

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.22.016

实验研究

卫气月生理变化周期中大鼠血浆代谢标志物的特征

李博林¹, 王亚利^{2*}, 张明泉³, 王鑫国³, 贾琳¹, 闫翠环², 曹文利³, 师旭亮³

(1. 河北省中医院, 河北省石家庄市中山路 389 号, 050011; 2. 河北医科大学; 3. 河北中医学院)

摘要 目的 探讨卫气月生理变化的潜在代谢标志物。方法 以秋分日所在的农历月确定月初(农历八月初一)、月中(八月十五)及月末(八月三十)。将 10 只 SD 大鼠分别在相应日期的正午 12:00 眼眶后静脉丛采血, 采用高效液相色谱-质谱联用仪检测血浆代谢物, 利用主成分分析和偏最小二乘法对数据进行统计分析, 比较各组之间血浆代谢组学数据, 探索各组之间差异性代谢标志物, 推测卫气月生理变化的潜在标志物。结果 与月中比较, 月初有 7 种差异代谢物为区分两组的可能标志物, 月末有 8 种差异代谢物为区分两组的可能标志物; 与月末比较, 月初有 9 种差异代谢物为区别两组的可能标志物。推测其中的二十碳五烯酸、皮质醇、脯氨酸和富马酸二甲酯 4 种差异代谢物为卫气月生理变化的潜在差异性标志物。结论 卫气的月生理变化可能与脂质代谢、氨基酸代谢密切相关, 并可能受到激素水平变化的影响。

关键词 卫气; 月周期; 代谢组学; 色谱分析; 质谱分析

卫气学说是中医学重要的基本理论之一。关于卫气的实质, 国内一些学者从免疫功能^[1-3]、热代谢^[3-4]等方面进行了诠释, 虽然成果丰富, 但只着眼于单一功能而忽略了中医整体恒动观念。代谢组学是从系统的整体效应去看待研究对象, 通过研究生物体内小分子物质的变化及代谢物差异, 进而确定机体内部生物学变化过程。课题组依据《素问·八正神明论》中“月始生则血气始精, 卫气始行; 月郭满则血气实, 肌肉坚; 月郭空则肌肉减, 经络虚, 卫气去, 形独居”, 运用代谢组学方法, 研究代谢标志物伴随卫气月周期性生理变化的差异, 进而探求卫气的物质基础, 为卫气学说的本质研究提供思路和方法。

1 材料

1.1 动物

10 只健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 160 ~ 200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(京)2012-0001。

1.2 主要仪器及试剂

高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(HPLC-

MS): 美国 Applied Biosystems 公司; QL-901 涡旋振荡器: 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; YDS-40 液氮罐: 河南新乡市新亚低温容器有限责任公司; MDF-382E 型超低温保存箱: 日本三洋公司; TGL-46M 高速台式冷冻离心机: 湖南湘仪离心机仪器有限公司。

乙腈(批号: 145979)、甲醇(批号: 148670): 色谱级, 美国 Fisher Scientific 公司; 色谱柱(批号: H16-444922): 美国 Phenomenex 公司; 乙酸(批号: 6661104)、乙酸铵(批号: 9960932): 色谱级, 中国 Dikmapure 公司。

2 方法

2.1 实验时间及标本采集

以秋分日所在的农历月确定月初、月中和月末。将 10 只大鼠分别在 2013 年农历八月初一(月初)、八月十五(月中)、八月三十(月末)正午 12:00 取血, 眼眶后静脉丛采血 1 ml。

2.2 标本制备

血液中加入肝素钠 20 μ l, 以 3500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液于冻存管中, 液氮暂存, 后置于 -80℃ 低温冰箱保存。检测前将血浆置 4℃ 条件下复溶, 将乙腈预冷在 4℃ 条件下过夜。将复溶后

基金项目: 国家自然科学基金(81273609)

* 通讯作者: wang1955@163.com, (0311) 86261276

的血浆按照 100 μl 加入 300 μl 乙腈的比例沉淀蛋白, 涡旋混匀, 14000 r/min 离心 10 min, 取上清, 与水按照 1 : 1 稀释配比, 再 14000 r/min 离心 10 min。将上清液移入液相小瓶中备用待测。

2.3 HPLC-MS 检测

采用 HPLC-MS 对供试血浆样品进行分离、检测、分析。色谱条件: 色谱柱为 phenomenex Kinetex XB-C₁₈, 2.6 μm , 100 $\times$ 2.1 mm; 流动相: A: 水 (含 0.05% 乙酸, 2 mmol 乙酸铵溶液), B: 乙腈 (含 0.05% 乙酸, 2 mmol 乙酸铵溶液); 流速: 0.3 ml/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 5 μl 。梯度洗脱条件设置如表 1。

表 1 液相色谱流动相梯度条件

时间	流速 (ml/min)	A (%)	B (%)
00: 00: 01	0.30	100	0
00: 05: 00	0.30	100	0
00: 17: 02	0.30	0	100
00: 22: 02	0.30	0	100
00: 22: 10	0.30	100	0
00: 28: 02	0.30	100	0

注: A, 水 (含 0.05% 乙酸, 2 mmol 乙酸铵溶液); B, 乙腈 (含 0.05% 乙酸, 2 mmol 乙酸铵溶液)

质谱条件: 正离子模式下进行检测, 质谱检测数据采集范围: 质荷比 (m/z) 50 ~ 850 Da; CurtainGas: 30psi; Gas1: 55psi, Gas2: 55psi; DP: 60V; EP: 10V; CE: 5eV; ISP: 5500V; Tem: 500 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 统计学方法

采用 MarkerViewTM 1.2.1 代谢组学分析软件进行峰识别、峰过滤、峰对齐, 最终获得包括质荷比、保留时间及峰面积的二维数据阵。采用 SIMCA 13.0.3 软件对数据进行多变量分析, 具体分析方法包括主成分分析 (PCA)^[8]、偏最小二乘法 (PLS)^[9] 分析。将分析结果结合在线数据库检索鉴定可能的生物标志物。通过 MarkerViewTM 1.2.1 代谢组学分析软件的 t 检验分析标志性代谢物的组间差异。

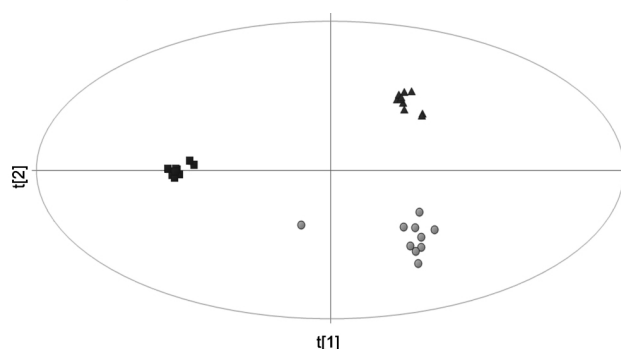
3 结果

3.1 月初、月中和月末的 PCA 分析

PCA 能从总体上反映各组样本之间的总体代谢差异和组内样本之间的变异度大小。本分析在正离子模式下共获得 3 个主成分, 累积 $R^2X = 0.581$ (R^2X 为判别模型质量的主要参数, 该值代表模型的解释率, 一般来说该值大于 0.4 即表示该模型可靠)。因此当前 PCA 模型适合解释各时间点之间的

代谢差异。

图 1 示, 月初与月末同处于第一主成分的右侧中 (椭圆形中纵轴分割区别第一主成分, 即纵轴左右两侧第一主成分不同), 而被横轴分隔, 处于第二主成分的上下两侧 (椭圆形中横轴分割区别第二主成分, 即横轴上下两侧第二主成分不同), 表明月初与月末代谢标志物第一主成分相似, 第二主成分存在差异。月中则完全被纵轴分隔于月初、月末之外, 处于第一主成分的左侧中, 且被横轴所分隔, 处于第二主成分上下两侧, 表明月中的代谢标志物第一主成分可区分月中与月初、月末, 而第二主成分却与月初、月末各有交叉。



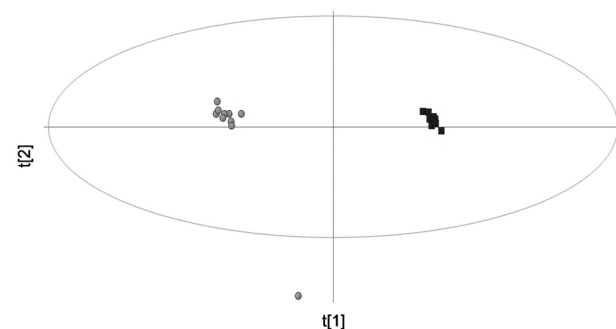
注: ●表示月初; ■表示月中; ▲表示月末; $t[1]$ 表示第一主成分度; $t[2]$ 表示第二主成分度; $R^2X[1] = 0.341$ $R^2X[2] = 0.17$

图 1 月初、月中、月末大鼠血浆代谢物主成分分析图

3.2 月初、月中和月末的 PLS 分析

为了获得导致这种显著差异的代谢物信息, 我们进一步采用监督性的多维统计方法即 PLS 对样本进行两两分析。

3.2.1 月初与月中的 PLS 分析 其模型质量参数为: 在正模式下, 具有 2 个主成分, $R^2X = 0.52$, $R^2Y = 0.997$, $Q^2 = 0.959$ 。图 2 示, PLS 得分图表

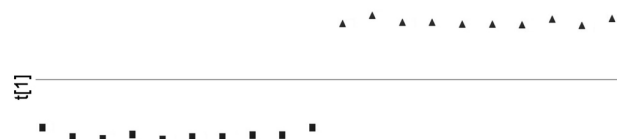


注: ●表示月初; ■表示月中; $t[1]$ 表示第一主成分度; $t[2]$ 表示第二主成分度; $R^2X[1] = 0.427$ $R^2X[2] = 0.0938$

图 2 月初与月中大鼠血浆代谢物偏最小二乘法分析图

明大鼠血浆代谢物在月初与月中之间具有显著差异。

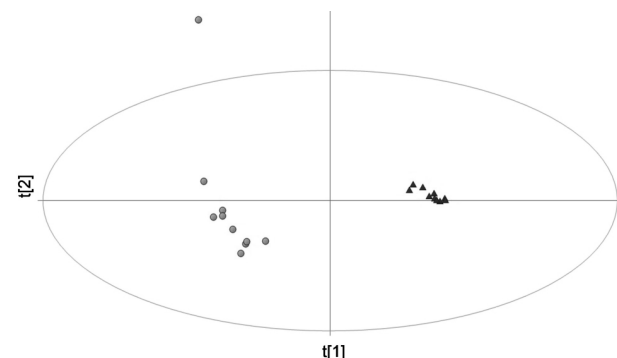
3.2.2 月中与月末的 PLS 分析 其模型质量参数为: 在正模式下, 具有 1 个主成分, $R^2X = 0.48$, $R^2Y = 0.996$, $Q^2 = 0.99$ 。图 3 示, PLS 得分图表明大鼠血浆代谢物在月中与月末之间具有显著差异。



注: ■表示月中; ▲表示月末; t [1] 表示第一主成分度; $R^2X [1] = 0.48$

图 3 月中与月末大鼠血浆代谢物偏最小二乘法分析图

3.2.3 月初与月末的 PLS 分析 其模型质量参数为: 在正模式下, 具有 3 个主成分, $R^2X = 0.52$, $R^2Y = 0.997$, $Q^2 = 0.959$ 。图 4 示, PLS 得分图表明大鼠血浆代谢物在月初与月末之间具有显著差异。



注: ●表示月初; ▲表示月末; t [1] 表示第一主成分度; t [2] 表示第二主成分度; $R^2X [1] = 0.277$, $R^2X [2] = 0.21$

图 4 月初与月末大鼠血浆代谢物偏最小二乘法分析图

3.3 差异性代谢物的确定

采用 PLS 模型的重要变量因子即 VIP 值 (VIP 值表示某个单一数据对整体数据的影响程度, 数值越高影响越大。本实验设定 $VIP > 1$), 并结合 t 检验的 P 值 ($P < 0.01$) 来筛选确定相关差异性代谢物的数据信息。将筛选确定的数据利用在线数据库 (<http://www.hmdb.ca/metabolites>; <http://metlin.scripps.edu>) 检索, 查找可能的代谢物, 依据精确分子量进一步缩小范围, 分析推测代谢物。

经初步比对并推测出 1-磷酸鞘氨醇、植物鞘氨醇、皮质醇、二十碳五烯酸、鹅去氧胆酸硫酸盐、脯氨酸、富马酸二甲酯 7 种差异代谢物为月初区分月中的潜在标志物 (见表 2); 亚油酰胺、1-磷酸鞘氨醇、磷脂酰甘油、二十碳五烯酸、脯氨酸、皮质醇、富马酸二甲酯、肉毒碱 8 种差异代谢

物为月末区分月中的潜在标志物 (见表 3); 胆固醇乙酸酯、脯氨酸、富马酸二甲酯、皮质醇、植物鞘氨醇、肉毒碱、亚油酰胺、二十碳五烯酸、甘氨酸熊脱氧胆酸 9 种差异代谢物为月初区别月末的潜在标志物 (见表 4)。

表 2 月初区别月中的大鼠血浆潜在标志物

重要变量因子	t 检验	质荷比	保留时间 (min)	物质名称
1.52776	1.38E-13	380.40	17.14	1-磷酸鞘氨醇
1.37623	4.07E-7	318.36	13.79	植物鞘氨醇
1.35769	8.97E-7	362.28	13.99	皮质醇
1.26338	2.05E-5	302.52	15.21	二十碳五烯酸
1.25153	2.61E-5	473.16	13.93	鹅去氧胆酸硫酸盐
1.11786	4.00E-4	116.04	0.77	脯氨酸
1.06131	3.42E-3	144.00	23.94	富马酸二甲酯

表 3 月末区别月中的大鼠血浆潜在标志物

重要变量因子	t 检验	质荷比	保留时间 (min)	物质名称
1.46204	1.75E-16	279.24	18.93	亚油酰胺
1.44437	1.38E-13	380.40	17.14	1-磷酸鞘氨醇
1.43480	1.43E-12	246.12	15.37	磷脂酰甘油
1.43402	1.57E-12	302.52	15.21	二十碳五烯酸
1.41352	4.59E-11	116.04	0.77	脯氨酸
1.40823	9.32E-11	362.28	13.99	皮质醇
1.20300	1.33E-5	144.00	23.94	富马酸二甲酯
1.16854	3.57E-5	162.24	0.76	肉毒碱

表 4 月初区别月末的大鼠血浆潜在标志物

重要变量因子	t 检验	质荷比	保留时间 (min)	物质名称
2.00777	4.91E-14	428.28	19.49	胆固醇乙酸酯
1.93081	6.19E-10	116.04	0.77	脯氨酸
1.74625	1.85E-6	144.00	23.94	富马酸二甲酯
1.74105	2.22E-6	362.28	13.99	皮质醇
1.73684	2.67E-6	318.36	13.79	植物鞘氨醇
1.69240	7.10E-6	162.24	0.76	肉毒碱
1.58448	6.85E-5	279.36	15.80	亚油酰胺
1.42091	7.80E-4	302.52	15.21	二十碳五烯酸
1.16146	9.36E-3	449.16	0.72	甘氨酸熊脱氧胆酸

3.4 潜在标志物倍性变化值比较

综合以上各时间点比较的差异物, 可见在各时间点差异物中同时存在的标志物则为影响卫气月生理性变化的潜在标志物。针对潜在标志物采用倍性变化的分析方法进一步研究。倍性变化是一种描述两个用于相比较的对象数量差异的方法。本实验通过比对潜在标志物在月初/月末、月中/月末和月末/月末的倍性变化值即可反映该物质在月初、月中、月末的差异。表 5 示, 二十碳五烯酸、皮质醇存在月中高于月初和月末, 脯氨酸、富马酸二甲酯存在

月中低于月初和月末的趋势。

表 5 月初、月中、月末大鼠血浆潜在标志物倍性变化值

潜在标志物	月初/月末	月中/月末	月末/月末
脯氨酸	0.7269	0.5754	1
皮质醇	1.2604	2.1747	1
二十碳五烯酸	0.5371	1.3792	1
富马酸二甲酯	0.8511	0.6074	1

4 讨论

卫气学说是中医基础理论的重要组成部分,包括卫气的来源、循行、功能等方面。中医学认为人与自然界是一个有机整体,自然界的直接或间接地影响着人体,人的生命活动与自然界具有周期性相适应的变化,人体的卫气循行受此影响也相应地产生了日、月、年的变化规律。月球绕地球公转形成的月周期,不仅对自然界产生巨大影响,同时生物体内也随之产生了月周期性的变化,而这种变化势必影响到卫气的运行。《黄帝内经》已揭示随着月亮的圆缺,人体的卫气也发生了周期性的生理变化。因此,明晰卫气月生理变化的物质基础对卫气的研究有重要意义。代谢组学作为一种系统性和整体性的研究方法,可以从整体上反映生物体的功能水平,能比较全面地揭示疾病在发展过程中生物体系内发生的一系列生物化学变化^[4],而发现的差异性代谢标志物能够多靶点、多层次网络式反映机体内部变化,这与中医的整体观念相一致。课题组采用代谢组学的方法来研究随卫气月生理变化而出现相应变化的代谢标志物,从而寻找体内呈现月变化的物质,印证《黄帝内经》关于卫气月变化的理论,而这些潜在的代谢标志物将是诠释卫气实质的重要依据。

本研究结果显示,1-磷酸鞘氨醇、植物鞘氨醇、皮质醇、二十碳五烯酸、鹅去氧胆酸硫酸盐、脯氨酸、富马酸二甲酯、亚油酰胺、磷脂酰甘油、肉毒碱、胆固醇乙酸酯、甘氨酸脱氧胆酸物质分别在月初、月中、月末不同时间点存在差异,而其中皮质醇、二十碳五烯酸、脯氨酸、富马酸二甲酯四种潜在差异性标志物的变化贯穿于卫气月生理变化的始终,且二十碳五烯酸和皮质醇存在月中高于月初、月末的趋势,脯氨酸、富马酸二甲酯存在月中低于月初、月末的趋势。这些物质的变化涉及脂质代谢、氨基酸代谢,同时伴有细胞与激素水平的调节。二十碳五烯酸是 n-3 多不饱和脂肪酸,属必需长链不饱和脂肪酸,通过调节脂肪酸合成和 β -氧

化改善脂肪酸、甘油三酯代谢,同时具有抗肿瘤、降血糖、保护肾脏、改善胰岛素抵抗、防治心脑血管疾病的作用^[8-9]。二十碳五烯酸表现的月中升高可能与脂肪代谢、 β -氧化增强有关,而且防御保护功能提高,这与卫气月中较强的描述相一致。脯氨酸是常见 20 种组成蛋白质的氨基酸中唯一的亚氨基酸,在稳定生物大分子结构、降低细胞酸性、解除氨毒以及作为能量库调节细胞氧化还原等方面起到重要作用。脯氨酸在月中降低可能是参与能量代谢,为机体提供能量,体内能量提供增加可能是卫气增强的一个客观标志。富马酸二甲酯能够调节细胞氧化还原系统及免疫炎症^[10-11],被认为是具有无重大免疫抑制的免疫调节剂。皮质醇是肾上腺素在应激状态下产生的糖皮质激素,可以调节糖、蛋白质以及脂肪的代谢,在维持血压稳定和控制机体的炎症反应方面有重要作用^[12]。皮质醇的升高不仅可以调节体内三大能量物质代谢,而且对于提高整体的防御保护机制都有一定意义,这种作用可能与卫气“温煦防御”功能相关,故其出现月中含量上升。这些差异性代谢物质的发现表明,卫气月生理性变化可能与脂质代谢、氨基酸代谢有关,同时还伴随着一些激素水平的变化,受细胞、激素等多重调节,是机体整体多层次网络式的变化过程,就其所涉及的功能而言也是多方面相互交织。正是由于这些整体性复杂的网络代谢过程决定了卫气的功能及月变化的循行规律。

本研究应用代谢组学探讨卫气月生理性变化的潜在标志物,从系统整体观寻求卫气实质,印证《黄帝内经》理论,丰富了卫气学说。由于《黄帝内经》并未言及营气、元气等也具有同样的月生理性变化,故而目前认为所测物质交集应该仅代表卫气。本研究依据《黄帝内经》所言的卫气月变化采集大鼠月初、月中、月末的血液检测其代谢物质,取 3 次检测结果的交集确定为卫气月变化的代谢标志物,可以在一定程度上避免假阳性物质的存在。但由于动物实验的局限性,本研究尚存在不足之处,今后我们将采用大样本临床试验,并结合对营气、元气等的研究,进一步明确卫气特有的标志物。

参考文献

- [1] 王洪琦,李建国,马晶,等. 卫气虚弱与机体免疫机制相关性研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(12): 3, 32.
- [2] 许朝进,席孝贤,贺新怀. 卫气与黏膜免疫的相关性探讨 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(12): 2283-2284.

- [5] 周晓平, 杨进. 从气象医学理论探析卫气的实质 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(4): 259-260.
- [6] 陈萌. 卫气的实质与医学意义 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(8): 501-502.
- [7] FIEHN O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes [J]. Plant Mol Biol, 2002, 48(12): 155-171.
- [8] WAGNER S, SCHOLZ K, SIEER M, et al. Tools in metabolomics an integrated validation approach for LC-MS metabolomic profiling of mercapturic acids in human urine [J]. Anal Chem, 2007, 79(7): 2918-2926.
- [9] 韩淳淳, 周红光, 陈海彬, 等. 代谢组学在中医基础理论研究中的应用 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(9): 101-104.
- [10] FUKUNAGA K, HOSSAIN Z, TAKAHASHI K. Marine phosphatidylcholine suppresses 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats by inducing apoptosis [J]. Nutr Res, 2008, 28(9): 635-640.
- [11] LIU X, XUE Y, LIU C, et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice [J]. Lipids Health Dis, 2013, 12(1): 109-116.
- [12] LINKER RA, LEE DH, RYAN S, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway [J]. Brain, 2011, 134(Pt3): 678-692.
- [13] STELMASIAK Z, DUDKOWSKA-KONOPA A, REJDAK K. Head trauma and neuroprotection [J]. Med Sci Monit, 2000, 6(2): 426-432.
- [14] 关坚红, 余仲苟, 马玉姗, 等. 高敏 C 反应蛋白、同型半胱氨酸、颈动脉粥样硬化斑块与进展性脑梗死的相关性分析 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(24): 22-23.

Study on Plasma Metabolic Biomarkers of Wei Qi (卫气) Monthly Physiological Changes in Rats

LI Bolin¹, WANG Yali², ZHANG Mingquan³, WANG Xinguo³, JIA Lin¹, YAN Cuihuan², CAO Wenli³, SHI Xuliang³

(1. Hebei Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang, 050011; 2. Hebei Medical University; 3. Hebei University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the potential metabolic biomarkers of Wei Qi monthly physiological changes. **Methods** The beginning of the month (1st Aug. of the lunar calendar), the middle of the month (15th Aug.) and the end of the month (30th Aug.) were set by the lunar calendar month with autumnal equinox. Ten SD rats were sampled from posterior orbital venous plexus at midday 12: 00 on corresponding days. Plasma metabolites were detected by high performance liquid chromatography/mass spectrometry instrument. Data was analyzed by principal component analysis and partial least square method. Plasma metabolomics data in each group were compared. Differential metabolic markers in each group were explored. The potential metabolic biomarkers of Wei Qi monthly physiological changes were inferred. **Results** Compared with the middle of the month, 7 differential metabolites on the beginning of the month might be possible markers to distinguish between the two groups, while 8 differential metabolites on the end of the month might be possible markers to distinguish between the two groups. Compared with the end of the month, 9 differential metabolites on the beginning of the month might be possible markers to distinguish between the two groups. Four differential metabolites (including eicosapentaenoic acid, cortisol, proline and dimethyl fumarate) were inferred as the potential metabolic biomarkers of Wei Qi monthly physiological change. **Conclusion** Wei Qi monthly physiological change might relate to lipid metabolism and amino acid metabolism closely and it might be influenced by change of hormone level.

Keywords Wei Qi (卫气); lunar cycle; metabolomics; chromatographic analysis; mass spectral analysis

(收稿日期: 2015-09-17; 修回日期: 2015-12-23)

编辑: 柴倩云

34