

· 药物代谢 ·

基于核磁共振代谢组学法 检测灌服桂枝煎剂大鼠的血清代谢物

刘镔, 韩林涛*, 薛大权, 黄芳, 李晶晶

(湖北中医药大学药学院, 基础医学院, 中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**研究灌服桂枝煎剂后,慢性心肌缺血大鼠血清的代谢物。**方法:**SD大鼠随机等分成正常组、桂枝组、模型组,正常组大鼠按 $0.04\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 每日灌服生理盐水1次,其他组大鼠按 $0.04\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射盐酸异丙肾上腺素,连续6d,造模后,桂枝组大鼠按 $0.625\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 灌服桂枝煎剂,灌胃14d,断头取血,观察大鼠心脏组织病理学样本,通过核磁共振质谱检测代谢物信息,利用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别式法(OPLS-DA)判别大鼠血清代谢物组学的特点及其生物标记物。**结果:**与模型组比较,桂枝组大鼠细胞完整,肌纤维排列整齐,无水腫情况;PCA显示桂枝组大鼠血清样本离正常组样本更近,OPLS-DA显示各组样本间都能分开,且模型准确参数 $Q^2 > 0.9$,说明模型的预测能力强。3组大鼠血清中均检测到了碳水化合物、多种氨基酸、有机酸等28种代谢物。**结论:**桂枝煎剂可降低慢性心肌损伤程度。代谢组学可作为检测中药治疗心血管疾病的一种有效手段,为中药的临床应用提供参考。

[关键词] 桂枝;煎剂;慢性心肌缺血;生物标记物;代谢组学;主成分分析

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0080-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180080

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150807.1002.022.html>

[网络出版时间] 2015-08-07 10:02

Detection of Serum Metabolites After Intragastric Administration of Guizhi Decoction in Rats by Nuclear Magnetic Resonance Metabonomics LIU E, HAN Lin-tao*, XUE Da-quan, HUANG Fang, LI Jing-jing
(Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Ministry of Education, School of Basic Medical, Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To detect serum metabolites in rats with chronic myocardial ischemia after intragastric administration of Guizhi decoction. **Method:** Rats were divided into 3 groups randomly, included the Guizhi group, the model group and the normal group. The normal group was given normal saline with dose of $0.04\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ once a day simultaneously, the other groups were intraperitoneal given isoprenaline hydrochloride with dose of $0.04\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ once a day, six days in a row, after modeling, the Guizhi group was intragastric administration of Guizhi decoction with dose of $0.625\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, then after two weeks, HE staining of the heart tissue of rats was observed. Characteristics of serum metabolites in rats were measured by nuclear magnetic resonance mass spectrometry, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). **Result:** Compared with the model group, rat cells of the Guizhi group was completed with neat muscle fiber and no edema. Rat serum samples of the Guizhi group were closely to the normal group, two samples were separated with model accurate parameter of $Q^2 > 0.9$. Twenty-eight metabolites were detected in rat serum of three groups, including carbohydrate, amino acids, organic acids and so on. **Conclusion:** Guizhi decoction can reduce the degree of chronic myocardial injury. Metabonomics is an effective technique for detecting traditional Chinese medicine in the treatment of cardiovascular disease.

[收稿日期] 20150311(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81470178);武汉市科技局应用基础研究计划项目(2013062301010814)

[第一作者] 刘镔,在读硕士,从事药物新制剂、新剂型及新技术研究,Tel:13437285340,E-mail:hbzyliue@163.com

[通讯作者] *韩林涛,博士,副研究员,从事中药及其复方的物质基础与作用机制研究,Tel:027-62029728,E-mail:9463450@qq.com

[Key words] Cinnamomi Ramulus; decoction; chronic myocardial ischemia; biomarkers; metabonomics; principal component analysis

心肌缺血是一种常见的心肌损伤,是由于心脏血液灌注的减少和氧气供应不足引起的^[1],可导致心脏功能障碍、心肌梗死、猝死等。中医根据其病变部位(心、胸)和临床症状(胸闷,心律失常)等,将其归属于“胸痹”范畴^[2],病机为“阳微阴弦”,即因心之阳气不足,失于温煦,故致水湿、痰饮内生,或瘀血阻络,致阳气不通,心失所养而出现短气憋闷、胸痛之症。胸痹的基本治法是通阳,即宣通阳气。针对水饮、痰浊、瘀血等不同的阴浊邪气,通阳分为利水通阳、豁痰通阳、活血通阳、辛温通阳等不同治法^[3-14]。桂枝是应用最广泛的中药之一,性辛、温,在治疗心血管疾病中主要起温助心阳、通阳利水的作用。桂枝能提高人体冠动脉血流量,改善心肌循环,增加心肌血流量,已被广泛用于治疗心肌缺血、心率失常、心悸等心血管疾病^[15-17]。本文主要结合动态代谢组学和药理学方法研究桂枝对大鼠心肌缺血的保护作用,通过探索其代谢物及后期代谢途径,以利于更准确了解桂枝保护心肌缺血的代谢机制,为该药材的临床应用提供参考。

1 材料

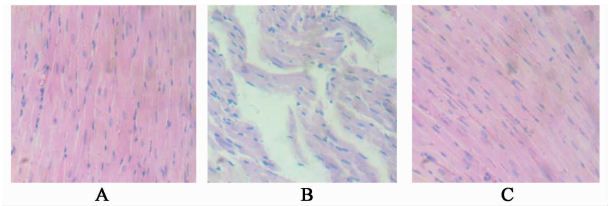
AVIII 600 MHz 型液体核磁共振谱仪(德国 Bruker Biospin),DW-86L626 型超低温冰箱(青岛海尔科技有限公司),ALI 04 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FD-1C-50 型冷风干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),SF-TGL-16GS 型离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司),N-800F 型光学显微镜(宁波永新光学股份有限公司)。盐酸异丙肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司,批号 130207,国药准字 H310213344),0.9% 氯化钠注射液(武汉市滨湖双鹤药业有限公司,批号 1301200809),D₂O(99.9% 氘代,美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司),桂枝煎液(自制,桂枝 9 g,煎煮,滤过,浓缩,保存在 -80 °C 低温冰箱中,临时时取出)。桂枝药材购自武汉滨湖双鹤制药有限公司,经湖北中医药大学周贻祥教授鉴定为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥嫩叶。

SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重 180 ~ 200 g,由华中科技大学同济医学院提供,合格证号 SCXK(鄂)2010-0009。

2 方法与结果

2.1 样品的前处理 15 只大鼠随机等分成正常

组、桂枝组、模型组,正常组大鼠按 0.04 mg·kg⁻¹ 每日灌服生理盐水 1 次,其他组大鼠按 0.04 mg·kg⁻¹ 腹腔注射盐酸异丙肾上腺素,制造慢性心肌缺血模型,连续 6 d,造模后,桂枝组大鼠按 0.625 g·mL⁻¹ 灌服桂枝煎剂 14 d,眼球取血,血液样本立即收集到埃普多夫管中,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 8 min,取上清液于 -20 °C 冰箱保存。取大鼠心脏,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,观测其组织病理学心脏样本,见图 1。结果显示正常组心肌缺血病理组织细胞完整,纵切面横纹清晰,核处于细胞中间,细胞无水肿情况。模型组的心肌细胞水肿,纵切面横纹间距增大,排列扭曲,有细胞坏死,提示造模成功。与模型组比较,桂枝组细胞完整,肌纤维排列整齐密集,细胞几乎无水肿情况。说明桂枝对慢性心肌缺血大鼠的治疗起作用了。



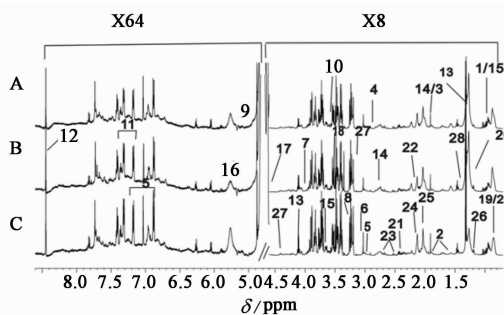
A. 正常组; B. 模型组; C. 桂枝组

图 1 桂枝煎剂对大鼠心肌组织的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Guizhi decoction on rat myocardium(HE, ×200)

2.2 核磁共振(NMR) 温度 25 °C, ¹H 和 ¹³C 核的共振频率分别为 599.77, 150.82 MHz, 血样使用序列 [RD-90°-(τ-180°-τ)n-ACQ] 采集小分子信息谱宽(SW)20 ppm, 等待时间(RD)2 s, 90 度脉宽 11.5 μs, 采样点数 32 K, 火焰离子化检测仪(flame ionization detector, FID)累加数 64 次。回波演化时间(d20)350 μs, 回波循环(L4)100, 总回波时间(2nτ)70 ms。由于 ¹H-NMR 图谱采集的信号部分重叠, 便于归属物质的准确性, 故对部分样品进行了二维图谱的采集。二维谱使用了同核化学位移相关谱(correlation spectroscopy, COSY), 异核单量子关系图谱(heteronuclear singular quantum correlation, HSQC), J 分解谱(J-resolved spectroscopy, JRES) 和 ¹H 的异核多糖相关谱(heteronuclear multiple bond correlation, HMBC) 序列记录这 4 种谱图。JRES 的谱宽 7 225.4 Hz, 采样点数分别为 2 048 和 256, 累加数 16 次。COSY 和全相关光谱学(total correlation

spectroscopy, TOCSY) 试验中, 采样点数分别为 512 (F1) 和 2 048 (F2), 谱宽均为 7 225. 4 Hz, 累加数 16 次。TOCSY 试验自旋锁定时间 80 ms。¹H-¹³C 近程相关谱 HSQC 试验谱宽 7 225 Hz (F2, ¹H) × 37 878. 8 Hz (F1, ¹³C), 采样点数 2 048 (F2) × 512 (F1), 累加数 16 次, 异核偶合自旋耦合常数 ¹J_{C-H} 140 Hz。¹H-¹³C 远程相关谱 HMBC 的参数基本和 HSQC 一样, 见图 2。



区间 δ 0.70 ~ 4.60 和 δ 5.20 ~ 8.60 的信号纵向拉伸 8,64 倍。

A. 正常组; B. 模型组; C. 桂枝组

图 2 大鼠灌胃给药后血清 NMR

Fig. 2 Serum NMR after intragastric administration of Guizhi decoction

由图 2 可知, 26 种代谢物被检测出, 这些代谢物由氨基酸类、葡萄糖、脂质、有机酸和 O-乙酰蛋白, N-乙酰蛋白等组成。另外, 可明显看出大鼠血清中一些内源性代谢物水平的改变。在一维图谱中可能还有一些生物标志物肉眼无法辨别, 拟将进行多变量数据分析, 提取更多大鼠血清代谢物信息。

2.3 数据分析 采用 TopSpin 3.0 软件分析图谱数据, 利用乳酸定标, 手动校准基线和调相位, 运用 Amix 3.8.2 软件对图谱进行积分, 去除水峰, 用 SIMCA-P+ 对已经归一化的数据进行模式识别, 观察样本变化趋势, 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 见图 3, 得分图中每个点代表一个样本的 NMR 图谱, 利用正交偏最小二乘判别式法 (OPLS-DA) 对数据进一步分析, 见图 4 ~ 6。

由图 3 可知, 模型组、桂枝组、正常组样本都在置信区间内, 未出现异常点。3 组大鼠血清样本分开趋势明显, 每组血清样本间聚集明显。慢性心肌缺血大鼠通过灌服桂枝煎剂, 病情缓和, 桂枝组血清样本趋向于正常组, 说明桂枝煎剂对大鼠慢性心肌缺血有明显作用。另说明以核磁共振为代表的代谢组学方法是可以运用于中药疗效的检测。

OPLS-DA 分析可提高分类判别能力, 筛选得到

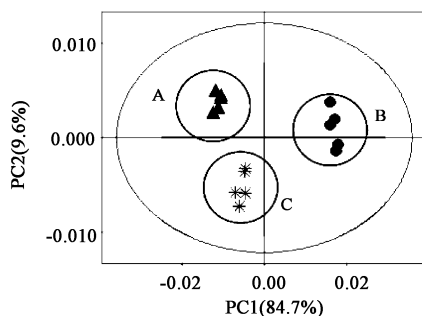


图 3 正常组 (A), 模型组 (B) 和桂枝组 (C) 大鼠血清代谢物 ¹H-NMR 的 PCA 得分

Fig. 3 PCA scores of ¹H-NMR of rat serum metabolites collected from normal group (A), model group (B) and Guizhi group (C)

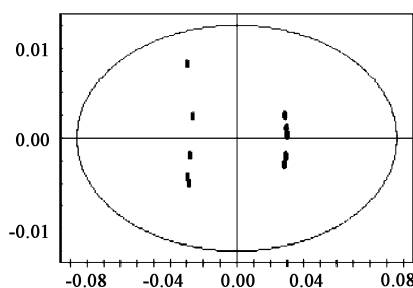


图 4 正常组 (左侧) 和模型组 (右侧) 大鼠血清代谢物比较的 OPLS-DA 得分

Fig. 4 OPLS-DA scores of rat serum metabolites collected from normal group (left) and model group (right)

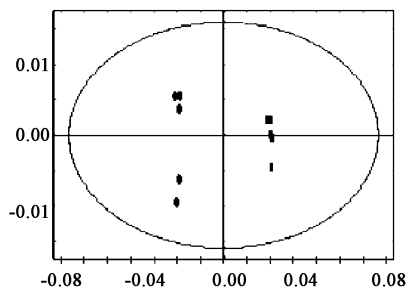


图 5 模型组 (左侧) 和桂枝组 (右侧) 大鼠血清代谢物比较的 OPLS-DA 得分

Fig. 5 OPLS-DA scores of rat serum metabolites collected from model group (left) and Guizhi group (right)

由组间差异形成的潜在生物标记物, 同时减少无关因素对相似性聚类分析的干扰。 R^2X 和 Q^2 是评价模型的 2 个参数, R^2X 是组分 X 方差的代表, Q^2 可用于 OPLS-DA 两两样本比较的正确率, 用来表示模型的预测能力, 两者取值范围均为 0 ~ 1, 两者越接近 1 代表模型的可靠正确性越大, 一般来说 $Q^2 > 0.9$ 代表模型的预测能力很强, $Q^2 > 0.5$ 代表模型的预测能力一般, $Q^2 < 0.5$ 代表模型预测能力不好, 本文中样本的所有 Q^2 均 > 0.9 , 说明模型的质

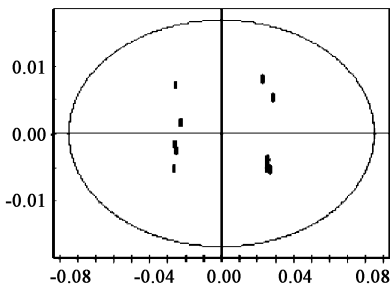


图 6 正常组(左侧)和桂枝组(右侧)大鼠血清代谢物比较的 OPLS-DA 得分

Fig. 6 OPLS-DA scores of rat serum metabolites collected from normal group (left) and the Guizhi group (right)

量较高。由图 4 可知,模型组和正常组能很好地分离开来,且该模型质量良好 ($R^2X = 0.923, Q^2 =$

0.988)。同理,桂枝组和模型组 ($R^2X = 0.835, Q^2 = 0.997$),桂枝组和正常组 ($R^2X = 0.975, Q^2 = 0.991$)也能很好分离。

2.4 生物标志物确定 生物标志物可表现心肌缺血大鼠血清代谢指纹图谱的差异。根据核磁共振一维图谱标志物的化学位移和二维图谱的特征,显著性差异 ($P < 0.05$)的化合物作为潜在生物标志物。通过 HMBC 代谢物数据库检索和质谱同位素的对照,对潜在的生物标志物进行鉴定,见表 1。结果表明桂枝煎剂诱导了大鼠某些生理变化,导致了代谢混乱与糖酵解促进等,提示桂枝煎剂可降低慢性心肌损伤程度,通过能量代谢和调节氨基酸代谢的变化来维持代谢平衡。

表 1 各组大鼠血清代谢物的 NMR 数据

Table 1 NMR assignment of serum metabolites in rats from three groups

No.	生物标志物	化学位移 ¹ H	化学位移 ¹³ C	试验名称
1	结氨酸	0.98(d), 1.04(d), 2.25(d), 3.61(d)	63.4, 175.2	JRES, COSY, TCOSY, HSQC, HMBC
2	精氨酸	1.77(m), 1.88(m), 3.27(m)	-	JRES, COSY, HSQC, HMBC
3	谷氨酸	2.45(m), 2.10(m)	-	CPMG
4	二甲基谷氨酸	2.91(s), 3.00(dd), 3.69(s)	42.0, 63.5	JRES, HSQC
5	络氨酸	3.15(dd), 3.96(dd), 6.89(d), 7.18(d)	-	JRES, CPMG
6	肌氨酸	3.03(S), 3.93(S)	40.0, 56.9	JRES, HSQC
7	胆碱	3.19(s), 3.55(dd), 4.06(m)	56.8, 75.5, 58.5	JRES, COSY, HMBC
8	三甲基氧化氮	3.35(s), 3.25(s)	52.0, 56.2	HSQC
9	α -葡萄糖	3.45(m), 3.53(dd), 3.71(t), 3.85(m), 5.24(d)	72.5, 74.5, 75.7, 78.7, 94.8	JRES, COSY, HMBC, HSQC
10	甘氨酸	3.55(s)	44.6, 175.2	HSQC, HMBC, JRES
11	苯丙氨酸	3.97(dd), 7.32(m), 7.38(m), 7.41(m)	-	JRES, CPMG
12	甲酸	8.46(s)	-	CPMG
13	乳酸	1.32(d), 4.10(q)	22.9, 71.4, 185.2	HSQC, HMBC, JRES
14	油脂	0.87(m), 1.27(m), 1.57(m), 2.00(m), 2.24(m), 2.79(m)	25.4, 25.6, 27.5, 29.7, 28.3, 36.5	HSQC, HMBC, JRES, CPMG
15	异亮氨酸	0.94(t), 1.00(d), 3.65(m)	-	CPMG
16	不饱和脂肪酸	2.75(m), 5.30(m)	38.4, 130.8	JRES
17	β -葡萄糖	3.24(dd), 3.40(dd), 3.50(t), 4.64(d), 3.55(m), 3.73(m)	77.1, 72.5, 78.6, 98.8, 65.4, 74.2	JRES, COSY, TOCSY, HSQC
18	甘油	3.84(m)	75.7	CPMG
19	高密度脂蛋白	0.87(m)	25.4	HSQC
20	低密度脂蛋白	0.88(m)	-	HSQC
21	丙酮酸	2.37(s)	-	CPMG
22	乙酰乙胺	2.22(s)	36.5	JRES, HSQC
23	柠檬酸	2.52(d), 2.69(d)	-	JRES
24	O-乙酰蛋白	2.13(s)	23.1	JRES, HSQC
25	N-乙酰蛋白	2.04(s)	25.0	JRES, HSQC
26	D-3-羟基丁酸	4.15(dt), 2.40(dd)	68.3, 49.1	HMBC, HSQC
27	苏氨酸	1.31(d), 4.41(m)	23.0, 68.5	CPMG, HSQC
28	丙氨酸	1.47(d), 3.77(dd)	19.1, 57.5	JRES, COSY, HSQC

注:s表示单峰,d表示双峰,t表示三重峰,dd表示双二峰,q表示四重峰,m表示多重峰。

3 讨论

本文检测到血清中28种代谢物,从这些代谢物中可简单判断桂枝煎剂治疗慢性心肌缺血大鼠经历了氨基酸代谢、能量代谢、胆碱代谢等过程,但这些代谢通路有待进一步研究确认。正常人的心脏,绝大部分的能量来自于线粒体的氧化,能量又来源于脂肪酸氧化过程^[18],而脂肪酸是由脂肪组织在三酰甘油脂肪酶的作用下水解得到的^[19]。剩下的能量由糖酵解和三羧酸循环中的三磷酸鸟苷(GTP)生成过程^[20]。心肌缺血损坏了粒线体的正常电子传递链,使得心肌细胞中脂肪酸氧化受到抑制^[21],这些代谢过程也验证了在大鼠慢性心肌缺血模型组存在不饱和脂肪酸、丙酮酸等物质。另外,文献报道了心血管类疾病与氨基酸代谢的异常有关^[22-23]。肌氨酸含量是用于评价慢性心肌缺血的指标之一,肌氨酸作为蛋白质的水解产物之一,可能慢性心肌缺血大鼠的蛋白质代谢过程受到了干扰,其代谢通路有待进一步研究。

在心血管疾病的研究中,相比较传统的研究手段,代谢组学使用无创方法检测体内代谢物,检测仪器更灵敏,进样效率更高,提高了检测的准确率,减少不必要的误差。目前,国内对于中药治疗慢性心肌缺血的研究甚少,本文采用代谢组学方法,全方位动态研究大鼠体内代谢过程,为临床治疗心血管疾病提供参考。在后续试验中,可结合GC-MS代谢组学方法,与核磁共振方法进行比较,观察大鼠血清代谢物的差异,优化检测方法,为临床提供全面的指导。

[参考文献]

[1] Cheng T O. Cardiovascular health, risks and diseases in contemporary China [J]. *Int J Cardio*, 2011, 152 (3): 285-294.

[2] 郝丽梅,毛静远,毕颖斐,等. 冠心病中医常用治法古今文献分析[J]. *中医杂志*, 2013, 54(22): 1964-1968.

[3] 岳美中. 岳美中医文集. 第2卷[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005: 138-139.

[4] 张保伟. 刘渡舟教授妙用苓桂术甘汤治疗疑难杂病拾萃[J]. *中医学药*, 2003, 21(1): 22-23.

[5] 马子霖,唐靖一. 通阳法在心系病证治疗中的意义[J]. *黑龙江中医药*, 2010, 39(1): 2, 11.

[6] 邹石,喻玲. 陈瑞春通阳益气治胸痹经验[J]. *江西中医药*, 2007, 38(3): 6-7.

[7] 朱晓娜,郭景瑞,赵娟,等. 祛痰化瘀汤对冠心病心绞痛患者血脂及血液流变学的影响[J]. *陕西中医学院学报*, 2009, 32(1): 18-19.

[8] 李向珏,温玉霞,袁金铃. 瓜蒌薤白类方治疗胸痹心痛的实验研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17(26): 4065-4066, 4155.

[9] 容兆宇. 血府逐瘀汤对37例冠心病心绞痛患者细胞因子及氧自由基的影响[J]. *中医研究*, 2006, 19(7): 26-28.

[10] 王进益,张介眉,雷健,等. 搏心通胶囊对冠心病心绞痛患者脂质过氧化损伤的保护作用[J]. *湖北中医学院学报*, 2007, 9(1): 30-32.

[11] 张介眉,时昭红,郝建军,等. 搏心通对饲高脂家兔抗氧化损伤、改善内皮功能作用的实验研究[J]. *中医杂志*, 2006, 47(2): 142-143.

[12] 稽克刚,唐可清,王海涛,等. 补气通阳颗粒改善血管内皮功能的临床研究[J]. *中外医学研究*, 2009, 7(5): 84-85.

[13] 陈明,刘燕华,张保伟. 刘渡舟伤寒临证指要. 第3卷[M]. 北京: 学苑出版社, 2000: 90-99.

[14] 张洁,刘建华,武晨,等. 茯苓皮的挥发性成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(18): 66-69.

[15] 张连生. 曲淑琴. 鉴古酌今论桂枝[J]. *吉林中医药*, 2008, 28(3): 213-214.

[16] 侯家玉. 中药药理学. 第8卷[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 30-31.

[17] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1976: 358.

[18] Luo R Y, Liao S, Tao G Y, et al. Dynamic analysis of optimality in myocardial energy metabolism under normal and ischemic conditions[J]. *Mol Syst Biol*, 2006, 2(1): 1-6.

[19] 贾伟. 医学代谢组学. 第3卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 48-95.

[20] Lopaschuk G D, Ussher J R, Folmes C D, et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(1): 207-258.

[21] 张洪源,万海清. 生物化学. 第2卷[M]. 3版. 北京: 化学工业出版社, 2006: 28.

[22] Teul J, Rupérez F J, Garcia A, et al. Improving metabolite knowledge in stable atherosclerosis patients by association and correlation of GC-MS and 1H NMR fingerprints [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8 (12): 5580-5589.

[23] Gordon A, Hultman E, Kaijser L, et al. Creatine supplementation in chronic heart failure increases skeletal muscle creatine phosphate and muscle performance [J]. *Cardiovascular Res*, 1995, 30 (3): 413-418.

[责任编辑 刘德文]