

· 基础研究 ·

基于血浆代谢组学和网络药理学研究脑心通胶囊 活血化瘀作用机制

李伟霞^{1,2} 李曼曼¹ 牛璐² 张书琦¹ 张辉¹ 王晓艳^{1,2} 唐进法^{1,2} 李学林^{1,2}

摘要 **目的** 运用代谢组学和网络药理学探讨脑心通胶囊活血化瘀的作用机制。**方法** 24 只大鼠随机分为空白组、模型组和药物组，每组 8 只。药物组给予脑心通胶囊 1.5 g/kg 灌胃，空白组和模型组灌胃给予等量的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液，每日早、晚各 1 次，共 7 次。实验第 3 天第 5 次给药后模型组和药物组给予肾上腺素（0.8 mg/kg 两次）制备急性血瘀证模型。超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术分析大鼠血浆代谢轮廓，采用 Progenesis Q1 和 Simca-P 软件进行多元统计分析及其差异内源性代谢物筛查，通过 MetaboAnalyst 数据库对代谢通路进行分析。通过 MBRole 2.0 数据库对差异内源性代谢物的作用靶标进行筛选，利用网络药理学方法对脑心通胶囊中主要活性成分及其作用靶标进行筛选，采用 Cytoscape 软件构建差异内源性代谢物-靶标-脑心通胶囊活性成分网络。**结果** 正常组和模型组比较鉴定得到白三烯 A₄、21-脱氧皮质醇、7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯、17 α , 21-二羟基孕烯醇酮、1-磷酸鞘氨醇和鹅去氧胆酸 6 个差异内源性代谢物，涉及花生四烯酸代谢、类固醇激素的合成、初级胆汁酸的生物合成和鞘脂代谢四条代谢途径。脑心通胶囊中的 47 个活性成分可通过对 4 个差异内源性代谢物（白三烯 A₄、21-脱氧皮质醇、1-磷酸鞘氨醇和鹅去氧胆酸）的调节发挥活血化瘀作用，涉及花生四烯酸代谢、类固醇激素的合成和鞘脂代谢途径。**结论** 本研究从代谢组学和网络药理学角度阐释了脑心通胶囊的活血化瘀作用机制，为脑心通胶囊的深入研究提供依据，为中成药的作用机制研究提供新思路。

关键词 脑心通胶囊；活血化瘀；超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱；代谢组学；网络药理学

Study on the Mechanism of Activating Blood and Removing Stasis of Naoxintong Capsule Based on Plasma Metabolomics and Network Pharmacology LI Wei-xia^{1,2}, LI Man-man¹, NIU Lu², ZHANG Shu-qi¹, ZHANG Hui¹, WANG Xiao-yan^{1,2}, TANG Jin-fa^{1,2}, and LI Xue-lin^{1,2} 1 Henan Province Engineering Research Center for Clinical Application, Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine / Henan Province Engineering Laboratory for Clinical Evaluation Technology of Chinese Medicine, Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450000); 2 Provincial and Ministerial Co Construction Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Respiratory Diseases with Traditional Chinese Medicine of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046); 3 College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of activating blood and removing stasis of Naoxintong Capsule by using metabolomics strategy and network pharmacology. **Methods** Twenty-four rats were randomly divided into blank group, model group and drug group, 8 in each group. Drug group was gavaged Naoxintong Capsules at a dose of 1.5 g/kg, blank group and model group were gavaged with a equal volume of 0.5% sodium

基金项目：国家“重大新药创制”科技重大专项（No.2015ZX09501004-001-007）；国家自然科学基金资助项目（No.U1504827, No.82004082）；河南省中医药拔尖人才培养项目（豫中医科教〔2018〕35号）；张怀亮全国名老中医药专家传承工作室建设项目（No. 国中医药人教函〔2018〕134号）

作者单位：1. 河南中医药大学第一附属医院药学部 河南省中药临床应用、评价与转化工程研究中心/河南省中药临床药学中药重点实验室（郑州 450008）；2. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心（郑州 450046）；3. 河南中医药大学药学院（郑州 450046）

通讯作者：李学林，Tel: 0371-66245142, E-mail: lixuelin450000@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20220902.101

carboxymethyl cellulose solution, 1 time in the morning and 1 time in the evening, 7 times in totally. On the third day of the experiment, the model group and the drug group were given adrenaline twice at the dosage of 0.8 mg/kg to establish the acute blood stasis model after fifth gavaged. Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry technology was used to analyze the plasma metabolic profiles of rats. Progenesis Q1 and Simca-P were used for multivariate statistical analysis and differential endogenous metabolite screening, and metabolic pathways were analyzed by MetaboAnalyst database. The targets of endogenous metabolites were screened by MBRole 2.0 database, and the main active components of Naoxintong Capsule and their targets were screened by network pharmacology method. The network of endogenous metabolite, target, and active components of Naoxintong Capsule was constructed by Cytoscape. **Results** Compared with the blank group, 6 potential differential endogenous metabolites including leukotriene A4, 21-deoxycortisol, 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenolate, 17 α , 21-dihydroxypregnenolone, sphingosine 1-phosphate and chenodeoxycholic acid were identified in model group, involving 4 metabolic pathways of arachidonic acid metabolism, steroid hormone biosynthesis, primary bile acid biosynthesis and sphingolipid metabolism. The 47 active components in Naoxintong Capsule could activate blood and remove stasis by regulating the 4 differential endogenous metabolites (leukotriene A4, 21-Deoxycortisol, Sphingosine 1-phosphate and Chenodeoxycholic acid), involving arachidonic acid metabolism, steroid hormone synthesis, and sphingolipid metabolism. **Conclusion** The mechanism of Naoxintong Capsule in activating blood and removing stasis is interpreted by metabolomics and network pharmacology, providing a basis for the in-depth study of Naoxintong Capsule and provides a new idea for the study of the mechanism of action of Chinese patent medicine.

KEYWORDS Naoxintong Capsule; activating blood and removing stasis; ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry; metabolomics; network pharmacology

心脑血管疾病具有患病率、致残率和病死率高, 并发症多等特点, 多发于中老年人, 随着全球人口年龄的增长, 其患病率不断上升, 甚至呈年轻化趋势, 造成了严重的公共卫生负担^[1]。现代研究显示, 血瘀证贯穿心、脑血管疾病发病的始终, 治疗上多以活血祛瘀为基本治则^[2]。脑心通胶囊是“脑心同治”理论的代表性方药, 临床常用于心、脑血管疾病的治疗^[3, 4]。脑心通胶囊源于清代王清任《医林改错·下卷·瘫痿论》中经典名方补阳还五汤^[5], 是在原方基础上加味虫类药全蝎、水蛭和活血化瘀药丹参、乳香、没药、鸡血藤等, 采用现代技术制成的复方中药口服制剂^[6], 具有益气活血、化瘀通络之功效, 但其活血化瘀的作用机制尚未完全明确。故本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, UPLC-QTOF/MS) 技术结合代谢组学和网络药理学策略对脑心通胶囊如何通过对内源性代谢物的调控发挥活血化瘀作用的机制进行探讨, 通过筛选生物标志物, 注释相关代谢通路, 构建脑心通胶囊活性成分与内源性小分子及其靶标的网络, 以期阐释脑心通胶囊活血化瘀的作用机制, 为临床研究提供科学依据。

材料与方

1 动物 雌性 SD 大鼠 24 只, 体重 (200 ± 20) g,

北京维通利华动物实验中心提供, 许可证号 SCXK (京) 2016-0006。实验前适应性饲养一周, 保持 12 h 昼夜节律, 自由摄食饮水。本研究经河南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准 (No. YFYD2017008), 所有程序均严格按照动物使用和护理的伦理原则进行。

2 药品与试剂 脑心通胶囊 (陕西步长制药有限公司, 规格 0.4 g/片, 批号: 190193); 盐酸肾上腺素注射液 (遂成药业股份有限公司, 规格: 1 mL: 1 mg, 批号: 61903011); 鹅去氧胆酸标准品 (成都克洛玛生物科技有限公司, 批号: CHB180307, 纯度 ≥ 98%); 甲酸 (色谱级) 购自北京迪科马科技有限公司 (批号: 5271362), 色谱级甲醇 (批号: I1116807045) 和乙腈 (批号: I1145630112) 购自德国 Merck 公司, 亮氨酸-脑啡肽 (批号: W15071910) 购自美国 Sigma 公司。

3 仪器 ACQUITY UPLC HSS T3 C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), Waters Acquity™ UPLC 液相系统, Xevo G2-XS Q-TOF 质谱仪, 配有 Lock-spray 接口, 电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI), MassLynx v4.1 质谱工作站 (美国 Waters 公司); Neofuge 1600R 型台式低温高速离心机 (上海力申科学仪器股份有限公司); VG 3 S25 涡旋混匀器 (德国 IKA VORTEX 公司); Molecular (摩

尔)元素型 18120 超纯水系统。

4 造模、分组及给药 将 24 只大鼠按照随机数字表法分为 3 组, 每组 8 只, 分别为空白组、模型组和药物组。取适量脑心通胶囊内容物加入 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 配制成 0.33 g/mL 的脑心通胶囊混悬液, 药物组大鼠脑心通胶囊每日给药剂量为临床等效量的 3 倍量 (1.5 g/kg)^[7]。空白组和模型组大鼠灌胃给予等量的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。每日早、晚各 1 次, 共 7 次。正式实验第 3 天第 5 次灌胃给药后, 模型组和药物组制备急性血瘀证模型^[8]。模型组和药物组大鼠皮下注射盐酸肾上腺素注射液 0.8 mg/kg 共两次, 间隔时间为 4 h; 第一次皮下给予盐酸肾上腺素后 2 h, 将大鼠置于 0~2 °C 冰水中游泳 4 min, 制作大鼠急性血瘀证模型。参考前期研究, 通过检测血液流变学判定造模成功与否^[8]。模型组所有大鼠均造模成功。

5 取样方法 实验第 4 天, 大鼠最后一次灌胃后 1 h, 用 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 然后用肝素抗凝真空采血管腹主动脉采血。于 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血浆 200 μ L, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 600 μ L 预冷的甲醇稀释, 涡旋 3 min, 于 4 °C 采用 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 80 μ L, 进样 3 μ L, 采用 UPLC-QTOF/MS 进行数据采集。取 3 组所有血浆样品各 10 μ L, 加入血清总量 3 倍的甲醇, 按上述方法离心制得质控 (quality control, QC) 组样品。在样本分析过程中, 每 4 针样品插入 1 个 QC 样本, 用以监测仪器的稳定性。

6 UPLC-QTOF/MS 技术进行质谱分析

6.1 代谢轮廓分析 采用 UPLC-QTOF/MS 负离子模式对空白组、模型组、药物组和 QC 组 4 组血浆样品进行分析。色谱条件采用 Acquity UPLC[®] BEH C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m) 色谱柱, 柱温 40 °C, 进样量 3 μ L。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。梯度洗脱: 0~2 min, 5%~20% B; 2~12 min, 20%~65% B; 12~23 min, 65%~90% B; 23~26.5 min, 90%~100% B; 26.5~27.5 min, 100%~5% B; 27.5~30 min, 5% B。

质谱条件采用 ESI 源, 负离子模式扫描; 毛细管电压 2.5 kV, 离子源温度 140 °C, 脱溶剂气温度 450 °C, 锥孔电压 40 V; 锥孔气流量 50 L/h, 脱溶剂气流量 800 L/h; 碰撞能量 10~45 V, 间隔扫描时间为 0.2 s; 质量扫描范围 50~1 200 m/z。数据采集处理使用 MassLynx[™] v4.1 (Waters Corp.) 工作站, 以 MS^E Continuum 模式进行数据采集。准确质量测定采

用亮氨酸-脑啡肽 (leucine-enkephalin, ESI⁺: m/z 556.2771, ESI⁻: m/z 554.2615) 溶液为锁定质量溶液。

6.2 质谱数据多元统计分析 利用 Progenesis QI v2.1 软件对所获得的质谱数据进行数据对齐、峰提取、样品分组、去卷积及归一化等处理, 应用 Simca 13.0 对各组数据进行多元变量分析, 首先通过非监督型的主成分分析 (principle component analysis, PCA) 观察四组之间的聚类情况, 然后采用监督型偏最小二乘判别分析 (partial least squares - discriminant analysis, PLS-DA) 观察四组之间的聚类情况, 进一步采用正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares - discriminant analysis, OPLS-DA) 观察正常组和模型组之间的聚类情况, 并处理得到反映内源性代谢物重要强度的 S-plot 图, 进而将满足变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) > 3, P 值 (P value) < 0.05 和倍性变化 (fold change, FC) \geq 2 的化合物作为差异内源性代谢物。

6.3 通过在线数据库、文献查阅和对照品比对等对差异内源性代谢物进行鉴定 通过人类代谢组数据库 (The Human Metabolome Database, HMDB) 对差异内源性代谢物进行检索、匹配, 结合文献信息及对照品比对等方法, 对差异内源性代谢物进行鉴定确认。并使用 SPSS 16.0 软件对差异内源性代谢物的峰强度进行组间统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

6.4 差异内源性代谢物的作用代谢通路注释 采用 MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 对鉴定得到的差异内源性代谢物进行代谢通路注释。

7 差异内源性代谢物的靶标基因筛选及其与脑心通胶囊活性成分的网络构建 首先通过 MBRole 2.0 (<http://csbg.cnb.csic.es/mbrole2/>) 在线数据库对鉴定得到的差异内源性代谢物作用的靶标进行筛选; 然后通过中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSIP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsip.php>) 数据库和文献^[9] 查阅, 对脑心通胶囊的主要活性成分进行筛选, 并通过从 TCMSIP 和 Swiss target prediction (<http://www.swiss target prediction.ch/>) 在线数据库对活性成分的作用靶标进行筛选; 通过差异内源性代谢物和脑心通胶囊活性成分的共有作用靶标, 采用 Cytoscape 3.6.1 软件构建差异内源性代谢

物 - 靶标 - 脑心通胶囊活性成分网络。

结 果

1 各组代谢轮廓分析 (图 1) 空白组、模型组、药物组和 QC 组大鼠代表性血浆样品在负离子模式下的基峰色谱图 (base peak chromatogram, BPC) 显示, 4 组的代谢轮廓在峰形和峰强度方面均存在一定差异。

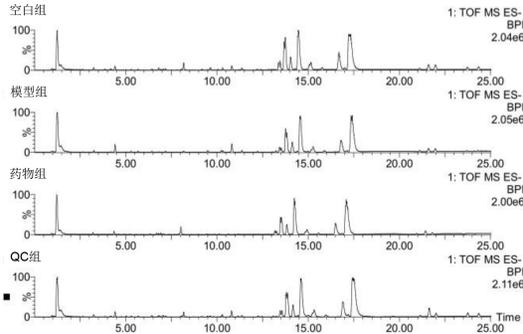
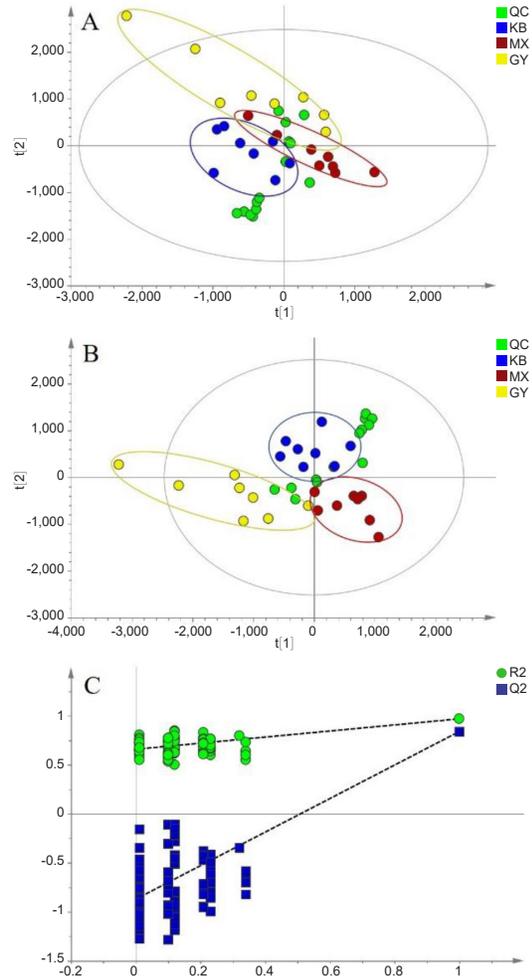


图 1 各组大鼠血浆在负离子模式下的 BPC 图

2 质谱数据多元统计分析 (图 2) PCA 得分图 (图 2A) 可以看出空白组、模型组和药物组血浆分别聚集在一起, 说明 3 组间代谢轮廓存在差异。PLS-DA 图中 (图 2B) 可见 3 组样本呈现较好的聚类效果, 3 组明显区分, 模型参数 $R^2Y=0.95$, $Q^2=0.70$, 表明模型有效。采用置换检验对 PLS-DA 模型进行验证, $Q2$ 在纵轴上的截距为负值 (图 2C), 说明所建立的 PLS-DA 模型未过度拟合。

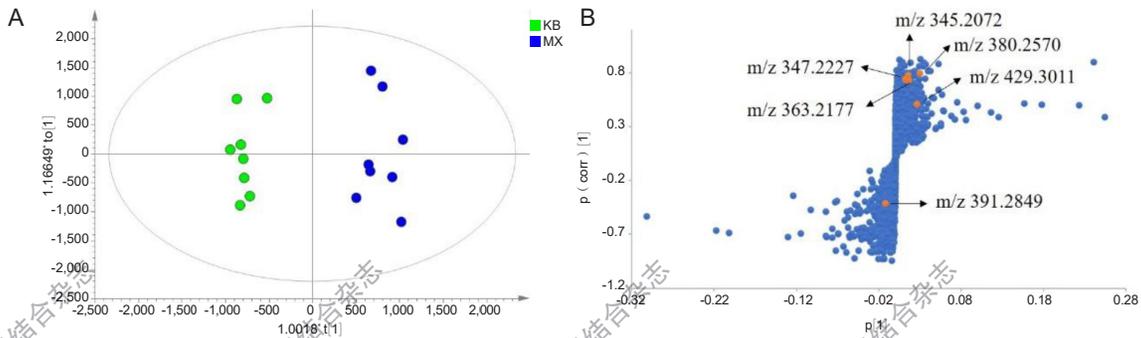
3 差异内源性代谢物的鉴定 (图 3, 表 1、2) 空白组和模型组血浆样本的 OPLS-DA 得分图显示两组聚类效果较好且明显分离, 模型参数 $R^2Y=0.93$, $Q^2=0.81$, 表明模型具有较好的解释度和预测度。进一步处理得到反映内源性代谢物重要强度的 S-plot 图, 并通过筛选鉴定得到 6 个急性血瘀证的差异内源性代谢物 (表 1)。与空白组比较, 模型组大鼠血



注: QC 代表质控组; KB 代表空白组; MX 代表模型组; GY 代表药物组; R2 和 Q2 代表拟合优度系数

图 2 各组大鼠血浆在负离子模式下质谱数据分析结果

浆中白三烯 A4 (leukotriene A4), 21-脱氧皮质醇 (21-deoxycortisol), 7α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯 (7α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate), 17α , 21-二羟基孕烯醇酮 (17α , 21-dihydroxypregnenolone) 和 1-磷酸鞘氨醇 (sphinganine 1-phosphate) 的含量升高, 鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid) 的



注: (A) 图中绿色圆点代表空白组 (KB), 蓝色圆点代表代表模型组 (MX), 每个圆点代表一个样本, 横坐标反映组间差异, 纵坐标反映组内差异; (B) 图中每个圆点代表一个内源性代谢物, 越靠近两个角的内源性代谢物重要度越强, 橘色圆点代表筛选鉴定出的差异内源性代谢物

图 3 空白组和模型组大鼠负离子模式血浆样本的 OPLS-DA 得分图 (A) 及 S-plot 图 (B)

表 1 空白组和模型组大鼠差异内源性代谢物信息

序号	tR/min	分子式	m/z	化合物	VIP 值	HMDB ID	KEGG ID
M1	9.15	C ₂₀ H ₃ OO ₃	363.2177	leukotriene A4	1.52	0001337	C00909
M2	11.59	C ₂₁ H ₃ OO ₄	345.2072	21-deoxycortisol	1.44	0004030	C05497
M3	12.13	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	391.2849	chenodeoxycholic acid	1.52	0000518	C02528
M4	15.25	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	429.3011	7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate	2.41	0012458	C17337
M5	10.65	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	347.2227	17 α , 21-dihydroxypregnenolone	1.09	0006762	C05487
M6	12.68	C ₁₈ H ₄₀ NO ₅ P	380.2570	sphinganine 1-phosphate	2.82	0001383	C01120

表 2 各组大鼠差异内源性代谢物离子强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	白三烯 A4	21-脱氧皮质醇	鹅去氧胆酸	7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯	17 α , 21-二羟基孕烯醇酮	1-磷酸鞘氨醇
空白	8	79.36 \pm 39.78	104.96 \pm 40.79	972.46 \pm 512.50	655.88 \pm 155.58	128.69 \pm 33.45	1 317.07 \pm 348.02
模型	8	643.29 \pm 355.78*	637.30 \pm 206.06*	201.01 \pm 124.16*	1 889.62 \pm 953.14*	439.64 \pm 186.77*	3 122.20 \pm 873.40*
药物	8	319.79 \pm 203.12 Δ	416.53 \pm 158.18 Δ	429.51 \pm 190.25 Δ	1 059.19 \pm 380.31 Δ	287.10 \pm 93.96 Δ	2 199.89 \pm 742.64 Δ

注:与空白组比较,*P<0.05;与模型组比较, Δ P<0.05

含量降低 (P<0.05)。与模型组比较,药物组大鼠血浆中白三烯 A4 (leukotriene A4), 21-脱氧皮质醇 (21-deoxycortisol), 7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯 (7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate), 17 α , 21-二羟基孕烯醇酮 (17 α , 21-dihydroxypregnenolone) 和 1-磷酸鞘氨醇 (sphinganine 1-phosphate) 的含量降低, 鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid) 的含量升高 (P<0.05)。

4 代谢通路分析 (图 4) 鉴定得到的 6 个差异内源性代谢物主要与以下 4 条代谢途径相关: 花生四烯酸代谢、类固醇激素的生物合成、鞘脂代谢和初级胆汁酸的生物合成。

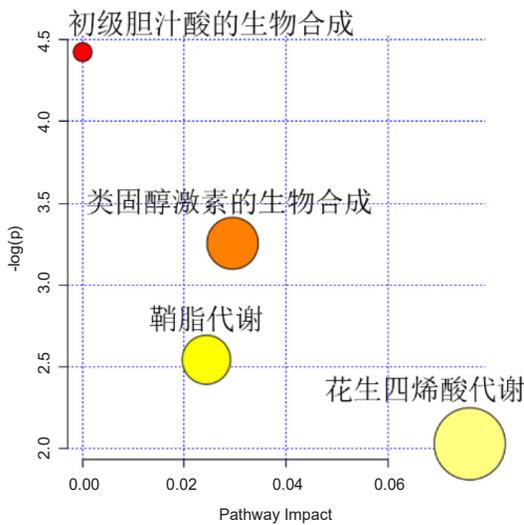
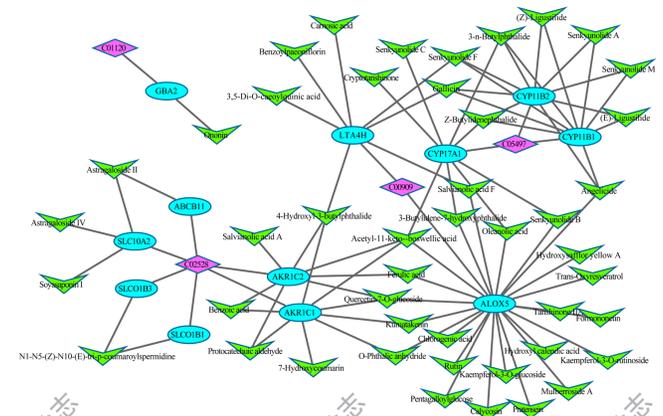


图 4 差异代谢物涉及的代谢通路

5 差异内源性代谢物的靶标基因筛选及其与脑心通胶囊活性成分的网络构建 (图 5, 表 3) 筛选得到 6 个差异内源性代谢物的作用靶标 72 个, 脑心通胶囊中 64 个主要活性成分的作用靶标 1 031 个, 两

者共有靶标 12 个。与 12 个共有靶标作用的差异内源性代谢物有 4 个, 对应的脑心通胶囊效应成分 47 个, 相互作用网络见图 6, 其网络拓扑信息见表 2。结果显示, 脑心通胶囊中有 31 个成分通过 ALOX5 和 LTA4H 作用于白三烯 A4, 芒柄花苷 (ononin) 可通过 GBA2 作用于 1-磷酸鞘氨醇, 有 21 个成分通过 ABCB11、AKR1C1、AKR1C2、SLC10A2、SLCO1B1 和 SLCO1B3 作用于鹅去氧胆酸, 26 个成分通过 CYP11B1、CYP11B2 和 CYP17A1 作用于 21-脱氧皮质醇。其中度值较高的成分主要包括乙酰-11-酮- β -乳香酸 (acetyl-11-keto- β -boswellic acid)、没食子酸甲酯 (gallicin)、槲皮素-7-O-葡萄糖苷 (quercetin-7-o-glucoside)、正丁基苯酚、4-羟基-3-丁基苯酚、洋川芎内酯 F、3-正丁基苯酚、新当归内酯、洋川芎内酯 B、原儿茶醛、苯甲酸和阿魏酸等; 度值较高的靶标主要包括 ALOX5、CYP11B1、



注:红色代表差异内源性代谢物;蓝色代表靶标;绿色代表脑心通胶囊中活性成分

图 5 差异内源性代谢物与脑心通胶囊活性成分

共有靶标的作用网络

表 3 脑心通胶囊中主要活性成分与差异内源性代谢物及其共有靶标的网络拓扑信息

名称	度值	中介中心性	接近中心性	拓扑系数	名称	度值	中介中心性	接近中心性	拓扑系数
C02528	6	0.25	0.30	0.25	Senkyunolide A	2	0.00	0.24	1.00
C05497	3	0.02	0.29	0.58	Salvianolic acid F	2	0.03	0.33	0.52
C00909	2	0.03	0.33	0.52	Kumatakenin	2	0.03	0.36	0.55
C01120	1	0.00	0.67	0.00	(Z)-Ligustilide	2	0.00	0.24	1.00
ALOX5	24	0.56	0.44	0.10	(E)-Ligustilide	2	0.00	0.24	1.00
CYP11B1	10	0.09	0.31	0.40	Senkyunolide M	2	0.00	0.24	1.00
CYP11B2	10	0.09	0.31	0.40	O-Phthalic anhydride	2	0.03	0.36	0.55
CYP17A1	9	0.17	0.34	0.27	Oleanolic acid	2	0.02	0.33	0.55
AKR1C1	9	0.22	0.37	0.22	Senkyunolide C	1	0.00	0.26	0.00
AKR1C2	8	0.18	0.36	0.23	Mulberroside A	1	0.00	0.31	0.00
LTA4H	8	0.17	0.34	0.20	Hydroxysafflor yellow A	1	0.00	0.31	0.00
SLC10A2	4	0.08	0.24	0.30	7-Hydroxycoumarin	1	0.00	0.27	0.00
GBA2	2	1.00	1.00	0.00	Rutin	1	0.00	0.31	0.00
SLCO1B1	2	0.02	0.23	0.60	Pentagalloylglucose	1	0.00	0.31	0.00
SLCO1B3	2	0.02	0.23	0.60	Calycosin	1	0.00	0.31	0.00
ABCB11	2	0.02	0.23	0.60	3, 5-Di-O-caffeoylquinic acid	1	0.00	0.26	0.00
Acetyl-11-keto-β-boswellic acid	4	0.16	0.40	0.34	Salvianolic acid A	1	0.00	0.27	0.00
Gallicin	3	0.03	0.29	0.56	Ononin	1	0.00	0.67	0.00
Quercetin-7-O-glucoside	3	0.06	0.37	0.44	Benzoylpaeoniflorin	1	0.00	0.26	0.00
Z-Butylidenephthalide	3	0.02	0.29	0.58	Pratensein	1	0.00	0.31	0.00
4-Hydroxyl-3-butylphthalide	3	0.08	0.32	0.43	Hydroxyl calendic acid	1	0.00	0.31	0.00
Senkyunolide F	3	0.03	0.29	0.56	Trans-Oxyresveratrol	1	0.00	0.31	0.00
3-n-Butylphthalide	3	0.02	0.29	0.58	Formononetin	1	0.00	0.31	0.00
Angelicide	3	0.12	0.35	0.43	Astragaloside IV	1	0.00	0.19	0.00
Senkyunolide B	2	0.02	0.33	0.55	Soyasaponin I	1	0.00	0.19	0.00
Protocatechuic aldehyde	2	0.00	0.28	0.75	Carnosic acid	1	0.00	0.26	0.00
Benzoic acid	2	0.00	0.28	0.75	Kaempferol-3-O-glucoside	1	0.00	0.31	0.00
Ferulic acid	2	0.03	0.36	0.54	Cryptotanshinone	1	0.00	0.26	0.00
N1-N5-(Z)-N10-(E)-tri-p-coumaroylspermidine	2	0.00	0.19	1.00	Chlorogenic acid	1	0.00	0.31	0.00
Astragaloside II	2	0.00	0.19	0.67	Tanshinone II A	1	0.00	0.31	0.00
3-Butylidene-7-hydroxyphthalide	2	0.02	0.33	0.55					

CYP11B2、CYP17A1、AKR1C1、AKR1C2、LTA4H 等。

讨 论

血瘀证是血液运行不畅或血液瘀滞不通的病理状态，涉及临床各科的大部分疾病中，最常见于心、脑血管疾病，活血化瘀法是治疗血瘀证的主要方法^[10]。脑心通胶囊具有益气活血、化瘀通络之功效，临床应用多年，在治疗心脑血管疾病方面疗效显著，具有“脑心同治”的作用^[11]。代谢组学立足于生命活动“系统性、整体性”的研究思路，网络药理学可系统整合药物、靶标和疾病相互关系，两者与中医药“整体观念”均不谋而合，目前代谢组学和网络药理学均被广泛应用于中药的作用机制及物质基础研究中^[12-15]。故

本研究运用代谢组学技术和网络药理学方法整合探究脑心通胶囊活血化瘀的作用机制。预实验发现，在负离子模式下能得到更多内源性代谢物的信息，对差异内源性代谢物的寻找有利，因此本实验选择对负离子模式下的数据进行多元统计分析。共鉴定得到 6 个生物标记物，涉及花生四烯酸代谢，类固醇激素的合成，初级胆汁酸的生物合成和鞘脂代谢 4 条代谢途径，与脑心通胶囊中的 47 个活性成分具有相互作用。

白三烯 A4 是花生四烯酸的一种代谢产物，可促进血管收缩、凝血及血栓的形成^[16, 17]。类固醇激素在合成过程中主要涉及细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP) 和羟基类固醇脱氢酶 (hydroxysteroid dehydrogenase, HSD) 两类酶。21-脱氧皮质醇是

糖皮质激素在机体代谢过程中生成的,属于神经类固醇激素糖皮质激素,当血瘀形成时,21-脱氧皮质醇含量增加^[18]。17 α , 21-二羟基孕烯醇酮是皮质醇的主要前体,皮质醇属于肾上腺皮质激素中的糖皮质激素,在调控免疫炎症及血压等方面发挥重要作用,当其含量升高时可增强血管的收缩性,使管腔狭窄,导致动脉粥样硬化斑块的稳定性降低^[19]。鹅去氧胆酸可防止血小板凝聚和血栓的形成,对心脑血管具有一定的防治作用^[20],有文献表明鹅去氧胆酸具有降低血液黏度及调节血脂的作用^[21],模型组鹅去氧胆酸含量降低,与文献结果一致。血脂代谢异常与脑中风、冠心病等心脑血管疾病关系密切,而胆汁酸利于脂类物质的吸收,降低血脂的浓度^[22]。文献中对于7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯的报道较少,本研究结果显示,与空白组比较,模型组7 α -羟基-3-氧代-4-胆甾烯酸酯含量升高,而药物组其含量降低,说明其可能对血瘀的形成起到促进作用。鞘脂及其代谢物可调节血小板的激活和凝聚^[23],与心脑血管疾病尤其是动脉粥样硬化关系密切,在动脉粥样硬化中,鞘脂的含量明显高于正常血浆^[24]。1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是鞘脂的一种代谢产物醇,是血浆的一个重要组成成分,在细胞增殖、移动、心血管系统、免疫系统方面都有着重要的作用^[25]。鞘氨醇激酶(sphingosine kinase, SPHK)是S1P合成的关键酶。血小板中含丰富的SPHKs而含少量的鞘氨醇裂解酶,因此血小板中S1P生成多而降解少,被视为S1P的存储细胞。另外,血液中其他细胞如红细胞、巨噬细胞、单核细胞也能合成分泌S1P。一些刺激血栓形成的物质如二磷酸腺苷、血凝素等在诱导血小板激活及凝聚过程中,可促进血小板中S1P的大量释放^[22]。因此,当血瘀形成时,1-磷酸鞘氨醇含量升高,鞘脂代谢异常,脑心通胶囊干预对鞘脂代谢紊乱具有较好的调节作用。

网络药理学研究显示,补阳还五汤可作用于 ABCB11 和 ALOX5 等靶标^[26];当归-川芎药对可作用于 ABCB11、AKR1C2、LTA4H、SLC10A2、CYP17A1 等靶标^[27];丹参和红花中的丹参素、丹参酮 II A、阿魏酸和槲皮素等可通过作用于免疫、炎症反应相关的蛋白如 ALOX5、LTA4H 等调节花生四烯酸代谢,且槲皮素可间接抑制白三烯等炎症介质释放发挥抗炎作用,从而发挥活血化瘀的治疗作用^[28, 29]。中药分析和代谢组学等相关研究显示,芒柄花素和槲皮素是黄芪的主要入血成分,黄芪可作用于花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢和原发性胆汁酸生物合成^[30];阿魏酸、

洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、正丁基苯酞、藁本内酯、丁烯基苯酞、原儿茶醛和苯甲酸等是当归和川芎中的主要效应成分,羟基红花黄色素 A 是红花中的主要效应成分,当归-川芎药对和当归-红花药对可通过对鹅去氧胆酸、鞘氨醇、白三烯 A4 等的调节作用于花生四烯酸代谢、鞘脂代谢和初级胆汁酸生物合成,从而发挥活血化瘀的作用^[31, 32]。以上结果有力支撑了文中脑心通胶囊的 47 个活性成分通过对 ABCB11、ALOX5、AKR1C2、LTA4H、SLC10A2、CYP17A1 等 12 个靶标和白三烯 A4、21-脱氧皮质醇、1-磷酸鞘氨醇和鹅去氧胆酸 4 个差异内源性代谢物的调节,作用于花生四烯酸代谢,类固醇激素的合成,初级胆汁酸的生物合成和鞘脂代谢途径,起到活血化瘀功效。

综上所述,本文采用 UPLC-QTOF/MS 技术,基于血浆代谢组学和网络药理学策略探究了脑心通胶囊活血化瘀的作用机制。结果表明大鼠急性血瘀的形成主要与花生四烯酸代谢、类固醇激素的合成、初级胆汁酸的生物合成和鞘脂代谢的紊乱密切相关,脑心通胶囊对急性血瘀模型大鼠的活血化瘀作用机制可能是其中的 47 个活性成分通过 12 个靶标对 4 个差异内源性代谢物的调节使紊乱的代谢向正常状态转归,为深入的机制探讨提供参考。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Li M, Han B, Zhao H, et al. Biological active ingredients of *Astragali Radix* and its mechanisms in treating cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Phytomedicine*, 2022, 98: 153918.
- [2] 金茫茫, 陈敏, 李倩倩, 等. 活血化瘀类中成药在脑血管疾病中的应用合理性调查 [J]. *中医药管理杂志*, 2020, 38 (14): 115-117.
- [3] 赵涛, 王一民, 刘娜, 等. 从补阳还五汤到脑心通胶囊——脑心同治的思路探讨 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2012, 7 (10): 900-903.
- [4] 李伟霞, 张书琦, 赵艺丹, 等. 脑心通胶囊化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (10): 1998-2005.
- [5] 清·王清任著. 医林改错 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 36-37.
- [6] 耿潇, 陈璐, 赵步长, 等. 基于血清蛋白组学初步探讨脑心通胶囊防治心脑血管疾病的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41 (15): 2864-2871.
- [7] Li J, Bai Y, Bai Y, et al. Pharmacokinetics of caffeic acid, ferulic acid, formononetin,

- cryptotanshinone, and tanshinone II A after oral administration of naoxintong capsule in rat by HPLC-MS/MS [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 9057238.
- [8] 李伟霞, 黄美艳, 唐于平, 等. 大鼠急性血瘀证模型造模方法的研究与评价 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27 (12): 1761–1765.
- [9] Ma XH, Lv B, Li P, et al. Identification of “multiple components-multiple targets-multiple pathways” associated with Naoxintong Capsule in the treatment of heart diseases using UPLC/Q-TOF-MS and network pharmacology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 9468087.
- [10] Liu Y, Yin H, Chen K. Platelet proteomics and its advanced application for research of blood stasis syndrome and activated blood circulation herbs of Chinese medicine [J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56 (11): 1000–1006.
- [11] 《脑心通胶囊临床应用中国专家共识》编写组. 脑心通胶囊临床应用中国专家共识 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37 (9): 1039–1042.
- [12] Tao T, He T, Wang X, et al. Metabolic profiling analysis of patients with coronary heart disease undergoing Xuefu Zhuyu Decoction treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10, 985.
- [13] Zhou H, Li L, Zhao H, et al. A Large-Scale, Multi-center urine biomarkers identification of coronary heart disease in TCM syndrome differentiation [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18 (5): 1994–2003.
- [14] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11 (2): 110–120.
- [15] 吕尚, 杨世林, 饶毅, 等. 代谢组学及其相关技术在中药研发领域的应用进展 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (21): 4182–4191.
- [16] Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, et al. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (3): 1238–1243.
- [17] Jala VR, Haribabu B. Leukotrienes and atherosclerosis: new roles for old mediators [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25 (6): 315–322.
- [18] Milewicz A, Afelska A, Wasikowa R, et al. Evaluation of 21-deoxycortisol as a marker for the detection of heterozygous carriers of 21-hydroxylase deficiency [J]. *Endokrynol Pol*, 1993, 44 (2): 187–193.
- [19] Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, et al. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1 (6): 469–474.
- [20] 徐辰祺, 卜军, 何奔. 胆汁酸在心血管疾病中的作用 [J]. *生理科学进展*, 2015, 46 (6): 424–428.
- [21] Olivieri O, Speziali G, Castagna A, et al. The positive association between plasma myristic acid and ApoC III concentrations in cardiovascular disease patients is supported by the effects of myristic acid in HepG2 cells [J]. *J Nutr*, 2020, 150 (10): 2707–2715.
- [22] Sun JL, Lin HZ, Gou P. Research progress of sphingolipid metabolism and related diseases [J]. *Bio Technol*, 2011, 21 (5): 93–97.
- [23] 袁子文, 钟立甲, 纪鹏, 等. 当归干预血瘀证大鼠血浆代谢组学研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30 (4): 559–567.
- [24] Lee KJ, Mwongela SM, Kottegoda S, et al. Determination of sphingosine kinase activity for cellular signaling studies [J]. *Anal Chem*, 2008, 80 (5): 1620–1627.
- [25] Kurano M, Yatomi Y. Sphingosine 1-phosphate and atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2018, 25 (1): 16–26.
- [26] Xiong Z, Yang F, Li W, et al. Deciphering pharmacological mechanism of Buyang Huanwu Decoction for spinal cord injury by network pharmacology approach [J]. *Evid Based Complement Alternat*, 2021, 2021: 9921534.
- [27] 袁可欣, 谭艺, 张成玲, 等. 基于网络药理学和分子对接的“当归-川芎”药对作用机制研究 [J]. *西南大学学报 (自然科学版)*, 2021, 43 (10): 77–83.
- [28] He S, Wang T, Shi C, et al. Network pharmacology-based approach to understand the effect and mechanism of Danshen against anemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114615.
- [29] 林娟, 韩彦琪, 武琦, 等. 基于网络药理学的丹红化瘀口服液治疗视网膜中央静脉阻塞症的作用机制研究 [J]. *中草药*, 2022, 53 (6): 1643–1651.
- [30] 王丹妮. 基于网络药理学和液质联用技术研究黄芩和炙黄芪抗衰老作用及其机制 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2020.
- [31] 金益. 当归-红花药对配伍相互作用与物质基础研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [32] 李伟霞. 当归-川芎药对功效物质与配伍作用机理研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.

(收稿: 2021-01-13 在线: 2022-12-29)

责任编辑: 邱禹