

· 药物代谢 ·

## 基于非靶向尿液代谢组学方法的气虚模型评价

后宗<sup>1</sup>, 刘舒<sup>2</sup>, 宋凤瑞<sup>2</sup>, 刘志强<sup>2\*</sup>

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 中国科学院 长春应用化学研究所  
吉林省中药化学与质谱重点实验室, 电分析化学国家重点实验室, 长春 130022)

**[摘要]** 目的:通过代谢组学方法,从生物标志物及代谢通路角度,探讨 Balb/C-nu 小鼠游泳力竭法建立气虚模型的复制情况。方法:将 Balb/C-nu 小鼠随机分为正常组和气虚组,其中气虚组采用连续 15 d 尾部固定 5% 体质量金属游泳至力竭(鼻尖浸水时间>5 s)的方法建立气虚模型。利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS)进行尿液代谢组学分析,流动相选择乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~1 min, 5%~8%A; 1~4 min, 8%~8.5%A; 4~5 min, 8.5%~12%A; 5~10 min, 12%~40%A; 10~12 min, 40%~100%A; 12~15 min, 100%A),流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL,电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,扫描范围为  $m/z$  50~1 000。运用主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)、人类代谢组数据库(HMDB)和 MS<sup>E</sup> 采集的高碰撞能量离子碎片信息,以及串联质谱法(MS/MS)碎片离子信息等鉴定潜在的生物标志物。采用京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库与 MetaboAnalyst 5.0 分析生物标志物的相应代谢通路及通路富集。结果:正常组和气虚组小鼠尿液内源性物质明显分离,并有 24 个具有显著差异的生物标志物。这些生物标志物涉及的代谢通路有三羧酸循环、糖酵解代谢、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、嘧啶代谢、类固醇激素生物合成和色氨酸代谢等。其中,与能量相关的代谢通路有三羧酸循环、糖酵解代谢、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、嘧啶代谢、类固醇激素生物合成。结论:通过尿液代谢组学考察,结合体征外观,成功评价了 Balb/C-nu 小鼠游泳力竭法建立的气虚模型,同时验证了气虚与能量代谢途径密切相关。

**[关键词]** 气虚; 代谢组学; 能量代谢; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS); 中医证候; Balb/C-nu 小鼠; 作用机制

[中图分类号] R22;R28;R969.1;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)19-0121-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220251 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220126.1226.003.html>

[网络出版日期] 2022-01-27 16:31

### Evaluation of Qi-deficiency Model Based on Urine Non-targeted Metabonomics

HOU Zong<sup>1</sup>, LIU Shu<sup>2</sup>, SONG Fengrui<sup>2</sup>, LIU Zhiqiang<sup>2\*</sup>

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Jilin Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Chemistry and Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the success of Qi-deficiency model of Balb/C-nu mice established by swimming exhaustion test from the view of biomarkers and metabolic pathways by metabonomics. **Method:** Balb/C-nu mice were randomly divided into the normal group and Qi-deficiency group, Qi-deficiency model was established by swimming with 5% body weight metal fixed at the tail for 15 consecutive days until exhaustion (nose tip immersion time>5 s). The urine metabonomics was analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS), and the mobile phase was

[收稿日期] 2021-10-19

[基金项目] 国家自然科学基金联合基金项目(U19A2012);吉林省重大科技专项子课题(20200504005YY)

[第一作者] 后宗,在读博士,从事中药分析学研究,E-mail:1129153921@qq.com

[通信作者] \* 刘志强,博士,研究员,从事中药新药分析研究,E-mail:liuzq@ciac.ac.cn

acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-1 min, 5%-8%A; 1-4 min, 8%-8.5%A; 4-5 min, 8.5%-12%A; 5-10 min, 12%-40%A; 10-12 min, 40%-100%A; 12-15 min, 100%A), the flow rate was 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, the injection volume was 10 μL, electrospray ionization (ESI) in positive and negative ion modes was used in MS analysis, the MS data were acquired in full-scan mode from *m/z* 50-1 000. Principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), human metabolome database (HMDB), high collision energy ion fragments collected by MS<sup>E</sup> and tandem MS (MS/MS) ion information were used to identify potential biomarkers. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database and MetaboAnalyst 5.0 were used to analyze the corresponding metabolic pathways and pathway enrichment of biomarkers. **Result:** Endogenous substances in urine of mice in normal group and Qi-deficiency group were obviously separated, and there were 24 biomarkers with significant difference. The metabolic pathways involved in these biomarkers were tricarboxylic acid cycle, glycolysis metabolism, amino acid metabolism, fatty acid metabolism, pyrimidine metabolism, steroid hormone biosynthesis and tryptophan metabolism. Among them, the metabolic pathways related to energy were tricarboxylic acid cycle, glycolysis metabolism, amino acid metabolism, fatty acid metabolism, pyrimidine metabolism and steroid hormone biosynthesis. **Conclusion:** Through the investigation of urine metabolomics, combined with the physical signs, the Qi-deficiency model established by swimming exhaustion test in Balb/C-nu mice is successfully evaluated, and it is also verified that there is a close correlation between Qi-deficiency and energy metabolism.

**[Keywords]** Qi-deficiency; metabolomics; energy metabolism; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS); traditional Chinese medicine syndrome; Balb/C-nu mice; mechanism

气虚是中医理论中的一种主要证候,具有广泛且复杂的生理病理状态,其发病与性别、年龄、职业、生活区域等多种因素有关<sup>[1-3]</sup>,既存在于正常人群,也存在于久病、重病的人群中,发病人群比例高达40.38%<sup>[4]</sup>,给患者带来了很大的生理负担和心理困扰。因此,开展气虚相关研究是非常有必要的,而在研究过程中良好的气虚模型及其评价标准就显得尤为重要。目前,研究者常选择大鼠和小鼠为实验动物,采用控制饮食法<sup>[5]</sup>、中药泻下法<sup>[6]</sup>、疲劳力竭法<sup>[7]</sup>或多种方法相结合<sup>[8]</sup>等方式建立气虚模型<sup>[9]</sup>,但这些模型存在现代医学认知的不统一、个体差异大及气虚状态恢复快等问题。Balb/C-nu小鼠具有免疫功能低下、个体差异小、遗传基因纯等特点,已被广泛用于免疫学和疾病发生机制的研究。其既能满足中医理论气虚模型的要求,又能符合现代医学研究的认知,从而增加模型建立的准确性和重复性。另外,现有的气虚模型评价指标较为单一,存在全面性不足的问题。代谢组学技术可从整体上描述内源性代谢物的动态变化,并可对内源性小分子代谢物进行定性、定量分析,从而反映机体的整体功能状态<sup>[10-15]</sup>。这与中医理论的整体观是一致的,可为中医药在证候及疾病治疗中的复杂性提供可靠、有效的解决途径。

为了更加全面地建立单一证候的气虚动物模型并对其进行评价,本研究选取Balb/C-nu小鼠为实验对象,利用游泳力竭法建立气虚模型,在分析小鼠生理体征变化的基础上,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS)代谢组学技术、化学模式识别方法及生物信息学技术筛选潜在的生物标志物及相关代谢通路,从能量代谢途径方面较为全面地评价和阐释建立的气虚模型,为中医证候相关模型的建立和评价提供参考和思路。

## 1 材料

ACQUITY UPLC型液相色谱系统和SYNAPT G2型四极杆-飞行时间质谱仪(美国Waters公司), Allegra X-30R型高速离心机(美国贝克曼库尔特商贸有限公司), Milli-Q Plus型净水系统(美国密理博公司)。亮氨酸脑啡肽(美国Waters公司,批号186006013-1),水为自制去离子水,乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

Balb/C-nu小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006, SPF级,雄性,6周龄,体质量16~20 g。饲养环境为温度(25±2)℃、相对湿度50%~60%,人工光照明暗各12 h循环。本文涉及的动物实验经长春中医药大学动物研究伦理委员会批准,批准编号2020353。

## 2 方法

**2.1 动物模型的建立**<sup>[16-19]</sup> 将20只Balb/C-nu小鼠适应性喂养1周,随机分为2组,即正常组和气虚组,每组10只。气虚组连续15 d采用尾部固定5%体质量金属游泳至力竭(鼻尖浸水时间>5 s)的方法建立气虚模型。同时,正常组常规饲养,不加干预。

**2.2 样品收集及制备** 实验结束前1 d上午8:00至11:00,采用反射排尿采集方式收集每只小鼠的尿液,收集尿液时温度(25±2)℃。尿液收集完毕后,于4℃、5 000 r·min<sup>-1</sup>离心处理10 min(离心半径82 mm,下同),去除杂质,并于-80℃冷冻保存。分析前将冻存的尿液样品取出,置于4℃下缓慢解冻,加入4倍量甲醇,震荡1 h,于4℃、14 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得代谢组学分析的待测样品。

### 2.3 UPLC-Q-TOF/MS检测

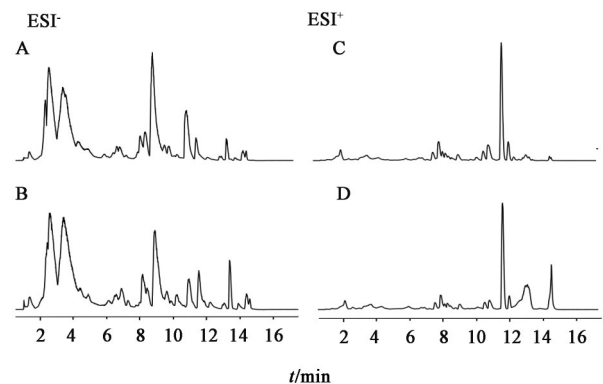
**2.3.1 色谱条件** Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),流动相选择乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~1 min, 5%~8%A; 1~4 min, 8%~8.5%A; 4~5 min, 8.5%~12%A; 5~10 min, 12%~40%A; 10~12 min, 40%~100%A; 12~15 min, 100%A),柱温40℃,流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>,进样量10 μL。

**2.3.2 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI),离子源温度150℃,正、负离子检测模式,正离子模式下的毛细管电压3.0 kV,负离子模式下的毛细管电压2.5 kV,锥孔电压均为40 V,锥孔气和去溶剂气流速分别为50、700 L·h<sup>-1</sup>,去溶剂气温度350℃,低碰撞能5 eV,高碰撞能25~35 eV,扫描范围设定 $m/z$  50~1 000。同时,实验采用质量控制(QC)样品评价并监测仪器在分析过程中的稳定性。

**2.4 数据处理与分析** 原始数据用Progenesis Q1软件进行处理。通过EZinfo 2.0软件对处理后的数据进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)处理,以变量重要性投影(VIP)值>1和 $P<0.05$ 为标准,筛选有显著差异的潜在生物标志物。根据精确相对分子质量、碎片离子、Progenesis Q1软件中Progenesis MetaScope数据库的匹配,以及人类代谢组数据库(HMDB)的检索对潜在的生物标志物进行鉴定。将筛选的生物标志物通过京都基因和基因组百科全书(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,并通过MetaboAnalyst 5.0进行代谢途径富集。

## 3 结果

**3.1 UPLC-Q-TOF/MS数据的多元分析** 采用UPLC-Q-TOF/MS分别在正、负离子模式下进行尿液代谢组学分析,得各组典型的基峰色谱图(BPI),见图1。采用无监督的PCA得到可视化组间的代谢差异,结果发现正常组和气虚组内源性物质在正、负离子模式下均明显分离,表明小鼠在气虚模型建立后,尿液内源性代谢物发生了明显变化,PCA得分图见增强出版附加材料。进一步建立有监督的OPLS-DA模型进行分析,正常组和气虚组在正、负离子模式下的模型评价参数 $R^2Y$ (模型对 $Y$ 矩阵的解释率)分别为0.963、0.989, $Q^2$ (模型预测能力)分别为0.849、0.972,说明建立的模型稳定可行,得分图及S-plot见增强出版附加材料。结果发现正常组和气虚组可明显区分,表明气虚组小鼠的内源性物质随着气虚状态而发生了明显变化。



注:A、C.正常组;B、D.气虚组

图1 不同离子模式下各组小鼠尿液的BPI

Fig. 1 BPI of urine of mice for each group in negative and positive ion modes

**3.2 潜在生物标志物的鉴定和确认** 由OPLS-DA模型的S-plot筛选出有显著贡献的潜在生物标志物(VIP值>1且 $P<0.05$ )。根据其精确相对分子质量、碎片离子、Progenesis Q1中Progenesis MetaScope数据库的匹配及HMDB的检索,对可能的潜在标志物进行鉴定和确认,结果共鉴定了24个尿液内源性生物标志物,其中包括在负离子模式下鉴定的19种化合物和正离子模式鉴定的5种化合物,见表1。

**3.3 潜在生物标志物的代谢通路分析** 利用KEGG数据库对各生物标志物相关代谢通路进行检索,将这些生物标志物之间的潜在联系通过网络形式体现,结果发现相关代谢通路有三羧酸循环、糖酵解代谢、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、嘧啶代谢、类固醇激素生物合成及色氨酸代谢,见图2。

表1 各组小鼠尿液潜在生物标志物的相关信息

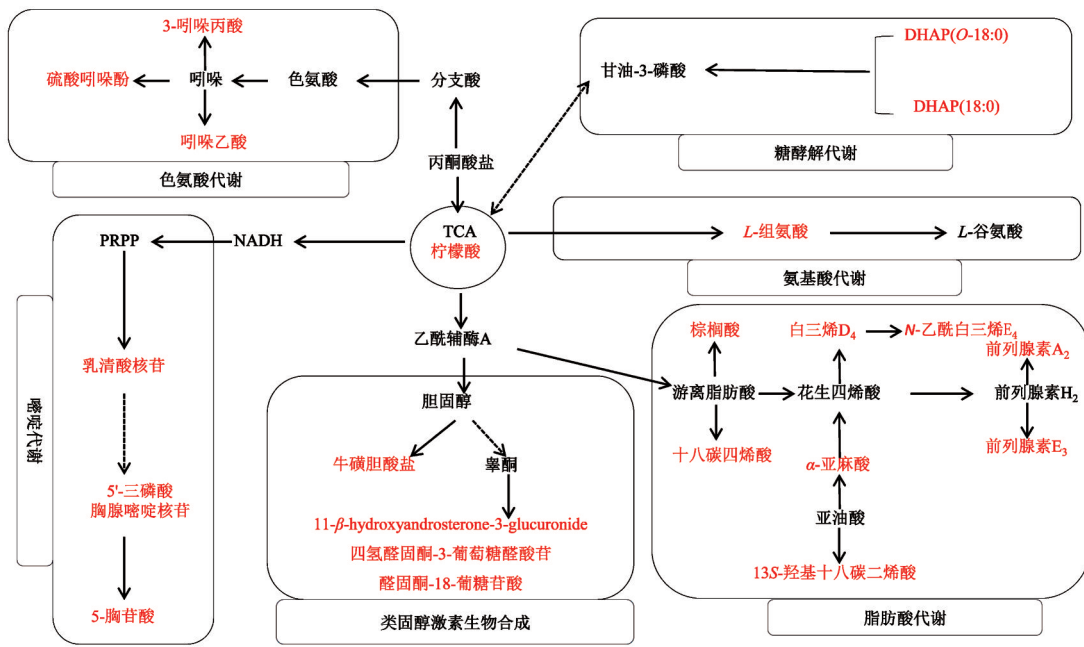
Table 1 Information of identified potential biomarkers in urine of mice in each group

| 离子模式 | 化合物  | 分子式   | $\delta$ /ppm | $t_R$ /min | $m/z$     | 碎片离子                                    | 通路        |
|------|--|---|---------------|------------|-----------|---|-----------|
| 负    | 柠檬酸  | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>                                  | -3.09         | 0.92       | 173.008 6 | 154.998 7、145.013 9、129.016 7、103.040 2 | 三羧酸循环     |
|      | 白三烯D <sub>4</sub>                              | C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S               | 5.26          | 9.23       | 496.263 3 | 451.195 6、333.206 5、175.024 6           | 花生四烯酸代谢   |
|      | 5-胸苷酸  | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> P               | -4.26         | 8.35       | 321.044 8 | 291.001 2、241.085 0                     | 嘧啶代谢      |
|      | 乳清酸核苷  | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>                 | 6.30          | 9.70       | 269.044 5 | 244.157 5、224.126 4、197.066 1、113.024 8 | 嘧啶代谢      |
|      | 11- $\beta$ -hydroxyandrosterone-3-glucuronide | C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>                                | -6.14         | 9.72       | 527.246 8 | 509.238 2、305.160 5、287.185 2、269.043 1 | 类固醇激素生物合成 |
|      | 四氢醛固酮-3-葡萄糖醛酸苷                                 | C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>                               | -1.78         | 9.75       | 539.248 8 | 495.258 9、373.196 0、333.206 5           | 类固醇激素生物合成 |
|      | L-组氨酸  | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>                   | 0.02          | 8.45       | 309.131 7 | 135.044 4、119.049 3                     | 氨基酸代谢     |
|      | 磷酸二氢丙酮(DHAP)(O-18:0)                           | C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> O <sub>6</sub> P                              | -8.31         | 13.89      | 443.246 7 | 427.220 4、309.170 8、168.988 3           | 糖酵解代谢     |
|      | 醛固酮-18-葡糖苷酸                                    | C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>                               | 0.97          | 13.07      | 557.201 0 | 361.132 0、182.073 7、121.028 3           | 类固醇激素生物合成 |
|      | 13S-羟基十八碳二烯酸                                   | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>                                | -3.06         | 12.52      | 295.227 0 | 277.141 8、233.153 8、151.040 3           | 脂肪酸代谢     |
|      | 前列腺素E <sub>3</sub>                             | C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>                                | -2.54         | 11.36      | 350.208 4 | 331.193 1、313.191 9、305.045 6、287.244 6 | 花生四烯酸代谢   |
|      | 牛磺胆酸盐  | C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> S                             | 7.94          | 9.77       | 536.275 6 | 514.281 6、496.264 2、373.263 8           | 胆汁酸代谢     |
|      | N-乙酰白三烯E <sub>4</sub>                          | C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>6</sub> S                             | -1.18         | 11.26      | 526.247 4 | 493.244 4、395.206 6、373.075 4、113.023 4 | 花生四烯酸代谢   |
|      | 硫酸吲哚酚  | C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> S                               | -3.52         | 2.85       | 212.001 6 | 132.044 8、104.049 7、79.963 7            | 色氨酸代谢     |
|      | 3-吲哚丙酸   | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                               | -8.66         | 1.57       | 377.143 6 | 188.093 9、144.065 3、131.036 1、116.069 6 | 色氨酸代谢     |
|      | 5'-三磷酸胸腺嘧啶核苷                                   | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub> | -9.18         | 2.85       | 462.967 0 | 448.991 5、354.979 8                     | 嘧啶代谢      |
|      | 硫酸胆固醇  | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub> S                              | -1.67         | 14.10      | 465.303 6 | 381.232 9、367.224 5、96.959 4、79.956 2   | 类固醇激素生物合成 |
|      | DHAP(18:0)                                     | C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> O <sub>7</sub> P                              | -5.02         | 7.92       | 417.234 6 | 345.155 1、291.091 2                     | 糖酵解代谢     |
|      | 吲哚乙酸   | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                               | -3.14         | 7.48       | 204.066 0 | 186.115 2、160.076 9、142.067 6、130.064 4 | 色氨酸代谢     |
| 正    | 前列腺素A <sub>2</sub>                             | C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                                | -0.56         | 7.89       | 334.214 2 | 317.215 3、299.198 9、131.050 2、97.066 0  | 花生四烯酸代谢   |
|      | 棕榈酸  | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>                                | 3.19          | 11.20      | 274.274 9 | 257.266 1、239.234 5、197.080 0           | 脂肪酸代谢     |
|      | 十八碳四烯酸   | C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>                                | 5.75          | 10.69      | 313.180 5 | 291.198 7、273.223 4、231.173 2、195.104 8 | 脂肪酸代谢     |
|      | $\alpha$ -亚麻酸                                  | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                                | 8.79          | 10.67      | 301.216 2 | 251.161 9、233.155 5、219.178 0           | 亚麻酸代谢     |
|      | 12S-羟基七烷三烯酸(12S-HHT)                           | C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>                                | 9.15          | 10.24      | 303.195 6 | 263.244 4、235.166 4、219.171 6           | 花生四烯酸代谢   |

3.4 生物标志物代谢通路的富集分析 通过 MetaboAnalyst 5.0 软件对代谢途径进行富集分析, 见图3。结果发现富集分析所得的主要代谢通路包括三羧酸循环、氨基酸代谢、脂肪酸代谢、嘧啶代谢、类固醇激素生物合成。同时, 对潜在生物标志物相对丰度进行分析, 结果见增强出版附加材料。其中, 相对丰度归一化过程采用的是 Progenesis QI 软件中默认的“Normalise to all compounds”方法。首先在峰对齐时自动选择1个参考样本, 即作为归一化的参考样本。然后将运行中的化合物离子丰度与归一化参考样本中的丰度进行比较, 得到比率。Progenesis QI 软件对每次运行中的所有比率数据进行常用对数(lg)转换, 生成一系列正态分布的

lg 比率, 最后以这些数据作为系数因子即可得到归一化的相对丰度。

3.5 代谢通路相关的气虚证分析 气虚是中医理论中的一种主要证候, 泛指身体虚弱、面色苍白、四肢乏力、语声低微等, 其发生与多种因素有关, 主要包括先天不足和后天劳积, 后者主要由过劳、年老、久病等因素造成, 而这些因素与机体的能量代谢密切相关。由代谢通路分析结果可知, 与正常组比较, 气虚组小鼠发生了三羧酸循环、糖酵解代谢、脂肪酸代谢及氨基酸代谢紊乱现象, 同时伴有激素水平的改变。其中三羧酸循环是能量代谢的主要过程, 糖酵解是机体相对缺氧时生理获得能量的主要途径, 而脂肪酸和氨基酸是能量来源严重不足或者



注:红色标出的为潜在生物标志物

图2 各组小鼠内源性代谢生物标志物相关代谢通路网络

Fig. 2 Network of metabolic pathways related to endogenous metabolic biomarkers of mice in each group

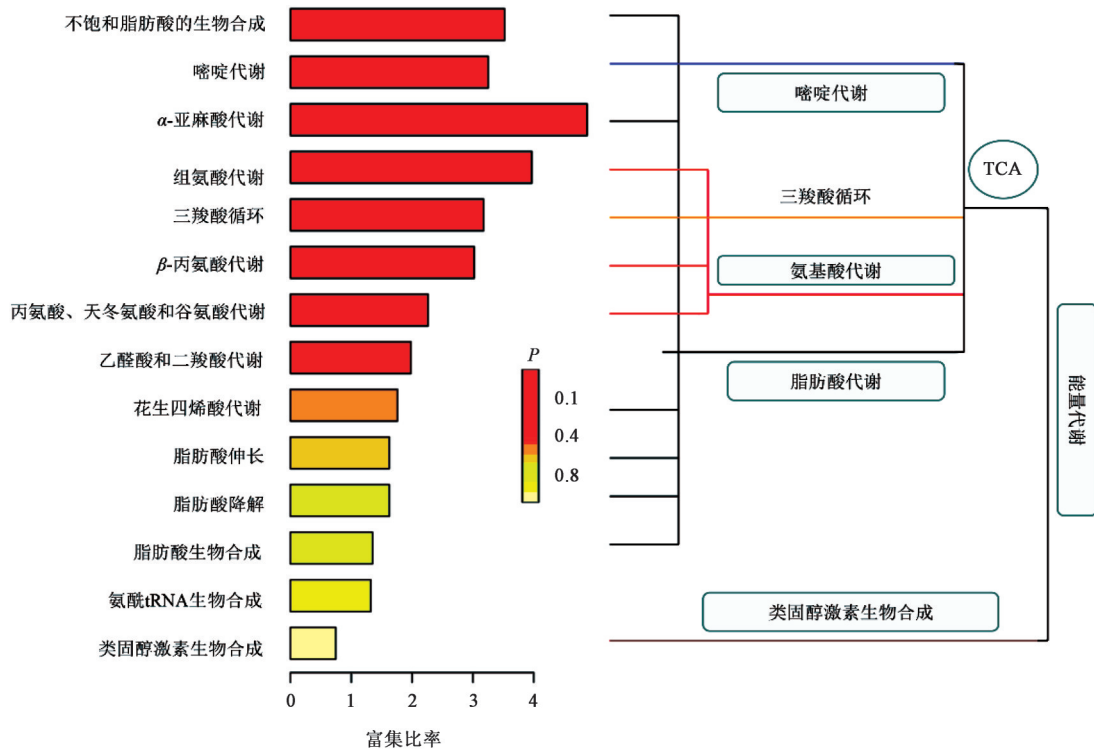


图3 各组小鼠内源性代谢生物标志物的相关代谢通路富集

Fig. 3 Enrichment of metabolic pathways related to endogenous metabolic biomarkers of mice in each group

消耗程度过高时,机体体内发生的补充能量的一种生理过程,这些过程的发生体现了机体能量需求严重不足。说明实验小鼠在造模过程中出现了“过劳”现象,结合其精神萎靡、倦怠嗜卧、耐力减弱、行动迟缓、两眼惺忪无神、抓力变小等体征外观,较为

充分地说明小鼠出现了气虚状态,见图4。

#### 4 讨论

气虚是中医临床中最常见的证候之一,其症状的临床特征表现为气短、乏力、懒言等<sup>[20]</sup>。机体一旦发生气虚将会出现病理生理变化,并且引起体内

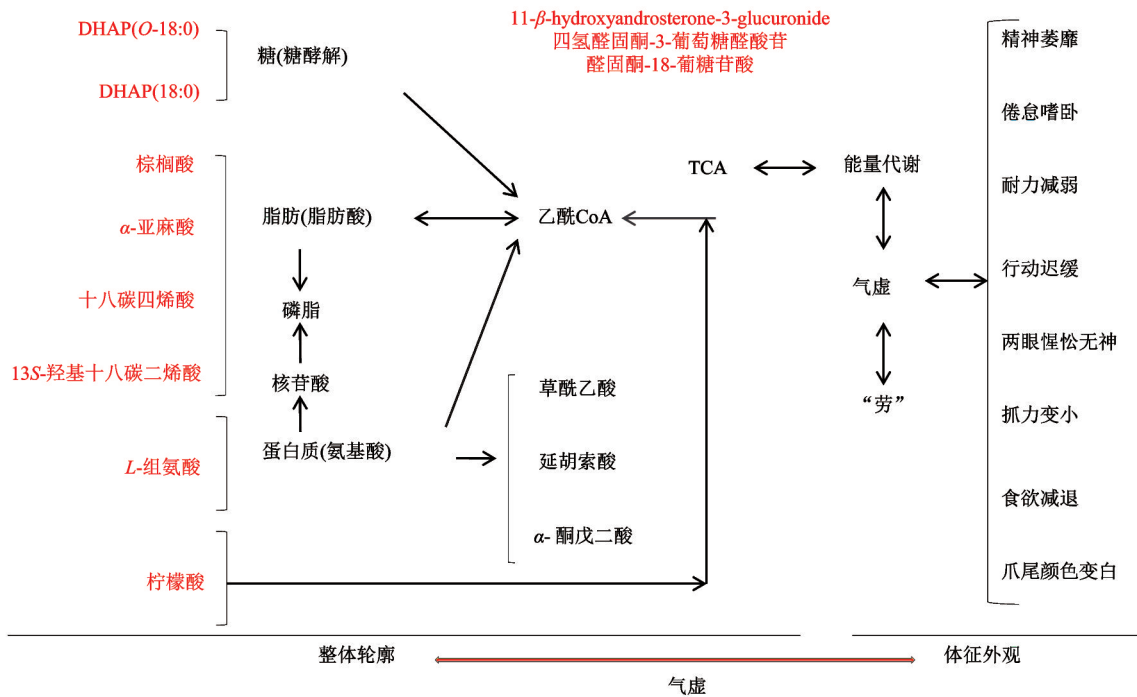


图4 代谢通路相关的气虚状态分析网络

Fig. 4 Analysis network of Qi-deficiency state related to metabolic pathways

整体代谢轮廓的变化。研究发现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<sup>[21]</sup>,表现出气虚与能量代谢途径密切相关。

本研究主要通过代谢组学方法,从能量代谢通路角度,探讨了Balb/C-nu小鼠游泳力竭法建立气虚模型的复制情况。结果显示,通过游泳力竭实验,Balb/C-nu小鼠体内发生了三羧酸循环、糖酵解代谢、脂肪酸代谢改变的现象。这些代谢途径均与能量代谢密切相关,尤其脂肪酸的代谢紊乱表明机体能量需求严重不足。说明实验小鼠在造模过程中出现了“过劳”现象,达到了气虚状态,提示采用Balb/C-nu小鼠游泳力竭法建立的气虚模型复制成功。这与很多研究的相关结论是一致的。如李林等<sup>[22]</sup>研究发现气虚证大鼠尿液的代谢轮廓发生了变化,且主要和能量代谢途径相关。于修芳等<sup>[23]</sup>研究发现游泳力竭致气虚证大鼠涉及能量代谢的血清内源性物质发生了很大变化。尹春园<sup>[24]</sup>采用代谢组学技术对气虚血瘀证脑梗死大鼠及缺血性心力衰竭大鼠进行研究,发现能量代谢通路也发生了紊乱。除此之外,病后形成的气虚证患者涉及能量代谢内源性物质也发生了很大变化<sup>[25-26]</sup>。

与前人采用体征外观、生理生化等较为单一指标评价气虚模型比较,本实验从整体内源性代谢物及代谢通路变化出发,结合体征外观,更为全面地评价了气虚模型。同时,本实验证实了能量代谢途

径与气虚具有密切相关性,可从能量代谢途径评价和阐释气虚模型,可为建立单一的气虚模型及其评价提供具体方法和参数,也可为中医证候相关模型的建立和评价提供有益借鉴。综上所述,虽然本研究筛选出了气虚模型的生物标志物及相关代谢通路,但由于缺乏特征性和专属性,尚不能完全作为中医气虚微观表征的金标准,本课题组后续将对这一问题进行深入研究,以期获得更广泛的应用和借鉴。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 张筠,陈志军,刘磊,等. 2296例大学新生气虚体质状况调查[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(3): 310-311, 335.
- [2] 徐厚平,钟红卫,汪世强. 气虚体质研究概况浅析[J]. 山西中医, 2010, 26(7): 57-58.
- [3] 毕建璐. 补中益气丸干预气虚质的临床观察及其血浆代谢组学机制研究[D]. 广州:南方医科大学, 2014.
- [4] 陈润东,杨志敏,林熾钊,等. 中医体质分型6525例调查分析[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(2): 104-106.
- [5] LI F T, YANG D, SONG F Y, et al. *In vitro* effects of ginseng and the seed of *Zizyphus jujuba* var. *spinosa* on gut microbiota of rats with spleen deficiency[J].

- Chem Biodivers, 2020, 17(9): e2000199.
- [ 6 ] LUO L, CHEN J H, WANG Y Y, et al. <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics study on urine of rat with spleen-Qi deficiency pattern[J]. Chin Pharmacol Bull, 2017, 33(10): 1363-1370.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] 冯果, 武静, 陈继婷, 等. 健脾温胃散对脾气虚胃炎大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-6 及胃组织 IRAK-4 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 145-150.
- [ 9 ] 后宗, 刘舒, 宋凤瑞, 等. 气虚型肝癌动物模型构建的思考[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(3): 84-88, 93.
- [ 10 ] 杨玉萍, 张霞, 王翀翀, 等. 不同年龄大鼠尿液代谢组学研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(2): 166-172.
- [ 11 ] 尹恒, 王建伟, 张亚峰, 等. UPLC-MS 对骨质疏松症阴虚证临床代谢标志物筛查研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(9): 1316-1322.
- [ 12 ] HOU Z, LIU S, SONG F, et al. Comprehensive physiopathology and serum metabolomics for the evaluation of the influence mechanism of Qi deficiency on xenograft mouse models of liver cancer[J]. J Sep Sci, 2021, 44(20): 3789-3798.
- [ 13 ] 玄静, 刘燕, 张永清. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 的生姜干预腹泻小鼠血清代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1): 157-164.
- [ 14 ] 徐霞, 王玮玮, 张文彤, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠造模及参苓白术散给药不同阶段的血浆代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 111-119.
- [ 15 ] 朱黎霞, 韦园诗, 黄星星, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 分析痰瘀互结型冠心病患者的血浆脂质组学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 110-117.
- [ 16 ] 余意, 胡明华, 张丹丹, 等. 黄芪多糖对气虚大鼠的补气作用及其机制探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(4): 505-510.
- [ 17 ] 梁庆, 王晖. 延胡索乙素在气虚大鼠皮肤上的渗透动力学研究[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(5): 601-604.
- [ 18 ] 李静, 李亮, 杨萍, 等. 气虚证模型大鼠尿液代谢组学特征[J]. 中医杂志, 2021, 62(6): 516-522.
- [ 19 ] 李祥, 张悦, 张文智, 等. 气虚血瘀证动物模型的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 228-234.
- [ 20 ] 蔡铭, 夏婧, 郑桃云, 等. 中医气虚证评价指标的研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1578-1581.
- [ 21 ] 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.
- [ 22 ] 李林, 王建农, 任建勋, 等. 气虚血瘀证大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学[J]. 科学通报, 2007, 52(15): 1758-1762.
- [ 23 ] 于修芳, 朴成玉, 董蕊, 等. 五加生化胶囊干预气虚血瘀证的 GC-MS 代谢组学研究[J]. 中药材, 2017, 40(11): 2677-2680.
- [ 24 ] 尹春园. 基于代谢组学的气虚血瘀证生物学基础研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [ 25 ] 朱明丹, 杜武勋, 姜民, 等. 心肌梗死恢复期气虚血瘀证的代谢组学研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(6): 1527-1530.
- [ 26 ] 华何与, 崔凯, 关山越. 不稳定型心绞痛痰浊痹阻证与气虚血瘀证血浆代谢组学研究[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(4): 578-581.

[责任编辑 刘德文]