

基于代谢组学技术的黄芪根与地上部分醋酸乙酯部位的药效比较

王二兵¹, 郝津芳², 刘锐玲³, 卢晓林³, 曲婷丽^{3*}, 赵正保^{3*}

1. 太原科技大学化学与生物工程学院, 山西 太原 030021

2. 山西华康药业股份有限公司 质控部, 山西 万荣 442040

3. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 比较黄芪根与地上部分醋酸乙酯部位的药效作用, 为黄芪地上部分的资源利用提供依据。**方法** 采用环磷酰胺复制白细胞减少症小鼠动物模型, 以药效学指标与核磁共振 (NMR) 代谢组学相结合的方法对黄芪根和地上部分醋酸乙酯部位进行药效比较研究。**结果** 黄芪根和地上部分醋酸乙酯部位均可升高白细胞数、单核细胞数、淋巴细胞数和中性粒细胞数; 黄芪根醋酸乙酯部位可回调小鼠脾脏中异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、精氨酸、肌酸、次黄嘌呤 6 个差异代谢物, 黄芪地上部分醋酸乙酯部位可回调小鼠脾脏中精氨酸、天冬氨酸、肌酸、甘油磷酸胆碱、鲨肌醇 5 个差异代谢物, 其治疗指数 (EI) 值分别为 451.83 和 469.17。**结论** 黄芪根与地上部分醋酸乙酯部位均具有较好的升高白细胞的作用, 且升白机制均可能与能量代谢、氨基酸代谢、胆碱代谢和嘌呤代谢有关。

关键词: 黄芪; 地上部分; 根; 醋酸乙酯部位; ¹H-NMR; 代谢组学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)10-2240-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.003

Efficacy comparative analysis between part of ethyl acetate in aerial parts and roots of *Astragali Radix* based on metabolomics

WANG Er-bing¹, HAO Jin-fang², LIU Rui-ling³, LU Xiao-lin³, QU Ting-li³, ZHAO Zheng-bao³

1. Institute of Chemical and Biological Technology, Taiyuan University of Science and Technology, Taiyuan 030021, China

2. Shanxi Huakang Pharmaceuticals Co., Ltd., Wanrong 442040, China

3. School of Pharmaceutical Science of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: **Objective** To compare the efficacy between part of ethyl acetate in aerial parts and roots of *Astragali Radix* (AR), and to provide scientific evidences for the comprehensive utilization of aerial parts of *Astragalus membranaceus* (APAM). **Methods** An experimental mouse model of leucopenia was induced by cyclophosphamide, and efficacy indicators combined with NMR based on metabolomic approach were employed to compare the therapeutic effects of part of ethyl acetate in APAM and AR. **Results** Part of ethyl acetate in APAM and AR increased the contents of white blood cell (WBC), monocytes (MO), lymphocyte (LY), and neutrophils (NE). The levels of six potential endogenous metabolites (isoleucine, leucine, valine, arginine, creatine, and hypoxanthine) were reversed by part of ethyl acetate in APAM, and five potential endogenous metabolites (arginine, aspartate, creatine, GPC, and scyllo-Inositol) were reversed by part of ethyl acetate in AR. Efficacy indexes were 451.83 and 469.17. **Conclusion** Both parts of ethyl acetate in APAM and AR elevated WBC, the mechanisms of them on leukocytosis were probably related to energy metabolism, amino acids metabolism, choline metabolism, and purine metabolism.

Key words: *Astragali Radix*; aerial parts; roots; part of ethyl acetate; ¹H-NMR; metabolomics

黄芪为临床上常用的中药, 性味甘、微温, 归肺、脾经, 具有益气固表、排脓托毒、利尿、敛疮生肌等功效, 可用于呼吸系统、消化系统、心血管系统等疾

病的治疗^[1-4]。《中国药典》2015 年版一部收录黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄

收稿日期: 2018-01-23

作者简介: 王二兵 (1979—), 男, 讲师, 硕士, 主要从事中药新药及代谢组学研究。E-mail: erbing_wang@126.com

*通信作者 曲婷丽 (1981—), 女, 副教授, 博士, 主要从事中药新药及代谢组学研究。E-mail: qutingli@126.com

赵正保 (1961—), 男, 教授, 博士, 主要从事溃疡性结肠炎新药及中药质量控制研究。Tel: (0351)4690242 E-mail: zhengbao_z@163.com

芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 其药用部位为根, 但文献研究报道^[5-8]黄芪地上部分(主要由茎和叶组成)含有与黄芪(根)相类似的化学成分, 即含有黄酮、皂苷、多糖等, 且总含量相差不大, 如黄芪根含总皂苷 0.261 6%, 黄芪茎叶含总皂苷 0.216 2%, 黄芪地上茎叶含多糖 0.78%, 根部含多糖 1.10%; 另外, 黄芪地上部分具有增强抗体形成功能、增强单核巨噬细胞的吞噬功能、免疫刺激和免疫调节、抗氧化、抗炎、保肝等药理活性^[9-12]。

由于黄芪药材的种植面积有限, 生长周期长, 导致其产量少, 但临床使用量较大, 而黄芪地上部分每年均可采收, 且其产量是根的 3~4 倍, 长期以来作为非药用部位大量废弃。因此为了充分利用黄芪资源, 本课题组对黄芪根和地上部分进行了化学成分和药效活性的比较研究。前期研究发现黄芪根与地上部分水提液均具有较好的升高白细胞的作用^[13], 但水提液中含有的化学成分除了次级代谢物(黄酮类、皂苷类等), 还含有大量的初级代谢物(氨基酸类、有机酸类等)。一般认为黄芪中的黄酮类和皂苷类等次级代谢物是其发挥活性的药效成分, 因此本研究首先制备富含黄酮类和皂苷类成分的黄芪根及地上部分水提液醋酸乙酯萃取物(以下简称醋酸乙酯部位), 通过复制白细胞减少症动物模型, 采用药效指标结合代谢组学技术对黄芪根和地上部分的醋酸乙酯部位进行药效活性比较, 为黄芪地上部分的资源利用提供参考及依据。

1 材料

1.1 药材

黄芪根及地上部分(5年生)均采自山西省浑源县, 采自同一区域, 经山西医科大学药学院白云娥副教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao, 样品保存于山西医科大学。

1.2 动物

昆明种小鼠, 雄性, 体质量(20±2)g, 购自山西医科大学动物中心, 实验动物许可证号 SCXK(晋)2009-0001。动物颗粒饲料喂养, 自由摄食、饮水, 适应1周后进行实验。

1.3 仪器与试剂

Bruker 600.13 MHz 核磁仪(德国布鲁克公司); 动物血球分析仪(美国 Drewscientific 公司); TGL-16 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);

超声波细胞破碎机(宁波新芝生物科技有限公司)。环磷酸胺(江苏盛迪医药有限公司, 批号 15092125); 醋酸乙酯(分析纯, 北京化学试剂公司); 三甲基硅烷丙酸钠盐(TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA); K₂HPO₄、NaH₂PO₄(分析纯, 天津广福精细化工研究所); NMR 试剂: 重水(Norell, Landisville 公司); 氘代甲醇(质量分数 99.8%, Merck 公司)。

2 方法

2.1 黄芪根及地上部分醋酸乙酯部位的制备

将黄芪药材(根)粉碎成粉末, 取粉末 100 g, 加 1 000 mL 水, 加热提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩至 100 mL, 加同体积的醋酸乙酯萃取 3 次, 合并醋酸乙酯萃取液, 浓缩至干, 即得黄芪根醋酸乙酯部位(HQ-R-E)。取黄芪地上部分同法操作, 即得黄芪地上部分醋酸乙酯部位(HQ-A-E)。

2.2 动物模型的制备及给药

取小鼠称质量、编号, 随机分为 4 组(每组 6 只), 分别为对照组、模型组、HQ-R-E 组和 HQ-A-E 组。实验操作过程参照文献方法^[13]进行, HQ-R-E 组和 HQ-A-E 组均连续 ig 给药 10 d, 剂量相当于黄芪根及地上部分生药 10 g/(kg·d)(此为黄芪药材临床上的日最大服用量, 且预试验结果证实此剂量有效), 于实验第 4~6 天, 模型组、HQ-R-E 组和 HQ-A-E 组小鼠均 ip 环磷酸胺 80 mg/kg, 对照组 ip 生理盐水, 于末次给药 24 h 后, 眼眶采血, 进行血常规指标检测。颈椎脱臼处死小鼠, 解剖, 取小鼠脾脏, 放入液氮中速冻, 置于-80℃冰箱保存, 备用。

2.3 脾脏核磁备样及测定条件

2.3.1 脾脏样品的制备 取各组脾脏样本约 80 mg, 精密称定, 置 EP 管中, 加甲醇-水(1:2)混合溶液 900 μL, 匀浆 5 min 后, 离心(4℃、13 000 r/min) 15 min, 取上清液并在氮气流下干燥。干燥后的样品加入含 0.01% TSP 的磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L K₂HPO₄-0.2 mol/L KH₂PO₄, pH 7.4) 550 μL 溶解, 最后离心(4℃、13 000 r/min) 15 min 后, 取 500 μL 上清液转移至 5 mm 核磁管中用于 NMR 分析^[14]。

2.3.2 测定条件 所有样品在 600 MHz NMR 仪上测定, 扫描频率为 600.13 MHz, 扫描次数 64, 谱宽 12 345.7 Hz, 采用 noesypr1d 序列, TSP 作为内标。

2.4 NMR 数据处理

所有核磁图谱均采用 MestReNova 软件(version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella,

西班牙) 处理。经过定标、基线和相位校正后, 以 δ 0.01 积分段对 δ 0.01~9.00 进行分段积分, δ 4.60~5.61 的残余水峰不进行积分。将积分后的数据导入到 excel 表中, 用于后续的分析。

2.5 数据统计分析

多变量数据分析采用 SIMCA-P 13.0 软件 (Umetrics, 瑞典) 进行。主成分分析 (PCA) 首先在以均值为中心的数据上进行, 以识别对照组和模型组之间的差异。应用偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 对样品组间的代谢特征进行鉴别。结构判别分析 (OPLS-DA) 用于识别对群体分离起作用的代谢物。对模型的有效性进行 200 次置换测试, 7 倍交叉验证和 CV-ANOVA 方法分析。

实验值 (血常规指标值及代谢物的相对含量)

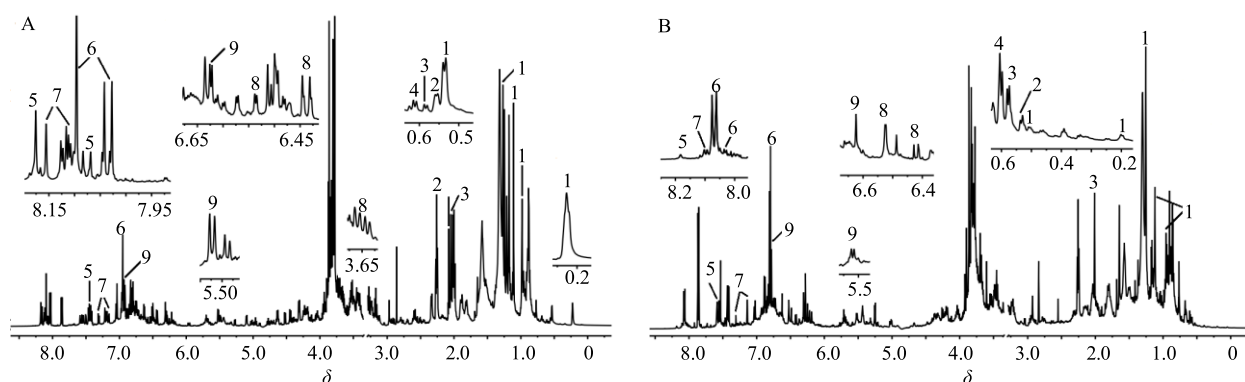


图 1 HQ-R-E (A) 和 HQ-A-E (B) ^1H -NMR 图谱

Fig. 1 Typical ^1H -NMR spectra in HQ-R-E (A) and HQ-A-E (B)

表 1 HQ-R-E 和 HQ-A-E 的化学成分指认

Table 1 Assignments of ^1H -NMR spectral peaks obtained from HQ-R-E and HQ-A-E

编号	代谢物	δ_{H}	来源
1	黄芪皂苷 I	0.25 (s), 0.55 (s), 0.89 (s), 0.99 (s), 1.12 (s), 1.19 (s), 1.22 (s), 1.26 (s), 2.00 (s), 2.03 (s)	HQ-R-E、HQ-A-E
2	黄芪皂苷 II	0.25 (s), 0.57 (s), 0.89 (s), 0.97 (s), 2.08 (s)	HQ-R-E、HQ-A-E
3	黄芪皂苷 III	0.37 (d, $J=4.2$ Hz), 0.53 (d, $J=4.2$ Hz), 2.02 (s)	HQ-R-E、HQ-A-E
4	黄芪皂苷 IV	0.25 (d, $J=4.2$ Hz), 0.58 (d, $J=4.2$ Hz), 1.01 (s), 1.24 (s)	HQ-R-E、HQ-A-E
5	芒柄花素	7.04 (d, $J=9.0$ Hz), 7.45 (d, $J=9.0$ Hz), 8.07 (d, $J=8.7$ Hz), 8.18 (s)	HQ-R-E、HQ-A-E
6	毛蕊异黄酮	6.85 (d, $J=8.0$ Hz), 6.93 (dd, $J=3.2, 6.4$ Hz), 7.04 (brs), 8.04 (d, $J=9.0$ Hz), 8.11 (s)	HQ-R-E、HQ-A-E
7	毛蕊异黄酮苷	7.23 (d, $J=2.4$ Hz), 7.20 (dd, $J=2.4, 9.0$ Hz), 8.13 (d, $J=9.0$ Hz), 8.18 (s)	HQ-R-E、HQ-A-E
8	异黄烷苷	2.97 (dd, $J=4.8, 10.8$ Hz), 3.65 (dd, $J=5.4, 6.6$ Hz), 6.42 (d, $J=8.7$ Hz), 6.53 (d, $J=2.3$ Hz)	HQ-R-E、HQ-A-E
9	紫檀烷苷	5.52 (d, $J=6.7$ Hz), 6.54 (d, $J=2.4$ Hz), 6.63 (d, $J=2.4$ Hz), 6.79 (dd, $J=2.4, 8.4$ Hz), 6.92 (d, $J=7.7$ Hz), 7.7 (d, $J=8.4$ Hz)	HQ-R-E、HQ-A-E

3.2 HQ-R-E 和 HQ-A-E 药效比较

由图 2 可知, 在实验的第 11 天, 与对照组比较, 模型组小鼠的白细胞数 (WBC)、中性粒细胞 (NE)、淋巴细胞 (LY)、单核细胞 (MO) 均有显著降低 ($P<0.01$), 说明在实验的 11 d 内, 白细胞

均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。

3 结果

3.1 HQ-R-E 和 HQ-A-E 的化学成分比较

HQ-R-E 和 HQ-A-E 的 ^1H -NMR 样品制备方法, 参照文献方法^[15]制备。通过比对对照品和文献资料报道数据^[16-18], 从 ^1H -NMR 图谱 (图 1) 可以看出, HQ-A-E 与 HQ-R-E 含有相同的化学成分, 即黄酮类成分有芒柄花素、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、异黄烷苷、紫檀烷苷; 皂苷类成分有黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 IV (表 1)。但在化学成分相对含量方面, 与 HQ-R-E 相比, HQ-A-E 中黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 IV、芒柄花素、异黄烷苷的相对含量相对较高, 而黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、紫檀烷苷的相对含量较低 (表 2)。

减少症的小鼠模型没有自行恢复。而 HQ-R-E 组和 HQ-A-E 组小鼠的血常规指标 (WBC、NE、LY、MO) 均有明显的恢复, 与模型组比较差异显著 ($P<0.01$), 但 HQ-R-E 和 HQ-A-E 两组之间比较差异无显著性 ($P>0.05$)。

3.3 核磁共振分析

小鼠脾脏 ^1H -NMR 谱图见图 3。依据文献资料^[19-21]、HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 和 BMRB (<http://www.bmrwisc.edu/>) 共指出脾脏中的代谢物 33 个 (表 3), 包括 5 种有机酸, 分别为 3-羟基

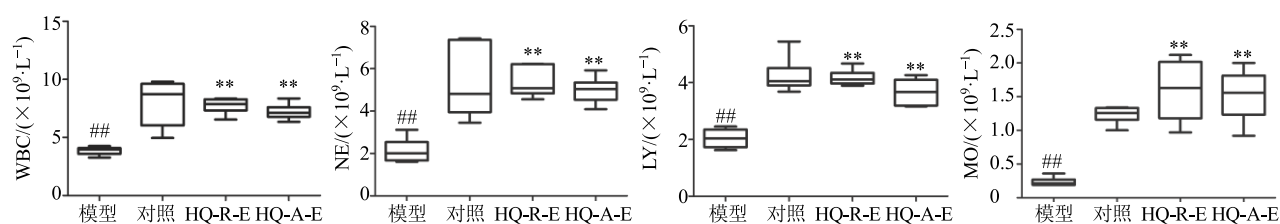
丁酸、醋酸、牛磺酸、甲酸和富马酸; 13 个氨基酸, 分别为缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、精氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸; 2 个糖酵解产物, 分别为乳酸和丙酮酸; 3 个胆碱代谢物, 分别

表 2 HQ-R-E 和 HQ-A-E 中主要化合物的相对含量

Table 2 Relative contents of major components in HQ-R-E and HQ-A-E

黄芪部位	相对含量				
	黄芪皂苷 I	黄芪皂苷 II	黄芪皂苷 III	黄芪皂苷 IV	芒柄花素
HQ-A-E	0.831 8±0.048 5	0.396 0±0.042 1	0.061 7±0.007 1	3.248 9±0.353 7	0.184 3±0.007 6
HQ-R-E	0.410 6±0.032 7	1.346 0±0.101 8	0.254 0±0.023 3	1.204 7±0.078 1	0.159 4±0.005 5

黄芪部位	相对含量			
	毛蕊异黄酮	毛蕊异黄酮苷	异黄烷苷	紫檀烷苷
HQ-A-E	0.157 8±0.017 9	0.014 2±0.001 1	0.340 1±0.035 4	0.216 1±0.020 6
HQ-R-E	0.291 5±0.024 5	0.079 9±0.006 5	0.066 7±0.006 4	0.239 4±0.039 6



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

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

图 2 HQ-R-E 和 HQ-A-E 对小鼠血常规的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of HQ-A-E and HQ-R-E on periphery blood parameters of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

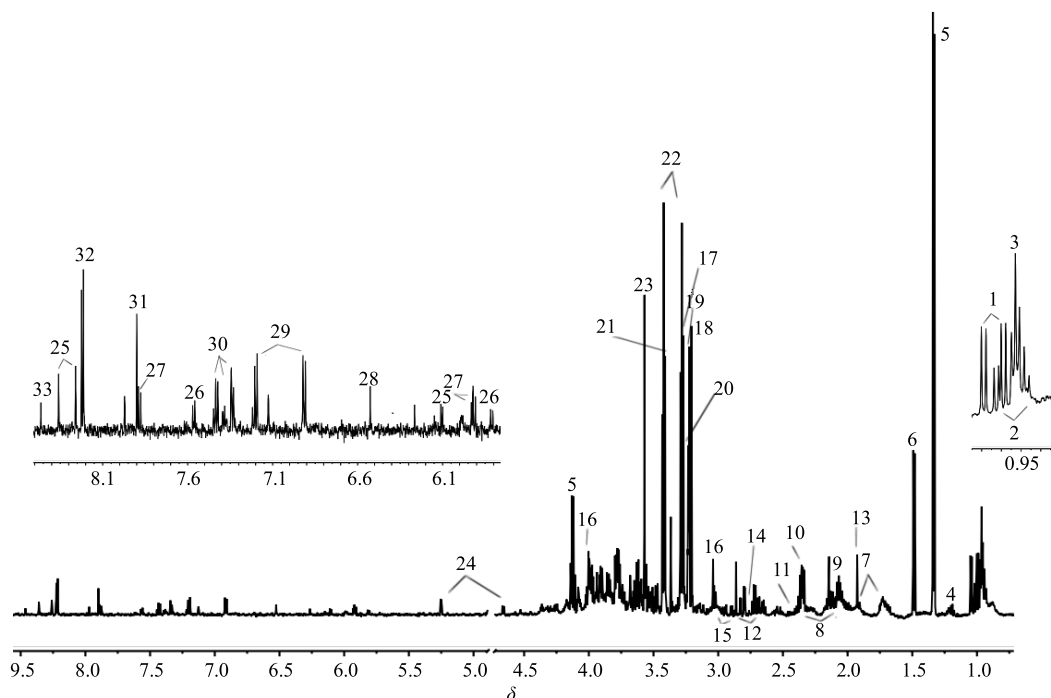


图 3 小鼠脾脏 ^1H -NMR 图谱

Fig. 3 Representative ^1H -NMR spectra of spleen in mice

表 3 $^1\text{H-NMR}$ 指认的小鼠脾脏中的代谢物Table 3 $^1\text{H-NMR}$ assignments of major metabolites from mice spleen

编号	代谢物	δ_{H}
1	缬氨酸	0.99 (d, $J=7.2$ Hz), 1.04 (d, $J=6.6$ Hz)
2	异亮氨酸	0.94 (t, $J=7.2$ Hz), 1.01 (d, $J=6.6$ Hz)
3	亮氨酸	0.96 (t, $J=6.6$ Hz)
4	3-羟基丁酸	1.20 (d, $J=6.6$ Hz)
5	乳酸	1.33 (d, $J=7.2$ Hz), 4.12 (q, $J=7.2$ Hz)
6	丙氨酸	1.48 (d, $J=7.2$ Hz)
7	精氨酸	1.70 (m), 1.92 (m)
8	谷氨酸	2.07 (m), 2.35 (m)
9	蛋氨酸	2.14 (s), 2.14 (m), 2.64 (t, $J=7.8$ Hz)
10	丙酮酸	2.37 (s)
11	谷氨酰胺	2.44 (m), 3.77 (m)
12	天冬氨酸	2.67 (dd, $J=8.4, 17.4$ Hz), 2.82 (dd, $J=3.6, 17.4$ Hz)
13	醋酸	1.93 (s)
14	二甲胺	2.74 (s)
15	天冬酰胺	2.89 (dd, $J=7.2, 16.8$ Hz), 2.94 (dd, $J=4.2, 16.8$ Hz)
16	肌酸	3.03 (s), 3.94 (s)
17	鲨肌醇	3.36 (s)
18	胆碱	3.21 (s)
19	磷脂酰胆碱	3.22 (s)
20	甘油磷酸胆碱	3.23 (s)
21	甜菜碱	3.27 (s)
22	牛磺酸	3.27 (t, $J=6.6$ Hz), 3.42 (t, $J=6.6$ Hz)
23	甘氨酸	3.56 (s)
24	葡萄糖	5.23 (d, $J=3.6$ Hz), 4.65 (d, $J=7.8$ Hz)
25	肌苷	6.10 (d, $J=5.4$ Hz), 8.24 (s), 8.35 (s)
26	尿嘧啶	5.81 (d, $J=7.8$ Hz), 7.55 (d, $J=7.8$ Hz)
27	尿苷	5.90 (d, $J=7.8$ Hz), 5.92 (d, $J=4.8$ Hz), 7.89 (d, $J=8.4$ Hz)
28	富马酸	6.52 (s)
29	酪氨酸	6.91 (d, $J=8.4$ Hz), 7.20 (d, $J=8.4$ Hz)
30	苯丙氨酸	7.33 (d, $J=7.2$ Hz), 7.39 (m), 7.43 (t, $J=7.2$ Hz)
31	黄嘌呤	7.90 (s)
32	次黄嘌呤	8.20 (s), 8.22 (s)
33	甲酸	8.46 (s)

为胆碱、磷脂酰胆碱和甘油磷酸胆碱；1 个有机胺类化合物二甲胺；7 个含氮化合物，分别为肌酸、甜菜碱、肌苷、尿嘧啶、尿苷、黄嘌呤和次黄嘌呤以及葡萄糖和鲨肌醇。

3.4 多元统计分析

从对照组和模型组的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中，可明显看出，对照组和模型组小鼠脾脏中的代谢物有显著

的差异，为了更详细地了解模型（即环磷酸腺苷诱导

的白细胞减少症）组小鼠体内脾脏中代谢物的变化水平，进一步进行多元统计分析。

在 PCA 得分图（图 4-A）中，脾脏中的代谢物在对照组和模型组之间能明显分开，PC1 和 PC2 分别为 34.2% 和 14.0%。图 4-B 为 PLS-DA 图，左边的预测值均低于右边的原始值，说明了判别模型的有效性。采用 OPLS-DA（图 4-C）结合 VIP 值（ >1.0 ）来寻找对照组和模型组之间的差异代谢物。

3.5 HQ-R-E 和 HQ-A-E 对差异代谢物的回调作用

分析发现（表 4），HQ-R-E 可回调脾脏中异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、精氨酸、肌酸、次黄嘌呤 6 个差异代谢物，HQ-A-E 可回调脾脏中精氨酸、天冬氨酸、肌酸、甘油磷酸胆碱、鲨肌醇 5 个差异代谢物。与 HQ-R-E 相比，HQ-A-E 可明显回调差异代谢物中天冬氨酸、鲨肌醇的水平，且回调作用具有显著性差异（ $P<0.05$ ）；不能回调异亮氨酸、次黄嘌呤的水平（ $P<0.05$ ）；对相同差异代谢物精氨酸、肌酸的回调作用，无显著性差异（ $P>0.05$ ）。综上分析，HQ-R-E 与 HQ-A-E 均具有升高白细胞的作用，但对脾脏中内源性代谢物的回调作用不全相同，而导致它们可能通过不同的机制升高白细胞。

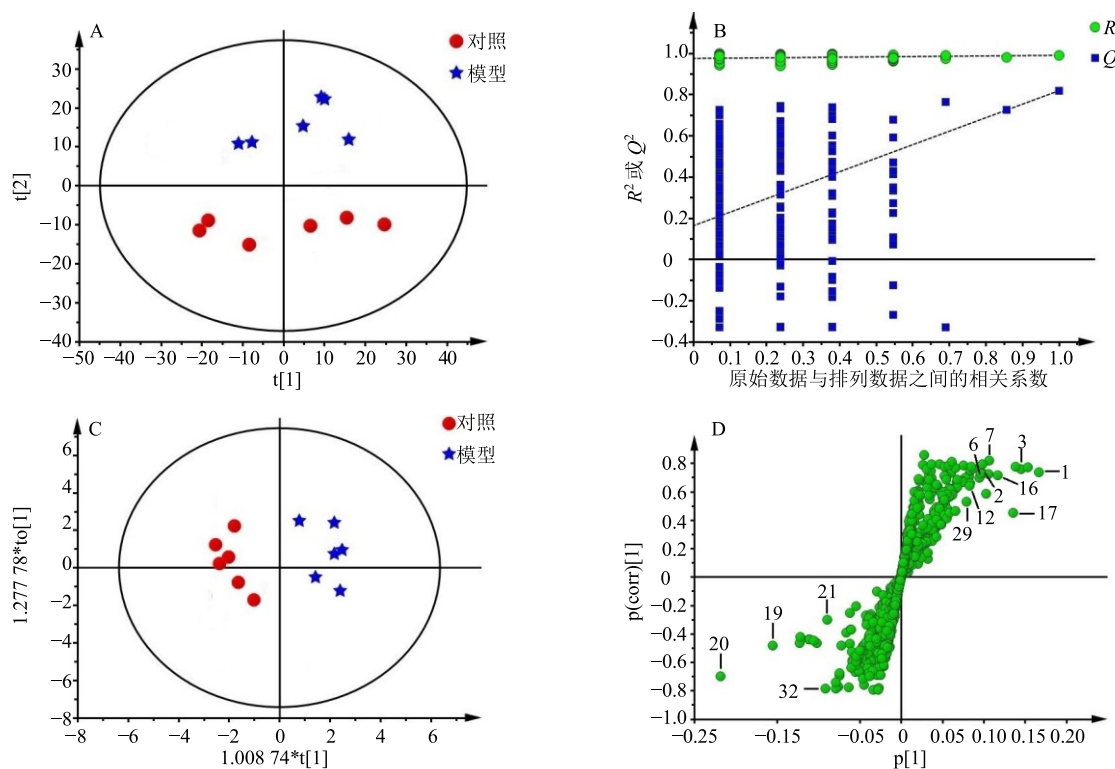
为了比较两给药组对白细胞减少症的治疗作用，引入了回调率和治疗指数（EI）指标。

$$\text{回调率} = |(X_i - M_i)/(M_i - C_i)|$$

$$\text{EI} = \sum_{i=1}^n |(X_i - M_i)/(M_i - C_i)|$$

C_i 是指对照组中某一代谢物的平均相对含量， M_i 是指模型组中某一代谢物的平均相对含量， X_i 是指给药组中某一代谢物的平均相对含量

EI 是所有代谢物的回调率之和，值越大，表明回调作用越大，即治疗白细胞减少症的作用更强。经计算 HQ-A-E 回调率分别为 51.63%（精氨酸）、137.09%（天冬氨酸）、67.70%（肌酸）、60.21%（甘油磷酸胆碱）、152.54%（鲨肌醇），EI 值为 469.17%；HQ-R-E 回调率分别为 164.01%（异亮氨酸）、55.06%



D 图中的代谢物编号与表 3 中代谢物编号相对应

Number of metabolites in Fig. D corresponds to the number of metabolites in Table 3

图 4 对照组和模型组小鼠脾脏的 PCA 图 (A)、PLS-DA 模型验证 (B)、OPLS-DA 图 (C) 和 S-plot 图 (D)

Fig. 4 PCA score plot (A), PLS-DA permutation test (B), OPLS-DA score plot (C), and S-plot (D) of mice spleen between control and model groups

表 4 HQ-R-E 和 HQ-A-E 对小鼠脾脏中潜在生物标志物的调节作用

Table 4 Regulation effects of HQ-R-E and HQ-A-E on potential biomarkers in mice spleen

组别	相对含量						
	异亮氨酸	亮氨酸	缬氨酸	丙氨酸	精氨酸	天冬氨酸	肌酸
对照	0.415 1±0.026 7	0.966 5±0.081 4	0.672 8±0.061 4	0.432 6±0.076 4	0.212 0±0.052 8	0.106 6±0.016 5	0.253 1±0.024 3
模型	0.312 3±0.046 4 ^{##}	0.633 2±0.106 9 ^{##}	0.433 4±0.073 5 ^{##}	0.295 2±0.039 0 ^{##}	0.123 5±0.020 1 ^{##}	0.085 3±0.014 8 [#]	0.162 4±0.022 0 ^{##}
HQ-A-E	0.349 2±0.056 1 ^{▲▲}	0.723 4±0.139 5	0.505 8±0.109 5	0.329 6±0.020 8	0.169 2±0.029 0 ^{**}	0.114 5±0.016 1 ^{▲▲}	0.223 8±0.031 1 ^{**}
HQ-R-E	0.480 9±0.079 2 ^{**}	0.816 7±0.124 4 [*]	0.531 0±0.090 2 [*]	0.351 6±0.070 4	0.176 6±0.043 2 [*]	0.083 5±0.022 8	0.204 0±0.034 1 [*]

组别	相对含量					
	磷脂酰胆碱	甘油磷脂酰胆碱	甜菜碱	鲨肌醇	酪氨酸	次黄嘌呤
对照	0.421 3±0.046 4	2.360 2±0.309 3	1.373 6±0.278 5	0.130 6±0.017 6	0.139 2±0.020 7	0.198 4±0.036 2
模型	0.508 4±0.093 1 [#]	3.764 4±0.937 8 ^{##}	1.786 0±0.413 5 [#]	0.085 3±0.022 7 ^{##}	0.089 4±0.017 2 ^{##}	0.285 6±0.047 6 [#]
HQ-A-E	0.495 9±0.095 1	2.919 0±0.362 8 [*]	1.453 4±0.272 6	0.154 4±0.025 3 ^{▲▲}	0.105 6±0.019 2	0.271 4±0.058 5 ^{▲▲}
HQ-R-E	0.497 6±0.087 8	2.947 4±0.740 9	1.591 8±0.369 0	0.098 8±0.022 7	0.104 4±0.017 5	0.210 5±0.028 7 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与 HQ-R-E 组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs HQ-R-E group

(亮氨酸)、40.77%(缬氨酸)、60.00%(精氨酸)、45.87%(肌酸)、86.12%(次黄嘌呤), EI 值为 451.83%。表明 HQ-R-E 和 HQ-A-E 升高白细胞的作用相当。

4 讨论

4.1 HQ-R-E 和 HQ-A-E 成分及药效差异

HQ-R-E 和 HQ-A-E 含有相同的化学成分, 但

相对含量差别较大,这说明植物中次级代谢物的生物合成与自身的环境息息相关,但药效学比较发现,HQ-R-E 和 HQ-A-E 的药效活性差别较小,均具有较好的升高白细胞的作用,这可能是因为虽然 HQ-R-E 和 HQ-A-E 中所含有的化合物含量不同,但进入小鼠体内后,化合物之间能相互转化,如黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II 能转化为黄芪皂苷 IV,毛蕊异黄酮苷能水解为毛蕊异黄酮^[22],所以可能所有化合物共同作用的结果使得 HQ-R-E 和 HQ-A-E 具有相似的升高白细胞的作用。

4.2 HQ-R-E 和 HQ-A-E 对小鼠脾脏代谢物的影响

HQ-R-E 和 HQ-A-E 均具有较好的升高白细胞的作用,可通过作用于能量代谢、氨基酸代谢、胆碱代谢和嘌呤代谢发挥升高白细胞的作用。

4.2.1 能量代谢 亮氨酸和异亮氨酸是重要的生酮氨基酸,可转化为 3-羟基丁酸的中间产物而产生能量^[23]。模型组中亮氨酸和异亮氨酸的水平均下降,说明环磷酰胺影响了小鼠体内的能量代谢。HQ-R-E 给药后,亮氨酸和异亮氨酸的水平均明显回调,说明 HQ-R-E 可通过恢复能量代谢升高白细胞。

肌酸是由甘氨酸、蛋氨酸和精氨酸在肝脏中合成,它可在肌酸激酶的作用下转化成磷酸肌酸,而磷酸肌酸是一种重要的储能化合物,能存储 ATP 的能量^[24-25]。模型组小鼠脾脏中肌酸、精氨酸的水平均下降,给予 HQ-R-E 和 HQ-A-E 后,肌酸和精氨酸的水平均回调,说明 HQ-R-E 和 HQ-A-E 升高白细胞的作用可能与能量代谢有关。

4.2.2 氨基酸代谢 文献报道^[26]环磷酰胺会影响小鼠脾脏中氨基酸的代谢水平,进而影响到体内的氨基酸代谢。氨基酸在机体内有重要的作用,它是构成蛋白质的基本单位,且对免疫系统也有重要的作用,如精氨酸是维持动物生长的必需氨基酸,对免疫系统有重要的调节作用^[27]。实验中,模型组小鼠体内异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、酪氨酸的水平均降低,说明环磷酰胺影响了小鼠脾脏中氨基酸的代谢水平,与之前的文献报道一致^[15]。与模型组相比,HQ-R-E 给药组小鼠脾脏中异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、精氨酸的水平均回调,HQ-A-E 给药组中,精氨酸、天冬氨酸的水平均明显回调,且两给药组均可回调精氨酸的水平;两给药组之间比较,HQ-R-E 可明显回调小鼠脾脏中异亮氨酸的水平,HQ-A-E 可明显回调天冬氨酸的水平。HQ-R-E 和 HQ-A-E 均可通过调

节氨基酸代谢而升高白细胞。

4.2.3 嘌呤代谢 文献报道^[26]环磷酰胺可影响动物体内次黄嘌呤的水平,而干扰嘌呤代谢;且次黄嘌呤能引起动物体内白细胞减少^[28]。本实验中,模型组小鼠脾脏中次黄嘌呤的水平升高,而 HQ-R-E 给药后,可明显回调次黄嘌呤的水平,说明 HQ-R-E 可通过影响嘌呤代谢而升高白细胞。

4.2.4 胆碱代谢 磷脂酰胆碱、甘油磷脂酰胆碱和胆碱是构成细胞膜的基本成分,它们水平的变化会引起细胞膜损伤,进而会影响细胞的数量^[29]。本研究中,模型组小鼠体内磷脂酰胆碱和甘油磷脂酰胆碱的水平升高,而 HQ-A-E 给药后,小鼠脾脏甘油磷脂酰胆碱的水平回调,说明其升高白细胞机制可能与影响机体的胆碱代谢有关。

在本研究中,发现 HQ-R-E 和 HQ-A-E 中含有相同的化学成分,但在含量上有差异;药效学和代谢组学比较发现,HQ-R-E 和 HQ-A-E 均具有较好的升高白细胞的作用,且升高白细胞的作用相当,可通过作用于能量代谢、氨基酸代谢、胆碱代谢和嘌呤代谢发挥作用。由于黄芪的药理作用广泛,单以白细胞减少症动物模型为研究对象,很难得出 HQ-A-E 可代替黄芪用于临床的结论,因此,在后续研究中,应增加与黄芪不同药理作用相适应的动物模型,多方面比较 HQ-R-E 和 HQ-A-E 的药效差异,为黄芪地上部分作为药用资源奠定基础。

参考文献

- [1] Li C X, Luo J, Li L, *et al.* The collagenolytic effects of the traditional Chinese medicine preparation, Han-Dan-Gan-Le, contribute to reversal of chemical induced liver fibrosis in rats [J]. *Life Sci*, 2003, 72(14): 1563-1571.
- [2] 左 军, 张文钊, 胡晓阳, 等. 黄芪现代药理及临床研究进展 [J]. *中医药信息*, 2014, 31(1): 111-112.
- [3] Zhao L H, Ma Z X, Zhu J, *et al.* Characterization of polysaccharide from *Astragalus Radix* as the macrophage stimulator [J]. *Cell Immunol*, 2011, 271(2): 329-334.
- [4] Kuo Y H, Tsai W J, Loke S H, *et al.* *Astragalus membranaceus* flavonoids (AMF) ameliorate chronic fatigue syndrome induced by food intake restriction plus forced swimming [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122(1): 28-34.
- [5] Lin L Z. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus* [J]. *J Chromatogr*, 2000, 876(1/2): 87-95.

- [6] 朱正兰, 江蔚新. 黄芪地上部分有效成分研究 [J]. 黑龙江医药, 2004, 17(6): 417-419.
- [7] 毕志明, 余庆涛, 李 萍, 等. 蒙古黄芪地上部分的黄酮类成分 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 263-265.
- [8] 张国庆. 内蒙黄芪茎叶与根部有效成分比较研究 [J]. 中草药, 2007, 38(增刊): 264-265.
- [9] 陈虎虎, 龚苏晓, 张铁军, 等. 黄芪茎、叶的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 134-137.
- [10] 张国庆. 黄芪茎叶的利用研究. 黄芪茎叶的利用研究 [J]. 天津药学, 2010, 22(5): 5-7.
- [11] 焦 艳, 闻 杰, 张德山. 膜荚黄芪茎叶总黄酮对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中医药信息, 1997(5): 44.
- [12] 焦 艳, 闻 杰, 于晓红, 等. 膜荚黄芪茎叶总黄酮对小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(6): 356-358.
- [13] Wang E B, Jin B F, Li X, *et al.* Comparative analysis between aerial parts and roots (*Astragali Radix*) of *Astragalus membranaceus* by NMR-based metabolomics [J]. *Food Agr Immunol*, 2017, 28(6): 1126-1141.
- [14] Niu Q Y, Li Z Y, Du G H, *et al.* ¹H NMR based metabolomic profiling revealed doxorubicin-induced systematic alterations in a rat model [J]. *J Pharm Biomed*, 2016, 118(11): 338-348.
- [15] Qu T L, Li Z Y, Zhao S J, *et al.* A metabonomic analysis reveals novel regulatory mechanism of Huangqi injection on leucopenia mice [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, 38(2): 113-123.
- [16] Liu Y Q, Nyberg N T, Jäger A K, *et al.* Facilitated visual Interpretation of scores in principal component analysis by bioactivity-labeling of ¹H-NMR spectra-metabolomics investigation and identification of a new α -glucosidase inhibitor in *Radix Astragali* [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 411.
- [17] Li Z Y, He P, Sun H F, *et al.* ¹H NMR based metabolomic study of the antifatigue effect of *Astragali Radix* [J]. *Mol Bio Syst*, 2014, 10(11): 3022-3030.
- [18] Li A P, Li Z Y, Sun H F, *et al.* Comparison of two different *Astragali Radix* by a ¹H NMR-based metabolomic approach [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(5): 2005-2016.
- [19] Jiang L M, Huang J, Wang Y L, *et al.* Metabonomic analysis reveals the CCl₄-induced systems alterations for multiple rat organs [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(7): 3848-3859.
- [20] Zhang L M, Ye Y F, An Y P, *et al.* Systems responses of rats to A Fatoxin B1 exposure revealed with metabonomic changes in multiple biological matrices [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(2): 614-623.
- [21] Shin J H, Yang J Y, Jeon B Y, *et al.* ¹H NMR-based metabolomic profiling in mice infected with mycobacterium tuberculosis [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(5): 2238-2247.
- [22] Liu M H, Li P L, Zeng X, *et al.* Identification and pharmacokinetics of multiple potential bioactive constituents after oral administration of *Radix Astragali* on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 5047-5071.
- [23] Shi X H, Xiao C N, Wang Y L, *et al.* Gallic acid intake induces alterations to systems metabolism in rats [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(2): 991-1006.
- [24] Ma C, Bi K S, Zhang M, *et al.* Toxicology effects of morning glory seed in rat: A metabonomic method for profiling of urine metabolic changes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 134-142.
- [25] Ma C, Bi K S, Zhang M, *et al.* Metabonomic study of biochemical changes in the urine of morning glory seed treated rat [J]. *J Pharm Biomed*, 2010, 53(3): 559-566.
- [26] Qu T L, Wang E B, Li A P, *et al.* NMR based metabolomic approach revealed cyclophosphamide-induced systematic alterations in a rat model [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(112): 111020-111030.
- [27] Roth E. Immune and cell modulation by amino acids [J]. *Clin Nutr*, 2007, 26(5): 535-544.
- [28] Ding L, Zhang F B, Liu H, *et al.* Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase activity is related to 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine-induced leukopenia in the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18(1): 63-73.
- [29] Li F, Xu Q, Zheng T, *et al.* Metabonomic analysis of allium macrostemon bunge as a treatment for acute myocardial ischemia in rats [J]. *J Pharm Biomed*, 2014, 88(88c): 225-234.