

· 经典名方 ·

六味地黄丸对大鼠生长发育过程中血液代谢的影响

康舒宇¹, 张艾嘉¹, 张佳琪¹, 王萍^{1,2*}, 王喜军^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学 国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心, 国家中医药管理局
中药血清药物化学重点实验室, 中美中医方证代谢组学技术合作中心, 哈尔滨 150040;
2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:以代谢组学的整体代谢轮廓和生物标记物为指标,研究六味地黄丸对大鼠生长发育过程中血液代谢的影响。方法:利用超高效液相色谱-高清质谱(UPLC-HDMS)联用技术建立血液代谢组学研究方法,表征给药前后不同时间的大鼠血液代谢轮廓;采用模式识别方法整合分析代谢轮廓,寻找与药物作用相关的差异代谢标记物,依托 MetPA 和京都基因与基因组百科全书(KEGG)等数据库,解析与差异标记物相关的代谢通路,研究六味地黄丸对大鼠生长发育过程中血液代谢的影响。结果:六味地黄丸通过调控苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、硫酸高香草酸、溶血性磷脂酰胆碱[16:1(9Z)]等 30 个血液代谢标记物及 12 个相关的靶标代谢通路,显著影响大鼠生长发育过程中血液代谢轮廓,并圈定了硫酸高香草酸、苯丙氨酸、甘氨酸等 8 个代谢标记物为六味地黄丸影响大鼠生长发育的核心代谢标记物。结论:六味地黄丸能够显著调控大鼠生长发育过程中的血液代谢网络,从而影响大鼠的生长发育。

[关键词] 六味地黄丸; 生长发育; 血液代谢; 代谢标记物; 氨基酸代谢; 硫酸高香草酸; 甘氨酸

[中图分类号] R22;R24;R969.1;R28;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190848

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190102.0923.001.html>

[网络出版时间] 2019-01-04 10:01

Effect of Liuwei Dihuangwan on Blood Metabolism During Growth and Development of Rats

KANG Shu-yu¹, ZHANG Ai-jia¹, ZHANG Jia-qi¹, WANG Ping^{1,2*}, WANG Xi-jun^{1*}

(1. Sino-America Chinmedomics Technology Collaboration Center, Key Laboratory of Serum
Pharmacochimistry, Research Center of Chinmedomics, State Administration of Traditional
Chinese Medicine (TCM), Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** The effect of Liuwei Dihuangwan on blood metabolism during growth and development of rats was investigated by taking the overall metabolic profile and biomarkers of metabolomics as indexes. **Method:** Ultra performance liquid chromatography-high definition mass spectrometry (UPLC-HDMS) was employed to establish a blood metabolomics study method for characterizing the blood metabolic profile of rats at different time before and after administration. The pattern recognition method was used to integrate and analyze the metabolic profiles, and the differential metabolic markers related to drug action were searched. Based on

[收稿日期] 20181025(004)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473584)

[第一作者] 康舒宇,在读博士,从事中药血清药物化学和中医方证代谢组学研究,E-mail:835437234@qq.com

[通信作者] *王萍,博士,副研究员,硕士生导师,从事中药血清药物化学、中医方证代谢组学及脑卒中的发病机制研究,Tel:010-64032656,E-mail:hudielanwp@sina.com;

*王喜军,博士,教授,博士生导师,从事中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究,Tel:0451-82110818,E-mail:xijunw@sina.com

metabolomics pathway analysis (MetPA) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and other databases, the metabolic pathways related to differential markers were analyzed to study the effect of Liuwei Dihuangwan on blood metabolism during growth and development of rats. **Result:** Liuwei Dihuangwan significantly affect the blood metabolism profiles during growth and development of rats by regulating 30 blood metabolic markers and 12 related target metabolic pathways, and 8 key metabolic markers were delineated. **Conclusion:** Liuwei Dihuangwan can significantly regulate the blood metabolic network during the growth and development of rats, thereby affecting the growth and development of rats.

[**Key words**] Liuwei Dihuangwan; growth and development; blood metabolism; metabolic markers; amino acid metabolism; 3-methoxy-4- (sulfoxy) -benzeneacetic acid; glycocholic acid

随着社会的不断发展,儿童生长发育问题已成为每个家庭关注的焦点。生长发育是一个连续不断的过程,生长是各器官、系统的长大,发育是细胞、组织、器官的分化与功能成熟。二者紧密联系,生长是发育的物质基础,生长的量变可在一定程度上反映身体器官、系统的成熟状况。人的生长发育是从受精卵到成人的成熟过程,其中小儿的生长发育在整个小儿时期以非等速不断进行着,同时生长发育过程中也伴随着机体代谢的变化^[1-2]。中医认为肾主藏精,为先天之本,肾精、肾气具有促进机体生长发育的作用,因此肾的健康与否标志着人体生长发育的盛衰^[3]。

六味地黄丸(LW)源自宋代钱乙所著的《小儿药证直诀》,原名地黄丸,由熟地黄、山茱萸肉、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓 6 味药组成,是在张仲景的肾气丸基础上,去温补的桂枝、附子二药而成,为滋补肾阴的经典名方,最初被用于治疗小儿先天肾阴不足所致的五迟证、五软证^[4]。以往研究者们更多关注其补肾作用及其相关应用,而忽视了该方的经典疗效。代谢组学是继基因组学、蛋白质组学和转录组学之后新兴的组学,是系统生物学的重要组成部分。应用代谢组学技术能够同时定性、定量分析某一生物或细胞在特定生理时期内所有低相对分子质量的代谢产物^[5]。由于代谢组学的研究方式与中医学系统观和整体观的核心思想不谋而合^[6],被广泛应用于中医药研究中,并在疾病的诊断^[7-8]、治疗^[9-10]等方面发挥重要作用。本课题组为解决中药有效性及安全性等相关科学问题,将中药血清药物化学与代谢组学有机结合,建立了中医方证代谢组学理论体系^[11-12],并长期致力于经典名方的研究工作。前期研究发现,LW 具有改善缺血缺氧脑瘫大鼠整体行为能力及病理状态的作用^[13],并且大量临床应用及药理研究表明 LW 对多个系统具有重要影响。基于 LW 的经典疗效及主治病证,同时结合中

医理论,说明 LW 对机体的生长发育具有一定影响,但代谢调控机制不清。因此,本实验从代谢组学角度研究 LW 对大鼠生长发育过程中血液代谢的影响,从而诠释“滋补肾阴”对生长发育影响的科学内涵。

1 材料

ACQUITY™ UPLC 型超高效液相系统-SYNAPT™ HDMS 型质谱仪(美国 Waters 公司,含 MassLynx V4.1 工作站),MS 3 digital 型旋涡混匀器(德国 IKA 公司),Unique-R20 型多功能超纯水系统(厦门市锐思捷水纯化技术有限公司)。羧甲基纤维素钠(天津市致远化学试剂有限公司),亮氨酸脑啡肽(德国 Sigma 公司),乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。LW 组方熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、泽泻、牡丹皮饮片均购自北京同仁堂哈尔滨药店,经黑龙江中医药大学王喜军教授鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》(一部)的相关规定;结合本课题组前期研究结果,将仲景牌 LW 的人体日剂量(每天按生药量计算为 9 g)折算本实验中大鼠的给药剂量,以人体日剂量折合为本实验中大鼠的低剂量,人体日剂量的 5 倍折合成大鼠的中剂量,人体日剂量的 10 倍折合成大鼠的高剂量;熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、泽泻、牡丹皮饮片按 8:4:4:3:3:3 比例适量充分混合,加 10 倍量甲醇浸泡 30 min,超声提取 40 min,重复 3 次,合并滤液,减压浓缩,得 LW 提取液浓膏,加入 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液,制成生药质量浓度为 0.81 g·mL⁻¹ 的混悬液,即 LW 高剂量提取液,将该高剂量提取液用 0.5% CMC-Na 溶液逐级稀释成 0.405 g·mL⁻¹ 的 LW 中剂量提取液以及 0.081 g·mL⁻¹ 的 LW 低剂量提取液,于 4 °C 保存备用。

21 d 龄雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 40 ~ 50 g,由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供,SPF 级环境下饲养,温度(24 ± 3) °C,相对湿度 65% ~ 75%,

12 h 光照, 12 h 黑暗, 自由摄食饮水。本文涉及的动物实验经黑龙江中医药大学动物使用与管理委员会批准, 批准号 201703501。

2 方法与结果

2.1 动物分组与给药 实验动物在 27 d 龄时按体质量随机分为 4 组, 每组 15 只, 分别为空白组 (C), LW 低剂量组 (LWL), LW 中剂量组 (LWM) 和 LW 高剂量组 (LWH)。各给药组每天灌胃给予相应剂量的 LW 提取液, 空白组给予等量的 0.5% CMC-Na 溶液, 持续 16 d。

2.2 样品的采集与预处理 各组大鼠在给药第 0, 1, 4, 7, 10, 13, 16 天, 由眼底后静脉丛采集给药后 1 h 的血液, 每只大鼠每次采集血液约 0.6 mL, 采集血液后清理眼部, 防止留下血迹及预防感染。血液室温放置 30 min 后于 4 °C, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上层清液, 于 -80 °C 冷冻备用。分析前将血清样本室温解冻, 涡旋 30 s 使样品混匀, 取血清 50 μL 与甲醇 200 μL 混合, 涡旋 30 s, 于 4 °C, 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 供 UPLC-HDMS 分析。

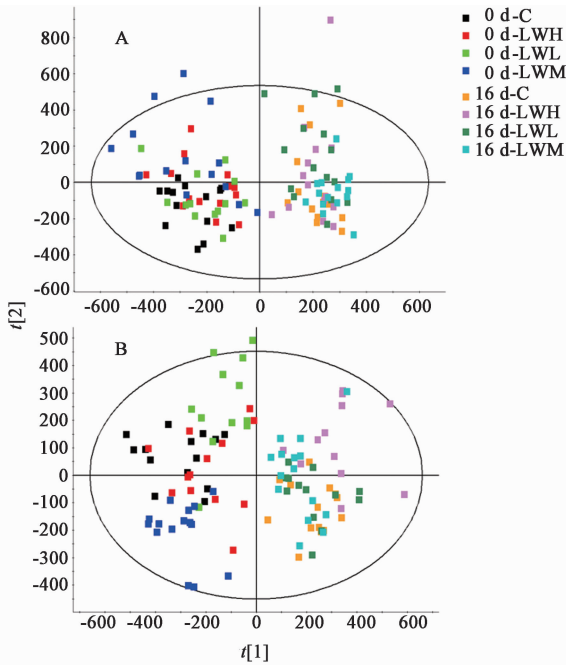
2.3 检测条件 色谱条件为 ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0~2.0 min, 5%~50% A; 2.0~3.0 min, 50%~70% A; 3.0~8.0 min, 70%~80% A; 8.0~8.5 min, 80%~100% A), 柱温 40 °C, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 正、负离子模式下进样量分别为 3 μL 和 2 μL。质谱条件为采用电喷雾离子源 (ESI); 正离子模式下, 离子源温度 110 °C, 脱溶剂气流量 800 L·h⁻¹, 脱溶剂气温度 380 °C, 锥孔气流量 50 L·h⁻¹, 样品锥孔电压 30 V, 毛细管电压 2.6 kV, 提取锥孔电压 3.0 V; 负离子模式下, 离子源温度 110 °C, 脱溶剂气流量 800 L·h⁻¹, 脱溶剂气温度 380 °C, 锥孔气流量 50 L·h⁻¹, 样品锥孔电压 35 V, 毛细管电压 2.0 kV, 提取锥孔电压 3.5 V。扫描范围 *m/z* 50~1 000, 扫描时间 0.2 s, 以 Centriod 模式进行数据采集。

2.4 代谢组学数据处理和分析 将获得的所有血液代谢组学数据导入 Progenesis Q1 软件中进行色谱峰对齐、峰提取、归一化等处理, 结合 EZinfo 2.0 软件对大鼠给药前后的血液代谢轮廓进行分析。利用非监督型主成分分析 (PCA) 观察各组大鼠给药前后代谢轮廓的变化, 同时应用偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 得到反映各组聚类程度的得分图以及大

鼠给药过程中的经时变化情况。进一步应用正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 获得反映变量贡献度大小的得分图和变量重要性投影 (VIP) 值, 选取对分组贡献度较大 (VIP 值 > 1.0) 的离子, 同时结合组间 *t* 检验结果 ($P < 0.05$), 圈定潜在差异代谢标记物, 进一步利用二级质谱信息并结合人类代谢组数据库 (HMDB), 京都基因与基因组百科全书 (KEGG), MetPA 等数据库对潜在差异代谢标记物进行结构鉴定及代谢通路拓扑分析, 阐释其生物学意义, 评价 LW 对大鼠生长发育过程中血液代谢的影响。数据采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.5 大鼠血液代谢轮廓分析 应用 Progenesis Q1 软件对获得的 4 组大鼠给药前后的血液代谢数据进行处理, 并结合 EZinfo 2.0 软件对给药前后的大鼠血液代谢轮廓进行分析, PCA 得分图见图 1, 可见 LW 对生长过程中血液代谢轮廓的影响。通过对给药第 16 天的各组大鼠血液代谢轮廓数据进行分析, 得到 PLS-DA 得分图, 见图 2。结果发现正、负离子模式下空白组与各剂量的给药组组间明显区分, 同时空白组与 LWH 分离尤为显著, 表明生长期大鼠在正常代谢的基础上, 血液代谢轮廓在药物的作用下发生扰动, 且高剂量药物对机体代谢的影响更为显著。故采用 PLS-DA 对 LWH 给药前后 7 个时间点血液代谢数据进行分析, 表征药物干预下大鼠血液代谢轮廓的经时变化趋势, 见图 3。结果发现给药 16 天内, LWH 大鼠的血液代谢轮廓随药物干预时间的增加而发生明显变化, 从给药第 0 天开始, 直至给药第 16 天结束, 整体代谢轮廓变化沿逆时针方向而改变。表明药物干预影响了大鼠的血液代谢轮廓, 且不同干预时间对机体代谢的影响不同。

2.6 潜在差异代谢标记物的鉴定 由图 2 可知, 空白组与 LWH 明显分离, 故对这 2 组间的差异代谢标记物进行分析, 作为 LW 影响大鼠生长发育的差异代谢标记物。采用 EZinfo 2.0 软件对空白组与 LWH 的血液代谢数据进行 OPLS-DA 分析, 结果发现两组有明显的聚类区分趋势, 见图 4。在 OPLS-DA 基础上, 通过得分图和 VIP 值筛选出组间差异性变量, 见图 5, 距离原点中心越远的离子, 对分组的贡献度越大。选择 VIP 值 > 1.0 且 $P < 0.05$ 的变量, 通过 HMDB 结合二级碎片离子信息, 以及 MassLynx V4.1 软件 MassFragment 模块对潜在差异代谢标记物进行二级结构验证, 最终表征了 30 个



A. 正离子模式; B. 负离子模式 (图 2 ~ 5 同)

图 1 各组大鼠给药前后代谢轮廓的 PCA 得分

Fig. 1 PCA score plots of metabolic profiles of rats from different groups before and after oral administration

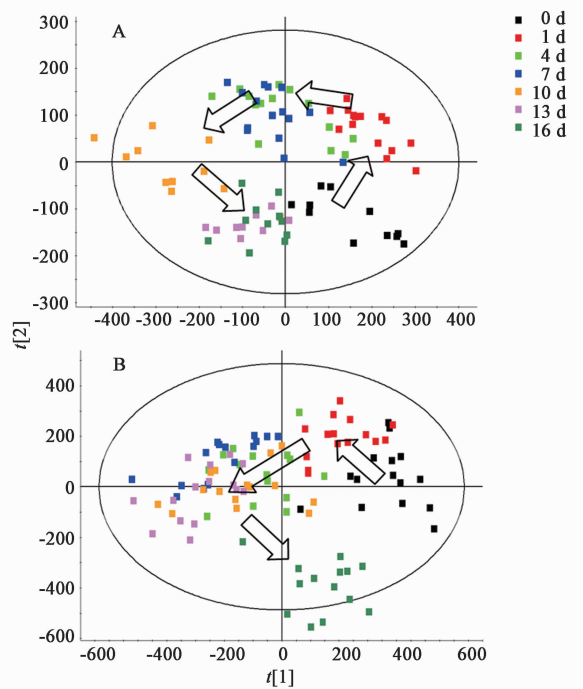


图 3 LWH 大鼠给药前后 7 个时间点代谢轮廓的 PLS-DA 得分

Fig. 3 PLS-DA score plots of metabolic profiles of rats from LWH at 7 time points before and after administration

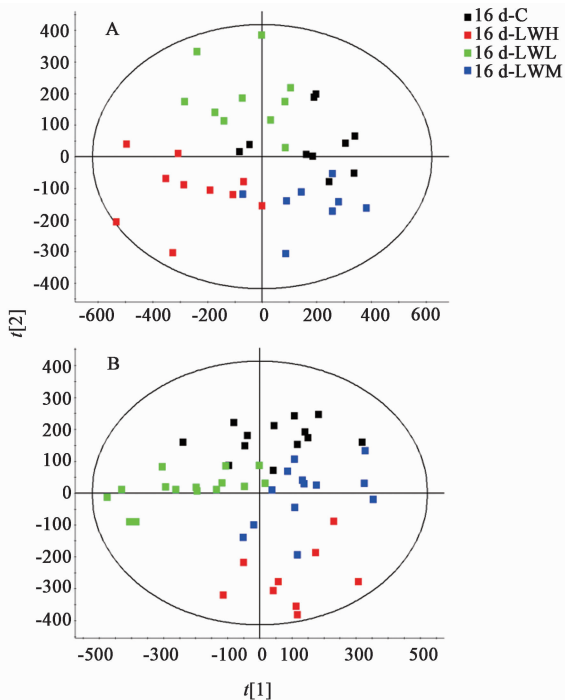


图 2 给药第 16 天各组大鼠代谢轮廓的 PLS-DA 得分

Fig. 2 PLS-DA score plots of metabolic profiles of rats from different groups on 16th day of administration

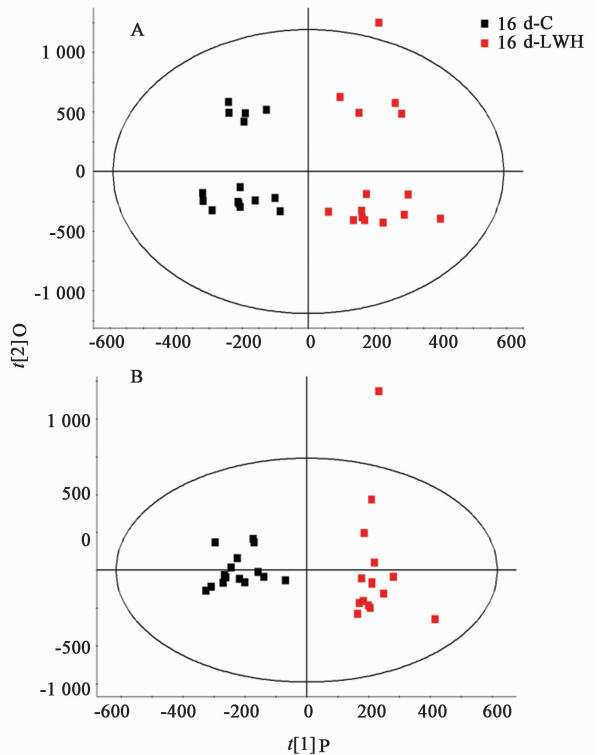


图 4 给药第 16 天空白组与 LWH 大鼠代谢轮廓的 OPLS-DA 得分

Fig. 4 OPLS-DA score plots of metabolic profiles of rats from LWH and blank group on 16th day of administration

LW 干预后的血液差异代谢标记物, 其中正离子模式下 16 个, 负离子模式下 18 个, 双离子模式下同时表征 4 个, 见表 1。

2.7 代谢通路分析 利用 MetPA 数据库联合多个高级的路径分析程序对表 1 中鉴定得到的 30 个血

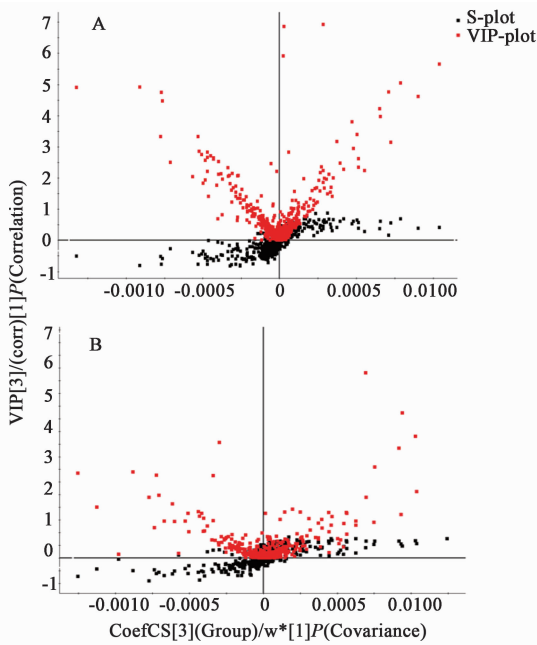


图 5 给药第 16 天空白组与 LWH 差异代谢标记物的 VIP-plot 和 S-plot
Fig. 5 VIP plot and S-plot of differential metabolic biomarkers between blank group and LWH on 16th day of administration

液代谢标记物的相关代谢通路进行拓扑特征分析,将通路影响值 (pathway impact) > 0.01 的代谢通路作为潜在靶标代谢通路,结果显示这些代谢物涉及的通路包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,苯丙氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,戊糖和葡萄糖醛酸相互转化,视黄醇代谢,色氨酸代谢,酪氨酸代谢,花生四烯酸代谢,甘油磷脂代谢,淀粉和蔗糖代谢,初级胆汁酸生物合成以及嘌呤代谢,见图 6。对上述 12 个潜在靶标代谢通路进行分析后发现,LW 主要造成大鼠氨基酸代谢、碳水化合物代谢、维生素代谢、脂质代谢和核苷酸代谢扰动。为了进一步实现 LW 对大鼠生长发育过程中血液代谢网络的可视化,根据 MetPA, HMDB 和 KEGG 等数据库绘制其代谢网络,见图 7。

3 讨论

生长发育过程是以阶段性增速的形式不断进行,并伴随着代谢变化。中医认为肾为先天之本,肾精、肾气具有促进机体生长发育的作用,小儿生长发育过程伴随着肾精及肾气的逐渐充盛,表现出一系列机体变化。LW 作为滋补肾阴的经典名方,最初用于小儿先天肾阴不足所致的五迟证、五软证,现广泛应用于生殖泌尿系统^[14-15]、内分泌系统^[16]、神经系统^[17-19]、循环系统^[20]等疾病。在前期基础上,本研究立足于 LW 的经典疗效,应用代谢组学技术研

究 LW 对大鼠生长发育过程中血液代谢的影响。结果表明大鼠连续给予 LW 提取液 16 d,机体受到药物的影响,血液代谢轮廓发生明显变化,最终表征了苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、硫酸高香草酸、溶血性磷脂酰胆碱等 30 个差异代谢标记物,从而引起苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,苯丙氨酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成等 12 个相关代谢通路扰动,主要涉及机体的氨基酸代谢、碳水化合物代谢、维生素代谢、脂质代谢和核苷酸代谢。

大鼠连续给予 LW 提取液后,机体代谢物苯丙氨酸,苯丙酮酸,色氨酸,酪氨酸,亮氨酸,硫酸高香草酸,苯乳酸,硫酸吡啶酚,2-苯乙酰胺和 5-氨基戊酸的含量均发生显著变化,表明氨基酸代谢受药物显著影响。氨基酸是构成蛋白质的基本单位,氨基酸代谢参与生命活动的各个部分。其中苯丙氨酸能够影响机体生长发育和正常生理机能的维持,在肝脏等组织经代谢可产生酪氨酸,酪氨酸在神经系统和肾上腺髓质作用合成神经递质或某些激素^[21-22];色氨酸在体内具有重要的生理生化功能,可促进机体生长发育、体质量增加,其代谢产物 5-羟色胺是人体中枢神经系统的重要神经递质,能够调节人体精神活动^[23]。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成中核心代谢物,三者在机体内可以相互转化,本研究中苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸在血液中的含量显著降低,提示 LW 促进氨基酸代谢,从而促进机体生长发育。同时 2-苯乙酰胺和苯丙酮酸作为苯丙氨酸的代谢产物,含量也发生了明显变化,进一步验证苯丙氨酸代谢发生扰动,从而引起酪氨酸代谢发生扰动。而硫酸高香草酸作为酪氨酸代谢的终产物之一,其含量明显升高,再次证明酪氨酸代谢增强。亮氨酸作为最有效的支链氨基酸,可以修复肌肉损伤,调节哺乳动物骨骼肌蛋白质的代谢及脂肪代谢,为机体提供能量^[24],本研究中亮氨酸含量显著降低,可能是 LW 通过促进亮氨酸代谢以达到促进机体骨骼肌蛋白质、脂肪代谢的目的,从而为机体提供能量。胆汁酸在脂肪代谢中起着重要作用,胆酸作为人体 4 种主要胆汁酸,能够在肝脏内与甘氨酸结合生成甘氨酸胆酸,或与牛磺酸结合生成牛磺胆酸,具有促进脂类物质吸收和吸收的作用。熊去氧胆酸作为鹅去氧胆酸的异构体,能够增加胆汁酸分泌,降低胆汁中胆固醇及胆固醇酯。连续给予 LW 提取液后,胆酸、甘氨酸胆酸和熊去氧胆酸在负离子模式下均表现较大的 VIP 值,同时其含量变化显著,提示 LW 可能通过调节胆汁酸从而影响机

表 1 空白组与 LW 间差异代谢标记物的鉴定

Table 1 Identification of differential metabolic biomarkers between blank group and LW

No.	t_R /min	m/z	相对分子 质量	扫描模式	分子式	化合物	VIP 值	趋势		
								LW	LWM	LWH
1	0.57	118.086 9	117.079 0	ESI ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂	5-氨基戊酸	1.46	↑	↑ ¹⁾	↑ ¹⁾
2	0.77	167.019 9	168.028 3	ESI ⁻	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	尿酸	1.60	↓	↓ ¹⁾	↓ ¹⁾
3	0.80	136.076 1	135.068 4	ESI ⁺	C ₈ H ₉ NO	2-苯乙酰胺	1.17	↑	↓	↓ ¹⁾
4	0.80	165.055 0	164.047 3	ESI ⁺	C ₉ H ₈ O ₃	苯丙酮酸	1.15	↑	↓	↓ ²⁾
5	0.89	180.065 6	181.073 9	ESI ⁻	C ₉ H ₁₁ NO ₃	L-酪氨酸	1.99	↓ ¹⁾	↓ ¹⁾	↓ ²⁾
6	0.96	132.102 1	131.094 6	ESI ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂	L-亮氨酸	1.53	↓ ¹⁾	↓ ¹⁾	↓ ²⁾
7	1.12	166.086 7	165.079 0	ESI ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₂	L-苯丙氨酸	2.28	↓ ²⁾	↓ ¹⁾	↓ ²⁾
8	1.31	205.098 0	204.089 9	ESI ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-色氨酸	1.22	↓	↓ ¹⁾	↓ ²⁾
9	1.74	212.001 7	213.009 6	ESI ⁻	C ₈ H ₇ NO ₄ S	硫酸吡啶酚	2.98	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾
10	1.79	261.009 5	262.014 7	ESI ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	硫酸高香草酸 [3-methoxy-4-(sulfoxy)-benzeneacetic acid]	7.83	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾
11	1.86	165.054 5	166.063 0	ESI ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₃	苯乳酸	1.36	↑	↑ ¹⁾	↑ ²⁾
12	2.02	297.097 9	298.105 3	ESI ⁻	C ₁₄ H ₁₈ O ₇	2-苯乙醇葡萄糖苷酸	1.21	↑ ²⁾	↓	↑ ²⁾
13	2.63	464.303 8	465.309 0	ESI ⁻	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	甘氨酸胆酸	3.00	↓ ¹⁾	↑	↓ ¹⁾
14	2.98	335.222 9	336.230 1	ESI ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	白三烯 B4	1.05	↓	↓	↓ ²⁾
15	3.01	407.284 3	408.287 6	ESI ⁻	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	胆酸	6.74	↑	↓	↑ ¹⁾
16	3.01	373.276 8	372.263 5	ESI ⁺	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	鹿酰乙醇酰胺 (cervonoyl ethanolamide)	3.48	↑	↓	↑ ¹⁾
17	3.16	542.326 2	541.316 8	ESI ⁺	C ₂₈ H ₄₈ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 [20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]	1.54	↓	↑ ¹⁾	↑ ²⁾
18	3.49	301.217 5	300.208 9	ESI ⁺	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	全反式视黄酸	1.59	↓ ¹⁾	↓	↓ ²⁾
19	3.49	317.212 4	318.219 5	ESI ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	白三烯 A4	1.29	↓	↓ ²⁾	↓ ¹⁾
20	3.58	391.287 1	392.284 6	ESI ⁻	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	熊去氧胆酸	5.49	↑ ²⁾	↓	↑ ²⁾
21	3.70	518.326 1	517.316 8	ESI ⁺	C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 [18:3(9Z,12Z,15Z)]	1.25	↑ ²⁾	↑	↑ ²⁾
22	3.77	494.329 3	493.316 8	ESI ⁺	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 [16:1(9Z)]	2.51	↑ ¹⁾	↑ ²⁾	↑ ¹⁾
23	3.93	466.294 6	467.301 2	ESI ⁻	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 (14:0)	1.10	↑ ¹⁾	↑	↑ ²⁾
24	4.33	570.362 1	569.348 1	ESI ⁺	C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 [22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	2.06	↑ ¹⁾	↓	↑ ²⁾
25	4.64	510.357 6	509.348 2	ESI ⁺	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 (17:0)	1.35	↑	↑	↑ ¹⁾
26	4.88	494.326 1	495.332 5	ESI ⁻	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 (16:0)	1.69	↑	↑ ¹⁾	↑ ²⁾
27	5.56	482.328 8	481.316 8	ESI ⁺	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 (15:0)	2.22	↓	↑ ¹⁾	↑ ¹⁾
28	5.60	546.358 1	545.348 1	ESI ⁺	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 [20:3(5Z,8Z,11Z)]	2.71	↑	↑ ²⁾	↑ ²⁾
29	5.83	550.389 2	549.379 4	ESI ⁺	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	溶血性磷脂酰胆碱 [20:1(11Z)]	2.07	↓ ²⁾	↑	↓ ²⁾
30	8.09	329.248 6	330.255 9	ESI ⁻	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	二十二碳五烯酸	1.72	↓	↑	↑ ²⁾

注:与空白组比较,↑和↓表示血液代谢标记物的相对质量分数在 LW 各给药组中呈上升或下降趋势,¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

体脂肪代谢。通过深入分析 30 个血液代谢标记物及 12 个相关的靶标代谢通路,最终确定了苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、硫酸高香草酸、亮氨酸、胆酸、甘氨酸和熊去氧胆酸 8 个代谢标记物为 LW 影响大鼠生长发育的核心代谢标记物,这些标记物通过诱导氨基酸

代谢和脂质代谢扰动,进而影响中枢系统和肾脏系统的功能,从而达到促进生长发育的作用。

本研究以非病理状态下的幼鼠为研究对象,研究 LW 对大鼠生长发育过程中血液代谢的影响,不同于以往的药效学研究思路。结合 LW 对大鼠生长发育

- towards understanding traditional Chinese medicine[J]. *Planta Med*, 2010, 76(17):2026-2035.
- [7] 郝明丽,徐敏. 代谢组学在 2 型糖尿病研究中的应用及进展[J]. *内科理论与实践*, 2016, 11(3):191-194.
- [8] TIAN J S, XIA X T, WU Y F, et al. Discovery, screening and evaluation of a plasma biomarker panel for subjects with psychological suboptimal health state using ¹H-NMR-based metabolomics profiles[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33820.
- [9] XIE J, ZHANG A H, WANG X J. Metabolomic applications in hepatocellular carcinoma: toward the exploration of therapeutics and diagnosis through small molecules[J]. *RSC Adv*, 2017, 7(28):17217-17226.
- [10] 陈瑞,马宁宁,范姗姗,等. 基于代谢组学分析金芪降糖片改善 2 型糖尿病大鼠脂代谢紊乱的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):102-107.
- [11] 王喜军. 中药药效物质基础研究的系统方法学——中医方证代谢组学[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(1): 13-17.
- [12] WANG X J, ZHANG A H, SUN H. Future perspectives of Chinese medical formulae: chinmedomics as an effector[J]. *Omics*, 2012, 16(7/8):414-421.
- [13] 李秋菊,王萍,王美佳,等. 基于中医方证代谢组学技术的六味地黄丸干预脑瘫大鼠模型研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2016, 18(10):1684-1696.
- [14] WANG P, SUN H, LV H T, et al. Thyroxine and reserpine-induced changes in metabolic profiles of rat urine and the therapeutic effect of Liu Wei Di Huang Wan detected by UPLC-HDMS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3):631-645.
- [15] 王喜军,张宁,孙晖,等. 六味地黄丸血中移行成分对氢化可的松致大鼠肾虚动物模型的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(2):33-37.
- [16] 杜亚明,李祥华,张家均. 六味地黄丸对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(6):6-9.
- [17] ZHANG Y X, MA Y, ZHOU W, et al. Effect of Liuwei Dihuang decoction on the function of hypothalamus-pituitary-ovary axis in senescence-accelerated mouse [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med*, 2004, 24(4): 325-330.
- [18] LIU J P, FENG L, ZHANG M H, et al. Neuroprotective effect of Liuwei Dihuang decoction on cognition deficits of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(1): 371-381.
- [19] ZHOU W X, CHENG X R, ZHANG Y X. Effect of Liuwei Dihuang decoction, a traditional Chinese medicinal prescription, on the neuroendocrine immunomodulation network [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 162:170-178.
- [20] WANG J, YAO K W, YANG X C, et al. Chinese patent medicine Liu Wei Di Huang Wan combined with antihypertensive drugs, a new integrative medicine therapy, for the treatment of essential hypertension: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, doi: 10.1155/2012/714805.
- [21] Stonier C, McGale E H, Aber G M. Studies of phenylalanine hydroxylase activity in patients with chronic renal failure: the effect of haemodialysis [J]. *Clin Chim Acta*, 1984, 143(2):115-122.
- [22] Rasmussen D D, Ishizuka B, Quigley M E, et al. Effects of tyrosine and tryptophan ingestion on plasma catecholamine and 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983, 57(4):760-763.
- [23] 张将,唐爱国. 色氨酸及其代谢产物检测的临床应用 [J]. *实用预防医学*, 2012, 19(4):633-636.
- [24] 陈浩,毛湘冰,陈代文,等. 亮氨酸调节哺乳动物脂肪代谢的研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2014, 26(7): 1723-1727.
- [25] 康舒宇,张佳琪,张艾嘉,等. 基于尿液代谢组学的六味地黄丸对大鼠生长发育的影响 [J]. *药学学报*, 2018, 53(10):1713-1720.

[责任编辑 刘德文]