

基于方证代谢组学的云南白药配伍环境中草乌活血化瘀作用的药效物质基础研究

韩莹¹, 董辉¹, 孙晖^{1*}, 张清宇², 陈鹜³, 杨乐⁴, 王喜军^{1,4*}

1. 黑龙江中医药大学, 经方与现代中药融合创新全国重点实验室/国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心, 黑龙江哈尔滨 150040
2. 江苏护理职业学院, 江苏淮安 223003
3. 康龙化成(北京)新药技术股份有限公司, 北京 100176
4. 广州中医药大学第二附属医院, 省部共建中医湿证国家重点实验室, 广东广州 510405

摘要: 目的 阐明云南白药配伍环境中草乌 *Aconiti Kusnezoffii Radix* 活血化瘀作用的药效物质基础, 科学评价草乌在云南白药配伍环境中的作用。方法 应用方证代谢组学研究策略, 在应用临床生物化学及组织病理学评价云南白药治疗血瘀证的有效性的基础上, 利用代谢组学技术发现云南白药治疗血瘀证调节的血液代谢标记物及代谢通路, 进一步应用代谢标记物与血中成分关联分析挖掘与血液代谢标记物高度相关的入血成分。结果 云南白药能改善血瘀证模型大鼠血液流变学参数及组织病理学改变, 并将血瘀证大鼠的 23 个血液代谢标记物回调至正常水平, 其中 13 个具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。在云南白药治疗血瘀证有效状态下表征的 7 个草乌生物碱类血中移行成分中, 4 个入血成分与血液代谢标记物高度相关, 最终确定森布星 B、异塔拉定、塔拉乌头胺及展花乌头宁为云南白药配伍环境中草乌活血化瘀作用的潜在药效物质基础。结论 利用方证代谢组学技术揭示了云南白药配伍环境中草乌活血化瘀作用的药效物质基础研究, 为精准评价云南白药疗效, 实现云南白药临床精准遣药、产品升级并进一步提升认可度及市场占有率服务。

关键词: 云南白药; 草乌; 方证代谢组学; 血瘀证; 森布星 B; 异塔拉定; 塔拉乌头胺; 展花乌头宁

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)08-2678-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.08.005

Pharmacodynamic material basis of *Aconiti Kusnezoffii Radix* under Yunnan Baiyao compatibility in effect of activating blood circulation and removing blood stasis based on chinmedomics

HAN Ying¹, DONG Hui¹, SUN Hui¹, ZHANG Qingyu², CHEN Ao³, YANG Le⁴, WANG Xijun^{1,4}

1. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classical Formula and Modern Chinese Medicines, National Chinmedomics Research Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China
2. Jiangsu Nursing Vocational College, Huaian 223003, China
3. Pharmaron Beijing Co., Ltd., Beijing 100176, China
4. State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: Objective To elucidate the pharmacodynamic material basis of activating blood circulation and removing blood stasis effect of Caowu (*Aconiti Kusnezoffii Radix*) in Yunnan Baiyao (云南白药, YNBY) compatibility environment, and interpret the effects of *Aconiti Kusnezoffii Radix* in YNBY compatibility environment. **Methods** Chinmedomics strategy was applied to the study. On the

收稿日期: 2024-12-30

基金项目: 国家中医药管理局公益性行业科研专项(2015468004); 国家自然科学基金面上项目(82274199); 黑龙江省自然科学基金青年基金项目(QC2018117); 中央支持地方高校改革发展资金人才培养计划(2021ZYQLG001); 黑龙江科技英才春雁支持计划(CYQN24013)

作者简介: 韩莹, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为方证代谢组学。E-mail: hanying314@sina.com

*通信作者: 孙晖, 教授, 博士生导师, 从事中药体内直接作用物质及中药质量标准研究。E-mail: sunhui7045@163.com

王喜军, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: xijunw@sina.com

basis of clinical biochemistry and histopathology evaluation of the effectiveness of YNBY in the treatment of blood stasis syndrome, the metabolic markers and metabolic pathways regulated by YNBY in treatment of blood stasis syndrome were found by metabolomics. Analysis of correlation between metabolic markers and serum constituents was used to excavate blood entry components that were highly correlated with blood metabolic markers. **Results** YNBY could improve hemorheological parameters and histopathological changes of blood stasis syndrome model rats, and restore 23 blood metabolic markers to normal level in rats with blood stasis syndrome, 13 of them were statistically significant ($P < 0.05, 0.01$). A total of seven alkaloids components of *Aconiti Kusnezoffii Radix* absorbed into blood in the effective state of YNBY treatment of blood stasis syndrome were characterized, four of them were highly correlated with blood metabolic markers. It was finally determined that sembuxin B, isotalatizidine, talatisamine and chasmanine were the potential pharmacodynamic material bases of *Aconiti Kusnezoffii Radix* in the compatibility environment of YNBY in promoting blood circulation and removing blood stasis. **Conclusion** This study determined the potential pharmacodynamic material bases of *Aconiti Kusnezoffii Radix* in the compatibility environment of YNBY in promoting blood circulation and removing blood stasis, which serves to effective evaluation of YNBY, clinical precision dispensing and product upgrading of YNBY, and further enhance the recognition and market share. **Key words:** Yunnan Baiyao; *Aconiti Kusnezoffii Radix*; chinmedomics; blood stasis syndrome; sembuxin B; isotalatizidine; talatisamine; chasmanine

云南白药是我国具有自主知识产权的中药大品种，药用历史已有百余年。云南白药具有活血化瘀等作用，常用于治疗跌打损伤，临床疗效确切。2013 年，香港卫生署发布新闻公报，因云南白药中含有未标示乌头类生物碱成分，指令药物进口商丰华（香港）公司回收云南白药散剂等 5 款云南白药中成药。草乌 *Aconiti Kusnezoffii Radix* 是云南白药不可或缺的主要药材，尽管在有效剂量及治疗周期内临床上未显示不良反应，但由于草乌含有乌头碱等有毒生物碱，云南白药被国际所排斥，严重地影响其有效利用及国际发展。

草乌为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根，始载于《神农本草经》。历代医家及本草著作称草乌“有毒”，需炮制或与其他中草药配伍后方可供内服使用。现代研究表明，人服用生草乌 3~4.5 g 可出现毒性反应，草乌对小鼠的半数致死量 (ip) 生用为 0.19 g/kg，而炮制后则为 6~10 g/kg。乌头类双酯型二萜生物碱既是草乌引起中毒的主要毒性物质，同时也是其主要的生理活性物质，已有草乌甲素^[1-2]等作为药品应用于临床治疗疾病。研究表明，乌头碱类成分具有强心^[3-4]、镇痛^[5]、活血^[6]、抗炎^[7]、抗抑郁^[8-9]、抗肿瘤^[10-11]、抗氧化^[12]、抗病毒^[13]等药理作用。

从古至今，草乌的毒性众所周知，但由于其具有良好的活血化瘀功效，且药用价值高，在临床仍有较高的使用频率。科学评价草乌在云南白药配伍中的作用，揭示配伍环境下草乌发挥作用的药效物质基础，对充分发挥云南白药疗效、提高国际市场的份额具有十分重要的意义。本研究采用 sc 盐酸肾

上腺素的方法复制血瘀证大鼠模型，利用方证代组学研究策略评价云南白药的活血化瘀作用，阐明血瘀证血液潜在生物标记物及云南白药调节的代谢经路，进一步表征与血液潜在生物标记物高度关联的血中移行成分，最终阐释云南白药配伍环境中草乌活血化瘀作用的药效物质基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，9 周龄，由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供，合格证号 SCXK (辽) 2015-0001。大鼠在 SPF 环境中饲养，环境温度 (25±1) °C，相对湿度 (50±5) %，12 h 光/暗周期交替，自由进食饮水。动物实验经黑龙江中医药大学伦理委员会批准 (批准号 2019011501)。

1.2 药品与试剂

云南白药 (批号 ZFA1621) 由云南白药股份有限公司提供，按《中国药典》2020 年版检验，结果符合规定；盐酸肾上腺素注射液 (批号 H12020526) 购自天津金耀药业有限公司；氯化钠注射液 (批号 180923D7) 购自哈尔滨三联药业有限公司；甲醇 (色谱级，批号 192934) 购自德国 Merck 公司；乙腈 (色谱级，批号 194036) 购自美国赛默飞世尔科技公司；甲酸 (色谱级，批号 193682) 购自天津科密欧化学试剂有限公司；其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

Waters Acquity™ UPLC 液相色谱仪、Waters Synapt G2-Si 质谱分析系统 (美国 Waters 公司)；Z30 型全自动血流变测试仪 (南京志伦科技有限公

司); KDC-160HR 型高速低温离心机 (科大创新股份公司); AG135 型分析天平 (瑞士 METTLER 公司); RVC 2-18 CD plus 真空离心浓缩仪 (德国 Christ 公司); 900 系列超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 给药溶液的制备

取盐酸肾上腺素注射液, 用生理盐水稀释为 0.18 mg/mL 的溶液; 精密称取云南白药 10.29 g, 加入 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 500 mL, 配制成质量浓度为 20.58 mg/mL 的溶液。

2.2 分组、造模与给药

33 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和云南白药 (180 mg/kg, 相当于人体等效剂量) 组, 每组 11 只。除对照组外, 其余大鼠 sc 盐酸肾上腺素 (0.3 mg/kg), 1 次/d, 连续 7 d, 制备血瘀证模型。给药组于第 8 天 ig 云南白药给药溶液, 对照组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续给药 15 d。

2.3 样品采集

于实验第 7 天, 腹主动脉采集对照组和模型组大鼠血液, 于给药第 15 天采集云南白药组大鼠血液。采集血液 (肝素钠抗凝血) 1 mL 用于全血黏度检测; 血液于 4 °C、4 000 r/min 离心 15 min 后, 取血浆 (肝素钠抗凝血) 1 mL 用于血浆黏度检测, 取血浆 (柠檬酸钠抗凝血) 2 mL 用于血浆凝血酶原时间、血浆凝血酶时间、纤维蛋白原检测。另采集血液 3 mL, 静置 30 min, 4 °C、4 000 r/min 离心 15 min, 取血清 100 μ L 用于代谢组学分析。采集大鼠血液后, 分别摘取大鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏及肾脏, 生理盐水冲洗, 滤纸擦拭干净表面水分后, 称定质量, 计算脏器指数, 于 10% 中性甲醛中固定用于病理学检测^[14]。

脏器指数 = 脏器质量 / 体质量

2.4 血清代谢组学分析

2.4.1 样品制备 取大鼠血清 100 μ L, 加入 400 μ L 甲醇, 混悬振荡 60 s 后, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 于真空离心浓缩仪浓缩, 用 100 μ L 50% 甲醇复溶, 混悬振荡 60 s, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液供液质分析。

2.4.2 分析条件 使用 Waters Acquity™ UPLC 液相色谱仪串联 Waters Synapt G2-Si 质谱分析系统进行血清代谢组学分析。

(1) 色谱条件: 采用 Waters Acquity UPLC™

HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温 35 °C, 体积流量 0.4 mL/min, 进样体积 2 μ L。流动相 A 为 0.1% 甲酸乙腈溶液, B 为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~2.0 min, 1%~30% A; 2.0~3.0 min, 30%~40% A; 3.0~4.0 min, 40%~50% A; 4.0~5.0 min, 50%~60% A; 5.0~6.0 min, 60%~65% A; 6.0~7.0 min, 65%~70% A; 7.0~10.0 min, 70%~99% A。

(2) 质谱条件: 毛细管电压分别为 3.0 kV (正离子)、2.5 kV (负离子); 锥孔电压分别为 30 V (正离子)、20 V (负离子); 去溶剂气温度为 350 °C (正、负离子); 去溶剂气体积流量为 800 L/h (正、负离子); 离子源温度为 110 °C (正、负离子); 采用亮氨酸脑啡肽 ([M+H]⁺ m/z 556.277 1、[M-H]⁻ m/z 554.261 5) 进行质量校正, 校正溶液体积流量为 10 μ L/min, 校正频率为 0.2 s; 色谱仪流出液不经分流直接注入质谱仪进行正、负离子全扫描分析, 扫描范围 m/z 50~1 200。

2.4.3 数据处理 数据采用 Progenesis QI 软件进行分析, 得到的数据矩阵应用 EZinfo 3.0 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 同时结合投影变量重要性 (variable importance for the projection, VIP) 值 (VIP > 1) 及组间 t 检验 ($P < 0.05$) 结果, 筛选关键性的代谢产物。Mass Fragment™ 应用管理器用于表征 MS/MS 碎片离子分析过程, 在 Metlin、HMDB 和 Chemspider 数据库的基础上, 利用 MetPA 软件对潜在的生物标志物进行重建、相互作用和路径分析, 以分析生物标志物和确定代谢途径。

采用 PCMS 软件进行血中移行成分及血清代谢产物关联性分析, 设置 $0.5 \leq |r| \leq 0.7$ 为高度正 (负) 相关, $0.7 \leq |r| \leq 1$ 为极度正 (负) 相关; 选择与血清代谢产物高度相关个数在 5 个及以上的血中移行成分, 作为云南白药配伍环境中草乌活血化瘀作用的潜在药效物质基础。

2.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 云南白药治疗血瘀证大鼠的疗效评价

3.1.1 经典血液流变学及组织病理学评价 应用

经典血液流变学及组织病理学评价云南白药治疗血瘀证大鼠的疗效,发现与对照组比较,模型组大鼠全血黏度及血浆黏度升高,凝血酶时间、凝血酶原时间缩短,血浆纤维蛋白原含量升高;模型组大鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏均出现不同程度的血管扩张、充血、瘀血、水肿及炎细胞浸润等血瘀证的病理变化,其中以心脏及脾脏的改变最为显著。给予云南白药治疗 15 d 后,大鼠全血黏度及血浆黏度降低,血浆凝血酶时间、血浆凝血酶原时

间均延长;各脏器瘀血、充血、水肿及炎细胞浸润等病理现象大部分消失,形态结构恢复完整、清晰,接近对照组大鼠,且云南白药对心脏、肝脏及肾脏瘀血的改善效果较好^[14]。

3.1.2 脏器指数评价 如图 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏指数稍有下降,肾脏指数稍有升高;给予云南白药治疗后,大鼠心脏、脾脏、肾脏指数升高,肝脏、肺脏指数降低,组间比较差异无显著性。

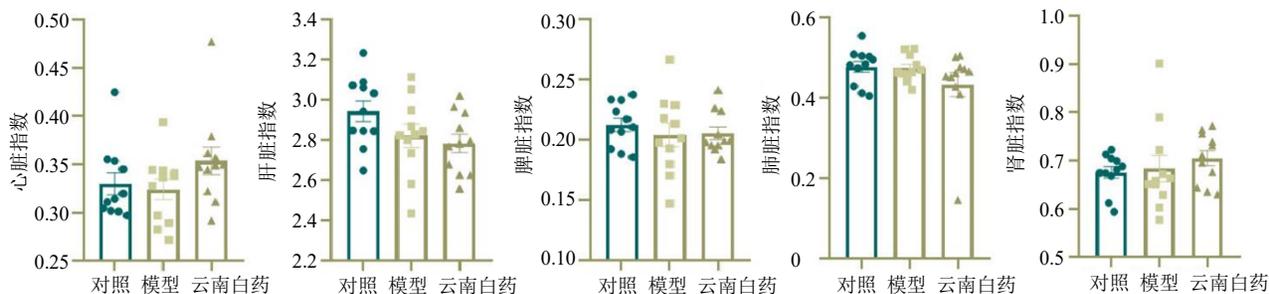


图 1 各组大鼠脏器指数 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Fig. 1 Organ coefficients of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

3.2 云南白药治疗血瘀证的血清代谢组学研究

采用优化的色谱-质谱联用方法,将采集得到的对照组、模型组及云南白药组大鼠血清代谢轮廓数据(图 2-A)输入 Progenesis Q1 软件,各色谱峰经过匹配、提取、标准化流程后,将离子归一化,进行非监督型 PCA,得到能反映组间变化趋势的得分图(图 2-B、C),可见模型组、对照组及云南白药组聚类明显,组间分离。

根据关键性代谢产物的保留时间及精确相对分子质量,利用元素组成分析(分辨率 > 10 000,精密度 < 5×10^{-6}),确定可能的化学式;以精确相对分子质量、可能的化学式及二级质谱数据为线索,检索 HMDB 数据库(<http://www.hmdb.ca>)等代谢产物和质谱数据库,进行质谱信息匹配,初步推测代谢产物的可能归属;进一步将匹配所得化合物及相应二级质谱信息输入 Masslynx 嵌套的 Massfragment 软件,根据化学结构裂解的可能性及生物质谱裂解规律,验证鉴定的有效性。如表 1 所示,从模型组大鼠血清样本中筛选出了包括赖氨酸、白三烯 A₄ 等在内的 34 个潜在生物标记物,其中正离子模式下 13 个、负离子模式下 21 个。经云南白药治疗 15 d 后,能回调血瘀证的 23 个潜在生物标记物,包括尿刊酸、焦谷氨酸等,其中 13 个有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$, 图 2-D)。将云南白药

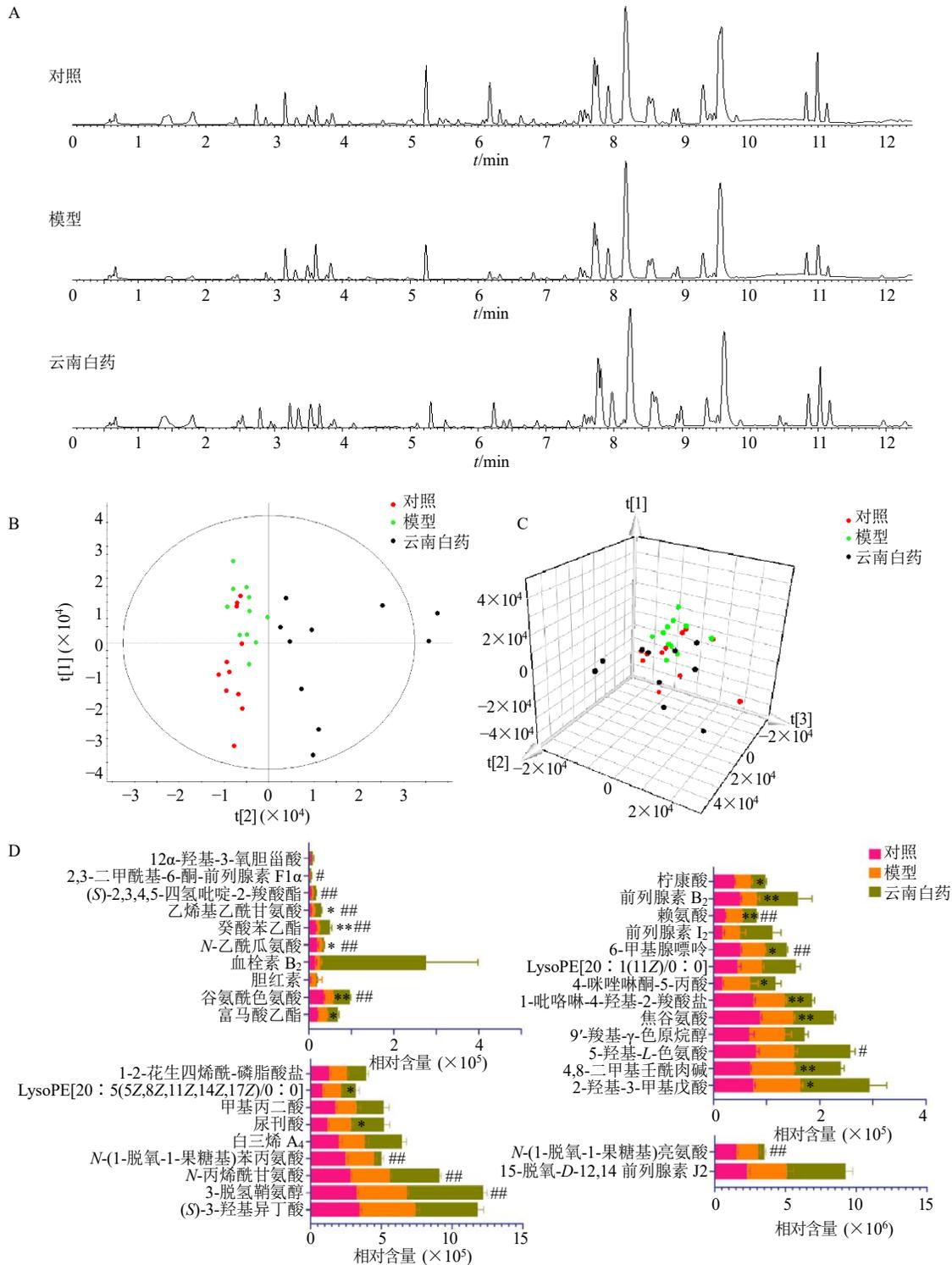
能回调的 23 个血瘀证血清潜在生物标记物进行 MetPA 分析,发现组氨酸代谢、鞘脂代谢、谷胱甘肽代谢、卟啉和叶绿素代谢、花生四烯酸代谢及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解为云南白药治疗血瘀证的关键代谢通路(图 3)。

3.3 云南白药配伍环境中草乌生物碱类血中移行成分与代谢标记物相关性研究

采用 PCMS 软件进行分析,分别计算云南白药配伍环境下草乌 7 个血中移行成分^[15]与云南白药调节的 23 个血瘀证血清潜在生物标记物的 Pearson 相关系数,得到关联分析热图(图 4),发现与 5 个及以上血清潜在生物标记物高度相关的血中移行成分为森布星 B、异塔拉定、塔拉乌头胺及展花乌头宁。

4 讨论

中药的药效物质基础研究是解读中药有效性及安全性等问题的关键环节,然而,由于中药方剂给药形式的特殊性及方证对应疗效的专属性,决定了中药药效物质基础研究的复杂性。以往关于中药药效物质基础研究已形成了许多行之有效的研究方法,如高通量活性筛选技术^[16]、基于药效基团的虚拟筛选及分子对接技术^[17-18]、网络药理学技术^[19]等,在解决中药活性成分确认方面起到积极的促进作用。然而由于思路、方法及应用技术的局限,都



A-负离子模式下, 各组大鼠血清代谢产物基峰离子色谱图; B-负离子模式下, 各组大鼠血清样本 PCA 得分图 ($n=11$); C-负离子模式下, 各组大鼠血清样本三维空间 PCA 得分图 ($n=11$); D-云南白药治疗后, 34 个血清潜在生物标记物相对含量柱形图; 与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。

A-base peak ion chromatograms for serum metabolites of rats in each group in negative ion mode; B-PCA score plot of serum samples from each group of rats in negative ion mode ($n=11$); C-three-dimensional PCA score plot of serum samples from each group of rats in negative ion mode ($n=11$); D-histograms of peaks abundance of 34 serum potential biomarkers after Yunnan Baiyao treatment; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.

图 2 云南白药治疗血瘀证调节的关键血清代谢标记物

Fig. 2 Key serum metabolic markers regulated by Yunnan Baiyao in treatment of blood stasis syndrome

表 1 血瘀证血清潜在生物标记物

Table 1 Potential biomarkers in serum of blood stasis syndrome

序号	t_R /min	质荷比 (m/z)	离子模式	HMDB ID	化学式	代谢产物	模型 vs 对照
1	0.56	147.113 2	M+H	HMDB0003405	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	赖氨酸	↑
2	0.75	216.099 1	M-H	HMDB0000856	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₄	N-乙酰瓜氨酸	↓
3	1.14	139.050 6	M+H	HMDB0000301	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	尿刊酸	↓
4	1.23	129.019 2	M-H	HMDB0000634	C ₅ H ₆ O ₄	柠康酸	↑
5	1.58	130.050 2	M+H	HMDB0001843	C ₅ H ₇ NO ₃	N-丙烯酰甘氨酸	↑
6	1.58	128.035 0	M-H	HMDB0002234	C ₅ H ₇ NO ₃	1-吡咯啉-4-羟基-2-羧酸盐	↑
7	2.39	150.077 8	M+H	HMDB0002099	C ₆ H ₇ N ₅	6-甲基腺嘌呤	↑
8	2.42	149.046 6	M-H	HMDB0000023	C ₄ H ₈ O ₃	(S)-3-羟基异丁酸	↑
9	2.55	293.147 7	M+H	HMDB0037840	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	N-(1-脱氧-1-果糖基)亮氨酸	↓
10	2.61	221.092 1	M+H	HMDB0000472	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₃	5-羟基-L-色氨酸	↓
11	2.64	145.050 0	M+H	HMDB0040207	C ₆ H ₈ O ₄	富马酸乙酯	↑
12	2.85	328.139 2	M+H	HMDB0037846	C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	N-(1-脱氧-1-果糖基)苯丙氨酸	↓
13	2.90	142.050 6	M-H	HMDB0000894	C ₆ H ₉ NO ₃	乙烯基乙酰甘氨酸	↑
14	3.49	331.117 7	M-H	HMDB0028830	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅	谷氨酰色氨酸	↓
15	3.75	131.071 2	M-H	HMDB0000317	C ₆ H ₁₂ O ₃	2-羟基-3-甲基戊酸	↑
16	3.85	155.045 9	M-H	HMDB0001014	C ₆ H ₈ N ₂ O ₃	4-咪唑啉酮-5-丙酸	↓
17	4.45	351.216 2	M-H	HMDB0001335	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	前列腺素 I ₂	↑
18	4.55	128.035 4	M-H	HMDB0000267	C ₅ H ₇ NO ₃	焦谷氨酸	↑
19	4.98	369.226 4	M-H	HMDB0003252	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	血栓素 B ₂	↑
20	5.21	421.257 9	M+FA-H	HMDB0012868	C ₂₃ H ₃₆ O ₄	9'-羧基-γ-色原烷醇	↓
21	5.32	583.255 5	M-H	HMDB0000054	C ₃₃ H ₃₆ N ₄ O ₆	胆红素	↑
22	5.41	150.053 0	M+Na	HMDB0059657	C ₆ H ₉ NO ₂	(S)-2,3,4,5-四氢吡啶-2-羧酸酯	↓
23	5.41	117.018 7	M-H	HMDB0000202	C ₄ H ₆ O ₄	甲基丙二酸	↑
24	5.83	508.340 2	M+H	HMDB0011512	C ₂₅ H ₅₀ NO ₇ P	LysoPE[20:1(11Z)/0:0]	↓
25	5.91	385.234 8	M-H	HMDB0000385	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	12α-羟基-3-氧胆甾酸	↑
26	6.29	330.264 0	M+H	HMDB0006202	C ₁₈ H ₃₅ NO ₄	4,8-二甲基壬酰肉碱	↓
27	6.65	315.196 4	M-H	HMDB0005079	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	15-脱氧-D-12,14-前列腺素 J ₂	↑
28	6.76	300.290 2	M+H	HMDB0001480	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	3-脱氢鞘氨醇	↓
29	6.79	333.203 9	M-H	HMDB0004236	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	前列腺素 B ₂	↑
30	7.33	341.197 1	M-H	HMDB0002277	C ₁₈ H ₃₀ O ₆	2,3-二甲酰基-6-酮-前列腺素 F _{1α}	↑
31	7.43	317.211 4	M-H	HMDB0001337	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	白三烯 A ₄	↑
32	7.66	544.263 6	M+FA-H	HMDB0011519	C ₂₅ H ₄₂ NO ₇ P	LysoPE[20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0]	↑
33	7.85	277.216 3	M+H	HMDB0032464	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	癸酸苯乙酯	↓
34	8.61	455.219 6	M-H	HMDB0012496	C ₂₃ H ₃₉ O ₇ P	1-2-花生四烯酰-磷脂酸盐	↑

↑表示升高, ↓表示降低。

↑ indicates up-regulated, ↓ indicates down-regulated.

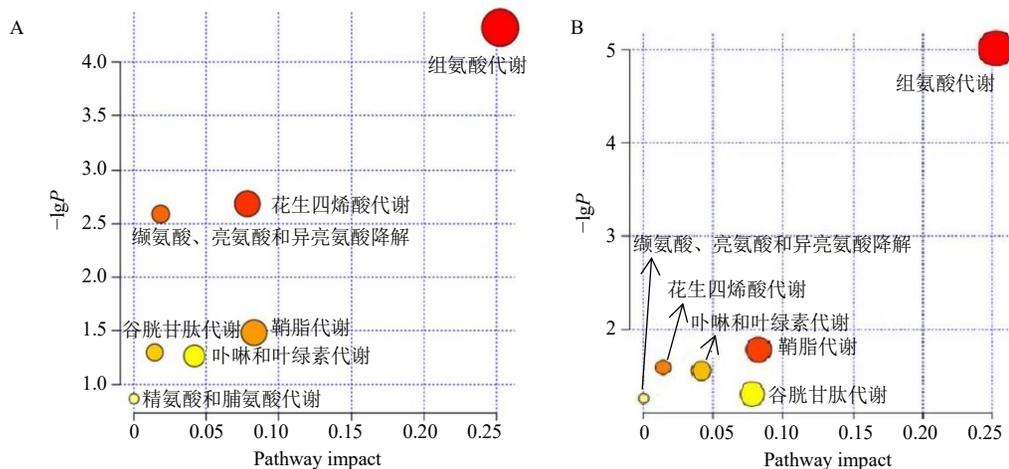


图 3 MetPA 富集得到血瘀证 (A) 及云南白药调节的相关代谢通路 (B)

Fig. 3 Metabolic pathways related to blood stasis syndrome (A) and regulated by Yunnan Baiyao (B) obtained from MetPA enrichment

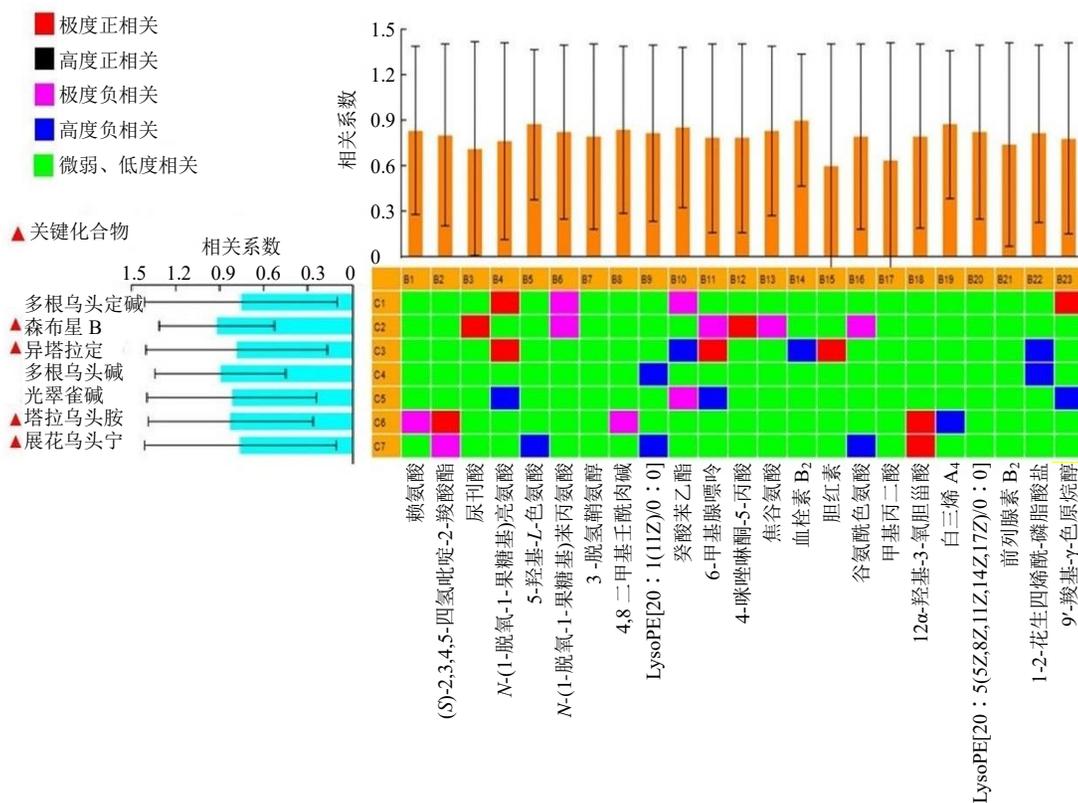


图 4 血中移行成分与血清潜在生物标记物关联分析热图

Fig. 4 Heatmap of correlation between serum potential biomarkers and constituents absorbed into blood

在某些方面存在不可逾越的弊端，并不能使发现的所谓活性成分与中药的临床有效性直接相关联，致使实质性的中药药效物质基础研究寥寥无几，中药药效物质基础研究进展缓慢。方证代谢组学是利用代谢组学技术表征证候生物标记物及精准评价方剂效应，利用中药血清药物化学方法鉴定方剂表达疗效的体内显效成分，进而发现并确认与生物标记物高度关联的中药药效物质基础，从而阐明方剂效应成分及效应机制，解决中药有效性相关科学问题的系统科学^[20-26]，为中药药效物质基础研究提供了新途径。

本研究应用方证代谢组学研究策略，在前期研究确证云南白药治疗大鼠血瘀证的有效性的基础上，首先应用代谢组学技术表征了血瘀证的 34 个血清潜在生物标记物、云南白药调节的 23 个血瘀证生物标记物及包括组氨酸代谢、花生四烯酸代谢、鞘脂代谢等在内的相关代谢通路。4-咪唑啉酮-5-丙酸、尿刊酸与组氨酸代谢密切相关。在肝脏中，尿刊酸由尿刊酸水合酶转化为咪唑-4-酮-5-丙酸，而 4-咪唑啉酮-5-丙酸可以自发地衰变成 4-氧戊二酸酰

胺或甲酰基谷氨酰胺，并最终转化为谷氨酸^[27]。尿刊酸是皮肤中的主要光线受体，以反式尿刊酸存在，经紫外线照射后转变为顺式尿刊酸。研究显示，血瘀型银屑病患者存在显著的代谢紊乱，特别是血脂代谢异常^[28]。银屑病患者照射治疗后顺式尿刊酸含量增加，同时发现细胞活性明显降低，进一步实验证实尿刊酸降低细胞活性具有剂量相关性^[29]。白三烯 A₄、前列腺素 I₂ (prostaglandin I₂, PGI₂)、前列腺素 B₂ (prostaglandin B₂, PGB₂) 及血栓素 B₂ (thromboxane B₂, TXB₂) 与花生四烯酸代谢密切相关。PGI₂ 是一种强大的血管扩张剂，可抑制血小板黏附与聚集，防止在初级止血 (血液凝块形成的一部分) 中涉及的血小板栓塞的形成^[30]。PGB₂ 是 PGI₂ 前列腺素类的代谢产物。TXB₂ 在血小板释放反应中很重要，具有强烈的收缩血管、促进血小板聚集以及导致血栓形成等作用，跟踪检测 TXB₂ 含量可直观反映体内瘀血情况^[31]。研究发现临床气虚血瘀证患者血液中 TXB₂ 含量升高^[32]。TXB₂ 作为血栓素 A₂ (thromboxane A₂, TXA₂) 的降解产物，常被用于标志 TXA₂ 的产生水平和 TXA₂ 相关酶的活性^[33]。

研究证实以 TXA₂ 升高为主的 TXA₂/PGI₂ 失衡是血瘀证的一个重要指标^[34-35]。LysoPE[20 : 5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0 : 0] 与 LysoPE[20 : 1(11Z)/0 : 0] 是溶血磷脂, 与鞘脂代谢密切相关。溶血磷脂服务于重要的信号传导如溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acids, LPA)。LPA 主要产生于血栓形成过程中被激活的血小板, 可通过 G 蛋白偶联受体引起多种生物学效应^[36]; LPA 能够引起正常内皮的迁移, 在伤口愈合、溃疡愈合以及血管再生中均发挥重要作用; 此外, LPA 也具有引起平滑肌收缩、血小板聚集的功能^[37]。

进一步应用 PCMS 关联分析, 得到与血清潜在生物标记物高度相关的 4 个血中移行成分, 判定为云南白药配伍环境中草乌活血化瘀的潜在药效物质基础。本研究表征出的 4 个潜在药效物质基础成分均为胺醇型 C₁₉-二萜生物碱。研究表明, 胺醇型 C₁₉-二萜生物碱对离体牛蛙心肌细胞损伤、大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用, 对多种动物模型具有改善肌力作用和左室舒张功能等活性; 进一步研究发现异塔拉定等醇胺型二萜生物碱是强心的活性成分。“心主血脉”, 心脏的搏动可使血液在脉道中顺畅的运行, 一旦心脏功能受损, 血液运行不通畅则易形成“血瘀”^[38]。

本研究采用方证代谢组学理论方法, 建立云南白药配伍环境中草乌药效生物评价体系, 提取与血瘀证标记物轨迹变化高度关联的草乌生物碱类成分, 明确云南白药配伍环境中草乌活血化瘀作用的药效成分为森布星 B、异塔拉定、塔拉乌头胺及展花乌头宁。本研究首次报道了云南白药中草乌生物碱类显效成分, 在保证有效性和配伍的前提下, 存在于可追溯药材中; 从化学成分层面解释了云南白药临床使用剂量及组方的合理性, 为提高云南白药的国际化进程和认可度提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Huang S N, Yang B B, Ma L, *et al.* Bulleyaconitine A exerts antianxiety and antivisceral hypersensitivity effects [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 328.
 [2] Zhao M J, Wang M Y, Ma L, *et al.* Bulleyaconitine A inhibits morphine-induced withdrawal symptoms, conditioned place preference, and locomotor sensitization via microglial dynorphin A expression [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 620926.
 [3] Zhang J, Li D, Zhong D, *et al.* Processed lateral root of

Aconitum carmichaelii Debx.: A review of cardiotoxic effects and cardiotoxicity on molecular mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1026219.
 [4] Wang X Y, Zhou Q M, Guo L, *et al.* Cardioprotective effects and concentration-response relationship of aminoalcohol-diterpenoid alkaloids from *Aconitum carmichaelii* [J]. *Fitoterapia*, 2021, 149: 104822.
 [5] Guo Q L, Xia H, Meng X H, *et al.* C₁₉-Diterpenoid alkaloid arabinosides from an aqueous extract of the lateral root of *Aconitum carmichaelii* and their analgesic activities [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(3): 409-419.
 [6] Zyuz'kov G N, Zhdanov V V, Miroshnichenko L A, *et al.* Mechanisms of hemostimulating effect of *Aconitum baicalense* diterpene alkaloids [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2013, 155(3): 350-353.
 [7] Wangchuk P, Navarro S, Shepherd C, *et al.* Diterpenoid alkaloids of *Aconitum laciniatum* and mitigation of inflammation by 14-O-acetylneoline in a murine model of ulcerative colitis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12845.
 [8] Perviz S, Khan H, Pervaiz A. Plant alkaloids as an emerging therapeutic alternative for the treatment of depression [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 28.
 [9] Nesterova Y V, Povetieva T N, Suslov N I, *et al.* Antidepressant activity of diterpene alkaloids of *Aconitum baicalense* Turcz. [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2011, 151(4): 425-428.
 [10] Yu Y, Wu S F, Zhang J Q, *et al.* Structurally diverse diterpenoid alkaloids from the lateral roots of *Aconitum carmichaelii* Debx. and their anti-tumor activities based on *in vitro* systematic evaluation and network pharmacology analysis [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(43): 26594-26606.
 [11] Fan H L, Xuan J B, Du X Y, *et al.* Antitumor component recognition from the *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* herb pair extract by chemometrics and mean impact value [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(69): 39602-39610.
 [12] Han N R, Kim K C, Kim J S, *et al.* SBT (composed of *Panax ginseng* and *Aconitum carmichaelii*) and stigmasterol enhances nitric oxide production and exerts curative properties as a potential anti-oxidant and immunity-enhancing agent [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 199.
 [13] Xu W M, Zhang M, Liu H W, *et al.* Antiviral activity of aconite alkaloids from *Aconitum carmichaelii* Debx. [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(10): 1486-1490.
 [14] Zhang Q Y, Zhang A H, Wu F F, *et al.* UPLC-G2Si-HDMS untargeted metabolomics for identification of Yunnan Baiyao's metabolic target in promoting blood circulation

- and removing blood stasis [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3208.
- [15] 杨波, 韩莹, 张清宇, 等. 云南白药配伍环境中草乌活血化瘀作用的血中移行成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(15): 3349-3357.
- [16] Fu J, Lv Y N, Jia Q Q, *et al.* Dual-mixed/CMC model for screening target components from traditional Chinese medicines simultaneously acting on EGFR & FGFR4 receptors [J]. *Talanta*, 2019, 192: 248-254.
- [17] Jiang Y Y, Gao H W. Pharmacophore-based drug design for potential AChE inhibitors from Traditional Chinese Medicine Database [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 76: 400-414.
- [18] Zuo Y H, Liu Y B, Cheng C S, *et al.* Isovalerylbinankadsurin A ameliorates cardiac ischemia/reperfusion injury through activating GR dependent RISK signaling [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104897.
- [19] Kong Q, Wu Y, Gu Y, *et al.* Analysis of the molecular mechanism of Pudilan (PDL) treatment for COVID-19 by network pharmacology tools [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110316.
- [20] Ren J L, Zhang A H, Wang X J. Traditional Chinese medicine for COVID-19 treatment [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104743.
- [21] Kong L, Sun Y, Sun H, *et al.* Chinmedomics strategy for elucidating the pharmacological effects and discovering bioactive compounds from kluoxin against diabetic retinopathy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 728256.
- [22] Liu S B, Lu S W, Sun H, *et al.* Deciphering the Q-markers of nourishing kidney-yin of *Cortex Phellodendri Amurensis* from ZhibaiDihuang Pill based on chinmedomics strategy [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153690.
- [23] Li X N, Zhang A H, Wang M J, *et al.* Screening the active compounds of *Phellodendri Amurensis Cortex* for treating prostate cancer by high-throughput chinmedomics [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46234.
- [24] Xie J, Zhang A H, Sun H, *et al.* Recent advances and effective strategies in the discovery and applications of natural products [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(2): 812-824.
- [25] Han Y, Sun H, Zhang A H, *et al.* Chinmedomics, a new strategy for evaluating the therapeutic efficacy of herbal medicines [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 216: 107680.
- [26] 刘鸿达, 孔玲, 孙晖, 等. 方证代谢组学理论及方法的形成和发展 [J]. *中草药*, 2025, 56(8): 2629-2637.
- [27] 李燕华, 毕志刚, 蒋艺. 紫外线及其辐射的尿刊酸对朗格汉斯细胞功能影响的研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2002, 22(3): 185.
- [28] 李冠勇, 刘华昌. 银屑病辨证分型与血浆内皮素水平的关系 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1996, 16(11): 663.
- [29] 静桂芳. NBUVB 光疗治疗银屑病的疗效相关因素分析 [D]. 大连: 大连医科大学, 2007.
- [30] 李晓, 姜萍. 血管内皮细胞损伤与血瘀证 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20(2): 3.
- [31] 刘又文, 谭旭仪, 陈献韬, 等. 当归补血汤对气虚血瘀证模型大鼠 TXB₂ 及 6-keto-PGF1 α 的影响 [J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(8): 29-31.
- [32] 王维, 李配富, 陈红. 气虚血瘀证肺癌患者血液 TXB₂、6-keto-PGF1 α 、NO、ROS 的相关研究 [J]. *中国中医急症*, 2012, 21(7): 1047.
- [33] 黄清春, 储永良, 何晓红, 等. 复方丹参对类风湿关节炎滑膜环氧酶下游通路的调节作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(10): 1416-1419.
- [34] 杨水祥, 洪秀芳, 李天德, 等. 冠心病血瘀证患者血小板脂质过氧化物与血栓素 A₂/前列环素平衡的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1993, 13(11): 661-662.
- [35] 蔡耀南, 赖世隆, 刘启德. 血瘀证、气虚血瘀证患者微循环改变及血浆 TXA₂、PGI₂ 水平的研究 [J]. *徐州医学院学报*, 1997, 17(3): 63-66.
- [36] 张兆辉. 溶血磷脂酸与缺血性脑损伤 [J]. *国外医学 神经病学神经外科学分册*, 2001, 28(4): 259-262.
- [37] 江波, 江林涌, 周汉良. 磷脂酸和溶血磷脂酸的生理功能 [J]. *生理科学进展*, 2002, 33(2): 159-162.
- [38] Liu X X, Jian X X, Cai X F, *et al.* Cardioactive C₁₉-diterpenoid alkaloids from the lateral roots of *Aconitum Carmichaeli* "Fu Zi" [J]. *Chem Pharm Bull*, 2012, 60(1): 144-149.

[责任编辑 李亚楠]