

· 药物代谢 ·

结合血清代谢组学与支持向量回归机揭示右归丸调节 肾阳虚证的代谢标志物群及其作用机制

陈瑞群, 廖成彬, 郭茜, 张磊, 王秀凤*
(广东药科大学基础学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**寻找右归丸(Youguiwan, YGP)治疗肾阳虚证(KYDS)的血清代谢标志物群,并进一步探索右归丸中不同药性的中药(补阳药、补阴药、补血药)对代谢标志物的调节作用。**方法:**利用核磁共振氢谱(¹H-NMR)技术对右归丸治疗的KYDS大鼠进行血清代谢组学研究,并结合模式识别来分析血清代谢物的变化情况,从而寻找右归丸治疗KYDS的代谢标志物。同时,利用支持向量回归机(SVR)建立数学模型,分析和预测了右归丸中不同药性中药的剂量变化对代谢标志物的影响,探索右归丸中不同药性的中药起调节作用的代谢物,研究右归丸的作用机制。**结果:**找出了22个代谢标志物,包括氨基酸代谢(亮氨酸、缬氨酸、精氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、酪氨酸、牛磺酸),糖代谢(乳酸、乙酸和β-葡萄糖),能量代谢(甘油、肌酸、肌醇),菌群代谢[甜菜碱/氧化三甲胺(TMAO)],脂类代谢[极低密度脂蛋白(VLDL),低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)]及糖蛋白[N-乙酰糖蛋白(NAG)]。SVR分析后发现补阳药主要对HDL和甜菜碱/TMAO起作用,补阴药主要对LDL/VLDL,亮氨酸和NAG起作用;补血药主要对肌酸、谷氨酸、乳酸、甲硫氨酸、肌醇和甘油起作用。**结论:**基于¹H-NMR的血清代谢组学能够发现肾阳虚证的代谢标志物群,与SVR结合能进一步揭示右归丸中不同药性中药调节肾阳虚证的作用机制。

[关键词] 血清代谢组学; 肾阳虚证; 右归丸; 核磁共振氢谱; 支持向量回归机; 代谢标志物群; 糖蛋白

[中图分类号] R22;R289;R969.1;R284;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0062-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181202

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1042.006.html>

[网络出版时间] 2018-03-27 14:19

Analysis of Metabolic Markers and Mechanism of Action of Youguiwan in Regulating Kidney-Yang Deficiency Syndrome by Serum Metabonomics and Support Vector Regression

CHEN Rui-qun, LIAO Cheng-bin, GUO Qian, ZHANG Lei, WANG Xiu-feng*

(School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To find out the serum metabolic markers of Youguiwan (YGP) in the treatment of kidney-Yang deficiency syndrome (KYDS), and to further explore the regulatory role of medicinal herbs (the Yang-tonifying herbs, the Yin-tonifying herbs and the blood-tonifying herbs) with different properties in YGP on the metabolic markers. **Method:** We used proton hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) to study on the serum metabonomics of KYDS rats treated by YGP, and combined with pattern recognition to analyze the changes of serum metabolites, thereby finding the metabolic markers of YGP in the treatment of KYDS. At the same time, a mathematical model was established by support vector regression (SVR) to analyze and predict the influence of dose changes of medicinal herbs with different properties in YGP on the metabolic markers.

[收稿日期] 20171205(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403153);广东省科技计划项目(2014A020212603)

[第一作者] 陈瑞群,在读硕士,从事生物系统与数据挖掘研究,E-mail:975201721@qq.com

[通信作者] *王秀凤,硕士,副教授,从事生物系统与数据挖掘研究,E-mail:979272627@qq.com

Further exploration of which metabolites were regulated by medicinal herbs with different properties in YGP, and the mechanism of action of YGP was preliminary investigated. **Result:** Twenty-two metabolic markers were identified, including amino acid metabolism (leucine, valine, arginine, alanine, methionine, glutamate, glutamine, threonine, tyrosine and taurine), glucose metabolism (lactate, acetate and β -glucose), energy metabolism (glycerol, creatine and myo-inositol), gut metabolism [betaine/trimethylamine oxide (TMAO)], lipid metabolism [very-low density lipoprotein (VLDL), low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL)] and glycoprotein [*N*-acetyl glucoside (NAG)]. Furthermore, using SVR analysis and prediction, we found that the Yang-tonifying herbs mainly acted on HDL and betaine/TMAO; the Yin-tonifying herbs primarily acted on LDL/VLDL, NAG and leucine; while the blood-tonifying herbs chiefly played a role in creatine, glutamate, lactic acid, methionine, myo-inositol and glycerol. **Conclusion:** The serum metabonomics based on $^1\text{H-NMR}$ can find metabolic markers of KYDS, and the mechanism of action of KYDS regulated by medicinal herbs with different properties in YGP can be further revealed by integrating with SVR.

[**Key words**] serum metabonomics; kidney-Yang deficiency syndrome; Youguiwan; proton hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy; support vector regression machine; metabolic marker group; glycoprotein

肾阳虚证是中医的一种常见证候,首次记载于中国最早的系统理论专著《黄帝内经》中。中医认为,肾为脏腑之本,是机体阴阳消长之枢纽,因此许多学者对肾阳虚证的本质进行广泛而深入的研究。现代研究表明,肾阳虚证与神经、内分泌、免疫系统密切相关,是多系统和器官功能的综合表现^[1]。右归丸出自《景岳全书》,具有温补肾阳、填精益髓之功效,是调节肾阳虚证的经典复方^[2]。右归丸由 10 味中药组成,根据中药药性理论可分为补阳药(菟丝子、杜仲、肉桂、附子、鹿角胶),补阴药(熟地黄、山药、山茱萸、枸杞)和补血药(当归)。虽然对于肾阳虚证发病机制和右归丸的疗效已有大量的研究,但研究都比较单一,不能从整体角度来揭示中药复方多成分、多靶点、多途径的协同作用机制,导致对肾阳虚证的早期诊断以及右归丸对肾阳虚证的调节机制仍不是特别清楚。

代谢组学通过测定各种体液中中小分子代谢物的组成变化来认识和反映代谢网络在疾病和药物作用下的变化,具有融合整体、动态、综合、分析于一体的特点。其是从整体的“生化表型”来把握生物体的功能状态,与中医药学的“整体观念”思想方法具有内在相通性^[3-4]。支持向量回归机(SVR)作为一种机器学习方法,具有良好的预测功能,可利用 SVR 建模预测输入变量变化时的输出变量变化,从而探究变量之间的相互调控关系^[5-6]。目前,SVR 模型已被广泛用于响应预测。Goli 等^[7]利用 SVR 对乳腺癌患者进行生存预测和特征选择。此外,课题组前期以肾阳虚证以及右归丸对肾阳虚证的调节作用为研究对象,对肾阳虚证的发病机制、右归丸的配伍

规律和疗效已经进行了很多研究^[8-10]。在此基础上,本实验结合血清代谢组学和 SVR 来分析和预测右归丸中不同药性中药的药量变化对肾阳虚证相关代谢标志物的影响,从系统的角度进一步探索右归丸中不同药性中药分别对哪些代谢物起到了调节作用,分析右归丸治疗肾阳虚证的作用机制,为临床科学解释中医药的治疗作用和方剂的配伍规律提供了参考。

1 材料

Avance III 500 MHz 型全数字化超导核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司),JJ300 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂),BJH-W300F 型陶瓷自动中药煲(广东天际电器股份有限公司),TGL-16 型台式高速离心机(上海医用分析仪器厂)。0.9% 氯化钠注射液(贵州天地药业有限责任公司,批号 H52020069,规格 500 mL:4.5 g),氢化可的松注射液(山西晋新双鹤药业有限公司,批号 201002215,规格 5 mL:25 mg),重水(D_2O ,广东药科大学中心实验室),试剂盒均由北京北免东雅生物技术研究所提供;右归丸中的 10 味中药饮片熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子、鹿角胶、杜仲、肉桂、当归和附子均购自广州市采芝林药业有限公司,经广东药科大学中药学院中药资源系马鸿雁副教授鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》(一部)的相关项下要求。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,由广东省实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2008-0002。所有大鼠在标准环境下自由饮食,温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(55 ± 5)%,自然光黑暗周期的环境中饲养,本文涉及的动物实验经广东药科大

学伦理委员会批准,批准号 gdpulac2014031。

2 方法与结果

2.1 右归丸均匀设计拆方 右归丸由熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、鹿角胶、菟丝子、杜仲、肉桂、附子和当归 10 味中药按 8:4:3:4:4:4:4:2:2:3 的比例组成。根据传统中药配伍的君臣佐使关系将右归丸的

各味中药分为核心药和补血药,然后结合单味中药的药性,将核心药分成补阴药和补阳药。其中熟地黄、山药、山茱萸和枸杞子为补阴药;菟丝子、鹿角胶、杜仲、肉桂和附子为补阳药;当归为补血药。最后,把补阴药、补阳药和补血药作为影响右归丸药效的 3 个因素,按 $U_5(5^3)$ 均匀设计表安排拆方方案,见表 1。

表 1 右归丸及其均匀设计组试验方案

Table 1 Experimental program of Youguiwan and its uniform design groups

组别	补阴药				补阳药					补血药
	熟地黄	山药	山茱萸	枸杞子	菟丝子	鹿角胶	杜仲	肉桂	附子	当归
右归丸	24	12	9	12	12	12	12	6	6	9
设计 1	12	6	4.5	6	8	8	8	4	4	18
设计 2	24	12	9	12	16	16	16	8	8	13.5
设计 3	36	18	13.5	18	4	4	4	2	2	9
设计 4	48	24	18	25	12	12	12	6	6	4.5
设计 5	12	6	4.5	6	4	4	4	2	2	4.5

2.2 右归丸提取液的制备 根据《景岳全书》中右归丸的原始组成和制备方法^[11],除鹿角胶外,将右归丸中的其他 9 味中药用水浸泡 30 min,大火煮 20 min 至沸腾,接着小火煮 20 min,用 5 层纱布过滤。滤渣再用冷水浸泡 1 h,大火煮 20 min 至沸腾,接着小火煮 20 min,用 5 层纱布过滤。合并 2 次滤液,鹿角胶趁热加入上述药液烊化,用旋转蒸发仪浓缩至 111 mL,得生药质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的右归丸提取液,给药体积 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,大鼠用药量 = 成人用药量 $\times 0.018 \times 5$ 。

2.3 动物分组 随机将大鼠分成正常组、模型组、给药组(包括右归丸组和设计 1~5 组),共 8 组,每组 8 只,共 64 只。

2.4 动物处理 正常组大鼠后肢肌肉注射 0.9% 氯化钠注射液 0.3 mL,每天 1 次,自由饮水、饮食,连续 22 d。肾阳虚大鼠模型复制过程为氢化可的松混悬液充分混匀,按剂量 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后肢肌肉注射,每天 1 次,自由饮水、饮食连续 22 d。6 组给药组在肾阳虚大鼠模型复制的第 8 天开始分别用右归丸和均匀设计的 5 个药方的汤剂灌胃给药,给药体积均为 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,自由饮水、饮食,连续 15 d。第 23 天处死,取血清,并用放射免疫分析法检测四碘甲状腺原氨酸(T_4),皮质醇(CORT)和睾酮(T)。

2.5 样品的收集与预处理 收集第 23 天的静脉血,静置 1 h,于 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上层

血清并分装储存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 液氮中待分析。分析前,取出血清室温下解冻,取上清液 300 μL ,加入磷酸盐缓冲液 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4) 180 μL 和重水 120 μL 。充分混匀,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $14\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液,用移液枪取上清液 600 μL 至 5 mm 核磁管中,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,待测。

2.6 $^1\text{H-NMR}$ 图谱的采集与处理 使用超导核磁共振谱仪测定血清的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱,采用弛豫时间(CPMG)脉冲序列抑制大分子信号,获得自由感应衰减信号(FID)。FID 经过傅立叶变换转为二维 NMR 谱图。参数设定为回波时间 100 ms,谱宽 10 kHz,采样点数 32 k,采样累加数 128 次,温度设置 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,弛豫延迟时间设定 4 s。将 NMR 图谱文件夹导入 TopSpin 2.0 软件,以乳酸峰($\delta, \delta = 1.33$)为化学位移参考峰,对图谱进行手动相位校正和基线校正,即获得各样品对应的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱。利用 AMIX 程序按 0.004 ppm 等间隔分段积分,为了消除剩余水峰引起的影晌,将积分区间 4.7~5.2 的积分值设为零,对产生的所有积分数据按总面积进行归一化处理。数据结果以 Excel 文件格式保存,并导入 SIMCA 13.0 软件,经 Pareto 标度化预处理后进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。

2.7 生物标志物的确定 为了鉴定潜在的生物标志物,使用一些可用的生物化学数据库,如人类代谢

组学数据库 (HMDB), 京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 和 ChemSpider 中的 ¹H-NMR 信息进行谱峰归属。此外, 还通过与参考文献进行比较, 进一步确定了其中潜在的生物标志物^[12-14]。将化学位移值、负载值和相关系数(*r*) 直接导入 Matlab 2016a 进行处理, 得到相关系数图谱。根据相关系数阈值表 (*n* = 8) 确定 |*r*| ≥ 0.707 的为候选代谢标志物^[8]。图谱右侧的颜色条代表组间差异程度, 红色代谢有显著性差异, 蓝色代表无显著性差异。

2.8 支持向量回归机 (SVR) 模型的建立 SVR 主要根据给定的样本集合 $\{(x_i, y_i) \mid i = 1, 2, \dots, k\}$ 寻找反应样本数据的最优函数关系 $y = f(x)$ 。其中 x_i 表示输入向量, y_i 表示期望输出。采用适当的核函数 $k(x_i, x_j)$ 来确定如下回归模型。

$$f(x) = \bar{\omega} \cdot \varphi(x) + b = \sum_{i=1}^n (\alpha_i - \alpha_i^*) k(x_i, x) + b$$

在回归模型中, 当 α_i 不为零或 α_i^* 不为零时对应的样本即为支持向量。常用的核函数包括径向基函数 (RBF) 核、线性核、多项式核等。在代谢组学水平上, 采用 SVR 建立右归丸药量与肾阳虚代谢标志物含量关系的回归模型, 其中输入变量为右归丸中各种中药的药量, 输出变量是肾阳虚代谢标志物的含量。通过回归预测分析, 寻找右归丸中不同药性的中药及中药组合对代谢标志物含量的影响, 进而分析右归丸对肾阳虚证的影响和作用机制。

2.9 统计分析 使用 SPSS 20.0 软件对组间的生化指标和代谢物相对含量进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2.10 生化指标及血清¹H-NMR 谱图的分析 生化指标数据见表 2。结果发现与正常组比较, 模型组 T_4 , CORT 和 T 的水平都显著下降 ($P < 0.05$), 而经过右归丸及其均匀设计组给药后, T_4 , CORT 和 T 的水平较模型组均显著升高 ($P < 0.05$)。血清¹H-NMR 谱见图 1, 结果得到 33 种代谢物。

2.11 模式识别的分析 正常组、模型组、右归丸及其均匀设计组的 PCA 情况见图 2。结果发现正常组、模型组、右归丸及其均匀设计组的 PCA 均可以明显分开, 说明这些样本间具有不同的代谢特征。PCA 模型的主要参数为①正常组、模型组与右归丸组的 $R^2X = 0.793, Q^2 = 0.606$; ②设计 1 组与模型组的 $R^2X = 0.974, Q^2 = 0.882$; ③设计 2 组与模型组的 $R^2X = 0.906, Q^2 = 0.643$; ④设计 3 组与模型组的 $R^2X = 0.779, Q^2 = 0.643$; ⑤设计 4 组与模型组的 $R^2X = 0.814, Q^2 = 0.681$; ⑥设计 5 组与模型组的

表 2 正常组、模型组及 6 个药方组的激素指标值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

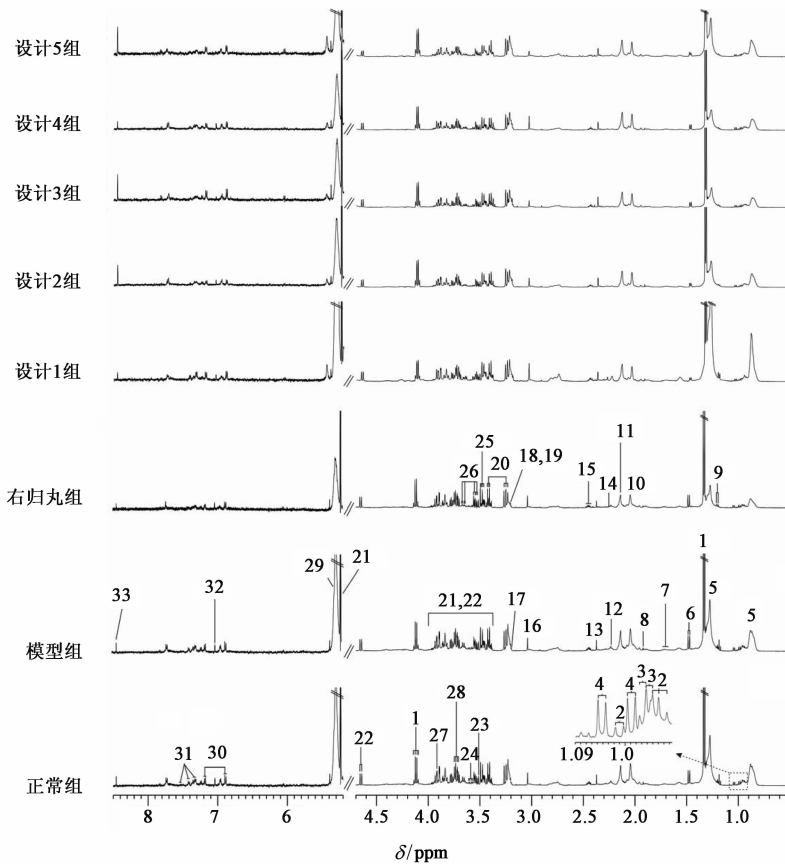
Table 2 Values of hormone indicators in normal group, model group and six prescription groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	$T_4/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	CORT/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	T/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	57.4 ± 2.7	2 440.4 ± 63.7	27.6 ± 5.0
模型	33.8 ± 4.2 ¹⁾	915.1 ± 73.8 ¹⁾	14.3 ± 3.5 ¹⁾
右归丸	51.9 ± 4.4 ²⁾	2 208.2 ± 62.5 ²⁾	22.2 ± 4.0 ²⁾
设计 1	46.9 ± 1.9 ²⁾	1 879.7 ± 66.5 ²⁾	16.3 ± 1.9 ²⁾
设计 2	52.7 ± 3.4 ²⁾	2 149.2 ± 78.2 ²⁾	22.6 ± 3.4 ²⁾
设计 3	49.9 ± 3.2 ²⁾	2 088.1 ± 88.4 ²⁾	18.9 ± 2.5 ²⁾
设计 4	51.3 ± 4.7 ²⁾	2 160.3 ± 63.9 ²⁾	21.6 ± 3.2 ²⁾
设计 5	43.2 ± 3.6 ²⁾	1 503.2 ± 56.6 ²⁾	18.2 ± 2.4 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

$R^2X = 0.77, Q^2 = 0.419$ 。为了得到对区分样本有贡献的代谢物变化, 进一步进行 OPLS-DA, 结果见图 3。同时, 为了验证 OPLS-DA 模型的可靠性, 采用 7 倍交叉验证法进行验证, 得到了 OPLS-DA 模型的主要参数为①设计 1 组与模型组的 $R^2X = 0.802, R^2Y = 0.995, Q^2 = 0.963$; ②设计 2 组与模型组的 $R^2X = 0.797, R^2Y = 0.977, Q^2 = 0.820$; ③设计 3 组与模型组的 $R^2X = 0.754, R^2Y = 0.999, Q^2 = 0.974$; ④设计 4 组与模型组的 $R^2X = 0.723, R^2Y = 0.999, Q^2 = 0.964$; ⑤设计 5 组与模型组的 $R^2X = 0.685, R^2Y = 0.992, Q^2 = 0.971$ 。结果发现右归丸及其设计组与模型组均能明显分开, 说明给药前后大鼠体内的代谢物发生了显著的变化。因此, 选择 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 (VIP) 值 > 1 的差异变量进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异性代谢标志物, 见图 4 和表 3。

2.12 SVR 模型的分析与预测 调整右归丸中补阴药、补阳药和补血药的药量, 利用 SVR 预测模型来预测不同药物药量增大 30% 时, 代谢标志物含量的变化, 并使用留一法检验对建立的 SVR 模型进行检验。留一法检验是从数据集中依次将每个样本单独取出, 用剩下的样本集进行训练, 对取出的单个样本进行测试, 重复这样的过程, 直到数据集中每个样本都被单独测试过。最终, 获得每个模型的预测误差和预测复相关系数。结果各模型的预测误差均 < 2%, 说明模型的可行性。此外, 所有样本训练模型和预测模型的复相关系数都 > 0.85, 说明模型的预测效果是可靠的。结果发现 22 个代谢标志物中, 有 13 个在 SVR 模型中的变化有意义, 见表 4, 而 8 个代谢标志物 (丙氨酸、缬氨酸、精氨酸、苏氨酸、牛磺酸、谷氨酰胺、乙酸和 β -葡萄糖) 变化不明显。



1. 乳酸; 2. 异亮氨酸; 3. 亮氨酸; 4. 缬氨酸; 5. 脂类物质; 6. 丙氨酸; 7. 精氨酸; 8. 乙酸; 9. 3-羟基丁酸; 10. N-乙酰糖蛋白; 11. 甲硫氨酸; 12. O-乙酰糖蛋白; 13. 丙酮酸; 14. 谷氨酸; 15. 谷氨酰胺; 16. 肌酸; 17. 胆碱; 18. 磷脂酰胆碱; 19. 甘油磷脂酰胆碱; 20. 牛磺酸; 21. α -葡萄糖; 22. β -葡萄糖; 23. 甘氨酸; 24. 肌醇; 25. 苏氨酸; 26. 甘油; 27. 甜菜碱/TMAO; 28. 丙氨酸; 29. 不饱和脂类物质; 30. 酪氨酸; 31. 苯丙氨酸; 32. 组氨酸; 33. 甲酸

图 1 各实验组的一维¹H-NMR 比较

Fig.1 Comparison of one-dimensional ¹H-NMR spectra of experimental groups

3 讨论

本研究找出了右归丸调节肾虚证的 22 个代谢标志物, 主要涉及氨基酸代谢、糖代谢、能量代谢、菌群代谢、脂类代谢以及糖蛋白。利用 SVR 分析与预测后发现右归丸中的补阳药主要对 HDL 和甜菜碱/TMAO 起作用; 补阴药主要对 LDL/VLDL, 亮氨酸和 NAG 起作用; 补血药主要对肌酸、谷氨酸、乳酸、甲硫氨酸、肌醇和甘油起作用。在右归丸的全方、补阳药、补阴药、补血药和组方(核心药、补阳药+补血药、补阴药+补血药)中, 全方主要对 HDL, 亮氨酸, 甲硫氨酸, 肌醇和甜菜碱/TMAO 起作用; 核心药主要对 LDL/VLDL 和 NAG 起作用; 补血药主要对甘油起作用; 补阴药+补血药主要对肌酸、谷氨酸和乳酸起作用。可以明显地发现, 单独的补阳药、补阴药和补血药对代谢物数量的调节作用很少, 而当其进行组合后, 对代谢物数量的调节明显增加。这也验证了中药复方配伍的科学性和有效性。

此外, 还有 8 个代谢标志物(丙氨酸、缬氨酸、精氨酸、苏氨酸、牛磺酸、谷氨酰胺、乙酸和 β -葡萄糖)在 SVR 模型中的变化不明显。

本文研究还发现作为治疗肾虚证的右归丸方中补阴药和补血药作用的代谢标志物分别为 4 个和 6 个, 均比补阳药作用的代谢标志物(3 个)多; 而补阴药和补血药的组分(分别为 4 种和 1 种中药)又比补阳药的组分(5 种中药)少。补阳药是君药, 对疾病起主要的治疗作用, 但需要在补阴药和补血药的协同作用下才能较好地发挥疗效, 这也与中医的阴阳互根理论相一致; 根据阴阳互根理论, 临床上治疗阳虚证时, 在助阳剂中适当佐以滋阴药, 即谓“阴中求阳”, 阴得阳升而泉源不竭。补阴药是臣药, 能够协助君药发挥治疗作用。补血药是佐药, 能够协助主药发挥疗效, 或消减主药的烈性和毒性, 补阳药中的附子就是一种有毒的中药材。故临床上治疗气虚证时, 在补气剂中也常佐以补血药。中药复方的

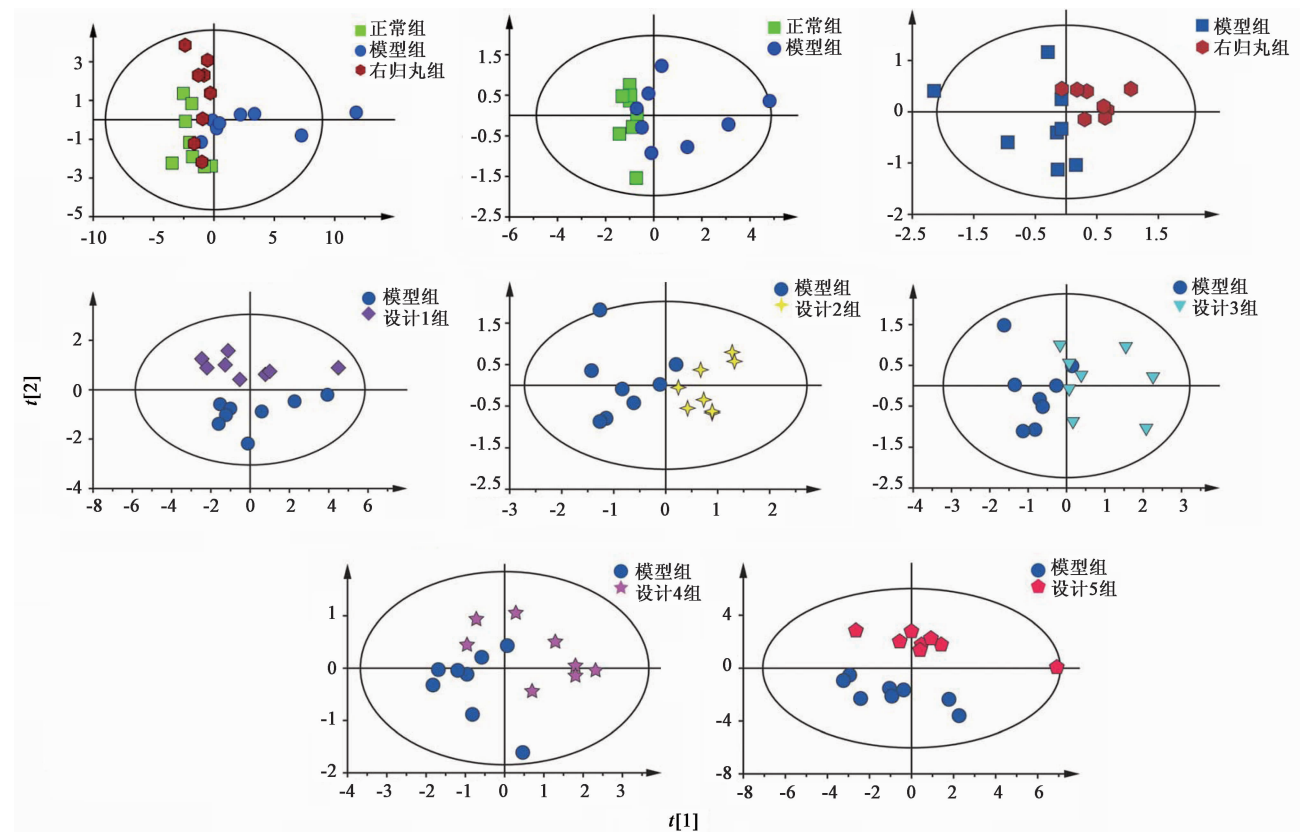
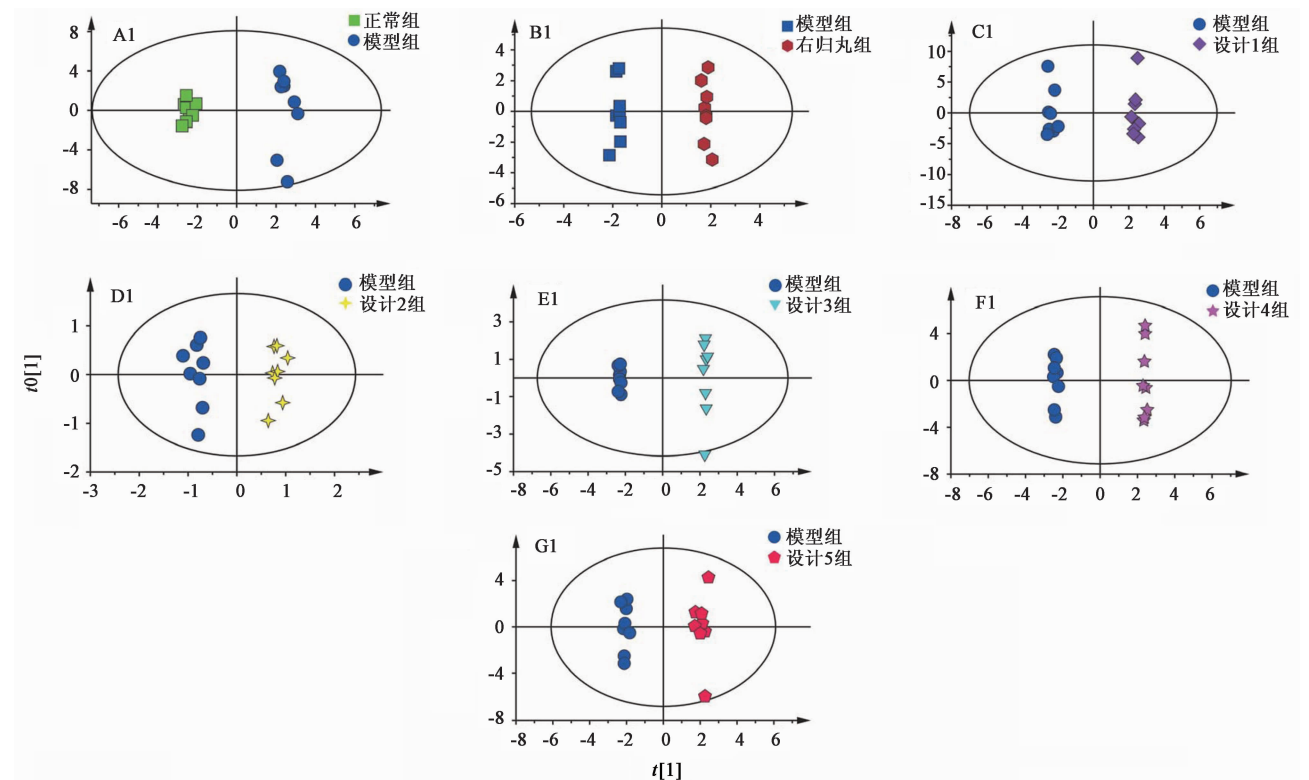


图 2 各实验组的 PCA 比较

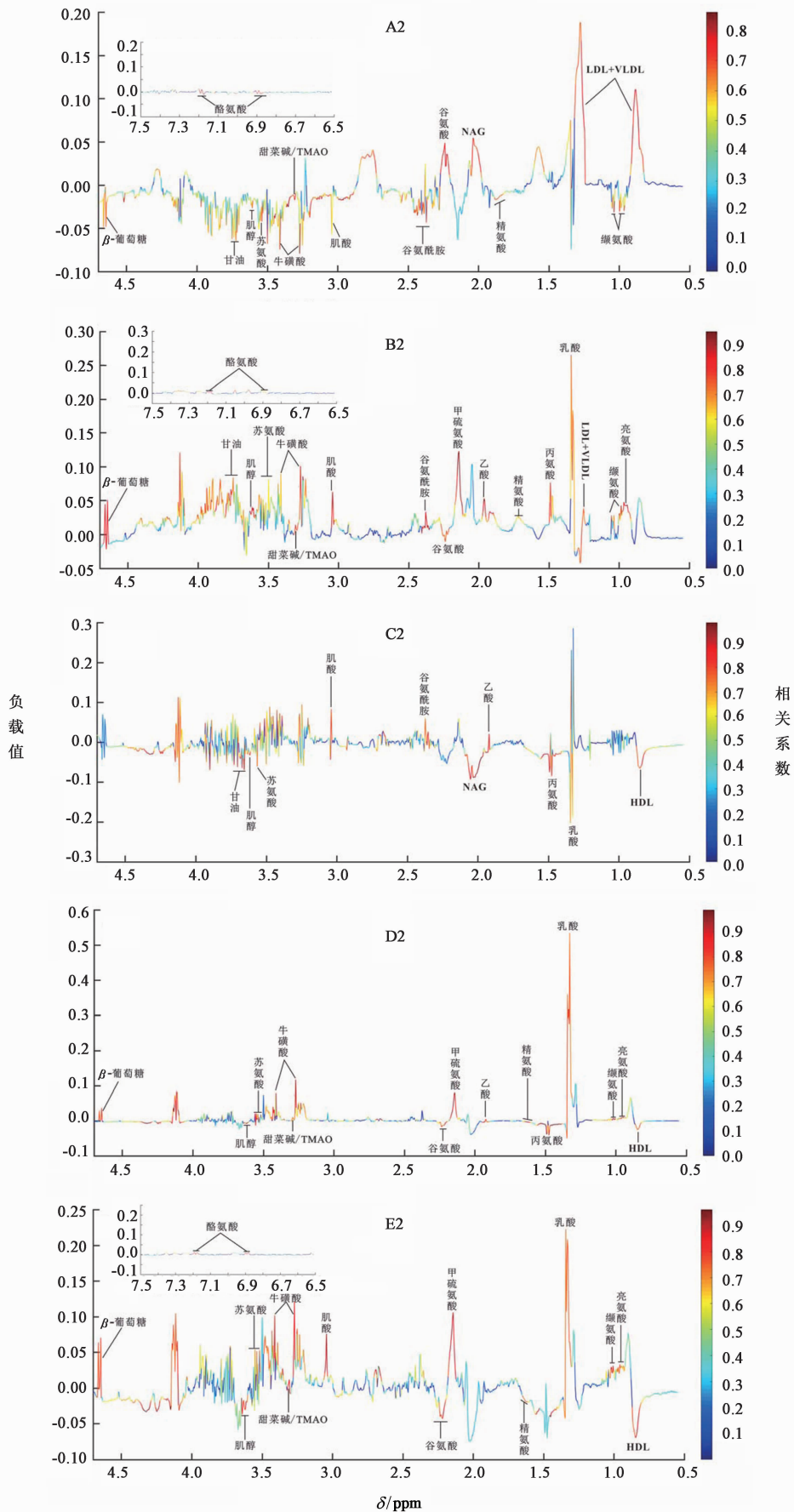
Fig. 2 Comparison of PCA plots of experimental groups

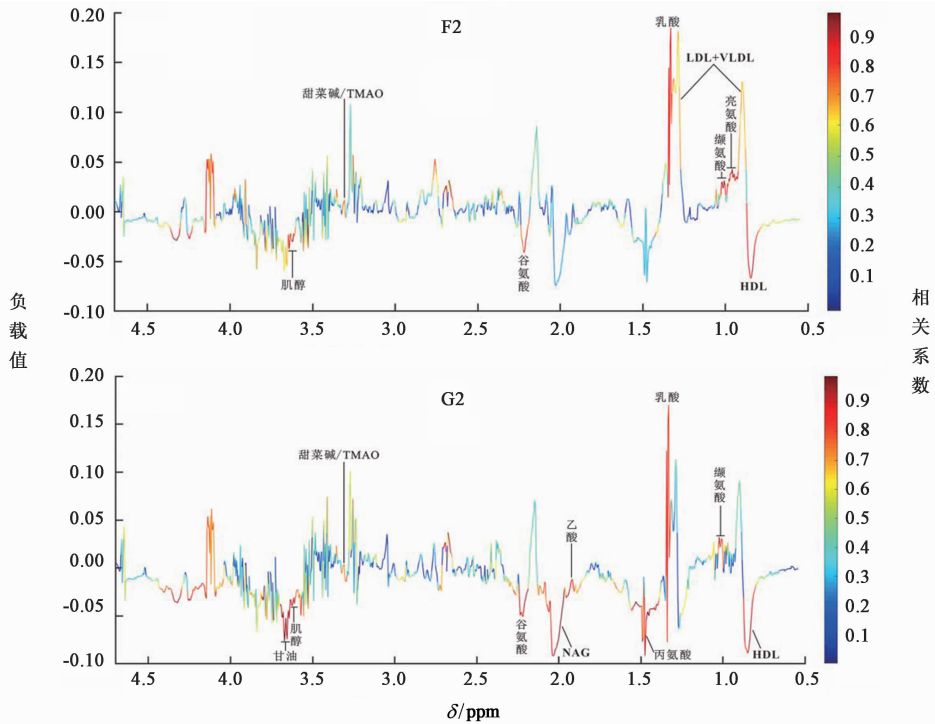


A1 ~ G1 的 OPLS-DA 分别对应图 4 中 A2 ~ G2 的线性热图

图 3 各实验组的 OPLS-DA 比较

Fig. 3 Comparison of PCA plots of experimental groups





HDL. 高密度脂蛋白; LDL. 低密度脂蛋白; VLDL. 极低密度脂蛋白; TMAO. 氧化三甲胺; NAG. *N*-乙酰糖蛋白(表 3,4 同)

图 4 各实验组的线性热比较

Fig.4 Comparison of linear heat maps of experimental groups

表 3 代谢标志物在各组实验组间的变化情况

Table 3 Changes of metabolic markers among experimental groups

代谢标志物	化学位移值 /ppm	模型组-正常组	右归丸组-模型组	设计 1 组-模型组	设计 2 组-模型组	设计 3 组-模型组	设计 4 组-模型组	设计 5 组-模型组
HDL	0.84 (m)	-	-	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾
LDL + VLDL	0.89 (m), 1.29 (m)	↑ ²⁾	↓ ²⁾	-	-	-	↑ ²⁾	-
亮氨酸	0.95 (d)	-	↑ ²⁾	-	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	-
缬氨酸	0.97 (d), 1.02 (d)	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	-	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ¹⁾
乳酸	1.33 (d), 4.11 (t)	-	↑ ²⁾	↑ ¹⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾
丙氨酸	1.48 (d)	-	↑ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	-	-	↓ ¹⁾
精氨酸	1.68 (m)	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	-	↑ ²⁾	↑ ¹⁾	-	-
乙酸	1.91 (s)	-	↑ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	-	-	↓ ²⁾
NAG	2.04 (s)	↑ ²⁾	-	↓ ²⁾	-	-	-	↓ ²⁾
甲硫氨酸	2.13 (s)	-	↑ ²⁾	-	↑ ²⁾	↑ ¹⁾	-	-
谷氨酸	2.14 (m)	↓ ²⁾	↑ ²⁾	-	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾
谷氨酰胺	2.41 (m)	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	↓ ²⁾	-	-	-	-
肌酸	3.04 (s)	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	↑ ¹⁾	-	↑ ²⁾	-	-
牛磺酸	3.25 (t), 3.41 (t)	↓ ¹⁾	↑ ¹⁾	-	↑ ²⁾	↑ ²⁾	-	-
苏氨酸	3.56 (dd)	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	-	-
肌醇	3.63 (dd)	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	↓ ¹⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾	↓ ²⁾
甘油	3.64 (dd), 3.87 (m)	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	↓ ¹⁾	-	-	-	↓ ²⁾
甜菜碱/TMAO	3.27 (s)	↓ ²⁾	↑ ²⁾	-	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ¹⁾
酪氨酸	6.87 (m), 7.17 (m)	↓ ¹⁾	↑ ²⁾	-	-	↑ ²⁾	-	-
β-葡萄糖	4.64 (d)	↓ ²⁾	↑ ²⁾	-	↑ ²⁾	↑ ²⁾	-	-

注: s. 单重峰; d. 二重峰; m. 多重峰; t. 三重峰; dd. 四重峰。“-”表示浓度变化不明显,“↑”表示浓度上升,“↓”表示浓度下降。¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 SVR 分析预测右归丸中不同成分对代谢标志物质量分数的影响

Table 4 Effect of different components in YGP on contents of metabolic markers by SVR analysis and prediction

代谢标志物	全方药	核心药	补阴药 + 补血药	补阴药	补血药	补阳药	补阳药 + 补血药
肌酸	4.975 5	0.160 1	7.437 0 ²⁾	2.614 5	4.821 9 ¹⁾	-2.402 7	2.412 0
谷氨酸	5.500 9	2.058 1	5.796 0 ²⁾	2.346 3	3.446 8 ¹⁾	-0.204 0	3.235 9
HDL	-1.960 3 ²⁾	-1.713 8	-0.622 8	-0.372 9	-0.233 1	-1.482 2 ¹⁾	-1.709 0
乳酸	5.444 3	1.317 3	6.629 5 ²⁾	2.150 3	4.130 0 ¹⁾	-0.814 2	3.323 5
LDL + VLDL	0.736 0	1.077 4 ²⁾	0.284 1	0.645 5 ¹⁾	-0.262 2	0.575 7	0.204 8
亮氨酸	1.597 9 ²⁾	1.391 1	1.392 9	1.153 1 ¹⁾	0.324 5	0.481 3	0.758 8
甲硫氨酸	1.302 7 ²⁾	0.710 9	1.201 5	0.551 4	0.857 3 ¹⁾	0.575 7	1.223 0
肌醇	0.170 9 ²⁾	0.157 1	0.162 9	0.141 4	0.157 3 ¹⁾	0.150 1	0.163 5
NAG	-1.090 3	-1.264 6 ²⁾	-0.868 2	-1.048 1 ¹⁾	-0.180 3	-0.294 3	-0.119 5
甜菜碱/TMAO	3.371 6 ²⁾	3.358 9	0.944 3	1.042 3	0.001 4	2.757 9 ¹⁾	2.733 2
甘油	0.024 8	-0.155 0	0.061 3	-0.146 0	0.196 3 ^{1,2)}	-0.001 3	0.170 8

注:正、负值分别表示代谢物质量分数的增加、减少;¹⁾在补阳药、补阴药和补血药中代谢标志物质量分数发生变化最大的值,²⁾在 7 组中代谢标志物质量分数发生变化最大的值。

不同配伍会引起药效变化,从而起到整体增效减毒作用。同时,从代谢标志物的数量看,在一定程度上证实了中药复方多靶点协同作用的机制。

本研究将代谢组学与 SVR 分析相结合,从系统的角度来阐释右归丸治疗肾阳虚证的作用机制,可为临床科学解释中医药的治疗作用和方剂的配伍规律提供参考方法。本实验使用的方法不是对单一化学成分进行提取,而是突出中医的整体性,更符合中药复方整体的协同作用机制。但是,由于本研究的结果是建立在小样本的模型分析与预测基础上,缺乏大样本的有效性验证,后续还需要通过增加样本量和药理实验来进一步验证。同时,本实验是基于动物来发现的代谢标志物,而由于人和动物对中药的代谢作用不同,代谢产物也可能会有差异。因此,后续准备收集临床样本来进一步研究右归丸的作用机制。

[参考文献]

[1] 董兴刚,张庆怡,陈以平. 肾阳虚证的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2003,4(5):299-300.
 [2] 郭杨,马勇. 中医药治疗骨质疏松症的常用处方分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):188-191.
 [3] 王玉龙,吕光耀,王娅妮,等. 基于¹H-NMR 的丹七片对自发性高血压大鼠尿液代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(4):102-107.
 [4] 何瑶,王丽娟,刘婷婷,等. 基于代谢组学技术分析四物汤治疗原发性痛经证的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(12):82-89.
 [5] 刘瑞新,史新元,乔延江. 支持向量回归等 6 种方法用于均匀设计优化的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(11):89-92.
 [6] 王秀凤,张磊,伍庆华,等. 基于支持向量回归机的肾阳虚大鼠垂体-肾上腺轴与垂体-性腺轴功能动态分

析[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20(11):1487-1489.
 [7] Goli S, Mahjub H, Faradmal J, et al. Survival prediction and feature selection in patients with breast cancer using support vector regression [J]. Comput Math Methods Med, 2016, doi:10.1155/2016/2157984.
 [8] CHEN R Q, WANG J, LIAO C B, et al. ¹H-NMR studies on serum metabonomic changes over time in a kidney-Yang deficiency syndrome model [J]. Rsc Adv, 2017, 7(54):34251-34261.
 [9] 王秀凤,伊丽娜,张磊,等. 基于粗糙集的肾气丸、右归丸、右归饮 3 首补肾阳类方配伍规律研究[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(1):114-118.
 [10] 王秀凤,张磊,唐小娅,等. 基于决策规则模型及均匀设计拆方的右归丸配伍规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):321-324.
 [11] JI X M, LIU H L, AN C, et al. You-Gui pills promote nerve regeneration by regulating netrin1, DCC and Rho family GTPases RhoA, Rac1, Cdc42 in C57BL/6 mice with experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Ethnopharmacol, 2016, doi: 10.1016/j.jep.2016.04.025.
 [12] JIANG C Y, YANG K M, YANG L, et al. A ¹H-NMR-based metabonomic investigation of time-related metabolic trajectories of the plasma, urine and liver extracts of hyperlipidemic hamsters [J]. PLoS One, 2013, 8(6):e66786.
 [13] 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):793-811.
 [14] Pechlivanis A, Kostidis S, Saraşlanidis P, et al. ¹H-NMR-based metabonomic investigation of the effect of two different exercise sessions on the metabolic fingerprint of human urine [J]. J Proteome Res, 2010, 9(12):6405-6416.

[责任编辑 刘德文]