

五灵胶囊对肝郁大鼠肝脏和大脑的调节作用

于金高¹, 惠玉晶¹, 宋忠兴¹, 唐志书^{1,2*}, 王梅¹, 刘红娜³, 周建平³, 曹兆军³

[1. 陕西中医药大学陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712046; 2. 北京中医药大学, 北京 100029; 3. 清华德人西安幸福制药有限公司, 陕西 西安 710043]

摘要: **目的** 研究五灵胶囊对肝郁大鼠肝脏和大脑的调节作用。**方法** 采用超高效液相色谱法对五灵胶囊小分子化学成分进行表征。90只SD大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药组和五灵胶囊高、中、低剂量组(1、0.5、0.25 g/kg), 采用多因素造模法制备肝郁证模型并连续给药30 d。采用旷场实验、糖水偏好实验等表征大鼠的情绪状态; 采用HE染色、ELISA和Western blot等技术检测肝脏组织形态以及大脑中炎症因子、神经递质、神经营养因子等表达, 采用GC-MS技术靶向分析大鼠大脑和肝脏的代谢组。**结果** 与正常组比较, 五灵胶囊能改善大鼠的行为指标, 回调肝指数, 改善肝脏组织形态; 并能降低大鼠脑中IL-1 β 、IL-6水平, 不同程度增加5-HT、DA、Bcl-2和BDNF等表达。靶向代谢组学研究表明, 五灵胶囊可同时调节大鼠肝脏和大脑中的氧化应激和炎症相关代谢物, 还可能通过调节支链氨基酸、单胺类神经递质等途径调节肝-脑轴。**结论** 本研究发现五灵胶囊对肝郁大鼠的肝脏和大脑均具有一定调节作用。

关键词: 五灵胶囊; 肝郁; 焦虑; 抑郁; 代谢组学

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)06-2018-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.041

五灵胶囊由丹参、五味子、柴胡、灵芝4味中药经回流提取、减压浓缩等工艺制备而成, 具有疏肝健脾、活血化瘀的作用, 主要用于治疗慢性乙型肝炎属肝郁脾虚挟瘀证, 症见纳呆、腹胀暖气、胁肋胀痛、疲乏无力等^[1-2]。

中医认为, 肝主疏泄、主情志, 肝气郁结则情志不舒, 故慢性乙型肝炎造成的肝郁证可能影响到患者的情绪状态。临床研究发现, 慢性乙型肝炎患者有近50%患有焦虑和抑郁等情绪障碍, 且随着病情的加重和病程的延长这一比例逐渐提高^[2-3], 具体表现为不同程度的情绪消极低落、焦虑、易怒、记忆力下降、失眠等, 这些表现也与中医临床上肝郁相关证型的表现一致^[4-6]。现代生物学研究发现, 肝脏与大脑之间有着非常密切的物质和信息交流, 支链/直链氨基酸、生物胺、葡萄糖及糖基化产物等是同时调控肝脏代谢功能和大脑认知功能的重要媒介^[7-8], 肝-脑轴是肝脏受损导致情绪障碍的生理学基础^[9]。

五灵胶囊对肝郁证动物模型的调节作用未见报道。本研究采用多因素造模法建立肝郁大鼠模型, 在此基础上评价五灵胶囊的调节作用, 并从肝脏和大脑代谢的角度探索相关的作用机制, 以期在五灵胶囊的临床应用提供科学

依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级成年雄性SD大鼠, 体质量(200 \pm 20)g, 购自成都达硕实验动物有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(川)2020-030], 于光暗周期各12h的环境下饲养, 保持室内温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度(50 \pm 10)% , 给予普通大鼠饲料饲养。实验方案经陕西中医药大学动物实验伦理委员会批准(伦理号SUCMDL20210620001), 所有程序均严格按照动物使用和护理的伦理原则进行。

1.2 药物与试剂 五灵胶囊药物粉末(批号21031-210304, 清华德人西安幸福制药有限公司); 复方丹参滴丸(批号200412, 天津天士力医药集团股份有限公司)。盐酸肾上腺素(批号2012071, 天津金耀药业有限公司); 大鼠多巴胺(dopamine, DA)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA试剂盒[批号H721AD0357、H721AD0356、H816AD0501、H831AD0501, 生工生物工程(上海)股份有限公司]; 脑源性神经营养因子(BDNF)抗体(批号10C7172, 武汉博士德生物工程

收稿日期: 2023-09-05

基金项目: 中药大品种品牌价值提升示范研究项目(202190025); 现财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-21); 咸阳市2020重大科技专项(2020K01-20)

作者简介: 于金高(1989—), 男, 博士, 副教授, 从事中药物质基础与毒效评价研究。Tel: (029) 38182205, E-mail: jingao_yu@sina.cn

*通信作者: 唐志书(1972—), 男, 博士, 教授, 从事中药资源开发与中药质量分析研究。Tel: (010) 64089180, E-mail: tzs6565@163.com

有限公司); β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 抗体、Bcl-2 相关蛋白 X (Bax) 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体 (批号 20536-1-AP、12789-1-AP、50599-2-Ig、SA00001-2, 武汉三鹰生物技术有限公司); 彩虹 245 广谱蛋白 marker (批号 326F021, 北京索莱宝生物科技有限公司); 甲氧胺吡啶溶液、硅烷化试剂 (BSTFA+1% TMCS) (批号 BCCD8751、BCCD2584, 德国 Sigma 公司); L-2-氯苯丙氨酸、正己烷中 34 种正构烷烃类混合对照品 (批号 J15J7E9147、YY21050464, 上海源叶生物科技有限公司)。

1.3 仪器 1510 型多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); GCMS-TQ8050NX 型气-质联用系统 (日本岛津公司); EPS300 型蛋白质电泳转印系统 (上海天能科技有限公司); GelDoc XR 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 五灵胶囊化学成分分析 采用超高效液相色谱 (UPLC) 法, 参考前期研究条件^[10], 对五灵胶囊的小分子化学成分进行表征, 并且以对照品进行对比确认。参照 2020 年版《中国药典》规定的色谱条件, 以丹酚酸 B、五味子醇甲的峰面积为对照, 采用外标一点法计算五灵胶囊中各成分的含量; 参照 2020 年版《中国药典》规定的灵芝多糖、三萜及甾醇的含量测定方法对五灵胶囊中多糖和三萜皂苷的含量进行测定。

2.2 动物分组、造模及给药 将 90 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 7 d, 随机分为正常组、模型组、阳性药组 (复方丹参滴丸) 和五灵胶囊高、中、低剂量组, 五灵胶囊组每组 20 只大鼠, 其余组每组 10 只大鼠。采用多因素造模法制备肝郁证模型, 除正常组单独饲养外, 其余大鼠持续 30 d 交替给予复合刺激 (40~65 V 随机电击 10 min、夹尾 5~30 min、水框浸泡 12 h、断食 12 h、断水 12 h、孤养 24 h、湿框 24 h、100 W 超声波 (40 kHz) 持续刺激 2~8 h、辣椒粉刺激 12 h、8 W 超声波 (20~55 kHz) 不规则刺激 24 h、昼夜颠倒 24 h), 造模过程中每只大鼠每周 1 次颈部皮下注射盐酸肾上腺素 0.1 mL。

五灵胶囊组在造模的同时灌胃给予五灵胶囊粉末水混悬液, 高剂量按人临床等效剂量 2 倍换算, 即 1.0 g/kg, 中、低剂量分别为人临床等效剂量 1 倍 (0.5 g/kg) 和 0.5 倍 (0.25 g/kg); 复方丹参滴丸研碎后以纯水混悬, 给药剂量为 90 mg/kg; 正常组与模型组灌胃等体积纯水, 连续造模及给药 30 d。给药结束后次日, 大鼠以 10% 水合氯醛 0.4 mL/100 g 腹腔注射麻醉, 取部分肝脏于 4% 多聚甲醛中室温固定 24 h; 取部分肝脏、大脑海马及皮层组织于液氮速冻后置于 -80 °C 保存。

2.3 行为学观察 采用旷场实验、糖水偏好实验和 Morris 水迷宫实验表征大鼠情绪状态和记忆能力。①旷场实验, 将大鼠放置在地面上直径为 50 cm 的圆板中心, 立即测定 60 s 内大鼠停滞 (四肢爬行活动停止) 总时长。②糖水偏

好实验, 适应性训练时给予大鼠完全相同饮水瓶 2 个 (分别装纯水和 1% 蔗糖水溶液), 自由饮用 12 h 后交换水瓶位置再自由饮用 12 h, 接着断食断水 12 h 后开始测试, 给予大鼠 1 瓶纯水、1 瓶 1% 蔗糖水溶液, 分别计算 12 h 饮水量, 计算糖水偏好率, 公式为糖水偏好率 = 糖水消耗量 / 糖水和纯水总消耗量 \times 100%。③Morris 水迷宫实验, 将水迷宫划分为 4 个象限, 在某一象限中心水面下 1 cm 设一圆形平台, 每天将大鼠分别从 4 个象限边缘中间点面向桶壁放入水中, 记录大鼠在 60 s 内找到平台的时间, 如其未找到, 则引导其爬上平台并停留 10 s, 连续训练 4 d 后开始测试, 将大鼠从平台所在象限的对角象限放入, 利用水迷宫软件记录运动轨迹以及潜伏期等数据。

2.4 脏器指数和粪便含水率测定 给药结束后解剖大鼠, 取其肝脏称定质量, 计算脏器指数。在给药第 7 天和第 12 天分别收集大鼠粪便, 采用烘干法测定粪便含水率。

2.5 HE 染色观察肝组织病理变化 解剖时取肝右叶以 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 石蜡包埋、切片, 常规 HE 染色, 中性树脂封片, 于光镜下观察肝组织结构的病理变化。

2.6 ELISA 法检测脑组织 IL-1 β 、IL-6、DA 及 5-HT 水平 将大鼠的大脑皮层和海马组织低温匀浆, 离心后取上清, 按照相应 ELISA 试剂盒说明书分别检测 IL-1 β 、IL-6、DA 及 5-HT 水平。

2.7 Western blot 法检测脑组织 BDNF、Bcl-2、Bax 蛋白表达 将蛋白酶、磷酸酶抑制剂与上样缓冲液按比例加至脑组织中, 匀浆后放置 10 min, 离心取上清, BCA 法进行蛋白定量, 蛋白煮沸变性后保存待测。取蛋白样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿法转印至 PVDF 膜, 5% BSA 溶液室温封闭 2 h, 孵育 BDNF、Bcl-2、Bax 及 β -actin 一抗, 充分洗膜后加入相应二抗进行孵育, 再次充分洗膜后用化学发光法显色, 凝胶成像系统检测并拍照, 通过 Image J 软件计算灰度值。

2.8 代谢组学检测 取肝脏和大脑样本约 100 mg 加入 1 mL 异丙醇-乙腈-水 (3 : 3 : 2, 含 1 mg/L L-2-氯苯丙氨酸内标物) 提取液, 室温匀浆 2 min, 振摇 1 h, 高速离心 10 min, 取上清液 0.8 mL, 离心浓缩至近干, 冷冻干燥充分除去水分。冻干物中加入 80 μ L 15 mg/mL 甲氧胺吡啶溶液静置, 涡旋 2 min, 37 °C 密闭孵育 24 h。次日加入 80 μ L 硅烷化试剂, 涡旋 5 s, 70 °C 孵育 1 h, 室温放冷。加入 600 μ L 正庚烷, 取 180 μ L 至玻璃内衬管中进样分析。另取 50 μ L 各样本混合, 作为质控样本。以纯水作为空白对照, 识别衍生化背景信号。

DB-5 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm, 1.0 μ m); 载气氦气, 体积流量 1 mL/min; 不分流方式进样; 进样口温度 280 °C; 升温程序, 100 °C 维持 4 min, 以 4 °C/min 上升至 320 °C, 维持 8 min; 质谱离子源温度 200 °C; 溶剂延迟 3.5 min。根据 GCMSsolution 4.52 软件内嵌的 Smart Metabolite Database 数据库, 采用 C7~C40 正构烷烃进行保留时间校正, 以多反应监测和选择离子监测模式对 571 种

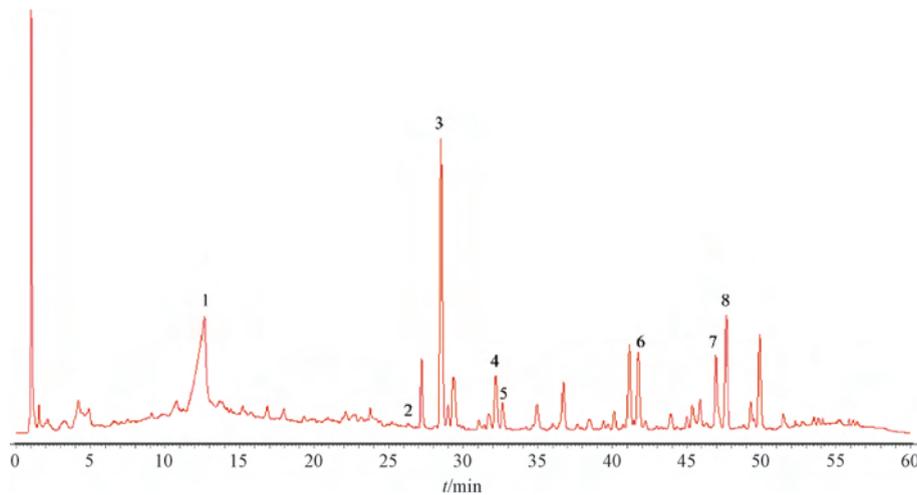
硅烷化内源性代谢物（包括糖类、氨基酸、脂质等）进行靶向定量检测。

2.9 数据处理和分析 糖水偏好指数与粪便含水率数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，旷场实验、Morris水迷宫相关数据以（中位数 \pm 四分位）数表示，其余数据均以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，将各数据导入 GraphPad Prism 6.0 软件作图，组间差异采用单因素方差分析进行计算， $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。代谢组学色谱图以 GCMSsolution 软件自动积分前 2 个最大峰的峰面积，平滑 5 次，半峰宽 3 s，时间带 0.3 min。峰面积导出后以 R 语言软件进行处理，根据内标物峰面积和样本重量归一化后再进行中心化和 pareto 标度化处理，最后进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 并作图。在 S 形图 (S-Plot) 中以协方差绝对

值 >0.02 和相关性绝对值 >0.1 为阈值筛选关键代谢物，输入 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 组学平台进行代谢通路分析。共享与特有化合物结构分析图 (SUS-plot) 中以相关性绝对值 >0.2 和相关性之差绝对值 <0.1 为阈值筛选关键代谢物。

3 结果

3.1 五灵胶囊的物质基础 五灵胶囊中含有多种有效成分，包括来自丹参的丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹酚酸 B，来自五味子的五味子醇甲、五味子醇乙，来自柴胡的柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 等 (图 1)。含量测定结果显示五灵胶囊药粉中五味子醇甲含量为 0.458%，丹酚酸 B 含量为 1.154%，总多糖含量为 3.418%，三萜及甾醇含量为 3.161%。



1. 丹酚酸 B 2. 柴胡皂苷 A 3. 五味子醇甲 4. 五味子醇乙 5. 柴胡皂苷 D 6. 丹参酮 I 7. 五味子甲素 8. 丹参酮 II_A

图 1 五灵胶囊的 UPLC 图

3.2 五灵胶囊对肝郁大鼠行为学的影响 在旷场实验中，与正常组比较，模型大鼠较为呆滞，探索行为减少，60 s 内停滞时长增加 ($P<0.05$)，糖水偏好指数降低 ($P<0.01$)，表明造模后大鼠表现出焦虑和抑郁倾向，模型复制成功；与模型组比较，五灵胶囊高、中剂量组旷场停滞时长缩短 ($P<0.05$, $P<0.01$)，中、低剂量组糖水偏好指数升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 2A~2B。

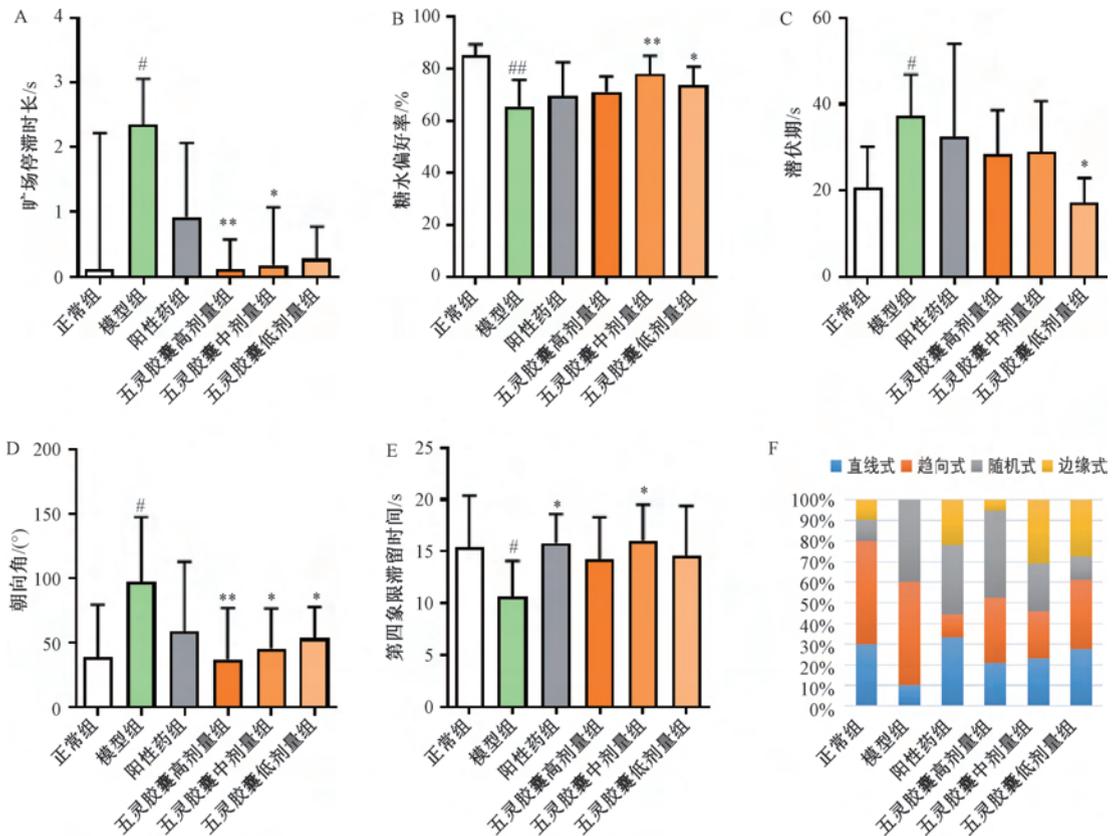
焦虑和抑郁情绪往往伴随着记忆力功能减退，Morris 水迷宫实验通过记录大鼠在水平迷宫中的行为模式评价其空间学习记忆能力。由图 2C~2F 可知，与正常组比较，模型组潜伏期延长 ($P<0.05$)，朝向角度增加 ($P<0.05$)，第四象限滞留时间缩短 ($P<0.05$)，且其直线式搜寻策略占比降低，更加趋向于漫无目的的随机式，表明肝郁证大鼠的学习记忆能力受损，这与临床上肝郁证患者的健忘症状表现一致；与模型组比较，五灵胶囊低剂量组潜伏期缩短 ($P<0.05$)，五灵胶囊各剂量组朝向角度减小 ($P<0.05$)，阳性药组和五灵胶囊中剂量组第四象限滞留时间延长 ($P<0.05$)。

3.3 五灵胶囊对肝郁大鼠肝组织形态及粪便含水率的影响 与正常组比较，模型组肝指数和粪便含水率降低

($P<0.05$, $P<0.01$)，说明肝郁证大鼠的肝脏代谢出现异常，且与之相关的消化系统功能也出现了改变，表现出一定程度的脾虚特征；与模型组比较，五灵胶囊中剂量组肝指数升高 ($P<0.01$)，见图 3A~3B。进一步对肝脏进行病理结构观察发现，正常组大鼠肝脏肝细胞索排列整齐，轮廓清晰，围绕中央静脉呈明显辐射状；模型大鼠肝细胞索排列出现了轻微散乱，辐射状不明显，且出现炎细胞浸润，提示肝脏代谢发生异常；阳性药组和五灵胶囊各剂量组在肝细胞索辐射状排列和炎细胞浸润方面均有不同程度改善，见图 3C。

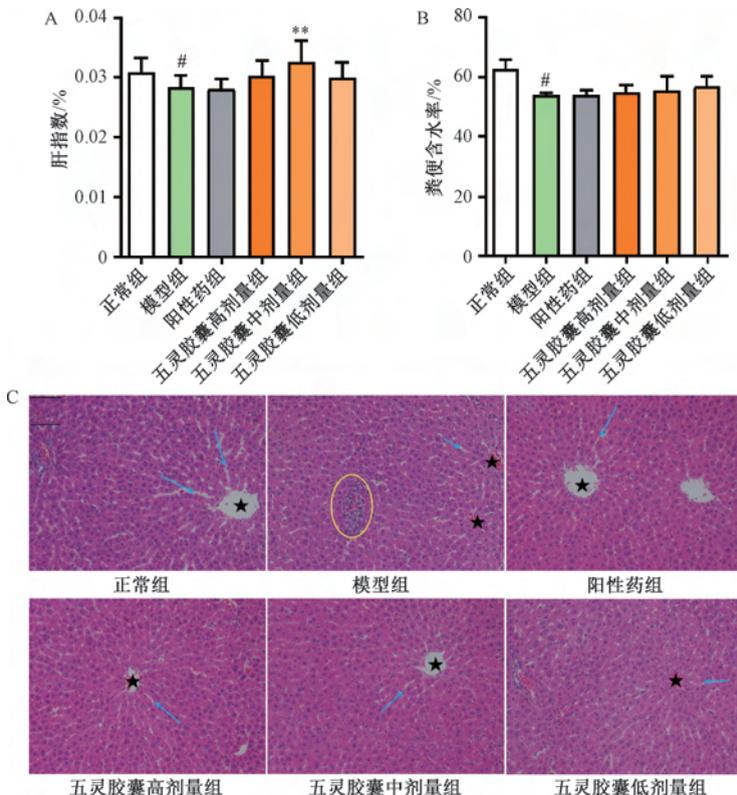
3.4 五灵胶囊对肝郁大鼠脑组织炎症因子和单胺类代谢物的影响 与正常组比较，模型组大鼠大脑 5-HT 水平和 Be1-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，五灵胶囊各剂量组 IL-1 β 、IL-6 水平均降低 ($P<0.01$)，DA 水平升高 ($P<0.01$)，五灵胶囊高、低剂量组 5-HT 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，阳性药组 BDNF 水平升高 ($P<0.05$)，阳性药组和五灵胶囊中剂量组 Be1-2 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，见图 4。

3.5 五灵胶囊同时调节肝脏和大脑中生物胺代谢以及抗氧化和抗炎相关通路 为了进一步探究该模型中大鼠肝脏和



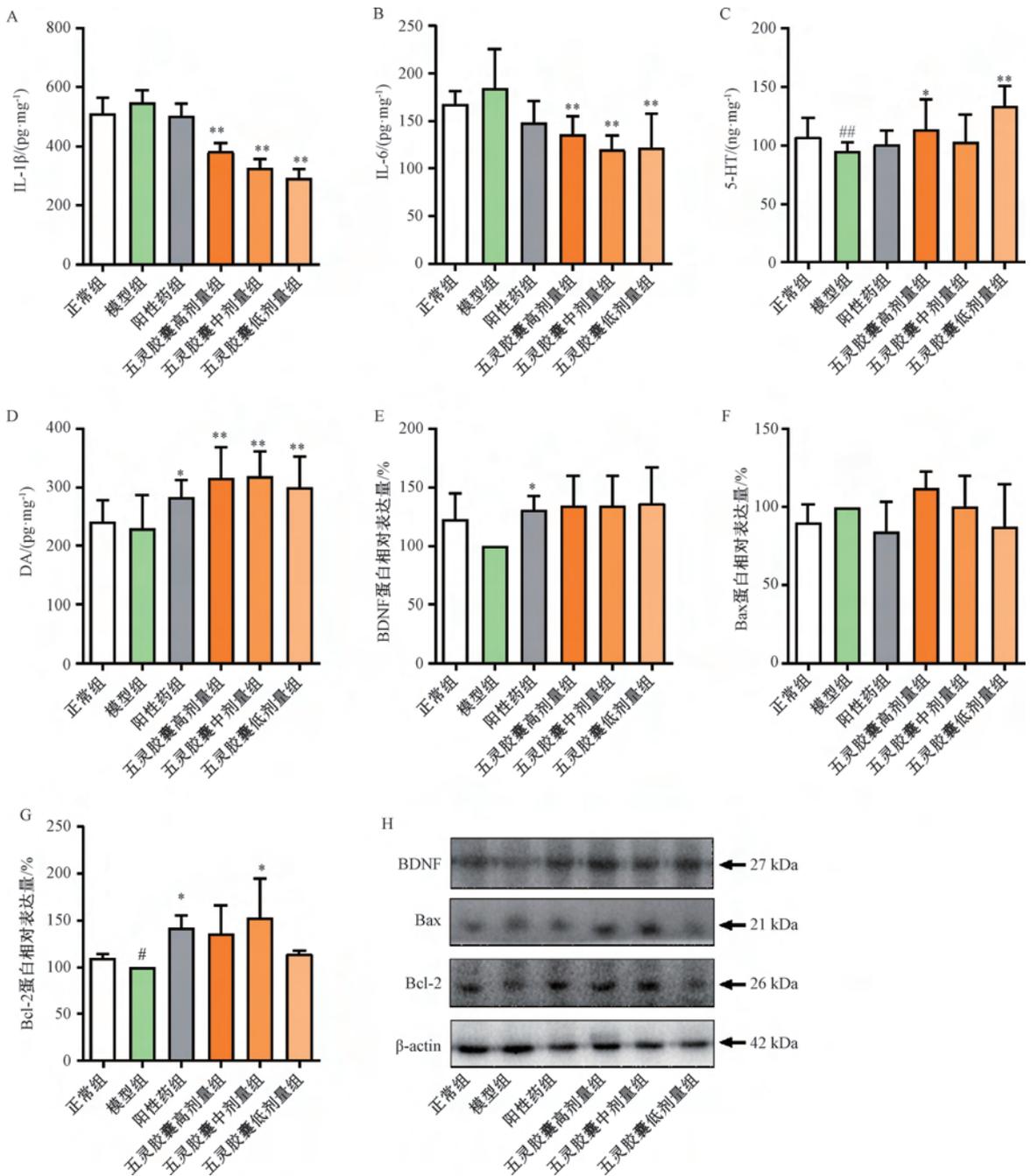
注: A为各组旷场滞留时长, B为各组糖水偏好率, C为各组潜伏期, D为各组朝向角, E为各组第四象限滞留时间, F为各组搜索策略。与正常组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 五灵胶囊对肝郁大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 20$)



注: A为各组肝指数, B为各组粪便含水率, C为各组肝脏组织病理。与正常组比较, # $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。★为中央静脉, 蓝色箭头为肝细胞索, 黄色椭圆为炎性浸润。

图3 五灵胶囊对肝郁大鼠肝组织形态及粪便含水率的影响 (HE染色, $\times 200, \bar{x} \pm s, n = 10 \sim 20$)



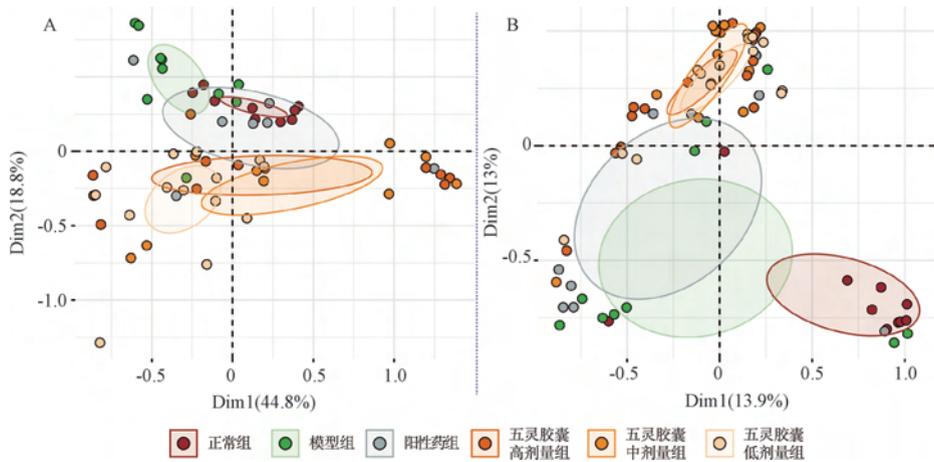
注：A~D分别为大鼠脑组织中IL-1β、IL-6、5-HT、DA水平，E~G分别为大鼠脑组织中BDNF、Bax、Bcl-2蛋白表达，H为大鼠脑组织BDNF、Bax、Bcl-2蛋白条带图。与正常组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01。

图4 五灵胶囊对肝郁大鼠脑组织炎症因子和单胺类代谢物的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 20$)

大脑的代谢物变化，揭示肝脏和大脑的代谢关联，实验采用气-质联用靶向代谢组学检测了各组大鼠大脑和肝脏中的代谢物，并以代谢物峰面积作为定量依据，采用PCA分析进行代谢轮廓表征（图5）。结果表明，模型组（绿色圈）与正常组（红色圈）大鼠的代谢轮廓发生了明显偏移，而阳性药组（灰色）和五灵胶囊处理各组（橙色）代谢轮廓则倾向于二者之间，说明药物处理在一定程度上回调了大鼠肝脏和大脑的代谢。

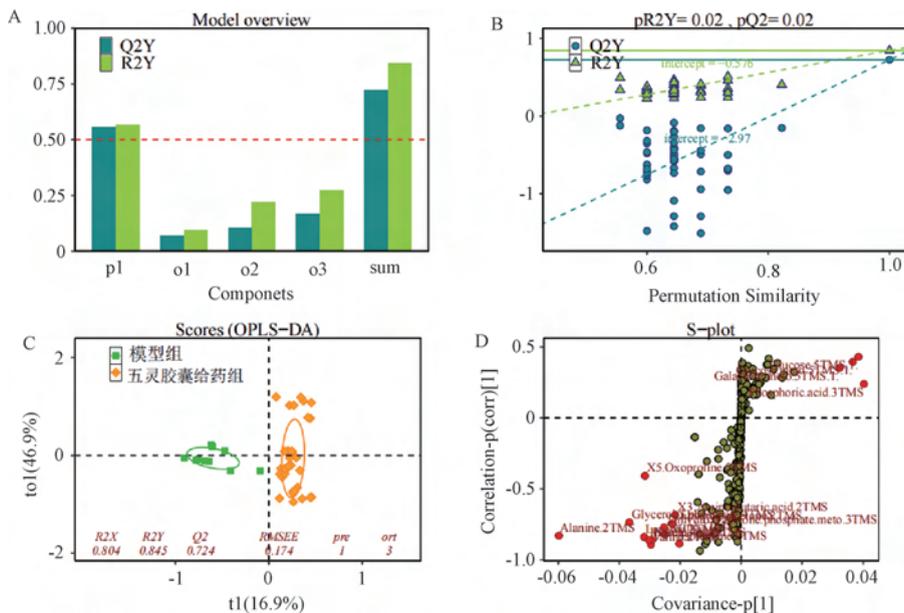
灵胶囊各给药组之间肝脏（图6）和大脑（图7）的代谢差异。结果表明，OPLS-DA建模具有较好的可靠度和预测性，*Q*²值均达到0.7左右（图6A、7A），置换检验中*Q*²和*R*²截距均为负值，充分说明了建模的可靠性（图6B、7B）。得分图分析显示大鼠肝脏和大脑的代谢轮廓在模型组和五灵胶囊处理组之间均具有显著差异（图6C、7C）。

S-Plot分析表明，五灵胶囊给药后在肝脏中主要的差异代谢物包括上调的葡萄糖（glucose）、半乳糖（galactose）以及下调的丙氨酸（alanine）、缬氨酸（valine）、丝氨酸



注：A 为大脑代谢轮廓，B 为肝脏代谢轮廓。

图5 各组大鼠大脑和肝脏代谢轮廓 PCA 分析



注：A 为交叉验证，B 为置换检验，C 为得分图，D 为 S-Plot 图。

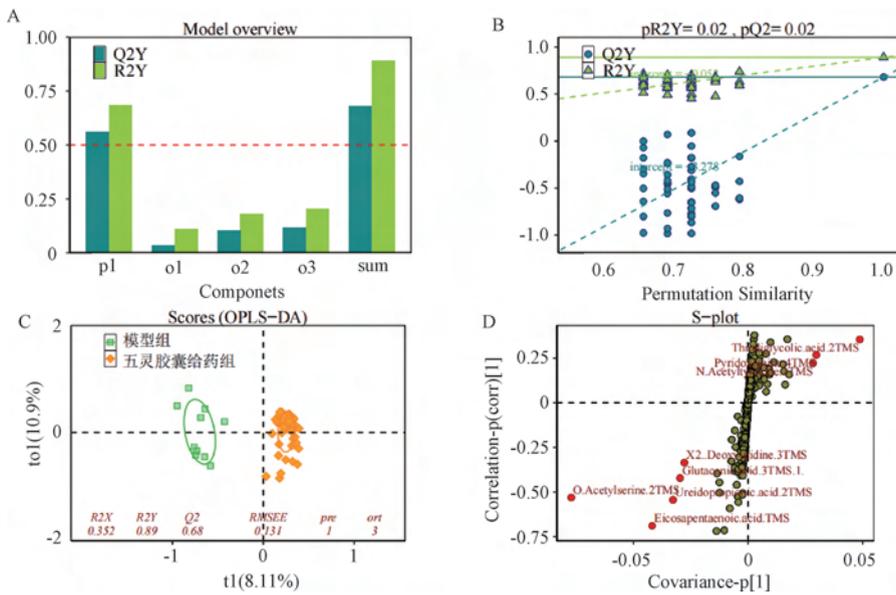
图6 模型组与五灵胶囊组大鼠肝脏代谢物 OPLS-DA 分析

(serine)、亮氨酸 (leucine)、异亮氨酸 (isoleucine)、羟脯氨酸 (hydroxyproline)、3-氨基戊二酸 (3-aminoglutaric acid)、甘油磷酸 (glycerol 3-phosphate)、二羟基丙酮 (dihydroxyacetone)、烟酰胺 (niacinamide) 等 (图 6D)。经 MetaboAnalyst 分析主要属于糖代谢通路、氨酰-tRNA 合成通路、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解通路、甘油酯代谢通路等。

而在大脑中主要的差异代谢物包括五灵胶囊处理后上调的亚硫基二乙酸 (thiodiglycolic acid)、吡哆胺 (pyridoxamine)、N-乙酰酪氨酸 (N-acetyltyrosine) 和下调的二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid)、戊烯二酸 (glutaconic acid)、O-乙酰丝氨酸 (O-acetylserine)、脲基丙酸 (ureidopropionic acid)、2'-脱氧尿苷 (2'-deoxyuridine) 等 (图 7D)，这些代谢物经 MetaboAnalyst 分析，主要属于嘧啶代谢和维生素 B6 代谢通路等。

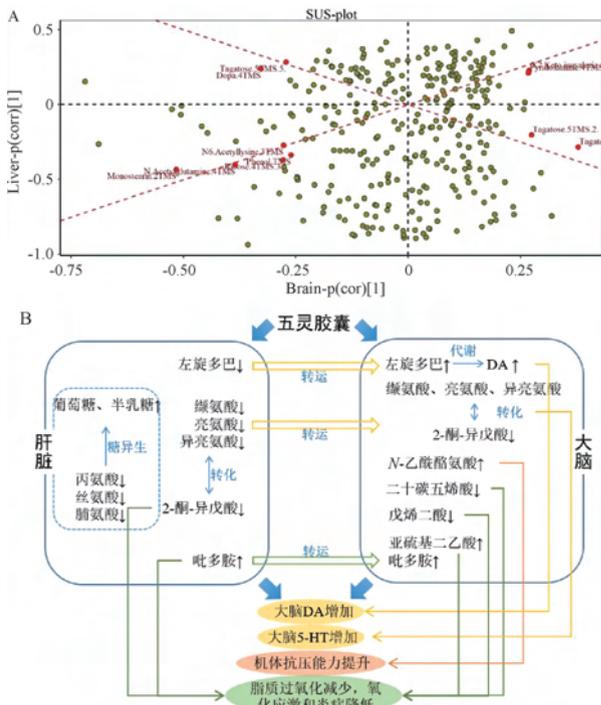
研究进一步通过观察大脑和肝脏关联的 SUS-plot (图 8)，发现五灵胶囊处理后，在大脑和肝脏之间出现了同向调节代谢物和反向调节代谢物。其中，2-酮-异戊酸 (2-keto-isovaleric acid)、吡哆胺 (pyridoxamine)、硬脂酸甘油酯 (monostearin)、N-乙酰谷氨酰胺 (N-acetylglutamine)、核糖 (ribose)、苯酚 (phenol)、6-乙酰赖氨酸 (6-acetyllysine) 等在大脑和肝脏中同时呈升高或降低；而左旋多巴 (dopa)、塔格糖 (tagatose) 在大脑和肝脏中分别呈相反的调节趋势。这些同向和反向调节代谢物可能是五灵胶囊调节肝-脑轴的关键代谢物靶点。

2-酮-异戊酸是支链氨基酸的同源物质^[11]，其含量降低与缬氨酸、亮氨酸等降低趋势一致，提示在肝脏和大脑中支链氨基酸的含量同时发生降低。支链氨基酸除了在肝脏中引起氧化应激和炎症，还可进入大脑，抑制 5-HT 等神经递质的合成^[12]。同理，吡哆胺也同时在肝脏和大脑中含量



注：A 为交叉验证，B 为置换检验，C 为得分图，D 为 S-Plot 图。

图 7 模型组与五灵胶囊组大鼠大脑代谢物 OPLS-DA 分析



注：A 为大脑和肝脏之间的 SUS-plot 图，B 为五灵胶囊对肝-脑轴的调节作用。

图 8 五灵胶囊在大脑和肝脏之间的 SUS-plot 图以及对肝-脑轴的调节作用

上升，有助于同时抑制肝脏和大脑中的脂质过氧化反应。左旋多巴是 DA 的代谢前体，肝脏中左旋多巴可被转运进入大脑并代谢为 DA；五灵胶囊处理后，左旋多巴在肝脏和大脑中呈现相反的调节模式，提示左旋多巴的转运过程可能被增强。五灵胶囊同时调节肝郁模型大鼠肝脏和大脑中的这些代谢物，说明其对肝-脑轴具有一定的调节作用。

4 讨论

随着社会发展及人类生活方式的改变，人类社会竞争

加剧、生活压力大等因素易造成焦虑、抑郁等不良情绪^[13]。而由于缺乏特效药，慢性乙型肝炎病程复杂多变，治疗过程漫长，患者更容易产生情绪问题，影响治疗依从性，增加了医患矛盾风险^[14]。

本研究使用复方丹参滴丸作为阳性对照，主要有以下几个原因：(1) 大量研究已经证明丹参以及其中的丹参醌类、丹酚酸类、丹参素等对焦虑、抑郁等具有显著的调节作用^[15-18]，本实验中肝郁证模型的行为学评价也主要是焦虑、抑郁状态等方面；(2) 功效方面，复方丹参滴丸具有较好的活血化痰和疏肝解郁作用，王灿等^[19]将其用于辅助治疗肝郁气滞导致的乳腺癌，取得了良好效果；(3) 复方丹参滴丸和五灵胶囊的配方中，丹参分别为君药和臣药，对复方整体功效的发挥均起着至关重要的作用。但是，在本研究中，复方丹参滴丸作为阳性药仍具有一定的局限性。

气-质联用技术具有色谱分辨率高、代谢物覆盖范围广、有机试剂消耗较少等特点，与液-质联用方法比较，其对糖类、氨基酸、脂质等具有更好的分析能力^[20]。本研究应用了气-质联用靶向代谢组学方法，该方法与 571 种内源性代谢物数据库结合后，大大简化了代谢物鉴定流程，实现了鉴定、检测和定量的同步；再结合 R 语言数据处理和作图脚本，实现了代谢组学研究的半自动化。

本研究中五灵胶囊处理后肝脏中的支链氨基酸下调结果与肝脏病理切片和肝指数较为一致，提示肝脏的氧化应激和炎症水平降低。这可能是由于摄入的五灵胶囊中含有大量糖类^[10]，葡萄糖和半乳糖增加的同时，丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸等（糖异生主要来源）减少，导致机体发生了糖代谢适应性调节^[21]。其中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸统称为支链氨基酸，往往在机体发生氧化应激、炎症等状态下代谢减慢、产生堆积，从而反过来又通过线粒体途径诱导氧化应激和炎症^[22]。

有研究表明，给予 N-乙酰酪氨酸处理能够提高动物的

抗压能力^[23]。亚硫酸二乙酸、吡多胺(维生素B6)和N-乙酰酪氨酸均与机体抗氧化代谢通路有关,其中吡多胺是机体脂质氧化和氧化糖基反应的抑制因子,研究显示吡多胺能够缓解神经损伤,提高认知能力^[24];N-乙酰酪氨酸还能够介导“线粒体兴奋”效应(即在应激状态下,线粒体通过释放微量的活性氧,激活细胞各类抗氧化因子表达,从而帮助机体对抗应激压力)。而五灵胶囊增加大脑中代谢物含量能够帮助机体应对生存环境造成的应激压力。

二十碳五烯酸在大脑中主要分布在小胶质细胞中^[25],而小胶质细胞是介导大脑炎症的主要细胞,二十碳五烯酸含量降低可能意味着减弱小胶质细胞介导的炎症,而本实验恰恰表明给予五灵胶囊后大鼠大脑炎症显著减轻。戊烯二酸是机体组织内代谢废弃物,对大脑有一定的毒性,可引起脂质过氧化、蛋白质巯基氧化和谷胱甘肽降低^[26]。

本研究提示五灵胶囊可能在缓解慢性乙型肝炎患者症状的同时,还可能通过调节肝脏和大脑的代谢,改善患者的焦虑和抑郁等不良情绪状态,这为临床上五灵胶囊对肝郁证的治疗作用提供了一定的科学依据。本研究为多途径表征五灵胶囊的药理作用、解析其药效机制以及为其临床上更好地发挥治疗作用提供了科学数据支撑。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 刘蔚. 慢性乙型肝炎合并抑郁障碍的相关因素分析及中医证型分布特点[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.

[3] Yilmaz A, Ucmak F, Dönmez S, et al. Somatosensory amplification, anxiety, and depression in patients with hepatitis B: impact on functionality[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(21): e3779.

[4] 边静. 疏肝调神针刺法治疗肝郁气滞型广泛性焦虑症的临床观察[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2021.

[5] 杜珍蓉. 失眠症肝郁脾虚证的血清代谢组学研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.

[6] 翟成瑾. 肝郁型抑郁患者认知功能受损特征及影响因素研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.

[7] Cheon S Y, Song J. The association between hepatic encephalopathy and diabetic encephalopathy: the brain-liver axis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 463.

[8] Wang S Z, Yu Y J, Adeli K. Role of gut microbiota in neuroendocrine regulation of carbohydrate and lipid metabolism via the microbiota-gut-brain-liver axis[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(4): 527.

[9] Keightley P C, Koloski N A, Talley N J. Pathways in gut-brain communication: evidence for distinct gut-to-brain and brain-to-gut syndromes[J]. *Aust N Z J Psychiatry*, 2015, 49(3): 207-214.

[10] 惠玉晶, 于金高, 唐志书, 等. 不同制备工艺条件下五灵胶囊对肝郁脾虚挟痰证大鼠的治疗作用比较研究[J]. 中国

中药杂志, 2022, 47(23): 6380-6390.

[11] Walejko J M, Christopher B A, Crown S B, et al. Branched-chain α -ketoacids are preferentially reaminated and activate protein synthesis in the heart[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1680.

[12] 谢小青, 刘亚贤, 陈顺, 等. 支链氨基酸在非酒精性脂肪性肝病发生发展中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(2): 439-442.

[13] Hayley S, Poulter M O, Merali Z, et al. The pathogenesis of clinical depression: stressor-and cytokine-induced alterations of neuroplasticity[J]. *Neuroscience*, 2005, 135(3): 659-678.

[14] 高贵元, 黄捷, 刘丹, 等. 抑郁症的发病机制及抗抑郁药物的研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(1): 52-55; 70.

[15] 李云, 苟小军, 周明眉, 等. 复方丹参滴丸对LPS造抑抑郁样行为模型小鼠的抗抑郁作用实验研究[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(3): 83-86.

[16] 路家琦. Tanshinone II A通过激活ERK-CREB-BDNF信号通路改善小鼠抑郁样行为[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.

[17] 钟淑娟, 郑思超, 丘秀玉, 等. 丹参素钠对慢性不可预知温和应激模型小鼠的抗抑郁作用[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(23): 2819-2824.

[18] 张立娟, 张进强, 贺慧, 等. 丹参抗抑郁的神经免疫机制研究探讨[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2017, 19(8): 1289-1293.

[19] 王灿, 江华, 徐其锋, 等. 复方丹参滴丸对乳腺癌术后化疗患者抗氧化能力及心脏保护作用分析[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 56-58.

[20] 李丽, 张英秀, 赵日杂, 等. 基于GC-MS代谢组学的云南紫菀和臭蚤草的多元统计分析及其抑菌活性研究[J]. 药学报, 2021, 56(11): 3118-3129.

[21] Bröer S, Bröer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms[J]. *Biochem J*, 2017, 474(12): 1935-1963.

[22] Liu S Y, Li L, Lou P, et al. Elevated branched-chain α -keto acids exacerbate macrophage oxidative stress and chronic inflammatory damage in type 2 diabetes mellitus[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 175: 141-154.

[23] Matsumura T, Uryu O, Matsuhisa F, et al. N-acetyl-L-tyrosine is an intrinsic triggering factor of mitohormesis in stressed animals[J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(5): e49211.

[24] Allott K, McGorry P D, Yuen H P, et al. The vitamins in psychosis study: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effects of vitamins B₁₂, B₆, and folic acid on symptoms and neurocognition in first-episode psychosis[J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 86(1): 35-44.

[25] Cisbani G, Metherel A H, Smith M E, et al. Murine and human microglial cells are relatively enriched with eicosapentaenoic acid compared to the whole brain[J]. *Neurochem Int*, 2021, 150: 105154.

[26] Schuck P F, Busanello E N, Tonin A M, et al. Neurotoxic effects of trans-glutaconic acid in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 607610.