

心血瘀阻与气阴两虚证心肌缺血大鼠模型的代谢组学表征与辨识

严蓓^①, 阿基业^①, 郝海平^①, 王广基^{①*}, 朱萱萱^②, 查伟斌^①, 刘林生^①,
管恩泽^③, 张颖^①, 顾胜华^①, 黄青^①, 郑媛婷^①

① 中国药科大学, 药物代谢动力学重点实验室, 南京 210009;

② 江苏省中医院临床研究所, 药理实验室, 南京 210029;

③ 南京中医药大学, 药学院, 南京 210029

* 联系人, E-mail: guangjiwang@hotmail.com

收稿日期: 2008-08-27; 接受日期: 2008-10-13

国家自然科学基金(批准号: 30630076 和 30572228)和国家科技支撑计划(批准号: 2006BAI08B04-05)资助项目

摘要 本实验建立了心血瘀阻和气阴两虚证心肌缺血大鼠模型, 基于气相色谱/飞行时间质谱(GC/TOF-MS)检测技术的代谢组学方法, 分析血浆中的内源性小分子代谢物, 发现两种中医证和正常大鼠之间代谢图谱存在明显差异, 数据处理和模式识别后各组可被清晰地区分。与正常大鼠相比, 模型大鼠血浆中羟脯氨酸、苏糖酸、谷氨酰胺、柠檬酸等化合物的相对含量发生了显著变化。两种“证型”大鼠间血浆中缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、鸟氨酸、羟脯氨酸、赖氨酸、2-羟基丁酸、3-羟基丁酸、呋喃半乳糖、肌醇等化合物的相对含量存在显著差异, 这些化合物是区分这两种中医证型的潜在生物标志物。研究结果提示, 这两种证型与能量代谢异常、氧化应激反应、氨基酸代谢异常等体内变化密切相关。此发现为探索这两种基于心肌缺血的中医证的科学内涵、病理机制及科学“辨证”提供了研究基础。

关键词

代谢组学

气相色谱/飞行时间质谱

心血瘀阻

气阴两虚

心肌缺血

大鼠模型

中医认识和治疗疾病的重点在于辨证, 辨证才能施治, 证主要反映疾病在某一特定阶段的病理变化实质, 是中医在长期临床实践中对某些症候群的理论概括。辨证是从机体反应性的角度来认识疾病, 从分析疾病当时所表现的症状和体征来认识这些临床表现的内在联系, 并且以此来反映疾病本质^[1,2], 是一种“由外及内”的抽象判别。但目前辨证得出的结论多为定性, 许多情况下是依专家的经验打分, 主观性比较大, 难以做到真正意义上的客观化和量化。运用现代研究技术手段进行中医“证”本质研究, 进而建立客观化和量化的中医证表征与辨识体系, 具有十

分重要的科学意义。

最新出现的系统生物学方法——代谢组学, 为中医“辨证”的研究提供了一个崭新的平台。代谢组学是近年来兴起的一门新的系统生物学技术方法, 在许多学科领域展现了越来越重要的应用前景, 尤其在生物医学^[3~10]领域, 在疾病诊断和模型评价方面显示了极大的优势。它同基因组学、蛋白质组学并称为三大组学, 是当今世界上生命科学研究最为活跃的领域之一。代谢组学是通过考察生物体系受内外因素刺激或扰动后, 其代谢组(即小分子代谢物群)的变化或其随时间的变化, 来研究生物体系的一门科学。

代谢组学反映的是各因素综合作用下的终端效应, 是各个因素效应的综合体现, 具有基因组学和蛋白组学无法比拟的优势。代谢组学以生物体整体代谢物为研究对象, 阐明整体功能状态的基本思想与中医理论的整体观是相对应的。中医是通过“望、闻、问、切”的四诊信息来认识机体的整体功能状态改变, 而代谢组学是运用现代分析技术手段获得内源性代谢组信息以认识机体的整体功能状态, 从认识方法论的角度来看, 二者的认知对象具有本质的相通性, 因而代谢组学有望能够为中医辨证分型及证本质等中医药现代化关键科学问题研究提供全新的研究思路与技术手段。国内已初步开展了一些基于核磁共振技术的中医证的代谢组学研究^[11,12], 取得了较好的效果, 但都只是针对某一种“证”的代谢组学表征研究, 目前尚未见将代谢组学研究应用于中医“辨证分型”的报道。

冠心病与心绞痛属于中医学“心痛”、“厥心痛”、“胸痹”等病症范畴, 《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[13]将其分为心血瘀阻、气阴两虚、气虚血瘀、气滞血瘀、痰阻心脉等8种证型。心血瘀阻患者主要表现为胸部疼痛剧烈, 固定不遗, 入夜更甚, 伴有胸闷, 日久不愈, 时怔忡不宁, 毛发干枯, 舌质紫暗或见瘀斑, 脉涩或结代; 气阴两虚证患者主要表现心胸阵阵隐痛, 时作时止, 胸闷气短, 心悸怔忡, 头昏乏力, 口干咽干, 心烦失眠, 舌红或有齿痕, 苔薄, 脉沉细弱。中医病证动物模型的缺乏是限制中医药现代化研究的重要因素之一, 而核心原因是由于缺乏科学的中医证动物模型评价方法与体系。目前所采用的各种现代病理、生理学的客观指标有相当大的片面性, 而中医四诊指标的主观性和经验性较强, 难以鉴别和把握。因此, 本实验尝试建立基于心肌缺血的心血瘀阻证和气阴两虚证的病证结合动物模型, 探讨运用代谢组学研究技术进行中医证动物模型表征与评价的可行性。

采用小剂量长时间给予大鼠异丙肾上腺素造成慢性心肌缺血损伤模型^[14], 之后模仿临床形成心血瘀阻和气阴两虚的病因造模, 附加肾上腺素加冰水刺激模仿肝气郁结和寒邪导致心血瘀阻证^[15], 而附加睡眠剥夺使大鼠紧张、焦虑、劳累、惊恐等^[16]建立气阴两虚证模型。运用已建立的基于气相色谱/飞行

时间质谱(GC/TOF-MS)测定技术的代谢组学研究方法^[17,18]对这两种模型进行表征和辨识, 寻找“同病异证”的体内代谢组差异, 揭示“同病异证”所对应机体的内源性物质基础的变化, 探索中医证候生物学本质, 这不仅为中医病证结合动物模型及辨证理论的研究提供了新的研究方法和途径, 也将为中医临床“辨证分型”的客观化、量化研究和综合评价体系的建立奠定基础, 有助于进一步开展符合中医“方证对应”思想的整体药效评价研究, 探索中药的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器和动物

盐酸异丙肾上腺素注射液(ISO, 上海禾丰制药有限公司); 盐酸肾上腺素注射液(天津金耀集团有限公司); 1,2-¹³C2-肉蔻酸(稳定的同位素内标, Isotec, US); 盐酸甲氧胺(纯度 98%, Sigma-Aldrich, Germany); 系列烷烃标准溶液(C8-C40, Sigma-Aldrich, Switzerland); 吡啶(99.8% GC, Sigma-Aldrich, India); MSTFA 含 1% TMCS(MSTFA, N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺; TMCS, 三甲基氯硅烷, Pierce, USA); 甲醇(色谱纯, Tedia, USA); 正庚烷(色谱纯, Merck, Germany); 超纯水由 Milli-Q 系统制得(Millipore, USA)。

分离和检测系统是 GC/TOF-MS, 其中 GC 是美国安捷伦公司 6980 GC, 配备安捷伦 7683 序列自动进样器和 DB-5 熔凝硅胶毛细管柱(10 m×0.18 mm i.d., J&W Scientific, USA), 串联于 GC 后的是一台 TOF-MS(Pegasus, Leco, USA); 离心装置是 Biofuge Stratos 离心机(SORVALL, Germany); SPD2010-230 SpeedVac 减压浓缩装置(Thermo, USA)用于有机溶剂的挥干; LG-R-80 血液黏度仪, E&H64 血沉压积仪(北京世帝科学仪器有限公司)分别用于血液黏度和红细胞压积的测定。

25 只 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠, SPF 级(许可证号: SCXK-(军)2002-001), 体重 140~160 g, 由中国军事医学科学院实验动物中心提供, 室温(20±2)℃, 湿度 50%±20%, 室内明暗周期为 12h/12h。

1.2 造模方法和采样

大鼠随机分成 3 组, 即对照组($n=7$)、心血瘀阻证

心肌缺血组(简称为血瘀组, $n=9$)和气阴两虚证心肌缺血组(简称为气阴两虚组, $n=9$)。预先饲养两周后开始实验: 对照组皮下注射生理盐水, 血瘀组和气阴两虚组皮下注射ISO 2 mg/kg, 连续 10 天^[14]。继续正常饲养对照组, 血瘀组恢复 3 天后皮下注射 0.1%盐酸肾上腺素 0.6 mL/kg, 2 h后将大鼠浸入 4℃冰水内进行冷刺激 5 min, 2 h后再皮下注射 0.1%盐酸肾上腺素 0.6 mL/kg, 持续 2 天。后再进行连续两天同样的刺激, 次日清晨采样。气阴两虚组恢复 2 天后, 小站台水环境法剥夺大鼠睡眠 72 h, 2 天后再剥夺大鼠睡眠 72 h 后采样。造成心肌缺血后的反复附加刺激模拟临床患者疾病的慢性形成过程。大鼠取样前禁食 12 h, 但可自由饮水。实验过程中观察大鼠行为学特征的变化。

各组均由眼眶采 250 μL 全血, 置于含有 EDTA-2Na 的试管中, 然后 $1600\times g$ 离心 10 min。转移上层血浆, 置于-80℃冰箱保存, 用于代谢组学的分析。

大鼠颈总动脉插管取血 5 mL, 肝素抗凝血测定高到低切变率(200, 100, 30, 1/s)全血黏度、血浆黏度和红细胞压积。大鼠取血后立即处死, 迅速取出心脏, 用冰生理盐水清洗、滤纸拭干后称全心重量(HW), 计算心重指数(HW/BW), 于福尔马林溶液中固定, 进行病理切片, 光学显微镜下观察病理形态学改变。

1.3 样品处理

100 μL 血浆中加入 400 μL 含有内标肉寇酸的甲醇溶液(4 μg), 涡旋振荡 5 min 后在 4℃下静置 1 h, $20000\times g$ 、4℃离心 10 min。取 100 μL 上清液于 GC 小瓶中, 减压挥干溶剂, GC 小瓶中加入 30 μL 甲氧胺毗啶溶液(10 mg/mL), 涡旋振荡 3 min, 室温静置 16 h 进行肟化, 然后加入 30 μL 衍生化试剂 MSTFA (含 1% TMCS), 涡旋振荡 1 min, 室温静置 1 h 进行硅烷化, 最后再加入 30 μL 外标甲基肉寇酸酯庚烷溶液(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 混匀后进行 GC/TOF-MS 检测。

1.4 GC/TOF-MS 数据采集和处理

Agilent GC 6980 GC 与 Pegasus TOFMS 串联连接。所选择最佳的 GC/TOF-MS 操作条件是: 进样量 1 μL , 采用不分流进样模式; 氦气是载气, 恒流速度是 1 mL/min, 采用程序升温模式: 70℃(2.0 min),

70~310℃线性升温(35℃/min), 310℃(2.0 min); 进样口温度: 250℃; 清洗时间和流速: 1 min, 20 mL/min; 传输管温度: 250℃; 离子源温度: 200℃; 离子源电压和电流: -70 eV, 3.0 mA; MS 采用全扫描方式进行数据采集, 扫描范围 m/z 50~800, 速度是 20 spectra/s, 有 170 s 的溶剂延迟, 检测电压是-1650 V。

自动峰检测、内标及化合物峰面积的计算均由美国力可公司的ChromaTOF 2.00 软件完成^[17]。自动峰检测和质谱图去卷积法中的峰宽均设为 2 s。信噪比(S/N)低于 20 的峰将被剔除。各个峰的保留指数由它们的保留时间与系列烷烃C8-C40 的保留时间的比值计算得来, 将所有检测化合物的质谱图和保留指数与标准样品以及NIST库 2.0(2005)中的质谱图和保留指数做对比来进行峰鉴别。

1.5 多元数据分析

多元数据分析和建模均由SIMCA-P 11 软件(Umetrics, Umeå, Sweden)来完成^[19]。实验样本作为观测变量、内标标准化的峰面积作为响应变量建立数据矩阵, 它代表一个K维的空间, 其中K表示变量的个数。然后运用主成分分析(PCA)和偏最小二乘-判别式分析(PLS-DA)进行数据的降维, 用几个主成分来描述组间或样本间最大的差异。PCA用来观察样品的聚集、离散及离群点, PLS-DA得分图展示组间的差异, 例如本文中区分对照组和血瘀组、对照组和气阴两虚组, PLS-DA 载荷图用于计算造成这种区分的主要差异变量。用交叉验证的方法来确定主成分的个数^[20]。交叉验证方法中 R^2X , R^2Y 和 Q^2Y 是评价模型的 3 个指标, 它们分别表示模型能够解释所有 GC/TOF-MS 响应变量的程度、模型能够解释和预测观测变量的程度, 这 3 个参数的范围是 0~1, 其越接近于 1, 说明模型解释或预测的能力越强。最后用 One-way ANOVA 对上述差异变量进行统计检验, Bonferroni 法用于多组间的多重比较检验, 在 0.05 或 0.01 水平有显著性差异(校正的P值分别为 0.016 或 0.003, 分别由 0.05/3 或 0.01/3 算得, 其中 3 为多重检验的次数), 最终确定有显著性差异的变量, 即为可能的生物标志物, 在NIST谱库中检索鉴别这些化合物的结构并用标准样品进行确证。

2 结果

2.1 病理切片和血液流变

从心肌病理切片结果(图 1)看出, 对照组心肌细胞横纹清晰, 核居中, 间质未见血管扩张及炎细胞浸润, 心外膜、心内膜无异常。血瘀组主要为心内膜下心肌坏死, 坏死处心肌细胞结构消失, 为增生的纤维母细胞取代, 可见新生的小血管长入。气阴两虚组的结果与血瘀组相似, 两组的病理切片无明显差异。与对照组相比, 两个模型组心重指数显著升高, 且血瘀组还要显著高于气阴两虚组(表 1)。这些均表明模型组已形成明显的心肌缺血损伤, 并伴有心肌肥厚。

血液流变学的结果见表 1。与对照组比较, 血瘀组 200, 100, 30, 1/s 4 个切变率全血黏度显著升高, 表明血瘀证造模成功。而气阴两虚组 200, 100, 30/s 3 个切变率全血黏度也显著升高, 200, 100/s 切变率全血黏度甚至显著高于血瘀组, 但红细胞压积降低, 表明该法造成的心肌缺血气阴两虚证还伴有血黏增高的症状, 临幊上红细胞压积降低往往是由贫血引起的。本实验中降低的红细胞压积有可能是由“劳”造成的“虚”的体现。此外大鼠被剥夺睡眠后出现精神不振、活动减少、皮毛枯槁、毛发竖立、拱背的情况, 这些

都提示气阴两虚证造模成功。

2.2 血浆的 GC/TOF-MS 谱图

各组大鼠血浆代谢组典型的 GC/TOF-MS 总离子流色谱图(TIC)见图 2, 由 ChromaTOF 2.00 软件解析出每个 TIC 图都大约包含 200 个化合物(S/N>20), 利用 NIST 谱库和标准样品, 约鉴定出 80 个化合物, 其中包含大量的内源性代谢物, 包括丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、谷氨酸等一系列氨基酸, 吖喃半乳糖、葡萄糖等糖类, 棕榈酸、透明质酸、亚油酸、油酸等脂肪酸类, 还有 3-羟基丁酸、乳酸、胆安、延胡索酸、苹果酸、肌酐、氨基丙二酸、牛磺酸、肌醇、胆固醇等各种小分子代谢物。从 TIC 图中可观察到 3 组大鼠血浆中一些化合物的比例有较明显的差异, 如 3-羟基丁酸、肌酐、透明质酸等(图 2 中圈注的峰表示这些化合物)。

2.3 多元数据分析结果

大鼠血浆的 PLS-DA 得分图(图 3)显示, 空白对照和两种中医证大鼠的血浆样本 3 组间可以明显区分开来, 3 个主成分模型的解释度(R^2Y)是 89.6%, 预测度是(Q^2Y)51.2%, 它可解释 GC/TOF-MS 响应变量

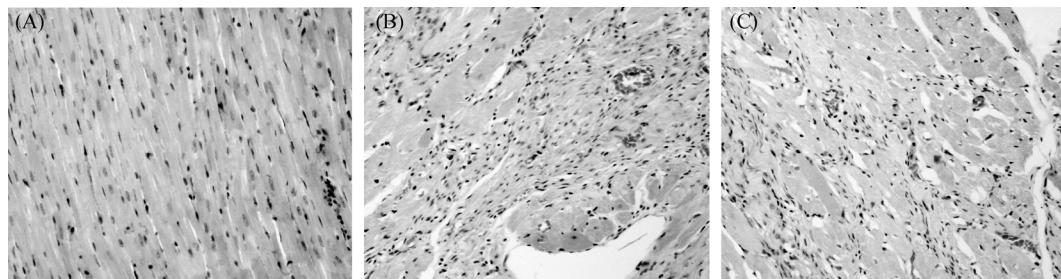


图 1 心肌病理切片结果($\times 200$)
(A) 对照组; (B) 血瘀组; (C) 气阴两虚组

表 1 心血瘀阻证和气阴两虚证心肌缺血大鼠的全血黏度、血浆黏度、红细胞压积和心重指数参数值($\bar{x} \pm SE$)

组别	全血黏度/ s^{-1}				血浆黏度/ s^{-1}	红细胞压积/%	心重指数/ $HW \cdot BW^{-1}, mg \cdot g^{-1}$
	200	100	30	1			
对照组($n=7$)	3.61 \pm 0.23	3.90 \pm 0.25	4.77 \pm 0.33	18.16 \pm 1.72	2.02 \pm 0.47	55 \pm 1	3.11 \pm 0.06
血瘀组($n=9$)	4.39 \pm 0.20 ^a	4.80 \pm 0.23 ^a	6.06 \pm 0.35 ^b	26.90 \pm 3.11 ^a	2.58 \pm 0.33	52 \pm 1 ^d	4.38 \pm 0.08 ^{bc}
气阴两虚组($n=9$)	5.13 \pm 0.18 ^{bc}	5.48 \pm 0.19 ^{bc}	6.64 \pm 0.24 ^b	24.27 \pm 1.61	2.59 \pm 0.47	47 \pm 1 ^b	4.09 \pm 0.09 ^b

a, b: 与对照组比较, 分别在 0.05 和 0.01 水平有显著性差异; c, d: 血瘀组分别在 0.05 和 0.01 水平显著高于气阴两虚组; e: 气阴两虚组在 0.05 水平显著高于血瘀组

(R^2X) 的 33.3%，图中每个点表示一个样本。

PLS-DA 载荷图寻找出对分型做出贡献的差异变量，图 4 是综合 PLS-DA 得分图和载荷图在一起的二元谱图，图中显示空白对照组和血瘀组血浆样本间可

明显区分开来，同时寻找到造成这种区分的差异化合物。同理可以分别观察到空白对照组和血瘀组、血瘀组和气阴两虚组间的分簇，并寻找出两组间差异显著的化合物(图未显示)。数据进一步用 One-way

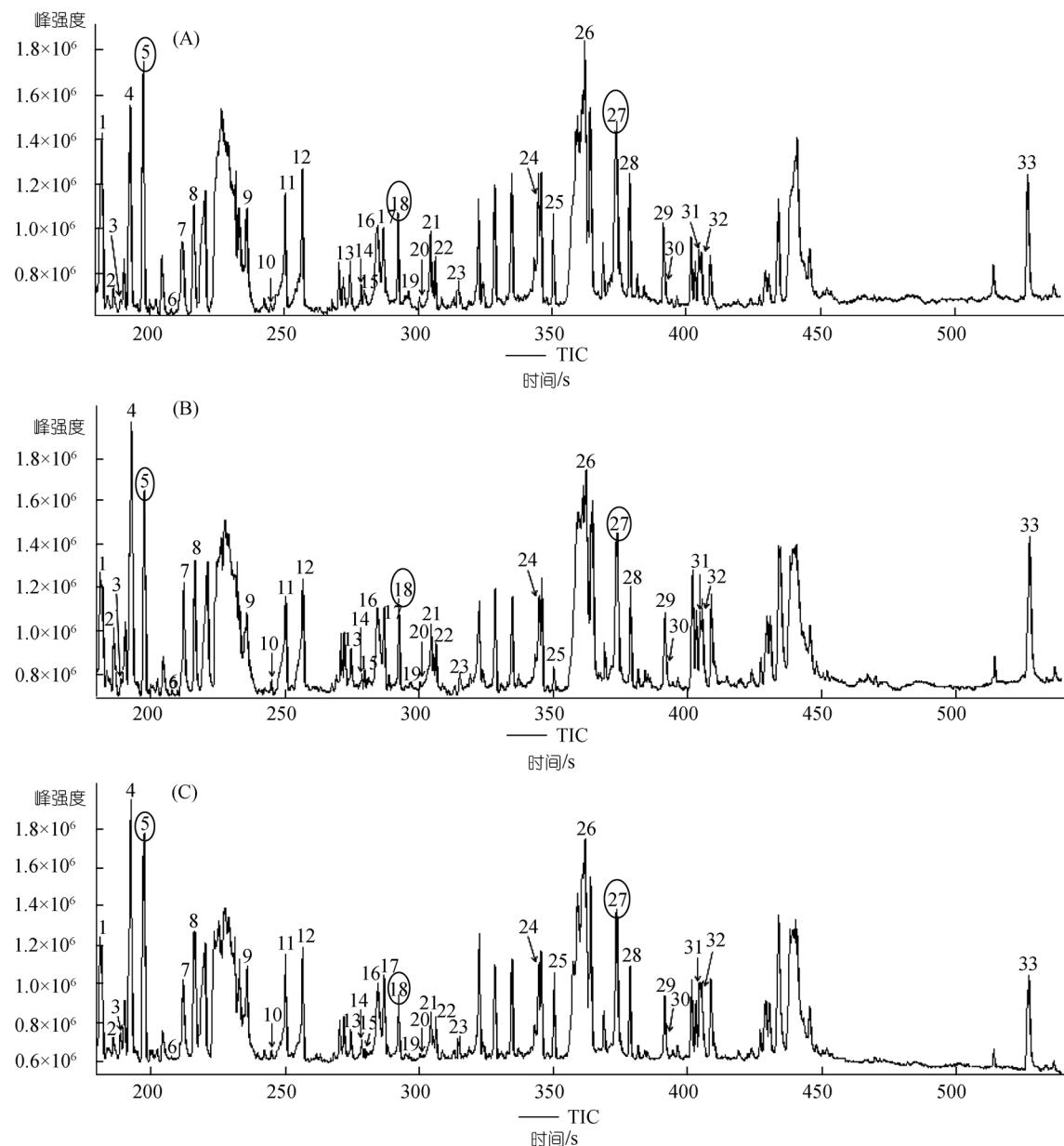
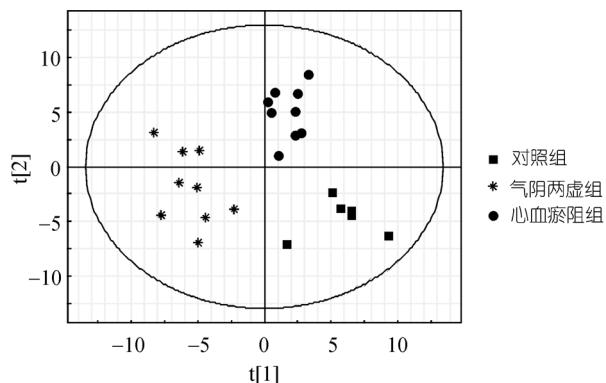


图 2 大鼠血浆的 GC/TOF-MS TIC 图

(A) 对照组; (B) 血瘀组; (C) 气阴两虚组

各峰代表鉴定出结构且含量相对较大的化合物。1: 丙氨酸; 2: 甘氨酸; 3: 2-羟基丁酸; 4: 乳酸; 5: 3-羟基丁酸; 6: 3-甲基-3-羟基丁酸; 7: 缬氨酸; 8: 胆安; 9: 琥珀酸; 10: 延胡索酸; 11: 丝氨酸; 12: 苏氨酸; 13: 氨基丙二酸; 14: 苹果酸; 15: 2,5-二氨基戊内酰胺; 16: 蛋氨酸; 17: 羟脯氨酸; 18: 肌酐; 19: 苏糖酸; 20: 谷氨酰胺; 21: 鸟氨酸; 22: 谷氨酸; 23: 牛磺酸; 24: 柠檬酸; 25: 味喃半乳糖; 26: 葡萄糖; 27: 透明质酸; 28: 棕榈酸; 29: 肌醇; 30: 尿酸; 31: 亚油酸; 32: 油酸; 33: 胆固醇。图注的表示直观看上去相对面积有差异的峰



**图 3 对照组和模型组 3 组血浆代谢组的 PLS-DA 得分图
($t[1]/t[2]$)**

ANOVA 和 Bonferroni 多重比较的方法处理来验证上述结果, 在 NIST 谱库中检索, 并用标准样品进行确证, 最终确定可能的生物标志物(表 2)。

血瘀组大鼠血浆中缬氨酸、肌酐和未知化合物 1 显著高于对照组, 而未知化合物 4 显著低于对照组。气阴两虚组大鼠血浆中 2-羟基丁酸和 2-氨基丁酸显著高于对照组, 而焦谷氨酸、谷氨酸、透明质酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、2,5-二氨基戊内酰胺和鸟氨酸显著低于对照组。两个模型组大鼠血浆中未知化合物 2 显著高于对照组, 而羟脯氨酸、苏糖酸、谷氨酰胺、柠檬酸和未知化合物 3 显著低于对照组。

缬氨酸、2-氨基丁酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、2,5-二氨基戊内酰胺、鸟氨酸、羟脯氨酸、赖氨酸、2-羟基丁酸、3-羟基丁酸、呋喃半乳糖、肌醇和未知化合物 4 等是造成两个证大鼠模型区分开来的主要化合物, 血瘀组大鼠血浆中前 9 种化合物显著高于气阴两虚组, 而后 5 种化合物显著低于气阴两虚组, 提示它们是区分这两种病证的潜在的生物标志物。

3 讨论

大鼠组织病理切片、血液流变数据和大鼠行为学等指标证实本实验成功建立了心血瘀阻和气阴两虚证心肌缺血大鼠模型。代谢组学的结果不仅显示两个模型组与对照组能够被明显区分, 两个模型组之间也能得到很好的分型。3 组间内源性代谢物的含量存在明显差异, 提示模型大鼠的相关生物代谢通路发生了改变, 并且不同病证间生化代谢通路又有所

不同。

首先是能量代谢的变化。心血瘀组模型中给予大鼠肾上腺素会加强能量的利用和产热^[21]作用, 冰水刺激时也会使产能增加, 此外气阴两虚模型的小水台站立造成大鼠疲劳, 导致需要更多的能量供给, 因此会增强葡萄糖氧化以及脂肪利用和氧化。柠檬酸和透明质酸分别是三羧酸循环和脂肪酸代谢的中介产物, 前者在两个模型组、后者在气阴两虚组体内含量显著下降, 说明三羧酸循环减弱, 脂肪氧化降低, 机体产能减少, 这似乎与前述内容存在矛盾。本实验对此的解释是: 肾上腺素加冰水刺激时和站立小水台初期, 大鼠三羧酸循环加速, 脂肪代谢增强, 其中介产物过度消耗和代谢终产物的大量积累最终导致大鼠精神不振、活动减少, 于是导致能量消耗减少。气阴两虚组大鼠能量代谢的异常更为明显, 不仅体现在低水平的透明质酸, 其血浆中高水平的 2-羟基丁酸也提示能量代谢异常^[22]。此外, 3-羟基丁酸是脂肪酸在肝中氧化分解的中间产物, 是肝外组织不可缺少的能量来源, 有报道^[23,24]指出 3-羟基丁酸可以改善缺血过程中的能量代谢并抑制再灌后的脂质过氧化, 具有中枢保护作用。与血瘀组相比, 气阴两虚大鼠血浆中相对高水平的 3-羟基丁酸进一步提示这种证型和能量代谢的异常相关, 3-羟基丁酸的上调可能是由机体代偿保护作用引起。能量代谢障碍有可能导致气血运行不畅, 这与“胸痹而痛”, 与“寒邪”造成的手足不温、四肢厥冷, 气阴两虚表现出的气短乏力相一致。

其次是氧化应激反应。谷胱甘肽的稳态平衡在氧化-抗氧化平衡中具有重要的作用^[25], 它是在 γ -谷氨酰循环中合成的^[26]。与对照组相比, 中医证模型大鼠血浆中 γ -谷氨酰循环中介产物甘氨酸、谷氨酸、焦谷氨酸的含量下降, 在气阴两虚组中下降尤为明显, 提示 γ -谷氨酰循环减弱, 氧化应激损伤作用增强。此外, 模型大鼠血浆中低水平的苏糖酸也与氧化应激反应有密切关系^[27,28]。

再次是氨基酸代谢及其他代谢的变化。两个证型大鼠血浆中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^[29]。羟脯氨酸是蛋白胶原的主要成分, 同样也是弹力蛋白的成分, 所以它是检测胶原蛋白和弹力蛋白的指标, 它在维持胶原活性中

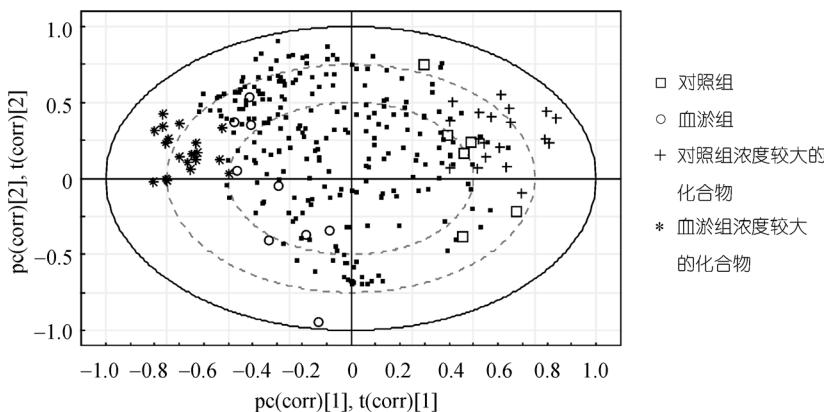


图 4 对照组和血瘀组血浆代谢组的 PLS-DA 得分和载荷二元图
(pc(corr)[1], t(corr)[1] / pc(corr)[2], t(corr)[2])

表 2 两种中医证造成的大鼠血浆代谢物变化的统计分析结果

代谢通路	保留指数	代谢物	对照组	血瘀组	气阴两虚组
能量代谢	1153.6	2-羟基丁酸	$4.33 \times 10^5 \pm 8.02 \times 10^4$	$3.64 \times 10^5 \pm 3.96 \times 10^4$	$1.06 \times 10^6 \pm 1.61 \times 10^{5\text{bf}}$
	1181.9	3-羟基丁酸	$1.85 \times 10^7 \pm 2.52 \times 10^6$	$1.53 \times 10^7 \pm 1.26 \times 10^6$	$2.27 \times 10^7 \pm 1.37 \times 10^{6\text{f}}$
	1813.9	柠檬酸	$1.17 \times 10^7 \pm 5.80 \times 10^5$	$8.82 \times 10^6 \pm 3.28 \times 10^{5\text{b}}$	$8.92 \times 10^6 \pm 3.76 \times 10^{5\text{b}}$
	2018.1	透明质酸	$2.05 \times 10^6 \pm 2.68 \times 10^5$	$1.48 \times 10^6 \pm 1.94 \times 10^5$	$1.27 \times 10^6 \pm 1.95 \times 10^{5\text{a}}$
氧化应激	1145.0	甘氨酸	$2.96 \times 10^6 \pm 7.06 \times 10^5$	$2.54 \times 10^6 \pm 2.77 \times 10^{5\text{c}}$	$1.32 \times 10^6 \pm 1.93 \times 10^{5\text{b}}$
	1628.0	谷氨酸	$6.93 \times 10^5 \pm 6.11 \times 10^4$	$5.88 \times 10^5 \pm 4.47 \times 10^4$	$4.63 \times 10^5 \pm 6.54 \times 10^{4\text{a}}$
	1528.1	焦谷氨酸	$3.15 \times 10^6 \pm 2.48 \times 10^5$	$2.83 \times 10^6 \pm 1.53 \times 10^5$	$2.41 \times 10^6 \pm 2.62 \times 10^{5\text{a}}$
	1579.7	苏糖酸	$3.44 \times 10^5 \pm 4.62 \times 10^4$	$2.07 \times 10^5 \pm 2.36 \times 10^{4\text{b}}$	$2.40 \times 10^5 \pm 2.47 \times 10^{4\text{a}}$
氨基酸代谢	1233.3	缬氨酸	$6.27 \times 10^6 \pm 3.27 \times 10^5$	$7.54 \times 10^6 \pm 4.33 \times 10^{5\text{ad}}$	$5.41 \times 10^6 \pm 3.64 \times 10^5$
	1361.3	丝氨酸	$1.29 \times 10^7 \pm 8.41 \times 10^5$	$1.22 \times 10^7 \pm 5.64 \times 10^5\text{d}$	$9.04 \times 10^6 \pm 6.40 \times 10^{5\text{b}}$
	1400.6	苏氨酸	$1.67 \times 10^7 \pm 1.12 \times 10^6$	$1.43 \times 10^7 \pm 7.07 \times 10^{5\text{c}}$	$1.15 \times 10^7 \pm 6.34 \times 10^{5\text{b}}$
	1602.5	谷氨酰胺	$8.29 \times 10^6 \pm 8.32 \times 10^5$	$6.42 \times 10^6 \pm 4.63 \times 10^{5\text{a}}$	$5.86 \times 10^6 \pm 3.73 \times 10^{5\text{b}}$
其他	1714.2	赖氨酸	$8.10 \times 10^6 \pm 5.61 \times 10^5$	$9.09 \times 10^6 \pm 8.90 \times 10^{5\text{c}}$	$7.13 \times 10^6 \pm 4.92 \times 10^5$
	1537.2	羟脯氨酸	$4.91 \times 10^6 \pm 4.28 \times 10^5$	$3.66 \times 10^6 \pm 2.71 \times 10^{5\text{bd}}$	$1.80 \times 10^6 \pm 1.14 \times 10^{5\text{b}}$
	1546.0	肌酐	$4.76 \times 10^6 \pm 3.70 \times 10^5$	$6.32 \times 10^6 \pm 4.45 \times 10^{5\text{a}}$	$5.49 \times 10^6 \pm 3.80 \times 10^5$
	2125.8	肌醇	$4.58 \times 10^6 \pm 3.42 \times 10^5$	$3.86 \times 10^6 \pm 1.55 \times 10^5$	$4.88 \times 10^6 \pm 4.11 \times 10^{5\text{e}}$
未鉴定出结构	1194.0	2-氨基丁酸	$3.85 \times 10^5 \pm 2.69 \times 10^4$	$4.15 \times 10^5 \pm 1.61 \times 10^4$	$5.07 \times 10^5 \pm 4.57 \times 10^{4\text{a}}$
	1504.3	2,5-二氨基戊内酰胺	$7.30 \times 10^5 \pm 3.23 \times 10^4$	$6.46 \times 10^5 \pm 2.16 \times 10^{4\text{d}}$	$5.32 \times 10^5 \pm 2.98 \times 10^{4\text{b}}$
	1622.9	鸟氨酸	$6.88 \times 10^6 \pm 4.17 \times 10^5$	$6.39 \times 10^6 \pm 3.58 \times 10^{5\text{d}}$	$4.40 \times 10^6 \pm 2.49 \times 10^{5\text{b}}$
	1869.4	呋喃半乳糖	$2.02 \times 10^6 \pm 2.38 \times 10^5$	$1.51 \times 10^6 \pm 5.43 \times 10^5$	$3.16 \times 10^6 \pm 2.55 \times 10^{5\text{f}}$
	1206.9	未知化合物 1	$1.11 \times 10^5 \pm 9.98 \times 10^3$	$1.60 \times 10^5 \pm 7.96 \times 10^{3\text{b}}$	$1.36 \times 10^5 \pm 1.15 \times 10^4$
	1469.5	未知化合物 2	$4.77 \times 10^5 \pm 7.20 \times 10^4$	$1.44 \times 10^6 \pm 2.18 \times 10^{5\text{b}}$	$1.18 \times 10^6 \pm 2.55 \times 10^{5\text{a}}$
	1577.1	未知化合物 3	$3.70 \times 10^5 \pm 2.29 \times 10^4$	$3.03 \times 10^5 \pm 1.34 \times 10^{4\text{b}}$	$2.90 \times 10^5 \pm 1.18 \times 10^{4\text{b}}$
	1625.2	未知化合物 4	$8.18 \times 10^5 \pm 7.07 \times 10^4$	$5.66 \times 10^5 \pm 3.77 \times 10^{4\text{b}}$	$7.47 \times 10^5 \pm 6.34 \times 10^{4\text{c}}$

a) 代谢物的相对峰面积(由内标标准化的峰面积)由 $\bar{x} \pm SE$ 表示; a,b: 与对照组相比, 分别在 0.05 和 0.01 水平有显著性差异; c,d: 血瘀组代谢物的相对峰面积分别在 0.05 和 0.01 水平显著高于气阴两虚组; e,f: 气阴两虚组代谢物的相对峰面积分别在 0.05 和 0.01 水平显著高于血瘀组

有重要作用(<http://hmdb.ca/index.html>)。两种证型大鼠血浆中降低的羟脯氨酸说明胶原或弹性蛋白的合成受到抑制,使游离的羟脯氨酸入血量减少,反映了机体的老化程度^[30]。提示两种证型的心肌缺血与机体的老化程度有关,羟脯氨酸在两种证型大鼠体内的含量的差异也反映了机体老化程度的不同。在模型组,尤其是血瘀组肌酐含量显著增加,大鼠出现肾损伤^[31,32],提示两种中医证,尤其是心血瘀阻证伴随着肾功能异常。肌醇在两个模型组间存在显著差异,肌醇是磷脂酰肌醇第二信使系统的重要组成部分,神经细胞中肌醇的水平和磷脂酰肌醇第二信使系统调节的异常与病理生理和一些抑郁性障碍、急性焦虑症、强制性障碍等精神疾病相关^[33]。这就预示着两种证神经第二信使系统的调节可能有所差异,造成二者行为学上的差异。此外,谷氨酸代谢异常还与中枢疲劳有关^[34],因此,气阴两虚证中的头昏乏力感可能也与谷氨酸的代谢异常有关。

两种心肌缺血中医证的共同特点是它们与能量代谢、氧化应激反应、氨基酸代谢等多种代谢通路的异常相关,这是整体多个系统功能改变,共同造成的结果,但是不同病证之间又有不同的代谢特点。利用

代谢组学技术能够全面地反映心血瘀阻和气阴两虚证心肌缺血的代谢共性和各自特征,进而揭示这些“证型”真正的生物学本质,为临床辨证施治提供科学客观的指标和证据将具有十分重要的科学意义。

用代谢组学的方法对比分析服用中药或采用中医疗法前后体液中内源性物质之间所存在的差异以及药物体内外成分谱的变化,是探索传统中药的作用物质基础和疗效的有效工具,将成为未来用系统生物学研究中药的重要手段。代谢组学与中医药结合研究是中医药现代化所面临的前所未有的契机,它将加快中医与西医的沟通和融合,所阐述的中医药的科学内涵将使之更好地被现代社会所接受^[35]。运用代谢组学研究中药,对认识中药的药效作用和产生毒副作用的物质基础,乃至在治病中正确用药,具有重要的科学意义、社会效益和经济效益^[36]。国内多家单位开展了相关研究工作,可喜的研究成果相继出现^[37-42]。本研究发现了两种中医证型的生物标记物,为今后的中药治疗及方证对应研究提供了基础,但与证相关的内源性小分子化合物是否为药效相关生物标记物仍需进一步的研究。

参考文献

- 常虹,李凤云,赵晓威,等.中医学.北京:学苑出版社,2001.3—5
- 李仪奎.中药药理实验方法学.上海:上海科学技术出版社,1991.19—20
- Brindle J T, Antti H, Holmes E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat Med*, 2002, 8(12): 1439—1444[DOI]
- Sabatine M S, Liu E, Morrow D A, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation*, 2005, 112(25): 3868—3875[DOI]
- Denkert C, Budczies J, Kind T, et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 10795—10804 [DOI]
- Yin P, Zhao X, Li Q, et al. Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultraperformance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS). *J Proteome Res*, 2006, 5(9): 2135—2143[DOI]
- Yang J, Zhao X, Liu X, et al. High performance liquid chromatography-mass spectrometry for metabonomics: potential biomarkers for acute deterioration of liver function in chronic hepatitis B. *J Proteome Res*, 2006, 5(3): 554—561[DOI]
- Chen M, Zhao L, Jia W. Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone-induced animal model. *J Proteome Res*, 2005, 4(6): 2391—2396[DOI]
- Wang C, Kong H, Guan Y, et al. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *Anal Chem*, 2005, 77(13): 4108—4116[DOI]
- Li M, Wang B, Zhang M, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2117—2122[DOI]
- 罗和古,丁杰,岳广欣,等.大鼠肝郁脾虚证的代谢组学研究.中西医结合学报,2007,5(3): 307—313
- 李林,王建农,任建勋.气虚血瘀证大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学.科学通报,2007,52(15): 1758—1762

- 13 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行). 北京: 中国医药科技出版社, 2002. 68—69
- 14 Qi Y F, Shi Y R, Bu D F, et al. Changes of adrenomedullin and receptor activity modifying protein 2 (RAMP2) in myocardium and aorta in rats with isoproterenol-induced myocardial ischemia. *Peptides*, 2003, 24(3): 463—468 [[DOI](#)]
- 15 毛腾敏, 林建和. “血瘀”病理模型探索(一). 北京医科大学学报, 1985, 17(4): 246—248
- 16 章忱, 盛学仕, 吕嵘, 等. 动物心肌缺血中医证型规范化标准化研究(二). 上海中医药杂志, 2003, 37(3): 42—45
- 17 A J Y, Trygg J, Gullberg J, et al. Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome. *Anal Chem*, 2005, 77(24): 8086—8094 [[DOI](#)]
- 18 Jonsson P, Johansson A I, Gullberg J, et al. High-Throughput data analysis for detecting and identifying differences between samples in GC/MS-based metabolomic analyses. *Anal Chem*, 2005, 77(17): 5635—5642 [[DOI](#)]
- 19 Trygg J, Lundstedt T. Chemometrics techniques for metabonomics. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 469—479 [[DOI](#)]
- 20 Wold S. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics*, 1978, 20(3): 397—405 [[DOI](#)]
- 21 吴梧桐. 生物化学, 第四版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 233—240
- 22 Silva A R, Ruschel C, Helegda C, et al. Inhibition of *in vitro* CO₂ production and lipid synthesis by 2-hydroxybutyric acid in rat brain. *Braz J Med Biol Res*, 2001, 34(5): 627—631
- 23 Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, et al. Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Jpn J Pharmacol*, 2002, 89(1): 36—43 [[DOI](#)]
- 24 Dardzinski B J, Smith S L, Towfighi J, et al. Increased plasma beta-hydroxybutyrate, preserved cerebral energy metabolism, and amelioration of brain damage during neonatal hypoxia ischemia with dexamethasone pretreatment. *Pediatr Res*, 2000, 48(2): 248—255 [[DOI](#)]
- 25 Leeuwenburgh C, Ji L L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 316(2): 941—949 [[DOI](#)]
- 26 Anderson M E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*, 1998, 111—112: 1—14 [[DOI](#)]
- 27 Thomas M, Hughes R E. A relationship between ascorbic acid and threonic acid in guinea-pigs. *Food Chem Toxicol*, 1983, 21(4): 449—452 [[DOI](#)]
- 28 Miura D, Tanaka H, Wariishi H. Metabolomic differential display analysis of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown under air and 100% oxygen. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 234(1): 111—116 [[DOI](#)]
- 29 Walsh N P, Blannin A K, Robson P J, et al. Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanisms. *Sports Med*, 1998, 26(3): 177—191 [[DOI](#)]
- 30 Koyama K, Sato T, Omichi N, et al. Relationship between aging and hydroxyproline content of serum in human being. *Ann Physiol Anthropol*, 1993, 12(4): 243—249
- 31 Banday A A, Farooq N, Priyamvada S, et al. Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life Sci*, 2008, 82(9—10): 450—459 [[DOI](#)]
- 32 Omurtag G Z, Tozan A, Sehirli A O, et al. Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *J Pineal Res*, 2008, 44(4): 432—438 [[DOI](#)]
- 33 Kim H, McGrath B M, Silverstone P H. A review of the possible relevance of inositol and the phosphatidylinositol second messenger system (PI-cycle) to psychiatric disorders-focus on magnetic resonance spectroscopy (MRS) studies. *Hum Psychopharmacol*, 2005, 20(5): 309—326 [[DOI](#)]
- 34 邢雅玲, 余林中. 睡眠剥夺机制和中医药干预的进展. 中药药理与临床, 2003, 19(6): 47—49
- 35 王广基, 查伟斌, 郝海平, 等. 代谢组学技术在中医药关键科学问题研究中的应用前景分析. 中国天然药物, 2008, 6(2): 89—97
- 36 刘昌孝, 司端远, 万仁忠, 等. 代谢组学与天然药物和中药研究. 中国天然药物, 2008, 6(2): 82—88
- 37 黄玉荣, 魏广力, 龙红, 等. 钩藤多动合剂的药效作用及用代谢组学方法研究其生化机制. 中草药, 2005, 36(3): 398—402
- 38 周明眉, 刘平, 贾伟, 等. 基于代谢网络变化的中药整体效应评价方法研究. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(6): 113—119
- 39 Wang X Y, Su M M, Qiu Y P, et al. Metabolic regulatory net-work alterations in response to acute cold stress and ginsenoside intervention. *J Proteome Res*, 2007, 6(9): 3449—3455 [[DOI](#)]
- 40 Li F M, Lu X M, Liu H P, et al. A pharmaco-metabonomic study on the therapeutic basis and metabolic effects of *Epimedium brevicornum* Maxim on hydrocortisone-induced rat using UPLC-MS. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(4): 397—405 [[DOI](#)]
- 41 蒋宁, 周文霞, 张永祥. 应用代谢组学方法研究比较六味及八味地黄汤的作用机理. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 45
- 42 陆益红, 王广基, 黄青, 等. 自发性高血压大鼠血浆代谢组学研究及人参总皂苷作用机制初探. 中国天然药物, 2007, 11(6): 443—447