

黄芪建中汤治疗大鼠慢性萎缩性胃炎的代谢组学研究

刘月涛^{1*}, 胡英还^{1,2}, 秦雪梅^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 分析黄芪建中汤(Huangqi Jianzhong Decoction, HQJZ)对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠血浆内源性代谢物紊乱的调控作用, 阐明其对靶标的调控途径。方法 以脱氧胆酸钠和氨水溶液交替饮用进行化学诱导, 结合饥饱失常方法复制 CAG 大鼠模型。将大鼠随机分为对照组、模型组、阳性药(替普瑞酮)组和 HQJZ 高、中、低剂量组, 连续 4 周 ig 给药。利用传统药效学指标(体质量、生化指标和组织病理学)评价 HQJZ 药效。用 ¹H-NMR 采集血浆代谢物数据, 进行多元统计分析, 寻找与 HQJZ 疗效相关的药效标志物。并结合偏最小二乘回归分析(PLS-RA)和 MetPA 筛选出与疗效最相关的代谢通路。结果 HQJZ 可显著抑制 CAG 病变, 与替普瑞酮作用相当。¹H-NMR 代谢组学找到 18 个与 CAG 密切相关的血浆代谢物。HQJZ 可显著调节 3-羟基丁酸、乳酸、醋酸、琥珀酸等 10 个代谢物的紊乱, 通路分析显示精氨酸-脯氨酸代谢、甘油代谢和甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢为其治疗 CAG 的主要靶标途径。结论 HQJZ 对 CAG 治疗作用的主要效应机制涉及其对能量平衡、免疫失调、炎症和氧化应激的调节作用。

关键词: 黄芪建中汤; 慢性萎缩性胃炎; 代谢调控机制; 代谢组学; 通路分析

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2312-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.011

Metabonomics study on interventions of Huangqi Jianzhong Decoction against chronic atrophic gastritis in rats

LIU Yue-tao¹, HU Ying-huan^{1,2}, QIN Xue-mei¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To address the protective role Huangqi Jianzhong Decoction (HQJZ) against chronic atrophic gastritis (CAG) in rats with metabolites in serum, and illuminate its regulative approaches to the targets. **Methods** CAG rat model was constructed by alternant administrations of ammonia solution and sodium deoxycholate, combined with the hunger disorder method. Rats were randomly separated into five groups: control group, model group, positive group (teprenone), low-dose group, medium-dose group, and high-dose group of HQJZ for continuous ig administration for four weeks. Body weight, biochemical indexes, and histopathological exam were used to evaluate the efficacy of HQJZ after the model replicated successfully. ¹H NMR-based metabonomics was employed to analyze the plasma metabolic features of HQJZ deviated from CAG rats. Partial least square regression analysis (PLS-RA) and MetPA analysis were utilized to explore the relevant pathways and the underlying mechanism involved in HQJZ against CAG. **Results** The pharmacodynamic results demonstrated that HQJZ possessed beneficial activities in treating CAG, which partially ascribed to the improvement of gastric PA and antioxidant system *in vivo*. A total of 18 plasma metabolites were selected as the potential biomarkers related to the development of CAG, 10 out of them including 3-hydroxybutyrate, lactate, acetate, succinate, etc. were significantly regulated by HQJZ. Three regulation pathways: arginine and proline metabolism, glycerolipid metabolism, and glycine, serine and threonine metabolism, were recognized to be the most relevant efficacy of HQJZ against CAG based on PLS-RA and MetPA analysis. **Conclusion** The efficacy of HQJZ against CAG were ascribed to the improvement of the pathological changes due to its regulation to the energy imbalance, excessive oxidative stress, immune disorders, as well as inflammation.

Key words: Huangqi Jianzhong Decoction; chronic atrophic gastritis; metabolism regulation mechanism; metabonomics; pathway analysis

收稿日期: 2018-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31570346, 81703697); 山西省青年科技研究基金资助项目(2015021193)

*通信作者 刘月涛(1984—), 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向为中医药代谢组学。Tel: 18935190804 E-mail: yuetaoliu@sxu.edu.cn
秦雪梅, 教授, 博士生导师, 主要从事中药质量评控及中医药代谢组学研究。E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

黄芪建中汤 (Huangqi Jianzhong Decoction, HQJZ) 为健脾补虚的经典名方。临床及药理实验均显示, 其对慢性萎缩性胃炎 (CAG) 疗效确切, 但其现有作用机制研究多针对单一的病理状态或作用靶点, 与中医药的整体观存在一定差距, 不能有效体现中药多靶点、多途径的作用模式^[1-3]。

代谢组学作为系统生物学的一种, 在定量、系统研究生物内源性小分子代谢物整体和动态改变规律上具有独特优势。其全局、动态的研究方法观与中药的整体调节相一致, 在阐释中药复方的作用机制上潜力巨大^[4-5]。随着代谢组学的快速发展, 数据的分析和处理方法也在不断地进步。其中, MetPA 在中药代谢通路分析上应用广泛, 可用于辅助分析相关代谢通路^[6], 但其局限于差异代谢物的定性研究, 没有考虑代谢途径的整体变化, 尤其是缺乏与相关诊断指标的相关分析, 不能有效表征代谢通路的生物学意义。偏最小二乘回归分析 (PLS-RA) 可以有效阐明整个代谢通路与生理指标的相关性, 为变量生理意义的阐述提供理论依据^[7]。因此, PLS-RA 和 MetPA 的结合是确定与中药药效相关重要靶标途径的有力工具。

本研究结合传统药效学和代谢组学方法, 并整合非靶向代谢组学、PLS-RA 与 MetPA, 阐释 HQJZ 对 CAG 治疗作用潜在的机制和靶标途径。

1 仪器与材料

1.1 药材

黄芪、白芍、桂枝、炙甘草和饴糖均购于太原同仁堂药店 (批号分别为 20161021、20160428、20160804、20160509、20160520), 生姜和大枣统一在市场购置, 经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定, 分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根的加工炮制品、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根和樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎、鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的成熟果实。

1.2 实验动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 (180±20) g, SPF 级, 许可证号 SCXK (京) 2012-0011, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养环境为温度 (25±2) °C、湿度 (50±10) %, 光/暗周期为 12 h,

自购入时起适应性饲养 7 d 后开始实验, 期间自由摄食和饮水。

1.3 药品与试剂

脱氧胆酸钠 (北京奥博星生物技术有限责任公司); 氨水 (天津市大茂化学试剂厂); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 (天津市化学试剂六厂); 甲醇 (北京化工厂), 以上试剂均为分析纯。重水 (D₂O, 美国 Norell 公司); 3-(三甲基硅基) 氘代丙酸钠 (TSP, 美国 Cambridge Isotope Laboratories Inc. 公司); 生理盐水 (华北制药股份有限公司); 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和胃蛋白酶 (PA) 试剂盒均购自南京建成生物技术工程研究所; 替普瑞酮 [卫材 (中国) 药业有限公司, 批号 20161001]。

1.4 仪器

Bruker 600-MHz AVANCE III NMR Spectrometer (德国布鲁克公司); SC-3160 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); Legend Micro 17R 高速低温离心机 (美国赛默飞公司); Scientz-1LS 离心浓缩仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); SpectraMax 190 酶标仪 (美国 AD 公司); BX53 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 大鼠代谢笼 (北京佳源兴业有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备

HQJZ 为黄芪 9 g、桂枝 9 g、白芍 18 g、炙甘草 6 g、生姜 9 g、大枣 4 枚和饴糖 30 g。按组方比例混合药材饮片 (除饴糖), 蒸馏水浸泡 1 h ($V_{\text{溶剂}}:W_{\text{样本}}=5:1$), 回流提取 2 次, 每次 2 h, 用纱布滤过, 合并滤液, 减压浓缩, 加入 30 g 饴糖, -20 °C 保存备用, 给药前复温, 并保证用药期间每周配药 1 次。

2.2 CAG 大鼠模型的复制

SD 大鼠 40 只, 适应饲养 1 周后, 按以下方法造模: ①造模第 1 日, 大鼠给予浓度为 20 mmol/L 的脱氧胆酸钠溶液代替饮用水, 自由饮用 24 h。更换浓度为 0.1% 的氨水溶液, 自由饮用 24 h。再给予 20 mmol/L 的脱氧胆酸钠溶液 24 h, 反复交替进行, 直至造模成功。②饥饱失常: 模型制备期间大鼠给予标准饲料, 2 d 足食, 1 d 禁食, 反复循环。对照组大鼠自由饮水, 标准饲料喂养。造模期间每 3 天称体质量 1 次, 造模 10 周后, 随机抽取 4 只大鼠, 进行胃组织病理学检测, 判断造模成功与否。

2.3 分组、给药及样本收集

SD 大鼠按体质量随机分为 6 组, 除模型组 10

只外, 其他每组大鼠 6 只, 分为对照组、模型组, HQJZ 低 (HQJZL, 生药 4.6 g/kg)、中 (HQJZM, 生药 9.2 g/kg)、高 (HQJZH, 生药 18.4 g/kg) 剂量组和阳性药 (替普瑞酮, P, 0.13 g/kg) 组。除对照组和模型组外, 大鼠造模成功后开始 ig 给药, 给药 4 周。末次给药 40 min 后, ip 20% 乌拉坦 (7.5 mL/kg) 麻醉, 迅速腹主动脉取血, 用肝素钠抗凝采血管收集血样, 3 500 r/min 离心 20 min, 取上清液, 分装, -80 °C 保存, 备用。

2.4 HQJZ 对 CAG 大鼠治疗作用的药效学评价

2.4.1 体质量变化动态监测 追踪记录整个实验周期大鼠的体质量变化, 采用 Origin (version 8.0, Origin Lab, 美国) 软件绘制体质量动态变化曲线, 评价 HQJZ 对模型大鼠体质量变化的影响。

2.4.2 生化测试 按照试剂盒说明测定血浆中 MDA 水平、SOD 活性及胃组织中 PA 的活性。

2.4.3 组织病理检查 固定胃组织样品于 10% 甲醛溶液中 48 h, 常规石蜡包埋, 5 mm 切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察, 评价 HQJZ 对胃组织病理形态学的影响。

2.5 HQJZ 对 CAG 大鼠治疗作用的代谢组学研究

2.5.1 样本处理 大鼠血浆样品室温解冻, 准确吸取 300 μ L 置于 1.5 mL EP 管中, 加入 300 μ L D₂O 后, 涡旋 30 s, 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min, 取上清 550 μ L, 将其转移至 5 mm 核磁管中, 待测。

2.5.2 NMR 检测条件 所有核磁数据在 Bruker 600 MHz AVANCE III NMR 谱仪 (配有 Bruker 5 mm BBO 探头, 质子频率 600.13 MHz, 采集温度 25 °C) 上采集。测样前对谱仪进行温度校正和匀场校正。

血浆样品 1D 核磁采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列以抑制蛋白质和脂蛋白的宽单峰。扫描次数为 64, 采集时间为 2.654 s, 谱宽 12 345.7 Hz, 图谱大小 65 536 数据点, 延迟时间 (RD) 为 1 s。

血浆样本 2D ¹H-¹H COSY NMR 谱采用 noesygppr1d 脉冲序列, 选取参数为 RD 1.5 s, F2 谱宽 6 602.1 Hz, F1 谱宽 6 601.5 Hz; 采用 hsqcetgpsisp 脉冲序列, 选取参数为 RD 1.2 s, F2 谱宽 6 602.1 Hz, F1 谱宽 36 220.3 Hz。以肌酸 (δ 3.04) 为标准对血浆谱图进行化学位移的校正。

2.5.3 图谱处理 采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 软件对所有 ¹H-NMR 图谱进行傅里叶转换、相

位以及基线调整。在 1D 和 2D 核磁图谱中, 分别以肌酸 (δ 3.04) 为标准对血浆谱图进行化学位移的校正。并对 δ 0.50~9.50 区域内的谱图进行 δ 0.04 等步长分割, 切除 δ 4.68~5.20 区域的水峰信号, 剩余区段进行积分, 将所产生的积分数据进行归一化处理。

2.5.4 数据处理 采用 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, 瑞典) 软件对 ¹H-NMR 积分数据进行中心化和规格化处理, 进行 PLS-DA, 用来评价各实验组的代谢轮廓差异。进一步利用 OPLS-DA 优化组间差异, 利用 R^2_X 、 R^2_Y 和 Q^2 进行模型评价, 采用 S-plot 用来寻找对分组贡献较大的差异代谢物。使用 SPSS 16.0 软件, 采用独立样本 t 检验对差异代谢物进行显著性检验。根据 NMR 谱的信号归属对这些潜在生物标志物进行鉴定, 并与 HMDB (<http://www.hmdb.ca>) 和 KEGG (<http://www.kegg.com/>) 等数据库比对, 结合二维核磁谱推测其可能的化学结构。代谢通路分析中, 利用代谢组学在线分析网站 Metabo Analyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) 进行 MetPA 分析, 对代谢通路进行归宿并筛选相关代谢通路。

同时, 通过 PLS-RA 评估不同的代谢途径和 PA 之间的关系。将 PA 水平作为变量 Y 描述疾病的损伤程度, 参与同一代谢途径的代谢物的峰面积作为变量 X 。预测的变化 (Q^2_Y) 和模型的意义 (P 值) 是其主要的诊断参数, 用于评价代谢途径的重要性。

各指标结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用 SPSS 16.0 软件进行。

3 结果

3.1 HQJZ 对 CAG 大鼠体质量的影响

各组大鼠在治疗给药期间的体质量如图 1 所示, 模型组大鼠体质量显著低于对照组, 各给药组大鼠体质量处于模型组和对照组之间, 且随着给药时间的延长, 体质量逐渐趋于对照组, 其中 HQJZM

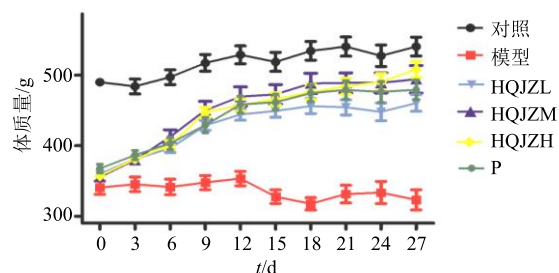


图 1 HQJZ 对 CAG 大鼠体质量的影响

Fig. 1 Effects of HQJZ on body weight of rats with CAG

组大鼠体质量与对照组最为相近。说明 HQJZ 对 CAG 大鼠体质量的降低产生了较好的回调作用, HQJZM 疗效最佳, 且与阳性药替普瑞酮相当。

3.2 HQJZ 对 CAG 大鼠各项生化指标的影响

各组大鼠在治疗给药期间的生化指标结果见表 1。与对照组比较, 模型组大鼠血浆中 MDA 水平显著升高 ($P<0.01$), SOD 活性显著降低 ($P<0.05$), PA 活性显著降低 ($P<0.01$), 结果表明模型复制可靠稳定。经治疗给药后, HQJZL 对 SOD、MDA 及 PA 具有调节作用, 但无统计学意义。HQJZH、HQJZM 组大鼠血浆中 SOD 活性显著升高 ($P<0.05$), MDA 水平下调 ($P<0.01$), PA 活性显著回升 ($P<0.01$), 且 HQJZM 的调节作用略优于 HQJZH, 与阳性药替普瑞酮的改善作用相当。结果提示 HQJZM 对 CAG 的治疗作用最佳。

表 1 HQJZ 对 CAG 大鼠各项生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of HQJZ on biochemical indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	PA/(U·mg ⁻¹)
对照	6	202.09 ± 9.352	5.26 ± 0.41	1.52 ± 0.23
模型	10	130.69 ± 9.676 [#]	7.85 ± 0.62 ^{##}	0.83 ± 0.12 ^{##}
HQJZL	6	159.10 ± 8.444	6.57 ± 0.51	0.99 ± 0.17
HQJZM	6	214.18 ± 18.105 [*]	6.23 ± 0.30 ^{**}	1.37 ± 0.15 ^{**}
HQJZH	6	202.18 ± 14.464 [*]	6.24 ± 0.32 ^{**}	1.29 ± 0.12 ^{**}
P	6	217.72 ± 11.086 [*]	6.43 ± 0.54 [*]	1.46 ± 0.31 ^{**}

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$

^{**} $P<0.01$, 下同

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below

3.3 HQJZ 对 CAG 大鼠胃组织病理学的影响

大鼠胃组织病理分析结果如图 2 所示, 对照组大鼠胃黏膜未见明显异常。模型组大鼠胃体可见黏膜层上皮细胞萎缩、胞核固缩、胞浆嗜酸性增强, 部分病例黏膜下层水肿、炎细胞灶性浸润, 散在黏膜上皮细胞水肿、脱落。P 组表现为黏膜小灶性炎细胞浸润, 黏膜上皮细胞轻至中度萎缩, 胞核固缩(坏死)、染色加深, 病变程度减轻, 病变范围较小, 呈现出明显的抑制作用。HQJZ 各剂量组大鼠胃体可见肌层肌细胞水样变性, 部分肌细胞轻度萎缩, 胞浆嗜酸性增强, 黏膜层见鳞状细胞灶性增生, 轻度炎细胞浸润。HQJZH、HQJZL 组大鼠胃组织病理差异不明显。而 HQJZM 组大鼠病变恢复程度和范围最为明显, 表明该剂量的保护作用最佳。

3.4 HQJZ 对 CAG 大鼠治疗作用的代谢组学研究

3.4.1 HQJZ 对 CAG 大鼠血浆代谢紊乱的调节作用 PLS-DA 得分图(图 3)显示对照组与模型组有明显的区分, 与药效学结果和预防给药研究结果一致。经药物干预后, HQJZM 组及 P 组最接近对照组, 表明 HQJZM 对 CAG 大鼠血浆代谢紊乱的调控作用最佳, 与替普瑞酮相当。

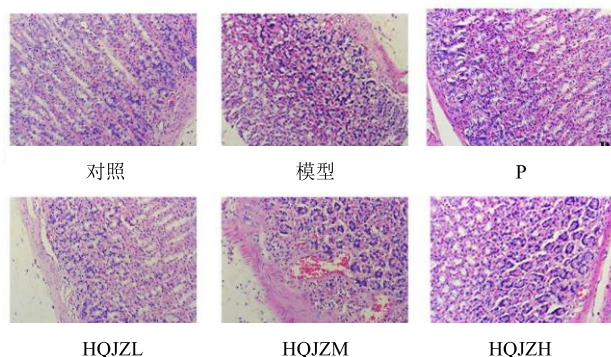


图 2 各组大鼠胃组织病理学结果 (×200)

Fig. 2 Staining results of gastric histopathology of rats in each group (×200)

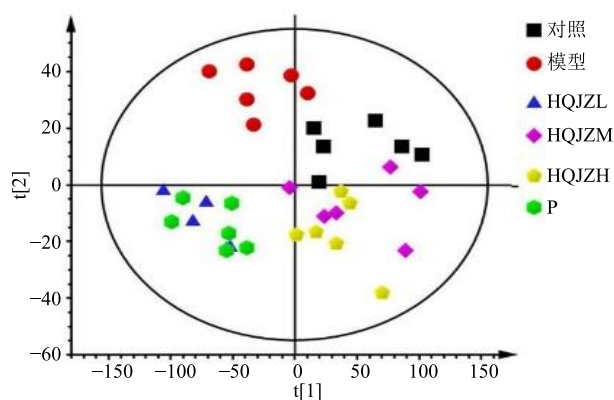


图 3 各组大鼠血浆样本 PLS-DA 得分图

Fig. 3 PLS-DA score of plasma samples of rats in each group

3.4.2 CAG 大鼠血浆差异代谢物的鉴定 从 OPLS-DA 得分图(图 4-A)可以看出对照组和模型组明显位于 $t[1]$ 轴的两侧, 利用相应 S-plot 图(图 4-B)寻找二者之间的差异, 筛选 $VIP>1$ 且 $P<0.05$ 的变量, 根据 HMDB 和 KEGG 等数据库以及文献中数据对差异物进行比对, 识别了 18 个血浆差异物(表 2)。

3.4.3 HQJZ 对 CAG 大鼠血浆效应标志物的影响 如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血浆中 3-羟基丁酸、乳酸、醋酸、琥珀酸、甘油磷酸胆碱和缬氨酸含量显著升高, 而胆碱、肌酸、脯氨酸、甜

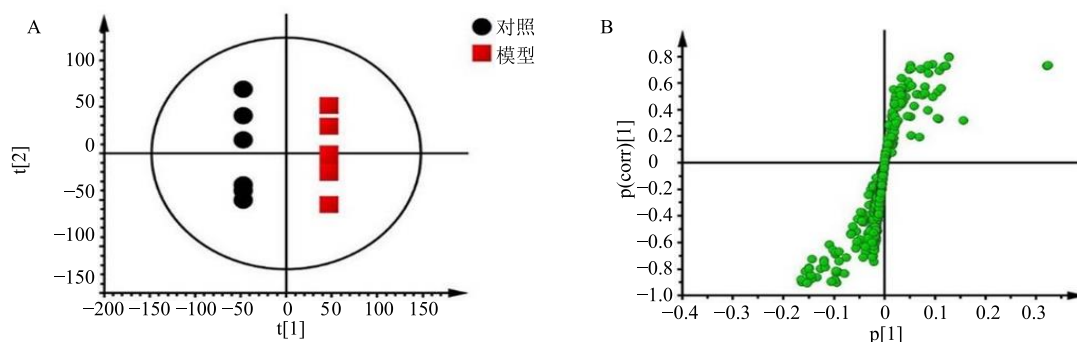


图 4 大鼠血浆的 OPLS-DA 散点图 (A) 和 S-plot 图 (B)

Fig. 4 OPLS-DA scatter plot (A) and S-plot diagram (B) of plasma in rats

表 2 大鼠血浆代谢物归属

Table 2 Assignments of plasma metabolites in treatment of rats

编号	代谢物	基团	δ_{H}	VIP 值
P1	3-羟基丁酸 (3-hydroxybutyrate)	$\gamma\text{-CH}_3$, half- αCH_2 , half- αCH_2	1.21 (d, $J = 6.6$ Hz), 2.40 (dd, $J = 7.2$, 14.4 Hz), 2.32 (dd, $J = 6.6$, 14.4 Hz)	2.23
P2	乳酸 (lactate)	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_3$	1.33 (d, $J = 6.6$ Hz)	6.65
P3	醋酸 (acetate)	CH_3	1.92 (s)	2.00
P4	琥珀酸 (succinate)	CH_2	2.42 (s)	1.24
P5	胆碱 (choline)	$N(\text{CH}_3)_3$	3.25 (s)	1.40
P6	肌酸 (creatinine)	CH_3 , CH_2	3.04 (s), 3.92 (s)	5.02
P7	甘油磷酸胆碱 (glycerophosphocholine)	$N(\text{CH}_3)_3$	3.28 (s)	1.65
P8	缬氨酸 (valine)	$\gamma\text{-CH}_3$, $\gamma'\text{-CH}_3$	1.04 (d, $J = 7.2$ Hz), 2.27 (m), 3.65 (d, $J = 4.8$ Hz)	1.29
P9	脯氨酸 (proline)	CH_2	3.37 (d, $J = 7.2$ Hz)	5.35
P10	甜菜碱 (betaine)	$N(\text{CH}_3)_3$, CH_2	3.28 (s), 3.9 (s)	6.38
P11	精氨酸 (arginine)	CH_2	1.72 (m), 1.91 (m), 3.25 (t, $J = 8.4$ Hz), 3.77 (d, $J = 6.6$ Hz)	1.93
P12	牛磺酸 (taurine)	$S\text{-CH}_2$, $N\text{-CH}_2$	3.25 (t, $J = 8.4$ Hz), 3.41 (d, $J = 6.0$ Hz)	5.43
P13	瓜氨酸 (citrulline)	CH_2	1.57 (m), 1.88 (m), 3.15 (q, $J = 6.6$ Hz), 3.72 (t, $J = 3.6$ Hz)	5.98
P14	甘油 (glycerol)	CH_2OH , CHOH	3.46 (dd, $J = 1.8$, 6.0 Hz), 3.48 (dd, $J = 3.0$, 5.4 Hz)	5.51
P15	甘氨酸 (glycine)	CH_2	3.53 (s)	4.61
P16	β -葡萄糖 (β -glucose)	1-CH	4.65 (d, $J = 7.8$ Hz)	4.32
P17	α -葡萄糖 (α -glucose)	1-CH	5.24 (d, $J = 3.6$ Hz), 3.90 (dd, $J = 12.0$, 2.4 Hz)	3.28
P18	糖原 (glycogen)	$\text{CH}(\text{OH})$	3.4~3.9 (m), 5.38~5.45 (m)	5.68

菜碱、精氨酸、牛磺酸、瓜氨酸、甘油、甘氨酸、 β -葡萄糖、 α -葡萄糖和糖原的含量显著降低。HQJZ 能显著逆转 3-羟基丁酸、乳酸、醋酸、琥珀酸、胆碱、肌酸、甘油磷酸胆碱、缬氨酸、甜菜碱、甘油的异常，这些标志物可能与其对 CAG 的治疗作用相关，可以进一步表征其药效作用机制。

3.4.4 大鼠血浆差异代谢物代谢通路分析 结果如表 3 所示，18 个潜在的血浆代谢物参与了 8 种不同的代谢途径，包括脂肪酸代谢、糖代谢、TCA 循环、

精氨酸-脯氨酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸生物合成、牛磺酸-亚牛磺酸代谢、甘油代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢。经 HQJZ 治疗后，脂肪酸代谢、TCA 循环、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸生物合成和甘油代谢通路被整体调节，糖代谢中仅乳酸被调节，精氨酸-脯氨酸代谢中仅肌酸被显著调节，甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢通路中的 3 个血浆差异物（胆碱、甘油磷酸胆碱、甜菜碱）被调节，牛磺酸-亚牛磺酸代谢通路未被调节。

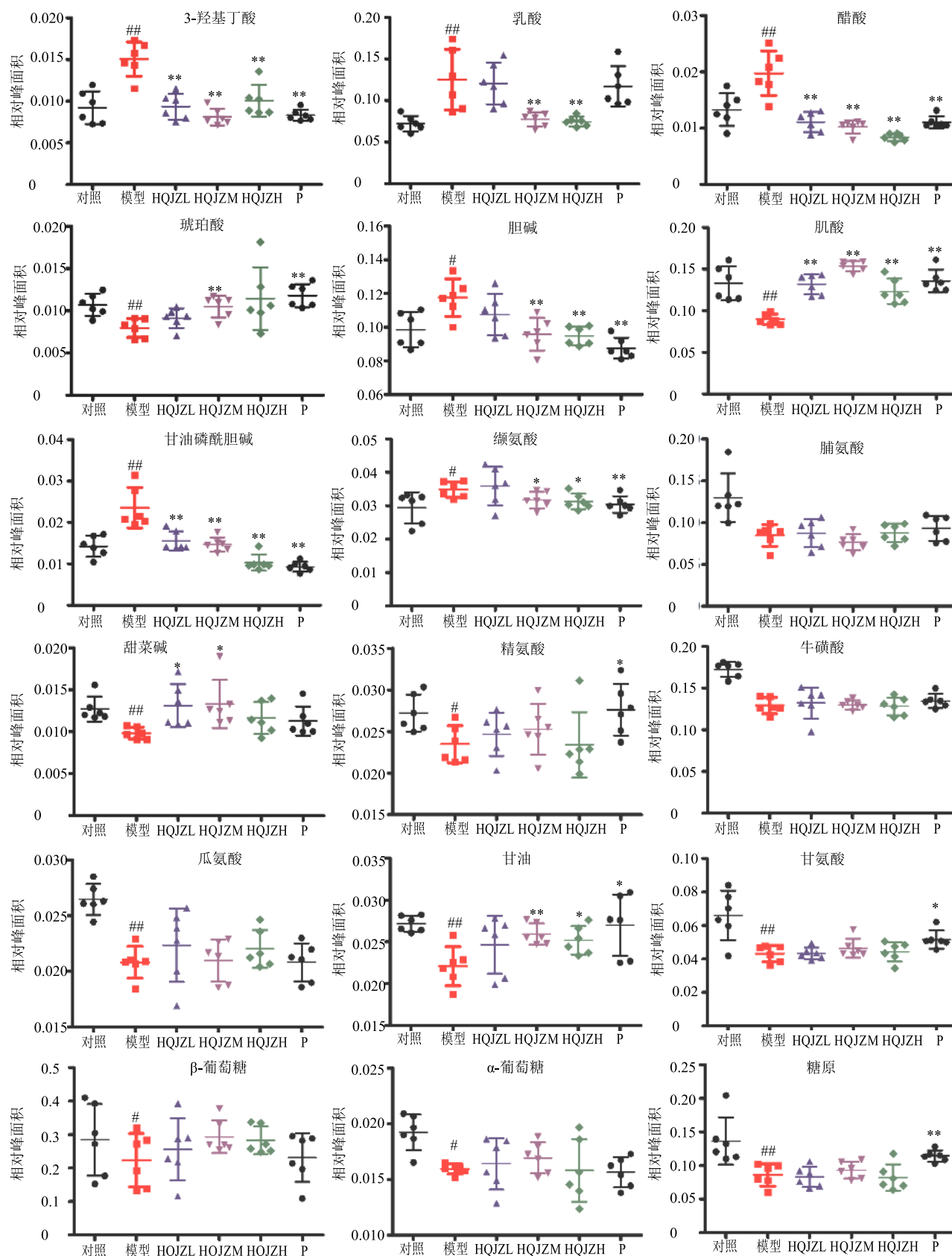


图 5 HQJZ 对 CAG 大鼠血浆效应标志物的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Effects of HQJZ on effect biomarkers in plasma of CAG rats ($\bar{x} \pm s$)

表 3 血浆差异代谢通路归属及 PLS-RA 模型的诊断参数

Table 3 Classification of differential metabolic pathway in plasma and summary of diagnostic parameters of PLS-RA model

编号	代谢通路	R^2_X	R^2_Y	Q^2_Y	P 值	代谢物
MP ₁	脂肪酸代谢 (fatty acid metabolism)	0.687	0.811	0.773	1.27×10^{-3}	P ₁ 、P ₃
MP ₂	糖代谢 (glucose metabolism)	0.642	0.783	0.766	1.44×10^{-3}	P ₂ 、P ₁₆ 、P ₁₇ 、P ₁₈
MP ₃	TCA 循环 (TCA cycle)	1	0.457	0.407	0.095	P ₄
MP ₄	精氨酸-脯氨酸代谢 (arginine and proline metabolism)	0.802	0.738	0.675	6.36×10^{-3}	P ₆ 、P ₉ 、P ₁₁ 、P ₁₃
MP ₅	缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸生物合成 (valine, leucine, and isoleucine biosynthesis)	1	0.388	0.325	0.013	P ₈
MP ₆	牛磺酸-亚牛磺酸代谢 (taurine and hypotaurine metabolism)	1	0.898	0.892	0.171	P ₁₂
MP ₇	甘油代谢 (glycerolipid metabolism)	1	0.694	0.666	7.15×10^{-3}	P ₁₄
MP ₈	甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢 (glycine, serine, and threonine metabolism)	0.592	0.950	0.917	1.38×10^{-4}	P ₅ 、P ₇ 、P ₁₀ 、P ₁₅

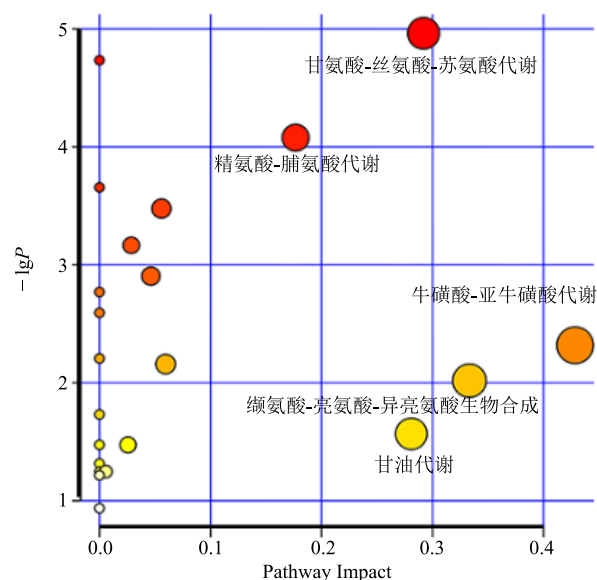
PLS-RA 结果如表 3 所示, 其中的 5 种途径脂肪酸代谢、糖代谢、精氨酸-脯氨酸代谢、甘油代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢通路与 PA 相关性较强, 其 Q^2_Y 值分别为 0.773、0.766、0.675、0.666 和 0.917, P 值分别为 1.27×10^{-3} 、 1.44×10^{-3} 、 6.36×10^{-3} 、 7.15×10^{-3} 和 1.38×10^{-4} 。甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢通路具有最高的 Q^2_Y 值, 表明该通路在 CAG 的病理发展中发挥重要作用。而经 HQJZ 治疗后, 5 条通路均被调节。

MetPA 结果如图 6 显示, 精氨酸-脯氨酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸生物合成、牛磺酸-亚牛磺酸代谢、甘油代谢和甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢通路为 CAG 发展相关的重要的代谢通路 (Impact 值 > 0.1)。精氨酸-脯氨酸代谢、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸生物合成、甘油代谢和甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢通路与药物治疗作用密切相关, 表明这 4 条通路在 HQJZ 的治疗机制中具有重要作用。

PLS-RA 和 MetPA 的结果相互验证, 提示精氨酸-脯氨酸代谢、甘油代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢是与复方治疗最相关的 3 条通路。

4 讨论

本研究采用造模成功后给药的方式, 探讨 HQJZ 对 CAG 大鼠的治疗作用机制。利用体质量、生化指标和组织病理检查等传统药效学指标对 HQJZ 进行药效学评价; 同时采用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术检测收集到的各组大鼠的血浆样本, 通过多元统计等计量学方法筛选差异代谢物和相关代谢通路。代谢组学鉴定了 18 个与 CAG 相关的血浆生物标志物, 筛选了 HQJZ 治疗给药对其中的 10 个大鼠血浆药效标志物具有



每个点代表一条代谢通路, 点的颜色和大小与代谢通路的影响值正相关

Each point represents a metabolic pathway, and color and size of points are positively related to value of the metabolic pathway

图 6 血浆代谢通路的 MetPA 分析

Fig. 6 MetPA analysis of plasma metabolic pathways

显著的回调作用。HQJZ 对 CAG 的治疗作用表现为药物对 CAG 大鼠血浆代谢轮廓的调控, 且中剂量组的调节作用最明显 (与替普瑞酮相当), 说明药物发挥最佳治疗作用的剂量值为中剂量。利用 MetPA 分析筛选与 CAG 发展及 HQJZ 治疗作用机制相关的代谢通路, 结果表明精氨酸-脯氨酸代谢、甘油代谢和甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢通路是与 CAG 发展和药物治疗最相关的通路。

4.1 精氨酸-脯氨酸代谢

代谢物肌酐、脯氨酸、精氨酸和瓜氨酸涉及的

代谢通路为精氨酸-脯氨酸代谢。脯氨酸可以代谢产生电子,进而产生活性氧(ROS),引发多种下游效应,包括阻断细胞周期、自噬和凋亡^[8]。精氨酸可通过抑制黄嘌呤氧化酶的活性来抑制氧化应激^[9]。瓜氨酸作为一氧化氮合酶(NOS)家族催化精氨酸的副产物,可以防止氧化损伤^[10]。CAG 大鼠血浆中这 4 个氨基酸的含量降低,表明该条通路在 CAG 的发生发展中的重要性,且进一步提示 CAG 的疾病机制与机体氧化应激密切相关。经 HQJZ 干预后,瓜氨酸被显著调节。提示 HQJZ 可以通过部分改善 CAG 的氧化损伤来发挥预防及保护作用。

4.2 甘油代谢

甘油是细胞能量生成和脂质合成过程中所必需的。据报道,甘油摄取减少会抑制机体能量和脂质产生,从而导致细胞增殖受损^[11]。本研究中,CAG 大鼠血浆甘油含量下降,这表明 CAG 疾病可能涉及了能量失衡等病理改变,而 HQJZ 对甘油有显著的调节作用,提示调控能量失衡可能为 CAG 治疗作用的主要起效机制之一。

4.3 甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢

代谢物胆碱、甘油磷酸胆碱和甜菜碱参与甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢,该条途径可为 TCA 循环提供重要的能量代谢前体。据报道,胆碱能缓解由刀豆蛋白(ConA)和脂多糖(LPS)共同刺激致大鼠免疫系统受损的程度^[12]。HQJZ 都能显著提高 CAG 大鼠中胆碱含量,提示该复方可以改善 CAG 大鼠的免疫系统紊乱。甘油磷酸胆碱是乙酰胆碱的前体,是一种副交感神经剂。有研究表明机体内高浓度甘油磷酸胆碱与吲哚美辛致胃溃疡炎症的发展密切相关,其产生的效果类似于在副交感神经支配下维持组织炎症的状态^[13]。而机体内甜菜碱的不足与乙酰水杨酸诱导的胃损伤相关^[14]。经 HQJZ 干预后胆碱、甘油磷酸胆碱和甜菜碱的紊乱被调节,表明 HQJZ 通过改善炎症和免疫系统发挥其保护作用。

综合以上结果,说明 HQJZ 对 CAG 大鼠胃部病理状态有明显的改善作用,起效机制主要涉及能量平衡、炎症反应、免疫功能和氧化应激。

参考文献

[1] 刘旺根,蒋时红.黄芪建中汤干预脾虚型慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜表皮生长因子含量、诱导型一氧化氮合成酶和表皮生长因子受体基因的表达[J].中国临床

康复,2006,10(43):123-125.

- [2] 陈四清,蒋时红,王琦.黄芪建中汤对慢性萎缩性胃炎大鼠表皮生长因子及其受体基因 mRNA 表达的影响[J].陕西中医,2007,28(3):502-503.
- [3] Wei Y, Ma L X, Yin S J, et al. Huangqi Jianzhong Tang for treatment of chronic gastritis: A systematic review of randomized clinical trials [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2015, 2015: 878164.
- [4] Zhang A H, Sun H, Qiu S, et al. Recent highlights of metabolomics in Chinese medicine syndrome research [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/402159.
- [5] 赵凡凡,李肖,高丽,等.甘草水提物干预 D-半乳糖致衰老大鼠的肝脏代谢组学研究[J].中草药,2017,48(17):3545-3553.
- [6] Xia J, Wishart D S. MetPA: A web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(18): 2342-2344.
- [7] Huang X, Shao L, Gong Y, et al. A metabonomic characterization of CCl₄-induced acute liver failure using partial least square regression based on the GC/MS metabolic profiles of plasma in mice [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 870(2): 178-185.
- [8] Selen E S, Bolandnazar Z, Tonelli M, et al. NMR Metabolomics show evidence for mitochondrial oxidative stress in a mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(8): 3284-3291.
- [9] Jimenez M D, Martin M J, Alarcón De La Lastra C, et al. Role of L-arginine in ibuprofen-induced oxidative stress and neutrophil infiltration in gastric mucosa [J]. *Free Radic Res*, 2004, 38(9): 903-911.
- [10] Phang J M, Liu W, Zahirnyk O. Proline metabolism and microenvironmental stress [J]. *Annu Rev Nutr*, 2010, doi: 10.1146/annurev.nutr.012809.104638.
- [11] Lundquist F, Tygstrup N, Winkler K, et al. Ethanol metabolism and production of free acetate in the human liver [J]. *J Clin Invest*, 1962, 41(5): 955-961.
- [12] Lewis E D, Richard C, Goruk S, et al. The form of choline in the maternal diet affects immune development in suckled rat off spring [J]. *J Nutr*, 2016, 146(4): 823-830.
- [13] Ramadan S, Bonin A M, Kennedy B J, et al. Nuclear magnetic resonance analysis of indomethacin-induced gastric ulcers [J]. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18(2): 123-128.
- [14] Zöllei I, Szabó A, Kaszaki J, et al. Betaine-palmitate reduces acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2001, 36(8): 811-816.