

二冬汤对大鼠尿液代谢产物的影响

赵 益, 张启云, 李冰涛, 罗 蓉, 徐国良, 刘红宁, 孙有智(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 研究滋阴方二冬汤对大鼠内源性代谢产物的影响。**方法** 取 SD 大鼠 6 只, 灌胃给予二冬汤, 分别于给药前 1 d 及给药 5、10 d 的末次给药后, 收集 4 h 内的尿液, 经过液相色谱分离, 三重四极杆质谱检测尿液中内源性代谢物信息, 采用主成分分析法降维、正交信号校正、偏最小二乘法判别分析法, 分析二冬汤在不同给药天数时内源性代谢产物的差别, 以及可能的生物标记物。**结果** 给药 5、10 d 后引起变化的生物标记物, 与给药前 1 d 比较, 均有明显的变化。给药 5 d 的数据比较集中, 给药 10 d 的数据比较分散。二冬汤给药 5 d 的样本点具有良好的聚类特征, 提示给药 5 d 后二冬汤对大鼠尿液中内源性物质的代谢产生显著性影响, 其中, 内源性物质含量变化上升的有 16 个, 下降的有 17 个。**结论** 二冬汤给药后对大鼠内源性物质有影响, 其生物学功能可能涉及到提高机体免疫力、促进机体的能量代谢、抗菌、抗病毒、抑制肿瘤细胞转移等, 为二冬汤的开发和利用提供参考。

关键词: 二冬汤; 尿液代谢; 内源性代谢产物

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0173-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.018

Effect of *Erdong* Decoction on Urinary Metabolites of Rats

ZHAO Yi, ZHANG Qiyun, LI Bingtao, LUO Rong, XU Guoliang, LIU Hongning, SUN Youzhi(Key Laboratory of Modern Preparation of Ministry of Education, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of endogenous metabolites concentrations in the urine of rats administered with *Erdong* Decoction. **Methods** The urine samples were collected one day before administration, and 5 and 10 days after administration of *Erdong* Decoction in rats. LC-MS /MS was used for the analysis of the urine, and then the acquired data were analyzed by principal component analysis (PCA), orthogonal signal correction (OSC) and partial least square method (PLS) to find the difference of endogenous metabolites in different time and to catch the possible biological tag. **Results** The urinary endogenous metabolites concentrations on the fifth day and the 10th day of administration were obviously different from those one day before the administration. The data on the fifth day were relatively centralized, but the data on the tenth day were relatively scattered. The data of the fifth day had good clustering characteristics, indicating that *Erdong* Decoction had obvious effect on urinary endogenous metabolites 5 days after administration, and the changes were shown as the decrease in 16 biomarkers and the decrease in 17 biomarkers. **Conclusion** The administration of *Erdong* Decoction shows an effect on the endogenous metabolites, and its biological function may be involved in enhancing immunity, promoting energy metabolism, counteracting bacteria and virus, and inhibiting the metastasis of tumor cells, which will benefit to the development and utilization of *Erdong* Decoction.

Keywords: *Erdong* Decoction; Urinary metabolism; Endogenous metabolism products

收稿日期: 2012-10-16

作者简介: 赵益, 女, 讲师, 主要从事中药药理学研究。Email: zhysyz2008@yahoo.com.cn。通讯作者: 刘红宁, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型的研究。Email: lhongning@yahoo.com.cn。

基金项目: 江西省卫生厅项目(2008B001; 2009Z01); 江西省教育厅项目(GJJ10549; GJJ10216)。

二冬汤由天冬、麦冬两味中药组成,是滋补肺阴的经典方,具有祛痰、抗炎、提高机体免疫力的作用^[1],也有在二冬汤的基础上加减方来防治糖尿病脂质代谢紊乱的报道^[2]。代谢组学研究的技术和方法日趋成熟,在病变标志物的发现、疾病的诊断和治疗、药物药效及毒理安全性评价等方面得到了广泛的应用^[3-5]。本实验运用LC/MS/MS分析方法测定二冬汤对大鼠体内小分子物质的影响,为认识二冬汤的药理活性提供新的评价手段。

1 材料与方法

1.1 动物 SD大鼠6只,雄性,体质量(180 ± 20)g,由江西中医学院实验动物中心提供,批号:SCXK(赣)2005-0001。

1.2 药品与试剂 天冬、麦冬(北京同仁堂);二冬汤:精密称取天冬、麦冬各200 g,第1次加入8倍量的水煎煮3 h,第2次加入6倍量的水煎煮2 h,合并2次滤液,过滤,滤液浓缩,浓度为2 g/mL。甲酸(色谱纯试剂,Fluka, USA);乙腈:(色谱纯试剂,TD, USA);其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 HPLC-MS/MS质谱仪:Agilent 6410 triple quadrupole 液质联用系统,配有G1311A四元泵、G1322A真空脱气机、G1329A自动进样器和G1316A柱温箱,MassHunter软件控制及数据处理系统,美国Agilent公司;色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse SB- C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m);3-18K型高速冷冻离心机, Sigma公司;SW-80A微型涡流混合仪,上海沪西分析仪器厂。

1.4 分组与给药 取SD大鼠6只,灌胃给予二冬汤15.99 g/kg,每天2次,共10 d,分别于给药前1 d、给药5 d、给药10 d的末次给药后,收集大鼠4 h内的尿液。将收集的尿液4 $^{\circ}$ C, 13000 r/min离心5 min,取上清液0.5 mL,加入甲醇0.5 mL,涡旋混匀,于4 $^{\circ}$ C静置3 h,4 $^{\circ}$ C, 18000 r/min离心10 min,取上清液,进样分析。

1.5 LC-MS数据的采集与处理

1.5.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse SB- C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m)。流动相A:乙腈,流动相B:0.1%甲酸水;流速:0.4 mL/min;进样量:3 μ L;柱温:35 $^{\circ}$ C;运行20 min。梯度洗脱条件如下:0~6 min(100% B),6~8 min(30% B),

12~14 min(10% B),14.1~15 min(10% B),之后运行5 min。

1.5.2 质谱条件 离子源模式:ESI正离子模式;毛细管电压:4000 V;雾化器压力:275.8 kPa;干燥气流速:10 L $\cdot$ min⁻¹;干燥气温度:350 $^{\circ}$ C;全扫描监测得尿液总离子流图(total ion chromatogram, TIC),提取质谱信息,得到尿液样品所含物质的质荷比。

1.6 统计学分析 采用独立样本T检验(Independent samples T test)比较空白对照组与给药组数据的显著性。Hotelling T²检验观察值(样本)的差异性。独立样本T检验使用SPSS 16.0软件程序包,Hotelling T²检验使用SIMCA-P 12.0多变量分析软件自带程序。

2 结果

2.1 给药大鼠尿液总离子流图 全扫描监测得给药组尿液总离子流图(total ion chromatogram, TIC),见图1。反映尿液样品的化合物信息,从中提取质谱信息, m/z值及相应的丰度(Abundance)。

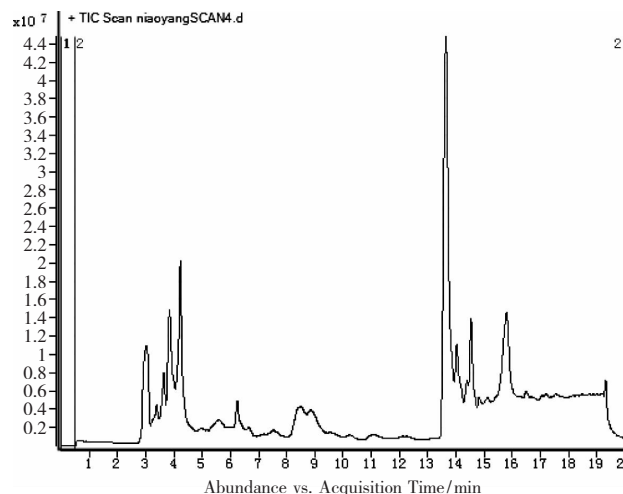
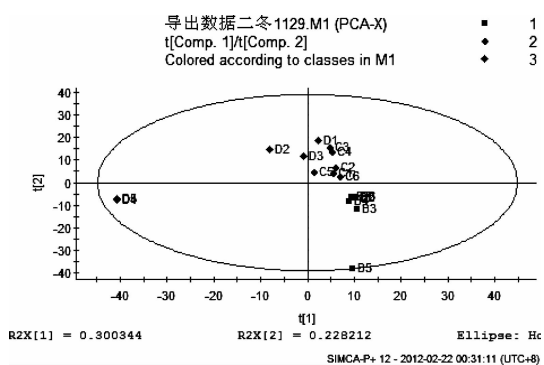


图1 二冬汤给药组大鼠尿液总离子流图

Figure 1 The TIC results in the administered rats

2.2 各组大鼠尿液数据均值PCA分析 使用SIMCA-P 12.0多变量软件将二冬汤组给药5 d、给药10 d的尿样与给药前1 d的尿样内源性物质丰度值进行主成分分析可知,给药组与给药前的样本基本都沿t[2](第二主成分)大致分开,因此t[2]轴方向表示组间差异,同时给药5 d和给药10 d样本也基本沿着t[2]轴方向大致分开,提示具有给药天数差异。同时,从样本的分布来看,给药5 d的数据比较集中,给药10 d的数据比较分散。说明二冬汤给药5 d组的样本



B. 给药前 1 d 均值样本点; C. 给药 5 d 均值样本点; D. 给药 10 d 均值样本点

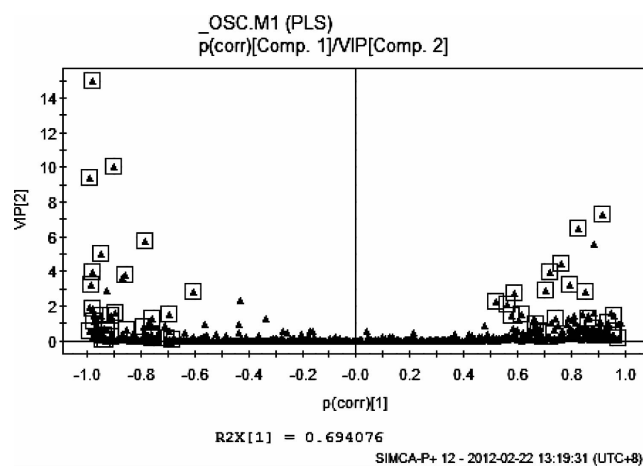
图 2 给药后二冬汤组尿液数据均值的主成分得分图

Figure 2 PCA scores plot of the averages of urine samples from the administrated group

点具有良好的聚类特征, 两组之间无样本点重合并有组间差异性, 提示给药后二冬汤对大鼠尿液中内源性物质的代谢产生显著性影响, 见图 2。

2.3 大鼠尿液数据均值 OSC-PLS-DA 分析 使用 SIMCA-P 11.0 自带的程序进行正交信号校正, 建立 OSC-PLS-DA 模型。OSC-PLS-DA 模型的 U 形图, 由模型重要性系数 (VIP) 和变量相关系数 $P(\text{corr})$ 两个变量组成。VIP 是反映变量对模型重要性的系数, VIP 值越大, 变量对模型越重要, 在 PLS-DA 模型中, $VIP > 1$ 的变量被视为模型的重要变量。相关系数性系数是用于描述两组变量相关性的指标, 相关系数绝对值越大则变量间的相关性越大, 相关性大的变量组间差异必然越显著, 在本实验中, 即给药前与给药后不同天数经 t 检验具有显著性差异。生物标记物是能够代表性地反映生物体生理病理变化或外界环境刺激的内源性物质, 在 OSC-PLS-DA 模型上即是具有较好相关性的重要变量。根据总结经验满足 $VIP > 1$ 、 $|P(\text{corr})| > 0.7$ 的变量能够满足生物标记物变量 (m/z 值) 的要求。如图 3 所示, 多数变量在八点附近, 少数变量偏离, 对模型有重要影响, 所代表的物质为可能的生物标记物。

2.4 生物标记物的提取和确定 给药 5 d 后引起变化的生物标记物, 与给药前比较, 含量变化上升的共有 17 个, 下降的共有 5 个, 通过以下网站 <http://www.hmdb.ca/> 进行检索, 初步判定这些生物标记物的可能化合物, 经查阅文献, 其生物学功能主要涉及到提高机体免疫力、促进机体的能量代谢、抗菌、



P[1], VIP[2] 分别是第一、二主成分的载荷; ▲: 以质荷比 (m/z) 命名的变量; □: 为生物标记物变量。

图 3 二冬汤给药 5 d 后尿样数据均值 OSC-PLS-DA 分析得分图
Figure 3 The OSC-PLS-DA map of rat urine samples data after administer ration for 5 days.

抗病毒、抑制肿瘤细胞转移等, 见表 1。

3 讨论

本实验是利用代谢组学为研究手段, 考察给予二冬汤后尿液中内源性物质的变化, 在一定程度上反映二冬汤对体内代谢的影响以及滋阴方的药理作用, 为进一步探讨二冬汤的内源性物质基础和作用机制奠定基础。实验结果显示, 二冬汤给药后可以提高正常大鼠体内 urocanic acid、5, 6-Dihydroxyindole、Cystathionine ketimine 等内源性物质的含量, 这些物质含有一些人体必须的具有氨基酸酶活性的物质, 可以促进机体的新陈代谢, 并有利于各种免疫球蛋白和抗体的产生, 能够启动机体的免疫系统, 增强机体的免疫功能。这进一步印证了我们在前期得出的二冬汤含药血清通过增强机体免疫功能达到抑制肿瘤细胞增殖的结果^[6]。其次, 二冬汤还可以提高正常大鼠体内 13S-hydroxyoctadecadienoic acid、4-Oxo-13-cis-retinoate 等内源性物质的含量, 前者是由亚油酸形成的具有能够防止癌细胞粘附于内皮细胞、并抑制癌症细胞转移, 后者环磷腺苷能够加速其合成, 促进癌细胞正常分化而达到抑制癌前病变的作用, 同时二冬汤还可以提高大鼠体内 2'-Deoxyuridine、Deoxyhypusine、Tyramine glucuronide 等物质的含量, 该类物质具有较强的抗菌、抗病毒作用, 并有利于机体内有害物质的排泄。

表1 二冬汤给药后大鼠的可能生物标记物

Table 1 The Potential biomarkers in the urine of the administered group

m/z	可能的化合物	相关的生物功能	含量变化
139.1	urocanic acid	由组氨酸断裂而成，具有免疫调剂作用	上升
149.1	(R)2,3-Dihydroxy-methyl Valerate	一种促使氨基酸类物质合成的媒介物	上升
150.1	5,6-Dihydroxyindole	一类具有络氨酸酶活性的物质，具有提高免疫力的活性	上升
153.1	3,4-Dihydroxyphenylacet aldehyde	一类具有抗氧化、抗病毒、抗菌活性的物质	上升
170.2	L-2,3-Dihydrodipicolinate	参与赖氨酸的生物合成途径，具有增强机体免疫力、提高中枢神经组织功能的活性物质	上升
177.2	D-glucurono-6,3-lactone	维生素 C 及抗菌药物的代谢产物	上升
191.2	Oxalosuccinic acid	细胞质的异柠檬酸脱氢酶和线粒体的异柠檬酸脱氢酶的底物	上升
204.2	Cystathionine ketimine	增加丝氨酸的活性，是一种非必需氨基酸，有助于免疫血球素和抗体的产生，维持健康的免疫系统	下降
218.2	Deoxyhypusine	具有抗病毒活性，与其他抗病毒药合用，可以治疗 I 型 HIV 感染。艾滋病的治疗	上升
229.2	2'-Deoxyuridine	一类具有抗病毒、抗微生物的活性物质	上升
250.2	S-Acetyldihydrolipoamide	硫辛酸与酶的赖氨酸残基结合，转移后释出的还原性硫辛酰胺	上升
251.2	Ubiquinone Q1	充血性心力衰竭辅助用品	下降
266.2	Thiamine	在体内以辅酶形式参与糖的分解代谢，保护神经系统；促进肠胃蠕动，增加食欲。 植烷酸和降植烷酸代谢产物的媒介物	下降
283.2	Pristanal	该物质是亚油酸在体内合成形成的，能够防止癌细胞粘附于内皮细胞中，从而抑制癌症	上升
297.2	13S-hydroxyoctadecadienoic acid	细胞的转移，环磷酸能够加速其合成。	上升
314.2	4-Oxo-13-cis-retinoate	能够通过促进癌细胞正常分化而达到抑制癌前病变的作用	上升
321.2	Octanoylglucuronide	加速体内毒性物质的排泄	上升
325.2	Fructose 1,6-bisphosphate	调节水、电解质及酸碱平衡用果糖	上升
347.2	Gibberellin A3	赤霉素，是广泛存在的一类植物激素	下降
349.3	Riboflavin reduced	卟啉和叶绿素新陈代谢的媒介物，视黄酸还原酶的载体	上升
355.2	Prostaglandin F2a	可以防治哮喘、胃溃疡病、休克、高血压及心血管疾病等	上升
365.2	Xanthylic acid	嘌呤代谢的主要中间代谢物	下降

虽然代谢组学目前运用到许多领域，但还是存在许多问题^[7]，比如在全谱的分析中缺乏量的概念，对于生物标志物的寻找过于单一和片面。随着新技术的不断出现，比如Q-TOF，将会使代谢产物的分析更加整合一体化、标准化、定量化。

参考文献：

[1] 高建平，许旭，吴耀平，等. 二冬膏祛痰、抗炎及免疫作用的研究[J]. 中成药，2003，25（9）：762-763.
[2] 刘哲丞，宋娟，崔红霞，等. 二冬颗粒对糖尿病大鼠脂代谢紊乱的改善与防治作用的实验研究[J]. 中外医疗，2010，19：99.
[3] Oresic M, Viadal PA, Hanninen V. Metabolomic approaches to phe-

notype characterization and applications to complex diseases[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2006, 6(4): 575-585.
[4] Mally A, Ambers A, Hard GC, et al. Are 4-hydroxy-2(E)-nonenal derived mercapturic acids and H-1 NMR metabonomics Potential biomarkers of chemically induced oxidative stress in the kidney[J]. Toxicology, 2007, 230(23): 244-255.
[5] Bowser R, Cudkowicz M, Kaddurah DR. Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2006, 6(3): 387-398.
[6-9] 赵益，罗蓉，尚广彬，等. 二冬汤含药血清对肺癌细胞A549的作用研究[J]. 新中医，2012，44(9)：113-115.
[7-10] 夏建飞，梁琼麟，胡坪，等. 代谢组学研究策略与方法的新进展[J]. 分析化学，2009，37(1)：136-143.

(编辑：宋威)