

当归干预血瘀证大鼠血浆代谢组学研究

袁子文,钟立甲,纪鹏,华永丽,姚万玲,马琪,张晓松,文艳巧,魏彦明*

甘肃农业大学动物医学院,兰州 730070

摘要:运用代谢组学方法,探讨当归干预血瘀证大鼠作用机制。连续灌胃给予大鼠当归水煎液 7 d 后,建立大鼠急性血瘀模型,采集血液进行血液流变学、凝血因子检测,采用 LC-Q/TOF-MS 技术结合多元统计比较分析各组大鼠血浆内源性代谢物,筛选差异代谢物并构建其代谢通路。结果显示,当归干预能显著降低血瘀模型大鼠血液黏度及血浆 FIB 含量 ($P < 0.05$),缩短 TT、PT、APTT ($P < 0.05$);血瘀模型大鼠血浆中 15 个内源性代谢物含量发生显著变化 ($P < 0.05$),其中磷脂酰胆碱、花生四烯酸、鞘磷脂等含量上升,甘油酸、L-谷氨酸、L-缬氨酸等含量下降,差异代谢物主要涉及 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢、甘油磷脂代谢、鞘脂代谢等路径。当归干预可通过回调差异代谢物含量,调节异常的氨基酸、脂质代谢进而预防血瘀的发生。

关键词:当归;大鼠;血瘀证;血浆;代谢组学

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.4.005

Plasma Metabolomics of Angelica Intervene in Blood Stasis Syndrome Rats

YUAN Zi-wen, ZHONG Li-jia, JI Peng, HUA Yong-li, YAO Wan-ling,

MA Qi, ZHANG Xiao-song, WEN Yan-qiao, WEI Yan-ming*

Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: The LC-Q/TOF-MS was used to explore the mechanism of angelica intervention in blood stasis syndrome (BSS) rats. The model of acute rats BSS was established by subcutaneous adrenaline combined with ice water bath after rats was treated with angelica decoction (8 g/kg/d) for 7 days. Blood was collected for hemorheology, coagulation factor detection and plasma was analyzed by LC-Q/TOF-MS. The plasma metabolic profiles of normal control (NC), model group (MG) and Dang-gui intervention group (DG) were analyzed by principal component analysis (PCA) and partial least squares (PLS-DA) method. According to the variable importance projection (VIP) and *t* test, plasma differential metabolites of BSS rats were screened and its metabolic pathway was constructed by MetPA database. The results showed that angelica intervention can significantly decrease the blood viscosity and plasma FIB content of BSS rats ($P < 0.05$) and shorten TT, PT and APTT ($P < 0.05$). Metabolomics analysis showed that the contents of 15 endogenous metabolites in plasma of BSS rats were significantly changed, the contents of phosphatidylcholine, arachidonic acid and sphingomyelin, *et al* were increased, and the contents of glycerol acid, L-glutamic acid and L-valine, *et al* decreased. Differential metabolites mainly involve D-glutamine and D-glutamate metabolism, glycerol phospholipid metabolism, sphingolipid metabolism and other pathways, Angelica can reverse the abnormal metabolic content ($P < 0.05$), and then adjust the abnormal amino acids, lipid metabolism to play the role of prevention of blood stasis.

Key words: *Angelica sinensis*; rat; blood stasis syndrome; plasma; metabolomics

血瘀证是中医临床的一种常见多发证型,多由气虚、气滞、痰浊、血寒、阴虚、郁热等引起,临床可见于多种疾病的发生发展过程中,其主要表现为血液循环障碍、血液流变学异常以及血栓形成等^[1-3]。随着人类生活质量的不断提高,以血瘀证为主证的疾

病频发,如心脑血管疾病、糖尿病血管病变等^[4]。因此,加强活血化瘀类中药及复方作用机理的研究具有重要意义。

当归为伞形科植物 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,具有补血、活血、调经止痛等作用,常用来治疗血瘀、血虚萎黄、月经不调、经闭痛经、眩晕、心悸等^[5]。近年来,对当归补血^[6]、抗炎^[7]、抗氧化^[8]等作用机理已有较深入的研究,虽也有对其活血作用的研究,但仅局限于宏观评价,且对其作用

收稿日期:2017-08-15 接受日期:2018-01-08

基金项目:国家自然科学基金(31472234);公益性行业(农业)科技专项(201403051);国家肉牛/牦牛产业技术体系(GARS-37)

*通信作者 Tel:86-931-7631077;E-mail:weiyim@gsau.edu.cn

机制的研究不够全面和深入^[9]。

代谢组学是对某生物、组织、器官或细胞在特定生理时期产生的所有小分子代谢物进行定性、定量分析的方法,近年来,其在中医药研究中的应用极大地促进了中医药现代化研究^[10,11]。通过分析机体在中药作用下内源性代谢物的变化,可客观全面地评价药物对机体的干预作用,从而准确地反映机体的状态,进而可阐明中药发挥药理作用的分子机制^[12]。

鉴于此,本研究采用皮下注射肾上腺素结合冰水浴的方法建立了大鼠急性血瘀模型,通过检测大鼠血液流变学及凝血功能指标并采用液相色谱-四级杆/飞行时间串联质谱(LC-Q/TOF-MS)对当归干预前后血瘀证大鼠血浆中内源代谢物进行分析鉴定,从代谢水平探讨了当归干预血瘀证大鼠的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 药材、仪器和试剂

当归购于甘肃岷县,经甘肃农业大学动物医学院中兽医教研室魏彦明教授鉴定为 *A. Sinensis*。亮氨酸-脑啡肽为 Sigma 公司产品;色谱级乙腈,甲醇均购于 Merck 公司(Darmstadt, German);盐酸肾上腺素注射液(1 mg/mL)购于天津金耀药业有限公司;水合氯醛购于上海展云化工有限公司,其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

液相色谱-四级杆/飞行时间串联质谱 LC-Q/TOF-MS(Agilent,1290 Infinity LC,6530UHD and Accurate-Mass Q-TOF/MS);TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机;KMD 型调温电热套(山东永兴仪器厂);LBY-N6A 型旋转式血液粘度计(北京普利生仪器有限公司)。分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 药材制备及给药剂量

称取当归 400 g,加 1200 mL 蒸馏水浸泡 1 h,煎煮 1 h 取上清液,滤渣再加 600 mL 蒸馏水,煎煮 0.5 h,过滤取上清液,合并两次上清液,减压浓缩,定容至 400 mL,使其相当于含生药 1 g/mL,置 4 °C 备用。《中华人民共和国药典》(2015 年版)规定人临床当归一日用量为:6 ~ 12 g^[13]。本研究中人临床当归一日用量按 10 g 计算,动物给药剂量按体表面积换

算系数计算:动物给药剂量 = 人临床用量 × 0.018/200 × 1000 × 临床等效量的倍数^[14]。根据预实验大鼠当归灌胃给药剂量选用临床等效量的 9 倍量进行给药,即大鼠给药剂量 = 10 × 0.018/200 × 1000 × 9 = 8.1 ≈ 8 g/kg。

2.2 动物分组及给药

雌性 Wistar 大鼠(180 ~ 200 g)24 只,购于兰州大学医学院实验动物中心[实验动物质量合格证号:SCXK(甘)2015-005],采用随机数字表法将其分为 3 组:正常对照组(NC)、血瘀模型组(M)、当归干预组(DG),每组 8 只,于代谢笼内饲养,期间保持房间通风良好,控制室温 24 ± 2 °C、湿度 50 ± 5 %、12 h 昼/夜循环、使其自由饮食。适应性饲养一周后,当归干预组大鼠灌胃给予当归水煎液(8 g/kg/d),正常对照组和模型组大鼠灌胃等量生理盐水,每天一次,连续 7 d。第 7 次灌胃给药 8 h 后除正常对照组外,对其余两组大鼠进行造模^[14]:皮下注射盐酸肾上腺素注射液(0.08 mL/100 g),2 h 后将其置于 0 ~ 2 °C 冰水浴中游泳 5 min,取出擦干背毛,2 h 后再次皮下注射等量的盐酸肾上腺素注射液,以复制大鼠急性血瘀模型。造模完成后将各组大鼠禁食不禁水饲养 12 h。

2.3 样品采集与制备

造模完成 12 h 后对各组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉,腹主动脉采血(肝素钠抗凝)。取部分抗凝血用于血液流变学分析及凝血因子检测,部分抗凝血于室温 3000 rpm 离心 10 min,取上层血浆于 -80 °C 冰箱保存备用。

LC-Q/TOF-MS 样品制备:取 -80 °C 保存的血浆样本,室温解冻,涡旋震荡 5 s。分别取各组血浆样本 100 μL 向其中加入 300 μL 色谱级甲醇,涡旋震荡 30 s,4 °C 静置 20 min 后于 4 °C,12000 rpm 离心 15 min,取 200 μL 上清液,用于 LC-Q/TOF-MS 分析。

质量控制样本(Quality control samples, QC samples)的制备:等量吸取各组中每个血浆样本各 50 μL,将其混合均匀后作为质控样本,用于检测仪器稳定性和重复性。

2.4 血液流变学分析及凝血因子检测

分别取 600 μL 血浆和肝素钠抗凝全血,于 37 °C 检测各组大鼠在不同切变率下(1 s⁻¹、5 s⁻¹、30 s⁻¹、200 s⁻¹)血浆及全血粘度。另取各组大鼠血浆按照 ELISA 试剂盒说明书分别进行凝血酶原时间(Prothrombin time, PT)、凝血时间(Coagulation time,

TT)、活化部分凝血活酶时间(Activated partial thromboplastin time, APTT)及纤维蛋白原含量(Fibrinogen, FIB)的测定。

2.5 基于 LC-Q/TOF-MS 的代谢组学检测

液相色谱分离条件: C_{18} 色谱柱(Agilent, 100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 流速 0.4 mL/min, 流动相 A(0.1% 甲酸 + 超纯水), 流动相 B(0.1% 甲酸 + 乙腈), 自动进样器温度 4 $^{\circ}$ C, 进样量 4 μ L。梯度洗脱条件: 0 ~ 1 min, 5% B 流动相; 1 ~ 6 min, 5% ~ 20% B 流动相; 6 ~ 9 min, 20% ~ 50% B 流动相; 9 ~ 15 min, 50% ~ 95% B 流动相。

Q/TOF-MS 质谱分析条件设置: 毛细管电压 4 KV; 锥孔电压 35 KV; 离子源温度 100 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度 350 $^{\circ}$ C; 以氮气为反向锥孔气(流速 50 L/h)和脱溶剂气(正、负离子模式下流速分别为 600、700 L/h)。用亮氨酸-脑啡肽(浓度 200 μ g/mL, 流速 100 μ L/min)锁定质量, 在正离子模式下产生 556. 2771 Da 的 $[M + H]^+$ 离子, 在负离子模式下产生 554. 2615 Da 的 $[M - H]^-$ 离子, 以确保质谱检测质量的准确性和重复性。检测开始时先对 QC 样本连续检测 6 次, 使仪器达平衡稳定, 再进行各组样本检测, 期间每检测 5 个样本再检测一次 QC 样本, 以确保检测结果稳定可靠。

2.6 数据处理

将 LC-Q/TOF-MS 系统采集到的原始数据(. D 格式)导入 XCMS 软件(<https://xcmsonline.scripps.edu/>)进行色谱峰提取、去噪、峰匹配、峰对齐及数据导出。将得到的数据进行归一化, 并采用修正 80% 规则去除缺失值, 最终得到二维数据矩阵表。将处理后的数据导入网络在线分析软件 MetaboAnalyst 3.0(<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>), 采用无监督的主成分分析(PCA)及有监督的正交偏最小二乘判别分析(PLS-DA)方法进行模式识别分析。

2.7 潜在生物标志物的筛选与鉴定

PLS-DA 分析中 PLS-DA 载荷图(loading plot)上每个点代表一个变量, 变量对分类的重要程度(VIP, variable importance in the projection)其值的大小表示某个变量对模型分类的贡献程度, 一般认为 VIP > 1.0 的变量具有统计学意义, 获取 VIP > 1.0 的代谢物并用 SPSS 20.0 (IBM SPSS, USA) 软件进行 t 检验分析, 筛选组间差异代谢物 ($P < 0.05$)。将所筛选差异代谢物的保留时间、精确的质荷比

(m/z) 输入公共数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>) 以及 KEGG (<http://www.kegg.jp/>) 中进行检索, 代谢物质谱 m/z 误差值设置为 10 ppm。最终结合数据库与文献中精确的质谱图来确认代谢物, 作为潜在生物标志物。

2.8 代谢通路分析

将鉴定到的潜在生物标志物的 KEGG ID 输入到 MetaboAnalyst 3.0 软件进行代谢通路的绘制, 依据代谢通路影响值 (pathway Impact) 筛选出靶标路径 (Impact > 0.1)。

2.9 统计分析

实验数据用样本均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS 20.0 软件用于统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, t 检验用于两组间差异比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, 差异显著; $P < 0.01$ 表示差异极显著。

3 实验结果

3.1 血液流变学和凝血因子检测

各组血液流变学和凝血因子检测结果如图 1、2。从图中可知, 与正常对照组相比, 血瘀模型组大鼠的全血、血浆黏度在不同切变率下均极显著升高 ($P < 0.01$) (图 1), TT、PT、APTT 极显著缩短, FIB 含量极显著增加 ($P < 0.01$) (图 2), 表明大鼠在造模后血液粘滞, 发生微循环障碍、红细胞聚集性升高, 凝血系统功能活跃, 血凝倾向增强, 表明大鼠血瘀模型复制成功。与血瘀模型组相比, 当归干预组大鼠全血、血浆黏度在不同切变率下均显著降低 ($P < 0.05$), TT、PT、APTT 显著增加 ($P < 0.05$), FIB 含量显著减少 ($P < 0.05$) (图 1、2), 表明当归具有显著的活血化瘀作用, 可预防血瘀发生。

3.2 LC-Q/TOF-MS 分析

采用 LC-Q/TOF-MS 对各组血浆样本进行检测, 各组大鼠血浆样本总离子流图见图 3, 从图中可以看出在正、负离子模式下各组血浆样本代谢轮廓存在明显差异。为了更直观地反映各组血浆样本间的整体差异, 分别进行无监督的 PCA 分析和有监督的 PLS-DA 分析, 结果表明, 在正、负离子模式下血瘀模型组与正常对照组大鼠血浆样本间均可完全分离 (图 4、5), 说明大鼠造模后内源性代谢物发生了显著的改变, 表明血瘀模型成功复制。此外, 由图 5 可知, 当归干预组与血瘀模型组完全分离, 但趋近于

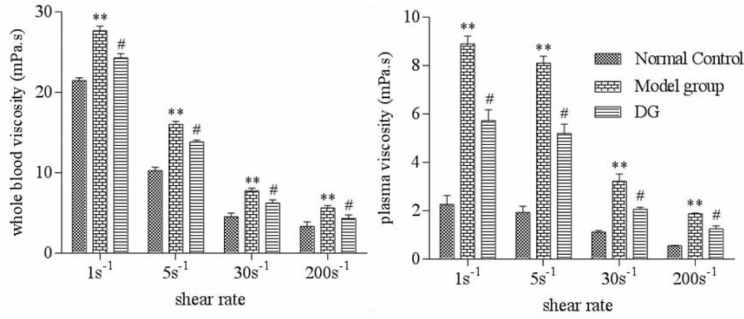


图1 不同切变率下空白对照组、模型组及当归干预组大鼠血液黏度 (n = 8)

Fig. 1 Blood viscosity of normal control, model group and dang-gui intervention group under different shear rates (n = 8)

注:左:全血黏度;右:血浆黏度;与空白对照组比较, ** P < 0.01; 与模型组比较, # P < 0.05

Note: Left: whole blood viscosity; Right: plasma viscosity; Compare with normal control, ** P < 0.01; Compare with model group, # P < 0.05

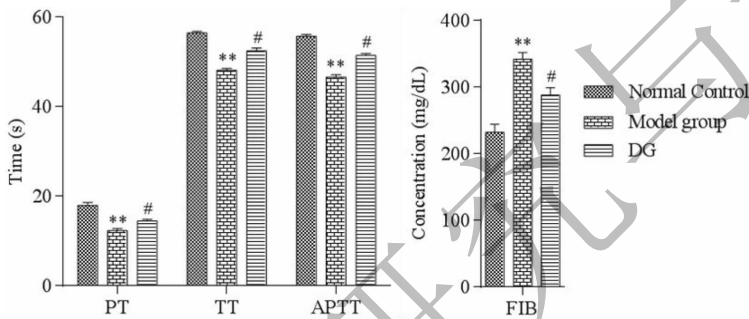


图2 空白对照组、模型组和当归干预组大鼠凝血因子检测结果 (n = 8)

Fig. 2 The results of coagulation factor test in normal control, model group and Dang-Gui intervention group (n = 8)

注:与空白对照组比较, ** P < 0.01; 与模型组比较, # P < 0.05

Note: Compare with normal control, ** P < 0.01; Compare with model group, # P < 0.05

正常对照组,表明当归干预可显著地预防血栓的形成,此结果与生理生化检测结果一致。另外,从图

4、5中也可以看出质控样本(QC)聚集良好,说明该LC-Q/TOF-MS检测系统稳定可靠。

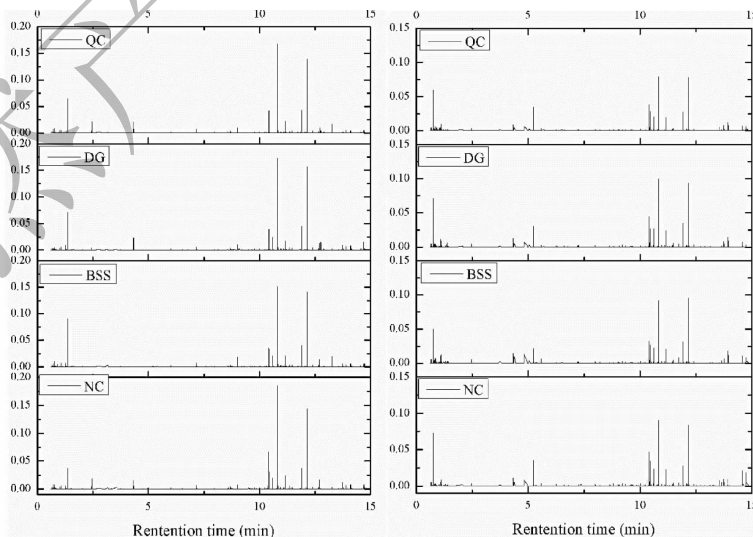


图3 血浆样本总离子流图(左:正离子模式;右负离子模式)

Fig. 3 Total ion current chromatograms of plasma sample in positive mode (ESI⁺, left) and negative mode (ESI⁻, right)

注:NC:正常对照组;BSS:血瘀证模型组;DG:当归干预组;QC:质控样本

Note: NC: normal control; BSS: blood stasis syndrome model group; DG: Dang-Gui intervention group; QC: quality control samples

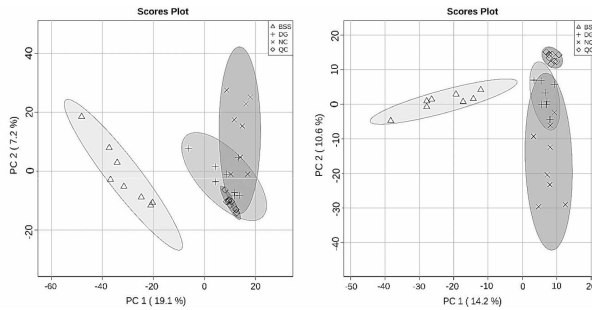


图4 各组血浆样本正(左)、负(右)离子模式下PCA得分图($n=8$)

Fig. 4 PCA Score plot of plasma of normal control, model group and DG group in positive mode (ESI^+ , left) and negative model (ESI^- , right) ($n=8$)

注:NC:正常对照组;BSS:血瘀证模型组;AIG:当归干预组;QC:质控样本

Note:NC:normal control;BSS:blood stasis syndrome model group;DG:Dang-Gui intervention group;QC:quality control samples

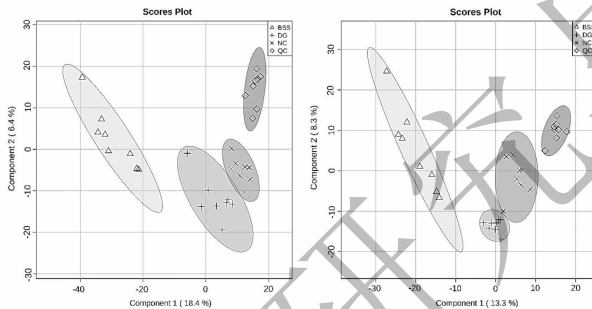


图5 各组血浆样本正(左)、负(右)离子模式下PLS-DA得分图($n=8$)

Fig. 5 PLS-DA Score plot of plasma of normal control group, model group and DG group in positive mode (ESI^+ , left) and negative model (ESI^- , right) ($n=8$)

注:NC:正常对照组;BSS:血瘀证模型组;DG:当归干预组;QC:质控样本

Note:NC:normal control;BSS:blood stasis syndrome model group;DG:Dang-Gui intervention group;QC:quality control samples

3.3 血瘀证大鼠潜在生物标志物的筛选及鉴定

依2.7所述方法进行血瘀证大鼠潜在生物标志物的筛选及鉴定,结果表明在正、负离子模式下共筛选鉴定到血瘀证大鼠血浆样本潜在生物标志物15个(表1)。与正常对照组相比,血瘀模型组大鼠血浆样本中磷脂酰胆碱、磷酸胆碱、花生四烯酸、鞘磷脂、溶血磷脂、半乳糖基神经酰胺、磷脂酰乙醇胺、葡糖神经酰胺、磷脂酸、3-亚磺基丙氨酸、肌酸、1-吡咯啉-2-羧酸含量显著上升($P < 0.05$),甘油酸、L-缬氨酸、L-谷氨酸含量显著下降($P < 0.05$)。给予当归干预后,各生物标志物含量均发生显著回调,其中甘油酸、L-缬氨酸、肌酸、磷酸胆碱、花生四烯酸、鞘磷脂、溶血磷脂、磷脂酸含量可回调至正常水平。

3.4 血瘀证大鼠血浆潜在生物标志物分层聚类分析

为了进一步验证血瘀证大鼠潜在生物标志物的

预测性能,对筛选到的血瘀证潜在生物标志物进行分层聚类分析,得可视化热图6。由图6可知,筛选到的潜在生物标志物可明显地将正常对照组、血瘀模型组和当归干预组进行区分,且组内聚类良好,表明筛选到的血瘀证潜在生物标志物较为可靠,可用于区分血瘀模型与正常对照组。此外,当归干预组与正常对照组处于同一分支,说明当归干预组中潜在生物标志物含量变化与正常对照组基本相同,表明当归可显著回调潜在生物标志物含量。

3.5 代谢通路构建

将潜在生物标志物KEGG ID输入MetaboAnalyst 3.0数据库,构建其代谢通路,根据通路富集路径拓扑结构分析Pathway impact > 0.1 ,筛选出主要靶标路径(表2)。结果表明,15个潜在生物标志物主要涉及D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢、甘油磷脂代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、花生四烯

表1 正负离子模式下血瘀证大鼠血浆样本潜在生物标志物 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)Table 1 Potential biomarkers of plasma on BSS rat in positive and negative model ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

保留时间 Retention time (s)	质荷比 m/z	Δ (ppm)	VIP	P . value	代谢物名称 Metabolites name	化学式 Chemical formula	趋势 Trend			KEGG ID	离子模式 Ion model
							M/NC	DG/M	DG/NC		
44.559	139.0608	5	1.76	0.025	甘油酸 Glyceric acid	$C_3H_6O_4$	↓	↑	-	C00258	+
47.994	134.0223	0	1.18	0.004	1-吡咯啉-2-羧酸 Pyroline-2-carboxylic acid	$C_5H_7NO_2$	↑	↓	↑	C03564	-
65.507	168.029	7	3.33	0.021	L-谷氨酸 L-Glutamic acid	$C_5H_9NO_4$	↓	↑	↓	C00025	-
66.428	286.9724	7	1.49	0.02	磷脂酰胆碱 Phosphatidylcholine	$C_{46}H_{88}NO_8P$	↑	↓	↑	C00157	+
82.647	276.1918	0	27.36	0	L-缬氨酸 L-Valine	$C_5H_{11}NO_2$	↓	↑	-	C00183	+
262.688	130.0631	7	2.16	0.027	肌酸 Creatine	$C_4H_9N_3O_2$	↑	↓	-	C00300	-
485.938	268.1308	7	1.12	0.046	磷酸胆碱 Phosphorylcholine	$C_5H_{15}NO_4P$	↑	↓	-	C00588	+
540.824	387.2982	6	1.68	0.002	花生四烯酸 Arachidonic acid	$C_{20}H_{32}O_2$	↑	↓	-	C00219	+
564.955	413.3136	6	1.56	0.009	鞘磷脂 Sphingomyelin	$C_{45}H_{91}N_2O_6P$	↑	↓	-	C00550	+
565.208	346.214	2	1.63	0.008	溶血磷脂 Lysophospholipid	$C_{30}H_{50}NO_7P$	↑	↓	-	C04230	+
603.708	371.3036	2	2.06	0.009	半乳糖基神经酰胺 Galactosylceramide	$C_{40}H_{77}NO_8$	↑	↓	↑	C02686	+
614.119	441.3453	2	1.85	0.011	磷脂酰乙醇胺 Phosphatidylethanolamine	$C_{43}H_{84}NO_7P$	↑	↓	↑	C00350	+
658.213	399.3353	2	3.75	0.013	葡糖神经酰胺 Glucosylceramide	$C_{44}H_{85}NO_8$	↑	↓	↓	C01190	+
884.663	731.5334	0	2.36	0.01	磷脂酸 Phosphatidic acid	$C_{35}H_{69}O_8P$	↑	↓	-	C00416	+
884.691	189.9568	7	1.59	0.038	3-亚磺基丙氨酸 3-Sulfinoalanine	$C_3H_7NO_4S$	↑	↓	↑	C00606	-

注: Δ : 潜在生物标志物理论质荷比值与实测值间的差值; M/NC: 与正常对照组相比, 血瘀模型组中代谢物含量变化; DG/M: 与血瘀模型组相比, 当归干预组中代谢物含量变化; DG/NC: 与空白组相比, 当归干预组中代谢物含量变化; “↑”表示含量显著升高 ($P < 0.05$); “↓”表示含量显著降低 ($P < 0.05$); “-”表示含量无差异 ($P > 0.05$)。

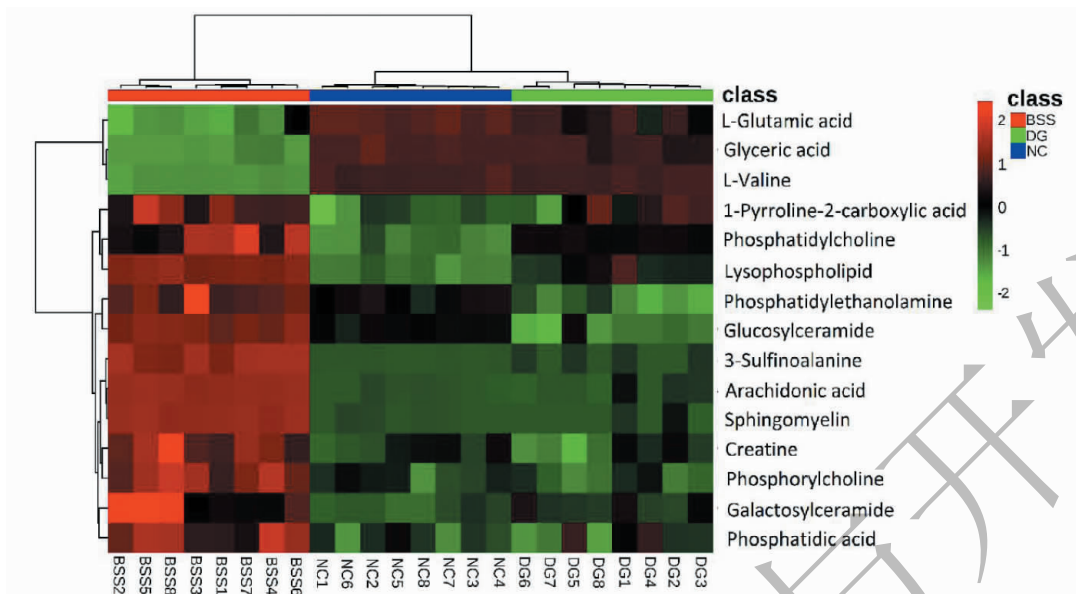
Note: Δ : The difference between the theoretical value and the measured value of the potential biomarker; M/NC: Compared with normal control group, the change of metabolites content in model group; DG/M: Compared with model group, the change of metabolites content in Dang-Gui intervention group; DG/NC: Compared with normal control group, the change of metabolites content in Dang-Gui intervention group; “↑” represents up; “↓” represents down ($P < 0.05$); “-” represents no difference ($P > 0.05$).

酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、丙氨酸, 天冬氨酸和谷氨酸代谢、鞘脂代谢、甘油脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢路径(图7), 当归干预可显著回调潜在生物标志物含量变化, 表明当归可通过对以上代谢路径的调节而预防血瘀的发生。

4 讨论与结论

血瘀证为中医临床常见的症候之一, 其主要病

理学变化为血液呈“黏、浓、凝、聚”状态^[15]。血液流变学检测是血瘀证临床诊断与药物疗效评定的重要指标, 研究表明在高切变率下, 血液黏度主要由红细胞的变形性决定, 中切变率时反映红细胞解聚后无变形时的血液黏度, 在低切变率下, 血液黏度则主要取决于红细胞的聚集性^[16]。本实验结果表明, 与正常对照组相比, 在高、中、低切变率下血瘀模型组大鼠血液黏度均极显著升高 ($P < 0.01$), 说明造模后

图6 血瘀证大鼠潜在生物标志物热图分析($n=8$)Fig. 6 Heatmap analysis of potential biomarkers of blood stasis syndrome rat ($n=8$)

注:BSS:血瘀证模型组;DG:当归干预组;NC:正常对照组

Note: BSS: blood stasis syndrome model group; DG: Dang-Gui intervention group; NC: normal control.

表2 血瘀证大鼠潜在生物标志物代谢路径分析结果

Table 2 Result from pathway analysis of potential biomarkers of blood stasis syndrome rats

代谢路径 Metabolic pathway	Total	Hits	Impact
<i>D</i> -谷氨酰胺和 <i>D</i> -谷氨酸代谢 <i>D</i> -Glutamine and <i>D</i> -glutamate metabolism	5	1	1
甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	30	5	0.517
缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸生物合成 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	11	1	0.333
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	36	2	0.326
牛磺酸和亚牛磺酸代谢 Taurine and hypotaurine metabolism	8	1	0.286
丙氨酸,天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	1	0.259
鞘脂代谢 Sphingolipid metabolism	21	3	0.195
甘油脂代谢 Glycerolipid metabolism	18	2	0.124
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	44	3	0.105

注:Total:代谢途径中所涉及代谢物的总数目;Hits:本研究所筛选的潜在生物标志物在代谢路径中的个数;Impact:通路拓扑分析的影响值。
Note: Total: the total number of metabolites involved in this metabolic pathway; Hits: the number of potential biomarkers selected in this study in the metabolic pathway; Impact: the impact of the topology analysis.

大鼠血液呈“黏、浓、聚”状态。此外,与正常对照组相比,血瘀模型组大鼠 TT、PT、APTT 极显著缩短($P < 0.01$),FIB 含量极显著增加($P < 0.01$),表明造模后大鼠血液凝血倾向增加;与血瘀模型组相比,当归干预组大鼠血液黏度及血浆 FIB 含量均显著降低($P < 0.05$),TT、PT、APTT 显著延长($P < 0.05$),说明当归可对血瘀起到显著的预防作用。

代谢组学分析结果表明血瘀模型组大鼠体内 15 个内源性代谢物含量发生显著改变,当归干预可

显著回调其异常变化(表 1)。MetPA 代谢通路分析表明 15 个差异代谢物主要涉及 *D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢、甘油脂代谢、花生四烯酸代谢等 9 条代谢路径(表 2),说明大鼠血瘀证的形成主要与氨基酸代谢和脂质代谢异常有关。

(1)氨基酸代谢:谷氨酸(GLU)为非必需氨基酸,可参与机体内多种代谢过程,在 *D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢中,谷氨酸在谷氨酸脱氢酶的作用下可生成 α -酮戊二酸,在丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸

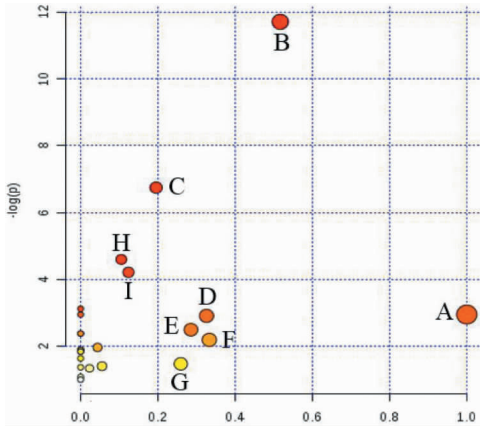


图7 血瘀模型大鼠潜在生物标志物相关代谢通路

Fig. 7 Metabolic pathway of potential biomarkers of blood stasis syndrome rat

Note: A: *D*-Glutamine and *D*-glutamate metabolism, B: Glycerophospholipid metabolism, C: Valine, leucine and isoleucine biosynthesis, D: Arachidonic acid metabolism, E: Taurine and hypotaurine metabolism, F: Alanine, aspartate and glutamate metabolism, G: Sphingolipid metabolism, H: Glycerolipid metabolism, I: Arginine and proline metabolism.

代谢中谷氨酸可被代谢为琥珀酸,二者均可进入三羧酸循环为机体提供能量,此外,更重要的是谷氨酸可经精氨酸、脯氨酸代谢路径合成精氨酸和脯氨酸^[17]。精氨酸是体内合成NO的唯一底物,NO是机体信号分子和炎症介质,具有较强的舒张血管作用,在维持血管张力恒定及调节血压方面起重要作用,补充机体内精氨酸有助于NO的产生,进而可促进血管扩张和血管再生^[18,19]。脯氨酸是机体内胶原蛋白的主要成分,可促进损伤软组织修复,亦可通过抗氧化而抑制细胞凋亡,增加其含量可改善心血管病^[20]。肌酸为精氨酸分解代谢为尿素的中间产物,1-吡咯啉-2-羧酸为脯氨酸分解代谢中间产物,二者在血瘀模型组大鼠血浆中含量均显著升高,谷氨酸含量显著降低,说明血瘀发生后机体血液循环障碍,造成组织缺血缺氧及能量供应不足,机体一方面利用谷氨酸供能增加,以代偿性地增加能量供应,另一方面机体大量利用谷氨酸合成精氨酸、脯氨酸,但由于体内脯氨酸分解代谢增强,精氨酸大量分解为肌酸而进一步产生尿素排出,未对血瘀产生明显的缓解作用。当归干预则可显著回调谷氨酸、肌酸及1-吡咯啉-2-羧酸含量,说明当归干预可促进谷氨酸合成进而增加精氨酸、脯氨酸合成,同时又可抑制脯氨酸分解及精氨酸向尿素的转变,从而增加脯氨酸含量并促使精氨酸分解产生NO用于促进血管扩张、再生及损伤组织修复,以

缓解血瘀症状及预防血瘀形成。

牛磺酸和亚牛磺酸代谢路径侧面反应了机体的能量代谢水平,其代谢中间产物3-亚磺基丙氨酸含量在模型组中显著升高,说明血瘀模型大鼠体内能量代谢紊乱。此外,缬氨酸在机体应激情况下可被分解用于供能,本试验结果表明模型组大鼠血浆缬氨酸含量显著下降,进一步表明血瘀证大鼠体内发生能量代谢紊乱,氨基酸分解供能增加,牛磺酸和亚牛磺酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成路径受到干扰,当归干预对其具有显著的调节作用,可改善其代谢异常。

(2)脂质代谢:甘油磷脂为机体内含量最多的一类磷脂,是生物膜成分之一,可参与细胞识别及信号转导等^[21]。已有研究表明^[22],血瘀形成后蛋白激酶通路被激活,促使磷脂酶A2(PLA2)活化,PLA2能使甘油磷脂水解为溶血磷脂及不饱和脂肪酸,如:花生四烯酸等,花生四烯酸为炎症介质,经代谢可产生前列腺素E2(PGE2)和血栓素A2(TXA2),PGE2不但能够引起疼痛和炎症反应而且可与TXA2促进血小板聚集,血管收缩、凝血及形成血栓。与正常对照组相比,血瘀模型组大鼠血浆甘油酸含量显著下降,而其代谢中间产物磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、溶血性磷脂酰胆碱及花生四烯酸含量均显著升高,表明造模后血瘀模型大鼠体内甘油酯代谢紊乱,进而引起了甘油磷脂代谢和花生四烯酸代谢紊乱,当归干预后其含量均发生显著回调,说明当归干预可显著调节以上异常的脂质代谢,进而预防血瘀发生。

鞘磷脂的蓄积是心脑血管疾病形成的因素之一,特别是在动脉粥样硬化中,其含量明显高于正常血浆^[23]。本实验结果也发现血瘀模型组中鞘磷脂及其前体物质半乳糖基神经酰胺、葡萄糖神经酰胺含量显著升高,而当归干预后均可使其回调,表明血瘀形成过程中鞘磷脂代谢异常,提前给予当归干预对鞘磷脂代谢异常具有很好的调节作用。

综上所述,本研究表明大鼠急性血瘀的形成主要与D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢、甘油磷脂代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、鞘脂代谢、甘油酯代谢、精氨酸和脯氨酸代谢路径紊乱密切相关,当归干预可通过回调潜在生物标志物含量,进一步调节异常的氨基酸、脂质代谢,从而预防血瘀的发生。

参考文献

- 1 Du JX (杜金行), Li TF (李腾飞), Shi ZX (史载祥). Review and prospect of clinical studies on blood stasis syndrome and promoting blood circulation therapy [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2012, 22: 2247-2253.
- 2 Guo QZ (郭强中), Li YY (李云英). Research progress of blood stasis syndrome [J]. *J Liaoning Univ TCM* (辽宁中医药大学学报), 2012, 14: 45-50.
- 3 Guo S, Chen J, Chuo W, et al. A new biomarkers feature pattern consisting of TNF- α , IL-10, and IL-8 for blood stasis syndrome with myocardial ischemia [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 7: 130702.
- 4 Cho KH, Kim KP, Woo BC, et al. Relationship between blood stasis syndrome score and cardioankle vascular index in stroke patients [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 3: 440-448.
- 5 Liu YH (刘医辉), Yang SY (杨世英), Ma WL (马伟林), et al. Research progress on pharmacological effects of *Angelica sinensis* [J]. *China Modern Med* (中国当代医药), 2014, 21: 192-196.
- 6 Li PL, Sun HG, Hua YL, et al. Metabolomics study of hematopoietic function of *Angelica sinensis* on blood deficiency mice model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 166: 261-269.
- 7 Yao WL, Zhang L, Hua YL, et al. The investigation of anti-inflammatory activity of volatile oil of *Angelica sinensis* by plasma metabolomics approach [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29: 269-277.
- 8 Ji P, Wei YM, Xue WX, et al. Characterization and antioxidative activities of polysaccharide in Chinese angelica and its processed products [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 67: 195-200.
- 9 Zhang M (张明). The comparative study about the quality and the effect on enriching and invigorating blood of Gansu different regional angelica [D]. Gansu: Gansu University of Chinese Medicine (甘肃中医药大学), 2015.
- 10 Liu P (刘萍), Wang P (王平), Chen G (陈刚), et al. Research thinking and method of application of metabonomics in complicated theory system of traditional Chinese medicine [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2011, 26: 993-998.
- 11 Huang XC (黄晓晨), Su SL (宿树兰), Guo JM (郭建明), et al. Application and thinking of metabonomics in some scientific problems of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45: 147-153.
- 12 Guo N, Yang DW, Wang XX, et al. Metabonomic study of chronic heart failure and effects of Chinese herbal decoction in rats [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1362: 89-101.
- 13 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China Vol I (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 133.
- 14 Li WX (李伟霞), Huang MY (黄美艳), Tang YP (唐于平), et al. Establishment and optimization of acute blood stasis rat model [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2011, 27: 1765-1770.
- 15 Liu J (刘佳), Li ST (李胜涛), Luo YF (罗永芬). Discussion on blood out of channel: According to blood stasis in the book a treatise on blood troubles [J]. *J Liaoning Univ TCM* (辽宁中医药大学学报), 2009, 11: 47-49.
- 16 Zheng LH (郑立华), Wang QP (王秋萍), Geng HY (耿红艳), et al. To study the correlation of blood viscosity with hematocrit, blood glucose, blood lipids, high-density lipoprotein and low-density lipoprotein [J]. *Chin J Lab Diagn* (中国实验诊断学), 2010, 14: 1415-1417.
- 17 Yan HB (闫洪波), Wang W (王威), Li LD (李令娣), et al. Research progress of the arginine biosynthetic pathway in prokaryotic cells [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2015, 31: 21-28.
- 18 Bao QL (鲍倩玲), Liu YC (刘怡晟), Zhang WL (张伟利). Arginine: an important immune nutrient [J]. *Foreign Medical Sciences Section of Pediatrics* (国外医学儿科学分册), 2004, 31: 258-260.
- 19 Tsai AG, Acero C, Nance PR, et al. Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288: H1730-1739.
- 20 Zhang C (张超), Meng ZH (孟照辉). Functions of P5CRs in the process of organ development and carcinoma growth [J]. *Clin Med* (临床医学), 2016, 36: 122-124.
- 21 Gao X (高欣). The study of phosphatidylcholines (PCs) and lysophosphatidylcholines (LPCs) components inhibition to UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) [D]. Beijing: Chinese Academy of Military Medical Sciences (中国人民解放军军事医学科学院), 2015.
- 22 Zhou CH (周长虹). Study of molecular evolution of phospholipase A2 group IIA in rats [D]. Nanning: Guangxi Medical University (广西医科大学), 2010.
- 23 Qing Y (卿艳), Chen W (陈伟), Wang LL (王莉莉), et al. The biological functions of sphingomyelin synthase and its relations with atherosclerosis [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2010, 26: 573-576.