

1. 一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,包括以下步骤:

(1) 复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型作为病证组,同时选择自发性高血压大鼠作为模型组,选择正常组作为对照;

(2) 实验动物干预,根据人与动物间体表面积折算的等效剂量,给予高血压病肝阳上亢证治疗药物;

(3) 检测大鼠指标,包括大鼠血压测量、大鼠痛阈测定、大鼠旋转时间测定、大鼠面温测量、大鼠饮水量测量;

(4) 血清样本的收集;

(5) 大鼠血清Ang II、DA、NE、E、5-HT的检测;

(6) 大鼠血清代谢组学分析;

(7) 选取数据,纳入下述高血压病肝阳上亢证大鼠PLS回归模型进行检验,PLS二维得分图中病证组和模型组分离,则建立的高血压病肝阳上亢证大鼠模型成功,否则不成功;

$$Y = -0.030X_{28} - 0.037X_{23} - 0.032X_2 + 0.027X_{12} - 0.025X_{27} - 0.040X_{24} + 0.038X_{11} + 0.020X_{56} + 0.020X_{46} + 0.020X_{48} + 0.020X_{57} + 0.018X_{58} + 0.020X_{55} + 0.018X_{52} + 0.018X_{50} + 0.032X_{15} + 0.017X_{49} + 0.021X_{14} - 0.024X_{26} + 0.024X_{59} + 0.029X_{13} + 0.014X_{47} + 0.016X_{54} - 0.025X_{29} - 0.043X_6 + 0.014X_{51} - 0.030X_1 - 0.024X_{36} - 0.031X_7 + 0.041X_{17} + 0.017X_{53} + 0.009X_{45} + 0.008X_{44}$$

其中,X₁是干预前收缩压数据,X₂是干预第1周收缩压数据,X₆是干预前舒张压数据,X₇是干预第1周舒张压数据,X₁₁是干预前痛阈数据,X₁₂是干预第1周痛阈数据,X₁₃是干预第2周痛阈数据,X₁₄是干预第3周痛阈数据,X₁₅是干预第4周痛阈数据,X₁₇是干预第1周旋转时间数据,X₂₃是干预第2周面温数据,X₂₄是干预第3周面温数据,X₂₆是干预前饮水量数据,X₂₇是干预第1周饮水量数据,X₂₈是干预第2周饮水量数据,X₂₉是干预第3周饮水量数据,X₃₆是Phenylethylamine峰强度,X₄₄是TG(18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/20:0)[iso6]峰强度,X₄₅是Ceramide(d18:1/12:0)峰强度,X₄₆是Testosterone峰强度,X₄₇是Androsterone峰强度,X₄₈是Dihydrotestosterone峰强度,X₄₉是8(R)-Hydroperoxylinoleic acid峰强度,X₅₀是Tetrahydrodeoxycorticosterone峰强度,X₅₁是PE(16:0/15:0)峰强度,X₅₂是SM(d18:0/16:1(9Z))峰强度,X₅₃是Chenodeoxycholic acid峰强度,X₅₄是PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/,22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))峰强度,X₅₅是Lactosylceramide(d18:1/18:0)峰强度,X₅₆是Glucosylceramide(d18:1/26:0)峰强度,X₅₇是3-O-Sulfogalactosylceramide,(d18:1/26:1(17Z))峰强度,X₅₈是Ceramide(d18:1/25:0)峰强度,X₅₉是9,10-DHOME峰强度。

2. 根据权利要求1所述的一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,其特征在于:步骤(1)所述的复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型方法为,采用每天灌服附子药液方法复制高血压病肝阳上亢证模型。

3. 根据权利要求2所述的一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,其特征在于:步骤(1)所述的复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型方法为,每天灌服附子药液20mL·kg⁻¹的方法复制高血压病肝阳上亢证模型,连续给药6周。

4. 根据权利要求1所述的一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,其特征在于:步骤(2)所述的实验动物干预是,根据人与动物间体表面积折算的等效剂量,计算给予钩藤、天麻或石决明。

5. 根据权利要求4所述的一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,其特征在于:每日给予钩藤 $2.29\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,给予天麻 $1.15\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,或每日给予石决明 $2.29\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

6. 根据权利要求4所述的一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,其特征在于:给予钩藤、天麻或石决明每天定时给药,每周给药6d,连续给药4周,根据体重调整给药量。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,其特征在于:该方法在高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别中的应用。

8. 根据权利要求1-6中任一项所述的一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,其特征在于:该方法在高血压病肝阳上亢证中药复方的方-证相关效应物质基础和作用机理研究中的应用。

一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,本发明涉及一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法及其应用,该方法用于评价高血压病肝阳上亢证大鼠模型。

背景技术

[0002] 病证结合动物模型,是指在中医药理论指导下,适当结合现代医学理论与实验动物科学知识,分别或同时采用传统中医学病因复制证候动物模型和现代医学病因复制疾病动物模型,令动物模型既能体现疾病的病理特征,又能系统动态地反映此特定阶段所出现的证候特征。高血压病肝阳上亢证是高血压病常见证候类型,具有特征性的发病机制和证候表征组合,因此在研究高血压病肝阳上亢证时,选用既具有高血压病的病理特点又能体现肝阳上亢证阶段性特征的病证结合动物模型,将有助于深入探讨高血压病肝阳上亢证的特点与本质,同时也有助于对治疗高血压病肝阳上亢证相关中药方剂的作用机制进行研究。

[0003] 为复制高血压病肝阳上亢证动物模型,鄢东红[鄢东红,等.湖南中医学院学报,1999,19(4):35-38.]等人采用自发性高血压大鼠加灌附子汤的方法,一方面大鼠血压稳定升高,另一方面出现了近似人类肝阳上亢证的表现,如易激惹、饮水多、旋转时间缩短及痛阈降低等。同时应用平肝潜阳的“潜阳方”进行反证,发现上述诸证均有改善。此方法利用附子的“久用必耗伤精血,致肝肾阴虚,阴不潜阳而肝阳偏亢”的药性特点制造的肝阳上亢证,操作简单,重复性好,在动物实验中得到了广泛应用。

[0004] 目前,对高血压病肝阳上亢证的判定多从以下几个途径进行:模型动物的宏观体征、行为表现,与证候相关的理化指标,以及从中药药物的反证进行推测。目前采集模型动物的四诊表征判定动物证候属性,是较为常用的方法之一。依据高血压病肝阳上亢证临床表现与造模后动物的体征、行为一一对照,进行等效转换,常以检测旋转时间的长短评价是否出现眩晕;检测痛阈值的高低变化评价是否出现头疼;观察易激惹程度的变化评价是否存在烦躁易怒;观察饮水量的多少变化评价是否出现口干的症状;检测面部温度的高低变化评价是否存在面部烘热的表现。在高血压病肝阳上亢证动物模型评价研究时,还常参照临床报道的与高血压病肝阳上亢证表现相关的生化指标进行评价,如儿茶酚胺一类可以反映体内外周交感-肾上腺髓质系统兴奋性的指标。此外,在动物模型建立过程中常选用临床上常用并且疗效确切的治疗该证型的经典复方,通过比较方药对某些具有代表性指标的影响以确定建立的动物模型是否属于该证型。因此,为证实高血压病肝阳上亢证模型的成立,常常选用临床上具有代表的方剂,观察其对高血压病肝阳上亢证有关的异常指标的影响,从而说明模型建立的正确性与可靠性。

[0005] 但当前的评价方法存在诸多弊端。首先,高血压病肝阳上亢证是体内系统病理变化的结果,尽管部分生理生化指标能够一定程度反映证候的特点,但具有相当大的片面性,并且没有特异性检测指标。采用几个理化指标简单叠加以阐释肝阳上亢证,这种对应层面的不一致性决定了难以对证候进行客观化描述。其次,反证高血压病肝阳上亢证动物模型

时,应谨慎选取确有其效而又机理明确的方剂才能以此为依据来观察方剂作用模型后的效应,判断所建立的动物模型是否具有高血压病肝阳上亢证的性质,而目前临床上选用的反证方剂多是临床上的经验方,并未深入研究其药理机制。另外,回顾以往应用“以方测证”的方法时,通常只设立了正常组、高血压病肝阳上亢证组即模型组以及测证方剂组,往往缺乏对照组,然而没有对照组就不能简单的将方剂取得的功效判定为该证候的属性。此外,在进行高血压病肝阳上亢证动物模型评价时多关注动物宏观体征与生化指标的改善,对于机体内物质的扰动却关注较少,然而对高血压病肝阳上亢证模型大鼠的内在变化进行整体层面的阐述,探明高血压病肝阳上亢证发生发展过程中所产生的特殊物质群,对模型的评价具有重要意义。

发明内容

[0006] 为解决现有技术上的不足,本发明提供一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法。

[0007] 本发明的目的是提供一种判别指标全面,并且包含高血压病肝阳上亢证发生发展过程中所产生的特殊物质群的判别方法。

[0008] 本发明的技术方案如下:

本发明提供了一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,包括以下步骤:

(1)复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型作为病证组,同时选择自发性高血压大鼠作为模型组,选择正常组作为对照;

(2)实验动物干预,根据人与动物间体表面积折算的等效剂量,给予高血压病肝阳上亢证治疗药物;

(3)检测大鼠指标,包括大鼠血压测量、大鼠痛阈测定、大鼠旋转时间测定、大鼠面温测量、大鼠饮水量测量;

(4)血清样本的收集;

(5)大鼠血清Ang II、DA、NE、E、5-HT的检测;

(6)大鼠血清代谢组学分析;

(7)选取数据,纳入下述高血压病肝阳上亢证大鼠PLS回归模型进行检验,PLS二维得分图中病证组和模型组分离,则建立的高血压病肝阳上亢证大鼠模型成功,否则不成功;

$$Y = -0.030X_{28} - 0.037X_{23} - 0.032X_2 + 0.027X_{12} - 0.025X_{27} - 0.040X_{24} + 0.038X_{11} + 0.020X_{56} + 0.020X_{46} + 0.020X_{48} + 0.020X_{57} + 0.018X_{58} + 0.020X_{55} + 0.018X_{52} + 0.018X_{50} + 0.032X_{15} + 0.017X_{49} + 0.021X_{14} - 0.024X_{26} + 0.024X_{59} + 0.029X_{13} + 0.014X_{47} + 0.016X_{54} - 0.025X_{29} - 0.043X_6 + 0.014X_{51} - 0.030X_1 - 0.024X_{36} - 0.031X_7 + 0.041X_{17} + 0.017X_{53} + 0.009X_{45} + 0.008X_{44}$$

其中,X₁是干预前收缩压数据,X₂是干预第1周收缩压数据,X₆是干预前舒张压数据,X₇是干预第1周舒张压数据,X₁₁是干预前痛阈数据,X₁₂是干预第1周痛阈数据,X₁₃是干预第2周痛阈数据,X₁₄是干预第3周痛阈数据,X₁₅是干预第4周痛阈数据,X₁₇是干预第1周旋转时间数据,X₂₃是干预第2周面温数据,X₂₄是干预第3周面温数据,X₂₆是干预前饮水量数据,X₂₇是干预第1周饮水量数据,X₂₈是干预第2周饮水量数据,X₂₉是干预第3周饮水量数据,X₃₆是Phenylethylamine峰强度,X₄₄是TG(18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/20:0)[iso6]峰强度,X₄₅是Ceramide(d18:1/12:0)峰强度,X₄₆是Testosterone峰强度,X₄₇是

Androsterone峰强度, X48是Dihydrotestosterone峰强度, X49是8(R)-Hydroperoxylinoleic acid峰强度, X50是Tetrahydrocorticosterone峰强度, X51是PE(16:0/15:0)峰强度, X52是SM(d18:0/16:1(9Z))峰强度, X53是Chenodeoxycholic acid峰强度, X54是PC(18:4(6Z, 9Z, 12Z, 15Z)/, 22:6(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z))峰强度, X55是Lactosylceramide(d18:1/18:0)峰强度, X56是Glucosylceramide(d18:1/26:0)峰强度, X57是3-O-Sulfogalactosylceramide, (d18:1/26:1(17Z))峰强度, X58是Ceramide(d18:1/25:0)峰强度, X59是9,10-DHOME峰强度。

[0009] 优选的, 步骤(1)所述的复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型方法为, 采用每天灌服附子药液方法复制高血压病肝阳上亢证模型。

[0010] 更优选的, 步骤(1)所述的复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型方法为, 每天灌服附子药液 $20\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的方法复制高血压病肝阳上亢证模型, 连续给药6周。

[0011] 优选的, 步骤(2)所述的实验动物干预是, 根据人与动物间体表面积折算的等效剂量, 计算给予钩藤、天麻或石决明。

[0012] 更优选的, 每日给予钩藤 $2.29\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给予天麻 $1.15\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 或每日给予石决明 $2.29\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

[0013] 优选的, 给予钩藤、天麻或石决明每天定时给药, 每周给药6d, 连续给药4周, 根据体重调整给药量。

[0014] 该方法在高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别中的应用。

[0015] 该方法在高血压病肝阳上亢证中药复方的方-证相关效应物质基础和作用机理研究中的应用。

[0016] 本发明的有益效果是:

首先, 本方法选用生理生化指标全面, 并且特异性。

[0017] 其次, 本方法设立高血压病肝阳上亢证组即模型组和病证组, 对照观察指标。

[0018] 再次, 本方法不仅关注动物宏观体征与生化指标的改善, 还关注高血压病肝阳上亢证发生发展过程中所产生的特殊物质群。

[0019] 最后, 本方法可应用于高血压病肝阳上亢证中药复方的方-证相关效应物质基础和作用机理研究。

附图说明

[0020] 图1是PCA二维得分图(A、B为N-M正负离子模式, C、D为N-DS正负离子模式, E、F为M-DS正负离子模式)。

[0021] 图2是PLS-DA二维得分图(A、B为N-M正负离子模式, C、D为N-DS正负离子模式, E、F为M-DS正负离子模式)。

[0022] 图3是OPLS-DA二维得分图(A、B为N-M正负离子模式, C、D为N-DS正负离子模式, E、F为M-DS正负离子模式)。

[0023] 图4是N-M、N-DS以及M-DS数据矩阵韦恩图。

[0024] 图5是各组高血压潜在生物标志物的变化比较(注: 与模型组比 $\circ P < 0.05$, 与病证组比 $\bullet P < 0.05$)。

[0025] 图6是各组肝阳上亢证潜在生物标志物的变化比较(注: 与病证组比 $*P < 0.05$ 。 \bullet PC

为PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)))。

[0026] 图7是潜在生物标志物对高血压病肝阳上亢证大鼠ROC分析结果。

[0027] 图8 是SVM分类评估图。

[0028] 图9 是高血压病肝阳上亢证大鼠VIP直方图。

[0029] 图10 是PLS二维得分图。

具体实施方式

[0030] 实施例1 判别方法的构建

一、实验材料

(一)实验动物

SPF级8周龄雄性SHR(自发性高血压大鼠(spontaneouslyhypertensiverat,SHR))56只,体重 186.35 ± 8.15 g,SPF级8周龄雄性WKY 7只,体重 190.15 ± 6.37 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司(SCXK(京):2012-0001)。SHR随机分为病证组(DS Group)、病证钩藤组(DSGT Group)、病证天麻组(DSTM Group)、病证石决明组(DSSJM Group)、模型组(M Group)、模型钩藤组(MGT Group)、模型天麻组(MTM Group)、模型石决明组(MSJM Group),WKY作为正常组(Normal Group,N Group)。每组7只。

[0031] (二)实验药物

附子、钩藤、天麻、石决明药材按照《中华人民共和国药典》(2015年版)规格,一次性购自亳州市沪谯药业有限公司,并鉴定为正品(由山东中医药大学药学院徐凌川教授鉴定)。

[0032] ①附子灌胃液的标准化制备:附子药材加入8倍量水,浸泡30min,水浴加热提取1h,过滤,残渣加6倍量水再提取1h,先用四层纱布过滤后,再抽滤,合并两次提取液,混合后浓缩为含生药 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的附子灌胃液, -20°C 保存备用。

[0033] ②钩藤灌胃液的标准化制备:钩藤以75%乙醇8倍量回流提取2次,每次2h,合并提取液,60减压回收,得浓缩为含生药 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液,置于 -20°C 保存。

[0034] ③天麻灌胃液的标准化制备:天麻浸泡0.5 h,10倍量水回流提取2次,每次1 h,合并提取液,60℃减压回收,得浓缩为含生药 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液,置于 -20°C 保存。

[0035] ④石决明灌胃液的标准化制备:石决明浸泡0.5 h,10倍量水回流提取2次,每次1 h,60℃减压回收,得浓缩为含生药 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液,置于 -20°C 保存。

[0036] (三)实验试剂

Ang II试剂盒(批号:10614R)、DA试剂盒(批号:10871R)、NE试剂盒(批号:10953R)、E试剂盒(批号:10105R)、5-HT试剂盒(批号:10801R),购自美国R&DSYSTEMS公司;乙腈、甲醇(色谱级),购自美国Merck公司;甲酸(色谱纯),购自Fisher公司;超纯水,购于中国屈臣氏有限公司。

[0037] (四)实验仪器

大小鼠无创血压仪BP-98A(北京软隆技术有限公司),ZXC-A型大鼠压痛仪(山东省医学科学院设备站),手持式红外测温仪(GM550),BB5060UV型CO₂培养箱(德国Heraeus公司),Elx50型洗板机(美国BioTek公司),Multiskan G0全波长酶标仪(美国Thermo Scientific公司),UltiMate 3000超高效液相色谱仪(美国Thermo公司),Q Exactive™ hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer(美国Thermo Scientific公司),微量移液器

(芬兰Dragon公司),高速台式离心机(美国Thermo Scientific公司),Vortex-Genie 2涡旋震荡器(美国SI公司)。

[0038] 二、实验方法

(一)高血压病肝阳上亢证大鼠模型的复制方法

大鼠适应性饲养1周后,参照文献方法[鄢东红,等.湖南中医学院学报,1999,19(4):35-38;熊新贵.长沙:湘雅医院,2009.],DS Group、DSGT Group、DSTM Group、DSSJM Group大鼠按照每天灌服附子药液 $20\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的方法复制高血压病肝阳上亢证模型,连续给药6周,同时正常组与模型组大鼠给予等量的蒸馏水。

[0039] (二)实验动物干预方法

高血压病肝阳上亢证大鼠模型复制后,根据人与动物间体表面积折算的等效剂量,计算各组给药量。MGT Group与DSGT Group每日给予钩藤 $2.29\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,MTM Group与DSTM Group每日给予天麻 $1.15\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,MSJM Group与DSSJM Group每日给予石决明 $2.29\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,其余组给予等量蒸馏水。每天定时给药,每周给药6d,连续给药4周,根据体重调整给药量。

[0040] (三)大鼠指标检测

①大鼠血压测量:采用无创套尾法检测大鼠安静状态下尾动脉血压。每只大鼠连续测量3次,取平均值作为应测血压值,每周检测一次。

[0041] ②大鼠痛阈测定:采用大鼠压痛测量仪测定安静状态下大鼠疼痛阈值。每周进行一次测定。

[0042] ③大鼠旋转时间测定:采用自制旋转测量仪器测定大鼠旋转时间。每周进行一次测定。

[0043] ④大鼠面温测量:采用红外测温仪,测量安静状态下大鼠面部温度。每周进行一次测量。

[0044] ⑤大鼠饮水量测量:于早9点每笼供饮用水300mL,24h后测量剩余饮水量,差值加灌胃量即为当日每笼总饮水量,除以每笼大鼠只数为当日每只大鼠饮水量。每周连续测量三天,取平均值作为当周每日饮水量。

[0045] (四)血清样本的收集

末次给药后,所有大鼠禁食不禁水12h,大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 $0.3\text{mL}\cdot100\text{g}^{-1}$ 麻醉,下腔静脉取血,注入不抗凝试管中,静置30min, $3500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,取上清液。将血清分为两部分,一部分用于ELISA试剂盒检测,另一部分用于代谢组学分析,分别置于 -80°C 冰箱保存。

[0046] (五)大鼠血清Ang II、DA、NE、E、5-HT的检测

采用酶联免疫吸附法对大鼠血清Ang II、DA、NE、E、5-HT的含量进行检测,严格按照试剂盒说明书进行操作。

[0047] (六)大鼠血清代谢组学分析

A、样本制备

取备用血清室温解冻,摇匀,精密吸取血清 $100\mu\text{L}$,加入预冷甲醇 $300\mu\text{L}$,涡旋1min后以 $12000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,吸取上清液,经 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤于液相小瓶中, -20°C 保存备用

B、色谱条件

液相色谱为UltiMate 3000超高效液相色谱仪(UPLC,Thermo Scientific),色谱柱规格为T Halo-C18柱(2.1mm×100 mm,2.7 μ m)。流速为0.30 mL·min⁻¹,柱温保持在45℃,进样器温度为15℃,进样量5 μ L。流动相A为水(含0.05%甲酸),B为乙腈(含0.05%甲酸),梯度洗脱:0~1 min,2%~2% B;1~3 min,2%~20% B;3~4 min,20%~20% B;4~7 min,20%~40% B;7~9 min,40%~70% B;9~15 min,70%~98% B。每次进样前以初始流动相平衡3 min。

[0048] C、质谱条件

质谱为Thermo Scientific公司的四级杆-静电场轨道阱超高分辨质谱仪(Q Exactive™ hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer),采用正负离子模式进行检测。正离子模式检测条件为:HESI离子源,鞘气45arb,辅助气10arb,裂解电压3.5KV,源内温度300℃,S-Lens RF Level为55,质谱采集范围 80-1000 m/z,分辨率为70000。负离子模式检测条件为:HESI离子源,鞘气40arb,辅助气10arb,裂解电压2.8KV,源内温度320℃,S-Lens RF Level为55,质谱采集范围 80-1000 m/z,分辨率为70000。在正负离子检测模式分析后,对目标代谢物进行分析,获得相关代谢物的MS/MS谱。碰撞能量分别为30eV、45eV、60 eV或-30eV、-45eV、-60 eV。

[0049] D、数据质量控制

同时将所有血清样本各取10 μ L等量混合,制备成包含所有生物信息的QC。QC包含了所有样品信息,因此最具有代表性,通过分析检测序列中插入QC的主成分分析结果,可以检测从样品前处理到样品检测过程中方法的稳定性和重复性。在大批量检测序列运行之前连续运行5次QC,使系统稳定,之后在样品检测序列中每间隔10针插入1次空白清洗和QC分析。

[0050] (七)数据处理

A、统计学处理

采用SPSS22.0统计软件进行分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组宏观体征相关数据以及血压测量数据采用重复测量方差分析(analysis of variance of repeated measures data),酶免数据采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。若总体上存在差异,则需进一步进行组间多重比较。

[0051] B、代谢组学数据处理

将正负离子的原始谱图数据.Raw格式文件,利用ProteoWizard软件转换为.mzXML格式,之后采用R语言进行峰识别、峰对齐、峰校正和RT校正,逐一考察优化每个参数设置,最终获得包括质荷比(m/z)、RT及其峰面积的二维数据矩阵。之后将对齐后的数据导入MetaboAnalys 3.0软件进行多变量分析。采用PCA、PLS-DA以及OPLS-DA对数据进行分析,采用基于OPLS-DA产生的S-plot结合VIP值进行标志物的筛选,并通过VIP-plot控制标志物的质量。通过 Fold Change分析以及t-test进一步筛选变量,保留表达差异2倍以上且 $P < 0.05$ 的变量,回归原始数据核对后将剩余变量作为显著表达差异的变量,即潜在生物标志物。

[0052] 由于大部分的内源性小分子代谢物的结构类型、元素组成等信息未知,因而对这些生物标志物的鉴定难度较大。本研究根据生物标志物的精确分子量在HMDB(<http://www.hmdb.ca>)、METLIN(<https://metlin.scripps.edu>)、KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)等数据库中进行检索,并利用Mass Frontier 7.0以及相关文献对MS/MS谱进行解析。

[0053] 三、实验结果

(一)外观性情观察

干预期间,正常组大鼠被毛均匀细密,双目灵活,红亮有神,唇鼻色淡红湿润,笼内较安静,抓取时无明显反抗,反应较灵敏,正常饮食水,大便性状正常。模型组大鼠与病证组大鼠毛色逐渐失去光泽,甚者出现被毛发黄干燥,颈部出现竖毛,尾巴出现中度角化现象,病证组大鼠同笼互相打斗现象明显,抓取时反抗激烈攻击观察者,模型组大鼠在抓取时虽未攻击观察者但有尖叫、惊跳现象。经药物干预后的各组大鼠则随干预时间的延长,性情逐渐温顺,同笼打斗现象逐渐减少。

[0054] (二)干预前后血压变化结果

A、收缩压变化结果

各组大鼠干预前后收缩压变化见表1。不同干预时间之间大鼠收缩压存在显著差异($F=296.04, P<0.001$),各药物干预组不同时间点收缩压具有显著差异性($P<0.001$)。各组之间收缩压也存在显著性差异($F=3076.16, P<0.001$)。各组收缩压与干预时间点之间存在交互作用($F=29.57, P<0.001$)。

[0055] 进一步分析单独效应,结果显示,与模型组相比,给予钩藤、天麻的SHR在干预第1周即出现收缩压下降($P<0.05$),随着干预时间的延长各给药组降压效果逐渐加强,以模型钩藤组干预效果最好。与病证组相比,给予钩藤、天麻与石决明的高血压病肝阳上亢证大鼠在第2周开始呈现降压效应($P<0.05$),至干预第4周收缩压降至最低,与病证组比较均具有显著差异($P<0.001$),并以钩藤干预效果最好。与干预前相比,各给药组收缩压均下降明显($P<0.001$)。结果表明钩藤、天麻、石决明均具有降低收缩压的作用,以钩藤最佳,天麻次之。

[0056] 表1 各组大鼠不同时间点收缩压结果($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预1周	干预2周	干预3周	干预4周	Sum	F	P
N	130.04±3.99	128.57±3.19	131.62±5.09	129.57±1.51	130.57±2.84	129.99±0.38	0.64	0.641
M	196.21±2.43	194.19±4.06	198.05±1.76	196.48±1.50	198.52±2.83	196.59±0.33	2.83	0.082
MGT	197.46±2.34	189.90±2.76 ^{◆▲}	179.10±2.66 ^{◇○}	175.86±3.60 ^{◇○}	170.81±1.41 ^{◇○}	182.55±0.58	139.46	0.000
MTM	196.67±2.76	190.67±3.02 ^{◆▲}	185.14±1.80 ^{◇○}	180.86±2.42 ^{◇○}	176.33±2.24 ^{◇○}	186.06±0.43	84.14	0.000
MSJM	196.71±1.71	192.33±1.84 ^{◆▲}	190.38±1.46 ^{◇○}	187.43±2.21 ^{◇○}	184.48±1.92 ^{◇○}	190.24±0.35	45.59	0.000
DS	207.83±4.48	206.62±1.46	207.86±1.88	207.33±2.46	208.48±3.10	207.57±0.49	0.36	0.741
DSGT	208.00±2.30	197.14±2.38 [◇]	188.00±1.91 ^{◇○}	183.24±1.88 ^{◇○}	178.05±1.96 ^{◇○}	191.01±0.21	231.31	0.000
DSTM	208.25±1.97	197.19±1.17 [◇]	192.90±1.65 ^{◇○}	187.10±1.60 ^{◇○}	184.10±2.56 ^{◇○}	193.82±0.37	221.03	0.000
DSSJM	207.21±2.22	203.52±2.43	200.24±1.45 ^{◇○}	195.48±2.53 ^{◇○}	189.38±2.32 ^{◇○}	199.15±0.39	66.96	0.000
Sum	194.16±23.75	188.90±22.29	185.92±21.11	182.59±21.02	180.08±20.90	186.33±0.13	296.04 [*]	0.000 [*]
F	563.77	553.82	574.52	652.13	577.13	3076.16 [*]		($F=29.57, P=0.000$) [#]
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 [*]		

注:*主效应的F统计量和P值,#交互效应的F统计量和P值;与模型组比,◆ $P<0.05$,◇ $P<0.001$;与病证组比,○ $P<0.001$ (单因素方差分析);与干预前比较,▲ $P<0.05$,△ $P<0.001$ (单因素重复测量方差分析)。

[0057] B、舒张压变化结果

各组大鼠干预前后舒张压变化见表2。不同干预时间之间大鼠舒张压存在显著差异 ($F=65.07, P<0.001$), 各药物干预组不同时间点舒张压具有差异性 ($P<0.05$)。各组之间舒张压也存在显著性差异 ($F=380.79, P<0.001$)。各组舒张压与干预时间点之间存在交互作用 ($F=5.20, P<0.001$)。

[0058] 进一步分析单独效应, 结果显示, 与模型组相比, 给予钩藤、天麻与石决明的SHR在干预第2周时舒张压下降 ($P<0.05$), 随着干预时间的延长降压效果逐渐加强, 至干预第4周后与模型组相比具有显著差异性 ($P<0.001$)。与病证组相比, 给予钩藤、天麻的高血压病肝阳上亢证大鼠在干预第1周后舒张压即出现降低 ($P<0.05$), 至干预第4周后各干预组与病证组相比舒张压显著降低 ($P<0.001$)。与干预前相比, 随着干预时间的延长至干预第4周, 各药物干预组舒张压持续下降, 与干预前比较均具有显著差异性 ($P<0.001$)。结果表明钩藤、天麻、石决明均具有降低舒张压的作用, 以钩藤最佳, 石决明次之, 但石决明在干预期间对舒张压的调节作用有波动。

[0059] 表2 各组大鼠不同时间点舒张压结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预1周	干预2周	干预3周	干预4周	Sum	F	P
N	92.33±6.08	91.76±7.47	93.29±7.91	87.90±7.70	89.10±6.18	90.91±1.53	0.84	0.615
M	154.58±5.88	142.57±6.76 [▲]	162.43±5.92 [▲]	148.29±4.87	160.62±6.51	153.62	12.50	0.000
MGT	152.58±8.13	139.38±2.18 [▲]	144.95±3.11 [◇]	136.14±6.58 [▲]	133.10±2.42 [◇]	141.11±0.93	13.43	0.000
MTM	160.46±7.01	144.57±5.32 [▲]	150.62±6.56 [▲]	141.57±8.67 [▲]	143.52±8.85 [◇]	147.95±0.86	6.00	0.007
MSJM	157.33±4.70	143.19±3.01 [◇]	151.90±10.22 [*]	150.48±3.63	136.71±3.37 [◇]	148.00±1.11	15.64	0.000
DS	168.54±10.49	155.00±4.92 [▲]	164.24±5.37	156.38±6.18 [▲]	168.24±8.66	162.72±1.22	5.57	0.016
DSGT	167.71±5.73	144.57±4.02 [◇]	149.62±2.95 [◇]	139.95±3.98 [◇]	145.29±3.56 [◇]	149.54±0.86	54.06	0.000
DSTM	168.46±5.22	146.52±3.98 [◇]	157.10±8.92 [▲]	144.52±8.23 [▲]	149.81±4.21 [◇]	153.41±0.70	14.57	0.000
DSSJM	165.83±6.53	150.67±4.36 [◇]	161.62±7.65	157.38±2.37 [▲]	143.33±6.13 [◇]	155.53±1.31	21.27	0.000
Sum	154.18±23.78	139.80±18.26	148.42±21.63	140.29±20.69	141.08±21.99	144.75±0.36	65.07 [*]	0.000 [*]
F	82.28	99.54	67.38	80.56	98.99	380.79 [*]		($F=5.20, P=0.000$) [#]
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 [*]		

注: *主效应的 F 统计量和 P 值, #交互效应的 F 统计量和 P 值; 与模型组比[◇] $P<0.05$, $P<0.001$; 与病证组比, [●] $P<0.05$, [○] $P<0.001$ (单因素方差分析); 与干预前比较, [▲] $P<0.05$, [△] $P<0.001$ (单因素重复测量方差分析)。

[0060] (三) 干预前后痛阈变化结果

各组大鼠干预前后痛阈变化见表3。不同干预时间之间大鼠痛阈存在显著差异 ($F=18.50, P<0.001$), 其中病证钩藤组、病证天麻组与病证石决明组不同时间点痛阈具有差异性 ($P<0.05$)。各组之间痛阈也存在显著性差异 ($F=156.28, P<0.001$)。各组痛阈与干预时间点之间存在交互作用 ($F=3.49, P<0.001$)。

[0061] 进一步分析单独效应, 结果显示, 在整个干预期间除干预第4周模型钩藤组痛阈值的升高较模型组具有显著差异 ($P<0.05$), 其余时间点给予钩藤、天麻与石决明后SHR的痛阈虽出现升高的趋势但无统计学意义 ($P>0.05$)。与病证组相比, 给予钩藤、天麻与石决明3周后痛阈值出现升高 ($P<0.05$), 至干预第4周后与病证组相比具有显著差异性 ($P<$

0.001)。与干预前相比,SHR经干预后仅以模型钩藤组在干预第4周痛阈升高较干预前比有统计学意义($P<0.05$);而病证钩藤组、病证天麻组与病证石决明组痛阈值随着干预时间的延长持续升高,至干预第4周与干预前比较均具有显著差异性($P<0.001$)。结果表明钩藤、天麻、石决明可以提高高血压病肝阳上亢证大鼠的痛阈,钩藤与石决明效果相当。

[0062] 表3 各组大鼠不同时间点痛阈结果($\bar{x}\pm s$)

组别	干预前	干预1周	干预2周	干预3周	干预4周	Sum	F	P
N	501.50±19.89	495.50±5.81	485.50±28.63	498.50±28.63	480.50±39.67	492.30±3.99	0.80	0.498
M	429.00±14.80	438.00±10.95	436.50±40.62	435.00±27.26	433.00±8.66	434.30±3.56	0.15	0.866
MGT	436.00±14.14	426.00±90.40	442.00±35.94	452.50±29.22	460.50±20.83 [▲]	443.40±5.95	0.529	0.57
MTM	415.50±27.52	419.00±33.45	427.50±38.44	429.00±51.53	437.00±35.37	425.60±6.04	0.34	0.741
MSJM	417.75±31.42	426.00±36.33	428.50±36.41	434.50±15.48	442.50±20.68	429.85±3.86	0.64	0.590
DS	315.50±29.08	292.00±12.65	318.50±33.46	297.00±24.80	314.00±31.18	307.40±6.04	1.66	0.22
DSGT	308.00±13.57	316.00±18.33	357.00±32.36 [▲]	394.00±22.09 [△]	442.00±26.23 [△]	363.40±4.57	43.39	0.000
DSTM	310.00±20.40	334.5±9.79 [▲]	343.00±50.55	348.50±12.07 [▲]	382.50±18.43 [△]	343.70±4.34	6.65	0.001
DSSJM	305.50±18.32	319.00±17.64	347.00±12.12 [▲]	361.00±36.87 [▲]	415.50±12.56 [△]	349.60±3.92	29.05	0.000
Sum	382.08±72.84	385.11±76.19	398.39±65.28	405.56±65.33	423.06±53.33	398.84±1.60	18.50 [*]	0.000 [*]
F	77.53	26.90	18.25	31.24	25.72	156.28 [*]	(F=3.49,	
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 [*]	P=0.000) [#]	

注:*主效应的F统计量和P值,#交互效应的F统计量和P值;与模型组比,[◆] $P<0.05$;与病证组比,[●] $P<0.05$,[○] $P<0.001$ (单因素方差分析);与干预前比较,[▲] $P<0.05$,[△] $P<0.001$ (单因素重复测量方差分析)。

[0063] (四) 干预前后旋转时间变化结果

各组大鼠干预前后旋转时间变化见表4。不同干预时间之间大鼠旋转时间存在显著差异($F=10.95$, $P<0.001$),各组之间旋转时间的改善也存在显著性差异($F=48.56$, $P<0.001$)。各组旋转时间与不同干预时间点之间不存在交互作用($F=1.03$, $P=0.433$)。

[0064] 进步一分析单独效应,结果显示,与模型组相比,给予天麻、石决明干预4周后SHR出现旋转时间延长($P<0.05$),其余干预时间点与模型组相比旋转时间的延长无统计学意义($P>0.05$)。与病证组相比,给予钩藤、天麻、石决明2周后高血压病肝阳上亢证大鼠的旋转时间均出现延长($P<0.05$),至干预第4周后与病证组相比旋转时间的延长具有显著差异性($P<0.001$)。与干预前相比,干预4周后模型天麻组与模型石决明组旋转时间的延长较干预前比较有统计学意义($P<0.05$),但模型钩藤组在整个干预期间的旋转时间变化与干预前均无明显差异($P>0.05$);病证钩藤组、病证天麻组与病证石决明组经药物干预后旋转时间逐渐延长,至干预第4周,各组旋转时间与干预前比较均具有显著差异($P<0.001$)。结果表明钩藤、天麻、石决明对高血压病肝阳上亢证大鼠的旋转时间的干预作用优于SHR,但三者之间效果无显著差异。

[0065] 表4 各组大鼠不同时间点旋转时间结果($\bar{x}\pm s$)

组别	干预前	干预1周	干预2周	干预3周	干预4周	Sum	F	P
N	109.38±12.58	104.38±11.60	101.75±9.77	100.00±9.35	102.63±10.21	103.63±1.93	0.95	0.437
M	67.00±12.71	69.63±8.53	64.50±11.41	68.88±12.03	70.38±12.52	68.08±1.77	0.33	0.802
MGT	66.00±17.68	70.38±16.06	74.13±12.28	76.50±5.35	79.63±7.01	73.32±2.67	1.76	0.20
MTM	65.38±6.50	72.50±13.75	75.25±13.04	79.63±10.49 [▲]	81.75±10.29 ^{◆▲}	74.90±1.57	2.56	0.084
MSJM	66.00±17.68	71.38±16.19	76.00±15.27	81.00±11.59	83.50±5.07 ^{◆▲}	75.58±2.99	2.65	0.078
DS	50.25±13.78	51.88±9.95	51.63±8.65	50.88±9.57	51.38±15.98	51.20±1.38	0.02	0.991
DSGT	52.75±10.19	61.88±23.27	67.88±13.44 [●]	70.50±10.41 ^{◆▲}	72.50±5.93 ^{◆▲}	65.10±1.78	2.42	0.121
DSTM	51.58±11.38	65.00±5.10 [▲]	69.00±7.71 ^{◆▲}	74.13±10.40 [◆]	76.38±5.97 ^{◆▲}	67.18±1.35	10.94	0.000
DSSJM	52.75±18.07	64.88±9.08	70.50±10.41 [◆]	72.00±22.90 [◆]	74.13±10.97 ^{◆▲}	66.85±2.00	2.36	0.122
Sum	64.54±21.74	70.21±18.67	72.29±16.67	74.83±16.78	76.92±15.87	71.76±0.67	10.95 [*]	0.000 [*]
F	13.87	8.84	10.59	8.98	14.77	48.56 [*]	(F=1.14,	
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 [*]	P=0.289) [*]	

注：^{*}主效应的 F 统计量和 P 值，[#]交互效应的 F 统计量和 P 值；与模型组比，[◆] $P < 0.05$ ，[◇] $P < 0.001$ ；与病证组比，[●] $P < 0.05$ ，[○] $P < 0.001$ （单因素方差分析）；与干预前比较，[▲] $P < 0.05$ ，[△] $P < 0.001$ （单因素重复测量方差分析）。

[0066] (五) 干预前后面温变化结果

各组大鼠干预前后面温变化见表5。不同干预时间之间大鼠面温存在显著差异 ($F = 25.29, P < 0.001$)，各组之间面温也存在显著性差异 ($F = 23.91, P < 0.001$)。各组痛阈与干预时间点之间存在交互作用 ($F = 1.58, P = 0.029$)。

[0067] 进一步分析单独效应，结果显示，与模型组相比，经钩藤、天麻、石决明干预后，除钩藤干预第3周与第4周以及石决明干预第3周出现明显改善外 ($P < 0.05$)，其余时间点药物干预后面温的变化与模型组比较未见差异性 ($P > 0.05$)。与病证组相比，给予钩藤、天麻、石决明1周后高血压病肝阳上亢证大鼠的面温即出现降低 ($P < 0.05$)，至干预第4周后降至最低 ($P < 0.05$)。与干预前相比，模型钩藤组、模型天麻组以及模型石决明组在干预4周后面温的下降较干预前比较具有统计学意义 ($P < 0.05$)。病证石决明组在干预1周后即出现面温的降低 ($P < 0.05$)，病证钩藤组与病证天麻组在干预2周后出现降低 ($P < 0.05$)，至干预第4周与干预前比较均具有显著差异 ($P < 0.001$)。结果表明钩藤、天麻、石决明可降低高血压病肝阳上亢证大鼠的面温，三者效果相当。

[0068] 表5 各组大鼠不同时间面温结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预1周	干预2周	干预3周	干预4周	Sum	F	P
N	27.61±0.49	27.74±0.66	26.45±0.78 [▲]	26.69±1.07 [▲]	27.68±1.15	27.23±0.14	4.07	0.10
M	27.71±1.09	27.64±1.76	26.95±0.73	27.57±0.64	27.25±0.59	27.43±0.14	0.69	0.609
MGT	28.06±0.80	27.65±0.60	26.38±0.69 [▲]	25.75±2.60 [◆]	25.39±1.24 ^{◆▲}	26.65±0.18	5.16	0.027
MTM	28.11±0.79	27.88±1.17	27.14±2.18	26.56±2.23	26.18±2.59 [▲]	27.17±0.29	1.47	0.24
MSJM	27.95±0.85	27.48±0.69	26.66±3.11	26.06±1.81 [◆]	25.59±1.73 [▲]	26.75±0.35	2.46	0.068
DS	29.71±2.54	30.65±0.42	29.49±0.64	29.80±0.65	30.08±0.86	29.87±0.18	0.90	0.476
DSGT	29.93±0.38	29.50±0.92 [◆]	28.73±0.99 [▲]	27.53±1.06 ^{◆▲}	26.41±1.19 ^{○▲}	28.42±0.16	19.05	0.000
DSTM	30.03±0.99	29.25±0.60 [◆]	28.23±1.47 [▲]	27.85±0.65 ^{◆▲}	27.00±3.19 ^{◆▲}	28.47±0.25	3.85	0.013
DSSJM	30.33±1.26	29.40±1.04 ^{◆▲}	28.56±1.13 [▲]	27.30±0.65 ^{◆▲}	26.75±1.53 ^{○▲}	28.47±0.20	13.64	0.000
Sum	28.83±1.55	28.58±1.41	27.62±1.80	27.24±1.78	26.92±2.12	27.84±0.07	25.29 [*]	0.000 [*]
F	7.35	11.44	4.53	5.47	5.09	23.91 [*]	(F=1.58,	
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 [*]	P=0.029) [#]	

注：*主效应的 F 统计量和 P 值，[#]交互效应的 F 统计量和 P 值；与模型组比，[◆] $P < 0.05$ ；与病证组比，[●] $P < 0.05$ ，[○] $P < 0.001$ （单因素方差分析）；与干预前比较，[▲] $P < 0.05$ ，[△] $P < 0.001$ （单因素重复测量方差分析）。

[0069] (六) 饮水量变化结果

各组大鼠干预前后饮水量变化见表6。不同干预时间之间大鼠饮水量存在显著差异 ($F=4.73, P=0.007$)，各组之间的饮水量也存在显著性差异 ($F=4.14, P=0.010$)。各组饮水量变化与干预时间点之间不存在交互作用 ($F=1.22, P=0.26$)。

[0070] 进一步分析单独效应，结果显示，与模型组相比，经钩藤、天麻、石决明干预4周后饮水量有所减少 ($P < 0.05$)。与病证组相比，给予天麻、石决明2周后高血压病肝阳上亢证大鼠的饮水量均有不同程度的减少 ($P < 0.05$)。与干预前相比，模型钩藤组、模型天麻组以及模型石决明组在干预各个时间点的饮水量变化未见明显差异 ($P > 0.05$)；而高血压病肝阳上亢证大鼠经钩藤、石决明干预4周后饮水量较干预前具有差异性 ($P < 0.05$)。结果表明钩藤、天麻、石决明对高血压病肝阳上亢证大鼠的饮水量有改善作用，三者作用相当。

[0071] 表6 各组大鼠不同时间饮水量结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预 1 周	干预 2 周	干预 3 周	干预 4 周	Sum	F	P
N	29.54±4.51	30.54±1.13	31.46±3.00	31.04±1.70	31.38±6.02	30.79±1.50	0.21	0.762
M	32.70±4.68	34.41±2.90	34.88±5.95	35.04±4.91	36.13±3.71	34.63±1.78	0.33	0.657
MGT	34.33±2.34	32.71±2.86	31.61±2.75	29.70±1.33	27.07±3.36 [◆]	31.01±0.14	0.76	0.543
MTM	34.63±4.21	32.88±3.33	31.96±6.99	29.81±3.23	28.71±3.54 [◆]	31.60±1.39	0.94	0.459
MSJM	34.63±4.21	32.33±2.96	31.13±3.44	28.74±2.57	27.74±2.92 [◆]	30.21±0.88	1.43	0.351
DS	40.67±3.19	40.08±5.32	41.13±4.80	41.50±7.95	41.88±1.94	40.98±0.23	0.48	0.613
DSGT	41.58±5.83	39.67±2.46	36.75±4.42	33.79±2.91 [●]	30.33±5.95 ^{◆▲}	36.43±2.30	10.10	0.31
DSTM	40.00±4.24	38.25±0.89	33.13±4.42 [●]	34.25±2.55 [●]	31.04±1.70 [●]	35.62±1.85	14.36	0.16
DSSJM	40.33±5.05	38.75±3.36	36.75±4.42 [●]	33.96±5.44 ^{◆▲}	31.52±5.09 ^{◆▲}	35.78±2.50	1.06	0.491
Sum	35.66±5.97	35.04±4.28	33.58±4.21	33.06±5.47	31.73±5.43	34.12±0.57	4.73 [*]	0.007 [*]
F	3.57	3.86	1.69	2.69	2.92	4.14 [*]	(F=1.22,	
P	0.012	0.010	0.172	0.039	0.030	0.010 [*]	P=0.26) [#]	

注：*主效应的 F 统计量和 P 值，[#]交互效应的 F 统计量和 P 值；与模型组比，[◆] $P < 0.05$ ；与病证组比，[●] $P < 0.05$ (单因素方差分析)；与干预前比较，[▲] $P < 0.05$ ，[△] $P < 0.001$ (单因素重复测量方差分析)。

[0072] (七) 酶免结果

各组大鼠干预前后酶免变化见表7。与模型组相比，钩藤干预后SHR血清中Ang II含量降低 ($P < 0.05$)；天麻干预后降低了SHR血清中DA的含量 ($P < 0.05$)，但钩藤、天麻、石决明对SHR血清中E、NE、5-HT的调整与模型组无显著差异性 ($P > 0.05$)。与病证组比，经钩藤与石决明干预后，除了对高血压病肝阳上亢证大鼠血清中DA水平有下调趋势但无显著差异外 ($P > 0.05$)，对Ang II、E、NE以及5-HT均有改善作用 ($P < 0.05$)；天麻则可以调整高血压病肝阳上亢证大鼠血清中Ang II、E、DA、5-HT的含量 ($P < 0.05$)。结果表明，钩藤、天麻与石决明均可以回调高血压病肝阳上亢证大鼠血清中Ang II、E、5-HT的含量，三种药物不同程度的减少了高血压病肝阳上亢证大鼠体内CA类物质的含量，改善了交感-肾上腺髓质功能。

[0073] 表7 各组大鼠Ang II、E、NE、DA、5-HT结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ang II (ng/mL)	E (ng/mL)	NE (nmol/mL)	DA (ng/mL)	5-HT (ng/mL)
N	168.70±14.32	105.07±9.63	5.77±1.14	150.42±16.69	16.24±2.87
M	210.81±35.03	118.01±14.58	7.72±1.05	189.34±12.54	14.67±1.71
MGT	162.55±39.12 [◆]	110.63±13.29	6.78±0.55	177.40±14.99	12.60±3.17
MTM	181.05±33.36	104.66±13.41	7.32±1.59	160.79±18.54 [◆]	13.57±2.65
MSJM	179.21±20.01	102.27±10.56	6.87±0.55	171.41±16.17	12.45±1.87
DS	241.68±38.25	138.44±37.88	8.48±0.62	200.07±23.28	8.01±3.17
DSGT	176.49±30.87 [◇]	118.03±15.75 [◆]	6.69±1.01 [◆]	184.70±28.73	10.91±3.65 [◆]
DSTM	187.64±34.22 [◆]	110.76±16.54 [◆]	7.55±0.74	175.67±23.35 [◆]	12.66±1.31 [◆]
DSSJM	184.55±33.73 [◆]	110.26±12.00 [◆]	6.52±1.33 [◆]	180.23±24.80	11.23±2.63 [◆]
<i>F</i>	4.02	2.64	4.22	3.65	5.42
<i>P</i>	0.001	0.016	0.001	0.002	0.000

注:与模型组比,◆ $P < 0.05$,◇ $P < 0.001$;与病证组比,● $P < 0.05$,○ $P < 0.001$ 。

[0074] 综上,经钩藤、天麻、石决明干预后,SHR与高血压病肝阳上亢证大鼠的血压均出现降低,提示血压指标可为高血压与高血压病肝阳上亢证共性指标。而经钩藤、天麻、石决明对大鼠的痛阈、旋转时间、面温、饮水量以及易激惹程度等宏观指标的改善情况分析,则以高血压病肝阳上亢证大鼠的改善较为明显,故将宏观体征指标作为高血压病肝阳上亢证的指标。因钩藤、天麻、石决明干预后,SHR与高血压病肝阳上亢证大鼠在Ang II、E、NE、DA与5-HT生化指标的改善状况上,一方面反映了三者降低血压的药效,另一方面又体现出其改善交感-肾上腺髓质功能的作用,因此将生化指标作为高血压病肝阳上亢证的指标。

[0075] (八) 高血压病肝阳上亢证代谢标志物数据库构建

由于原始数据分组较多,不同大鼠模型与不同干预药物之间相互影响,难以筛选核心代谢标志物。因此,为分析正常大鼠与SHR之间、正常大鼠与高血压病肝阳上亢证大鼠之间以及SHR与高血压病肝阳上亢证大鼠之间的代谢产物的差异,区分高血压代谢标志物与高血压病肝阳上亢证代谢标志物,本研究对正负离子模式下原始的九组数据矩阵进行了拆分,分别对正负离子模式下的正常-模型(N-M)数据矩阵、正常-病证(N-DS)数据矩阵、模型-病证(M-DS)数据矩阵进行多变量统计分析以及差异代谢物的筛选,具体研究如下。

[0076] A、多变量统计分析

将正负离子模式下N-M、N-DS、M-DS数据矩阵分别导入MetaboAnalyst3.0中,经数据过滤、归一化(Normalization by sum)和标准化(Pareto scaling)处理后,对满足正态性的数据进行分析。

[0077] 首先应用PCA对六个数据矩阵进行分析,结果如图1所示,无论是正离子模式还是负离子模式下,正常组与模型组明显分开,正常组与病证组明显分开,说明两种大鼠模型与正常大鼠代谢模式存在明显差异;同时模型组与病证组分离良好,提示高血压病肝阳上亢证大鼠与SHR代谢轮廓不同。进一步采用有监督的PLS-DA对六个数据矩阵进行分析,结果如图2所示,六个数据矩阵在基于正负离子两种模式下所建立的PLS-DA二维得分图均实现了

完全分离。VIP的大小反映了变量对分类的重要程度，VIP>1的变量是潜在差异变量筛选的依据之一，因此本研究同时提取PLS-DA模型中VIP>1的变量。为获得更大程度的区分内源性代谢产物的差异，我们采用OPLS-DA方法继续对各数据矩阵进行分析，如图3所示，基于OPLS-DA模式清晰的反应了正常大鼠与SHR、正常大鼠与高血压病肝阳上亢证大鼠以及SHR与高血压病肝阳上亢证大鼠的不同代谢轮廓。所建模式具有较好的解释能力与预测能力，模式识别可靠有效。

[0078] B、差异代谢物筛选

通过上述对正常组、模型组、病证组的正确分类，表明大鼠血清中确实存在可以区分高血压和高血压病肝阳上亢证的潜在标志物，然而要确定潜在标志物需要对差异代谢进行仔细筛查提取。本研究首先使用基于OPLS-DA产生的S-Plot进行差异变量的筛选，具有较高的 p 和 $p(\text{corr})$ 值的变量是对OPLS-DA模型贡献最大的变量。之后对S-Plot筛选出的变量的VIP值进行筛查，由于VIP>1的变量是对结合模型有贡献的变量，因此排除VIP<1的变量。同时通过VIP-Plot排除没有可靠置信区间的变量。对剩余差异变量采用Fold Change与 t -test相结合的方法，筛选表达相差2倍以上并且 $P<0.05$ 的变量为显著差异性变量。最后回归原始数据进行验证，提取筛选出的差异代谢物的正负离子模式下色谱峰来验证结果的准确性，剔除不可靠的代谢物，最终剩余变量为存在明显表达差异的变量，作为潜在标志物进行后续分析。

[0079] C、代谢物数据集构建

通过对数据矩阵中的变量进行上述筛选，纳入的最终变量中，N-M数据矩阵差异变量代表了正常大鼠与SHR之间的差异代谢物，与高血压病密切相关；N-DS数据矩阵差异变量代表了正常大鼠与高血压病肝阳上亢证大鼠之间的差异代谢物，与高血压病肝阳上亢证密切相关；而M-DS数据矩阵差异变量代表了SHR与高血压病肝阳上亢证大鼠之间的差异代谢物，与肝阳上亢证密切相关。但各个差异代谢物之间存在交叉重叠(见图4)，因此需要对差异代谢物进行合并同类型。提取三个数据矩阵差异变量之间交叉的46个变量作为高血压病肝阳上亢证代谢物数据集；对N-DS与M-DS数据矩阵中剩余的差异变量进行剔除合并，最终剩余53个差异变量作为肝阳上亢证代谢物数据集。

[0080] 由前期对药物干预后的大鼠代谢特征进行分析可知，SHR与高血压病肝阳上亢证大鼠经钩藤、天麻、石决明干预后，体内的代谢轮廓均发生不同程度的变化，表明药物对SHR和高血压病肝阳上亢证大鼠均有干预作用，在降血压的同时调整肝阳上亢证的病理状态。因此，我们通过对药物干预后的高血压病肝阳上亢证代谢数据集和肝阳上亢证代谢物数据集进行比对，筛查出经三种药物干预后变化一致并趋于正常的代谢标志物，将高血压病肝阳上亢证代谢数据集中钩藤、天麻、石决明共同干预调整的标志物作为降血压潜在生物标志物数据集；将肝阳上亢证代谢数据集中钩藤、天麻、石决明共同干预调整的标志物作为平肝潜阳潜在生物标志物数据集。

[0081] (九)潜在生物标志物鉴定

本研究中我们对潜在代谢标记物标志物进行二级质谱(MS/MS)实验，一部分代谢标志物是利用Mass Frontier 7.0对获得的二级质谱图进行解析并与代谢组学数据库中的结构进行比对来确定的，一部分代谢标志物过代谢组学数据库信息、文献报道和结构解析来确定。最终我们确定出了14个降血压潜在生物标记物(表8)与23个平肝潜阳潜在生物标记物

(表9),钩藤、天麻、石决明对SHR以及高血压病肝阳上亢证大鼠降血压潜在生物标志物数据集中的潜在代谢标记物干预情况见图5,钩藤、天麻、石决明对高血压病肝阳上亢证大鼠平肝潜阳潜在生物标志物数据集中的潜在代谢标记物干预情况见图6。

[0082] 表8 降血压潜在标志物

NO.	RT (min)	Exact mass	ion mode	KEGG	identified metabolites	Formula	Pathway
1	0.71	240.1222	+	C01262	Anserine	$C_{10}H_{16}N_4O_3$	Histidine metabolism
2	3.62	121.0891	+	C05332	Phenylethylamine	$C_8H_{11}N$	Phenylalanine metabolism
3	3.85	179.0582	+	C01586	Hippuric acid	$C_9H_9NO_3$	Phenylalanine metabolism
4	9.44	276.2089	+	C16300	Stearidonic acid	$C_{18}H_{28}O_2$	α -Linolenic acid metabolism
5	9.81	837.7058	+	C01190	Glucosylceramide (d18:1/26:1(17Z))	$C_{50}H_{95}NO_8$	Sphingolipid metabolism
6	9.81	256.2402	+	C00249	Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	Fatty acid metabolism
7	10.22	567.3325	+	C04230	LysoPC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	$C_{30}H_{50}NO_7P$	Glycerophospholipid metabolism
8	10.26	519.3325	+	C04230	LysoPC(18:2(9Z,12Z))	$C_{30}H_{50}NO_7P$	Glycerophospholipid metabolism
9	10.36	569.3481	+	C04230	LysoPC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	$C_{30}H_{50}NO_7P$	Glycerophospholipid metabolism
10	0.92	147.0532	-	C00025	L-Glutamic acid	$C_5H_9NO_4$	Arginine and proline metabolism
11	0.92	192.0270	-	C00158	Citric acid	$C_6H_8O_7$	Citrate cycle (TCA cycle)
12	1.06	118.0266	-	C00042	Succinic acid	$C_4H_6O_4$	Citrate cycle (TCA cycle)
13	1.19	104.0473	-	C05984	2-Hydroxybutyric acid	$C_4H_8O_3$	Propanoate metabolism
14	8.76	352.2250	-	C00584	Prostaglandin E2	$C_{20}H_{32}O_5$	Arachidonic acid metabolism

表9 平肝潜阳潜在标志物

NO.	RT (min)	Exact mass	ion mode	KEGG	identified metabolites	Formula	Pathway
1	3.93	648.4730	+	C00416	PA(16:0/16:0)	C ₃₅ H ₆₉ O ₃ P	Glycerophospholipid metabolism
2	4.45	224.1412	+	C11512	Methyl jasmonate	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	α -Linolenic acid metabolism
3	10.26	523.3638	+	C04230	LysoPC(18:0)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	Glycerophospholipid metabolism
4	12.38	825.5309	+	C00157	PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	C ₄₈ H ₇₆ NO ₈ P	Glycerophospholipid metabolism
5	12.56	677.4996	+	C00350	PE(16:0/15:0)	C ₃₆ H ₇₂ NO ₈ P	Glycerophospholipid metabolism
6	13.09	281.2719	+	C19670	Oleamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	Fatty acid metabolism
7	13.51	290.2245	+	C03917	Dihydrotestosterone	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	Steroid hormone biosynthesis
8	13.67	288.2089	+	C00535	Testosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	Steroid hormone biosynthesis
9	13.79	917.6626	+	C06125	3-O-Sulfogalactosylceramide (d18:1/26:1(17Z))	C ₅₀ H ₉₅ NO ₁₁ S	Sphingolipid metabolism
10	13.84	889.6490	+	C01290	Lactosylceramide (d18:1/18:0)	C ₄₈ H ₉₁ NO ₁₃	Sphingolipid metabolism
11	13.99	839.7214	+	C01190	Glucosylceramide (d18:1/26:0)	C ₅₀ H ₉₇ NO ₈	Sphingolipid metabolism
12	14.15	392.2927	+	C02528	Chenodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	Primary bile acid biosynthesis

13	14.20	702.5675	+	C00550	SM(d18:0/16:1 (9Z))	$C_{39}H_{79}N_2$ O_6P	Sphingolipid metabolism
14	14.21	663.6529	+	C00195	Ceramide (d18:1/25:0)	$C_{43}H_{85}NO$ 3	Sphingolipid metabolism
15	14.26	334.2508	+	C13713	Tetrahydrodeox ycorticosterone	$C_{21}H_{34}O_3$	Steroid hormone biosynthesis
16	14.32	312.2301	+	C14831	8(R)-Hydroper oxylinoleic acid	$C_{18}H_{32}O_4$	Linoleic acid metabolism
17	14.37	290.2245	+	C00523	Androsterone	$C_{19}H_{30}O_2$	Steroid hormone biosynthesis
18	14.46	481.4495	+	C00195	Ceramide (d18:1/12:0)	$C_{30}H_{59}NO$ 3	Sphingolipid metabolism
19	14.49	912.8146	+	C00422	TG(18:1(9Z)/1 8:2(9Z,12Z)/20 :0)[iso6]	$C_{59}H_{108}O_6$	Glycerophospholi pid metabolism
20	8.36	416.3290	-	C01673	Calcitriol	$C_{27}H_{44}O_3$	Steroid biosynthesis
21	8.93	430.3083	-	C17337	7 alpha -Hydroxy -3 -oxo-4-choleste noate	$C_{27}H_{44}O_2$	Primary bile acid biosynthesis
22	9.78	314.2457	-	C14828	9,10-DHOME	$C_{18}H_{34}O_4$	Linoleic acid metabolism
23	9.95	430.3083	-	C05455	7a-Hydroxy-ch olestene-3-one	$C_{27}H_{44}O_2$	Primary bile acid biosynthesis

至此,我们得到了能体现降血压效应的潜在生物标志物与体现平肝潜阳效应的潜在生物标志物,这些标志物即为高血压病肝阳上亢证与肝阳上亢证的潜在生物标志物。由于高血压病肝阳上亢证潜在生物标志物中存在即能够体现高血压病的因子也存在能够体现肝阳上亢证的因子,故将两部分生物标志物合并为高血压病肝阳上亢证潜在生物标志物数据集,共包含37个潜在生物标记物。

[0083] 为进一步对37个潜在生物标志物判别高血压病肝阳上亢证大鼠模型的能力进行评价,采用ROC曲线进行评估,以曲线下面积(AUC)的大小反映标志物诊断的准确度。一般而

言,AUC值越大,标志物临床诊断准确性越高。表10展示了37个潜在生物标志物的AUC值、灵敏度和特异度。发现其中有27个潜在生物标志物AUC达到0.8以上,并且在最近临界点处有较理想的灵敏度与特异度。

[0084] 表10 高血压病肝阳上亢证潜在标志物ROC曲线分析结果

identified metabolites	AUC	Sensitivity	Specificity
Phenylethylamine	1.000	100%	100%
LysoPC(18:2(9Z,12Z))	1.000	100%	100%
Succinic acid	1.000	100%	100%
Citric acid	1.000	100%	100%
PA(16:0/16:0)	1.000	100%	100%
TG(18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/20:0)[iso6]	1.000	100%	100%
Ceramide (d18:1/12:0)	1.000	100%	100%
Testosterone	1.000	100%	100%
Androsterone	1.000	100%	100%

Dihydrotestosterone	1.000	100%	100%
8(R)-Hydroperoxylinoleic acid	1.000	100%	100%
Tetrahydrodeoxycorticosterone	1.000	100%	100%
SM(d18:0/16:1(9Z))	1.000	100%	100%
Chenodeoxycholic acid	1.000	100%	100%
PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.000	100%	100%
Lactosylceramide (d18:1/18:0)	1.000	100%	100%
Glucosylceramide (d18:1/26:0)	1.000	100%	100%
3-O-Sulfogalactosylceramide	1.000	100%	100%
Ceramide (d18:1/25:0)	1.000	100%	100%
9,10-DHOME	1.000	100%	100%
PE(16:0/15:0)	1.000	100%	85.7%
Prostaglandin E2	0.918	85.7%	71.4%
Hippuric acid	0.959	85.7%	100%
L-Glutamic acid	0.878	85.7%	100%
7a-Hydroxy-cholestene-3-one	0.878	85.7%	85.7%
7 α -Hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate	0.878	85.7%	85.7%
Calcitriol	0.878	85.7%	85.7%
Stearidonic acid	0.776	85.7%	71.4%
Anserine	0.735	71.4%	100%
LysoPC(18:0)	0.735	100%	71.4%
Palmitic acid	0.714	71.4%	71.4%
Glucosylceramide (d18:1/26:1(17Z))	0.714	57.1%	100%
LysoPC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	0.714	85.7%	71.4%
2-Hydroxybutyric acid	0.674	85.7%	42.9%
LysoPC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.612	85.7%	57.1%
Methyl jasmonate	0.612	100%	28.6%
Oleamide	0.571	57.1%	85.7%

在此基础上,采用支持向量机(Support Vector Machine,SVM)对拟合的ROC曲线进程评估,以进一步验证潜在生物标志物对高血压病肝阳上亢证大鼠模型的评价能力。由于若直接通过AUC值选取标志物,则所纳入的标志物是特定数据的最佳生物标志物,从而增加了过拟合的风险,导致评价结果过于乐观,因此对标志物进行了筛选。根据文献知识对27个标

志物进行预判,选取PA(16:0/16:0)、TG(18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/20:0)[iso6]、Ceramide(d18:1/12:0)、Testosterone、Androsterone、Dihydrotestosterone、8(R)-Hydroperoxylinoleic acid、Tetrahydrodeoxycorticosterone、PE(16:0/15:0)、SM(d18:0/16:1(9Z))、Chenodeoxycholic acid、PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))、Lactosylceramide(d18:1/18:0)、Glucosylceramide(d18:1/26:0)、3-O-Sulfogalactosylceramide(d18:1/26:1(17Z))、Ceramide(d18:1/25:0)、9,10-DHOME、7 α -Hydroxy-cholestene-3-one、Calcidiol、7 α -Hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate、Calcitriol共21个生物标志物进行组合。由于本次研究纳入的样本量较少,为了产生平滑的ROC曲线,进行100次交叉验证,以结果的平均值产生ROC曲线。结果如图7所示,当21个生物标志组合在一起时,其AUC为1.00。进一步通过SVM用来进行分类评估,由图8可知所选取的21个潜在生物标志物可准确将SHR与高血压病肝阳上亢证大鼠区分,两者完全分离未出现交叉。

[0085] 综上,通过对高血压病肝阳上亢证潜在生物标志物数据集进行ROC曲线分析,最终确定27个潜在生物标志物作为评价高血压肝阳上证大鼠模型的核心标志物。

[0086] (十) 高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别系统构建

通过上述实验,我们多层次的采集了高血压病肝阳上亢证大鼠模型的宏观表征、血液生化学以及代谢组学的特征数据,并从中提取了核心判别因子,在此基础上以将所有数据导入SIMCA-P软件构建PLS模型,以建立宏观与微观相结合的高血压病肝阳上亢证大鼠模型的判别系统。

[0087] 首先对变量进行标识,由于易激惹指标为计数资料,其他指标为计量资料,为避免对模型构建造成影响故未纳入,其他所有指标变量标识见表11。

[0088] 表11 高血压病肝阳上亢证模型指标变量标识表

变量标识	变量	变量标识	变量
X ₁	干预前收缩压数据	X ₃₂	E 含量
X ₂	干预第 1 周收缩压数据	X ₃₃	NE 含量
X ₃	干预第 2 周收缩压数据	X ₃₄	DA 含量
X ₄	干预第 3 周收缩压数据	X ₃₅	5-HT 含量
X ₅	干预第 4 周收缩压数据	X ₃₆	Phenylethylamine 峰强度
X ₆	干预前舒张压数据	X ₃₇	Hippuric acid 峰强度
X ₇	干预第 1 周舒张压数据	X ₃₈	LysoPC(18:2(9Z,12Z)) 峰强度
X ₈	干预第 2 周舒张压数据	X ₃₉	Succinic acid 峰强度

X ₉	干预第 3 周舒张压数据	X ₄₀	L-Glutamic acid 峰强度
X ₁₀	干预第 4 周舒张压数据	X ₄₁	Citric acid 峰强度
X ₁₁	干预前痛阈数据	X ₄₂	Prostaglandin E2 峰强度
X ₁₂	干预第 1 周痛阈数据	X ₄₃	PA(16:0/16:0) 峰强度
X ₁₃	干预第 2 周痛阈数据	X ₄₄	TG(18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/20:0)[iso6] 峰强度
X ₁₄	干预第 3 周痛阈数据	X ₄₅	Ceramide (d18:1/12:0) 峰强度
X ₁₅	干预第 4 周痛阈数据	X ₄₆	Testosterone 峰强度
X ₁₆	干预前旋转时间数据	X ₄₇	Androsterone 峰强度
X ₁₇	干预第 1 周旋转时间数据	X ₄₈	Dihydrotestosterone 峰强度
X ₁₈	干预第 2 周旋转时间数据	X ₄₉	8(R)-Hydroperoxylinoleic acid 峰强度
X ₁₉	干预第 3 周旋转时间数据	X ₅₀	Tetrahydrocorticosterone 峰强度
X ₂₀	干预第 4 周旋转时间数据	X ₅₁	PE(16:0/15:0) 峰强度
X ₂₁	干预前面温数据	X ₅₂	SM(d18:0/16:1(9Z)) 峰强度
X ₂₂	干预第 1 周面温数据	X ₅₃	Chenodeoxycholic acid 峰强度
X ₂₃	干预第 2 周面温数据	X ₅₄	PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) 峰强度
X ₂₄	干预第 3 周面温数据	X ₅₅	Lactosylceramide (d18:1/18:0) 峰强度
X ₂₅	干预第 4 周面温数据	X ₅₆	Glucosylceramide (d18:1/26:0) 峰强度
X ₂₆	干预前饮水量数据	X ₅₇	3-O-Sulfogalactosylceramide (d18:1/26:1(17Z)) 峰强度
X ₂₇	干预第 1 周饮水量数据	X ₅₈	Ceramide (d18:1/25:0) 峰强度
X ₂₈	干预第 2 周饮水量数据	X ₅₉	9,10-DHOME 峰强度
X ₂₉	干预第 3 周饮水量数据	X ₆₀	7a-Hydroxy-cholestene-3-one 峰强度

X ₃₀	干预第 4 周饮水量数据	X ₆₁	7 α -Hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate 峰强度
X ₃₁	Ang II 含量	X ₆₂	Calcitriol 峰强度

采用VIP >1 且具有95%置信区间的变量(见图9)所对应的回归系数建立高血压病肝阳上亢证PLS 回归模型(系数保留小数点后三位): $Y=-0.030X_{28}-0.037X_{23}-0.032X_{2}+0.027X_{12}-0.025X_{27}-0.040X_{24}+0.038X_{11}+0.020X_{56}+0.020X_{46}+0.020X_{48}+0.020X_{57}+0.018X_{58}+0.020X_{55}+0.018X_{52}+0.018X_{50}+0.032X_{15}+0.017X_{49}+0.021X_{14}-0.024X_{26}+0.024X_{59}+0.029X_{13}+0.014X_{47}+0.016X_{54}-0.025X_{29}-0.043X_6+0.014X_{51}-0.030X_{1}-0.024X_{36}-0.031X_7+0.041X_{17}+0.017X_{53}+0.009X_{45}+0.008X_{44}$ 。

[0089] 综上,本课题组将中医传统四诊诊疗观念与现代科学技术相结合,多层次的采集大鼠的宏观体征表现、血液生化指标,代谢组学数据,通过对数据的整合分析,得出高血压病肝阳上亢证大鼠模型的判别系统,确定出高血压病肝阳上亢证大鼠模型以血压较高同时伴有痛阈、旋转时间、饮水量与面温指标的明显变化为宏观特征,以体内神经酰胺、睾酮、雄激素、二氢睾酮、四氢脱氧皮质酮、鹅去氧胆酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、鞘磷脂等在内的27个潜在生物标志物异常扰动为微观特征,并借助PLS分析方法初步构建了高血压病肝阳上亢证大鼠模型的判别系统。该高血压病肝阳上亢证大鼠模型的判别系统既具有高血压病的病理特点又能体现肝阳上亢证的特征,借助该判别系统将有助于深入探讨治疗高血压病肝阳上亢证中药复方的方-证相关效应物质基础和作用机理。

[0090] 实施例2 判别方法的验证

为了检验所构建的模型对未知样本的预测能力,本研究在建模时引入了7个独立样本作为测试集,分别为来自随机选取的1个病证组样本和6个药物干预组样本,从而保证了所构建模型预测能力的客观性。结果见图10,可见模型组与病证组明显分开,表明SHR与高血压病肝阳上亢证大鼠的病理情况不同。PLS模型 R^2Y 为99.0%, Q^2 为97.9%,表明模型有较好的预测能力且预测准确率较高。同时可以观察到,测试集的1个病证样本准确的落在病证组区域,而6个药物干预组与病证组相互分离,单独分布,反应了所构建模型对未知样本的准确预测。

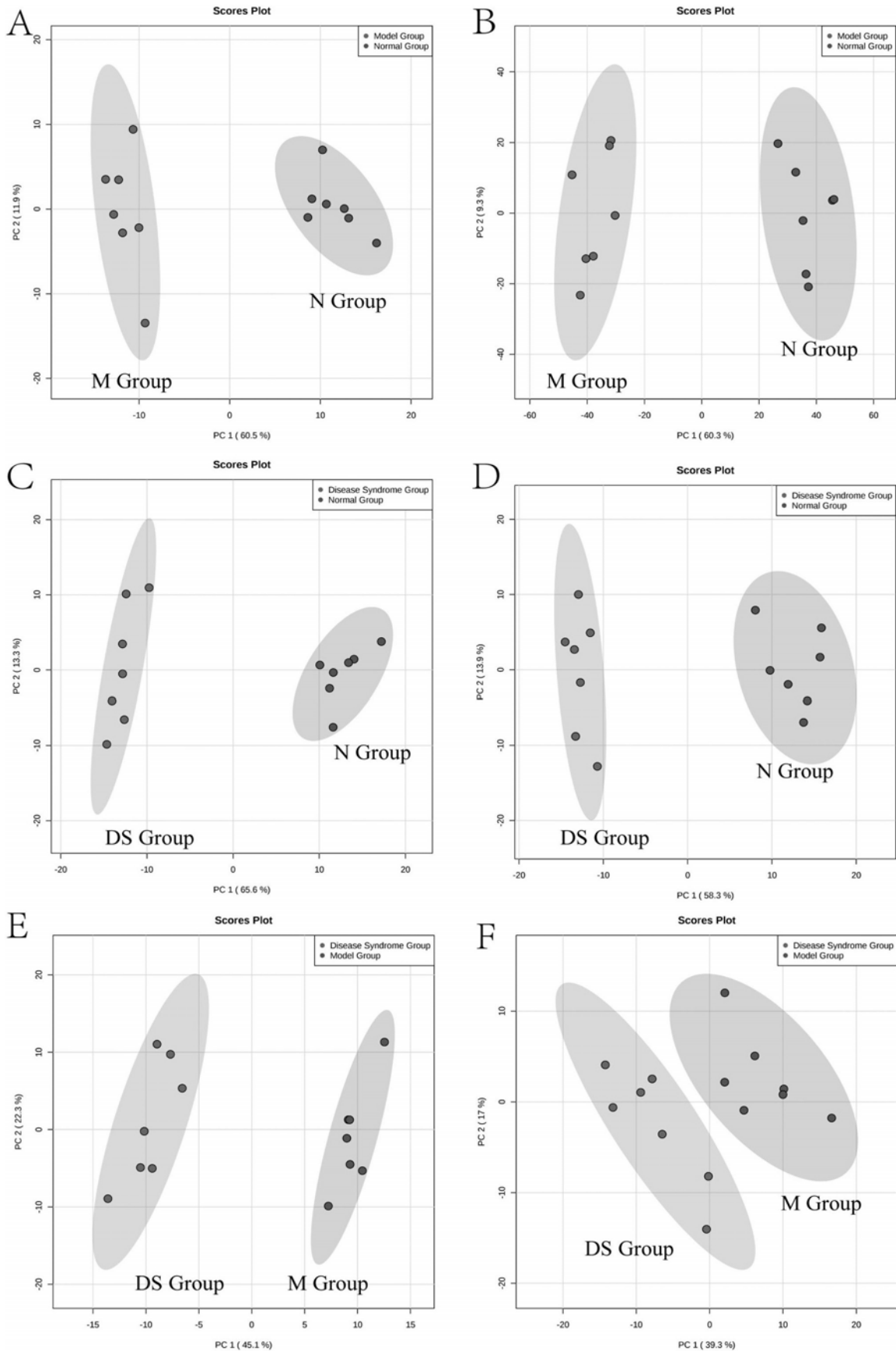


图1

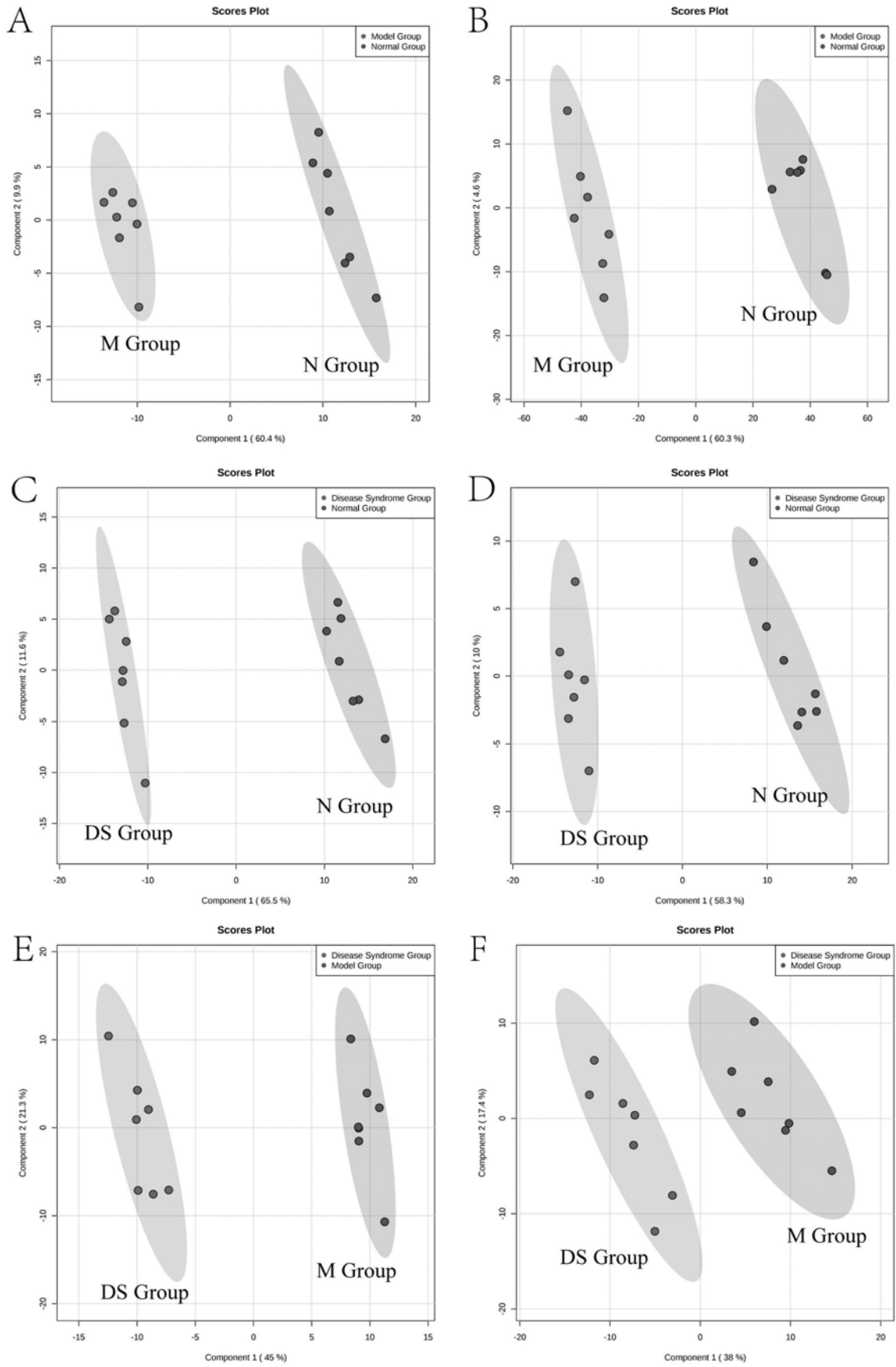


图2

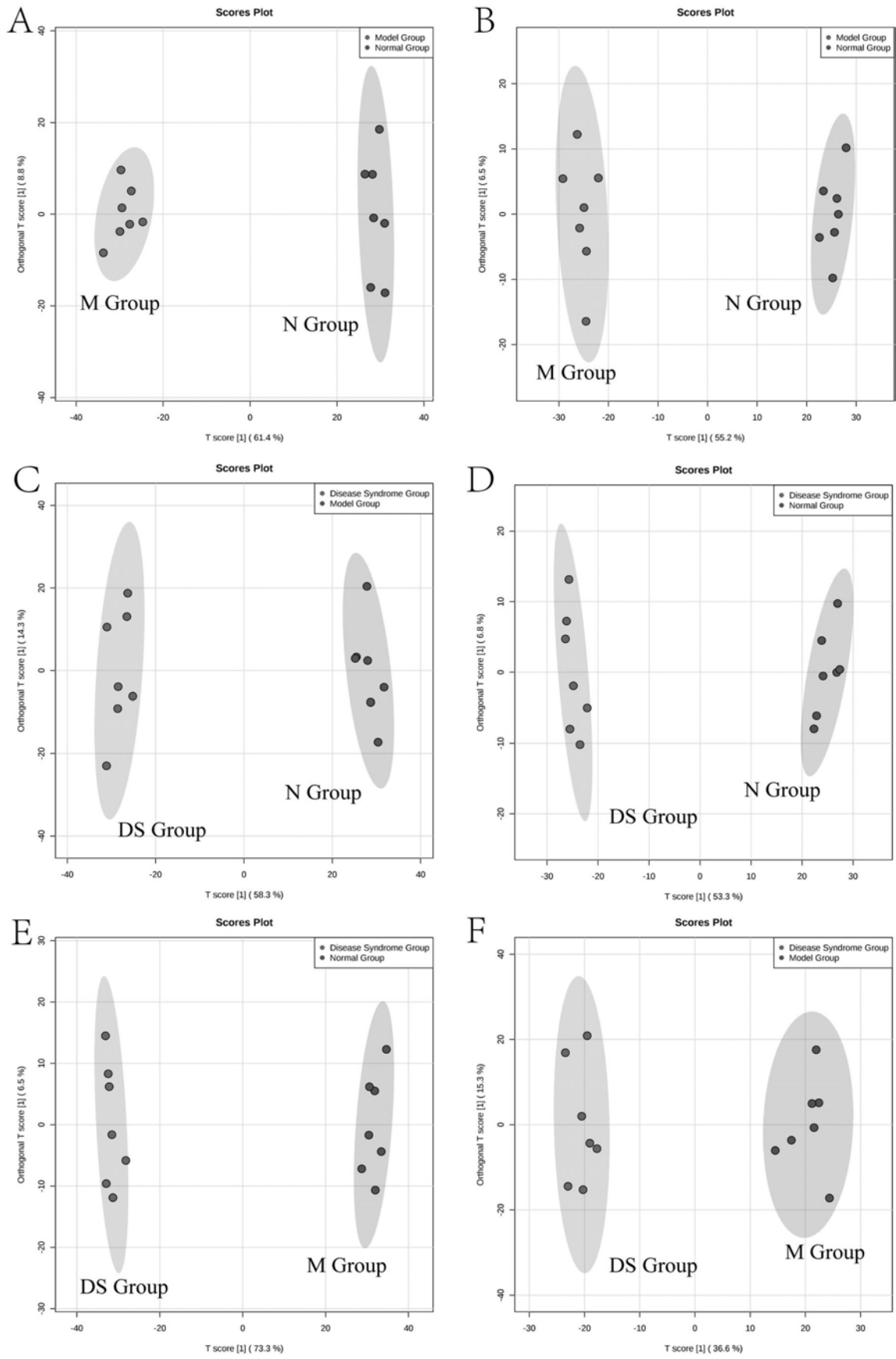


图3

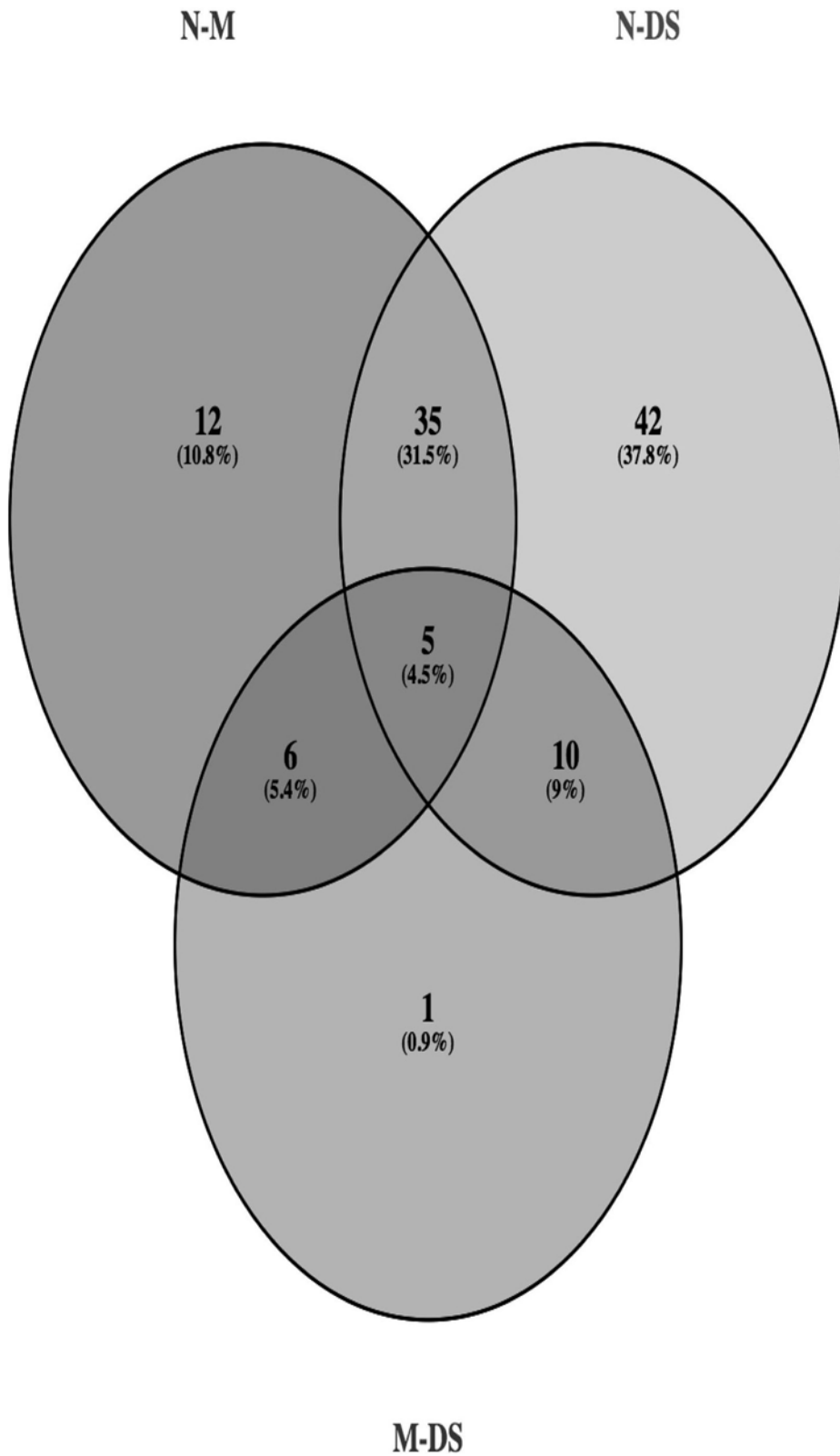


图4

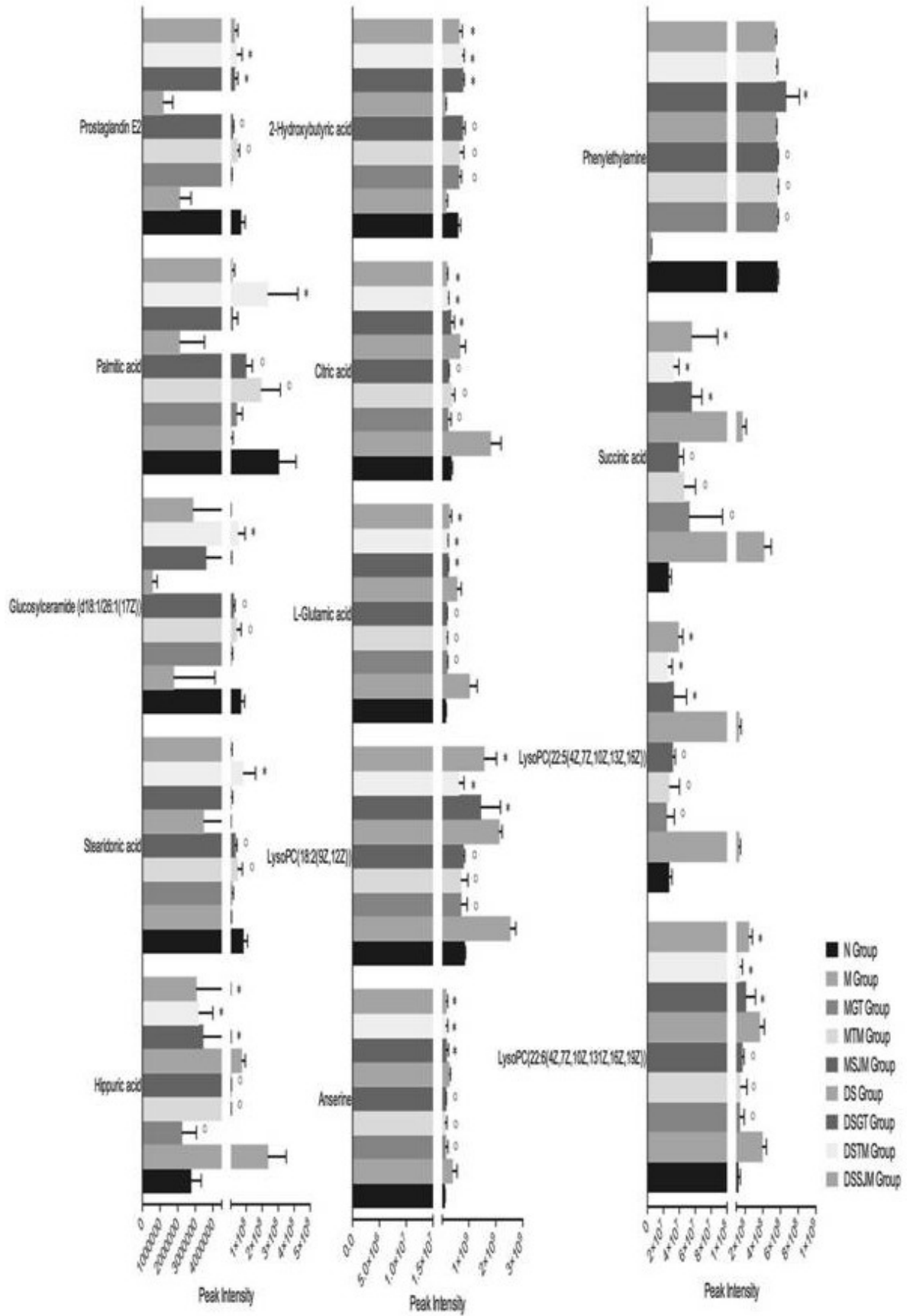


图5

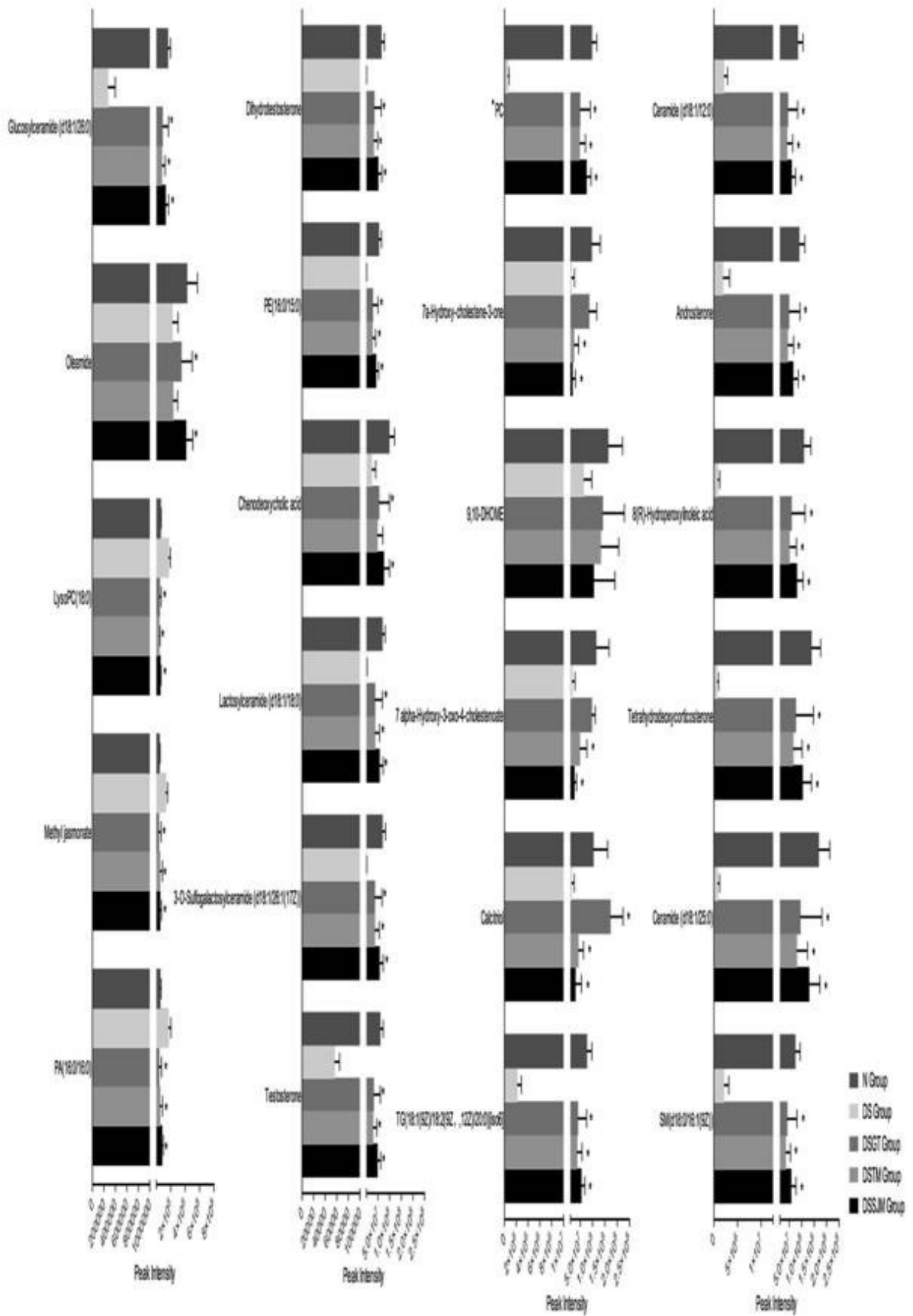


图6

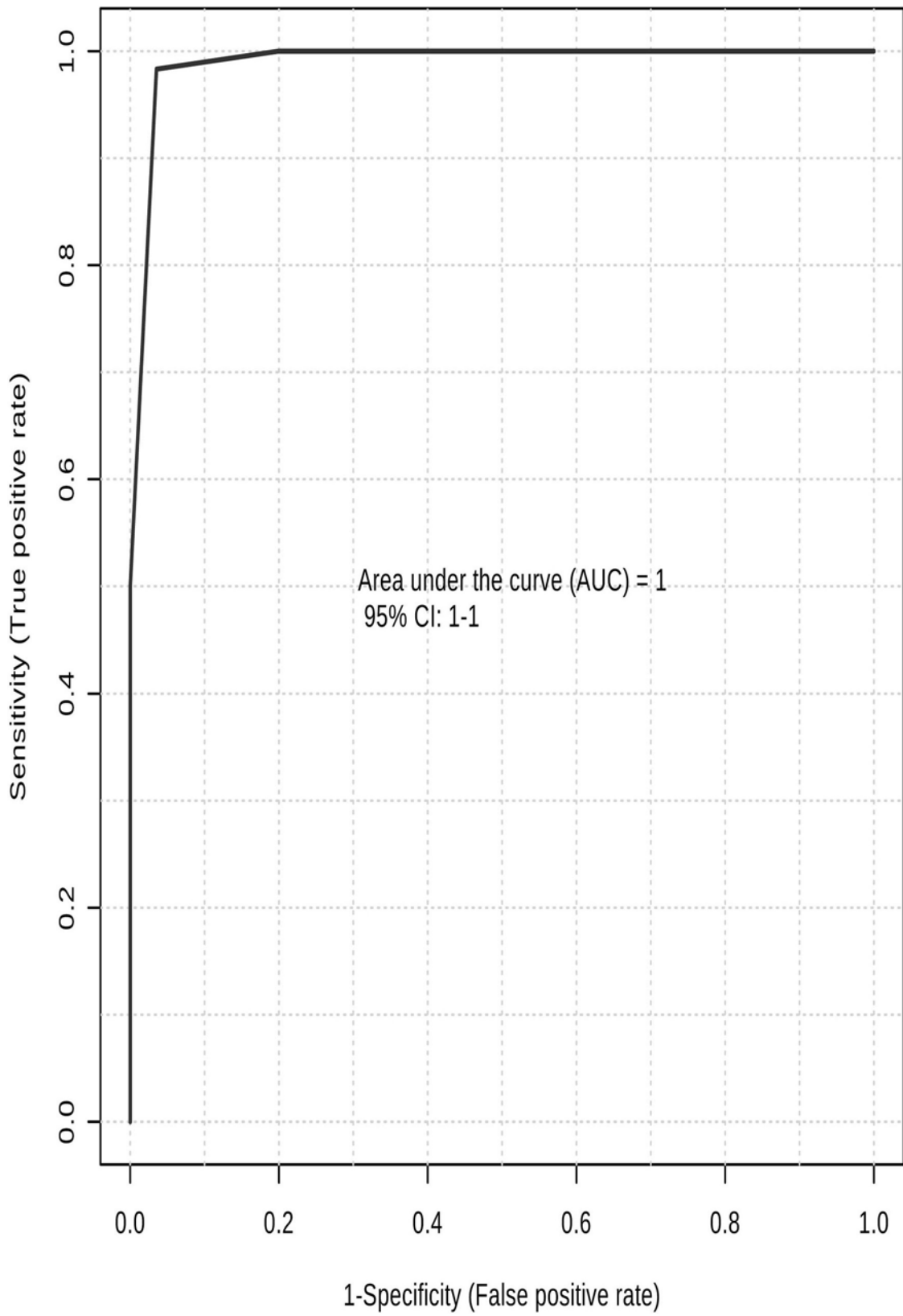


图7

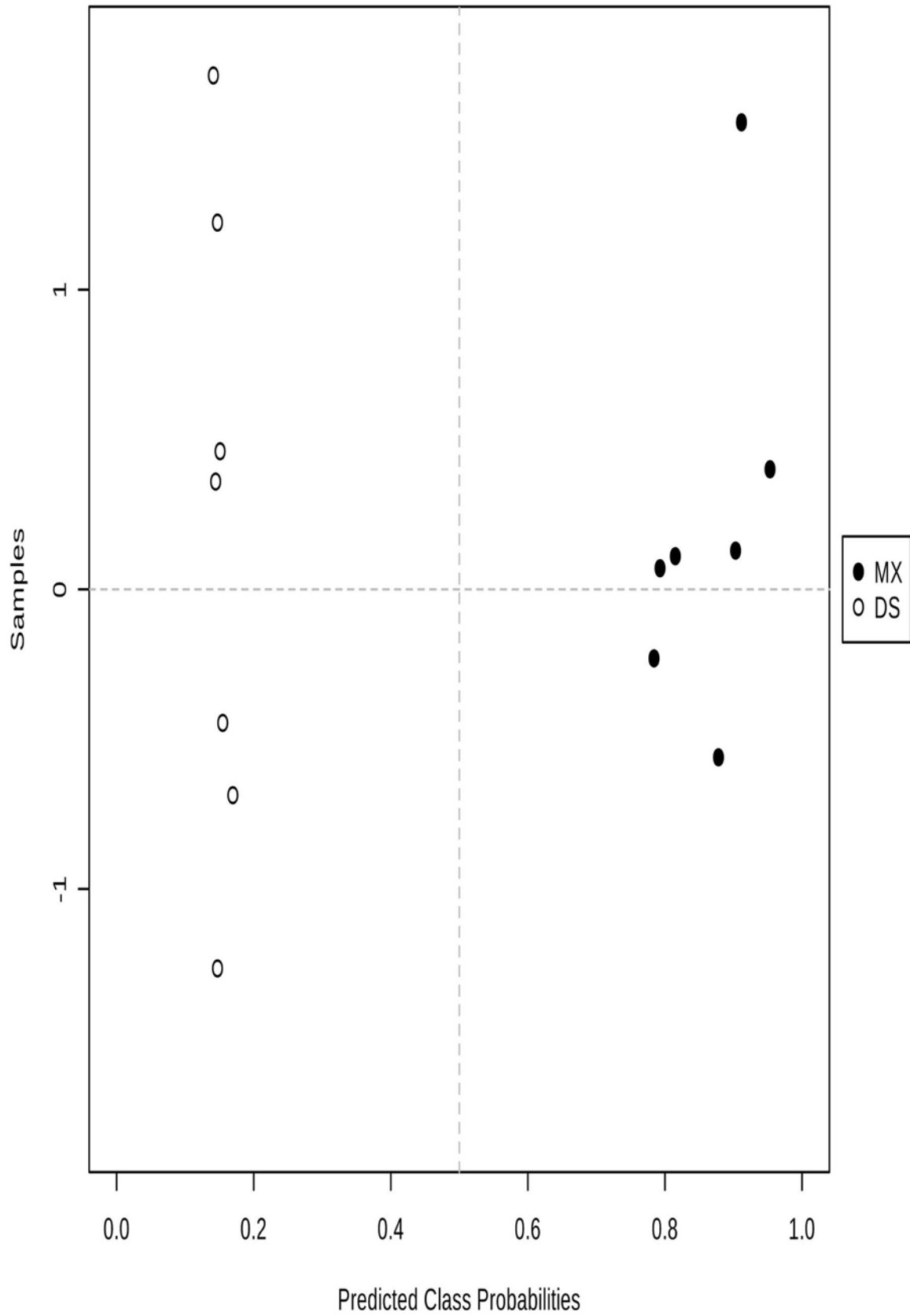


图8

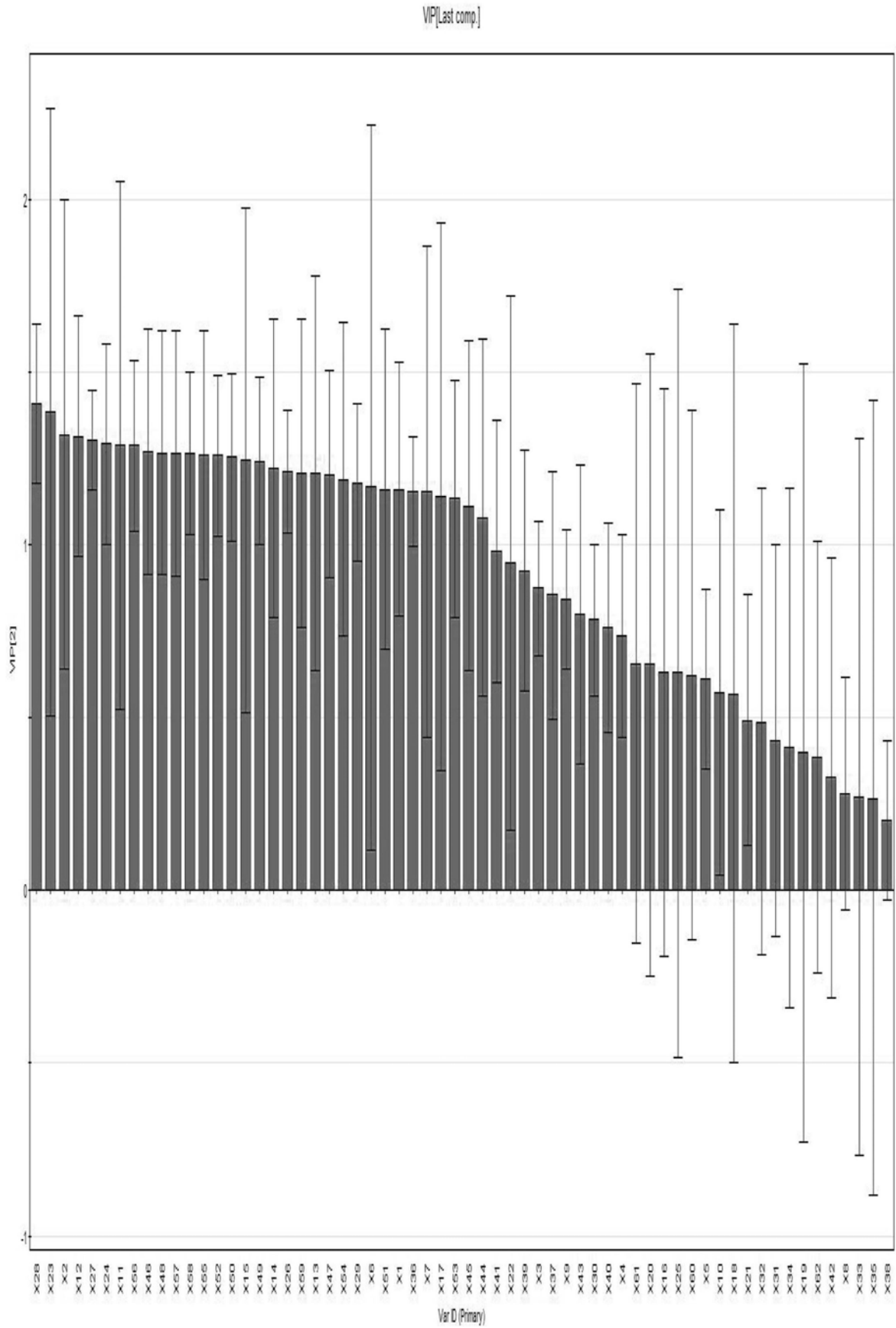


图9

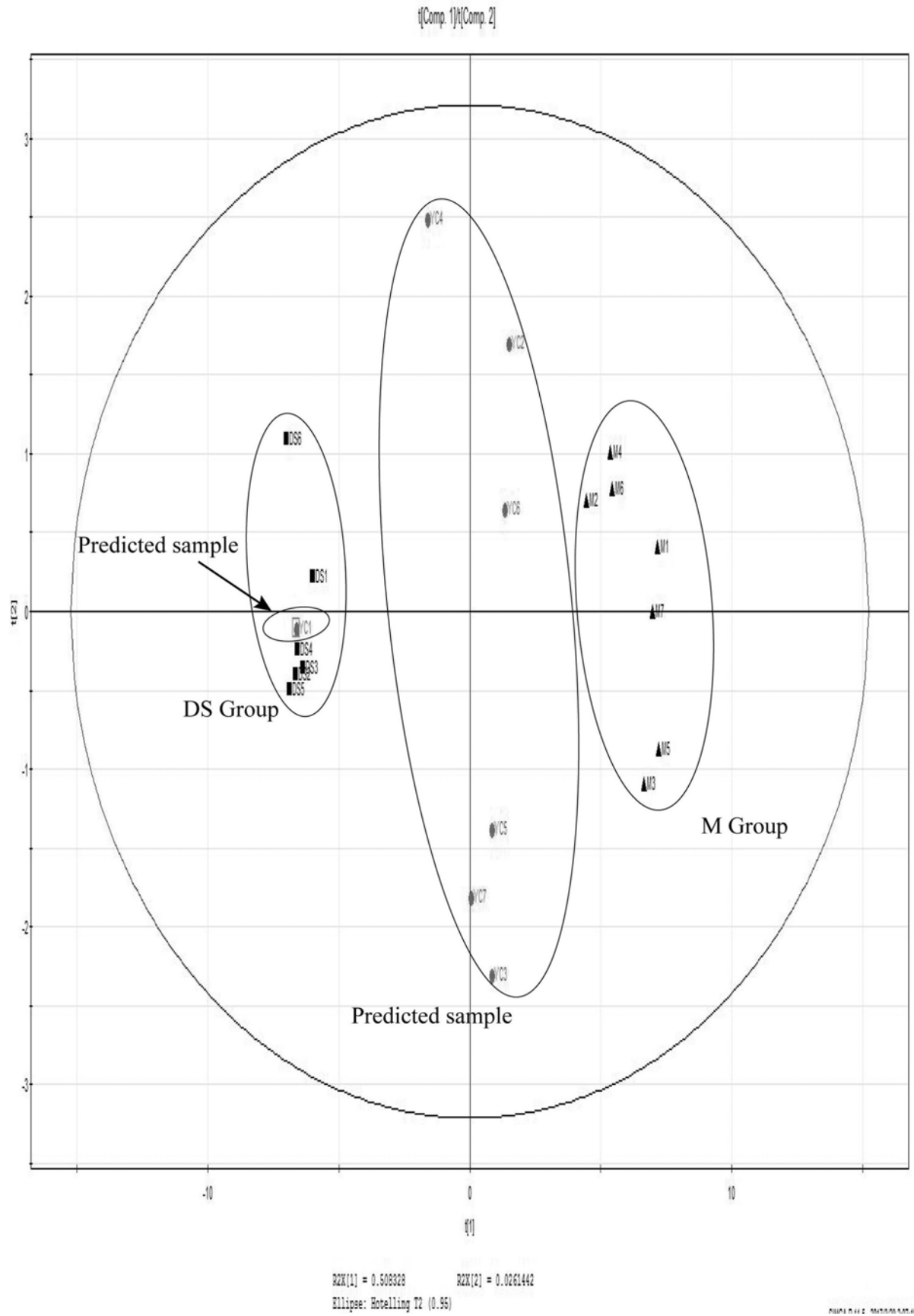


图10

专利名称(译)	一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法及其应用		
公开(公告)号	CN107247884A	公开(公告)日	2017-10-13
申请号	CN2017110530206.9	申请日	2017-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	山东中医药大学		
申请(专利权)人(译)	山东中医药大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东中医药大学		
[标]发明人	李运伦 杨雯晴 齐冬梅 蒋海强		
发明人	李运伦 杨雯晴 齐冬梅 蒋海强		
IPC分类号	G06F19/00 G06F19/24 A61B5/0205 A61B5/00		
CPC分类号	A61B5/02055 A61B5/021 A61B5/4827 A61B2503/40 A61B2503/42 G16B40/00		
代理人(译)	张红军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种高血压病肝阳上亢证大鼠模型判别方法,本发明判别指标全面,并且包含高血压病肝阳上亢证发生发展过程中所产生的特殊物质群的判别方法。步骤包括复制高血压病肝阳上亢证大鼠模型作为病证组,并进行宏观和生化生理指标的测定,选取数据,纳入下述高血压病肝阳上亢证大鼠PLS回归模型进行检验,PLS二维得分图中病证组和模型组分离,则建立的高血压病肝阳上亢证大鼠模型成功,否则不成功。

