

· 药剂与炮制 ·

姜炭炮制前后对虚寒性出血症大鼠尿液代谢组学分析

莫毛燕¹, 朱琼花¹, 薛兴阳², 邓仙梅¹, 周苏娟¹, 孟江^{1*}, 王淑美¹

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 广州医科大学附属肿瘤医院, 广州 510000)

[摘要] 目的:运用代谢组学研究姜炭炮制前后对虚寒性出血症大鼠尿液的代谢表型变化,探讨姜炭炮制前后药效及作用机制的变化。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)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)研究空白组与模型组、姜炭组、干姜组相互间的代谢物谱差异,通过变量重要性投影(VIP)在尿液中发现潜在的生物标志物,通过矫正率筛选姜炭温经止血的药效生物标志物。结果:姜炭可使虚寒性出血证大鼠发生紊乱的内源性生物标志物回归正常水平,而干姜作用较弱。筛选出与虚寒性出血症相关的7种生物标志物,其中乙酰乙酸、丙酮酸、氮氧三甲胺、牛磺酸、色氨酸为姜炭温经止血的药效生物标志物。结论:代谢组学研究能较全面地反应生物体的生理及代谢状态,为中医“证”的本质研究及中药炮制前后药效评价提供新方法。

[关键词] 姜炭; 虚寒性出血证; 代谢组学; 核磁共振; 尿液; 大黄

[中图分类号] R945;R283.3;R969.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150702.0957.001.html>

[网络出版时间] 2015-07-02 9:57

Urine Metabonomics Analysis of Dried and Charred Zingiberis Rhizoma Recens on Rats with Deficiency-cold Hemorrhagic Disease MO Mao-yan¹, ZHU Qiong-hua¹, XUE Xing-yang², DENG Xian-mei¹, ZHOU Su-juan¹, MENG Jiang^{1*}, WANG Shu-mei¹ (1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Cancer Center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate urine metabolic profile of rats with deficiency-cold hemorrhagic disease, and discuss intervention effects of dried and charred Zingiberis Rhizoma Recens. **Method:** Proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) technique was used to analyze metabolome in urine. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was processed to analyze metabonome difference among four groups. Seven potential biomarkers were selected by variable importance in the projection (VIP). Principal component analysis (PCA) was employed to process data from the charred Zingiberis Rhizoma Recens treatment group, hemostatic effects of charred Zingiberis Rhizoma Recens were investigated through the content of potential biomarkers. **Result:** Charred Zingiberis Rhizoma Recens could make disorder endogenous biomarkers of the model rats to normal levels, while dried Zingiberis Rhizoma Recens had weaker efficacy. Acetoacetic acid, pyruvic acid, nitrogen oxygen trimethylamine, taurine and tryptophan were efficacy of hemostasis biomarkers in charred Zingiberis Rhizoma Recens. **Conclusion:** Metabonomics can reflect the whole status of metabolism in biosystems, it can be treated as a potential powerful approach in pharmacological studies for different processed products and investigation of essence of syndrome in traditional Chinese medicine.

[Key words] charred Zingiberis Rhizoma Recens; deficiency-cold hemorrhagic disease; metabonomics; nuclear magnetic resonance; urine; Rhei Radix et Rhizoma

[收稿日期] 20141222(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473352)

[第一作者] 莫毛燕,在读硕士,从事中药炮制与质量标准研究,Tel:020-39352169,E-mail:1109910186@qq.com

[通讯作者] *孟江,博士,教授,硕士生导师,从事中药炮制与质量控制的研究,Tel:02039352169,E-mail:jiangmeng666@126.com

炭药为中医临床常用的止血药,目前有80多种炭药在临床使用,2010年版《中国药典》收载有20多种。古人提出的炭药止血、炒炭存性的炮制理论具有一定的科学内涵,但炭药止血的机制和药效物质尚未完全阐明。姜炭味苦而涩,其性守而不走,长于温经止血^[1],是临床治疗虚寒性出血证的经典中药。代谢组学作为一种系统性、整体性的研究方法,能够较全面地揭示药物治疗疾病过程中生物体系内所发生的一系列生物化学变化,该方法强调将人体作为一个完整系统来研究,从整体角度考察疾病和药物对人体产生的效应,与中医学的整体思想相吻合^[2-3]。在前期已对姜炭炮制工艺、药效学、质量控制研究的基础上^[4-6],本实验运用核磁共振代谢组学分析方法,结合模式识别技术分析姜炭炮制前后对虚寒性出血症大鼠尿液中内源性代谢物的影响及变化规律,确定其内源性生物标志物和药效生物标志物,探讨姜炭炮制前后的药效变化及其作用机制。

1 材料

500 MHz型全数字化超导核磁共振谱仪(瑞士Bruker公司),TGL-24MC型低温离心机(杭州硕联仪器有限公司),CY-640型电控炒药机(台州博大制药机械科技有限公司)。干姜、大黄产地均为四川,均购自广州致信药业有限公司,经广东药学院中药学院刘基柱副教授鉴定分别为姜科植物姜*Zingiber officinale*的干燥根茎和蓼科植物药用大黄*Rheum officinale*的干燥根茎;氘水(D₂O,美国Sigma公司),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

雄性SD大鼠,SPF级,体重280~320 g,24只,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK-(粤)2008-0002,适应性饲养7 d后用于实验。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 干姜、姜炭和大黄 取干姜药材,除去杂质,略泡,洗净,润透,切厚片,干燥,筛去碎屑,粉碎,过50目筛,得干姜样品。按2010年版《中国药典》(一部)附录II D炒炭法炮制,取干姜饮片置电控炒药机中,于310℃炒13~17 min,炮制程度为外焦黑内棕褐色^[7],晾凉,筛去碎屑,粉碎,过50目筛,得姜炭。取大黄药材,除去杂质,洗净,润透,切厚片,晾干,筛去碎屑,粉碎,过50目筛,得大黄样品。

2.1.2 干姜、姜炭和大黄灌胃液^[6] 分别取干姜、姜炭适量,加8倍量95%乙醇回流提取2次,每次3 h,合并提取液,减压浓缩至无醇味,加适量水溶解至6 g·mL⁻¹,得干姜、姜炭醇提液。取大黄适量,加

8倍量水浸泡2 h,煎煮2次,每次15 min,合并滤液,加热浓缩至3 g·mL⁻¹,得大黄水提液。

2.2 动物分组和尿液样本收集 24只大鼠随机分成4组,每组6只,包括空白组、模型组、干姜组、姜炭组。模型组、干姜组和姜炭组大鼠每天按0.03 g·g⁻¹灌胃大黄药液,连续给药10 d,空白组给予等体积水。在造模第6天开始,干姜组和姜炭组分别按0.04 g·g⁻¹灌胃干姜醇提液和姜炭醇提液。从第6天开始,每隔1 d,模型组、干姜组和姜炭组眼眶取血2 mL,连续3次。第10天给药后,收集24 h尿液。尿液收集时,大鼠置于代谢笼中,代谢笼集尿器置于冰上,加入1%叠氮化钠溶液50 μL作为防腐剂,于3 000 r·min⁻¹,4℃离心10 min,取上清液,转移至2 mL塑料离心管中,放入-80℃冰箱中保存,备用。

2.3 尿液的预处理 将尿液放置室温解冻10 min,吸取样品液400 μL,加入pH 7.4磷酸缓冲液(含0.2 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄和Na₂HPO₄)200 μL,静止20 min后离心(4℃,10 000 r·min⁻¹,10 min),取上清液500 μL并转移至5 mm核磁管中,加入D₂O[含0.05% 3-(三甲基硅基)丙酸钠-2,2,3,3-D₄]50 μL,震荡混匀,待测。

2.4 ¹H-NMR及数据分析 调用NOESY脉冲序列进行氢谱峰的测定,设置参数后采样,得自由感应衰减(FID)信号。仪器参数为谱宽10 000 Hz,采样点数32 K,累加数256次,测试温度25℃,预饱和2 s进行抑制水峰。将¹H-NMR图谱进行基线校正和相位调整,以3-(三甲基硅基)丙酸钠-2,2,3,3-D₄作为化学位移参考峰(δ 0.0)对¹H-NMR图谱的化学位移进行定标。在δ 0.80~9.80区域按δ 0.04化学位移间隔进行分段积分,同时将水峰部分(δ 4.6~5.2)设置为零,将每张图谱积分处理后,将积分数据按样品编号、时间编号以Excel文件储存,以便数字化处理。

2.5 统计学分析 数据文件用SIMCA-P12.0(瑞典Umetries公司)统计软件分析,采用偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)对各组进行模式识别。具有差异的生物标志物使用SPSS 17.0软件处理,采用独立样本t检验进行统计和比较,考察代谢物组间的显著性差异。

3 结果

3.1 大鼠行为学及药效学指标考察 模型组大鼠在造模过程中,大鼠出现体重减轻,体温下降,食欲降低,活动减少,便溏,脱毛,尿黄等现象。空白组大鼠毛发光泽,行动快捷,饮食、大便均正常。结合前

期药效学试验结果(与空白组相比,模型组大鼠血液的全血低切黏度、中切黏度、高切黏度和大鼠血栓素 B₂、6-酮-前列腺素 F_{1α}、血栓素 B₂ 与 6-酮-前列腺素 F_{1α} 的比值均具有显著性差异或极显著性差异),说明虚寒性出血症模型造模成功^[6]。

3.2 ¹H-NMR 代谢物谱的大鼠尿液分析^[7] 4 组大鼠尿液的¹H-NMR 图谱见图 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、耦合常数等。

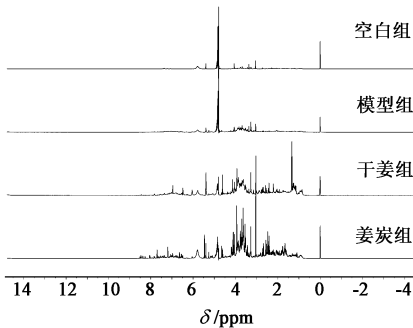
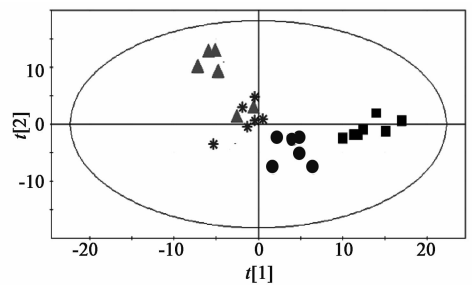


图 1 大鼠尿液的¹H-NMR 代谢物谱

Fig. 1 ¹H-NMR spectra of rat urine in four groups

3.3 虚寒性出血证大鼠的机体代谢表型 ¹H-NMR 图谱提供了尿液中内源性代谢物的基本信息,为了进一步确定各组间的代谢物差异,需要对复杂数据进行降维处理,以消除多信息共存中的重叠部分,提取出主要成分进行分析。采用 PLS-DA 对各组大鼠尿液样本¹H-NMR 代谢轮廓进行分析,得分见图 2, 3。所有样本点均分布在椭圆形(95% 置信区间内)区域,空白组和模型组的尿液样本点完全分开,说明灌胃大黄药液结合眼眶放血造模 10 d,虚寒性出血证大鼠机体生理与物质代谢已经发生了明显改变,与行为学和药效试验结果相符。为了检验 PLS-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 PLS-DA 模型的主要参数,模型区分度 R₂X (cum) = 0.896, R₂Y (cum) = 0.98, 模型预测率 Q₂ (cum) = 0.964,说明该模型稳定可信。

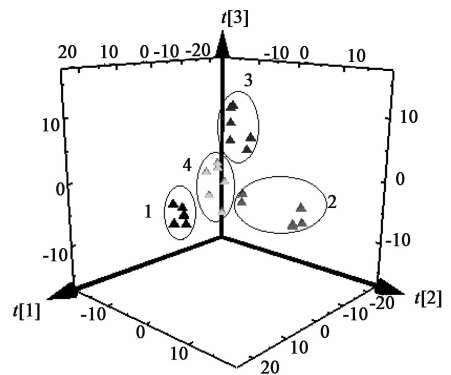
3.4 与虚寒性出血证相关的潜在生物标志物 为了确定造模前后差异的代谢产物,应用 PLS-DA 模型中变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)参数评价潜在的生物标志物。VIP 越大,变量对模型越重要。VIP > 1 的变量被视为重要。选取 VIP > 1 的生物标志物,利用 SPSS 17.0 软件对这些生物标志物的相对峰面积进行独立样本 t 检验,只有 P < 0.05 的生物标志物才被认为是潜在的生物标志物。按上述原则,最终筛选得到了 7 种



■ 空白组; ▲ 模型组; * 干姜组; ● 姜炭组

图 2 大鼠尿液的 PLS-DA 二维得分

Fig. 2 Score plots of PLS-DA for 2D of rat urine in four groups



1. 空白组; 2. 模型组; 3. 干姜组; 4. 姜炭组

图 3 大鼠尿液的 PLS-DA 三维得分

Fig. 3 Score plots of PLS-DA for 3D of rat urine in four groups

与虚寒性出血证相关的生物标志物,见表 1。

3.5 姜炭温经止血的內源性药效生物标志物确定 药物的治疗作用是将病理状态下异常变化的代谢物群(生物标志物)回调到正常状态,故选取回调明显、具有显著性差异的潜在生物标志物作为药效生物标志物(群),并以矫正率评价药物的整体疗效^[8]。矫正率 = 100% × (给药组积分值 - 模型组积分值) / (空白组积分值 - 模型组积分值),见表 1。其中姜炭组 7 个生物标志物中除了脂质体外,其他 6 个生物标志物的矫正率均 > 80%,干姜组对氮氧三甲胺、牛磺酸、马尿酸、色氨酸 4 个生物标志物矫正率 > 92%。选择矫正率较高,且与模型组比较具有显著性差异,和空白组比较无统计学意义的生物标志物为药效生物标志物。初步认为符合以上条件的乙酰乙酸、丙酮酸、氮氧三甲胺、牛磺酸、色氨酸为姜炭温经止血的药效生物标志物。

3.6 姜炭、干姜对虚寒性出血证大鼠的干预作用 由图 2, 3 可知,给药后姜炭组与模型组完全分开,且与空白组比较接近,说明姜炭对虚寒性出血证大鼠产生了有效的干预作用,而干姜组和模型组比较接近,说明干姜对虚寒性出血证大鼠干预和矫正作用

表 1 与虚寒性出血症相关的大鼠尿液生物标志物 (n=6)

Table 1 Biomarkers associated in urine of rats with deficiency-cold hemorrhagic disease (n=6)

生物标志物	化学位移	VIP	生物标志物相对峰面积 ($\bar{x} \pm s$)				矫正率/%	
			空白组	模型组	干姜组	姜炭组	干姜组	姜炭组
脂质体	1.24m	1.425 4	0.604 ± 0.027 ²⁾	0.459 ± 0.083	1.618 ± 0.371 ^{2,4)}	0.504 ± 0.063 ⁴⁾	799.31	31.03
乙酰乙酸	2.24s	1.244 9	0.751 ± 0.022 ²⁾	0.438 ± 0.061	0.506 ± 0.031 ⁴⁾	0.745 ± 0.084 ²⁾	21.73	98.08
丙酮酸	2.37s	1.096 7	0.630 ± 0.010 ²⁾	0.424 ± 0.122	0.533 ± 0.054 ^{1,4)}	0.665 ± 0.091 ²⁾	52.91	116.99
氮氧三甲胺	3.29s	1.203 9	0.735 ± 0.008 ²⁾	1.118 ± 0.145	0.711 ± 0.072 ²⁾	0.783 ± 0.362 ¹⁾	106.27	87.47
牛磺酸	3.45t	1.094 9	0.752 ± 0.009 ²⁾	1.071 ± 0.206	0.708 ± 0.102 ²⁾	0.741 ± 0.129 ²⁾	113.79	103.45
马尿酸	7.83dd	1.016 6	0.135 ± 0.023 ¹⁾	0.178 ± 0.027	0.138 ± 0.030 ¹⁾	0.143 ± 0.062 ^{1,4)}	93.02	81.40
色氨酸	7.28m	1.221 1	0.232 ± 0.026 ²⁾	0.362 ± 0.104	0.212 ± 0.044 ^{1,3)}	0.257 ± 0.055 ¹⁾	115.38	80.77

注:m 多重峰,s 单峰,t 三重峰,dd 双二重峰。与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与空白组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01。

较弱。由表 1 可知,干姜、姜炭对 7 个生物标志物中 4 个药效生物标志物具有相同的回调模式,矫正率都 >80%;而对乙酰乙酸、丙酮酸内源性生物标志物的调节作用,姜炭矫正率远高于干姜。其中姜炭组的色氨酸、干姜组的马尿酸与空白组无统计学意义,故姜炭和干姜除了具有相同的药效生物标志物为氮氧三甲胺和牛磺酸外,干姜还有马尿酸,姜炭有乙酰乙酸、丙酮酸和色氨酸,说明干姜和姜炭既有相似的作用特点,又有不同的作用机制。这与干姜专于温中散寒,姜炭专于温经止血的药效作用相符。从体内内源性成分的变化角度,揭示了干姜炒炭后药效发生变化及其体内作用机制的不同。

4 讨论

中医认为虚寒性出血证是脾气虚寒,气虚统摄无权可使血不循经而溢于脉外。本文采取常规的大黄苦寒药加放血法造模,前期药效学试验发现血常规显示各项指标低于正常组^[6]。研究表明虚寒证时,能量代谢及耗氧量降低^[9],由表 1 可知,模型组丙酮酸含量降低,说明机体糖代谢减缓了,能量供应不足^[10],出现大鼠嗜睡、厌食等症。造模后尿中牛磺酸和色氨酸的含量升高,乙酰乙酸水平下降,说明机体脂质代谢失调^[11],促使大鼠体内脂肪消耗加快,出现大鼠体重减轻。造模后马尿酸含量升高,提示肠道菌群代谢失调^[12],大鼠出现腹泻糖稀等症。虚寒性出血症大鼠灌服姜炭后,尿中各个生物标志物都得到不同程度的恢复,说明姜炭可通过调节肠道菌群、糖代谢和脂质代谢来矫正虚寒性出血症大鼠模型,起到温经止血的作用,而干姜作用不明显,表明姜炭炮制前后药效及其作用机制的不同。

本文采用代谢组学法,从机体内源性代谢产物变化角度,对虚寒性出血症大鼠造模前后、给药前后尿液进行分析,结果显示造模后大鼠尿液代谢物组发生了变化且被明显分为 2 类,证明虚寒性出血症

模型造模成功。同时给予姜炭后,造模组又恢复接近空白组,说明姜炭对虚寒性出血症具有较好的矫正效果。采用主成分分析和 t 检验找出了虚寒性出血症的潜在生物标志物和姜炭温经止血的药效生物标志物,为虚寒性出血症动物模型和姜炭温经止血疗效的评价提供了客观化评价指标和方法。

[参考文献]

- [1] 龚千峰. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2011:116-117.
- [2] 刘昌孝. 代谢组学在中药现代研究中的意义[J]. 中草药,2004,35(6):601-605.
- [3] 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.
- [4] 孟江,许舒娅,卢国勇,等. 星点设计-效应面法优化姜炭炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):8-11.
- [5] 孟江,许舒娅,陈磊,等. 干姜“炒炭存性”质量标准初探[J]. 中国中药杂志,2012,37(4):453-456.
- [6] 苏敏,梁慧超,孟江,等. 姜炭对虚寒性出血证大鼠凝血功能,血栓素 B₂ 和 6-酮-前列腺素 F_{1α} 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):190-193.
- [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):793-811.
- [8] 邵青,姚宏,程翼宇,等. 一种中药药动学-药效学联合分析方法:中国,201110046258.1[P]. 2011-09-14.
- [9] 钟凌云,廖智慧,龚千锋,等. 基于代谢组学研究姜制对黄连药性的影响[J]. 中草药,2013,44(22):3177-3181.
- [10] 邹忠杰,龚梦鹃,王淑美,等. 双黄连口服液抗炎作用的代谢组学研究[J]. 中成药,2013,35(1):15-19.
- [11] 施旭光,吴美音,王闽予,等. 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[J]. 中药新药与临床药理,2013,24(6):552-554.
- [12] Wei L, Liao P Q, Wu H F, et al. Metabolic profiling studies on the toxicological effects of realgar in rat by ¹H-NMR spectroscopy [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009,234(3):314-325.

[责任编辑 刘德文]