

基于代谢组学分析桂枝饮片与配方颗粒改善寒凝血瘀证的作用机制异同

梁雪红^{1,2}, 韦锦斌¹, 潘诗翰¹, 冯琳琳¹, 张学艳³, 唐美晨¹, 苏志恒¹

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021; 3. 广西玉林市第一人民医院, 玉林 537099)

摘要 目的: 基于核磁共振氢谱(¹H-NMR)代谢组学分析桂枝饮片及其配方颗粒改善寒凝血瘀证(BSS)大鼠作用机制的异同点。**方法:** 首先, 利用液相色谱和质谱技术分析桂枝饮片与配方颗粒的化学成分; 其次, 将28只SD雌鼠随机分为空白组、模型组、饮片组和颗粒组。采用冰水浴+皮下注射肾上腺素构建模型, 造模结束后收集大鼠的24 h尿液, 进行代谢组学分析, 从代谢组学层面上揭示桂枝饮片与配方颗粒改善BSS大鼠代谢轮廓调控机制。**结果:** 饮片和配方颗粒分别鉴定出19个、20个成分, 共同检测到15个成分, 饮片检测到而颗粒未检测到4个成分, 配方颗粒检测到而饮片未检测到5个成分。与模型组相比, 饮片组和颗粒组在给予药物干预后全血粘度指标显著回调, 饮片组的红细胞聚集指数指标显著回调。代谢组学结果显示, 饮片组与模型组比较, 筛选出15个差异代谢物, 桂枝饮片可通过调控甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、组氨酸代谢及牛磺酸和次牛磺酸代谢4条通路改善BSS。颗粒组与模型组比较, 筛选出13个差异代谢物, 桂枝配方颗粒可通过调控甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢及组氨酸代谢3条通路改善BSS。**结论:** 桂枝饮片和配方颗粒均可通过回调差异代谢物和代谢通路的紊乱来改善BSS, 这表示桂枝配方颗粒与饮片有相似的药效。

关键词 桂枝; 配方颗粒; 化学成分; 寒凝血瘀证; 代谢组学

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2024)12-1603-11

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.004

Analysis on the similarity and difference of the mechanism of Guizhi decoction and formula granules alleviating blood stasis syndrome via metabolomics

LIANG Xuehong^{1,2}, WEI Jinbin¹, PAN Shihan¹, FENG Linlin¹, ZHANG Xueyan³, TANG Meichen¹, SU Zhiheng¹.

(1. Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Medical University Affiliated Cancer Hospital, Nanning 530021, China; 3. The First People's Hospital of Yulin City, Yulin 537099, China)

Abstract Objective: To analyze the similarity and difference of the mechanism for Guizhi decoction and its formula granules alleviating blood stasis syndrome (BSS) in rats using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) metabolomics. **Methods:** Firstly, the chemical constituents of Guizhi decoction and its formula granules were analyzed based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technology. Secondly, 28 SD female mice were randomly divided into control group, model group, decoction group and granule group. The model was constructed with ice water bath and subcutaneous injection of adrenaline. After the modeling was completed, 24 h urine of rats was collected and metabolomic analysis was performed to reveal the metabolic profile regulation mechanism of BSS rats improved by Guizhi decoction and formula granules from the metabolomic level. **Results:** A total of 19 and 20 chemical constituents were identified in decoction and formula granules respectively, and 15 chemical constituents were identified together, 4 chemical constituents were identified in decoction but not in formula granules, and 5 chemical constituents were identified in formula granules but not in decoction. Compared with the model group, the index of whole blood viscosity was significantly regressed after

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目资助(No.82174263); 广西科技重大专项资助项目(No.2022JBGS042)

[通信作者] 苏志恒, E-mail:suzhiheng915@126.com

[收稿日期] 2024-08-30

drug intervention in the decoction group and the granule group, and the index of red blood cell aggregation was significantly regressed in the decoction group. The metabolomics results showed that 15 differential metabolites were screened in the decoction group compared with the model group, and that it could improve BSS by modulating four pathways: glycine, serine and threonine metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, histidine metabolism, and taurine and hypotaurine metabolism. Thirteen differential metabolites were screened in the granule group compared with the model group. Guizhi formula granules could alleviate BSS by regulating three pathways: glycine, serine and threonine metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism and histidine metabolism. **Conclusion:** Both Guizhi decoction and formula granules can improve BSS by regressing disordered differential metabolites and metabolic pathways, which indicates that Guizhi formula granules have similar efficacy to the decoction.

Keywords Guizhi; formula granules; chemical constituent; blood stasis syndrome; metabolomics

寒凝血瘀证(blood stasis syndrome, BSS)是临床常见的中医证候之一,因寒邪侵袭血脉或因寒可伤阳或阳虚寒凝自内生,血脉失阳气温煦,易导致血脉发生痉挛气血运行不畅而引起血淤^[1]。BSS 临幊上主要表现为血液流变学、凝血功能、血小板功能等指标改变^[2]。中医通常以温经散寒、活血化瘀的方法治疗 BSS^[3]。桂枝(Cinnamomi Ramulus)是樟科植物肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl)的干燥嫩枝,有发汗解肌、温通经脉和助阳化气的功效^[4]。研究表明桂枝的主要成分桂皮醛能抗血小板聚集和抗血栓形成^[5]。中药传统汤剂煎煮、服用、携带均不方便,难以适应现代快节奏的生活方式^[6]。而中药配方颗粒具有免煎煮,携带及使用方便,可灵活配伍、随证加减等优势,在临幊上得到了广泛应用^[7]。目前,尚未有研究对比桂枝的饮片和配方颗粒两种中药剂型抗寒凝血瘀药效和代谢机制。代谢组学的整体性研究方法,与中医药整体观相契合。核磁共振氢谱(¹H-NMR)分析技术具有样品前处理方法简便、快速非破坏性、测试价格低等优点^[8]。基于此,本研究运用¹H-NMR 的代谢组学技术探究桂枝的饮片和配方颗粒治疗 BSS 的药效和作用机制差异。

1 材料和方法

1.1 药材、试剂与仪器

桂枝饮片(广西仙茱中药科技有限公司,批号20220601),经广西医科大学朱丹教授鉴定为正品;桂枝配方颗粒(培力(南宁)药业有限公司,批号:20220601);盐酸肾上腺素注射液(远大医药(中国)有限公司,批号230501);全自动血液流变测试仪(北京赛科希德科技股份有限公司);台式高速冷冻

离心机(赛默飞世尔科技公司);600 MHz核磁共振波谱仪(型号:AVANCE NEO 600MHZ,美国布鲁克);超高效液相色谱系统(型号:UPLC Acquity TM,英国 Waters 公司);串联四极杆飞行时间质谱仪(型号:Xevo G2-S Q-TOF,英国 Waters 公司)。

1.2 动物分组及给药

28只SPF级SD雌鼠180~220 g,由广西医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(桂)2020-0003,实验动物使用许可证号:SYXK(桂)2020-0004。动物房的温度维持在(20±2)℃,湿度维持在(55±15)%,自由饮水、饮食,并采用12 h昼夜节律。动物福利和实验方案经广西医科大学动物实验伦理委员会批准。

适应性喂养7 d后,大鼠随机分为空白组、模型组、饮片组和颗粒组,饮片组和颗粒组分别每日以3.6 g/kg(按生药量计)灌胃给予桂枝饮片煎煮液、桂枝配方颗粒溶液;而空白组和模型组则每日灌胃等量的纯净水,连续灌胃14 d。饮片煎煮液的制备方法同文献报道^[9]。称取饮片当量的配方颗粒,加入100 °C纯化水搅拌至完全溶解,即得到配方颗粒溶液。

1.3 供试品溶液的制备

饮片煎煮液与配方颗粒溶液分别加入纯化水稀释成0.1 g/mL(每1 mL相当于0.1 g的生药量),将稀释液以12 000 r/min 离心10 min,采用0.22 μm的PVDF微孔滤膜过滤,即得到供试品溶液。

1.4 UPLC-Q-TOF/MS成分分析

1.4.1 液相色谱检测条件 使用 ACQUITY UPLC 液相色谱系统和 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm i.d., 英国 Waters 公司);色谱柱温度25 °C;流速0.3 mL/min;流动

相: A 相为 0.1% 甲酸—水,B 相为乙腈。梯度洗脱: 0.00~1.00 min(5% B), 1.00~3.00 min(5%~15% B), 3.00~6.00 min(15%~27% B), 6.00~11.50 min(27%~52% B), 11.50~12.00 min(52%~70% B), 12.00~12.50 min(70%~100% B), 12.50~13.00 min(100% B), 13.00~13.10 min(100% B~5% B), 13.1~15.00 min(5% B), 进样体积 5 μL。

1.4.2 质谱检测条件 电喷雾离子源(ESI); 正、负离子模式; 质量范围 50~1 500 m/z; 扫描时间为 0.5 s; 离子源温度为 100°C; 毛细管电压为 1.95 kV(ESI⁺) 和 2.5 kV(ESI⁻); 脱溶剂气流速度为 800 L/h(ESI⁺) 和 600 L/h(ESI⁻), 温度均为 350 °C; 锥气孔电压、锥孔气流量和提取电压在正、负离子模式下均为 40 kV、40 L/h 和 4 V, 流速为 20 mL/min。

1.5 化学成分鉴定

使用 Masslynx 4.1 软件对原始数据进行分析。通过查阅文献整理桂枝化学成分, 包括结构式、分子量、质谱信息等, 构建桂枝成分质谱数据库, 利用一级质谱分析, 获得各色谱峰的精确分子量、保留时间和准分子离子峰信息, 并与建立的质谱数据库中的化学成分进行比对, 得到初步的鉴定结果, 再进一步利用二级碎片信息与 HMDB 数据库以及相关参考文献对比, 将质量误差控制在 10 以内, 推测出各化学成分。

1.6 造模及样本收集

寒凝血瘀模型大鼠的建立具体方法同文献[9]。分别于实验第 0, 第 4, 第 7, 第 10, 第 14 天称量并记录大鼠的体重。实验最后一日收集大鼠 12 h 尿液, 将尿液 4 °C 下 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 于 -80 °C 冰箱保存待测。实验结束后, 用 20% 乌拉坦麻醉大鼠, 剂量为 0.005 mL/g, 腹主动脉采集全血。

1.7 血液流变学指标的测定

通过全自动血液流变测试仪, 测定大鼠全血在不同切变率下(200 s⁻¹、50 s⁻¹、5 s⁻¹、1 s⁻¹)的全血粘度(whole blood viscosity, WBV)和红细胞聚集指数。

1.8 ¹H-NMR 代谢组学检测和数据分析

取尿液 400 μL 与 50 μL PBS(pH=7.4)混合, 涡旋 1 min 后离心(4 °C, 12 000 r/min, 10 min), 取上清液与 50 μL D₂O(含 2.0 mg/mL TSP)混合涡旋 1 min, 移入 5 mm 的核磁管中, 进行 ¹H-NMR 分析。尿液样品采用 600 MHz 核磁共振波谱仪的 cpmgpr1d Bruker 标准序列进行检测。质子共振频率 600.15 MHz, 检测谱宽 10.4 kHz, 采集点数 64 k, 扫描次数

64 次, 弛豫延迟时间 4.0 s, 采样时间间隔 2.7 s, 采集温度 295.5 K。

使用 MestReNove6.1.0 软件对核磁图谱进行对 TMS 峰进行标定, 相位校正和基线校正, 裁剪掉水峰和尿素峰(δ4.5~δ6.2 ppm), 选取化学位移 δ0.00~δ10.00 ppm 范围, 以 0.04 ppm 对核磁图谱进行分段积分和数据归一化。将得到的数据导入 SIMCA-P14.1 软件, 进行多元统计分析, 包括主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 和 正交一偏最小二乘投影判别分析(orthogonal-partial least squares projection discriminant analysis, OPLS-DA), 并进行 200 次置换检验, 以评估模型的可靠性。最后根据 VIP>1.0 且 P<0.05 筛选差异代谢物。利用 Chenomx NMR Suite 8.6 软件和 BMRB 数据库(<http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/>)对代谢物进行核磁一维和二维的指认。将鉴定出的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.MetaboAnalyst.ca/>) 网站进行代谢通路分析。

1.9 统计学方法

采用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件进行统计分析, 实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。通过单因素方差分析比较各组间的差异, 根据莱文检验各组数据方差是否齐性, 若方差齐性, 两两比较用最小显著差异(LSD)进行检验, 否则采用 Dunnett-t3 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 5 软件绘制折线图、柱状图和箱线图。

2 结 果

2.1 桂枝饮片与配方颗粒成分鉴定

正、负离子模式下基峰色谱图见图 1、图 2, 经过比对数据库及相关化合物文献的报道, 桂枝饮片与配方颗粒分别鉴定出 19 个、20 个化学成分。二者共同检测到的成分有 15 个, 分别是肉桂醛、香叶醇、丁香酚、甲基丁香酚、脱落酸、肉桂醇、茴香烯、庚酸、棕榈酸、乙酸肉桂酯、肉桂酸、荜澄茄烯、二氢红花菜豆酸、肉豆蔻醛、叶绿醇; 饮片中检测到而配方颗粒未检测到的成分是香草酸、α-姜黄烯、丁香酸、没食子酸乙酯; 配方颗粒中检测到而饮片未检测到的成分是乙酸苄酯、α-荜澄茄油烯、δ-紫穗槐烯、甲基庚烯酮、硬脂酸。见表 1 和表 2。

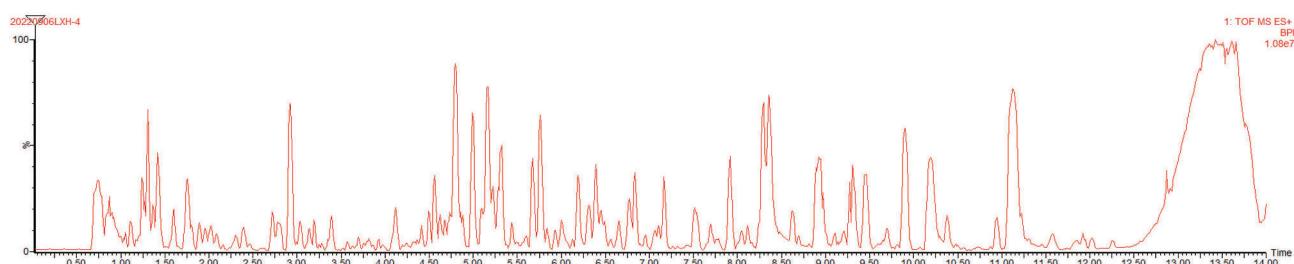
2.2 药效学评价

2.2.1 大鼠体质量变化 与空白组相比,模型组大鼠体质量在第10、第14天显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,饮片组大鼠的体质量在第7,第10,第14天显著升高($P<0.05$),颗粒组大鼠的体质量在第4,第7,第10,第14天显著升高($P<0.05$)。饮片组和颗粒组大鼠的体质量在各时间点比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图3A。

2.2.2 寒凝血瘀模型大鼠的评价 与空白组相比,

模型组大鼠的舌象出现明显的血瘀,体征观察评分、WBV指标和红细胞聚集指数均显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,饮片组和颗粒组大鼠的舌象血瘀减少,体征观察评分和WBV显著降低($P<0.01$)。而红细胞聚集指数只有饮片组得到显著回调($P<0.05$),颗粒组有回调趋势但差异无统计学意义($P>0.05$)。结果表明,本实验成功建立了寒凝血瘀模型大鼠,桂枝的饮片和配方颗粒可改善大鼠的血瘀症状,见图3B~图3G。

A



B

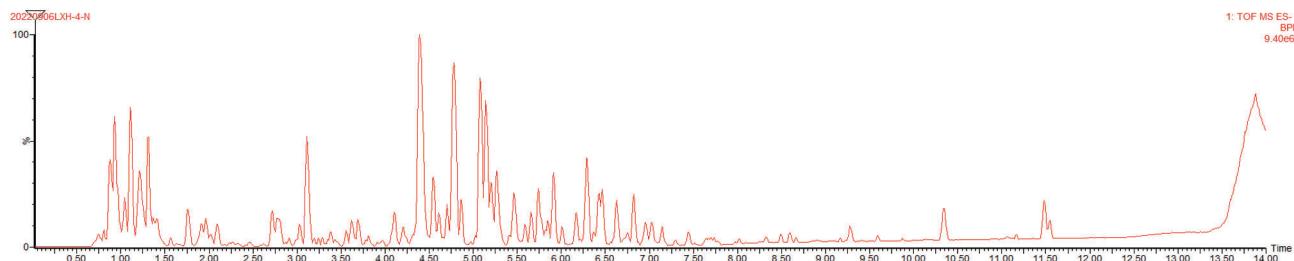
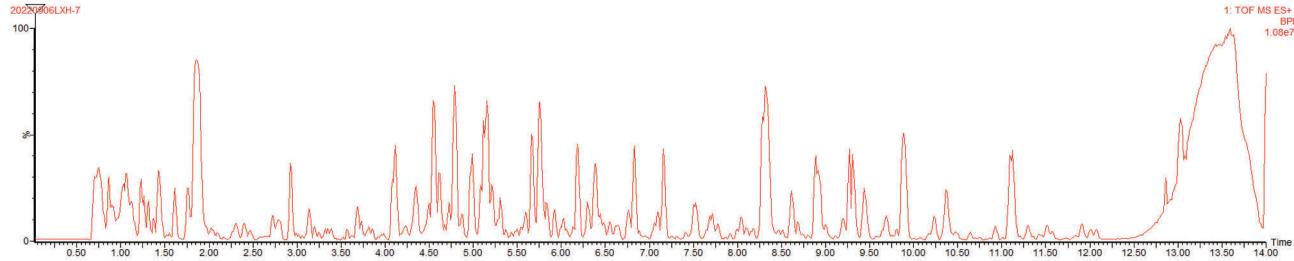


图1 桂枝饮片正离子(A)、负离子(B)模式下基峰色谱图

C



D

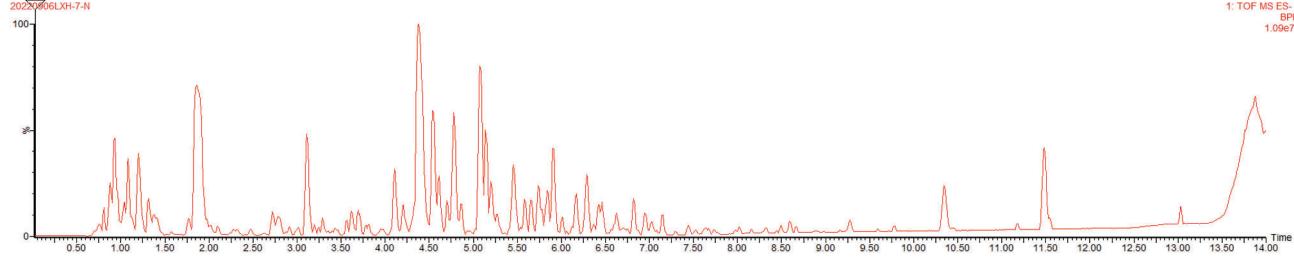


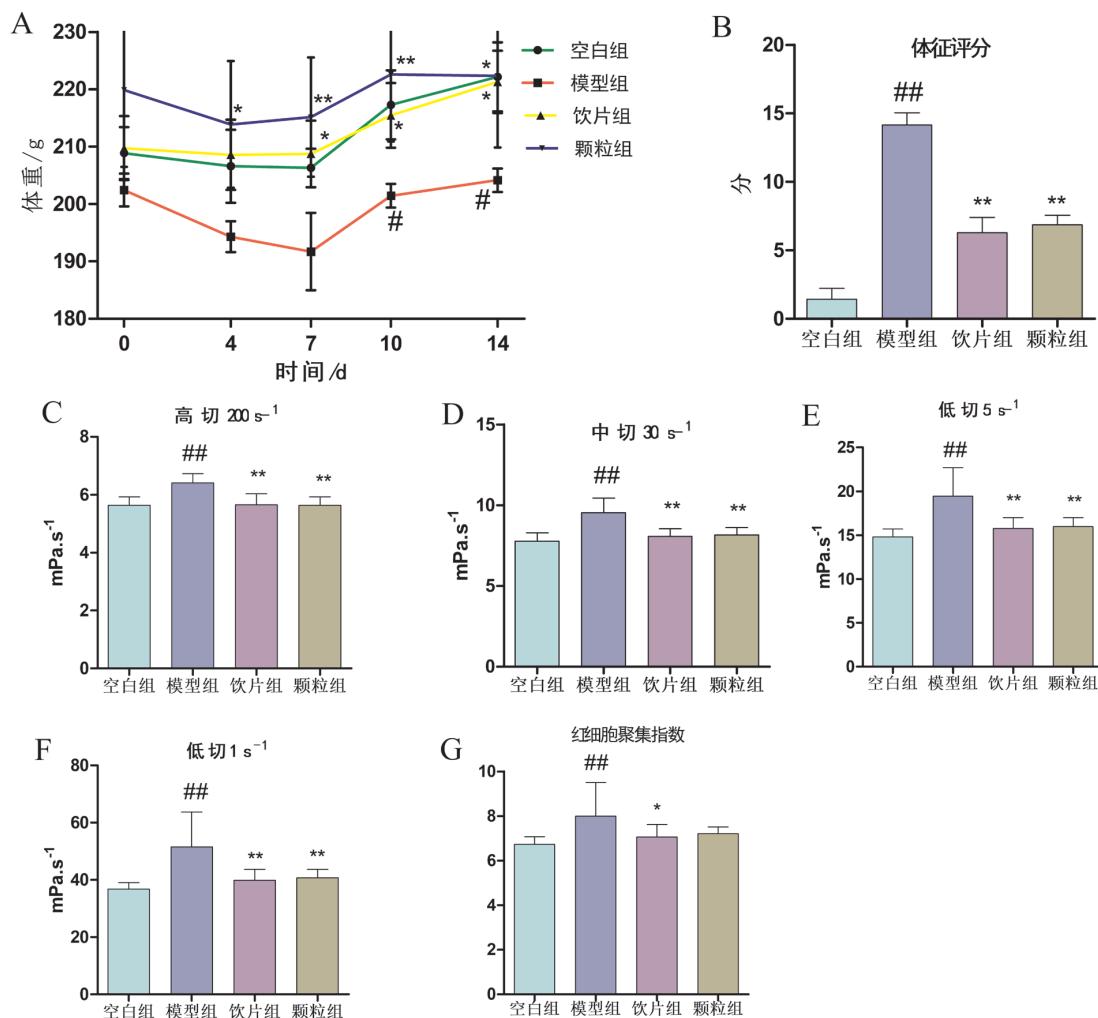
图2 桂枝配方颗粒正离子(C)、负离子(D)模式下基峰色谱图

表1 桂枝饮片化学成分鉴定表

序号	t _r /min	化合物名称	分子式	离子形式	质荷比	化学位移/ppm	二级碎片
1	0.86	肉桂醛	C ₉ H ₈ O	[M-H] ⁻	131.049 4	9.3	115.019 4,77.039 2
2	1.12	香草酸	C ₈ H ₆ O ₄	[2M+K] ⁺	375.046 0	5.9	111.008 6,109.029 6
3	1.47	肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	166.086 1	4.2	131.049 8,79.053 6
4	2.10	香叶醇	C ₁₀ H ₁₈ O	[M+H] ⁺	155.144 5	5.8	123.116 6,85.064 6
5	3.34	乙酸肉桂酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	[2M+H] ⁺	353.174 3	2.8	115.053 8,87.044 3
6	3.44	丁香酚	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	182.118 1	2.7	147.079 9,109.064 6
7	4.28	α-姜黄烯	C ₁₅ H ₂₂	[M+K] ⁺	241.135 2	2.9	135.116 2,69.069 8
8	4.35	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	[2M+Hac-H] ⁺	455.121 5	5.5	153.053 9,149.025 0
9	5.20	没食子酸乙酯	C ₉ H ₁₀ O ₅	[2M-H] ⁻	395.099 5	4.3	169.013 6,151.002,109.028 2
10	5.22	甲基丁香酚	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	[2M+NH ₄] ⁺	374.231 3	3.5	163.077,139.074 4,137.061 0
11	6.37	肉桂醇	C ₉ H ₁₀ O	[M+FA-H] ⁻	179.071 6	1.4	133.066 3,101.038 7,69.033 8
12	6.91	庚酸	C ₇ H ₁₄ O ₂	[M+FA-H] ⁻	175.096 6	2.3	85.102 5,73.029 4
13	8.11	荜澄茄烯	C ₁₅ H ₂₈	[M+2Na-H] ⁺	253.190 9	0.4	181.195 5,179.180 2,167.178 9
14	8.53	脱落酸	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	297.170 3	1.2	247.132 4,151.076 6
15	8.57	二氢红花菜豆酸	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	[M+H] ⁺	283.155 5	3.5	267.124 3,193.087 7,191.105 6
16	9.80	肉豆蔻醛	C ₁₄ H ₂₈ O	[M+H] ⁺	213.222 8	3.4	195.212 8,181.196 2
17	10.25	茴香烯	C ₁₀ H ₁₂ O	[2M+K] ⁺	335.142 8	4.5	133.066 6,123.081 3,79.054 3
18	11.70	叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	[M+K] ⁺	335.272 6	3.0	209.228 9,155.179 9,127.149 2
19	12.99	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	289.273 9	7.3	197.228 3,127.149

表2 桂枝配方颗粒化学成分鉴定表

序号	t _r /min	化合物名称	分子式	离子形式	质荷比	化学位移/ppm	二级碎片
1	0.84	肉桂醛	C ₉ H ₈ O	[M-H] ⁻	131.049 2	8.1	131.049 3,103.018 4, 89.002 4,87.024 1,81.033 2
2	0.84	乙酸苄酯	C ₉ H ₁₀ O ₂	[M-H ₂ O-H] ⁻	131.049 2	7.1	85.028 5,81.033 2
3	2.13	香叶醇	C ₁₀ H ₁₈ O	[M+H] ⁺	155.141 9	7.1	85.102 1,85.064 6
4	3.36	丁香酚	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	[2M+Na] ⁺	351.157 0	0.6	149.059 7,119.050 6,117.071 5,109.065 2
5	3.56	α-荜澄茄油烯	C ₁₅ H ₂₄	[M+K] ⁺	243.152 9	7.8	153.164 9,95.085 2
6	3.56	δ-紫穗槐烯	C ₁₅ H ₂₄	[M+K] ⁺	243.152 9	5.8	153.164 9,95.085 2
7	4.03	甲基丁香酚	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	[2M+Na] ⁺	379.188 5	6.6	177.092 4,153.091 6
8	5.13	脱落酸	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	247.132 2	7.3	201.127 1,85.064 2
9	5.22	肉桂醇	C ₉ H ₁₀ O	[2M+Hac-H] ⁻	327.162 0	6.7	93.033 6,81.034 5
10	5.80	茴香烯	C ₁₀ H ₁₂ O	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	181.122 5	5.5	119.087 1,91.055 7
11	6.94	庚酸	C ₇ H ₁₄ O ₂	[M+FA-H] ⁻	175.098 1	2.9	57.070 3,113.060 4
12	7.41	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M+Na] ⁺	279.231 8	6.4	213.256 8,197.228 1, 169.196 4,127.147 8,113.132 2
13	7.71	乙酸肉桂酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	[M+FA-H] ⁻	221.083 2	7.5	131.049 5,91.054 9,85.029 3
14	8.48	甲基庚烯酮	C ₈ H ₁₄ O	[M+FA-H] ⁻	171.102 7	0.3	81.070 0,55.054 4
15	9.57	肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₂	[2M-H] ⁻	295.100 1	8.5	147.044 3,121.029 8,83.013
16	9.60	荜澄茄烯	C ₁₅ H ₂₈	[M+H] ⁺	209.225 8	2.9	165.165,153.165 1,125.133 2
17	11.09	二氢红花菜豆酸	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	[M+H] ⁺	283.155 2	4.3	253.142 2,239.129 4,237.148 7
18	11.18	肉豆蔻醛	C ₁₄ H ₂₈ O	[M+ACN+Na] ⁺	276.229 3	1.8	141.164,127.149 8
19	11.51	叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	[M+Na] ⁺	319.298 6	4.7	265.287 2,223.244 8,209.226 7, 139.149 3,125.132 8
20	13.81	硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	[M+K-2H] ⁻	321.219 4	2.7	283.261 9,197.226 0



A:各组大鼠体重;B:各组大鼠体征评分;C~F:各组大鼠WBV指标;G:各组大鼠红细胞聚集指数;与空白组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比:^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

图3 药效评价指标 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

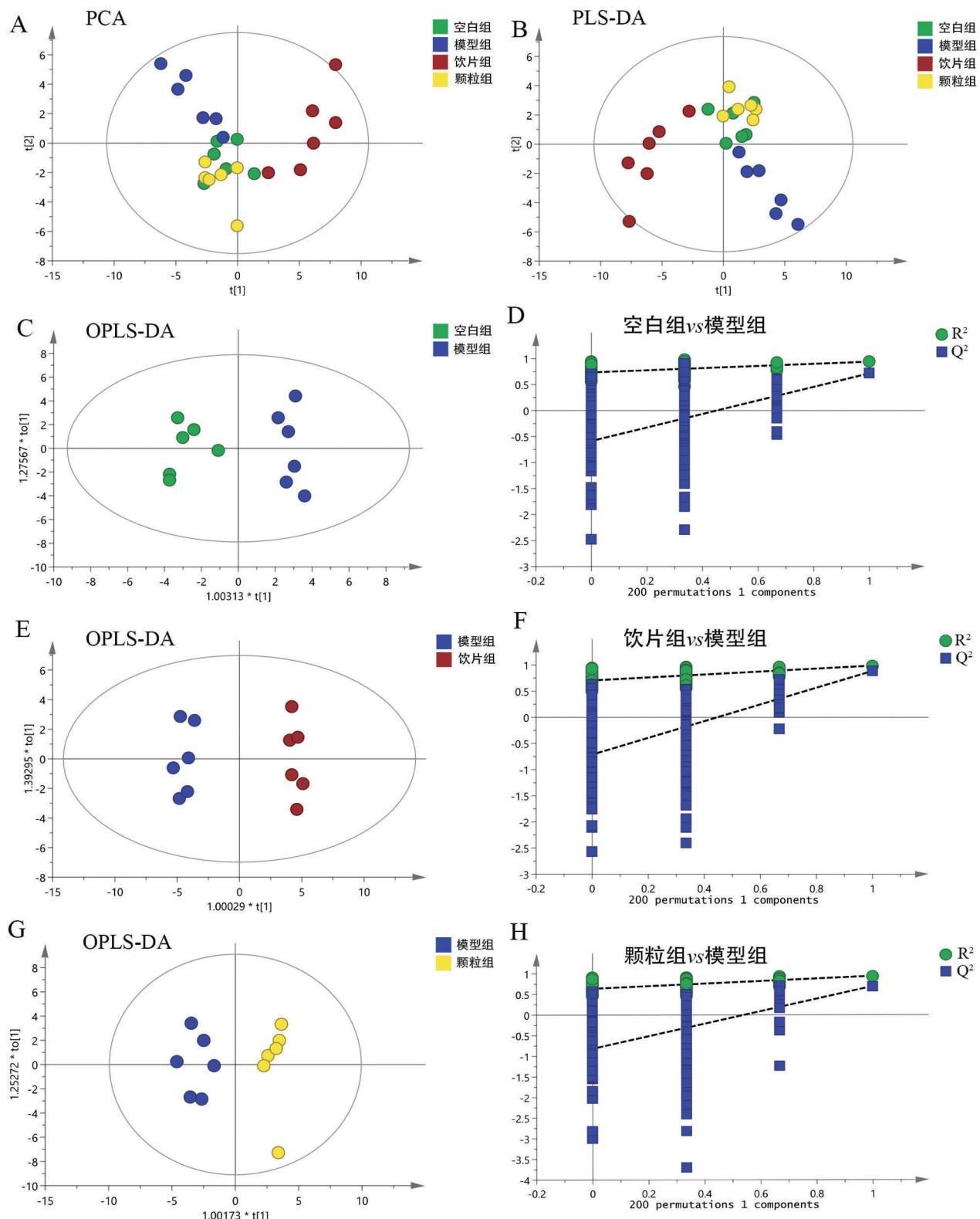
2.3 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学

2.3.1 多元统计分析 PCA 得分图(图4A)展示了4组大鼠的代谢轮廓,模型组大鼠的代谢轮廓与其他3组有明显的分离。同时,饮片组和颗粒组的样本点均向空白组靠近,而颗粒组靠近更明显。说明桂枝饮片和配方颗粒均可以回调BSS的代谢轮廓,但回调程度不完全一致。为了更好地展示各组代谢轮廓分离情况,继续采用PLS-DA(图4B)和OPLS-DA(图4C、图4E、图4G)进行分析,结果表明桂枝饮片和配方颗粒可以回调BSS引起的代谢轮廓紊乱。

进一步采用200次置换检验对构建的OPLS-

DA模型进行可靠性验证,左侧所有的 Q^2 和 R^2 值均低于右侧的原始点,且 Q^2 的蓝色回归线与Y轴的相交值小于0(图4D、图4F、图4H),结果表明所建立的模型具有良好的稳健性,不存在过拟合现象。

多元统计分析模型预测参数如下:PCA模型解释和预测参数 $R^2X=0.942, Q^2=0.529$;PLS-DA模型解释和预测参数 $R^2X=0.647, R^2Y=0.650, Q^2=0.467$;空白组vs模型组的OPLS-DA模型解释和预测参数 $R^2X=0.709, R^2Y=0.941, Q^2=0.717$;饮片组vs模型组的OPLS-DA模型解释和预测参数 $R^2X=0.718, R^2Y=0.989, Q^2=0.887$;颗粒组vs模型组的OPLS-DA模型解释和预测参数 $R^2X=0.829, R^2Y=0.944, Q^2=0.696$ 。



A:PCA得分图;B:PLS-DA得分图;C:空白组vs模型组的OPLS-DA得分图;D:空白组vs模型组OPLS-DA分析的200次检验;E:饮片组vs模型组的OPLS-DA得分图;F:饮片组vs模型组OPLS-DA分析的200次检验;G:颗粒组vs模型组的OPLS-DA得分图;H:颗粒组vs模型组OPLS-DA分析的200次检验。

图4 不同组别大鼠的多元统计分析

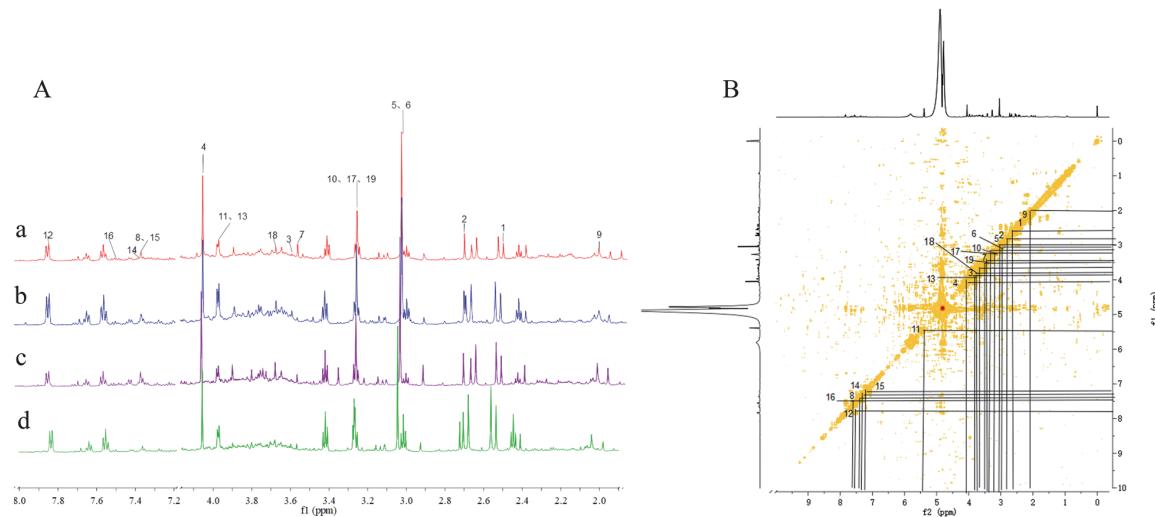
2.3.2 潜在差异代谢物的筛选与鉴定 为寻找BSS大鼠的潜在差异代谢物,选择VIP>1且P<0.05的代谢物作为标志性代谢物。与空白组比较,模型组筛选出17个代谢物,分别是柠檬酸、二甲胺、肌氨酸、肌酐、肌酸、磷酸肌酸、甘氨酸、N-苯乙酰甘氨酸、N-乙酰甘氨酸、甜菜碱、乙醇酸、马尿酸、咖啡因、苯乙酸、咪唑、苯甲酸和组氨酸。与模型组比较,饮片组筛选出15个代谢物,分别是N,N-二甲基

甘氨酸、肌酐、肌酸、磷酸肌酸、牛磺酸、咖啡因、苯乙酸、甘氨酸、N-乙酰甘氨酸、苯乙酰甘氨酸、甜菜碱、乙醇酸、马尿酸、苯甲酸和组氨酸;颗粒组筛选出13个代谢物,分别是肌酐、肌酸、甘氨酸、N-乙酰甘氨酸、苯乙酰甘氨酸、甜菜碱、磷酸肌酸、乙醇酸、马尿酸、咖啡因、组氨酸、咪唑和苯甲酸,详细信息见表3。差异代谢物的一维和二维核磁共振图谱的指认见图5,差异代谢物相对含量变化见图6。

表3 寒凝血瘀大鼠尿液差异代谢物特征

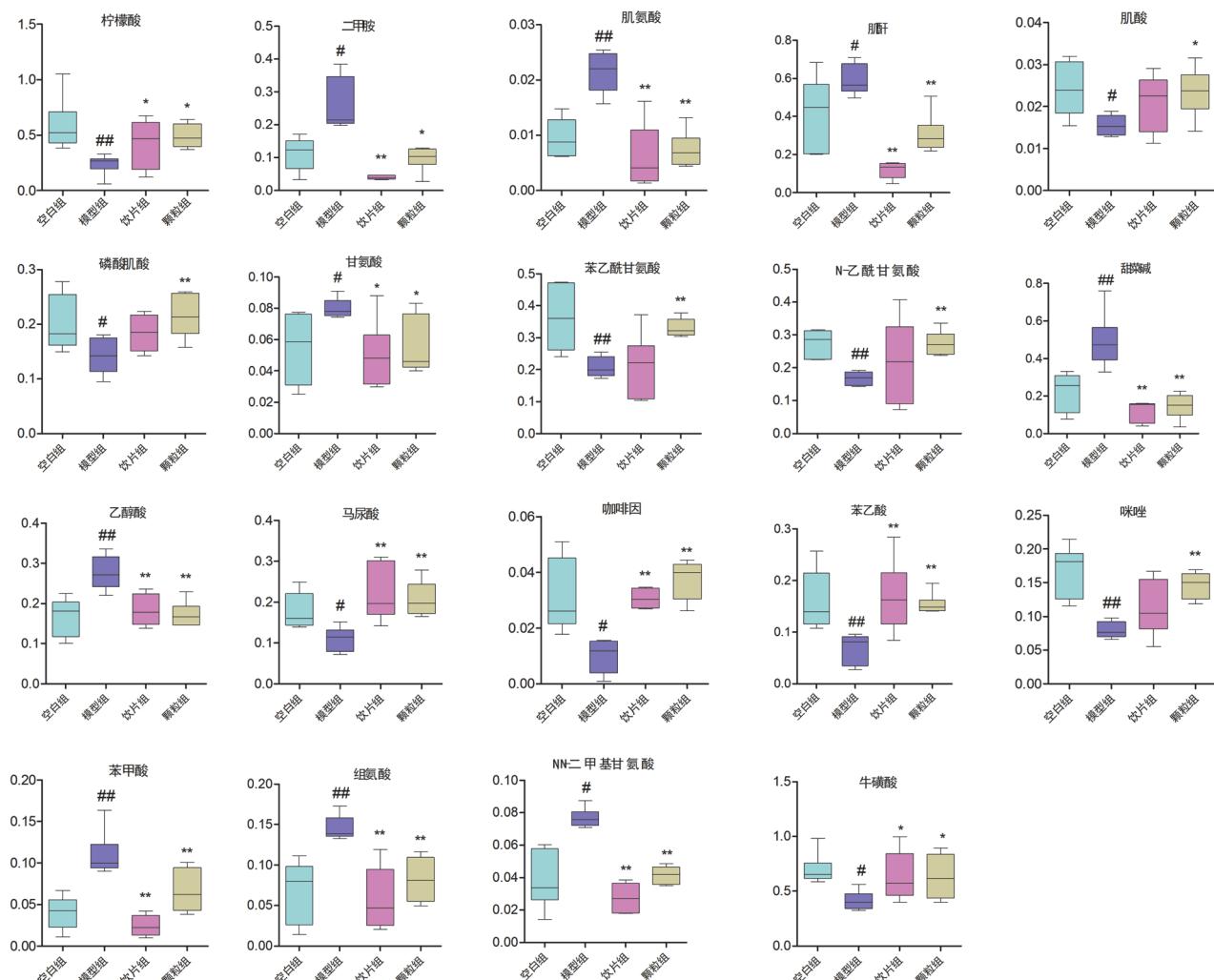
序号	代谢物	化学位移δ	VIP值	模型组vs 空白组	饮片组vs 模型组	颗粒组vs 模型组	HMDB ID	KEGG ID	代谢通路
1	柠檬酸	2.522(d), 2.685(d)	1.39	↓**	↑*	↑*	HMDB0000094	C00158	乙醛酸盐和二羧酸盐代谢;柠檬酸循环(TCA循环);丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酰胺代谢
2	二甲胺	2.707(s)	1.39	↑*	↓**	↓*	HMDB0000087	C00543	—
3	肌氨酸	2.737(s),3.611(s)	1.39	↑**	↓**	↓**	HMDB0000271	C00213	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢
4	肌酸酐	3.027(s),4.035(s)	2.56	↑*	↓**	↓**	HMDB0000562	C00791	—
5	肌酸	3.0260(s),3.954(s)	2.56	↓*	↑	↑*	HMDB0000064	C00300	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;精氨酸和脯氨酸代谢
6	磷酸肌酸	3.026(s),3.954(s)	2.56	↓*	↑	↑**	HMDB0001511	C02305	精氨酸和脯氨酸代谢
7	甘氨酸	3.552(s)	1.11	↑*	↓**	↓*	HMDB0000123	C00037	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;乙醛酸盐和二羧酸盐代谢;初级胆汁酸生物合成;硫辛酸代谢;谷胱甘肽代谢;卟啉代谢
8	苯乙酰甘氨酸	3.664(s),3.746(d), 7.340(t),7.408(t)	1.84	↓**	↑	↑**	HMDB0000821	C05598	苯丙氨酸代谢
9	N-乙酰甘氨酸	2.026(s),3.746(d)	1.68	↓**	↑	↑**	HMDB0000532	—	—
10	甜菜碱	3.252(s),3.879(s)	1.41	↑**	↓**	↓**	HMDB0000043	C00719	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢
11	乙醇酸	3.954(s)	1.46	↑**	↓**	↓**	—	C00160	乙醛酸盐和二羧酸盐代谢
12	马尿酸	3.957(d),7.536(t), 7.624(t),7.820(d)	1.46	↓*	↑**	↑**	HMDB0000714	C01586	—
13	咖啡因	3.336(s),3.527(s), 3.954(s),7.898(s)	1.46	↓*	↑**	↑**	HMDB0001847	C07481	咖啡因代谢
14	苯乙酸	3.527(s),7.280(t), 7.300(t),7.371(t)	1.06	↓**	↑**	↑**	HMDB0000209	C07086	苯丙氨酸代谢
15	咪唑	7.333(s),8.250(s)	1.12	↓**	↑	↑**	HMDB0001525	C01589	—
16	苯甲酸	7.482(t),7.536(t), 7.863(d)	1.22	↑**	↓**	↓**	HMDB0001870	C00180	—
17	组氨酸	3.167(q),3.231(q), 3.985(q),7.088(s), 7.869(s)	1.03	↑**	↓**	↓**	HMDB0000177	C00135	组氨酸代谢; β-丙氨酸代谢
18	N,N-二甲基甘氨酸	2.913(s),3.707(s)	2.88	↑*	↓**	↓**	HMDB0000092	C01026	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢
19	牛磺酸	3.251(t),3.404(t)	3.28	↓*	↑*	↑*	HMDB0000251	C00245	初级胆汁酸生物合成;牛磺酸和次牛磺酸代谢

*P<0.05, **P<0.01。



A: ^1H -NMR 图谱差异代谢物的识别(a: 饮片组; b: 空白组; c: 颗粒组; d. 模型组); B: ^1H - ^1H COSY 图谱差异代谢物的确认图; 图A中的数字编号信息见表3。

图 5 寒凝血瘀大鼠差异代谢物 ^1D - 和 ^2D -NMR 图谱的识别



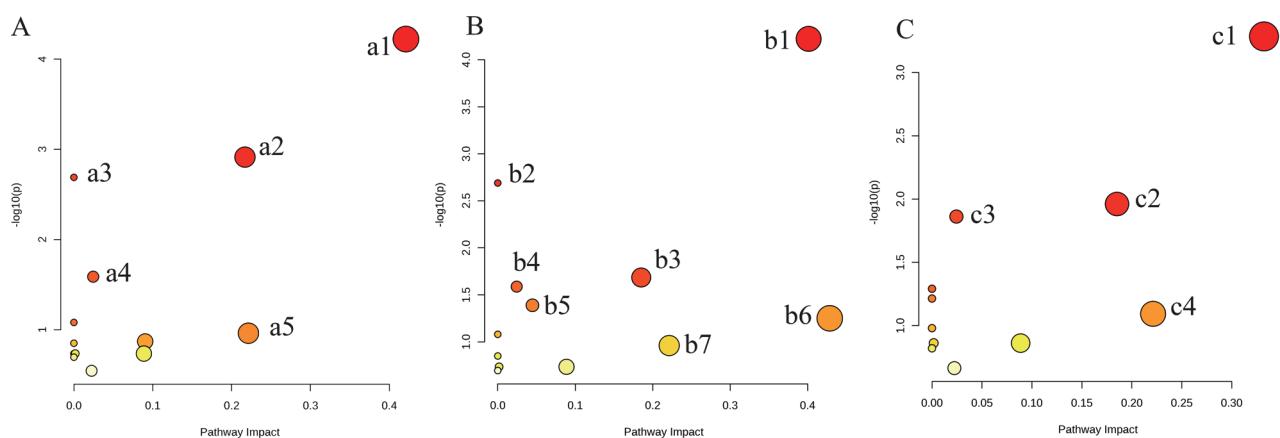
与空白组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$; 与模型组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 6 BBS 的差异代谢物含量变化图

2.3.3 BSS 大鼠尿液相关代谢通路分析 将差异代谢物导入 MetaboAnalyst6.0 (<http://www.MetaboAnalyst.ca>) 在线网站进行代谢通路分析, 见图 7。寒凝血瘀涉及的主要代谢通路包括甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、苯丙氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢和组氨酸代谢。经桂枝饮片干预后扰动的代谢通路, 主要有甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、乙醛酸盐和二

羧酸盐代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成、牛磺酸和次牛磺酸代谢和组氨酸代谢。经桂枝配方颗粒干预后影响的代谢通路, 主要有甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、精氨酸和脯氨酸代谢和组氨酸代谢。

根据 $\text{Impact} > 0.1$ 筛选得到 4 条重要的代谢通路: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、组氨酸代谢和牛磺酸和次牛磺酸代谢。



A: 空白组 vs 模型组; B: 饮片组 vs 模型组; C: 颗粒组 vs 模型组; 每个圆点代表一条代谢通路; 图中只标出 $P < 0.05$ 或 $\text{Impact} > 0.1$ 的通路; a1、b1、c1: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; a2、b3、c2: 乙醛酸盐和二羧酸盐代谢; a3、b2: 苯丙氨酸代谢; a4、b4、c3: 精氨酸和脯氨酸代谢; a5、b7、c4: 组氨酸代谢; b5: 初级胆汁酸生物合成; b6: 牛磺酸和次牛磺酸代谢。

图 7 大鼠尿液样本的代谢通路分析

3 讨 论

本研究结果显示, BSS 大鼠表现出喜扎堆、畏寒蜷缩、舌质紫暗、形体消瘦等症状, 全血粘度和红细胞聚集指数升高, 提示模型建立成功。桂枝饮片和桂枝配方颗粒则可不同程度改善上述血瘀病症, 并降低 WBV 和红细胞聚集指数。这表明桂枝饮片和桂枝配方颗粒能改善 BSS。

代谢组学结果发现了 4 条重要的代谢通路: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、组氨酸代谢及牛磺酸和次牛磺酸代谢。

甘氨酸、甜菜碱、肌氨酸和肌酸共同参与了甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 这条代谢途径主要参与体内磷酸肌酸和 ATP 的合成。甘氨酸在抗炎、抗氧化以及代谢调节中起重要作用。在利用 $^1\text{H-NMR}$ 的代谢组学方法揭示葛根素对大鼠血瘀证的干预作用研究中, Zou 等^[10]发现, 与健康对照组相比, 血瘀组大鼠的甘氨酸水平更高。本研究结果发现, 桂

枝饮片和桂枝配方颗粒均可不同程度显著回调了甘氨酸水平, 从而可能回调了 BSS 大鼠的发生的氧化应激。甜菜碱通过抑制 NLRP3 炎症小体激活、NF- κ B 信号通路、恢复能量代谢等发挥抗炎作用^[11]。本研究发现, 与空白组相比, 模型组的甜菜碱显著升高, 这与文献报道结果一致^[12]。经桂枝饮片和桂枝配方颗粒汤剂干预后, BSS 大鼠的甜菜碱水平均得到显著回调。因此, 通过改善甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径紊乱来纠正 BSS 可能是桂枝的饮片和配方颗粒的共同作用通路。肌酸可被肌酸激酶催化形成磷酸肌酸, 磷酸肌酸含有高能键, 具有储能作用能补偿机体 ATP 的浓度, 肌酸在人体内储存越多, 其运动能力越强^[13]。本研究结果发现, 模型组大鼠尿液的肌酸和磷酸肌酸减少, 能量被大量消耗, 这表明 BSS 状态下机体能量供给方式发生改变。桂枝配方颗粒肌酸和磷酸肌酸水平显著升高, 这表示桂枝配方颗粒可回调因寒凝血瘀引起的能量供给异常。乙醛酸盐和二羧酸盐代谢是柠檬酸循环的一个分支, 且可以通过影响柠檬酸循环关键

酶的活性,导致柠檬酸循环中各种反应物和产物的异常水平^[14-15]。本研究中大鼠经过寒凝血瘀造模后柠檬酸水平出现了明显的降低,且在桂枝饮片和配方颗粒汤剂治疗后,柠檬酸水平得到回调。这表明桂枝的饮片和配方颗粒通过调节乙醛酸盐和二羧酸盐代谢途径改善寒凝血瘀。组氨酸的生物合成发生在肠道菌群中,表明组氨酸代谢可能参与了BSS大鼠的肠道菌群失调,桂枝的饮片和配方颗粒干预可改善组氨酸水平的紊乱。

在本研究中,发现桂枝饮片还扰动了牛磺酸和次牛磺酸代谢途径而发挥抗BSS作用。牛磺酸是牛磺酸和次牛黄酸代谢通路上的关键代谢物,是一种普遍存在于心肌细胞线粒体中的β-氨基酸^[16]。牛磺酸水平的升高可以抑制活性氧(ROS)的产生,减轻氧化应激^[17]。牛磺酸是胆汁酸盐的重要组成部分,后者参与脂肪的消化过程,牛磺酸和次牛磺酸代谢的异常说明脂肪代谢过程受到影响。本研究结果显示,模型组大鼠的牛磺酸水平与空白组相比显著降低,再给予桂枝饮片汤剂后,牛磺酸的水平得到显著回调,这与之前的研究结果^[12, 18]一致。

综上,BSS大鼠存在明显的氨基酸代谢、脂质代谢和能量代谢等代谢异常,桂枝饮片和配方颗粒可通过回调BSS大鼠的代谢异常和抑制凝血过程从而发挥抗寒凝血瘀的作用。这也表示桂枝配方颗粒抗大鼠寒凝血瘀的作用与传统桂枝饮片煎煮液的药效作用相似,桂枝配方颗粒具有一定临床实用意义。

参考文献:

- [1] 周世卿,张婷婷,李甜甜,等.寒凝血瘀证裸小鼠模型的建立及评价[J].辽宁中医杂志,2019,46(2): 415-417.
- [2] 褚剑锋.寒凝血瘀成因及病理[J].中国中西医结合杂志,2022,42(6): 669-671.
- [3] 徐小荟,熊丽辉.以药测证法对大鼠寒凝血瘀证关键证素的研究[J].长春中医药大学学报,2018,34(4): 656-658.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典——一部:2020年版[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [5] 黄敬群,罗晓星,王四旺,等.桂皮醛对抗血小板聚集和血栓形成的特点[J].中国临床康复,2006,10(31): 34-36.
- [6] 岳佑淞,张璐,王艳丽,等.中药配方颗粒汤剂与传统汤剂对比研究进展与有关问题分析[J].医药导报,2023,42(7): 1033-1038.
- [7] 李高岩,杨一荻,曲范娜,等.中药配方颗粒研究现状及问题思考[J].药学研究,2024,43(1): 99-104.
- [8] 徐博,吴翠,李卓俊,等.1H-NMR技术在中药分析领域的应用现状[J].药物分析杂志,2021,41(10): 1663-1669.
- [9] 吴金霞.基于代谢组学的当归四逆汤“温经通脉”作用机制的研究[D].南宁:广西医科大学,2019.
- [10] ZOU Z J, LIU Z H, GONG M J, et al. Intervention effects of puerarin on blood stasis in rats revealed by a 1H NMR-based metabonomic approach[J]. Phytomedicine, 2015, 22(3): 333-343.
- [11] ZHAO G F, HE F, WU C L, et al. Betaine in inflammation: mechanistic aspects and applications[J]. Frontiers in immunology, 2018, 9: 1070.
- [12] 杨秀娟,杨志军,李硕,等.基于超高效液相色谱—四极杆飞行时间质谱联用技术的血瘀模型大鼠血浆代谢组学分析[J].色谱,2019,37(1): 71-79.[J].
- [13] 王雅男.运动干预IR大鼠血液代谢组学与线粒体形态研究[D].太原:山西大学,2016.
- [14] TANG M, GAO X, GENG T, et al. Metabolomics analysis of the therapeutic effects of Qiwei Tongbi oral liquid on rheumatoid arthritis in rats[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2021, 202: 114166.
- [15] MURPHY M P. How mitochondria produce reactive oxygen species[J]. The biochemical journal, 2009, 417(1): 1-13.
- [16] SCHAFFER S W, SHIMADA-TAKAURA K, JONG C J, et al. Impaired energy metabolism of the taurine-deficient heart[J]. Amino acids, 2016, 48(2): 549-558.
- [17] 王立英.牛磺酸抑制心肌成纤维细胞的增殖作用及机制研究[D].长春:吉林大学,2013.
- [18] ZHAO L L, QIU X J, WANG W B, et al. NMR metabolomics and random forests models to identify potential plasma biomarkers of blood stasis syndrome with coronary heart disease patients[J]. Frontiers in physiology, 2019, 10: 1109.

本文引用格式:

梁雪红,韦锦斌,潘诗翰,等.基于代谢组学分析桂枝饮片与配方颗粒改善寒凝血瘀证的作用机制异同[J].广西医科大学学报,2024,41(12): 1603-1613.DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.004
LIANG X H, WEI J B, PAN S H, et al. Analysis on the similarity and difference of the mechanism of Guizhi decoction and formula granules alleviating blood stasis syndrome via metabolomics[J]. Journal of Guangxi medical university, 2024,41(12): 1603-1613.DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.12.004