

清伙灵对大鼠积滞化热证干预作用的代谢组学研究

刘梅森¹,林汉卿¹,李钟²,胡旭光²,邹忠杰²,施琬²,戴王强²,韩彬^{2*}

(1. 深圳市味奇生物科技有限公司,广东深圳 518100; 2. 广东药学院中药学院,广州 510006)

[摘要] **目的:**运用代谢组学方法研究积滞化热模型大鼠机体代谢表型的变化及清伙灵发挥干预作用的相关代谢途径。**方法:**实验分正常组、模型组和清伙灵组。模型组和清伙灵组给予特制饲料并 ip 阿托品(0.25 mg·kg⁻¹),每日 2 次,连续造模 7 d,从造模第 4 天开始,ig 清伙灵(2.64 g·kg⁻¹),每日 1 次。大鼠血清和尿液的代谢指纹利用核磁共振氢谱(¹H-NMR)进行表征。综合使用主成分分析、正交偏最小二乘判别分析和单变量统计分析方法探讨积滞化热证引起的机体代谢表型的变化,鉴定及比较相关的代谢标志物。**结果:**与正常组比较,模型组的肛温、饮水量、进食量等有明显改变(*P* < 0.05)。在血清和尿液中分别筛选得到 6 种和 7 种与积滞化热证相关的代谢标志物。模型组大鼠机体代谢表型发生了明显的改变,脂质代谢、糖吸收和代谢、肠道菌群都受到不同程度的影响。清伙灵组与模型组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。**结论:**清伙灵能有效改善积滞化热证候大鼠的脂质和糖代谢失衡,并可调节肠道菌群。

[关键词] 代谢组学;核磁共振;积滞化热证;清伙灵

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0118-05

[doi] 10.11653/syjf2014050118

Metabonomic Study of Intervention Effects of Qinghuoling on Stagnant Heat Syndrome in Rats

LIU Mei-sen¹, LIN Han-qing¹, LI Zhong², HU Xu-guang², ZOU Zhong-jie²,
SHI Wan², DAI Wang-qiang², HAN Bin^{2*}

(1. Shenzhen Weicky Biology Technology Co. Ltd., Shenzhen 518100, China;

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the metabolic profile of stagnant heat syndrome in rats and the intervention effects of Qinghuoling. **Method:** There were control, model and Qinghuoling groups. Model and Qinghuoling groups were treated with special feed and ip atropine (0.25 mg·kg⁻¹), twice a day, continues modeling for 7 days, from the 4 th day of modeling, ig Qinghuoling (2.64 g·kg⁻¹), once a day. Proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) technique was used to analyze the rat serum and urine metabolic profiles. Multivariate data analysis methods such as orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and principal components analysis (PCA), and univariate statistical analysis methods were used to analyze the metabonome difference between the control and model group samples, to identify the corresponding metabolic biomarkers and to study the intervention effect of Qinghuoling. The mechanism of action of Qinghuoling was illustrated through the selected biomarkers. **Result:** Compared with the control group, rectal temperature, water intake, and food intake of model group has a significant change The metabolic phenotype of rats in model group greatly changed, Lipid metabolism, glucose uptake and metabolism, intestinal flora have been affected in different degrees and Qinghuoling had efficacious intervention. Six and sevenpotential biomarkers were selected in rat serum

[收稿日期] 20131205(021)

[基金项目] 国家自然科学基金(81050019);广东省科技计划项目(2012B060300031)

[第一作者] 刘梅森,博士,教授级高级工程师,从事婴幼儿食品研发,E-mail:meisen18@sina.com

[通讯作者] * 韩彬,硕士,教授,从事中药方剂配伍及代谢性疾病研究,Tel: 020-39352182,E-mail: hblz99@21cn.com

and urine, respectively. **Conclusion:** Qinghuoling can effectively improve the disturbance of lipids and glucose metabolism and modulate the gut microflora environment in rats.

[**Key words**] metabonomics; NMR; Stagnant heat syndrome; Qinghuoling

小儿由于脾胃薄弱、乳食不知自节,若家长喂养不当,则易造成小儿胃肠积滞,且积滞易于化热,这在儿科颇为常见^[1]。积滞化热证产生原因较复杂,运用中医药治疗效果理想,但相关研究不够深入。代谢组学通过对生物系统因病理生理或基因改变等刺激所致动态多参数代谢应答的定量测定^[2],反映的是人体生化网络对所有扰动因素进行应答和变化的终端信息,与中医“证”的内涵比较接近,为揭开“证”的实质提供了契机^[3]。目前尚未见运用代谢组学方法从机体整体代谢表型的角度来探讨该证的病机及中药干预作用的报道。清伙灵精选多种中药(含桑叶、葛根、茯苓、杏仁),可预防和治疗婴幼儿食用奶粉后形成的积滞化热证。本文拟使用核磁共振(NMR)方法建立大鼠血清及尿液的代谢指纹谱,探讨积滞化热证引起的机体代谢状态的变化,进而鉴定与积滞化热证相关的代谢标志物,并通过比较清伙灵干预下这些代谢物的变化情况,探讨清伙灵作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠(SPF 级),体质量 160 g~180 g,购自广东省医学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2008-0002。

1.2 仪器与试剂 Bruker AVANCE III 500 MHz 全数字化超导核磁共振谱仪(Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany);清伙灵(每 100 g 含桑叶、葛根、茯苓、杏仁提取物 4.8 g,辅料小麦胚芽、低聚果糖等 95.2 g),批号 08200620;叠氮钠(NaN_3)、氘水(D_2O)购自美国 Sigma 公司。高蛋白特制饲料采用精制鱼松、黄豆粉、精制面粉、全脂奶粉按重量 1:2:1:2 加适量的蒸馏水拌匀成饼,再用电热恒温鼓风干燥机烘干制成,由广东省实验动物中心提供。硫酸阿托品注射液,购自天津药业集团新郑股份有限公司(批号 1210221)。

2 方法

2.1 动物分组、给药及血清、尿液收集 将 18 只雄性 SD 大鼠置于 12 h 光照和 12 h 黑暗环境(温度 22 ℃,湿度 50%)下自由饮食。饲养 3 d 后随机分为 3 组,分别为正常组、积滞化热模型组和清伙灵给药组。实验过程中正常组给予常规饲料并 ip 生理盐水($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),每日 2 次;模型组和给药组给予特

制饲料并 ip 阿托品($0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),日 2 次,连续造模 7 d。从造模第 4 天开始,正常组和模型组 ig 蒸馏水($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),给药组 ig 清伙灵(提取物 $2.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),根据动物与人体间的等效剂量换算确定,灌胃容积按每日 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日 1 次^[4]。每日记录各组大鼠的肛温、体重、饮水量及饮水量。末次给药 30 min 后,各组大鼠置于具有集尿器(放于冰上)的代谢笼中收集 12 h 尿液,同时加入 2% NaN_3 溶液 0.5 mL 做防腐剂,收集的尿液置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。尿液收集完成后,于大鼠眼眶后静脉丛取血 3 mL,经凝固(4 ℃, 60 min)后离心($3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min, 4 ℃)得到血清,置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

2.2 血清和尿液样本预处理 参照我们前文^[5]报道的方法,血清:室温解冻后,于 5 mm NMR 测试管中加入 400 μL 血清,然后加入 50 μL 磷酸缓冲液($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH7.4)和 50 μL D_2O (用于锁场),振荡混匀,待测。尿液:室温解冻后,取 200 μL 磷酸缓冲液($0.2 \text{ M} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH7.4)加入到 400 μL 尿液中,静置 20 min 后离心($3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 4 ℃),取 500 μL 上清液加至 5 mm NMR 测试管中,然后再加入 50 μL D_2O (含有质量浓度 0.05% TSP- d_4),振荡混匀,待测。

2.3 血清和尿液代谢指纹谱的测试 实验温度为 298 K;对于水峰采用有预饱和的 1D NOESY 脉冲序列进行抑制,对于血清中蛋白质及脂蛋白较宽的共振信号采用 Carr-Purcell-Meibom-Gill (CPMG, relaxation delay- 90° -(τ - 180° - τ)_n-acquisition) 脉冲序列进行抑制;总的回波时间 $2n\tau = 100 \text{ ms}$;为使采样后的磁化矢量完全恢复到热平衡态,弛豫延迟时间为 4 s;谱宽 10 kHz;采样点数 64 K;采集次数 128 次;傅立叶变换中线宽因子为 0.3 Hz。在软件 MestReNova 6.1 (Mestrelab Research S. L, Santiago de Compostela, Spain)中手动对所获谱图进行相位和基线校正,然后进行化学位移的定标,血清和尿液样品分别参照乳酸的甲基共振双重峰(δ 1.33)和 TSP(δ 0.0)^[5]。

2.4 数据分析 对于血清和尿液样品分别按 δ 0.01 和 0.02 等间隔在 δ 0.5~9.5 区域分段积分,

将所得数据转换成 ASC II 文件输出到 Excel 2007 (Microsoft Inc., Bellevue, WA) 中进行下一步处理^[5]。对于血清和尿液样品,为了消除饱和水峰时引起的谱线差异及消除由于尿素与溶剂交换质子后发生的部分饱和转移所造成的尿素信号差异,分别将区域 δ 4.74 ~ 5.22 和 δ 4.50 ~ 5.98 设为 0 积分段。各分段积分值进行归一化处理后乘以 10 000 导入 SIMCA-P 12.0 (Umetrics AB, Umea, Sweden), 进行主成分分析 (PCA) 及正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 前,数据要经过 Pareto 标度化处理^[5]。

3 结果

3.1 大鼠体重、饮水量、摄食量和肛温的变化 实验结果表明(见表 1):连续 7 天给予大鼠特制饲料和阿托品后,大鼠肛温明显升高,体重增长缓慢,饮水量明显增加,饮食量减少,说明模型制作成功。给予清伙灵后模型大鼠的各项指标都有明显改善。

表 1 积滞化热证候造模第 7 天大鼠体重、饮水量、摄食量和肛温的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)					
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肛温 /℃	体重 /g	饮水量 /mL	饮食量 /g
正常	-	35.42 ± 0.53	216.3 ± 13.3	204.0 ± 23.7	151.0 ± 13.4
模型	-	37.32 ± 0.42 ¹⁾	162.7 ± 11.1 ¹⁾	248.3 ± 24.1 ¹⁾	88.2 ± 10.6 ¹⁾
清伙灵	2.64	35.72 ± 0.43 ²⁾	189.4 ± 12.1 ²⁾	235.6 ± 28.5 ²⁾	131.2 ± 17.6 ²⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 血清和尿液的¹H-NMR 代谢物谱分析 如图 1,表 2 和表 3 所示,血清和尿液中的代谢物主要是氨基酸类、有机酸类和酮体等物质,除此之外,血清中还含有大量的脂蛋白和脂类物质。

3.3 积滞化热模型大鼠机体代谢指纹谱的变化 大鼠血清和尿液所含成分非常复杂,本文使用多变量统计分析中的正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 法对正常组和模型组大鼠的代谢指纹谱进行比较。如图 2 所示,两组大鼠的血清和尿液样本点在 PC1 维可以完全区分开,说明模型组大鼠机体生理及物质代谢状况已经发生了明显的改变。本文采用 7 倍交叉验证法对 OPLS-DA 模型的可靠性进行了验证,主要参数如下,血清: $R^2 X(\text{cum}) = 0.84$, $R^2 Y(\text{cum}) = 0.86$, $Q^2(\text{cum}) = 0.90$;尿液: $R^2 X(\text{cum}) = 0.75$, $R^2 Y(\text{cum}) = 0.83$, $Q^2(\text{cum}) = 0.88$ 。

3.4 与积滞化热证相关的代谢标志物鉴定 首先选取 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 (Variable importance in the projection, VIP) > 1 的差异变量,然后再利用 t 检验 ($P < 0.05$) 对筛选到的差异变量进行验证,最终在血清和尿液中分别筛选得到 6

种和 7 种与积滞化热证相关的代谢标志物,见表 2 ~ 3。

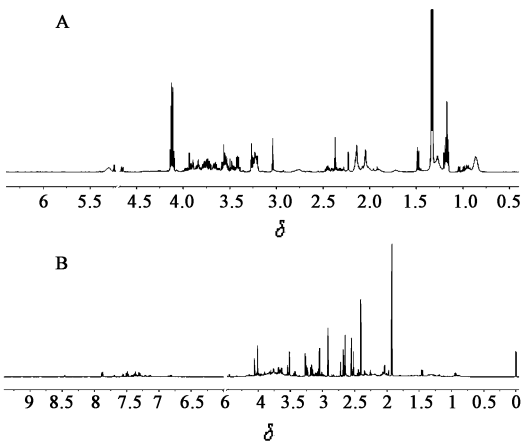


图 1 正常组大鼠血清 (A) 和尿液 (B) ¹H-NMR

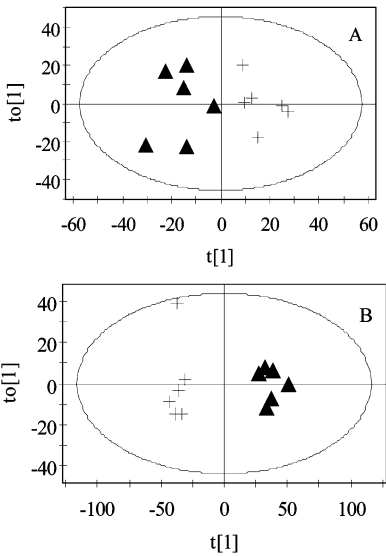


图 2 (▲) 正常组和 (+) 模型组大鼠血清 (A) 和尿液 (B) OPLS-DA 得分

3.5 清伙灵对大鼠积滞化热证的干预作用 从大鼠血清和尿液样本代谢指纹的主成分分析 (PCA) 可以看出(见图 3):给药组样本点与模型组样本点可以完全分离,且与正常组样本点接近。综合这两个方面的实验结果可以看出清伙灵有效的干预了积滞化热模型大鼠的生理及代谢状况。

4 讨论

血清和尿液中通常包含众多的代谢产物,NMR 的技术优势在于可以对所有代谢产物同时测定,并且代谢产物的化学位移具有非常高的重现性。本文中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导^[6, 7],同时借助于软件 Chenomx NMR Suite 7.1 (Chenomx, Inc.,

表 2 与积滞化热证相关的大鼠血清生物标志物($\bar{x} \pm s, n = 6$)

代谢产物	$\delta^1\text{H}$	VIP	归一化后峰面积		
			对照组	模型组	给药组
3-羟基丁酸	1.20 (d)	3.78	62.86 $\pm$ 10.96	78.90 $\pm$ 11.30 ¹⁾	63.66 $\pm$ 12.43 ²⁾
	2.35 (m)	1.34	22.08 $\pm$ 3.60	25.87 $\pm$ 1.26 ¹⁾	21.76 $\pm$ 2.95 ²⁾
丙酮	2.23 (s)	2.74	27.71 $\pm$ 5.39	36.13 $\pm$ 6.15 ¹⁾	30.71 $\pm$ 8.06 ²⁾
丙酮酸	2.37 (s)	3.85	59.43 $\pm$ 5.46	74.50 $\pm$ 10.95 ¹⁾	58.38 $\pm$ 6.91 ²⁾
β -葡萄糖	3.25 (d)	3.88	64.95 $\pm$ 10.46	50.20 $\pm$ 4.06 ¹⁾	62.88 $\pm$ 6.40 ²⁾
	4.65 (d)	2.22	16.70 $\pm$ 4.68	10.99 $\pm$ 3.42 ¹⁾	13.86 $\pm$ 3.25 ²⁾
甜菜碱	3.27 (s)	4.16	84.11 $\pm$ 7.66	68.79 $\pm$ 4.98 ¹⁾	71.70 $\pm$ 11.55
α -葡萄糖	5.24 (d)	3.01	24.41 $\pm$ 6.62	15.46 $\pm$ 1.87 ¹⁾	18.07 $\pm$ 2.33 ²⁾

注：s. 单峰;d. 双重峰; t. 三重峰; m. 多重峰(表 3 同)。

表 3 与积滞化热证相关的大鼠尿液生物标志物($\bar{x} \pm s, n = 6$)

代谢产物	$\delta^1\text{H}$	VIP	归一化后峰面积		
			对照组	模型组	给药组
乙酸	1.93 (s)	7.52	560.09 $\pm$ 261.14	52.41 $\pm$ 20.17 ¹⁾	61.36 $\pm$ 51.91 ²⁾
琥珀酸	2.41 (s)	3.12	351.84 $\pm$ 54.74	250.64 $\pm$ 51.95 ¹⁾	250.53 $\pm$ 68.18
三甲胺	2.91 (s)	4.25	165.78 $\pm$ 53.37	17.00 $\pm$ 6.25 ¹⁾	41.71 $\pm$ 60.44 ²⁾
肌酐	3.05 (s)	5.61	133.84 $\pm$ 49.79	391.77 $\pm$ 75.43 ¹⁾	297.70 $\pm$ 104.27 ²⁾
	4.06 (s)	2.30	123.90 $\pm$ 45.84	188.59 $\pm$ 45.83 ¹⁾	157.07 $\pm$ 66.22 ²⁾
氧化三甲胺	3.27 (s)	2.05	136.62 $\pm$ 25.96	222.36 $\pm$ 66.77 ¹⁾	176.94 $\pm$ 63.85 ²⁾
甘氨酸	3.57 (s)	1.61	55.22 $\pm$ 15.50	86.64 $\pm$ 27.22 ¹⁾	93.60 $\pm$ 33.12
马尿酸	7.56 (t)	1.32	18.72 $\pm$ 3.17	35.63 $\pm$ 10.51 ¹⁾	28.69 $\pm$ 3.83 ²⁾
	7.64 (t)	1.08	2.55 $\pm$ 0.86	13.51 $\pm$ 6.42 ¹⁾	7.88 $\pm$ 12.16 ²⁾
	7.84 (d)	1.69	1.88 $\pm$ 0.43	28.72 $\pm$ 15.92 ¹⁾	18.85 $\pm$ 15.92 ²⁾

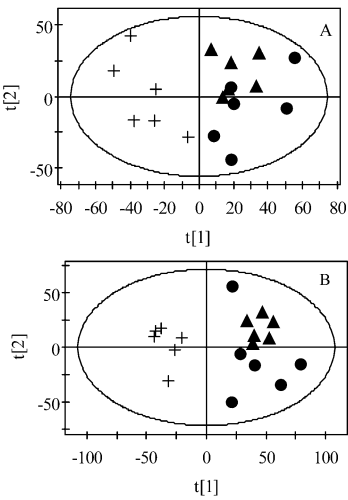


图 3 (▲) 正常组; (+) 模型组; (●) 给药组大鼠血清(A)和尿液(B)PCA 得分

Edmonton, Alberta, Canada) 中代谢产物的自动解析功能。

文献^[4, 8]报道积滞化热模型大鼠胃分泌功能受到明显抑制,胃酸分泌量减少,游离酸和总酸度下降,胃蛋白酶活性也下降,十二指肠 MMC 的周期延长,峰值振幅减少,十二指肠运动减慢,可引起脘腹胀满,消化不良,这影响了机体对营养物质的吸收,直接导致了血清中葡萄糖含量的下降。丙酮酸是葡萄糖有氧和无氧代谢的共同产物,其水平的升高说明糖代谢的紊乱。与三羧酸循环相关代谢产物如琥珀酸在尿液中含量降低说明机体有氧代谢活动被抑制,这可能导致了血清中丙酮酸水平的升高。酮体是脂肪酸在肝脏中 β -氧化后的中间代谢产物,是肝脏输出能源的一种形式,血清中 3-羟基丁酸和丙酮含量升高说明机体酮体生成作用加强,体现了脂质代谢的紊乱。乙酸是短链脂肪酸氧化的产物,其含

量的变化同样体现了脂质代谢的紊乱^[9]。马尿酸、氧化三甲胺和三甲胺均与肠道菌群的代谢有关,其含量的变化说明模型组肠道菌群受到一定同程度的影响^[10]。

从表 2 和表 3 可以看出,清伙灵给药组中,大部分生物标志物的含量与模型组样本间相比具有统计学差异,表明清伙灵能有效地改善积滞化热证导致的大鼠机体脂质和糖代谢失衡,同时可以调节肠道菌群及纠正机体消化不良,增加营养物质的吸收。

本文基于 NMR 的代谢组学方法研究了积滞化热证大鼠机体代谢表型的变化及清伙灵的干预作用,为深入解析清伙灵的作用机制和建立科学的中药治疗上火病证评价系统提供了实验依据,也为中医“证”的本质研究及相应方剂的药效评价提供一种新方法。

[参考文献]

[1] 赵霞,汪受传. 小儿积滞化热的理论探讨[J]. 光明中医, 2003, 18(6):6.

[2] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29 (11):1181.

[3] Wang X, Sun H, Zhang A, *et al.* Potential role of

metabolomics approaches in the area of traditional Chinese medicine: as pillars of the bridge between Chinese and Western medicine [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55(5):859.

[4] 沈磊,刘晓波,施贵荣,等. 高河菜提取物对积滞化热模型大鼠消化液成分的影响[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(5):1.

[5] 邹忠杰,胡旭光,龚梦鹃,等. 利血平所致大鼠脾虚证代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3):291.

[6] Nicholson J K, Lindon J C, Everett J R. NMR spectroscopy of biofluids[J]. Annu Rep NMR Spectro, 1999, 38:1.

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

[8] 叶红,刘像安,陈建双. 清热化滞颗粒对积滞大鼠胃肌电活动的影响[J]. 承德医学院学报, 2009, 26 (1):89.

[9] 董继扬,危阳洋,戴晓侠,等. 硫酸氧钒毒性的核磁共振代谢组学方法研究[J]. 化学学报,2010, 68 (17):1758.

[10] Wei L, Liao P, Wu H, *et al.* Metabolic profiling studies on the toxicological effects of realgar in rats by ¹H-NMR spectroscopy [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 234(3):314.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国医药导报》杂志
欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的国家级医药卫生类科技核心期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并被万方数据、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中国期刊全文数据库、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库、中文科技期刊数据库收录。每期定价 20 元,全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设有专家论坛、研究进展、论著、临床研究、药理与毒理、中医中药、生物医药、病理分析、药品鉴定、制剂与技术、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、护理研究、教学研究、药物经济学、科研管理、政策研究、医药监管等栏目,是广大医药科研、教育、临床等人员开阔视野、交流经验、增进学术交流的贴身参谋和得力助手,也是发表学术论文的园地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表,来稿注明单位名称、地址、电话、联系人姓名。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿信箱:yyzx68@vip.163.com

网址:www.yiyaodaobao.com.cn