

· 论著 ·

四逆汤治疗甲状腺功能减退症的血清代谢组学研究

贾雨婷^a, 靳雨晨^a, 谭光国^b (第四军医大学, a. 学员一旅; b. 药学系药物分析学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 利用血清代谢组学鉴定甲状腺功能减退症(甲减)相关的代谢变化,评价四逆汤治疗甲减的作用。方法 将24只大鼠分为假手术组、模型组和四逆汤治疗组,采用甲状腺切除诱导甲减模型,给予4周相应的治疗后,取大鼠血清进行超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪(UPLC-Q-TOFMS)分析,结合模式识别分析各组间代谢物差异,评价四逆汤的治疗作用。结果 血清代谢组学分析鉴定了9种甲减相关的生物标志物,涉及三羧酸循环、苯丙氨酸代谢、鞘脂代谢和磷脂代谢,同时数据显示四逆汤对甲减有改善治疗作用。结论 四逆汤能够通过调节失衡的三羧酸循环、苯丙氨酸代谢和磷脂代谢而发挥治疗甲减的作用。

[关键词] 甲减;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪;四逆汤;代谢组学

[中图分类号] R977 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)03-0237-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.011

Study on Sini decoction in treatment of hypothyroidism by metabonomic method

JIA Yuting^a, JIN Yuchen^a, TAN Guangguo^b (Fourth Military Medical University, a. First Cadets Brigade; b. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate therapeutic effects of Sini decoction (SND) on hypothyroidism based on serum metabonomics method. **Methods** Twenty-four rats were randomly divided into three groups including sham group, surgery-induced hypothyroid model group and SND-treated group. The SND-treated group was given SND for 4 weeks. After 4 weeks, the serum samples of each rat were collected and analyzed by UHPLC-Q-TOFMS, pattern recognition analysis of metabolomics differences among the groups and therapeutic effects of SND were evaluated. **Results** Total of 9 metabolites were identified through serum metabonomics analysis. It was showed that there was a possible mechanism that hypothyroidism was mainly involved in citrate cycle, phenylalanine metabolism, sphingolipid metabolism and phospholipid metabolism and the damage of hypothyroidism was reversed by SND. **Conclusion** SND administration could provide satisfactory effects on hypothyroidism through partially regulating the perturbed citrate cycle, phenylalanine metabolism and phospholipid metabolism.

[Key words] hypothyroidism; UHPLC-Q-TOFMS; Sini decoction; metabonomics

甲状腺功能减退症(甲减)是机体缺乏充足甲状腺激素的一种代谢性疾病^[1]。甲状腺激素替代疗法是目前治疗甲减的主要方法,但是这种方法存在着明显的副作用,主要是在药物使用期间很难控制机体甲状腺激素水平,可导致患者增加罹患心血管疾病^[2]、骨质疏松症^[3]等的风险。因此,寻找新的治疗甲减的方法显得尤为重要。

中医治疗甲减是现在一种较为有效的手段。中医理论显示,甲减多属于“水肿”、“虚劳”等范畴,脾

肾阳虚是其主要证候^[4]。四逆汤出自张仲景的《伤寒论》,由附子、干姜和甘草组成,是回阳救逆的基础方,其治疗脾肾阳虚证具有渊源的历史和临床基础^[5]。但因四逆汤化学成分复杂,其作用机制仍不明确。代谢组学是对生物体内尽可能多的代谢物进行定量分析,并寻找代谢物与机体生理病理变化的相互关系的一种研究方式^[6]。它能够阐明机体的整体代谢状态,与中医的整体观念不谋而合^[7]。我们课题组研究发现,四逆汤对甲减的治疗有较好的疗效,并对其进行了尿液代谢组学研究^[8]。但是,对于甲减引起的血清代谢物的变化以及四逆汤对血清代谢物的调节作用均未系统和深入地进行研究。鉴于此,笔者采用UHPLC-Q-TOFMS技术开展甲减的血清代谢组学研究,鉴定了甲减相关的代谢改变,并通过比较血清代谢物的变化情况,评价了四逆汤治疗甲减的整体药效,并从代谢物调控水平探讨了四

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81402888);全军医学科技青年培育项目(13QNT197);陕西自然科学基金项目(2015JM8458)

[作者简介] 贾雨婷,药学本科学员。Tel: 17829000129; E-mail: 525375225@qq.com

[通讯作者] 谭光国,博士,讲师。研究方向:中药复杂体系分析。Tel: 18706819001; E-mail: guanguotan@gmail.com

逆汤治疗甲减的作用机制。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统 (Agilent 有限科技公司), Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOFMS 串联四极杆-飞行时间质谱仪 (Agilent 有限科技公司)。

1.2 试剂 三碘甲状腺氨酸放射免疫试剂盒、甲状腺素放射免疫试剂盒 (北京北方生物技术研究所)。HPLC 级甲醇和乙腈 (Merck 公司, Darmstadt, Germany), 甲酸 (Fluka 公司, Buchs, Switzerland)。植物鞘氨醇和棕榈酰卡尼丁 (Acros Organics 公司, New Jersey, USA), 柠檬酸、琥珀酸、酪氨酸、苯丙氨酸和马尿酸 (上海纯晶试剂有限公司)。附子 (产地: 四川江油)、炙甘草 (产地: 新疆)、干姜 (产地: 贵州) 购自西安市老百姓大药房。

1.3 实验动物 洁净级 Wistar 雄性大鼠 24 只, 体重 (170±15) g, 第四军医大学实验动物中心提供。大鼠饲养于保持 12 h/12 h 昼夜的房间中, 给予标准饲料, 恒温 21~23 °C, 相对湿度为 40% 左右, 12 h 交替照明, 24 只大鼠在上述条件下适应环境 1 周。

2 方法

2.1 四逆汤的制备 采用 2015 年版《中国药典》的组成^[9], 称取附子 60 g、干姜 40 g、甘草 60 g, 用 1 600 ml 纯净水浸泡 1 h, 再煎煮 2 h, 趁热过滤, 残渣再用 1 200 ml 的纯净水煎煮 1 h, 过滤, 合并 2 次滤液并减压浓缩, 使四逆汤浓度为 1 g 药材/ml。

2.2 甲减脾肾阳虚证模型的建立和治疗 将 Wistar 大鼠随机分为 3 组: 假手术组 (Sham)、模型组 (甲状腺切除诱导)、四逆汤治疗组 (1 g/ml), 每组 8 只。按照文献方法制备甲减模型^[10]: 大鼠用氯胺酮 (10 mg/kg, im) 和甲苯噻嗪 (5 mg/kg, im) 进行麻醉后, 沿大鼠颈部皮肤中线切开, 清洗皮肤表面下的组织, 唾液腺在侧面可收缩。分离两侧的胸骨舌骨肌并保持其能够伸缩。在甲状腺两叶间的峡部处沿着中线切开, 小心切除两侧的甲状腺。假手术组大鼠用同样的方法进行手术, 但是在暴露气管后再将切口进行缝合, 不切除两侧的甲状腺。手术后, 给大鼠注射酮咯酸 (50 mg/kg, im) 和庆大霉素 (10 mg/kg, im), 连续注射 5 d。密切注意大鼠情况, 防止术后综合征。此后, 大鼠接受四逆汤治疗 4 周, 每天四逆汤灌胃, 剂量为 10 ml/kg, 连续治疗 4 周。假手术组和模型组大鼠均生理盐水灌胃

4 周。

2.3 样本收集 经四逆汤治疗 4 周后, 大鼠眼眶取血, 血样在室温下放置 45 min, 4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 15 min, 得到血清。将血清分成两份: 一份用放射免疫法测定总三碘甲状腺氨酸 (T₃) 和总甲状腺素 (T₄) 水平; 另一份置于 -80 °C 用于代谢组学分析。代谢组学质量控制 (QC) 样品来自于合并等量不同大鼠的血清。

2.4 样品制备 将冻存的血清于室温下融化, 取 100 μl 血清, 加入 400 μl 甲醇, 涡旋 1 min, 在冰水浴中超声提取 10 min, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min。放置于 4 °C 冰箱中待进样。

2.5 UHPLC-MS 分析 色谱条件: 色谱分离使用 Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 柱温 40 °C。流动相 A 为 0.1% 的甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 的甲酸乙腈, 采用梯度洗脱, 梯度洗脱条件: 0~2 min, 5% B; 2~17 min, 5%~95% B; 17~19 min, 95% B。平衡色谱柱 6 min, 流速 350 μl/min, 进样量为 2 μl。质谱条件: 质谱采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式进行检测, 检测参数: 毛细管电压 3 500 V、干燥气流速 11 L/min、干燥气温度 350 °C、喷雾气压 45 psig、碎裂电压 120 V、Skimmer 电压 60 V, 数据采集范围 m/z 50~1 000, 选取 121.050 9 m/z 和 922.009 8 m/z 的内标离子作实时质量数校正。潜在生物标志物离子进一步进行 MS/MS 分析, 碰撞能量设为 15 V。

2.6 数据分析 原始数据 (.d 格式) 经 Agilent MassHunter Qualitative software 软件转换为通用数据格式 (.mzData), 同步进行去同位素峰。数据进一步采用 XCMS 软件包进行峰校正和峰积分, 最终得到由保留时间、质荷比和峰强度组成的三维数据矩阵。XCMS 参数除设定 $fwhm=10$, $bw=10$ 和 $snthresh=5$ 以外, 其他参数均采用默认值^[11]。采用修正 80% 规则来去除缺失值^[10]。为校正质谱响应, 采用每个样品的总峰面积进行归一化。将归一化的数据导入到 SIMCA-P V11.0 (Umetrics, Sweden) 软件, 进一步进行中心化, 标准化处理, 然后做偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)。对差异代谢物进一步进行双侧 t 检验分析 (模型组与假手术组间) 和 ANOVA 分析。模型参数 R²X、R²Y、Q²Y、R²Y-截距和 Q²Y-截距用于评价模型的质量, 以避免过拟合的风险。

2.7 代谢物的鉴定 详细的代谢物鉴定方法参照文献^[10]。

3 结果和讨论

3.1 生物化学指标的测定 采用放射免疫法对大鼠血清中的 T_3 和 T_4 进行测定。结果如图 1 所示。与假手术组相比,模型组和四逆汤治疗组的 T_3 和 T_4 水平在甲状腺切除手术 4 周之后显著下降。与模型组相比,四逆汤治疗组大鼠血清中的 T_3 和 T_4 水平在治疗 4 周之后有明显提高,结果表明甲减模型成功建立,并且四逆汤药效显著。

3.2 基于 UHPLC-MS 的血清代谢轮廓分析 代谢组学研究成功的关键是获取稳定重现的代谢组学数据,只有稳定重现的代谢组学数据才能够反应机体内源性小分子代谢物的代谢状态。为了评价分析系统的稳定性,本研究等体积混合来自每只大鼠血清作为新的 QC 样品, QC 样品采用实际样品一样

的前处理方法,并平均分布在实测样品序列中,一共分析 9 次。主成分分析 9 个 QC 样品显示它们的峰面积在第一主成分和第二主成分的偏差都在 2SD (标准差)范围内(图 2),这表明该分析系统稳定可靠,采集到实测样品的数据在统计学上是可以接受的。这也表明接下来多变量统计分析获得的差异代谢物是来源于样品内在代谢差异,而不是分析系统不稳定引起的方法差异。

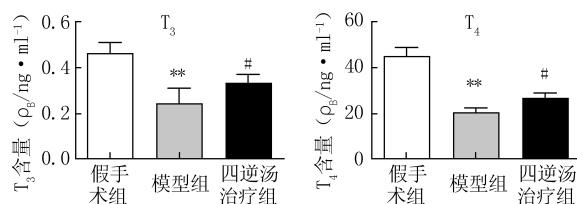


图 1 大鼠血清中 T_3 、 T_4 的测定结果

** $P < 0.01$, 与假手术组比较; # $P < 0.05$, 与模型组比较

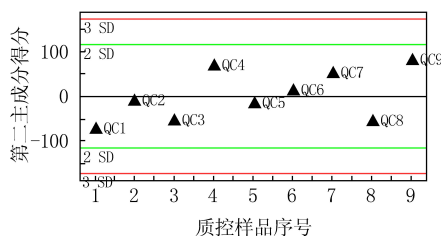
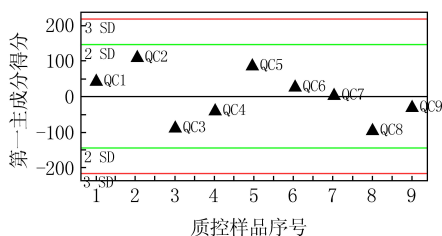


图 2 采用主成分分析在第一主成分(A)和第二主成分(B)方向获得的 9 个质控样品的得分偏差图

3.3 多变量统计分析和潜在生物标志物的鉴定 经过数据前处理后, UHPLC-Q-TOFMS 数据集得到了 1 214 个离子, 由于变量众多, 若使用传统的统计方法, 欲从中找出对甲减模型组和假手术组分类起主要作用的离子将是十分困难的。因此, 本研究采用 PLS-DA, PLS-DA 是一种有监督的模式识别方法, 已经广泛用于代谢组学研究中。图 3A 显示了 PLS-DA 模型的得分图, 可以看出模型组和假手术组明显区分为两类。模型参数 $R^2 Y$ 和 Q^2 (cum) (预测能力) 为 0.987 和 0.869。模型验证采用置换检验的方法, 经 20 次置换检验后产生截距 R^2 和 Q^2

分别为 0.827 和 -0.108(图 3B), 结果表明模型具有好的预测能力和可靠性。为了鉴定引起以上代谢差异的代谢物, 结合模型组与假手术组之间的 PLS-DA 分析获得的 VIP 值(变量重要性, $VIP > 1$)和双侧 t 检验分析, 筛选鉴定了 9 种甲减相关的生物标志物, 结果如表 1 所示。

3.4 潜在生物标志物生物学意义的解释 甲减是机体复杂的内分泌紊乱综合征, 本研究利用代谢组学方法鉴别了与甲减密切相关的 9 种代谢物。查询 KEGG 数据库, 我们发现这些代谢物主要涉及三羧酸循环、苯丙氨酸代谢、鞘脂代谢和磷脂代谢。

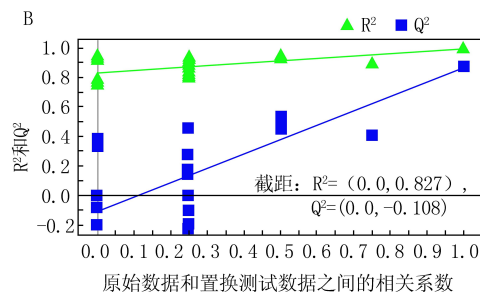
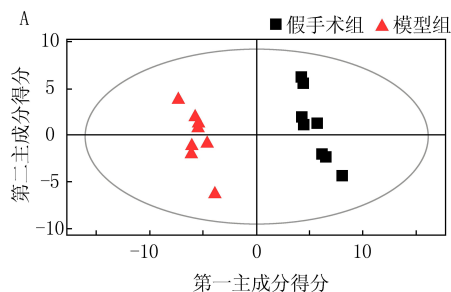


图 3 基于 UHPLC-Q-TOFMS 数据 PLS-DA 分析的得分图(A)和 PLS-DA 分析置换检验验证图(B)

表1 潜在甲减生物标志物及其代谢通路

序号	保留时间 (t/min)	质荷比	分子式	代谢物	VIP	模型组	四逆汤治疗组	代谢通路
1	1.23	193.034	C ₆ H ₈ O ₇	柠檬酸	1.3	↓*	↑△	三羧酸循环
2	1.57	119.033	C ₄ H ₆ O ₄	琥珀酸	1.1	↓*	↑△	三羧酸循环
3	1.65	182.080	C ₉ H ₁₁ NO ₃	酪氨酸	1.4	↑*	↓△	苯丙氨酸代谢
4	3.55	166.085	C ₉ H ₁₁ NO ₂	苯丙氨酸	1.4	↑*	↓△	苯丙氨酸代谢
5	5.49	180.065	C ₉ H ₉ NO ₃	马尿酸	1.5	↓*	↑△	苯丙氨酸代谢
6	10.18	318.299	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	植物鞘氨醇	1.1	↓*	↑#	鞘脂代谢
7	12.79	400.341	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	棕榈酰卡尼丁	1.6	↓*	↑#	鞘脂代谢
8	13.40	496.342	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱(16:0)	2.1	↑*	↓△	磷脂代谢
9	13.47	546.356	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱(20:3)	1.3	↑*	↓△	磷脂代谢

注:VIP.假手术组与模型组之间的变量重要性。* P<0.05,与假手术组比较;# P≥0.05,与模型组比较;△ P<0.05,与假手术组比较

3.4.1 三羧酸循环 相比较假手术组,模型组血清样品中柠檬酸和琥珀酸明显下降,这表明甲减与三羧酸循环密切相关。先前研究也报道了甲状腺激素能够影响三羧酸循环的活性,并且甲状腺激素能够促进线粒体钙离子的释放,而钙离子的释放能够刺激整个三羧酸循环的活性^[12],这间接证实了我们的研究结果。

3.4.2 苯丙氨酸代谢 相比较假手术组,模型组血清样品中苯丙氨酸和酪氨酸含量明显升高,而马尿酸含量明显下降,这表明甲减会导致苯丙氨酸代谢的紊乱。Sjoberg 等^[13]报道甲减会通过阻断酪氨酸代谢通路的开始部分进行阻断而影响酪氨酸和苯丙氨酸水平,这一研究结果与我们的结果相一致。

3.4.3 鞘脂代谢 相比较假手术组,模型组血清样品中植物鞘氨醇和棕榈酰卡尼丁含量显著下降,这表明甲减与鞘脂代谢密切相关。之前的研究表明甲状腺激素能够调节鞘磷脂酶和神经酰胺合成酶的生成,并且甲状腺激素的缺乏会通过降低鞘磷脂酶的活性来减少神经酰胺的含量^[14],这与我们的结果相一致。然而,本研究中没有更多的鞘脂被鉴定,为全面了解卒中后鞘脂的代谢紊乱,有必要采用脂质组学平台对其进行深入研究。

3.4.4 磷脂代谢 相比假手术组,模型组血清样品中溶血磷脂酰胆碱(16:0和20:3)的浓度明显升高,这表明甲减与磷脂代谢物密切相关。溶血磷脂酰胆碱是重要的信号分子,具有多种生物学功能,如调节细胞增殖、炎症等作用^[15,16]。先前的研究报道了甲减或甲状腺癌患者体内也会出现磷脂浓度异常^[17,18],这与我们的研究结果相一致。

3.5 四逆汤治疗作用 四逆汤是一种有效治疗甲减的中药复方,然而其治疗甲减的作用机制仍不清楚。以甲减相关标志物作为监测指标可评价四逆汤的治疗作用。图4显示了9种标志物在不同组

的变化情况,经统计学分析发现,四逆汤对柠檬酸、琥珀酸、酪氨酸、苯丙氨酸、马尿酸、溶血磷脂酰胆碱(16:0和20:3)有明显的逆转作用。结合甲减生物标志物的变化,我们推断四逆汤通过调节三羧酸循环、苯丙氨酸代谢和磷脂代谢来发挥治疗甲减的作用。

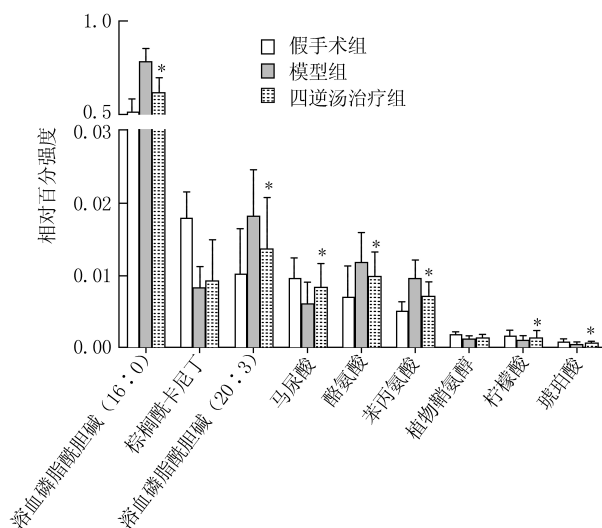


图4 9种标志物在假手术组、模型组和四逆汤治疗组中的相对强度比较 * P<0.05,与模型组比较

4 结论

本研究采用UHPLC-Q-TOFMS代谢组学方法成功的用于甲减相关代谢物的筛选和四逆汤治疗机制的研究。9种代谢物被鉴别为甲减生物标志物,它们涉及三羧酸循环、苯丙氨酸代谢、鞘脂代谢和磷脂代谢。以发现的生物标志物作为潜在的药物靶标,证实了四逆汤能够恢复失衡的三羧酸循环、苯丙氨酸代谢和磷脂代谢而发挥治疗甲减的作用。然而,由于样品数量有限,其结果更多的是提供一种方法借鉴,而不是说明疾病和药物作用的确切结论。

- [3] 任 强. 半枝莲化学成分及药理作用研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(3): 157-159.
- [4] 栾连军, 王叶飞, 吴永江, 等. 半枝莲总黄酮中 4 种有效成分含量测定[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(1): 23-26.
- [5] 高晓霞, 原红霞, 赵云丽, 等. HPLC 法测定半枝莲及其制剂热炎宁胶囊中野黄芩苷[J]. 中草药, 2007, 38(4): 56-57.
- [6] 唐 璐, 李 希, 易晓霞. 高效液相色谱法测定莲苓清热颗粒中野黄芩苷的含量[J]. 中药与临床, 2013, 4(3): 18-20.
- [7] 曾秋红. 半枝莲黄酮类化合物体外抗肿瘤活性的研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(1): 137-139.
- [8] 鲁芹飞, 黄 松, 朱德全, 等. 仙慈丹的质量标准研究[J]. 中国药师, 2013, 16(11): 1644-1647.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 109-110.
- [收稿日期] 2014-12-01 [修回日期] 2015-03-23
[本文编辑] 顾文华

(上接第 240 页)

【参考文献】

- [1] Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2000, 75(4): 519-631.
- [2] Flynn RW, Bonellie SR, Jung RT, *et al.* Serum thyroid-stimulating hormone concentration and morbidity from cardiovascular disease and fractures in patients on long-term thyroxine therapy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(1): 186-193.
- [3] La Vignera S, Vicari E, Tumino S, *et al.* L-thyroxin treatment and post-menopausal osteoporosis: relevance of the risk profile present in clinical history [J]. Minerva Ginecol, 2008, 60(6): 475-484.
- [4] 蔡定芳, 陈晓红, 刘彦芳, 等. 探讨阴中求阳与阳中求阴对谷氨酸单钠大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(7): 415-417.
- [5] Tan G, Zhu Z, Jing J, *et al.* Characterization of constituents in Sini decoction and rat plasma by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25(8): 913-924.
- [6] Guo L, Tan G, Liu P, *et al.* Three plasma metabolite signatures for diagnosing high altitude pulmonary edema [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15126.
- [7] Wang M, Lamers RJ, Korthout HA, *et al.* Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology [J]. Phytother Res, 2005, 19(3): 173-182.
- [8] Wu S, Tan G, Dong X, *et al.* Metabolic profiling provides a system understanding of hypothyroidism in rats and its application [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55599.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 789.
- [10] Alzoubi KH, Gerges NZ, Aleisa AM, *et al.* Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of hippocampus-dependent learning and memory: Behavioral, electrophysiological, and molecular studies [J]. Hippocampus, 2009, 19(1): 66-78.
- [11] Tan G, Lou Z, Liao W, *et al.* Hydrophilic interaction and reversed-phase ultraperformance liquid chromatography TOF-MS for serum metabonomic analysis of myocardial infarction in rats and its applications [J]. Mol Biosyst, 2012, 8(2): 548-556.
- [12] Briere JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, *et al.* Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 291(6): C1114-C1120.
- [13] Sjoberg S, Eriksson M, Nordin C. L-thyroxine treatment and neurotransmitter levels in the cerebrospinal fluid of hypothyroid patients: a pilot study [J]. Eur J Endocrinol, 1998, 139(5): 493-497.
- [14] Babenko NA. Long- and short-term effects of thyroxine on sphingolipid metabolism in rat liver [J]. Med Sci Monit, 2005, 11(5): Br131-138.
- [15] Xu Y. Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1582(1-3): 81-88.
- [16] Wang L, Radu CG, Yang LV, *et al.* Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(5): 2234-2247.
- [17] Zelinskaia NB. The significance of studying phospholipids in the diagnosis of hypothyroidism [J]. Vrach Delo, 1989, (5): 79-81.
- [18] Raffelt K, Moka D, Sullentrop F, *et al.* Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an *in vitro* (31)P high-resolution NMR study [J]. NMR Biomed, 2000, 13(1): 8-13.
- [收稿日期] 2016-03-14 [修回日期] 2016-04-22
[本文编辑] 顾文华