

本文引文格式:杨彩艳,方晓燕,卢国康,等.基于动脉粥样硬化家兔模型研究痹病药膳方代谢组学与配方优化[J].右江民族医学院学报,2023,45(6):848-860.

【论著与临床报道】

基于动脉粥样硬化家兔模型研究痹病药膳方代谢组学与配方优化

杨彩艳^{1,2},方晓燕³,卢国康³,黎飏¹,黄永毅¹,李小婷¹,莫枫川¹,农成威¹,李保生¹,王金花^{1,3}

1. 广西壮族自治区中药体内药物化学数据库建设与应用工程研究中心,广西 百色 533000;
2. 广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室,广西 百色 533000;
3. 广西高校生态铝工业基地环境与人群健康研究重点实验室,广西 百色 533000;
4. 桂林医学院,广西 桂林 541001)

摘要:目的 研究痹病药膳方的配伍规律和作用机制,为其深入研发提供科学依据。方法 使用动脉粥样硬化(AS)家兔模型,研究血脂水平、血液流变学和主动脉弓形态评价优化方剂配方;使用 LC-MS 技术比较研究各配方血清代谢组学,最优配方血清、心和肝代谢组学阐述其代谢机制。结果 痹病药膳方最优配方为鸡血藤、土茯苓和黄芪(配方3);血清中3种配方共有药效代谢差异物24个,配方3特有药效代谢差异物8个,配方1与配方2药效代谢差异物差异较小,配方3与其它两个配方药效代谢差异物差异较大;配方3在血清、心和肝中药效代谢差异物较大,在肝中鉴定的药效代谢差异物最多、心其次,配方3在血清、心和肝中共有的药效代谢差异物较少;配方1和配方2的代谢机制差异很小,配方3与其它两个配方差异较大;配方3在不同组织器官中的药效差异比较大。结论 配方3为最佳配方,血清中配方3与其它两个配方代谢轮廓差异比较大;配方3在不同组织和器官中代谢轮廓差异较大。

关键词:痹病药膳方;组方优化;AS家兔模型;代谢组学

中图分类号:R284 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2023)06-0848-13

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.06.003

Metabonomics and formula optimization of Bibing Yaoshan prescription based on atherosclerosis rabbit model

Yang Caiyan^{1,2}, Fang Xiaoyan³, Lu Guokang³, Li Biao¹, Huang Yongyi¹, Li Xiaoting¹,
Mo Fengchuan¹, Nong Chengwei¹, Li Baosheng¹, Wang Jinhua^{1,3}

1. Guangxi Database Construction and Application Engineering Research Center for Intracorporal Pharmacochimistry of Traditional Chinese Medicine, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Studies on Characteristic Ethnic Medicine in Youjiang River Basin, Baise 533000, Guangxi, China;
3. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Environment and Population Health Research in Ecological Aluminum Industry Base, Baise 533000, Guangxi, China;
4. Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the compatibility regularities and mechanisms of action of the Bibing Yaoshan prescription, providing a scientific basis for its further research and development. **Methods** Using an atherosclerosis (AS) rabbit model, this research evaluated optimal formulations by examining blood lipid

基金项目:广西重点研发计划(桂科 AB1850004);百色市科学研究与技术开发计划项目(百科 20211803-1);右江民族医学院科研课题(yy2021sk018)

第一作者简介:杨彩艳(1975—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药药效物质、作用机制和质量标准研究,E-mail:yangcaiyan@ymun.edu.cn

通讯作者简介:王金花(1979—),女,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:病理生理研究,E-mail:wangjinhua@ymun.edu.cn

levels, hemorheology and aortic arch morphology. LC-MS technology was employed to conduct comparative serum metabolomic studies of various formulations and elucidate their metabolic mechanisms, specifically focusing on the most optimal formula in serum, heart and liver. **Results** The optimal Bibing Yaoshan prescription formulation included *Suberect spatholobus*, *Smilax glabra* Roxb, and *Astragalus membranaceus* (Formula 3). there were 24 pharmacodynamic metabolites in serum among the three formulas, with eight specific to Formula 3, the difference of pharmacodynamic metabolites between Formula 1 and 2 was not obvious but between Formula 3 and other two formulas was significant. Notable variations in pharmacodynamic metabolites of Formula 3 were seen in serum, heart and liver, with the highest identification of pharmacodynamic metabolites in the liver, followed by the heart, Formula 3 has fewer mutual pharmacodynamic metabolism differences in serum, heart and liver. The metabolic mechanism differences between Formulas 1 and 2 were minor, while Formula 3 differed notably from the other two formulas. Formula 3 exhibited substantial variation in effect across different tissues and organs. **Conclusion** Formula 3 emerged as the most optimal, displaying significantly distinct metabolic profiles in serum compared to the other two formulas. the metabolic profile of Formula 3 varies greatly in different tissues and organs.

Key words: Bibing Yaoshan prescription; formula optimization; AS rabbit model; metabolomics

心脑血管疾病(cardiovascular and cerebrovascular diseases, CCD)主要病理基础是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS),全球仅由冠状动脉疾病(coronary artery disease, CAD)导致的致死率约为 31%^[1-2]。在中医病名中没有发现 AS 病名,但其症状和中风、胸痹、眩晕等相似,属于中医痹病的范畴。痹病的病因病机主要因火旺、血虚、痰浊、气滞、阴虚等导致,常采用清热解毒、活血化瘀、益气养血等治疗。

痹病药膳方由鸡血藤(*Spatholobus suberectus* Dunn)、土茯苓(*Smilax glabra* Roxb)和猪腿骨组成,在壮族地区被广泛用于防治瘫痪^[3]。鸡血藤为豆科密花豆属密花豆的根、茎,因其具有养血活血、通经活络等功效而在中医临床中被用于治疗贫血病、月经病和动脉粥样硬化性心脑血管疾病等,现代药理学研究结果表明鸡血藤乙醇提取物具有抗炎、神经保护、降血脂、改善血液流变学、补血和抗癌等药效^[4-8]。土茯苓属于百合科菝葜属土茯苓的根,具有解毒、除湿、通利关节药效,常用于治疗梅毒、重金属中毒、肌张力增高、肾炎、心血管疾病、糖尿病血管并发症等,现代药理学研究表明它具有抗炎、抗氧化和抗心衰等药效^[9-12]。猪腿骨是一种食物并可用于提供营养从而增强人体的免疫力即中医理论中的“补气”。中药黄芪(*Astragalus membranaceus* Fisch)为豆科黄芪属植物膜荚黄芪的根,因其具有药效好、价格低在被广泛用于增强人体免疫力,现代药理学研究表明黄芪具有提高心功能、促进血管生成、调节血糖、抗癌、增强免疫调节活性等药效,其主要的药效成分为黄酮类、三萜皂苷类和多糖^[13-17]。

痹病药膳方在壮族地区被用于防治类风湿性关节炎、动脉粥样硬化(AS)、痛风等痹病,但尚无其药效、

作用机制、组方优化、配伍规律等研究的报道。本文比较研究各配方家兔血清代谢组学,比较研究最优配方血清、心和肝的代谢组学,优化其配方和研究其代谢机制,为深入研发痹病药膳方提供科学实验基础。

1 材料和方法

1.1 试剂和动物 胆固醇(No. 531F102, Solarbio), 总胆固醇(TC)(No. 201012; maccera biology Co. Ltd.), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)(No. 200928; maccera biology Co. Ltd.), 甘油三酯(TG)(No. 201020; maccera biology Co. Ltd.), 高密度脂蛋白(HDL-C)(No. 200928; maccera biology Co. Ltd.), 超氧化物歧化酶(SOD)(No. 20010910228; Meikang biotechnology Co. Ltd), 乌拉坦(氨基甲酸乙酯, HY1223-500g, 上海恒远生物科技有限公司), 家兔(No. 0008757, 雌雄各半, 4.5 个月龄, 体重 2.00~2.50 kg, 广西田东兔业有限责任公司)。

1.2 痹病药膳方的制备 痹病药膳方组成为 25 g 鸡血藤、25 g 土茯苓和 500 g 猪腿骨^[3]。配方 1 为 75 g 鸡血藤, 配方 2 为 37.5 g 鸡血藤和 37.5 g 土茯苓, 配方 3 为 34.5 g 鸡血藤、34.5 g 土茯苓和 6 g 黄芪; 根据人一动物药物剂量换算表将其换算成家兔的剂量都是 3.5 g/(kg·d), 血脂康的剂量是 0.36 g/(kg·d)^[18]。药材于 2020 年 9 月 15 日购自百色市正阳药店, 样本(No. 20200915)存放于广西壮族自治区中药体内药物化学数据库建设与应用工程研究中心。血脂康胶囊(No. 20201201)作为阳性药物, 购自北京北大维信生物科技有限公司。分别依次使用乙醇-水(90:10、50:50和 5:95, 每种溶剂提取 3 次, 每次提取 72 h)在室温下浸提 8 kg 配方 1、配方 2 和配方 3 的药材, 提取液减压浓缩至 2 L。

1.3 样本采集和药效评价 高脂饲料自制,成分为胆固醇—猪油—蛋黄粉—基础饲料(1:8:4:87)^[18]。48 只家兔单笼饲养,适应 1 周后随机分为正常组(CG)、模型组(MG)、血脂康组(PG)、配方 1 组(SG)、配方 2 组(DG)和配方 3 组(AG),每组都是雌雄各半。实验 60 d,每周称 1 次体重,正常组给予基础饲料,其他组给予高脂饲料;此外,血脂康组、配方 1 组、配方 2 组和配方 3 组 分别口服给予血脂康、配方 1~3,给药 60 d。

实验结束后所有家兔禁食不禁水 12 h,采集耳缘静脉血液,检测血浆 TC、LDL-C、TG、HDL-C 和 SOD 含量(7600-020 全自动生化分析仪,Hitachi)及测试血液流变学(SA9000 全自动锥板式血液流变分析仪)。所有家兔耳缘静脉注射乌拉坦—水(25:100, m/v;4 mL/kg),然后从颈静脉收集血清、心和肝,用于代谢组学研究,采集主动脉弓样本,用 Motic BA210 数码生物显微镜和 Motic BA600 虚拟扫描切片系统分析病理切片分析。

1.4 代谢组学分析 80 mg 心和肝样本依次加入 200 μ L H₂O,匀浆、涡旋 60 s,加入 800 μ L 甲醇—乙腈(1:1, v/v)、涡旋 60 s 和低温超声 30 min 2 次。400 μ L 甲醇—乙腈(1:1, v/v) 加入到 100 μ L 心和肝的样品及血清中,所有样品涡旋 60 s,并在 -20 $^{\circ}$ C 放置 1 h 沉淀蛋白质,然后在 14 000 r/min 离心 10 min,上清液使用 0.22 μ m 滤膜过滤,并使用 UPLC-Q-

TOF-MS(Agilent 1290 超高效液相色谱、Agilent, AB Triple TOF 6600 质量分析器、AB SCIEX)分析, Q-TOF-MS 配置电喷雾(ESI), UPLC 配置色谱柱(填料: Waters、ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μ m, 柱规格 2.1 mm \times 100 mm; 填料: Waters、ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μ m, 柱规格 2.1 mm \times 100 mm)。色谱条件和质谱参数设置同参考文献^[18]。代谢组学研究由上海中科新生命生物科技有限公司完成。

1.5 统计学方法 实验数据使用($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素分析法分析不同组之间的差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。使用 SPSS 26.0(IBM, New York, USA)和 GraphPad Prism 8.0(GraphPad Prism, California, USA)分析活性数据。此外,使用 SIMCA-P 14.1(Umetrics, Umea, Sweden)软件对代谢差异物进行主成分分析(PCA)、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)。

2 结果

2.1 痹病药膳方在 AS 家兔模型中的作用 实验期间所有家兔的体重都是稳定增加的,不同组间体重差异不明显。其它各组的 SOD 值都比正常组低,30 d 时差异无统计学意义,60 d 时差异有统计学意义,其它各组间的差异无统计学意义,见表 1。这表明因高脂诱导的氧化应激在 30 d 内不明显,当实验持续到 60 d 时导致家兔产生氧化应激障碍,配方 1~3 均没有表现出明显的抗氧化活性。

表 1 家兔血液流变学和 SOD 数据 ($n=8$)

组别	全血黏度(1.00 s ⁻¹) / mPa·s		全血黏度(5.00 s ⁻¹) / mPa·s		全血黏度(30.00 s ⁻¹) / mPa·s		全血黏度(200.00 s ⁻¹) / mPa·s	
	30 d	60 d	30 d	60 d	30 d	60 d	30 d	60 d
正常组	18.69 \pm 1.23	20.12 \pm 1.84	8.06 \pm 0.88	8.10 \pm 0.66	4.34 \pm 0.09	4.44 \pm 0.36	3.11 \pm 0.15	3.14 \pm 0.17
模型组	26.28 \pm 4.70 ^b	25.71 \pm 2.18 ^b	9.71 \pm 1.23 ^b	10.24 \pm 1.51 ^b	4.92 \pm 0.451 ^b	5.00 \pm 0.37 ^b	3.44 \pm 0.31 ^b	3.40 \pm 0.30 ^a
配方 2 组	20.37 \pm 0.96 ^d	20.90 \pm 1.60 ^d	8.10 \pm 0.90 ^d	8.24 \pm 1.40 ^d	4.44 \pm 0.08 ^d	4.52 \pm 0.44 ^d	3.19 \pm 0.20 ^c	3.21 \pm 0.17
配方 3 组	21.01 \pm 1.92 ^d	20.75 \pm 2.33 ^d	8.58 \pm 0.51 ^c	8.48 \pm 1.14 ^d	4.88 \pm 0.64 ^{ae}	4.94 \pm 0.36 ^{ae}	3.39 \pm 0.20 ^a	3.07 \pm 0.18 ^c
F	12.148	13.227	5.251	5.283	4.497	4.525	4.003	3.521
P	<0.001	<0.001	0.005	0.005	0.011	0.010	0.017	0.028

表 1(续) 家兔血液流变学和 SOD 数据 ($n=8$)

组别	血浆黏度/mPa·s		红细胞聚集指数		全血高切指数		全血低切指数		SOD/U·mL ⁻¹	
	30 d	60 d	30 d	60 d	30 d	60 d	30 d	60 d	30 d	60 d
正常组	1.20 \pm 0.03	1.20 \pm 0.02	6.22 \pm 0.40	6.22 \pm 0.52	2.59 \pm 0.30	2.61 \pm 0.22	16.03 \pm 1.04	17.62 \pm 0.90	127.40 \pm 8.08	126.72 \pm 13.56
模型组	1.21 \pm 0.05	1.24 \pm 0.06	7.31 \pm 1.20 ^a	7.97 \pm 1.67 ^a	2.79 \pm 0.41	2.80 \pm 0.22	20.87 \pm 2.64 ^b	20.47 \pm 2.24 ^b	121.49 \pm 10.37	102.86 \pm 14.27 ^b
配方 1 组	—	—	—	—	—	—	—	—	122.40 \pm 8.13	103.22 \pm 18.54
配方 2 组	1.25 \pm 0.07	1.28 \pm 0.05 ^a	6.11 \pm 0.34 ^d	6.17 \pm 0.61 ^c	2.61 \pm 0.05	2.72 \pm 0.30	15.58 \pm 1.80 ^d	16.21 \pm 3.73	124.58 \pm 15.27	106.52 \pm 16.77 ^a
配方 3 组	1.21 \pm 0.07 ^d	1.20 \pm 0.02 ^e	6.19 \pm 0.50 ^d	6.22 \pm 0.51 ^c	2.83 \pm 0.30	2.83 \pm 0.07	18.17 \pm 1.61 ^{adf}	18.25 \pm 1.39	122.78 \pm 6.06	104.12 \pm 20.69 ^a
F	1.311	6.560	5.310	6.772	1.330	1.651	13.575	4.457	0.474	2.878
P	0.290	0.002	0.005	<0.001	0.285	0.200	<0.001	0.011	0.703	0.037

注:①表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。②与正常组比较,a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$;与模型组比较,c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$;与配方 2 组比较,e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$ 。

血清脂质数据结果,见表 2。与正常组 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 相比,模型组值大且差异有统计学意义($P < 0.01$);血脂康组、配方 1 组、配方 2 组和配方 3 组的值高于正常组但低于模型组,与模型组之间的统计学差异显著;在血脂康组、配方 1 组、配方 2 组和配方 3 组中,除 HDL-C 值外,其它血脂值从高到低的顺序是 配方 1 组、配方 2 组、配方 3 组和血脂康组;

配方 3 组血浆的 HDL-C 值要高于配方 1 组和配方 2 组但其它值却比它们更低。这些结果表明家兔高脂饮食能导致高血脂疾病,血脂康、配方 1~配方 3 均表现一定程度的预防药效,药效由强到弱的顺序是:血脂康→配方 3→配方 2→配方 1,使用少量黄芪代替同质量的鸡血藤和土茯苓能增强抗 AS 免疫能力,黄芪在配方 3 中扮演佐药和使药的角色。

表 2 主动脉弓和血脂数据 ($n=8$)

组别	TG/(mmol·L ⁻¹)		TC/(mmol·L ⁻¹)		内膜厚度/ 度/ μm	内膜厚度/ 中膜厚度
	30 d	60 d	30 d	60 d		
正常组	0.96±0.11	0.96±0.14	2.04±0.28	2.08±0.35	19.16±5.55	0.09±0.02
模型组	1.58±0.25 ^b	1.62±0.31 ^b	4.11±0.52 ^b	4.32±0.51 ^b	59.52±7.48 ^b	0.25±0.06 ^b
血脂康组	0.99±0.15 ^d	1.03±0.13 ^d	3.13±0.18 ^d	2.96±0.28 ^{db}	23.14±6.78 ^d	0.13±0.03 ^d
配方 1 组	1.31±0.18 ^c	1.30±0.17 ^c	3.72±0.15	3.73±0.32 ^{bc}	45.23±6.32 ^{db}	0.16±0.07 ^c
配方 2 组	1.29±0.23 ^{bc}	1.26±0.15 ^{bd}	3.66±0.14 ^{bc}	3.68±0.43 ^{bc}	39.14±6.89 ^{db}	0.15±0.06 ^d
配方 3 组	1.11±0.09 ^{bde}	1.17±0.12 ^{ade}	3.63±0.17 ^{bc}	3.66±0.41 ^{bc}	35.23±8.93 ^{db}	0.14±0.05 ^d
F	13.815	13.265	56.205	31.817	34.987	8.533
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2(续) 主动脉弓和血脂数据 ($n=8$)

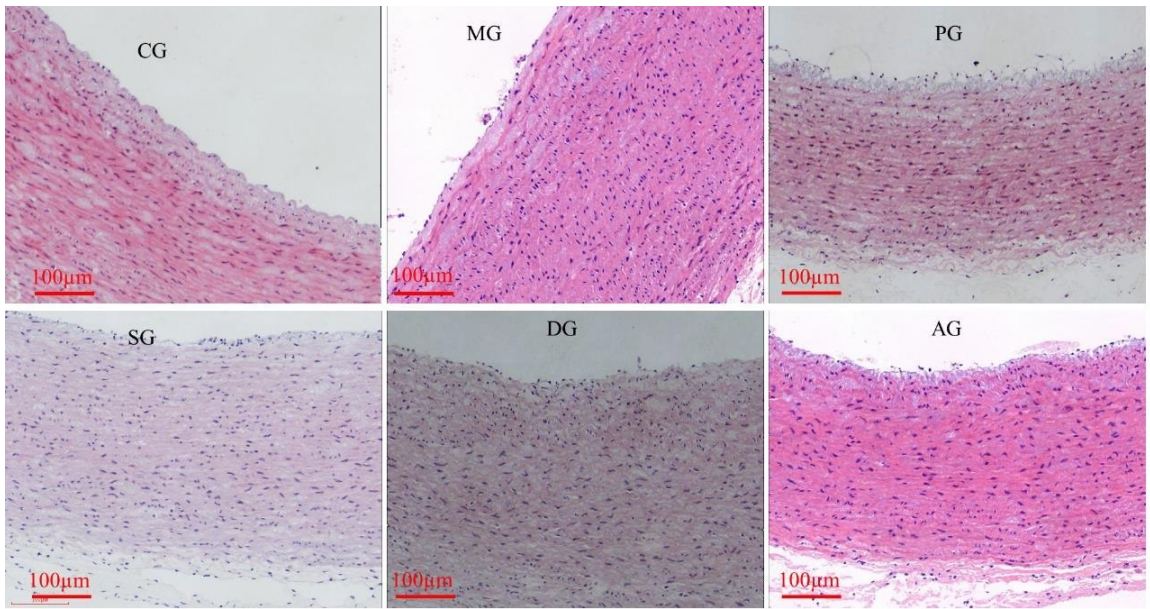
组别	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)		HDL-C/(mmol·L ⁻¹)		斑块面积/ μm^2	斑块面积/ 主动脉弓面积
	30 d	60 d	30 d	60 d		
正常组	0.49±0.19	0.62±0.07	0.80±0.29	0.71±0.35	16228.53±5958.44	0.0419±0.0170
模型组	1.63±0.35 ^b	1.94±0.33 ^b	1.13±0.19 ^a	1.19±0.09 ^b	105878.96±7992.85 ^b	0.2213±0.0527 ^b
血脂康组	1.02±0.22 ^{db}	1.21±0.23 ^{db}	0.99±0.15	1.03±0.18 ^b	55742.46±4889.23 ^{db}	0.0650±0.0356 ^d
配方 1 组	1.29±0.31 ^b	1.53±0.29 ^{cb}	0.82±0.19	0.89±0.21	68634.533±5871.32 ^{dbf}	0.0723±0.0483 ^d
配方 2 组	1.18±0.26 ^{bc}	1.45±0.28 ^{db}	0.95±0.17	1.06±0.15 ^a	57649.25±4782.13 ^{db}	0.0699±0.0288 ^d
配方 3 组	1.11±0.29 ^{bd}	1.39±0.32 ^{db}	1.11±0.23	1.12±0.17 ^b	53578.92±2418.02 ^{dbf}	0.0667±0.0296 ^d
F	14.767	21.005	3.586	5.615	214.124	24.581
P	<0.001	<0.001	<0.009	<0.001	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。②与正常组比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$;与模型组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$;与配方 2 组比较,e: $P < 0.05$,f: $P < 0.01$ 。

血液流变学的数据见表 1。和正常组相比,除血浆黏度和全血高切指数外,模型组各项值升高且差异有统计学意义。大部分配方 2 组和配方 3 组的值都高于正常组,但低于模型组的值,配方 2 组和模型组相比,只有全血高切指数、60 d 时全血黏度、30 d 时血浆黏度和 60 d 时全血低切指数的统计学差异无统计学意义。配方 3 组与配方 2 组之间,只有全血黏度、60 d 时血浆黏度、30 d 时全血高切指数差异有统计学意义,且配方 3 组的高于配方 2 组的。以上结果表明家兔高脂饮食可以诱导高黏血症,配方 2 和配方 3 都具有预防药效,配方 2 药效略优于配方 3。

主动脉弓病理形态研究的结果见图 1,内膜厚度值、内膜、中膜厚度比值及粥样斑块面积结果见表 2。正常组内膜的内皮细胞相对完整和排列整齐,内部弹

力膜清晰;中膜平滑肌中细胞的排列和体积都是正常的,从内膜到中膜都没有发现泡沫细胞和脂质沉积。和正常组相比,模型组内膜内皮细胞出现肿胀和变性,聚集有很多泡沫细胞,一些内弹力膜断裂;平滑肌受损和排列浑浊,从内膜到中膜都发现脂质在细胞外沉积。血脂康组、配方 1 组、配方 2 组和配方 3 组发生了和模型组相似的病变但程度比模型组轻,其病变程度由重到轻的顺序是配方 1 组、配方 2 组和配方 3 组、血脂康组且与内膜厚度值、内膜、中膜厚度比值及粥样斑块面积一致。这些结果表明血脂康的药效最强,配方 1 的药效最弱,配方 2 药效弱于配方 3。综合抗氧化、降血脂、改善血液流变学和病理形态结果,配方 3 是抗 AS 的最优配方。



注:CG 为正常组, MG 为模型组, PG 为血脂康组, SG 为配方 1 组, DG 为配方 2 组, AG 为配方 3 组。

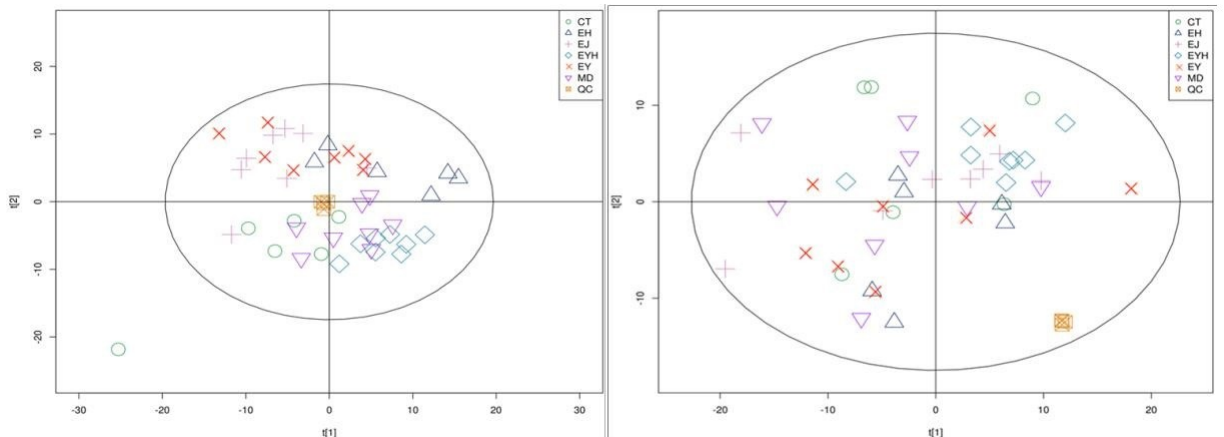
图 1 主动脉弓病理形态研究结果 (10×)

2.2 代谢组学

2.2.1 模型可靠性和稳定性研究 为了阐明痹病药膳方不同配方代谢轮廓差异,比较研究了各配方干预 AS 家兔血清代谢组学;为了更全面阐述痹病药膳方代谢轮廓,比较研究了配方 3 干预 AS 家兔血清、心和肝代谢组学。质控(QC)样品 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流图保留时间的重叠性和色谱峰的响应强度都很好,表明整个实验过程中仪器误差引起的变化较小。使用 XCMS 软件在正/负离子模式下分别从血清、心和肝中提取到的离子峰数目分别是 11489/8516、16286/11321 和 16147/11150,正离子峰的数目均高于负离子峰,表明研究所有器官组织中正离子模式优于负离子模式。

使用 UPLC-Q-TOF-MS 数据建立主成分分析

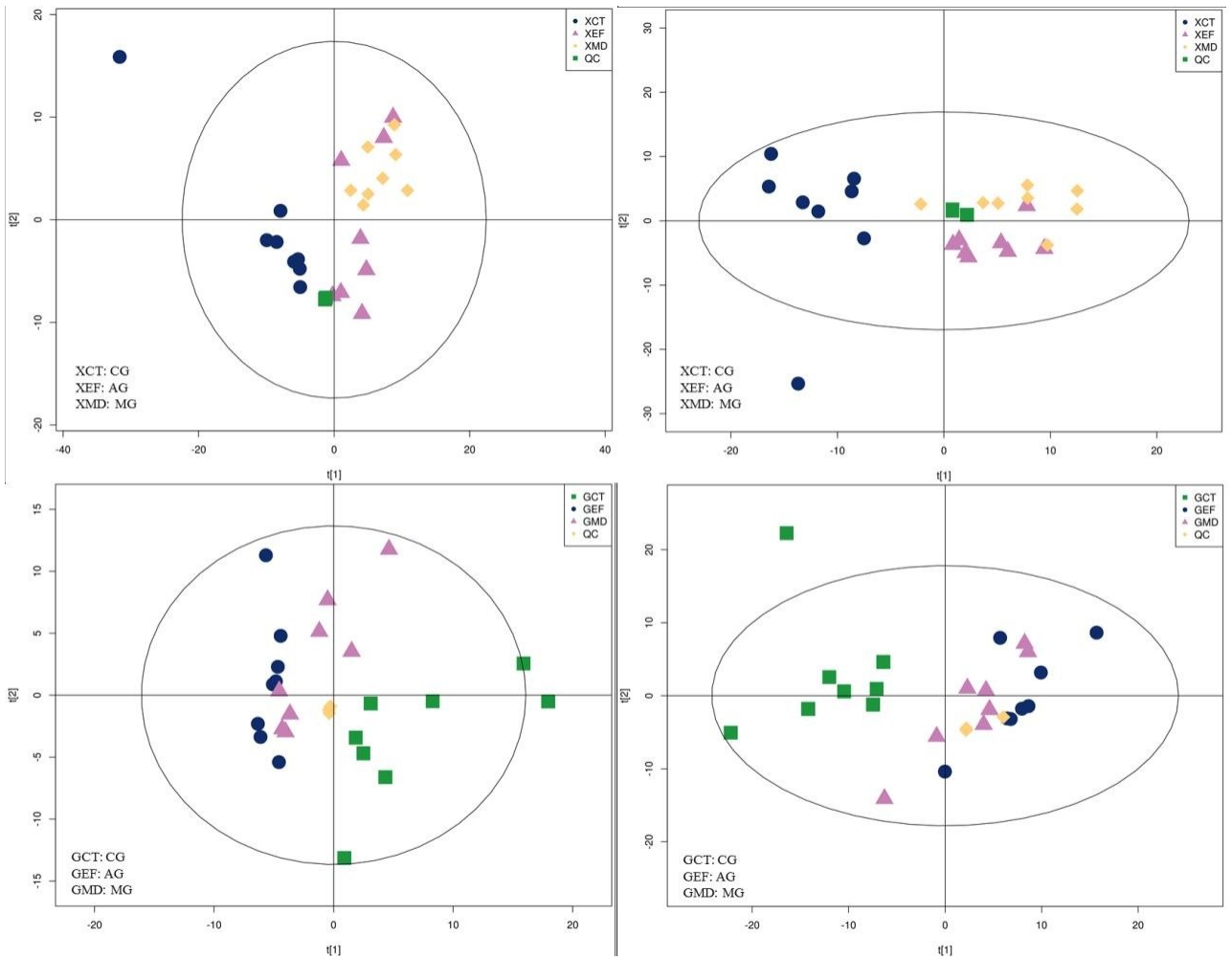
(PCA)模型识别正常组、模型组、配方 1 组、配方 2 组和配方 3 组 之间的总体差异(见图 2、图 3、表 3)。所有 QC 正负离子模式下的离子峰都紧密聚集,表明实验具有良好的重复性。得分图表明除了负离子模式下血清中的模型组和正常组、配方 2 组和模型组外,其它不同组间能很好的聚类。这个结果表明心、肝及正离子模式下血清中鉴别的代谢差异物都是可行的。此外,使用偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)识别不同组间的代谢差异物(见图 4~图 6,表 3)。除心在正离子模式下其配方 3 组和模型组的值为 0.473 cum 外,其它的都大于 0.50 cum;表明代谢模型稳定可靠,心在正离子模式下其配方 3 组和模型组之间模型的稳定性也较好。



注:左图和右图分别在正负离子模式下测试,两种模式下 $R^2 X$ 值分别是 0.544 和 0.555;

CT、MD、EJ、EY 和 EYH 分别代表正常组、模型组、配方 1 组、配方 2 组和配方 3 组。

图 2 血清质量控制样本(QC)的主成分分析(PCA)得分图



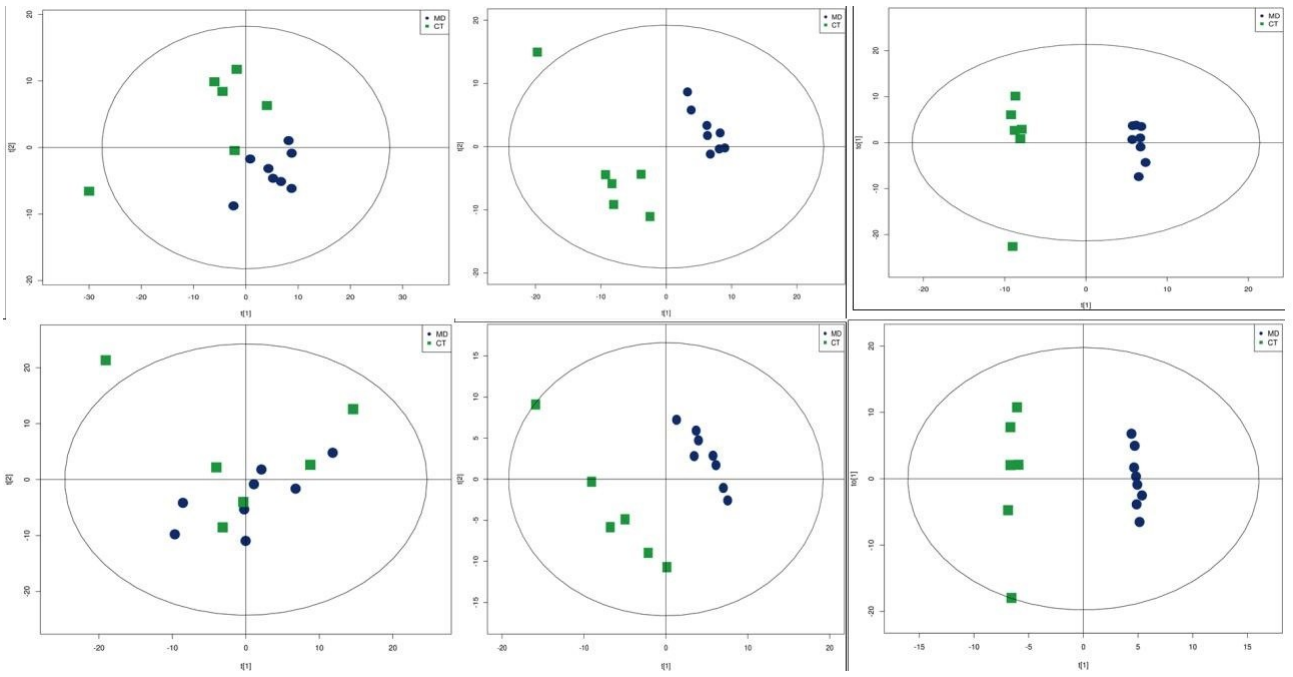
注：左图和右图分别在正负离子模式下测试，上图为心、下图为肝；
心的 $R^2 X$ 值分别为 0.517 和 0.568，肝的 $R^2 X$ 值分别为 0.542 和 0.511；
CG 为正常组,AG 为配方 3 组,MG 为模型组。

图 3 心和肝 QC 的 PCA 分析得分图

表 3 多元统计分析 $R^2 X$ 、 $R^2 Y$ 和 Q^2 值

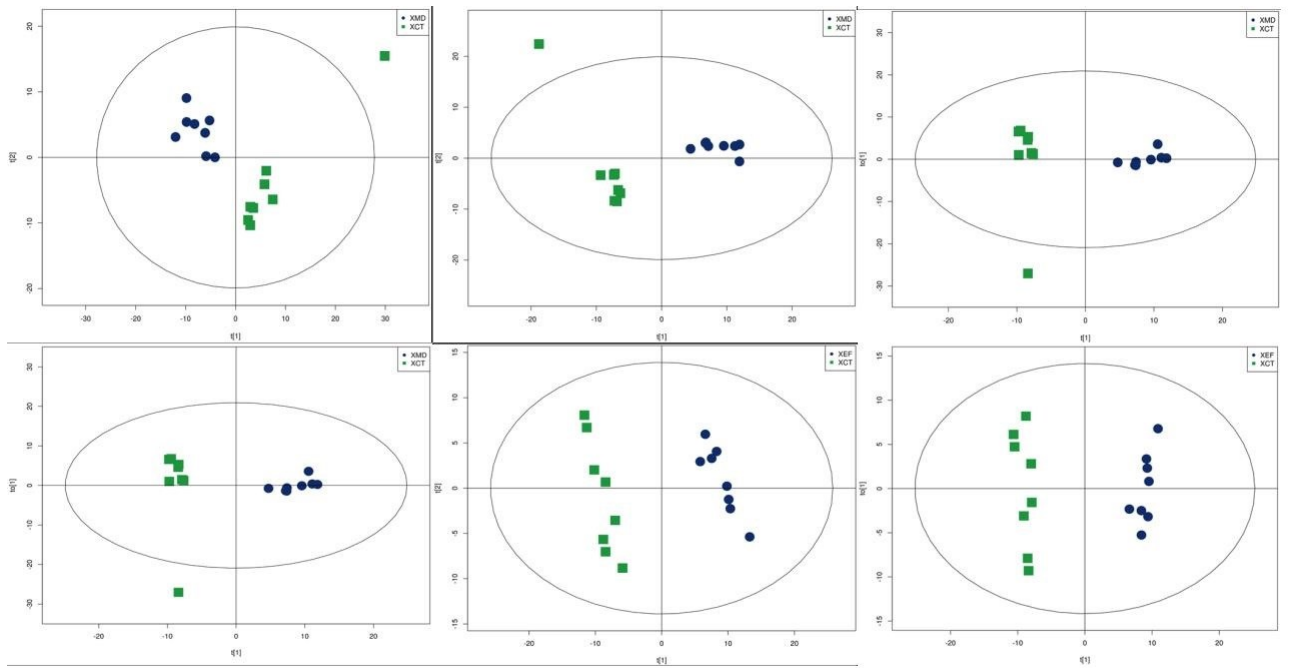
组别	PCA		PLS-DA		OPLS-DA		
	$R^2 X$	$R^2 X$	$R^2 Y$	Q^2	$R^2 X$	$R^2 Y$	Q^2
血清							
模型组/正常组	0.586/0.570	0.564/0.254	0.997/0.986	0.927/0.752	0.564/0.328	0.994/0.995	0.826/0.560
配方 1 组/正常组	0.593/0.552	0.456/0.334	0.984/0.954	0.925/0.413	0.460/0.337	0.984/0.960	0.906/0.596
配方 1 组/模型组	0.541/0.561	0.445/0.481	0.993/0.990	0.874/0.780	0.341/0.481	0.980/0.990	0.849/0.719
配方 2 组/正常组	0.580/0.556	0.538/0.295	0.995/0.970	0.920/0.618	0.538/0.410	0.995/0.991	0.920/0.748
配方 2 组/模型组	0.501/0.561	0.436/0.600	0.998/0.994	0.925/0.965	0.371/0.600	0.965/0.994	0.843/0.725
配方 3 组/正常组	0.527/0.537	0.579/0.439	0.997/0.994	0.934/0.819	0.515/0.439	0.949/0.994	0.850/0.770
配方 3 组/模型组	0.515/0.527	0.329/0.486	0.996/0.989	0.760/0.821	0.329/0.486	0.996/0.989	0.690/0.773
心							
模型组/正常组	0.553/0.585	0.451/0.460	0.963/0.993	0.899/0.887	0.451/0.460	0.963/0.993	0.861/0.881
配方 3 组/正常组	0.536/0.605	0.499/0.388	0.994/0.986	0.949/0.914	0.499/0.388	0.994/0.986	0.890/0.903
配方 3 组/模型组	0.533/0.503	0.430/0.310	0.990/0.947	0.764/0.595	0.430/0.310	0.990/0.947	0.473/0.594
肝							
模型组/正常组	0.521/0.520	0.279/0.441	0.990/0.996	0.745/0.897	0.279/0.441	0.990/0.990	0.784/0.900
配方 3 组/正常组	0.521/0.533	0.290/0.380	0.991/0.989	0.869/0.911	0.290/0.380	0.991/0.989	0.824/0.902
配方 3 组/模型组	0.563/0.568	0.221/0.459	0.994/0.994	0.732/0.818	0.221/0.459	0.994/0.994	0.742/0.639

注：“/”左边和右边的值分别为正离子模式和负离子模式下的值。



注:上下图分别为正负离子模式。CG为正常组, MG为模型组。

图 4 血清中模型组(蓝色)和正常组(绿色)比较 PCA(左图)、PLS-DA(中间)和 OPLS-DA(右边)得分图

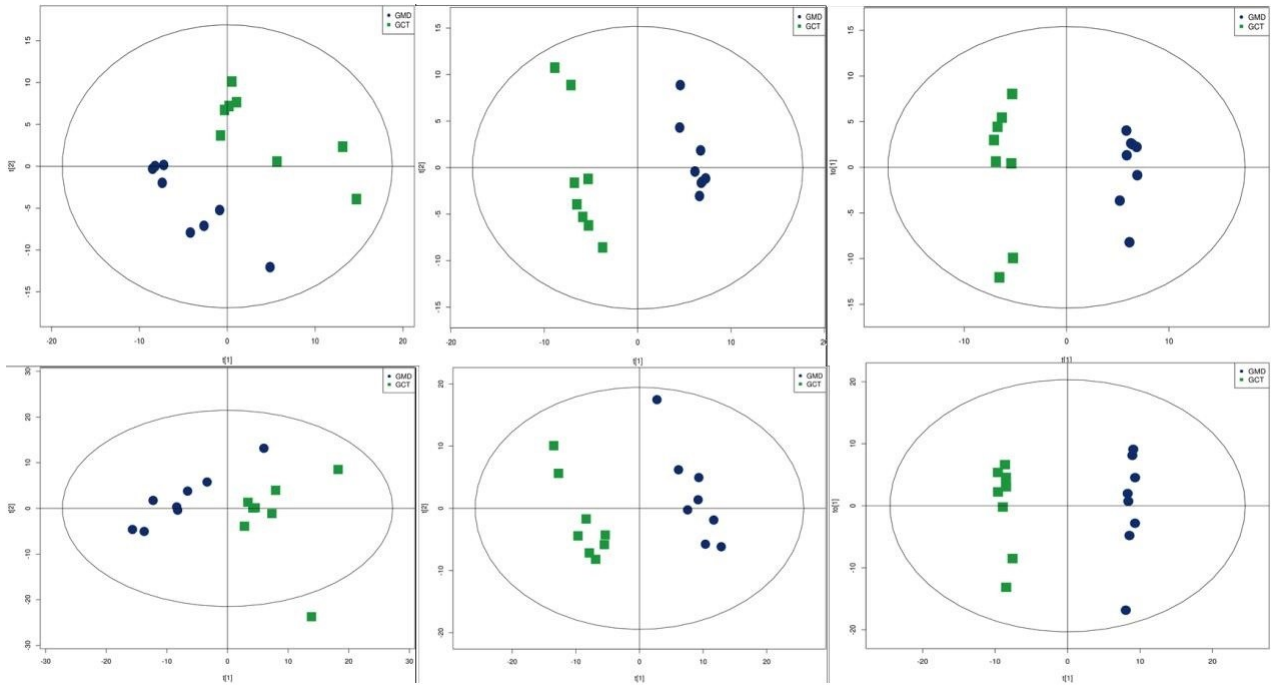


注:上下图分别为正负离子模式。CG为正常组, MG为模型组。

图 5 心中模型组(蓝色)和正常组(绿色)比较 PCA(左图)、PLS-DA(中间)和 OPLS-DA(右边)得分图

2.2.2 代谢差异物研究 正常组和模型组之间的差异代谢物(variable metabolites, VM, $P < 0.05$)被定义为疾病代谢差异物(diseases metabolite, DM);既是疾病代谢差异物也是模型组和药物组间的代谢差异物,且配方对模型组的调控方向和模型组与正常组的

相反,被定义为药效代谢差异物(pharmacodynamic metabolite, PM)。血清、心和肝中识别的 DM 如表 4 和图 7 所示;从血清、心和肝中鉴定的 PM 见表 5、表 6 和图 8。



注:上下图分别为正负离子模式。CG 为正常组, MG 为模型组。

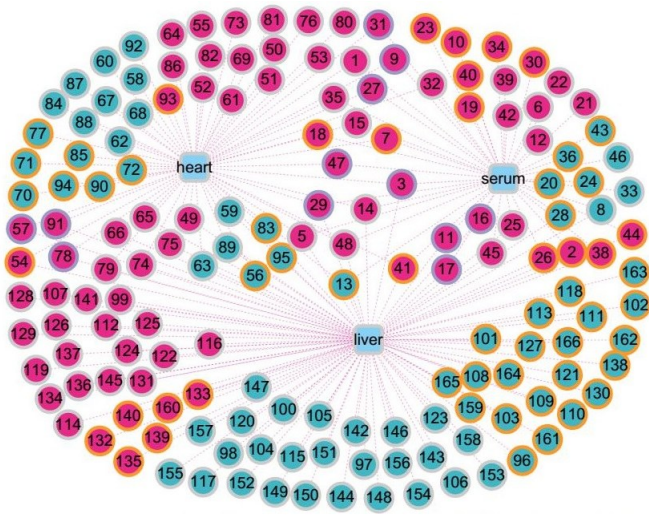
图 6 肝中模型组(蓝色)和正常组(绿色)比较 PCA(左图)、PLS-DA(中间)和 OPLS-DA(右边)得分图

表 4 VM 名称及序号

No.	名称	No.	名称	No.	名称
1	1-Stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	57	Glycerophosphocholine	113	Nitrosobenzene
2	Acetylcarnitine	58	Cytosine	114	Glutathione
3	D-Mannose	59	Guanosine 5'-monophosphate	115	Gly-Arg
4	1-Stearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol 3-phosphocholine	60	Cytidine	116	gamma-L-Glutamyl-L-glutamic acid
5	1-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	61	1-Palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	117	N6-Methyl-L-lysine
6	Trigonelline	62	Pantothenate	118	4-Aminobutyric acid
7	Creatine	63	Inosine 5'-monophosphate (IMP)	119	Adenosine monophosphate
8	1-Stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol	64	Pro-Asp	120	S-Methyl-5'-thioadenosine
9	L-Alanine	65	Anthranilic acid (Vitamin L1)	121	Diocetyl phthalate
10	Histamine	66	1-Aminocyclopropanecarboxylic acid	122	ADP-ribose
11	L-Glutamine	67	L-Leucine	123	D-Mannose-6-phosphate
12	2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	68	L-Anserine	124	Adenine
13	模型组(18:2(9Z,12Z)/0:0/0:0)[rac]	69	Thiamine	125	Tyr-Arg
14	D-Proline	70	alpha-Linolenic acid	126	5,2'-O-dimethylcytidine
15	Betaine	71	Pantothenol	127	Leu-Thr
16	4-Imidazoleacetic acid	72	His-Ile	128	L-Aspartate
17	1-Eicosatrienoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	73	Cyclohexylamine	129	beta-D-Glucosamine
18	Sphingosine	74	L-Glutamate	130	Lys-Pro
19	5-Hydroxyindoleacetate	75	Adenosine	131	S-Adenosyl-L-homocysteine
20	beta.-Cyano-L-alanine	76	1-Myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	132	Uracil
21	PC(16:0/16:0)	77	sn-Glycerol 3-phosphoethanolamine	133	Nicotinate
22	L-Citrulline	78	Arg-Ala	134	Isomaltose
23	L-Carnitine	79	Arachidonic Acid (peroxide free)	135	N6-methyladenosine
24	Thymine	80	Dihydroxyacetone	136	Gamma-Glutamylcysteine
25	L-Proline	81	D-Lyxose	137	25-hydroxyvitamin D3
26	2-Hydroxyadenine	82	DL-3-Phenyllactic acid	138	Linoleic acid
27	(3-Carboxypropyl)trimethylammonium cation	83	3-Hydroxycapric acid	139	L-Palmitoylcarnitine
28	1-Palmitoyllysophosphatidylcholine	84	7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z-Docosapentaenoic acid	140	Stearoylcarnitine
29	Creatinine	85	Capric acid	141	3-Methylhistidine
30	Triethanolamine	86	4-Pyridoxic acid	142	D-Ribose 5-phosphate
31	L-Histidine	87	1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol	143	D-Galactarate

表 4(续) VM 名称及序号

No.	名称	No.	名称	No.	名称
32	L-Carnosine	88	Thymidine	144	D-Erythrose 4-phosphate
33	N-Palmitoylsphingosine	89	Dihydroxyacetone phosphate	145	Bilirubin
34	5-Hydroxytryptophol (5HTOL)	90	Pristanic acid	146	alpha-D-Glucose 1-phosphate
35	Phosphorylcholine	91	L-Malic acid	147	D-Mannose 1-phosphate
36	Sphinganine	92	L-Iditol	148	D-Ribose
37	Sphingomyelin	93	Myristic acid	149	Cholesteryl sulfate
38	Cholic acid	94	all cis-(6,9,12)-Linolenic acid	150	D-Threitol
39	Deoxyinosine	95	Norethindrone Acetate	151	D-Allose
40	Thromboxane B2	96	Inosine	152	L-Sorbose
41	Pentadecanoic Acid	97	Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid	153	Flutamide
42	Quinate	98	Methyl 4-hydroxybenzoate	154	Glycerol 3-phosphate
43	12(R)-HETE	99	Vanillin	155	cis-9-Palmitoleic acid
44	Heptadecanoic acid	100	UDP-N-acetylglucosamine	156	D-Maltose
45	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	101	N-Acetylmannosamine	157	D-galacturonic acid
46	Prostaglandin H2	102	N-Acetyl-D-glucosamine	158	Glycolate
47	1-Stearoyl-sn-glycerol 3-phosphocholine	103	Xanthosine	159	2-Methyl-3-hydroxybutyric acid
48	1-Stearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol 3-phosphocholine (SOPC)	104	Quinone	160	2-Oxadipic acid
49	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine	105	Uridine 5'-monophosphate (UMP)	161	Acamprosate
50	Argininosuccinic acid	106	D-Glucose 6-phosphate	162	DL-lactate
51	1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	107	Tyr-Val	163	Acetyl phosphate
52	Flavin adenine dinucleotide (FAD)	108	Xanthine	164	Isovalerylglycine
53	Adenosine 5'-diphosphate (ADP)	109	Guanosine	165	Deoxycholic acid
54	Thioetheramide-PC	110	2-Methylbutyrylcarnitine	166	Indoxyl sulfate
55	1-Stearoyl-rac-glycerol	111	Val-Phe		
56	Melamine	112	20-Hydroxyarachidonic acid		



注：圆角矩形结点的为器官或组织，椭圆形结点为靶点；蓝色结点为所有药物在所有组织或器官中没有实现回调；橙色边线的为下调，无色边线的为上调，紫色边线的为不同器官组织中调节方向不一样。

图 7 药效代谢差异物—器官/组织—药物相关关系网络

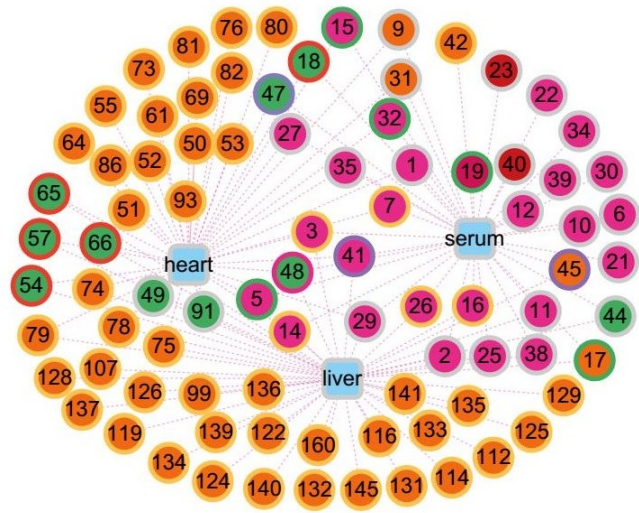
从血清中鉴定出 39 个 DM, 分别鉴定出 29、26 和 33 个配方 1、2 和 3 的 PM。在血清中, 当一半鸡血藤被同样质量的土茯苓代替时即为配方 1 变为配方 2 时, 3 个 PM(VM 7、19、和 45) 消失; 一些 PM 倍数变化 (fold changes, FC) 值如肌苷 (VM 29, 配方 1 组/模型组 = 16.39554381, 配方 2 组/模型组 = 1.163027468)、三乙醇胺 (30, 配方 1 组/模型组 = 12.68455178, 配方 2 组/模型组 = 7.942100461) 和 5-羟-β-吡啶乙醇 (34, 配方 1 组/模型组 = 1.677599136, 配方 2 组/模型组 = 2.781925834) 等存在明显差异, 说明配方 1 和 2 的回调程度即药效程度明显不同。血清中, 当配方 2 变成配方 3 时, 2 个 PM (VM 23 和 40) 消失, 还识别出 11 个 PM (VM 7、9、17、18、19、31、42、44、45、47 和 48), 同时发现 PM (VM 12, 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇; VM 29, 肌苷) FC 值也发生改变。血清中, 配方 3 有 8 个特有的 PM; 配方 1 和 3 有 26 个共同的 PM, 配方 1 和 3 有 24 个共同的 PM, 3 个药物有 24 个共有的 PM (图 5、表 5 和表 6)。这些结果表明方剂配方发生变化尤其是配方 2 变成配方 3 时, 血清中发挥药效的代谢差异物发生了明显变化, 表明代谢机制也发生了明显的变化。

表 5 配方 1 和配方 2 在血清中 PM 结果

No.	VIP	FC	P 值	药物	No.	VIP	FC	P 值	药物	No.	VIP	FC	P 值	药物
1	4.432	11.094	<0.001	配方 1	15	18.547	1.678	0.009	配方 1	30	1.166	0.620	0.031	配方 1
1	4.432	11.094	<0.001	配方 2	15	18.547	1.678	0.009	配方 2	30	1.166	0.620	0.031	配方 2
2	22.450	0.444	<0.001	配方 1	16	1.436	0.322	0.011	配方 1	32	1.438	2.197	0.037	配方 1
2	22.450	0.444	<0.001	配方 2	16	1.436	0.322	0.011	配方 2	32	1.438	2.197	0.037	配方 2
3	2.7506	0.465	<0.001	配方 1	19	1.505	0.270	0.044	配方 1	34	4.270	0.331	0.042	配方 1
3	2.7506	0.465	<0.001	配方 2	21	1.272	1.715	0.017	配方 1	34	4.270	0.331	0.042	配方 2
5	10.361	1.750	<0.001	配方 1	21	1.272	1.715	0.017	配方 2	35	2.956	1.248	0.043	配方 1
5	10.361	1.750	<0.001	配方 2	22	1.242	1.458	0.019	配方 1	35	2.956	1.248	0.043	配方 2
6	4.996	13.247	<0.001	配方 1	22	1.242	1.458	0.019	配方 2	38	1.116	0.414	0.006	配方 1
6	4.996	13.247	<0.001	配方 2	23	2.820	0.269	0.020	配方 1	38	1.116	0.414	0.006	配方 2
7	2.598	0.412	<0.001	配方 1	23	2.820	0.269	0.020	配方 2	39	1.557	2.080	0.027	配方 1
10	6.409	0.248	0.003	配方 1	25	1.861	2.208	0.021	配方 1	39	1.557	2.080	0.027	配方 2
10	6.409	0.248	0.003	配方 2	25	1.861	2.208	0.021	配方 2	40	2.064	0.110	0.035	配方 1
11	2.787	1.775	0.005	配方 1	26	2.363	0.231	0.026	配方 1	40	2.064	0.110	0.035	配方 2
11	2.787	1.775	0.005	配方 2	26	2.363	0.230	0.026	配方 2	41	3.296	0.547	0.038	配方 1
12	5.326	1.536	0.008	配方 1	27	5.301	0.664	0.027	配方 1	41	3.296	0.547	0.038	配方 2
12	5.326	1.536	0.008	配方 2	27	5.301	0.664	0.027	配方 2	45	3.708	6.850	0.005	配方 1
14	6.687	1.550	0.009	配方 1	29	11.805	0.890	0.031	配方 1					
14	6.687	1.550	0.009	配方 2	29	11.805	0.890	0.031	配方 2					

表 6 配方 3 在不同组织器官中 PM 结果

No.	VIP	FC	P 值	来源	No.	VIP	FC	P 值	来源	No.	VIP	FC	P 值	来源
27	5.301	0.664	0.027	血清	122	1.094	2.185	0.006	肝	134	4.804	1.514	0.034	肝
27	10.360	1.300	0.045	心	65	3.544	8.724	<0.001	肝	9	3.326	1.166	0.021	心
20	15.174	15.444	<0.001	肝	79	6.103	2.516	<0.001	心	128	1.878	1.496	0.016	肝
49	12.405	2.570	<0.001	肝	79	2.813	1.721	0.008	肝	23	1.438	2.197	0.037	血清
66	2.174	1.313	0.010	肝	78	2.786	1.432	0.044	心	22	1.242	1.458	0.019	血清
17	1.014	7.235	<0.001	肝	78	1.30	0.538	0.024	肝	74	3.404	1.397	0.045	心
76	1.556	1.463	0.041	心	50	2.411	1.942	<0.001	心	74	4.655	1.273	0.037	肝
48	1.383	1.971	<0.001	心	129	1.129	1.523	0.0161	肝	11	2.787	1.775	0.004	血清
5	10.361	1.750	<0.001	血清	15	18.547	1.678	0.009	血清	11	1.789	0.700	0.009	肝
5	8.142	1.411	0.026	肝	145	1.053	2.515	0.001	肝	31	3.502	1.747	0.019	心
61	4.098	2.167	<0.001	心	38	1.116	0.414	0.006	血清	91	5.899	1.276	0.011	心
50	2.510	3.187	<0.001	心	38	1.058	0.365	0.007	肝	139	2.424	0.662	0.041	肝
51	2.365	2.132	<0.001	心	7	2.598	0.412	0.001	血清	25	5.675	1.678	0.026	血清
1	4.432	11.094	<0.001	血清	7	1.780	1.475	0.000	心	25	2.661	1.295	0.030	肝
1	18.908	2.990	<0.001	心	29	11.805	0.890	0.031	血清	93	11.39	0.628	0.022	心
47	12.906	2.113	<0.001	心	29	3.267	1.178	0.041	心	135	1.306	0.743	0.035	肝
55	1.094	2.518	<0.001	心	29	9.540	1.267	0.002	肝	133	2.052	0.571	0.021	肝
112	2.033	1.664	0.002	肝	73	11.582	2.004	0.012	心	21	1.272	1.715	0.017	血清
137	1.809	1.734	0.039	肝	39	1.557	2.080	0.027	血清	41	3.296	0.547	0.038	血清
12	5.326	1.536	0.008	血清	80	1.071	1.329	<0.001	心	35	2.956	1.248	0.043	血清
26	2.363	0.230	0.026	血清	82	1.077	3.754	<0.001	心	35	9.505	1.636	<0.001	心
160	8.179	0.560	<0.001	肝	81	2.346	1.289	<0.001	心	64	1.033	1.430	0.002	心
141	4.254	1.648	0.044	肝	3	2.751	0.465	<0.001	血清	42	1.972	2.326	<0.001	血清
16	1.436	0.322	0.011	血清	3	2.049	1.195	0.036	心	131	1.561	2.934	0.019	肝
86	1.197	1.623	0.004	心	14	6.687	1.550	0.009	血清	18	1.378	0.257	0.013	血清
126	1.068	1.573	0.008	肝	14	3.930	1.409	0.007	心	140	2.355	0.732	0.043	肝
19	1.505	0.270	0.044	血清	52	1.004	1.546	<0.001	心	69	1.964	1.480	0.009	心
34	4.270	0.331	0.042	血清	136	1.054	1.353	0.037	肝	54	1.468	0.507	0.001	肝
2	22.450	0.444	<0.001	血清	116	1.615	1.663	0.004	肝	30	1.166	0.620	0.031	血清
2	10.368	0.333	0.035	肝	114	10.640	1.534	0.003	肝	6	4.996	13.247	<0.001	血清
124	3.776	1.597	0.007	肝	49	2.645	1.599	<0.001	心	125	1.016	1.617	0.008	肝
75	4.161	1.559	0.024	心	57	2.134	0.495	0.043	肝	107	1.329	13.331	<0.001	肝
75	1.659	2.282	<0.001	肝	44	4.957	0.454	0.003	血清	132	1.901	0.816	0.019	肝
53	2.130	1.660	<0.001	心	10	6.409	0.248	0.003	血清	99	1.100	4.855	<0.001	肝



注：圆角矩形结点的为器官或组织，椭圆形结点为药效代谢差异物 (PM)；桃红色结点为三种药物共有的 PM (除 7 不是变方 1 的)，橙色结点为只是变方 2 的 PM (除 45 也是鸡血藤的)，绿色结点为变方 2 在部分器官或组织中的 PM。深红色结点有银色边线的为鸡血藤与痹病药膳方变方 1 共有的 PM，深红色节点有绿色边线的为鸡血藤与痹病药膳方变方 2 共有的 PM。桃红色结点中，绿色边线的在心中不是 PM，黄色边线的在肝中不是 PM，紫色边线的只在血清中为 PM，银色边线的为对应器官中的 PM；橙色结点中，绿色边线的只在肝中为 PM，紫色边线的在血清和肝中是 PM，银色边线在对应器官中均为 PM；绿色结点中，红色边线的在心中不是 PM，桃红色边线的只在心中是 PM，紫色边线的在血清中不是 PM，银色边线的在肝中不是 PM；深红色结点中，绿色边线的为鸡血藤与变方 2 共有的 PM，银色边线的为鸡血藤与变方 1 共有的 PM。

图 8 药效代谢差异物—器官/组织—药物相关关系网络

从心和肝中分别鉴定出 56 和 97 个 DM, 33 和 41 个配方 3 的 PM。从血清、心和肝中都鉴定到 6 个 DM (VM 3、5、14、29、41 和 48)；其中 VM 29 为血清、心和肝中共有的 PM, VM 48 只在心中为 PM, VM 5 为肝和血清中共有的 PM, VM 41 只为血清中的 PM, VM 3 和 14 为心和血清中共有 DM。从心和肝中鉴定到 16 个特有的 DM (VM 49、54、56、57、59、63、65、66、74、75、78、79、83、89、91 和 95)；VM 54、57、65 和 66 只在肝中为

PM, VM 49 和 91 只在心中为 PM, VM 74、75、78 和 79 在心和肝中都是 PM。从心和血清中鉴定到共有 DM 10 个 (VM 1、7、9、15、18、27、31、32、35 和 47), VM 15、18 和 32 只在血清中为 PM, VM 47 只在心中为 PM, VM 1、7、9、27、31 和 35 在心和血清中都是 PM。从肝和血清中鉴定到共有 DM 11 个 (VM 2、8、11、16、17、25、26、28、38、44 和 45), VM 16、26 和 44 只在血清中为 PM, VM 17 只在肝中为 PM, VM 2、11、25、38 和 45 在肝和血清中都是 PM。血清、心和肝中分别鉴定到 18、31 和 71 个特有的 DM, 其中分别有 12、15 和 24 个为 PM。以上结果表明不同器官、组织中 DM 及其配方 3 在不同组织器官中 PM 存在巨大差异, 即使是从不同组织或器官中都鉴定到的许多 DM 如 VM 3、29、57 和 58 等被调节的方向也不一致 (见表 6 灰色背景), 表明疾病的病理机制、药物在不同组织、器官中代谢机制存在巨大区别。

2.2.3 代谢通路研究 应用 MetaboAnalyst 5.0 进行代谢通路分析和通路富集分析阐明关键代谢通路 (见表 4、图 6 和图 7)。结果表明血清中组氨酸 (histidine)、糖鞘脂 (glycosphingolipid) 和精氨酸 (arginine) 代谢通路对 3 个配方都是极为重要的代谢通路；丙氨酸、天冬氨酸盐和谷氨酸盐代谢 (alanine, aspartate and glutamate metabolism), 精氨酸和脯氨酸代谢 (arginine and proline metabolism), 精氨酸生物合成 (arginine biosynthesis) 以及组氨酸代谢 (histidine metabolism) 是配方 3 在心中发挥药效的重要代谢通路；精氨酸生物合成, D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸盐代谢 (D-glutamine and D-glutamate metabolism), 谷胱甘肽代谢 (glutathione metabolism) 以及丙氨酸、天冬氨酸盐和谷氨酸盐代谢是配方 3 在肝中发挥药效的重要代谢通路。以上结果表明 3 个配方在血清中发挥药效所涉及的代谢通路差异不大, 配方 3 在不同组织器官中代谢通路差异比较大。

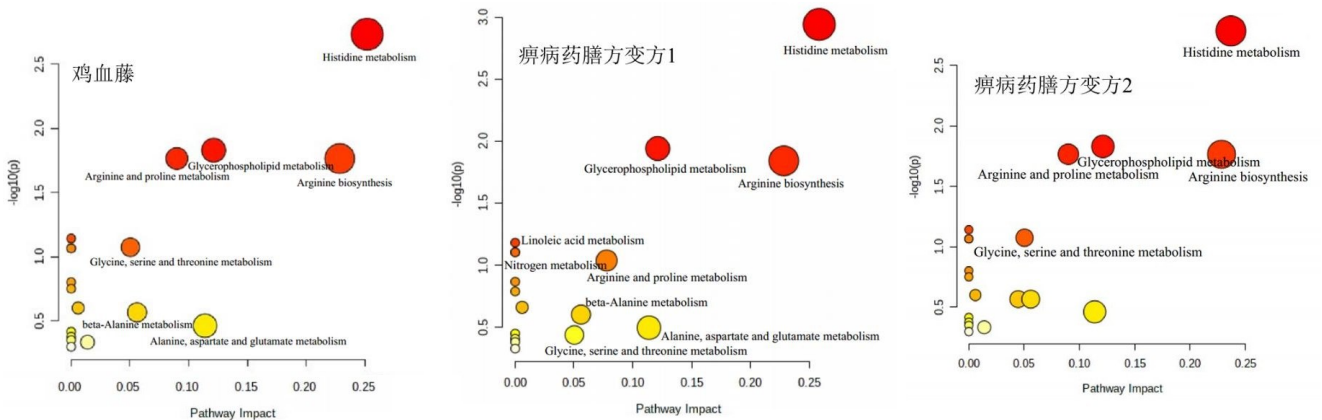


图 9 鸡血藤、痹病药膳方变方 1 和痹病药膳方变方 2 在血清中的代谢通路

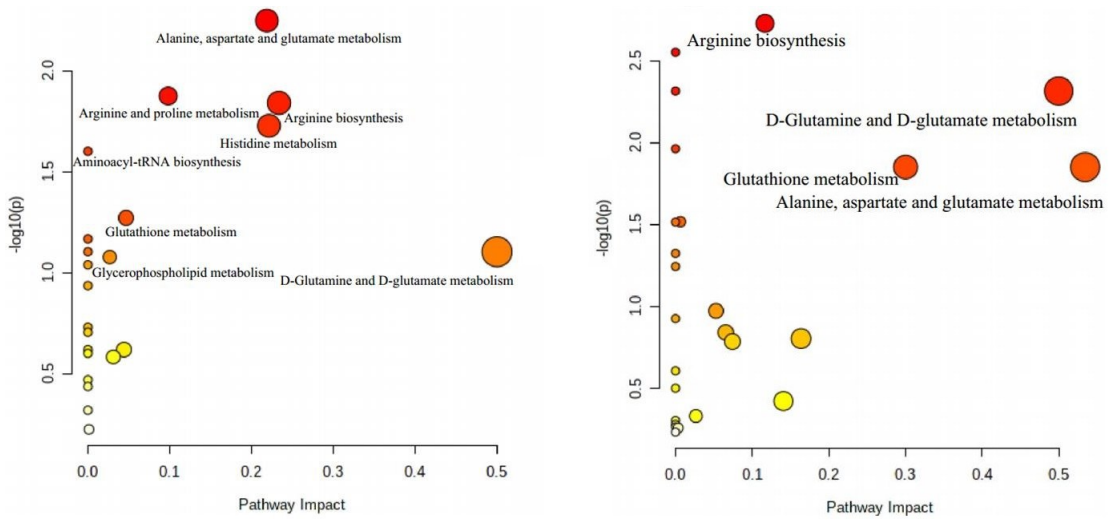


图 10 痹病药膳方变方 2 在心(左图)和肝(右图)中的代谢通路

3 讨论

LDL-C 是导致 AS 的关键因素,降低其水平是降低 AS 发生和大多数心血管疾病死亡因素的重要途径;LDL-C 与 HDL-C 的比值代表致动脉粥样化蛋白和保护性脂蛋白平衡关系,是用来预测心血管疾病发生的重要指标^[19-21]。正常组、模型组、血脂康组、配方 1 组、配方 2 组和配方 3 组的 LDL-C 与 HDL-C 比值在 30 d 时分别为 0.61、1.44、1.03、1.57、1.24 和 1.00,60 d 时分别是 0.86、1.63、1.07、1.71、1.37 和 1.24;除配方 1 组外,这些结果基本与主动脉弓病理研究结果一致。这表明 3 个配方都能有效预防心血管疾病发生,配方 3 要优于配方 2。

在 3 个配方血清代谢组学研究中,配方 1 和 2 的 PM 差异不大,配方 3 与二者的 PM 差异比较大。表明在配方 3 中,黄芪的量虽然小,但所起的药效却是非常重要的。此外,在优化痹病药膳方配方优化过程中一些 PM 消失,一些 PM 即使还在,但其 FC 值也发生了变化;表明当方剂的配方发生变化时其代谢轮廓也发生重要变化,合理组成让痹病药膳方产生了更多的选择性和专一性。

血液中代谢物的含量通常受多个蛋白支配,换言之,当某个蛋白质表达出现异常时,其它组织或器官中的蛋白质会自动弥补其功能;因此,其它器官尤其是病理改变器官的代谢组学更值得进行研究。与血清代谢组学相比,从心和肝中鉴别了更多的 PM,因此心和肝的病理形态差异以及蛋白质和基因表达差异值得深入研究。一些 VM 在不同组织器官中差异很大甚至方向相反,这与成分在体内代谢相关,因此其代谢规律值得深入研究。

本研究虽然通过不同配方对 AS 家兔预防药效来优化方剂配方,但配方有限。本研究虽然比较了 3 个配方在血清中 PM 和代谢通路差异,配方 3 在心和肝

中 PM 和代谢通路差异,但这些药效代谢差异物之间哪些是关键以及相互如何相互影响并不清楚。因此痹病药膳方配方优化和作用机制仍需深入研究。

参考文献:

- [1] ISLAM S J, MEHTA A. Discordance between estimated cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis in psoriasis: when seeing helps believing[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2022, 29(4): 588-590.
- [2] NONTERAH E A, CROWTHER N J, ODURO A, et al. Poor cardiovascular health is associated with subclinical atherosclerosis in apparently healthy sub-Saharan African populations: an H3Africa AWI-Gen study[J]. *BMC Med*, 2021, 19(1): 30.
- [3] 钟鸣. 中国壮医药大辞典[M]. 南宁: 广西科学技术出版社/广西民族出版社, 2016: 197.
- [4] LEE B J, JO I Y, BU Y, et al. Antiplatelet effects of *Spatholobus suberectus* via inhibition of the glycoprotein IIb/IIIa receptor[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(2): 460-467.
- [5] LEE M H, LIN Y P, HSU F L, et al. Bioactive constituents of *Spatholobus suberectus* in regulating tyrosinase-related proteins and mRNA in HEMn cells[J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(12): 1262-1270.
- [6] ZHANG R, LIU C, LIU X J, et al. Protective effect of *Spatholobus suberectus* on brain tissues in cerebral ischemia[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(9): 3963-3969.
- [7] TIAN Z, LIU S B, WANG Y C, et al. Neuroprotective effects of formononetin against NMDA-induced apoptosis in cortical neurons [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(12): 1770-1775.
- [8] KIM H, YI S S, LEE H K, et al. Antiproliferative effect of vine stem extract from *spatholobus suberectus* dunn on rat C6 glioma cells through regulation of ROS, mitochond-

- drial depolarization, and P21 protein expression[J]. *Nutr Cancer*, 2018, 70(4):605-619.
- [9] ZHAO X Y, CHEN R Y, SHI Y Y, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids from *Smilax glabra* Roxb[J]. *Molecules*, 2020, 25(22):5295-5307.
- [10] WANG T W, YE Y L, JI J, et al. Astilbin from *Smilax glabra* Roxb alleviates high-fat diet-induced metabolic dysfunction[J]. *Food Funct*, 2022, 13(9):5023-5036.
- [11] SANG H Q, GU J F, YUAN J R, et al. The protective effect of *Smilax glabra* extract on advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction in HUVECs via RAGE-ERK1/2-NF- κ B pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1):785-795.
- [12] HUANG L P, DENG J, CHEN G T, et al. The anti-hyperuricemic effect of four astilbin stereoisomers in *Smilax glabra* on hyperuricemic mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238:111777.
- [13] ADESSO S, RUSSO R, QUARONI A, et al. *Astragalus membranaceus* extract attenuates inflammation and oxidative stress in intestinal epithelial cells via NF- κ B activation and Nrf2 response[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3):800-813.
- [14] CAI J, PAN R H, JIA X, et al. The combination of *astragalus membranaceus* and *ligustrazine* ameliorates micro-haemorrhage by maintaining blood-brain barrier integrity in cerebrally ischaemic rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158:301-309.
- [15] TAN Y Q, CHEN H W, LI J. *Astragaloside IV*: an effective drug for the treatment of cardiovascular diseases[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:3731-3746.
- [16] TANG X L, WANG H J, CHEN H H, et al. Protective effects of *Astragalus membranaceus* and *ligustrazine* on rat brain microvascular endothelial cell injury after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation by suppressing the PKC δ /MARCKS pathway[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2020, 24(7):947-956.
- [17] QIU L H, ZHANG B Q, LIAN M J, et al. Vascular protective effects of *Astragalus membranaceus* and its main constituents in rats with chronic hyperhomocysteinemia[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3):2401-2407.
- [18] 方晓燕, 李保生, 黎飏, 等. 基于网络药理学、分子对接和代谢组学研究抗 AS 药效与机制[J]. *右江民族医学院学报*, 2022, 44(6):783-793.
- [19] DREXEL H, LARCHER B, MADER A, et al. The LDL-C/ApoB ratio predicts major cardiovascular events in patients with established atherosclerotic cardiovascular disease[J]. *Atherosclerosis*, 2021, 329:44-49.
- [20] XU X D, DONG Y X, MA N N, et al. MiR-337-3p lowers serum LDL-C level through targeting PCSK9 in hyperlipidemic mice[J]. *Metabolism*, 2021, 119:154768.
- [21] FOX K M, TAI M H, KOSTEV K, et al. Treatment patterns and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) goal attainment among patients receiving high- or moderate-intensity statins[J]. *Clin Res Cardiol*, 2018, 107(5):380-388.

收稿日期:2023-08-27;修回日期:2023-09-13

(上接第 841 页)

- [15] CHEN M, ZHANG J. miR-186-5p inhibits the progression of oral squamous cell carcinoma by targeting ITGA6 to impair the activity of the PI3K/AKT pathway[J]. *J Oral Pathol Med*, 2022, 51(4):322-331.
- [16] 郭利培, 刘洁, 张文青, 等. 吴茱萸碱调控 PI3K/AKT 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(4):612-618.
- [17] 尹倩, 李斯斯, 饶兴旺, 等. 辣椒素通过 PI3K/AKT 信号通路对鼻咽癌细胞增殖、凋亡及侵袭的抑制作用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(16):1966-1970.
- [18] 李本珊. 羟喜树碱通过 TGF- β 诱导的 PI3K/AKT 通路抑制鼻咽癌进展的机制研究[D]. 广州:南方医科大学, 2019.
- [19] CHEN M, XU R D, WU L G, et al. Relationship between circulating tumor cells undergoing EMT and short-term efficacy following interventional treatment in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Interv Med*, 2020, 3(3):146-150.
- [20] REN Z T, NIU Y F, FAN B, et al. Upregulation of homeobox D10 expression suppresses invasion and migration of clear cell renal cell carcinoma through targeting of E-cadherin[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(3):1837-1846.
- [21] CHOI S, YU J Y, KIM W, et al. N-cadherin mediates the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward breast tumor cells[J]. *Theranostics*, 2021, 11(14):6786-6799.
- [22] JAUDAH A M. Vimentin immunoexpression is associated with higher tumor grade, metastasis, and shorter survival in colorectal cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(3):493-500.
- [23] 刘晓燕, 龙凤, 赵玉, 等. 基于 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路探讨蒲公英多糖对三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(7):1135-1143.
- [24] 朱军辉, 金明, 邱浩, 等. Calreticulin 通过诱导细胞 EMT 促进鼻咽癌迁移和侵袭[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(5):925-929.

收稿日期:2023-07-28;修回日期:2023-09-07