

驴胶补血颗粒对环磷酰胺致小鼠白细胞减少症的作用及代谢组学机制研究

何小燕^{1,2}, 颜磊^{1,2}, 徐向平³, 黄胜³, 颜冬兰³, 秦雪梅^{1,2}, 田俊生^{1,2,3*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

3. 九芝堂股份有限公司, 湖南 长沙 410205

摘要: **目的** 观察驴胶补血颗粒对环磷酰胺致小鼠白细胞减少症的改善作用, 并采用 ¹H-NMR 代谢组学方法探讨其作用机制。 **方法** 采用 ip 环磷酰胺的方法制备小鼠白细胞(WBC)减少症模型, 测定 WBC、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)和血小板(PLT)等血液常规指标。利用 ¹H-NMR 代谢组学技术分析小鼠血清中内源性代谢产物的变化, 并对差异代谢产物进行通路分析, 探讨驴胶补血颗粒对 WBC 减少症小鼠血清内源性代谢产物的调节作用及其代谢通路调控机制。 **结果** 与对照组比较, 模型组小鼠 WBC、RBC、HGB 以及 PLT 水平显著降低 ($P < 0.01$), 而驴胶补血颗粒能显著升高小鼠 WBC 和 PLT 水平 ($P < 0.05$), 并回调潜在的差异代谢产物的水平。 **结论** 驴胶补血颗粒可能通过调节机体免疫功能、调控能量代谢和氨基酸代谢达到改善 WBC 减少症的作用。

关键词: 驴胶补血颗粒; 环磷酰胺; 白细胞减少症; 核磁共振; 代谢组学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2282-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.008

Investigation on positive effect and possible mechanisms of Lvjiao Buxue Granules treatment on cyclophosphamide-induced leucopenia mice through ¹H-NMR based metabolomics approach

HE Xiao-yan^{1,2}, YAN Lei^{1,2}, XU Xiang-ping³, HUANG Sheng³, YAN Dong-lan³, QIN Xue-mei^{1,2},
TIAN Jun-sheng^{1,2,3}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Taiyuan 030006, China

3. Jiuzhitang Co., Ltd., Changsha 410205, China

Abstract: Objective To investigate the positive effect and possible mechanism of Lvjiao Buxue Granules on the leukopenia induced by cyclophosphamide in mice using ¹H-NMR metabolomics approach. **Methods** Cyclophosphamide was used to establish the leucopenia mice, and the content of white blood cells, red blood cells, hemoglobin, platelets and other routine blood indexes were measured. The changes of endogenous metabolites in serum were analyzed by ¹H-NMR metabolomics to investigate the regulation effect of Lvjiao Buxue Granules on serum endogenous metabolites in mice with leukopenia and the regulation mechanism of metabolic pathway. **Results** Compared with the control group, the contents of white blood cells, red blood cells, hemoglobin, and platelets in the model group were decreased significantly ($P < 0.01$), while the level of white blood cells and platelets in the treatment group were increased significantly ($P < 0.05$), and Lvjiao Buxue Granules can call back the level of potential differences metabolites. **Conclusion** Lvjiao Buxue Granules can improve leukopenia by regulating the immune function, energy metabolism, and amino acid metabolism.

Key words: Lvjiao Buxue Granules; cyclophosphamide; leucopenia; ¹H-NMR; metabolomics

收稿日期: 2018-01-11

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目(2016M602414); 山西省科技研究计划(201603D321077, 201603D3113013, 201601D011122, 201701D22111344); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18); 山西省重点实验室基金(201605D111004)

作者简介: 何小燕(1992—), 女, 山西临汾人, 硕士在读, 研究方向为中药药理。Tel: 18234124138 E-mail: hexiaoyan0760@163.com

*通信作者 田俊生(1980—), 男, 内蒙古人, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理与新药研发。

Tel: (0351)7019297 Fax: (0351)7018379 E-mail: jstian@sxu.edu.cn

白细胞 (WBC) 减少症是指外周血中 WBC 数量低于 $4 \times 10^9/L$, 由细菌病毒感染、肿瘤放化疗以及某些毒性药物等引发的一种疾病^[1-3]。在肿瘤放化疗中尤为常见, 其主要发病机制为抗肿瘤药物缺乏特异性, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 对正常细胞尤其是增生旺盛的骨髓细胞造成严重损伤, 从而导致 WBC 生成减少^[4-5]。

目前对于 WBC 减少症的传统治疗药物如碳酸锂等效果不够明确, 新型药物如粒细胞集落刺激因子等则价格昂贵, 副作用较大, 而中成药如地榆升白片 (DY)、芪胶升白胶囊等治疗 WBC 减少症具有多组分、多靶点、多途径的特点以及疗效好、毒副作用小的优点^[6-9]。驴胶补血颗粒 (LJG) 由阿胶、熟地黄、黄芪、当归、党参、白术 6 味药材组成, 具有补血、益气、调经的功效, 广泛用于各类贫血、血小板减少、月经不调等疾病的治疗^[10-15]。临床观察发现, LJG 对癌症患者放化疗过程中产生的 WBC 减少症具有一定的治疗效果^[16-17], 然而其现代药理研究相对匮乏, 作用机制尚不明确。

代谢组学是系统生物学的重要组成部分, 基于系统性、整体性的特点使得其对中药复方治疗的多组分、多靶点整体药效评价以及机制研究具有明显优势^[18-21]。王穆等^[22]采用代谢组学的方法研究了四物汤对环磷酰胺所致血虚证的治疗效果; 李伟霞等^[23]采用代谢组学的方法研究了佛手散对血虚小鼠的养血补血作用机制; 刘彩春等^[24]采用代谢组学的方法研究了 LJG 的补血作用机制, 但是有关 LJG 改善 WBC 减少症的效果及作用机制的研究报道较少。

环磷酰胺为临床常用广谱抗肿瘤药物, 其可干扰 DNA 及 RNA 功能, 在干扰肿瘤细胞的同时也会影响到正常细胞, 因此常用于复制 WBC 减少症^[25-26]、免疫抑制^[27-28]、血虚证^[29-30]等实验动物模型。环磷酰胺诱导的 WBC 减少症动物模型表现与临床癌症患者化疗症状比较接近。因此, 本研究采用环磷酰胺致小鼠 WBC 减少症模型, 结合 1H -NMR 代谢组学方法, 对 LJG 的升白作用及其机制进行探讨, 为该药物的临床合理使用及新适应症的增加提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及仪器

注射用环磷酰胺 (批号 15051325, 江苏盛迪医药有限公司); LJG (批号 201402011, 九芝堂股份

有限公司); DY (批号 150201, 成都地奥集团天府药业股份有限公司); D_2O (美国默克试剂公司); Bruker 600 MHz 核磁测试仪 (德国布鲁克公司); 动物用血液细胞分析仪 (迈瑞医疗国际有限公司)。

1.2 动物

SPF 级健康雄性 ICR 小鼠, 体质量 18~22 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2014-0001。

1.3 模型制备、分组及给药

将 72 只小鼠置于室温 (24 ± 1) $^{\circ}C$ 、湿度 (60 ± 5) % 及昼夜自然节律光照环境下自由饮食。适应 1 周后随机分为对照组, 模型组, LJG 高 (LJGH, 12 g/kg)、中 (LJGM, 6 g/kg)、低 (LJGL, 3 g/kg) 剂量组, 阳性对照 DY 组 (0.14 g/kg), 每组 12 只。参照文献方法^[31-33]并结合预试验改进造模方法, 将本次造模分为 2 个阶段: 第 1~3 天, 除对照组外其他各组 ip 给予环磷酰胺 80 mg/kg, 对照组 ip 给予等体积生理盐水, 连续 3 d。第 16~18 天, 重复进行上述造模过程连续 3 d。各给药组于第 5 天起, 开始 ig 给药, 对照组和模型组给予等体积蒸馏水, 每日 1 次, 连续 17 d。

1.4 血清样本收集及血液学常规指标检测

分别于实验第 4、19、22 天即第 1 阶段造模后、第 2 阶段造模后和给药 17 d 后, 小鼠断尾采血, 收集血液样本, 用于血液学常规指标测定。实验第 23 天, 小鼠摘眼球采血, 收集血液样品, 室温静置 30 min, $4^{\circ}C$ 、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 置于 $-80^{\circ}C$ 冰箱保存备用。

1.5 小鼠脏器指数的检测

于第 23 天颈椎脱臼处死小鼠, 解剖取小鼠脾脏与胸腺, 生理盐水稍加冲洗后吸干脏器表面水分, 称定质量, 分别计算脾脏及胸腺的脏器指数, 脏器指数 = 脏器质量/体质量。

1.6 血清 1H -NMR 检测

将血清样品在冰水中解冻, 精密吸取 100 μL 置于 1.5 mL EP 管中, 加入 350 μL D_2O , 涡旋 30 s, $4^{\circ}C$ 、13 000 r/min 离心 20 min, 取上清 400 μL 转移至 5 mm 核磁管中, 待测。

血清样品采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列在 600 MHz NMR 仪上测定, 以衰减蛋白质和脂蛋白的宽峰。测定频率为 600.13 MHz, 扫描次数为 128, 谱宽 12 345.679 Hz, 傅里叶变换 0.188 Hz, 脉冲间隔 D1 为 1 s, 延迟时间为 4.0 s。

1.7 $^1\text{H-NMR}$ 谱图处理与数据分析

核磁谱图采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 处理。参照文献方法^[9], 以肌酐甲基峰的化学位移 (δ 3.04) 为标准, 对 $^1\text{H-NMR}$ 谱图进行定标及相位和基线校正, 并去除 δ 4.67~5.61 残余水峰的干扰, 以 δ 0.01 的积分段对化学区间 δ 0.82~8.49 进行分段积分并根据总峰面积归一化。将图谱积分值输入到 Excel 2010 (Microsoft Inc) 中, 再将 Excel 数据导入 SIMCA-P 14.1 软件中进行偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 并在 SPSS 16.0 软件中对差异代谢产物进行 ANOVA 分析, 以 $\text{VIP}>1$ 和 $P<0.05$ 为差异代谢产物。

为了确定差异代谢产物的相关通路, 将差异代谢物进一步导入 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 中, 选择 Pathway analysis, 输入差异代谢名称, 选择 Pathway library 为 Mus musculus (mouse), 根据其通路富集分析的 P 值和通路拓扑学分析的 Impact 值筛选作用通路。

采用 SPSS 16.0 统计软件对血常规数据以及脏器指数进行单因素方差分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 LJG 对 WBC 减少症小鼠血液学常规指标的影响

2.1.1 WBC 指标 实验第 4、19、22 天各组小鼠 WBC 测定结果见图 1。由图 1 可知, 第一阶段造模后, 除对照组外, 其余各组小鼠 WBC 数目显著下降, 表明环磷酰胺致小鼠 WBC 减少症模型复制成功。给药 15 d (实验第 19 天) 后, 由于环磷酰胺的干预, 给药组小鼠与模型组之间 WBC、红细胞 (RBC)、血红蛋白 (HGB) 和血小板 (PLT) 量无显著差异。继续给予 LJG, 至实验第 22 天各给药组小鼠 WBC 数目趋于正常水平, 且与模型组比较差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。表明 LJG 和 DY 对环磷

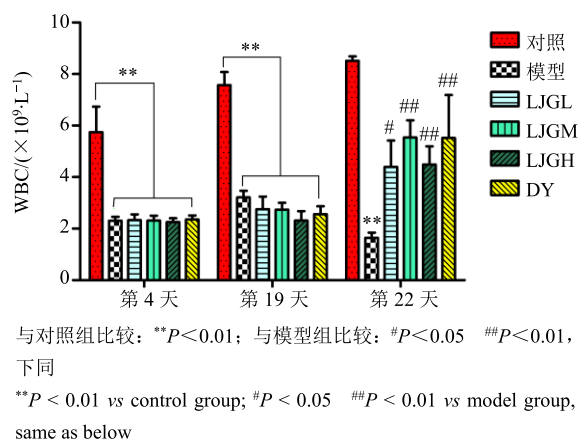


图 1 LJG 对 WBC 减少症小鼠血清中 WBC 量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Fig. 1 Effect of LJG on serum WBC level in leucopenia mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

酰胺造成的 WBC 减少症均具有一定的改善作用, 其中以 LJGM 作用效果最佳。

2.1.2 其他血液学常规指标 对对照组、模型组和 LJGM 组小鼠其他血液学常规指标检测结果进行分析 (表 1)。第 1 阶段给予环磷酰胺后, 模型组小鼠血清中 RBC、HGB 以及 PLT 量与对照组比较均无显著差异, 而第 2 阶段给予环磷酰胺后, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 RBC、HGB、PLT 量显著下降。说明随着环磷酰胺造模的进行, 小鼠血清中 RBC、HGB、PLT 含量也随之显著降低, 而 LJGM 给药 17 d 后可以显著增加小鼠血清中 PLT 的量 ($P<0.01$)。

2.2 LJG 对 WBC 减少症小鼠脏器指数的影响

模型组小鼠的脾脏和胸腺指数均显著低于对照组 ($P<0.01$, 图 2), 表明环磷酰胺对小鼠的免疫器官具有一定的损伤作用。与模型组比较, LJGM 能够不同程度地增加小鼠脾脏和胸腺指数 ($P<0.01$), 表明 LJG 能够改善环磷酰胺导致的脏器损伤。

2.3 血清 $^1\text{H-NMR}$ 谱图分析

对照组、模型组、LJGM 组小鼠血清 $^1\text{H-NMR}$

表 1 LJG 对 WBC 减少症小鼠血清中 RBC、HGB、PLT 量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Effect of LJG on serum RBC, HGB, and PLT in leucopenia mice ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	第 4 天			第 19 天			第 22 天		
	RBC	HGB	PLT	RBC	HGB	PLT	RBC	HGB	PLT
对照	4.51 $\pm$ 0.39	64.42 $\pm$ 8.20	1 148.00 $\pm$ 108.99	5.22 $\pm$ 0.58	71.75 $\pm$ 8.83	946.58 $\pm$ 173.83	5.50 $\pm$ 0.86	76.90 $\pm$ 13.94	1 051.46 $\pm$ 182.67
模型	4.51 $\pm$ 0.48	63.58 $\pm$ 7.83	1 035.67 $\pm$ 190.52	4.71 $\pm$ 0.56**	63.55 $\pm$ 6.86**	710.89 $\pm$ 216.94**	4.37 $\pm$ 0.30**	59.25 $\pm$ 5.11**	588.44 $\pm$ 129.88**
LJGM	4.41 $\pm$ 0.36	61.58 $\pm$ 4.46	989.33 $\pm$ 158.15	4.40 $\pm$ 0.74**	58.88 $\pm$ 9.23**	696.38 $\pm$ 211.33**	4.28 $\pm$ 0.69**	59.37 $\pm$ 12.64**	730.50 $\pm$ 141.70**

图谱见图 3。通过化学位移、偶合常数以及裂分情况等核磁数据分析,参考文献报道^[24]并结合 HMDB (<http://www.hmdb.ca>) 数据库以及 Chenomx NMR suite (Chenomx Inc., 加拿大) 软件分析,共指出 32 种内源性代谢产物,主要包括氨基酸、糖类以及有机酸等,具体指认结果见图 3 和表 2。

2.4 多元统计分析

2.4.1 环磷酰胺对小鼠血清代谢产物的影响 为观

察环磷酰胺造模对小鼠血清代谢产物的影响,对对照组和模型组进行 OPLS-DA (图 4-A)。OPLS-DA 利用正交信号校正的思想,能够滤除一些随机噪声,更好地区分组间差异,提高模型的有效性和解析能力。模型验证图可以用于判定 OPLS-DA 模型是否过拟合,设定检验次数为 200,得到模型验证结果如图 4-B 所示,左侧所有 Q^2 值低于右侧原始点或 Q^2 的回归线与纵轴相交数值小于零,证明 OPLS-DA

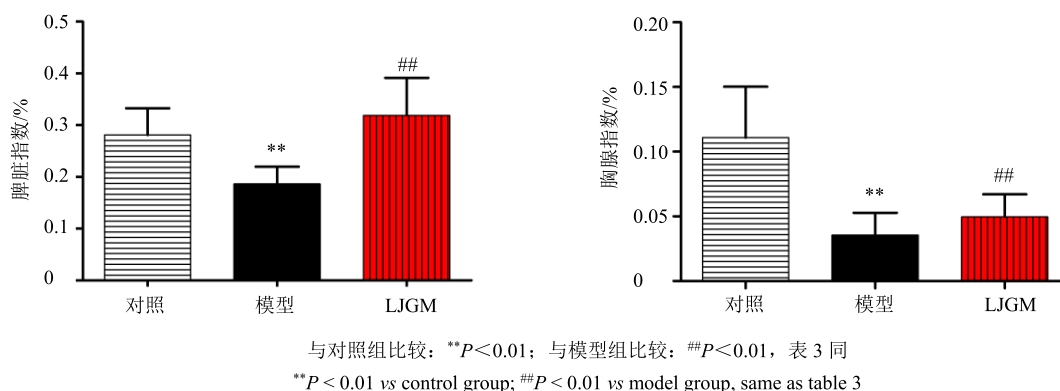


图 2 LJG 对 WBC 减少症小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
 Fig. 2 Effect of LJG on spleen and thymus index in leucopenia mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

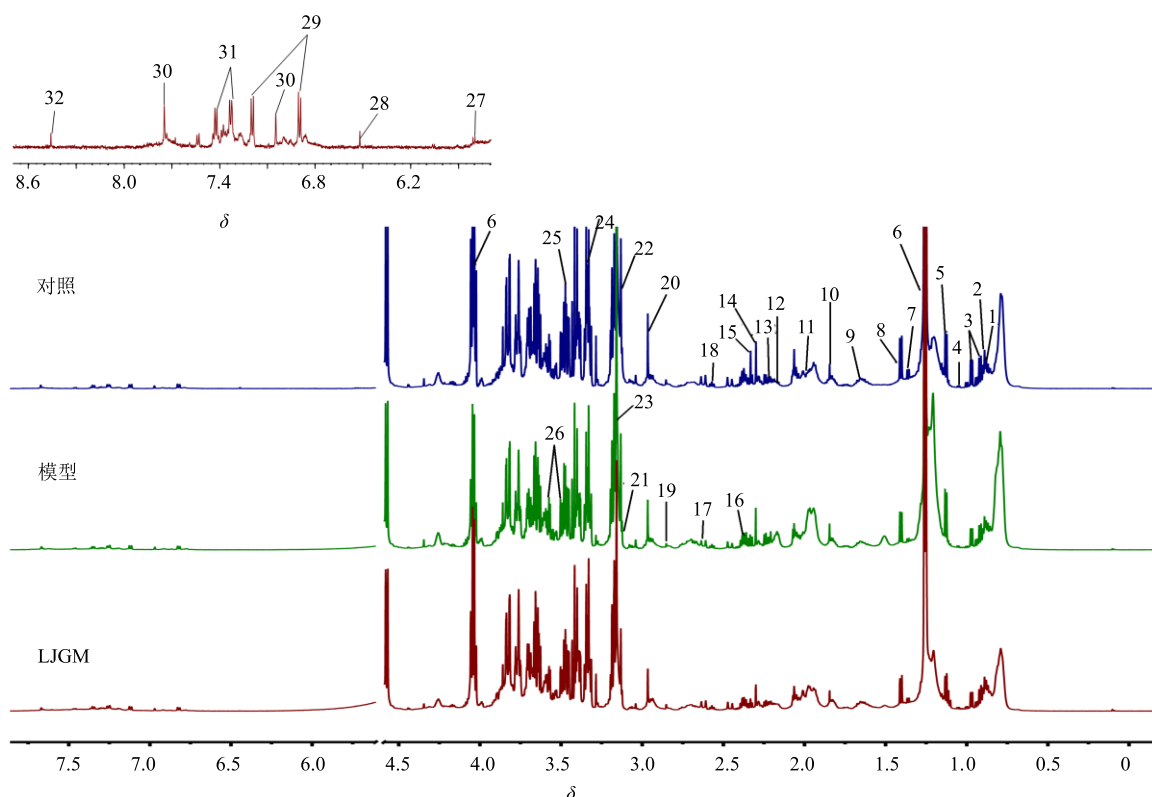


图 3 对照组、模型组、LJGM 组小鼠血清 $^1\text{H-NMR}$ 图谱
 Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of mice serum in control, model, and LJGM groups

表 2 小鼠血清样本 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中主要代谢物峰归属Table 2 $^1\text{H-NMR}$ assignments of major metabolites in serum of mice

编号	代谢物	δ_{H}	编号	代谢物	δ_{H}
1	异亮氨酸	0.94 (t, $J = 7.2$ Hz), 1.02 (d, $J = 7.2$ Hz)	20	肌酐	3.04 (s), 3.93 (s)
2	亮氨酸	0.96 (t, $J = 6.6$ Hz)	21	磷脂胆碱	3.20 (s)
3	缬氨酸	0.99 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.04 (d, $J = 6.6$ Hz)	22	胆碱	3.21 (s)
4	异丁酸	1.08 (d, $J = 7.2$ Hz)	23	甘油磷酸胆碱	3.23 (s)
5	3-羟基丁酸	1.20 (d, $J = 6.6$ Hz), 2.30 (m)	24	鲨肌醇	3.36 (s)
6	乳酸	1.33 (d, $J = 7.2$ Hz), 4.11 (q, $J = 7.2$ Hz)	25	葡萄糖	3.38 (m), 3.46 (m), 3.54 (dd, $J = 3.6, 6.6$ Hz), 3.74 (m), 3.84 (m), 4.65 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.24 (d, $J = 3.6$ Hz)
7	2-丙酸苯酯	1.44 (d, $J = 7.2$ Hz)	26	甘油脂	3.56 (dd, $J = 6.6, 11.4$ Hz), 3.65 (dd, $J =$ 4.2, 11.4 Hz)
8	丙氨酸	1.48 (d, $J = 7.2$ Hz)	27	尿嘧啶	5.80 (d, $J = 7.2$ Hz), 7.54 (d, $J = 7.8$ Hz)
9	赖氨酸	1.72 (m), 1.90 (m)	28	富马酸	6.52 (s)
10	醋酸	1.92 (s)	29	酪氨酸	6.90 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz)
11	谷氨酸	2.07 (m), 2.35 (m)	28	富马酸	6.52 (s)
12	丙酮	2.23 (s)	29	尿嘧啶	5.8 (d, $J = 7.2$ Hz), 7.54 (d, $J = 7.8$ Hz)
13	乙酰乙酸	2.28 (s)	30	甲基组氨酸	7.04 (s), 7.76 (s)
14	丙酮酸	2.37 (s)	31	苯丙氨酸	7.33 (d, $J = 9.0$ Hz), 7.37 (m), 7.43 (m)
15	琥珀酸	2.41 (s)	32	甲酸	8.46 (s)
16	谷氨酰胺	2.45 (m)			
17	柠檬酸	2.53 (d, $J = 16.2$ Hz), 2.70 (d, $J = 16.2$ Hz)			
18	蛋氨酸	2.64 (t, $J = 7.2$ Hz)			
19	三甲胺	2.93 (s)			

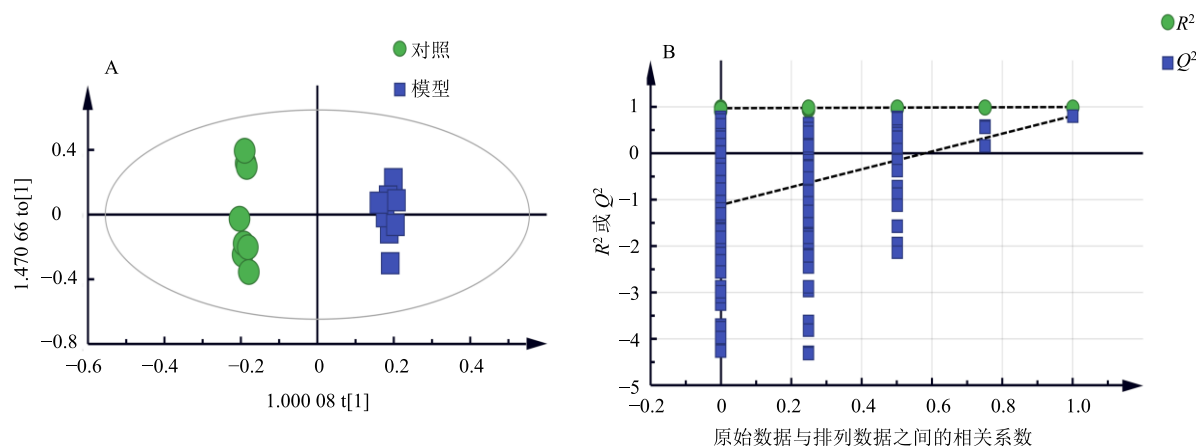


图 4 对照组和模型组 OPLS-DA 散点图 (A) 及模型验证图 (B)

Fig. 4 Control group and model group OPLS-DA plot (A) and permutation plot (B)

模型是有效的。根据 $\text{VIP} > 1$ 以及 $P < 0.05$ 值筛选出差异代谢产物, 见表 3。

2.4.2 LJG 对差异代谢物的回调作用 由 3D PLS-DA 散点图 (图 5-A) 可以看出, 对照组、模型组和 LJGM 组样本均能明显分开, 且 LJGM 组样本位于对照组和模型组之间, 说明 LJGM 对 WBC 减少症有一定的治疗作用。由 S-plot (图 5-B) 可看出造模以及 LJG 给药对小鼠血清代谢产物的影响。图 5-B 中, 第一 (三) 象限的点表示该区域里的物质在模型组以及 LJGM 组中均比在对照组中高 (低), 表明环磷酸酰胺造模对小鼠血清代谢产物的影响。第二 (四)

象限则表示此区域内的物质与对照组相比, 在模型组中升高 (降低), 在 LJGM 组降低 (升高), 表明 LJG 给药对环磷酸酰胺所致 WBC 减少症具有明显的调节作用。LJGM 组与模型组 OPLS-DA 散点图及模型验证见图 6, 根据 $\text{VIP} > 1$ 以及 $P < 0.05$ 值筛选出差异代谢产物见表 3。

2.5 代谢通路分析

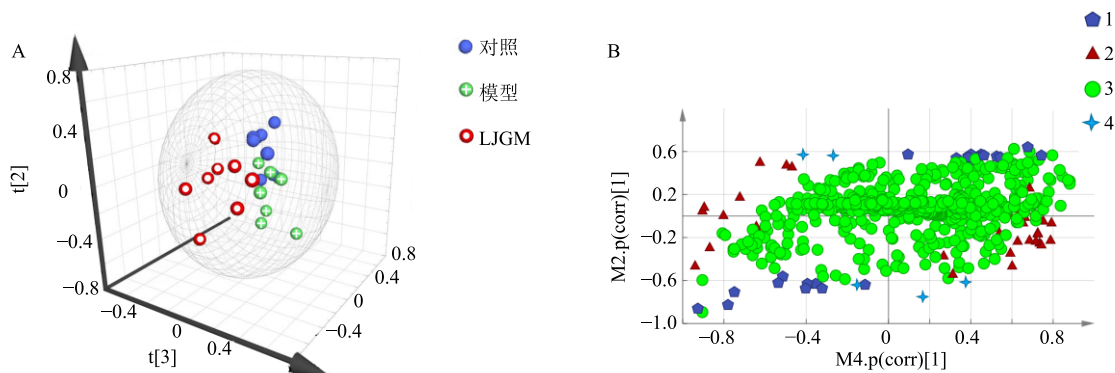
分析环磷酸酰胺造模对小鼠正常代谢通路的影响以及 LJG 治疗对 WBC 减少症小鼠代谢通路的影响。由图 7 可知, 环磷酸酰胺造模后引起变化的代谢通路主要包括乙醛酸及二羧酸代谢、三羧酸 (TCA) 循

表 3 血清 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中差异代谢产物相对峰面积 ($\times 100$) ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Relative peak areas of differential metabolites in $^1\text{H-NMR}$ spectra of serum ($\times 100$) ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	相对峰面积						
	乳酸	柠檬酸	葡萄糖	丙酮	琥珀酸	甘油酯	肌酐
对照	1.17 ± 0.26	0.10 ± 0.01	0.31 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.18 ± 0.07	0.39 ± 0.03	0.41 ± 0.00
模型	$0.78 \pm 0.17^{**}$	$0.07 \pm 0.00^{**}$	$0.38 \pm 0.06^{**}$	$0.08 \pm 0.02^{**}$	$0.11 \pm 0.02^{**}$	$0.45 \pm 0.06^{**}$	$0.37 \pm 0.03^{**}$
LJGM	0.99 ± 0.28	0.08 ± 0.00	$0.28 \pm 0.06^{##}$	0.09 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.43 ± 0.04

组别	相对峰面积						
	异亮氨酸	亮氨酸	缬氨酸	赖氨酸	谷氨酸	鲨肌醇	胆碱
对照	0.29 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.12 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.78 ± 0.01
模型	0.29 ± 0.04	0.32 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.83 ± 0.02
LJGM	$0.39 \pm 0.07^{##}$	$0.45 \pm 0.09^{##}$	$0.27 \pm 0.06^{##}$	$0.15 \pm 0.02^{##}$	$0.32 \pm 0.07^{##}$	$0.20 \pm 0.04^{##}$	$0.61 \pm 0.08^{##}$



A-对照组、模型组和 LJGM 组 PLS-DA 散点图 B-S-plot 图 1-模型组与对照组比较具有显著差异的物质 2-给药组与模型组比较具有显著差异的物质 3-无显著差异的物质 4-1 和 2 均有显著差异的物质
A-PLS-DA plot of control group, model group and LJGM group B-S-plot diagram 1-the differential metabolites between control and model groups 2-the differential metabolites between model and LJM groups 3-the metabolites that no statistical difference 4-the common differential metabolites between 1 and 2

图 5 LJG 对白细胞减少症小鼠血清异常代谢轮廓的调节作用

Fig. 5 Effect of LJG on serum abnormal metabolic profile of mice leucopenia

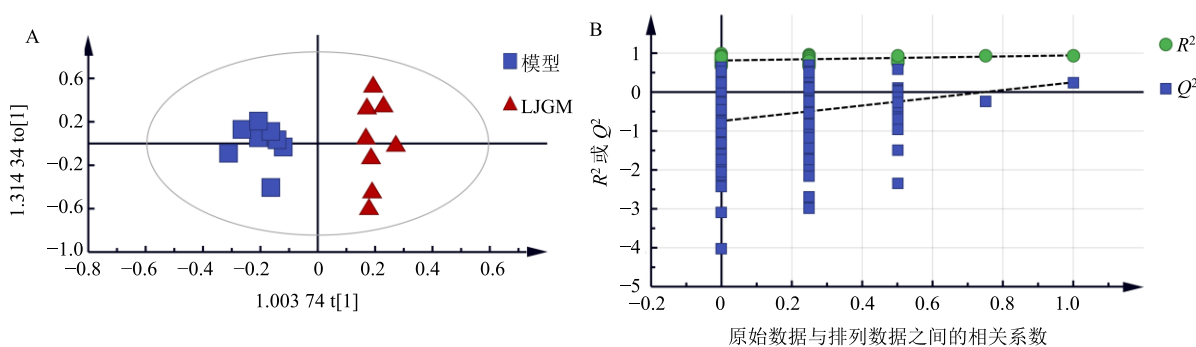


图 6 LJGM 组和模型组 OPLS-DA (A) 及模型验证图 (B)

Fig. 6 OPLS-DA (A) and permutation plot (B) of LJGM group and model group

环、甘油酯代谢、淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢等。而给药后引起变化的通路有缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, *D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸盐代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 丙氨酸、天冬氨酸盐和谷氨酸

盐代谢, 谷胱甘肽代谢等。

3 讨论

LJG 临床常用于久病气血两虚所致的体虚乏力、面黄肌瘦、头晕目眩、月经过少、闭经等, 通

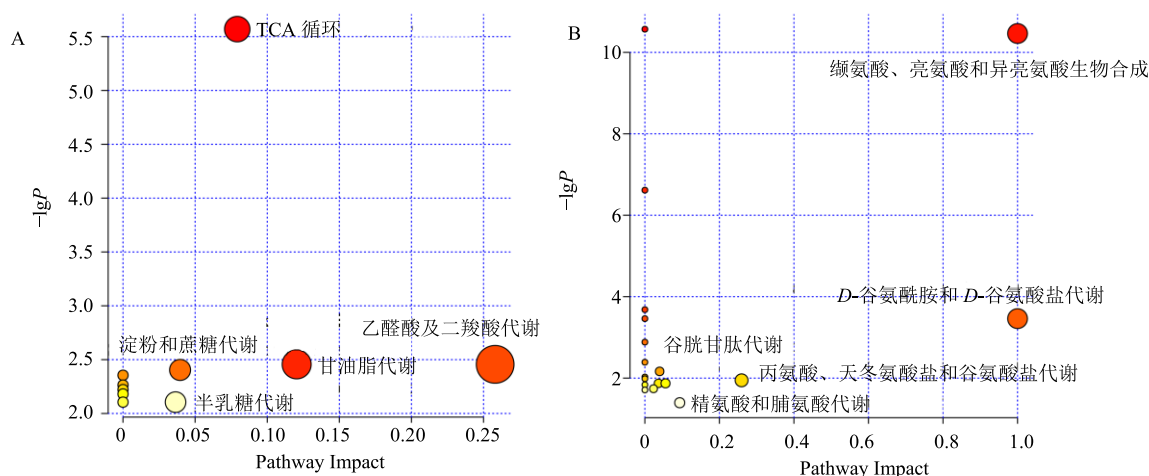


图 7 对照组与模型组 (A) 和 LJGM 组与模型组 (B) 差异代谢物 MetPA 通路分析

Fig. 7 MetPA analysis of differential metabolites in ^1H -NMR spectra of serum plot of control group vs model group (A) and LJGM group vs model group (B)

过对 LJG 药理活性和化学成分的不断研究,发现其含有的氨基酸类、多糖类以及微量元素铁等对 WBC 减少症具有一定的疗效。因此,本实验采用环磷酰胺致小鼠 WBC 减少症模型,结合 ^1H -NMR 代谢组学方法,对 LJG 改善 WBC 减少症的作用及其机制进行探讨。

由于环磷酰胺造模后第 5 天,造模动物会自行恢复,故本次实验造模分为 2 个阶段。此外,研究表明化疗药物对骨髓的抑制作用与血细胞的半衰期有关,RBC 的半衰期为 120 d,PLT 的半衰期为 5~7 d,WBC 的半衰期为 6~8 h,所以化疗致骨髓抑制以 WBC 减少为主要和首发症状,其次是 PLT 减少,最后是 RBC 减少^[34-35]。本实验中可见第 1 阶段造模后各造模组小鼠 PLT、RBC 数目以及 HGB 量与对照组比较无差异,第 2 阶段造模后各造模组小鼠 PLT、RBC 数目以及 HGB 量与对照组比较均具有显著差异。此外,由于 LJG 作为传统的补血药物,研究表明其能显著升高 RBV、HGB、PLT 量,但本实验中仅观察到 LJG 升高 PLT 量,而对 RBC 以及 HGB 无显著影响,可能是由于 RBC 恢复较慢或给药时间较短等因素造成的,因本实验关注点在 LJG 升白作用,故未对此现象进行深入研究,在未来的工作中应继续对其进行研究。

脾脏与胸腺是机体重要的免疫器官。脾脏不仅是机体细胞免疫和体液免疫的中心,还可以储藏血液,此外在胚胎发育早期,脾脏有造血功能,但出生后脾脏的造血功能基本消失,但在某些条件如机体出

现严重造血障碍等刺激下会恢复部分造血功能^[36-38]。胸腺为机体的重要淋巴器官,其功能与免疫紧密相关^[39-40]。实验结果显示,模型组小鼠与对照组相比其脾脏指数、胸腺指数显著下降,说明环磷酰胺能够显著影响机体的免疫器官,而 LJG 能够恢复这种改变,并显著提高脾脏脏器指数,表明 LJG 可能通过拮抗环磷酰胺导致的脾脏损伤增强机体免疫功能而发挥升白作用。

采用 ^1H -NMR 代谢组学分析技术对对照组与模型组小鼠血清进行代谢组学分析,共找出 7 个有关的差异代谢物,其主要涉及二羧酸代谢、TCA 循环、甘油酯代谢、淀粉和蔗糖代谢等通路。与对照组比较,模型组小鼠血清中乳酸、琥珀酸、肌酐、葡萄糖、柠檬酸等显著降低,丙酮、甘油酯显著上升,说明环磷酰胺造模后主要影响机体的能量代谢,这与临床上 WBC 减少症患者乏力、肢体酸软等的症状相吻合^[41]。给予 LJG 后,相关差异代谢物显著回调,表明其对集体能量代谢紊乱具有较好的调节作用。

LJG 改善环磷酰胺致小鼠 WBC 机制可能涉及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸盐代谢、谷胱甘肽代谢等以及 TCA 循环、乙醛酸及二羧酸代谢等。缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸为支链氨基酸,进入体内后能纠正血浆中支链氨基酸和芳香氨基酸失衡,调节血糖,并提供能量^[42],LJG 可以显著提高模型组小鼠血清中异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸的量,使 3 种氨基酸的量趋于正常。赖氨酸是人体必需氨基酸,能促进人体发育、

增强免疫功能^[43], LJG 可提高模型组小鼠血清中赖氨酸的含量从而增强机体免疫。LJG 可以直接或者间接改善环磷酸胺所致的小鼠能量代谢, 并增强其免疫力, 进而发挥升白作用。能量代谢与中医气虚、血虚等密切相关^[44], 而 LJG 组方可补血、益气, 这恰与中医理论切合。

本研究结果还发现, LJG 可显著促进 WBC 增殖, 从而提升环磷酸胺诱导的 WBC 减少症小鼠的机体免疫能力, 对改善环磷酸胺引起的免疫功能损害和免疫系统失衡起到较好的改善作用, 其机制可能同样涉及能量代谢与氨基酸代谢。虽然通过 ¹H-NMR 已经确定了差异代谢物和主要代谢途径, 以及它们在 WBC 减少症和 LJG 干预中的可能作用机制, 但是仍具有一些局限性, 需要进一步深入研究。

首先, 代谢组学仅基于 ¹H-NMR 数据进行分析, 在未来的研究中应该采用其他代谢组学方法或多种代谢组学技术联用开展研究; 其次, 本研究只观察了血清的代谢组学特征, 应进一步开展血浆、尿液、肝脏和脾脏样本的系统研究, 以准确反映 WBC 减少症的病理变化和 LJG 的治疗机制; 最后, 可以开展系统药理学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学的整合分析研究, 从而系统全面地阐释 WBC 减少症复杂生物学过程以及 LJG 的多途径、多靶点的治疗作用机制。

参考文献

- [1] Liu H, Cheng Z, Song W, *et al.* Immunoproteomic to analysis the pathogenicity factors in leukopenia caused by klebsiella pneumonia bacteremia [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110011.
- [2] Camops M I, Vieira W D A, Campos C N, *et al.* Atorvastatin and trans-caryophyllene for the prevention of leukopenia in an experimental chemotherapy model in Wistar rats [J]. *Mol Clin Oncol*, 2015, 3(4): 825-828.
- [3] Yang S K, Hong M, Baek J, *et al.* A common missense variant in *NUDT15* confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(9): 1017-1020.
- [4] Chen X F, Qian J, Pei D, *et al.* Prognostic value of perioperative leukocyte count in respectable gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(9): 2818-2827.
- [5] Liu W, Zhang C C, Li K. Prognostic value of chemotherapy-induced leukopenia in small-cell lung cancer [J]. *Cancer Biol Med*, 2013, 10(2): 92-98.
- [6] 蔡艳芳, 王 华. 地榆升白片治疗抗结核化疗白细胞

- 减少症临床效果分析 [J]. *北方药学*, 2017, 14(1): 179-180.
- [7] 付利然. 地榆升白片治疗恶性肿瘤放疗后白细胞减少随机平行对照研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2014, 28(1): 71-73.
- [8] 刘 凌, 李 丹, 庞 缨, 等. 芪胶升白胶囊治疗化疗后白细胞减少的临床疗效观察 [J]. *中国医药科学*, 2013, 3(6): 15-17.
- [9] 郑 伟, 周露露, 杨 岩, 等. 芪胶升白胶囊联合化疗对肿瘤患者白细胞减少及化疗效果的临床观察 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2013, 28(4): 425-428.
- [10] 郭建生, 彭 宇, 湛 扩, 等. 两种不同提取工艺的驴胶补血冲剂对气血双虚大鼠胸腺、脾脏的影响 [J]. *中医药导报*, 2007, 13(1): 15-16.
- [11] 彭 宇. 两种不同工艺的驴胶补血冲剂改善动物血虚的实验对比研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2007.
- [12] 郭建生, 彭 宇, 湛 扩, 等. 不同制备工艺的驴胶补血冲剂对缺铁性贫血大鼠的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2007, 27(2): 7-8.
- [13] 李振华. 新驴胶补血颗粒治疗气血两虚型月经过少的临床研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [14] 林 洁, 张 敏, 陈锦黎, 等. 新驴胶补血颗粒治疗气血两虚型月经过少的多中心、随机对照、临床等效性研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2014, 48(12): 52-55.
- [15] 谢 安, 谷陟欣, 邹 志, 等. 新驴胶补血颗粒对小鼠非特异性免疫、耐疲劳、耐缺氧功能的影响 [J]. *中南药学*, 2011, 9(11): 827-829.
- [16] 余三红. 驴胶补血冲剂的临床应用概述 [J]. *湖南中医杂志*, 1999, 15(1): 42-43.
- [17] 黎让贤, 范伏元. 驴胶补血冲剂治疗原发性白细胞减少症 100 例临床观察 [J]. *湖南中医杂志*, 1998, 14(1): 27-28.
- [18] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181.
- [19] Johnson C H, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(7): 451-459.
- [20] Dias D A, Koal T. Progress in metabolomics standardization and its significance in future clinical laboratory medicine [J]. *Ejifcc*, 2016, 27(4): 331-343.
- [21] Wang X, Zhang A, Sun H, *et al.* Chinmedomics: Newer theory and application [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 299-307.
- [22] 王 穆, 让蔚清, 张 琪, 等. 四物汤对环磷酸胺所致血虚证治疗后的代谢组学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(5): 630-634.

- [23] 李伟霞, 黄美艳, 唐于平, 等. 基于代谢组学研究佛手散对血虚小鼠的养血补血作用机制 [J]. 药学报, 2013, 48(8): 1301-1306.
- [24] 刘彩春, 刘 欢, 谷陟欣, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学的驴胶补血颗粒补血作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1142-1148.
- [25] Liu B, Luo Y, Luo D, *et al.* Treatment effect of low intensity pulsed ultrasound on leukopenia induced by cyclophosphamide in rabbits [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(7): 3315-3325.
- [26] Salem M L, Nassef M, Abdel Salam S G R, *et al.* Effect of administration timing of post-chemotherapy granulocyte colony-stimulating factor on host immune cell recovery and CD8^+ T-cell responses [J]. *J Immunotoxicol*, 2016, 13(6): 784-792.
- [27] Im S A, Kim K H, Kim H S, *et al.* Processed aloe vera gel ameliorates cyclophosphamide-induced immunotoxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 19342-19354.
- [28] 宋 雁, 贾旭东, 崔文明, 等. 不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(3): 218-225.
- [29] 刘文斌, 徐 岩, 李智萌, 等. 参红补血颗粒对血虚证小鼠肾脏组织中 EPO mRNA 和骨髓组织中 GM-CSF mRNA 表达水平的影响 [J]. 吉林大学学报, 2017, 43(3): 538-542.
- [30] 王正引. 四物汤对血虚证小鼠细胞凋亡影响的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [31] 张 迪. 归芪猪蹄汤对白细胞减少症大鼠作用的实验研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [32] 郑 丹, 沙启明, 王剑青, 等. 去甲斑蝥素对环磷酰胺诱导的白细胞减少症模型大鼠骨髓造血功能的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(3): 826-831.
- [33] 刘 芳, 张 红, 谢人明. 珠子参对环磷酰胺所致小鼠白细胞减少的影响 [J]. 现代中医药, 2015, 35(5): 164-168.
- [34] 潘旭枫, 黄学武. 益气除痰方对肺癌化疗患者全血细胞计数的影响 [J]. 中国当代医药, 2017, 24(2): 134-136.
- [35] 高 珊. 麦粒灸对肿瘤化疗骨髓抑制的临床研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [36] Inra C N, Zhou B O, Acar M, *et al.* A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen [J]. *Nature*, 2015, 527(7579): 466-471.
- [37] Liu H H, Chen F P, Liu R K, *et al.* Ginsenoside Rg1 improves bone marrow haematopoietic activity via extramedullary haematopoiesis of the spleen [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(11): 2575-2586.
- [38] Bronte V, Pittet M J. The spleen in local and systemic regulation of immunity [J]. *Immunity*, 2013, 39(5): 806-818.
- [39] 韩贵芝, 张春芝, 刘翠容, 等. 大蒜素对小鼠胸腺淋巴细胞周期进程影响的实验研究 [J]. 中国预防医学杂志, 2017, 18(12): 942-944.
- [40] 王 勇, 司丽芳, 李相能, 等. 银杏叶提取物增强大鼠脾脏和胸腺的免疫功能 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(6): 792-795.
- [41] 周国栋. 中西医结合治疗恶性肿瘤化疗后白细胞减少症疗效观察 [J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(7): 36-37.
- [42] 李修阳. 基于代谢组学的多囊卵巢综合征痰湿证生物标志物筛选 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [43] Yang Q Q, Suen P K, Zhang C Q, *et al.* Improved growth performance, food efficiency, and lysine availability in growing rats fed with lysine-biofortified rice [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-01555-0.
- [44] 杨泽民. 脾虚证物质能量代谢基因差异表达及其生物信息分析 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.