

基于 LC-MS 代谢组学技术的注射用黄芪多糖活性成分调控巨噬细胞代谢研究

李树颖^{1,2}, 李科^{1,4*}, 秦雪梅¹, 李先荣³, 杜昱光⁴

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 山西省中医药研究院, 山西 太原 030006

4. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

摘要: **目的** 采用 LC-MS 代谢组学方法, 研究注射用黄芪多糖活性成分对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 Raw 264.7 吞噬活性的影响。**方法** 采用中性红法检测注射用黄芪多糖中不同相对分子质量多糖对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响, 筛选出活性成分, 并对细胞培养液和细胞裂解液进行 LC-MS 分析, 结合多元统计分析和代谢通路分析, 探索其作用机制。**结果** 注射用黄芪多糖的小相对分子质量多糖在质量浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时能显著增强 Raw 264.7 细胞的吞噬活性。与对照组比较, 注射用黄芪多糖活性成分作用于 Raw 264.7 细胞后, 细胞内外共发现 41 种差异代谢物, 主要涉及氨基酸代谢、能量代谢及抗氧化作用。**结论** 注射用黄芪多糖的小相对分子质量多糖能提高巨噬细胞吞噬活性, 其机制可能与氨基酸代谢、能量代谢及抗氧化作用密切相关。

关键词: 注射用黄芪多糖; 吞噬; 代谢组学; 氨基酸代谢; 能量代谢; 抗氧化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)06-1575-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.026

Study on active constituents of *Astragalus* polysaccharides for injection to regulate metabolism of macrophages based on LC-MS metabolomics

LI Shu-ying^{1,2}, LI Ke^{1,4*}, QIN Xue-mei¹, LI Xian-rong³, DU Yu-guang⁴

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

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030006, China

4. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: **Objective** To study the phagocytosis of mouse monocyte-macrophage Raw 264.7 by the active constituents of *Astragalus* polysaccharides for injection based on LC-MS metabolomics. **Methods** Neutral red method was used to detect the phagocytosis of Raw 264.7 by different molecular weight fractions of *Astragalus* polysaccharides for injection. The active components were selected, and the cell culture supernatant and cell lysate were analyzed by LC-MS. Combined with multivariate statistical analysis and metabolism pathway analysis, the mechanism of action was studied. **Results** The small molecular weight fraction of *Astragalus* polysaccharides for injection significantly promoted the phagocytosis of Raw 264.7 at a concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$. Compared with the control group, after the active part of the injection of *Astragalus* polysaccharides was applied to Raw 264.7, 41 differential metabolites were found in and out of the cells, mainly related to amino acid metabolism, energy metabolism and antioxidant effects. **Conclusion** The small molecular weight fraction of *Astragalus* polysaccharides for injection can increase the phagocytosis of Raw 264.7, and its mechanism may be closely related to amino acid metabolism, energy metabolism and antioxidant effects.

Key words: *Astragalus* polysaccharide for injection; phagocytosis; metabolomics; amino acid metabolism; energy metabolism; anti-oxidant

收稿日期: 2019-10-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 山西省优秀人才科技创新项目 (201605D211030); 山西省优秀人才科技创新项目 (201705D211020); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目 (20150313004-5)

作者简介: 李树颖 (1993—), 在读硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: shuyingli_01@163.com

***通信作者** 李科 Tel/Fax: (0351)7019297 E-mail: like@sxu.edu.cn

中药注射剂是现代药物制剂技术与传统中医药相结合的产物^[1-2], 由于其独特的疗效, 全国每年约有 4 亿人次使用, 而且用量以每年 30% 的速度增长^[3]。但该剂型所致的不良反应随之增加^[4]。中药注射剂的不良反应是由于中药自身的特殊性造成的, 这种特殊性主要表现在以下 3 个方面^[5]: (1) 合理用药难辨别; (2) 量效关系不明确; (3) 药物质量难判断。

注射用黄芪多糖 (APS) 是 20 世纪 90 年代初山西省中医药研究院根据山西省黄芪资源现状研发的中药静脉用粉针剂。APS 能提高病人化疗后白细胞水平, 增强其免疫功能, 是当时国内首个全面改善放、化疗患者血象、提高肿瘤患者生存质量的中成药。该药的成功上市不仅促进了糖类成为国内研究的热点, 而且也引发了世界各大植物药研究机构的竞相角逐^[6]。APS 在提纯及功效评价等方面取得了大量的研究成果, 然而也存在诸多问题。该药作为大分子极性物质组, 无明确特异分子构象, 药效成分究竟是哪种多糖或特征糖链尚不清楚, 药理机制不明确, 疗效并不稳定, 较难进入国际市场^[7-8]。因此 APS 进行二次开发困难众多。如何筛选出组分单一、体内代谢途径明确、药效机制清楚的化合物, 急需新的研究思路和方法。为此, 本研究将 APS 按不同相对分子质量分为 2 部分, 并从细胞水平对其进行活性筛选。

APS 活性方面已有大量研究报道, 其对固有免疫和适应性免疫均有较强调节功能, 具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗衰老等多种药理活性, 然而这些差异功能均是以其固有免疫调节作用为基础实现的^[9-10]。

代谢组学是一门致力于研究代谢物的成熟的组学科学, 支持疾病的预测以及精准医学^[11]。非靶向代谢组学对特定生物体、细胞进行了全面的无偏见的分析。其中, 不同的技术具有不同的优势, 液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 通常是首选平台, 与毛细管电泳-质谱联用 (CE-MS) 相比, 其稳定性更高; 与核磁共振 (NMR) 相比, 其灵敏度更高; 与气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 相比, 其样品不需要衍生化^[12-14]。

因此, 本研究主要针对 APS 的固有免疫功能调节作用进行, 选取小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 Raw 264.7 进行活性筛选和机制研究, 对细胞培养液和细胞裂解液进行 LC-MS 分析, 结合多元统计分析和代谢通路分析, 探索其作用机制。研究结果将为该药的二次开发奠定基础, 同时也为其他糖类药物

研发提供思路。

1 材料

1.1 细胞

Raw 264.7 细胞来自美国模式菌种收集中心。

1.2 药品与试剂

APS (批号 20180322, 质量分数 >90%, 天津赛诺制药有限公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS)、DMEM 高葡萄糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (FBS)、脂多糖 (LPS, 批号 L2880, 质量分数 ≥99%) 购自北京索莱宝科技有限公司; 乙腈 (质谱级)、甲酸 (质谱级), Fisher Scientific 公司; 超纯水。

1.3 仪器

细胞培养箱 (力康生物医疗科技控股有限公司); Sartorius BSA124S 分析天平 (德国 Sartorius 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); Infinite M200 Pro 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机和 UP-250 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 高分辨液质联用仪 (Thermo Scientific Q Exactive); Xcalibur 数据处理软件 (Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 APS 分离

参照文献方法^[15], 将 APS 溶解在去离子水中, 质量浓度为 10.0 mg/mL, 将 3 mL 该溶液加到预平衡过夜的 Sephadex G-100 柱上 (80 cm × 2.5 cm)。用蒸馏水以 0.5 mL/min 洗脱, 每 6 分钟收集 1 管。通过 HPLC 隔管检测相对分子质量。根据相对分子质量合并各管的多糖组分, 然后浓缩并冻干, 分离得到的 2 部分多糖分别命名为 APS-I 和 APS-II。

2.2 细胞培养

将 Raw 264.7 细胞在含有 10% FBS、100 μg/L 青霉素和 100 μg/L 链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下培养, 直至细胞生长至对数期。

2.3 细胞吞噬活性测定

Raw 264.7 细胞的吞噬能力以中性红摄取量确定^[16]。在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中调节细胞密度为 1×10^5 个/mL, 加入 96 孔板中, 培养 24 h 后, 弃去培养基, 将细胞分别与 100 μL 不同质量浓度 (10、20、30、50、70、80、100 μg/mL) 的 APS、APS-I、APS-II 培养 24 h。另使用 100 μL 0.4 μg/mL

LPS 作为阳性对照, 100 μL 无血清的 DMEM 培养基作为对照。孵育 24 h 后, 弃去培养基并用 PBS 洗涤 2 次, 向每个孔中加入 100 μL 0.075% 中性红。培养 4 h 后, 吸出液体并用 PBS 洗涤 2 次。最后, 用 200 μL 细胞裂解液裂解, 培养过夜。使用酶标仪在 540 nm 处测量吸光度 (A) 值。

2.4 样品制备

将相同数量的 Raw 264.7 细胞 (1×10^5 个/mL) 于直径为 10 cm 的培养皿中培养, 每组设置 6 个重复, 当细胞生长至 90% 时加入 10 mL 质量浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 APS-II, 培养 24 h 后, 收集细胞外培养基于液氮中速冻, 并储存在 -80°C 条件下, 用于进一步细胞外代谢组学分析。PBS 洗涤细胞 3 次, 用细胞刮刀刮下培养皿中的细胞, 4°C 、1 200 r/min 离心 10 min, 收集细胞沉淀, 于液氮中速冻, 并储存在 -80°C 下, 用于进一步细胞内代谢组学分析。

细胞外代谢物提取方法^[17]: 将细胞外液于 4°C 融化, 加入 1.2 mL 100% 甲醇到 400 μL 细胞外液中, 涡旋 30 s, 冰浴中静置 5 min, 4°C 、13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清并冻干。

细胞内代谢物提取方法: 参考文献方法^[18], 并稍做修改, 将细胞 4°C 融化, 反复冻融 5 次后, 加入 1 mL 75% 甲醇, 于冰上超声破碎 15 min (超 5 s, 停 9 s), 4°C 、13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。收集沉淀加入 1 mL 75% 甲醇, 再次超声破碎 15 min, 合并 2 次上清液冻干。

于冻干后的细胞上清液和细胞裂解物中加入 60 μL 1% 甲酸水溶液复溶, 4°C 、13 000 r/min 离心 10 min, 上清置于液相小瓶中。另通过混合各自的等分试样作为 QC 样本。空白为提取溶剂。

2.5 色谱条件

流动相为 10% 甲酸水 (A) 和乙腈 (B)。梯度为: 0~2 min, 1% B; 2~8 min, 1%~35% B; 8~11 min, 35%~40% B; 11~14 min, 40%~60% B; 14~17 min, 60%~99% B; 17~19 min, 99%~1% B; 19~20 min, 1% B。体积流量 0.2 mL/min, 进样量为 5 μL , 柱温 40°C , Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)。

2.6 质谱条件

参照文献方法^[19], 采用 HESI 离子化方式, 正极电压为 3.5 kV, 负极 2.5 kV。扫描模式为 Full Scan/dd-MS2, 采集范围为 m/z 100~1 500, 正负离子切换采集模式, 毛细管温度 320°C , 加热器温度

300°C , 鞘气体积流量 35 arb, 辅助气体流量 10 arb。分辨率采用 MS Full Scan 35 000 FWHM, MS/MS 17 500 FWHM, 碰撞能量为 12.5、25.0、37.5 eV。

2.7 数据处理

将采集到的原始 LC-MS/MS 数据文件导入 Compound Discoverer 2.0 软件 (美国 Thermo Fisher 公司), 设置参数^[19], 获取匹配和对齐的峰值数据, 将得到的峰面积等进行归一化, 再将归一化后的数据导入 SIMCA-P 13.0 软件进行主成分分析 (PCA)、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。结合 OPLS-DA 的 S-plot 图中 $VIP > 1$ 以及独立样本 t 检验筛选差异代谢物 (以 $P < 0.05$ 为标准筛选)。

通过使用 HMDB 数据库并结合二级碎片离子对筛选出的差异代谢物进行指认、通过 Metaboanalyst 平台进行通路富集分析, 并对差异代谢物进行相关性分析。

采用 SPASS 16.0 软件对数据进行单因素方差分析, 各结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 APS 的分离纯化

前期研究获得了 APS 的高效液相色谱-蒸发光散射 (HPLC-ELSD) 图谱, 见图 1。并有研究分析了其结构特征^[20], 分析表明 APS 主要由 3 种不同相对分子质量的多糖组成。用 Sephadex G-100 分离后, 根据相对分子质量将 APS 分成 2 部分, 命名为 APS-I 和 APS-II。APS-I 主要集中在 16~28 管, APS-II 主要集中在 28~46 管 (图 2)。分别收集 2 种多糖级分, 浓缩并冻干用于后续分析。

3.2 APS、APS-I 和 APS-II 对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响

不同质量浓度的 APS、APS-I 和 APS-II 对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响见图 3-A。当 APS

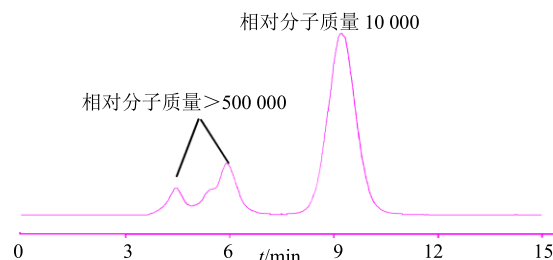


图 1 APS 的 HPLC-ELSD 图

Fig. 1 HPLC-ELSD analysis of APS

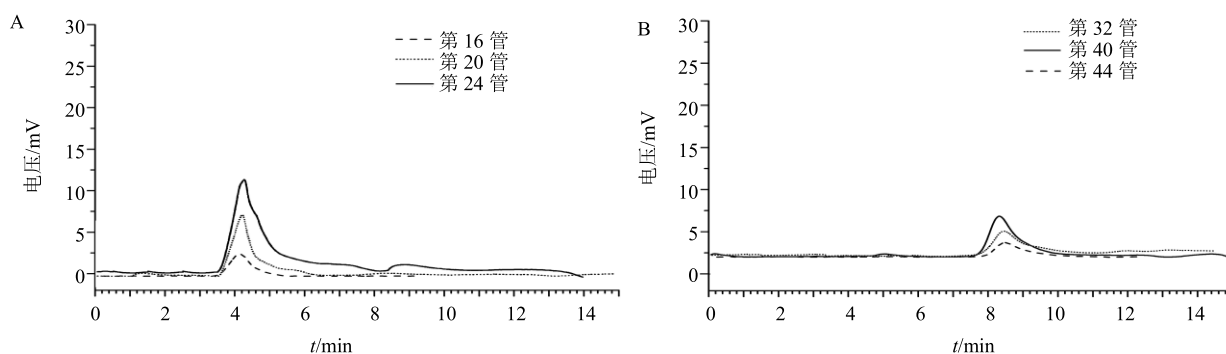


图 2 各管中 APS-I (A) 和 APS-II (B) HPLC-ELSD 图

Fig. 2 HPLC-ELSD analysis of APS-I (A) and APS-II (B) of each tube

质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, Raw 264.7 细胞的吞噬活性最强, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 超过此质量浓度后吞噬活性随质量浓度增加而降低。当 APS-I 和 APS-II 的质量浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时, Raw 264.7 细胞的吞噬活性最强, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。3 种多糖对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响大小顺序为 APS-II > APS > APS-I。如图 3-B 所示, 通过将最佳质量浓度下 APS、APS-I、APS-II 对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响和 LPS 进行比较, 发现 APS 和 APS-II 对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响与 LPS 相当, 但 APS-I 对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响较小。说明 APS-II 能通过增强巨噬细胞的吞噬活性提高机体固有免疫作用。

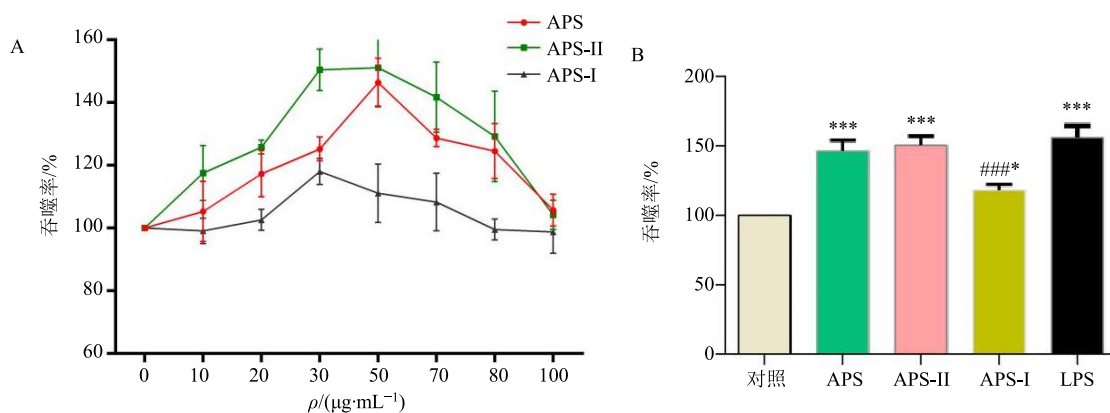
3.3 分析方法可靠性检测

为检测分析方法的重复性和稳定性, 分别对细胞内和细胞外 QC 样本进行了聚类分析, PCA 结果

表明所有 QC 样本都在标准偏差 (SD) 的 2 倍范围之内 (图 4-A、4-C)。同时, 细胞内 QC 样本 RSD < 30% 的变量占 98.7%, 细胞外 QC 样本 RSD < 30% 的变量占 90% (图 4-B、4-D)。以上结果表明该分析方法具有很高的稳定性和重复性, 适合大批量进样。

3.4 细胞和培养上清液代谢图谱分析

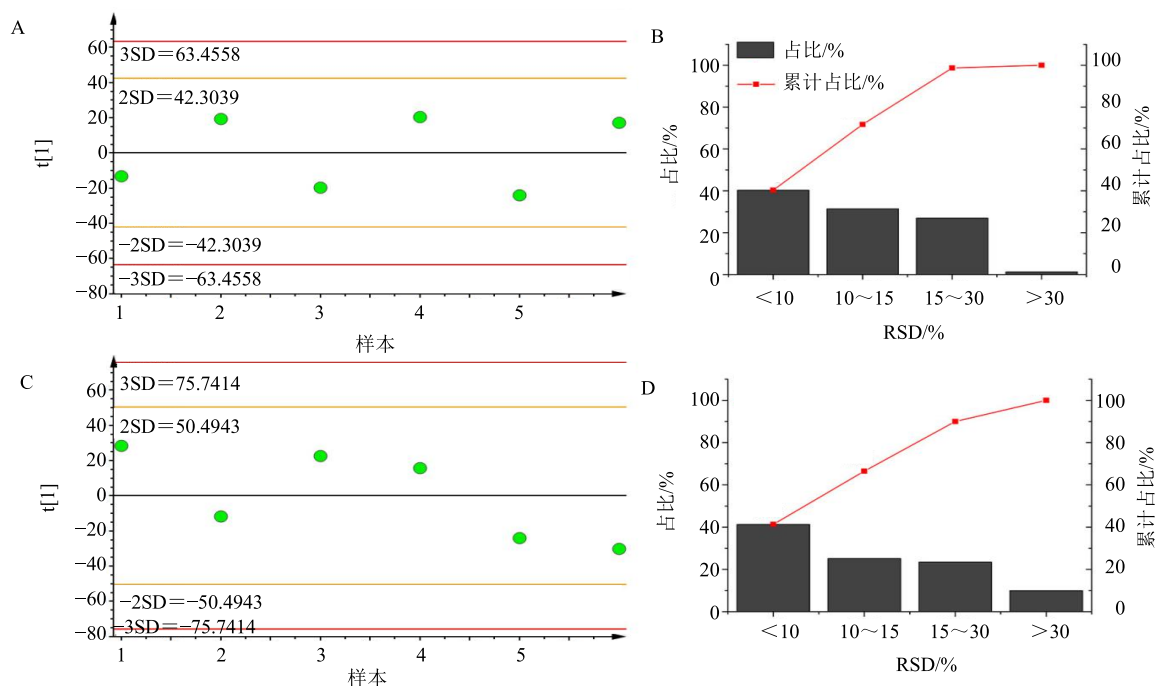
通过超高效液相色谱-串联 Orbitrap 质谱 (UHPLC-Q Exactive Orbitrap) 方法对对照组和给药组 Raw 264.7 细胞的裂解物以及培养上清液进行数据采集, 得到各组代谢轮廓, 见图 5 和 6。为了解给药后细胞代谢物变化, 对对照组和给药组进行了多元统计分析。从 PCA 和 PLS-DA 得分图中可以看出细胞内代谢物在对照组与给药组之间能明显分开 (图 7-A、B), 细胞外代谢物在对照组与给药组之间也能明显分开 (图 8-A、B), 表明 APS-II 对 Raw 264.7 细胞有一定的调控作用。模型评价指标 (图 7-C、8-C)



A-不同浓度的 APS、APS-I 和 APS-II 对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响 B-最佳剂量下 APS、APS-I、APS-II 和 LPS 对 RAW 264.7 细胞吞噬活性的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与 LPS 组比较: #### $P < 0.001$

A-The effects of different concentrations of APS, APS-I and APS-II on the phagocytosis activity of RAW 264.7 cells B-The effects of APS, APS-I, APS-II and LPS on the phagocytosis activity of RAW 264.7 cells at the optimal dose; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group; #### $P < 0.001$ vs LPS group

图 3 APS、APS-I 和 APS-II 对 Raw 264.7 细胞吞噬活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effects of APS, APS-I, and APS-II on phagocytic activity of Raw 264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-细胞内 QC 样本 PCA 得分 B-细胞内 QC 样本 RSD C-细胞外 QC 样本 PCA 得分 D-细胞外 QC 样本 RSD
A-PCA score map of QC samples in cells B-RSD of QC samples in cells C-PCA score map of extracellular QC samples D-RSD of extracellular QC samples

图 4 QC 样本检验分析方法可靠性

Fig. 4 Reliability investigation of analytical method using QC samples

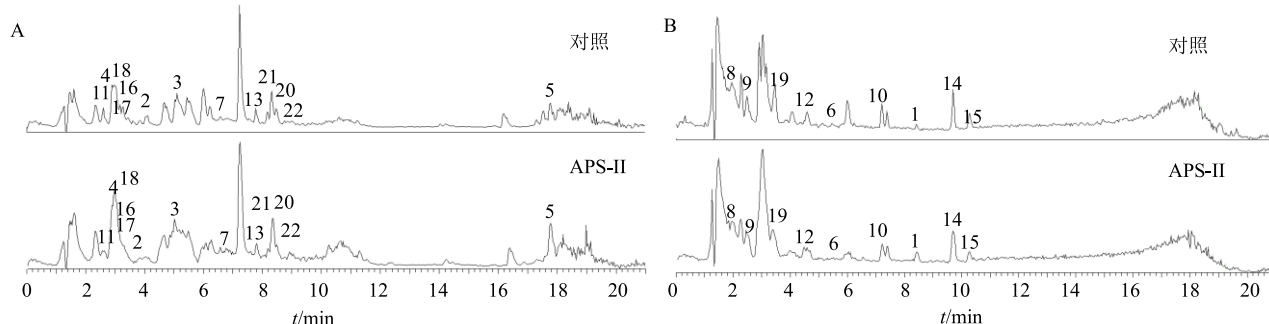


图 5 对照组和 APS-II 给药组 Raw 264.7 细胞裂解物 UHPLC-MS 正 (A)、负 (B) 离子模式的总离子流图
Fig. 5 UHPLC-MS total ion chromatograms of cell lysate of Raw 264.7 in control group and APS-II group in positive ion (A) and negative ion (B) mode

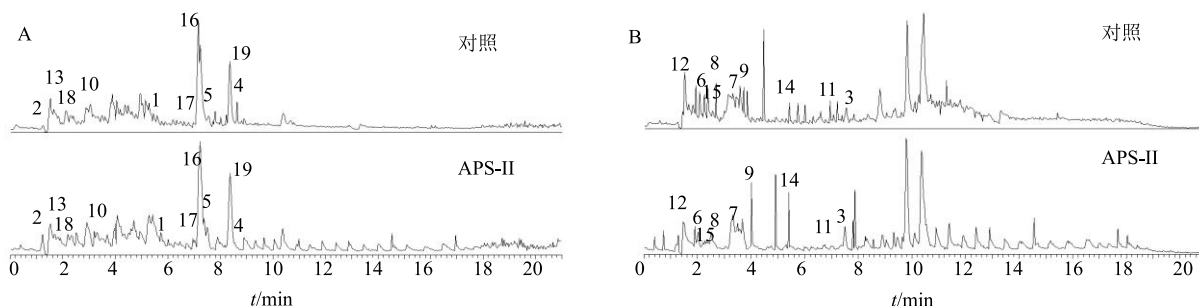


图 6 对照组和 APS-II 给药组 Raw 264.7 细胞培养上清液 UHPLC-MS 正 (A)、负 (B) 离子模式的总离子流图
Fig. 6 UHPLC-MS total ion chromatograms of cell culture supernatant of Raw 264.7 in control group and APS-II group in positive ion (A) and negative ion (B) mode

显示左侧所有 Q^2 (R^2) 低于右边原始值, Q^2 所在蓝色回归线与左侧纵坐标相交于零以下, 表明模型验证有效。OPLS-DA 有助于筛选出给药后的差异代谢物 (图 7-D、8-D)。通过 S-plot 图结合 $VIP > 1$ (图 7-E、8-E) 以及独立样本 t 检验 $P < 0.05$ 筛

选出细胞和培养上清液中的差异代谢物。结果表明, 与对照组比较, 给药后细胞内 2-氨基己二酸、GDP 葡萄糖、*L*-精氨酸等 17 个代谢物水平显著升高, *D*-焦谷氨酸、*L*-色氨酸、*D*-棉子糖等 5 个代谢物水平显著降低 (图 9)。细胞培养上清液中瓜氨酸、

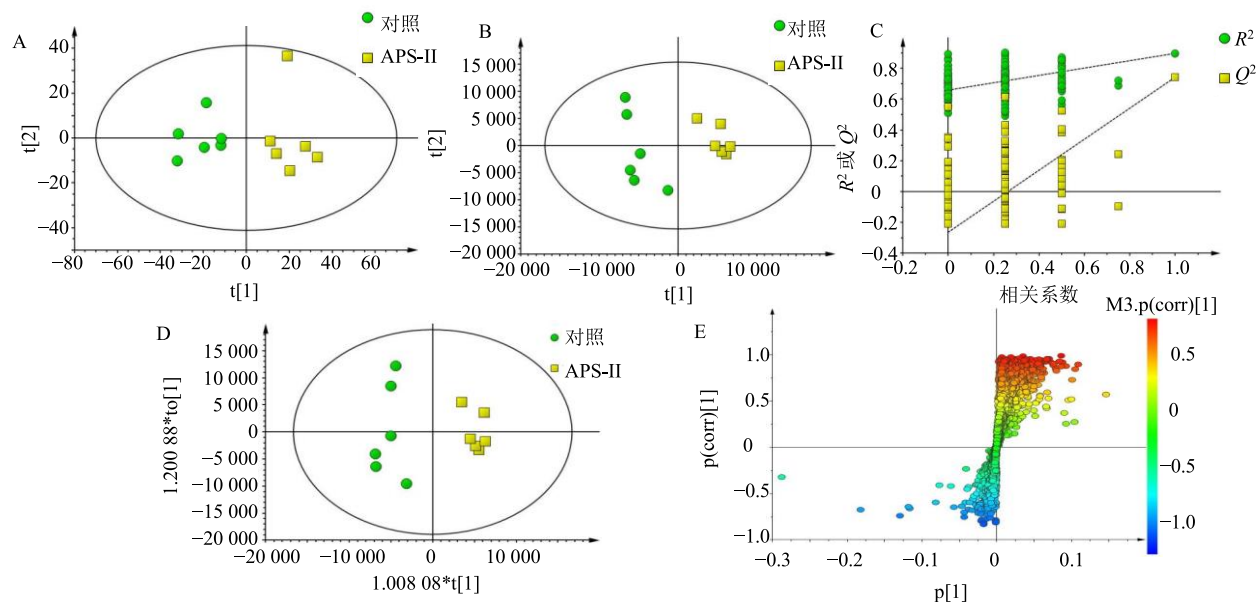


图 7 对照组和 APS-II 给药组 Raw 264.7 细胞裂解物 PCA (A) 及 PLS-DA 得分图 (B)、模型验证结果 (C)、OPLS-DA 散点图 (D) 和 S-plot 图 (E)

Fig. 7 PCA (A) and PLS-DA scores (B), model validation results (C), OPLS-DA scatter plots (D) and corresponding S-plot (E) of cell lysate of Raw 264.7 in control group and APS-II group

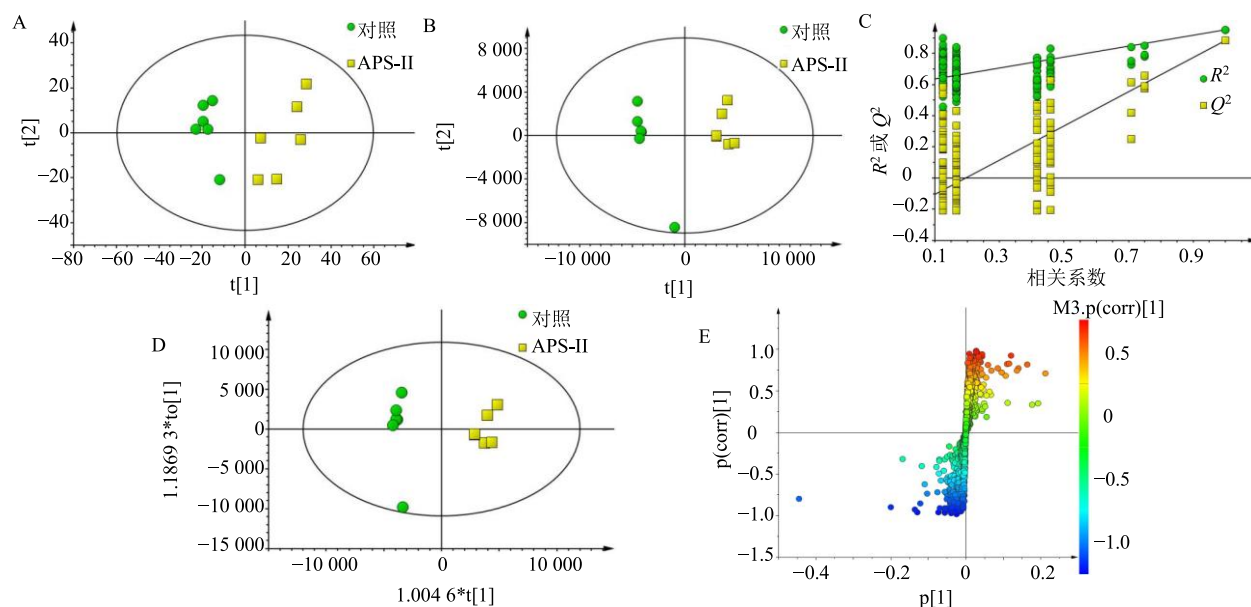


图 8 对照组和 APS-II 给药组 Raw 264.7 细胞培养上清液 PCA (A) 及 PLS-DA 得分图 (B)、模型验证结果 (C)、OPLS-DA 散点图 (D) 和 S-plot 图 (E)

Fig. 8 PCA (A) and PLS-DA scores (B), model validation results (C), OPLS-DA scatter plots (D) and corresponding S-plot (E) of cell culture supernatant of Raw 264.7 in control group and APS-II group

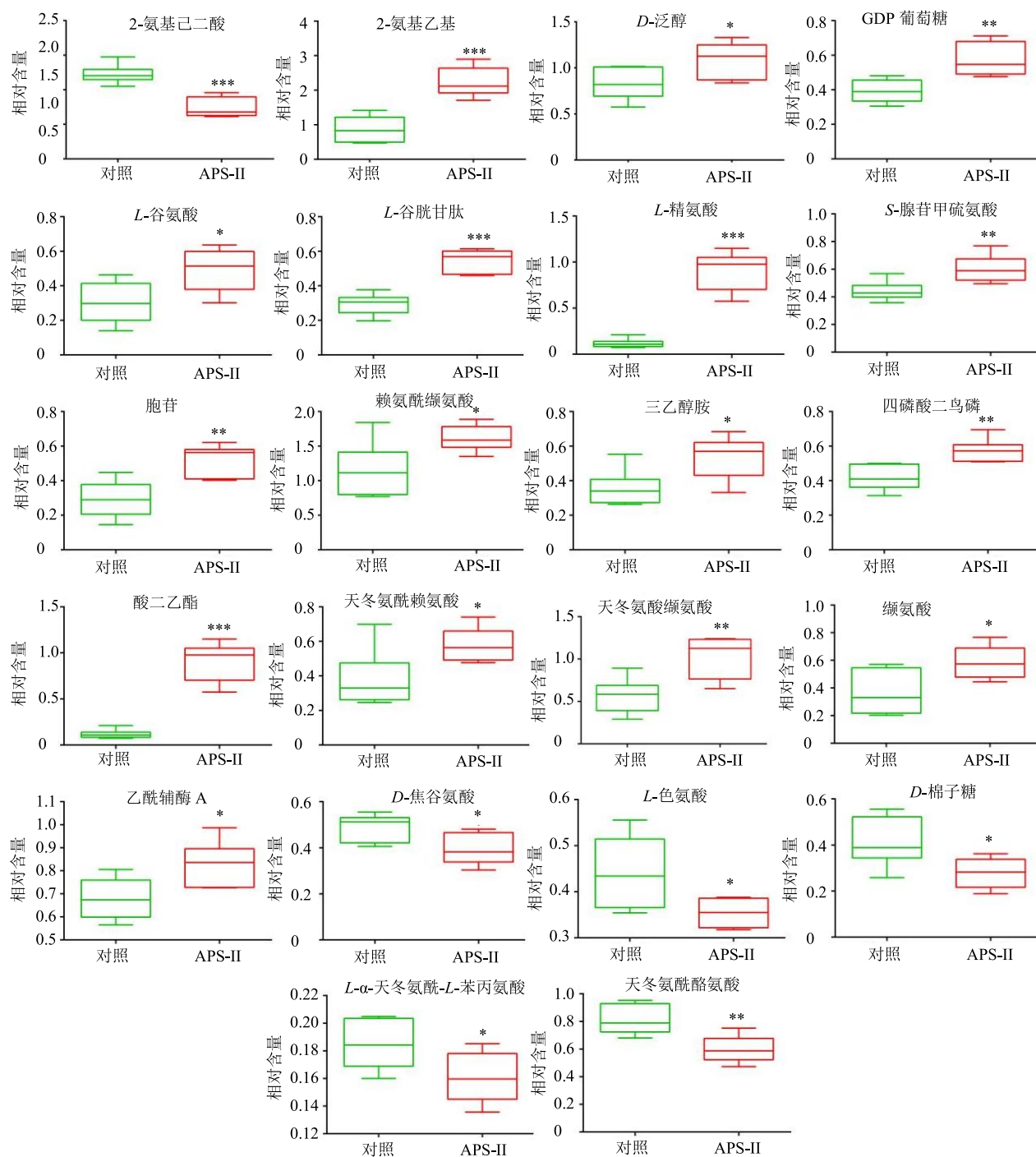


图 9 对照组和 APS-II 给药组 Raw 264.7 细胞裂解物中差异代谢物归一化峰面积箱状图

Fig. 9 Box-whisker plot of normalized peak area of differential metabolites in Raw 264.7 cell lysates in control and APS-II administration groups

鸟嘌呤、甜菜碱等 6 个代谢物水平显著升高，黄嘌呤、鸟苷、尿苷等 13 个代谢物水平显著降低(图 10)。

3.5 代谢通路分析

将细胞裂解物和细胞培养上清液中的差异代谢物代入 Metboanalyst 中进行通路富集分析，选择影响值 > 0.1 的代谢途径作为 APS-II 影响 Raw 264.7

吞噬作用的主要途径，结果见图 11。APS-II 给药后，细胞内 8 条代谢通路发生了变化：谷胱甘肽代谢，精氨酸和脯氨酸代谢，半胱氨酸和蛋氨酸代谢，D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，线粒体中的脂肪酸延长，丙酮酸代谢，脂肪酸代谢，细胞外 3 条代谢通路发生了变化：

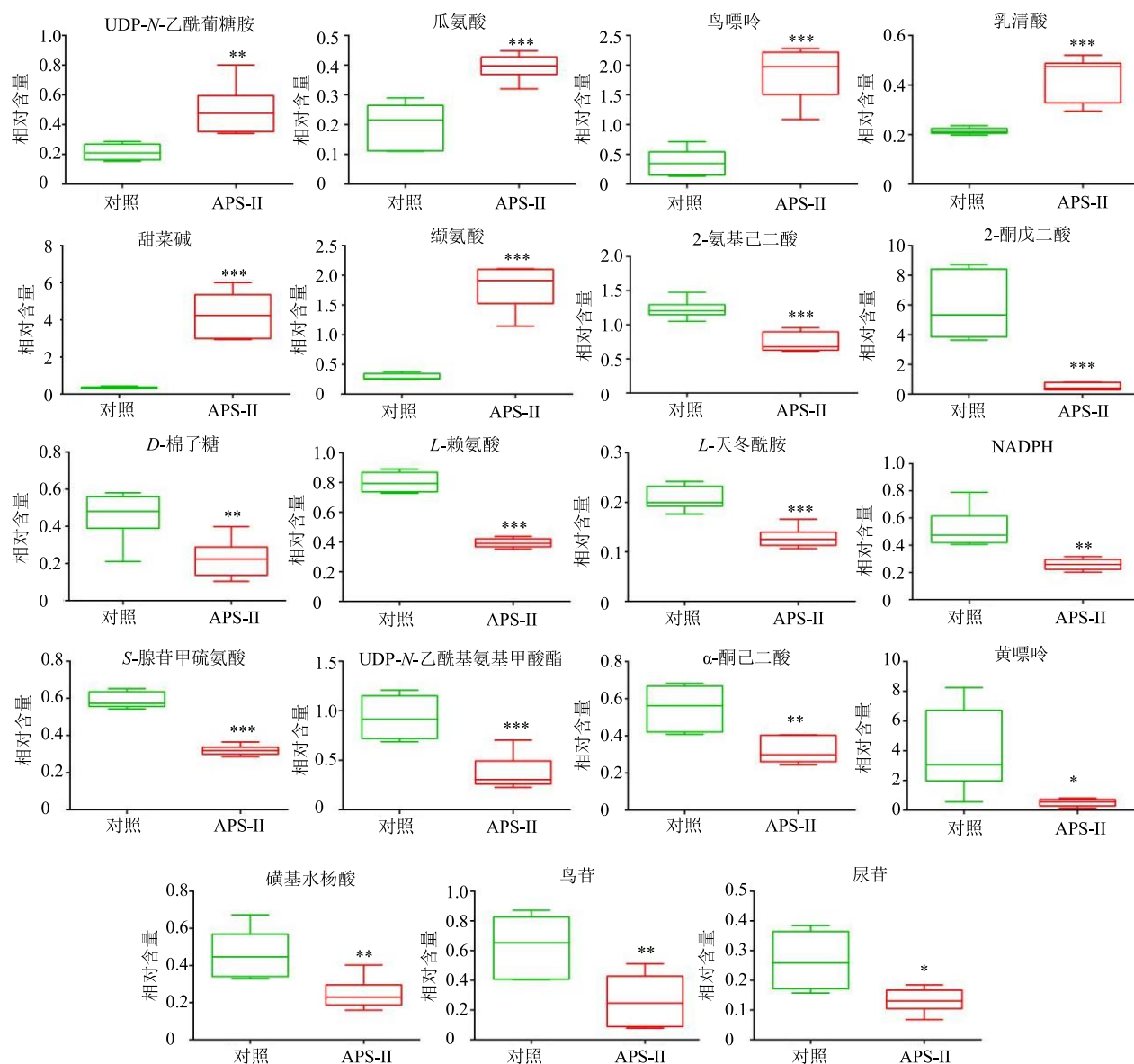


图 10 对照组和 APS-II 给药组 Raw 264.7 细胞培养上清液中差异代谢物归一化峰面积箱状图

Fig. 10 Box-whisker plot of normalized peak area of differential metabolites in Raw 264.7 cell culture supernatant in control and APS-II administration groups

赖氨酸生物合成、赖氨酸降解、半胱氨酸和蛋氨酸代谢。

3.6 差异代谢物的相关分析

从图 12 相关性分析结果可以看出细胞内外差异代谢物之间的相关性。细胞内 D-棉子糖、天冬氨酰络氨酸、天冬酰胺缬氨酸、L-色氨酸正相关关系较强。赖氨酰缬氨酸、2-氨基乙基、L-谷胱甘肽、L-谷氨酸等正相关关系较强。细胞外缬氨酸、瓜氨酸、鸟嘌呤等正相关关系较强。L-赖氨酸、α-酮己二酸、尿苷、S-腺苷甲硫氨酸、D-棉子糖等正相关关系较强。细胞内赖氨酰缬氨酸、D-泛醇、天冬氨

酰络氨酸、天冬酰胺缬氨酸、缬氨酸、三乙醇胺、D-焦谷氨酸等与细胞外 L-赖氨酸、L-天冬酰胺、α-酮己二酸、瓜氨酸等相关性较强。说明 APS-II 提高 Raw 264.7 细胞吞噬活性与多条代谢通路有关，且各代谢物之间相互影响，相互关联，共同调控代谢通路。

4 讨论

本课题组前期已对 APS-I 和 APS-II 进行了特征结构分析。结果表明 APS-I 为非均一性多糖，平均相对分子质量大于 500 000，主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、半乳糖醛酸组成，阿拉伯糖为其主要成分，并测出 5 种糖苷键类型，其中以

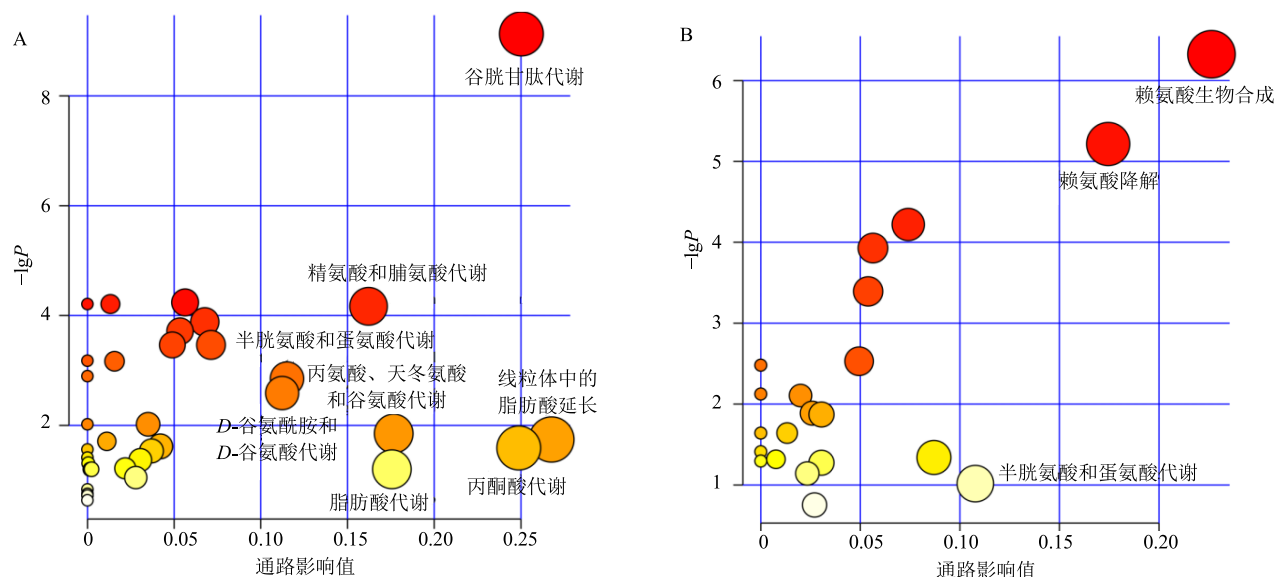


图 11 细胞裂解物 (A) 和上清液 (B) 中 MetPA 通路分析

Fig. 11 Analysis of MetPA pathway in cell lysate (A) and supernatant (B)

1,5- β -阿拉伯糖连接为主；APS-II 为均一性多糖，平均相对分子质量为 10 000，主要由葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、半乳糖醛酸组成，葡萄糖为其主要成分，并测出 5 种糖苷键类型，其中以 1,4- α -葡萄糖连接为主。

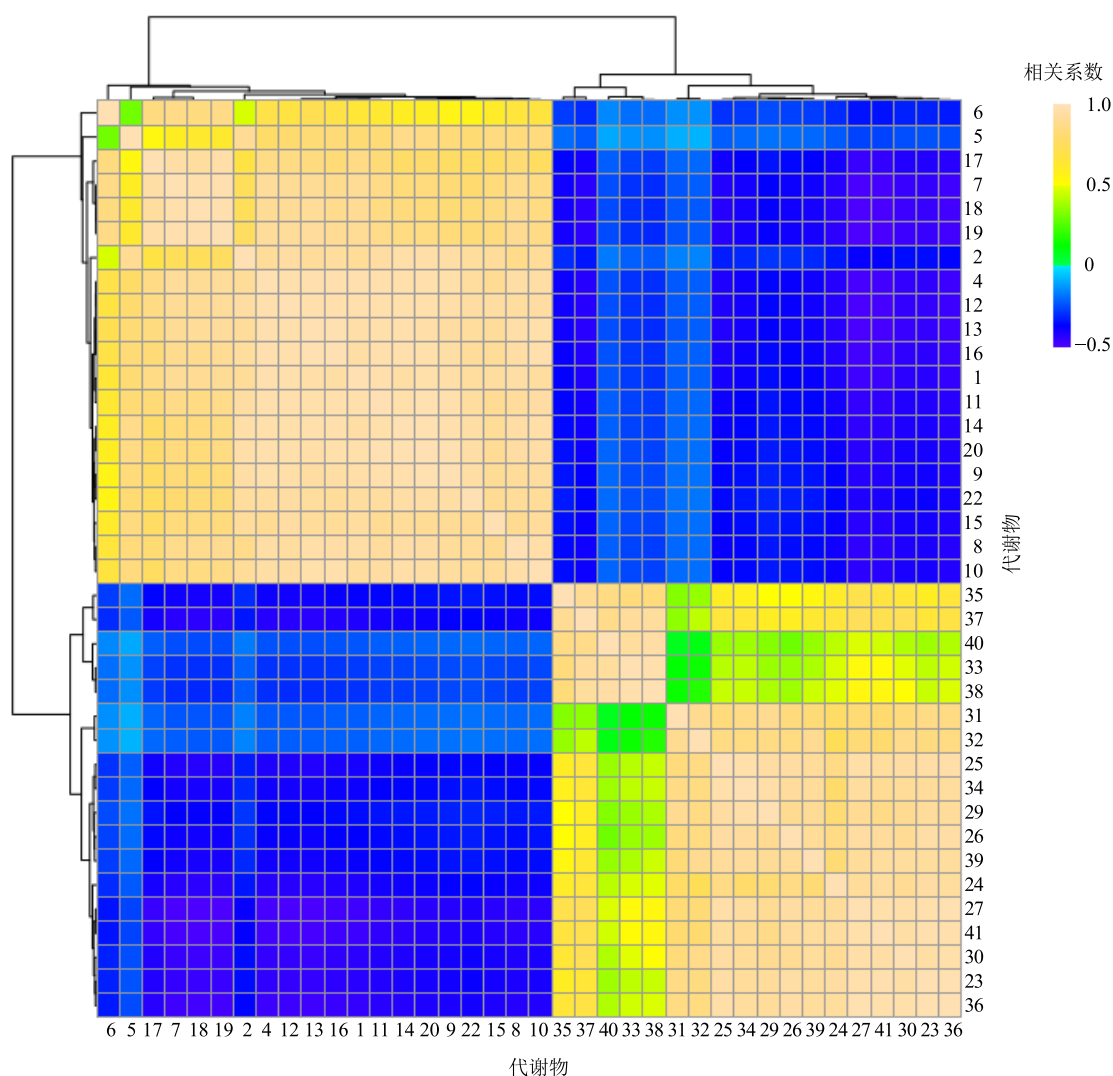
免疫是人体为维护自身健康而抵御外界侵害的功能，包括固有免疫与适应性免疫。固有免疫无特异性，作用范围广，适应性免疫具有特异性^[21]。APS 具有多重功效，以免疫调节最为突出，另有少数多糖也具有此免疫功能。本课题组通过细胞水平和动物水平筛选出免疫活性多糖，由于 APS 的药理活性均是由固有免疫为基础实现的，因此，本研究以固有免疫进行机制研究，以 Raw 264.7 细胞为研究对象，采用 LC-MS 代谢组学方法从细胞内和细胞外 2 方面分析，结果表明 APS-II 可能参与氨基酸代谢、能量代谢以及抗氧化作用调控巨噬细胞吞噬。

(1) 氨基酸代谢：氨基酸在体内的作用包括合成蛋白质和多肽以及转化为糖、脂质等，或氧化生成二氧化碳和水，释放能量。氨基酸还具有免疫调节作用，如 *L*-精氨酸能增加一氧化氮 (NO) 的形成，刺激过氧亚硝酸盐的形成^[22-23]。与对照组比较，给药后赖氨酸、缬氨酸、*L*-精氨酸、缬氨酸、*S*-腺苷甲硫氨酸、瓜氨酸等氨基酸水平显著升高，说明 APS-II 通过增加氨基酸含量，增强机体能量，调节机体免疫系统。

(2) 能量代谢：乙酰辅酶 A 是葡萄糖、脂肪酸和氨基酸分解代谢的产物。葡萄糖通过糖酵解生成丙酮酸，丙酮酸经酶催化氧化脱羧生成乙酰辅酶 A，在线粒体中，乙酰辅酶 A 经酶催化生成柠檬酸盐，柠檬酸盐通过三羧酸循环 (TCA) 进行氧化。因此，乙酰辅酶 A 为细胞代谢状态的基本指标，同时，丙酮酸通过乙酰辅酶 A 和 TCA 循环使糖、氨基酸和脂肪相互转化，产生能量^[24-25]。本实验中，给药后乙酰辅酶 A 水平显著升高，表明 APS-II 增强 Raw 264.7 细胞吞噬活性与促进细胞能量代谢相关。

(3) 抗氧化作用：谷胱甘肽是细胞中重要的抗氧化剂，可防止细胞中的物质被活性氧氧化，并且可以清除代谢产物引起的毒性物质^[26]。同时，谷氨酸作为谷胱甘肽的合成底物之一，直接或间接促进机体的抗氧化作用^[27]。有研究报道，APS 具有抗氧化活性^[28-30]。本实验中 APS-II 提高了细胞内谷胱甘肽和谷氨酸水平，推测在临床中 APS-II 可以通过清除放、化疗导致细胞代谢紊乱引起的氧自由基或毒性物质，从而保护细胞。

本实验针对固有免疫进行机制研究，确定了 APS-II 作用于 Raw 264.7 细胞后的差异代谢物及代谢途径，初步确定了作用机制，筛选出注射用 APS 的活性成分，为注射用 APS 的二次开发奠定了基础。但仍存在一定的局限性有待后续进一步研究，对 APS-II 促进 Raw 264.7 细胞吞噬作用的机制研究



细胞裂解物: 1-赖氨酸缬氨酸 2-2-氨基乙基磷酸 3-L-α-天冬酰胺-L-苯丙氨酸 4-D-泛醇 5-L-精氨酸 6-焦碳酸二乙酯 7-天冬酰胺络氨酸 8-天冬酰胺赖氨酸 9-天冬酰胺缬氨酸 10-缬氨酸 11-三乙醇胺 12-S-腺苷甲硫氨酸 13-四磷酸二鸟苷 14-L-谷胱甘肽 15-L-谷氨酸 16-GDP 葡萄糖 17-D-棉子糖 18-L-色氨酸 19-D-焦谷氨酸 20-胞苷 21-乙酰辅酶 A 22-2-氨基己二酸

细胞培养上清液: 23-L-赖氨酸 24-磺基水杨酸 25-NADPH 26-UDP-N-乙酰基氨基酸酯 27-L-天冬酰胺 28-乳酸 29-鸟苷 30-α-酮己二酸 31-2-酮戊二酸 32-黄嘌呤 33-缬氨酸 34-尿苷 35-UDP-N-乙酰葡萄糖胺 36-S-腺苷甲硫氨酸 37-瓜氨酸 38-鸟嘌呤 39-D-棉子糖 40-甜菜碱 41-2-氨基己二酸

Raw 264.7 cell lysates: 1-lysyl-valine 2-2-ciliatine 3-L-alpha-aspartyl-L-phenylalanine 4-D-panthenol 5-L-arginine 6-diethylpyrocarbonate 7-aspartyl-tyrosine 8-aspartyl-lysine 9-asparaginy-lysine 10-valine 11-triethanolamine 12-S-adenosylmethionine 13-diguanosine tetraphosphate 14-L-glutathione 15-L-glutamic acid 16-GDP-glucose 17-D-raffinose 18-L-tryptophan 19-D-pyroglutamic acid 20-cytidine 21-acetyl-CoA 22-2-aminoadipic acid

Cell culture supernatant of Raw 264.7: 23-L-lysine 24-sulfosalicylic acid 25-NADPH 26-UDP-N-acetylmuraminat 27-L-asparagine 28-orotic acid 29-guanosine 30-alpha-ketoadipic acid 31-2-keto-glutaramic acid 32-xanthine 33-valine 34-uridine 35-UDP-N-acetylglucosamine 36-S-adenosylmethionine 37-citrulline 38-guanine 39-D-raffinose 40-betaine 41-2-aminoadipic acid

图 12 细胞内、外差异代谢物相关性分析

Fig. 12 Correlation analysis of differential metabolites in and out of cells

深入性不足, 需要进一步采用转录组和蛋白质组学等方法全面解释其作用机制。

参考文献

[1] 任钧国, 刘建勋. 中药注射剂上市后作用机制研究的

思路与方法 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(11): 1319-1322.

[2] 周国锋, 李媛, 林芮, 等. 中药注射剂治疗心力衰竭系统评价再评价 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 125-129.

- [3] 魏 晶, 王瑜歆, 潘卫三, 等. 中药注射剂不良反应与质量标准完善 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(6): 464-467.
- [4] 尹 婕, 金少鸿. 中药注射剂不良反应现状及风险控制措施浅析 [J]. 中国药事, 2013, 27(9): 989-993.
- [5] 白晓菊. 从中药注射剂不良反应看中药上市后再评价问题 [J]. 中国药物警戒, 2009, 6(2): 86-90.
- [6] 肖 宇, 宋壁伶, 张弘毅. 现代科技创造黄芪真正价值——中药二类新药注射用黄芪多糖 [J]. 天津药学, 2007, 19(1): 77-78.
- [7] 时潇丽, 姚春霞, 林 晓, 等. 多糖药物应用与研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(9): 1057-1062.
- [8] 桑 青, 崔慧文, 姬胜利. 肝素类抗凝药物研究进展 [A] // 山东省药学会 2010 年生化与生物技术药物学术研讨会论文集 [C]. 烟台: 山东省药学会, 2010.
- [9] 李 钦, 胡继宏, 高 博, 等. 黄芪多糖在免疫调节方面的最新研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 199-206.
- [10] Jin M L, Zhao K, Huang Q S, *et al.* Structural features and biological activities of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.12.002.
- [11] Miggliels P, Wouters B, Westen G J P, *et al.* Novel technologies for metabolomics: More for less [J]. *Trends Anal Chem*, 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.11.021.
- [12] Zhang M L, Wang Y, Zhang Q, *et al.* UPLC/Q-TOF-MS-based metabolomics study of the anti-osteoporosis effects of *Achyranthes bidentata* polysaccharides in ovariectomized rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.204.
- [13] Christ B, Pluskal T, Aubry S, *et al.* Contribution of untargeted metabolomics for future assessment of biotech crops [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23(12): 1047-1056.
- [14] Li C, Zhang J M, Wu R J, *et al.* A novel strategy for rapidly and accurately screening biomarkers based on ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1063(31): 47-56.
- [15] Shu X, Zhang Y F, Jia J X, *et al.* Extraction, purification and properties of water-soluble polysaccharides from mushroom *Lepista nuda* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.214.
- [16] Lee S M, Yoon M Y, Park H R. Protective effects of *Paeonia lactiflora* Pall. on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, doi: 10.1271/bbb.70756.
- [17] Bermejo S B, López E S, Puyana M C, *et al.* An untargeted metabolomic strategy based on liquid chromatography-mass spectrometry to study high glucose-induced changes in HK-2 cells [J]. *J Chromatogr A*, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.03.009.
- [18] Tian J S, Liu S B, He X Y, *et al.* Metabolomics studies on corticosterone-induced PC12 cells: A strategy for evaluating an *in vitro* depression model and revealing the metabolic regulation mechanism [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2018, doi: 10.1016/j.ntt.2018.07.002.
- [19] 梁梅丽, 赵 芳, 方 媛, 等. 基于LC-MS技术的柴胡石油醚部位对抑郁症模型大鼠海马组织的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2291-2301.
- [20] 王 莹, 许玮仪, 李丽潇, 等. 注射用黄芪多糖相对分子质量测定方法的比较及研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 348-353.
- [21] 张 沛, 姚朝增, 韩 锰, 等. 壳聚糖的特性分析及其免疫调节功能研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(10): 1781-1791.
- [22] Roth E. Immune and cell modulation by amino acids [J]. *Clin Nutr*, 2007, 26(5): 535-544.
- [23] 陈 勇, 刘华江, 赵妍妍, 等. 复方氨基酸注射液预防胃癌根治术后感染及改善免疫功能的研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(22): 3446-3449.
- [24] Shi L, Tu B P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: Mechanisms and consequences [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.003.
- [25] 耿 放, 张 宁, 方 衡, 等. 逍遥散对急性肝损伤大鼠模型保护作用的代谢组学研究 [J]. 中药材, 2014, 37(2): 275-279.
- [26] Douglas F G, John B W. The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Redox Biol*, 2019, doi: 10.1016/j.redox.2019.101171.
- [27] 薛晓利, 张建琴, 马 雯, 等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的黄芪甲苷对秀丽隐杆线虫寿命的延长作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2274-2281.
- [28] Yan H, Xie Y P, Sun S G, *et al.* Chemical analysis of *Astragalus mongholicus* polysaccharides and antioxidant activity of the polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 82(3): 636-640.
- [29] Li R, Chen W C, Wang W P, *et al.* Antioxidant activity of *Astragalus* polysaccharides and antitumour activity of the polysaccharides and siRNA [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 82(2): 240-244.
- [30] Chen R Z, Tan L, Jin C G, *et al.* Extraction, isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Astragalus membranaceus* [J]. *Ind Crop Prod*, 2015, 77(23): 434-443.