N, Peng X R. Study on pharmacodynamics of Xinshenghua Granule [J]. China Pharm, 2008, 11(5): 515-518.
- [6] Pang H Q, Tang Y P, Cao Y J, et al. Comparatively evaluating the pharmacokinetic of fifteen constituents in normal and blood deficiency rats after oral administration of Xin-Sheng-Hua Granule by UPLC-MS/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1061/1062: 372-381.
- [7] Pang H Q, Xu D Q, Tang Y P, et al. Comparatively evaluating the role of herb pairs containing *Angelicae Sinensis Radix* in Xin-Sheng-Hua granule by withdrawal analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9456350.
- [8] 黄美艳, 唐于平, 李伟霞, 等. 采用代谢组学策略研究佛手散对急性血瘀大鼠的活血化瘀作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3576-3582.
- [9] Huang M Y, Tang Y P, Li W X, et al. Evaluate activating blood circulation and dissipating blood stasis effect mechanism of Foshousan on acute blood stasis rats on basis of metabolomic approach [J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38(20): 3576-3582.
- [10] Li X Y, Jin X, Li Y Z, et al. Network toxicology and LC-MS-based metabolomics: New approaches for mechanism of action of toxic components in traditional

- Chinese medicines [J]. CHM, 2019, 11(4): 357-363
- [9] 向 柏, 方 瑜, 郑小莉, 等. 复方丹参滴丸的临床应用进展 [J]. 中成药, 2007, 29(12): 1819-1821.
- Xiang B, Fang Y, Zheng X L, et al. Progress in clinical application of compound *Salvia miltiorrhiza* dropping pills [J]. Chin Tradit Pat Med, 2007, 29(12): 1819-1821.
- [10] 陈 凯, 陈敏娜, 王 琼, 等. 基于网络药理学及分子对接技术的复方丹参滴丸治疗心绞痛潜在分子机制探讨 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1282-1293.
- Chen K, Chen M N, Wang Q, et al. Potential molecular mechanism of Compound Danshen Dripping Pills in treatment of angina pectoris based on network pharmacology and molecular docking [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(7): 1282-1293.
- [11] 刘永成, 田 颖, 郭 栋, 等. 复方丹参滴丸治疗原发性高血压的系统评价和Meta分析 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3111-3124.
- Liu Y C, Tian Y, Guo D, et al. Fufang Danshen Dripping Pills in treatment of essential hypertension: A systematic review and Meta-analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(10): 3111-3124.
- [12] Khedr S, Deussen A, Kopaliani I, et al. Effects of tryptophan-containing peptides on angiotensin-converting enzyme activity and vessel tone *ex vivo* and *in vivo* [J]. Eur J Nutr, 2018, 57(3): 907-915.
- [13] 吴雪芬, 郑雪娜, 郭 鑫, 等. 针刺对失眠大鼠5-HT及其受体、HPA轴相关激素影响的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(1): 127-129.
- Wu X F, Zheng X N, Guo X, et al. Effects of acupuncture treatment on 5-HT, its receptors and HPA-related hormones in rats with insomnia [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(1): 127-129.
- [14] Whelan J, Fritsche K. Linoleic acid [J]. Adv Nutr, 2013, 4(3): 311-312.
- [15] Naughton S S, Mathai M L, Hryciw D H, et al. Linoleic acid and the pathogenesis of obesity [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2016, 125: 90-99.
- [16] Burns J L, Nakamura M T, Ma D W L. Differentiating the biological effects of linoleic acid from arachidonic acid in health and disease [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids, 2018, 135: 1-4.
- [17] Szczuko M, Kikut J, Komorniak N, et al. The role of arachidonic and linoleic acid derivatives in pathological pregnancies and the human reproduction process [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): E9628.
- [18] Son D J, Akiba S, Hong J T, et al. Piperine inhibits the activities of platelet cytosolic phospholipase A2 and thromboxane A2 synthase without affecting cyclooxygenase-1 activity: Different mechanisms of action are involved in the inhibition of platelet aggregation and macrophage inflammatory response [J]. Nutrients, 2014, 6(8): 3336-3352.
- [19] Martínez-Reyes I, Chandel N S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 102.
- [20] 卢永康, 彭 康, 朱传武, 等. 补阳还五汤对中风后遗症"气虚血瘀"大鼠模型能量代谢的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(11): 2280-2283.
- Lu Y K, Peng K, Zhu C W, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction on energy metabolism of rats with deficiency of qi and blood stasis after stroke [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2007, 25(11): 2280-2283.
- [21] 黄 烁, 孙明谦, 孙 蕾, 等. 基于液质联用技术对急性血瘀证大鼠动物模型的代谢研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(3): 332-334.
- Huang S, Sun M Q, Sun L, et al. Study on metabolism of acute blood stasis rat model based on the liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2017, 23(3): 332-334.
- [22] 董娟妮, 毛俊俊, 龙丽辉, 等. 红花-甘草配伍对寒凝血瘀模型大鼠血浆及脑组织中腺苷酸及能荷的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(24): 2507-2511.
- Dong J N, Mao J J, Long L H, et al. Effects of *Carthamus tinctorius* L. -*Glycyrrhiza radix* on adenosine acids and energy charge levels in plasma and brain of rats with cold coagulation and blood stasis [J]. Chin J Hosp Pharm, 2019, 39(24): 2507-2511.

[责任编辑 兰新新]