哮喘异常黑胆质证大鼠模型的生物学标志研究

巴吐尔·买买提明[1],娜祖科·库尔班塔依[1],买吾拉尼江·依孜布拉[2],尤丽[3],哈木拉提·吾甫尔[2]

1. 新疆医科大学中心实验室,乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学维吾尔医医学院,乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学中医学院,乌鲁木齐 830011

摘要 为了维医证候研究逐步走向标准化和客观化,采用核磁共振(nuclear magnetic resonance,NMR)为基础的代谢组学技术对哮喘异常黑胆质证动物模型体内代谢变化信息与临床患者进行对比研究,揭示两者之间的异同点。分别选择哮喘异常黑胆质证大鼠模型和临床患者作为研究对象,采集血浆样本,通过NMR测试其氢谱,并采用正交偏最小二乘判别分析法(orthogonal partial least-squares discriminant analysis,OPLS-DA)进行多变量分析。结果显示,与健康志愿者相比,临床患者血浆中亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和丙氨酸含量明显降低;与脂代谢相关的极低密度脂蛋白(VLDL)和不饱和脂类在患者体内明显降低,而乙酸、丙酮、乙酰乙酸和肉碱含量明显升高;谷氨酰胺在患者体内明显的升高,而肌酸、肌酸酐、鲨肌醇和乳酸明显下降。对动物模型而言,健康对照组与2种模型组比较,模型组大鼠血浆中与脂代谢相关的代谢物以及乳酸、肉碱和谷氨酰胺含量的变化趋势与临床患者一致,但氨基酸含量的变化相反;异常黑胆质证模型大鼠与哮喘异常黑胆质证模型大鼠相比较,只有丙氨酸和肌酸酐含量在哮喘异常黑胆质证模型大鼠血浆中明显比前者低。研究表明,虽然氨基酸的代谢变化在模型大鼠和临床患者体内有所不同,但是与脂代谢相关的代谢物含量的变化趋势一致。氨基酸代谢的不同可能与模型制作过程中环境的剧烈变化有关。脂代谢相关的代谢物可作为临床患者与动物模型共同的异常黑胆质证代谢标志物。

关键词 维吾尔医学;异常黑胆质证;哮喘;动物模型

证候理论是维吾尔医学体液论的核心理论之一,证候动物模型是揭示证候生物学基础的有力工具,所以模型的评价依据必须与临床诊断依据一致。维吾尔医学对证的诊断手段主要包括问、触、叩、切等[1]。通过这些方法在患者身上可以得到完整的病例资料,并做出准确的辨证诊断。但是,对动物模型要想得到病例资料并作出辨证诊断,困难较大。在同一疾病状态下,实验动物与人类有着相似的病理生理基础,即在病理生理变化层面存在着很大的一致性。以临床在病证结合条件下证候的诊断标准为依据,通过将患者的证候诊断指标与动物表征指标的相同生理病理意义进行比较,可对患者与动物模型证候属性进行同质性研究。

代谢组学是动态和多参数测量生命体对病理生理性刺激应答的一种新型学科[2]。核磁共振(NMR)作为一种新型、高效、重现性好和非破坏性的代谢组学研究方法被广泛应用到疾病生物标志物的发现、诊断和预后评价等领域[3-6],同时,也正在成为传统医学理论现代研究中的重要研究手段[7-11]。

本研究以异常黑胆质证为研究对象,建立哮喘异常黑胆质证动物模型,收集模型的血浆代谢物变化信息,阐述异常黑胆质证发生发展过程中的代谢网络变化特点。同时,将病证结合动物模型相关代谢变化信息与临床患者相比较,揭示哮喘异常黑胆质证动物模型代谢变化特点与临床患者之间的异同点。

1 方法与材料

1.1 临床样本选择

选择2013年6月至2014年6月之间在新疆医科大学第四附属医院诊治的哮喘异常黑胆质证患者38例,另有39名健康志愿者作为对照组。选择的标准包括个人无心血管疾病、肝病、肾病或炎症性疾病。受试者的平均年龄为(46.3±12.1)岁(年龄范围20~65岁)。异常黑胆质证患者的体液分型根据维吾尔医学体液分型的分类标准确定[1]。收集患者早餐前空腹血液并分离血浆,保存在-80℃冰箱中待测。

收稿日期:2015-06-08;修回日期:2015-11-24
基金项目:国家自然科学基金项目(81460749);新疆维吾尔自治区"天山英才工程"项目(Y0231027)
作者简介:巴吐尔·买买提明,教授,研究方向为维吾尔医学,电子信箱:batur72@163.com;哈木拉提·吾甫尔(通信作者),教授,研究方向为新疆重大疾病的中维西医干预,电子信箱:halmurat@263.net
引用格式:巴吐尔·买买提明, 娜祖科·库尔班塔依, 买吾拉尼江·依孜布拉, 等. 哮喘异常黑胆质证大鼠模型的生物学标志研究[J]. 科技导报, 2016, 34(18): 94-100; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.18.011

1.2 实验动物

SD大鼠84只,SPF级,雄性,质量(150±30)g,购买于新疆医科大学动物实验中心。

1.3 仪器与试剂

600兆核磁共振波谱仪(美国,VARIAN公司),RQH-350型人工气候箱(上海精宏实验设备有限公司),403A NEBULIZER型压缩空气式雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司),JXDT-1型小鼠跳台仪器。重水(Deuteriumoxide;美国Cambridge Isotop Laboratories, Inc.),卵清蛋白(ovalbumin, OVA;美国Sigma公司,型号:A-5253),氢氧化铝($A1(OH)_3$,天津永晟精细化工有限公司),NaCl(天津市福晨化学试机厂),K_2HPO_3(天津市光复精细化工研究所),NaH_2PO_3(沈阳化学试剂厂)。

1.4 异常黑胆质证大鼠动物模型的建立

根据前期研究中所确定的异常黑胆质证大鼠模型的建立方法,复制模型,所有的研究在清洁级环境下进行。

1.4.1 干旱属性饲料的制备

干旱属性饲料和普通鼠饲料按质量比3:7混合,其中干旱属性饲料即芫荽子和大麦按质量比1:1制成颗粒状干饲料。

1.4.2 模型的制备

采用干寒喂养环境+干寒属性饲料+慢性不可预见性电刺激等多因素复合作用,建立异常黑胆质证动物模型。将大鼠稳定饲养1周后,按完全随机方法分组,即空白对照组和模型组。空白对照组在清洁动物房内室温下(温度(25±3)℃,相对湿度60%~80%)用普通饲料饲养,未受任何刺激,随机饮食水,从6:00 am至6:00 pm提供光线。模型组采用干寒饲养环境(温度(6±1)℃,相对湿度25%~32.8%)、干寒属性饲料喂养、间断足底电刺激(第1周每次30min、电压35 V、1次/d;第2周每次35 min、电压40V、1次/d;第3周每次45 min、电压45V、1次/d)、禁止运动(第1周每次45 min、1次/d;第2周每次60 min、1次/d;第3周每次90 min、1次/d)、强迫游泳(水温(20±5)℃,1次/d,每次5 min)等多因素复合作用21天,建立维吾尔医学异常黑胆质证动物模型。

1.5 哮喘异常黑胆质证大鼠模型的建立

在已建立的异常黑胆质证大鼠模型的基础上,实验第1天腹腔注射1 mL抗原液(含10 mg OVA(卵清蛋白)、100 mg $Al(OH)_3$)初次致敏,实验第8天重复1次加强致敏。从实验第15天开始,每天1次将大鼠置于密闭玻璃钟罩,以10% OVA生理盐水雾化吸入20 min以激发异常黑胆质证载体的哮喘病动物模型。

大鼠在麻醉状态下从腹主动脉采血,以3500 r/min,离心10 min,分离血浆,-80℃低温冰箱中保存。

1.6 血浆的NMR测试

血浆样本在室温中解冻,取200 μL血浆与400 μL磷酸盐生理盐水缓冲液混合,以4℃,10000 r/min,离心10 min,取上清液550 μL,在Inova600型核磁共振波谱仪上采用自旋回波(Carr-Purcell-Meiboom-Gill,CPMG)脉冲序列进行测试。

对所有血浆NMR图谱采用线宽为0.3 Hz的指数窗函数进行傅里叶变换后进行基线及相位调整并进行自动积分,积分值进行归一化处理(每一段的积分值处以所有积分值之和),用SIMCA-P+11(umetrics Inc., Umea, Sweden)软件进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discriminant analysis,OPLS-DA)。代谢物在两组中的差异性采用OPLS-DA分析中获得的变量重要性参数(variable importance in the projection,VIP)值确定。*VIP*>1的代谢物被认为是在两组中具有差异性的代谢物[12],而代谢物含量变化的方向采用OPLS-DA分析中的变量相关系数(correlation coefficient,r)判断。

2 结果

2.1 哮喘异常黑胆质证患者血浆中的代谢变化

人血浆典型的^{1}H-NMR谱如图1(a)所示。^{1}H-NMR谱的OPLS-DA分析模型是通过把每一个NMR数据作为X变量,样本的组别信息作为Y变量建立的。R^2X和Q^2是所建立的模型的质量评价指标,分析模型的优化程度用R^2X参数描述、表示X的总变异,用交叉核实参数Q^2描述模型的累积预测程度、表示预测结果的真实性。图2中(a)和(b)为健康志愿者与哮喘异常黑胆质证患者比较的OPLS-DA分析得分图和线图。

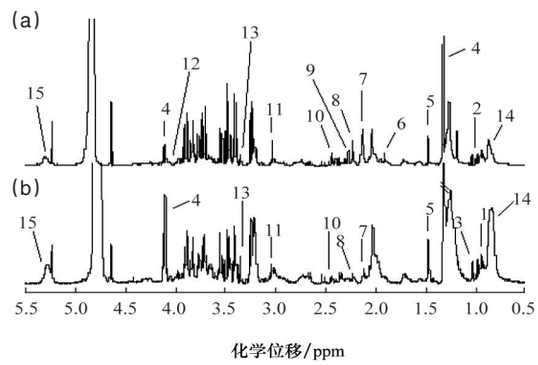


图1 大鼠(a)与人(b)的典型的^{1}H-NMR图谱

Fig. 1 Typical ^{1}H-NMR spectra of plasma

OPLS-DA分析模型R^2X=0.56,模型预测值Q^2=0.61;可见分析模型的可靠性高。OPLS-DA分析中变量的VIP值显示,与健康志愿者比较,哮喘异常黑胆质证患者血浆中15种代谢物含量发生了显著的变化。这些代谢物主要与糖代谢、脂肪代谢、氨基酸代谢以及机体免疫功能有关,详见表1。在差异性代谢物中r值为正的代谢物在患者血浆中含量降低的代谢物,r值为负的代谢物在患者血浆中含量升高的代谢物。

结果显示,与健康志愿者相比,患者血浆中多种氨基酸含量明显降低,包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和丙氨酸等。与脂代谢相关的极低密度脂蛋白(VLDL)和不饱和脂类在患

表1　主要差异性代谢物及其相关系数和VIP值

Table 1　Correlation coefficients and VIP values of otherness metabolites

序号	代谢物	化学位移	归属	动物模型						人	
				正常组/异黑模型		正常组/异黑哮喘		异黑模型/异黑哮喘		健康志愿者/异黑哮喘患者	
				r值	VIP值	r值	VIP值	r值	VIP值	r值	VIP值
1	异亮氨酸	0.93(t),1.00(d),1.96(m)	δ-CH_3,β-CH_3,β-CH	−0.62	1.35	−0.83	1.94			0.60	1.78
2	亮氨酸	0.95(d),0.97(d),1.72(m)	δ-CH_3,δ-CH_3,β-CH_2/γ-CH	−0.63	1.08	−0.68	1.32			0.69	2.88
3	缬氨酸	0.98(d),1.03(d),3.60(d)	CH_3,CH_3,α-CH_2	−0.65	1.35	−0.70	1.56			0.58	1.88
4	乳酸	1.33(d),4.11(q)	CH_3,CH	0.91	6.05	0.81	7.99			0.84	11.39
5	丙氨酸	1.47(d),3.76(q)	CH_3,α-CH	−0.68	2.05	−0.82	2.71	0.71	3.20	0.49	2.82
6	乙酸	1.91(s)		−0.79	1.44	−0.85	1.96			−0.55	1.47
7	谷氨酰胺	2.13(m),2.36(m),3.75(t)	β-CH_2,γ-CH_2,α-CH	−0.71	2.04	−0.90	2.61			−0.35	1.62
8	丙酮	2.22(s)		−0.92	2.86	−0.86	3.71			−0.35	1.96
9	乙酰乙酸	2.27(s)		−0.65	2.18	−0.61	1.47			−0.35	1.03
10	肉碱	2.46(q)	CH_2(COO)	−0.83	2.27	−0.92	2.15			−0.50	2.38
11	肌酸	3.03(s),3.93(s)	CH_3,CH_2							0.46	1.49
12	肌酸酐	3.06(s),4.05(s)	CH_3,CH_2					0.68	1.22	0.41	1.47
13	鲨肌醇	3.35(s)	6×CH							0.41	2.47
14	VLDL	0.88(m),1.26(m), 2.22(m)	$CH_3CH_2CH_2C$,$CH_3CH_2(CH_2)_n$,CH_2CO	0.95	5.94	0.91	6.41			0.47	3.87
15	不饱和脂类	5.28(m),5.30(m)	$CHCH_2CH_2$,$CHCH_2CH$	0.94	3.14	0.91	3.08			0.58	2.06

注:s为单峰,d为双重峰,t为三重峰,q为四重峰,m为多重峰,dd为双重双重峰,ddd为双重双重双重峰。异黑模型:异常黑胆质证模型大鼠;异黑哮喘:哮喘病异常黑胆质证。

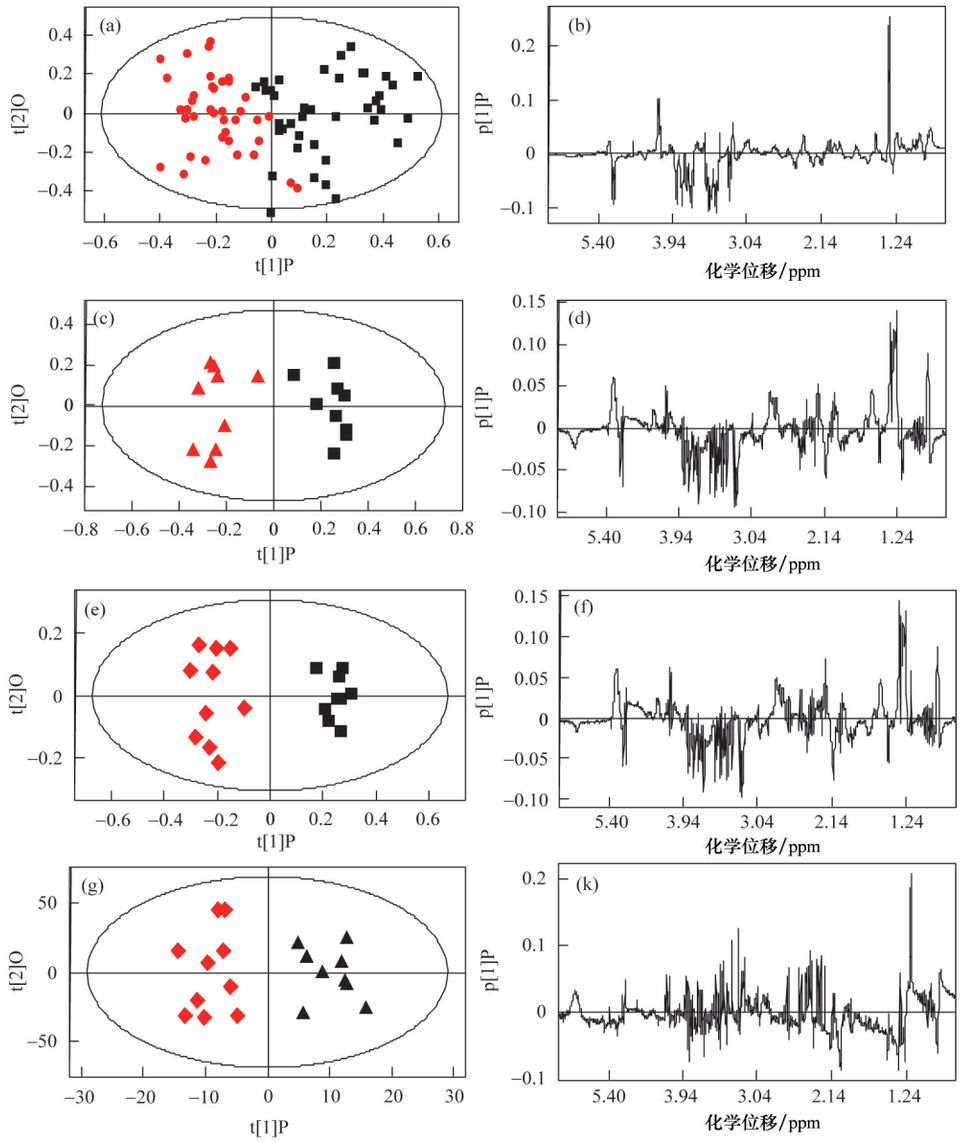
者体内明显降低,但是,乙酸、丙酮、乙酰乙酸和肉碱含量却明显升高。除此之外,谷氨酰胺在患者体内表现出了明显的升高趋势,与免疫功能相关的肌酸、肌酸酐和鲨肌醇及葡萄糖的无氧氧化产物乳酸在患者体内发生了明显的下调。

2.2　模型大鼠血浆中的代谢变化

大鼠血浆典型的^{1}H-NMR谱如图1(b)所示。本研究对健康对照组、异常黑胆质证模型组和哮喘异常黑胆质证组大鼠血浆代谢物含量进行了比较分析。图2中(c)、(d)和(e)、(f)分别为健康对照组与异常黑胆质证模型大鼠及健康对照组与哮喘异常黑胆质证模型大鼠比较的OPLS-DA分析得分图和线图,模型参数分别为R^2X=0.62、Q^2=0.86和R^2X=47、Q^2=0.85。图2(g)和(k)分别为异常黑胆质证模型大鼠与哮喘异常黑胆质证模型大鼠比较的OPLS-DA分析得分图和线图,模型参数为R^2X=0.26、Q^2=−0.07。

结果显示,异常黑胆质证模型大鼠和哮喘异常黑胆质证模型大鼠分别与健康对照组比较有相似的体内代谢变化特点。两种模型组血浆中与脂代谢相关的VLDL和不饱和脂肪酸含量显著降低,但是其下游代谢产物乙酸、丙酮和乙酰乙酸含量显著升高。异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸和丙氨酸等4种氨基酸在两种模型组大鼠血浆中都明显下降;除此之外,肉碱和谷氨酰胺含量发生了明显的上调,而乳酸含量在两种模型组大鼠血浆中明显下降。只有肌酸在两种模型组大鼠血浆中的变化不同,即异常黑胆质证模型大鼠血浆中肌酸含量明显升高,而哮喘异常黑胆质证模型大鼠血浆中没有发生变化。

异常黑胆质证模型大鼠与哮喘异常黑胆质证模型大鼠相比,只发现2种代谢物含量有差异性,分别是丙氨酸和肌酸酐,其含量在哮喘异常黑胆质证模型大鼠血浆中明显比前者低。



图(a)和(b)为健康志愿者与哮喘异常黑胆质证患者比较的OPLS-DA分析得分图和线图,(■)为健康志愿者,(●)为哮喘异常黑胆质证患者;图(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)分别为健康对照组、异常黑胆质证模型大鼠及哮喘异常黑胆质证模型大鼠比较的OPLS-DA分析得分图和线图,(■)健康对照组,(▲)异常黑胆质证模型大鼠,(◆)哮喘异常黑胆质证模型大鼠

图2　不同组别之间的OPLS-DA分析得分图和线图

Fig. 2　OPLS-DA score plots and line plots of different groups

3　讨论

维医体液论认为,黑胆质为黑色、酸味的液体,在肝脏中产生并在脾脏中储存,有保持器官的形态和特点、控制体液的过度燃烧、存储和运输多种营养物质、影响思想和情感等功能[1,7]。黑胆质的失衡或正常体液的过度燃烧都会导致异常黑胆质,这是身体对某些疾病易感性增加的主要原因。在维医体液论中,异常黑胆质证的主要临床表现为脉搏缓慢、眼眶深成蓝色、脸色黯淡、味苦、舌苔灰色或黑色、皮肤粗糙、体温偏低、排尿次数少但量多、失眠、多梦等[13,14]。诊断异常黑胆质证在临床实践中存在的这些宏观特征的生物学基础是什么?

本研究显示,哮喘异常黑胆质证患者、异常黑胆质证大鼠和哮喘异常黑胆质证大鼠体内代谢变化特点有很多相似之处,证明异常黑胆质证作为一种病理变化产物,在不同状态下有明显的共性。

在哮喘发作导致的通气活动剧烈而又缺氧的情况下,呼吸肌能量供应主要来自脂肪酸[15]。连续性的气道炎症引起气道阻力的持续性增加,随之加重呼吸肌的负荷,增加其能量消耗。本研究中,与脂代谢相关的代谢物,包括VLDL、不饱和脂质、乙酸、丙酮和乙酰乙酸等在临床患者和2种模型动物

血浆中的浓度变化一致,即VLDL和不饱和脂质含量降低,但是其下游代谢产物乙酸、丙酮和乙酰乙酸等含量升高。丙酮和乙酰乙酸被称为酮体,为肝细胞线粒体中的脂肪酸进行分解代谢之后的中间产物,若脂代谢增加,血中酮体的浓度就会增高。模型大鼠血浆中的丙氨酸含量的增加也与脂肪代谢的加强有关。临床患者和模型大鼠血浆中与脂代谢相关代谢物含量的变化与哮喘发作状态下呼吸肌能量代谢的加强有关。

临床患者和两种模型组大鼠体内与脂肪代谢有关的肉碱含量均显著增加。骨骼肌是体内脂代谢的主要场所[16],而代谢过程中长链脂酰辅酶A主要依靠肉碱脂酰转移酶I(carnitine palmitoyltransferase-I,CPT-I)通过线粒体膜,这一步是整个脂肪代谢的调节点,也是脂代谢过程的主要限速步骤[17,18]。CPT-I的活性主要受其生物抑制剂丙二酸单酰辅酶A的调控[17,18]。可见,丙二酸单酰辅酶A活性的降低所导致的脂代谢的加强可能与异常黑胆质证的发生、发展密切相关。

本研究显示,临床患者和模型大鼠血浆乳酸含量显著下降。长时间处于缺氧状态下的动物体内乳酸水平先增高后下降[19],缺氧的初始期,葡萄糖的有氧氧化过程受到抑制、糖酵解过程却增强,并且形成大量的乳酸。当体内乳酸含量升高时,由于机体发生的应急调解作用,糖异生过程则加强,增加乳酸的消耗,因此,在缺氧的后期机体内乳酸的含量会下降。哮喘病异常黑胆质证大部分为重症,哮喘异常黑胆质证大鼠处在急性重复性缺氧状态下,这种长期的缺氧状态会导致体内乳酸含量的降低。脂肪代谢的加强也会引起体内乳酸含量的下降[20]。

谷氨酰胺含量与细胞膜的保护及免疫功能有关。免疫系统是机体主要的疾病防御系统,谷氨酰胺通过增加总淋巴细胞计数维持免疫系统的功能[21]。谷氨酰胺还可以保护细胞、组织免受自由基的伤害[22]。本研究中,临床患者和模型大鼠血浆谷氨酰胺含量均发生了上调,这可能与机体在应急状态下的调节机制有关。

临床患者血浆中的肌酸、肌酸酐和鲨肌醇等3种代谢物含量与健康志愿者比较明显降低,而两种模型组大鼠与健康组比较没有发生变化。但是,哮喘异常黑胆质证大鼠血浆中的肌酸酐含量明显低于异常黑胆质证模型大鼠。肌酸作为肝脏合成能量的重要底物可转变成磷酸肌酸来储存ATP高能磷酸键。肌酸、肌酸酐和鲨肌醇水平降低与脂肪的动员和肝脏代谢功能障碍有关[23]。病证结合大鼠血浆中的肌酸酐含量明显低于证组大鼠,说明,病证结合状态下模型大鼠处在能量消耗持续增加、能量代谢持续恶化的病理状态。

本研究中,氨基酸含量在动物模型和临床患者体内表现出相反的变化趋势,即缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸和丙氨酸等4种氨基酸在两种模型大鼠血浆中的含量比健康对照组明显升高,但是在哮喘异常黑胆质证患者血浆中这4种氨基酸含量与健康志愿者比较明显降低。支链氨基酸(BCAA)即亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸是保持骨骼肌蛋白质代谢的关键,其产生ATP的效率也高于其他氨基酸[24]。研究结果显示,哮喘异常黑胆质病证在发生、发展过程中会引起体重减轻[1,13]和能量代谢紊乱[25,26]等情况,这些变化通常发生在骨骼肌。模型大鼠处在一种应急状态下,即长期低温、强迫运动等,体能消耗巨大,而BCAA参与到机体能量代谢过程有利于持续耗能状态下的能量供应[27]。可见,突然和巨大的能量消耗导致骨骼肌蛋白分解,使血浆BCAA含量升高。但是,临床患者与模型动物比较,其体内能量代谢的改变是一个长期而漫长的过程,没有像模型大鼠一样发生剧烈的生存环境变化,因此,临床患者可能因为机体长期处在持续耗能状态导致BCAA的减少。

4 结论

采用基于NMR的代谢组学方法对哮喘异常黑胆质证患者与哮喘异常黑胆质证模型大鼠的血浆代谢物变化机制进行了比较分析。结果显示,虽然氨基酸含量的变化趋势在模型大鼠和临床患者体内有所不同,但是与脂代谢相关的各类代谢物的变化情况高度一致。氨基酸代谢的不一致可能与模型制作过程中环境的剧烈变化引起的。脂代谢相关的代谢物可作为临床患者和动物模型共同的异常黑胆质证代谢标志物。

参考文献(References)

[1] 买买提明·沙比尔. 维吾尔医学诊断学[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993.
Mamatimin Sabir. Diagnostics of Uyghur medicine[M]. Urumqi: Science and Technology Publishing Company in Xinjiang, 1993.

[2] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189.

[3] Carrola J, Rocha C M, Barros A S, et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of Urine[J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10(1): 221-230.

[4] Griffin J L, Atherton H J, Steinbeck C, et al. A Metadata description of the data in "A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human"[J]. BMC Research Notes, 2011(4): 272.

[5] Connor S C, Hansen M K, Corner A, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics data to aid biomarker discovery in type 2 diabetes [J]. Molecular Biosystems, 2010, 6(5): 909-921.

[6] Godoy M M, Lopes E P, Silva R O, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics[J]. Journal of Viral Hepatitis, 2010, 17(12): 854-858.

[7] Mamtimin B, Hizbulla M, Kurbantay N, et al. An magnetic resonance-based plasma metabonomic investigation on abnormal Savda in different complicated diseases[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 34(2): 166-172.

[8] 巴吐尔·买买提明, 徐卫芳, 李威, 等. 基于核磁共振分析支气管哮喘

患者中医肾虚痰瘀证与维医异常黑胆质证共性特征[J]. 科技导报, 2014, 32(16): 24-28.
Batur Mamtimin, Xu Weifang, Li Wei, et al. Comparative study of stasis-phlegm and abnormal Savda syndrome asthma patients based on NMR[J]. Science & Technology Review, 2014, 32(16): 24-28.

[9] Mamtimin B, Kedena, Kong B, et al. Plasma amino acid profiling of cancer patients with abnormal Savda based on high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 34(5): 560-565.

[10] 吴燕, 巴吐尔·买买提明, 李威, 等. 基于代谢组学分析研究支气管哮喘的维医"同病异证"性[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(11): 1441-1446.
Wu Yan, Batur Mamtimin, Li Wei, et al. Different syndromes in the same disease of bronchial asthma of Uygur medicine abnormal Savda syndrome based on metabonomics[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2014, 37(11): 1441-1446.

[11] 巴吐尔·买买提明, 哈木拉提·吾甫尔, 孔彬, 等. 肿瘤病维医不同证型与血浆脂肪酸含量的相关性研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(2): 376-380.
Batur Mamtimin, Halmurat Upur, Kong Bin, et al. Correlation study between cancer patients with different syndromes in Uyghur medicine and plasma fatty acid content[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2015, 30(2): 376-380.

[12] Jansson J, Willing B, Lucio M, et al. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease[J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6386.

[13] 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医学体液论及其现代研究[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 2003.
Halmurat Upur. Therapy of Mizaj and Hilit in Uyghur medicine and modern study[M]. Urumqi: Science and Technique Publishing Company in Xinjiang, 2003.

[14] Hooper L V, Gordon J I. Commensal host-bacterial relationships in the gut[J]. Science, 2001, 292(5519): 1115-1118.

[15] 钱元诚. 呼吸治疗的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 65-67.
Qian Yuancheng. Basic and clinical study of respiratory therapy[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2003: 65-67.

[16] Zurlo F, Larson K, Bogardus C, et al. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1990, 86: 1423-1427.

[17] McGarry J D, Mills S E, Long C S, et al. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat[J]. The Biochemical Journal, 1983, 214(1): 21-28.

[18] Saggerson E D, Carpenter C A. Carnitine palmitoyltransferase and carnitine octanoyltransferase activities in liver, kidney cortex, adipocyte, lactating mammary gland, skeletal muscle and heart[J]. FEBS Letters, 1981, 129: 229-232.

[19] 孙秀泓, 罗自强. 肺的非呼吸功能基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 167-169.
Sun Xiuhong, Luo Ziqiang. Non-respiratory function of lung basic and clinical[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2003: 167-169.

[20] 艾斯克尔·吐拉洪, 哈木拉提·吾甫尔, 豪富华, 等. 基于NMR的维吾尔医异常黑胆质型肿瘤患者血浆代谢组学分析[J]. 科技导报, 2009, 27(13): 27-31.
Aisikeer Turahun, Halmurat Upur, Hao FuHua, et al. Metabonomic studies on abnormal Savda syndrome patients with neoplasm using NMR spectroscopy[J]. Science & Technology Review, 2009, 27(13): 27-31.

[21] Wang Y, Cloarec O, Tang H, et al. Magic angle spinning NMR and $^{1}H-^{31}P$ heteronuclear statistical total correlation spectroscopy of intact human gut biopsies[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(4): 1058-1066.

[22] Jones D P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance[J]. Methods in Enzymology, 2002, 348: 93-112.

[23] Shariff M I, Ladep N G, Cox I J, et al. Characterization of urinary biomarkers of hepatocellular carcinoma using magnetic resonance spectroscopy in a Nigerian population[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(2): 1096-1103.

[24] Jet L L, Miller R H. Amino acid metabolism during exercise in trained rats: The potential role of carnitine in the metabolism of branched chain a acid[J]. Metabolism, 1987, 36: 748-752.

[25] Mamtimin B, Upur H, Hao F, et al. Plasma metabonomic analysis with ^{1}H nuclear magnetic resonance revealing the relationship of different tumors and the disease homology theory of traditional Uyghur medicine[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2011, 17(2): 111-115.

[26] Mamtimin B, Upur H, Hao F, et al. Correlative analysis of neoplasm patients with phlegm-stasis or abnormal Savda syndrome, based on metabonomics[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 32(1): 119-124.

[27] Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, et al. Suppression of glycogen consumption during acute exercise by dietary branched-chain amino acids in rats[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2000, 46(2): 71-74.

Metabonomic study of abnormal Savda rat model with asthma

MAMTIMIN Batur[1], KURBANTAY Nazuk[1], HIZBULLA Mawlanjan[2], YOU Li[3], UPUR Halmurat[2]

1. Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. College of Traditional Uyghur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract In order to standardize the syndrome of traditional Uyghur medicine, abnormal Savda rat model with asthma is selected as study subject and metabolic changes are investigated in animal model and clinical patient to reveal the similarity and difference between them. Sprague Dawley (SD) rats are subjected to abnormal Savda-producing conditions, followed by induction of asthma. Clinical patients of abnormal Savda with asthma are also selected as study subjects. Serum samples are collected from each test group and analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR). Spectral profiles are analyzed by multivariate analysis using orthogonal projection to latent structure with discriminant analysis (OPLS-DA). Results show that compared with healthy controls, leucine, isoleucine, valine, alanine, lipid related metabolites like VLDL, and unsaturated lipids concentration in plasma of patients are decreased, but acetic acid, acetone, acetoacetate and carnitine are significantly increased; glutamate in patients also shows a significant increase while creatine, creatinine, scyllo-inositol and lactate are significantly reduced. For animal models, the change in concentration of lipid related metabolites and lactate, carnitine and glutamine is consistent with the clinical patient, but the amino acid displays an opposite trend. Alanine and creatinine concentrations are higher in plasma of abnormal Savda rat model compared to abnormal Savda with asthma rat model. It is concluded that although the amino acid metabolism in rat model is different from that in clinical patient , their changes of lipid related metabolites contents are highly consistent. Fat related metabolites may be considered biomarkers of abnormal Savda.

Keywords traditional Uyghur medicine; abnormal Savda; asthma; animal model

（责任编辑　吴晓丽）