

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.24.016

玉屏风散对卫气虚证模型大鼠胸腺代谢组学特征标志物的影响

贾琳¹, 王亚利^{2*}, 杨倩¹, 张明泉³, 师旭亮³, 李博林¹

(1. 河北省中医院, 河北省石家庄市中山路 389 号, 050031; 2. 河北医科大学中西医结合学院; 3. 河北中医学院基础医学院)

摘要 目的 探讨卫气虚证胸腺代谢组学的特征性代谢标志物及玉屏风散的干预作用。方法 将 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和治疗组, 每组 10 只。正常组常规饲养, 模型组给予疲劳联合寒热交替法复制大鼠卫气虚证模型, 治疗组每日造模后灌服玉屏风散中药配方颗粒剂 25 g/(kg·d), 连续 7 天。采用高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪 (HPLC-MS) 检测各组大鼠的胸腺代谢物, 利用主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 对检测数据进行统计分析, 比较各组大鼠胸腺代谢组学原始谱图和数据, 确定潜在标志物及其变化趋势。结果 皮质醇、环腺苷酸、硫酸、棕榈酸、高肌肽、天门冬氨酸、富马酸二甲酯、腺嘌呤 8 种差异代谢物为正常组区分模型组的可能标记物, 其中棕榈酸在模型组呈上升趋势, 其余物质在模型组呈下降趋势; 治疗组的这 8 种差异代谢物向正常组回归, 棕榈酸在治疗组显著回落, 其余物质显著回升。结论 皮质醇、环腺苷酸、硫酸、棕榈酸、高肌肽、天门冬氨酸、富马酸二甲酯、腺嘌呤共同构成了卫气虚证大鼠的胸腺代谢组学特征性标志物, 而玉屏风散具有回调以上物质在胸腺内紊乱代谢的作用。

关键词 卫气虚; 玉屏风散; 代谢组学; 胸腺

卫气是人体正气的重要组成部分, 具有温煦、防御等功能, 正如《灵枢·本藏》所言“卫气者, 所以温分肉, 充皮肤, 肥腠理, 司开合者也”。卫气虚是临床常见证型, 一些学者从免疫功能^[1]、热代谢^[2]等方面对卫气虚证进行了诠释, 从一定程度上揭示了卫气虚证的本质。代谢组学具有整体性、系统性、综合性的特点, 将生物体作为一个完整的系统研究, 能够多靶点多层面反映机体内部整体性变化, 更符合中医整体恒动观念。故课题组在前期研究^[3]的基础上将人体中枢免疫器官胸腺作为卫气研究的靶器官, 采用代谢组学方法研究卫气虚模型大鼠胸腺组织代谢标志物及中药玉屏风散干预后代谢标志物的变化, 为卫气虚证型本质的研究提供新的思路, 同时从代谢组学的角度探讨玉屏风散的可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 30 只, 6 周龄, 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 药物

玉屏风散中药配方颗粒: 黄芪 (批号: 310027T), 白术 (批号: 309040T), 防风 (批号: 310232T), 广州一方制药有限公司生产, 黄芪、白术、防风比例为 2 : 2 : 1, 用前以蒸馏水配制, 浓度为 1.667 g/ml。

1.3 主要试剂及仪器

乙腈 (批号: 145979)、甲醇 (批号: 148670): 色谱级, 美国 Fisher 公司; 乙酸 (批号: 6661104)、乙酸铵 (批号: 9960932): 色谱级, 中国 Dikmapure 公司。色谱柱: 美国 Phenomenex 公司, Kinetex 2.6u XB-C18 100A 型; 高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪 (HPLC-MS): 美

基金项目: 国家自然科学基金 (81273609)

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

国 Applied Biosystems (AB) 公司; 液相系统: ekspert™ ultraLC100 型, 美国 Applied Biosystems (AB) 公司; 质谱系统: AB Sciex QTRAP 4500 型, 美国 Applied Biosystems (AB) 公司, 配有 EI、离子阱; 涡旋振荡器: QL-901 型, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 恒温箱: YHW-4101S 型, 天津泰斯特仪器有限公司; 自制 50 cm × 30 cm × 40 cm 游泳池 (水深 25 cm)。

1.4 分组及处理方法

将 30 只大鼠适应性喂养 14 天, 再以随机数字表法分为正常组、模型组和治疗组, 每组 10 只。正常组常规饲养, 模型组给予疲劳联合寒热交替法造模^[9], 即大鼠首先在 20℃ 左右常温水游泳 30 min, 然后取出常规饲养室 [室温 (25 ± 1)℃] 饲养, 0.5 h 后将大鼠放入 (40 ± 1)℃ 恒温箱中 15 min, 再 0.5 h 后进行寒冷刺激, 即将大鼠放入 -20℃ 冰柜中 20 min, 以上过程每日 1 次, 连续 7 天。卫气虚证大鼠模型评定标准^[4-5]: 蜷缩、扎堆、怕冷、恶风; 背毛凌乱、无光泽、汗出明显; 喷嚏、有痰鸣音及鼻分泌物; 反应迟钝、懒动。治疗组: 造模同模型组, 每日造模后按动物与人药物换算公式^[9]计算所得灌服玉屏风散中药配方颗粒 25 g/(kg·d), 每日 1 次, 连续 7 天。

1.5 HPLC-MS 检测

将大鼠断头处死取胸腺, 液氮暂存, 转 -80℃ 保存。检测前将胸腺加入萃取液 (乙腈: 甲醇 = 375: 125), 以 0.1 mg/μl 浓度匀浆, 涡旋 3 min, 离心 (4℃, 13 000 r/min, 10 min), 过滤备用。色谱条件: 色谱柱为 Phenomenex Kinetex XB-C18, 2.6 μm, 100 × 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℃, 进样量: 10 μl。质谱条件: 负离子 (ESI-) 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; Curtain Gas: 30 psi, Gas1: 55 psi, Gas2: 55 psi; DP: -60 V; EP: -10 V; CE: -10 eV; ISP: -4500 V; Tem: 550℃。

1.6 代谢数据处理

测得原始数据后利用 MarkerView™ 1.2.1 软件进行以下处理: 数据格式转换、导入, 图谱查看、对比, 去噪音, 质谱峰提取, 反卷积处理; 峰排列、对齐、合并; 峰合并后开始列表去噪音; 缝隙填补处理等, 最终获得二维数据阵。采用 SIMCA-P

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)、偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA)。将分析结果结合在线数据库 (<http://metlin.scripps.edu/>) 检索鉴定可能的生物标志物。通过 Marker View™ 1.2.1 软件进行 *t* 检验, 分析标志性代谢物的组间差异。

2 结果

2.1 各组大鼠胸腺代谢物的 PCA 分析

3 组的 PCA 分析在负离子模式下进行, 共获得 3 个主成分, 累积 R²X = 0.576, 因此该模型适合解释 3 组之间的代谢差异。图 1 示, 模型组游离于治疗组、正常组之外, 可以与它们明显分类, 说明模型组的代谢成分与另两组有区别; 而治疗组和正常组处于相近的区域, 且部分融合交织, 说明两者的代谢成分相似。

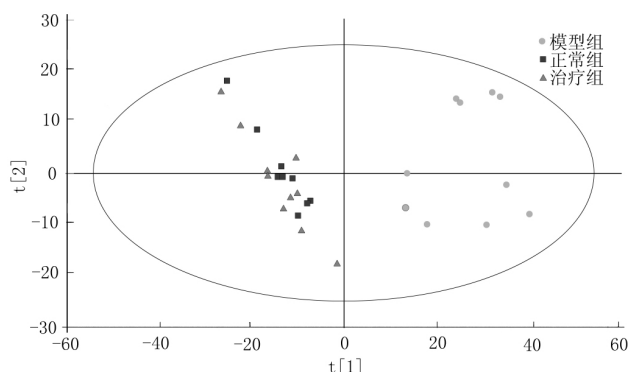


图 1 各组大鼠胸腺代谢物的主成分分析图

2.2 各组大鼠胸腺代谢物的 PLS-DA 分析

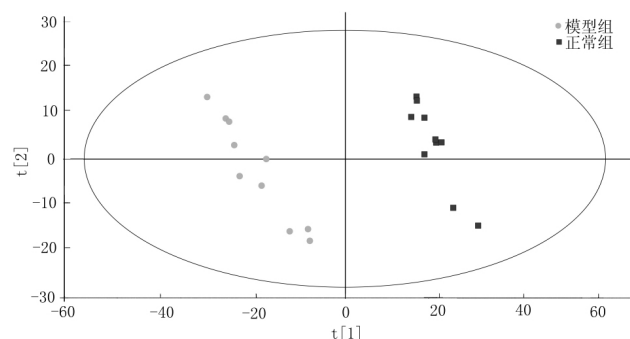


图 2 正常组和模型组大鼠胸腺代谢物的偏最小二乘法-判别分析图

为了进一步确定正常组与模型组、模型组和治疗组是否存在显著的代谢差异, 我们采用 PLS-DA 进一步分析。其中, 正常组与模型组的模型质量参数为: 具有 3 个主成分, R²X = 0.546, R²Y = 0.999, Q² = 0.954; 表明两组之间具有显著的差异, 如图 2 所示。模型组和治疗组的模型质量参数

为: 具有 3 个主成分, $R^2X = 0.549$, $R^2Y = 0.998$, $Q^2 = 0.947$; 两组之间亦存在显著差异, 如图 3 所示。

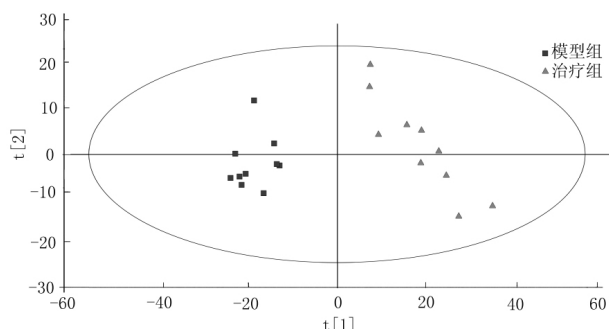


图 3 模型组和治疗组大鼠胸腺代谢物的偏最小二乘法判别分析

2.3 各组大鼠差异性代谢产物的挖掘

为了获得导致正常组与模型组显著差异的代谢物信息, 我们采用 PLS-DA 模型的重要变量因子, 即 VIP 值 (阈值 > 1.0) (由 SIMCA-P 13.0.3 软件自主提取, 即根据 PLS-DA 模型提取对数据影响大的变量值, 数据中某个数据对整体数据的影响数值越大, 表示影响越强), 并结合 t 检验的 P 值 (阈值 0.05) 来寻找差异性表达代谢物。结果在负离子模式下初步比对并推测出皮质醇、环腺苷酸、硫酸、棕榈酸、高肌肽、天门冬氨酸苏氨酸、富马酸二甲酯、腺嘌呤 8 种差异代谢物为正常组区分模型组的可能标记物; 其中棕榈酸在模型组呈上升趋势, 其余物质在模型组呈下降趋势, 具体见表 1。

表 1 模型组区分正常组的可能标志物

VIP 值	t 检验	质荷比	保留时间	物质	趋势
1.47110	0.014771	362.22	17.25	皮质醇	↓
1.48993	0.000760	329.21	11.13	环腺苷酸	↓
1.27436	0.000003	264.10	15.73	硫酸	↓
1.36007	0.000045	256.42	16.32	棕榈酸	↑
1.53410	0.000495	240.12	16.94	高肌肽	↓
1.41732	0.012309	234.08	23.55	天门冬氨酸苏氨酸	↓
1.32209	0.000871	144.00	0.83	富马酸二甲酯	↓
1.33068	0.029686	135.13	1.01	腺嘌呤	↓

2.4 倍性变化分析

我们对模型组和治疗组之间差异性代谢产物进行挖掘, 发现上述 8 种物质在模型组和治疗组之间仍存在显著差异, 如表 2 所示。进一步采用倍性变化分析进行研究, 倍性变化是一种描述两个相比的对象数量差异的方法。我们以正常组作为参照组, 通过比对上述物质在模型组/正常组和治疗组/正常组的倍性变化值来说明该物质在 3 组内含量的差异。结果发现棕榈酸在模型组/正常组上升, 在治

疗组/正常组回落, 接近 1; 其余物质在模型组/正常组下降, 治疗组/正常组回升, 接近 1, 如表 3 所示。

表 2 8 种标志物在模型组和治疗组的差异

VIP 值	t 检验	质荷比	保留时间	物质	趋势
1.50258	0.010292	329.21	11.13	环腺苷酸	↑
1.46260	0.001451	362.22	17.25	皮质醇	↑
1.45206	0.000940	144.00	0.83	富马酸二甲酯	↑
1.53117	0.009654	256.42	16.32	棕榈酸	↓
1.42950	0.008722	264.10	15.73	硫酸	↑
1.32798	0.018651	135.13	1.01	腺嘌呤	↑
1.31526	0.010504	234.08	23.55	天门冬氨酸苏氨酸	↑
1.31204	0.000571	240.12	16.94	高肌肽	↑

表 3 差异性代谢物在模型组/正常组和治疗组/正常组倍性变化趋势

物质	模型组/正常组 倍性变化值	治疗组/正常组 倍性变化值	倍性变化 趋势
皮质醇	0.7983	0.9411	↑
环腺苷酸	0.8562	0.9609	↑
硫酸	0.8870	0.9457	↑
棕榈酸	1.0544	0.9852	↓
高肌肽	0.9004	0.9927	↑
天门冬氨酸苏氨酸	0.9175	1.0076	↑
富马酸二甲酯	0.9206	0.9835	↑
腺嘌呤	0.9277	0.9960	↑

3 讨论

中医学认为, 卫气的功能主要集中在温煦、防御及调节排汗三方面。卫气虚证是卫气的功能降低, 症见恶风、自汗、时常感冒、气短乏力、舌淡脉弱等, 属于中医证候学范畴。中医证候包含外在征象和内在本质, 外在征象通过四诊获得, 而出现的外在征象必然根本于内在本质。从现代医学角度看证候的内在本质应当是中医证的发生、发展的物质基础, 这些物质决定了证候的动态变化^[9]。早在 1992 年, 区永欣等^[8]证实了卫气虚证小鼠对外环境冷热刺激的体温调节稳定性差; 对高温环境的耐受性差, 腠理疏松, 易于出汗; 卫气虚证小鼠网状内皮系统廓清功能下降, 胸腺组织中 cAMP 和 cGMP 含量发生变化。方素萍等^[8]则进一步证实了卫气虚证小鼠耐寒、耐热能力下降, 而玉屏风散对其具有良好的调节作用。同时, 学者们亦发现, 卫气虚时存在 NK 细胞活性^[1]、免疫球蛋白 A 含量^[8]、T 淋巴细胞亚群 CD4、CD8 含量^[10]等免疫指标下降。这些在一定程度上揭示了卫气虚证的实

质, 成果丰富但着眼于单一功能, 而忽略了中医整体观念。代谢组学是从系统整体效应去看待研究对象, 而非某个生物学指标入手, 通过研究生物体内小分子物质的变化及代谢物差异, 进而确定机体内生物学变化过程。因此, 课题组将中枢免疫器官胸腺作为研究的靶器官, 采用代谢组学方法研究卫气虚大鼠胸腺的代谢标志物, 并通过玉屏风散干预观察其反证疗效, 从代谢组学角度证实该药治疗卫气虚证的疗效基础。

研究结果发现, 模型组与正常组的胸腺代谢谱明显不同, 皮质醇、环腺苷酸、硫酸、棕榈酸、高肌肽、天门冬氨酸苏氨酸、富马酸二甲酯、腺嘌呤 8 种物质共同构成了卫气虚证大鼠的胸腺代谢组学特征; 经玉屏风散干预的治疗组向正常组回归, 部分融合在一起。通过对以上差异代谢物的倍性变化分析发现: 棕榈酸在模型组显著上升, 经玉屏风散干预后显著回落; 其余物质在模型组显著下调, 经玉屏风散干预后显著回升。

皮质醇是肾上腺皮质分泌的主要糖皮质激素, 它除对物质代谢有调节作用外, 亦有免疫调节作用, 在寒证或阳气虚损性疾病患者中均存在血清或鼻分泌物中皮质醇水平低下^[1-12]。而以温阳为基础治疗缓解期支气管哮喘等阳虚疾患时可显著提高患者的血清皮质醇水平^[13]。本研究中模型组大鼠胸腺组织皮质醇含量下降, 与上述研究结果具有一致性。环腺苷酸 (cAMP) 既是细胞内重要的生物活性物质, 又可增强气道纤毛清除功能, 具有抗炎及免疫调节作用^[14]。黄高等^[15]发现肺气虚证大鼠血液中 cAMP 显著下降, 经固表实卫治疗后 cAMP 显著增高。硫酸是人体能量代谢, 特别是糖代谢所必需的物质^[16]。本研究发现卫气虚证大鼠胸腺组织硫酸含量减少, 可能与卫气虚时其温养全身的功能减退, 机体产热及获能减少, 硫酸含量下降, 糖在组织内的代谢受到影响有关。棕榈酸是一种饱和高级脂肪酸, 可引起单核-巨噬细胞增殖, 诱导局部炎症, 引起代谢综合征^[17], 而代谢综合征不仅影响了物质代谢, 也导致了能量代谢、免疫系统的紊乱^[18], 推测这与卫气的防御功能减退有关。高肌肽属于肌肽类活性肽, 具有免疫调节及促进细胞能量代谢等作用^[19], 故而推测其参与了卫气温养及防御功能的发挥。天门冬氨酸苏氨酸由天门冬氨酸的羧基与苏氨酸的氨基缩合而成, 属二肽类物质, 二肽类物质对多种人体代谢和生理具有调节功能, 有促进免疫、抗菌、抗病毒等作用^[20-21], 故

而推测其与卫气的防御功能有关。富马酸二甲酯对微生物有广泛、高效的抑菌、杀菌作用^[22], 故而推测其与卫气的防御机制有关。腺嘌呤又称维生素 B4, 当白细胞缺乏时, 腺嘌呤能促进白细胞增生^[23], 故而推测腺嘌呤参与了卫气的防御机制。

综上, 这些差异性代谢标志物的变化均能够影响到卫气的功能, 当其失衡时则出现卫气虚证候。经过玉屏风散干预后, 这些差异性代谢标志物趋于平衡, 从药效的角度进一步证明这些代谢标志物调节机体卫气的盛衰。这些差异性代谢标志物的功能涉及到多组织多器官, 是机体整体多层次功能的体现, 而这些物质整体性的功能调节作用更符合中医学的整体观念, 能够更好地阐释卫气虚证的本质。

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] 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.
- [3] 贾琳, 王亚利, 张明全, 等. 卫气虚证大鼠模型的建立及玉屏风散的反证效果 [J]. 中医杂志, 2015, 56(8): 690-693.
- [4] 李娜. 卫气与神经传导相关性的理论和实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009.
- [5] 区永欣, 邝杰钊, 王洪琦, 等. 卫气理论的实验研究 [J]. 广州中医学院学报, 1992, 9(3): 135-140.
- [6] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2005: 48-49.
- [7] 沈自尹. 有关证与神经内分泌免疫网络的研究 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(1): 10-11.
- [8] 方素萍, 吕鑫霞, 陈玉英, 等. 卫益颗粒 (玉屏风散) 对小鼠冷热刺激适应能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3): 33-35.
- [9] 廖世忠. 玉屏风散防止易感者探讨其“卫气”与免疫球蛋白的关系 [J]. 辽宁中医杂志, 1993, 20(11): 35.
- [10] 王洪琦, 马晶, 李建国, 等. 大气污染对人体卫外功能的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(2): 45-46, 56.
- [11] 周小军, 李宁, 李凤梅, 等. 寒热证候与鼻黏膜相关性的临床研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(3): 50-51.
- [12] 李新华. 不同证型者唾液皮质醇含量的观测 [J]. 湖南中医药导报, 2001, 7(3): 123-124.
- [13] 熊广, 曲敬来, 王文辉. 肺俞穴注射鹿茸精对支气管哮喘缓解期患者血浆皮质醇、醛固酮及 IgE 水平的影响 [J]. 黑龙江中医药, 2004(2): 10-12.
- [14] 杜娟, 李兴周, 周建. 葡甲胺环腺苷酸治疗儿童支气管哮喘的疗效及对 T 细胞亚群的影响 [J]. 医药导报,

- 2006, 25(11): 1162-1164.
- [5] 黄高, 朱祝生, 吴红. 固表实卫治疗“肺气虚证”的实验研究[J]. 江西中医药, 2010, 41(4): 73-74.
- [6] 孙路路, 张石革. 维生素 B₁ (硫胺) 缺乏症(脚气病) 与补充维生素 B₁ [J]. 中国药房, 2003, 14(6): 383-384.
- [7] 田振华, 沈捷, 马向华, 等. 棕榈酸棕榈酯对人外周血单核细胞增殖的影响[J]. 江苏医药, 2009, 35(6): 654-656.
- [8] 谢伶俐, 周力, 李丽滨. 炎症与非酒精性脂肪性肝病[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(30): 3118-3122.
- [9] 包丽芹, 邹积宏. 肌肽在医药领域的应用及其研究概况[J]. 黑龙江医药, 2005, 18(1): 17-20.
- [20] 田颖, 王刚. 脯-甘氨酸环二肽对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3093-3094.
- [21] 席鹏彬, 林映才, 朱选, 等. 谷氨酰胺二肽对断奶仔猪生长性能、细胞免疫及血液生化指标的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(9): 900-905.
- [22] 刘畅, 迟秋池, 王珂. 气相色谱串联质谱-内标法测定面粉及面制品中富马酸二甲酯[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(11): 1737-1739.
- [23] 刘怀民. 健脾益肾方合维生素 B₄ 片治疗恶性肿瘤放疗后白细胞减少症疗效观察[J]. 河北中医, 2011, 33(6): 871-872.

Effects of *Yupingfeng San* (玉屏风散) on Thymus Metabolomic Characteristic Markers in Defensive-Qi Deficiency Syndrome Rat Model

JIA Lin¹, WANG Yali², YANG Qian¹, ZHANG Mingquan³, SHI Xuliang³, LI Bolin²

(1. Traditional Chinese Medicine Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, 050031; 2. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University; 3. Basic Medical School, Hebei University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To evaluate the characteristic metabolic markers of the thymus metabolomics in Defensive-Qi Deficiency syndrome and the intervention effect of *Yupingfeng San*. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into a normal group, a model group and a treatment group, with 10 in each. The normal group was fed normally. The model group was given fatigue combined with cold and heat alternating method to establish the Defensive-Qi Deficiency syndrome model. The treatment group was gavaged with *Yupingfeng San* granules 25 g/ (kg · d) after the same daily modeling method as the model group for 7 days. The thymus metabolites were detected by High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC-MS), and the data were analyzed with principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The primitive spectrum and data of thymus metabolomics of each group were compared with each other to determine the potential markers and their trends. **Results** Eight differential metabolites including cortisol, cAMP, thiamine, palmitic acid, homocarnosine, aspartyl threonine, dimethyl fumarate (DMF) and adenine were the probable markers to distinguish the normal group from the model group. The palmitic acid level showed an upward trend in the model group, and the other seven showed a downward trend. The levels of 8 metabolites in the treatment group were turning normal as that in the normal group, with the palmitic acid level declined obviously and the others rose remarkably. **Conclusion** Cortisol, cAMP, thiamine, palmitic acid, homocarnosine, aspartyl threonine, DMF and adenine seem to be the characteristic markers of the thymus metabolomics in rat model of Defensive-Qi Deficiency syndrome, and *Yupingfeng San* could regulate back their metabolic disturbance in thymus.

Keywords defensive-Qi deficiency; *Yupingfeng San*; metabolomics; thymus

收稿日期: 2015-11-11; 修回日期: 2016-04-10

编辑: 邓媛