

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.11.017

基于核磁共振技术的益肾喘宁汤对支气管哮喘肾气虚证模型大鼠血清代谢组学的影响

宋红^{*}, 郑小伟, 王颖, 刘晓谷, 邱翠云, 姜春燕

(浙江中医药大学基础医学院, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053)

摘要 目的 利用核磁共振技术探讨益肾喘宁汤治疗支气管哮喘肾气虚证的可能作用机制。方法 将 42 只 Wistar 大鼠随机分成正常对照组、模型组、中药组各 14 只, 除正常对照组外, 其余各组大鼠均采用卵蛋白联合游泳力竭法、恐伤肾双因素复合法建立支气管哮喘肾气虚证模型。实验第 15 天开始中药组大鼠给予益肾喘宁汤 2.0 g/(kg·d) 灌胃, 正常对照组和模型组给予等量的生理盐水灌胃。各组大鼠连续灌胃 15 天后腹主动脉采血分离血清, 进行氢谱核磁共振检测, 最终筛选并鉴定出各组大鼠血清中的差异代谢物。结果 共鉴定出 20 种差异具有统计学意义的血清代谢物, 相对于正常对照组, 模型组大鼠血清中异亮氨酸、谷氨酰胺含量显著升高, 乳酸含量显著降低。相对于模型组, 中药组大鼠血清中乳酸含量显著升高, 脂类 (R-CH₃)、脂类 (R-CH₂)、脂类 (CH₂CH₂CO)、脂类 (CH₂C=C)、脂类 (C=CCH₂C=C) 以及不饱和脂肪酸的含量降低 ($P < 0.05$)。结论 益肾喘宁汤治疗支气管哮喘肾气虚证的可能主要机制为促进机体脂类代谢, 进而改善机体能量代谢缺乏状态。

关键词 支气管哮喘; 益肾喘宁汤; 肾气虚证; 核磁共振; 血清代谢组学; 能量代谢

支气管哮喘属慢性气道炎症疾病, 为呼吸系统的常见病, 目前我国哮喘患者逾 3000 万, 且呈现增加趋势^[1], 成为日益严重的公共卫生问题。支气管哮喘属于中医学“哮病”和“喘证”范畴, 中医临床分型较多, 其中肾气虚型所占比重较大^[2]。本研究应用核磁共振技术进行血清代谢组学分析, 探索益肾喘宁汤干预支气管哮喘肾气虚证的靶点及代谢通路, 希望能为支气管哮喘肾气虚证的中医治疗提供帮助。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠 42 只, 6~8 周龄, 体重 200~250 g, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2012-0002, 购于上海史莱克实验动物有限责任公司。

1.2 药物

益肾喘宁汤组成: 熟地黄、山萸肉、山药、泽泻、苦参、天浆壳、牡丹皮、茯苓各 12 g, 五味子 5 g, 沉香 8 g, 旋覆花、黛蛤散、黄芪各 15 g, 中

药均购自浙江中医药大学中医门诊部, 经水煎、过滤、浓缩、灭菌, 配制成含生药 1.6 g/ml 的药液, 置 4℃ 保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

卵清蛋白 (Sigma 公司, 批号: SLBD2312V), 氢氧化铝凝胶 (上海美兴化工股份有限公司, 批号: 091101), 0.9% 氯化钠注射液 (科伦制药有限公司, 批号: D130627D1), NaH₂PO₄ (广东汕头市西陇化工厂, 批号: 0112051), NaN₃ (成都市科龙化工试剂厂, 批号: 20091103), 戊巴比妥钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: WS2006040), 重水 (D₂O, 北京百灵威科技有限公司, 批号: LVC0N06)。梅花针 (固始公元医疗器械有限公司, 批号: 14C423573), 15A 保险丝 (临沂市兰山区枣沟头熔断丝厂), 超声雾化吸入器 (江苏鱼跃医疗设备股份有限公司), 5417R 型冷冻台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), 核磁共振谱仪 (Bruker 公司, 600 MHz)。

1.4 动物分组、造模及给药

42 只大鼠适应性喂养 7 天后, 用随机数字表法分为正常对照组、模型组、中药组各 14 只。除

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY13H270008); 国家自然科学基金项目 (81373521)

* 通讯作者: 163songhong@163.com, (0571) 86613771

正常对照组外, 其余各组大鼠均采用卵蛋白致敏法联合游泳力竭法、恐伤肾双因素复合法建立支气管哮喘肾气虚证模型^[3], 具体方法: 1) 支气管哮喘造模: 实验第 1 天, 用含有卵清蛋白 1 mg、氢氧化铝凝胶 10 mg 混合液 1 ml 注入腹腔内令其致敏。正常对照组用等量的生理盐水替代, 7 天后用相同的方法重复致敏 1 次。第 15 天将上述造模大鼠置于 65 cm × 45 cm × 45 cm 大小的玻璃罩内, 以 1% 的卵清蛋白超声雾化吸入 30 min, 激发哮喘, 每日 1 次, 连续激发直至实验第 30 天。正常对照组用等量的生理盐水替代。2) 肾气虚证造模: 实验第 1 天开始, 每日上午于同一时间将大鼠置一安静房间进行惊恐刺激, 每次 10 min, 即放送有猫叫声的磁带, 同时用梅花针叩击大鼠 (20 次/min), 模拟猫抓拿攻击大鼠的情景; 每日下午将动物负重: 于大鼠尾根部缠绕重量为该大鼠体重 10% 的保险丝, 放入水深 50 cm、水温 20℃ 的水槽中游泳, 以力竭为度 (大鼠鼻尖没入水面 10s), 每日 1 次, 共 14 天。中药组大鼠于实验第 15 天开始给予益肾喘宁汤 2.0 g/(kg · d) 灌胃, 正常对照组和模型组用等量的生理盐水灌胃。各组大鼠连续灌胃 15 天 (实验共 30 天)。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况 观察各组大鼠实验前后一般情况, 包括精神、活动、毛发、体重等。

1.5.2 血清代谢组学检测 实验第 30 天, 24 h 内将各组大鼠逐一称重后用 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射进行深度麻醉, 从腹主动脉采血, 血液样本在 4℃、3000 r/min 下离心 10 min, 收集上清液, 置 -70℃ 冷冻备用。缓冲液的配制 500 ml: 将 10.05 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加入到 380 ml 的蒸馏水中, 震荡混合均匀后加入 4% NaN_3 的水溶液, 然后调整 pH 值到 7.4, 加蒸馏水至 400 ml, 再加入 100 ml D_2O , 混合均匀即可。将 200 μl 血清与等量的缓冲液加入到 5 mm 核磁共振管中, 当样本全部溶解呈匀质透明时进行核磁共振代谢组学检测。

1.5.3 核磁共振数据分析及代谢物鉴定 采集大鼠血清代谢氢谱图, 选择各组大鼠血液中具有代表性的核磁共振氢谱图。因核磁共振分析中得到的数据十分庞大, 为充分提取有价值的潜在信息, 还需要对数据积分后将上面保存的 Excel 格式数据输入到 SIMCA-P⁺ 软件 (V11.0, Umetrics AB, Umea, Sweden) 对归一化后的数据利用主成分分析法和正交偏最小二乘法判别分析法进行多变量数据统计

分析, 采用 SPSS16.0 软件。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

正常对照组大鼠活泼机灵, 毛发光泽, 体重日益增加, 呼吸顺畅。模型组大鼠活动量明显减少, 扎堆蜷卧, 皮毛蓬松枯燥, 体重增幅减轻, 胃纳差, 行动迟缓, 悬尾抵抗力减弱, 游泳时间日渐缩短; 哮喘激发后出现喘促、张口呼吸、咳嗽、抓挠全身、面部及耳紫绀、二便失禁、双肺闻及哮鸣音等表现。中药组上述症状体征均有不同程度的好转或消失。

2.2 各组大鼠血清代谢组学检测结果

表 1 示, 结合主成分分析法、偏最小二乘法判别分析法以及正交偏最小二乘法判别分析法, 最终筛选并鉴定出 20 种有统计学意义的差异代谢物, 包括脂类、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、N-乙酰糖蛋白、乙酰乙酸、谷氨酸、丙酮酸、谷氨酰胺、胆碱、不饱和脂肪酸、酪氨酸和苯丙氨酸, 涉及脂类代谢、氨基酸代谢、糖酵解、酮体代谢、肌酸代谢和胆碱代谢等代谢途径。通过代谢物的相关系数确定大鼠血清中代谢成分的差异性。相关系数在差异性代谢物中为正值的代谢物是在大鼠血清中浓度升高的代谢物, 相关系

表 1 差异有统计学意义的血清代谢物在各组比较的相关系数

编号	差异代谢物	化学位移	相关系数	
			模型组 vs 正常对照组	中药组 vs 模型组
1	脂类 (-R-CH ₃ -)	0.87	+0.777	-0.619
2	脂类 (-R-CH ₂ -)	1.26		-0.623
3	亮氨酸	0.95	+0.848	
4	异亮氨酸	1.01	+0.928	
5	缬氨酸	1.04	+0.847	
6	3-羟基丁酸	1.19	+0.759	+0.604
7	乳酸	1.32	-0.935	+0.926
8	丙氨酸	1.47	-0.774	
9	脂类 (-CH ₂ CH ₂ CO-)	1.55		-0.637
10	脂类 (-CH ₂ C=C-)	2.01		-0.590
11	N-乙酰糖蛋白	2.03	+0.749	
12	乙酰乙酸	2.22	+0.739	+0.661
13	谷氨酸	2.35	+0.769	+0.662
14	丙酮酸	2.36	-0.889	+0.824
15	谷氨酰胺	2.43	+0.908	
16	脂类 (-C=CCH ₂ C=C-)	2.81		-0.606
17	胆碱	3.21	+0.750	
18	不饱和脂肪酸 (UFA)	5.30	+0.731	-0.580
19	酪氨酸	7.17		+0.637
20	苯丙氨酸	7.43	+0.842	

注: 前组比后组含量高为 + 号, 前组比后组含量低为 - 号。

数在差异性代谢物中为负值的代谢物是在大鼠血清中浓度降低的代谢物。结果发现,相对于正常对照组,模型组大鼠血清中异亮氨酸、谷氨酰胺含量显著升高,脂类($R-CH_3$)、亮氨酸、缬氨酸、3-羟基丁酸、N-乙酰糖蛋白、乙酰乙酸、谷氨酸、胆碱、不饱和脂肪酸、苯丙氨酸含量有所升高;乳酸含量有显著降低,丙氨酸、丙酮酸的含量降低。相对于模型组,中药组大鼠血清中乳酸含量有显著升高,3-羟基丁酸、乙酰乙酸、谷氨酸、丙酮酸、酪氨酸有所升高;脂类($R-CH_3$)、脂类($R-CH_2$)、脂类(CH_2CH_2CO)、脂类($CH_2C=C$)、脂类($C=CCH_2C=C$)以及不饱和脂肪酸的含量降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

支气管哮喘发病多在幼年或少年且与家族遗传有密切的相关性,其发病多在冬季,症状多在夜间尤其是半夜前后发作或加重,冬季为肾所主时,夜半亦为肾所主时,因此,哮喘与肾虚有关^[4]。中医学认为,肾气虚哮喘病机多属本虚标实,肺主气司呼吸,为五脏六腑之华盖,位于上焦,肾藏精主纳气,居于下焦。肺属金,肾属水,金水相生。哮喘病久发,肺阴亏损,金不生水,“母病及子”,肺肾两虚,摄纳失常。治宜补肺纳肾,降气平喘^[5]。我们采用的益肾喘宁汤是多年临床验方,是在七味都气丸的基础上加减而成的,以补肺肾治本,兼以化痰行气活血、补泻兼施、缓调阴阳,长期使用可减少临床支气管哮喘患者对激素等药物的依赖^[6]。

基于核磁共振技术代谢组学的优点是对样品无破坏性,检测无偏向性,且预处理简单,一维氢谱核磁共振对含氢化合物均有响应,能完成样品中大多数化合物的检测,满足代谢组学中的对尽可能多的化合物进行检测的目标^[7]。代谢组学的研究方法与中医学的整体观念、系统观念甚至辨证论治思维一致^[8],强调把人体作为一个完整的系统来研究,而中医证候表现的是致病因素及机体反应的综合情况,两者皆从机体整体变化的角度进行分析,从而架起了方与证研究的桥梁^[9]。本研究核磁共振结果与模型验证结果相一致,可排除核磁共振技术本身的假阳性问题。

本研究结果显示,支气管哮喘肾气虚证大鼠血清必需氨基酸中的异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸的含量都增加,说明体内氨基酸代谢紊乱。其中异亮氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸都参与三羧酸循

环,证明体内的三羧酸循环可能被破坏^[10]。三羧酸循环是糖、脂肪和蛋白质分解的共同通路,又是糖类、脂类、氨基酸代谢联系的枢纽,三羧酸循环被破坏,则机体内能量缺乏,表现为支气管哮喘肾气虚证的各种虚弱征象。与正常对照组相比,模型组大鼠血清中乳酸含量显著降低,而中药组大鼠血清乳酸含量又显著高于模型组。在代谢过程中,乳酸可以通过糖异生作用转变为葡萄糖,用以维持血糖水平,获得能量,对各项生命活动的完成十分重要,我们推测支气管哮喘肾气虚证模型大鼠体内糖代谢出现紊乱,同时大鼠活动量减少、精神倦怠等的表现与机体产生的能量减少有关,中药组大鼠各项症状、体征的改善与机体能量的恢复密切相关。中药组乳酸含量较模型组含量明显升高,我们推测大鼠体内糖代谢紊乱得到了明显的改善;同时中药组大鼠血清中的各种脂类和不饱和脂肪酸含量均低于模型组。模型组大鼠血清中丙酮酸含量明显降低,中药组丙酮酸含量基本恢复正常,人体内的丙酮酸是由葡萄糖或糖原降解及氨基酸分解而产生,对体内能量代谢具有十分重要的作用。丙酮酸可提高耐力,加速脂肪动员,脂肪动员产生的甘油和脂肪酸在氧和丙酮酸供给充足的情况下,经三羧酸循环分解成二氧化碳和水,同时释放出大量的能量^[11]。实验结果也发现,模型组大鼠血清中的脂类物质明显高于正常对照组,而中药组大鼠血清中的脂类物质又明显低于模型组,由此我们推测益肾喘宁汤能够促进机体的脂类代谢途径,进而改善机体能量缺乏的状态,但其中的机理还需要进一步探索。

参考文献

- [1] 崔晓红. 合理用药治疗支气管哮喘患者的探讨 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(22): 756-757.
- [2] 李素云, 李亚, 李建生, 等. 支气管哮喘缓解期中医证候及其临床特征的文献分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(3): 391-393.
- [3] 郑小伟, 宋红, 王颖, 等. 肾气虚哮喘模型及中西药联合干预的实验研究 [J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(2): 129-131.
- [4] 姜洪玉, 周兆山. 补肾清肺法治疗哮喘急性发作期患者 90 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2013, 54(1): 48-50.
- [5] 中华中医药学会肺系病分会. 支气管哮喘中医诊疗专家共识 (2012) [J]. 中医杂志, 2013, 54(7): 627-629.
- [6] 刘莹, 朱洪达, 陶方方, 等. 益肾喘宁汤干预肾气虚哮喘模型的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 216-218.
- [7] 许国旺, 路鑫, 杨胜利. 代谢组学研究进展 [J]. 中国医

学科学院学报, 2007, 29(6): 701-711.

[8] 贾伟, 蒋健, 刘平, 等. 代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(8): 621-624.

[9] 张建平, 朱明丹, 张少强, 等. 代谢组学在中医药领域的应用 [J]. 中医杂志, 2011, 52(6): 451-453.

[10] 李育, 赵靖霞, 杨根金, 等. 早期肾透明细胞癌患者血清的核磁共振氢谱代谢组研究 [J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(1): 67-70.

[11] 张正古. 补充丙酮酸对体重、体脂和运动能力影响的研究进展 [J]. 辽宁体育科技, 2012, 34(5): 41-43.

Effect of *Yishen Chuanning Decoction* (益肾喘宁汤) on Serum Metabonomics in Rats Model with Bronchial Asthma of Kidney-qi Deficiency Syndrome: Based on Nuclear Magnetic Resonance Technics

SONG Hong, ZHENG Xiaowei, WANG Ying, LIU Xiaogu, KUANG Cuiyun, JIANG Chunyan

(Basic Medicine School, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou, 310053)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yishen Chuanning Decoction* (益肾喘宁汤) in treating bronchial asthma of kidney-qi deficiency syndrome using nuclear magnetic resonance. **Methods** Randomly divided 42 Wistar rats into normal control group, model group and the Chinese medicine group, with 14 rats in each. Except for the normal control group, rats were treated with exhausting swimming and great fright impairing the kidney to establish bronchial asthma of kidney-qi deficiency syndrome model. The Chinese medicine group was given *Yishen Chuanning Decoction* 2.0 g/(kg·d) for gavage from the 15th day of experiment. The normal control group and the model group were given equal dose saline for gavage. Collected blood from aorta abdominalis and separated serum of rats in each group after 15 days of continuous gavage. Conducted H-nuclear magnetic resonance examination. Finally selected and authenticated different metabolite of rats in different groups. **Results** Totally authenticated 20 kinds of serum metabolites whose difference had statistic significance. Compared to those in the normal control group, isoleucine and glutamine levels remarkably increased while that of the lactic acid remarkably decreased in the model group. Compared with the model group, lactic acid level in the Chinese medicine group remarkably increased, while the lipid (R-CH₃), lipid (R-CH₂), lipid (CH₂CH₂CO), lipid (CH₂C=C), lipid (C=CCH₂C=C) and unsaturated fatty acid levels decreased (P<0.05). **Conclusion** The possible functional mechanism of *Yishen Chuanning Decoction* (益肾喘宁汤) in treating bronchial asthma of kidney-qi deficiency syndrome is to promote body lipid metabolism and improve energy metabolism deficiency of the body.

Keywords bronchial asthma; *Yishen Chuanning Decoction* (益肾喘宁汤); kidney-qi deficiency syndrome; nuclear magnetic resonance; serum metabonomics; energy metabolism

(收稿日期: 2015-08-20; 修回日期: 2016-01-21)

编辑: 邓 媛

第 30 次全国特色医疗名医学术交流会暨老年病论坛的通知

我国现已进入老龄化社会, 根据全国老龄工作会议和国家中医药管理局的要求, 为了研讨老年病的中医药防治和交流特色医疗的经验, 由中国民间中医医药研究开发协会特色医疗分会、北京聚医杰医药科学研究院联合主办的“第 30 次全国特色医疗名医学术交流会暨老年病论坛”定于 2016 年 7 月 26 日-29 日(25 日报到)在安徽省黄山市召开。特邀请全国各地的中医特色医疗名医、特别是专长于中医药防治老年病的各级名中医、基层中医、民间中医及养老、老年保健工作者参加本次会议。

本次会议的主题是: 弘扬中医药特色优势, 发挥防治老年病特长。本次会议有几点亮点: 一是请有关专家做老年病防治及养老、医养结合方面的经验介绍及学术讲座; 二是交流运用中医药防治老年病的新经验新成果, 向到会代表赠送《中医药防治老年病特色医疗经验荟萃》一书; 三是成立“中医药防治老年病研究专家委员会”, 欢迎符合条件者报名参加; 四是表彰一批老年病防治方面的优秀论文、学术成果。

本次会议收报名费 300 元、会务及培训资料费 1500 元, 会期食宿参观统一安排, 费用自理。报名方式: 请在 7 月 18 日前办理参会报名手续。请将参会报名费 300 元、个人技术简介、交流论文(无论文也可报名)、申报表彰材料、2 寸蓝底照片 4 张快递至: 北京市 100036-98 信箱黄山会议会务组叶续宗秘书长收, 邮编 100036。联系电话: 010-63772051、18600893817、18500577884, 会议地址另行通知。本次会议代表名额为 80 人, 名额有限请及时报名。