

黄芪注射液乙酸乙酯萃取物对小鼠白细胞减少症作用的代谢组学

曲婷丽^{1,2}, 王二兵³, 李震宇², 赵正保^{1*}, 秦雪梅^{2*}

(1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001; 2. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006; 3. 太原科技大学化学与生物工程学院, 山西 太原 030021)

摘要: **目的** 考察黄芪注射液乙酸乙酯萃取物对小鼠白细胞减少症的作用。**方法** 采用环磷酰胺复制小鼠白细胞减少症的动物模型, 采用核磁共振 (NMR) 代谢组学技术结合多元统计方法进行代谢组学分析。**结果** 黄芪注射液乙酸乙酯萃取物能升高模型小鼠的白细胞、单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的水平, 并回调潜在的 10 个内源性代谢物 (脂质、亮氨酸、3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、丙酮酸、肌酸、鲨肌醇、甜菜碱、葡萄糖) 的水平。**结论** 黄芪注射液乙酸乙酯萃取物治疗白细胞减少症的代谢途径可能与机体能量代谢、氨基酸代谢、氧化应激和胆碱代谢有关。

关键词: 黄芪注射液; 乙酸乙酯萃取物; 代谢组学; NMR; 白细胞减少症

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0455-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.003

Metabolomics of ethyl acetate extract from Huangqi Injection on leucopenia mice

QU Ting-li^{1,2}, WANG Er-bing³, LI Zhen-yu², ZHAO Zheng-bao^{1*}, QIN Xue-mei^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Institute of Chemical and Biological Technology, Taiyuan University of Science and Technology, Taiyuan 030021, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of ethyl acetate extract from Huangqi Injection (HQIEACE) on leucopenia mice. **METHODS** An experimental mouse model of leucopenia was induced by cyclophosphamide. NMR based metabolomic profiling technique coupled with multivariate statistical method was used for performing metabolomic analysis. **RESULTS** HQIEACE could elevate the levels of white blood cell, monocytes, neutrophils and lymphocyte in modeled mice. The levels of ten potential endogenous metabolites (lipid, leucine, 3-D-hydroxybutyrate, lactate, alanine, pyruvate, creatine, scyllo-inositol, betaine and glucose) were reversed. **CONCLUSION** The metabolic pathways related to the pharmacological effects of HQIEACE on leucopenia are probably involved in body energy metabolism, amino acid metabolism, oxidative stress and choline metabolism.

KEY WORDS: Huangqi Injection; ethyl acetate extract; metabolomics; NMR; leucopenia

黄芪注射液由黄芪经水提醇沉法制备而成, 具有益气养元、扶正祛邪、养心通脉、健脾利湿等功效, 可用于心气虚损、血脉瘀阻之病毒性心肌炎、心功能不全及脾虚湿困之肝炎等症^[1]。其收载于中药部颁标准第 17 册 (WS₃-B-3335-98), 在临床上可用于心血管系统疾病、消化系统疾病、呼吸系

统疾病、原发性肾病综合征等^[2-3]。黄芪注射液中的化学成分已报道的有黄酮类、皂苷类、氨基酸类、糖类等^[4]。文献资料报道^[5-11], 黄芪注射液可用于抗肿瘤药物的辅助用药, 具有升高白细胞的作用, 但对于具体的升高白细胞机制及化学成分的研究几乎没有报道。

收稿日期: 2016-09-29

作者简介: 曲婷丽 (1981—), 女, 硕士, 讲师, 从事代谢组学及中药药效物质基础研究。E-mail: qutingli@126.com

* 通信作者: 赵正保 (1961—), 男, 博士, 教授, 从事溃疡性结肠炎新药及中药质量控制研究。Tel: (0351) 4690242, E-mail: zhengbao_z@163.com

秦雪梅 (1963—), 女, 博士, 教授, 从事中药质量标准及代谢组学研究。Tel: (0351) 7011501, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

白细胞减少症是指外周血液中白细胞数低于 $4 \times 10^9/L$ ，白细胞数减少会削弱人体免疫能力，临床常出现严重的感染和出血。白细胞减少症发病的原因较多，如大出血、肿瘤放化疗、细菌病毒的感染等，但较多的是由放疗和化疗所引起。目前，对于白细胞减少症的治疗药物临床主要有西药和中药，西药的副作用较大，且价钱较高，而中药的应用机制不明确，所以有必要对中药的升白机制进行研究，以使其较好的应用于临床。

代谢组学是一种分析复杂系统的新型组学技术，可对样品中的小分子进行高通量、无偏差地全面分析，在化学信息的表征上更全面，可以敏感直观地表征和鉴定不同样品的化学差异成分。近年来，代谢组学技术开始用于药物作用机制的初步研究，李伟霞等^[12]采用代谢组学方法研究佛手散对血虚小鼠的养血补血的作用机制，李春雨等^[13]采用代谢组学技术研究了大黄治疗慢性肾功能衰竭的作用机制，皮子凤等^[14]采用代谢组学方法研究了中药五味子治疗大鼠糖尿病肾病的作用机制。

环磷酰胺是临床上常用的广谱抗肿瘤药，主要副作用是对增殖较快的正常组织有伤害作用，导致多器官毒性，包括免疫抑制、基因毒性^[15]。研究发现，环磷酰胺可用作小鼠白细胞减少症的诱导物，能成功诱导白细胞减少症的动物模型^[16]。因此，本实验采用环磷酰胺引起白细胞减少症的动物模型，对黄芪注射液乙酸乙酯萃取物的升白作用进行研究，为后续具体的升高白细胞的化学成分研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料 黄芪注射液（正大青春宝药业，批号 1309133）。

1.2 动物 昆明种小鼠，体质量 $18 \sim 22\text{ g}$ ，购于军事医学科学院实验动物中心，动物许可证号 SCXK（军事）2012-0004。动物自由摄食饮水，适应 1 周后进行实验。

1.3 仪器与试剂 Bruker 600-MHz AVANCE III NMR Spectrometer（600.13 MHz 质子频率，德国布鲁克公司）；旋转蒸发仪（RE-52A，上海亚荣生化仪器厂）；TGL-16 高速台式冷冻离心机（湖南湘仪离心机仪器有限公司）。三甲基硅烷丙酸钠盐（TSP，Cambridge Isotope Laboratories Inc.，MA，11-12486）；分析纯乙酸乙酯（北京化学试剂公司，20151210）；分析纯磷酸氢二钾；磷酸二氢钠（天津广福精细化工研究所，20150902，20150813）；

色谱纯乙腈（美国 Fisher 公司，158670）。NMR 试剂：重水（Norell，Landisville 公司，美国，14F-140）；氘代甲醇（99.8%，Merck 公司，德国，MBBB5519V）。

2 方法

2.1 黄芪注射液乙酸乙酯萃取物的制备 黄芪注射液加等体积的乙酸乙酯萃取 2 次，合并萃取液，蒸干，即得。

2.2 动物模型的制备 动物称重，编号，随机分为 3 组，每组 8 只小鼠。分为正常组、模型组和黄芪注射液乙酸乙酯组（ 10 mL/kg ）。所有动物均眼眶采血 $20\text{ }\mu\text{L}$ ，检测血细胞数量；以后每间隔 2 d 称重一次，记录动物体质量的变化，同时按体质量变化调整给药剂量。实验第 1 天开始造模，模型组及黄芪注射液乙酸乙酯组动物均腹腔注射环磷酰胺（ 80 mg/kg 体质量），正常组给予等体积的生理盐水，连续注射 3 d；于最后一次注射环磷酰胺后 24 h 眼眶采血 $20\text{ }\mu\text{L}$ ，检测血细胞的数量；实验第 4 天，开始腹腔注射给予黄芪注射液乙酸乙酯萃取物溶液，连续给药 7 d。黄芪注射液乙酸乙酯组给药剂量为 10 mL/kg 体质量，模型组和正常组给予 10 mL/kg 体质量的生理盐水，于末次给药 24 h 后，眼眶采血，测定血常规， $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $13\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ，取上清液移至 EP 管中，于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存，备用。颈椎脱臼处死小鼠，解剖取小鼠脾脏，生理盐水稍加冲洗后吸干脏器表面水分，移至冻存管中，放入液氮中速冻，置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存，备用。

2.3 血清、脾脏核磁备样及测定条件

2.3.1 血清 将血清样品在冰水中解冻，精密吸取 $150\text{ }\mu\text{L}$ 置于 EP 管中，加入 $450\text{ }\mu\text{L D}_2\text{O}$ ，于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $13\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ，取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 上清液，转移至 5 mm 核磁管中待测。

2.3.2 脾脏 取脾脏样本 80 mg ，置 2 mL EP 管中，加甲醇 $300\text{ }\mu\text{L}$ 和蒸馏水 $600\text{ }\mu\text{L}$ ，电子超声匀浆器匀浆 5 min ，于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $13\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ，取上清液于 2 mm EP 管中， $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下氮气吹干，加入 pH 7.4 含 0.01% TSP 的磷酸盐缓冲液 $550\text{ }\mu\text{L}$ ，于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $13\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min ，取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 上清液，转移至 5 mm 核磁管中待测。

2.3.3 核磁测定条件 样品在 600 MHz NMR 仪上测定，测定频率为 600.13 MHz，血清扫描次数为 128，脾脏扫描次数为 64，谱宽 $12\text{ }345.7\text{ Hz}$ 。血清样品采用 cpmgprld 脉冲序列，脾脏样品采用 noe-

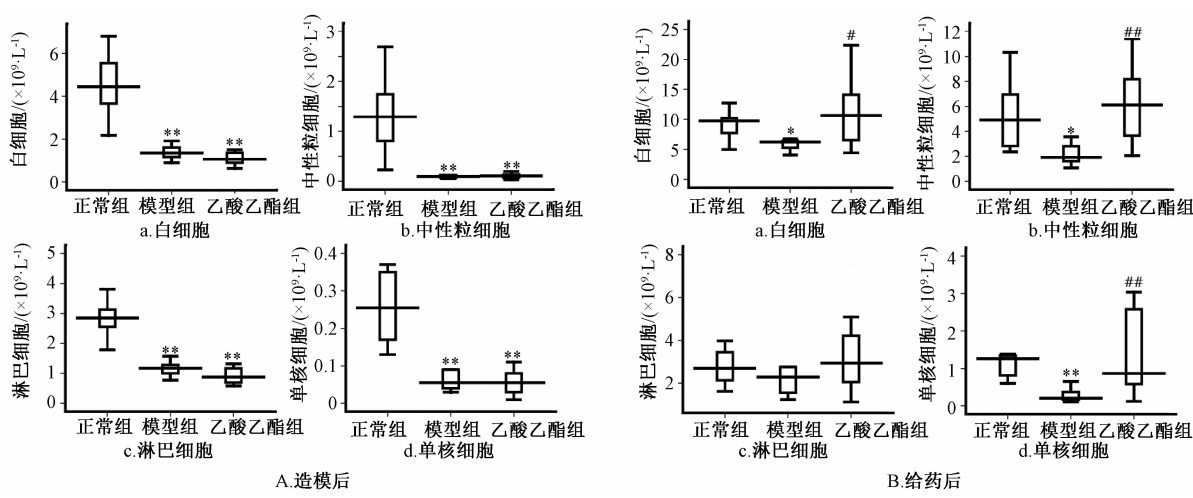
syppr1d 序列。

2.4 数据分析 核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, Spain) 进行处理。图谱经过定标、相位和基线校正后,以 80.01 积分段对化学位移区间进行分段积分。血清¹H-NMR 中对化学区间 δ 0.82 ~ 8.49 进行分段积分,其中 δ 4.66 ~ 5.22 (残余水峰)不进行积分。脾脏¹H-NMR 对化学区间 δ 0.01 ~ 9.49 进行分段积分,其中 δ 4.60 ~ 5.61 (残余水峰)不进行积分。将积分后的数据导入到 Excel 表中,用于后续的分析。将 Excel 中的积分数据导入 SIMCA-P 13.0 软件中进行 PCA 分析 (principal component analysis, 主成分分析),再用 OPLS-DA 分析 (Orthogonal partial least squares discriminant analysis, 正交偏最小二乘法判别分析)找出样品间差异代谢产物,并在 SPSS 16.0 软件中对差异代

谢产物进行 ANOVA 分析,即先对模型组和正常组的差异代谢物相对含量进行 *t* 检验,再对模型组和黄芪注射液乙酸乙酯组的差异代谢物相对含量进行 *t* 检验分析。血常规白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞均表示为均值±标准差, *P* < 0.05 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 血常规结果 由图 1 可知,环磷酰胺造模 3 d 后,模型组、黄芪注射液乙酸乙酯组与正常组之间白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞均有显著性差异 (*P* < 0.05),说明成功复制了白细胞减少症的动物模型。腹腔注射黄芪注射液乙酸乙酯萃取物 7 d 后,黄芪注射液乙酸乙酯组小鼠的白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞的水平升高,与正常组比较无显著性差异 (*P* > 0.05)。



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

图 1 血常规箱图
Fig. 1 Boxplots of blood routine

3.2 血清与脾脏的核磁共振分析 通过化学位移、耦合常数及峰型等核磁数据分析,并结合文献数据和标准品对照,从小鼠脾脏核磁指纹图谱中指出了 35 种化合物,血清核磁指纹图谱中指出了 27 种化合物,主要包括有机酸、氨基酸、糖类等,具体指出结果见表 1。

3.3 多元统计分析

3.3.1 PLS-DA (偏最小二乘判别) 分析 首先对正常组、模型组、黄芪注射液乙酸乙酯组 3 组样本进行 PLS-DA 分析,以 3 个主成分为坐标轴构建的 3D 得分散点图见图 2。从脾脏的得分散点图 2A 和

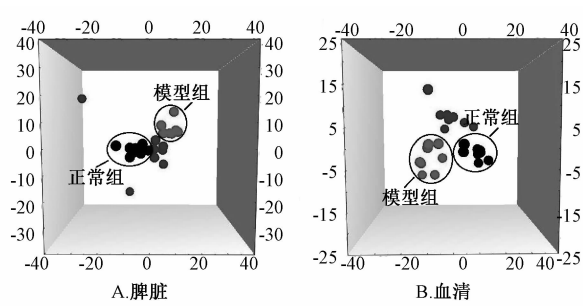


图 2 小鼠脾脏和血清的三维 PLS-DA 得分图
Fig. 2 Three-dimensional PLS-DA score plots of mouse spleen and serum

表 1 小鼠脾脏和血清中的代谢物
Tab. 1 Metabolites in mouse spleen and serum

序号	代谢物	化学位移	来源
1	缬氨酸	0.99 (d, J = 7.2 Hz), 1.04 (d, J = 6.6 Hz)	脾脏,血清
2	异亮氨酸	0.94 (t, J = 7.2 Hz), 1.01 (d, J = 6.6 Hz)	脾脏,血清
3	亮氨酸	0.96 (t, J = 6.6 Hz)	脾脏,血清
4	3-羟基丁酸	1.20 (d, J = 6.6 Hz)	脾脏,血清
5	乳酸	1.33 (d, J = 7.2 Hz), 4.12 (q, J = 7.2 Hz)	脾脏,血清
6	丙氨酸	1.48 (d, J = 7.2 Hz)	脾脏,血清
7	赖氨酸	1.49 (m), 1.72 (m), 1.92 (m)	脾脏,血清
8	精氨酸	1.70 (m), 1.92 (m)	脾脏
9	谷氨酸	2.07 (m), 2.35 (m)	脾脏,血清
10	蛋氨酸	2.14 (s), 2.14(m), 2.64 (t, J = 7.8 Hz)	脾脏
11	谷氨酰胺	2.44 (m), 3.77 (m)	脾脏,血清
12	丙酮酸	2.37 (s)	脾脏,血清
13	琥珀酸	2.40 (s)	脾脏,血清
14	二甲胺	2.74 (s)	脾脏
15	天冬氨酸	2.67 (dd, J = 8.4, 17.4 Hz), 2.82 (dd, J = 3.6, 17.4 Hz)	脾脏
16	天冬酰胺	2.89 (dd, J = 7.2, 16.8 Hz), 2.94 (dd, J = 4.2, 16.8 Hz)	脾脏
17	肌酸	3.03(s), 3.94(s)	脾脏,血清
18	鲨肌醇	3.36(s)	脾脏,血清
19	胆碱	3.21(s)	脾脏,血清
20	磷脂酰胆碱	3.22 (s)	脾脏
21	甘油磷酰胆碱	3.23 (s)	脾脏
22	牛磺酸	3.27 (t, J = 6.6 Hz), 3.42 (t, J = 6.6 Hz)	脾脏
23	甘氨酸	3.56 (s)	脾脏,血清
24	腺苷	6.10 (d, J = 5.4 Hz), 8.24 (s), 8.35 (s)	脾脏
25	尿嘧啶	5.81 (d, J = 7.8 Hz), 7.55 (d, J = 7.8 Hz)	脾脏
26	尿苷	5.90 (d, J = 7.8 Hz), 5.92 (d, J = 4.8 Hz), 7.89 (d, J = 8.4 Hz)	脾脏
27	胞嘧啶核苷	5.91 (d, J = 3.6 Hz), 6.07 (d, J = 7.8 Hz), 7.85 (d, J = 7.2 Hz)	脾脏
28	富马酸	6.52 (s)	脾脏
29	酪氨酸	6.91 (d, J = 8.4 Hz), 7.20 (d, J = 8.4 Hz)	脾脏,血清
30	组胺	7.10 (s), 7.92 (s)	脾脏,血清
31	苯丙氨酸	7.33 (d, J = 7.2 Hz), 7.39 (m), 7.43 (t, J = 7.2 Hz)	脾脏,血清
32	烟酰胺	7.60 (dd, J = 5.4, 7.8 Hz), 8.72 (dd, J = 1.2, 4.8 Hz), 8.94 (d, J = 2.4 Hz)	脾脏
33	黄嘌呤	7.90 (s)	脾脏
34	次黄嘌呤	8.20 (s), 8.22 (s)	脾脏
35	甲酸	8.46 (s)	脾脏,血清
36	脂质	0.86 (m), 1.28 (m), 2.78 (m), 5.30 (m)	血清
37	O-乙酰化糖蛋白	2.14 (s)	血清
38	柠檬酸	2.53 (d, J = 16.2 Hz), 2.69 (d, J = 16.2 Hz)	血清
39	二甲基甘氨酸	2.92 (s)	血清
40	氧化三甲胺	3.26 (s)	血清
41	甜菜碱	3.27 (s)	血清
42	甘油酯	3.56 (dd, J = 6.0, 12 Hz), 3.66 (dd, J = 4.2, 11.4 Hz)	血清
43	葡萄糖	5.23 (d, J = 3.6 Hz), 4.65 (d, J = 7.8 Hz)	血清

血清的得分散点图 2B 中可以看出, 3 组样本均能明显分开, 且黄芪注射液乙酸乙酯组样本均位于正常组和模型组之间, 说明黄芪注射液乙酸乙酯萃取物对白细胞减少症有一定的治疗作用。因此, 进一步采用多元统计分析确定正常组和模型组引起的内源性代谢物差异, 并分析乙酸乙酯萃取物对内源性差异代谢物的回调作用。

3.3.2 小鼠血清中生物标志物的发现及黄芪注射液乙酸乙酯萃取物的回调作用 结合相应的 S-plot (图 3) 及变量重要性 (VIP) 值 (大于 1.0), 寻找差异代谢物。模型组小鼠血清中脂质、亮氨酸、3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、丙酮酸、肌酸、鲨肌醇的水平均降低, 甜菜碱、葡萄糖的水平均升高。差异代谢物中的亮氨酸、3-羟基丁酸、乳酸、丙氨

酸、丙酮酸、肌酸、甜菜碱、鲨肌醇和葡萄糖，模型组与正常组比较有显著性差异。

进一步分析发现，黄芪注射液乙酸乙酯萃取物治疗后，可回调血清中 10 个内源性代谢物脂质、亮氨酸、3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、丙酮酸、肌酸、鲨肌醇、甜菜碱、葡萄糖的水平，可明显回调乳酸、肌酸和甜菜碱的水平。见表 2。

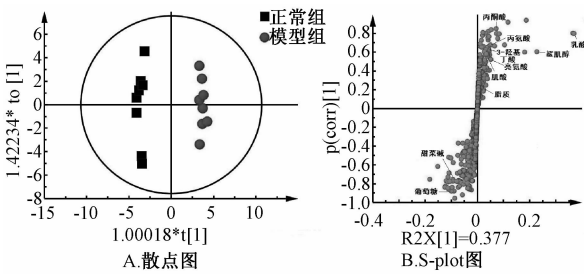


图 3 小鼠血清的 OPLS-DA 和 S-plot 分析
Fig. 3 OPLS-DA and S-plot analyses of mouse serum

表 2 小鼠血清代谢物积分水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Comparison of integral levels of metabolites in mouse serum ($\bar{x} \pm s$)

序号	代谢物	化学位移	正常组	模型组	乙酸乙酯组
1	脂质	0.88	0.90 ± 0.20	0.76 ± 0.14	0.88 ± 0.25
2	亮氨酸	0.98	0.43 ± 0.16	0.29 ± 0.04 *	0.34 ± 0.14
3	3-羟基丁酸	1.21	0.19 ± 0.09	0.10 ± 0.01 **	0.16 ± 0.05
4	乳酸	1.34	14.11 ± 0.77	9.36 ± 2.60 **	11.90 ± 2.03 #
5	丙氨酸	1.48	0.33 ± 0.08	0.22 ± 0.08 *	0.31 ± 0.10
6	丙酮酸	2.38	0.21 ± 0.02	0.11 ± 0.03 **	0.14 ± 0.02
7	肌酸	3.04	0.24 ± 0.07	0.17 ± 0.02 *	0.27 ± 0.05 ##
8	甜菜碱	3.27	0.36 ± 0.15	0.68 ± 0.14 **	0.51 ± 0.17 #
9	鲨肌醇	3.36	3.05 ± 2.34	0.74 ± 0.26 *	2.03 ± 1.63
10	葡萄糖	5.24	0.26 ± 0.14	0.67 ± 0.13 **	0.49 ± 0.29

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

3.3.3 小鼠脾脏中生物标志物的发现及黄芪注射液乙酸乙酯萃取物的回调作用 结合相应的 S-plot (图 4) 及 VIP 值 (大于 1.0)，寻找差异代谢物。模型组小鼠脾脏中，丙酮酸、胆碱、磷脂酰胆碱、牛磺酸和次黄嘌呤的水平均升高，异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、赖氨酸、精氨酸、甘油磷脂酰胆碱和乳酸的水平均下降。差异代谢物中的异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、赖氨酸、磷脂酰胆碱、甘油磷脂酰胆碱、牛磺酸、乳酸和次黄嘌呤，模型组与正常组比较有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。进一步分析发现，黄芪注射液乙酸乙酯萃取物治疗后，可回

调脾脏中 12 个内源性代谢物丙酮酸、胆碱、磷脂酰胆碱、牛磺酸、次黄嘌呤、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、赖氨酸、精氨酸、甘油磷脂酰胆碱和乳酸的水平，可明显回调磷脂酰胆碱、牛磺酸和次黄嘌呤的水平 ($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

4.1 能量代谢 丙酮酸是葡萄糖的糖酵解产物，能转化成乙酰辅酶 A 而进入三羧酸循环，还能在乳酸脱氢酶的作用下转化成乳酸，在丙氨酸转氨酶的作用下转化成丙氨酸^[17]，同时在葡萄糖有氧化和能量生产也具有重要的作用^[18]。在本试验中观察到，模型组小鼠血清中丙酮酸和乳酸的水平均下降，说明环磷酸胺可能影响到机体的能量代谢，这与之前的研究报道一致^[19-20]。

在试验中同时观察到模型组小鼠血脂、3-HB (3-羟基丁酸)、亮氨酸和异亮氨酸水平的下降，3-HB 是脂肪酸的代谢中间物^[21]；亮氨酸和异亮氨酸是重要的生酮氨基酸，为 3-HB 的中间产物^[22]，这些生物标志物的变化进一步表明环磷酸胺可能影响到能量代谢。所有上述代谢物在黄芪注射液乙酸乙酯萃取物治疗后逆转，说明其治疗作用的机制可能

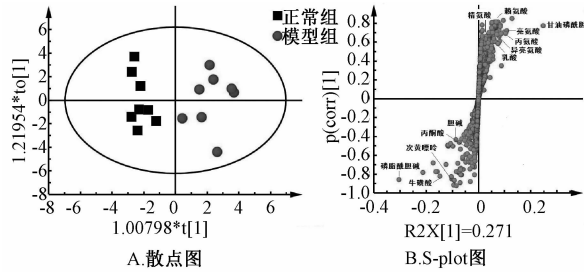


图 4 小鼠脾脏的 OPLS-DA 和 S-plot 分析
Fig. 4 OPLS-DA and S-plot analyses of mouse spleen

表 3 小鼠脾脏代谢物积分水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of integral levels of metabolites in mouse spleen ($\bar{x} \pm s$)

序号	代谢物	化学位移	正常组	模型组	乙酸乙酯组
1	异亮氨酸	0.95	0.51 ± 0.09	0.41 ± 0.03 **	0.47 ± 0.06
2	亮氨酸	0.98	0.54 ± 0.07	0.45 ± 0.03 *	0.49 ± 0.08
3	丙氨酸	1.50	0.74 ± 0.09	0.62 ± 0.04 *	0.66 ± 0.12
4	赖氨酸	1.72	0.30 ± 0.04	0.24 ± 0.02 *	0.27 ± 0.07
5	精氨酸	1.92	0.25 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.07
6	丙酮酸	2.37	0.42 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.09
7	胆碱	3.21	1.83 ± 0.27	2.00 ± 0.15	1.85 ± 0.41
8	磷脂酰胆碱	3.23	1.85 ± 0.26	3.11 ± 0.49 **	1.89 ± 0.30 ##
9	甘油磷酰胆碱	3.24	1.90 ± 0.65	1.11 ± 0.08 **	1.33 ± 0.40
10	牛磺酸	3.44	1.01 ± 0.14	1.28 ± 0.11 **	1.10 ± 0.12 ##
11	乳酸	4.12	0.70 ± 0.09	0.58 ± 0.06 *	0.64 ± 0.13
12	次黄嘌呤	8.22	0.13 ± 0.02	0.21 ± 0.02 **	0.15 ± 0.03 ##

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

与改善能量代谢有关。

肌酸由甘氨酸、精氨酸和蛋氨酸在肝脏中合成，98% 的肌酸分布在肌肉中，可在肌酸激酶的作用下转化成磷酸肌酸，是一种重要的储能化合物，能存储过剩 ATP 的能量^[23-24]。模型组小鼠血清中肌酸水平下降，给予黄芪注射液乙酸乙酯萃取物后，肌酸水平回调，进一步说明乙酸乙酯萃取物升高白细胞的机制可能与能量代谢有关。

4.2 氨基酸代谢 模型组小鼠体内氨基酸的变化包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、精氨酸水平的降低和谷氨酸水平的升高。氨基酸是蛋白质在生物合成中的基本单位，同时在免疫系统中发挥着重要作用，丙氨酸参与淋巴细胞的再生和免疫过程^[21]；精氨酸是一种维持动物最佳生长和氮平衡的必需氨基酸，对免疫系统有调节作用^[25]；谷氨酰胺可通过谷氨酰胺磷酸酶水解成谷氨酸，是谷氨酸的主要来源，能影响淋巴细胞的增殖，单核细胞/巨噬细胞的免疫反应和热休克蛋白 Hsp 70 的合成^[26]。黄芪注射液乙酸乙酯萃取物治疗后，上述的这些代谢物都回调，说明其治疗作用可能与氨基酸代谢有关。

4.3 氧化应激 牛磺酸和甜菜碱的变化可能与环磷酸引起的氧化应激有关^[27]。在大多数哺乳动物的组织中，牛磺酸是一个重要的自由氨基酸，有许多重要的生理作用，如抗氧化、渗透调节和胆汁酸结合等^[28]；甜菜碱是细胞膜的重要组成部分，也是一个甲基供体^[29]，在磷脂代谢、清除氧自由基和膜结构中扮演重要的角色，牛磺酸和甜菜碱通过脂质过氧化作用和过氧化的状态来抵抗氧化应激^[30]。模型组中，牛磺酸和甜菜碱的水平均升高，黄芪注射液乙酸乙酯萃取物治疗后，减少了两者水

平，说明其治疗作用可能与对抗机体的氧化应激有关。

4.4 胆碱代谢 胆碱和磷脂酰胆碱是构成细胞膜的基本成分，其水平变化与细胞膜损伤有关^[31]。模型组小鼠脾脏中磷脂酰胆碱水平的升高预示环磷酸引起了脾脏功能的损伤，给予黄芪注射液乙酸乙酯萃取物后，磷脂酰胆碱水平回调，说明乙酸乙酯萃取物能协助机体修复细胞膜，以恢复脾脏的功能。

5 结论

本研究通过¹H-NMR 代谢组学结合多元统计的方法，对黄芪注射液乙酸乙酯萃取物针对环磷酸导致小鼠白细胞减少症的作用进行了研究，确定了小鼠血清和脾脏中的潜在生物标志物，并阐明黄芪注射液乙酸乙酯萃取物的升高白细胞的作用机制可能是与机体的能量代谢、氨基酸代谢、氧化应激和胆碱代谢有关。由于在黄芪注射液中含有较多的化学成分，因此后续会进一步研究黄芪注射液中具有升高白细胞作用的化学成分。

参考文献：

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

[2] 高维娟. 黄芪注射液临床应用研究进展[J]. 承德医学院学报, 2014, 31(2): 129-131.

[3] 张喜平, 袁玉梅. 黄芪注射液临床应用概况[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(2): 96-98.

[4] 陈国辉, 黄文凤. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1482-1485.

[5] 陈姜华, 葛永勤. 地塞米松加黄芪注射液足三里穴位注射升白细胞临床观察[J]. 当代护士: 学术版, 2005(4): 53-

54. 江泓. 耳体针结合治疗化疗所致白细胞减少症45例[J]. 广西中医药, 2002, 25(1): 44.

[6] 林嘉麟, 陈乐. 化疗后白细胞降低的中药水针治疗与护理[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1788-1789.

[7] 王东峰. 黄芪针足三里穴封闭治疗化疗后白细胞减少症288例[J]. 国医论坛, 2000, 15(6): 27.

[8] 潘峰. 黄芪注射液辅助化疗增效减毒的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2002.

[9] 罗国庆. 力尔凡合化疗及中药治疗中晚期食管癌[J]. 浙江中西医结合杂志, 2000, 10(4): 220.

[10] 高晓红. 薯蓣丸合穴位注射治疗白细胞减少症30例[J]. 国医论坛, 2002, 17(5): 8.

[11] 李伟霞, 黄美艳, 唐于平, 等. 基于代谢组学研究佛手散对血虚小鼠的养血补血作用机制[J]. 药科学报, 2013, 48(8): 1301-1306.

[12] 李春雨, 王平, 王张, 等. 基于代谢组学技术的大黄治疗慢性肾功能衰竭的作用机制研究[J]. 中草药, 2012, 43(2): 312-315.

[13] 皮子凤, 门丽慧, 张静, 等. 五味子治疗大鼠糖尿病肾病作用机制的血清代谢组学研究[J]. 分析化学研究报告, 2015, 43(2): 169-175.

[14] Das U B, Mallick M, Debnath J M, *et al.* Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats[J]. *Asian J Androl*, 2002, 4(3): 201-207.

[15] Wang J X, Tong X, Li P B, *et al.* Immuno-enhancement effects of Shenqi Fuzheng Injection on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 139(3): 788-795.

[16] Guo P P, Wang J S, Dong G, *et al.* NMR-based metabolomics approach to study the chronic toxicity of crude ricin from castor bean kernels on rats[J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(9): 2426-2440.

[17] Zhao X J, Huang C Y, Lei H H, *et al.* Dynamic metabolic response of mice to acute mequindox exposure[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(11): 5183-5190.

[18] Zong K Q, Wang M, Zhang Q, *et al.* A metabonomic approach to the analysis of cyclophosphamide induced blood deficiency in bALB/c mice[J]. *Chin Pharm Bulletin*, 2009, 25: 61-65.

[19] 王穆, 让蔚清, 张琪, 等. 四物汤对环磷酰胺所致血虚证治疗后的代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 630-634.

[20] Plecko B, Stoeckler-Ipsiroglu S, Schober E, *et al.* Oral β -hydroxybutyrate supplementation in two patients with hyperinsulinemic hypoglycemia: Monitoring of β -hydroxybutyrate levels in blood and cerebrospinal fluid, and in the brain by *in vivo* magnetic resonance spectroscopy[J]. *Pediatr Res*, 2002, 52(2): 301-306.

[21] Shi X H, Xiao C N, Wang Y L, *et al.* Gallic acid intake induces alterations to systems metabolism in rats[J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(2): 991-1006.

[22] Ma C, Bi K S, Zhang M, *et al.* Toxicology effects of morning glory seed in rat: A metabonomic method for profiling of urine metabolic changes[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 134-142.

[23] Ma C, Bi K S, Zhang M, *et al.* Metabonomic study of biochemical changes in the urine of morning glory seed treated rat[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2010, 53(3): 559-566.

[24] Roth E. Immune and cell modulation by amino acids[J]. *Clin Nutr*, 2007, 26(5): 535-544.

[25] Exner R, Tamandl D, Goetzinger P, *et al.* Perioperative Gly-Gln infusion diminishes the surgery-induced period of immunosuppression[J]. *Ann Surg*, 2003, 237(1): 110-115.

[26] 潘模英, 倪秀雄, 姚琦, 等. 紫杉醇和环磷酰胺致肝损伤程度的对比实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2004, 27(3): 17-18.

[27] Froger N, Moutsimilli L, Cadetti L, *et al.* Taurine: the comeback of a nutraceutical in the prevention of retinal degenerations[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2014, 41: 44-63.

[28] Korzun W J. Oral creatine supplementation lowers serum homocysteine concentrations in humans[J]. *Clin Lab Sc*, 2004, 17(2): 102-106.

[29] Erman F, Balkan J, Cevikbas U, *et al.* Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication[J]. *Amino Acids*, 2004, 27(2): 199-205.

[30] Li F, Xu Q, Zheng T, *et al.* Metabonomic analysis of allium macrostemon bunge as a treatment for acute myocardial ischemia in rats[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2014, 88: 225-234.

[31]