

# 基于LC-MS技术的养心通脉方干预冠心病血瘀证的代谢组学分析

周曼丽<sup>1</sup>, 俞贇丰<sup>1</sup>, 罗晓欣<sup>1</sup>, 周霞辉<sup>1</sup>, 张宜帆<sup>1</sup>, 赵彦祺<sup>1</sup>, 简维雄<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学 中医学院, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学 中医诊断学湖南省重点实验室, 中医心肺病证辨证与药膳食疗重点研究室, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的: 用代谢组学方法分析养心通脉方(YXTM)对冠心病血瘀证大鼠心肌组织内源性代谢产物的影响, 探讨养心通脉方治疗心血瘀阻证的机制。方法: 采用高脂饮食联合维生素D<sub>3</sub>灌胃、异丙肾上腺素(ISO)皮下注射的方法制备慢性心肌缺血心血瘀阻证模型, 同时采用养心通脉方干预模型。运用超高效液相串联高分辨质谱仪检测正常组、模型组、养心通脉方组3组大鼠心肌组织代谢产物, 每组8只, 利用SIMCA 14.1软件对高通量代谢组数据进行多元统计分析, 并通过MetaboAnalyst软件分析相关的代谢通路。结果: 3组大鼠的心肌样本点均位于椭圆置信区间的不同区域内, 正常组和模型组完全分离, 养心通脉方组与正常组存在部分交叉和重叠, 从代谢谱的角度证明心血瘀阻证模型复制成功, 且养心通脉方在一定程度上具有促使机体恢复到正常状态趋势的潜力。经养心通脉方干预后6个差异性代谢物具有显著的变化, 其代谢通路涉及缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸的生物合成, 泛酸和辅酶A(CoA)生物合成, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解, 氨酰基转运RNA的生物合成, 嘌呤代谢。结论: 养心通脉方对心血瘀阻证大鼠的治疗作用与改善心肌内源性代谢物水平有关, 其机制涉及磷脂代谢、氨基酸代谢、能量代谢、炎症反应以及血小板活化聚集等多个方面。

**[关键词]** 养心通脉方; 心血瘀阻证; 心肌组织; 生物标志物; 代谢通路

**[中图分类号]** R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)22-0139-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211318

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210922.1213.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-09-23 12:22

## LC-MS-Based Metabonomics Study of Yangxin Tongmaifang Against Coronary Heart Disease Differentiated into Blood Stasis Syndrome

ZHOU Man-li<sup>1</sup>, YU Yun-feng<sup>1</sup>, LUO Xiao-xin<sup>1</sup>, ZHOU Xia-hui<sup>1</sup>, ZHANG Yi-fan<sup>1</sup>,  
ZHAO Yan-zhen<sup>1</sup>, JIAN Wei-xiong<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Provincial Key Laboratory of TCM Diagnostics, Key Laboratory of TCM Heart and Lung Syndrome Differentiation & Medicated Diet and Dietotherapy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Yangxin Tongmaifang (YXTM) on endogenous metabolites in the myocardial tissue of rats with coronary heart disease due to blood stasis based on the metabolomics approach, and to explore its mechanism in the treatment of heart blood stasis syndrome. **Method:** A rat model of chronic myocardial ischemia due to heart blood stasis was established via the high-fat diet

**[收稿日期]** 20210416(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81973753);湖南省自然科学基金项目(2018JJ2291);研究生质量工程项目(2018CX28, 2020CX57, 2020CX40)

**[第一作者]** 周曼丽, 在读硕士, 从事心血管疾病中医证治机制研究工作, E-mail: 1378327198@qq.com

**[通信作者]** \* 简维雄, 博士, 教授, 从事心血管疾病中医证治机制研究工作, E-mail: daxiong20001977@163.com

combined with intragastric administration of vitamin D<sub>3</sub> and subcutaneous injection of isoproterenol (ISO), followed by the intervention with YXTM. The metabolites in the myocardial tissues of rats in the normal group ( $n=8$ ), model group ( $n=8$ ), and YXTM group ( $n=8$ ) were detected by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. The high-throughput metabolomics data were then subjected to multivariate statistical analysis using SIMCA 14.1, and the related metabolic pathways were analyzed with MetaboAnalyst. **Result:** The myocardial sample points of rats in the three groups were located in different areas of the elliptical confidence interval. The normal group and the model group were completely separated. There existed some crossovers and overlaps between the YXTM group and the normal group. The heart blood stasis syndrome model was proved successfully replicated from the perspective of metabolic profiling, and YXTM had the potential to promote the body to return to a normal state. After the intervention with YXTM, six differential metabolites changed significantly. Such metabolic pathways as valine, leucine, and isoleucine biosynthesis, pantothenate and coenzyme A (CoA) biosynthesis, valine, leucine, and isoleucine degradation, biosynthesis of aminoacyl-transfer RNA synthetases, and purine metabolism were involved. **Conclusion:** The therapeutic effect of YXTM on heart blood stasis syndrome in rats is related to the improved levels of myocardial endogenous metabolites, and its mechanism involves phospholipid metabolism, amino acid metabolism, energy metabolism, inflammatory response, and platelet activation and aggregation.

**[Keywords]** Yangxin Tongmaifang (YXTM); heart blood stasis syndrome; myocardial tissue; biomarker; metabolic pathway

冠心病(CHD)是临床常见的严重危害人类健康的重大疾病<sup>[1]</sup>。冠心病病理形成过程中并没有明显的临床症状,当血管腔狭窄甚至完全闭塞,导致心肌缺血、缺氧时才会被发现<sup>[2]</sup>。冠心病已成为世界范围内的公共卫生问题<sup>[3]</sup>。世界卫生组织曾预测,CHD有可能超过传染性疾病成为致死原因的首位<sup>[4]</sup>。冠心病归属中医“胸痹”范畴,血瘀证是最常见、最主要,也是目前研究最多、最深入的中医证型<sup>[5-6]</sup>。《黄帝内经·素问·脉要精微论》云:“脉者……血之府也……涩则心痛”,强调胸痹病位在心,病机关键在于血脉瘀阻<sup>[7]</sup>。养心通脉方是我国著名中医学家秦伯未先生用于治疗冠心病“胸痹心痛”的经典名方,采用生地、人参、丹参、桂枝等药物配伍而成<sup>[8]</sup>。湖南中医药大学袁肇凯教授根据秦伯未先生“扶养心气,和通血脉”原则,对养心通脉方进行加减组成新方,由人参、丹参、桂枝、泽泻、枳实5味药物组成<sup>[9-10]</sup>,具有益气养阴、活血祛瘀、养心通脉之功效<sup>[11]</sup>。目前多位学者已经在基础机制方面开展研究,发现养心通脉方具有良好的抗心肌缺血,改善血液流变学的作用<sup>[8]</sup>,能够有效抑制动脉粥样硬化斑块的形成和发展<sup>[12]</sup>,刺激血管内皮细胞“增殖”“迁移”和“管腔结构形成”<sup>[13]</sup>,提高心肌代偿能力,同时还能增强线粒体活性,改善冠心病症状和减少心血管不良事件的发生<sup>[11]</sup>。目前对于养心通脉方的研究已经深入到分子水平,但由于中药复方

多靶点的作用,养心通脉方发挥作用的机制亟待从“整体的、联系的”层面去阐释<sup>[14]</sup>。代谢组学是近年发展起来的对机体中内源性小分子物质的整体及其动态变化规律进行检测分析的一门新技术<sup>[15]</sup>。课题组前期研究运用气相色谱-质谱法(GC-MS)对结扎大鼠冠状动脉左前降支复制的急性心肌梗死心血瘀阻证模型进行心肌组织代谢产物的鉴定,并探究养心通脉方干预后的表型变化及代谢途径。结果发现苹果酸等10种代谢产物与血瘀证的形成密切相关,主要涉及糖代谢紊乱,养心通脉方可以有效干预这一过程<sup>[16]</sup>。本实验在前期研究工作的基础上利用超高效液相色谱串联高分辨质谱法的代谢组学分析方法,进一步探究养心通脉方对冠心病血瘀证大鼠心肌组织内源性代谢产物的影响,深入探讨养心通脉方干预血瘀证的代谢通路和可能机制。

## 1 材料

SPF级雄性SD大鼠24只,体质量200~220g,购自湖南斯莱克景达动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004,经湖南中医药大学动物福利与伦理委员会批准,批准号LL2018041002。养心通脉方各药物购自湖南中医药大学第一附属医院,由人参、丹参、桂枝、枳实、泽泻按比例组成,5 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;维生素D<sub>3</sub>(湖北楚米生物科技有限公司,批号2019070401);异丙肾上腺素、苏木素(美国

Sigma公司,批号分别为BSF190725,517-28-2);伊红(北京索莱宝科技有限公司,批号15086-94-9);甲醇、甲酸、乙腈(CNW科技公司,批号分别为CFEQ-4-140000-9025,CFEQ-4-531380-0001,SP002A-4L-C);L-2-氯苯丙氨酸(上海恒创生物科技有限公司,批号103616-89-3);Lyso PC17:0(美国Avanti公司,批号855676C);大鼠三磷酸腺苷(ATP)和总磷酸腺苷酸(TAP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为ml460314,ml961104)。

ACQUITY型超高效液相色谱仪,ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm)(美国Waters公司);AB Triple TOF 5600型高分辨质谱仪(包括电喷雾检测器,美国AB Sciex公司);LNG-T98型冷冻浓缩离心干燥器(太仓市华美生化仪器厂);75002455型台式高速冷冻离心机及轮转式切片仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];JXFSTPRP-24/32型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司);PURELAB® Chorus系列超纯水系统(英国ELGA公司);KD-BM II型生物组织包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);YD-A型生物组织摊片机(浙江金华益迪医疗设备有限公司);Moticam Pro 205A型三目生物显微镜(麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司);RT-6100酶型标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);N-1300型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 将各中药放入水中浸泡30 min,家用煎药罐煎煮。一煎用药物总量10倍量水,二煎用总药物总量8倍量水。2次煎煮开锅后文火煎30~40 min,将2次熬煮的水煎液混合,水浴加热浓缩至含生药质量浓度为1.25 g·mL<sup>-1</sup>的溶液,4℃冰箱冷藏备用。

**2.2 造模与给药** 取SD雄性大鼠,参照本课题组以往的研究方法<sup>[17-18]</sup>进行造模:运用高脂饲料进行适应性喂养,饲料配方3%胆固醇,0.5%胆酸钠,0.2%丙基硫氧嘧啶,5%白糖,10%猪油,81.3%基础饲料。7 d后使用维生素D<sub>3</sub>粉剂灌胃(30万U·kg<sup>-1</sup>),14 d时继续维生素D<sub>3</sub>溶液灌胃(20万U·kg<sup>-1</sup>),在维生素D<sub>3</sub>灌胃结束后继续高脂喂养7周,参照相关文献<sup>[19]</sup>并加以修改,将造模大鼠予以皮下多点注射异丙肾上腺素(ISO,5 mg·kg<sup>-1</sup>)连续3 d。分阶段取材验证造模成功后,运用SPSS 21.0简单随机抽样法将16只造模成功的大鼠分为模型组,YXTM组,

每组8只动物。另取8只未进行造模且一直以普通饲料喂养的SD雄性大鼠作为正常对照组。YXTM组进行煎液灌胃,按照成年人50 kg标准,YXTM组大鼠每次给药剂量为5 mg·kg<sup>-1</sup>,正常组、模型组均给予等体积蒸馏水灌胃,每天1次,连续21 d后进行取材。取材部位左心室心前区,各组取材部位保持一致。

## 2.3 观察指标

**2.3.1 苏木素-伊红(HE)染色** 造模成功后处死大鼠,取腹主动脉放置于甲醛溶液中固定,使用梯度乙醇脱水后石蜡包埋切片,苏木素染料进行核染,伊红染液使胞质着色,封片后在光学显微镜下观察动脉血管管腔形态结构并拍照。

**2.3.2 ATP和TAP含量检测** 根据ATP和TAP检测的ELISA试剂盒说明书的方法按步骤分别进行操作,加样,加酶,温育,洗涤,显色后测定450 nm波长处各孔吸光度A,记录原始数据,并进行绘图及统计学分析。

**2.3.3 心肌代谢组学检测** 称取储存于-80℃冰箱的心肌样本30 mg,加入用甲醇配制的0.3 g·L<sup>-1</sup> L-2-氯苯丙氨酸和0.01 g·L<sup>-1</sup> Lyso PC17:0各20 μL,加入80%甲醇水溶液400 μL;加入两个钢珠后在-20℃环境下预冷放置2 min,60 Hz研磨机匀浆研磨处理2 min;冰水浴中超声提取10 min后再置于-20℃静置20 min;13 000 r·min<sup>-1</sup>,4℃离心(离心半径10 cm,下同)10 min,取上清液300 μL挥干,然后用20%甲醇水400 μL复溶,涡旋混匀30 s后超声提取2 min;再次13 000 r·min<sup>-1</sup>,4℃离心10 min,使用0.22 μm的有机相针孔过滤器过滤注射器吸取上清液150 μL,完成后转移到LC进样小瓶中,-80℃低温保存用于液相色谱-质谱法(LC-MS)分析。

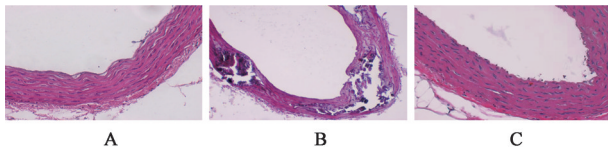
色谱条件:采用ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);柱温45℃,流速为0.4 mL·min<sup>-1</sup>,进样量5 μL;流动相0.1%甲酸水(A),0.1%甲酸乙腈-甲醇(2:3)混合溶液(B),梯度洗脱(0~2 min,95%A;2~4 min,95%~80%A;4~9 min,80%~75%A;9~17 min,75%~40%A;17~19 min,40%~0%A;19~19.1 min,0%A;19.1~20.1 min,0~95%A)。质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),样品质谱信号采集分别采用正负离子扫描模式。

**2.4 数据处理** 原始数据经Progenesis QI v2.3软件进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化处理。根据化合物定性结果打分(Score≥50分),对定性得到的化合物进行筛选,共

鉴定出243个有效化合物。将筛选得到的数据导入SIMCA 14.1软件,进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。采用OPLS-DA模型提取第一主成分的变量权重值[变量重要性指数(VIP)值 $\geq 1.2$ ]并综合两组间比较T检验的P值( $P < 0.05$ )以及组间比较的S-plot图作为差异代谢物的筛选条件。将鉴定出来的差异代谢物的京都基因与基因组百科全书(KEGG)号输入MetaboAnalyst 5.0网页(<https://www.metaboanalyst.ca/>)进行代谢通路分析,以影响值Raw  $P < 0.05$ 作为潜在关键代谢通路的筛选标准。采用SPSS 21.0进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 HE染色** 正常组主动脉内膜、中膜和外膜结构完整,层次分明;模型组内膜断裂,中膜出现钙化斑块脱落后的空腔,外膜管壁狭窄、变细,三层结构排列紊乱。经养心通脉方干预后,动脉三层膜结构恢复完整,仅有少数炎症细胞附着在内膜上,见图1;与正常组比较,模型组ATP水平下调,差异具有显著的统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组相比,YXTM组ATP,TAP水平显著上调,渐接近正常组水平,说明中药干预后可以明显改善缺血心肌能量代谢失调的状态,见表1。



A. 正常组;B. 模型组;C. YXTM组(图2同)  
图1 YXTM对大鼠腹主动脉影响的病理染色(HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Pathological staining results in abdominal aorta of YXTM (HE,  $\times 200$ )

表1 YXTM对大鼠心肌组织ATP和TAP含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )  
Table 1 Expressions of ATP and TAP in myocardial tissues of YXTM ( $\bar{x} \pm s, n=8$ ) nmol·L<sup>-1</sup>

组别	ATP	TAP
正常	810.79 $\pm$ 49.71	1 393.72 $\pm$ 112.68
模型	602.49 $\pm$ 66.82 <sup>1)</sup>	1 530.98 $\pm$ 69.91
YXTM	758.56 $\pm$ 52.59 <sup>2)</sup>	1 734.82 $\pm$ 122.68 <sup>1,2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.001$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 PCA与OPLS-DA** PCA结果表明正常组、模型组和YXTM组分别处于不同的象限内,正常组和模型组完全分离,模型组和YXTM组之间存在部分交叉和重叠,提示模型组大鼠与正常组大鼠在代谢

水平上存在显著差异,经养心通脉方干预后,机体内的代谢状态有向正常组靠近的趋势。OPLS-DA提示组间比较表现出良好的区分特性,且模型具有较高的拟合度和预测性( $R^2X$ 分别是0.983, 0.989; $R^2Y$ 分别是1, 1, $Q^2$ 分别是0.825, 0.964);相对应的S-plot图的两端存在对这种区分起重要贡献的潜在差异代谢物。见图2~4。

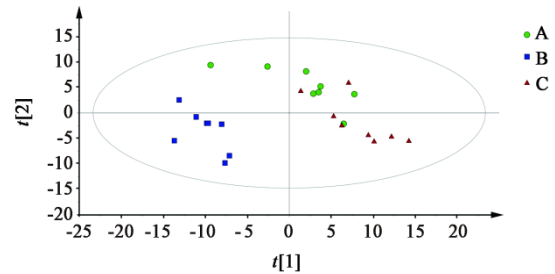
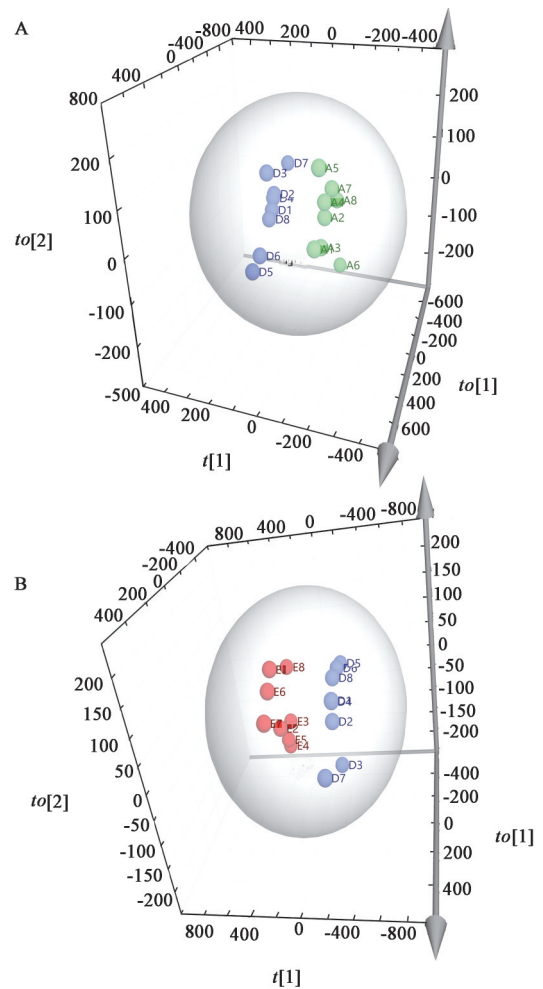


图2 YXTM对大鼠心肌组织代谢物PCA

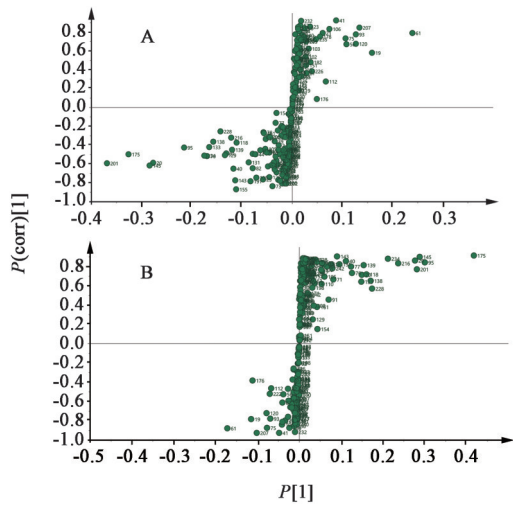
Fig. 2 PCA analysis of rats metabolites in myocardial tissue of YXTM



绿色. 正常组;蓝色. 模型组;红色. YXTM组

图3 YXTM作用大鼠心肌组织代谢物OPLS-DA得分

Fig. 3 OPLS-DA score plots of myocardial tissues of rats for YXTM



A. 模型组 VS 正常组; B. YXTM组 VS 模型组

图4 YXTM作用大鼠心肌组织代谢物分析 S-plot

Fig. 4 S-plot analysis of metabolites in myocardial tissue of rats in YXTM

**3.3 代谢差异物的筛选** 采用OPLS-DA模型提取第一主成分的VIP值(VIP值>1.2)并综合两组间比较T检验的P值( $P < 0.05$ )以及组间比较的S-plot图作为差异代谢物的筛选条件,通过KEGG和HMDB数据库对得到的差异代谢物进行分析鉴别,共鉴定出6个潜在生物标志物,分别为PE[18:1(9Z)/0:0],磷酸三苯酯,肌苷,iridotrial,*L*-异亮氨酸,泛酸,见表2,3。

表2 YXTM不同组别差异代谢物的筛选信息

Table 2 Screening information for different metabolites in YXTM

No.	Var ID	通用名	模型组 VS 正常组			YXTM组 VS 模型组		
			VIP值	FC	P	VIP值	FC	P
1	20	磷脂酰乙醇胺[18:1(9Z)/0:0]	3.91	0.48	0.017	4.03	3.44	<0.001
2	61	磷酸三苯酯	3.05	1.39	<0.001	2.48	0.56	<0.001
3	19	肌苷	2.23	1.28	0.018	1.74	0.72	<0.001
4	207	iridotrial	1.69	1.34	<0.001	1.44	0.55	<0.001
5	143	<i>L</i> -异亮氨酸	1.46	0.65	<0.001	1.29	1.98	<0.001
6	75	泛酸	1.38	1.36	<0.001	1.11	0.61	<0.001

表3 YXTM不同组别差异代谢物鉴定的基本信息

Table 3 Basic information for identification of differential metabolites

No.	代谢物名称	通用名	分子式	<i>m/z</i>	评分	离子模式
1	磷脂酰乙醇胺[18:1(9Z)/0:0]	PE[18:1(9Z)/0:0]	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>7</sub> P	480.31	55.6	ESI <sup>+</sup>
2	磷酸三苯酯	triphenyl phosphate	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	327.08	54.1	ESI <sup>+</sup>
3	肌苷	inosine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	267.07	55.6	ESI <sup>-</sup>
4	iridotrial	iridotrial	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	205.09	50.5	ESI <sup>+</sup>
5	<i>L</i> -异亮氨酸	<i>L</i> -isoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	132.10	51.6	ESI <sup>+</sup>
6	泛酸	pantothenic acid	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	220.12	53.2	ESI <sup>+</sup>

**3.4 代谢通路分析** 将上述筛选得到的内源性差异代谢物导入到MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>)数据库中进行代谢通路分析,发现5条与之相关的代谢通路,包括缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,泛酸和CoA生物合成,缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的降解,氨酰基tRNA的生物合成,嘌呤代谢。其中缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸生物合成代谢通路,可作为养心通脉方治疗冠心病血瘀证的潜在靶标路径。见表4。

#### 4 讨论

一直以来,中药临床前药效评估多倾向于研究药物对解剖学损伤、生理病理变化的影响<sup>[20-21]</sup>。随着组学技术的发展,中药(尤其是复方)的整体性作用机制和疗效在代谢组学的研究方法下将可能得到充分的展示和“挖掘”,帮助人们更好地理解中药干预后,机体内物质的代谢途径和代谢状况<sup>[20]</sup>,为中药药效评价及作用机制研究提供了强有力的技术支撑<sup>[22]</sup>。本研究所用养心通脉方是由袁肇凯教授根据秦伯未先生“扶养心气,和通血脉”原则调整组方而成,名为养心通脉方,此方组成为人参、丹参、桂枝、泽泻、枳实<sup>[10]</sup>。人参、桂枝补益心气<sup>[14]</sup>,枳实化痰除痞,泽泻能利水渗湿、通利血脉<sup>[23]</sup>。已有大量医学实验及临床研究证实其对缺血性心脏病、高脂血症、动脉粥样硬化等均具有较好的治疗效

表4 YXTM显著代谢通路的信息

Table 4 Specific information on significant metabolic pathways of YXTM

代谢通路	匹配代谢物/个	Raw P	-lgP	通路影响值
缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	8	0.026	1.581	0
泛酸和CoA生物合成	19	0.061	1.211	0.007 14
缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的降解	40	0.126	0.900	0
氨酰基 tRNA 的生物合成	48	0.149	0.826	0
嘌呤代谢	66	0.200	0.698	0.002 49

注:Details均为KEGG数据库,Hits均为1。

果<sup>[24]</sup>。现代药理研究表明,方中人参的有效成分能够促血管生成、降低炎症因子表达<sup>[25-26]</sup>,丹参扩张血管,抗动脉粥样硬化<sup>[27]</sup>,桂枝抗炎、双向调节血压<sup>[28]</sup>,泽泻抗炎、抗氧化损伤、降血脂<sup>[29]</sup>,枳实升压、强心、抗氧化<sup>[30]</sup>。

本研究采用LC-MS联用技术检测各组大鼠的心肌样本,通过多元统计分析和单变量统计分析的方法筛选潜在生物标志物及相关代谢通路。结果表明,养心通脉方干预后,PE[18:1(9Z)/0:0],磷酸三苯酯,肌苷,iridotrial,L-异亮氨酸,泛酸6种生物标志物具有显著变化,其相关性最强的通路为缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,可作为养心通脉方治疗冠心病血瘀证的作用靶点。冠心病属中医“胸痹”“真心痛”的范畴,其病理演变是一个漫长而又复杂的过程。《症因脉治》提到过:“胸痹之因,饮食不节,饥饱损伤,痰凝血滞,中焦混浊,则闭食闷胸之症作矣”<sup>[30]</sup>。现代医学研究证明,血脂、血黏性增高是造成痰瘀的生化物质基础<sup>[31]</sup>,大量的脂质凝聚于脉中形成痰浊,日久黏滞于血脉之内,凝结成块,导致瘀血内生。这种病理状态持续发展下去,痰借血体,血借痰凝,痰瘀互结,与血脉形成斑块。随着人体正气的亏虚,营血瘀滞渐重,沉积血府,血脉不再柔顺,瘀血征象更为突出<sup>[32]</sup>。

磷脂酰乙醇胺(PE)属于磷脂组分<sup>[33]</sup>,是生物膜中含量较丰富的磷脂分子,尤其在高度活跃的生物膜中含量更高<sup>[34]</sup>。PE属于花生四烯乙醇胺(AEA)的前体<sup>[35]</sup>。据报道,在大鼠缺血再灌注模型中,AEA通过降低冠脉肌酸激酶和乳酸脱氢酶水平,减少心肌梗死面积,改善心脏功能<sup>[36]</sup>。PE作为体内重要的脂质分子之一,具有一定的抗动脉粥样硬化的作用,能够清除低密度脂蛋白胆固醇、增加高密度脂蛋白胆固醇<sup>[37]</sup>,改善脂质代谢紊乱,从而减少动

脉粥样硬化斑块的形成<sup>[38]</sup>。养心通脉方组PE[18:1(9Z)/0:0]含量较模型组上调,说明养心通脉方可通过调节PE[18:1(9Z)/0:0]的含量,控制血脂于合适水平。方中枳实、泽泻豁痰宣痹,开胸散结,人参、丹参、桂枝补益心气,活血化瘀,共同改善痰瘀互结的病理状态,发挥心肌保护作用。

磷酸三苯酯(TPHP)是一种内分泌干扰物,体内过量蓄积会干扰大鼠细胞能量代谢和肌酸合成<sup>[39]</sup>,破坏碳水化合物和脂质代谢,促进代谢性疾病发生发展<sup>[40]</sup>。肌酸在心肌发生缺血缺氧的情况下能够转化为ATP为机体供能,保护心肌细胞<sup>[41]</sup>。模型组大鼠中TPHP的含量较正常组大鼠上调,导致肌酸分解不足。与正常组比较,模型组大鼠体内的ATP水平显著降低,这加剧了机体的能量需求危机。此外,TPHP还具有诱导炎症的能力,通过显著增加白细胞数目,放大机体发生的炎症反应<sup>[42]</sup>,从而刺激血管内皮细胞相关黏附分子的表达,促进血小板聚集,加速血瘀证的形成。经养心通脉方干预后TPHP的含量向正常水平回调,ATP与TAP表达量上升,渐接近甚至高于正常组水平。养心通脉方中丹参的主要成分丹酚酸B具有抑制炎症因子诱导黏附分子等表达和释放的作用<sup>[43]</sup>,这可能是通过调节TPHP的表达,抑制血小板与内皮细胞之间的通讯,减少活化血小板的黏附,从而减缓血瘀证的发展进程。

肌苷是人体内ATP,辅酶A等的组成部分之一,通过影响机体ATP的水平,在人体的物质代谢及能量代谢过程中起关键作用<sup>[44]</sup>。当机体内能量代谢发生紊乱时,ATP水平最先受到影响<sup>[45]</sup>。肌苷是ATP的降解产物<sup>[46]</sup>,对细胞膜有良好的通透性,能直接进入细胞,通过下调环氧化酶-2(COX-2)mRNA及蛋白其他途径,使处于低能缺血缺氧状态下的细胞继续顺利地进行代谢。泛酸是乙酰辅酶A的重要组成部分,是三羧酸循环(TCA)的关键中间代谢产物<sup>[42]</sup>。心肌缺血导致能量代谢障碍的大鼠会激活泛酸和CoA合成途径,提高心肌的缺血适应能力,缓解“能量失衡”的状态<sup>[43]</sup>。模型组肌苷和泛酸的表达量较正常组的升高暗示了TCA循环的上调,这可能是机体为心肌快速补偿供能的表现。模型组TAP表达量较正常组稍升高,但差异无显著意义<sup>[47]</sup>。模型组大鼠主动脉HE染色发现内膜断裂,中膜出现钙化斑块脱落后的空腔。血管病变表现表明,机体在能量代谢危机下表现出了“自救”反应,但在不采取相应治疗措施的前提下,仍然无法

遏制血瘀证的发生发展。经养心通脉方干预21 d后,动脉三层膜结构恢复完整,仅有少数炎症细胞附着在内膜上。

*L*-异亮氨酸参与缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的生物合成代谢通路,属于支链氨基酸,可通过转氨基作用生成琥珀酰辅酶A参与TCA循环,调节心肌能量代谢<sup>[48]</sup>。心肌组织缺血缺氧后,*L*-异亮氨酸通过雷帕霉素靶蛋白(mTOR)磷酸化显著正调控mTOR通路<sup>[49]</sup>。本研究中,模型组大鼠*L*-异亮氨酸下调,低水平的*L*-异亮氨酸通过AMPK/mTOR/FoxO1途径调节肝脏脂肪生成,改善脂肪酸 $\beta$ 氧化<sup>[49]</sup>,帮助心肌细胞度过急性损伤期,暂时满足机体的能量需求。经养心通脉方干预后*L*-异亮氨酸显著上调,激活mTOR通路,诱发机体自噬反应,降解功能受损或老化的细胞器<sup>[45]</sup>,最优化保证能量供给,减缓心肌细胞损伤和凋亡。目前已有证据支持支链氨基酸及其衍生物作为心血管疾病的潜在生物标志物<sup>[49-50]</sup>,本研究结果进一步支持这点结论。

综上所述,养心通脉方能够通过改变机体的能量代谢方式,有效改善大鼠痰瘀互结、血脉瘀滞的状态,减缓冠心病血瘀证的发展进程。本实验基于LC-MS技术既从整体观角度考察了养心通脉方的疗效,又从生物标志物及代谢通路层面考察养心通脉方的作用机制,其机制涉及磷脂代谢、氨基酸代谢、能量代谢、炎症反应以及血小板活化聚集等多个方面。本研究可为养心通脉方的后续研究与开发提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 李丽丽,李月,卢恒,等. 基于液相色谱-质谱法不同花期金银花代谢组学分析[J]. 分析测试学报, 2020,39(12):1501-1507.

[2] 蔡芬. MLKL通过上调ICAM-1表达促进人单核细胞与内皮细胞的粘附功能以及与冠心病的相关性研究[D]. 广州:南方医科大学,2020.

[3] 韩文博. 基于“络风内动”病机理论的风邪实质探讨及冠心病风邪临床表征研究[D]. 北京:北京中医药大学,2020.

[4] 王守东. 球囊在冠状动脉分叉病变中的应用及TGF- $\beta$ 1-SPHK1-TIMP-1信号通路在冠心病内皮细胞凋亡中的作用[D]. 济南:山东大学,2019.

[5] 邢亚楠,杨冠华,刘苏宁,等. 冠心病血瘀证研究概述[J]. 中国医药导报,2009,6(2):5-7.

[6] XIONG X J, WANG Z, WANG J. Innovative strategy

in treating angina pectoris with Chinese patent medicines by promoting blood circulation and removing blood stasis: experience from combination therapy in Chinese medicine[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015,13(4):540-553.

[7] 王传池. 冠心病不同发展阶段中医证演变规律研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2020.

[8] 黄正新,黄献平,袁肇凯. 养心通脉方对大鼠心肌缺血损伤模型心肌细胞线粒体功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2016,36(7):25-27.

[9] 黄海波. 养心通脉方对早发冠心病血瘀证家系CHL1、ZEB2基因甲基化作用影响的研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2015.

[10] 袁肇凯,周泽泉,范福元,等. 养心通脉片治疗冠心病心绞痛的临床研究[J]. 中药新药与临床药理,1998,(1):18-22,60.

[11] 卢健棋,林露南,李苏依,等. 养心通脉方含药血清对家兔骨髓内皮祖细胞增殖、迁移和黏附能力的影响[J]. 中医杂志,2016,57(14):1242-1246.

[12] 黄献平,袁肇凯,杨涛,等. 养心通脉片对兔动脉粥样硬化斑块的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2007,27(6):27-29.

[13] 袁肇凯,莫莉,黄献平,等. 养心通脉有效部位方对心肌缺血大鼠心脏血管内皮细胞血管生成的影响[J]. 现代生物医学进展,2009,9(8):1405-1408.

[14] 郑景辉. 养心通脉方研究述评[J]. 吉林中医药,2015,35(2):187-190.

[15] 陈宁,隋云鹏,孟凡刚. 帕金森病早期SNCA基因Ala53Thr碱基替换对小鼠模型嗅球组织中内源性代谢产物表达的影响[J]. 中国现代神经疾病杂志,2021,21(6):493-501.

[16] 简维雄,陈清华,黄献平,等. 大鼠心血瘀阻证心肌组织代谢组学的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(4):515-520.

[17] 简维雄,左和宁,袁肇凯,等. 心血瘀阻证动态演变过程大鼠模型的建立及方证验证评价[J]. 中医杂志,2015,56(16):1420-1424.

[18] 孙安会. 冠心病血瘀证病因病势对心肌细胞能量代谢及病证网络模型的影响[D]. 长沙:湖南中医药大学,2016.

[19] 彭峰林,黄丽丽,郭艳菊. 运动性心肌缺血损伤模型大鼠的制备[J]. 中国组织工程研究,2016,20(40):6007-6013.

[20] 贾伟,蒋健,刘平,等. 代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用[J]. 中国中药杂志,2006,31(8):621-624.

[21] 孙成宏,李翔子,肖贺,等. 基于UPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS技术的首荟通便胶囊干预慢传输型便秘

- 的代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(3): 532-538.
- [22] 牟菲. 丹参-降香对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及机制的代谢组学研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- [23] 曾雪芹. 从“心-肠-菌”出发探讨养心通脉方对冠心病血瘀证大鼠模型肠道微生态平衡的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [24] 袁肇凯, 莫莉, 黄献平, 等. 养心通脉有效部位方对心肌缺血大鼠心血管内皮细胞血管生成的影响[J]. 心血管康复医学杂志, 2009, 18(2): 180-184.
- [25] 杨清华, 王庆高, 潘朝铤, 等. 养心通脉方对心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生及相关生长因子表达的影响[J]. 广西中医药, 2019, 42(3): 75-77.
- [26] 王倩, 李冰冰, 黄文静, 等. 基于2种色谱-质谱联用技术的参芪降糖颗粒化学成分分析[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1568-1581.
- [27] 浦锡娟, 徐凯琳. 丹参的药理作用研究进展[J]. 临床医学工程, 2009, 16(8): 154-155.
- [28] 袁海建, 李卫, 金建明, 等. 桂枝汤化学成分、药理作用机制与临床应用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4556-4564.
- [29] 刘珊珊, 郭杰, 李宗艾, 等. 泽泻化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1578-1595.
- [30] 张红, 孙明江, 王凌. 枳实的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(11): 1787-1790.
- [31] 王阶, 赵涛, 熊兴江, 等. 丹红注射液治疗冠心病的作用机制与临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 173-178.
- [32] 简维雄, 袁肇凯, 黄献平, 等. 冠心病心血瘀阻证血浆代谢组学的检测分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(6): 579-584.
- [33] 王海波, 莫紫梅, 袁光蔚, 等. 高效液相色谱法测定磷脂软胶囊中磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 579-585.
- [34] 徐国庆, 郝长春, 赫剑真, 等. 牛血清蛋白对二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺单层膜结构的影响[J]. 高等学校化学学报, 2017, 38(12): 2238-2247.
- [35] 刘为敏, 段恩奎. 花生四烯乙醇胺的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 152-155.
- [36] 吴艳, 李岱, 姜德建. 花生四烯酸乙醇胺的心血管作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(1): 28-32.
- [37] SHERRATT S C R, MASON R P. Eicosapentaenoic acid inhibits oxidation of high density lipoprotein particles in a manner distinct from docosahexaenoic acid [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2): 335-338.
- [38] 鲁媛. 基于代谢组学策略研究高脂血症新型生物标志物与调脂方FTZ的作用机制[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [39] ALAM T M, NEERATHILINGAM M, ALAM M K, et al. <sup>1</sup>H Nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomic study of chronic organophosphate exposure in rats [J]. *Metabolites*, 2012, 2(3): 479-495.
- [40] 胡维, 王姝, 于海兵, 等. 磷酸三苯酯致大鼠肝脏代谢紊乱的生物信息学分析[J]. 环境与职业医学, 2020, 37(2): 111-120.
- [41] 刘瑛琪, 李天德, 任艺虹, 等. 磷酸肌酸对心肌细胞线粒体的保护作用[J]. 心脏杂志, 2004, 16(1): 14-16.
- [42] 林泽桁, 施明杰, 陈欣林, 等. 磷酸三苯酯对幼年小鼠血液和胸腺中免疫细胞及细胞因子的影响[J]. 环境与职业医学, 2020, 37(4): 391-396.
- [43] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2015, 36(2): 141-152.
- [44] 金冠钦, 孙黎, 王玉洪, 等. LC-MS/MS法测定人血浆中肌昔浓度的不确定度评估[J]. 山西医科大学学报, 2020, 51(11): 1255-1262.
- [45] 周曼丽, 俞赞丰, 冯宇, 等. 冠心病血瘀证形成过程中心肌细胞能量代谢酶作用及其机制研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2020, 28(12): 76-84.
- [46] 吕长江, 刘福和, 王国伟, 等. 当归补血颗粒对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(6): 666-671.
- [47] 李琴, 张红, 郭云良, 等. 肌昔对脑缺血再灌注后COX-2表达的调节作用[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(7): 640-642.
- [48] 夏伯候, 白璐, 张英帅, 等. 基于GC-MS代谢组学探讨妇科千金胶囊治疗盆腔炎机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4940-4946.
- [49] NIE C, HE T, ZHANG W, et al. Branched chain amino acids: beyond nutrition metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 954.
- [50] 姜月华, 陶燕楠, 亓英姿, 等. 基于UPLC-MS探讨痰湿壅盛型高血压病小鼠血浆代谢组学特点[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2671-2676.

[责任编辑 顾雪竹]