中医研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000322

补中益气丸干预健康气虚质人群的血浆代谢组学研究

毕建璐[1],严美花[2],陈洁瑜[1],程静茹[1],于冰琰[3],赵晓山[1],罗 仁[1]

(1. 南方医科大学中医药学院中医内科教研室,广州 510515;2. 中日友好医院临床医学研究所药物药理室,北京 100029;
3. 南方医科大学预防保健门诊部,广州 510515)

【摘 要】**目的**:基于核磁共振(nuclear magnetic resonance,NMR)的代谢组学方法,对气虚质健康人干预前后的血浆内源性代谢物的变化进行了比较研究,寻找气虚质的可能特征代谢物。**方法**:招募健康气虚质 20 人随机分为干预组和对照组,应用补中益气丸进行 1 个月的干预,并对他们的血浆样品进行代谢组学检测,采用多元统计分析方法寻找补中益气丸干预气虚质血浆内源性差异代谢产物。**结果**:对补中益气丸干预前后血浆样本应用 Simca-P 软件分析提取变量重要性预测值(variable importance predictive,VIP),筛选出 VIP>1,$P<0.05$ 的有差异的化学位移值 45 个,通过代谢产物数据库发掘对分类贡献较大的特异性代谢物 30 个。**结论**:这些差异代谢产物主要与三羧酸循环相关,说明补中益气丸调节了气虚质的能量代谢异常。而补中益气丸干预后疲劳与记忆力下降等症状的改善则可能与其能调节伽马氨基丁酸、磷脂酰胆碱、血氨的浓度有关。

【关键词】气虚质;补中益气丸;代谢组

【中图分类号】R211 【文献标志码】A 【收稿日期】2014-01-24

Plasma metabonomic analysis of healthy qi-deficiency constitution after the intervention by Buzhongyiqi pills

Bi Jianlu[1], Yan Meihua[2], Chen Jieyu[1], Cheng Jingru[1], Yu Bingyan[3], Zhao Xiaoshan[1], Luo Ren[1]

(1. Teaching and Researching Section of Traditional Chinese Medicine Internal Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University; 2. Drug Pharmacolog Laboratory, Institute of Clinical Medicine, Sino-Japanese Friendship Hospital; 3. Preventive Health Care Clinics, Southern Medical University)

【Abstract】***Objective***: To compare the endogenous metabolites in the plasma of people with qi-deficiency constitution after the intervention by Buzhongyiqi pills using nuclear magnetic resonance(NMR)-based metabonomics and to find the possible specific metabolites. ***Methods***: Twenty healthy people with qi-deficiency constitution were recruited and divided into control group and intervention group. Buzhongyiqi pills were used to do the intervention and the plasma was tested by NMR-based metabonomics before and after the intervention. Multivariate statistical analysis was done to find the serum-derived metabolic differences after the intervention by Buzhongyiqi pills. ***Results***: The plasma before and after the intervention was analyzed by Simca-P and 45 changed chemical shift values(VIP>1, $P<0.05$) were selected. Thirty specific metabolites were found through human metabolite database. ***Conclusion***: These differences in metabolites are related to the tricarboxylic acid cycle. Buzhongyiqi pills can improve the disorder of energy metabolism, memory deterioration and fatigue of qi-deficiency population, which may associated with its regulation of GABA, phosphatidylcholine, blood ammonia concentration.

【Key words】qi-deficiency constitution; Buzhongyiqi pills; metabonomics

体质是指人体生命过程中,在先天禀赋和后天获得的基础上所形成的形态结构、生理功能和心理状态方面综合的、相对稳定的固有特质,是人类在生长、发育过程中所形成的与自然、社会环境相适应的人体个性特征;表现为结构、功能、代谢以及对外界刺激反应等方面的个体差异性,对某些病因和疾病的易感性,以及疾病转归中的某种倾向性[1]。气虚质是以气短懒言,容易疲乏,精神不振,易出汗等为主要表现的体质类型,目前对气虚质的研究仍处于流行病学调查方面[2],其基因[3-4]、蛋白[5]、代谢方面

作者介绍:毕建璐,Email:116706379@qq.com,
研究方向:亚健康与中医体质。

通信作者:罗 仁,Email:luoren@wo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金委员会-广东省人民政府联合基金资助项目(编号:U1132001);国家中医药管理局中医临床基地业务建设科研专项课题资助项目(编号:2011B032200004);广东省自然科学基金资助项目(编号:S2012010009177);海珠区科技计划资助项目(编号:2011-YL-07)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxb.000322.html

的机制研究不多。而代谢组学是通过测定人体各种体液内代谢物的组成变化来认识和反映人体代谢网络的变化规律。在方法学上具有融整体、动态、综合、分析于一体的特点，对于揭示具有复杂性表现的各种体质的代谢模式有着独特的优势。本文基于核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）的代谢组学方法，对气虚质健康人补中益气丸干预前后的血浆中内源性代谢物的变化进行了比较研究，寻找气虚质的可能特征代谢物，并从代谢途径方面给出了相应的解释。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2013 年 5 月在广州市某医科大学在读各年级本科大学生中招募研究对象，选择气虚质的人群进行健康体检（包括三大常规、肝肾功能、胸片、心电图等），筛选出健康气虚质共 20 人签署知情同意书后入组，入组后通过随机数法将 20 人随机分为对照组和干预组。由医院专职医务人员采集血液样品。

1.2 诊断标准

气虚质诊断标准参照中华中医药学会发布的“中医体质分类与判定”[6]，应用中医体质量表进行体质判定。

1.3 入选标准

符合健康人的诊断标准；年龄 18~60 岁；符合气虚质的诊断标准；自愿签署知情同意书者。

1.4 排除标准

不符合健康人诊断标准者；有严重不良生活方式者；近期内（4 周内）有各种感染者；年龄<18 周岁或>60 周岁者；妊娠或哺乳期妇女，对试验药物过敏者；正在参加其他药物临床试验的受试者；未签署知情同意书者；研究人员认为有其他原因不适合临床试验者；有家族遗传性疾病者。

1.5 干预药物

干预组给予河南宛西制药生产的仲景牌补中益气丸（由炙黄芪、党参 、炙甘草、炒白术、当归 、升麻、柴胡、陈皮共八味中药组成的浓缩丸，批准文号：Z41021825，生产批号：130302）。口服，1 次 8 丸，1 日 3 次，连续服用 28 d。对照组不予任何药物干预。

1.6 仪器和试剂

Bruker AVANCE Ⅲ 500MHz 超导液体 NMR 仪；ZH-2-BLENDER 震荡器（天津药典标准仪器制药厂）；DL-360 超声波清洗器（宁波石浦海天电子仪器厂，频率（4.5 ± 0.225）kHz，功率 240 W；TGL-16G 台式高速冷冻离心机（上海安亭科学仪器厂）；氮吹仪：KL512，金坛市盛蓝仪器制造有限公司。叠氮化钠（NaN_3）、磷酸二氢钠（NaH_2PO_4）、磷酸氢二钠（Na_2HPO_4），水合氯醛，氯化钠（NaCl），乙腈（CH_3CN）等均为国产分析纯。重水（D_2O）和含氘代三甲基硅基丙酸钠盐的重水购自青岛腾龙科技有限公司。

1.7 血浆样品的准备及数据的采集和处理

血浆常温解冻后，离心（14 000 × g，10 min，4 ℃），取上清液 0.3 ml，加入 0.1 ml 的重水和 0.2 ml PBS 缓冲溶液，混匀后转入 5 mm 核磁管。4 ℃冰箱保存，备用。NMR 仪使用带 Z 向梯度匀场的 5 mm 反向检测探头。调用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill[CPMG，recycle delay-90°-$(\tau$-180°-$\tau)_n$-acquisition] 脉冲序列，相关参数如下：τ=1 ms，总回波时间 2 nτ=100 ms，采样点数 64 k，叠加次数 128 次，谱宽为 20×10^{-6} Hz，采样范围-5~15。控制温度在 298 k。

1.8 NMR 数据分析

采用 MestReNova 对所得 NMR 数据经傅立叶变换得到谱图，然后调整相位并进行基线校正，以乳酸双重峰（1.33）为化学位移参考峰。进行自动积分，积分区间 0.5~9.0 ppm，积分间隔 0.04 ppm。为了消除剩余水峰引起的影响，将积分区间 4.7~5.2 ppm 的积分值设为零，然后对所有积分数据进行归一化处理。所得数据输出并转换为 Excel 文件保存。

将保存的 Excel 格式数据输入到 SIMCA-P+软件（V12.00，Umetrics，Sweden）进行多元统计分析。本实验运用主成分分析（principal component analysis，PCA）、偏最小二乘判别法（partial least squares discriminant analysis，PLS-DA）对血浆代谢组数据进行分析。统计分析采用 SPSS 13.0，入选人群基线情况两样本计量资料比较用两独立样本 t 检验，计数资料用 χ^2 检验。在 SIMCA-P 软件的 PLS-DA 模型中提取变量重要性预测值（variable importance predictive，VIP），进一步将这些变量的归一化积分值进行统计学分析（两独立样本 t 检验），提取 VIP 值>1，P<0.05 的变量作为有差异的化学位移值。

2 结 果

2.1 基本情况

入选气虚质人群共 20 人，随机分为对照组和干预组各 10 人。对照组包含男性 4 例、女性 6 例，干预组包含男性 6 例、女性 4 例（表 1）。

表 1 气虚质对照组和干预组人群基本情况

Tab.1 Basic information of qi-deficiency control group and intervention group

组别	例数	性别		年龄（岁）
		男	女	
对照组	10	4	6	21.00 ± 1.25
干预组	10	6	4	20.20 ± 1.14
χ^2 值		0.200		1.500
P 值		0.656		0.151

2.2 气虚质用药前后对照组与干预组血浆的 ^{1}H NMR 谱分析

2.2.1 气虚质用药前后对照组与干预组血浆 ^{1}H NMR 谱及模式识别分析 由于个体差异，很难从肉眼观察到各个组之间血浆代谢物的变化，所以本文采用 PCA 方法来观察气虚质用药前对照组与干预组之间代谢产物的变化。建模后计算出 2 个主成分，模型参数 R^2X=0.757，Q^2=0.48，2 组对应积分

矩阵图(图 1)。图中每个点表示 1 个样本。由图 1 可知,用药前对照组与干预组不能明显区分而应用补中益气丸干预后干预组与对照组较用药前有所分离(图 2)。

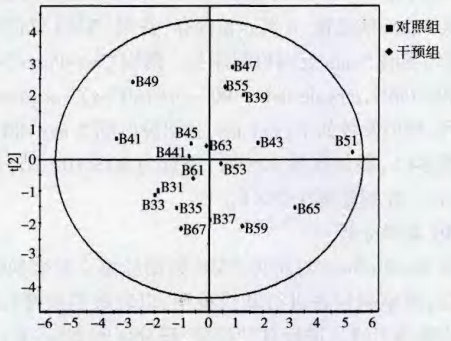


图 1 气虚质用药前对照组干预组对比 PCA

Fig.1 Comparison of PCA between intervention group and control group before the intervention

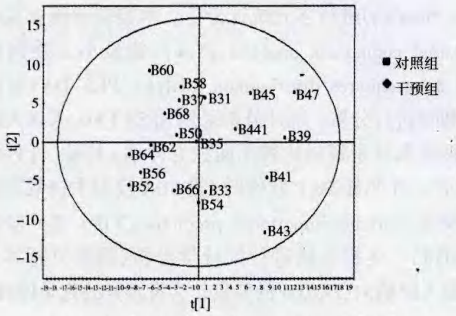


图 2 气虚质用药后对照组干预组对比 PCA

Fig.2 Comparison of PCA between intervention group and control group after the intervention

2.2.2 气虚质干预组用药前后血浆 ^{1}H NMR 谱及模式识别分析 图 3 为气虚质干预组用药前后血浆代谢组 DLS-DA 模型在模型中提取 VIP 值，筛选出 VIP>1 的化学位移值,之后对其相对应的归一化积分值进行统计分析,筛选出 $P<0.05$ 的差异化学位移值,将有差异的 45 个化学位移值通过代谢产物数据库(http://www.hmdb.ca)查找其所代表的代谢物,发掘对分类贡献较大的特异性代谢物 30个(表 2)。

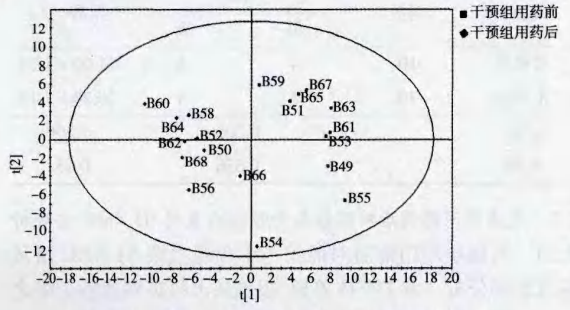


图 3 气虚质干预组用药前后对比 PLS-DA 图

Fig.3 PLS-DA map of intervention group before and after the intervention

表 2 气虚质干预组用药前后比较特异性代谢物

Tab.2 Specific metabolites in qi-deficiency intervention group before and after the intervention

化学位移值	VIP值	t 值	P 值	可能的代谢产物
6.94	2.05	9.097	0.000	肾上腺素
2.61,2.17	1.84	−6.07	0.000	蛋氨酸
7.74,7.7	1.84	−5.58	0.000	N-乙酰基酪氨酸
6.78,7.22	1.8	−5.52	0.000	酪氨酸
7.06,7.66,7.1,3.98,7.9	1.79	5.674	0.000	组氨酸
7.78	1.69	4.936	0.000	羟基苯甲酸
7.82,7.62	1.67	4.712	0.000	马尿酸
3.77,1.49	1.64	4.593	0.000	丙氨酸
7.34	1.6	4.267	0.000	乙酰氨基
7.42	1.57	4.157	0.000	甲基马尿酸
2.13,2.45	1.48	3.764	0.002	谷氨酰胺
7.46	1.44	3.514	0.006	香草酸
3.9	1.42	3.392	0.003	门冬氨酸
7.38	1.41	3.269	0.005	苯丙氨酸
1.97,1.25	1.39	3.334	0.004	异亮氨酸
5.42,5.38	1.37	3.229	0.005	α－亚麻酸
3.94	1.35	2.953	0.009	肌酸
5.7,5.74	1.35	3.133	0.006	鞘氨醇
1.93	1.33	3.072	0.007	GABA
1.01,0.97	1.31	2.883	0.01	缬氨酸
3.29	1.31	3.064	0.007	磷脂酰胆碱
2.49	1.27	2.859	0.011	酮古洛糖酸
1.17	1.28	2.948	0.009	乙醇
0.81,1.05	1.26	2.369	0.03	醛固酮
2.29	1.24	2.193	0.043	乙酰乙酸
7.3	1.24	2.8	0.012	苯乙酰甘氨酸
3.41	1.21	2.67	0.016	脯氨酸
6.06	1.18	2.145	0.047	肌酐
3.61	1.13	2.461	0.025	肌醇
3.25	1.07	2.124	0.049	甜菜碱

注:GABA 为 γ- 氨基丁酸

3 讨 论

本课题基于 NMR 的代谢组学方法,结合模式识别技术分析气虚质用药前后血浆代谢谱的差异表达。结果显示,气虚质用药前后血浆代谢组特征有明显区别,提示气虚质应用补中益气丸干预后的相关生物代谢通路发生了改变。这些差异代谢物多为糖、脂肪、蛋白质三大物质能量代谢过程的中间产物,与脂肪酸代谢、三羧酸循环、氨基酸代谢、丙酮酸代谢、糖异生、葡萄糖-丙氨酸循环、类固醇合成、嘌呤嘧啶代谢、肌醇代谢、磷脂合成、甘氨酸和丝氨酸代谢、线粒体电子传递链等多个代谢通路相

关。气虚质以脏腑功能低下，机体新陈代谢减缓，产能不足为表现，比如气短懒言，容易疲乏，精神不振，易出汗等，而检测出的差异代谢物与能量代谢密切相关，亦证明了这一现象。

三羧酸循环是生物机体获取能量的主要方式。是糖、脂肪和蛋白质 3 种主要有机物在体内彻底氧化的共同代谢途径，三羧酸循环的起始物乙酰-辅酶 A，它是体内 3 种主要有机物互变的联络机构，因糖和甘油在体内代谢可生成 α-酮戊二酸及草酰乙酸等三羧酸循环的中间产物，这些中间产物可以转变成为某些氨基酸；而有些氨基酸又可通过不同途径变成 α-酮戊二酸和草酰乙酸，再经糖异生的途径生成糖或转变成甘油，因此三羧酸循环不仅是 3 种主要的有机物分解代谢的最终共同途径，而且也是它们互变的联络机构。气虚质的人与三羧酸循环相关的代谢产物存在异常，而通过补中益气丸干预后，这些异常得到了明显的改善。

GABA 是中枢神经系统中很重要的抑制性神经递质，它是一种天然存在的非蛋白组成氨基酸，能有效的改善脑血管流通、增加氧的供给，调节脑神经细胞机能，促进脑的代谢功能，从而改善疲劳、头晕耳鸣、记忆力衰退、抑郁等症状[7-8]。磷脂酰胆碱是磷脂的主要成分之一，它能将大脑的指令迅速传递，信息传递越快，记忆力越强。而 GABA 还可以提高葡萄糖磷酸酯酶的活性，增加乙酰胆碱的生成，扩张血管，增加血流量，并降低血氨，促进血氨排泄[9]。有研究认为，氨与外周组织的疲劳和肌肉痉挛也有关系[10]，降低血氨可以有效改善疲劳症状。气虚质的人经常出现疲乏症状，而研究发现，应用补中益气丸干预后气虚质的疲劳与记忆力下降症状有明显改善，这可能与补中益气丸调节 GABA 与磷脂酰胆碱、血氨的浓度，促进脑代谢与血氨的排泄有关。

综上所述，气虚质是一种以新陈代谢减缓，产能不足为表现的体质类型，应用补中益气丸干预气虚质后，其与三羧酸循环相关的氨基酸、脂类、蛋白质有明显的改变，说明补中益气丸调节了气虚质的能量代谢异常。而补中益气丸干预后疲劳与记忆力下降症状的改善则可能与其能调节 GABA、磷脂酰胆碱、血氨的浓度有关。

参 考 文 献

[1] 王 琦，王睿林，李英帅.中医体质学学科发展述评[J].中华中医药杂志，2007(9)：627-630.

[2] 王 琦，朱燕波.中国一般人群中医体质流行病学调查——基于全国 9 省市 21948 例流行病学调查数据[J].中华中医药杂志，2009，24(01)：7-12.

[3] 周小军，田道法，王士贞，等.气虚体质之鼻咽癌高癌家系成员基因组稳定与修复基因表达[J].中医药信息，2009，26(5)：59-62.

[4] 潘志强，方肇勤，卢文丽，等.阳气虚和气阴阳虚证荷瘤小鼠肾上腺基因表达的差异性[J].上海中医药大学学报，2008，23(3)：45-50.

[5] 周俊亮，潘佩光，刘友章，等.蛋白质组学在气虚体质研究中的应用[J].世界中医药，2009，4(1)：46-48.

[6] 中华中医药学会.中医体质分类与判定[J].世界中西医结合杂志，2009，4(4)：303-304.

[7] Lewis DA，Volk DW，Hashimoto T.Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia：a novel target for the treatment of working memory dysfunction[J].Psychopharmacology (Berl)，2004，174(1)：143-150.

[8] Castellano C，Cestari V，Cabib S，et al.Strain-dependent effects of post-training GABA receptor agonists and antagonists on memory storage in mice[J].Psychopharmacology(Berl)，1993，111(2)：134-138.

[9] 江 波.GABA(γ-氨基丁酸)——一种新型的功能食品因子[J].中国食品学报，2008，8(2)：1-4.

[10] Brouns F，Beckers E，Wagenmakers AJ，et al.Ammonia accumulation during highly intensive long-lasting cycling：individual observations[J].Int J Sports Med，1990，11(S2)：S78-S84.

（责任编辑：关蕴良）

《中华医学教育探索杂志》

邮发代号：78-127