

· 药物代谢 ·

脾胃湿热证大鼠模型的尿液代谢组学分析

于静波, 韩越*, 谢新, 周梓洋, 陈静梅, 王伟轶, 邱靖淞, 王宇红*

(湖南中医药大学药学院, 科技创新中心/中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的:以脾胃湿热证模型大鼠为研究对象,基于尿液代谢组学寻找潜在生物标志物及相关代谢通路,从内源性小分子代谢物层面探究脾胃湿热证候本质。方法:将16只SD大鼠随机分为正常组及模型组,正常组给予普通饲料喂养,模型组在此基础上每日增加200 g·L⁻¹蜂蜜水自由饮用,猪油与白酒隔日交替灌服,共喂养17 d,第10天起每日相同时间将大鼠置于温度30~34 °C、相对湿度95%的环境中2 h,共7 d,建立脾胃湿热证大鼠模型,并通过观察一般体征,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血浆胃动素(MTL)、胃泌素(GT)含量及胃肠组织病理学检查对模型进行评价;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,检测条件为ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 1%~18%B; 3~8 min, 18%~40%B; 8~10 min, 40%~100%B),流速0.4 mL·min⁻¹,电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,扫描范围 m/z 50~1 000。利用单变量与多变量统计分析筛选组间差异离子,根据精确相对分子质量计算其元素组成,将碎片离子信息与人类代谢组数据库(HMDB)等数据库匹配以鉴定生物标志物。通过京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库获得代谢物的生物信息,采用MetaboAnalyst 5.0软件分析其相关代谢通路。结果:与正常组比较,模型组肛温显著上升($P<0.01$),血浆MTL和GT水平均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),胃及结肠组织出现充血、出血及炎性浸润等病理性变化;尿液代谢组学研究发现L-组氨酸、柠檬酸、异柠檬酸等25个差异代谢物可作为脾胃湿热证的生物标志物,其中13个代谢物为内源性物质的Ⅱ相代谢产物(葡萄糖醛酸结合物、硫酸结合物和乙酰基结合物),涉及组氨酸代谢、三羧酸循环、乙醛酸和二羧酸代谢等代谢通路。结论:脾胃湿热证主要引起组氨酸代谢、三羧酸循环、乙醛酸和二羧酸代谢3条代谢通路的紊乱,以及内源性代谢物的活性/失活状态失衡,可能涉及机体免疫应答、物质及能量代谢、炎症反应和肠道菌群等方面,可为脾胃湿热证模型的建立和应用提供依据。

[关键词] 脾胃湿热证; 动物模型; 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; 尿液; 生物标志物; 代谢通路

[中图分类号] R22;R28;R969.1;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)10-0166-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230566

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230109.1259.004.html>

[网络出版日期] 2023-01-10 11:04:34

Metabolomic Analysis of Urine in Rat Model with Spleen-stomach Damp-heat Syndrome

YU Jingbo, HAN Yue*, XIE Xin, ZHOU Ziyang, CHEN Jingmei, WANG Weiyi,

QIU Jingsong, WANG Yuhong*

(School of Pharmacy, Science&Technology Innovation Center/National Key Laboratory Cultivation Base of Chinese Medicinal Powder&Innovative Medicinal Jointly Established by Province and Ministry, Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention&Treatment of Depressive Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[收稿日期] 2022-11-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82204613);湖南省自然科学基金项目(2020JJ5415, 2021JJ40410);湖南省教育厅项目(20C1413);湖南中医药大学一流学科开放基金项目(2020ZYX06, 2021ZYX25);中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目(科函[2020]8号)

[第一作者] 于静波, 博士, 讲师, 从事中医方证代谢组学研究, Tel: 0731-88458137, E-mail: Xiaoyu1989ly@126.com

[通信作者] * 韩越, 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础及代谢组学研究, Tel: 0731-88458240, E-mail: hanyuewudi417@163.com;

* 王宇红, 博士, 研究员, 从事中药神经精神药理研究, Tel: 0731-88459550, E-mail: wyh107@126.com

[Abstract] **Objective:** Taking the rat model of spleen-stomach damp-heat syndrome (SSDHS) as the research object, this study aimed to investigate the potential biomarkers of SSDHS and the related metabolic pathways based on urine metabolomics, and tried to reveal the essence of SSDHS at the level of endogenous small molecular metabolites. **Method:** Sixteen SD rats were randomly divided into normal and model groups. The normal group was fed normal chow and the model group was fed with 200 g·L⁻¹ honey water daily, and lard and Chinese Baijiu alternately on alternate days for 17 days. The SSDHS model rats were exposed to external dampness-heat environment with temperature at 30-34 °C, relative humidity of 95% for 2 h at the same time every day from the 10th day for 7 d. Then, the model was evaluated by observing the general conditions of the rats, measuring the contents of motilin (MTL) and gastrin (GT) in plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and examining the histopathology of gastrointestinal tissues. In addition, the urine metabolomics analysis was performed by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), and the detection conditions was as follows: ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution (A)-0.1% formic acid acetonitrile solution (B) for gradient elution (0-3 min, 1%-18%B; 3-8 min, 18%-40%B; 8-10 min, 40%-100%B), the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹, electrospray ionization (ESI) in positive and negative ion modes, scanning range of *m/z* 50-1 000. The univariate and multivariate statistical analysis were constructed for screening inter-group differential ions, the element composition was calculated according to the precise relative molecular weight, and ion information was matched with databases such as Human Metabolome Database (HMDB) to identify biomarkers. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database was used to obtain the biological information of metabolites, and their associated metabolic pathways were analyzed by MetaboAnalyst 5.0. **Result:** Compared with the normal group, the rectal temperature of the model group increased significantly ($P<0.01$), the levels of plasma MTL and GT decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$), and pathological changes such as bleeding, congestion and inflammatory infiltration in the gastric and colonic tissues. A total of 25 differential metabolites such as *L*-histidine, citric acid and isocitric acid were found to be the potential biomarker of SSDHS by urine metabolomics, 13 of which were phase II metabolites of endogenous substances (glucuronic acid conjugates, sulfuric acid conjugates and acetyl conjugates), involving the metabolic pathways of histidine metabolism, tricarboxylic acid cycle, glyoxylate and dicarboxylate metabolism. **Conclusion:** SSDHS primarily causes disorders of histidine metabolism, tricarboxylic acid cycle, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, as well as the imbalance of the activation/inactivation of endogenous metabolites, which may involve the immune response, material and energy metabolism, inflammatory response and intestinal flora, and may provide a basis for the establishment and application of SSDHS model.

[Keywords] spleen-stomach damp-heat syndrome; animal model; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); metabolomics; urine; biomarkers; metabolic pathways

脾胃湿热证主要指湿热内蕴,中焦气机升降失调,脾胃湿热相互郁蒸。中医认为其发病之因与饮食不节、情志失调、感受外来湿热之邪及体质因素密切相关^[1]。由于现代人心理压力偏大、饮食结构发生较大改变及全球气温逐步升高,导致脾胃湿热证成为临床常见实证,该证临床症状复杂,病程持久,病势缠绵难愈^[2]。证是对疾病过程中一定阶段的病因、病位、病性、病势及机体抗病能力强弱等本质的概括^[3],而证候本质仍是中医药研究领域的关键科学问题^[4-5]。因此,

建立能够真正反映“脾胃湿热证”中医证候特点的动物模型对于阐明证候本质、评价方剂疗效、揭示中医药治病机制等方面具有重要价值。

目前,脾胃湿热证的造模方法可分为单因素造模法、复合因素造模法及与西医疾病相联系的病症结合造模法^[6]。其中,中医证候学造模方法以“饮食+环境”因素为主,但对于诱导发病的方案并未统一^[7]。此外,现有的脾胃湿热证模型评价方法较为单一,缺乏整体客观量化指标,其证候表型下的生物学基础仍未清晰。

代谢组学研究以机体内源性小分子代谢物为研究对象,从整体上探究其类型及数量变化的动态规律,这与中医理论的整体观相一致,现已被广泛用于中医药研究中疾病生物标志物的发现、药效和毒性评价及作用机制等研究^[8-10]。因此,本研究拟采用“内因湿热+外因湿热”的复合因素建立脾胃湿热证大鼠模型^[11],基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)比较正常大鼠和脾胃湿热证大鼠尿液中小分子代谢物的差异,寻找脾胃湿热证候生物标志物,并追溯关键代谢通路,阐释脾胃湿热证发病的生物学机制,为脾胃湿热证模型建立和应用,以及证候本质研究提供依据。

1 材料

ACQUITY™ UPLC I-Class型超高效液相色谱仪、Xevo G2-XS Q-TOF型质谱仪(美国Waters公司),5424R型高速离心机(德国Eppendorf公司),Mini-Q Intergral型纯水系统(美国Millipore公司),Axio Scope A1型荧光正置显微镜(德国Carl Zeiss显微镜有限公司),HistoCore PEARL型全封闭组织脱水机、HistoCore Arcadia H型全自动组织包埋机、HistoCore Arcadia C型冷台、RM-2235型石蜡切片机、HI-1210型摊片机(德国Leica公司),101-1AB型鼓风干燥箱(北京中兴伟业世纪仪器有限公司),PRX-280C型人工气候箱(江苏天翎仪器有限公司),Varioskan Flash型多功能酶标仪(美国Thermo公司)。

56度红星二锅头(北京红星股份有限公司,批号68373749474),中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,批号20200624),4%多聚甲醛(上海Biosharp生物科技公司,批号70100900),苏木素、伊红染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为19082002、19071801),大鼠胃动素(MTL)、胃泌素(GT)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为A2NWP9YRCK、VW9FTJD3KT),甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

雄性SPF级SD大鼠16只,7周龄,体质量180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004。动物饲养于温度22~25℃、相对湿度50%~60%、12 h光照/12 h黑暗交替环境。本文涉及的动物实验经湖南中医药大学实验动物中心伦理委员会批准,伦理编号LL2020122301。

2 方法与结果

2.1 动物分组及模型的建立 依据文献^[11-12]方法并加以改良建立脾胃湿热证大鼠模型,将16只SD大鼠

适应性饲养1周,随机分为正常组和模型组,每组8只。正常组普通饲料喂养17 d,模型组每日加用200 g·L⁻¹蜂蜜水自由饮用,同时隔日交替灌服剂量为10 g·kg⁻¹的猪油和10 mL·kg⁻¹的白酒,共17 d,在喂养10 d后,每日相同时间将模型组大鼠置于温度(32±2)℃、相对湿度95%的人工气候箱2 h,共7 d。根据脾胃湿热证中医诊疗专家共识意见(2017)^[13],脾胃湿热证患者普遍存在MTL、GT水平紊乱,胃黏膜局部炎性反应,胃肠动力障碍等病理变化,故选择血浆MTL、GT含量及胃肠组织病理学检查作为脾胃湿热证大鼠模型评价指标。

2.2 ELISA检测大鼠血浆中MTL、GT的含量 造模结束后,大鼠禁食12 h,麻醉,腹主动脉取血置于肝素钠抗凝管中,于4℃、3 500 r·min⁻¹离心10 min(离心半径8 cm,下同),取上层血浆,-80℃保存。测定时,血浆样品于4℃、3 500 r·min⁻¹离心15 min,取上清液备用。按照ELISA试剂盒说明书操作,在450 nm处测定吸光度A,计算各组大鼠血浆样品中MTL、GT含量。使用统计软件SPSS 19.0对各组大鼠血浆MTL、GT含量进行独立样本t检验统计分析,见表1。结果发现与正常组比较,模型组MTL和GT水平均明显下降(P<0.05, P<0.01)。

表1 各组大鼠血浆MTL、GT水平的比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of plasma MTL and GT levels in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

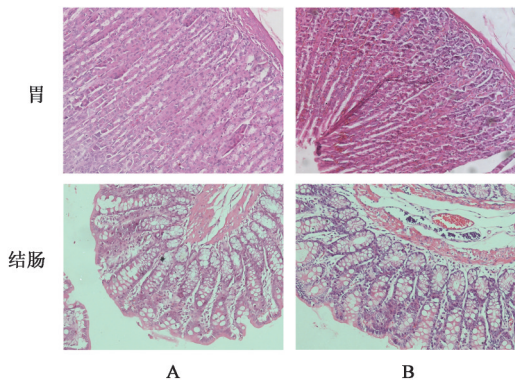
组别	MTL	GT
正常组	579.74±95.93	185.46±45.52
模型组	434.61±86.71 ¹⁾	111.99±7.05 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01

2.3 大鼠胃、结肠组织病理学观察 大鼠取血后立即解剖获取胃、结肠组织,置于4%多聚甲醛中固定,经乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片厚度约5 μm,于37℃干燥箱内过夜,次日进行苏木素-伊红(HE)染色,封片后于显微镜下观察组织形态学变化。病理观察显示,正常组大鼠胃黏膜组织结构完整,无特异性改变;模型组大鼠胃黏膜组织可见组织充血、出血。正常组大鼠结肠绒毛排列紧密,柱状上皮细胞排列整齐,无病理变化;模型组大鼠结肠黏膜组织中可见血管扩张、充血及出血,间质区可见炎性细胞浸润,提示造模成功。见图1。

2.4 尿液代谢组学研究

2.4.1 尿液样品收集及制备 造模结束后接取大鼠12 h夜尿,4℃、13 000 r·min⁻¹离心15 min,-80℃保存,分析前在室温条件下解冻。取原始浓度尿液样本,蒸馏水稀释至4倍后涡旋30 s混匀,于4℃、



注:A.正常组;B.模型组

图1 各组大鼠胃、结肠组织的病理形态观察(HE,×200)

Fig. 1 Pathomorphological observation of stomach and colon tissues of rats in each group (HE,×200)

13 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液过0.22 μm微孔滤膜,供UPLC-Q-TOF-MS分析。

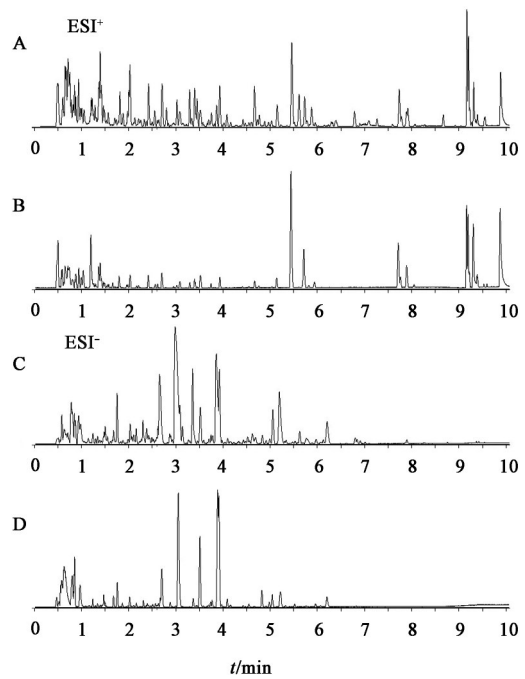
2.4.2 色谱条件 ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 1%~18%B; 3~8 min, 18%~40%B; 8~10 min, 40%~100%B),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温40℃,样品仓温度10℃,进样量3 μL,色谱仪流出液不经分流直接注入质谱仪进行扫描。

2.4.3 质谱条件 正、负离子模式下采用MassLynx 4.1工作站,centroid模式进行数据采集,电喷雾离子源(ESI),离子源温度100℃,毛细管电压3.0 kV(ESI⁺)、2.5 kV(ESI⁻),样品锥孔电压40 V,提取锥孔电压3.5 V(ESI⁺)、4.0 V(ESI⁻),脱溶剂气温度400℃,脱溶剂气流量800 L·h⁻¹,利用甲酸钠溶液进行仪器校正,200 ng·L⁻¹亮氨酸-脑啡肽(*m/z* 556.277 1 [M+H]⁺, *m/z* 554.261 5 [M-H]⁻)溶液进行在线质量校正,扫描范围*m/z* 50~1 000。

2.4.4 脾胃湿热证模型大鼠尿液代谢轮廓分析

利用建立的尿液样品处理方法及分析方法对正常组和模型组大鼠尿液样品进行全扫描数据采集,获得每组大鼠的代谢轮廓信息,见图2。将2组MS数据导入Progenesis QI 2.0软件中进行峰匹配、峰提取、去卷积及归一化等数据预处理,再利用EZinfo 2.0软件进行无监督的主成分分析(PCA),得到反映组间代谢差异的得分图,见图3。结果显示,模型组和正常组尿液内源性代谢物在正、负离子模式下组内聚类明显,组间区分突出,表明脾胃湿热证候模型建立后大鼠整体代谢轮廓发生明显改变。

2.4.5 脾胃湿热证模型大鼠尿液潜在生物标志物的鉴定 利用EZinfo 2.0软件进行监督型的



注:A,C.正常组;B,D.模型组

图2 各组大鼠尿液样品的基峰离子色谱

Fig. 2 Base peak ion chromatography of urine samples of rats from each group

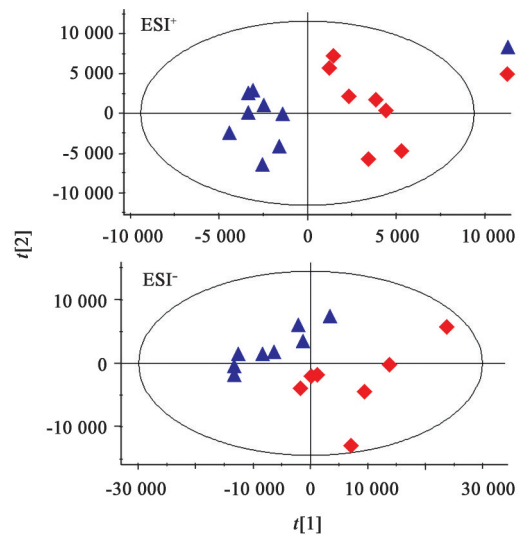


图3 各组大鼠尿液样品的PCA得分

Fig. 3 PCA scores of urine samples of rats from each group

正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),根据模型的 R^2Y (表示模型对Y矩阵的解释能力)与 Q^2 (表示模型的预测能力)进行模型质量评价,并通过置换检验评价模型是否过拟合。结果显示,正离子模式下 $R^2Y=0.989$, $Q^2=0.777$,负离子模式下 $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.935$,说明该模型稳定可靠。进一步对其进行200次置换检验,正离子模式下 $Q^2=-0.538$,负离子模式下 $Q^2=-0.548$,说明该模型不存在过拟合。选择变量重要性投影(VIP)值>1,同时曼-惠特尼秩和检验中

$P < 0.05$ 的离子作为潜在生物标志物候选离子, 见图4。根据候选离子的精确相对分子质量计算其元素组成, 二级碎片离子信息与人类代谢组数据库 (HMDB)、mzCloud 及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 等数据库进行匹配鉴定潜在生物标志物。共鉴定 25 个脾胃湿热证模型大鼠尿液潜在生物标志物, 其中正离子模式下共鉴定 6 个, 负离子模式下

共鉴定 21 个(代谢物异柠檬酸和 6-羟基-5-甲基吡啶葡萄糖醛酸苷在正、负离子模式下均检出), 包括酪胺葡萄糖醛酸苷、6-羟基-5-甲基吡啶葡萄糖醛酸苷、*N*-乙酰牛磺酸、香草酸 4-硫酸盐等 13 个内源性物质的 II 相代谢产物(葡萄糖醛酸结合物、硫酸结合物和乙酰基结合物), 见表 2。

利用 MetaboAnalyst 5.0 软件对上述 25 个代谢物

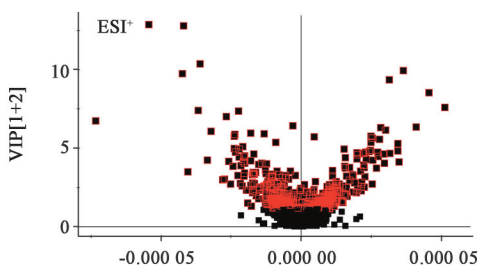


图4 正常组与脾胃湿热证模型组大鼠尿液样品的VIP分析

Fig. 4 VIP analysis of urine samples of rats from each group

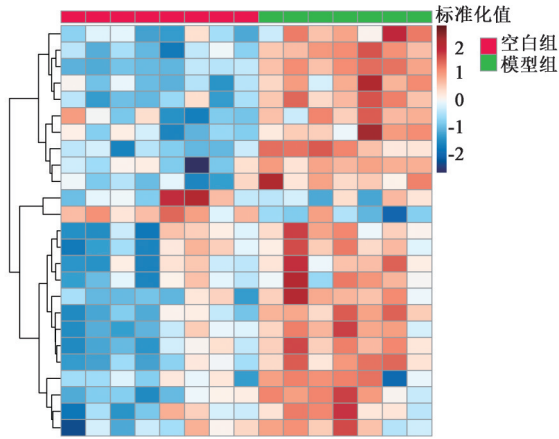
表2 脾胃湿热证模型大鼠尿液潜在生物标志物信息

Table 2 Information of potential biomarkers in urine of spleen-stomach damp-heat syndrome rat model

No.	t_R /min	离子模式	m/z	代谢物	分子式	化合物类别	VIP值	变化趋势
1	0.68	ESI ⁺	127.049 3	咪唑-4-乙酸	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	氨基酸或其衍生物	3.43	↑
2	0.78	ESI ⁺	156.076 7	<i>L</i> -组氨酸	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	氨基酸或其衍生物	1.36	↑
3	0.94	ESI ⁺	215.015 4	异柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	三羧酸循环中间产物	1.01	↑
4	1.29	ESI ⁺	336.107 7	酪胺葡萄糖醛酸苷	C ₁₄ H ₁₉ NO ₇	葡萄糖醛酸结合物	1.44	↑
5	3.40	ESI ⁺	340.102 9	6-羟基-5-甲基吡啶葡萄糖醛酸苷	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	葡萄糖醛酸结合物	12.85	↑
6	4.70	ESI ⁺	209.116 5	3-氧代癸酸	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	脂肪酸或其衍生物	1.16	↓
7	0.59	ESI ⁻	209.028 5	半乳糖二酸	C ₆ H ₁₀ O ₈	葡萄糖醛酸或其衍生物	1.03	↑
8	0.70	ESI ⁻	191.018 0	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	三羧酸循环中间产物	3.73	↑
9	0.71	ESI ⁻	166.016 3	<i>N</i> -乙酰牛磺酸	C ₄ H ₉ NO ₄ S	乙酰基结合物	3.39	↑
10	0.79	ESI ⁻	254.980 4	抗坏血酸 2-硫酸盐	C ₆ H ₈ O ₉ S	硫酸结合物	7.27	↑
11	0.98	ESI ⁻	191.018 1	异柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	三羧酸循环中间产物	11.05	↑
12	1.35	ESI ⁻	263.021 6	3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸酯	C ₉ H ₁₂ O ₇ S	硫酸结合物	2.72	↑
13	1.47	ESI ⁻	182.044 2	4-吡哆酸	C ₈ H ₉ NO ₄	维生素	2.34	↑
14	2.03	ESI ⁻	218.102 0	泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	维生素	4.98	↑
15	2.29	ESI ⁻	246.990 2	香草酸 4-硫酸盐	C ₈ H ₈ O ₇ S	硫酸结合物	1.34	↑
16	2.32	ESI ⁻	261.006 2	高香草酸硫酸盐	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	硫酸结合物	4.62	↑
17	3.04	ESI ⁻	212.000 9	硫酸吡哆酚	C ₈ H ₇ NO ₄ S	硫酸结合物	16.77	↑
18	3.09	ESI ⁻	178.049 5	马尿酸	C ₉ H ₉ NO ₃	氨基酸或其衍生物	9.64	↑
19	3.14	ESI ⁻	239.995 6	吡哆-3-羧酸- <i>O</i> -硫酸酯	C ₉ H ₇ NO ₅ S	硫酸结合物	1.40	↑
20	3.38	ESI ⁻	338.087 3	6-羟基-5-甲基吡啶葡萄糖醛酸苷	C ₁₅ H ₁₇ NO ₈	葡萄糖醛酸结合物	4.34	↑
21	3.78	ESI ⁻	172.096 3	<i>N</i> -乙酰亮氨酸	C ₈ H ₁₅ NO ₃	乙酰基结合物	2.97	↑
22	3.89	ESI ⁻	187.005 6	对甲酚硫酸盐	C ₇ H ₈ O ₄ S	硫酸结合物	14.62	↑
23	3.92	ESI ⁻	283.081 4	对甲酚葡萄糖醛酸苷	C ₁₃ H ₁₆ O ₇	葡萄糖醛酸结合物	11.78	↑
24	3.98	ESI ⁻	173.080 2	辛二酸	C ₈ H ₁₄ O ₄	脂肪酸或其衍生物	1.34	↑
25	5.05	ESI ⁻	297.097 1	2-苯乙醇葡萄糖醛酸苷	C ₁₄ H ₁₈ O ₇	葡萄糖醛酸结合物	11.09	↑
26	5.16	ESI ⁻	245.137 8	3-羟基十二烷二酸	C ₁₂ H ₂₂ O ₅	脂肪酸或其衍生物	1.24	↑
27	5.97	ESI ⁻	201.111 7	癸二酸	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	脂肪酸或其衍生物	2.61	↑

注: ↑. 相对表达量上升, ↓. 相对表达量下降

进行聚类分析,结果发现其相对表达量在正常组和模型组之间存在明显差异,见图5。



注:蓝色代表低表达;红色代表高表达

图5 脾胃湿热证模型大鼠尿液潜在生物标志物的聚类分析

Fig. 5 Clustering analysis of potential biomarkers in urine of spleen-stomach damp-heat syndrome rat model

2.4.6 脾胃湿热证模型大鼠尿液生物标志物相关代谢通路分析 通过KEGG数据库对25个脾胃湿热证模型大鼠尿液生物标志物的生物信息进

表3 脾胃湿热证模型大鼠尿液中潜在生物标志物的代谢通路信息

Table 3 Information of metabolism pathways of potential biomarkers in urine of spleen-stomach damp-heat syndrome rat model

编号	代谢通路	富集代谢物	通路影响值	-lgP
1	组氨酸代谢	L-组氨酸、咪唑-4-乙酸	0.221 3	2.136 9
2	三羧酸循环	柠檬酸、异柠檬酸	0.135 4	1.945 6
3	乙醛酸和二羧酸代谢	柠檬酸、异柠檬酸	0.031 8	1.553 5
4	维生素B ₆ 代谢	4-吡哆酸	0.000 0	1.135 6
5	苯丙氨酸代谢	马尿酸	0.000 0	1.091 5
6	戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化	葡萄糖醛酸	0.140 6	0.849 6
7	泛酸和辅酶A生物合成	泛酸	0.007 1	0.827 8
8	β-丙氨酸代谢	L-组氨酸	0.000 0	0.787 6
9	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	柠檬酸	0.000 0	0.674 2
10	氨酰转运核糖核酸生物合成	L-组氨酸	0.000 0	0.472 7

3 讨论

脾胃湿热证为中医脾胃理论中的重要实证,临床调查研究显示,脾胃湿热证主要涉及消化系统疾病^[14],同时也是脾胃病中最常见证型^[15]。因此,利用现代前沿科学技术和研究策略去客观揭示脾胃湿热证候本质并建立合理有效的证候模型显得尤为重要。

本研究中模型组大鼠在“内因湿热+外因湿热”作用下,其一般体征、胃肠道激素、胃肠组织病理的变化与正常组比较更为明显,与临床脾胃湿热证相

行检索,利用MetaboAnalyst 5.0进行通路富集分析,生成直观可交互探索的数据网络系统。结果发现与脾胃湿热证主要相关的代谢通路为组氨酸代谢、三羧酸循环、乙醛酸和二羧酸代谢三条代谢通路($P<0.05$),见图6和表3。

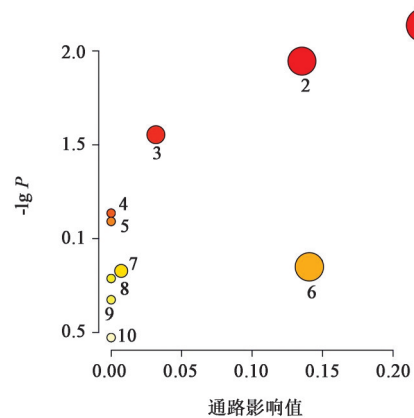


图6 脾胃湿热证模型大鼠尿液中潜在生物标志物的KEGG通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of potential biomarkers in urine of spleen-stomach damp-heat syndrome rat model

近,表明该模型可较大程度地体现脾胃湿热证。在代谢组学分析中,本研究通过比较正常组与模型组大鼠尿液中的内源性代谢物,筛选出与脾胃湿热证相关的25个生物标志物,并通过通路富集分析得到与脾胃湿热证相关的3条关键代谢通路,即组氨酸代谢、三羧酸循环、乙醛酸和二羧酸代谢。组氨酸代谢参与机体免疫应答、胃酸分泌及炎症反应^[16],在组氨酸脱羧酶(HDC)作用下组氨酸脱去羧基生成组胺,组胺可作用于组胺-H₂受体以促进胃酸分泌^[17],同时胃液中组氨酸和组胺含量与慢性

浅表性胃炎转向肠上皮化生的病理进程呈正相关^[18]。组胺进一步在二胺氧化酶和醛脱氢酶作用下氧化生成咪唑-4-乙酸^[19],该产物可作为慢性萎缩性胃炎的生物标志物,是一种 γ -氨基丁酸(GABA)受体激动剂,GABA受体激活后可促进小肠内分泌细胞STC-1释放肠促胰酶肽以影响胃肠功能及胃酸分泌^[20-21]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠尿液中L-组氨酸和咪唑-4-乙酸丰度明显改变,推测组氨酸代谢异常所引起胃酸分泌紊乱和炎症反应可能是脾胃湿热证具有胃脘痞满、胀痛或灼热,大便溏而不爽或有黏液等症状的原因。三羧酸循环作为糖和脂肪酸有氧氧化途径中的最后阶段,是机体从体外摄取营养物质后通过物质代谢释放能量的关键步骤。研究表明,慢性胃炎脾胃湿热证交感神经组织细胞代谢呈代偿性亢进状态^[22]。此外,在能量代谢中,肠道菌群产生的乙醛酸和二羧酸代谢为三羧酸循环的支路,可通过柠檬酸和异柠檬酸影响三羧酸循环。本研究发现脾胃湿热证大鼠尿液中柠檬酸和异柠檬酸含量升高,提示宿主或菌群能量代谢紊乱可能是脾胃湿热证的生物学机制之一,但仍需进一步利用靶向代谢组学技术进行验证。

本研究发现的25个生物标志物中13个代谢物为内源性物质的Ⅱ相代谢产物,包含4个葡萄糖醛酸结合物、7个硫酸结合物及2个乙酰基结合物。胃肠道中内源性代谢物可在尿苷二磷酸葡萄糖醛基转移酶(UGTs)和硫酸基转移酶(SULTs)的作用下经Ⅱ相代谢反应添加葡萄糖醛酸或硫酸基团使其灭活,而肠道菌群分泌的 β -葡萄糖醛酸酶(GUS)和硫酸酯酶(SULF)可使失活的代谢物脱去葡萄糖醛酸或硫酸基团而恢复活性^[23-24]。脾胃湿热证为胃癌前病变的主要中医证型^[25],最新研究证实GUS和SULF的表达情况分别与肠癌和胃癌的发病及预后相关^[26-27]。本研究中酪氨酸代谢通路中的酪胺、高香草酸与葡萄糖醛酸基团和硫酸基团的结合相对增强,导致酪胺和高香草酸失活率增加,从而影响酪氨酸代谢过程。推测模型大鼠体内UGTs和SULTs同与其功能相反的GUS和SULF表达相对紊乱,导致内源性代谢物存在活性/失活状态失衡现象而无法正常工作。

本研究利用代谢组学技术探究脾胃湿热证大鼠尿液代谢标记物并追溯关键代谢通路,从整体代谢水平阐释脾胃湿热证发病的生物学机制,为脾胃湿热证模型建立和应用,以及证候本质研究提供了

实验依据。后续将收集临床脾胃湿热证患者尿液样本,通过动物模型尿液生物标志物与临床患者尿液生物标志物相桥接,进而构建脾胃湿热证的临床评价体系。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 劳绍贤,胡玲.劳绍贤教授“祛湿以运脾,清热以防变”脾胃湿热学术思想撷萃[J].中国中西医结合消化杂志,2019,27(5):323-324.
- [2] 王明星,胡运莲,许盼.连朴清胃胶囊对慢性胃炎脾胃湿热证模型大鼠血清TNF- α 及IL-1 β 的影响[J].湖北中医杂志,2015,37(9):6-8.
- [3] 李经纬.中医大辞典[M].2版.北京:人民卫生出版社,2004:931.
- [4] TANG S Q, WANG Y L, XIE Z Y, et al. Serum metabolic profiling of traditional Chinese medicine syndromes in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. J Integr Med, 2021, 19(3):274-281.
- [5] 吴琪,张新雪,焦婷婷,等.慢性肾脏病肾阳虚证证候特征与临床生物学指标相关性及相关因素[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(19):204-213.
- [6] 李威莹,吴威,孙凡雅,等.脾胃湿热证动物模型的构建与评价研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(11):77-82.
- [7] 朱闽,何清湖,苟建宁.中医“湿热证”病证结合动物模型研究进展[J].中华中医药杂志,2017,32(2):656-658.
- [8] PIAO S H, TAN S Y, LI K P, et al. UPLC-QTOF/MS-based lipidomic profiling of liver Qi-stagnation and spleen-deficiency syndrome in patients with hyperlipidemia[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018:4530849.
- [9] 郭雄健,卢盛文,闫广利,等.基于代谢组学考察京尼平苷对慢性酒精中毒大鼠的神经保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(12):155-163.
- [10] LI J X, LI R Z, SUN A, et al. Metabolomics and integrated network pharmacology analysis reveal tricrin as the active anti-cancer component of Weijing decoction by suppression of PRKCA and sphingolipid signaling[J]. Pharmacol Res, 2021, 171:105574.
- [11] 吕冠华,劳绍贤.脾胃湿热证动物模型的建立与评价[J].广州中医药大学学报,2005,22(3):231-235.
- [12] 胡小勤,曾雪霞,付蓉,等.黄芩、苍术对脾胃湿热证大鼠燥湿作用的性效关系[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(13):35-42.
- [13] 张声生,黄恒青,方文怡,等.脾胃湿热证中医诊疗专

- 家共识意见(2017)[J]. 中医杂志, 2017, 58(11): 987-990.
- [14] 杨春波, 黄可成, 肖丽春, 等. 脾胃湿热证的临床研究——附400例资料分析[J]. 中医杂志, 1994, 35(7): 425-427.
- [15] 邱健. 分消走泄法在脾胃病临床中的应用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2015, 13(17): 3-5, 29.
- [16] BROSNAN M E, BROSNAN J T. Histidine metabolism and function[J]. *J Nutr*, 2020, 150(Suppl 1): 2570S-2575S.
- [17] FURUTANI K, AIHARA T, NAKAMURA E, et al. Crucial role of histamine for regulation of gastric acid secretion ascertained by histidine decarboxylase-knockout mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(1): 331-338.
- [18] LEE W, UM J, HWANG B, et al. Assessing the progression of gastric cancer via profiling of histamine, histidine, and bile acids in gastric juice using LC-MS/MS[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 197: 105539.
- [19] HIRASAWA N. Expression of histidine decarboxylase and its roles in inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 376.
- [20] JANSEN A, HOEPFNER M, HERZIG K H, et al. GABA (C) receptors in neuroendocrine gut cells: A new GABA-binding site in the gut[J]. *Pflugers Arch*, 2000, 441(2/3): 294-300.
- [21] PIQUERAS L, MARTINEZ V. Peripheral GABAB agonists stimulate gastric acid secretion in mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2004, 142(6): 1038-1048.
- [22] 祁建生, 李秀娟, 杨春波, 等. 慢性胃炎脾胃虚实证红细胞游离Ca²⁺及膜Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1999, 7(1): 16-18.
- [23] ERVIN S M, SIMPSON J B, GIBBS M E, et al. Structural insights into endobiotic reactivation by human gut microbiome-encoded sulfatases [J]. *Biochemistry*, 2020, 59(40): 3939-3950.
- [24] JANCOVA P, ANZENBACHER P, ANZENBACHEROVA E. Phase II drug metabolizing enzymes [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2010, 154(2): 103-116.
- [25] 廖云辉, 黄健, 孙月明, 等. 胃癌前病变脾胃湿热证的证治研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(23): 182-185.
- [26] WEI X, LI J, YANG X, et al. An enzyme-activated two-photon ratiometric fluorescent probe with lysosome targetability for imaging β -glucuronidase in colon cancer cells and tissue [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1192: 339354.
- [27] 王佳敏, 初冬美, 张家铜, 等. 基于GEO和TCGA联合分析SULF1对胃癌总体生存率的影响[J]. 中国医科大学学报, 2022, 51(10): 865-869.

[责任编辑 李嘉麟]