

· 药物代谢 ·

基于代谢组学的补中益气汤“益气升阳”配伍机制研究

施旭光^{1*}, 吴美音¹, 黄曼婷¹, 王闽予¹, 邹忠杰², 龚梦鹃²

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:通过补中益气汤不同配伍组合代谢产物的比较,揭示补中益气汤“益气升阳”的配伍机制。方法:运用核磁共振氢谱(¹H-NMR)技术建立大鼠血清的代谢指纹谱。应用正交偏最小二乘判别分析研究模型组和补中益气汤组、升柴加剂量组、去升麻柴胡组(20 g·kg⁻¹, ig 15 d)之间的代谢物谱差异,并通过变量重要性投影(VIP)在血清中选取生物标志物,比较各组的标志物并找出差别。结果:补中益气汤组对脾气虚证的调节作用体现在对能量代谢方式、糖代谢、脂肪代谢、氨基酸代谢的调节修正上面,而升柴加剂量组、去升麻柴胡组虽然能一定程度的改善模型组大鼠的三大营养物质代谢,但未能从根本上恢复模型大鼠的能量代谢方式,仍然以无氧呼吸为主。结论:补中益气汤组对脾气虚的调整作用最强,主要体现在氨基酸代谢及能量代谢方式的恢复方面。

[关键词] 补中益气汤; 代谢组学; 核磁共振; 脾气虚证; 配伍

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0103-04

[doi] 10.11653/syfy2014010103

Study of Buzhong Yiqi Decoction ‘Yiqi Shengyang’ Compatibility Mechanism Based on Metabonomics

SHI Xu-guang^{1*}, WU Mei-yin¹, HUANG Man-ting¹, WANG Min-yu¹, ZOU Zhong-jie², GONG Meng-juan²

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study Buzhong Yiqi decoction ‘Yiqi Shengyang’ compatibility mechanism based on metabonomics. **Method:** The nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) was used to establish the rat serum metabolic fingerprinting techniques. The orthogonal partial least-squares discriminant was applied for analysis of metabolite profiling difference between model group and Buzhong Yiqi decoction group, increased Cimicifugae Rhizoma-Bupleuri Radix dosage group, Buzhong Yiqi without Cimicifugae Rhizoma-Bupleuri Radix group, and through the variable importance in projection (VIP) biomarkers in serum were selected, the markers were compared to find the differences. **Result:** the moderating effect of Buzhong Yiqi decoction on spleen deficiency syndrome was reflected in the way of energy metabolism, glucose metabolism, lipid metabolism, amino acid metabolism regulation revision, while increased Cimicifugae Rhizoma-Bupleuri Radix dosage group, Buzhong Yiqi without Cimicifugae Rhizoma-Bupleuri Radix group improved three big nutrients metabolism to a certain extent in models group rats, but failed to restore the rat model’ energy metabolism fundamentally, still in anaerobic respiration. **Conclusion:** Buzhong Yiqi decoction has adjustment effect on spleen deficiency of the strongest, mainly reflect in the recovery of amino acid metabolism and energy metabolism.

[Key words] Buzhong Yiqi decoction; metabonomics; nuclear magnetic resonance; spleen deficiency syndrome; compatibility

[收稿日期] 20130425(022)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2011010003926); 广东省科技计划项目(2011B061300096); 广东省科技计划项目(2012B060300031)

[通讯作者] *施旭光,教授,博士生导师,从事方剂配伍规律的研究, Tel:020-39358096, E-mail: sxg6902@126.com

代谢组学方法主要是用于研究生物体内所有代谢产物(主要是低分子量代谢物)在疾病或外源性物质等因素扰动下的动态变化,并以此来反映生物体的病理生理变化趋势,进而揭示其变化的机制^[1]。代谢组学强调把人体作为一个完整的系统来研究,从整体观出发考察疾病和药物对人体产生的整体效应,与中医学的整体思想相吻合^[2-3]。

补中益气汤是临床上治疗脾虚证的经典方剂,其最具特色的组方特点是“益气升阳”配伍。作者之前的研究表明,该方及其配伍可提高脾气虚动物模型免疫器官指数、调节胃肠运动功能、提高血清胃泌素含量、提高胃黏膜血流量、提高血清淀粉酶和肌酸激酶活性^[4-6]。本文从代谢组学的角度,进一步探讨补中益气汤“益气升阳”配伍作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, SPF 级, (180 ± 20) g, 购于广东省医学动物实验中心, 许可证号 SCXK(粤)2008-0002。大鼠处于自然光暗周期的环境中饲养, 并控制室温(25 ± 1) °C, 相对湿度 50% ~ 70%, 实验期间自由饮水。

1.2 仪器及试剂 Bruker AVANCE III 500 MHz 全数字化超导核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司); TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 大黄 *Rheum palmatum* L. (广州正信中药饮片有限公司, 批号 20110108)、芒硝 *Natrii Sulfas* (广东天试中药饮片有限公司, 批号 20110305) 均购于广州中医药大学第一附属医院(经广州中医药大学中药鉴定教研室李薇老师鉴定); 氘水(D₂O)(美国 Sigma 公司)。

1.3 硝黄饲料的制备 取正常饲料、大黄、芒硝分别打粉, 以 60:1:1 的比例用蒸馏水混合均匀, 重新塑形, 在 60 °C 恒温箱中烘干。

1.4 药物水煎液的制备 精确称取适量的药材, 经鉴定后, 用蒸馏水进行煎煮[先取 10 倍量的水, 煎煮 1 h(沸后), 滤出药液; 再取 8 倍量的水煎煮 45 min(沸后), 合并 2 次的滤液], 将各组方的药液浓缩为 1 g·mL⁻¹, 冰箱保存, 备用。各试验组给药处方(按临床处方用量)如下:[以下药材均购自广州中医药大学第一附属医院, 均经广州中医药大学中药鉴定教研室李薇老师鉴定。符合《中国药典》(2010 年版)项下标准]。①补中益气汤组: 黄芪 30 g, 升麻 6 g, 柴胡 6 g, 边条参 10 g, 炙甘草 15 g, 当归 6 g, 橘皮 6 g, 白术 10 g。②补中益气汤去“升麻-柴胡”组: 黄芪 30 g, 边条参 10 g, 炙甘草 15 g, 当归 6 g, 橘皮 6 g, 白术 10 g。③补中益气汤“升柴加剂量”

组: 黄芪 30 g, 升麻 12 g, 柴胡 12 g, 边条参 10 g, 炙甘草 15 g, 当归 6 g, 橘皮 6 g, 白术 10 g。

2 方法

2.1 脾气虚模型的复制 参照文献[7]使用的偏食法和苦寒泻下法进行造模: 造模第 1 天用 50° 白酒 10 mL·kg⁻¹ ig, 第 2 天以后用食醋 10 mL·kg⁻¹ ig, 喂饲体质量 8% 的硝黄饲料量, 同时游泳至耐力极限, 造模时间 15 d。

2.2 动物的分组、给药及样本采集 模型复制成功后, 随机将大鼠分成 4 组, 每组 10 只, 分别为补中益气汤组、补中益气汤“升柴加剂量”组、去“升麻-柴胡”组和模型组, 另取 10 只正常组大鼠做为对照。正常组及模型组每天 ig 生理盐水 0.02 mL·g⁻¹, 其余各组 ig 相应的药物水煎液 20 g·kg⁻¹ (0.02 mL·g⁻¹), 共 15 d。第 15 天 ig 2 h 后, ip 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 静置 2 ~ 3 h, 3 500 r·min⁻¹, 15 min, 吸取上层血清, 置于 -20 °C 冰箱保存备用。

2.3 样本的预处理^[8] 血清室温下解冻, 400 μL 的血清中加入 50 μL 磷酸缓冲液(0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄-0.2 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, pH 7.4) 和 100 μL D₂O(用于锁场), 震荡混匀, 待测。

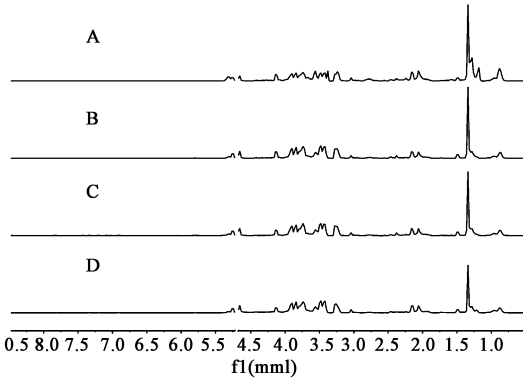
2.4 ¹H-NMR 分析 实验温度为 298 K; 采用有预饱和的 ID NOESY 脉冲序压制水峰, 总的回波时间 2πτ = 100 ms; 弛豫延迟时间 4 s, 使采样后的磁化矢量完全恢复到热平衡态; 谱宽 10 kHz; 采样点数 64 K; 采集次数 64 次。采用线宽为 0.3 Hz 的指数窗函数进行傅立叶变换。运用软件 MestReNova 6.1 (Mestrelab Research S. L, Santiago de Compostela, Spain) 对所获谱图进行手动相位和基线校正后, 对血清样品参照乳酸的甲基共振双重峰(δ1.33) 对¹H-NMR 谱的化学位移进行定标^[9]。

2.5 数据分析 在 δ 0.5 ~ 9.5 区域按 δ 0.02 等间隔分段积分, 然后将所得数据转换成 ASC II 文件输出到 Excel 2007 (Microsoft Inc., Bellevue, WA) 中进行下一步处理。对于血清样品, 将区域 δ 4.68 ~ 5.22 设为 0 积分段。在进行模式识别分析之前对各分段积分值进行归一化处理, 所得数据乘以 10 000 后导入 SIMCA-P 12.0 (Umetrics AB, Umea, Sweden), 经 Pareto 标度化预处理后, 进行正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。运用 SPSS 17.0 对代谢物相对含量的组间差异进行 t 检验。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 血清¹H-NMR 代谢物谱分析 大鼠血清的¹H-

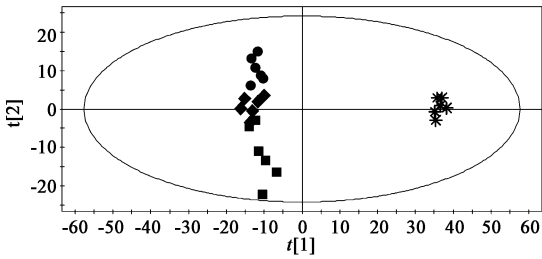
NMR 谱如图 1 所示。代谢物谱峰的归属主要是依据化学位移值、峰的列分情况、耦合常数及参考文献报道^[10-11]。



A. 模型组; B. 去“升麻柴胡”20 g·kg⁻¹组;
C. 升麻加剂量 20 g·kg⁻¹组; D. 补中益气汤 20 g·kg⁻¹组

图 1 模型组与各给药组的波形图比较

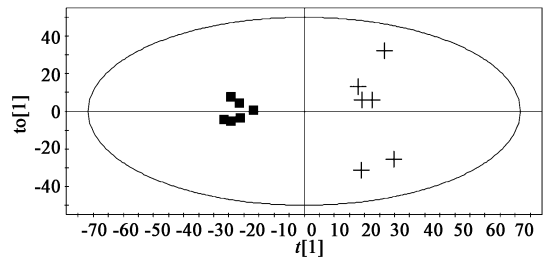
3.2 各给药组所致脾虚大鼠代谢表型的变化 先运用 PCA 法分析,观察各给药组与模型组的血清内含物图谱的差异。从图 2 中可以看出,各给药组与模型组可以明显的区分开来,说明在给药治疗过程当中大鼠的机体生理及物质代谢状况已经发生了明显的变化。



*. 模型组, ■. 补中益气汤 20 g·kg⁻¹组,
●. 补中益气汤升麻加剂量 20 g·kg⁻¹组,
◆. 补中益气汤去“升麻柴胡”20 g·kg⁻¹组

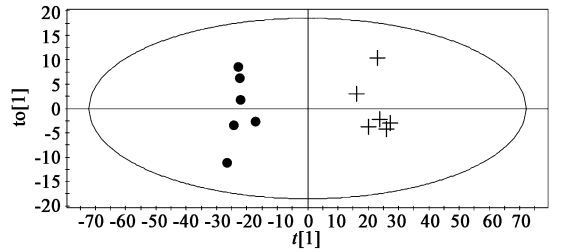
图 2 补中益气汤不同配伍组与模型组的 PCA 得分

3.3 补中益气汤不同配伍作用机制的探讨 运用 OPLS-DA 的方法,将各配伍组与模型组进行比较,得到各组的 OPLS-DA 得分图如下,各给药组与模型组在 PC1 维可以完全分开。为了验证 OPLS-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 OPLS-DA 模型的主要参数:模型组与补中益气汤组: $R^2X(cum) = 0.74$, $R^2Y(cum)$, 0.972, $Q^2(cum) = 0.932$; 模型组与“升麻加剂量”组: $R^2X(cum) = 0.617$, $R^2Y(cum)$, 0.979, $Q^2(cum) = 0.915$; 模型组与去“升麻柴胡”组: $R^2X(cum) = 0.919$, $R^2Y(cum)$, 0.998, $Q^2(cum) = 0.967$, 值越接近 1,可靠性越大。见图 3~5。



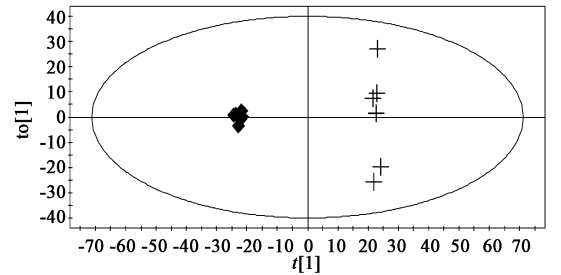
■. 补中益气汤 20 g·kg⁻¹组, +. 模型组

图 3 模型组与补中益气汤组的 OPLS-DA 得分



●. 升麻加剂量 20 g·kg⁻¹组, +. 模型组

图 4 模型组与补中益气汤升麻加剂量组的 OPLS-DA 得分



◆. 去“升麻柴胡”20 g·kg⁻¹组, +. 模型组

图 5 模型组与补中益气汤去“升麻柴胡”组的 OPLS-DA 得分

从图中可以看出,各给药组都能与模型组很好的区分开来,说明各给药组的大鼠的机体生理及代谢都产生了明显的变化。使用 OPLS-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记物。选取 VIP > 1 的差异变量,再用 *t* 检验筛选出 $P < 0.05$ 的差异变量,认为它们为潜在的生物标记物,各给药组分别和模型组进行比较。见表 1。

4 讨论

糖代谢障碍时,脂肪酸分解代谢加强,使乙酰乙酸形成量增多,超过外周组织的利用而积累于血液中。乙酰乙酸少部分自发脱羧形成丙酮,大部分则形成 β -羟基丁酸^[12]。从表中看出,与模型组相比,各给药组血糖浓度、 β -羟基丁酸的含量均有所降低 ($P < 0.05$),说明经过药物治疗模型大鼠的糖代谢已经得到恢复,血液中的葡萄糖已经能正常利用,糖异生过程被抑制。LDL 是血浆脂蛋白的一种,利用超速离心法可将血浆脂蛋白分为四大类:乳糜微粒

表 1 补中益气汤给药组与模型组相比的差异性代谢产物

代谢产物	归一化后的相对峰面积			
	模型组	补中益气汤 20 g·kg ⁻¹ 组	补中益气汤升柴 加剂量 20 g·kg ⁻¹ 组	补中益气汤去升麻 柴胡 20 g·kg ⁻¹ 组
葡萄糖	76.47 ± 34.69	3.83 ± 2.51 ¹⁾	2.41 ± 1.65 ¹⁾	2.26 ± 1.71 ¹⁾
β-羟基丁酸	66.14 ± 21.12	11.56 ± 3.25 ¹⁾	9.30 ± 0.81 ¹⁾	9.32 ± 1.41 ¹⁾
LDL	57.45 ± 15.40	31.44 ± 4.58 ¹⁾	41.09 ± 3.11 ¹⁾	32.93 ± 4.60 ¹⁾
乳酸	521.72 ± 1.25	491.88 ± 57.29 ¹⁾	613.93 ± 28.78 ¹⁾	546.75 ± 43.60 ¹⁾
脂质	22.06 ± 3.94	34.22 ± 1.80 ¹⁾	19.85 ± 1.38 ¹⁾	-
丙氨酸	45.34 ± 8.61	58.72 ± 3.32 ¹⁾	-	-
谷氨酸	16.68 ± 4.42	11.19 ± 0.74 ¹⁾	-	-
苯丙氨酸	53.54 ± 9.36	78.02 ± 2.10 ¹⁾	-	-
脯氨酸	31.00 ± 6.30	52.10 ± 2.05 ¹⁾	-	-
天冬氨酸	11.83 ± 3.37	5.01 ± 0.96 ¹⁾	-	-
甘氨酸	32.84 ± 6.30	38.60 ± 2.07 ¹⁾	-	-

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。正常情况下,人体的血浆脂蛋白代谢可分为外源性代谢途径和内源性代谢途径来完成^[12]。表中结果显示,模型组大鼠血清中 LDL 的含量过高,经过治疗后,各给药组 LDL 含量均有所降低($P < 0.05$),说明补中益气汤及其加裁组对模型大鼠的脂肪代谢起到了一定的调节作用。乳酸是无氧呼吸的代谢产物,与模型组相比,补中益气汤组的乳酸含量有所降低,说明补中益气汤能够修正模型大鼠的能量代谢方式,使有氧呼吸得以恢复;而升柴加剂量组、去升麻柴胡组则是升高了乳酸的含量,并未改善其能量代谢的方式,仍以无氧呼吸为主。从表中结果也可看出,补中益气汤原方组对脾气虚证模型大鼠氨基酸代谢也较明显的改善作用。

实验结果表明,从影响营养物质体内代谢的角度来看,补中益气汤无论去掉有升阳作用的“升麻、柴胡”,还是加大“升麻、柴胡”的用量,都会影响其作用效果,进一步说明补中益气汤原方中大量“益气药”与少量“升阳药”(升麻、柴胡)配伍,共奏“益气升阳”之效以治疗脾气虚证的合理性。希望通过本研究的研究和报道,能对补中益气汤的进一步研究和临床应用提供理论依据。

[参考文献]

[1] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. Metabonomics: understanding them etabolic responses of living systems to path ophysiological stimulivia multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29(11):1181.

[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.

[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.

[4] 施旭光, 翟理祥, 邓淙友, 等. 补中益气汤“益气升阳”配伍对脾虚小鼠作用的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(8):45.

[5] 施旭光, 邓淙友, 翟理祥, 等. 补中益气汤及“益气升阳”配伍对脾虚大鼠药理效应的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(3):271.

[6] 施旭光, 王闽予, 翟理祥, 等. 补中益气汤及其配伍对脾虚大鼠胃泌素及其基因表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6):609.

[7] 刘群英, 冯雯琪, 卓廉士. 脾气虚、脾阳虚、脾气下陷证大鼠模型评价[J]. 北京医学, 2009, 31(9):568.

[8] 邹忠杰, 施旭光, 龚梦鹃, 等. 利血平所致大鼠脾虚证代谢研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3):291.

[9] 邹忠杰, 龚梦鹃, 谢媛媛, 等. 氢化可的松诱导的肾虚大鼠尿液代谢组学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8):133.

[10] Nicholson J K, Foxall P J, Spraul M, et al. 750 MHz¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma[J]. Anal Chem, 1995, 67(5):793.

[11] Nicholson J K, Lindon J C, Everett J R. NMR spectroscopy of biofluids[J]. Annu Rep NMR Spectro, 1999, 38:1.

[12] 李萍. 生物化学检验[M]. 北京:人民卫生出版社, 1998:156.

[责任编辑 聂淑琴]