

基于 UPLC-Q-TOF/MS 的归身和归尾补血机制的代谢组学初步研究

杨秀娟^{1,2}, 邓毅^{1,2*}, 吴国霞¹, 杨延泽¹, 杨志军^{1,2}, 曼琼¹

¹甘肃中医药大学药学院; ²甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000

摘要:通过比较归身和归尾对溶血性血虚大鼠血清内源性代谢物的差异,探讨归身和归尾补血机制的异同。采用乙酰苯肼(APH)复制溶血性血虚大鼠模型,基于 UPLC-Q-TOF/MS 比较归身和归尾给药后的大鼠血清代谢指纹图谱,采用 SIMCA-P14.0 软件进行多变量统计分析和单变量统计分析,寻找差异代谢物。与空白对照组比,溶血性血虚模型组中琥珀酸盐、尿嘧啶、乳清酸、胞啉、尿苷、胆酸、焦谷氨酸、胞嘧啶、脱氧尿苷、3-甲基组氨酸、甲基腺苷在模型组中相对含量升高,而左旋谷酰胺、左旋色氨酸、异亮氨酸、PC(16:0/16:0)、脯氨酸相对含量降低,归身和归尾给药后,各代谢物出现不同程度的回调,归身组回调更接近正常组。同时,归身和归尾给药后可通过嘧啶代谢、氨基酸代谢、饱和和不饱和脂肪酸代谢及能量代谢等途径调节代谢通路。

关键词: 归身; 归尾; 补血机制; 代谢组学

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.2.002

Metabolomic Analysis of Enriching Blood Function of *Angelica Sinensis* Body and Tail Using UPLC-Q-TOF/MS

YANG Xiu-juan^{1,2}, DENG Yi^{1,2*}, WU Guo-xia¹, YANG Yan-ze^{1,2}, YANG Zhi-jun^{1,2}, MAN Qiong¹

¹Gansu College of Traditional Chinese Medicine; ²Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: The aim of the present study was to identify the different endogenous metabolites in hemolytic blood deficiency rats, and subsequently compare the different enriching-blood mechanisms of *Angelica sinensis* body and *Angelica sinensis* tail. *Angelica sinensis* body and *Angelica sinensis* tail were used to intervene the hemolytic blood deficiency rats induced by N-acetyl phenyl hydrazine (APH). Metabolomic fingerprints of rat serum samples were determined by ultrahigh-pressure liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS). The data sets were then imported and subjected to multivariate statistical analysis and univariate statistical analysis using SIMCA-P14.0. Compared with normal group, the levels of succinate, uracil, orotic acid, cytidine, uridine, cholic acid, pyroglutamate acid, cytosine, deoxyuridine, 3-methylglycine, and methyladenosine were significantly ($P < 0.05$) elevated in model group, while the levels of L-glutamine, L-tryptophan, isoleucine, PC(16:0/16:0), and L-proline were significantly ($P < 0.05$) decreased, indicating the hemolytic blood deficiency model was built successfully. In addition, the abnormal contents of serum metabolites could be turned over after the treatment of *Angelica sinensis* body and *Angelica sinensis* tail, and the *Angelica sinensis* body had better effects. On the basis of these metabolites, it appeared that the pyrimidine, amino acid metabolism, fatty acid metabolism and energy metabolism could be regulated by *Angelica sinensis* body and *Angelica sinensis* tail.

Key words: *Angelica sinensis* body; *Angelica sinensis* tail; enriching blood mechanism; metabolomic

收稿日期: 2017-08-31 接受日期: 2017-11-28

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金(81360633); 甘肃省自然科学基金(1506RJZA044); 甘肃省中管局项目(GZK-2016-25); 甘肃省教育厅高等学校科研项目(2017A-056); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金(zzy-2016-06)

* 通信作者 Tel: 86-931-8765389; E-mail: dengyi@gszy.edu.cn

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的根, 始载于《神农本草经》, 被列为中品^[1], 是甘肃地道药材之一。当归具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效, 主要用于血虚萎黄、眩晕心悸、月经不调、经闭痛经、肠燥便秘等证^[2], 被誉为“补血圣药”。自古以来当归入药就有归身及归尾之

分,中医古籍所记载了当归不同药用部位功效的差异。如《汤液本草》曰:“当归……身能养血,尾能行血,用者不分,不如不使。”《药性赋》曰:“……身养血而中守;梢破血而下流;全活血而不走”。《药类法象》曰:“当归用尾破血,身和血。”《本草正义》:“归身主守,补固有功;归尾主通,逐瘀自验。”《医学启源》(金·张元素):“(当归)能和血补血,尾破血,身和血。”同时很多方剂也采用了当归的不同部位入药,如百合固金汤、当归拈痛汤、清胃散、一贯煎等方剂中采用归身入药体现了养血和血的作用,补阳还五汤、血竭软胶囊、大七厘散、仙方活命饮、代抵当丸、血府逐瘀汤中采用归尾入药体现活血化瘀的作用。

现代研究表明,当归不同药用部位不仅在在性状、粉末及理化鉴定方面存在差异,其化学成分和微量元素的含量等也具有一定差异性^[3]。有研究表明发挥补血作用的有效成分主要为当归多糖^[4,5],因此课题组前期已对当归不同药用部位的提取工艺及整体质量进行了评价,建立了不同药用部位的特征图谱,对当归不同药用部位的当归多糖含量进行了测定。在前期对归身和归尾进行药理作用比较研究的基础上,本实验采用 UPLC-Q-TOF/MS 方法分析溶血性血虚模型和归身、归尾给药后大鼠血清代谢物差异,寻找与归身和归尾补血作用密切相关的潜在生物标记物,为深入探讨其作用机制及在临床上更好的使用和开发当归药用部位提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

当归药材购于岷县清水乡,经甘肃中医药大学中药鉴定学教研室李成义教授鉴定为伞形科植物 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的根。严格按照 2015 版《中华人民共和国药典》当归项下规定将药材分离出归身部分。生理盐水(批号:1612193201,石家庄四药有限公司);碘伏(批号 160302,德州亿申康消毒制品有限公司);盐酸乙酰苯肼(批号:20160824,上海中秦化学试剂有限公司);乙腈(Merck, 1499230-935);乙酸铵(Sigma, 70221)。

MH-1000 调温型电热套(京科伟永兴仪器有限公司);HX-7 型电子天平(慈溪市天东衡器厂);微量采血管 40 μ L(批号 20130716,淄博来绪医用器材有限公司);Triple TOF 5600 + 质谱仪(AB SCIEX);Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(Agi-

lent);低温高速离心机(Eppendorf 5430R);色谱柱:Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm column, Abacus Junior vet5 动物血细胞分析仪(美国 ABBOTT 公司)。

1.2 动物及溶血性血虚大鼠模型建立

Wistar 大鼠 32 只,SPF 级,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,由兰州大学动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK(甘)2013-0002。

除空白对照组外,其余 5 组大鼠均于实验开始第 1、4 d 分别皮下注射 2% APH 100, 50 mg/kg 造模^[6-8]。

1.3 色谱条件及 Q-TOF 质谱条件^[9,10]

样品采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统(UPLC)HILIC 色谱柱进行分离;柱温 25 $^{\circ}$ C;流速 0.3 mL/min;进样量 2 μ L;流动相组成 A:水 + 25 mM 乙酸铵 + 25 mM 氨水, B:乙腈;梯度洗脱程序如下:0 ~ 1 min, 85% B;1 ~ 12 min, B 从 85% 线性变化至 65%;12 ~ 12.1 min, B 从 65% 线性变化至 40%;12.1 ~ 15 min, B 维持在 40%;15 ~ 15.1 min, B 从 40% 线性变化至 85%;15.1 ~ 20 min, B 维持在 85%;整个分析过程中样品置于 4 $^{\circ}$ C 自动进样器中。为避免仪器检测信号波动而造成的影响,采用随机顺序进行样本的连续分析。样本队列中插入 QC 样品,用于监测和评价系统的稳定性及实验数据的可靠性。

分别采用电喷雾电离(ESI)正离子和负离子模式进行检测。样品经 UPLC 分离后用 Triple TOF 5600 质谱仪(AB SCIEX)进行质谱分析。HILIC 色谱分离后的 ESI 源条件如下:Ion Source Gas1 (Gas1):60, Ion Source Gas2 (Gas2):60, Curtain gas (CUR):30, source temperature:600 $^{\circ}$ C, Ion Sapary Voltage Floating (ISVF) \pm 5500 V(正负两种模式);TOF MS scan m/z range:60-1000 Da, product ion scan m/z range:25 ~ 1000 Da, TOF MS scan accumulation time 0.20 s/spectra, product ion scan accumulation time 0.05 s/spectra;二级质谱采用 information dependent acquisition (IDA) 获得,并且采用 high sensitivity 模式,Declustering potential (DP): \pm 60V(正负两种模式),Collision Energy:35 \pm 15 eV, IDA 设置如下 Exclude isotopes within 4 Da, Candidate ions to monitor per cycle:6。

1.4 归身及归尾样品的制备^[1]

称取适量当归,洗净泥土,严格按照 2015 版《中

《中国药典》当归项下规定,以根头明显膨大处为归头,直径 1.5~4 cm;归头以下主根部分为归身,呈圆柱形,表面凹凸不平;除主根之外其余侧根为归尾,上粗下细而呈纺锤形,直径 0.3~1.0 cm,表面可见须根痕,多扭曲而附着于主根之上;所有药材一次性分部后自然阴干,存放于甘肃中医药大学理化实验室。精密称取归身、归尾药材各 200 g,分别加 12 倍量水,煎煮 40 min,过滤,收集滤液,药渣再按上述方法提取 2 次,合并 3 次滤液,浓缩至 200 mL(含药量 1 g/mL),3~4 °C 冰箱保存备用。

1.5 分组给药、样本收集及质控样本(QC)的制备^[11,12]

适应性喂养一周,Wistar 大鼠 32 只随机分为空白对照组(K)、模型组(M)、归身组(S)、归尾组(W),每组 8 只。正常组与模型组给予生理盐水 20 mL/kg,给药组分别给予归身和归尾水煎液 10.8 g/kg,灌胃给药,每天一次,连续给药 12 d。

末次给药后,水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉采血 2 mL 加入已添加乙二胺四乙酸(EDTA)的采血管内,全血进动物血细胞分析仪测定外周血常规。另采血 3 mL,血液收集在离心管中 37 °C(或室温)静置 1 h,进行凝固分层,然后 3000 rpm 室温离心取上清转至干净的离心管中,再 12000 rpm 4 °C 离心 10 min,取上清分装到 1.5 mL 离心管中,每管 0.2 mL,-80 °C 冰箱冻存备用。

样品等量混合(30 μL)用于制备 QC 样本,QC 样本用于测定进样前仪器状态及平衡色谱-质谱系统,并用于评价整个实验过程中系统稳定性。

1.6 血液学常规指标测定

取全血采用动物血细胞分析仪测定 RBC、HCT、HGB、WBC、PLT 等血液学常规指标的含量。

1.7 血清样本 UPLC-Q-TOF/MS 检测

取 1.5 项下血清样本于 4 °C 环境下缓慢解冻后,取各组样本 100 μL 分别加入 400 μL 预冷甲醇/乙腈溶液(1:1, v/v),涡旋混合,-20 °C 静置 10 min,14000 rpm 4 °C 离心 20 min,取上清真空干燥,质谱分析时加入 100 μL 乙腈水溶液(乙腈:水 = 1:1, v/v)复溶,涡旋,14000 rpm 4 °C 离心 15 min,取上清液进样分析。

1.8 UPLC-Q-TOF/MS 谱图预处理与数据分析

原始数据经 ProteoWizard 转换成 .mzML 格式,然后采用 XCMS 程序进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积。代谢物结构鉴定采用精确质量数匹配(<25 ppm)和二级谱图匹配的方式,检索数据库。对 XCMS 提取得到的数据,删除组内缺失值 >50% 的离子峰^[12,13]。应用软件 SIMCA-P 14.1 进行模式识别,数据经 Pareto-scaling 预处理后,进行多维统计分析,包括无监督主成分分析(PCA)分析,有监督偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)。单维统计分析包括 Student's t-test 和变异倍数分析,R 软件绘制火山图。

2 结果与讨论

2.1 动物血细胞分析仪测定 RBC、HGB、HCT、PLT、WBC 的含量

与正常组比较,模型组大鼠全血中 RBC、HGB、HCT、PLT、WBC 的含量分别显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

与模型组比较,归身、归尾药物组大鼠全血中 RBC、HGB、HCT、PLT 的含量显著升高($P < 0.01$),归身与归尾组间差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见表 1。

表 1 归身和归尾水煎液对溶血性血虚大鼠外周血象的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of the water decoction of Angelica sinensis body and tail on peripheral hemogram in rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	红细胞 RBC($10^{12}/L$)	血红蛋白浓度 HGB(g/L)	红细胞压积 HCT(%)	血小板 PLT($10^{10}/L$)	白细胞 WBC($10^9/L$)
空白对照 Control	9.54 ± 0.37	172.93 ± 6.62	52.38 ± 1.51	93.83 ± 80.63	13.90 ± 1.47
模型 Model	4.46 ± 0.20**	117.30 ± 5.56**	46.25 ± 1.85**	57.55 ± 11.98**	11.90 ± 1.40**
归身 Angelica sinensis body	6.12 ± 0.12 ^{##}	154.40 ± 5.19 ^{##}	53.27 ± 1.57 ^{##}	67.53 ± 5.11 [#]	12.25 ± 2.02
归尾 Angelica sinensis tail	5.69 ± 0.40 [▲]	123.10 ± 3.70 [▲]	51.41 ± 2.03 [▲]	63.30 ± 7.61	11.93 ± 1.03

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;^{##} $P < 0.01$;与归身组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

Note:compared with control group,** $P < 0.01$;compared with model group,[#] $P < 0.05$;^{##} $P < 0.01$;compared with Angelica sinensis body group,[▲] $P < 0.05$ 。

从外周血象的结果表明,归身和归尾均可改善 RBC、HCT、HGB 等这些指标的含 量,具有补血作用,而归身和归尾组间在补血效果上有显著差异,归身补血作用优于归尾。

2.2 质量控制

2.2.1 QC 样本总离子流图(TIC)的比较

将 QC 样本 UPLC-Q-TOF MS 总离子流图,进行谱图重叠比较,结果表明各色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠,说明在整个实验过程中仪器误差引起的变异较小,以负离子模式下为例见图 1。

2.2.2 总体样本主成分分析(PCA)

采用 XCMS 软件对代谢物离子峰进行提取,将所有实验样本和 QC 样本提取得到的峰,经 Pareto-scaling 后进行 PCA 分析,正、负离子模式下 QC 样本紧密聚集在一起,表明本项目实验的重复性好。经 7-fold cross-validation (7 次循环交互验证)得到的 PCA,以负离子模式 PCA 见图 2。(http://www.metaboanalyst.ca)。

综上所述,本次试验的仪器分析系统稳定性较好,试验数据稳定可靠。在试验中获得的代谢谱差异能反映样本间自身的生物学差异。

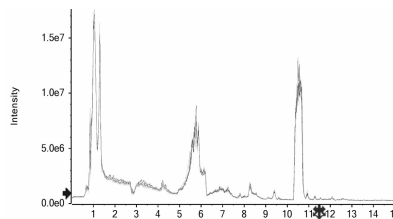


图 1 QC 血清样品负离子模式 TIC 重叠图

Fig. 1 A The total ion current (TIC) chromatograms of serum sample in the negative ion mode (ESI-).

注:空白对照组为 K,模型组为 M,归身组为 S,归尾组为 W, QC 样品为 QC

Note:K:control group and model group;M:model group;S:Angelica sinensis body;W:Angelica sinensis tail;QC:QC sample

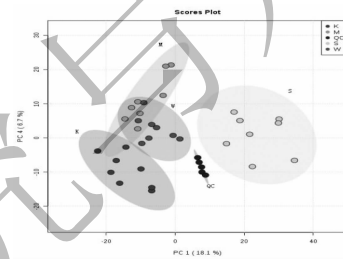


图 2 负离子模式下血清样本的 PCA 得分图

Fig.2 PCA scores plot of serum sample in the negative ion mode (ESI-).

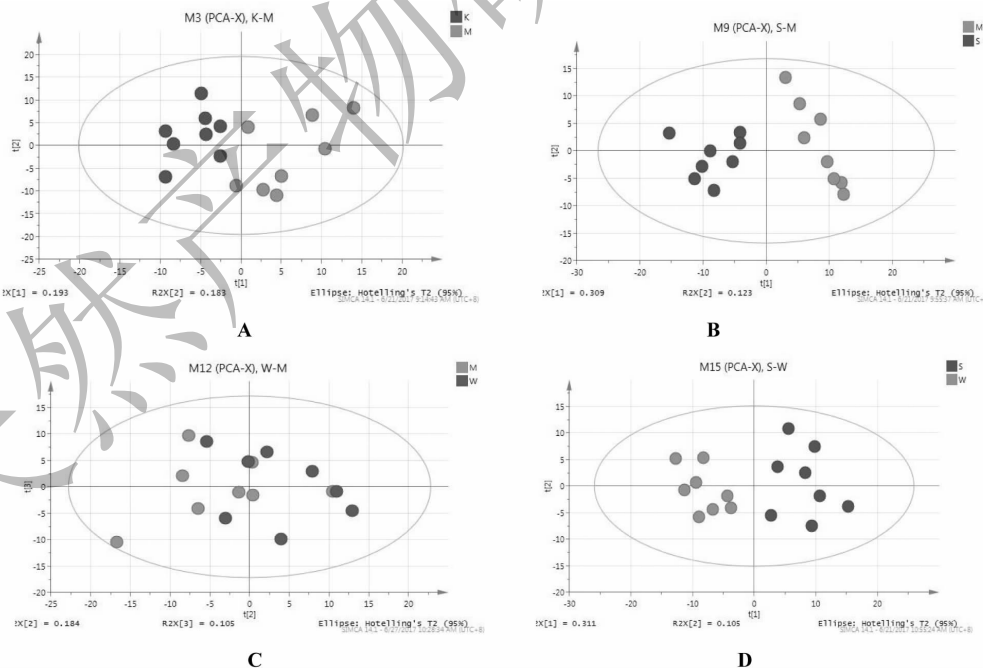


图 3 各组间的 PCA 图

Fig. 3 The PCA score plots in each group

注:A:正常组与模型组;B:归身组与模型组;C:归尾组与模型组;D:归身组与归尾组

Note:A:control group and model group;B: Angelica sinensis body and model group;C: Angelica sinensis tail and model group;D: Angelica sinensis body and Angelica sinensis tail

表 2 各组间 PLS-DA 模型参数表

Table 2 Evaluation parameter of PLS-DA in each group

分组 Group	正离子模式 Positive ion mode			负离子模式 Negative ion mode		
	A	R ² Y(cum)	Q ² (cum)	A	R ² Y(cum)	Q ² (cum)
M-K	3	0.990	0.681	2	0.988	0.824
S-M	4	0.997	0.900	2	0.983	0.898
W-M	4	0.998	0.902	2	0.974	0.786
S-W	4	0.993	0.832	3	0.999	0.925

2.3 数据分析

2.3.1 各组大鼠血清样品中多变量数据分析

对大鼠血清样本中的代谢物进行主成分分析 (PCA), 观察归身与模型组, 归尾与模型组, 以及归身和归尾组样本之间的总体分布趋势, 找出可能存在的离散点。

样本经 HILIC 色谱分离条件得到的数据, 正常组与模型组, 归身组与模型组, 归身组和归尾组在 PCA 图上得到很好的分离, 而归尾和模型组间没有达到完全分离, 分离趋势不明显。PCA 总图见图 2, 各组比较 PCA 见图 3(A、B、C、D)。采用偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 建立代谢物表达量与样品类别之间的关系模型, 来实现对样品类别的预测, 同时通过计算变量投影重要度 (VIP) 来衡量各代谢物的表达模式

对每组样本分类判别的影响强度和解释能力, 从而辅助标志代谢物的筛选 (通常以 VIP score > 1.0 作为筛选标准)。分别建立正常组与模型组, 归身组与模型组, 归尾组与模型组, 归身组和归尾组的 PLS-DA 模型, 经七次循环交互验证得到的模型评价参数 (R²Y, Q²) 列于表 2, R²Y, Q² 越接近于 1, 表明模型越稳定可靠, 通过本实验表明归身组与模型组, 归尾组与模型组, 归身组和归尾组模型稳定可靠。

2.3.2 各组大鼠血清样品中单变量数据分析

本实验采用了单变量统计分析 (变异倍数分析 (FC)、T 检验) 以及综合前两种分析方法的火山图, 通过单变量分析, 可直观显示两组间代谢物变化的显著性, 从而筛选标志性代谢物, 筛选条件通常为: FC > 2.0, 且 P value < 0.05。图 4 为各组间负离子模式下火山图, A 为正常组与模型组, B 为归身组与

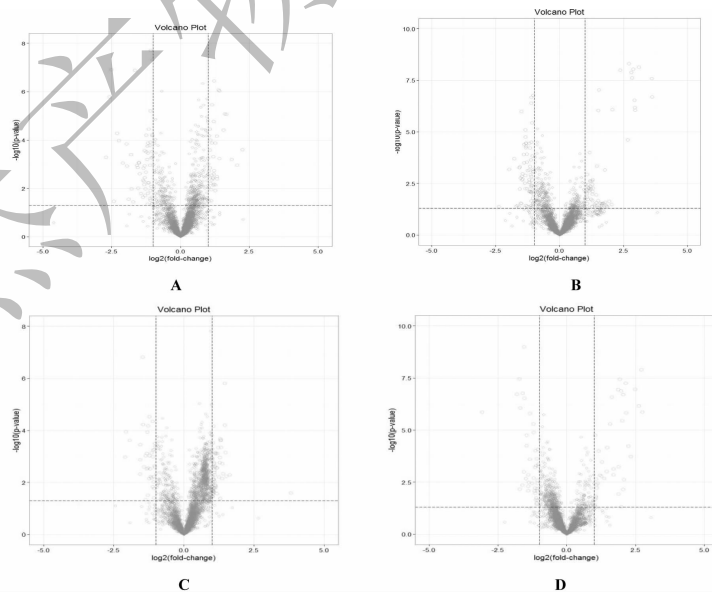


图 4 各组间负离子模式下火山图

Fig. 4 The volcano plot of negative ion mode in each group

注: A: 正常组与模型组; B: 归身组与模型组; C: 归尾组与模型组; D: 归身组与归尾组

Note: A: control group and model group; B: *Angelica sinensis* body and model group; C: *Angelica sinensis* tail and model group; D: *Angelica sinensis* body and *Angelica sinensis* tail

模型组, C 为归尾组与模型组, D 为归身组和归尾组, 图中抛物线两侧散在点为 $FC > 2.0$, 且 $P \text{ value} < 0.05$ 的代谢物, 即单变量统计分析筛选的差异代谢物。

2.3.3 显著性差异代谢物筛选^[14,15]

与模型组相比, 归身组和归尾组共筛选出差异代谢物 16 个, 以变异倍数分析 (Fold change, FC) 来评价两组间代谢物变化的显著性, 其中 $FC > 1$, 代表代谢物相对含量升高, $FC < 1$, 代表代谢物相对含量降低。用 \uparrow/\downarrow 表示, 与正常组比较, 模型组中琥珀

酸盐、尿嘧啶、乳清酸、胞啶、尿苷、胆酸、胞嘧啶、脱氧尿苷、3-甲基组氨酸、甲基腺苷、脯氨酸的相对含量升高, 而左旋谷酰胺、左旋色氨酸、异亮氨酸、PC (16:0/16:0)、焦谷氨酸相对含量降低, 经过归身和归尾给药后, 各代谢物出现不同程度的回调。其中, 归身组回调效果较归尾组明显, 见表 3。

筛选出归身与归尾组差异代谢物甘油、亚油酸、棕榈酸、棕榈油酸、精氨酸、乳酸、神经酸、谷氨酸、鸟氨酸等 31 个。见表 4。

表 3 各组间血清中生物标志物及其相对含量变化

Table 3 The administration of biomarkers and relative content changes of serum in each group

加合物 Adduct	名称 Name	m/z	模型组 Model group	归身组 Angelica sinensis body group	归尾组 Angelica sinensis tail group
(M-H)-	琥珀酸盐 Succinate	117.02	\uparrow	$\downarrow\downarrow$	\downarrow
(M-H)-	尿嘧啶 Ura	111.02	\uparrow	$\downarrow\downarrow$	\downarrow
(M-H)-	乳清酸 Orotic acid	155.01	\uparrow	\downarrow	\downarrow
(M-H)-	左旋谷酰胺 L-glutamine	145.06	\downarrow	\uparrow	\uparrow
(M-H)-	左旋色氨酸 L-tryptophan	203.08	\downarrow	\uparrow	\uparrow
(M-H)-	胞苷 Cytidine	242.08	\uparrow	\downarrow	\downarrow
(M-H)-	尿苷 Uridine	243.06	\uparrow	\downarrow	\downarrow
(M-H)-	异亮氨酸 Ile	130.09	\downarrow	\uparrow	\downarrow
(M + CH ₃ COO)-	胆酸 Cholic acid	467.30	\uparrow	\downarrow	-
(M + H) +	焦谷氨酸 Pyroglutamic acid	130.05	\downarrow	\uparrow	-
(M + H) +	胞嘧啶 Cytosine	112.05	\uparrow	\downarrow	\downarrow
(2M + H) +	脱氧尿苷 Deoxyuridine	457.16	\uparrow	\downarrow	\downarrow
(M + H) +	3-甲基组氨酸 3-methylhistidine	170.09	\uparrow	\downarrow	\downarrow
(M + H) +	甲基腺苷 Methyladenosine	282.12	\uparrow	\downarrow	\downarrow
(M + CH ₃ CN + Na) +	PC (16:0/16:0)	797.59	\downarrow	\uparrow	\uparrow
(M + H) +	脯氨酸 Proline	116.07	\downarrow	\uparrow	-

表 4 归身组与归尾组的差异代谢物

Table 4 The differences metabolites of Angelica sinensis body and Angelica sinensis tail

加合物 Adduct	名称 Name	VIP	P-value	m/z	rt(s)
(M-H ₂ O-H)-	3-甲基-4-羟基苯乙二醇 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol	2.14	0.00	245.01	38.65
(M + CH ₃ COO)-	甘油 Glycerol	1.19	0.00	151.06	181.08
(M-H)-	海藻糖 Trehalose	1.63	0.00	341.11	686.50
(M-H)-	亚油酸 Linoleic acid	15.96	0.00	279.23	70.74
(M-H)-	精氨酸 Arginine	2.16	0.00	173.11	950.24
(M-H)-	乳酸 Lactic acid	1.18	0.00	89.03	547.47
(M-H)-	神经酸 Nervonic acid	1.40	0.00	365.34	65.41
(M-H)-	棕榈酸 Palmitic acid	5.40	0.00	511.47	72.47

续表 4(Continued Tab. 4)

加合物 Adduct	名称 Name	VIP	P-value	m/z	rt(s)
(M + CH ₃ COO) ⁻	肌醇 Inositol	1.72	0.00	179.06	734.55
(M-H) ⁻	葡萄糖 Glucose	6.02	0.00	179.06	547.58
(M-H) ⁻	棕榈油酸 Palmitoleic acid	1.63	0.00	507.44	72.86
(M-H) ⁻	塔格糖 Tagatose	1.17	0.03	130.05	562.54
(M-H) ⁻	羟基十六酸 Hydroxyhexadecanoic acid	1.88	0.01	271.23	76.96
(M-H) ⁻	阿洛糖 D-Allose	8.49	0.01	179.06	565.15
(M-H) ⁻	A-D-葡萄糖 A-D-glucose	6.02	0.00	179.06	547.58
(M-H) ⁻	尿囊素 Allantoin	1.04	0.02	157.04	327.13
(M-H) ⁻	肌氨酸 Creatine	1.26	0.02	130.06	642.49
(M-H) ⁻	肉豆蔻酸 Myristic acid	2.87	0.03	227.20	74.53
(M-H) ⁻	十五酸 Pentadecanoic acid	1.67	0.04	241.22	73.68
(M + NH ₄) ⁺	蔗糖 Sucrose	1.23	0.00	360.15	686.51
(M + H) ⁺	胍基丁酸 Guanidinobutyric acid	1.98	0.00	146.09	662.24
(M + CH ₃ COO + 2H) ⁺	甲基氧乙酸 Methoxyacetic acid	1.06	0.00	151.06	179.78
(M + H) ⁺	喹啉 Carboline	1.01	0.00	169.07	72.48
(M + H) ⁺	雌马酚 Equol	1.14	0.00	243.10	41.09
(M + NH ₄) ⁺	22 碳六烯酸 Docosahexaenoic Acid	4.19	0.00	346.27	69.55
(M + H) ⁺	脱氧胞苷 Deoxycytidine	1.12	0.01	116.07	947.93
(M + H) ⁺	鸟氨酸 Ornithine	1.20	0.01	133.10	948.11
(M-H + 2Na) ⁺	胆碱磷酸 Phosphoryl choline	2.84	0.01	568.34	343.34
(M + H) ⁺	棕榈酰肉碱 Palmitoyl carnitine	1.21	0.02	400.34	312.85
(M + NH ₄) ⁺	甘露糖 Aldohexos	4.50	0.04	198.10	554.54
(M + H) ⁺	谷氨酸 Glutamic acid	2.13	0.04	148.06	750.71

2.3.4 差异代谢物聚类分析

为了评价所选代谢物合理性,选取层次聚类方法,以归身和归尾在负离子模式显著性差异代谢物层次聚类结果为例,本实验结果表明归身和归尾组明显聚为两类,说明二者在治疗溶血性血虚模型时血清样本所得到的代谢物在表达模式有所不同,见图 5。

2.3.5 差异代谢物 KEGG 通路分析

KEGG 路径图用图表来表示物种代谢的反应/相互作用网络、遗传信息处理、人类疾病的反应/相互作用网络、药物开发的关系网络,不仅提供生化物质相互转化所有可能的代谢途径,还包含对催化各步反应的酶的全面注解,通过 KegSketch 软件人工绘制,通路图中的分子网络是一张包括了点(同源基因,蛋白质,小分子)以及边(反应,相互,关系)的图,KEGG 中给出了不针对特异物种的一致性参考

通路^[16,17],可对已知代谢物的一些功能进行解释。

将鉴定到的差异代谢物提交到 KEGG 网站(<http://www.kegg.jp/kegg/mapper.html>),可得到主要的代谢通路。研究表明,乙酰苯肼造成溶血性血虚模型后,主要表现为嘧啶代谢、氨基酸代谢紊乱,能量代谢,饱和脂肪酸及不饱和脂肪酸代谢发生障碍等,给予药物治疗后,归身组和归尾组中乳清酸、胞嘧啶、胞苷、尿苷、脱氧尿苷的相对含量都出现回调,此类代谢物主要参与核苷酸代谢通路中的嘧啶代谢通路,左旋色氨酸、异亮氨酸、组氨酸的相对含量也出现逆转,主要参与氨基酸代谢通路,结果表明二者都可通过恢复嘧啶代谢和氨基酸代谢来改善溶血性贫血。APH 是一种强氧化剂,能特异性地对红细胞起缓和而进行性氧化损伤作用,可直接破坏红细胞的膜蛋白和脂类,使膜溶解破裂,红细胞崩解,造成溶血性贫血^[18],有文献报道红细胞核苷酸

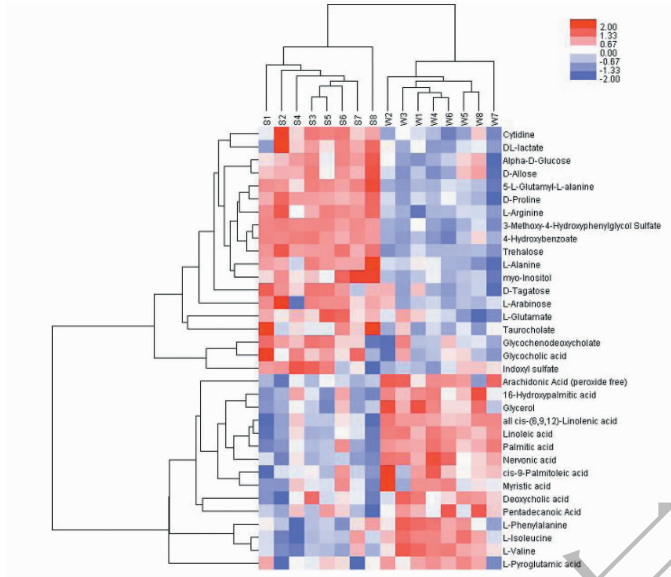


图 5 归身和归尾组负离子模式显著性差异代谢物层次聚类结果

Fig. 5 The hierarchical clustering results of significantly potential metabolites of negative a ion mode between *Angelica sinensis* body and *Angelica sinensis* tail

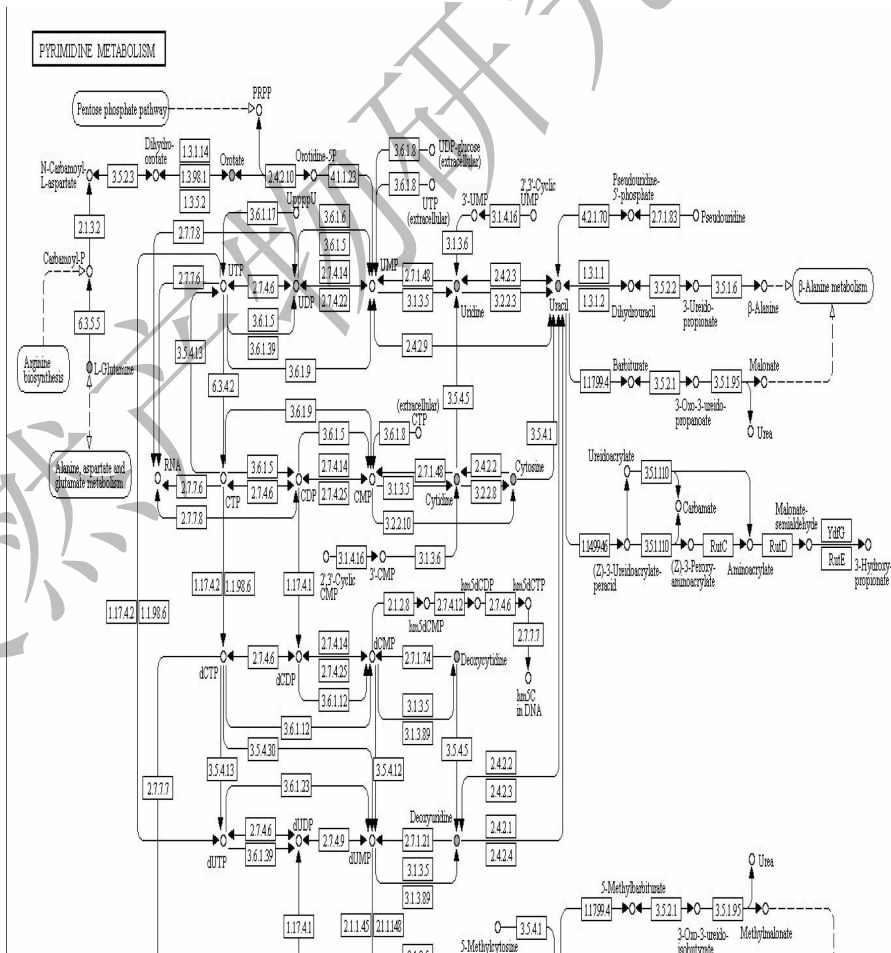


图 6 嘧啶代谢通路简图

Fig. 6 The simple diagram of pyrimidine metabolism pathway

代谢异常、氨基酸代谢异常与溶血性贫血发生有密切的联系^[19,20]。

将筛选出归身与归尾组的 31 个差异代谢物经过 KEGG 通路分析,棕榈酸、肉豆蔻酸、棕榈油酸、棕榈酰肉碱、亚油酸参与了饱和和不饱和脂肪酸代谢通路,其中亚油酸是游离脂肪酸,能诱导机体产生大量活性物质,引起机体红细胞的急性损伤,通过给予归身可降低血清内亚油酸含量,抑制和改变 APH 所造成的红细胞损伤状态^[21,22]。APH 造成红细胞膜破损,大鼠血液中氧含量显著降低,机体进入缺氧状态,糖代谢代偿性加强。葡萄糖是机体能量的主要物质^[23],乳酸是糖酵解的正常代谢产物,是由丙酮酸在乳酸脱氢酶的作用下产生的,主要能维持机体正常的能量代谢^[24],乳酸水平的异常表明能量代谢紊乱。经归身和归尾给药后,机体中甘油、肌醇、塔格糖、蔗糖、海藻糖、乳酸及阿洛糖等代谢物的表达有差异,其中甘油、肌醇、塔格糖参与了半乳糖代谢,蔗糖、海藻糖参与了蔗糖代谢,乳酸、阿洛糖、D-葡萄糖参与果糖和甘露糖代谢及糖酵解,以上研究表明,归身和归尾给药后可参与糖代谢等途径。

综上所述归身和归尾都可参与饱和和不饱和脂肪酸代谢、糖代谢、能量代谢通路,从而发挥补血机制,二者在差异代谢物的表达量上有差异。其中涉及的一个代谢通路图见图 6。

3 结论

本研究通过代谢组学方法比较了归身和归尾对溶血性血虚大鼠的内源性代谢物差异,探讨给予归身和归尾后对血虚大鼠紊乱代谢的作用机制。从药效角度,归身与归尾都具有补血作用,归身优于归尾;从代谢组学角度,筛选出归身、归尾组与模型组的差异代谢物,研究发现归身和归尾都可调节嘧啶代谢及氨基酸代谢。同时,筛选出归身与归尾组的差异代谢物在表达量上有差异,发现归身和归尾都可调节饱和和不饱和脂肪酸代谢、糖代谢、能量代谢及氨基酸等多条代谢通路,差异代谢物在表达量上有差异,可能是归身和归尾发挥补血机制的差异。通过药效学和代谢组学的结合,探讨归身和归尾补血机制的差异,表征了中药发挥作用的整体效应。

参考文献

1 Guo JM (郭锦明). Textual research of herbology and pharmacognosics in *Angelica sinensis* [J]. *China Prescription*

Drug (中国处方药), 2015, 13(10): 18-19.

2 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会), Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Chinese Medicine and Pharmaceutical Publisher, Beijing, 2015: 133.

3 Lei ZQ (雷载权), Zhang TM (张廷模). Chinese clinical pharmacy (中华临床中药学) [M]. Beijing: People's Medical Publishine House, 1998: 1733.

4 He XL (何晓莉), Guan XJ (关雪晶), Wu H (吴宏), et al. Effects of Angelica polysaccharides on the apoptosis and oxidative damage in bone marrow mononuclear cells of ionizing radiation injured mice [J]. *J Chongqing Med Univer* (重庆医科大学学报), 2012, 37(4): 315-319.

5 Chen FM (陈凤鸣), Guan XJ (关雪晶), Wu H (吴宏), et al. Effects of angelica polysaccharides on bone marrow vascular endothelial growth factor in acute radiation injured mice [J]. *J Chongqing Med Univer* (重庆医科大学学报), 2014, 39: 612-616.

6 Chen Q (陈奇). The research and method of pharmacology of traditional Chinese Medicine [M]. 2nd. Beijing: People's Medical Publishine House, 2006: 90-503.

7 Liu CC (刘彩春), Liu H (刘欢), Gu DX (谷陟欣), et al. Mechanisms of tonifying blood with Lvjiao Buxue Granules studies by ¹H NMR metabolomics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, 47(7): 1142-1145.

8 Deng Y (邓毅), Zhang M (张明), Zhang YP (张艳萍). The intervention of Gansu Danggui on the mice models with acetyl phenyl hydrazine-induced hemolytic Blood-deficiency [J]. *Western J Tradit Chin Med* (西部中医药), 2015, 28: 5-8.

9 Huang MY (黄美艳), Tang YP (唐于平), Li WX (李伟霞), et al. Evaluate activating blood circulation and dissipating blood stasis effect mechanism of Foshousan on acute blood stasis rats on basis of metabolomic approach [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 38: 3576-3582.

10 Xiao QC, Chun XZ, Hany M, et al. Profiling of the perturbed metabolomic state of mouse spleen during acute and chronic toxoplasmosis [J]. *Biomed Central*, 2017, 10: 339.

11 J Van Der Greef, S Martin, P Juhasz, et al. The art and practice of systems biology in medicine: mapping patterns of relationships [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6: 1540-1559.

12 Wang H, Liu ZQ, Wang SY, et al. UHPLC-Q-TOF/MS based plasma metabolomics reveals the metabolic perturbations by manganese exposure in rat models [J]. *Metallomics*, 2017, 9: 192-203.