

基于非靶标血浆代谢组学研究少腹逐瘀汤对血瘀证大鼠的干预作用

张悦^{1,2}, 邓海山^{1,2*}, 时乐², 谢彤¹, 单进军¹, 宿树兰², 韩疏影²

(1.江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室,江苏 南京 210023;2.南京中医药大学药学院,江苏 南京 210023)

摘要:目的 分析少腹逐瘀汤对血瘀模型大鼠血浆内源性代谢物的调节作用,从代谢组学的视角探究少腹逐瘀汤的治疗机制。方法 以冰水浴结合肾上腺素的方法建立大鼠血瘀模型,以 GC-MS 为检测手段获得血浆代谢轮廓,通过倍数(Fold Change)以及单因素方差分析,确定差异性代谢物。结果 最终得到天冬酰胺、谷氨酸、核糖醇、尿嘧啶等 8 种差异性代谢物。除胱氨酸外,其他差异性代谢物的含量在血瘀大鼠体内显著降低。低剂量的少腹逐瘀汤可显著提高尿嘧啶的水平,并使 3-磷酸甘油酸外的差异性代谢物向正常水平回归;高剂量的少腹逐瘀汤可显著提高天冬酰胺、核糖醇的水平,并使木糖醇、尿嘧啶的水平向正常回归。结论 少腹逐瘀汤可能通过调节氨基酸代谢、能量代谢发挥对血瘀证的治疗作用,不同剂量的少腹逐瘀汤对血瘀证导致的代谢物紊乱的调节作用可能是不同的。

关键词:少腹逐瘀汤;代谢组学;GC-MS;血瘀证;血浆

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2018)03-0318-04

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2018.0318

Study on the Intervention Effect of Shaofu Zhuyu Decoction on Blood Stasis Syndrome Based upon Non-target Plasma Metabolomics Strategy

ZHANG Yue^{1,2}, DENG Hai-shan^{1,2*}, SHI Le², XIE Tong¹, SHAN Jin-jun¹, SU Shu-lan², HAN Shu-ying²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Nanjing, 210023, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the therapeutic mechanism of Shaofu Zhuyu decoction(SFZYD) on blood stasis syndrome from the perspective of plasma metabolomics. **METHODS** A blood stasis syndrome rats model was established by ice-water bath in combination with an injection with adrenaline. The plasma metabolomic profile was obtained by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Fold change and one-way analysis of variance (ANOVA) were used to search for potential biomarkers. **RESULTS** Finally, eight potential biomarkers, such as asparagine, glutamic acid, ribitol and uracil, were obtained. The levels of these potential biomarkers, except that of cystine, were decreased significantly in blood stasis syndrome rats. SFZYD at low dose significantly increased the level of uracil, and reversed other potential biomarkers, except 3-phosphoglycerate, into normal level; SFZYD at high dose significantly adjusted the levels of asparagine and ribitol, and xylitol and uracil showed trend towards the normal levels. **CONCLUSION** SFZYD shows good therapeutic effect on blood stasis syndrome by regulating the metabolism of amino acids and energy, and different doses of SFZYD may have different regulating effects on the potential biomarkers associated with blood stasis.

KEY WORDS:Shaofu Zhuyu decoction; metabolomics; GC-MS; blood stasis; plasma

血瘀证是常见的证候之一,血液循环障碍是典型的表现^[1],血液循环障碍可导致多种疾病的发生^[2]。少腹逐瘀汤是治疗血瘀证的经典名方,由当归、川芎、赤芍等 10 味中药组成,对于原发性痛经、子宫内膜异位等具有较好的治疗效果^[3-4]。

代谢组学是以基因组学、蛋白质组学的研究理念为基础,通过研究生物体在外界条件(环境、药物

等)刺激后,体内小分子代谢物变化规律的学科^[5]。代谢物记录了生物体所经历的内外环境的变化。以代谢物的变化反映药物的治疗机制,有望越过中药组分复杂性这一难题。代谢组学为中药的现代化研究提供了契机。非靶标代谢组学研究血浆、尿液等生物体液中尽可能多的小分子代谢物,以期全面地反映机体在环境刺激前后的状态^[6]。本实验以非靶

收稿日期:2017-12-11

基金项目:国家自然科学基金(81102898);江苏省自然科学基金(BK2010561);江苏省“青蓝工程”资助项目(2012);江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室资助项目(JKLPRD201407)

作者简介:张悦(1991-),女,硕士研究生。*通信作者:邓海山,男,副教授,主要从事药物分析方法研究与应用,E-mail:hs_deng@njucm.edu.cn

标代谢组学为研究手段,描绘大鼠血浆的代谢物谱,寻找相关生物标记物,阐述少腹逐瘀汤的治疗机制。

1 材料

1.1 试剂与药材

甲氧胺(批号:BCBN2932V,纯度:98%,Sigma-Aldrich,美国),吡啶(批号:STBD3575V,纯度:99.8%,Sigma-Aldrich,德国),N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA,批号:BCBS4254V,纯度:98.5%,Sigma-Aldrich,美国)含1%三甲基氯硅烷(TMCS),1,2-¹³C₂肉豆蔻酸(批号:SH2326V,纯度:99%,Sigma-Aldrich,美国),正己烷(批号:4A6004,纯度:95%,ROE,美国),甲醇(批号:1880707710,纯度:99.9%,Merk,德国)。

盐酸肾上腺素注射液(批号:H31021062,禾丰制药有限公司,上海),少腹逐瘀汤组方药材购自南京中医药大学附属医院,并经南京中医药大学药学院谷巍教授鉴定。

1.2 药材提取

将当归、川芎、赤芍、肉桂、小茴香、五灵脂、没药、蒲黄、延胡索、干姜按照3:1:2:1:0.5:2:1:3:1:1比例配比。取当归、川芎、肉桂、小茴香、没药、干姜适量加入8倍量水提取挥发油。将赤芍、五灵脂、蒲黄、延胡索与上述残渣、药液混合,加至10倍量水,煎煮提取2次,合并2次滤液,减压浓缩。将挥发油与浓缩液混匀后,储存于4℃冰箱备用。

1.3 仪器

气相色谱-质谱联用仪(Trace 1310/TSQ 8000, Thermo,美国),TG-5MS毛细管色谱柱(Thermo,美国),真空离心浓缩仪(Speed-vac, Thermo,美国),Allegra 64R低温高速离心机(Beckman,美国),Allegra X-15R冷冻离心机(Beckman,美国),THZ-C恒温振荡器(太仓市强乐实验设备有限公司,苏州),SA-6900全自动血流变测试仪(赛科希德科技发展有限公司,北京)。

2 方法

2.1 动物实验

雌性SD大鼠,体质量(230±10)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,大鼠适应性饲养1周后,随机分为空白对照组(空白组)、模型组、少腹逐瘀汤低(SFZYD-1,4.65 g/kg)、高(SFZYD-2,18.6 g/kg)剂量组,共4组,每组8只。空白组与模型组给予等体积的去离子水,其余给予相应剂量少腹逐瘀汤,灌胃

7 d。除空白组注射生理盐水,其余各组于末次给药后,皮下注射盐酸肾上腺素注射液(0.08 mg/kg),2 h后将大鼠浸入冰水中5 min,冰水浴结束后2 h再次注射同等剂量的盐酸肾上腺素注射液,制备急性血瘀证大鼠模型^[7]。造模结束18 h后,大鼠经水合氯醛麻醉进行采血。全血分为2部分,一部分全血(约4 mL)采用肝素抗凝,用于全血与血浆黏度的测定;剩余部分采用EDTA抗凝,于3 000 r/min(10 min,4℃)离心,取血浆用于代谢组学测定。

2.2 全血与血浆黏度测定

将含肝素的真空采血管静置20 min,测定高、中、低切率下全血黏度;检测结束后全血以3 000 r/min离心10 min,取血浆测定血浆黏度。全血、血浆黏度在采血后4 h内完成测定。

2.3 血浆样品前处理

取50 μL血浆于离心管,加入200 μL含¹³C标记的肉豆蔻酸(12.5 μg/mL)的甲醇溶液,涡旋3 min后,于高速温控离心机离心(18 000 r/min,4℃,10 min)。取上清100 μL,放入浓缩仪中挥干(45℃,2 h)。将30 μL甲氧胺吡啶(10 mg/mL)加入上述样品,涡旋5 min,放入恒温振荡器振荡(300 r/min,30℃,90 min)后加入30 μL BSTFA,混匀后再次于恒温振荡器振荡(300 r/min,37℃,30 min)。振荡结束后,将样品离心(18 000 r/min,4℃,10 min)并取上清进样。

2.4 气相色谱-质谱条件

样品分析使用GC-MS(Trace 1310/TSQ 8000),样品的分离在TG-5MS(30 m×0.25 mm,0.25 μm)毛细管色谱柱上进行。载气为氦气,流速:1.2 mL/min;进样口温度:250℃,传输线温度:250℃,离子源温度:280℃;采用程序升温:60℃保持1 min,13 min后温度升至320℃,最后以320℃的温度保持5 min;仪器配EI离子源,离子源温度:280℃;采用全扫描模式,扫描范围*m/z*:50~500,质谱采集时间:3.5~19 min;样品分析采用随机进样的方式,进样量:1 μL。

2.5 统计学方法

使用MS-DIAL v.2.7.2^[8]及NIST 2014数据库进行峰提取、鉴定、对齐以及峰面积的计算,采用内标峰面积对代谢物峰面积进行归一化。采用SIM-CA-P 13.0(Umetrics,瑞典)进行多变量分析,Mataboanalysis 3.0(<http://www.metaboanalyst.ca>)进行Fold Change计算,结合单因素方差分析(SPSS

20.0)结果以确定差异性代谢物,最终将差异性代谢物导入 Mataboanalysis 3.0 进行代谢通路分析。

3 结果

3.1 血液流变学测定结果

血瘀证是一种因血液流动性和黏性异常而引起的紊乱症^[9]。表 1 为大鼠全血、血浆的黏度测定结

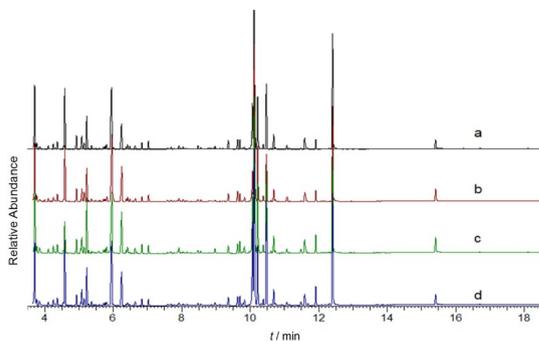
表 1 不同组别大鼠血液流变学测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	全血黏度/(mPa·s)			血浆黏度/(mPa·s)
	低切/(1 s ⁻¹)	中切/(50 s ⁻¹)	高切/(200 s ⁻¹)	
空白组	24.18±1.65	4.69±0.22	3.76±0.17	1.16±0.02
模型组	30.11±2.39 ^{**}	5.36±0.49 [*]	4.22±0.40 [*]	1.22±0.03 ^{**}
SFZYD-1	29.55±0.96	5.26±0.11 ^{△△}	4.15±0.12 [△]	1.19±0.04
SFZYD-2	24.56±3.94 [△]	4.73±0.53	3.79±0.40	1.18±0.04 [△]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3.2 化合物鉴定

样品进行 GC-MS 分析后,获得总离子流图(图 1)。根据化合物的质荷比、保留时间、保留指数进行化合物的鉴定。最终鉴定化合物 101 个,包括氨基酸、糖醇、糖类等。



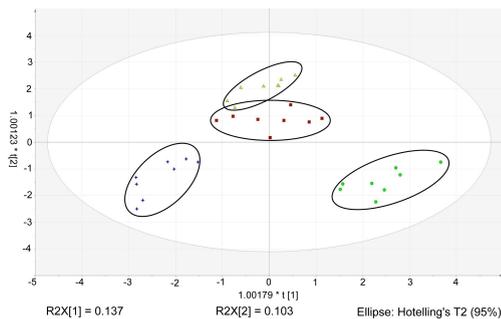
注:a.空白组;b.模型组;c.SFZYD-1;d.SFZYD-2

图 1 不同组别大鼠血浆 GC-MS 总离子流图

3.3 血浆代谢轮廓分析

将含有样品名称、化合物名称以及归一化峰面积的数据集,导入到 SIMCA-P 中,进行正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。如图 2 所示,空白组与模型组可以在 OPLS-DA 得分图上完全区分,表明以冰水浴结合肾上腺素的造模方式可改变正常大鼠血浆中的代谢物水平。应用少腹逐瘀汤的组别均呈现出向空白组回调的趋势,表明少腹逐瘀汤对血瘀导致的代谢物水平异常具有调节作用。高、低剂量组相距较近,低剂量组的回调趋势稍优于高剂量组。

果。结果显示,与空白组相比,模型组的全血及血浆黏度均显著提高,表明血瘀模型制备成功;给予低剂量的少腹逐瘀汤后,可以显著改善大鼠的中、高切全血黏度;给予高剂量的少腹逐瘀汤后,全血的低切黏度、血浆黏度显著降低,表明少腹逐瘀汤可改善血瘀大鼠的血液循环障碍。



注:●为空白组;+为模型组;■为 SFZYD-1;▲为 SFZYD-2。

$R^2X=0.971, R^2Y=0.869, Q^2=0.712$ 。

图 2 大鼠血浆 OPLS-DA 得分图

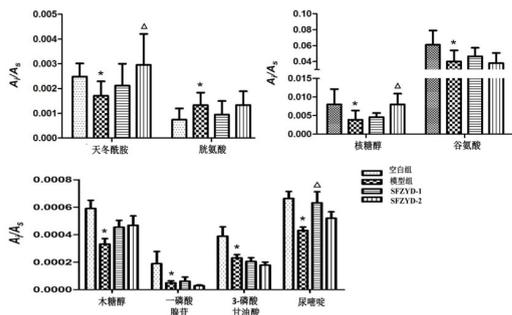
3.4 差异性代谢物筛选

以 $P<0.05, FC>1.2$ 为限定条件,找出空白组与模型组之间的差异性代谢物。最终确定的差异性代谢物包括谷氨酸、尿嘧啶、木糖醇、一磷酸腺苷、天冬酰胺、胱氨酸、3-磷酸甘油酸、核糖醇。图 3 展示了不同组别的差异性代谢物的相对含量变化。由图可知,在模型组大鼠血浆中,除胱氨酸含量升高外,其他 7 种潜在的生物标记物含量均降低。服用低剂量的少腹逐瘀汤后,除 3-磷酸甘油酸以外的因血瘀证导致失调的代谢物有恢复正常的趋势,高剂量的腹逐瘀汤可调节天冬酰胺、核糖醇等 4 种潜在的差异性代谢物,使其向正常水平回归。

3.5 代谢通路分析

将上述差异性代谢物导入 Mataboanalysis 3.0 进行代谢通路分析,分析结果显示这些代谢物涉及的通路包括组氨酸代谢,丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢,谷氨酰胺和谷氨酸代谢等。其中丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢,谷氨酰胺和谷氨酸代谢这两条代谢通路 $P<0.05$,通路影响值 Impact value>

0.1,表明血瘀证对这两条通路有较大影响。



注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

图3 不同组别大鼠血浆中差异性代谢物的相对含量变化

4 讨论

低剂量的少腹逐瘀汤可显著调节大鼠血浆中尿嘧啶的水平。尿嘧啶参与丙氨酸的合成,尿嘧啶被还原为二氢尿嘧啶后,水解生成丙氨酸^[10]。丙氨酸作为体内供能物质,当大鼠经历大量的耗能过程后,可能会间接的消耗大量尿嘧啶。服用低剂量的少腹逐瘀汤可使大鼠血浆中的尿嘧啶水平显著升高。低剂量的少腹逐瘀汤还可以调节胱氨酸、木糖醇、谷氨酸等代谢物的水平,使它们向正常水平发展。这些代谢物参与体内的氧化应激^[11]、合成产能物质^[12]或者自身为产能物质。

高剂量的少腹逐瘀汤可显著调节大鼠血浆中天冬酰胺以及核糖醇的含量。大鼠在冰水中运动耗能、运动后消耗体内产能物质来弥补散失的热量,使能量过度消耗,可能导致天冬酰胺、核糖醇在血瘀证大鼠体内代谢异常。天冬酰胺参与天门冬氨酸和谷氨酸代谢。天冬酰胺可以与天冬氨酸相互转化,天冬氨酸是合成延胡索酸(三羧酸循环中间体)的前体物质^[13]。谷氨酸可以与 α -酮戊二酸(三羧酸循环中间体)之间相互转化^[13]。与天冬酰胺含量的显著降低相对应,谷氨酸的含量也表现出显著下降。这两种氨基酸也是哺乳动物ATP的重要来源^[14],这两种氨基酸含量的显著降低,提示血瘀大鼠体内大量的能量消耗。核糖醇与能量代谢相关,其含量的显著性降低,提示在血瘀证大鼠体内存在糖代谢障碍^[15]。服用高剂量的少腹逐瘀汤可以纠正血瘀证导致的谷氨酰胺、核糖醇的代谢异常。此外,高剂量的少腹逐瘀汤还可以调节木糖醇、尿嘧啶的水平,使其向正常的方向转归。

低剂量少腹逐瘀汤对差异性代谢物的调节作用较为温和。除尿嘧啶外,虽然对其它差异性代谢物

的调节作用未表现出显著性差异,但可以调节除3-磷酸甘油酸外的所有差异性代谢物,使其向正常水平发展。高剂量的少腹逐瘀汤可能主要通过调节天冬酰胺以及核糖醇的水平,发挥对血瘀证的治疗效果。除木糖醇、尿嘧啶外,其他代谢物的水平未呈现回调趋势。

本实验从非靶标代谢组学的角度出发,从血瘀大鼠的血浆中发现了谷氨酸、天冬酰胺、核糖醇等潜在的生物标记物,这些代谢产物与氨基酸代谢、能量代谢密切相关。同时,也发现不同剂量的少腹逐瘀汤在发挥对血瘀证的治疗作用时,对于代谢物的调节程度不同。

参考文献:

- [1] 鲍那杰. 少腹逐瘀汤的现代研究进展[J]. 中医药导报, 2015, 21(22): 88-91.
- [2] LIAO J, LIU Y, WANG J. Identification of more objective biomarkers for Blood-Stasis syndrome diagnosis[J]. BMC Complem Altern M, 2016, 16(1): 371.
- [3] LEE H, CHOI TY, MYUNG CS, et al. Herbal medicine (Shaofu Zhuyu decoction) for treating primary dysmenorrhea: A systematic review of randomized clinical trials[J]. Maturitas, 2016, 86: 64-73.
- [4] WEN Y, WANG Y, FENG TT, et al. Differential proteomics analysis of endometriosis in blood stasis syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2017: 1-5.
- [5] 吴昱铮, 王广基, 郝海平. 中药代谢组学研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(2): 129-135.
- [6] 谢华里, 李培武, 王秀媛, 等. 非靶标代谢组研究温度对黄曲霉菌代谢的影响[J]. 分析测试学报, 2017, 36(11): 1304-1311.
- [7] 谢波, 邓海山, 喻斌, 等. 寒凝血瘀证大鼠模型的优化筛选研究[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(3): 262-265.
- [8] TSUGAWA H, CAJKA T, KIND T, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis[J]. Nat Methods, 2015, 12(6): 523-526.
- [9] LI HX, HAN SY, WANG XW, et al. Effect of the carthamins yellow from Carthamus tinctorius L. on hemorheological disorders of blood stasis in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(8): 1797-1802.
- [10] BROWN EG. Ring nitrogen and key biomolecules: The biochemistry of N-heterocycles[M]. Berlin: Springer, 1998:106.
- [11] ISOKAWA M, SHIMOSAWA T, FUNATSU T, et al. Determination and characterization of total thiols in mouse serum samples using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2016, 1019: 59-65.
- [12] CHEN X, JIANG ZH, CHEN S, et al. Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application[J]. Intern J Biol Sci, 2010, 6(7): 834-844.
- [13] 王浩. 生物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 193-195.
- [14] 黎育颖, 尹杰, 王利剑, 等. 谷氨酸和天冬氨酸对断奶仔猪生长性能和肠道功能的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(11): 3863-3869.
- [15] 程可. 抑郁大鼠嗅球的代谢组学研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.

(编辑:董宇)