

脾气虚证大鼠尿液代谢组学异常及补中益气汤干预作用的研究

施旭光¹, 吴美音¹, 王闽予¹, 黄张杰¹, 邹忠杰², 黄曼婷¹, 龚梦鹃² (1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 运用代谢组学方法研究脾气虚证大鼠尿液的代谢表型变化, 筛选出与脾气虚证相关的代谢标志物, 并探讨补中益气汤的治疗作用。方法 利用核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 技术建立大鼠尿液的代谢指纹谱。应用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)研究正常对照组与模型组、模型组与补中益气汤组之间的代谢物谱差异, 并通过变量重要性投影(VIP)在尿液中选取生物标志物。结果 模型组及补中益气汤组的代谢表型发生了明显的变化, 并筛选出与脾气虚证相关的 9 种代谢产物, 补中益气汤对部分生物标志物有逆转作用。结论 脾气虚证大鼠的脂质及氨基酸代谢都出现了紊乱, 能量代谢降低; 经补中益气汤治疗后大鼠蛋白质代谢明显增强, 保证了大鼠机体能量的供给。

关键词: 脾气虚证; 补中益气汤; 代谢组学; 核磁共振

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)06-0552-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.006

Abnormality of Urine Metabonomics in Spleen-*qi* Deficiency Rats and Intervention of *Buzhong Yiqi* Decoction

SHI Xuguang¹, WU Meiyin¹, WANG Mingyu¹, HUANG Zhangjie¹, ZOU Zhongjie², HUANG Manting¹, GONG Mengjuan² (1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Department of Chinese Herbal Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the urine metabolic phenotypes of spleen-*qi* deficiency in rats for the identification of the corresponding potential biomarkers, and to investigate the therapeutic effect of *Buzhong Yiqi* Decoction. **Methods** Proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) technique was used to analyze the rat metabonome. Principal component analysis(PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) were carried out to investigate the metabonome difference among normal control group, negative control group and *Buzhong Yiqi* Decoction group. Potential biomarkers in rat serum and urine were selected via the parameter of variable importance in the projection (VIP). **Results** The metabolic phenotypes of rats varied greatly in negative control group and *Buzhong yiqi* Decoction group. Nine metabolites in spleen-*qi* deficiency rat urine were found and *Buzhong Yiqi* Decoction had reverse effect on some of these biomarkers. **Conclusion** The lipid and amino acid metabolism are seriously disturbed and energy metabolism is low in rats with spleen-*qi* deficiency. Treatment with *Buzhong Yiqi* Decoction can enhance the amino acid metabolism significantly, which ensures the energy supply in rats.

Keywords: Spleen-*qi* deficiency; *Buzhong Yiqi* Decoction; Metabonomics; Nuclear magnetic resonance

补中益气汤出自金元时期著名医家李东垣的《脾胃论》, 由黄芪、炙甘草、人参、当归、橘皮、升麻、柴胡、白术组成, 是李东垣脾胃学说的代表方, 体现治疗劳倦内伤之法, 也是补中益气法、甘温除热法、

益气升阳法的代表方。近年有大量关于补中益气汤的相关研究^[1-2], 但在代谢组学方面的研究尚未见报道。代谢组学作为一种系统性、整体性的研究方法, 能够较全面地揭示方剂治疗疾病过程中生物体系内所发生

收稿日期: 2013-04-23

作者简介: 施旭光, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 方剂配伍规律的研究。Email: sxg6902@126.com。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(S2011010003926); 广东省科技计划项目(2011B061300096, 2012B060300031)。

的一系列生物化学变化。代谢组学强调把人体作为一个完整的系统来研究,从整体观出发考察疾病和药物对人体产生的整体效应,与中医学的整体思想相吻合^[3-4]。本实验基于代谢组学的方法,检测脾气虚证模型及补中益气汤治疗后的大鼠尿液代谢表型的变化,并筛选出与脾气虚证及补中益气汤作用密切相关的代谢标志物。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 18 只, SPF 级, 体质量 (200 ± 20) g, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(粤)2008-0002。大鼠处于自然光暗周期的环境中饲养, 并控制室温 (25 ± 1) °C, 相对湿度 50 %~70 %。

1.2 仪器及试剂 Bruker AVANCE III 500 MHz 全数字化超导核磁共振谱仪, 瑞士 Bruker 公司; TGL-16G 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 叠氮钠 (NaN₃), 广州瑞舒生物科技有限公司; 氘水 (D₂O), 美国 Sigma 公司。

1.3 药物 补中益气汤 (黄芪 30 g, 升麻 6 g, 柴胡 6 g, 边条参 10 g, 炙甘草 15 g, 当归 6 g, 橘皮 6 g, 白术 9 g), 按常法制成 1 g·mL⁻¹ 水煎液, 冰箱保存备用。药物购于广州中医药大学第一附属医院, 经广州中医药大学中药鉴定教研室李薇老师鉴定。

1.4 脾气虚证大鼠模型的建立^[5] 雄性 SD 大鼠, 造模第 1 天灌胃 50 °白酒 10 mL·kg⁻¹, 第 2 天以后用食醋 10 mL·kg⁻¹ 灌胃, 同时喂饲混合饲料 (大黄: 芒硝: 普通饲料 = 1: 1: 60), 控制饮食, 每天给予体质量 8 % 的饲料量。下午负重 (体质量 10 % 的物体) 游泳至耐力极限 (鼻尖没入水下 3 s), 共 15 d。实验全程观测动物的体质量、粪便情况、毛色、精神状态、活动状况、行为等。造模第 15 天, 大鼠出现体质量显著下降、腹泻严重、肛门秽浊、蜷缩聚集、毛色暗黄、脱毛等症状, 提示模型复制成功。

1.5 分组、给药与样本采集 将 12 只脾气虚大鼠随机分为模型组、补中益气汤组, 每组 6 只。另取 6 只正常大鼠作为正常对照组。补中益气汤组大鼠灌胃给予补中益气汤 20 g·kg⁻¹ (按照体表面积换算为大鼠的等效剂量), 给药容积为 20 mL·kg⁻¹, 模型组及正常对照组灌胃等容积蒸馏水, 各组每天给予体质量 10 % 的正常饲料, 连续 15 d, 第 15 天给药 3 h 后, 收集动物 24 h 尿液, 将收集的尿液置于冰水浴上并加 100 μL 1 % NaN₃ 溶液防腐, 3000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 取上清液置 -80 °C 冰箱保存备用。

1.6 样本的预处理^[6] 室温解冻尿液后, 将 400 μL 的

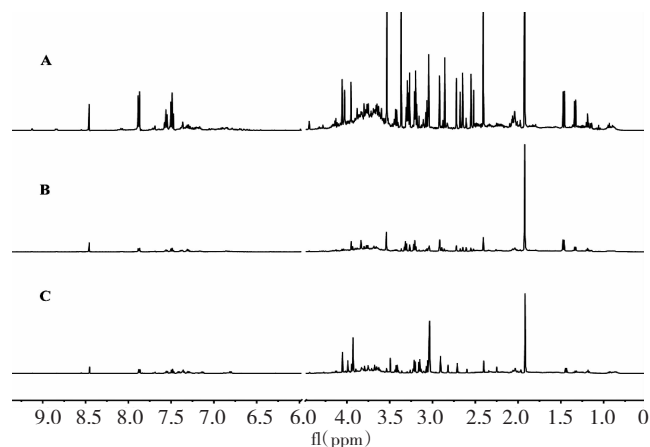
尿液中加入 200 μL 磷酸缓冲液 (0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.2 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, pH7.4), 静置 20 min 后离心 (3500 r·min⁻¹, 10 min, 4 °C), 取上清 500 μL 加入 5 mm NMR 测试管中, 加入 50 μL D₂O [含 0.05 % 3-三甲基甲硅烷基 2, 2, 3, 3-四氟代丙酸钠 (3-(trimethylsilyl)[2, 2, 3, 3-H₄] propionate, TSP), 震荡混匀, 待测。

1.7 ¹H-NMR 分析 实验温度为 298 K, 采用有预饱和的 ID NOESY 脉冲序压制水峰, 弛豫延迟时间 4 s, 使采样后的磁化矢量完全恢复到热平衡态; 谱宽 10 kHz, 采样点数 64 K, 采集次数 64 次。采用线宽为 0.3 Hz 的指数窗函数进行傅立叶变换。运用 MestReNova 6.1 软件 (Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, Spain), 对所获谱图进行手动相位和基线校正后, 参照 TSP (δ 0.0) 对 ¹H-NMR 谱的化学位移进行定标。

1.8 统计学处理方法 在 δ 0.5 ~ 9.5 区域按 δ 0.02 等间隔分段积分, 然后将所得数据转换成 ASC II 文件输出到 Microsoft Excel 2007 中进行下一步处理。将区域 δ 4.48 ~ 5.98 设为 0 积分段。在进行模式识别分析之前对各分段积分值进行归一化处理, 所得数据乘以 10000 后导入 SIMCA-P 12.0 (Umetrics AB, Umea, Sweden), 经 Pareto 标度化预处理后, 进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。运用 PASW 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) 对代谢物相对含量的组间差异进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 尿液 ¹H-NMR 代谢物谱分析 大鼠尿液的 ¹H-NMR 谱如图 1。代谢物谱峰的归属主要是依据化学位移值、峰的裂分情况、耦合常数及参考文献报道^[7-8]。



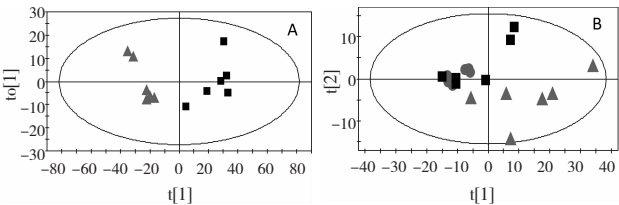
A. 正常对照组; B. 模型组; C. 补中益气汤组

图 1 大鼠尿液的 ¹H-NMR 代谢物谱图

Figure 1 ¹H-NMR spectra of rat urine

2.2 脾气虚证大鼠的机体代谢表型变化 使用 OPLS-

DA 研究正常对照组和模型组大鼠的代谢物谱差异。如图 2A 所示, 正常对照组和模型组的尿液样本点在 PC1 维可以完全区分开, 说明脾气虚状态下大鼠机体生理及物质代谢状况已经发生了明显的改变。为了验证 OPLS-DA 模型的可靠性, 采用 7 倍交叉验证法对其进行验证, 得到了 OPLS-DA 模型的主要参数: $R_2X(cum)=0.902$, $R_2Y(cum)=0.894$, $Q_2(cum)=0.797$ 。可见, 本文建立的模型可靠性较高。



注: 模型组(▲); 正常对照组(■); 补中益气汤组(●)
图 2 各组大鼠尿液 OPLS-DA 得分图(A)和 PCA 得分图(B)
Figure 2 Score plots of OPLS-DA(A) and PCA(B) derived from ¹H-NMR spectra of rat urine

2.3 与脾气虚证相关的潜在生物标志物的确定 使用 OPLS-DA 模型中变量重要性投影(Variable importance in the projection, VIP)参数评价潜在的生物标志物。选取 VIP>1 的差异变量, 再用 *t* 检验对筛选到的差异变量进行检验, 只有 $P < 0.05$ 的差异变量才被认为是潜在的生物标志物。按照上述原则, 最终筛选得到 9 种与脾气虚证相关的代谢产物, 结果见表 1。

2.4 补中益气汤对脾气虚证大鼠的干预作用 主成分分析(PCA)得分图如图 2B, 补中益气汤组样本点与正常对照组样本点比较接近, 说明补中益气汤对大鼠的脾气虚证有拮抗作用。补中益气汤对脾气虚证生物标志物的干预作用见表 1, 补中益气汤可以对部分生

表 1 与脾气虚证相关的大鼠尿液生物标志物($n=6$)
Table 1 Biomarkers associated with spleen-qi deficiency in rat urine

代谢产物	δH	VIP 值	归一化后的相对峰面积		
			正常对照组	模型组	补中益气汤组
2-氧代-3-甲基戊酸	1.94(m)	6.05	256.93 ± 1.40	77.12 ± 41.29 [△]	151.90 ± 13.16 [*]
琥珀酸	2.42(s)	3.65	55.91 ± 17.63	6.18 ± 3.15 [△]	14.31 ± 8.81 [*]
乙酸苯酯	3.54(s)	3.40	49.51 ± 17.09	5.49 ± 2.80 [△]	3.22 ± 2.83
二甲基甘氨酸	2.92(s)	2.46	31.42 ± 15.29	5.41 ± 3.29 [△]	17.81 ± 1.60 [*]
柠檬酸	2.66(s)	1.94	18.56 ± 9.89	2.28 ± 1.65 [△]	9.37 ± 0.75 [*]
脂质	3.2(s)	1.87	19.34 ± 11.91	2.98 ± 2.36 [△]	6.65 ± 7.72 [*]
2-羟基异丁酸	1.36(s)	1.85	23.69 ± 22.92	3.29 ± 0.99 [△]	1.77 ± 1.22
3-羟基异丁酸	1.21(s)	1.49	15.06 ± 11.05	3.09 ± 2.59 [△]	2.71 ± 1.65
甲酸	8.48(s)	1.24	9.73 ± 6.60	1.94 ± 1.29 [△]	2.69 ± 3.05 [*]

注: 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与正常对照组比较, [△] $P < 0.05$; s 代表单峰, m 代表多重峰。

物标志物产生逆转作用。

3 讨论

中医学理论认为, 脾主运化, 胃主受纳, 具有腐熟水谷的功能, 为“后天之本”。运化是脾的最基本生理功能和核心, 也是脾胃学说的重要内容之一, 脾气虚时常以消化道病理生理改变和功能障碍为主^[9]。我们通过代谢组学方法, 最终筛选得到 9 种与脾气虚证相关的代谢产物。与正常对照组比较, 模型组中二甲基甘氨酸、2-羟基异丁酸、3-羟基异丁酸以及甲酸等与氨基酸代谢相关的物质含量以及脂质含量均有所降低 ($P < 0.05$); 参与三羧酸循环的代谢产物琥珀酸、柠檬酸含量也有所降低 ($P < 0.05$), 说明脾气虚证模型大鼠的脂质与氨基酸代谢都出现了紊乱, 能量代谢降低。

补中益气汤升高了琥珀酸、柠檬酸的含量, 说明该方对脾气虚证大鼠的三羧酸循环有一定的恢复作用; 同时也升高了甲酸、二甲基甘氨酸及脂质的含量, 说明该方对脾气虚证大鼠的氨基酸代谢及脂质代谢也起到了一定的恢复作用。

本文利用代谢组学的方法, 筛选出与脾气虚证相关的代谢标志物及补中益气汤的干预作用, 结果显示, 利用代谢组学方法可较全面地反映脾气虚证动物的病理生理及代谢状态, 为补中益气汤治疗脾气虚证作用机理的研究提供新的方法与思路。

参考文献:

[1] 刘晓玲, 王汝俊, 莫旺福, 等. 补中益气汤对脾虚大鼠胃黏膜 TFF1 mRNA 与蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28 (3): 25-28.

[2] 张靖, 高天舒, 范秋灵, 等. 补中益气汤对甲减肾损害模型大鼠肾脏功能、形态及 VEGF 表达的影响[J]. 天津中医药, 2012, 29(2): 169-172.

[3] 刘昌孝. 代谢物组学在中药现代研究中的意义[J]. 中草药, 2004, 35(6): 601-605.

[4] 高鹏飞, 刘卫红, 吴俊珠, 等. 代谢组学在中医药研究中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 284-288.

[5] 施旭光, 王闽予, 吴美音, 等. 脾气虚证 4 种不同造模方法的比较研究[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(2): 69-73.

[6] 邹忠杰, 施旭光, 龚梦鹃, 等. 利血平所致大鼠脾虚证代谢研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 291-294.

[7] Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, et al. 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma[J]. Anal Chem, 1995, 67 (5): 793-811.

[8] Nicholson JK, Lindon JC, Everett JR. NMR spectroscopy of biofluids [J]. Annu Rep NMR Spectro, 1999, 38: 1-88.

[9] 施旭光, 王闽予, 翟理祥, 等. 补中益气汤配伍对脾气虚大鼠胃泌素及其基因表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 609-612.

(编辑: 梁进权)