

气阴两虚证心肌缺血模型方证对应的代谢组学表征

严蓓^{1,2}, 阿基业², 郝海平², 王广基^{2*}, 刘林生², 查伟斌², 张颖², 顾胜华²

(1. 卫生部北京医院药学部临床药理室, 北京 100730; 2. 中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: 为了探索“方证对应”的科学内涵, 本研究以气阴两虚证心肌缺血为模型, 以基于气相色谱/飞行时间质谱 (GC-TOF/MS) 检测技术的代谢组学方法为技术手段, 对比分析了生脉注射液、丹参注射液和普萘洛尔的保护作用。数据处理和模式识别后, 无论从 PLS-DA 散点图直观观察还是药物纠正的异常的内源性化合物个数来看, 生脉注射液都显示优于其他两种药物的效果, 进一步用与心血管和睡眠密切相关的指标内皮素-1 验证了代谢组学的结果。最后分析了受到调节的化合物及相关生化代谢通路, 推测生脉注射液的作用与调节能量代谢、脂代谢、氨基酸代谢等多条代谢途径有关, 这为生脉“方”“对应”用于气阴两虚“证”心肌缺血提供了科学的证据。此发现说明代谢组学在中医药研究中具有巨大的潜力, 这为传统中医理论的现代化研究提供了新的研究思路与方法。

关键词: 代谢组学; 气相色谱-飞行时间质谱; 方证对应; 气阴两虚; 心肌缺血; 生脉注射液

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 08-0976-07

Metabonomic phenotype of “formula corresponding to pattern types” based on “Qi and Yin deficiency pattern” of myocardial ischemia rat model

YAN Bei^{1,2}, A Ji-ye², HAO Hai-ping², WANG Guang-ji^{2*}, LIU Lin-sheng², ZHA Wei-bin², ZHANG Ying², GU Sheng-hua²

(1. Department of Clinical Pharmacology, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China;

2. Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: In order to explore the scientific connotation of “Fangzhengduiying (formula corresponding to pattern types)”, “Qiyinliangxuzheng (Qi and Yin deficiency pattern)” of myocardial ischemia rat model and GC-TOF/MS based metabonomic method were used for comparing the effects of Sheng-mai injection, Salvia injection and propranolol in the present study. After data processing and pattern recognition, Sheng-mai injection showed better efficacy than the other two drugs in accordance with not only visual observation from PLS-DA scores plots but also the number of abnormal endogenous compounds restored to the normal level. Further studies showed that Sheng-mai injection could normalize the level of plasma endothelin-1, the index related to cardiovascular diseases and sleep disorders, which verified the results of metabonomics. Finally, the regulated metabolites and related metabolic pathways were analyzed, and it was supposed that the effects of Sheng-mai injection involved in the alternation of energy metabolism, lipid metabolism, amino acids metabolism, and so on. These findings provided scientific evidence to Shengmai “Fang” used for “Qi and Yin deficiency pattern” correspondingly, indicating that metabonomics has great potential in traditional Chinese medical research, which provides a novel approach and way to modernization of traditional Chinese medicine.

收稿日期: 2011-02-24.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09304-001, 2009ZX09502-004); 国家自然科学基金资助项目 (30630076); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2008038, BK2008493).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-83271060, E-mail: guangjiwang@hotmail.com

Key words: metabonomics; GC-TOF/MS; formula corresponding to pattern types; Qi and Yin deficiency pattern; myocardial ischemia; Sheng-mai injection

辨证论治的基础是病证结合, 实施手段是方证对应。“方证对应”的“方”是指药物的特定组合和具有明确应用指征的药物, “证”是证候, 即对四诊信息表达的机体病理生理变化整体反应的概括, “对应”是指一系统中某一项在性质、作用、位置、数量上跟另一系统中某一项相当, “方证对应”就是指在治疗疾病时所选用的方必须与证候相对应, 有是证用是方, 方随证立, 证变则方变^[1,2]。方证对应不仅是临床施治的前题, 还是中医药疗效评价体系建立的核心内容。

现代方证领域的研究主要是定位在对方或对证的探索上, 较少考虑到方与证之间的内在联系。中医证候模型的建立及模型评价指标体系的缺乏是限制中医“方证对应”思想研究的主要瓶颈, 目前用于中药的药效评价大都还是采用模拟现代医学发病原理进行简单复制的动物模型, 难以体现中医药的临床疗效特点和科学内涵。正因为没有找到合适的切入点和方法, 动物实验结果也就不能代表中医几千年来来的实践经验^[3]。由此看出, 证候是研究方证的基础, 建立相关的证候模型是其先决条件, 本实验室已经建立了气阴两虚型和心血瘀阻型心肌缺血大鼠模型, 并用代谢组学的方法从整体上阐述了其代谢共性和各自特性^[4], 为“方证对应”研究奠定了基础。

补益类及活血化瘀类中药是目前中医临床治疗心血管疾病的两大类常用药物。补益类以益气固脱、强心复脉、生津敛汗为主要作用, 活血化瘀类以通行行血、消散瘀滞为主要作用。生脉注射液是临床广泛使用的补益类中成药的代表, 适用于气阴两虚, 脉虚欲脱的心悸、气短、四肢厥冷、汗出、脉欲绝及心肌梗死、心源性休克等具有上述证候者。丹参注射液则是活血化瘀类中成药的代表, 适用于凝血瘀滞之症, 对冠心病心绞痛、心肌梗死具有显著的疗效^[5]。生脉注射液这个“方”和气阴两虚证心肌缺血这个病“证”之间“对应”关系的本质及如何从中医角度体现生脉注射液的特色, 应该借助于新的科学技术手段。

正因为代谢组学与中医的整体观相吻合, 且具有终点放大效应, 反映了多因素相互作用下机体的整体状态, 用代谢组学的方法对比分析服用中药或采用中医疗法前后体液中内源性物质之间所存在的

差异以及药物体内成分谱的变化, 是探索传统中药的作用物质基础和疗效的有效工具, 为方证对应的研究提供了技术平台。本文将以气阴两虚证心肌缺血大鼠模型为例, 用代谢组学的方法阐述生脉注射液和丹参注射液对气阴两虚证心肌缺血保护作用的特点, 探索生脉注射液对证用于气阴两虚的科学内涵。

材料与方法

试药和仪器 盐酸异丙肾上腺素注射液 (ISO, 上海禾丰制药有限公司); 盐酸肾上腺素注射液 (天津金耀集团有限公司); 生脉注射液 (20 mL·支⁻¹; 江苏苏中药业集团股份有限公司, 批号: 07091307; 经含量测定含人参皂苷 Rg1 约 173.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、Re 约 96.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、Rd 约 65.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、Rb1 约 259.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、五味子醇甲约 2.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、五味子甲素约 46.2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、五味子乙素约 255.7 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); 丹参注射液 (上海中西制药有限公司, 批号: 070901); 普萘洛尔 (Sigma-Aldrich, India)。大鼠内皮素-1 ELISA 试剂盒 (ET-1, 上海西唐生物科技有限公司)。代谢组学用试剂和仪器, 包括同位素内标、肼化试剂、硅烷化试剂、分离和检测系统、离心装置、减压浓缩装置等同前报道^[4]。

动物 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 55 只, 许可证号 SCXK-(军) 2002-001, 体重 140~160 g, 由中国军事医学科学院实验动物中心提供。室温 20 ± 2 °C, 湿度 50% ± 20%, 室内保持 12 h/12 h 昼夜。

实验方案 大鼠预先饲养两周后开始实验, 随机分成 5 组: ① 正常对照组 ($n = 7$) —— 实验期间给予生理盐水; ② 气阴两虚证心肌缺血组 (即模型组, $n = 12$) —— 每天皮下注射异丙肾上腺素 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 连续 10 天; 2 天后剥夺大鼠睡眠 72 h 后采样 (采样点 1), 2 天后再剥夺大鼠睡眠 72 h 后采样 (采样点 2); ③ 普萘洛尔组 ($n = 12$) —— 造模同时每天腹腔注射普萘洛尔溶液 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; ④ 生脉组 ($n = 12$) —— 造模同时腹腔注射生脉注射液, 前 5 天每天 6 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 之后每天 5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$; ⑤ 丹参组 ($n = 12$) —— 造模同时每天腹腔注射丹参注射液 1.5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。③~⑤组采样点同②组。

每次采样前大鼠禁食 12 h, 可自由饮水。由眼眶

采全血 500 μL , 置于含有 EDTA-2Na 的试管中, 分离血浆置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 一部分用于代谢组学分析, 一部分用于血浆内皮素-1 (ET-1) 测定。正常对照组实验终点取心肌用于病理切片 ($n = 5$), 其他组每个时间点取心肌用于病理切片 ($n = 5$)。大鼠处死后迅速取出心脏, HE 染色进行病理切片, 光镜下观察病理形态学改变。血浆 ET-1 测定采用 ELISA 方法, 严格按照试剂盒说明书检测。

血浆样品处理以及数据采集和处理 血浆样品须经衍生化处理, 然后利用 GC-TOF/MS 进行测定, 血浆样品处理和数据采集处理的具体方法同前报道^[4]。

多元数据分析 同前报道^[4], 简言之 PCA 用来观察样品的聚集、离散及离群点, PLS-DA 得分图展示组间的差异, 例如本文中区分 5 个实验组, PLS-DA 载荷图用于计算造成这种区分的主要差异变量。用交叉验证的方法来确定主成分的个数。

最后用 One-way ANOVA 对模式识别得到的差异变量进行统计检验, SNK 法用于多组间的多重比较检验 ($P < 0.05$, 显著性差异), 最终确定有显著性差异的变量, 即为可能的生物标志物, 在 NIST 等谱库中检索鉴别这些化合物的结构并用标准样品进行确证。

结果与讨论

1 心肌病理切片分析 3 种药物对气阴两虚证心肌缺血模型大鼠的保护作用

心肌病理切片结果如图 1 所示, 采样点 1: 模型组心肌损伤主要为心内膜下心肌坏死呈多灶性条索状、片状坏死, 甚至环状坏死, 坏死处心肌细胞结构消失, 出现肉芽组织增生修复即增生的纤维母细胞和胶原取代, 可见新生的小血管长入, 与模型组相比, 普萘洛尔组心肌损伤改善较明显, 因为普萘洛尔可防止异丙肾上腺素诱导的心肌损伤^[6, 7]。丹参组略有改善, 生脉组也有改善, 介于普萘洛尔组与丹参组之间。采样点 2: 模型组心肌损伤性质与采样点 1 相似, 只是范围有所减小, 说明停止注射异丙肾上腺素心肌损伤有自行恢复的趋势, 这与报道一致^[8, 9], 与模型组相比, 普萘洛尔组、生脉组和丹参组均有改善, 以普萘洛尔组最为明显, 可能是普萘洛尔拮抗异丙肾上腺素的 β 受体激动作用。

2 3 种药物整体药效作用的代谢组学表征

将正常对照组、模型组、普萘洛尔组、生脉组和丹参组各分成一类, 每个采样点所有数据分别进行 PLS-DA 分析, 从 PLS-DA 三维得分图可以看出, 在

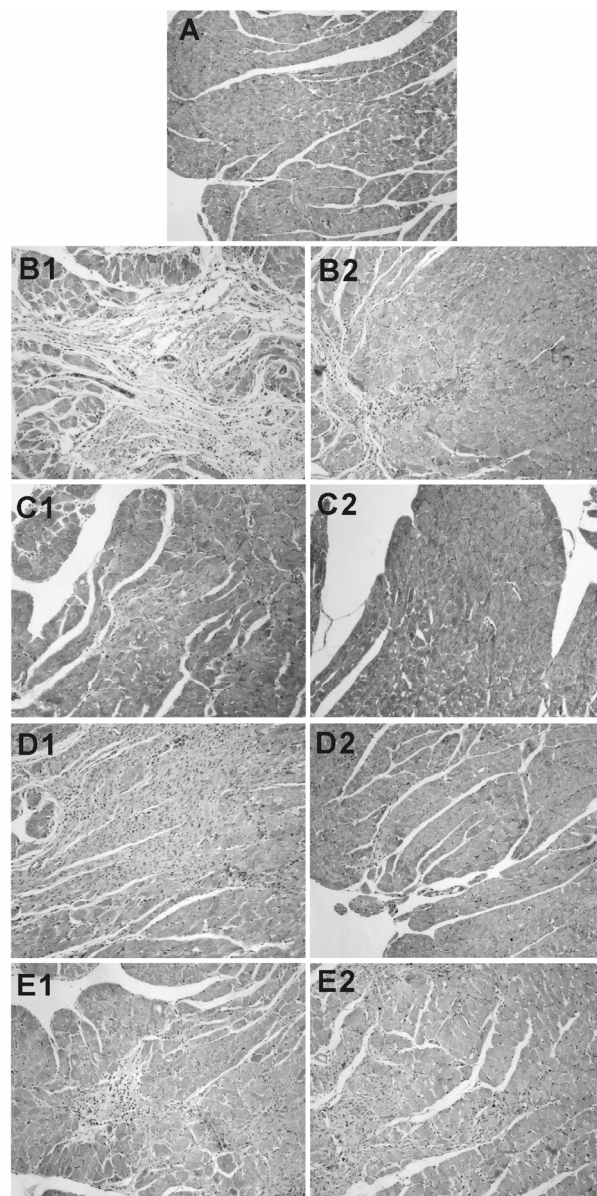


Figure 1 Myocardium histopathology: normal myocardium section (A); myocardium sections of the model group at the first (B1) and second (B2) sampling points; propranolol group at the first (C1) and second (C2) sampling points; Sheng-mai injection group at the first (D1) and second (D2) sampling points; Salvia injection group at the first (E1) and second (E2) sampling points (magnification $\times 100$)

采样点 1 (图 2A), 模型组和随行正常对照组明显的分成两簇, 3 个给药组均离开模型组, 生脉组紧邻正常对照组, 丹参组紧邻模型组, 普萘洛尔组在另一个方向, 离正常对照组和模型组都有一定距离; 在采样点 2 (图 2B), 模型组和随行正常对照组仍然明显的分成两簇, 3 个给药组均离开模型组, 生脉组还是紧邻正常对照组, 丹参组紧靠模型组, 普萘洛尔组与丹参组相似。以上结果说明正常对照组和模型组间内源性代谢物的含量存在明显差异, 这在作者之前的研究

中已经得到验证, 而经普萘洛尔、生脉注射液和丹参注射液预防给药后, 异常代谢均有改善, 且生脉注射液对气阴两虚证心肌缺血大鼠体内异常代谢的调节作用更加明显。代谢组学结果更加直观、明确、综合的反映了生脉注射液保护气阴两虚证心肌缺血的优势。

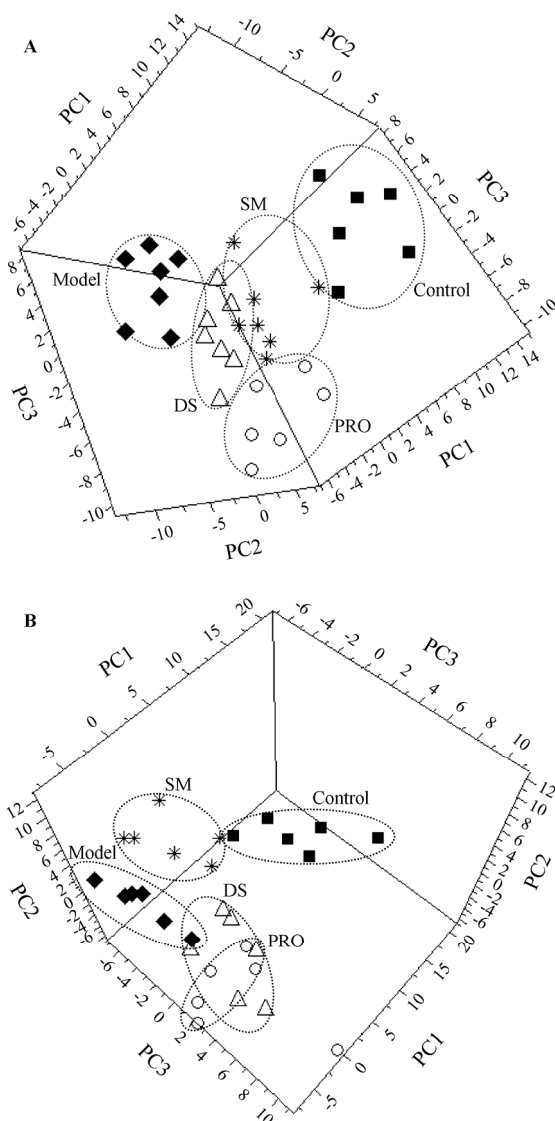


Figure 2 PLS-DA scores plots (PC1/PC2/PC3) of the control, model, propranolol (PRO), Sheng-mai injection (SM) and Salvia injection (DS) groups at the first sampling point (A) and second sampling point (B) ■: Control group; ◆: Model group; ○: PRO group; *: SM group; △: DS group

3 生物标记物群的鉴定及分析

通过 PLS-DA 载荷图和 One-way ANOVA 寻找出预防给普萘洛尔、生脉注射液和丹参注射液后对大鼠异常代谢的调节作用。如表 1 所示, 采样点 1 模型大鼠血浆中 49 个内源性代谢物水平发生显著异常, 普

萘洛尔预防给药后仅将其中 1 个化合物调节到了正常水平, 有将其中 5 个化合物调节到正常水平的趋势。生脉注射液预防给药后将其中 4 个化合物调节到了正常水平, 有将其中 8 个化合物调节到正常水平的趋势。丹参注射液预防给药后也仅将其中 1 个化合物调节到了正常水平, 有将其中 5 个化合物调节到正常水平的趋势。

Table 1 The number of endogenous compounds significantly different between the control and model groups and regulated by PRO, SM and DS

Group	$P < 0.05$ vs control	$P < 0.05$ vs model, $P > 0.05$ vs control	$P > 0.05$ vs control and model	Total
Sampling point 1				
Model	49			
PRO		1 (2%)	5 (10%)	6 (12%)
SM		4 (8%)	8 (16%)	12 (24%)
DS		1 (2%)	5 (10%)	6 (12%)
Sampling point 2				
Model	65			
PRO		3 (5%)	16 (25%)	19 (29%)
SM		6 (9%)	14 (22%)	20 (31%)
DS		1 (2%)	11 (17%)	12 (18%)

采样点 2 模型大鼠血浆中 65 个内源性代谢物水平发生异常, 普萘洛尔预防给药后将其中 3 个化合物调节到了正常水平, 有将其中 16 个化合物调节到正常水平的趋势。生脉注射液预防给药后将其中 6 个化合物调节到了正常水平, 有将其中 14 个化合物调节到正常水平的趋势。丹参注射液预防给药后仅将其中 1 个化合物调节到了正常水平, 有将其中 11 个化合物调节到正常水平的趋势。

由此可见, 生脉注射液调节的异常化合物的个数最多、程度最大, 普萘洛尔要略好于丹参注射液, 可能的原因是普萘洛尔不仅可防止异丙肾上腺素诱导的心肌损伤, 另一方面也有增加觉醒状态和减少快速动眼睡眠的作用^[10-12]。遗憾的是, 几种药物有调节作用的化合物中只有少量鉴定出了结构, 且主要是生脉注射液起到调节作用的化合物。

如表 2 (未鉴定出结构的化合物中只列出其中峰面积大于 6×10^4 的化合物) 所示, 生脉注射液可将气阴两虚证心肌缺血模型大鼠血浆中高水平的胆固醇调节到正常水平, 说明它对脂代谢的紊乱有一定改善作用。它可将气阴两虚证心肌缺血模型大鼠血浆高水平的 2-羟基丁酸调节到正常水平, 即能改善大鼠能量缺乏的状况^[13]。它还可将气阴两虚证心肌缺血

模型大鼠血浆中低水平的胱氨酸、甘氨酸、羟脯氨酸调节到正常水平。之前的研究已经分析, 胱氨酸和甘氨酸是自由基清除剂谷胱甘肽合成的原料^[14], 生脉注射液发挥疗效的作用与人参和五味子抗氧化和抗衰老的药理效应^[15-17]一致。生脉注射液将血浆中高水平的 1-磷酸肌醇调节到正常水平提示它可能参与第二信使系统的调节^[18], 即影响精神状态和主观感受。此外, 模型组与正常对照两组进行统计检验时, 模型大鼠血浆谷氨酰胺和苏氨酸显著降低 ($P < 0.05$),

门冬氨酸显著升高 ($P < 0.05$), 但 5 个实验组比较时差异无统计学意义, 这可能是由于多重比较的统计方法造成的, 但仍能看出生脉注射液对于这种有微弱异常的化合物也有改善的趋势。

4 3 种药物对 ET-1 的调节作用

ET-1 是内皮细胞产生的^[19], 它也产生于许多其他类型的细胞, 如中枢神经系统的神经元和星形胶质细胞、肝细胞等^[20]。它的产生受化学或物理刺激如缺氧的影响^[21]。它是强力的促有丝分裂剂、内源

Table 2 Changes of endogenous metabolites in the “Qi and Yin deficiency pattern” of myocardial ischemia rat model and PRO/SM/DS intervention. $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 7$. Data are presented as the mean of relative peak areas of metabolites. * $P < 0.05$ vs control; $^{\Delta}P < 0.05$ vs model and $^{\Delta}P > 0.05$ vs control; $^{\S}P > 0.05$ vs control and model (One-way ANOVA, SNK for the multiple comparison)

Metabolite	Sampling point	Control	Model	PRO	SM	DS
Cholesterol	1	$2.33 \times 10^7 \pm 2.48 \times 10^6$	$3.76 \times 10^7 \pm 1.96 \times 10^6^*$	$3.78 \times 10^7 \pm 3.77 \times 10^6$	$3.00 \times 10^7 \pm 2.73 \times 10^6^{\S}$	$3.60 \times 10^7 \pm 1.67 \times 10^6$
	2	$2.24 \times 10^7 \pm 1.98 \times 10^6$	$3.55 \times 10^7 \pm 2.31 \times 10^6^*$	$7.20 \times 10^6 \pm 2.72 \times 10^6$	$2.73 \times 10^7 \pm 2.95 \times 10^6^{\S}$	$3.04 \times 10^7 \pm 2.13 \times 10^6^{\S}$
2-Hydroxybutyrate	1	$7.86 \times 10^5 \pm 1.04 \times 10^5$	$2.52 \times 10^6 \pm 4.21 \times 10^5^*$	$3.50 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^6$	$1.24 \times 10^6 \pm 4.71 \times 10^5$	$1.22 \times 10^6 \pm 4.41 \times 10^5$
	2	$8.04 \times 10^5 \pm 1.26 \times 10^5$	$1.90 \times 10^6 \pm 2.97 \times 10^5^*$	$8.03 \times 10^5 \pm 3.03 \times 10^5$	$9.26 \times 10^5 \pm 2.22 \times 10^5^{\Delta}$	$1.23 \times 10^6 \pm 2.29 \times 10^5^{\S}$
Cystine	1	$1.13 \times 10^6 \pm 1.16 \times 10^5$	$5.64 \times 10^5 \pm 3.53 \times 10^4^*$	$8.67 \times 10^5 \pm 9.77 \times 10^4$	$7.58 \times 10^5 \pm 7.38 \times 10^4$	$6.51 \times 10^5 \pm 3.16 \times 10^4$
	2	$1.24 \times 10^6 \pm 1.35 \times 10^5$	$8.23 \times 10^5 \pm 4.37 \times 10^4^*$	$2.05 \times 10^5 \pm 7.73 \times 10^4$	$1.11 \times 10^6 \pm 8.95 \times 10^4^{\Delta}$	$7.51 \times 10^5 \pm 1.03 \times 10^5$
Glycine	1	$1.67 \times 10^7 \pm 1.04 \times 10^6$	$1.03 \times 10^7 \pm 5.17 \times 10^5^*$	$1.11 \times 10^7 \pm 5.95 \times 10^5$	$1.23 \times 10^7 \pm 7.33 \times 10^5$	$1.14 \times 10^7 \pm 6.21 \times 10^5$
	2	$1.59 \times 10^7 \pm 4.10 \times 10^5$	$1.16 \times 10^7 \pm 5.38 \times 10^5^*$	$2.66 \times 10^6 \pm 1.01 \times 10^6$	$1.49 \times 10^7 \pm 8.13 \times 10^5^{\Delta}$	$1.20 \times 10^7 \pm 7.08 \times 10^5$
Hydroxyproline	1	$8.48 \times 10^6 \pm 4.58 \times 10^5$	$2.19 \times 10^6 \pm 1.79 \times 10^5^*$	$2.76 \times 10^6 \pm 3.83 \times 10^5$	$3.17 \times 10^6 \pm 2.83 \times 10^5$	$2.82 \times 10^6 \pm 1.15 \times 10^5$
	2	$7.56 \times 10^6 \pm 2.35 \times 10^5$	$3.12 \times 10^6 \pm 2.31 \times 10^5^*$	$9.53 \times 10^5 \pm 3.60 \times 10^5$	$4.59 \times 10^6 \pm 3.25 \times 10^5^{\Delta}$	$3.16 \times 10^6 \pm 3.54 \times 10^5$
Inositol-1-phosphate	1	$5.53 \times 10^6 \pm 5.73 \times 10^5$	$7.70 \times 10^6 \pm 3.35 \times 10^5^*$	$8.51 \times 10^6 \pm 7.98 \times 10^5$	$7.09 \times 10^6 \pm 2.05 \times 10^5$	$7.94 \times 10^6 \pm 3.26 \times 10^5$
	2	$5.30 \times 10^6 \pm 3.27 \times 10^5$	$7.51 \times 10^6 \pm 2.58 \times 10^5^*$	$1.30 \times 10^6 \pm 4.91 \times 10^5$	$6.20 \times 10^6 \pm 2.51 \times 10^5^{\Delta}$	$7.44 \times 10^6 \pm 2.95 \times 10^5$
α -Aminobutyrate	1	$9.53 \times 10^5 \pm 1.04 \times 10^5$	$1.14 \times 10^6 \pm 1.33 \times 10^5$	$1.71 \times 10^6 \pm 1.94 \times 10^5$	$1.17 \times 10^6 \pm 1.51 \times 10^5$	$1.04 \times 10^6 \pm 1.17 \times 10^5$
	2	$7.91 \times 10^5 \pm 1.27 \times 10^5$	$1.60 \times 10^6 \pm 2.46 \times 10^5^*$	$3.75 \times 10^5 \pm 1.42 \times 10^5$	$1.25 \times 10^6 \pm 1.36 \times 10^5^{\S}$	$1.13 \times 10^6 \pm 2.01 \times 10^5^{\S}$
Glutamine	1	$2.59 \times 10^7 \pm 1.02 \times 10^6$	$1.94 \times 10^7 \pm 6.79 \times 10^5$	$2.17 \times 10^7 \pm 8.66 \times 10^5$	$2.09 \times 10^7 \pm 6.76 \times 10^5$	$2.04 \times 10^7 \pm 5.68 \times 10^5$
	2	$2.72 \times 10^7 \pm 1.39 \times 10^6$	$1.91 \times 10^7 \pm 3.41 \times 10^5$	$1.57 \times 10^6 \pm 5.95 \times 10^5$	$2.21 \times 10^7 \pm 6.26 \times 10^5$	$1.96 \times 10^7 \pm 8.93 \times 10^5$
Threonine	1	$3.74 \times 10^7 \pm 1.98 \times 10^6$	$1.82 \times 10^7 \pm 1.12 \times 10^6$	$2.07 \times 10^7 \pm 1.27 \times 10^6$	$2.35 \times 10^7 \pm 1.88 \times 10^6$	$2.16 \times 10^7 \pm 1.25 \times 10^6$
	2	$3.81 \times 10^7 \pm 2.16 \times 10^6$	$2.39 \times 10^7 \pm 1.38 \times 10^6$	$6.49 \times 10^6 \pm 2.45 \times 10^6$	$2.90 \times 10^7 \pm 1.22 \times 10^6$	$2.33 \times 10^7 \pm 1.57 \times 10^6$
Aspartate	1	$1.74 \times 10^6 \pm 1.54 \times 10^5$	$2.91 \times 10^6 \pm 3.76 \times 10^5$	$2.72 \times 10^6 \pm 2.31 \times 10^5$	$2.56 \times 10^6 \pm 2.10 \times 10^5$	$2.44 \times 10^6 \pm 2.27 \times 10^5$
	2	$1.60 \times 10^6 \pm 9.36 \times 10^4$	$3.11 \times 10^6 \pm 2.22 \times 10^5$	$2.78 \times 10^6 \pm 1.90 \times 10^5$	$2.27 \times 10^6 \pm 1.64 \times 10^5$	$2.49 \times 10^6 \pm 2.55 \times 10^5$
Unidentified compound 1	1	$1.64 \times 10^6 \pm 1.50 \times 10^5$	$3.10 \times 10^6 \pm 2.08 \times 10^5^*$	$3.04 \times 10^6 \pm 5.97 \times 10^5$	$1.86 \times 10^6 \pm 2.46 \times 10^5^{\Delta}$	$2.60 \times 10^6 \pm 1.79 \times 10^5^{\S}$
	2	$1.30 \times 10^6 \pm 1.51 \times 10^5$	$2.33 \times 10^6 \pm 1.02 \times 10^5^*$	$1.12 \times 10^6 \pm 4.22 \times 10^5$	$1.42 \times 10^6 \pm 1.48 \times 10^5^{\Delta}$	$1.70 \times 10^6 \pm 1.58 \times 10^5^{\S}$
Unidentified compound 2	1	$4.89 \times 10^5 \pm 3.14 \times 10^4$	$2.79 \times 10^5 \pm 1.72 \times 10^4^*$	$3.45 \times 10^5 \pm 3.42 \times 10^4$	$4.48 \times 10^5 \pm 4.66 \times 10^4^{\Delta}$	$3.29 \times 10^5 \pm 1.24 \times 10^4$
	2	$5.30 \times 10^5 \pm 3.64 \times 10^4$	$3.54 \times 10^5 \pm 3.39 \times 10^4^*$	$7.45 \times 10^4 \pm 2.82 \times 10^4$	$4.02 \times 10^5 \pm 2.19 \times 10^4$	$4.03 \times 10^5 \pm 2.99 \times 10^4$
Unidentified compound 3	1	$5.74 \times 10^5 \pm 5.17 \times 10^4$	$9.38 \times 10^5 \pm 8.64 \times 10^4^*$	$7.98 \times 10^5 \pm 8.29 \times 10^4$	$9.16 \times 10^5 \pm 8.37 \times 10^4$	$9.70 \times 10^5 \pm 5.43 \times 10^4$
	2	$5.28 \times 10^5 \pm 5.06 \times 10^4$	$1.28 \times 10^6 \pm 1.63 \times 10^5^*$	$1.59 \times 10^5 \pm 6.01 \times 10^4$	$6.77 \times 10^5 \pm 4.95 \times 10^4^{\Delta}$	$7.33 \times 10^5 \pm 4.09 \times 10^4^{\Delta}$
Unidentified compound 4	1	$4.92 \times 10^5 \pm 1.85 \times 10^4$	$6.62 \times 10^5 \pm 3.45 \times 10^4^*$	$5.55 \times 10^5 \pm 4.40 \times 10^4^{\S}$	$4.36 \times 10^5 \pm 1.81 \times 10^4^{\Delta}$	$5.94 \times 10^5 \pm 3.73 \times 10^4^{\S}$
	2	$4.08 \times 10^5 \pm 2.82 \times 10^4$	$4.45 \times 10^5 \pm 3.21 \times 10^4$	$8.68 \times 10^4 \pm 3.28 \times 10^4$	$3.49 \times 10^5 \pm 3.04 \times 10^4$	$3.64 \times 10^5 \pm 1.79 \times 10^4$
Unidentified compound 5	1	$2.71 \times 10^6 \pm 3.14 \times 10^5$	$3.75 \times 10^6 \pm 2.87 \times 10^5^*$	$3.22 \times 10^6 \pm 1.61 \times 10^5^{\S}$	$3.16 \times 10^6 \pm 2.49 \times 10^5^{\S}$	$3.50 \times 10^6 \pm 1.84 \times 10^5^{\S}$
	2	$2.87 \times 10^6 \pm 4.73 \times 10^5$	$3.44 \times 10^6 \pm 3.21 \times 10^5$	$3.49 \times 10^5 \pm 1.32 \times 10^5$	$2.51 \times 10^6 \pm 2.67 \times 10^5$	$3.11 \times 10^6 \pm 2.20 \times 10^5$
Unidentified compound 6	1	$1.05 \times 10^6 \pm 9.78 \times 10^4$	$4.73 \times 10^5 \pm 5.16 \times 10^4^*$	$5.57 \times 10^5 \pm 5.57 \times 10^4$	$9.51 \times 10^5 \pm 1.24 \times 10^5^{\Delta}$	$6.47 \times 10^5 \pm 9.53 \times 10^4$
	2	$1.12 \times 10^6 \pm 1.12 \times 10^5$	$1.06 \times 10^6 \pm 1.43 \times 10^5$	$2.26 \times 10^5 \pm 8.55 \times 10^4$	$8.92 \times 10^5 \pm 1.13 \times 10^5$	$8.09 \times 10^5 \pm 5.68 \times 10^4$
Unidentified compound 7	1	$1.88 \times 10^6 \pm 1.92 \times 10^5$	$1.38 \times 10^6 \pm 1.44 \times 10^5^*$	$1.01 \times 10^6 \pm 9.66 \times 10^4$	$1.57 \times 10^6 \pm 9.42 \times 10^4^{\Delta}$	$1.17 \times 10^6 \pm 1.28 \times 10^5$
	2	$1.33 \times 10^6 \pm 1.15 \times 10^5$	$7.51 \times 10^5 \pm 9.62 \times 10^4$	$3.17 \times 10^5 \pm 1.20 \times 10^5$	$6.83 \times 10^5 \pm 4.50 \times 10^4$	$9.43 \times 10^5 \pm 8.11 \times 10^4$
Unidentified compound 8	1	$3.67 \times 10^6 \pm 4.14 \times 10^5$	$3.01 \times 10^6 \pm 1.37 \times 10^5$	$3.15 \times 10^6 \pm 3.31 \times 10^5$	$3.01 \times 10^6 \pm 1.86 \times 10^5$	$2.89 \times 10^6 \pm 3.50 \times 10^5$
	2	$3.72 \times 10^6 \pm 2.63 \times 10^5$	$2.40 \times 10^6 \pm 2.78 \times 10^5^*$	$8.02 \times 10^5 \pm 3.03 \times 10^5$	$3.28 \times 10^6 \pm 2.39 \times 10^5^{\S}$	$3.42 \times 10^6 \pm 2.65 \times 10^5^{\S}$

性血管收缩剂, 而且与心衰、肾脏疾病和高血压密切相关。文献^[22]报道还指出异相睡眠剥夺会升高血浆 ET-1, ET-1 可能是造成睡眠剥夺情况下高血压、心血管疾病等发生的原因, 因此 ET-1 可作为睡眠剥夺引发的气阴两虚证的生物标记物。代谢组学的结果表明生脉注射液对气阴两虚证心肌缺血的疗效最佳, 因此选择与心血管疾病和睡眠剥夺密切相关的 ET-1 作为药效评价指标来确证结果。如图 3 所示, 造模结束时模型大鼠血浆 ET-1 显著高于正常对照组, 仅有生脉组显著低于模型组 ($P < 0.05$), 提示生脉注射液对于睡眠剥夺所致气阴两虚证的保护作用优于普萘洛尔和丹参注射液, 这与代谢组学的研究结果一致。

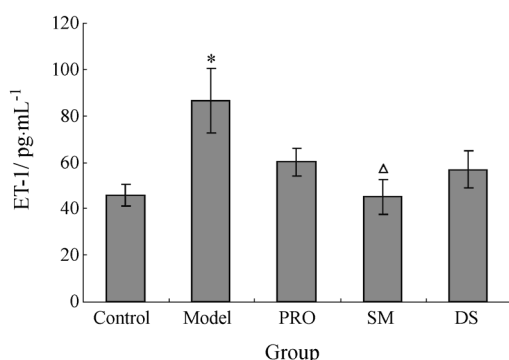


Figure 3 Alteration of plasma ET-1 at the second sampling point. Each dark bar represented the $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs control; Δ $P < 0.05$ vs model (One-way ANOVA)

以上心肌病理切片表明预防给予大鼠普萘洛尔、生脉或丹参注射液后均可明显改善气阴两虚证心肌缺血模型大鼠心肌损伤, 且普萘洛尔的作用更明显。PLS-DA 分析显示生脉注射液最接近于正常对照而远离模型组。从调节异常的内源性小分子代谢物的个数分析, 生脉注射液调节异常水平化合物的数量最多、程度最大, 提示其预防效果最佳, 推测它主要是通过调节异常的能量代谢、脂代谢、氨基酸代谢等途径发挥作用, 但是许多化合物的结构未知, 下一步还需对此进行鉴定并分析相关代谢通路及其在疾病发生发展中的作用, 探讨药物作用机制。与睡眠剥夺和心血管疾病密切相关的血浆 ET-1 结果也提示生脉注射液能将气阴两虚证心肌缺血模型大鼠升高的 ET-1 调节到正常水平, 而普萘洛尔和丹参注射液只有改善作用。由于本研究是将代谢组学应用于中医“方证对应”的初步探索和尝试, 需要进一步完善实验设计和操作, 如设立正常动物给予丹参或生脉组、不同剂量组等。

结论

气阴两虚证心肌缺血模型大鼠体内代谢状态显著异常, 预防应用生脉注射液能够改善这种异常的代谢状况, 效果优于普萘洛尔和丹参注射液, 它所调节的代谢通路涉及能量代谢、脂代谢、氨基酸代谢等。代谢组学方法证明生脉注射液适于预防气阴两虚证心肌缺血, 提示中医“方证对应”理论的科学性, 进一步说明在中医临床中对中成药的使用遵循辩证施治与方证对应的必要性。本项研究中发现病理切片结果与代谢组学结果的不一致性, 一方面提示中药的疗效评价需采用多指标体系结合的方法, 另一方面也提示“金标准”病理学分析并不能反映整体功能状态的改变, 单纯依赖常规药效、病理学检查结果评价中药与化学药的药效差异显得不够全面; 而代谢组学研究所提供的信息能反映中药对生物体异常代谢的调节作用, 从而探索中药作用机制, 并突出其通过调节生物体代谢功能状态而发挥治疗作用的特点。

References

- [1] Yuan P, Zhang JP. Discussion on ‘combination between disease and syndrome’, ‘correspondence between recipe and syndrome’ through the connotation of ‘disease’ [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2008, 49: 654–655.
- [2] Dou ZF, Guo L, Zhang JL, et al. Thinking about studies on ‘correspondence between recipe and syndrome’ [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2006, 47: 563–570.
- [3] Lu Y. Thoughts and methods of research on ‘correspondence between recipe and syndrome’ by system biology [J]. Pharm Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2007, 23: 231–233.
- [4] Yan B, A JY, Hao HP, et al. Metabonomic phenotype and identification of “heart blood stasis obstruction pattern” and “qi and yin deficiency pattern” myocardial ischemia rat model [J]. Sci China Ser C, 2009, 52: 1081–1090.
- [5] Cai SH, Liu XN, Chen H. Application of Chinese herbal injection in cardiology department based on ‘identifying pattern’ [J]. J Fujian Coll Tradit Chin Med (福建中医学院学报), 2007, 17: 19–22.
- [6] Pinelli A, Trivulzio S, Tomasoni L, et al. Isoproterenol-induced myocardial infarction in rabbits. Protection by propranolol or labetalol: a proposed non-invasive procedure [J]. Eur J Pharm Sci, 2004, 23: 277–285.
- [7] Blidaru M, Cuparencu B, Pleșca-Manea L. The influence of intracerebroventricular administration of (+/-) propranolol and (+/-) verapamil on experimental myocardial ischemia and

- necrosis in rats [J]. Acta Physiol Hung, 2000, 87: 99–111.
- [8] Golomb E, Abassi ZA, Cuda G, et al. Angiotensin II maintains, but does not mediate, isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. Am J Physiol, 1994, 267: H1496–H1506.
- [9] Prodanov K, Kolarova R, Tsakova L, et al. Dynamic biochemical, metrometric and histomorphological studies in isoproterenol-induced myocardial hypertrophy and its regression in rats [J]. Eksp Med Morfol, 1991, 30: 26–30.
- [10] Monti JM. Disturbances of sleep and wakefulness associated with the use of antihypertensive agents [J]. Life Sci, 1987, 41: 1979–1988.
- [11] Hilakivi LA, Taira T, Hilakivi I, et al. Early postnatal treatment with propranolol affects development of brain amines and behavior [J]. Psychopharmacology (Berl), 1988, 96: 353–359.
- [12] Ongini E, Milani S, Marzanatti M, et al. Effects of selected beta-adrenergic blocking agents on sleep stages in spontaneously hypertensive rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 257: 114–119.
- [13] Silva AR, Ruschel C, Helegda C, et al. Inhibition of *in vitro* CO₂ production and lipid synthesis by 2-hydroxybutyric acid in rat brain [J]. Braz J Med Biol Res, 2001, 34: 627–631.
- [14] Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation [J]. Chem Biol Interact, 1998, 111–112: 1–14.
- [15] Li Yang, Zhang TJ, Liu SX, et al. Advanced research on the constituents and pharmacological activities of ginseng [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 40: 64–66.
- [16] Zhao CH, Chen XC, Jin JS, et al. Effect of ginsenoside Rg1 on expression of p21, cyclin E and CDK2 in the process of cell senescence [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 673–676.
- [17] Su MW, Wang NP, Xin HW, et al. The progress in the study of pharmacological actions in *Schisandra chinensis* [J]. China Pharm (中国药师), 2009, 12: 960–962.
- [18] Kim H, McGrath BM, Silverstone PH. A review of the possible relevance of inositol and the phosphatidylinositol second messenger system (PI-cycle) to psychiatric disorders-focus on magnetic resonance spectroscopy (MRS) studies [J]. Hum Psychopharmacol, 2005, 20: 309–326.
- [19] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells [J]. Nature, 1988, 332: 411–415.
- [20] Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology [J]. Pharmacol Rev, 1994, 46: 325–415.
- [21] Simonson MS. Endothelins: multifunctional renal peptides [J]. Physiol Rev, 1993, 73: 375–411.
- [22] Palma BD, Gabriel A Jr, Bignotto M, et al. Paradoxical sleep deprivation increases plasma endothelin levels [J]. Braz J Med Biol Res, 2002, 35: 75–79.