

本文引用:李亚梅,宾雨飞,夏伯候,罗弘杉,徐佳,张鹏,龚云,廖端芳,林丽美.基于气质联用技术的补血益母丸治疗气血两虚小鼠的代谢组学研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(1):53-60.

# 基于气质联用技术的补血益母丸治疗气血两虚小鼠的代谢组学研究

李亚梅<sup>1</sup>,宾雨飞<sup>1,2</sup>,夏伯候<sup>1</sup>,罗弘杉<sup>1</sup>,徐佳<sup>1</sup>,张鹏<sup>3</sup>,龚云<sup>3</sup>,廖端芳<sup>1\*</sup>,林丽美<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学药学院湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室,湖南长沙410208;2.湖南省株洲市攸县人民医院,湖南株洲412300;3.株洲千金药业股份有限公司,湖南株洲412007)

**[摘要]** **目的** 研究补血益母丸干预气血两虚模型小鼠内源性代谢物的变化,寻找与治疗气血两虚相关的代谢生物标志物,探讨补血益母丸对气血两虚模型的调节作用及可能机制。**方法** 采用眼眶放血和腹腔注射环磷酰胺建立气血两虚小鼠模型,造模成功后将动物分为模型组、乳酸亚铁组、四物汤组、补血益母丸低剂量组和补血益母丸高剂量组,借助气相色谱质谱联用(GC-MS)技术,对小鼠血清样本代谢物进行检测,采用主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)筛选差异代谢物。应用ELISA法检测小鼠血清中促红细胞生成素(EPO)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素2(IL-2)的含量。**结果** 对照组、模型组和补血益母丸治疗组血清样本能够得到很好的区分,共鉴定出14种潜在生物标志物,补血益母丸给药后气血两虚小鼠的内源性代谢物水平发生不同程度的回调。与正常组相比,模型组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 明显升高( $P<0.01$ ),IL-2、EPO和GM-CSF明显降低( $P<0.01$ )。与模型组相比,补血益母丸低、高剂量组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 含量明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );IL-2、GM-CSF及EPO含量明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。**结论** 补血益母丸可以使气血两虚小鼠的异常代谢有所恢复,其治疗作用可能与机体内14个差异代谢物及3条相关代谢通路的调节有关。

**[关键词]** 补血益母丸;气血两虚;气质联用;代谢组学

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.01.010

## Metabolomics Study of Buxue Yimu Pill on Treatment of Qi-Blood Deficiency Mice by Using GC-MS

LI Yamei<sup>1</sup>, BIN Yufei<sup>1,2</sup>, XIA Bohou<sup>1</sup>, LUO Hongshan<sup>1</sup>, XU Jia<sup>1</sup>, ZHANG Peng<sup>3</sup>, GONG Yun<sup>3</sup>, LIAO Duanfang<sup>1\*</sup>, LIN Limei<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. People's Hospital of You County, Zhuzhou, Hunan 412300, China; 3. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd, Zhuzhou, Hunan 412000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the changes of endogenous metabolites of Buxue Yimu Pill in mice with qi-blood deficiency, find related metabolic biomarkers, and explore the effects and mechanism of Buxue Yimu Pill on qi-blood deficiency model. **Methods** The qi-blood deficiency mouse model was established by orbital exsanguination and intraperitoneal injection of cyclophosphamide. After successful modeling, the animals were divided into model group, ferrous lactate group, Siwu Decoction group, low-dose group and high-dose group of Buxue Yimu Pill. The serum metabolites of mice were measured by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to screen the different metabolites. The content of erythropoietin (EPO), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-2 (IL-2) in mouse serum was detected by

**[收稿日期]** 2020-06-05

**[基金项目]** 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-HUN-21);湖南省自然科学基金项目(2019JJ50443);湖南省教育厅项目(19C1398);湖南中医药大学中药学一流学科。

**[作者简介]** 李亚梅,女,实验师,在读博士研究生,研究方向:中药抗炎免疫药理研究。

**[通讯作者]** \*林丽美,女,教授,博士研究生导师,E-mail:lizasmile@163.com;廖端芳,男,教授,博士研究生导师,E-mail:dfliao@hnu.edu.cn。

**ELISA. Results** The serum samples of the control group, model group and high-dose of Buxue Yimu Pill group could be well distinguished. A total of 14 potential biomarkers were identified. The levels of endogenous metabolites restored in varying degrees after the treatment of Buxue Yimu Pill. Compared with the control group, the serum levels of TNF- $\alpha$  in the model group significantly increased ( $P<0.01$ ), while the levels of IL-2, EPO and GM-CSF in the model group significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the serum levels of TNF- $\alpha$  in the mice with low and high dose of Buxue Yimu Pill were significantly reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while the levels of IL-2, GM-CSF and EPO were significantly increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

**Conclusion** Buxue Yimu Pill can restore the abnormal metabolism of qi-blood deficiency mice, and its therapeutic effect may be related to the regulation of 14 metabolites and 3 related metabolic pathways in the organism.

[**Keywords**] Buxue Yimu Pill; qi-blood deficiency; gas chromatography-mass spectrometry; metabolomics

气血两虚证是一种整体的、综合的病证,多因失血过多或久病过劳或年老体衰等导致气、血功能或脏腑组织的机能活动减退<sup>[1]</sup>。血虚证多见于机体骨髓造血功能减退、造血微环境变化、胸腺及脾脏细胞过度凋亡等;气虚证多见机体免疫功能下降,引起免疫器官、免疫细胞、免疫分子等不同水平的功能损伤。气血互生互用,气推动血运行,血方可滋养全身。若机体血虚不足,则气缺乏血的供养而出现气虚症状;若未及时干预,将发展为气血两虚证<sup>[2]</sup>。

补血益母丸为株洲千金药业独家研制产品,由当归、黄芪、阿胶、益母草和陈皮 5 味中草药组成,具有祛瘀生新、补益气血的双重功效。方中当归性温,味甘辛,归肝、心、脾经,擅补血活血,为君药;黄芪性温,味甘,归脾、胃、肾经,擅补中气、益元气而通调血脉;阿胶味甘,性平,归肺、肾、肝经,擅滋阴补血止血,为补血要药,二者配合能增进益气补血之功,为臣药;陈皮性温,味辛苦,具有温胃散寒、理气健脾的功效;益母草性微寒,味辛苦,归心、肝、膀胱经,活血调经,与陈皮共为佐药<sup>[3]</sup>。

代谢组学是一门新兴学科,与蛋白质组学、转录组学相比,具有其特殊优势。首先,代谢组学放大了基因和蛋白的微小变化,从而使检测更加容易;其次,代谢组学不需要建立全基因测序库且代谢产物的种类远远低于基因和蛋白,从而减少了工作量;最重要的一点,代谢组学是最接近表型的研究方法,通过代谢产物分析可以系统地反映机体的病理生理状态<sup>[4-5]</sup>。

中药具有多成分、多靶点的特点,运用代谢组学方法可以系统地研究中药作用于机体后内源性代谢产物的变化,为研究该药的作用机制提供坚实的佐证基础<sup>[6]</sup>。基于 GC-MS 为分析手段的代谢组学,对生物体液、组织提取物等进行系统分析,找出相关的差异代谢物,阐述相关的代谢路径,对机体整体的状况和功能做出评价,从而探讨其应用于疾病诊断的可行性<sup>[7-8]</sup>。目前,代谢组学技术多用于中药复方,既能

够从整体观角度考察中药复方的疗效,又能从生物标志物及代谢通路层面考察中药复方的作用机制<sup>[9]</sup>。

本研究采用气质联用(GC-MS)技术对各组小鼠血清样本进行测定,采用主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)来筛选差异性代谢物。应用 ELISA 法检测小鼠血清中 EPO、GM-CSF、TNF- $\alpha$  和 IL-2 的含量,寻找与治疗气血两虚有关的代谢生物标志物,探讨补血益母丸对气血两虚模型小鼠的调节作用及其可能机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

昆明小鼠[动物许可证编号:SCKK(湘)2016-0002],雄性,体质量 18~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。所有小鼠均自由饮食饮水,适应性喂养 1 周,称取体质量。

### 1.2 药物

补血益母丸(批号 20181205,规格:12 g $\times$ 10 袋,湖南株洲千金药业股份有限公司);环磷酰胺(批号 18091225,规格:0.2 g/瓶,江苏盛迪医药有限公司);四物汤(白芍 10 g,川芎 10 g,当归 10 g,生地 10 g),购自湖南中医药大学第一附属医院三九颗粒药房;乳酸亚铁口服液(批号 20180815,规格:10 mL $\times$ 10 支,石家庄宇惠制药有限公司)。

环磷酰胺配制成浓度为 10 mg/mL 的溶液,四物汤冲剂配制成浓度为 0.8 g/mL 的溶液,补血益母丸配制成 91 mg/mL 和 364 mg/mL 的混悬液。

### 1.3 主要试剂及仪器

甲醇、无水乙醇(100092683)、二甲苯(10023418)国药集团化学试剂有限公司;甲氧胺(BCBP2843V)、吡啶(STBF7305V)、苹果酸(04027AEV)、N,O-双(三甲基硅烷基)、乙酰胺(BSTFA,BCBR2690V)均购自 Sigma 公司;EPO ELISA 试剂盒(E-EL-M0027c)、GM-CSF ELISA 试剂盒(E-EL-M0032c)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;IL-2 高敏 ELISA

试剂盒(70-EK202HS-96)、TNF- $\alpha$ 高敏ELISA试剂盒(70-EK282HS-96)购自杭州联科生物技术股份有限公司;GC-MS-QP2010气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司);DC-24型24位氮吹仪(上海安谱实验科技有限公司);5415R高速冷冻离心机(Eppendorf公司);多功能酶标仪(5 Lx800, Bio Tek)、水平摇床(TS-1)(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);Vortex QL-901涡旋振荡器(德国维根实验通用设备公司);BSA6202S-CW电子天平(德国赛多利斯公司)。

## 2 方法

### 2.1 气血两虚小鼠模型的建立和干预方法

根据预实验结果和参考方晓艳等<sup>[10]</sup>和袁拯忠等<sup>[11]</sup>方法建立气血两虚小鼠模型,除正常对照组小鼠外,其余小鼠均用于模型建立,分别在第1、3、5、7、9天,每只小鼠予眼眶采血0.3~0.5 mL;第2、4、6、8天,每只小鼠(注射前需禁食不禁水12 h)经腹腔注射环磷酸酰胺80、40、40、40 mg/kg,正常对照组腹腔注射相同体积的生理盐水。于第9天末次眼眶采血后送至湖南中医药大学第一附属医院门诊检验科完成血常规检测分析。

将50只已造模好的小鼠随机分为模型组、乳酸亚铁组(西药阳性药物)、四物汤组(中药阳性药物)、补血益母丸低剂量组和补血益母丸高剂量组,每组10只。补血益母丸人用量为24 g/d,乳酸亚铁口服液人用量为30~60 mL/d,四物汤人用剂量为40 g/d,根据人-小鼠体表面积剂量换算得到小鼠给药剂量。正常对照组与模型组给予10 mL/kg生理盐水灌胃;乳酸亚铁组10 mL/kg(等效剂量的2倍)灌胃;四物汤组12 g/kg(等效剂量的2倍)的剂量灌胃;补血益母丸低、高剂量组分别给予1.82 g/kg(等效剂量的1/2)和7.28 g/kg(等效剂量的2倍)的剂量灌胃。连续灌胃10 d。

给药结束后,摘除小鼠眼球取血,全血存于1.5 mL EP管中,静置3 h后于4℃,13 000 r/min离心15 min,取上清分清至新的EP管中,-80℃保存,备用。

### 2.2 GC-MS法分析血清样本代谢物

2.2.1 样品前处理 取不同组别小鼠血清100  $\mu$ L混合均匀,作为质控样本(QC)。将冻存于-80℃的血清于4℃冰箱解冻3 h;向血清中加入50  $\mu$ L苹果酸(内标,1 mg/mL),涡旋混匀30 s,加入450  $\mu$ L甲

醇除去蛋白,涡旋混合,静置8 min后13 000 r/min离心10 min,取上清液,氮气吹干。

向残渣中加入50  $\mu$ L甲氧胺-吡啶(20 mg/mL),置于70℃预先加热好的水浴锅内反应1 h;再加入100  $\mu$ L BSTFA,混匀,继续70℃下反应1 h,室温下放置2 h,样品于13 000 r/min离心8 min,取上清100  $\mu$ L至250  $\mu$ L内插管,放入进样瓶用于GC-MS检测<sup>[12]</sup>。

2.2.2 GC-MS数据采集 参照周亚敏等实验条件<sup>[13]</sup>,具体设置为:气相-质谱色谱联用仪上采集数据,色谱柱为DB-5MS石英毛细管柱(0.25 mm $\times$ 30 mm, 0.25  $\mu$ m);进样量1  $\mu$ L;载气为氦气(99.999%),流速为1.0 mL/min;分流比10:1;柱温在70℃保持4 min后,以20℃/min的速度升温至110℃,再以8℃/min的速度升温至270℃,并保持5 min。进样口温度为280℃,电子轰击离子源温度为200℃;溶剂延迟时间为6.5 min;质谱扫描范围m/z 35~550。

2.2.3 数据分析 将GC-MS实验结果转化为化合物的保留时间和相对峰面积信息,进行PCA、OPLS-DA,以上分析采用SMICA 14.0软件处理;采用SPSS 21.0软件处理,实验数据t检验分析和单因素方差分析(one-way ANOVA)显著性水平设为P<0.05;生物标志物处理用KEGG数据库。

### 2.3 ELISA法检测血清造血因子和免疫因子的含量

按照ELISA试剂盒说明书,分别检测血清中IL-2、TNF- $\alpha$ 、EPO以及GM-CSF的含量。将存于-80℃的血清逐级解冻,倍比稀释法配制标准品溶液并加入相应的孔中,按顺序将样本(每孔100  $\mu$ L)加入到样本孔中,37℃恒温孵育90 min;弃去液体,甩干;每孔加入100  $\mu$ L的生物素化抗体稀释液,37℃孵育1 h;甩干液体,洗板3次;每孔加入100  $\mu$ L的酶结合物稀释液,37℃孵育30 min;甩干液体,洗板5次;每孔加入90  $\mu$ L的底物溶液,37℃孵育15 min;每孔加入50  $\mu$ L的反应终止液,终止反应;于酶标仪上测其450 nm下每孔的吸光度值,记录结果。

## 3 结果

### 3.1 GC-MS分析血清代谢物

3.1.1 GC-MS图谱与代谢物质指认 对正常组、模型组、补血益母丸给药组和阳性药物组的小鼠血清

样本进行 GC-MS 分析,得到总离子流色谱图(图 1)。经过系统对总离子流色谱图进行噪声处理、基线校正等处理后,共得到 100 个变量峰,对其中相似度大于 80% 的 39 个化合物进行了鉴别。见表 1。

**3.1.2 多元变量数据分析** 在 PCA 模型中,发现正常组和模型组两组具有一定分离度,进一步对两者进行分类处理,类别间的数学模型(OPLS-DA),建立的模型解释能力参数 R<sup>2</sup><sub>Y</sub>、预测能力参数 Q<sup>2</sup> 分别为 0.75、0.59,说明该模型的区分程度和预测程度都较好。在 OPLS-DA 模型中,得分图显示两组样本间分类明显(图 2A),为防止模型过拟合,对两组数据进行模型验证(200 次),模型预测参数 R<sup>2</sup> 小于 0.4, Q<sup>2</sup> 小于 -0.05,表明模型可靠(图 2B),这对后期代谢物分析准确性提供依据。为了更好地对正常组、模型组、补血益母丸给药组和阳性药物组的小鼠血清代谢谱进行分型,我们采用 PLS-DA 和 OPLS-DA 方法对得到的 38 个变量数据进行分析。从图 2C、2D 可知,补血益母丸给药组和阳性药物组均在模型组和正常组之间,由此说明,经药物治疗后,3 组小鼠血清代谢物水平趋向于正常发展,同时也发现,相比于阳性药物组,补血益母丸给药组在代谢物水平恢复能力上较强于阳性西药组和阳性中药组,阳性西药组向正常组恢复效果较好。

**3.1.3 潜在代谢标志物确定** 在分析正常组和模型组时,两者分别在 y 轴的作用两侧,说明两者具有明显的代谢差异(图 2B)。因此,为探究两者差异物,需要在 PLS-DA 模型进行关键变量分析,即通过 VIP 值来筛选差异代谢物, VIP > 1 的变量被认为对分类起着关键作用,见图 3。对筛选的差异代谢物进行显著性检验,同时符合 VIP > 1 且 P < 0.05 的 6 个变量被认为与血虚有潜在关联,并利用 KEGG、HMDB 等数

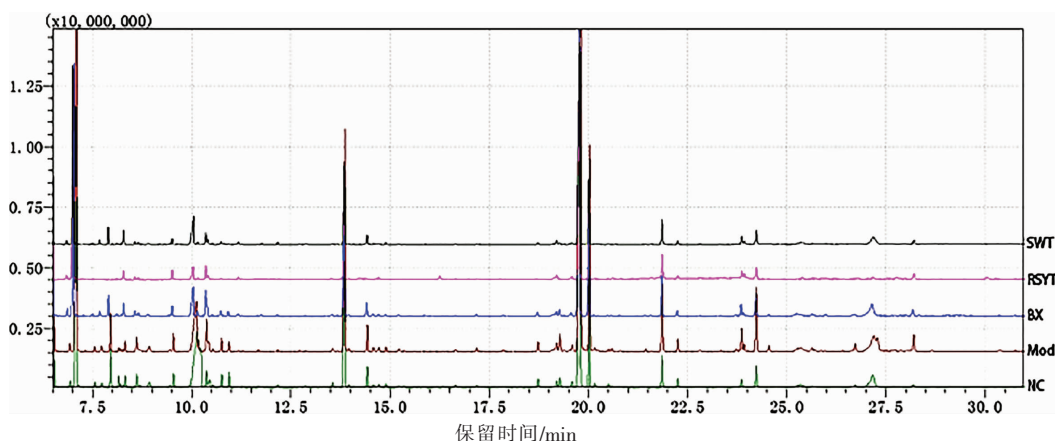
据库对变量结构鉴定并用标准品验证(表 2),从表 2 可知,与正常组相比,模型组小鼠血清中的缬氨酸、尿素、甘氨酸、2-丁烯二酸、脯氨酸、十六酸、亚油酸、十八酸、花生四烯酸水平均显著下调,而 3-羟基丁酸、异亮氨酸、苏氨酸、果糖、葡萄糖含量显著上调。这 14 种物质被确定为气血两虚小鼠血清潜在代谢标志物。

**3.1.4 潜在生物标志物层次聚类分析** 层次聚类分析获得潜在生物标志物的热力图,如图 4 所示。从该热图能够直观显示出 14 种潜在生物标志物在各组之间的含量变化。从图中可以看出,正常组和模型组中潜在生物标志物含量水平能够明显区分,补血益母丸高剂量组和模型组中潜在生物标志物含量水平也有较好区分。

**3.1.5 代谢通路分析** 将所筛选得到的潜在生物标志物输入 MetaboAnalyst 网站中进行通路分析,以 Impact 值大于 0.1 选为潜在相关代谢通路,结果显示这些生物标志物共涉及到 3 条主要通路,分别是 Linoleic acid metabolism(亚油酸代谢),Glycine, serine and threonine metabolism(甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢),Arginine and Proline metabolism(精氨酸与脯氨酸代谢),结果如图 5 所示,由此可知,经环磷酰胺造模后,小鼠机体发生紊乱,主要集中于脂肪酸代谢和氨基酸代谢。

## 3.2 血清中炎症因子和免疫因子含量

与正常组相比,模型组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  明显升高(P < 0.01);与模型组相比,补血益母丸低、高剂量组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  含量明显降低(P < 0.05, P < 0.01)。与正常组相比,模型组小鼠血清中 IL-2、EPO 和 GM-CFS 明显降低(P < 0.01);与模型组相比,补血益母丸低、高剂量组小鼠血清中 IL-2、EPO 和 GM-



注:NC.正常组;Mod.模型组;BX.补血益母丸组;RSYT.乳酸亚铁组;SWT.四物汤组

图 1 各组小鼠血清总离子流色谱图

表1 正常组和模型组血清中已鉴定的主要差异代谢物

序号	$t_R$ /min	名称	变化趋势	VIP	相似度 /%	代谢通路
1	7.109	丙酸		0.50	96	
2	7.331	乙酸		0.81	94	
3	7.560	缬氨酸	↓	1.49 <sup>a</sup>	98	氨基酸代谢
4	7.732	丙氨酸		0.99	95	
5	8.153	丁酸		0.92	83	
6	8.269	天冬氨酸		0.48	80	
7	8.322	乙二酸		0.39	81	
8	8.613	羟基丁酸	↑	1.34 <sup>a</sup>	84	能量代谢
9	8.941	异亮氨酸	↑	1.48 <sup>a</sup>	85	氨基酸代谢
10	10.119	尿素	↓	1.45 <sup>a</sup>	93	氨基酸代谢
11	10.374	丙三醇		0.53	93	
12	10.753	苏氨酸	↑	1.46 <sup>a</sup>	96	氨基酸代谢
13	10.941	甘氨酸	↓	1.47 <sup>a</sup>	92	氨基酸代谢
14	11.077	丁二酸		0.93	85	
15	11.678	2-丁烯二酸	↓	1.18 <sup>a</sup>	94	柠檬酸循环
16	11.767	丝氨酸		0.92	84	
17	13.964	十六烷		0.66	93	
18	14.428	脯氨酸	↓	1.44 <sup>a</sup>	97	氨基酸代谢
19	15.224	戊二酸		0.78	88	
20	16.652	D-核糖		0.57	86	
21	17.189	亚硫酸		0.94	85	
22	17.910	磷酸		0.20	87	
23	18.726	丙三酸		0.55	88	
24	19.202	呋喃二糖		0.68	84	
25	19.283	赖氨酸		0.68	84	
26	19.389	D-果糖	↑	1.14 <sup>a</sup>	86	碳水化合物代谢
27	19.591	D-葡萄糖	↑	1.42 <sup>a</sup>	90	碳水化合物代谢
28	20.036	半乳糖		0.54	88	
29	20.587	葡萄糖酸		0.57	83	
30	20.803	L-半乳糖吡喃糖		0.74	86	
31	21.443	D-甘露吡喃糖		0.95	84	
32	21.589	棕榈反油酸	↓	1.28 <sup>a</sup>	87	脂肪酸代谢
33	22.252	1肌醇		0.32	90	
34	23.929	亚油酸	↓	1.43 <sup>a</sup>	96	脂质代谢
35	24.005	反式十三辛酸		0.59	83	
36	24.236	硬脂酸	↓	1.36 <sup>a</sup>	96	脂肪酸代谢
37	24.552	D-葡萄糖醛酸		0.26	87	
38	25.642	花生四烯酸	↓	1.36 <sup>a</sup>	91	脂质代谢
39	28.199	棕榈酸		0.50	92	

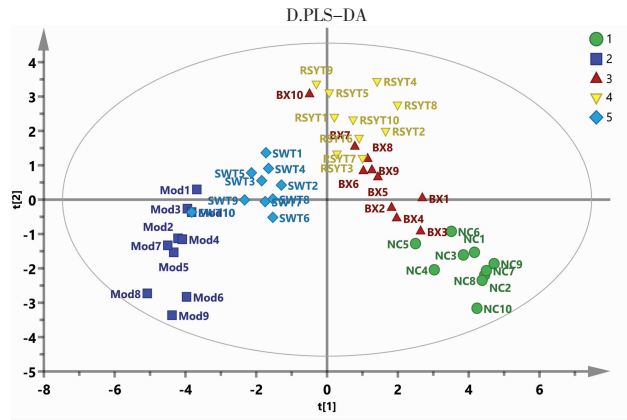
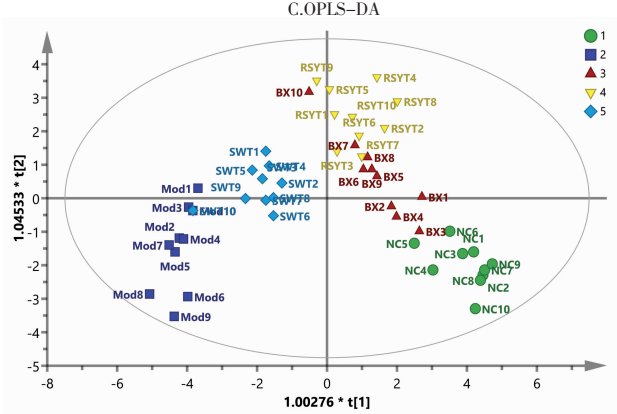
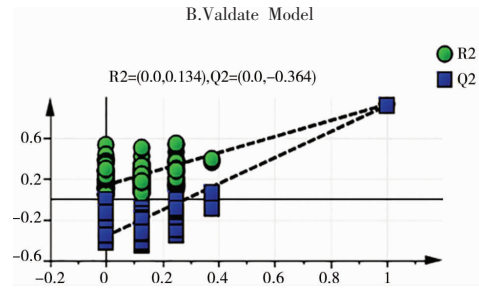
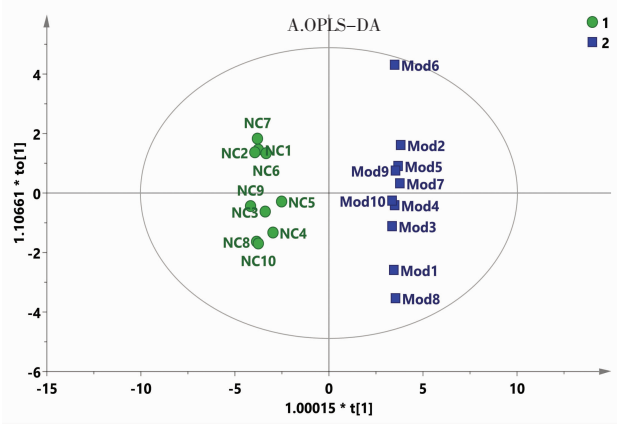
注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ , ↑:含量增加, ↓:含量降低;对变化趋势大的差异代谢物进行代谢通路富集

CFS 均有一定的上升( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 6。

#### 4 讨论

气血两虚证涉及机体多种变化,研究<sup>[14-15]</sup>表明

主要集中于体内神经-内分泌-免疫网络系统,传统药理学研究通常只对单一或少数几个因素进行研究,缺乏整体性和综合性。代谢组学是一门新兴学科,是系统生物学研究中不可或缺的<sup>[16]</sup>,采用一种全



注:NC 正常组;Mod 模型组;BX 补血益母丸组;RSYT 乳酸亚铁组;SWT 四物汤组

图 2 各组 GC-MS 的 OPLS-DA 得分图及 OPLS-DA 模型验证图

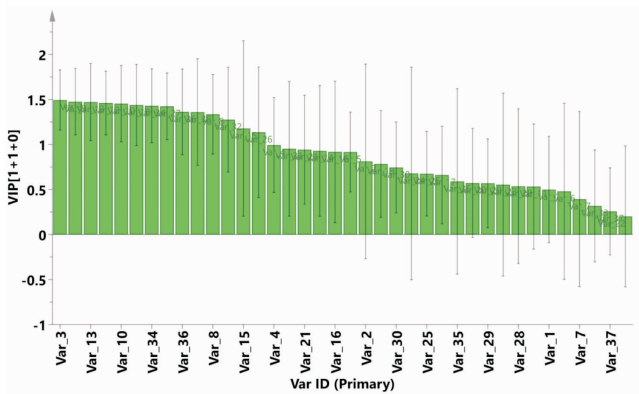


图 3 差异性标志物的 VIP 图

景式研究理念,客观认识机体生理和病理变化实质,系统化地描述机体全局性代谢网络<sup>[17]</sup>。本研究采用 GC-MS 联合模式识别和统计分析方法,对气血两虚小鼠的血液内源性代谢物进行初步探索。

经分析得到了较好的分类模式,分析正常组与模型组、模型组与补血益母丸给药组之间的内在差异物,得到 14 个差异标志物,包括 5 种氨基酸(甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、5 种脂肪酸及其代谢产物(亚油酸、硬脂酸、花生四烯酸、棕榈反

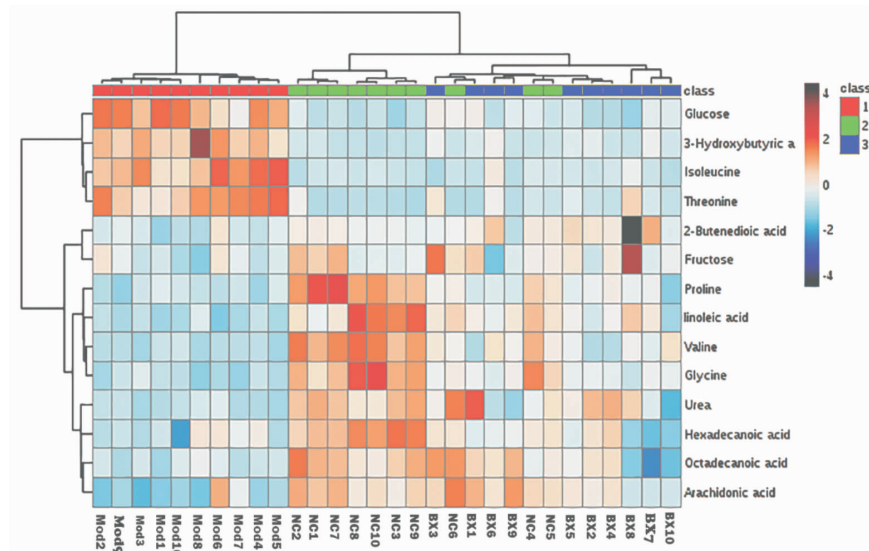


图 4 各组小鼠血清中潜在生物标志物的层次聚类分析

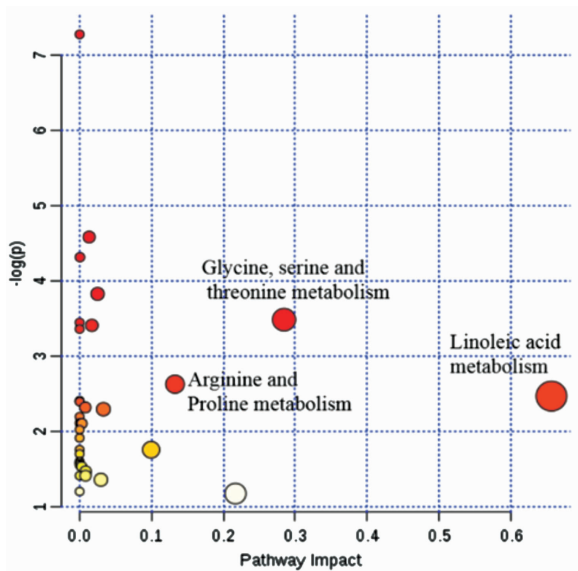


图 5 差异标志物代谢通路分析

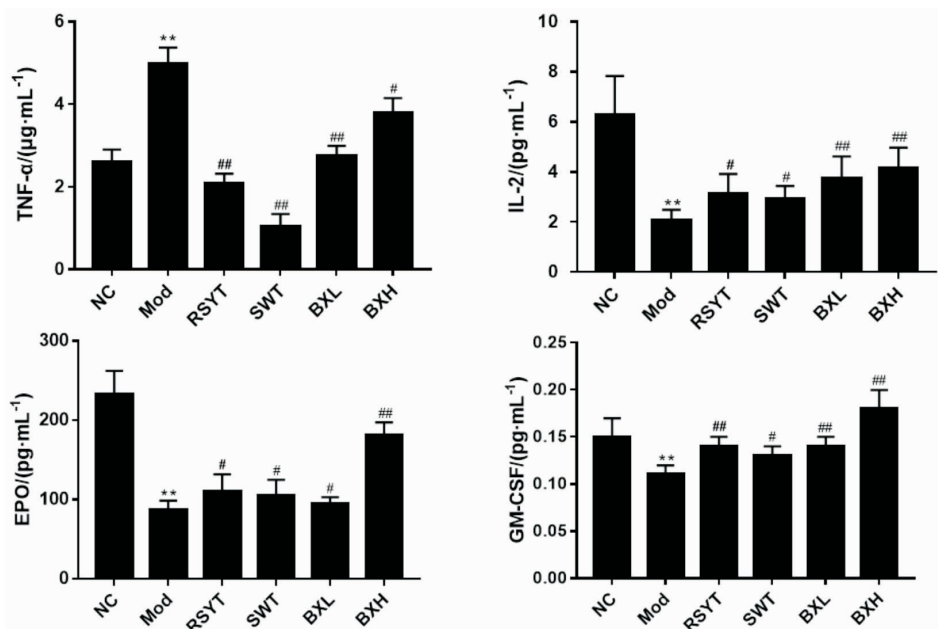
油酸、3-羟基丁酸), 2 种糖类(果糖、葡萄糖), 1 种三羧酸循环中的重要中间产物(2-丁烯二酸)和尿素。

氨基酸是构成蛋白质的基本单位, 对机体免疫系统有着重要作用<sup>[18]</sup>。甘氨酸和脯氨酸为非必需氨基酸, 可调节血清中铁离子含量, 促进血清中蛋白质合成<sup>[19]</sup>。血虚模型小鼠的肝脏会严重受损, 体内红细胞发生溶血, 血红蛋白含量下降, 促使其合成加快, 甘氨酸和脯氨酸代谢加强, 消耗增加, 含量显著降低。此外, 甘氨酸抗肝损伤会大量消耗, 含量进一步降低。缬氨酸是一种支链必需氨基酸和生糖氨基酸<sup>[20]</sup>, 可调节血糖含量、修复组织, 为机体供能。血虚状态

时, 缬氨酸可给肌肉提供额外能量, 防止肌肉衰弱, 故模型组血清中缬氨酸含量显著下降。苏氨酸和异亮氨酸为必需氨基酸, 前者主要维持机体蛋白平衡, 后者是生糖兼生酮氨基酸, 促进血红蛋白形成, 气血两虚小鼠血红蛋白合成量降低, 苏氨酸和异亮氨酸参加相关代谢降低, 因此, 其在血中含量增加<sup>[21]</sup>。尿素是蛋白质的最终代谢产物, 血虚时, 小鼠体内氨基酸代谢受到抑制, 使血清尿素含量显著下降。给予补血益母丸治疗后, 小鼠血清中代谢物向正常组靠拢, 说明补血益母丸治疗气血两虚可能与调节氨基酸代谢相关, 通过调节机体免疫力调节气血。

差异代谢物中有 5 种脂肪酸及其代谢产物。血虚时, 血糖下降, 为补充机体所需能量, 机体动用脂肪在肝脏产生酮体 3-羟基丁酸, 进入血液给机体供能; 此时, 脂类代谢代偿性增强, 亚油酸参与脂肪分解和新陈代谢, 因此, 血虚小鼠血中亚油酸含量降低<sup>[22]</sup>。花生四烯酸可降低血液黏度、调节血细胞功能<sup>[23]</sup>, 在血虚状态下, 小鼠体内花生四烯酸含量降低, 外周血常规紊乱, 血细胞功能降低。经补血益母丸治疗后, 血虚小鼠血清中脂肪酸也向正常组小鼠靠拢, 说明补血益母丸可通过调节脂肪酸类物质发挥抗气血两虚作用。

造模后, 机体内红细胞发生溶血, 血液中氧含量显著下降, 糖酵解与糖异生代谢加强, 使得糖类物质含量上升, 经补血益母丸干预后, 相关能量代谢加强, 机体血液中氧含量恢复正常, 进而缓解血虚状态。



注: NC 正常组; Mod 模型组; RSYT 乳酸亚铁组; SWT 四物汤组; BXL 补血益母丸低剂量组; BXH 补血益母丸高剂量组; 与正常组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

图 6 血清中 TNF- $\alpha$ (A)、IL-2(B)、EPO(C)和 GM-CSF(D)的含量

TNF- $\alpha$  是介导炎性反应的主要细胞因子,参与造血和免疫调节<sup>[24]</sup>。IL-2 是具有广泛生物活性的细胞因子,在机体免疫反应中发挥双向免疫调节作用<sup>[25]</sup>。而 EPO 和 GM-CSF 均为集落刺激因子,能兴奋骨髓造血功能<sup>[1]</sup>。本研究表明补血益母丸可有效下调气血两虚小鼠血清中 TNF- $\alpha$  含量,上调血清中 IL-2 的量,发挥抗炎和免疫调节作用。补血益母丸能促进血清 EPO 和 GM-CSF 的生成,改善骨髓造血情况而达到治疗气血虚的效果。

以 GC-MS 代谢组学技术结合代谢通路调控分析在小鼠血清中潜在的生物标志物,这些代谢物的变化参与了机体的脂肪酸代谢、氨基酸代谢、能量代谢等,经补血益母丸治疗后,其中部分代谢物水平向正常组靠拢。因此,推测补血益母丸主要通过改善肝功能、抗氧化损伤、增强血细胞功能、调节机体免疫和抑制细胞凋亡等途径改善血虚。

综上所述,补血益母丸可通过改善气血两虚小鼠脂肪酸、氨基酸和能量代谢,同时,提高小鼠免疫功能来发挥治疗气血两虚证的作用。

## 参考文献

- [1] 侯伊萍.安神补脑液对小鼠气血两虚模型保护作用研究[D].长春:吉林大学,2019.
- [2] 张文卓,董 慧,黄晓巍.血虚证中医药研究进展[J].中国当代医药,2013,20(1):16-18.
- [3] 尹 胜,张素英,刘 林,等.补血益母颗粒对大鼠药流后子宫出血的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2012,32(10):5-7.
- [4] 杨 波,杨 强,张爱华,等.基于代谢组学技术的中医药研究进展[J].中国医药导报,2019,16(24):24-28.
- [5] KANTHIDA K, WANWIPA V, PRAMOTE C. Informatics for metabolomics[J]. *Translational Biomedical Informatics*, 2016, 939:91-115.
- [6] 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.
- [7] PAPADIMITROPOULOS M P, VASILOPOULOU C G, MAGA-NTEVE C, et al. Untargeted GC-MS metabolomics[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1738: 133-147.
- [8] 覃一枫,魏崑,杭晓敏,等.基于 GC-MS 技术的甘草总黄酮对伊立替康致肠炎小鼠的血浆代谢组学的影响研究[J].中草药,2018,49(24):5836-5842.
- [9] 马素娜,关亚奇,张 森,等.代谢组学技术在中医证候学研究中的应用优势[J].时珍国医国药,2019,30(7):1714-1716.
- [10] 方晓艳,程再兴,苗明三.小鼠气血双虚模型的复制[J].中国医药导报,2008,5(35):9-10.
- [11] 袁拯忠,叶 人,陈增强,等.两种血虚证小鼠模型比较[J].中华中医药学刊,2009,27(6):1265-1266.
- [12] ESCOBAR-MORREALE H F, SAMINO S, INSENER M, et al. Metabolic heterogeneity in polycystic ovary syndrome is determined by obesity: plasma metabolomic approach using GC-MS[J]. *Clinical Chemistry*, 2012, 58(6): 999-1009.
- [13] 周亚敏,肖 榕,胡玉珍,等.玉竹多糖对甲亢阴虚型大鼠干预的血清代谢组学研究[J].中国药理学杂志,2017,52(14):1263-1268.
- [14] 苗明三,周立华,侯江红,等.四种中成药对气血双虚模型小鼠血象及免疫水平的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(11):2025-2028.
- [15] 李艳霞,张建军,王景霞,等.芍药苷对血虚肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴和单胺类神经递质的影响[J].中华中医药杂志,2014,29(8):2591-2595.
- [16] HUAN T, FORSBERG E M, RINEHART D, et al. Systems biology-guided by XCMS online metabolomics[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(5): 461-462.
- [17] CASADEI L, VALERIO M, MANETTI C. Metabolomics: Challenges and opportunities in systems biology studies[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1702: 327-336.
- [18] EULENBURG V, ARMSSEN W, BETZ H, et al. Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2005, 30(6): 325-333.
- [19] 吕子全,郭非凡.氨基酸感应与糖脂代谢调控的研究进展[J].生命科学,2013,25(2):152-157.
- [20] 刘正清,刘绍璞,闫曙光,等.CdTe 量子点与 L-天冬氨酸相互作用的研究及其分析应用[J].化学学报,2011,69(24):2969-2974.
- [21] 宗楷淇.三种血虚证模型代谢组学分析及芍药苷补血作用机制研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2008.
- [22] 纪 鹏.生当归及其不同炮制品干预小鼠血虚模型的代谢组学研究[D].兰州:甘肃农业大学,2015.
- [23] 陶 磊,傅淑霞.花生四烯酸与氧化应激的研究进展[J].中国病理生理杂志,2011,27(11):2233-2236.
- [24] SEN M K, ALMUSLEHI M S M, GYENGESI E, et al. Suppression of the peripheral immune system limits the central immune response following cuprizone-feeding: relevance to modelling multiple sclerosis[J]. *Cell*, 2019, 8(11):1314.
- [25] 杨 名,赵 扬,陈广洁.TNF- $\alpha$  调节 Treg 细胞增殖与功能的研究进展[J].现代免疫学,2013,33(6):505-509.