

应用核磁共振代谢组技术研究生理性肾虚证

吴 斌¹ 沈自尹¹ 王丽丽² 黄建华¹ 张新民¹ 刘小雨¹ 夏世金¹

(1. 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所, 上海市乌鲁木齐中路 12 号, 200040;

2. 浙江中医药大学药学院)

[摘要] **目的** 观察生理性肾虚过程中尿液代谢物的特征性变化, 以及补肾中药淫羊藿总黄酮(EF)的干预作用。**方法** 收集4、10、18、24月龄组和EF干预组SD大鼠的尿液进行¹H核磁共振检测, 分别采用T²检验和趋势过滤法筛选生理性肾虚证的特征性代谢物, 同时观察EF对这些代谢物的影响。**结果** 筛选了34个与生理性肾虚证密切相关的谱峰, 并鉴定了13个代谢物; 发现生理性肾虚进程中存在明显的代谢差异, EF能明显地改变生理性肾虚进程中的代谢物轨迹。**结论** 生理性肾虚证是和多个代谢途径相关, 补肾可能改善了部分代谢途径, 代谢组学技术为生理性肾虚证的研究提供了新的手段和方法。

[关键词] 肾虚证; 代谢组学; 淫羊藿总黄酮; 时间点; 衰老

Application of Nuclear Magnetic Resonance Metabonomic Technique in the Study on Physiological Kidney Deficiency Syndrome

WU Bin¹, SHEN Ziyin¹, WANG Lili², et al.

(1. Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040; 2. College of Pharmacy, Zhejiang University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe the specific changes of urine metabolite in the process of physiological kidney deficiency and the effect of flavone of Herba Epimedii (EF) which functions to reinforce the kidney. **Methods** The urine of SD rats of 4, 10, 18, 24 months old rats with EF intervention were collected. The urine was examined by ¹H nuclear magnetic resonance and the specific metabolite of physiological kidney deficiency syndrome was selected by T² test and tendency filtration method. At the same time, the effect of EF on the metabolite was observed. **Results** The 34 spectrum peaks related to physiological kidney deficiency syndrome were selected and 13 metabolites were determined, finding that the significant difference of metabolism existed in the process of physiological kidney deficiency and EF could change the orbit of metabolites. **Conclusion** The physiological kidney deficiency syndrome is related with multiple metabolic ways, reinforcing the kidney may improve some of these metabolic ways. The metabonomic technique provides a new way for studying the physiological kidney deficiency syndrome.

Key Words Kidney deficiency syndrome; Metabonomic; Flavone of Herba Epimedii (EF); Time point; Aging

在我们以往的系列研究中, 发现衰老和肾虚在神经内分泌免疫网络, 尤其在下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺(HPAT)轴的许多重要指标上存在甚为相似的变化^[1], 据此提出“衰老是生理性肾虚”^[2]。自古至今, 补肾法都是中医药用以延缓衰老的重要方法之一, 缘于肾虚是衰老之本。围绕生理性肾虚证又开展了系列的基因表达谱研究(转录组)^[3,4], 根据系统生物学的思想^[5], 本研究从代谢组的角度探讨生理性肾虚证及补肾的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用清洁级雄性SD大鼠50只(190~220g, 8周龄), 由复旦大学实验动物科学部提供, 许可证号: SCXK(沪)2007-0002。

1.2 药物与仪器

采用辽宁产朝鲜淫羊藿(Epimedium Kereanum Nakai), 由第二军医大学药学院天然化学室提取淫羊藿总黄酮(EF), 实验时用蒸馏水配制浓度为30g/L的溶液。Bruker Avance II 600兆超导脉冲傅里叶变换NMR谱仪, 购自瑞士Bruker Spectrospin AG公司。

1.3 动物分组及给药方法

动物购买后适应性喂养1周, 采用成组设计方案, 根据大鼠体重随机分为4月龄组、18月龄组、10月龄组、24月龄组和EF干预组, 共5组, 每组10只。EF干预组从21月龄给予淫羊藿总黄酮灌胃(0.06g·kg⁻¹·d⁻¹), 灌胃时间为3个月, 直到处死前4天停药; 24月龄组同时给予蒸馏水灌胃, 实验期间所有动物自由摄食、饮水。动物饲养房条件为自然明暗周期, 室温19℃~23℃, 相对湿度为45%~70%。

1.4 尿液的收集和处理

采用代谢笼法, 各组大鼠处死前一天收集大鼠24h尿液, 收集管内加入1%NaN₃溶液作为防腐剂。对收集

的尿液进行 3000r/min 离心 10min 去除固体杂质,取上清液,置于-80℃冰箱中保存备用。

NMR 测量前样品准备:在 400 μl 尿样中加入 200 μl 缓冲液(0.2M Na₂HPO₄/0.04M NaH₂PO₄, pH = 7.4),放置 10min, 4℃、8000r/min 离心 5min;取上清液 500 μl,添加 50 μl D₂O, 5 μl 0.1% TSP;转入 5ml 样品管中进行测试。

1.5 NMR 数据采集与分析

参照文献[6]方法进行数据采集与分析。数据在 Bruker Avance II 600 超导脉冲傅里叶变换 NMR 谱仪上采集。采用有预饱和的 1 NOESY 脉冲序列,取如下参数:谱宽 7000Hz,混合时间 2.04s,弛豫延迟时间 3.04s,采样点数 64K,累加次数 128 次;在弛豫延迟期间采用预饱和方式抑制水峰,谱仪偏置设置在水峰的位置。FID 信号经过傅里叶变换转换为 NMR 图谱,所用窗函数为 0.3Hz 线增宽因子。以 TSP 为化学位移参考峰的位置,设定为 0。将各样本的 1D NMR 数据依次进行相位校正、基线校正和化学位移校正;对校正后的 1D NMR 数据按默认范围(从 0.7~9.5ppm,每段为 0.02ppm)进行分段积分,同时排除以溶剂峰为中心的部分(4.6~5.05ppm)、尿素峰的部分(5.6~5.9ppm)和包含 TPS 峰的部分(0~0.7ppm, 1.6~1.8ppm),最后获得 393 谱峰值。对所产生的所有积分数以均数为中心和 pareto 方法进行标准化,以 Excel 文件格式贮存。

采用 MATLAB7.0 分析平台,自编程序进行分析:①筛选生理性肾虚特征代谢物:首先对 393 谱峰值进行方差分析,获得 221 谱峰值($P < 0.05$),一方面将上述得到的数据采用主成分分析(Principal component analysis, PCA),取前 3 个成分进行 Hotelling's T^2 检验筛选出生理性肾虚的相关代谢物;另外鉴于 PCA 的方法往往强调变化大的变量,这就容易导致忽略一些变化小,而在生理性肾虚进程中具有重要作用的代谢物,故又采用趋势过滤的方法筛选随月龄逐渐升高或下降的特征性代谢物。综合上述结果获取生理性肾虚的特征代谢物。②EF 对生理性肾虚的干预作用分析:对 5 组 50 个样本进行 PCA 分析,比较不同月龄组大鼠之间的代谢轨迹(metabonomic trajectory)的差异,并观察 EF 对肾虚进程代谢轨迹的影响;此外还比较 EF 对趋势过滤方法筛的特征性代谢物的影响。

2 结果

2.1 生理性肾虚证的特征性代谢物和 EF 的干预作用

图 1 示,典型的 ¹H NMR 光谱中,被标示的谱峰代

表了生理性肾虚过程中尿液的内分泌成分。通过 PCA 分析,前 3 个成分被提取出来(达到总变量的 60.6%),从图 2-A 中我们可以发现,4、10、18 和 24 月龄组之间是彼此分开的,说明尿液的内分泌代谢谱能够反映生理性肾虚的进程,EF 干预组的代谢显著地偏离了 24 月龄组,表明 EF 改变了生理学肾虚进程的代谢特征,一个类似的结果可以在图 2-B(均值代谢物轨迹图)中发现。

使用 Hotelling's T^2 ,筛选出 12 个重要谱峰,通过研究文献比对,可以确定 6 个代谢物,它们是醋酸盐(acetate)、二甲基甘氨酸(dimethylglycine)、肌酐(creatinine)、氧化三甲胺(TMAO)、尿囊素(alantoin)和葡萄糖。

趋势过滤方法发现 25 个具有上升或下降趋势的谱峰值,EF 逆转了其中 21 个谱峰的趋势,占 84%,通过文献比对,其中可以鉴定 9 个代谢物:缬氨酸(valine)、乳酸盐(lactate)、丙氨酸(L-alanine)、N-乙酰糖蛋白(N-acetylgluco protein)、琥珀酸盐(succinate)、氧化三甲胺(TMAO)、N-甲烟酸内盐(Trigonelline)、马尿酸盐(Hippurate)和葡萄糖(见表 2)。和前述 T^2 分析结果比较,有 3 个谱峰和 2 种代谢物重复,故总共获得 34 个谱峰和 13 种代谢物被鉴定。

2.2 代谢通路分析

KEGG 数据库为代谢物从代谢途径的水平理解细胞或组织的生物学意义提供了生物信息资源^[7]。将 13 种已鉴定的代谢物输入 KEGG 数据库,可以发现 6 个代谢物涉及到 14 条代谢通路,表 3 示,这些代谢物主要与氨基酸和糖代谢相关。

3 讨论

中医认为,“肾”为先天之本,主生长、发育,《素问·上古天真论》中以女子七、男子八为基数描述了人体的生长、发育、壮盛、衰老曲线,因此,从衰老入手来研究肾虚不失为一个捷径。大鼠平均寿命约 30 个月,若人的寿命以 100 岁计算,24 月龄大鼠约等于人的 75 岁,故本研究选择 24 月龄作为肾虚模型。

本研究中应用 NMR 结合多元分析的方法研究生理性肾虚的特征性代谢物,获得了 34 谱峰,鉴定了 13 个代谢物。Williams 等^[8]的研究结果和本研究获得的结果相比有一定差异,比如马尿酸盐在前者研究中是随着年龄的增加而增加,但在本研究中却是下降。分析原因可能有二,一是时间跨度不同,在前者的研究中,只取了 4 周到 20 周(相当与 4 月龄)的大鼠,即大鼠最大月龄正处于青春期,本研究是从 4 月到 24 月,达到了真正的衰老期;二是二次实验所用大鼠的种系不一

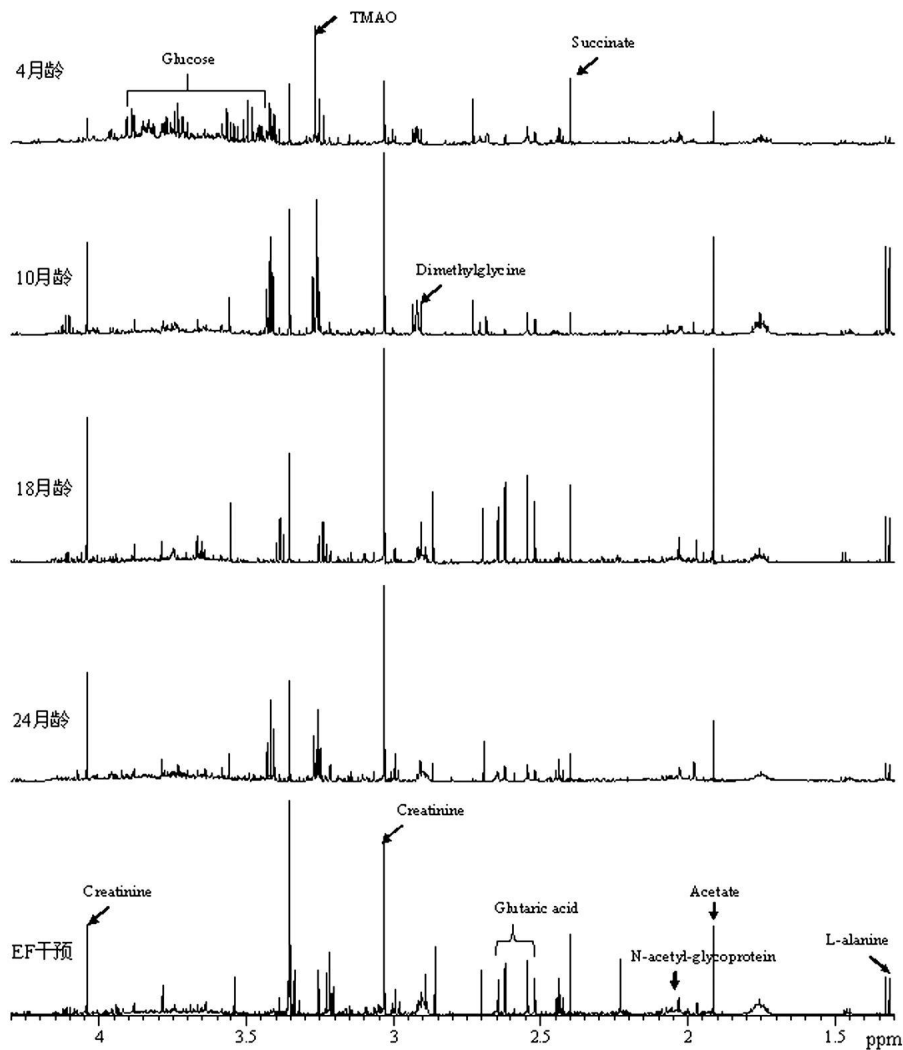


图1 各组动物尿液¹H NMR 代谢谱

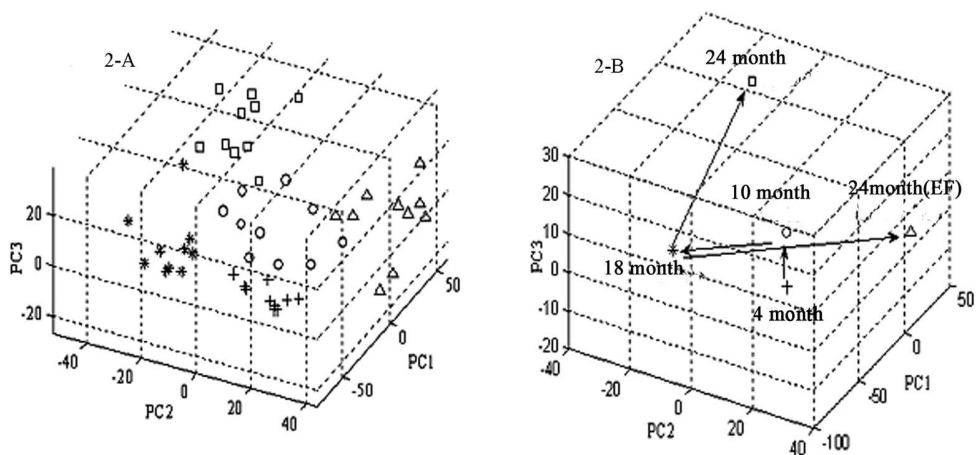


图2 各组大鼠尿液主成分分析图

注: +: 4 月龄; O: 10 月龄; *: 18 月龄; □: 24 月龄; △: EF 干预

样, 本研究是 SD 大鼠, 前者用的是 Wistar 大鼠, 而不同品系的动物是代谢物差异的重要原因之一。
由于生理性肾虚与衰老具有密切的关系, 根据衰老研究文献, 在这次研究涉及的 14 条代谢途径中, 丙酮酸盐和氧化磷酸化代谢途径与衰老具有明确的联系。有文献报道, 衰老可以由 ATP 合成的线粒体 DNA

表1 Hotelling's T² 检验筛选的生理性肾虚证相关的代谢物($x \pm s$)

代谢物	化学位移	相对含量				
		4月龄组	10月龄组	18月龄组	24月龄组	EF干预组
醋酸盐	1.90~1.92	5.89±0.78	21.45±11.50	8.26±4.06	9.60±4.57	21.17±8.37
—	2.22~2.24	3.32±0.28	3.53±0.49	3.39±0.34	19.05±5.94	5.75±1.32
—	2.72~2.74	7.30±0.72	4.33±2.11	6.28±1.08	2.79±1.73	2.44±1.07
二甲基甘氨酸	2.88~2.90	2.22±0.50	6.83±2.74	4.24±2.81	8.48±3.40	11.74±4.96
—	2.92~2.94	9.19±1.54	8.77±4.64	21.01±6.42	5.03±2.96	5.75±1.12
肌酐	3.02~3.04	21.95±2.80	41.85±3.90	44.65±5.18	37.55±4.24	35.25±6.50
氧化三甲胺	3.24~3.26	9.46±1.77	16.15±7.54	21.89±5.44	30.08±6.14	11.05±4.68
葡萄糖	3.26~3.28	21.25±3.21	10.14±4.79	18.73±4.85	11.34±2.09	3.82±2.00
—	3.40~3.42	8.81±2.48	10.72±3.54	17.90±3.62	18.53±5.08	9.65±3.50
—	3.70~3.72	13.65±2.57	8.11±1.27	9.35±1.64	8.80±1.63	7.02±1.44
—	3.82~3.84	15.37±2.97	7.50±1.91	8.92±2.18	7.98±1.38	7.02±1.50
—	3.84~3.86	12.68±2.05	7.17±2.20	7.79±1.61	7.87±1.59	6.80±1.91
肌酐	4.04~4.06	9.02±0.96	21.23±2.08	17.93±2.09	17.20±1.61	18.14±2.71
尿囊素	5.90~5.92	0.78±0.43	1.69±0.62	4.94±0.82	2.25±0.33	1.13±0.18
—	6.04~6.06	1.21±0.36	1.03±0.33	6.62±1.90	1.07±0.22	0.85±0.18
—	7.34~7.36	6.22±1.19	6.74±1.44	7.00±1.95	3.85±1.05	4.22±1.11

注: $P < 0.05$ 为有统计学意义, —:代表未知代谢物

表2 趋势过滤方法筛选的生理性肾虚证相关的代谢物

代谢物	化学位移	相对含量					EF干预组	EF干预趋势
		4月龄组	10月龄组	18月龄组	24月龄组	年龄变化趋势		
缬氨酸	0.84~0.86	1.83±0.26	2.71±0.78	2.81±1.14	3.22±0.81	↑	2.34±0.36	↓
—	0.86~0.88	2.75±0.31	3.39±0.61	3.78±1.27	4.08±0.89	↑	3.34±0.44	↓
—	0.94~0.96	1.78±0.19	1.85±0.25	1.95±0.16	2.44±0.67	↑	2.42±0.48	↓
乳酸盐	1.20~1.22	1.99±0.26	2.22±0.11	2.28±0.21	2.35±0.39	↑	2.32±0.17	↓
丙氨酸	1.28~1.30	2.51±0.33	2.51±0.22	2.74±0.56	2.80±0.38	↑	2.31±0.15	↓
—	1.40~1.42	1.93±0.27	1.98±0.20	2.04±0.23	2.32±0.47	↑	2.10±0.28	↓
—	1.48~1.50	1.93±0.24	2.15±0.23	2.35±0.41	2.41±0.47	↑	2.10±0.21	↓
N-乙酰氨基酸蛋白	2.00~2.02	5.29±0.92	4.18±0.32	4.15±0.27	4.11±0.46	↓	4.29±0.32	↑
—	2.30~2.32	3.51±0.59	3.07±0.47	2.88±0.29	2.83±0.43	↓	2.82±0.29	↓
琥珀酸盐	2.38~2.40	9.09±1.55	7.34±3.35	5.65±0.98	5.22±0.77	↓	6.08±1.26	↑
氧化三甲胺	3.24~3.26	9.46±1.77	16.15±7.54	21.89±5.44	30.08±6.14	↑	11.05±4.68	↓
葡萄糖	3.40~3.42	8.81±2.48	10.72±3.54	17.90±3.62	18.53±5.08	↑	9.65±3.50	↓
—	3.42~3.44	9.50±2.50	12.64±7.63	12.91±5.34	14.30±6.89	↑	5.40±1.18	↓
—	3.52~3.54	6.59±0.89	5.25±1.75	4.92±0.76	4.16±0.32	↓	5.96±1.49	↑
—	3.64~3.66	12.45±0.65	10.67±1.59	9.23±0.85	8.81±0.88	↓	10.48±1.93	↑
—	5.24~5.26	1.57±0.42	1.20±0.37	1.13±0.19	0.83±0.19	↓	3.02±1.25	↑
—	4.12~4.14	5.62±0.50	4.93±1.07	4.44±0.69	4.35±0.39	↓	4.59±0.71	↑
N-甲烟酸内盐	4.44~4.46	2.10±0.30	1.70±0.20	1.65±0.16	1.60±0.22	↓	1.48±0.39	↓
—	4.46~4.48	1.95±0.72	1.68±0.24	1.58±0.22	1.31±0.17	↓	1.36±0.34	↑
—	4.50~4.52	1.56±0.25	1.51±0.22	1.45±0.15	1.30±0.24	↓	1.17±0.32	↓
—	4.52~4.54	1.13±0.25	1.12±0.23	1.01±0.11	0.89±0.22	↓	0.96±0.38	↑
—	5.08~5.10	0.92±0.20	0.86±0.16	0.77±0.13	0.63±0.11	↓	1.45±0.35	↑
—	5.10~5.12	1.00±0.27	0.85±0.10	0.75±0.09	0.67±0.09	↓	1.49±0.39	↑
—	7.14~7.16	1.79±0.20	1.66±0.27	1.41±0.19	1.40±0.24	↓	1.81±0.20	↑
—	7.16~7.18	1.87±0.14	1.78±0.17	1.69±0.29	1.56±0.20	↓	1.48±0.12	↓
—	7.22~7.24	1.53±0.09	1.40±0.21	1.26±0.27	1.25±0.18	↓	1.34±0.14	↑
—	7.24~7.26	2.19±0.20	1.54±0.09	1.44±0.25	1.42±0.16	↓	1.70±0.24	↑
—	7.30~7.32	2.14±0.28	2.06±0.57	1.92±0.44	1.47±0.16	↓	1.70±0.24	↑
马尿酸盐	7.48~7.50	2.25±0.49	2.24±0.34	1.73±0.37	1.58±0.30	↓	1.80±0.37	↑
—	7.68~7.70	1.09±0.38	1.05±0.17	1.03±0.29	0.92±0.13	↓	1.32±0.26	↑

注: ↑:随年龄升高, ↓:随年龄降低, —:未知代谢物。

表 3 生理性肾虚证代谢物涉及的代谢途径		
化合物编号代谢物	代谢途径	功能分类
C00033 醋酸盐	糖酵解/糖异生	糖代谢
	丙酮酸代谢	糖代谢
C01026 二甲基甘氨酸	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	氨基酸代谢
C00183 缬氨酸	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸降解	氨基酸代谢
	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸合成	氨基酸代谢
	硒胺酸代谢	氨基酸代谢
	泛酸与 CoA 生物合成	辅酶因子和维生素代谢
C00186 乳酸盐	糖酵解/糖异生	糖代谢
	丙酮酸代谢	糖代谢
C00041 丙氨酸	丙氨酸和天冬氨酸代谢	氨基酸代谢
C00042 琥珀酸盐	谷氨酸代谢	氨基酸代谢
	氧化磷酸化	能量代谢
	碳固定	能量代谢
	三羧酸循环	糖代谢
	丙酸代谢	糖代谢
	丁酸代谢	糖代谢

突变堆积而引起,ATP 生成不足就会损害细胞功能,进而影响组织功能,甚至坏死^[10,11]。丙酮酸盐代谢直接影响了线粒体功能的异常,在衰老状态下,丙酮酸盐载体和丙酮酸盐呼吸效率均下降(大约 40%)^[12],本次研究中有两个代谢物涉及到丙酮酸盐代谢,其主要影响从乳酸盐到醋酸盐的局部代谢途径,在衰老过程中,大鼠尿液中分泌的乳酸盐含量增加,而醋酸盐的含量下降,EF 干预后,这种趋势被逆转,这也许暗示了 EF 抗衰老的作用机制。在氧化磷酸化代谢途径中,琥珀酸盐是一个重要的底物,随着衰老的进展,其含量逐渐下降,EF 干预能明显增加其含量。上述代谢途径分析表明,EF 能将生理性肾虚的代谢物有助于重塑到年轻水平,可能与促进了线粒体的呼吸,增加了 ATP 的产量,最终延缓衰老有关。据此我们推断,人体生理性肾虚证是和多个代谢途径相关,补肾可能改善了部分代谢途径。

本研究应用代谢组技术研究生理性肾虚证的特征代谢物及代谢途径,获得了一批有意义的代谢物。尽管代谢组检测的是代谢组分的集合,尤其指小分子物质,具有高通量分析和低实验成本的优势,但由于目前国际上代谢物数据库还很不完善,从而影响了本研究对肾虚证内涵的更深入了解。相信随着代谢组技术及代谢物数据库的不断完善,代谢组对于探索和丰富中医证候的机制必然具有良好的前景。

参考文献

[1]沈自尹·肾虚与衰老的研究[J]·中医杂志,1987,28(10):

57—59.

[2]张新民,沈自尹,王文健,等·补肾中药对老年神经—内分泌和免疫系统作用机理的研究[J]·中国中西医结合杂志,1994,14(11):686—689.

[3]沈自尹,张新民,林伟,等·基于基因表达谱数据建立肾虚证量化数学模型[J]·中国中西医结合杂志,2008,28(2):131—134.

[4]沈自尹,黄建华,陈伟华·以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究[J]·中国中西医结合杂志,2007,27(2):135—137.

[5]沈自尹·系统生物学和中医证的研究[J]·华夏医药,2007,2(1):3—6.

[6]Viant MR, Lyeth BG, Miller MG, et al· An NMR metabolomic investigation of early metabolic disturbances following traumatic brain injury in a mammalian model[J]· NMR Biomed, 2005, 18(8):507—516.

[7]Okuda S, Yamada T, Hamajima M, et al· KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways[J/OL]· Nucleic Acids Res, 2008, 36(Web Server issue): W423—426.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2447737>.

[8]Williams RE, Lenz EM, Lowden JS, et al· The metabolomics of aging and development in the rat: an investigation into the effect of age on the profile of endogenous metabolites in the urine of male rats using ¹H NMR and HPLC-TOF MS[J]· Mol Biosyst, 2005, 1(2):166—175.

[9]Williams RE, Lenz EM, Rantalainen M, et al· The comparative metabolomics of age-related changes in the urinary composition of male Wistar-derived and Zucker (fa/fa) obese rats[J]· Mol Biosyst, 2006, 2(3—4):193—202.

[10]Seo AY, Xu J, Servais S, et al· Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences[J]· Aging Cell, 2008, 7(5):706—716.

[11]Jendrach M, Pohl S, Voth M, et al· Morpho-dynamic changes of mitochondria during ageing of human endothelial cells[J]· Mech Ageing Dev, 2005, 126(6—7):813—821.

[12]Paradies G, Petrosillo G, Gadaleta MN, et al· The effect of aging and acetyl-L-carnitine on the pyruvate transport and oxidation in rat heart mitochondria[J]· FEBS Lett, 1999, 454(3):207—209.

(收稿日期:2008—03—14;修回日期:2009—01—13)

[编辑:行之]

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的质量要求生产,符合药用各项指标,有 0 号、1 号、2 号等型号,多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务。价格:每万粒 135 元(含邮资)。

地址:浙江新昌县一诺胶囊有限公司,邮政编码:312560
电话:(0575) 86061888,013706852676,联系人:潘炎锋