

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2015.11.017

疏肝健脾方对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝脏代谢组学的影响

高家荣^{*}, 陈金锋², 姜 辉¹, 韩燕全¹

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽省合肥市梅山路 117 号, 230031; 2. 安徽省六安市中医院)

摘要 目的 从代谢组学的角度探讨疏肝健脾方防治肝纤维化的可能作用机制。方法 15 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、疏肝健脾方组, 每组 5 只。模型组和疏肝健脾方组皮下注射 50% 四氯化碳溶液 0.1 ml/100 g, 每周 2 次, 连续 12 周, 复制大鼠肝纤维化模型。造模第 1 天起, 疏肝健脾方组给予疏肝健脾方 16.2 g/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予等量生理盐水。每天 1 次, 连续 16 周。末次给药后处死大鼠, 取肝组织观察病理学变化, 采用气相色谱-飞行时间质谱联用技术分析其代谢谱变化, 鉴定差异化合物并进行相关代谢通路分析。结果 模型组大鼠肝组织见有少量的脂肪空泡变性, 结缔组织增生, 炎性细胞浸润, 可见非典型的假小叶形成; 疏肝健脾方组未见大范围的脂肪空泡, 仅有少量炎性细胞浸润, 肝纤维化明显好转。与正常组比较, 模型组中共发现棕榈酸、二十碳烯酸、苹果酸、延胡索酸、谷氨酰胺、盐德草碱、N-乙酰-4-氨基丁酸、葡萄糖酸 8 个生物标志物; 与模型组比较, 疏肝健脾方能够使 8 个生物标志物向正常水平靠近。结论 疏肝健脾方对肝纤维化大鼠有一定的保护作用, 其机制可能与调节能量代谢、酪氨酸代谢、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、糖代谢紊乱有关。

关键词 肝纤维化; 疏肝健脾方; 代谢组学; 肝脏代谢谱; 气相色谱-飞行时间质谱联用技术

肝纤维化是继发于各种慢性肝脏疾病之后组织修复过程中的代偿反应^[1-2]。代谢组学是通过对内源性代谢物种类及数量变化的分析, 将人体作为一个完整的体系来研究, 应用全面性系统策略解读疾病过程和机制。因此, 将代谢组学方法应用于中药作用机制等研究领域, 有可能探索出中医药现代化研究的新方法和新途径。本研究旨在通过气相色谱-飞行时间质谱联用 (GC-TOF MS) 技术研究四氯化碳 (CCl₄) 诱导的肝纤维化大鼠肝脏代谢谱变化, 并对其代谢通路进行分析, 探索疏肝健脾方抗肝纤维化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

疏肝健脾方由茵陈 13.5 g、板蓝根 10.0 g、白芍 8.1 g、薏苡仁 10.0 g、北柴胡 6.7 g、白术 6.7 g、枳壳 6.7 g、猪苓 6.7 g、茯苓 6.7 g、黄芪 6.7 g、泽兰 6.7 g 组成; CCl₄: 天津市富宇精田化工有限公

司, 批号: 12020; L-2-氯苯丙氨酸: 上海恒柏生物科技有限公司, 货号: 103616-89-3; 4% 多聚甲醛: 北京索莱宝科技有限公司, 批号 20121113; 甲醇: 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20130129; 三氯甲烷: 天津市福晨化学试剂厂, 批号: 20100512。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠 15 只, 雄性, 6~7 周龄, 体重 180~220 g, 购于安徽医科大学实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK (皖) 2011-002。动物自由进食、饮水, 喂标准颗粒饲料, 室温 18~22℃, 相对湿度 40%~60%, 自然光照环境中饲养, 常规观察 1 周后实验。

1.3 仪器

GL-20A 全自动冷冻高速离心机: 湖南仪器仪表总厂离心机厂; GL-88B 漩涡混合器: 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司; 7890A GC 色谱仪: 美国安捷伦科技公司; Pegasus 4D 质谱仪: 美国 LECO 公司; -80℃ 超低温冰箱: 三洋公司; KDC-16H 高速离心机: 科大创新股份有限公司中佳分公

基金项目: 国家自然科学基金 (81102874)

* 通讯作者: zyfygj2006@163.com, (0551) 62838556

司; 37°C 温箱: 湖北省黄石市医疗器械厂; Moticam AE31 多功能光学显微镜: 上海新振仪器设备有限公司。

1.4 动物分组与处理方法

大鼠适应性饲养 1 周后, 按随机数字表将其分为正常组、模型组、疏肝健脾方组, 每组 5 只。模型组和疏肝健脾方组分别于大鼠背部皮下注射 50% CCl_4 0.1 ml/100 g, 每周 2 次, 连续 12 周, 复制肝纤维化动物模型^[3-4]。造模第 1 天起, 疏肝健脾方组给予疏肝健脾方 16.2 g/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予等量生理盐水。每天 1 次, 连续 16 周。

1.5 肝脏病理组织学观察

末次给药后处死大鼠, 取固定部位肝组织, 置于 4% 多聚甲醛液中固定, 48 h 后常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、HE 染色、脱水、透明、封片, 光学显微镜下观察病理组织学改变。

1.6 GC-TOF MS 检测

麻醉处死大鼠, 取 100 mg 肝脏组织样本于 2 ml 离心管里, 加入 50 μl L-2-氯苯丙氨酸; 后加入 0.35 ml 甲醇氯仿混合液 (3:1), 70 Hz 研磨仪处理 5 min; 将样本 4°C、12 000 r/min 离心 15 min, 取出 0.35 ml 上清于 2 ml 进样瓶 (甲烷硅基化的) 中, 在真空浓缩器中干燥提取物, 向干燥代谢物加入 80 μl 甲氧胺盐试剂 (甲氧胺盐酸盐, 溶于吡啶 20 mg/ml), 轻轻混匀后, 放入烘箱中 37°C 孵育 2 h, 向每个样品中迅速加入 100 μl BSTFA (含有 1% TCMS), 将混合物 70°C 孵育 1 h, 冷却至室温, 供 GC-TOF MS 分析。分析条件: 柱温: 80°C 维持 0.2 min, 以每分钟 10°C 递增到 180°C, 再以每分钟 5°C 递增到 240°C, 最后以每分钟 20°C 递增到 290°C, 290°C 维持 11 min; 进样量: 1 μl , 进样口温度: 280°C; 接口温度: 270°C; 离子源 (EI) 温度: 220°C; 不分流进样; 电离电压: -70 eV; 载气: 高纯氦气, 3.0 ml/min; 扫描方式: 全扫描, 20~600 m/z。使用 Chroma TOF 4.3X 软件卷积峰的面积, 使用 LECO-Fiehn Rtx5 数据库识别感兴趣的峰。

1.7 数据分析

采用 Chroma TOF 4.3X 软件和 LECO-Fiehn Rtx5 数据库进行峰提取、峰基线过滤和校准、峰对齐、反褶积分分析及峰识别和集成分析。将共有峰的相对峰面积导入 SIMCA-P⁺ V11.0 (Umetrics AB, Umea, Sweden) 软件, 经归一化处理后进行

主成分分析 (PCA)、偏最小二乘方 - 判别模式 (PLS-DA)、正交偏最小二乘方 - 判别模式 (OPLS-DA) 识别分析; 本实验应用 *Student-t* 检验处理所得的 GC-TOF MS 数据。

2 结果

2.1 各组大鼠病理组织学改变

HE 染色显示: 正常组肝细胞结构清晰, 肝细胞核大而圆, 核膜清晰, 核仁明显, 胞质丰富, 肝索排列规则有序, 无胶原纤维增生沉积; 模型组见有少量的脂肪空泡变性, 结缔组织增生, 炎性细胞浸润, 可见非典型的假小叶形成; 疏肝健脾方组干预后未见大范围的脂肪空泡, 结缔组织增生减少, 仅有少量炎性细胞浸润, 肝纤维化呈现明显好转的趋势。

2.2 各组大鼠治疗后肝脏样品总离子图

图 1 示, 正常组与模型组图谱明显不同, 而正常组与疏肝健脾方组图谱较相似。通过 GC-TOF MS 分析所有的肝脏样品, 经过 LECO-Fiehn Rtx5 对峰进行识别后, 总共得到 555 种代谢化合物, 再通过 Chroma TOF 4.3X 软件对数据校正后补齐空白值, 消除数据噪音, 然后用内标归一, 最终得到 555 种代谢化合物。为了进一步说明代谢谱的不同, 我们对代谢谱进行预处理并运用模式识别技术对其进行分析。

2.3 各组大鼠肝脏样本 PLS-DA 分析

为了理解 3 组代谢谱之间总的趋势, 我们选取样本进行 PCA 分析。PCA 结果没有显示满意分离, 为了获取更加理想的组间分离及增强对分类贡献大的变量的识别, 我们进一步进行了有监督的 PLS-DA 分析。PLS-DA 得分图比 PCA 得分图获得了更好的分离, 如图 2 所示, 从该图可以看出模型组与正常组被明显区分开来。我们通过 7 折交叉验证法去评估该模型的解释率和预测能力大小。从 SIMCA-P⁺ V11.0 软件获得的分类参数 $R^2Y = 0.902$, $Q^2 = 0.419$ (图 2A); $R^2Y = 0.941$, $Q^2 = 0.644$ (图 2B); $R^2Y = 0.938$, $Q^2 = 0.688$ (图 2C), 可见该模型稳定性、拟合能力及预测能力均较好。之后通过排列实验随机多次 ($n = 200$) 改变分类变量 y 的排列顺序得到相应不同的随机 Q^2 值对模型有效性做进一步的检验。通过排列实验获得的 $R^2Y = 0.905$, $Q^2 = 0.171$; $R^2Y = 0.946$, $Q^2 = 0.149$; $R^2Y = 0.929$, $Q^2 = 0.345$, 该值表明此模型是可靠的, 模型未存在过拟合现象。

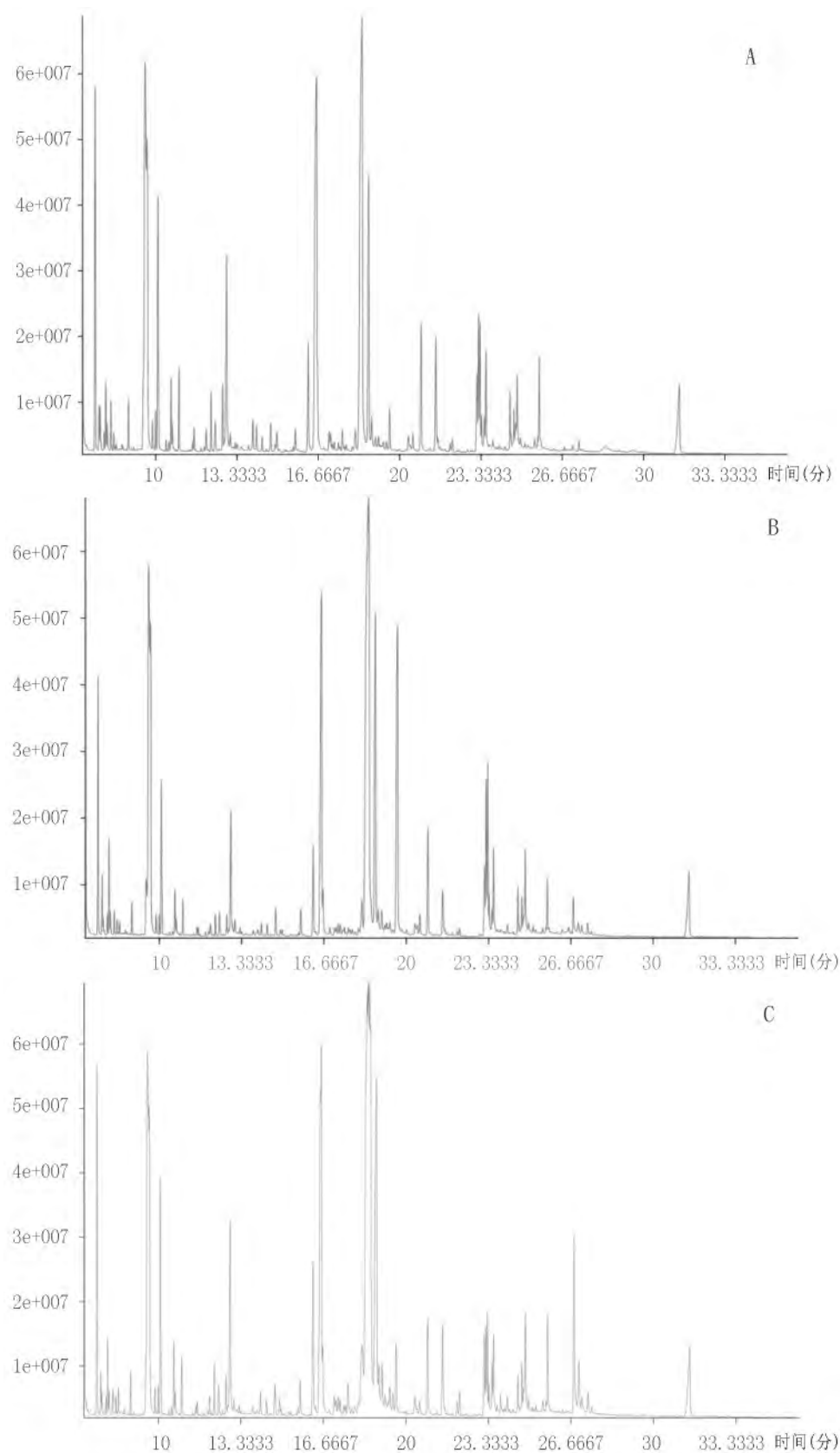


图 1 各组大鼠肝脏样品总离子图
注：A：正常组；B：模型组；C：疏肝健脾方组

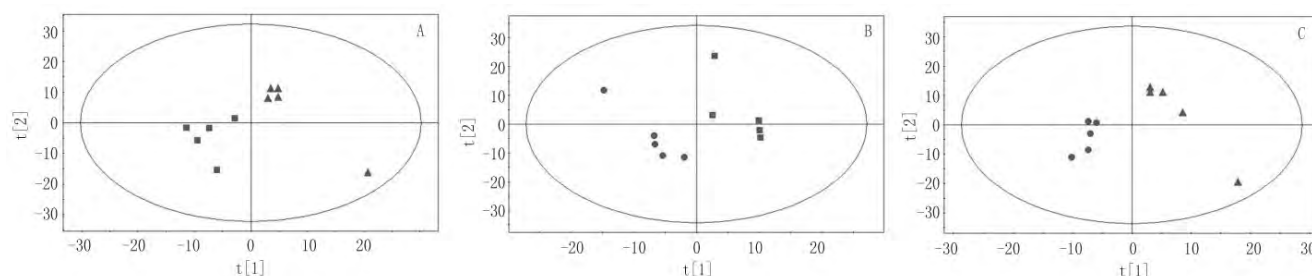


图 2 各组大鼠肝脏组织 PLS-DA 得分图

注: ▲正常组; ■模型组; ●疏肝健脾方组

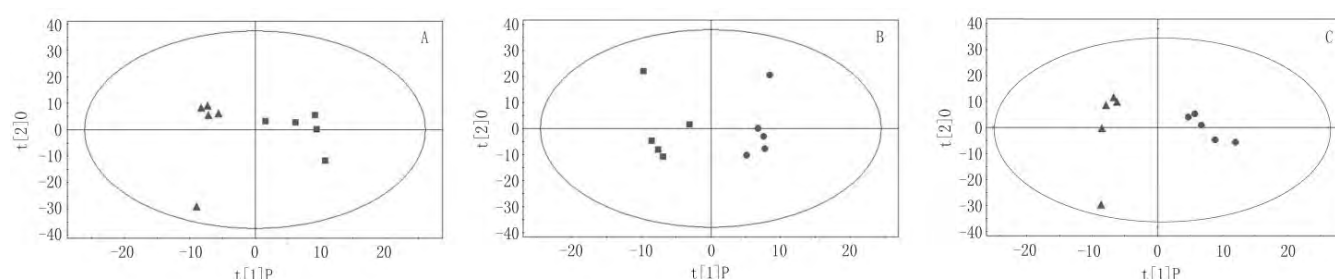


图 3 各组大鼠肝脏组织 OPLS-DA 得分图

注: ▲正常组; ■模型组; ●疏肝健脾方组

2.4 各组大鼠肝脏样本 OPLS-DA 分析

为了最大化地凸显模型内部不同组别之间的差异,我们通过对 PLS-DA 模型进行正交矫正处理,构建了 OPLS-DA 图,如图 3 所示。从该图可以看出模型组与正常组被明显区分开来。基于 OPLS-DA 得分图构建载荷图,其目的是为了说明变量对组间差异贡献的大小,同时从载荷图也能得出重要变量(如果此变量离图中心越远,表明该变量对组间差异贡献越大),但由于载荷图所含变量较多,较复杂,因此在此未展示。

2.5 各组大鼠肝脏生物标志物的筛选及鉴定

将 VIP (变量重要性投影值) > 1 及 $P < 0.05$ 的化合物筛选出来作为差异性化合物。利用 LECO-Fiehn Rtx5 数据库对具有明显差异的化合物进行结构鉴定。基于以上分析,二十碳烯酸、棕榈酸、葡萄糖酸、苹果酸、延胡索酸、N-乙酰-4-氨基丁酸、谷氨酰胺、盐德草碱 8 个内源性代谢物被筛选出来作为具有明显差异的化合物。其中,与正常组比较,苹果酸、延胡索酸、谷氨酰胺、盐德草碱、N-乙酰-4-氨基丁酸、葡萄糖酸含量在模型组中升高,而棕榈酸、二十碳烯酸含量在模型组中降低;与模型组比较,经过疏肝健脾方干预后,上述内源性代谢物的含量均明显有向正常组转归的趋势。结果如表 1 所示。

表 1 大鼠肝脏生物标志物及其变化趋势

序号	VarID	可能化合物	RT	VIP	模型组	疏肝健脾方组
1	66	盐德草碱	8.82042	2.56623	↑	↓
2	108	谷氨酰胺	10.0299	2.10063	↑	↓
3	110	N-乙酰-4-氨基丁酸	10.0884	1.39216	↑	↓
4	129	延胡索酸	10.5361	2.33769	↑	↓
5	197	苹果酸	12.2640	2.18948	↑	↓
6	369	葡萄糖酸	19.3321	2.04286	↑	↓
7	397	棕榈酸	20.8772	2.04953	↓	↑
8	419	二十碳烯酸	22.0084	1.45367	↓	↑

注: VarID 是导入软件后,肝脏中筛选的 555 个峰对应该物质的编号; VIP 值是变量对分类的重要性大小; RT 指的是该物质的保留时间

3 讨论

肝纤维化是各种损肝因素如病毒性肝炎、酒精性肝病、某些代谢性疾病、药物及化学毒物损伤及寄生虫病等引起的一种组织损伤-修复应答,是多种慢性肝病发展成肝硬化的主要病理学基础。目前大多数学者认为肝脏疾病按照“急性-慢性-肝纤维化-肝硬化-肝癌”的递进模式发展而来,肝硬化为不可逆阶段,而肝纤维化为一动态过程,属于可逆性病变^[5-8]。因此,从肝纤维化发生、发展的不同环节入手,及时阻断肝纤维化的进一步发展具有重要意义。

疏肝健脾方以“见肝知病，知肝传脾，当先实脾”中医理论为指导创制而成，是安徽中医药大学第一附属医院用于治疗急慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化活动期的经验方^[7-8]。全方共奏疏肝理脾、活血解毒之功效。本实验病理结果表明，模型组大鼠肝脏虽有少量的脂肪空泡变性，但未见较大的囊泡结果，虽有一定量的结缔组织增生，但尚未有典型的假小叶形成，经疏肝健脾方干预后，肝纤维化病理损伤程度减轻。本课题组前期的研究结果亦表明，疏肝健脾方对大鼠肝纤维化、化学性肝损伤大鼠具有很好的治疗作用^[9-10]。

GC-TOF MS 技术主要是针对挥发性物质进行分离鉴定的质谱技术，配套有相应的数据库如 NIST、LECO-FiehnRtx5 等。近几年来随着化学衍生化技术的快速发展，使众多非挥发性物质都能转化为气态，从而使 GC-TOF MS 应用于动物代谢组学成为可能^[11-12]。本实验基于 GC-TOF MS 的代谢组学分析结果表明，疏肝健脾方对 CCl₄ 诱导的代谢谱紊乱有确切影响，且能纠正代谢物紊乱。作为三羧酸循环（TCA 循环）的重要中间产物，苹果酸和 α-酮戊二酸为机体供应能量。研究表明，在氧化应激存在的情况下，TCA 循环被抑制以减少氧自由基的产生，且与各种原因引起的肝病具有一定的联系^[13]。因此，我们推测在模型组中苹果酸和 α-酮戊二酸含量升高是由 TCA 循环障碍所致。经疏肝健脾方干预后，苹果酸和 α-酮戊二酸含量明显减少，调节其向正常方向发展，表明疏肝健脾方对 CCl₄ 诱导的肝纤维化保护作用机制可能与调节能量代谢紊乱有关。

既往研究表明，CCl₄ 诱导的慢性肝损伤大鼠模型能够被酪氨酸所逆转，促进肝损伤恢复，表明酪氨酸与肝损伤等肝脏疾病联系密切^[14]。盐德草碱是酪氨酸代谢的中间产物，它是苯基乙醇胺 n-甲基转移酶的底物。本实验中与正常组比较，CCl₄ 诱导的模型组大鼠盐德草碱含量明显上调可能是酪氨酸代谢紊乱所致。经疏肝健脾方干预后，盐德草碱含量明显向正常组靠近，预示疏肝健脾方的作用可能依赖于酪氨酸代谢调节。自由脂肪酸能够损伤细胞膜和细胞器膜，导致细胞内微器官受到破坏，且其能够明显增加细胞因子的毒性，导致肝脏退变，炎性细胞浸润，促使肝纤维化形成，而棕榈酸是游离脂肪酸，二十碳烯酸是不饱和脂肪酸^[15]。本实验中与正常组比较，CCl₄ 诱导的模型组大鼠棕榈酸、二十碳烯酸含量发生明显变化可能是脂肪

酸代谢紊乱所致。经疏肝健脾方干预后，棕榈酸、二十碳烯酸含量明显向正常组靠近，预示疏肝健脾方的作用可能与调节脂肪酸代谢紊乱有关。

N-乙酰-4-氨基丁酸是由 γ-氨基丁酸（GABA）衍生而来，而 GABA 由谷氨酸在谷氨酸脱羧酶作用下转化而来。谷氨酰胺是蛋白质合成中的编码氨基酸，在机体内通过谷氨酸与氨作用形成。研究表明，谷氨酸是合成谷胱甘肽（GSH）的三个氨基酸之一，而 GSH 是机体重要的自由基清除酶，其已被证实是 CCl₄ 毒性的重要分子机制^[16]。本实验中与正常组比较，CCl₄ 诱导的模型组大鼠 N-乙酰-4-氨基丁酸含量明显升高，推测可能是氨基酸代谢紊乱所致。经疏肝健脾方干预后，N-乙酰-4-氨基丁酸含量明显向正常组靠近，预示疏肝健脾方的作用可能与调节氨基酸代谢紊乱有关。另外，肝纤维化等肝脏疾病与糖代谢紊乱具有一定联系，而葡萄糖酸是葡萄糖的醛基受氧化转化而来^[17]。本实验中与正常组比较，模型组的葡萄糖酸含量明显升高与糖代谢变化密切相关。疏肝健脾方能够明显扭转模型组升高的葡萄糖酸水平，表明疏肝健脾方抗肝纤维化的作用机制可能与调节糖代谢有关。

综上，代谢组学研究结果表明，疏肝健脾方对肝纤维化大鼠具有保护作用，其机制可能与调节能量代谢、酪氨酸代谢、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、糖代谢紊乱有关。本实验亦确认了代谢组学研究方法可以被应用于中药复方的作用机制研究。

参考文献

- [1] 张莎莎, 吕文良, 张旭, 等. 肝纤维化的治疗研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(4): 471-475.
- [2] 张莎莎, 吕文良, 张旭, 等. 单味药治疗肝纤维化研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(7): 77-79.
- [3] Wu J, Norton PA. Animal models of liver fibrosis [J]. Scand J Gastroenterol, 1996, 31(12): 1137-1143.
- [4] Chen X, Shen Y, Zheng Y, et al. Quantification of liver viscoelasticity with acoustic radiation force: a study of hepatic fibrosis in a rat model [J]. Ultrasound Med Biol, 2013, 39(11): 2091-2102.
- [5] Liu X, Xu J, Brenner DA, et al. Reversibility of liver fibrosis and inactivation of fibrogenic myofibroblasts [J]. Curr Pathobiol Rep, 2013, 1(3): 209-214.
- [6] Rockey DC. Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013, 11(3): 224-231.
- [7] 曹承楼, 杨素霞, 张国梁, 等. 肝乐冲剂治疗慢性病毒性肝炎肝郁脾虚证疗效观察 [J]. 河南中医, 2007, 27

- (10): 28-29.
- [8] 杨小军, 张国梁, 施卫兵. 肝乐冲剂治疗乙型肝炎肝郁脾虚型 60 例临床观察 [J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(3): 353-354.
- [9] 姜辉, 吴芙蓉, 夏伦祝, 等. 肝乐颗粒抗四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(5): 480-483.
- [10] 姜辉, 高家荣, 陈金锋, 等. 疏肝健脾方对肝纤维化大鼠肝组织 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 中药材, 2013, 36(5): 776-780.
- [11] Gou X, Tao Q, Feng Q, et al. Urinary metabonomics characterization of liver fibrosis induced by CCl₄ in rats and intervention effects of Xia Yu Xue Decoction [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 74: 62-65. doi: 10. 1016/j. jpba. 2012. 09. 021.
- [12] Gou X, Tao Q, Feng Q, Urine metabolic profile changes of CCl₄-liver fibrosis in rats and intervention effects of Yi Guan Jian Decoction using metabonomic approach [J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13: 123-135. doi: 10. 1186/1472-6882-13-123.
- [13] Singh KK. Oxidative stress, disease and cancer [M]. London: Imperial College Press, 2006: 649-655.
- [14] Ohta Y, Sahashi D. L-tryptophan administration promotes the reversion of pre-established chronic liver injury in rats treated with carbon tetrachloride [J]. J Nutr Biochem, 2002, 13(9): 550-559.
- [15] Gyamfi D, Everitt HE, Tewfik I, et al. Hepatic mitochondrial dysfunction induced by fatty acids and ethanol [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(11): 2131-2145.
- [16] 张锦周, 庄志雄. 四氯化碳急性染毒对大鼠肝脏脂质过氧化物的影响 [J]. 中国公共卫生学报, 1998, 17(6): 341-342.
- [17] Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases [J]. J Hepatol, 2012, 56(4): 952-964.

Effect of *Shugan Jianpi Fang* (疏肝健脾方) on Liver Metabonomics in Hepatic Fibrosis Rats Induced by Carbon Tetrachloride

GAO Jiarong¹, CHEN Jinfeng², JIANG Hui¹, HAN Yanquan¹

(1. First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Province, 230031; 2. Lu'an Hospital of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore possible mechanism of *Shugan Jianpi Fang* in preventing and treating hepatic fibrosis by metabonomics method. **Methods** Fifteen Sprague Dawley rats were randomly divided into normal group ($n=5$), model group ($n=5$) and *Shugan Jianpi Fang* group ($n=5$). Rats in model group and *Shugan Jianpi Fang* group were given hypodermic injection of 50% carbon tetrachloride solution, 0.1 ml/100 g, twice a week, for 12 weeks to replicate rat models with hepatic fibrosis. From the first day of modeling, *Shugan Jianpi Fang* group was given *Shugan Jianpi Fang* 16.2 g/ (kg · d) by gavage, and normal group and model group were given equivalent normal saline, once every day, for 16 weeks. Rats were killed after the last administration. Hepatic tissue was taken out to observe the pathological changes. Gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOFMS) was adopted to analyze the changes of metabolic profiling. Different compounds were identified and relative metabolic pathways were analyzed. **Results** In hepatic tissue of rats in model group, there was a little fatty degeneration, connective tissue proliferation, inflammatory cell infiltration, and atypical pseudolobule. Rats' hepatic tissue of *Shugan Jianpi Fang* group showed no large-scale fat vacuole, but a little inflammatory cell infiltration and improved hepatic fibrosis. Compared with normal group, 8 biomarkers including palmitic acid, eicosenoic acid, malic acid, fumaric acid, glutamine, halostachine, N-acetyl-4-amino butyric acid and gluconate were found in model group. Compared with model group, *Shugan Jianpi Fang* could change 8 biomarkers close to the normal levels. **Conclusion** *Shugan Jianpi Fang* could provide a certain extent protection to rats with hepatic fibrosis. The mechanism may be related to regulating the disorders of energy, tyrosine, fatty acid, amino acid, and glucose metabolism.

Keywords Hepatic fibrosis; *Shugan Jianpi Fang* (疏肝健脾方); Metabonomics; Gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOFMS)

(收稿日期: 2014-06-26; 修回日期: 2014-11-10)

编辑: 邓 媛