

基于代谢组学鉴定枳术连夏汤治疗慢性胃炎大鼠的血清标志物

臧雨宸^{1,2}, 王胜娟^{1,2}, 徐俊达³, 马晟尧^{1,2}

1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院药学部 (北京 100038)
2. 临床合理用药生物特征谱学评价北京市重点实验室 (北京 100038)
3. 首都医科大学中医药学院 (北京 100069)

【摘要】目的 探讨基于 HPLC 代谢组学分析枳术连夏汤作用慢性胃炎模型大鼠血清代谢物变化的特征, 为中医药治疗慢性胃炎、改善代谢障碍提供参考依据。**方法** 将 40 只 SD 雄性大鼠随机分为 4 组: 正常对照组, 模型组、阳性药物对照组和枳术连夏汤治疗组, 每组 10 只。正常对照组大鼠常规饲养, 其他 3 组大鼠建立慢性胃炎模型。模型构建成功后, 正常对照组和模型组大鼠每日正常饲养, 枳术连夏汤治疗组在正常对照组基础上, 每日灌服 $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的枳术连夏汤; 阳性药物对照组在正常对照组基础上, 每日灌服 $0.648 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的胃炎康胶囊, 连续 8 周。整个实验过程中, 每 2 周对各组大鼠进行称重 1 次。给药结束后, 测定各组大鼠胃液 pH 值和胃蛋白酶活力; 采用 HE 法观察各组大鼠胃组织形态; 采用免疫组化法检测各组大鼠血清中胃黏膜保护因子表皮细胞生长因子 (EGF) 和转化生长因子 α (TGF- α) 的表达及胃蛋白酶原 (PG) 的含量; 采用 HPLC 法分析大鼠血清中各代谢物, 并通过正交偏最小二乘法判别分析法对每组数据进行分析, 最终确定各组大鼠血清标志物。**结果** 枳术连夏汤可降低慢性胃炎大鼠胃液 pH ($P < 0.05$), 增加胃蛋白酶活力 ($P < 0.05$); HE 染色发现, 枳术连夏汤可显著改善慢性胃炎大鼠胃组织结构 ($P < 0.05$); 免疫组化染色显示, 枳术连夏汤可显著降低胃组织中 TGF- α 阳性表达 ($P < 0.05$); 血清 PG 含量测定发现, 枳术连夏汤治疗显著增加慢性胃炎大鼠血清中 PGII 含量 ($P < 0.05$); HPLC-MS 分析各组大鼠血清代谢物结果表明, 枳术连夏汤可以改变大鼠血清中甜菜碱、甲硫氨酸、糖原、葡萄糖、苯丙氨酸、谷胱甘肽和次黄嘌呤的代谢水平; 明显恢复丙二酸、肌苷、肌醇、谷氨酰胺、甲基苯二酸乙醇胺和烟酰胺的水平; 还可以调节甘油、乳酸和乙酰乙酸等代谢物。**结论** 枳术连夏汤治疗慢性胃炎大鼠具有显著治疗效果, 且与糖酵解代谢途径密切相关。

【关键词】 枳术连夏汤; 慢性胃炎大鼠; 糖酵解途径; 高效液相色谱法; 代谢组学

Identification of serum markers of Zhizhu Lianxia decoction in treating chronic gastritis rats based on metabonomics

Yu-Chen ZANG^{1,2}, Sheng-Juan WANG^{1,2}, Jun-Da XU³, Sheng-Yao MA^{1,2}

1. Department of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

2. Beijing Key Laboratory of Bio-characteristic Profiling for Evaluation of Rational Drug Use, Beijing 100038, China

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202307005

基金项目: 北京市卫生科技发展专项基金 (编号: 2019-7-420)

通信作者: 臧雨宸, 初级药师, Email: zangyuchen@bjsjth.cn

<https://ywlxwb.whuzhmedj.com/>

3. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: Yu-Chen ZANG, Email: zangyuchen@bjcmu.cn

【Abstract】Objective To explore the characteristics of the changes in serum metabolites of Zhizhu Lianxia decoction in treating chronic gastritis model rats based on HPLC metabonomics, and to provide a reference for traditional Chinese medicine to treat chronic gastritis and improve metabolic disorders. **Methods** 40 male SD rats were randomly divided into 4 groups: the normal control group, the model group, the positive drug control group and the Zhizhu Lianxia decoction treatment group, 10 in each group. The rats in the normal control group were fed routinely, and the rats in the other 3 groups were used to establish chronic gastritis models. After the model was successfully constructed, the rats in the normal control group and the model group were fed normally every day, and the Zhizhu Lianxia decoction treatment group was given $18 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Zhizhu Lianxia decoction daily on the basis of the normal control group; on the basis of the normal control group, rats in the positive drug control group were given $0.648 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Weiyankang capsules daily for 8 weeks. During the whole experiment, the rats in each group were weighed once every 2 weeks. After the treatment, the pH value and pepsin activity of the gastric juice of each group were determined; the HE method was used to observe the gastric tissue morphology of rats; the immunohistochemical method was used to detect the gastric mucosal protective factors, such as epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor α (TGF- α), and the content of pepsinogen (PG) in the serum of rats; HPLC method was used to analysis the metabolites in rat serum, the orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) was used to analyze the data of all groups, and finally the serum markers of rats in each group were determined. **Results** Zhizhu Lianxia decoction decreased the pH ($P<0.05$) and increased pepsin activity ($P<0.05$) in rats with chronic gastritis; HE staining showed that Zhishulianxia decoction significantly improved the structure of gastric tissues in rats with chronic gastritis ($P<0.05$); immunohistochemical staining showed that Zhizhu Lianxia decoction significantly reduced the positive expression of TGF- α in gastric tissues ($P<0.05$); the PG content in serum was determined and found to be significantly increased in rats with chronic gastritis ($P<0.05$). The results of HPLC-MS analysis of serum metabolites in all groups of rats showed that Zhizhu Lianxia decoction could change the metabolic levels of betaine, methionine, glycogen, glucose, phenylalanine, glutathione and hypoxanthine in the serum of rats; significantly restore the levels of malonic acid, inosine, inositol, glutamine, methylphenylenedioxymethamphetamine and nicotinamide; regulate the metabolites such as glycerol, lactic acid and acetoacetate. **Conclusion** Zhizhu Lianxia decoction has a significant therapeutic effect in the treatment of chronic gastritis rats, and it is closely related to the glycolytic metabolic pathway.

【Keywords】 Zhizhu Lianxia decoction; Chronic gastritis rats; Glycolytic pathway; HPLC; Metabolomics

慢性胃炎是一种由胃黏膜的炎症反应所引发的病变，其引发原因多种多样，但实质上是由于黏膜的特异再生能力发生退行性病变而引起的炎症反应，最终造成胃腺体的不可逆萎缩，甚至消失^[1]。慢性胃炎的主要症状包括食欲不振、胃胀

气、胃隐痛、胃脘饱胀等，饭后，胃饱胀或胃痛感会加重^[2]。偶尔如果出现胆汁反流状态时，会出现持久性的胃腹痛，尤其是在进餐后，这种状态更为严重^[3]。

慢性胃炎是西医病名，中医学中并没有这个

词,根据慢性胃炎的特征,多于中医上胃痛、暖气、痞满、嘈杂、泛酸和呕吐等病症类似^[4]。根据中医记载,痞满的病因主要是感受外邪、情志失调和内伤饮食等所引起的患者中焦气机不畅,脾胃功能失调等。《景岳全书》中对痞满做了非常详细的描述,“无物无滞而痞者虚痞也;凡有邪有滞而痞者,实痞也。无胀无痛而满者,虚满也;有胀有痛而满者,实满也。虚痞虚满者,非大加温补不可;实痞实满者,可消可散也”^[5]。

枳术连夏汤是黑龙江省中医药大学附属第一医院李冀教授的经验方,以枳术汤为基础,再加上黄连半夏^[6]。《金匱要略》是枳术汤的首次记录出处,是根据张仲景关于治疗水饮结于心下而改善的药方,原文记载为“心下坚,大如盘,边如旋盘,水饮所作,枳术汤主之”^[7]。李冀教授在多年临床实践过程中,发现枳术连夏汤对许多慢性胃炎、胃下垂、胃十二指肠溃疡和胃肠功能紊乱等疾病有非常好的效果^[8]。因此,本研究探讨基于 HPLC 代谢组学分析枳术连夏汤作用慢性胃炎模型大鼠血清代谢物变化的特征,为中医药治疗慢性胃炎、改善代谢障碍提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1200 型安捷伦高效液相色谱仪(上海 Alcott Biotech Co. Ltd); UV1100 型紫外分光光度计(北京 Rayleigh 仪器分析公司); BP211D 型十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司); Mili-Q50 SP 型纯水系统(美国 Millipore 公司); VX200 型涡旋震荡仪(美国 Labnet International 公司); UNIVERSAL 32R 型台式冷冻离心机(德国 Hettich 公司)。

枳术连夏汤由黑龙江省中医药大学附属第一医院制备提供,处方:枳实 20 g、白术 10 g、黄连 10 g、半夏 10 g,制备方法:4 种药材加入适量水,先大火煎熬 30 min 后,再小火煎熬,当药汁浓缩至二分之一时,再将汤药按照同样的方法熬一遍即得;胃炎康胶囊(陕西华龙制药有限公司,批号:Z20054118);脱氧胆酸溶液(上海谷研实业有限公司,批号:GOY-S1966);氨水(山西锦洋药用辅料有限公司,批号:9004-32-4);胃蛋白酶检测试剂盒(上海齐一生物科技有限公司,批号:NG0010);HE 染色试剂盒(北

京麦瑞博生物科技有限公司,批号:MT0013);乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)试剂盒(南京建成生物工程公司,批号:A020-2-1、A032-1-1);乙腈和甲酸均为分析纯;生物标志物 2-氧代己二酸(批号:3184-35-8)、甲硫氨酸(批号:1115-47-5)、甜菜碱(批号:66455-29)、葡萄糖(批号:14431-43-7)、苯丙氨酸(批号:63-91-2)、谷胱甘肽(批号:70-18-8)、次黄嘌呤(批号:68-94-0)、丙二酸(批号:108-59-8)、肌苷(批号:58-63-9)、肌醇(批号:87-89-8)、谷氨酰胺(批号:56-85-9)、甲基苯二酸乙醇胺(批号:579-07-7)、烟酰胺(批号:2646-71-1)、甘油(批号:154804-51-0)、乳酸(批号:107-96-0)、乙酰乙酸(批号:141-78-6)、腺苷(批号:81921-35-9)均购自 Sigma。

1.2 实验动物

健康清洁级 SD 雄性大鼠,体重 180~210 g,购自南华大学实验动物中心。双眼正常,瞳孔规则,室温环境下群居饲养,相对湿度 40%~60%。所有操作遵循原国家卫生部关于实验动物的使用和福利标准,并符合相关的动物伦理学要求(首都医科大学附属北京世纪坛医院伦理审查批件号:AEWC-2101461)。

1.3 研究方法

1.3.1 实验动物分组及慢性胃炎模型的建立

将 40 只 SD 雄性大鼠按照随机分组原则分为 4 组:正常对照组、模型组、阳性药物对照组和枳术连夏汤治疗组,每组 10 只。正常对照组大鼠常规饲养,其他 3 组大鼠建立慢性胃炎模型:前 3 周各组大鼠自由进食饮水,单日饮用脱氧胆酸溶液(20 mL·kg⁻¹),双日饮用氨水溶液(0.1%),每次 2 mL/只,给药后禁水 1 h;第 4 周单日禁食不禁水,双日自由进食进水,继续单双日交替饮用脱氧胆酸溶液(20 mL·kg⁻¹)和氨水溶液(0.1%)^[9]。

1.3.2 给药与取材

模型构建成功后,正常对照组和模型组大鼠每日正常饲养,枳术连夏汤治疗组在正常对照组基础上,每日灌服 18 g·kg⁻¹的枳术连夏汤;阳性药物对照组在正常对照组基础上,每日灌服 0.648 g·kg⁻¹的胃炎康胶囊,连续 8 周。整个实验过程,每 2 周对每组大鼠进行称重 1 次。

给药结束后,对每组大鼠禁食 24 h,接着采用乌拉坦进行麻醉;将各组大鼠采用仰卧姿势固

定,同时保证大鼠头部要高于胃部;用剪刀小心剪开大鼠腹部腹,使胃部暴露出来;接着在大鼠幽门处结扎,4 h后,于大鼠腹主动脉处取血,约4 mL,用于后续标志物分析。取血后,结扎各大鼠贲门,取全胃,先用生理盐水清洗各大鼠胃表面,接着沿着胃小弯处切开胃腔,收集胃液,用于后续胃液中相关酶蛋白测定;再取各组大鼠胃窦部组织,用10%多聚甲醛固定,制作切片,用于后续病理检测。

1.3.3 大鼠一般状态观察及胃蛋白酶测定

大鼠一般状态观察:每日上午9:00观察各组大鼠的行为状态、饮食、活动时间、大鼠毛发光泽以及大便性状等。

大鼠胃蛋白酶测定:按照上述步骤收集各组大鼠胃液,用酸度计测定各组大鼠胃液pH值,再用试剂盒按照比色法测定各组大鼠胃蛋白酶活力^[10]。

1.3.4 HE染色及形态结构观察

取材与固定:取出上述处理好的胃窦部组织,水洗10 min后,将其切成厚度约为2~3 μm。

脱水与透明处理:依次经过80%乙醇进行脱水处理2 h;经过95%乙醇进行脱水处理2 h,并重复1次;经过100%乙醇进行脱水处理2 h,并重复2次;接着依次进行透明化处理、浸蜡包埋、切片与展片、脱蜡与染色以及脱水与封片。

1.3.5 大鼠血清样品制备

处理结束后,收集各组大鼠血液,一部分用来测定大鼠生化指标,一部分用来做代谢组分析。大鼠生化指标检测中,LDH和CK浓度测定均通过UV1100紫外分光光度计进行。

代谢组样品制备步骤如下:将100 μL大鼠血浆滴加到甲醇溶液中,通过涡旋混匀处理后,4℃、15 000 × g离心10 min。将上清液转移到进样瓶中,通过HPLC分析血清中各成分。

1.3.6 大鼠血清中胃蛋白酶原I、胃蛋白酶原II含量测定

将大鼠血清样品用100 mmol · L⁻¹, pH 7.0的磷酸缓冲液冲洗沉淀2遍,去上清液,将细胞沉淀悬浮于5 mL磷酸缓冲液中;超声波破碎10 min,40 kHz,10 s振动,5 s间隔。接着,按照胃蛋白酶原I(pepsinogen I, PGI)(批号JKSJ--1021)、胃蛋白酶原II(pepsinogen II, PGII)(批号JKSJ--1022)检测试剂盒(德国IBL)说明书进行操作,测定大鼠血清中PGI、PGII含量。

1.3.7 免疫组化法检测大鼠胃黏膜保护因子EGF和TGF-α的表达

取出大鼠胃黏膜组织,按照脱水、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、抗原修复、封闭、二抗孵育、显色、苏木素复染、脱水、封片等步骤制备切片后,进行免疫组化染色。免疫组化染色采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法检测大鼠胃黏膜中EGF和TGF-α蛋白表达状况^[11]。

1.3.8 HPLC-MS条件

色谱条件:采用InertSustain Bio C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),柱温为45℃,流速为0.3 mL · min⁻¹,流动相A为含有0.1%甲酸水溶液,B为乙腈,梯度洗脱(0~3 min, 97%~80%A; 3~6 min, 80%~40%A; 6~12 min, 40%A; 12~13 min, 40%~20%A; 13~14 min, 20%~2%A; 14~21 min, 2%~97%A);平衡时间4 min,进样量3 μL。

质谱条件:采用正负离子模式;ESI离子源;雾化压力为275.79 kPa;毛细管电压400 V,裂解电压10 V;干燥气温度350℃;干燥气流速10.0 L · min⁻¹;MS/MS的离子扫描范围设置为50~1 000 m/z;MS离子扫描范围设置为100~1 000 m/z;图谱采集频率为1.0 spec · s⁻¹。

1.3.9 生物标志物鉴定

根据OPLS-DA模型计算得到的VIP继续寻找大鼠慢性胃炎潜在疾病的生物标志物,其中当VIP > 1.5时,为了进一步验证找到的差异物是否具有显著差异,通常采用T检验法,其中若FC > 1.2时,且P < 0.05则表示差异有统计学意义。再通过对差异物的同位素比例和质荷比,在KEGG、METLIN和HMDB这三大数据库中继续搜索潜在标志物。

1.3.10 方法学验证

对于新建立的HPLC方法,首先进行稳定性和重复性评价。采取同一个样品,按照样品处理法平行处理6次,连续进样检测测定其重复性。同样,样品分析时,每隔3个样品上样一针质量控制样品,总共进样6次,对其稳定性进行检测。

对于不同极性离子的方法学评价,其中肾上腺素采用正离子模式, m/z 184.0897;甲基胞嘧啶采用正离子模式, m/z 125.05292;尿酸采用负离子模式, m/z 167.0292;去氧皮质酮采用负离子模式, m/z 329.2202;醛固酮采用负离子模式,

m/z 359.1938。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析,方差分析后多重比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

正常对照组大鼠活泼好动,毛发色泽光滑,精神好,食欲旺,体重稳步增长;模型组大鼠食欲差,毛发无光泽,精神差,不爱动,大鼠增长缓慢甚至不增长,出现日益消瘦的局面;阳性药物对照组大鼠和枳术连夏汤治疗组大鼠经过治疗后,状态有所改善,但和正常对照组相比,大鼠状态仍然有所差距。各组大鼠体重记录见表 1。

2.2 枳术连夏汤对慢性胃炎模型大鼠胃液 pH 值和胃蛋白酶活力影响

与正常对照组相比,模型组大鼠胃液 pH 值较高,胃蛋白酶活力显著下降;与模型组相比,阳性药物对照组和枳术连夏汤治疗组大鼠胃液 pH 值有所下降,胃蛋白酶活力有所增加。具体结果见表 2。

2.3 各组大鼠胃组织形态结构观察结果

各组大鼠胃组织形态结构如图 1 所示,正常

对照组大鼠胃结构完整清晰;模型组大鼠胃壁结构缺失,不清晰,胃黏膜排列不整齐,胃腺体稀疏,胃腺体内有明显腺体萎缩发生,可见明显充血及水肿发生,可见大量淋巴细胞和炎性细胞产生,且胃基层细胞出现破裂,胃基础出现明显断裂;与模型组大鼠相比,阳性药物对照组和枳术连夏汤治疗组大鼠胃组织结构发生明显改善,不过与正常对照组相比,仍有少数残缺。

2.4 各组大鼠胃组织 EGF、TGF- α 的含量变化

免疫组化检测可见各组大鼠胃组织中 EGF 阳性细胞表达,颜色为棕黄色、黄色或褐色,染色颗粒位于细胞浆或细胞膜中;模型组中 EGF 阳性表达显著增多;阳性药物治疗组和枳术连夏汤治疗组也呈现不同程度增加,密集分布。与正常对照组相比,模型组胃组织中 TGF- α 阳性表达降低;与模型组相比,阳性药物治疗组和枳术连夏汤治疗组呈现不同程度增加,密集分布。结果见图 2,图 3 和表 3。

2.5 各组大鼠血清胃蛋白酶原含量测定

与正常对照组相比,模型组大鼠血清中 PGI 和 PGI/PGII 含量显著降低,PGII 含量显著增加;与模型组相比,阳性药物对照组和枳术连夏汤治疗组大鼠血清中 PGI 和 PGI/PGII 含量显著增加,PGII 含量显著降低。结果见表 4。

表1 各组大鼠体重测量结果 (g, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1. Results of body weight measurement for each group of rats (g, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	0周	2周	4周	6周	8周
正常对照组	205.35 ± 12.44	238.68 ± 12.27	269.03 ± 9.13	294.26 ± 10.26	315.46 ± 10.75
模型组	204.82 ± 13.75	225.12 ± 11.31 ^a	246.17 ± 12.05 ^b	251.54 ± 12.13 ^b	256.78 ± 10.68 ^b
阳性药物对照组	205.27 ± 9.63	229.34 ± 12.08 ^c	252.58 ± 11.69 ^c	273.84 ± 8.93 ^c	297.24 ± 12.19 ^c
枳术连夏汤治疗组	205.48 ± 10.82	231.72 ± 10.64 ^c	255.74 ± 12.18 ^c	281.58 ± 9.57 ^c	302.56 ± 9.53 ^c

注:与正常对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组相比,^c $P < 0.01$

表2 各组大鼠胃液pH值和胃蛋白酶活力影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2. Effect of pH and pepsin activity of gastric juice of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	pH值	胃蛋白酶 (U · mL ⁻¹)
正常对照组	3.04 ± 0.28	121.89 ± 5.05
模型组	3.97 ± 0.25 ^a	83.56 ± 6.14 ^a
阳性药物对照组	3.36 ± 0.53 ^b	108.47 ± 4.68 ^b
枳术连夏汤治疗组	3.21 ± 0.42 ^b	110.59 ± 4.71 ^b

注:与正常对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$

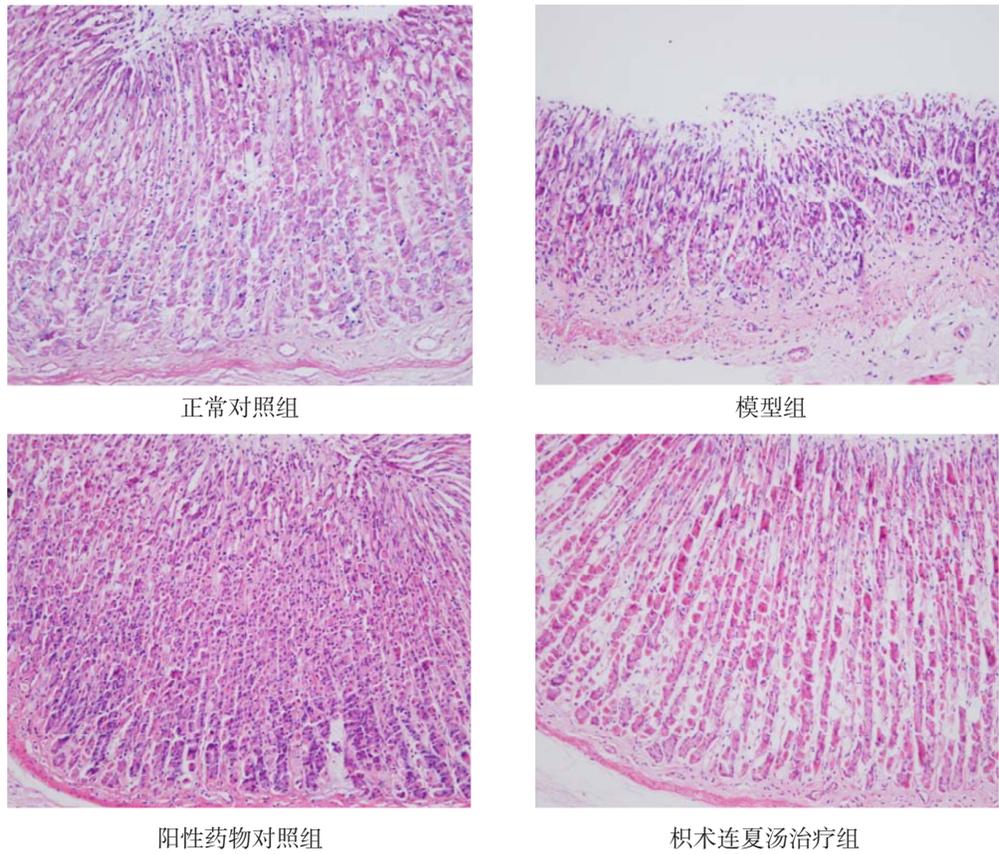


图1 各组大鼠胃组织形态结构观察 (400 ×)

Figure 1. Morphological and structural observation of the stomach of rats in each group (400 ×)

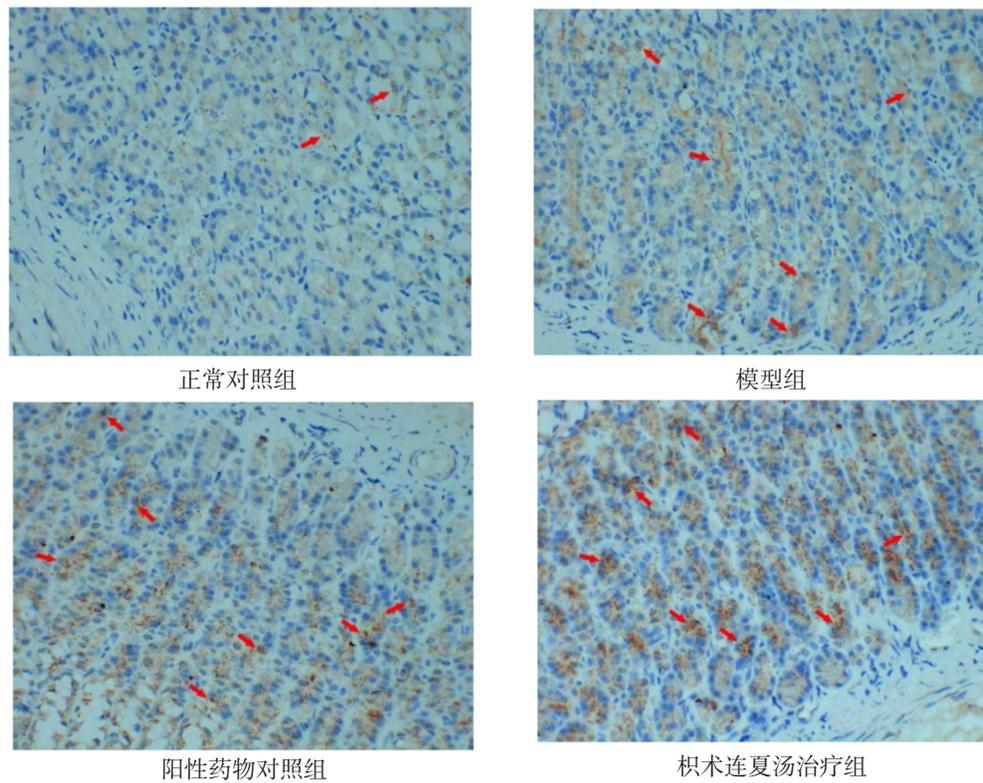


图2 各组大鼠胃组织EGF的免疫组化检测 (400 ×)

Figure 2. Immunohistochemical detection of EGF in gastric tissue of rats in each group (400 ×)

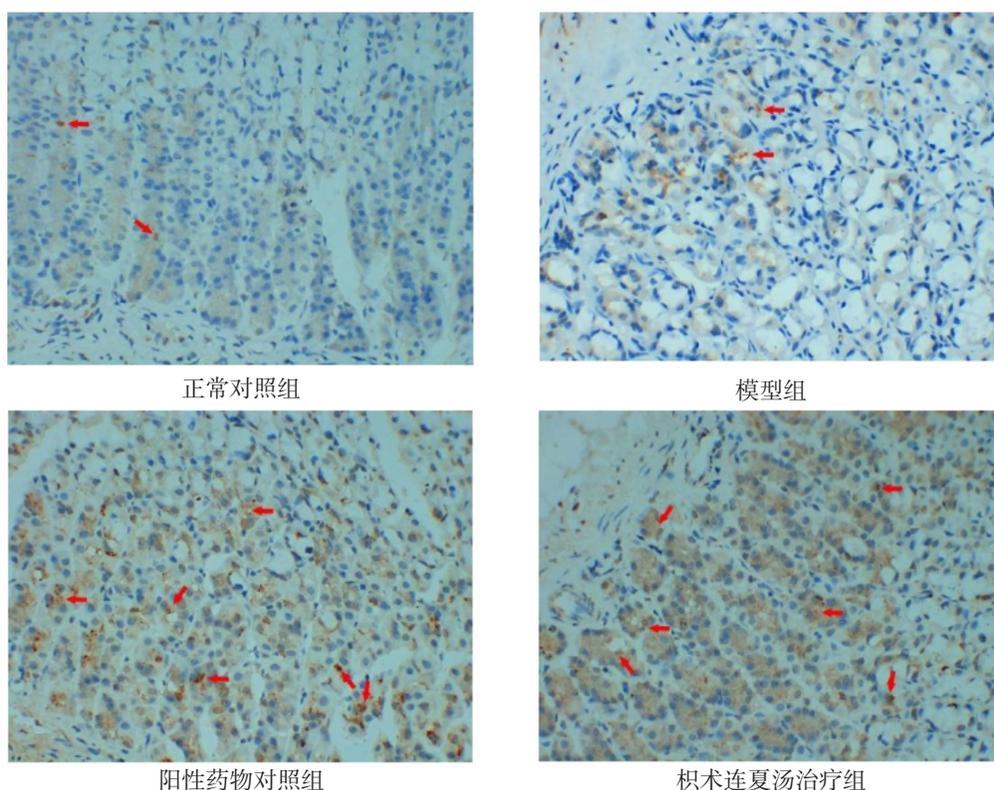


图3 各组大鼠胃组织TGF-α的免疫组化检测 (400 ×)

Figure 3. Immunohistochemical detection of TGF-α in gastric tissue of rats in each group (400 ×)

表3 各组大鼠胃组织EGF、TGF-α的免疫组化平均光密度分析 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3. Mean optical density analysis of EGF and TGF-α in gastric tissues of rats in each group by immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	EGF	TGF-α
正常对照组	0.0169 ± 0.0042	0.0435 ± 0.0137
模型组	0.0274 ± 0.0107 ^a	0.0352 ± 0.0149 ^a
阳性药物对照组	0.0403 ± 0.0059 ^b	0.0452 ± 0.0152 ^b
枳术连夏汤治疗组	0.0383 ± 0.0051 ^b	0.0446 ± 0.0205 ^b

注：与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$

表4 各组大鼠血清中PG含量测定 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4. Determination of PG content in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	PGI (ng · mL ⁻¹)	PGII (ng · mL ⁻¹)	PGI/PGII
正常对照组	17.28 ± 4.59	0.48 ± 0.35	46.42 ± 25.81
模型组	11.04 ± 2.36 ^a	0.67 ± 0.24 ^a	17.93 ± 7.32 ^a
阳性药物对照组	14.84 ± 3.25 ^b	0.55 ± 0.16 ^b	35.55 ± 3.29 ^b
枳术连夏汤治疗组	15.35 ± 2.18 ^b	0.52 ± 0.18 ^b	39.26 ± 3.13 ^b

注：与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$

2.6 各组大鼠血清中代谢物HPLC分析

各组 HPLC 色谱图见图 4。重复性和稳定性结果见表 5。

鉴于 HPLC 分析大鼠血清后代谢图谱太复杂，无法直接通过图谱判断各组之间的差异性，因此，本文通过正交偏最小二乘法判别分析

(OPLS-DA)^[11] 对各组数据进行分析，结果如图 5 所示，模型组与正常对照组之间，各组数据代谢分布得到了显著分离；模型组与阳性药物对照组和枳术连夏汤治疗组之间，各组代谢物之间分布也得到了显著分离。结果表明，大鼠血清代谢组学数据情况已经发生明显改变，表明 OPLS-

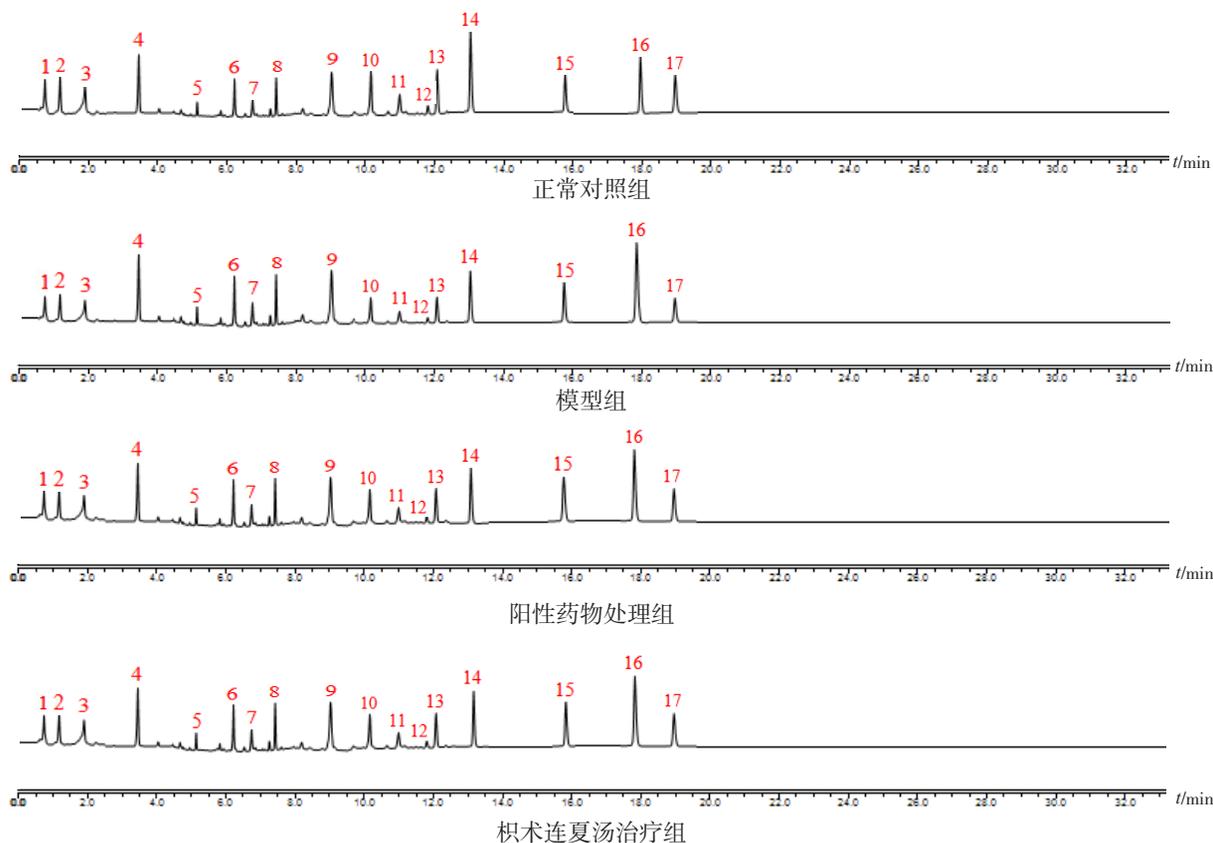


图4 各组大鼠血清中代谢物HPLC分析

Figure 4. HPLC analysis of metabolites in serum of rats in each group

注: 1.2-氧代己二酸; 2.甲硫氨酸; 3.甜菜碱; 4.葡萄糖; 5.苯丙氨酸; 6.谷胱甘肽; 7.次黄嘌呤; 8.丙二酸; 9.肌苷; 10.肌醇; 11.谷氨酰胺; 12.甲基苯二酸乙醇胺; 13.烟酰胺; 14.甘油; 15.乳酸; 16.乙酰乙酸(141-78-6); 17.腺苷

表5 大鼠血清代谢物分析的重复性和稳定性结果 (n=6)

Table 5. Repeatability and stability results (n=6)

模式	选择离子 (m/z)	重复性				稳定性			
		保留时间		峰面积		保留时间		峰面积	
		均值 (min)	RSD (%)	均值	RSD (%)	均值 (min)	RSD (%)	均值	RSD (%)
ESI (+)	192.4	4.29	0.82	4 023	9.02	4.34	0.95	2 036	6.53
	135.3	5.76	0.68	7 437	10.17	5.89	0.72	5 452	8.47
ESI (-)	169.1	6.52	0.79	3 862	7.24	6.59	0.89	3 152	5.24
	332.5	8.38	0.73	5 471	8.37	8.37	0.85	3 053	6.28
	363.7	9.85	0.65	3 788	10.49	10.15	0.69	2 684	7.39

DA 模型有效。根据模型, 枳术连夏汤可以改变大鼠血清中甜菜碱、甲硫氨酸、糖原、葡萄糖、苯丙氨酸、谷胱甘肽和次黄嘌呤的代谢水平; 枳术连夏汤可以明显恢复丙二酸、肌苷、肌醇、谷氨酰胺、甲基苯二酸乙醇胺和烟酰胺的水平; 枳术连夏汤可以调节甘油、乳酸和乙酰乙酸等代谢物。

根据上述 OPLS-DA 模型计算得到的变量权重值 (VIP) 继续寻找大鼠慢性胃炎潜在疾病的

生物标准物, 其中当 $VIP > 1.5$ 时, 为了进一步验证找到的差异物是否具有显著差异, 通常采用 T 检验法, 其中若 $FC > 1.2$ 时, 且 $P < 0.05$ 则表示差异显著。再通过对差异物的同位素比例和质荷比, 在 KEGG、METLIN 和 HMDB 这三大数据库中继续搜索潜在标准物, 结果发现除了 2-氧代己二酸外, 其余 16 个生物标志物均于大鼠糖酵解途径相关, 具体见表 6。

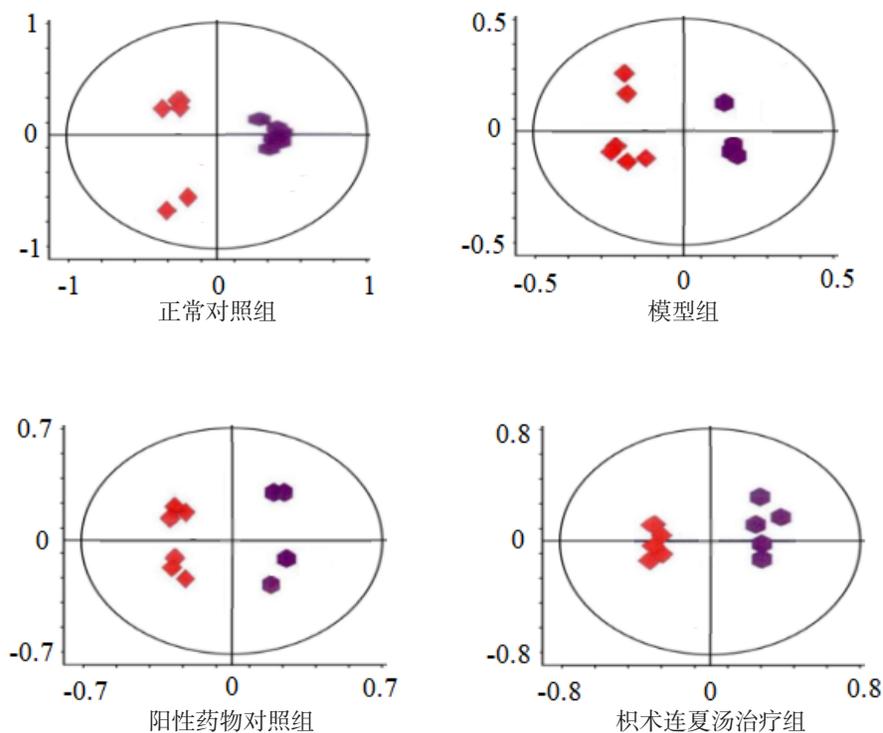


图5 各组大鼠血清代谢组学数据的模式识别分析OPLS-DA图

Figure 5. OPLS-DA plot for pattern recognition analysis of serum metabolomics data from various groups of rats

注：图中红色的点表明这些代谢物的变量权重值 (VIP) ≥ 1，紫红色的点表示这些代谢物的VIP ≤ 1

表6 大鼠血浆代谢物潜在标志物

Table 6. Potential markers for rat plasma metabolites

序号	出峰时间 (min)	相对分子质量	成分	趋势
1	0.69	160.0351	2-氧代己二酸	↓
2	1.21	149.2104	甲硫氨酸	↓
3	1.85	117.1528	甜菜碱	↓
4	3.37	180.1612	葡萄糖	↑
5	5.14	165.1929	苯丙氨酸	↑
6	6.23	307.3284	谷胱甘肽	↑
7	6.74	136.1115	次黄嘌呤	↑
8	7.56	104.0326	丙二酸	↑
9	9.04	268.2261	肌苷	↑
10	10.08	180.1619	肌醇	↑
11	11.12	146.1537	谷氨酰胺	↑
12	11.91	119.1642	甲基苯二酸乙醇胺	↓
13	12.26	122.1187	烟酰胺	↓
14	13.18	92.0915	甘油	↓
15	15.82	90.3561	乳酸	↓
16	17.76	130.1453	乙酰乙酸	↑
17	18.697	267.2389	腺苷	↓

3 讨论

枳术连夏汤是由白术、枳实、半夏和黄连等药物组成, 这些药物均具有抗炎镇痛的功效。炎症是机体中由于损伤所导致的炎症因子产生的一种病理性防御反应, 主要以局部组织发生增生、渗出以及变质为主^[12]。饶丽梦等^[13]研究发现菖蒲郁金汤在治疗重症病毒性脑炎时, 炎症因子 TNF- α 与 IL-6 含量显著增加。沈利芳等^[14]研究发现甘草泻心汤在治疗复发性口腔溃疡时, 炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 含量显著增加。本研究中, 免疫组化检测可见枳术连夏汤治疗后大鼠胃组织中 EGF 与 TGF- α 阳性细胞表达增多, 该结果表明枳术连夏汤对慢性胃炎大鼠的治疗可能是通过炎症因子来调节的, 与前人研究一致。

众所周知, 胃是机体内消化食物的中空器官, 主要受大脑神经系统和胃饱胀感所控制, 当胃有饥饿感时, 会刺激大脑, 发出摄入饮食的指令^[15]。研究^[16]显示, 胃和脑部之间的相互作用一旦发生异常, 就会直接影响机体生理和病理状况, 多种动物实验显示, 当胃功能发生障碍时, 能够直接导致机体行为发生障碍, 当长期处于这种状态, 就会直接影响机体的行为和健康。本研究密切关注各组大鼠状态, 结果发现正常对照组大鼠活泼好动, 毛发色泽光滑, 精神好, 食欲旺, 体质量稳步增长; 慢性胃炎模型组大鼠食欲差, 毛发无光泽, 精神差, 不爱动, 大鼠增长缓慢甚至不增长, 出现日益消瘦的局面; 阳性药物对照组大鼠和枳术连夏汤治疗组大鼠经过治疗后, 状态有所改善, 但是和对照组相比, 大鼠状态仍然有所差距。

慢性胃炎是一类隐藏性疾病, 不易发现, 一旦发现又很难根治, 严重者甚至会发展成胃癌。一直以来, 学者专家们一直在寻找一种早期诊断方法, 血清属于机体中容易获得, 且又不易对机体造成伤害的样品^[7,15-17]。因此, 如何通过血清获得早期慢性胃炎的判断数据一直以来是研究的热点。本研究首先成功构建了大鼠慢性胃炎模型大鼠, 接着用枳术连夏汤对慢性胃炎模型大鼠进行治疗, 再采取治疗后各组大鼠的血液, 通过 HPLC 技术进行分析, 结果在大鼠血液中成功地鉴定了 17 个生物标志物, 其中 16 个与糖酵解途径相关。糖原是机体内通过葡萄糖高度聚合的产物, 可以通过糖异生的方法由甘油合丙酮酸合

成, 进而参与糖酵解途径。糖酵解发生过程中, 代谢所产生的能量能够被 ATP、NADH 和酶结合 FADH₂ 的形式被捕获。厌氧条件下, 葡萄糖代谢的最终产物是乳酸盐, 因此, 人们也经常将其用于评估机体内供需不平衡的严重程度。甘油是机体内形成脂肪酸骨架的物质, 还可以当作能量存储源, 需要时能够转化为葡萄糖为机体提供所需能量。肌醇是细胞中的第二信使, 在信号转导过程中主要以肌醇磷酸盐的形式存在。综上所述, 大鼠血清标志物中 16 个物质均与糖酵解途径密切相关。该结果表明, 枳术连夏汤治疗慢性胃炎大鼠具有显著治疗效果, 且与糖酵解代谢途径密切相关, 这个研究为将来对慢性胃炎的早期判断提供了理论和实践基础。

这项研究有一些局限性。首先, 样本量过少; 其次, 没有进行临床研究; 第三, 定性分析慢性胃炎大鼠血清中标志物, 没有对其进行定量分析。这些在将来的研究中都需要进一步调查。

参考文献

- 1 孔祥茹, 杨岩, 李慧臻, 等. MNNG 不同给药剂量及途径对大鼠胃黏膜组织病理学的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(6): 381-384,338. [Kong XR, Yang Y, Li HZ, et al. The effect of different routes and doses of N-methyl-N-nitro N-nitrosoguanidine administration on pathological changes of gastric mucosa in rats[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2015, 23(6): 381-384,338.] DOI: 10.3969/j.issn.1671-038X.2015.06.02.
- 2 吴全峰, 赵立波, 王晓玲, 等. 炎症性肠病的治疗药物研究进展 [J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2011-2019. [Wu QF, Zhao LB, Wang XL, et al. Research progress in therapeutic drugs for inflammatory bowel disease[J]. Chinese Pharmacist, 2020, 23(10): 2011-2019.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2020.10.033.
- 3 Chandra SA, Nolan MW, Malarkey DE. Chemical carcinogenesis of the gastrointestinal tract in rodents: an overview with emphasis on NTP carcinogenesis bioassays[J]. Toxicol Pathol, 2010, 38(1): 188-197. DOI: 10.1177/0192623309356452.
- 4 Huang CW, Tholey A. Tandem mass tag protein labeling for top-down identification and quantification[J]. Anal Chem, 2012, 84(1): 161-170. DOI: 10.1021/ac202243r.

- 5 易晋宇, 殷静, 石海莲, 等. 慢性萎缩性胃炎动物模型制备研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(1): 210–214. [Yi JY, Yin J, Shi HL, et al. Research progress on development of animal models of chronic atrophic gastritis[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 48(1): 210–214.] DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2021.01.059
- 6 郑剑, 李冀, 孙姐男. 浅析李冀教授治疗肝胃不和型胃脘痛的临证经验[J]. 中医药信息, 2015, (3): 56–58. [Zheng J, Li J, Sun DN. Clinical experience of the treatment for epigastric pain with the syndrome of incoordination between liver and stomach from Professor LI Ji[J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2015, (3): 56–58.] DOI: CNKI:SUN:ZYXN.0.2015-03-019.
- 7 程时平, 郑其进, 李佑桥. 枳术汤加减治疗慢性功能性便秘临床研究[J]. 中医学报, 2012, 27(8): 1023–1025. [Cheng SP, Zheng QJ, Li YQ. Clinical research on zhizhu decoction in the treatment of chronic functional constipation[J]. China Journal of Chinese Medicine, 2012, 27(8): 1023–1025.] DOI: CNKI:SUN:HNZK.0.2012-08-048
- 8 吴全娥, 李在斯, 运峰, 等. 李冀教授运用升阳益胃汤加减验案三则[J]. 中医药学报, 2016, 44(3): 111–113. [Wu QE, Li ZS, Yun F, et al. Three Cases of Shengyang Yiwei Decoction with plus and minus by Professor LI Ji[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 44(3): 111–113.] DOI: CNKI:SUN:ZYXB.0.2016-03-040.
- 9 Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, et al. Helicobacter pylori-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models[J]. Dis Model Mech, 2017, 10(2): 89–104. DOI: 10.1242/dmm.027649.
- 10 Zhang Y, Alexander PB, Wang XF. TGF-beta family signaling in the control of cell proliferation and survival[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9(4): a022145. DOI: 10.1101/cshperspect.a022145.
- 11 符海邨, 张倩睿, 熊蕊, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在中药质量评价中的应用进展[J]. 中国药师, 2022, 25(5): 864–867. [Fu HT, Zhang QR, Xiong R, et al. Research Progress in Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine Based on Fingerprint Combined with QAMS[J]. China Pharmacist, 2022, 25(5): 864–867.] DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.05.020.
- 12 沈丕安, 主编. 中药药理与临床运用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 109–942.
- 13 饶丽梦, 韩静. 菖蒲郁金汤辅助治疗对重症病毒性脑炎的中医证候、神经功能及炎症因子的影响[J]. 四川中医, 2023, 41(2): 91–94. [Rao LM, Han J. Effects of adjuvant therapy with Calamus yujin Tang on TCM symptoms, neurological function and inflammatory factors in severe viral encephalitis [J]. Sichuan Traditional Chinese Medicine, 2023, 41(2): 91–94]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C44YLT10AiTRKibY1V5Vjs7ioT0BO4yQ4m_mOgeS2ml3UFX6aMvy-ZBcQAK9FkapQL_amF-CtbkgYc-PFVvkWe2B&uniplatform=NZKPT.
- 14 沈利芳. 甘草泻心汤治疗复发性口腔溃疡的临床疗效及对中医证候积分、炎症因子水平的影响[J]. 中国民间疗法, 2022, 30(21): 55–58. [Shen LF. Clinical efficacy of Glycyrrhiza glabra soup in the treatment of recurrent oral ulcers and its effect on the Chinese medicine evidence score and inflammatory factor levels[J]. Chinese Folk Therapy, 2022, 30(21): 55–58]. DOI: 10.19621/j.cnki.11-3555/r.2022.2119.
- 15 郑学宝, 胡玲, 王汝俊, 等. 枳术汤对脾虚便秘小鼠胃肠运动的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(31): 240–242. [Zheng XB, Hu L, Wang RJ, et al. Effect of zhizhu decoction on gastric motility of mice with spleen insufficiency constipation[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2005, 9(31): 240–242.] DOI: 10.3321/j.issn:1673-8225.2005.31.085.
- 16 张家衡, 刘彦, 金太欣, 等. 枳术汤加味对外科手术患者肠黏膜屏障功能影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008(5): 454–456. [Zhang JH, Liu Y, Jin TX, et al. The effect of Hovenia jiao tang plus flavor on intestinal mucosal barrier function in surgical patients[J]. Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine, 2008, 14(5): 454–456.] DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2008.05.006.
- 17 潘继波. 枳术汤加味治疗胆汁反流性胃炎 60 例[J]. 西部中医药, 2013, 26(10): 96–97. [Pan JB. Modified ZhiZhuTang in treating 60 cases of bile reflux gastritis[J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 26(10): 96–97.] DOI: 10.3969/j.issn.1004-6852.2013.10.034.

收稿日期: 2022 年 11 月 01 日 修回日期: 2023 年 02 月 07 日
 本文编辑: 钟巧妮 周璐敏