

基于药效学和代谢组学研究当归补血汤不同提取物对溶血性贫血大鼠的作用

樊秦^{1,2,3}, 王雅琼¹, 赵彩霞¹,

张志瑞¹, 张宏美¹, 宋冰^{1*}, 阎教科⁴, 戚欢阳⁵

¹甘肃中医药大学; ²甘肃中医药大学甘肃省中医药研究中心; ³敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000; ⁴兰州美尔康生物科技有限公司, 兰州 7300002; ⁵厦门市健康医疗大数据中心(厦门市医药研究所)厦门市天然药物研究与开发重点实验室, 厦门 361008

摘要: 运用动物模型和血浆代谢组学, 探讨当归补血汤抗溶血性贫血作用的有效部位及其分子机制。将雄性 Wistar 大鼠 56 只随机分为 7 组, 即为正常对照组 (normal control group, NC)、模型组 (model group, MOD)、阳性对照组 (positive control group, PC)、4 个当归补血汤提取物给药组: 水提取物组 (water extract group, WE)、70%醇提取物组 (70% alcohol extract group, AE)、水提醇沉上清提取物组 (water extraction and alcohol precipitation supernatant extract group, WASE) 和水提醇沉组 (water extraction and alcohol precipitation group, WEAP)。模型组和各给药组皮下注射 2% 乙酰苯肼 (acetylphenylhydrazine, APH) 建立溶血性贫血模型, 通过测定血常规指标和促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 含量评价不同给药组抗溶血性贫血效果; 采用气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 技术结合多元统计分析鉴定代谢物, 比较分析各给药组代谢轮廓及差异生物标志物, 并构建其代谢通路; 采用试剂盒测定各组大鼠血清中与氧化应激、炎症因子和造血调控相关因子的水平, 对代谢通路的生物学功能进行验证。通过比较分析血常规指标和 EPO 含量, 证明模型制备成功, 综合评价表明 WASE 组抗溶血性贫血效果最好。代谢组学结果显示模型组与正常对照组代谢轮廓明显分离, WASE 组代谢轮廓更趋向于正常对照组代谢轮廓。与正常对照组相比, 溶血性贫血大鼠模型中涉及能量、氨基酸、糖和脂肪酸代谢有关的 6 条代谢通路受到影响, 而 WASE 组可调节此 6 条代谢通路。与模型组比较, 除 PC 组外, 其余各给药组均能显著性降低血清中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) 和白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 含量 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 显著升高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) 和还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 并且 WASE 组大鼠血清中 MDA ($P < 0.01$) 和 TNF- α 含量较其他给药组均显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。由上可知 WASE 组治疗溶血性贫血效果最好, 主要通过影响 6 条代谢通路调节机体能量代谢、抗氧化、抗炎和造血细胞功能作用, 改善溶血性贫血模型大鼠代谢紊乱, 达到治疗溶血性贫血的作用。

关键词: 当归补血汤提取物; 溶血性贫血; 代谢通路; 分子机制

中图分类号: R285 文献标识码: A

Effects of different extracts of Danggui Buxue Decoction on hemolytic anemia rats based on pharmacodynamics and metabolomics

FAN Qin^{1,2,3}, WANG Ya-qiong¹, ZHAO Cai-xia¹, ZHANG Zhi-rui¹, ZHANG Hong-mei¹, SONG Bing^{1*}, YAN Jiao-ke⁴, QI Huan-yang⁵

¹Gansu University of Chinese Medicine; ²Research Center of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine; ³Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China; ⁴Lanzhou Meierkang Biotechnology Co.,

Ltd., Lanzhou 730000, China; ⁵Xiamen Health and Medical Big Data Center (Xiamen Medicine Research Institute), Xiamen Key Laboratory of Natural Medicine Research and Development, Xiamen 361008, China

Abstract: The effective parts and molecular mechanism of Danggui Buxue decoction in anti-hemolytic anemia were studied with animal model and plasma metabolomics. Fifty-six male wistar rats were randomly divided into seven groups: normal control group (NC), model group (MOD), positive control group (PC), and four Danggui Buxue decoction extract administration group, including water extract group (WE), 70% alcohol extract group (AE), water extraction and alcohol precipitation supernatant extract group (WASE) and water extraction and alcohol precipitation group (WEAP). The model group and each treatment group were subcutaneously injected with 2% acetylphenylhydrazine (APH) to establish a hemolytic anemia model. The anti-hemolytic anemia effect of treatment group was evaluated by measuring blood routine indexes and erythropoietin (EPO) content. The significant different metabolites between groups were identified by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) combined with multivariate statistical analysis, and their metabolic pathways were constructed. The levels of factors related to oxidative stress, inflammatory factors and hematopoietic regulation in serum of rats in each group were measured with kits. The comprehensive evaluation of pharmacodynamics showed that WASE group had the best anti-hemolytic anemia effect. Compared with the K group, 6 metabolic pathways related to the metabolism of energy, amino acid, sugar and fatty acid were affected in the hemolytic anemia rat model, and these 6 metabolic pathways could be regulated in the WASE group. Compared with model group, except group PC, in the serum of other administration groups, the content of malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-2 (IL-2) were all significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and the levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were all significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). However, the content of MDA ($P < 0.01$) and TNF- α ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) in serum of WASE group were significantly lower than those of other groups. All these showed that WASE group has the best effect for hemolytic anemia, which mainly regulated the body's energy metabolism, antioxidant, anti-inflammatory and hematopoietic cell function by affecting six metabolic pathways, and improved the metabolic disorders of hemolytic anemia model rats, so as to treat hemolytic anemia.

Key words: extracts of danggui buxue decoction; hemolytic anemia; metabolic pathway; molecular mechanism

溶血性贫血是由于红细胞破坏速率增加，超过骨髓造血的代偿能力而发生的。化学药物虽然对溶血性贫血有较好治疗效果，但长期使用会引起抑制骨骼生长发育、降低抵抗力和造成代谢紊乱等。中药在治疗溶血性贫血方面具有疗效好、毒副作用小的特点^[1]。因此研究中医药对此类疾病的治疗作用及其机制具有广泛的应用前景。

中医理论认为，溶血性贫血的发病机制是由于脾胃虚弱，运化无力，气血不足所致。经典名方当归补血汤最早记载于《内外伤辨惑论》，为金代医家李东垣所写，组成剂量为黄芪（一两）、当归（酒洗，二钱），水煎服，方中君药黄芪补气健脾，臣药当归补血活血，两药配伍，益气补血，气血双补，主治为劳倦内伤、气弱血虚，面赤肌热、烦渴欲饮和产后虚弱^[2]。现代药理学研究表明，当归补血汤可用来治疗和改善各种贫血包括肾性贫血、缺铁性贫血、妊娠贫血、溶血性贫血等各种原因引起的贫血^[3]，但由于当归补血汤中化学成分复杂，有效部位不明确，致使制备工艺控制指标不确定，影响其质量及疗效，限制其在中医药领域中的应用和发展，因此对当归补血汤治疗溶血性贫血的药效物质基础及其抗溶血性贫血的整体综合治疗机制进行进一步研究十分必要。

代谢组学利用高通量数据库可系统揭示与生理、病理相关的内源性代谢谱的变化，挖掘潜在生物标志物及可能代谢通路，识别和量化疾病代谢机制，此方法已成为现代探索和治疗疾病的又一个关键突破点。同时组学研究以整体生物系统为研究对象与中医药整体调节治疗观念相符，在中医药学等相关研究领域广泛应用^[4]。在代谢组学研究中，气相色谱-质谱联用仪（gas chromatography-mass spectrometer, GC-

MS) 是一种进行非靶向代谢组研究的常规技术, 具有分离性好、灵敏度高、可定性和定量的特点, 近年来被广泛应用于中医药研究中^[5]。

本研究运用药效学和基于 GC-MS 技术的代谢组学方法, 阐明当归补血汤治疗溶血性贫血的有效部位、作用特点及其影响的代谢通路, 为当归补血汤药效物质基础研究, 提高其质量和治疗效果, 指导临床合理应用, 开发新药, 促进中药标准化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

XS-900i 血细胞分析仪 (日本 Sysmex 公司); Agilent 5975C-7890A 型 GC-MS (美国 Agilent 公司); BIO-RAD 全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司); FDU-2110 冷冻干燥机 (日本东京理化器械株式会社); MG-2200 型氮气吹干仪 (日本东京理化器械株式会社)。

1.2 试剂

乙酰苯肼 (acetylphenylhydrazine, APH) (批号: DF290118, 萨恩化学技术 (上海) 有限公司); 二十二烷 (批号: CHB190222, 成都克洛玛生物科技有限公司); *N*-甲基-*N*-三甲基硅烷基-三氟乙酰胺 (*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, MSTFA) (批号: LK30T55)、*O*-甲基羟胺盐酸盐 (*O*-methylhydroxylamine hydrochloride, MOA) (批号: LD30P35) 均购自北京百灵威科技有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒均购自江苏菲亚生物科技有限公司; 驴胶补血颗粒 (规格: 20 g/袋, 批号: 202212030, 九芝堂股份有限公司)。

当归和黄芪饮片均购自甘肃弘润药业有限公司, 经甘肃中医药大学李成义教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 干燥根的切制饮片和豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *Mongholicus* (Bge.) Hsiao 干燥根的切制饮片, 所有饮片均符合《中华人民共和国药典》2020 年版品种规定。

1.3 试验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 56 只, 雄性, 体质量 250~300 g, 购自甘肃中医药大学动物中心, 实验动物使用许可证号: SYXK (甘) 2015-0005, 实验动物质量合格证许可证号: SCXK (甘) 2015-002 本实验方案符合甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审查批准要求, 伦理审查批准号: 2019-218。

1.4 当归补血汤提取物制备

当归和黄芪饮片 (1:5), 分别加纯化水 10 倍量和 8 倍量回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并两次滤液浓缩冷冻干燥, 得到当归补血汤水提物组 (water extract group, WE); 提取溶剂为 70%乙醇, 其余按上述操作, 得到当归补血汤 70%醇提物组 (70% alcohol extract group, AE); 按 WE 方法将水提液中加入乙醇使含醇量达到 70%, 静置 24 h, 抽滤得沉淀, 烘干, 得当归补血汤水提醇沉组 (water extraction and

alcohol precipitation group, WEAP), 上清液抽滤液减压浓缩, 冷冻干燥, 得当归补血汤水提醇沉上清提取物组 (water extraction and alcohol precipitation supernatant extract group, WASE)。4 种提取物主要有效成分含量见表 1。

表 1 4 种提取物主要有效成分含量 ($x \pm s, n = 3$)

Table 1 The content of main active components of 4 extracts ($x \pm s, n = 3$)

提取物 Exact	含量 Content (mg/g)						
	绿原酸 Chlorogenic acid	阿魏酸 Ferulic acid	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 Calycosin-7-O- β -D-glucoside	洋川芎内酯 I Senkyunolide I	洋川芎内酯 H Senkyunolide H	芒柄花苷 Ononin	美迪紫檀素 Medicarpin
WE	0.037 \pm 0.00	0.164 \pm 0.00	0.574 \pm 0.01	0.157 \pm 0.01	0.014 \pm 0.00	0.228 \pm 0.01	0.027 \pm 0.00
AE	0.058 \pm 0.00	0.258 \pm 0.00	0.620 \pm 0.02	0.430 \pm 0.01	0.017 \pm 0.00	0.300 \pm 0.01	0.054 \pm 0.00
WEAP	0.039 \pm 0.00	0.240 \pm 0.00	0.969 \pm 0.02	0.197 \pm 0.01	0.021 \pm 0.00	0.423 \pm 0.01	0.015 \pm 0.00
WASE	0.037 \pm 0.00	0.031 \pm 0.00	0.059 \pm 0.00	0.022 \pm 0.00	0.004 \pm 0.00	0.017 \pm 0.00	0.007 \pm 0.00

1.5 分组、造模和给药

雄性 Wistar 大鼠 56 只每组 8 只, 模型组 (model group, MOD) 和各给药组均于实验第 1 d 和第 4 d 分别皮下注射 2% APH 100 mg/kg 和 50 mg/kg, 正常对照组 (normal control group, NC) 注射等体积的生理盐水。用 0.9% 生理盐水配制驴胶补血颗粒得阳性对照组 (lvjiao buxue granule, positive control group, PC)。造模第 4 d 后, PC 组灌胃给药 3.6 g/kg^[6], 和 WE、AE、WASE 和 WEAP 组每组均给予 36 g/kg, 正常对照组和模型组分别灌胃等体积生理盐水, 连续 12 d。

1.6 药效指标测定

末次给药 24 h 后, 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血置采血管中, 用血细胞分析仪检测各组大鼠外周血中红细胞数 (red blood cell, RBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB)、血小板计数 (platelets, PLT)、红细胞压积 (hematokrit, HCT) 和平均血红蛋白浓度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 含量。严格根据 ELISA 试剂盒操作说明测定 EPO、IL-6、TNF- α 和 IL-2 含量, 按照氧化抗氧化试剂盒操作说明测定 MDA、GSH 和 SOD 含量。血浆分装保存在 -80 °C 冰箱, 用于 GC-MS 的测定。

1.7 样品处理及 GC-MS 测定条件

取各组大鼠 100 μ L 血浆加入 75% 乙腈 450 μ L 涡旋 30 s, 12 000 r/min, 4 °C, 离心 10 min, 取样品上清液于 1.5 mL 离心管中, 氮气吹干, 加入 20 mg/mL 的 MOA 吡啶溶液 50 μ L, 在 25 °C 条件下脲化 24 h, 再加入 MSTFA 100 μ L, 60 °C 衍生化 2 h, 之后加内标二十二烷 (0.5 mg/mL) 50 μ L, 涡旋 30 s 后, 12 000 r/min, 4 °C, 离心 10 min, 取上清液进行 GC-MS 测定。色谱检测条件: 色谱柱为 Agilent HP-5MS 石英毛细管柱 (0.25 mm \times 30 m, 0.25 μ m), 进样量: 1 μ L。载气: 高纯氦气。离子源温度为 230 °C, 进样口温度为 280 °C, 辅助加热区温度为 280 °C。初始柱温 70 °C, 保持 4 min, 以 8 °C/min 的速率升高到

125 °C，然后以 6 °C/min 的速率升高到 200 °C，再以 4 °C/min 的速率升高到 300 °C，保持 5 min。隔膜吹扫流速为 3 mL/min。质谱电离电压：70 eV，扫描方式：全扫描， m/z 35~800。溶剂延迟 5 min。

在血浆样品处理过程中，同时制备质量控制（quality control, QC）样品，按照与样品制备相同的程序取等量的每个血浆样品混合来制备 QC 样品，在序列分析开始及每测定 8 个样品时测定 1 个 QC 样品。

1.8 抗溶血性贫血生物标志物鉴定

采用 NIST 17 数据库对大鼠内源性代谢产物进行识别和鉴定，筛选出匹配度 $\geq 80\%$ 的代谢物^[7]，同时对比相关文献和应用 Human Metabolome Database 进一步鉴定代谢物。经过鉴定经峰对齐和归一化处理，将鉴定代谢物的原始峰数据输入 SIMAC 14.1 软件进行正交偏最小二乘判别（orthogonal partial least squares - discriminant analysis, OPLS-DA）分析，根据 OPLS-DA 模型得到各代谢物变量重要性投影（variable importance projection, VIP）值，若代谢物 VIP 值 > 1 ，并且 t 检验 $P < 0.05$ 则为显著性差异代谢物^[8]。将显著性差异代谢物输入 MetaboAnalyst 5.0 数据平台进行代谢通路富集分析，通路 Impact 值 > 0.1 且 $P < 0.05$ 为关键代谢通路。

1.9 统计方法

数据用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析和 t 检验。通过 SPSSAU 数据科学分析平台对当归补血汤不同提取物各组血常规指标和 EPO 含量进行熵权-TOPSIS 模型分析，对各组药效进行综合评价。

2 结果与分析

2.1 当归补血汤不同提取物对溶血性贫血大鼠模型的影响

与正常对照组比较，模型组大鼠血浆中 HGB ($P < 0.01$)、RBC ($P < 0.01$)、HCT ($P < 0.05$)、PLT ($P < 0.01$)、MCHC ($P < 0.01$) 和 EPO 水平均显著降低 ($P < 0.05$)，表明乙酰苯肼皮下注射可使大鼠出现溶血性贫血状态，模型复制成功^[9]。与模型组比较，各给药组大鼠 HGB ($P < 0.01$)、RBC ($P < 0.01$)、HCT ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、PLT ($P < 0.01$)、MCHC ($P < 0.01$) 和 EPO ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 水平均显著升高，表明各给药组对溶血性贫血均有治疗作用，结果见表 2。

表 2 给药组对溶血性贫血大鼠模型血常规指标和红细胞生成素的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 2 Effects of drug administration group on blood routine indexes and erythropoietin in hemolytic anemia rat model ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	HGB (g/L)	RBC ($\times 10^{12}$ 个/L)	HCT (%)	PLT ($\times 10^9$ 个/L)	MCHC (pg/L)	EPO (ng/L)
NC	-	154.00 \pm 6.78**	8.04 \pm 0.39**	48.26 \pm 1.55*	845.38 \pm 64.06**	331.21 \pm 11.78**	34.33 \pm 4.32*
MOD	-	136.50 \pm 10.13##	5.49 \pm 0.44##	45.02 \pm 2.47#	594.00 \pm 42.09##	287.25 \pm 15.33##	24.72 \pm 2.83#
PC	3.6	158.50 \pm 3.42**	6.63 \pm 0.37**	49.94 \pm 3.35**	828.00 \pm 109.52**	326.00 \pm 5.55**	37.76 \pm 7.69**
WE	36	153.38 \pm 4.07**	6.27 \pm 0.39**	50.34 \pm 3.22**	828.88 \pm 96.72**	311.75 \pm 10.10**	52.11 \pm 11.92**

AE	36	158.50 ± 5.66**	6.39 ± 0.46**	51.66 ± 3.07**	821.13 ± 95.46**	312.38 ± 10.74**	42.48 ± 7.29**
WEAP	36	154.38 ± 5.28**	6.51 ± 0.45**	48.18 ± 1.70*	873.38 ± 78.87**	318.75 ± 9.54**	52.33 ± 13.68**
WASE	36	159.38 ± 3.29**	6.25 ± 0.19**	48.14 ± 1.62**	709.13 ± 47.38**	328.25 ± 3.37**	33.42 ± 3.81*

注：与 NC 组比较，[#]*P* < 0.05，^{##}*P* < 0.01；与 MOD 组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01。Note: Compared with NC group, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; Compared with MOD group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

2.2 熵权-TOPSIS 模型分析不同给药组综合药效

基于给药组药效学血常规指标和 EPO 含量，利用 SPSSAU 数据科学分析平台进行熵权-TOPSIS 模型分析，所获得的权重系数结果如表 3 所示，在此基础上，利用熵权法加权生成的数据进行 TOPSIS 分析，得到各给药组与最优方案的距离（the distance of the optimal solution, D^+ ）、与最劣方案的距离（the distance of the worst solution, D^- ）及最优解的欧氏贴近度（euclidean closeness of optimal solution, C_i ）（表 3）。 D^+ 越小、 D^- 越大、 C_i 越大，则被评价疗效越优。由表 4 可知，不同给药组对药效学指标的综合影响由大到小的顺序为 WASE > WE > AE > PC > WEAP。

表 3 熵值法计算权重系数结果

Table 3 Results of weight calculation by entropy method

指标 Index	信息熵值 e Information entropy value e	信息效用值 d Information utility value d	权重系数 w Weight coefficient w
EPO	0.990 5	0.009 5	83.18%
HGB	0.999 9	0.000 1	0.67%
RBC	0.999 8	0.000 2	1.43%
HCT	0.999 8	0.000 2	2.00%
PLT	0.998 6	0.001 4	12.72%

表 4 TOPSIS 评价计算结果

Table 4 TOPSIS evaluation results

组别 Goup	D^+	D^-	C_i	排序结果 Sort result
WASE	0.077	26.157	0.997	1
WE	5.664	21.770	0.794	2
AE	10.551	16.121	0.604	3
PC	13.423	15.549	0.537	4
WEAP	26.157	0.040	0.002	5

2.3 多元统计变量分析

各组大鼠血浆样品中代谢物经 GC-MS 测定，共鉴定出 69 个化合物，各色谱峰能完全分离可以对代谢物进行鉴定分析（见图 1）。由 OPLS-DA 模型分析可见，MOD 组和 NC 对照组能完全分离，各给药组的代谢轮廓都有向 NC 组恢复的趋势，其趋势与综合药效评价结果基本一致，WASE 组更趋向于 NC 组（见图 2A、2B）。此外，QC 样本紧密聚类，表明 GC-MS 测定系统稳定，测定方法具有良好的重复性和

稳定性。OPLS-DA 得分图如图 2B 所示，模型组和正常对照组完全分离，表明两组之间血浆代谢物存在显著差异， $Q^2=0.883$ ，表明模型具有良好的解释和预测能力。对 OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验（见图 2C）， Q^2 和 R^2 分别为 0.582 和 0.901，所有 R^2 和 Q^2 值均低于右侧原始值，表明模型没有过度拟合。

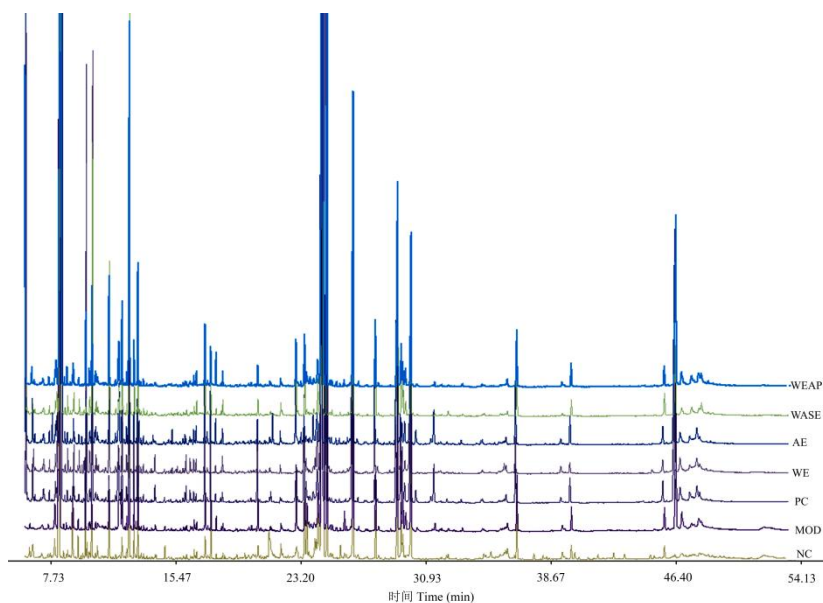


图 1 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram

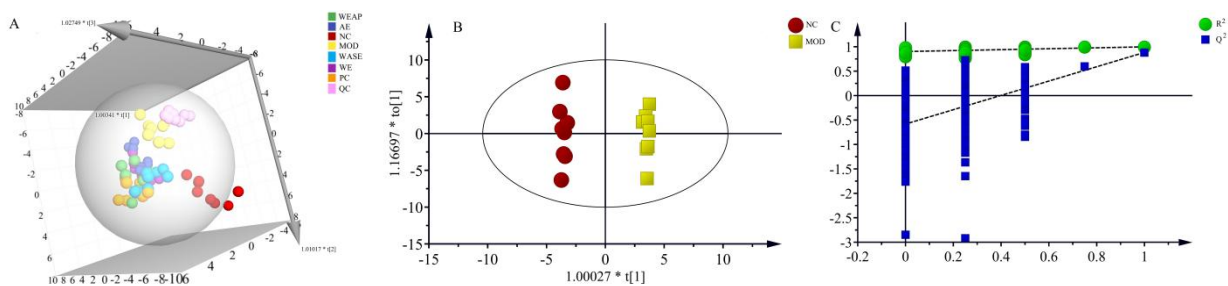


图 2 多元统计变量图

Fig. 2 Plot of multivariate statistical variables

注：A. 各组 OPLS-DA 3D 得分图；B. 正常对照组和模型组 OPLS-DA 得分图；C. 置换检验图。

Note: A. OPLS-DA 3D score chart of each group; B. OPLS-DA scores chart of normal control group and model group; C. Permutation test diagram.

2.4 溶血性贫血显著性差异代谢物的鉴定

根据 OPLS-DA 模型分析，依据代谢物 VIP 值 > 1 ， $P < 0.05$ 原则，MOD 组与 NC 组比较共筛选出 22 个显著性差异代谢物。其中 PC、WE、AE、WASE 和 WEAP 组能分别显著调节其中 13、14、17、15 和 14 个差异代谢物（见表 5）。

表 5 给药组对溶血性贫血大鼠显著性差异代谢物的影响

Table 5 Effect of drug administration group on significantly different metabolites in rats with hemolytic anemia

编号 No.	差异代谢物 Different metabolite	VIP 值 VIP value	P 值 P value	MOD/NC	PC /MOD	WE /MOD	AE /MOD	WASE /MOD	WEAP /MOD
M1	乳酸 Lactic acid	1.31	0.02	1.34 ↑*	1.31 ↑**	1.60 ↑**	1.53 ↑**	1.05 ↑	1.29 ↑*
M2	丝氨酸 Serine	1.55	0.00	1.64 ↑**	1.20 ↑*	1.37 ↑*	1.29 ↑*	1.20 ↑*	1.23 ↑*
M3	琥珀酸 Succinic acid	1.43	0.01	1.72 ↑**	0.85 ↓	1.07 ↑	1.51 ↑	0.75 ↓	0.94 ↓
M4	富马酸 Fumaric acid	1.57	0.00	0.68 ↓**	1.81 ↑**	2.19 ↑**	1.85 ↑**	1.46 ↑*	1.85 ↑**
M5	2,3-二羟基丁酸 2,3-Dihydroxybutyric acid	1.41	0.01	1.64 ↑**	0.71 ↓	1.11 ↑	0.95 ↓	0.73 ↓	0.81 ↓
M6	β-丙氨酸 β-Alanine	1.17	0.04	1.40 ↑*	1.06	1.22 ↑	1.69 ↑**	0.74 ↓*	1.35 ↑*
M7	苹果酸 Malic acid	1.23	0.03	1.42 ↑*	0.91 ↓	1.09 ↑	1.13 ↑	0.91 ↓	1.09 ↑
M8	1-甲基-4-氢氧基-1H-咪唑- 2-胺 1-Methyl-4-hydroxyl-1H- imidazole-2-amine	1.97	0.00	0.29 ↓**	1.83 ↑	1.13 ↑	0.96 ↓	2.90 ↑	2.80 ↑
M9	三羟基丁酸 Trihydroxybutyric acid	1.87	0.00	1.75 ↑**	0.84 ↓	0.72 ↓**	0.74 ↓*	0.95 ↓	0.88 ↓
M10	α-酮戊二酸 α-Ketoglutaric acid	2.13	0.00	2.23 ↑**	0.88 ↓	0.99 ↓*	1.00 ↑*	0.82 ↓	0.87 ↓
M11	阿拉伯呋喃糖 Arabinofuranose	1.26	0.03	0.45 ↓*	2.24 ↑**	1.17 ↑	1.91 ↑**	1.84 ↑**	1.93 ↑*
M12	木糖醇 Xylitol	1.71	0.00	0.54 ↓**	1.38 ↑**	1.43 ↑*	1.60 ↑**	1.25 ↑**	1.08 ↑
M13	甘油磷酸 Glycerophosphate	1.53	0.01	0.51 ↓**	1.15 ↑	1.64 ↑**	1.67 ↑**	1.75 ↑**	1.11 ↑
M14	柠檬酸 Citric acid	1.63	0.02	1.53 ↑*	0.54 ↓**	0.31 ↓**	0.34 ↓**	0.71 ↓**	0.71 ↓**
M15	肌醇 Inositol	1.64	0.00	1.30 ↑**	0.70 ↓	1.01 ↑	1.05 ↑	0.78 ↓**	0.88 ↓*
M16	硬脂酸 Stearic acid	1.75	0.00	1.22 ↑**	0.77 ↓**	0.99 ↓	0.90 ↓*	0.84 ↓*	0.85 ↓**
M17	花生四烯酸 Arachidonic acid	1.24	0.03	1.32 ↑*	0.63 ↓**	0.45 ↓*	0.54 ↓**	0.73 ↓**	0.55 ↓**
M18	2-棕榈酸单甘油酯 2-Palmitoic acid monoglyceride	1.40	0.01	1.33 ↑**	0.56 ↓**	0.68 ↓**	0.62 ↓**	0.53 ↓**	0.73 ↓**
M19	· 棕榈酸单甘油酯 Monoglyceride palmitate	1.72	0.00	1.40 ↑**	0.64 ↓**	0.56 ↓**	0.63 ↓**	0.81 ↓*	0.81 ↓**
M20	十八烷酸单甘油酯 Octadecanoic acid monoglyceride	1.66	0.00	1.79 ↑**	0.56 ↓**	0.63 ↓**	0.69 ↓**	0.51 ↓**	0.55 ↓**
M21	硬脂酸甘油酯 Stearin glyceride	1.72	0.00	1.59 ↑**	0.53 ↓**	0.40 ↓**	0.52 ↓**	0.76 ↓*	0.68 ↓**

注：↑表示水平上升；↓表示水平下降；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。Note: ↑ indicates that the level increases; ↓ indicates that the level decreases; * $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

2.5 显著性调节代谢通路分析

KEGG 通路分析结果表明，MOD 组主要显著性影响 6 条代谢通路：(a) β -丙氨酸代谢、(b) 花生四烯酸、(c) 三羧酸循环、(d) 甘氨酸，丝氨酸和苏氨酸代谢、(e) 戊糖和葡萄糖醛酸之间相互转化和 (f) 肌醇磷酸代（见图 3A）。WASE 组可调节上述 6 条代谢通路（见图 3E）；PC 组和 WE 组均可调节 4 条代谢通路：三羧酸循环、花生四烯酸、戊糖和葡萄糖醛酸之间的相互转化和甘氨酸，丝氨酸和苏氨酸代谢（见图 3B, 3C）；AE 和 WEAP（见图 3D, 3F）组均可调节三羧酸循环、花生四烯酸、甘氨酸，丝氨酸和苏氨酸代谢和 β -丙氨酸代谢，此外 AE 还可调节戊糖和葡萄糖醛酸之间的相互转化，WEAP 组可调节肌醇磷酸代谢。五个给药组可共同调节 3 条关键代谢通路：三羧酸循环代谢通路、花生四烯酸代谢和甘氨酸代谢通路，丝氨酸和苏氨酸代谢通路。

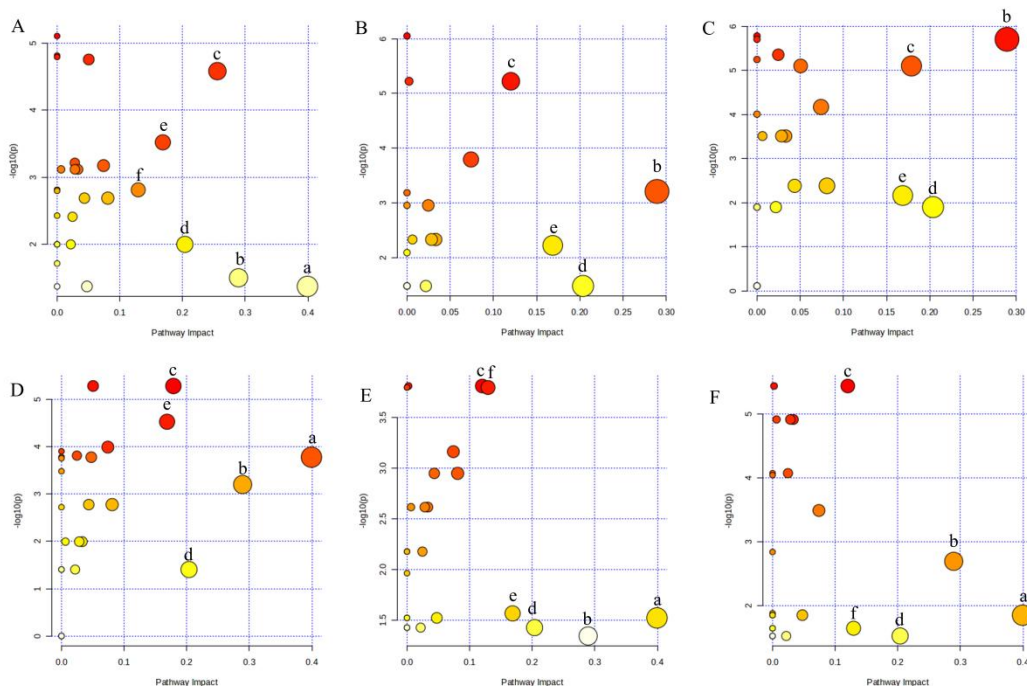


图 3 大鼠血浆代谢通路气泡图

Fig. 3 Bubble diagram of rat plasma metabolic pathway

注：A. MOD; B. PC; C. WE; D. AE; E. WASE; F. WEAP。

2.6 当归补血汤不同提取物对溶血性贫血大鼠氧化应激、炎症因子和造血调控因子指标的影响

如表 6 所示，与 NC 组比较，MOD 组大鼠血清中 MDA、IL-2、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$)，SOD 和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与 MOD 组比较，除 PC 组大鼠血清中 MDA、IL-6 和 TNF- α 含量无显著性差异外，其余各给药组均能显著性降低血清中 MDA、IL-2、IL-6 和 TNF- α 含量 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，显著升高 SOD 和 GSH 水平 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，并且 WASE 组大鼠血清中 MDA 和 TNF- α 含量较其他给药组均显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

表 6 给药组对溶血性贫血大鼠氧化应激、炎症因子及造血调控因子指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effect of drug administration group on oxidative stress, inflammatory factors and hematopoietic regulatory factor of hemolytic anemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)	GSH (μ mol/L)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-2 (ng/L)
MOD	-	32.99 \pm 2.09 ^{##}	107.94 \pm 5.23 ^{##}	15.28 \pm 2.51 ^{##}	543.70 \pm 37.33 ^{##}	292.42 \pm 41.25 ^{##}	901.75 \pm 154.05 ^{##}
NC	-	11.64 \pm 3.22 ^{**}	124.73 \pm 8.93	30.75 \pm 5.37	496.25 \pm 36.34	184.04 \pm 34.55	722.06 \pm 52.17
PC	3.6	30.53 \pm 4.14 ^{$\Delta\Delta$}	117.66 \pm 11.80 ^{$\Delta\Delta$}	29.25 \pm 9.10 ^{**}	516.10 \pm 26.55 ^{$\Delta\Delta$}	283.92 \pm 45.47 ^{$\Delta\Delta$}	749.28 \pm 101.06 [*]
AE	36	17.55 \pm 3.23 ^{**$\Delta\Delta$}	128.51 \pm 8.69 ^{**}	24.56 \pm 6.87 [*]	488.65 \pm 40.34 ^{**}	247.04 \pm 37.25 ^{$\Delta\Delta$}	707.35 \pm 145.90 ^{**}
WE	36	29.21 \pm 3.31 ^{**$\Delta\Delta$}	136.53 \pm 9.19 ^{**$\Delta\Delta$}	28.50 \pm 6.29 ^{**}	500.55 \pm 30.39 ^{$\Delta\Delta$}	243.09 \pm 27.92 ^{$\Delta\Delta$}	760.66 \pm 121.97 [*]
WEAP	36	15.60 \pm 2.67 ^{**$\Delta\Delta$}	120.46 \pm 5.99 ^{**}	22.41 \pm 7.68 [*]	447.92 \pm 13.75 ^{**}	242.14 \pm 30.32 ^{$\Delta\Delta$}	764.63 \pm 146.41 [*]
WASE	36	7.26 \pm 1.86 ^{**}	127.92 \pm 4.18 ^{**}	24.58 \pm 4.65 ^{**}	463.96 \pm 39.56 ^{**}	200.48 \pm 46.14 ^{**}	754.04 \pm 54.39 [*]

注：与 NC 组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与 MOD 组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与 WASE 组比较， ^{Δ} $P < 0.05$ ， ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with NC group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with MOD group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with WASE group, ^{Δ} $P < 0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$.

2.7 药效指标与代谢物、炎症因子、造血调控因子和氧化应激指标相关性分析

22 种差异性代谢物、TNF- α 、IL-6、IL-2、GSH、MDA 和 SOD 与各组药效学指标 RBC、HGB、PLT、HCT、MCHC 和 EPO 进行相关性分析，如图 4 所示，差异性化合物与药效学指标都具有不同相关性，GSH 和 SOD 与各药效学指标呈正相关，MDA、TNF- α 、IL-2 和 IL-6 与各药效学指标呈负相关，表明这些差异性代谢物水平、炎症因子、造血调控因子和氧化应激指标与溶血性贫血治疗有关。

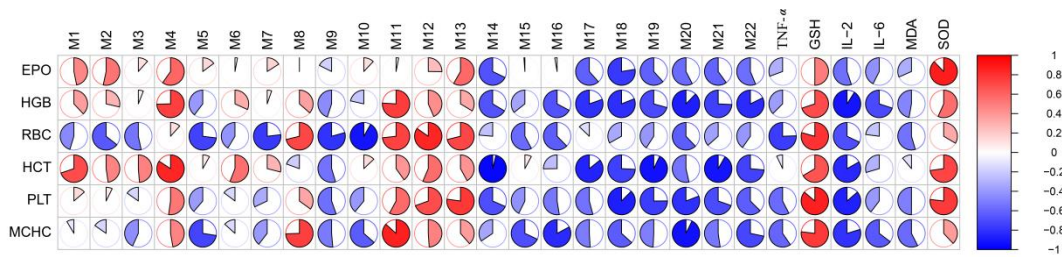


图 4 相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis

3 讨论与结论

在本研究中，基于 GC-MS 技术进行的代谢组学研究发现与溶血性贫血大鼠模型相关的代谢通路有 6 条，主要与能量、糖、氨基酸和脂肪酸代谢有关，其中五个给药组可共同调节的 3 条代谢通路为三羧酸循环、甘氨酸，丝氨酸和苏氨酸代谢和花生四烯酸代谢，其余三条各给药组各自调节的代谢通路为： β -丙氨酸代谢通路、肌醇磷酸代谢通路、戊糖和葡萄糖醛酸之间相互转化通路代谢通路。

6条代谢通路中三羧酸循环是需氧生物体内糖类、脂类和氨基酸代谢联系的枢纽，是主要的能量供给途径和物质代谢途径。三羧酸循环减少能导致三种主要营养物质代谢紊乱，ATP合成减少能量供应不足，最终导致造血干细胞（hematopoietic stem cells, HSCs）细胞凋亡^[10]。戊糖和葡萄糖醛酸相互转化途径涉及能量代谢过程，木糖醇在戊糖和葡萄糖醛酸相互转化通路中，这条通路代谢紊乱可能导致小鼠能量代谢异常^[11]。文献报道当归补血汤能促进出血性贫血大鼠脾脏产生ATP，阻止细胞凋亡^[12]。本实验结果表明，三羧酸循环途径中模型组大鼠血浆中琥珀酸、苹果酸、柠檬酸、和 α -酮戊二酸均显著上调，而富马酸显著下调，WASE给药组使琥珀酸、柠檬酸显著下调，富马酸水平显著上调；戊糖和葡萄糖醛酸相互转化途径中木糖醇水平在溶血性贫血大鼠模型血浆中显著降低，WASE组能显著回调其水平。表明WASE组能够改善溶血性贫血大鼠体内三羧酸循环和戊糖和葡萄糖醛酸相互转化途径出现的代谢紊乱，进而调节机体能量和物质代谢。

过量活性氧（reactive oxygen species, ROS）水平是HSCs衰竭的根源^[13]，文献报道甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径中三种氨基酸可相互转化，并与自由基清除有关^[14]。 β -丙氨酸代谢通路中 β -丙氨酸在机体内通过酶的作用可代谢为肌肽和乙酰辅酶A，肌肽能够增强机体清除自由基的能力，保持机体HSCs的稳定和自我更新，乙酰辅酶A可促进机体能量代谢加速ATP的生成，促进机体HSCs的增殖^[15]。Hua等研究表明当归补血汤可调节血虚大鼠甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，降低血浆中ROS^[16]。本实验中APH所致大鼠溶血性贫血模型中丝氨酸和 β -丙氨酸水平分别均显著上调，表明甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路和 β -丙氨酸代谢通路出现紊乱，WASE组干预后与模型组比较丝氨酸和 β -丙氨酸水平分别显著上调和下调，并且能显著降低溶血性贫血大鼠血清中脂质过氧化指标MDA的含量，显著提高氧自由基清除指标SOD和GSH水平。表明WASE组通过调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸， β -丙氨酸代谢途径，提高机体清除活性氧的能力来缓解溶血性贫血症状。

花生四烯酸是一种不饱和脂肪，是炎症因子前列腺素、白三烯和血栓素的前体，可激活炎症通道。当归补血汤可使血虚大鼠模型血浆中上调的花生四烯酸水平回调，能够调节由血虚引起的花生四烯酸代谢紊乱而产生的炎症^[16]。花生四烯酸代谢紊乱和脂肪酸降解与贫血有关^[17]。肌醇磷酸代谢通路中肌醇的下游产物磷脂酰肌醇三磷酸为第二信使可参与调控PIK/Akt信号通路的调节，AKT是P13K主要的下游效应分子，AKT不仅能影响造血细胞的增殖和发育，同时也能调节间质细胞的功能，进而对造血系统提供支持^[18]。本实验结果显示，WASE组能显著回调花生四烯酸和肌醇水平。TNF- α 和IL-6是重要的炎症因子，其中TNF- α 和IL-2还是重要的造血负调控因子，能够抑制骨髓造血细胞的增殖与分化^[19,20]。WASE组能显著降低溶血性贫血大鼠血清中IL-6、TNF- α 和IL-2含量。表明WASE组能够参与脂质代谢，调节花生四烯酸和肌醇磷酸代谢通路紊乱，抑制炎症，调节造血细胞功能，达到补血作用。WASE提取物使抗溶血性贫血作用的活性成分更加明确，可使制备工艺更加稳定，提高其整体质量和疗效，减少无效成分干扰，为其药效物质基础研究，临床合理应用及新药开发提供研究基础。

综上所述, WASE 提取物通过影响 6 条代谢通路, 调节机体能量代谢和造血调控因子、产生抗氧化和抗炎作用, 改善溶血性贫血模型大鼠代谢紊乱, 达到治疗溶血性贫血的作用。本研究为当归补血汤临床应用及其新药研发奠定理论基础。

参考文献

- 1 Lee HY,Gao X,Barrasa MI,et al.PPAR- α and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal[J].Nature,2015,522:474-477.
- 2 Ma YC,et al.Research progress of Danggui Buxue Decoction[J].J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报),2023,25:10-13.
- 3 Li XL,Zhang XY,Zhao H,et al.Historical evolution and textual research on classic prescription Danggui Buxuetang[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2023,29:38-45.
- 4 Fan QR,et al.Mechanism of blood-activating and mass-dissipating Chinese patent medicine against hyperplasia of mammary glands and use with other medicine: a review[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2023,48:292-299.
- 5 Yao MX,Ran S,Sun FF,et al.Mechanism of processing-compatibility of ginger in treating cold asthma rat by gas chromatography-mass spectrometry based on metabolomics[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2020,51:669-681.
- 6 Yang XJ,Deng Y,Wu GX,et al.Enriching blood function of different medicinal part in *Angelica sinensis* on the hemolytic blood deficiency in rats[J].Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2018,34:539-543.
- 7 Yan R,Jiang H,Gu S,et al.Fecal metabolites were altered, identified as biomarkers and correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus in a GC-MS-based metabolomics study[J].Front Immunol,2020,11:2138.
- 8 Tian G,Li C,Zhai YY,et al.GC-MS based metabolomic profiling of lung tissue couple with network pharmacology revealed the possible protection mechanism of Pudilan Xiaoyan oral liquid in LPS-induced lung injury of mice[J].Biomed pharmacothera,2020,124:109833.
- 9 Zhang Y,Fei QQ,Wang J,et al.Study on blood enrichment mechanism of steamed notoginseng based on metabolomics method[J].Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志),2019,44:2139-2148.
- 10 Zhou Y,Qin D Q,Zhang W,et al.Integrated LC-MS and GC-MS-based untargeted metabolomics studies of the effect of azadirachtin on bactrocera dorsalis larvae[J].Sci Rep,2020,10:2036.
- 11 Zhong YH,WangLL,Qiu ZC,et al.The antitussive and expectorant mechanisms of deapio-platycodin D as determined by metabolomics[J].Acta Pharm Sin(药学报),2022,57:3186-3194.
- 12 Shi XQ,Zhu ZH,Yue SJ,et al.Integration of organ metabolomics and proteomics in exploring the blood enriching mechanism of Danggui Buxue Decoction in hemorrhagic anemia rats[J].J Ethnopharmacol,2020,261:113000.
- 13 Naka K,Muraguchi T,Hoshii T,et al.Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells[J].Antioxid Redox Signal,2008,10:1883-1894.
- 14 Chen R,Wang J,Liao C,et al.Exploring the biomarkers and therapeutic mechanism of kidney-yang deficiency syndrome treated by You-gui pill using systems pharmacology and serum metabonomics[J].RSC Adv.2018,8:1098-1115.
- 15 Dong S.Effect and mechanism of inositol and d-chiro-inositol on alcoholic fatty liver rats[D].Tianjin:Tianjin University of Science and Technology (天津科技大学),2015.
- 16 Hua YL,Ma Q,Yuan ZW,et al.A novel approach based on metabolomics coupled with network pharmacology to explain the effect mechanisms of Danggui Buxue Tang in anaemia[J].Chin J Nat Med,2019,17:275-290.
- 17 Liu Y,Li X,Li A,et al.UHPLC Q-Exactive MS-based spleen metabolomics and lipidomics to explore the effect mechanisms of Danggui Buxue Decoction in anemia mice[J].J Pharmaceut Biomed.2020,185:113234.
- 18 Zotes TM,Spada R,Mulens V,et al.PI3K p110 δ is expressed by gp38⁺CD31⁺ and gp38⁺CD31⁺ spleen stromal cells and regulates their CCL19, CCL21, and LT β R mRNA levels[J].PLoS One,2013,8:e72960.

- 19 Liu J,Shan LJ,Xie R.Experimental study on effect of aplastic anemia the model rat's regulation factors treated with tonifying kidney and replenishing essence method[J].Guangming J Chin Med(光明中医),2012,27:1310-1312.
- 20 Shen SH,Wang HN,Ruan JC,et al.Effects of IL-2, IFN- α and TNF- α on hematopoietic progenitor and hematopoietic environment[J].J Wenzhou Medical Univ(温州医学院学报),2000,30:121-123.

收稿日期: 2024-07-26 接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 甘肃省高等学校创新基金项目(2022A-073); 兰州市人才创新创业项目(2022-RC-44); 敦煌医学与转化教育部重点实验室项目(DHYX21-09); 厦门市科技局一般科技计划项目(3502Z20224004)

*通讯作者: Tel: 18194192558; E-mail: songbing@gszy.edu.cn