



# 四物汤对环磷酰胺所致血虚证治疗后的代谢组学研究

王穆<sup>1,2</sup>, 让蔚清<sup>2</sup>, 张琪<sup>3</sup>, 霍超<sup>1</sup>, 马增春<sup>1</sup>, 王宇光<sup>1</sup>, 颜贤忠<sup>3\*</sup>, 高月<sup>1\*</sup>

(1. 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所 药理与毒理研究室, 北京 100850;

2. 南华大学 公共卫生学院 环境医学与放射卫生研究所, 湖南 衡阳 421001;

3. 军事医学科学院 生物医学分析中心, 北京 100850)

**[摘要]** 目的:通过分析血虚证模型以及给予四物汤反证后小鼠血清和组织提取物的代谢组学变化,结合模式识别的统计分析方法,探讨环磷酰胺所致血虚证及四物汤治疗后的特征性内源代谢谱的改变,为中药经典复方四物汤的作用机制研究提供科学依据。方法:将 C57 小鼠按体重随机分为 3 组:正常对照组、环磷酰胺模型组、四物汤给药组( $10\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),每组 10 只,连续给药 7 d 后股动脉取血,同时取脾脏、胸腺及股骨骨髓。用 600 MHz 超导傅立叶变化核磁共振波谱仪检测,对所得到的氢谱按每段 0.04 进行分段积分并归一化后,用 SIMCA-P10.0 软件进行主成分分析。结果:正常对照组、环磷酰胺模型组和四物汤给药组的血清代谢物组成、胸腺、脾脏、骨髓提取物的成分明显不同。其中环磷酰胺导致血清中的乳酸、3-羟基丁酸、胆碱、葡萄糖的含量下调,低密度脂蛋白、亮氨酸/异亮氨酸含量上调;胸腺提取物中的牛磺酸,胆碱,  $\text{F}\beta$ :  $\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ , *epi-coprostanol*, 乳酸含量下调;脾脏提取物中的乳酸, 3-羟基丁酸, 胆碱,  $\text{F}\beta$ :  $\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ , *epi-coprostanol*, 牛磺酸的含量下调;骨髓提取物中的乳酸、3-羟基丁酸、胆碱、葡萄糖的含量下调。给予四物汤后,以上各成分在不同程度上得到有效逆转。结论:环磷酰胺所致血虚证的可能机制是导致机体脂肪酸  $\beta$  氧化功能紊乱、细胞内外渗透压平衡破坏以及糖酵解功能失调。经典补血方剂治疗血虚证的机制可能与改善线粒体功能,纠正脂肪酸  $\beta$  氧化功能紊乱;稳定细胞膜,维持细胞内外正常渗透压;调节糖酵解,促进机体正常能量代谢有关。

**[关键词]** 四物汤;血虚证;环磷酰胺;代谢组学;核磁共振;主成分分析

血虚证是临床常见的证候之一,各类贫血性疾病、放化损伤等均可有血虚证表现。环磷酰胺作为常用抗肿瘤药物和免疫抑制剂,其主要毒副作用是骨髓造血障碍,可导致骨髓造血干/祖细胞的集落生成能力降低,骨髓细胞凋亡增多,骨髓中  $\text{CD34}^+$  细胞减少,细胞周期紊乱等<sup>[1]</sup>,常作为血虚证研究中的化学损伤类药物。前期研究表明:环磷酰胺可通过破坏细胞分子网络的信号转导,抑制骨髓造血干/祖细胞的迁移,影响其增殖、分化、凋亡而达到对机体造血功能的抑制<sup>[2,4]</sup>。

代谢组学是利用核磁共振技术,在检测生物体

液组成成分的基础上结合模式识别的分析方法发展而来。主要考察生物体系受环境刺激或病理生理扰动后的代谢产物动态变化,分析代谢产物整体的变化轨迹,以此阐述某种病理(生理)过程中所发生的一系列生物学事件及机制。以生物整体性和动态性的变化研究方剂对机体的影响,代谢组学克服了基因组学和蛋白质组学不能提供方剂进入机体后整体功能的信息,与中医药理论的整体观和辨证施治更相吻合<sup>[5]</sup>。

本实验在前期基因组学和蛋白组学的研究基础上,以 C57 小鼠为研究对象,采用环磷酰胺一次腹腔注射的方法建立中医血虚证模型,收集正常组、模型组和四物汤药物反证组小鼠的血清、胸腺、脾脏和骨髓等样品,经过一系列样品前期处理后用 NMR 技术进行测定,并应用主成分分析的模式识别方法分析各组差异,在代谢组学层面上对血虚证及四物汤反证的机制进行进一步观察,探讨环磷酰胺引起的特征性内源代谢谱的改变,为四物汤的作用机制

**[收稿日期]** 2009-09-02

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30672628, 30730112)

**[通信作者]** \* 高月,研究员, Tel: (010) 66931312, E-mail: gaoyue@yahoo.com; \* 颜贤忠,研究员, Tel: (010) 66930305, E-mail: yanxz@proteomics.cn

**[作者简介]** 王穆,硕士研究生,主要从事食物药物毒理的代谢组学研究, E-mail: wangmu2009@163.com



研究提供科学的实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 药物来源及制备** 四物汤的4种药材饮片熟地黄 *Radix Rehmanniae*、当归 *Radix Angelicae Sinensis*、白芍 *Radix Paeoniae Alba*、川芎 *Rhizoma Chuanxiong*, 均购自北京同仁堂中药厂, 经军事医学科学院二所马百平教授鉴定。四物汤按《太平惠民和剂局方》规定的剂量比例称取组成(熟地黄-当归-白芍-川芎15:10:10:6)。经水煎、过滤、浓缩配制成100%药液(即每1 mL药液含生药1 g), 制备完毕后置4℃保存备用。

**1.2 动物与分组** 实验用C57小鼠30只, 体重( $18 \pm 2$ ) g, 购自军事医学科学院实验动物研究中心, 合格证号为SCXK-(军)-2002-001。按体重随机分为正常对照组、环磷酰胺血虚证模型组和四物汤给药组, 每组10只动物, 饲养于普通级动物房, 室内温度( $22 \pm 2$ )℃, 相对湿度30%~40%, 各组小鼠喂常规饲料, 自由饮水。

**1.3 造模及处理** 正常对照组: 一次性腹腔注射与血虚证模型组同体积的生理盐水; 血虚证模型组:  $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 环磷酰胺一次性腹腔注射后, 灌胃给予同等体积的生理盐水; 药物反证组: 造模后每只小鼠灌胃给予四物汤水煎液  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连续给药7 d<sup>[4]</sup>。

**1.4 取材与处理** 各组分别于造模后第7天进行股动脉取血,  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min后取得血清; 并取胸腺、脾脏以及股骨上段骨髓, 置于-80℃冰箱保存。核磁共振测试前的样品准备: 血浆, 常温解冻,  $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清200 μL, 添加0.1% TSP 100 μL, 250 μL D<sub>2</sub>O于5 mm样品管中, 混匀, 备用。组织提取物: ①于水溶性干燥样品中加入550 μL D<sub>2</sub>O (pH 7.4,  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )及25 μL TSP (D<sub>2</sub>O溶液,  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 振荡溶解,  $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清, 加入5 mm样品管中。②于脂溶性干燥样品中加入550 μL CD<sub>3</sub>Cl (99.9%), 振荡溶解,  $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清, 加入5 mm样品管中, 待测<sup>[5]</sup>。

**1.5 NMR数据采集** 血清: 分别采用弛豫编辑脉冲序列CPMG、扩散编辑脉冲序列LED<sub>bp</sub>进行试验, 采用预饱和方式抑制水峰, 饱和时间为2 s, 谱宽8 000 Hz, 采样点数64 k, 累加次数128次。FID信号经过32 k点傅立叶变换转为一维NMR图谱。以

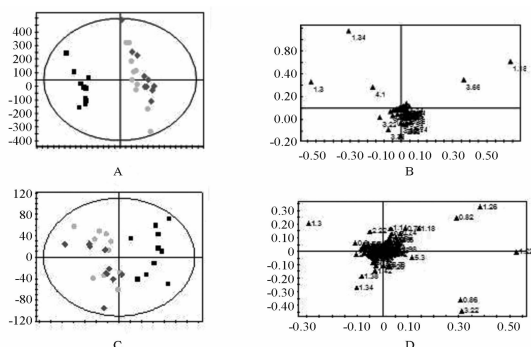
TSP为化学位移参考峰的位置, 设为δ0。调用VNMR程序分别将CPMG谱的δ4.4~0.4以及LED谱的δ6.0~0的谱峰, 按每段0.04进行分段积分。将积分数据归一化之后输出, 用于模式识别分析<sup>[6]</sup>。组织提取物: 采用有预饱和的1D NOESY脉冲序列, 取如下参数: 谱宽8 000 Hz, 混合时间0.15 s, 弛豫延迟时间2 s, 采样点数32 k, 累加次数64次; 在弛豫延迟期间采用预饱和方式抑制水峰。FID信号经过傅立叶变换转换为NMR图谱。以TSP为化学位移参考峰的位置, 并定为δ0。将δ6.0~0.4(水溶性成分)以及δ8~0(脂溶性成分)内的谱图进行分段(每段长度为0.04)并积分, 同时排除包含溶剂峰的部分(δ4.6~5.2), 将所产生的所有积分数据归一化, 以文本文件格式输出, 用于进行模式识别分析<sup>[7]</sup>。

**1.6 主成分分析** 将所得到的数据文件输入SIMCA-P10.0软件包(Umetrics AB, Umeå, Sweden), 进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 必要时加上正交信号校正(orthogonal signal correction, OSC)处理。

## 2 结果

**2.1 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠血清代谢组学变化的影响** 对于血清代谢物的检测选用了2种不同的脉冲序列, 分别是弛豫编辑脉冲序列CPMG和扩散编辑脉冲序列LED<sub>bp</sub>。CPMG序列抑制了血清中的蛋白质等大分子的共振信号, 而选择性的保留了葡萄糖、氨基酸等小分子化合物的信号, 很好的解决了小分子代谢物的信号被大分子覆盖的问题<sup>[8-9]</sup>。对<sup>1</sup>H-NMR CPMG谱和LED谱的主成分分析结果显示, 正常组、血虚证模型组以及四物汤反证组血清代谢物的组成能够明显区分(图1)。从因子载荷图可以进一步发现对这种区分贡献最大的代谢物分别为: 乳酸(δ1.34, δ4.1), 3-HB(δ1.18), 胆碱(δ3.18), 葡萄糖(δ3.46, δ3.74), *N*-连接糖蛋白(δ2.06), VLDL/LDL (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> (δ1.22, δ0.86), N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (δ3.22), Gly-C<sub>3</sub> (δ3.9), UFA (δ5.3)。四物汤处理后上述效应得到逆转; 血虚证模型组中*N*-乙酰糖蛋白(δ2.06), UFA (δ5.3)的含量显著上升, 而给予四物汤处理后并未发生明显的改变。

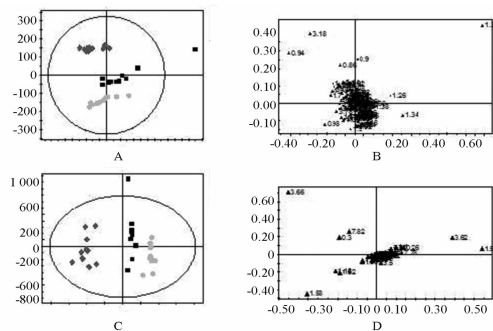
**2.2 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠胸腺提取物的代谢组学变化的影响** 对胸腺水溶性和脂溶性



A, B. CPMG 谱; C, D. LED 谱; A, C. 得分图;  
B, D. 载荷图。■正常组; ●血虚证模型组; ◆四物汤反证组。

图 1 环磷酰胺所致血虚证及四物汤反证小鼠血清  
代谢物变化的主成分分析结果

提取物的主成分分析发现,正常组、环磷酰胺所致血虚证模型组以及四物汤反证组之间能够明显的区分(图 2)。从因子载荷图可以进一步发现对这种区分贡献最大的代谢物分别为:乳酸( $\delta 1.3$ ),胆碱( $\delta 3.22, \delta 3.18$ ),丙氨酸( $\delta 1.46$ ),3-HB( $\delta 1.22, \delta 1.18$ ),牛磺酸( $\delta 3.26, \delta 3.42$ ),亮氨酸/异亮氨酸( $\delta 0.98, \delta 0.94, \delta 0.9, \delta 0.86$ ),PC-C<sub>2</sub>( $\delta 3.66, \delta 3.62$ ),F $\beta$ :RCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO( $\delta 1.58, \delta 1.5$ ),*epi*-coprostanol( $\delta 0.3$ )。其中,环磷酰胺所致血虚证模型的胸腺提取物中,乳酸( $\delta 1.3$ ),胆碱( $\delta 3.22, \delta 3.18$ ),牛磺酸( $\delta 3.26, \delta 3.42$ ),*epi*-coprostanol( $\delta 0.3$ ),3-HB( $\delta 1.22, \delta 1.18$ )的相对含量显著下降,亮氨酸/异亮氨酸( $\delta 0.98, \delta 0.94, \delta 0.9, \delta 0.86$ ),F $\beta$ :RCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO( $\delta 1.58, \delta 1.5$ )的含量显著上升,给予四物汤后,以上效应均得到有效的逆转。同时还发现:与正常组相比,丙氨酸( $\delta 1.46$ )的含量在血虚证模型组中没有明显的变化,而给予四物汤后其含量显著上升。



A, B. 水溶性成分; C, D. 脂溶性成分; A, C. 得分图; B, D. 载荷图。

■正常组; ●血虚证模型组; ◆四物汤反证组(图 3, 4 同)。

图 2 环磷酰胺所致血虚证及四物汤反证小鼠胸腺提取物  
变化的主成分分析结果

2.3 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠脾脏提取物的代谢组学变化的影响 对脾脏水溶性和脂溶性提取物的主成分分析发现,正常组与环磷酰胺所致血虚证模型组以及四物汤反证组之间能够明显的区分(图 3)。从因子载荷图可以进一步发现对这种区分贡献最大的代谢物分别为:乳酸( $\delta 1.34, \delta 1.34$ ),胆碱( $\delta 3.22$ ),牛磺酸( $\delta 3.42, \delta 3.26$ ),3-HB( $\delta 1.26$ ),VLDL/LDL(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>( $\delta 1.22$ ),F $\beta$ :RCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO( $\delta 1.62, \delta 1.58, \delta 1.54$ ),丙三醇( $\delta 3.66, \delta 3.7$ )。其中乳酸( $\delta 1.34, \delta 1.34$ ),胆碱( $\delta 3.22$ ),牛磺酸( $\delta 3.42, \delta 3.26$ ),3-HB( $\delta 1.26$ ),VLDL/LDL(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>( $\delta 1.22$ ),F $\beta$ :RCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO( $\delta 1.62, \delta 1.58, \delta 1.54$ )相对含量显著下降;丙三醇( $\delta 3.66, \delta 3.7$ )的含量显著上升,给予四物汤后上述效应得到有效的逆转,尤其能够改善造模后机体牛磺酸的相对含量。

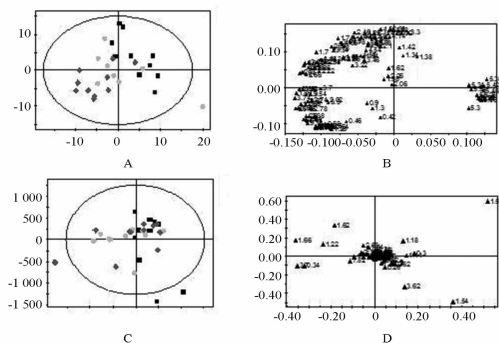


图 3 环磷酰胺所致血虚证及四物汤反证小鼠脾脏  
提取物变化的主成分分析结果

2.4 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠骨髓提取物的代谢组学变化的影响 对骨髓水溶性和脂溶性提取物的主成分分析发现,正常组、环磷酰胺所致血虚证模型组以及四物汤反证组之间能够明显的区分(图 4)。从因子载荷图可以进一步发现对这种区分贡献最大的代谢物分别为:乳酸( $\delta 1.34, \delta 1.3$ ),胆碱( $\delta 3.22, \delta 3.18$ ),牛磺酸( $\delta 3.26$ ),3-HB( $\delta 1.26, \delta 1.22$ ),丙氨酸( $\delta 1.46, \delta 1.5$ ),亮氨酸/异亮氨酸( $\delta 0.86, \delta 0.94, \delta 0.98$ ),*epi*-coprostanol( $\delta 0.3, \delta 0.27$ ),F $\beta$ :RCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO( $\delta 1.46, \delta 1.58, \delta 1.54$ ),VLDL/LDL(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>( $\delta 1.1, \delta 1.14, \delta 1.02, \delta 1.18$ ),PC-C<sub>2</sub>( $\delta 3.62$ )。其中,乳酸( $\delta 1.34, \delta 1.3$ ),胆碱( $\delta 3.22, \delta 3.18$ ),牛磺酸( $\delta 3.26$ ),3-HB( $\delta 1.26, \delta 1.22$ ),丙氨酸( $\delta 1.46, \delta 1.5$ ),*epi*-coprostanol( $\delta 0.3, \delta 0.27$ )含量显著下降;乙醇( $\delta 1.18$ ),葡萄糖

( $\delta 3.46, \delta 3.74$ ),  $\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$  ( $\delta 1.46, \delta 1.58, \delta 1.54$ ),  $\text{VLDL/LDL}(\text{CH}_2)_n$  ( $\delta 1.1, \delta 1.14, \delta 1.02, \delta 1.18$ ),  $\text{PC-C}_2$  ( $\delta 3.62$ ) 的含量显著上升, 给予四物汤后乳酸( $\delta 1.34, \delta 1.3$ ), 胆碱( $\delta 3.22, \delta 3.18$ ), 牛磺酸( $\delta 3.26$ ) 含量回调上升, 乙醇( $\delta 1.18$ ), 葡萄糖( $\delta 3.46, \delta 3.74$ ) 含量进一步上升。

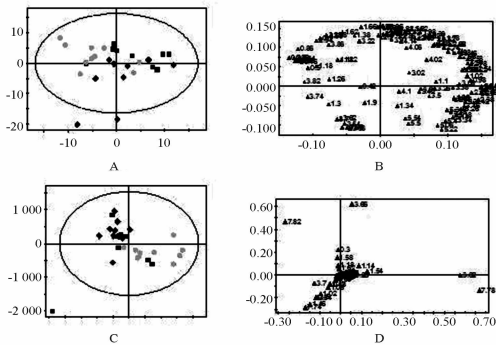


图 4 环磷酰胺所致血虚证及四物汤反证小鼠骨髓提取物变化的主成分分析结果

环磷酰胺所致血虚证模型各样本的代谢物变化见表 1。

表 1 环磷酰胺所致血虚证模型各样本的代谢物变化

成分	血清	胸腺	脾脏	骨髓
乳酸	↓	↓	↓	↓
胆碱	↓	↓	↓	↓
葡萄糖	↓			↑
牛磺酸		↓	↓	↓
乙醇				↑
丙氨酸				↓
VLDL/LDL	↓		↓	↑
丙三醇			↑	
亮氨酸/异亮氨酸		↑		
表甾烷醇		↓		↓
N 连接糖蛋白	↑			
$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	↓			
$\text{F}\beta\text{:CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$		↑	↓	↑

### 3 结论与讨论

正常组、环磷酰胺造模组及四物汤反证组的血清代谢物组成、胸腺、脾脏、骨髓提取物的成分明显不同。乳酸是糖酵解过程正常代谢产物, 在缺氧的条件下由乳酸脱氢酶的催化丙酮酸生成, 维持机体正常的能量代谢。乳酸水平的异常提示机体能量代谢失调<sup>[8-9]</sup>。在环磷酰胺所致血虚证模型中发现乳酸的含量明显改变, 说明机体无氧化功能受损; 四物汤反证后, 能够明显逆转上述效应, 因此可以推测

四物汤能够改善机体的能量代谢。胆碱是乙酰胆碱的重要前体, 是体内的重要的甲基供体, 是能量代谢和脂类代谢的重要参与者<sup>[10]</sup>。胆碱相对含量的降低就进一步说明了血虚证模型中存在着能量代谢功能的损害, 并提示机体可能有脂类代谢的失调。本实验发现四物汤能够明显提高血虚证模型中胆碱含量的降低, 可能与四物汤能够改善机体的能量代谢和脂类代谢有关。牛磺酸是体内一种重要的含硫氨基酸, 具有稳定细胞膜, 协助  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+$  等离子的转运、维持细胞内外正常的渗透压的功能。研究发现四物汤能够改善造模后机体胸腺和脾脏提取物中牛磺酸的相对含量, 提示四物汤在维持细胞膜稳定方面有一定的作用。3-羟基丁酸是脂酸在肝内  $\beta$  氧化后正常的代谢中间产物, 是肝脏输出能源的一种形式。在环磷酰胺所致血虚证模型中均发现 3-羟基丁酸下降, 可能由于环磷酰胺导致脂肪酸的  $\beta$  氧化功能受到抑制所致; 给予四物汤后, 3-羟基丁酸含量明显升高, 说明脂肪酸的  $\beta$  氧化受抑制的现象得到改善。 $\text{F}\beta\text{:RCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$  是脂肪酸  $\beta$  氧化过程中的中间代谢产物, 其浓度的改变反映线粒体的功能状况。本实验发现,  $\text{F}\beta\text{:RCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$  的浓度在造模后发生明显改变, 说明药物损伤所致血虚证模型中存在着线粒体功能紊乱; 给予四物汤后, 上述效应出现逆转, 推测四物汤具有保护线粒体的功能。丙氨酸是体内重要的非必须氨基酸, 有研究显示丙氨酸是淋巴细胞再生及免疫过程中重要的参与者<sup>[11]</sup>。在环磷酰胺模型药物反证组的胸腺水提物中发现, 丙氨酸的含量发生了明显的升高, 可能与四物汤能够改善环磷酰胺免疫抑制作用有关。表甾烷醇 (*epi-coprostanol*) 是广泛存在于动物体内的 27 碳化合物, 由胆固醇在相应酶的催化下氢化生成, 被认为是动物体内重要的抗氧化物质。造模发现此种物质的相对浓度下降, 而给予四物汤后, 此种物质的相对浓度明显上升, 可能与四物汤能够改善机体的抗氧化功能有关。

综上所述, 环磷酰胺所致血虚证的机制可能与导致机体脂肪酸  $\beta$  氧化功能紊乱、细胞内外渗透压平衡破坏、糖酵解功能、抗氧化功能失调有关。经典补血方剂四物汤治疗血虚证的机制可能与改善线粒体功能, 纠正脂肪酸  $\beta$  氧化功能紊乱; 稳定细胞膜, 维持细胞内外渗透压平衡; 调节糖酵解, 促进机体正常能量代谢以及增强机体抗氧化能力、免疫力有关,



其深入的作用机制还有待进一步探索。

#### [参考文献]

- [1] 马增春,高月,刘永学,等. 环磷酸胺所致血虚证小鼠骨髓CD34<sup>+</sup>细胞的变化及其意义[J]. 中国基础医学杂志,2001,7(7):42.
- [2] 杨明会,马增春,窦永起,等. 四物汤对血虚证患者血清蛋白质的影响[J]. 中国中药杂志,2008,33(4):420.
- [3] 刘丽丽,马增春,高月,等. 四物汤对环磷酸胺致血虚证小鼠骨髓蛋白质组的影响[J]. 中国中药杂志,2006,31(14):1172.
- [4] 马增春,谭洪玲,高月,等. 环磷酸胺损伤小鼠骨髓造血的机制[J]. 毒理学杂志,2007,21(4):233.
- [5] Jane Qiu. Traditional Chinese medicine and western science face almost irreconcilable differences. Can systems biology bring them together[J]. Nature, 2007, 448(12):126.
- [6] Lindon J C, Nicholson J K, Holmes E, et al. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids[J]. Conc Magn Reson, 2000, 12(5):289.
- [7] E M Lenz, J Bright, I D Wilson, et al. A <sup>1</sup>H-NMR-based meta-

- bonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33:1103.
- [8] Maria A Constantinou, Stamatios E Theocharis, Emmanuel Mikros. Application of metabonomics on an experimental model of fibrosis and cirrhosis induced by thioacetamide in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 218:11.
- [9] Nicholson J K, Wilson I D. Opinion: Understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism[J]. Nat Rev Drug Discov,2003, 2(8):668.
- [10] Nielsen J, Ytrebo L M, Borud O. Lactate and pyruvate concentrations in capillary blood from newborns[J]. Acta Paediatr, 1994, 83(9):920.
- [11] Plecko B, Stoeckler-Ipsiroglu S, Schober E, et al. Oral beta-hydroxybutyrate supplementation in two patients with hyperinsulinemic hypoglycemia: Monitoring of beta-hydroxybutyrate levels in blood and cerebrospinal fluid, and in the brain by *in vivo* magnetic resonance spectroscopy[J]. Pediatr Res, 2002, 52(2):301.

## NMR-spectroscopy-based metabonomic approach to analysis of Siwutang, a novel prescription, treated blood deficiency in mice

WANG Mu<sup>1,2</sup>, RANG Weiqing<sup>2</sup>, ZHANG Qi<sup>3</sup>, HUO Chao<sup>1</sup>, MA Zengchun<sup>1</sup>, WANG Yuguang<sup>1</sup>, YAN Xianzhong<sup>3\*</sup>, GAO Yue<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;

2. Environmental Medicine and Radio-Hygiene, School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China;

3. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To discover the characteristic changes of metabolic profiles in C57 mice with cyclophosphamide induced blood deficiency and the effect of Siwutang. **Method:** An integrated metabonomic study using high-resolution <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has been applied to investigate the metabolic profiles of serum, aqueous and lipidic extracts of thoracic gland, spleen, bone marrow obtained from control, model group (intraperitoneal injection of cyclophosphamide at a dose of 250 mg · kg<sup>-1</sup>) and Siwutang treated model group. The NMR spectra were integrated in segments of 0.04 ppm and then analyzed by principal component analysis (PCA) using SIMCA-P software to visualize the similarities and differences in metabolic profiles between these groups. **Result:** PCA result showed conspicuous difference in the metabolic profiles between groups. Compared with the control group, the model group contained lower concentration of lactate, 3-hydroxybutyrate, choline, glucose, and higher concentration of VLDL/LDL, leucine/isoleucine in serum. Lower concentration of taurine choline, Fβ;RCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO, Epi-coprostanol and lactate were found in both in thoracic gland extracts and spleen extracts. And in spleen extracts, we also found the lower concentration of 3-HB. In the extracts of bone marrow, the lower concentration of lactate, choline, glucose were observed. When they were dosed with Siwutang 10 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> for 7 days, the effects above-mentioned were reversed. **Conclusion:** The injury established by injecting CTX is a kind of proper model to develop further metabonomics researches. The damage of mitochondria, disorder of energy metabolism and osmoregulation are observed in cyclophosphamide caused blood deficiency model by NMR-based-metabonomics method, and the Siwutang can improve these effects.

[Key words] decoction of four drugs; blood deficiency; cyclophosphamide; metabonomics; NMR; PCA

doi: 10.4268/cjcm20100520

[责任编辑 张宁宁]