

基于LC-MS代谢组学研究黄芪注射液对白细胞减少症模型小鼠的干预作用[△]

刘 腾^{1*}, 许晋芳¹, 卢晓林¹, 侯宏保¹, 李震宇², 曲婷丽^{1#}, 赵正保^{1#b} (1. 山西医科大学药学院, 太原 030001; 2. 山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)21-2627-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.21.12

摘要 目的:研究黄芪注射液对白细胞减少症模型小鼠的干预作用。方法:将昆明种小鼠随机分为正常组、模型组和药物组,每组8只。模型组和药物组小鼠均腹腔注射环磷酰胺以复制白细胞减少症模型,正常组小鼠腹腔注射等体积无菌注射用水。造模成功后,正常组和模型组小鼠均腹腔注射等体积无菌注射用水,药物组小鼠腹腔注射黄芪注射液0.04 mL/10 g,每日1次,连续7 d。在检测各组小鼠血常规指标(白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞计数)的基础上,采用液质联用技术(LC-MS)分析血清中的代谢产物,并通过主成分分析(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)等多元统计分析以及HMDB、METLIN、KEGG等数据库和相关文献指认、鉴定差异代谢物;借助MetPA在线工具对差异代谢物的代谢通路进行分析,并基于皮尔逊相关系数分析血常规指标与差异代谢物的相关性。结果:与正常组比较,模型组小鼠血常规指标计数均显著减少($P<0.01$);与模型组比较,黄芪注射液组小鼠上述血常规指标均显著增加($P<0.01$)。正常组和模型组小鼠血清样品的LC-MS图谱明显不同,且黄芪注射液组血清样品LC-MS代谢组学数据与正常组接近。多元统计分析和相关数据库分析显示,与正常组比较,模型组小鼠血清中L-异亮氨酸、二十碳五烯酸等17个代谢物含量显著升高,亚精胺等4个代谢物含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,黄芪注射液可回调小鼠血清中柠檬酸、L-脯氨酸、乙酰肉碱、L-异亮氨酸、L-苯丙氨酸、1-磷酸鞘氨醇、溶血磷脂酰肌醇、二十碳五烯酸和亚油酸等9个代谢物的含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且主要与亚油酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,苯丙氨酸代谢等通路有关(代谢通路影响值均大于0.1)。相关性分析显示,血常规指数与模型组中含量升高的D-鞘氨醇、亚油酸、柠檬酸等含量之间的相关性较明显(r 的绝对值普遍大于0.5)。结论:黄芪注射液可增加白细胞减少症模型小鼠的白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞计数;其升高白细胞的作用可能与亚油酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成及苯丙氨酸代谢等途径有关。

关键词 黄芪注射液;白细胞减少症;环磷酰胺;液质联用技术;代谢组学;小鼠

Study on the Intervention Effects of Huangqi Injection on Leukopenia Model Mice Based on LC-MS Metabolomics

LIU Teng¹, XU Jinfang¹, LU Xiaolin¹, HOU Hongbao¹, LI Zhenyu², QU Tingli¹, ZHAO Zhengbao¹ (1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the intervention effects of Huangqi injection on leucopenia model mice. METHODS: Kunming mice were randomly divided into normal group, model group and drug group, with 8 mice in each group. Model group and drug group were given intraperitoneal injection of cyclophosphamide to induce leukopenia model. Normal group was given intraperitoneal injection of equal volume of sterile water. After modeling successfully, normal group and model group were given intraperitoneal injection of equal volume of sterile water; drug group was given intraperitoneal injection of Huangqi injection 0.04 mL/10 g, once a day, for consecutive 7 d. Based on the detection of blood routine indexes (leukocyte, lymphocyte, neutrophil, monocyte count) of mice in each group, the metabolites in serum were analyzed by LC-MS. Principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), HMDB, METLIN, KEGG and other databases as well as related literatures were used to identify the differential metabolites. The metabolic pathways of differential metabolites were analyzed with MetPA online tools, and the correlation of blood routine indexes and differential metabolites were analyzed on the basis of Pearson correlation coefficient. RESULTS: Compared with normal group, blood routine indexes of model group were decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, above blood routine

[△] 基金项目:山西省回国留学人员科研资助项目(No.2017-017);地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室开放基金项目;山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室开放课题

* 硕士研究生。研究方向:代谢组学。电话:0351-3987249。E-mail:1345733930@qq.com

#a 通信作者:副教授,博士。研究方向:中药药效物质及代谢组学。电话:0351-3987249。E-mail:qutingli@126.com

#b 通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药新药及质量标准。电话:0351-3987249。E-mail:zhengbao_z@163.com

indexes of drug group were all increased significantly ($P < 0.01$). LC-MS chromatogram of serum samples in normal group and model group were significantly different, and LC-MS metabolomics data of serum samples in drug group were similar to those of normal group. Multivariate statistical analysis and correlated database analysis revealed that compared with normal group, serum contents of 17 metabolites as *L*-isoleucine, eicosapentaenoic acid were increased significantly in model group, while the contents of 4 metabolites as spermidine were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model group, Huangqi injection could reverse the serum contents of 9 metabolites in mice, such as citric acid, *L*-proline, acetylcarnitine, *L*-isoleucine, *L*-phenylalanine, sphingosine-1-phosphate, lysophosphatidylinositol, eicosapentaenoic acid and linoleic acid ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), which were associated with linoleic acid metabolism, biosynthesis of phenylalanine, tyrosine and tryptophan, and phenylalanine metabolism (metabolism pathway influential values were all higher than 0.1). Correlation analysis showed that there was a significant correlation between blood routine indexes and the contents of *D*-sphingosine, linoleic acid and citric acid in model group (the absolute values of r were generally greater than 0.5). CONCLUSIONS: Huangqi injection can increase the counts of leukocytes, lymphocytes, neutrophils and monocytes in leucopenia model mice. The increase of leukocytes may be related to linoleic acid metabolism, biosynthesis of phenylalanine, tyrosine and tryptophan, and phenylalanine metabolism.

KEYWORDS Huangqi injection; Leucopenia; Cyclophosphamide; LC-MS; Metabolomics; Mice

黄芪注射液由单味黄芪药材经水提醇沉工艺制备而成,收录于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第17册)》^[1],具有益气养元、扶正祛邪、养心通脉、健脾利湿等功效,可用于治疗心气虚损、心功能不全和血脉瘀阻之病毒性心肌炎、脾虚湿困之肝炎等症^[1-4],在临床上亦可用于治疗消化系统疾病、呼吸系统疾病、心血管系统疾病、原发性肾病综合征等^[5-10]。有研究指出,黄芪注射液在临床上可作为肿瘤治疗的辅助用药,具有明显的升高白细胞的作用^[11-14],但有关该作用具体机制的研究报道较少。本课题组前期采用核磁共振(NMR)代谢组学方法研究发现,黄芪注射液升高白细胞的机制可能与其调控能量代谢、氨基酸代谢、氧化应激反应和胆碱代谢有关^[15]。但由于生物样本的复杂性,代谢物的NMR图谱通常会出现严重的信号重叠,加之方法灵敏度相对较低,使得对差异代谢物的检测不够全面,故该方法并不适用于分析低含量的代谢物^[16]。气质联用技术(LC-MS)具有强大的分离能力,且灵敏度较高,现已被广泛应用于代谢组学研究中^[16]。基于此,本研究借助LC-MS代谢组学的方法对黄芪注射液升高白细胞的药效作用及其具体机制进行进一步探讨,以期为该药的临床应用提供更为充分的实验依据。

1 材料

1.1 仪器与软件

HEMAVET 950FS 型动物血液分析仪(美国 Drew Scientific 公司);Q Exactive 型高分辨 LC-MS 仪、Xcalibur 3.2 工作站软件、Compound Discoverer 3.0 软件(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Simca-P 13.0 软件(瑞典 Umetrics 公司);KDC-149HR 型离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

注射用环磷酰胺(德国 Baxter Oncology GmbH 公司,批号:8J270A,规格:1.0 g);黄芪注射液(正大青春宝药业有限公司,批号:1807163,规格:每支装 10 mL);灭

菌注射用水(石家庄四药有限公司,批号:1903093205,规格:500 mL);甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠 24 只,雄性,体质量(20 ± 2) g,由山西医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(晋)2019-0001。所有小鼠均自由摄食、饮水,适应性喂养 7 d 后进行后续实验。

2 方法与结果

2.1 分组与给药

将小鼠随机分为正常组、模型组和药物组,每组 8 只。模型组和药物组小鼠均腹腔注射环磷酰胺(80 mg/kg,每日 1 次,连续 3 d)以复制白细胞减少症模型,正常组小鼠腹腔注射等体积无菌注射用水。通过比较模型组、药物组与正常组小鼠血常规指标[白细胞(WBC)、中性粒细胞(NE)、淋巴细胞(LY)、单核细胞(MO)计数]是否有显著差异来判断模型是否复制成功^[17]。造模成功后,药物组小鼠腹腔注射黄芪注射液(0.04 mL/10 g,剂量设置参考本课题组前期研究结果^[15]),正常组和模型组小鼠均腹腔注射等体积灭菌注射用水,每日 1 次,连续 7 d。在实验过程中,每隔 2 d 称定小鼠体质量 1 次,并及时根据体质量调整环磷酰胺和黄芪注射液的剂量。

2.2 血样采集

各组小鼠末次给药并禁食、禁水过夜后处死,摘取眼球取血适量,置于含乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)的 EP 管中,用于血常规指标检测;同法取血适量,不抗凝,于 4 °C 下以 13 000 r/min 离心 15 min,分离得血清样品,于 -80 °C 条件下保存,用于 LC-MS 代谢组学分析。

2.3 小鼠血常规指标水平检测

取“2.2”项下各组小鼠经抗凝处理的血样适量,使用动物血液分析仪检测其 WBC、NE、LY、MO 计数等指标。采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析;血常规指标检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差

分析或 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果, 与正常组小鼠比较, 模型组小鼠 WBC、NE、LY、MO 计数均显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 药物组小鼠上述血常规指标均显著增加 ($P < 0.01$), 详见表 1。

表 1 各组小鼠血常规指标水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8, \times 10^9 L^{-1}$)

Tab 1 Comparison of routine blood indexes of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8, \times 10^9 L^{-1}$)

组别	WBC 计数	NE 计数	LY 计数	MO 计数
正常组	9.71 ± 0.46	4.88 ± 0.50	3.41 ± 0.41	1.14 ± 0.14
模型组	5.97 ± 0.82**	2.32 ± 0.20**	2.70 ± 0.44**	0.30 ± 0.03**
药物组	11.44 ± 1.52 [#]	4.70 ± 0.42 [#]	3.96 ± 0.25 [#]	2.46 ± 0.36 [#]

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.01$

2.4 小鼠血清样品 LC-MS 分析

2.4.1 血清样品的处理 取“2.2”项下冻存的血清样品适量, 解冻后, 精密吸取 100 μL , 置于 EP 管中, 依次加入甲醇 225 μL 、乙腈 75 μL 以沉淀蛋白, 涡旋 2 min 后, 于 4 $^{\circ}C$ 下以 13 000 r/min 离心 15 min 后, 取上清液, 待测。

2.4.2 质控(QC)样品的制备 分别取“2.4.1”项下制备的所有待测血清样品各 10 μL , 混合, 即得 QC 样品。

2.4.3 LC-MS 条件 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B), 梯度洗脱 (0~2 min, 98% A; 2~3 min, 98% A \rightarrow 65% A; 3~15 min, 65% A \rightarrow 30% A; 15~18 min, 30% A; 18~29 min, 30% A \rightarrow 2% A; 29~31 min, 2% A; 31~33 min, 2% A \rightarrow 98% A; 33~35 min, 98% A); 柱温: 40 $^{\circ}C$; 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 5 μL 。离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 采用正、负离子切换采集模式和 Full Scan/dd-MS² 扫描模式; 正、负极电压: 3 500 V; 毛细管温度: 320 $^{\circ}C$; 鞘气流速: 35 Arb; 辅气流速: 10 arb; 扫描范围: m/z 100~1 500。

2.4.4 LC-MS 检测系统的稳定性分析 在进行小鼠血清样品 LC-MS 代谢组学分析的过程中, 各血清样品每分析 6 次, 需随机检测 QC 样品 1 次以监测 LC-MS 检测系统的稳定性。本研究随机选择 6 只小鼠 (下同) 的原始检测数据 (即色谱峰峰面积, 下同) 进行分析: 将 LC-MS 原始数据的“Raw”格式文件导入 Compound Discover 3.0 软件中进行提取和预处理, 再将所得数据用 Excel 2010 软件进行面积归一化处理后, 通过 Simca-P 13.0 软件进行偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA), 其得分图见图 1。由图 1 可见, 正常组、模型组小鼠血清样品和 QC 样品均分别聚在一起, 提示该 LC-MS 代谢组学检测系统的稳定性良好^[18]。

2.4.5 代谢物分析 采用“2.4.3”项下 LC-MS 条件, 于正、负离子模式下采集正常组和模型组小鼠血清样品的总离子流图 (TIC), 详见图 2、图 3。结果显示, 代谢物在较短时间内可被很好地分离, 且在正、负离子模式下, 正

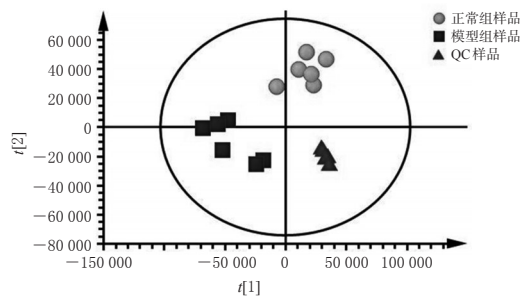


图 1 正常组、模型组小鼠血清样品和 QC 样品的 PLS-DA 得分图

Fig 1 PLS-DA score plot of serum samples and QC samples in normal group and model group

常组和模型组小鼠血清代谢物有所不同。基于此, 本研究进一步采用多元统计分析技术对正常组和模型组之间的差异进行分析。

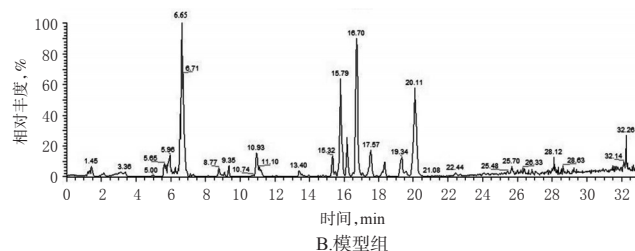
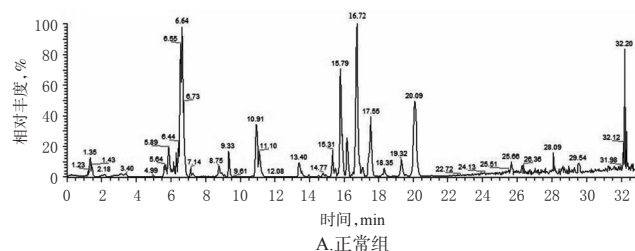


图 2 小鼠血清中代谢物的 TIC 图 (正离子模式)

Fig 2 TIC chromatograms of metabolites in the serum of mice (positive ion mode)

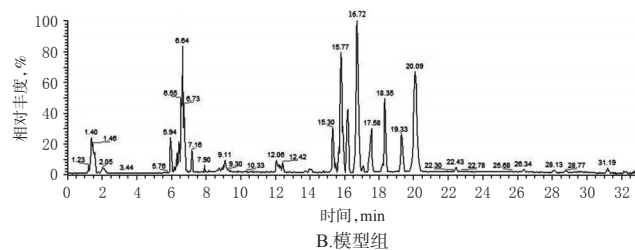
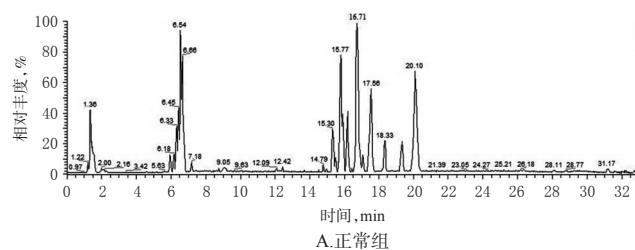


图 3 小鼠血清中代谢物的 TIC 图 (负离子模式)

Fig 3 TIC chromatograms of metabolites in the serum of mice (negative ion mode)

2.4.6 多元统计分析 将LC-MS原始数据的“Raw”格式文件按“2.4.4”项下方法处理后,使用Simca-P 13.0软件进行主成分分析(PCA)、PLS-DA和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等多元统计分析以寻找差异代谢物。以正常组和模型组比较的OPLS-DA模型所得的变量投影重要度(VIP)值($VIP > 1.0$)为标准筛选潜在的差异代谢物^[19-21]。

首先,对正常组、模型组、药物组小鼠的数据进行OPLS-DA分析,其得分图见图4。由图4可见,药物组与正常组的数据较为接近,且这两者与模型组数据分布在不同象限,提示黄芪注射液对环磷酰胺所致小鼠代谢紊乱具有一定的回调作用。

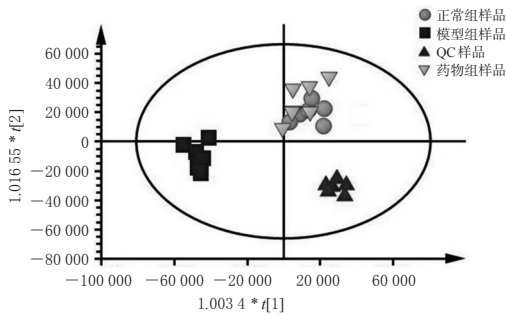
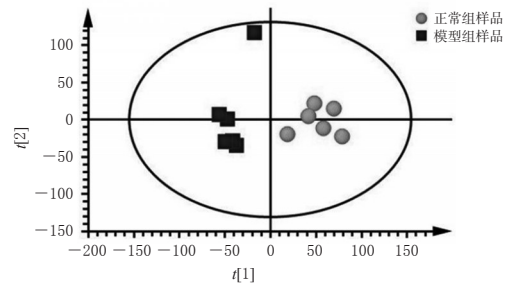


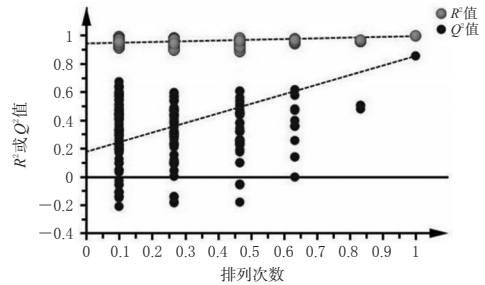
图4 正常组、模型组和药物组小鼠血清样品的OPLS-DA得分图

Fig 4 OPLS-DA score plot of serum samples of mice in normal group, model group and drug group

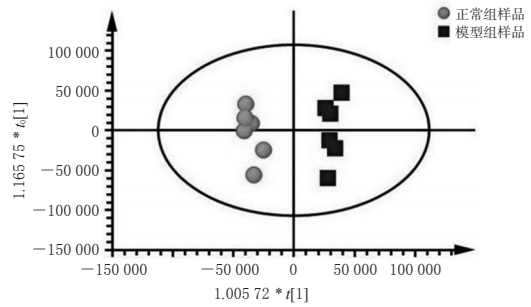
其次,对正常组和模型组小鼠的血清样品进行PCA,其得分图见图5A。由图5A可知,正常组与模型组小鼠血清中的代谢物均能明显区分,表明造模药物环磷酰胺对小鼠血清内源性代谢物产生了明显的影响。为了验证分类模型的有效性,笔者对模型进行了排列试验验证($n=200$),其置换检验结果见图5B。由图5B可知,其中所有的 R^2 和 Q^2 值(分别表示模型的解释、预测能力)都低于原始模型,表明判别模型稳定、预测能力良好^[22]。随后,对正常组和模型组小鼠的血清样品进行OPLS-DA,其得分图见图5C。由图5C可知,正常组与模型组小鼠血清中的代谢物可沿纵轴明显分开,说明两组之间有明显的差异。在通过Compound Discoverer 3.0软件获取代谢物的 m/z 和准确分子量后,结合S-plot图(图5D)中的VIP值($VIP > 1.0$)和 t 检验($P < 0.05$),利用HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、METLIN (<http://enigma.lbl.gov/metlin/>)、KEGG (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)等在线数据库对差异代谢物进行初步分析指认;最后,通过与上述在线数据库和相关文献^[21,23]中的标准图谱进行对比,共鉴定出差异代谢物21个,详见表2(表中,保留时间以正常组样品为例,各组各代谢物的含量均以归一化后的峰面积百分比表示)。由表2可见,与正常组比较,模型组小鼠血清中脯氨酸、甜菜碱、柠檬酸、L-脯氨酸、乙酰肉碱、烟酰胺、L-异亮氨酸、L-苯丙氨酸



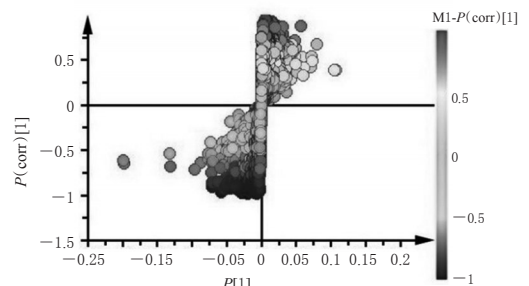
A. PCA得分图



B. PLS-DA置换检验图



C. OPLS-DA得分图



D. S-plot图

图5 正常组和模型组小鼠血清样品的多元统计分析结果
Fig 5 Multivariate statistical analysis results of serum samples of mice in normal group and model group

酸、1-磷酸鞘氨醇、D-鞘氨醇、1-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇、溶血磷脂酰肌醇、1-十七烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、二十碳五烯酸、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸酐、亚油酸等17个差异代谢物的含量均显著升高,而亚精胺、葡萄糖、尿酸、芥酰胺等4个差异代谢物的含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,黄芪注射液可明显回调血清中9个差异代谢物的含量,分别为柠檬酸、L-脯氨酸、乙酰肉碱、L-异亮氨酸、L-苯丙氨酸、1-磷酸鞘氨醇、溶血磷脂酰肌醇、二十碳五烯酸、亚油酸($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表2 正常组、模型组和药物组小鼠血清中的差异代谢物及其含量($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Differential metabolites and their serum contents of mice in normal group, model group and drug group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

序号	差异代谢物	保留时间,min	VIP值	分子式	<i>m/z</i>	采集模式	正常组	模型组	药物组
1	亚精胺	1.20	1.06	C ₈ H ₁₆ N ₂	145.158 1	ESI ⁺	0.508 3 ± 0.125 7	0.311 8 ± 0.050 7*	0.408 2 ± 0.128 1
2	脯氨酰胺	1.24	3.79	C ₈ H ₁₆ N ₂ O	114.079 5	ESI ⁺	1.090 9 ± 0.236 9	1.429 2 ± 0.265 5*	1.242 9 ± 0.217 0
3	葡萄糖	1.37	7.60	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.063 2	ESI ⁺	14.193 8 ± 1.919 0	11.195 1 ± 2.347 0*	13.570 3 ± 4.304 2
4	甜菜碱	1.46	3.00	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.079 3	ESI ⁺	5.741 1 ± 1.002 3	7.286 5 ± 1.066 2*	6.150 4 ± 1.529 7
5	尿酸	1.50	3.34	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	168.028 0	ESI ⁺	5.661 7 ± 0.707 5	4.270 3 ± 0.895 7*	3.296 1 ± 0.836 3
6	柠檬酸	1.51	4.94	C ₆ H ₈ O ₇	192.026 8	ESI ⁻	1.001 6 ± 0.562 2	1.857 6 ± 0.124 1*	1.399 7 ± 0.206 0**
7	L-脯氨酸	1.94	3.85	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.079 3	ESI ⁺	1.195 6 ± 0.241 9	1.718 5 ± 0.468 3*	1.202 3 ± 0.226 8*
8	乙酰肉碱	2.22	2.18	C ₈ H ₁₇ NO ₄	203.116 0	ESI ⁺	4.674 0 ± 0.599 5	6.927 2 ± 2.108 8*	4.568 4 ± 1.385 3*
9	烟酰胺	2.31	4.10	C ₆ H ₆ N ₂ O	122.048 3	ESI ⁺	1.067 9 ± 0.495 2	1.791 2 ± 0.364 7*	1.751 6 ± 0.662 1
10	L-异亮氨酸	3.26	2.80	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.094 9	ESI ⁺	14.528 4 ± 4.268 3	27.974 3 ± 8.945 8*	16.490 4 ± 4.505 7*
11	L-苯丙氨酸	5.71	2.35	C ₉ H ₉ NO ₂	165.079 1	ESI ⁺	11.981 9 ± 2.729 9	15.498 8 ± 2.312 7*	11.804 0 ± 2.615 9*
12	1-磷酸鞘氨醇	13.75	1.57	C ₁₈ H ₃₈ NO ₃ P	379.249 1	ESI ⁺	4.8127 2 ± 2.278 7	7.701 7 ± 0.986 7*	4.477 2 ± 0.983 4**
13	D-鞘氨醇	14.35	2.04	C ₁₈ H ₃₂ NO ₂	299.282 5	ESI ⁺	0.227 8 ± 0.099 5	0.527 3 ± 0.201 7*	0.453 4 ± 0.167 8
14	1-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇	15.34	1.73	C ₂₃ H ₄₆ NO ₃ P	481.317 0	ESI ⁺	1.890 0 ± 0.246 3	2.657 7 ± 0.568 7*	2.276 4 ± 0.480 0
15	溶血磷脂酰肌醇	16.55	1.28	C ₂₅ H ₄₈ O ₂ P	620.297 0	ESI ⁻	1.508 5 ± 0.426 6	2.586 3 ± 0.938 4*	1.547 1 ± 0.447 9*
16	1-十七烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱	18.28	1.10	C ₂₅ H ₅₀ NO ₃ P	509.348 7	ESI ⁺	7.655 3 ± 1.596 3	11.684 8 ± 3.298 0*	9.247 7 ± 1.860 2
17	二十碳五烯酸	18.41	1.01	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	302.224 8	ESI ⁻	14.156 0 ± 1.571 9	19.339 2 ± 4.373 0*	13.826 8 ± 4.159 2*
18	邻苯二甲酸二丁酯	19.55	1.14	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	278.152 0	ESI ⁺	5.596 0 ± 0.687 3	9.524 6 ± 2.404 0**	8.336 3 ± 3.074 9
19	邻苯二甲酸酐	19.59	1.06	C ₈ H ₆ O ₃	148.016 2	ESI ⁺	8.976 3 ± 0.805 0	14.707 2 ± 3.342 1**	12.463 6 ± 4.271 6
20	亚油酸	26.41	1.55	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240 4	ESI ⁺	0.388 8 ± 0.061 3	0.799 5 ± 0.118 1**	0.623 7 ± 0.093 4*
21	芥酰胺	32.13	1.14	C ₂₂ H ₄₄ NO	337.334 6	ESI ⁺	11.309 5 ± 0.832 0	8.690 4 ± 1.567 1**	11.388 6 ± 3.497 3

注:与正常组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与模型组比较,#*P*<0.05,###*P*<0.01

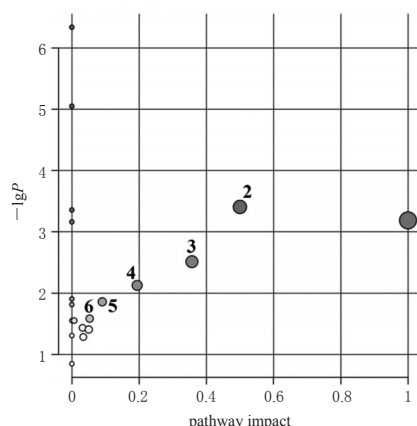
Note: vs. Normal group, **P*<0.05, ***P*<0.01; vs. model group, #*P*<0.05, ###*P*<0.01

2.5 代谢通路分析

为了寻找与白细胞减少症相关的代谢通路,笔者将“2.4.6”项下所得的21个差异代谢物导入MetPA在线工具(MetaboAnalyst 3.0, <http://www.Metaboanalyst.ca>)中进行分析,共寻找到与白细胞减少症最相关的6条代谢途径[代谢通路影响(Pathway impact)值大于0],分别为亚油酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,苯丙氨酸代谢,烟酸和烟酰胺代谢,柠檬酸(TCA)循环,半乳糖代谢,详见图6。结合表2中黄芪注射液可显著回调的差异代谢物分析结果可知,黄芪注射液治疗白细胞减少症可能与亚油酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,苯丙氨酸代谢等途径有关。

2.6 血常规与差异代谢物的相关性分析

本研究采用MetPA在线工具计算皮尔逊相关系数以考察血常规指标WBC、NE、LY、MO计数与21个差异代谢物含量之间的相关性,结果见图7(图中,1~21分别对应表2中的21个差异代谢物)。由图7可知,LY计数与差异代谢物含量之间的相关性大于WBC、NE、MO计数(前者*r*的绝对值普遍大于后三者);WBC、NE、LY、MO计数与模型组中含量降低的差异代谢物芥酰胺、葡萄糖、尿酸、亚精胺含量之间的相关性均较小(*r*分别为-0.20~-0.30、-0.16~-0.32、-0.15~-0.31、-0.06~-0.48,绝对值普遍小于0.5),与模型组中含量升高的差异代谢物D-鞘氨醇、亚油酸、柠檬酸含量之间的相关性均较大(*r*分别为-0.67~-0.55、-0.68~



注:1.亚油酸代谢;2.苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成;3.苯丙氨酸代谢;4.烟酸和烟酰胺代谢;5. TCA循环;6.半乳糖代谢

Note: 1. linoleic acid metabolism; 2. phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; 3. phenylalanine metabolism; 4. nicotinate and nicotinamide metabolism; 5. TCA cycle; 6. galactose metabolism

图6 代谢通路分析结果

Fig 6 Results of metabolism pathway analysis

-0.56、-0.73~-0.49,绝对值普遍大于0.5)。

3 讨论

3.1 黄芪注射液给药剂量的选择

黄芪注射液在临床上的用量为20 mL/d,以成人的体质量60 kg计算,成人用量为 3.33×10^{-4} mL/(g·d),再根据体表面积换算成小鼠等效剂量为成人的10倍,小鼠用量应为 3.33×10^{-3} mL/(g·d)。本课题组前期实验中采

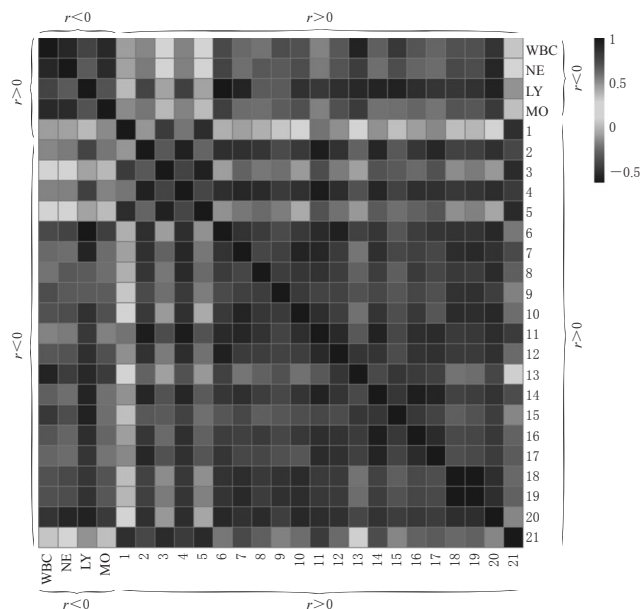


图7 血常规指标与差异代谢物的相关性分析结果

Fig 7 Correlation analysis results of routine blood indexes and differential metabolites

用白细胞减少症动物模型,考察了给药剂量分别为 3×10^{-3} 、 4×10^{-3} 、 5×10^{-3} 的黄芪注射液升高白细胞的作用。实验结果显示,3个剂量组均有升高白细胞的作用,因此在本实验中选择了 4×10^{-3} mL/(g·d)的给药剂量,即每日给药剂量为0.04 mL/10 g。

3.2 黄芪注射液升高白细胞的代谢通路分析

3.2.1 亚油酸代谢 亚油酸和油酸是组成细胞膜的主要成分,其含量升高可能与造血干细胞的坏死和凋亡有一定关系^[24]。本研究使用环磷酰胺造模后,发现模型组小鼠体内亚油酸含量显著升高,这一结果与文献结果^[25-27]基本一致,说明环磷酰胺可通过作用于亚油酸代谢途径而引起白细胞减少。给予黄芪注射液后,小鼠体内的亚油酸含量显著降低,提示黄芪注射液可回调小鼠亚油酸水平,这种回调作用可能与亚油酸代谢通路有关。

3.2.2 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成以及苯丙氨酸代谢 氨基酸是蛋白质的重要组成部分,氨基酸代谢在氨基酸的生物合成和代谢中起着重要作用,是细胞增殖、生存和发育的必经途径^[15,21]。已有研究报道,调节氨基酸代谢可作为治疗白细胞减少症的手段之一^[15,21]。苯丙氨酸是人体必需的芳香族氨基酸之一,在正常情况下可以作为氨基酸残基在人体组织细胞中参与合成各种蛋白质,其也可在肝脏中产生酪氨酸,而酪氨酸可促进某些激素和神经递质(如多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素)的分泌^[28]。有研究指出,肝脏和肾脏疾病和免疫力、神经体液、遗传和其他因素都有可能引发苯丙氨酸代谢疾病,因此苯丙氨酸代谢的稳定状态有助于人体正常生长发育和生理机能的维持^[29]。本研究发现,模型

组小鼠体内的葡萄糖水平显著降低,而L-苯丙氨酸水平显著升高,说明环磷酰胺可引起苯丙氨酸的生物合成发生变化,与文献结果^[21,29]基本一致。在给予黄芪注射液后,小鼠体内L-苯丙氨酸水平显著降低,说明黄芪注射液可通过作用于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成及苯丙氨酸代谢通路,发挥治疗白细胞减少症的作用。

3.3 血常规指标与差异代谢物的相关性

白细胞减少症以体内WBC低于 4.0×10^9 L⁻¹为诊断标准。本研究的血常规检测结果显示,模型组小鼠的WBC、NE、LY、MO计数均显著减少,说明模型复制成功;给予黄芪注射液后,药物组小鼠上述血常规指标均显著增加,说明黄芪注射液有升高白细胞的作用。本研究对各组小鼠的血清样品进行LC-MS代谢组学分析,共鉴定出差异代谢物21个,与正常组比较,模型组小鼠血清中亚精胺、葡萄糖、尿酸、芥酰胺等4个差异代谢物的含量显著下降;相关性分析显示,下降的差异代谢物含量与血常规指标水平呈正相关(r 普遍大于0),说明常规的检测方法与代谢组的检测结果一致,一定程度上验证了代谢组学结果的可靠性。

3.4 NMR代谢组学结果与LC-MS代谢组学结果比较

本课题组前期采用NMR代谢组学方法研究黄芪注射液升高白细胞的作用机制,找到了差异代谢物19个,共涉及7条代谢通路^[15]。LC-MS代谢组学与NMR代谢组学分析结果相比,有能被两种方法同时检出的差异代谢物(如葡萄糖、甜菜碱、异亮氨酸等),也有只能通过单一方法检出的差异代谢物(如乳酸、肌酸、赖氨酸、精氨酸等只能被NMR法检出,亚油酸、D-鞘氨醇只能被LC-MS法检出)。可见,两种代谢组学方法结合使用将有助于更全面地筛选环磷酰胺致白细胞减少的差异代谢物。两种代谢组学方法分析结果均涉及到了TCA和半乳糖代谢,同时也涉及到了其余不同的代谢途径,亦可将这两种方法互为补充。

综上所述,本研究采用LC-MS代谢组学的方法对黄芪注射液干预环磷酰胺致小鼠白细胞减少症的作用机制进行了研究,确定了模型小鼠血清中21个差异代谢物,阐明了黄芪注射液升高白细胞的作用机制可能是与亚油酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的合成以及苯丙氨酸代谢等通路有关。本研究结果可与之前NMR代谢组学的结果相互补充,能更全面地阐明黄芪注射液治疗白细胞减少症的作用机制,为该制剂在临床上用于肿瘤辅助治疗提供更充分的实验依据。在后续的研究中,本课题组将采用Western blotting等方法检测前文所得代谢通路中一些关键代谢物的表达情况,对上述代谢组学分析结果进行验证。

参考文献

[1] 卫生部.中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂:第17册[S].北京:人民卫生出版社,1998:256.

- [2] 尤淑贤,王小平.炙甘草汤治疗病毒性心肌炎的循证药理学评价研究[J].中医临床研究,2019,11(28):141-145.
- [3] 王纯.探讨心宁汤配合黄芪注射液治疗病毒性心肌炎的临床疗效[J/CD].中西医结合心血管病电子杂志,2016,4(32):145-146.
- [4] 郭雪红.黄芪注射液的药理作用及临床应用研究进展[J].中国药房,2015,26(21):3018-3021.
- [5] 高维娟.黄芪注射液临床应用研究进展[J].承德医学院学报,2014,31(2):129-131.
- [6] 张喜平,袁玉梅.黄芪注射液临床应用概况[J].医学研究杂志,2007,36(2):96-98.
- [7] 王洋.黄芪注射液对血液透析患者残余肾功能的影响[J].中国现代药物应用,2019,13(22):123-125.
- [8] 崔受云.黄芪注射液治疗心脑血管疾病的临床应用[J/CD].临床医药文献电子杂志,2018,5(27):50-52.
- [9] 漆映辉,曲晓璐,刘晨,等.黄芪注射液对慢性肾脏病患者对比剂暴露后肾脏功能状态的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2019,20(2):109-112.
- [10] 赵海鹰,高丽华,邢秀玲,等.黄芪注射液在肾脏疾病中的临床应用进展[J].临床误诊误治,2017,30(8):113-116.
- [11] 汪东杰,汪丽艳,黄炜.黄芪注射液对乳腺癌患者辅助化疗后胃肠道不良反应及营养状态的影响[J].新中医,2019,51(10):128-131.
- [12] 曾凡娟,周一鸣,张银花,等.黄芪注射液在血液肿瘤化疗儿童中的应用探究[J].中国合理用药探索,2019,16(11):156-159.
- [13] HUANG XY, ZHANG SZ, WANG WX. Enhanced antitumor efficacy with combined administration of astragalus and pterostilbene for melanoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(3):1163-1169.
- [14] 江云丽.黄芪注射液配合生脉注射液治疗肿瘤放疗后白细胞减少症临床研究[J].亚太传统医药,2016,12(16):148-149.
- [15] QU TL, LI ZY, ZHAO SJ, et al. A metabonomic analysis reveals novel regulatory mechanism of Huangqi injection on leucopenia mice[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, 38(2):113-123.
- [16] LI X, LUO H, HUANG T, et al. Statistically correlating NMR spectra and LC-MS data to facilitate the identification of individual metabolites in metabolomics mixtures[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(7):1301-1309.
- [17] 曲婷丽,王二兵,李震宇,等.黄芪注射液乙酸乙酯萃取物对小鼠白细胞减少症作用的代谢组学[J].中成药,2017,39(3):455-461.
- [18] CHENG Y, LIU Y, TAN J, et al. Integrated serum metabolomics and network pharmacology approach to reveal the potential mechanisms of withanolides from the leaves of *Datura metel* L. on psoriasis[J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2020. DOI:10.1016/j.jpba.2020.113277.
- [19] 宫文霞.当归及其活性成分的抗抑郁作用及机制研究[D].太原:山西大学,2019.
- [20] 谢运飞,李芸霞,刘美辰,等.基于血浆代谢组学的附子脂溶性生物碱对佐剂性关节炎模型大鼠的毒性作用机制研究[J].中国药房,2019,30(1):78-83.
- [21] TIAN SS, HUANG PL, GU Y, et al. Systems biology analysis of the effect and mechanism of Qi-jing-sheng-bai granule on leucopenia in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2019. DOI:10.3389/fphar.2019.00408.
- [22] LI GX, GAO WL, XU YJ, et al. Serum metabonomics study of pregnant women with gestational diabetes mellitus based on LC-MS[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(8):2057-2063.
- [23] CHEN CC, YIN QC, TIAN JS, et al. Studies on the potential link between antidepressant effect of Xiaoyao San and its pharmacological activity of hepatoprotection based on multiplatform metabolomics[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020. DOI:10.1016/j.jep.2019.112432.
- [24] BROWN DM, WILLIAMS H, RYAN KJP, et al. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and serine biosynthetic pathway genes are co-ordinately increased during anabolic agent-induced skeletal muscle growth[J]. *Sci Rep*, 2016. DOI:10.1038/srep28693.
- [25] 师莹,阳勇,秦伟瀚,等.环磷酸胺对小鼠免疫抑制作用过程中代谢通路变化的代谢组学研究[J].中国实验动物学报,2017,25(5):539-543.
- [26] 陈婧,刘云霞,徐叶峰,等.代谢组学分析骨髓抑制模型小鼠血清小分子代谢产物[J].色谱,2017,35(12):1312-1316.
- [27] JI P, WEI YM, HUA YL, et al. A novel approach using metabolomics coupled with hematological and biochemical parameters to explain the enriching-blood effect and mechanism of unprocessed *Angelica sinensis* and its 4 kinds of processed products[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018. DOI:10.1016/j.jep.2017.09.028.
- [28] FERNSTROM JD, FERNSTROM MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain[J]. *J Nutr*, 2007, 137(6 Suppl 1):1539S-1547S.
- [29] LI SJ, LIN H, QU C, et al. Urine and plasma metabonomics coupled with UHPLC-QTOF/MS and multivariate data analysis on potential biomarkers in anemia and hematonic effects of herb pair Gui-Hong[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015. DOI:10.1016/j.jep.2015.05.019.

(收稿日期:2020-03-21 修回日期:2020-08-20)

(编辑:张元媛)