

本文引用:农雅萍,朱露露,陈思雨,孙梅梅,兰蕾.隔姜灸对肝郁脾虚型功能性胃肠病大鼠血清代谢组学的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(10):1695-1704.

隔姜灸对肝郁脾虚型功能性胃肠病大鼠血清代谢组学的影响

农雅萍¹,朱露露¹,陈思雨¹,孙梅梅¹,兰蕾^{2*}

(1.广西中医药大学,广西 南宁 530001;2.广西中医药大学附属国际壮医医院,广西 南宁 530201)

[摘要] **目的** 基于UPLC-Q-TOF/MS代谢组学方法探讨隔姜灸对肝郁脾虚型功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGIDs)大鼠血清代谢组学的影响。**方法** 将50只雄性SPF级SD大鼠随机均分为正常组、模型组、隔姜灸组、百忧解组和莫沙必利组。正常组正常饲养,其余4组采用复合病因法造模,连续21 d。隔姜灸组捆绑束缚并隔姜灸神阙穴30 min,灌服0.9%氯化钠溶液;其余3组每日捆绑束缚30 min后,模型组灌服0.9%氯化钠溶液,百忧解组灌服浓度为1 mg/mL百忧解溶液,莫沙必利组灌服浓度为1 mg/mL莫沙必利溶液,均连续干预14 d。观察各组大鼠一般情况变化;在造模前后及干预完成后分别进行旷场实验;实验结束后行系统解剖,测定胃残留率和小肠推进率,并对各组大鼠进行血清代谢组学分析。**结果** (1)造模后,与正常组及模型前大鼠相比,其余各组大鼠爬格子数、站立数、修饰数减少($P<0.01$);干预后与造模后比较,隔姜灸组爬格子数、站立数、修饰数均增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);其余各组大鼠无明显变化($P>0.05$)。(2)与正常组大鼠比较,模型组和百忧解组大鼠小肠推进率均降低、胃残留率均升高($P<0.01$);与模型组大鼠比较,隔姜灸组和莫沙必利组小肠推进率均升高($P<0.05$)、胃残留率均显著降低($P<0.01$)。(3)代谢组学分析共筛选出潜在生物标志物8种,分别为肌酸、苯基丙氨酸、色氨酸和溶血卵磷脂的5个分型LysoPC(18:1)、LysoPC(18:2)、LysoPC(18:3)、LysoPC(16:1)、LysoPC(16:0)。归属注释和富集分析得到与疾病相关的关键代谢通路:亚油酸代谢通路,苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成通路,苯丙氨酸代谢通路,甘油磷脂代谢通路,精氨酸和脯氨酸代谢通路。**结论** 隔姜灸能促胃肠动力抗抑郁,改善FGIDs大鼠肝郁脾虚症状;隔姜灸可能通过调节肌酸、苯基丙氨酸、色氨酸、溶血卵磷脂等物质,调节亚油酸代谢和苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成等。

[关键词] 隔姜灸;功能性胃肠病;肝郁脾虚;代谢组学;超高效液相色谱-四级杆串联质谱;潜在生物标志物;关键代谢通路

[中图分类号]R245.8 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.10.017

Effects of ginger-separated moxibustion on serum metabolomics in rats with functional gastrointestinal disease caused by liver qi stagnation and spleen deficiency

NONG Yaping¹, ZHU Lulu¹, CHEN Siyu¹, SUN Meimei¹, LAN Lei^{2*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. International Zhuang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530201, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of ginger-separated moxibustion on serum metabolomics in rats with functional gastrointestinal disorders (FGIDs) caused by liver qi stagnation and spleen deficiency based on UPLC-Q-TOF/MS metabolomics. **Methods** Fifty male SPF SD rats were randomly divided into the normal group, model group, ginger-separated moxibustion group, fluoxetine group and mosapride group. The normal group was fed normally, and the other 4 groups were

[收稿日期]2021-12-01

[基金项目]广西自然科学基金面上项目(2018GXNSFAA050148);广西中医药适宜技术开发与推广项目(GZSY21-42);2017年广西中医药大学引进博士科研启动基金项目(2017BS05);广西中医药重点学科壮医经筋推拿学(GZXK-Z-20-61);广西中医药重点学科壮医外治学(GZXK-Z-20-62)。

[第一作者]农雅萍,女,硕士研究生,研究方向:针灸推拿的理论与应用研究。

[通信作者]* 兰蕾,女,博士,硕士研究生导师,E-mail:429462077@qq.com。

modeled by composite etiology method for 21 d. Ginger-separated moxibustion group was bound and treated with ginger-separated moxibustion on "Shenque" (RN8) for 30 min, and 0.9% sodium chloride solution was given by intragastric administration. After 30 min of daily binding and restraint in the other three groups, the model group received 0.9% sodium chloride solution by intragastric administration, and the prozac group was given 1 mg/mL prozac solution by intragastric administration. The mosapride group was given 1 mg/mL mosapride solution for 14 d. The general changes of rats in each group were observed. The open field experiments were performed before and after modeling and after intervention. After the experiment, we performed systematic anatomy to determine the gastric residual rate and intestinal propulsion rate, and performed the serum metabolomics analysis for each group of rats. **Results** (1) After modeling, compared with those of the normal group and the pre-model group, the number of climbing lattice, standing and modification in other groups decreased ($P<0.01$); compared with the model group, the ginger-separated moxibustion group showed increase of the climbing lattice, standing and modification after intervention ($P<0.05$ or $P<0.01$). There were no significant changes in the other groups ($P>0.05$). (2) Compared with the normal group, the model group and the prozac group showed increase in the small intestinal propulsion rate and the gastric residual rate ($P<0.01$). Compared with the model group, the ginger-separated moxibustion group and the mosapride group both showed increase in small intestinal propulsion rates ($P<0.05$), and the gastric residual rates decreased significantly ($P<0.01$). (3) A total of 8 potential biomarkers were screened by Metabolomics analyses, which were creatine, phenylalanine, tryptophan, and 5 types of lysophosphatidylcholine including LysoPC (18:1), LysoPC (18:2), LysoPC (18:3), LysoPC (16:1), LysoPC (16:0). The key metabolic pathways related to diseases obtained by the attribution annotation and enrichment analysis were linoleic acid metabolic pathway, biosynthesis pathway of phenylalanine, tyrosine and tryptophan, phenylalanine metabolic pathway, glycerol phospholipid metabolic pathway, and metabolic pathway of arginine and proline. **Conclusion** Ginger-separated moxibustion may promote gastrointestinal motility, take the anti-depression effect, and improve symptoms caused by liver qi stagnation and spleen deficiency in FGIDs rats; it may adjust the biosynthesis of linoleic acid metabolism and phenylalanine, tyrosine, tryptophan biosynthesis by regulating creatine, phenylalanine, tryptophan, lysophosphatidylcholine, etc.

[**Keywords**] ginger-separated moxibustion; functional gastrointestinal disorders; liver qi stagnation and spleen deficiency; metabolomics; ultra performance liquid chromatography-quadrupole tandem mass spectrometry; potential biomarkers; key metabolic pathways

功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGIDs)是一种常见的疾病,以消化道动力与内脏感觉异常为主要病理生理特征,并具有多种症状反复发作、较难治愈等特点。越来越多的证据表明,当今研究工作者对“生物-心理-社会”研究模式的重视体现 FGIDs 与抑郁症密不可分,全球 FGIDs 患病率为 40%,该疾病有时伴随着精神疾病,包括抑郁和焦虑^[1-4],以显著而持续的心境低落为主要临床特征,并且出现胃肠动力障碍、性功能障碍、失眠症状等^[5-6]。由于 FGIDs 和精神疾病具有共病特性,所以单方面诊疗经常导致两者治愈率不高,甚至无效^[7-8]。西医对抑郁症的治疗都是单靶点的,抗抑郁药物不具备促进胃肠动力作用,促胃肠动力药物对抗抑郁疗效无效,并且这种单方面治疗可能还会产生毒副作用。如选择性 5-羟色胺摄取抑制剂作为目前常用的抗抑郁药,在抗抑郁的同时,常常因抑制胃肠动力,导致被迫停药。一些促胃动力药如甲氧氯普胺可能有导致抑郁的毒副作用^[9]。因此,建立在整

体观念和辨证论治基础上的中医疗法,包括中药和针灸,在多靶点的治疗上逐步显现优势。前期本团队进行了大量针灸治疗肝郁脾虚型 FGIDs 的实验和临床研究,取得了肯定的疗效^[10-12]。

代谢组学是 20 世纪 90 年代末期发展起来的一门新兴学科,是研究关于生物体被扰动后(如基因改变或环境变化后)其代谢产物(内源性代谢物质)种类、数量及其变化规律的科学。代谢组学着重研究的是生物整体、器官或组织的内源性代谢物质的代谢途径,及其所受内在或者外在因素的影响,以及随时间变化的规律。代谢组学通过揭示内在和外在因素影响下代谢整体的变化轨迹,来反映某种病理生理过程中所发生的一系列生物事件,其研究机体的生理与病理的联系,与中医治病从整体观念出发不谋而合^[13-14]。本实验以 FGIDs 大鼠为研究对象,用隔姜灸和促胃肠动力药莫沙必利及抗抑郁药百忧解干预后,在代谢组学水平上比较不同组之间血清代谢物表达的差异性,找出潜在生物标志物,

探讨隔姜灸治疗肝郁脾虚型 FGIDs 可能涉及的信号通路和作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SD 雄性大鼠 50 只, SPF 级, 体质量 180~220 g。由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物合格证编号: SCXK(湘)2019-0004。动物饲养于广西中医药大学第一附属医院 SPF 级实验室, 饲养温度: 20~25 ℃, 相对湿度: 50%~70%。

1.2 主要仪器

电子天平(型号: FA2004N, 上海菁海仪器有限公司); 电子秤(型号: JCS-11001C, 哈尔滨众汇衡器有限公司); 离心机(型号: Micro 17R, 美国 Thermo Scientific 公司); 超高效液相色谱系统(型号: ACQUITY 型, 美国 Waters 公司); 串联四级杆飞行时间质谱仪(型号: Xevo G2, 美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 mm)。

1.3 主要试剂及药物

乙腈(质谱纯, 批号: C12395750)、甲酸(色谱纯, 批号: C12423877)、甲醇(质谱纯, 批号: C12435159)均来自上海麦克林生化科技有限公司; 甲酸铵(色谱纯, 天津市光复精细化工研究所, 批号: 20171220)。莫沙必利(上海陶素生化科技有限公司, 批号: 112885-41-3); 百忧解(上海陶素生化科技有限公司, 批号: 56296-78-7); 艾绒(南阳市德济堂商贸有限公司, 批号: 201901); 十五眼艾塔模具四件套(古法石磨艾淘宝店, 批号 201812, 规格: 十五眼)。

1.4 动物模型制备及评定

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 按随机数字表法分为 5 组, 每组 10 只, 分别为正常组、模型组、隔姜灸组、百忧解组、莫沙比利组。采用复合病因造模法^[5], 即慢性束缚应激+过度疲劳+饮食失节, 在此基础上配合夹尾 30 min、摇晃 5 min。具体方法为: 实验前全部大鼠进行预游泳, 剔除游泳时间少于 10 min 以及大于 20 min 的大鼠。符合条件造模大鼠每日置于自制束缚瓶中束缚限制 3 h, 配合夹尾 30 min 及摇晃 5 min。再置于盛有温水(22±1) ℃的塑料缸中游泳至力竭, 隔日足量给食, 隔日禁食不禁水, 连续造模 21 d。模型成功评定标准: 造模大鼠精神状态较

差, 目色暗红, 毛发枯黄散乱无光泽, 胡须下垂, 眼角留有分泌物, 耳郭色淡, 大便时结时溏, 旷场实验情况为大鼠的爬格子数、站立数、修饰数减少。

1.5 干预方法

造模成功后, 各组大鼠分别给予不同的干预, 时间均为 14 d。(1)正常组: 正常饲养。(2)模型组: 捆绑束缚 30 min, 灌服 0.9%氯化钠溶液(各组灌胃容积均为 1 mL/100 g 体质量)。(3)隔姜灸组: 捆绑束缚 30 min 后取神阙穴进行隔姜灸。参照王海军等^[6]选取神阙穴, 具体定位为: 在大鼠腹部正中线上, 剑突与耻骨联合上缘连线的上 2/3 与下 1/3 的交点处。对大鼠腹部进行剃毛后, 将一片中间刺有数孔的直径 10 mm、厚 2 mm 的生姜置于神阙穴上, 姜片上放自制直径 5 mm、高 5 mm 的艾柱, 点燃施灸, 待艾柱燃完且余热散尽后, 再更换另一壮, 每穴连续灸 5 壮, 灸后灌服 0.9%氯化钠溶液。(4)百忧解组: 捆绑束缚 30 min, 按 10 mg/kg 剂量灌服百忧解溶液。(5)莫沙必利组: 捆绑束缚 30 min, 按 10 mg/kg 剂量灌服莫沙必利溶液。

1.6 观察指标

1.6.1 一般状态观察 观察大鼠的精神状态、束缚反应程度、活动度、毛发颜色光泽度、皮肤黏膜、耳郭色泽、眼角分泌物、大便性状等情况。

1.6.2 大鼠行为学的测定 实验用自制纸质旷场箱(100 cm×100 cm×40 cm), 其内侧壁和底面为黑色, 用白色双面胶贴将其底面划分为 9 块面积相等的正方形。旷场箱四周由不透光的帘子隔离开人及其他物品, 环境安静无干扰, 使大鼠适应暗光环境后置其于旷场箱中央, 并同步计时和录像, 观察 5 min 内大鼠的活动情况, 包括爬格子数、站立数和修饰数, 在放入下一只大鼠前清洁箱底以避免干扰观察结果, 旷场实验用于造模前至干预后结束。

1.6.3 胃残留率、小肠推进率的测定 参照陈苏宁等^[7]的方法, 干预完成后, 各组大鼠禁食 24 h, 按 1 mL/100 g 灌胃容积给予每只大鼠灌服营养性半固体糊, 麻醉 30 min 后, 打开腹腔, 分离出胃。沿胃幽门处剪取胃, 擦拭干, 称胃全重(M1), 再沿胃大弯处剪开胃, 用生理盐水洗净胃内容物, 用滤纸擦拭干, 称胃净重(M2), 计算胃残留率[胃残留率=(M1-M2)/灌胃量×100%]。同时迅速分离出小肠, 用镊子轻轻提

取上端至幽门、下端至回盲部的肠管,平铺于试验台上,轻轻拉成直线,用直尺量小肠全长(L1)以及幽门至黑色营养性半固体糊所达最前端的长度(L2),计算出小肠推进率(小肠推进率=L2/L1×100%)。

1.7 血液样品收集及处理

禁食不禁水 24 h 后,给予每只大鼠 1 mL/100 g 灌胃容积灌服 1 次营养性半固体糊,30 min 麻醉,快速用负压采血针从腹主动脉取血 5 mL,4 ℃低温以 3000 r/min、半径 8.57 cm 离心 15 min,吸取上清液,于-80 ℃冰箱保存备用。采血后分离胃肠,行胃残留率测试和小肠推进率测试。

1.8 UPLC-Q-TOF/MS 检测

从 5 个组中各取 8 个样本血清,取血清样本 200 μL 置于 1.5 mL EP 管中,加 4 倍体积的预冷甲醇,充分混匀后,于 4 ℃低温以 12 000 r/min、半径 8.57 cm 离心 10 min,以沉淀样本中蛋白质等不溶性成分,并转移上清液至干净 1.5 mL EP 管中,采用氮吹干燥法挥去全部液体,得样本干燥粉末;向样本粉末中加入 200 μL 初始流动相,充分溶解并混匀后,于 4 ℃低温以 12 000 r/min、半径 8.57 cm 离心 10 min,以除去不溶性成分,转移上清液至进样瓶中待液质联用检测。

色谱条件:样本的色谱分析在超高效液相色谱分析系统中进行,所用色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ column (100 mm×2.1 mm,1.8 μm),柱温:30 ℃,流动相分别为含有 0.1%甲酸和 5 mmol/L 甲酸铵的水相(A)和乙腈有机相(B),洗脱条件为:0~0.5 min,98% A;0.5~2.0 min,98%~60% A;2.0~7.0 min,60%~2% A;7.0~9.0 min:2%~60% A;9.0~10.0 min,60%~98% A。

质谱条件:电喷雾离子源 ESI 以正模式(ESI⁺)和负离子(ESI⁻)运行,质谱检测参数设置为:碰撞电压 3.0 kV(负离子:2.5 kV);样本孔及提取锥孔电压 30 V(负离子:40 V)和 4.0 V;脱溶剂气速度及温度 600 L/h and 350 ℃(负离子:150 ℃);锥孔气流速度 1 L/h;离子源温度 80 ℃(负离子:100 ℃);扫描时间 0.15 s;扫描间隔延迟 0.02 s;选用亮氨酸-脑啡肽作为实时校正物质,其浓度与流速分别为 0.5 mg/mL 及 10 μL/min。一级质谱数据质荷比采集范围为 50~1200 m/z,二级质谱数据质荷比采集范围为 10~1200 m/z。

1.9 数据处理及潜在生物标志物筛选

应用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,符合正态分布者,多组计量资料采用单因素方差分析,方差齐者用 LSD 法,方差不齐者用 Tamhane's T₂ 法;不符合正态分布者使用秩和检验。均以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。代谢组学运用 MarkerLynx Applications Manager 4.1 对原始数据进行处理(包括峰对齐和峰校准等)、提取和导出,导出后经 SIMCA-P 11.5 将其转化成 txt 格式,得到变量以 Rt_m/z 表示的峰强度数据矩阵,将其转存成 xls 格式后,对其进行 80%过滤。过滤后将数据导入 SIMCA-P 14.1 进行多元统计学分析,包括主成分分析(principal component analysis, PCA),偏最小二乘判别分析(partial least-squares discrimination analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(O-PLS-DA)。建立用于潜在生物标志物筛选的 OPLS-DA 数学模型,进一步经过 200 次置换验证确认模型不存在过拟合后,以变量投影重要性(VIP)>3 及 $P<0.05$ 为标准,进行潜在生物标志物筛选,潜在生物标志物的确认以实际检测精确质量数与在线数据库 Human Metabolome Database (HMDB <https://hmdb.ca/>)质谱数据比对的方式进行。得到的潜在生物标志物,采用 MetaboAnalyst 5.0 软件进行通路分析。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

造模前,各组大鼠精神状态均良好,反应敏捷,目色鲜红,皮肤黏膜红润,皮毛柔顺有光泽,眼角无分泌物,耳郭呈淡粉色,粪便干湿适中。初次束缚时,各组造模大鼠警惕性高,攻击性强,拼命挣扎撕咬束缚瓶、嘶叫、双目怒睁、毛须竖立、粪球排泄明显增多,3 h 后解除束缚,大鼠到处乱窜。造模结束后,正常组大鼠未见异常;而各组造模大鼠精神状态较差,目色暗红,活动减少,扎堆蜷缩在角落,毛发枯黄散乱无光泽,胡须下垂,眼角留有分泌物,耳郭色淡,吱吱细叫,大便时结时溏。干预结束后,正常组大鼠的一般状态与初期基本一致;模型组大鼠未见明显好转;莫沙必利组、百忧解组大鼠精神状态均出现好转,莫沙必利组大鼠粪便质地较为改善,百忧解组大鼠活动度改善;隔姜灸组大鼠较其余组精神状态较好,活动增加,毛发较整洁、有光泽,眼角未见分泌物,耳郭淡红色,大便多呈粪球状。

2.2 旷场实验结果

造模前,各组大鼠爬格子数、站立数和修饰数比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。造模后,与正常组大鼠相比,其余各组大鼠的爬格子数、站立数、修饰数减少($P<0.01$);与造模前比较,除正常组外其余各组大鼠爬格子数、站立数和修饰数减少,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。干预后与造模后相比较,隔姜灸组爬格子数、站立数、修饰数均增加,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);百忧解组、莫沙必利组爬格子数、站立数、修饰数均增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表1。

表1 各组大鼠旷物实验结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

检测指标	组别	造模前	造模后	干预后
爬格子数/个	正常组	53.9±18.6	57.3±15.3	55.2±22.5
	模型组	50.3±13.6	19.6±9.6***	23.1±9.2**
	隔姜灸组	55.1±15.9	21.1±10.6***	45.1±20.6**▲▲
	百忧解组	51.0±15.9	18.9±10.2***	29.4±8.3**
	莫沙必利组	52.1±14.7	21.3±11.0***	24.0±8.3**
站立数/次	正常组	7.8±4.1	8.5±3.2	8.6±3.5
	模型组	6.5±1.9	2.8±1.9***	3.1±3.6
	隔姜灸组	7.9±2.4	2.7±1.8***	5.9±4.3▲
	百忧解组	8.2±1.8	3.1±2.6***	4.3±2.4
	莫沙必利组	6.3±4.0	2.6±1.6***	3.2±2.0
修饰数/次	正常组	3.0±1.3	2.9±1.6	2.9±1.20
	模型组	2.6±1.1	1.4±1.2***	2.1±1.0
	隔姜灸组	2.4±1.2	1.3±1.2***	2.5±1.4▲
	百忧解组	2.4±1.5	1.2±1.0***	2.0±0.8
	莫沙必利组	2.3±1.2	1.2±1.0***	2.1±1.5

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与造模前比较,* $P<0.05$,# $P<0.01$;与造模后比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

2.3 胃残留率、小肠推进率情况

与正常组比较,模型组和百忧解组大鼠小肠推进率降低、胃残留率升高($P<0.01$);与模型组比较,隔姜灸组和莫沙必利组大鼠小肠推进率均升高($P<0.05$)、胃残留率均显著降低($P<0.01$)。详见表2。

表2 各组大鼠小肠推进率和胃残留率结果($\bar{x}\pm s, n=10, \%$)

组别	小肠推进率	胃残留率
正常组	59.03±5.39	22.09±7.50
模型组	51.65±6.63**	54.74±12.30**
隔姜灸组	56.33±3.61#	32.37±10.67#
百忧解组	52.77±4.0**	51.31±16.02**
莫沙必利组	57.09±4.06#	31.70±9.23#

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,# $P<0.01$ 。

2.4 总离子基峰色谱图(base peak chromatogram, BPI)

血清样本经液质联用检测后,其中所含成分可

被液相色谱系统分离和洗脱,形成色谱图。BPI是每个样本经检测后,以时间-相对强度为横纵坐标所描绘得到的样本中成分洗脱情况的典型代表图。从正离子和负离子检测模式下各组BPI图观察到,各组样品整体色谱峰一致与离子强度稳定,表明液相色谱与质谱分析检测状态稳定(见图1-2)。另外,正常组、模型组及不同药物处理组的所含成分及相对含量情况均有所不同,提示接受隔姜灸或药物处理后,大鼠血清所含成分及含量发生了一定改变。

2.5 多元统计数据分析

将归一化后的数据导入多元统计分析软件SIMCA-P 14.1,利用PCA和PLS-DA对数据进行降维,从总体上观察各组样本之间的总体代谢轮廓差异和组内样本之间的变异度,对数据进行缺失值处理、标准化、主成分添加等操作,表明各组间代谢轮廓已经发生了变化。

由表3可知,正离子状态下 $Q2=0.806$,表明模型的预测能力好,但 $R2X<0.4$,表明模型尚不能很好解释 X 矩阵,进一步利用组间PLS-DA分析。图3可见质控样品高度集中,表明检测过程稳定性好,数据可靠性高。模型组与正常组大鼠血清的PCA得分分布无重叠,表明模型组与正常组代谢轮廓不同。隔姜灸组、百忧解组、莫沙必利组比较分散,与模型组有少部分重叠,表明各组相对模型组代谢轮廓已发生变化,但与模型组相比无显著性差异。因此,进一步采用OPLS-DA对各组样品进行统计分析模型建立。

表3 PCA建模分析

组别	正离子		负离子	
	$R2X$	$Q2$	$R2X$	$Q2$
隔姜灸组	0.287	0.806	0.398	0.155
百忧解组	0.287	0.806	0.357	0.079
莫沙必利组	0.287	0.806	0.382	0.097

注: $R2X$ 表示所建模型对 X 矩阵的解释率, $Q2$ 表示模型的预测能力。

$R2X$ 和 $R2Y$ 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, $Q2$ 表示模型的预测能力,表4可见图中质控样品聚集在一起不分散,表明检测过程稳定性好,数据可靠。正负离子状态下大多数 $Q2>0.4$,表明模型的预测能力好,大多数 $R2Y>0.4$,表明模型能很好解释 Y 矩阵,只有1个 $R2X>0.4$,表明模型不能很好解释 X 矩阵。图4可见模型组与正常组大鼠血清

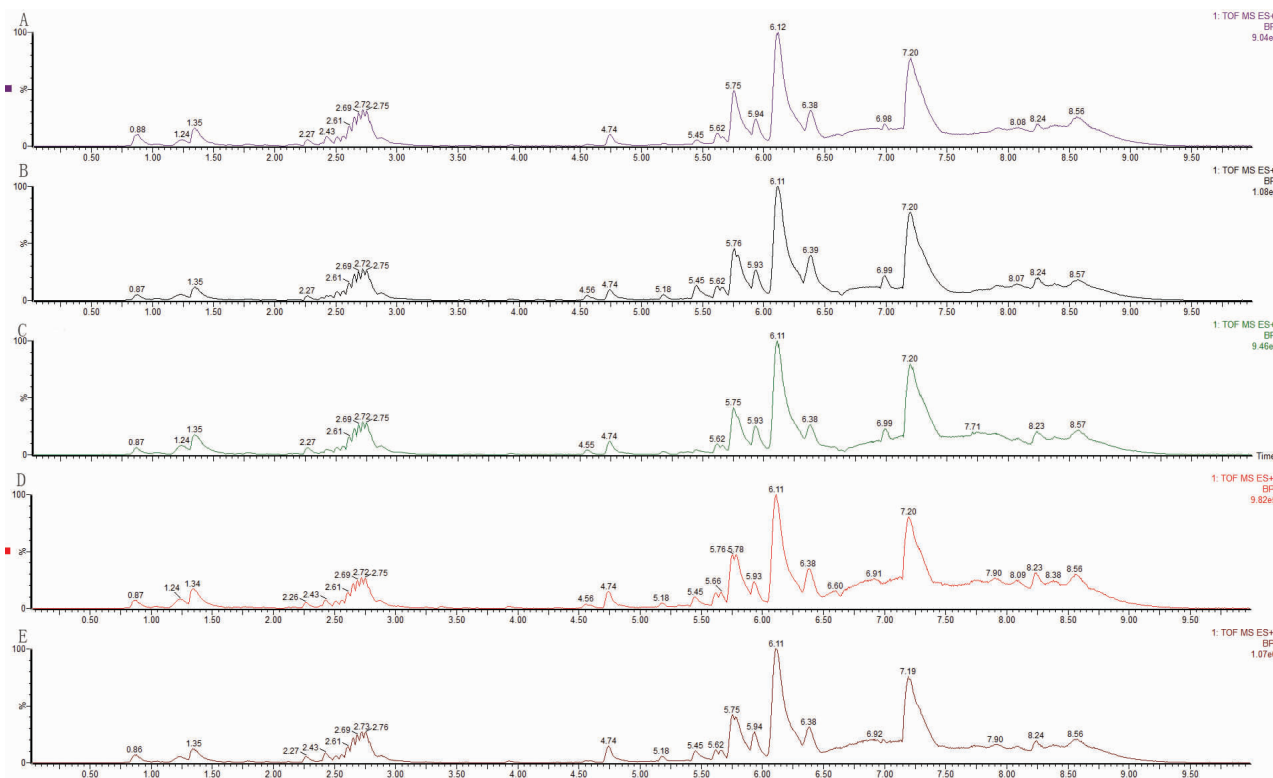


图 1 正离子模式下各组大鼠 BPI 情况

注:A.正常组;B.模型组;C.隔姜灸组;D.百忧解组;E.莫沙必利组。

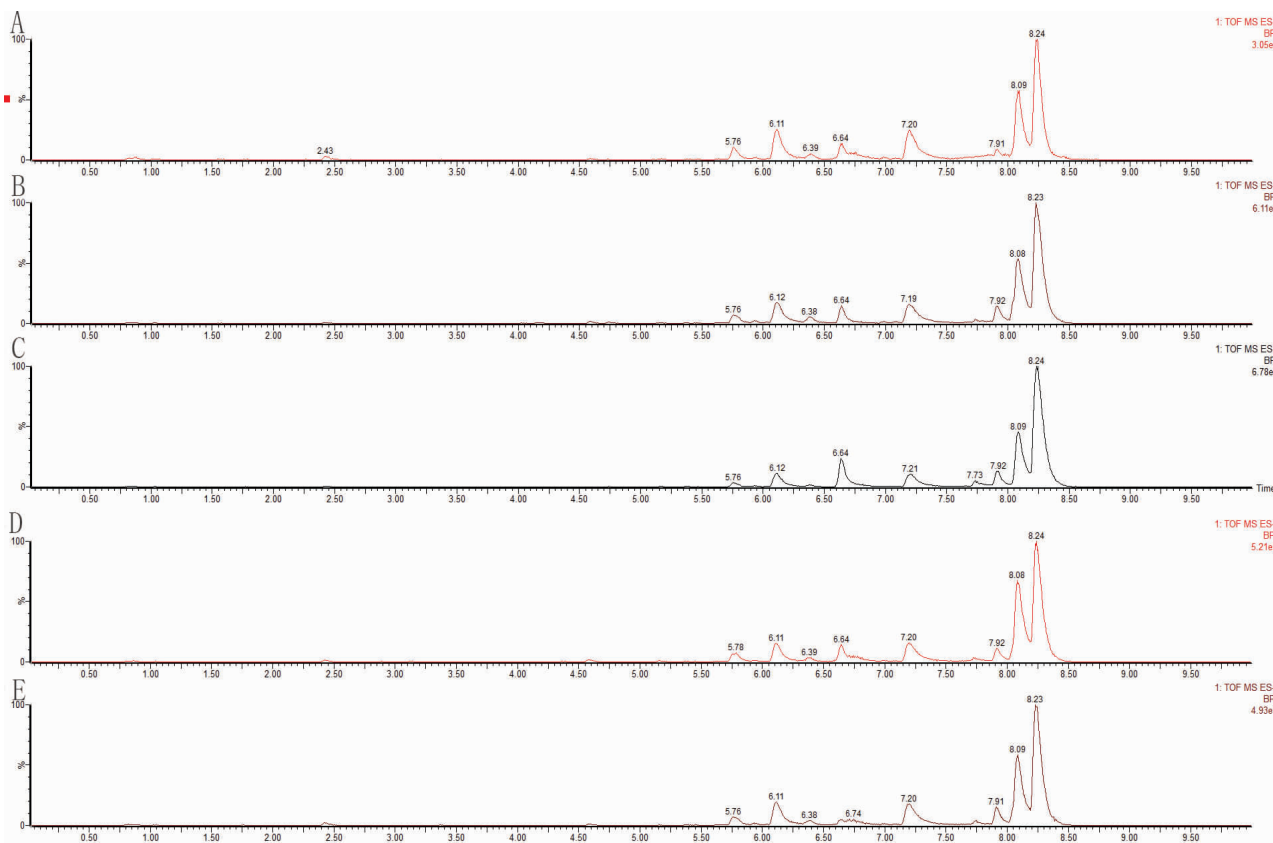


图 2 负离子模式下各组大鼠 BPI 情况

注:A.正常组;B.模型组;C.隔姜灸组;D.百忧解组;E.莫沙必利组。

的 PLS-DA 得分的分布无重叠,表明模型组与正常组代谢轮廓不同,造模成功。隔姜灸组和莫沙必利

组呈正离子状态,百忧解组呈负离子状态,与模型组和正常组都无重叠,表明各组相对模型组代谢轮廓

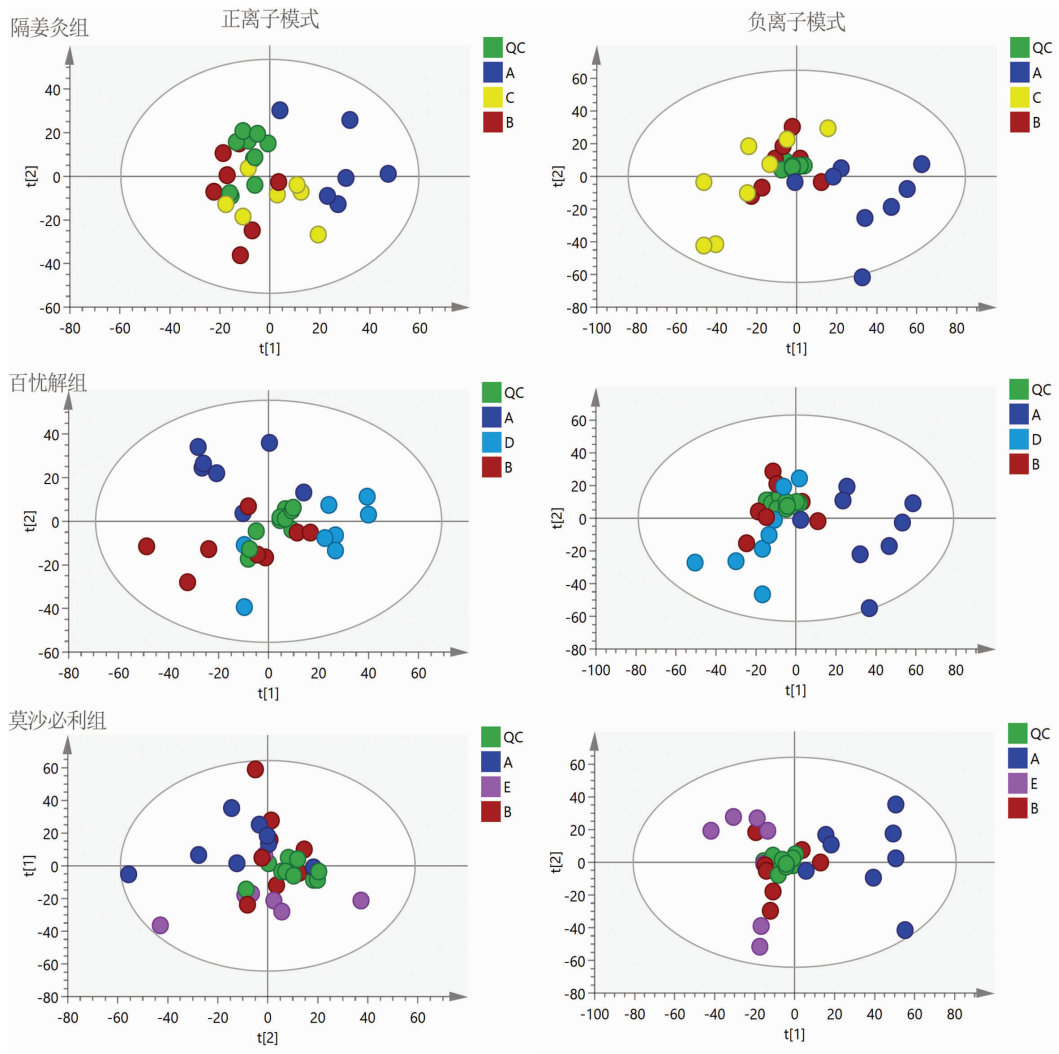


图3 不同离子模式下各组大鼠血清的PCA得分图

注:A.正常组;B.模型组;C.隔姜灸组;D.百忧解组;E.莫沙必利组;QC.质控样本组。运用SIMCA-P 14.1软件做PCA得分图,因组内存在个体差异或仪器检测等原因,组内存在个别点(样本)偏离同组点(样本)的大体趋势,称之为异常点(样本),行得分图剔除诊断确定为异常点,因而每组的样本数存在差异。

表4 PLS-DA建模分析

组别	正离子			负离子		
	R2X	R2Y	Q2	R2X	R2Y	Q2
隔姜灸组	0.437	0.994	0.79	0.391	0.67	0.391
百忧解组	0.304	0.739	0.466	0.344	0.75	0.528
莫沙必利组	0.382	0.948	0.589	0.361	0.737	0.54

注: $R2X$ 和 $R2Y$ 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, $Q2$ 表示模型的预测能力。

已发生变化,代谢轮廓与模型组相比有显著差异。

2.6 潜在生物标志物的筛选

如图5和表5所示,为了消除组内与分类不相关的噪声信息,实验采用OPLS-DA过滤与模型分类不相关的信号,综合 $R2$ 和 $Q2$ 等模型参数并应用置换检验对模型进行拟合检验。计算OPLS-DA模型的VIP并绘制S-plot图锁定潜在生物标志物,如

图5所示。变量筛选模型结果经导出后,以 $VIP>3$ 、 $P<0.05$ 为条件对所构建的数学模型进行与肝郁脾虚型FGIDs潜在生物标志物的筛选。共筛选出潜在生物标志物8个,分别为肌酸、苯丙氨酸、色氨酸,以及溶血卵磷脂的分型LysoPC(18:1)、LysoPC(18:2)、LysoPC(18:3)、LysoPC(16:1)、LysoPC(16:0)。

2.7 代谢通路分析

根据鉴定出的潜在生物标志物,采用Metabo-Analyst 5.0对标志物涉及的代谢通路进行归属和富集分析,从而找到与肝郁脾虚型FGIDs相关的关键代谢通路。以Impact值 >0.1 选潜在相关代谢通路,肝郁脾虚型FGIDs大鼠血清代谢组学通路富集结果:(1)亚油酸代谢通路;(2)苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成通路;(3)苯丙氨酸代谢通路;(4)甘油磷脂代谢通路;(5)精氨酸和脯氨酸代谢通路。

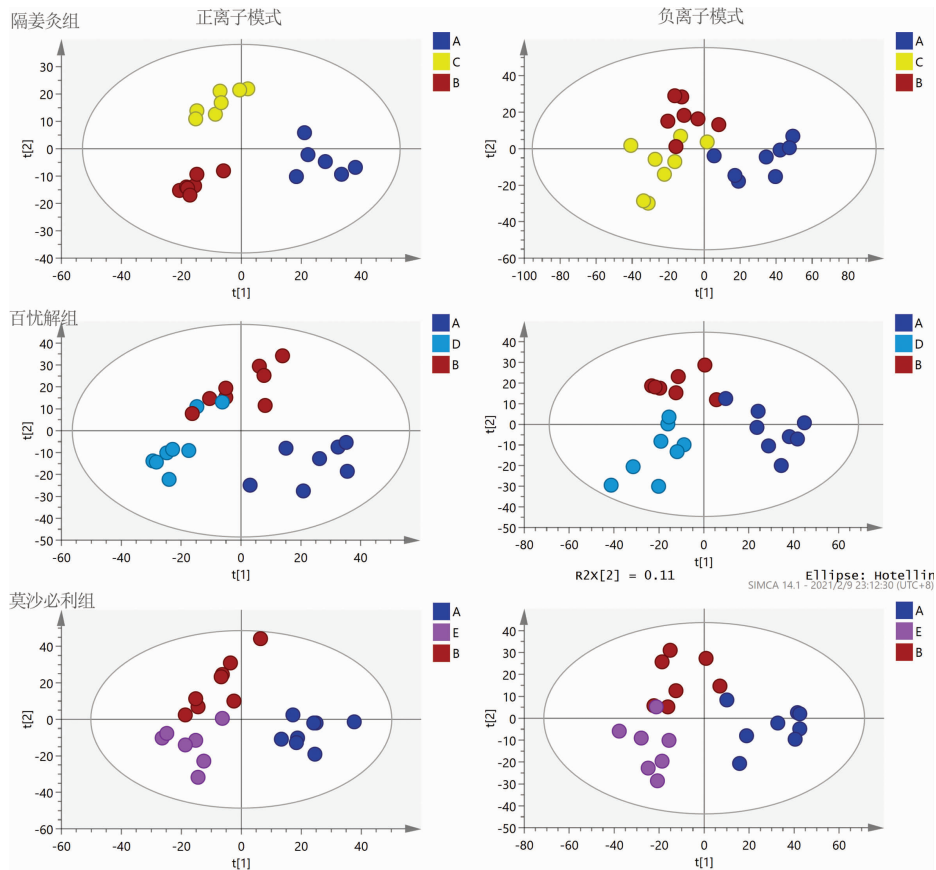


图 4 不同离子模式下各组大鼠血清的 PLS-DA 得分图

注:A.正常组;B.模型组;C.隔姜灸组;D.百忧解组;E.莫沙必利组。运用 SIMCA-P 14.1 软件做 PLS-DA 得分图,因组内存在个体差异或仪器检测等原因,组内存在个别点(样本)偏离同组点(样本)的大体趋势,称之为异常点(样本),行得分图剔除诊断确定为异常点,因而每组的样本数存在差异。

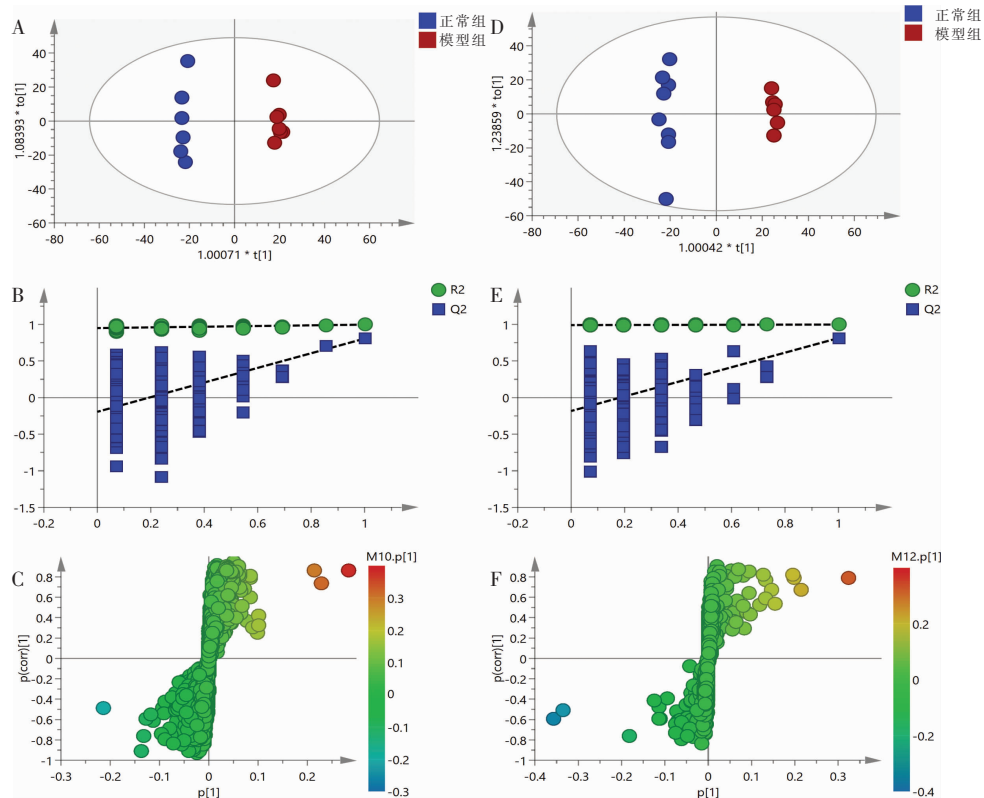


图 5 正常组与模型组 OPLS-DA 得分图、S-plot 图及 200 次置换检验图

注:(1)离子模式:正常组与模型组的 OPLS-DA 得分图(A),200 次置换检验图(B),S-plot 图(C);(2)负离子模式:正常组与模型组的 OPLS-DA 得分图(D),200 次置换检验图(E),S-plot 图(F)。

表5 肝郁脾虚型 FGIDs 潜在生物标志物筛选表

No	Metabolite	RT/min	m/z	VIP	A	B	C	D	E	
1	Creatine	0.94	132.075	6	3.75	4.06±1.93**	10.71±4.00	9.92±2.03	14.66±2.84	11.51±5.01
2	Phenylalanine	2.27	120.080	8	4.92	301.73±28.34**	359.06±30.03	391.07±20.00	381.29±9.00	363.48±32.26
3	LysoPC(18:3(9Z,12Z,15Z)/0:0)	5.39	518.324	3	5.55	213.09±21.17**	286.57±34.48	275.61±16.95	301.81±13.68	271.82±41.37
4	LysoPC(16:1(9Z)/0:0)	5.45	494.324	6	13.90	12.09±1.18**	7.58±2.32	4.94±0.89*	6.72±1.56	7.44±2.00
5	LysoPC(20:1(11Z)/0:0)	7.42	550.387	3	4.79	30.85±3.94**	72.49±21.95	63.29±8.58	90.13±16.38	84.18±23.55
6	Tryptophan	2.43	203.083	4	5.08	43.29±11.92	33.24±8.16	45.59±15.90	30.70±5.40	44.50±12.11
7	LysoPC(18:2(9Z,12Z)/0:0)	5.77	564.330	1	11.62	107.32±15.56**	165.21±25.02	194.14±20.90	171.29±11.87	163.99±41.58
8	LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	5.79	588.329	9	9.27	111.26±24.98	147.68±12.61	141.06±17.75	144.50±13.95	158.77±40.80
9	LysoPC(16:0/0:0)	6.12	540.330	8	13.10	403.06±39.60*	499.24±62.52	485.96±55.61	473.13±40.93	453.20±75.60
10	LysoPC(18:1(9Z)/0:0)	6.40	566.346	4	11.27	54.28±12.00**	104.48±22.04	105.33±12.02	106.58±11.49	101.68±25.50
11	12-Hydroxyeicosatetr-aenoic acid	6.64	319.228	8	23.12	661.62±218.47	403.04±93.15	389.61±116.89	513.09±91.16	363.96±193.98
12	LysoPC(18:0/0:0)	7.20	568.362	4	10.18	393.54±48.70	499.11±27.36	468.51±51.33	449.76±59.19	413.24±69.92
13	Palmitoleic acid	8.03	253.218	3	19.02	34.37±20.87	167.20±94.27	154.74±68.35	133.05±64.14	159.28±61.33
14	Linoleic acid	8.24	279.234	2	23.70	810.90±237.49	2 420.30±394.76	2 343.59±344.82	2 342.61±182.32	2 357.20±276.48

注:A.正常组;B.模型组;C.隔姜灸组;D.百忧解组;E.莫沙必利组。以VIP>3、P<0.05为条件对所构建的数学模型进行潜在生物标志物的筛选。

3 讨论

隔姜灸是一种有效的治疗和保健方法,最早记载于杨继洲的《针灸大成·卷七》:“灸法用生姜切片如钱厚,搭于舌上穴中,然后灸之”。艾灸可以平衡阴阳、调和气血、扶正祛邪、温通经络,生姜具有发汗解表、温中止呕、温肺止咳,解鱼蟹毒、解药毒的作用,味辛,性微温,归肺、脾、胃经。艾灸配合辛温的生姜,是温热效应和药物效应的叠加。神阙穴位于人体的正中点,有“脐通百脉、主治百病”“一穴系全身”之说;居于中焦和下焦的交界,与消化系统及泌尿生殖系统联系紧密,为消化系统的枢纽,也是气机升降出入的总枢纽,有调理脏腑气血、通达气机的作用。研究表明脐灸治疗在临床上效果显著^[18-19],隔姜灸治疗可以改善 FGIDs 患者的胃痛、胃胀、泛酸等不适症状,有利于胃黏膜修复且可以调节胃肠运动紊乱和情绪心理,从而提高患者生活质量^[20-22]。

本研究选用肝郁脾虚型 FGIDs 大鼠为实验对象,成功复制了肝郁脾虚型 FGIDs 大鼠模型,通过实验观察隔姜灸神阙穴对大鼠行为学和胃肠动力的影响,并检测血清代谢组学的变化,证实隔姜灸神阙穴不仅能增强大鼠活力,改善肝郁脾虚状态,还能促进胃肠动力,对肝郁脾虚型 FGIDs 具有确切的疗效。在代谢组学研究中,采用 OPLS-DA,以VIP>3、P<0.05为限定条件对所构建的数学模型进行潜在生物标志物的筛选,共筛选出差异代谢物 8 种,分别为肌

酸、苯丙氨酸、色氨酸和溶血卵磷脂的 5 个分型 [LysoPC (18:1)、LysoPC (18:2)、LysoPC (18:3)、LysoPC (16:1)、LysoPC(16:0)]。对潜在生物标志物,采用Metabo-Analyst 5.0 软件对涉及的代谢通路进行注释和富集分析,找到与 FGIDs 相关的关键代谢通路:亚油酸代谢通路、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成通路、苯丙氨酸代谢通路、甘油磷脂代谢通路、精氨酸和脯氨酸代谢通路。其中,影响较大的有亚油酸代谢通路和苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成通路。

亚油酸是公认的一种生物体必需的不饱和脂肪酸。因为其能降低血液胆固醇,预防动脉粥样硬化而倍受重视^[23],胆固醇必须与亚油酸结合后,才能在体内进行正常的运转和代谢。如果缺乏亚油酸,胆固醇就会与一些饱和脂肪酸结合,发生代谢障碍,在血管壁上沉积下来,逐步形成动脉粥样硬化,引发心脑血管疾病。有研究报道,适宜比例的亚麻酸/亚油酸可能通过调控相关信号分子基因表达,提高草鱼幼鱼肠道免疫屏障和物理屏障功能,从而提高其对营养物质的消化吸收能力,最终提高草鱼幼鱼生长性能^[24]。根据本研究血清代谢组学的分析结果,推断隔姜灸可能通过调节亚油酸的代谢通路改善大鼠肠道免疫和消化吸收功能,促进胃肠动力,从而改善大鼠肝郁脾虚的症状。

苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸均为生物体需要的氨基酸。苯丙氨酸为酪氨酸的代谢前体,这两种化合物都可以被转变成影响情绪和大脑功能的化学物质^[25]。

酪氨酸通过酪氨酸羟化酶代谢途径最终可生成多巴胺和去甲肾上腺素,进一步通过脑-肠轴调节全身神经、免疫、内分泌三大系统。色氨酸在体内可代谢为5-羟色胺,是一种强血管收缩剂和平滑肌收缩刺激剂,同时是一种脑肠肽,可调节中枢神经系统和肠神经系统,从而对胃肠动力和情绪产生影响。研究也表明,胃肠动力的增强可能与5-羟色胺含量提高有关^[20]。因此,推断隔姜灸可能通过苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成通路进一步调节脑-肠神经内分泌系统达到改善大鼠肝郁脾虚症状的作用。

参考文献

- [1] 侯政昆,胡文,刘凤斌,等.罗马IV共识对功能性胃肠病中医临床评价研究的启示[J].中国中药杂志,2018,43(10):2168-2176.
- [2] 熊兰.肠道菌群、心理状况与功能性胃肠病的相关性[J].中国卫生标准管理,2021,12(8):74-77.
- [3] SPERBER A D, BANGDIWALA S I, DROSSMAN D A, et al. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders, results of Rome foundation global study[J]. Gastroenterology, 2021, 160(1): 99-114.
- [4] DEUTSCH D, BOUCHOUCHA M, DEVROEDE G, et al. Functional gastrointestinal disorders as predictors of suicidal ideation: An observational study[J]. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2021, 33(1S Suppl 1): e758-e765.
- [5] 林沛玲,周广文,叶衬轩.睡眠状况对功能性胃肠病患者治疗效果及心理状态的影响[J].世界睡眠医学杂志,2021,8(6):968-969.
- [6] 毛心勇,郭宇,国嵩,等.中医“促动力药物”在功能性胃肠病中的应用[J].世界中西医结合杂志,2020,15(1):193-196.
- [7] 孙祥生,丁兆猛,王建荣.文拉法辛缓释片联合舒肝解郁胶囊治疗胃肠功能紊乱伴抑郁症69例疗效观察[J].安徽医药,2019,23(12):2494-2497.
- [8] TITOV N, ANDERSSON G. Using brief measures to identify depression and other mental disorders: A challenge for research and clinical practice[J]. Internet Interventions, 2021, 28: 100450.
- [9] 陈世伟,王长之,刘超,等.甲氧氯普胺不良反应中文文献分析[J].中国药事,2020,34(10):1231-1236.
- [10] 兰蕾,常小荣,严洁,等.针刺足阳明胃经特定穴治疗功能性消化不良30例[J].湖南中医药大学学报,2010,30(1):66-69.
- [11] 刘未艾.从脑肠轴途径探讨隔药灸对FGIDs肝郁脾虚模型大鼠胃肠动力障碍和感觉异常影响的作用机制[D].长沙:湖南中医药大学,2013.
- [12] 章海凤.隔药灸对FGIDs(肝郁脾虚证)大鼠海马和杏仁核AMPA受体的调节机制[D].长沙:湖南中医药大学,2014.
- [13] BAHARUM S N, AZIZAN K A. Metabolomics in systems biology[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2018, 1102: 51-68.
- [14] 张海龙,司一妹.基于代谢组学的中医证候研究意义及实践探索[J].中华中医药学刊,2021,39(9):21-24.
- [15] 李艳彦,谢鸣,陈禹,等.一种运用复合病因造模法复制大鼠肝郁脾虚证模型的研究[J].中国中医基础医学杂志,2006,12(6):439-442.
- [16] 王海军,冀来喜.关于大鼠“神阙”穴的定位[J].针刺研究,2007, 32(5):312.
- [17] 陈苏宁,礼海,史业东.胃痛痞痞方对功能性消化不良大鼠血清及胃组织中 Ghrelin、Leptin 的影响[J].世界华人消化杂志,2010, 18(26):2800-2803.
- [18] 刘兰群,李惠兰,陈之罡,等.隔盐隔姜灸神阙穴治疗脑卒中后急性尿失禁的效果观察[J].中国康复理论与实践,2015,21(4):475-478.
- [19] 张萌,李金红,肖丽,等.对行化疗的消化道癌症患者采用药灸神阙穴进行治疗对其免疫功能的影响[J].当代医药论丛,2018,16(8):98-100.
- [20] 林玉芳,诸剑芳,陈益丹,等.隔姜灸对慢性疲劳综合征患者疲劳、睡眠质量及抑郁状态的影响:随机对照研究[J].中国针灸,2020, 40(8):816-820.
- [21] 吴瑞兰.讨论针灸治疗功能性胃肠病的优势[J].中医临床研究, 2015,7(22):51-52.
- [22] 张欢,刘涛,陈洁.隔姜灸对功能性消化不良患者胃黏膜肥大细胞表达的影响研究[J].基层医学论坛,2021,25(33):4877-4878.
- [23] FROYEN E, BURNS-WHITMORE B. The effects of linoleic acid on lipid risk markers for cardiovascular disease[J]. Current Developments in Nutrition, 2021, 5(Supplement_2): 495.
- [24] 曾芸芸.不同比例的亚麻酸/亚油酸对草鱼幼鱼消化吸收能力和肠道免疫功能的影响及其调控机制[D].雅安:四川农业大学, 2015.
- [25] 刘振,周宁,刘通,等.基于代谢组学的抑郁症研究进展[J].中国病理生理杂志,2020,36(12):2264-2275.
- [26] 王潇,王婷,张晨,等.基于代谢组学研究厚朴“发汗”前后对胃肠动力障碍大鼠的影响[J].中国中药杂志,2019,44(6):1170-1178.

(本文编辑 匡静之)