

## • 药理与临床 •

## 基于代谢组学和肠道菌群探讨大黄-桃仁“逐瘀泻热”协同增效的作用机制

王红艳<sup>1</sup>, 邹远荣<sup>1</sup>, 黄建萍<sup>1</sup>, 夏泽冰<sup>1</sup>, 王彦辰<sup>1</sup>, 张子健<sup>1</sup>, 彭亮<sup>1</sup>, 张岗<sup>1</sup>, 高静<sup>1</sup>, 颜永刚<sup>1\*</sup>  
陕西中医药大学, 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, “秦药”研发重点实验室, 陕西 咸阳 712046

**摘要:** 目的 探讨大黄、桃仁配伍前后“逐瘀泻热”协同增效的作用及作用机制。方法 建立大黄-桃仁水提物的含量测定方法, 将大鼠随机分为对照组、模型组、大黄组、桃仁组和大黄-桃仁组, 干预给药 21 d 后依据 Schwartzman 反应原理复制“瘀热”大鼠模型, 通过血液流变, 凝血四项及肝脏、肾脏组织病理学变化评估大黄、桃仁配伍前后的“逐瘀泻热”作用。采用 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术及 16S rRNA 高通量测序技术分析各组大鼠血浆代谢产物和肠道菌群的变化。结果 所建立的 HPLC 法可同时测定大黄-桃仁水提物中 10 种化学成分的含量; 药效学研究表明大黄、桃仁、大黄-桃仁均有明显的“逐瘀泻热”功效, 且配伍后该功效增强, 同时, 给药后改善了肝、肾炎症及充血等病理情况。代谢组学结果显示, 大黄、桃仁可能通过富马酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-谷氨酰胺等差异代谢物调控苯丙氨酸代谢、 $\beta$ -丙氨酸代谢、蛋白质的消化和吸收等通路发挥协同增强“逐瘀泻热”的功效。16S rRNA 结果显示, 配伍桃仁能够削弱大黄对变形菌门、拟杆菌属、志贺氏菌属等相对丰度的影响, 配伍大黄能够削弱桃仁对拟杆菌门的影响, 2 药配伍能够增强疣微菌门、经黏液真杆菌属、普雷沃氏菌属等的相对丰度, 减少异杆菌属相对丰度, 使厚壁菌门的相对丰度维持平衡。结论 大黄、桃仁“逐瘀泻热”协同增效的疗效可能与改善肠道菌群组成, 影响苯丙氨酸代谢、 $\beta$ -丙氨酸代谢、蛋白质的消化和吸收等代谢通路有关。

**关键词:** 大黄; 桃仁; 配伍; 逐瘀泻热; 协同增效; 肠道菌群; 代谢组学; 没食子酸; (+)-儿茶素; 苦杏仁苷; 野黑樱苷; 番泻苷 B; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)11-3893-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.11.011

## Synergistic mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* in removing blood stasis and purging heat based on metabolomics and intestinal flora

WANG Hongyan<sup>1</sup>, ZOU Yuanrong<sup>1</sup>, HUANG Jianping<sup>1</sup>, XIA Zebing<sup>1</sup>, WANG Yanchen<sup>1</sup>, ZHANG Zijian<sup>1</sup>, PENG Liang<sup>1</sup>, ZHANG Gang<sup>1</sup>, GAO Jing<sup>1</sup>, YAN Yonggang<sup>1</sup>

“Qin Medicine” R&D Key Laboratory, Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

**Abstract: Objective** To investigate the synergistic effect and mechanism of removing blood stasis and purging heat before and after the compatibility of Dahuang (*Rhei Radix et Rhizoma*) and Taoren (*Persicae Semen*). **Methods** A method for determining the content of water extract of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* was established. The rats were randomly divided into control group, model group, *Rhei Radix et Rhizoma* group, *Persicae Semen* group and *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* group. After 21 d of intervention, “stasis heat” rat model was replicated according to the Schwartzman reaction principle. The effect of removing blood stasis and purging heat before and after the compatibility of *Rhei Radix et Rhizoma* and *Persicae Semen* was evaluated by hemorheology, coagulation of four items, and liver and kidney histopathological changes. UPLC-Q-TOF-MS metabolomics technology and 16S rRNA high-throughput sequencing technology were used to analyze the plasma metabolites and intestinal flora changes in each group. **Results** The established HPLC method could simultaneously determine the contents of 10 chemical components in water

收稿日期: 2024-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973592); 陕西省中医药管理局项目 (2021-GJ-JC004); 陕西中医药大学“秦药”品质评价与资源开发学科创新团队项目 (2019-QN01)

作者简介: 王红艳 (1977—), 讲师, 从事中药复方及药对研究。Tel: 13759845952 E-mail: Fengyun8817@163.com

\*通信作者: 颜永刚, 男, 博士, 教授, 主要从事中药资源开发与中药配伍研究。Tel: 13892062171 E-mail: yunfeng828@163.com

extract of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen*. *Rhei Radix et Rhizoma*, *Persicae Semen*, and *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* had the obvious effect of removing blood stasis and purging heat, and the effect was enhanced after compatibility. At the same time, the pathological conditions such as liver and kidney inflammation and congestion were improved after administration. The results of metabolomics showed that *Rhei Radix et Rhizoma* and *Persicae Semen* may regulate phenylalanine metabolism,  $\beta$ -alanine metabolism, protein digestion and absorption through fumaric acid,  $\gamma$ -aminobutyric acid, *L*-glutamine and other differential metabolites to play a synergistic effect of removing blood stasis and purging heat. The results of 16S rRNA showed that the compatibility of *Persicae Semen* could weaken the effect of *Rhei Radix et Rhizoma* on the relative abundance of Proteobacteria, *Bacteroides* and *Shigella*. The compatibility of *Rhei Radix et Rhizoma* could weaken the effect of *Persicae Semen* on *Bacteroides*. The compatibility of the two drugs could enhance the relative abundance of Verrucomicrobia, *Myxomycetes* and *Prevotella*, reduce the relative abundance of *Heterobacter*, and maintain the relative abundance of Firmicutes. **Conclusion** The synergistic effect of *Rhei Radix et Rhizoma* and *Persicae Semen* in removing blood stasis and purging heat may be related to improving the composition of intestinal flora, affecting metabolic pathways such as phenylalanine metabolism,  $\beta$ -alanine metabolism, protein digestion and absorption.

**Key words:** *Rhei Radix et Rhizoma*; *Persicae Semen*; compatibility; removing blood stasis and purging heat; synergistic effect; intestinal flora; metabolomics; gallic acid; (+)-catechin; amygdalin; prunasin; sennoside B; aloe-emodin; rhein; emodin; chrysophanol; emodin methyl ether

“瘀热”出自于张仲景《伤寒论·太阳病篇》，是外感热病或内伤杂病进展至某个阶段，火热毒邪或挟痰湿壅滞于血分，搏血为瘀，致血热、血瘀相搏，共同为患而成的一种复合病理因素<sup>[1-2]</sup>。现代研究将此过程阐述为炎症引起的凝血和血液流变学异常，微循环紊乱，最终造成组织器官缺血缺氧以及机体代谢障碍或衰竭的一种病理状态<sup>[3]</sup>。在中医基础理论中，热为阳邪，具有燔灼、炎上、生风、急迫妄动等基本特性，与血瘀共存往往使得病位广泛，病程缠绵不愈、病势凶险难测，不加干预，结果不善，预后亦极差<sup>[4-6]</sup>。目前，在西方医学中，常用阿司匹林、氯吡格雷、替格瑞洛等药物预防和改善“瘀热互结”证相关症状，然而，这些药物长期使用会出现出血和血栓栓塞等不良反应，存在明显的局限性<sup>[7]</sup>。中医药在预防和治疗“瘀热互结”证方面历史悠久，积累了丰富的临床实践经验，治疗时遵循“辨证论治、治病求本、标本兼治”等原则，采用“逐瘀泻热”法进行治疗，从根本上阻止瘀血积聚，防止热邪与血瘀互结<sup>[8-9]</sup>。

大黄-桃仁药对是桃核承气汤、抵挡汤和抵挡丸等“逐瘀泻热”经典名方的核心药对<sup>[10]</sup>，二者因性味、归经、功效峻缓的异同，配伍使用可以起到相辅、相制、相引的作用。在性味及功效方面，大黄性寒味苦，药性峻猛，沉而不浮，既能清积泻热，又能活血化瘀；桃仁性平味苦，药性和缓，能祛瘀泻热，《医学衷中参西录》载“方中用桃仁者，取其能引大黄之力专入血分以破血也”，2药配伍刚柔并济、药少力专，使清热之效大增，活血不伤血，能破血逐瘀、通腑泄浊、荡涤肠中湿热瘀结之毒<sup>[11-13]</sup>。药对为复方的最小配伍单位，是研究证候疗法的最合适分析单位，

研究大黄-桃仁协同增效的作用机制，对于理解“逐瘀泻热”清热化瘀复方的治病原理、配伍规律均具有重要意义<sup>[14]</sup>。然而，在目前的研究中，多数针对大黄-桃仁药对治疗“瘀热互结”所致某一疾病的单独的药理作用及作用机制，或是研究单药“逐瘀泻热”的功效及作用机制，对其配伍前后协同增效的药效及作用机制研究却鲜有报道。

课题组前期通过挖掘《中医方剂大辞典》中含有大黄、桃仁的方剂，发现大黄-桃仁药对发挥活血化瘀功效的配比为1:8~3:1，进而采用药物化学及药效学实验证实大黄-桃仁发挥逐瘀泻热功效的最佳配比为1:1，活血化瘀效应表现出明显的协同作用<sup>[15-17]</sup>。课题组前期研究仅对大黄-桃仁药对“逐瘀泻热”的功效进行了评价，并未涉及2药配伍前后的协同增效作用及分子机制研究。鉴于此，本研究在前期的工作基础上，建立了一种可同时测定大黄-桃仁药对水提取物中10种化学成分含量的高效液相色谱法，并通过体温变化、血液流变学、凝血四项等指标评价大黄、桃仁配伍“逐瘀泻热”协同增效的功效，进一步采用非靶向代谢组学和16S rRNA高通量测序技术对各给药组的血浆代谢物及肠道菌群进行分析，探析单药及药对对“瘀热”模型大鼠代谢物及肠道菌群的影响，以期在大鼠内源性代谢物及肠道菌群层面阐明大黄-桃仁药对逐瘀泻热功效协同增效的科学内涵。

## 1 材料

### 1.1 动物

8周龄 SPF 级 SD 大鼠，体质量(200±20)g，雌雄各半，购自成都达硕实验动物有限公司，合格证号 SCXK(川)2020-030。动物饲养于陕西中医

药大学中药药理实验室。动物实验符合实验动物伦理相关规定和管理条例,经陕西中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 SUCMDL20221029001)。

## 1.2 药材

大黄(批号 20201212,青海省果洛州达日县)、桃仁(批号 20201224,甘肃省平凉市静宁县),经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为蓼科植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 的干燥根和根茎、蔷薇科植物山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子。临用前,大黄炮制为熟大黄,桃仁去皮尖,粉碎过 40 目筛。

## 1.3 药品与试剂

对照品 B(批号 Y21A11Y121808)、大黄酚(批号 T29D10F107203)、(+)-儿茶素(批号 P21J11F118380)、大黄酸(批号 T06J10F92311)、没食子酸(批号 C17D10C105977)、芦荟大黄素(批号 Y02M11Y16995)、大黄素(批号 T17A10F95418)、大黄素甲醚(批号 T18O10F100404)、苦杏仁苷(批号 Z28A6L2815)、野黑樱苷(批号 A20GB158481)购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数均>98%;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号 SMB00704)、色谱级甲酸铵(批号 714690)购自美国 Sigma 公司;凝血酶时间(thrombin time, TT)检测试剂盒(批号 20190114)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)检测试剂盒(批号 20190214)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)检测试剂盒(批号 20190214)、血浆纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)检测试剂盒(批号 20192012)检测试剂盒购自泰州中勤世帝生物技术有限公司;色谱级乙腈(批号 4340863)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;色谱级甲酸(批号 F0654)购自日本 TCI 公司;2-氯-L-苯丙氨酸(批号 MFCD00077921)购自美国 Aladdin 公司;纯水由纯水仪制备。

## 1.4 仪器

DHG-9030 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);BP211D 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司);S3000 型高效液相色谱仪[华谱科仪(北京)科技有限公司];D24UV 型纯水仪(德国 Merck Millipore 公司);LG-R-80A 型全自动血液流变学仪、LG-PABER-1 型血小板聚集凝血因子分析仪(北京世帝科学仪器公司);MT-JC218 型数字式电子体温计(深圳家康科技有限公司);

TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);H1850-R 型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);BE-2600 型混匀仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Eppendorf5305 型真空浓缩仪(德国 Eppendorf 公司);Thermo Vanquish 液相色谱、Thermo OrbitrapExploris120 型质谱检测器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

## 2 方法

### 2.1 大黄-桃仁水提物的制备

分别取大黄-桃仁(1:1)混合粉末,加 10 倍量水浸泡 60 min,煎煮 60 min,滤过;滤渣加 8 倍量水煎煮 30 min,滤过,合并 2 次滤液,浓缩至 1 g/mL 的溶液(以生药量计)。

### 2.2 大黄-桃仁水提物的含量测定

**2.2.1 色谱条件** Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5μm);柱温 30℃;流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱:0~3 min, 20%~30% A; 3~30 min, 30%~45% A; 30~55 min, 45%~70% A, 55~80 min, 70%~80% A; 80~85 min, 80% A; 85~90 min, 80%~95% A; 90~95 min, 95%~100% A; 95~100 min, 100% A; 系统平衡时间 10 min; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 254 nm。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称定番泻苷 B、大黄酚、(+)-儿茶素、大黄酸、没食子酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚、苦杏仁苷、野黑樱苷对照品适量,甲醇溶解,制成质量浓度分别为 0.220、0.207、0.402、0.231、0.195、0.195、0.196、0.202、0.206、0.077 mg/mL 的混合对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取“2.1”项下大黄-桃仁水提物 10 mL 于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 40 mL 甲醇称定质量,超声 30 min 后放至常温,加甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

### 2.2.4 方法学考察

(1) 线性关系考察:精密吸取各混合对照品溶液 2、5、10、15、20 μL,按“2.2.1”项下方法进样测定,重复测定 3 次,记录出峰时间和峰面积积分值。

(2) 精密度试验:精密吸取各混合对照品溶液 10 μL,按“2.2.1”项下方法连续进样测定 6 次,记录峰面积积分值并计算 RSD。

(3) 稳定性试验:精密吸取供试品溶液,分别于制备后的 0、2、4、8、12、16、24 h 按“2.2.1”

项下方法进样测定，记录峰面积积分值并计算 RSD。

(4) 重复性试验：取大黄-桃仁（1：1）样品 6 份，按“2.2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，按“2.2.1”项下方法分别进样测定，记录峰面积积分值，计算 RSD。

(5) 加样回收率试验：取大黄-桃仁（1：1）样品 9 份，分别精密加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液（分别相当于原样品质量分数的 80%、100%、120%），按“2.2.1”项下方法测定，计算各成分的加样回收率和平均 RSD。

### 2.3 动物分组、造模与给药

将大鼠随机分为对照组、模型组、大黄组、桃仁组和大黄-桃仁组，每组 8 只。大黄-桃仁给药剂量为 16.2 g/kg（相当于临床等效剂量的 15 倍量），各单药给药剂量与大黄-桃仁相同，各给药组大鼠 ig 相应药物，对照组、模型组 ig 等体积生理盐水，1 次/d，连续 21 d。第 21 天给药后，依据 Schwartzman 反应原理，采用间隔 24 h 重复尾 iv LPS 复制“瘀热”大鼠模型<sup>[16]</sup>。LPS 用生理盐水配制成 20 mg/L，第 1 次尾 iv LPS（50 μg/kg），于注射 0.5 h 后给药；24 h 后，第 2 次尾 iv LPS（50 μg/kg），于注射 0.5 h 后给药，对照组尾 iv 等体积生理盐水。

### 2.4 体征观察

观察大鼠造模前后一般体征，包括大鼠造模前后精神状况、眼球充血及大小便等情况。于给药后 0.5、1.5、2、4、5、6、7、8、9、10 h 测定肛温，记录数据，以注射 LPS 前 2 h 肛温为基础体温，计算温差（ $\Delta T$ ）。

### 2.5 取材与检测

造模结束后 2 h，大鼠采用 3%戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉取血至枸橼酸钠抗凝管，3 500 r/min 离心 10 min，分离血浆，测定 TT、PT、APTT、FIB；肝素钠抗凝全血用于测定不同切变率下的全血黏度（whole blood viscosity, WBV），离心取血浆，测定血浆黏度（plasma viscosity, PV）。取血后迅速摘取肝、肾称定质量，并置于 4%多聚甲醛固定过夜，进行常规修剪、脱水、包埋、切片（5 μm），采用苏木素-伊红（HE）染色，在显微镜下观察组织病理变化。取结肠内容物于灭菌 EP 管中，液氮冷冻后转移至-80 °C 冰箱保存，用于肠道菌群检测。

### 2.6 血浆代谢组学分析

2.6.1 血浆样本的处理 将各组血浆在 4 °C 条件

下解冻，涡旋 1 min 后精确移取 100 μL 样本于 2 mL 离心管中，加入 400 μL 甲醇溶液涡旋混匀；4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液浓缩干燥；质谱分析时加入 150 μL 2-氯-L-苯丙氨酸溶液复溶，取上清液过 0.22 μm 滤膜进行 LC-MS 检测。

2.6.2 质控样本的制备 分别取 20 μL 所有血浆样本混匀，按“2.6.1”项下方法处理。

2.6.3 色谱条件 Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> HSST3 色谱柱（150 mm×2.1 mm，1.8 μm）；正离子模式，流动相为 0.1%甲酸乙腈溶液（B）-0.1%甲酸水溶液（A），梯度洗脱：0~1 min，2% B；1~9 min，2%~50% B；9~12 min，50%~98% B；12~13.5 min，98% B；13.5~14 min，98%~2% B；14~20 min，2% B。负离子模式，流动相为乙腈（B）-5 mmol/L 甲酸铵水溶液（A），梯度洗脱：0~1 min，2% B；1~9 min，2%~50% B；9~12 min，50%~98% B；12~13.5 min，98% B；13.5~14 min，98%~2% B；14~17 min，2% B。体积流量 0.25 mL/min；柱温 40 °C；进样量 2 μL。

2.6.4 质谱条件 采用正、负离子模式分别采集数据；电喷雾离子源（ESI）；喷雾电压 3.50 kV（正离子模式），-2.50 kV（负离子模式）；鞘气体积流量 378 L/h；辅助气体积流量 726 L/h；毛细管温度 325 °C；以分辨率 60 000 进行一级全扫描，扫描范围  $m/z$  100~1 000，并采用 HCD 进行二级裂解，碰撞能量 30%，二级分辨率为 15 000。

2.6.5 数据分析 通过 Proteowizard 软件包（v3.0.8789）进行峰检测、峰过滤等下机前处理。采用公共数据库 HMDB、massbank、LipidMaps、mzcloud、京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）及诺米代谢自建物质库进行代谢物鉴定。利用质控样本的 LOESS 信号校正方法进行校正，消除系统误差，过滤质控样本中 RSD>30%的物质。采用 R 软件包 Ropls 对数据进行主成分分析（principal component analysis, PCA）、偏最小二乘-判别分析（partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA）、正交偏最小二乘-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA）进行降维分析， $P$  值可评估代谢物在不同组别间差异的统计显著性，投影变量重要性（variable importance in projection, VIP）值可评估代谢物对样本分类的贡献程度，以  $P<0.05$  且  $VIP>1$  为标准筛选差异代谢物，进行

通路富集分析。其中代谢物、代谢通路进行拓扑学分析采用 Excel、Cytoscape 软件，代谢通路气泡图的绘制采用微生信在线云平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>)。

## 2.7 16S rRNA 测序分析

**2.7.1 测序方法** 对各组大鼠的盲肠内容物进行总 DNA 提取，采用全式金公司的 Pfu 高保真 DNA 聚合酶对目标片段进行 PCR 扩增，对扩增产物磁珠纯化回收并进行荧光定量，依据定量结果及各样本的测序量需求，将样本按相应比例混合，使用 Tru Seq Nano DNALT Library Prep Kit 制备测序文库，随后上机进行高通量测序。

**2.7.2 数据分析** 使用 QIIME2 (2019.4) R 语言 ggplot2 包、vegan 包、stat 包、ape 包、R 脚本等进行物种组成分析、 $\alpha$  多样性分析、 $\beta$  多样性分析、物种差异分析与标志物种筛选，使用 PICRUST2、KEGG 进行差异菌群的功能分析。

## 2.8 统计学分析

采用 Microsoft Office Excel 2007 软件统计指标数据，采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计学分析，组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

## 3 结果

### 3.1 大黄-桃仁药对的含量测定

#### 3.1.1 方法学考察

(1) 线性关系考察：如表 1 所示，番泻苷 B、没食子酸、(+)-儿茶素、苦杏仁苷、野黑樱苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚这 10 种成分线性回归的相关系数 ( $R^2$ ) 均大于 0.998 5，表明其线性关系良好。

(2) 精密度试验：番泻苷 B、没食子酸、(+)-儿茶素、苦杏仁苷、野黑樱苷、芦荟大黄素、大黄酸、

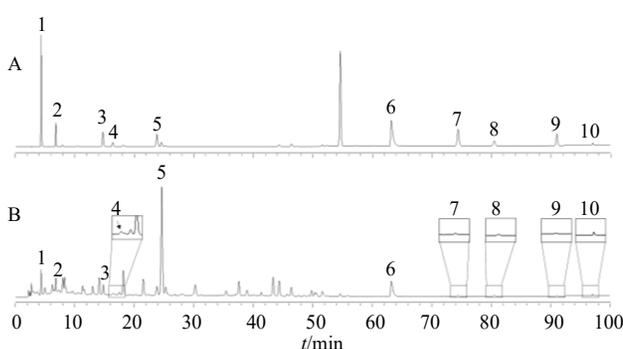
大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 1.54%、1.70%、1.33%、1.67%、1.71%、1.82%、1.42%、1.97%、1.98%、1.92%，均小于 3%，表明该仪器精密度良好。

(3) 稳定性试验：番泻苷 B、没食子酸、(+)-儿茶素、苦杏仁苷、野黑樱苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 2.39%、0.79%、2.24%、1.7%、1.06%、1.97%、1.72%、1.12%、1.33%、1.93%，表明供试品溶液在 24h 内稳定性良好。

(4) 重复性试验：番泻苷 B、没食子酸、(+)-儿茶素、苦杏仁苷、野黑樱苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均质量分数的 RSD 分别为 1.29%、1.46%、2.23%、0.98%、0.61%、0.78%、1.70%、2.19%、2.35%、1.53%，表明该方法重复性良好。

(5) 加样回收率试验：番泻苷 B、没食子酸、(+)-儿茶素、苦杏仁苷、野黑樱苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均加样回收率分别为 98.53%、99.12%、98.92%、100.06%、100.10%、96.69%、99.17%、98.96%、97.87%、100.04%，RSD 分别为 1.34%、1.67%、1.45%、1.79%、2.03%、1.75%、1.99%、1.55%、1.73%、1.91%，表明回收率良好。

**3.1.2 含量测定** 取供试品溶液，按“2.2”项下的色谱条件进样检测，色谱图见图 1，将所得峰面积代入线性方程计算各成分含量，结果见表 2。



1-没食子酸；2-(+)-儿茶素；3-苦杏仁苷；4-野黑樱苷；5-番泻苷 B；6-芦荟大黄素；7-大黄酸；8-大黄素；9-大黄酚；10-大黄素甲醚。  
1-gallic acid；2-(+)-catechin；3-amygdalin；4-prunasin；5-sennoside B；6-aloe-emodin；7-rhein；8-emodin；9-chrysophanol；10-emodin methyl ether.

图 1 混合对照品 (A) 和大黄-桃仁水提物 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and water extract of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* (B)

表 1 10 种成分的线性关系

Table 1 Linear relationship of 10 components

成分	线性方程	$R^2$	线性范围/ $\mu\text{g}$
番泻苷 B	$Y=66\ 473 X+52\ 791$	0.999 1	0.44~4.40
没食子酸	$Y=291\ 027 X+187\ 307$	0.999 2	0.39~3.90
(+)-儿茶素	$Y=52\ 878 X+44\ 071$	0.999 5	0.80~8.04
苦杏仁苷	$Y=4\ 562.2 X+3\ 482.5$	0.999 4	0.40~4.04
野黑樱苷	$Y=2\ 657.2 X+2\ 945.5$	0.998 6	0.15~1.54
芦荟大黄素	$Y=427\ 094 X+316\ 350$	0.999 4	0.39~3.90
大黄酸	$Y=211\ 246 X+116\ 755$	0.999 5	0.46~4.62
大黄素	$Y=111\ 806 X+93\ 260$	0.998 7	0.41~4.12
大黄酚	$Y=36\ 105 X+30\ 098$	0.999 8	0.41~4.14
大黄素甲醚	$Y=54\ 653 X+99\ 454$	0.998 5	0.39~3.92

表 2 大黄-桃仁水提取物中 10 种成分的含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

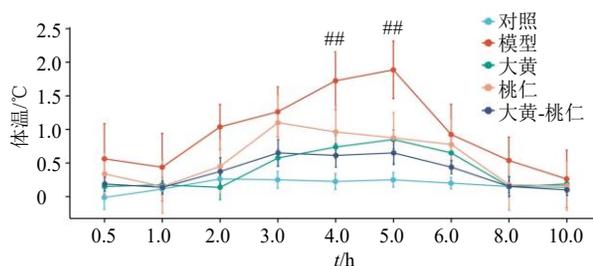
Table 2 Contents of 10 components in water extract of *Rhei Radix et Rhizoma-Persicae Semen* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

成分	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )
没食子酸	0.308±0.007
(+)-儿茶素	1.768±0.011
苦杏仁苷	40.737±0.680
野黑樱苷	7.748±0.116
番泻苷 B	2.658±0.071
芦荟大黄素	0.068±0.002
大黄酸	2.044±0.028
大黄素	0.072±0.002
大黄酚	0.028±0.005
大黄素甲醚	0.018±0.001

### 3.2 大黄、桃仁配伍前后对“瘀热”大鼠的影响

**3.2.1 大鼠一般情况比较** 对照组大鼠活动正常，毛发光泽，反应灵敏；与对照组比较，模型组大鼠普遍出现耸毛、眼球充血、精神萎靡、进食量减少、反应迟钝等症状；大黄组、大黄-桃仁组大鼠前期出现腹泻症状，给药 5 d 后有所好转，且大黄-桃仁组腹泻情况较 大黄组轻，桃仁组大鼠无明显异常情况。

**3.2.2 对大鼠体温的影响** 如图 2 所示，与对照组比较，造模 1 h 后模型组、大黄-桃仁组、桃仁组体温明显上升，2 h 后大黄组体温明显上升。与模型组比较，各给药组大鼠体温差上升缓慢且整体低于模型组，对体温的缓解作用由高到低依次为大黄-桃仁组 > 大黄组 > 桃仁组，表明大黄、桃仁均有改善“瘀



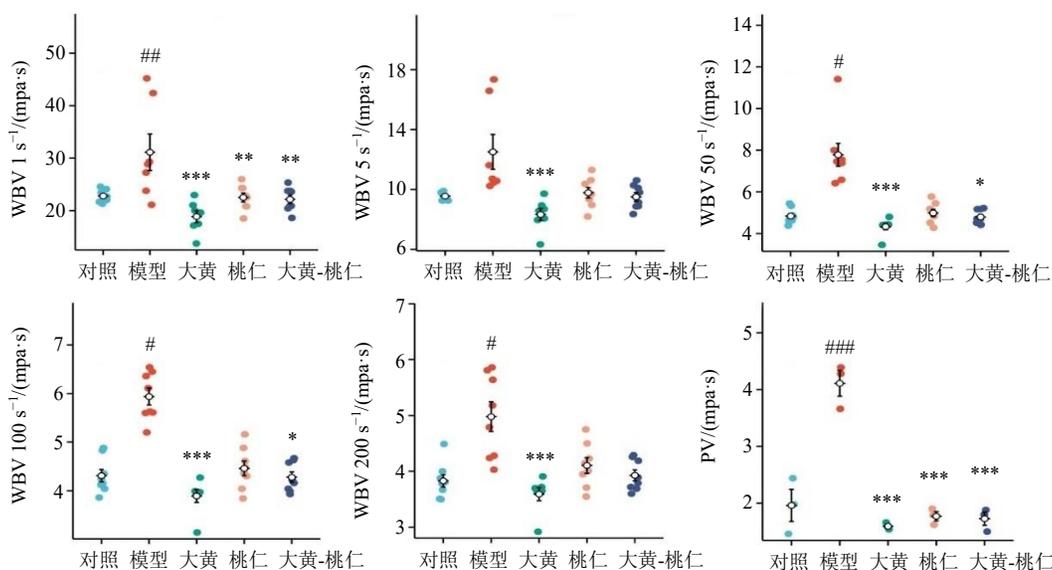
与对照组比较：## $P < 0.01$ 。  
## $P < 0.01$  vs control group.

图 2 各组大鼠体温变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Changes in body temperature of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

热”模型大鼠体温异常升高的作用，且配伍后疗效更佳。模型组、大黄组体温差在 5 h 达到峰值，大黄-桃仁组、桃仁组体温差在 3 h 达到峰值，大黄-桃仁组达峰时间对大黄组提前，可能是因为配伍桃仁后能更快引药入经，到达靶器官、靶细胞发挥“泻热”作用。

**3.2.3 对血液流变学的影响** 如图 3 所示，与对照组比较，除 5 s<sup>-1</sup> 切变率下的 WBV 外，模型组大鼠在不同切变率下的 WBV、PV 均有所升高 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )，提示模型组血液黏滞性增高，流动阻力增大；与模型组比较，各给药组在不同切变率下的 WBV、PV 均有所降低，其中大黄-桃仁组改善“瘀热”模型大鼠的血液黏度效果最佳 ( $P < 0.001$ )。



与对照组比较：# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ；与模型组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ，下图同。

# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as below figures.

图 3 各组大鼠血液流变学变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Changes in blood rheology of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**3.2.4 对凝血功能的影响** 如图4所示,与对照组比较,模型组FIB显著升高( $P<0.001$ ),TT、PT、APTT显著降低( $P<0.001$ );与模型组比较,各给药组FIB显著降低( $P<0.001$ ),TT、PT及APTT显著升高( $P<0.01$ 、 $0.001$ ),表明大黄、桃仁均能够改善“瘀热”模型大鼠凝血功能,且桃仁改善效果略优于大黄,2药配伍后对血液黏、浓、聚的病理情况改善增强。

**3.2.5 对肝、肾脏指数的影响** 如图5所示,与对照组比较,模型组肝脏指数升高,肾脏指数无明显变化;与模型组比较,大黄-桃仁组、桃仁组肝、肾脏指数均有所增加,其中大黄-桃仁组肝脏指数具有显著性差异( $P<0.05$ )。推断产生此结果的主要原

因可能是“瘀热”模型为急性模型,致模型组肝、肾脏指数与对照组无显著差异,而给药组前期给药时间较长,引起肝、肾脏指数的变化。

**3.2.6 对肝、肾组织病理变化的影响** 如图6所示,与对照组比较,模型组大鼠肾组织大多可见肾小球毛细血管扩张,肾小管充血水肿;大黄组、桃仁组、大黄-桃仁组肾小球充血及水肿情况明显改善,大黄组还存在毛细血管扩张情况。与对照组比较,模型组大鼠肝组织汇管区炎性细胞浸润较多,中央静脉及周围肝窦明显扩张,并且肝细胞胞浆疏松,排列紊乱,部分变性坏死;大黄组、桃仁组、大黄-桃仁组肝组织以上病理改变明显改善。总体来说,大黄-桃仁组肝、肾组织更接近对照组。

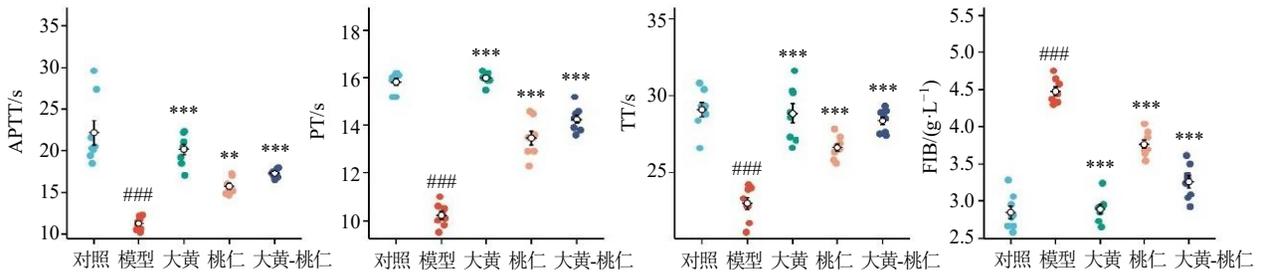


图4 各组大鼠凝血功能变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Changes in coagulation function of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

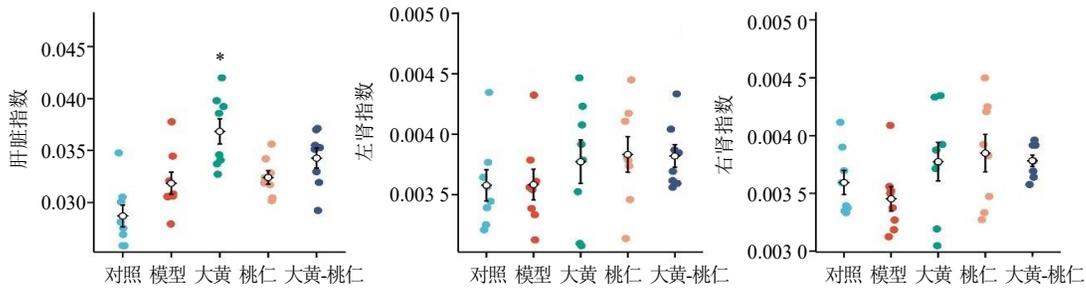


图5 各组大鼠肝、肾脏指数变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 5 Changes in liver and kidney indices of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

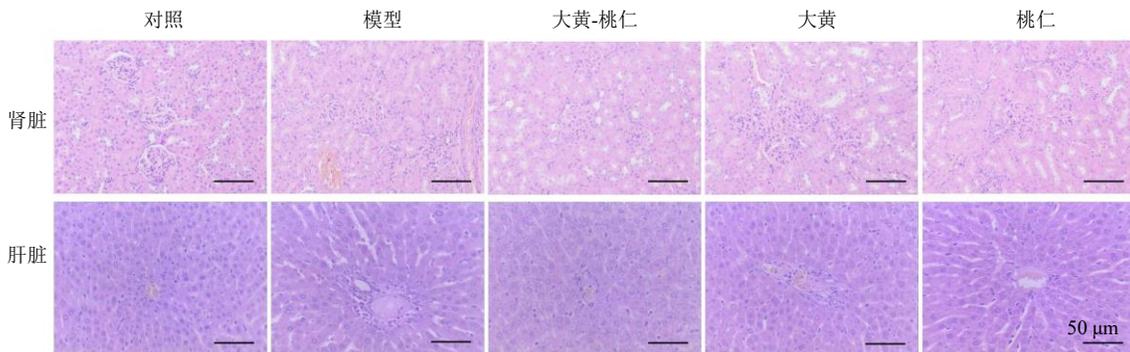


图6 各组大鼠肾、肝组织 HE 染色结果 ( $\times 400$ )

Fig. 6 HE stained results of liver and kidney tissue of rats in each group ( $\times 400$ )

### 3.3 代谢组学分析结果

**3.3.1 总基峰色谱图** 经色谱分离流出的组分不断进入质谱，质谱连续扫描进行数据采集。每次扫描得到1张质谱图，选择每张质谱图中强度最大的离子连续描绘，以离子强度为纵坐标、时间为横坐标，得到各组大鼠血清代谢物基峰正、负离子色谱图，见图7。

**3.3.2 方法学验证** 对代谢数据进行PCA，结果见图8。与其他样本比较，质控样本分布集中，表明本实验所用仪器较为稳定，所建立的代谢组学分析方法有较好的重复性。

### 3.3.3 多元统计学分析

(1) PCA: 对标准化处理后的总体代谢物进行非监督模式的PCA，如图9所示，各组样本均在置信区间内，未出现异常样本，各组间有部分交叉重叠，大黄组组内较分散。

(2) OPLS-DA: 对各组代谢数据进行OPLS-DA，如图10所示，各组样本间有较高分散度，而组内样本相对聚集，表明所建立的模型对组间样品具有良好的区分度，组内样品高度聚合为一类。对各组样本进置换检验 ( $n=200$ )，见图11，所有蓝色的 $Q^2$ 点均低于最右的原始蓝色的 $Q^2$ 点，说明模

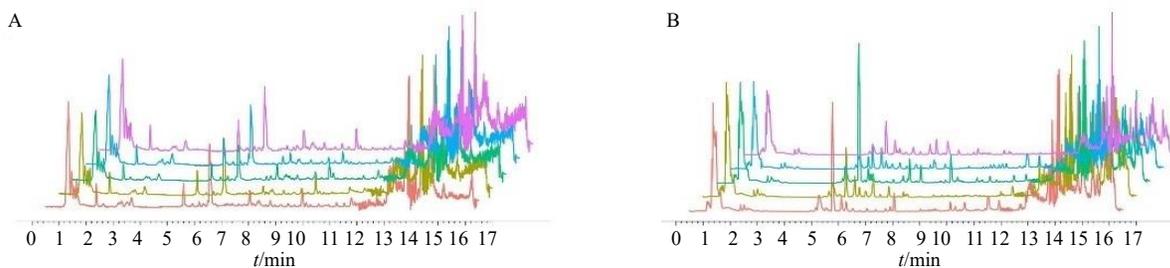


图7 各组大鼠血浆代谢物基峰正 (A)、负 (B) 离子色谱图

Fig. 7 Positive (A) and negative (B) ion chromatograms of basal peaks of serum metabolites of rats in each group

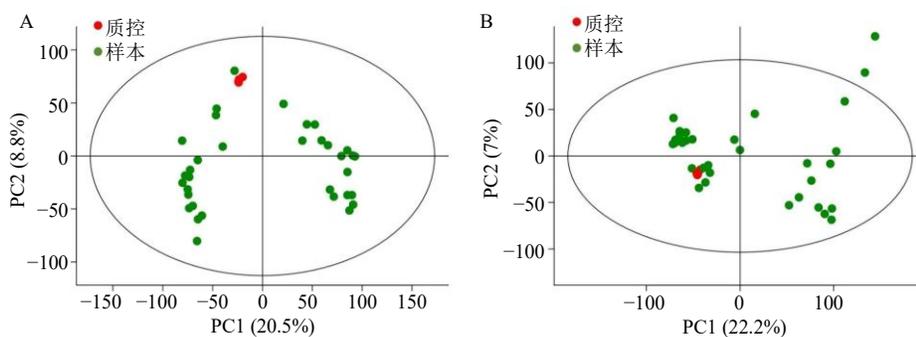


图8 正 (A)、负 (B) 离子模式下血清质控样本和每组大鼠血浆样本的PCA图

Fig. 8 PCA plots of serum quality control samples and rat plasma samples from each group in positive (A) and negative (B) ion modes

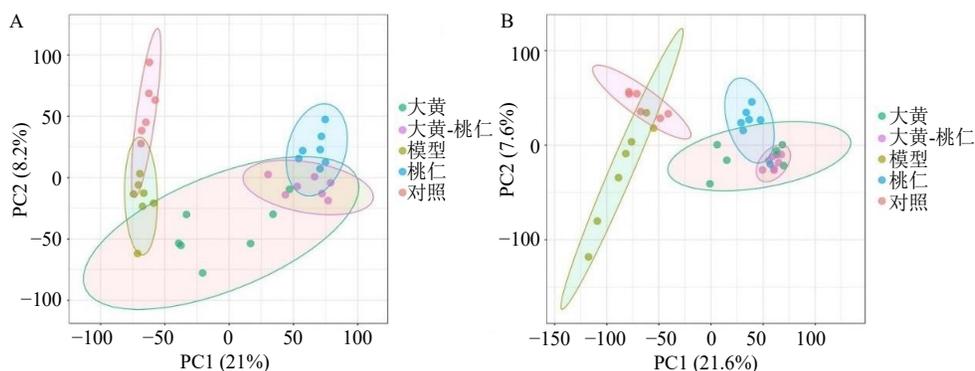


图9 正 (A)、负 (B) 离子模式下整体代谢物PCA得分图

Fig. 9 PCA scores plots of overall metabolites in positive (A) and negative (B) ion modes

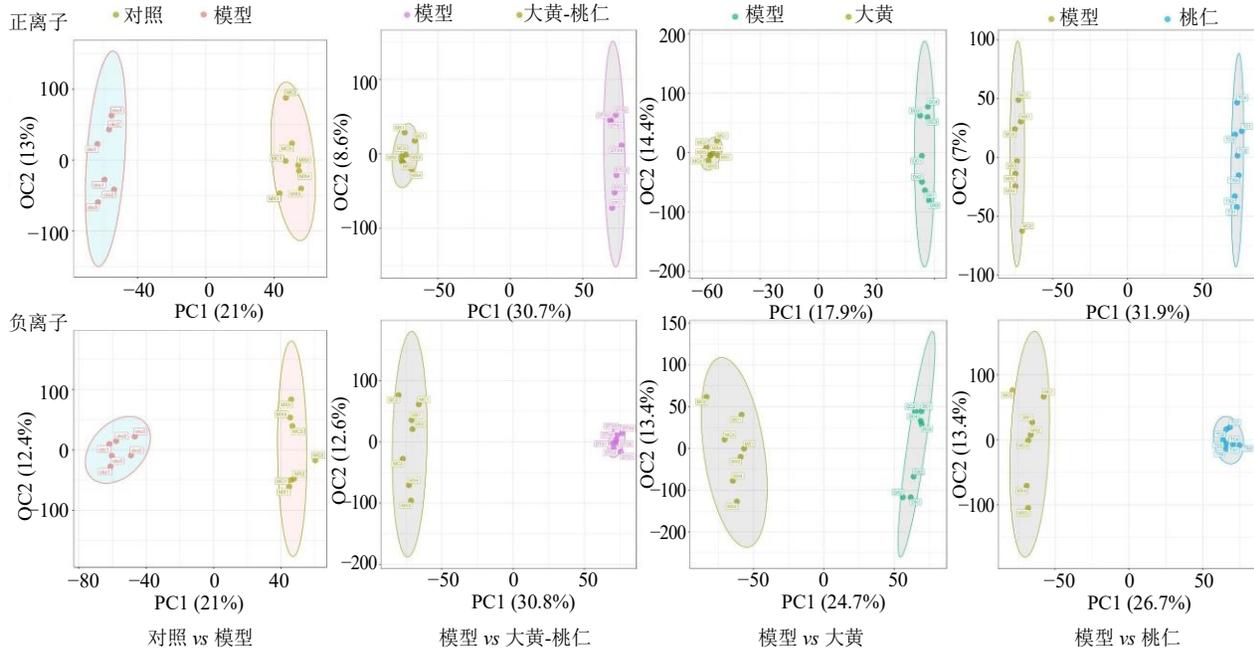


图 10 大鼠血浆代谢组学数据 OPLS-DA 得分图

Fig. 10 OPLS-DA score plots of rat plasma metabolomics data

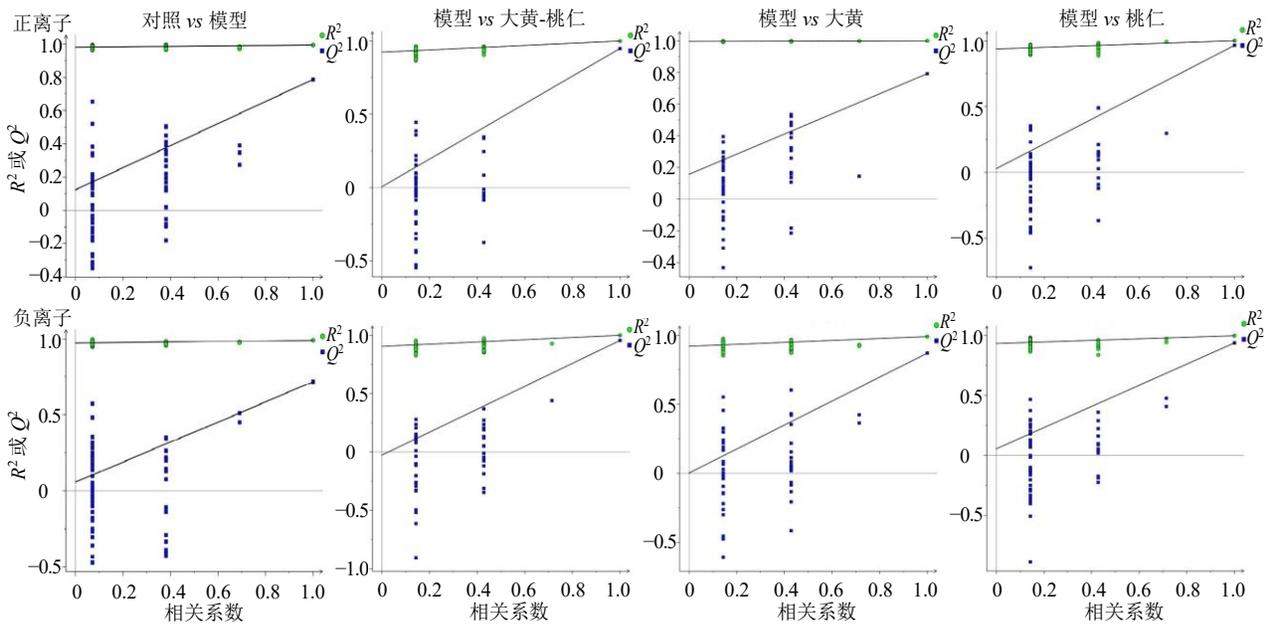


图 11 大鼠血浆代谢组学数据 200 次置换检验图

Fig. 11 Plots of 200 permutation test for metabolomics data in rat plasma

型预测良好，不存在过拟合，可进行后续差异代谢物的筛选。

**3.3.4 差异代谢物的筛选** 与对照组比较，模型组筛选出 134 个差异代谢物；与模型组比较，大黄-桃仁组、大黄组、桃仁组分别筛选出 249、202、250 个差异代谢物，各组 VIP 前 10 名的血浆差异代谢物见表 3。

**3.3.5 代谢通路分析** 采用 MetaboAnalyst 软件包对各组筛选到的差异代谢物进行 KEGG 功能通路富集，筛选其中  $P < 0.05$  的代谢通路，并绘制 KEGG 富集通路气泡图，见图 12。结果显示，“瘀热”大鼠模型主要通过调控  $\beta$ -丙氨酸代谢、维生素的消化吸收、嘧啶代谢等代谢通路发生“瘀热”病理状况。大黄主要通过苯丙氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸等

表3 各组大鼠血浆差异代谢物

Table 3 Differential metabolites in plasma of rats in each group

组别	代谢物	<i>m/z</i>	分子式	VIP	离子模式
对照组 vs 模型组	胸苷	223.03	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2.33	负离子
	1-吡咯啉-2-羧酸	114.06	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	2.20	正离子
	同瓜氨酸	190.12	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	2.19	正离子
	雄烯二酮	288.95	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	2.19	负离子
	吉托根宁	433.33	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	2.18	正离子
	2-氧代己二酸	159.03	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	2.16	负离子
	阿斯巴甜	295.13	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2.15	正离子
	神经酰胺	302.31	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	2.11	正离子
	(S)-可待因	285.13	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	2.10	正离子
	3-甲基黄嘌呤	165.09	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	2.09	负离子
模型组 vs 大黄-桃仁组	α-氧代苯乙酸	149.02	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1.80	负离子
	左炔诺孕酮	311.20	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	1.80	负离子
	异丁香酚	163.08	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1.80	负离子
	羟基吡啶	134.06	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO	1.79	正离子
	没食子酸	169.01	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	1.78	负离子
	胆碱硫酸盐	184.06	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S	1.78	正离子
	白藜芦醇	229.09	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	1.78	正离子
	黄芩素	271.06	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1.78	正离子
	3-甲基黄嘌呤	165.09	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1.77	负离子
	芹菜素	269.05	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1.76	负离子
模型组 vs 大黄组	黄芩素	271.06	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	2.24	正离子
	茴香脑	149.10	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	2.17	正离子
	噻唑啉酸	262.08	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	2.10	正离子
	芦荟大黄素	253.05	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	2.08	正离子
	白藜芦醇	229.09	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	2.06	正离子
	胆碱硫酸酯	184.06	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S	2.05	正离子
	8-羟基喹啉	146.06	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO	1.10	正离子
	L-蛋氨酸亚砷	166.05	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> S	1.97	正离子
	L-索罗糖	181.09	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1.96	正离子
	染料木素	271.06	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1.96	正离子
模型组 vs 桃仁组	左炔诺孕酮	311.20	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	1.93	负离子
	α-氧代苯乙酸	149.02	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1.92	负离子
	β-胍基丙酸	130.06	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1.88	负离子
	黄曲霉毒素 G1	327.05	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	1.87	负离子
	尼古丁	160.94	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	1.87	负离子
	葡萄糖内酯	177.04	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	1.85	负离子
	半乳糖醇	180.97	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	1.81	负离子
	鸟苷	283.26	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	1.79	负离子
	别胆酸	407.28	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	1.78	负离子
	柠檬酸	129.02	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	1.76	负离子

通路逐瘀泻热,桃仁主要通过丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等通路逐瘀泻热,大黄-桃仁药对主要通过丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等通路逐瘀泻热。模型组 vs 大黄组、模型组 vs 桃仁组、模型组 vs 大黄-桃仁组差异代谢物均调控过氧化物酶体增殖剂激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 信号通路。模型组 vs 大黄组、模型组 vs 大黄-桃仁组差异代谢物共同调控苯丙氨酸代谢通路,

模型组 vs 桃仁组、模型组 vs 大黄-桃仁组差异代谢物共同调控丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,  $\beta$ -丙氨酸代谢,此外,模型组 vs 大黄-桃仁组差异代谢物还调控胆固醇代谢途径。故推测大黄在药对中能够发挥调控苯丙氨酸代谢通路的作用,桃仁在药对中能够发挥调控丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及  $\beta$ -丙氨酸代谢通路的作用,配伍后对胆固醇代谢途径的调控增强,以达到配伍后协同增效的作用。

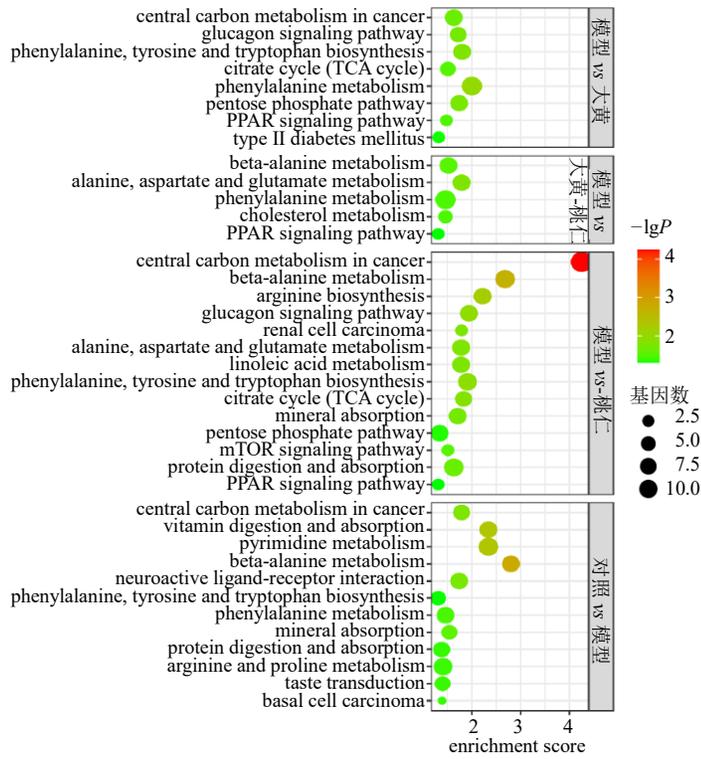


图 12 各组代谢通路富集气泡图

Fig. 12 Enrichment bubble plots of metabolic pathway for each group

3.3.6 “差异代谢物-通路”网络图 将各组“差异代谢物-通路”EXCEL 准备拓扑文件导入 Cytoscape 软件, 使用插件 NetworkAnalyzer 进行分析, 并绘制各组“差异代谢物-通路”网络图, 结果见图 13。

结果表明, 度值 >10 的 5 个通路分别为对照组 vs 模型组、模型组 vs 大黄-桃仁组、模型组 vs 大黄组 差异代谢物共同调控的苯丙氨酸代谢, 对照组 vs 模型组、模型组 vs 大黄-桃仁组、模型组 vs 桃仁组差

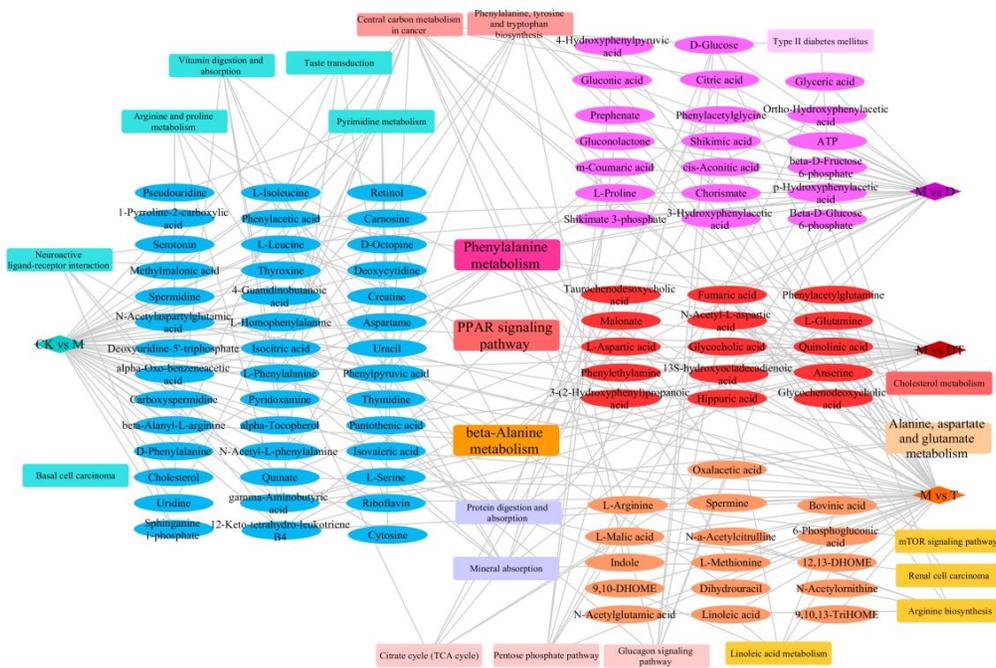


图 13 各组“差异代谢物-通路”网络图

Fig. 13 “Differential metabolite-pathway” network diagram for each group

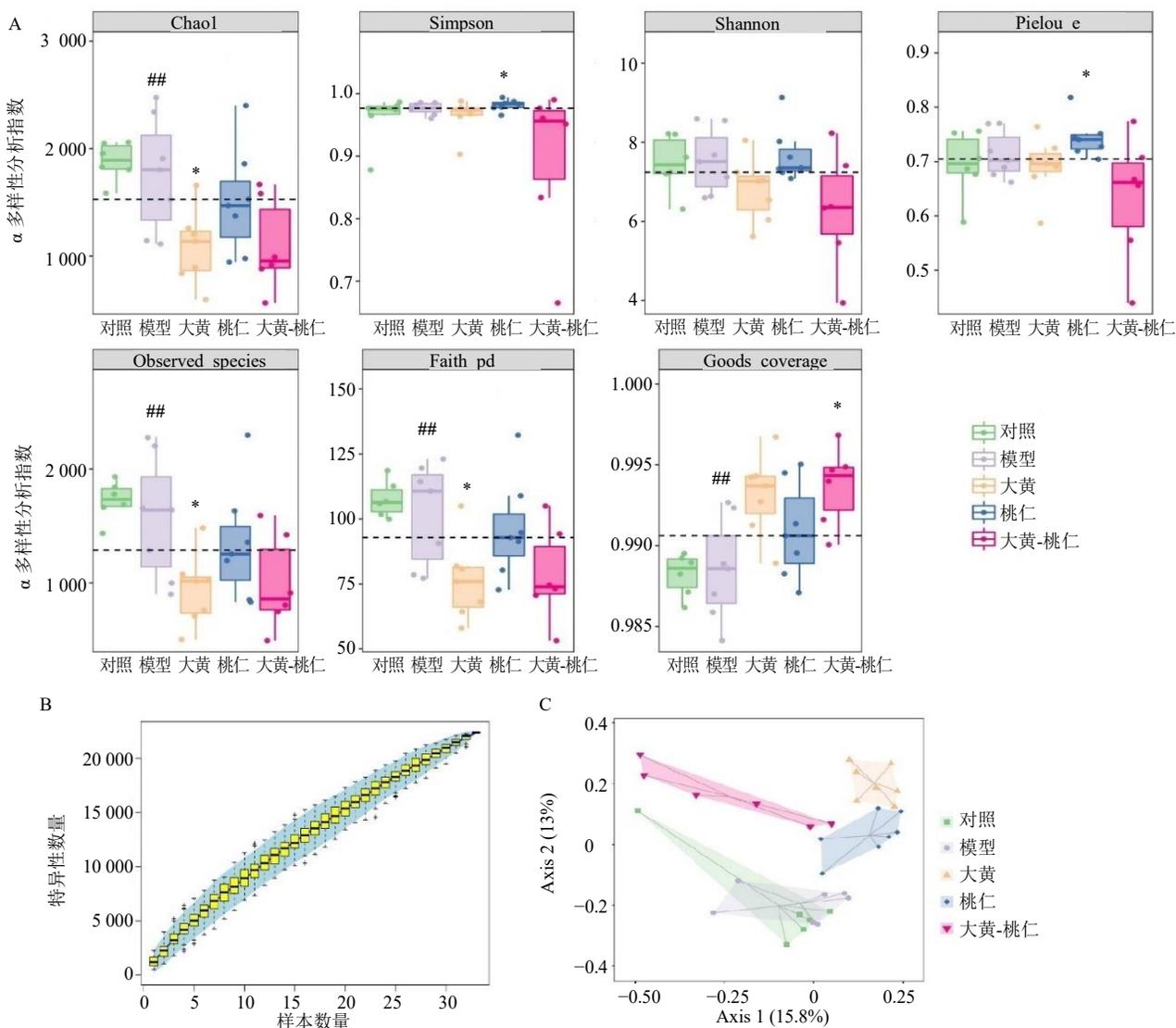
异代谢物共同调控的  $\beta$ -丙氨酸代谢, 对照组 vs 模型组、模型组 vs 桃仁组差异代谢物共同调控的蛋白质的消化和吸收通路, 对照组 vs 模型组、模型组 vs 大黄组、模型组 vs 桃仁组差异代谢物共同调控的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、癌症的中枢碳代谢通路。此外, 3 个给药组差异代谢物均调控了 PPAR 代谢通路, 模型组 vs 大黄-桃仁组差异代谢物显著调控胆固醇代谢通路。度值排名前 10 的差异代谢物为富马酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、D-葡萄糖、L-谷氨酰胺、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、12-酮-四氢-白三烯 B<sub>4</sub>、异柠檬酸、13S-羟基亚油酸、L-精氨酸。综上, 大黄、桃仁可能通过富马酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-谷氨酰胺等差异代谢物调控苯丙氨酸代谢、 $\beta$ -丙氨酸代谢、

蛋白质的消化和吸收、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、癌症的中枢碳代谢、PPAR 代谢通路、胆固醇代谢通路等通路发挥协同增效“逐瘀泻热”的功效。

### 3.4 肠道菌群分析结果

#### 3.4.1 多样性分析

(1)  $\alpha$  多样性分析: 采用  $\alpha$  多样性评估各组大鼠肠道物种的丰富度和多样性, 本研究选取了 Chao1、Simpson、Shannon 等 7 个指标。由图 14-A 可知, 各组 Goods coverage 指数均大于 0.9, 说明大鼠肠道菌群序列未测出的概率更低, 测序结果能反映样本中微生物的真实情况。与对照组比较, 模型组大鼠 Chao1、Observed species、Faith\_pd 指数呈



A- $\alpha$  多样性分析指数; B-物种累积曲线; C-PCoA 图。

A- $\alpha$  diversity analysis index; B-species accumulation curve; C-PCoA plot.

图 14 多样性分析结果

Fig. 14 Results of diversity analysis

下降趋势, Shannon、Simpson、Pielou\_e 指数呈上升趋势, 差异无统计学意义; 与模型组比较, 除 T 组的 Simpson、Shannon、Pielou\_e 指数呈上升趋势, 其余指数在各给药组均呈下降趋势。由各组大鼠肠内容物菌群物种累积曲线 (图 14-B) 可知, 随着样本量的扩大, 检测到的分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 总数也在增加, 且渐趋平缓, 说明大鼠肠内容物测序样本量合理, 能够充分反映群落的多样性。

(2)  $\beta$  多样性分析: 采用非约束排序分析方法 PCoA 进行降维分析, 并绘制 PCoA 图。由图 14-C 可知, 各给药组与模型组样本间差异显著, 表明给药后“瘀热”模型大鼠肠道菌群的变化显著。

**3.4.2 肠道菌群的结构分析** 如图 15-A 所示, 在门水平, 主要由厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 等组成, 但在各组中组成不同。与对照组比较, 模型组变形菌门、放线菌门相对丰度升高, 拟杆菌门相对丰度降低。与模型组比较, 大黄组厚壁菌门相对丰度降低, 变形菌门、疣微菌门相对丰度升高; 桃仁组厚壁菌门、变形菌门、放线菌门相对丰度降低, 拟杆菌门相对丰度升高; 大黄-桃仁组变形菌门相对丰度降低, 疣微菌门相对丰度升高。

如图 15-B 所示, 在属水平, 主要由乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、异杆菌属 *Allobaculum*、志贺氏菌属 *Shigella* 等组成。与对照组比较, 模型组乳酸杆菌属、拟杆菌属 *Bacteroides*、副普雷沃氏菌属

*Paraprevotella* 相对丰度降低, 异杆菌属、志贺氏菌属、颤螺菌属 *Oscillospira*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium* 相对丰度升高。与模型组比较, 大黄组乳酸杆菌属、颤螺菌属、梭菌属 *Clostridium* 相对丰度降低, 异杆菌属、志贺氏菌属、拟杆菌属等相对丰度升高; 桃仁组乳酸杆菌属、志贺氏菌属、梭菌属等相对丰度降低, 异杆菌属、拟杆菌属、普雷沃氏菌属 *Prevotella* 等相对丰度升高; 大黄-桃仁组异杆菌属、双歧杆菌属相对丰度降低, 乳酸杆菌属、拟杆菌属、梭菌属等相对丰度升高。

由以上结果可以推断, 与单药相比, 配伍桃仁能够削弱大黄对变形菌门、拟杆菌属、志贺氏菌属、螺杆菌属 *Helicobacter* 等相对丰度的影响, 配伍大黄能够削弱桃仁对拟杆菌门的影响, 2 药配伍能够增强疣微菌门、经黏液真杆菌属、普雷沃氏菌属、乳酸杆菌属等的相对丰度, 减少异杆菌属相对丰度, 使厚壁菌门的相对丰度维持平衡。

**3.4.3 LEfSe 分析** 采用 LEfSe 两两分析各组间差异菌群, 由差异菌群的 LDA 效应值柱状图 (图 16-A) 与基于分类等级树的组间差异分类单元展示图 (图 16-B) 可知, 对照组显著富集的群落主要在变形菌门和厚壁菌门, 包括莫拉菌科 (Moraxellaceae)、SMB53 菌属、不动杆菌属 *Acinetobacter* 等; 模型组显著富集的群落主要在厚壁菌门、放线菌门、糖细菌菌门 (TM7), 包括明串珠菌科、脱硫弧菌属等; 大黄组主要富集的群落主要在厚壁菌门、变形菌门、疣微菌门等, 包括肠杆菌目 (Enterobacteriales)、丹毒丝菌目 (Erysipelotrichi)、志贺氏菌属等; 桃仁

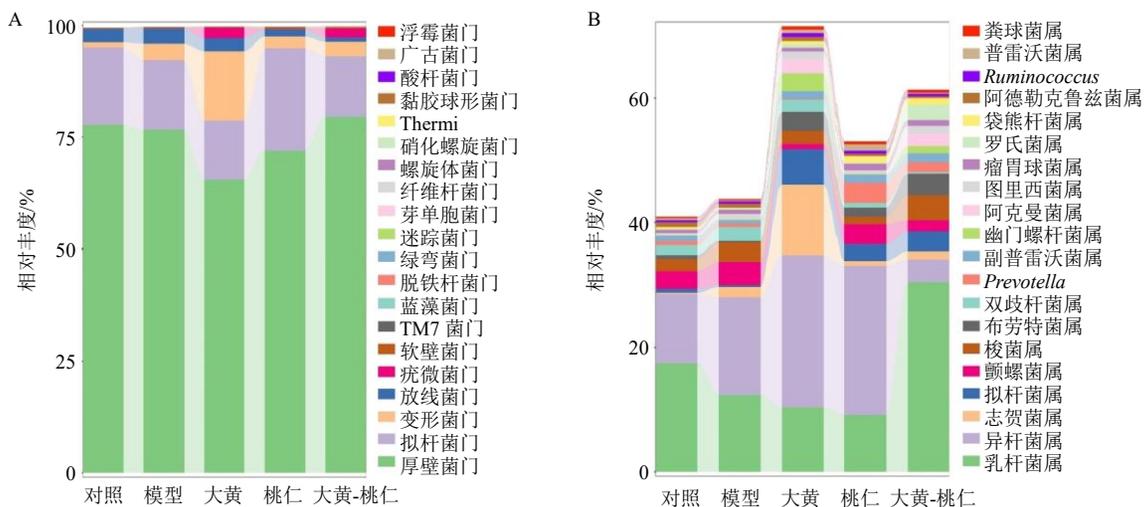


图 15 门 (A)、属 (B) 水平分类组成柱状图

Fig. 15 Histogram of taxonomic composition at level of phylum (A) and genus (B)

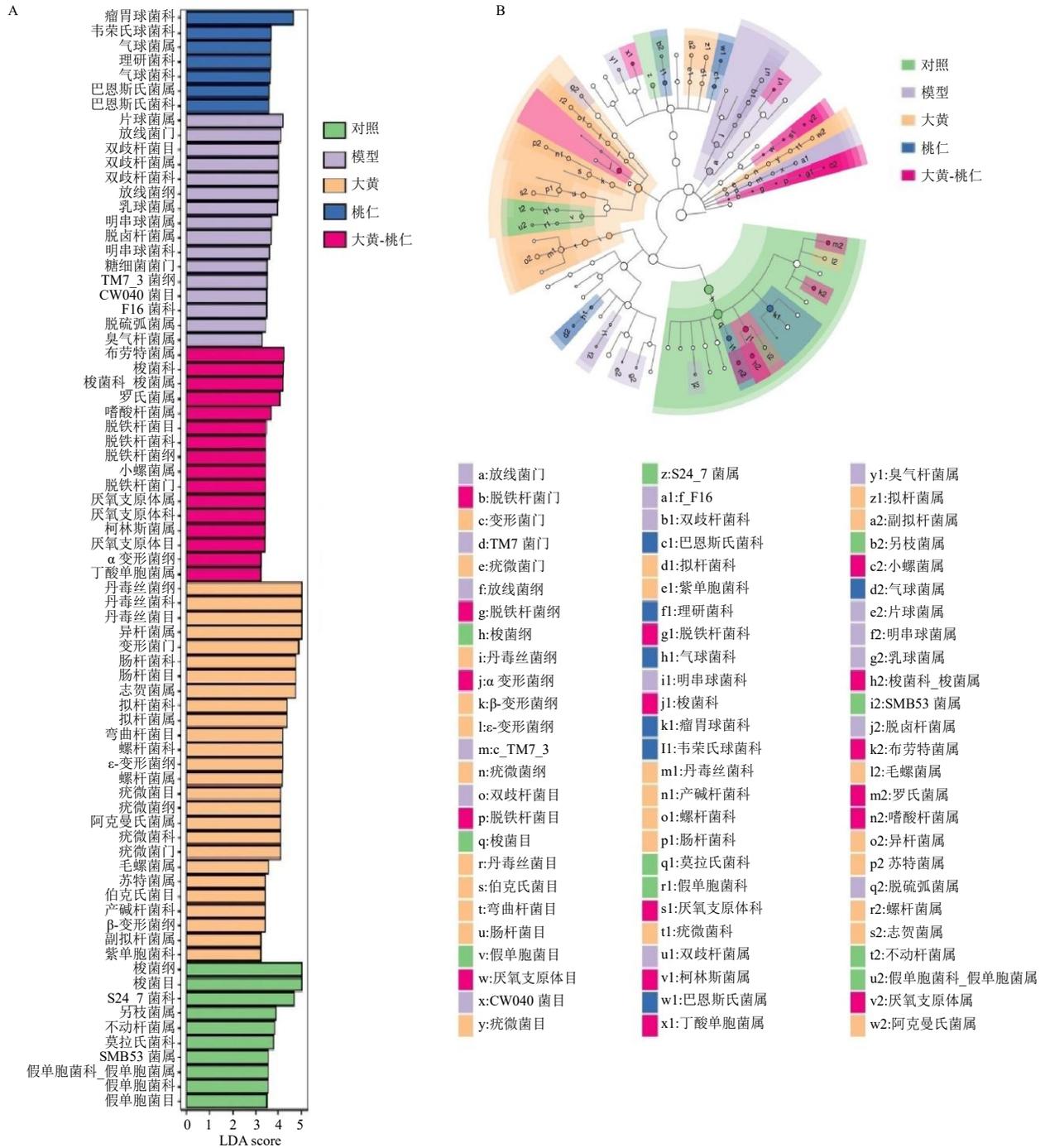


图 16 标志物种的 LDA 效应值柱状图 (A)、基于分类等级树的组间差异分类单元展示图 (B)

Fig. 16 Histogram of LDA effect values for marker species (A), display of taxonomic units based on taxonomic hierarchical trees for differences between groups (B)

组显著富集的群落主要在拟杆菌门、厚壁菌门，包括瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、理研菌科 (Rikenellaceae)、巴氏杆菌属 *Barnesiella* 等；大黄-桃仁组显著富集的群落主要在脱铁杆菌门、软壁菌门、厚壁菌门等，包括厌氧支原体目 (Anaeroplasmatales)、罗氏菌属 *Roseburia*、α 变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 等。

### 4 讨论

中医证候是患者一系列临床表现的症状和体征的概况，是中医理论中不可缺少的重要组成部分，有助于指导医生制定个性化治疗方案<sup>[18]</sup>。瘀热互结是临床上多种疾病的中医基本证候和病机之一，如慢性肾脏疾病、糖尿病及其并发症、子宫内膜异位症、脑卒中、肝性脑病等<sup>[19]</sup>。研究表明，治

疗瘀热互结证相关疾病的方剂如桃核承气汤,其全方的药理作用及临床应用与大黄-桃仁药对密切相关,提示大黄-桃仁作为“逐瘀泻热”法的核心具有一定的药效学基础。基于文献研究发现,大黄-桃仁发挥“逐瘀泻热”功效与促进血管生成、抗凝血、抗血栓、抗炎有关,其中促进血管生成与活血相关,抗凝血、抗血栓与化瘀相关,而抗炎则贯穿了“逐瘀泻热”整个进程<sup>[20]</sup>。朱琳等<sup>[21]</sup>研究发现大黄中番泻苷 B、没食子酸、(+)-儿茶素等 8 种成分是发挥活血化瘀功效的关键所在,番泻苷 B 可通过下调白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)/Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)/信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路活性抑制炎症反应, (+)-儿茶素能参与调控 PPAR 信号通路发挥抗炎作用,二者均对血栓的形成具有抑制作用<sup>[22-23]</sup>。大黄中大黄酸、芦荟大黄素、大黄素等 10 个蒽醌及衍生物均能抑制腺苷二磷酸诱发的血小板聚集<sup>[24]</sup>;桃仁的主要活性成分苦杏仁苷在苦杏仁苷酶的作用下可降解为野黑樱苷,二者均能降低血液中胆固醇的含量,改善血液循环,并能抑制炎症因子的表达从而起到逐瘀清热作用<sup>[25-26]</sup>,可作为大黄-桃仁功效物质群进行深层次研究。在既往研究<sup>[21,27]</sup>中,关于大黄-桃仁的含量测定多集中在药材粉末配伍或只关注于药对中大黄活性成分,而忽略了桃仁中的活性,基于此,本研究建立了同时测定大黄-桃仁药对水提取物中番泻苷 B、没食子酸、(+)-儿茶素等 10 种化学成分含量的测定方法,该方法准确可靠、灵敏度高、重复性好,可用于大黄-桃仁药对的质量控制与配伍研究提供科学依据。

本研究采用 LPS 为造模材料,依据 Shwartzman 反应原理,采用 24 h 重复尾 iv LPS 的方法复制瘀热互结证模型。LPS 为经典的外源性致热毒素,来源于革兰阴性细菌的细胞壁,进入血液可刺激机体免疫细胞产生内源性致热源<sup>[28]</sup>,如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-1 $\beta$  等,内源性致热源一方面直接或间接刺激发热中枢介质的合成与释放,使得体温升高,另一方面会促进组织因子的表达,引起凝血系统激活和凝血酶产生,导致血瘀<sup>[29-30]</sup>。此外,大鼠在第 1 次注射 LPS 后,会使得单核巨噬细胞系统封闭,以至于第 2 次注射 LPS 后,促凝血物质无法被清除,LPS 无法被机体灭活,导致机体产生更加剧烈的炎症反应,血液呈现高度的凝血状态<sup>[31]</sup>,此过程与瘀热互结证的

发病理论高度契合,适用于本研究,多项研究也证实了该模型的可靠性。体内药效学结果显示,与对照组比较,模型组大鼠  $\Delta T$ 、血液流变学指标均显著升高,凝血功能指标除 FIB 显著延长外,均显著降低,且肝脏和肾脏均受到了一定的病理损伤,与前期研究结果一致,表明大鼠造模成功;与模型组比较,大黄、桃仁均能够改善“瘀热”模型大鼠血液流变学、凝血功能、肝肾炎症及充血,且配伍后疗效更佳。

为了探讨其协同增效的作用机制,本研究采用代谢组学观察大黄、桃仁配伍前后对“瘀热”模型大鼠体内代谢物的影响,结果显示富马酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-谷氨酰胺等差异代谢物富集程度较高。研究发现,血管内皮损伤与血瘀证密切相关,富马酸已被证实能调节缺氧/缺血性血管反应主要调节因子缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ),增加 HIF-1 活性,从而维持血管内皮稳定,缓解血瘀状态<sup>[32-33]</sup>。 $\gamma$ -氨基丁酸是一种重要的中枢神经系统抑制性神经递质,体温升高可使  $\gamma$ -氨基丁酸的含量增加,一项研究发现在急性脑梗死体温升高患者中  $\gamma$ -氨基丁酸的含量可达体温正常患者的 10 倍,可使脑外伤后的继发性损伤加重,影响脑缺血预后<sup>[34-35]</sup>。L-谷氨酰胺由 L-谷氨酸在谷氨酰胺合成酶作用下生成,可作为 L-精氨酸的前体促进一氧化氮合成,具有抗氧化、抗炎的作用,还能降低纤维蛋白表达,抑制凝血级联反应从而抑制血栓的形成<sup>[36-37]</sup>。此外,差异代谢物富集通路分析发现大黄在药对中能够发挥调控苯丙氨酸代谢通路的作用,桃仁在药对中能够发挥调控丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及  $\beta$ -丙氨酸代谢通路的作用。值得注意的是,相较于单药,配伍后对胆固醇代谢途径的调控增强,分析其差异代谢物发现,胆固醇在模型组中显著上调,在各给药组中则为相反的表趋势,胆固醇的过量累积会促进氧化低密度脂蛋白的产生,诱导泡沫细胞形成,加剧炎症反应,导致动脉粥样硬化易损斑的形成<sup>[38]</sup>。此外,还发现药对配伍前后的差异代谢物均调控 PPAR 信号通路,该通路在调节脂质和葡萄糖稳态、细胞增殖、凋亡和炎症中发挥关键作用<sup>[39]</sup>。提示大黄、桃仁通过调控多个代谢物、多个通路发挥“逐瘀泻热”的作用。

本研究结合 16S rRNA 进一步观察大黄、桃仁配伍前后对“瘀热”模型大鼠肠道菌群的影响。结果显示,配伍桃仁能够削弱大黄对变形菌门、拟杆

菌属、志贺氏菌属、螺杆菌属等相对丰度的影响。志贺氏菌属、螺杆菌属均属于变形菌门，志贺氏菌属是引起细菌性痢疾的主要病原体，能够侵入结肠黏膜上皮细胞，诱导巨噬细胞凋亡，引发炎症反应，导致腹泻、腹痛等症状<sup>[40-41]</sup>。螺杆菌属和拟杆菌属均与腹泻及结肠炎症等密切相关<sup>[42-43]</sup>。以上结果表明，配伍桃仁后能够减轻大黄引起的胃肠道疾病，这可能是由于配伍桃仁后大黄中的儿茶素、大黄素溶出增加，而二者的含量与志贺氏菌属、螺杆菌属、拟杆菌属中的某些菌群，如福氏志贺氏菌、幽门螺杆菌、脆弱拟杆菌的存在呈负相关<sup>[21,44-49]</sup>。2药配伍能够增强疣微菌门、经黏液真杆菌属、普雷沃氏菌属、普氏菌属等的相对丰度，减少异杆菌属相对丰度，使厚壁菌门的相对丰度维持平衡。经黏液真杆菌相对丰度与内脏脂肪面积负相关，内脏脂肪面积被认为是心血管和代谢疾病风险的肥胖生物标志物<sup>[50]</sup>，该菌还能通过产生细菌素防止病原体定植，并通过上调调节性T细胞和短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA)含量发挥抗炎和维持葡萄糖稳态作用<sup>[51]</sup>。普雷沃氏菌属、普氏菌属均属于拟杆菌门。普氏菌有助于减轻体重，降低胆固醇水平，并抑制双歧杆菌的作用<sup>[52]</sup>。对肠道菌群的研究有助于认识瘀热互结证候及其治疗，本研究通过肠道菌群研究大黄、桃仁配伍“逐瘀泻热”协同增效，为中药药对的研究提供了理论依据。

综上，本研究首次联合非靶向代谢和16S rRNA技术初步探讨了大黄、桃仁配伍前后“逐瘀泻热”协同增效的作用机制，为中药药对的配伍机制研究提供了新技术和新思路，能够更全面地揭示大黄-桃仁药对的协同机制，推动中药现代化研究。本研究也存在一定缺陷，如2个组学的因果关系尚未建立，缺少差异代谢物和菌群的验证实验，后期会注重组学间的关联分析，进一步利用靶向代谢组学及菌群移植等方法展开更深入的研究，深入阐释大黄、桃仁配伍前后“逐瘀泻热”协同增效的作用机制。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 龚杰, 林朝亮, 成向进, 等. 瘀热方治疗急性缺血性脑卒中瘀热证临床研究 [J]. 山东中医杂志, 2023, 42(2): 132-136.
- [2] 郭立中, 周仲瑛, 金妙文, 等. 瘀热相搏证的提出及对中医临床实践的指导作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(3): 137-139.
- [3] Xu J J, Xu F, Wang W, et al. Elucidation of the mechanisms and effective substances of *Paeoniae Radix Rubra* against toxic heat and blood stasis syndrome with a stage-oriented strategy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 842839.
- [4] 魏孔熙, 王磊, 许小敏, 等. 重离子放疗损伤及其防治的中医认识探讨 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(12): 2992-2994.
- [5] Liu K H, Liu E S, Lin L, et al. L-Theanine mediates the p38MAPK signaling pathway to alleviate heat-induced oxidative stress and inflammation in mice [J]. *Food Funct*, 2022, 13(4): 2120-2130.
- [6] 周仲瑛, 吴勉华, 周学平, 等. “瘀热相搏证”的研究 [J]. 世界中医药, 2010, 5(4): 232-235.
- [7] Mehuys E, De Backer T, De Keyser F, et al. Prevalence and management of drug interactions between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and antithrombotics in ambulatory care [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88(8): 3896-3902.
- [8] Jun P, Zhao H Y, Jung I C, et al. Efficacy of herbal medicine treatment based on syndrome differentiation for Parkinson's disease: A systematic review and Meta-analysis of randomized placebo-controlled clinical trials [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1108407.
- [9] Huang Y L, Ni N, Hong Y L, et al. Progress in traditional Chinese medicine for the treatment of migraine [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(8): 1731-1748.
- [10] 郑浩迪, 萧至健, 王新佩. 《伤寒论》攻瘀三方研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(1): 42-45.
- [11] 赵方舟. 血瘀证的发展与古今诊断依据的对比研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [12] 李冉, 钟相根, 李明, 等. 桃核承气汤瘀热互结关系探析 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(12): 6417-6420.
- [13] 易永丽, 雷娅, 王坤, 等. 大黄-桃仁药对调控子宫腺肌病在位内膜线粒体稳态的机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4709-4718.
- [14] Jo H G, Baek E, Lee D H. Comparative efficacy of east Asian herbal formulae containing *Astragali Radix-Cinnamomi Ramulus* herb-pair against diabetic peripheral neuropathy and mechanism prediction: A Bayesian network Meta-analysis integrated with network pharmacology [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(5): 1361.
- [15] 颜永刚, 王红艳, 尹立敏, 等. 基于响应曲面分析法的不同配比桃仁-大黄活血化瘀效应相互作用研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3560-3567.
- [16] 颜永刚, 王红艳, 尹立敏, 等. 桃仁-大黄药对对脂多糖所致蓄血证模型大鼠的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(5): 1148-1151.
- [17] 王红艳, 颜永刚, 王亚丽, 等. 桃仁-大黄药对活血化瘀最佳配比的古代文献数据挖掘及其对寒凝血瘀大鼠模型的影响分析 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2563-2567.
- [18] Ji Q, Luo Y Q, Wang W H, et al. Research advances in

- traditional Chinese medicine syndromes in cancer patients [J]. *J Integr Med*, 2016, 14(1): 12-21.
- [19] 周冉冉, 付春梅, 李冉, 等. 桃核承气汤的临床应用研究进展 [J]. *现代中医临床*, 2020, 27(1): 71-76.
- [20] 黄建萍, 井亚江, 王七龙, 等. 基于 LC/GC-MS 和网络药理学探讨大黄-桃仁药对逐瘀泻热的作用机制 [J]. *中南药学*, 2024, 22(4): 892-901.
- [21] 朱琳, 刘莹, 申洁, 等. 基于功效实验-网络药理学-HPLC 探讨大黄-桃仁配伍活血化瘀的物质基础及分子作用机制 [J]. *药学报*, 2024, 59(7): 2126-2134.
- [22] 李毅, 李文忠, 师路, 等. 番泻苷 B 对胃癌细胞生长、凋亡、干样特性以及 IL-6/JAK2/STAT3 通路的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(10): 861-867.
- [23] 裴丽珊. 基于网络药理学桃核承气汤分子机制研究及君药大黄质量标志物预测 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2020.
- [24] 谭鹏, 张海珠, 李洋, 等. 基于活血生物效价检测大黄中 10 个蒽醌类成分抗血小板聚集作用初步研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 859-865.
- [25] 敖君求, 张清安, 邵凯, 等. 苦杏仁苷的生理功能提取及测定方法研究进展 [J]. *农产品加工*, 2021(1): 64-68.
- [26] 吾热娅提古丽·克维尔, 艾百拉·热合曼, 依米提·热合曼. 苦杏仁苷研究进展 [J]. *绿色科技*, 2015, 17(10): 286-288.
- [27] 颜永刚, 尹立敏, 王红艳, 等. 大黄-桃仁药对不同配比对大黄中 10 种成分提取量的影响 [J]. *中药材*, 2016, 39(7): 1578-1581.
- [28] Wu S H, Chen X X, Cai R X, *et al.* Sulfated Chinese yam polysaccharides alleviate LPS-induced acute inflammation in mice through modulating intestinal microbiota [J]. *Foods*, 2023, 12(9): 1772.
- [29] Brito H O, Barbosa F L, Reis R C D, *et al.* Evidence of substance P autocrine circuitry that involves TNF- $\alpha$ , IL-6, and PGE<sub>2</sub> in endogenous pyrogen-induced fever [J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 293: 1-7.
- [30] Oe Y, Takahashi N. Tissue factor, thrombosis, and chronic kidney disease [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(11): 2737.
- [31] Chahin A B, Opal J M, Opal S M. Whatever happened to the Shwartzman phenomenon? [J]. *Innate Immun*, 2018, 24(8): 466-479.
- [32] 刘城鑫, 蔡贝贝, 叶贝, 等. 岗藿清瘟汤截断扭转法在登革热血管内皮功能障碍中的应用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(6): 1042-1044.
- [33] 赖小华. 基于网络药理学初步探讨益气活血药延缓血管衰老的作用机制 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [34] 赵月霞, 王金, 孙奎胜. 老年弥漫性轴索损伤患者肺部感染远期预后分析 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(20): 5897-5898.
- [35] 梁金, 刘文博, 孙建平, 等. 急性缺血性脑卒中短期预后后的危险因素分析 [J]. *医学与哲学 (B)*, 2015, 36(2): 45-48.
- [36] 廖利. 益母草及其特异性成分盐酸益母草碱的抗血栓作用及机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2022.
- [37] 陈帅, 陆登成, 王维, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的自发性高血压大鼠血浆代谢组学研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(18): 3108-3112.
- [38] 陈纪焯, 李晓雅, 于宗良, 等. 基于瘀毒理论与细胞胞葬的关系探讨动脉粥样硬化易损斑块的病机 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(1): 188-193.
- [39] Tsukahara T, Matsuda Y, Haniu H. Lysophospholipid-related diseases and PPAR $\gamma$  signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2730.
- [40] 谢婧, 张怡悦, 唐仲辉, 等. 城市化梯度下入侵生物非洲大蜗牛肠道微生物群落特征 [J]. *应用生态学报*, 2023, 34(10): 2813-2819.
- [41] 康静静, 杨玉荣, 梁宏德. 志贺氏菌病发病机制的研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(9): 1939-1944.
- [42] 王剑. 健康和腹泻成年川金丝猴粪样菌群比较分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [43] 刘东慧, 权衡, 李彩玉, 等. 细菌素防治动物细菌性疾病的研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2024, 46(9): 986-996.
- [44] 廖文钰. 肉桂及其黄酮醇类活性成分抗大口黑鲈虹彩病毒作用及机制研究 [D]. 钦州: 北部湾大学, 2024.
- [45] 张鑫, 马丽苹, 张芸, 等. 茶叶儿茶素对肠道微生物的调节作用 [J]. *食品科学*, 2013, 34(5): 232-237.
- [46] 王争争. 油枣中黄酮类化合物的分离鉴定及生物活性研究 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2020.
- [47] 谢璟, 王荣丽. 大黄素对肺炎链球菌肺炎小鼠肺组织炎症反应及 p38 MAPK 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58(30): 44-47.
- [48] 赵克勤, 刘阳, 赵健森, 等. 基于网络药理学联合分子对接技术探讨“石菖蒲-郁金”治疗慢性萎缩性胃炎潜在生物学机制 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2024, 33(19): 2718-2725.
- [49] 郑彦懿. 大黄牡丹汤对溃疡性结肠炎小鼠及其肠道菌群的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [50] 李奕霖. 基于组学整合技术探讨参苓白术散调节脾虚湿盛型 IBS-D 患者肠道菌群和代谢物的效应机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2023.
- [51] 彭川, 胡学芳, 陈正涛, 等. 基于 16S rRNA 技术研究萎连丸对 2 型糖尿病 db/db 小鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(12): 63-70.
- [52] van Muijlwijk G H, van Mierlo G, Jansen P W T C, *et al.* Identification of *Allobaculum mucolyticum* as a novel human intestinal mucin degrader [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1966278.