DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.07.027

基于血小板代谢组学探究补阳还五汤对气虚血瘀证的影响

张国瑗[1,2],李瑛[3],王紫艳[3],孙明谦[3],刘建勋[3]
(1.中国中医科学院博士后科研流动站,北京 100700;2.中国中医科学院西苑医院临床药理研究所,北京 100091;3.中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,北京 100091)

摘要:目的 利用代谢组学方法研究气虚血瘀证大鼠模型血小板中的代谢物变化情况,并进一步阐释补阳还五汤对气虚血瘀证的干预作用。方法 将30只SD大鼠(Sprague Dawley Rats)随机分为正常组、模型组、补阳还五汤组。模型组通过水环境多平台睡眠剥夺系统建立睡眠剥夺模型,补阳还五汤组为在造模成功之后给药2周,给药的同时加睡眠剥夺。补阳还五汤组按照临床剂量13 g·kg^{-1}灌胃补阳还五汤,正常组和模型组灌服等量的蒸馏水,每日同时间灌胃1次,连续14 d。从抓力、凝血功能、血小板形态及聚集率、P-选择素(P-Selectin,CD62P)表达率综合评价模型的构建和血小板功能;利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(Ultra-high Performance Liquid Chromatography with Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry,UPLC-Q-TOF-MS)进行大鼠血小板中内源性代谢物的代谢组学分析,检测条件为反相色谱(Reverse Phase Liquid Chromatography,RPLC)柱和亲水作用色谱(Hydrophilic Interaction Chromatography,HILIC)柱,流动相0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱,流速0.3 mL·min^{-1},电喷雾离子源(Electrospray Ionization,ESI),正、负离子模式检测,扫描范围m/z 50~1000。利用多元统计分析筛选组间差异离子,将碎片离子信息与人类代谢组数据库(Human Metabolome Database,HMDB)等数据库匹配以鉴定生物标志物。通过京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库获得代谢物的生物信息,采用MetaboAnalyst 5.0软件分析其相关代谢通路。结果 研究显示,与正常组比较,模型组大鼠抓力显著降低($P<0.01$),补阳还五汤组较模型组可显著升高抓力($P<0.01$);与正常组比较,模型组大鼠活化部分凝血活酶时间(Activated Partial Thromboplastin Time,APTT)降低($P<0.01$),凝血酶时间(Thrombin Time,TT)值明显升高($P<0.05$);纤维蛋白原(Fibrinogen,FIB)升高($P<0.05$),与模型组比较,补阳还五汤组APTT值显著上升($P<0.01$),FIB值下降($P<0.05$);与正常组比较,模型组大鼠血小板最大聚集率(Maximum Aggregation Rate,MAR)、平均聚集率(Average Aggregation Rate,AAR)显著上升($P<0.01$),与模型组比较,补阳还五汤组的血小板MAR、AAR明显降低,具有不同程度的差异($P<0.01$,$P<0.05$);与正常组比较,模型组大鼠血小板CD62P表达明显升高($P<0.05$),补阳还五汤组可明显降低血小板CD62P的表达率($P<0.05$);扫描电镜结果显示,与正常组比较,模型组血小板过度活化,伪足伸出明显,血小板之间聚集现象增多;与模型组比较,补阳还五汤组少见血小板活化和聚集现象减少。代谢组学结果显示,气虚血瘀证大鼠模型血小板代谢紊乱,最终得到95种差异显著代谢物,主要的差异代谢物集中在脂肪酸、氨基酸、磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、核苷酸等。补阳还五汤对气虚血瘀证的干预作用主要反映在对脂质代谢、氨基酸代谢、核酸代谢、能量代谢等代谢途径的调节。结论 研究初步揭示了气虚血瘀证模型大鼠血小板的代谢组学特征,并为补阳还五汤干预气虚血瘀证关于血小板的作用机制提供依据。

关键词:代谢组学;血小板;气虚血瘀证;补阳还五汤;脂质代谢;血小板活化
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)07-0126-11

Effect of Buyang Huanwu Decoction(补阳还五汤) on Qi Deficiency and Blood Stasis Syndrome Based on Platelet Metabolomics

ZHANG Guoyuan[1,2],LI Ying[3],WANG Ziyan[3],SUN Mingqian[3],LIU Jianxun[3]
(1. Postdoctoral Research Mobile Station,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100700,China;
2. Institute of Clinical Pharmacology of Xiyuan Hospital,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100091,China;
3. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100091,China)

Abstract:*Objective* To study the changes in metabolites in platelets of a rat model of Qi deficiency and blood stasis syndrome using metabolomics methods and further elucidate the intervention effect of Buyang Huanwu Decoction(补阳还五汤,BYHWD)

基金项目:国家自然科学基金重点项目(82030124);国家自然科学基金面上项目(82274141);国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202007)

作者简介:张国瑗(1989-),女,山东潍坊人,在站博士后,研究方向:中医药代谢组学。
通讯作者:孙明谦(1981-),男,吉林桦甸人,研究员,硕士研究生导师,博士,研究方向:中医药代谢组学。E-mail:mingqian_sun@163.com。
刘建勋(1955-),男,河北安平人,研究员,博士研究生导师、博士后导师,博士,研究方向:中药药理。E-mail:liujx0324@sina.com。

on Qi deficiency and blood stasis syndrome. *Method* Thirty Sprague dawley(SD) rats were randomly divided into the normal, model and BYHWD groups. The model group established a sleep deprivation model through a multi-platform sleep deprivation system in the water environment. The BYHWD group was administered for two weeks after successful modeling, with sleep deprivation added simultaneously. The administration group was orally administered BYHWD at a clinical dose of 13 g · kg^{-1}, while the normal and model groups were orally administered an equal amount of distilled water once a day at the same time for 14 consecutive days. The construction of a comprehensive evaluation model and platelet function were evaluated from the perspectives of grip, coagulation function, platelet morphology, aggregation rate and CD62P(P-Selectin) expression rate. The metabolomics analysis of endogenous metabolites in rat platelets was carried out by using Ultra-high Performance Liquid Chromatography with Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry(UPLC-Q-TOF-MS). The detection conditions were reverse phase chromatography column(RPLC) and Hydrophilic Interaction Chromatography(HILIC) chromatographic column, mobile phase 0.1% formic acid aqueous solution(A)-0.1% formic acid acetonitrile solution(B) gradient elution, flow rate 0.3 mL · min^{-1}, electric spray ion source(ESI), positive and negative ion mode detection, scanning range m/z 50-1000. The multivariate statistical analysis was used to screen the inter-group differential ions and match fragment ion information with databases such as the Human Metabolome Database(HMDB) to identify biomarkers. The biological information of metabolites was obtained through the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) database, and their related metabolic pathways were analyzed using MetaboAnalyst 5.0 software. *Result* Study showed that compared with that of the normal group, the grip of the model group decreased($P<0.01$), and BYHWD significantly increased the grip compared to the model group($P<0.01$). Compared with that of the normal group, the activated partial thromboplastin time(APTT) of coagulation function in the model group decreased($P<0.01$), while the thrombin time(TT) increased($P<0.05$) and the level of fibrinogen(FIB) increased($P<0.05$). Compared with those of the model group, the APTT in the BYHWD group significantly increased($P<0.01$), while FIB level decreased($P<0.05$). Compared with those of the normal group, the maximum platelet aggregation rate(MAR) and average platelet aggregation rate(AAR) of the model group rats were significantly increased($P<0.01$). Compared with those of the model group, the MAR and AAR of platelets in the BYHWD group were significantly reduced, with varying degrees of difference($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with that of the normal group, the expression of platelet CD62P in the model group was significantly increased($P<0.05$), and the BYHWD group could significantly reduce the expression rate of platelet CD62P($P<0.05$). The scanning electron microscopy results showed that compared with the normal group, the model group showed excessive platelet activation, significant pseudopodia extension and increased aggregation between platelets. Compared with the model group, the BYHWD group had fewer platelet activation and aggregation phenomena. The metabolomics results showed that the platelet metabolism of the rat model with Qi deficiency and blood stasis syndrome was disrupted, resulting in 95 significantly different metabolites. The main differential metabolites were concentrated in fatty acids, amino acids, phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, nucleotides, etc. The intervention effect of BYHWD on Qi deficiency and blood stasis syndrome was mainly reflected in the regulation of metabolic pathways such as lipid metabolism, amino acid metabolism, nucleic acid metabolism and energy metabolism. *Conclusion* Study preliminarily reveals the metabolomics characteristics of platelets in rats with Qi deficiency and blood stasis syndrome and provides a basis for the mechanism of action of BYHWD on platelets in the intervention of Qi deficiency and blood stasis syndrome.

Keywords: metabolomics; platelet; Qi deficiency and blood stasis syndrome; Buyang Huanwu Decoction(补阳还五汤); lipid metabolism; platelet activation

气虚血瘀证是中医临床常见证候之一，一般指体内气机失调、血液停滞或血运不畅等导致血液瘀滞于经脉及脏腑，多种器官疾病可能伴有气虚血瘀证，涉及心脏、肝脏、大脑等疾病的不同阶段[1-2]。课题组经过 973 项目“基于病证结合的气血相关理论研究”，初步阐释出能量代谢、血小板聚集等是气虚血瘀形成的主要因素，基本明确了能量代谢是“气”的生物学基础，但“血瘀”形成的生物学过程及病理机制尚待进一步深入研究。血小板是来源于骨髓的具有生物活性的微小胞质，血小板参与了血瘀发生的全过程，其功能异常在血瘀证的发病与演化中发挥着重要作用[3]。现代医学研究发现，血瘀证和血液的循环以及微循环发生障碍与血液高黏滞、血小板的活化并且黏附聚集、免疫功能障碍、能量代谢、氧化应激以及血栓形成等多种的病理生理变化相关。中医证候的科学内涵研究是中医药研究的一个难点问题，系统生物学研究与中医证候的整体观相吻合，蛋白质组学、代谢组学等组学范畴，为气虚血瘀证研究提供了新的思路与方法[3]，通过分析蛋白轮廓、代谢物谱变化，可同时从多个分子通路和代谢途径阐释证候的生物学基础，揭示气虚血瘀证的演化规律与药物的作用网络机制[4-5]。目前，以血小板为主要研究对象的代谢组学研究较少，仅见 1 篇报道[6]，虽然已有血小板组学(PLATELETOMICS, http://www.plateletomics.com/plateletomics)数据库，但其仅限于血小板核糖核酸相关的年龄和性别的研究。

气虚血瘀证大鼠模型的研究[7-8]发现，大鼠心脏线粒体三羧酸循环(Tricarboxylic Acid Cycle, TCA cycle)异常，三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)含量明显降低，说明气虚血瘀证的形成可能是由于细胞内的能量代谢低下、ATP 生成减少，进而无力推动血液运行，经脉之血滞瘀，推断能量代谢异常是气虚血瘀证的使动因素。气虚血瘀证大鼠出现血小板形态异常、血小板聚集率、活化明显增强，提示血小板聚集、活化是气虚血瘀证形成的关键机制[9]。补阳还五汤出自清代名医王清任的《医林改错》，由黄芪(生)、川芎、当归尾、红花、赤芍、桃仁、地龙 7 味药组成，为益气活血化瘀的代表方剂。临床研究

表明补阳还五汤能够抗血小板聚集,扩张微血管,通过调节局部微循环,从而改善血液黏度及组织灌注[7,10-11]。补阳还五汤能改善气虚血瘀模型大鼠的血瘀状态、降低血液黏度,抑制炎症因子的释放,减轻血管内皮损伤,通过抑制核转录因子/高迁移率蛋白(NF-κB/HMGB1)信号通路影响气虚血瘀证大鼠血小板活化及血小板微颗粒(Platelet Microparticles,PMPs)释放[12-13]。在基于血小板代谢组学的研究中气虚血瘀证是否有关于能量代谢和血小板功能的小分子代谢异常,补阳还五汤对该代谢物表达是否有调节作用,还有待于研究。

本研究以中医理论为指导,结合宏观和微观的评价指标,采用方证相应的研究策略,构建气虚血瘀证模型,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(Ultra-high Performance Liquid Chromatography with Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry,UPLC-Q-TOF-MS)对气虚血瘀证大鼠模型的血小板进行代谢组学研究,对气虚血瘀证的代谢特征和补阳还五汤的作用机理进行探索,为探究气虚血瘀证模型的生物学特征研究提供依据。

1 材料

1.1 动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠(Sprague Dawley Rats)30 只,体质量 200~210 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2021-0011。本实验经中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批通过,编号 22022XLC041。动物饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心,温度(23±2)℃,相对湿度 45%~65%,照明环境 12 h 光照/12 h 黑暗交替。

1.2 药物与试剂

补阳还五汤(济宁华能制药厂有限公司,批号 14000206164;补阳还五汤组方:黄芪 60 g,赤芍 15 g,当归 20 g,川芎 12 g,地龙 12 g,红花 12 g,桃仁 12 g)。P-选择素(P-Selectin,CD62P)抗体(美国 Biolengend 公司,批号 B223746),糖蛋白Ⅲa(Glycoprotein Ⅲa,CD61)抗体(德国 Miltenyi Biotec 公司,批号 5180528478),凝血酶时间(Thrombin Time,TT)、活化部分凝血活酶时间(Activated Partial Thromboplastin Time,APTT)、凝血酶原时间(Prothrombin Time,PT)、纤维蛋白原(Fibrinogen,FIB)检测试剂盒(上海太阳生物技术有限公司,批号分别为 211201300、211208100、21125002、211206900),血小板聚集诱导剂二磷酸腺苷(Adenosine Diphosphate,ADP)(法国 Hyphen BioMed 公司,批号 F2000702),戊二醛固定液(北京索莱宝科技有限公司,批号 CR2202015),四氧化锇(美国 Polysciences 公司,批号 33376),叔丁醇(国药集团化学试剂有限公司,批号 20170425),亮氨酸脑啡肽(Leucine Enkephalin,LE,美国 Waters 公司,批号 W02102015),乙腈、甲醇、异丙醇、甲酸均为色谱纯,其余试剂为分析纯。

1.3 仪器

ACQUITY™ UPLC I-Class 型液相色谱系统、Xevo G2-XS Q-TOF 型质谱仪、MassLynx V4.1 色谱工作站(美国 Waters 公司),5424R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),VORTEX GENIUS 3 型涡旋震荡器(德国 IKA 公司),Milli-Q gradient A-10 型纯水仪(美国 Millipore 公司),MouseOx 型小动物无创脉搏血氧仪(美国 Starr Life Science Inc 公司),CytoFLEX 型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司),VIP3000 型小动物麻醉机(美国 Matrx 公司),血小板功能检测样品杯(江苏英诺华医疗技术有限公司),PL-12 型血小板聚集仪(江苏英诺华医疗技术有限公司),Synergy4 型全功能酶标仪(美国 BioTek 公司),IEC-CL31R 型离心机(美国 ThermoFisher 公司),ES-1002HA 型百分之一电子天平(长沙湘平科技发展有限公司),YLS-13A 型大小鼠抓力测定仪(北京众实迪创科技发展有限公司),S-3400N 型扫描电子显微镜(日本 HITACHI 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

30 只 SD 大鼠适应性饲养 3 d 后随机分为正常组、模型组、补阳还五汤组,每组 10 只。气虚血瘀证候模型参考文献[8]的方法建立,将大鼠放入水深 3.5 cm 的水环境多平台盒里,使其不能逃脱但可自由进食饮水,每天随机睡眠剥夺 16 h,连续 6 周建立大鼠气虚血瘀证模型。以大鼠一般状态、抓力、凝血功能作为模型成立的基本指标[14-16]。补阳还五汤组在造模之后开始给药,连续 14 d,给药同时进行睡眠剥夺,按 70 kg 成人每日剂量 143 g 换算,大鼠的每日给药量按体表面积系数换算为(143 g/70 kg)×6.3=12.87 g·kg^{-1},实际每日以 13 g·kg^{-1}的药量进行灌胃,灌胃体积 10 mL·kg^{-1}。正常组和模型组灌服等量蒸馏水,每日 1 次,连续 14 d。

2.2 检测指标

2.2.1 大鼠一般状态观察 在安静的环境下,观察大鼠的一般体征,包括大鼠的毛色、精神状态、饮食活动、抓取时的应激情况、大便质地情况以及体质量变化等。

2.2.2 大鼠抓力测定 在实验终点,大鼠平静状态下,右手抓取大鼠按放在抓力板上,左手向前推住抓力板,然后右手滑至大鼠尾部,左手轻轻松开抓力板,抓力板随右手拉鼠尾的力量向前滑行,待大鼠用力抓住抓力板时及时加力后拉,测取抓力,每只大鼠测量 3 次,取平均值。

2.2.3 凝血功能检测 实验结束麻醉后,腹主动脉取血置于 3.8% 枸橼酸钠抗凝管,1600×g 离心 10 min,取上清血浆,按照 PT、APTT、TT、FIB 试剂盒说明书检测。

2.2.4 血小板聚集率检测 大鼠用戊巴比妥钠麻醉,取仰卧位,腹主动脉取血 2 mL 于 3.8% 枸橼酸钠抗凝管,静置 30 min。诱导剂为白色粉末的 ADP,用纯水 0.5 mL 溶解作为母液,测样时取母液 100 μL,用生理盐水 300 μL 稀释,放置于冰上,待测。采用 PL-12 型全自动血小板聚集仪,按流程进行检测。

2.2.5 血小板表面 CD62P 表达率的检测 腹主动脉取血于 3.8% 枸橼酸钠抗凝采血管,200×g 离心 10 min,取上层富血小板血浆(Platelet Rich Plasma,PRP)10 μL,加入磷酸缓冲盐溶液(Phosphate-Buffered Saline,PBS) 和抗体混合液 40 μL,抗体终浓度分别为:anti-CD62P-APC(15.38 mg·L^{-1}),anti-CD61-PE(2.31 μg·L^{-1}),室温避光孵育 15 min,加 PBS 1 mL,400×g 离心清洗多余抗体,再加 PBS 100 μL 混匀,上机检测。

2.2.6 血小板形态学观察 大鼠用戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血 2 mL,3.8% 枸橼酸钠抗凝,200×g 室温离心 10 min,取 PRP 10 μL 均匀涂抹于玻片,静置 10 min,吸去多余的 PRP,倒入预冷的戊二醛溶液,4 ℃固定至少 1 h,PBS 清洗,1% 四氧化锇固定 1 h,PBS 清洗 3 次,脱水,乙醇按照 50%、70%、90%、100% 浓度梯度脱水,每次 15 min。99.9% 的叔丁醇脱水,30 min。冷冻干燥 2 h,用导电的双面碳带将玻片固定在样品台上,喷涂纳米金颗粒,用电子显微镜上机观察。

2.3 样本采集

大鼠禁食不禁水 12 h 后，腹腔注射戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉取血 2 mL，置于枸橼酸钠抗凝管，于 4 ℃、110 × g 离心 10 min 后取上层 PRP，将 PRP 在 986 × g 离心 10 min，取下层血小板样本。血小板样本计数后配平（约 9×10^9 个/mL），PBS 清洗，置于 -80 ℃冰箱保存待测。

2.4 样本检测与分析

2.4.1 样品制备 取 2.3 项下的血小板样本，在室温下解冻，涡旋混匀 2 min，加甲醇：乙腈：水（4∶4∶1）500 μL，超声（40 kHz，250 W）10 min，涡旋振荡 2 min，4 ℃、13 201 × g、10 min 离心后取上清到 2 mL 离心管，沉淀再次加甲醇：乙腈：水（4∶4∶1）500 μL，以同样的条件超声、涡旋、离心后取上清到 2 mL 离心管，两次上清合并后氮吹干，加甲醇：乙腈：水（4∶4∶1）400 μL 复溶，4 ℃、13 201 × g、10 min 离心取上清，待测。分别吸取每份样本 10 μL，混合，作为质控（Quality Control，QC）样本，用于检测仪器稳定性和重复性。

2.4.2 色谱条件 反相色谱（Reverse Phase Liquid Chromatography，RPLC）：反相色谱柱（Waters 公司，X - bridge C_{18} 3 μm，2.1 mm × 100 mm），流动相 A 为 0.1% 甲酸水，流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈。梯度程序（0 min，30% B；0 ~ 7 min，30% → 70% B；7 ~ 9 min，80B% ；9 ~ 12 min，80% →90% B；12 ~ 15 min，90% B；15 ~ 15.01 min，90% B→30% B；15.01 ~ 18 min，30% B）。流速 0.3 mL · min^{-1}，柱温 40 ℃。亲水作用色谱（Hydrophilic Interaction Chromatography，HILIC）：HILIC 色谱柱（Waters 公司，ACQUITY UPLC，BEH amide 1.7 μm，2.1 mm × 100 mm），流动相同 RPLC。梯度程序（0 min，95% B；0 ~ 10 min，95% → 70% B；10 ~ 11 min，70% B；11 ~ 13 min，70% →95% B；13 ~ 15 min，95% B），流速 0.3 mL · min^{-1}，柱温 35 ℃。

2.4.3 质谱条件 采用电喷雾离子源，正负离子模式扫描，载气为氮气，离子源温度 100 ℃，去溶剂气温度 400 ℃，锥孔电压 35 V。正离子模式毛细管电压 3 kV，负离子模式毛细管电压 2.5 kV，分辨率为 12 000。采用全信息串联质谱模式进行数据采集，一级扫描范围 m/z 50 ~ 1200，扫描时间为 0.2 s。采用甲酸钠标准品建立质量轴标准曲线，亮氨酸脑啡肽（Leucine Enkephalin，LE）实时校正（m/z 556.277 1 $[M + H]^+$，m/z 554.261 5 $[M - H]^-$），LE 浓度为 200 ng/mL，流速 5 μL/min。

2.5 数据处理和统计分析

2.5.1 数据处理与多元统计分析 对于质谱分析获得的质谱数据导入 Progenesis QI 2.0 数据分析软件进行预处理，所有样品通过保留时间和 m/z 进行归一化、峰对齐、峰提取、去卷积化、标度换算等操作，将谱图信息转化为由保留时间、质荷比和峰强度等标度组成的二维数据矩阵。将筛选得到的二维数据矩阵导入 SMICA 14.1 软件进行偏最小二乘法判别分析（Partial Least Squares Discriminant Analysis，PLS - DA）多元统计分析。置换检验考察该模型是否存在过度拟合。

2.5.2 标志物的筛选与鉴定 将二维数据矩阵导入 EZinfo 2.0 获得变量重要性投影（Variable Importance in Projection，VIP）值，用于寻找与疾病相关的差异代谢物。进一步采用 Progenesis QI 2.0 软件分析得到组间具有 t 检验 $P < 0.05$ 的差异代谢物。在 QC 的相对标准偏差（RSD）< 30% 的基础上，符合 $P < 0.05$、VIP > 1 的内源性分子可以作为区分模型组和对照组的差异代谢物。将差异代谢物的一级、二级质谱图与人类代谢组数据库（Human Metabolome Database，HMDB，https://hmdb.ca）检索结果的理论碎片进行比对，确认后即得到疾病的差异代谢物进行进一步分析。

2.5.3 代谢通路分析 将筛选的差异代谢物通过京都基因和基因组百科全书（KEGG，https://www.genome.jp/kegg）数据库进行注释，寻找各生物标志物所在的相关代谢通路，利用 Metabo Analyst 5.0 数据库（https://www.metaboanalyst.ca）进行代谢通路功能分析。

2.5.4 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.0 软件统计分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用独立样本 t 检验进行统计学分析，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤对大鼠抓力的影响

与正常组比较，模型组抓力均显著下降（$P < 0.01$）；与模型组比较，补阳还五汤组抓力显著升高（$P < 0.01$）。见表 1。

表 1 补阳还五汤对各组大鼠抓力的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	剂量/（g · kg^{-1}）	抓力/（g）
正常组	8	-	735.39 ± 72.46
模型组	8	-	440.55 ± 54.12[2)]
补阳还五汤组	8	13	718.05 ± 120.27[4)]

注：2）与正常组比较，$P < 0.01$；4）与模型组比较，$P < 0.01$。

3.2 补阳还五汤对大鼠凝血功能的影响

与正常组比较，模型组大鼠的 APTT 有显著降低（$P < 0.01$），TT 值和 FIB 值明显升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，补阳还五汤组 APTT 值显著上升（$P < 0.01$），FIB 值明显下降（$P < 0.05$）；PT 值在各组之间无统计学意义（$P > 0.05$）。见表 2。

表 2 补阳还五汤对各组大鼠凝血功能的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	剂量/（g · kg^{-1}）	APTT/（s）	TT/（s）	PT/（s）	FIB/（s）
正常组	8	-	27.18 ± 9.84	39.48 ± 3.63	18.47 ± 1.69	2.22 ± 0.56
模型组	9	-	16.69 ± 2.72[2)]	43.99 ± 2.96[1)]	17.36 ± 0.95	2.74 ± 0.34[1)]
补阳还五汤组	9	13	26.69 ± 4.51[4)]	44.04 ± 3.61	16.74 ± 0.91	2.245 ± .55[3)]

注：1）与正常组比较，$P < 0.05$；2）与正常组比较，$P < 0.01$；3）与模型组比较，$P < 0.05$；4）与模型组比较，$P < 0.01$。

3.3 补阳还五汤对血小板聚集率的影响

与正常组比较，模型组的血小板最大聚集率（Maximum Aggregation Rate，MAR）、平均聚集率（Average Aggregation Rate，AAR）显著升高，差异具有显著统计学意义（$P < 0.01$）；与模型组比较，补阳还五汤组的血小板 MAR、AAR 明显降低，具有不同程度的差异（$P < 0.01$，$P < 0.05$）。见表 3。

表 3 补阳还五汤对各组大鼠血小板聚集率的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	剂量/（g · kg^{-1}）	MAR/（%）	AAR/（%）
正常组	8	-	53.20 ± 10.67	38.20 ± 7.40
模型组	8	-	80.80 ± 7.75[2)]	61.91 ± 19.07[2)]
补阳还五汤组	8	13	46.89 ± 26.65[4)]	35.06 ± 22.63[3)]

注：2）与正常组比较，$P < 0.01$；3）与模型组比较，$P < 0.05$；4）与模型组比较，$P < 0.01$。

3.4 补阳还五汤对大鼠血小板 CD62P 表达的影响

与正常组比较，模型组大鼠血小板 CD62P 表达明显升高（$P < 0.05$），与模型组比较，补阳还五汤可明显降低血小板 CD62P 的表达率（$P < 0.05$）。见表 4。

表 4 补阳还五汤对各组大鼠血小板 CD62P 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g·kg^{-1})	CD62P/(%)
正常组	8	–	1.30 ± 0.06
模型组	8	–	1.38 ± 0.06[1)]
补阳还五汤组	8	13	1.31 ± 0.05[3)]

注:1)与正常组比较,$P < 0.05$;3)与模型组比较,$P < 0.05$。

3.5 补阳还五汤对大鼠血小板形态学的影响

结果显示,正常组血小板轮廓较规整,外壁较圆滑,不聚团,伪足较少伸出,有零星轻度活化现象。与正常组比较,模型组血小板的活化聚集情况明显,血小板间联结情况多发,伪足互相交错,聚集情况明显多发,细胞膜表面不平滑。与模型组比较,补阳还五汤可明显抑制模型大鼠血小板的活化,血小板间联结情况较少,整体聚集现象明显改善。见插页XLII图 1。

4 代谢组学研究

4.1 UPLC – Q – TOF – MS 代谢轮廓图

采用 UPLC – Q – TOF – MS 检测正、负离子模式下的代谢物谱图,得到的基峰离子色谱图(BPI)。如图 2 所示。

比较正离子和负离子模式:各组的 RPLC 基峰图中的谱峰大体上是一致的。此时无法直接从谱图上观察出两组的差异,需要采用统计分析和模式识别方法进一步挖掘出组间的差异和其中潜在的生物标志物。比较 RPLC 和 HILIC 模式:在同一正离子模式或负离子模式下,基峰图在峰强度和保留时间方面 RPLC 和 HILIC 之间明显不同。

4.2 系统稳定性考察

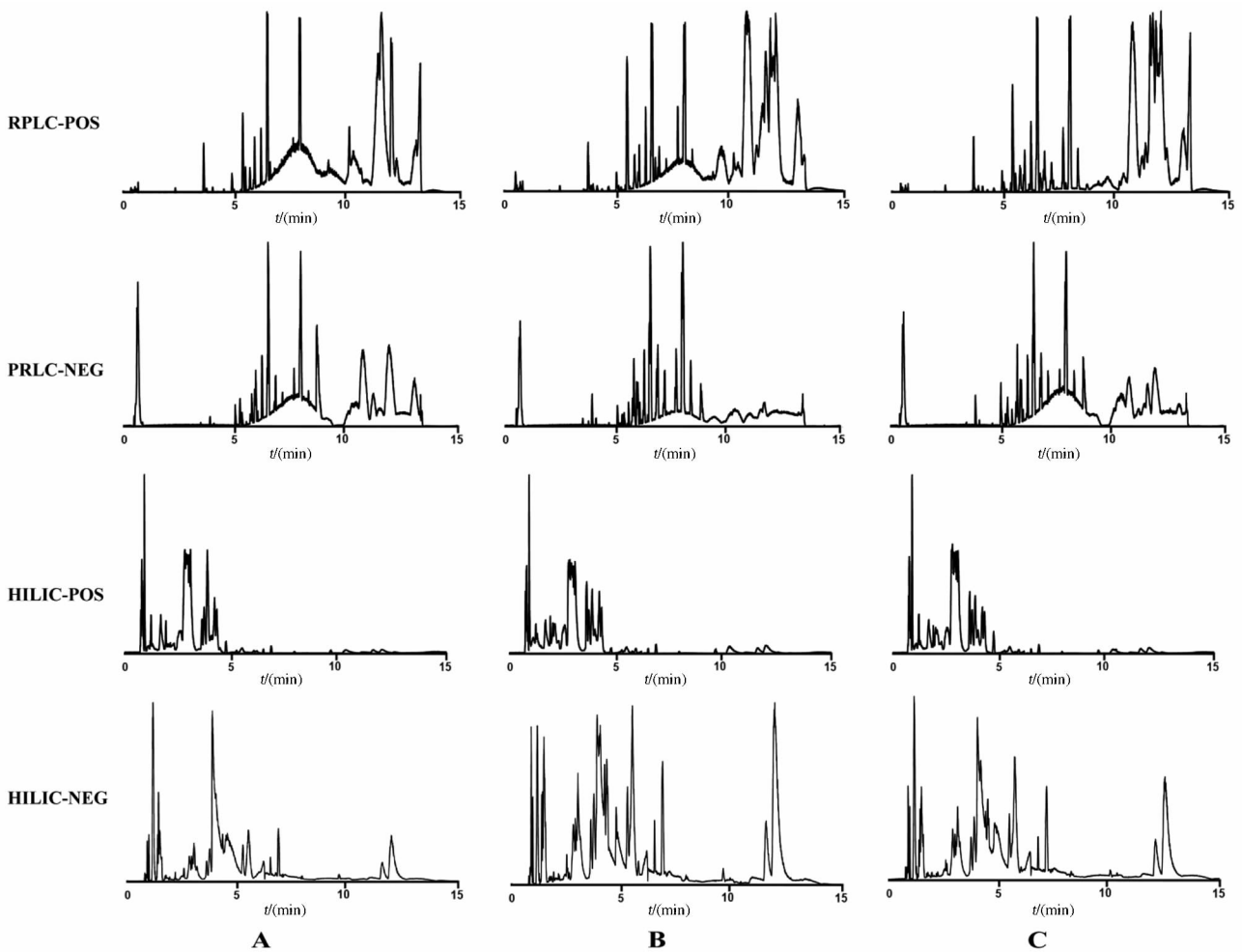
为在 UPLC – Q – TOF – MS 数据采集过程中监测和评价仪器的稳定性以及重复性,每进 6 个样品后插入 1 个 QC 样本。分析结束后,从 QC 样本中选 15 个代表性的特征峰来评价整个实验的稳定性。在 RPLC – POS、RPLC – NEG、HILIC – POS、HILIC – NEG 4 种模式下,t_R 的波动 < 0.2 min,m/z < 10 ppm,离子强度变化的 RSD < 30%。结果提示仪器的精密度良好,运行稳定,实验结果具有较好的重复性,该方法可以用于代谢组学分析。

4.3 多元统计分析

从结果插页XLII图 3 PLS – DA 得分图中可以看出,各组之间得到良好区分。在各个模式下模型参数符合要求,RPLC – POS、RPLC – NEG、HILIC – POS、HILIC – NEG 的模型参数 R^2Y 为 0.922、0.98、0.921、0.99,Q^2 为 0.873、0.968、0.879、0.988。置换检验对 PLS – DA 模型验证结果,Q^2 在纵轴上的截距为负值(插页XLII图 3),说明所建模型未过度拟合。

4.4 潜在生物标志物的发现

模型组和正常组比较,在血小板中鉴定筛选得到 95 种差异显著代谢物,主要的差异代谢物集中在脂肪酸类、氨基酸类、



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 补阳还五汤组。
图 2 各组大鼠血小板样品的基峰离子色谱

表 5 气虚血瘀证大鼠血小板差异代谢物以及补阳还五汤调节的相关代谢成分

HMDB ID	化合物	化学式	分子量	t_R/(min)	离子模式	模型组/正常组	补阳还五汤组/模型组	代谢通路
HMDB0000005	2-酮丁酸	$C_4H_6O_3$	102.031 7	2.44	ESI^-	↓	–	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成
HMDB0000008	2-羟基丁酸	$C_4H_8O_3$	104.047 3	3.91	ESI^-	↓	↑	丙酸代谢
HMDB0000019	α-酮异戊酸	$C_5H_8O_3$	116.047 3	1.85	ESI^-	↓	↑	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成
HMDB0000045	一磷酸腺苷	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	347.063 1	11.58	ESI^-	↑	↓	嘌呤代谢
HMDB0000048	蜜二糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.116 2	9.06	ESI^-	↓	↑	半乳糖代谢
HMDB0000072	顺式乌头酸	$C_6H_6O_6$	174.016 4	4.05	ESI^-	↓	–	TCA 循环
HMDB0000086	甘油磷酸胆碱	$C_8H_{20}NO_6P$	257.102 8	0.78	ESI^+	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0000089	胞苷	$C_9H_{13}N_3O_5$	243.085 5	9.62	ESI^-	↑	↓	嘧啶代谢
HMDB0000107	半乳糖醇	$C_6H_{14}O_6$	182.079 0	6.57	ESI^-	↑	↓	半乳糖代谢
HMDB0000114	甘油磷酰乙醇胺	$C_5H_{14}NO_6P$	215.055 9	9.94	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0000118	高香草酸	$C_9H_{10}O_4$	182.057 9	6.75	ESI^-	↓	↑	酪氨酸代谢
HMDB0000122	D-葡萄糖	$C_6H_{12}O_6$	180.063 4	9.91	ESI^-	↓	↑	糖酵解/糖新生
HMDB0000124	6-磷酸果糖	$C_6H_{13}O_9P$	260.029 7	10.67	ESI^-	↓	↑	氨基糖和核苷酸糖代谢
HMDB0000130	高龙胆酸	$C_8H_8O_4$	168.042 3	7.94	ESI^-	↓	↑	酪氨酸代谢
HMDB0000138	甘胆酸	$C_{26}H_{43}NO_6$	465.309 0	4.19	ESI^-	↑	↓	初级胆汁酸生物合成
HMDB0000139	甘油酸	$C_3H_6O_4$	106.026 6	3.91	ESI^-	↓	↑	TCA 循环
HMDB0000148	谷氨酸	$C_5H_9NO_4$	147.053 2	2.24	ESI^-	↓	↑	TCA 循环
HMDB0000156	苹果酸	$C_4H_6O_5$	134.021 5	2.65	ESI^-	↑	–	TCA 循环
HMDB0000157	次黄嘌呤	$C_5H_4N_4O$	136.038 5	3.67	ESI^-	↑	↓	嘌呤代谢
HMDB0000175	肌苷酸	$C_{10}H_{13}N_4O_8P$	348.047 1	11.97	ESI^-	↑	↓	嘌呤代谢
HMDB0000190	乳酸	$C_3H_6O_3$	90.031 7	0.77	ESI^-	↑	↓	糖酵解/糖新生
HMDB0000195	肌苷	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	268.080 8	4.78	ESI^-	↑	↓	嘌呤代谢
HMDB0000207	油酸	$C_{18}H_{34}O_2$	282.255 9	8.18	ESI^-	↑	↓	不饱和脂肪酸的生物合成
HMDB0000220	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	256.240 2	0.99	ESI^+	↑	↓	不饱和脂肪酸的生物合成
HMDB0000222	棕榈酰肉碱	$C_{23}H_{45}NO_4$	400.342 1	8.05	ESI^+	↑	–	脂肪酸代谢
HMDB0000224	O-磷酸乙醇胺	$C_2H_8NO_4P$	141.019 1	10.44	ESI^-	↑	↓	鞘磷脂代谢
HMDB0000251	牛磺酸	$C_2H_7NO_3S$	125.014 7	6.88	ESI^-	↑	↓	牛磺酸和低牛磺酸代谢
HMDB0000269	鞘氨醇	$C_{18}H_{39}NO_2$	301.298 1	5.98	ESI^+	↑	↓	鞘磷脂代谢
HMDB0000277	鞘氨醇-1-磷酸	$C_{18}H_{38}NO_5P$	379.248 8	6.07	ESI^-	↑	↓	鞘磷脂代谢
HMDB0000285	尿苷三磷酸	$C_9H_{15}N_2O_{15}P_3$	483.968 5	12.00	ESI^-	↑	↓	嘧啶代谢
HMDB0000288	尿苷 5′-单磷酸盐	$C_9H_{13}N_2O_9P$	324.035 9	11.61	ESI^-	↓	↑	嘧啶代谢
HMDB0000289	尿酸	$C_5H_4N_4O_3$	168.028 3	6.52	ESI^-	↑	↓	嘧啶代谢
HMDB0000290	尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺	$C_{17}H_{27}N_3O_{17}P_2$	607.081 6	0.86	ESI^-	↑	–	氨基糖和核苷酸糖代谢
HMDB0000292	黄嘌呤	$C_5H_4N_4O_2$	152.033 4	4.23	ESI^-	↑	–	嘌呤代谢
HMDB0000296	尿苷	$C_9H_{12}N_2O_6$	244.069 5	3.62	ESI^-	↑	↓	嘧啶代谢
HMDB0000564	PC(16∶0/16∶0)	$C_{40}H_{80}NO_8P$	733.562 2	4.48	ESI^+	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0000574	L-半胱氨酸	$C_3H_7NO_2S$	121.019 7	9.82	ESI^-	↓	↑	牛磺酸和低牛磺酸代谢
HMDB0000618	D-核糖-5-磷酸	$C_5H_{11}O_8P$	230.019 2	9.56	ESI^-	↑	↓	戊糖磷酸途径
HMDB0000630	胞嘧啶	$C_4H_5N_3O$	111.043 3	3.67	ESI^-	↑	↓	嘧啶代谢
HMDB0000641	谷氨酰胺	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.069 1	7.94	ESI^-	↓	↑	TCA 循环
HMDB0000653	胆固醇硫酸酯	$C_{27}H_{46}O_4S$	466.311 7	1.50	ESI^-	↑	↓	类固醇激素生物合成
HMDB0000673	亚油酸	$C_{18}H_{32}O_2$	280.240 2	7.71	ESI^+	↑	–	亚油酸代谢
HMDB0000684	犬尿氨酸	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	208.084 8	4.46	ESI^-	↑	↓	色氨酸代谢
HMDB0000827	硬脂酸	$C_{18}H_{36}O_2$	284.271 5	4.25	ESI^-	↑	↓	不饱和脂肪酸的生物合成
HMDB0000939	S-腺苷同型半胱氨酸	$C_{14}H_{20}N_6O_5S$	384.121 6	9.69	ESI^-	↑	↓	半胱氨酸和蛋氨酸代谢
HMDB0001043	花生四烯酸	$C_{20}H_{32}O_2$	304.240 2	8.24	ESI^+	↑	↓	花生四烯酸代谢
HMDB0001068	D-景天庚酮糖-7-磷酸	$C_7H_{15}O_{10}P$	290.040 3	9.64	ESI^-	↓	↑	戊糖磷酸途径
HMDB0001085	白三烯 B_4	$C_{20}H_{32}O_4$	336.230 1	6.80	ESI^-	↑	↓	花生四烯酸代谢
HMDB0001173	5′-甲硫腺苷	$C_{11}H_{15}N_5O_3S$	297.089 6	0.97	ESI^+	↑	↓	半胱氨酸和蛋氨酸代谢
HMDB0001190	吲哚乙醛	$C_{10}H_9NO$	159.068 4	0.82	ESI^+	↑	↓	色氨酸代谢
HMDB0001198	白三烯 C_4	$C_{30}H_{47}N_3O_9S$	625.303 3	4.35	ESI^-	↑	↓	花生四烯酸代谢
HMDB0001220	前列腺素 E_2	$C_{20}H_{32}O_5$	352.225 0	1.60	ESI^-	↓	–	花生四烯酸代谢
HMDB0001337	白三烯 A_4	$C_{20}H_{30}O_3$	318.219 5	7.04	ESI^-	↑	↓	花生四烯酸代谢

续表 5 气虚血瘀证大鼠血小板差异代谢物以及补阳还五汤调节的相关代谢成分

HMDB ID	化合物	化学式	分子量	t_R/(min)	离子模式	模型组/正常组	补阳还五汤组/模型组	代谢通路
HMDB0001388	α-亚麻酸	$C_{18}H_{30}O_2$	278.224 6	7.27	ESI^+	↓	↑	α-亚麻酸代谢
HMDB0001397	鸟苷一磷酸	$C_{10}H_{14}N_5O_8P$	363.058 0	7.20	ESI^-	↑	↓	嘌呤代谢
HMDB0002190	5,6-环氧-8,11,14-二十碳三烯酸	$C_{20}H_{32}O_3$	320.235 1	0.93	ESI^-	↑	↓	花生四烯酸代谢
HMDB0002226	肾上腺酸	$C_{22}H_{36}O_2$	332.271 5	4.22	ESI^+	↑	↓	不饱和脂肪酸的生物合成
HMDB0003335	肌苷-5′-二磷酸	$C_{10}H_{14}N_4O_{11}P_2$	428.013 4	6.26	ESI^-	↓	↑	嘌呤代谢
HMDB0003447	吲哚-3-乙醇	$C_{10}H_{11}NO$	161.084 1	7.52	ESI^+	↑	-	色氨酸代谢
HMDB0004029	11-脱氢皮质酮	$C_{21}H_{28}O_4$	344.198 8	8.23	ESI^-	↓	↑	类固醇激素生物合成
HMDB0004610	植物鞘氨醇	$C_{18}H_{39}NO_3$	317.293 0	0.98	ESI^+	↓	↑	鞘磷脂代谢
HMDB0004866	LacCer(d18:1/12:0)	$C_{42}H_{79}NO_{13}$	805.555 1	15.97	ESI^-	↑	-	鞘磷脂代谢
HMDB0005779	PE[P-18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)]	$C_{43}H_{78}NO_7P$	751.551 6	1.00	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0005780	PE[P-16:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]	$C_{43}H_{74}NO_7P$	747.520 3	2.85	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0006294	16-羟基十六烷酸	$C_{16}H_{32}O_3$	272.235 1	10.23	ESI^-	↓	-	脂肪酸代谢
HMDB0007852	LysoPA[0:0/18:2(9Z,12Z)]	$C_{21}H_{39}O_7P$	434.243 3	6.94	ESI^-	↓	↑	甘油磷脂代谢
HMDB0007878	PC(14:0/20:0)	$C_{42}H_{84}NO_8P$	761.593 5	15.35	ESI^-	↓	↑	甘油磷脂代谢
HMDB0007880	PC[14:0/20:2(11Z,14Z)]	$C_{42}H_{80}NO_8P$	757.562 2	1.14	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0007887	PC[14:0/22:1(13Z)]	$C_{44}H_{86}NO_8P$	787.690 1	15.36	ESI^-	↓	↑	甘油磷脂代谢
HMDB0007889	PC[14:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)]	$C_{44}H_{80}NO_8P$	781.562 2	2.46	ESI^-	↓	↑	甘油磷脂代谢
HMDB0007921	PC[14:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)]	$C_{44}H_{82}NO_8P$	783.577 8	3.87	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0007936	PC[15:0/16:1(9Z)]	$C_{39}H_{76}NO_8P$	717.530 8	3.06	ESI^-	↓	-	甘油磷脂代谢
HMDB0007938	PC[15:0/18:1(11Z)]	$C_{41}H_{80}NO_8P$	745.562 2	2.93	ESI^-	↓	↑	甘油磷脂代谢
HMDB0007940	PC[15:0/18:2(9Z,12Z)]	$C_{41}H_{78}NO_8P$	743.546 5	2.93	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0007941	PC[15:0/18:3(6Z,9Z,12Z)]	$C_{41}H_{76}NO_8P$	741.530 9	2.43	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0007946	PC[15:0/20:2(11Z,14Z)]	$C_{43}H_{82}NO_8P$	771.577 8	2.89	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0007949	PC[15:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)]	$C_{43}H_{78}NO_8P$	767.546 5	1.00	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0007955	PC[15:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)]	$C_{45}H_{82}NO_8P$	795.577 8	2.83	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0007961	PC(15:0/P-16:0)	$C_{39}H_{78}NO_7P$	703.551 6	11.10	ESI^+	↓	-	甘油磷脂代谢
HMDB0007988	PC[16:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)]	$C_{46}H_{84}NO_8P$	809.593 5	2.97	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0007989	PC[16:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)]	$C_{46}H_{82}NO_8P$	807.577 8	2.98	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0008359	PC[20:2(11Z,14Z)/P-18:1(11Z)]	$C_{46}H_{86}NO_7P$	795.612 4	2.96	ESI^-	↑	↓	甘油磷脂代谢
HMDB0009793	PI[16:0/22:4(10Z,13Z,16Z,19Z)]	$C_{47}H_{83}O_{13}P$	886.557 1	6.27	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0009795	PI[16:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)]	$C_{47}H_{81}O_{13}P$	884.541 5	5.27	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0010331	棕榈酰葡萄糖醛酸	$C_{22}H_{42}O_7$	418.293 1	1.51	ESI^-	↑	↓	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化
HMDB0010383	LysoPC[16:1(9Z)/0:0]	$C_{24}H_{48}NO_7P$	493.316 8	6.65	ESI^-	↓	-	甘油磷脂代谢
HMDB0010384	LysoPC(18:0/0:0)	$C_{26}H_{54}NO_7P$	523.363 8	4.25	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0010386	LysoPC[18:2(9Z,12Z)/0:0]	$C_{26}H_{50}NO_7P$	519.332 5	4.32	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0010391	LysoPC[20:1(11Z)/0:0]	$C_{28}H_{56}NO_7P$	549.379 4	9.81	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0010392	LysoPC[20:2(11Z,14Z)/0:0]	$C_{28}H_{54}NO_7P$	547.363 8	8.64	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0010395	LysoPC[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0]	$C_{28}H_{50}NO_7P$	543.332 5	4.23	ESI^-	↓	-	甘油磷脂代谢
HMDB0010408	LysoPC[P-18:1(9Z)/0:0]	$C_{26}H_{52}NO_6P$	505.353 2	7.52	ESI^+	↑	-	甘油磷脂代谢
HMDB0011149	LysoPC(O-18:0/0:0)	$C_{26}H_{56}NO_6P$	509.348 5	10.08	ESI^-	↑	-	醚脂代谢
HMDB0012100	SM[d18:1/18:1(11Z)]	$C_{41}H_{81}N_2O_6P$	728.583 2	3.86	ESI^-	↑	↓	鞘磷脂代谢
HMDB0013122	LysoPC(P-18:0/0:0)	$C_{26}H_{54}NO_6P$	507.368 9	4.37	ESI^-	↑	-	甘油磷脂代谢

注：↑表达水平上调；↓表达水平下调；-无变化。

磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、核苷酸等，所得代谢物见表 5。经补阳还五汤干预后回调的代谢物有 67 种，插页ⅩⅬⅢ图 4 显示正常组与模型组以及模型组与补阳还五汤组大鼠血小板中这 67 种差异代谢物相对含量具有明显差异。

4.5 代谢通路的富集分析

通过 KEGG 数据库对筛选得到的血小板中的差异代谢物进行检索，利用 MetaboAnalyst 5.0 进行通路富集，相应的代谢通路图见插页ⅩⅬⅢ图 5。满足通路影响值 >0.1 和 $P<0.05$ 的通路途径有：亚油酸代谢、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢、甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、嘌呤代谢、鞘脂代谢、嘧啶代谢、乙醛酸和二羧酸代谢以及牛磺酸和次牛磺酸代谢。

5 讨论

本研究通过睡眠剥夺法构建气虚血瘀证模型观察补阳还五汤的干预作用及代谢特征，结果显示，模型组大鼠出现抓力降低等气虚证的客观表现，凝血功能异常等血瘀的病机变化，经补阳还五汤治疗后，大鼠抓力增加和凝血功能改善，并且改善血小板过度聚集和异常活化的情况。在血小板代谢组学层面，气虚血瘀模型存在血小板代谢紊乱，补阳还五汤可以通过

调节花生四烯酸代谢、鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、嘌呤代谢等代谢途径干预气虚血瘀证。

脂质代谢异常是气虚血瘀证模型大鼠受到影响的关键代谢途径之一，在模型组中多个脂肪酸、鞘脂、甘油磷脂类代谢物发生不同程度的代谢紊乱。血管炎症是气虚血瘀的重要致病因素，炎症产生的活性氧自由基，可增加血管的通透性，促进生物膜磷脂中的多聚不饱和脂肪酸释放，引起脂质过氧化，造成生物膜损伤。气虚血瘀大鼠血管内皮细胞有损伤并伴随着血小板活化、炎症反应发生，补阳还五汤可以改善机体血小板活化和炎症程度，起到保护血管内皮的作用[17-18]。气虚血瘀证状态下，血小板活化加剧，花生四烯酸从磷脂中游离出来，在环氧酶作用下，花生四烯酸转变为前列腺素环内过氧化物，并进一步转化为脂质过氧化物，白三烯、羟基脂肪酸、脂氧素等与炎性反应相关生物活性的物质生成。模型组血小板中花生四烯酸含量显著上升，花生四烯酸介导炎症和参与血小板活化，并且与血瘀呈正相关[19]，花生四烯酸代谢网络是产生炎症介质的主要因素，此次还检测到多种花生四烯酸途径上的代谢物被补阳还五汤回调，如白三烯 A_4、白三烯 B_4、白三烯 C_4、5,6－环氧－8,11,14－二十碳三烯酸，提示补阳还五汤可调节花生四烯酸代谢途径抑制炎症，减少血小板聚集，减轻脂质的过氧化和血瘀证的损伤。α－亚麻酸可生成二十碳五烯酸，通过靶向 IL－6 和 TNF－α 降低炎症反应[20]。二十碳五烯酸可减低血小板的黏稠度，增加血管的通透性；模型组 α－亚麻酸的含量下降，提示气虚血瘀证模型炎症反应和血小板聚集增加。本次实验中补阳还五汤显著回调血小板中 α－亚麻酸的含量，改善炎症，增加血管的通透性减轻血瘀。模型组在缺血缺氧条件下，缺氧诱导因子－1α 抑制棕榈酸的代谢分解，导致棕榈酸大量积累[21]，使脂肪酸 β 氧化障碍影响能量代谢。补阳还五汤干预后，棕榈酸水平下降，表明补阳还五汤调节棕榈酸改善体内能量代谢，促进气虚血瘀的改善[22]。

在血小板的膜结构中脂肪酸、甘油脂、甘油磷脂是丰度相对较高的三类脂质，约占血小板脂质总量的 71%[23]。本次实验中检测到了多种磷脂类成分，如磷脂酰胆碱（Phosphatidylcholine，PC）、磷脂酰乙醇胺（Phosphatidylethanolamine，PE）、溶血磷脂酰胆碱（Lyso－phosphatidylcholine，LysoPC）、磷脂酰肌醇（Phosphatidylinositol，PI）在模型组中与对照组有差异，表明气虚血瘀证大鼠血小板中磷脂代谢紊乱。甘油磷脂代谢异常时的重要症状也是出现炎症反应[24]。LysoPC 升高诱发的炎症反应，与血小板活化因子相互作用，增加氧化应激且干扰血管内皮功能[25]。鞘脂的代谢物神经酰胺（Ceramide，Cer），鞘氨醇（Sphingosine，Sph）和鞘氨醇－1－磷酸（Sphingosine 1－phosphate，S1P）等是构成血小板膜结构的主要成分之一，其参与信号转导的许多关键过程[26-28]。鞘脂代谢异常引起血小板炎症，生物膜脂质过氧化，血小板功能发生障碍，可能与血瘀的发生相关。活化的血小板释放 S1P，与血小板表面受体结合暴露纤维蛋白原受体，增加血小板反应性，进一步刺激血小板聚集，从而导致血瘀[29-30]。在此次实验中，血小板中的 LacCer（d18∶1/12∶0）、Sph、S1P、植物鞘氨醇、SM［d18∶1/18∶1（11Z）］、O－磷酸乙醇胺在模型组与对照组都被检测出有含量差异，提示气虚血瘀模型鞘脂代谢紊乱，并且补阳还五汤可以显著回调 Sph、S1P、植物鞘氨醇、SM［d18∶1/18∶1(11Z)］、O－磷酸乙醇的含量来改善炎症反应与血小板活化。

牛磺酸主要由半胱氨酸脱羧生成，具有较强抗氧化活性，能减少线粒体中丙二酸生成，通过增强细胞抗氧化防御系统，增强内源性氧自由基清除活力，调节线粒体活性氧生成速率，发挥抗氧化作用，抑制细胞凋亡[31-32]。此外，牛磺酸能够抑制 TNF－α、IL－1β、IL－18 等炎症表达[33]。在血小板中牛磺酸、S－腺苷同型半胱氨酸、5′－甲硫腺苷、半胱氨酸的代谢出现异常，给以补阳还五汤后，这些代谢物可被显著回调，提示气虚血瘀模型有牛磺酸和次牛磺酸代谢途径的紊乱，补阳还五汤可以干预该途径改善细胞凋亡与调节炎症反应。色氨酸水平与免疫激活紧密相关，而免疫激活与炎症是气虚血瘀的重要机制[34]。由于模型组体内气虚血瘀的形成，造成主要参与色氨酸代谢的吲哚－3－乙醇、犬尿氨酸、吲哚乙醛在血小板中的含量上升，呈现色氨酸代谢整体上升的状态，并且补阳还五汤通过干预犬尿氨酸、吲哚乙醛调节机体免疫与减轻炎症[35]。

气虚的病理生理学基础是单位时间产生的化学能（动力）不足或消耗过量[36]，气虚与能量代谢途径密切相关[37]。本次实验中在气虚血瘀模型淤血缺氧的状态下，出现半乳糖代谢、磷酸戊糖途径、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、糖酵解与糖异生、三羧酸循环多条能量代谢途径的紊乱，提示机体存在供能障碍[38]，模型组能量需求严重不足，从而表现出精神萎靡、倦怠嗜卧、抓力变小等气虚的外观状态。TCA 循环是糖、脂肪酸和某些氨基酸相互转变的代谢枢纽，可继发性地影响其他代谢。谷氨酰胺可增强免疫、维持酸碱平衡、增加细胞体积、增强肌肉细胞内蛋白质的合成等。在疾病状态下谷氨酰胺的需求增大[39]，谷氨酰胺通过线粒体代谢进入 TCA 循环，满足细胞的能量需求，可能因为病症状态下，增加了谷氨酰胺和谷氨酸代谢的消耗，使模型组中谷氨酰胺和谷氨酸含量显著下降，谷氨酸代谢异常与中枢疲劳有关[40]，谷氨酸的代谢异常可能引起气虚证患者的头昏乏力症状。气虚证患者谷氨酰胺的水平显著降低与机体免疫功能的下降有一定关联[34]。补阳还五汤可以干预谷氨酰胺、谷氨酸的代谢，改善机体免疫和能量的异常状态。

嘌呤已被证明在血小板、肌肉和神经传递的生理学中起重要作用[41]。嘌呤核苷酸是嘌呤在体内的主要存在形式，在体内被水解后生成鸟嘌呤和腺嘌呤，经脱氨基作用生成次黄嘌呤及黄嘌呤，再在黄嘌呤氧化酶的作用下，最终氧化生成尿酸[42]。嘌呤代谢是维持体内线粒体氧化应激稳态的重要组成部分，在供应能量、调节代谢以及组成辅酶等方面起着非常重要的作用，尿酸在血管壁上沉积，损伤血管内膜，引起脂质过氧化反应和低密度脂蛋白胆固醇的氧化，导致血管壁的损伤加重。补阳还五汤可以回调次黄嘌呤、肌酐、尿酸、尿苷等多种嘌呤代谢途径上代谢物的含量，减轻血管损伤。

本研究初步探索了气虚血瘀证血小板的代谢组学特征，并阐释了补阳还五汤干预后的代谢水平变化。气虚血瘀证的潜在差异代谢物涉及脂质代谢、氨基酸代谢、能量代谢及核酸代谢等途径，补阳还五汤对气虚血瘀证的干预主要包括能量供应、免疫炎症反应、血小板活化和血管内皮损伤。虽然本次研究筛选出了气虚血瘀证模型的血小板生物标志物及相关代谢通路，但所得生物标志物仍需进一步利用靶向代谢组学技术进行验证，后续需要基因组学、蛋白组学等共同参与，从而更为深入和全面地揭示气虚血瘀证血小板的生物学基础，为临床气虚血瘀证的中医诊治及疗效评估提供实验依据。

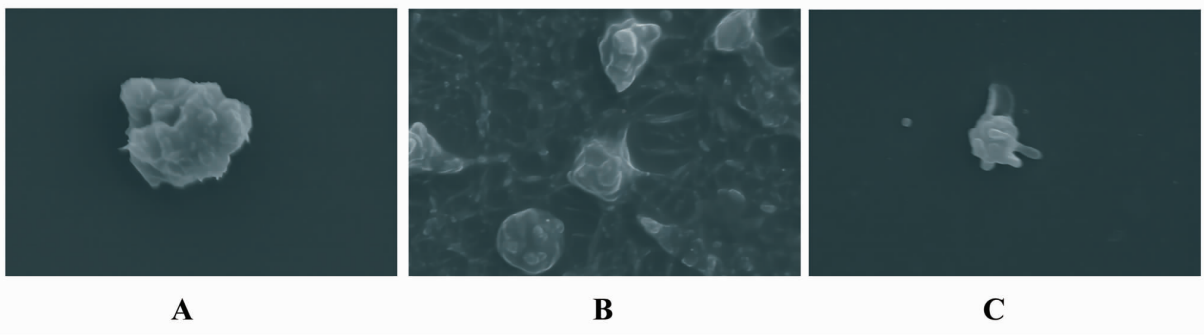
参考文献

[1] 刘军莲，宋剑南. 中医血瘀证本质研究概况[J]. 辽宁中医杂

志, 2006, 33(9): 1091 - 1093.
[2] 李莎莎, 肖雪, 王跃生, 等. 血瘀证与活血化瘀研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2009, 24(1): 102 - 104.
[3] LI Y, SUN M Q, LI L, et al. Application and prospect of platelet multi - omics technology in study of blood stasis syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2022, 28(2): 99 - 105.
[4] 谢雅革, 沈克平, 卢艳琳, 等. 基于代谢组学的中医血瘀证研究概述[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2598 - 2601.
[5] ZHOU H F, LIN B Y, YANG J H, et al. Analysis of the mechanism of Buyang Huanwu Decoction against cerebral ischemia - reperfusion by multi - omics[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 305: 116112.
[6] SIMON L M, EDELSTEIN L C, NAGALLA S, et al. Human platelet microRNA - mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics[J]. Blood, 2014, 123(16): 37 - 45.
[7] GALLEGO L D, SCHNEIDER M, MITTAL C, et al. Phase separation directs ubiquitination of gene - body nucleosomes[J]. Nature, 2020, 579(7800): 592 - 597.
[8] 陈进成, 刘建勋, 林成仁, 等. 基于"劳则气耗"理论研究气虚证动物模型的建立方法[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2177 - 2183.
[9] 史雅红, 任建勋, 刘建勋, 等. 睡眠剥夺诱导的大鼠血瘀证对血小板活化影响的研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3341 - 3345.
[10] 李树晖, 皮兴文. 补阳还五汤治疗中风后遗症的可行性[J]. 中医临床研究, 2022, 14(30): 56 - 58.
[11] 赵阳阳. 补阳还五汤加味对气虚血瘀型缺血性脑中风血小板聚集率的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(2): 306 - 308.
[12] 冯月男, 孙思邈, 凌爽, 等. 基于 NF - κB/HMGB1 炎性信号通路探讨补阳还五汤对气虚血瘀大鼠的保护机制[J]. 中药材, 2022, 45(10): 2482 - 2486.
[13] 卞敬琦, 牛雯颖, 冯月男, 等. 补阳还五汤对气虚血瘀模型血小板活化影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(2): 43 - 46.
[14] 陈进成, 刘建勋, 马博, 等. 气虚血瘀证大鼠模型的建立与评价[J]. 中医杂志, 2020, 61(3): 229 - 234.
[15] 任建勋, 尹春园, 史雅红, 等. 睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型的评价[J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 428 - 434.
[16] 刘建勋. 病证结合动物模型拟临床研究思路与方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 70 - 76.
[17] 冯月男, 牛雯颖, 张玉昆, 等. 基于血小板活化和炎症相关指标探讨补阳还五汤对气虚血瘀证调控机制的研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(3): 581 - 584.
[18] 王紫艳, 李磊, 刘建勋, 等. 补阳还五汤对多因素诱导急性血瘀证模型大鼠血小板功能及相关炎性因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(21): 1 - 9.
[19] TORTOSA - CAPARRÓS E, NAVAS - CARRILLO D, MARÍN F, et al. Anti - inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(16): 3421 - 3429.
[20] 黄美艳, 唐于平, 李伟霞, 等. 采用代谢组学策略研究佛手散对急性血瘀大鼠的活血化瘀作用机制[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3576 - 3582.
[21] CHEN C Y, LUO F, WU P Y, et al. Metabolomics reveals metabolite changes of patients with pulmonary arterial hypertension in China[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(4): 2484 - 2496.
[22] 赵钟辉, 郭蓉娟, 冉超, 等. 基于代谢组学探讨补阳还五汤治疗脑梗死恢复期气虚血瘀证的效应机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(8): 1390 - 1401.
[23] PENG B, GEUE S, COMAN C, et al. Identification of key lipids critical for platelet activation by comprehensive analysis of the platelet lipidome[J]. Blood, 2018, 132(5): 1 - 12.
[24] 麦旦提, 杨婵, 薛芸, 等. 基于花生四烯酸代谢通路研究水飞蓟素对脂多糖诱导炎症模型影响[J]. 色谱, 2017, 35(6): 578 - 586.
[25] WANG Z N, KLIPFELL E, BENNETT B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. Nature, 2011, 472(7341): 57 - 63.
[26] DREXLER Y, MOLINA J, MITROFANOVA A, et al. Sphingosine - 1 - phosphate metabolism and signaling in kidney diseases[J]. J Am Soc Nephrol, 2021, 32(1): 9 - 31.
[27] PETERSEN N H T, OLSEN O D, GROTH - PEDERSEN L, et al. Transformation - associated changes in sphingolipid metabolism sensitize cells to lysosomal cell death induced by inhibitors of acid sphingomyelinase[J]. Cancer Cell, 2013, 24(3): 379 - 393.
[28] TIDHAR R, SIMS K, ROSENFELD - GUR E, et al. A rapid ceramide synthase activity using NBD - sphinganine and solid phase extraction[J]. J Lipid Res, 2015, 56(1): 193 - 199.
[29] JUNG B, OBINATA H, GALVANI S, et al. Flow - regulated endothelial S1P receptor - 1 signaling sustains vascular development[J]. Dev Cell, 2012, 23(3): 600 - 610.
[30] PARHAM K A, ZEBOL J R, TOOLEY K L, et al. Sphingosine 1 - phosphate is a ligand for peroxisome proliferator - activated receptor - γ that regulates neoangiogenesis[J]. FASEB J, 2015, 29(9): 3638 - 3653.
[31] 陈严, 吴柱国. 牛磺酸对心肌保护作用的研究进展[J]. 广东医学院学报, 2010, 28(5): 569 - 572.
[32] WU H, JIN Y, WEI J N, et al. Mode of action of taurine as a neuroprotector[J]. Brain Res, 2005, 1038(2): 123 - 131.
[33] 赵晓艳, 杜彦廷, 段佳慧, 等. 牛磺酸对高尿酸血症大鼠抗氧化指标和炎症因子的影响[J]. 动物医学进展, 2018, 39(6): 51 - 54.
[34] 王靖怡, 李军, 陈恒文, 等. 冠心病血瘀证免疫炎症机制研究撷要[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22(11): 3803 - 3809.
[35] 尤心怡, 王文凤, 徐霞, 等. 基于 UPLC - Q - TOF/MS 的补阳还五汤抗慢性炎症大鼠血浆代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(4): 468 - 476.
[36] 王义国, 于明珠, 张启明, 等. 气虚的生物学基础和症状特征[J]. 陕西中医药大学学报, 2019, 42(6): 33 - 35, 47.
[37] 后宗, 刘舒, 宋凤瑞, 等. 基于非靶向尿液代谢组学方法的气虚模型评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(19): 121 - 127.
[38] 李静, 钟森杰, 李亮, 等. 基于尿液代谢组学的冠心病血瘀证模型大鼠生物学基础研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(3): 63 - 68.
[39] 刘江碧, 熊小明. 谷氨酰胺在肠道中的作用研究进展[J]. 中药与临床, 2019, 10(2): 60 - 62.
[40] 邢雅玲, 余林中. 睡眠剥夺机制和中医药干预的进展[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(6): 47 - 49.
[41] LINDEN J, KOCH - NOLTE F, DAHL G. Purine release, metabolism, and signaling in the inflammatory response[J]. Annu Rev Immunol, 2019, 37: 325 - 347.
[42] 杨丽军. 糖肾康(浓缩)丸对糖尿病肾病大鼠的药效学及代谢组学研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.

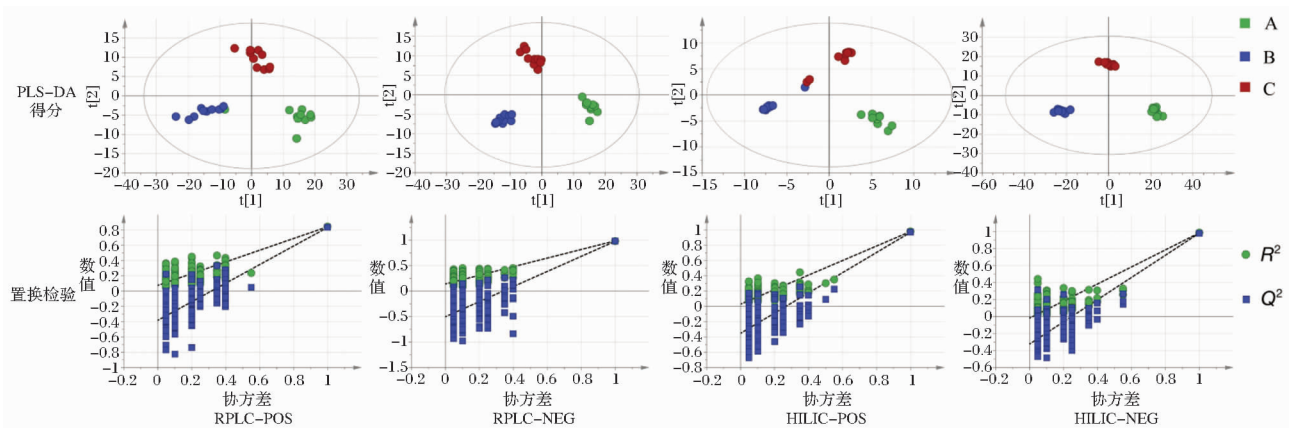
基于血小板代谢组学探究补阳还五汤对气虚血瘀证的影响

（正文见 126－134 页）



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 补阳还五汤组。

图 1　补阳还五汤对各组大鼠血小板形态学影响（扫描电镜，×10 000）



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 补阳还五汤组。

图 3　气虚血瘀证大鼠血小板样本多元统计分析结果

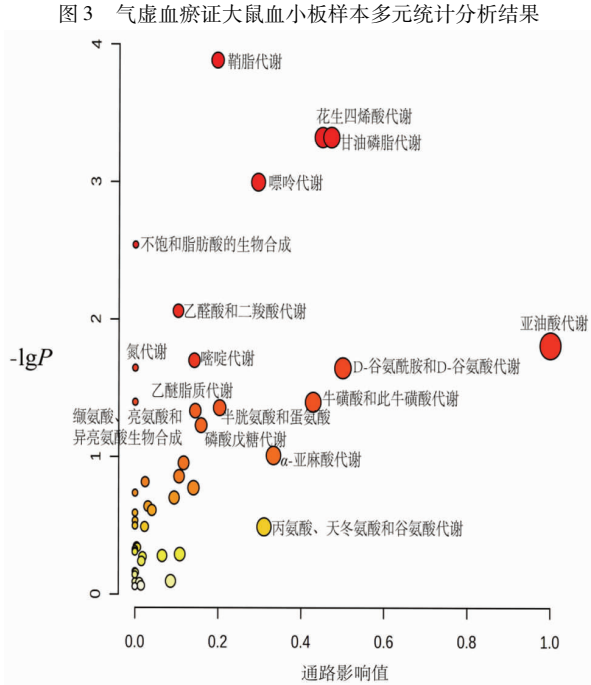
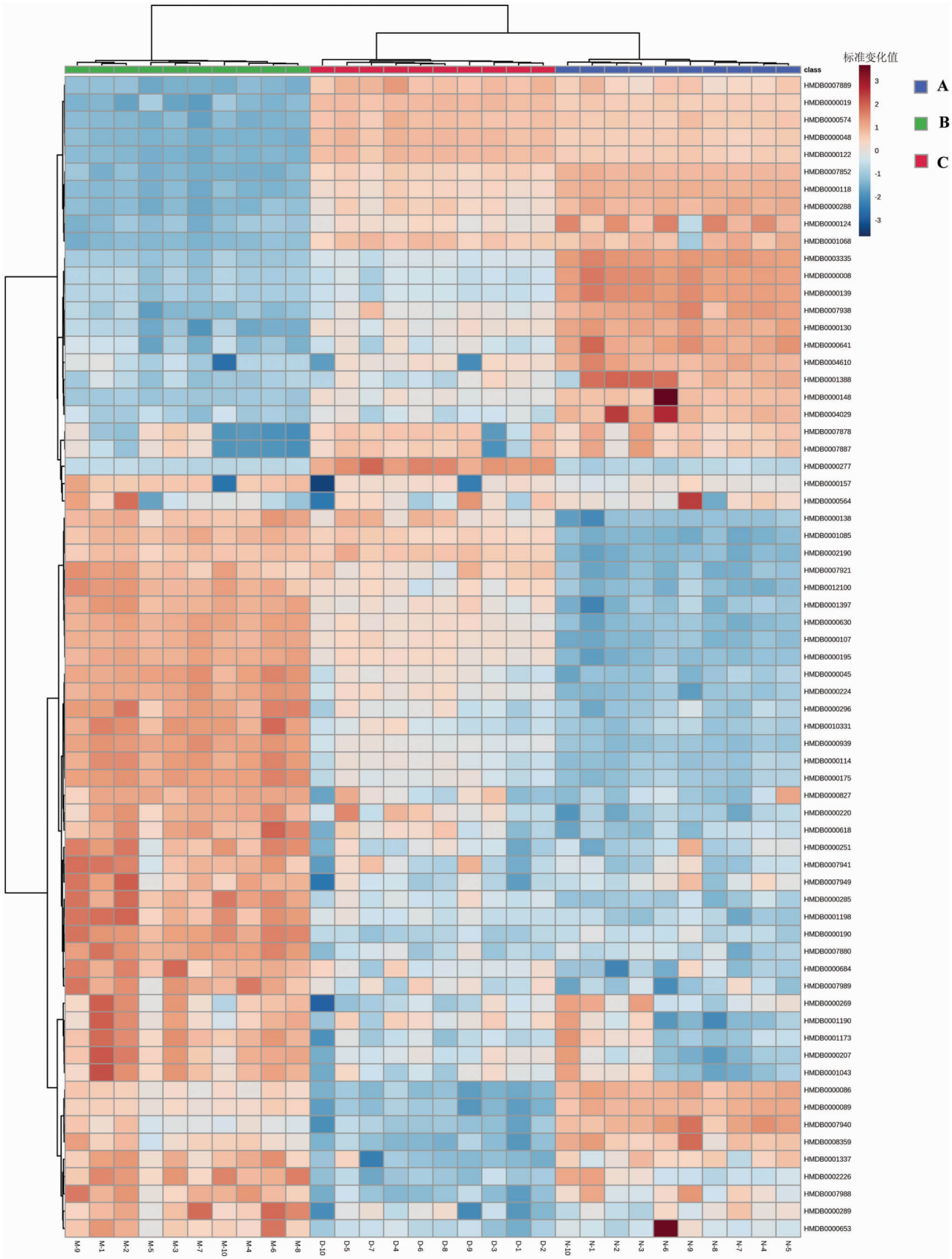


图 5　气虚血瘀证大鼠血小板中潜在生物标志物的 KEGG 通路富集分析



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 补阳还五汤组。红色代表高表达，蓝色代表低表达；颜色越深表明强度变化越大。

图 4 补阳还五汤调节的相关生物代谢成分在各组大鼠中的变化