

本文引用: 刘恃君, 陆玉爱, 侯师艺, 戈玉莹, 夏伯侯, 谢明霞, 李亚梅. 补血益母丸对气血双虚小鼠的毛发代谢组学研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(6): 982-990.

补血益母丸对气血双虚小鼠的毛发代谢组学研究

刘恃君, 陆玉爱, 侯师艺, 戈玉莹, 夏伯侯, 谢明霞*, 李亚梅*
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

[摘要] **目的** 探讨补血益母丸对气血双虚小鼠的毛发代谢组学研究。**方法** 采用腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)及眼眶放血, 建立气血双虚小鼠模型后, 将动物分为模型组、补血益母丸低剂量组和补血益母丸高剂量组, 另设正常组, 并连续 10 d 对小鼠进行灌胃补血益母丸 1.82、7.28 g·kg⁻¹ 干预。通过气相色谱飞行时间质谱(gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, GC-TOF-MS)技术对各实验组小鼠的毛发进行分析, 采用主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)寻找并发现补血益母丸作用于气血双虚模型小鼠的差异代谢物。**结果** 毛发中有 5 个差异性代谢物与 CTX 致免疫低下型气血双虚证相关, 主要涉及酪氨酸代谢(tyrosine metabolism)和初级胆汁酸生物合成(primary bile acid biosynthesis); 经补血益母丸治疗后代谢轮廓趋近正常组, 有 11 个代谢物涉及 3 条代谢通路, 推测补血益母丸对气血双虚证的治疗作用可能通过调控氨基酸代谢有关。**结论** 本研究从毛发代谢组学角度为中医气血双虚病症及补血益母丸的干预提供了氨基酸代谢、胆汁酸代谢机制层面的解释, 部分揭示了补血益母丸益气补血作用机制, 为其临床运用提供了一定理论依据。

[关键词] 代谢组学; 补血益母丸; 气血双虚; 气质联用; 毛发代谢

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.06.008

Hair metabolomics study on Buxue Yimu Pill treating mice with qi-blood deficiency

LIU Shijun, LU Yu'ai, HOU Shiyi, GE Yuying, XIA Bohou, XIE Mingxia*, LI Yamei*
College of Pharmacy/Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

[Abstract] **Objective** To study Buxue Yimu Pill (BXYMP) treating mice with qi-blood deficiency based on hair metabolomics. **Methods** A mouse model of qi-blood deficiency was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CTX) and orbital bloodletting. After modeling, the animals were divided into model group, as well as low- and high-dose BXYMP groups which were intragastrically treated with BXYMP at doses of 1.82 and 7.28 g·kg⁻¹ respectively for 10 consecutive days. Additionally, a normal group was set up for comparison. Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS) was used to analyze the hair of mice from each experimental group. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) were employed to discover and identify the differential metabolites in the mice with qi-blood deficiency after the treatment of BXYMP. **Results** Five differential metabolites in the hair were associated with CTX-induced immunodeficiency of qi-

[收稿日期] 2023-11-09

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2022JJ50008); 湖南省卫生健康委员会 2023 年度科研计划课题(B202313057639); 湖南省教育厅科学研究项目(23A0307, 23B0383); 湖南中医药大学重点学科中药学科(校行发规字[2023]2 号); 2023 年湖南中医药大学研究生创新项目(2023CX153)。

[通信作者] * 李亚梅, 女, 博士, E-mail: yameili@hnu.edu.cn; 谢明霞, 女, 博士, E-mail: xiemingxia0618@163.com。

blood deficiency pattern, mainly involving tyrosine metabolism and primary bile acid biosynthesis; after treatment with BXYMP, the metabolic profile approached that of the normal group, with 11 metabolites involved in three metabolic pathways. It was speculated that the therapeutic effect of BXYMP on qi-blood deficiency pattern may be related to the regulation of amino acid metabolism.

Conclusion This study explains the TCM pattern of qi-blood deficiency and the intervention of BXYMP on it in ways of the mechanisms of amino acid metabolism and bile acid metabolism from the perspective of hair metabolomics. It partially reveals the mechanism of action of BXYMP in supplementing qi and tonifying blood, providing a certain theoretical basis for its clinical application.

[**Keywords**] metabolomics; Buxue Yimu Pill; qi-blood deficiency; gas chromatography time-of-flight mass spectrometry; hair metabolism

气血双虚为中医证候名,是一种整体综合的病证,由于失血过多、长期患病或者是年老体弱、精神压力等原因,易造成人体气血亏虚,从而加快机体对能量的消耗,增加新陈代谢的产物,造成亚健康状态^[1]。中医理论认为“发为血之余”,毛发不仅具有仪表功能,又是体内气血盛衰的外在标志。《杂病源流犀烛》曰:“毛发也者,所以为一身之仪表。”这种仪表含义的描述既概括了毛发的仪表功能,又反映了从仪表的外证探知机体的成熟;同时,毛发荣枯反映气血的盛衰,至今仍然是临床诊疗毛发疾病时最方便、最直观的方法之一^[2]。而且,给予益气补血中药干预调整气血双虚的代谢紊乱,可有效预防亚健康疾病的发生^[3]。因此,从气血双虚诱导亚健康的最终内部表型产物(代谢产物)出发,以外证部位的毛发为对象,进行气血双虚病理机制中药干预的现代医学解释是可行的^[4]。

补血益母丸由当归、黄芪、阿胶、益母草、陈皮5味中药配伍而成,其中“当归-益母草”为核心药物。方中当归性温味甘辛,善补血活血为君药;黄芪性温味甘,善补中气、益精血、通畅血液;阿胶味甘性平,善养阴、止血,为补血要药,二者益气养血,能增强君药之功用,故为臣药。陈皮性温味苦,常温胃、祛寒、理气健脾;益母草性微寒味苦,具有活血化瘀的功效,与陈皮共作为佐药^[5]。全方兼具补益气血、祛瘀生新双重功效,主要用于气血双虚兼血瘀证产后腹痛。刘海燕等^[6]学者发现,补血益母复方在治疗供血不足方面有较好的疗效,适用于气虚血瘀引起的贫血,且能显著改善贫血症状,为治疗供血不足的有效药物。现代药理研究表明,补血益母丸具有补气、补血、抗炎、免疫调节、子宫修复、改善血液循环代谢等药理作用^[7]。然而,补血益母丸对气血双虚的作用机制仍不明确。因此,明确补血益母丸的作用机制,有助于完善补血益母丸的理论研究,为其临床合理

用药提供科学依据。

代谢组学是一种适合复杂体系的研究手段^[8],从整体角度诠释生物体内在的变化状态^[9]。中药代谢的内环境是一个动态过程与代谢组学研究特点相符合,因此,代谢组学对于揭示中药的代谢模式具有独特的优势^[10]。本研究区别其他的传统生物样本,使用头发作为代谢样本,可用于长期和回顾性地测定外来生物暴露和内源性扰动并且与中医“发为血之余”的理论相吻合。与代谢物停留时间有限的传统标本相比,头发作为一种生物生长器在样品稳定性方面具有优势,可以进行“从天到年”的测量,并且易于收集、运输和存储^[11-12]。

为了进一步明确补血益母丸治疗气血双虚证的代谢标志物及代谢通路,本研究基于气相色谱-飞行时间质谱联用仪(gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, GC-TOF-MS)对气血双虚模型小鼠及补血益母丸干预小鼠的毛发样本进行测定。采用主成分分析法(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)筛选差异性代谢物。探讨补血益母丸对气血双虚模型小鼠的调节作用及其可能机制,为气血双虚的病理及补血益母改善气血双虚提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

40只昆明小鼠,动物许可证编号:SCKK(湘)2016-0002,雄性,体质量18~22g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(动物伦理批准号:HN-LL-KY-2016-004-01)。所有小鼠均自由饮食饮水,适应性喂养1周。

1.2 药物

补血益母丸(批号:20181205,规格:12g×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)。环磷酰胺配制成浓度为 10.00 mg·mL⁻¹ 的溶液,补血益母丸配制成 91.00 mg·mL⁻¹ 和 364.00 mg·mL⁻¹ 的混悬液,均用生理盐水作为溶剂配制。

1.3 试剂及仪器

甲醇(德国 CNW Technologies GmbH 公司,批号:67-56-1);氯仿、吡啶(阿达玛斯试剂中国公司,批号:67-66-3、110-86-1);氢氧化钾、浓硫酸(国药集团化学试剂有限公司,批号:1310-58-3、7664-93-9);甲氧铵盐(东京化成工业株式会社,批号:593-56-6);L-2-氯苯丙氨酸(上海恒柏生物科技公司,批号:103616-89-3);饱和脂肪酸甲酯(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,批号:TRC-A144890);气相色谱、PEGASUS HT、质谱仪、色谱柱[美国 Agilent 公司,型号:7890A、8890、LECO、DB-5MS(30 m×250 μm×0.25 μm)];离心机、超低温冰箱(美国赛默飞世尔科技公司,型号:Heraeus Fresco17、Forma 900 series);分析天平(德国赛多利斯公司,型号 BSA124S-CW);研磨仪(上海净信科技有限公司,型号:JXFSTPRP-24);纯水仪(安徽石润科技有限公司,型号:明澈 D24 UV);超声仪(深圳市雷德邦电子有限公司,型号:PS-60AL);烘箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号:DHG-9023A);真空干燥仪(太仓市华美生化仪器厂,型号:LNG-T98)。

1.4 方法

1.4.1 气血双虚小鼠模型的建立 根据本课题组前期研究^[5],建立动物模型。通过小鼠眼眶放血和经腹腔注射环磷酰胺建立气血双虚模型。经血常规分析确认造模成功小鼠,将 30 只已造模好的小鼠随机分为模型组和补血益母丸高、低剂量组,每组 10 只。根据人-小鼠体表面积剂量换算得到小鼠给药剂量。补血益母丸低、高剂量组分别给予 1.82 g·kg⁻¹(等效剂量的 1/2)和 7.28 g·kg⁻¹(等效剂量的 2 倍)的剂量灌胃^[13];正常组与模型组给予 10 mL·kg⁻¹ 生理盐水灌胃,连续灌胃 10 d。给药结束后,取小鼠后颈毛发,并用 2 mL 超纯水和 2 mL 甲醇洗涤两次置于 2 mL EP 管中,-80 °C 保存^[14]。本模型建立成功相关的指标及补血益母丸的干预作用具体见本课题组前期文章^[5]。

1.4.2 毛发样品前处理 取样本(10 ±1) mg 于 2 mL EP 管中,加入 1 mL 1 mol/L 的氢氧化钾溶液,涡旋 30 s 后放入 54 °C 烘箱孵育 23 h;冷却室温后,加入

84 μL 9 mol·L⁻¹ 的硫酸溶液,涡旋 30 s;将样本在 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,转移上清液于 2 mL EP 管中,提取物在真空浓缩器中干燥;向干燥好的样本中加入 1 mL 70% 的甲醇溶液,再加入 5 μL L-2-氯苯丙氨酸,涡旋 30 s 后,冰水浴超声 25 min;将样本 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min;移取 900 μL 上清液于 5 mL EP 管中,再加入 900 μL 氯仿,涡旋 30 s;将样本振荡 20 min^[15];小心移取下层溶液 600 μL,每个样本各取 100 μL 混合成 QC 样本;在真空浓缩器中干燥提取物;向干燥后的代谢物加入 40 μL 甲氧铵盐试剂,轻轻混匀后,放入烘箱中 80 °C 孵育 30 min;向每个样品中加入 50 μL BSTFA,将混合物 70 °C 孵育 1.5 h;冷却至室温,向混合的样本中加入 5 μL 饱和脂肪酸甲酯;然后通过 GC-TOF-MS 对所有样品进行分析。

1.4.3 GC-TOF-MS 数据采集 使用 GC-TOF-MS 进行数据采集。该系统使用 DB-5MS 毛细管柱。进样量 1 μL,He 为载气,前部入口吹扫流量为 3 mL·min⁻¹,气体流速为 1 mL·min⁻¹。温度程序:初始温度 50 °C 1 min;10 °C·min⁻¹,50~310 °C;然后在 310 °C 下保持 8 min。注入、传输线和离子源温度分别为 280、280、250 °C。在电子碰撞模式下,能量为 70 eV。溶剂延迟 6.25 min,在质谱扫描范围为 50~500 m/z 下获得质谱数据。

1.4.4 数据分析 使用 ChromaTOF 软件对质谱数据进行了峰提取、基线矫正、峰对齐等分析。通过 LECO-Fiehn Rtx5 数据库对物质定性。最后,将 QC 样本中检出率 50% 以下或 RSD>30% 的峰剔除^[16]。经过内标的归一化后将得到的数据矩阵导入 SIMCA15.0.2 统计软件进行 PCA 以及 OPLS-DA。根据 VIP 筛选差异代谢物,并利用单变量统计分析方法的 *t* 检验,显著性水平设为 *P*<0.05。利用 PubChem 和 KEGG 生物学数据库进行生物标志物的通路富集分析。

2 结果

2.1 GC-TOF-MS 图谱

对正常组、模型组、补血益母丸高低剂量组的共 40 例小鼠毛发样本进行 GC-TOF-MS 分析,从中提取 724 个峰并对原始数据中的缺失值进行模拟,数值模拟方法为最小值二分之一法进行填补。数据标

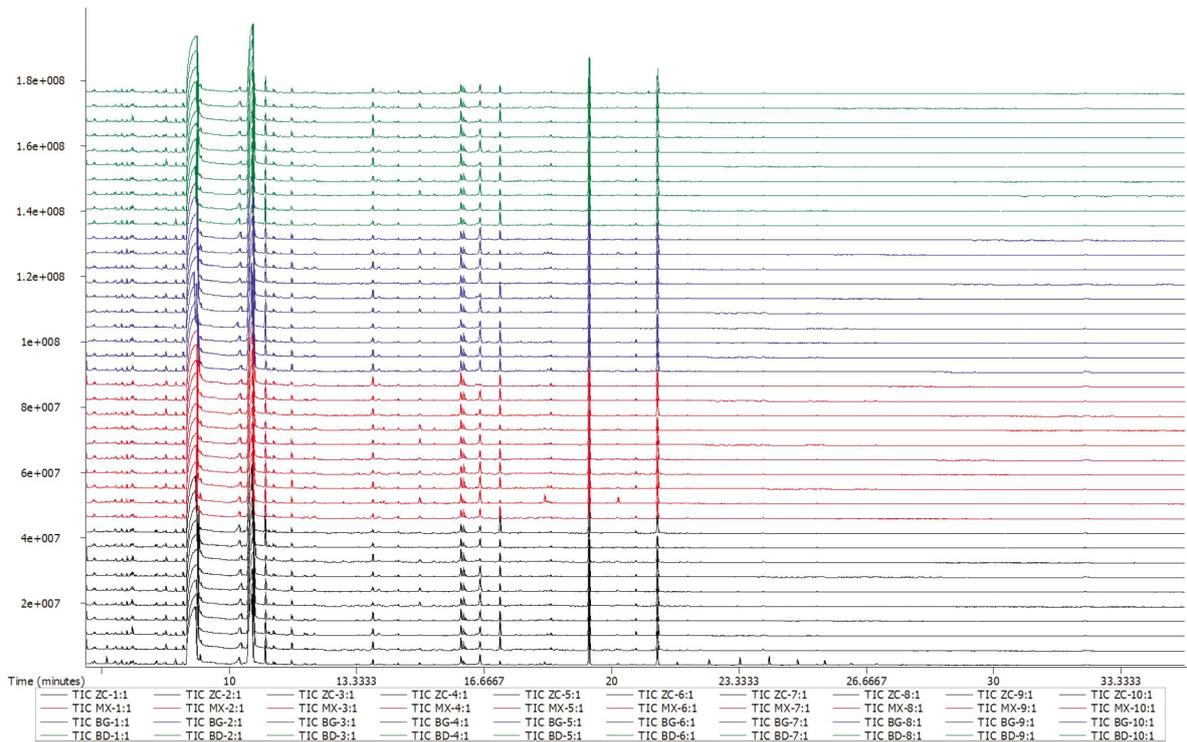


图1 总离子流色谱图(TIC)图谱

准化利用内标进行归一化。经过预处理后 671 个峰被保留,不同的颜色代表不同组别,结果显示(图 1)得到总离子流色谱图的趋势比较相似,证明重复性好,结果可靠。

2.2 QC 验证

在物质提取、检测分析过程中会有系统误差,导致 QC 样品间存在差异。差异越小说明整个方法稳定性越好数据质量越高。本次实验抽取了 5 份 QC 样品数据用于评估实验的可重复性和仪器稳定性。对 5 份 QC 样本进行 PCA 分析,如图 2 所示;其散点图分布较集中,说明整个实验仪器的稳定性较好,误差小,实验的数据是稳定可靠的。并且内标在 QC 样品中峰面积的 RSD 为 4.49%, $RSD \leq 30\%$ 说明仪器数据采集稳定。

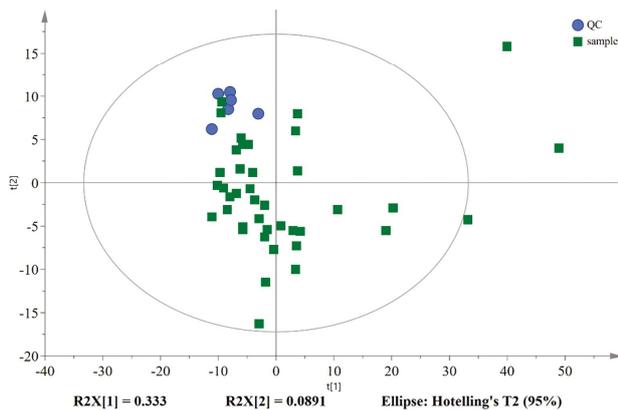


图2 QC 样本 PCA 得分图

2.3 多元变量数据分析

对得到代谢物数据进行 PCA 分析,建立模型参数 $R^2X=0.77$, $Q^2=0.596$,模型分析了 77%的原始数据,累计贡献率为 56.9%。如图 3 所示,样品集中分布于散点图的椭圆内,证明模型拟合效果较好。正常组和模型组两组间有分离趋势,但存在部分交叉重叠。补血益母丸高剂量组和补血益母丸低剂量组分布在模型组和正常组之间,表明经药物治疗后,补血益母丸能够显著改善模型组代谢物水平趋向于正常发展。

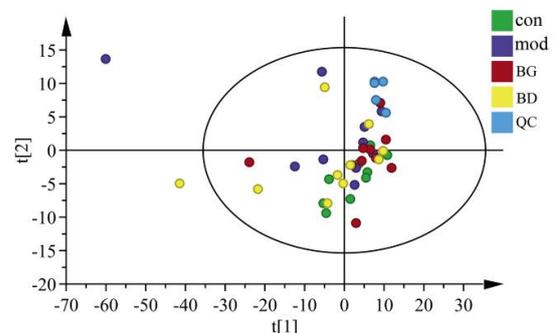


图3 基于 GC-MS 的多组比较 PCA 得分图

注:con.正常组;mod.模型组;BG.补血益母丸高剂量组;BD.补血益母丸低剂量组。

为了获得更高水平的群体分离,筛选补血益母丸组治疗气血双虚的可能机制,应用了 OPLS-DA 进一步对组间进行分析处理,如图 4A 所示,模型组

与正常组显著的位于两侧,说明两者代谢组数据之间存在显著差异。建立的模型解释能力参数 R^2X 预测能力参数 Q^2 分别为 0.983、0.934,说明该模型具有较好区分能力以及预测能力。如图 4C 所示,模型组和补血益母丸高剂量组也能完全区分,说明给药后机体内源性代谢物发生显著变化。其模型解释能力参数 R^2Y 、预测能力参数 Q^2 分别为 0.996、0.980。如图 4E 所示,模型组较补血益母丸低剂量组比较,其模型解释能力参数 R^2X 、预测能力参数 Q^2 分别为 0.986、0.968。200 次置换检验结果也显示该模型有效,模型组与正常组模型组 R^2 和 Q^2 的截距分别为 0.703、-1.150,补血益母丸高剂量 R^2 和 Q^2 的截距分别为 0.795、-0.989,模型组较补血益母丸低剂量 R^2 和 Q^2 的截距分别为 0.434、-0.943,均可用于其差异标志物的筛选。

2.4 潜在代谢标志物确定

确认模型可进行差异代谢物筛选后,进一步对差异的标志代谢物进行筛选,以解释补血益母丸治

疗气血双虚的机制,在 OPLS-DA 模型进行关键变量分析,使用 $P<0.05$ 、 $VIP>1$ 的原则,对筛选的差异代谢物进行显著性检验,筛选得到的变量被认为与气血双虚有潜在关联。与正常组相比,模型组小鼠毛发中的对苯二甲酸、二十四碳烷含量显著下调,香草酸、粪甾烷酸、3,4-二羟基扁桃酸含量显著上调,这 5 种物质可能为气血双虚小鼠毛发潜在代谢标志物,见表 1。在模型组与补血益母丸高、低剂量组中,异亮氨酸、脱氢莽草酸、二十四(碳)烷、(S)-甘露醇酸、2,4,6-三羟基二苯甲酮含量显著上升。香草酸、环亮氨酸、三甲基赖氨酸、皮质酮 2、2-脱氧-D-半乳糖 2、酪胺含量显著下调,这 11 种物质可能为补血益母丸对气血双虚小鼠毛发代谢机制潜在标志物,见表 2—3。

将筛选差异代谢物的结果以火山图的形式进行可视化,结果如图 5A、C、E 所示,散点颜色代表最终的筛选结果,红色表示显著上调的代谢物,蓝色表示

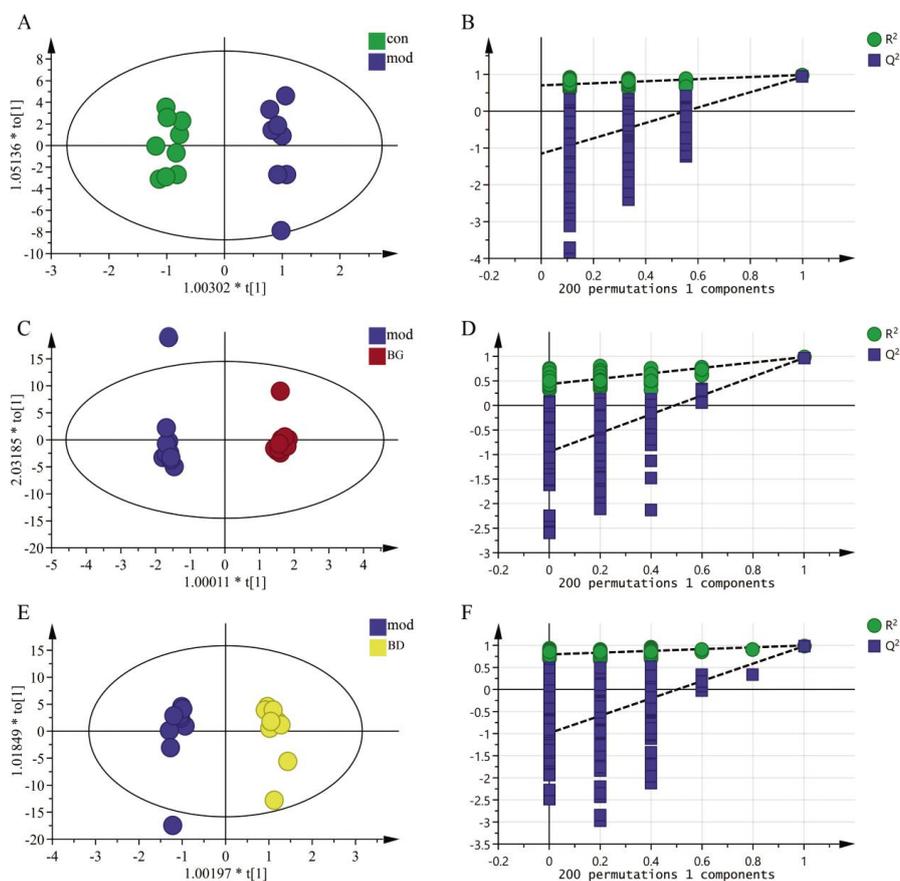


图4 各组 OPLS-DA 得分图(A,C,E)及其置换检验(B,D,F)

注:con.正常组;mod.模型组;BG.补血益母丸高剂量组;BD.补血益母丸低剂量组。

表 1 正常组与模型组毛发中主要代谢差异物

名称	t_R/min	VIP	P 值	变化趋势
对苯二甲酸	16.82	1.73	0.011	↓
香草酸	16.53	1.82	0.037	↑
二十四碳烷	22.57	1.83	0.045	↓
粪甾烷	26.38	2.98	0.031	↑
3,4-二羟基扁桃酸	18.06	2.76	0.026	↑

表 2 模型组与高剂量组毛发中主要代谢差异物

名称	t_R/min	VIP	P 值	变化趋势
异亮氨酸	10.75	1.59	0.027	↑
香草酸	16.53	1.75	0.037	↓
脱氧莽草酸	16.70	1.29	0.020	↑
环亮氨酸	9.48	1.76	0.042	↓
三甲基赖氨酸	14.52	1.38	0.036	↓

表 3 模型组与低剂量组毛发中主要代谢差异物

名称	t_R/min	VIP	P 值	变化趋势
二十四碳烷	22.57	2.90	0.013	↑
皮质酮 2	28.10	1.96	0.024	↓
(S)-甘露醇酸	13.12	1.79	0.048	↑
2-脱氧-D-半乳糖 2	16.66	1.97	0.031	↓
2,4,6-三羟基二苯甲酮	20.86	2.79	0.014	↑
酪胺	18.04	2.97	0.005	↓

显著下调的代谢物,灰色为非显著差异的代谢物。并分别对正常组与模型组,模型组与补血益母丸高剂量组的差异代谢物进行 ROC 曲线分析反应标

志物的灵敏度和可靠度,结果如图 5B、D、F 所示,ROC 曲线靠近左上角,即灵敏度越高,误判率越低,曲线下面积 AUC 均接近 1,表现出较好的分类效果。模型组与正常组敏感度为 87.5%,特异性为 73.3%;模型组与补血益母丸高剂量组敏感度为 70%,特异性为 84%;模型组与补血益母丸低剂量组敏感度为 85%,特异性为 78.3%。

2.5 潜在生物标记物层次聚类分析

层次聚类分析将具有相同特征的代谢物归为一类,发现代谢物在不同组间的变化特征。对差异代谢物

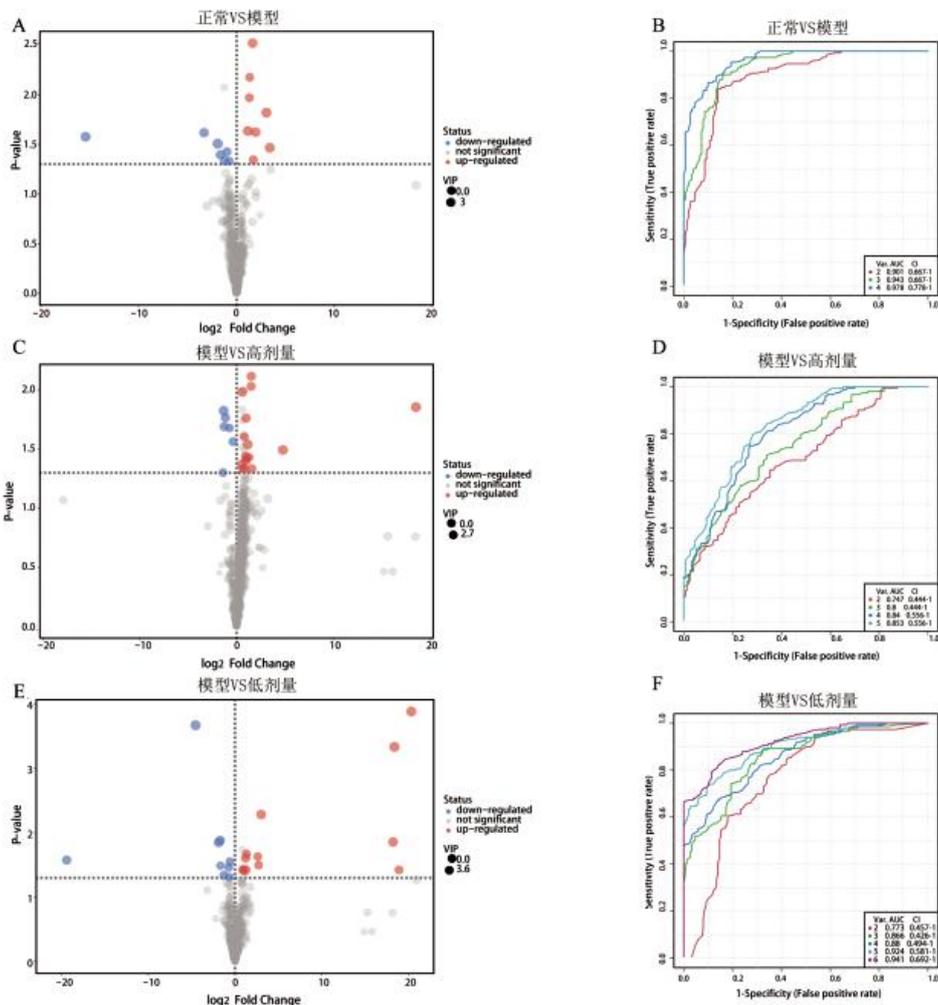


图 5 各组火山图及多变量 ROC 曲线

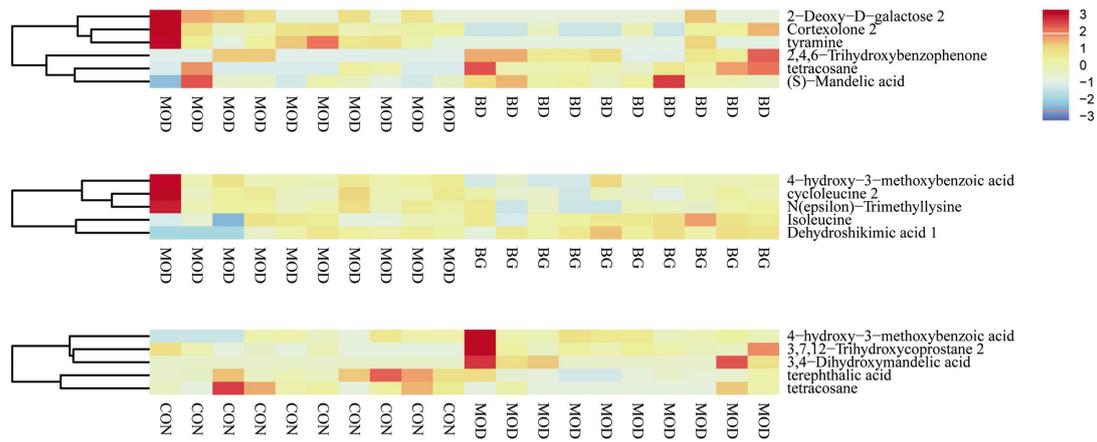


图 6 各组层次聚类热图

注: con.正常组; mod.模型组; BG. 补血益母丸高剂量组; BD. 补血益母丸低剂量组。

的定量值计算欧式距离矩阵(euclidean distance matrix),将差异代谢物进行聚类以热图进行可视化,如图 6 所示。正常组和模型组中差异标志物含量水平能够明显区分,模型组与给药组也能明显区分。该热图能够反映出不同组分之间可能存在的生物标记物的变化情况。

2.6 差异代谢物的代谢通路分析

对差异代谢物进一步代谢通路分析,找到与代谢物差异相关性最高的关键通路。将代谢差异物输入 KEGG、PubChem 等权威代谢物数据库进行映射,对应物种的通路数据库进行搜索和代谢通路分析。将代谢通路分析的结果以气泡图进行可视化,这些差异代谢途径的显著性由 *P* 值和富集因子决定的,气泡较大、颜色较深的代谢途径越为显著,如图 7A 所示,大鼠造模后共 5 个差异代谢物参与了 2 条不

同的代谢通路,为酪氨酸代谢(tyrosine metabolism)和初级胆汁酸生物合成(primary bile acid biosynthesis)。由此可知,经环磷酰胺造模后,小鼠机体发生紊乱,主要集中于氨基酸代谢和胆汁酸合成。如图 7B 所示,经补血益母丸治疗后的 11 个差异代谢物参与了 3 条代谢途径,包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解(valine, leucine and isoleucine degradation)、氨基酰-tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)。结果表明,经补血益母丸治疗后,体内的代谢紊乱得到改变,主要集中在氨基酸代谢。

3 讨论

本实验采用放血和注射环磷酰胺建立了有中医

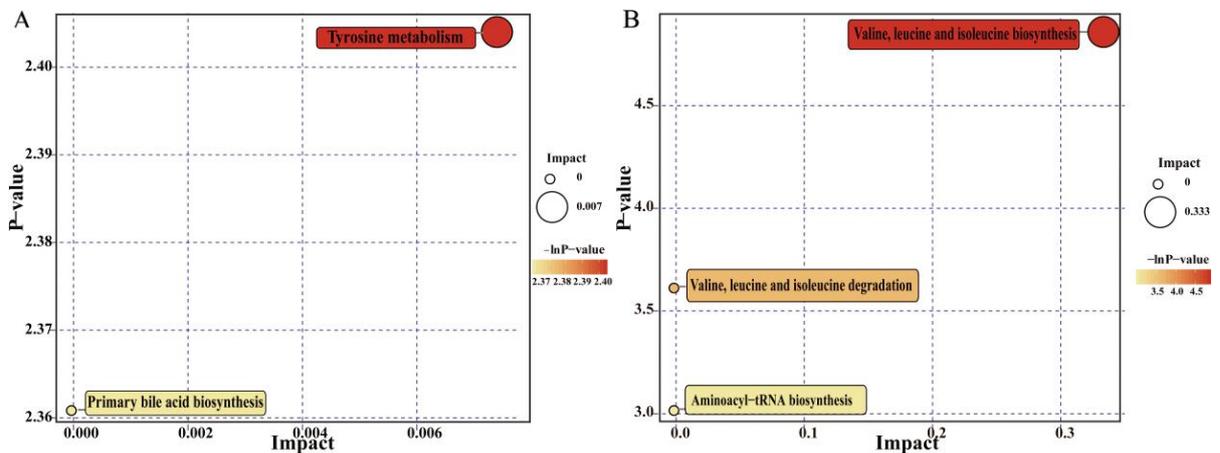


图 7 代谢通路图

注: A. 正常组与模型组; B. 模型组与补血益母丸组。

药特色的气血双虚小鼠模型,其气血双虚状态的持续时间相对较长,有利于中药药效的表达^[17]。当前对气血双虚发病机制的研究主要集中在基因多态性和基因表达差异等方面。但是,中医气血双虚是先天遗传和后天环境共同影响的结果,单靠基因的差异无法全面解释其发生的分子机制^[18]。本研究采用GC-TOF-MS联合模式识别和统计分析方法,基于代谢组学对气血双虚小鼠的毛发内源性代谢物及补血益母丸对气血双虚的内在分子机制进行初步探索。

代谢组学研究结果显示,气血双虚证小鼠体内受较大扰动的代谢通路初级胆汁酸生物合成和酪氨酸代谢。胆汁酸是胆固醇在肝脏分解代谢的产物,初级胆汁酸是由肝中胆固醇经肝细胞通过多步酶促反应合成的^[19],初级胆汁酸生物合成通路中主要的代谢差异物为5- β -胆碱-3 α ,7 α ,12 α -三醇(5- β -Cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol)。其是肝脏中初级胆汁酸、鹅去氧胆酸和胆酸生物合成的中间体^[20]。血虚时,人体血糖下降,为补充机体所需能量,胆汁酸合成增多,促进脂肪的分解,缓解血虚时的血糖下降。因此,在模型组中初级胆汁酸生物合成通路中代谢差异物5- β -胆碱-3 α ,7 α ,12 α -三醇上调。结果说明初级胆汁酸生物合成与气血双虚证患者的心悸、头晕、免疫功能紊乱疾病相关^[21]。

氨基酸是人体内起着非常关键的作用的物质,它不仅是构成蛋白质的基本单元,而且还是多种重要含氮化合物的前驱体。酪氨酸(L-tyrosine)是一种非常重要的营养必需氨基酸,在人体和动物的新陈代谢、生长发育中发挥着非常关键的作用,还具有调节情绪和刺激神经系统的作用,此外还有帮助加快体内新陈代谢,治疗慢性疲劳等疾病的功效^[22]。酪氨酸代谢通路中主要的差异代谢物为3,4-二羟基扁桃酸(3,4-Dihydroxymandelic acid, DHMA),DHMA是一种有效的抗氧化剂和自由基清除剂。DHMA在酪氨酸代谢中是去甲肾上腺素的代谢产物,而左旋酪氨酸产生的左旋3,4-二羟基苯丙氨酸(左旋多巴)可以增加儿茶酚胺(多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素)的合成和释放^[23]。模型组中DHMA水平高于正常组,导致其上游代谢物肾上腺素水平增加。肾上腺素分泌增多可见焦虑不安、面色苍白、眩晕、出汗、四肢发冷、无力、心悸,短时的血乳酸或血糖升高等。而气血双虚人群活动时会出现多汗、气短、乏力、

四肢发冷的表现,与肾上腺素分泌增多的表现相似。结果提示酪氨酸代谢与气血双虚证患者的失血过多、久病过劳或年老体衰精神紧张负性情绪密切相关。

经补血益母丸治疗后,气血双虚证小鼠体内受较大扰动的代谢通路为氨基酸代谢。氨基酸可以利用自身及其代谢产物,对机体的生命活动和细胞基因表达的信号转导、免疫、抗氧化、抗应激等进行调控,对神经和内分泌产生影响,这些调节影响着生长发育、生产以及健康状况^[24-25]。异亮氨酸属于支链氨基酸,主要在肌肉中分解代谢。异亮氨酸(isoleucine)是蛋白质和葡萄糖代谢的调节器,也是维持淋巴细胞敏感性与免疫细胞功能所必需的功能物质^[26],经给与补血益母丸后异亮氨酸水平上调,说明促进其维持机体各免疫细胞的功能,从而增强机体免疫力。以上结果表明,补血益母丸治疗气血双虚可能与调节氨基酸代谢相关,通过改善气血双虚患者氨基酸代谢,进而调节机体免疫力恢复气血平衡。

本研究以GC-TOF-MS代谢组学技术分析在小鼠毛发中潜在的生物标志物,结果显示气血双虚改变了机体的氨基酸代谢、胆汁酸代谢等,经补血益母丸治疗后,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、抗氧化损伤和调节机体免疫等途径改善气血双虚。综上所述,补血益母丸可能通过回调氨基酸代谢紊乱从而发挥对气血双虚的调节作用。同时,提高小鼠免疫功能来发挥治疗气血双虚证的作用。特别是缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成代谢有关,这为后续从代谢水平阐释补血益母丸治疗气血双虚的生物学机制奠定了实验基础。但由于人体内氨基酸代谢复杂多样,尚有很多未涉及的氨基酸代谢通路,未来尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 毕建璐. 补中益气丸干预气虚质的临床观察及其血浆代谢组学机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [2] 刘先利, 刘宝利. 基于中医古籍文献探讨血虚证病因、症候及治则治法[J]. 北京中医药, 2020, 39(3): 262-265.
- [3] 刘芳, 张胜. 疏肝养血法治疗斑秃的研究概况[J]. 中医临床研究, 2019, 11(32): 139-142.
- [4] 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.

- [5] 李亚梅, 宾雨飞, 夏伯候, 等. 补血益母丸对气血双虚模型小鼠的药效作用研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(3): 158-164.
- [6] 刘海燕, 金季玲, 张士表, 等. 补血益母颗粒治疗功血的临床观察[J]. 光明中医, 2013, 28(3): 515-516.
- [7] 吴梦瑶, 张鹏, 龚云. 补血益母丸/颗粒化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 1037-1043.
- [8] 刘萍, 王平, 陈刚, 等. 应用代谢组学探讨中医药复杂理论体系的研究思路和方法[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 993-998.
- [9] WANG M, CHEN L, LIU D, et al. Metabolomics highlights pharmacological bioactivity and biochemical mechanism of traditional Chinese medicine[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2017, 273: 133-141.
- [10] 黄晓晨, 宿树兰, 郭建明, 等. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考[J]. 中草药, 2014, 45(2): 147-153.
- [11] CAPLAN Y H, GOLDBERGER B A. Alternative specimens for workplace drug testing[J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2001, 25(5): 396-399.
- [12] CHANG W C, WANG P H, CHANG C W, et al. Extraction strategies for tackling complete hair metabolome using LC-HRMS-based analysis[J]. *Talanta*, 2021, 223(Pt 1): 121708.
- [13] 李亚梅, 宾雨飞, 夏伯候, 等. 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.
- [14] YANG Y, YIN Y Q, TANG X L, et al. Evaluating different extraction approaches for GC-MS based metabolomics analysis of the giant pandas' fur[J]. *Toxics*, 2022, 10(11): 688.
- [15] DELPLANCHE T D J, DE SEYMOUR J V, TONG C, et al. Analysis of sequential hair segments reflects changes in the metabolome across the trimesters of pregnancy[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):36.
- [16] DUNN W B, BROADHURST D, BEGLEY P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(7): 1060-1083.
- [17] 田峰, 张蕙, 任连生. 加味当归补血颗粒对环磷酰胺的骨髓抑制及荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药物与临床, 2004, 4(6): 445-448.
- [18] 肖雅. 桂附地黄丸干预阳虚体质的临床观察及血浆代谢组学机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [19] 居永慧, 姚卫峰, 张丽. 胆汁酸代谢在中药研究中的应用进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2360-2367.
- [20] FURSTER C, WIKVALL K. Identification of CYP3A4 as the major enzyme responsible for 25-hydroxylation of 5beta-cholestane-3alpha, 7alpha, 12alpha-triol in human liver microsomes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1437(1): 46-52.
- [21] 唐晓波. 再生障碍性贫血中医证候分析[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [22] ZHENG P, CHEN J J, HUANG T, et al. A novel urinary metabolite signature for diagnosing major depressive disorder[J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(12): 5904-5911.
- [23] 李超, 鞠建庆, 潘文慧, 等. 基于血清代谢组学的高血压病中医证型代谢模式差异分析[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5515-5520.
- [24] XIA Z, CHOLEWA J M, ZHAO Y, et al. A potential strategy for counteracting age-related sarcopenia: Preliminary evidence of combined exercise training and leucine supplementation[J]. *Food & Function*, 2017, 8(12): 4528-4538.
- [25] CEMIN H S, TOKACH M D, WOODWORTH J C, et al. Branched-chain amino acid interactions in growing pig diets[J]. *Translational Animal Science*, 2019, 3(4): 1246-1253.
- [26] LES I, DOVAL E, GARCÍA-MARTÍNEZ R, et al. Effects of branched-chain amino acids supplementation in patients with cirrhosis and a previous episode of hepatic encephalopathy: A randomized study[J]. *The American Journal of Gastroenterology*, 2011, 106(6): 1081-1088.

(本文编辑 苏维)