

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.11.016

益气凉血生肌方与阿托伐他汀片对腹主动脉球囊损伤模型大鼠血管损伤及血清代谢物差异的影响比较研究

毛天诗¹, 谢龙¹, 高群¹, 潘熠¹, 贾文浩²✉, 林谦¹✉

1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓5号, 100700; 2. 北京中医药大学第三附属医院

[摘要] **目的** 从代谢组学角度对比分析益气凉血生肌方与阿托伐他汀对大鼠血管损伤修复的影响及可能机制。**方法** 将24只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、益气凉血生肌方组、阿托伐他汀组, 每组6只。除假手术组外其余各组大鼠采用球囊拉伤腹主动脉构建血管损伤大鼠模型。各组大鼠术后当天开始灌胃, 假手术组、模型组大鼠灌胃去离子水15 ml/(kg·d), 益气凉血生肌方组予益气凉血生肌方混悬液6 g/(kg·d)灌胃, 阿托伐他汀组予阿托伐他汀混悬液2 mg/(kg·d)灌胃。各组均连续灌胃4周后, HE染色观察腹主动脉损伤段病理形态; ELISA法检测血清一氧化氮(NO)及C反应蛋白(CRP)水平; 采用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)技术进行血清广泛靶向代谢组学检测, 运用多元统计分析方法筛选两种药物的代谢标志物及代谢途径; 比较各组大鼠两种药物血清关键代谢标志物水平。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠腹主动脉病理显示新生内膜明显增生, 检测血清NO水平明显降低、CRP水平明显升高($P<0.01$); 与模型组相比, 益气凉血生肌方组与阿托伐他汀组大鼠动脉内膜增生程度均减轻, 血清NO水平升高、CRP水平下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。血清代谢组学结果显示, 益气凉血生肌方组获得49种代谢标志物、6条代谢途径, 阿托伐他汀组获得41种代谢标志物、4条代谢途径。两种药物共同调节38种代谢物, 甘油磷脂代谢和精氨酸相关代谢是两种药物的共同代谢途径, 溶血磷脂酰胆碱(16:1/0:0)[LPC(16:1/0:0)]、磷脂酰胆碱(15:0/15:0)[PC(15:0/15:0)]为甘油磷脂代谢途径的关键代谢物, 鸟氨酸、亚精胺为精氨酸相关代谢途径的关键代谢物。三羧酸循环、谷胱甘肽代谢是益气凉血生肌方独有的代谢途径。与假手术组相比, 模型组LPC(16:1/0:0)、鸟氨酸、亚精胺水平均升高, PC(15:0/15:0)水平下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组相比, 益气凉血生肌方组及阿托伐他汀组LPC(16:1/0:0)、鸟氨酸、亚精胺水平均降低, PC(15:0/15:0)水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与益气凉血生肌方组相比, 阿托伐他汀组LPC(16:1/0:0)降低程度更为显著($P<0.01$)。**结论** 益气凉血生肌方与阿托伐他汀均可调节脂质代谢及精氨酸相关代谢, 发挥降血脂、抗炎、提高精氨酸/NO生物利用、改善内皮功能障碍的作用。阿托伐他汀在降脂、抗炎方面更具优势, 而益气凉血生肌方在调节能量代谢、改善氧化应激方面更佳。

[关键词] 经皮冠状动脉介入术; 血管损伤; 益气凉血生肌方; 阿托伐他汀; 不良心血管事件; 代谢组学

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是冠心病的重要治疗手段之一, 但其在解除冠状动脉狭窄、实现血运重建的同时, 也对血管内皮造成一定程度损伤, 可能引发内皮修复不良导致的再狭窄、远期血管管腔丢失等问

题^[1]。目前临床上主要通过冠心病二级预防药物进行PCI术后干预, 以减少术后并发症及不良心血管事件(major adverse cardiovascular events, MACE)的发生^[2]。阿托伐他汀是指南推荐的一种二级预防药物, 具有降血脂、抗炎等作用^[3-6], 已成为PCI术后的常用治疗药物。但有研究^[7]表明, 即使严格遵循指南进行药物干预, PCI术后1年内MACE发生率仍约为8%。

近年来中医药在PCI术后MACE的防治中受到

基金项目:国家自然科学基金(82074188);北京中医药大学新教师启动基金项目(2021-JYB-XJSJJ-080)

✉ 通讯作者:贾文浩, jqhx@bucm.edu.cn; 林谦, linqian62@126.com

广泛关注。益气凉血生肌方是首都国医名师廖家桢创制的中药验方,具有益气活血、凉血生肌之功。前期临床研究^[8-10]证实,益气凉血生肌方可明显改善冠心病患者 PCI 术后胸闷、气短、乏力诸症,缓解术后心绞痛症状,减少术后 MACE 的发生,改善患者近期及远期生存质量。基础实验发现该方可抑制新生内膜过度增生、调节雷帕霉素(mTORC1)信号通路减轻氧化应激、抑制 Toll 样受体 4/核因子 κ B (TLR4/NF- κ B) 信号通路减轻炎症反应等^[11-12]。本研究采用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)广泛靶向代谢组学技术,从代谢组学角度对比益气凉血生肌方与阿托伐他汀这两种药物对大鼠血管损伤修复的差异,旨在为益气凉血生肌方的临床应用提供实验依据。本研究获得中国中医科学院医学实验中心实验动物伦理委员会批准(批件号: ERCCACMS21-2208-02)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,体质量(250 ± 20)g,由北京斯贝福生物科技有限公司提供,实验动物生产许可证编号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于中国中医科学院医学实验中心,温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~60%,昼夜 12 h 交替,分笼饲养,自由进食和饮水。实验正式开始前适应性饲养 1 周。

1.2 药物

益气凉血生肌方按照成人一日剂量(黄芪 30 g、丹参 15 g、牡丹皮 10 g、金银花 10 g)配制成颗粒剂,颗粒剂由北京康仁堂药业有限公司提供(批号: 201005),并采用 UPLC-MS/MS 技术对其进行质量控制及成分鉴定;阿托伐他汀钙片(辉瑞制药,规格: 20 mg/片,批号: EK5190)。

1.3 主要试剂及仪器

甲醇(货号: I1163007135)、乙腈(货号: CAEQ400308400), Merck 公司;甲酸(货号: RH302171)、氨水(货号: A112080), Aladdin 公司;戊巴比妥钠(货号: WS20060401), 国药集团化学试剂有限公司;苏木素染色液(货号: G1140)、伊红染色液(货号: G1100), Solarbio 公司;一氧化氮(NO) ELISA 试剂盒(货号: YAD106027)、C 反应蛋白(CRP)ELISA 试剂盒(货号: YAD8947), 北京雅安达生物技术有限公司。

SCIEX ExionLC AD 型超高效液相色谱仪、SCIEX QTRAP®型串联质谱, 美国 SCIEX 公司;

iMark 型全自动酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; BSA224 W-CW 型万分之一电子天平, 德国 Sartorius 公司; Cascade 3.1 型纯水仪, 美国 PALL 公司; Allegra®X-15R 型台式冷冻离心机, 美国 Beckman 公司。

1.4 动物分组、造模与给药

采用随机数字表法将 24 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、益气凉血生肌方组、阿托伐他汀组, 每组 6 只。除假手术组外其余各组大鼠参照文献[13]构建大鼠腹主动脉球囊损伤模型, 假手术组除不插入球囊, 其余操作均与模型组相同。各组大鼠术后当天开始灌胃, 假手术组、模型组大鼠灌胃去离子水 15 ml/(kg·d), 益气凉血生肌方组予益气凉血生肌方混悬液 6 g/(kg·d)灌胃, 阿托伐他汀组予阿托伐他汀混悬液 2 mg/(kg·d)灌胃。各组大鼠均连续灌胃 4 周。益气凉血生肌方组和阿托伐他汀组给药剂量按照成人(70 kg)与大鼠体表面积折算比率 6.3 换算等效剂量^[14]。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 腹主动脉病理形态 末次给药后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 次日取材。采用 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 心脏取血后处死大鼠, 并立即取材胸腹主动脉。腹主动脉损伤段经洗涤、固定、切片后, 行苏木素-伊红(HE)染色, 显微镜下进行病理形态学观察。

1.5.2 血清 NO 和 CRP 水平检测 血液经两次离心(25°C 、3 000 r/min 离心 10 min, 4°C 、3 000 r/min 离心 10 min, 离心半径均为 10 cm), 取上层血清至 1.5 ml EP 管中, -80°C 保存。根据 ELISA 试剂盒说明书进行检测。采用酶标仪检测, 在 450 nm 波长处依次测量各孔的 OD 值。

1.5.3 血清代谢组学检测 血清样品解冻后, 涡旋 10 s 混匀, 取样品 50 μl 加入到对应编号的离心管中; 加入 300 μl 纯甲醇内标提取液, 涡旋 3 min, 离心 10 min (离心半径 10 cm, 4°C 、12 000 r/min); 吸取上清液 200 μl 至另一个对应编号的离心管中, -20°C 静置 30 min; 再次离心 3 min (离心半径 10 cm, 4°C 、12 000 r/min); 吸取 150 μl 上清液于对应进样瓶中, 用于上机分析。

色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 C18 色谱柱(1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm); 流动相: 溶剂 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 溶剂 B 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液; 洗脱梯度: 0~11 min, 5% $\rightarrow$ 90% B; 11~12 min, 90% B; 12~12.1 min, 90% $\rightarrow$ 5% B; 12.1~14 min, 5% B; 流速 0.4 ml/min, 柱温 40°C , 进样量 2 μl 。

质谱条件：采用 QTRAP 质谱仪的电喷雾离子源 (ESI)，正负离子扫描模式采集样品质谱信息。

1.5.4 代谢组学数据处理、分析及统计 利用 MultiQuan 软件处理原始的质谱数据，进行峰对齐、提取、积分校正和归一化处理，得到所有代谢物在各个样本中的量化数据，包括代谢物名称、分子式、保留时间、质荷比 (m/z) 和峰面积等。使用 Analyst 1.6.3 软件进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法分析 (OPLS-DA)。采用置换检验评价 OPLS-DA 模型的可靠性，参数 Q^2 表示模型的预测能力， $Q^2 > 0.5$ 表明模型有效； R^2Y 表示模型的解释率，越接近于 1 表明模型越稳定可靠。进一步计算代谢物的变量投影重要度 (VIP)、差异倍数 (FC) 及 P 值。在 OPLS-DA 模型中，设置三个比较组：模型组 vs 假手术组、益气凉血生肌方 vs 模型组、阿托伐他汀组 vs 模型组，根据 $VIP > 1$ ， $P < 0.05$ ，且 $FC > 1.2$ 或 $FC < 0.8$ 筛选出各比较组的异常代谢物，并基于人类代谢组数据库 (HMDB, <https://hmdb.ca/>) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG, <https://www.kegg.jp/kegg/compound/>) 进行代谢物鉴定。

1.5.5 代谢标志物获取及代谢途径分析 将模型组 vs 假手术组、益气凉血生肌方 vs 模型组的异常代谢物进行 Venn 分析，获取益气凉血生肌方干预血管损伤修复的代谢标志物；将模型组 vs 假手术组、阿托伐他汀组 vs 模型组的异常代谢物进行 Venn 分析，获取阿托伐他汀干预血管损伤修复的代谢标志物。利用 MetaboAnalyst 5.0 软件分别对益气凉血生肌方和阿托伐他汀的代谢标志物进行代谢途径分析，筛选出 $P < 0.05$ 和 $Impact > 0.1$ 的代谢途径。

1.6 统计学方法

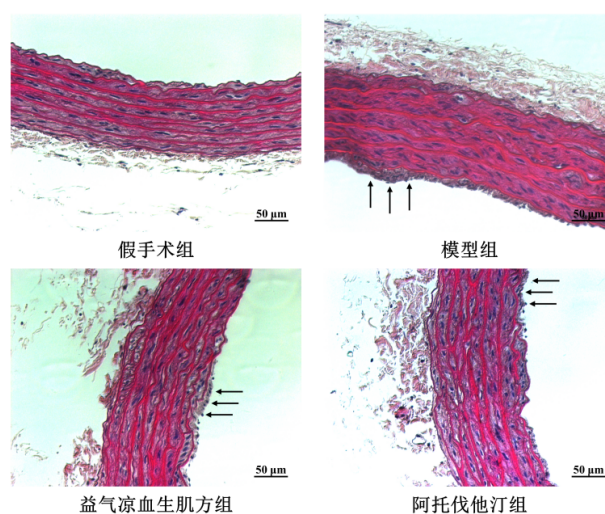
采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析，用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。计量资料符合正态分布用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，方差齐时多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法；方差不齐时，多组间比较采用 Welch 检验，两两比较采用 Tamhane's T^2 法。数据不符合正态分布时采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠腹主动脉病理染色结果

图 1 示，假手术组的正常腹主动脉血管壁较光

滑，内弹性膜卷曲形成皱纹，内膜、中膜和外膜结构清晰可见、细胞排列整齐；内膜为单层内皮细胞，中膜为多层平滑肌细胞，胞核大小均匀、形态呈梭形。模型组的血管壁欠光滑，可见新生内膜及中膜均增厚，但以内膜增厚更加显著；新生内膜中可见大量平滑肌细胞增生，细胞排列紊乱，细胞外基质增多。益气凉血生肌方组和阿托伐他汀组的血管壁均欠光滑，内膜增生程度较模型组减轻，平滑肌细胞增生减少，且益气凉血生肌方组和阿托伐他汀组内膜增生程度差别不大。



注：图中箭头指示为腹主动脉内膜增厚处。

图 1 各组大鼠腹主动脉损伤段病理形态比较(HE 染色, $\times 200$)

Figure 1 Comparison of pathological morphology of the injured segment of the abdominal aorta in each group of rats (HE staining, $\times 200$)

2.2 各组大鼠血清 NO 及 CRP 水平比较

表 1 示，与假手术组相比，模型组 NO 水平明显下降、CRP 水平明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，益气凉血生肌方组和阿托伐他汀组 NO 水平显著提高、CRP 水平下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；益气凉血生肌方组和阿托伐他汀组 NO、CRP 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠血清代谢产物轮廓分析

各组样本 PCA 分析结果显示，假手术组、模型组、益气凉血生肌方组、阿托伐他汀组的代谢谱呈现明显分离趋势，表明各组的代谢产物轮廓存在差异；益气凉血生肌方组与阿托伐他汀组的代谢谱部分重合，说明两组的代谢产物具有一定相似性，初步表明益气凉血生肌方对大鼠血管损伤修复的调节作用可能与阿托伐他汀相似，详见图 2。

表1 各组大鼠血清 NO、CRP 水平测定结果比较
 Table 1 Comparison of the results of serum NO and CRP levels
 in rats of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NO/nmol·ml ⁻¹	CRP/ng·ml ⁻¹
假手术组	6	68.08±3.99	6.16±0.62
模型组	6	51.14±3.72 ^{a)}	8.59±0.48 ^{a)}
益气凉血生肌方组	6	64.27±4.16 ^{b)}	6.93±0.54 ^{c)}
阿托伐他汀组	6	65.68±3.29 ^{b)}	6.57±0.53 ^{b)}

注：NO，一氧化氮；CRP，C 反应蛋白。
 a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
 c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

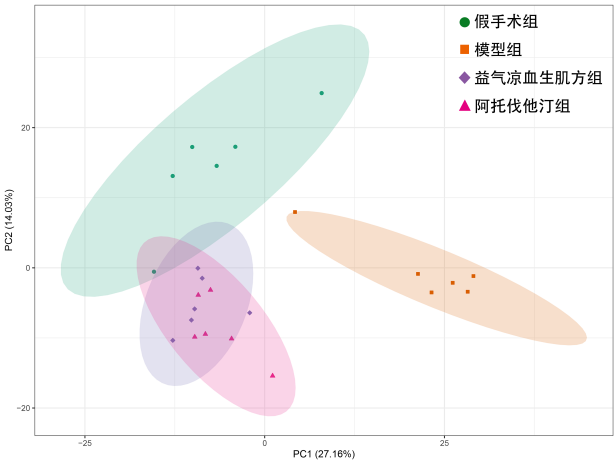
2.4 各比较组血清异常代谢物筛选结果

OPLS-DA 模型评价结果显示，模型组 vs 假手术组 R^2Y 为 0.997， Q^2 为 0.790；益气凉血生肌方组 vs 模型组 R^2Y 为 0.991， Q^2 为 0.844；阿托伐他汀组 vs 模型组 R^2Y 为 0.998， Q^2 为 0.903。三个比较组的参数 R^2Y 与 Q^2 均接近 1，表明建立的模型均稳定可靠，为异常代谢物的筛选提供了良好的前提条件。根据筛选标准，在模型组 vs 假手术组中共鉴定出 70 种异常代谢物，在益气凉血生肌方组 vs 模型组中共鉴定出 96 种异常代谢物，在阿托伐他汀组 vs 模型组中共鉴定出 97 种异常代谢物。

表2 益气凉血生肌方与阿托伐他汀的共同差异血清代谢标志物变化情况

Table 2 Changes in serum metabolic markers of common differences between <i>Yiqi Liangxue Shengji Formula</i> (益气凉血生肌方) and atorvastatin											
序号	代谢物名称	<i>m/z</i>	模型组	益气凉血生肌方组	阿托伐他汀组	序号	代谢物名称	<i>m/z</i>	模型组	益气凉血生肌方组	阿托伐他汀组
1	蜜二糖	342.116	↑	↓	↓	20	L-岩藻糖	164.068	↓	↑	↑
2	皮质醇	362.209	↑	↓	↓	21	草酸	160.037	↑	↓	↓
3	甘油磷酸胆碱	257.103	↑	↓	↓	22	甲戊酸	148.074	↑	↓	↓
4	鸟氨酸	132.089	↑	↓	↓	23	核黄素	376.138	↑	↓	↓
5	硫胺素	265.112	↑	↓	↓	24	焦谷氨酸	129.043	↑	↓	↓
6	胸腺嘧啶	126.043	↑	↓	↓	25	生物蝶呤	237.086	↑	↓	↓
7	脱氧胆酸	392.293	↑	↓	↓	26	D-阿拉伯糖醇	152.069	↑	↓	↓
8	N-乙酰-L-天冬氨酸	175.048	↑	↓	↓	27	十六烷二酸	286.214	↑	↓	↓
9	瓜氨酸	175.096	↑	↓	↓	28	尿苷琥珀酸	176.043	↑	↓	↓
10	反式肉桂酸	148.052	↑	↓	↓	29	鼠李糖	164.068	↓	↑	↑
11	N-甲酰-L-蛋氨酸	177.046	↑	↓	↓	30	牛磺酸鹅去氧胆酸	499.297	↑	↓	↓
12	亚精胺	145.158	↑	↓	↓	31	γ-谷氨酰半胱氨酸	250.062	↓	↑	↑
13	烟酰胺	122.100	↑	↓	↓	32	1-吡咯啉-4-羧基-2-羧酸盐	129.043	↑	↓	↓
14	磷酸胆碱	184.074	↑	↓	↓	33	D-木糖醇	152.068	↑	↓	↓
15	4-胍基丁酸	145.085	↑	↓	↓	34	莽草酸	174.053	↑	↓	↓
16	PC (15 : 0/15 : 0)	705.531	↓	↑	↑	35	N2-乙酰鸟氨酸	174.101	↑	↓	↓
17	LPC (16 : 1/0 : 0)	493.317	↑	↓	↓	36	D-丙氨酰-D-丙氨酸	160.085	↑	↓	↓
18	异烟酸	123.032	↑	↓	↓	37	6-磷酸山梨糖醇	262.045	↑	↓	↓
19	顺式乌头酸	174.016	↑	↓	↓	38	3,4-二羟基苯乙醇	170.058	↑	↓	↓

注：PC，磷脂酰胆碱；LPC，溶血磷脂酰胆碱； m/z ，质荷比；↑，上调；↓，下调。



注：PC1，第一预测主成分；PC2，第二预测主成分。
 图2 各组大鼠血清代谢产物主成分分析二维图
 Figure 2 Two-dimensional plot of principal component analysis of serum metabolites in each group of rats

2.5 益气凉血生肌方与阿托伐他汀的血清代谢标志物结果

将各比较组的异常代谢物取交集，最终获得 49 种益气凉血生肌方的代谢标志物、41 种阿托伐他汀的代谢标志物。将代谢标志物进行聚类分析，益气凉血生肌方与阿托伐他汀的共同代谢标志物有 38 种，详见表 2。与模型组比较，益气凉血生肌方

组与阿托伐他汀组共同上调磷脂酰胆碱（15：0/15：0）[PC（15：0/15：0）]、L-岩藻糖、鼠李糖、 γ -谷氨酰半胱氨酸，其余各代谢物均下调。益气凉血生肌方单独调节的代谢标志物共 11 种，阿托伐他汀单独调节的代谢标志物有 3 种，详见表 3。

2.6 益气凉血生肌方与阿托伐他汀的代谢途径分析结果

使用 MetaboAnalyst 5.0 对代谢标志物进行代谢途径富集分析，根据 $P < 0.05$ 和 Impact 值 > 0.1 的筛选标准，得到 6 条益气凉血生肌方的代谢途径、4 条阿托伐他汀的代谢途径，见图 3。其中，甘油磷脂代谢和精氨酸相关代谢是两种药物的共同代谢途径。此外，三羧酸循环和谷胱甘肽代谢是益气凉

血生肌方独有的代谢途径。

2.7 各组大鼠血清代谢物溶血磷脂酰胆碱（16：1/0：0）[LPC（16：1/0：0）]、PC（15：0/15：0）、鸟氨酸及亚精胺水平比较

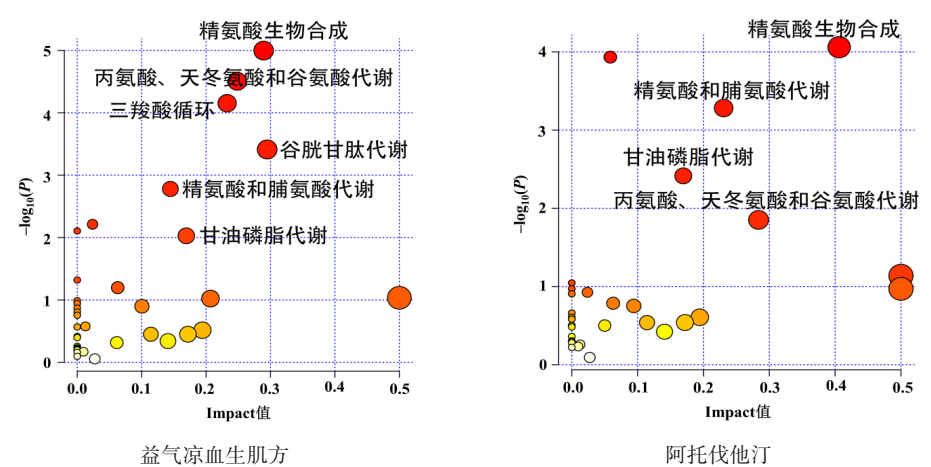
本研究分别比较两种药物均显著调节的甘油磷脂代谢途径的关键代谢物 LPC（16：1/0：0）、PC（15：0/15：0），精氨酸相关代谢途径的关键代谢物鸟氨酸、亚精胺，对比益气凉血生肌方与阿托伐他汀的代谢调节差异。图 4 示，与假手术组相比，模型组 LPC（16：1/0：0）、鸟氨酸、亚精胺水平均升高，PC（15：0/15：0）水平下降（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。与模型组相比，益气凉血生肌方组及阿托伐他汀组 LPC（16：1/0：0）、鸟氨酸、亚精胺水

表 3 益气凉血生肌方或阿托伐他汀单独调节的血清代谢标志物变化情况

Table 3 Changes in serum metabolic markers modulated by Yiqi Liangxue Shengji Formula（益气凉血生肌方） or atorvastatin alone

序号	代谢物名称	m/z	模型组	益气凉血生肌方组	序号	代谢物名称	m/z	模型组	阿托伐他汀组
1	谷胱甘肽	307.084	↓	↑	1	犬尿氨酸	208.085	↓	↑
2	肌酐	113.059	↑	↓	2	葫芦巴碱	137.048	↓	↑
3	L-谷氨酰胺	146.069	↓	↑	3	L-谷氨酸	147.053	↑	↓
4	2-羟基丁酸	104.047	↑	↓					
5	L-乳酸	90.032	↑	↓					
6	异柠檬酸	192.027	↓	↑					
7	酮戊二酸	146.022	↑	↓					
8	丙酮酸	88.016	↑	↓					
9	琥珀酸	118.027	↑	↓					
10	L-古龙内酯	178.048	↓	↑					
11	9, 12, 13-三羟基十八烯酸	330.241	↑	↓					

注：m/z，质荷比；↑，上调；↓，下调。

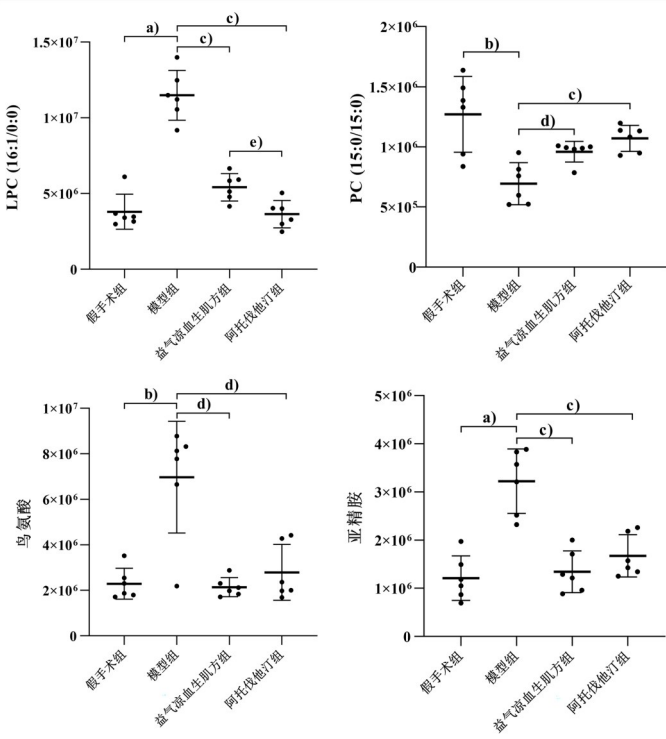


注：气泡越大代表该代谢通路 Impact 值越大，颜色越红代表该条通路 P 值越小。

图 3 益气凉血生肌方与阿托伐他汀的代谢途径分析结果

Figure 3 Results of metabolic pathway analysis of Yiqi Liangxue Shengji Formula（益气凉血生肌方） and atorvastatin

平均降低，PC（15：0/15：0）水平升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与益气凉血生肌方组相比，阿托伐他汀组 LPC（16：1/0：0）降低程度更为显著（ $P<0.01$ ），PC（15：0/15：0）、鸟氨酸、亚精胺水平差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。



注：LPC，溶血磷脂酰胆碱；PC，磷脂酰胆碱。
 a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与益气凉血生肌方组比较， $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠血清代谢物 LPC(16:1/0:0)、PC(15:0/15:0)、鸟氨酸及亚精胺水平比较

Figure 4 Comparison of serum metabolite levels of LPC (16:1/0:0), PC (15:0/15:0), ornithine and spermine in the rats of each group

3 讨论

首都国医名师廖家桢认为 PCI 术后的创伤修复，一方面与气血盛衰有极大关系，气虚血弱则手术创面愈合不良，应用内托之法可以起到促进修复愈合的效果；另一方面与气血凝滞、郁而化热导致瘀热互结相关，故而创制益气凉血生肌方^[10]。全方由黄芪、丹参、牡丹皮、金银花组成，针对 PCI 术后“虚-瘀-热”的核心病机，临床应用于冠心病 PCI 术后气虚血瘀、瘀热互结证患者，以促进介入术后创面修复，达到益气活血、凉血生肌之效。
 现代医学认为，PCI 术后内皮修复与炎症反应、氧化应激、血小板聚集、内皮功能障碍、新生动脉粥样硬化等病理生理过程密切相关^[15]。临床

上，降血脂治疗是贯穿整个冠心病及 PCI 术后治疗过程的重要环节之一^[16]，他汀类药物主要通过降低低密度脂蛋白水平达到稳定或逆转斑块进展的作用^[17]。除此之外，他汀类药物还具有减轻创面局部或全身炎症反应、抗氧化、改善内皮功能等多效作用，这些作用使他汀类药物成为减少 MACE 发生的有效治疗方法之一^[18]。因此，本实验选用阿托伐他汀作为对照药物。
 本研究结果显示，大鼠腹主动脉球囊损伤后可见新生内膜及中膜均增厚，新生内膜中可以见到大量平滑肌细胞增生，而益气凉血生肌方和阿托伐他汀均可显著修复血管壁损伤，内膜增生程度明显减轻，平滑肌细胞增生减少，且益气凉血生肌方和阿托伐他汀效果相当。
 为比较益气凉血生肌方与阿托伐他汀对血管损伤修复的差异，明确中医药在 PCI 术后防治方面的优势，我们从代谢组学角度，采用 UPLC-MS/MS 技术对两种药物进行对比。结果发现，益气凉血生肌方与阿托伐他汀均可以显著调节 38 种代谢物，包括氨基酸类代谢物如鸟氨酸、瓜氨酸，醇胺类代谢物如亚精胺，脂质代谢物如 LPC 及 PC [LPC (16:1/0:0)、PC (15:0/15:0)] 等；甘油磷脂代谢和精氨酸相关代谢是两者共同的代谢调节途径。甘油磷脂代谢途径中的多种酶促脂质代谢物，如 LPC、PC、游离脂肪酸等，均在炎症反应和脂质氧化中发挥重要作用^[19]。LPC 是氧化型低密度脂蛋白的主要成分，是心血管疾病中的不良因子，在炎症、氧化应激条件下均可以促进 PC 转化为 LPC，血浆中 LPC 释放增加^[20]。临床研究发现，在动脉粥样硬化及炎症性疾病中，LPC 水平明显升高^[21]；基础研究发现，LPC 可通过丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路诱导冠状动脉平滑肌细胞向内皮层迁移、钙化^[22]。因此，针对性地抑制 LPC 过度生成可能是减轻炎症、抑制平滑肌细胞迁移、促进再内皮化的一种新策略。本研究中模型组大鼠血清的 LPC (16:1/0:0) 水平升高、PC (15:0/15:0) 水平下降，益气凉血生肌方与阿托伐他汀干预后均发生了回调，可见益气凉血生肌方与阿托伐他汀均可以通过调节甘油磷脂代谢，减少 PC 向 LPC 转化，从而减轻炎症和内皮损伤，利于内膜修复。
 在 3 条精氨酸相关代谢途径中，鸟氨酸、瓜氨酸、亚精胺这三种代谢物关系密切，它们都是精氨酸的代谢产物。精氨酸是扩血管物质 NO 的前体，其在生物体内重要的两条分解途径包括精氨酸/NO

分解途径、精氨酸/鸟氨酸/亚精胺分解途径^[23]。在机械损伤及氧化应激状态下,精氨酸/NO途径受到抑制,导致NO生成减少、瓜氨酸增多;而精氨酸经鸟氨酸/亚精胺途径增强,导致鸟氨酸和亚精胺水平升高^[24-25]。瓜氨酸水平增高表明精氨酸生物利用度下降,且与MACE高风险相关^[26]。鸟氨酸、亚精胺作为精氨酸另一代谢途径的产物,其合成受到抑制可以减弱大鼠损伤主动脉组织的平滑肌细胞增殖迁移、促进内皮功能修复^[27]。本研究结果显示,模型组瓜氨酸、鸟氨酸、亚精胺水平均升高,而益气凉血生肌方组和阿托伐他汀组的相关代谢物水平回调,表明益气凉血生肌方与阿托伐他汀均可以提高精氨酸/NO生物利用度、改善内皮功能障碍、促进内皮损伤修复。

以上结果表明,调节脂质代谢、抗炎、调节内皮功能是两种药物干预血管损伤修复的共同点。我们在进一步比较了相同代谢途径上的关键代谢物水平后发现,脂质代谢途径中,阿托伐他汀降低LPC水平更加显著,同时阿托伐他汀组的炎症因子CRP水平也更低,初步表明阿托伐他汀在降脂、抗炎方面更具优势。而在精氨酸相关代谢途径中,鸟氨酸、亚精胺及NO水平在益气凉血生肌方组和阿托伐他汀组间无明显差异,表明益气凉血生肌方与阿托伐他汀在改善血管内皮功能方面可能作用相当。

此外,我们发现益气凉血生肌方的代谢途径更加广泛,还与改善氧化应激、调节能量代谢有关。谷胱甘肽是机体内重要的抗氧化剂,也是谷胱甘肽代谢途径的主要代谢物,其水平升高与心血管疾病风险增加呈正相关^[28]。而谷胱甘肽代谢及谷胱甘肽仅为益气凉血生肌方显著调节的代谢途径及代谢物,表明益气凉血生肌方在改善氧化应激方面可能更具优势。他汀类药物尽管是二级预防的常用药物,但临床上仍有部分患者存在肌病、肝功能损伤等他汀类药物不耐受的表现,可能与他汀类药物抑制参与线粒体电子传递的泛素化途径引起泛醌缺乏,从而造成乳酸堆积、能量产生减少有关,外源性补充辅酶Q10(即泛醌)可以逆转阿托伐他汀诱导的小鼠线粒体功能障碍和运动耐量减低^[29]。本研究发现,阿托伐他汀对能量代谢及相关代谢物如丙酮酸、酮戊二酸等无显著调节作用,而益气凉血生肌方可以减少乳酸积累,并通过促进三羧酸循环调节能量代谢。中医学认为,乏力、气短是心气虚证的辨证要素^[30]。现代研究发现,心肌能量代谢障碍可能是心气虚证的科学内涵^[31]。前期研究^[9]

也证实益气凉血生肌方可明显改善PCI术后患者的胸闷、气短、乏力症状。因此,调节能量代谢也是益气凉血生肌方的优势之一。

综上所述,腹主动脉球囊损伤的大鼠血清处于代谢紊乱状态,益气凉血生肌方与阿托伐他汀均在一定程度上调节机体内环境、促进内皮良性修复。从代谢组学角度看,两种药物均能够调节脂质代谢及精氨酸相关代谢,从而发挥降血脂、抗炎、提高精氨酸/NO生物利用、改善内皮功能障碍的作用。两者相比,阿托伐他汀在降血脂、抗炎方面更具优势,益气凉血生肌方在调节能量代谢、改善氧化应激方面更佳。因此,中西医结合治疗可能是PCI术后促进内皮修复、减少MACE发生更为合适的选择。但本实验仅从代谢组学角度探讨了中药与西药的差异,且两种药物的对比指标较少,后续将在此基础上进一步完善相关研究,或从分子角度进行深入探讨。

参考文献

- [1]LAWTON JS, TAMIS-HOLLAND JE, BANGALORE S, et al. 2021 ACC/AHA/SCAI guideline for coronary artery revascularization: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on clinical practice guidelines [J]. Circulation, 2022, 145(3):e4-e7.
- [2]NEUMANN FJ, SOUSA-UVA M, AHLSSON A, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization[J]. Eur Heart J, 2019, 40(2): 87-165.
- [3]NISSEN SE, TUZCU EM, SCHOENHAGEN P, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial[J]. JAMA, 2004, 291(9): 1071-1080.
- [4]DAVIGNON J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins[J]. Circulation, 2004, 109(23): III 39-III 43.
- [5]MACIN SM, PERNA ER, FARÍAS EF, et al. Atorvastatin has an important acute anti-inflammatory effect in patients with acute coronary syndrome: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Am Heart J, 2005, 149(3): 451-457.
- [6]ZHENG D, LIANG Q, ZENG F, et al. Atorvastatin protects endothelium by decreasing asymmetric dimethylarginine in dyslipidemia rats [J]. Lipids Health Dis, 2015, 14: 41. doi: 10.1186/s12944-015-0041-2.
- [7]MADHAWAN MV, KIRTANE AJ, REDFORS B, et al.

- Stent-related adverse events >1 year after percutaneous coronary intervention [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75 (6):590-604.
- [8]马征, 龙佳, 贾文浩, 等. 益气凉血生肌方预防冠心病 PCI术后气虚血瘀、痰热互结证患者主要不良心血管事件的随机对照试验[J]. *中医杂志*, 2019, 60(21): 1837-1842.
- [9]贾文浩, 万洁, 马征, 等. 益气凉血生肌方对 PCI术后中医症状及证候要素影响的研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(2): 229-232.
- [10]苏菲, 万洁, 董巧稚, 等. 从 10 年随访探讨益气凉血生肌方改善 PCI术后生存质量的跟踪研究[J]. *世界中医药*, 2016, 11(3): 395-397,401.
- [11]李颖妃, 黄雁超, 金刚, 等. 益气凉血生肌方基于 TLR4/NF-κB 通路减轻内皮细胞炎症损伤的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(7): 882-887.
- [12]汪吴娇, 刘璐, 龙佳, 等. 基于 mTOR1 信号通路研究益气凉血生肌方对人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. *现代中西医结合杂志*, 2023, 32(1): 10-14,37.
- [13]MULLER DW, ELLIS SG, TOPOL EJ. Experimental models of coronary artery restenosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1992, 19(2): 418-432.
- [14]NAIR A, MORSY MA, JACOB S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development[J]. *Drug Dev Res*, 2018, 79(8): 373-382.
- [15]郝伟, 赵晨, 胡思宁, 等. 冠状动脉药物洗脱支架内再狭窄的最新研究进展[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2023, 31(1): 63-68.
- [16]李建军. 血脂异常与动脉粥样硬化关系的现代观念[J]. *中国循环杂志*, 2022, 37(3): 212-214.
- [17]NISSEN SE. Effect of intensive lipid lowering on progression of coronary atherosclerosis: evidence for an early benefit from the Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering(REVERSAL) trial[J]. *Am J Cardiol*, 2005, 96(5A): 61F-68F.
- [18]KAMISHIRADO H, INOUE T, SAKUMA M, et al. Effects of statins on restenosis after coronary stent implantation[J]. *Angiology*, 2007, 58(1): 55-60.
- [19]LU J, CHEN B, CHEN T, et al. Comprehensive metabolomics identified lipid peroxidation as a prominent feature in human plasma of patients with coronary heart diseases [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 899-907. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.032.
- [20]SCHMITZ G, RUEBSAAMEN K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208(1): 10-18.
- [21]ZHOU X, WANG R, ZHANG T, et al. Identification of lysophosphatidylcholines and sphingolipids as potential biomarkers for acute aortic dissection via serum metabolomics [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2019, 57 (3) : 434-441.
- [22]LIU P, ZHU W, CHEN C, et al. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases [J]. *Life Sci*, 2020, 247: 117443. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117443.
- [23]PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine [J]. *Nature*, 1988, 333(6174): 664-666.
- [24]KHADDAJ MR, MATHEW JC, KENDRICK DJ, et al. The vascular endothelium: a regulator of arterial tone and interface for the immune system [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2017, 54(7-8): 458-470.
- [25]FORTE A, HELLSTRAND P, NILSSON BO, et al. The polyamine pathway as a potential target for vascular diseases: focus on restenosis [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2011, 9(6): 706-714.
- [26]TANG WHW, WANG Z, CHO L, et al. Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(22): 2061-2067.
- [27]NISHIDA K, ABIKO T, ISHIHARA M, et al. Arterial injury-induced smooth muscle cell proliferation in rats is accompanied by increase in polyamine synthesis and level [J]. *Atherosclerosis*, 1990, 83(2-3): 119-125.
- [28]SHIMIZU H, KIYOHARA Y, KATO I, et al. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study [J]. *Stroke*, 2004, 35(9): 2072-2077.
- [29]MURAKI A, MIYASHITA K, MITSUISHI M, et al. Coenzyme Q10 reverses mitochondrial dysfunction in atorvastatin-treated mice and increases exercise endurance[J]. *J Appl Physiol*(1985), 2012, 113(3): 479-486.
- [30]林谦, 霍艳明, 郭维琴, 等. 心气虚证中医辨证规律的临床研究[J]. *中西医结合杂志*, 1990, 10(2): 78-81,68.
- [31]韩晶岩. 心气虚血瘀的科学内涵和芪参益气滴丸补气活血的作用机理[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(2): 139-147.

Comparative Study on Effect of *Yiqi Liangxue Shengji Formula* (益气凉血生肌方) and Atorvastatin Tablets on Vascular Injury and Differences in Serum Metabolites in Abdominal Aortic Balloon Injury Model Rats

MAO Tianshi¹, XIE Long¹, GAO Qun¹, PAN Yi¹, JIA Wenhao², LIN Qian¹

1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700; 2. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital

ABSTRACT **Objective** To compare the effects and differences of *Yiqi Liangxue Shengji Formula* (益气凉血生肌方) and atorvastatin on the repair of vascular injury in rats from the perspective of metabolomics. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into sham-surgery, model, traditional Chinese medicine (TCM), and atorvastatin groups, with 6 rats in each group. The rat model was established by balloon-induced abdominal aorta injury. Gavage was started on the day after surgery in all groups of rats. The sham and model groups were given with deionized water, TCM group received *Yiqi Liangxue Shengji Formula* 6 g/(kg·d), and the atorvastatin group treated with atorvastatin suspension 2 mg/(kg·d) for 4 weeks. HE staining was used to observe the pathological morphology of the injured segment of the abdominal aorta; ELISA detection was used to test serum nitric oxide (NO) and C-reactive protein (CRP) levels; UPLC MS/MS technology was used for widely targeted metabolomics detection in serum, and multivariate statistical analysis was used to screen metabolic markers and pathways of two drugs; finally, compare serum levels of key metabolic markers of the above two medications in rats of each group. **Results** Compared with the sham-surgery group, the neointima significantly thickened, the level of NO decreased significantly and the level of CRP increased in serum of the model group ($P < 0.01$); compared with the model group, the degree of arterial intimal hyperplasia in TCM group and atorvastatin group reduced, with an increase in NO levels and a decrease in CRP levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The results of serum metabolomics showed that TCM group obtained 49 metabolic markers and 6 metabolic pathways, while atorvastatin group obtained 41 metabolic markers and 4 metabolic pathways. The two medications jointly regulated 38 metabolites. Glycerophospholipid metabolism and arginine-related metabolism were common metabolic pathways for both medications. Lysophosphatidylcholine (16:1/0:0) [LPC (16:1/0:0)], phosphatidylcholine (15:0/15:0) [PC (15:0/15:0)] were the key metabolites of glycerophospholipid metabolic pathway; ornithine, spermidine were the key metabolites of arginine-related metabolic pathway. The tricarboxylic acid cycle and glutathione metabolism were the unique metabolic pathways of *Yiqi Liangxue Shengji Formula*. Compared with the sham-surgery group, LPC (16:1/0:0), ornithine, and spermidine levels elevated and PC (15:0/15:0) levels decreased in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, LPC (16:1/0:0), ornithine, and spermidine levels decreased, and PC (15:0/15:0) levels increased in both TCM group and atorvastatin group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The degree of LPC reduction (16:1/0:0) was more significant in atorvastatin group compared with that in the TCM group ($P < 0.01$). **Conclusions** Both sham-surgery and atorvastatin could regulate lipid metabolism and arginine-related metabolism, exert the characteristics of lipid-lowering, anti-inflammatory, improve arginine/NO bioavailability, and improve endothelial dysfunction. Atorvastatin showed more advantages in lipid-lowering and anti-inflammatory, while *Yiqi Liangxue Shengji Formula* has unique characteristics in regulating energy metabolism and improving oxidative stress.

Keywords percutaneous coronary intervention; vascular injury; *Yiqi Liangxue Shengji Formula* (益气凉血生肌方); atorvastatin; adverse cardiovascular events; metabolomics

(收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2023-11-22)

[编辑: 邓媛]