

从代谢组学的角度探讨维胃方对大鼠实验性胃溃疡的疗效机制

彭树灵 刘晓伟 张真瑞 杨健 贺红燕 肖卫平

摘要 **目的** 从代谢组学的角度探讨维胃方对大鼠实验性胃溃疡的疗效机制。**方法** 采用乙酸灼烧法制备大鼠胃溃疡模型;采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)获得正常对照组、模型组、自愈组与维胃方治疗组的大鼠胃黏膜匀浆代谢物谱。经数据前处理后,进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),寻找表征正常对照组与模型组差异的生物标记物;使用主成分分析(PCA)考察维胃方对胃溃疡的治疗效果,并根据生物标记物的变化解释其作用机制。**结果** 模型组与正常对照组的胃黏膜代谢物谱差异有统计学意义;生物标记物包括有机酸、脂肪酸、氨基酸等物质,表明胃溃疡大鼠的胃黏膜出现能量代谢与物质代谢异常;维胃方通过调节胃黏膜的代谢功能,达到有效治疗胃溃疡的目的。**结论** 运用代谢组学技术从整体上揭示了维胃方对大鼠实验性胃溃疡的疗效机制,凸显了中药多靶点综合治疗的特色。

关键词 代谢组学;维胃方;胃溃疡;气相色谱-质谱

Investigation of Therapeutic Mechanism of Weiweifang on Experimental Gastric Ulcer in Rats Viewing from Metabonomics PENG Shu-ling, LIU Xiao-wei, ZHANG Zhen-rui, et al *School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510515)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the therapeutic mechanism of Weiweifang (WWF, a Chinese herbal preparation) on gastric ulcer in rats viewing from metabonomics. **Methods** Wistar rats were made to gastric model by acetic acid cauterization and randomized into the model group, the spontaneously healing group and the three WWF treatment groups, and a group of normal rats was set for control. Metabolic spectra of gastric mucosa extraction of rats were acquired with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique. After being pre-processing, data were subjected to partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to discover the biomarkers in rats of the normal group and the model group. The therapeutic effect of WWF on experimental gastric ulcer was assessed by principal component analyses (PCA), and its action of mechanism was explained viewing from the changes of biomarkers. **Results** Spectra of biomarkers, including organic acids, fatty acids, amino acids, etc. in model rats were statistically different to those in normal rats, which demonstrated that the energy and substance metabolisms were disordered in rats with gastric ulcer. WWF could cure gastric ulcer effectively by way of regulating the metabolism of gastric mucosa. **Conclusion** The therapeutic mechanism of WWF on experimental gastric ulcer in rats is revealed integrally by metabonomics in this study, displaying prominently the characteristics of Chinese medicine multiple targets comprehensive therapy.

KEYWORDS metabonomics; Weiweifang; gastric ulcer; gas chromatography-mass spectrometry

维胃方(WWF)是临床治疗胃溃疡的经验方,由三七、白及、茯苓、蒲公英组成。实验表明^[1-5],WWF可调节乙酸性胃溃疡大鼠血清胃泌素(gastrin, GAS)、表

皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、一氧化氮(nitric oxide, NO)的水平及诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的活性,提高胃黏膜中氨基己糖的含量,从而减轻胃黏膜损伤、增强胃黏膜保护作用,有效促进胃溃疡愈合。研究采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)技术^[6],从代谢组学的角度进一步探讨WWF对实验性胃溃疡的治疗效果及其作用机制。

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 30271567);广东省中医药管理局基金(No. 1040089)

作者单位:南方医科大学中医药学院中医诊断教研室(广州 510515)

通讯作者:刘晓伟, Tel: 010-61648249, E-mail: lxw33@126.com

材料与方 法

1 药物 维胃方(WWF)由三七、茯苓、白及、蒲公英组成,所有药物均来自南方医院中药房,以上药物按一定比例配伍后,常规煎煮 2 次,合并滤液,浓缩至生药含量 1.5 g/mL,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

2 试剂与仪器 氯甲酸乙酯(ECF)、无水乙醇、吡啶、氢氧化钠、无水硫酸钠(均为分析纯),购自阿拉丁试剂公司;氯仿、冰醋酸(分析纯),广东省光华化学厂有限公司;乳酸、花生四烯酸、胆甾醇、谷氨酸、蛋氨酸、酪氨酸等对照品购自国药集团化学试剂有限公司;HP6890GC/5973MS 气相色谱-质谱联用仪(GC/MS)为美国惠普公司产品。

3 动物 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 48 只,购于南方医科大学动物实验中心,体重 200 ~ 220g(SCXK 粤 2006-0015)。

4 方法

4.1 造模 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 6 组:对照组、模型组、自愈组与 WWF 高、中、低剂量组(每组 8 只)。对照组给予正常饮食,模型组及 WWF 组采用乙酸法制备大鼠胃溃疡模型,参照 Okabe 等^[7]的方法略加改进。造模前大鼠禁食不禁水 24 h,用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(3.5 mL/kg),上腹部备皮,消毒,铺手术洞巾,自剑突下剪一 1.5 ~ 2.0 cm 纵切口,暴露鼠胃,将蘸有冰醋酸直径 5 mm 的圆形滤纸贴于胃窦前壁浆膜面(避开血管)1 min 后,用适当的生理盐水冲洗腹腔,还纳胃体,逐层缝合腹膜、腹肌与皮肤,消毒;术后给予正常饮食。

4.2 给药与样本收集 术后第 4 天,WWF 高、中、低剂量组分别按浓度 1.5 g/mL、0.75 g/mL、0.375 g/mL 灌胃给药,10 mL/kg,每天 1 次,连续 7 天。对照组与模型组于造模后 3 天处死,自愈组与 WWF 组于造模后 10 天,即给药 7 天后处死;取出鼠胃,沿胃大弯剪开胃壁,用冰生理盐水冲洗干净后展平,用带刻度的显微镜测量溃疡面的横径及纵径;将胃置于冰上,用手术刀片轻轻地刮取溃疡周围胃窦黏膜约 200 mg, -80 ℃ 保存,备用。

4.3 样品预处理 取胃窦黏膜置于玻璃匀浆器中,加入 1 倍重量体积的冰生理盐水匀浆,匀浆液于低温离心机 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,参照 Qiu Y 等^[8]的方法,对上清液进行 ECF 衍生化处理后用氯仿萃取,弃去水层,氯仿层用无水硫酸钠脱水,经微孔滤膜(0.22 μm,聚四氟乙烯材质)过滤后,转移至气相样品瓶中,作为供试液。

4.4 GC-MS 分析条件 色谱柱:DB-5MS 毛细管柱(Agilent,30 m × 0.25 mm,0.25 μm);分流比为 1:1;进样量:2 μL;进样口温度:260 ℃;程序升温:起始温度 85 ℃,保持 1 min,以 10 ℃/min 升至 140 ℃,以 1 ℃/min 升至 155 ℃,以 5 ℃/min 升至 215 ℃,保持 1 min,以 5 ℃/min 升至 220 ℃;再以 10 ℃/min 升至 300 ℃,保持 5 min;载气:高纯度氮气,流速 1 mL/min;质谱条件:传输线温度:280 ℃;电离方式:EI,电离能量 70 eV;离子源温度:230 ℃;质量扫描范围:30 ~ 550 m/z。

4.5 数据处理及分析 使用 Agilent 色谱工作站对各组样品的 GC-MS 总离子流图中各种代谢物峰面积进行积分,扣除溶剂峰、杂质峰及内标峰,挑选共有峰进行归一化处理。得到由共有峰号、样品号及归一化后的峰强度组成的矩阵,标准化处理后将其导入 SIMCA-P + 12.0(瑞典,Umetrics AB,Umea)进行偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),寻找表征正常对照组与模型组差异的生物标记物;行主成分分析(PCA)考察维胃方的治疗作用;运用 SPSS 13.0 对代谢物相对含量的差异进行 *t* 检验或单因素方差分析。

4.6 代谢物的鉴定 使用工作站中 WILEY275.L 及 NIST05.L 数据库进行代谢物鉴定,结合网站(<http://www.hmdb.ca/>)文献判断其是否为内源性代谢物,选择数据库中匹配度较高的内源性代谢物质作为鉴定结果,部分物质通过标准品进一步鉴定。

结 果

1 胃黏膜大体观察 模型组形成直径 5 ~ 6 mm 的明显溃疡,中心凹陷,覆盖灰白色或黄白色苔状物;自愈组溃疡有所收敛,但仍比较明显;WWF 中剂量组愈合效果良好,WWF 高、低剂量组仍见溃疡,但面积明显小于自愈组。

2 GC-MS 总离子流图(TIC) 经直观分析,对照组与模型组 TIC 存在明显差异,表明两组胃黏膜代谢物谱明显不同。经共有峰挑选,获得并鉴定了 38 个内源性代谢产物。

3 模式识别 经 PLS-DA 分析,正常对照组与模型组明显区分(图 1-A);选取变量投影重要性(Variable Importance in the Projection, VIP) > 1 的 17 种代谢物作为生物标记物(图 1-B),这些物质表征了两种状态的差异,与分组密切相关^[9];进一步对两组间标记物相对含量的差异进行 *t* 检验。结果显示,两组比较,胃黏膜某些有机酸、脂肪酸、胆甾醇、氨基酸水平差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1),表明胃溃疡大鼠代谢功能障碍。

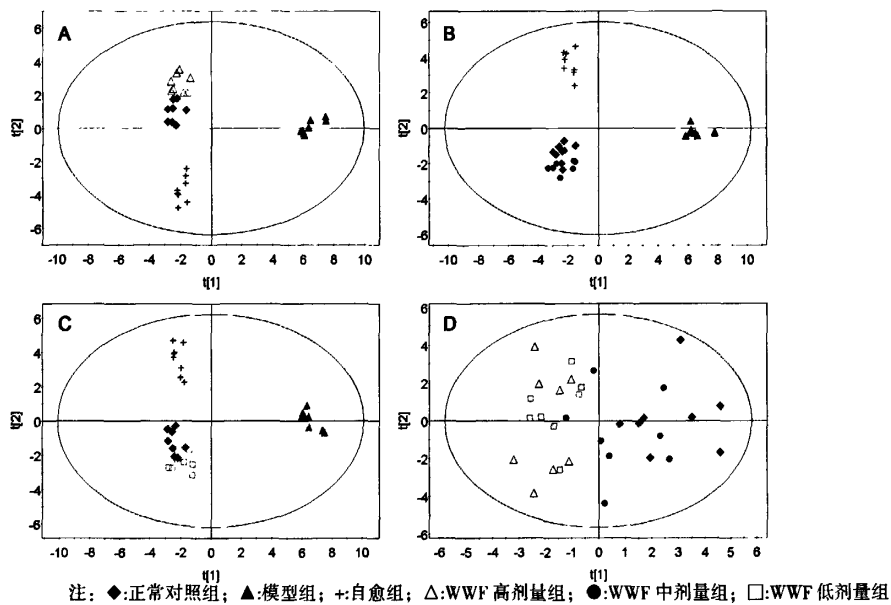
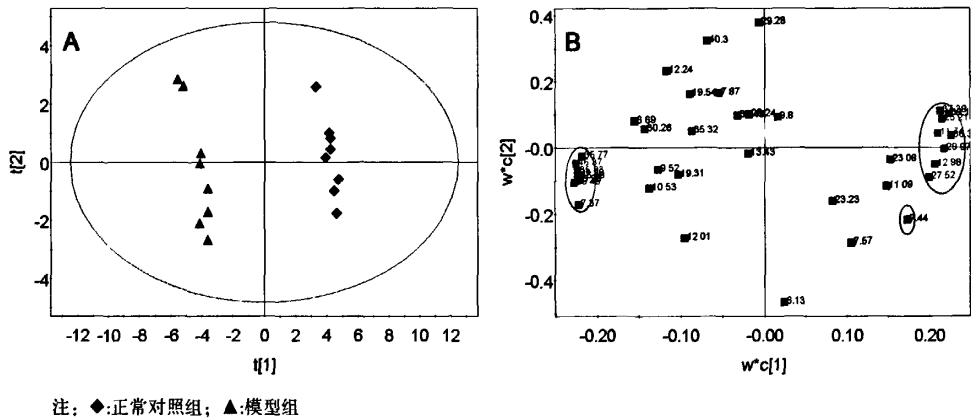


表 1 模型组、自愈组与维胃方不同剂量组代谢标记物水平的变化							
VIP 值	保留时间 (min)	代谢物	模型组	自愈组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
1.355	5.98	乳酸	↑↑	↑↑	-	-	-
1.367	7.37	苹果酸	↑↑	↑↑	-	-	-
1.072	7.44	丙氨酸	↓↓	-	↓↓	-	↓↓
1.285	11.74	亮氨酸	↓↓	↓↓	↑↑	↑	↑
1.266	12.98	脯氨酸	↓↓	↓↓	-	↓↓	↓↓
1.320	25.21	谷氨酸	↓↓	↓↓	-	↑	↑
1.221	27.52	苯丙氨酸	↓↓	-	-	-	-
1.334	29.97	焦谷氨酸	↓↓	-	-	-	-
1.374	31.98	软脂酸	↑↑	↓↓	-	-	-
1.341	35.77	亚油酸	↑↑	↓↓	-	-	-
1.376	35.93	油酸	↑↑	↓↓	↓↓	-	-
1.384	36.38	赖氨酸	↓↓	↓↓	↑	-	↑↑
1.368	36.49	硬脂酸	↑↑	↓↓	-	-	-
1.305	37.38	组氨酸	↓↓	-	-	-	-
1.397	38.46	花生四烯酸	↑↑	↑↑	-	-	-
1.371	39.12	酪氨酸	↓↓	↓↓	↓↓	-	↓↓
1.385	46.37	胆固醇	↑↑	↓↓	-	-	-

注：与对照组比较，- 差异无统计学意义；↑、↓ $P < 0.05$ ；↑↑、↓↓ $P < 0.01$

PCA 分析结果(图 2)可见,所有个体的主成分得分值均分布于椭圆形(95% 置信区间)区域内,WWF 高、中、低剂量组远离模型组及自愈组,与正常对照组接近(图 2-A、B、C);其中维胃方中剂量组与正常组交互重叠,表明其效果最佳(图 2-B、D)。进一步考察自愈组、WWF 组与正常对照组的代谢标记物相对含量差异的显著性(单因素方差分析),结果显示:与正常对照组比较,WWF 组大多数标记物水平差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1),表明 WWF 对胃溃疡大鼠的代谢状态具有回调作用。

讨 论

1 大鼠胃溃疡代谢功能的变化 模型组胃黏膜

的乳酸、苹果酸水平显著升高($P < 0.01$),表明黏膜细胞无氧糖酵解增强,三羧酸循环紊乱,这是由于乙酸使胃浆膜蛋白质变性,胃壁损伤,导致炎症介质大量释放,黏膜下微血管循环障碍、供血不足所致^[10,11]。某些必需氨基酸(亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸与酪氨酸)水平显著降于对照组($P < 0.01$),表明模型组胃黏膜修复原料严重不足,可能因这些物质在溃疡应激状态下直接或间接参与三羧酸循环而过度消耗;谷氨酸、焦谷氨酸是 γ -谷氨酰基循环的中间物质,而脯氨酸是谷氨酸的前体物质,这些物质在溃疡形成过程因合成抗自由基损伤的谷胱甘肽而显著下降($P < 0.01$)^[12,13]。谷氨酸、酪氨酸、组氨酸对胃黏膜还有直接的保护作用,这些物质下降表明胃黏膜的防御能力降低。脂肪酸(软脂酸、硬脂酸、亚油酸、油酸与花生四烯酸)及胆甾醇是细胞生物膜的构成成分,这些物质大量堆积,是由于胃溃疡大鼠的胃黏膜细胞被大量破坏且因能量代谢障碍无法利用及转运所致;另外,脂肪酸的堆积也是炎症的表现,它加重了细胞线粒体功能障碍;其中炎症介质白三烯的前体物质-花生四烯酸大量堆积甚至具细胞毒作用^[14]。

2 WWF 对大鼠胃溃疡的治疗作用 PCA 分析结果直观地表明,WWF 中剂量对大鼠乙酸性胃溃疡具有较佳的治疗效果(图 2)。考察标记物水平的变化可知,WWF 组乳酸、苹果酸与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而自愈组仍处于高水平($P < 0.01$),表明 WWF 可有效调节胃再生黏膜的微循环,缓解其缺血、缺氧状态,改善能量代谢障碍,这可能与全方调节大鼠血清 NO 水平和 NOS 活性相关^[2],也与三七的活血化瘀功效密切相关,表明治疗胃溃疡时加入活血药物有利于溃疡修复。另外,WWF 中剂量组大部分氨基酸已回复至正常对照组水平($P > 0.05$),部分显著高于正常对照组($P < 0.05$),表明 WWF 对氨基酸代谢有回调作用,可能因 WWF 改善了三羧酸循环,阻断了必需氨基酸的过度利用及方中三七、茯苓与蒲公英有效消除氧自由基,减轻炎症介质浸润^[15-17],减少了对谷氨酸、焦谷氨酸的消耗;中剂量 WWF 还可促进黏膜细胞富积利于溃疡修复的物质(亮氨酸、谷氨酸与组氨酸),增强了胃黏膜的防御屏障,可能与三七、茯苓增强细胞免疫^[15,16]及全方改善能量代谢有关。此外,WWF 组脂肪酸及胆甾醇水平与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),自愈组则显著下降($P < 0.01$),表明 WWF 使胃黏膜得到良好修复,特别是白及可有效促进溃疡面的愈合^[18],而在自愈机制下再生黏膜结构处于异常状态,

溃疡易于复发,可能与机体反射性过度调节有关。总之,WWF 通过调节胃黏膜能量代谢、氨基酸代谢及脂类代谢,从整体上发挥胃溃疡的治疗作用,提高了溃疡愈合质量^[19]。

参 考 文 献

- [1] 苏尚贤,刘晓伟,张晓洁,等.维胃方对实验性大鼠胃溃疡治疗机理的研究[J].深圳中西医结合杂志,2007,17(4):201-203.
Su SX, Liu XW, Zhang XJ, et al. Study on the therapeutic mechanism of Weiwei formula on experimental rat's gastric ulcer[J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2007, 17(4):201-203.
- [2] 丁慧波,刘晓伟,陈欣,等.维胃方对实验性大鼠胃溃疡血清 NO 和 NOS 的影响[J].四川中医,2007,25(9):15-17.
Ding HB, Liu XW, Chen X, et al. Effect of Weifeifang on NO and NOS of blood serum in experimental rat with gastric ulcer[J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2007, 25(9):15-17.
- [3] 陈欣,刘晓伟,陈宛圆,等.维胃方对乙酸诱导大鼠胃溃疡愈合效果及血清 GAS, EGF 水平的影响[J].时珍国医国药,2007,18(10):2333-2335.
Chen X, Liu XW, Chen TY, et al. Therapeutic effect of Weifeifang (WWF) on acetic acid-induced gastric ulcer and the levels of GAS and EGF in rats[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2007, 18(10):2333-2335.
- [4] 肖卫平,刘晓伟,卓冰帆,等.维胃方对胃溃疡大鼠胃粘膜氨基己糖含量的影响[J].浙江中医杂志,2008,43(7):378-379.
Xiao WP, Liu XW, Zhuo BF, et al. Effect of Weifeifang on hexosamine level in gastric mucosa of experimental gastric ulcer rats[J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2008, 43(7):378-379.
- [5] 贺红燕,刘晓伟,肖卫平,等.维胃方对大鼠胃溃疡的疗效及血清白介素 2 影响的研究[J].时珍国医国药,2009,20(9):2141-2143.
He HY, Liu XW, Xiao WP, et al. Therapeutic effect of Weifeifang (WWF) on gastric ulcer and on serum IL-2 in experimental rats[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2009, 20(9):2141-2143.
- [6] Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics[J]. J Proteome Res, 2007, 6(2):443-458.
- [7] Okabe S, Roth JLA, Pfeiffer CJ. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing[J]. Am J Dig Dis, 1971, 16(3):277-284.

- [8] Qiu Y, Su M, Liu Y, et al. Application of ethylchloroformate derivatization for gas chromatography-mass spectrometry based metabonomic profiling[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 583(2): 277-283.
- [9] Nordlund Å, Johansson I, Källestål C, et al. Improved ability of biological and previous caries multimarkers to predict caries disease as revealed by multivariate PLS modeling[J/OL]. *BMC Oral Health*, 2009, 9:28. [2010-01-16]. <http://www.biomedcentral.com/1472-6831/9/28>.
- [10] Eamlamnam K, Patumraj S, Visedopas N, et al. Effects of aloe vera and sucralate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(13):2034-2039.
- [11] Motilva V, Martin MJ, Luque MI, et al. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in chronic gastric lesion induced by acetic acid in rat[J]. *Gen Pharmac*, 1996, 27(3):545-550.
- [12] Oshima A, Asayama K, Sakai N, et al. The role of endogenous free radical scavengers on tissue recovery in the experimental ulcer model[J]. *J Clin Gastroenterol*, 1990, 12(1):S58-64.
- [13] Wu G, Fang YZ, Yang S, et al. Glutathione metabolism and its implications for health[J]. *J Nutr*, 2004, 134(3):489-492.
- [14] Paola M Di, Lorusso M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(9-10):1330-1337.
- [15] 杨志刚, 陈阿琴, 俞颂东. 三七药理研究新进展[J]. *上海中医药杂志*, 2005, 39(4):59-62.
- Yang ZG, Chen AQ, Yu SD. Research progress of pharmacological actions of panax notoginseng[J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2005, 39(4):59-62.
- [16] 金惠, 赵英博, 江维, 等. 茯苓药理作用及临床应用研究进展[J]. *湖北中医杂志*, 2008, 30(4):59-61.
- Jin H, Zhao YB, Jiang W, et al. Study progresses in pharmacology and clinical application of Poria cocos[J]. *Hubei J Tradit Chin Med*, 2008, 30(4):59-61.
- [17] 修锐, 金华. 药蒲公英的药理作用[J]. *国外医药·植物药分册*, 2008, 23(1):11-12.
- Xiu R, Jin H. Pharmacology of Taraxacum officinale Wigg[J]. *World Phytomed*, 2008, 23(1):11-12.
- [18] 刘莹, 崔炯莫, 李洪斌, 等. 白及超微粉对大鼠实验性胃溃疡的影响[J]. *中草药*, 2008, 39(3):397-400.
- Liu Y, Cui JM, Li HB, et al. Effect of ultra-fine powder of Bletilla striata on experimental gastric ulcer in rats[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2008, 39(3):397-400.
- [19] Tarnawski A, Stachura J, Krause WJ, et al. Quality of gastric ulcer healing: a new emerging concept[J]. *J Clin Gastroenterol*, 1991, 13(Suppl 1):S42-S47.

(收稿:2010-01-25 修回:2010-07-18)

《中国中西医结合影像学杂志》2011 年征订启事

《中国中西医结合影像学杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和山东中医药大学附属医院主办的国家级学术期刊,是中国中西医结合学会系列杂志之一,于 2003 年第 1 季度正式创刊。本刊已被中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊综合评价数据库、俄罗斯《文摘杂志》(AJ of VI NI TI)和波兰《哥白尼索引》(IC)收录。

本刊以中西医结合影像学临床与实验研究为主要内容,重视影像学研究的进展、新理论及新技术,以普及和提高相结合,促进中西医结合影像学的发展。主要栏目:专家论坛、论著、论著摘要、综述、编译、讲座、经验交流、短篇与个案、继续教育园地、信息等。读者对象为广大医学影像工作者(主要包括 X 线、CT、MR、DSA、US 等)和中医、西医临床医师,以及从事影像学及核医学研究的人员。

本刊为双月刊,大 16 开,96 页码,105 g 铜版纸印刷,国内外公开发行,国内统一连续出版物号:CN 11-4894/R,国际标准连续出版物号:ISSN 1672-0512;邮发代号:24-200;每期定价 15.00 元,全年 90.00 元,可通过邮局订阅,也可直接汇款至本刊编辑部订阅。

地址:山东省济南市经十路 16369 号《中国中西医结合影像学杂志》编辑部;邮政编码:250014;电话:0531-68616919;传真:0531-82666651;E-mail:yxbjb@163.com