

应用液质联用技术研究脾虚大鼠血清代谢物谱群特征

贾连群 甄毕贤 徐 莹 杨关林

摘要 目的 应用液质联用技术(LC-MS)研究脾气虚、脾阳虚大鼠血清代谢物谱群变化特征,并从小分子代谢物水平探讨脾虚证候本质。**方法** 21 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,随机分为正常组、脾气虚组、脾阳虚组,每组 7 只。脾气虚证模型造模方法采用先饱食 1 天,再禁食 2 天,自由饮水,每日游泳至力竭,水温 35 ~ 37 ℃,连续 15 天。脾阳虚证造模方法采用脾气虚证加灌服 20% 番泻叶水浸剂(2 mL/100 g),早晚各 1 次,连续 1 周。在造模结束后,根据大鼠的一般情况、体重变化及肛温的改变进行模型评价,运用 LC-MS 技术对大鼠进行血清代谢组学检测,应用正交偏最小二乘判别分析研究组间代谢物谱图差异,并通过变量重要性投影(OPLS-DA)选取血清中与证型相关的生物标志物。**结果** 与造模前比较,脾气虚组和脾阳虚组大鼠的体重均有显著降低,两组体重差值与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),脾阳虚组较脾气虚组体重值降低更明显($P < 0.05$);与正常组比较,脾气虚组和脾阳虚组大鼠的肛温下降,脾阳虚组较脾气虚组降低更多($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与正常组比较,脾气虚组与脾阳虚组 PC(19:0)/PE(22:0)、PC(17:0)/PE(20:0)、癸酸、油酸、硬脂酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、葡萄糖含量升高,花生四烯酸、亚麻酸、十二碳烯酸、雄酮、4-庚酮、DHAP(6:0)、尿苷等含量降低。与脾气虚组比较,脾阳虚组 PC(22:1)、PC(22:6)、PE(18:0)/PC(15:0)、视黄醇及脱氧胞苷相对含量显著升高,PC(18:1)、PC(19:3)、PC(20:3)、PC(17:0)/PE(20:0)、PC(19:1)/PE(22:1)、PC(19:0)/PE(22:0)、PC(17:1)/PE(20:1)、PC(16:1)/PE(19:1)、胆酸、马尿酸、糠酸、十一烷二甲酸、棕榈油酸、羟基硬脂酸、二十碳三烯酸、苯丙氨酸、酪氨酸、谷氨酸、丝氨酸、氨基甲酰基天冬氨酸、棕榈酰肉碱、肉豆蔻酰肉碱、乙酰左旋肉碱及亚油肉碱相对含量较脾气虚组显著降低。**结论** 脾气虚及脾阳虚模型大鼠血清中多种代谢物的相对含量发生了显著变化,并初步获得了一些可能与脾虚证候相关的潜在小分子生物标志物。这可能为探索脾虚的中医证候的科学内涵、病理机制提供了一定的数据参考。

关键词 液质联用;血清;脾气虚证;脾阳虚证;代谢组学

Study on Serum Metabolite Profiling in Pi-deficiency Rats Based on LC-MS Technique JIA Lian-qun, ZHEN Bi-xian, XU Ying, and YANG Guan-lin Key Lab of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Ministry of Education of China (Province-Ministry Co-construct), Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847)

ABSTRACT Objective To explore metabolite profiling changes in serum of rats with pi-qi deficiency syndrome (PQDS) and pi-yang deficiency syndrome (PYDS) based on liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) technique, and to explore the essence of Pi-deficiency syndrome (PDS) from small molecule metabolite level. **Methods** Totally 21 male SD rats of SPF grade were randomly divided into three groups, the normal control group, the PQDS group, and the PYDS group, 7 in each group. Rats in the PQDS group overate for 1 day and fasted for 2 days. They drank freely and then swam to be exhausted in water at 35 ℃ - 37 ℃ for 15 successive days. The PYDS model was established by the same method for PQDS rats plus drenching 20% Folium sennae water extract (2 mL/100 g), once in the morning and once in the evening for one successive week. After modeling, models were evaluated according to rat general state, changes in body weight and rectal temperature. Serum metabonomic profiles were detected using LC-MS tech-

基金项目:国家重点基础研究发展计划("973"计划)资助项目(No. 2013CB531704);国家自然科学基金青年基金项目(No. 81202834)

作者单位:辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室(沈阳 110847)

通讯作者:杨关林, Tel: 024-31207358, E-mail: yang_guanlin@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.03.0359

nique. Difference in inter-group metabolite spectrograms was analyzed using orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). Potential biomarkers related to syndrome types in rat serum were selected via the parameter of variable importance in the projection (VIP). Results The weight of rats in the PQDS group and the PYDS group decreased more significantly after modeling. The difference in pre-post weight was statistically significant from that of the normal control group ($P < 0.01$). It was more obviously lowered in the PYDS group than in the PQDS group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the rectal temperature of rats in the PYDS group and the PQDS group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). It decreased more in the PYDS group than in the PQDS group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the normal control group, levels of PC(19:0)/PE(22:0), PC(17:0)/PE(20:0), capric acid, oleic acid, stearic acid, succinic acid, fumaric acid, malic acid, glucose increased; arachidonic acid, linolenic acid, lauric acid, androsterone, 4-heptanone, dihydroxyacetonephosphate (DHAP) (6:0), and uridine decreased in the PYDS group and the PQDS group. Compared with the PQDS group, levels of PC(22:1), PC (22:6), PE (18:0)/PC (15:0), retinol, and deoxycytidine increased significantly in the PYDS group; PC (18:1), PC(19:3), PC (20:3), PC (17:0)/PE (20:0), PC (19:1)/PE (22:1), PC (19:0)/PE (22:0), PC (17:1)/PE (20:1), PC (16:1)/PE (19:1), cholic acid, hippuric acid, furoic acid, undecanedicarboxylic acid, palmitoleic acid, hydroxy stearic acid, eicosatrienoic acid, phenylalanine, tyrosine, glutamic acid, serine, carbamoyl aspartic acid, palmitoyl carnitine, tetradecanoyl carnitine, acetylcarnitine, and linoleylcarnitine decreased more significantly in the PYDS group. Conclusions Comparative contents of various serum metabolites changed significantly in PQDS and PYQS model groups. Some potential small molecular biomarkers related to PDS were preliminarily identified. These results might provide some data reference for exploring scientific connotation and pathological mechanisms of PDS.

KEYWORDS liquid chromatograph-mass spectrometer; serum; Pi-qi deficiency syndrome; Pi-yang deficiency syndrome; metabonomics

脾乃中医五脏之一,担负着人体运化、升清、统血的重要生理功能,其中“脾主运化”是脾最主要的生理功能,若脾运化功能失常,则会出现食少、腹胀、大便溏薄等脾虚失运证候。李东垣的《脾胃论·脾胃盛衰论》中就有“百病皆脾胃衰而生也”之说。现代研究表明,脾虚证与消化系统、分泌系统、免疫系统等多个系统的功能紊乱失常有关^[1]。

代谢组学是应用现代数据分析方法对复杂体系的整体进行认识,能够揭示在治疗疾病过程中机体所发生的代谢物及代谢途径的改变,强调从整体角度来研究机体的功能水平,这与中医学整体观念和辨证论治的理论内涵相一致。通过代谢组学分析,有助于全面地理解机体内物质的代谢途径^[2],并为阐明脾虚证候的科学内涵提供理论依据。因此本文采用液质联用分析法(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)研究脾气虚、脾阳虚大鼠与正常大鼠血清代谢谱群差异,希望筛选出与脾气虚证、脾阳虚证相关的代表性小分子生物代谢物,为进一步的研究提供理论基础。

材料与方法

1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 21 只,体重

(200 ± 10)g,购于辽宁省本溪实验动物中心,许可证号:SCXK(辽)-2010-0001。大鼠在辽宁中医药大学实验动物中心饲养,许可证号:SYXK(辽)-2013-000-9。室温 $18 \sim 23$ °C,相对湿度 45%~55%,自由饮水进食,适应性饲养 1 周。

2 试剂与仪器 甲醇(色谱级,美国 Merk 公司)、乙腈(色谱级,美国 Merk 公司)、甲酸(色谱级,美国 Merk 公司),蒸馏水(屈臣氏)。美国 Agilent LC-Q/TOF-MS (Agilent, 1290 Infinity LC, 6530 UHD and Accurate-Mass Q-TOF /MS);VOR-TEX-5 涡旋混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);MIKRO 22R 台式高速冷冻离心机(LAB-WAY SCIENCE,德国);欧姆龙 MC-142L 型电子体温计(欧姆龙大连有限公司)。

3 分组、模型建立及给药方法 21 只大鼠按体重随机分为正常组、脾气虚组、脾阳虚组,每组 7 只。脾气虚组及脾阳虚组首先建立脾气虚证(饮食不节加力竭游泳)^[3,4]模型,先饱食 1 日,再禁食 2 日(由于脾气虚证病因较多,不能全部模拟,本实验仅选择饮食失节和劳倦过度作为干预因素,即采用饱食 1 日,饥饿 2 日,结合每日力竭游泳,造成脾气虚,这符合“饮食自

倍,肠胃乃伤”、“谷不入,半日则气虚,一日则气少”、“劳则气耗”等中医学理论),自由饮水,每日游泳至力竭,水温 35 ~ 37 ℃,3 日 1 个循环,共 5 个循环连续 15 日。出现食少、神疲乏力、消瘦、毛色枯槁无光泽、便软或溏时判定脾气虚证模型建立成功。脾阳虚组继续灌服 20% 番泻叶水浸剂(2 mL/100 g),早晚各 1 次,连续 1 周^[5]。出现四肢不温、畏寒、便溏、不欲饮、食少、毛色枯槁无华时判定脾阳虚证模型建立成功,最终两组造模成功率为 100%。正常组自由饮食水,不给予干预。

4 大鼠一般情况、体重变化及肛温观察 造模前与造模结束时分别称量各组大鼠体重及测量各组大鼠肛温的变化。其中肛温检测法:将测温探头插入直肠约 3 cm,待测温计显示数字稳定后读数,各组大鼠平行交替进行测试。

5 LC-MS 检测分析方法

5.1 标本采集及样品处理 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,大鼠腹主动脉取血 5 mL,静置 2 h 后 4 ℃ 2 500 r/min 离心 20 min 并收集血清。56 ℃ 水浴灭活 30 min,分装, - 86 ℃ 保存。取冷冻储存的样本,置室温下解冻 15 min,涡漩振荡 5 s。分别取 100 μL 的样本加入 300 μL HPLC 级甲醇,涡漩振荡 30 s, 4 ℃ 静置 20 min;所有样本进行冷冻离心(1 2000 r/min, 4 ℃, 15 min),取 200 μL 上清液,转入进样小瓶,进行 LC-MS 检测分析。

5.2 数据采集及样品分析 色谱分离采用 Agilent 公司 C₁₈ 色谱柱(Agilent, 100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)。色谱分离条件为:柱温为 40 ℃;流速 0.4 mL/min;流动相组成 A:水 + 0.1% 甲酸,B:乙腈加 0.1% 甲酸;梯度洗脱程序见表 1。进样量为 5 μL,自动进样器温度 4 ℃。

表 1 流动相梯度洗脱程序表			
时间 (min)	流量 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	95	5
2	0.4	95	5
17	0.4	5	95
19	0.4	5	95

质谱采用正负离子模式检测,以氮气作为雾化、锥孔气;飞行管检测模式 V 型。其中正离子模式条件为:毛细管电压 4 kV、锥孔电压 35 kV、离子源温度 100 ℃;脱溶剂气温度 350 ℃、反向锥孔气流 50 L/h、脱溶剂气 600 L/h、萃取锥孔 4 V;负离子模式检测条件:毛细管电压 3.5 kV、锥孔电压 50 kV、离子源温度 100 ℃;脱溶剂气温度 300 ℃、反向锥孔气流 50 L/h、

脱溶剂气 700 L/h、萃取锥孔 4 V。离子扫描时间 0.03 s、扫描时间间隔 0.02 s、数据采集范围:100 ~ 1 000 m/z。为确保质量的准确性和重复性,应用亮氨酸 - 脑啡肽作为锁定质量,正离子模式下产生 [M + H]⁺ 离子 556.2771 Da。负离子模式下产生 [M-H]⁻ 离子 554.2615 Da。

5.3 数据处理方法 数据采用安捷伦公司工作站 MassHunter 对所有原始质谱数据进行预处理,并导出 mz 格式数据,在 R 软件平台下采用 xcms 程序代码进行数据预处理。将编辑后的数据矩阵导入 Simca-P 软件(版本 11.0)。软件对整体数据进行模型拟合分析,分别进行主成分分析(PCA)、偏最小平方判别分析(PLS-DA)和正交校正的偏最小二乘法 - 判别分析法(OPLS-DA)分析。采用 t 检验考察代谢学组间差异进行显著性。

6 统计学方法 数据采用 SPSS 16.0 软件处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 ANOVA 进行组间比较, P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠一般情况、体温及肛温结果比较(表 2) 正常组大鼠体格健壮,反应敏捷,行动迅速,被毛紧密有光泽,大便正常;脾气虚组大鼠明显消瘦,神疲乏力,反应迟钝,行动缓慢,被毛蓬起无光泽,便软或溏,符合脾气虚证动物模型评估标准;脾阳虚组大鼠出现弓背、扎堆、肛温下降、便稀或肛周污秽、神疲乏力、反应迟钝,消瘦,毛色枯槁无光泽。符合脾阳虚证动物模型评估标准。

造模结束后,脾气虚组和脾阳虚组大鼠的体重与造模前比较均有显著降低,两组体重差值与正常组比较差异亦有统计学意义(P < 0.01),脾阳虚组较脾气虚组体重差值降低明显(P < 0.05);造模结束后,与正常组比较,脾气虚组和脾阳虚组大鼠的肛温有所下降,脾阳虚组较脾气虚组降低更多(P < 0.05, P < 0.01)。

表 2 造模前后各组大鼠体重差值及肛温比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	体重差值(g)	肛温(℃)
正常	7	29.47 ± 3.64	37.33 ± 0.28
脾气虚	7	-6.11 ± 2.09**	36.80 ± 0.26*
脾阳虚	7	-10.69 ± 5.25** [△]	36.21 ± 0.60** ^{△△}

注:与正常组比较,*P < 0.05,**P < 0.01;与脾气虚组比较,[△]P < 0.05

2 3 组大鼠血清 LC/TOF-MS 谱图(图 1) 各组大鼠血清代谢谱典型的 LC/TOF-MS 总离子流色谱图(TIC)中可以看出,组间部分色谱峰峰高及峰面

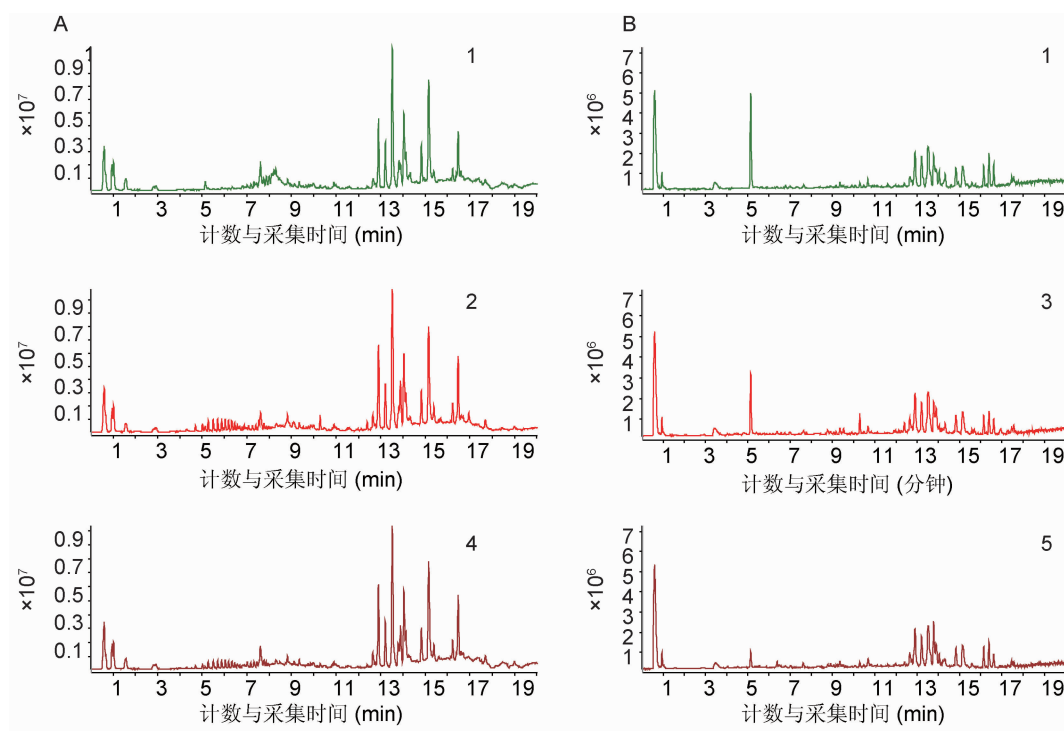
积有一定的差异,说明某些物质的含量发生相对变化。

3 各组多元数据分析结果

3.1 PCA 分析结果(图 2) 正离子模式下共获得 3 个主成分, $R^2X=0.602$,负离子模式下获得 3 个主成分, $R^2X=0.575$ 。因此从 PCA 得分图中可以看出正常组、脾气虚组、脾阳虚组聚类明显,说明 3 组样本中有明显差异。

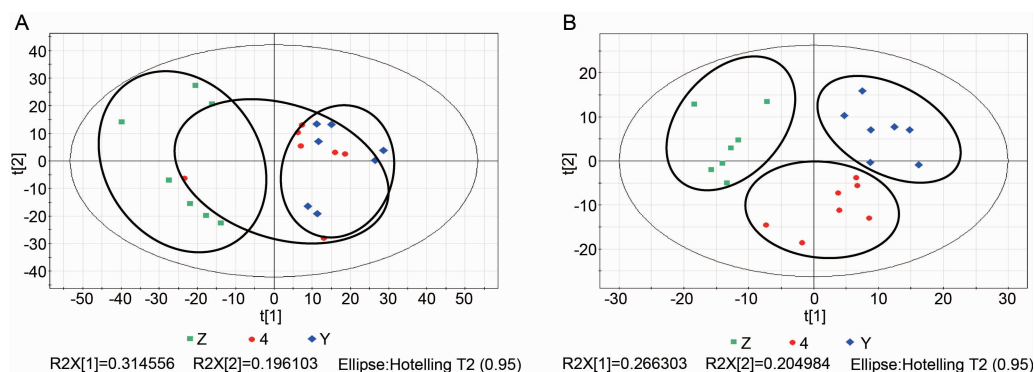
3.2 PLS-DA 分析结果(图 3) 通过主成分分

析后,未发现异常需要剔除的样本(所有样本均在置信区间内),所以进一步应用 PLS-DA 进行建模分析。大鼠血清的 PLS-DA 得分图显示,两种中医证型大鼠的血清样本可以明显区分开来,正离子模式下得到 3 个主成分, $R^2X=0.465$, $R^2Y=0.993$, $Q^2=0.851$,负离子模式下得到 2 个主成分, $R^2X=0.411$, $R^2Y=0.98$, $Q^2=0.852$ 。从 PLS-DA 得分图中可以看出脾气虚组、脾阳虚组聚类明显,说明两模型组样本有明显差异。



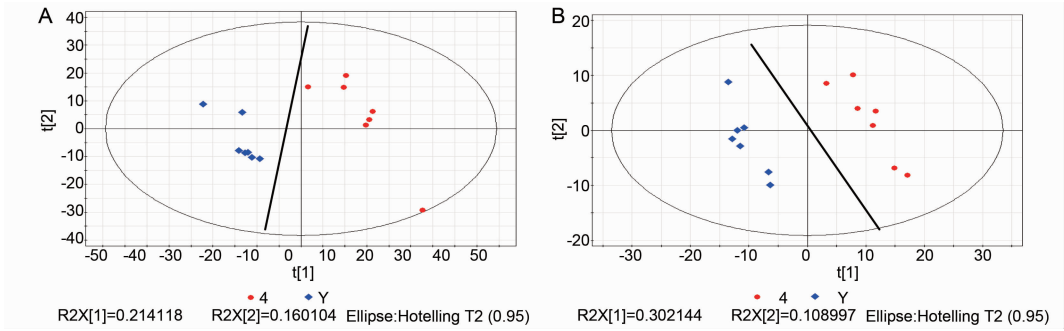
注:A 为正离子模式下 TIC;B 为负离子模式下 TIC;1 为正常组;2 为脾气虚组;3 为脾阳虚组

图 1 各组大鼠 TIC 图



注:A 为正离子模式下 PCA 得分图;B 为负离子模式下 PCA 得分图;(■)为正常组;(●)为脾气虚组;(◆)脾阳虚组

图 2 各组 PCA 得分图



注:A 为正离子模式下脾气虚组及脾阳虚组 PLS-DA 得分图;B 为负离子模式下脾气虚组及脾阳虚组 PLS-DA 得分图;(●)为脾气虚组;(◆)为脾阳虚组

图 3 模型组 PLS-DA 得分图

3.3 OPLS-DA 分析结果(表 3、4) 通过数据分析,脾气虚组与脾阳虚组 PC(19:0)/PE(22:0)、PC(17:0)/PE(20:0)、癸酸、油酸、硬脂酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、葡萄糖含量较正常组显著升高,花生四烯酸、亚麻酸、十二碳烯酸、雄酮、4-庚酮、DHAP(6:0)、尿苷等含量较正常组降低;并且脾阳虚组与脾气虚组比较存在同样变化趋势,它们可能是区分 3 组具有代表性的小分子差异代谢物。

通过数据分析,脾阳虚组与脾气虚组比较,主要存在脂代谢与氨基酸代谢异常。在脂代谢中脾阳虚组 PC(22:1)、PC(22:6)、PE(18:0)/PC(15:0) 相对含量较脾气虚组显著升高,PC(18:1)、PC(19:3)、PC(20:3)、PC(17:0)/PE(20:0)、PC(19:1)/PE(22:1)、PC(19:0)/PE(22:0)、PC(17:1)/PE(20:1)、

表 4 脾气虚、脾阳虚组大鼠血清差异代谢物分析及代谢通路归属总结

代谢通路	代谢产物	VIP 值	变化趋势 (脾阳虚组与 脾气虚组相比)
脂代谢	PC(22:1)	2.14	↑
	PC(22:6)	1.62	↑
	PE(18:0)/PC(15:0)	1.69	↑
	PC(20:3)	1.96	↓
	PC(18:1)	1.85	↓
	PC(19:3)	1.63	↓
	PC(19:1)/PE(22:1)	1.98	↓
	PC(17:1)/PE(20:1)	1.90	↓
	PC(16:1)/PE(19:1)	1.88	↓
	PC(19:0)/PE(22:0)	1.68	↓
	PC(17:0)/PE(20:0)	1.45	↓
	马尿酸	1.58	↓
	糠酸	1.50	↓
	十一烷二甲酸	1.46	↓
	羟基硬脂酸	1.39	↓
氨基酸代谢	棕榈油酸	1.32	↓
	二十碳三烯酸	1.27	↓
	胆酸	1.06	↓
	氨基甲酰基天冬氨酸	1.78	↓
	酪氨酸	1.72	↓
	谷氨酸	1.68	↓
	苯丙氨酸	1.33	↓
其他	丝氨酸	1.16	↓
	视黄醇	1.89	↑
	脱氧胞苷	1.49	↑
	棕榈酰肉碱	2.08	↓
	肉豆蔻酰肉碱	1.82	↓
	左旋肉碱	1.55	↓
	亚油肉碱	1.47	↓

表 3 3 组大鼠血清差异代谢物分析结果

代谢产物	脾气虚组与 正常组比较		脾阳虚组与 正常组比较		脾阳虚组与 脾气虚组比较	
	VIP 值	变化 趋势	VIP 值	变化 趋势	VIP 值	变化 趋势
PC(19:0)/PE(22:0)	1.72	↑	1.59	↑	1.68	↑
PC(17:0)/PE(20:0)	1.64	↑	1.66	↑	1.66	↑
癸酸	1.34	↑	1.56	↑	1.96	↑
油酸	1.63	↑	1.16	↑	1.84	↑
硬脂酸	1.51	↑	1.21	↑	1.50	↑
琥珀酸	1.12	↑	1.54	↑	1.57	↑
延胡索酸	1.10	↑	1.43	↑	1.29	↑
苹果酸	1.10	↑	1.44	↑	1.27	↑
葡萄糖	1.10	↑	1.55	↑	1.64	↑
花生四烯酸	1.52	↓	1.65	↓	1.87	↓
亚麻酸	1.46	↓	1.41	↓	1.21	↓
十二碳烯酸	1.15	↓	1.43	↓	1.37	↓
雄酮	1.49	↓	1.60	↓	2.20	↓
4-庚酮	1.35	↓	1.57	↓	1.87	↓
DHAP(6:0)	1.26	↓	1.50	↓	1.86	↓
尿苷	1.36	↓	1.52	↓	1.56	↓

PC(16:1)/PE(19:1)、胆酸、马尿酸、糠酸、十一烷二甲酸、棕榈油酸、羟基硬脂酸、二十碳三烯酸相对含量较脾气虚组显著降低。在氨基酸代谢中,脾阳虚组苯丙氨酸、酪氨酸、谷氨酸、丝氨酸及氨基甲酰基天冬氨酸相对含量较脾气虚组显著降低。其他代谢物中脾阳

虚组视黄醇、脱氧胞苷相对含量较脾气虚组显著升高;棕榈酰肉碱、肉豆蔻酰肉碱、乙酰左旋肉碱、亚油肉碱等相对含量较脾气虚组显著降低。提示它们可能是区分两种脾虚证型的潜在小分子生物代谢物。

讨 论

代谢组学是通过考察生物体受到刺激或干扰后其代谢产物的变化来研究生物体系的一项新技术。其分析的是生物体受外部刺激或基因修饰后所产生的全部代谢产物,这与中医学的整体观念、系统观念甚至辨证论治的思想非常吻合。因此,中医证候的生物学基础可能从代谢组学研究中找出特异的标志性代谢产物,为中医证候研究及模型评价提供理论依据。本实验的结果显示,两个脾虚组与正常组能够被明显区分,两脾虚组之间也能得到很好的分型,组间某些内源性代谢物的含量存在明显差异,说明脾虚大鼠的某些代谢通路发生了改变,并且不同脾虚证型之间代谢通路又有所不同。

首先通过对大鼠体重及体温的变化作为测量指标,不仅反映造模情况,同时也可以初步判断机体的代谢情况。造模结束后,模型组大鼠体重差值与造模前相比均有显著降低($P < 0.01$),脾阳虚组较脾气虚组体重值降低明显($P < 0.05$);同样与正常组比较,模型组大鼠的肛温有所下降,脾阳虚组较气虚组降低更多($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此现象说明模型组大鼠存在机体代谢异常,导致身形消瘦等体重减轻的状况,同时伴随着体温降低的情况。同时脾阳虚组的表现比脾气虚组更为严重说明虽然均为脾虚证,但证型不同其外在表现及测量指标值也有所差别,这可能与证型的产生机制有关。

中医学认为脾主运化,司水谷精微之化生,故脾与消化系统关系最为密切。现代研究表明脾虚伴随机体能量代谢降低^[6],表现为肢体倦怠、神疲乏力、形体消瘦、少气懒言等。本实验结果显示在能量代谢方面,两脾虚组血清中与三羧酸循环相关代谢产物如琥珀酸、延胡索酸、苹果酸水平显著升高。推测其在脾虚状态下,会出现三羧酸循环中间产物的积累,可能是参与三羧酸循环的某个环节出现异常所致。脾虚大鼠的三羧酸循环障碍说明其存在能量代谢异常,过度的消耗和代谢产物的大量积累最终导致机体供能不足,进而表现出精神不振、活动减少等症状。

同样葡萄糖作为生物体内能量代谢不可缺少的物质,参与了多种代谢过程。脾气虚及脾阳虚组与正常组比较,血清中葡萄糖含量显著升高,这可能是脾虚导致脾失健运,使津液输布紊乱失衡,营养物质无法正常

利用即无法进入胞内供能而积于血脉之中,使血糖含量升高,影响正常代谢过程。

脂代谢和能量代谢密切相关,结果显示在脂代谢方面,两脾虚组血清中 $PC(19:0)/PE(22:0)$ 、 $PC(17:0)/PE(20:0)$ 、癸酸、硬脂酸、含量较正常组显著升高,花生四烯酸、亚麻酸、十二碳烯酸含量较正常组显著降低。以上多种脂肪酸水平变化说明机体脂质代谢发生紊乱。其中亚麻酸属于不饱和脂肪酸,有文献表明其具有调节血脂的作用,明显降低血浆甘油三酯、血浆总胆固醇水平^[7]。

从结果中显示两脾虚组多数饱和脂肪酸含量较正常组显著升高,不饱和脂肪酸含量较正常组显著降低。以上结果综合作用可能会引起血中胆固醇含量上升,并进一步促使血糖升高,导致机体代谢紊乱、出现免疫力下降等机能减弱的症状。

与脾气虚组比较,脾阳虚组三羧酸循环中间产物琥珀酸、富马酸等的累计水平更高,这可能因阳虚组能量消耗较气虚组更为严重导致。两脾虚组中多种脂肪酸含量发生相对变化。与脾阳虚组比较,脾气虚组左旋肉碱、棕榈酰肉碱、肉豆蔻酰肉碱、亚油肉碱含量相对升高,有文献报道,许多脂肪酸及有机酸代谢性疾病常伴有肉碱和酰基肉碱的变化。肉碱及酰基肉碱作为能量转移,传递脂肪酸入线粒体工具,是转运脂肪酸的载体,影响脂类代谢^[8,9],其含量缺乏可能会阻碍脂代谢通路,导致机体能量供应不足,皮下脂肪组织含量减少,由于脂肪储备不足容易出现畏寒肢冷,四肢不温等阳虚症状,这可能是阳虚组不耐寒冷的原因之一。

苯丙氨酸是酪氨酸的前体,酪氨酸参与儿茶酚胺类神经递质的代谢,包括多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素等。与脾阳虚组比较,脾气虚组苯丙氨酸、酪氨酸含量相对降低明显,即阳虚组含量较高,这可能会使气虚组神经递质类的含量降低,使副交感神经功能相对亢进,从而使动物表现出神疲乏力等类似于气虚的症状。

除此之外,在其化合物中,雄酮作为一种重要的雄性激素,主要是促进雄性的性器官和第二性征的发育和维持,以及促进蛋白质合成,使身体肌肉发达,在两脾虚模型组中,雄酮含量明显降低,可能代表了一系列蛋白质代谢的异常,造成身形消瘦等症状。还有一些化合物如脱氧胞苷、视黄醇等代谢物的含量水平也发生相对变化,说明脾虚大鼠可能还存在核酸代谢、维生素代谢等代谢通路的异常。

本实验从代谢组学角度,对脾虚两种不同证型进

行研究,这是整体多个系统协同作用所造成的结果,但是在不同证型之间又有不同的代谢特点,利用代谢组学技术有助于找到与证型相关的生物代谢物。这为研究探讨脾虚证的证型、诊断、发病机制提供了提供初步数据参考。

参 考 文 献

- [1] 贺燕,鲍书哲,徐惠波.脾虚动物模型的造模方法及其病理改变[J].山西中医学院学报,2008,9(1):55-57.
- [2] Linton JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research and development[J]. Pharmac Res, 2006, 23(6): 1075-1088.
- [3] 沈丽波,钱会南.脾虚模型实验研究方法概述[J].中国中医药信息杂志,2005,12(1):93-95.
- [4] 刘旭东,刘文俊,孙大宇,等.脾气虚证模型大鼠神疲乏力的客观化评价[J].中华中医药杂志,2015,30(3):699-701.
- [5] 刘汶,张敦义.番泻叶致脾虚证动物模型的造型方法[J].中国中西医结合脾胃杂志,1998,6(4):231-232.
- [6] 宋雅芳,王汝俊,刘友章,等.健脾益气中药对脾虚大鼠肝组织线粒体功能的影响[J].中药新药与临床药理,2009,20(5):423-426.
- [7] 许继取.亚麻酸对高脂大鼠血脂影响及促进肝脏 SR-BI 表达机制研究[D].武汉:华中科技大学,2006.
- [8] 冯宁,郭长江,高兰兴.体内肉碱来源及其对脂类代谢的影响[J].氨基酸和生物资源,1998,20(4):48-50.
- [9] 韩连书,高晓岚,叶军,等.串联质谱分析干血滤纸片酰基肉碱方法的建立[J].中华检验医学杂志,2005,28(1):88-91.

(收稿:2014-07-16 修回:2015-07-10)

国际中西医结合高峰论坛会议纪要

2015 年 9 月 25 日,由世界中医药学会联合会、河北中医学院主办,西班牙欧洲中医基金会承办的“国际中西医结合高峰论坛”于“第十二届世界中医药大会”期间在西班牙巴塞罗那隆重召开。

会议由河北中医学院中西医结合学院院长杜惠兰主持,河北中医学院副院长高维娟出席开幕式并致辞。来自葡萄牙、巴西、比利时及我国河北、安徽、广州、福建、江苏、香港等省和地区的 16 位专家作了专题报告和大会发言。内容涉及中西医结合教育、临床疾病诊治经验、中西医结合基础理论及中药研究等方面。

杜惠兰教授作了关于“中西医结合教育工作的成就与展望”的专题报告,总结了中西医结合教育事业在教育体系、教育管理、教育模式及人才培养等方面取得的成就,提出目前存在的问题,指出应采取相应的措施,应多渠道、多种形式完善中西医结合教育体系,促使中西医结合教育事业健康和谐发展。

朱建华教授作了“鹿龙再生汤治疗再生障碍性贫血的研究”的报告,证实鹿龙再生汤通过降低再障患者血清造血抑制活性从而改善骨髓造血功能。范焕芳教授就“经方名方治疗肿瘤病案分析”和诸多学者交流了经方名方治疗肿瘤的经验。陈志强教授作了“膜性肾病的中西医结合治疗”的报告,结合自身多年临床经验,提出了治疗膜性肾病的中西医结合治疗方案。陈栋教授分享了“陈氏挑针与牵旋法治腰椎间盘突出症”的技术。Maria da Luz Rosario de Sousa 教授讲述了电磁神经刺激对颞下颌功能失调的应用。Daniel Cerqueira Ribeiro 博士针对不同电导率对原穴短期针刺效应进行了评估。申国明教授根据俞募配穴的理论基础,提出“靶向趋同”假说。贾春生教授提出了“刺灸法效应特异性”概念,建立“刺灸法文献数据库”,探讨刺灸法效应特异性规律。李泽虔教授作了“益气化痰祛瘀方调控 NO-cGMP-KATP 途径对慢性阻塞性肺疾病肺血管舒张作用的影响”的报告。李伟莉教授经过实验显示补肾安胎冲剂通过 VEGF-Ras-MAPK 信号通路发挥保胎作用。蔡立民教授作了“活血通痹法(活血灵片)预防骨科大手术后深静脉血栓形成的实验及临床研究”的报告。Wilfried Legein 教授生动地讲述了蘑菇的营养价值和药用。

本次论坛的召开,明确了中西医结合教育的办学方向和人才培养目标,交流了中西医结合临床疾病诊治经验、诊疗新技术,分享了中西医结合基础理论研究的成果。本次会议扩大了中西医结合在国外的影响,增进了世界各个国家和地区中西医结合学术团体之间的了解、合作和学术交流。大会内容丰富,交流气氛热烈,实用性强。

(杜惠兰 王香婷 贺明整理)