

## 基于粪便代谢组学探讨当归—桂枝配方 颗粒干预寒凝血瘀证的作用机制

余纪蔚<sup>1,2</sup>, 冯琳琳<sup>2</sup>, 王倩怡<sup>3</sup>, 农运园<sup>2</sup>, 黄淑琳<sup>2</sup>, 潘诗翰<sup>2</sup>, 韦锦斌<sup>2</sup>, 苏志恒<sup>2</sup>

(1. 广西医科大学第二附属医院药学部, 南宁 530007; 2. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 3. 广西医科大学附属肿瘤医院药学部, 南宁 530021)

**摘要 目的:**基于<sup>1</sup>H-NMR 粪便代谢组学技术研究当归—桂枝配方颗粒(DGK-GZK)干预寒凝血瘀证(BSS)的作用机制。**方法:**将18只SD雌鼠随机分为3组,空白组、模型组、DGK-GZK组。通过大鼠体重变化、血液流变学指标评价DGK-GZK干预血瘀的疗效,同时收集各组大鼠第14天的粪便样本,进行<sup>1</sup>H-NMR代谢组学分析,从代谢层面上阐明BSS的发病机制和DGK-GZK干预BSS的调控机制。**结果:**与模型组比较,DGK-GZK组大鼠在给予药物干预后体重降低减缓,同时血液流变学显著回调( $P<0.01$ );粪便代谢组学结果显示,模型组的代谢轮廓在第14天与空白组明显区分,而DGK-GZK组的代谢轮廓与模型组分离并趋于空白组,基于多元统计分析共筛选出了15种与BSS相关的生物标志物,主要涉及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,丁酸代谢,乙醛酸和二羧酸代谢等通路,而DGK-GZK组可显著回调这7种生物标志物(醋酸盐、丙氨酸、甜菜碱、丁酸盐、亮氨酸、丙酸盐、苏氨酸)(均 $P<0.05$ ),主要调控甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,丁酸代谢,乙醛酸和二羧酸代谢等途径的紊乱。**结论:**BSS是一个动态而缓慢的发展过程,DGK-GZK可通过回调不同代谢物而改善BSS。

**关键词** 当归—桂枝;寒凝血瘀证;配方颗粒;粪便代谢组学

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2025)01-0047-09

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.007

### Study on the mechanism of Danggui-Guizhi formula granules in the intervention of cold coagulation and blood stasis syndrome based on fecal metabolomics

YU Jiwei<sup>1,2</sup>, FENG Linlin<sup>2</sup>, WANG Qianyi<sup>3</sup>, NONG Yunyuan<sup>2</sup>, HUANG Shulin<sup>2</sup>, PAN Shihan<sup>2</sup>, WEI Jinbin<sup>2</sup>, SU Zhiheng<sup>2</sup>. (1. School of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China; 2. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Department of Pharmacy, Guangxi Medical University Cancer Hospital, Nanning 530021, China)

**Abstract Objective:** The mechanism of Danggui-Guizhi formula granules (DGK-GZK) in the intervention of cold coagulation and blood stasis syndrome (BSS) was studied based on <sup>1</sup>H-NMR fecal metabolomics. **Methods:** Eighteen SD female mice were randomly divided into three groups: control group, model group and DGK-GZK group. The effect of DGK-GZK on blood stasis was evaluated by weight changes and hemorheology indexes of rats. Meanwhile, fecal samples of rats in each group on the 14th day were collected for <sup>1</sup>H-NMR metabolomics analysis, so as to elucidate the pathogenesis of BSS and the regulation mechanism of DGK-GZK in the intervention of BSS from the metabolic level. **Results:** Compared with the model group, the weight loss of rats in the DGK-GZK group was slowed down after drug intervention, and the hemorheology was significantly reversed ( $P<0.01$ ). Fecal metabolomics results showed that the metabolic profile of the model group was significantly different from that of the control group on the 14th day, while the metabolic profile of the DGK-GZK group was separated from that of the model group and tended to be that of the control group. A total of fifteen biomarkers related

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(No. 82174263);广西科技重大专项(No. 桂科AA23023035-5)

[通信作者] 苏志恒, E-mail: suzhiheng915@126.com; 韦锦斌, E-mail: wjbguangxi@sina.cn

[收稿日期] 2024-11-24

to BSS were screened by multivariate statistical analysis, mainly involving pathways such as glycine, serine and threonine metabolism, alanine, aspartate and glutamate metabolism, butyric acid metabolism, as well as glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism. DGK-GZK could significantly reverse these seven biomarkers: acetate, alanine, betaine, butyrate, leucine, propionate, and threonine (all  $P < 0.05$ ), mainly regulating the disorders in pathways such as glycine, serine and threonine metabolism, alanine, aspartate and glutamate metabolism, butyric acid metabolism, as well as glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism. **Conclusion:** BSS is a dynamic and slow-developing process, and the DGK-GZK can improve BSS by regulating various metabolites.

**Keywords** Danggui-Guizhi; cold coagulation and blood stasis syndrome; formula granule; fecal metabolomics

寒凝血瘀证(cold coagulation and blood stasis syndrome, BSS)是中医常见的慢性全身病症之一,多因经脉受到寒邪,形成血液淤积、血液循环不畅<sup>[1]</sup>;或与机体长时间处于潮湿寒冷环境,导致阳气损伤、阳气不足有关<sup>[2]</sup>。当归-桂枝配方颗粒(DGK-GZK)由当归四逆汤演变发展而来,当归四逆汤是“温经通脉、养血散寒”的经典复方;当归具有主治血虚血瘀诸证,补血调经,润肠通便,活血止痛的功效<sup>[3]</sup>。当归的主要成分有阿魏酸、绿原酸、当归多糖、邻苯二甲酸等,这些成分能抑制血小板聚集、改善血液张力和血液流变学等效应<sup>[4]</sup>;桂枝具有散寒解表、温通经脉、通阳化气之功效<sup>[5]</sup>。桂枝的主要成分含有肉桂酸、肉桂醛以及肉桂醇等,具有抗凝、抗炎以及扩张血管的作用<sup>[6]</sup>。“当归-桂枝”这一组合在古代医学经典著作中的应用非常普遍,例如《伤寒论》里的当归四逆汤和《金匮要略》里的温经汤等,这些药方的成分可用于应对诸如糖尿病周围神经损伤和寒凝血瘀型的子宫腺肌症等问题<sup>[7]</sup>。课题组之前的研究已经证明当归四逆汤和缺少某些成分的混合物对于缓解寒凝血瘀病状并纠正其引发的代谢失调有显著效果<sup>[8-9]</sup>。由于中药传统饮片与配方颗粒的制备、使用方法不同,因此传统饮片与配方颗粒在体内吸收、分布、代谢、排泄规律及时效不同,导致药效呈现差异,DGK-GZK这类制剂类型对BSS患者的作用机制比较尚未明确。代谢组学的整体分析法和中医学理论相吻合<sup>[8]</sup>。因此,本研究利用<sup>1</sup>H-NMR代谢组学技术来探究DGK-GZK对BSS大鼠粪便代谢的影响及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 药材、主要试剂和仪器

当归、桂枝中药饮片购于广西仙荣中药科技有限公司,生产批号分别为20220401、20220601,由广

西医科大学朱丹教授鉴定。当归配方颗粒(每1 g配方颗粒相当于饮片1.5 g)、桂枝配方颗粒(每1 g配方颗粒相当于饮片7.5 g)用相应的同一批号中药饮片制成,配方颗粒制作由培力(南宁)药业有限公司完成;磷酸二氢钠和磷酸氢二钠由天津市大茂化学试剂厂生产;盐酸肾上腺素注射液(生产批号:20220308)由远大医药(中国)有限公司生产;3-(三甲基甲硅烷基)丙酸-d4钠盐、重水由上海麦克林生化科技有限公司生产。

超纯水制造系统(型号:Milli-QIntegral10,德国默克密理博公司);核磁共振波谱仪(型号:600 MHz,德国Bruker公司);全自动血液流变测试仪(型号:SA-9000,北京赛科希德科技发展有限公司);万分之一电子天平(型号:EL204,梅斯特-托利多国际贸易(上海)公司);高速冷冻离心机(型号:f5810R,美国Eppendorf公司);可调量程移液器(德国Eppendorf公司);数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

### 1.2 样品制备

DGK-GZK分别按照中药配方颗粒国家标准由制药公司进行制备,并把DGK-GZK按张仲景《伤寒论》当归四逆汤复方比例(当归:桂枝=4:3)混合成实验给药液,于-20℃冰箱中保存备用。

### 1.3 动物分组及给药方案

18只SPF级SD雌性大鼠,体重180~200 g,实验动物使用许可证号:SYXK(桂)2020-0004,生产许可证号:SCXK(桂)2020-0003,由广西医科大学实验动物中心提供。实验大鼠饲养于湿度(50±5)%、温度(25±2)℃的温控室内,每12 h黑暗/光照循环,自由摄取食物、饮水。本动物实验方案已经广西医科大学机构伦理学委员会审批通过(伦理审查批准号为202209022)。大鼠适应性喂养7 d后,随机分为3组:空白组、模型组、DGK-GZK组,每组6只,造模期间DGK-GZK组每日灌胃给予DGK-

GZK,给药剂量为1.9 mg/g,空白组和模型组给予等量生理盐水,1次/d,连续灌胃给药14 d。

急性BSS大鼠模型的建立:每日将DGK-GZK组和模型组大鼠置于冰水浴(0~2 °C)中5~10 min,当大鼠出现反应迟钝、呼吸微弱、腿部僵直欲沉时将其从冰水中取出,连续刺激14 d。空白组大鼠则置于37 °C水浴中10 min,连续刺激14 d。在实验第14天,DGK-GZK组和模型组注射0.8 mg/kg盐酸肾上腺素注射液,共注射2次,间隔时间为4 h,首次注射2 h后进行冰水浴,建立急性BSS大鼠模型。空白组大鼠则在第14天注射等量生理盐水,2 h后放入温水(35~37 °C)中5 min。每隔3 d监测一次大鼠的体重,观察大鼠体重变化并记录,测量体重前大鼠禁食12 h。

#### 1.4 样本收集

收集第14天各组大鼠的粪便样本,放置于-80 °C冰箱中保存待测。大鼠末次给药后可以饮水但不可进食,并在给药后24 h内对大鼠进行麻醉解剖,利用含有肝素钠的抗凝剂试管采集全血,并于室温条件下保存,采血后2 h内需进行指标检测。

#### 1.5 血液流变指标的测定

采集的血液用于全血黏度(whole blood viscosity, WBV)的测量,测量通过全自动血液流变检测仪完成。在温度为37 °C环境下,测定大鼠全血在不同切变率下(200 s<sup>-1</sup>、50 s<sup>-1</sup>、5 s<sup>-1</sup>、1 s<sup>-1</sup>)的WBV。

#### 1.6 <sup>1</sup>H-NMR代谢组学数据分析

精确称取100 mg粪便样品,将其与1 mL的磷酸盐缓冲液混合,涡旋振荡3 min后再超声15 min,以上步骤重复3次。在4 °C中,12 000 r/min离心15 min后取上清液,对离心后的沉淀重复上述操作,合并两次提取液。取400 μL提取液置于5 mm的核磁管,再加入150 μL含TSP的重水混匀,于4 °C冰箱保存待测。

在600 MHz核磁共振波谱仪中进行大鼠粪便样本的实验分析,测试温度25 °C,cpmgrp1d Bruker标准序列,扫描次数64次,固定接收器增益,弛豫延迟5 s,光谱宽度20×10<sup>6</sup>,以0.3 Hz线宽进行处理。

参照文献[10]对核磁数据进行多元统计分析。使用MestReNove软件对核磁图谱的TMS峰进行定标,剪切水峰,基线和峰提取、峰积分自动化调整。随后进行总面积归一化,并进行峰面积切分。使用SIMCA-P14.1软件进行多元统计学分析,包括主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)、

正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)及200次置换检验,然后在 $P<0.05$ 和VIP>1进行筛选差异变量。使用MestReNove软件导出mnova格式文件,利用Chenomx NMR suite 8.6软件和从BMRB数据库分析其峰的数目、峰的裂分(一维),对不同化学位移下的峰进行鉴定。为了找到与疾病相关的代谢通路,运用Metabo-Analyst 5.0软件对鉴定出的潜在生物标志物进行代谢通路的归属和富集。

#### 1.7 统计学方法

使用SPSS 24.0对实验数据进行统计分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 药效学评价

**2.1.1 3组大鼠体征评分和体重变化** 与空白组比较,模型组大鼠体征评分升高( $P<0.01$ ),体重逐渐下降,但在第4、第7、第10天体重差异无统计学意义( $P>0.05$ ),第14天表现出显著差异( $P<0.05$ );与模型组比较,DGK-GZK组大鼠体征评分降低( $P<0.01$ ),体重逐渐上升,但在第4、第7、第10、第14天差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ ),见图1。

**2.1.2 BSS大鼠模型评价** 与空白组比较,模型组大鼠舌头呈现一定程度的血瘀现象,且WBV升高( $P<0.01$ );与模型组比较,DGK-GZK组WBV下降( $P<0.01$ ),见图2。提示BSS大鼠模型构建成功<sup>[8]</sup>。

### 2.2 <sup>1</sup>H-NMR代谢组学分析

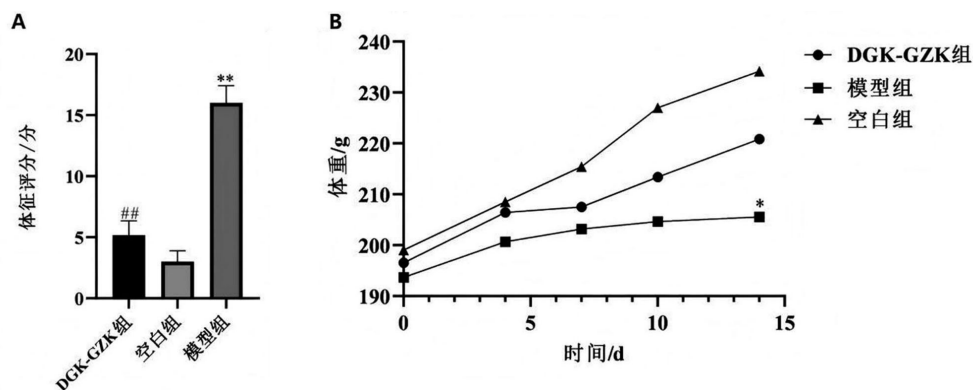
**2.2.1 多元统计分析** 为了深入研究BSS大鼠的粪便样本和各组代谢轮廓特征,用PLS-DA分析方法建立模型,旨在揭示有无药物干预情况下大鼠粪便的代谢规律。本实验DGK-GZK能够回调BSS大鼠的代谢轮廓,说明DGK-GZK对BSS有治疗效果,见图3。

为了更直接地展示大鼠粪便代谢轮廓分离情况,本研究对模型组与空白组之间的差异代谢物进行筛选和鉴定,构建OPLS-DA模型,200次置换检验结果表明,拟预测性 $Q^2$ 均在0以下,与实际结果的 $Q^2$ 相差甚远,说明建立的模型具有较好的适应度、鉴别性和预测能力,并未出现过度拟合的情况,见图4。

**2.2.2 差异代谢物的分析** 在对比各组代谢轮廓后,进一步寻找给予DGK-GZK后BSS大鼠的潜在

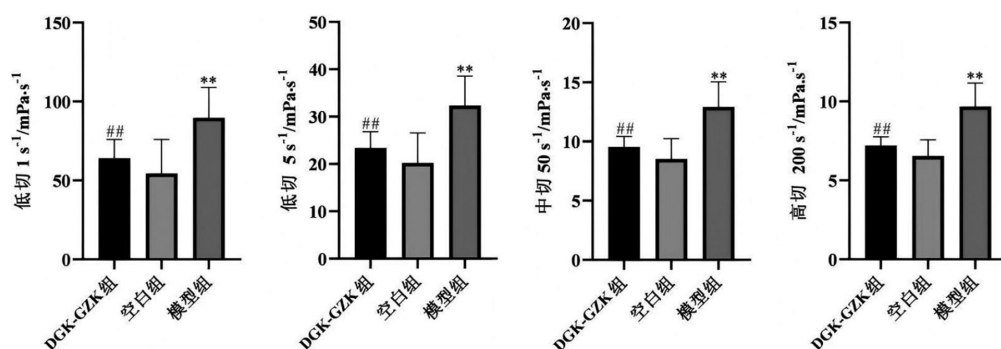
差异代谢物。经 OPLS-DA 分析,按照  $P < 0.05$ ,  $VIP > 1$  的规则,共筛选出 15 种差异代谢物。差异代谢物根据文献资料和人类代谢组数据库(HMDB)的化学位移等相关信息进行识别和鉴定,见图 5。这 15 种差异代谢物为亮氨酸、乳酸、苏氨酸、醋酸盐、丁酸盐、丙酸盐、丙酮、乙酰乙酸盐、甘氨酸、缬氨

酸、肌氨酸、胍基乙酸盐、丙氨酸、甜菜碱、天冬氨酸,见表 1。差异代谢物的相对定量结果见表 2,表明 DGK-GZK 可以调节 BSS 大鼠体内 7 种代谢物(醋酸盐、丙氨酸、甜菜碱、丁酸盐、亮氨酸、丙酸盐、苏氨酸)的代谢紊乱,从而改善 BSS。



A:3组大鼠体征评分比较;B:3组大鼠体重变化。与空白组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ ;  $\bar{x} \pm s, n=6$ 。

图1 3组大鼠体征评分和体重变化



与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ ;  $\bar{x} \pm s, n=6$ 。

图2 3组大鼠WBV比较

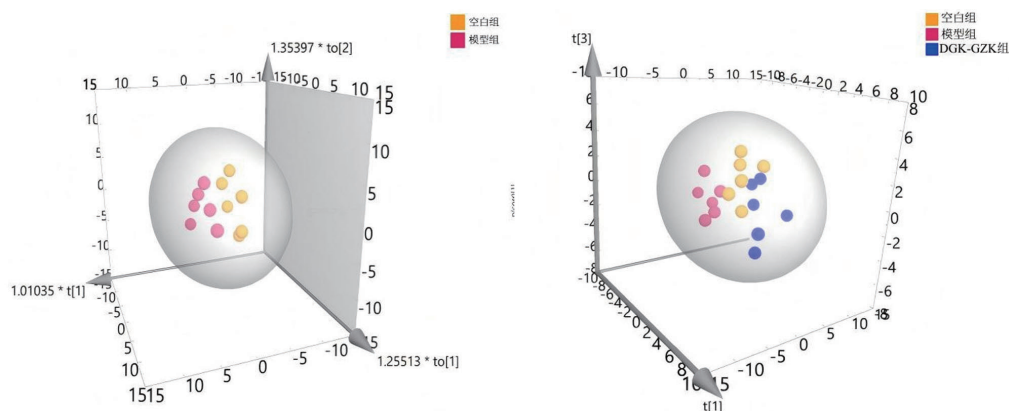


图3 3组大鼠多元统计分析( $n=6$ )

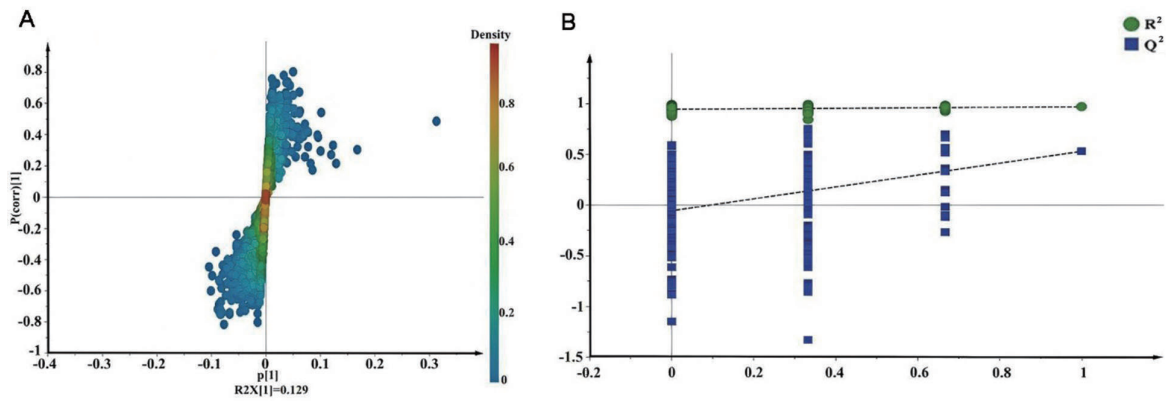
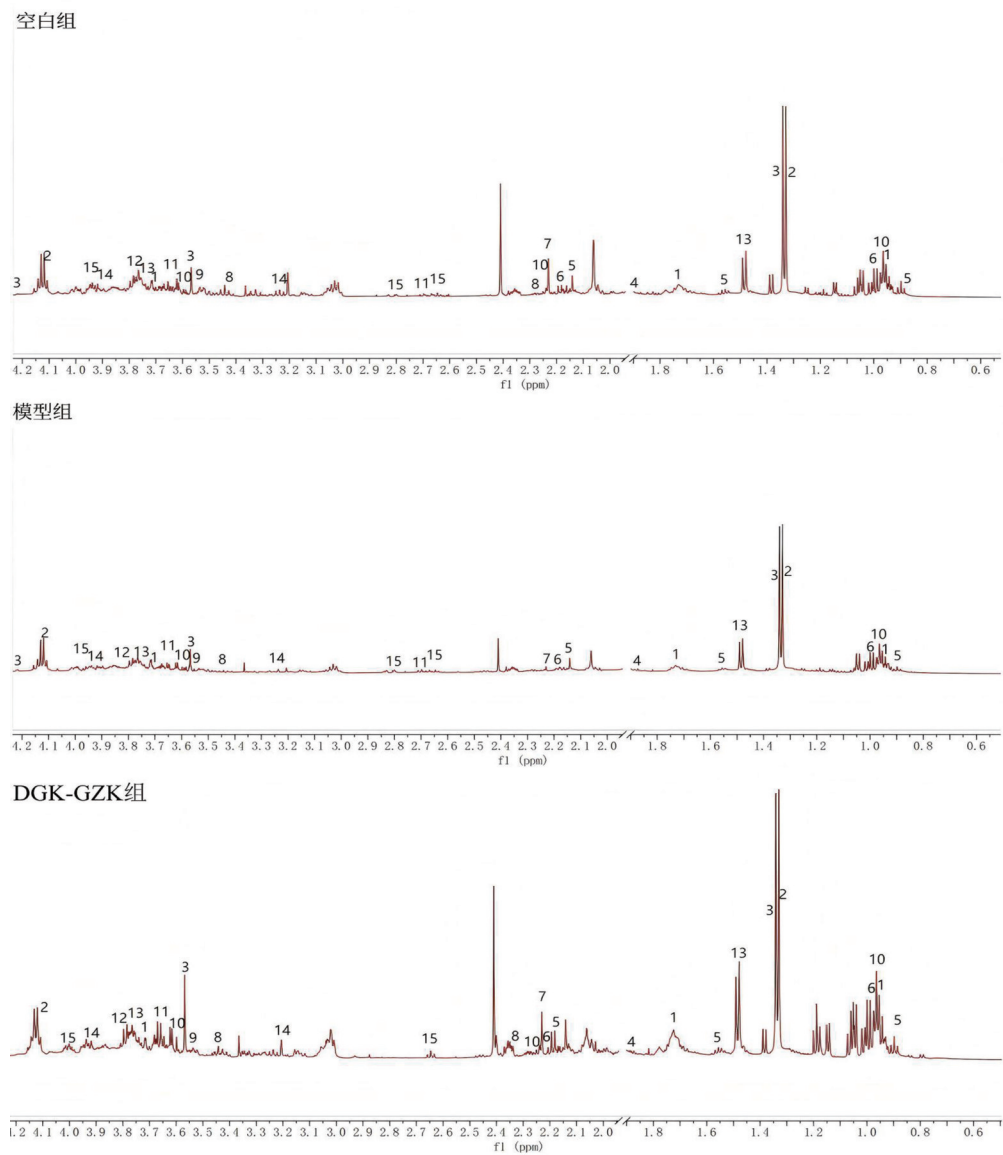


图4 大鼠粪便代谢物的OPLS-DA模型S-Plot图(A)及200次置换检验结果(B)



1:亮氨酸;2:乳酸;3:苏氨酸;4:醋酸盐;5:丁酸盐;6:丙酸盐;7:丙酮;8:乙酰乙酸盐;9:甘氨酸;10:缬氨酸;11:肌氨酸;  
12:胍基乙酸盐;13:丙氨酸;14:甜菜碱;15:天冬氨酸。

图5 不同组别的代表性<sup>1</sup>H-NMR光谱图

| 表1 BSS大鼠粪便差异代谢物特征表 |      |       |                               |             |         |                                                      |
|--------------------|------|-------|-------------------------------|-------------|---------|------------------------------------------------------|
| 序号                 | VIP  | 代谢物名称 | 位移                            | HMDB ID     | KEGG ID | 代谢通路                                                 |
| 1                  | 0.96 | 亮氨酸   | 0.954、0.943、1.700、1.731、3.726 | HMDB0000687 | C00123  | 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成                                    |
| 2                  | 1.35 | 乳酸    | 1.319、4.109                   | HMDB0000190 | C00186  | 丙酮酸代谢;糖酵解/糖异生                                        |
| 3                  | 1.35 | 苏氨酸   | 1.319、3.578、4.243             | HMDB0000167 | C00188  | 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成                      |
| 4                  | 1.36 | 醋酸盐   | 1.909                         | HMDB0000042 | C00033  | 丙酮酸代谢;糖酵解/糖异生;乙醛酸和二羧酸代谢                              |
| 5                  | 1.36 | 丁酸盐   | 0.882、1.564、2.147             | HMDB0000039 | C00246  | 丁酸代谢                                                 |
| 6                  | 1.93 | 丙酸盐   | 1.044、2.172                   | HMDB0000237 | C00163  | 丙酸代谢                                                 |
| 7                  | 2.15 | 丙酮    | 2.235                         | HMDB0001659 | C00207  | —                                                    |
| 8                  | 2.17 | 乙酰乙酸盐 | 2.269、3.439                   | HMDB0000060 | C00164  | 丁酸代谢;酪氨酸代谢                                           |
| 9                  | 3.22 | 甘氨酸   | 3.552                         | HMDB0000123 | C00037  | 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;乙醛酸和二羧酸代谢;脂质酸代谢;谷胱甘肽代谢;卟啉代谢;初级胆汁酸生物合成  |
| 10                 | 3.25 | 缬氨酸   | 0.978、1.029、2.261、3.603       | HMDB0000883 | C00183  | 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成;泛酸盐和 CoA 的生物合成                     |
| 11                 | 3.32 | 肌氨酸   | 2.720、3.606                   | HMDB0000271 | C00213  | 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢                                        |
| 12                 | 3.34 | 胍基乙酸盐 | 3.781                         | HMDB0000128 | C00581  | 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;精氨酸和脯氨酸代谢                              |
| 13                 | 3.43 | 丙氨酸   | 1.469、3.775                   | HMDB0000161 | C00041  | 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢;硒化合物代谢                                |
| 14                 | 3.46 | 甜菜碱   | 3.235、3.887                   | HMDB0000043 | C00719  | 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢                                        |
| 15                 | 3.50 | 天冬氨酸  | 2.674、2.802、3.891             | HMDB0000191 | C00049  | 泛酸和 CoA 生物合成丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢精氨酸生物合成烟酸和烟酰胺代谢组氨酸代谢—丙氨酸代谢 |

| 表2 大鼠粪便中差异代谢物的相对含量   |     |                          |            |                         |
|----------------------|-----|--------------------------|------------|-------------------------|
| $\bar{x} \pm s, n=6$ |     |                          |            |                         |
| 序号                   | 代谢物 | DGK-GZK 组                | 空白组        | 模型组                     |
| 1                    | 醋酸盐 | 53.97±10.88 <sup>#</sup> | 54.32±7.23 | 37.51±3.98 <sup>*</sup> |
| 2                    | 丙氨酸 | 16.82±5.26 <sup>#</sup>  | 17.15±3.92 | 10.35±0.94 <sup>*</sup> |
| 3                    | 甜菜碱 | 1.89±0.16 <sup>#</sup>   | 2.23±0.16  | 1.35±0.30 <sup>*</sup>  |
| 4                    | 丁酸盐 | 9.19±3.29 <sup>#</sup>   | 10.53±3.34 | 4.80±0.46 <sup>*</sup>  |
| 5                    | 亮氨酸 | 20.66±7.35 <sup>#</sup>  | 20.53±4.35 | 12.82±0.79 <sup>*</sup> |
| 6                    | 丙酸盐 | 10.88±3.69 <sup>#</sup>  | 12.54±2.42 | 6.55±0.44 <sup>*</sup>  |
| 7                    | 苏氨酸 | 3.38±0.35 <sup>#</sup>   | 3.65±0.65  | 2.06±0.53 <sup>*</sup>  |

与空白组比较,<sup>\*</sup>*P*<0.05;与模型组比较,<sup>#</sup>*P*<0.05。

**2.2.3 代谢通路的富集** 为了明确 DGK-GZK 生物标志物相关的代谢通路,通过 **metaboanalyst**(<https://www.metaboanalyst.ca/>)在线网站进行代谢通路分析,通路映射结果见图6。横坐标为通路重要性,一般认为重要性>0.1的通路 与代谢物密切相关,分析发现甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢对 BSS 大鼠粪便代谢的影响最大(重要性=0.433 08),涉及的代谢通路包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,丁酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢重要性分别为 0.223 56、0.111 11、0.105 82,见表3。

表3 代谢通路信息表

| 序号 | 代谢通路名称           | <i>P</i>  | $-\log(P)$ | 重要性      |
|----|------------------|-----------|------------|----------|
| 1  | 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢    | 7.65E-06  | 5.116 6    | 0.433 08 |
| 2  | 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢   | 0.027 747 | 1.556 8    | 0.223 56 |
| 3  | 丁酸代谢             | 0.008 279 | 2.082 0    | 0.111 11 |
| 4  | 乙醛酸和二羧酸代谢        | 0.035 619 | 1.448 3    | 0.105 82 |
| 5  | 谷胱甘肽代谢           | 0.236 830 | 0.625 6    | 0.088 73 |
| 6  | 丙酮酸代谢            | 0.019 089 | 1.719 2    | 0.079 51 |
| 7  | 戊糖和葡萄糖醛酸相互转化     | 0.167 130 | 0.777 0    | 0.072 29 |
| 8  | 精氨酸和脯氨酸代谢        | 0.294 190 | 0.531 4    | 0.046 51 |
| 9  | 糖酵解/糖异生          | 0.024 120 | 1.617 6    | 0.028 31 |
| 10 | 初级胆汁酸生物合成        | 0.360 220 | 0.443 4    | 0.007 58 |
| 11 | 硫辛酸代谢            | 0.236 830 | 0.625 6    | 0.001 70 |
| 12 | 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成 | 3.81E-05  | 4.419 1    | 0.000 00 |
| 13 | 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解   | 0.005 591 | 2.252 5    | 0.000 00 |
| 14 | 泛酸和 CoA 生物合成     | 0.014 574 | 1.836 4    | 0.000 00 |
| 15 | 精氨酸生物合成          | 0.125 870 | 0.900 1    | 0.000 00 |
| 16 | 烟酸和烟酰胺代谢         | 0.134 270 | 0.872 0    | 0.000 00 |
| 17 | 组氨酸代谢            | 0.142 600 | 0.845 9    | 0.000 00 |
| 18 | 硒化合物代谢           | 0.175 150 | 0.756 6    | 0.000 00 |
| 19 | $\beta$ -丙氨酸代谢   | 0.183 110 | 0.737 3    | 0.000 00 |
| 20 | 丙酸代谢             | 0.191 000 | 0.719 0    | 0.000 00 |
| 21 | 卟啉代谢             | 0.258 830 | 0.587 0    | 0.000 00 |
| 22 | 酪氨酸代谢            | 0.334 530 | 0.475 6    | 0.000 00 |

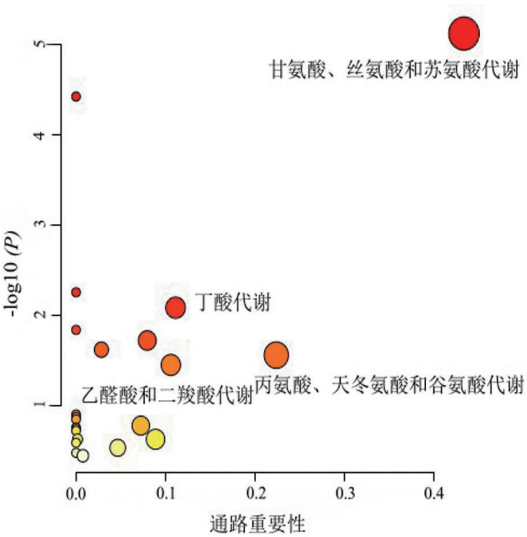


图6 代谢通路富集分析

3 讨论

BSS 是一种中医常见的慢性全身病症,其主要是经络受到寒邪影响,导致血液循环不畅和血液淤积<sup>[11]</sup>。本实验通过冰水浴法构建 BSS 大鼠模型,研

究 DGK-GZK 对 BSS 的治疗效果。冰水浴法是目前 BSS 大鼠模型最常用的造模方法,其具有普适性好、无特定疾病限制等优点<sup>[12]</sup>。在冰水中浸泡后,模型组大鼠均出现喜扎堆、畏寒蜷缩、形体消瘦等症状,与文献<sup>[7]</sup>描述的一致。WBV 代表着血液流动速率的高低,因此它的测量能够揭示血管的功能状况<sup>[13]</sup>。从血液流变学和大鼠体重的数据来看,模型组大鼠 WBV 数值远超于空白组,与研究报道<sup>[9,14]</sup>相符。说明使用 DGK-GZK 能有效地减缓 BSS 大鼠的血液流变学情况,并且有助于大鼠恢复正常的体重以达到治疗 BSS。

通过代谢组学的方法,可以探索生物体在受到外部刺激后产生的代谢异常,从而解释其应对刺激的机制<sup>[15]</sup>。本研究运用了 <sup>1</sup>H-NMR 代谢组学技术来探讨 DGK-GZK 治疗对大鼠 BSS 的作用机制。多元统计分析和代谢通路映射结果显示,空白组、模型组和 DGK-GZK 组的代谢特征有明显差异。PLS-DA 得分图表明给药组的代谢特征与模型组有所区

分,并向空白组靠拢,提示通过给药可在一定程度上改善BSS引起的代谢紊乱。研究结果显示,DGK-GZK组有7个差异代谢物的相对含量与模型组比较差异具有统计学意义,呈现回调趋势。此外,发现了4个重要的代谢通路,包括甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,丁酸代谢以及乙醛酸和二羧酸代谢途径。苏氨酸可以进入到分解代谢途径,代谢为甘氨酸、乙酰辅酶A、丙酮酸等多种重要的产物,这些产物在宿主代谢中起着至关重要的作用<sup>[16]</sup>。甜菜碱可通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路、NLRP3炎症小体激活、恢复能量代谢等发挥抗炎作用<sup>[17]</sup>。苏氨酸、甜菜碱均参与甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢。本研究发现,BSS大鼠粪便中苏氨酸、甜菜碱等生物标志物含量显著下降,给药后大鼠粪便中生物标志物含量均显著回升,提示可通过调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路达到治疗BSS的功效。醋酸盐参与乙醛酸和二羧酸代谢,也是一种柠檬酸循环的分支,主要通过柠檬酸循环关键酶活性的影响,而使各种反应物和产物在柠檬酸循环中产生异常水平<sup>[18-19]</sup>。与相关文献<sup>[20]</sup>报道一致,大鼠经过造模后,柠檬酸水平出现了明显下降,并且在DGK-GZK治疗后,柠檬酸水平得到回调。丁酸盐可以作为宿主的能量代谢底物,脂肪酸氧化使丁酸代谢成CO<sub>2</sub>或乙酰辅酶A,从而合成脂质和葡萄糖<sup>[21]</sup>,参与三羧酸循环,氧化分解产生ATP。因此丁酸盐代谢通路是三羧酸循环的一个支路,通过氧化代谢丁酸盐生成能量和产生重要的代谢中间产物。三羧酸循环是生物能量来源和氧化还原稳态的重要途径<sup>[22-24]</sup>。在BSS发展中,三羧酸循环持续紊乱,可能导致炎症、免疫功能受损等<sup>[7]</sup>。表明DGK-GZK可调节三羧酸循环,并能够起到抗炎、调控免疫以及增强能量储备等治疗BSS的效果。

综上,BSS是一个动态而缓慢的发展过程,DGK-GZK可通过回调不同代谢物而改善BSS。本研究为深入探讨DGK-GZK治疗BSS提供了理论支持。

## 参考文献:

- [1] 黄慧敏.当归四逆汤干预寒凝血瘀证动态调控机制及药效物质基础研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2021.
- [2] 王迪,成秀梅,方惠敏,等. 中医药治疗妇科寒凝血瘀证的研究概况与进展[J]. 河北中医药学报, 2020, 35(1): 60-64.
- [3] 潘扬,周留勇,尤建良. 尤建良治疗大肠癌便血经验及验案两则[J]. 中国民间疗法, 2023, 31(8):45-48.
- [4] HUA Y L, YAO W L, JI P, et al. Integrated metabon-omic-proteomic studies on blood enrichment effects of *Angelica sinensis* on a blood deficiency mice model[J]. *Pharmaceutical biology*, 2017, 55(1):853-863.
- [5] 朱华,秦丽,杜沛霖,等. 桂枝药理活性及其临床应用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(22):61-65.
- [6] 许源,宿树兰,王团结,等. 桂枝的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(4):674-678.
- [7] 覃银艳,农运园,冯琳琳,等. 基于动态尿液代谢组学探讨当归-桂枝干预寒凝血瘀证的作用机制[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(2):260-269.
- [8] HUANG H M, WU J X, LU R G, et al. Dynamic urinary metabolomics analysis based on UHPLC- Q- TOF/MS to investigate the potential biomarkers of blood stasis syndrome and the effects of Danggui Sini decoction[J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2020, 179: 112986.
- [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] LIU X W, TANG C L, ZHENG H, et al. Investigation of the hepatoprotective effect of *Corydalis saxicola* Bunting on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by tin <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics and network pharmacology approaches[J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2018, 159: 252-261.
- [11] 廖利,赵兴桃,王成,等. 血瘀证模型研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(12): 7256-7260.
- [12] 宋晓丹,成秀梅,周湘,等. 寒凝血瘀证动物模型研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 267-274.
- [13] 赖满筱. 基于功效的降香及其替代药材对气滞血瘀证心肌缺血大鼠的药效比较研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [14] 杨延泽,邓毅,杨秀娟,等. 当归不同配伍对急性血瘀大鼠血液流变学、凝血功能及心、肺病理影响[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(6): 125-129.
- [15] 吕燕慧,谢磊,陈威,等. 代谢组学在中医证候中的应用进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2):367.
- [16] 张思聪,张艳蕾,李福昌. 苏氨酸的代谢及其营养生理作用[J]. 饲料研究, 2012(7): 14-16.

- [17] ZHAO G F, HE F, WU C L, et al. Betaine in inflammation: mechanistic aspects and applications[J]. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 1070.
- [18] MURPHY M P. How mitochondria produce reactive oxygen species[J]. *Biochemical journal*, 2009, 417(1): 1-13.
- [19] 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.
- [20] 冯琳琳, 唐思琪, 农运园, 等. 基于代谢组学和网络药理学的当归四逆汤改善寒凝血瘀致肾损伤作用机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(24): 6730-6739.
- [21] 徐境含. 基于肠道微生态探究三氯蔗糖致小鼠2型糖尿病的可能[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- [22] KIM S, HWANG J, XUAN J H, et al. Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis[J]. *PLoS one*, 2014, 9(6): e97501.
- [23] KANG W, SUZUKI M, SAITO T, et al. Emerging role of TCA cycle-related enzymes in human diseases[J]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(23): 13057.
- [24] RYAN D G, YANG M, PRAG H A, et al. Disruption of the TCA cycle reveals an ATF4-dependent integration of redox and amino acid metabolism[J]. *eLife*, 2021, 10: e72593.

本文引用格式:

余纪蔚, 冯琳琳, 王倩怡, 等. 基于粪便代谢组学探讨当归—桂枝配方颗粒干预寒凝血瘀证的作用机制[J]. *广西医科大学学报*, 2025, 42(1): 47-55. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.007

YU J W, FENG L L, WANG Q Y, et al. Study on the mechanism of Danggui-Guizhi formula granules in the intervention of cold coagulation and blood stasis syndrome based on fecal metabolomics [J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2025, 42(1): 47-55. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.007