气虚血瘀证大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学

李林 王建农 任建勋 向俊锋 唐亚林* 刘建勋 韩丁

(中国科学院化学研究所分子动态与稳态结构国家重点实验室, 北京 100080; 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091.)

* 联系人, E-mail: tangyl@iccas.ac.cn

摘要 利用基于核磁共振氢谱的组学分析方法研究气虚血瘀证大鼠对比于正常大鼠尿液的组成变化, 发现病变大鼠尿液中甲酸(formate)、肌氨酸酐(creatinine)、 α -酮戊二酸(2-oxoglutarate/2-OG)、柠檬酸(citrate)、牛磺酸(taurine)、氧化三甲胺(trimethylamine-N-oxide/TMAO)、琥珀酸(succinate)、马尿酸(hippurate)等成分的含量发生了变化, 为进一步提示气虚血瘀证的产生机制和病症治疗提供了证据。

关键词 代谢组学 核磁共振 气虚血瘀症 尿液

近年来, 从全局角度分析生物体系在生理、病理、药理及毒理状态下发生的各种动态变化成为国外生物医学研究的热点之一, 并形成了以基因组学、蛋白质组学及代谢组学^[1]为代表的现代“组学”分析技术。代谢组学是通过考察生物体系受刺激或扰动后其代谢产物的变化或其随时间的变化来研究生物体系的代谢途径的一种技术, 它的出现为生命科学的发展提供了有力的现代化实验技术手段。作为当前代谢组学研究中的主要技术之一, 与高效液相-质谱联用技术相比, 核磁共振的缺点是灵敏度较低, 但其优势也是非常明显的。核磁共振能对样品实现非破坏性、非选择性的分析, 可在接近生理条件下进行实验, 可设计多种编辑手段, 实验方法灵活多样^[2]。另外, 核磁共振氢谱对各种含氢化合物均有响应, 能完成代谢产物中大多数有机化合物的检测, 满足了代谢组学中对尽可能多的化合物进行检测的目的^[3], 因此被越来越广泛地用于代谢组学研究。Solanky等人^[4]利用基于核磁共振氢谱的代谢组学方法研究了食用异黄酮对人体代谢的影响, 王全军等人^[5,6]利用大鼠血浆和尿液的¹H NMR谱代谢组学研究了Z24在大鼠体内的毒理特性。

“气虚”是中医学中的一个基本辨证。气虚患者主要表现为面色苍白而无光泽, 少言懒言, 疲倦乏力, 食欲不振, 不耐劳动, 稍动即头晕、气短、自汗, 平时易感冒, 舌质淡或舌边有齿痕, 苔少, 脉虚无力。临床研究表明, 气虚证与高血压、糖尿病、冠心病、

慢性心衰、中风、急性脑梗塞、乳腺癌等多种疾病的发生密切相关^[7]。对于气虚证进行代谢组学研究, 将有利于更好地预防和治疗这些疾病, 进一步量化气虚证临床诊断指标。

1 材料和方法

() 动物、试剂和仪器。健康成年 Sprague Dawley(SD)大鼠, ♂, 体重 200~220 g, SPF 级, 由北京维通利华实验动物中心提供, 室温为 25℃, 动物置于代谢笼中, 自由摄食饮水。重水(deuterium oxide/D₂O)为美国 CIL 公司产品; 2,2,3,3-三甲基硅烷基丙酸(3-trimethylsilyl-[2,2,3,3-D₄]-propionate/TSP)为美国 Aldrich 公司产品。SGD-1 型声、光、电刺激仪, 由中国中医科学院西苑医院研制; AVANCE 600 超导傅里叶变换核磁共振谱仪, 为瑞士布鲁克公司产品。

() 造模方法和样品收集。模型方法主要依据中医“劳则气耗”的理论, 采用睡眠剥夺的方法。12 只动物, 随机分为气虚血瘀证候组(模型组, 8 只)和空白组(4 只)。将模型组动物置入 SGD-1 型声、光、电刺激仪中, 在稳定的人工光照条件下, 按常相光照、反相光照、持续光照、持续黑暗^{a)}这 4 个随机安排的过程进行, 并利用电流刺激的方法对大鼠进行 72 h 的睡眠剥夺, 此为一个阶段, 持续 7 d。6 个阶段后, 完成造模。用代谢笼收集尿液, 放于接尿管中在 -20℃ 下保存。

() 尿液的处理。尿液样品于 4℃, 7000 r/min 离心 10 min 以去除固体杂质。从每份尿液中取 400 μ L 上层清液加入 200 μ L 磷酸盐/D₂O 缓冲溶液(0.2

2007-01-11 收稿, 2007-05-08 接受

a) 常相光照(LD/6AM~18 PM 光照, 18 PM~6 AM 黑暗); 反相光照(DL/6AM~18 PM 黑暗, 18 PM~6 AM 光照); 持续光照(LL/24 h 光照); 持续黑暗(DD/24 h 黑暗)

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-15-1758>

mol/L, pH 7.4), 并加 TSP 为内标 ($M_{\text{TSP}}=1 \times 10^{-3}$ mol/L). 样品静置 10 min 后再于 4 °C, 7000 r/min 离心 10 min, 取上层清液 550 μL 置于 5 mm 核磁管中, 准备进行 NMR 测试.

() NMR 数据采集和处理. 在 AVANCE 600 NMR 仪上调用 noesypr1d 脉冲序列, 采用预饱和方式抑制水峰, 预饱和时间为 2 s, 谱宽 9615 Hz, 采样点数 64 k, 采样时间 3.41 s, 累加次数 128 次, 并控制温度在 298.2 K. FID 信号经过 32 k 傅里叶变换转为 ^1H NMR 谱图.

选取氢谱质量较高的样品进行 ^{13}C 和 2D NMR (总相关谱(TOCSY), 异核单量子相干谱(HSQC), 异核多键相关谱(HMBC))测试, 用于对代谢物中的各种成分进行指认. 2D NMR 实验参数设置情况见表 1.

表 1 2D NMR 实验参数

2D 实验	TOCSY	HSQC	HMBC
脉冲程序	mlevphpr	hsqcetgp	hmbcgp1pndqf
采样点数	2048 $\times$ 256	2048 $\times$ 256	2048 $\times$ 256
累加次数	48	48	48
变换点数	1024 $\times$ 1024	1024 $\times$ 1024	1024 $\times$ 1024

尿液样品 ^1H NMR 谱以 TSP 为化学位移参考峰的位置, 设为 δ 0. 相位和基线调整后将氢谱的 δ 0.2~9.8 区域进行分段积分, 每段为 0.04. 为了避免溶剂峰压制对谱图造成的影响, 水峰附近的区域

(δ 4.2~5.2)被去除. 将积分数据归一化之后, 以文本文件或 Excel 文件贮存, 用于随后的主成分分析(principal components analysis, PCA).

() 主成分分析. 将氢谱数据矩阵用 MATLAB 软件进行主成分分析, 求出主成分(principal components, PC), 利用 PC 对各组大鼠尿液的代谢组进行分析.

2 结果

2.1 大鼠尿液的氢谱

空白组和模型组大鼠尿液的典型氢谱如图 1 所示.

2.2 主成分分析结果

对 12 只大鼠尿液氢谱积分值的 PCA 结果见图 2. 由图 2 可见, 主成分积分值集中分布于椭圆形散点图(95%置信区间内)的两个区域, 模型组与空白组之间无交叉和重叠. 空白组分布在左方而模型组分布在右方. 对氢谱变化影响最大的两个主成分的贡献率分别为 47.2%(PC1)和 13.6%(PC2).

2.3 代谢物成分指认

根据 ^1H , ^{13}C NMR 谱和其他 2D NMR 实验(TOCSY, HSQC, HMBC)并参考文献[8~11], 我们可以对大鼠尿液中的化合物进行指认. 大鼠尿液的 HSQC 谱如图 3 所示. 表 2 和图 4 给出了部分代谢物的 NMR 谱峰归属情况.

图 1 空白组(a)和模型组(b)大鼠尿液的 ^1H NMR 谱

图2 空白组和模型组尿液样品之散点分布图(t_1/t_2)

■, 空白组; □, 模型组

图3 空白组大鼠尿液局部放大的 HSQC 谱

3 讨论

大鼠尿液 ^1H NMR 谱 PCA 表明模型组与空白组在积分值散点图中呈聚类型分布, 两组未见重叠. 对 PC1 和 PC2 进一步分析表明, 与空白组相比, 模型组大鼠尿液中甲酸(formate, δ 8.47)、肌氨酸酐(creatinine, δ 4.05, 3.04)等的共振峰相对积分面积明显增高, 而 α -酮戊二酸(2-OG, δ 3.02, 2.45)、柠檬酸(citrate, δ 2.69, 2.54)、牛磺酸(taurine, δ 3.44, 3.28)、氧化三甲胺

(TMAO, δ 3.28)、琥珀酸(succinate, δ 2.41)、马尿酸(hippurate, δ 7.84, 7.64, 7.56, 3.97)等的相对积分面积则明显下降. 在模型组的 ^1H NMR谱中发现肌氨酸酐的含量增加最为明显, 这有可能预示着肾小管损伤^[12]和肾毒性^[13]的存在, 模型组大鼠尿液的肌氨酸酐含量增加, 提示气虚证可能与肾功能异常有着密切关系; TMAO, 柠檬酸, α -酮戊二酸, 琥珀酸的含量变化则可能预示着肾髓质毒性的存在^[14,15]. 同时, 柠檬酸、琥珀

表 2 大鼠尿液中部分代谢物的 NMR 谱峰归属

名称	序数	δ_{H}	δ_{C}	HMBC($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	结构式
马尿酸 (hippurate)	1	—	133.4		
	2, 6	7.838	127.2	2, 6→4, 2, 6→7	
	3, 5	7.555	128.9	3, 5→1	
	4	7.644	132.3	4→2, 6	
	7	—	170.6		
	8	3.970	44.04	8→9, 8→7	
	9	—	177.0		
α -酮戊二酸 (2-OG)	1, 7	—	181.7		
	2, 6	3.020	36.04	2, 6→1, 3, 4, 5, 7	
	3, 5	2.452	30.83	3, 5→1, 2, 4, 6, 7	
	4	—	205.7		
柠檬酸 (citrate)	1, 6	—	179.1		
	2, 5	2.538, 2.688	45.50	2, 5→3, 5→4	
	3	—	75.53		
	4	—	181.9		
牛磺酸 (taurine)	1	3.436	35.64	1→2	
	2	3.281	47.76	2→1	
琥珀酸 (succinate)	2, 3	2.413	34.23	2, 3→1, 4	
	1, 4	—	181.7

图 4 空白组大鼠尿液中部分成分归属图

酸和 α -酮戊二酸是三羧酸循环能量代谢及糖酵解途径的媒介物质,上述内源性代谢物的损耗通常是由于线粒体功能紊乱造成的^[16]。

中医理论认为“劳则气耗”,疲劳分为3类:形体疲劳、脏腑疲劳、神志疲劳。睡眠剥夺导致的中枢疲劳属于神志疲劳。睡眠剥夺与昼夜颠倒作为一种强烈的应激源,对机体可产生生理和心理应激反应,以致造成多方面负面影响,使机体处于一种兴奋状态^[17],但是随着应激时间的延长,兴奋状态的持续,神经内分泌系统以及内环境都将发生变化,使机体的生理和病理发生改变,造成多系统、多器官的功能障碍。这与中医论述“劳(中枢性疲劳)则气耗”所致的气虚血瘀证所表现出的全身机能减退的症状以及循环系统的改变有一定的吻合之处。以上分析说明尿液代谢组学分析能够较好地反映气虚证的代谢特征,为进一步提示气虚血瘀证的产生机制和病症治疗提供了证据。

参 考 文 献

- 1 Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181—1189[DOI]
- 2 颜贤忠, 赵剑宇, 彭双清, 等. 代谢组学在后基因时代的作用. *波谱学杂志*, 2004, 21(2): 263—271
- 3 许国旺, 杨军. 代谢组学及其研究进展. *色谱*, 2003, 21(4): 316—320
- 4 Solanky K S, Bauley N J, Beckwith-Hall B M, et al. Biofluid ^1H NMR-based metabonomic techniques in nutrition research—metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J Nutr Biochem*, 2005, 16: 236—244[DOI]
- 5 王全军, 颜贤忠, 吴纯启, 等. Z24 经口染毒大鼠血浆的代谢组学研究. *卫生毒理学杂志*, 2004, 18(2): 74—76
- 6 王全军, 颜贤忠, 吴纯启, 等. Z24 经口染毒大鼠尿液的核磁共振谱代谢组学研究. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(6): 460—465
- 7 于赫, 孙力. 气虚证的生物化学与分子生物学研究进展. *中医药信息*, 2005, 22(5): 48—51
- 8 Lindon J C, Nicholson J K, Holmes E, et al. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn Reson*, 2000, 12(5): 289—320[DOI]
- 9 Bollard M E, Stanley E G, Lindon J C, et al. NMR-based metabonomics approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed*, 2005, 18: 143—162[DOI]
- 10 Constantinou M A, Papakonstantinou E, Spraul M, et al. ^1H NMR-based metabonomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 542(2): 169—177[DOI]
- 11 Fan T W M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog NMR Spectrosc*, 1996, 28: 161—219
- 12 Holmes E, Nicholson J K, Nicholls A W, et al. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine. *Chemometri Intell Lab Sys*, 1998, 44: 245—255[DOI]
- 13 Gartland K P, Bonner F W, Timbrell J A, et al. Biochemical characterizations of para-aminophenol-induced nephrotoxic lesions in the F344 rat. *Arch Toxicol*, 1989, 63(2): 97—106[DOI]
- 14 Holmes E, Caddick S, Lindon J C, et al. ^1H and ^2H NMR spectroscopic studies on the metabolism and biochemical effects of 2-bromoethanamine in the rat. *Biochem Pharmacol*, 1995, 49(10): 1349—1359[DOI]
- 15 Ebbels T M D, Holmes E, Lindon J C, et al. Evaluation of metabolic variation in normal rat strains from a statistical analysis of ^1H NMR spectra of urine. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36: 823—833[DOI]
- 16 Antti H, Bollard M E, Ebbels T M D, et al. Batch statistical processing of ^1H NMR-derived urinary spectral data. *J Chemometrics*, 2002, 16: 461—468[DOI]
- 17 Allan R. Current perspectives on the function of sleep. *Perspect Bio Med*, 1998, 41: 359—390